

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26304035

研究課題名(和文) ミャンマーとバングラデシュにおける家畜と野生小型哺乳動物の住血性寄生虫の分子疫学

研究課題名(英文) Molecular epidemiology of hemoparasites of livestock and wild small mammals in Myanmar and Bangladesh

研究代表者

片倉 賢 (KATAKURA, Ken)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：10130155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミャンマーでイヌのバベシアとネコのトキソプラズマという寄生虫の調査を行い、それらの分布、感染の経路、遺伝的關係などについての新しい知見が得られた。野生の小型哺乳動物を捕獲して遺伝子を調べたところ、ハツカネズミ類は多様であること、ジャコウネズミは2つの系統が棲息していることが分かった。バングラデシュのイヌの血液を次世代シーケンス解析したところ、流血中を循環する細胞フリーDNAの検出が寄生虫検査に有用であることが分かった。こうした研究によって、ミャンマーやバングラデシュの小動物家畜や野生小型哺乳類における寄生虫感染の一端が明らかになり、アジアにおける寄生虫の移動や進化についての理解が深まった。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological surveys of canine and feline parasites, including Babesia and Toxoplasma, were conducted in Myanmar. The results revealed new insights of distribution of Babesia gibsoni and B. canis vogeli in dogs, transmission of Toxoplasma from cats to goats and phylogenetic relationship of B. gibsoni parasites. Wild small mammals were captured and examined for their phylogenetic relationships. Mus species were more genetically variable and two distinct phylogenetic Suncus species may be introduced into Myanmar. In addition, next generation sequence analysis of dog plasma samples from Bangladesh revealed that cell-free DNA was useful for diagnosis of hemoparasite infections. Although overall understanding of parasites of wild small mammals await further studies, hemoprotozoan parasite infections in dogs were newly detected in Myanmar. The results contribute to understanding of introduction and evolution of the parasites in Indochina.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：獣医学 寄生虫 疫学 ミャンマー 野生小型哺乳類 バベシア トキソプラズマ 系統解析

## 1. 研究開始当初の背景

ミャンマーは、インド亜大陸と東アジアを結ぶインドシナ半島の動植物相の豊かな要所であるが、自然科学に関する体系的な研究はあまり実施されてこなかった。獣医学的観点からみても、家畜や野生動物の寄生虫や媒介節足動物に関する疫学的調査報告は見当たらない。そのため、この地域の各種の寄生虫の分布と遺伝子情報を明らかにすることは、インドシナにおける寄生虫の進化、分布拡大様式、人獣共通感染症対策そして畜産振興や食の安全の視点からも重要である。

マダニ媒介性血液原虫であるタイレリアやバベシアは世界中に蔓延しており、ウシ、ウマ、イヌなどにおいて大きな被害を与えている。申請者らはウシ 731 頭を対象にこれらの感染率と分布についての調査を実施し、*Theileria orientalis*、*Babesia bovis*、*B. bigemina* の PCR 陽性率はそれぞれ 36.2、9.8、17.1% であり、これらの原虫種がミャンマー各地に蔓延していることを明らかにした（平成 22-25 年度科研費海外学術調査）。*T. orientalis* については、ピロプラズマ主要膜抗原遺伝子(MPSP)の系統樹解析により、ミャンマーに分布する本原虫株は東南アジア株と近縁であることを突きとめた。

トキソプラズマは組織寄生性コクシジウムであり、食肉を介する人獣共通感染症として重要である。申請者らは家畜の抗トキソプラズマ抗体陽性率を調査し、ウシ 569 頭における陽性率は 1.6%、ヤギ 281 頭では 11.4% であり、ヤギの感染率が高いことを突きとめた。

近年、ミャンマーにおける野生動物の調査も始められ、ハツカネズミ類の *Mus* 属の調査によって、ミャンマーには *M. lepidoides* と *M. nitidulus* という 2 種類の新種が生息していることが明らかになった。

一方、バングラデシュのヒトの内臓リーシュマニア症流行地で野犬を捕獲し、50 頭から血液を採取し、血液原虫の検査を行ったところ、*Leishmania donovani*、*Babesia gibsoni*、*Anaplasmataceae* に対する PCR 陽性率は、それぞれ 20.0、30.0、58.0% であり、野犬は複数の病原微生物に感染していることが判明した。

## 2. 研究の目的

本研究は、平成 22-25 年度の海外学術調査の結果をふまえた発展的な継続研究であり、以下の研究を遂行するために計画された。(1) イヌのバベシア感染の調査、(2) ヤギとネコのトキソプラズマ感染の調査、(3) 野生小型哺乳類の分布調査と分子系統解析、(4) 野生小型哺乳類の住血性原虫の調査、(5) バングラデシュにおけるイヌの住血性微生物感染の網羅的検出。

## 3. 研究の方法

### (1) イヌの血液サンプリングとバベシア種の同定・遺伝子解析

ヤンゴンでは小動物病院に来院したイヌ 46 頭から、ネビドーにおいては野良犬 20 頭から血液を採取した。血液は FTA elute™ カード (GE ヘルスケア) に滴下・乾燥させ、カードから DNA を抽出した。バベシア属に共通なプライマーを用いて 18S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

原虫遺伝子の系統解析については、*Babesia gibsoni* thrombospondin-related adhesive protein 遺伝子 (*BgTRAP*) の部分的塩基配列を決定し、近隣結合法 (NJ 法) 解析を行った。

### (2) ヤギとネコのトキソプラズマ感染の調査

ヤギにおけるトキソプラズマ感染リスクを調べるため、ヤギ飼育の中心地である Pyawbwe においてパイロットスタディを実施した。ラテックス凝集反応キットを用いて血中の抗体価を測定し、聞き取り調査の結果をもとにリスクファクターを分析した。また、Pyawbwe 地域のネコの糞便検査を実施し、オーシストを回収した。オーシスト 1 個単位で DNA を抽出し、ミトコンドリア COI 遺伝子 (*ToxCOI*) を増幅し、解析した。

### (3) 野生小型哺乳類の分布と遺伝的多様性

野生小型哺乳類については、ヤンゴン、ビー、バガン、マンダレーの各都市近郊において、ミャンマーの中央部を南北に流れる大河であるエーヤワディ川 (Ayawaddy River) の両岸で *Mus* 属、*Rattus* 属、*Bandicota* 属をシャーマントラップや捕鼠籠を用いて捕獲した (図 1)。 *Suncus* 属のジャコウネズミについては図 1 に示した各地でシャーマントラップを用いて捕獲した。

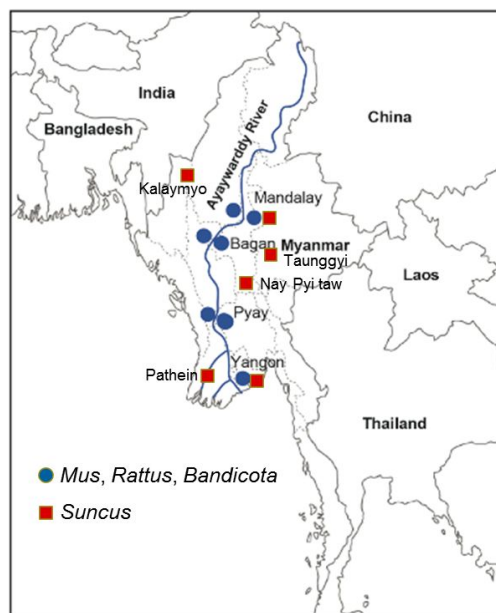


図 1. 野生小型哺乳類の捕獲地

捕獲した動物の肝臓から DNA を抽出し、ミトコンドリア *Cytb* 遺伝子 (*Cytb*) または核遺伝子である *melanocortin 1 receptor* 遺伝子 (*Mclr*) を増幅・シーケンスして、NJ 法解析を行った。

#### (4) 野生小型哺乳類の住血性原虫の調査

捕獲した動物から採取した血液は FTA elute カードに滴下・乾燥し、カードから DNA を抽出した。バベシア属については、齧歯類バベシア属の検出も可能なプライマーを用いて 18S rRNA 遺伝子の PCR 検出を試みた。

*Trypanosoma* 属原虫については、本属に共通な ITS1 領域や glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 (*GARDH*) の PCR 検出を試みた。PCR 産物はシーケンス後に BLAST 検索を行った。

#### (5) バングラデシュにおけるイヌの住血性微生物感染の調査

バングラデシュのヒトの内臓リーシュマニア症流行地で採取した野犬 18 頭と陰性コントロールとしての日本産実験動物犬 4 頭の血漿から、150 bp 以下の cell-free DNA (cfDNA) を回収した。cfDNA ライブラリーを作製した後、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を用いて解読した。得られたリードはイヌゲノムへのマッピングと BLAST 解析に供した。

### 4. 研究成果

#### (1) イヌのバベシア感染とバベシア原虫の分子系統解析

バベシア属の 18S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR の種々の条件を検討し、最終的にヤングンのイヌ 2 頭から *B. gibsoni* を検出し、両都市の 8 頭から *B. canis vogeli* を検出した。イヌからのバベシア属原虫の検出は、ミャンマーにおける初めての報告である。

*BgTRAP* の分子系統解析の結果、ミャンマーの *B. gibsoni* 株は、日本、韓国、台湾などの東アジアの株と近縁であり、バングラデシュやインドの株とは異なる集団を形成することが明らかとなった(図 2)。

#### (2) ヤギとネコのトキソプラズマ感染の調査

Pyawbwe におけるヤギ 162 頭の抗トキソプラズマ抗体陽性率は 11.8% であった。感染のリスクファクターとして、農場にネコがいること ( $p < 0.016$ )、他の家畜や家禽も飼育していること ( $p < 0.038$ )、および定期的な駆虫やワクチン接種をしていないこと ( $p < 0.003$ ) が挙げられた。

農場のネコ 12 匹から糞便内オーシストを回収し、オーシスト 1 個単位で DNA を抽出したのち、*ToxCO1* を増幅しシーケンス解析を行った。その結果、このオーシストはト

キソプラズマ由来であることを確認することができた。ヤギからのトキソプラズマの分離は行われていないが、この農場では、ネコとヤギの間でトキソプラズマの感染環が成立している可能性が強く示唆された。

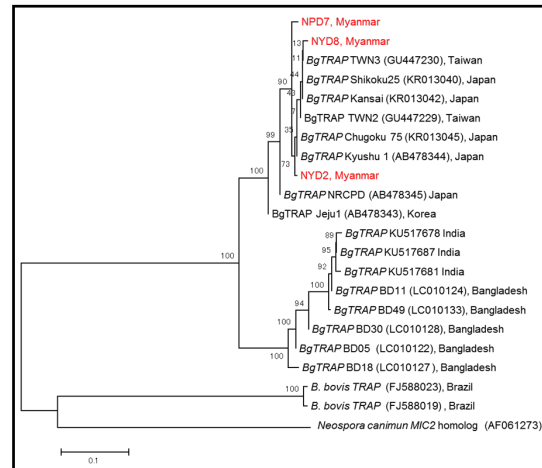


図 2. *BgTRAP* の系統樹 (NJ 法)

#### (3) 野生小型哺乳類の分布と分子系統解析

連携研究者の鈴木らは、ミャンマーにおいて *Mus lepidoides* と *M. nitidulus* という 2 種類の新種が生息していることを突きとめたが、前者は Popa 山で、後者はヤングン近郊で発見されたものである (Suzuki and Aplin, 2012)。

本研究による追加調査で、マンダレーのエーワディ川の西岸に *M. lepidoides* と遺伝的類似性の高い個体 (*Mus* sp.) が発見された。*M. nitidulus* は 27 個体捕獲され、ピーおよびバガンにおいて発見された個体の解析の結果、ミャンマー国内には 2 つの遺伝的系統が生息していることが判明した。*M. musculus* は 10 個体捕獲された。さらに、これまでラオスにおいてのみ報告のあった *M. fragilicauda* が 9 個体発見された。これらの遺伝子解析の結果、ミャンマーには多様な *Mus* 属が分布していること、および遺伝的にも多様性のあることが明らかになった (図 3)。

ラット類については、*Rattus rattus* (クマネズミ)、*Rattus norvegicus* (ドブネズミ)、*Rattus exulans* (ナンヨウネズミ) をそれぞれ 7、6、25 個体捕獲できた。*Bandicota* 属は 16 個体採集できた。分子系統解析の結果、ラット類は周辺諸国のものと遺伝的類縁性が高いことが分かった。

ジャコウネズミ (*Suncus murinus*-*S. montanus* complex) のミトコンドリア遺伝子の解析では、日本のジャコウネズミは東シナ海の大陸を経由した外来種であるのに対して、ミャンマーでは少なくとも 2 つの遺伝系統が移入していることが明らかになった。

#### (4) 野生小型哺乳類の住血性原虫の調査

*Rattus norvegicus* と *Bandicota bengalensis* が



ら、ノミをベクターとするトリパノソーマで、ヒトへの感染も知られている *Trypanosoma lewisi* の DNA を検出することができた。

一方、齧歯類バベシア原虫は、*Rattus* 属、*Bandicota* 属、*Mus* 属のいずれからも検出できなかった。宿主である野生齧歯類は遺伝的に多様であること、またこれらに寄生する寄生虫に関する情報がまだまだ少ないことから、今後、PCR の条件等を詳細に検討し、解析を進めていく必要であると考えられた。

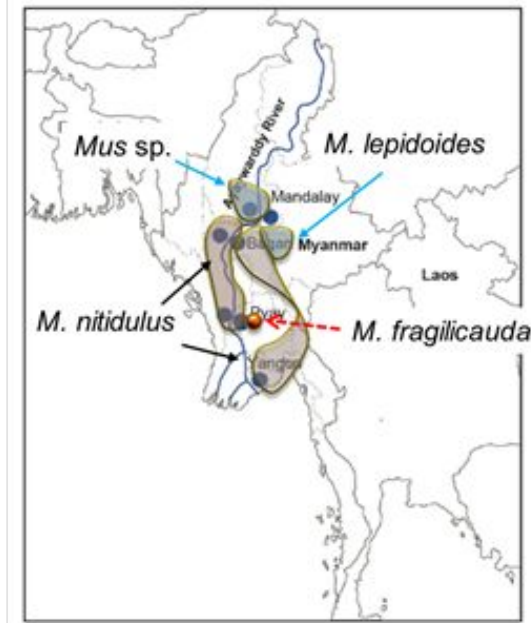


図 3. ミャンマーにおける *Mus* 属の分布に関する新知見

(5) バングラデシュにおけるイヌの住血性微生物感染の網羅的検出

バングラデシュの野犬 14 頭とコントロール 4 頭の合計 18 サンプルから cfDNA を回収し、約 4,600 万リードを得ることができた。そのうちの 98% は宿主であるイヌのゲノム由来であった。残りのリードを BLAST 解析に供したところ、犬糸状虫、リーシュマニア、ボルバキア（犬糸状虫の共生菌）、アナプラズマ、バベシアなどと高い相同性をもつ配列を検出できた。このことから、感染症の診断においても cell-free DNA 解析が有用であることが示唆された。

#### < 引用文献 >

Suzuki H, Aplin KP (eds: Macholán M, Baird SJE, Munclinger P, Piálek J), Cambridge University Press, Evolution of the House Mouse (Cambridge series in morphology and molecules), Phylogeny and biogeography of the genus *Mus* in Eurasia, pp35–64, 2012

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件) (すべて査読有り)

Ohdachi SD, Kinoshita G, Oda S, Motokawa M, Johgahara T, Arai S, Nguyen ST, Suzuki H, Katakura K, Bawm S, Min M, Thwe TL, Gamage CD, Hashim RB, Omar H, Maryanto I, Ghadirian T, Ranoroso MC, Moribe J, Tsuchiya K: Intraspecific phylogeny of the house shrews, *Suncus murinus*-*S. montanus* species complex, based on mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mammal Study* 41, 229–238, 2016

doi: 10.3106/041.041.0408

Akter S, Alam MZ, Nakao R, Yasin MG, Kato H, Katakura K: Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral leishmaniasis-endemic areas of Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 95, 795-799, 2016

doi:10.4269/ajtmh.16-0151

Katakura K: An experimental challenge model of visceral leishmaniasis by *Leishmania donovani* promastigotes in mice. *Parasitol Int* 65, 603-606, 2016

doi: 10.1016/j.parint.2016.03.008

Bawm S, Maung WY, Win MT, Thu MJ, Chel HM, Khaing TA, 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* Article ID 4794318, 4 pages, 2016

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4794318>

Qiu Y, Nakao R, Thu MJ, Akter S, Alam MZ, Kato S, Katakura K, Sugimoto C: Molecular evidence of spotted fever group rickettsiae and *Anaplasmataceae* from ticks and stray dogs in Bangladesh. *Parasitol Res* 115, 949-955, 2016

doi: 10.1007/s00436-015-4819-y

Bawm S, Htun LL, Maw NN, Ngwe T, Tosa Y, Kon T, Kaneko C, Nakao R, Sakurai T, Kato H, Katakura K: Molecular survey of *Babesia* infections in cattle from different areas of Myanmar. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 204-207, 2016

doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.010

Terao M, Akter S, Yasin Md.G, Nakao R, Kato H, Alam MZ, Katakura K: Molecular detection and genetic diversity of *Babesia gibsoni* in dogs in Bangladesh. *Infect Genet Evol* 31, 53-60, 2015

doi: 10.1016/j.meegid.2015.01.011

Suzuki H, Yakimenko LV, Usuda D, Frisman LV: Tracing the eastward dispersal of the house mouse, *Mus musculus*. *Genes Environ* 37, 20, 2015

doi: 10.1186/s41021-015-0013-9

Thomson V, Aplin KP, Cooper A, Hisheh S, Suzuki H, Maryanto I, Yap G, Donnellan SC: Molecular genetic evidence for the place of origin of the Pacific rat, *Rattus exulans*. *PLoS One* 9, e91356, 2014

doi: 10.1371/journal.pone.0091356

Ikeda T, Yoshimura M, Onoyama K, Oku Y, Nonaka N, Katakura K: Where to deliver baits for deworming urban red foxes for *Echinococcus multilocularis* control: new protocol for micro-habitat modeling of fox denning requirements. *Parasit Vectors* 7, 357, 2014

doi:10.1186/1756-3305-7-357

Mohanta K, Ichikawa-Seki M, Shoriki T, Katakura K, Itagaki T: Characteristics and molecular phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh, determined based on spermatogenesis and nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Parasitol Res* 113, 2493-2501, 2014

doi: 10.1007/s00436-014-3898-5

Alam MZ, Nakao R, Sakurai T, Kato H, Qu J-Q, Chai J-J, Chang K-P, Schönian G, Katakura K: Genetic diversity of *Leishmania donovani/infantum* complex in China through microsatellite analysis. *Infect Genet Evol* 22, 112-119, 2014

doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.019

Chiba R, Amagai Y, Tanaka A, Katakura K, Matsuda H: Nerve growth factor promotes killing of *Leishmania donovani* by macrophages through the induction of hydrogen peroxide. *Microbes Infect* 16, 702-706, 2014

doi: 10.1016/j.micinf.2014.06.001

Alam MZ, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Nakao R, Kato H, Schönian G, Uezato H, Hashiguchi Y, Katakura K: Population genetics of *Leishmania (Leishmania) major* DNA isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Pakistan based on multilocus microsatellite typing. *Parasit Vectors* 7, 332, 2014

doi: 10.1186/1756-3305-7-332

Bawm S, Shimizu K, Hirota J, Tosa Y, Htun LL, Maw NN, Thein M, Kato H, Sakurai T, Katakura K: Molecular prevalence and genetic diversity of bovine *Theileria orientalis* in Myanmar. *Parasitol Int* 63, 640-645, 2014

doi: 10.1016/j.tbd.2015.10.010

[学会発表](計8件)

Bawm S, Phyu AZ, Htun LL, 中尾 亮、片倉 賢: Seroprevalence of *Toxoplasma*

*gondii* infection in cats in Myanmar and sequencing analysis of the parasite oocysts, 第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月6日、日本大学(藤沢市)

Akter S, 中尾 亮、Alam MZ、Yasin G、片倉 賢: Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral leishmaniasis endemic areas of Bangladesh, 第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月6日、日本大学(藤沢市)

中尾 亮、邸 永晋、木下豪太、Thu MJ、阿部貴志、片倉 賢、杉本千尋: 超高速遺伝子解析技術によるマダニ保有微生物の探索、第85回日本寄生虫学会大会、2016年3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎市)

Bawm S, Htun LL, Nakao R, Kato H, Katakura K: Molecular survey of bovine piroplasms in Myanmar, 第85回日本寄生虫学会大会、2016年3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎市)

鈴木 仁、島田朋史、Thwe TL、Zaw KMM、片倉 賢: ミャンマー産ハツカネズミ亜属(subgenus *Mus*)の地理的分布と多様化機構、日本動物学会第86回大会、2015年9月19日、新潟朱鷺メッセ(新潟市)

Mori S, Tsutiya K, Bawm S, Arai S, Thwe TL, Min MZ, Katakura K, Yasuda SP, Suzuki H: Characterization of coat color variation in *Bandicota* species from Myanmar using *Mclr* sequence and spectrophotometric data, The Vth International Wildlife Management Congress, 2015年7月28日、Sapporo Convention Center(札幌市)

森智 子、土屋公幸、Bawm S、新井 智、Min MZ、片倉 賢、鈴木 仁: ミャンマー産 *Bandicota* 属3種の分子系統と毛色変異、日本哺乳類学会2014年大会、2014年9月5日、京都大学吉田キャンパス(京都市)

鈴木 仁、土屋公幸、Bawm S、新井 智、Min MZ、片倉 賢: ミャンマー産ネズミ類の分子系統と生物地理学的理解に向けて、日本哺乳類学会2014年大会、2014年9月5日、京都大学吉田キャンパス(京都市)

[図書](計2件)

片倉 賢 他(木村哲、喜田宏編) 医薬ジャーナル社、改訂3版 人獣共通感染症(リーシュマニア症)、551(pp.431-436)、2016

片倉 賢 他(獣医公衆衛生学教育研修協議会編) 文永堂、獣医公衆衛生学II(アメリカトリパノソーマ症、アフリカトリパノソーマ症、リーシュマニア症、ジア

ルジア症) 331 (pp.126-130)、2014

〔その他〕

研究室ホームページ

<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/parasitol/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片倉 賢 (KATAKURA, Ken)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：10130155

### (2) 連携研究者

中尾 亮 (NAKAO, Ryo)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：50633955

鈴木 仁 (SUZUKI, Hitoshi)

北海道大学・地球環境科学研究科・教授

研究者番号：40179239

### (3) 研究協力者

Saw Bawm

ミャンマー獣医科学大学・准教授

Tin Tin Myaing

ミャンマー獣医協会・前会長

Thida Lay Thwe

ヤンゴン大学・動物学講座・教授

Mohammad Zahangir Alam

バングラデシュ農科大学・獣医学部・教授