

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	肖寧
学位論文題目			
<i>Echinococcus shiquicus</i> n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China (中国におけるチベットギツネとクチグロナキウサギから発見された新種のテニア科 条虫 <i>Echinococcus shiquicus</i> )			
共著者名			
Qiu Jiamin, 中尾 稔, Li Tiaoying, Yang Wen, Chen Xingwang, Peter M. Schantz, Philip S. Craig, 伊藤 亮			
International Journal for Parasitology 35巻693頁～701頁 平成17年			
研究目的			
<p>標高4,000メートルを越えるチベット高原は約5,000万年前のインド・ユーラシアプレートの衝突によって形成された。大陸性気候下に発達した高地性の草原（ステップ）には旧北区と東洋区の動植物が混在しており、居住する人々の殆どはチベット民族である。チベット高原はその特有な自然環境のために高山性生物の分類・生態・進化などの研究にとって重要な地域になっている。また、チベット民族の特有な風習が感染症の流行動態に与える影響についても不明な点が多い。</p>			
<p>1964年にチベット高原でエキノコックス症（多包虫症）の患者が初めて確認されて以来、疫学調査が実施され、単包条虫 <i>Echinococcus granulosus</i> と多包条虫 <i>Echinococcus multilocularis</i> の両種が家畜や野生動物の間に蔓延していることが判明した。住民の罹患率も高く、一部の地域では多包虫症3%、単包虫症5%に達しており、公衆衛生上重要な問題となっている。エキノコックス症の流行を制圧するためには、自然界での寄生虫の生活環を正確に把握する必要がある。チベット高原での流行にはイヌ・オオカミ・アカギツネ・チベットギツネ・ヤク・ヒツジ・ナキウサギ・野ネズミなどの多様な野生動物と家畜が複雑に関与しており、現在、中国・英国・フランス・米国・日本などの研究者が参加した国際共同研究により、その実態が解明されつつある。我々はこの研究の過程で新種の高山性のエキノコックスを発見した。本研究では、新種の特徴を整理し、将来のエキノコックス根絶のための基礎資料とするため、形態や遺伝子情報に基づく分類学的研究を行った。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 標本採集

2001～2003年にチベット高原の石渠（Shiqu County）で野生動物（チベットギツネ・アカギツネ・ナキウサギ・ハタネズミ）や家畜（ヒツジ・イヌ）からエキノコックス成虫と幼虫を採集した。これらのサンプルは形態観察のために4%ホルマリンで、遺伝子解析のために70～99%エタノールで保存した。

### 2. 形態観察

小腸から得た成虫はデラフィールド・ヘマトキシリンで染色し、形態観察に供した。頭節の鉤や受胎片節の卵は虫体をスライドガラスで軽く圧平破壊して観察した。肝臓の幼虫組織はパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジンで染色して観察した。

### 3. 遺伝子解読

PCR法でエキノコックスのミトコンドリア遺伝子（*cox1*・*nad1*・*atp6*・*cob*・*rrnL*）と核遺伝子（*e1p*, ezrin-radixin-moesin-like protein）を増幅した。鋳型DNAとして、幼虫の場合はエタノール保存病巣からゲノムDNAを抽出して用いた。成虫は微小なのでDNA抽出が困難なため、1個体毎に0.02 N NaOHで溶解液を作成し、これを鋳型とした。PCR産物はダイレクトシーケンスし、塩基配列を決定した。得られた配列に基づき、NJ法により分子系統樹を作成した。

## 成 績

### 1. チベット高原に分布するエキノコックスの種類

遺伝子解析により、石渠には多包条虫（*E. multilocularis*）と単包条虫ヒツジ系統（*E. granulosus*）が同所的に存在することを確認した。更に、ミトコンドリア・核遺伝子共に新規の塩基配列がチベットギツネとナキウサギからの虫体標本に見いだされ、この情報が新種エキノコックス発見の決め手となった。発見地を記念し、新種は *Echinococcus shiquicus* と命名した。

### 2. 新種の形態の特徴

*E. shiquicus* の成虫はチベットギツネ（*Vulpes ferrilata*）のみに見出された。この成虫は形態的に二つのタイプに分けられた。最初のタイプは片節が2つしかなく、受胎片節が未成熟片節に直接連結していた。次のタイプは未熟片節・成熟片節・受胎片節の順に3つの片節が連結していた。他のエキノコックスに比べて、*E. shiquicus* 成虫の全長は1.3～1.7 mmと短く、頭節の鉤も小さかった。また、成熟片節の生殖孔は前縁に近く開口した。受胎片節の子宮には分岐がなく、内包する虫卵数は100個以下だった。

*E. shiquicus* の幼虫はクチグロナキウサギ（*Ochotona curzoniae*）だけに発見された。

幼虫シストは肝臓に寄生し、一部は肺にも見られた。その形態は単包性で、大きさは直径約 10 mm だった。内部には娘包がなく、シスト壁には発育した繁殖包が多数付着し、繁殖包内には原頭節がみられた。

### 3. 分子系統学的解析

*E. shiquicus*と既知のエキノコックス属条虫のミトコンドリアDNA配列を比較すると *nad1* 遺伝子で16.9~21.0% (divergence value) の範囲で異なっていた。多包条虫と単包条虫の違いは19.3%であることから、*E. shiquicus* が示した値は種レベルの違いであった。また、核遺伝子 *elp* のイントロン領域を同一地域で採集された3種で比較したところ、*E. shiquicus* は多包条虫と5.2%、単包条虫と4.7%異なっていた。多包条虫と単包条虫ではこの領域は5.3%異なっていた。核遺伝子の比較により、同所性の3種はお互いに生殖隔離されていることが示唆された。また、ミトコンドリア *cob* 遺伝子を用いて3種の種内変異を調べたところ、*E. shiquicus* は1.3%と高く、多包条虫と単包条虫には種内変異がほとんど見られなかった。これは *E. shiquicus* がチベット高原の固有種として古くから高地に隔離されていたことを意味した。3種のミトコンドリア遺伝子 (*atp6*, *nad1*, *cox1*) を用いて分子系統樹を作成したが、利用できる他のエキノコックス種の塩基配列が短く、情報量が少ないため、類縁関係について明解な結果が得られなかった。

## 考 案

従来、エキノコックスは *E. granulosus* (単包条虫), *E. multilocularis* (多包条虫), *E. oligarthrus*, *E. vogeli* の4種類に分類されてきた(1)。特に、単包条虫は中間宿主の範囲が広く、ヒツジ・ウマ・ウシ・ブタ・ラクダ・ヘラジカなどに寄生するものをそれぞれ生物学的系統 (strain) として扱ってきた。しかし、中間宿主の違いは同胞種 (sibling species) の存在を示唆しており、実際、ミトコンドリア遺伝子の塩基配列にも多大な相違がみられ、ウシ系統を *E. ortleppi*, ウマ系統を *E. equinus* として独立種として扱うことが提言された(2)。今回、新種として記載された *E. shiquicus* は成虫の形態が多包条虫と極めて類似しており、共同研究者のQiuらは当初 *E. shiquicus* を多包条虫の変異体として扱ったほどである(3)。しかし、幼虫の形態は多包条虫とは全く異なり、単包性シストであった。*E. shiquicus* はチベットギツネとクチグロナキウサギだけから発見されており、両者が特異的な終宿主と中間宿主であると考えられた。ナキウサギは高原の優占種であり、個体数が多く、チベットギツネとの間で食物連鎖が形成されている。さらに両者はチベット高原の固有種で、高地適応のために低地に生息域を広げることができない。従って、*E. shiquicus* も宿主と共に進化し、古来よりチベット高原に封印されてきたと考えられた。一方、あらゆる環境への適応能が高いアカギツネは多包条虫と共にチベット高原へ侵入し、単包条虫は家畜のヒツジと共にチベット高原へ最近導入されたのであろう。ミトコンドリア遺伝子の種内変異の割合はこの仮説を裏付けている。

核遺伝子の解析からチベット高原に分布する3種のエキノコックスは生殖隔離されていることが示唆された。3種エキノコックスが遺伝的な同一性を維持できる仕組みについて以下のような2つの仮説が考えられた。最初の仮説は食物連鎖に関連する生態学的仮説である。イヌ・ヒツジ（単包条虫）、アカギツネ・ハタネズミ（多包条虫）、チベットギツネ・ナキウサギ（*E. shiquicus*）の組み合わせで強固な食物連鎖が形成されると、エキノコックスもそれぞれ隔離されることになる。しかし、食物連鎖は絶対的なものではない。1個体の終宿主に混合感染が生じて、小腸で複数種のエキノコックス成虫が混在する可能性もあるので、生態学的仮説だけでは不十分である。次の仮説はエキノコックス成虫の生殖機能に関する生理学的仮説である。エキノコックスは雌雄同体なので、もし自家受精が優先すれば混合感染が生じても遺伝的な種の同一性を維持することができるだろう。

ヒトが *E. shiquicus* に感染する可能性は否定できない。チベットでは医療設備が貧困なため、外科的な病巣切除ができず、患者の治療と病原寄生虫の正確な診断ができない。今後、ヒトの感染について調査を進める必要がある。

## 結 論

チベット高原に分布するエキノコックスの種類を調査した。新種 *Echinococcus shiquicus* を記載し、チベットギツネとクチグロナキウサギが種特異的な宿主であることを解明した。新種の形態学的ならびに遺伝学的特徴を調べたことは、今後のチベットでのエキノコックス防圧対策に役立つだろう。また、この新種はエキノコックスの系統進化や分類体系を再構築する際に欠かせないものとなった。

## 引 用 文 献

1. Kumaratilake L.M., and Thompson R.C.A. (1982) A review of the taxonomy and speciation of the genus *Echinococcus* Rudolphi 1801. *Z. Parasitenkd.* 68, 121-146.
2. Thompson R.C.A., and McManus D.P. (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* 18, 452-457.
3. Qiu J.M., Chen X.W., Ren M., Luo C.X., Liu D.L., Liu X.T., and He D.L. (1995) Epidemiological study on alveolar hydatid disease in Qinghai-Xizang plateau (in Chinese). *J. Pract. Parasit. Dis.* 3, 106-109.

## 参 考 论 文

1. Xiao N., Qiu J.M., Nakao M., Li T.Y., Yang W., Chen X.W., Schantz P.M., Craig P.S., and Ito A. (2006) *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol. Int.* 55, (in press).
2. Li T.Y., Qiu J.M., Yang W., Craig P.S., Chen X. W., Xiao N., Ito A., Giraudoux P., Mamuti W., Yu W., and Schantz P.M. (2005) Echinococcosis in Tibetan populations, western Sichuan Province, China. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1866-1873.
3. Xiao N., Li T.Y., Qiu J.M., Nakao M., Chen X.W., Nakaya K., Yamasaki H., Schantz P.M., Craig P.S., and Ito A. (2004) The Tibetan hare *Lepus oiostolus*: a novel intermediate host for *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Res.* 92, 352-353.
4. Xiao N., Qiu J.M., Nakao M., Nakaya K., Yamasaki H., Sako Y., Mamuti W., Schantz P.M., Craig P.S., and Ito A. (2003) Short report: identification of *Echinococcus* species from a yak in the Qinghai-Tibet plateau region of China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 445-446.
5. Xiao N., Mamuti W., Yamasaki H., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Gottstein B., Schantz P.M., Lightowers M.W., Craig P.S., and Ito A. (2003) Evaluation of use of recombinant Em18 and affinity-purified Em18 for serological differentiation of alveolar echinococcosis from cystic echinococcosis and other parasitic infections. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3351-3353.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	肖 寧
<p>審査委員長 若 宮 伸 隆 ㊟</p> <p>審査委員 上 口 勇 次 郎 ㊟</p> <p>審査委員 伊 藤 亮 ㊟</p> <p>審査委員 渡 部 剛 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><i>Echinococcus shiquicus</i> n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China</p>			
<p>標高 4000 メートルを超えるチベット高原は、約 5000 年前に、大きな地殻変動によって生まれ、その特有な自然環境のために、動植物において、固有の進化・発展を遂げてきたと考えられている。また、居住する民は、ほとんどチベット民族であり、民族特有の風習が感染症の存続に、重要な因子になっていることが推測されている。</p> <p>本論分提出者の肖氏は、このチベット高原に生息する特有な動物に着目し、人獣共通感染症である、エキノコックス症に焦点をあて、チベット高原における本症の原因寄生虫の同定を試み、種々の解析を行った。方法としては、チベット高原の石渠 (shuiqu country) において、野生動物や家畜から、エキノコックスの成虫と幼虫の</p>			

採取を行った。成虫は、デラフィールド・ヘマトキシリン染色を行い、スライドグラス上で圧平破壊し観察し、幼虫は、パラフィン切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジンで染色し、形態観察を行った。遺伝子解析は、エキノコッカスのミトコンドリア遺伝子と核遺伝子を、PCR法により、増幅して、direct sequence を行い、塩基配列の決定を行った。

その結果として、チベット高原において、3種のエキノコッカス種の寄生虫を発見した。特筆すべきことは、その中の一つが、形態学と遺伝子解析から新種のエキノコッカス種であることが同定され、*Echinococcus shiquicus* と命名された。*E. shiquicus* は、他の4種のエキノコッカス虫と比較して、全長が1.3 ~ 1.7mm と短く、他と異なる形態を有していた。本寄生虫は、成虫が、チベットギツネのみ、さらに幼虫が、クチグロナキウサギにのみ発見され、幼虫ではおもに肝臓にチストとして生存していた。遺伝子解析からは、他の4種のエキノコッカスのミトコンドリアの遺伝子変異との相違性により、新種のエキノコッカス種であることが明らかになった。また、核遺伝子の比較から、*E. shiquicus* と多包条虫・単包条虫は、お互いに生殖隔離されていることが明らかになった。さらに、ミトコンドリア遺伝子において、3種のエキノコッカスの当地における複数個体の多型性を検討した結果、*E. shiquicus* のみが多型を示し、他の2種ではほとんど多型はみられなかった。このことより、*E. shiquicus* は、チベット高原固有種として、古くからこの地に生息していたと推測した。

これらの研究成果は、エキノコッカス研究において新たな知見を示すものであり、本分野の研究発展に多大の寄与するものであると考えられる。

なお、論文提出者に対する試問審査においても適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることを確認した。

以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判定した。