

Study of intra-species diversity in Giardia intestinalis Assessment of a genotype distribution in isolated islands of Indonesia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tokoro, Masaharu メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00051096

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ジョルジアの種内変異に関する研究：
インドネシアの孤立地域での遺伝子型分布

課題番号：18406007

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金
基盤研究（B）研究成果報告書

平成20年4月

研究代表者 所 正治

金沢大学大学院医学系研究科講師

金沢大学附属図書館



1300-04665-1

はじめに

ジアルジア(ランブル鞭毛虫)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、先進国から発展途上国まで世界中に分布し、特に熱帯・亜熱帯地域では小児の慢性下痢、栄養障害の原因原虫として注目されている。しかしながら、本原虫に対する有効な公衆衛生対策は未だ確立しておらず、発展途上国の流行地域では小児、特に乳幼児において5-20%の感染率が報告され、また先進国においてもしばしば水を介した集団発生が問題となっていることから、対策構築のベースとなる基礎データの充実と新たな介入方法の確立が求められている。

近年の分子疫学の進歩は、この病原性腸管寄生原虫の種内に形態学的には区別のできない複数の遺伝子型の存在を明らかにしてきた。遺伝子型は現在までに7タイプ(AからG)が知られ、そこには、ヒトを含む多くのほ乳類に感染するAおよびBのような人獣共通感染症型や、各種ほ乳類に特異的とされるC、D、E、F、Gのような異なる宿主特異性を示すタイプが含まれ、また、ヒトに感染する遺伝子型AとBの中にも多様な亜型の存在が報告されてきた。しかし、その種内多型の成立と維持のメカニズム、そして宿主であるヒトとの共進化の経緯は不明であり、また流行地域である熱帯・亜熱帯の発展途上国におけるジアルジアの分子疫学的研究も十分とはいえず、地理的な遺伝子型分布の実体についても未だ明らかになっていない。

本報告書では、人工的な淘汰圧の付与による病原性原虫集団に対する進化学的な介入を目指した我々のジアルジア研究における初の研究助成である平成18年度-平成19年度科学研究費補助金基盤研究(B)「ジアルジアの種内変異に関する研究：インドネシアの孤立地域での遺伝子型分布」によって得ることのできたジアルジアの種内多型、地理的分布、宿主特異性さらに多型の維持・成立のメカニズムに関する現在までの知見を網羅的に記載する。

本研究では、未解明であった本原虫の遺伝子多型解析のための分子疫学的な手法の確立と今後の解析においてリファレンスとなる基礎的なデータ収集を実現し、初期の目的をほぼ達成することができた。本研究の遂行にあたっては分担・協力研究者はもとより本報告書に記すことのできなかった多くの方々のご協力をいただいた。ここに記し心より感謝を表したい。

目次

はじめに	1
1. 研究組織	3
2. 研究経費	3
3. 研究発表	
3-1 雑誌論文	4
3-2 学会発表	4
3-3 図書	6
4. 研究成果	7
5. 学会誌等発表資料	19

1. 研究組織

研究代表者	所 正治（金沢大学大学院医学系研究科講師）
研究分担者	井関基弘（金沢大学大学院医学系研究科客員教授）
研究協力者	Din Syafruddin（インドネシアエイクマン研究所主任研究員） 仲本賢太郎（金沢大学大学院医学系研究科） Amjad I. A. Hussein（金沢大学大学院医学系研究科） 荒井朋子（金沢大学大学院医学系研究科） 吉田知代（金沢大学大学院医学系研究科） 山口智博（金沢大学大学院医学系研究科） 田中身和（金沢大学大学院医学系研究科）

2. 研究経費

（金額単位：円）

年度	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	3,100,000	930,000	4,030,000
平成19年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	5,200,000	1,560,000	6,760,000

3. 研究発表

3-1 雑誌論文

- 1) 所 正治、井関基弘: クリプトスポリジウム症: 特集/消化管寄生虫症の最近の話題.
G. I. Research (査読なし) 2006. 8;14(4):336-341.
- 2) 仲本賢太郎、所 正治 世界的にみた感染症の検査法—赤痢アメーバ、クリプトスポリジウム
臨床と微生物 (査読なし) 2007. 7; 34(4): 329-334
- 3) Nagano S, Matsubayashi M, Kita T, Narushima T, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai
K, Baba E: Detection of a mixed infection of a novel *Cryptosporidium andersoni* and its
subgenotype in Japanese cattle. Vet Parasitol. (査読あり) 2007 Nov 10;149 (3-4) :213-8.
Epub 2007 Sep 6.
- 4) Abe N, Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M: Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum*
isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences.
Parasitology Research (査読あり) 99 (3), 303-5, 2006.

3-2 学会発表

- 1) Masaharu Tokoro, Tomohiro Yamaguchi, Amjad I. A. Hussein, Din Syafruddin, Motohiro Iseki:
Study on intra-species diversity of *Giardia intestinalis*: molecular epidemiological analysis
as a powerful tool: Open Science Meeting 2007 Towards a Sustainable World, Nov. 2007, Denpasar,
Indonesia
- 2) Tomoyo Yoshida, Miwa Tanaka, Din Syafruddin, Minoru Yamada, Naoki Arizono, Masaharu Tokoro:
Genotyping of *Cyclospora cayentanensis*: An assessment of zoonosis potential: Open Science
Meeting 2007 Towards a Sustainable World, Nov. 2007, Denpasar, Indonesia
- 3) 山口智博、Amjad I. A. Hussein、所 正治: ジアルジアの遺伝子型間の混合感染に関する考
察 第25回北陸病害動物研究会、2007.6、金沢
- 4) 田中身和、仲本賢太郎、所 正治: 赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムのPCR・市販キッ
トによる検出の有用性 第25回北陸病害動物研究会、2007.6、金沢
- 5) 荒井朋子、仲本賢太郎、Amjad I. A. Hussein、吉田知代、田中身和、山口智博、所正治: 発
展途上国のフィールド調査で見られる多彩な腸管寄生原虫 第25回北陸病害動物研究会、
2007.6、金沢
- 6) 吉田知代、及川陽三郎、高田伸弘、所 正治: 野鼠から検出されるトリパノソーマはヒトへ
感染するのか? 第25回北陸病害動物研究会、2007.6、金沢
- 7) 及川陽三郎、吉田知代、所 正治、高田伸弘: 野鼠血液中バベシアの検出法に関する考察 第
25回北陸病害動物研究会、2007.6、金沢
- 8) 及川陽三郎、高田伸弘、矢野泰弘、吉田知代、所 正治: 野鼠の赤血球に寄生するバベシ
アの形態学的特徴と遺伝子型との関係 第15回ダニと疾患のインターフェースに関するセミ
ナー (SADI綾の照葉樹大会)、2007.5、宮崎
- 9) Masaharu Tokoro, Amjad I. A. Hussein, Kentaro Nakamoto, Din Syafruddin, Motohiro Iseki:

- Genotyping of *Giardia intestinalis*: Phylogenetic analysis using multiple gene loci 第76回日本寄生虫学会大会、2007.3、大阪
- 10) Kentaro Nakamoto, Masaharu Tokoro, Tomoyoshi Nozaki: Characterization of S-adenosyl-L-methionine synthase from *Entamoeba histolytica*: Expression analysis of native enzyme in trophozoites 第76回日本寄生虫学会大会、2007.3、大阪
 - 11) Amjad I. A. Hussein, Tomohiro Yamaguchi, Kentaro Nakamoto, Masaharu Tokoro: Genotyping of clinical isolates of *Giardia intestinalis* from Palestine 第76回日本寄生虫学会大会、2007.3、大阪
 - 12) Tomoko Arai, Isao Kimata, Kentaro Nakamoto, Motohiro Iseki, Masaharu Tokoro: An in vitro growth assessment method of *Cryptosporidium parvum* using quantitative real-time PCR 第76回日本寄生虫学会大会、2007.3、大阪
 - 13) Tomoyo Yoshida, Miwa Tanaka, Din Syafruddin, Minoru Yamada, Naoki Arizono, Masaharu Tokoro: Genotyping of *Cyclospora cayetanensis*: an assessment of zoonosis potential 第76回日本寄生虫学会大会、2007.3、大阪
 - 14) 所 正治、Amjad IA Hussein、春木宏介、木村憲司、Din Syafruddin、Tudor R Olariu、井関基弘: 多地域由来のジアルジアの遺伝子型解析: 複数遺伝子座による系統樹解析 第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同会 (2006.10、長崎)
 - 15) Masaharu Tokoro, Tomohiro Yamaguchi, Kenji Kimura, Tudor Rares Olariu, Motohiro Iseki: Study of intra-species diversities in *Giardia intestinalis*: What is the driving force in the formation of various genotypes The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Japan, Aug. 24 to 25, 2006
 - 16) Kentaro Nakamoto, Isao Kimata, Niichiro Abe, Motohiro Iseki, Masaharu Tokoro: A novel one step polymerase chain reaction method to detect major human clinical isolates of *Cryptosporidium* The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Japan, Aug. 24 to 25, 2006
 - 17) Amjad I. A. Hussein, Tomohiro Yamaguchi, Kentaro Nakamoto, Masaharu Tokoro: Genotyping of clinical isolates of *Giardia intestinalis* from Palestine: A phylogenetic analysis using multiple gene loci The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Japan, Aug. 24 to 25, 2006
 - 18) Tomoko Arai, Isao Kimata, Hiroshi Ichimura, Motohiro Iseki, Masaharu Tokoro: A trial for the detection of intestinal protozoan parasites by real-time PCR The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Japan, Aug. 24 to 25, 2006
 - 19) Tomoyo Yoshida, Tomoko Arai, Kentaro Nakamoto, Motohiro Iseki, Masaharu Tokoro: Are humans the only host for *Cyclospora cayetanensis*? : A gene analysis to detect zoonoses The 9th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Gifu, Japan, Aug. 24 to 25, 2006
 - 20) 仲本 賢太郎、所 正治: 腸管寄生原虫のPCRによる検出 第24回北陸病害動物研究会 (2006.5、富山)
 - 21) 山口智博、及川陽三郎、所 正治: ジアルジア (ランブル鞭毛虫) の遺伝子型解析 第24回北

陸病害動物研究会 (2006. 5、富山)

- 22) 荒井朋子, 吉田知代, 古川博, 小松八千代, 所 正治: PCR 法によるサイクロスポーラの検出 第 24 回北陸病害動物研究会 (2006. 5、富山)
- 23) 所 正治、古川 博、小松八千代、吉田知代、荒井朋子、井関基弘: PCR 法によるサイクロスポーラの検出 第 17 回日本臨床寄生虫学会 (2006. 6、東京)
- 24) 仲本賢太郎、坪井敬文、所 正治、野崎知義: 赤痢アメーバにおける S-adenosyl-L-methionine synthase および S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase の解析 第 75 回日本寄生虫学会大会 (2006. 5、弘前)
- 25) 所 正治、仲本賢太郎、荒井朋子、井関基弘: ジアルジアの遺伝子型における多型解析 第 75 回日本寄生虫学会大会 (2006. 5、弘前)
- 26) 原田倫世、藤本陽子、中村公亮、城戸康年、坂本君平、八木欣平、所 正治、藪義貞、鈴木高史、北潔: *Cryptosporidium* シアン耐性酸化酵素 (AOX) の解析 第 75 回日本寄生虫学会大会 (2006. 5、弘前)
- 27) 荒井朋子、仲本賢太郎、木俣勲、北出幸夫、坪井敬文、所 正治: リアルタイム PCR を用いたアデノシンアナログのクリプトスポリジウム増殖抑制効果の評価 第 75 回日本寄生虫学会大会 (2006. 5、弘前)
- 28) 中村一内山ふくみ、所 正治、福田一、鮫島直樹、澤田浩武、布井博幸、廣松賢治、名和行文: 治療に難渋した無γグロブリン血症患者のランブル鞭毛虫症の 1 例 第 75 回日本寄生虫学会大会 (2006. 5、弘前)

3-3 図書

- 1) 所 正治: 消化管・泌尿生殖器寄生原虫症. 医学書院: 今日の治療指針-私はこう治療している 2008. 1:184-186
- 2) 所 正治: ジアルジア症 (ランブル鞭毛虫症) ・クリプトスポリジウム症. 熱帯病治療薬研究班: 寄生虫症薬物治療の手引き (2007 年. 1) 改訂第 6.0 版:11-14
- 3) 所 正治、仲本賢太郎: 腸管寄生原虫の病原因子. 日本臨床: 増刊新感染症学 -新時代の基礎・臨床研究- (下) 2007. 3;65(増刊号 3):470-473.
- 4) 井関基弘、所 正治: クリプトスポリジウム症. 日本臨床: 増刊新感染症学 -新時代の基礎・臨床研究- (下) 2007. 3;65(増刊号 3):287-290.
- 5) Tokoro M, Nakamoto K, Hussein AIA, Arai T: Genotyping of *Cryptosporidium* species: current status and future direction. Sankei-sha Co., Ltd.: Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2006:3-7
- 6) Hussein AIA, Nakamoto K, Yamaguchi T, Yoshida T, Tokoro M: Technical notes for the genotyping of *Giardia intestinalis*. Sankei-sha Co., Ltd.: Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions 2006:10-13

4. 研究成果

4-1 研究の背景

ジアルジアは、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、先進国から発展途上国まで世界中に分布し、特に熱帯・亜熱帯地域では小児の慢性下痢、栄養障害の原因原虫として注目されている[1]。様々な動物から検出されるジアルジア属の中で、ヒトに病原性を示す唯一のジアルジアが *Giardia intestinalis* だが、近年の分子生物学の進歩は、この病原性原虫の種内に形態学的には区別のできない複数の遺伝子型の存在を明らかにしてきた。遺伝子型は現在までに7タイプ（A から G）が報告され[2]、そこには、ヒトを含む多くのほ乳類に感染する A および B のような人獣共通感染症型や、各種ほ乳類に特異的とされる C、D、E、F、G のような異なる宿主特異性を示すタイプが含まれ、また、ヒトに感染する遺伝子型 A と B の中にも多様な亜型の存在が報告されてきた。

ジアルジアは、系統樹解析によって最も古いタイプの真核生物のひとつに分類されてきたが[3]、上記のような著しい種内多型の成立と維持のメカニズム、そして、宿主であるヒトとの共進化の経緯は不明であり、また、問題となっている熱帯地域におけるジアルジアの分子疫学的研究は、わずかであり、遺伝子型分布の実体は未解明といえる[4]。

我々は、病原性原虫に対する進化学的アプローチでの対策構築を目的とした研究の一環として、そのベースとなる種内多型の解析を *G. intestinalis* を材料として実施してきたが[5]、本研究では、さらに研究を発展させるべく、これまでに分子疫学的研究が実施されていないインドネシアにおけるジアルジアの地理的分布と宿主特異性の遺伝子型との相関に的をしぼり、種内多型形成および維持機構の解明を目指した。

4-2 研究目的

ジアルジアの種内変異の研究のための分子疫学的データ解析方法の確立とともに、今後の研究の基礎となる各遺伝子型（ジアルジア研究では assemblage とされる）のリファレンス遺伝子配列の収集を実施した。また、種内多型の形成・維持機構の解明のために、以下の具体的な課題を設定した。

1) 地理的隔離による遺伝子型多型形成の可能性評価: インドネシアの遠く隔たった2つの地域でのフィールド調査を実施し、各地域における遺伝子型分布の特性を明らかにし、例えば創始者効果のような限定的な遺伝子型分布が実際に認められるのかを確認。

2) ジアルジアの宿主特異性あるいはライフサイクルの物理的な隔離といった同一地域での部分的な隔離が遺伝子型多型形成の原因となる可能性の評価: 乳幼児および学童を対象とした検診方式によるヒト検体の採取とともに人獣共通感染症であるジアルジアのリザーバと考えられる動物由来サンプルの解析を実施。

4-3 材料と方法

4-3-1 調査地域とサンプル採取 予備調査によってインドネシアの小児における高率のジアルジア感染を認めていたため、すでに現地保健関係者との関係構築済みのシベル島およびスンバ島の2カ所を調査地域として選定した（表1、図1）。これらの調査地域は互いに直線距離で2500km隔たっ

ており、また、ともに同国の辺境に位置することから、異なる島嶼部に分布するジアルジアの遺伝子型の地理的隔離による影響評価が可能である。同国最西部のインド洋に面した西スマトラ州のメンタワイ諸島シベル島では、港湾都市であるムアラシベルおよび内陸の隔離村落ウガイ村・マドバック村で調査を実施した。また、最南東部の東ヌサトゥンガラ州スンバ島では内陸都市ワイカブバックにおいて調査を実施した。さらにインドネシア島嶼部のサンプルとの比較を目的に、ユーラシア大陸部のジアルジアサンプルとして、これまでに解析済みのネパールの学童（6-12歳）から採取されたジアルジア陽性サンプル（9サンプル）および日本国内で検出された旅行者を主とする下痢症患者サンプル（5サンプル）とともに、今回は調査を実施しなかったインドネシア南スラウエシのマカッサルサンプル（3サンプル）を解析のための追加データとして使用した。

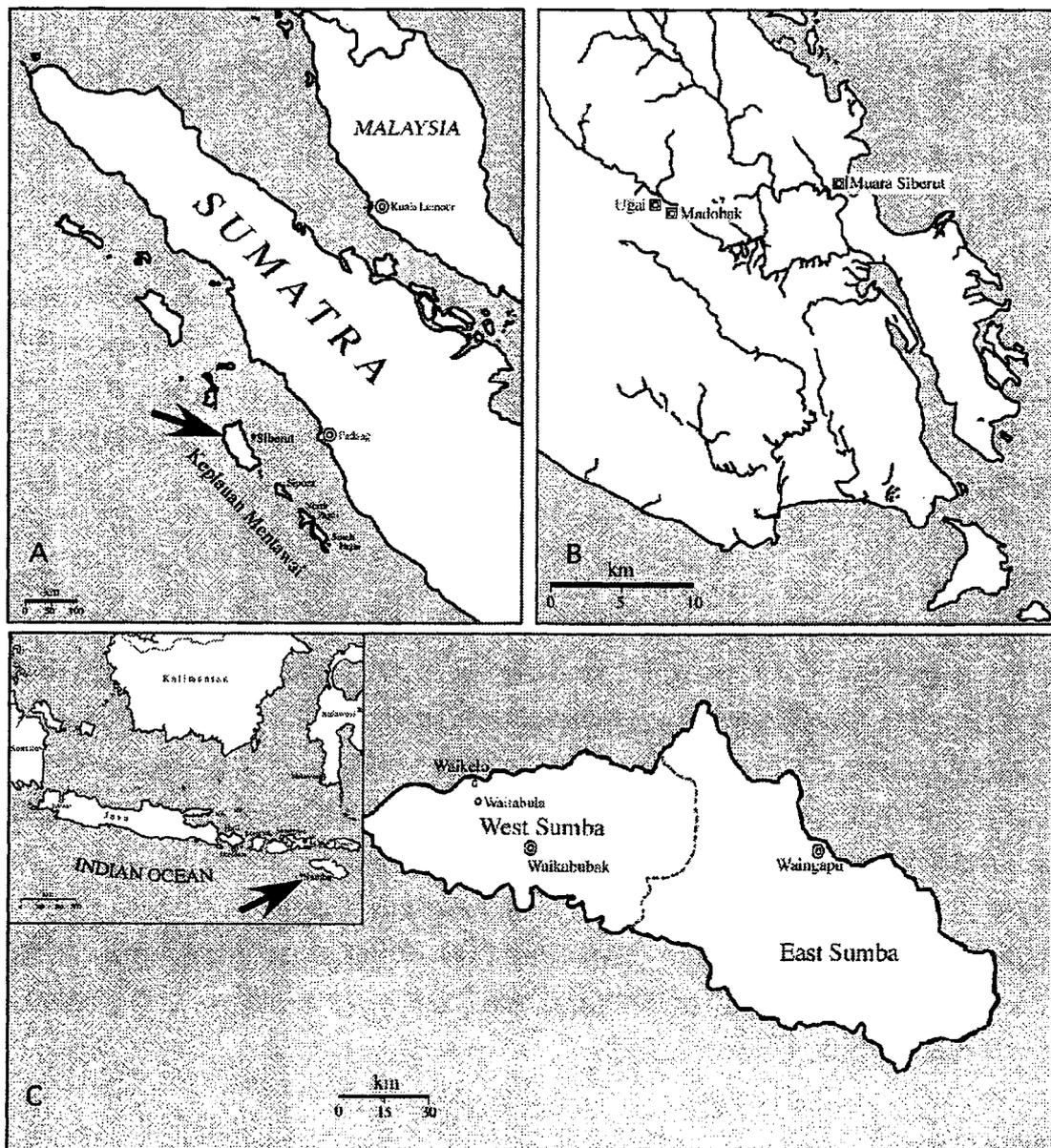


図1. 調査地域 (A, B) 同国最西部のインド洋に面した西スマトラ州のメンタワイ諸島シベル島 (港湾都市であるムアラシベルおよび内陸の隔離村落ウガイ村・マドバック村)
調査地域 (C) 最南東部の東ヌサトゥンガラ州スンバ島 (内陸都市ワイカブバック)

表1 本研究で実施されたフィールドワークおよびジアルジア検出率の一覧

Fieldwork site	Collection date	<i>Giardia</i> positive rate (%)				
		Human	Dog	Mouse	Pig	Goat
Siberut Island, West Sumatra, Indonesia	Previous studies	17/235 (7.2%)	NA*	NA	NA	NA
	2006. 11. 7-11. 16	3/160 (1.8%)	NA	NA	NA	NA
	2007. 1. 4-1. 11	16/179 (8.9%)	NA	NA	NA	NA
Sumba Island, East Nusa Tenggara, Indonesia	2007. 4. 6-4. 15	21/140 (15.0%)	13/20 (65.0%)	3/4 (75%)	1/49 (2.0%)	0/8 (0%)
	2007. 7. 19-7. 28	36/204 (17.6%)	0/14 (0%)	4/13 (30.7%)	1/52 (1.9%)	1/24 (4.1%)

*NA: not available.

4-3-2 ゲノム DNA 精製と遺伝子配列決定 各糞便サンプルからのジアルジアのシストの精製はシヨ糖遠心浮遊法によって実施し、QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) または Quick Gene DNA tissue Kit S (FUJIFILM) によって genomic DNA を精製した。遺伝子型解析のための PCR には、*G. intestinalis* の glutamate dehydrogenase (GDH)、18S ribosomal RNA (18SrRNA)、elongation factor 1 α (EF1- α) および triosephosphate isomerase (TPI) の各遺伝子をターゲットとしたプライマーセットおよび各 PCR 条件をそれぞれ最適化し (表 2) 使用した [6]。PCR は、TaKaRa LA Taq with GC Buffer (TaKaRa) の標準プロトコルにおいて、GC buffer I を用い 5% DMSO 添加の条件で実施した。増幅産物は 2% アガロースエチジウムブロマイドゲルを用いて電気泳動によって確認後、ゲル内から切り出し、Quantum Prep Feeze 'N squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad) およびエタノール沈殿によって精製を行った。PCR 増幅産物の DNA 配列決定には、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンスによって配列を決定した。また、異なる遺伝子型の混合感染がシーケンス波形より疑われたサンプルに関しては、PCR 後の増幅産物を TaKaRa BKL Kit (TaKaRa) を用いてベクター (pBluescript II SK+, STRATA GENE) にサブクローニングし、各遺伝子型を分離の上 DNA 配列を決定した。

表2 使用したプライマーセットと各 PCR の条件

Target gene	Product size	Primer sequence	Annealing temp.	Cycle No.
GDH*	455 bp	eF : 5' -TCAACGTAAAYCGYGGYTCCGT-3' R : 5' -GTTRCCTTGACATCTCC-3'	52°C	30
	432 bp	iF : 5' - CAGTACAACCTCYGCTCTCGG-3' R : 5' -GTTRCCTTGACATCTCC-3'	52°C	30
18SrRNA	480 bp	F : 5' -TCCGGTYGATCCCTGCCG-3' R : 5' -CTGGATTACCGCGGCTGCT-3'	60°C	30
EF1- α	709 bp	F : 5' -GCTCSTTCAAGTACGGTGG-3' R : 5' -AGCTCYTGTGRTGCATYTC-3'	56°C	30
TPI*	675 bp	eF : 5' - AAATYATGCCTGCTCGTCC-3' R : 5' -TCTCGCAGTTRCTYCCATTGGC-3'	53°C	30
	665 bp	iF : 5' -TGCTCGTCCGCTTCATCG-3' R : 5' -TCTCGCAGTTRCTYCCATTGGC-3'	60°C	30

*GDH および TPI 遺伝子については seminested-PCR のために external forward primer (eF) と internal forward primer (iF) を使用した。

4-3-3 データ解析 得られたDNA配列の解析はDNA Data Bank of Japan (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) のCLUSTALW (ver. 1.83) [7]およびTreeView[8]、PAUP* version 4.0 Beta[9]、MacClade version 4.08[10]による系統樹解析 (Neighbor-Joining法、Parsimony法および最尤法) に供し、総合的に得られた樹形の妥当性を評価した。またリファレンス配列としては、上記DDBJより assemblage A1 (L40509)、A2 (L40510)、B3 (AF069059)、B4 (L40508)、C (U60982)、D (U60986)、E (U47632)、F (AF069057)、G (AF069058) およびアウトグループとして*G. ardeae*(AF069060)をホモロジーサーチにより選択し使用した。

4-4 結果と考察

4-4-1 フィールドワークにおけるジアルジアの検出率 本研究で実施されたフィールドワークの詳細とジアルジア検出率の一覧を表1に示した。2年間の研究期間に計4回のフィールド調査を実施し、ヒト糞便については計683検体を収集し、76サンプル (11.1%) のジアルジアを得ることができた。

シベル島での2回のフィールドワークでは、全体として1.8-7.2%のジアルジアが12歳以下の小児から検出された (表1)。年齢別の検出率の評価を内陸部の熱帯雨林に孤立した二つの村落ウガイ・マドバック地域で実施したところ、6歳未満の低年齢層では高いジアルジアの検出率が小学生では減少し、高学年ではほとんど感染を認めないことが判明した (表3)。最終的にシベル島では計20サンプルのジアルジアを得たが、ほとんどが低年齢層の小児からの検出だった。

一方、スンバ島においては、2007年の1月から7月に3回のフィールドワークが実施され、ヒト由来計73サンプル (検出率8.9-17.6%) およびイヌ13サンプル (検出率0-65%)、野鼠7サンプル (検出率30.7-75%)、ブタ2サンプル (検出率1.9-2%)、ヤギ1サンプル (0-4.1%) を採取した。

発展途上国の特にジアルジアの流行地域での成人におけるジアルジアに対する獲得免疫の存在は、旅行者下痢症が住民に問題のない通常的环境中で先進国からの旅行者のみに問題となる点で明らかであり、またジアルジア特異的なIgG抗体価が1歳を境に年齢とともに上昇し16歳までに成人レベルに達するというエジプトでの調査でも示されている[11]。したがって本研究で得られた小学生高学年でのジアルジア検出率の減少は、おそらくジアルジアによる繰り返しの暴露とそれに伴う獲得免疫発達の結果と考えられる。

表3 ウガイ・マドバック地域で採取されたヒト糞便サンプルの年齢階層別ジアルジア検出率

Age group (years)	Sex	No. of samples	No. of Giardia positive samples (%)
<6	M	33	2 (6.06)
	F	38	3 (7.89)
	Total	71	5 (7.04)
7-12	M	22	1 (4.54)
	F	18	0 (0)
	Total	40	1 (2.50)
Total	M	55	3 (5.45)
	F	56	3 (5.25)
	Total	111	6 (5.40)

実際、スンバ島において2007年の4月にジアルジアが検出された小児の内14人について同年7月に追跡調査を実施したところ、3ヶ月後にもほぼ全員がジアルジア陽性であることを確認した。この感染の継続が同一株による持続感染なのか、あるいは新たに別の株による暴露をうけて再感染しているものなのかについては現在解析を進めているが、いずれにせよ持続的なジアルジアの感染が起こっており、このような状態の小児の栄養および成長への影響の評価とともに、その対策の構築が今後の重要な課題である。

4-4-2 遺伝子型解析 表4に、現在までに遺伝子型同定が実施されたジアルジアサンプルの一覧を示した。マカッサル（3 サンプル）、ネパール（9 サンプル）、日本（国内感染1、帰国者サンプル4 サンプル）の各サンプルはこれまでに当研究グループにおいて同定したものを系統樹解析でコントロールとして用いたものである。

ヒト由来のジアルジアでは、混合感染を疑う重複波形がシーケンス時に認められたシベルの2検体（IdnH-7 および17）についてサブクローニングを実施し、各10 クローンを分離しそれぞれ4タイプ、2タイプの異なる遺伝子配列を同定した。これらの2つの混合感染例からは、IdnH-8 とともにイヌに特異的な遺伝子型とされる *assemblage C* および *D* が同定された。このようなイヌ特異的な遺伝子型のヒトからの検出は日本人のアフリカからの帰国者下痢症においても検出されている（JpH-1）。一方、その他のヒト由来サンプルについては、*assemblage A* または *B* のみが検出され、*assemblage A* についてはすべての同定配列がヒトに特異的とされる *A2* および動物に多い *A1* と100%の一致を認めた。対照的に *assemblage B* においては著しい多型の存在が確認され、これまでに報告されている DDBJ/GenBank のリファレンス配列を含めた検索の結果でも100%のDNA配列の一致を認めるサンプルは限られていた。このため、*assemblage B* のサンプルについては系統樹解析により単系統に属することを確認する方法で遺伝子型同定を実施する必要がある。

一方、動物由来のジアルジアについては、イヌ、ブタ、野鼠のいずれからも *assemblage B3*、*B4* とともに *B* の亜型が検出され、唯一、野鼠由来の *IdnM-2* から齧歯類特異的とされる *assemblage G* が *assemblage B* との混合感染として検出された。

ヒトから検出されたイヌ特異的な遺伝子型がほぼすべて混合感染として検出されたことは、これらのサンプルに検出されたジアルジアにおけるゲノム上での対立遺伝子多型の存在を示唆するが、これまでに分離培養されたジアルジア株から複数遺伝子型が検出されたことはなく、また、基本的にクローナルな2分裂によって増殖し有性生殖は例え起こっているとしても通常増殖には関与しないと考えられている本原虫ではヘテロ接合状態がありうるかどうか不明である。今回のサンプルについては分離培養が実施できなかったためにその詳細を解析できなかったが、ヒトにおいてイヌ特異的な遺伝子型による感染が、複数遺伝子型による混合感染の形式であれ、あるいは特異な遺伝子構成を保持する株による感染であれ、実際に起こりうるということが判明したことから、このような特異ケースの解析はジアルジアの種内多型構造を理解する上で重要な課題である。

一方、複数の遺伝子座位をターゲットとしたことから認められうるマーカー間での同定遺伝子型の矛盾は、上記のイヌ特異的な遺伝子型の混合感染と考えられるサンプル以外には比較的少数に留まった。このことは、ジアルジアが基本的にクローナルな集団として構成されているという従来の見解を支持する結果である。それでもいくつかのサンプル（*IdnH-19*、*21*、*22*、*23*、*25*、*35* や *JpH-3*）では、*assemblage A* と *B* という非常に異なる遺伝子型が *GDH* と *TPI* ターゲットでそれぞれ同定された。

表4 遺伝子型同定結果一覧

いずれかのターゲット座位によって遺伝子型を決定できたサンプルを示した。Assemblage A, BにおいてA1, A2, B3, B4と単系統のクラスターを系統樹解析において構成したサンプル以外は各亜型を特定できず、単にA, Bとして示した。また、nd: not determined は、未だ解析が終了していないか、PCR産物の得られていないものを示す。

Place	Sample No.	determined genotypes of each gene locus					
		GDH	ISS rRNA	EF1α	IP1		
Makassar (3 samples)	Idnt-1	nd	B	B	nd		
	Idnt-2	nd	B	nd	B		
	Idnt-3	B	B	B	nd		
Siberut (15 samples)	Idnt-4	B4	B	nd	B		
	Idnt-5	B4	B	nd	nd		
	Idnt-6	nd	B	nd	nd		
	Idnt-7-1 ⁴	D	nd	A	nd		
	Idnt-8	G	A	B	nd		
	Idnt-9	nd	nd	A	nd		
	Idnt-10	nd	nd	B	nd		
	Idnt-11	nd	nd	B	nd		
	Idnt-12	nd	B	B	nd		
	Idnt-13	nd	nd	B	nd		
	Idnt-14	B3	B	B	nd		
	Idnt-15	A2	nd	B	nd		
	Idnt-16	nd	nd	A	nd		
	Idnt-17-1 ²	B3, C	B	B	B		
	Idnt-18	B3	B	nd	nd		
	Idnt-19	B	nd	nd	A2		
	Idnt-20	A2	nd	nd	A2		
	Idnt-21	B3	nd	nd	A2		
Idnt-22	B	nd	nd	A2			
Idnt-23	B	nd	nd	A2			
Idnt-24	B	nd	nd	nd			
Idnt-25	B	nd	nd	A1			
Idnt-26	B	nd	nd	B4			
Idnt-27	B	nd	nd	B4			
Idnt-28	B	nd	nd	B4			
Idnt-29	nd	nd	nd	B			
Idnt-30	nd	nd	nd	B3			
Idnt-31	nd	nd	nd	B4			
Idnt-32	B	nd	nd	B3			
Idnt-33	B	nd	nd	B4			
Idnt-34	A2	nd	nd	A2			
Idnt-35	A2	nd	nd	B			
Idnt-36	B	nd	nd	B4			
Indonesia Sumba human (37 samples)	Idnt-37	B3	nd	nd	B4		
	Idnt-38	nd	nd	nd	B4		
	Idnt-39	B3	nd	nd	B4		
	Idnt-40	B3	nd	nd	B4		
	Idnt-41	B	nd	nd	B4		
	Idnt-42	nd	nd	nd	B3		
	Idnt-43	A2	nd	nd	A2		
	Idnt-44	A2	nd	nd	A2		
	Idnt-45	B	nd	nd	B4		
	Idnt-46	A2	nd	nd	A2		
	Idnt-47	A2	nd	nd	A2		
	Idnt-48	B	nd	nd	B4		
	Idnt-49	B3	nd	nd	B4		
	Idnt-50	B	nd	nd	B4		
	Idnt-51	B	nd	nd	B4		
	Idnt-52	B	nd	nd	B4		
	Idnt-53	A2	nd	nd	A2		
	Idnt-54	B	nd	nd	B4		
	Idnt-55	B	nd	nd	B3		
Sumba - dog (12 samples)	IdntD-1	nd	nd	nd	B		
	IdntD-2	nd	nd	nd	B3		
	IdntD-3	nd	nd	nd	B4		
	IdntD-4	nd	nd	nd	B		
	IdntD-5	nd	nd	nd	B		
	IdntD-6	nd	nd	nd	B4		
	IdntD-7	nd	nd	nd	B4		
	IdntD-8	nd	nd	nd	B		
	IdntD-9	B	nd	nd	B3		
	IdntD-10	B	nd	nd	B3		
	IdntD-11	B	nd	nd	B3		
	IdntD-12	B	nd	nd	B3		
Sumba - pig (1 sample)	IdntP-1	nd	nd	nd	B		
	Idnt-1	nd	nd	nd	B4		
	Idnt-2	B, G	nd	nd	B, G		
Sumba - mouse (3 samples)	Idnt-3	nd	nd	nd	B		
	NepH-1	B3	B	B	nd		
	NepH-2	B3	B	nd	nd		
Nepal elementary school (9 samples)	NepH-3	B3	B	nd	nd		
	NepH-4	nd	nd	nd	nd		
	NepH-5	B4	B	B	nd		
	NepH-6	B3	B	B	B		
	NepH-7	B3	nd	nd	nd		
	NepH-8	B3	B	nd	B		
	NepH-9	B3	B	B	nd		
	Japan (Clinical samples)	Africa	JpH-1	B3	B, D	D	B
		Japan	JpH-2	B	B	B	nd
SouthEast Asia		JpH-3	A2	A	B	A2	
Korea		JpH-4	B	B	B	nd	
India		JpH-5	B	B	B	A1	

⁴final number represent colony number of subcloning
nd: not determined

マーカーによる遺伝子型の矛盾については、プライマーによる特定遺伝子型の選択によって説明することが可能である。ジアルジアの遺伝子型同定時に使用されるプライマーは、ジアルジアのマーカー座位における極めて高い多型故に、複数のプライマーの混合であるデジェネレート (degenerate) プライマーである。このために、テンプレート中に複数の遺伝子型が混合して存在している場合に、ターゲット部位とプライマーとの相補性の違いによって一部のテンプレートのみが選択的に増加する危険性があるものと考えられる。したがって GDH で assemblage B であったものが TPI で assemblage A と認識される例では、実際は A と B の混合感染であるにもかかわらず、それぞれのプライマーセットのターゲットとのマッチの度合いによって単独の遺伝子型による感染と認識されているのではないかと考えられる。この可能性の評価には、やはり培養による株の分離が必要であり、今後の研究においては収集サンプルからの培養分離株の構築に重点を置く必要がある。

4-4-3 系統樹解析 これまでの解析から、約 400bp の DNA 配列を用いているにもかかわらず 18SrRNA 遺伝子をターゲットとした部分配列では、assemblage A における A1 や A2 および B における B3 や B4 といった遺伝子型における亜型の同定が困難なことが判明した。このような系統樹解析における遺伝子型間の DNA 配列の多型の不足を理由とする解像度の低さは、EF1- α においても認められたため、本研究における系統樹解析には主に、GDH と TPI 遺伝子の部分配列を用いた。

本研究における系統樹解析では、研究の目的で示した、種内多型の形成・維持に関わると考えられている 2 つの因子 (地理的隔離および同一地域でのライフサイクルの隔離) の評価を実施した。

4-4-3-1 地理的隔離による遺伝子型多型形成の可能性 ヒト由来のサンプルにおける地域性の評価のために、ネパール、日本などのインドネシア以外の地域で分離されたジアルジアサンプルとインドネシア各地の島嶼部で採取されたジアルジアサンプルをそれぞれ GDH 遺伝子座による個別の系統樹解析によって比較した結果を図 2 に示した。図 2A に示したユーラシア大陸で採取されたジアルジアは assemblage A2 と B に分類され、assemblage B 内では B3 および B4 とクラスターを形成する亜型の存在が確認された。NepH-3 と JpH-2, 4 は採取地はネパールと日本だが 100% の遺伝子配列の一致を示し、それ以外の assemblage B に分類されたサンプルはすべて異なる配列を保持していた。この傾向は、インドネシア島嶼部に分布するジアルジアにおいても同様に認められ、A2 と完全一致する IdnH-15, 20, 34, 35, 43, 44, 46, 47 はシベル島およびスンバ島それぞれの異なる地域からのサンプルを含み、一方 assemblage B 内で完全一致をみた IdnH-19, 22, 25, 27, 33, 36, 45, 51 は全てシベル島由来のサンプルであり、採取地域での同遺伝子亜型のアウトブレイクを示唆する結果となった。しかし、その他のサンプルについては遺伝子配列の重複は一切認められず、assemblage B における著しく高い多型の存在を裏付ける結果となった。大陸から島嶼部へと進出していった人類の拡散を念頭に、少数の個体がもとの集団から分かれて新たな地域に進出する際に、その地域での創始者になることで種分化の原動力になる創始者効果 (founder effect) を、インドネシアの島々でのジアルジアの分布について予期していたが、2500km の距離を隔てたシベル島とスンバ島に分布する遺伝子型においても地域性を示唆する遺伝子型の偏りは認められず、また、島嶼部への分布に従って遺伝子型の多様性が失われるような結果も得られなかった。シベル島のサンプルではヒトに感染している assemblage C や D が検出され、サンプル数の差があるために断言は困難だが、島嶼部に分布するジアルジアのほうが大陸部よりもむしろ、豊かな多型を維持しているように見受けられた。

したがってグローバル化に伴う遺伝子型の地域性の喪失はありうるものの、現在のジアルジアの

遺伝子型の地理的分布には、多型形成・維持の原動力となるような隔離や地域性の痕跡は認められなかった。

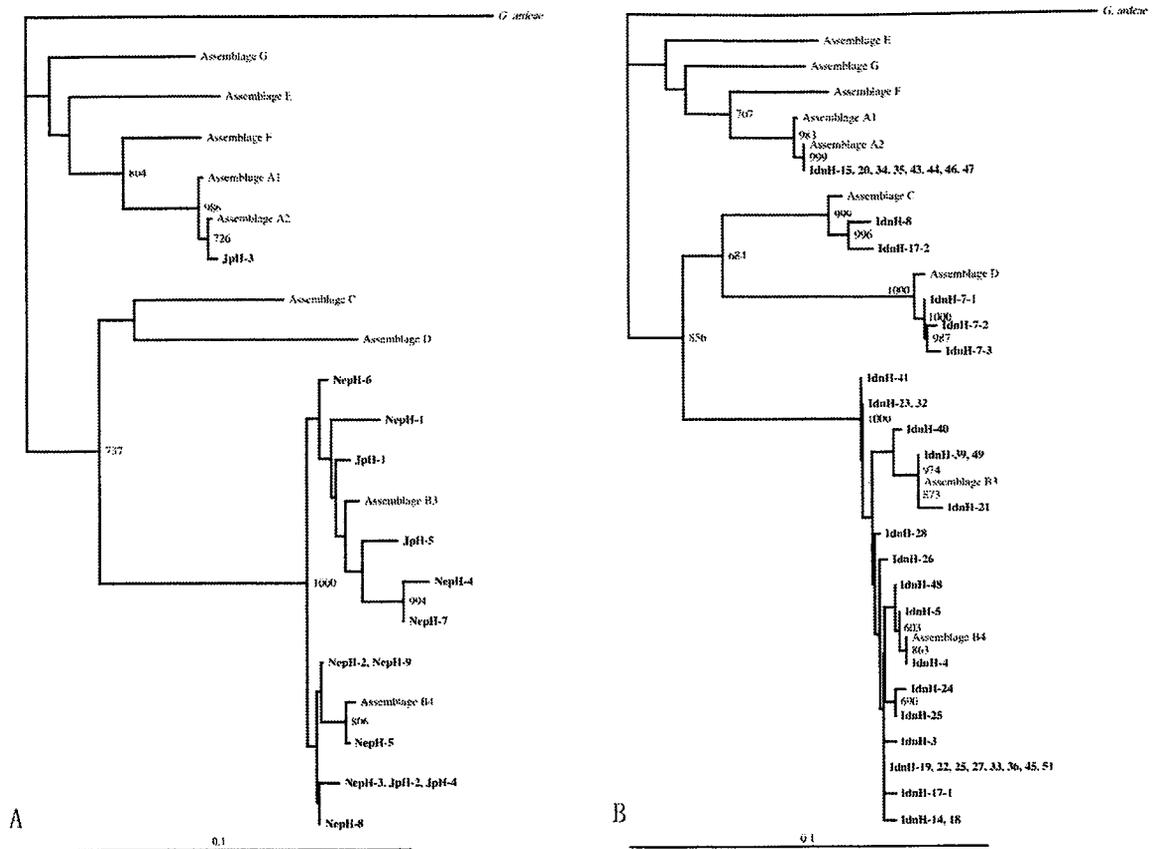


図2 GDH 遺伝子の部分配列を用いたヒト由来ジアルジアサンプルの系統樹解析 NJ法を用いた系統樹解析の結果を示す。ブートストラップ値 (1000 replicates) については、600 以上の値を示すノードについて示した。Assemblage として示した項目はリファレンスデータであり、材料と方法にアクセス番号を示した。それ以外は、すべて本研究で同定したサンプルである。

A ; ネパール (Nep) および日本 (Jp) で検出されたジアルジアによる系統樹。B ; インドネシア国内で検出されたジアルジアによる系統樹。採取地は IdnH-1~3;マカッサル、IdnH-4~18;シベル島、IdnH-19~55;スンバ島と示す。

4-4-3-2 宿主特異性あるいはライフサイクルの物理的な隔離といった同一地域での部分的な隔離が遺伝子型多型形成の原因となる可能性 同一地域に分布するジアルジア集団が、宿主特異性や環境による物理的障壁によって隔離される、いわゆる棲み分けが遺伝子型の多様性とどうかかわるかを評価するために、スンバ島のワイカブバックで採取されたヒトおよび動物からのジアルジアサンプルの、特に assemblage B 内の多型型について TPI 遺伝子の部分配列による系統樹解析を実施した(図3)。結果として得られた NJ 法による系統樹には、I~IV の4つのクラスターが形成された。興味深いことに、それぞれのクラスターには優位な宿主と考えられる特異性が認められた。クラスター I はイヌ (2 サンプル)、野鼠 (1)、ブタ (1)、ヒト (1) と動物優位に。クラスター II はヒト (7)、イヌ (2)、野鼠 (1) とヒト優位に。クラスター III はイヌ (5)、野鼠 (1)、ヒト (1) と動物優

位に。また、クラスターIVにはヒト (14)、イヌ (2) とヒト優位な遺伝子型構成を保持する。

これら全ての遺伝子配列はすべて assemblage B に分類されるため、おそらく宿主特異性は直接の感染を妨げないと考えられるが、各クラスターを構成する亜型にヒトあるいは動物といった最適宿主が存在するかのようにみえる結果となった。個々の遺伝子配列は複数の1塩基多型を示しながらもクラスターを形成していることから、おそらく共通の祖先配列をもち、クラスターごとの独立した棲み分けによって特異変異を蓄積し、複数の遺伝子型によるグループを形成しているものと考えられた。

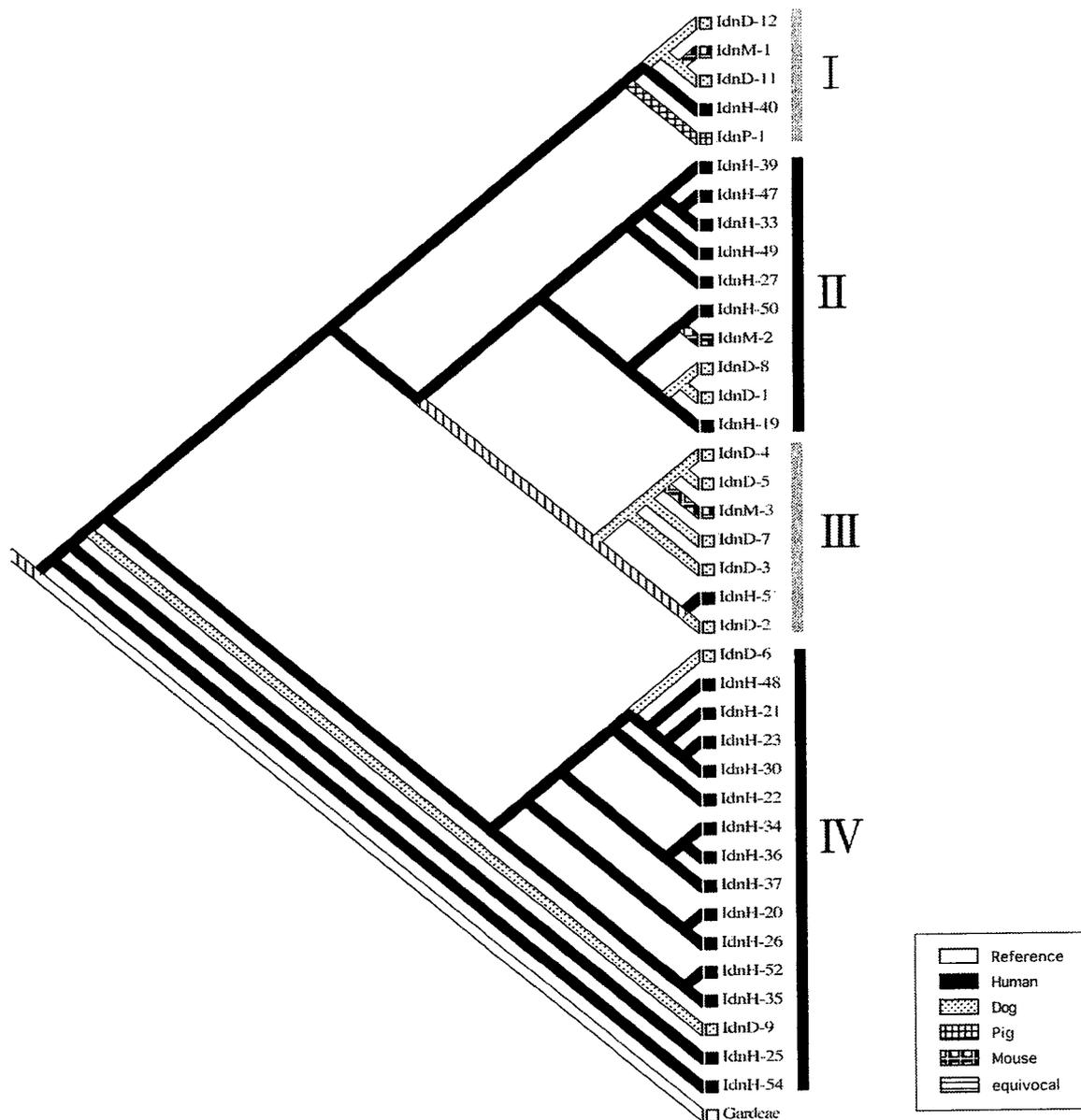


図 3 TPI 遺伝子の部分配列を用いたスンバ島で採取されたジアルジアサンプルの系統樹解析 NJ 法を用いた系統樹解析の結果を示す。G. ardeae (AF069564) をアウトグループとした。各サンプルの Idn*の*印が検出された宿主を示す。H;human, D;dog, M;mouse, P;pig。クラスターの II と IV はヒト優位型にまた、クラスターの I と III は動物優位型と見なすことができる。

4-5 結語

G. intestinalis に認められる著しい種内での多型は、従来考えられてきた地理的隔離によって成立するジアルジアの地域種とは考えにくいことが明らかになった。つまり、少なくとも現在のジアルジアの遺伝子型の分布には地理的隔離の痕跡は認められない。

一方、宿主特異性による隔離を原因とした種内多型維持の可能性については、assemblage C や D および A1、A2 のような、assemblage レベルの多型形成と維持については十分に説明可能と考えられ、実際、本研究においても、偶発寄生を示唆する感染例が観察はされたものの、ほぼすべてのサンプルにおいて遺伝子型による宿主特異性は従来の見解を支持する結果となった。

しかし、特に assemblage B のような幅広い宿主特異性と著しい多型を保持する遺伝子型の内部の亜型レベルでの多型については、各宿主に特異的な亜型が持続的に固定し、宿主間での隔離を継続して上記のような宿主特異性を形成するというような徴候は認められない。むしろ、本研究で観察することができたスンバ島の事例では、偶然におこるライフサイクルの棲み分けが変異の独立した蓄積を可能とする隔離を引き起こしているように見える。つまり、ジアルジア集団の一部の隔離と合併がある程度の時間の継続を伴いながら繰り返し、亜型レベルでの多型形成と維持を可能にしているというモデルが示唆された。

以上の知見をまとめる。

- 1) ヒトのサンプルからは、いずれの地域においても高いレベルで遺伝子配列の保存されている assemblage A 特に A2 と、極めて多型に富みほとんどの検出配列がリファレンスとの完全一致をみない assemblage B の亜型が同定された。
- 2) 従来イヌに特異的と考えられてきた assemblage C や D が、シベル島で採取されたヒトの糞便から検出された。
- 3) これまでに我々が解析してきたネパールで採取されたサンプルおよび日本人の旅行者下痢症サンプル由来のジアルジアの遺伝子型と本研究で得られたシベル島およびスンバ島で得られたジアルジアの遺伝子型について採取/感染地域による特異性の有無を評価したが、少なくとも現在のジアルジアの遺伝子型の地理的分布には統計的に認識される地域性は存在しない。
- 4) assemblage B はスンバ島の同一地域から得られたヒトとヒト以外のほ乳類（イヌ、ブタ、野鼠）の両方から検出されたが、各宿主に分布する *G. intestinalis* の遺伝子多型にはそれぞれに異なる優位な単系統のクラスターが存在し、何らかのライフサイクルの隔離機構が存在し、それぞれの亜型に独自の変異蓄積が起こっている可能性が示唆された。

[文献]

- [1] Caccio SM, Thompson RCA, McLauchlin J and Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005;21(9):430-7.
- [2] Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G and Ey PL. Molecular Systematics of the Parasitic Protozoan

Giardia intestinalis. Mol. Biol. Evol. 1999;16(9):1135-44.

[3] SOGIN, M. L., J. H. GUNDERSON, H. J. ELWOOD, R. A. ALONSO, and D. A. PEATTIE. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science. 1989;243:75-77.

[4] Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 2005 Sep;21(9):430-7.

[5] Abe N, Kimata I, Tokoro M. Genotyping of *Giardia* Isolates from Human in Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Gene Sequences. Japan Journal of Infectious Disease. 2005;58:57-58.

[6] Hussein AIA, Nakamoto K, Yamaguchi T, Tokoro M. Technical notes for the genotyping of *Giardia intestinalis*. Parasitic Zoonoses in Asian-Pacific Regions. 2006;1:10-13

[7] Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. *CLUSTALW*. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-4680.

[8] Page, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 1996;12: 357-358.

[9] David L. Swofford. : PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Florida State University CD-ROM. 2002.

[10] Maddison, D. R. and W. P. Maddison, MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08. 2003. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

[11] Abdel Fattah SM, Maklad KA, Gadallah MA. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in different age groups in Cairo. J Egypt Soc Parasitol. 1991;21(3):707-13.