

研究班の個別研究内容の紹介1

1 宮平 靖

- 実験シャーガス病動物感染モデルを
利用した新規感染制御手法の開発研究
- マラリア感染制御手法の新規開発

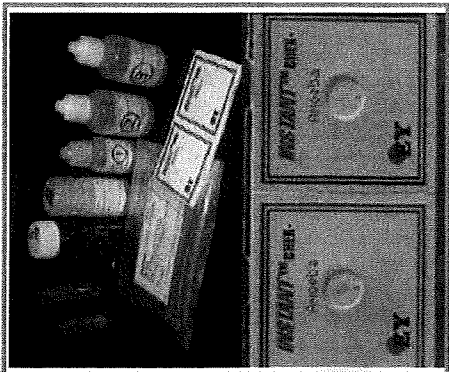
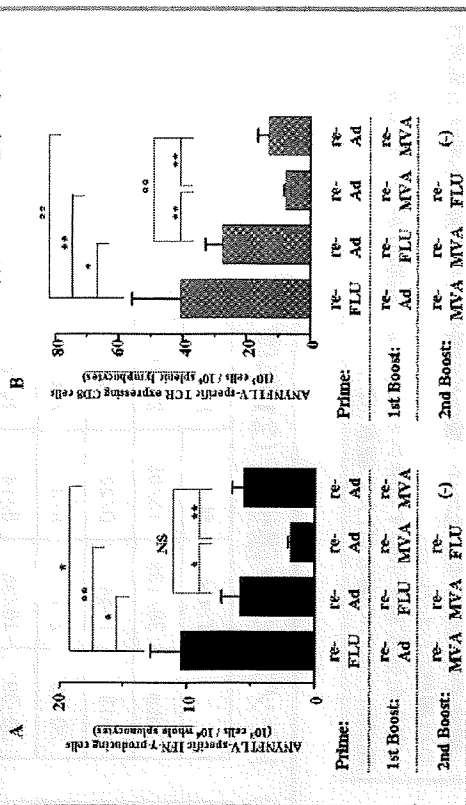
2 竹内 勤

- 慢性期シャーガス病の疫学研究
- 抗シャーガス病抗体検査キットの有用
性についての評価

3 赤尾信明

- 組織寄生虫症の免疫血清抗体検査
- dot-ELISA法の確立と赤痢アメーバ
の血清抗体検査キットの開発

3種組換えウイルスベクターを用いたCD8陽性T細胞誘導手法



赤痢アメーバの血清抗体検査キットの開発

開発スクリーニングキット
Instant-Check-Chagas

全血を用いても十分に検出できる。

シャーガス病の疫学調査の実施

迅速な検査結果の提供、検査キットの簡便な使用、検査結果の即時判定が可能。

研究班の個別研究内容の紹介2

4 大西健児

- 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

5 高本雅哉

- 慢性寄生虫/原虫症の罹患状況調査
 - トキソプラズマ感染におけるSTAT6シグナルの機能解析

在留外国人超音波健診結果

方法

ベトナム出身者68人、ブラジル出身者42人、ペルー出身者26人、ボリビア出身者24人、フィリピン出身者12人、アルゼンチン出身者5人、ナイジェリア出身者3人、コロンビア出身者2人、ニュージーランド出身者、オーストラリア出身者、メキシコ出身者、チリ出身者、イラク出身者各1人を対象に、寄生虫性病変の検索を目的に肝・胆の超音波検査を行った。

結果

網状や線維状所見、低エコー域などの慢性寄生虫症を示唆する異常所見は観察されなかった。
 寄生虫性疾患を示唆する所見ではないが、脂肪肝が7人、胆石が2人、脂肪肝と胆石の両者が1人に観察された。

トキソプラズマ陽性者 (20年度)

	Total	M	F
Total	61/201	24/70	36/114
1-19	2/15	1/6	1/9
20-29	6/30	0/10	6/19
30-39	10/34	3/12	7/18
40-49	23/68	11/24	12/37
50-59	13/30	6/12	7/16
60-89	5/19	2/3	3/14

トキソプラズマ陽性者 (21年度)

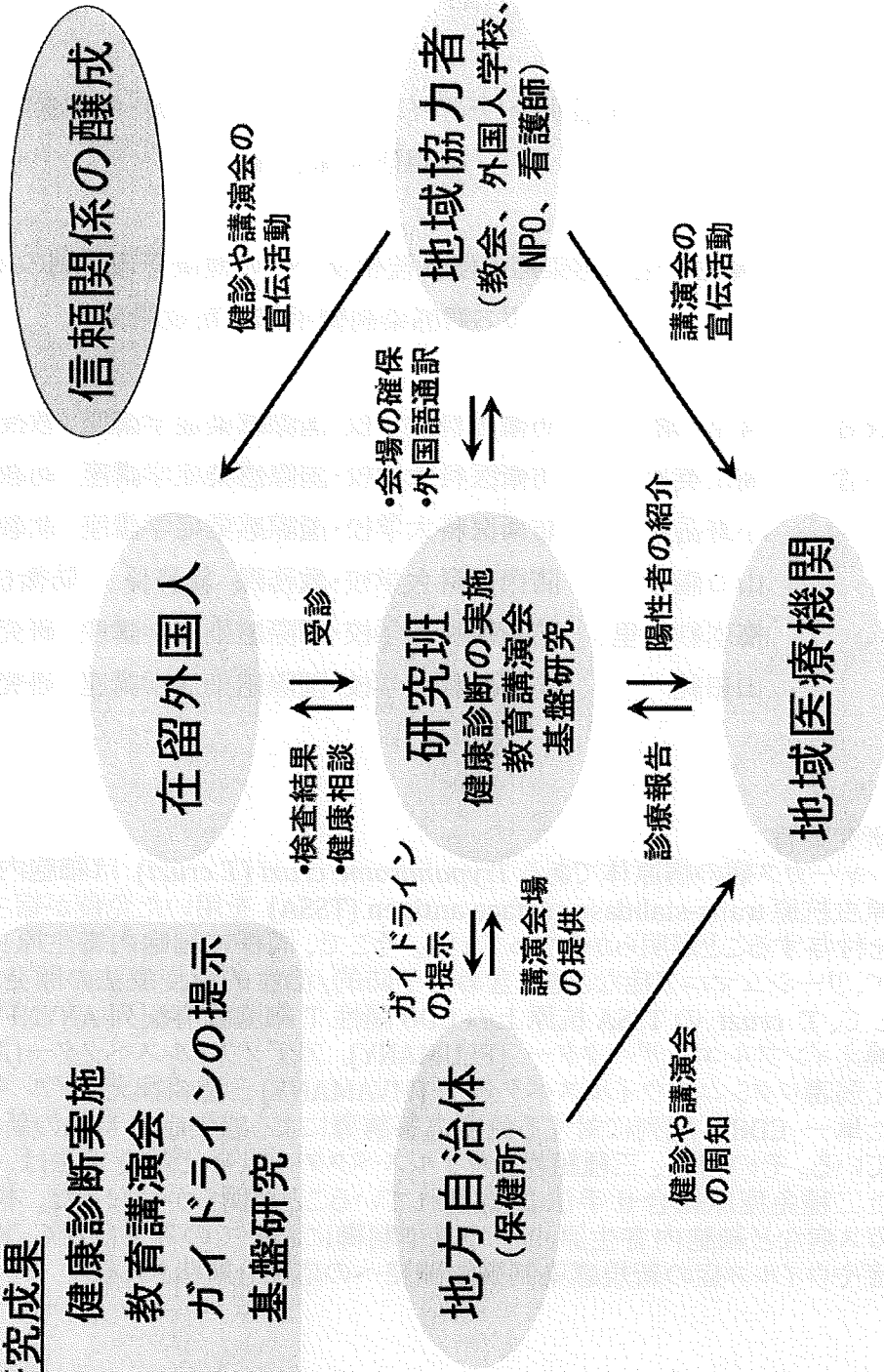
	Total	M	F
Total	38/139	15/65	23/74
1-19	1/54	0/29	1/25
20-29	2/11	0/3	2/8
30-39	16/35	6/14	10/21
40-49	13/28	5/12	8/16
50-59	3/8	2/5	1/3
60-	3/3	2/2	1/1

在留外国人におけるトキソプラズマ症の罹患調査

総括

研究成果

- 1 健康診断実施
- 2 教育講演会
- 3 ガイドラインの提示
- 4 基盤研究



厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・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
	山口陽子	防衛医科大学校・教務課 総務係 防衛技官
	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
	山田純	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^b 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- γ) 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。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- γ 産生細胞を誘導することが明らかになった。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、血中出現原虫数および生存マウス数において

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(新型インフルエンザ等新興・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
	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
	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
	山田純	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による感染防御効果について検討したが、現状で最大限の効果を有する積極的 CD8T 細胞誘導手法を用いても、マラリア赤内型感染に対しては CD8T 細胞のみの免疫誘導では感染制御能は期待できないことが明らかとなった。

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^b 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、*Pyoelii* 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- γ 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および感染実験

組換えアデノウイルス接種二週間後に組換えワクシニアウイルスを接種、さらに 12 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。

5. 抗原特異的 CTL 移入およびワクチン接種との組み合わせによる感染実験

TSSA 抗原特異的 CTL を組換えマラリア原虫感染前日および3日後にマウスに接種し、血中原虫密度および生存率について検討した。

さらに、ワクチン接種と CTL 移入を組み合わせることによる感染防御効果についても検討した。

C. 研究結果

1. TSSA エピトープ発現組換えマalaria原虫の作製

TSSA エピトープである H-2K^b 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alaria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alaria原虫はクローニング後、ゲノム DNA を抽出し *Bgl*III 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alaria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alaria原虫由来粗抗原によるエピトープ特異的 CD8T 細胞の誘導

組換えマalaria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alaria原虫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- γ 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alaria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alaria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alaria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 細胞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alaria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alaria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2週間後に組換えワクシニアウイルスを接種、さらに12週間後に各組換えマalaria原虫の接種を行った。各マalaria原虫を接種した未処理マウスおよび野生型を接種した免疫マウスにおいて著しい生存率の低下が認められ、エピトープ発現マalaria原虫を接種した免疫マウスにおいては生存率が改善した。一方、コントロールの免疫群

およびコントロールマラリア原虫接種においても非特異的な防御効果が認められた。この両群の比較では、抗原特異的 CD8T 細胞の誘導による感染防御効果は認められなかった。

5. 抗原特異的 CTL 移入およびワクチン接種との組み合わせによる感染実験

すでに樹立している TSSA 抗原特異的 CTL の移入実験によっても感染防御効果は認められなかった。さらに、Prime/Boost 法と TSSA 抗原特異的 CD8T 細胞移入の組み合わせによる効果を検討したが、抗原特異的 CD8T 細胞による感染制御能は認められなかった。

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、ワクチン接種による感染防御能付与につ

いて検討したところ、エピトープ発現マラリア原虫を接種した免疫マウスにおいては生存率が改善したものの、コントロールの免疫群およびコントロールマラリア原虫接種において非特異的な防御効果が認められ、両群の比較では抗原特異的 CD8T 細胞の誘導による感染防御効果は認められなかった。このような非特異的感染防御効果の詳細な機構は明らかではないが、ワクチン接種によって誘導された免疫細胞によって産生された IFN- γ 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、マラリア赤内型感染によって抗原特異的 CD8T 細胞は誘導されるが、現状で最大限の効果を有する積極的 CD8T 細胞誘導手法を用いても、マラリア赤内型感染に対しては CD8T 細胞のみの免疫誘導では感染制御能は期待できないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究論文
該当項目なし

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:組織寄生症の免疫血清抗体検査

研究分担者 赤尾信明

協力研究者 中山景介

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: 国内に在留する外国人を対象とした、慢性寄生虫感染症の罹患状況の把握とその対策に資するために平成 19 年度から実施した健診の受診者総数は 467 名であった。このうち 390 名について血清中の抗寄生虫抗体検査を実施した。その結果、トキソカラ症、顎口虫症、旋毛虫症、赤痢アメーバ症、マラリアに対する抗体陽性者を見だし、過去にこれらの寄生虫症に感染した、あるいは現在感染している可能性のある在留外国人の存在が示唆された。また、寄生虫抗体検査手技としての dot-ELISA 法を確立すると共に、トキソカラ抗体と赤痢アメーバ抗体検査については簡易迅速抗体検査キットを作製し、健診における検査法として活用できることを確認した。

A. 研究目的

わが国でかつて蔓延した回虫症などの腸管寄生虫感染症は、現在国内ではその感染者を見ることは少なくなった。しかし、人とモノの交流・流通の拡大に伴い、感染症の疫学動向に劇的な変化がもたらされるようになってきた。新型感染症の勃発は、単に一国の問題にとどまることはなく、瞬く間に世界中に拡散し、多くの人的・経済的被害を招来することは、平成 21 年度春から始まった新型 H1N1 インフルエンザの流行においても記憶に新しい。

これらの急性感染症に比較して、感染

症の中には、感染者本人が感染を自覚することなく日常生活を送ることが出来るものの、加齢、妊娠・出産、ストレスなどを契機として発症するものがある。慢性寄生虫感染症はまさにこのような範疇の感染症であり、今日の日本においては一般臨床医の関心を引くことは少なく、診断方法や治療薬についての情報は非常に限られている。

平成 19 年度から開始された本研究事業は、在留外国人を対象とする慢性寄生虫感染症の実態調査結果を元にした流行監視体制の整備と、これら特殊感染症の検査手法を確立するための問題

点を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 被験者の募集

東京医科歯科大学倫理審査委員会の審査承認(受付番号 419 号)を受け、神奈川県大和市、藤沢市、平塚市のカトリック教会の信者と群馬県太田市と常総市に所在するブラジル人学校の生徒ならびにその保護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。健診は、平成 19 年度から平成 21 年度の研究期間内に 9 カ所 513 名について実施した。

2. 検体の採取

慢性寄生虫感染症に対する血清抗体検査のために、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室に搬送され、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alaria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alaria感染の有無を最終的に確認した。また、血液の一部については FTA カード(ワットマン、WB120210)を用いて DNA を保存した。

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法によって実施した。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、多包虫抗原、赤痢アメーバHK-1抗原である。

dot-ELISAによる抗体検査術式は以下の通りである。

1. ニトロセルロース(NC)膜への抗原感作:調整した抗原液を 0.5 μ 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同じ NC 膜に 0.5 μ L 滴下して 37 $^{\circ}$ C で 30 分間乾燥させた。

2. ブロッキング:0.005% Tween20 加 PBS100mL にウシ血清アルブミン 1g を加えてブロッキングバッファー(以下 BSA/T)とした。乾燥させた膜は BSA/T に 30 分間浸した後、37 $^{\circ}$ C で 30 分間乾燥させ、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倍に希釈した検体を70 µL添加し、37°Cで40分間反応させた。その後0.005% Tween20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POD標識抗ヒトIgGウサギ血清(Cappel社、コスモバイオ)を500倍に希釈し、その70µL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 発色基質にはEzWestBlue (ATTO, AE-1490)を用い、7分間発色させた後、蒸留水で洗い酵素反応を停止してから結果を観察した。検査に要した時間は1検体あたり約2時間であった。

マラリア抗体検査は市販抗体検査キット(Malaria IgG Celisa, Cellabs Pty Ltd、重松貿易取扱)を用い、添付のマニュアルに従って検査した。また、赤痢アメーバ抗体とトキソカラ抗体の検査には、今回新たに開発した迅速抗体検査キット(ToxocaraCHEK, InstantAmoebaCHEK)によって行った。これに使用した抗原は、赤痢アメーバHK-1株(慶応義塾大学医学部小林正規先生より分与)およびイヌ回虫幼虫排泄物抗原(当教室で作製)であり、キット化はEY-LAB(Hong Kong)に依頼した。その測定原理を図1に示す。測定に要する時間はどちらのキットについても約3分以内に終了した。

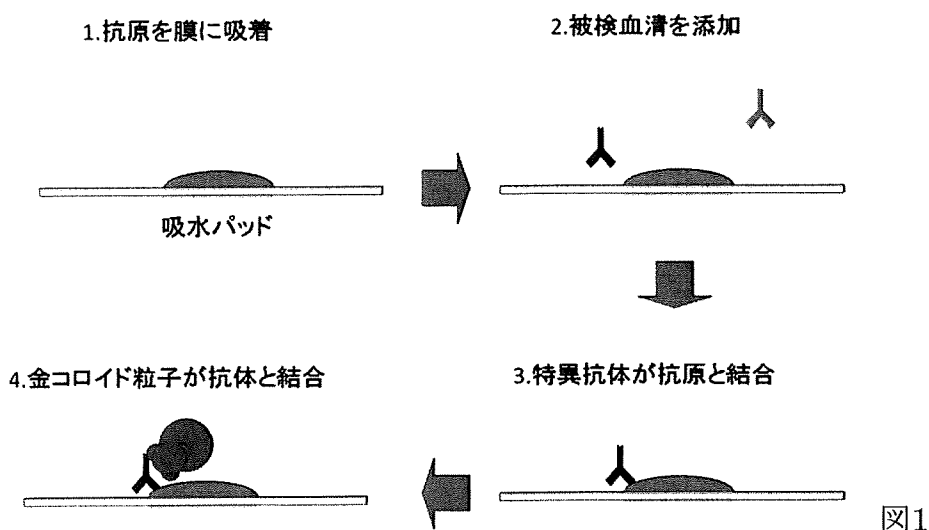


図1

C. 研究結果

1. 被験者の概要

平成19年度から平成21年度の3年間に検診に参加した在留外国人は合計

515名で、男性197名、女性287名、性別不明31名であった。受診者の国籍、年齢、滞在期間などについては別途報告される予定であるので、詳細はここで

は記さない。このうち、血液あるいは血清の採取に同意した受診者は492名であった。

2. 寄生虫抗体スクリーニング検査

dot-ELISAおよび迅速抗体検査キットによる、8種類の寄生虫抗体検査成績を表1に示す。何らかの寄生虫抗体に対して陽性と判定された検体は38検体(7.7%)であった。そのうち、トキソカラ抗体に陽

性を示したものが20検体と最も多かった。また、市販のマラリア抗体検査キットで陽性となったものは2検体で、その国籍はナイジェリアとブラジルであった。これら2検体については薄層塗抹ギムザ染色標本によりマラリア原虫の有無を検査したが原虫は認められなかった。さらに、OptiMALを用いて原虫抗原の有無を検査したが、これについても血液中のマラリア抗原は陰性であった。

表1 血清中の各種寄生虫抗体検査結果

		検診実施年度			合計
		平成19年度	平成20年度	平成21年度	
抗原	検査数	105	220	167	492
	マラリア抗体	ND	1	1	2
	トキソカラ抗体	9	9	2	20
	顎口虫抗体	2	3	3	8
	旋毛虫抗体	0	1	0	1
	肺吸虫抗体	0	0	0	0
	有鉤囊虫抗体	ND	0	0	0
	多包虫抗体	1	0	0	1

ND: not done

OptiMALを用いてマラリア抗原検査を実施し得たのは平成19年度と20年度の受診者のうちの151検体であった。検査の結果、1名がOptiMALで陽性を示した(図2)。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。

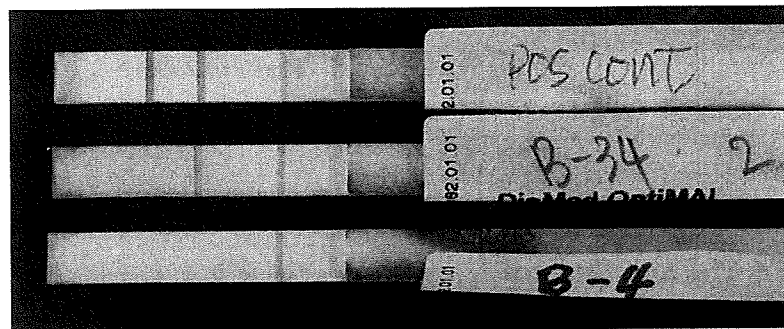


図2

D. 考察

今回測定に用いた抗原は、線虫類3種類、吸虫類1種類、条虫類2種類、原虫類1種類であった。トキソカラ症は、イヌ回虫やネコ回虫の幼虫包蔵卵の経口摂取、あるいは待機宿主となるウシやニワトリの生肉、生肝臓の生食により感染する。全身倦怠感や発熱を主な症状とし、侵入した幼虫は肝臓や中枢神経系、筋肉内に長期間寄生し、様々な合併症を惹起することが知られている[1, 2]。先進国のみならず開発途上国からも多数の報告例がある。

顎口虫症は、中間宿主となる淡水魚、両生類、爬虫類の筋肉内に寄生する感染幼虫を接触して感染する、食品媒介寄生虫症であり、皮膚爬行症や内臓幼虫移行症を引き起こす。国内感染も報告されているが、メキシコなどの中米やインドシナ半島では多数の患者が報告されている。

旋毛虫症は哺乳動物の筋肉細胞内に寄生している幼虫が、不完全調理食品として人に摂食されて感染が起こる。

感染源となる食肉にはブタ肉を始め、クマ肉、馬肉などが知られている。旋毛虫症は世界中に分布しており、同じ食材を食べたヒトの間での集団発生が報告されている。患者の多くは中東やロシアから報告されているが、アルゼンチンやインドシナ半島諸国、特にタイやベトナム)では患者の発生が多い。

肺吸虫症は第2中間宿主となる淡水あるいは喫水産甲殻類(国内ではサワガニ、モクズガニ)に寄生するメタセルカリアをこれらの甲殻類を使った料理と共に喫食することによって感染する。国内で捕獲されたサワガニを食して集団感染した在日タイ人症例[3]や中国およびタイからの移民集団に見られた肺吸虫症例[4]が報告あり、日本国内でのサワガニの肺吸虫メタセルカリア汚染状況を知らずに、母国の食習慣を再現して感染したり、来日以前に感染し、国内で感染が発見される例が相次いでいる。

有鉤囊虫は有鉤条虫の虫卵を経口摂取することによって感染する寄生虫症で、人体内では幼虫(囊虫)のまま全身の皮

下組織や中枢神経系などに寄生し、その寄生部位によっては生命に関わる重篤な症状を惹起する。国内感染はなくそのすべては輸入感染症と位置づけられている。

多包虫症は、有鉤囊虫症と同じく、多包条虫の虫卵が飲料水などと共にヒトに摂取されて起こる寄生虫症で、国内でも北海道を中心に感染者が報告されている。感染から発症までに十数年を要することから、早期診断・早期治療の重要性が指摘されている寄生虫症である。多包虫症は北緯40度以北の国々で流行が見られるが、単包虫は南米や中央アジアなどの牧畜の盛んな国で流行している。

今回、在留外国人の検診時に実施した血清抗体検査結果からは、表1に示したごとく、肺吸虫と有鉤囊虫を原因とする寄生虫症以外の抗原に対する抗体保有者を見いだすことが出来た。慢性寄生虫症の多くは、国内での感染がないか、きわめてまれな寄生虫症の範疇に属し、その多くは一般臨床医が経験したことの無いものであり、通常の検査では確定診断に至ることは困難である。本研究班の研究結果は、これらの寄生虫症に対する抗体検査体制の確立にも寄与できるものであったと考えられた。

寄生虫抗体検査を実施するに当たっては、当該寄生虫抗原の確保が常に問題となる。今回実施した抗体検査においても、国内では入手困難な寄生虫種もあり、今後慢性寄生虫症の対策を講じる上

で、安定した寄生虫抗原の入手と簡易抗体検査キットの開発が求められる。

E.結論

3年間にわたる研究において、神奈川県ならびに群馬県に在住する外国人を対象に9回にわたる住民検診を実施し、513名の受診者を得た。そのうち、採血に同意の得られた492名について、血清寄生虫抗体検査を実施した。その結果、延べ38検体で寄生虫抗体陽性者を見いだした。これらは、国内でも一般住民はもとより、臨床医にとっても情報の乏しい感染症であり、今後とも診断・治療体制の確立や啓蒙に向けた活動が必要である。

F.健康危険情報

該当項目なし

G.引用文献

[1] 吉川正英, 王寺幸輝, 石坂重昭, 岩野正之, 成智熙, 斉藤能彦, 広松賢治, 中村ふくみ, 名和行文. イヌ回虫幼虫ES抗原に高い抗体価を示したネフローゼ症候群再燃例. *Clinical Parasitology*; 2005. p. 47-49.

[2] 吉川正英, 石坂重昭, 大森佐和子, 中谷公彦, 西野俊彦, 吉本宗平, 椎木英夫, 斉藤能彦, 中村ふくみ, 名和行文. 慢性関節リウマチ(Ra)類似の臨床経過中に下腿浮腫,好酸球増多,低蛋白血症が出現しイヌ回虫幼虫Es抗原に対して高

い抗体価を示した1例. *Clinical Parasitology*. 2004;14(1):74-76.

[3] 在日タイ人女性に集団感染したウエステルマン肺吸虫症の4例. *日呼吸会誌*47(3), 2009,p249

[4] Paragonimiasis cases recently found among immigrants in Japan. *Internal Medicine*. 2004 May;43(5):388-92.

H.発表論文

[1] 赤尾信明. 肝イヌ回虫症. *日本臨床*. 2010;印刷中.

[2] 赤尾信明. creeping diseaseの原因となる寄生虫. *皮膚科診療カラーアトラス*: 講談社; 2010. 印刷中

[3] Katarina M, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Loop-mediated Isothermal Amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs Directly from sand samples. *Journal of Parasitology*. 2010;投稿中.

[4] Ayi I, Akao N. Evaluation of a New Anti-*Entamoeba histolytica* Antibody Detection Kit -

INSTANTTMCHEK-Amoeba. *Ghana Medical Journal*. 2010;投稿中.

[5] 赤尾信明. ヒトの犬・猫回虫症 犬や猫の回虫がヒトに感染するとどうなるか?. *Clinic Note*. 2009;52(November):66-68.

[6] 赤尾信明. 小児のイヌ・ネコ回虫症 (トキソカラ症). *小児科臨床*. 2009;62(4):697-702.

[7] 赤尾信明. 原虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト. 東京: 南江堂; 2010.印刷中

[8] 赤尾信明. 寄生虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト. 東京: 南江堂; 2010.印刷中

[9] 赤尾信明. イヌ回虫症 (トキソカラ症). 岸本寿男, 山田章雄編. *ズーノーシスハンドブック*. 東京: メディカルサイエンス社; 2009. p. 83-85.

[10] 菅沼真澄, 七戸和博, 友田弥里, 鈴木晟幹, 赤尾信明, 太田伸生. 動物から感染するヒトの回虫症. *臨床福祉ジャーナル*. 2009;6(1):39-43.

[11] 大友弘士, 赤尾信明. 抗微生物薬の治療効果の判定 2.マラリア. *検査と技術*. 2009;37(10増刊号):977-982.

[12] Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Somura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58:1227-1230.

I.知的財産権の出願・登録状況
該当項目なし

平成 21 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)
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
分担研究報告書

分担研究課題：

- ① 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
- ② マラリアおよび条虫症に関する知識の普及

分担研究者 大西健児 東京都立墨東病院 感染症科

分担研究者 千種雄一 独協医科大学 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

- ① 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。
- ② 我が国に居住する外国人のみならず日本人にとっても、マラリア及び条虫症の知識は必要である。講演会を通してこの両疾患の知識の普及をはかった。

① 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

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。海外から来日した人の中には、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。

住血吸虫症は、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。住血吸虫症は肝繊維症から肝硬変へと移行し、門脈圧亢進症を引き起こすことから、感染者を発見し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み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。異常所見と性別患者数を表 1 に示した。

表 1:肝・胆の超音波異常所見

異常所見	男性	女性	合計
------	----	----	----