

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25304041

研究課題名(和文) モンゴルにおける家畜原虫病と冷害死の実態調査

研究課題名(英文) Epidemiological survey of protozoan diseases in Mongolia and their impact against cold weather.

研究代表者

五十嵐 慎 (IGARASHI, Makoto)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60374766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性消耗性疾患である原虫病として、トキソプラズマ・ネオスポラ・クリプトスポリジウム・バベシア・タイレリアおよびトリパノソーマの疫学調査をモンゴル国内で実施し、感染状況を明らかにした。また、現地で継続活用可能な原虫病の簡易診断法の構築を目指し、*Babesia bovis*の遺伝子多型解析を行なった。さらにトリパノソーマ簡易診断用の免疫クロマトグラフィー試薬を作製した。また、矯疫に自然感染していた馬からのトリパノソーマ虫体の分離・培養に成功した。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological survey of chronic protozoan diseases including *Toxoplasma*, *Neospora*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Theileria*, and *Trypanosoma* were conducted in Mongolia. Seroprevalences of *Toxoplasma* and *Neospora* were about 10% in cattle, 40-50% in sheep and goat, and negative in horse and camel. Infection rates of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horse were about 50% and 20%, respectively. Tick with *Babesia microti* infection was about 30%. Genotyping of *Babesia bovis* was performed for developing molecular diagnostic tool. Immunochromatography was prepared for diagnosis of *Trypanosoma* infection. Isolation and in vitro culture of *Trypanosoma equiperdum* were successfully established.

研究分野：原虫病学

キーワード：モンゴル トキソプラズマ ネオスポラ バベシア タイレリア トリパノソーマ

## 1. 研究開始当初の背景

モンゴルでは全就労人口の3割以上が農畜産業に従事し、その内の約8割が畜産業を営んでいる。モンゴル国内で飼育されている全家畜頭数は3千万頭以上に及ぶが、モンゴルにおける農畜産業総生産のGDP(約58億ドル、2010年)に占める割合は約16%(2010年)と極めて低い。その理由には、ほとんどの畜産農家が遊牧生活を営む零細経営で生産性や収益が極めて低いことに加え、家畜の慢性消耗性感染症が根強く蔓延していること、そして冬季にはモンゴル語で「ゾド」と呼ばれる冷害(雪害)に見舞われることが上げられる。その結果として、国内総家畜の20%にもおよび家畜が大量死している。

慢性消耗性疾患の筆頭に家畜原虫病がある。ピロプラズマ病やトリパノソーマ病は貧血を、トキソプラズマ病やネオスポーラ病は流産を、クリプトスポリジウム病は下痢を、牛、馬、羊、山羊などに引き起こし、直接的に感染動物の肥育率や生産性を低下させるだけでなく、一部の感染動物は、消耗により冬期のゾドを乗り切れないと考える。このような状況下において、モンゴル政府では畜産業界の脆弱性を改善するべく、家畜感染症のコントロールを国家振興の重点課題と位置付け、その実現策を現在も模索している。本提案研究では、家畜原虫病と冷害に焦点を当て、慢性消耗性原虫病疾患の蔓延がゾドの被害を押し上げている科学的根拠を明らかにする。その実態を受けて、ゾドによる被害の軽減に向けたモンゴル国固有の原虫病対策の清浄化プログラムを考案する。

また、モンゴルのような家畜原虫病高度汚染国での包括的な野外疫学調査とそれに立脚した原虫病対策確立の成果は、世界規模での原虫病対策を策定する上で極めて有用かつ具体的なモデルとなる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、モンゴルにおける慢性消耗性疾患である原虫病の感染状況を調査し家畜の原虫病感染と冷害死との因果関係を明らかにすることである。加えて、現地で継続活用可能な原虫病の簡易診断法を構築し、現地共同研究者とともに原虫病の清浄化プログラムを考案することにより、人材育成と国際貢献を図る。

## 3. 研究の方法

(1) 調査研究実施国・地域及び旅行経路  
調査実施国と拠点地域：モンゴル国内の家畜放牧エリアでの聞き取り調査および家畜血液および血清の採取。

調査動物：飼育されている牛、馬、ヤク、羊、山羊、ラクダの家畜動物、および牧野に存在するダニおよびアブ。

調査原虫：トキソプラズマ、ネオスポーラ、ピロプラズマ(パベシア、タイレリア)、トリパノソーマ、クリプトスポリジウムの原虫  
旅行経路：帯広 成田 モンゴル(ウランバートル) 成田 帯広、あるいは、帯広 千歳 仁川 モンゴル(ウランバートル) 仁川 千歳 帯広

## (2) 研究体制・役割分担

本研究課題は、トキソプラズマ/ネオスポーラ/クリプトスポリジウム(五十嵐)、タイレリア/パベシア(横山)、トリパノソーマ(井上)を担当し、3人の共同研究体制で行われた。

さらに現地疫学調査の遂行には、モンゴル国立農業大学・獣医学研究所の協力のもとに行われ、獣医学研究所の持つ全国ネットワークを利用しながら、サンプル採取・回収を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) サンプルの採取

平成 25 年から平成 27 年の研究期間 3 年間で、モンゴル国内 (Selenge, Khuvsgul, Arkhangai, Bulgan, Khovd, Bayan-ugii, Dundgovi, Dornogovi, Umnugovi, Tuv, Arkhust, Khishigten, Tsant, Khentii, Erdene, Uvurkhangai, Bayankhongor, Zavkhan, Govisumber, Sukhbaatar) の遊牧地において、家畜からの血液および血清サンプルの採取を行なった。調査期間中に深刻なゾド (冷害) の発生はなかった。採取したサンプル数はウシ (約 900 検体)・ウマ (約 1900)・ヒツジ (約 1400)・ヤギ (約 1400)・ラクダ (約 300)・ヤク (約 250) であった。また、バベシアを媒介するマダニおよびトリパノソーマを媒介するアブの採取も行なった。

## (2) トキソプラズマおよびネオスポーラの疫学調査

### ウシ

モンゴル国内 12 州より採取した 861 検体について ELISA 法を用いて抗体価の測定を行なった (Table 1)。

Table 1. Seroprevalance

Province	total n	Toxoplasma positive (%)	Neospora positive (%)
1 Tuv	167	10 (6.0)	16 (9.6)
2 Selenge	86	3 (3.5)	5 (5.8)
3 khuvsgul	96	6 (6.3)	3 (3.1)
4 Ulaanbaatar	112	8 (7.1)	18 (16.1)
5 Khentii	4	-	-
6 Khovd	96	7 (7.3)	4 (4.2)
7 Bayan-Ulgii	80	4 (5.0)	4 (5.0)
8 Uvs	39	2 (5.1)	-
9 Uvurkhangai	20	1 (5.0)	-
10 Bayankhongor	12	1 (8.3)	2 (16.7)
11 Arkhangai	67	12 (17.9)	17 (25.4)
12 Dornod	82	5 (6.1)	2 (2.4)
Grand total	861	72 (8.4)	92 (10.7)

トキソプラズマ感染率は国内全体で 8.4% であり、アルハンガイ州で 17.9% と若干高い傾向が認められた。

ネオスポーラ感染率は国内全体で 10.7% であり、アルハンガイ州 (25.4%) およびウランバートル周辺 (16.1%) で高い感染率を示

した。

### ウマ

セレンゲ、フブスグル、アルハンガイ 3 州より採取した 188 検体について、ラテックス凝集反応法による抗体価の測定を行なった。3 検体 (1.6%) で陽性が検出された。

### ヒツジ・ヤギ

ウランバートル近郊の遊牧地より採取したヒツジ 126 検体、ヤギ 121 検体についてラテックス凝集反応法により抗体価の測定を行なった。ヒツジで 62 検体 (49.2%)、ヤギで 48 検体 (39.7%) が陽性であった。ヒツジおよびヤギの心臓および脳を入手し、パイオアッセイによる虫体の分離を試みたが、結果は陰性であった。

### ラクダ

ドンドゴビ州より採取した 96 検体についてラテックス凝集反応法により抗体価の測定を行なったところ、すべてのサンプルが陰性を示した。

## (3) クリプトスポリジウム

聞き取り調査の結果、どの家畜においても下痢を引き起こしている症例はほとんどなかった。市販の検査キットを用いて数例の下痢症家畜糞便を検査したが陰性を示した。これらのことからモンゴルではクリプトスポリジウムの発生は非常にまれであると結論づけ、調査対象から外した。

## (4) ピロプラズマ

### Babesia bovis の遺伝子多型解析

ウシに対する悪性ピロプラズマ病である Babesia bovis はモンゴル国内に蔓延している。ワクチンの開発や診断抗原の作製の知見を得るため、表面抗原 MSA-1 の遺伝子多型解析を行なった。多くの検体が C 型に分類されたが、一部 AS 型に分類されるものもあった。

### ウマピロプラズマ病の疫学調査

トゥブ州より採取したウマ血清 250 検体に

いて ELISA 法でピロプラズマ病の疫学調査を行なった (Table 2)。半数以上において *B. caballi* の感染が確認され、約 20% が *T. equi* に感染していた。混合感染は約 10% で認められた。

Table 2.

Seroprevalence of <i>B. caballi</i> and <i>T. equi</i> .				
district	n	ELISA (%)		
		<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	Mixed
Arhust	108	68 (62.9)	10 (9.3)	8 (7.4)
Tseel	112	50 (44.6)	33 (29.5)	12 (10.7)
Ulziit	30	11 (36.7)	6 (20)	6 (20)
Total (%)	250	129 (51.6)	49 (19.6)	26 (10.4)
age				
0-4	42	15 (35.7)	8 (19.05)	5 (11.9)
5-9	117	64 (54.7)	29 (24.8)	11 (9.4)
10-14	70	42 (34.3)	11 (15.7)	9 (12.9)
15-20	21	8 (38.1)	1 (4.8)	1 (4.8)
sex				
Male	144	86 (59.7)	30 (20.8)	16 (11.1)
Female	106	43 (40.6)	19 (17.9)	10 (9.4)

ダニにおける *B. microti* 保有率についてバヤンウルギー、フブスグル、セレンゲ 3 州より採取したダニより、人獣共通感染症である *B. microti* の検出を試みた。得られたダニは *Dermacentor nuttalli* と *Ixodes persulcatus* の 2 種に分類された。採取した *Ixodes persulcatus* の約 30% から *B. microti* の DNA が検出された。一方で、*Dermacentor nuttalli* からは *B. microti* の DNA は検出されなかった。

#### (5) トリパノソーマ

トリパノソーマ簡易診断法の開発  
スーラ病を引き起こすトリパノソーマ原虫感染に対する血清診断のための新規抗原 (TeGM6-4r) を同定し、その有用性を確認した。さらにその抗原を用いた免疫クロマトグラフィー試薬を作製し、簡易診断法を確立した。

#### 媾疫トリパノソーマ原虫の分離

感染馬より媾疫トリパノソーマ原虫の分離・試験管内培養に成功した。歴史的に媾疫トリパノソーマの分離株は 1979 年に中国で

樹立されたのが最後であり、それ以来新しい株が分離されていなかった。そのことが媾疫トリパノソーマの研究に影を落としていたが、今回の成果から今後の研究の進展に大いに期待が持てる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Bawm, S., Maung, WY., Win, MY., Thu, MJ., Chel, HM., Khaing, TA., Wai, SS., Htun, LL., Myaing, TT., Tiwananthagorn, S., Igarashi, M., Katakura, K.

Serological Survey and Factors Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Goats in Myanmar.

Scientifica. 査読有、Volume 2016 (2016), Article ID 4794318, p4

DOI: 10.1155/2016/4794318.

Liyanagunawardena, N., Sivakumar, T., Kothalawala, H., Silva, SS., Battsetseg, B3., Lan, DT., Inoue, N., Igarashi, I., Yokoyama, N.

Type-specific PCR assays for *Babesia bovis* msa-1 genotypes in Asia: Revisiting the genetic diversity in Sri Lanka, Mongolia, and Vietnam.

Infect. Genet. Evol. 査読有、37, 64-69 (2016)

DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.029.

Tuvshintulga, B., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Narantsatsaral, SO., Enkhtaiwan, B., Battur, B., Hayashida, K., Okubo, K., Ishizaki, T., Inoue, N., Igarashi, I., Yokoyama, N.

The PCR detection and phylogenetic characterization of *Babesia microti* in questing ticks in Mongolia.

Parasitol. Int. 査読有、64, 527-532. (2015)

DOI: 10.1016/j.parint.2015.07.007.

Nguyen, TT., Ruttayaporn, N., Goto, Y., Kawazu, S., Sakurai, T., Inoue, N.

A TeGM6-4r antigen-based immunochromatographic test (ICT) for animal trypanosomiasis.

Parasitol. Res. 査読有、114, 4319-4325 (2015)

DOI: 10.1007/s00436-015-4672-z.

Tonkin, ML., Halavaty, AS., Ramaswamy, R., Ruan, J., Igarashi, M., Ngô, HM., Boulanger, MJ.

Structural and functional divergence of

the aldolase fold in *Toxoplasma gondii*.  
J. Mol. Biol. 査読有、427, 840-852 (2015)  
DOI: 10.1016/j.jmb.2014.09.019.

Salman, D., Oohashi, E., Mohamed, AE.,  
Abd El-Mottelib, Ael-R., Okada, T.,  
Igarashi, M.  
Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and  
*Neospora caninum* in pet rabbits in Japan.  
J. Vet. Med. Sci. 査読有、76, 855-862  
(2014)  
<http://doi.org/10.1292/jvms.13-0632>

Zhou, M., Suganuma, K., Ruttayaporn, N.,  
Nguyen, TT., Yamasaki, S., Igarashi, I.,  
Kawazu, S., Suzuki, Y., Inoue, N.  
Identification and characterization of a  
*Trypanosoma congolense* 46 kDa protein as  
a candidate serodiagnostic antigen.  
J. Vet. Med. Sci. 査読有、76, 799-806  
(2014)  
<http://doi.org/10.1292/jvms.13-0462>

Nguyen, TT., Zhou, M., Ruttayaporn, N.,  
Nguyen, QD., Nguyen, VK., Goto, Y., Suzuki,  
Y., Kawazu, S., Inoue, N.  
Diagnostic value of the recombinant tandem  
repeat antigen TeGM6-4r for surra in water  
buffaloes.  
Vet. Parasitol. 査読有、201, 18-23 (2014)  
DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.01.009.

Guswanto, A., Sivakumar, T., Rizk, MA.,  
Elsayed, SA., Youssef, MA., ElSaid Eel, S.,  
Yokoyama, N., Igarashi I.  
Evaluation of a fluorescence-based method  
for antibabesial drug screening.  
Antimicrob Agents Chemother. 査読有、58,  
4713-4717 (2014)  
DOI: 10.1128/AAC.00022-14.

Sivakumar, T., Tattiyapong, M., Okubo,  
K., Suganuma, K., Hayashida, K., Igarashi,  
I., Zakimi, S., Matsumoto, K., Inokuma, H.,  
Yokoyama, N.  
PCR detection of *Babesia ovata* from  
questing ticks in Japan.  
Ticks Tick Borne Dis. 査読有、5, 305-310  
(2014)  
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.12.006.

Mochabo, KM., Zhou, M., Suganuma, K.,  
Kawazu, S., Suzuki, Y., Inoue, N.  
Expression, immunolocalization and  
serodiagnostic value of Tc38630 protein  
from *Trypanosoma congolense*.  
Parasitol. Res. 査読有、112, 3357-3363  
(2013)  
DOI: 10.1007/s00436-013-3515-z.

Munkhjargal, T., Sivakumar, T.,  
Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila,  
M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D.,  
Byambaa, B., Terkawi, MA., Yokoyama, N.,  
Igarashi, I.  
Prevalence and genetic diversity of equine  
piroplasms in Tov province, Mongolia.  
Infect. Genet. Evol. 査読有、16, 178-185  
(2013)  
DOI: 10.1016/j.meegid.2013.02.005.

Yoshinari, T., Sivakumar, T., Asada, M.,  
Battsetseg, B., Huang, X., Lan, DT.,  
Inpankaew, T., Ybañez, AP., Alhassan, A.,  
Thekisoe, OM., De Macedo, AC., Inokuma, H.,  
Igarashi, I., Yokoyama, N.  
A PCR based survey of *Babesia ovata* in  
cattle from various Asian, African and  
South American countries.  
J. Vet. Med. Sci. 査読有、75, 211-214  
(2013)  
<http://doi.org/10.1292/jvms.12-0329>

Okada, T., Marmansari, D., Li, Z.M.,  
Adilbish, A., Canko, S., Ueno, A., Shono,  
H., Furuoka, H., Igarashi, M.  
A novel dense granule protein, GRA22, is  
involved in regulating parasite egress in  
*Toxoplasma gondii*.  
Mol. Biochem. Parasitol. 査読有、189, 5-13  
(2013)  
DOI: 10.1016/j.molbiopara.2013.04.005.

[学会発表](計 9件)

Abdelbaset Abdelbaset、五十嵐 慎  
Analysis of the Role of *Toxoplasma*  
*gondii* Lactate dehydrogenase during stage  
conversion using Knockout techniques.  
第85回日本寄生虫学会大会、2016年3月18  
日~3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮  
崎市)

村田 優穂、高野 量、五十嵐 慎、加藤 健  
太郎  
トキソプラズマのシスト形成に寄与する因  
子の探索  
第85回日本寄生虫学会大会、2016年3月18  
日~3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮  
崎市)

Bumduuren Tuvshintulga、Sivakumar  
Thillaiampalam、横山 直明、五十嵐 郁男  
PCR detection and phylogenetic  
characterization of *Babesia microti* in  
questing ticks in Mongolia  
第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月  
7日~9月9日、北里大学獣医学部(青森県・  
十和田市)

Nguyen, TT., Ruttayaporn, N., Goto, Y.,

Lun, ZR., Kawazu, S., Othim, CP., Mbwambo, HA., Sugimoto, C., Inoue, N.

A TeGM6-4r antigen based immuno-chromatographic test (ICT) for diagnosis of animal trypanosomosis.

18<sup>th</sup> Japanese-German Cooperative symposium on Protozoan Diseases, 2014年9月30日~10月3日、Dresden (Germany)

Salman Doaa、大橋 英二、Abdelbaset Abdelbaset E、五十嵐 慎

Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolate from Tokachi subprefecture in Japan.

第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日~9月12日、北海道大学(北海道・札幌市)

横山 直明、Sivakumar Thillaiamapalam、林田 京子、杉本 千尋

Genetic diversity of *Theileria*

第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日~9月12日、北海道大学(北海道・札幌市)

Nguyen Thu Thuy、Ruttayaporn Ngasaman、後藤 康之、Lun Zhao-Rong、河津 信一郎、Othim Charles、Mbwambo Heriel、杉本 千尋、井上 昇

A TeGM6-4r antigen based immune-chromatographic test (ICT) for diagnosis of animal trypanosomosis

第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日~9月12日、北海道大学(北海道・札幌市)

横山 直明、Sivakumar Thillaiamapalam、五十嵐郁男、猪熊壽

*Babesia ovata*: Epidemiology and Clinical significance.

第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27日~3月28日、愛媛大学(愛媛県・松山市)

Doaa Salman、Muller Compaore、Suphasawatt Puranaveja、岡田 只士、五十嵐 慎

Identification and characterization of novel bradyzoite-specific genes in *Toxoplasma gondii*

第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日~9月22日、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十嵐 慎 (IGARASHI, Makoto)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：60374766

### (2) 研究分担者

井上 昇 (INOUE, Noboru)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：10271751

横山 直明 (YOKOYAMA, Naoaki)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：80301802