

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26305011

研究課題名(和文) PK遺伝子から見たアジアにおけるウエステルマン肺吸虫と肺吸虫症の分子疫学的研究

研究課題名(英文) Epidemiological studies on paragonimus westermaniasis in Asia based on the PK gene

研究代表者

吾妻 健 (AGATSUMA, Takeshi)

高知大学・医学部・特任教授

研究者番号：40117031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウエステルマン肺吸虫における核DNAである、Pkイントロンの塩基配列を調べた。その結果、インド産とスリランカ産は、かなり古い時期に祖先種から分岐すること、またマレーシアとフィリピンの集団が東アジアの系統内にクラスターする系統樹が得られ、これまでのミトコンドリアDNAの系統樹とかなり異なる系統樹となった。また、Pkイントロン部位における多くの変異は、アレル間に起こる組換えによるものであることが考えられた。これは、二倍体では、減数分裂時、三倍体では、体細胞分裂時に生じるものと思われた。核DNA(Pkイントロン)のデータからもインド産とスリランカ産は、別種であると結論された。

研究成果の概要(英文)：In this study, nucleotide sequences of Pk intron (nuclear DNA) in *Paragonimus westermani* were used to construct phylogenetic trees. As a result, it was discovered that the India and Sri Lankan clades have been diverged from the other Asian clades of *P. westermani* considerably long time ago. In addition, it became clear that two clades from Malaysia and Philippines was included in the East Asia clade. Phylogenetic tree obtained from this intron region became quite different from the tree using mitochondrial DNA (cox1). Furthermore, it was considered that a lot of mutation of the Pk intron position has been created by the recombination events between different alleles, indicating a single event of triploid origin. Both of the India and Sri Lankan clades could be separate species from *P. westermani*.

研究分野：医動物学

キーワード：ウエステルマン肺吸虫 フォスファーゲンキナーゼ遺伝子 イントロン ミトコンドリアDNA 人獣共通感染症 東南アジア 尿検査

1. 研究開始当初の背景

肺吸虫症は、Neglected Tropical Diseases の中の一つで、グローバルには、現在でもなお数百万以上もの人々が感染している (Keiser & Utzinger, 2005)。肺吸虫症は、一方、肺結核と誤診され易く、インド北東部では、不必要な治療投薬による副作用、入院生活の精神的負担、医療経済的負担等など、無視できない問題となっている (Narain et al., 2009)。同地区では、さらに近年急増の、エイズ患者の肺結核は、免疫力低下により、命の危険に曝されることに伴い、流行地での肺吸虫症の確定診断はさらに急務を要する。さて、肺吸虫症の病原体の中で、世界で初めて(1877年)記載された肺吸虫は、インドベンガル産トラからのウエステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (以後、ウ肺吸虫) である。インドにおける、その後の調査でもウ肺吸虫によるヒト症例報告は少なく、Singh らによるインド初のヒト症例も、あまり確定的証拠のないものである (Singh et al., 1982, 1986)。本申請者らは、最近、インド北東部の3つの州 (アッサム州、アランナチャル州、メガラヤ州) で、本症流行地を認め、喀痰虫卵のDNA 分析を行ったところ、ヒロクチ肺吸虫 *P. heterotremus* 感染によるものであることを見出した (Rekha et al., 2007)。ところが、この侵淫地で採集したメタセルカリアは、DNA 分析で、すべて、ウ肺吸虫であった。これらのことから、インド産のウ肺吸虫はヒト感染性がないものと考えられる (本申請者ら Narain et al., 2009)。さらに、スリランカ、タイ、マレーシアなどの東南アジアにおいても、メタセルカリアでのウ肺吸虫の存在は確認されているにもかかわらず、その肺吸虫症の症例は、驚くべきことにこれまで全く報告されていない。このことは、南アジアのウ肺吸虫は、ヒトに罹らず、東アジアのウ肺吸虫とは、遺伝的に異なることを示している。これは、“全てのウ肺吸虫はヒトの病原体である” というこれまでの考えを改め、病原体の遺伝的背景を詳細に調べることの重要性を示している。ウ肺吸虫による肺吸虫症の症例の大部分は、日本、中国、韓国などの東アジアに局限されている。ちなみに本邦においては、毎年50-100例の症例が報告されている (Nawa, Intern Med, 39, 353, 2000)。これまで申請者らは、東アジア、東南アジア、南アジアの3系統のウ肺吸虫について、アロザイム(15 遺伝子座)の各座位

における頻度やミトコンドリアDNA (以後 mtDNA) *cox1* 領域、核リボソームRNA 遺伝子 (以後 rRNA) ITS2、28S の3領域におけるDNA 解析を行ってきた。解析の結果、それぞれの系統は極めて異なり多様性に富んでいること、中でもインドやスリランカのウ肺吸虫がかなり古い時代に分岐することが分かった (Iwagami et al., 2008, 2009; Devi et al., 2012)。これは、ウ肺吸虫が南アジアの付近で生じ、もともと動物寄生であったが、アジアにおける分布の拡大にともない、ヒト感染能を獲得して行ったことを暗示する。一方、さらにインドでは、申請者らは、ごく最近になって、新規のウ肺吸虫を発見し、ヒト感染性のある東アジアのタイプと類似することを見出した (Devi et al., 2012)。この発見は、これまで、インドの当地方において、ウ肺吸虫による肺吸虫症例を見逃してきた可能性を暗示し、当地方でのヒト肺吸虫症例を始めから見直す必要性を促すものである。

2. 研究の目的

まず、研究期間内に、インド北東部の3つの州の肺吸虫症流行地において住民の尿 (一部血液) を用いた疫学調査を行ない、感染者の特定を行なう。次に感染を疑われた住民から、虫卵陽性喀痰を採集し、虫卵のDNA 検査による病原体の種の同定を行なう。さらに流行地の中間宿主カニを採集し、メタセルカリアを単離して、一部は直接DNA 分析に、一部は成虫を得るため、動物感染実験に供する。得られた成虫は種の同定のための形態並びにDNA 分析に用いる。次に、本研究で調査する遺伝子は、rRNA 遺伝子の28S とITS2、mtDNA の *cox1*、さらに新規に、核遺伝子であるフォスファージェンキナーゼ (以降PK) 遺伝子のイントロン領域を用いる。

スリランカでは、上述したようにウ肺吸虫症例の報告がないため、住民を対象とした疫学調査は行なわず、中間宿主カニを採集し、感染メタセルカリアを単離して同様に動物感染実験に供する。得られた成虫は種の同定のための形態分析並びにDNA 分析に用いる。本研究で調査する核遺伝子 (rRNA 遺伝子及びPK 遺伝子) およびmtDNA 遺伝子 (*cox1*) は、インド調査と同様の遺伝子である。なお、東アジア、東南アジアの各地のDNA は、すでに採集済みである。

3. 研究の方法

インド及びスリランカにおいて肺吸虫症とその病原体に関するフィールドワークとラボワークを以下のように行う。まずインドでは肺吸虫症の侵淫地において住民から尿、喀痰、血液の採取を行う。感染陽性者の喀痰より得られた虫卵からDNAを抽出し塩基配列を決定後、種の鑑別を行う。また尿と血液についてはELISA法により本症感染陽性率を調べる。各流行地の中間宿主カニからメタセルカリアを採取し、動物感染後、成虫を回収する。得られたメタセルカリア及び成虫は、形態観察並びに塩基配列決定に供する。症例報告のないスリランカにおいては、住民調査は、行なわない。第二中間宿主カニからメタセルカリアを採取し実験動物感染後、成虫を回収する。ラボワークはインドと同様に行う。

4. 研究成果

Paragonimus westermani の PkD1Int3 の塩基配列を調べた。Pwには、二倍体と三倍体があり、ヘテロの場合は、クローニングを行ない、配列を決定した。まず、二倍体では、中国大陸からは、北東部(2集団)の Guifanzi から9個体(18シーケンス)及び Xigutai から4個体(5シーケンス)、南部(2集団)の LuiSui から3個体(5シーケンス)及び Minchin から5個体(7シーケンス)、台湾から2集団、8個体(10シーケンス)、日本から4集団、18個体(24シーケンス)、韓国から4個体(7シーケンス)、フィリピンから2集団、10個体(11シーケンス)、マレーシアから1個体(2シーケンス)、スリランカ3集団、10個体(10シーケンス)、インド4個体(5シーケンス)について、系統樹解析を行なった。その結果、インド及びスリランカの集団は、比較的個体変異が低いが、系統的にかなり初期に分岐した系統であることが分かった。この2つの系統以外をまとめると、大きく2つのクラスターに分かれ、一方のクラスターには、マレーシアとフィリピンの集団とともに、中国、日本、台湾、が含まれ、もう1つのクラスターには、中国、日本、台湾、韓国の集団が含まれた。ミトコンドリアDNAでは、スリランカとインドの系統が、PkD1Int3同様にPw進化の初期に分岐し、次にマレーシアとフィリピンの系統が分岐し、決して、中国など東アジアの系統のクラスターに含まれない。今回、核DNAであるPkD1Int3では、上述したようにマレーシ

アとフィリピンの集団が、東アジアの系統内にクラスターし、これまでの系統樹と異なる系統樹が得られた。マレーシアとフィリピンの集団を除く、2つのクラスターは、遺伝的にかなり異なっていることも明らかとなった。また、ハプロタイプ(アリル)の分析を行なったところ、同一のハプロタイプが、中国の南部と日本の集団に共存することも明らかとなった。これらのことは、以下のことを暗示している。Pwの進化の中で、スリランカとインドの集団が始めに分岐して独自の進化過程を歩んだ。おそらく、これらの地域の周辺で、Pwが起源したことを示している。次に、マレーシアとフィリピンの系統が分岐し、同様に独自の進化過程に入って行く。しかし、氷河期には、陸の沈下と島間の陸橋の形成によって、中間宿主や終宿主の移動が容易となり、特に終宿主である肉食哺乳類の移動が可能となった。この宿主の移動により、Pwの系統間の交流が可能になり、マレーシアとフィリピンの系統が、東アジアの系統と交雑を行なった結果、核遺伝子がヘテロになったと考えることができる。一方、三倍体については、多くの変異が認められたが、大きく2つに分かれた。この2つクラスターは、それぞれ数回のイントロン内組換えによって、生じた変異からなることが分かった。これは、極めて異なった2つの系統間の交雑によって生じたものと推定される。この2つの系統は、上述した二倍体の2つのクラスターの塩基配列とほぼ一致し、三倍体の起源の配列であることが明らかとなった。しかし、この大きく異なる2つの配列が、いつ、どこで、生じ、保存されて来たのかは、いまだ、不明である。

第二中間宿主であるサワガニ *Geothelphusa dehaani* の集団をミトコンドリアDNA(*cox1*, 16S)と核DNA(AkInt)を用いて分析した。分析した集団は、九州地方9集団(*cox1*計45匹、45シーケンス、AkInt:90シーケンス)、四国地方12集団(*cox1*計60匹、60シーケンス、AkInt:120シーケンス)、本州5集団(*cox1*計20匹、20シーケンス、AkInt:45シーケンス)であった。まず*cox1*のML法による系統樹解析の結果、四国地方が極めて多型であったこと、九州地方には、古い分岐の系統があること、本州には、全体的に多型の小さい集団が多いことなどが、明らかとなった。AkIntでは、大きく2つの集団に分かれ、*cox1*の配列が大きく異なった個体間の交

雑を示す遺伝子型が数多く見られた。これは、一旦隔離され分化した集団が、再び移動により遭遇し、交雑したものと考えられる。以上をまとめると、サワガニは、沖縄諸島の近郊で起源し、徐々に日本本土に北上したものが日本サワガニとなり、台湾に移行し隔離され、多くの speciation により、台湾産サワガニに種分化したものと推定された。そして、これらの集団は、更新世 (Pleistocene) における、氷河期のはじまりから、幾度となく繰り返されて来た、島嶼と大陸間の陸橋の消失にともない、集団個体の離合集散の結果であるものと考えられた。

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 12 件)

1. S Uni, Ahmad Syihan Mat Udin, T Agatsuma, W Saijuntha, Rosli Ramli, Yvonne Lim Ai Lian, S Sivanandam, E Lefoulon, C Martin, D M Belabut, S Kasim, M Rasul A Halim, H Omar, S Bhasu, M Fukuda, M Matsubayashi, M Harada, Chen Chee Dhang, N Sukanuma, R Hashim, H Takaoka, M Sofian Azirun, *Malayfilaria sofiani* n. gen., n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from common treeshrews (*Tupaia glis*) in Peninsular Malaysia and its phylogenetic status in *Wuchereria-Brugia* clade. Parasites & Vectors, (2017) 査読有
2. A. Ribas, W. Saijuntha, T. Agatsuma, C. Thongjun, K. Lamsan, S. Poonlaphdecha: Helminths in rodents from Wet Markets in Thailand. Helminthologia 53(4) 326-330, DOI: <https://doi.org/10.1515/helmin-2016-0036> (2016) 査読有
3. Saijuntha W, Tantrawatpan C, Jarilla BR, Agatsuma T, Andrews RH, Petney TN.: Intron sequence of the taurocyamine kinase gene as a marker to investigate genetic variation of *Paragonimus* species in Japan and the origins of triploidy in *P. westermani*. Trans R Soc Trop Med Hyg 110(1): 67-73. doi: 10.1093/trstmh/trv109 (2016). 査読有
4. Wickramasinghe S, Yatawara L, Nagataki M, Agatsuma T. : Arginine kinase in *Toxocara canis*: Exon-intron organization, functional analysis of site-directed mutants and evaluation of putative enzyme inhibitors. Asian Pac J Trop Med. 2016 Oct; 9 (10): 995-1001(2016).doi: 10.1016/j.apjtm. 2016.07.023. 査読有
5. Ribas A, Saijuntha W, Agatsuma T, Prantlova V, Poonlaphdecha S. : Rodents as a Source of *Salmonella* Contamination in Wet Markets in Thailand. Vector Borne Zoonotic Dis. 16(8):537-540(2016). doi:10.1089/vbz. 2015.1894. 査読有
6. T. Shotake, W. Saijuntha, T Agatsuma, Y Kawamoto: Genetic diversity within and among gelada (*Theropithecus gelada*) populations based on mitochondrial DNA analysis. Anthropological Science, 124(3), 157-167(2016).DOI:10.1537/ase.160717 査読有
7. M. Nagataki, C. Tantrawatpan, T. Agatsuma, T. Sugiura, K. Duengngai, P. Sithithaworn, R. H. Andrews, T. N. Petney, W. Saijuntha: Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea : Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: *Echinostoma revolutum* and *E. miyagawai*. Infection, Genetics and Evolution 35: 56-62 (2015). Doi:10.1016/j.meegid.2015.07.022 査読有
8. S. Uni, M. Fukuda, T. Agatsuma, Odile Bain, Y. Otsuka, J. Nakatani, M. Matsubayashi, M. Harada, H. Omar, R. Ramli, R. Hashim, M. S. Azirun, H. Takaoka: *Onchocerca takaokai* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) in Japanese wild boars (*Sus scrofa leucomystax*): Description and molecular identification of intradermal females. Parasitology International 64 (6) : 493-502 (2015). Doi:10.1016/j.Parint. 2015.07.001 査読有
9. S. Tokuhiro, M. Nagataki, B. R. Jarilla, K. Uda, T. Suzuki, T. Sugiura, T. Agatsuma Phosphagen kinase in

- Schistosoma japonicum*: II. Determination of amino acid residues essential for substrate catalysis using site-directed mutagenesis. *Molecular & Biochemical Parasitology* 194, 56-63 (2014). doi:10.1016/j.molbiopara.2014.04.010 査読有
10. Saijuntha W, Tantrawatpan C, Sithithaworn P, Duengai K, Agatsuma T, Andrews RH, Petney TN: Genetic characterization and phylogenetic analysis of echinostomes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 45(5): 1003-1010(2014). doi:10.4269/ajtmh.13-0260 査読有
11. Wang C, Saijuntha W, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Muth S, Meng CC, Ai Y, Agatsuma T. Molecular characterization of sympatrically distributed *Neotricula aperta*-like snails in the Mekong River, Kratie, Cambodia. *Mitochondrial DNA*, 27:1038-1041(2014). http://dx.doi.org/10.3109/19401736.2014.926544 査読有
12. W. Saijuntha, B. Jarilla, A. K. Leonardo, L. S. Sunico, L. R. Leonardo, R.H. Andrews, P. Sithithaworn, Trevor N. Petney, M. Kirinoki, N. Kato-Hayashi, M. Kikuchi, Y. Chigusa, T. Agatsuma. Genetic Structure Inferred from Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Sequence of *Oncomelania quadrasi*, the Intermediate Snail Host of *Schistosoma japonicum* in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 90(6), 1140-1145 (2014). 査読有 doi:10.4269/ajtmh-13-0260

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1 .吾妻健、W. Saijuntha: 高知産肝蛭が *F. hepatica* と *F. gigantica* の雑種であるもう一つの証拠: 高知産肝蛭の核 Pk 遺伝子座がヘテロである。Another molecular evidence of hybridization of *Fasciola* sp. from Kochi, Japan between *F. hepatica* and *F. gigantica* 第57回日本熱帯医学会大会 2016年11月5日~6日一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- 2 . 吾妻健、W. Saijuntha: フォスファーゲンキナーゼ遺伝子から見た、住血吸虫の系統関係と推定分岐年代 第72回日本寄

生虫学会西日本支部大会、2016年10月15日~16日、岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜県岐阜市)

3 .W. Saijuntha, T Agatsuma: Population genetics of *Bithynia* sp, the intermediate host of *Opisthorchis viverrini*, in southeast Asia. 第68回日本衛生動物学会大会、2016年4月15日~17日、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

4 .W. Saijuntha, 古屋八重子, 山岡 遵, 産田 孝, 岩代洋子, 吾妻 健: 南西日本における肺吸虫第二中間宿主サワガニの分子生物地理学的研究。第68回日本衛生動物学会大会、2016年4月15日~17日、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

5 .W. Saijuntha, C. Tantrawatpan, T. Agatsuma: タイ、ラオス、カンボジアにおける *Indoplanorbis exustus* の遺伝的多様性と隠遁種の存在 第67回日本衛生動物学会大会、2015年3月27日~29日、金沢大学宝町キャンパス(石川県金沢市)

6 . 桐木雅史、林尚子、M. Sinuon、D. Socheat、C. M. Chuor、大前比呂思、C Wang、吾妻健、千種雄一: カンボジアにおけるメコン住血吸虫中間宿主貝生態調査の試み。第55回日本熱帯医学会大会・第29回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、2014年11月1日~3日、東京女子医科大学弥生記念講堂(東京都新宿区)

7 .吾妻健、JY. Xiao、C. Wang、B. Jarilla、R. Rajapakse、L.R. Leonardo、I. Ithoi、Umi、千種雄一、松田肇、斉藤康秀、W. Saijuntha: フォスファーゲンキナーゼ遺伝子イントロンから見た、肝蛭の分子系統、第70回日本寄生虫学会西日本支部大会、2014年10月18日~19日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況（計 2 件）

名称：ジンゲロール含有組成物
発明者：受田浩之、島村智子、吾妻健など
権利者：株式会社ソフィ、株式会社高南メ
デイカル、ひまわり乳業株式会社など
種類：特許（通常）
番号：特許第5906541号
取得年月日：平成28年4月1日
国内外の別：国内

名称：低栄養状態改善組成物
発明者：野村晴香、吾妻健
権利者：株式会社ソフィ、株式会社高南メ
デイカル、など
種類：特許（通常）
番号：特許第6011836号
取得年月日：平成28年10月19日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ps_ken51/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吾妻 健（AGATSUMA, Takeshi）
高知大学・医学部・特任教授
研究者番号：40117031

(2) 研究分担者

（ 0 ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ 0 ）

研究者番号：

(4) 研究協力者

（Weerachai Saijuntha）