

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet Parasitol.* 151:158-163, 2008.
2. Iseki H, Takabatake N, Ota N, Ishigame T, Yokoyama N, Igarashi I. *Babesia*: The protective effects of killed *Propionibacterium acnes* on the infections of two rodent *Babesia* parasites in mice. *Exp Parasitol.* 118:543-548, 2008.
3. Goo YK, Jia H, Aboge GO, Terkawi MA, Kuriki K, Nakamura C, Kumagai A, Zhou J, Lee EG, Nishikawa Y, Igarashi I, Fujisaki K, Xuan X. *Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. *Exp Parasitol.* 118:555-560, 2008.
4. Salim BO, Hassan SM, Bakheit MA, Alhassan A, Igarashi I, Karanis P, Abdelrahman MB. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitol Res.* 103:1145-1150, 2008.
5. Takabatake N, Iseki H, Ikehara Y, Kanuka H, Yokoyama N, Sekimizu K, Igarashi I. Isolation and pathogenic characterization of an OBI variant of *Babesia rodhaini* which has a glycoporphin A-independent pathway to murine red blood cells. *Vet Parasitol.* 159:97-104, 2009.

2. 学会発表

1. Serodiagnosis of infection in dogs by an ELISA with recombinant BgTRAP of *Babesia gibsoni*. 具潤景ほか12名。第145回日本獣医学会, 平成20年3月28-30日、相模原市。
2. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. 横山直明他6名、第145回日本獣医学会, 平成20年3月28-30日、相模原市。
3. マウスバベシア原虫と宿主赤血球膜シアル酸分子の関わりについて横山直明ほか4名, 第77回日本寄生虫学会, 平成20年4月3-4日、長崎市。
4. ピロプラズマ類原虫及びマラリア原虫ミトコンドリアのゲノム構造。彦坂健児ほか5名, 第77回日本寄生虫学会, 平成20年4月3-4日、長崎市。
5. 北海道道東地域の放牧牛における *Theileria orientalis* 感染の分子疫学調査。大田奈穂美ほか13名、第146回日本獣医学会, 平成20年9月24-26日、宮崎市。
6. 熊本県の放牧牛における *Theileria orientalis* 感染の疫学調査。水野大介ほか10名、第146回日本獣医学会, 平成20年9月24-26日、宮崎市。
7. 北海道道東地域の放牧牛における *Theileria orientalis* 感染の分子疫学調査。大田奈穂美ほか13名、第146回日本獣医学会, 平成20年9月24-26日、宮崎市。
8. タイにおけるウシバベシア症の疫学調査。周麗佳ほか6名、第146回日本獣医学会, 平成20年9月24-26日、宮崎市。
9. ヒトバベシア原虫遺伝子簡易検出法の開発。井関博ほか7名、第146回日本獣医学会, 平成20年9月24-26日、宮崎市。
10. Growth inhibitory effect of terpene nerolidol against *Babesia* parasites.

Mahmoud Abou-Laia ほか3名第 146
回日本獣医学会, 平成20年9月24-
26日, 宮崎市。

11. 等温遺伝子増幅法(LAMP)の蚊媒
介感染症への応用。青沼宏佳ほか8
名、第 146回日本獣医学会, 平成20
年9月24-26日, 宮崎市。
12. Application of the immuno-
chromatographic test (ICT) for the
diagnosis of tick borne-disease。五
十嵐郁男ほか7名、VI International
Conference on ticks and tick-borne
pathogens、平成20年9月21-26
日、ブエノスアイレス。
13. Application of the immuno-
chromatographic test (ICT) for the
diagnosis of tick borne-disease。五
十嵐郁男ほか7名。16th Japanese-
German Cooperative Symposium on
Protozoan Diseases. 平成20年9月
24-29日、ゲッチンゲン。

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

分担研究報告書

寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究

住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究

研究分担者 大前比呂思 国立感染症研究所・寄生動物部 室長

研究要旨 現在わが国で行われる健康診断では、aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), gamma-glutamyl transferase(GGT)といった肝胆道系酵素が計測されることが多い。住血吸虫症の場合、従来、ASTやALP, GGTなどが上昇することが多いとされてきたが、最近の輸入例では、これらの酵素の異常を全く示さない例も報告されている。そこで、2000年にフィリピン、レイテ島で採取された日本住血吸虫症感染者血清を用い、腹部超音波検査所見による肝線維化と肝胆道系酵素の上昇の関連について検討し、1991年の結果と比較した。ASTとALPは、1991年の調査で上昇を示した例が多かったが、2000年に行った調査では、超音波検査で進行した肝線維化と診断された例でのみ、ASTやALPの上昇がみられた。最近の集団治療を中心とした対策による morbidity 改善により、住血吸虫浸淫地で肝胆道系酵素の異常を示すような感染例が減少し、その結果、輸入感染例においても肝機能障害を示さない例が増加していると思われる。

A. 目的

肝機能障害を起こす日本住血吸虫症やマンソン住血吸虫症では、従来、急激に発症する例や肝肥大をきたすような例を中心に、日本国内での一般健診でも計測される aspartate aminotransferase (AST) や alkaline phosphatase(ALP), gamma-glutamyl transpeptidase(γ -GTP, GGT)などの肝胆道系酵素の上昇する例が多いと報告されてきた。しかし、最近の感染例では、無症状で経過し画像検査などで偶然発見されるような例も多い。また、世界的にみても、対策の一環としてブラジカンテルによる集団治療が積極的に行われるようになってから、多くの浸淫地で、住血吸虫による morbidity は改善しており、肝機能障害を示すような例は、以前に比して減少している可能性もある。

そこで、住血吸虫症診断における肝胆道系酵素計測の意義を フィリピン

住血吸虫症浸淫地で集団的治療が本格的に行われた前後で比較し検討した。

B. 研究方法

フィリピン、レイテ島の日本住血吸虫症浸淫地では、1990年代前半からブラジカンテルによる集団的治療が本格化した。そこで、対象として、2000年8月にレイテ島パロの Schistosomiasis Research Hospital を受診し、糞便検査によって診断された18才以上の日本住血吸虫感染者を選び、既に報告されている1991年の結果と比較した。2000年の受診時に採取され保存されていた血液を用いて肝胆道系酵素の変動を調べるとともに、同時に行われた腹部超音波検査の結果もあわせて検討し、肝線維化の進行と肝胆道系酵素の変動の関係について検討した。対象者は、1991年；118人、2000年；131人で、男女比は、両期間ともおよ

そ2:1である。また、HBs抗原陽性者とHCV抗体陽性者、問診で過度のアルコール摂取歴が疑われた例は、対象から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いられた血清は、フィリピン共和国保健省主導の住血吸虫症対策のもと、検査時当初は、個々の Schistosomiasis Research Hospital 受診者の病態把握を主目的として採取されたものである。将来の研究利用については、採取時に書面で許可を得た。

C. 研究結果

図1と2には、各々の肝胆道系酵素について、1991年、2000年の検査結果の平均値を肝臓の超音波パターン毎に示す。1991年、2000年とも、日本住血吸虫感染者で、 γ -GTP(正常域:10~50IU/l)やALT(正常域:6~43IU/l)の上昇を示した例は、殆どみられなかった(図1Aと図2A)。一方、AST(正常域:11~40IU/l)とALP(正常域:80~260IU/l)は、1991年の時点では、上昇を示した例が多く、特に超音波検査で進行した肝線維化と判断される例ほど、異常値となることが多かった(図1Aと図1B)。ところが、2000年に行った調査では、超音波検査でType 3:Network patternを示すような、進行した肝線維化と診断された例でのみ、ASTやALPの上昇がみられただけだった(図2Aと図2B)。

D. 考察

住血吸虫感染者で肝胆道系酵素を計測した、1980年以降の主な報告例をまとめてみると、結果は、調査時期や対象者の違いによって様々である(表)。総じて1980年代、1990年代前半の調査では、マンソン・日本住血吸虫症とも、肝胆道系酵素(特にASTとALP)が上昇していたと

の報告が多い。一方、1990年代後半以降の調査になると、ウイルス肝炎を合併していない住血吸虫症例では、肝胆道系酵素の異常を示すことは少ない。病院受診者を対象とした今回の調査では、ウイルス肝炎合併例でなくてもASTの上昇を示したが、検診を受診した無症状者を主な対象としたフィリピン、ミンドロ島の日本住血吸虫浸淫地での調査では、174人の感染者のうち、ASTやALTの異常を示した例は全く認められなかった。

また、わが国におけるマンソン住血吸虫症や日本住血吸虫症の輸入例でも、最近肝胆道系酵素の上昇を示す報告は少ない。最近の集団治療を中心とした対策による morbidity 改善により、住血吸虫浸淫地で、肝胆道系酵素の異常を示す感染例が減少した結果が反映されたことによると思われる。一方、日本人で海外渡航時の住血吸虫感染が疑われた例でも、最近の報告では、好酸球増多や肝胆道系酵素上昇を示す例は殆どいない。もっとも、初感染後に肝肥大を示す例や典型的な症状(Katayama fever)を示す例では、最近の報告でも従来と同様、好酸球増多と並んで肝胆道系酵素の上昇が報告されている。住血吸虫症浸淫地で初感染する場合も、最近は大量の住血吸虫セルカリアに同時に暴露される可能性が、以前に比して相対的に減少しており、結果として、渡航者の初感染で典型的な症状を示す例が減少している可能性が指摘される。

E. 結論

フィリピン、レイテ島の日本住血吸虫症浸淫地で、住血吸虫感染者が示す肝胆道系酵素の異常を、プラジカンテルによる集団治療が本格化する前後した。集団治療の実施前は、肝胆道系酵素の異常を示す例も多いが、治療的介入後は、一部の例を除き殆どの例が正常値を示すようになる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishikawa H, Ohmae H.
Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean Journal of Parasitology* 2009 (in press)

2) 大前比呂思, 朝日博子, Orlando S Sy, 桐木雅史, 千草雄一. 肝胆道系酵素の測定は、住血吸虫症の診断に役立つのか。

Clinical Parasitology 2008 (in press)

2. 学会発表

1) Ohmae H, Olveda R, Socheat D, Sudomo M, Chigusa Y, Matsuda H.
Recent situation and next steps of schistosomiasis control programs in Southeast Asia.

The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.

2) Socheat D, Sinuon M, Tsuyuoka R, , Odermatt P, Ohmae H, Matsuda H, Antonio MS Palmer K.

A success story of Schistosomiasis integrated with deworming in Cambodia.

The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.

3) Ishikawa H, Hisakane N, Ohmae H, Kirinoki M, Chigusa Y, Pangilinan Redulla A, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H.

Modeling the dynamics and control of transmissions of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia

The 27th International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep – 3 Oct, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

図 1 A フィリピン、レイテ島の Schistosomiasis Research Hospital を受診した日本住血吸虫症患者での肝胆道系酵素の異常 (1991 年 集団治療実施前)

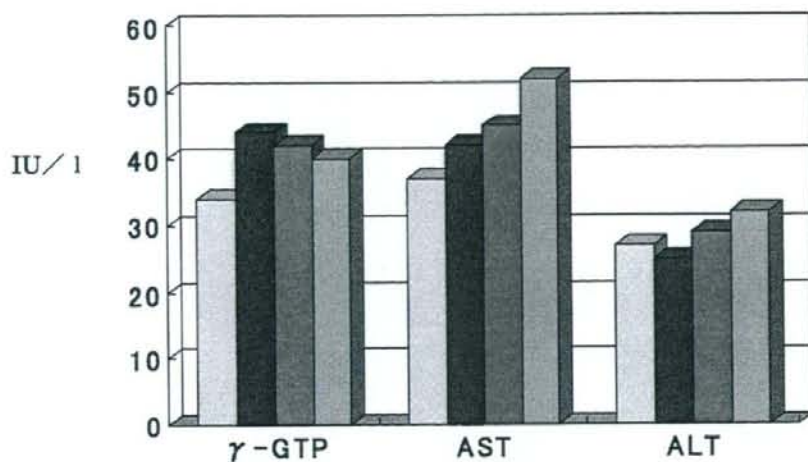


図 1 B フィリピン、レイテ島の Schistosomiasis Research Hospital を受診した日本住血吸虫症患者での肝胆道系酵素の異常 (1991 年 集団治療実施前)

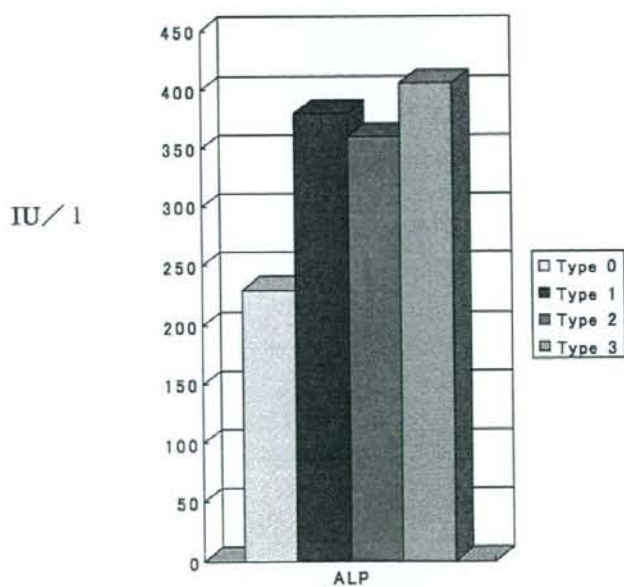


図 2 A フィリピン、レイテ島の Schistosomiasis Research Hospital を受診した日本住血吸虫症患者での肝胆道系酵素の異常（2000年 集団治療実施後）

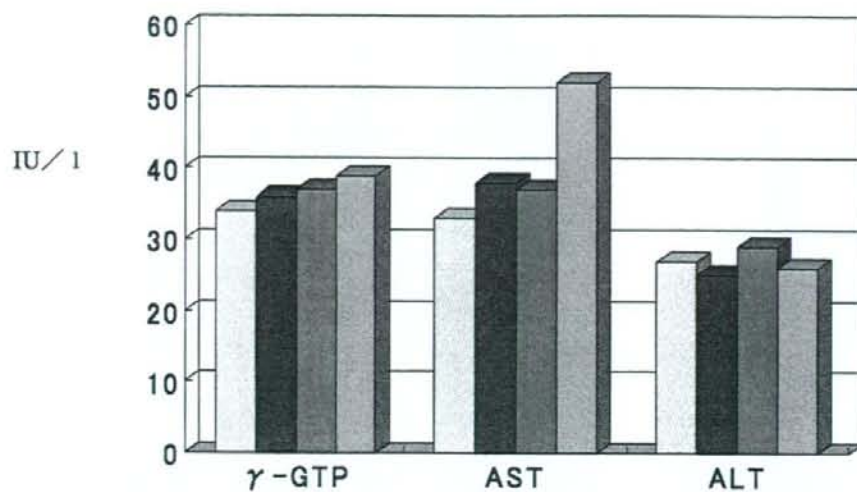


図 2 B フィリピン、レイテ島の Schistosomiasis Research Hospital を受診した日本住血吸虫症患者での肝胆道系酵素の異常（2000年 集団治療実施後）

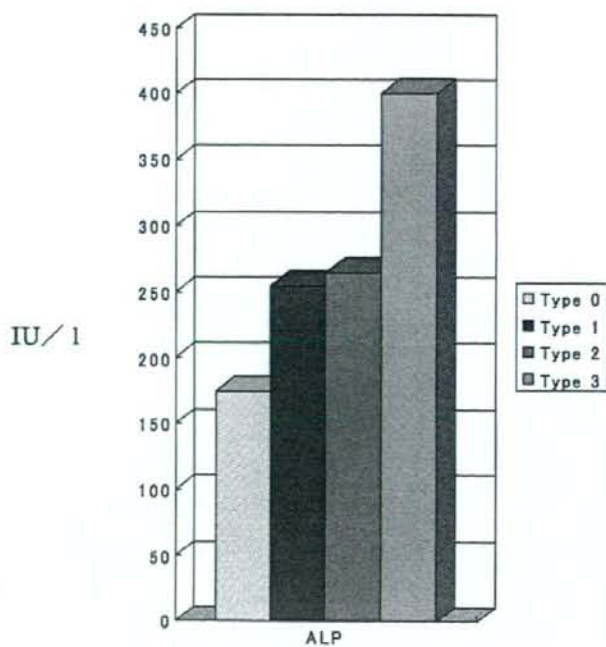


表 住血吸虫症における肝胆道系酵素の異常 —報告例のまとめ—

	対 象	結 果	調 査 者	調 査 ・ 報 告 年 度
マソソ住血吸虫症	浸淫地住民	感染者では、AST, ALPが高値を示す例が多い。	Mansour MM, <i>et al.</i>	Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981
	浸淫地住民	299 人の感染者中、約 30%で ALP や胆汁酸が高値。	田邊将信 他	Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997
	浸淫地住民	肝線維化が進んだ例やC型肝炎合併例で、AST, ALT, ALP, GGT が高値。	Fahim FA, <i>et al.</i>	Dis Markers, 2000
	渡航時日本人感染者	抗体陽性者 5 例中、異常値を示した例は 0。	前田拓哉 他	2008 年度日本寄生虫学会臨床検討会
日本住血吸虫症	浸淫地住民 (病院受診者)	何人かの異常値を示す例がみられるが、10 年間でかなり減少。	大前比呂思 他	(1991 年調査) (2000 年調査)
	浸淫地住民 (住民検診)	ミンドロ島で 174 人の感染者の AST 及び ALT を調べ、異常者は 0。	千種雄一 他	2002 年度日本寄生虫学会で発表 (2001 年調査)
メソソ住血吸虫症	浸淫地住民 (住民検診) ただし全員が有症状	AST 異常: 7/32 名 ALT 異常: 1/32 名	大竹英博 他	2000 年度日本熱帯医学会で発表 (1999 年調査)

人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析

研究分担者 奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨：寄生原虫トリパノソーマのゲノムは、特有のシンテニー構造（種間を通じて遺伝子が染色体上で同一方向に並び、数百kbに渡って遺伝子の順序が保たれている）を持つことが明らかとなった。本研究ではシンテニー構造の成立起源について、ピリミジン合成酵素遺伝子クラスターをモデルとした解析から、シンテニー構造がキネトプラスチダ類の共通祖先で成立した可能性を示した。

A. 研究目的

本研究は、アメリカトリパノソーマ症（シャーガス病）や日本住血吸虫症など、人獣共通寄生虫症を引き起こす病原体の特異な分子機構を同定し、新規治療薬開発およびワクチン開発を行なうことを目的とする。

本年度は、トリパノソーマゲノムに固有の特徴であるゲノムのシンテニーの起源の解析から、トリパノソーマの遺伝的多様性の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行なった。

B. 研究方法

トリパノソーマでは、ピリミジン合成経路を構成する6酵素は5遺伝子でコードされ（第5、第6酵素は単一の融合遺伝子でコードされる）、これらの遺伝子は染色体DNA上でクラスターを形成する。このピリミジン合成遺伝子クラスター（*pyr*クラスターはトリパノソーマ類に広く保存されている（＝シンテニー））。トリパノソーマ類が属するユーグレノゾア生物群のうち、トリパノソーマと同じキネトプラスチダ類に属する自由生活性のポド、およびキネトプラスチダ類よりも先に分岐したディプロネマ類について、ピリミジン合成遺伝子のクローニングおよび分子系統学的解析を行ない、同遺伝子群のシンテニーの有無とその起源について考察した。

C. 研究結果

pyr クラスターはポド類の *Parabodo caudatus* および *Neobodo saliens* において保存されていることが強く示唆された。一方、ディプロネマ *Diplonema papillatum* では *pyr* クラスターは検出されず、さらに第4、第6酵素遺伝

子はキネトプラスチダ類とは異なる起源を持つことが強く示唆された。特に第6酵素遺伝子はキネトプラスチダ類とは異なり、第5酵素遺伝子と融合していない独立型遺伝子であった。

さらに、ポドおよびトリパノソーマの *pyr* クラスターを比較すると、遺伝子間の非翻訳領域はトリパノソーマの方が大きいことが明らかとなった。

D. 考察

トリパノソーマ3種のゲノム解読から、種特異的で寄生様式に深く関連する遺伝子はシンテニー間の領域に局在することが明らかとなり、これはシンテニー構造を乱すような遺伝子増幅や大規模なゲノム再編成が進化上起こりにくく、シンテニー構造を維持する何らかの機構が作用していることを意味している。本研究で明らかとなった、自由生活性ポドのゲノムに存在する *pyr* クラスターのシンテニーは、シンテニー構造の維持の重要性を強く示唆するものである。したがってシンテニー構造は寄生性トリパノソーマ出現の遥か以前、キネトプラスチダ類の共通祖先で成立したことが推定される。シンテニーが維持される機構は不明だが、これはトリパノソーマを含むキネトプラスチダ類において普遍的かつもっとも重要な生命基盤であると考えられる。

また、寄生生物は宿主に多くを依存するため、そのゲノムは縮小する傾向にあることが指摘されてきたが、本研究から、トリパノソーマではむしろ寄生適応に伴いゲノムが増大してきた可能性が示唆された。

E. 結論

トリパノソーマゲノムに特徴的なシンテニー構造について、その成立はキネトプラスチダ類の共通祖先に起きたことが推定された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. *Parasitol Int*, in press

Inaoka DK, Sakamoto K, Shimizu H, Shiba T, Kurisu G, Nara T, Aoki T, Kita K, Harada S. Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry*, 47 (41): 10881-10891, 2008

Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto T, Murata E, Aoki T, Nara T. Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: An extraordinary gap between kinetoplastids and diplomonads. *Protist*, 159(3): 459-470, 2008

Yamazaki M, Ohwada A, Miyaji A, Yamazaki H, Nara T, Hirai S, Fujii H, Uekusa T, Suzuki M, Iwase A, Takahashi K. Pulmonary paragonimiasis with coincidental malignant mesothelioma. *Intern Med*, 47(11): 1027-1031, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業（国際医学協力研究事業）
「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」
分担研究報告書

わが国におけるマalaria媒介蚊の分布と分類に関する分子系統学的研究

研究分担者 小林 睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）
研究協力者 澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長）
比嘉 由紀子（長崎大学熱帯医学研究所・病害動物学部門）
津田 良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第一室長）
二瓶 直子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・客員研究員）

研究要旨： わが国における最近のマalariaの流行は、年間 50-80 名のマalaria症例のすべてが海外で感染した輸入症例であり、国内での感染は認められていない。しかし、媒介蚊であるハマダラカ属蚊は依然として国内に生息しており、最新の分布状況の把握が望まれている。国内におけるハマダラカの調査は、1969-1974 年に実施された全国的な調査(Oguma and Kanda, 1977)を最後に、南西諸島以外ではほとんど実施されていない。そこで我々は、2001-2008 年にかけて国内各地、特に北海道を中心にハマダラカを捕集し、得られたすべての個体についてリボソーム DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) 2 領域の部分塩基配列情報を基に系統解析を行っている。本結果を基に、国内における最新のハマダラカ属蚊の分布状況を把握しようとするものである。

2001-2003 年に北海道で行った調査では、オオツルハマダラカ、エセシナハマダラカ、エンガルハマダラカの生息を確認したが、1970 年代中頃まで北海道に広く生息していたシナハマダラカの存在は確認できなかった。本種蚊は、翌 2004 年、続く 2005 年と 2008 年に、釧路湿原で捕集されたが、北海道におけるシナハマダラカの分布域が、約 30 年の間に極端に減少したことが推察された。ところが、その形態学的特徴から、当初、シナハマダラカであると同定した釧路産の個体は、その後の遺伝子解析により、横浜産シナハマダラカよりもむしろ、2005 年韓国で新たに報告された *Anopheles belenrae* (Rueda, 2005) に最も近縁であることが示唆された。

近年、中国・韓国では、これまで unknown species とされた標本が再評価され、新種の記載が相次いだ。本結果は、それら近隣諸国に分布する海外の種も視野に入れ、国内産ハマダラカ属をあらためて評価する必要性が強く示唆された。

A. 研究目的

わが国におけるマラリアの流行は、第二次大戦後も年間 2 万人を超す患者数(うち死亡者 100-200 人)が記録され、1940 年代後半の北海道では、少なくとも 7 名の熱帯熱マラリア患者が戦後マラリアとして報告された。しかし、最近では、年間 50-80 名のマラリア症例のすべては海外で感染した輸入症例であり、国内での感染は認められていない。しかし、媒介蚊であるハマダラカ属蚊は依然として国内に生息することは事実であり、最新の分布状況の把握が望まれている。

国内におけるハマダラカの調査は、1969-1974 年に実施された全国的な調査(Oguma & Kanda, 1977)を最後に、南西諸島以外ではほとんど実施されてこなかった。そこで我々は、2001-2008 年にかけて国内各地でハマダラカを捕集し、得られたすべての個体についてリボソーム DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) 2 領域の部分塩基配列情報を基に系統解析を行った。ハマダラカ属には形態的分類が困難な種が存在することから、それぞれの種間の系統関係を明らかにし、その結果を基に国内における最新のハマダラカ属蚊の分布状況を把握することが目的である。

B. 研究方法

1. ハマダラカの捕集

2001-2008 年にかけて、主に北海道においてハマダラカの調査を行った。蚊の捕集は主にドライアイスを用いた CDC 型トラップにより昼夜捕集、および捕虫網を用いてスウィーピングし、一部幼虫調査も行っ

た。捕集日および捕集地は以下の通りである。

- 1)2001 年 8 月:北海道女満別市(牛舎)
- 2)2001 年 9 月:横浜市(牛舎)
- 3)2002 年 7 月:北海道女満別市(牛舎)
- 4)2002 年 7 月:北海道深川市(牛舎)
- 5)2003 年 7 月:北海道勇払郡鶴川町(牛舎)
- 6)2003 年 7 月:北海道夕張郡栗山町(牛舎)
- 7)2003 年 8 月:北海道函館市(牛舎)
- 8)2003 年 8 月:北海道上磯郡知内町(牛舎)
- 9)2003 年 8 月:北海道亀田郡七飯町(牛舎)
- 10)2004 年 8 月:北海道釧路市釧路湿原
- 11)2005 年 6 月:同上 (ビジターセンター)
- 12)2008 年 7 月:同上 (野生保護センター)

2. ゲノム DNA の検出と遺伝子解析

捕集蚊は個体毎に REDEExtract-N-Am (SHIGMA)を用いてゲノム DNA を抽出した。プライマーおよび PCR は Beebe and Saul (1995) に準じて行った。反応後の PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により確認した。得られた増幅産物はゲルから抽出・精製後、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.1.1 (ABI)を用いたダイレクトシーケンシング法により、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて約 550 塩基長の配列を決定した。塩基配列の解析には GENETYX-WIN ver.9 (GENETYX Co.) および Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を利用した。また、分子系統樹は、MEGA ver.3.1 を用いて作成した。

C. 研究結果

図1(左)に、1969-1974年にハマダラカが採集された北海道内の地点を示した(図は Oguma & Kanda, 1977を改変・作成)。1969-1974年の調査では、シナハマダラカとオオツルハマダラカは、ともに函館、札幌、稚内と網走の各地点で採集されている。一方、エンガルハマダラカ(1978年に新種として記載)は稚内から網走にかけての北部沿岸部一帯と、苫小牧、釧路周辺と広範に生息していた。しかし、当時は、エセシナハマダラの存在は確認されていない。一方、2001-2003年の我々の調査では、シナハマダラカは捕集されなかったが、オオツルハマダラカとエンガルハマダラカは広い範囲に分布し、エセシナハマダラは道央の限られた範囲にその分布域が確認された(図1, 右)。

1970年代半ばまで北海道内に広く生息していたシナハマダラカは、2003年の時点ではその分布を確認できなかったが、翌2004年に釧路湿原でシナハマダラカが1頭ドライアイストラップに捕集された。次いで2005年には幼虫が採集され、2008年には成虫が再び釧路湿原で捕集された。北海道におけるシナハマダラカの分布域が、約30年の間に極端に減少したことが示唆された。

次に、ITS2領域の部分塩基配列(553塩基)を基に近隣結合法にて系統樹を作成した(図2)。北海道では、2003年までにシナハマダラカを採集できなかったことから、横浜市で採集されたシナハマダラカ(横浜産)のITS2塩基配列情報を参考として用い、系統解析を行った。図2が示すように、横浜産シナハマダラカ、エンガルハマダラカ、エセシナハマダラカ、オオツルハマダラカの4種

は、それぞれが明らかに異なるクラスターを形成していた。このことは、これらは形態学的にも異なる種として認められているが、分子系統解析によっても支持されることが明らかになった。

ところが、2004年の時点では、形態学的分類ではシナハマダラカであると同定された釧路湿原捕集の合計6個体(釧路産シナハマダラ)は、その後のITS2の系統解析の結果、横浜産シナハマダラカよりもむしろ、2005年韓国で新たに報告された *An. bebenrae* (Rueda, 2005) に最も近縁であることが明らかになった。

D. 考察

本研究では、北海道におけるシナハマダラカの分布域が、1974年の採集時から約30年の間に極端に減少したことが明らかになった。30年間に北海道の環境の何が変わったのだろうか？例えば、北海道の水稲作付地域を見ると、2007年度は、道央から西方、および北見市周辺に水稲の作付市町村は広がっており、釧路湿原を含む道東地域には水田はほとんど見られない。「蚊の科学」(佐々ら, 1976)には、シナハマダラカ幼虫は、水田・排水溝・湿原・池沼で発生し、オオツルハマダラカは湿原や池沼・水田で発生すると記述され、生息地に多少の違いはありそうである。その意味では、釧路湿原はシナハマダラカよりもむしろ、オオツルハマダラカが好む環境のように思われるが、実際にはシナハマダラカのみが採集された。北海道以南の地域にもそのような環境変化が見られるのだろうか？また、水田作付地域の変遷、植相の変化、ならびに殺虫剤使用

の履歴など、環境の変化を詳細に、全国的な規模で検討する必要がある。

近年、中国・韓国では、これまで unknown species とされた標本が再評価され、新種の記載が相次いでいる。釧路産シナハマダラカが、横浜産シナハマダラカよりもむしろ、2005年に韓国で新たに報告された *An. belenrae* (Rueda, 2005) に最も近縁であったことは興味深い。国内で近年、新種として認められたエンガルハマダラカ (Kanda & Oguma, 1978) とシナハマダラカは、雄の脚に見られる白帯と、蛹以外の外部形態では判別は難しく、雄蚊の把握器運動回数が他のハマダラカ属蚊と異なることから注目された (Kanda & Oguma, 1976)。両者は形態学的には非常に近い種類と考えられるが、遺伝子解析の結果からは、異なるクラスターに位置しており、別種と認識されている。同様の議論は、韓国産シナハマダラカと、再評価されて新たに新種の記載がされた *An. belenrae*、*An. kleini* (Rueda et al., 2005) との間でも起きており (Wilkerson et al., 2003)、遺伝子解析では別種とみなされるが、形態的にはほとんど区別が付かない。残念なことに、我々が採集した釧路産シナハマダラカの形態的特徴は、従来の形態学的分類によるとシナハマダラカと同定されたが、それ以上の詳細は記録していない。従って、*An. belenrae* と同一の種とみなされるのか、あるいは別の種類であるのか、形態学的特徴も含めて今後詳細に検討する必要がある。また、Hwang (2007) は、*An. kleini* とエンガルハマダラカがシノニムである可能性を示唆している。

このように、近隣諸国におけるハマダラカ属蚊分類に関しては、遺伝子解析による再評価が精力的に行われていることから、我々も、それら海外の種も視野に入れ、少なくとも国内に分布する国内産ハマダラカ属をあらためて評価する必要がある。

E. 結論

- 1) 最近のマラリア症例のすべては輸入症例であり、国内感染の報告はないが、媒介蚊であるハマダラカ属蚊は依然として国内に生息しており最新の分布状況の把握が望まれている。
- 2) 2001-2008年の北海道を中心に行った調査で捕集したハマダラカ属蚊の rDNA ITS2 領域の部分塩基配列から系統解析を行い、国内における最新のハマダラカ属蚊の分布状況を把握した。
- 3) 1969-1974年時の分布域と2001-2003年時の相違は、1970年代中頃まで北海道に広く生息していたシナハマダラカの存在が確認できなかったことであり、北海道においてシナハマダラカの分布域が、約30年の間に極端に減少したと考えられた。
- 4) ITS2の遺伝子情報を基に系統解析を行った結果、釧路産シナハマダラカは、横浜産よりもむしろ、2005年韓国で新たに報告された *Anopheles belenrae* (Rueda, 2005) に最も近縁であることが示唆された。

5) 近年、中国・韓国では、これまで *unknown species* とされた標本が再評価され、新種の記載が相次いでいることから、それら近隣諸国に分布する海外の種も視野に入れ、国内産ハマダラカ属をあらためて評価する必要性が強く示唆された。なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Sawabe, K., Higa, Y., Tsuda, Y., Nihei, N. and Kobayashi, M. (2009) Current distribution and molecular identification of anopheline mosquitoes in Japan. The 43th U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 1月, 東京.

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

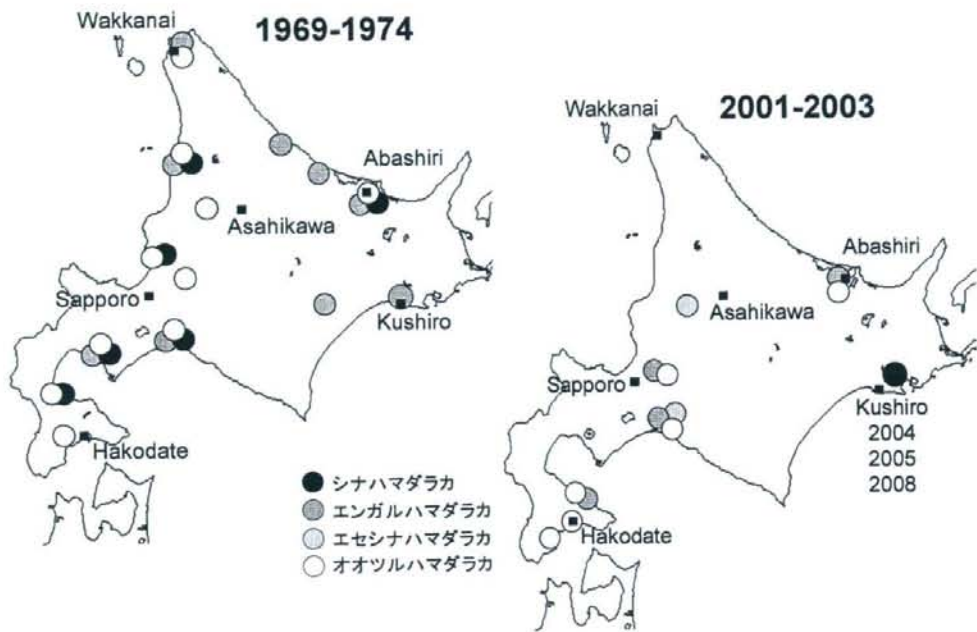


図1 北海道におけるハマダラカ属蚊捕集地

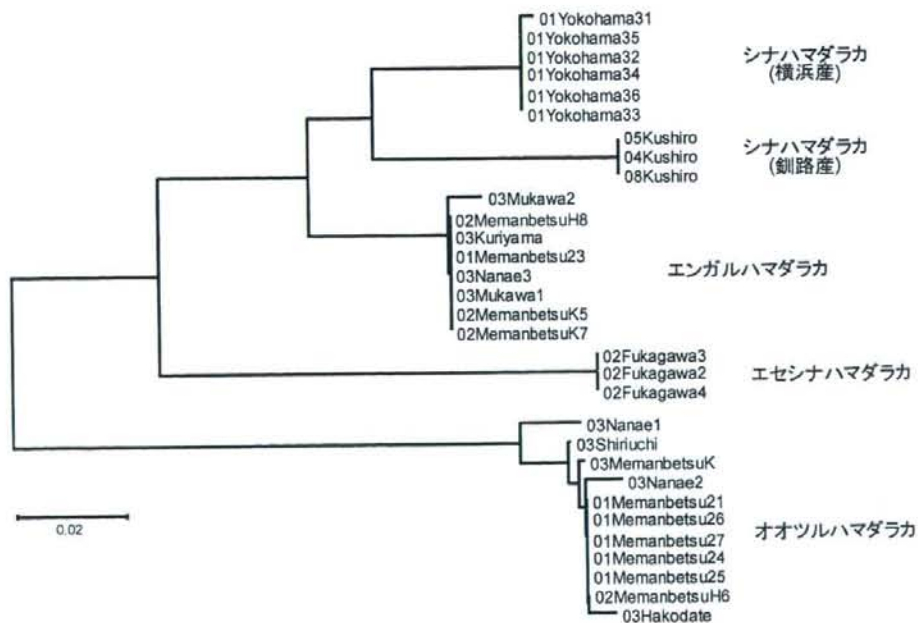


図2 ITS2 領域部分塩基配列 (553 塩基) を基に作成した NJ (近隣結合法) 系統樹

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業（国際医学協力研究事業））

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

分担研究報告書

人獣共通幼虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）の病態、診断、治療、予防に向けた研究

研究分担者 伊藤 亮 旭川医科大学寄生虫学講座教授

研究要旨

脳囊虫症とエキノコックス症は、地球規模で環境汚染、流行拡大が年々深刻化しており、WHOにより狂犬病その他とともに **Neglected Tropical Diseases** にリストアップされた人獣共通寄生虫疾患である。本研究では、これらの寄生虫疾患についての病態、診断、治療、予防に向けた総括的な研究として、免疫、遺伝子診断法の改善、病原体である寄生虫の遺伝子多型解析による感染地域の特定の可能性について研究を実施した。囊虫症を引き起こす有鉤条虫(*Taenia solium*)は、ミトコンドリア遺伝子解析によりアジア型およびアメリカ・アフリカ型に分けることができるが、さらにそれぞれの地域内でのサブタイピングにより、患者の旅行歴と照らし合わせることで感染した地域を特定できるようになった。また、人体寄生テニア属条虫 3 種の遺伝子鑑別法も確立した。エキノコックス属条虫に関するミトコンドリア遺伝子解析を中心とする種の再検討を行い、アフリカライオンから分離されていた単包条虫ライオン strain を独立種として再評価した。単包条虫ゲノタイプ G1-G10 と呼ばれていたものを 4 種類に再分類し、全世界に分布しているエキノコックス属条虫を 9 種類に再分類した。これらの基礎研究成果に基づき、患者確認に必要な血清抗体検査法、遺伝子検査法の改善、開発に取り組み、感染者、感染動物の検出精度が大きく向上した。今後、致死的な人獣共通幼虫症を引き起こす一群の条虫に関して、遺伝子多型解析に基づく地球規模での地理拡散、進化、病原性の獲得機序、宿主転換などの研究へと発展することが期待できる。

A. 研究目的

人獣共通幼虫症として地球規模で深刻な問題を提示している疾患は、脳囊虫症とエキノコックス症（単包虫症ならびに多包虫症）である。人体寄生テニア属条虫種は 3 種類(*Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiatica*)が知られているが、これら 3 種の中で人体脳囊虫症を引き起こすのは *T. solium* だけである。

本研究では 1) これら 3 種類が同所的に分布している地域の発見、3 種鑑別法の改善、開発、2) *T. solium* と他の 2 種類の分子分類学的評価、3) 囊虫症流行地での患者検出方法の改善、4) 患者が感染した地域特定の可能性について研究を展開した。エキノコックス症に関しても同様に、遺伝子解析による種の再検討、病原性と病態転換（内生出芽と外生出芽）、宿

主転換（イヌ科動物とネコ科動物）と血清診断法の改良と評価を試みた。

B. 研究方法

材料：テニア属条虫症：テニア条虫感染者由来の虫体、糞便、血清

囊虫症：摘出病巣（囊虫）、血清

エキノコックス症：世界各国において画像診断ならびに外科手術により確定診断がついた単包虫症、多包虫症患者から得られたエタノール固定原頭節、血清、ならびに野生動物から得られたエタノール固定原頭節ならびに虫卵、成虫

方法：従来法を用いて、寄生虫（虫卵、幼虫、成虫）ならびに糞便内のミトコンドリアならびに核遺伝子を解析した。新たに LAMP 法の導入を試みた。抗体検査についても各種遺伝子組み換え抗原を用いてイムノブロット、ELISA、さらに迅速キットを用いる迅速検査を実施した。

C. 研究結果

1. テニア症・囊虫症研究：

1) 新しい遺伝子鑑別法の開発：すでに確立していた遺伝子検査法により鑑別した 3 種条虫を用い、新しい簡便な遺伝子鑑別法(LAMP 法)を確立した(論文 1、第 17 回熱帯医学・マラリア会議発表)。テニア属寄生虫症患者から得られた糞便を用いて LAMP 法の評価を試み、感度がこれまでの Multiplex PCR よりも格段に高くなることが判明した(第 43 回日米寄生虫学ワークショップ発表)。

2) インドネシア、バリ島で発見された囊虫症患者から得られた病巣を用いて遺伝子解析した結果、予想と異なり、バリ島に分布している *T. solium* は他の東南ア

ジア地域と異なる遺伝子配列を示すことが判明した(論文 2)。また、国内で外科治療を受けた症例の脳から摘出された病理標本と、患者の旅行先の国から入手した *T. solium* サンプルの遺伝子解析を展開し、ほぼ感染地域を特定できる成績が得られつつある(Yanagida T et al. in prep.)。

2. エキノコックス症研究：

1) 分子分類学的、分子検査学的研究：①ウガンダの国立公園内でアフリカライオンの糞便を採取し、テニア科条虫虫卵を検出し、虫卵 1 個ごとにミトコンドリア遺伝子解析を実施した。また南アフリカプレトリア大学寄生虫博物館に *Echinococcus granulosus felidis* として故 Prof. Anna Verster によって原記載された歴史的な標本の一部を分与してもらい、遺伝子解析を行った。その結果、フォルマリン固定成虫と糞便内虫卵から得られた遺伝子情報が全く同じであり、またこれまで報告されていた *E. granulosus sensu lato* (G1-G10) とほぼ等距離で遺伝子変異が認められることから独立種として再評価した(論文 3)。②ペルーの家畜並びに患者から得られた単包虫病巣を用いた遺伝子解析から G1, G6, G7 が確認された(論文 4)。③モンゴルから多包虫症症例が初めて確認された(Ito A et al. submitted)。④アメリカ、ミネソタで 1977 年に発見された多包虫症例病理標本を用いて遺伝子解析を試み、北半球における多包条虫の遺伝子多型研究成果(Nakao M et al, in prep.) と照らし合わせた結果、北アメリカタイプであることが判明した(論文 5)。⑤中国四川

省におけるエキノコックス症患者標本を用いた遺伝子解析から、患者は単包虫症と多包虫症ならびに両疾患の重複症例であり、2005年に四川省から新種記載された *Echinococcus shiquicus* の人症例は見つからなかった(論文6)。⑥ *E. granulosus* G1の検査法の比較解析が試みられた(論文7)。

2) 免疫診断学的研究: 多包虫症のWHO病態分類表に基づく患者特定と抗体応答性についてブラインド評価を試み、旭川医科大学で開発された遺伝子組換え Em18を用いるELISA法が他の遺伝子組み換え抗原を用いるELISA法よりも格段に感度が高いこと、治癒判定基準としても非常に有用であることが報告された(論文8)。遺伝子組換え Em18を用いる迅速キットが開発された(論文9)。

3) 疫学的研究: エキノコックス症伝搬生態学的研究から、チベット高原ならびに新疆ウイグル自治区における流行の深刻さが浮き彫りになってきた(論文10, 11)。

D. E. 考察・結論

人獣共通幼虫症(脳囊虫症、エキノコックス症)に関する分子、遺伝子から流行の現場までを標榜する総合的な研究を展開してきた。感染者の特定、感染地の特定がかなりの精度で実施できる見通しがついてきた。アジアを中心に、テニア症感染の実態が判明し始めており、我々が開発した免疫学的検査法、遺伝子検査法が流行地の特定、感染者の発見、患者特定に非常に大きく役立ってきていると評価できよう。特にエキノコックス症迅速診断キットの開発は治療を要する活性

病巣を有している患者の96%を20分以内に1度の検査でほぼ100%間違いなく確認できることから、病院での外来患者の診断、治癒経過観察のみならず、地域住民検診にも大きく役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nkouawa A et al. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 168-174.
- 2) Sudewi AAR et al. *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia: serology and mtDNA analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 96-98.
- 3) Hüttner M et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 2008; 38: 861-868.
- 4) Moro P et al. Molecular identification of *Echinococcus canadensis* and haplotypes of *E. granulosus* sensu strict (G1) and *E. canadensis* (G6) from Peru. *Parasitol Int* 2009; in press.
- 5) Yamasaki H et al. Genetic analysis of *Echinococcus multilocularis*

- originating from a patient with alveolar echinococcosis occurring in Minnesota in 1977. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 245-247.
- 6) Li TY et al. Species identification of human echinococcosis using histopathology and genotyping in northwestern China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 585-590.
 - 7) Boufana BS et al. Evaluation of three PCR assays for the identification of the sheep strain (Genotype 1) of *Echinococcus granulosus* in canid feces and parasite tissues. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 777-783.
 - 8) Tappe D et al. Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Am J Trop Med Hyg* 2009; in press.
 - 9) Sako Y et al. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 252-254.
 - 10) Craig PS et al. Echinococcoses and Tibetan communities. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1674-1675.
 - 11) Giraudoux P et al. Small mammal assemblages and habitat distribution in the northern Junggar basin, Xinjiang, China: a pilot survey. *Mammalia* 2008; 72: 309-319.
2. 総説発表
- 1) Ito A et al. Molecular and immunological diagnosis of taeniasis and cysticercosis in Asia and the Pacific. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; 39 (Suppl 1): 37-47.
 - 2) 伊藤亮他. エキノコックス症に関する診断法の進展. *日本内科学雑誌* 2008; 97: 1900-1909.
 - 3) Ito A, Takayanagui MO. Immunological and molecular diagnosis. In: *Clinical Cysticercosis, World Federation of Cysticercosis*, in press.
 - 4) Okamoto M, Ito A. Chapter 13. Isolation of nucleic acids from helminthes. In: *Handbook of Nucleic Acid Purification* (ed. by Liu D), Taylor & Francis Group, London, 271-291, 2009.
 - 5) Ito A et al. Taeniasis. In: *Molecular Detection of Foodborne Pathogens* (ed. by Liu D), Taylor & Francis Group, London, in press.
 - 6) Flisser A, Craig PS, Ito A. Cysticercosis and taeniosis: *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. In: *Zoonoses* (eds. by Soulsby EJJ, Torgerson P), Oxford Press, in press.