

財団法人 日中医学協会

2010年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011年 3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 太田 伸 生

所属機関名：東京医科歯科大学

所属部署名：大学院医歯学総合研究科

所在地：東京都文京区湯島1-5-45

電話：03-5803-5191



職名：教授

内線：

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感染感受性の地理的特異性に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 太田伸生

職名： 教授

所属機関名：東京医科歯科大学

部署名：大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 陸 紹紅

職名：副所長（教授）

所属機関名：浙江省医学アカデミー

部署名：寄生虫病研究所

4. 当該研究における発表論文等

Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R et al. Schistosomicidal and anti-

fecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89.

Parasitol Int, 2011, 印刷中

中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感受性の地理的特異性に関する研究

研究者氏名 太田伸生
所属機関 東京医科歯科大学大学院
国際環境寄生虫病学分野・教授
共同研究者 陸 紹弘、聞 礼永、汪 天平
下河原理江子、熊谷 貴、二瓶直子、斎藤康秀

要旨

日本住血吸虫症の日本国内での流行は終息したが、今日でも中国揚子江流域とフィリピンなど地理的に隔離されて流行地が散在する。住血吸虫は中間宿主である貝とヒトを含む哺乳動物宿主で生活史が成立するが、異なった流行地の貝と住血吸虫との間での感染が成立するかは十分に解明されていない。日本では患者発生はないが中間宿主貝が存在する状況下で、外国から住血吸虫が持ち込まれるリスクを評価するための情報が十分でない。本研究ではアジア域内で住血吸虫または中間宿主貝の移動が発生した場合のリスク評価の資料として、中国、フィリピンまたは日本産の中間宿主貝が異なる流行地の住血吸虫に如何なる感染感受性を示すかを比較検討した。中間宿主貝である *Oncomelania hupensis* とその亜種に対する日本および中国株日本住血吸虫の感染効率を PCR と LAMP 法による遺伝子検出により調べた。その結果、日本株の *O.h.nosophora* は日本と中国の住血吸虫の感染を受容するのに対して、中国の *Oncomelania* 属貝は検討した何れの流行地の住血吸虫株に対しても感受性が低く、中間宿主貝の生体防御機能には大きな地理的特徴が認められた。本研究では貝の感染を従来よりも高い感度で検出する方法を応用することにより、精度の高い情報が得られた。モノの交流活性化に伴ってリスクが高くなる住血吸虫のアジア域内移動に対して、エビデンスに基づいたリスク評価を行うための基礎資料となると考えた。

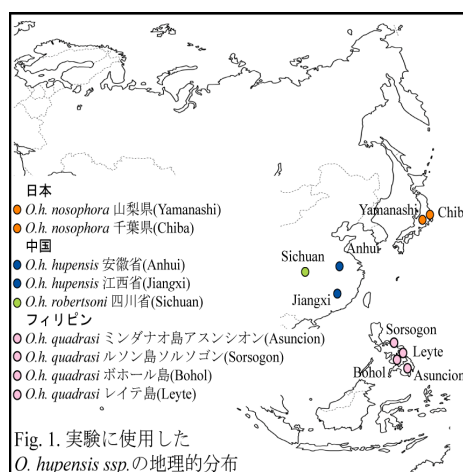
Key Words :日本住血吸虫 *Oncomelania*、感染感受性、LAMP 法、リスク評価

緒言

日本住血吸虫症は東アジアに流行地を抱える重要な熱帯感染症で、血管内寄生吸虫である日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* が原因となる寄生虫病である¹⁾。日本中間宿主とし、ヒトを含む哺乳動物を終卵が外界で孵化して幼虫が中間宿主貝にセルカリアとよぶ感染幼虫が水中で主体内では血管内で雌雄がペアを形成虫卵に対する宿主の免疫応答として

日本住血吸虫症は日本、中国、フィリピンが存在したが、日本では1996年には中国の揚子江流域と雲南省の一部、レイテ、パラワン島など、インドネシ

流行地である。日本住血吸虫の中間宿主 *Oncomelania hupensis* spp であり、その生息地は湿った草地である。日本ではミヤイリガイと呼ばれ (*Oh.nosophora*)、甲府盆地、備後平野、筑後平野などに分布して病気も流行していた。中国では *Oh. hupensis* と *Oh. robertsoni* が主に揚子江流域に生息し、特に前者が中国における主要な媒介者である。フィリピンでは *Oh. quadrasi* という小型の貝が媒介している。日本住血吸虫は一応一属一種とされるが、地理的に隔絶された環境下で、アジア域内相互に中間宿主貝と住血吸虫の組合せがどの程度厳密



住血吸虫は淡水産の巻き貝を中宿主とする生活史を形成する。虫に侵入し、一定の発育を遂げた後終宿主に経皮的に感染する。終宿して産卵し、毛細血管に塞栓した様々な病変が起こってくる。フィリピンおよびインドネシアに流公式に流行終息を宣言した。現在フィリピンのミンダナオ、ルソン、アのスラウェシ島の一部などが主は小型の淡水産巻き貝である

であるのかはよく判っていない。しかし、上記に示したように中間宿主貝は日本、中国、フィリピンそれぞれで別種（亜種）であるので、相互の地理的距離が住血吸虫-中間宿主貝の感受性に反映されていることも考えられる²⁾。日本国内で言えば、旧流行地である甲府と久留米とでは、それぞれの地理的分布に応じたミヤイリガイ株がその地域の住血吸虫だけを媒介するという報告もある。

経済発展が著しいアジア地域では人とモノの交流が活発になり、様々な感染症の移動も容易になってきた。住血吸虫は生活史が複雑であるために流行域の移動は本来起こりにくいが、アジア域内に中間宿主貝の生息域が散在していることを考えると、流行地からヒトを含む終宿主が移動する事により病気発生地域の拡大も可能性を否定する根拠はない。日本では流行は終息したが、甲府盆地にはミヤイリガイの生息地域が散在し、対策事業の終息に伴って生息域はむしろ拡大している。中国から何らかの方法で寄生虫が持ち込まれた場合の流行再興について、リスク評価のためのエビデンスが得られていない。

中間宿主貝の住血吸虫幼虫に対する感受性は、古典的には有毛幼虫（ミラシジウム）の暴露後16週間を待ってヒトへの感染幼虫であるセルカリアの遊出の有無を確認して判定していた。しかし、この方法では時間がかかることに加えて、貝の中での発育経過を追う研究は不可能であった。当研究室ではPCRやLAMPによる寄生虫遺伝子の検出系を利用し、中間宿主の各地理的分離株の住血吸虫株に対する感受性を評価する方法を確立したので³⁾、本研究においてその応用により中間宿主株と日本住血吸虫の感受性を時間経過で追いながら評価し、日本住血吸虫症のアジア域内での拡散のリスク評価を試みた。

対象と方法

Oncomelania 属貝: 使用した中間宿主貝は山梨県産（山梨株）および千葉県産（木更津株）の *O. h. nosophora*、中国安徽省産（Tonglin 株）および Anqin 株）および江西省産（Jiangxi 株）の *O. h. hupensis*、中国四川省産（Sichuan 株）の *O. robertsoni*、およびフィリピン産の *O. quadrasi* を用いた。山梨株を除いて他はすべて、実験室内飼育貝を用いた。



日本住血吸虫: 日本住血吸虫は山梨株と中国安徽省株を用いた。ともに実験室内でマウスを用いて継代維持してきたものを用いた。

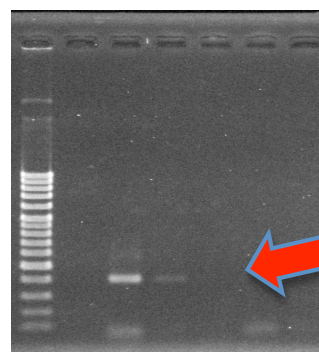
PCR法およびLAMP法: PCRとしては日本住血吸虫の28SリボソームDNAを標的として (GeneBank Accession# Z46504) *Oncomelania* 貝からの住血吸虫DNAの増幅を行った。396 bpのバンドの増幅を確認して感染を判定した。LAMP法には28SリボソームDNAのほかにも Sjr2 (GeneBank Accession# AF412221) も用いて検討した。

住血吸虫感染検出: *Oncomelania* 貝を24穴プレートに1個ずつ加えてRPMI1640培地で満たしておき、そこに日本住血吸虫ミラシジウム20匹を添加した。顕微鏡で遊離しているミラシジウムがないことを確認して貝を別のプレートに移した。その24時間後以降、一定時間経過ごとに検出を行い、最終的には16週後のセルカリアの遊出まで追跡した。

(Sj:10pg 1pg 100fg DNA)

結果

貝からPCRによる住血吸虫感染の検出: 貝は殻ごと試験管した後PCRおよびLAMPに用いた。予備実験として行った検出DNAをテンプレートした場合は28SリボソームDNA検出を示した(右欄)。LAMP法による検出の場合も同等の感度がこれをDNA量換算した場合、1匹のミラシジウムが存在する感染を検出できる事が確認された。一方、より高感度で検出としたLAMP測定だが⁴⁾、われわれの方法では全く検出がで



内で破碎し、DNA抽出を行うでは日本住血吸虫ゲノムの場合、100fgの検出感度を得られ(データ不提示)、る貝であれば、その検出できるとされたSjr2を標的せず、遺伝子検出のための

標的としては必ずしも至適の標的遺伝子とは考えられなかった。

ミラシジウムの貝への侵入効率：貝にミラシジウムを添加24時間後にPCR実施した場合、貝への侵入効率についてのデー

Habitat	Snail ssp	Sj Yamanashi		Sj Chinese		
		number of snails	Ratio *	number of snails	Ratio *	
Japan	Yamanashi	<i>O.h.nosophora</i>	28/29	97%	6/12	50%
	Chiba		19/20	95%	0/10	0%
China	Anhui (Tongling)	<i>O.h.hupensis</i>	0/30	0%	3/13	23%
	Anhui (Anqing)		1/10	10%	0/10	0%
	Jiangxi		0/30	0%	3/12	25%
	Hunan		-	-	0/10	0%
	Sichuan	<i>O.h.robertsoni</i>	18/20	90%	-	-
Philippine	Luzon	<i>O.h.quadrasi</i>	13/20	65%	-	-
	Leyte		15/20	75%	-	-
	Bohol		11/20	55%	0/10	0%
	Mindanao		14/20	70%	0/10	0%

タが観察されると考えた。検討した結果、日本の住血吸虫は山梨株、木更津株の *Oh.nosophora* にはほぼ 100% の侵入効率を示した一方、中国の *Oh.hupensis* にはほとんど侵入ができなかった。しかし、*Oh.robertsoni* の Sichuan 株には *Oh.nosophora* と同等の侵入を示し、中国の中間宿主貝でも亜種の異なる 2 種類の貝では住血吸虫の侵入感受性が異なることがわかった。日本産住血吸虫はフィリピンのはに対しては中等度に侵入効率を示した (上図)。

一方、中国の日本住血吸虫はアジア域内全ての中間宿主貝に対して侵入効率が低く、同じ流行地の貝に対してでも 10-20% 程度の低い侵入効率しか示さなかった。フィリピンのはに対しては日本の住血吸虫と同様に、中間レベルの侵入効率しか示さず、中国の寄生虫に対して高い侵入効率を許容する中間宿主貝は観察することができなかった。

中間宿主貝内での感染幼虫への発育：ミラシジウム暴露後 16 週待ってセルカリア遊出までの期間のフォローを幾つかの寄生

Habitat	Snail ssp	1Day	16Wks	
		% *	% *	
Japan	Yamanashi	<i>O.h.nosophora</i>	97%	67%
	Chiba		95%	ND
China	Anhui (Tongling)	<i>O.h.hupensis</i>	0%	0%
	Anhui (Anqing)		10%	5%
	Jiangxi		0%	ND
	Hunan		ND	ND
	Sichuan	<i>O.h.robertsoni</i>	90%	ND
Philippines	Luzon	<i>O.h.quadrasi</i>	65%	ND
	Leyte		75%	ND
	Bohol		55%	0%
	Mindanao		70%	0%

虫-中間宿主貝の組合せについて実施した。長期間の実験室内の貝飼育の困難性のために情報整理は困難であったが、可能な範囲で情報を整理した (左図)。最も注目した点は、Yamanashi 株の住血吸虫は Yamanashi 株の貝に 16 週後も高い感受性を示したのに対して、侵入効率では中等度の数値を示したフィリピンのはにつ

いては、16 週後ではセルカリア遊出が全く認められなかったことである。同様に高い侵入効率を示した千葉県産の貝や中国四川省の *Oh.robertsoni* での 16 週後までの発育効率の結論は残念ながら本報告の時点では得ることができなかった。少なくともミラシジウムの侵入と発育とが独立の規定機構を持っていることを示すデータであると考えた。一方、中国の貝に対しては日本産の住血吸虫の侵入効率が元々低かったが、侵入に成功したミラシジウムは感染幼虫まで発育可能であることが示唆

された。

考察

本研究では、日本住血吸虫ミラシジウムが、同じ *Oncomelania* 属の中間宿主貝であっても異なった感染感受性を示すことを明らかにすることができた。最も注目した所見は、日本の中間宿主貝がアジア域内の多くの寄生虫株に対して比較的高い感受性を示した一方で、中国揚子江流域に生息する中間宿主貝は恐らく物理的バリアも含めて、住血吸虫の侵入を許容しない事が推測された点である。さらに、侵入効率という観点からは、日本の住血吸虫が中国の貝でも、最も地理的距離が大きい四川省産の *O. h. robertsoni* に特に高い侵入効率を示したことは興味深い。*Oh. robertsoni* は形態学的に *Oh. nosophora* と類似しており、中国国内でも特異な共進化を遂げた寄生虫-中間宿主貝と考えらる。日本産の住血吸虫が *Oh. robertsoni* で感染幼虫まで発育できるか否かは未だ検討が終了していないが、*Oh. robertsoni* と *Oh. nosophora* は形態的にも類似しており、その起源の比較が興味深い。今後は揚子江下流域に分布する住血吸虫の *Oh. robertsoni* に対する感受性も整理する必要がある。

その一方で、中国住血吸虫株のミラシジウムをそれぞれの貝に暴露したところ、何れにおいても限られた侵入効率しか得ることができなかつた。中国安徽省の寄生虫を安徽省の貝に暴露した場合でさえも同様の結果しか得られなかつたので、中国産の中間宿主貝ではもともと自然防御免疫系が強く機能していることが考えられた。特に侵入後 24 時間にすでに PCR でも検出不能になるということは、強い虫体破壊機序が働いていることが推測され、中国の *Oncomelania* 属貝の生物学的特性を決定する機序の解明が興味深い。

中間宿主貝の住血吸虫に対する感受性を考える時、今回の研究から明らかなのはミラシジウムの侵入と貝体内での発育の 2 つの因子が独立して関与しているということである。日本産の住血吸虫は山梨株の貝体内に高率に侵入して、そのまま発育した。一方、日本産の住血吸虫は中国株の貝に侵入効率は悪いが、一旦侵入したらそのまま発育できることが推定される。しかし、日本産住血吸虫はフィリピン産の貝に侵入することは比較的容易であるが、その貝体内では強い発育阻害がかかっているデータであった。この事は中間宿主貝の住血吸虫ミラシジウムに対して、物理的バリアと生物学的バリアの 2 つの異なった機序が機能していることを示唆する。これらの機序解析を通して、中間宿主貝の日本住血吸虫に対する感染感受性の概要が解明されれば、それを応用して住血吸虫症対策戦略やリスク評価に新たな展望が拓かれると期待される。

参考文献

- (1) Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000;77:41-51.
- (2) Zhou XN, Wang LY, Chen MG, Wu XH, Jiang QW, Chen XY, Zheng J, Utzinger J, 2005. The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now. *Acta Tro*. 96: 97–105.
- (3) Kumagai T,* Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu SH, Chen R, Wen LY, and Ohta O. Detection of Early and Single Infections of *Schistosoma japonicum* in the Intermediate Host Snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay. *Am J Trop Med Hyg*. 83:542-8, 2010.
- (4) Xu J, Rong R, Zhang HQ, Shi CJ, Zhu XQ, Xia CM, 2010. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol* 40: 327–331.

注意・参考文献

本研究は2010年の第79回日本寄生虫学会にて口演発表した。

- (1) 中国安徽省における日本住血吸虫症中間宿主のサーベイランスツールの開発
- (2) LAMP法を用いた日本住血吸虫中間宿主貝の感染モニタリングとその疫学的応用の検討