

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21255010

研究課題名（和文）アフリカに生息する小型草食獣の生体情報を使った環境評価、資源活用、家畜疾病の調査

研究課題名（英文）Environmental evaluation, practical use of the resources and investigation of the domestic animal diseases using the living body information of small antelopes in Africa

研究代表者

安田 準 (YASUDA JUN)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20142705

研究成果の概要（和文）：野生動物の生息環境を監視するため、小型草食獣から得られる糞便や被毛などの生体情報を用いた評価法を確立した。糞便由来腸内細菌の薬剤耐性と遺伝的多様性を調査した。また、寄生虫や血液原虫を用いて家畜と野生動物の分子系統学解析による疾病伝播調査を実施した。肉や被毛を用いた野生動物の種判別法を確立し、野生動物精巢の形態学的観察や精子と糞便中のテストステロンを定量して非侵襲的な繁殖機能診断法を確立した。

さらに、土壌や水系環境と生息動物（カバ）の金属汚染調査を行った。

研究成果の概要（英文）： To monitor the environmental conservation of wildlife, we established the method of evaluation using the living body information of small antelopes in Africa. We investigated genetic characteristics and antimicrobial resistance of enteric bacteria in the feces. We investigated spread of diseases analyzed by molecular phylogeny of parasites and blood protozoa of wildlife. We also established species identification of wildlife using DNA extracted from tissues and non-invasive breeding diagnosis using testosterone concentration in the feces. We reported the bio-accumulation of metals and metalloid in hippopotami and environmental soil, river sediment and plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2010年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2011年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
年度			
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：アフリカザンビア、小型草食野生動物、糞便中大腸菌、薬剤耐性菌、糞便中テストステロン、mtDNA 12S RNA 種別判別法、時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）、密猟対策

1. 研究開始当初の背景

(1) 安田を研究代表者とする本研究班は、

1999年～2001年と2003年～2006年の7年間に実施した海外学術調査では、節足動物媒介性

の原虫病やウイルス病、寄生虫病さらには現地住民に感染の恐れのある家畜や野生動物に起因する人獣共通感染症などについて、野生動物と現地住民の家畜との間で生育環境が重なることが発症誘因の一つと考え、家畜と野生動物あるいは動物と地域住民の相互伝播性疾患を分子疫学的観点から調べてきた。またダニワクチンを臨床試験段階まで開発した。さらにタイレリア病やピロプラズマ病のLAMP法によるDNAレベルでの種鑑別や、常温PCR法によるサルモネラ診断システムを確立した。

(2) アフリカにおける野生動物の保護や生態調査は、ヨーロッパの植民地時代から研究者が現地入りして膨大なデータの蓄積があるが、その視点はゴリラ、サイ、ライオン、ゾウなど人々の関心の深い動物種に集中する傾向があり、現地住民の家畜とその周辺に生息する小型野生草食獣には関心が低い。アフリカに普遍的に生息し、その数も多いインパラやダイカなどの小型草食獣は糞や被毛などの採取が容易であり、その群間の比較により地域の環境状況を反映する可能性があり、周辺の家畜の生体材料と比較もできると考え、本研究課題を企画するに至った。

2. 研究の目的

(1) 南部アフリカに普遍的に生息するインパラやダイカなどの小型草食獣から得た生体材料（被毛、糞、血液、内外寄生虫など）を用いて、腸内細菌（大腸菌、腸球菌）の薬剤耐性遺伝子、内外寄生虫（ダニ中に含まれる血液原虫、肝蛭、住血吸虫、線虫）のDNA鑑別、動物種の遺伝的多様性と地域特性、血中と環境（土壌や水系生物）中の環境汚染物質（重金属など）などを分析して関連性をデータベース化する。また同時にこれら小型草食獣と飼育環境が重なる牛や緬山羊からも同様に生体材料を採材し、家畜と野生動物との間の相

互伝播関係を獣医学の視点から解析する。これらの生物学的指標は広く環境汚染の監視モニターとなる。

(2) 遺伝子を用いた生物地理学的解析からは、感染症の伝搬と深く関連する動物の移動・分散の状況を解明して、適正な畜産開発（野生草食獣の畜肉としての利用を含む）、密猟防止対策、人獣共通感染症対策など、アフリカを取り巻く今日的諸問題解決に寄与することが最終目的である。

3. 研究の方法

インフラストラクチャーの全く整備されていないアフリカの野生動物生息地域における材料採取と検体処理は、海外研究協力者との共同研究として実施する。調査地域の選定と採材許可などを事前にザンビアの海外研究協力者が準備して、研究班員到着とともに調査を開始できる態勢を取る。検体はザンビア大学獣医学部に搬入し、研究協力者の実験設備を使って分析する。一部検体は検疫を経て輸入して研究分担者が解析する。

4. 研究成果

(1) 糞便由来の腸内細菌を用いた薬剤耐性と遺伝的多様性の調査

① ザンビアの野生動物生息地域と隣接する農村の健康牛から分離した糞便由来大腸菌および腸球菌の性状を指標として、家畜と野生動物間の病原体伝播の監視ができるかを検証するため、野生動物糞便 168 検体、家畜糞便 39 検体を採取した。薬剤耐性評価はディスク拡散法で行い、遺伝子型別はランダム増幅遺伝子多型 (RAPD) 解析を実施して、大腸菌と腸球菌の薬剤耐性評価と遺伝子型別を行った。薬剤耐性大腸菌・腸球菌検出率は野生動物と家畜間、地域間で有意な差は認められなかった。大腸菌では異なる検体由来の

菌株間で RAPD 型が一致する例は見られなかった。遺伝子型別により腸球菌の動物間の伝播が示唆されたことから、細菌の遺伝子型別は家畜・野生動物間の病原体伝播の監視に有用だと考えられた。

②野生動物および家畜から分離される大腸菌の複数の特徴を指標とし、環境中の抗菌剤汚染やヒト由来大腸菌の伝播の影響を評価した。野生動物、家畜への抗菌剤使用がないザンビア大学農場、観光野生動物牧場、国際会議場敷地内（展示放牧）の3カ所で採材した。採取した糞便から、大腸菌を1検体からそれぞれ4株ずつ分離した。ディスク拡散法によるスクリーニングを行った後、最小発育阻止濃度を測定して薬剤耐性を評価した。また、0抗原血清型別、系統遺伝グループ分類、遺伝子型別を行った。大腸菌分離率について、材料の新鮮度、宿主動物の食性との関連性が示唆された。耐性菌分離率について、調査地の人口密度との関連性が示唆された。ヒトから野生動物や家畜への OTC 耐性菌伝播が示唆された。各調査地において、別検体間で遺伝的な近縁関係が見られたため、別検体間における大腸菌および耐性菌伝播が起こる可能性が示唆された。ヒトと野生動物、家畜との接触の度合いと、ヒトが野生動物、家畜に与える影響との関連性を示唆できた。

(2) 家畜と野生動物の分子系統学解析による疾病伝播調査

①ザンビアのウシ13頭から25虫体、レチュエ5頭から14虫体、岩手県のウシ9頭から16虫体、ウマ2頭から4虫体の計59虫体の *Setaria* 属線虫の形態学同定を行った。虫体からゲノムDNAを抽出し、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。形態観察からザンビアのウシ由来虫体は *S. labiatopapillosa* もしくは *S. digitata* と、レチュエ由来虫体は *S. bicoronata* もしくは

S. boulengeri と同定された。C01領域の解析結果では、*S. labiatopapillosa* で5遺伝子型、ザンビアの *S. digitata* で3遺伝子型、ザンビアのウシ由来 *Setaria sp.* で2遺伝子型、*S. bicoronata* で4遺伝子型、*S. boulengeri* で4遺伝子型、レチュエ由来 *Setaria sp.* で2遺伝子型、日本の *S. digitata* で2遺伝子型、*S. equina* で3遺伝子型がそれぞれ識別された。系統解析では、*Setaria* 属は他属の糸状虫と異なる独自のクラスターを形成しており、さらにそのクラスター内で、それぞれ宿主ごとの分岐群を形成していた。

②4頭のプク腹腔から糸状虫23虫体が検出され、形態特徴により *Setaria bicoronata* および *Setaria pillersi* と同定された。COX1領域および12SrRNA領域の塩基配列が得られ、他種糸状虫を含めた系統樹においても両種は独自のクレードを形成し、形態による種同定が支持された。2頭の腸間膜静脈から住血吸虫32虫体が検出され、28rRNA領域の塩基配列が一致したことから、*Schistosoma mattheii* と同定された。3頭の大腸から腸結節虫120虫体が検出され、形態特徴により *Oesophagostomum lechewei* と同定された。ITS2領域の塩基配列は、*O. columbianum* と97%の相同性であり、系統樹でも同じクレードに属した。4頭の小腸から *Bunostomum* 属の鉤虫19虫体が検出された。ITS2領域の塩基配列は、*B. trigonocephalum* との塩基相同性が89%であった。4頭の第1胃から双口吸虫が多数検出され、形態特徴により *Calicophoron microbothrium* と同定された。ITS2領域の塩基配列は、*C. microbothrium* と99–100%相同性であり、系統樹でも同じクレードに属した。*S. mattheii*、*Bunostomum sp.*、*Trichuris sp.*、舌虫はプクから初めて検出され、プクが宿主であることが明らかと

なった。得られた DNA データは今後分子学的同定および各寄生虫種の分子系統学的考察に役立つと思われる。

③ ザンビアのウシとレチュエから検出した肝蛭虫体を貯精嚢内精子の有無と ITS1 型の識別により種同定を行い、ミトコンドリア DNA の nad1 領域および cox1 領域の塩基配列に基づきザンビア産肝蛭の起源を解明した。全 128 虫体は、貯精嚢内に成熟精子を有する有精子型虫体であり、ITS1 型が Fg 型であったことから、*F. gigantea* と同定された。ザンビア産 *F. gigantea* の nad1 領域と cox1 領域を繋ぎ合わせた連結配列は 41 型のハプロタイプ (Fg-Z1~41) が識別され、これらのハプロタイプは明確に異なる 3 つの系統群 (クレード A、B、C) に分かれた。ウシ由来ハプロタイプはクレード A、B、C のいずれかに属し、レチュエ由来ハプロタイプはクレード C に属した。クレード B と C は、A と比較して高い遺伝的多様性を有しており、古い系統群であると考えられた。

④ バベシアやタイレリアなどの血液原虫は産業動物分野では大きな経済的影響を与えているが、犬の血液原虫病の疫学調査は、人獣共通感染症の観点からみても重要である。PCR 法とダイレクトシーケンス法を用いた犬の血液原虫の感染率を調査した。ザンビア各地で 505 頭の家畜犬の FTA カード乾燥血液から DNA を抽出した。PCR 法によって、原虫の 18S rRNA の V4 超可変領域の増幅を行った。PCR 産物をアガロース電気泳動によって検出し、ダイレクトシーケンス法を用いて解析した。ザンビアにおける *Babesia canis* の全体での感染率は 5.35 %、*Hepatozoon canis* の全体での感染率は 6.14 % と、ザンビアでは他のアフリカ諸国と比べてバベシアの感染率は低く、ヘパトゾーンも同様であった。また、ヘモプラズマ感染率は全体で 18.3 % と高

く、*M. haemocanis* と *C. M. haematoparvum* の 2 種類が検出された。疫学統計解析の結果からバベシア症の罹患とヘモプラズマの感染の間に相関が見られなかったこと、ダニの生存に適さない乾季が長いザンビア国内で高い感染率を示したことから、ヘモプラズマの感染拡大には節足動物による媒介以外に、伝播経路が存在する可能性が考えられた。

(3) 肉や被毛を用いた野生動物の種判別

① 従来の観察や確認を主とした生態調査は野生動物資源の定量的な評価を行うための十分なデータを取得することが困難である。また密猟された野生動物は一旦解体されてしまうと肉からの種同定は困難である。遺伝子解析などの先端技術を利用することで、これまで得られなかった対象動物の個体情報を効率良く、高い精度で取得できる可能性が高い。動物種が明らかな 29 個体 (11 種類の野生動物) の筋組織ミトコンドリア DNA を抽出し、PCR 法で COX1 領域の塩基配列を明らかにした。ジーンバンクデータベースで cox1 領域の塩基配列が明らかになっている野生動物は、Puku、Eland、Impala、Kafue Lechwe、Waterbuck、Bullalo、Wildebeest、Sable、Bushbuck である。11 種類中 9 種類で cox1 遺伝子の増幅に成功したので、これらを照合して系統樹解析を行い動物種を明らかにした。これにより肉からの動物種同定が可能になり、密猟摘発に有用なツールとなることが期待される。

② 遺伝子分析に基づく種判別手法は、野生動物に関わる犯罪の抑止力として期待されている。43 個体の種が明らかな 17 種類の野生動物と流通食肉の筋肉や皮膚・肝臓組織から DNA を抽出した。本研究では mtDNA 12S RNA を用いた種判別手法の有効性を検証した。43 種の野生動物および家畜のうち 38 種で判別に成功し、本手法は概ね有効であると考えら

れた。

(4) ザンビアにおける繁殖学調査

①Black Lechwe (*Kobus leche smithemani*) はアフリカのザンビア共和国北東部の湿原地帯に局限して生息するウシ科の固有野生動物である。Black Lechwe 雄 23 頭から精巣と精巣上体を採取した。生殖腺は肉眼的に精巣および精巣上体の計測と精子形成ステージを調べた。採取した全ての個体において、精巣 3 部位では精子形成が、精巣上体 3 部位では精子が認められ、精子形成周期は 8 ステージに分類でき、発現頻度が最も多いものは第 2 ステージで、減数分裂の初期ステージにあたる第 1~3 ステージが全体の 6 割近くを占めた。精子形成状況が活発であったことから、10 月は Black Lechwe 雄の繁殖季節であることが組織学的に初めて証明された。

②ザンビア産 Impala 雄のステロイドホルモン産生マーカーである 3β -水酸化ステロイド脱水素酵素 (HSD) の同雄精巣内発現を免疫学的に探索した。Impala 雄 26 個体の精巣を薄切して免疫染色を行った。一次抗体として抗 3β -HSD を、二次抗体および発色処理はダコの Envision キットを用いて精巣内の 3β -HSD 発現状態を観察した。全ての個体において、精巣の間質細胞にのみ 3β -HSD の発現が認められた。一方、4 月および 5 月に採取した個体の精巣において、 3β -HSD 陽性細胞が多数観察でき、精巣内ステロイド合成の活発化が見られた。しかし、6 月から 9 月にかけて 3β -HSD 陽性細胞の出現数が減少し、 3β -HSD 発現量の低下がうかがわれた。

③ザンビアの野生草食動物の繁殖機能を非侵襲的に探索する手法を確立する目的で、滅菌乾燥処理した糞中ステロイドホルモンを簡便かつ高感度な時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) により解析できるか否かを検討した。野生草食動物雄 (プク 7 頭・インパラ 6

頭) から排泄直後の新鮮糞を乾熱滅菌処理してテストステロンを測定した。プク雄 7 頭のテストステロン濃度は 31.6~108.9ng/g、インパラ雄 6 頭のテストステロン濃度は 41.28~178.26ng/g であった。

(5) ザンビアにおける環境中金属汚染調査

①サウスルアンガ国立公園内水系に生息するカバの肝臓 (16)、土壌 (22)、水系中の沈殿物 (4)、植物 (11) などに含まれる金属や半金属 (Cd, Pb, Hg, As) の汚染状況を調査した。有害金属の汚染度は低く環境汚染は確認されなかった。しかしながらカバの肝臓中の Hg レベルは環境試料よりも高い濃度で検出され、食物連鎖を通してカバに蓄積していることが分かった。カバの肝臓と植物の Cd レベルは土壌よりも高かったので、環境中に汚染があれば更に高くなることが考えられた。また、カバの肝臓中の Cr と Ni レベルは他の有害金属よりも高かった。

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 4 件)

①Nakayama, M.M.S., Yasuda, J. et al. (他 5 名 6 番目)、Metal and metalloid levels and bio-accumulation characteristics in soil, sediment, land, plants and hippopotami from the South Luangwa National Park, Zambia, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 査読有、80 巻、2012、333-338
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.003>

[学会発表] (計 1 3 件)

①石井明日菜, 福土秀人, 安田準, 吉田光敏ら、ザンビアにおける家畜と野生動物及び人と野生動物の混在地域における動物糞便由来大腸菌の薬剤耐性、第 154 回日本獣医学会

学術集会、2012.9.14～16、岩手大学（岩手県）

②鈴木 尋，安田準ら、ザンビアにおけるイヌのヘモプラズマ感染状況、第154回日本獣医学会学術集会、2012.9.14～16、岩手大学（岩手県）

③Ichikawa, M., Yasuda, J., Itagaki, T. et al., Three distinct subpopulations of *Fasciola gigantica* in Zambia, Forum Cheju 15, The 15th Japan-Korea parasitologist's seminar、2012.5.15、宮崎コンベンションセンター（宮崎県）

④鈴木佳奈子，安田準，板垣匡ら、ザンビア国の野生ブクから検出された寄生虫について、第153回日本獣医学会学術集会、2012.3.27～29、大宮ソニックシティ（埼玉県）

⑤Nakayama, M. M. S., Yasuda, J. et al., Concentration and bioaccumulation of 10 metals in soil, river sediment, plant and hippopotamus in South Liangwa National Park, Zambia, 3rd CSTS and 5th SETAC-Africa joint Toxicology Conference. 2011.5.31～6.3, University of Buea, (Cameroon)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 準 (YASUDA JUN)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20142705

(2) 研究分担者

吉田 光敏 (YOSHIDA MITSUTOSHI)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：00174954

福士 秀人 (FUKUSHI HIDETO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10156763

鈴木 正嗣 (SUZUKI MASATSUGU)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90216440

板垣 匡 (ITAGAKI TADASHI)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80203074

浅野 玄 (ASANO MAKOTO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30377692

(3) 連携研究者

杉本 千尋 (SUGIMOTO CHIHIRO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：90231373

杉山 誠 (SUGIYAMA MAKOTO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80196774

磯貝 恵美子 (ISOGAI EMIKO)

東北大学大学院・農学研究科・教授

研究者番号：80113570

(4) 海外研究協力者

Syakalima, M.

ザンビア大学・獣医学部・講師

Zulu, V.C.

ザンビア大学・獣医学部・講師

Mubita, C.

ザンビア大学・獣医学部・技師長