

令和元年6月24日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2018

課題番号：26304039

研究課題名(和文) ガーナ共和国の野生動物・家畜におけるクラミジア分布調査とゲノム多様性

研究課題名(英文) Surveillance of Chlamydia and their diversity in wildlife and livestock in Ghana

研究代表者

大屋 賢司 (Ohya, Kenji)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・室長

研究者番号：50402219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：成果の殆どは代表者が岐阜大学時代に実施した調査に基づくものである。クラミジアは、多様な宿主域、病態を示し、医・獣医領域で重要な菌種が多い。本課題では、ガーナ共和国に生息する、野生動物や在来家畜が保有するクラミジアの調査、検出されたクラミジアの遺伝学的多様性を解析した。山間部の粗放的な環境で飼育される家畜と野鳥の間でクラミジアが循環している可能性、都市部の集約的な環境で飼育される家畜にはクラミジアが潜在していることが示された。この他、ガーナで家畜化途上の大型齧歯類グラスカッターの保有微生物、腸内菌叢の解析などを行い、同国の公衆衛生、家畜衛生向上に繋がる多くの知見を得ることができたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、クラミジアの自然界における存在様式について、病原体ゲノム、動物遺伝学および生態学の専門家と協力し、多方面からの解析を実施することができた。さらに、生物多様性の宝庫というガーナの特性を活かし、国内では実施不可能な包括的な解析を行うことができた。本課題の遂行中に得られた知見は、他の病原体にも応用することができ、特に家畜の抗酸菌症、節足動物媒介感染症では多くの成果が得られた。また、ガーナで家畜化が試みられている齧歯類グラスカッターの保有微生物叢の解析も可能となり、飼養効率向上を目指した後続研究が行われている。以上のように、国内外の公衆衛生、家畜衛生向上に繋がる成果が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Chlamydia, one of the important pathogens in the medical and veterinary fields, exhibits broad host range and pathogenesis in their host. In this study, we carried out surveillance and analyzed diversity of chlamydia species among wildlife and livestock (local breeds) in Ghana. We revealed that circulation of chlamydia among wild birds and local livestock reared extensively around an inland foothill of Ghana, and that chlamydia resides latently in extensively reared local livestock in a farm in Accra. In addition to chlamydia, we conducted microbiological inspection of grasscutters which is a giant rodent on the way of domestication, to examine whether they possess pathogens for human and other livestock and to compare their intestinal flora with other livestock. Through this study, we think we could gain a lot of knowledge with potential to improve public health and animal hygiene in this country.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：感染症 野生動物 家畜 クラミジア アフリカ

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

## 1. 研究開始当初の背景

本課題は、研究代表者が岐阜大学応用生物科学部に在籍中（～平成30年10月）に立案し、その殆どを実施した研究課題である。ガーナ共和国(以下ガーナ)は、ギニア湾岸の熱帯雨林からサバンナをへてサハラへと至ることから、熱帯アフリカ諸国の中でも地理的多様性が大きく、そこに生息する動植物も極めて多様である。予備調査の結果、ガーナの野生鳥類(スズメ目)より検出されるクラミジアに関して、本来反芻獣を宿主とする *Chlamydia abortus* が分布していることを明らかにした。クラミジアは、医・獣医領域における感染症の原因として重要なものが多く、自然界では様々な動物に保有されている。感染源となる動物における保有状況の把握が公衆衛生上重要であるが、不明の点も多い。生物多様性の宝庫であるガーナにおいては、これまで日本では実施できなかった、多様な動物種と保有するクラミジアの関係について包括的解析が可能であり、不明の点が多いクラミジアの自然界における存在様式にせまることが出来ると考え、課題の骨子を立案した。

## 2. 研究の目的

生物多様性の宝庫ともいわれるガーナ共和国に生息する野生動物・家畜において、人や家畜の重要な病原体であるクラミジア分布調査と遺伝子型別を行う。クラミジアは偏性細胞内寄生菌であるため、現地における培養ができず、詳細なゲノム、遺伝子解析が困難となっている。そのため、クラミジアを始めとした偏性細胞内寄生細菌の、解像度の高いゲノム、遺伝子解析を可能とする技術の開発も目指した。ガーナの多様な野生動物・家畜の保有するクラミジアのゲノム・遺伝子型別を行い、由来宿主との関係を解析することにより、不明の点が多い、クラミジアの自然界における存在様式を明らかにすることを当初の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 調査地および対象動物

野生動物(野鳥)および粗放的環境で飼育される家畜(山羊、羊、鶏)の調査は、首都アク



図1: 調査地ガーナの概略図

ラより北に300 km程度、ガーナとトーゴ国境沿いのアファジャト山麓で実施した(図1)。粗放的環境で飼育される家畜として、アクラ市内のガーナ大学附属農場で飼育される家畜(山羊、羊、鶏)を対象とした。グラスカッター(*Thryonomys swinderianus*)は、飼育個体としてガーナ大学附属農場で飼育される個体を、野生個体はアクラ市内のブッシュミートマーケットで狩猟個体を購入し利用した。動物からの採材については、岐阜大学動物実験

委員会の承認を得て実施した。

### (2) クラミジアおよびその他微生物の遺伝子解析

各動物の糞便より、PureLink Genomic DNA mini kit (Invitrogen)もしくは ISOFEAL for Beads Beating (ニッポンジーン)を用いて抽出したDNAを鋳型として用いた。遺伝子型別に用いるDNAは、illustra GenomiPhi V2 kit (GE Healthcare)を用いて増幅後さらに NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit(NEW ENGLAND BioLabs)を用いて濃縮した。次世代シーケンズ解析は、MiSeq reagent kit v3 600 cycle (Illumina)を用いて作製したライブラリーをMiSeqに供しリードを得た。V3-V4領域を標的にした16Sアンプリコンは、QIIME2

(<https://qiime2.org>)プラットフォーム上で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 家畜・野生動物に分布するクラミジアの多様性

アフジャト山麓において、野鳥（10種 29羽） 集落にて粗放的環境で飼育されている鶏（28羽） 山羊（30頭） 羊（5頭）の直腸スワブより DNA を抽出し、23S rRNA および外膜蛋白質 *envB* 領域を標的としたリアルタイム PCR によるクラミジア属の検出を行った。野鳥からは 37.9%、鶏からは 21.4% 山羊からは 40%、羊からは 60% といずれの動物からも高確率でクラミジアが検出された。陽性 30 検体のうち 7 検体で *ompA* 領域の配列解析に成功した。山羊・羊からの陽性例は *C. abortus*、*C. pecorum* いずれも反芻獣から検出されるクラミジアと同じクレードに配置されたが、1 例は *C. psittaci* と同じであった。野鳥での陽性 1 例は、山羊、羊から検出された *C. pecorum* と同じクレードに配置された。以上のことから同山麓に生息する各種動物から、多様なクラミジアの存在が示され、野鳥と家畜間でのクラミジアの伝播が示唆された。アフジャト山麓にて、多様な動物間でクラミジアの伝播が示唆されたため、集約的な環境で飼育されている家畜について検討した。ガーナ大学附属農場で、それぞれ地域種である Nungua Blackhead sheep 50 頭と West African Dwarf goat 53 頭、いずれも健康個体を対象とした。羊の 10.0% および山羊 1.9% からクラミジア DNA が検出された。羊から検出された 5 検体について、*ompA* 領域を増幅し系統解析を行ったところ、検出されたのは全て *C. pecorum* であり、低病原性株と同じクレードに配置された。クラミジアの他、羊の 50% からガンマヘルペスウイルスが検出された。地域種は近代品種と比べ増体率等は劣るが、一般的に地域固有の感染症等のストレスに強いとされる。ヘルペスウイルス、クラミジア共に多様な宿主域・病態を示すが、農場で飼育される地域種には、ヘルペスウイルスやクラミジアが潜在していることが示された。また、クラミジアの多様性解析について、より解像度の高いゲノム、遺伝子型別を可能にするため、抗クラミジア単クローン抗体や抗 Methyl-CpG binding Domain (MBD) 抗体（宿主 DNA に結合）を用いて、検体中のクラミジア（DNA）を濃縮する系を検討した。仮想検体（糞便に既知濃度のクラミジアをスパイクした検体）を用いた検討の結果、現地の環境では、全ゲノム解析に耐えうる品質の DNA を得ることは難しかったものの、ゲノム DNA の非特異増幅を行う酵素と抗 MBD 抗体を組み合わせ、*enoA* や *gltA* など複数のハウスキーピング遺伝子の解析を行うことが可能となり、上記検体のより詳細な解析データが得られた。さらにクラミジア DNA の解析過程で得られた知見は、抗酸菌や節足動物媒介病原体など、他の細胞内寄生細菌の解析にも応用することが可能であり、これら病原体についても多くの成果を得ることができた。

##### (2) 大型齧歯類グラスカッターの保有する微生物

グラスカッターは、サブサハラ原産の大型齧歯類であり、その肉は地域住民に非常に好まれている。市場に出回る肉の多くはブッシュミートとしてであり、家畜化途上の動物であるといえる。グラスカッターを家畜化するにあたり、ヒトや周辺の家畜へ感染するような病原体を保有していないか調べることは非常に重要である。まず、グラスカッターの体表に寄生するダニの調査を行った。その殆どは *Ixodes* 属であり、これらダニは *Anaplasma* 属や *Babesia* 属などヒトや家畜に病原性を示す細菌を保有しており、野生個体でなく、適切に管理された環境で飼育されたグラスカッターを利用することが重要であることが示された。さらに、糞便中の菌叢を他の家畜（牛、山羊、羊、兔）と比較した。16S アンプリコン解析を行い各動物の腸内菌叢の多様性を評価すると、グラスカッターの腸内菌叢は、牛、山羊、羊との類似度は低く、兔と比較的近いことが示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Appiah-Kwarteng C, Saito T, Toda N, (省略) Ohya K (13 人中 9 番目), (省略)  
"Native SAG1 in *Toxoplasma gondii* lysates is superior to recombinant SAG1 for serodiagnosis of *T. gondii* infections in chickens." *Parasitol Int*, 69: 114-120, 2019. 査読あり DOI: 10.1016/j.parint.2019.01.001.

Okubo T, Yossapol M, Maruyama F, (省略) Ohya K (10 人中 6 番目), (省略)  
"Phenotypic and genotypic analyses of antimicrobial resistant bacteria in livestock in Uganda." *Transbound Emerg Dis*, 66: 317-326, 2019. 査読あり DOI: 10.1111/tbed.13024.

Moonga LC, Hayashida K, Nakao R (11 人中 3 番目), (省略) "Molecular detection of *Rickettsia felis* in dogs, rodents and cat fleas in Zambia." *Parasit Vectors*, 12: 168, 2019. 査読あり DOI: 10.1186/s13071-019-3435-6.

Salim B, Alanazi AD, Omori R, Alyousif MS, Alanazi IO, Katakura K, Nakao R.  
"Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia." *Acta Tropica*, 193: 78-83, 2019. 査読あり DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.02.029.

Chatanga E, Mossad E, Abdo Abubaker H, Amin Alnour S, Katakura K, Nakao R, Salim B. "Evidence of multiple point mutations in *Theileria annulata* cytochrome b gene incriminated in buparvaquone treatment failure." *Acta Tropica*, 191: 128-132, 2019. 査読あり DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.12.041.

Ito T, Sawai K, Kawai M, Nozaki K, Otsu K, Fukushi H, Ohya K\*, Maruyama F. \*: corresponding author "Draft genome sequences of *Mycobacterium sensuensis* isolate GF74 and *Mycobacterium colombiense* isolate GF28 and GF76 from a swine farm in Japan." *Microbiol Resourc Announc*, 7: e00936-18, 2019. 査読あり DOI: 10.1128/MRA.00936-18.

Ito T, Maruyama F, Sawai K, Nozaki K, Otsu K, Ohya K\*. "Draft genome sequence of *Mycobacterium virginense* strain GF75, isolated from the mud of a swine farm in Japan." *Genome Announc*, 6: e00362-18, 2018. 査読あり DOI: 10.1128/genomeA.00362-18.

Yoshida S, Araki T, Asai T, (省略) Ohya K (12 人中 9 番目), (省略)  
"Phylogenetic uniqueness of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from an abnormal pulmonary bovine case." *Infect Genet Evol*, 62: 122-129, 2018. 査読あり DOI: 10.1016/j.meegid.2018.04.013.

Oba M, Katayama Y, Tsuchiaka S, Omatsu T, Murata Y, Ohya K, Makino S, Nagai M, Mizutani T. "Discovery of an immunodeficiency-associated virus-like virus from pig feces in Japan." *Jpn J Vet Res*, 66: 53-56, 2018. 査読あり DOI: 10.14943/jjvr.66.1.53.

Chahota R, Ogawa H, Ohya K, Yamaguchi T, Everett KD, Fukushi H, "Involvement of multiple *Chlamydia suis* genotypes in porcine conjunctivitis." *Transbound Emerg Dis*, 65: 272-277, 2018. 査読あり DOI: 10.1111/tbed.12645.

Qiu Y, Kaneko C, Kajihara M, (省略), Nakao R (13 人中 13 番目). "Tick-borne haemoparasites and *Anaplasmataceae* in domestic dogs in Zambia." *Ticks Tick Borne Dis*, 9: 988-995, 2018. 査読あり DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.025.

Chitanga S, Simulundu E, Simuunza MC, (省略) Nakao R (12人中7番目), (省略)  
"First molecular detection and genetic characterization of *Coxiella burnetii* in  
Zambian dogs and rodents." *Parasit Vectors*, 11: 40, 2018. 査読あり DOI:  
10.1186/s13071-018-2629-7.

Vlahakis PA, Chitanga S, Simuunza MC, (省略) Nakao R (11人中9番目), (省略)  
"Molecular detection and characterization of zoonotic *Anaplasma* species in domestic  
dogs in Lusaka, Zambia." *Ticks Tick Borne Dis*, 9: 39-43, 2018. 査読あり DOI:  
10.1016/j.ttbdis.2017.10.010.

大屋賢司, "ガーナ共和国の家畜飼育の現状と在来家畜について." 日生研たより, 62: 92-  
96, 2016. 査読無し

Nakao R, Jongejan F, Sugimoto C. "Draft genome sequences of three strains of  
*Ehrlichia ruminantium*, a tick-borne pathogen of ruminants, isolated from Zimbabwe,  
The Gambia, and Ghana." *Genome Announc*, 4: e00453-16, 2016. 査読あり DOI:  
10.1128/genomeA.00453-16.

Ohtani A, Kubo M, Shimoda, Ohya K (11人中4番目), (省略) Fukushi H (11人中10番  
目), Maeda K. "Genetic and antigenic analysis of *Chlamydia pecorum* strains isolated  
from calves with diarrhea." *J. Vet. Med. Sci.* 77: 777-782, 2015. 査読あり DOI:  
10.1292/jvms.14-0585.

福土秀人. "オウム病" 公衆衛生情報 44: 20-21, 2014. 査読なし

[学会発表](計11件)

大屋賢司 (11人中1番目), (省略) 福土秀人 (11人中10番目), 村山美穂. "西アフリカ  
の大型草食齧歯類グラスカッターと反芻家畜の腸内菌叢比較." 第161回日本獣医学会学術集  
会. 2018. 9. つくば

Kenji Ohya, Yasuhiro Takashima. "Microbes on grasscutter in terms of public health  
and animal hygiene" In: "Novel domestication of large rodent "grasscutter" in  
Ghana." 2018.6 (Gifu) (JSPS 二国間交流事業共同研究として主催)

小川寛人, Ayizanga Raphael, Kayang Boniface, 山田雅夫, 大屋賢司. "ガーナ共和国のブ  
タにおけるフィロウィルスの血清疫学調査" 平成29年度北海道大学人獣共通感染症リサーチ  
センター 共同利用・共同研究拠点 成果報告会. 2018.2. 札幌

大屋賢司 (14人中1番目), (省略), 中尾亮 (14人中10番目), 福土秀人 (14人中11  
番目), (省略) "西アフリカの大型齧歯類グラスカッターの保有する微生物について"  
第160回日本獣医学会学術集会 2017.9. 鹿児島

大屋賢司. "動物に存在する多様なクラミジアについて" 第35回日本クラミジア研究  
会 2017.9. 東京

大屋賢司, 高島康弘, 小川寛人, 大松勉, 水谷哲也, 川端寛樹, Christopher Adenyo,  
Boniface Kayang, 村山 美穂. "ガーナにおけるグラスカッター飼育プロジェクト" 第54回  
日本アフリカ学会学術集会 2017.5. 長野

大屋賢司, 岡田彩加, 下里徳宏, 鈴木陽介, 菅沼彰太, Chris ADENYO, Boniface  
KAYANG, 村山美穂, 福土秀人. "ガーナの農場で飼育される山羊・羊(地域種)における病  
原体保有状況" 第159回日本獣医学会学術集会 2016.9. 藤沢

鈴木陽介, 大屋賢司, 菅沼彰太, 福土秀人. "流産の発生した豚農場におけるクラミジ

アの分布状況。” 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016.9. 藤沢

大屋賢司.“ 動物のクラミジア症とその多様性解明に向けた取り組み ” 平成 27 年度家畜衛生研修会 2015.10. つくば

菅沼彰太, 大屋賢司, Louisa SAWYERR, 高須正規, 福士秀人.“ 農場で飼育される和牛(黒毛和種)糞便からの *Chlamydia pecorum* の検出 ” 第 33 回日本クラミジア研究会学術集会 2015.10. 岡山

大屋賢司, 安田早織, 高島康弘, 菅沼彰太, SAWYERR Luisa, KAYANG Boniface, OWUSU Erasmus, 村山美穂, 福士秀人.“ ガーナ共和国内陸部山麓の野鳥・家畜が保有するクラミジアの多様性 ” 第 33 回日本クラミジア研究会学術集会 2015.10. 岡山

〔図書〕(計 4 件)

大屋賢司, 緑書房, 猫クラミジア症, 動物病院スタッフのための犬・猫の感染症ガイド, 2019, 118-119 .

大屋賢司, 緑書房, 猫クラミジア症, 臨床獣医師のための犬・猫の感染症診療, 2018, 266-270 .

大屋賢司, 文永堂, クラミジア門クラミジア綱, 獣医微生物学 (第 4 版), 2018, 211-216 .

大屋賢司, 北海道大学出版会, クラミジア・宿主間相互作用 (偏性細胞内寄生性), 病原細菌・ウイルス図鑑, 2017, 480-487 .

〔産業財産権〕

出願状況・取得状況 (各 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 福士 秀人

ローマ字氏名: FUKUSHI Hideto

所属研究機関名: 岐阜大学

部局名: 応用生物科学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 10156763

研究分担者氏名: 中尾 亮

ローマ字氏名: NAKAO Ryo

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 獣医学研究院

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 50633955

### (2) 研究協力者

省略

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。