

菌種の中に区別がつかないものがあった。特に Vp は、選択分離培地にてよく生育する *V. alginolyticus* (Va) と区別がつかなかった。*recA* は、Vc および Vv に関しては比較的独立したグループを作ったが、Vp において変動が大きかった。*atpA* は、Vc, Vp, Vv とともに独立したグループを作り、これを用いて同定用 PCR を構築できることが期待された。

そこで、データベース上の配列を比較しそれぞれに特異的な領域からプライマーを設計した。なお、本 PCR はマルチプレックスが可能となるよう産物のサイズが異なるようにした。上記分離菌株から代表的な株 20 を選択し、*atpA* 遺伝子による PCR を検討した。対照として、上記環境因子の項目で使用した Vc, Vp, Vv 同定用 PCR (それぞれ、*omp#*, *toxR-Vp*, *hly*) を使用した。その結果、全ての株の結果が対照 PCR と一致した。すなわち、各 PCR は Vc, Vp, Vv を特異的に検出した。試験中、Vc の患者由来株に関して Vv 同定用 *hly* プライマーによって非特異的バンドが検出された。(図 3)

【PMA による死菌 PCR の抑制】

PMA 処理により、リアルタイム PCR での検出が生菌と死菌の間で 16-17 サイクル、2 回処理により約 20 サイクル異なった。菌数にして 10^4 、2 回処理の場合は 10^5 に相当した。

D. 考察

Vv, Vp は水温が約 20℃を超えると急激に菌数が増加し始める傾向にあり、逆に 20℃を下回る日が続くと菌数は減少した。Vp は Vv より少し水温が低くても分離される傾向に

あった。Vv 感染症は夏場に集中しており、温暖化により水温が 25℃を超える日が増えると菌数が高い状態が長く続き感染症のリスクは増加すると思われた。Vp による食中毒も同様にリスクの高い期間が温暖化により増加する可能性が考えられた。

Vc が地点 C でのみ高い頻度で分離されたのは、地点 C に隣接する汽水湖が関与している可能性が考えられた。検体が少ないため、Vc 菌数の相関をみるのは今回のデータのみでは不十分であると思われるが、比較的塩分濃度が低い地点 C のデータは水温とともに菌数が増加する傾向にあった。

一般的に、Vv, Vc, Vp 共に汽水域に生息するとされているが、採水時の気象データとの相関を比較すると、3 菌種にはそれぞれ特徴があると思われた。

微生物同定においては 16S rRNA を標的とするのが一般的であるが、ビブリオ属菌ではこれまでに *recA*, *atpA* をベースとした同定法が報告されている。本研究で検討した結果、Vc, Vp, Vv を調査対象とするには *atpA* が最も適切と考えられた。また、今回新たに考案した *atpA* をベースとした PCR 法は従来の同定用 PCR と同等の成績を示した。本 PCR 法はマルチプレックスで行え、非特異的増幅産物も認められていない。環境中には様々な生物が存在するため *atpA* のような house keeping 遺伝子を指標とした方が生物種の調査手段としては適していると考えられる。

PMA 処理はビブリオ属菌に対しても有効であることが示された。今後、上記 PCR 法と組み合わせるなどの活用が期待される

E. 結論

Vc, Vp, Vv とも環境因子によって分布が変化することが示唆された。house keeping 遺伝子の一つ *atpA* の同定マーカーとしての有用性、ならびにビブリオ属菌に対しての PMA 法の有効性が示された。

F. 健康危機情報

温暖化による海水温上昇に関し、Vv および Vp 感染リスクの増加が懸念される。

G. 研究発表

特になし



图 1. 採水地点

表1. 採水調査結果

| 採水日 | 採水場所 | 気温 | 水温 | 透視度 | 塩分濃度(%) | 採水時刻 | V _v (MPN/100ml) | V _v (定性) | V _p (MPN/100ml) | V _p (定性) | V _c (MPN/100ml) | V _c (定性) |
|------------|------|------|------|-----|---------|-------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|
| 2008/4/21 | 地点A | 21.0 | 18.5 | 35 | 29 | 9:52 | <3 | + | <3 | - | | |
| 2008/5/13 | 地点A | 23.5 | 20.5 | 15 | 31 | 14:55 | 7 | | 14 | | | |
| 2008/6/10 | 地点A | 23.5 | 23.0 | 47 | 33 | 14:10 | <3 | - | 38 | | | |
| 2008/7/1 | 地点A | 26.0 | 25.5 | 30 | 15 | 10:15 | 4,300 | | 2,300 | | | |
| 2008/7/15 | 地点A | 32.0 | 31.5 | 40 | 23 | 9:25 | 2,100 | | 150,000 | | | |
| 2008/7/28 | 地点A | 32.3 | 32.5 | 30 | 20 | 9:18 | 150,000 | | 460,000 | | | |
| 2008/8/4 | 地点A | 31.5 | 30.5 | 21 | 28 | 9:41 | 930 | | 2,300 | | | |
| 2008/8/19 | 地点A | 29.0 | 29.5 | 15 | 24 | 9:36 | 1,200 | | 23,000 | | | |
| 2008/9/1 | 地点A | 29.0 | 29.0 | 37 | 28 | 9:57 | 230 | | 2,300 | | <3 | - |
| 2008/9/16 | 地点A | 26.5 | 26.0 | 15 | 9 | 10:46 | 1,200 | | 230 | | 23,000 | |
| 2008/10/6 | 地点A | 22.0 | 24.0 | 36 | 21 | 9:37 | 930 | | 930 | | <3 | - |
| 2008/10/27 | 地点A | 19.5 | 21.5 | 49 | 28 | 9:45 | 7 | | 150 | | <3 | - |
| 2008/11/17 | 地点A | 18 | 18 | 41 | 28 | 13:30 | <3 | - | 23 | | <3 | - |
| 2008/12/8 | 地点A | 8.5 | 10 | >50 | 26 | 10:00 | <3 | - | 7.4 | | <3 | - |
| 2008/12/24 | 地点A | 9 | 12 | >50 | 27 | 10:11 | <3 | - | 3.8 | | <3 | - |
| 2008/4/21 | 地点B | 18.5 | 16.5 | >50 | 32 | 9:08 | <3 | - | <3 | - | | |
| 2008/5/13 | 地点B | 20.5 | 20.0 | 40 | 34 | 14:15 | <3 | - | <3 | - | | |
| 2008/6/10 | 地点B | 24.0 | 22.5 | >50 | 32 | 13:30 | <3 | - | 240 | | | |
| 2008/7/1 | 地点B | 26.8 | 25.5 | 28 | 23 | 9:30 | 2,300 | | 4,300 | | | |
| 2008/7/15 | 地点B | 30.0 | 29.5 | >50 | 29 | 10:04 | 750 | | 23,000 | | | |
| 2008/7/28 | 地点B | 31.5 | 31.5 | >50 | 30 | 10:00 | 230 | | 3,800 | | | |
| 2008/8/4 | 地点B | 31.0 | 27.5 | >50 | 33 | 10:20 | <3 | - | 480 | | | |
| 2008/8/19 | 地点B | 27.5 | 28.0 | >50 | 32 | 10:18 | <3 | - | 240 | | | |
| 2008/9/1 | 地点B | 28.0 | 28.7 | >50 | 30 | 10:37 | 15 | | 460 | | <3 | - |
| 2008/9/16 | 地点B | 26.0 | 26.5 | >50 | 32 | 11:28 | 3 | | 15,000 | | <3 | - |
| 2008/10/6 | 地点B | 22.0 | 23.5 | 34 | 27 | 10:15 | 21 | | 430 | | 3 | |
| 2008/10/27 | 地点B | 19.5 | 21.0 | 40 | 32 | 10:25 | <3 | - | 930 | | <3 | - |
| 2008/11/17 | 地点B | 18 | 19.5 | 40 | 33 | 14:11 | <3 | - | 43 | | <3 | - |
| 2008/12/8 | 地点B | 7.8 | 12 | 22 | 33 | 10:40 | <3 | - | 9.2 | | <3 | - |
| 2008/12/24 | 地点B | 14.5 | 14 | >50 | 32 | 10:56 | <3 | - | <3 | + | <3 | - |
| 2008/4/21 | 地点C | 20.0 | 17.5 | 28 | 31 | 10:20 | <3 | - | <3 | + | | |
| 2008/5/13 | 地点C | 19.0 | 22.0 | 29 | 30 | 15:28 | 15 | | 7 | | | |
| 2008/6/10 | 地点C | 22.0 | 23.5 | 25 | 30 | 14:45 | 75 | | 4,600 | | | |
| 2008/7/1 | 地点C | 28.0 | 27.0 | 11 | 20 | 11:00 | 93,000 | | 9,300 | | | |
| 2008/7/15 | 地点C | 29.3 | 30.0 | >50 | 27 | 8:50 | 21,000 | | 1,100,000 | | | |
| 2008/7/28 | 地点C | 29.8 | 33.0 | 12 | 25 | 8:41 | 240,000 | | >1100000 | | | |
| 2008/8/4 | 地点C | 29.8 | 29.5 | 35 | 29 | 9:10 | 9,300 | | 15,000 | | | |
| 2008/8/19 | 地点C | 29.0 | 29.5 | 30 | 28 | 9:06 | 4,300 | | 23,000 | | | |
| 2008/9/1 | 地点C | 27.8 | 27.0 | >50 | 25 | 8:50 | 4,300 | | 23,000 | | 430 | |
| 2008/9/16 | 地点C | 27.0 | 26.5 | 42 | 19 | 9:50 | 150,000 | | 930,000 | | 93,000 | |
| 2008/10/6 | 地点C | 22.0 | 24.0 | >50 | 26 | 9:05 | 930 | | 93,000 | | 1,500 | |
| 2008/10/27 | 地点C | 20.0 | 22.0 | >50 | 30 | 9:10 | 43 | | 480 | | 150 | |
| 2008/11/17 | 地点C | 17.5 | 18 | 40 | 28 | 9:32 | 15 | | 43 | | 230 | |
| 2008/12/8 | 地点C | 8.5 | 14.5 | 27 | 29 | 9:25 | <3 | - | 43 | | <3 | - |
| 2008/12/24 | 地点C | 7.5 | 12.5 | >50 | 30 | 9:30 | 3 | | 3.6 | | <3 | - |

表2 ピブリオ菌分布と環境因子の相関係数 (*:P<0.05, **:P<0.01, ***:P<0.001)

| | 気温 | 水温 | 透視度 | 塩分濃度 | log(V _v MPN) | log(V _p MPN) | log(V _c MPN) |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 気温 | 1 | | | | | | |
| 水温 | 0.96296 | 1 | | | | | |
| 透視度 | -0.19832 | -0.22538 | 1 | | | | |
| 塩分濃度 | -0.29703 | -0.32558 | 0.31001 | 1 | | | |
| log(V _v MPN) | 0.65720 | 0.72853 | -0.37732 | -0.68883 | 1 | | |
| log(V _p MPN) | 0.72150 | 0.82111 | -0.18788 | -0.44576 | 0.84614 | 1 | |
| log(V _c MPN) | 0.45038 | 0.41618 | -0.22973 | -0.69412 | 0.79975 | 0.59485 | 1 |

(注) 統計数値表編集委員会編：簡約統計数値表より判定

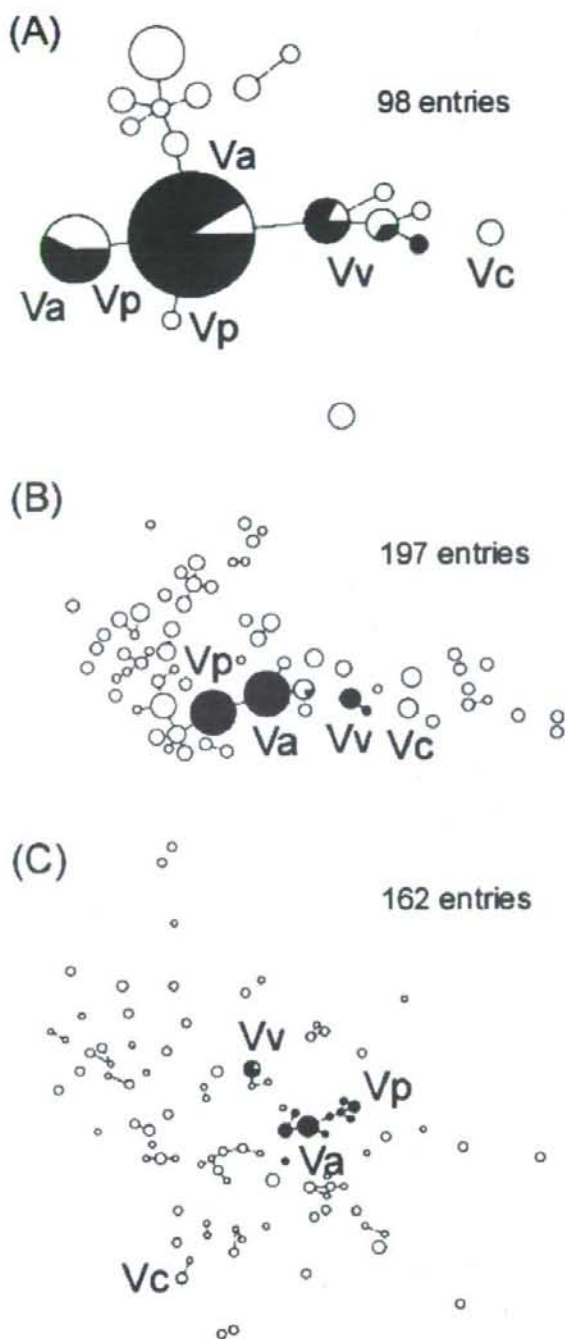


図 2. 試験遺伝子配列に基づく最小全域木。A, 16S rRNA; B, *atp4*; C, *recA*。右に示す数字は解析に使用したエントリー数。

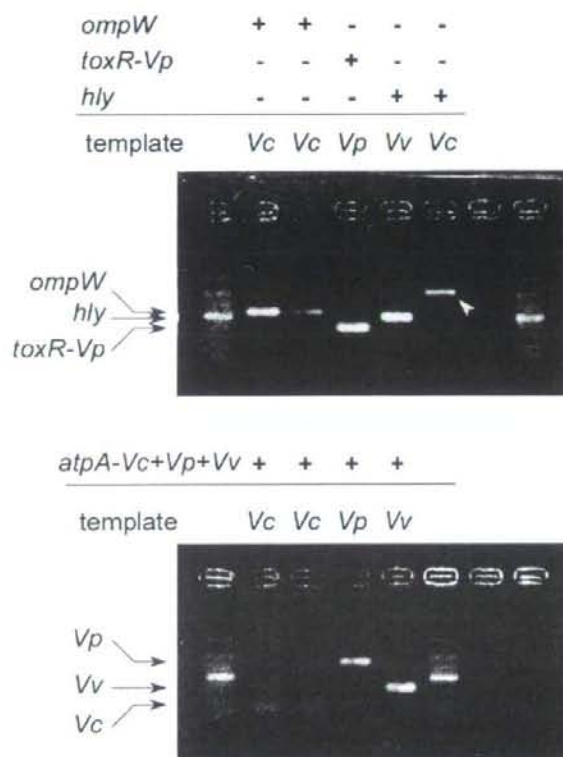


图 3. 同定用 PCR 实施例。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法に関する研究

地球温暖化と寄生虫感染症

| | | |
|-------|--------|-----------------|
| 分担研究者 | 大前 比呂思 | 国立感染症研究所 寄生動物部 |
| 研究協力者 | 杉山 広 | 国立感染症研究所 寄生動物部 |
| | 倉持 利明 | 国立科学博物館 動物研究部 |
| | 當眞 弘 | 琉球大学医学部・地域環境医科学 |

研究要旨 寄生虫症に対する気候変化の影響は、媒介動物によってヒトに感染する寄生虫でより明らかと言われている。現在国内には、マラリア原虫を媒介するハマダラカ (*Anopheles* 属) や日本住血吸虫を媒介する宮入貝 (*Oncomelania hupensis nosopjora*) の生息が確認されており、今後の温暖化に伴う生息数の増加や生息地域の拡大が心配される。また、媒介動物を介したこれらの病原体の生活環は、現在国内では確認されていないので、病原体の国内侵入を阻止するという観点からは、病原体に感染した媒介動物に対する防疫についても考えねばならない。そこで、検疫対象疾患として指定され、航空機等による媒介蚊侵入の可能性も高いマラリアについては、感染蚊からのマラリア原虫検出法の改良に取り組み、日本住血吸虫媒介介については、気候・環境変化と生息状況の関係について調査した。また、わが国の食生活から考えて重要な魚類媒介寄生虫症については、アニサキス症を例として、温暖化やそれに伴う海流変化による、海産魚類寄生虫種の変化について調査した。

ハマダラカからのマラリア原虫検出法改良については、ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子による PCR 法で、*An. dirus* 体内のマラリア原虫スポロゾイトの検出を試みた。新規 PCR 法による結果は、三日熱マラリア、熱帯熱マラリアとも、標準となる CS-ELISA による結果と 90% 程度一致した。また、日本住血吸虫を媒介する淡水性陸生貝 *Oncomelania* 属に関する研究は、熱帯のフィリピンで問題となる *O.h. quadrasi* を研究対象とした。*O.h. quadrasi* の生息には、温度よりも降水量の方が重要で、従来乾燥に弱いとされてきたが、場所によってはかなりの乾燥条件にも耐えることが判明した。また、海産魚類が媒介するアニサキス幼虫の調査では、台湾産タチウオには *Anisakis typica* が優占的に寄生していることが明らかとなった。日本近海で本虫が検出されたとの報告には乏しく、本邦産のサバ由来の虫体についても分子同定を行った結果、北日本には *A. simplex* s. str. が、南日本には *A. pegreffii* が優占的に分布していた。これらの結果から、*Anisakis* I 型幼虫の種 (同胞種)、特に *A. typica* が温暖化による魚類由来感染症の生物指標となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

気候変化と寄生虫症の蔓延については、現在、色々な可能性が指摘されている。寄生虫に限らず、マラリア原虫のように媒介

動物を介してヒトに感染する病原体は、他の動物を介することなく直接ヒトに感染する病原体に比して、総じて気候変化の影響を受けやすいと言われている。また、昆虫

によって媒介される寄生虫だけではなく、淡水産陸生貝によって媒介される住血吸虫も、蚊に媒介されるアルボウイルス群と同じかそれ以上に、気候変化の影響を受けやすいとする報告がある。

現在国内には、マラリア原虫を媒介するハマダラカ (*Anopheles* 属) や日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) を媒介する宮入貝 (*Oncomelania hupensis nosopjora*) の生息が確認されており、今後の気候変動に伴う生息数の増加や生息地域の拡大が懸念される。一方、マラリア原虫や日本住血吸虫は、現在国内で媒介動物を介した生活環は存在せず、輸入例の報告にとどまっているので、病原体の国内侵入をモニタリングするという観点からは、病原体を有した媒介動物に関する適切な検疫についても考えねばならない。そこで、検疫対象疾患に指定され、航空機等による媒介蚊侵入の可能性も高いマラリアについては、マラリア原虫感染蚊からのマラリア原虫検出法の改良に取り組み、日本住血吸虫媒介貝については、気候・環境変化と生息状況の関係について調査することとした。

また、魚類の生食を好むわが国の食習慣を考えると、海産魚類によって媒介される寄生虫と気候変動に関する問題も重要である。海産魚類によって媒介される寄生虫症で、国内で最も報告が多いものの一つにアニサキス症があるが、近年、地球温暖化に伴う海水温の上昇や海流変化による、アニサキス (*Anisakis*) 属の幼虫が寄生できる暖海性魚類の北上化が報告されている。媒介

動物である魚類の分布域が変化、拡大すれば、アニサキス症において病原となりうる虫種の種類や感染者数にも影響を及ぼす可能性が高い。そこで、本研究では暖海性のタチウオを対象に、台湾で *Anisakis* I 型幼虫の検出と分子同定を試みた。

B. 研究方法

三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) と熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) をメンブレンフィーディングにより、感染させた *Anopheles dirus* (実験室にて継代飼育) の乾燥標本をタイの共同研究者より供与された。これらの標本を用いて、ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子を応用した PCR 法によるマラリア原虫スポロゾイト検出結果を CS-ELISA による結果と比較した。なお、CS-ELISA は米国 CDC より供与の *P. vivax*-210, *P. vivax*-247 と *P. falciparum* 特異的キットにより実施された。また、未吸血の *An. dirus* 陰性対照として用いた。

S. japonicum の媒介貝については、フィリピンでの媒介貝である *O. h. quadrasi* にて、生息を左右する気候条件を検討した。特に、1980 年代にフィリピン中部のピサヤ地方で降水量の減少がみられた際の影響について、ボホール島浸淫地の例を解析した。また、*Anisakis* 属幼虫と暖海性魚類への寄生については、台湾台中市の鮮魚店から購入したタチウオで調べた。魚の内臓を肉眼で検索し、検出した虫体は光学顕微鏡下に観察し、形態学的に *Anisakis* I 型と確認さ

れた虫体を選んだ。次に、各虫体に由来する DNA をテンプレートとし、rDNA の ITS 領域を標的とするプライマー・ペアを用いて、当該領域を PCR 増幅した。増幅された産物は制限酵素 *Hinf*I で消化し、得られた切断パターンに基づき D'Amelio ら(2000)の提唱に従って、種 及び 同胞種の同定を試みた (RFLP 解析)。

C. 研究結果

マラリア原虫感染からの原虫検出に関する研究では、Pv-210, Pv-247, Pf 特異 ELISA キットを用いて検討する各グループで 30 匹ずつ、マラリア原虫感染血液を吸血させた蚊を用意した。ELISA で陽性となった蚊の約 90% で、PCR の結果も陽性となった (表 1)。また、非感染蚊で陽性と判断された例は、ELISA 及び PCR 法の両方で 1 例もみられなかった。

従来、フィリピンにおける日本住血吸虫媒介員の生息と気候・環境変化に関する研究では、*O.h.quadrasi* は、月別降水量が常に 100mm/月以上で、明らかな乾季がない地域を好んで生息するとされてきた。しかし、最近ネグロス島で見つかった生息地には、明らかな乾季がある。また、1980 年代にボホール島では 4 ヶ月の総計降水量が、100mm 以下になるような降水量の極端な減少がみられたが、1987 年を除き、住血吸虫の感染率は低下しなかった (表 2)。

アニサキス症に関する調査では、台湾産タチウオ (7 尾) を検索したところ、6 尾にアニサキス幼虫の寄生を認め、総計 110 匹

の虫体を検出した。そこで、総ての虫体について虫種の分子同定を試みた結果、93 匹 (85%) は *A. typica*、15 匹は (13%) は *A. pegreffii*、2 匹は *A. simplex* s. str. (2%) と同定された (表 3)。これより、台湾産タチウオには *A. typica* が優占的に寄生していることが明らかとなった。

D. 考察

マラリア原虫感染を蚊で、確認する場合、ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子による PCR 法の結果は、CS-ELISA 法による結果と 90% 程度一致した。ただ、熱帯熱マラリア原虫感染血液を吸血させた蚊 30 匹からの検出は、PCR 法で 16 例、ELISA でも 18 例にとどまったが、これは、メンブレンフィーディングにより感染させた際の効率が悪かった可能性もある。

日本住血吸虫の媒介員の生息条件は、温帯では気温、熱帯では降水量が重要であるとの報告がみられるが、フィリピン、ボホール島、ネグロス島の *O.h.quadrasi* は、かなりの乾燥条件にも耐ええることがわかった。結果として、従来考えられてきたよりも、*O.h.quadrasi* は乾燥条件に強い、或いは、中国の浸淫地でみられるように、各々の浸淫地の気候・環境条件にあわせて、媒介員が生物学的に適応しているといった可能性が示唆される。

海産魚類を対象とした研究では、今回、台湾産タチウオに *A. typica* が相当数寄生している事を認めたが、日本国内で本虫が検出されたとの報告は乏しい。日本産サバでの調査では、*A. pegreffii*、*A. simplex* s. str. が検出され、九州では、*A. pegreffii*

の比率が高い。今回の調査で、暖海性魚類のタチウオの北上を観察するには、*A. typica*を生物指標とすることが有効であると考えられ、魚に寄生する*Anisakis*属幼虫の種（同胞種）の違いが、温暖化・海流変化などの指標になる可能性が示された。

E. 結論

ミトコンドリア・チトクローム *b* によるPCR法で、*An. dirus*体内のマラリア原虫スポロゾイトを検出した結果は、三日熱マラリア、熱帯熱マラリアとも、CS-ELISAによる結果と90%程度一致した。今後、マラリア原虫感染蚊を検出・モニタリングする実用的技術として期待できる。

フィリピン国内で、日本住血吸虫を媒介している*O. h. quadrasi*は、従来乾燥に弱いとされてきたが、場所によってはかなりの乾燥条件にも耐えることが判明した。また、海産魚類が媒介するアニサキス幼虫の調査では、台湾産タチウオには、*A. typica*が優占的に寄生していることが明らかとなった。日本近海で本虫が検出されたとの報告には乏しく、*A. typica*が温暖化による魚類由来感染症の生物指標となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

(1) Izumiya S, Omura M, Takasaki

T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol* 121(2):144-150, 2009.

(2) 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)

(3) 大前比呂思, 石川洋文. 気候変動と寄生虫症 資源環境対策 44(9):29-38, 2008.

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) 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.

- (3) 大前比呂思, 千種雄一, 松田肇, 桐木雅史, 朝日博子, Sinuon M, Socheat D.
東南アジアにおける住血吸虫症の拡がり
と気候変化について
第 68 回日本寄生虫学会・東日本支部
大会 浜松, 2008.10.4.
- (4) 梅原 梓里, 杉山広, 森嶋康之, 山崎
浩, 大前比呂思, 荒木潤, 川上泰, 黄
鴻堅, 内田明彦. 台湾でタチウオから
検出されたアニサキス幼虫の分子同定

第 78 回日本寄生虫学会大会 東京,
2009. 3. 28-29.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

表1 ミトコンドリア・チトクローム *b* を利用した PCR 法による
Anopheles dirus からのマラリア原虫スポロゾイトの検出

| | 三日熱マラリア | | 熱帯熱マラリア | |
|-----------------|-------------|-----|---------|-----|
| | Pv-210ELISA | PCR | PfELISA | PCR |
| 三日熱マラリア原虫吸血蚊 | 30 | 27 | 0 | 0 |
| 熱帯熱マラリア原虫吸血蚊 | 0 | 0 | 18 | 16 |
| マラリア原虫非吸血蚊 (対照) | 0 | 0 | 0 | 0 |

表2 フィリピン、ボホール島における 1980 年代の降水量の減少と
住民の日本住血吸虫感染率の推移

| | 降水量の変化 (mm) | | | | | 住民の感染率 (%) |
|------|-------------|-------|-------|-------|--------|------------|
| | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 4ヶ月の総計 | |
| 1981 | 60.5 | 71.4 | 15.9 | 134.6 | 282.0 | 4.7 |
| 1982 | 106.5 | 263.5 | 28.0 | 136.4 | 534.0 | 1.9 |
| 1983 | 9.3 | 5.3 | 10.2 | 2.3 | 27.0 | 1.8 |
| 1984 | 181.9 | 61.2 | 77.7 | 35.0 | 355.0 | 4.2 |
| 1985 | 66.1 | 30.5 | 160.1 | 72.0 | 328.0 | 1.2 |
| 1986 | 62.6 | 125.6 | 84.2 | 209.0 | 482.0 | 2.6 |
| 1987 | 76.5 | 15.6 | 2.5 | 8.4 | 99.0 | 1.6 |
| 1988 | 103.2 | 124.3 | 92.1 | 184.5 | 414.1 | 1.5 |

表3 台湾のタチウオからの *Anisakis* I型幼虫の検出状況

| 検査尾数 | 陽性尾数 | <i>Anisakis</i> I型幼虫の検出虫体数 | | | |
|------|------|----------------------------|---------------------|---------------------------|-----|
| | | <i>A. typica</i> | <i>A. pegreffii</i> | <i>A. simplex</i> s. str. | 総数 |
| 7 | 6 | 93 | 15 | 2 | 110 |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

わが国におけるヒストプラズマ症の疫学ならびに迅速診断法の研究

分担研究者 宮崎義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）
研究協力者 大野秀明（国立感染症研究所 生物活性物質部）
荒川宜親（国立感染症研究所 感染病理部）
佐多徹太郎（国立感染症研究所 細菌第2部） 1

研究要旨 ヒストプラズマ症はヒストプラズマ属菌による深在性真菌症の一つであり、わが国では輸入真菌症として取り扱われている。一方、わが国でヒストプラズマ症が疑われた患者の約 15%では明らかな海外渡航歴がないなど、わが国に土着するヒストプラズマ属菌の存在が疑われている。さらに、ヒストプラズマ症では慢性肉芽腫性疾患や肺線維症、他の酵母様真菌感染症と診断されている場合があり、診断が困難な感染症でもある。このような背景のもと、われわれは地球温暖化に伴い、今後わが国でも発生頻度の上昇が懸念される真菌症、とくにヒストプラズマ症について、わが国での実態、疫学的調査ならびに迅速診断法の確立にむけた検討を行うこととした。その結果、われわれが検討した nested PCR 法は感度、特異度とも臨床応用可能なレベルであると判断された。実際に依頼のあった臨床検体について PCR 法による *H. capsulatum* の検出を試みた結果、生検組織のみでなく血清からも *H. capsulatum* 遺伝子が検出され、診断の一助となることが示された。さらに、わが国の環境からの *H. capsulatum* 分離について検討を行ない、今回は分離できなかったが引き続きモニタリングを行っている。

A. 研究目的

ヒストプラズマ症 (histoplasmosis) はヒストプラズマ属菌による深在性真菌症の一つであり、ヒストプラズマ属菌は健康者に播種性感染症を起こす病原性の強い真菌であることが知られている。ヒストプラズマ症はわが国では輸入真菌症 (imported mycosis) の一つとされており、米国ミシシッピ川流域、オハイオや中南米、東南アジア、オセアニア、アフリカ中部など比較

的温暖な地域が主な流行地域である。一方、わが国でヒストプラズマ症と診断あるいは疑われた患者は中南米や北米、東南アジアで感染したと考えられる例が多数であるが、約 15%では明らかな海外渡航歴がないなど、わが国に土着するヒストプラズマ属菌の存在が示唆される。このように日本におけるヒストプラズマ属菌ならびに患者の疫学等に関しては解明されていない部分が多い。

さらにヒストプラズマ症では、臨床徴候に特長が乏しく、わが国では肺結核やサルコイドーシスなどの慢性肉芽腫性疾患や肺線維症、酵母様真菌感染症と診断されている例も散見され、診断の遅れなどから死亡例も報告されている。また、ヒストプラズマ属菌の人工培地での発育は緩徐で、コロニー形成が観察されるまで通常数週間を要するなど診断に際して困難な要因も加わっている。

このような背景のもと、われわれは地球温暖化に伴い、今後わが国でも発生頻度の上昇が懸念される真菌症、とくにヒストプラズマ症について、わが国での実態、疫学的調査ならびに迅速診断法の確立にむけた検討を行うこととした。

B. 研究方法

1. PCR法を用いた *Histoplasma capsulatum* 遺伝子の検出系作成。現在までに PCR法を用いた *H. capsulatum* 遺伝子の検出の標的遺伝子として 18S rRNA 遺伝子や M antigen 遺伝子などを目的とした方法が報告されている。このなかでも M antigen 遺伝子を標的としたものはヒストプラズマ特異的とされ、これを用いた nested PCR法の系を検討した。

First PCRとして用いた primerの塩基配列は、Msp1F: 5'-acaagagacgacggttagcttcacg-3'、Msp2R: 5'-accgagcgccataaggacgtc-3'であり、アニーリング温度 60°C、サイクル数 40にて反応を行った。次に nested PCRとして、first PCRの反応液 10 µlを供し、Msp2F: 5'-cgggcccgcgttaacagcggc-3'、Msp3R: 5'-ataaggacgacacgaaggc-3'を用いて上記と同様の条件で増幅を行った。なお増幅産物については、direct sequence法

により 2本鎖両方について塩基配列を確認した。

2. PCR法のヒストプラズマ症診断における有用性、臨床的な応用を考慮し喀痰、生検組織、血清などの臨床検体を用いた PCR法の系を検討した。喀痰の処理は NALC-NaOHで前処理を行い、proteinase K処理、フェノール・クロロフォルム法にて PCR供試検体とした。生検組織は無菌的にホモジナイズした後、DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN)を用いて処理し PCR用サンプルを調整した。

さらに、播種性ヒストプラズマ症の早期診断を考慮し、血液中のヒストプラズマを検出する系を検討した。この方法では血清を等量の lysis bufferと混和した後、proteinase K、β-glucanase処理を行いその一部を PCR法に供した。

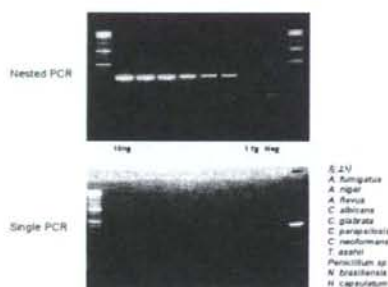
3. エアースAMPLING法による空中浮遊真菌検出の検討。PBI international社製の SASスーパー100エアースAMPLERを用いて、1地点あたり 200L、50Lの2点法で大気中空中浮遊真菌の検出の検討を行った。真菌用培地は potato dextrose agarを使用し、90 mmシャーレで作製した寒天平板培地を直接エアースAMPLERに装着し、吸入した大気中の塵芥が直接培地に接種される方法で行った。環境中の *H. capsulatum* 検出検討の一環として山間部の比較的湿潤な環境からのエアースAMPLING法による浮遊真菌の分離・培養について検討した。

C. 研究結果

1. PCR法を用いた *Histoplasma capsulatum*

遺伝子の検出。保存してあった *H. capsulatum* genome DNA を用いた検討で、first PCR 法により 318 bp の増幅産物が得られ、nested PCR 法では 269 bp の増幅産物が得られた。Nested PCR 法の検出感度としては genome DNA 量にして 1 fg が検出でき、また主要な真菌に対して nested PCR 法を行った結果、今回用いた primer は *H. capsulatum* のみを増幅することが確認された (図 1)。

図 1 *H. capsulatum* 検出 PCR 法



2. PCR 法のヒストプラズマ症診断における有用性。診断目的で依頼のあったヒストプラズマ症疑いの 3 症例について検討した。そのうち 1 例では生検組織と血清、残る 2 例では血清のみが検体として送付されてきた。

生検組織については GMS 染色にて酵母様微生物が確認されており、また 3 例の血清検体については ELISA 法を用いた抗ヒストプラズマ抗体 (Histoplasma DxSelect™; Focus diagnosis 社) 測定にて陽性が確認された。これらの検体を前述のとおり処理を行

い PCR を行った結果、1 例の生検組織と血清で目的とする 269 bp の増幅産物が確認された (図 2)。さらに、増幅産物の塩基配列を確認し BLAST search を行ったところ *H. capsulatum* の塩基配列とほぼ 100% 一致していた。

図 2 PCR 法による *H. capsulatum* 遺伝子の検出。



(M antigen 遺伝子を標的とした nested PCR を行い、269bp の増幅産物が得られた。Lane 1: 100 bp ladder, 2: 生検組織 (抗ヒストプラズマ抗体陽性)、3: 血清 (lane 2 と同一者)、4: 血清 (非感染性疾病: 抗ヒストプラズマ抗体陰性)、5: *H. capsulatum* コントロール DNA、6: 陰性コントロール。

Lane 2、3 の増幅産物の塩基配列は *H. capsulatum* とほぼ 100% 一致していた。)

3. エアースAMPLING 法による空中浮遊真菌検出の検討。今回の検討箇所では大気 200L サンプルングの浮遊真菌数は 45~65 個、50L サンプルングでは 10~29 個が認め

られた。検出菌種としてはアスペルギルス属菌、ペニシリウム属菌が主体であり、ヒストプラズマ属菌の検出は認めなかった。

D. 考察

ヒストプラズマ症の流行地域は世界的に広く分布し、輸入真菌症のなかではもっとも広範囲に生息する原因真菌である。ヒストプラズマ症の原因菌として *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*、*H. capsulatum* var. *duboisii*、*H. farciminosum* があり、このなかでもわが国で認められるヒストプラズマ症では *H. capsulatum* var. *capsulatum* によるものが大部分とされる。ヒストプラズマ属菌は自然環境内では菌糸形、感染宿主内では酵母形を示す二形性真菌 (dimorphic fungus) であり、細胞内寄生菌である。ヒストプラズマ属菌は一般的に土壤中に生息しており、コウモリや鳥の糞などで活発に発育し、そこから空气中に散布された胞子を吸入することで経気道的にヒトに感染すると考えられている。このため、汚染地域での集団感染もしばしば報告されている。

わが国でのヒストプラズマ症を含めた輸入真菌症患者数の推移をみると、ヒストプラズマ症とコクシジオイデス症と診断されるものが1980年代後半から急激に増加しているのがうかがわれるが、これはちょうど海外旅行者が急激に増加した時期と同じである。このようにヒストプラズマ症はコクシジオイデス症とならんでわが国では極めて重要な輸入真菌症であるといえる。一方、わが国の土壤等からヒストプラズマ属菌が分離された報告は未だないが、本症と診断された症例には海外渡航歴のない例も

散見されるためその存在が以前から疑われている。地球温暖化とこのようなヒストプラズマ症の背景を考え合わせた場合、今後流行地域の拡大に伴う日本人旅行者のヒストプラズマ症患者の増加や、わが国におけるヒストプラズマ症の国内感染事例の増加が懸念される。

この様な状況に対処するため本研究では、1) ヒストプラズマ症の感染源の追求をはじめとする疫学的研究、2) ヒストプラズマ症の迅速診断法の研究、を大きな柱にして行ってきた。

ヒストプラズマ症の迅速診断法としては抗原検出法やPCR法が有用とされるが、抗原検出法では他の真菌との交叉反応が問題となっている。このため、今回迅速診断法としてPCR法について検討した。われわれの用いたPCR法では特異度は他の真菌と交叉しないことが確認され、一方感度についてはnested PCR法とすることでDNA量にして1 fgの微量な量まで検出できることが確認された。また今回、PCR法の有用性を実際にヒストプラズマ症が疑われた症例について検討することが可能であった。結果としては抗ヒストプラズマ抗体陽性3例を対象としたが、1例については生検組織と血清から *H. capsulatum* DNA が検出できた。これは診断的には播種性ヒストプラズマ症であることが疑われ、臨床側に速やかにこの情報をフィードバックできた結果となり、迅速診断法としての有用性が伺われた。また、他の2例については血清のみ検討でき結果が陰性であったことは、いわゆる急性肺ヒストプラズマ症の可能性が高いが、発病直後の検体ではなかったため今回はこれ以上の考察の域を出ない。なお、

培養法にて陽性検体がなかったことについては血清ならびに生検組織がすでに冷凍保存されたものであったことが大きく影響を与えているものと推測される。

さらに今回エアースAMPLING法での空中浮遊真菌の検討を行い、その結果環境からの真菌の感染経路の推定に有用であることが伺われた。また、今回の検討箇所ではヒストプラズマ属菌は検出されなかったが、今後の課題としてヒストプラズマ属菌の好定着箇所や他の真菌との成長速度の違いからみられる偽陰性の問題など解決しなければならない問題点がある。今後さらに調査を進め、わが国でのヒストプラズマ症の実態を解明できればと考えている。

E. 結論

地球温暖化により問題となる真菌症と考えられるヒストプラズマ症について疫学的検討ならびに迅速診断法の開発について検討した。その結果、*H. capsulatum* を特異的に検出可能な nested PCR 法を開発し、この PCR 系を臨床的にヒストプラズマ症が疑われる症例に応用した結果、血清中の *H. capsulatum* も検出できるなどその有用性が伺われた。また、わが国の環境中から浮遊真菌として *H. capsulatum* の検出についても検討を継続している。

F. 健康危険情報

東南アジア旅行中に *H. capsulatum* に感染したと思われる日本人旅行者 3 名

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K,

Yanagihara K, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in comparison with amphotericin B, liposomal amphotericin B, and micafungin against murine pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52(5):1868-70. 2008

- 2) Ohno H, Matsuo N, Suyama N, Nagayoshi Y, Kohara N, Kazumi Y, Miyazaki Y, Kohno S. The first surgical treatment case of pulmonary *Mycobacterium mageritense* infection in Japan. *Inter Med* 47: 2187-2190, 2008.

2. 学会発表

- 1) 宮崎義継. 日米ガイドラインからみた重症感染症戦略-真菌症-. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸)
- 2) 宮崎義継. 多様な深在性真菌感染症の現況. 衛生微生物技術協議会 第 29 回研究会 (東京)
- 3) 山越 智、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継 SST-REX 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定. 第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス、金沢、2008.
- 4) 山越 智、橋本ゆき、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継. シグナルシーケンストラップ法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定. 第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
- 5) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野 茂、宮崎義継. *Candida albicans* の biofilm に対するミカファンジンとポリコナゾール、アンフォテリシン B との併用効果. 第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、

2008.

- 6) 大川原明子、山越 智、橋本ゆき、
大野秀明、新見昌一、宮崎義継。
C. albicans 細胞壁表層のマンナン構造
の違いによる初期免疫応答の解析。
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、
2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究

気候変動とバングラデシュにおける下痢症

分担研究者 我妻ゆき子 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授

研究要旨

目的：本研究では、アジアにおける温暖化影響評価と予測のための疫学的・統計学的解析法の開発、温暖化研究ネットワーク構築と、影響解析手法の技術移転を目的とする。

研究方法：バングラデシュにある国際下痢症研究センターと共同研究協定を締結し、下痢症発生データに関して共同研究利用承認を得た。気象データベースに関しては、バングラデッシュ気象局と京都大学防災研究所の協力を得て研究利用可能とした。異常気象現象、特に降雨や温度の変動に関して下痢症発生の時系列分析を行った。

結果：下痢症患者の発生数の20年間値からの変異には2つのピークがあり、はじめのピークは4月から5月にかけてで、2つ目のものは8月から10月にかけてであった。はじめのピークは1ヶ月のラグをもって気温上昇変動と相関し、2つ目のピークについては、ラグをもち、同期間、特に雨季の後期に降った降雨量と関連していた。コレラに関する分析では、多雨と少雨の両方ある閾値をもって発生が増加した。水位に関しては特定のパターンを示さなかった。

まとめ：気象因子の変異は、病原細菌の増殖や人への暴露の変動を伴って、これらの現象を起こしているものと考えられる。疾病発生や病原細菌等の増殖に関わる因子について、気候変動との関連を明らかにする更なる研究が必要とされる。

A. 研究目的

ペルーにおける研究では、1997-98 EL Nino event は通常の季節変動に伴う気温の変化から予測された数をはるかに上回る患者発生数が報告された。これまでバングラデッシュでは、コレラの発生とベンガル湾の海水温の上昇などについて、特定の数年間についての研究は報告されてきたが、地上気象因子の変動との長期的関連をみる研究は少なかった。

本研究では、アジアにおける温暖化影響評価と予測のための疫学的・統計学的解析法の開発、温暖化研究ネットワーク構築と、影響解析手法の技術移転を目的とする。はじめに、バングラデッシュにおける地上気象因子が下痢疾患発生数に及ぼす影響について、気象データベースと疾病発生データベースを作成し、過去20年間にわたる量的エビデンスを計測することから開始した。

B. 研究方法

バングラデシュにある国際下痢症研究センタ

ーと共同研究協定を締結し、下痢症発生データに関して共同研究承認を得た。気象データベースに関しては、バングラデッシュ気象局と京都大学防災研究所の協力を得て研究利用可能とした。異常気象現象、特に降雨や温度の変動に関して下痢症発生の時系列分析を行った。

（倫理面への配慮）

国際下痢症研究センター（ICDDR, B）の研究審査委員会及び倫理委員会に研究プロトコールを提出し、承認を受けた。

C. 研究結果

下痢症患者の発生数の20年間値からの変異には2つのピークがあり、はじめのピークは4月から5月にかけてで、2つ目のものは8月から10月にかけてであった。はじめのピークは1ヶ月のラグをもって気温上昇変動と相関するとともに、先行する冬の寒さにも関連していた（1°Cごとに16%の疾病発生数の上昇）。2つ目のピークについては、ラグをもち、同期間、特に雨季の後期

に降った降雨量と関連していた（110mm/moごとに30%の疾病発生数の上昇）。

コレラ患者のみを分析した結果、平均雨量が45mmの閾値から、10mm増加するごとに患者数は14%（95%信頼区間：10.1%–18.9%）増加した。また、閾値以下の雨量においても、10mm減少するごとに24%（95%信頼区間：10.7%–38.6%）増加した。

D. 考察

下痢症発生と気象因子の時系列分析によって、その関連性のパターンを同定することができた。また、その影響は、温度や雨量など、気象因子の絶対量と、その変動の両方に影響され、特にある閾値以上、もしくは以下では、下痢症患者数の増減の程度を数量化することが可能であった。水位のデータをモデル中に組み入れた後も、大きく雨量と下痢症発生の関係を変えることはなかった。これは、水位の上昇という現象は、降雨が特定以上となるあるパスウェイを示しているにすぎないことを示唆していると考えられる。しかし、引き続き水位データについては検証を続けることとした。

季節変動や年々変動にみられる変異は、病原細菌側の因子と、ヒト側の因子、たとえば発病率や重症化因子を考慮に入れなければならない。現在の疾患サーベイランス手法（医療施設による systematic sampling）での発生度測定精度を上げるための、妥当性検定のための医療施設における疾患モニタリングと、地域罹患データの住民番号によるリンクの構築の必要性について、共同研究機関と調整を行っている。これによって、アジアレベルでの標準化感染症サーベイランス手法についての改良と提案を行って行く予定である。

大洪水の前後のコレラとコレラ以外の下痢症患者数の分析では、大洪水が特に影響を及ぼしたのは、圧倒的に低所得者層であった。水系感染においては、飲料水ソースや社会経済指標もモデルに組み入れて、地球温暖化インパクト測定モデルの改善を図る必要があると思われる。

E. 結論

気象因子の変異は、病原細菌の増殖や人への暴露の変動を伴って、これらの現象を起こしているものと考えられる。病原細菌等の増殖因子について、気候変動との関連の明らかにするさらなる研究が必要とされる。気候変動は、食糧生産に大きな影響を与え、熱帯アジアの途上国においては、食糧セキュリティを低下させることが報告されている。このことは、すでに低栄養児の多い開発途上国において、一層問題を深刻にしている。この低栄養と感染症重症化の悪循環に対する地球温暖化影響インパクトに関して、今後ともモニタリングしてゆく必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashizume M, Armstrong B, Hajat S, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Sack DA. The effect of rainfall on the incidence of cholera in Bangladesh. *Epidemiology*. 2008 Jan;19(1):103-10.

Hashizume M, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Hunter PR, Armstrong B, Sack DA. Factors determining vulnerability to diarrhoea during and after severe floods in Bangladesh. *J Water Health*. 2008 Sep;6(3):323-32.

2. 学会発表

Wagatsuma Y, Terao T, Hayashi T, Faruque ASG., Sack DA. Influence of Local and Global Climatic Changes on Diarrhea Diseases in Bangladesh. US-Japan Viral Disease Panel Satellite Symposium, Nagasaki, Japan, 26 May 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
該当せず。