

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20406007

研究課題名（和文） インドネシアに分布するジアルジアの遺伝的多型形成維持機構の研究

研究課題名（英文） Study on intra-species diversity of *Giardia intestinalis*: How has the diversity been maintained?

研究代表者

所 正治 (TOKORO MASAHARU)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30338024

研究成果の概要（和文）：病原性腸管寄生原虫ジアルジアの種内多型の形成および維持メカニズムを解明し、各遺伝子型形成の背景にあるライフサイクルの特異性を考慮した原虫対策を確立することを目的に、インドネシアのスンバ島において継続的な横断的分子疫学調査を実施した。その結果、調査地域におけるジアルジアをはじめとする多様な各種原虫の高度のまん延を確認しリファレンスとして収集することができた。さらに、地理的分布と感染者からの聞き取り調査より、ジアルジアの各遺伝子型に特異的な伝播経路を示し、生活環の隔離・棲み分けが、遺伝子型の維持形成に重要な役割を果たす可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To Reveal the driving force behind the formation of various genotypes in the population of *Giardia intestinalis*, and to establish a novel intervention approach using the background mechanisms to control parasites, we conducted a series of cross-sectional molecular epidemiologic investigation in Sumba Island, Indonesia. In this study, we confirmed the endemic status of various intestinal protozoan parasites in the site, and collected various protozoan specimens as references for genetic analyses. *G. intestinalis* seems to possess different transmission routes according to the genotypes, which might be maintaining each diversified genotype as a result of habitat isolation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	10,500,000	3,150,000	13,650,000

研究分野：寄生虫学

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：ジアルジア、腸管寄生原虫、種内多型、分子疫学

## 1. 研究開始当初の背景

*Giardia intestinalis* (syn. *G. duodenalis*, *G. lamblia*) は下痢を主症状とするジアルジア症の原因となる腸管寄生原虫であり、先進

国では旅行者下痢症や水系感染によるアウトブレイクの原因として、また熱帯・亜熱帯の衛生環境の悪い地域においては小児の慢性下痢、発育障害の原因として重視されてい

る。

ジアルジアは分子生物学的には遺伝子座位の差異により系統解析によって遺伝子型 A-G の 7 遺伝子型に分類されており、そのうちヒトから検出されるものは主に A および B である。ともに世界中で分離されているが、遺伝子型 A が遺伝的に高度に保存され、いくつかの亜型を示すもののほぼ全世界で同一の遺伝子配列が各亜型として検出されるのに対して、遺伝子型 B は、ほぼすべての分離株が新たな変異を含む無数の多形を保持し、系統解析のみによりクラスターとして分類可能な遺伝子型である。このような 2 遺伝子型の明らかな違いから、両者をそれぞれ別種 (*G. intestinalis* と *G. enterica*) とする提案もあるが、進化学的背景 (地理的隔離によるバリエーションではないのか、あるいは原虫においても生殖隔離があてはまるのかなど) も不明な現状では早計と考えられる。

本研究では途上国における両遺伝子型の分布解析を通じて、まん延地域におけるライフサイクルの隔離、動物糞便検体の遺伝子解析による人獣共通感染の可能性を調査し、各遺伝子型の形成維持機構を評価した。

## 2. 研究の目的

病原性腸管寄生原虫ジアルジアの種内多型の形成および維持メカニズムを解明し、各遺伝子型形成の背景にあるライフサイクルの特異性を考慮した原虫対策を確立すること。

## 3. 研究の方法

インドネシアのスンバ島、ウィータブラ市およびワイニャプ村において、学校健診ベースおよび家畜・コンパニオンアニマルの糞便を対象とした横断的分子疫学調査を実施した。調査においては、糞便を材料としたジアルジアの遺伝子型同定および培養分離株の確立、尿による分泌型抗ジアルジア抗体の評価、さらに感染児童をターゲットとした居住地 GPS マッピング・聞き取り調査により生活環境と各遺伝子型の分布における相関評価を実施した。

## 4. 研究成果

本研究で明らかとなった成果は以下の通り。(1) 調査地域には、ジアルジアをはじめアメーバ類、腸トリコモナス、メニール鞭毛虫、大腸バランチジウム、ブラストシスチスなどの多様な腸管寄生原虫がまん延しており、学童のジアルジア陽性率は常時 10~20%に上ることが判明した。本地域に見られるこのような高度な寄生原虫まん延状態は、介入試験をはじめとする様々な調査研究の

ベースとして重要である。

(2) ジアルジアの遺伝子型解析では、多様な遺伝子型が同定された。ヒトにおいては、2008 年度の 37 サンプル中、7 サンプルで遺伝子型 A、24 サンプルで B、混合感染が 6 サンプル検出された。同様に、2009 年度には 39 サンプル (A5、B30、混合 4)、2010 年度に 69 サンプル (A17、B52、混合 0) の結果を得た。また、動物においては、イヌから遺伝子型 A および B、ブタから B および E、マウスから G および近縁種の *Giardia muris* および *Octomitus* spp. を検出した。その他、ウシ、ヤギ、水牛、アヒル、ニワトリからの糞便を収集したが、いずれもジアルジアは検出されなかった。本研究において同定・解析したすべての遺伝子情報は、これまでに報告がほとんどなかったインドネシアの島嶼地域に分布するジアルジアのデータとして貴重と考えられ、DNA Data bank of Japan (DDBJ) にリファレンスとして登録済みである。

(3) ヒトから検出された遺伝子型 A および B の GPS マッピングによる分布図では、市街地から農村部まで広域に分布する遺伝子型 B に対して、遺伝子型 A は、幹線道路沿いに集中することが明らかとなった。一方、陽性児童の追跡調査における聞き取りでは、各遺伝子型と強い相関を示す項目は認められなかったが、遺伝子型 A と給水車利用、また遺伝子型 B と家畜飼育に弱い相関があり、給水車の進入可能な地域での遺伝子型 A の水を介した感染と人獣共通感染症として伝播する遺伝子型 B の可能性が示唆された。このような表現形における両遺伝子型の明らかな違いは、従来の報告では知られていなかった事実であり、今後の研究のベースとして重要な発見と言える。

(4) 本研究においても、遺伝子型 A のシーケンス配列はリファレンスと完全に一致しており、遺伝子型 A が保存的であるとする従来の知見を裏付ける結果となった。また、遺伝子型 B では遺伝子型内部における著しい多型を認めたが、これまでの研究で解析してきたユーラシア大陸部及びインドネシアの異なる島嶼部で得られたジアルジアの遺伝子配列との比較では、採取地域に依存する特徴的なクラスターは認められなかった。この点は、ユビキタスに分布するジアルジアでは地理的隔離による変異の蓄積が起こり難い可能性を示唆している。

(5) 以上の結果を考察すると、ジアルジアの遺伝子型 A と B においては、種内多型の形成維持のメカニズムは、地理的隔離ではなく、むしろ同一地域に分布しながらも生活環を隔離した棲み分けが重要な役割を果たして

いる可能性がある。

#### 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6件)

(1) Kamikawa R, Inagaki Y, Tokoro M, Roger IA, Hashimoto T. Split introns in the genome of a divergent eukaryote *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing. *Current Biology*. 2011 Feb 22;21(4):311-5. 査読あり

(2) Tokoro M, Syafruddin D, Itoh M, Asih P, Rahman M.  
Can humoral host immune responses prevent *Giardia* infection?: The urinary antibody titers in Indonesian school children  
XII International Congress of Parasitology ICOPA. 2010 Aug;135-138 査読なし

(3) Suzuki Y, Nakamura T, Tokoro M, Togano T, Ohsaka M, Kohri M, Hirata Y, Miyazaki K, Danbara M, Horie R, Miura I, Sunakawa K, Higashihara M.  
A case of giardiasis expressing severe systemic symptoms and marked hypereosinophilia.  
*Parasitology International*. 2010; 59(3):487-9. 査読あり

(4) Hussein AI, Yamaguchi T, Nakamoto K, Iseki M, Tokoro M.  
Multiple-subgenotype infections of *Giardia intestinalis* detected in Palestinian clinical cases using a subcloning approach. *Parasitology International* 2009; 58(3):258-262. 査読あり

(5) 所 正治, Amjad I. A. Hussein、田中身和、山口智博、森尾友宏、佐藤隆介、水谷修紀  
免疫低下にともなう MAC 感染症に合併した呼吸器クリプトスポリジウム症の一例  
日本臨床寄生虫学会誌 2008;19 (1):55-58 査読なし

(6) 所 正治、山口智博、田中身和、小林 顕、及川陽三郎  
病原性寄生原虫における分子分類の現状。  
*Current status of molecular taxonomy in pathogenic protozoan parasites*  
十全医学会雑誌 2008. 6;117 (2):53-57. 査読

なし

〔学会発表〕(計32件)

(1) Tokoro M, Matsumura T, Hidayati APN, Syafruddin D  
Comprehensive identification of protozoan parasites: distribution of species and genotypes in Sumba Island, Indonesia  
45<sup>th</sup> Annual U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases, 2011 Jan 12. National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

(2) Tokoro M, Syafruddin D, Itoh M, Asih P  
Characteristics of genotype distribution of *Giardia intestinalis* in an endemic area of Indonesia  
11<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2010 Oct 26-28. National Institute of Biological Resources (NIBR), Incheon, Korea

(3) Tokoro M, Syafruddin D, Itoh M, Asih P, Rahman M.  
Can humoral host immune responses prevent *Giardia* infection?: The urinary antibody titers in Indonesian school children  
XII International Congress of Parasitology, 2010 Aug 15-20. Melbourne Convention and Exhibition Centre (MCEC), Melbourne, Australia

(4) 所 正治  
寄生虫分子分類の現状と問題点  
第28回北陸病害動物研究会、2010.7.3、富山大学医学部、富山

(5) 松村 隆弘、仲本 賢太郎、所 正治  
*Giardia intestinalis* の培地適応性の違いに関する考察：培養分離株によって最適培養条件は異なるのか？  
第79回日本寄生虫学会、2010.5.21、大雪クリスタルホール、旭川

(6) 所 正治、伊藤 誠、水野 哲志  
獲得免疫がジアルジア感染を抑制しているのか？  
第79回日本寄生虫学会、2010.5.21、大雪クリスタルホール、旭川

(7) 松村隆弘、仲本賢太郎、所 正治  
ヒト糞便検体からの *Giardia intestinalis* 新規分離株の培養条件の検討  
第65回日本寄生虫学会西日本支部大会、2009.11.8、大阪大学医学部、大阪

(8) 仲本賢太郎、所 正治

これからの寄生原虫類の検査・同定法：DNA  
バーコーディングによるアプローチ  
第 27 回北陸病害動物研究会、2009. 6. 27、金  
沢大学医薬保健研究域医学系、金沢

(9) Masaharu Tokoro, Tomohiro Yamaguchi,  
Amjad I. A. Hussein, Din Syafruddin

How has *Giardia intestinalis* maintained  
its complex intraspecific diversity?

The 43th Annual U.S.-Japan Joint  
Conference on Parasitic Diseases,  
International Medical Center of Japan,  
Tokyo, Japan. January 7-8, 2009

(10) Kentaro Nakamoto, Miwa Tanaka,  
Hiroshi Tachibana, Masaharu Tokoro  
Molecular identification of *Entamoeba* spp.  
in cynomolgus monkeys and humans

The 43th Annual U.S.-Japan Joint  
Conference on Parasitic Diseases,  
International Medical Center of Japan,  
Tokyo, Japan.  
January 7-8, 2009

(11) 山口智博、田中身和、Amjad. I. A.  
Hussein、Din Syafruddin、所正治

インドネシアスンバ島における *Giardia*  
*intestinalis* の分子疫学調査

第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会、  
2008. 11. 01~02、神戸大学医学部神緑会館、  
神戸

(12) 田中身和、山口智博、仲本賢太郎、所  
正治

インドネシアのカニクイザルから検出され  
た *Entamoeba nuttalli*

第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会、  
2008. 11. 01~02、神戸大学医学部神緑会館、  
神戸

(13) 所 正治

寄生虫・衛生動物合同シンポジウム「寄生  
虫学の現状と将来展望および教育」

グローバル化時代における寄生虫学の未  
来展望

第 64 回日本寄生虫学会西日本支部大会、  
2008. 11. 01~02、神戸大学医学部神緑会館、  
神戸

(14) 所 正治、浅井隆志、竹内 勤

HIV 感染者にみられる原虫症の診断

HAART 時代の HIV に伴う日和見感染症診断と  
治療の最前線、2008. 10. 18、国立病院機構大  
阪医療センター緊急災害医療棟会議室、大阪

(15) K. Nakamoto, T. Yamaguchi, H. Hussein,  
D. Syafruddin, K. Kimura, M. Tokoro

How has *Giardia intestinalis* maintained  
genetic diversity within its clonal  
population?

XVIIth International Congress for  
Tropical Medicine and Malaria,  
International Convention Center, Jeju,  
Korea, Sept. 29-Oct. 3, 2008.

(16) Masaharu Tokoro

Intra-species diversity of intestinal  
protozoan parasites: How did they evolve  
into human pathogens? [Invitation  
Lecture]

The 10th Asian-Pacific Congress for  
Parasitic Zoonoses, College of Medicine  
National Taiwan University, Taipei,  
Taiwan, Aug. 30-31, 2008.

(17) A. I. A. Hussein, T. Yamaguchi,  
M. Tanaka, M. Tokoro

Critical notes for *Giardia*  
*Intestinalis* genotyping studies using  
multiple gene loci.

The 10th Asian-Pacific Congress for  
Parasitic Zoonoses, College of Medicine  
National Taiwan University, Taipei,  
Taiwan, Aug. 30-31, 2008.

(18) 所 正治、森尾友宏、佐藤隆介、水谷  
修紀、Amjad I. A. Hussein、田中身和、山口  
智博

免疫低下にともなう MAC 感染症に合併した呼  
吸器クリプトスポリジウム症の一例

第 19 回日本臨床寄生虫学会、2008. 6. 7、京  
都府立医科大学図書館ホール、京都

(19) 山口智博、田中身和、荒井朋子、Amjad  
I. A. Hussein、所 正治

水系拡散する原虫類の分子疫学：遺伝子レベ  
ルで見たジアルジアの種内多型

第 26 回北陸病害動物研究会、2008. 6. 7、わ  
くわく RIVER CAN 九頭竜川資料館、福井

(20) 松村隆弘、仲本賢太郎、田中身和、山  
口智博、荒井朋子、所 正治

水系拡散する原虫類の分子疫学：PCR による  
クリプトスポリジウムスクリーニング法の  
検討

第 26 回北陸病害動物研究会、2008. 6. 7、わ  
くわく RIVER CAN 九頭竜川資料館、福井

(21) 田中身和、山口智博、荒井朋子、仲本  
賢太郎、所 正治

赤痢アメーバの分子疫学

第 26 回北陸病害動物研究会、2008. 6. 7、わ

くわく RIVER CAN 九頭竜川資料館、福井

(22) 所 正治、吉田知代、木村憲司  
サイクロスポーラの種内変異の解析：人獣共通感染症の可能性評価  
第 77 回日本寄生虫学会大会、2008. 4. 4、長崎ブリックホール、長崎

(23) 山口智博、Hussein Amjad I.I.A.、藤原恵夢、田中身和、Din Syafruddin、木村憲司、春木宏介、所 正治  
*Giardia intestinalis* の種内多型の維持機構の解析  
第 77 回日本寄生虫学会大会、2008. 4. 4、長崎ブリックホール、長崎

(24) 田中身和、山口智博、羽根田くる美、吉田知代、Din Syafruddin、及川陽三郎、高田伸弘、荒井朋子、井関基弘、所 正治  
人獣共通感染症のリスク評価：動物由来腸管寄生原虫の遺伝子型解析  
第 77 回日本寄生虫学会大会、2008. 4. 4、長崎ブリックホール、長崎

〔図書〕(計 16 件)

(1) 荒井朋子、所 正治  
クリプトスポリジウムのオーシストの染色  
「Medical Technology」  
別冊 新 染色法のすべて 2011. 3. 25 (文光堂) :372-373

(2) 井関基弘、所 正治  
クリプトスポリジウム症。  
改訂版 人獣共通感染症(木村 哲、喜田 弘、編、医薬ジャーナル社) 2011. 2. 20:406-414.

(3) 所 正治  
トキソプラズマ症  
今日の治療指針-私はこう治療している  
2011. 1. 1 (医学書院) :252-253

(4) 所 正治  
肝クリプトスポリジウム症  
別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 13 肝・胆道症候群 (第 2 版) -その他の肝・胆道系疾患を含めて- 2010. 9:131-134.

(5) 所 正治、伊藤 誠、水野哲志、Rahman Moshir、Din Syafruddin  
獲得免疫がジアルジア感染を抑制しているのか?  
Recent Advances in Medical Sciences: Parasites and their Human and Animal Hosts 2010:31-33

(6) 松村隆弘、 仲本賢太郎、所 正治  
ヒト糞便検体からの *Giardia intestinalis*

の分離培養：新規分離株の培養条件の検討  
Recent Advances in Medical Sciences: Parasites and their Human and Animal Hosts 2010:53-56

(7) 所 正治  
外来を訪れる寄生虫症：抗原虫薬：メトロニダゾール、チニダゾール、ST 合剤  
Medical Practice 2010. 9 (文光堂) : 438-439.

(8) 所 正治、井関基弘  
クリプトスポリジウムとジアルジア  
広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査-その数値をどう読むか-[第 7 版] 日本臨床 2010. 6:68(6)増刊号:263-266.

(9) 所 正治  
ランブル鞭毛虫症 (ジアルジア症)、その他の原虫症  
今日の消化器疾患治療指針 第 3 版 2010. 3 (医学書院) : 438-439.

(10) 所 正治  
クリプトスポリジウム症  
今日の診断指針 第 6 版 2010. 3 (医学書院) : 1387-1388.

(11) 所 正治、竹内勤  
腸管寄生虫症  
別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 12 消化管症候群 (第 2 版) -その他の消化器疾患を含めて- 2009. 9:70-74.

(12) Hussein AIA, Yamaguchia T, Tanaka M, Tokoro M  
*Giardia intestinalis* Genotyping to Where? Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2008:74-78

(13) Tokoro M  
Intraspecies diversity of intestinal protozoan parasites: How did they evolve into human pathogens?  
Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2008:33-37

(14) 所 正治  
クリプトスポリジウム症  
別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No8 呼吸器症候群 (第 2 版) -その他の呼吸器疾患を含めて- 2008. 12:188-191.

(15) 所 正治  
寄生虫性肝胆系疾患/特集・肉芽腫性肝疾患の基礎と臨床  
肝胆膵 2008. 10 (アークメディア) ; 57(4) :565-570

(16) 所 正治

クリプトスポリジウム症/特集・寄生虫感染症  
化学療法の領域 2008.9 (医薬ジャーナル社) ;  
24(9) : 21-25

[その他]

ホームページ等

<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・講師

研究者番号 : 30338024

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし