

平成30年 5月24日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05261

研究課題名(和文) 無鉤条虫・アジア条虫感染家畜の迅速検査法の開発と宿主特異性規定因子の探索

研究課題名(英文) Development of the detection method for animal cysticercosis and the investigation of the genetic factors for host specificity

研究代表者

柳田 哲矢 (Yanagida, Tetsuya)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：40431837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシ・ブタにおける無鉤条虫とアジア条虫感染の検査法開発を目指した。開発した血清検査法を用いて流行地で調査を行った結果、ウシの無鉤条虫感染を検出できた。一方のブタのアジア条虫感染については、感染個体を確認することができなかった。本法の検出感度と特異性を検証するため、また、本法でブタのアジア条虫感染を検出できるかを明らかにするため、今後も調査を続ける必要がある。また、上記2種の条虫の交雑子孫がウシに感染することを初めて明らかにした。比較ゲノム解析により、2種の条虫の宿主を決める遺伝子を絞り込める可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was aimed to develop the detection method for cysticercosis, caused by *Taenia saginata* or *Taenia asiatica*, in cattle and pigs. Field surveys in the endemic areas were conducted using the developed serology, and it revealed the method can detect *T. saginata* cysticercosis in cattle. Further extensive surveys are needed to examine the sensitivity and specificity of the method, and whether the method can detect *T. asiatica* cysticercosis in pig.

It was for the first time directly demonstrated that cattle can be the intermediate host for the hybrid descendant between *T. saginata* and *T. asiatica*. This study indicates the possibility that comparative genomics can reveal the genetic factors controlling the host specificity of *T. saginata* and *T. asiatica*.

研究分野：寄生虫学

キーワード：囊虫症 テニア症 無鉤条虫 アジア条虫 血清検査 宿主特異性

1. 研究開始当初の背景

テニア症・囊虫症(以下、本症)は、ヒト(終宿主)とブタ・ウシ(中間宿主)間で感染環が成立する感染症で、典型的な「顧みられない熱帯病」、「顧みられない人獣共通感染症」である。本症の原因は有鉤条虫(*Taenia solium*)、無鉤条虫(*Taenia saginata*)、アジア条虫(*Taenia asiatica*)の3種で、FAO/WHOによる食品媒介性寄生虫のリスク評価では有鉤条虫が第1位、無鉤条虫が19位に格付けされている。ヒトは、条虫の幼虫(囊虫)が感染した家畜の肉や肝臓を生食することで感染し、テニア症(成虫の腸管感染)となる。一方、ブタ・ウシはテニア症患者が排出した虫卵を経口摂取して感染し、囊虫症(幼虫の全身感染)となる。有鉤条虫はヒトの囊虫症の原因にもなり、脳囊虫症は致死性である。本症は、豚・牛肉の生食と、屋外での排便行為により感染環が成立するため、開発途上国の僻地で流行している。しかし近年、流行地からの移民や旅行者が原因となる症例が先進国でも多く発生し、新興感染症として問題視されている。日本では本症は輸入感染症と考えられているが、国内飼育されたブタ肝臓の生食が原因と考えられるアジア条虫の集団感染が2011年以降に発生した。農・畜産業に外国人技能実習生を多く受け入れている我が国において、本症をいつまでも「人ごと」と捉えることはできない。

本症は、家畜とヒトのみで感染環が維持されるため、適切な治療と、インフラや食肉検査体制、生活習慣の改善により根絶可能である。しかし、地理的・経済的理由から上下水道の整備が難しい地域や、食肉検査を行う人材の育成が進んでいない地域、豚・牛肉の生食が食文化として根付いている地域が多く残されているため、未だ世界中で蔓延している。我々は、本症の根絶には感染者・感染家畜を迅速に検出し適切に治療・排除することが不可欠と考え、信頼性の高い検査法の確立を目指してきた。本症の原因となる3種の条虫のうち、有鉤条虫に関する検査法はおおよそ完成していたが、無鉤条虫とアジア条虫の家畜における囊虫症に関しては実用化されたものがなく、新たに開発する必要があった。

近年、本症に関しては「無鉤条虫とアジア条虫の交雑」という新たな問題が生じている。従来、テニア症の患者から排出された虫体は、ミトコンドリアDNA(mtDNA)に基づき同定されてきた。しかし、複数の核遺伝子を調べた結果、mtDNAでアジア条虫と同定された虫体のほとんどが無鉤条虫との交雑子孫であり、「純粋なアジア条虫」ではないことが示された。これまでmtDNAでアジア条虫感染と同定された患者は、豚の肝臓を生食して感染したとされてきたが、交雑子孫がウシとブタのいずれに感染しているかは不明である。そのため、感染源が誤認されてきた可能性は否定できない。このように、「食の安全」を確保するためには、この交雑の問題を

解決する必要性が生じていた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、ウシとブタにおける無鉤条虫・アジア条虫感染を高感度で検出可能な迅速検査法の開発である。開発途上国を中心に地球規模で蔓延する人獣共通感染症であるテニア症・囊虫症を根絶するためには、患者を簡便に検出できる信頼性の高い検査法が必須である。

本研究の第二の目的は、近年その存在が明らかになった無鉤条虫とアジア条虫の交雑子孫について、宿主範囲を解明することである。2種の交雑子孫がアジア各地に分布することが判明した現在、「無鉤条虫はウシ、アジア条虫はブタが中間宿主」という既成観念を取り払い、改めて家畜における両種ならびに交雑子孫の寄生状況を調査する必要がある。また、交雑子孫も含めた比較ゲノム解析により、両種の宿主特異性を規定する遺伝因子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 血清検査法の開発

血清検査法としては、無鉤条虫とアジア条虫の幼虫が感染することによりウシ・ブタ体内で産生される抗体を検出するELISA法の開発を目指した。抗体を検出するための抗原としては、有鉤条虫の囊虫(有鉤囊虫)ないしは無鉤条虫の囊虫(無鉤囊虫)に含まれる囊虫液をイオンカラムで精製したものを用いた。アジア条虫については、十分な量の囊虫が得られなかったため、抗原精製を行わなかった。ELISAリーダーや吸光度計が利用できない流行地で速やかに結果を得るため、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)を発色基質として用い、色調の変化に基づいて肉眼で結果を判定した(図1)。

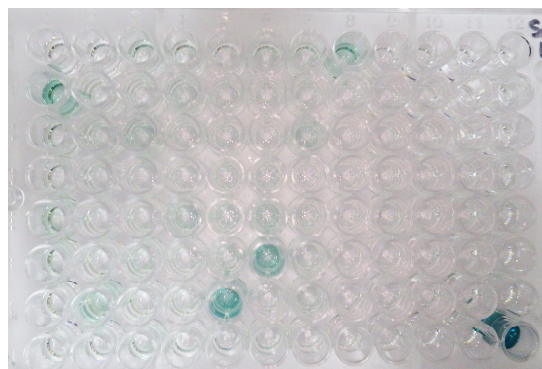


図1. ELISAの結果。緑色が陽性。

(2) 流行地でのフィールド調査

タイ、インドネシア、ラオスの流行地で家畜囊虫症のフィールド調査を行った。調査地は、以前の調査でテニア症・囊虫症の流行が確認されている地域から選定した。調査では、現地研究者と流行地内の集落を回り、飼い主の許可を得て各家庭で飼育されているウシ・ブタから採血した。採血の際には、家畜の年齢、性別、飼育法、飼い主の家の位置

(GPS) などについて記録した。採集した血液については、現地において血清を分離し、ELISA 法に用いた。血清検査の結果に基づき、陽性個体と陰性個体をそれぞれ購入して解剖した。全身の筋肉と肝臓、心臓、脳の各部位を 5mm から 1cm 程度に薄く切り、囊虫の寄生の有無を確認した。囊虫が確認された場合には、70%エタノールないしは RNA later で固定し、遺伝子解析の材料とした。囊虫からの DNA 抽出は、DNeasy Mini Kit (QIAGEN) ないしは PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher) を用いて行った。囊虫の種同定は、mtDNA の cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子をターゲットとして有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫の 3 種を鑑別する multiplex PCR によって行った。の塩基配列に基づいて行った。mtDNA で無鉤条虫ないしはアジア条虫と同定されたものについては、核 DNA の polymerase delta (*pold*) と ezrin-radixin-mosein-like protein (*elp*) 遺伝子の一部塩基配列を決定し、交雑子孫かどうかを調べた。

(3) 宿主特異性を規定する遺伝子の探索

無鉤条虫とアジア条虫の宿主特異性をコントロールしている遺伝子を探索するため、無鉤条虫、アジア条虫、交雑子孫を材料として比較ゲノム解析を行った。無鉤条虫としては、アジア条虫が分布していないバリ島のテニア症患者から得られた成虫 1 虫体とラオスのウシから得られた囊虫 7 虫体、アジア条虫としては、「純粋なアジア条虫」が分布していると考えられる台湾のテニア症患者から得られた 1 虫体、交雑子孫としてはラオスのウシから得られた 1 虫体を材料とした。ゲノムのシーケンシングには Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher) を用いた。

4. 研究成果

血清検査法の開発とフィールド調査

2015-17 年にかけて、タイ・ターソーヤーン郡、インドネシア・バリ島・カラングサム県、ラオス・セボン郡でフィールド調査を行った。2015 年に実施したタイとインドネシアの調査では、住民にとってより重要な家畜であるウシを調べる許可が飼い主から得られなかったため、ブタのみを検査対象とした。2016 年と 2017 年に調査を行ったラオスでは、飼い主の許可が得られたためブタとウシの両方を対象とした。血液を採集した家畜は、ブタが計 295 頭、ウシが計 115 頭だった。採血後に現地で ELISA 法を実施し、肉眼で結果を判定した。なお、ラオスのブタ 27 頭とウシ 93 頭については有鉤囊虫から精製した抗原 (Tso) と無鉤囊虫から精製した抗原 (Tsa) の両方を用い、それ以外については Tso のみを使用した。ELISA 法の結果、Tso ではブタの 1.4%、ウシの 5.2% が陽性、ブタの 2.7%、ウシの 1.7% が弱陽性となった。一方、Tsa ではブタの 5.2%、ウシの 5.7% が陽性、ブタの

1.7%、ウシの 6.6% が弱陽性となった。これらの結果に基づき、それぞれの抗原について複数個体の陽性、弱陽性および陰性個体を購入して解剖した。ブタについては、Tso 陽性ブタでは 3 頭中 2 頭、Tso 弱陽性ブタでは 7 頭中 2 頭の筋肉から囊虫が検出された (図 2)、Tso 陰性ブタ 10 頭、Tsa 陽性ブタ 1 頭と Tsa 陰性ブタ 2 頭については筋肉から囊虫は検出されなかった。

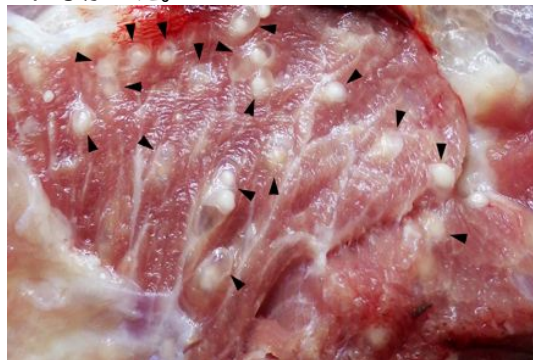


図 2. ブタ筋肉中の囊虫 (矢頭)

ウシについては、Tso 陽性ウシ 4 頭中 3 頭、Tsa 陽性ウシ 3 頭中 2 頭の筋肉から囊虫が検出された (図 3)。なお、Tso 陽性かつ Tsa 陰性のウシ 1 頭の筋肉からは囊虫は検出されず、Tso 陰性かつ Tsa 陽性のウシ 1 頭の筋肉からは囊虫が検出された。



図 3. ウシ筋肉中の囊虫 (矢印)

ブタおよびウシの筋肉から得られた囊虫について mtDNA に基づく multiplex PCR 法で解析した結果、ブタの囊虫は有鉤条虫、ウシの囊虫は無鉤条虫と同定された。無鉤条虫と同定された囊虫 24 虫体について核 DNA の *pold* と *elp* 遺伝子の塩基配列を決定した結果、1 虫体は *elp* が無鉤条虫型の対立遺伝子とアジア条虫型の対立遺伝子のヘテロであった。すなわち、この虫体は純粋な無鉤条虫ではなく、アジア条虫と無鉤条虫の交雑子孫であることが示された。これは、家畜から交雑子孫が確認された世界初の例である。

このように、Tso を用いた ELISA 法でブタの有鉤囊虫症とウシの無鉤囊虫症が検出できること、Tsa を用いた ELISA 法でウシの無鉤囊虫症 (交雑子孫含む) が検出できることが示された。ただし、いずれの抗体を用いた ELISA 法においても、陽性でありながら筋肉中から囊虫が確認できない例が見られた。こ

の原因として、極少数の寄生の場合に解剖で囊虫を見逃した可能性、感染はしたものの宿主応答によって解剖時には虫体が消失していた可能性などが考えられる。また、Tso 弱陰性ブタと Tsa 陽性ブタにおいて、筋肉中に囊虫が確認されなかった一方、腸間膜や肝臓周囲に胞状条虫 (*Taenia hydatigena*) の囊虫が確認された。胞状条虫は、本性の原因となる3種の条虫と同属で遺伝的に近縁であり、そのため交差反応を起こした可能性が示された。以上の結果から、本研究で開発した血清検査法については、ウシ・ブタともに解剖数を増やして検出感度と特異性の検証を続ける必要があると考えられた。また、本研究ではアジア条虫に感染した家畜を確認することができなかった。そのため、ヒトにおいてアジア条虫の感染が多く報告されている地域での調査を継続する必要がある。

宿主特異性を規定する遺伝子の探索

交雑子孫の虫体を含む、ウシの筋肉から得られた囊虫8虫体と、バリ島のテニア症患者由来無鉤条虫成虫1虫体、台湾のテニア症患者由来アジア条虫成虫1虫体についてゲノム解析を行った。リファレンス配列としては、まずは2016年に中国の研究グループが報告した無鉤条虫とアジア条虫のゲノム情報を用いた。その結果、リファレンスとして用いた中国のアジア条虫と本研究で解析した台湾のアジア条虫間で大きな違いが見られるゲノム領域が複数みられた。このことと、リファレンスの虫体が採集された地域(雲南省)のアジア条虫を以前我々が調べた結果全て交雑子孫であったことから、リファレンスの配列はアジア条虫ではなく交雑子孫の配列であることが強く示唆された。次に、バリ島の無鉤条虫と台湾のアジア条虫のゲノムをリファレンスとして用い、ラオスのウシから得られた囊虫の変異解析を行った。その結果、交雑子孫も含め、全体としては無鉤条虫に近いという結果が得られた。ただし、同じ宿主から得られた囊虫間でも変異の数や変異が見られた領域が異なった。本研究で入手することはできなかったが、ブタ由来のアジア条虫および交雑子孫を加えて解析することにより、無鉤条虫とアジア条虫の宿主特異性を決める遺伝子が絞り込める可能性が示された。

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2件)

Ito A, Yanagida T, Nakao M. Recent advances and perspectives in molecular epidemiology of *Taenia solium* cysticercosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 2016, 357-367. (査読有)
Swastika K, Dharmawan NS, Suardita IK,

Kepeng IN, Wandra T, Sako Y, Okamoto M, Yanagida T, Sasaki M, Giraudoux P, Nakao M, Yoshida T, Diarthini LPE, Sudarmaja IM, Purba IE, Budke CM, Ito A. Swine cysticercosis in the Karangasem district of Bali, Indonesia: an evaluation of serological screening methods. *Acta Tropica*, 163, 2016, 46-53. (査読有)

[学会発表](計8件)

Ito A. Helminths in pigs: The Impact of *Taenia solium* and *Taenia asiatica* in Asia. JITMM 2017, Bangkok, Dec 2017. (招待講演)

Ito A. Advances in basic and applied science towards the control of zoonotic cestodiasis: the importance of basic research. International Symposium on Cestode Zoonosis Control, Chengdu, Nov 2017. (招待講演)

Ito A. Towards the control of neurocysticercosis: challenges in rural and remote endemic regions. JITMM 2016, Bangkok, Dec 2016. (招待講演)

柳田哲矢・迫康仁・Xangsayarath P・Putthana V・Phomvixay K・伊藤亮・佐藤宏・岡本宗裕. ラオス・セポン郡における家畜囊虫症調査. 日本寄生虫学会西日本支部大会. 大阪, 2016年10月.

Ito A. Taeniasis/neurocysticercosis: recent advances and perspectives in molecular epidemiology of three human species and *Taenia solium* cysticercosis. 7th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, Malang, May 2016. (招待講演)

柳田哲矢・Swastika K・Dharmawan NS・Wandra T・佐藤宏・迫康仁・伊藤亮・岡本宗裕. バリ島およびニューギニア島における有鉤条虫の遺伝的多様性とその起源. 第85回日本寄生虫学会. 宮崎, 2016年3月.

Ito A. Cestode zoonoses: the importance of molecular approach for identification of causative species. JITMM 2015, Bangkok, Dec 2015. (招待講演)

Ito A. One Health: Towards the control of neurocysticercosis caused by accidental ingestion of eggs of the pork tapeworm, *Taenia solium*. One Health Conference 2015, Nagasaki, Nov 2015. (招待講演)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 哲矢 (YANAGIDA, Tetsuya)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：40431837

(2) 研究分担者

迫 康仁 (SAKO, Yasuhito)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：40312459

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

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

佐藤 宏 (SATO, Hiroshi)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：90211945

水上 洋一 (MIZUKAMI, Yoichi)
山口大学・大学研究推進機構・教授
研究者番号：80274158