

令和元年6月19日現在

機関番号：11201

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：16H05806

研究課題名(和文) ウガンダで流行している肝蛭種の分子学的識別と伝播経路の解明

研究課題名(英文) Molecular identification of Fasciola speceis distributed in Uganda and elucidation of dispersal routes

研究代表者

関 まどか (Ichikawa-Seki, Madoka)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：20700488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝蛭症は世界中で畜産業に甚大な経済被害を与えているが、多くのアフリカ諸国では家畜で蔓延している肝蛭の種類すら正確に識別されていないのが現状である。本研究ではウガンダを研究拠点とし、はじめに申請者が開発した新規種識別マーカーを用いて肝蛭の流行種を調査する。次に、系統解析マーカーを駆使して現地に肝蛭が伝播・定着した経緯を明らかにする。また、アフリカ大陸に周辺諸国から肝蛭が伝播した経路を明らかにするために、中東・北アフリカ、南アフリカ地域からの肝蛭材料を採集し、解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が世界に先駆けて開発した新規種識別マーカーを肝蛭症が問題となっている現場に適用し、病因学的研究に役立てた点に本研究成果の学術的意義と社会的意義を見出すことができる。本研究では、肝蛭症による経済被害が周辺諸国に比べて深刻なウガンダにおける流行種を正確に識別し、肝蛭症の現状を把握することができた。また、研究拠点としたウガンダとその周辺国での肝蛭の伝播経路を辿ることができた。このような本研究成果を現地の研究者・獣医師と共有したことにより、効果的な肝蛭症防除対策を考案する契機となることができたことを確信する。

研究成果の概要(英文)：Fasciolosis caused by liver fluke infection has severe economic damage to the livestock industry all over the world. However, in many African countries, The endemic Fasciola species has not accurately identified. The objective of this study was to investigate endemic species by using molecular species identification markers which developed recently by our research project. In addition, dispersal route of Fasciola flukes inside African continent was analyzed by the phylogenetic markers.

Uganda was the first research center in this project, then, we expanded the target areas to north and south African countries as well as middle east area to examine the dispersal route of Fasciola flukes inside and outside the African continent.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：獣医学 人獣共通感染症 寄生虫 肝蛭

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

## 1. 研究開始当初の背景

肝蛭症は *Fasciola* 属の吸虫が主に反芻獣の肝臓に寄生するために起こる疾患で、肝障害による宿主の発育遅延や、感染した肝臓が廃棄される原因となる。特に畜産が主要産業である途上国やヨーロッパ諸国、オーストラリアで経済被害が大きく、その損失額は世界中で年間 3.2 億 US ドルにも及ぶ (Spithill et al. 1997)。本症は人獣共通感染症でもあり、世界中で 1 億 8000 万人に感染リスクがある (WHO)。

### (1) 新規種識別マーカーを用いたウガンダで流行している肝蛭種の調査

肝蛭症の原因として主に温帯地域に分布する *Fasciola hepatica* と、主に熱帯地域に分布する *F. gigantica* がよく知られている。両種の感受性や病害は宿主動物種ごとに異なるとされているため (Dalton 1998)、両種を正確に識別しなければならない。これまでに研究代表者の研究チームをはじめ世界中の研究者が分子学的識別法の開発に取り組んできたが、いずれの方法も信頼性に欠けていた。研究代表者はホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (*pepck*) と DNA ポリメラーゼ (*pold*) 遺伝子の塩基配列に基づく識別法の開発に成功し、簡便かつ極めて正確に肝蛭種を識別できるようになった (Shoriki et al. 2016)。

多くの地域が熱帯気候に属するアフリカでは、*F. gigantica* が優勢と考えられているが、東アフリカを中心に *F. hepatica* も分布するとされる。しかしながら、信頼性の高い分子学的マーカーを用いて流行種が調査された例はないため、アフリカ諸国では家畜で蔓延している肝蛭種すら正確に把握されていないのが現状である。そこで本研究では、研究代表者が開発した *pepck* と *pold* を適用し、ウガンダを拠点として東アフリカで流行している肝蛭種を調査する。

ウガンダでは農村人口が国民の 87% を占めており、労働力もその大半が農業に従事していることから、同国の経済は農業・農村を基本としたものといえる。ウガンダではウシ 1140 万頭、ヤギ 1244 万頭、ヒツジ 341 万頭が飼養されている (JAICAF)。これらの反芻家畜における肝蛭症の有病率は 84% に及び、損失額は最大で年間 9000 万 US ドルに上ると試算されており (Joan et al. 2015)、この試算額は周辺諸国を圧倒的に上回る。したがって、ウガンダでは本研究に対するニーズが非常に高い。

### (2) 系統解析マーカーを用いたウガンダにおける肝蛭の伝播経路の解明

周辺諸国に比べて肝蛭症の被害が著しいウガンダでは、肝蛭症に対して適切な防除対策を講じることが急務である。病原体が伝播・定着した経緯を究明することは、感染症対策に結び付くため重要である。研究代表者らは、ミトコンドリア DNA の NADH デヒドロゲナーゼ subunit 1 (*nad1*) とシトクロム c オキシダーゼ subunit 1 (*cox1*) 遺伝子の多様性に基づく系統解析により肝蛭の伝播経路を明らかにしてきた。広大なアフリカで肝蛭の伝播経路を解明することは難しいが、研究代表者らはこれまでにエジプト、ナイジェリア、ザンビアの 3 カ国について系統解析データを蓄積してきた (図 1)。ウガンダの肝蛭をこれらのリファレンスデータと比較することで、肝蛭がアフリカ大陸内でどのような伝播経路を辿ってウガンダに定着したのかが明らかになる。



図 1. ウガンダの位置

## 2. 研究の目的

- ・新規種識別マーカーを用いた肝蛭種の同定
- ・系統解析マーカーを用いた肝蛭の遺伝的多様性と拡散経路の評価

を実施してウガンダを拠点にアフリカにおける肝蛭の流行種とその遺伝的多様性を解析し、効果的な肝蛭症防除対策を講じる為の基盤情報とする。本研究は以下のステップにより遂行した。

- (1) 拠点地域、ウガンダにおける予備的な解析
- (2) 研究遂行過程で得たアフリカ各国（エチオピア、南アフリカ、アルジェリア）および中東地域（アフガニスタン、パキスタン）の肝蛭の遺伝的多様性解析を通じて、肝蛭の拡散経路の推察

## 3. 研究の方法

- (1) 新規種識別マーカーを用いた肝蛭種の同定

*pepck* は種特異的プライマーを用いた multiplex PCR 法、*pold* は PCR 増幅産物の制限酵素（*Alu* I）による断片長多型を用いた PCR-RFLP 法によりそれぞれ解析する。研究代表者が開発したこれらの簡易識別法では、*F. hepatica* と *F. gigantica* を極めて正確に識別することができる（図2）。

ウガンダを含む東アフリカは *F. hepatica* と *F. gigantica* が混在する地域とされる。調査対象地区における流行種を同定した。

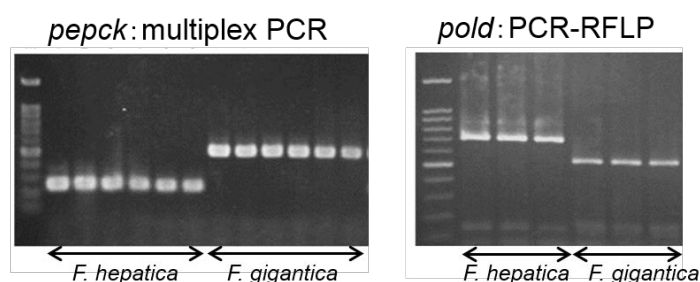


図2. *pepck* と *pold* を用いた簡易識別法

- (2) 系統解析マーカーを用いた肝蛭の遺伝的多様性と拡散経路の評価

各虫体からミトコンドリア DNA の *nad1* (535bp) と *cox1* (430bp) を増幅し、塩基配列を解析した。

塩基配列の相違に基づきハプロタイプを識別し、ネットワーク解析を行う。研究代表者らの先行研究データをリファレンスにして、ウガンダ由来肝蛭とエジプト、ナイジェリア、ザンビア由来の肝蛭を比較し、周辺諸国からウガンダへの拡散・定着の経緯を明らかにした（図3）。この際、遺伝的多様性の指標であるハプロタイプ多様度、塩基多様度、遺伝的分化係数を算出する。一般に、個体群の拡散は遺伝的多様度の高い地域から低い地域に向かって起こったと結論付けられる。

また、得られたウガンダ以外の各国由来の肝蛭についてもこれらの指標を用いて解析を行い、アフリカにおける肝蛭の拡散経路を明らかにした。

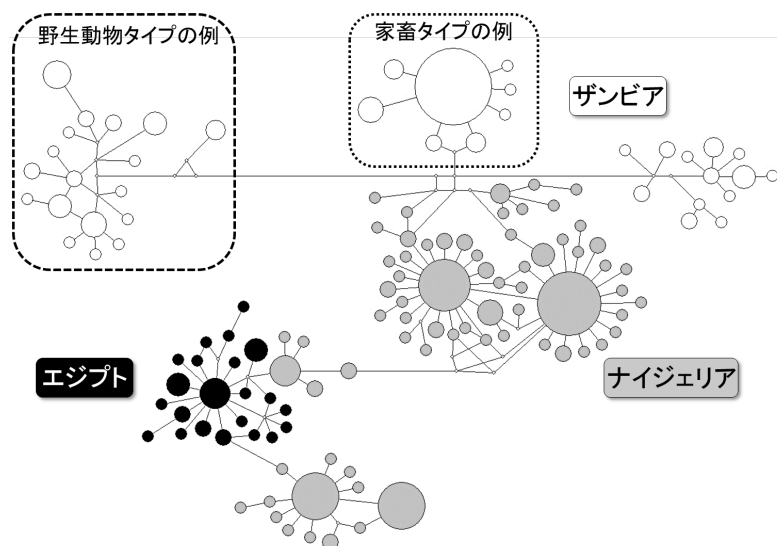


図3. 研究代表者らの先行研究で得られたネットワーク解析結果（各円はハプロタイプで、円の大きさは虫体数に対応する）

#### 4. 研究成果

##### (1)新規種識別マーカー (*pepck* と *pold*) を用いた肝蛭種の同定

アフリカ諸国：ウガンダ（研究拠点）、エチオピア、南アフリカ、アルジェリア

ウガンダには *F. gigantea* のみが分布することが明らかになった。一方、アルジェリアには *F. hepatica* のみが分布することが明らかとなった。また、エチオピアと南アフリカには *F. hepatica* と *F. gigantea* の両種が分布することが判明した。

中東地域：アフガニスタン、パキスタン

アフガニスタンには *F. hepatica* が分布する一方、パキスタンに分布する肝蛭は *F. gigantea* であることが明らかになった。

##### (2)系統解析マーカーを用いた肝蛭の遺伝的多様性と拡散経路の評価

アフリカ諸国：ウガンダ（研究拠点）、エチオピア、南アフリカ、アルジェリア

ウガンダの *F. gigantea* はザンビア由来の *F. gigantea* と近縁であることが明らかになり、地理的に比較的近いアフリカの地域で *F. gigantea* の伝播があることが示された。一方、アルジェリアの *F. hepatica* は地理的に近いエジプトから報告された *F. hepatica* よりもむしろヨーロッパ（スペイン）由来の *F. hepatica* と系統的に近縁であることが判明した。したがって、アフリカ諸国への肝蛭の拡散には、アフリカ大陸内での伝播以外に、植民地支配時代の旧宗主国からの家畜の移動が大きく影響したことが示唆された。現在、この観点からエチオピアと南アフリカ由来肝蛭について、拡散経路の考察を進めている。

中東地域：アフガニスタン、パキスタン

アフガニスタンの *F. hepatica* は中国の *F. hepatica* と近縁で、肝蛭はシルクロードの交易を通じて東へ拡散したことが示唆された。一方、エジプト、アルジェリアを含む北アフリカ地域への拡散を示す証拠は得られず、中東とアフリカの *F. hepatica* 個体群は隔離されていると考えられた。一方、パキスタン由来の *F. gigantea* については南アジア諸国由来の *F. gigantea* と近縁で、アフリカ由来の *F. gigantea* との系統関係は明確にならなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Thang, T.N., Hakim, H., Rahimi, R.R., Ichikawa-Seki, M. Molecular analysis reveals expansion of *Fasciola hepatica* distribution from Afghanistan to China. *Parasitol Int.* **72**: In press. 査読有. doi: 10.1016/j.parint.2019.101930.
2. Hayashi, K., Ichikawa-Seki, M., Mohanta, U.K., Shoriki, T., Chaichanasak, P., Itagaki, T. (2018) Hybrid origin of Asian aspermic *Fasciola* flukes is confirmed by analyzing two single-copy genes, *pepck* and *pold*. *J Vet Med Sci.* **80**: 98-102. 査読有. doi: 10.1292/jvms.17-0406.
3. Ichikawa-Seki, M., Shiroma, T., Kariya, T., Nakao, R., Ohari, Y., Hayashi, K., Fukumoto, S. (2017) Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan. *Parasitol Int.* **66**: 519-521. 査読有. doi: 10.1016/j.parint.2017.04.005.
4. Hayashi, K., Ichikawa-Seki, M., Ohari, Y., Mohanta, U.K., Aita, J., Satoh, H., Ehara, S., Tokashiki, M., Shiroma, T., Azuta, A., Oka, N., Watanabe, T., Harasawa, R., Inohana, S., Ichijo, T., Furuhashi, K. (2017) First detection of *Allobilharzia*

- visceralis* (Schistosomatidae, Trematoda) from *Cygnus cygnus* in Japan. *Parasitol Int.* **66**:925-929. 査読有. doi: 10.1016/j.parint.2016.10.015.
5. Ichikawa-Seki, M., Tokashiki, M., Opara, M.N., Iroh, G., Hayashi, K., Mohanta, U.M., Itagaki, T. (2017) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola gigantica* from Nigeria. *Parasitol Int.* **66**:893-897. 査読有. doi: 10.1016/j.parint.2016.10.010.
  6. Ichikawa-Seki, M., Peng, M., Hayashi, K., Shoriki, T., Mohanta, U.K., Shibahara, T., Itagaki, T. (2017) Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveals that hybridization between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* occurred in China. *Parasitology.* **144**:206-213. 査読有. doi: 10.1017/S003118201600161X.
  7. Hayashi, K., Ichikawa-Seki, M., Allamanda, P., Wibowo, P.E., Mohanta, U.K., Sodirun, Guswanto, A., Nishikawa, Y. (2016) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola gigantica* from western Java, Indonesia. *Parasitol Int.* **65**:424-427. 査読有. doi: 10.1016/j.parint.2016.06.004.
  8. Shoriki, T., Ichikawa-Seki, M., Sukanuma, K., Naito, I., Hayashi, K., Nakao, M., Aita, J., Mohanta, U.K., Inoue, N., Murakami, K., Itagaki, T. (2016) Novel methods for the molecular discrimination of *Fasciola* spp. on the basis of nuclear protein-coding genes. *Parasitol Int.* **65**:180-183. 査読有. doi: 10.1016/j.parint.2015.12.002.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Thang, N.T., Vazquez-Prieto, S., Vilas, R., Paniagua, E., Ubeira, F. M, Ichikawa-Seki, M. (2018) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from Spain. 第 12 回蠕虫研究会プログラム・講演要旨: 5
2. 関まどか、田渋谷敦士、Thang N.T.、林慶、中尾稔、Mohanta, U.K.、福本晋也、中尾亮(2018) 単為生殖型肝蛭の核 DNA の遺伝子型を qPCR により識別する方法の確立. 第 12 回蠕虫研究会プログラム・講演要旨: 12
3. Thang, N.T., Hakim, H., Tashibu, A., Rahimi, R.R., Ichikawa-Seki, M. (2018) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes in sheep from Afghanistan. 第 160 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 324.
4. 田渋谷敦士、林慶、中尾稔、Mohanta, U.K.、福本晋也、中尾亮、関まどか(2018) 単為生殖型肝蛭の核 DNA の遺伝子型を qPCR により識別する方法の確立 第 160 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 324.
5. 関まどか、田渋谷敦士、Thang, N.T.、林慶、中尾稔、Mohanta, U.K.、福本晋也、中尾亮(2018) 単為生殖型肝蛭の核 DNA の遺伝子型を qPCR により識別する方法の確立. 第 26 回分子寄生虫学ワークショップ第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会講演要旨集: 2.
6. Tashibu, A., Hayashi, K. Nakao, M., Mohanta U.K., Fukumoto, S., Nakao, R., Ichikawa-Seki, M. (2018) Development of quantitative PCRs to determine nuclear genotypes of hybrid *Fasciola* flukes. 14th International Congress of Parasitology, Taegu
7. 田渋谷敦士、林慶、中尾 稔、福本晋也、中尾 亮、関まどか(2017) 単為生殖型肝蛭の *pepck* 遺伝子型を qPCR により識別する方法の確立. 第 11 回蠕虫研究会プログラム・講演

要旨: 27

8. 田渋敦士、林 慶、中尾 稔、福本晋也、中尾 亮、関まどか(2017)単為生殖型肝蛭の *pepck* 遺伝子型を qPCR により識別する方法の確立. 第 160 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 342
9. 田渋敦士、林 慶、中尾 稔、関まどか(2017)リアルタイム PCR 法による単為生殖型肝蛭の遺伝子型を識別する方法の確立. 第 86 回日本寄生虫学会大会・プログラム・抄録集:50.
10. Ichikawa-Seki, M., Hayashi, K. Saad K. B. (2017) Molecular characterization of *Fasciola gigantica* from Malaysia. 26th international Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Kuala Lumpur

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: なし

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

ローマ字氏名: Richard Echodu, Patrick Vudriko(ウガンダ)

ローマ字氏名: Yitagele Terefe(エチオピア)

ローマ字氏名: Laatamna Abdelkarim (アルジェリア)

ローマ字氏名: Ali Halajian (南アフリカ)

ローマ字氏名: Hakimullah Hakim (アフガニスタン)

ローマ字氏名: Muhammad Fiaz Qamar (パキスタン)

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。