

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立  
シャーガス病感染制御手法の新規開発

|       |       |                  |       |
|-------|-------|------------------|-------|
| 分担研究者 | 宮平 靖  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 教授    |
| 研究協力者 | 高山英次  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 小野岳史  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 金山敦宏  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 山口陽子  | 防衛医科大学校・教務課 総務係  | 防衛技官  |
|       | 須原史子  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 研究補助者 |
|       | 梅本紗央里 | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 研究補助者 |

研究要旨

シャーガス病の病原体である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) は細胞内寄生原虫であり、原虫抗原 trans-sialidase surface antigen (TSSA) を用いた免疫が宿主防御免疫応答を付与することが明らかとなっている。そこで、同様に細胞内寄生原虫症であるマラリア、リーシュマニア症などをも含めた予防的/治療的免疫療法の開発研究のモデルとして、*T. cruzi* の TSSA 抗原上の CD8 陽性 T 細胞誘導配列 ANYNFTLV 発現する組換えインフルエンザベクター (FLUMANY)、アデノウイルスベクター (AdMANY) と組換え弱毒ワクシニアウイルスベクター (MVAMANY) 三種組換えウイルスベクターを用いた単一 CD8T 配列に対する免疫応答誘導による感染制御手法の新規開発を目指している。その結果、三種組換えウイルスベクター組合せ免疫手法は、従来知られてきた二種免疫原組合せ手法よりも優れていることが明らかになった。本手法は、シャーガス病など細胞内寄生原虫症の感染制御においてのみではなく、細胞内感染細菌症やウイルス症の新規感染制御法開発への応用も期待される。

A. 研究目的

中南米に流行するシャーガス病の病原体である *T. cruzi* は細胞内寄生原虫であり、我々は原虫抗原 TSSA を用いた免疫が宿主防御免疫応答を付与することを見出し、同抗原上に H-2K<sup>b</sup> 拘

束性 CD8 陽性 T 細胞誘導配列 ANYNFTLV を同定し解析を行ってきた。本研究では、作製済みの ANYNFTLV 発現組換えアデノウイルスベクター (AdMANY)、組換え弱毒ワクシニアウイルスベクター

(MVAMANY) に加え、同配列発現組換えインフルエンザベクター (FLUMANY) を新たに作製し、これら三種組換えウイルスベクターを用いた単一 CD8 陽性 T 細胞配列に対する免疫応答誘導による宿主防御能の解析を目的とした。

## B. 研究方法

C57BL/6 マウスへ上記三種ウイルスベクターを組み合わせて免疫し、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導レベルを ANYNFTLV/MHC-pentamer 標識を用いたフローサイトメーター法およびインターフェロン-ガンマ (IFN- $\gamma$ ) 産生細胞数を ELISPOT アッセイ法によって解析した。さらに、免疫マウスへの感染実験により血中出現原虫数の算出および生存マウス数の算定から感染防御能を判定した。

## C. 研究結果

組換えウイルスベクター三種免疫手法は、単独または二種免疫手法に比べて抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導能が優れていた。三種免疫では、(1) FLUMANY 初回, AdMANY 二回, MVAMANY 終回免疫、(2) AdMANY 初回, FLUMANY 二回, MVAMANY 終回免疫は、(3) AdMANY 初回, MVAMANY 二回, FLUMANY 終回免疫に比較して、より高レベルの特異的

CD8 陽性 T 細胞分化を誘導することが明らかになった (図 1)。また、(1) の免疫条件では(2)の免疫条件に比較して、より多くの IFN- $\gamma$  産生細胞を誘導することが明らかになった (図 2)。そして、感染実験においても(2)の三種免疫手法は二種免疫手法に比べて、血中出現原虫数 (図 3) および生存マウス数 (図 4) においても、高い感染防御能を誘導した。

## D. 考察

実験シャーガス病モデルを用いた三種組換えウイルスベクター組合せ免疫手法の検討では、従来知られてきた二種免疫原組合せ手法より抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能に優れていた。感染実験においてもこの結論を支持する結果が得られ、新たなワクチン手法として注目される。

## E. 結論

三種組換えウイルスベクター組合せ免疫手法は、旧来の免疫療法の殻を打ち破る CD8 陽性 T 細胞免疫応答の誘導手法に着目した新規感染制御手法として期待できる。本新規感染制御手法は、シャーガス病の新規感染制御手法としてのみではなく、同様に細胞内寄生原虫症であるマラリア、リーシュマニア症などをも含めた予防的/治療的免疫療法の新規手法としての応用

も期待できる。さらに、本新規手法は、細胞内寄生原虫症の感染制御においてのみではなく、細胞内感染細菌症やウイルス症の新規感染制御法開発に応用できるもととしても期待できるであろう。

#### **F. 健康危険情報**

該当項目なし

#### **G. 研究論文**

該当項目なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当項目なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立  
マラリア感染制御手法の新規開発

|       |       |                  |       |
|-------|-------|------------------|-------|
| 主任研究者 | 宮平靖   | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 教授    |
| 研究協力者 | 小野岳史  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 金山敦宏  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 高山英次  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 山口陽子  | 防衛医科大学校・教務課 総務係  | 防衛技官  |
|       | 須原史子  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 研究補助者 |
|       | 梅本紗央里 | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 研究補助者 |

研究要旨

マラリア赤内型における「発症阻止」手法の開発を目指し、抗原特異的 CD8T 細胞の積極的誘導による感染防御の可能性について検討を行った。*Trypanosoma cruzi* において抗原特異的防御免疫応答を誘導することが明らかになっている trans-sialidase surface antigen, TSSA エピトープを発現する遺伝子組換えマラリア原虫を作出し、免疫応答の解析およびワクチン接種による特異的防御免疫誘導の検討を行ったところ、エピトープ発現マラリア原虫の感染によってエピトープ特異的 CD8T 細胞が誘導されることがわかった。さらに prime-boost 法によるワクチン接種後に組換えマラリア原虫を感染させたところ、エピトープ発現組換えマラリア原虫では生存率の改善が認められた。

A. 研究目的

マラリアの感染制御手法の開発研究は、その複雑なライフサイクルの理解の下に「感染阻止」「発症阻止」「伝播阻止」のアプローチから進められている。

現在最も実用化に近いアプローチは「感染阻止」だが、マラリアの

臨床症状顕現・致命的経過の原因となるのは赤内型であり、このステージを制御する「発症阻止」手法の開発が、マラリアによる人的・経済的損失を抑えるために最も重要であると考えられる。そこで、マラリア赤内型における「発症阻止」手法の開発を目指し、抗原特異的 CD8 の

積極的誘導による感染防御の可能性について検討を行った。

CD8 による防御機構としては細胞障害活性が知られており、MHC 分子を発現しない赤血球内に寄生するマラリア原虫の殺滅には無効であると考えられてきたが、近年 CD8 の細胞障害活性は感染細胞の間接的な殺滅にも関わっているとの報告が、ある種の感染系で報告されている。従って、ナチュラルコースで防御能を示唆する結果が十分得られていなくとも、相当量の抗原特異的 CD8 の積極的誘導が防御効果を発揮する可能性は否定できない。この仮定に基づき、内在性の標的抗原分子の探索に先立ち、すでに *Trypanosoma cruzi* において抗原特異的防御免疫応答を誘導することが明らかになっている trans-sialidase surface antigen, TSSA エピトープを 発現する遺伝子組換えマラリア原虫を作出し、免疫応答の解析およびワクチン接種による特異的防御免疫誘導の検討を行った。

## B. 研究方法

1. エピトープ発現組換え DNA の作製  
TSSA エピトープである H-2K<sup>b</sup> 拘束性 ANYNFTLV 配列を付加した *P.berghei* HSP70 プロモーターDNA 断片または GFP DNA 断片を PCR により合成した。各 DNA 断片をクローニングし塩基配列確認した後、*P.yoelii* DHFR 遺伝子領域に相同組換え可能な pyDH7 ベクターへ

サブクローニングし、それぞれ pyDH7-TSSA、pyDH7GFP-TSSA とした。

## 2. エピトープ発現マラリア原虫の作出

作製した TSSA エピトープ発現ベクターをネズミマラリア原虫である *P. yoelii* の DHFR 領域に AMAXA Nucleofector System (amaxa 社, ドイツ) を用いて同社のプロトコールに従って相同組換えにより導入し、組換え体をピリメサミン投与により得た。

## 3. ELISPOT アッセイ

組換えマラリア由来粗抗原接種マウス膝下リンパ節または組換えマラリア原虫感染マウス脾臓より細胞を調製し、エピトープ特異的 CD8T 細胞数を IFN- $\gamma$  産生を指標として ELISPOT 法にて検討した。

## 4. ワクチン接種による免疫誘導及び感染実験

組換えアデノウイルス接種二週間後、組換えワクシニアウイルス接種三週間後に各組換えマラリア原虫を免疫マウスに感染させ、血中原虫密度および生存率について検討した。

## C. 研究結果

### 1. TSSA エピトープ発現組換えマラリア原虫の作製

TSSA エピトープである H-2K<sup>b</sup> 拘束性

ANYNFTLV 配列、およびこの配列を GFP の C 末端に融合させたものを HSP70 プロモーターにより発現するコンストラクトを作製し、ネズミマラリア原虫である *P.yoelii* の DHFR 領域に相同組換えにより導入した。各組換えマラリア原虫はクローニング後、ゲノム DNA を抽出し *BglII* で切断後、サザンブロッティングにより組込み部位の確認を行った。さらに赤内型における増殖および致死株としての性質を保持していることも確認した。また、GFP 発現マラリア原虫については、赤血球内での GFP 発現および、血中原虫密度と GFP 発現率の相関も確認した。

2.TSSA 発現マラリア原虫由来粗抗原によるエпитープ特異的 CD8T 細胞の誘導  
組換えマラリア原虫が TSSA エピトープを発現しているかを確認するために、各組換えマラリアを感染させたマウスより感染赤血球を分離し、これを粗抗原としてアジュバントと混合し、マウスの足蹠に皮下注射、二週後に膝下リンパ節を取り出し、TSSA エピトープ特異的 CD8T 細胞の誘導を IFN- $\gamma$  産生を指標として ELISPOT アッセイにて検討した。さらに二度の特異抗原刺激による増殖誘導を行った。その結果、抗原特異的 CD8T 細胞が誘導されており、これらの組換えマラリア原虫が目的のエピトープを発現していることが確認された。

3.TSSA 発現マラリア原虫感染によるエピトープ特異的 CD8T 細胞の誘導

次に各組換えマラリア原虫をマウスに感染させた後、血中原虫密度が 20-40 % になった時点でクロロキン投与を行ない、治癒後に抗原特異的 CD8T が誘導されているかを同じく ELISPOT アッセイにより検討した。その結果、組換えマラリア感染によってもエピトープ特異的 CD8T が誘導されることが確認された。

4. ワクチン接種によるエピトープ発現マラリア原虫の感染制御

エピトープ特異的 CD8T 細胞をさらに効果的に誘導する目的で、組換えアデノウイルスと組換えワクシニアウイルスを用いた prime-boost 接種を行った。組換えアデノウイルス接種二週間後、組換えワクシニアウイルス接種三週間後に各組換えマラリア原虫を免疫マウスに感染させ、血中原虫密度および生存率について検討したところ、コントロールとなるエピトープを持たないマラリア原虫に感染したマウスに対し、TSSA エピトープ発現マラリア感染マウスにおいては血中原虫密度に有意差は認められなかったが、生存率の改善が認められた。

#### D. 考察

TSSA エピトープ発現組換えマラリア原虫由来粗抗原を用いて免疫したマウ

スにおいて TSSA エピトープ特異的 CD8T 細胞が誘導されていたことから、組換えマラリア原虫において TSSA エピトープが発現していることが確かめられた。また、原虫感染によってもエピトープ特異的 CD8T 細胞が誘導された。このことは、ナチュラルコースの感染によってもエピトープ特異的 CD8T 細胞が誘導されうることを示している。

現在最も免疫誘導効率の高いワクチン手法である組換えアデノウイルスと組換えワクシニアウイルスを用いた prime-boost 接種を行った後、各組換えマラリア原虫を免疫マウスに感染させ、血中原虫密度および生存率について検討したところ、コントロールとなるエピトープを持たないマラリア原虫に感染したマウスに対し、TSSA エピトープ発現マラリア感染マウスにおいては血中原虫密度に有意差は認められなかったが、生存率の改善が認められた。

MHC クラス I を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してエピトープ特異的 CD8T 細胞が感染防御能を示す機構は明らかではないが、誘導されたエピトープ特異的 CD8T 細胞によって産生される IFN- $\gamma$  が感染赤血球を殺滅する

可能性が考えられ、現在その機構の解析を行っている。

## E. 結論

本研究ではマラリア赤内型における「発症阻止」手法の開発を目指し、抗原特異的 CD8 の積極的誘導による感染防御の可能性について検討を行った。TSSA エピトープ発現マラリア原虫を作製し、この組換えマラリア原虫に対するワクチン接種効果を検討したところ、血中原虫密度には差がなかったが、生存率の改善が認められた。これらの感染防御免疫応答が特異的であることを、H-2K<sup>d</sup> 拘束性抗原エピトープを発現する組換えマラリア原虫による感染実験、および抗原特異的 CD8T クローンの移入による感染防御の確認を実施し、さらに内在性標的抗原の探索を進めていく予定である。

## F. 健康危険情報

該当項目なし

## G. 研究論文

該当項目なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立

脳マラリア感染制御手法の新規開発

|       |       |                  |       |
|-------|-------|------------------|-------|
| 主任研究者 | 宮平靖   | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 教授    |
| 研究協力者 | 金山敦宏  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 小野岳史  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 高山英次  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 助教    |
|       | 山口陽子  | 防衛医科大学校・教務課 総務係  | 防衛技官  |
|       | 須原史子  | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 研究補助者 |
|       | 梅本紗央里 | 防衛医科大学校・国際感染症学講座 | 研究補助者 |

研究要旨： 熱帯熱マラリアの合併症として頻発する脳マラリアでは、CD8<sup>+</sup>T 細胞の脳への蓄積を伴うことが知られている。本研究では、マウス脳マラリア実験系を用いて CD8<sup>+</sup>T 細胞の役割を解析することを試みている。

A. 研究目的

熱帯熱マラリアは症状の進行が早く、しかも死亡する確率が高いことが知られている。合併症として多発するのが脳マラリアである。その発症メカニズムとしては、脳の毛細血管にマラリア原虫の感染した赤血球が集積して血管が閉塞することが考えられ、同様の理由により脳以外の組織の血管も閉塞する。その結果、腎不全、肺水腫を伴いながら意識障害、麻痺、痙攣の症状を呈し、昏睡へと陥る。C57BL/6

マウス等のネズミマラリアへの感染実験では、脳に CD8<sup>+</sup>T 細胞が集積することが知られている。一方で、CD8<sup>+</sup>T 細胞を中和抗体で除去すると、脳マラリアの進行が軽減あるいは発症が抑制されることが報告されている。しかしながら、CD8<sup>+</sup>T 細胞はマラリア原虫の排除に一定の機能を持っていることが知られており、CD8<sup>+</sup>T 細胞の脳マラリアにおける役割は明確になっていない。そこで、脳マラリアの発症あるいは進行に関与すると考えられる



CD8<sup>+</sup>T 細胞をマウスに移入することによって、マラリア感染に与える影響を検討した。

## B. 研究方法

脳マラリアは、血液脳関門の破綻が特徴的である。これを確認するために、Evans blue を感染したマウスに静脈注射し、脳組織への漏出によって判定した。トリパノソーマ原虫の TSSA 抗原を発現した遺伝子改変マラリアを作製した。一方、TSSA 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の株を樹立した。

## C. 研究結果

ネズミマラリア株の一つ、*P. berghei* ANKA を C57BL/6 マウスに感染させたときには、脳組織への血液成分の漏出が確認されたが、*P. berghei* NK65 を C57BL/6 マウスに感染させた場合には、ほとんど漏出がみられなかった。このことから、ANKA 株の C57BL/6 マウスへの感染が脳マラリア発症のモデルとして有用であることが確認できた。

## D. 考察

ネズミマラリア *P. berghei* ANKA 株の C57BL/6 マウスへの感染実験系において、TSSA 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を予め静脈から移入したマウスに遺伝子改変マラリアを感染させ、CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能を解析しつつある。

## E. 結論

今後、CD8<sup>+</sup>T 細胞の脳マラリアにおける役割を解明し、脳マラリアの発症・進行のメカニズムを理解する結果、重症化するマラリアに対する新規制御手法の構築に繋がると考えられる。

## F. 健康危険情報

該当項目なし

## G. 研究論文

該当項目なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立

分担研究課題:消化管原虫およびマラリア原虫検査

分担研究者 赤尾信明<sup>1</sup>・春木宏介<sup>2</sup>

1 東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野

2 獨協医科大学越谷病院臨床検査部

研究要旨: 日本国内における海外長期滞在経験者や在留外国人を対象に慢性感染症の罹患状況の調査, サーベイランス体制の確立を目的に, 平成 18 年度に神奈川県大和市にて2度にわたって健診を実施し, 慢性寄生虫感染症に対する検査を実施した。マラリア迅速診断キット(OptiMal)を用いた検査では, 検査した 105 検体すべてが陰性であった。また, ホルマリンエーテル法による寄生虫卵および原虫類嚢子の検査では 47 検体中1例から鉤虫卵を検出した。原虫嚢子陽性者は見られなかった。

A. 研究目的

今日, 日本人の海外旅行者数は毎年 1700 万人を超え, 海外からの短期観光旅行者も年間 700 万人に達しようとしている。これらの短期旅行者が日本国内で発病する, いわゆる輸入感染症の多くは急性感染症で, ウイルスや細菌類を原因とするものが多い。一方, 商用で海外に長期間滞在した経験を持つ人や, 老後を海外で長期間暮らす人も増加してきている。さらに, 特別永住者を除く在留外国人は, 平成 17 年度には約 150 万人を超えている。これ

らの人の中には, 感染しても自覚症状の乏しい慢性寄生虫症の流行地や, かつては日本でも広く存在した土壤伝播寄生虫感染症の流行地から帰国あるいは来日する人も多数おり, 国内での流行の兆しが確認されている。輸入感染症の多くは, 検疫体制の強化により水際で日本国内への侵入を防ぎ得るものの, 人的交流の拡大に伴いヒトにより持ち込まれる慢性感染症の実態の把握は困難である。

このため, 本研究班の初年度において, 日本国内における海外長期滞在経

験者や在留外国人を対象に慢性寄生虫感染症の罹患状況の実態調査を実施することにした。

## B. 研究方法

### 1. 被検者の募集

東京医科歯科大学倫理審査委員会の審査の承認(受付番号 419 号)を受け、協力研究委員の小林国際クリニック(神奈川県大和市西鶴間) 院長小林米幸医師の協力の下、同医院を受診中の在留外国人並びにカトリック大和教会(神奈川県大和市南林間)の信者を対象に検診を実施した。実施に当たっては倫理審査委員会の承認条件に則り、事前にインフォームドコンセントを十分行い、ヘルシンキ宣言を尊重し、個人の人権擁護、研究によって生じる不利益について説明を行い、書面にて自由意志による参加である旨の了解を得た。

研究初年度の検診は平成 18 年 12 月 22 日と平成 19 年 1 月 6 日の 2 回実施した。

### 2. 検体の採取

事前に配布した糞便採取容器に母指頭大の糞便を受診者に採取してもらい、検診当日に持参してもらい容器を回収した。あるいは、検診終了後に小林国際クリニックに郵送にて送付されてきた。検診

当日に採血した血液は遠心分離後、血清生化学検査終了後冷蔵にて搬送され、事後の検査に供した。また、EDTA 添加試験管で採血した血液を用いて薄層塗抹標本を作製し、ギムザ染色を施した。残りの血液はマラリア迅速診断キット(OptiMAL®, DiaMed 社)を用いて検査した。

### 3. 糞便検査

糞便内の寄生虫卵検査にはホルマリン・エーテル遠心沈澱法を用いた。また、原虫類の嚢子(シスト)の検出にはホルマリン・エーテル法の沈渣にヨード染色を施して観察した。鏡検に際しては、20mm×20mm のカバーガラス1枚と18mm×18mm(ヨード染色標本)カバーガラス1枚のすべての視野を観察した。

### 4. 慢性寄生虫感染症に対する血清抗体検査

検診受診者の慢性寄生虫感染症に対する血清抗体検査はdot-ELISA法あるいは、われわれが開発した迅速診断キット(ToxocaraCHEK)によって行った。用いた抗原は、イヌ回虫幼虫排泄物抗原、剛棘顎口虫幼虫抗原、旋毛虫筋肉内幼虫抗原、ウエステルマン肺吸虫抗原、肝蛭抗原、有鉤囊虫抗原、赤痢アメーバHK-1抗原である。被検血清は1:200希釈、二次抗体(抗ヒトIgG抗体)は1:2000希釈して試験に供した。発色基質には

EzWestBlue (ATTO, AE-1490)を用いた。また、ToxocaraCHEKは添付のマニュアルに従って実施した。

## C. 研究結果

### 1. 被検者の概要

平成 18 年 12 月に実施した検診では 51 名、平成 19 年 1 月の検診では 63 名の受診者があり、初年度の受診者総数は 114 名であった。この内、血液あるいは血清、糞便のいずれかの検体を回収し得たのは 107 名であった。受診者の性別、年齢、国籍、滞在期間などについて

は別途分担研究者から報告されるので、詳細はここでは記さない。

### 2. マラリア原虫抗原検査

OptiMAL を用いてマラリア抗原検査を実施し得たのは 105 検体であった。検査結果を図1a, b に示す。いずれの回の検査でも、陽性対照血液(熱帯熱マラリア陽性患者血液)でのみ2本の陽性バンドが出現したが、検診受診者の血液はすべて陰性と判定された。本検査結果については分担研究者である春木の報告書の中でもふれられている。

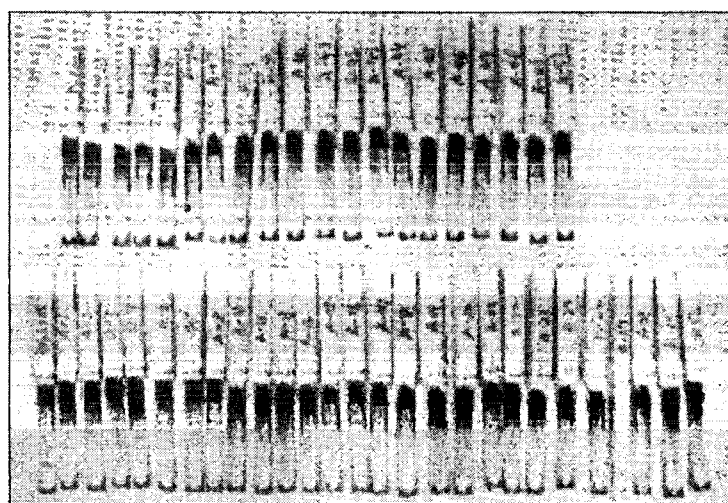


図 1 a

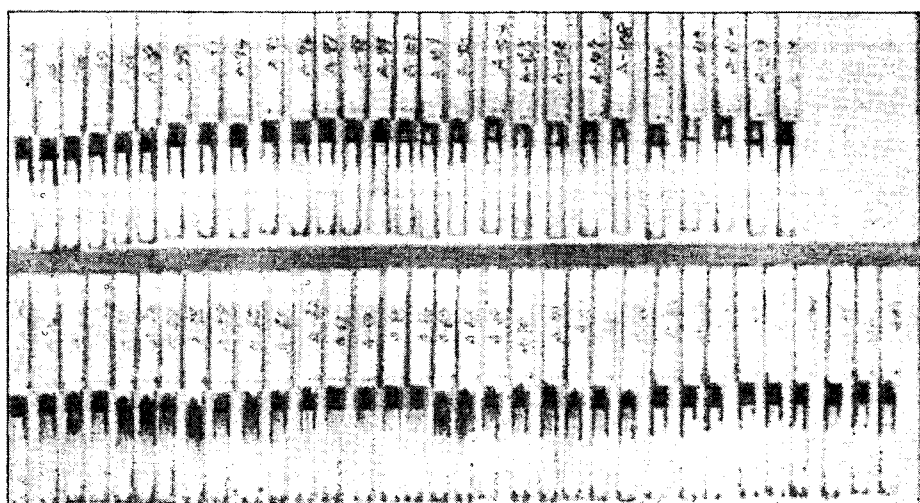


図 1 b

### 3. 糞便検査結果

糞便検査のための検体が回収できたのは、第1回目検診時30検体、第2回目検診時17検体であった。これら47検体をホルマリン・エーテル法により糞便内の虫卵を検査したところ、1例から鉤虫卵を検出した(図2)。この検体はフィリピンから来日した女性のものであった。残りの

糞便を用いて濾紙培養法を行ったがフィリア型幼虫は見つからなかった。また、22×22mm カバーガラス1枚中には6個の鉤虫卵が認められ、その計測値の平均は  $67.0 \pm 0.9 \times 38.7 \pm 1.1 \mu\text{m}$  であった。沈渣のヨード染色標本ではいずれの検体からも原虫類の嚢子は検出されなかった。

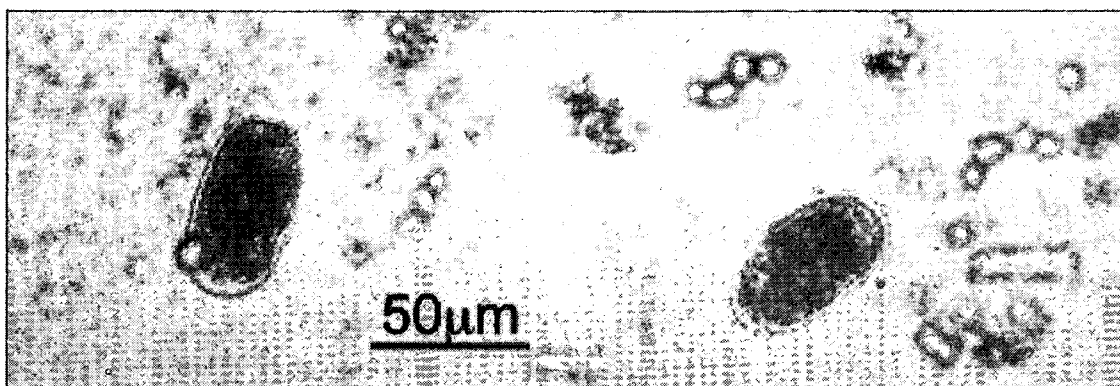


図2 検体番号79の糞便検査で見つかった鉤虫卵

### 4. 血清寄生虫抗体スクリーニング検査

表1に ToxocaraCHEK の結果を示す。

抗体陽性と判定されたのは9検体(8.6%)、疑陽性35検体であった。

表1 ToxocaraCHEKによるトキソカラ抗体検査結果

|              | 陽性        | 疑陽性         | 陰性          |
|--------------|-----------|-------------|-------------|
| ToxocaraCHEK | 9<br>8.6% | 35<br>33.3% | 61<br>58.1% |

dot-ELISAによるスクリーニング検査結果は表2に示した。赤痢アメーバ抗体陽性者に対して、赤痢アメーバHK-1抗原を用いて寒天ゲル内二重拡散法を実施

したところ、33検体すべてで沈降抗体は確認できなかった。その他の抗体陽性者については、現在さらに精密検査を実施中である。

表2 dot-ELISAによる寄生虫抗体スクリーニング結果

| 抗原     | 陽性検体 | 陽性率   |
|--------|------|-------|
| 赤痢アメーバ | 33   | 31.4% |
| 肺吸虫    | 3    | 2.9%  |
| 顎口虫    | 2    | 1.9%  |
| 多包虫    | 1    | 1.0%  |

#### D. 考察

初年度は、健診システムの構築と検査項目の選択に重点をおき検討を行った。マラリア感染の有無については迅速診断キット OptiMAL®で検査したが、陽性者は見られなかった。OptiMAL®は流血中の原虫感染率が0.002%程度以上の場合陽性反応が見られるといわれているので、今回の結果からは完全にマラリア感染者がゼロであるとは断定できないが、少なくとも、有症者でかつ抗原陽性者を見いだすことは出来なかった。次年度については、過去の感染をよりの確に判断できる抗体検査法の併用を考慮すべきだと考えられた。

糞便検査を実施し得た47検体の中で、1検体から鉤虫卵が検出された。鉤虫感染は慢性貧血の原因となり、小児の重症例では栄養不良、発育障害を引き起こすといわれている。今回、鉤虫卵が検出された検体について濾紙培養法を行ったが、フィラリア型幼虫が検出できなかった。これは検体がすでにホルマリン水で

固定されていたためだと考えられた。そのため、検出された鉤虫卵の虫種を決定することは出来なかった。通常、東南アジアに分布する種類はズビニ鉤虫であるといわれているが、来年度にはホルマリン固定された虫卵による虫種の同定についても検討を加えていきたい。

寄生虫抗体スクリーニング検査で、赤痢アメーバ抗体陽性者が105名中33名(31.4%)に見られた。これらの検体についてはさらに寒天ゲル内二重拡散法を用いて沈降抗体の有無を検討したが、明らかに沈降線を形成した検体は認められなかった。今回のdot-ELISAの感度・特異性に関しては次年度以降に検討の余地があると思われる。肺吸虫、顎口虫、多包虫抗原に対して陽性を示した検体については現在さらに詳細な検討を加えており、改めて報告したい。

#### E. 結論

初年度の研究で、神奈川県下に在住する外国人114名を対象に糞便検査と血清寄生虫抗体スクリーニング検査並びに全血を用いたマラリア原虫検査を実

施した。糞便検査で1名から鉤虫卵を検出した。寄生虫抗体スクリーニング検査では赤痢アメーバ抗体陽性者が33名(31.4%)に見られたが、寒天ゲル内二重拡散法ではすべて陰性であった。抗体陽性者に対する詳細な検討が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当項目なし

#### G. 研究論文

##### 1. 論文発表

[1] Akao N, Ohta N. Toxocariasis in Japan.

Parasitology International. 2007;56(2):87-93

[2] Cho S, Egami M, Ohnuki H, Saito Y,

Chinone S, Shichinohe K, Suganuma M, Akao N. 71.

Migration Behaviour and Pathogenesis of Five

Ascarid Parasites, *Toxocara canis*, *Baylisascaris* [8] 赤尾信明. 変貌するトキソカラ症と新しい動物モデル(2). 東獣ジャーナル.

*procyonis*, *B. transfuga*, *Ascaris suum*, and *A.*

*lumbricoides* in the Mongolian gerbil, *Meriones*

*unguiculatus*. Journal of Helminthology

2007;81:43-47. [9] 大友弘士, 赤尾信明. 感染症に及

[3] Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N (下) -新時代の基礎・臨床研究-: 日

Morio T, Mochizuki M. Identification of human

herpesvirus 6 variant A in a patient with ocular

toxocariasis. Archives of Ophthalmology.

2007;125:1426-1427.

[4] Maeda T, Yamada H, Akao N, Iga M, Endo T,

Koibuchi T, Odawara T, Iwamoto A, Fujii T.

Unusual radiological findings of *Fasciola hepatica* infection with a huge cystic and multilocular lesions. Internal Medicine.

2008;47:449-452.

[5] 赤尾信明. 医動物学. In: 紀代子 芝, editor. 臨床検査技師 イエロー・ノート臨床編. 東京: メジカルビュー; 2007. p. 138-183.

[6] 赤尾信明. 変貌するトキソカラ症と新しい動物モデル(1). 東獣ジャーナル. 2007;45(11): 16-18.

[7] 赤尾信明. 医動物学. In: 紀代子 芝, editor. 臨床検査技師 グリーン・ノート臨床編. 東京: メジカルビュー; 2007. p.

[8] 赤尾信明. 変貌するトキソカラ症と新しい動物モデル(2). 東獣ジャーナル. 2007;45(12): 15-17.

[9] 大友弘士, 赤尾信明. 感染症に及ぼす地球温暖化の影響. 新感染症学

本臨床 2007. p. 653-658.

#### 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（平成19年度厚新興再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立に関する研究  
日本住血吸虫症の簡易診断法に関する研究

分担研究者 大前比呂思 国立感染症研究所・寄生動物部 室長  
研究協力者 朝日博子 国立感染症研究所・寄生動物部 主任研究官  
研究協力者 千種雄一 獨協医科大学・熱帯病寄生虫学センター 教授

**研究要旨** 従来の研究で、日本住血吸虫感染者の尿中には、日本住血吸虫：*Schistosoma japonicum* 成虫体（SWAP）及び虫卵（SEA）に対する IgG 抗体が出現しており、各々診断検査に十分使用できることがわかっている。また、日本住血吸虫成虫の tegument に局在し、22.6kDa の理論上分子量を持つ蛋白のレコンビナント抗原（rSj 22.6）を用いた場合も、尿による日本住血吸虫症免疫診断は可能である。そこで、今年度は、尿による日本住血吸虫症の簡易診断法の精度向上を目指して、抗 SWAP 抗体と抗 SEA 抗体、さらに rSj 22.6 を用いて、回虫や鉤虫など、他の消化管寄生蠕虫の感染者を中心に、他の寄生蠕虫感染者で偽陽性を示す例がないかを検討した。また、実際に日本に滞在する 41 人の外国人から採取された尿を用いて同様な検査を行い、その結果を血清による虫卵抗原に対する ELISA による結果と比較した。その結果、住血吸虫以外の消化管寄生蠕虫に感染している例で、尿中の SWAP 及び SEA に対する IgG 抗体価 や rSj 22.6 に対する抗体価が上昇している例はみられなかった。また、日本に在住する 41 人の外国人から採取された尿を用いた検査でも、全例陰性となり、その結果は血清による ELISA の結果と一致した。

A. 研究目的

わが国においては、1976 年を最後に日本住血吸虫症の国内発症の例はみられていない。しかし、山梨県の甲府盆地や千葉県の本郷市、小櫃川流域には、未だ宮入貝が生息している。これらの地域の宮入貝は、フィリピンや中国の住血吸虫症浸淫地で問題となっている日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* strain に感染性があるので、今後国内で再興感染症として問題になる可能性を否定することはできない。

現在、対策の進展によって、日本住血吸虫浸淫では、軽症例や虫卵排泄数が少ない例が増えており、1 回の糞便

検査では診断できないことも多い。その為、日本住血吸虫の感染の有無を正確に検査・診断できる簡便な検査の開発が望まれる。そこで、尿を用いた、非侵襲的で簡便な検査法の開発を目指すこととした。

B. 研究方法

今までの研究の結果、日本住血吸虫感染者の尿中には、*S. japonicum* 成虫体（SWAP）及び虫卵（SEA）に対する IgG 抗体が出現しており、各々が診断検査に使用できることがわかっている。また、*S. japonicum* 成虫の tegument に局在し、22.6kDa の理論上分子量を持つ蛋白のレコンビナント



抗原 (rSj 22.6) を用いても、尿による免疫診断は可能である。そこで、今年度は、尿による日本住血吸虫症の簡易診断法の精度向上を目指して、抗 SWAP 抗体と抗 SEA 抗体、さらに rSj 22.6 を用いて、回虫や鉤虫など、他の消化管寄生蠕虫の感染者 50 人について、偽陽性を示す例がないかを検討した。また、実際に日本に滞在する 41 人の外国人から採取された尿を用いて同様な検査を行い、その結果を血清による虫卵抗原に対する ELISA による結果と比較した。

(倫理面への配慮)

血液及び尿の検体は、提供者の自由意志のもと、本研究の関してその研究目的、内容につき十分な説明を受けた上で、提供者の同意を文書で得てから採取した。

### C. 研究結果

フィリピンの日本住血吸虫症浸淫地、レイテ島で得られた虫卵陽性者の尿 (Sj-Urine) を陽性コントロールとした。同じくレイテ島で得られた住血吸虫に感染していない回虫、鉤虫卵養成者の尿 (N-1) 50 検体、2008 年 1 月の外国人健診で得られた尿 (N-2) 41 検体について検討した。その結果、N-1 及び N-2 の検体で、陽性となった例はみられなかった (図 1)。また、rSj 22.6 を用いて、N-1 及び N-2 の尿検体を分析したところ、やはり、陽性となった例はみられなかった。N-2 については、採取した血清で、日本住血吸虫の虫卵を用いた ELISA も併せて行ったが、41 例中陽性を示した例は 1 例もみられず、尿を用いた解析結果と一致した。

### D. 考察

抗 SWAP 抗体と抗 SEA 抗体、レコ

ンビナント蛋白 rSj 22.6 とも、日本住血吸虫以外の消化管寄生蠕虫感染に対しては反応を示さず、尿による免疫診断に利用できることが示された。特に、実験的に住血吸虫の生活環を維持していないと入手できない粗抗原を用いる必要がないレコンビナント蛋白 rSj22.6 による診断は、今後の検査診断体制を考えると期待できる。

ところで、2008 年 1 月の外国人健診で尿が採取された 41 例のうち 28 例は、日本住血吸虫症浸淫地を国内に持つフィリピンの出身であったが、尿及び血清による免疫診断で住血吸虫症が疑われた例はみられなかった。しかしながら、問診によれば、日本住血吸虫症浸淫地であるミンダナオ島やレイテ島などの出身者は、今回の健診の受診者にはみられず、また、浸淫地を訪問したことがある例もわずかであった。

### E. 結論

尿による日本住血吸虫症の簡易診断法の精度向上を目指して、抗 SWAP 抗体と抗 SEA 抗体、レコンビナント蛋白 rSj 22.6 を用いて検討したところ、他消化管寄生蠕虫の感染者で、擬陽性を示した例はみられなかった。また、在日外国人健診 (41 人中、フィリピン出身者は 28 人) で得られた尿を用いて検討した場合も、陽性者はみられず、その結果は、血清による虫卵抗原に対する ELISA による結果と一致した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

4月3, 4日, 長崎

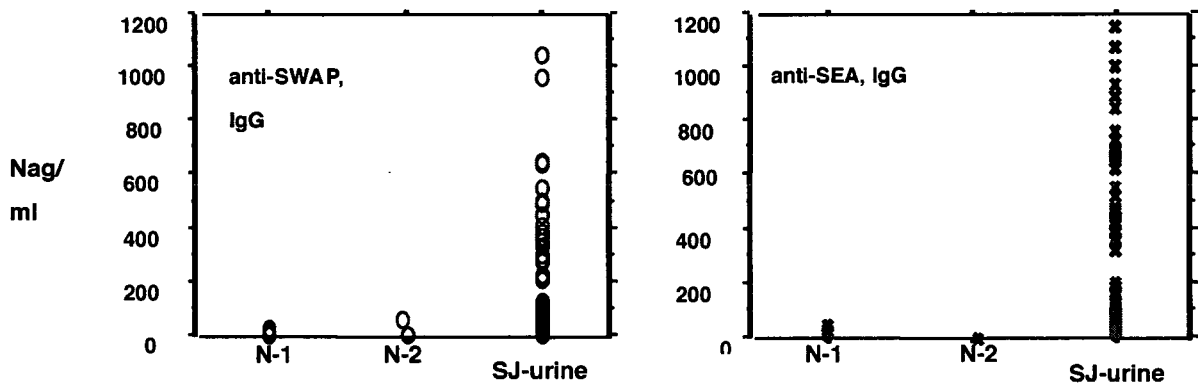
2. 学会発表

朝日博子, 大前比呂思, Orlando S Sy, 鈴木玲子, 田邊将信, 松田肇, 山下隆夫, 鹿島準子, 太田伸生  
日本住血吸虫感染者の尿中に認められる特異抗体の検出  
第77回日本寄生虫学会, 2008年

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得   なし
- 2. その他      なし

図 尿中の日本住血吸虫: *Schistosoma japonicum* 成虫体 (SWAP) 及び虫卵 (SEA) に対する IgG 抗体の出現



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

厚生労働科学研究費補助金（平成19年度厚新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立に関する研究  
在日外国人における慢性循環器疾患の罹患状況に関する研究

分担研究者 大前比呂思 （国立感染症研究所 寄生動物部 室長）

分担研究者 春木 宏介 （獨協医科大学越谷分院 臨床検査学 教授）

慢性寄生虫症による循環器合併症罹患状況を把握する為の予備調査として、2007年12月、2008年1月に、神奈川県大和市周辺に居住する在日外国人101人に対し、血圧測定と心臓の超音波検査を行った。13人の被験者で、WHOの基準（1999年）：140/90mmHg以上となる高血圧が指摘され、特に61歳以上の高齢者では、約半数が高血圧症と診断された。また、30歳以上の例を中心に19例で弁機能の異常所見が認められ、幼少期の溶連菌感染との関係が疑われたが、明らかな弁膜症の所見がみられたのは、僧帽弁狭窄尿と診断された1例にとどまった。出身地域別に検討したところ、中南米出身者12名中で、大動脈弁の異常や左室肥大を指摘された被験者はいなかった。アジア出身者でみられた大動脈弁の異常や左室肥大は、シャーガス病のような慢性寄生原虫症ではなく放置された高血圧症と関連が深いと思われた。また、心臓収縮能の低下を示した例では、左室前壁や心室中隔の運動能が低下しており、慢性心不全の原因としては、弁膜症ではなく、虚血性心疾患がより疑われた。このような健診の場合は、心電図検査も、あわせて行う必要性が再認識された。

#### A. 目的

慢性寄生虫症の中には、*Trypanozoma cruzi* によるシャーガス病のように、合併症として重大な循環器病変を起こすものがある。このような循環器病変は、感染後10年以上の長い経過をへて発症することもあるので、心臓弁膜症や高血圧症といった他の慢性循環器疾患との鑑別が必要になることが多い。そこで、今回、寄生虫症の罹患状況の把握を主目的とした在日外国人健診の実施にあたって、血圧測定と心臓超音波検査を行い、慢性循環器疾患の罹患状況について調査することとした。

#### B. 対象・方法

2007年12月と2008年1月に、小林国

際クリニック、カトリック大和教会で、神奈川県大和市及びその周辺に居住する在日外国人を対象とした健康診断を行った。その際、血圧測定以外に、希望者に対しては心臓の超音波検査も行って、循環器疾患の罹患状況について調べた。

WHOの基準（1999年）に基づき、収縮期血圧140mmHg以上、もしくは拡張期血圧90mmHg以上のいずれかの基準を満たした例は、高血圧症と判

断した。また、心臓超音波検査は B モードの検査に M モードの検査を併用し、弁膜症（大動脈弁閉鎖不全：AR，僧帽弁閉鎖不全：MR，僧帽弁狭窄：MS）や左室肥大：LVH の有無について調べると同時に、駆出率：EF による心機能評価も行った。左室の長径：LVDd が 35mm を超える例は LVH と診断し、EF が 50% を下回る例は心臓の収縮能が低下した状態と判断した。

#### （倫理面への配慮）

実際の検査実施にあたっては、被験者の自由意志のもと、本研究の関してその研究目的、内容につき十分な説明を受けた上で、検査を実施した。

#### C. 結果

血圧測定と心臓の超音波検査の両方を受けた 101 人について検討したところ、高血圧を示した例は 13 例にのぼり、特に 61 歳以上の 11 例では、6 例が高血圧症と診断された（表 1）。一方、超音波検査で弁膜症や左室肥大が疑われる例は、30 歳以下の年齢層では 14 例中 1 例にとどまったが、それ以上の全年齢層でみられ、特に加齢とともに増加する傾向はみられなかった。

また、対象となった在日外国人 101 人は、アジア系：87 人、中南米系：12 人、アフリカ系：2 人であった。そこで、アジア系と中南米系での比較を試みたが、中南米系の被験者が少なく傾向の違いについて論じることはできなかった（表 2，3）。ただ、シャーガス病で生じる心肥大や左室肥大は、今回の心臓超音波検査で、中南米出身者からはみつかっていない。

#### D. 考察

在日外国人においても日本人と同様、高血圧については、加齢とともに罹患率が増加する傾向がみられた。なかには、40 歳代、50 歳代で 100mmHg 以上を示しながらも、治療を受けていない例もあり、そのような被験者では AR や LVH などの変化が超音波検査でも確認された。

弁の機能異常を疑われた例は、他院で MS と診断され継続的なフォローを受けている 1 例を除けば、軽度の変化を示したのみであった。今回は、ドップラー法を併用しての詳細な検査を行う時間的余裕がなく、詳細な検討はできなかったため、多くの例では精密検査では異常なしと判断される可能性が高いと思われる。しかし、一次健診の段階で心臓超音波検査が行われることは少なく、他に直接比較できる調査結果は乏しいものの、101 人中 19 人で何らかの弁の異常が疑われるは、従来のがわが国での健診成績と比して、頻度としてたいへん多いと言えよう。このことが、途上国における溶連菌感染の蔓延と弁膜症罹患率の高さを意味するのか、或いは、被験者の約半数は病院受診者であったという今回の被験者集団の偏りを示すかについては不明である。

また、EF の低下していた例では、弁膜症の進行によるというよりも、心室前壁や心室中隔の運動が部分的な障害、すなわち虚血性心疾患がその原因と考えられた。今後はあわせて心電図検査も行い、虚血性心疾患についても十分に鑑別する必要があると思われる。

#### E. 結論