

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：82603

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：16H05820

研究課題名(和文) 南米エクアドルで住民から検出された肝吸虫新種の分類と生態疫学

研究課題名(英文) Systematics and transmission ecology of novel liver flukes causing human illness in Ecuador

研究代表者

杉山 広 (Sugiyama, Hiromu)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号：00145822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：南米エクアドルでAmphimerus属の肝吸虫に関する国際共同研究を行い、同国の全24県のうち、3県に本虫の流行地を見付け、多数の住民が感染する事実を明らかにした。感染源となる淡水魚も特定し、成虫・幼虫(メタセルカリア)・虫卵を材料として、種の同定に有効なマーカー(形態・遺伝子)も決定した。駆虫によって得られた成虫を出発材料に、ミトコンドリアDNA全長の塩基配列を解読し、遺伝子配列を登録した。また、肝吸虫と同様に、食品媒介吸虫である肝蛭と肺吸虫についても、エクアドル国内における地理的分布や分類、系統関係の解析などの検索・検討に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エクアドルに分布する肝吸虫と、さらに肝蛭および肺吸虫を対象として、汚染実態を解明し、各寄生虫の予防法・診断法の確立に取り組んだ。公衆衛生学・地域保健学的にも意義のある研究成果をあげることができ、地域住民の健康被害を予防・解決する成果を得たと考えている。これに加えて、宿主との共進化や寄生虫の種間競合などの学術的課題に繋がる話題も提供でき、吸虫類の種分化や進化機構を理解・解決するために重要な問題点も提示できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：A three-year joint research project in Ecuador, South America led to the discovery of new endemic areas of the liver fluke belonging to the genus Amphimerus which is responsible for infections among a large number of local residents. The study also identified several freshwater fish species as important sources of human infection. Morphologic features and genome sequencing required for the identification of this species were determined. In addition, the whole mitochondrial DNA was sequenced and registered (GenBank Accession No. MK238505). Experimental infection studies with the Amphimerus-metacercariae using hamster as the test animal featured the pathological changes: the biliary mucosa became edematous and epithelial hyperplasia was way marked. Fibrosis was prominent but the level of cirrhosis was not so severe. The liver fluke belonging to the genus Fasciola and the lung fluke belonging to the genus Paragonimus were also studied.

研究分野：寄生虫学

キーワード：肝吸虫 肝蛭 肺吸虫 エクアドル 南米

1. 研究開始当初の背景

肝吸虫症の原因として重要な原因種は、旧大陸に分布する2属3種の肝吸虫類(*Clonorchis*属および*Opisthorchis*属)で、東アジアおよび東南アジアの流行地には、少なくとも3,500万人の患者がいるものと推定される。一方で新大陸には、*Amphimerus*属の肝吸虫が分布するが、これは人には感染しない動物寄生種とされてきた。ところが2010年にエクアドルの北西部・エスメラルダス県の集落(サンミゲル地区)で、約300人の住民のほぼ2割から肝吸虫類の虫卵が検出され、駆虫で得た成虫が精査されて、*Amphimerus*属と形態同定された(Calvopina *et al.*, 2011)。さらにサンミゲル地区から直線距離で70 km離れたサントドミンゴ県のサントドミンゴ地区、および370 km離れたマナビ県のアグアラン地区にも新たな流行地が見付かった。エクアドルの太平洋側には、人体寄生性の*Amphimerus*属肝吸虫が広範に分布する。従来 of 定説は見直しが必要で、*Amphimerus*属肝吸虫の本態をさらに明らかにするために、本研究が企画された。

2. 研究の目的

エクアドルで相互に離れた2箇所(エスメラルダス県のサンミゲル地区とマナビ県のアグアラン地区)で検出した人体寄生性肝吸虫は、形態や分子系統関係の解析から多少の変異はあるが、同一種と考えられた。しかし同定に有用なマーカー(形態・遺伝子)は定まらず、分類学的位置(種名)は未確定であった。生活環に関しても、検査した多くの淡水魚が第2中間宿主であると明らかにされていたが、感染源として特に重要な魚類は特定できていなかった。また、恐らく淡水産の貝類であろう第1中間宿主も、未決定のままである。肝吸虫類全体の分子系統・分類学に関しては、本種を加えた再検討が必要である。また肝吸虫と同じ食品媒介吸虫の肝蛭と肺吸虫についても、*Amphimerus*属肝吸虫と同様の検索・検出が必要であり、これらの寄生虫種も、本研究における対象に加えた。

3. 研究の方法

南米エクアドルの住民における*Amphimerus*属肝吸虫の感染状況を全国レベルで把握する。そのために糞便検査法を改良し、血清検査法を構築する。流行地で淡水魚を捕獲し、メタセルカリアの寄生状況を調べ、感染源として特に重要な魚類は特定する。併せて、本属(本種)の同定に必要なマーカー(形態および遺伝子)を確定する。多種類の淡水魚から多数の吸虫類メタセルカリアが検出された場合や多数の住民を対象とした疫学研究に応用できる迅速診断法も開発・改良の必要がある。肝臓寄生の人獣共通寄生蠕虫として、エクアドルには肝蛭も分布するが、*Amphimerus*属肝吸虫感染との病態鑑別や特異的な血清診断法の開発に取り組む必要がある。肺吸虫についても、地理的分布の調査範囲を広げ、中間宿主の決定など疫学的検討も進め、各地に認める集団間の分子系統関係の解析に取り組む。

4. 研究成果

(1) エクアドルにおける*Amphimerus*属肝吸虫による患者発生の調査

エクアドルの16県・28箇所において、住民5,000人以上から糞便を得て、寄生虫卵の検査を実施した。その結果、サントドミンゴ県のサントドミンゴ地区に少人数の流行地を見付け、またマナビ県ではアグアラン地区の周辺には、本虫の流行地が広範に点在することが示された。今後も調査を継続することで、本虫の流行地が新たに発見される可能性が高い。なお患者検出

の糞便内虫卵検査として、Kato-Katz 法が最適であることも、各種検査法との比較試験を実施して明らかにした。

(2) *Amphimerus* 属肝吸虫による淡水魚の汚染状況調査

本症の流行地で 30 種類を超える淡水魚を検査し、マナビ県では現地で Ancha と呼ばれる小魚の寄生率が高く、陽性魚 1 尾あたりのメタセルカリア寄生数も多いことを明らかにした。しかもこの小魚を用いた料理「コルティエユ(内臓と頭部を除去してライム汁に一晩漬け込む)」が、感染源として重要であることも明らかになった。この小魚は陽性集落の周囲を流れる支流を好んで生息し、当該河川から本虫の第 1 中間宿主貝も検出されることが期待される。

(3) *Amphimerus* 属肝吸虫の形態学的特徴および宿主適合性の解析

メタセルカリアを用いた各種実験動物への感染試験を実施し、ネコとハムスターが本虫の好適終宿主であることを示した。*Amphimerus* 属は、(亜)成虫に発育すると、卵黄腺が卵巣より虫体後半に分布するようになり、この特徴からアジア産の肝吸虫各種と明確に形態鑑別される。一方で、*Amphimerus* 属内の各虫種は、卵黄腺の分布の程度(後部の精巣を越えて虫体後端にまで到達するか否か)で、形態学的に種鑑別されてきた。我々が得た多数の成虫は、卵黄腺の分布状況が千差万別で、卵黄腺の分布と後部精巣の位置関係を種の鑑別点に用いるのは、妥当でないとの結論を得た。

(4) 塩基配列の解読に代替する *Amphimerus* 属肝吸虫の迅速同定法の確立

住民から得た多数の糞便検体を標的とし、迅速診断法として、LAMP 法を開発した。一方、Ancha を含む流行地の魚から、肝吸虫と形態が酷似する異形吸虫類 *Haplorchis pumilio* のメタセルカリアも検出した。メタセルカリアで両種を鑑別するために、PCR-RFLP 法を開発した。現在、種特異プライマーを用いたワンステップ PCR 法を開発中である。ただし、我々が開発した糞便用 LAMP 法は、魚由来のメタセルカリアに適用できない場合があることも経験した。改良のための検討を進めている。

(5) 分子系統解析

Amphimerus 属肝吸虫のミトコンドリア DNA 全長の塩基配列を解読し、本虫の分子生物学的特徴を明らかにした(Ma *et al.*, 2019; GenBank Accession No. MK238505)。この配列を用いた系統解析の結果から、本虫が後傘吸虫科(肝吸虫類)に属することに間違いないと確認した。一方、*Amphimerus* 属内の種レベルでの解析は進展せず、これは米大陸の哺乳類に由来する *Amphimerus* 属肝吸虫に関し、我々以外に誰も遺伝子配列を登録しないことが原因と考えられた。米大陸各国の寄生虫学者に呼び掛け、材料を集め、遺伝子配列の解読と登録に取り組む必要がある。さらにアジアの材料も含めた解析に取り組み、肝吸虫類全体の分類を再検討したい。

(6) 胆管癌発生の可能性探査に連結する病理組織学的な検討

エクアドルの *Amphimerus* 属肝吸虫に対するハムスターの感受性は既に述べたように高く、投与メタセルカリアの平均 36%の虫体が回収された。感染後 17 日と最も早期に剖検した個体からは、子宮内に虫卵を認めない未成熟虫も検出されたが、虫体後半部に卵黄腺は分布し、本属の

敬太学的特徴は感染初期より発現した。また組織病理観察では、肝実質に虫道性病変を認めず、幼虫は胆道系を逆行して胆管・胆嚢に定着すると考えられた。さらに胆管上皮細胞の過形成と胆管の拡張、胆管周囲結合織の増殖・好酸球を主とした細胞浸潤等の所見が、剖検時期を問わずに認められた。ただし1年を超える長期感染例でも、肝実質への線維化の波及は限定的であり、典型的な肝硬変像の乏しさが本虫感染の特徴と考えられた。なお少数のメタセルカリアを用いた長期間感染は継続中であり、さらに感染動物に発癌イニシエーター（ジメチルニトロソアミン）を投与して胆管癌を誘発する試験は、エクアドルでの実施を目指して交渉中である。

(6) 肝蛭に関する研究

人獣共通感染症である肝蛭症の原因種は、エクアドルでは *Fasciola hepatica* (Fh) であることを分子学的に明らかにした。さらにエクアドルの Fh 虫体と、ヨーロッパおよび南米各国の Fh 虫体についてミトコンドリアの *nad1* 遺伝子の塩基配列を解読し、それらを分子系統学的に解析した。その結果、エクアドルを含む南米の Fh とヨーロッパの Fh は遺伝学的に近縁な集団であることが分かり、南米の Fh はヨーロッパの植民地時代に家畜とともに持ち込まれ、それが定着した集団であることが推察された。

(7) 肺吸虫に関する研究

エクアドルは肺吸虫症の患者も多く、メキシコ肺吸虫の高度汚染国として有名である (Calvopina *et al.*, 2014)。人への感染源となる淡水産カニの形態と地理的分布を解析し、新たな流行地を発見すると共に、肺吸虫症と結核との類症鑑別が重要な症例を誌上報告した。肺吸虫の地理的分布の調査と、迅速血清診断法の確立に取り組んでいる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Ma J, He JJ, Zhou CY, Sun MM, Cevallos W, Sugiyama H, Zhu XQ, Calvopina M. Characterization of the mitochondrial genome sequences of the liver fluke *Amphimerus* sp. (Trematoda: Opisthorchiidae) from Ecuador and phylogenetic implications. *Acta Trop.* 2019;195:90-96. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.04.025.
- 2) Calvopina M, Romero-Alvarez D, Diaz F, Cevallos W, Sugiyama H. A comparison of Kato-Katz technique to three other methods for diagnosis of *Amphimerus* spp. liver fluke infection and the prevalence of infection in Chachi Amerindians of Ecuador. *PLoS One.* 2018;13(10):e0203811. doi: 10.1371/journal.pone.0203811.
- 3) Calvopina M, Gonzalez M, Munoz G, Cevallos W, Celi M, Rodriguez R, Sugiyama H. Asymptomatic *Fasciola hepatica* infection presenting with hypereosinophilia. *Arch Clin Microbiol.* 2018;9(1):1-4. doi: 10.4172/1989-8436.100073.
- 4) Calvopina M, Romero-Alvarez D, Rendon M, Takagi H, Sugiyama H. *Hypolobocera guayaquilensis* (Decapoda: Pseudothelphusidae): A New crab Intermediate host of

Paragonimus mexicanus in Manabí Province, Ecuador. Korean J Parasitol. 2018; 56(2):189-194. doi: 10.3347/kjp.2018.56.2.189.

5) Cevallos W, Fernandez-Soto P, Calvopina M, Fontecha-Cuenca C, Sugiyama H, Sato M, Lopez Aban J, Vicente B, Muro A. LAMPhimerus: A novel LAMP assay for detecting *Amphimerus* sp. DNA in human stool samples. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(6):e0005672.

6) Calvopina M, Romero-Alvarez D, Macias R, Sugiyama H. Severe Pleuropulmonary paragonimiasis caused by *Paragonimus mexicanus* treated as tuberculosis in Ecuador. Am J Trop Med Hyg. 2017;96:97-99. doi: 10.4269/ajtmh.16-0351.

7) Takeda M, Sugiyama H, Kumazawa H, Romero D, Calvopina M, Recent collections of freshwater crabs from the Pacific and Amazonian regions of Ecuador, South America. J Teikyo Heisei Univ. 2016;27:1-16

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 高木秀和, カルボピーニャ M, 板垣匡, 杉山広 分子生物学手法を用いたエクアドルの肝吸虫 *Amphimerus* sp. の種判別の比較検討 第 88 回日本寄生虫学会大会 (長崎, 2019 年 3 月 16 日)

2) 杉山 広, 森嶋康之, 窪田理恵, 常盤俊大, 高木秀和, 板垣 匡, ヨシノ TP. 米国に分布する肝臓寄生の吸虫 *Amphimerus elongatus* の動物感染試験. 第 78 回日本寄生虫学会東日本支部大会 (下野, 2018 年 10 月 20 日).

3) 笠原慎平、尾針由真、Manuel Calvopina、高木秀和、杉山 広、板垣 匡 pepck 遺伝子をマーカーとした multiplexPCR は *Fasciola* 属を正確に識別しない. 第 64 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部大会 (札幌、2018 年 10 月 13 日)

4) 杉山 広, 森嶋康之, 川上 泰, 窪田理恵, 常盤俊大, 高木秀和, 板垣 匡, カルボピーニャ M. エクアドルで検出された肝吸虫 *Amphimerus* sp. のハムスターへの感染試験. 第 161 回日本獣医学会大会 (つくば, 2018 年 9 月 12 日).

5) 笠原慎平、尾針由真、Manuel Calvopina、高木秀和、杉山 広、板垣 匡 エクアドル産の分子同定および系統解析. 第 161 回日本獣医学会大会 (つくば, 2018 年 9 月 12 日).

6) Kasahara S, Ohari Y, Calvopina M, Takagi H, Sugiyama H, Itagaki T. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from Ecuador. ICOPA 2018 (Daegu, Aug, 22, 2018).

7) 笠原慎平、尾針由真、Manuel Calvopina、高木秀和、杉山 広、板垣 匡 エクアドル産 *Fasciola* 属の分子系統学的解析. 第 87 回日本寄生虫学会大会 (東京, 2018 年 3 月 18 日).

8) 杉山 広, 森嶋康之, 高木秀和, 板垣 匡, ヨシノ TP. 米国に分布する肝臓寄生の吸虫 *Amphimerus elongatus* に関する検討. 第 77 回日本寄生虫学会東日本支部大会 (相模原, 2017 年 11 月 3 日).

9) 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 森嶋康之, 山崎 浩, 熊澤秀雄, 高木秀和, 板垣 匡, カルボピーニャ M. 南米エクアドルで住民から検出された肝吸虫 *Amphimerus* sp. に関する検討. 第 86 回日本寄生虫学会大会 (札幌, 2017 年 5 月 28 日).

6. 研究組織

(1) 研究分担者

板垣 匡 (Itagaki, Tadashi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 80203074

高木秀和 (Takagi, Hidekazu)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90288522