

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04346

研究課題名(和文)環境DNAを用いたタイ肝吸虫の感染リスク評価

研究課題名(英文) Application of environmental DNA (eDNA) technique for determination of Opisthorchiasis infection risks

研究代表者

サトウ 恵 (SATO, MEGUMI)

新潟大学・医歯学系・研究教授

研究者番号：70601813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：吸虫の一つであるタイ肝吸虫Ovは、その生活史において、2つの中間宿主を必要とし、その間、水中で過ごす。終宿主から糞便と共に排出された虫卵が水中に入り、第一中間宿主の貝に入り成長したのち遊出し、第二中間宿主のコイ科の魚の中で感染型に成長し、ヒトはその魚を生で食べる事でOvに感染する。環境中(水中)でOvを検出することができれば、今までにない新しいOv感染リスク評価ができるようになる。本研究では、我々が開発したOvのDNAを環境DNA手法を改良し、Ov蔓延地域においてリスクのある水域の評価を行うことにより、現地の人々が実施可能な具体的な感染症対策を提言することを目標とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境DNA手法は、遺伝子学的手法を用い生物の多様性と分布を調べることのできる、応用範囲の広い手法である。環境DNA手法を用いてタイ肝吸虫、住血吸虫などの蠕虫類またその中間宿主を水試料中にて検出することは公衆衛生学上でも新しい取り組みであり、画期的な領域である。環境DNA法は汚染されたまたは安全な水源を特定するためにも有用で、エコ疫学研究において非常に重要なツールである。医学を中心とした感染症の取り組みではヒトが対象とされる場合が多い。しかし、感染症への取り組みは多面的なアプローチが必要なことが多く、環境DNA手法を用いた感染リスク評価は今後の感染症対策の一つとなりえる。

研究成果の概要(英文)：The liver fluke *Opisthorchis viverrini* (Ov) requires two intermediate hosts in its life cycle, during which time Ov spends time in water body. Eggs excreted in feces from the definitive host enter the water, enter the first intermediate host; *Bithynia* snails, and then cercariae will be released. Cercariae goes into second intermediate host; cyprinid fishes, and becomes infectious stages; metacercariae. People can be infected with Ov by eating raw sedonc intermediate fishes with Ov metacercariae. If Ov DNA can be detected in the environment (water), we will be able to conduct a new type of Ov infection risk assessment. In this study, we improved the Ov eDNA detection system which were developed previously by our team, and apply it at Ov prevalent areas. Thereby the local people can implement new countermeasures to prevent Ov infection.

研究分野：寄生虫学

キーワード：タイ肝吸虫 環境DNA ラオス

## 1. 研究開始当初の背景

タイ肝吸虫症はタイ肝吸虫 *Opisthynchus viverrini*; Ov によって引き起こされる蠕虫感染症であり、タイ、ラオス、ベトナムなどの東南アジア諸国でおよそ 2000 万人の感染者がいると推定されている。Ov の寿命は 20 年以上と長く、細胆管に長期間寄生し、胆管の周囲に慢性的な炎症を引き起こすなどして、最終的に胆管癌へと進行することもある。Ov は国際がん研究機関 International Agency for Research on Cancer (IARC) によって、タバコやアスベストなども含まれる「ヒトに発癌性を有する物質」であるグループ 1 に分類されている。Ov は食物媒介性感染症であり、Ov の感染型であるメタセルカリアに汚染されているコイ科の淡水魚を生食することで感染をおこす。Ov 感染症は WHO が定義する NTDs の食物媒介吸虫類感染症に数えられる世界的に問題な感染症の一つでもある。タイの東北部やラオスにおいては、この感染を引きおこす原因となっている生魚の料理はとてモピュラーであり、感染率を下げるのが難しい。そのため、これらの地域において重要な感染症として位置づけられている。通常、その地域で用いられている Ov への対策は検便を実施し、Ov の卵が糞便中に見つけれられた Ov 感染陽性者に対して治療を行うというものである。しかしながら Ov はヒトのみに感染をおこすわけではなく、他の動物宿主(犬やネコなど)にも感染をおこす人獣共通感染症であるため、そういったヒト以外の宿主への対策なしでは、地域における Ov の生活史を完全に断つことは出来ない。環境中に Ov が残ることで、ヒトへの再感染は容易におこることになる。Ov 蔓延地域の人々は Ov 感染を防ぐためには Ov に感染した生魚を食べなければいいと知ってはいるが、Ov のメタセルカリアは肉眼で見えるものではないので、それを実行することは難しいと報告されている。食生活の変容は、その土地で得られる食べ物の流通や文化などもあるので、簡単に変えられるものではない。そういった地域で、Ov 感染、またそれに続く胆管癌の発生を防ぐためには、安全な食物(Ov 感染のない魚)を得るためのサーベイランスシステムが必要である。我々のチームはこれまでにラオスの環境水を用いて Ov を検出できるシステムを確立した(Hashizume et al, 2017)しかし、この方法論を用いて現地で Ov 感染リスク地域を評価するためには、古典手法(形態学的観察)との比較などの評価と、方法の高感度化などの手法の改良を必要とし、これを本研究での主テーマとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、Ov 感染症蔓延地域の環境水に Ov そしてその中間宿主となる貝や魚の存在の有無を確認し、Ov 感染蔓延地域において実際に環境における Ov 感染リスクを評価することで Ov 感染を防ぐための新しいアプローチを作成することを目指した。

## 3. 研究の方法

我々が開発したリアルタイム PCR による Ov の環境 DNA 検出系(Hashizume et al., 2017)、また開発予定の中間宿主の検出系を用いて、Ov 蔓延地域における環境中の Ov と中間宿主の動向を探り、地域における Ov の感染リスク評価を行った。

### (1) 実験室における Ov 環境 DNA 手法の感度と精度の再確認

研究協力機関であるマヒドン大学は中間宿主である貝を扱う軟体動物部門を有している。ここでは Ov の生活史を、実験感染系で維持しているため、その水を用いて、すでに確立している Ov の検出系の感度と精度の確認を行った。すなわち既知の数の Ov で感染させた、貝(*B. siamensis*)や魚(Cyprinidae)を水槽で飼い、時系列で採水をした検体を用いて Ov 環境 DNA 検出系の感度・精度の再確認を行った。感度の改善のため、環境 DNA 分析における水サンプルの濾過方法の検討を実施し、一番効率が良い重力濾過へ変更を行った。また、今まで単一遺伝子にて Ov の検出を実施していたが、それを multi-gene 検出へ変更した。

### (2) 第一中間宿主である貝のデータベースの充実化

Ov の第一中間宿主は *Bithynia* 属の巻き貝(*B. funiculata* *B. siamensis*)であるが、その遺伝子情報はほとんどデータベースに登録されておらず、また実際に Ov の感染地域に行くと、他にも形態学的に紛らわしい貝が多数存在する。そのため *Bithynia* も含め、Ov 蔓延地域で見られる貝においては形態学的分類を行い、それに対応した遺伝子データを揃える。貝はその地域によって分布種が大きくことなるため、現地の専門家が必要であるが、マヒドン大学軟体動物部門には貝の専門家があり、長年メコン地域で貝を収集して分類をしている。この専門家の協力が得ながら第一中間宿主の検出系の開発を試みた。

### (3) 中間宿主の環境 DNA 検出系の作成

第一中間宿主(*B. funiculata* *B. siamensis*)の検出系は2の結果を用いて作成する。また、メコン流域の第二中間宿主のデータはすでに存在するものを用いて行う。なお、魚類の環境 DNA 分析に関しては分担者の源らによってすでに優れた検出系が構築済みであるため(Miya et al. 2015)それを熱帯域に適用するための調整を行った。第一中間宿主の検出系のラボにおける感度・精度確認は1のマヒドン大学軟体動物部門において実施した。

### (4) ヒトの Ov 感染状況の確認

ヒトのOv感染率、感染強度を確認し、住んでいる地域、食料を手に入れる場所（特に生魚）などの社会的情報を入手する。現地の人々は割と近隣で食料品を手に入れる傾向があるため（早朝のマーケットなど）、調査場所はラオス側の協力者である現地の保健局と相談し、これまでの検便でOvの感染率が高い場所を選択した。現地の保健省によって近年、検便が実施されている地域はそのデータを使用した。

(5) Ovそして第一、第二中間宿主環境DNA手法を用いた調査と古典的手法との比較、また、その地域におけるそれぞれの分布状況の確認

(4) で選択した地域の様々な水源において、環境水を採取し、環境DNA分析手法を用いて、Ovおよび第一、第二中間宿主それぞれのDNAの検出を行う。環境DNA検出では必ずしも検出率が100%ではないため、同一地点で3サンプルを得た。同時に環境DNA検体を採取した同じ水域において、第一、第二中間宿主の貝および魚を入手し（可能な場合、魚は市場において入手）、古典的寄生虫学手法（形態学）を用い、貝のセルカリア、魚のメタセルカリアを検査した。環境DNA手法と寄生虫学手法の結果を比較し、一致度を確認した。

(6) 結果の統合と検討

(3) ~ (5) の結果を統合し、Ovの実際の蔓延地においてOv感染リスクの差があるのかなどを、統計解析を行いOvの分布要因の推定を行った。

#### 4. 研究成果

本研究においては方法論の改良により、Ovの環境DNAの検出率が増加した。改良をした部分は水検体の濾過をポンプによるものから、重力濾過へ、それに伴いフィルターを硝子ファイバーからステリベクスへ変更を行った。研究室での方法論の感度・精度確認は日本人学生をマヒドン大学へ数か月派遣し、実施した。COVID-19蔓延の影響により、現地調査が合計で2023年3月と2023年6月の2回となってしまったが、3月には従来法（手動ポンプ）

図1 環境DNA手法によるOv検出

collection	2015 May	2015 Oct	2023 Mar	2023 June			
				P	G1	G2	G3
Filtration tech.	pumping			gravity			
Filter	GF/D			sterivex			
PCR target	Single gene			Multi gene			
Site No.	OV specific DNA result						
1	pos	pos				pos	
2					pos		
14					pos	pos	pos
22				pos			
26						pos	
34		pos	pos		pos		pos
42				pos	pos		pos
61			pos				
Total No. of Pos	1	2	2	2	4	3	3

6月には両方法論を実施出来、結果比較を行うことができた（図1）。重力濾過は従来法に比較し、手動による労力や、電気を使用しない、など飛躍的な省力化が実現でき、野外調査における検体処理能力が飛躍的に向上することができた。また、従来法ではOv DNAを単一遺伝子で検出を行っていたが、そこもmulti-gene検出とし、感度を向上させることに成功した。2015年のデータは以前論文化しているデータであるが（Hashizume et al., 2017）、比較のために同じ地点において採水を実施している。図1の採水ポイント1と34に関しては複数回の時期においてOvが検出されておりOv感染に関して必要な地点であることが確認された。

環境DNA手法と古典的寄生虫検査法によるOvの検出状況を図2に示す。環境DNA手法によりOv・DNAが検出された地点で採取された第二中間宿主の魚からOvの感染型であるメタセルカリアが検出された。両方法論での結果は完全に一致をしている。通常の調査で、第二中間宿主からのメタセルカリアの検出は高くても数パーセントであることから、環境DNA手法によるOvの検出感度はかなり高く、環境DNAが古典的手法と比較して遜色がないことが確認された。寄生虫感染のダイナミクスを知るために環境DNA手法が非常に優れていると言える。統計学処理を用いて、Ov/DNAの分布要因を探ったところ、採水地点から500m圏内の建物数

図2 環境DNA手法によるOv/DNA検出と古典的寄生虫検査法によるOv検出の比較

collection	2023 Mar	2023 June			
		P	G1	G2	G3
Filtration tech.	Pumping		gravity		
Filter	GF/D		sterivex		
PCR target	Multi gene				
Site No.					
1				pos	
2			pos		
14			pos	pos	pos
22		pos			
26				pos	
34	pos		pos		pos
42		pos	pos		pos
61	pos				
Total No. of Pos	2	2	4	3	3

Site	No. of collected Bithynia Snail		MTC pos fish No./ examined fish No.	
	March	June	March	June
1	256	80		1/12
2				1/12
3				
4				
5		1		
6	42	40		
7	13			
8	18	10		
10				
11	28	58		
12	14	1		
13		27		
14		12		5/12
15	25			
16				
17				
18				
20		3		2/3
22				
23		3		
25				
26	10	4		1/12
27	7			
28	5	3		
29	37			
30				
34	72		2/3	4/12
42	83		1/6	6/12
61				
62				
63				
	455	397		

が増加する、電気伝導度が増加する、第一中間宿主の貝の捕獲数が増加する、状況で *Ov*・DNA 検出が上がる、という結果が出た。の電気伝導度は下水が混入した水源で、高くなることが知られており、電気伝導度が高く *Ov*・DNA が陽性の地点はヒトを含む *Ov* 感染終宿主からの糞便による汚染が想定される。要因が、中間宿主の存在の点からも感染がアクティブにおこっていることが推察される。今後は *Ov* の成長段階に応じた特異的検出法を開発し、上述の推察の検証を行う予定である。また中間宿主の検出系はさらなる改良が必要である。

本研究結果により、実際に *Ov* 感染リスクの高い地域に対する、実行可能性の高いアプローチを講ずることが出来ると考えている。本研究で得られた成果は、現在論文化を進めており、研究協力者である現地の保健局ともデータを共有している。そのデータをどのように利用し、どういった対策法を講じるのか、実際的にどの程度の社会還元性を果たせるのか、今後の検案事項である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Riko Matsuo, Megumi Sato, Marcello Otake Sato, Poom Adisakwattana, Orawan Phuphisut, Tippayarat Yoonuan, Yanin Limpanont, Yupa Chusongsang, Paporn Poodeepiyasawat, Toshifumi Minamoto
2. 発表標題 Detection of <i>Opisthorchis viverrini</i> by using environmental DNA
3. 学会等名 International Congress of Tropical Medicine and Malaria 2020 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Marcello Otake Sato, Megumi Sato, Yasuhito Sako
2. 発表標題 ENVIRONMENTAL DNA AND RISK MAPPING
3. 学会等名 15th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Megumi Sato, Riko Matsuo, Natsumi Kihara, Phypphailin Prasayasith, Tippayarat Yoonuan, Poom Adisakwattana, Tiengkham Pongvongsa, Toshifumi Minamoto, Marcello Otake Sato
2. 発表標題 Ecoepidemiology of opisthorchiasis in Savannakhet-Lao PDR using the eDNA approach
3. 学会等名 Joint International Tropical Medicine Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	源 利文  (Minamoto Toshifumi)  (50450656)	神戸大学・人間発達環境学研究科・教授    (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	オオタケサトウ マルセロ  (OtakeSato Marcello)  (50771896)	新潟薬科大学・医療技術学部・教授     (33101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	Mahidol University			
ラオス	Savannakhet Provincial Malaria Station			