

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305011

研究課題名(和文) エクアドルの吸虫類、特に人症例が判明した新規肝吸虫の同定、分子系統、感染源の研究

研究課題名(英文) Novel liver fluke species causing human illness in Ecuador: Prevalence, morphological and genetic identification, and infection sources

研究代表者

杉山 広 (Sugiyama, Hiromu)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：00145822

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)：南米エクアドルで住民を対象に肝吸虫の調査を実施して、太平洋側の3県にAmphimerus属肝吸虫の流行地を見いだした。淡水魚を20種類以上検査して、Guabinaという魚がメタセルカリアの寄生数が多く、感染源として最も重要であることを明らかにした。メタセルカリアの種同定には、患者由来の成虫を用いて解読した遺伝子配列が、マーカーとして役立った。肺吸虫に関しては、エクアドルでの過去の研究成果を紐解き、総説論文をまとめた。陽性地区の淡水産カニから幼虫を分離し、実験ネコへの感染試験で成虫を回収、本虫(メキシコ肺吸虫)の形態と遺伝子に関する知見も得た。

研究成果の概要(英文)：The geographical distribution, prevalence, and intermediate hosts of the liver fluke belonging to the genus Amphimerus were investigated in Ecuador. Endemic areas were found in 3 provinces in the Pacific Coast. More than 20 species of the freshwater fish were examined for metacercariae. Small fishes called Guabina, which are highly prevalent in the small streams flowing along the villages, were found to be the most important sources of infection in humans. This fish species recorded a high number of metacercariae per fish. We analyzed the sequence of ribosomal ITS2 DNA from adult Amphimerus flukes discharged by patients after praziquantel treatment, and utilized it as a marker to identify the metacercariae of this species in fish. A literature review was also conducted on lung flukes to summarize the status of the disease, paragonimiasis caused by Paragonimus mexicanus.

研究分野：寄生虫学

キーワード：肝吸虫 Amohimerus 肺吸虫 Paragonimus エクアドル 人獣共通感染症 食品媒介感染症 伝搬生態学

1. 研究開始当初の背景

肝吸虫症の原因として重要な原因種は、旧大陸に分布する2属3種の肝吸虫類(*Clonorchis* 属および *Opisthorchis* 属)で、東アジアおよび東南アジアの流行地には、少なくとも3,500万人の患者がいるものと推定される。一方で新大陸には、*Amphimerus* 属の肝吸虫が分布するが、これは人には感染しない動物寄生種とされてきた。ところが2010年にエクアドルの北西部・エスメラルダス県の集落(サンミゲル地区)で、約300人の住民のほぼ2割から肝吸虫類の虫卵が検出され、駆虫で得た成虫が精査されて、*Amphimerus* 属と形態同定された(*Calvopina et al.*, 2011)。そこで従来の定説を見直すために、本研究が企画された。

2. 研究の目的

エクアドルで見い出された人体寄生性肝吸虫は、種が未決定である。種同定に有用なマーカー(形態・遺伝子)も定まっていない。感染源(第2中間宿主)も不明のままである。分布状況・汚染状況も明らかでない。肝吸虫類全体の分子系統・分類学に関して、本種を加えて再検討の必要がある。また、肝吸虫症例は肺吸虫症の流行地に隣接して見付かったことから、両種の生活環に共通して必要な生態系・環境因子があると考えられる。これを特定して、新たな流行地を探索する。これらの課題を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

南米エクアドルの住民における *Amphimerus* 属肝吸虫の感染状況を全国レベルで把握する。そのために糞便検査法を改良し、血清検査法を構築する。淡水魚を感染源と想定して、流行地で捕獲された魚を検査し、メタセルカリアの寄生状況を調べる。本属の同定に必要なマーカー(形態および遺伝子)を決定する。多数の淡水魚を検査材料として、相当数の吸虫類メタセルカリアが検出された場合には、これらを迅速・正確に同定・鑑別する必要がある。そのための分子診断法を構築する。分子系統解析にも取り組み、肝吸虫類の分類学的再検討を行う。

エクアドルの肺吸虫については、分子系統・疫学に関する検討を行う。さらに現地の実情に合わせた肝吸虫症・肺吸虫症の診断法を確立する。

4. 研究成果

(1) エクアドルにおける *Amphimerus* 属肝吸虫による患者発生の調査

エクアドルの10県・13箇所において、住民2,600人以上から糞便を得て、寄生虫卵の検査を実施した。その結果、2県の2箇所に *Amphimerus* 属肝吸虫の新たな流行地を見いだした(マナビ県のアグアラン地区およびサ

ントドミンゴ県のサントドミンゴ地区)。これら計3箇所に認められた陽性の集落は、いずれも熱帯雨林に覆われ、比較的大きな河川に面し、住民は淡水魚を常食していた。住環境や食生活が一致する地域は、同国の南西部・太平洋側や東部・アマゾン側にも広がることから、今後も調査を継続することで、本虫の流行地が新たに発見される可能性は高い。

(2) *Amphimerus* 属肝吸虫による淡水魚の汚染状況調査

本省の流行地で20種類を超える淡水魚を検査し、特にGuabinaという魚は陽性率が高く、魚1尾あたりのメタセルカリア寄生数も多いことから、感染源として極めて重要であることを明らかにした。この魚は陽性集落の周囲を流れる支流を好んで生息する。生息地の特性に関するこのような情報を活用して、本虫の新たな第2中間宿主の検出・特定に努めたい。

(3) *Amphimerus* 属肝吸虫の形態学的特徴および宿主適合性の解析

メタセルカリアを用いた各種実験動物への感染試験を実施し、ネコとハムスターが本虫の好適終宿主であることを証明した。また陽性地区では、人体症例やネコの他、イヌにも感染例を認めている。一方、成虫の形態学的特徴は、終宿主の種類と無関係であることが分かった。現在、終宿主から回収された成虫の形態所見に基づく本虫の検索表を作成中である。検索表に既報の *Amphimerus* 属肝吸虫(ペルーやブラジルに分布する動物寄生種)を加え、種の同定・鑑別に幅広く活用できるような検索表の作成に努める予定としている。

(4) 塩基配列の解読に代替する *Amphimerus* 属肝吸虫の迅速同定法の確立

魚から検出されるメタセルカリアの種同定には、現在、リボソームDNA・ITS2領域の遺伝子配列をマーカーとして利用している。このマーカー配列は、駆虫・濾便によって得た患者由来の成虫を用いて、我々が登録した。流行地のイヌおよびネコから検出された *Amphimerus* 属肝吸虫の当該領域の配列も、相互に完全に一致し、現時点で隠蔽種は見つかっていない。

一方、流行地の魚から、*Amphimerus* 属の肝吸虫と形態が酷似する異形吸虫類 *Haplorchis pumilio* のメタセルカリアも検出された。*H. pumilio* は、南米や東南アジアで人の下痢症の原因として問題視されている。両種はITS2領域の塩基配列の解読で容易に鑑別できるが、より迅速な鑑別法として、PCR-RFLP法および種特異プライマーを用いたワンストップPCR法を開発中である。

(5) 分子系統解析

分子系統解析は進展しなかった。新大陸の

哺乳類由来の *Amphimerus* 属肝吸虫は、我々以外に誰も遺伝子配列を登録せず、これが一つの原因である。今後、各国の寄生虫学者に呼び掛け、新大陸の材料を収集し、遺伝子配列の解読と登録を進めたい。肝吸虫類（肝吸虫科：the family Opisthorchiidae）は重要な人体寄生種を含むにもかかわらず、分子系統分類に関しては混乱がある（Petney *et al.*, 2013）。旧大陸の材料を含めた分子系統解析に取り組み、肝吸虫類の分類を再検討する必要がある、今後の重要な課題となる。

(6) 肺吸虫に関する研究

エクアドルは肺吸虫症の患者も多く、メキシコ肺吸虫の高度汚染国として有名である。そこで同国の研究動向を把握するため、既報の収集・解析を行い、肺吸虫（症）に関する総説論文をまとめた（Calvopina *et al.*, 2014）。人への感染源となる淡水産カニの形態と地理的分布を解析し、2報の論文を作成した（Takeda *et al.*, 2014, 2016）。同国における肺吸虫症の発生動向の解明と、そのための血清診断法の確立に現在、取り組んでいる。

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 5 件)

1) Takeda M, Sugiyama H, Kumazawa H, Romero D, Calvopina M. Recent Collections of Freshwater Crabs from the Pacific and Amazonian Regions of Ecuador, South America. *J. Heisei Teikyo Univ.*, 27, 1-16, 2016.

2) Sugiyama H, Shibata K, Arakawa K, Morishima Y, Yamasaki H, Gokudan M, Iwakiri T, Fukumori J. Paragonimiasis due to the consumption of wild boar meat in Japan: Contamination levels of lung fluke larvae in muscle samples of wild boars caught in the Kagoshima Prefecture. *Jpn. J. Inf. Dis.*, 68, 536-537, 2015.

3) Calvopina M, Cevallos W, Atherton R, Saunders M, Small A, Kumazawa H, Sugiyama H. High prevalence of the liver fluke *Amphimerus* sp. in domestic cats and dogs in an area for human amphimeriasis in Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2):e0003526, 1-9, 2015.

4) Calvopina M, Romero D, Castaneda B, Hashiguchi Y, Sugiyama H. Current status of *Paragonimus* and paragonimiasis in Ecuador. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109, 849-855, 2014.

5) Takeda M, Sugiyama H, Calvopina M, Romero D. R. Some Freshwater Crabs from Ecuador, South America. *J. Heisei Teikyo Univ.*, 25, 1-13, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Calvopina M, Romero D, Valverde G, Cevallos W, Sugiyama H. Clinical tolerance and drug efficacy of praziquantel in the treatment of human amphimerosis. International Congress on Tropical Medicine and Malaria 2016 (Brisbane, Sept, 18 to 22, 2016).

2) Romero D, Sugiyama H, Valverde-Munoz G, Kumazawa H, Calvopina M. Fishes involved in *Amphimerus* sp. human transmission cycle in Ecuador. International Congress on Tropical Medicine and Malaria 2016 (Brisbane, Sept, 18 to 22, 2016).

3) 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 森嶋康之, 山崎 浩, 熊澤秀雄, カルボピーニャ・マヌエル. エクアドルで人体症例の原因となる肝吸虫 *Amphimerus* sp. に関する検討. 第 75 回日本寄生虫学会東日本支部大会(東京, 2015 年 9 月 26 日).

4) 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 森嶋康之, 山崎 浩, 熊澤秀雄, カルボピーニャ・マヌエル. エクアドルで人体症例の原因となる肝吸虫 *Amphimerus* sp. に関する検討. 日本獣医臨床寄生虫学会大会(東京, 2015 年 12 月 19 日)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 広 (Sugiyama, Hiromu)
国立感染症研研究所・寄生動物部・室長
研究者番号：00145822

(2) 研究分担者

熊澤秀雄 (Kumazawa, Hideo)
高知大学・医学部・助教
研究者番号：70127942