

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24年5月23日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21406009

研究課題名（和文） テニア科条虫幼虫感染家畜個体の識別に有用な新しい技術開発とリスク評価への応用

研究課題名（英文） Development of diagnostic methods for domestic animals infected with larval taeniid cestodes and application to risk management.

研究代表者

岡本宗裕（OKAMOTO MUNEHIRO）

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70177096

研究成果の概要（和文）：中国・四川省チベット高原とインドネシア・バリ島でヒト寄生テニア科条虫について、家畜とヒトの疫学調査を実施した。四川省チベット高原では、有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫の3種が同所的に流行していることが明らかとなった。バリ島では有鉤条虫が、南部では無鉤条虫が流行していることが確認された。また、四川省チベット高原では、無鉤条虫とアジア条虫の交雑体が発見された。我々が開発した遺伝子診断法と免疫診断法が、流行地の家畜の診断に利用できるかどうかを検討した。また、これらのデータをもとに、流行地における家畜のリスク評価を行った。

研究成果の概要（英文）：Parasitological survey on human taeniid cestods was done in Tibetan Plateau, Sichuan, China and Bali, Indonesia. In Tibetan Plateau, three human *Taenia*, *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia asiatica* were endemic sympatrically. In Bali, *T. solium* was endemic in the northern part of island and *T. saginata* was endemic in the southern part. In addition, hybrid between *T. saginata* and *T. asiatica* was found in Tibetan Plateau. We examined the molecular and immunological diagnostic methods for human taniasis/cysticercosis, which were developed by our research group. We also evaluated the risk of domestic animals for endemic of human taniasis/cysticercosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学A

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：囊虫症・テニア症・中間宿主・家畜・個体識別・リスク評価・分子疫学調査

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は平成14～17年度にかけて基盤研究（A）（代表者・伊藤）の研究分担者として、旭川医科大学、インドネシア国立感染症研究所、インドネシア大学、マヒドール大学等と共同で、ヒトのテニア症・囊虫症

の疫学調査を実施してきた。その結果、流行地におけるヒトの感染状況についてはかなり詳細に把握することができた。しかしそれまでの調査は「ヒト」に限定されており、実際の感染源となる家畜の感染状況についての情報はほとんどないのが現状であった。こ

れは、それまでの調査が「医学者」主体の調査であったため、家畜の調査が実施できなかったことが主な原因と考えられた。そこで基盤研究（B）平成18～20年度（代表者・岡本）では、「獣医師」主体の研究グループを組織し、中間宿主家畜の分子疫学調査を実施することを目的として、調査を実施してきた。

家畜の調査は剖検による虫体の確認が確実であるが、貴重な家畜を提供してもらい網羅的に剖検することは実際には不可能であった。そこでまず、所有者の許可のもと採血を実施し、特異抗体の検出により感染の有無を確認した。その結果、タイの流行地ではブタ有鉤囊虫症の感染率は予想外に低いことが明らかとなった。一方で、ウシの無鉤囊虫症やブタのタイワンテニア症については、有鉤条虫の抗原では検出できず、十分な疫学データを得ることができなかった。そこで、実験感染動物の血清を用い、これらに特異的な免疫診断法を開発した。しかし、自然感染動物に対する有用性については、未検討であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず有鉤囊虫に対する免疫診断法と前研究課題において開発した無鉤条虫とアジア条虫に対する免疫診断法が、実際の疫学調査に使用できるかどうかを検討する。そのためには、剖検により確実に感染していることが判明している動物の血清が必要であるが、わが国にはこれらの条虫が存在しないため、野外材料での検討には海外で得られた血清を使用する。我が国の法律では、家畜の血清の国内への持ち込みが寄生されているため、調査地で実施できる診断法を開発する。また、テニア症の遺伝子診断に関しても、調査地で実施できる簡便な診断法を開発する。

これらの検査法の有効性を確認した上で、インドネシア・タイ・中国のテニア症・囊虫症流行地において「家畜の疫学調査」を血清学的に実施するとともに、虫体・宿主の多様性について分子遺伝学的に検討する。これらの結果とこれまで得られているヒトの疫学データから、「どのような飼育形態がリスクが高いのか」、「どんな品種がリスクが高いのか」を検討し、家畜からヒトへ、ヒトから家畜への感染流行地における家畜のリスクを評価する。

3. 研究の方法

我々の研究グループはインドネシアとタイにおいて数回にわたりヒトのテニア症・囊虫症の疫学調査を実施してきた。その結果、インドネシアでは有鉤条虫は、イリアンジャヤ、バリ島、北スマトラに、無鉤条虫は、バリ島に、タイワンテニアは北スマトラに流行

地があることが、タイではカンチャナブリ州の流行地で3種が同時に生息していることを明らかになった。また、中国四川省のチベット高原でも、ヒト寄生のテニア3種が同所的に存在する流行地が見つかった。

そこで本研究では、中国四川省のチベット高原とインドネシアバリ島において、疫学調査を実施した。対象としているテニア属条虫の終宿主はヒトのみなので、まず流行地においてヒトの疫学調査を実施した。ヒトの調査は、糞便検査と聞き取り調査を併用し、感染が疑われた場合には駆虫の投与によって確認すると共に、排出された虫体について遺伝子検査を実施した。遺伝子検査は、PCRとLAMPを行い、必要に応じて得特定の遺伝子の塩基配列を決定した。

また、我々がヒトの患者に用いている無鉤条虫に対する免疫診断法と前研究課題で開発した無鉤条虫とアジア条虫に対する免疫診断法の有効性を調べた。ヒトの調査において確認された患者の住居の周囲で飼育されているブタについて、採血を行い、有鉤囊虫とアジア条虫に対する免疫診断を実施した。また、バリ島の屠場で得られたウシの血清について、無鉤条虫についての免疫診断を実施した。

これらのデータをもとに、両流行地における家畜のリスク評価を行った。

4. 研究成果

（1）平成21年度疫学調査

中国四川省疫学研究所の研究員とともに、同省チベット高原の流行地で調査を実施した。4つの集落で調査を実施したところ、いずれの地域でもテニアの感染者が認められ同地域はヒトテニア症の濃厚汚染地域であることが明らかとなった。特に、そのうちの1集落では人体有鉤囊虫症の患者も多数確認できた。形態的に無鉤条虫あるいはタイワンテニアと思われる条虫の人体寄生は全ての集落で確認できた。これらの虫体について、ミトコンドリアDNAと核のDNAを用いた遺伝子診断を実施したところ、全て無鉤条虫であった。これらの虫体から虫卵を分離し、豚に感染させたが、幼虫の寄生は確認できなかった。

（2）平成22年度疫学調査

中国四川省疫学研究所の研究員とともに、同省チベット高原の流行地で調査を実施した。前年度に調査した2地区に加え、新たに2つの集落で調査を実施したところ、いずれの地域でもテニアの感染者が認められ同地域はヒトテニア症の濃厚汚染地域であることが再確認できた。形態的に無鉤条虫あるいはアジア条虫と思われる条虫の人体寄生は全ての集落で確認できたが、有鉤条虫は昨年

度と同様、1 集落で確認できたのみであった。これらの虫体について、ミトコンドリア DNA と核の DNA を用いた遺伝子診断を実施したところ、1 集落において採集された 2 虫体は、Hybrid 由来であることが確認できた。また、同地域で生息しているブタからテニアの幼虫を採取した。遺伝子検査は、平成 23 年度に実施する予定である。

(3) 平成 23 年度疫学調査

インドネシア・バリ島では、無鉤条虫と有鉤条虫のヒトでの感染が確認されているが、中間宿主である家畜からの報告はほとんど無い。平成 23 年度は、インドネシア厚生省ならびにバリ島・ウダヤナ大学の研究者とともに、バリ島北部の流行地においてヒトおよび家畜の感染状況を調べた。その結果、ヒトから有鉤条虫の成虫を得ると共に、現地で実施した ELISA により、有鉤条虫に対する抗体を保有しているヒトおよびブタを確認した。このブタを剖検したところ、多数の有鉤条虫の寄生が確認できたため、バリ島において有鉤条虫の生活環が成立していることが明らかとなった。この虫体の遺伝子解析を実施したところ、アジア型であるが、従来考えられていたパプアのものとは異なることが明らかとなった。

(4) 遺伝子診断法の開発

中間宿主の異なる種に由来するテニア症をコントロールするためには、感染源を特定する必要があり、正確な同定が不可欠である。そこで、我々は、有鉤条虫を含めた 3 種のテニア属条虫を一度の検査で同定できる multiplex PCR の検査系を確立していた。この方法により、本調査で得られた海外の患者からの虫体や日本国内の輸入感染患者からの虫体について実験室レベルでは容易に同定できた。しかし、テニア症の流行地は発展途上国のごく小さな村であることが多く、実際中国四川省チベット高原では、電源が安定しないため PCR による検査は実際には不可能であった。そこで、我々は、特別な機材を使用しない LAMP 法を用いた検査法を開発し、実際、中国の流行地の宿泊場所においてヒトからの虫体を採集当日に同定することに成功した。

(5) 家畜の免疫診断

家畜の診断についてはあまり研究が進んでいなかったが、平成 23 年度に大きな進展があった。迫らが開発した抗原とプロテイン G を用いた ELISA で、ブタの有鉤条虫症の診断が可能となった。そこで、この検査法を用いて、バリ島でブタの検査を実施したところ、複数の感染ブタを発見することができた。これらは、特別な機材のないホテル等で実施し

た検査の結果であり、流行地での感染源対策にはきわめて有効な検査法と考えられた。無鉤条虫の免疫診断について、バリ島の屠場のウシについて実施したところ、数値的には陽性と判定される個体が多数見られた。ヒトの流行状況を考えると、それほど高率に感染しているとは考えられず、何らかの非特異反応が起こっていると考えられた。抗原の精製等、さらなる改良が必要と考えられた。アジア条虫については、流行地でサンプルが入手できなかったため、大きな進展はなかった。

(6) リスク評価

上述のように、家畜の疫学調査の際、同時にヒトの診断も実施している。そこで、GIS (地理情報システム) の専門家である海外共同研究者のジロウド博士とラオル博士と共に、調査地の地形、植生とテニア症・囊虫症の流行との関連を検討した。また、現在ヒト-ブタ間の有鉤条虫の伝播についての分析を進めている (投稿準備中)。ヒトとブタの両方を同時に検査し、両者の関係を分析するのは世界的にも初めての試みである。

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 11 件)

- ① Swastika K, Dewiyani CI, Yanagida T, Sako Y, Sudarmaja M, Sutisna P, Wandra T, Dharmawan NS, Nakaya K, Okamoto M, Ito A (2012) An ocular cysticercosis in Bali, Indonesia caused by *Taenia solium* Asian genotype. *Parasitology International* 61(2): 378-380、査読有
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.11.004>
- ② Hailemariam Z, Nakao M, Menkir S, Lavikainen A, Yanagida T, Okamoto M, Ito A (2012) Molecular identification of unilocular hydatid cysts from domestic ungulates in Ethiopia: Implications for human infections. *Parasitology International* 61(2): 375-377、査読有
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.022>
- ③ Yamane K, Suzuki Y, Tachi E, Li T, Chen X, Nakao M, Nkouawa A, Yanagida T, Sako Y, Ito A, Sato H, Okamoto M (2012) Recent hybridization between *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*. *Parasitology International* 61(2): 351-355、査読有
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.01.005>
- ④ Knapp J, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Saarma U, Lavikainen A, Ito (2011) A.

Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): An inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61(3): 628-638、査読有

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.022

⑤ Wandra T, Sudewi AAR, Swastika K, Sutisna P, Dharmawan NS, Yulfi H, Darlan DM, I Kapti N, Samaan G, Sato MO, Okamoto M, Sako Y, Ito A (2011) Taeniasis/Cyaticercosis in Bali, Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 42(4): 793-802、査読有

⑥ Ito A, Okamoto M, Li T, Wandra T, Dharmawan NS, Swastika K, Dekumyoy P, Kusolsuk T, Davvajav A, Davaasuren A, Dorjsuren T, Mekonnen SM, Negasi ZH, Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Lavikainen AJ, Nkouawa A, Mohammadzadeh T (2011) The first workshop towards the control of cestode zoonoses in Asia and Africa. *Parasites & Vector* 4:114、査読有
DOI:http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-114

⑦ Anantaphruti MT, Okamoto M, Yoonuan T, Saguankiat S, Kusolsuk T, Sato M, Sato MO, Sako Y, Waikagul J, Ito A. (2010) Molecular and serological survey on taeniasis and cysticercosis in Kanchanaburi Province, Thailand. *Parasitology International* 59, 326-330、査読有

⑧ Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Knapp J, Nkouawa A, Sako Y, Ito A. (2010) State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: Phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 444-452、査読有

⑨ Okamoto M, Nakao M, Blair D, Anantaphruti M T, Jitra Waikagul J, Ito A. (2010) Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica*. *Parasitol. Int.*, 59, 70-74、査読有

⑩ Nakao M, Xia N, Okamoto M, Yanagida T, Sako Y, Ito A. (2009) Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology International* 58, 384-389、査読有

⑪ Okamoto M, Urushima H, Hasegawa H. (2009) Phylogenetic relationships of rodent pinworms (genus *Syphacia*) in Japan inferred from 28S rDNA sequences. *Parasitology International* 58, 330-333.

[学会発表] (計 6 件)

① Li T, Long C, Nakao M, Chen X, Okamoto M, Giraudoux P, Craig PS, Xiao N, Huang L, Ito A. Usefulness of pumpkin seeds combining areca nuts in treatment of community-based screened taeniasis carriers, China. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, (2011/12, Bangkok, Thailand)

② Kusolsuk T, Dekumyoy P, Chaisiri K, Sanguankiat S, Okamoto M, Yanagida T, Sako Y, Komalanisra C, Ito A. Taenia and Taeniasis: Epidemiological survey and molecular identification in Tha Song Yang district, Tak Province, Thailand. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, (2011/12, Bangkok, Thailand)

③ Swastica K, Wandra T, Sudarmaja M, Dharmawan NS, Sako Y, Yanagida T, Okamoto M, Sutisna P, Ito A. Current situation of taeniasis and cysticercosis in Bali, Indonesia. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, (2011/12, Bangkok, Thailand)

④ Okamoto M. Hybridization between *Taenia asiatica* and *Taenia saginata* and taxonomic status of *T. asiatica*. Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, (2011/12, Bangkok, Thailand)

⑤ Okamoto M. The present knowledge on *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*: Evidence of hybrids.

Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, (2010/12, Bangkok, Thailand)

⑥ Okamoto M. Cross-fertilization and hybridization in *Taenia* species. 6th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, (2009/12, Bangkok, Thailand)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 宗裕 (OKAMOTO MUNEHIRO)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70177096

(2)研究分担者

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

迫 康仁 (ITO AKIRA)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：40312459

(3)連携研究者

岡本 芳晴 (OKAMOTO YOSHIHARU)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：50194410