

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

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：26305008

研究課題名(和文) 途上国における腸管寄生原虫感染実態の網羅的研究

研究課題名(英文) Comprehensive molecular epidemiological study for parasites distributing in Indonesia

研究代表者

所 正治 (Tokoro, Masaharu)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30338024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：エントアメーバ属とジアルジア属を網羅的にスクリーニングする分子疫学調査によって、寄生原虫の各種、遺伝子型は、まん延地域の環境および宿主要因に対して異なる反応を示すことが明らかになった。大腸アメーバの陽性率は雨期に高く、一方、ジアルジアでは、遺伝子型AとBともに乾期に陽性率が高かった。いずれの場合も女兒における陽性率の季節性がその主要因となっており、男児では有意差をみなかった。途上国における腸管寄生原虫のまん延実態把握には、網羅的なアプローチによる分子疫学的解析が極めて有効である。

研究成果の概要(英文)：Seasonal molecular epidemiology of Entamoeba spp. and Giardia intestinalis was evaluated using children's and related animal fecal samples at a rural village in Indonesia. The higher positive rate of E. coli in rainy season (23.9%, vs. 33.7%, $P=0.02$ in dry and rainy seasons respectively) was observed, and the main factor that brings about this was thought to be the higher E. coli prevalence (11.5% vs. 20.6%, $P=0.02$, same as the above) in female. While, the genotyping evaluation of G. intestinalis confirmed the lower prevalence of both assemblage A and B among female population in rainy season (A: 5.9% vs. 0.8%, $P=0.026$; B: 16.9%, vs. 7.8%, $P=0.035$, same as the above), though there was no seasonal difference of those prevalences in male. The comprehensive molecular screening approaches for those various species and genotypes could address environmental and host-related factors effectively.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：インドネシア 分子分類 エントアメーバ ジアルジア 季節性 宿主因子 腸管寄生原虫 人獣共通感染

1. 研究開始当初の背景

インドネシア、スンバ島において 2009 年以來継続的に実施してきた学童検診によって、病原性腸管寄生虫(エントアメーバ属、ジアルジアなど)および非病原性原虫(プラストシスチス、腸トリコモナス、メニール鞭毛虫、レトルタモナス属、エンテロモナス属など)の同地域における高度まん延を確認してきた。途上国におけるこのような寄生原虫の高度まん延は、世界中でよく知られるが、従来の調査は個別の原虫種を扱ったものが大部分であり、多様な寄生原虫を網羅的に取り扱った環境要因や宿主要因の疫学的評価は、ほとんど実施されていない。

2. 研究の目的

幅広い寄生原虫の種および遺伝子型の途上国におけるまん延実態とその動態を明らかにするために、まん延に關与する環境要因(水利用状況)と宿主要因(年齢、性差および宿主特異性)を網羅的分子同定によって疫学的に評価する。

3. 研究の方法

分子分類によるスクリーニングをベースとした観察的疫学研究(横断研究)として季節要因および宿主要因を評価した。具体的には、インドネシア、スンバ島、ワインニャプ村において 2014 年 9 月(乾期)に学童から採取したヒト糞便 243 検体および動物糞便(豚、犬、水牛、牛、山羊、馬、鼠、鶏)136 検体と、2015 年 2 月(雨期)に同様に採取したヒト糞便 199 検体および動物糞便(豚、犬、水牛、山羊、馬、鼠、鶏、家鴨)99 検体を材料とし、アメーバ類およびジアルジア、プラストシスチス、腸トリコモナスおよびフォルニカタ(メニール鞭毛虫、レトルタモナス属、エンテロモナス属)の分子疫学的評価を実施した。

4. 研究成果

(1) エントアメーバ属

アメーバ類全体の感染率は雨期に高い傾向にあった(乾期 41.2%、雨期 49.2%、 $P=0.054$)。種別感染率では、ディスパアメーバ *Entamoeba dispar* (乾期 7.8%、雨期 4.0%)、ハルトマンアメーバ *E. hartmanni* (乾期 20.6%、雨期 21.1%)では有意差はなく、大腸アメーバ *E. coli* では雨期に高値(乾期 23.9%、雨期 33.7%、 $P=0.02$)となった。

年齢層別解析では、アメーバ類全体及び各アメーバ種において感染率に特異傾向は認めなかったが、女兒の *E. coli* 感染のみで雨期における高学年層(7-9 学年)で高値の傾向(乾期 23.8%、雨期 37.7%、 $P=0.06$)をみた。

男女別では女兒においてアメーバ感染率が雨期に高値(乾期 21.0%、雨期 31.2%、 $P=0.02$)となり、特に *E. coli* で女兒における雨期での感染率の高値(乾期 11.5%、雨期 20.6%、 $P=0.02$)が特徴的だった。男児ではアメーバ感染率に季節変動はなかった(乾期 19.8%、雨期 18.1%)。

考察

・アメーバ類の中では、大腸アメーバのみに感染率の季節変動をみた。おそらく囊子の乾燥耐性が関係し、雨期における囊子の生存期間延長が感染率の上昇に關与する。

・女兒の特に高学年が季節性の影響を受けることから、水利用と關係する家事への従事、大腸アメーバ感染の季節性に關与する可能性が示唆された。

(2) ジアルジア

ジアルジア全体では、乾期と比較して雨期において陽性率が有意に低かった(乾期 21.5%、雨期 12.7%、 $P=0.038$)。

遺伝子型別では、Ass. A(乾期 6.1%、雨期 2.8%)、Ass. B(乾期 15.4%、雨期 9.9%)ともに雨期における低下傾向をみたが、有意差はなかった。

年齢別では、Ass. A は低年齢層においてより高率に感染し、Ass. B では年齢に關わらず感染する傾向がみられた。

性別でみると、Ass. A、B ともに男児では、感染率に季節変化を認めず、一方女兒では、雨期において Ass. A、B ともに感染率の低下をみた(A: 乾期 5.9%、雨期 0.8%、 $P=0.026$ 、B: 乾期 16.9%、雨期 7.8%、 $P=0.035$)。雨期のみの感染率で男女差をみると、Ass. A では女兒における低値(男児 5.9%、女兒 0.8%、 $P=0.044$)をみるが、Ass. B では男女差がなかった(男児 12.9%、女兒 7.8%)。

考察

・ジアルジア全体では、アメーバ類とは対照的に雨期に感染率が低下し、囊子の生存率などの寄生虫側の因子よりも、十分な水量による衛生状態の改善といった環境要因が、原虫感染の季節性に寄与するものと考えられた。

・女兒のみに各遺伝子型の感染率の季節変動を認め、さらに男女の感染率の違いが Ass. A で顕著なのに対して Ass. B ではほとんど無いことから、女兒でのジアルジア感染の季節変動が上記のジアルジア感染の季節性の主要要因と考えられた。また各遺伝子型の季節性に対する寄与が明らかに異なることから、人から検出される 2 つの遺伝子型 Ass. A と B における感染環の維持機構に、基本的な違いが存在する可能性が示唆された。

(3) 人獣共通感染

アメーバ類：*E. dispar* は人のみからの検出だったが、*E. hartmanni* と *E. coli* は、豚、齧歯類、ニワトリから検出され、人獣共通感染症として当地において維持されていると考えられた。

ジアルジア：齧歯類から *Giardia muris* と Ass. A が、また豚から Ass. E、犬から Ass. D、水牛から Ass. E が検出され、人にみられた Ass. B はいずれの動物からも検出されなかった。以上の観察より、少なくとも Ass. B は、当地において人を主な宿主として感染環が維持され、人に関連する各種の野禽、家畜などには、主に各宿主に特異的なジアルジア種や遺伝子型が分布する。したがって、当地でのジアルジアの人におけるまん延における人獣共通感染の役割は、限定的と考えられた。

ブラストシスチス：人獣の双方で高度まん延を見ることから、本原虫症は人獣共通感染症と考えられてきた。しかし、本研究で観察されたブラストシスチスの複数の遺伝子型の分布は、宿主特異性による分離を強く示唆するものだった。各遺伝子型の糞口感染が日常的に発生している寄生虫高度まん延地域におけるこのような知見は、人獣共通感染症とされてきた本原虫症に関する従来の仮説を疑わせるに十分な知見である。

その他の腸管寄生原虫：腸トリコモナスとフォルニカタについての分子分類及び解析は現在進行中である。

(4) 総括

環境要因と宿主要因は、寄生虫流行の推移を左右する重要な因子である。本研究では、分子疫学調査によって同定された腸管寄生原虫の各種、遺伝子型が、環境および宿主要因に対して異なる感受性を保持することを明らかにした。特に、水利用状況の違い（環境要因）や性差（宿主要因）によるこの違いは、有意差をもって十分に評価が可能であったことから、今後は、本研究の成果をベースに腸管寄生原虫のまん延の全体像（Dynamics of parasite life cycles in an endemic area）の解明に迫る。

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4件)

1. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, Arayama S, Asih PB, Rozi IE, Syafruddin D. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int.* 2016 Dec;65(6 Pt B):780-784. (査読あり)

2. Matsubayashi M, Sasagawa Y, Aita T, Tokoro M, Haritani M, Shibahara T. First report of mixed *Entamoeba polecki* (ST 1) and *E. suis* infection in piglets shedding abnormal feces by histopathological and molecular surveys. *Acta Parasitol.* 2016 Dec 1;61(4):665-670. (査読あり)

3. Matey EJ, Tokoro M, Mizuno T, Matsumura T, Nagamoto T, Bi X, Oyombra JA, Sang WK,

Songok EM, Ichimura H. Positive correlation of HIV infection with *Giardia intestinalis* assemblage B but not with assemblage A in asymptomatic Kenyan children. *AIDS.* 2016 Sep 24;30(15):2385-7. (査読あり)

4. 馳 亮太、伊藤禎浩、福田和司、所 正治、永元健啓.

確定診断にPCR検査が有用であったアメーバ性肝膿瘍の1例.

日本臨床寄生虫学会誌 2016;27(1);84-86. (査読あり)

〔学会発表〕(計26件)

1. Masaharu Tokoro, Tetsushi Mizuno, Takehiro Nagamoto, Joko Hendarto, Elizabeth Jemaiyo Matey, Hiroshi Ichimura, Elijah Maritim Sngok

Intestinal protozoan infections and HIV infection

The 14th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2016 Nov 26-27. Azabu University, Kanagawa, Japan

2. Tetsushi Mizuno, Elizabeth Jemaiyo Matey, Joko Hendarto, Takehiro Nagamoto, Din Syafruddin, Hiroshi Ichimura, Elijah Maritim Sngok, Masaharu Tokoro

Highly diversified *Giardia intestinalis* assemblage B in Africa: African origin?

The 14th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2016 Nov 26-27. Azabu University, Kanagawa, Japan

3. Joko Hendarto Tukimin, Takehiro Nagamoto, Tetsushi Mizuno, Din Syafruddin, Masaharu Tokoro

Molecular taxonomic analysis of *Retortamonas* spp. detected from humans and related animals in Indonesia: Collection of novel references.

The 14th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2016 Nov 26-27. Azabu University, Kanagawa, Japan

4. 所正治

途上国に分布する多様な腸管寄生原虫を検出する

第72回日本寄生虫学会西日本支部大会、2016.10.15、岐阜大学サテライトキャンパス（岐阜）

5. 永元健啓、荒山駿介、吉川尚男、所 正治 Self-made DNAzol と既存 DNA 精製キットの DNA 保存・精製効率の比較

第72回日本寄生虫学会西日本支部大会、2016.10.15、岐阜大学サテライトキャンパス（岐阜）

6. Joko Hendarto Tukimin, Takehiro Nagamoto, Din Syafruddin, Masaharu Tokoro Eight-nucleated cyst producing *Entamoeba* detected from chicken: *E. gallinarum*?

第72回日本寄生虫学会西日本支部大会、2016.10.15、岐阜大学サテライトキャンパス

(岐阜)
7.水野哲志、Elizabeth Jemaiyo MATEY, Joko HENDARTO、永元健啓、Din SYAFRUDDIN、市村宏、Elijah Maritim SONGOK、所 正治
アフリカのジアルジアに認められた著しい多型に関する考察
第 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2016.10.15、岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜)
8.邊見詩帆、所 正治、Din Syafruddin
新規プライマーを用いた未同定遺伝子型大腸アメーバの探索
第 34 回北陸病害動物研究会、2016.7.2、福井大学医学部臨床教育研修センター白翁会ホール(福井)
9.高畠万璃穂、所 正治
アフリカに分布するジアルジアに認められた遺伝子多型について
第 34 回北陸病害動物研究会、2016.7.2、福井大学医学部臨床教育研修センター白翁会ホール(福井)
10.永元健啓、所 正治、Din Syafruddin
エンテロモナスの種内多型解析
第 34 回北陸病害動物研究会、2016.7.2、福井大学医学部臨床教育研修センター白翁会ホール(福井)
11.Joko Hendarto, Takehiro Nagamoto, Din Syafruddin, Masaharu Tokoro
Axenic Culture of Retortamonas spp.
第 34 回北陸病害動物研究会、2016.7.2、福井大学医学部臨床教育研修センター白翁会ホール(福井)
12.吉川尚男、所 正治、Syafruddin Din
プラストシスチス属の人獣共通感染性、インドネシア・スンバ島住民とその家畜から分離された株について
第 85 回日本寄生虫学会大会 2016.03.19-20、宮崎市民プラザ(宮崎)
13.永元 健啓、Din Syafruddin、所 正治
腸管寄生原虫陽性率の季節変動
第 71 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2015.10.25、奈良女子大(奈良)
14.小林 雅子、海道 一恵、石山 進、野村 美奈、橋本 茂、所 正治
尿細胞診標本に線虫がみられた 2 症例
第 32 回北陸支部臨床細胞学会、2015.9.6、金沢大学附属病院宝ホール(金沢)
15.永元健啓、所 正治
インドネシアで検出された鞭毛虫の分子疫学
第 33 回北陸病害動物研究会、2015.6.13、金沢大学宝町キャンパス(金沢)
16.荒山駿介、所 正治
アメーバ類の分離培養について
第 33 回北陸病害動物研究会、2015.6.13、金沢大学宝町キャンパス(金沢)
17.佐藤祐樹、所 正治
インドネシアにおけるアメーバ類の感染状況
第 33 回北陸病害動物研究会、2015.6.13、金

沢大学宝町キャンパス(金沢)
18.輿 織江、所 正治
インドネシアにおけるジアルジアの感染状況
第 33 回北陸病害動物研究会、2015.6.13、金沢大学宝町キャンパス(金沢)
19.荒山 駿介、所 正治
低真空走査電子顕微鏡を用いた鞭毛虫類の形態解析手法の改良
第 84 回日本寄生虫学会大会 2015.03.21-22、杏林大学三鷹キャンパス(東京)
20.水野 哲志、Syafruddin Din、伊藤 誠、所 正治
Giardia intestinalis における assemblage A と B は別種とすべきか?
第 84 回日本寄生虫学会大会 2015.03.21-22、杏林大学三鷹キャンパス(東京)
21.Tetsushi Mizuno, Din Syafruddin, Makoto Ito, Masaharu Tokoro
Assemblage A and B of *Giardia intestinalis*: different species?
13th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2014 Nov 29-30. Taipei Medical University, Taipei, Taiwan
22.水野哲志、所 正治
インドネシア島嶼部における *Giardia intestinalis* の感染状況
第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2014.10.18、神戸医療大学ポートアイランドキャンパス(神戸)
23.所 正治
腸管寄生原虫叢は駆除されるべきか
第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2014.10.19、神戸医療大学ポートアイランドキャンパス(神戸)
24.Masaharu Tokoro, Hisao Yoshikawa, Din Syafruddin
Genetic diversity of *Giardia intestinalis* detected from humans: Is there any geographical distribution patterns?
13th International Congress of Parasitology, 2014 Aug.11-15. Mexico city, Mexico
25.Hisao Yoshikawa, Masaharu Tokoro, Din Syafruddin
Host-specificity of *Blastocystis* subtypes: Comparison of humans with domestic pigs and wild rodents in a small community in Sumba Island, Indonesia
13th International Congress of Parasitology, 2014 Aug.11-15. Mexico city, Mexico
26.水野哲志、所 正治
インドネシア島嶼部における *Giardia intestinalis* の感染状況について
第 32 回北陸病害動物研究会、2014.6.21、丸三製薬バイオテック株式会社本社(富山)

〔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0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.parasitology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

所 正治 (TOKORO MASAHARU)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30338024

(2) 研究分担者

吉川 尚男 (YOSHIKAWA HISAO)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：50191557

伊藤 誠 (ITOH MAKOTO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90137117

木村 憲司 (KIMURA KENJI)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10572183