

## まとめ

- (1) 在留外国人の慢性寄生虫/原虫症罹患状況の実態把握のため、地方自治体で在留外国人対象の健康診断を企画、実施し、334名(男性120名、女性183名、性別不明31名)の受診者を得た。
- (2) 健診時に日本語/英語/中国語/スペイン語並書の健康管理手帳を独自に作成し配布した。
- (3) 健診受診者の出身国、出身地での感染症情報、感染症罹患歴、家族歴、現病歴等の情報を得た。
- (4) 調査研究へ同意された方々を対象に、問診、採血、検便、超音波検査(肝エコー、心エコー)による健診を計7回実施し、健診受診者から検体および超音波画像を得た。
- (5) 血液検体を用いて血清学的免疫診断法を行い、ベトナム国籍の受診者2名が抗内臓リーシュマニア症抗体陽性、シャーガス病については、中南米出身者126名(アルゼンチン5名、コロンビア2名、チリ1名、ドミニカ2名、ブラジル51名、ペルー38名、ボリビア26名、メキシコ1名)のうち、ボリビア人1名の抗体陽性者を見出した。マラリア原虫検査では、迅速診断キットOptiMalで1名の抗原陽性者を見出したが、最終的に擬陽性と判定した。トキソプラズマ抗体陽性者は、平成20年度で61名(ブラジル20名、ボリビア20名、ペルー9名、コロンビア1名、アルゼンチン1名、ベトナム4名、フィリピン2名、日本1名、ナイジェリア2名、不明1名)であった。蟻虫症では、平成19年度はトキソカラ抗体陽性9名(フィリピン4名、タイ3名、ベトナム1名、韓国1名)、多包条虫症1名(フィリピン)を確認し、平成20年度はトキソカラ抗体陽性8名(ベトナム5名、ボリビア2名、フィリピン1名)、顎口虫抗体陽性5名(ボリビア3名、フィリピン1名、不明1名)、赤痢アメーバ抗体陽性1名(ベトナム)、旋毛虫抗体陽性1名(ボリビア)、1名に抗住血吸虫抗体陽性者(国籍ナイジェリア)を見出した。
- (6) 糞便検査陽性者は、平成19年度には鉤虫症1名(フィリピン人)を見出し、平成20年度には計13名(うちブラジル人1名は、3種混合感染)であり、*Entamoeba*属(*E. histolytica*か*E. dispar*は未確定)感染症罹患患者計6名(ブラジル人3名、うち1名は3種混合感染、ペルー人1名、ボリビア人1名、ベトナム人(血清診断陽性)1名)、ランブル鞭毛虫症罹患患者は計3名(ブラジル人1名は3種混合感染、ペルー人1名、ボリビア人1名)、クリプトスポリジウム症罹患患者は計6名(ブラジル人1名は3種混合感染、ベトナム人5名)であった。
- (7) マラリア、シャーガス病に対する新規感染制御手法の開発研究では、特にCD8陽性T細胞の免疫応答誘導を念頭に置いた新規免疫療法の開発を寄生原虫感染症モデルを用いて行っており、今回は3種類の組換えウイルスベクターを用いた手法がより高いレベルの抗原特異的CD8陽性T細胞の誘導能を示し、感染制御能も向上することを明らかにし有望な結果を得た。
- (8) 地方自治体(神奈川県)の行政担当者らとマニュアルの作成等を前提にした協議を開始した。

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

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

|       |       |                  |          |
|-------|-------|------------------|----------|
| 研究代表者 | 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

三種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の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

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

|       |       |                  |          |
|-------|-------|------------------|----------|
| 研究代表者 | 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 *Pyoelii* 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 *BglIII* 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、マウスの足趾に皮下注射、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 クローンへ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

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alaria感染制御手法の新規開発

|       |       |                        |
|-------|-------|------------------------|
| 研究代表者 | 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alariaの合併症として頻発する脳マalariaでは、 $CD8^+$ 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alaria実験系を用いて $CD8^+$ T 細胞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alaria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alariaである。その発症メカニズムとしては、脳の毛細血管にマalaria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alariaへの感染実験では、脳に $CD8^+$ T 細胞が集積

することが知られている。一方で、 $CD8^+$ T 細胞を中和抗体で除去すると、脳マalaria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、 $CD8^+$ T 細胞はマalaria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、 $CD8^+$ T 細胞の脳マalariaにおける役割は明確になってない。そこで、脳マalariaの発症あるいは進行に関与すると考えられる $CD8^+$ T 細胞をマウスに移入することによって、マalaria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

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  
慢性期シャーガス病の調査研究

研究分担者:竹内勤 慶應義塾大学医学部・教授  
研究協力者:三浦左千夫 慶應義塾大学医学部・助教

研究要旨:在日ラテンアメリカ人のシャーガス病感染状況の把握・本疾患を媒介する昆虫が生息しない我が国では輸血感染、臓器移植感染、母子感染以外に感染経路は皆無である。輸血感染防止対策上、医療・献血現場でその *T.cruzi* 抗体についてスクリーニングを行うことの出来る迅速診断キットの検討を行う。在日外国人の本疾患感染状況の把握をし、その健康管理/教育体制整備のための地方自治体におけるガイドラインを作製する

A. 研究目的

- ①在日ラテンアメリカ人の *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) 抗体保有者の検索。
- ②献血現場で対応できる迅速抗体測定キットの開発。

B. 研究方法

主任研究者と共に、調査研究参画への同意書が得られた方々を対象に抗体検査を行った。健診で得られた血清について病原体に対するIgG抗体の有無をクロマト法、IHA,IFA,ELISA法で調べた。既存の慢性シャーガス病患者血清(ブラジル・ポリビア)を用いて迅速スクリーニング用検査キットの開発を検討した。

C. 結果

南米からの移住者はブラジル人が 80%

を占めるといわれるが、今回はブラジル人集団からは感染を示唆する者は検出されなかった。しかし、ポリビア人集団(1/26名 3.8%)に抗体陽性者を検出した。

その他の中南米諸国からの集団にも抗体陽性者は見出せなかった。

迅速キットの開発については既存の検査キットと結果は略一致し、なおかつ献血現場で充分判定が可能なキットの試作が出来た。

D. 考察

ポリビアは現在最もシャーガス病の感染対策が遅れている国である。ポリビアからの定住者は2%に過ぎないが、すでに全国医療機関からのシャーガス病除外診断検査依頼の集中している地域のラ



テンアメリカ人中心に調査を継続すれば、更に潜在感染者が検出されるはずである。

開発途上の迅速抗体検査キットはスクリーニング用には十分な感度であり、献血現場で問診中に結果が出せられると思われる。

#### E. 結論

平塚で行ったように、各地のラテンアメリカ人支援 NPO,NGO の実施するネットワークを通じシャーガス病検診呼びかけ啓発講演を行い、検査希望者についての *T.cruzi* 抗体検査を行うのが理想である。同時に日赤などで行う献血現場で実施する問診票の改訂にも及び抗体スクリーニング検査実施を提言すべきである。

#### F. 健康危険情報

在日ボリビア人の抗体陽性者については本疾患、慢性感染キャリアーの可能性を強く示唆する者である。非発症者であるので、献血輸血の禁止など健康管理

面での注意を喚起する必要がある(参考資料 13)。

#### G. 論文:

1. Chagas 病に対する臨床医の対応と、日系人、非日系人との意識の差  
三浦左千夫: 竹内勤; 臨床寄生虫学会誌 19 卷-1 号、65~68 頁—2008

#### 2. 学会発表:

第17回国際熱帯病学会

「日本におけるラテンアメリカ人の慢性トリパノソーマクルーズ感染症について」  
2008-9月29~10月3日(濟州島)

#### 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

将来的に *Trypanosoma cruzi* 抗体スクリーニングキットが評価されれば出願する予定。

参考資料 13.

疫学調査活動参考：安全血液供給プロジェクトにて

啓発活動の重要性：外国人検診には医療通訳ボランティアの確保

松本では16名のラテンアメリカ人に対してスペイン語【1名】ポルトガル語【3名】でした。本研究班（宮平班）の医療通訳不足は今後の課題です。

長野県松本市・松本在住外国人検診にて、受診者75名、内シャーガス検査希望者ラテンアメリカ人16名全員。 2008-11-9日



検診前の啓発講話の風景：医療関係者＋受診者

川崎国際交流センター

ブラジルフェアにて。啓発教育展示：2008-9-20



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

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:組織寄生虫症の免疫血清抗体検査

研究分担者 赤尾信明

研究協力者 中山啓介

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: 在留外国人を対象として慢性寄生虫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 20 年度に神奈川県大和市及び藤沢市, 平塚市にて5回の健診を行い, 202 名の受診者に対して, 慢性寄生虫感染症に対する抗体あるいは抗原検査を実施した。マalaria迅速診断キット(OptiMAL)を用いた検査では, 1 検体で陽性反応を示したが, PCR 法や他の検査で陰性と判定された。また, トキソカラ症, 顎口虫症, 旋毛虫症, 赤痢アメーバ症に対する抗体保有者が少数ながら見られた。

A. 研究目的

慢性寄生虫感染症は, 熱帯熱マalariaのように, 発症すると急性経過を取って死に至る感染症ではなく, トキソプラズマ症のように, 宿主の免疫能が低下したときにその病原性が顕性化するものをいう。また, 宿主の免疫能とは無関係に, 一旦感染すると長期間感染が持続し, 持続する発熱や倦怠感などの症状を引き起こす感染症もある。

平成 19 年度から開始した, 在留外国人を対象とする慢性感染症の実態調査を本年度も引き続き実施し, 慢性寄生虫感染症に対する将来の対策手法の検討, 監視体制の整備に関する資料とすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 被検者の募集

平成 19 年度の研究開始時に, 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, 大和カトリック教会(神奈川県大和市南林間), 藤沢カトリック教会(〒251 神奈川県藤沢市鶴沼石上 1-1-17), 平塚カトリック教会(神奈川県平塚市夕陽ヶ丘 4-31)の信者を対象に健診を実施した。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。平成 20 年度の健診は平成 20 年 6 月 1 日、6 月 15 日に大和カトリック教会で、また、平成 20 年 8 月 10 日と 9 月 7 日には藤沢カトリック教会、平成 20 年 8 月 24 日には平塚カトリック教会の計 5 回実施した。と平成 19 年 1 月 6 日の 2 回実施した。

## 2. 検体の採取

健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まで冷蔵保存され、その後冷蔵状態で当研究用に搬送され、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。OptiMAL で陽性となった検体については Pan-R Malaria (panbio diagnostics 社) を用いて再検査し、さらに 18S rRNA をターゲットとした PCR 法を実施し、マラリア感染の有無を最終的に確認した。

## 3. 慢性寄生虫感染症に対する血清抗体検査

健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, InstantAmoeba CHEK) 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、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、Toxocara-CHEK と InstantAmoeba CHEK 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 20 年度に実施した健診に参加した在留外国人は男性 77 名、女性 122 名、性別不明 21 名の合計 220 名であった。この内、血液あるいは血清の採取に同意して検体を採取し得たのは 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 151 検体であった。検査結果、1 名が OptiMAL で陽性を示した (図 1)。しかし、pan-R Malaria Cassette (panbio 社) を用いた検査では陰性、熱帯熱マラリア及び三日熱マラリア特異プライマーを用いた PCR 法でもマラリア原虫の存在は否定された。さらに、末梢血塗抹標本のギムザ染色でもマラリア原虫を検出することは出来ず、OptiMAL での

陽性反応は疑陽性反応と判定した。

図 1

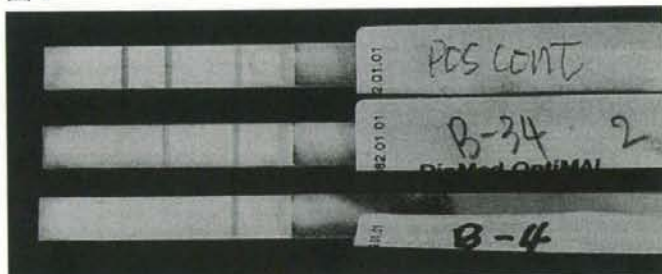


図 1b

3.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(4.5%)、疑陽性1検体であった。

dot-ELISA によるスクリーニング検査結果を表2に示した。赤痢アメーバ抗体

陽性者及び疑陽性者 23 名について、ToxoaraCHEK と同じ原理の元に作製したアメーバ抗体迅速検査キット (InstantAmoeba CHEK) をもちいた再検査では、1名の抗体陽性者が見いだされた。

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    | 1    | 192 |
|              | 4.5% | 0.5% | 95% |

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 | 疑陽性 |
|--------------------------|------|-----|
| 赤痢アメーバ                   | 8*   | 15  |
| (*うち1例は AmoebaCHEK でも陽性) |      |     |
| 肺吸虫                      | 0    | 2   |
| 顎口虫                      | 3    | 0   |
| 旋毛虫                      | 1    | 0   |
| 有鉤囊虫                     | 0    | 0   |
| 多包虫                      | 0    | 0   |

表 3 抗体陽性者の国籍別内

| 国籍   | イヌ回虫 | 顎口虫 | 旋毛虫 |
|------|------|-----|-----|
| ボリビア | 3    | 3   | 1   |
| ブラジル | 2    | 0   | 0   |
| ベトナム | 3    | 0   | 0   |
| 日本   | 1    | 0   | 0   |

#### D. 考察

平成20年度は、研究初年度に於いて構築した健診システムと抗体検査方法もちいて、インフォームドコンセントの得られた受診者を対象に、出来るだけ多数の在留外国人について、慢性寄生虫感染症の罹患状況を把握することを目的に検査を実施した。

マラリア感染の有無については迅速診断キット OptiMAL®で検査したところ 44歳のペルー人がスクリーニング検査で陽性と判定された(図 1)。しかし、pan-R Malaria Cassette を用いた再検査では抗原陰性と判定され、さらに、PCR 法によっても熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫 DNA は検出されなかった。OptiMAL はマラリア原虫が共通して持つ原虫性乳酸脱水素酵素(pLDH)を検出することにより原虫の有無を検査するが、pan-R Malaria Cassette はマラリア原虫が共通して持つアルドラーゼを検出する。このような測定原理の相違により疑陽

性反応が見られることはしばしば経験されることであり、マラリア迅速診断キットを用いる場合には注意を要すると考えられた。

dot-ELISA による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202名中8名(4.0%)に見られた。また疑陽性者は15名(7.4%)であったが、より精度の高い迅速診断キットを用いた検査でも1名が抗体陽性と判定された。陽性と判定されたのは50歳のベトナム女性であった。

今回実施した dot-ELISA の感度・特異性に関してはさらに検討すべき課題が残されている。抗体陽性検体についてのさらに詳細な検討システムの構築が次年度以降の検討課題だと考えられた。

#### E. 結論

本年度の研究で、神奈川県下に在住する外国人 202 名を対象に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。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1名見られた。また、トキソカラ抗体、顎口虫抗体、旋毛虫抗体陽性者も見いだされた。次年度以降、これらの抗体陽性者に対するフォローアップ検査体制の確立が必要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当項目なし

#### G. 研究論文

##### 1. 論文発表

[1] 赤尾信明, 太田伸生. 動物由来回虫症. SA Medicine. 2008;10(5):64-9.

[2] 赤尾信明. イヌ回虫症. 化学療法の領域. 2008;24(9):1351-7.

[3] 赤尾信明. ヒトのトキソカラ症と新しい動物モデル. 獣医寄生虫学雑誌. 2008;7(1):7-12.

[4] Yoshikawa M, Ouji Y, Nishiofuku M, Moriya K, Kasahara K, Mikasa K-i, Mizuno Y, Ogawa S, Akao N. Visceral toxocariasis from regular consumption of raw cow liver. Internal Medicine. 2008;47:1289-90.

[5] Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. Parasitology International. 2008;57(4):525-9.

[6] 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;47:449-52.

[7] Jin ZF, Akao N, Nobuta T, Ohta N. An improved method for recovery of muscle-stage larvae from mice infected with *Toxocara canis*. Journal of Parasitology. 2008;94(5):1164-5.

[8] Jin Z, Akao N, Ohta N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. Parasitology International. 2008;57(4):495-8.

#### 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

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:

我が国に居住する外国人の慢性寄生虫症を念頭においた肝・胆の超音波検査及び血清住血吸虫抗体の測定

研究分担者 大西健児 東京都立墨東病院 感染症科

研究協力者 千種雄一 獨協医科大学 熱帯病寄生虫病センター

研究協力者 中村(内山)ふくみ 東京都立墨東病院 感染症科

研究要旨:慢性寄生虫症で観察される所見を念頭におき、我が国に居住する187人の外国人を対象に肝・胆の超音波検査を行った。異常所見として網状所見、線維化所見、低エコー域などの肝の慢性寄生虫症を示唆する所見は観察されなかったが、脂肪肝が7人、胆石が2人、脂肪肝と胆石の合併が1人に認められた。これらは肥満や栄養過多と関連した所見であり、今後は日本に居住する外国人においても、過栄養対策が重要な健康政策になると推測される。また、我が国に居住する外国人307人の血清を用いてELISA法で住血吸虫抗体の測定を行ったところ、肝・胆の超音波検査で慢性住血吸虫症を示唆する所見がなく、かつ、自覚症状がない1人でマンソン住血吸虫抗体が陽性であった。ELISA法による血清抗体の測定はスクリーニング法に適した手法であると考えられる。

A. 研究目的

日本人の寄生虫症患者は少数であることから、我が国では臨床医をはじめとした医療従事者にとって寄生虫症は身近な疾患とは言いがたい現状にある。しかし、熱帯、亜熱帯の所謂発展途上国においては、寄生虫症は主要疾患の1つであり、医療分野のみならず経済分野へも大きな影響を及ぼしている。寄生虫症は急性寄生虫症と慢性寄生虫症に分けられ、慢性寄生虫症のなかには時間の経過に伴い増悪する疾患がある。そのよ

うな、時間経過につれ増悪する慢性寄生虫症のなかには、住血吸虫症やエキノコックス症のような肝に病変をきたす疾患があり、慢性寄生虫症の発見及び健康管理の観点からすれば、肝・胆の検査は重要である。肝・胆の検査には様々な手技があるが、なかでも超音波検査は非侵襲的で被検査者にとって負担の少ない検査手技である。来日した外国人の中には、慢性寄生虫症に罹患した状態で日本に居住している人の存在も考えられる。このような状態の人を発見し対策

を講じることは、国内的のみならず国際的な見地からみても重要な方策と考えられる。

ヒトの住血吸虫症には日本住血吸虫症、マンソン住血吸虫症、ビルハルツ住血吸虫症、メコン住血吸虫症の4種があり、世界保健機構も指摘しているように、マラリアや結核と同じく世界的に重要な感染症の1つである。なかでも日本住血吸虫症とマンソン住血吸虫症は肝繊維症から肝硬変へと進展し、門脈圧亢進症を引き起こすことから、感染者を発見し早期から経過観察を行う必要がある疾患である。日本に居住する外国人の血清の抗体検査を測定することで、住血吸虫症の罹患状況を知ることも有用な情報の入手方法である。

## B. 研究方法および対象受診者

### (1) 超音波検査

血清抗体測定や便の虫卵検査を主目的に来場した検査参加者のうち、超音波検査を希望した主に神奈川県に居住する外国人187人(男性62人、女性111人、性別不明14人)に対し、寄生虫感染に起因する病変検索を目的に肝・胆の超音波検査を行った。国別・性別・年齢別超音波検査受診者数は、ベトナム出身者68人(男性17人:3-59歳、女性39人:16-80歳、性別不明12人:5-74歳)、ブラジル出身者42人(男性14人:5-51歳、女性28人:5-78歳)、ペルー

出身者26人(男性9人:46-73歳、女性17人:27-73歳)、ボリビア出身者24人(男性11人:7-61歳、女性12人:2-47歳、性別不明1人:27歳)、フィリピン出身者12人(男性4人:34-58歳、女性8人:26-63歳)、アルゼンチン出身者5人(男性2人:34と77歳、女性3人:55-65歳)、ナイジェリア出身者3人(男性2人:39と44歳、性別不明1人:30歳)、コロンビア出身者2人(女性2人:44と48歳)、ニュージーランド出身者1人(男性1人:37歳)、オーストラリア出身者1人(男性1人:44歳)、メキシコ出身者1人(女性1人:65歳)、チリー出身者1人(女性1人:53歳)、イラク出身者1人(男性1人:40歳)であった。

### (2) 血清抗体検査

ELISA法を用いて血清の住血吸虫抗体を測定した。検査に供した血清は、主として神奈川県に居住する外国人305人分で、OD値cut offを0.200とした。

## C. 研究結果

### (1) 超音波検査

#### 1) 異常所見

肝・胆の超音波異常所見として、脂肪肝、胆石が観察された。住血吸虫症で観察される網状や線維状の異常所見、アメーバ肝膿瘍やエキノコックス症で見られる低エコー域などの寄生虫疾患を示唆する異常所見は観察されなかった。異