

令和元年6月15日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05803

研究課題名(和文) インドネシアの家畜生産性向上に寄与する原虫感染症の実態解明と病態増悪因子の同定

研究課題名(英文) Epidemiological analyses for detection of intestinal protozoan parasites at the fields in Indonesia toward developments of livestock production

研究代表者

松林 誠 (Matsubayashi, Makoto)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00321076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア、バンテン州、中部ジャワ州等において、潜在的下痢発症要因について明らかにするため、家畜の便を約600検体採取し、寄生虫調査を実施し、飼育形態等の関連性について評価した。牛では病原性の高い*E. bovis* が同調査エリアで高率に分布していること、遺伝子解析により他国でヒトから検出されている遺伝子型の*G. intestinalis* または*Cryptosporidium* が検出された。豚では日本でその病原性が示唆されている*Entamoeba* 属原虫が初めて検出され、土床飼育において高率であることが分かった。これらの情報は、インドネシア国内でセミナー等を開催し、技術、情報の普及を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究調査によりインドネシア国内において、初めて家畜における分子寄生虫学的調査を実施することができた。我が国で開発および改良した検査手法について、インドネシア国内の獣医系およびその関係者に情報提供を行い、家畜診断技術および生産性向上に貢献することができた。また、日本国内で散発していた致死性の豚アメーバ症について、海外においても同病原性原虫が存在する事を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：We collected about 600 fecal samples from cattle, pigs, and chickens reared in Banten, Central Java, and other areas, Indonesia, and conducted the examinations of intestinal parasites to clarify potential agents causing diarrhea. Consequently, we detected *Eimeria bovis* as high virulent species, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. in cattle. *Entamoeba suis* and *E. polecki* (ST1 and/or ST3), which have been implicated to be pathogenic in Japan, were highly detected in pigs at examined areas. These diagnostic methods and current information about the detected parasites were reported in several workshops that was hold in Indonesia.

研究分野：原虫学

キーワード：消化管寄生性原虫 豚 牛 インドネシア 生産性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

畜産経営において、特に幼獣期にける下痢発症の制御は、生産性に直結する重要な課題である。下痢症を惹起する病原微生物の中でも、寄生虫・原虫では畜産物への薬剤残留問題などから家畜に積極的に駆虫薬等が使用できず、先進国においてもその防除は衛生対策が中心となっている。飼育環境下におけるこれら寄生虫の潜在性を明らかにする事は、衛生状態の良否、またそのエリアにおける下痢発症メカニズムを推定する上で重要である。多民族国家であるインドネシアは2.4億の人口を有し、居住する人々の宗教および食・衣文化は多種多様である。近年は、食生活の多様化を背景に、例えば、牛や豚の飼養頭数は近年では高い伸び率を示している等、動物性タンパク質に対する需要が増加している。しかしながら、上述した下痢症を誘発するこれら寄生虫・原虫感染について、検査技術の普及および疫学情報が乏しいのが実情である。申請者らは、これまでに消化管寄生性原虫の検出および診断について、独自の改良を加え、検出感度の向上および簡便化を図ってきた。我が国のみならず、近隣のアジア諸国においても、寄生虫・原虫感染症を中心に分子疫学的に解明することは、家畜生産性向上に向けた改善に重要な課題である。

2. 研究の目的

我が国そしてインドネシアの家畜生産性向上にむけて、下痢症の誘発に関わる消化管寄生性原虫について、分子生物学的手法を用いて調査を実施する。特にこれらの原虫の中には、形態のみでは種を鑑別できないものが多く、遺伝子解析を行い、種および遺伝子型を決定する。具体的には、クリプトスポリジウムやジアルジア等の原虫では、検出されたオーシストおよびシストの形態のみからヒトへの感染性を鑑別することは出来ない。そのため、複数種のプライマーを使い分け、種および遺伝子型を同定し、人獣共通寄生性を評価する。また、申請者らは、これまでに *Cystoisospora suis* の検出、また豚に寄生する *Entamoeba* 属原虫の全遺伝子型を網羅的に増幅できるプライマーの設計、また通常よく使われる *18S rRNA* 遺伝子以外の遺伝子領域 (*Actin* gen 等)での解析事例を報告している。これらのアプローチを用いた解析は、インドネシアでは行われておらず、寄生虫・原虫の新しい系統分類データの提唱につながる可能性があり、学術的意義をも兼ね備えるものであると考えられる。また、これらの原虫について継続的に疫学データを蓄積するため、また現地協力者との情報共有および有効活用のため、糞便中からのこれら寄生虫・原虫の精製方法および診断法について、現場獣医師に対して技術移管を行うべくセミナーを開催する。

3. 研究の方法

調査エリア

インドネシアの首都ジャカルタからおおよそ 20km 西に位置するインドネシアバンテン州タンゲラン市において、牛および豚の糞便の採材を行った。牛は 11 村の 30 農家から 109 検体、豚は 29 農家から 196 検体採取した。また、2018 年には、中部ジャワ州の 11 地区、東ジャワ州の 2 地区、ジョグジャカルタ特別州の 1 地区の肉用牛 289 検体を採取した。これらの採材は、インドネシア農業省獣医学研究所およびガジャマダ大学と大阪府立大学が共同研究協定を結び、両機関さらに州を管轄する保健衛生所の協力のもと実施された。

検査方法

牛の糞便検体については、1g の便から砂糖遠心法により消化管寄生原虫または線虫、糸虫類を検査した。同時に、Whitlock universal chamber を用いて、*Eimeria* 原虫のオーシスト数(OPG)または線虫卵数(EPG)を計測した。*Cryptosporidium* 原虫および *Giardia* 原虫については、EasyStain™ を用いて免疫染色を行った。また、沈殿法により吸虫卵の検査を実施した。

豚の糞便については、DNAzol にて DNA を精製し、以下の遺伝子解析を実施した。

遺伝子解析

牛の糞便検体において、砂糖浮遊法または免疫染色により *Cryptosporidium* 原虫および *Giardia* 原虫が確認された検体について、残りの全糞便からオーシストまたはシストを同浮遊法により精製した。これを PBS に浮遊し、5 回、液体窒素により凍結融解を実施した後、キアゲン Stool mini kit (Qiagen)を用いて、ゲノム DNA を抽出した。*Cryptosporidium* 原虫については、*18S rRNA* 遺伝子領域、*Giardia* 原虫は *Glutamate dehydrogenase* 遺伝子領域および *-giardine* 遺伝子領域の部分配列を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。得られた増幅産物は、シークエンス解析を実施した。*Eimeria* spp. については、internal transcribed spacer 1 (ITS-1)遺伝子の部分領域を標的とする 6 種の *Eimeria* spp. (*E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*)それぞれに特異的なプライマーを用いて PCR を行い、特異産物の有無により種の同定を実施した。

豚検体については、*Entamoeba* spp. の *Entamoeba suis* または *Entamoeba polecki* の *SSU rRNA* 遺伝子の部分領域を増幅するプライマーを用いて PCR そしてシークエンス解析を実施し、種および遺伝子型を決定した。

セミナー

検査対象とした消化管寄生性原虫の基本情報他、そして検査方法等は、各種研究機関においてワークショップ、セミナーまたは技術講習会を開催し、情報共有を行うと共に技術移転を行った。

4. 研究成果

2017年、インドネシアバンテン州タンゲラン市で飼育されている牛109検体の糞便調査では、87検体(79.8%)において寄生虫および原虫が検出された。その内訳は、*Eimeria* spp. が85(78.0%)、*Strongyloides* spp. は35検体(32.1%)、*Capillaria* spp.は15検体(13.8%)、*Trichuris* spp.は10検体(9.2%)、*Fasciola gigantica* は36検体(33.0%)、*Paramphistomun* spp. は33検体(30.3%)、そして、*Giardia intestinalis* は9検体(8.3%)、*Cryptosporidium* spp. は1検体(0.9%)で陽性であった。調査した全ての町村で寄生虫・原虫が検出された。

G. intestinalis 陽性個体について、PCRを実施したところ、1検体で陽性が確認でき、その塩基配列は既報の Assemblage E と数 bp 異なり、系統樹解析により Assemblage E のクラスターに含まれた。*Cryptosporidium* spp.陽性検体については、いずれのPCRでも増幅産物は得られなかった。*G. intestinalis* および *Cryptosporidium* spp.は、検出されたシスト、オーシスト数が少数であり、このためPCRによる増幅が出来なかったと推測された。

2017年、インドネシアバンテン州タンゲラン市で飼育されている豚の糞便から抽出したDNAを用いて、豚に寄生する *E. suis*、*E. polecki* についてPCRを行った。その結果、196検体中169で *Entamoeba* が検出され、その内訳は、*E. suis* が160(81.6%)、*E. polecki* が64(32.7%)であった。*E. polecki* については、シークエンス解析の結果、subtype 1と3のいずれかまたは混合感染していることが分かった。コンクリート床または土床、清掃の程度等の飼育形態、さらに出荷時体重と原虫陽性率については、現在、情報の取りまとめを行っており、関連性を解析中である。

2018年、中部ジャワ州の11地区、東ジャワ州の2地区、ジョグジャカルタ特別州の1地区の肉用牛289検体を調査した。その結果、*Eimeria* spp. のオーシストは、Whitlock universal chamber 法では27検体(9.4%)、砂糖浮遊法では151検体(52.3%)で陽性であった。OPGは、平均99.3であり最低で40、最高で480であった。年齢別では1歳未満、1-2歳の群は、2歳以上の牛に比べて陽性率は高かった。PCRにより種の同定を試みたところ、病原性の高い *E. bovis* が最も高率で30検体、*E. ellipsoidalis* は8、*E. alabamensis* は6、*E. zuernii* は4検体、*E. auburnensis* は3、*E. cylindrica* は1検体であった。線虫類では、浮遊法において、*Strongyloides papillosus* で28検体、*Trichuris globulosa* は21検体、*Capillaria bovis* では1検体で陽性であった。*S. papillosus* と *T. globulosa* の平均EPGは、それぞれ128.1と40であった。飼育形態との関連では、本調査エリアは、個人経営農家が多く、少数飼育であったため、検出されたオーシスト数または虫卵数が少なく、重度感染が起こっていない可能性が考えられた。また、インドネシア国内で普及しているWhitlock universal chamber 法よりも砂糖浮遊法が、定性試験ではより高感度であることが分かった。日本国内では主にショ糖が用いられているが、インドネシアでは一般に使用されている安価な砂糖(Gula)が代用できることが分かった。

インドネシア国内において、農業省所属の獣医職員、地方公務員獣医師、各種研究機関研究員、大学教員および学生を対象に診断技術の導入および調査結果の紹介、およびその対策について、下記の通り、6件のワークショップ等を行った。また、ボゴール農科大学から引率教員含め3名、ガジャマダ大学から1名の学生の短期留学(さくらサイエンスプログラム、国費留学)の受入を行い、技術研修等を行った。

1. Makoto Matsubayashi. Development of Technology of Gastrointestinal Parasites. Workshop 「Development of Technology for detection of Gastrointestinal Parasites in Livestock」. Indonesian Research Centre for Veterinary Science, Bogor, Indonesia. September 2017.
2. Makoto Matsubayashi. Updating of Coccidiosis Research in Poultry and Livestock. Workshop 「Development of Technology for detection of Gastrointestinal Parasites in Livestock」. Indonesian Research Centre for Veterinary Science, Bogor, Indonesia. September 2017.
3. Makoto Matsubayashi. Workshop of Parasitology. 「Detection strategies for gastrointestinal protozoans in fecal samples and their molecular zoonotic evaluations」. Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. October 2018.
4. Makoto Matsubayashi. Workshop of Parasitology. 「Detailed understanding of the lifecycle in poultry *Eimeria* spp. and key factors for their pathogenicity」. Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. October 2018.
5. Makoto Matsubayashi. Workshop of Intestinal Protozoan Diseases. 「Coccidian epidemiological and virulence analyses in wild birds of Japan and new methods for detection of the parasites using GULA」. Airlangga University, Surabaya, Indonesia. December 2018.
6. Makoto Matsubayashi. Workshop of Intestinal Protozoan Diseases. 「Coccidian epidemiological and virulence analyses in wild birds of Japan and new methods for detection of the parasites using GULA」Taman Safari, Surabaya, Indonesia. December 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Fitrine Ekawastia, Wisnu Nurcahyob, April Hari Wardhana, Tomoyuki Shibahara, Masaharu Tokoro, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi. Molecular characterization of highly pathogenic *Eimeria* species among beef cattle on Java Island, Indonesia. Parasitology International. 2019. (印刷中)

〔学会発表〕(計2件)

April Hari Wardhana, Eny Martindah, Dyah Haryuningtyas Sawitri, Fitrine Ekawasti, Dias Aprita Dewi, Tomoyuki Shibahara, Masahiro Kusumoto, Masaharu Tokoro, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi. First molecular surveillance of porcine *Entamoeba suis* and *E. polecki* in Central Java, Indonesia. 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会. 平成30年(2018)10月13-14日 山口市(山口大学 共同獣医学部)

April Hari Wardhana, Eny Martindah, Dyah Haryuningtyas Sawitri, Fitrine Ekawasti, Dias Aprita Dewi, Tomoyuki Shibahara, Masahiro Kusumoto, Masaharu Tokoro, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi. Survey on gastrointestinal parasites in cattle of West Java, Indonesia and molecular detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. 第73回日本寄生虫学会西日本支部大会. 平成29年(2017)10月14-15日 大阪市(大阪市立大学)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/intpre/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：所 正治

ローマ字氏名：Tokoro Masaharu

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30338024

研究分担者氏名：笹井 和美

ローマ字氏名：Kazumi Sasai

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70211935

(2)研究協力者

研究協力者氏名：アプリル ハリ ワルドハナ
ローマ字氏名：April Hari Wardhana
研究協力者氏名：ディン シャフルディン
ローマ字氏名：Din Syafruddin
研究協力者氏名：シルビア マハラニ アナンタ
ローマ字氏名：Sylvia Maharani Ananta
研究協力者氏名：芝原 友幸
ローマ字氏名：Tomoyuki Shibahara
研究協力者氏名：楠本 正博
ローマ字氏名：Masahiro Kusumoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。