

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

輸入蠕虫性疾患の監視と医療対応整備に
関する研究 (H15-新興-8)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 太田 伸生

平成 16 (2004) 年 3 月

目次

I.	総括研究報告書	
	輸入蠕虫性疾患の監視と医療対応整備に関する研究	1
	太田伸生	
II.	分担研究報告	
1.	蠕虫感染症の簡易診断法開発に関する研究	
	— PCR 診断法の活用について	9
	太田伸生	
2.	消化管寄生虫感染による消化吸収障害の	
	実験モデルにおける解析	14
	症例報告からみた日本における輸入蠕虫感染症の	
	動向に関する予備的分析	19
	有菌直樹	
3.	輸入蠕虫症の疫学調査と蠕虫病疫学情報の	
	データベースについて	25
	川中正憲	
4.	ミニブタを用いた日本住血吸虫感染動物モデルの	
	開発に関する研究	31
	平山謙二	
5.	動物由来回虫症の発症病理に関する研究	35
	難治性動物由来回虫感染症の dot-ELISA による	
	血清診断法の確立に関する研究	43
	大都市圏で流行する広東住血線虫症の疫学調査	51
	赤尾信明	
6.	蠕虫病の病態解析に関する研究	58
	田邊將信	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	71
IV.	研究成果の刊行物・別刷	79

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

輸入蠕虫性疾患の監視と医療対応整備に関する研究

主任研究者 太田伸生 名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨

わが国で対策を講ずるべき輸入感染症のうち、蠕虫疾患について研究した。対策に必要なことは正確な情報把握と診断・治療および予防に関する国内の体制整備であることから、今年度は国内の蠕虫症発生に関する情報収集と診断法、病態解析に着手した。まず、蠕虫感染症の情報整備であるが、これらは一般に慢性に経過するため、疾病発生に関する正確な情報に乏しい。そこで出版媒体を通じて入手可能な国内の蠕虫症発生事例をすべて集め、データベース化する作業に取りかかった。しかしそれが正確な情報たりうるかは疑問が大きく、個別の施設でストックしてある情報と比較しながら最近の発生動態の把握を見直した。また、国内での情報が散逸している広東住血線虫症についてネズミを捕獲して実態調査をおこなった。この結果、東京、横浜、名古屋など大都市圏の港湾と住宅地に局所的に高頻度で感染ネズミが存在することが明らかとなった。その中間宿主は不明である。また最近の国内における広東住血線虫のヒト感染は血清疫学調査からも確認された。蠕虫感染症のなかで診断法が確立されていないのは幼虫移行症であり、今年度はイヌ、ネコ、クマ、アナグマ、ブタなどの回虫による幼虫移行症の血清診断法を検討した。その結果、それぞれの幼虫分泌抗原を用いることによって感度、特異性とも良好な成績が得られたが、一部に交差反応性の問題が残った。検便によらない蠕虫症診断法としてPCR診断を試みたが、住血吸虫では早期診断に利用可能であることがわかった。蠕虫感染症の病態解析のためにヒトの感染動態と類似した実験動物モデルの開発は依然として課題である。住血吸虫感染実験動物としてミニブタを用いたところ、従来の報告に相違して高い感受性を示し、ヒト慢性感染の特徴の再現も示しうることがわかった。その他、病態発現機序の解明を通じて新しい治療法の開発を検討したところ、消化管寄生線虫感染では小腸上皮細胞のトランスポーター発現低下が吸収阻害の機序として示唆された。住血吸虫症において上昇する瘧疾誘発因子CILIPは住血吸虫に対する感染感受性や病理発現調節に関わる成績が得られ、新しい治療標的となることが示された。

分担研究者

有菌直樹 京都府立医科大学・教授
川中正憲 国立感染症研究所・室長
平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所・教授
赤尾信明 東京医科歯科大学・助教授
田邊將信 慶応義塾大学・講師

A. 研究目的

かつて猛威を振るった蠕虫性疾患は第二次大戦後の広範な公衆衛生活動が奏功して、今日ほぼ制圧された状態となっている。し

かし熱帯・亜熱帯地方では蠕虫感染症が蔓延し、それらの地域とわが国とのヒト及びモノの交流がますます盛んになる今日の社会背景を考えると、輸入感染症としての蠕

虫疾患の監視は今後とも継続する必要がある。感染病原体の多様化は蠕虫症においても例外でなく、難治性の蠕虫感染症、特に動物の寄生虫による幼虫移行症が新興感染症として出現してきている。それらの多くでは診断・治療法が確立しておらず、効果的な治療薬が得られないなど医療対応の途が確立されておらず、基礎的／応用的研究の必要性が依然として残されている。

本研究では輸入蠕虫感染症の監視と医療対応の観点から早急な改善が求められる以下の諸点について研究活動を開始した。①国内の蠕虫疾患のデータベース化、②蠕虫疾患の診断に関する国内のレファレンス体制整備、③地方衛研で実施可能な蠕虫症の簡易診断および早期診断法の開発、④予防・治療法の開発、⑤蠕虫症の新しい実験動物モデルの開発と病態解析研究、⑥蠕虫による輸入食品汚染のモニタリング、などである。当面監視が必要と考える蠕虫感染症としては糞線虫症、住血吸虫症、旋毛虫症や広東住血線虫症をはじめとする各種幼虫移行症を考えた。蠕虫感染症は一般に慢性に経過するため、流行の実態把握が困難である一方で、新たに出現した幼虫移行症の中には致命的なものも存在し、国民の健康福祉の観点からは看過できない。本研究を通じて、わが国の輸入蠕虫疾患の実態を明らかにするとともに、蠕虫感染症輸入ルート of 監視、さらに患者発生に対して適切な医療対応の体制の確立をすすめる、それらの情報を保健・医療関係者のみならず広く国民に公開することでわが国の健康福祉に寄与することを目的としている。

B. 研究方法

今年度は国内の輸入蠕虫感染症の実態把握、診断法開発、動物モデル開発、病態解析等に的を絞って進めた。

B-1. 国内蠕虫感染症発生の実態調査と情報整理：わが国で発生報告のある蠕虫感染症の情報を網羅的に集めた。医学中央雑誌、

日本寄生虫学会出版物などからデータベース用資料を収集し、デジタル化して保存した。これら日本国内の出版媒体による情報がどの程度実際の情報を代表しているかを検証するために、特定施設の情報と質的・量的に比較検討した。特定施設として京都府立医大医動物学教室で所蔵する資料を得た。実際の疫学アプローチとしては国内に定着した事が推定される広東住血線虫に着目し、国内3地区（東京、神奈川、千葉）でネズミ（ドブネズミ及びクマネズミ）160頭余を捕獲してその実態を調査した。この数年来、本症の集団感染が見られた沖縄県ではインフォームドコンセントを得た上で住民血清の抗体検査を実施し、1981年に発表された同様調査の結果と比較した。

B-2. 蠕虫感染症の診断法開発：現時点では診断法が確立していない蠕虫感染症についてはその標準化を試み、確立している場合でも感染時期の特定や早期診断まで改善する可能性、あるいは地方衛研でならどこでも実施可能な簡便診断法の開発等を目指した研究を進めた。診断法の新規開発としてはイヌ、ネコ、アライグマ、クマ、ブタなどの回虫抗原を用いた幼虫移行症診断の為に dot-ELISA 法を検討した。それぞれの回虫幼虫分泌抗原(LES)を用いて、感度、特異性の比較検討をおこなった。診断法の改善としては PCR による蠕虫感染症診断法を検討した。マウスの日本住血吸虫またはマンソン住血吸虫感染において、血中または糞便中の寄生虫由来 DNA の検出システムの確立をすすめた。

B-3. 新しい蠕虫感染モデル動物の開発：ヒトの輸入蠕虫症病原体の診断、治療または病理研究を行うために、そのすべてに感染実験動物モデルが存在しているわけではない。またすでにマウスなどの感染実験モデルがあるとしてもヒトの病態を反映するものはごく限られている。ブタはヒトと解剖学的に類似しているため、ブタの感染実験モデル動物としての有用性が期待されるが、

ブタにヒトのどの蠕虫が適応するか十分なデータがない。今年度は国内産の CLAWN 系ミニブタに日本住血吸虫セルカリア 200 隻を感染させ、虫体の発育と病理および宿主免疫応答について調べた。

B-4. 蠕虫感染の病態解析：蠕虫感染による病態発現機序を解析することにより治療法開発に繋がる基礎的情報が得られる期待がかかる。腸管寄生線虫感染では低血糖、低タンパク血症など吸収障害による病態が見られる。その機構をペプチドやアミノ酸のトランスポーター発現制御の観点から検討するため、寄生虫感染と各トランスポーター遺伝子発現の関係を調べた。また、住血吸虫感染では血液凝固系の失調が症状発現と関連する可能性があることから、住血吸虫感染宿主で著明に上昇する瘰癧誘発性リポタンパク質で血液凝固因子でもある CILIP について感染宿主体内での動態や病理発現との関連などを調べ、さらに CILIP に対するモノクローナル抗体を投与することによる病理発現の変化を観察した。

(倫理的配慮) ヒト生物試料を用いる研究は倫理規定に従い書面によるインフォームドコンセントを得た上で実施した。動物実験は各研究施設の動物実験審査の承認を得た上で実施した。

C. 結果

今年度は以下に記す結果が得られた。

C-1. 国内蠕虫感染症発生の実態調査と情報整理：医学中央雑誌で得られる情報に基づく蠕虫感染症の年次変動、原因蠕虫の分析を整理すると回虫、日本海裂頭条虫など食品媒介性蠕虫の発生件数には特に増加傾向はないが、住血吸虫やテニアなど輸入感染症のカテゴリーに入る蠕虫症発生件数は明らかに増加の傾向が認められた。医学中央雑誌で得られる国内全般の蠕虫感染症の発生情報と京都府内の特定施設で把握している蠕虫感染症発生状況とを比較してみると、

全体の傾向は概略一致するものの、病原体個々の発生動向の比較では必ずしも一致しなかった。医学中央雑誌による情報には不確実例、重複症例もありうる事が考えられるが、さらに情報ソースが地理的に偏っている場合には全国レベルでの実態把握とはいえない可能性が指摘された。のためには「ウラ」が取れる情報に基づく解析が重要である。

疫学研究として広東住血線虫症の国内の動向把握を調査した。港湾や住居地のネズミの捕獲調査では、東京、横浜、千葉などで局所的に高頻度の感染が確認され、広東住血線虫の生活環が維持されているフォーカスが大都市圏で存在していた。この寄生虫の中間宿主はナメクジなど軟体動物であるが、感染ネズミが見つかった西東京市の住宅地内のフォーカスでは、ナメクジに感染幼虫は検出できなかった。しかし付近の土壌にはウスイロオカチグサという貝が多数生息し、現場では感染貝は検出されなかったが実験的には広東住血線虫幼虫に対する感受性を持つことがわかった。沖縄県住民の血清疫学調査では、1139 名の被検血清中、沖縄本島北部で 6.6%、南部で 10.1%、離島で 7.1%が広東住血線虫に対する抗体陽性であった。この結果を 1981 年の調査結果と比較すると陽性頻度は減少しているが、陽性者の分布する地域が沖縄県内で移動拡大している傾向が観察された。

C-2. 蠕虫感染症の診断法開発：動物由来線虫による幼虫移行症の簡便な血清診断として dot-ELISA の有用性を検討したが、検討した各種回虫症の場合、同種 LES を用いた dot-ELISA で感度よく抗体を検出できた。しかし特異性の面ではイヌ回虫 LES とアライグマ回虫 LES との間に共通抗原性が存在したり、アニサキスの LES とも交差反応が認められ、今後の課題として残された。蠕虫感染の診断を PCR で実施する試みとして住血吸虫で調べたところ、血液を用いたマンソン住血吸虫感染の PCR 診断では感染 4

週にはすでに特異バンドが検出され、早期診断法として有用であることが示唆された。一方検便で最も検出感度が上昇する感染8週前後では逆にPCR診断が偽陰性になる結果が得られた。また、駆虫後も血中に住血吸虫DNAが8週以上残存した。糞便試料を用いた日本住血吸虫感染のPCR診断をゲノム情報に基づいて検討しているが、十分なコピー数の遺伝子を増幅するプライマー設計に困難があり、現状ではEPGで10以下の感度までは達していない。

C-3. 新しい蠕虫感染モデル動物の開発：ミニプタでも日本住血吸虫感染が十分に成立することが確認され、CLAWN系ミニプタは住血吸虫の感染モデルとして利用可能であった。ヒトの感染経過とどの程度一致するかは未だ検討中であるが、慢性期には糞便中への虫卵排出がなくなる場合があるなど、差異も認められている。ミニプタが日本住血吸虫に十分な感受性があるという結果に基づいてγ線照射セルカリア投与による防御免疫をミニプタで検討したところ、対照群に比べて虫卵排出数が56%低下した他、肝臓病変の防止効果が観察された。従来からヒトの慢性住血吸虫症が動物実験で再現できないことがネックとなっていたが、今後の有用性に期待ができる。

C-4. 蠕虫感染の病態解析：消化管寄生虫感染による小腸吸収上皮細胞障害の可能性を検討した。*Nippostrongylus brasiliensis* 感染ラットでは一過性に低血糖と低アルブミン血症がおこる。その際に小腸上皮細胞ではSGLT1、GLUT5、PepT1などの各種トランスポーターの発現が対照と比して有意に低下していた。そのことから、それが感染時の吸収不良の機序と推定された。一方、住血吸虫症では慢性期に食道静脈瘤の破裂が死亡原因となるが、感染マウスでは消化管出血も重篤であるなど、出血傾向が病態を大きく作用する。住血吸虫感染宿主マウスではCILIPレベルに宿主の系統差が存在していることがわかり、C3H、BALB/cなど住

血吸虫感染に弱いとされた系統はCILIPレベルが高い一方で、比較的抵抗性であるC57BL/6はCILIPレベルが低かった。CILIPに対する単クローン抗体を投与すると肝臓病変の軽減効果が観察された。

D. 考察

輸入蠕虫症に対する医療対応整備という目的のためには、まずは情報の整備と公開が必要である。一般の医家または研究者が経験のない蠕虫感染症に遭遇した場合、現状の情報システムで十分に対応することは困難である。特に病歴を聴取する際にも病気個々の疫学的背景は診断のカギとなる情報であるが、日本国内で発生があった場合の感染源、感染が起る地域などは整理された情報提供窓口がない。そこでまず昨今の国内発生輸入蠕虫感染症の情報収集から着手したが、今日もっとも網羅的に収集できる医学中央雑誌から得た情報がどの程度実情を反映しているかについては系統だった検討がなされていない。蠕虫症はエキノコックス症を除いて発生の報告には法的な義務がなく、多忙な臨床医家にとっては文献報告まで行うことの方が稀であろう。実際に京都府の1施設の蓄積情報と比較した場合でも条虫症などの発生病数の年次推移には中央雑誌との間に違いがあり、蠕虫症についても全国的な情報収集システムを構築する必要がある。

そのような系統だった情報システム未整備の結果、多くの輸入蠕虫症が国内でも見過ごされていると考えられる。実際に広東住血線虫症は1960年代以降に持ち込まれたが、全国の寄生虫予防会の制度改編に伴って監視が途絶えてしまった。今回、東京の住宅地においてさえネズミの感染が高い地区が確認できたことはこの虫の生活環が人間の居住環境に隣接して確立されていることを示している。この数年来の新興・再興感染症発生がヒトと動物との接触によると思われることからすると、国内問題として看過できない。沖縄県でも広東住血線虫抗

体保有者はこの20年間で低下しているが、その地域分布が変化して来たことは流行フォーカスが移動したことを示唆している。

症例が発生した場合の対応を考えると正しい診断法と治療法、公衆衛生的観点からは正しい予防法を確立しておかなくてはならない。今日の蠕虫症の傾向としては本来はヒトの寄生虫ではないものの寄生による幼虫移行症の増加であるが、その診断は血清診断によるしかない。しかも特異性と感度を十分に満足する方法が確立されていない。今回の検討で数種の動物由来回虫感染のdot-ELISAによる診断法を検討しているが、抗原には幼虫の分泌抗原を用いる必要がある、きわめて限られた施設でしか実施できない。さらに抗原間での交差反応の問題が全て解決されておらず、特にアニサキスと多くの回虫抗原が交差反応することは日本人が一定割合いで抗アニサキス抗体を持っていることを考えると問題が大きい。Dot-ELISA自体は用いる抗原が微量で済むこと、及び特別の装置を要しないことなどの利点から、スクリーニング法として優れている。

国内監視の観点からは輸入住血吸虫症が増加し、一方で山梨県など旧流行地でも何らかの監視システムを残すことが望まれる状況では、その感染が新規発生事例なのか否かを判断できるならば衛生行政上有益である。今回検討した住血吸虫症のPCR診断は感染4週以内に早期診断が可能であり、かつ検便検査が住民検診に行われにくくなった実状からはPCRが実際に虫がいるか否かを判定する方法としても汎用性も期待できる。

今年度の研究から治療に直結する成果は未だ得られていないが、蠕虫感染に見られる病態の発生機序の情報が乏しかったのは事実であり、それらを埋める方向で研究をすすめることが出来た。消化管寄生線虫寄生による栄養不良の原因は単に寄生体による栄養分捕捉だけでなく、宿主の栄養吸収

システムに障害が起こっていることによる。なぜそのような現象が起こるかについての解明をすすめれば、他の原因による吸収不良の治療にも直結する可能性があり、引き続いて検討をすすめるべきと考えた。住血吸虫感染におけるCILIPも新しい治療標的としての可能性が明かとなり、これを新しい住血吸虫の感染モデル動物と組み合わせることによりこの方面の治療研究に大きな飛躍が期待できると考えられた。当面モデル実験動物としてのミニプタは購入コストが一头あたり8万円を要することで、モデル動物としての有用性がさらに確認できればコスト軽減にもつながる可能があるので、引き続いて検討を継続することにした。

E. 結論

わが国の輸入蠕虫感染症の実態を把握し、その診断、治療、病態解析など基礎的または応用的研究を推進した。広東住血線虫症は1960年代にわが国に持ち込まれた後、すでに東京、名古屋など大都市圏においても定着していることが確認され、監視体制の重要性が確認された。さらに実態把握には発生事例を漏れなく補足する必要があるが、医学中央雑誌などの印刷媒体による情報に加えて積極的な情報収集の努力をおこなうべきであることが結論された。輸入蠕虫症の診断法には当面考慮すべき重要疾患のすべてをカバーできる体制になっていないが、生命的予後と直結する数種の動物由来回虫による幼虫移行症のスクリーニングの方法についてdot-ELISA法の有効性を確認した。しかし特異性の点で一部問題が残った。その他、新しい感染実験動物モデルを住血吸虫症について開発し、新たな知見を得るシステムが備わったほか、腸管寄生線虫や住血吸虫感染の病態発現に関わる分子についての検討が進み、治療戦略に新しい情報が加わるなど、本研究計画の初年度としては一定の成果進展を得ることが出来た。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Osada Y, Anyan W K, Boamah D, Otchere J, Quartey J, Asigbee J R, Bosompem K M, Kojima S & Ohta N. : The antibody responses to adult-worm antigens of *Schistosoma haematobium*, among infected and resistant individuals from an endemic community in southern Ghana. *Ann Trop Med Parasitol*, 97: 817-826, 2003.

Itoh M, Ohta N, Kanazawa T, Nakajima Y, Sho M, Minai M, Zhou D, Chen Y, He H, He Y & Zhong Z. : Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: A tool for surveillance of schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34: 469-472, 2003.

Kumagai T, El-Malky M, Maruyama H & Ohta N. : Effects of CpG oligonucleotides on *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Nagoya Med J*, 46: 99-110, 2003.

Minai M, Hosaka Y & Ohta N. : Historical view of schistosomiasis japonica in Japan: implementation and evaluation of disease-control strategies in Yamanashi Prefecture. *Parasitol Int*, 52: 321-326, 2003.

Ohta N, Kumagai T, Maruyama H, Yoshida A, He R K, Renli Z. : Research on calpain of *Schistosoma japonicum* as a vaccine candidate. *Parasitol Int*, 53, in press.

Sekikawa S, Kawai Y, Fujiwara A, Takeda K, Tegoshi T, Uchikawa R, Yamada M. & Arizono N : Alterations in hexose, amino acid and peptide transporter expression in intestinal epithelial cells during *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the rat. *Int J Parasitol*, 33: 1419-1426, 2003.

有蘭直樹 : 国内寄生虫の動向. *治療学* 37 : 567-570, 2003.

Yu S H, Kawanaka M, Li X M, Xu L Q, Lan C G, Lin R : Epidemiological investigation on *Clonorchis sinensis* in human population in an Area of South China. *Jpn J Infect Dis*, 56, 168-171, 2003.

塩田恒三, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 吉田幸雄, 有蘭直樹 : 広節/日本海裂頭条虫の疫学的動向. *日本臨床寄生虫学会誌* 14, in press

平山謙二 : 住血吸虫を悪化させる宿主側の遺伝要因. *医学のあゆみ* 208 巻 2 号 95-98, 2004

Watanabe K, Kikuchi M, Ohno A, Mohamed R T, Nara T, Ubalee R, Senba M, Iwasaki T, Chen H, Aoki Y, Hirayama K : The miniature pig: A unique experimental model for *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int*, in press.

Akao N, Hayashi E, Sato H, Fujita K, Furuoka H : Diffuse retinochoroiditis due to *Baylisascaris procyonis* in Mongolian gerbils. *J Parasitol*, 89:174-175, 2003.

Akao N, Tomoda M, Hayashi E, Takayanagi TH, Fujita K : Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in Mongolian gerbils. *Veterinary Parasitol*, 113:229-237, 2003.

Hayashi E, Akao N, Fujita K : Evidence for the involvement of the optic nerve as a migratory route for larvae in ocular toxocariasis in Mongolian gerbils. *J Helminthol*, 77:311-315, 2003.

Higashide T, Akao N, Shirao E, Shirao Y : Angiographic and optical coherence

tomographic features of presumed ocular toxocariasis in the adult macula. *American J Ophthalmol*, 136:188-190, 2003.

Satou T, Akao N, Koike K, Watanabe I, Fujita K, Nikaïdo T : A new method for identifying potential remedies for larva migrans using crude drug extracts (1). *Natural Medicines*, 57(1):7-11, 2003.

Satou T, Akao N, Koike K, Watanabe I, Fujita K, Nikaïdo T : A new method for identifying potential remedies for larva migrans using crude drug extracts (2). *Natural Medicines*, 57(1):23-26, 2003.

広岡昌史, 堀池典生, 金子恵理, 阿部雅則, 道堯浩二郎, 坪井敬文, 赤尾信明, 恩地森一 : 肝内に多発性小結節像を呈した犬回虫症の1例。 *肝臓*, 44(5):237-242, 2003.

吉川正英, 城井 啓, 王寺幸輝, 美留町潤一, 西村文彦, 横田 浩, 石坂重昭, 米田 諭, 松森篤史, 山根佳子, 安藤 稔, 西村公男, 山尾純一, 福井 博, 内山ふくみ, 名和行文, 赤尾信明 : 腸閉塞症状を来した旋尾線虫幼虫 type X 感染例。 *奈良医学雑誌*, 54(1):43-47, 2003.

西浦 博, 角田隆文, 赤尾信明 : 著明な好酸球増多を認めたタイ肝吸虫症の1例。 *感染症学雑誌*, 77(9):677-681, 2003.

赤尾信明 : ペットを介する病気ー原虫・蠕虫感染症ー。 *小児科*, 44(5):789-798, 2003.

赤尾信明 : スナネズミと眼トキソカラ症。 *治療学*, 37(6):584-585, 2003.

赤尾信明 : 気になる病気 アニサキス症。 *日経ヘルス*, 6(4):36, 2003.

赤尾信明 : 十億人を悩ます鉤虫感染。別冊日経サイエンス 世界を脅かす感染症とどう闘うか。東京: 日経サイエンス社、136-143, 2003.

Tanabe M : Haemostatic abnormalities in schistosomiasis mansoni. *Parasitol Int*, 52(4): 351-359, 2003.

Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M : Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. *J Immunol*, 171(3):1556-63, 2003 .

2. 学会発表

Lu S, Kumagai T, Yan S, Ohmae H, Li S, Weng L, Maruyama H & Ohta N. : Prophylactic and therapeutic effects of artesunate against murine experimental infection with *Schistosoma japonicum*. : 38th Joint Meeting of Parasitic Diseases Panel, Japan-US Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, USA, Sep. 7-9, 2003.

Arizono N, Sekikawa, Yamada M : Alterations in hexose, amino acid and peptide transporter expression in intestinal epithelial cells during *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the rat. US-Japan Cooperative Medical Science Program Parasitic Diseases Panel Annual Meeting. University of Virginia, Charlottesville, Virginia, Sept. 7-9, 2003.

塩田恒三, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 吉田幸雄, 有菌直樹 : 広節/日本海裂頭条虫の疫学的動向. 第14回日本臨床寄生虫学会, 2003年6月、長崎

安里龍二、平良勝也、久高潤、中村正治、糸数清正、川中正憲：沖縄県における広東住血線虫症の発生とその病因学的背景、第14回日本臨床寄生虫学会、2003年6月、長崎

森嶋康之、杉山広、川中正憲、今成敏夫、飯塚信二、青木英雄：横浜市港湾区域のドブネズミに寄生する広東住血線虫に関する調査、日本寄生虫学会東日本大会、2003年10月、横浜

Watanabe K, Kikuchi M, Ohno A, R T Mohamed, Nara T, R Ubalee, Senba M, Iwasaki T, H Chen, Aoki Y, Hirayama K : The miniature pig: As Highly susceptible experimental model for *Schistosoma japonicum* infection. The 52nd Annual Meeting of the American society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, Pennsylvania, USA, December 3-7, 2003

Watanabe K, Kikuchi M, Ohno A, R T Mohamed, Nara T, R Ubalee, Senba M, Iwasaki T, H Chen, Aoki Y, Hirayama K : The miniature pig: As Highly susceptible experimental model for *Schistosoma japonicum* infection. U.S.-JAPAN Cooperative Medical Science Program Parasitic Diseases Panel Annual Meeting. Charlottesville, Virginia, USA, September 7-9, 2003

長 哲、齋藤康秀、茅根士郎、菅沼真澄、七戸和博、赤尾信明：スナネズミにおける動物性回虫類幼虫移行症に関する研究～イヌ回虫およびブタ回虫幼虫の移行経路の比較、第63回日本寄生虫学会東日本支部大会、2003年10月、横浜

林栄治、赤尾信明、小泉信夫、谷川力、藤田紘一郎：東京都心部における野ネズミの広東住血線虫の寄生状況と中間宿主の調査、第63回日本寄生虫学会東日本支部大会、

2003年10月、横浜

赤尾信明、西-中川佳代、西 起史：硝子体手術時の摘除組織中に幼虫様異物を認めた眼トキソカラ症の1例、第14回日本臨床寄生虫学会、2003年6月、長崎

西浦博、角田隆文、赤尾信明：ラオス国内で、発熱と好酸球増多にて発症したタイ肝吸虫症の1例、第14回日本臨床寄生虫学会、2003年6月、長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

蠕虫感染症の簡易診断法開発に関する研究—PCR 診断法の活用について

分担研究者 太田伸生 名古屋市立大学大学院医学研究科教授
研究協力者 金澤 保 産業医科大学教授
大槻茂男 ヒューマンサイエンス財団リサーチレジデント

研究要旨

蠕虫感染症の診断に PCR 法を応用する可能性について検討した。蠕虫感染の多様化に伴い検便では診断できない幼虫移行症が増加してきたこと、検査施設では検便技術の精度管理が困難になりつつあることなどの状況を克服するための取り組みである。住血吸虫感染への応用をまず試みることとし、今年度はマウスのマンソン住血吸虫感染の診断トライアル、および日本住血吸虫感染の診断のための遺伝子増幅領域の検討をおこなった。すでに報告のあるマンソン住血吸虫のタンDEM反復配列領域を標的とした PCR をマンソン住血吸虫感染マウス血液を用いて感染経過を追いながら実施したところ、感染3週以降に特異バンドが出現することが分かった。これは検便で診断が可能となる時期よりも約3~4週早く、また血清診断で抗体が出現する時期よりも1-2週間程度早いことから、早期診断法として優れていることが示唆された。一方、日本住血吸虫ではマンソン住血吸虫で認められたタンDEMの反復配列が存在しないか配列が異なるなどの原因でマンソン住血吸虫で用いたプライマーを適用することはできなかった。日本住血吸虫のゲノム情報から多コピー数を持つ遺伝子を検索し、候補遺伝子を選んだ。ゲノム DNA を鋳型とした PCR では特異バンド検出を 10 fg の感度で示すことができたが、血液や糞便試料での実用化を考えると感度の上昇が必要と考えられた。

A. 研究目的

わが国の国際化にともない、海外渡航人口や輸入品目が増加し、寄生虫症の持ち込みの危険性は年々増加していることが懸念される。輸入蠕虫症の監視を簡単しかも正確におこなうことを考えると、すでに確立した手法である検便や血清診断は決して十分とはいえない。国内の一定レベル以上の検査施設に普及している技術である PCR による診断法が確立されれば、地方衛研など各地域のレファレンスラボで迅速かつ確実に診断が可能となると期待される。PCR 法は、試料 DNA が未精製のままであったり、部分分解を受けていても、サンプル中に DNA ポリメラーゼ反応の阻害物質さえ含まなければ使用可能であり、寄生虫疾患でも原虫症の場合は実用化が進んでいる。し

かし、蠕虫症については未だ試験段階に留まっている。現在までマンソン住血吸虫感染者の血清や糞便から、PCR 法によってマンソン住血吸虫の DNA を検出する方法が報告されている。その方法は、マンソン住血吸虫ゲノム DNA に存在するタンDEM反復配列を標的とすることで、感度、特異性ともに優れた方法と思われるが、銀染色を必要とするなど方法論的にやや特殊であり、また日本住血吸虫症診断への応用性も不明である。

本研究では PCR 法を住血吸虫症診断に用いる場合の利点と欠点を検討し、実用化に必要な技術的改良を試みることとした。

B. 方法

B-1. 住血吸虫ゲノム DNA の単離：マンソ

ン住血吸虫と日本住血吸虫のミラシジウムを集め、DNA 抽出液 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA, 0.1% SDS) と proteinase K (100 µg/ml) を加え、中性フェノール、クロロホルムを順次処理した後、最後にエタノール添加で DNA を回収した。日本住血吸虫から 10 µg、マンソン住血吸虫から 3 µg のゲノム DNA を得た。使用する polymerase による増幅効率の差を検討するために、KOD dash、AmpliTaqGold、Taq の 3 種類を比較した。それぞれを用いた時の住血吸虫ゲノムの検出限界量を 1 サンプル当たり 0.1 fg~10 pg で検討した。添付バッファー、250 µM dNTP、0.75 U DNA polymerase (KOD dash は 0.5 U)、0.5 µM プライマー、鋳型 DNA を 1 µl 加えて反応させた。プライマーはマンソン住血吸虫タンデム縦列反復配列を標的とした GATCTGAATCCGACCAACCG / ATATTAACGCCACGCTCTC を用いた。PCR は、95°C5 分、95°C45 秒、63°C30 秒 (日本住血吸虫ゲノムの場合は 53°C)、72°C30 秒を 35 サイクル行い、72°C2 分伸長反応させた。反応終了後 2% アガロースゲルで電気泳動し、原法の銀染色でなくエチジウムブロマイド (EtBr) 染色を行なった。

B-2. 日本住血吸虫特異遺伝子を標的とした PCR: 日本住血吸虫に特異的な遺伝子として卵殻タンパク質遺伝子 *Schistosoma japonicum* eggshell protein (*SjEsp*) の全長を標的とし PCR を行った後 (First-PCR)、その PCR 産物 1 µl を鋳型とする Second-PCR で 476 bp を増幅した。用いたプライマーは first PCR: ATGATGAGTAGTTCATTGCTATCATTATTA / TCAGTATGATCTCCTGCCA, Second-PCR: CATATGGAAATGATAATTACGATA / CATATGTTGATTACCATACTTTTCA である。PCR は 95°C5 分後、95°C30 秒、55°C30 秒、72°C1 分を 35 サイクル行い、72°C2 分伸長反応を行った。日本住血吸虫特異配列としてゲノムに 1 万コピーが存在するレト

ロトランスポゾン遺伝子 (*SjR2*) も検討した。First-PCR で 1584 bp を増幅した後、それを鋳型にして Second-PCR を行った。相同配列がマンソン住血吸虫ゲノムにも存在するがプライマー配列は両者を区別して 660 bp を増幅するようにした。First-PCR のプライマー

TCTCTGCCTATGCCCCACAGATTGCA / GTTAATGAACTTCTCCGGCACACCTTTC、Second-PCR のプライマー配列は AAGACTGCCGCTCGTTTTGGAGTAC (Forward) を共通として、日本住血吸虫ゲノム検出用

ATTGTTTTGGGGATGGTGGGCAGCA (Backward)、マンソン住血吸虫ゲノム検出用 GGAAGGACAAGCTGGTTGATGTTGC (Backward) とした。PCR は 95°C5 分後、95°C30 秒、60°C30 秒、72°C2 分を 35 サイクル行い 72°C2 分伸長反応させた。

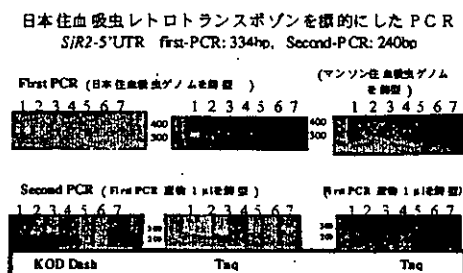
B-3. マンソン住血吸虫感染マウスの PCR 診断トライアル: マンソン住血吸虫感染 BALB/c マウス血液を用いて、マンソン住血吸虫のタンデム反復配列を B-1 で示したプライマーと PCR 条件下で住血吸虫 DNA の検出を経時的に調べた。治療後の DNA 検出動向を追跡するために、マウスにプラジカンテルを投与して駆虫した後の血液中の住血吸虫 DNA を調べた。

C. 研究結果

C-1. 日本住血吸虫ゲノム DNA 検出システムの検討: マンソン住血吸虫ゲノム DNA の PCR では、EtBr 染色を行なう限り、調べた 3 つの酵素での検出感度は >10 fg で原法より 10 倍低かった。このプライマーを使用した場合、検討したいずれの PCR 条件でも日本住血吸虫ゲノムを検出できなかったことから、マンソン住血吸虫で報告のある PCR 診断の条件はそのまま日本住血吸虫診断には応用できないと判断した。日本住血吸虫の *SjEsp* 遺伝子を標的とした PCR の結果、First-PCR においては PCR 産物のバンドは

検出されず、Second-PCR によってのみ日本住血吸虫ゲノムでバンドが現れた。しかし検出感度は目標検出限界ゲノム DNA 量に較べて 1000 倍以上低いため、この遺伝子配列は PCR 診断には応用できないと考えた。そこでコピー数が十分に多い配列で検討することとし、日本住血吸虫のレトロトランスポゾン *SjR2* を標的として試みた。KOD Dash では First-PCR において 100 fg のゲノム DNA 量でバンドを検出できたこと、Taq では First-PCR においてバンド検出に 10 pg のゲノム DNA 量が必要だったが Second-PCR では感度が 100 倍上昇したこと、以上から、いずれかの酵素を使えば目標検出限界である 1 fg の 100 倍量のゲノム DNA 量程度までの改良が可能であった (図 1)。

図 1

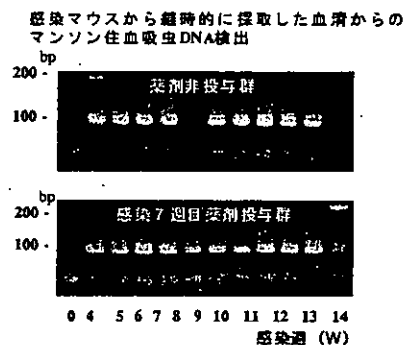


この Second-PCR 産物は日本住血吸虫ゲノムに特異的であった。このことから *SjR2* を標的として、First-PCR と Second-PCR に別々の polymerase を組み合わせて行うことにより、日本住血吸虫ゲノム DNA も十分な感度で検出できる可能性があると思われた。C-2. PCR 応用による Mansonella orientalis 感染時期推定の可能性：実験的に Mansonella orientalis を感染させた BALB/c マウスの血液中には、感染 3 週以降にはすでに寄生虫由来 DNA が検出された (図 2)。

それ以降、血中に住血吸虫 DNA が検出されたが、検便で確実に診断がおこなえる感染 7-8 週頃にはむしろバンドが弱くなる

ことが観察された。感染マウスをブラジカンテルで治療した後の DNA 検出動態を追跡したところ、治療後少なくとも 8 週以上に亘って PCR による特異バンドの出現が持続した。

図 2



以上のことから、Mansonella orientalis 感染では、そのタンDEM反復配列を標的とした PCR で早期診断が行えることがわかった。治療判定には投薬後 8 週以上も PCR 陽性が持続しており、検便の結果とは乖離がみられた。

D. 考察

蠕虫感染の診断に PCR を応用することには議論がある。即ち、蠕虫感染では虫卵、親虫または幼虫そのものを検出することで診断が確定する、ということから PCR を適用する意義があるか否か、が常に問われる。しかし幼虫移行症では虫体の確認は極めて困難であり、血清診断で確定診断を下すことには常にリスクが伴う。検便で虫卵を確認する従来の方法も、検査技師の精度管理が年々困難になってきており、代替方法が必要との認識はむしろ現場の声である。PCR は感染症の診断法としての応用価値が認められ、寄生虫症でも原虫感染の一部で活用されている。すなわち、一定レベル以上の検査機関ではもはや特殊検査ではない。蠕虫感染症診断にも応用できれば、大量検体処理が可能であること、血清診断に必要な抗原確保の必要がないことなど、PCR 診断の実用化は蠕虫症の国内監視にメリットが大きい。

実用化を考える場合、感度と特異性の問題はもとより、検査試料の状態について考えるべきである。日本国内での使用を考える限りは血液で可能なものはそれが一番よいであろう。 Manson 住血吸虫では感度と特異性を満足するプライマーの報告がすでにあり、今年度の検討でも血液中の住血吸虫 DNA の検出が早期診断に有用であるという予想外の結果が得られた。感染 3 週間後ですでに陽性になる機序は不明であるが、宿主体内を移動する幼虫は肺を通過する感染 2-3 週の時点で一部は宿主防御機構によって殺されることが考えられており、そこで放出された住血吸虫 DNA が検出される可能性はある。このような成績が感染虫数とどのように相関するかは今後の問題である。一方、日本住血吸虫については感度よく検出するためのプライマー設計から取り組む必要があったが、Manson 住血吸虫の場合のような高い感度を与えるプライマー設計には成功していない。

海外の流行地での実用まで視野に入れるならば、検査試料は糞便の方が実施は容易である。しかし糞便中の PCR 阻害因子については十分わかっていない。文献的には Manson 住血吸虫の糞便中の寄生虫 DNA 検出の感度は EPG=2 前後とされている。疫学調査では最低でもこの程度の感度は必要であり、日本住血吸虫の PCR 診断にはまだ問題が残されている。

住血吸虫以外にどのような蠕虫の診断に可能性があるかは不明であるが、今後の利用価値を考えると、輸入食品の寄生虫汚染を検査するシステムに応用ができる可能性がある。生鮮野菜や食肉から蠕虫感染症が持ち込まれる可能性は十分に考えられており、その検査体制は必要である。しかし現行体制では食品中から虫卵や虫体を直接検出する以外に方法がなく、事実上は検査手段がないことになる。輸入食品のサンプリング検査に PCR や免疫学的手段を応用することで事態の改善は期待できる。また、国

内の住血吸虫症旧流行地では安全宣言とともに監視事業は終了しているが、地域住民からの散発的な検査依頼に対して行政検査機関は対応が必要である。PCR 診断の活用で、監視体制を維持していることを住民へ説明することも可能である。

E. 結論

蠕虫感染症の PCR 診断の可能性を住血吸虫の場合をモデルにして検討した。Manson 住血吸虫感染では早期診断に利用可能であるなど、実用価値として高いものが期待されたが、一方で治癒判定には現時点では問題が残された。日本住血吸虫感染の PCR 診断には、用いるプライマーの設計に適した配列がゲノム上で見つかっておらず、十分な感度を得るものまで進まなかった。血液を試料として検査することは十分に可能であるが、糞便試料を用いた場合との比較は今後持ち越した。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Osada Y, Anyan W K, Boamah D, Otchere J, Quartey J, Asigbee J R, Bosompem K M, Kojima S & Ohta N. : The antibody responses to adult-worm antigens of *Schistosoma haematobium*, among infected and resistant individuals from an endemic community in southern Ghana. *Ann Trop Med Parasitol*, 97: 817-826, 2003.

Itoh M, Ohta N, Kanazawa T, Nakajima Y, Sho M, Minai M, Zhou D, Chen Y, He H, He Y & Zhong Z. : Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: A tool for surveillance of schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34: 469-472, 2003.

Kumagai T, El-Malky M, Maruyama H & Ohta N. : Effects of CpG oligonucleotides on *Schistosoma japonicum* infection in mice. Nagoya Med J., 46: 99-110, 2003.

Minai M, Hosaka Y & Ohta N. : Historical view of schistosomiasis japonica in Japan: implementation and evaluation of disease-control strategies in Yamanashi Prefecture. Parasitol Int, 52: 321-326, 2003.

Ohta N, Kumagai T, Maruyama H, Yoshida A, He R K, Renli Z. : Research on calpain of *Schistosoma japonicum* as a vaccine candidate. Parasitol Int, 53, in press.

2. 学会発表

Lu S, Kumagai T, Yan S, Ohmae H, Li S, Weng L, Maruyama H & Ohta N. : Prophylactic and therapeutic effects of artesunate against murine experimental infection with *Schistosoma japonicum*. : 38th Joint Meeting of Parasitic Diseases Panel, Japan-US Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, USA, Sep. 7-9, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

消化管寄生虫感染による消化吸収障害の実験モデルにおける解析

分担研究者 有菌直樹 京都府立医科大学医学研究科寄生病態学教授

研究要旨：回虫や鉤虫などの古典的消化管寄生虫感染がヒトにおよぼす影響のなかでもっとも重要なものが、宿主の栄養状態に対する影響である。本研究では消化管寄生虫によって生じる消化吸収障害の実験モデルとして *Nippostrongylus brasiliensis* 感染ラットを用い、血糖値、血清アルブミン値の変化を観察するとともに、小腸吸収上皮細胞におけるグルコーストランスポータの発現を RT-PCR 法、Western blot 法などを用いて解析した。その結果、*N. brasiliensis* 感染ラットにおいては、感染後一過性に低血糖、低蛋白血症、低アルブミン血症が生じることが明らかになり、回虫、鉤虫症のモデルとして適切であることが明らかになった。さらに低血糖、低蛋白血症、低アルブミン血症の時期に一致して、小腸吸収上皮細胞におけるグルコーストランスポータの SGLT-1, GLUT-5 やペプチドトランスポータの PepT1, アミノ酸トランスポータの LAT2 の発現低下が生じていることが明らかになった。一方、吸収上皮細胞の基底側における GLUT-1 発現が亢進することも明らかになった。以上の結果から、消化管寄生虫感染は吸収上皮細胞の主に管腔側に発現するグルコーストランスポータや一部のペプチド、アミノ酸トランスポータの発現に著しい影響を及ぼし、低血糖や低アルブミン血症などの病態を惹起する可能性が示唆された。吸収上皮細胞基底側における GLUT-1 発現の亢進は、一種のストレス反応であると考えられた。

A. 研究目的

世界で数十億人のひとびとが回虫や鉤虫などの消化管寄生虫に感染している。これらの寄生虫症の“病気”としての側面は、回虫症においては腸閉塞や胆道迷入などの機械的障害が、鉤虫症においては貧血が重要であり、開発途上国においては今なお重度感染による死亡者も見られる。一方、回虫や鉤虫の流行地域においては低アルブミン血症とともに小児の発育抑制がしばしば見られ、これらが駆虫によって改善することから、消化管寄生虫がなんらかの機序で感染者の栄養状

態に影響を及ぼすことが想定されてきた。寄生虫が宿主の栄養状態に与える影響は、回虫や鉤虫の感染者が極めて多数であるだけに、その社会に与える影響も大きい。しかし消化管寄生虫が消化吸収や宿主の栄養に与える影響の病理学的背景については残念ながら明確な解答が今なお得られていない。

寄生虫感染による低アルブミン血症の発生機序は3つの仮説が成り立ちうると考えている。第1に寄生虫感染によるタンパク漏出性腸症の発現、第2に小腸吸収上皮細胞の障害による吸収の低下、第3に食欲に及ぼす

影響である。本研究では、第2の仮説を検証するために、寄生虫感染が小腸吸収上皮細胞に及ぼす病理学的影響を及ぼしているかを *Nippostrongylus brasiliensis* 感染ラットをモデルとして解析した。吸収上皮細胞は小腸管腔内の糖、アミノ酸、脂肪を効率よく吸収するように特化した細胞であり、糖の吸収については、吸収上皮細胞の apical surface に SGLT1 や GLUT5 が発現し細胞内に糖を取り込むとともに、基底側に発現した GLUT2 が上皮細胞内に吸収した糖を体内へトランスポートする。また、アミノ酸やペプチドのトランスポートに関与する PepT1 や LAT2 の存在も知られている。したがって、本研究では各種のトランスポートの発現に焦点をあて寄生虫感染の消化吸収に及ぼす影響の解析を試みた。

B. 研究方法

動物と感染：8週齢雄性 Brown Norway/Sea ラット (SLC より購入) に 2000 の *Nippostrongylus brasiliensis* L3 幼虫を皮下接種し、感染させた。感染動物から経時的に採決し、血糖、血清タンパク、血清アルブミン量を測定した。また、非感染対照動物および感染 7, 14, 21 日後の動物を屠殺し worm burden を測定するとともに、小腸上皮を単離し total RNA を抽出し RT-PCR に供した。一部の単離上皮はタンパク抽出し Western blotting に供した。なお、動物実験にあたっては、京都府立医科大学動物実験倫理指針を遵守し実施した。

小腸上皮の単離：小腸を摘出し縦切開し PBS で軽く洗浄した後、1 cm 長に分割した小腸片を 1 mM EDTA を含む Ca, Mg-free Hanks 液 (4C) に浸漬した。小腸片ときどき軽く混和し 75 分後に試験管を 60 回激しく震盪することにより上皮を脱落させ、遠心により上皮分画を採取した。

total RNA の抽出と RT-PCR：採取された上皮細胞ペレットから Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出した。RT-PCR は Takara RNA LA

PCR kit を用いて実施した。使用プライマーは以下のとおりである。

β -actin

5'-AGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACG-3',
5'-CTTCTGCATCCTGTGACGCGATGC-3'

GAPDH

5'-CATCATCCCTGCATCCACTG-3',
5'-CAAAGGTGGAGGAATGGGAG-3'

thymidine kinase

5'-GGGGCAGATCCAGGTGATTC-3',
5'-GCCATCGTTTCACAGAAATCCAC-3'

SGLT1

5'-GAAGGGTGCATCGGAGAAGG-3',
5'-CTTTAGGGTCCTCCTCGACG-3'

GLUT1

5'-ATCGTCAACACGGCCTTCAC-3',
5'-AAGCCGGAAGCGATCTCATC-3'

GLUT2

5'-TTCTTTGGTGGGTGGCTTGG-3',
5'-TGGGGCTTTCTGGACAGAA-3'

GLUT5

5'-GGTACAACGTGGCTGCTGTC-3',
5'-CATGGGGACCACGTTGGAAG-3'

Na⁺,K⁺-ATPase

5'-TCTATCCTCCTCCACGGCAA-3',
5'-ATGTTGAGGCGGGCAGCAAT-3'

PepT1

5'-GGCTGGACTGGGCTAAAGAG-3',
5'-TGGGGAAGACTGGAAGAGTT-3'

LAT2

5'-AGAAGCTCCTAGGGGTCATG-3',
5'-GAAGGCCAGAACAGCAAGT-3'

PCR 産物の半定量：PCR 産物を電気泳動し、その ethidium bromide 染色像を CCD image saver (ATTO 社) に取り込み NIH Image ソフトウェアで強度を測定した。それぞれの強度を β -actin または GAPDH の強度で normalize し半定量化した。

Western blotting：単離上皮を 0.1% NP40 を含む SDS サンプルバッファーで可溶化したのち 4-20% gradient SDS-polyacrylamide で電

気泳動し Immobilon P 膜に転写した。抗 GLUT1 または抗 SGLT1 抗体 (Chemicon 社), HRP 標識二次抗体と順次反応し, ECL Western blot detection system (Amersham) を用いて検出した。

免疫組織化学: 小腸組織を 4% 中性ホルマリンで固定し, パラフィン包埋切片を作製後, 0.01M sodium citrate に浸漬し 121°C 10 分間の抗原賦活化処理を行い GLUT1 の免疫組織化学を実施した。

C. 研究結果

1. *N. brasiliensis* 感染後の血糖および血清アルブミンの変化

N. brasiliensis 感染後, 経時的に採血し, 血糖値, 血清総タンパク, 血清アルブミン量を測定した。

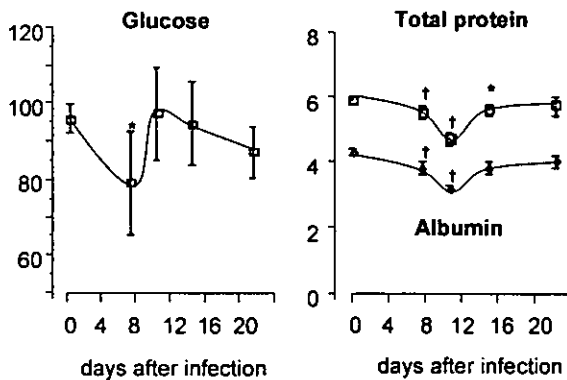


図 1. *N. brasiliensis* 感染後の血中グルコース, 総タンパクおよびアルブミン量の経時的变化

図 1 に示したごとく感染 7 日後に一過性の低血糖, 感染 7-14 日後に総タンパク量および血清アルブミン量の低下が認められた。感染 12-14 日後に小腸内の *N. brasiliensis* は急激に T 細胞依存性に排除されることが知られている。今回の感染実験で一部の小腸組織を採取した後, 残りの小腸内における虫体数をカウントした結果, 14 日後には大半の虫体が排除されていた (図 2)。これらの結果から, *N. brasiliensis* 感染後に低血糖および低アルブミン血症が生じること, さらにこれらの変化は

虫体の排除後に回復することが明らかになり, 回虫や鉤虫などのヒト腸管寄生虫の消化吸収障害の解析のための適切なモデルとなることが示された。

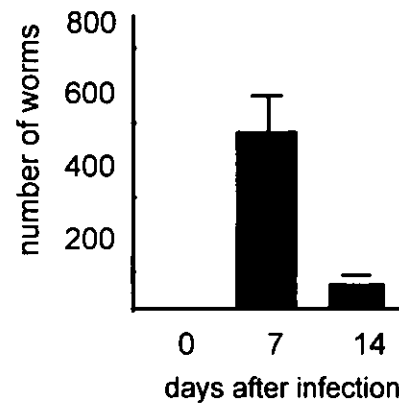


図 2. 小腸管腔内における虫体数

2. *N. brasiliensis* 感染後の小腸吸収上皮細胞における各種トランスポータの発現の推移

非感染および *N. brasiliensis* 感染 7, 14 日後の動物の小腸から上皮細胞を単離し, total RNA を抽出後 RT-PCR を行い, Thymidine kinase, GLUT1, GLUT2, GLUT5, SGLT1, Na^+, K^+ -ATPase, PepT1 および LAT2 の発現レベルを解析した (図 3)。

吸収上皮細胞の apical membrane に発現し小腸管腔からの糖の吸収にもっとも重要な役割を果たしている SGLT1 の遺伝子発現は感染にともなって変化がみられなかったが, 同様に吸収上皮細胞の apical membrane に発現する GLUT5 の遺伝子発現は感染にともない低下していた。吸収上皮細胞の basolateral membrane に発現する GLUT2 には変化が見られなかった。ペプチドの吸収に関与する PepT1 およびアミノ酸トランスポータの 1 つである LAT2 はともに有意の発現低下を認めた。このほか, Na^+, K^+ -ATPase の発現も低下していた。

一方, 正常小腸上皮細胞におけるタンパクレベルでの発現がきわめて軽度であり小腸管腔からの糖の吸収に重要な役割を果たしていないと考えられている GLUT1 の発現が

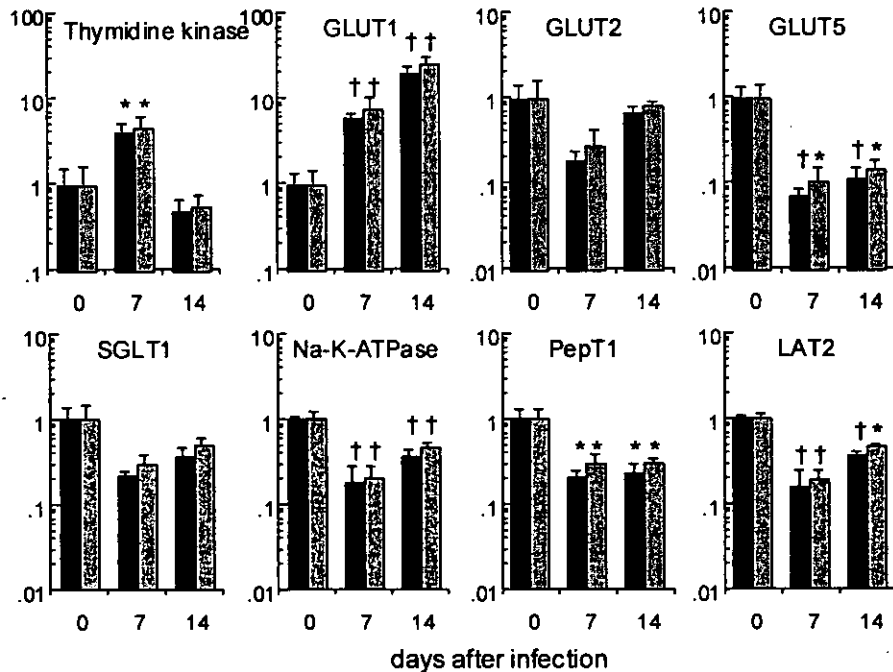


図3. *N. brasiliensis* 感染小腸上皮における各種トランスポータの半定量 RT-PCR による発現解析。黒色のバーはβ-actin により normalize, 灰色のバーは GAPDH により normalize した値を示す。非感染動物における発現量を 1 とした。*P<0.05, †P<0.01

感染 7, 14 日後増加していることが明らかになった。また細胞増殖の指標としての Thymidine kinase の遺伝子発現は感染 7 日後に増加していた。

3. トランスポータタンパク発現の解析

小腸上皮における数種のトランスポータの遺伝子発現が感染に伴い変化することが明らかになったが、グルコース吸収にもっとも重要な役割を持った SGLT1 の遺伝子発現には変化が見られなかった。そこでタンパクレベルにおける発現を調べるために Western blot 解析を行った。感染 7, 14 日後の SGLT1 は、図 5 に示したごとくスメアを生じ、intact なタンパク発現が見られないことが明らかになった。一方、遺伝子レベルで up-regulation を示した GLUT1 はタンパクレベルにおいても発現増強を示すことが明らかになった。

GLUT1 のタンパクレベルでの発現亢進が認められたため、GLUT1 の小腸上皮にお

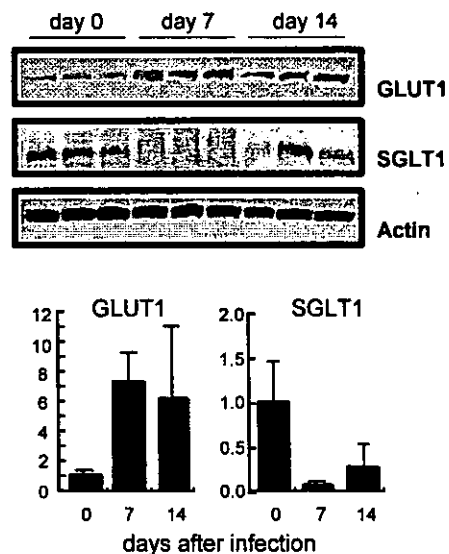


図5. *N. brasiliensis* 感染ラット小腸上皮の lysate における GLUT1 および SGLT1 の Western blotting 解析。

る局在を免疫組織化学で調べた。その結果、GLUT1 は感染後小腸上皮の基底側に発現し

ていることが明らかになった。

D. 考察

N. brasiliensis 感染により、小腸には絨毛萎縮が発現するとともに、 Na^+, K^+ -ATPase 活性、brush border 酵素の alkaline phosphatase, sucrase および isomaltase の活性が低下することがわれわれや他のグループから報告されていた。今回の研究で hexose transporter の GLUT5, peptide transporter の PepT1, amino acid transporter の LAT2 の遺伝子発現が低下することが明らかになった。グルコース吸収でもっとも重要な役割を果たしている SGLT1 は遺伝子発現には変化が見られなかったものの Western blot 解析で発現低下を見とめた。これらの結果から、*N. brasiliensis* 感染は小腸上皮細胞の各種トランスポータの発現の低下を通じて、グルコースやアミノ酸の吸収に大きな影響を与えるものと推測された。本研究で示したように、*N. brasiliensis* 感染動物には一過性の低血糖、低アルブミン血症が生じるが、これらの変化の少なくとも一部は、トランスポータの変化が関与していると推測される。

本研究で意外であったのは、感染にともなって GLUT1 の発現亢進が生じていたことである。GLUT1 は正常小腸における発現はわずかであり小腸管腔からの糖吸収にはほとんど関与していないと考えられている。*N. brasiliensis* 感染後に発現増強の見られた GLUT1 は、免疫組織化学には吸収上皮細胞の基底側に局在していたことから、管腔からの糖吸収には直接関与していないと考えられる。 Ca^{2+} influx, hypoxia, endotoxin の作用や酸化的リン酸化の阻害によって GLUT1 の遺伝子発現が亢進することが従来から報告されており、各種の細胞障害や hypoxia によって酸化的リン酸化が抑制された場合に GLUT1 の発現と解糖系の亢進が生じると考えられている。本研究で小腸上皮細胞における thymidine kinase の遺伝子発現が亢進していることが見出されたが、このことは小腸上

皮細胞の障害にもとづき上皮細胞更新が促進されていることを示唆している。したがって、GLUT1 の遺伝子発現亢進は管腔からの糖吸収とは無関係の、一種のストレス反応と考えられた。

E. 結論

今回の研究により、*N. brasiliensis* 感染は一過性の低血糖、低アルブミン血症を生じ回虫や鉤虫などのヒト腸管寄生虫の消化吸收障害の解析のための適切なモデルとなりうることを示された。さらに、小腸上皮細胞における各種トランスポータ発現を解析した結果、SGLT1, GLUT5, PepT1, LAT2 の発現低下が見出され、これらグルコース、ペプチド、アミノ酸トランスポータの発現低下が吸収障害の原因の1つであることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sekikawa, S., Kawai, Y., Fujiwara, A., Takeda, K., Tegoshi, T., Uchikawa, R., Yamada, M. and Arizono, N.: Alterations in hexose, amino acid and peptide transporter expression in intestinal epithelial cells during *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the rat. Int. J. Parasitol., 33: 1419-1426, 2003

2. 学会発表

Arizono, N., Sekikawa, Yamada, M.: Alterations in hexose, amino acid and peptide transporter expression in intestinal epithelial cells during *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the rat. US-Japan Cooperative Medical Science Program Parasitic Diseases Panel Annual Meeting. University of Virginia, Charlottesville, Virginia, Sept. 7-9, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし