

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

Dot-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

分担研究者 赤尾信明

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

共同研究者

佐塚あゆみ

東京医科歯科大学国際環境寄生虫病学分野

研究要旨: 海外から輸入される動物が持つ病原体によるヒトへの感染のうち動物由来回虫幼虫移行症は国内での発症例が少ないこともあって、検査診断体制が確立されていない。われわれは、ウサギにおけるアライグマ回虫幼虫移行症の国内発症例を契機に、動物由来回虫幼虫移行症の免疫学的血清診断法の確立を目指し、各種幼虫排泄物抗原(LES)を用いた dot-ELISA による鑑別診断のための抗体検査法の確立とその標準化を目指した。用いた回虫属抗原はいずれもヒトに感染するステージの幼虫から無菌的に調整した LES で、イヌ回虫(Tc)、ブタ回虫(As)、アライグマ回虫(Bp)、クマ回虫(Bt)を同一膜上に吸着させた。また、抗原性の比較のためにアニサキス幼虫飼養液(An)を濃縮したものも同時に用いた。これら抗原と、イヌ回虫幼虫包蔵卵を実験的にラットに経口投与して 6 週後に採血して得たイヌ回虫感染血清を用いて、dot-ELISA の反応条件並びに異種回虫属 LES 間の交差反応性を検討した。イヌ回虫感染ラット血清と Tc を用いた検討から、膜への吸着に必要な抗原量は 35ng/dot と plate-ELISA 法の約 1/3 量でも十分に結果を視認できることが明らかとなった。また、イヌ回虫感染ラット血清は Bp や Bt とほとんど反応しなかったが、An との間には強い交差反応が認められた。また、これらの結果は plate-ELISA の結果ともよく一致した。以上よりイヌ回虫幼虫感染症における Tc の血清診断法における有用性が確認されたが特異性においてはなお改善の余地が示唆された。

A. 研究目的

今日の日本では寄生虫病に感染する機会は少なくなったとはいえ、近年の海外渡航者の増加や海外から輸入される食品や動物の増加に伴い、海外から持ち込まれる寄生虫によるヒトへの感染が懸念されている。

最近、ウサギにおけるアライグマ回虫幼虫移行症が国内で初めて報告された¹⁾。アライグマ回虫はアライグマを固有宿主とし、非固有宿主であるヒトに感染すると幼虫が体内を移行し重篤な幼虫移行症を引き起こすのであり、欧米などの野生アライグマが多く生息する

地域ではヒトの死亡例も報告されている。またペットブームによる国内のアライグマの増加につれて野生化したアライグマも増加しており、アライグマ回虫幼虫移行症の国内発生例が今後増加することが予想される。

さらに、日本で見られる回虫幼虫移行症の例としてイヌ回虫幼虫移行症が挙げられる。イヌを固有宿主とするイヌ回虫によって引き起こされる疾患で、公園などの砂場に散布されたイヌの糞やニワトリなどの肉の生食から感染することがある。イヌ回虫幼虫がヒト体内を移行し、眼部や内臓に深刻な被害をもたらした症例が数多く報告されている²⁾。

動物由来回虫幼虫移行症は発達途中の未成熟な回虫によって引き起こされるため、糞便検査による診断ができず、幼虫が非常に小さいために病理学的に証明することも非常に困難なので、免疫学的血清診断法が広く用いられている。しかし動物由来回虫幼虫移行症は国内での発生例が少ない事もあり検査診断体制が確立されていない。

免疫学的血清診断法の中でも plate-ELISA は感度が高く有効な検査法として用いられているが、検査をする為には高価な機器が必要なこと、検査に使用する多数の抗原の製作や維持管理が必要なことから特定の大学や検査機関で実施されるに留まっている。また術式が統一されておらずそれぞれの機関ごとに判定基準が異なるという難点がある。

plate-ELISA の他に寄生虫のスクリーニング検査法として dot-ELISA が挙げられる。dot-ELISA は結果が視認により判定できること

から高価な設備を必要しないなどの利点を持ち、感度、特異性が検討され、術式が確立されれば寄生虫症の血清診断にとって有効な診断法となることが考えられる。

本研究では、動物由来回虫幼虫移行症の診断の為に抗原特異性の高い幼虫排泄物抗原 (LES) を用いた dot-ELISA による抗体検査法の確立とその標準化を目的とした。

B. 研究方法

1. 抗原と血清

抗原: 用いた回虫属抗原はいずれもヒトに感染するステージの幼虫から無菌的に作成した LES で、イヌ回虫 (*Toxocara canis*: 以下 Tc), ブタ回虫 (*Ascaris suum*: 以下 As), アライグマ回虫 (*Baylisascaris procyonis*: 以下 Bp), クマ回虫 (*Baylisascaris transfuga*: 以下 Bt), アニサキス幼虫飼養液 (*Anisakis simplex*: 以下 An) である³⁾。plate-ELISA においてイヌ回虫 LES と成虫粗抗原を用い抗原特異性の比較検討を行った結果、LES の cut-off 値が低く粗抗原に比べ高い特異性を示すことを確認したので⁴⁾、本研究では回虫属 LES を用いた検討を行った。dot-ELISA において回虫属抗原との比較の為に宮崎肺吸虫、ウェステルマン肺吸虫、マンソン孤虫、イヌ糸状虫の 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4, 以下 PBS) 抽出粗抗原を用いた。抗原抽出は天野ら(1998)の方法に準じて行った。

イヌ回虫感染ラット血清: dot-ELISA の反応条件並びに異種回虫属 LES 間の交差反応を

検討するために、イヌ回虫幼虫包蔵卵 1000 個をラットに経口投与し 6 週間後に採血して得た血清を作製した。また 40 例の非感染ラットより採血しプールしたものを陰性対照とした。

ヒト血清: dot-ELISA による診断法の検討にはトキソカラ症, アニサキス症, 肺吸虫症, 肝蛭症, 孤虫症, フィラリア症(熱帯性好酸球増多症)と診断された患者血清を用いた。全ての患者血清は免疫学的に同種抗原に対する陽性反応を確認した。また 30 例の健康者より採血しプールしたものを陰性対照とした。

dot-ELISA: 術式は天野ら(1998)に準じたが一部以下のように改変して行った。

(1)ニトロセルロース(NC)膜への抗原感作

寄生虫抗原原液をPBSで希釈する際、感作するLESの蛋白量について検討した。粗抗原は天野ら(1998)に準じ $2 \mu\text{g/ml}$ で行った。調整した抗原液を $0.5 \mu\text{l}$ ずつNC膜に滴下した。また陽性対照として健常人の血清を 400 倍に希釈したものを $0.5 \mu\text{l}$ 滴下して 37°C で 30 分間乾燥させた。

(2)ブロッキング 0.005 % Tween 加 PBS100ml に BSA1g を加えてブロッキングバッファー(以下 BSA/T)を作成した。乾燥させた膜は BSA/T に 30 分間浸した後, 37°C で 30 分間乾燥させた後, 使用時まで密閉容器に入れ冷蔵保存した。

(3)一次反応 抗原で感作した膜を取り出し BSA/T に浸して湿らせてからペーパータオルで水気を切り, 箱型にしたパラフィルムの上に

置いた。そこに BSA/T で 200 倍に希釈した健常人の血清と, 検体をそれぞれ $70 \mu\text{l}$ のせ, 37°C で 40 分間反応させた。その後 0.005 % Tween 加 PBS で洗浄しペーパータオルで水切りした。

(4)二次反応 BSA/T でペルオキシターゼ(POD)標識抗体を希釈した。感染ラット血清では POD 標識抗ラット IgG ヤギ血清を 300 倍, ヒト血清の場合には POD 標識抗ヒト IgG ウサギ血清を 500 倍に希釈して用いた。それぞれ $70 \mu\text{l}$ を膜にのせ, 37°C で 40 分間反応させた後, 一次反応後と同様に洗浄した。

(5)発色と反応停止 エタノール 12ml で 4-クロロ-1-ナフトール(SIGMA CHEMICAL CO. Lot109H8200) 30 mg を溶解し, PBS63ml, 30%過酸化水素水 $37.5 \mu\text{l}$ を加えて作製した基質液に膜を浸し 7 分間発色させた後, 蒸留水で洗い酵素反応を停止し, 結果を観察した。

plate-ELISA: dot-ELISA と比較検討を行う為に plate-ELISA を用いた。術式は天野ら(1998)に準じて行い, LES の抗原蛋白量は $1 \mu\text{g/ml}$ に調整し 96 穴ポリスチレンプレートへ感作した。また陰性対照血清の吸光度の 3 倍以上を示す値を plate-ELISA での陽性と判定した。⁵⁾

吸収法⁷⁾:

(1) トキソカラ症患者血清の数検体に抗アニサキス抗体保有の可能性を疑い, LES を用いた吸収法を行った。An に高い反応性を示したトキソカラ症患者血清を BSA/T で 200 倍に希釈し, $2 \mu\text{g/ml}$ になるように Tc を添加し

37℃ 30 分インキュベートした。それを イヌ回虫感染ラット血清と Tc を用いて、

抗原位置(ng)

	NC	400	200	100
No		50	35	

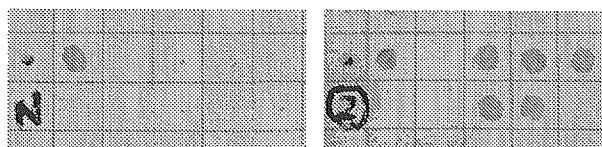


図 1 抗原蛋白量の検討 膜に吸着させる Tc の抗原蛋白量を 400～35ng の間で検討した。左:陰性対照血清, 右:イヌ回虫感染ラット血清

plate-ELISA にて測定した。

(2) 同じくアニサキス症血清の数検体に抗トキソカラ抗体保有の可能性を疑い, Anを用いた吸収法を行った。術式は前述と同様に行った。

(3) トキソカラ症の鑑別診断の為に, 交差反応を示した An, Bt に対し, あらかじめ An, Bt のそれぞれを添加し吸収を試みた。それぞれの濃度と 37℃での反応時間の組み合わせを 2 μg/ml-30 分, 2 μg/ml-45 分, 4 μg/ml-30 分とし検討を行った。

dot-ELISA の NC 膜に感作する抗原蛋白量に関する検討を行った。抗原蛋白量を 400～35 ng/dot の範囲で検討した結果, 35 ng でも十分に抗体を検出でき発色に問題がないことが確認できたので, 全ての抗原について 35 ng/dot で NC 膜を感作した(図1)。イヌ回虫感染ラット血清を用いた dot-ELISA における異種回虫属 LES 間の交差反応の検討では, Bp, Bt とはほとんど反応しなかったが, An との間に強い交差反応が認められた(図 2)。また, これらの結果は plate-ELISA と一致した(図 3)。

C. 研究結果

	NC	Bp	An		
No		As	Bt	Tc	

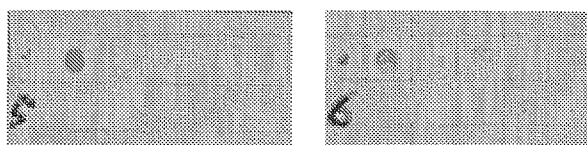


図 2 異種回虫属 LES 間の交差反応の検討

Bp:アライグマ回虫, As:ブタ回虫, An:アニサキス幼虫飼養液, Bt:クマ回虫, Tc:イヌ回虫。左:陰性対照血清, 右:イヌ回虫感染ラット血清

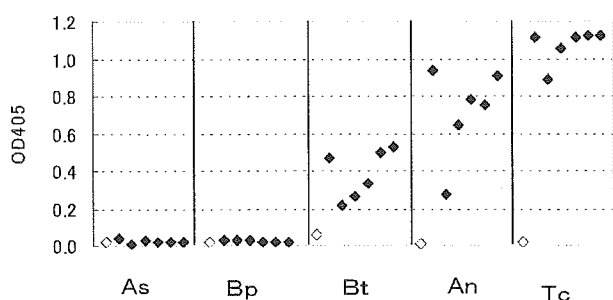


図 3 イヌ回虫感染ラット血清を用いた異種回虫属 LES 間の交差反応 Y 軸は波長 405nm における吸光度, X 軸は ES 抗原を示す。ES 抗原は左からブタ回虫(As), アライグマ回虫(Bp), クマ回虫(Bt), アニサキス(An), イヌ回虫(Tc)であり, イヌ回虫感染ラット血清 6 例(◆), 陰性対照(◇)の吸光度を示す。

次にトキソカラ症, アニサキス症, 肺吸虫症, 肝蛭症, 孤虫症, フィラリア症(熱帯性好酸球増多症)と診断された患者血清を用いて dot-ELISA による診断法の検討を行った。肺吸虫症, 肝蛭症, 孤虫症, 熱帯性好酸球増多症それぞれの患者血清は同種抗原に陽性反応を示し, 回虫属 LES には陰性であった(図 4)。トキソカラ症患者血清は An, Bt(図 4), As(図 5)に陽性反応が認められた。

	NC	As		Bt	
No		Bp		Tc	

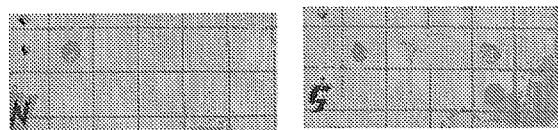


図 5 トキソカラ症患者血清の回虫属 LES に対する反応

	NC	An	Tc	Di	Sep
No		Bt	Bp	Pm	Fh

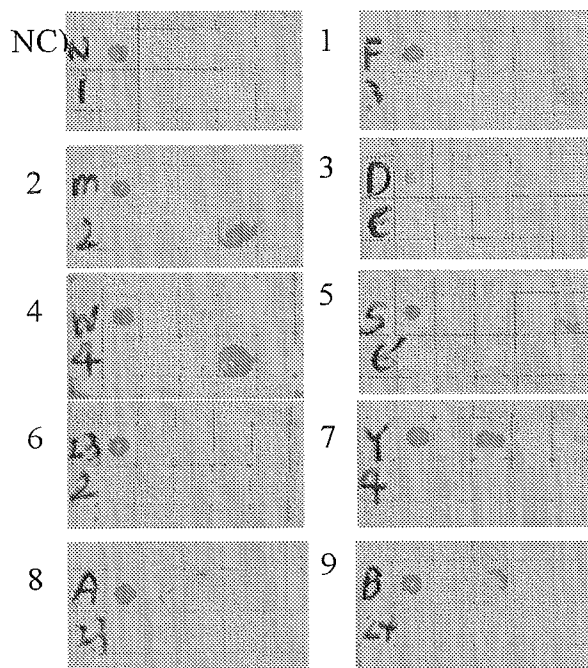


図 4 寄生虫症患者血清を用いた dot-ELISA による診断法の検討 Di:イヌ糸状虫, Pm:宮崎肺吸虫症(ウエステルマン肺吸虫症にはウエステルマン肺吸虫抗原を使用), Sep:マンソン孤虫, Fh:肝蛭症
患者血清 NC)陰性対照, 1)肝蛭症, 2)宮崎肺吸虫症, 3)フィラリア症, 4)ウエステルマン肺吸虫症, 5)孤虫症, 6)アニサキス症, 7)トキソカラ症, 8)7をAnで吸収, 9)7をBtで吸収

これら As, Bt, An についてさらに plate-ELISA でその反応性を検討したところ, As, Bt においては陽性反応が認められたものの, 血清希釈倍率を 800 倍にすると同種回虫抗原の反応の強さに比べ明らかに差が見られた(図 6)。An においては強い陽性反応が認められるものには個人差があった(図 7)。この An に対する強い陽性反応に抗アニサキス抗体保有の可能性を疑い, Tc を用いた吸収法により検討

を行った。plate-ELISAにて測定した結果、Tcに対する反応性は低下したがAnに対する反応性は変わらなかった(図8)。

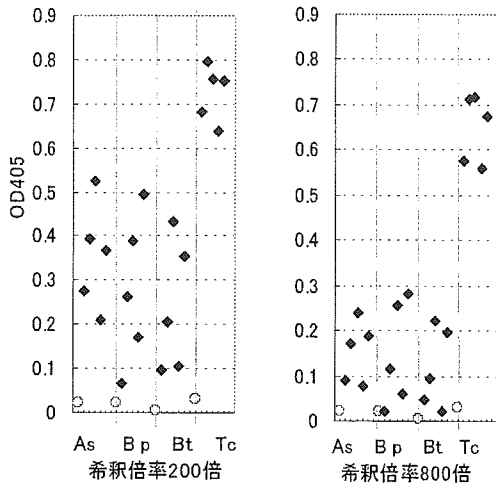


図6 トキソカラ症患者血清の異なる希釈倍率における回虫属LESに対する反応性の違い Y軸は波長405nmにおける吸光度 ◆:患者血清, ○:陰性対照

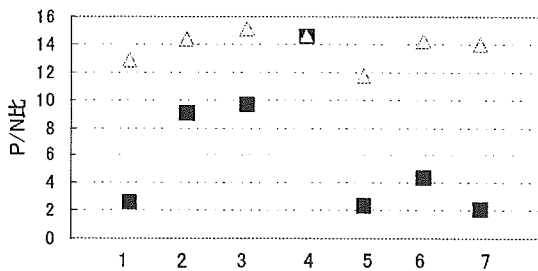


図7 トキソカラ症患者血清7例のイヌ回虫LES(Tc)とアニサキスLES(An)に対する反応P/N比を用い、検体のODを陰性対照のODで割って結果を指数化した。△:Tcに対する吸光度のP/N比, ■:Anに対する吸光度のP/N比。P/N>3を陽性と判定。

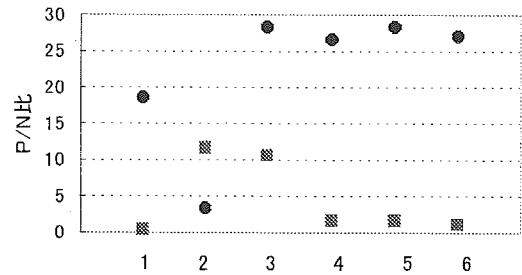


図8 トキソカラ症患者血清をイヌ回虫LES(Tc)で吸収後の反応の変化 X軸は左から1)アニサキス症患者血清, 2)トキソカラ症患者血清, 3)アニサキスLESに強い陽性を示すトキソカラ症患者血清, 4)3にTcを2 μ g/mlになるように添加し37°C30分間保持, 5)3にTcを2 μ g/mlになるように添加し37°C45分間保持, 6)3にTcを4 μ g/mlになるように添加し37°C30分間保持, を示す。■はTcに対する患者血清の吸光度のP/N比, ●はAnに対する患者血清の吸光度のP/N比を示す。P/N>3を陽性と判定。

またアニサキス症患者血清の中にもTcに強く反応する検体が認められた(図9, 10)。前述のトキソカラ症患者血清と同様に、Anを用いた吸収法を行いplate-ELISAにて測定した結果、Anに対する反応性は低下傾向にあったがTcに対する反応性に変化はなかった(図11)。次にこれらの血清と、Tcに陰性反応を示した検体を比較対照として用い、イヌ回虫LESよりもさらに特異性の高い抗原であると報告されているイヌ回虫組み換え抗原⁸⁾を用いてplate-ELISAにより検討を行った。Tcに強く反応した検体はどちらにも陽性を示し、Tcに陰性反応を示した検体はどちらにも陰性を示した。

	NC	An	Tc	Di	Sep
No		Bt	Bp	Pm	Fh

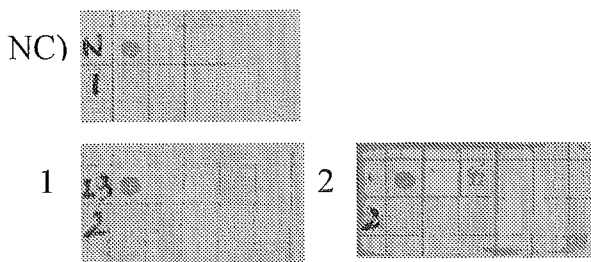


図 9 アニサキス症患者血清の回虫属 LES に対する反応

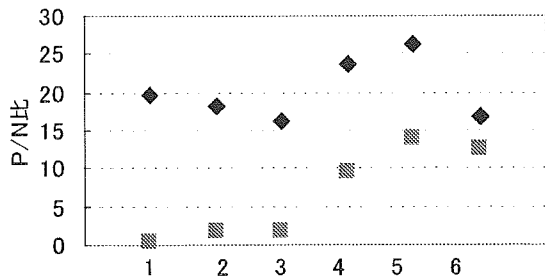


図 10 アニサキス症患者血清 6 例のイヌ回虫 LES(Tc)とアニサキス LES(An)に対する反応 ◆: An に対する吸光度の P/N 比, ▨: Tc に対する吸光度の P/N 比。P/N>3 を陽性と判定。

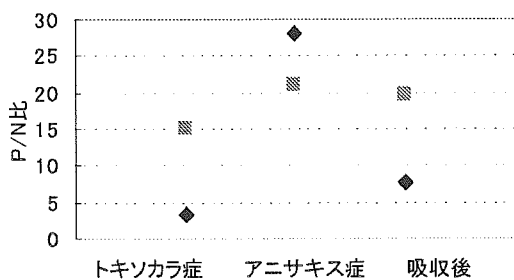


図 11 アニサキス症患者血清をアニサキス LES(An)で吸収後の反応の変化 トキソカラ症患者血清, アニサキス症患者血清, An を添加後 37°C30 分間保持し吸収したアニサキス症患者血清(吸収後)の An に対する P/N 比(◆), Tc に対する P/N 比(▨)を示す。

dot-ELISA においてトキソカラ症患者血清

は同種抗原以外にも陽性反応を示したので、トキソカラ症の鑑別診断の為に、dot-ELISA における吸収法を用いた検討を行った。吸収後の血清は吸収前の血清と変わらず An, Bt に陽性反応が認められた(図 4 の 7,8,9)。plate-ELISA と比較すると, An で吸収した血清の P/N 比は cut-off 値付近まで低下した。(図 13)

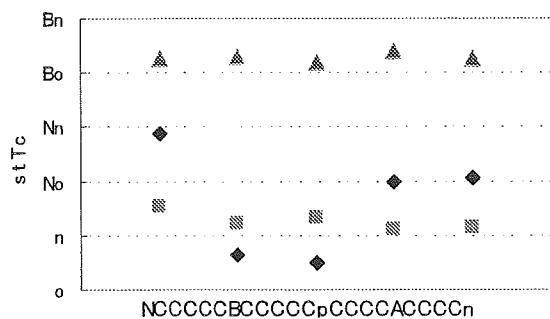


図 13 トキソカラ症患者血清の An または Bt による吸収後の反応の変化 X 軸は左から 1) アニサキス症との重複感染が疑われるトキソカラ症患者血清 2) 1) に An を 2 μg/ml になるように添加し 37°C30 分間保持 3) 1) に An を 4 μg/ml になるように添加し 37°C30 分間保持 4) 1) に Bt を 2 μg/ml になるように添加し 37°C30 分間保持 5) 1) に Bt を 4 μg/ml になるように添加し 37°C30 分間保持。▲: Tc に対する患者血清の吸光度の P/N 比, ◆: An に対する患者血清の吸光度の P/N 比, ▨: Bt に対する患者血清の吸光度の P/N 比。P/N>3 を陽性と判定。

D. 考察

寄生虫症の免疫学的血清診断法として dot-ELISA が適しているか評価するには特異性, 感度, 簡便さ, 再現性などについて検討する必要がある。今回それらの問題について動物由来回虫幼虫感染症を対象に, plate-ELISA と比較し検討を行った。

dot-ELISA の条件検討では用いる抗原蛋

白量が 35 ng/dot と plate-ELISA の 1/3 量でも十分に結果を視認できることが明らかとなった。dot-ELISA は plate-ELISA に用いる血清希釈液、洗浄液を共通して使用でき、結果が視認により判定できるので吸光度計のような特別な設備を必要としない。本研究では反応時間短縮のために plate-ELISA にならい 37°C 40 分としたが、反応時間を検討することにより室温における検査も可能と考えられる。天野ら(1998)によれば、抗原をニトロセルロース膜に感作すれば 2, 3 年間は冷蔵保存が可能であり、また夏場の室温に 10 日間放置しても反応性に変わりがなかった。これより抗原の安定性が保証され保存に場所をとらない為、抗原を感作したニトロセルロース膜を郵送することができるので、特定の大学や研究機関以外でも簡便に統一術式のもと検査を行うことが可能である。

トキソカラ症、アニサキス症、肺吸虫症、肝蛭症、孤虫症、フィラリア症(熱帯性好酸球増多症)と診断された患者血清を用いた dot-ELISA では、肺吸虫症、肝蛭症、孤虫症、熱帯性好酸球増多症それぞれの患者血清は同種抗原に対し陽性を示し、回虫属 LES には陰性であった。トキソカラ症患者血清は As, Bt, An に陽性反応が認められ、アニサキス症は Tc, Bt に陽性反応が認められた。これより回虫属 LES は dot-ELISA において回虫類感染症に対しては交差反応が認められたものの、吸虫類や条虫類の寄生虫症に対しては交差反応を示さず特異性が認められ、寄生虫症のスクリーニング検査における有効性が確認さ

れた。

トキソカラ症患者血清を用いた dot-ELISA では Bt, As, An に交差反応が認められたが plate-ELISA を組み合わせることで Bt, As との鑑別が可能であることが示唆された。An には強い交差反応が認められたが、その反応性には個人差が認められた。トキソカラ症の血清診断においてはアニサキス抗原に強い陽性反応を示すことが問題とされており⁹⁾、診断が困難な可能性がある。刺身を好んで食べる日本人は抗アニサキス抗体保有者が多く、陽性反応が交差反応であるのか他の要因によるものなのか明確ではない。この為、An に強い交差反応が認められた検体には抗アニサキス抗体を保有するアニサキス症との重複感染を疑い、検体を Tc で吸収してから plate-ELISA にて吸光度を測定した。結果、吸収後の検体の Tc に対する反応性は低下したが An に対する反応性は高いまま維持した。An に対する交差反応であれば、Tc による吸収後は Tc に対する反応性が低下すると共に、An に対する反応性も低下すると考えられることから、Tc により吸収されない An に特異的な抗体の存在を示唆しており、線虫類抗原間の交差反応ではなく患者血清中の抗アニサキス抗体によるものと思われ、アニサキス症の重複感染が強く示唆された。

アニサキス症患者血清の中で plate-ELISA において Tc に強い陽性反応を示した検体は、イヌ回虫組み換え抗原を用いた plate-ELISA においても陽性を認め、トキソカラ症との重複感染である可能性が示唆された。LES を用い

た plate-ELISA の結果が、組み換え抗原の結果と同様であったことは LES の抗原特異性が高いことを示唆していた。

このように、plate-ELISA において吸収法の効果が確認されたことから吸収法を併用することによるトキソカラ症とアニサキス症の鑑別診断の可能性が示唆されたが、dot-ELISA においては吸収前・吸収後の発色に反応の差が認められなかった。plate-ELISA にて確認したところ、An で吸収後の血清の P/N 比は cut-off 値まで低下していたので、吸収法の効果は確認されたが dot-ELISA への応用については更なる検討が必要とされた。

E. 結論

イヌ回虫幼虫移行症において LES の血清診断法における有用性が確認された。特異性においては回虫属間の交差反応に関してなお改善の余地が示唆されたが、吸収法併用の有効性が認められた。また微量の抗原で抗体を検出でき、特別な設備を必要としない dot-ELISA はその簡便さと感作された抗原の安定性から特定の検査機関に限らない寄生虫症のスクリーニングに有効であることが示唆された。

参考文献

- 1) Sato H, Kamiya H, Furuoka H.: Epidemiological aspects of the first outbreak of *Baylisascaris procyonis* larva migrans in rabbits in Japan. *J Vet Med Sci.* 65:453-457, 2003.
- 2) De Savigny DH. : In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol.* 61:781-782, 1975
- 3) 福本宗嗣 イヌ・ネコ回虫症 からだの科学 242:53-56, 2005.
- 4) 佐塚あゆみ, 荒木国興, 佐藤宏 et al. Dot-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 第73回日本寄生虫学会大会 2004 前橋市
- 5) 天野優子, 渡辺純一, 荒木国興 寄生虫疾患診断法としての dot-ELISA 法と ELISA 法の比較 肺吸虫症 134 例, マンソン孤虫症 35 例についての検討 病体生理誌 31:117-123, 1998.
- 6) 山崎浩, 荒木国興 寄生虫症の血清診断法 今日の寄生虫症診断の意義とその要領 臨床検査 43:1617-1624, 1999.
- 7) 荒木国興 寄生虫症の免疫学的診断 *JIM* 13:254-256, 2003.
- 8) Yamazaki H, Araki K, Lim PK, Zasmy N, Mak JW, Taib R, Aoki T.: Development of a Highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J*

- Clin Microbiol. 38: 1409-1413, 2000.
- 9) Perteguer MJ, Cuellar C, Guillen JL, et al: Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. Acta Trop. 89:85-89, 2003.

G. 研究論文

1. 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. 2005;93:151-159.
2. 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. 2005;129:83-87.
3. 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. 2005;91:716-719.
4. 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. 2005;110:134-139.
5. 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. 2005;49:159-161.
6. 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, 2005: 36; 1399-1406.
7. 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. 2005;16:11-14.
8. 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. 2005;22:263-266.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

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

大都市圏で拡大する広東住血線虫症の疫学調査

終宿主における寄生状況調査と血清疫学的手法を用いたドブネズミの感染状況調査

分担研究者 赤尾信明

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

共同研究者

林 栄治

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

研究要旨:首都圏における広東住血線虫症の流行疫学を明らかにするため、3年間にわたって終宿主となるネズミを捕獲し、その肺動脈内に寄生する広東住血線虫の寄生状況を調査した。また、感染ネズミの血清を用いてネズミの感染状況を血清疫学的に調査した。今年度新たに広東住血線虫感染ドブネズミが確認されたのは1地点であったが、その寄生率は80%と高率であった。また、剖検で肺動脈内に虫体を確認し得なかった159匹中5匹(3.1%)のドブネズミが抗体陽性と判定された。

A. 研究目的

ネズミの肺動脈内に寄生する広東住血線虫は中間宿主を介してヒトに感染すると好酸球性髄膜炎を起こすことが知られている。ヒトへの感染例は沖縄県を中心に報告があり、動物由来の共通感染症として重要な寄生虫症である。感染経路は、成虫が寄生したネズミの糞便内に産出された第1期幼虫が中間宿主であるナメクジ類や陸生貝類内で感染幼虫にまで発育し、これをヒトが何らかの手段によって摂食することによって起きる。これまで東京港湾地区で捕獲されたドブネズミに高率の感染がみられることが知られて

いた(堀ら, 1969, 1972; 内田ら1982)。堀らの調査では川崎・横浜の港湾地区で捕獲されたドブネズミの1.8%, 品川晴海地区のドブネズミの10.7%に寄生がみられたとしている。第13号埋め立て地(現在のお台場周辺)のドブネズミを調査した内田らは129頭中11頭(8.5%)に寄生をみている。我々はこれまでの3年間の調査で、東京都下27カ所で捕獲された217頭以上のドブネズミから46頭の感染ネズミを見だし、ドブネズミ間での流行が20年前の状況と全く変わっていないことが確認した。本研究の最終年度に当たる平成17年度では、こ

れまでの調査成績をまとめるとともに、過去の調査で得られたドブネズミ血清を用いて、血清疫学的調査を実施し、都市圏における広東住血線虫症の流行域の把握を行った。

B. 研究方法

1. ネズミの捕獲

昨年度と同様に、民間害虫駆除業者の協力を得て、東京都、神奈川県、千葉県内の12カ所で捕獲されたドブネズミ合計67匹について、捕獲後の個体を研究室に持ち帰り剖検した。開胸後、心臓と肺臓を摘出して実体顕微鏡下に肺動脈内を精査し、広東住血線虫の寄生の有無を検査した。

2. 捕獲ネズミの広東住血線虫に対する抗体測定

捕獲したドブネズミの血液を心臓から採血し、血清分離後用事まで -30°C で保存した。抗体検査に用いた抗原は広東住血線虫雌成虫抽出抗原と幼若成虫抽出抗原を用い、plate-ELISA法により抗体を測定した。

C. 研究結果

1. ネズミにおける広東住血線虫の寄生

状況

過去3年間にわたる東京近郊の都市部を中心とした調査の結果、5カ所で捕獲されたドブネズミに広東住血線虫成虫の寄生を確認した。これらの陽性ドブネズミの捕獲場所とそれぞれの検査頭数と陽性個体数のまとめを図1と表1に示した。本年度に新たに陽性個体が確認されたのは、千葉県銚子市で、10個体中8個体から広東住血線虫成虫の寄生を認めた。

これまでに陽性ドブネズミが確認された地点では中間宿主となりうる軟体動物（主としてナメクジ類）の調査もあわせて実施した。5カ所のうち1カ所（多摩川河口域の公園内）から採取したチャコウラナメクジから広東住血線虫感染幼虫を見だし、ラットへの感染実験から成虫の寄生を確認し、現在継代維持している。



図1 調査地点(X)と感染ドブネズミが確認された地点(X)および中間宿主から感染幼虫が認められた地点(X)

Table 1 平成16年度までの調査地点とその検査結果

捕獲場所			捕獲日	捕獲 個体	陽性 個体数	中間宿主 (チャコウラナメクジ) 調査	陽性 個体
東京都	千代田区	大手町地下鉄	01.Jul~	40以上	0		
	品川区	港湾部	02.Sep	2	0		
	台東区	ビル内	01.Jun	4	0		
		上野公園	02.Jun	2	0		
	豊島区	池袋駅前	02.Aug	18	0		
		ビル内	01.Aug	10	0		
		要町	03.Jun	4	0		
		千川路上植込み	03.April	10	0		
	江東区	新木場	03.Feb	1	0		
		荒川河川敷	03.Feb	3	0		
	新宿区	路上植込み	03.April	12	0		
		ビル内	01.May	4	0		
		高田馬場	01.Nov	1	0		
	大田区	蒲田駅ビル	00.Oct	5	0		
	西東京市	住宅街	02.April	8	8	100	0
	墨田区	住宅街	04.Aug	1	1	147	0
	浮島地区	公園	04 Sep	24	22	27	陽性*
神奈川県	横浜市	工場	01.May	8	0		
	戸塚区	駅周辺	01.Sep	5	0		
	平塚市	工場	01.May	2	0		
千葉県	千葉市	若葉区	03.April	3	0		
		都賀	03.Jun	7	0		
	市川市	遊戯施設	01.April	12	7		
	銚子市	漁港商業施設	05.Aug	10	8		
茨城県	那珂湊		05.Aug	15	0		
長野県	諏訪湖畔		05.Aug	1	0		

静岡県	焼津		05.Nov	5	0

*27 個体を同時に消化したため、陽性率は不明。27個体のチャコウラナメクジから476隻の広東住血線虫第3期幼虫を検出した(図2)。



図2 チャコウラナメクジから人工消化法によって回収された広東住血線虫第3期幼虫

2. 血清疫学的手法を用いた感染ドブネズミの調査

(1) 実験感染ラットを用いた基礎的検討

実験的に広東住血線虫感染幼虫を経口投与した2頭のラット血清を用いて、使用抗原と至適希釈濃度を検討した。感染ラット血清は感染後16週目のものを用い、陰性対照には2頭の非感染ラット血清を用いた。の結果、使用抗原が成虫抽出抗原と幼若抗原では感染ラット血清に対する吸光度に有意な差は認められず、被検血清の100倍希釈で感染ラットと非感染ラット血清の間で吸光度に有意な差を認めた(図3)。

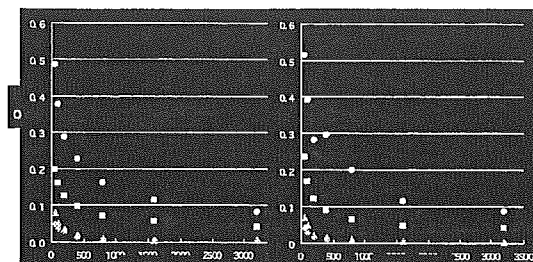


図3 成虫粗抗原(左)と幼若抗原(右)の抗原性の比較。●■は感染ラット, ▲◆は非感染ラット

また、感染経過につれてのラット血清中の抗体の変動を検討したところ、感染後5週目に抗体の急激な上昇を認め、以後経過を観察した9週目まで抗体は持続した。また、その経過は成虫抗原と幼若抗原では差を認めなかった(図4)。

そのため、ドブネズミの抗体調査には抗原の作成が容易な成虫抗原を用いることとした。

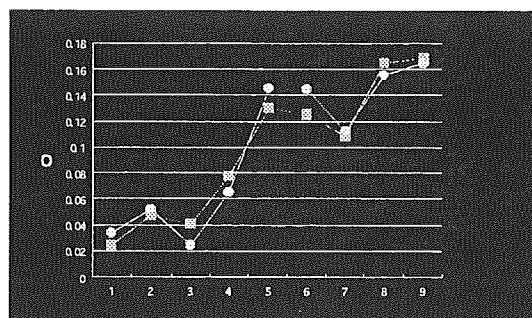


図4 感染ラット血清の抗体産生経過。■成虫抗原 ●幼若抗原

(2) 捕獲ドブネズミの血清疫学調査

捕獲時に採血を行い、剖検時に虫体は確認できなかったドブネズミ血清159検体を用いて、広東住血線虫成虫抗原に対する抗体の有無を測定した。陽性

対照として、虫体が剖検で確認できた6検体も同時に測定した。その結果、中丹が肺動脈内に確認できた6頭の平均吸光度 $OD_{405}=0.185$ と比べ、虫体の確認できなかった159頭のうち5頭の吸光度が他の154頭の吸光度に比べて有意な上昇が認められた(図5)。

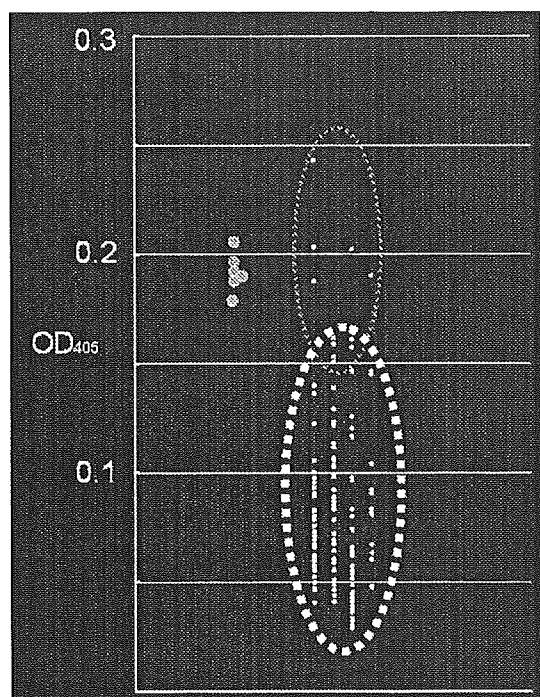


図5 ドブネズミ血清の広東住血線虫成虫抗原に対する抗体分布

- 剖検にて感染を確認したネズミ
- 剖検にて感染が確認されなかったネズミ

D. 考察

3年間にわたる調査によって、東京都を含めた関東の広い範囲にわたって広東住血線虫に感染したドブネズミが分布していることを明らかにすることができた。これまで、広東住血線虫感染ドブネズミ

は港湾部を中心として分布していると考えられてきたが、我々の調査によって、東京湾から直線距離にして20Km以上も離れた内陸部においても感染ドブネズミの分布が確認されたことが注目される。感染ドブネズミが分布するということは即ち、ヒトへの感染源となる中間宿主がドブネズミの棲息域に広く分布しているということを意味しており、ヒトの広東住血線虫症が発生するおそれも十分考えられる。今後とも監視を強化するとともに、地域の病院とも連携し患者発生に備えた対応整備が必要である。

剖検にて肺動脈内に虫体を確認できなかった159頭のドブネズミの血清のうち5頭で血清抗体が陽性と判定された。これは、剖検による虫体確認に見落としがあったのかあるいは感染から成虫が最終寄生部位に到達するまでの time lag による可能性が考えられた。しかし、いずれにしても、血清疫学的手法を併用することにより広東住血線虫幼虫感染の疫学調査をより効率よく行えると考えられた。

今後は患者発生の有無に焦点を合わせて臨床サイドと連携した疫学調査体制の整備が望まれる。

E. 結論

東京都、神奈川県、千葉県、茨城県、長野県、静岡県の27地区で捕獲したドブネズミのうち5地区のドブネズミに広東住血吸虫成虫の寄生を認め、うち1地区

に棲息するチャコウラナメクジから第3期幼虫(感染幼虫)を検出した。

F. 健康危険情報

多摩川河口域に生息するチャコウラナメクジに、ヒトに感染すると好酸球性髄膜炎を起こす広東住血線虫の感染幼虫を確認した。

G. 研究論文

1. 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*. 2005;93:151-159.
2. 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*. 2005;129:83-87.
3. 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*. 2005;91:716-719.
4. 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*. 2005;110:134-139.
5. 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*. 2005;49:159-161.
6. 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*, 2005; 36; 1399-1406.
7. 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*. 2005;16:11-14.
8. 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.

2005;22:263-266.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

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

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

分担研究者 赤尾信明

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

共同研究者

友田弥里

東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

研究要旨: 中国産あるいは韓国産キムチによる寄生虫卵汚染問題が韓国と中国の外交問題にまで発展した。国内にも両国から毎年多量のキムチが輸入されていることから、その汚染実態の調査を行った。その結果、国内で市販されている4種類のキムチのうち2種類から寄生虫卵が検出された。また韓国ソウル市内で購入した2種類のキムチのうち1種類からも虫卵が検出された。このうちの1種類はヒト回虫卵とその形態がきわめて類似していた。輸入食材の寄生虫卵汚染の効率的な検査方法開発の為、回虫卵タンパク膜抗原を指標とする免疫学的手法による検査方法を新たに開発した。

A. 研究目的

平成16年10月に韓国食料医薬品庁が中国産キムチから4種類の寄生虫卵を検出したと発表した。これに反論する形で中国は、中国に輸出された韓国産キムチおよび関連食品からも寄生虫卵が検出されたと中国国家質量監督検疫総局が発表し、それぞれの検疫当局が当該食材の輸入禁止、焼却処分をおこない、両国の政治問題にまで発展した。これらの発表を受けて我が国においても各地の検疫機関が中国産および韓国産キムチの抜き取り検査を実施したが、寄生虫卵は検出されなかったと報告した。

我々は、国内で流通している韓国産および中国産キムチの寄生虫卵汚染状況について、その検査手技を再検討し、より正確に検出できる手法に改良し、市販のキムチの寄生虫卵汚染状況を調査した。また、これらの検査には時間と熟練を要することから、これらの作業をより効率的に行えるあたらしい検査方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 輸入食材(キムチ)からの寄生虫卵検出方法

キムチからの寄生虫卵検出方法は村田ら(2002)を改変しておこなった。即ち、キムチ100gを洗浄液[消泡剤(Antifoam Y-30 Emulsion, Sigma, A5758) 150 μ L 添加 Tween80・クエン酸リン酸緩衝液(Tween80 0.5%, クエン酸, リン酸2ナトリウム 12 水塩, pH4.0)] 200mL中にいれ30分間激しく振盪した。次に洗滌瓶を用いてはを1枚ずつ振り洗い液量を400 mLとした。これを市販の金属茶こしを用いて濾過し、濾液をポリエチレンビーカーあるいはシリコン処理済みガラスビーカーに移した。この濾液を50mL ディスポ沈澱管8本に分注し、2500rpm5分間遠心(室温)後、上清を吸引除去した。沈渣を2本の50mL沈澱管に集め、再度2500rpm5分間遠心した後、上清のみを吸引除去した。沈渣に上記洗浄液を加えて全量を30mLとし、これにエーテル15mLを加え蓋をしてよく混和した。その後、同様に遠心し上清を吸引除去したのち、沈渣に蒸留水を加えて遠心し、最終の検査材料とした。村田ら(2002)はこの最終沈渣をさらに浮遊法を用いて検査し、浮遊してきたものを検査材料としているが、浮遊法をおこなうことによって虫卵検出率が大幅に低下することが明らかになったので、我々は最終沈澱物をすべて顕微鏡下に検査した。この点が今回我々の実施した方法と異なっている。

最終沈渣は約10mLとなり、これを22x22mmのスライドガラスを用いて検査する

と、1検体のキムチを検査するのに約100枚のスライドガラスを検査することになる。

2. 検査キムチ

検査をおこなったキムチは東京都台東区と渋谷区のスーパーマーケットおよび輸入食材専門店で購入した。また、韓国ソウル市内で購入した白菜キムチとワタリガニキムチについても検査した。

3. 寄生虫タンパク膜抗原を指標とした輸入食材からの寄生虫卵検出方法の開発

(1) 回虫卵虫卵表面タンパクの精製

ヒト回虫雌成虫の子宮をプラスチックシャーレに取り、子宮から虫卵を回収した。取り出した虫卵を0.5% Triton X 100に入れ37°Cで一晩攪拌しながら虫卵表面タンパクを可溶化した。これを透析後濃縮し、さらに凍結乾燥して虫卵タンパク膜抗原(egg surface protein, ESP)を得た。

(2) マウス免疫血清

ESP 1mg/mLをFreund完全アジュバントと共にマウス(BALB/c 雄, 8匹)腹腔内に2週間間隔で2回免疫した。最終免疫後1週目に採血して免疫血清を得た。

(3) SDS-PAGE と immunoblot

ESPと免疫血清の性状は10% SDS-PAGEとimmunoblotdabを用いて解析し

表1 市販キムチからの寄生虫卵検出状況

商品名	購入場所	検査材料(g) x検査回数	検出虫卵						
			A	B	C	D	E	F	G
1 S 家キムチ	アメ横スーパー	100x2 回	多数	3	1	陰性	陰性	陰性	陰性
2 Y 家キムチ	アメ横スーパー	100x1	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
3 自家製白菜キムチ	アメ横エスニック 食材店	100 x1	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
4 K 賞キムチ	渋谷区内スーパ ー	100 x1	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
5 自家製白菜キムチ	ソウル市内屋台	100 x1	陽性	陰性	1	1	2	1	陰性
6 ワタリガニキムチ	ソウル市内屋台	100 x1	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	1

た。抗血清は HRP 結合抗マウス IgG+ IgM ウサギ血清(シグマ)を用い、発色には DAB を用いた。

(4) ESP を指標とした被検材料の虫卵汚染測定

ヒト回虫卵約300個を10mL の0.5% Triton X 100 を加えた蒸留水中に添加し、37°Cで2時間振盪した。その上清に PVDF 膜を浸漬し、4°Cで48時間抗原を吸着させた。48時間後、膜を Tris-PBS (pH7.2)で洗浄し、さらに1%ウシアルブミン添加 Tris-PBS でブロッキング操作をおこなった(室温1時間)。次いで、0.2%ウシアルブミン添加 Tris-PBS で100倍に希釈した抗ヒト回虫 ESP マウス血清を膜と反応させた(37°C, 1時間)。反応

虫卵は全部で7種類が確認された(図1A~G)。このうち虫卵Bは第1回目の検査で2個発見されたため、再度100gの同一商品から100g採取して再度検査したところ、さらに1個の虫卵が発見された。検出された虫卵Bの大きさは72.5 μ m \times 47.5 μ m, 80.6 \times 49.6 μ m, 71.5 \times

終了後膜を十分に洗浄し、ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG血清(1:500)と反応させた。発色にはDABを用いた。

C. 研究成果

1. キムチからの寄生虫卵検出状況

検査に使用したキムチは6種類で白菜キムチ5種類、ワタリガニキムチ1種類である。これらを材料に検査した結果、国内で市販されているキムチ1種類と韓国ソウル市内で購入した2種類のキムチ(白菜キムチとワタリガニキムチ)の合計3種類のキムチから何らかの虫卵が検出された。検出された虫卵の種類と個数を表1に示した。

42.7 μ mあり、虫卵表面には回虫属に特有のタンパク膜とそのピットが確認された(図2)。以上の形態学的な特徴から回虫属の虫卵であると考えられた。虫卵内容物は卵細胞からやや発育した蝌蚪期の幼虫と考えられたが、ヒトへの感染型である幼虫包蔵卵にまでは発育してい