

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等・新興再興研究研究事業）

平成 20-22 年度 分担研究報告書

研究課題名：「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」

分担研究課題名：「食水系細菌感染症と環境モニタリングに関する研究」

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 八尋俊輔 熊本県保健環境科学研究所 微生物部

松本一俊 熊本県保健環境科学研究所 微生物部

森田昌知 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 地球温暖化に伴い細菌感染症のリスクも影響を受ける。温暖化に付随する現象の一つである海水温の上昇は、食水系細菌感染症のリスク変化をもたらすことが予想される。本研究では上記細菌感染症に関連したコレラ菌、腸炎ビブリオ、ビブリオ パルニフィカスを含むビブリオ属菌の環境分布調査に関して有効な手法等の開発・検討を主眼とする。

A. 研究目的

地球温暖化によって影響を受ける気候変動の一つに海水温の上昇がある。海水温の上昇はそこに生息する生物の活発性、活動時期を変え、ひいては優勢生物種の変化、生態系の変化をもたらす。こうした変化は当然のことながら水中に生息する細菌にも生じうるもので、そうした細菌の中にヒトに感染するものが存在すればヒトへの感染リスクもまた変動する。本研究では地球温暖化と細菌感染症の関係において、水との関連が深い食水系感染症を引き起こす細菌、特にビブリオ属菌（主に *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*；以下それぞれ Vc、Vp、Vv）に着目し環境モニタリングを行うための基礎技術の開発を目的とする。

B. 研究方法

【ビブリオ属菌と環境因子】

2008 年 4 月から 2010 年 11 月までの間、ほぼ毎月 1 回、3-4 地点において、ほぼ満潮時に岸壁から海水を採取した（図 1）（地点 D は平成 22 年度のみ）。採取した海水 10mL を倍濃度アルカリペプトン水（APW）10mL の 3 本に、1mL を APW10mL3 本に接種し、以下 10^{-4} まで PBS で 10 倍段階希釈し、各 1mL を APW10mL に接種後、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18 ± 2 時間培養した。また、定性試験として、海水 500mL を APW で培養した。その後、混濁がみられた培養液から 1 白金耳を選択培地（クロモアガービブリオ寒天培地）に塗抹し、 $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18 ± 2 時間培養した。寒天培地上の Vc、Vp、Vv と疑われるコロニーを純培養し、各種生化学性状試験（オキシダーゼ、1%NaCl 加 TSI、1%NaCl 加 LIM、1%NaCl 加 VP、0、3、8、10% 塩

分濃度発育試験)などで同定した。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。

【PMA による死菌 PCR の抑制】

環境中の微生物遺伝子を調査するに当たり障害となる死菌の影響を低減させるため、propidium monoazide (PMA) の効果をコレラ菌で検討した。65 度 15 分加熱処理を施した死菌と生菌を回収後、PBS に懸濁し、20mM PMA を終濃度 50 μ M になるように添加した。5 分間暗所で静置後、3-5 分間光照射を行った(参考文献: Appl. Env. Microbiol. 73, 5111-7, 2007)。菌を PBS で洗浄後、DNA を調製し PCR の鋳型として使用した。標的としては 16S rRNA を選択し、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR で産物を検出した。

【*atpA* 遺伝子によるビブリオ属菌分類】

新規の同定用遺伝子マーカーを検討するため、選択培地上で分離したビブリオ属菌の 16S rRNA, *atpA*, *recA* 遺伝子の配列を解析した。*atpA* については、Genbank に登録されているデータも含めて、これまでに約 80 菌種、600 株分のデータベースを最終的に構築した。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。

【*V. cholerae* 分離株の PFGE 解析】

分離した Vc の全 DNA を *NotI* で消化し、パルスフィールドゲル電気泳動法によって分離した。得られた泳動パターンからクラスター解析を行った。

【*V. vulnificus* 分離株の MLST 解析】

分離した Vv について、multilocus

sequence typing を行った。解析には <http://pubmlst.org/vvulnificus/>にある 10 遺伝子座(*glp*, *gyrB*, *mdh*, *metG*, *purM*, *dtdS*, *lysA*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA*)を用いた。得られた結果を上記データベースにある配列と比較した。

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数の変化を示す。夏場に水温上昇に伴う、Vp, Vv 菌数の上昇が顕著であった。Vc は平成 22 年度に追加した地点 D における調査の結果から、塩分濃度の極めて低い場所に生息していることが示唆された。

表 1 に気温 (°C)、水温 (°C)、透視度 (cm)、塩分濃度 (‰)、Vv 菌数、Vp 菌数、Vc 菌数の各相関係数に示す。Vv は、気温、水温、塩分濃度と高い相関が見られ、Vp は気温、水温に高い相関が見られたが、Vc は気温、水温との相関は高くなく、塩分濃度に高い相関を示した。

採水地点では下記に何回か塩分濃度の低下する時期があった。中には降水量の多い時期と関連が示唆されるものもあった(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。

【*atpA* 遺伝子によるビブリオ属菌分類】

新規遺伝子マーカー探索のため、海水からの種々の分離菌株について 16S rRNA, *recA*,

atpA 遺伝子のデータベースを構築し、minimum spanning tree によるクラスター解析を行った(図 4)。その結果、16S rRNA では菌種ごとに分かれにくく、*recA* では逆に分かれすぎることが判明した。*atpA* はほぼ菌種ごとにクラスターを作ることから、*atpA* を標的とした新規 PCR の系の検討を行った。最終的には Genbank、ならびに収集した海水からの分離株を併せて、約 80 菌種、600 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。データベースの配列情報から *Vc*, *Vp*, *Vv* 検出用 PCR プライマーを設計した。上記データベース中の分離株については、本 PCR によって正しく標的微生物が鑑別されることが示された。(図 5)。

【*V. cholerae* 分離株の PFGE 解析】

本研究で分離した *Vc* が遺伝的に均一のものなのかを調べるため、地点 C の株 6 株、地点 D の株 36 株を用いて PFGE による解析を行った。その結果、少なくとも地点 D の株は多様であることが明らかとなった。また、株数は少ないものの、地点 C の株も 3 つのグループに分けられた。さらに、地点 C の株は地点 D の株のグループに包含されることが明らかとなった。(図 6)

【*V. vulnificus* 分離株の MLST 解析】

Vc 同様、本研究で分離した *Vv* の多様性を調べるため、6 株について MLST による解析を行った。解析結果を、上記に示したサイトにあるデータベースと比較した。その結果、大きく 2 つのグループに分かれた。本研究の環境由来 2 株は、生物型 1 および 2 からなる環境株が多いとされるグループ、残りの 4 株は生物型 1 の患者株が多いグループに包含され

た。(図 7)

D. 考察

Vv, *Vp* は特に水温に影響されて菌数が増加し始めるが、*Vv* については、塩分濃度による影響もあると考えられた。一方、*Vc* は、水温による影響もあるものの、塩分濃度の低い地点で多く分離されたことから、塩分濃度が重要な因子と考えられた(図 2、表 1)。従って、それぞれの微生物が最適な環境条件を求めて分布を異にしていることが示唆される。

環境中にある *Vc* は PFGE 解析から多様であることが示唆された。隣接する地点 C からの *Vc* が塩分濃度の低い地点 D からの *Vc* と類似性があること、分離頻度が後者の方が高いことから、何らかの理由で *Vc* が移動することで塩分濃度の高いところでも検出されるようになる時が生じていることが考えられた。例えば、降水量などの自然現象によって環境因子が変化することが、ある地点での微生物の量の変化に結びつくことがあることが示唆された(図 2、図 3、図 6)。

本研究で分離された *Vv* 環境株には二つのグループがあり、一方は患者由来が多いグループに含まれた。本研究で分離された *Vv* が両方のグループを含んでいたことは興味深い。

本研究で検討してきた *atpA* 遺伝子配列の多様性に基づく PCR に関しては、その有用性が示された。また、死菌の影響を抑える PMA 法は環境サンプルから直接遺伝子検出を行う際に有用であると考えられる。今後、こうした遺伝子検出をベースとした手法を環境調査に応用していくことでより正確かつ迅

速な解析が可能になることが期待される。

E. 結論

Vc, Vp, Vv とともに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.

N. Sithivong, H. Izumiya, K. Munnalath, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, A. Vongdouangchanh, P. Vongprachanh, H.

Watanabe, and M. Ohnishi: Cholera Outbreak, Laos, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (4), 745-746, 2010.

S. Yamamoto, M. Morita, H. Izumiya, and H. Watanabe: Chitin disaccharide (GlcNAc)₂ induces natural competence in *Vibrio cholerae* through transcriptional and translational activation of a positive regulatory gene *tfoXVC*. *Gene*. 457, 42-49, 2010. (Jun)

M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakawa, S. Yamamoto, G.B. Nair, S. Matsushita, K. Yokoyama, A. Kai, K. Seto, H. Watanabe, and H. Izumiya: Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. *J. Med. Microbiol.* 59 (6), 708-712, 2010.

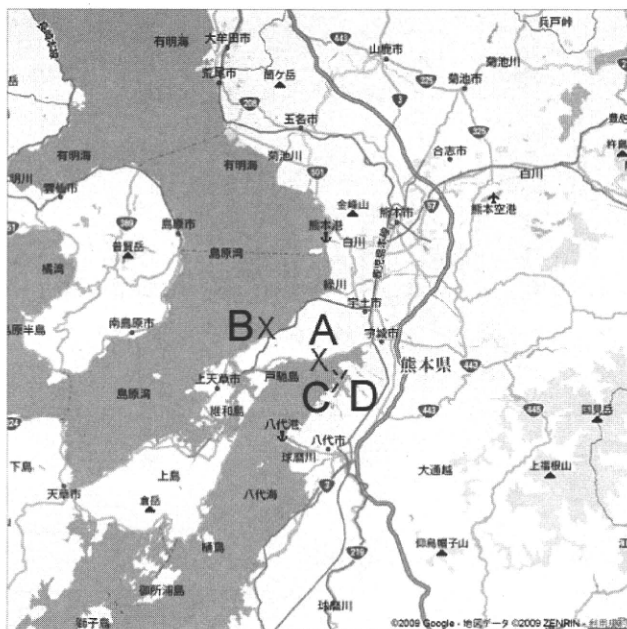


図 1. 採水地点

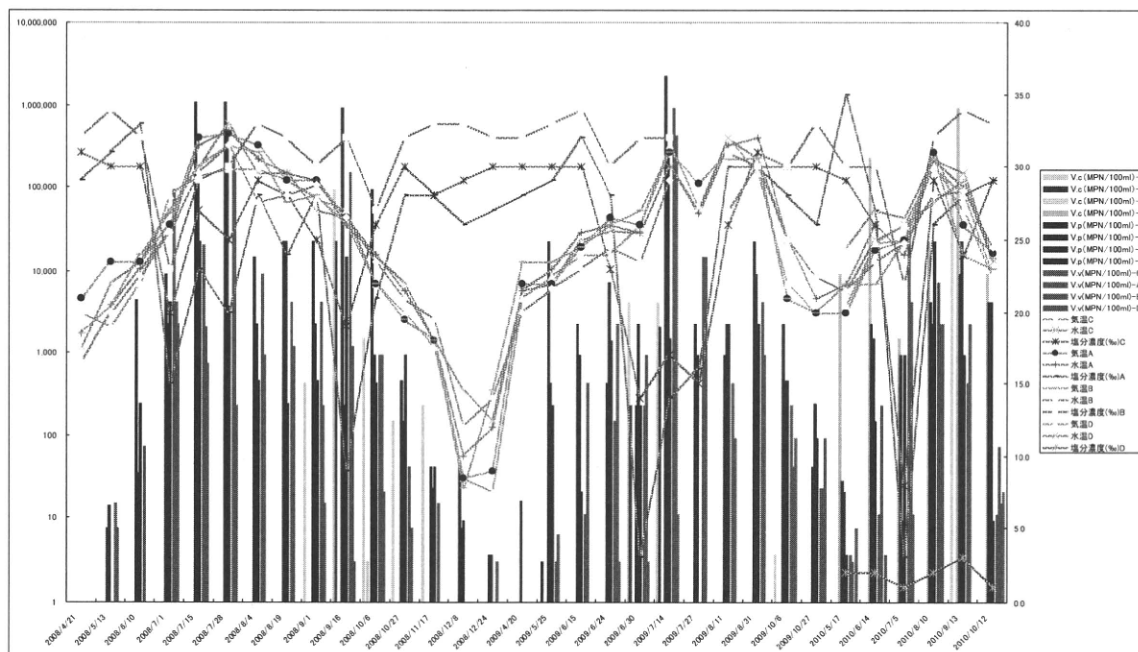


図 2. Vc, Vp, Vv 検出と環境因子の変化。

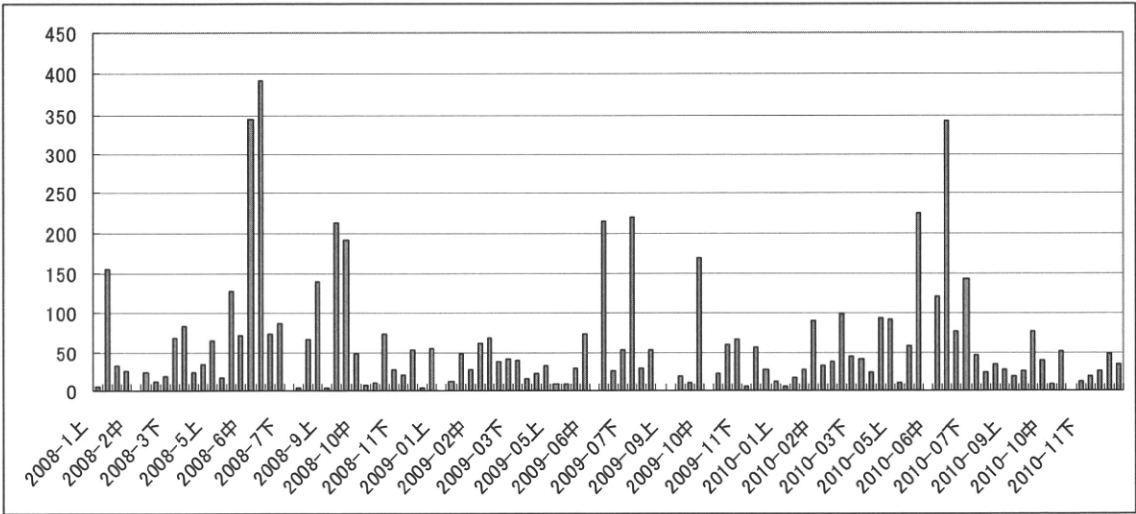


図 3. 採水地点付近の降水量の変化（気象庁）。

表 1. ビブリオ属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(VvMPN)		log(VpMPN)		log(VcMPN)	
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(VvMPN)	0.65720	***	0.72853	***	-0.37732	*	-0.68883	***	1					
log(VpMPN)	0.72150	***	0.82111	***	-0.18788		-0.44576	**	0.84614	***	1			
log(VcMPN)	0.45038	*	0.41618		-0.22973		-0.69412	***	0.79975	***	0.59485	**	1	

（平成 20 年度分データから）

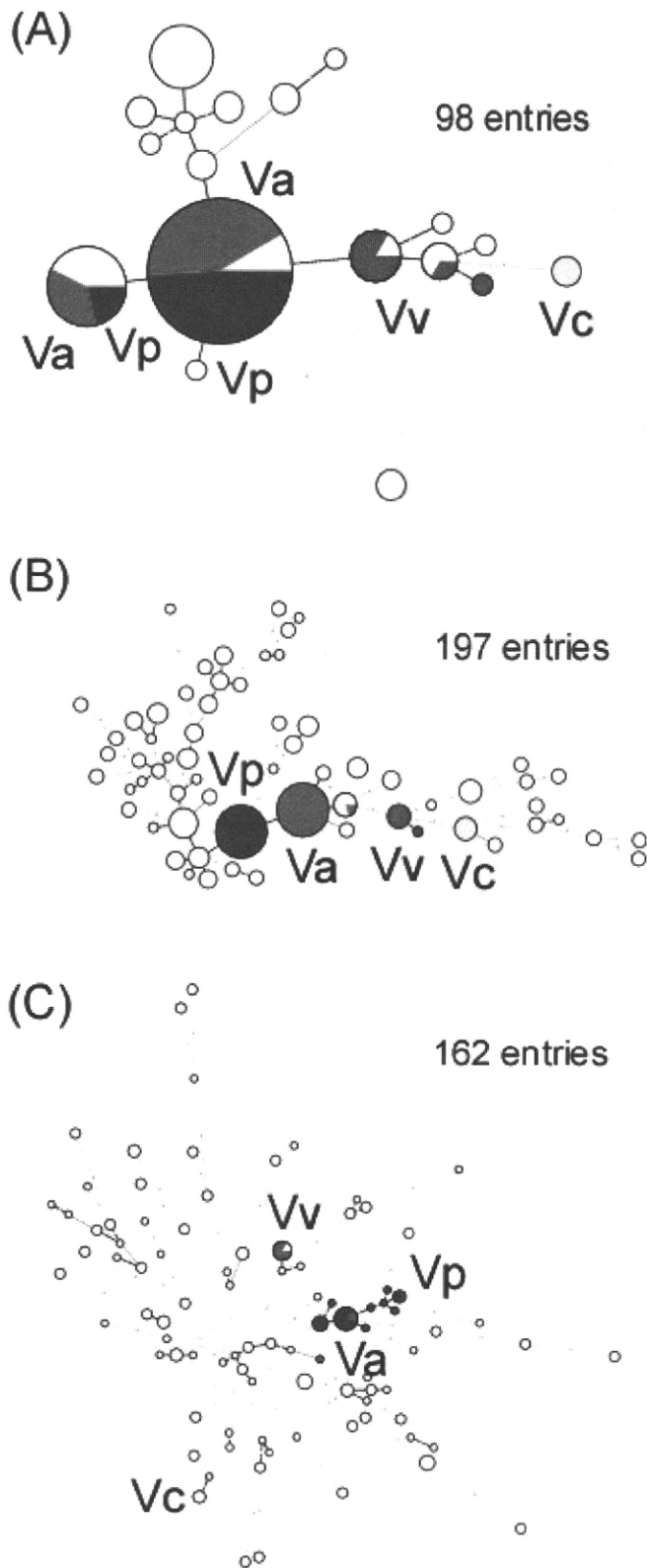


図 4. 試験遺伝子配列に基づく最小全域木。A, 16S rRNA; B, *atpA*; C, *recA*。右に示す数字は解析に使用したエントリー数。

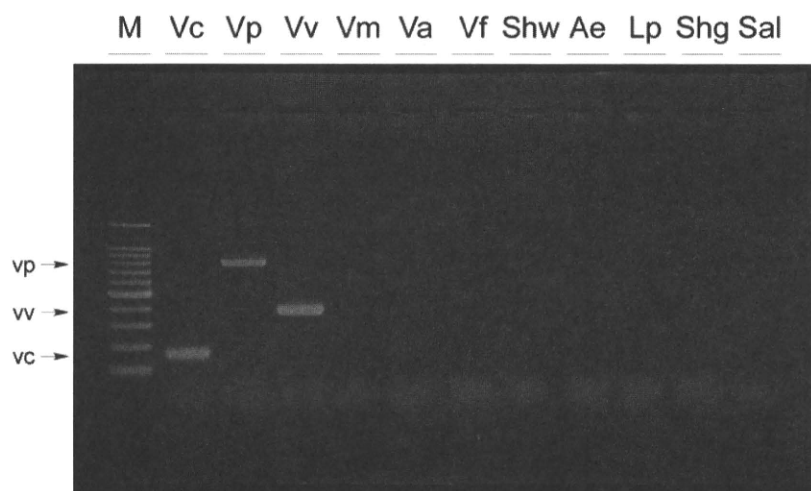


図 5. *atpA* 遺伝子配列の多型性に基づくマルチプレックス PCR。標的微生物である Vc, Vp, Vv を特異的に認識し、他のビブリオ属菌 (Vm, *V. mimicus*; Va, *V. alginolyticus*; Vf, *V. fluvialis*)、環境細菌 (Shw, *Shewanella* sp.; Ae, *Aeromonas* sp.; Lp, *Listonella* sp.)、ならびに腸内細菌科細菌 (Shg, *Shigella* sp.; Sal, *Salmonella* sp.) は認識しない。

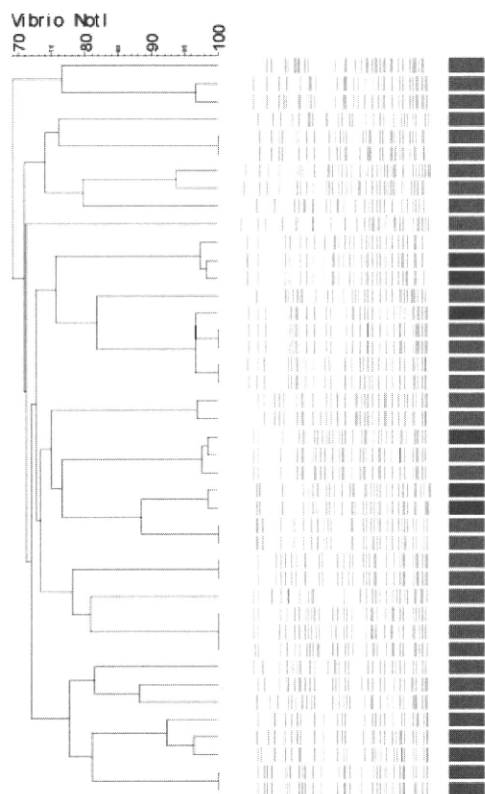


図 6. Vc 分離株の PFGE クラスタ解析。

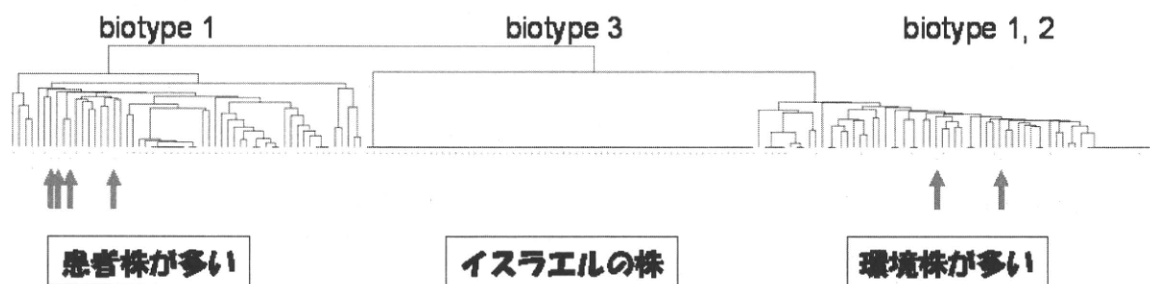


図 7. Vv 分離株の MLST 解析。矢印は本研究で分離された環境株。

厚生労働科学研究費補助金（平成 20－22 年度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確立に関する研究
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	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
	赤尾 信明	東京医科歯科大学 国際環境寄生虫学
	當眞 弘	琉球大学医学部 地域環境医科学
	倉持 利明	国立科学博物館

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により顕著に現れる。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、温暖化に伴う海産魚類の寄生虫種の変化は、今まで殆ど研究の対象になってこなかった。そこで、本研究では、媒介動物が広く国内に生息する寄生虫として、三日熱マラリア原虫と広東住血線虫、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を中心に検討を進めた。

マラリア原虫を保有したハマダラカ(*Anophles* 属)の国内侵入を防ぐうえで基礎となる蚊体内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。

一方、広東住血線虫に関する調査では、沖縄での広東住血線虫症の発生と気温変化との関係を再検討したが、直接の相関は認められなかった。さらに、本州での調査でも、中間宿主として重要なスクミリングカイの生息拡大も指摘されなかった。また、今後の気候変化によるさらなる国内での拡散を予測する為に、分子生物学的手法を用いて、過去の侵入拡散経路の検討も試みた。今までに採取された広東住血線虫で、核リボソーム DNA の ITS2 領域とミトコンドリア DNA の CO1 領域を用いた分子系統解析を試みたところ、従来考えられていた台湾-沖縄-本土というルート以外に、直接、中国や台湾から港湾の近い大都市部に侵入・拡散した可能性も指摘された。

アニサキス症に関する調査研究では、暖海性魚類を対象として、比較調査を進めた。日本産マサバでは、北部では *Anisakis simplex sensu stricto*、南部では *A. pegreffii* が寄生種の中心となった。また、台湾産タチウオと日本産タチウオで寄生状況を比較したところ、台中産タチウオには *A. typica* が優占的に寄生し、長崎産では *A. pegreffii* だけが寄生していた。また、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たが、ヒトへの感染源となる中間宿主の魚種は未だ不明の複殖門条虫症について、中間宿主として疑われる魚種から未知の幼虫が検出された場合、DNA 解析に基づいて同定することができるよう、ヒト及び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。寄生虫に限らず、マラリア原虫のように他の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・環境変化の影響を受けやすい。また、昆虫が媒介する寄生虫以外では、陸生貝によって媒介される寄生蠕虫も、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や広東住血線虫を媒介するアフリカマイマイの生息が確認されており、今後の気候変動に伴う生息地域の拡大が懸念される。また、マラリア原虫は、現在国内で媒介動物を介した生活環は存在せず、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、現実国内での発症例の報告がある広東住血線虫の媒介貝については、気候・環境変化と生息状況の変化、及び報告された臨床例の発生状況との関係について調査することとした。さらに、広東住血線虫については、今後の気候変化による国内での拡散を予測する為に、分子生物学的手法を用いて、過去の侵入拡散経路の検討も試みた。

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だが、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のはアニサキス症だが、近年、地球温暖化に伴う海水温の上昇や海流変化で、アニサキス (*Anisakis*) 属の幼虫が寄生できる暖海性魚類の回遊傾向の変化が報告されている。そこで、本研究では暖海性のマサバやタチウオを対象として、日本国内や台湾の幾つかの対象地域で、*Anisakis* I 型幼虫の検出と分子同定を試みた。

B. 研究方法

1) ベクターにより感染する寄生虫症

Membrane feeding 法によって三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) と熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) を感染させた *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、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、陰性対照としては、未吸血の *An. dirus* を用いた。

広東住血線虫については、沖縄県での今までの発症例を中心に、気候変化との関係

について再検討した。また、本州を中心に生息地の拡大が疑われるスクミリンゴカイについて、茨城県・福島県を中心に生息調査を行った。また、国内への侵入・拡散経路の検証のため、国内外で採取された広東住血線虫の虫体を用いて、核リボソーム DNA の ITS2 領域とミトコンドリア DNA の CO1 領域の分子系統解析を行い、本虫の地理的変異および系統関係の解析を試みた。日本各地と中華人民共和国広東省、福建省、浙江省、台湾台中市、タイ国バンコク市の家住性ネズミあるいは軟体動物から得た成虫あるいは第 3 期幼虫を用いた（表 1）。虫体は DNA 抽出後、PCR 法で目的の領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより配列を決定した。

2) 海産魚の媒介する寄生虫症

台中市（台湾）、長崎産のタチウオ（何れも 7 尾）を検索して、内臓および体腔からアニサキス虫体の検出を試みた。検出された虫体は鏡下に観察し、人体寄生の主要病原虫であるアニサキス・タイプ I 型虫体を選択し、DNA を抽出して、5.8S リボソーム DNA (rDNA) を含む介在配列（ITS 領域）を標的に PCR 増幅を行った。増幅産物は、RFLP 解析およびシーケンス解析を行い、虫種を分子同定した。また、室蘭、新潟、千葉、福岡産のマサバから検出され保存されているアニサキス虫体についても、同じ方法で虫種の分子同定を行った。

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、70%エタノールで固定された標本を用いた。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。

C. 研究結果

1) ベクターにより感染する寄生虫症

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 2）。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。

広東住血線虫症は、沖縄県でも年間の発生数は 2-3 例程度で、本来比較的稀な寄生虫疾患である。しかし、2000 年 1 月にはほぼ同時に、7 例が発症している。そこで、その時の集団発生と気候変化の関係について検索したが、特に報告数が多かった年の 1 月の平均気温が高いという傾向はみられなかった。また、平成 22 年度に行った茨城県・福島県での、中間宿主：スクミリンゴカイの生息調査では、新たな生息地の拡大は認められなかった。

また、採取された広東住血線虫の虫体の分子系統解析を行った地域のうち、首都圏

と奄美大島の個体間、沖縄本島と小笠原の個体間、仙台と名古屋の個体間では、それぞれ ITS2 の結果および CO1 の結果はともに完全に一致した（図 1）。決定した配列と、Gene bank に登録されている遺伝子配列情報を元に、近隣接合法による系統樹を作成したところ、首都圏-中国広東省・浙江省グループ、那覇-小笠原-タイ-フィリピン-ハワイ-フロリダ-ブラジル-カナリア諸島グループ、仙台-名古屋-福建省グループの 3 つのクレードが形成された（図 2）。

2) 海産魚の媒介する寄生虫症

アニサキス症に関する調査では、従来から、日本各地で入手できたマサバを中心に調査を進めてきたが、室蘭産では *Anisakis simplex* sensu stricto、福岡産では *A. pegreffii* が寄生種の中心となった（図 3）。また、福岡産マサバと長崎産タチウオで、アニサキス幼虫の寄生状況を比較したところ、ほぼ同じ比率を示した。また、台中（台湾）と長崎産 7 尾のタチウオの比較では、台中産のタチウオに比し、長崎産のタチウオでは、アニサキスの寄生するタチウオの数や寄生数とも少なくなる傾向を見られた。虫体の分子同定では、台湾産タチウオは、93 匹 (85%) が *Anisakis typica* で、長崎産タチウオからは、*A. pegreffii* が検出された。

複殖門条虫の分子同定には、治療の結果ヒトから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 だが、近縁種とも鑑別

可能な複殖門条虫特異的塩基配列を確認することができた。その結果、種の異同について見解が分かれていた、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、同種であることが証明された。

D. 考察

1) ベクターにより感染する寄生虫症

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 例にとどまり、Membrane feeding により感染させた際の効率が悪かった可能性もある。

最近の温暖化傾向は、沖縄でも明らかだが、1996 年 1 月の広東住血線虫症の集団発生と温度変化との間には、直接の相関はみられなかった。従来は中間宿主の摂取が原因で発症した例が殆どだったが、最近の症例では、サラダなどの生野菜の摂取が疑われるものの、真の感染源が不明な例が多い。もともと亜熱帯地域で、広東住血線虫及びアフリカマイマイが定着している沖縄県では、気温上昇に伴い発生数が増加したのではなく、汚染された野菜の流通と摂取により、偶発的にほぼ同時に報告例が増えた可能性が示唆された。また、スクミリンゴカの生息調査については、茨城県以北での生息は確認されず、地表温度が -4°C 以下になると、数日間で死滅するスクミリンゴ

カイについては、冬季の最低気温が著しく上昇しない限り、生息地が拡大する可能性は乏しいと判断された。一方、国内外で採取された広東住血線虫の分子生物学的手法による系統解析からは、従来言われていた、台湾-沖縄-九州という侵入拡散経路だけではなく、中国や台湾から、直接、港湾のある大都市部に直接侵入する複数の経路が考えられた。

2) 海産魚の媒介する寄生虫症

海産魚類を対象とした研究では、台湾産タチウオには *A. typica* が優占的に寄生し、長崎産には *A. pegreffii* だけが寄生、また国内の太平洋岸の各地で漁獲されたタチウオからは *A. simplex sensu stricto* が検出された。近年、宿主の生態を間接的に類推する手法として、寄生虫を生物指標として用いる方法が開発されているが、寄生するアニサキス幼虫の同胞種の違いが、温暖化や海流変化を推測する指標となる可能性が示された。

他の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た結果、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可能性もある。

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。

沖縄における広東住血線虫症の発生と、気温変化との間には、直接の関係は認められなかった。また、広東住血線虫の日本への侵入拡散経路は、従来言われていた、台湾-沖縄-九州という経路だけではなく、中国や台湾から、直接港湾のある大都市部に侵入する経路も考えられた。一方、本州における、中間宿主として重要なスクミリンゴカイの生息拡大は確認されなかった。

アニサキス幼虫の寄生状況の調査では、台湾産タチウオには *A. typica* が寄生し、*A. pegreffii* や *A. simplex sensu stricto* が寄生する日本産の傾向とは全く異なっていた。寄生するアニサキス幼虫の種・同胞種の違いが、温暖化や海流変化の指標となる可能性が示された。

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。一連の研究の結果、海産魚類の寄生虫に関する分子同定法が確立されたことにより、今後、暖海性魚類の生食により発生する寄生虫症について、正確な情報が入手できるようになることが期待さ

れる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- (1) Izumiyama 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 J of Parasitol* 47(1): 1-5, 2009.
- (3) 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.
- (4) Umehara A, Kawakami Y, Ooi H-K, Uchida A, Ohmae H, Sugiyama H. Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *Inter J of Food Microbiol*, 143: 161-165, 2010.

- (5) 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) 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.
- (2) 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
- (3) 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.
- (4) 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
- (5) Umehara A, Kawakami Y, Ooi H.-K, Uchida A, Ohmae H, Sugiyama H.

Molecular identification of *Anisakis*
type I larvae isolated from hairtail
fish off the coasts of Taiwan and Japan.
International Congress of Parasitology
(ICOPA XII), Melbourne,
15-20 August 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得 なし

表1 広東住血線虫の調査・分子系統解析

国 地 域	中 間 宿 主	終 宿 主
日本		
東 京（港区）		ドブネズミ(1)
小笠原諸島(母島・父島)	アフリカマイマイ(20)	ドブネズミ(10)
千 葉（千葉）		
神奈川（川崎）	チャコウラナメクジ(3)	
宮 城（仙台）		ドブネズミ(2)
愛 知（名古屋）		ドブネズミ(2)
鹿児島(奄美大島)		クマネズミ(2)
沖縄(那覇・南城)	アフリカマイマイ(1)	ドブネズミ(3)
中華人民共和国		
広東省(深圳)		ドブネズミ(2)
福建省(福州)		ドブネズミ(2)
浙江省(温州)		ドブネズミ(2)
台湾（台中）		ドブネズミ(2)
タ イ（バンコク）		ラット(1)

表2 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	Pf-ELISA	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

図1 国内に分布する広東住血線虫の種内変異

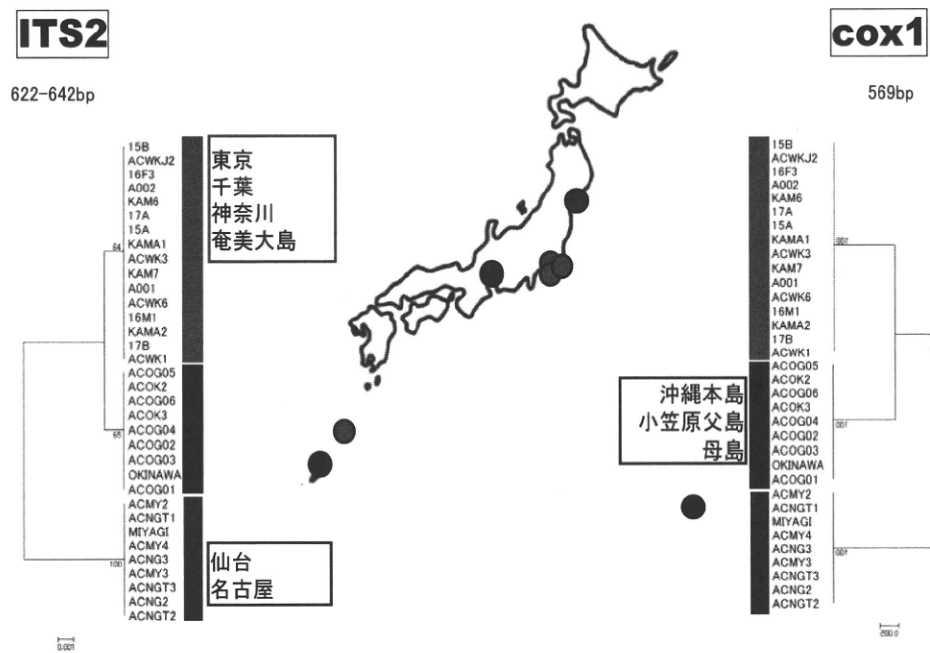


図2 東南アジアに分布する広東住血線虫との比較

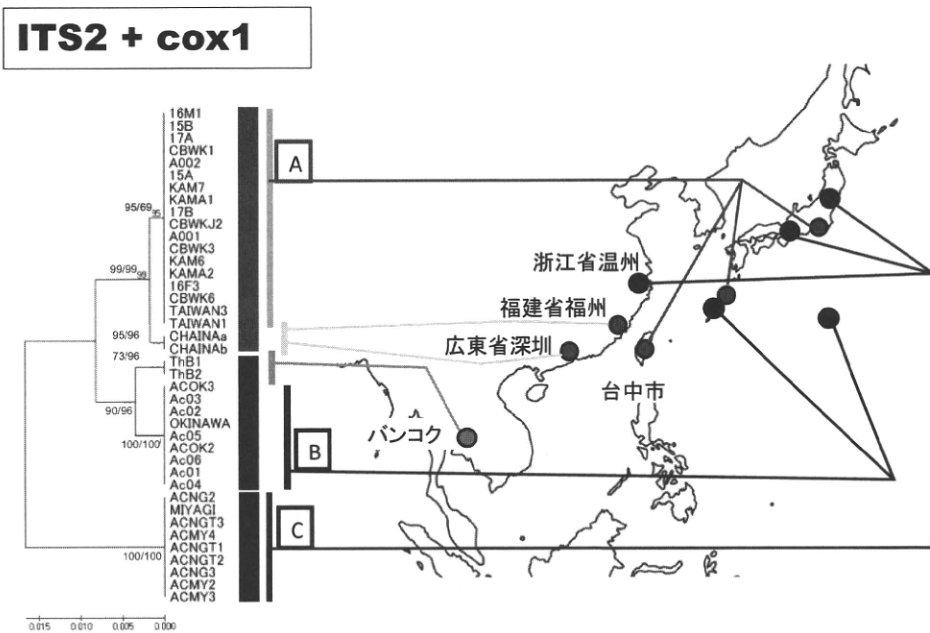
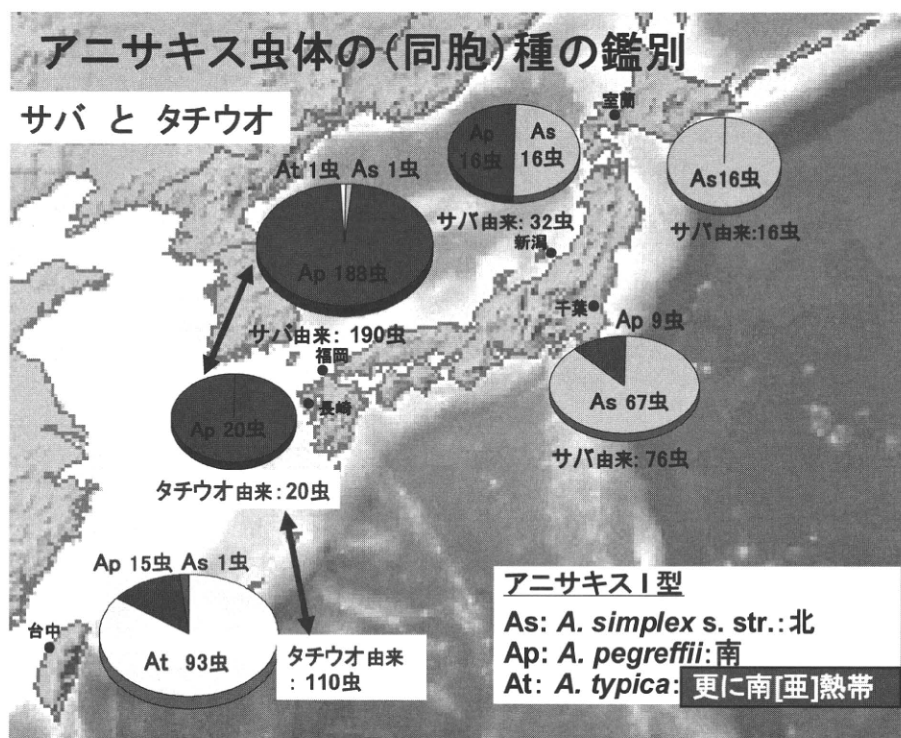


図3 日本国内及び台湾におけるアニサキス属Ⅰ型幼虫の分布
 一気候・海水温・海流変化と、寄生虫種や寄生魚類が関係する可能性一



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の発病に関する解析

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、田辺公一（国立感染症研究所 生物活性物質部）
Trepradab Norkaew、Pojana Sriburee（チェンマイ大学医学部
微生物学教室）
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）

研究要旨．地球の温暖化に伴い感染拡大が危惧される深在性真菌症であるヒストプラズマ症を研究対象とした。*H. capsulatum* に特異的な M antigen 遺伝子および 100-kDa 蛋白遺伝子を標的とした検査系を構築し、環境からの *H. capsulatum* の検出を行った。患者数の多いタイにおいて環境からの *H. capsulatum* 検出に本検査系が機能することを確認し、わが国の環境調査に適用したところ、わが国においても特異的な遺伝子が 1 ヶ所から検出された。今回開発した検査法は、環境の変化によりわが国において *H. capsulatum* のアウトブレイク等が発生した場合に、診断ならびに環境調査に有用であると考えられた。

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、深在性真菌症ではヒストプラズマ症、高病原性クリプトコックス症などが考えられる。ヒストプラズマ症はわが国においては輸入真菌症とされ、米国のミシシッピー川流域や東南アジア、オーストラリア、中南米のなかの温暖な地域がおもな流行地域であるが、地球の温暖化はヒストプラズマ属の生息・活動地域拡大をもたらす可能性がある。

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高い真菌である。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、東南アジアなどの流行地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とされる。また、近年わが国の犬や猫のヒストプラズマ症が報告されるなど、日本におけ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検出・分離培養に成功した報告はない。

一方、東南アジアにおいてヒストプラズマ症は年間を通じて発生が認められ、また HIV 感染者に合併する感染症として認識されているが、その感染源ならびに環境中のヒストプラズマ属のリザーバーが何であるか未解明な点が多い。

このような背景のもと、わが国の環境中のヒストプラズマ属生息の可能性についての検討と、東南アジアにおけるヒストプラズマ症の感染源、ヒストプラズマ属リザーバーの検出について検討を行った。