

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15972

研究課題名(和文)ゲノム情報に立脚した臨床現場で使用可能なウマトリパノソーマ症鑑別診断法の開発

研究課題名(英文)Development of definitive diagnostic tools against equine trypanosomoses

研究代表者

菅沼 啓輔 (Suganuma, Keisuke)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：60772184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウマトリパノソーマ症は二種類の異なるウマトリパノソーマ原虫の感染により引き起こされる致死的な原虫病である。申請者は、これらウマトリパノソーマ症の鑑別診断法を開発するために、申請者が独自に株化した嬖疫トリパノソーマに加え、ベルギー熱帯医学研究所から各種動物トリパノソーマを用いた比較ゲノム解析を実施した。またパラグアイ、スーダン、フィリピンなどウマトリパノソーマ症に加えそのほかの家畜にも動物トリパノソーマ症が蔓延している開発途上国における感染状況の疫学調査と感染リスク因子の探索を実施した。今後これらの研究成果をもとに動物トリパノソーマ症の清浄化が進むことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、経済的価値が高く疾病対応が急務であるが有効な鑑別診断法のないウマトリパノソーマ症に対する鑑別診断法を開発を行い、また実際の検体を用いて開発した鑑別診断法の実効性を検討した点である。

また社会的意義として、動物トリパノソーマ症汚染国である熱帯・亜熱帯地域の発展途上国を対象として、多くの経済被害が出ているウマトリパノソーマ症を含む動物トリパノソーマ症に対する疫学調査を実施し、トリパノソーマ感染リスク因子候補を見出した。それらのデータをもとに科学的知見に基づくトリパノソーマ症対策の実行が期待される。

研究成果の概要(英文)：Equine trypanosomosis caused by *Trypanosoma equiperdum* and *T. evansi* is a fatal protozoan diseases. To establish differential diagnosis methods for equine trypanosomosis, I have performed comparative genomic analysis of *T. equiperdum* IVM-t1 strain (isolated in Mongolia) and other animal trypanosomes (provided from Institute of Tropical Medicine, Belgium). In addition, epidemiological analysis and risk factor analysis of equine and animal trypanosomosis in developing countries, such as Paraguay, Sudan, and the Philippines, were performed. These results will contribute to establish of effective control strategies against animal trypanosomosis.

研究分野：獣医学

キーワード：トリパノソーマ 馬 家畜動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウマトリパノソーマ症は二種類の異なるウマトリパノソーマ原虫(媾疫(こうえき)トリパノソーマおよびエバンストリパノソーマ)の感染により引き起こされる致死的な原虫病である。前者は感染ウマの交尾によって、生殖器粘膜に感染し患畜は生殖器周囲の腫脹を呈す。その後生殖器粘膜で増殖した媾疫トリパノソーマは、組織に侵入し患畜は貧血・発熱・消瘦などの消耗性疾患を呈す。最終的に中枢神経系に寄生し麻痺などの中枢神経症状を呈し、患畜は斃死する。一方エバンストリパノソーマは、アブなどの吸血昆虫の吸血に伴い機械的に伝播される。患畜の血液中に寄生・増殖し消耗性疾患を呈し、その後中枢神経系に移行し中枢神経症状を呈し、最終的に斃死する。ウマトリパノソーマ症対策のポイントは 2 種類の病原原虫種の鑑別と、病原原虫に合わせた清浄化プログラムの実施であるが臨床症状はほぼ同一であり臨床的に鑑別が困難である。さらに種特異性の低い共通抗原を用いているため、現在の診断法では鑑別診断が不可能である。そのため不適切な清浄化プログラムの実施により感染が拡大している。また流行地の多くは開発途上国の農村地帯であることから、そのような現場でも実施可能な簡便な鑑別診断法の開発および対策立案・実施のために流行状況の把握と感染リスク因子候補の同定が求められている。

2. 研究の目的

本研究では(1)複数のウマトリパノソーマ株の遺伝情報を比較解析した結果を元に、臨床現場で使用可能な簡便な鑑別診断法(遺伝子診断法もしくはイムノクロマトグラフィー法)を開発すること、(2) 流行国の実態の把握と科学的知見に基づく清浄化プログラム実施のために疫学調査に基づく感染リスク因子の同定、を目的とする。

3. 研究の方法

(1)新規鑑別診断法開発のため、各種トリパノソーマゲノム・発現遺伝子を比較解析することで、2 種類のウマトリパノソーマそれぞれに特異的な鑑別診断候補遺伝子配列・抗原の同定を試みた。(北海道大学、モンゴル獣医学研究所との共同研究)

(2)ウマトリパノソーマ症を含む家畜トリパノソーマ流行国であるパラグアイ、スーダン、およびフィリピンから家畜血液・生殖器粘膜検体を収集した。それらの検体と個々の家畜情報をもとに、家畜トリパノソーマ症に対する疫学調査と感染リスク因子候補の探索を実施した。さらに血液・生殖器検体両者を収集したウマ個体に対しては、2 種類のウマトリパノソーマ症の鑑別診断を実施した。(帯広畜産大学フィールド科学センター、スーダン科学技術大学、フィリピンセブ科学技術大学などとの共同研究)

4. 研究成果

(1) 鑑別診断候補の探索

媾疫トリパノソーマ感染ウマから培養馴化・株化に成功した媾疫トリパノソーマモンゴル株のゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を実施した。すでにゲノム情報が公開されている各種トリパノソーマの情報と比較することで、媾疫トリパノソーマに特異的な鑑別診断候補遺伝子配列・抗原の同定を試みた。さらに同種トリパノソーマの複数株での比較を行うことで、より精度の高い鑑別診断を行うために、ベルギー熱帯医学研究所より複数株の動物トリパノソーマの分与を受けた。分与されたトリパノソーマリファレンス株のマウスでの増殖・*in vitro* 培養への馴化を試み、いくつかの株ではマウスへの増殖と *in vitro* 培養に成功し、そこからゲノム解析に供するための DNA を精製した。

(2) 疫学調査と感染リスク因子の探索

南米諸国はウマトリパノソーマ症をはじめとする家畜トリパノソーマ症が蔓延している。しかしパラグアイにおける家畜トリパノソーマ症の報告はなく、現在の流行状況は不明である。そこでパラグアイで飼養されているウマを対象にウマトリパノソーマ症の疫学調査と感染リスク因子の探索を行った。パラグアイ 17 県中 16 県で飼養されているウマから採集した血液検体を用いて分子生物学的検査を実施した結果、約 26% のウマ検体で陽性であった。媾疫トリパノソーマの検出が困難な血液検体を用いての検査で陽性であったこと、および一部の検体ではエバンストリパノソーマ特異遺伝子が検出されたことから、パラグアイで流行しているウマトリパノソーマの多くはエバンストリパノソーマであることが示唆された。一方で生殖器粘膜検体を検査していないため、今後媾疫トリパノソーマの感染を考慮したサンプリングと検査が望まれる。さらに感染状況と個体情報を用いた多重ロジスティック回帰分析によるウマトリパノソーマ感染リスク因子を探索した結果、吸血昆虫の発生と感染リスクの増加が関連していることが示唆された。そのため、パラグアイにおけるウマトリパノソーマ症対策のためにベクターの同定とその対策に重点を置く必要が示唆された。(Sugauma et al., *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*; Yamazaki et al., *Acta Tropica*)

動物トリパノソーマ症はフィリピン国において肝蛭症に続いて二番目に被害の大きな家畜疾病であると考えられている。フィリピン中部ビサヤ諸島地域で飼養されているウマなどの家畜を対象とした疫学調査を実施した結果、ヤギでのエバンストリパノソーマ感染が示唆された。また吸血昆虫が増加する雨季に感染リスクが高まることが示唆された。一般にヤギなどの中型・小型家畜は明確な臨床症状を呈さないため家畜トリパノソーマ症対策の盲点となっているが、これらの家畜がリザーバーとなりウマなどにトリパノソーマ感染を引き起こすことから、汚染地域の家畜全体に対する対策の実施が重要であることが示唆された。(Afraa et al., *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*; Afraa et al., 論文投稿中)

スーダンで飼養されている競走馬 50 頭を対象に血液検体・生殖器検体を収集した。これらの検体に対し分子生物学的検査を実施した結果、複数の生殖器検体にトリパノソーマ感染が確認された。検査で陽性ウマの中には生殖器周囲の腫脹や皮膚の丘疹などの臨床症状を呈する個体が含まれていたことから、検査結果に加え臨床症状を考慮することで瘧疾トリパノソーマ感染と診断した。(Ehab et al., 論文準備中)

一連の研究から、調査対象国における動物トリパノソーマ症感染状況の一端と、感染リスク因子候補が明らかとなった。これらの情報をもとに科学的知見に基づく動物トリパノソーマ症対策の立案と実施が期待される。一方で新型コロナウイルス感染症の影響でゲノム解析に供するトリパノソーマの感染・培養馴化実験が制限され、十分な比較ゲノム解析が行えなかった。今後比較ゲノム解析を進め、鑑別診断候補の特定とそれらを用いた鑑別診断法の開発と野外検体での実証を実施し、ウマトリパノソーマ症汚染国における疾病制御に貢献したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Elata Afraa, Galon Eloiza May, Moumouni Paul Franck Adjou, Ybanez Rochelle Haidee D., Mossaad Ehab, Salces Caro B., Bajenting Guindolino P., Ybanez Adrian P., Xuan Xuenan, Inoue Noboru, Suganuma Keisuke	4. 巻 21
2. 論文標題 First molecular detection and identification of Trypanosoma evansi in goats from Cebu, Philippines using a PCR-based assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports	6. 最初と最後の頁 100414 ~ 100414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vprsr.2020.100414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Davkharbayar Batbold, Davaasuren Batdorj, Narantsatsral Sandagdorj, Battur Banzragch, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Battsetseg Badgar, Mizushima Daiki, Inoue Noboru, Suganuma Keisuke	4. 巻 87
2. 論文標題 Treatment Efficiency of Combination Therapy With Diminazene Aceturate and Quinapyramine Sulfate in a Horse With Dourine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Equine Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 102905 ~ 102905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jevs.2019.102905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 ELATA Afraa, MOSSAAD Ehab, SATTI Rawan, MATAR Nadia, OHARI Yuma, XUAN Xuenan, INOUE Noboru, SUGANUMA Keisuke	4. 巻 82
2. 論文標題 Serological and molecular detection of selected hemoprotozoan parasites in donkeys in West Omdurman, Khartoum State, Sudan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 286 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mossaad Ehab, Ismail Ahmed Ali, Ibrahim Abdalla Mohamed, Musinguzi Peter, Angara Tamador E.E., Xuan Xuenan, Inoue Noboru, Suganuma Keisuke	4. 巻 203
2. 論文標題 Prevalence of different trypanosomes in livestock in Blue Nile and West Kordofan States, Sudan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Tropica	6. 最初と最後の頁 105302 ~ 105302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2019.105302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suganuma Keisuke, Kondoh Daisuke, Sivakumar Thillaiampalam, Mizushima Daiki, Elata Afra 'a Tajelsir Mohamed, Thekisoe Oriel M. M., Yokoyama Naoaki, Inoue Noboru	4. 巻 118
2. 論文標題 Molecular characterization of a new Trypanosoma (Megatrypanum) theileri isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 1927 ~ 1935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00436-019-06313-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Buscher Philippe, Gonzatti Mary Isabel, Hebert Laurent, Inoue Noboru, Pascucci Ilaria, Schnauffer Achim, Suganuma Keisuke, Touratier Louis, Van Reet Nick	4. 巻 12
2. 論文標題 Equine trypanosomosis: enigmas and diagnostic challenges	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-019-3484-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suganuma Keisuke, Acosta Tomas J., Valinotti Maria Fatima Rodriguez, Sanchez Antonio Rodriguez, Mossaad Ehab, Elata Afraa, Inoue Noboru	4. 巻 27
2. 論文標題 First molecular survey of animal trypanosomes in Paraguayan horses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports	6. 最初と最後の頁 100664 ~ 100664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vprsr.2021.100664	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Ai, Suganuma Keisuke, Kayano Mitsunori, Acosta Tomas J., Saitoh Tomoko, Valinotti Maria Fatima Rodriguez, Sanchez Antonio Rodriguez, Inoue Noboru	4. 巻 233
2. 論文標題 Risk factors for equine trypanosomosis and hematological analysis of horses in Paraguay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Tropica	6. 最初と最後の頁 106543 ~ 106543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2022.106543	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本獣医寄生虫学会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 276
3. 書名 寄生虫病学 第3版	

1. 著者名 村上 賢二、彦野 弘一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 304
3. 書名 家畜伝染病ハンドブック	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 トリパノソーマ症の治療薬及び予防薬	発明者 菅沼啓輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-081936	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

原虫病研究センターHP https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
モンゴル	獣医学研究所			
スーダン	スーダン科学技術大学			
フィリピン	セブ科学技術大学			