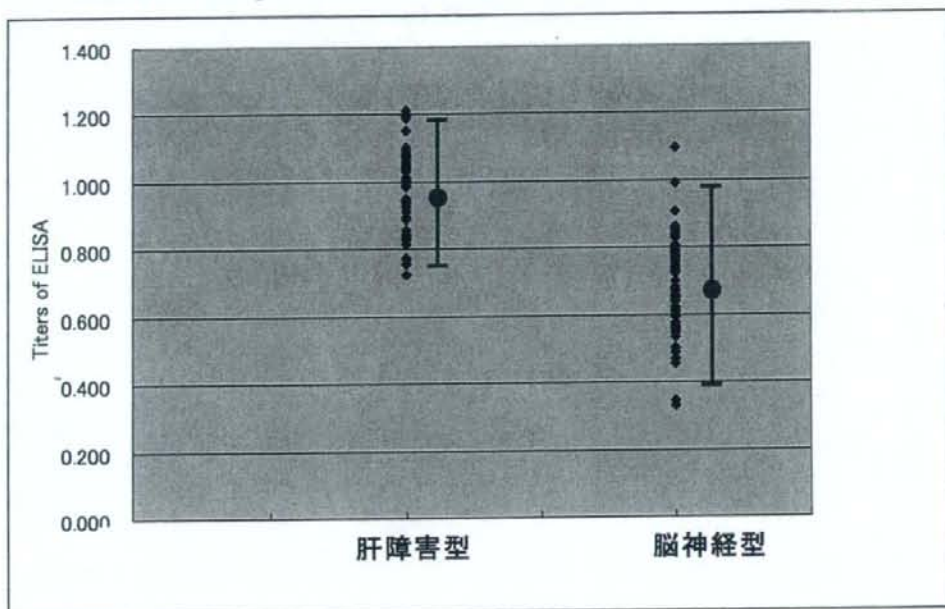


図2 日本住血感染者における虫卵粗抗原を利用した ELISA 抗体価と臨床病型の関係 — フィリピン、レイテ島、Schistosomiasis Research Hospital における 2000 年の調査 —



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

顧みられない病気に関する研究：
住血吸虫症の血清診断キット開発・評価

研究分担者 朝日博子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

非侵襲的な方法を用いたヒト住血吸虫症の診断方法の開発を目途として、第1段階として、日本住血吸虫 (SJ) 感染者の尿中に検出される抗体の特徴を明らかにした。SJ 感染者の尿中には、血清中と同様、診断に役立つ事が十分に期待できる程度の高い抗体価が検出された。抗体産生の特徴としては、1) 高い SJ 成虫 (SWAP) および虫卵 (SEA) IgG 抗体、2) 低い抗 SEA IgA 抗体、3) 中程度の抗 SWAP および抗 SEA IgM 抗体が挙げられる。得られた知見をもとに特異抗体産生の特徴を、抗体クラス、EPG、年齢、病態との相互関連や治療後の動態の観点から解析し、診断に至適な抗原抗体の組み合わせ条件を選択した。

SJ 成虫体の tegument に局在し、22.6kDa の理論分子量をもつ成分のレコンビナントタンパク (rSJA226) を SJ 症の免疫診断に導入した。rSJA226 は尿中の抗体検出に優れる事が判明した。さらに治療後早急に陰性化する特徴を有していた。レコンビナントタンパクを用いた簡易診断法作出への応用が期待できた。

A. 研究目的

世界中で数億人の感染者を数える住血吸虫症は広範な観点からコントロールを不可欠とされる感染症として重要である。ヒト住血吸虫症は主として Manson 住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本住血吸虫 (*S. japonicum*)、ビルハルツ住血吸虫 (*S. haematobium*)、メコン住血吸虫 (*S. mekongi*) 感染によって起こるもので

あるが、本症はいずれの種によっても

1) 長期に渉る経過を辿る事、2) 虫卵による不可逆的な組織破壊がある事、3) 自覚症状のない感染者も多く、ライフサイクルの維持の機会を供与すること、4) 流行地では再感染が繰り返される事等々疾病のコントロールの障害となっている。これらの問題に対処するため、感染の状態、すなわち active 感染なのか否か、morbidity

と active 感染との関連等を的確に把握する為の簡易診断法の開発が特に必要とされる。本研究では第一段階として主としてアジアで流行している日本住血吸虫 (SJ) 症の簡便かつ非侵襲的な診断法の開発を目的とした。

B. 研究方法

尿中に検出される特異抗体を非侵襲的な診断法に利用する為はその特徴を詳細に調べ、検出される抗体のクラス、排出虫卵数 (EPG)、治療後の動態等との関連等を解析した。SJ 感染流行地である Philippine 国 Leyte 島にある Schistosomiasis Control and Research Hospital (SCRH) で採集された検体のなかで、糞便内虫卵が陽性であった active 感染と考えられるひとから供与された尿および血清を用いた。尿および血清中の SJ 成虫抗原 (SJ-SWAP) および虫卵抗原 (SJ-SEA) に対する特異抗体を各クラス Immunoglobulin および isotype にわたって酵素抗体法を用いて検出し、その特徴を明らかにした。糞便中虫卵の確認できたヒトは 86 名 (男 67、女 17) であり、15 歳以下 23 名、15-30 歳 44 名、30 歳以上 30 名からなる。回虫および/または鉤虫感染が確認されたヒトおよび非感染のヒトからの検体をコントロールとして用いた。

診断用抗原作製維持に伴う困難を回避する為、SWAP および SEA と同等以上の感度を付与できる人工合成抗原を導入するため、抗体産生を刺激誘導している SJ 成分の特定を行った。先に得られたモノクローナル抗体を用いて、抗原として有用であろうと推測された、成虫体の tegument に存在する 22.6kDa タンパク成分のレコンビナントタンパク (rSJ226) を導入して、尿および血清中の特異抗体との反応性を調べた。

<倫理面への配慮>

検体は提供者が自由意志のもとで、本研究に関してその研究目的、内容について十分な説明を受けた上で、提供者の同意を得て供与を受けた。

C. 研究結果

SJ 感染者の尿中には、血清中と同様診断に用いることが十分に期待できる程度の高い抗体価が認められた。(Fig. 1) 抗体産生の特徴としては、尿中抗体では高い抗 SWAP および抗 SEA IgG、低い抗 SEA IgA、及び中程度の抗 SWAP IgA が検出された。また中程度の抗 SWAP および抗 SEA IgM が検出された。

尿中抗体検出感度は高く、抗 SWAP または抗 SEA IgG 抗体検出で最も高感度で感染を検出できた。両者を同時に検出することによってさらに高い感

度（平均96%）を得る事が出来た。

EPG と尿中に検出されたいずれの抗 SWAP および抗 SEA 抗体（IgA, IgG, IgM）との相関は認められなかった。

尿中に検出される抗 SWAP および抗 SEA IgG 抗体は、治療後比較的早期に低下し、6-12ヶ月後には顕著に低下し約半数が陰性化した（Fig. 2）。対照的に血清中の抗体は陰性化しなかった。

以上の結果から尿中の特異抗体の測定は本症の診断に有用であると考えられた。SJ成虫のtegument に局在する蛋白成分のレコンビナント蛋白（rSJ226）を抗原として特異抗体の検出を試みた結果、尿中抗体を高感度で検出できることが判明した（Fig. 3）。

EPGと尿中に検出された抗rSJ226 IgG抗体価との相関は認められなかった。

尿中に検出される抗rSJ226 IgG抗体価は治療後比較的早期に低下し、6-12ヶ月後には顕著に低下し約半数が陰性化した（Fig. 4）。

抗rSJ226 IgG抗体価はSWAPに対するIgG抗体価と相関を認めた。

D. 考察

本研究に用いた SJ 感染者群は、集団調査治療が繰り返されている地域であり、各人の感染の経過を明確に把握する事は困難である。また典型的な虫

卵排出や症状を示す例が激減しているとともに、糞便検査の感度もかなり低下しており、旧来の糞便検査で感染の状態や病態を診断する事は不可能に近い。こうした条件下で簡便かつ非侵襲的な診断用の検体として尿を使用する事が考えられた。

SJ 感染者の尿中の特異抗体価は高く、血清に代わり、非侵襲的検査用検体として十分に期待できる。またいくつかの抗原/抗体の組み合わせを用いることで、さらに高い感度を確保する事が出来ると考えられる。特に抗 SWAP および抗 SEA IgM 抗体については感染初期や再感染初期の虫卵排出前の段階を検出できる可能性が高い事から、IgG 抗体に加えて試験することが望まれる。

尿中抗体は血清抗体レベルとは相関が認められず（データは示していない）、治療によって成虫体を排除すると比較的すみやかに陰性化する事から、血清抗体を基盤にした場合とは異なる観点から、感染状況の解析が可能になると考えられる。

本研究で導入した rSJ226 は、尿中特異抗体検出に特に優れている事から、SWAP や SEA の代わりに診断に利用できる可能性が高い。また治療によって成虫体を排除すると比較的すみやかに陰性化することから、治療効果判定やワクチン効果判定等に適用でき

る可能性が考えられる。これまで低レベルの抗体も含めて検出する為に、酵素抗体法を用いて試験したが、試験方法の改良を併せて行うことにより、虫卵検出による診断や複雑な手技を必要とする検査法の欠点を補う方法の作出に供する事が期待される。

以上成虫体由来のレコンビナントタンパクを用いた結果で、簡易診断法の開発に有用であろうと推測される結果を得ているが、これまでに積み重ねられた研究結果で住血吸虫症では虫卵抗原の方が通常顕著に強い T cell および B cell 応答を宿主に誘導する事がよく証明されている。虫卵抗原を使う事の優越性は十分に推測される事から、重要な虫卵由来成分の特定と導入も必要と考えられる。

E. 結論

SJ 感染者の尿中特異抗体は、血清にかわり、非侵襲的検査用検体として使用する事が十分に期待できると考えられた。本研究で導入した SJ 成虫 tegument 由来成分のレコンビナントタンパク、rSJA226 で高い感度で尿中の特異抗体を検出できる事が判明した事から、流行地に在住する感染者を含め、誰でもが簡単に使用できる簡易な検出システムの作出を試みる事が次に考えられる。簡易迅速な診断キットが開発できれば、流行地における集

団検診、住血吸虫症コントロールに重要な疾病のモニターに適用でき、その用途と意義は大きいであろう。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Asahi, H., Ohmae, H., Sy, O.S., Tanabe, M., Matsuda, H., Yamashita, T., Sendo, F., Kajima, J., Ohta, N. Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *Schistosoma japonicum* infection. In preparation, 2009

2. 学会発表

朝日博子、大前比呂思、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回日本寄生虫学会大会 平成20年3月

大前比呂思、松田 肇、千種雄一、桐木雅史、朝日博子、Muth Sinuon, Doung Socheat, 東南アジアにおける住血吸虫症の広がり気候変化について 第68回日本寄生虫学会東日本支部大会 平成20年10月

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

住血吸虫症血清診断キットの評価

研究分担者 千種雄一

獨協医科大学 熱帯病寄生虫病センター 教授

研究要旨

住血吸虫症の PCR 検査法の開発および免疫学的検査法の改良をおこなった。

住血吸虫に由来する DNA を PCR で検出するため、4 種の人体寄生住血吸虫について種特異的プライマーと共通プライマーを作製した。種特異的プライマーはマルチプレックス PCR としても使用可能であった。動物実験において感染初期から住血吸虫の DNA が検出された。さらにビルハルツ住血吸虫症患者の唾液および尿からビルハルツ住血吸虫特異的 DNA が検出できた。本法は特に輸入症例の検査に有用であると考えられる。

住血吸虫症の流行地でより簡便に免疫学的検査を実施するため、携行器材の軽減を目的として ELISA プレートリーダーの代替としてのデジタル撮影画像解析法について検討した。発色度合のことなる発色基質液を分注した ELISA プレートについて吸光度 (415nm) を ELISA プレートリーダーで計測した。さらにスキャナーで取り込んだデジタル画像で、各ウェルの色成分 (赤・緑・青) および輝度の諧調を画像ソフトで分析して吸光度との相関を調べた。その結果、赤色成分と高い逆相関 ($R^2=0.9987$) を示すことが確認できたことから、デジタル撮影画像による ELISA の解析が可能であると示唆された。

A. 研究目的

住血吸虫症は現在でも世界的に重要な寄生虫性疾患であり、有病国においては地域住民の健康被害のみならず、社会経済的な問題ともなっている。さらに近年のグローバル化に伴う人々の交流により、住血吸虫症は発展途上国を中心とする流行地のみに留まることなく、日本を含む非流行地においても輸入感染症として遭遇する機会がある。しかしながら日本においては症例数の減少に伴う医療従事者の対応能力の低下が懸念されている。

有病国においては本症対策が進められているが、一方で対策の成果に伴う感染強度

の低下により、従来本症対策の現場で使用されてきた診断法 (Kato-Katz 法) では検出感度が不十分であることが指摘されている。そのため有病地において施行可能な高感度検査法の開発が求められている。

上記の現状を踏まえ、先進国において活動性の住血吸虫症の診断および種の鑑別が可能な検査法の開発を目的として (1)『住血吸虫の「遊離型 DNA」を標的とした診断法の開発』を、有病国の本症対策の現場で使用可能な免疫学的検査法を提供するために (2)『フィールドで使用可能な免疫学的検査法の改良』を実施した。

(1)『住血吸虫の「遊離型 DNA」を標的とした診断法の開発』(林 尚子、千種雄一)

ここでいう「遊離型 DNA」とは、細胞から遊離して循環している DNA および尿中に出現する DNA を指している。血清、尿などから標的 DNA を PCR で検出する試みは各種の住血吸虫症で報告があるが、今回は重複感染も含めた鑑別を考慮したプライマーの設計を試みた。

(2)『フィールドで使用可能な免疫学的検査法の改良』(桐木雅史、千種雄一)

我々は、これまでにフィールドで使用可能な免疫学的検査法として、whole-blood ELISA を開発し、日本住血吸虫症およびメコン住血吸虫症検査への応用を研究してきた。本研究では、本法の欠点の改善を試みた。

今回は、携行機材の軽減を目的として、携行器材の中で大きな割合を占めるプレートリーダーの代替法として、ELISA プレートのデジタル撮影画像をノートパソコンで解析する手法について検討した。

本研究は予備調査段階であるが、途中経過として報告する。

B. 研究方法

(1)『住血吸虫の「遊離型 DNA」を標的とした診断法の開発』

プライマー: *Schistosoma mansoni* (Sm)、*S. haematobium* (Sh)、*S. japonicum* (Sj)、*S. mekongi* (Smek) のミトコンドリア DNA の CO1 領域を標的とする特異的プライマーおよび共通プライマーを設計した。

PCR: 各種住血吸虫の虫体から抽出した DNA を鋳型に用いて PCR を行った。PCR

産物を常法に従って電気泳動して検出した。

住血吸虫感染動物からの DNA 検出: ICR マウスに Smek を経皮感染し、0、1 日後と、1-6 週後に採血・採尿し、各検体から DNA を抽出後、Smek 特異的プライマーで PCR を施行した。

住血吸虫症患者からの DNA 検出: 2009 年 1 月に関東地方の病院を受診したビルハルツ住血吸虫症患者に尿、血清、唾液の提供を依頼した。検体より DNA を抽出し、各特異的プライマーおよび共通プライマーで PCR を実施した。

(2)『フィールドで使用可能な免疫学的検査法の改良』

HRP の発色基質として ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt; Sigma Chemical, USA] を使用した。発色していない基質液と、HRP を反応させて発色した基質液を 9 6 穴マイクロプレートに分注した。発色した基質液としては、発色度合の異なる 6 種類の発色基質液を使用した。

マイクロプレートリーダーによる吸光度 (415nm) の測定と、スキャナーによる画像取り込みを行った。

デジタル画像は Adobe Photoshop で、各ウェルの色成分および輝度をそれぞれ 256 階調で解析した。

C. 研究結果

(1)『住血吸虫の「遊離型 DNA」を標的とした診断法の開発』

特異的プライマーによって各虫体 DNA を特異的に増幅することが出来た (図 1)。またこれらのプライマーはマルチプレック

スとしても使用可能であった (図 2)。

Smek 特異的 DNA は感染動物の血液および尿中より感染後 1 日目から増幅された。(図 3)

住血吸虫症患者の尿と唾液から住血吸虫共通 DNA と Sh 特異的 DNA が増幅され、Sm、Sj、Smek 特異的 DNA は増幅されなかった。

(2) 『フィールドで使用可能な免疫学的検査法の改良』

発色していない基質液と発色度合の異なる 6 種類の発色基質について、吸光度 (415nm) と、デジタル画像における色成分 (赤・緑・青) および輝度の諧調との相関を示した (図 4)。赤色成分が、吸光度と高い逆相関性を示した ($R^2=0.9987$)。

D. 考察

(1) 『住血吸虫の「遊離型 DNA」を標的とした診断法の開発』

我々は従来の糞便検査や免疫学的方法に代わる新しい診断法として、PCR 法等による住血吸虫の遺伝子の検出を導入することを目指している。今回、設計したプライマーによる PCR でヒトに寄生する住血吸虫 4 種類を鑑別できることが確認できた。輸入症例の鑑別診断への応用が期待される。特に感染地域や時期が不明なケースや、重複感染の可能性のあるケースに有効であると考えられる。

また、動物実験では感染早期から検出可能であることが示された。ヒトは実験動物に比べて身体が著しく大きいので、感染実験結果をそのままあてはめることはできないが、免疫学的検査で特異抗体が陽転する前に DNA を検出できることが期待される。

病原性惹起の主因である虫卵が産生される前に早期診断することができれば、本症による重症化の防止につながると期待される。

(2) 『フィールドで使用可能な免疫学的検査法の改良』

ELISA プレートの吸光度測定結果とデジタル画像上の赤色成分が、高い逆相関性を示すことがわかった。そこで ELISA プレートのデジタルカメラ撮影画像からデータを読み取る方法を検討している。使用ソフトとして、「DNA アレイ解析ソフト」と「プレート解析ソフト」を連係使用することで数値化が可能であることが業者の協力により判明した。今後はデータ解析作業の自動化、迅速化および補正の方法などを検討し、より実践的な解析方法を確立する。

さらに ELISA 操作の簡易化を目的として TSP (transferred solid phase)-ELISA の、whole-blood ELISA への導入を検討している。

E. 結論

(1) 『住血吸虫の「遊離型 DNA」を標的とした診断法の開発』

4 種の人体寄生住血吸虫 (*Schistosoma mansoni* (Sm)、*S. haematobium* (Sh)、*S. japonicum* (Sj)、*S. mekongi* (Smek)) について作製した種特異的プライマーおよび共通プライマーを用いた PCR により、重複感染も含めた鑑別診断が可能であると考えられた。また、早期診断の可能性も示唆された。

(2) 『フィールドで使用可能な免疫学的検査法の改良』

ELISA プレートの吸光度測定結果と、デジタル画像上の赤色成分が、高い逆相関性を示すことがわかった。デジタルカメラで

プレート撮影した画像でELISA結果を解析することができれば、ELISAプレートリーダーを有病地の調査現場に携行する必要がなくなり器材の軽減につながる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hisakane N, Kirinoki M, Chigusa Y, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H, Ishikawa H. The evaluation of control measures against *Schistosoma mekongi* in Cambodia by a mathematical model.

Parasitol Int. 2008 Sep; 57 (3): 379-385.

2. 学会発表

林尚子, 桐木雅史, Viroj Kitikoon, 金澤保, 松田肇, 千種雄一. マルチプレックス PCR によるヒト寄生住血吸虫類の鑑別. 第 78 回 日本寄生虫学会大会 東京 2009 年 3 月

桐木雅史, 林尚子, 千種雄一, Muth Sinuon, Doung Socheat, Viroj Kitikoon, 松田肇. カンボジアにおけるメコン住血吸虫症再興の潜在的リスク. 第 78 回 日本寄生虫学会大会 東京 2009 年 3 月

図 1

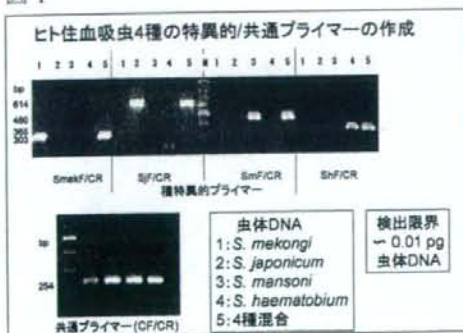


図 2

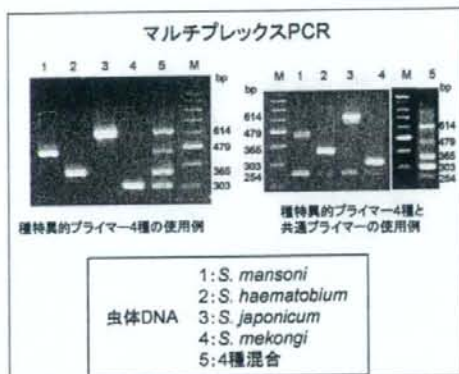


図 3

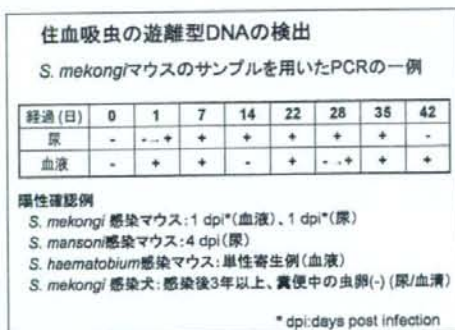
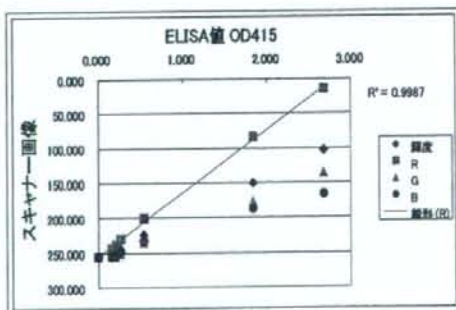


図 4



厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)

(総括・分担) 研究報告書

顧みられない病気に関する研究

寄生蠕虫症(条虫症)の検査診断法開発

研究分担者 山崎 浩 国立感染症研究所寄生動物部 室長

研究協力者 小林行治 アドテック株式会社

研究協力者 川中正憲 国立感染症研究所寄生動物部

研究協力者 倉持利明 国立科学博物館動物研究部

研究協力者 加藤基恵 テリ大学歯学部

研究要旨: 寄生蠕虫症の検査診断法の開発に関連して、幼虫移行症として重要なイヌ回虫症・ネコ回虫症(以下、トキソカラ症)の迅速血清診断キット開発に関する研究、ならびに国産あるいは輸入生鮮魚類を感染源とする裂頭条虫症・複殖門条虫症(以下、裂頭条虫症)の遺伝子診断法の確立に関する研究を行った。前者については、すでにトキソカラ症血清診断抗原として同定されたイヌ回虫幼虫プロテオグリカンのコアタンパク質のアミノ酸配列に基づいてペプチド抗原を合成し、それをを用いたキットの基礎反応系と抗体測定キットの仕様について検討した。一方、裂頭条虫症については、その病因となる条虫種の形態に基づく鑑別法の困難さを補うために、遺伝子解析による鑑別法を開発した。研究材料として、国立感染症研究所寄生動物部への依頼検査検体、国立科学博物館に保存されている標本、あるいは裂頭条虫の生息地などで収集したものをを用いて検討した。遺伝子検査の標的遺伝子は条虫の種間で最も塩基配列に違いが認められたミトコンドリアゲノムでコードされる ATPase subunit 6 遺伝子とし、それを標的にした multiplex PCR による鑑別法を確立した。

(1) 幼虫移行症としてのトキソカラ症迅速血清診断キットの開発

A. 研究目的

トキソカラ症はイヌ回虫やネコ回虫などトキソカラ属線虫の幼虫寄生によって惹起される寄生虫感染症で、重要な幼虫移行症の一つである。ヒトがその虫卵(幼虫包蔵卵)を経口的に摂取すると、小腸内で幼虫が孵化し、この幼虫が肝臓、肺、脳、あるいは眼部に移行して、肝疾患、呼吸器疾患、中枢神経症状、あるいは失明といった重篤な症状

を引き起こすことがある。本症の診断は、本症に特徴的な臨床症状は認められないが、血清、あるいは硝子体液中の抗トキソカラ抗体を検出する血清診断が有効とされる。その血清診断には、in vitro 培養されたイヌ回虫幼虫より培養液中に分泌、あるいは排泄される物質が血清診断抗原として汎用されてきた。しかし、この分泌・排泄物抗原は種特異性に問題があるとともに、抗原調製に多大な時間を要することから、安定的な抗原供給が困難である、などの問題があった。

考えられる。

裂頭条虫症の診断は駆虫、あるいは排出された条虫片節の形態に基づいて行われているが、その形態が互いに酷似するために、鑑別には高度な専門知識や標本作成技術が要求され、検査診断に要する時間も要するので、一般には難しいと言える。一方では、相変わらず頻発する裂頭条虫症の原因種の同定依頼が多いことも事実であり、寄生虫学的にはやはり正確な鑑別が必要であると考えられる。

そこで、形態学を基軸とした鑑別法に替わるより簡単で、迅速に鑑別診断ができる遺伝子鑑別法を確立するために研究を行った。本研究は前項のトキソカラ症血清診断キット開発と同様、研究成果として簡便で信頼性の高い検査診断が可能になり、検査診断基準のガイドライン策定、検査診断キットの供給体制が構築できるので、これらのことが厚生労働行政に反映することになる。

B. 研究方法

遺伝子診断法の確立に必要な研究材料は、国立感染症研究所寄生動物部に依頼検査として送付されてくる裂頭条虫標本、国立科学博物館動物研究部で保管されている標本、さらに、裂頭条虫が高密度で分布している地域において採取した標本を対象とした。それらの被検材料は成虫片節、幼虫(=プレロセルコイド)のいずれかであり、基本的には70%~80%エタノール固定されたものである。遺伝子診断法の確立に先立って、開発研究に用いた条虫種の遺伝子同定を行った。すなわち、市販のキットを用いてゲノムDNAを調製し、ミトコンドリアゲノムでコードされる cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝

子(*cox1*)、または ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子領域 (28S/ITS-1/5.8S/ITS-2/28S) を PCR で増幅し、その塩基配列に基づいて種を同定した。

次に、遺伝子診断法に用いる標的遺伝子として、種間で塩基配列が大きく異なるものが、種特異的プライマーを作成するのに都合がいい。そこで、ヒトに寄生する裂頭条虫科条虫の中でミトコンドリアゲノムが全く解読されていなかった鯨複殖門条虫についてミトコンドリアゲノムの全塩基配列を解読し、既知の裂頭条虫種のミトコンドリアゲノムにコードされる34個の遺伝子と2個の非コード領域を比較し、最も塩基配列に種間差がある遺伝子を特定した。その特定された遺伝子をターゲットにした multiplex PCR について検討した。

C. 研究成果

現在までに収集できた条虫は *cox1* 遺伝子、あるいは rRNA 遺伝子解析から、日本海裂頭条虫 (n=18)、広節裂頭条虫 (n=2)、太平洋裂頭条虫 (n=1)、鯨複殖門条虫 (n=9)、およびマンソン裂頭条虫 (n=5) であることが判明した。

遺伝子診断法の標的遺伝子を特定するために行った鯨複殖門条虫のミトコンドリアゲノムの解読と既知の裂頭条虫科条虫(日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、太平洋裂頭条虫、マンソン裂頭条虫)のミトコンドリアゲノムでコードされる34個の遺伝子(酸化的リン酸化に関与するタンパク質遺伝子12個、ribosomal RNA subunit 遺伝子2個、それに22個の tRNA 遺伝子)について種間の遺伝距離の解析から、全長510塩基対からなる ATPase subunit 6 (*atp6*) 遺伝子が最も種間

そこで、研究分担者は種特異性が高く、品質の精度管理が一定し、安定的に抗原供給が可能なレコンビナント抗原の開発を行った。すなわち、イヌ回虫幼虫の cDNA library よりトキソカラ症患者血清を用いて遺伝子のクローニングを行い、得られた抗原遺伝子は、大腸菌発現系を用いてレコンビナント抗原を作成し、その血清診断抗原としての評価を行ってきた。

本研究では、そのレコンビナント抗原をベースに、品質の一定した抗原調製、安定的な抗原供給が可能であるという観点から、合成ペプチド抗原を用いたトキソカラ症の血清診断キットを開発し、トキソカラ症患者の診断に役立てるとともに、標準化検査法として普及させ、厚生労働行政に反映させることを目的とした。

B. 研究方法

前述のイヌ回虫レコンビナント抗原のアミノ酸配列に基づいて、プロテイン・アドバイザーを用いて抗原となりうる B 細胞エピトープの検索を行った。その結果、5 つのエピトープ候補領域が得られたが、ペプチド内にシステイン残基を含み化学合成が困難な領域やヒトのホモログとの相同性の高い領域を除き、最終的に 2 領域(アミノ酸 14~15 残基)をペプチド抗原候補として化学合成し、精製標品(P-79 と P-80)、約 5 mg、純度 94~98%を得た。これらのペプチドを抗原としてイムノクロマト・スティックを作成し(アドテック株式会社に委託)、トキソカラ症抗体測定キットの基礎反応系の確立と抗原ペプチドの特異性を検討した。次いで、トキソカラ症患者血清ならびに健常人血清を用いてトキソカラ症抗体測定キットの仕様についても検討した。

C. 研究成果

1) 抗トキソカラ抗体測定キットの基礎反応系の確立: 2 種類の合成ペプチド抗原について、血清中の抗トキソカラ抗体を捕捉可能な抗原濃度を検討したところ、P-79 抗原では 100 μ g/mL の濃度で抗トキソカラ抗体が捕捉され、発色が確認された。陰性検体の一部でも発色が観察されたが、抗原希釈に用いたリン酸緩衝液では発色は見られなかった。一方、P-80 抗原では 100 μ g/mL、500 μ g/mL の濃度では血清中の抗トキソカラ抗体を捕捉することができなかったことから、イムノクロマト・スティックに抗原として固相化した場合、抗トキソカラ抗体との親和性は P-79 抗原の方が高いことが分かった。そこで、以下の実験は P-79 抗原を用いて行った。

2) トキソカラ症測定キット仕様の検討: イムノクロマト・スティックに P-79 抗原を 0.5、1.0、2.0 mg/mL の各濃度で固相化し、実際の測定系のための至適抗原濃度を検討した。イムノクロマト・スティックには血清注入孔、血清処理液注入孔、そして展開液注入孔からなる 3 つの孔から構成されるキットを試作し、検体と検体処理液を混合液として同時に加える 2 ステップ法と検体と検体処理液を別々に加える 3 ステップ法で検討した。反応時間は 15~20 分とした。

その結果、固相化するペプチド抗原濃度は 2 mg/mL で最もよい発色反応が確認された。測定法については、2 ステップ法では血清中の抗トキソカラ抗体を十分に捕捉することはできなかったが、3 ステップ法では、抗トキソカラ抗体が捕捉され、トキソカラ症陽性血清 11 検体中 9 検体で発色が確認された。しかしながら、陰性対照血清 3 検体中 2 例でも

弱い発色反応が確認された。

D. 考察と結論

2種類の合成ペプチド抗原を用いて基礎反応系を検討した結果から、P-79 抗原を用いた場合に、血清中の抗トキソカラ抗体を捕捉することができた。しかしながら、この反応系では、血清中の過剰な IgG 抗体が非特異的反応の原因になる可能性が考えられたので、抗体検出に用いる二次抗体と判定ラインにおける非特異的反応をなくす工夫が必要と考えられた。

トキソカラ症キット仕様の検討に関しては、固相化ペプチド抗原濃度を 2 mg/mL にするとともに、検体と検体処理液を分けて滴下する 3 ステップ法にすることによって、判定ラインに発色反応が確認出来たことから、この反応系が機能することが確認された。

現行の測定系では、一部の陰性血清での非特異的反応と考えられる反応が見られたために、これらを抑える抗体検出系の改善の必要性、また、健康人血清における非特異的反応の出現頻度の検討とともに、より多くのパネル血清を用いた評価が今後の検討課題と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

現在のところはない。

(2) 裂頭条虫症の遺伝子診断法の確立

A. 研究目的

裂頭条虫症、あるいは複殖門条虫症は裂頭条虫科 (Diphyllobothriidae) に属する条虫の成虫感染による寄生虫感染症で、ヒトはその幼虫 (= プレロセルコイド) が寄生する様々な魚類を摂取することによって感染する。

裂頭条虫症の原因になる種は、わが国ではサクラマス、カラフトマスやシロザケに寄生する日本海裂頭条虫であるが、欧州ではカワカマスやパーチ、南米、とくにチリでは養殖ギンザケやニジマス (= トラウト・サーモン) に寄生する広節裂頭条虫が重要である。また、人体寄生例としては稀ではあるが、太平洋裂頭条虫、*Diphyllobothrium dendriticum* や他の海洋性裂頭条虫による感染例もあるが、裂頭条虫属の種分類については解決すべき課題が残されている。一方、複殖門条虫症の原因になる種は鯨複殖門条虫 (従来は大複殖門条虫と呼ばれていた) であるが、その幼虫プレロセルコイドの経口摂取によるが、感染源は未だ不明であるが、海産魚類である可能性は高い。

これらの魚類媒介性条虫症は国内では刺身や寿司など魚の生食習慣を反映して発生数が多い。最近では、魚介類などの生鮮食品の輸送・流通システムの急速な進歩、あるいは海外での魚食習慣の変化に伴い、過去に裂頭条虫症が知られていなかった地域で発症する例が相次いでいる。このことは、わが国では圧倒的に日本海裂頭条虫による感染が見られるが、特に輸入魚を感染源とする日本海裂頭条虫以外の、従来知られていない条虫種による感染例が起きる可能性が

差が大きく、塩基配列に違いが見出されたので、*atp6* 遺伝子を標的とした multiplex PCR を検討した。

用いたプライマーはホルマリン固定によって DNA が断片化された標本にも適応できるように、短い PCR 産物が増幅されるようにデザインした。日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、マンソン裂頭条虫ならびに鯨複殖門裂頭条虫の *atp6* 遺伝子(いずれも 510 塩基対)の塩基配列に基づいて、それぞれの種に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーペアを合成し、その 4 組のプライマーペアを用いて multiplex PCR を行ったところ、いずれのプライマーペアとも種特異的な PCR 産物が増幅されたことで、プライマーペアが機能することが分かった。

そこで、予め遺伝子同定された標本について、その同定結果と multiplex PCR による鑑別結果が一致するか否かについて検討するために、より多くの条虫材料を用いて検討した。その結果、日本海裂頭条虫(n=7)では 181 bp、広節裂頭条虫(n=2)では 130 bp、マンソン裂頭条虫(n=3)では 102 bp、鯨複殖門条虫(n=6)では 207 bp の *atp6* 遺伝子断片が特異的に増幅され、結果は完全に一致した。ヒトに寄生するテニア属条虫 3 種(無鉤条虫、アジア条虫、有鉤条虫)の DNA を用いて multiplex PCR を行った場合には、これらの条虫では非特異的 PCR 産物は増幅されなかった。

以上の結果から、裂頭条虫科条虫の種は、PCR 産物の大きさのみで簡便に、かつ正確に鑑別できる方法が確立された。

D. 考察と結論

裂頭条虫科条虫の成虫寄生による感染症の治療法は種が異なっても基本的に同じであるために、臨床的には厳密な種の鑑別は必要でないかもしれない。しかしながら、裂頭条虫科条虫、とりわけ裂頭条虫属の条虫は現在でもその分類学的位置が不明な種類が多く、その分類学的再検討をする必要がある、それには遺伝子解析は欠かせない。

一方、国立感染症研究所への同定鑑別依頼に対しては、正確な種の同定が要求されている。また、分類形態に関する高度な専門知識や技術を有する専門家の枯渇が懸念される現状を鑑みると、より多くの裂頭条虫種(少なくとも人体寄生性の太平洋裂頭条虫や *D. dendriticum* を含む)を網羅した遺伝子鑑別法の確立が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

現在のところはない。

食品媒介性吸虫症の検査診断法開発

研究分担者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	梅原梓里	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨： 日本人が持つ伝統的な「生もの嗜好」という食習慣と密接に関連して、本邦では食品媒介寄生蠕虫症の発生数が多い。特に昨今では、魚介類を寿司・刺身で楽しむだけでなく、鶏肉・獣肉を（それら動物の内臓も含めて）加熱せずに生で賞味する人が増えた事に起因して、種々の食品媒介寄生蠕虫による感染事例の報告数が益々増加してきた。この様な食品媒介寄生蠕虫の中から、年間に推定 2,000 人以上もの患者を発生させるアニサキスと、年間の患者数は少ないが感染時に重篤な症状を惹起する肺吸虫を選び、今年度の検討を進めた。まず前者については、近年の国際的な研究成果の適用を鑑み、我が国で発生し、また今後発生し得るアニサキス症の原因虫を同定・鑑別する為の手技の開発に取り組んだ。また後者については、簡便で迅速な診断法（診断キット）の導入・改良に取り組み、その精度を評価すると共に、精度管理に必要な試料の収集に努めた。その結果、アニサキスに関しては、本邦で水揚げされた魚から初めて *Anisakis typica* を検出した。我々が設計したミスマッチ・プライマーを用いる事で、*A. typica* を含めた 3 種類の *Anisakis* I 型虫体（他に *A. simplex sensu stricto* および *A. pegreffii*）を迅速・簡便に鑑別する系（マルチプレックス PCR）が開発された。また肺吸虫に関しては、フロースルー免疫測定法に基づく診断キットを使用した場合、キット作製に用いた抗原の由来種と肺吸虫症患者の原因種とが一致した場合に、的確な診断結果が得られる事を明らかにした。

1. アニサキス症の主要原因虫と近縁種との分子鑑別法の開発

A. 研究目的

我が国では魚介類の生食に起因して、年間に 2,000 例以上のアニサキス症例が発生している。本症の主要な病原虫は *Anisakis simplex* であるが、本虫はアイソザイムや塩基配列の解析結果に基づき、*A. simplex sensu stricto* (*s. str.*, = 狭義の *A. simplex*), *A.*

pegreffii, *A. simplex* C の 3 種類の同胞種に分類する事が国際的にも一般的となってきた。そこで日本産の虫体に関して同胞種レベルで解析したところ、患者由来の虫体は殆どが *A. simplex s. str.* である事が明らかとなった。一方、魚由来の虫体（人への感染源）は、北海道では人体症例の虫体と同様に *A. simplex s. str.* であったが、九州では総て *A. pegreffii* であった。この様に九州では、魚と患者に由来する優占種が異なっていた。この検索に用いた

九州の虫体は、日本海産のマサバ *Scomber japonicus* (以下、サバ) に由来するものであったが、九州の市場では、東シナ海産のサバも流通量が多いと聞いた。そこで東シナ海産のサバを検索対象としてアニサキス虫体を検出し、得られた各個体を同胞種レベルで同定した。併せて、この検討過程で得た虫体を活用し、人体アニサキス症の主要原因虫である *A. simplex s. str.* とその近縁種との分子鑑別法の開発を試みた。

B. 研究方法

東シナ海で漁獲されたサバを福岡市の鮮魚店から購入し、体腔・内臓・筋肉を検索してアニサキス虫体を検出した。得られた虫体は、光学顕微鏡下に胃の形態・尾突起の有無を観察し、*Anisakis* I型と確認された虫体を選んで、常法に従いDNAを抽出した (*A. simplex* の各同胞種および *A. typica* の感染幼虫は形態鑑別が容易でない為に総称して *Anisakis* I型と呼ばれる)。次に、各虫体由来するDNAをテンプレートとし、リボソームDNAのITS領域を標的とするプライマー・ペアを用いて、当該領域をPCR増幅した。増幅された産物は、制限酵素 *Hinf*Iを用いた切断パターンの解析 (RFLP解析) および塩基配列の解読を行い、(同胞)種同定を行った。併せて、検出された虫体を用い、マルチプレックスPCR法による *Anisakis* I型虫体の分子鑑別法の開発に努めた。

C. 研究結果

東シナ海で漁獲されたサバ由来の虫体152匹のうち、150匹は *A. pegreffii* と同定され、1匹が *A. simplex s. str.* と同定された。残りの1匹は、PCR-RFLPで *A. simplex s. str.* あるいは *A. pegreffii* とは全く異なるパターンを示した。増幅産物の配列を解読したところ、この虫体はインドネシア産の *A. typica* (幼虫、マルソウダ由来、国際塩基配列データベースのアクセッション番号:

EU346092) および米産の *A. typica* (成虫、シワハイルカ由来、AB479120) と同一の配列を持つ事が分かり、*A. typica* と分子同定した。そこで本虫の塩基配列を登録し、アクセッション番号 (AB432908) を取得した。我が国で水揚げされた魚からの *A. typica* の検出は、今回が初めての記録となる。

本研究で3種類のアニサキス属虫体、すなわち *A. simplex s. str.*、*A. pegreffii* および *A. typica* が得られた事から、これを利用して、マルチプレックスPCR法による各種虫体の分子鑑別法の開発を試みた。まず各虫体のITS領域の塩基配列を解読し、*A. simplex s. str.* と *A. pegreffii* との間には、16bp離れた2箇所のみ塩基の置換がある事を確認した。次に、この2塩基の置換を反映させ、*A. pegreffii* に特異的なフォワードプライマー (APE, 23-mer) を作製した。更に、このプライマーAPEを改変し、5'末端側から2番目の塩基をTからGに意図的に置換したミスマッチ・プライマー (APE1) を作製した。また、*A. simplex s. str.* と *A. pegreffii* にのみ共通するフォワードプライマー (ApAs) および *A. typica* に特異的なフォワードプライマー (At) を作製した。これら3種類のフォワードプライマーと、線虫類のITS領域にユニバーサルなリバープライマー (PrimerB) を用いてマルチプレックスPCRを行なった [(APE+ApAs+At) + PrimerB および (APE1+ApAs+At) + PrimerB]。

A. pegreffii に特異的なフォワードプライマー (APE) を用いたマルチプレックスPCRでは、*A. pegreffii* だけでなく *A. simplex s. str.* のDNAからも、*A. pegreffii* に特異的であるべき約670bpのバンドが非特異的に増幅された。これに対して、ミスマッチ・プライマー (APE1) を用いたマルチプレックスPCRでは、*A. simplex s. str.* からは約670bpのバンドは増幅されず、約590bpのバンドのみが増幅された。一方 *A. pegreffii* からは、約670bp

の種特異バンドが増幅され、併せて約 590bp のバンドも増幅された。これに対して *A. typica* の DNA からは、予想サイズである本虫特異的な約 300bp のバンドのみが増幅された (図 1)。



図 1 *A. simplex* s. str. (レーン 1), *A. pegreffii* (レーン 2), *A. typica* (レーン 3) 由来の DNA を用いたマルチプレックス PCR 産物の電気泳動所見。 *A. pegreffii* 特異 mismatch プライマー (APE1), *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* とに特異的なプライマー (ApAs), *A. typica* に特異的なプライマー (At) の 3 種類のフォワードプライマーを、ユニバーサルなリバースプライマー (Primer B) と組み合わせて PCR 増幅させた。各バンドのサイズは DNA マーカー (レーン M, 100bp ラダー) で推定した。

D. 考察

A. typica は、*A. simplex* の近縁別種であり、これまでに我が国では、静岡県のスジルカから本虫の成虫が検出されていた。しかし幼虫の検出記録はなかった。したがって本報告が、*A. typica* の幼虫を日本で初めて検出した記録となる。

アニサキス科線虫の分子同定は、塩基配列の解読ではなく、最近ではより簡便な PCR-RFLP 法により実施されるようになってきた。しかしながらこの方法でも、電気泳動でバンドパターンを判読する前に、PCR 産物の制限酵素切断が必要であった。今回開発したマルチプレックス PCR 法では、1 回の PCR 反応 (とそれに続く電

気泳動) だけで、3 種類の *Anisakis* I 型虫体の鑑別が可能であった。アニサキス亜科線虫を迅速に同定するための方法として、本法は極めて有用であると考えられた。

E. 結論

本邦で水揚げされた魚から始めて *A. typica* を検出した。Mismatch プライマー APE1 を用いて、*A. typica* を含めた 3 種類の *Anisakis* I 型虫体 (他に *A. simplex* s. str. および *A. pegreffii*) を迅速・簡便に鑑別するマルチプレックス PCR の系を開発した。

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. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International* 57, 49-53, 2008.
2. Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., Sugiyama, H. Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 39 (Supplement 1), 26-31, 2008.
3. 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. 日本産 *Anisakis simplex* の同胞種レベルでの分類学的解析. 獣医寄生虫学会誌, 7, 36, 2008
4. 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. 同胞種レベルでみた日本産 *Anisakis simplex*: 感染源の特定に向けた検討. *Clinical Parasitology* (日本