

遺伝子による寄生蠕虫の同定の試み — ヒトから摘出された無鉤条虫の同定 —

Identification of Helminth Parasites by DNA Analysis
— A Human Case with *Taenia saginata* in Hokkaido —

八木 欣平 浦口 宏二 高橋 健一 宮西 浩嗣*

Kinpei YAGI, Kouji URAGUCHI, Kenichi TAKAHASHI and Kouji MIYANISHI

ヒトに寄生する寄生虫の種の同定は、治療や疫学的解析のために重要である。通常、線虫や吸虫などの寄生蠕虫の種の同定についてはその形態観察によりなされるが、しばしば虫体が破損して形態が失われていたり、エキノкокクス (*Echinococcus* spp.) の虫卵のように、発育段階によっては形態による同定が不可能な場合も多い。また、旋毛虫 (*Trichinella* spp.) のように、形態的な区別がほとんど不可能な寄生虫については、遺伝子工学的手法によって種を分類することが一般に受け入れられつつある。我々はこれまで、破損したアニサキス類の種の判定、野生動物の蛔虫の同定、多包条虫とその近縁の条虫類についての遺伝子による区別の試み等を報告してきた¹⁻³⁾。今回、札幌市在住の男性より摘出された頭節のない条虫の片節について、形態学的な検討と遺伝子解析を行い、無鉤条虫 *Taenia saginata* と同定したので報告する。

方 法

1. 材 料

検体は、札幌市在住の男性の糞便中に排出された約10 mmの白色の片節数個であった。これら片節は70%アルコールで固定され、密封した50 mLプラスチックチューブ内に保存されていた。実験室内でのヒトへの感染を防止するため、片節内の虫卵を失活させる目的で開封前に70°Cで12時間加熱処理した。

2. 形態学的検討

片節の一部を100%グリセリンに浸漬し実体鏡下でこれを観察した。形態の比較検討の資料として Fan⁴⁾ の報告を用いた。

3. 遺伝子解析

DNAの抽出、PCRによる増幅、塩基配列の決定は八木ら³⁾の報告にはほぼ準じて行った。すなわちDNAの調整は、片節の一部(約5 mm角)から市販のDNA抽出キット EASY-DNATM isolation kit (Invitrogen) を用いて抽

出し、抽出した total DNA を用いて Dinkel ら⁵⁾ が報告したプライマー P60F と P375R により、ミトコンドリア 12S rRNA gene の部分 DNA (約 370 bp) の増幅を試みた。P60F 及び P375R の塩基配列は各々 5'-TTAAGATATATGTGGTACAGGATTAGATACCC-3' 及び 5'-AACCGAGGGTGACGGGCGGTGTGTACC-3' である。PCR 反応混合液は、10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) ゼラチン, 0.2 mM の dNTP の混合液, それぞれ 10 p mol のプライマー, 1.25 単位の AmpliTaq GoldTM 耐熱性 Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer) 及び 1 µL の DNA 試料液で合計 50 µL になるように調製した。PCR は、95°C で 12 分間インキュベートした後、熱変性: 93°C, 1 分, アニリング: 55°C, 1.5 分, 伸長反応: 73°C, 2 分の条件で 50 サイクル行った。増幅ステップ終了後は、増幅反応液 45 µL を 1.5% のアガロースゲルにマウントして電気泳動を行い、確認された増幅産物についてはダイレクトシーケンシングによってその塩基配列を決定した。すなわち、それぞれの DNA 断片をアガロースゲルから EASYTRAPTM (Takara) DNA 抽出キットを用いて抽出し、これらの DNA 断片を BigDye サイクルシーケンシングキット (Perkin Elmer Co.) と ABI-PRISM 310 DNA シーケンサー (Perkin Elmer Co.) により塩基配列を決定した。この手順で得られた塩基配列の情報を、予め EMBL/Gen Bank^R に Nakao (1998) によって登録されていたテニア科条虫の 12S rRNA gene の塩基配列 (無鉤条虫 *Taenia saginata*, accession number AB031355, タイワンテニア (Taiwan taenia) *T. asiatica* 同 AB031356 及び有鉤条虫 *T. solium* 同 AB031357) と比較しそのホモロジー検索を行った。塩基配列の比較には遺伝子解析ソフト GeneWorks^R ver. 2.5 (IntelliGenetics, Inc.) を用いた。制限酵素による切断パターンの検討では、予め上記のアプリケーションソフトを用いて塩基配列を加工し、切断パターンを予測した。また、実際の増幅産物については、5 µL に 8 unit の制限酵素を加え、全量 12 mL で 37°C 1 時間反応させ、このうち 6 mL を 3% アガロースゲルで電気泳動し、切断パターンを観察した。

*札幌時計台病院

結果及び考察

1. 形態学的検討

片節はやや肉厚で、生殖孔は体側の片側に開孔し、透視により観察した子宮内には虫卵が多数形成されていた。虫卵は直径約30 μmで、ブロック状の幼虫皮殻を有し、中に六鉤幼虫の形成を認めるといった典型的なテニア科条虫の虫卵の形態を示していた。子宮の分岐は観察した片節では、片側に23及び24本であった。虫卵の形態は、本虫がテニア科条虫であることを示し、子宮の分岐数は無鉤条虫かタイワンテニアのいずれかであることを示した (Fig. 1)。

2. 遺伝子解析

増幅したPCR産物のサイズは、塩基配列を決定したところ375 bpであった。決定した塩基配列と GenBank[®] に登録された無鉤条虫、タイワンテニア及び有鉤条虫と比較検討した結果を Fig. 2 に示す。今回決定した条虫の塩基

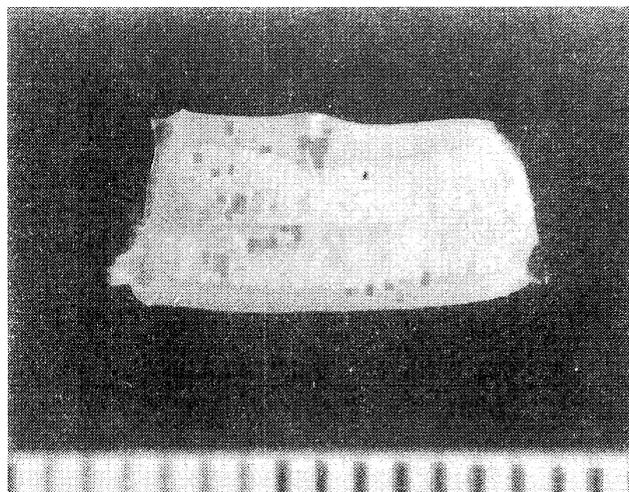


Fig. 1 A Gravid Proglottid of Taeniid Cestode from Human Patient

The specimen was transparentized by 100% glycerin.

Consensus	TTAAGATATA TGTGGTACAG GATTAGATAC CCATTAAYGT ATTTGTART	50
taeniid cestode from humanC... ..A.	50
Taenia saginata	-----C... ..A.	18
Taenia solium	-----T... ..A.	18
Taenia asiatica	-----C... ..G.	18
Consensus	ATTATCTTAG TTTAGTAACT AAAATGGTTT GGCAGTGAGT GATTCTTTT	100
taeniid cestode from human	100
Taenia saginata	68
Taenia solium	68
Taenia asiatica	68
Consensus	AGGGGAAGGT GTRGTGATAA GGATGTTCCG CCTATTAATT TACTTTTATT	150
taeniid cestode from humanG.....	150
Taenia saginataG.....	118
Taenia soliumA.....	118
Taenia asiaticaG.....	118
Consensus	ATGTTGGTGT ATATCTGGTT TRATATTATY GTTGARTGAT GYATAAGTTT	200
taeniid cestode from humanA.....C.....G....T.....	200
Taenia saginataA.....C.....G....T.....	168
Taenia soliumG.....T.....A...-T.....	165
Taenia asiaticaA.....C.....A...-C.....	166
Consensus	GTGTAGGTKT TAGTTAAGCY AAGTCTATGT GCTGCTTATA AAAGTATDYA	250
taeniid cestode from humanT.....T.....AC.	250
Taenia saginataT.....T.....AC.	218
Taenia soliumG.....C.....TT.	214
Taenia asiaticaT.....T.....GC.	216
Consensus	TGCGTTACWT TGATAAAGTT TTAGTTGTAA GTRCTATTAT ATATTYAGGA	300
taeniid cestode from humanA.....G.....C....	298
Taenia saginataA.....G.....C....	266
Taenia soliumT.....A.....T....	263
Taenia asiaticaA.....G.....C....	264
Consensus	CTTAARAGTA ATRTYAAATT AGTTTGTTTR TGTGAARTAA GTTTARCTCA	350
taeniid cestode from humanA....G.T.....AA.....G....	348
Taenia saginataA....G.T.....AA.....G....	316
Taenia soliumG....A.C.....GG.....A.....A....	313
Taenia asiaticaA....G.T.....AA.....A.....G....	314
Consensus	GGTACACACC GCCCGTCACC CTCGGTT	377
taeniid cestode from human	375
Taenia saginata	316
Taenia solium	313
Taenia asiatica	314

Fig. 2 Alignment of the Partial Mitochondrial 12S rRNA Gene Sequences of a Taeniid Cestode from a Human and 3 Species of Taeniid Cestodes

The nucleotide sequences of *Taenia saginata*, *T. solium* and *T. asiatica* are quoted from Nakao (1998). The sequence of present specimen is identical with that of *T. saginata*.

配列は無鉤条虫と100%、タイワンテニアと98%、有鉤条虫と92%の相同性を示した。登録された遺伝子配列を用いて、3種のテニア科条虫を切断パターンで区別することを目的に制限酵素の探索を行ったところ、*Ssp* Iにより無鉤条虫は200 bp、125 bp 及び50 bp、有鉤条虫は322 bp と50 bp、タイワンテニアは199 bp と174 bp に消化され、区別可能であることが予測された (Fig. 3, 4)。また、今回のサ

ンプルを使ってPCRと*Ssp* Iによる消化を行ったところ、Fig. 5に示すように無鉤条虫の切断パターンを示した。

テニア科条虫には、ヒトの小腸に寄生する代表的な種として、無鉤条虫 *T. saginata*、有鉤条虫 *T. solium* が古くから知られている。無鉤条虫はウシが中間宿主で、筋肉内に幼虫シストを形成し、このシストをヒトが経口的に取り込むことで感染が成立、小腸で成虫となる条虫で、顕著な

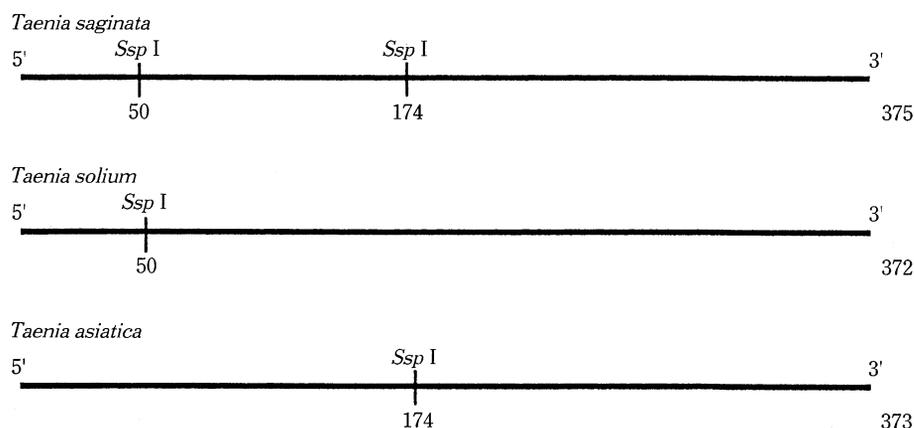


Fig. 3 Restriction Maps of the Partial Mitochondrial 12S rRNA Gene of *Taenia saginata*, *T. solium* and *T. asiatica* for Endonucleases *Ssp* I

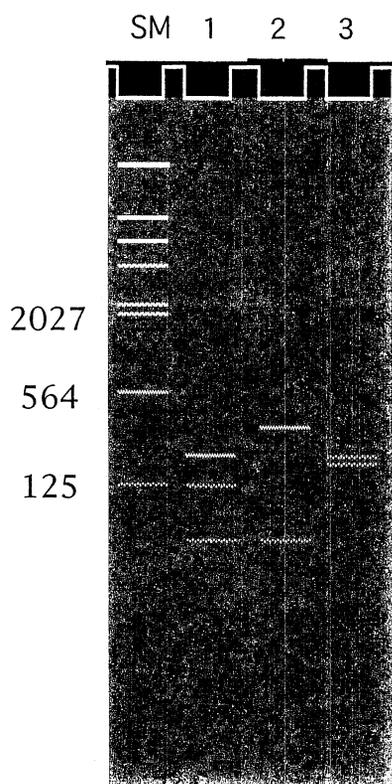


Fig. 4 An Expected View of Gel Electrophoresis of Digested PCR Products Amplified by 60F and p375 Primers for Endonuclease *Ssp* I; *Taenia saginata* (lane 1), *T. solium* (lane 2), *T. asiatica* (lane 3), Size marker λ /Hind III

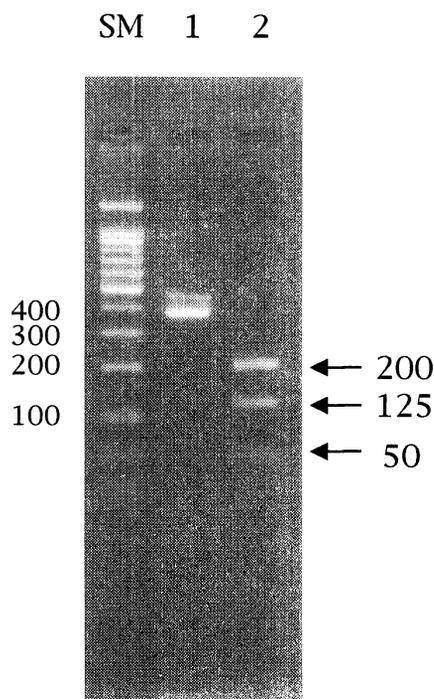


Fig. 5 Agarose Gel Electrophoresis for Undigested and Digested PCR Products of Present Specimen with Endonuclease *Ssp* I

Undigested (lane 1), Digested (lane 2), Size marker 100bp ladder (Takara)

病原性を持たない。一方、有鉤条虫はブタが中間宿主で、同様に筋肉内で幼虫シストを形成し、ヒトがそのシストを取り込むことで感染が成立する。この有鉤条虫は虫卵からもヒトへの感染が成立し、特に中枢神経系にシストを形成し神経症状を引き起こすことから、危険な寄生虫の一つとして知られている（中枢神経嚢虫症）。この寄生虫は、成虫を持った患者が感染源となるため、消化管から排出された片節の同定は迅速かつ確実であることが求められる。ヒトの小腸に寄生するテニア科条虫としては、これまではこの2種の区別がつけば診断上問題はなかったが、1990年代になって、アジアの一部における無鉤条虫に類似の条虫については、別種もしくは別亜種として扱うことが一般的に認められてきた（タイワンテニア *T. asiatica* もしくは *T. saginata asiatica*）^{6,7)}。このタイワンテニアは台湾、韓国、インドネシア及びタイに存在することが報告されており、ブタの肝臓に幼虫が寄生し、生食することにより感染するが、虫卵のヒトへの感染性については明らかではない⁸⁾。さらに、成虫の片節の形態では無鉤条虫との判別は困難である。この条虫の日本での存在は明らかにされていないが、近隣国に分布しているため、将来日本への持ち込みが起ると予測される。疫学的な情報を解析する上で、また、病原性を明らかにする上で、本種の正確な同定は重要と考えられる。

今回の検討の結果、形態的には無鉤条虫かタイワンテニアか区別できなかった検体を、ミトコンドリア12S rRNA 遺伝子の部分塩基配列の解析により無鉤条虫であると同定でき、この領域のPCR及び塩基配列の決定が種の同定に有用であることを示した。さらに、GenBank^Rに登録されている塩基配列を検討した結果、そのPCR産物の制限酵

素 *Ssp I* による切断パターンの差でこれら3種を区別することも明らかになった。種内変異について十分な検討は必要であるが、このことはシーケンサーなしに種を判断できる可能性を示したと考え、特に有鉤条虫のように迅速な種の判定を要求されるものに対する適用は、本種の2次的な感染を防御する上で重要であると考えられた。また、今回の結果は、これまで不可能であったこれらの条虫の虫卵による同定の可能性を示唆したといえる。このことについては、実際に虫卵を用いた検討で明らかにすることができると考えられた。

本調査研究は平成12年度遺伝子工学の基礎技術導入に関する特別研究「寄生虫や衛生動物等の種の同定のための遺伝子技術の開発」の一環として行われたことを付記し、ご協力いただいた関係諸氏に深謝します。

文 献

- 1) Yagi K, Ohyama T, Takahashi S, Ishikura H : Abstract Papers of IXth International Congress of Parasitology, 27 (1998)
- 2) 八木欣平, 浅川満彦, 大山 徹, 岡本宗裕 : 道衛研所報, 49, 159 (1999)
- 3) 八木欣平, 大山 徹, 岡本宗裕, 奥祐三郎, 神谷正男, 木村浩男 : 道衛研所報, 49, 163 (1999)
- 4) Fan PC : Parasitology Today, 4, 86 (1988)
- 5) Dinkel A, von Nickisch-Roseneck M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T : J. Clin. Microbiol., 36(7), 1871 (1998)
- 6) Eom KS, Rim HJ : Korean J. Parasitol., 31, 1 (1993)
- 7) Fan PC, Lin CY, Chen CC, Chung WC : J. Helminthol., 69, 299 (1995)
- 8) Galan-Puchades MT, Fuentes MV : Parasitology Today, 16, 174 (2000)