

平成21年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究（B）海外学術調査
研究期間：2006～2008
課題番号：18406008
研究課題名（和文） テニア症・囊虫症感染源対策のための中間宿主家畜における分子疫学調査とリスク評価
研究課題名（英文） Molecular epidemiological survey and risk evaluation of livestock animals for control of taeniasis and cyctercosis.
研究代表者
岡本 宗裕（OKAMOTO MUNWHIEO）
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：70177096

研究成果の概要：タイ・カンチャナブリ州とインドネシア・バリ島および北スマトラで疫学調査を実施した。タイでは、ヒトの調査から無鉤条虫、有鉤条虫、Asian *Taenia* の3種が同一地域に流行していることを確認した。無鉤条虫の実験感染ウシ血清および Asian *Taenia* 実験感染ブタ血清を用い血清診断法の開発を試みた結果、精製抗原にて良好な結果が得られた。タイの調査地で飼育されているブタの採血を行い、血清診断を実施したが、ブタの囊虫症は確認できなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：テニア症、囊虫症、中間宿主、家畜、分子疫学調査、リスク評価

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを終宿主とするテニア科条虫には、有鉤条虫 (*Taenia solium*)、無鉤条虫 (*Taenia saginata*)、タイワンテニア (*Taenia asiatica*) の3種が知られている。これらの条虫はヒトの腸管に寄生し、テニア症を引き起こす。テニア属の条虫は、中間宿主、終宿主とも哺乳類をその宿主としており、中間宿主は終宿主から排出された虫卵を、終宿主は中間宿主内の幼虫（囊虫）を経口摂取することにより感染する。上述の3種はそれぞれ、ブタ、ウシ、ブタを中間宿主としている。テ

ニア症を予防するためのもっとも有効な方法は感染源である家畜とヒトの間で成立している生活環を断ち切ることである。しかし、人の食習慣に根ざした生活環を断ち切ることは容易ではない。

研究代表者は以前よりこれらのテニア科条虫について旭川医科大学の研究分担者らと共同研究を実施してきた。特にインドネシアにおいては、研究分担者の伊藤を中心にインドネシア国立感染症研究所・インドネシア大学と共同でヒトの疫学調査を実施し、無鉤条虫についてはバリ島に、タイワンテニアに

についてはスマトラ島北部に、有鉤条虫についてはイリアンジャヤに濃厚な汚染地帯があり、さらに有鉤条虫はバリ島やスマトラ島北部にも流行地があることを明らかにしてきた。研究代表者も、平成17年2月にスマトラ島北部の流行地における疫学調査に参加した。これらの研究から、インドネシアにおけるヒトのテニア感染に関してはかなりのデータが蓄積されてきた。

しかし、発展途上国における家畜の疫学調査はきわめて困難なため、これら女中の中間宿主となる家畜（ブタ・ウシ）での調査は全く実施されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、テニア症・囊虫症流行地において「家畜の疫学調査」を分子遺伝学的に実施し、流行地における家畜のリスク評価を実施する。ヒトの疫学調査では、「ヒトの病気であること」を地域住民に説明することにより、検便や採血を比較的容易にしかも網羅的に実施することができる。また調査対象が野生動物の場合なら、捕獲許可さえ取れば調査は容易である。家畜であっても先進国のように家畜の屠殺を屠場で一括しておこなっている場合には、疫学調査は容易に実施できる。しかしテニア症の流行地は発展途上国の小さな村であることが多く、家畜は自家屠殺に供されることがほとんどで屠場での調査は実施できない。また、家畜はテニア科条虫に感染してもほとんど無症状であるため、蓄主にヒトへの感染のリスクを説明しても、なかなか提供してもらえないのが現状である。

そこで、家畜から採血し、特異抗体・循環抗原の検出により感染の有無を確認する。無鉤条虫、タイワンテニアについては、有用な血清診断法が開発されていないため、新しい診断法を開発する。さらに必要に応じて家畜を購入後剖検し、囊虫を採取して条虫の遺伝的多様性を調べる。また、流行地で多様な家畜品種、あるいはそれらの雑種が飼育されていると思われる。そこで、血液あるいは組織から宿主のDNAを抽出し、宿主の遺伝的多様性も同時に調べる。これらの調査結果とこれまで得られているヒトの疫学データから、「どのような飼育形態がリスクが高いのか」、「どんな品種がリスクが高いのか」を検討し、家畜からヒトへ、ヒトから家畜への感染ルートを明らかにする。さらに、これらの情報をもとにテニア症・囊虫症のコントロール法を検討することを最終的な目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 流行地におけるヒトの疫学調査

各年度とも、インドネシア・バリ島とタイ・カンチャナブリ州で疫学調査を実施した。

調査は、まず Kato-Katz 法による糞便内の虫卵検査と問診による片節排出の履歴を確認し、感染が疑われた場合、駆虫薬による駆虫を実施した。得られた虫体について、遺伝子解析を実施し、種ならびに種内変異を確認した。また、ミトコンドリアと核の遺伝子を調べることにより、無鉤条虫とタイワンテニアの交雑の可能性を検討した。

### (2) 中間宿主家畜からの採血

有鉤条虫とタイワンテニアの中間宿主はブタ、無鉤条虫の中間宿主はウシである。本調査では、流行地域内、特に患者の生活圏内を中心にブタより採血を実施した。採取した血液から血清を分離するとともに、一部は宿主 DNA 検査のため凍結またはエタノール中で保存した。

### (3) 屠場でのサンプリング

インドネシア・バリ島の屠場でウシからサンプリングを行った。屠場では、(2)と同様に血液を採取するとともに、感染個体が見つかった場合にはその個体を購入し、囊虫を分離して DNA 検査用にエタノール中で保存した。

### (4) ウシへの無鉤条虫の感染実験

未感染のウシに無鉤条虫卵を経口投与し、経時的に血清を採取した。採取した血清は、無鉤条虫に対する血清診断法の開発に利用した。

### (5) ブタへのタイワンテニアの感染実験

未感染のブタにタイワンテニアの虫卵を経口投与し、経時的に血清を採取した。採取した血清は、タイワンテニアに対する血清診断法の開発に利用した。

### (6) 無鉤条虫およびタイワンテニアに対する血清診断法の開発

上記(4)、(5)の血清と、未感染血清を用い、ELISA とウェスタンブロット法による血清診断法を開発した。特に、SCID マウスに感染させた幼虫より採取したシスト液を精製し（特許出願準備中）、感度・特異性ともに良好な抗原を精製した。

## 4. 研究成果

### (1) 採取された虫体の DNA 解析

疫学調査にて採取された虫体について、ミトコンドリア DNA と核の DNA を解析した。その結果、インドネシア・バリ島で採集された虫体は全て無鉤条虫であることが判明した。一方、タイ・カンチャナブリ州で採集された虫体には、3種全てが含まれており、3種が同所的に分布していることが明らかとなった。また、この地域では下記に示すよう

に、タイワンテニアと無鉤条虫の交雑個体由来と思われる虫体も得られた。

## (2) Asian *Taenia* (タイワンテニア) と無鉤条虫の交雑

Asian *Taenia* (タイワンテニア) はアジア諸国で流行しているヒトの条虫である。無鉤条虫と同様に頭節に鉤はみられないが、その中間宿主がブタであることから、*T. asiatica* という新種として記載された(Eom 2006)。しかし、鉤以外の成虫の形態も無鉤条虫に類似していること、CO1 遺伝子の塩基配列から推定された系統関係が無鉤条虫ときわめて近縁であることから、近年では無鉤条虫の亜種 (*Taenia saginata asiatica*) として扱われることが多いようである(McManus, 2006)。亜種は本来地理的隔離により生じた変異個体群を意味する言葉である。しかし、ヒトや家畜の寄生虫の場合、経済活動に伴う宿主移動により容易に分布を拡大する可能性があり、実際無鉤条虫と Asian *Taenia* が同一地域で流行しているケースも報告されている。亜種はあくまで同種であり、同一地域に生息した場合、当然交雑個体が生じるはずである。そこで本研究では、両種のミトコンドリアと核の遺伝子を調べ、交雑の可能性について検討した。

無鉤条虫と Asian *Taenia* は近縁ではあるがミトコンドリア DNA には明らかな差異が認められ、ミトコンドリア CO1 遺伝子をターゲットとした Multiplex PCR による鑑別法が確立されている。そこで、両者が混在しないとされている地域のヒトから採取されたサンプルについて Multiplex PCR により種の同定を行ったところ、無鉤条虫と Asian *Taenia* は明瞭に区別することができた。それらについて、核にコードされている elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) 遺伝子の塩基配列を調べた。その結果、種内でもごくわずかな変異は認められたが、明らかに Multiplex PCR で無鉤条虫と同定されたものは無鉤条虫タイプの EF-1 alpha 遺伝子を、Asian *Taenia* と同定されたものは Asian *Taenia* タイプの EF-1 alpha 遺伝子を持っていた。次に、有鉤条虫、無鉤条虫、Asian *Taenia* の3種が混生しているタイの流行地からのサンプルについて同様にミトコンドリアと核の遺伝子を検討した。その結果、1 サンプルにおいて、ミトコンドリアでは無鉤条虫と同定されたが、Asian *Taenia* タイプの EF-1 alpha 遺伝子をホモに持つことが明らかとなった。このことは、この個体が無鉤条虫と Asian *Taenia* の交雑体由来であること、すなわち交雑体に妊性があったことを意味するものであり、両条虫の同種説を支持するものと考えられる。

## (3) ウシの無鉤囊虫症の血清診断法の開発

無鉤条虫 (*Taenia saginata*) は人獣共通感染症の原因となり、その幼虫である無鉤囊虫が中間宿主である牛に寄生する。そのため、牛の屠畜検査では咬筋、舌筋、心筋などの目視検査により診断が行われている。しかし、この検査方法は重度の感染牛を発見するには効果的だが軽度の感染牛に対しては必ずしも有効な方法とはいえない。また、流行地における牛の感染状況についての報告はほとんどなく、容易にしかも高感度、高特異的に感染の診断ができる血清学的診断法の開発が望まれている。そこで、本研究では無鉤囊虫 (*T. saginata*) の粗抗原と精製抗原を用いた血清診断の可能性を検討した。

SCID マウスに実験感染させた無鉤囊虫のシスト液を粗抗原とし、シスト液を精製したものを精製抗原として使用した。一次抗体にはウシ血清を使用した。血清はインドネシアで *T. saginata* を実験感染させ定期的に採取されたウシ血清、流行地であるバリの屠場で採取されたウシ血清、および非汚染地域である日本のウシ血清をサンプルとして使用し ELISA 及びウェスタンブロットを行った。

粗抗原を使用した ELISA において、実験感染ウシの血清では寄生数に応じ、経時的に抗体価が上昇していたため、*T. saginata* に対する特異的な抗体を検出できていると考えられる。しかし、感染していないと考えられる日本の牛の一部の血清の中にも高い吸光度を示すものが存在した。また、粗抗原を用いてウェスタンブロットを行ったところ *T. saginata* 感染ウシでは低分子領域から高分子領域にかけて広く反応が見られた。日本のサンプルでは高分子領域にのみ反応が見られたことから、高分子領域に非特異的な抗原が存在する可能性が推察された。そこで、低分子領域の蛋白のみとなるように精製を行ったところ精製抗原でも実験感染ウシの血清で寄生数に応じて経時的に抗体価が上昇した。これに加えて、粗抗原では比較的高い吸光度の値となった日本のサンプルの吸光度が精製抗原では下がった。また、精製抗原を用いたウェスタンブロットを行った結果、低分子領域で感染ウシの血清のみが反応しそれ以外の血清では反応が見られなくなった。これらのことから精製により非特異的な抗原除去し、より特異性の高い抗原の精製に成功したと考えられる。そこで、日本のウシの吸光度の値から精製抗原を用いて ELISA を行った場合のカットオフ値を算出すると、バリの屠場のサンプルでは 41.5% が陽性となった。しかし、バリは無鉤囊虫症の流行地であるとはいえず 41.5% ものウシが感染しているとは考えにくい。この原因として、バリのウシと日本のウシの品種の差により、バリのウシであれば感染前から反応する抗体を持って

いる可能性が否定できない。また、バリでは日本には存在しない感染症の存在があり、それらの感染症との交叉も疑われる。そこで、抗原の特異性をさらに上げる必要もあり、特に他の寄生虫に感染したウシ血清を用いて更なる検討が必要である。

#### (4) ブタにおける感染実験

ミニブタに、タイワンテニアの虫卵を投与し、経時的に採血を行った。7ヶ月後に剖検したところ、肝が腹膜に癒着しており、肝表面に石灰化した病変が認められた。一部について、DNA解析を行ったところ、これらの病変はタイワンテニアの虫体由来であることが明らかとなった。

この実験で採取した感染血清を利用し、無鉤条虫の場合と同様にタイワンテニアに対する血清診断法を開発した。

#### (5) 血清診断による家畜における感染状況の把握

すでに確立している有鉤条虫に対する血清診断法と上記で開発した血清診断法を用いて、流行地における家畜の感染状況について、現在解析を進めている。一部のサンプルについてはすでに解析を終えたが、これまでのところ感染家畜は見つかっていない。このことから、流行地における家畜の感染率はかなり低いと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Nkouawa A., Okamoto M., Mabou A. K., Edingae E., Yamasaki H., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Blair D., Agatsuma T., Enyong P., Shibahara T., Moyou-Somo R. and Ito A. Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and clinical manifestations. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2009, 103; 255-261. 査読有

2. Ito A., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Okamoto M., Wandra T., Dandun I. N., Anantaphruti M. T., Waikagul J., Li T. and Qiu D. Molecular and immunological diagnosis of taeniasis and cysticercosis in Asia and the Pacific. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2008, 39 suppl1: 37-47. 査読有

3. Anantaphruti M. T., Yamasaki H., Nakao M., Waikagul J., Watthanakulpanich D.,

Nuamtanong S., Maipanich W., Pubampen S., Sanguankiat S., Muennoo C., Nakaya K., Sato M. O., Sako Y., Okamoto M., and Ito A. Sympatric Occurrence of *Taenia solium*, *T. saginata*, and *T. asiatica*, Thailand. Emerging Infectious Disease. 2007, 13, 1413-1416. 査読有

4. Wandra T., Margono S. S., Gafar M. S., Saragih J. M., Sutisna P., Sudewi A. A. R., Depary A. A., Yulfi H., Darla D. M., Okamoto M., Sato M. O., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Craig P. S. and Ito A. Current Situation of Taeniasis and Cysticercosis in Indonesia. Tropical Medicine and Health, 2007, 35, 323-328. 査読有

5. Okamoto M., Nakao M., Tachi E., Sako Y., Sato M. O., Yamasaki H., Nakaya K. and Ito A. ASIAN *TAENIA* - SPECIES OR SUBSPECIES? - Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2007, 38 suppl1, 125-130. 査読有

6. Okamoto M., Iseto C., Shibahara T., Sato M. O., Wandra T., Craig P. S. and Ito A. Intraspecific variation of *Spirometra erinaceieuropaei* and phylogenetic relationship between *Spirometra* and *Diphyllobothrium* inferred from mitochondrial CO1 gene sequences. Parasitology International, 2007, 56, 235-328. 査読有

7. Okamoto M., Oku Y., Kurosawa T. and Kamiya M. Genetic Uniformity of *Echinococcus multilocularis* Collected from Different Intermediate Host Species in Hokkaido, Japan. Journal of Veterinary Medical Science, 2006, 69, 55-60. 査読有

8. Wandra T., Depary A. A., Sutisna P., Margono S. S., Suroso T., Okamoto M., Craig P. S. and Ito A. Taeniasis and cysticercosis in Bali and North Sumatra, Indonesia. Parasitology International, 2006, 55 suppl1, 55-60. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Okamoto M. Ancestral hybridization between *Taenia saginata* and Asian *Taenia*. 43rd Annual U. S. -Japan Joint Conference on Parasitic Diseases. January 7-8, 2009, Medical Center of Japan, Tokyo, Japan.

2. Okamoto M. Evidence of ancestral

hybridization between *Taenia saginata* and Asian *Taenia*. XVIIth International Congress of Tropical Medicine and Malaria. September 29 - October 3, 2008, International Convention Center Jeju, Korea.

3. Okamoto M., Nakao M., Anataphruti M. T., Tachi E., Sako Y., Sato M. O., Yamasaki H., Nakaya N., Waikagul J. and Ito A. Is Asian *Taenia* Species or Subspecies? 21th Pacific Science Congress. June 12-18, 2007. Ginowan, Okinawa, Japan.

4. 岡本宗裕、中尾稔、舘英子、迫康仁、Marcello O. Sato、山崎浩、中谷和宏、伊藤亮 Asian *Taenia* (タイワンテニア) は独立種か、それとも亜種か。第76回日本寄生虫学会大会、2007年3月29～30日、大阪。

5. Okamoto M., Nakao M., Tachi E., Sako Y., Sato M. O., Yamasaki H., Nakaya N. and Ito A. ASIAN *TAENIA* - SPECIES OR SUBSPECIES? - FBPZ 2006, November 28-30, 2006, Bangkok, Thailand

[図書] (計 2 件)

1. Ito A., Nakao M., Sako Y., Nakaya K, Yanagida T, Okamoto M. Molecular Detection of Foodborne Pathogens Chapter 62. *Taenia*. 2009, 827-837.

2. Okamoto M., Ito A. Handbook of Nucleic Acid Purification Chapter 13. Purification of nucleic acids from helminthes. 2008, 271-291.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 宗裕 (OKAMOTO MUNEHIRO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：70177096

### (2) 研究分担者

岡本 芳晴 (OKAMOTO YOSHIHARU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50194410

伊藤 亮 (ITO AKIRA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：70054020

迫 康仁 (SAKO YASUHITO)

(2006, 2007 年)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40312459

### (3) 連携研究者

迫 康仁 (SAKO YASUHITO)

(2008 年)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40312459