

治療効果判定のための項目	
(1)	出血斑（網膜表層あるいは深層出血病変）が早期に吸収される
(2)	滲出性病変、幼虫の這痕が縮小あるいは消失する
(3)	血管炎が縮小あるいは消失する

3. 旋尾線虫症免疫診断用抗原の作製

新興蠕虫感染症としての旋尾線虫感染診断のための抗原開発を試みた。幼虫移行症の場合、抗原確保が問題であることから組替えタンパクとして診断用標準抗原を得ることにした。本虫幼虫の分泌排泄(ES)抗原が診断に適していることは判っていたので ES 抗原虫に診断用抗原を探すことにした。今年度は患者血清に認識される本虫 ES 抗原タンパクの MS 解析を行ない、データベースによるホモロジー検索により既知淡白であれば PCR による全長 cDNA のクローニング、未知タンパクであれば PCR 断片をプローブとしたスクリーニングに進むことを目指した。MS 解析では SDS-PAGE 後の ES 抗原から目的とするバンドを切り出し、トリプシン消化後に MALDI-TOF で解析した。そのペプチド断片のアミノ酸配列を決定してホモロジー検索を行なった。

4. 人獣共通条虫症病原体の分子的同定

形態的分類が困難な条虫の同定に DNA による方法の導入を試みた。2006 年に遭遇した 4 例の日本海裂頭条虫症患者から得た条虫体節の一部 (5 x 5 mm) から DNA 抽出を行い、下記プライマーにより PCR 増幅を行った。

internal transcribed spacer (ITS)-1,
 5'-AACAAGGTTTCCGTAGGTGA-3',
 5'-AGCAGTCTGCGATTCACATT-3';
 mitochondrial cytochrome oxidase (cox) 1,
 5'-TTGATCGTAAATTTGGTTC-3',

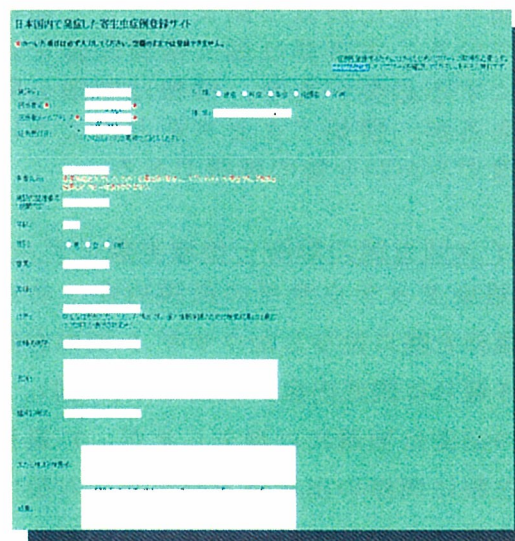
5'-AAAGAACCTATTGAACAAAG-3';
 NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3),
 5'-AACTTTGTGTTTCATTGGTA-3',
 5'-GACAATAAGTTATTAGCAGT-3'.

PCR 産物は DNA シーケンサーを用いて両鎖解析を行った。裂頭条虫感染者は、Dn1: 26 歳, 男; Dn2: 40 歳, 男; Dn3: 5 歳, 男; Dn4: 47 歳, 女で、このうち Dn3 はスイス長期滞在中の感染、他は国内感染であった。

C. 研究結果と考察

1. 症例登録システムの運用

国内の蠕虫感染発生動向のデータベースとなるべく登録システムの運用を開始した。日本寄生虫学会, 日本臨床寄生虫学会等で登録システムについて宣



伝活動を行い、情報提供とデータベースへの参加を呼びかけた結果、今年度は 39 例の新規登録が得られた。線虫感染 11 例, 吸虫感染 13 例, 条虫感染 15 例である。データ検索としては利用許可を受けたもののみが症例登録年, 蠕虫の種類, 種名, 患者国籍などのキーワードを入れて検索を実行することができるようにした。

指定された症例の詳細なデータを表示します

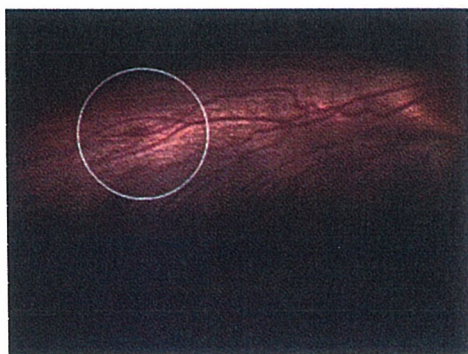
登録されているデータのうち患者氏名が匿名化され、個人情報保護法の観点から表示されません。

登録情報: 真田 雄大
 性別: 男
 生年月日: 2006.07.27
 年齢: 16
 職業: 学生
 国籍: カンボジア
 (注: 新潟県長岡(第7期)の文字のみが隠されています)
 医師名: 不明
 病名: カンボジアからの留学生(16歳、男)が罹患した、眼窩内に虫体(幼虫)を認める眼病。本人はカンボジアにて発症したと報告されており、2ヶ月経過観察中。日本へ渡来後に発症したとのことで、3ヶ月経過観察中。
 経過: カンボジアからの留学生(16歳、男)が罹患した、眼窩内に虫体(幼虫)を認める眼病。本人はカンボジアにて発症したと報告されており、2ヶ月経過観察中。日本へ渡来後に発症したとのことで、3ヶ月経過観察中。
 検査: 眼窩内に虫体(幼虫)を認める眼病。本人はカンボジアにて発症したと報告されており、2ヶ月経過観察中。日本へ渡来後に発症したとのことで、3ヶ月経過観察中。
 治療: カンボジアからの留学生(16歳、男)が罹患した、眼窩内に虫体(幼虫)を認める眼病。本人はカンボジアにて発症したと報告されており、2ヶ月経過観察中。日本へ渡来後に発症したとのことで、3ヶ月経過観察中。
 経過観察: 3ヶ月経過観察中

現段階では未だ十分な症例を得るに至っていないが、今後も継続して実態把握に努めることが重要であると考えている。今年度の発生事例の解析は未だ例数が少なく動向を評価する段階にないが、情報蓄積を通じてリスク評価、予測等の応用価値が高まることと期待している。本事業は個人情報保護を第一にする必要があり、情報は制限公開であるが、情報アクセスをどのように管理するかが今後の課題である。

2. イヌ回虫症の診断・治療実験モデル

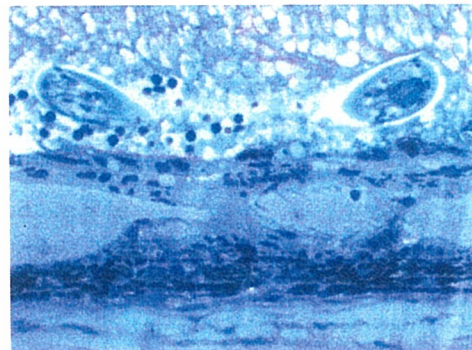
(1)感染ダッチウサギの網膜病変：幼虫包蔵卵を経口投与したウサギ1羽の右眼で5週目に眼底出血が観察した(下図)。この病変は翌週には消失したが、7週目の左眼に同様の出血斑を認めた。右眼で感染後17週目に硝子体の混濁を認め、これは実験終了時まで徐々に増悪した。



イヌ回虫幼虫包蔵卵経口投与後5週目の

ダッチウサギ眼底にみられた出血斑

イヌ回虫幼虫 30 隻を右眼に注入したダッチウサギでは 1 週目から硝子体混濁が出現し、4 週目以降には眼底を透過することが困難となった。網膜の病理組織学的検索により、脈絡膜に接した網膜桿体錐体層内に幼虫が観察された(下図)。



イヌ回虫幼虫を眼注したウサギの脈絡膜に接する桿体錐体層にみられた幼虫

(2)ウサギ眼内液中の LES 特異抗体

経口感染群：血清中の IgG 抗体は 2 週目から上昇がみられ、実験終了時の 20 週目まで高値を持続した。IgM 抗体は 2 週目に有意な上昇がみられたが、その後徐々に減少した。IgA 抗体と IgE 抗体は 3 から 5 週目にかけて一過性に上昇したが、その後の有意な上昇は確認できなかった。経口感染ウサギの房水中の特異抗体は感染後 5 週目に IgG 抗体のみが検出され、うち 1 羽のウサギは実験終了時まで高値を持続した。

幼虫眼注群：生きた幼虫 30 隻を右眼硝子体内に眼注したウサギでは房水中の IgG 抗体が 3 週目から徐々に上昇し始め、6 週目にはピークに達し、以後高値を維持した。IgM 抗体も同様の経過をたどったが、注入後 8 週目以降徐々に低下した。IgA、IgE 抗体も 3 ないし 4 週目から有意な上昇がみられ、その後も比較的高い値を維持した。眼内注入ウサギでは、

房水中の抗体上昇だけでなく血清中の IgG、IgM、IgE 抗体も検出されが IgA 抗体は血清中には検出されなかった。

感染後 6 週目の経口感染ウサギ涙液中に IgG 特異抗体を検出したが、IgA 抗体は認められなかった。

(3)眼トキシカラ症発症スナネズミを用いた駆虫剤とステロイド剤の治療効果：アルベンダゾール投与群、ステロイド眼注群、両剤併用群における治療効果を下表にまとめた。

実験的 eye トキシカラ症における駆虫剤とステロイド剤の効果

薬剤	急性期			慢性期		
	改善	不変	増悪	改善	不変	増悪
ABZ	2	3	5	0	10	3
ST(+)眼	3	0	0	3	1	0
ST(-)眼	1	0	1	1	3	0
併用群 ST(+)眼	3	0	0	3	0	0
併用群 ST(-)眼	1	0	1	0	2	0

出血性病変を主体とする急性期と滲出性病変や血管炎が主体の慢性期での ABZ 投与群では改善例は少なく、不変あるいは増悪傾向を示した。また、ABZ 投与後も眼内幼虫が死滅する像は全く認められなかった。ステロイドを結膜下に注射した群では、出血病変の早期の吸収像、滲出病変の消失、血管炎の改善など、炎症性病変が改善した個体が多くみられた。

ダッチウサギを用いた眼トキシカラ症の動物モデルの検討から、経口感染でも幼虫の眼球内注入群でも特異抗体が血清、房水双方に出現したが、IgA 抗体につい

ては幼虫注入側眼の房水にのみ検出された。IgG 抗体は感染経過を通じて高い値を持続したが、IgM 抗体は感染経過につれて減少していく傾向が見られ、IgG 抗体と IgM 抗体を同時に測定することによって、急性感染と慢性感染とを鑑別できること、房水中の抗体上昇と血清中の抗体上昇の時間差があること等がわかった。眼内 IgA 抗体の診断的意義については今後さらに検討していく必要がある。さらに、経口感染ウサギの涙液中に IgG 抗体が検出されたことは、涙液を用いた眼トキシカラ症の免疫診断の可能性を示唆した。

これまで眼トキシカラ症の治療について動物モデルを用いて検討した報告は極めて少なかった。今回スナネズミを用いた検討でアルベンダゾールは眼内に移行した幼虫に対して殺虫作用を示さない一方、ステロイド剤の結膜下注射によって幼虫による滲出性病変や血管炎は改善されたが、幼虫には何ら影響は及ぼさなかった。アルベンダゾール投与スナネズミの筋肉内幼虫数や脳内幼虫数は、非投与群に比べ減少していたことから Drug Delivery System を考慮した剤型を検討すべきであると考えた。

3. 新規診断用抗原作製

旋尾線虫の ES 抗原の SDS-PAGE の結果から約 80kD タンパクが ES 抗原特異的バンドの一つと判断し、ゲルからバンドを切り出して MS 解析を行なった。当該バンドは我々の研究から患者血清を用いた western blotting にても主要な認識分子の一つを推定された。TOF マスペターンは *C. elegans* のデータベースと相同のものではなく、LC-MS によるアミノ酸分析を行なって PCR プライマー設計により遺伝子クロ

ーニングを行なう予定である。ここで用いたアプローチは手技的にも簡便であり、他の幼虫移行症の診断抗原作製に応用することが可能である。これにより抗原の量的制限により国内での診断実施機関が限られていた問題が解決され、正確な診断とその発生情報把握が可能となるものと期待される。

4. 条虫の分子同定研究

塩基配列解析結果は、4例中3例についてデータベース登録を行った (AB288368 - AB288376)。ITS-1領域の塩基配列は、4例で種内変異は見られず、データベース登録されている広節裂頭条虫のそれとは2%の座位で相違が見られた。cox 1 遺伝子領域は、4例中1例で1塩基に変異が見られたのみで、広節裂頭条虫のそれとは7.4-7.6%の相違を示した。Kimura parameter-2法で求めたITS1, cox1領域のそれぞれの日本海裂頭条虫と各種裂頭条虫のgenetic distanceを下表に示した。ND3領域では、4例中1例で3座位に変異が見られた。広節裂頭条虫のND3領域はまだデータベース登録されておらず、種同定に利用できるか否かは不明であるが現時点では、ITS1及びcox1遺伝子領域がDNA診断の標的として適切であると考えられた。

表：日本海裂頭条虫と各種裂頭条虫のgenetic distance

裂頭条虫種名	ITS1	Cox1
<i>D. latum</i>	0.017	0.0716-0.0771
<i>D. dendriticum</i>	0.013	0.0634
<i>D. ditremum</i>	0.013	0.0937
<i>D. stemmacephalum</i>	0.063	0.1282
<i>Digramma</i> sp.	0.032	
<i>Ligula</i> sp.	0.030	0.1377

<i>Bothriocephalus claviceps</i>	0.372	
<i>Eubothrium rugosum</i>	0.470	
<i>Spirometra erinacei</i>		0.1625

D. 結論

ヒト蠕虫感染の発生動向を把握し、エビデンスに基づくリスク評価と医療対応を可能とするためのシステム整備を行った。輸入蠕虫症や動物由来蠕虫による幼虫移行症は今日の社会背景に則れば増加が予想されるが、一部の幼虫移行症を除いてヒトの感染を把握する技術が未整備である。免疫診断のための抗原作製を進め、正しい診断結果をデータベースに登録するシステム、全く手探りの状態にある治療法を動物モデルを基に情報整備することなどが本研究で進みつつある。特にダッチウサギやスナネズミなどの動物モデルにより従来は得られなかったエビデンスに立脚した治療戦略が初めて考えられるようになった。今後も引き続いて同様の研究を行い、情報整備と対策戦略確立に資する予定である。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

論文発表

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

Ohta N, Waikagul J. Disease burden and epidemiology of soil-transmitted

「動物由来感染症コントロール法の確立に関する研究」
分担研究報告書

住血吸虫の感染コントロール法の研究

分担研究者 平山謙二 長崎大学・熱帯医学研究所・疾病生態分野

研究要旨

住血吸虫症は中間宿主の淡水産巻貝から放出される感染型幼虫（セルカリア）の経皮感染によって引き起こされるぜん虫感染症で中国揚子江流域、フィリピンなどに分布する日本住血吸虫症とアフリカ、中南米に分布するマンスン住血吸虫症が重要である。本研究では放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニブタの血清中の特異抗体に反応する住血吸虫抗原の同定を行い、新しいワクチン候補の探索を行った。また、これまでの糞便中虫卵検査に代わる簡便で高感度の診断法作製のために感染の際に血中に検出される循環抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、感染の有無を決定しうるシステムを開発した。

A. 研究目的

マンスンやビルハルツ住血吸虫と違い、日本住血吸虫症では、ヒト以外の終宿主となる動物種が多数存在する。ヒトの感染がよくコントロールされている中国やフィリピンにおいても水牛、家豚、犬などが汚染地域における流行を維持していることから、動物を対象としたワクチン開発への期待は大きい。ガンマ線照射処理を施した不活化感染型幼虫セルカリアワクチンにより感染防御免疫が成立することが知られているが、応用面では事実上不可能である。そこで、この不活化ワクチンの効果を再現するようなワクチン分子を同定することを目的とした。

また、現在では感染の確定診断として、便中虫卵を直接観察する Kato-Katz 法が主に用いられているが、手間がかかるうえに誤陰性が多くバラつきもおおきく信頼性に乏しく活動性感染の検出や感染負荷量の評価にも適さないこと、慢性期患者では検出力が低下するという重大な欠点がある。最近のように、住血吸虫症のコントロールが進むにつれて、低い感染率を示す地域での患者の治療には簡便で高感度の活動性感染を識別できる診断法の開発が必須となっている。そこで血液あるいは尿検体で簡便に活動性感染が検出できる診断法の確立をめざした。

B. 研究方法

ミニブタ感染モデルを用いた日本住血吸虫ワクチン候補分子の探索

ミニブタに 200Gry の γ 線照射した不活化セルカリア 400 隻を感染させ免疫し、4 週間後の血清、および陰性血清を用いて虫体あるいは虫卵抗原のウェスタンブロッティングを行った。

血中の活動性感染を測定する診断キットの開発

活動性の感染を検出する系として腸粘膜関連抗原(GAA)を認識する抗体を産生するハイブリドーマ株を多数樹立し、この中から選択したモノクローナル抗体によるサンドイッチ ELISA 法を確立した。これを用いて中国江西省の流行地の患者について Kato-Katz 法 3 回繰り返し法による虫卵数と血清中の循環抗原量 (OD 値) との相関について検討した。

(倫理面での配慮)

フィールド調査及び、採血に関しては共同研究者らにより対象者のインフォームドコンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

日本住血吸虫ワクチン候補分子の探索

放射線不活化セルカリアワクチン後の血清に反応する抗原を虫体粗抗原と可溶性虫卵抗

原に対するウェスタンブロットにより探索した結果、図1に示すように可溶性虫卵抗原中に強い反応性が認められた。血清中の抗体が認識する抗原が蛋白あるいは糖鎖かを確認するために、虫卵抗原をグライコペプチターゼAで処理した後、同様に解析を行った（図1）

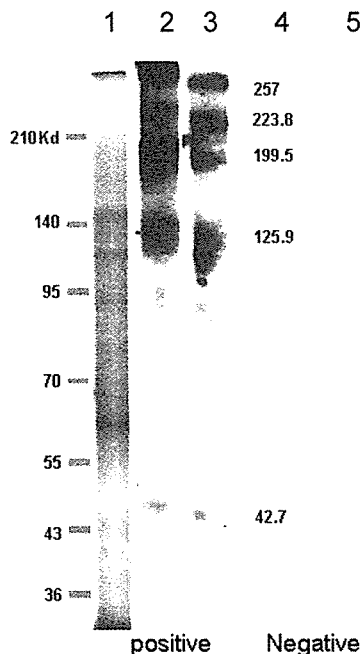


図1. 不活化セルカリアワクチン後のブタ血清に対する可溶性虫卵抗原の反応性

1. 可溶性虫卵抗原銀染色像
2. 未処理の可溶性虫卵抗原と不活化セルカリアワクチン後ブタ血清
3. グライコペプチターゼA処理可溶性虫卵抗原と不活化セルカリアワクチン後ブタ血清
4. 未処理可溶性虫卵抗原と正常非感染ブタ血清
5. グライコペプチターゼA処理可溶性虫卵抗原と非感染ブタ血清

不活化セルカリアワクチン後血清に反応性を示す虫卵抗原は、糖鎖の切断処理により分子量の低下を認めたが反応性を失うことはないように見えた。このことから、不活化セルカリアワクチン後血清中に含まれる抗体が認識するのは糖たんぱくのペプチドそのものであることが示唆された。

活動性感染を検出する診断キットの開発

通常法のサンドイッチ ELISA では、便中の虫卵検査が陽性であった患者で 20 から 50 倍希釈の血清でも検出が可能であった。しかし

感染強度 EPG100 以上の患者サンプルでは、OD 値の低下が認められ、必ずしも感染強度と OD 値の相関は認められなかった。

これは、感染が進行するに従って産生される抗体により、抗原がトラップされて検出が阻害されることが原因と考えられた。そこで、マノン住血吸虫の循環抗原を検出する際に一般的に用いられている方法である TCA（トリクロロ酢酸）処理を行いトラップされた抗原を可溶化したところ、感染強度の高い患者血清においても、OD 値と感染強度とのある程度の相関が認められるようになった。

ミニブタの日本住血吸虫感染モデルでも同様に血中の循環抗原量の測定を試みた。通常法のサンドイッチ ELISA では、ごく初期の感染の検出のみが可能で、感染経過に応じて検出力の低下が認められた。この感染後期の血清は TCA 処理することにより検出が可能となった。

D. 考察

日本住血吸虫ワクチン候補分子の探索

不活化セルカリアワクチン後の血清中の抗体が認識する抗原は、経皮感染後肺に到達するまでのセルカリアからシストソミューラ期に発現しているタンパクであると考えられる。セルカリアやソミューラ期のタンパクを大量に調整することは物理的に非常に困難であるため、これまでアミノ酸配列を決定することが困難であった。今回の研究から血清が可溶性虫卵抗原に反応することが明らかになったので、これらの抗原のN末端のアミノ酸配列を同定することがより現実的になった。さらに、中国のゲノム研究所が日本住血吸虫のゲノム配列をほぼ完全に明らかにしたので、ペプチド断片のデータから遺伝子を同定することが可能となった。今後部分アミノ酸配列を決定し、ゲノムデータより遺伝子を同定した後にセルカリアより調整した cDNA を鋳型としてクローンを作製し、最終的には組み換えタンパクあるいは DNA ワクチンを作製する予定である。

活動性感染を検出する診断キットの開発

抗体価の高い対象者では TCA 処理することにより、活動性の感染の検出が可能となるものの、初期感染対象者については通常法で行う必要があることを示唆する結果を得た。また、実際のフィールドでの使用を考慮すると

通常法、TCA 処理の2種類の方法を行うのは非常に困難であると考えられる。実際の検出感度は十分であると考えられたため、抗原抗体複合体から抗原を解離して検出する方法(抗体ビーズ法など)についてさらに検討し、高感度かつ簡便なキット化をめざして改良を行う。

また、マンソン住血吸虫で用いられているモノクローナル抗体は住血吸虫由来の腸管関連糖鎖抗原とされている。TCA 処理によって糖鎖が上清に濃縮され、検出が可能になる場合とTCA 処理後の pH 調整による抗原抗体複合体からの抗原の分離との両方の意味合いがあるため、このモノクローナル抗体が認識している抗原について、その抗原蛋白の性質を決定する必要があると考えられた。

今後、中国あるいはフィリピンの日本住血吸虫症浸淫地のフィールドで評価を行い、さらに改良を加えることによって、感染強度の測定系を確立することが可能であると考えている。

E. 結論

不活化セルカリアワクチン後の血清と反応する虫卵由来の抗原を検出することができた。また、活動性の感染を感度良く検出し感染強度の定量さえ可能となるような循環抗原を特異的に検出する測定系の原型を作成することに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yu C., Yin X., Kikuchi M., Hirayama, K. Zhu Y., Sequence analysis of full length cDNA of *Schistosoma japonicum* egg miracidia genes harboring signal sequence. Chinese journal of Schistosomiasis Control 18(1): 10-14, 2006.

Chen HG, Zeng XJ, Ge J, Jiang WS, Kikuchi M, Hirayama K. [Study of the efficacy of a monoclonal antibody biotin-avidin system for the diagnosis of schistosomiasis japonica] Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2006 Jul;40(4):244-7. Chinese.

2. 学会発表

平山謙二、菊池三穂子、安波道郎、塚原高広、石井一成、Lim J Koji, 金子明 : Malaria selection pressure might influence on the frequencies of several polymorphic markers for immune related genes in Vanuatu. 第 75 回日本寄生虫学会大会、平成 18 年 5 月 19 日・20 日、弘前文化センター、青森県弘前市 (I-A-06)

菊池三穂子、奥田尚子、塚原高広、安波道郎、佐藤智生、松尾恵、Ratawan Ubalee, Koji J. Lim, 金子明、平山謙二 : Geography-dependent difference in allele frequencies of immune-related loci presumably under malarial selection in Vanuatu. 56th annual meeting for the American society of Human Genetics, October 9-13, 2006, Earnest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana (1052-A)

高木明子、W. V. Mirani, 菊池三穂子、伊藤誠、木村英作、安波道郎、吉浦孝一郎、新川詔夫、平山謙二 : スリランカの象皮病多発家系における罹患同胞対解析を用いた疾患感受性遺伝子の探索 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会、2006 年 10 月 11 日～13 日、長崎ブリックホール、長崎県長崎市 (Tropical Medicine and Health 34th supplement 166)

平山謙二、高木明子、W. V. Mirani, 菊池三穂子、安波道郎、奥田尚子、伊藤誠、木村英作、吉浦孝一郎、新川詔夫 : スリランカの象皮病多発家系における罹患同胞対解析を用いた疾患感受性遺伝子の探索 第 51 回日本人類遺伝学会大会、2006 年 10 月 17 日～20 日、米子コンベンションセンター、鳥取県米子市 (O-31 150)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」班
分担研究報告書

蠕虫類の疫学に関する研究

分担研究者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	川中正憲	国立感染症研究所寄生動物部
同	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
同	荒川京子	国立感染症研究所寄生動物部
同	船津丸貞幸	佐賀県衛生薬業センター微生物課
同	平野敬之	佐賀県衛生薬業センター微生物課
同	吉川 亮	長崎県衛生公害研究所衛生微生物科
同	川上 泰	麻布大学環境保健学部
同	田邊将信	慶応大学医学部
同	伊藤 誠	愛知医科大学医学部

研究要旨： 吸虫，条虫，線虫という多様な動物種から構成される蠕虫は，時に動物だけではなく人を宿主に寄生し，思いがけない病害を与える事がある。この様な寄生蠕虫の例として，肺吸虫とアニサキスを取り上げ，我が国で発生した人体症例の分析を通じて，原因虫種を詳細に解析した。また，その分布状況を検索・考察する事で，コントロール法の確立を模索した。更に，輸入症例発生が危惧される肺吸虫について，流行地のインドと中国の研究者に協力を仰ぎ，現地での材料を用いて種の同定・鑑別という基本的な作業に取り組んだ。以上の結果，佐賀県での集団事例はウエステルマン肺吸虫が原因虫と再確認し，宮崎肺吸虫症発生の危険性を指摘した。中国産肺吸虫を用いて虫体の由来が特定できる事を示し，2種類の肺吸虫をインドに証明した。また，アニサキス症の主な原因虫は，我が国では狭義の *Anisakis simplex* である事を明らかにした。

1. 肺吸虫による食中毒事例の原因調査で佐賀県に見出されたウエステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫の新たな分布地

A. 研究目的

佐賀県の某ホテル内にある中華料理店を原因施設として，2004 年秋に肺吸虫症が集団発生し

た(患者計 4 名)。患者への聞き取り調査等から，原因はモクズガニ(老酒漬)で，唐津市を流れる玉島川の五反田地区で採集された事が判明した。従来の調査では，玉島川は肺吸虫陰性と報告していたので，五反田地区でモクズガニを捕獲して検索したところ，実際にウエステルマン肺吸虫(3 倍体型)のメタセルカリアが検出され

た。そこで玉島川におけるウエステルマン肺吸虫陽性ガニの分散状況を知る事を目的として、五反田地区の上流にある仁部地区でもモクズガニを捕獲し、肺吸虫の検出を試みた。

B. 研究方法

2006年10月に、玉島川の五反田地区とその上流の仁部地区でモクズガニを捕獲し、肺吸虫の検出を試みた。検出されたメタセルカリアは、形態観察と分子生物学的検討(PCR-PFLP)を行ない、種を同定した。サワガニもウエステルマン肺吸虫の第2中間宿主となる事から、五反田地区と仁部地区に加えて、更に上流の馬川地区と荒川地区でサワガニを捕獲し、肺吸虫メタセルカリアの検出を試みた。

C. 研究結果

五反田地区で捕獲されたモクズガニ21匹のうち4匹(寄生率19%)から、また仁部地区で捕獲された28匹のうち1匹(寄生率4%)から、肺吸虫のメタセルカリアが検出された。五反田地区での陽性率は、昨年度の調査の結果(寄生率19%、69匹のうち13匹が陽性)と一致した。一方サワガニでは、仁部地区で得た40匹のうち1匹(寄生率3%)が肺吸虫陽性であった。これらのメタセルカリアは、形態観察と分子生物学的検討の結果、モクズガニ由来のものはウエステルマン肺吸虫(3倍体型)、サワガニ由来のものは宮崎肺吸虫と同定された。

D. 考察

玉島川流域の五反田地区に加えて、仁部地区でもモクズガニにウエステルマン肺吸虫が寄生している事が分かった。陽性ガニは玉島川で広域に分散している危険性が示唆された。一方で、仁部地区のサワガニからは、宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出された。宮崎肺吸虫も人体寄生種である事が知られているので、ウエステルマン肺吸虫と共に宮崎肺吸虫に関する調査も、今後進める必要があると考えられた。これらの肺吸虫による疾病の予防対策を考える場合、行政を通じて、料飲店関係者に今回得られた情報を伝達し、肺吸虫症(寄生蠕虫症)の予防に関

する教育と啓発を行なう事が必要と考えられた。また一般住民に対しても、同様の教育と啓発が望ましいと考えられた。

E. 結論

2004年秋に佐賀県で集団発生した肺吸虫症事例に関連して、原因となったモクズガニの肺吸虫調査を玉島川で継続して実施し、仁部地区のモクズガニがウエステルマン肺吸虫陽性である事を新たに見出した。この仁部地区では、サワガニから宮崎肺吸虫が検出された。宮崎肺吸虫も人体寄生種であるので、ウエステルマン肺吸虫と共に宮崎肺吸虫についての注意も必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
 - 平野敬之、増本久人、池添博士、杉元昌志、松崎祐己、森田満雄、杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲. 平成16年に集団発生した肺吸虫による食中毒事例について. *Clinical Parasitology* (臨床寄生虫学会誌), 17:60-62, 2006
 - 杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、平野敬之、増本久人、池添博士. 平成16年に集団発生した肺吸虫による食中毒事例: 原因の寄生虫学的精査. *Clinical Parasitology* (臨床寄生虫学会誌), 17:63-66, 2006
 - 杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、平野敬之、増本久人、船津丸貞幸、藤原 義行、池添博士、松崎祐己、森田満雄. 2004年秋に集団発生したウエステルマン肺吸虫による食中毒事例について. 病原微生物検出情報, 27:277-278, 2006
 - 平野敬之、増本久人、坂本晃子、真茅美樹、船津丸貞幸、池添博士、杉元昌志、松崎祐己、森田満雄、杉山広、森嶋康之、川中正憲. ウエステルマン肺吸虫による食中毒事例について(発生概要と原因の寄生虫学的

精査)。佐賀県衛生薬業センター所報, 29 : 43-46, 2006

2. 学会発表

1. 杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲, 平野敬之, 増本久人, 池添博士. 食中毒事例の原因調査で佐賀県に分布を見出したウェステルマン肺吸虫. 第 142 回日本獣医学会学術集会, 山口, 2006
2. 平野敬之, 増本久人, 池添博士, 杉元昌志, 松崎祐己, 森田満雄, 杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲. 平成 16 年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例について. 第 17 回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 2006
3. 杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲, 平野敬之, 増本久人, 池添博士. 平成 16 年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例: 原因の寄生虫学的精査. 第 17 回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 2006
4. 平野敬之, 増本久人, 池添博士, 杉元昌志, 松崎祐己, 森田満雄, 杉山広, 森嶋康之, 川中正憲. 肺吸虫による食中毒事例について. 第 32 回九州衛生環境技術協議会, 福岡, 2006
5. 天草務, 平野敬之, 船津丸貞幸, 池添博士, 廣松寛, 杉元昌志, 森田満雄, 杉山広. ウェステルマン肺吸虫症による食中毒事例について (第 2 報). 平成 18 年度日本獣医公衆衛生学会 (九州), 熊本, 2006

2. インドに分布する肺吸虫: 形態観察と遺伝子配列の解読による種同定

A. 研究目的

我が国に長期間在住するアジア系外国人が、淡水産・汽水産のカニを用いて、出身地固有の料理を作り、加熱せずに賞味して肺吸虫に感染する事例が、近年増加の傾向にある。感染者の出身地を見ると、韓国、中国、タイなど、我が国と交流が深い東アジア・東南アジアの国からの者が多い。一方で南アジアの大国であるインドは、近年の IT 産業の国際化に伴い、我が国に

においても在留者数が急増している。インドには肺吸虫が分布し、しかも近年、病気としての重要性が認識される様になってきたが、種の同定・鑑別など寄生虫学的な検討は、むしろなおさらにされてきた。そこで、インド人の食習慣に関連した肺吸虫症が、我が国で発生する事態を危惧して、インドからの肺吸虫材料の入手を進め、得られた材料について形態観察と塩基配列の解読・系統関係の解析を行なった。

B. 研究方法

インド東北部のマニプール州で肺吸虫症の原因食品となっている淡水産のカニ *Potamiscus manipurensis* を検索材料にして、大小 2 種類の肺吸虫メタセルカリアが、インドの共同研究者により分離された。このメタセルカリア (アルコール固定標本) と試験感染イヌから回収された成虫 (アルコール固定標本とカルミン染色封入標本) の提供を受けた。これらについて、形態観察と塩基配列の解読・解析を行った。

C. 研究結果

(1) 大型メタセルカリアとそれに由来する成虫の形態

メタセルカリアは球形を呈し、直径は約 420 μ m であった。成虫は紡錘形を呈し、腹吸盤が虫体中央部より前方に位置した。卵巣はサンゴ状に複雑に分岐し、精巣は卵巣とほぼ同大で葉の分岐は乏しく、また皮棘は単生であった。この様な形態学的特徴から、本虫をスクリアピン肺吸虫 *Paragonimus skrjabini* と同定した。

(2) 小型メタセルカリアとそれに由来する成虫の形態

メタセルカリアは楕円形を呈し、長径は約 200 μ m、短径は約 160 μ m であった。成虫は少しずんぐりして楕円形を呈し、口吸盤 (横径: 約 440 μ m) が腹吸盤 (横径: 約 280 μ m) より大きく、卵巣は複雑に分岐し、皮棘が単生であった。この様な特徴から、ヒロクチ肺吸虫 *P. heterotremus* と同定した。

(3) 塩基配列の解読・解析

スクリアビン肺吸虫（アルコール固定されたメタセルカリアと成虫）から DNA の抽出と ITS2 領域の PCR 増幅を試みたが、産物を得る事はできなかった。一方、ヒロクチ肺吸虫のメタセルカリアから DNA を抽出し、同じく ITS2 領域を標的に PCR を試みたところ、予想サイズのバンド（約 520 bp）が増幅された。配列を解読し、ITS2 についてタイ産および中国産のヒロクチ肺吸虫の配列（データベース由来、タイ産と中国産の配列は相互に完全一致）と比較した。その結果、インド産はこれらと極めて良く一致し、タイ・中国・インドの虫体で一つのクレードを構成する事が分かった。また、タイ産・中国産との間に 4 塩基の違いを認めたと、これは種内多型を反映している事が示された。

D. 考察

インドの肺吸虫としては、まずウェステルマン肺吸虫 *P. westermani* が良く知られている。本虫は、オランダ・アムステルダム動物園で死亡したベンガルタイガー由来の虫体に対して、今から約 130 年前に命名された (Kerbert, 1878)。インドでは、それ以前に *P. compactus* が記載され (Cobbold, 1859)、その後には *P. edwardsi* が報告された (Gulati, 1926) が、これらは無視され、もっぱらウェステルマン肺吸虫が人獣に寄生し病害を与えていると考えられてきた。これは成虫を得て形態から種名を確定すると云う寄生虫学的な作業が、インドでは最近までなおざりにされてきたからで、この為にインド各地に分布する肺吸虫の種（分類・同定）に関しては、未だに不確かな点が数多く残されている。今回、インド東北部のマニプール州に分布する 2 種類の肺吸虫について、形態学的特徴を検討し、また一部については、塩基配列を解読して分子同定を試みる機会を得た。その結果、これらはウェステルマン肺吸虫ではなく、スクリアビン肺吸虫とヒロクチ肺吸虫である事が確認された。

スクリアビン肺吸虫は中国全土に広く分布し、人でしばしば皮下寄生する事が知られている。タイやネパールにも分布が示唆されているが、

インドでは本報告が最初の記録となる。一方ヒロクチ肺吸虫は、中国南部から東南アジアを経て、インド北東部（アルナチャール・プラディッシュ州）にまで分布し、特にタイでは分布する 6 種の肺吸虫のうち、唯一の人体寄生種として重視される。今回 2 種類の肺吸虫をインド（東北部）で証明したので、これらの肺吸虫が人や動物に感染して病害を与えている事を確認すると共に、別の肺吸虫症流行地でも食材とされる淡水産のカニを検索し、インドにおける肺吸虫の分布状況と肺吸虫症の侵淫状況を明かにしたいと考えている。

E. 結論

インド東北部のマニプール州で肺吸虫症の原因となっている淡水産のカニから、2 種類の肺吸虫メタセルカリアを検出した。形態観察と塩基配列の解読を行ない、スクリアビン肺吸虫とヒロクチ肺吸虫であると同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Singh, T.S., Singh, D.L. and Sugiyama, H. Possible discovery of Chinese lung fluke, *Paragonimus skrjabini*, in Manipur, India. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 37 (Supplement. 1):53-56, 2006

2. 学会発表

1. Singh, T.S., Sugiyama, H. and Rangsiruji, A. *Paragonimus* and paragonimiasis in India. The fifth seminar on food- and water-borne parasitic zoonoses, Bangkok, 2006
2. Singh, T.S., Sugiyama, H. Paragonimiasis: an emerging food borne parasitic zoonosis in North

3. 肺吸虫の由来地判別に向けての分子生物学的検討：中国産肺吸虫を用いての試み

A. 研究目的

在日外国人が淡水産・汽水産のカニを用いて出身地固有の料理を作り、非加熱で賞味して肺吸虫に感染する事例が増加の傾向にある。食材となるカニは、地元（日本）の市場で購入する事で、また住居近くの河川で自ら採集する事で調達される。更に彼らが里帰りする時に、我が国に持ち帰るカニも食材とされてきた。この場合は、我が国には分布しない肺吸虫で病気が発生する事も危惧される。原因となった肺吸虫の由来を検索するに当たっては、使い残された食材（カニ）からメタセルカリアを分離して検討材料とする事になるが、その場合は遺伝子配列に基づく解析が有用と考えられる。既に肺吸虫に関する遺伝子情報が、GenBankなどのデータベースに集積されており、日本に分布しない肺吸虫については、種同定を行なうことで外来種である事が明らかとなる。一方、本邦にも共存する肺吸虫、たとえばウェステルマン肺吸虫では、由来地にリンクした種内多型に関する情報が、在来か外来かの判別に必要となる。しかしながら、この様な情報は未だ十分に蓄積されているとは言えない。我々が診断に関与した在日外国人の肺吸虫症例では、中国人が多かった。そこで中国産肺吸虫のメタセルカリアを入手して塩基配列を解読し、由来地の特定に役立つような遺伝子領域の特定を試みた。

B. 研究方法

中国における肺吸虫症の流行地である浙江省に出掛け、中国の共同研究者と共に、肺吸虫症の原因食材となっている淡水産のカニ

(*Sinopotamon chekiangenes*) から、ウェステルマン肺吸虫のメタセルカリアを分離した。また浙江省で同一種のカニから分離され、約 10

年間アルコール（70%、室温）に浸漬されていたハリナスタ肺吸虫（タイと中国に分布、我が国には分布しない）のメタセルカリアも分与を受けた。これら両種のメタセルカリアから DNA を抽出し、核 DNA の ITS2 領域とミトコンドリア DNA の COI 領域を対象に PCR 増幅を試み、塩基配列を解読した。

C. 研究結果

中国産のウェステルマン肺吸虫メタセルカリアに由来する DNA を用いて、ITS2 領域(466bp)の配列を解読し、本邦（三重県）産の配列と比較したところ、両者は完全に一致する事が分かった。一方 COI 領域（396bp）では 6 箇所塩基に違いが認められ、この相違に基づいて両者は容易に鑑別される事が分かった。

中国産のハリナスタ肺吸虫メタセルカリアに由来する DNA を用いて、ITS2 領域を配列解読し、日本産肺吸虫（ウェステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、大平肺吸虫）の各配列と比較した。配列はいずれとも大きく異なり、鑑別は極めて容易である事が分かった。

D. 考察

扁形動物（吸虫類・条虫類）では、ITS2 領域は同一種内の変異が乏しく、従って種の同定に有用な領域であると認識されている。一方 COI 領域は、種内でも変異に富み、多型の検出に有用とされる。今回の中国産のウェステルマン肺吸虫とハリナスタ肺吸虫を用いた検討でも、これに一致する知見が得られた。従って、肺吸虫の由来を特定する必要が出た時は、まず ITS2 領域を解読して配列比較し、それで判明しない場合は、COI 領域を解読して配列比較すれば良い事が確認できた。室温で長期間アルコール保存されたハリナスタ肺吸虫からも、配列が解読できた事から、例えば老酒漬のカニから分離されたメタセルカリアも、由来の判別材料となり得ると考えられた。

E. 結論

中国産のウェステルマン肺吸虫とハリナスタ肺吸虫のメタセルカリアを材料に、ITS2 領域や

COI 領域の配列を解読し、本邦産の肺吸虫と鑑別できる事を明かにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Qian, B-Z., Sugiyama, H., Waikagul, J. and Zhu, Z-H. Sequence analysis of ITS2 and COI genes of *Paragonimus harinasutai*. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 24:119-121, 2006
2. Qian, B-Z. and Sugiyama, H. ITS2 sequence of *Paragonimus westermani* in Ninghai, Zhejiang. Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica, 13:77-80, 2006

4. 人体症例由来の *Anisakis simplex sensu lato* に関する同胞種レベルでの種同定

A. 研究目的

寄生線虫 *Anisakis simplex* は海産魚介類を待機宿主とし、これを捕食する海獣類を終宿主とする寄生蠕虫である。本虫の幼虫を宿した魚介類を生食して感染した場合に、アニサキス症が発生する。わが国では本症の発生率は非常に高く、人体症例は年間 3000 例に上ると推定されている。従来 *A. simplex* は形態学的に単一種とみなされていたが、最近ではリボソーム RNA 遺伝子の配列の相違から、3 種類の同胞種 (*A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii* および *A. simplex c*) に分類することが一般的となってきた。梅原ら (2006) は、日本近海で捕獲された海産魚から *A. simplex s. str.* と *A. pegreffii* とを見出し、我が国ではこの 2 種類の同胞種が、人体寄生の原因になり得るという危険性を指摘した。しかしな

がら、アニサキス症患者より摘出された虫体を同胞種レベルで同定した報告はわずかで、同胞種の違いがヒトへの感染性の差異に結びつくか等については検討されていない。そこで、アニサキス症患者より摘出された虫体を用い、同胞種レベルでの同定を試みた。

B. 研究方法

北海道および九州地方のアニサキス症患者 85 名より摘出された虫体を用いた。各虫体より DNA を調整し、ユニバーサルプライマーを用いて、5.8S リボソーム RNA 遺伝子を含む ITS 領域の PCR 増幅を試みた。得られた増幅産物は、制限酵素 *Hinf I* および *Hha I* によって消化し、Amelio et al. (2000) が報告した分類指標に基づいて同胞種の同定を行った。

C. 研究結果

アニサキス症患者 85 名のうち、84 名に由来する虫体は *A. simplex s. str.* と同定された。*A. pegreffii* と同定されたのは、九州地方の男性患者 1 名に由来する虫体のみであった。

D. 考察

臨床検体を用いた同胞種レベルでのアニサキスの同定は、2 虫体についてしか試みられておらず、1 虫は *A. simplex s. str.* (日本の症例由来)、他の 1 虫は *A. pegreffii* (スペインの症例由来) と報告されている。本研究のように多数の臨床検体を用いた検討は、世界で初めてのものである。また本研究の結果、我が国におけるアニサキス症の主要病原虫は *A. simplex s. str.* で、*A. pegreffii* の感染は稀である事も明らかとなった。*A. simplex s. str.* は主に北方産の魚類から見出されるので、今回得られた研究成果は、我が国のアニサキス症予防対策を構築する上で、極めて重要であると考えられた。

E. 結論

人体症例由来のアニサキス虫体を用いて同胞種レベルでの検討を行い、日本におけるアニサキス症の主要病原虫は *A. simplex s. str.*

である事を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International*, 56, in press, 2007

2. 学会発表

1. 梅原梓里, 川上泰, 松井俊裕, 荒木潤, 内田明彦. ヒトから抽出された *Anisakis simplex sensu lato* の同胞種について. 第75回日本寄生虫学会大会, 弘前, 2006

業績：感染研・寄生動物部 杉山 広 (2006 年分)

Sugiyama, H., Morishima, Y., Rangsiruji, A., Binchai, S., Ketudat, P. and Kawanaka, M. : Application of multiplex PCR for species discrimination using individual metacercariae of *Paragonimus* occurring in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 37 (Suppl. 3), 48-52, 2006.

Rangsiruji, A., Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y., Thawat, D., Binchai, S. and Ketudat, P. : A new species of *Paragonimus* other than *P. westermani* in southern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 37 (Suppl. 3), 57-61, 2006.

Singh, T.S., Singh, D.L. and Sugiyama, H. : Possible discovery of Chinese lung fluke, *Paragonimus skrjabini*, in Manipur, India. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 37 (Suppl. 3), 53-56, 2006.

Qian, B-Z., Sugiyama, H., Waikagul, J. and Zhu, Z-H. : Sequence analysis of ITS2 and COI genes of *Paragonimus harinasutai*. Chin. J. Parasitol. Parasitic Dis. 24, 119-121, 2006.

Qian, B-Z. and Sugiyama, H. : ITS2 sequence of *Paragonimus westermani* in Ninghai, Zhejiang. Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin. 13, 77-80, 2006.

平野敬之, 増本久人, 池添博士, 杉元昌志, 松崎祐己, 森田満雄, 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 川中正憲, : 平成 16 年に集団発生した肺吸虫による食中毒事例について, Clin. Parasitol. (臨床寄生虫学会誌) 17, 60-62, 2006.

杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 川中正憲, 平野敬之, 増本久人, 池添博士 : 平成 16 年に集団発生した肺吸虫による食中毒事例 : 原因の寄生虫学的精査, Clin. Parasitol. (臨床寄生虫学会誌) 17, 63-66, 2006.

杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲, 太田伸生, 赤尾信明, 有菌直樹, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 吉田彩子 : 輸入キムチから検出された回虫様卵の分子同定, Clin. Parasitol. (臨床寄生虫学会誌) 17, 153-155, 2006.

杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 川中正憲, 平野敬之, 増本久人, 船津丸貞幸, 藤原 義行, 池添博士, 松崎祐己, 森田満雄 : 2004 年秋に集団発生したウエステルマン肺吸虫による食中毒事例について, 病原微生物検出情報 27, 277-278, 2006.

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

レプトスピラ症ワクチンの開発に関する研究およびレプトスピラ症の疫学研究

分担研究者	小泉 信夫	国立感染症研究所 細菌第一部	主任研究官
研究協力者	樋坂 光明	共立製薬先端技術開発センター	研究開発一部一課 研究員
研究協力者	川上 和夫	共立製薬先端技術開発センター	研究開発一部 次長
研究協力者	鈴木 悟	共立製薬先端技術開発センター	研究開発一部二課 研究員
研究協力者	村上 保人	共立製薬先端技術開発センター	研究開発一部二課 課長
研究協力者	岸 雅彦	共立製薬先端技術開発センター	研究開発一部 部長
研究協力者	石川 幸治	宮崎県健福祉保健部康増進課	主査
研究協力者	馬場 義孝	宮崎県延岡保健所 衛生環境課	衛生係長
研究協力者	工藤 桃利	宮崎県延岡保健所	次長
研究協力者	玉得 吉信	宮崎県高千穂保健所 衛生管理課	課長
研究協力者	下村 高司	宮崎県日向保健所 衛生環境課	主査
研究協力者	山本 正悟	宮崎県衛研環境研究所	特別研究員
研究協力者	高取 一郎	宮崎県衛研環境研究所	食品衛生検査管理監
研究協力者	岩切 章	宮崎県衛研環境研究所	主任研究員
研究協力者	塩山 陽子	宮崎県衛研環境研究所	主任研究員

研究要旨

1. レプトスピラの感染防御タンパク質 LigA-m の組換えタンパク質を免疫することで、イヌにおいても LigA-m に対する抗体産生を誘導することができた。
2. LigA-m の経口ワクチンへの応用を目指して、LigA-m 発現大腸菌を作製しマウスに経口投与を行ったが、血中抗体産生は認められなかった。
3. 2006年8、9月に宮崎県北部で7例のレプトスピラ症が発生したため、レプトスピラ保菌動物調査を行った。同地域でネズミ57匹を捕獲しそのうちアカネズミ6匹からレプトスピラが分離でき、その分離株は患者血清と特異的に反応をした。また同地域で捕獲されたイノシシ、シカ、タヌキの腎臓中からレプトスピラ遺伝子 *flaB* を検出した。またレプトスピラ症疑いの猟犬からレプトスピラ抗体を検出した。

研究目的

レプトスピラ症は、スピロヘータの一種である病原性レプトスピラ (*Leptospira*) の感染により起こる人獣共通感染症である。レプトスピラ症の予防には、ワクチンが有効であることはすでに明らかになっているが、現行のワクチンは血清型に特異的な効果しかないと

め、血清型に依存しない広範囲のレプトスピラ感染に対して有効な新たなワクチンの開発が急務となっている。これまでの研究により、マウスおよびハムスターに対し感染防御免疫を誘導できるレプトスピラ抗原タンパク質 LigA-m を同定した。本年度は、他のレプトスピラ症モデル動物であるイヌを用いて、

LigA-m の感染防御効果を検討した。

レプトスピラは、自然界ではげっ歯類を中心として多くの野生動物の腎臓に定着し、尿中に排出され、その尿との接触で保菌動物間のレプトスピラの伝播は繰り返されている。この保菌動物間での伝播を遮断するために、LigA-m の経口ワクチンへの応用を試みた。

レプトスピラ症は全国的に散発例がみられるが、集発例は近年沖縄県でのみ報告されている。2006年8、9月に宮崎県北部で7例のレプトスピラ症が発生した。そのため、同地域でのレプトスピラ感染原因を明らかにするためにレプトスピラ保菌動物調査を行った。

方法

1. LigA-m のヒスチジンタグ組換えタンパク質の発現、精製

完全長 LigA-m は PCR によって増幅し、PQE60 ベクターを用いて、C 末端にヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質 (pLIGAM-F) として大腸菌 SCS110 で発現させ、Ni-NTA を用いてアフィニティー精製を行った。

2. イヌへの LigA-m の免疫

レプトスピラ抗体陰性の SPF ビーグル犬各 2 頭に、1 頭当たり 50 µg, 125 µg, 250 µg の組換え LigA-m タンパク質を免疫した。初回免疫にはフロイント完全アジュバントを用い、追加免疫は初回免疫 3 週間後に組換えタンパク質のみを注射した。なお注射部位は後肢大腿部筋肉内とした。初回免疫 2 日前、初回免疫時、初回免疫 1, 2, 3, 4 および 5 週目に採血を実施し抗体価の測定を行った。

3. 抗 LigA-m 抗体価測定

96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに GST/LigA-mC あるいは GST を 100 ng (TBS; 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5 で調製) 添加し、4°C で 1 晩吸着させた後、20 mg/ml BSA/TBST (TBS + 0.05% Tween20)

で 37°C, 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去後、BSA/TBST で 1,250 倍希釈したイヌ血清あるいは 50, 250, 1250 倍希釈した経口免疫マウス血清(下記 5 を参照)100 µl を加え、37°C, 2 時間インキュベーションし、200 µl の TBST で 3 回洗浄を行った。その後 BSA/TBST で希釈した 2 次抗体 (HRP 標識ウサギ抗イヌ IgG 1000 倍希釈あるいは HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 2000 倍希釈) を 100 µl 加え、37°C, 1 時間インキュベーションし、上述の通りに洗浄を行った。洗浄後、ABTS 溶液を各ウェル 100 µl 加えて室温で発色させ、405 nm で吸光度を測定した。

4. LigA-m 発現大腸菌の作製

大腸菌のリポタンパク質のシグナル配列 (Lpp) および N 末端アミノ酸配列を付与するベクター pDUMP (参考文献 1) の *Nco* I / *Bam*HI サイトに、PCR により増幅した成熟 LigA-m 全長をクローニングした。その後 pDUMP の RBS を含む Lpp+LigA-m を PCR で増幅し (3' 側プライマーに *Eco*R I サイトを導入)、*Eco*R I および *Kpn* I の切断断片 (RBS+Lpp+LigA-m 70 アミノ酸) と、上記 1 の pLIGAM-F の *Kpn* I / *Bg*II 切断断片 (LigA-m 70 ~ 1224 アミノ酸) を *Eco*R I / *Bg*II で消化した pQE60 ベクターにクローニングした。このプラスミドと *Lac*I の発現プラスミド pREP4 を用いて大腸菌 BL21 に形質転換した。LigA-m の発現は、抗 LigA-m 抗血清を用いたウエスタンブロット法により確認した。

5. マウスへの経口投与

LigA-m 発現大腸菌および非発現大腸菌 (LigA-m をクローニングしていないベクターを保持) を M9 培地で一晩培養後、新鮮な M9 培地に 1/100 量植え継ぎ、37°C で 2 時間半培養後、LigA-m の発現を誘導するため IPTG 10 µM (終濃度) を加えてさらに 1 時間培養した。培養後 OD600 = 1 に調整し、胃ゾンデを用い

てマウス 1 匹当たり 250 μ l を経口投与した。初回免疫として 1, 2, 3, 4 日目および 7, 8, 9, 10 日目に経口投与を行い、追加免疫として 22, 23, 24, 25 日目に経口投与を行った。経口免疫初日, 21 日後および 35 日後に採血を行い抗体価の測定を前述の ELISA 法にて行った。

6. レプトスピラの分離培養および各動物の腎臓からの DNA 抽出

ネズミの腎臓からコルトフ培地および EMJH 培地を用いてレプトスピラの分離培養を行った。培養は 30°C で 3 ヶ月間行い、1 週間ごとに暗視野顕微鏡下でレプトスピラの増殖の有無を観察した。

ネズミの腎臓 57 検体および猟友会の協力により採取したシカ腎臓 52 検体、イノシシ腎臓 39 検体およびタヌキ腎臓 1 検体から、DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を行った。

7. レプトスピラ *flaB* 遺伝子配列解析

レプトスピラ分離株より上記キットを用いて抽出した染色体 DNA および各動物の腎臓抽出 DNA を鋳型として、特異的プライマーを用いて *flaB* 遺伝子の増幅を行い (*flaB*-PCR; 腎臓抽出 DNA 検体については nested PCR), 増幅産物の塩基配列の決定を行った。

8. 顕微鏡下凝集試験

96 穴マイクロタイタープレートに、PBS で希釈したヒトあるいはイヌ血清と、被検レプトスピラ培養液(これまで国内で報告のある 15 血清型)をそれぞれ 25 μ l ずつ加え、37°C, 3 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡下で観察を行った。陰性対照と比較して、凝集していないフリーの菌数が 50% 以下になっている場合を陽性とした。

倫理面への配慮

動物実験を行うにあたっては、国立感染研究所動物実験委員会の承認を得て、実験動物管理運営規定、動物の保護と管理に関する法律に基づいて行った。

参考文献 1. Cullen PA et al. Plasmid. 49: 18-29, 2003.

結果および考察

1. LigA-m のイヌでの抗原性

これまでにマウスおよびハムスターを用いたレプトスピラ感染致死実験において、感染防御免疫を誘導することができたレプトスピラ感染防御抗原 LigA-m が、イヌにおいても感染防御抗原として機能するかについて調査を行った。ビーグル犬各 2 頭に、1 頭当たり 50 μ g, 125 μ g, 250 μ g の LigA-m 組換えタンパク質を筋肉内投与することにより、LigA-m に対する抗体を誘導することができた(図 1)。

レプトスピラ症に対する現行のワクチンは、血清型に特異的な効果しかなく、多くの血清型に有効な新たなワクチンの開発が急務となっている。これまでの研究から、*lig* 遺伝子は多くの病原性レプトスピラに存在し、異なる血清型に感染したレプトスピラ症患者血清中には、Lig タンパク質に対する抗体が産生されていることを明らかにしており、Lig タンパク質は多くの血清型感染に有効なワクチン候補と考えられている。本研究により、LigA-m はイヌに対しても抗原性を持ち、抗体産生を誘導することが明らかとなった。現在、この免疫したイヌに対して感染実験を開始しており、その結果が待たれるところである。

2. LigA-m の経口ワクチンへの応用

レプトスピラは、多くの野生動物の腎臓に定着し尿中に排出され、その尿との接触で動物間での伝播が繰り返されている。保菌動物を免疫することによってレプトスピラの伝播のサイクルを遮断することは、ヒトあるいは

家畜などへの感染予防のひとつの方法である。これまでに野生動物を経口的に免疫することで、狂犬病やペストのコントロールに成功している。そこでマウス、ハムスターにおいて腹腔免疫により感染防御効果がみられた LigA-m を経口的に免疫することで、レプトスピラの保菌動物であるマウスに感染防御効果を誘導するかについて調査を行った。

大腸菌の外膜に LigA-m が局在するように、大腸菌のリポタンパク質シグナル配列および N 末端 4 アミノ酸の下流に LigA-m の成熟型全長を挿入し大腸菌で発現を試みた。LigA-m の発現誘導は IPTG で行い、発現は SDS/PAGE および抗 LigA-m 抗血清を用いたウエスタン部ロット法にて確認した(data not shown)。LigA-m 発現大腸菌および非発現コントロール大腸菌を、胃ゾンデを用いてマウスに機械的に経口投与を行った。初回免疫後および追加免疫後に採血を行い、血中の IgG 抗体を測定したが、LigA-m に対する抗体価の上昇は認められなかった(data not shown)。

大腸菌による異種細菌タンパク質の発現およびタンパク質発現大腸菌の経口免疫による血中 IgG 抗体の誘導は、ボレリアの感染防御抗原 OspA で成功している(参考文献 2)。今回抗体産生誘導が行えなかった理由として、ボレリア OspA に比べ LigA-m は分子量が大きく、そのために発現やその後のフォールディングが適切に行われなかったことが考えられる。今後 LigA-m の感染防御活性を持つ最小断片を決定し、大腸菌内での適切な発現誘導を行うとともに、大腸菌以外の細菌あるいは植物発現系などを用いたデリバリー法の改良についても行っていくことが重要であると考えられた。

3. 宮城県北部におけるレプトスピラ保有動物調査

2006 年 8, 9 月に宮城県北部において 7 例のレプトスピラ症患者が発生した(表 1)。宮城県では 2000~2005 年で 3 例のレプトスピラ

症患者しか報告されておらず、その集団発生の感染原因特定のため、同地域でのレプトスピラ保有動物調査を行った。

レプトスピラの保有動物として最も重要なネズミからレプトスピラ分離を試みた。北部延岡市で 16 匹、日之影町 6 匹、高千穂町 9 匹、門川 26 匹を捕獲、腎臓の培養を行った結果、延岡市および高千穂町で捕獲されたアカネズミそれぞれ 1 匹と 5 匹からレプトスピラが分離された。両地区の分離株の鞭毛遺伝子 *flaB* 塩基配列は異なっていたが、すべて *L. interrogans* であることが明らかとなった(図 2)。また分離株の血清型は、標準レプトスピラ抗血清との反応性から、高千穂町で分離された 5 株は血清型 Autumnalis、延岡市分離株は Hebdomadis であると推定された(data not shown)。このネズミ分離株の血清型は、同地区で発生した患者の推定感染血清型と同一であった。そこで高千穂町の分離株 061201-3 および延岡市分離株 061129-7 に対して、患者血清を用いて凝集試験を行ったところ、高千穂分離株は高千穂町で発生患者血清と、延岡市分離株は延岡市の患者血清と特異的に反応が認められた(表 1)。また分離はできなかったものの、延岡市のアカネズミ 1 匹の腎臓からレプトスピラ *flaB* 遺伝子が検出され、*L. borgpetersenii* であることが明らかとなった(図 2)。

また患者が作業を行っていた畑や林に、シカやイノシシが出没していたことから、地元猟友会の協力によりシカ、イノシシを捕獲し腎臓からレプトスピラ遺伝子 *flaB* の検出を行った。およそ 30 mg の切片を腎臓皮質部分 2 ヶ所から切り出し、DNA 抽出、*flaB*-PCR を行い、どちらか一方からでも増幅産物が得られた場合を陽性個体と判定した。その結果、シカ腎臓 52 検体中 12 検体(23.1%)、イノシシ 39 検体中 4 検体(10.3%)、タヌキ 1 検体中 1 検体(100%)から *flaB* が検出された(表 2、図 2)。増幅された *flaB* の塩基配列を決定したところ、腎臓に定着していたレプトスピラ種は

L. interrogans (6 検体) および *L. borgpetersenii* (11 検体) であることが明らかになった(図 2)。

さらに延岡の動物病院に保存されていたレプトスピラ症疑いのイヌ血清について顕微鏡下凝集試験を行ったところ、8 頭中 6 頭からレプトスピラ抗体が検出された(表 3)。

本調査により、宮崎県北部地域では多くの野生動物がレプトスピラを保有していることが明らかとなった。患者からレプトスピラが分離できていないため確定することはできないものの、高千穂町のネズミは実際患者が作業を行っている畑で捕獲されており、また分離株は患者血清と特異的に反応したことから、ネズミが感染原因であることが強く示唆された。しかしながら、シカやイノシシも患者の畑や林などの作業場に出没することから、これら動物も感染原因である可能性もある。

またシカ、イノシシからレプトスピラ遺伝子が検出されたことは、これら野生動物の狩猟を行う人や、それらを加工・調理する人は、レプトスピラ感染のハイリスクグループであることを示唆しており、これらの人々へのレプトスピラ感染に対する注意喚起および感染防止策の教育を行うことが重要である。また猟犬からレプトスピラ抗体が検出されたことは、猟犬は狩猟を通してレプトスピラに感染したことが示唆された。同地域における狩猟者などハイリスクグループの人々および猟犬におけるレプトスピラ感染の実態把握を行うことも今後の課題であると考えられた。

参考文献 2. Gomes-Solecki MJC et al. *Vaccine*. 24: 4440-4449, 2006.

論文発表・著書

1. Masuzawa T, Okamoto Y, Une Y, Takeuchi T, Tsukagoshi K, Koizumi N, Kawabata H, Ohta S, Yoshikawa Y. Leptospirosis in squirrels imported from United States to Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 12(7):1153-1155 2006.
2. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ症. 新感染症学(下) 日本臨床増刊号 220-203, 2007.
3. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ症の最新の知見. *モダンメディア* 52(10): 299-306, 2006.
4. 小泉信夫, 渡辺治雄. ワイル病・秋やみ混合ワクチン. 予防接種のすべて 2006, 130-133, 日本小児医事出版社, 東京, 2006.
5. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ抗体. 検査地のみかた, 634-636, 中外医学社, 東京, 2006.