

とした。最終的に陽性が確認されたそれぞれの陽性本数を最確数表に当てはめてMPN値を算出した。分離した菌株は各検体より2株ずつ保存し、分離したVp、Vcについては病原因子 *tdh*、*trh*、*ct* の遺伝子の有無を TaKaRa Primer Set (VPD-1 & 2、VPR-1 & 2、VCT-1 & 2) を用いPCRで確認した。

【*atpA* 遺伝子によるビブリオ属菌分類】

昨年度の研究からビブリオ属菌の分類に有用と思われる house keeping 遺伝子として *atpA* が挙げられた。選択培地上に生育したコロニーからDNAを調製し、*atpA* 遺伝子をPCRで増幅し、塩基配列を決定、そのデータベースを構築した。菌株によっては16S rRNA 遺伝子も同様に塩基配列を決定した。

得られたデータベースからVc、Vp、Vvに特異的と推定されるプライマーを設計し、これらの菌株DNAを試験し、プライマーの有用性を検討した。また、Vc、Vp、Vvに特異的と推定されるプローブを作成し、リアルタイムPCRの検討も行った。

C. 研究結果

【ビブリオ属菌と環境因子】

図2に環境要因とMPN法で推定される各ビブリオ属菌の菌量の変化を示す。また、図3に塩分濃度と水温の分布、および100/100ml以上の値を示した際の条件をプロットしたものを示す。各菌種が分離されやすくなる条件は、Vpが水温の上昇に、Vcは塩分濃度の低下に、特に影響され、Vvはその中間の様相を呈した。水温変化は季節的な要因によると考えられる。一方、塩分濃度は、採水地点の近辺の降水量データを調べると、図2のよう

に、降水量の多い日と関連性があることが示唆された。

今回分離されたVp、Vcに病原因子を保有する株は無かった。

【*atpA* 遺伝子によるビブリオ属菌分類】

NCBI等の公共データベース、ならびに昨年度から収集した海水からの分離株を併せて、約30菌種、300株からなる*atpA* 遺伝子の塩基配列データベースを構築した。図4にはその配列に基づいた最小全域木を示す。Vc、Vv、Vp以外にも*V. alginolyticus*、*V. harveyi*などが独立したグループを形成することがわかった。また、同じ菌種内でも多少のバリエーションが観察された。

昨年度設計したVc、Vv、Vp鑑別様プライマーを用いて、分離菌株DNAを鋳型にPCRを行いその有用性を検討した。途中プライマーの再設計を伴ったが、Vc3株、Vv約40株、Vp約100株を試験した結果、いずれも特異的に検出された。

上記プライマーおよび新しく設計したプローブを用いてリアルタイムPCRの系を検討した。海水100mlをAPWで増菌後、その1mlからDNAを調製し、そこに含まれる各菌種のDNA量を定量した。その結果、Vpはほぼ全ての海水サンプルにおいて、Vc、VvはMPN法で多く検出されたサンプルにおいて、それぞれ検出された(図5)。

D. 考察

Vv、Vpは水温が約20°C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°Cを下回る日が続くと菌数は減少した。VvはVpより高い温度、低い塩分濃度の範囲で分離さ

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 の分離は塩分濃度の影響を大きく受けていると考えられた。塩分濃度の低下は降水量に関連すると推測されるが、より多くのデータが必要であろう。

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。気温、水温などは季節的な長期変動に、塩分濃度と関連すると思われる降水量は一時的な変動にリンクすると考えられる。

atpA をベースとした PCR 法の有用性を検討した結果、Vc、Vp、Vv の鑑別に有用であることが示唆された。さらにプローブを組み合わせたりリアルタイム PCR の系では、各海水サンプルの増菌後の菌量を定量することができた。増菌ステップを経ているため最終的な結果としては定性試験であるものの、今後、本方法によって *atpA* による試験法の応用性を高めることが期待される。

上記 PCR 法などに活用するため、分離菌株の *atpA* 塩基配列のデータベースを作製した。データベースから各菌種間で独立したグループが形成されることが明らかになった。一方、菌種内で多少のバリエーションも観察された。今後、さらにデータベースを拡充することで Vc、Vp、Vv 各菌株の傾向について何らかの情報が得られることが期待される。

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、応用性が示された。

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

S. Yamamoto, H. Izumiya, M. Morita, E. Arakawa, and H. Watanabe: Application of lambda Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene*. 438, 57-64, 2009.

H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. *J. Med. Microbiol.* 58 (11), 1486-1491, 2009.

T. Morita-Ishihara, J. Terajima, H. Watanabe, and H. Izumiya: Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 351-355, 2009.

塩分濃度(%)

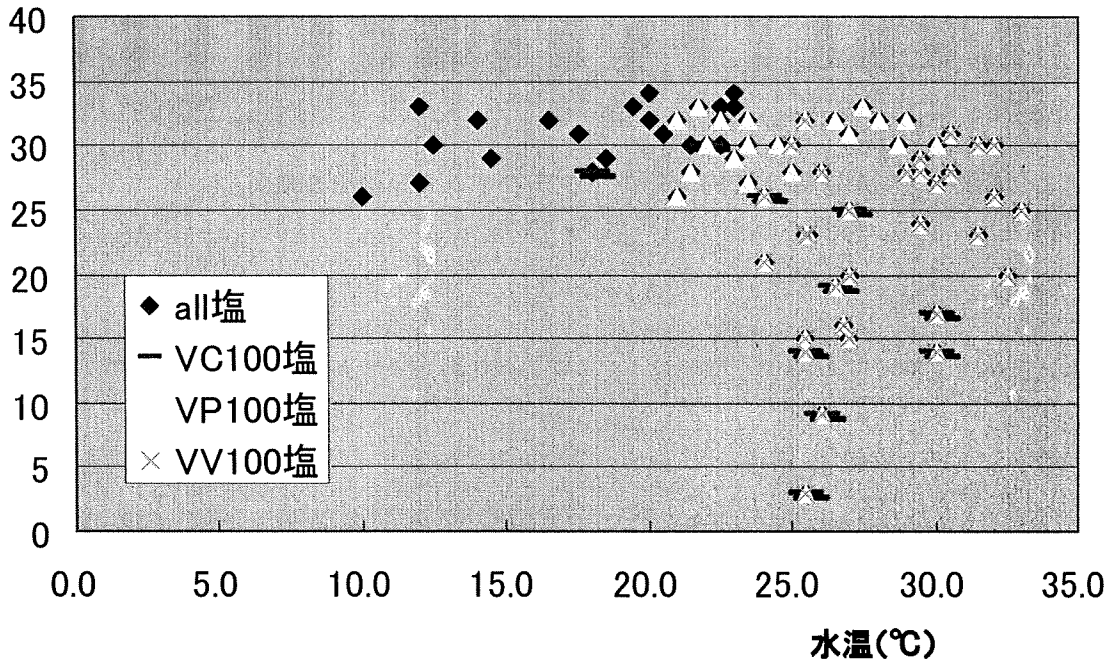


図3. 採水地点の水温(横軸)と塩分濃度(縦軸)の分布。Vc, Vp, Vvそれぞれについて100/100ml以上の菌が検出された条件について重ねて表してある。

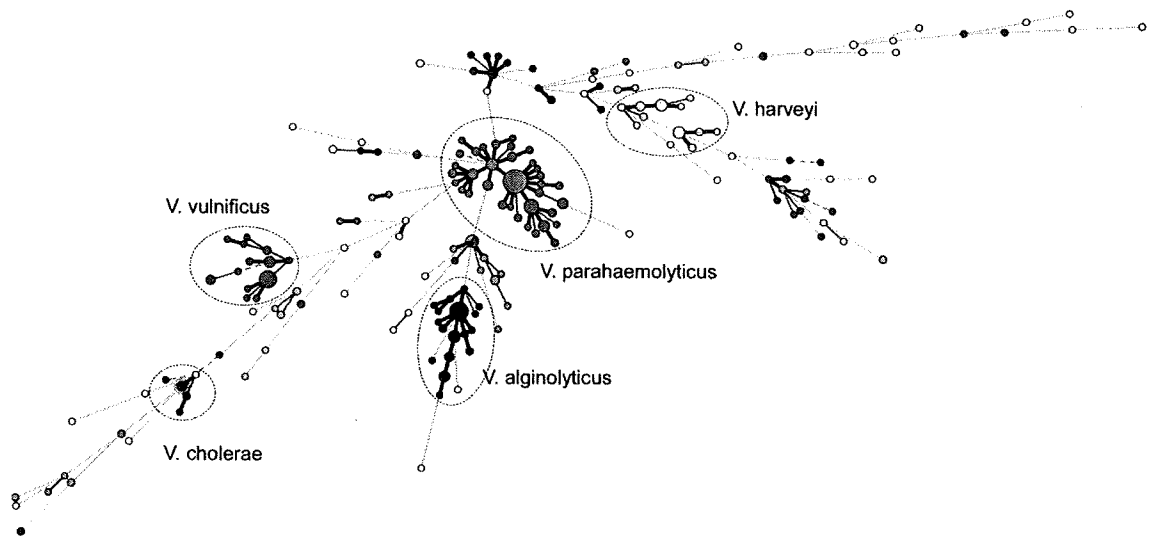


図4. *atpA* 遺伝子塩基配列に基づくビブリオ属菌の最小全域木 (minimal spanning tree)。

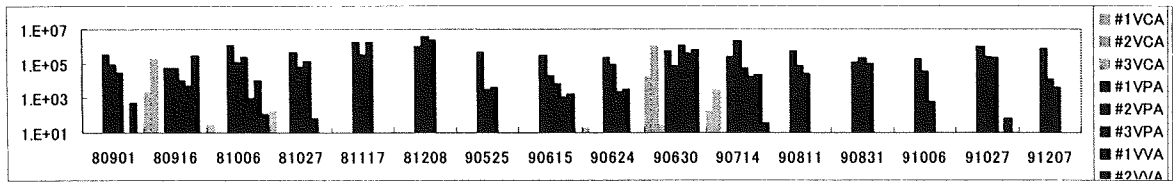


図 5. 増菌サンプルを用いた Vc, Vp, Vv リアルタイム PCR 検出の検討。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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

研究分担者	大前 比呂思	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	山崎 浩	国立感染症研究所 寄生動物部
	杉山 広	国立感染症研究所 寄生動物部
	石川 洋文	岡山大学大学院・環境学研究科・環境数理科学
	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・環境変化の影響は、媒介動物によってヒトに感染する寄生虫でより顕著に現れる。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は重要だが、日本周辺の海域が世界的にみても海水温上昇が目立つ地域であるにも関わらず、今まで温暖化に伴う海産魚類の寄生虫種の変化は、殆ど研究の対象になってこなかった。海産魚の生食に起因する寄生虫症の中で、最も国内での報告が多いアニサキス症については、昨年度に続いて、暖海性のタチウオとキンメダイを対象に、アニサキス属（*Anisakis* I, II型）幼虫の検出と分子同定を試みた。九州で水揚げされたサバとタチウオでは、*A. pegreffii*が中心で、魚種による違いはみられなかった。昨年度台湾で水揚げされたタチウオによる調査では、寄生種は *A. typica*が中心で、タチウオやサバに寄生するアニサキス属幼虫の種が、温暖化や海水温・潮流の変化と、関係している可能性が示唆された。また、静岡で水揚げされたキンメダイでは、*Anisakis* II型幼虫が多く検出され、他の魚種とは全く異なった結果となった。さらに本年度は、1994年に静岡県で集団発生したあと、北関東や東北地方でも報告され、温暖化による発生拡大が疑われる複殖門条虫症も、研究対象に加えた。ヒトとミンククジラ類では、複殖門条虫の成虫寄生が知られているが、ヒトへの感染型となる幼虫と、感染源となる中間宿主の魚種は未だ不明である。複殖門条虫症患者の魚摂取歴やミンククジラの食性などから、感染源としてはイワシ類が推定されるが、複殖門条虫の同定法が確立していないために魚種の特定には至っていない。そこで、中間宿主と推定されている魚類から未知の幼虫が発見された場合、DNA解析に基づいて同定することができるように、ヒトやミンククジラから得られた複殖門条虫の成虫のDNA解析に基づく複殖門条虫と近縁種との鑑別法を確立した。

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。温暖化に伴うマラリア流行の拡大の可能性については、アフリカ高地における熱帯熱マラリア流行の拡大をモデルとして解析され

ることが多いが、日本国内にもベクターが多く生息する三日熱マラリアに関しては、解析のためのよい数学モデルがない。また、日本の周辺の海域は、世界的にみても海水温の上昇が著しい地域で、温暖化に伴い、魚類においても様々な感染症の発生が懸念

される。しかし、生食の対象となる魚類について、温暖化に伴う寄生虫感染状況の変化を分析した報告は殆どない。

そこで、マラリアに関しては、中国寄生虫研究所と協力して、1990年代の中国雲南省の温度・降水量変化と三日熱マラリア発生との関連について分析し、数理モデルの作成を試みた。また、海産魚が感染源となる寄生虫に関しては、温暖化に伴い発生拡大や寄生種の変化が疑われる複殖門条虫症とアニサキス症を対象とした。

ヒトに複殖門条虫症を引き起こす種は大複殖門条虫と呼ばれ、第2中間宿主と推定されているイワシ類に寄生する幼虫を経口摂取することにより感染すると推測されるが、未だ感染源となる海産魚と幼虫は不明である。また、イワシ類の調査で未知の幼虫が見出された場合も、形態で複殖門条虫の幼虫を同定することは不可能である。そこで、形態学的鑑別に替わる遺伝子鑑別法を確立し、感染源となる魚種を同定し、適切な感染予防策を行えるようになることを目指した。

アニサキス症の原因となるアニサキス亜科の線虫には、多数の虫種が認められ、世界各地からその分布が報告されている。魚介類の生食が一般的な日本では、他国に比べて極めて多くの患者発生が報告され、その数は年間に2,000例を超えると推定されている。近年、地球温暖化に伴う海水温の上昇や海流変化によって、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、拡大するに伴い、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、昨年度に引き続き、暖海性の魚類について、アニサキス虫体の検出と同定を試み、地域と魚種の違いによるアニサキス幼虫寄生種の違いを分析した。

B. 研究方法

三日熱マラリアにおけるモデル作成では、中国雲南省(40地区)で、10年間(1984年1月～1993年12月)観察された、日照時間・気温(最高、最低、平均)・降水量と三日熱マラリア発症者数の相関から、基本的数学モデルを作成した。さらに、多変量時系列解析手法を利用して、予測が現実になくなるようにモデルを修正し、数理モデルを構築した。

複殖門条虫の遺伝子鑑別法の確立には、ヒト患者から駆虫によって得られた大複殖門条虫(成虫)とミンククジラから得られた鯨複殖門条虫(成虫)を用いた。標本はいずれも70%エタノールで固定されたものである。ゲノムDNAは市販のキットを用いて調製した。まず、PCRによってミトコンドリアゲノムを増幅し、得られた遺伝子断片の塩基配列解析から完全塩基配列を決定した。さらに、複殖門条虫幼虫と近縁種を鑑別するために、遺伝子解析に基づいた multiplex PCR 鑑別法について検討した。

アニサキス症の研究においては、長崎産のタチウオと福岡産のサバとで、アニサキス属幼虫の寄生状況を比較した。また、静岡産にキンメダイについても、検索を行った。魚から検出された各虫体は、先ず形態

を観察し、アニサキスの I 型・II 型にタイプ分類した。次に、個体別に DNA を抽出し、リボソーム DNA の介在配列 (ITS 領域) を標的に PCR 増幅した。得られた産物で RFLP 解析を行い、更に一部については塩基配列も解読して、虫種を確定した。

C. 研究結果

構築された三日熱マラリアにおける数理モデルでは、年間の温度・降水量などの気象変化と患者発生数の変動について、よく捉えることができた (図 1)。観測された範囲では温度が高いほど発症者数も多くなったが、降雨量は 200 ミリ前後が最適で、それより多い場合や少ない場合、発症者数は少なくなる傾向が捉えられた。ただし、極端に患者数の変化については、構築したモデルで捉えることはできなかった。

複殖門条虫の分子同定には、ヒトから駆得られた大複殖門条虫 (成虫) とミンククジラから得られた鯨複殖門条虫 (成虫) を用いた。複殖門条虫のミトコンドリアゲノムは全長 13,725 bp で、酸化的リン酸化に関与するタンパク質遺伝子 12 個、ribosomal RNA subunit 遺伝子 2 個、それに 22 個の tRNA 遺伝子の 34 個の遺伝子と 2 個の非コード領域から構成され、複殖門条虫特異的塩基配列が確認され、近縁種とも鑑別が可能であった。また、ヒトに寄生する大複殖門条虫とクジラに寄生する鯨複殖門条虫は研究者によって同種、あるいは別種と見解が二分していたが、本研究によって同種であることが証明された。

次に、12 個のタンパク質遺伝子を近縁種のそれと比較検討したところ、ATPase subunit 6 遺伝子 (*atp6*) の塩基配列に最も著明な種間差が見出されたことから、*atp6* 遺伝子を標的とした multiplex PCR について検討した。複殖門条虫とヒトに寄生する近縁の日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、マンソン裂頭条虫とを鑑別するために、それぞれの種に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーペアを合成し、その 4 組のプライマーペアを用いて multiplex PCR を行ったところ、鯨複殖門条虫では 207 bp の *atp6* 遺伝子が、日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫とマンソン裂頭条虫ではそれぞれ 181 bp、130 bp、102 bp の *atp6* 遺伝子が増幅され、PCR 産物の大きさのみで正確に種の鑑別ができる方法が確立された。

アニサキス症に関する調査では、長崎産タチウオ 7 尾を検索したところ、5 尾にアニサキス幼虫の寄生を認め、総計 20 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、全て *A. pegreffii* と同定された (図 2)。キンメダイ 6 尾は、総てアニサキス虫体が陽性であった。虫体は 1 尾あたり 2-8 匹で、合計 28 匹が検出された (1 尾平均 5.6 匹)。検出虫体の形態を詳細に観察したところ、26 匹がアニサキスの II 型で、I 型は 2 匹に過ぎない事が分かった。各虫体の DNA を出発材料として PCR 増幅して、RFLP 解析と塩基配列解読により、虫種の分子同定を試みた。その結果、II 型のアニサキスの中でも *A. physeteris* が最も多く、23 匹 (82%) が本

虫である事が分かった。一方、I型のアニサキス2匹は、何れも *A. simplex* (sensu stricto)であった(表1)。

D. 考察

中国の亜熱帯～温帯のマラリア流行地のデータをもとに作成された数理モデルでは、三日熱マラリアの流行も、熱帯熱マラリア同様に、気温変化の大きな影響を受けることが示唆された。今後は、蚊が発育や活動を止める気温の閾値を設定し、三日熱マラリア特有の休眠状態からの発症が疑われる、気温10度以下での患者発生も考慮するなど、より温度変化の影響をはかりやすいモデルへと修正していくことが望まれる。

魚類由来寄生虫症においては、複殖門条虫の分子同定法が確立され、ヒトに寄生する大複殖門条虫とクジラに寄生する鯨複殖門条虫が同種であることが判明した。その結果、複殖門条虫のヒトへの感染源と推定されるイワシ類などの第2中間宿主の調査で未知の条虫幼虫が発見されたその鑑別が可能となった。複殖門条虫幼虫及び寄生魚種の特定は、感染経路の特定による予防につながると同時に、温暖化に伴う寄生率の変化や寄生魚種の北上に関するモニタリングにも利用できる。

アニサキス症に関する調査では、長崎産タチウオから得られた虫体は、全て *A. pegreffii* と同定されたが、以前、福岡産サバを用いた調査では、190匹の虫体のうち188虫体が、*A. pegreffii* と同定されており、異なった魚種で同様な傾向が確認さ

れた(図2)。昨年度までのサバでの調査結果を含めると、日本北部では、主に *A. simplex* s. stricto. 南部では *A. pegreffii*、がみられることになる。昨年度の台湾で水揚げされたタチウオによる調査では、寄生種は *A. typica* が中心だった。タチウオに寄生するアニサキス属幼虫の種が、温暖化や海水温・潮流の変化と関係しており、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かもしれない。

一方、静岡産のキンメダイでは、*Anisakis* II型幼虫が多く検出され、他の魚種とは全く異なった結果となった。キンメダイは暖海性の魚類として知られ、世界中の熱帯から温帯域の大陸棚縁辺部に広く分布する。日本でも、三陸南部から種子島にいたる太平洋沿岸が良好な漁場になっている。しかしながら、このような海域だけでキンメダイが繁殖(再生産)しているのではなく、むしろ黒潮上流域からの資源加入の可能性も高い。従ってキンメダイに関しては、水揚げ地以外に、海流変化の可能性も含めてアニサキス寄生状況を分析する必要がある。

感染症としての寄生蠕虫症の多くは食品(魚介類や食肉など)に寄生する幼虫を経口摂取して感染するが、地球環境の変化は中間宿主(=寄生虫の幼虫が寄生する動物、魚類など)動物の個体群動態や分布域の変化などに大きな影響を及ぼす。そのような環境変化は、食物連鎖を構成する生態系の一員としての寄生虫についても、中間宿主における寄生率、ヒトへの感染率などにも大きな環境生態学的要因となって影響を及ぼす可能性が高い。

E. 結論

中国の亜熱帯～温帯のマラリア流行地のデータをもとに、三日熱マラリア流行に関する数理モデルを構築した。従来の報告と異なり、三日熱マラリアの流行も、熱帯熱マラリア同様に、気温変化の大きな影響を受けることが示唆された。

海産魚類によって媒介される寄生虫症については、複殖門条虫のDNA解析に基づく種の鑑別法を確立し、温暖化に伴い検出される地域が拡大しているヒトの大複殖門条虫と鯨複殖門条虫が、同一種であることが判明した。今後、確立された手法を用いて、感染源となる魚種がされ、温暖化と患者報告の増加について検討が進むことが期待される。さらに、アニサキス症での調査では、サバとタチウオでは、魚種の違いに関わらず、日本南部では *A. pegreffii* の寄生が多いことがわかった。一方、別の暖海性の魚種であるキンメダイからは、*A. physeteris* と *A. simplex* (sensu stricto) に加え、日本近海の魚介類からは殆ど検出された事がない *Anisakis brevipiculata* および *A. paggiae* も検出された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Ishikawa H, Ohmae H.

Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma*

japonicum and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean J of Parasitol* 47(1): 1-5, 2009.

- (2) Nakagawa Y, Ueki M, Fueda K, Ohmae H, Ishikawa H.

Risk assessment of re-emerging *Plasmodium falciparum* on Ishigaki Island using a stochastic model. *Trop Med & Hlth* 37(3): 97-107, 2009.

2. 学会発表

- (1) Ohmae H, Sugiyama M, Ebihara M,

Chigusa Y, Kirinoki M, Blas BL, Ducussin B, Sinuon M, Sochet D. Impact of Climate Changes on Parasitic Diseases, The 1st East Asian International Symposium on Climate Change and Health, July, 2009, Tsukuba.

- (2) Ohmae H, Ishikawa H, Fueda T,

Ono M, Tnag L, Gu Z, Basic analysis to estimate relationship between climate change and emerging of vivax malaria. The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area. January, 2010, Shanghai

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし

表 キンメダイからのアニサキス虫体の検出

番号	総検出 虫体数	アニサキスI型			アニサキスII型		
		As	Ap	At	Aphy	Abre	Apag
1	8	0	0	0	6	1	1
2	7	0	0	0	7	0	0
3	2	0	0	0	2	0	0
4	5	1	0	0	4	0	0
5	6	1	0	0	4	1	0
合計	28	2	0	0	23	2	1

アニサキスI型 As: *Anisakis simplex* sensu stricto; Ap: *A. pegreffii*; At: *A. typica*

アニサキスII型 Aphy: *A. physeteris*; Abre: *A. brevispiculata*; Apag: *A. paggiae*

図 1 三日熱マラリア患者数の数理モデルによる予測と実際の変動
—中国雲南省陸水県における気象データ及び患者数からモデルを構築し推計—

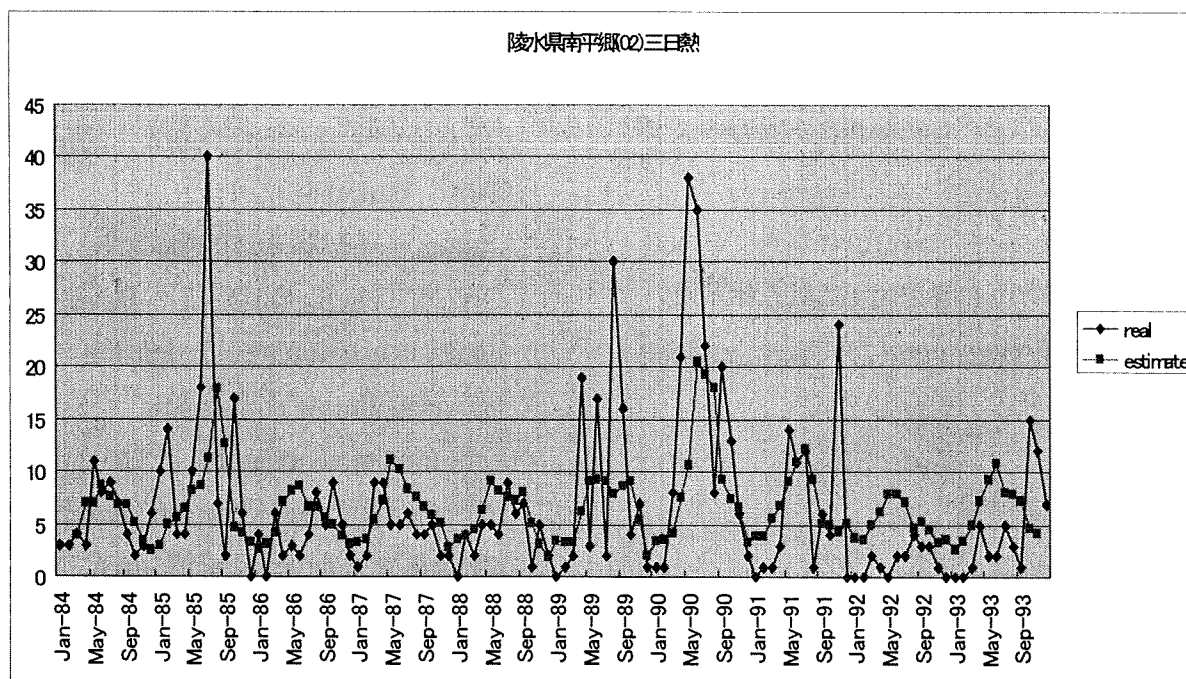
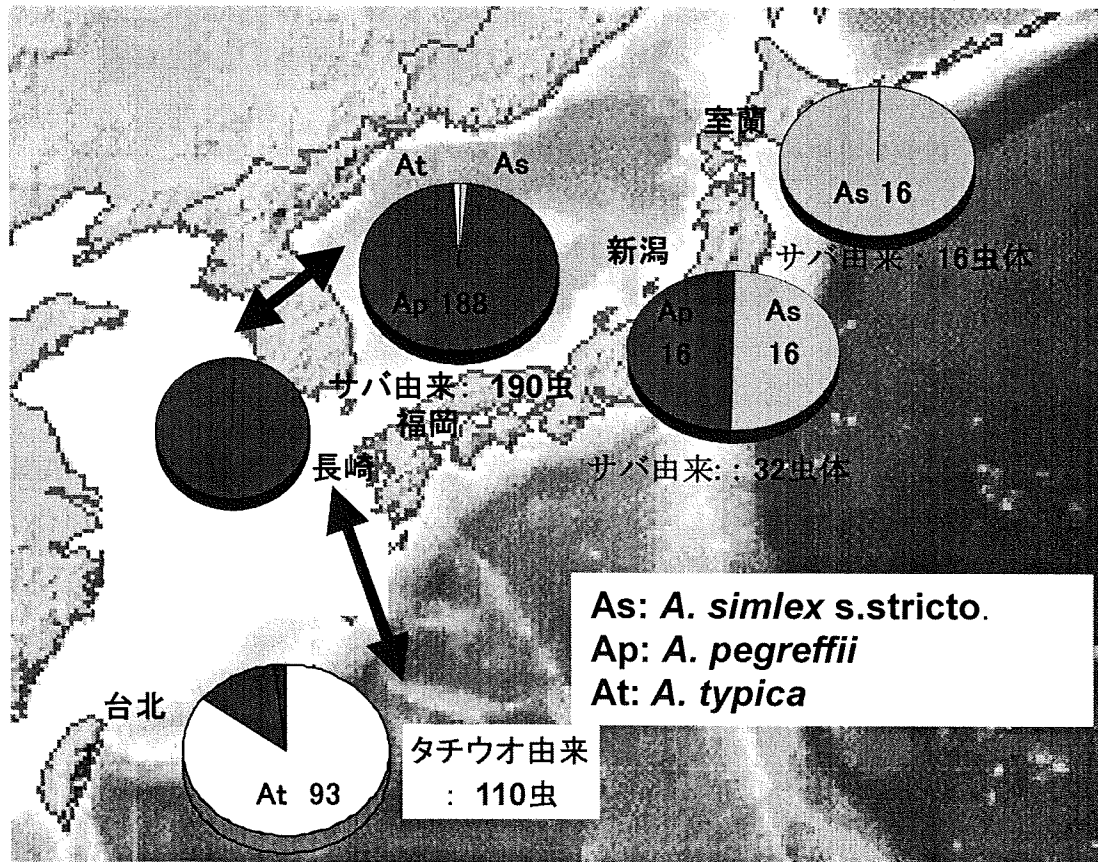


図2 日本国内及び台湾におけるアニサキス属 I 型幼虫の分布

— 気候・海水温・海流変化と、寄生虫種や寄生魚類が関係する可能性 —



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

環境の変化による病原真菌の動態と深在性真菌症との発病に関する解析

研究分担者 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、田辺公一（国立感染症研究所 生物活性物質部）
前田 健（山口大学農学部獣医微生物学）、
鈴木和男（和歌山県ふるさと自然公園センター）
Khuanchai Supparatpinyo（チェンマイ大学病院感染症科）
Pojana Sriburee（チェンマイ大学医学部微生物学教室）

研究要旨 ヒストプラズマ症はヒストプラズマ属による深在性真菌症の一つであり、おもに温暖な地域を流行地とする感染症であり、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と診断された患者で流行地への渡航歴が明確でない例の報告もあり、わが国に土着するヒストプラズマ属の存在が疑われており、温暖化によりその生息地域の拡大も懸念される。これらを背景に本研究では、ヒストプラズマ属のわが国での生息実態、疫学的調査について検討を行うこととした。その結果、土壌から生菌は分離されなかったが、ヒストプラズマ属特異的 PCR 法にて *H. capsulatum* と高い相同性を有する増幅産物が得られ、わが国でのヒストプラズマ属の存在が示唆された。この結果は、疫学的のみならず日本における公衆衛生学的にも極めて重要な知見であり、今後その証明に向けた更なる検討を促すものと考えられた。

A. 研究目的

地球の温暖化に伴い感染拡大が危惧される感染症のうち、深在性真菌症としてはヒストプラズマ症、コクジオイデス症、クリプトコックス症などが考えられる。ヒストプラズマ症、コクジオイデス症は、わが国においては輸入真菌症とされ、頻度の高いヒストプラズマ症は米国のミシシッピ川流域や東南アジアなどの温暖な地域がおもな流行地域であり、コクジオイデス症は米国カリフォルニアやアリゾナなどの砂

漠地帯が流行地域である。このようなことから地球の温暖化はこれら原因微生物の生息地域拡大をもたらす可能性がある。また、クリプトコックス症では、カナダ・バンクーバー島付近での *Cryptococcus gattii* による集団感染の原因として地球温暖化が挙げられるなど、今後嚴重な注意を要する感染症である。

ヒストプラズマ属は健常者にも播種性感染症を起こすこともある病原性の強い真菌である。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大多数であるが、約 15%では明らかな海外渡航歴がないなど、わが国に土着・生息するヒストプラズマ属の存在が以前より示唆されているが、わが国の環境からヒストプラズマ属の分離に成功した報告はない。このように日本におけるヒストプラズマ属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。

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、真にわが国でのヒストプラズマ属の生息は皆無なのかを検討するため、その実態解明、疫学的調査を行うこととした。

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'-acaagagacgacgtagcttcacg-3'、Msp2R: 5'-accagcggccataaggaagtc-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 μ l を供し、Msp2F: 5'-cgggccgctttaacagcggc-3'、Msp3R: 5'-ataaggacgtcacgaaggc-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 本鎖両方向から塩基配列を確認した。

2. 日本国内における自然環境からのヒストプラズマ属検出の検討。

今回の調査対象地域として、コウモリの堆積糞ならびにその下層にあたる土壌の両方が採取できる地区を 2 箇所（地点 A、地点 B）選定し調査した。

まず、堆積糞と土壌を一塊として滅菌した薬匙等を使用し適量採取し、滅菌チューブに保存した。採取した土壌約 15g を 50 ml チューブに移し、適量の PBS (penicillin 50 μ g/ml、streptomycin 50 μ g/ml を含む) に懸濁後ボルテックスを使い十分に混和し、60 分室温で静置した。その後遠心し、上清を培養法、PCR 法に供した。

培養法では、上記上清 100 μ l を brain heart infusion agar (penicillin 50 μ g/ml、streptomycin 50 μ g/ml を含む) に接種し、30°C で培養を行った。一方 PCR 法では、まず上記上清 100 μ l を採取し滅菌チューブに入れ、等量の lysis buffer と混和した。次に、proteinase K を終濃度 60 μ g/ml となるように加え、55°C で 60 分 incubate し、さらに 95°C で 10 分間加熱した。その後、WestaseTM (Takara) を加え 37°C で 60 分 incubate し、その 10 μ l を PCR 法に供した。

3. エアースAMPLING 法による空中浮遊ヒストプラズマ属の検出の検討。

PBI international 社製の SAS スーパー100 エアースAMPLER を用いて、2 地点で資料採取を行った地点でエアサンプリングを行った。

堆積糞含有土壌の採取と同時に 200L、50L の 2 点法で、大気中浮遊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ンプラーに装着し、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。サンプリングを行った培地は室温で 21 日間培養し、発育してきた菌から DNA 抽出後、遺伝子学的に同定を行った。

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。

2. 日本国内における自然環境からのヒストプラズマ属検出の検討。

今回調査対象とした地点は、地点 A がトンネル状の構造物であり、地点 B は奥が盲端となっている洞窟であった。両地点ともコウモリ（地点 B ではユビナガコウモリ）の生息が確認され、また地表には堆積糞も確認された。地点 A ではそれぞれ場所を替え 5 箇所、地点 B では 3 箇所から堆積糞を含む土壌を採取した（図 1）。

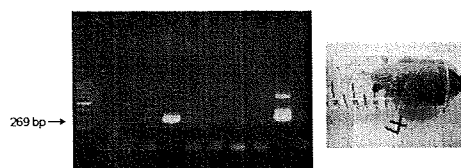
図1. 地点Aのサンプル採取箇所外観例



培養法では地点 A、B とともにグラム陰性小桿菌やカンジダ属が検出され、培養は 4 週間以上継続したがヒストプラズマ属と考えられる菌の発育は認めなかった。

一方、PCR 法を行ったところ地点 A の一箇所のサンプルから nested PCR 法で増幅産物が得られた。この増幅産物の塩基配列を決定し BLAST 検索を行ったところ、*H. capsulatum* の M antigen 遺伝子と 98% 一致した（図 2）。さらに陽性コントロールと比較したところ、数塩基の違いが認められた。

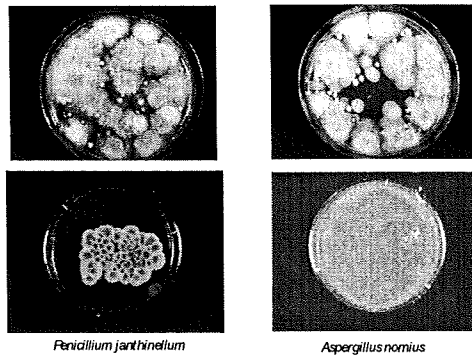
図2. 堆積糞含有土壌サンプルを使ったnested PCR法 (target gene: *H. capsulatum* M antigen gene)



3. エアースAMPLING法による空中浮遊ヒストプラズマ属の検出の検討。

今回の検討箇所では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（図 3）。

図3. エアーサンプリングで確認された空中浮遊菌



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。ヒストプラズマ属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、そこから空気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の推移をみると、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、ヒストプラズマ属の国内生息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、日本に生息しているヒストプラズマ属の活発化や生息地域拡大により、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。このような背景から、本研究では日本でのヒストプラズマ属の検出ならびに生息状況の調査を目的とした。

調査対象地域としてはコウモリの生息を第一の条件として、現在まで同様の調査がなされていない地域とし、寄せられた情報をもとに選定した。

今回われわれがヒストプラズマ属検出に用いた PCR 法について、特異性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。

この PCR 法を用いて、コウモリの堆積糞を含有する土壤をサンプリングし、PCR 法に供した結果、わずか 1 サンプルのみではあるが、*H. capsulatum* と高い相同性を有する DNA 断片が検出された。このことは、日本でのヒストプラズマ属の生息を示唆する結果ではあるが、ヒストプラズマ属と近縁の未知の微生物である可能性も否定できない。また、再現性や他の遺伝子の検出については、再現性にムラはあるものの、他の遺伝子を増幅する PCR 法でも一部増幅産物が認められている。再現性の問題については、PCR 増幅産物の状況から、おそらく極少量の DNA 量しか含まれていないことが原因と考える。一方、培養法の結果では、エアーサンプリングの結果も含め、今回の検討ではヒストプラズマ属の発育は認められなかったが、原因として他の発育菌

による相対的な発育阻害が起こっているのではないかと考えられた。この点についても、培養法の改良も含め検討課題である。

今回の検討では、PCR法のみではあるが、ヒストプラスマ属が日本でも存在することが示唆され、これははじめての報告となるものである。この結果は公衆衛生学的にも極めて重要な問題を提示するため、今後更なる検討を加え、その存在の有無を確認していく方針である。

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スマ症について、ヒストプラスマ属の日本における生息を調査した結果、菌の発育は認められなかったが、ヒストプラスマ属特異的 PCR法にて *H. capsulatum* と高い相同性を有する増幅産物が得られ、わが国でのヒストプラスマ属の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, and Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Intern Med.* in press.

2) Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by

pharmacological inhibition of Hsp90 related stress responses. *Medical Mycology*, in press.

3) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. *Jpn J Infect Dis.* Sep;62(5):392-3. 2009

4) Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01364-09. 2010.

2. 学会発表

1) Miyazaki Y. Antifungal Agent Update : Candins. 26th International Congress of Chemotherapy and Infection. Toronto, Canada. 2009

2) Miyazaki Y. Management of Invasive fungal Infections focusing on Respiratory Tract Infections. International Symposium joined with 49th Congress of Japanese Respiratory Society. Tokyo. Jun 14th. 2009.

3) 宮崎義継, 大野秀明. カビが起こす肺の病気. 第57回日本化学療法学会西日本支部総会市民公開講座. 名古屋. 2009

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

分担研究報告書

分担する研究項目：熱帯アジアにおける感染症と地球温暖化

研究分担者 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、温暖化影響解析手法の技術移転を目的とする。

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。また気候変動にもなう栄養不全と疾病発生についても解析を開始した。

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、プレモンスーンでは気温変動が、モンスーンでは異常降雨が影響していることが観察された。コレラに関する分析では、多雨と少雨の両方で閾値をもって発生が増加した。小児の栄養状態が気象因子と関連していることが示唆された。

まとめ：気象因子の変異は、病原細菌の増殖、人への暴露状況、人の栄養状態や免疫機能の変動を伴って、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。

B. 研究方法

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。

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。

さらに、胎児コホートや出生コホート研究により、気候変動による疾病発生が、早期栄養・早期免疫プログラミングを通じて影響されているかの検証を開始した。

（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つめ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。

バングラデシュにおいて、約5000人の妊婦-胎児-小児コホートのデータベースを整備中である。妊婦とその子供の血液データからmicronutrientsに気象因子による影響が示唆された。

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。

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。

出生コホートを用いた研究は、まだデータ整備中であるが、micronutrientsや免疫機能の気候変動との関連研究を進め、感染症重症化の早期予防につながる示唆を得ることが期待される。

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、明確なエビデンスを出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, Wagatsuma Y, Hayashi T, Saha SK, Streatfield K, Yunus M. The effect of temperature on mortality in rural Bangladesh--a population-based time-series study. *Int J Epidemiol.* 2009 Dec;38(6):1689-97.

2. 学会発表

Terao T, Hayashi T, Faruque ASG, Wagatsuma Y. Relationship between the anomalies of local and global meteorological elements and diarrhea diseases in Bangladesh. 第10回チュニジア-日本文化・科学・技術学術会議 (TJASSST 10). チュニジア共和国、ハマメット, 2009年11月11-13日。

Wagatsuma Y. Climate change impact on health: seasonality, malnutrition and fetal programming. 第135回生存圏シンポジウム 第5回 国際研究集会「南アジアの気象環境と人間活動に関する研究集会」 Relationship between weather environment and human activity in South Asia. 京都大学東南アジア研究所 稲盛財団記念館. 2010年1月30-31日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず。

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

デング熱診断サーベイランスのための NS1 抗原検出キットの評価および
空港検疫所におけるチクングニヤ熱・デング熱サーベイランス

分担研究者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
協力研究者 大松 勉、小滝 徹、林昌宏、田島茂、倉根一郎
(国立感染症研究所ウイルス第一部)
厚生労働省成田空港検疫所
三浦彰子、鎌倉和政、佐川宏明、笠松 美恵
(厚生労働省関西空港検疫所)

我が国のデング熱輸入症例は、この3年間は100人前後が報告されている。1999年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にある。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。また、空港検疫所では急性期の患者が健康相談に立ち寄ることもあり、特に病原体診断の精度向上が求められるものである。本年度は、デングウイルス NS1 抗原検出迅速キット (イムノクロマト法) の感度・特異性および有用性をウイルス遺伝子検出法と比較検討した。また、2005 年以來流行を拡大しているチクングニヤ熱は、我が国では法律に規定されていない感染症である。そこで、本研究班では厚生労働省成田空港検疫所および関西空港検疫所と共同研究としてチクングニヤ熱に関してサーベイランスを実施した。その結果、2009 年 9 月にインドネシアから帰国のチクングニヤ熱患者を確認し、ウイルスも分離した。分離されたウイルスは現在大きな流行を起こしているアフリカ型ではなくアジア型であることが遺伝子解析によって明らかになった。また各空港検疫所で確認されたデング熱患者の血清からウイルスを計7株分離し、遺伝子解析を行った。

A. 目的

我が国のデング熱輸入症例は、この3年間は100人前後が報告されている。1999年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にある。日本国内にはデングウ

イルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。そのため、病原体診断としてウイルス遺伝子検査にデングウイルスの非