

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21256003

研究課題名（和文） 世界におけるエキノコックス、テニア条虫の種分化、分子共進化研究

研究課題名（英文） Speciation of Taeniid cestodes (*Echinococcus* spp. and *Taenia* spp.) in the world and co-evolution of the host-parasite relationship

研究代表者

伊藤 亮 (ITO AKIRA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：70054020

研究成果の概要（和文）：雌雄同体である条虫の生殖戦略は自家受精であるが、①無鉤条虫とアジア条虫の交雑個体が、両種が同所的に分布している地域で、②有鉤条虫の 2 つの遺伝子型、アジアとアフリカ型がマダガスカルで同所的に分布し、交雑個体がそれぞれ確認された。多包条虫ならびに狭義の単包条虫の遺伝子多型と地理分布についての新知見が得られた。これら成果は条虫種間、種内変異を正確に検出できる遺伝子診断、免疫診断法を確立できた結果である。

研究成果の概要（英文）：Parasitic cestodes, Cestoda, Plathelminthes, have well been known to be hermatophroditic. Self-fertilization is the basic strategy for reproduction biology in cestodes. However, through our most recent studies on mitochondrial (haploid) and nuclear (diploid) DNA of two independent species infecting humans, *Taenia saginata* and *Taenia asiatica* have revealed that there are hybrids or hybrid derived adult tapeworms in Thailand and China where these species are sympatrically distributed. These data strongly reveal cross fertilization in the definitive host, humans, and launch “What is *T. asiatica*? Is it really independent species?” It is still under debates. Similar evidence showing cross fertilization between the intraspecies two, Asian and Afro/American genotypes of *Taenia solium* has been confirmed from larval stage of this parasite sampled in Madagascar. In Madagascar, we could have confirmed that the two genotypes are sympatrically distributed and also some hybrid individuals have been confirmed. Our work is the first one comparing both mitochondrial and nuclear genes in cestodes or platyhelminthes. These all data strongly suggest the cross fertilization in cestode reproduction biology. Molecular studies on *Echinococcus* spp. have also revealed that *E. granulosus* sensu lato is not a single species but 5 species, and a total of 9 independent species are included in the genus *Echinococcus*. Among these species, *E. multilocularis* is highly pathogenic and 3 (North American, Asian and European) genotypes have been known, but we have confirmed additional one, Mongolian genotype. The new information on the cestode speciation and identification has successfully been confirmed by the establishment of immuno- and molecular-diagnostic tools developed by our research team.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2010年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2011年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
年度			
年度			
総計	29,700,000	8,910,000	38,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：感染症・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

テニア科条虫は、条虫綱で致死的な囊虫症エキノコックス症などを引き起こす病原性が非常に高い種類を多く含む特殊な寄生虫集団である。囊虫症、エキノコックス症は難治性、致死性疾患として現在、WHOの **Neglected Tropical Diseases** に狂犬病、炭疽などのウイルス、細菌感染症とともにリストアップされている寄生虫疾患である。

これまで人体寄生テニア条虫は豚肉から感染する *Taenia solium*（有鉤条虫）と牛肉から感染する *Taenia saginata*（無鉤条虫）の2種類が知られていたが、アジアではこれら2種類以外に、

1) ブタの内臓を生食して感染する特殊な無鉤条虫の存在が古くから知られており、“Asian *Taenia*”と呼ばれていた。これは1993年に韓国の研究者により新種、*Taenia asiatica*（アジア条虫）として記載された（Eom and Rim. 1993. Korean J Parasitol）。これら2種類の人体寄生テニア条虫は同所的に分布している可能性があり、種間雑種が見つからないのであれば、別種であるとするべきであるという見解が出されていた（Ito et al. 2003. Lancet 362, 1918）。

2) 脳囊虫症を引き起こす *Taenia solium*（有鉤条虫）はアジア型と、アフリカ・アメリカ

型の2つの地理的遺伝子型に大別される事が本研究グループのこれまでの研究から判明していた（Nakao et al. 2002. Parasitology 124, 657）。

3) エキノコックス属条虫は世界に4種類分布し、地球規模で最も広く分布している、いわゆる単包条虫（*Echinococcus granulosus sensu lato*）は異なる遺伝子型（G1～G10）ならびにアフリカライオンに寄生する単包条虫（*E. granulosus felidis*）を有する単一種とみなされていた。

① 研究の学術的な経緯：

これまでの基盤研究（海外学術調査）により、1) 本研究グループの海外調査から中国、タイで無鉤条虫、アジア条虫両種が同所的に、さらに有鉤条虫を含め3種類が同所的に分布している地域が発見された（Li et al. 2006, Acta Trop 100, 223；Anantaphruti et al. 2007, Emerg Infect Dis 13, 1413）。さらにタイから得られたテニア条虫のミトコンドリアならびに核遺伝子を詳細に解析した結果、無鉤条虫とアジア条虫の交雑個体が複数個見つかった（Okamoto et al. 2010, Parasitol Int 59, 70）。

2) 有鉤条虫の2遺伝子型が同所的に分布する

と期待されるマダガスカルのパスツール研究所と共同研究を実施することになった。

3) 本研究グループのイ) ミトコンドリア遺伝子解析結果から、いわゆる単包条虫は1種類ではなく5種類であること(Nakao et al. 2007. *Parasitology* 134, 713)、ロ) チベット高地から2005年に発見された新種、チベット包状条虫(*E. shiquicus*) (Xiao et al. 2005. *Int J Parasitol* 35, 693)を含め、計9種類になること、多包条虫1種だけが多房性の包虫を形成すること、多包条虫には地理的特性を示す3つの遺伝子型(ヨーロッパ、アジア、アメリカ)が確認されたこと、姉妹種として新種記載されたチベット包状条虫の成虫形態は多包条虫に類似するが幼虫は単房性であること、亜種から独立種に戻されたライオンに寄生するライオン包状条虫(*E. felidis*)は人体症例が最も多く、地球規模で最も広く分布している狭義の単包条虫(*E. granulosus s.s.*)に最も近い位置を占め、姉妹種であること、これまで単包条虫とみなされていたG1-G10は、すべてイヌ科動物を終宿主とするのに対し、ライオン包状条虫だけがネコ科動物を終宿主にすることが判明した(Nakao et al. 2007. *Parasitology* 134, 713; Huttner et al. 2008. *Int J Parasitol*. 38, 861)。

以上の成績から、病態の転換[単房性(多包条虫以外の全種)と多房性(多包条虫)]、宿主転換(イヌ科とネコ科)の問題、地理的な特徴を示す遺伝子型が存在することが明確になりつつあると総括した。

4) 狭義の単包条虫(*E. granulosus s. s.*)の起源を解析するうえで、重要なサンプルとなる中近東、ヨルダンとイランからサンプルが提供された。

5) モンゴルから多包虫症患者標本が提供された。

6) これまで全く手がかりがなかったロシア

の研究者との連絡に成功し、共同研究を実施する打ち合わせが実施できた。

7) 条虫種の鑑別に必要なミトコンドリア遺伝子のみならず核遺伝子も数種類同定され、ミトコンドリアと核、それぞれの遺伝子解析が可能になった。核遺伝子は免疫診断法の開発時に遺伝子組み換え抗原遺伝子として見つけていたものが大きく役立った(Sako et al. 2002. *J Clin Microbiol* 40, 2760)。

8) 条虫種の鑑別に必要な遺伝子、免疫診断法が確立された(Nkouawa et al. 2009. *J Clin Microbiol* 47, 168 ; Sako et al. 2009. *J Clin Microbiol* 47, 252;)。

## 2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究ではエキノコックス条虫、特に多包条虫ならびに狭義の単包条虫ならびに人体寄生テニア条虫3種を用い、ミトコンドリアならびに核遺伝子の解析を通し地理的遺伝子多型の実態を明らかにし、地理的拡散の歴史、種の起源についての新知見を得、条虫と宿主との共進化を論ずることである。

## 3. 研究の方法

1) 地球規模での人体寄生人獣共通条虫のサンプリングならびに宿主血清、検便検査が中心になる。宿主血清、検便は感染個体の検出、鑑別に不可欠である。

2) ミトコンドリア遺伝子解析だけでは生殖戦略の解析が不可能なことから核遺伝子の解析をさらに発展させ単一核遺伝子をできるだけ多く拾い上げ、母系遺伝するミトコンドリア遺伝子と有性生殖による核遺伝子の詳細な解析から種間交雑、種内交雑を解析する。

3) 種の同定に必要なミトコンドリア、核遺伝子を特定し、遺伝子診断法を確立する。

4) その上で、種の同定に必要な免疫診断法も

開発する。

#### 4. 研究成果

①、タイのみならず中国でも無鉤条虫とアジア条虫が同所的に分布している地域が見つかり、その地域住民から駆虫された成虫のミトコンドリアと核遺伝子と遺伝子の解析により、両種間の交雑個体が確認された。アジア条虫は種として無鉤条虫から完全には隔離されていないことが示唆された。

②マダガスカルではアジア型とアフリカ型の有鉤条虫が同所的に分布しており、交雑個体が確認された。アジア型有鉤条虫の遺伝子型の詳細な解析からインドネシア、カリマンタンあたりからヒトの移動に伴って有鉤条虫も移動したと考えることは困難なこと、むしろインド大陸から本条虫が移動したと考えざるを得ない成績が得られた。

③ミトコンドリア遺伝子解析から多包条虫ではアジア型とモンゴル型の2遺伝子型がモンゴルから、アジア型がロシア(アルタイ地方)から確認され、すなわち多包条虫には4つの地理的特性を示す遺伝子型が存在することが確認された。

④ヒツジを中間宿主とする狭義の単包条虫はヒツジの発祥地と推定される中近東から全世界に拡散したと推定された。

⑤上記の種内変異、種間変異を正確に検出できる遺伝子診断法を確立した。

以上の成果から、条虫の生殖戦略、種分化、地理拡散の一端が判明しつつある。また、これまでの研究での限界、今後の課題が見えてきた。

#### 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](欧文誌 56件(すべて査読あり)、和文誌 6件(1件査読あり)、計 62件)

①Li T, Ito A, Chen X, Long C, Okamoto M,

Raoul F, Giraudoux P, Yanagida T, Nakao M, Xiao N, Craig PS. Usefulness of pumpkin seeds combined with areca nut extract in community-based treatment of human taeniasis in northwest Sichuan province. *Acta Trop* 2012; 124: 152-157.  
doi: 10.1016/j.actatropica.2012.08.002.

②Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, Nakao M, Sadjjadi SM, Hijawi N, Abdel-Hafez SK, Sako Y, Okamoto M, Ito A. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus* in the Middle East. *Parasitol Int* 2012; 61: 599-603.  
doi: 10.1016/j.parint.2012.05.014

③Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Giraudoux P, Raoul F, Nakaya K, Xiao N, Qiu J, Qiu D, Craig PS, Ito A. A Loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: application to a field survey. *Parasitol Int* 2012; 61: 723-725.  
doi: 10.1016/j.parint.2012.06.001

④Konyaev SV, Yanagida T, Ingovatova GM, Shoikhet YN, Nakao M, Sako Y, Bondarev AY, Ito A. Molecular identification of human echinococcosis in the Altai region of Russia. *Parasitol Int* 2012; 61: 711-714.  
doi: 10.1016/j.parint.2012.05.009

⑤Hailemariam Z, Nakao M, Menkir S, Lavikainen A, Yanagida T, Okamoto M, Ito A. Molecular identification of unilocular hydatid cysts from domestic ungulates in Ethiopia: implications for human infections. *Parasitol Int* 2012; 61: 375-377.  
doi: 10.1016/j.parint.2012.01.007

⑥Yamane K, Suzuki Y, Tachi E, Li TY, Chen

XW, Nakao M, Nkouawa A, Yanagida T, Sako Y, Ito A, Sato H, Okamoto M. Recent hybridization between *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*. *Parasitol Int* 2012; 61: 351-355.

doi: 10.1016/j.parint.2012.01.005.

⑦ Knapp J, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Saarma U, Lavikainen A, Ito A. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2011; 61: 628-638.

doi: 10.1016/j.ympev.2011.07.022.

⑧ Jongwietiwes U, Yanagida T, Ito A, Kline S. Isolated intradural-extramedullary spinal cysticercosis: a case report. *J Travel Med* 2011; 18: 284-287.

doi: 10.1111/j.1708-8305.2011.00535.x.

⑨ Sako Y, Nakaya K, Ito A. *Echinococcus multilocularis*: Identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Exp Parasitol* 2011; 27: 693-701.

doi: 10.1016/j.exppara.2010.11.005.

〔国際学会発表〕（計 31 件）

- ① Invited speaker on “The present situation of alveolar Echinococcosis and cystic Echinococcosis in Mongolia” at “Molecular Epidemiology” session at 24<sup>th</sup> International Congress of Hydatidology. Urumqi, China, 14-18 Sept 2011.
- ② Invited speaker on “Histopathological, serological, and molecular confirmation of alveolar echinococcosis cases in Mongolia”. At 3<sup>rd</sup> International Symposium on “Emerging Infectious

Diseases”, Ulaanbaatar, Mongolia, 29-30 July 2010.

- ③ Key note speaker on “The Recent advances in serodiagnosis of echinococcosis” at “Alveolar echinococcosis” session at 23<sup>rd</sup> International Congress of Hydatidology. Colonia, Uruguay, 10-12 Dec 2009.
- ④ Invited speaker on “Phylogeny and phylogeography of *Echinococcus*” at the workshop on “Biology and Biochemistry of Echinococcus” at 23<sup>rd</sup> International Congress of Hydatidology. Colonia, Uruguay, 10-12 Dec 2009.
- ⑤ Key note speaker on “Advances in Diagnosis of Neurocysticercosis” at the First Indonesian Congress of Neurological Diseases, Denpasar, Indonesia, 13-15 Nov 2009.
- ⑥ Invited speaker on “Echinococcosis: detection of patients and identification of parasites” at the 2<sup>nd</sup> Baltic Forum on Zoonoses, St Peterburg, Russia, 2-3 Oct 2009.
- ⑦ Special lecture on “Immuno- and Molecular-diagnosis of Echinococcosis” at 10th International Congress of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, Ulaanbaatar, Mongolia, 10-11 Sept 2009.

〔図書〕（欧文図書、5 件、和文図書、6 件、計 11 件）

- ① Ito A, Nakao M, Sako Y, Yanagida T, Nakaya K, Knapp J, Ishikawa Y (2012) Chapter *Echinococcus* and Echinococcosis. In: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens (ed. by Liu D), 249-263. CRC Press. (ISBN

9781439812426)

- ② Okamoto M, **Ito A** (2012) Chapter Taenia. In: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens (ed. by Liu D), 295-305. CRC Press. (ISBN 9781439812426)
- ③ Flisser A, Craig PS, **Ito A**. (2011) *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. In: Zoonoses. Palmer SR, Lord Soulsby, Torgerson PR, Brown DWG (eds), 627-644. Oxford University Press.
- ④ Okamoto M, **Ito A**. (2009). Chapter 13. Purification of nucleic acids from helminthes. In: Handbook of Nucleic Acid Purification (ed. by Liu D), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 271-291.
- ⑤ **Ito A**, Nakao M, Sako Y, Nakaya K, Okamoto M, Yanagida T. (2009). Chapter 62. Taeniasis. In: Foodborn Pathogens (ed. by Liu D), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 827-838.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 亮 (ITO AKIRA)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70054020

### (2) 研究分担者

中尾 稔 (NAKAO MINORU)  
旭川医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70155670

### (3) 研究分担者

中谷 和宏 (NAKAYA KAZUHIRO)  
旭川医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70109388

### (4) 研究分担者

迫 康仁 (SAKO YASUHITO)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40431837

### (5) 研究分担者

柳田 哲矢 (YANAGIDA TETSUYA)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40431837

### (6) 研究分担者

岡本 宗裕 (OKAMOTO MUNEHIRO)  
京都大学・霊長類研究所・教授  
研究者番号：70177096