

7.00500652A

厚生労働科学研究費補助金
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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 太田 伸生

平成 18 (2006) 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. ①実験室内試料及び野外サンプルを用いた
日本住血吸虫症の DNA 診断法の試験研究 7
②国内市販の輸入キムチの寄生虫卵混入の実態把握と
検査法に関する考察 11
太田伸生
2. 輸入蠕虫症調査と腸管寄生虫感染の
小腸粘膜免疫に関する研究 13
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 19
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 27
平山謙二
5. ①動物由来回虫症の動物モデルとしてのスナネズミの
特性に関する研究 30
②Dot-ELISA による動物由来回虫幼虫移行症の血清診断法の
確立とその標準化 39
③大都市圏で拡大する広東住血線虫症の疫学調査 49
④輸入食材の寄生虫卵汚染調査と
新規汚染検査法開発に関する研究 56
赤尾信明
6. 住血吸虫感染による凝固活性化因子 (CILIP) 誘導機構の解析 63
田邊將信

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 80

IV. 研究成果の刊行物・別刷 84

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 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授

研究要旨

わが国の輸入蠕虫感染症の発生動向をモニターし、輸入蠕虫症の診断・治療など医療対応に必要な技術開発を進めると共に、本邦における輸入蠕虫感染症の臨床及び保健行政に必要な情報を整備してデータベースとして提供する体制の構築をおこなった。情報整備に関する研究事業として、前年度に引き続いてわが国の蠕虫症発生に関する文献及び学会発表事例を収集し、累計で約3600件の情報をデータベース上に加えた。国内の輸入蠕虫症発生に関する正確な把握が出来ない国内体制の問題を鑑み、大学、研究所などで診断した症例を登録するシステムも立ち上げた。国内に定着した輸入蠕虫症病原体として広東住血線虫の首都圏でも追跡調査を行ってきたが、蠕虫感染症、特に各種幼線虫移行症の免疫診断について標準化の作業が一部完成したのを受けて、簡易診断法開発を手がけ、イヌ回虫に関しては従来のELISAに匹敵する迅速診断キットの開発が進んだ。診断技術に寄生虫学的バックグラウンドを必要としない診断法としてPCR診断法を蠕虫感染症に応用を図り、日本住血吸虫症の監視に効果のあることが確認された。特に感染早期の診断に有用であった。年度途中で輸入キムチの寄生虫卵汚染の可能性が報道され、本研究班でも市販の輸入キムチについて調査したところ、35.7%の商品から何らかの蠕虫卵が検出された。検出には従来本邦検疫機関で採用されている簡易法ではすべて陰性であり、今後の食品中の蠕虫卵検出には手技の改変が必要であることが判明した。食品サンプリング検査についても簡易診断法開発を手がけた。平行して蠕虫感染症の病理と感染免疫に関する基礎研究をすすめた。クマ回虫、アライグマ回虫等の感染モデルとしてスナネズミがヒトと類似の病理所見を示し、特にアライグマ回虫感染では中枢神経系に強い指向性が見られヒト病態解析に用いられることが示された。腸管寄生線虫の病理と感染防御を解明する目的でヒト鉤虫のモデルとなる *Nippostrongylus brasiliensis* 感染マウス腸管のムチン関連遺伝子の発現動態を調べ、経時的に発現遺伝子を変換することがわかり、治療標的にもなりうることを示された。前年に引き続いて住血吸虫症のモデル動物としてミニブタの研究を行い、さらに病態調節分子としてのCILIPの機能を解析した。以上をもとに輸入蠕虫症に対する医療現場と行政機関の円滑な対応に資する情報及び技術の整備を行った。

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
田邊将信 慶應義塾大学医学部・講師

A. 研究目的

輸入感染症が今日の日本国民の健康・福祉に影響する社会要因となってきた。感染症は病原体の種類によって病態は様々であるが、蠕虫感染症の特徴は一般に不定愁訴に終始するため case-detection が困難であり、国内の実態把握がなされていない。しかしその中には慢性に経過して確実に健康被害を与えるものや最近ではアライグマ回虫やクマ回虫などヒトに感染すると致死的経過をとるものも含ま

れる。その流入経路については最近の途上国からの生鮮食材の輸入、人間の移動、保虫宿主動物の輸入など多様であることが推定されるが、実態は殆ど把握されていない。そのような輸入全盛疾患については、臨床の現場では診断に困難を来すものが大半であり、治療法自体確立されていないケースも少なくない。さらに住血吸虫など国内で流行が終息したことに伴って監視体制が解かれた今、流行再興をコントロールすることは不可能である。

本研究班はわが国の医療機関や行政機関にあって、輸入蠕虫疾患が発生した時の対応を円滑にするべく、先ず情報を整備して診断・治療に関するレファレンスが容易に入手できる耐性を構築すること、及び輸入蠕虫症を効率的に監視し必要な対策を実施できることなどをめざした研究を実施することにした。全ての輸入蠕虫症を対象にすることは出来ないが、国内状況から監視が必要と思われる疾患としてアライグマ回虫症、クマ回虫症など新興の動物由来回虫感染症、住血吸虫症、国内に定着した広東住血線虫症、腸管寄生線虫症などである。それらの蠕虫症の診断法整備を進め、国内外の発生動向の情報を整備し、危機管理に繋がる研究成果を目指した。

輸入蠕虫症は病原体の持ち込みによる場合が多いことは勿論であるが、最近では在留外国人が増加してさまざまな食習慣を持ち込むことによる蠕虫症の再興という事態も散見される。そのような場合も広く「輸入蠕虫性疾患」と捉え、実態の調査と監視をおこなった。今年度は研究計画の最終年度であり、情報提供システムとしてのデータベース、診断法の標準化と簡易診断キットの作製、モデル動物の開発など掲げた重要課題の結論に至ることを念頭において研究を実施した。

B. 研究方法

研究班は3つのアプローチから取り組み、それらを総合して課題解決を図った。第一は輸入蠕虫症に関する情報システム構築である。臨床及び行政対応に必要な情報が絶対的に不足している現状を解決するために国内で発表された論文及び学会報告事例をデジタル入力してデータベース化する作業を継続した。情報収集システムも構築する目的で、インターネットによる症例登録システムを立ち上げた。個人情報保護の観点から匿名表記とアクセス制限の徹底を図って運用を計画した。輸入蠕虫感染症の中にはすでに国内に定着したものもあり、その代表的なものとして広東住血線虫の追跡調査を継続した。ペストコントロールの協力を得て首都圏のドブネズミを解剖して広東住血吸虫成虫の寄生を確認すると共に、寄生陽性個体の検出地区でナメクジなど中間宿主動物の幼虫寄生の有無を検討した。監視業務簡便化のために血清抗体の有無で代用できるか否かを確認するためにネズミの寄生状況と血清抗体の有無との相関を調べた。

蠕虫感染症の診断・検出システムの開発研究として、新規診断法の開発、その改良およびキット化などを行った。蠕虫症の診断や監視を従来の形態学的な手技に依らず、汎用的なラボ技術で実施できるものを開発した。住血吸虫感染をPCR法にてDNA診断することを試み、日本住血吸虫感染を終宿主及び中間宿主から検出する系を開発し、実験室内試料及び流行地より得たサンプルを用いて検討した。特に実際の流行地での監視事業への応用性を考えて、中国における重要な保虫宿主である水牛の糞便および流行地に生息する中間宿主貝からの住血吸虫DNA検出を試みた。各種動物由来回虫症の免疫診断法の標準化が終了したので、その簡易迅速診断キット開発を行った。イヌ回虫症についてイムノクロマトによる迅速発色反応のキットを作製して感度と特異性を検討した。

生鮮・加工食品からの蠕虫卵検出の検討を考えていたが、今年度は韓国におけるキムチからの虫卵検出が報道されたため、日本国内で市販されている輸入キムチの蠕虫卵汚染の実態を調べた。すでに報告のあった村田らの検査法に加えてキムチ洗浄液の沈査を検査する方法を行って両者の比較を行った。材料は東京、名古屋および大阪の食料品店で市販されているものを購入して調べた。商品表示にある原産地の記載をもとに虫卵汚染との関連も調べた。

第三のアプローチは蠕虫感染症の病態解析に関する基礎研究である。輸入蠕虫感染症には新興感染症も含まれ、病理・病態の解明が十分でないものがあるため本研究班ではヒトの感染を反映する動物モデルを検討してきた。スナネズミはヒトの寄生虫に高い感受性を示す場合があり、今年度はクマ回虫、アライグマ回虫、イヌ回虫などをスナネズミに感染させてその病理変化を追跡した。ヒト蠕虫感染症に匹敵する慢性感染モデル開発としてミニブタの住血吸虫感染が継続して研究され、サイトカイン動態、病理発現などについて実験研究を行った。腸管寄生線虫の感染経過に応じた宿主防御反応理解のために腸管粘膜における、ムチン関連遺伝子の発現動態を解析した。その他、寄生虫感染における病態修飾因子の検討を進め、住血吸虫感染宿主に特徴的に誘導されるCILIPの病態修飾の機能を解析した。

(倫理的配慮) 本年度の研究ではヒト試料を用いた臨床研究や疫学研究は行わなかったが、症例登録システム開始にあたっては患者氏名の匿名化と厳密なアクセス制限の配慮を行った。動物実験は各分担研究者の所属機関において動物実験指針に従って立案し、動物実験委員会の審査を経てから実施した。

C. 研究成果

今年度は以下に記す成果を得た。

首都圏の広東住血線虫分布調査では今年度新たに千葉県銚子市に感染ドブネズミの生息フォーカスを同定した。また、前年度に発見していた川崎市の多摩川河口地域のフォーカスでは今年度も依然として終宿主と中間宿主の感染が維持されていることが確認された。捕獲したネズミの剖検で陰性と判断した 159 個体中 5 頭の血清が ELISA による抗体検査によって有意な OD 値の上昇を示していた。医療機関及び保健行政機関対象の情報提供システムとしての「蠕虫症ネット」の整備を継続して行った。今年度は新たに 600 余件の論文または学会発表情報をデジタル化してネット上に追加した。一方で国内の輸入蠕虫症発生动向の把握に資するために個別症例登録システムを立ち上げた。各研究機関や大学、基幹病院等に協力を依頼して平成 17 年度に診断し得た症例 36 例を登録した。性別、年齢、推定される感染地、診断根拠の入力をいただき事業を開始したところであり、広範な参加を呼びかけている。

蠕虫感染症の診断法については迅速簡易診断キットの普及を図ることが理想であり、今年度はイヌ回虫症の迅速診断キット化に成功した。従来のイヌ回虫幼虫 ES 抗原を用いた ELISA に比べて本法は 3 分以内にほぼ同等の感度と特異性を示すことを確認した。日本住血吸虫症の PCR 診断は実験室レベルでは十分な感度と特異性を持つことが確認された。マウスの実験感染では感染 2 週後にマウス血清を用いた PCR で住血吸虫 DNA を検出することが可能であった。しかし感染水牛の糞便を試料とした場合、現状では安定した検出はできないため DNA 抽出と PCR の条件を再検討する必要がある。当面の実用価値は中間宿主貝の感染監視であり、中国の流行地由来の中間宿主貝で顕微鏡的目視により陰性と判定されたサンプルからも PCR で陽性となるものが見出された。また、在留外国人の食習慣移入

による蠕虫感染症再興の問題としてタイのパイヤサラダに生のカニを用いることによる肺吸虫感染発生事例があるが、食材中の肺吸虫の検出と種の同定を簡便に行う方法として multiplex PCR の有用性が確認された。

市販のキムチ 28 商品を検査し、延べ 10 商品 (35.7%) から何らかの蠕虫卵が検出された。正確な種の同定には至らなかったが、形態的には回虫様のもの、鞭虫様のものなどが多数を占めた。一部は DNA 配列を調べ、ヒト回虫と同属である *Ascaris* と高い相同性を示した。蠕虫卵が検出されたキムチは原産地表示からはすべて韓国産のものであった。しかし同一サンプルを村田らの方法で検査した場合は全て陰性であった。手技の煩雑さ故の困難があるため簡易検査法の開発が必要と考え、回虫卵蛋白膜を免役して得られた抗体を利用したディップスティック検査の実用性を検討したが、発色性や感度の正確な評価には至っていない。

蠕虫感染症の病態解明の研究としてスナネズミの各種回虫の実験的感染で幼虫移行症の病理変化を追跡したところ、アライグマ回虫感染では脳実質の炎症所見が強く現れ、ヒトのアライグマ回虫感染の病態研究に有用のモデルとなることが示唆された。一方、慢性住血吸虫症研究のモデルとして利用価値が高いと思われるミニブタを用いて肝臓病変の発現プロセスの解析が進んだ。さらにワクチン開発のモデルとしても検討され、パラミオシンとコレラ毒素サブユニット B の併用による粘膜免疫の効果について調べたところ、抗体上昇は確認されたが副作用の出現も認められ、問題のあることがわかった。腸管寄生線虫の感染経過に応じた粘膜のムチン関連遺伝子の発現状況を *Nippostrongylus brasiliensis* 感染マウスで調べた結果、杯細胞の発現遺伝子のパターンが明確に規定されていることが示され、蠕虫の防除因子解明の情報となりうるものであった。その他、住血吸虫感染宿主に特徴的に上昇する CILIP は LPS 刺激によるショックを回避する機能があり、その機構として肝細胞の反応性を誘導する可能性が明らかとなった。

D. 考察

輸入蠕虫感染症に対する国内の医療対応はきわめて脆弱な体制にあることは間違いない。それは近年の新興蠕虫感染症についての情報

が不足しており診断法や治療法が確立されていないこと、蠕虫症の診断技術の改善や新規技術の開発が遅れていること、対処にあたる専門家の絶対的な不足などが複合的に関連していることによる。今後は古典的な寄生虫学の経験を持つ人材が益々得がたくなることを考えると、学術的にも行政的にも医療や監視の現場をサポートする体制を整備することが急務である。日本を取り巻く近隣諸国における蠕虫感染症蔓延の実態を考えれば、わが国の衛生統計に漏れた輸入症例は相当数に上ることが予測できる。本研究の最大の使命は輸入蠕虫症の国内発生の実態をより正確に把握することと医療現場に診断や治療に関するサポート体制を構築することであった。その意味でデータベースは過去の国内発生事例を収集可能な情報ソースから集め、過去10年間の情報として約3600件を蓄えていることは、ほぼ全ての報告事例をカバーしていると考えている。今後の課題は情報を如何に医療現場の当事者のニーズに合った形で提供するかであり、簡便なキーワード検索など改良を継続していく予定である。また輸入蠕虫症の殆どは法令による症例捕捉の枠外に置かれているため、国内の発生動向を知る手だてが全くなかった。今年度から個別症例登録制度を立ち上げたので、今後は発生動向の概略を把握する手段として有効に活用することが望まれる。

国内の流行監視の上からは輸入食材や動物の検査と広東住血線虫などすでに定着した寄生虫の追跡監視が行われなくてはならない。今年度の調査で輸入キムチから寄生虫卵が高頻度で検出されたこと及びこの事実が検疫所の検査では見落とされていたことは、少なくとも生鮮野菜などの寄生虫卵汚染の監視手段がないことを意味する。今回の検討で用いたキムチの虫卵検出法は時間と人手を要する検査手技であり、日常の検疫業務に実施を求めることは現状では不可能である。その意味で簡易検査法開発が望まれる。これまで本研究班で蓄積した標準抗原・抗体を利用した簡易検査法実用化を継続して進めるべきであろう。キムチから分離された虫卵が実際にヒトへの感染性を持っているか否かは不明であるが、商品の鮮度によっては可能性を否定できないし、寄生虫の種類によっては有鉤囊虫症など臨床的に重篤なものが発生する可能性も否定できない。広東住血線虫の問題にしても沖縄県で死亡例が発生したことを考えると、首都

圏での広範な生息分布の状況は危険情報として地域の行政関係者に伝達すべきことと考えている。ヒトへの正確な感染ルートが明らかでないため、正確な予防策策定には今後の研究が待たれる。

新規診断法として開発を進めた蠕虫症のPCR診断は今後の流行監視のために少なくとも日本国内にあっては有効な手段として応用が考えられる。PCRは汎用技術であり特殊専門領域の知識や経験を必要としないため、食材や野外サンプルの検査に用いれば有用な情報となる。山梨県では日本住血吸虫中間宿主貝であるミヤイリガイが多数生息しているが山梨県による監視事業はすでに終了しており、専門家は配置されていない。臨時の調査にもPCRで対応できるのであれば今後も安定して監視体制を維持することが出来る。

医療対応としては最終的に治療まで行うことが患者の立場からは要求されるが、新興蠕虫感染症の多くは今日なお有効な治療薬がない。特にアライグマ回虫による幼虫移行症や広東住血線虫症など死亡例も見られる疾患では治療薬開発が急がれる。そのためにも動物実験でヒトの病態に近いモデル動物が開発されたことは今後の新たな展開を期待することが可能となったとあってよい。イヌ回虫症でも眼球内移動に至ったものでは本当に外科手術しか治療法がないのか、薬物療法の妥当性はどうか、などスナネズミの実験感染で新しい情報を得ることが出来るであろう。腸管寄生線虫の宿主粘膜の遺伝子発現で明確な発現プロファイルが見られたことは新しい治療標的探索にも繋がるもので、これらは新規駆虫薬開発に進める必要がある。CILIPは寄生虫感染宿主においてある種の病態の抑制因子となることもわかったが、その機序は依然として不明である。しかし示された実験結果は寄生虫感染宿主における病態修飾機構の一つとしてCILIPが関与していること、その機序は宿主細胞の各種サイトカインなど応答調節システムに対する応答性の低下によることなど興味ある事実を含んでおり、これらも新しい蠕虫症予防・治療戦略に応用が期待される。

E. 結論

わが国の輸入蠕虫感染症に対する監視と医療対応整備の課題として挙げた情報システム整備、診断・検出システムの開発、病態解析の実験研究を進め、それぞれの課題解決に必

要な新規情報を修めた。データベースの整備が進んだので、今後は医療現場のニーズに即した情報提供に改良を図ると共に、個別症例登録によってわが国の輸入蠕虫症動向のより実態に近い把握が可能となりつつある。国内監視の上で重要なことは診断や検出の新規技術開発であり、簡易迅速診断キット開発や PCR による DNA 診断の標準化、顕微鏡的視認に依らないスクリーニング法開発など行政にも応用可能な手技の開発が進んだ。病態解析研究はまだ実験研究の段階であるが、少なくともヒト病態解析のためのモデル動物が確立したことは今後の治療法開発への第一歩として大切な進歩であった。本研究を通じて得られた情報や技術は医療現場や行政部局に積極的に還元して、本法の輸入蠕虫感染症防止に貢献することに努めたい。

F. 健康危険情報

輸入キムチから高頻度で蠕虫卵が検出されたため、今回の調査結果は厚生労働省に報告し、健康被害に関する注意を喚起した。ただし、混入している虫卵がヒトに感染しうるものであるか否かは未だ結論は得られていない。

G. 研究発表

Osada Y, Kumagai T, Hato M, Suzuki T, El-Malky M, Asahi H, Kanazawa T & Ohta N.: Establishment of *Schistosoma japonicum* calpain-specific mouse T cell hybridoma and identification of a T cell epitope that stimulates IFN γ production. *Vaccine*, 23 : 2813-2819, 2005.

Tanaka Y, Hanada K, Orito E, Akahane Y, Chayama K, Yoshizawa H, Sata M, Ohta N., Miyakawa Y, Gojobori T & Mizokami M.: Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C endemic of Japan. *J. Hepatol* 42:47-53, 2005.

Lu SH, Kumagai T, Ai QH, Yan XL, Ohmae H, Yabu Y, Li SW, Wen LY, Maruyama H, Ohta N.: Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. *Parasitol Int*, 55: 63-68, 2006

太田伸生：中国の住血吸虫症 住血吸虫症と宮入慶之助—ミヤイリガイ発見から90年—。九州大学出版会、pp.131-141, 2005.

太田伸生：住血吸虫症における Th2 シフトとサイトカイン。臨床免疫（印刷中）

太田伸生：Endemic Tropical Diseases—取り残された感染症の問題を考える。感染症学雑誌（印刷中）

Ming-gang Chen Xiao-nong Zhou and Kenji Hirayama.: Asian Parasitology. Vol.5 Schistosomiasis in Asia. The committee of Asian unique strategy for controlling Asia's Parasitic diseases by Asian Parasitologists (AAA) and The federation of Asian Parasitologists (FAP). 195-278, 2005

平山謙二：住血吸虫症と体質 住血吸虫症と宮入慶之助—ミヤイリガイ発見から90年—。pp.103-108、宮入慶之助記念誌編集委員会編、九州大学出版会 2005年。

Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Arizono N.: Altered expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelium during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rat. *APMIS*, in press, 2006.

山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有蘭直樹, 藤村敬之, 藤村武史, 藤田拓司, 田中俊也, 加藤久登：日本における *Clinostomum* 属吸虫の人体寄生第22例目。Clinical Parasitology, in press. 2006.

有蘭直樹：アニサキス症、肝吸虫症、蟯虫症、鉤虫症。鞭虫症、幼虫移行症幼虫移行症の項。感染症予防必携（山崎修道編）、日本公衆衛生協会、p6-7、77-78、107-108、138-139、356-357、403-407、2004.

Akao N.: Human dirofilariasis in Japan. In: Kimura E, Rim, H.-J., Dejian, S. & Weerasooriya, M.V., editor. Filariasis in Asia and Western Pacific Islands. Tokyo: AAA Committee, The Federation of Asian Parasitologists, 145-152, 2005.

Akao N. : Critical assessment of existing and novel model systems of toxocariasis. In: Holland C, Smith H, editors. *Toxocara*: The Enigmatic Parasite. Oxfordshire: CABI Publishing, 74-85, 2005.

Ayi I, Akao N, Bosompemb KM, Akafo SK, Clarke J, Nyador L, Apea-Kubi KA, Fujita K.: Development of membrane-based tests for the

detection of urinary antigens and antibodies in human toxoplasmosis preliminary studies in Ghanaian patients. *Acta Tropica*, 93:151-159, 2005.

Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T.: The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Veterinary Parasitology*, 129:83-87, 2005.

Sato H, Une Y, Kawakami S, Osanai A, Kamiya H, Akao N, et al.: Fatal *Baylisascaris procyonis* larva migrans in a colony of Japanese macaques in a safari-style zoo. *Journal of Parasitology*, 91:716-719, 2005.

Satou T, Horiuchi A, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T.: *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst beta-carboline alkaloids-in vitro and mouse studies. *Experimental Parasitology*, 110:134-139, 2005.

Suzuki T, Joko T, Akao N, Ohashi Y.: Following the migration of a *Toxocara* larva in the retina by optical coherence tomography and fluorescein angiography. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 49:159-161, 2005.

川瀬正昭, 赤尾信明, 名和行文, 影井昇, 渡辺直熙, 新村真人: 旋尾線虫幼虫type-Xによる creeping eruptionの1例。臨床皮膚科、59:490-493, 2005.

芦田敦子, 河内繁雄, 斎田俊明, 高木雅哉, 赤尾信明: 旋尾線虫幼虫による creeping disease-自家製ホタルイカ沖漬けの生食により生じた1例。皮膚科の臨床、47:749-752, 2005.

赤尾信明, Chu AE: 演者開発による寄生虫抗体迅速検査キット。臨床寄生虫学雑誌、16:11-14, 2005.

鈴木崇, 上甲武志, 陳光明, 大橋裕一, 赤尾信明: 眼トキソカラ症の診断におけるトキソカラチェックの有用性。あたらしい眼科、22:263-266, 2005.

Hayashi E, Tuda J, Imada M, Akao N, Fujita K.: The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among school children in Manado, Indonesia.; *Southeast Journal of Tropical Medicine and Public Health* (in press), 2006.

Nakamura-Uchiyama F, Tokunaga Y, Suzuki A, Akao N, Hiromatsu K, Shigemi H, et al.: A case of *Ascaris suum* visceral larva migrans diagnosed by using *A. suum* larval excretory-secretory (ES) antigen. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*. (in press), 2006.

2. 学会発表

平山謙二: Vaccine and Diagnosis tool development for Schistosomiasis control. 日本熱帯医学会九州支部会、1月21~22日。

Honggen Chen, Shuying Xiew, Jun Ge, Dan Dan Lin, 菊池三穂子、平山謙二: 日本住血吸虫の感染負荷量を決定する循環抗原測定系の開発。日本寄生虫学会第74回大会、平成17年4月8-9日、鳥取市。

Kenji Hirayama Immunity in Schistosomiasis.: Scientific Working Group Meeting on Schistosomiasis. WHO/TDR, Switzerland, Geneva, 14-16, Nov. 2005.

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

実験室内試料及び野外サンプルを用いた日本住血吸虫症の DNA 診断法の試験研究

分担研究者：太田伸生（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

共同研究者：金澤 保（産業医科大学）

吉田彩子・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：輸入蠕虫症監視に PCR 法を応用した簡易検査法確立が実用価値が高いと考え、日本住血吸虫症の国内での流行再興にどのような応用が期待できるかを検討した。昨年度の研究を通じて、日本住血吸虫に特有の配列で且つゲノムあたりのコピー数が際立って多い遺伝子を同定してその検出のための PCR の条件を確立した。今年度はその PCR 手技を用いて、早期診断に応用する可能性、野外採取サンプルを用いる場合の問題点などについて検討した。ゲノムあたりのコピー数が 1 万以上に亘る *Sjal* を標的とした PCR ではマウスの実験的感染後 2 週で末梢血サンプル中に特異バンドを検出することが出来た。また実験室内で感染させたミヤイリガイも 1 隻のミラシジウムが存在すれば PCR で検出できた。野外採集サンプルでの実用性を調べるために流行地で得た *Oncomelania hupensis* から DNA を抽出して PCR を行うと感染陽性貝を検出することが可能であった。ヒトや大型家畜などの終宿主の糞便を材料とする PCR の実用性を検討したが、特異バンドを安定的に検出することは出来なかった。PCR の条件が必ずしも至適でない可能性があり、今後の検討を要する点であった。

A. 研究目的

蠕虫症の確定診断は一般に虫卵や虫体の目視によるため、医療機関における臨床対応や検疫業務などにおける検査に際して寄生虫学的訓練を受けた経験のある検査者がことが望ましいが、今日の国内の人的資源から考えればそれは不可能に近い。そのために一般的な検査手技を用いて確定診断が出来るように、血中の寄生虫由来循環抗原検出や寄生虫 DNA の検出などを代替検査法として開発していく必要がある。検査試料中の蠕虫由来 DNA を PCR 法により検出する方法は寄生虫学的経験のない検査者にも実施可能な蠕虫診断手技として期待される。昨年の本分担課題で PCR による日本住血吸虫症の DNA 診断の可能性を検討し、実験室レベルの動物感染に応用可能な PCR 法を確立したので、本年度はそのより詳細な実用化検討と野外採取サンプルへの応用性を確認する実験を中心に研究を進めた。

B. 研究方法

PCR の標的遺伝子として日本住血吸虫に特異的であり、かつゲノム中に 10,000 コピー以上が存在する *Sjal* を選定して検討した。日本

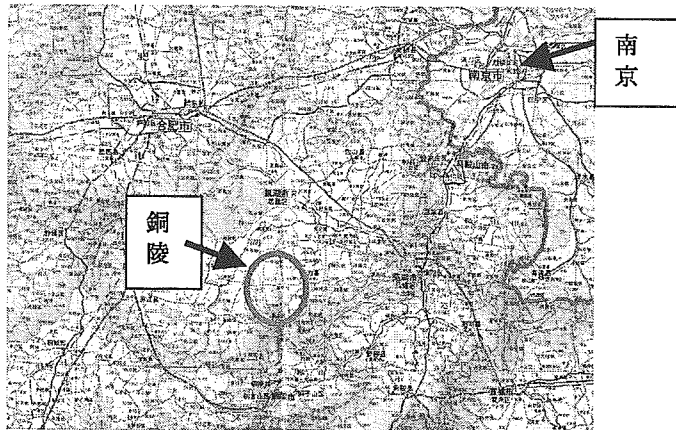
住血吸虫感染マウスの早期診断に応用する目的でセルカリア 20 隻感染 BALB/c マウスの血清を感染後 2 週で採取して PCR に用いた。

実際の疾病監視の目的のために中間宿主貝 (*Oncomelania sp.*) の感染を検出することの可否を検討した。中間宿主貝の中ではミラシジウム、スポロシスト、セルカリアの 3 つの発育ステージが存在しているが、少なくともミラシジウムとセルカリアは *Sjal* 検出のための住血吸虫試料として使用できることを確認しているが、中間宿主貝の感染早期の検出における問題の有無を確認した。山梨産の中間宿主貝 (*Oncomelania nosophora*) に 1 貝あたりミラシジウムを 0.4 隻、10 隻、2.0 隻感染させた 4 時間後のものから DNA を抽出して PCR に用いた。

今年度は PCR 診断法を流行地の中間宿主貝の感染モニタリングに用いることが可能か否かを検討する目的で中国の流行地で採取した貝を PCR の試料にしてみた。採取地は中国安徽省銅陵市の揚子江流域の流行地ですべて *O. hupensis* である (図 1)。それぞれの貝は圧平してセルカリアの有無を確認し、DNA を抽出して PCR で *Sjal* を増幅した。比較のために山

梨産のミヤイリガイからも DNA を抽出して PCR に供した。

図1 中間宿主貝採取を実施した中国の流行地



中国国内の重要な保虫宿主である水牛の糞便を用いた PCR も検討した。中国安徽省の流行地で採取した水牛の糞便を検便にて EPG を算定し、同じサンプルからヒト糞便内 DNA 抽出キットを用いて DNA を得て *Sjal* 検出の PCR 用の試料とした。

(倫理面への配慮)

本実験は名古屋市立大学の動物実験委員会にて審査を受けて承認された上で実施した。

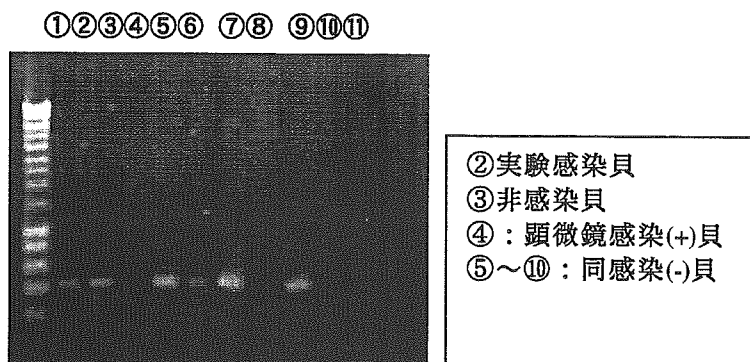
C. 研究結果

1. *Sjal* 検出の PCR による感染早期診断の可能性：日本住血吸虫感染マウスの血清を用いた場合、感染 4 週で *Sjal* の検出が可能であることはすでに示していたが、今回調べた感染 2 週マウス 3 例はすべて特異バンドを PCR で示

した。少なくとも感染 2 週で血中に日本住血吸虫 DNA が循環していることが明らかになった。中間宿主貝にミラシジウムを感染させたものでは、1 貝あたり 0.4 隻セルカリア感染の場合で検出が可能であった。

2. 流行地で採取した中間宿主貝からの *Sjal* 検出：圧平した貝から湧出するセルカリアの有無により感染(+)と(-)の判定を顕微鏡的に行った。その DNA を PCR にて増幅して *Sjal* を検出した。感染(+)と判定した貝は PCR にても特異バンドを示した。一方、顕微鏡的に感染(-)と判断した貝 7 固体中、3 個体が PCR にて陽性と判定された (図 2)。しかし山梨産のミヤイリガイを調べた場合は全ての個体が PCR で陰性であった。

〔図 2〕 流行地採取貝の PCR 検査



3. 水牛糞便を用いた PCR 診断応用の検討：調べた水牛の糞便の EPG は高いもので 4 程度の感染濃度であった。そのようなサンプルを用いた PCR では今回検討した条件で特異バンドを検出することができなかった。

D. 考察

住血吸虫感染を PCR による寄生虫 DNA の検出による試みはすでに Manson 住血吸虫の診断に用いる試みがなされている。しかしプライマーの設定には Manson 住血吸虫のケースを日本住血吸虫にそのまま当てはめることは不可能であり、本研究課題で検討したように日本住血吸虫感染では独自の PCR 条件を確立する必要がある。確定診断に寄生虫 DNA 検出を以て判断することの妥当性は今後も継続して検討する必要があるが、今回の検討では感染後 2 週においてすでに診断が可能となったことは、従来の如何なる方法によっても不可能であったごく早期の診断が今後は可能になることを示唆している。さらに例数を増やして特異性、感度の評価を進めることが望まれる。

一方、PCR 診断の当面の応用分野として中間宿主貝の監視が考えられる。その検査法として貝を圧平して遊出するセルカリアを顕微鏡で観察する方法が採られているが、ミラシジウム感染直後や少数のスポロシスト寄生の段階では見落としの可能性が高い。今回、中国の流行地で採取した貝の PCR 検査では顕微鏡で感染(-)と判定した個体の 4 割で PCR 陽性となったことは、false-positive でないならばセルカリアに発育する以前の感染貝を PCR で検出した、との解釈が可能である。山梨産のミヤリガイを用いた場合に PCR 陽性サンプルを見出していないので、今回の結果が false-positive であった可能性は高くないと考えている。これについても検査法としての信頼性を高めることにより、日本国内の中間宿主貝の監視に応用が出来る方法である。

PCR 診断法開発はヒトを含む終宿主に応用できることを最終的に目指しているが、今回の研究では感染水牛糞便で十分な検出効率が得られなかった。その原因は複数考えるべきであり、第一に糞便中の PCR 阻害物質が PCR 診断を妨げたこと、第二に検討した感染水牛の EPG が低く検出限界を下回っていたこと、第三に水牛の糞便は量的に多く、サンプリングの方法が今回の目的に合っていなかったこと、

などである。糞便の何処からどれくらい採取すべきか、現時点では判断の材料を持っていない。

以上の成績から、日本住血吸虫感染の PCR 診断法は十分に実用の可能性があることが考えられたが、検便に代わる確定診断の方法としては問題が残された。しかし、流行地の監視事業として行われる中間宿主貝の感染率調査には十分に応用が可能であり、従来の方法で検出できなかったものを検出できるようになる、という意味で感度の改善に貢献しうる新規診断法と考えられる。

E. 結論

日本住血吸虫症診断法としての PCR による DNA 診断は感染 2 週間後という従来のどの方法によっても困難であった早期診断を可能にすることが示された。マウスという小型実験動物と条件の異なる大型動物での実用性検討が次の課題である。中国における重要な保虫宿主である水牛の糞便を用いた PCR 診断は今回検討した条件では安定した成績を得ることが出来ない。一方、中間宿主貝の監視には PCR 診断は有用であると思われ、従来の顕微鏡検査では見逃されていたと思われるミラシジウムやスポロシストなどの発育ステージも PCR では検出することが可能である。寄生虫学的な知識・経験を必要としない検査法であるため流行地での疾病対策だけでなく、国内の検査機関における輸入感染症監視事業にも広く応用性が期待される。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究発表

論文発表

1. Osada Y, Kumagai T, Hato M, Suzuki T, El-Malky M, Asahi H, Kanazawa T & Ohta N. Establishment of *Schistosoma japonicum* calpain-specific mouse T cell hybridoma and identification of a T cell epitope that stimulates IFN γ production. *Vaccine*, 23 : 2813-2819, 2005.
2. Tanaka Y, Hanada K, Orito E, Akahane Y, Chayama K, Yoshizawa H, Sata M, Ohta N, Miyakawa Y, Gojobori T & Mizokami M. Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C endemic of Japan. *J. Hepatol* 42:47-53, 2005.
3. Lu SH, Kumagai T, Ai QH, Yan XL, Ohmae H,

Yabu Y, Li SW, Wen LY, Maruyama H, Ohta N.
Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate
against experimental *Schistosoma mansoni*
infection in mice using different treatment protocols.
Parasitol Int, 55: 63-68, 2006

4. 太田伸生 中国の住血吸虫症 住血吸虫症
と宮入慶之助—ミヤイリガイ発見から90年—、
九州大学出版会、pp.131-141, 2005.

5. 太田伸生 住血吸虫症における Th2 シフト
とサイトカイン 臨床免疫 (印刷中)

6. 太田伸生 *Endemic Tropical Diseases*—取り残
された感染症の問題を考える 感染症学雑誌
(印刷中)

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

国内市販の輸入キムチの寄生虫卵混入の実態把握と検査法に関する考察

分担研究者：太田伸生（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
共同研究者：吉田彩子（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：近年の中国など近隣アジア諸国から生鮮食品、特に野菜の輸入増加は蠕虫感染症の移入ルートの一つとして監視をすべきであるがそのための技術開発が十分でなく、行政的な監視も十分に機能しているとは考えられない。2005年に国際的に議論のあった中国産野菜を原料に用いたキムチから寄生虫卵が検出された問題では韓国国民の不安を招いたところであるが、日本国内では実態把握が出来ないため傍観に終始した。本研究班では日本で市販されている輸入キムチの寄生虫卵汚染状況について実態を把握すべく調査を実施したところ、市販の6商品中2種から蠕虫卵が検出された。虫種の同定は出来なかったが形態的に回虫卵様のもの、鞭虫類似のものなどが検出された。原産地表示で「日本産」とされているものからは寄生虫卵は検出されなかった。従来からキムチの虫卵汚染の可能性が指摘されていて、その検査法として浮遊法が推奨されていたが、今回の検査では浮遊法では何れも陰性であり、遠心沈殿による検査によって検出が可能となった。今後の検査手技には改善が必要であることが明らかになった。

A. 研究目的

輸入蠕虫症の移入ルートは多様であるが、生鮮食品、特に野菜の蠕虫卵汚染の可能性は否定できず、わが国の保健行政の中では適切な監視体制を構築する必要がある。しかし現時点では検疫などの行政の仕組みの中で効率的に監視する技術面の開発が十分でなく、監視そのものが機能していない可能性が高い。キムチは白菜を原料に用いる加工食品であるが、原料となる野菜に蠕虫卵が付着していた場合、一部の寄生虫の場合は一定期間感染力を保持できるものもあり、感染源となる可能性は否定できない。2005年には韓国国内で輸入野菜を原料にしたキムチに寄生虫卵が混入していたことが問題となったが、わが国では公式発表としてそのような事例はない、とされていた。しかし、検査法は浮遊法による簡易検査であったため、本研究班では詳細な検討は行うべきであると判断し、遠心沈殿法も行って輸入キムチに寄生虫卵混入がないのか事実を明らかにする検討を実施した。

B. 研究方法

名古屋市内で市販されているキムチをランダムに9商品購入して検査した。商品に表示された原産地標記に基づいて日本産3種類、輸入6種類として検査した。国産3種のうち1商品は「白菜は中国から輸入」とされていた。輸入6種類のうち5種類は韓国産、1種類は中国産と表示されていた。検査法はキムチ100gを洗浄液〔Antiform A 添加 0.5% Tween 80-クエン酸緩衝液〕で静置沈殿させ、メッシュで夾雑物を除いた後遠心沈殿し、エーテルにより脱脂を行った後、さらに遠心して沈査を鏡した。

（倫理面への配慮）

特に必要としない

C. 研究結果

検査した日本産キムチ3種については、輸入白菜を使用した商品も含めて寄生虫卵は検出さ

れなかった。一方、輸入キムチ6種類からは2種類(33.3%)から何らかの蠕虫卵が検出された〔図2〕。形態的には判定が困難であるが線虫卵であることは間違いないと判断された。一部は

図2



D. 考察

現行の国内流通輸入キムチに関していえばかなりの商品に何らかの蠕虫卵汚染があることは間違いない事実である。その原因は不明であるが、新聞報道であったように、輸入生鮮野菜に付着していた寄生虫卵が除去されないままにキムチという加工食品にされて出荷されていたことが可能性として考えられる。現時点ではこれらの虫卵がヒトの寄生虫卵であるのか、またそうであったとしても感染力を保持しているものであるかについては結論は得られていない。今後の検討が必要である。

そのような問題はキムチに限定することは妥当ではない。韓国に輸入された野菜が何処からのものかは現行の表示では追跡できないが、わが国に近隣アジア諸国から大量の野菜の輸入がされている現実からすれば、輸入野菜にも寄生虫卵が付着していると考えの方が良いと思われる。問題はそれをどのようにしてサンプリング検査を行うかであり、従来の古典的な寄生虫学検査では十分な監視は事実上不可能である。精度の高い簡易検査法の開発が待たれる。

キムチの検査法についてはすでに検査手技の報告が寄生虫学会等でなされていた。現在もわが国の検疫検査ではその方法〔浮遊法〕を踏襲していると聞いているが、今回の調査では浮遊法による限り寄生虫卵は全て陰性であった。遠心沈殿法を行って初めて虫卵検出が可能となっ

DNA 配列の比較から *Ascaris* 属と相同であることが示唆されている〔太田私信〕。

たのであり、検査法の改善は図らなければならないであろう。しかしその検査手技は時間と労力が大きな検査手技で、一般の行政検査機関でルーチン業務として実施するのは不可能と思われる。これについても簡易検査法の開発が必要である。

E. 結論

日本国内に流通する市販キムチを調査したところ、輸入キムチの3割から寄生虫卵が検出された。それがヒトに感染するものであるか否かについては結論が得られていない。従来の検査手技では検出が困難であるため、検査法の改善を行う必要があると共に、キムチのような加工食品でなく、生鮮食品を通じた蠕虫症輸入に関する監視強化が望まれる。

F. 健康危険情報

輸入キムチの寄生虫卵汚染については厚生労働省に危険情報として通告した。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

輸入蠕虫症調査と腸管寄生虫感染の小腸粘膜免疫に関する研究

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：輸入蠕虫症調査の一環として、平成 17 度は輸入キムチに含まれる寄生虫卵の調査を行った。対象は大阪、滋賀の小売店から購入した輸入キムチ 14 品目であった。中国原産 3 品目中 2 品目に寄生虫卵類似虫卵が、韓国原産 10 品目中 2 品目に寄生虫卵類似虫卵が、原産地不明の 1 品目に回虫卵類似虫卵が検出された。今後の問題として、種の同定と寄生虫卵の生死を明確にすることが安全性の上から重要であると考えられた。

平成 15, 16 年度は開発途上国において最もコモンな腸管寄生蠕虫症が健康に及ぼす影響に関する研究を実施したが、平成 17 度は鉤虫症モデルである *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 感染ラットを用いて腸管寄生虫に対する粘膜障害防御機構の解明に関する実験的研究を行った。Nb 感染ラット小腸上皮細胞を単離し、杯細胞関連遺伝子の発現を real-time PCR 法で経時的に追跡した結果、感染初期の Nb が小腸に定着する時期に粘液コア蛋白 MUC2、intestinal trefoil factor TFF3 及びシアル酸転移酵素 Siat4c の発現増強が見られ、これらの変化は T 細胞非依存性の急性期反応であると解された。Nb が性成熟する時期から排除される時期（感染 1-2 週間）には、粘液コア蛋白 MUC3, 4, resistin like-molecule (Relm) β 、硫酸基転移酵素 3ST1 の発現増強が見られ、線虫排除との関連が推測された。線虫を排除しない胸腺欠損 rnu/rnu ラットでは Relm β 及び 3ST1 の発現が対象 rnu/+ラットより有意に低値であった。これらの結果から、線虫感染によって各種の杯細胞関連遺伝子が経時的に発現パターンを変化させることが明らかになった。線虫排除時期に発現増強する遺伝子をさらに詳しく解析することにより新規の蠕虫防除因子が見出される可能性も示唆された。

I. 輸入蠕虫症の調査、特に輸入キムチの寄生虫卵調査

A. 調査目的

平成 17 年、中国産及び韓国産キムチに寄生虫卵が見出されたとの報道があった。わが国でも過去にキムチを介する腸管寄生虫感染が疑われた事例の報告があったが、いずれも推測の域をはず、いままで疫学的に調査さ

れたことはない。今回、本研究班による調査の一部を分担し、主に大阪における輸入キムチの寄生虫卵調査を行った。

B. 調査方法

2005 年 11 月中旬から下旬にキムチ 14 品目を大阪市 (No. 1-13) および滋賀県大津市 (No. 14) の小売店から購入した (表 1)。

寄生虫卵検出は村田ら (2003) の方法を

modify した。

1. キムチ 100 g を洗浄液(*) 200 mL 中でよく攪拌し 10 分放置
2. キムチ (白菜) を 1 枚づつ、新しい洗浄液 200 mL 中に入れスターラーで攪拌しつつよく洗浄
3. 上記(1)(2)の洗浄液をガーゼ 2 枚でろ過
4. ろ液を 500 mL のメートルグラスに入れ一夜放置
5. 沈渣を 50 mL コニカルチューブに入れ、エーテルを 1/5 -1/10 容量添加し震盪
6. 遠心後上層を捨てる。
7. 沈渣を適量の水で希釈し鏡検
*0.1M クエン酸緩衝液 pH4.0 に antifoam 0.015% (v/v), Tween 20 0.5% (v/v) を添加

C. 調査結果

表 1 に示したごとく中国原産 3 品目中 2 品目に寄生虫卵類似虫卵が、韓国原産 10 品目中 2 品目に寄生虫卵類似虫卵が、原産地不明の 1 品目に回虫卵類似虫卵が検出された。

表 1. 輸入キムチからの寄生虫卵類似卵の検出

No.	原産地	検査結果
1	中国	陰性
2	中国	鉤虫卵類似 1 個
3	中国	鞭虫卵類似 1 個
4	韓国	陰性
5	韓国	陰性
6	韓国	陰性
7	韓国	陰性
8	韓国	陰性
9	韓国	陰性
10	韓国	陰性
11	韓国	不明虫卵様 2 個
12	韓国	陰性
13	韓国	鞭虫卵様 11 個
14	不明	回虫卵様 8 個, 鞭虫様 1 個

注: No. 1-13 は大阪市、No. 14 は大津市で入手

各品目 100 g 当りの検出数は表 1 に示したごとく少数で、最大のもので No. 13 の 11 個であった。形態的には、鉤虫卵類似、鞭虫卵類似、回虫卵類似および分類不可に 4 大別

されたが、高濃度食塩及び種々のスパイスの含まれたキムチ中に長期間浸漬されているため、形態は変化しており虫卵形態での種同定はきわめて困難であった。

なお、No. 14 (図 1) については、国立感染研寄生虫部で DNA 分析され、回虫属であることが確認され、この点については別に報告されるものと思う。



図 1. No. 14 から検出された回虫卵様の虫卵

寄生虫卵の生死については、今回、検出数が少数であったことから判定しえなかった。しかし、今回観察された虫卵の大半は、卵殻内に桑実胚、蝌蚪期幼虫あるいは幼虫を包蔵していたことから、キムチに混入された後、ゆるやかに発育が進行したものと考えられた。1 個の虫卵では、観察中に卵殻が破損し内部から幼虫が出てきたが、これには運動性は見られず、死んでいるものと判断された。

D. 考察

輸入キムチから一定の頻度で寄生虫類似卵が検出されることが明らかになった。しかし、キムチから検出される虫卵数が少数であることと、高濃度食塩及び種々のスパイスの含まれたキムチ中に長期間浸漬されているための形態変化のため、形態学的な種同定は容易でなかった。本調査の No. 14 については、数個の虫卵をピックアップし、国立感染症研究所で DNA による種鑑別を実施した結果、回虫属の虫卵であることが明らかになったが、その他の虫卵については種鑑別はなしえなかった。従来から、ヒト腸管寄生虫症の多くは糞便内虫卵の形態学的検査で容易に種同定がつくために、虫卵からの DNA 抽出による鑑別法は開発されてこなかったが、今後一定の寄生虫症に対する簡易 DNA 診断法を

開発しておく必要があると思われる。種鑑別については、ヒト由来寄生虫卵のみが問題ではなく、幼虫移行症を生じる動物由来寄生虫も含めて鑑別すべきであろう。

虫卵の生死については、今回一定の方法で観察することはできなかったが、上述のごとく形態観察された多くの虫卵は卵殻内に桑実胚、蝌蚪期幼虫あるいは幼虫を包蔵していたことから、キムチに混入されれば、ただちに虫卵は死ぬわけではなく、少なくとも卵殻内でゆるやかに発育が進行するものと推測された。今後、虫卵の生死鑑別の簡易な鑑別法を開発する必要がある。

輸入キムチで公衆衛生学的にもっとも問題となるのは、回虫、イヌ蛔虫、有鉤条虫などの虫卵が混在している場合であろう。過去にも、胆道内回虫迷入症（杉山誠一他、岐阜県立岐阜病院年報 10 : 121-5, 1992）や神経有鉤囊虫症（三宅祐治他、脳神経外科 21:561-5, 1993）など、キムチが原因の可能性が指摘された症例がわが国から報告されている。

現在のところ、日本国内でこれらの症例数が近年格段に増加しつつある様子はうかがえないが（図 2）、これらの症例の少なくとも一部が輸入野菜やキムチに由来している可能性は今回の調査からも否定できず、疫学的な動向調査の継続が必要である。

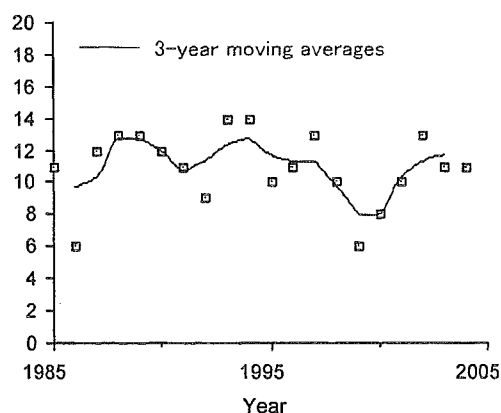


図 2. 日本における回虫症の症例報告数の年次推移。

結論

大阪、滋賀の小売店から購入した輸入キムチ 14 品目における寄生虫卵を調査した。中国原産 3 品目中 2 品目に寄生虫卵類似虫卵が、韓国原産 10 品目中 2 品目に寄生虫卵類似虫卵が、原産地不明の 1 品目に回虫卵類似虫卵が検出された。今後の課題として、種の同定と寄生虫卵の生死を明確にすることが安全性の観点から重要であると考えられた。

II. 腸管寄生虫感染の小腸粘膜免疫に関する調査研究

A. 研究目的

回虫、鉤虫、条虫などの古典的消化管寄生虫の感染は目に見える形での人体への影響が小さいことから neglected disease と呼ばれてきた。しかし、これら消化管寄生虫は小児の知的、身体的発育や成人の就労に影響を及ぼし、その結果、社会に全体に与える影響は決して小さなものではないことが明らかになりつつある。平成 15, 16 年度はそれぞれ、鉤虫症モデルとしての *Nippostrongylus brasiliensis* 感染ラットおよび寄生虫流行地域のヒトにおける小腸の病態および小腸粘膜免疫の特性について明らかにしてきた。平成 17 年度は、線虫感染に対する粘膜防御機構を明らかにする目的で、小腸杯細胞から分泌される粘液や非粘液分泌ペプチドに焦点を当て、これら分子の mRNA 発現を *N. brasiliensis* 感染ラットで解析した。

B. 研究方法

実験動物として BN 系、Fischer-344 系、マスト細胞欠損 Ws/Ws、及び胸腺欠損 rnu/rnu 及び対照 rnu/+ ラットを用いた。

N. brasiliensis L3 幼虫を 2,000 又は 1,000 感染後、経時的に剖検し、空腸を摘出後小腸上皮細胞を単離し、total RNA を抽出した。cDNA を合成後、real time PCR を実施し表 1 に示した各遺伝子の発現量を半定量化した。

表 2. Relative expression levels of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the gut mucosa of normal BN rats. Total RNA was extracted from epithelium separated from the jejunum, ileum or proximal colon, and RT-PCR was performed. Levels of each gene expression were normalized to that of β -actin. In the Table levels in the jejunum were arbitrary expressed as 1.00.

	Jejunum	Ileum	Colon
MUC2 (mucin core peptide 2)	1.0 \pm 0.2	4.5 \pm 1.8	153.2 \pm 49.8*
MUC3 (mucin core peptide 3)	1.0 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	7.5 \pm 3.0*
MUC4 (mucin core peptide 4)	1.0 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1	41.0 \pm 13.1*
Relm β (resistin-like molecule β)	1.0 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1	47.3 \pm 21.1*
TFF3 (intestinal trefoil factor)	1.0 \pm 0.4	2.7 \pm 0.5*	3.9 \pm 0.4*
Siat 4c (α -2,3-sialyltransferase IV)	1.0 \pm 0.2	11.7 \pm 4.1*	7.0 \pm 3.0*
3ST1 (3-O sulfotransferase-1)	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	15.4 \pm 3.0*
3ST2 (3-O sulfotransferase-2)	1.0 \pm 0.4	1.1 \pm 0.3	3.3 \pm 1.6
FUT1 (α -1,2-fucosyltransferase 1)	1.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	13.8 \pm 0.5*
FUT2 (α -1,2-fucosyltransferase 2)	1.0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3	14.3 \pm 2.8*
FUT4 (α -1,3-fucosyltransferase 4)	1.0 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1*	3.0 \pm 0.2*
Lew 1 (Lewis type 1 antigen synthase: β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5)	1.0 \pm 0.3	0.3 \pm 0.0	2.9 \pm 0.9

Data shown are mean \pm SE of 4 rats. *Significantly different from the levels in the jejunum ($p < 0.05$). UD: undetectable.

表 3. Number of goblet cells in the jejunum and ileum after *N. brasiliensis* infection.

Days after infection	Jejunum	Ileum
0	13.1 \pm 0.7	12.3 \pm 0.5
7	19.1 \pm 1.2*	14.9 \pm 1.2
14	21.5 \pm 1.2*	20.0 \pm 0.9*
21	11.3 \pm 1.0	11.3 \pm 1.3

Each measurement was performed on paraffin-embedded tissue sections. Figures in the table represent numbers of goblet cells/100 villus epithelial cells. All data are mean \pm SE of 4 rats. *Significantly different from day 0 ($P < 0.05$).

C. 研究結果

非感染 BN ラットにおける杯細胞関連遺伝子の発現レベルを空腸、回腸、大腸で比較したところ、全般的に大腸における発現レベルが高い結果が得られた (表 2) が、これは、大腸が小腸よりも杯細胞数が多いという事実を反映するものと思われた。

N. brasiliensis 感染後の小腸杯細胞数の変化を計測したところ、表 3 に示したごとく感染 7, 14 日後に杯細胞数の有意の増加を認められたが、*N. brasiliensis* の大半は排除された 21 日後には杯細胞数は感染前のレベルに低下していた。

BN ラットにおける杯細胞関連遺伝子の発現の 7, 14, 21 日後及び感染初期の 2, 3, 4, 5 日後の経時的変化を図 3 及び図 4 に示し、その要約を図 5 に図示した。感染初期の幼虫が小腸に到達する時期に粘液コアペプチド MUC2、粘液糖鎖末端のシアル化に参与する Siat 4c

及び非粘液分泌ペプチド TFF3 の upregulation が見られた。線虫が小腸内で成虫に発育し産卵を始める感染 1 週間後から、線虫が小腸から T 細胞依存性に排除される感染 2 週間には MUC2 及び TFF3 の発現は低下し、変わって MUC3, MUC4 の発現、硫酸基転移酵素 3ST1 及び非粘液分泌ペプチド Relm β の発現増強が見られた。Siat 4c の発現増強はこの時期まで維持されていた。一方、T 細胞依存性に線虫が排除された後にはこれらの発現は低下し、3ST2 の発現増強が見られた。

上述のような経時的な遺伝子発現増強は、原則的に線虫の寄生する空腸の上皮において生じ、線虫の寄生しない回腸の粘膜上皮では Relm β の発現増強を除いては見られなかった。

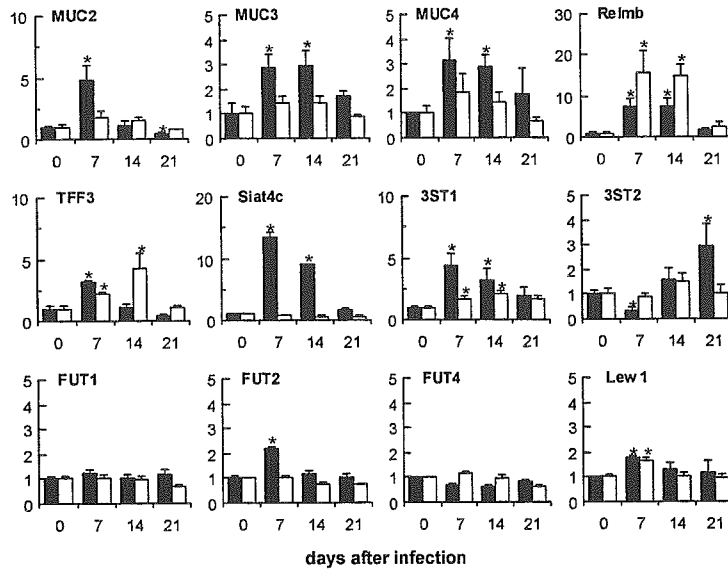


Figure 3. Expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the jejunal (closed columns) and ileal (open columns) villus epithelium of BN rats after infection with the nematode *N. brasiliensis*. Total RNA was extracted from the epithelial fraction, reverse transcribed, and relative quantification was carried out by RT-PCR. The quantified value for each sample was normalized with respect to that for β -actin. The data are means + SE of 4 animals. The vertical axis shows the expression levels, with day-0 average levels expressed as 1.0. *indicates values significantly different from the day-0 level ($P < 0.05$).

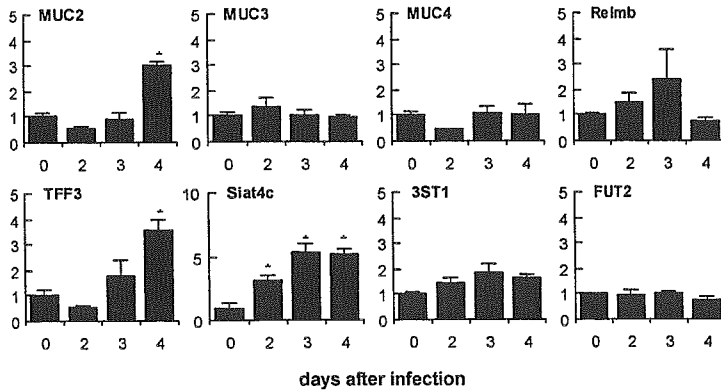


Figure 4. Expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the jejunal villus epithelium of BN rats in the early period after infection with the nematode *N. brasiliensis*. Total RNA was extracted from the epithelial fraction and semi-quantitative RT-PCR was performed as described in Fig. 1. The data are means + SE of 4 animals. The vertical axis shows the expression levels, with day-0 average levels expressed as 1.0. *indicates values significantly different from the day-0 level ($P < 0.05$).

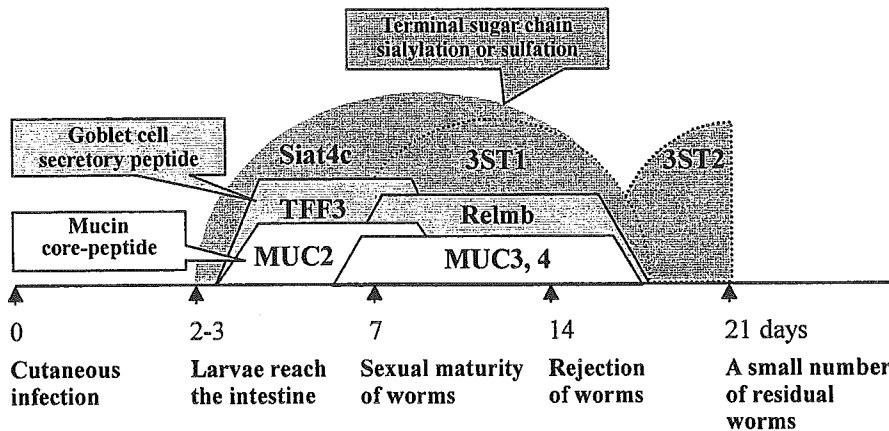


Figure 5. Successive upregulation of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelial cells during the course of *N. brasiliensis* infection.

F-344系ラット及びBNをbackgroundとするマスト細胞欠損Ws/WsラットでもBN系ラットと同様の結果が得られ、上述の変化はマスト細胞の活性化に依存しない変化であると考えられた（データ表示せず）。

一方、線虫を排除せず感染21日後にも持続的に線虫が寄生する胸腺欠損 rnu/rnu ラットにおいては、Relm β 及び3ST1の発現が対象 $rnu/+$ ラットより有意に低値であったが、MUC3, MUC4の発現レベルは rnu/rnu と $rnu/+$ 間で差を認めなかった（データ表示せず）。

D. 考察

本研究によって、小腸寄生線虫感染の感染初期から、成長期、産卵期、排除期、そして排除後に至るまで、杯細胞関連遺伝子の発現が経時的に変化していくことを始めた明らかにすることができた。杯細胞から分泌される粘液や非粘液ペプチドは一義的には粘膜防御作用を有すると思われる。感染初期に見られるMUC2, Siat4c, TFF3の発現増強はT細胞非依存性の急性期反応の1つと考えられ、MUC2粘液の増加、さらにSiat4cによる粘液のシアル化が粘膜防御になんらかの役割を果たしていると考えられる。

一方、線虫が産卵する時期から排除される時期にはMUC3, 4の発現増強が見られ、さらにRelm β 及び硫酸転移酵素の1つ3ST1の発現増強が見られた。胸腺欠損 rnu/rnu ラットでは、線虫の排除が生じないばかりか、Relm β 及び3ST1の発現増強が有意に低値であり、これらの発現がT細胞に依存性に生じている可能性が強く示唆された。非粘液ペプチドの線虫に対する作用や、硫酸基転移酵素3ST1の細胞膜糖鎖や粘液糖鎖の修飾への関与と線虫に対する作用などが今後の重要な課題となるものと思われる。

E. 結論

線虫感染によって各種の杯細胞関連遺伝子が経時的に発現パターンを変化させることが明らかになった。線虫排除時期に発現増強する遺伝子をさらに詳しく解析することにより新規の蠕虫防除因子が見出される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Arizono N. Altered expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelium during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rat. APMIS 2006 (in press)
- (2) 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 有菌直樹, 藤村敬之, 藤村武史, 藤田拓司, 田中俊也, 加藤久登. 日本における *Clinostoum* 属吸虫の人体寄生第22例目. Clinical Parasitology 2006 (in press)

2. 著書

- (1) 有菌直樹: アニサキス症, 肝吸虫症, 蟻虫症, 鉤虫症, 鞭虫症, 幼虫移行症 幼虫移行症の項. 感染症予防必携 (山崎修道編). 日本公衆衛生協会, p6-7, 77-78, 107-108, 138-139, 356-357, 403-407, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし