

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato-Hayashi N, Kirinoki M,
Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V,
Matsuda H, Chigusa Y.

Identification and differentiation of
human schistosomes by polymerase
chain reaction

Exp Parasitol. 2010 Mar;124:325-329.

2. 学会発表

- (1) Ohmae H, Chigusa Y, Blas BL,
Ducussin B, Sinuon M, Socheat D.
Impact of Climate Changes on
Schistosomiasis and other parasitic
diseases, The 1st East Asian
International Symposium on

Climate Change and Health, July,
2009, Tsukuba.

- (2) 大前比呂思 寄生虫症の疫学と対策
-マラリアと住血吸虫症対策の現場か
ら- 第3回現象数理21世紀COEシン
ポジウム 「感染症 -実像とモデリ
ング 分野の垣根を越えて-」
2010年2月 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

表 1 対象となった日本住血吸虫症患者の性比と年齢分布
 (フィリピン, レイテ島, Schistosomiasis Research Hospital)

年齢	男性	女性	総計
— 20	31	18	49
21 — 30	49	25	74
31 — 40	29	16	45
41 — 50	23	12	35
51 — 60	24	15	39
61 —	21	7	28
総計	177	93	270

表 2 日本住血吸虫症患者におけるプラジカンテル治療後の神経症状の変化

(フィリピン, レイテ島, Schistosomiasis Research Hospital)

	治療前	プラジカンテルによる治療後		
		3ヶ月後	6ヶ月後	12ヶ月後
四肢痙攣	244	22	12	33
(間代性 27)	222		19	10
(その他 6)	22		3	2
頭痛	136	11	15	16
めまい	136	18	10	17
感覚脱失	98	7	1	10
筋痙攣	57	3	1	1
構語障害	13	1	1	1
舌偏移	12	1	1	1
複視	6	2	0	0
その他	11	0	0	0
失語 麻痺など				

対象者数	270	219	229
216			

表3 日本住血吸虫症患者におけるプラジカンテル治療後の消化器症状の変化(フィリピン, レイテ島, Schistosomiasis Research Hospital)

	治療前	プラジカンテルによる治療後		
		3ヶ月後	6ヶ月後	12ヶ月後
血便	67	0	1	2
腹痛	66	2	4	1
発熱	21	0	0	0
対象者数	270	219	229	229
216				

表4 日本住血吸虫症患者における主な神経症状と腹部超音波検査所見(フィリピン, レイテ島, Schistosomiasis Research Hospital)

肝線維化 超音波所見	神経症状			超音波検査 被験者数
	痙攣	感覚脱失	筋痙攣	
0	26	14	12	29
1	34	20	14	38
2	16	8	6	19
3	8	4	2	10
総計	84	46	34	106

表5 メコン住血吸虫症における国際的超音波検査基準の一致率
(カンボジア王国、クラチエ省での検査)

	軽度病変 点数化 10 点以下	高度病変 点数化 11 点以上	全体

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）

顧みられない病気に関する研究：
寄生蠕虫症の診断法の確立と実用化

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、診断に役立てる事が十分に期待できる程度の高い抗体価が検出された。尿中に検出された抗体の特徴としては、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。次に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（rSJT226）をSJ症の免疫診断に導入した。rSJT226は尿中の抗体検出に優れる事が判明した。治療後早急に陰性化する特徴を有していた。さらに当該分子中に特異的モノクローナル抗体のepitopeとしてアミノ酸配列1種、および感染マウス、感染者の血清、尿中抗体のepitopeとしてアミノ酸配列4種を特定した。SJT226循環抗原を検出した結果、高率に循環抗原として存在することが判明した。これらの結果からrSJT226およびepitopeペプチドを用いた簡易診断法作出が期待できた。

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。

まず最初に日本住血吸虫 (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。尿中に検出された抗体の特徴としては、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 抗体が挙げられた。

次いで本年度では、診断用抗原作製維持に伴う困難を回避する為に、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した。

B. 研究方法

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 (SJT226) のレコンビナントタンパク (rSJT226) 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。さらに当該タンパク

のアミノ酸配列に基づいてペプチドライブラリーを作製し、特異的モノクローナル抗体 (SJA111 mAb)、感染マウス血清、感染者血清および尿中抗体と反応する B-cell epitope を決定した。

<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成虫のtegument に局在する蛋白成分のレコンビナント蛋白 (rSJT226) 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. 1)。

EPGと尿中に検出された抗rSJT226 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 rSJT226 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. 2)。

抗 rSJT226 IgG 抗体価は SWAP に対する IgG 抗体価と相関を認めた。

SJA111 mAb の epitope として、15mer のアミノ酸配列 1 種、および感染マウス、感染者の血清、尿中抗体の epitope として 4 種を特定した。ペプチド配列

等抗原構造の詳細は割愛する。

SJA111 mAb を用いて、SJT226 循環抗原を検出した結果、高率に循環抗原として存在することが判明した。SJT226 循環抗原は治療後速やかに低下した (Table1)。

D. 考察

本研究で導入した rSJT226 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応用できる可能性が考えられる。さらに SJT226 分子中の抗体と反応するアミノ酸配列 (epitope) を特定できたことからより特異的な抗体検出が可能になると考えられる。

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から住血吸虫症で

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 成虫 tegument 由来成分のレコンビナントタンパク、rSJT226 およびペプチドを用いて、高感度で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, 2010

安倍正史、白倉哲郎、中村文規、木村

聡、関 忠之、仲村美佐子、福富裕之、朝日博子、八木田健司、塩川 章、病理解剖用遺体に認められた原虫について、Clinical Parasitol. 19, 49-54, 2008.

Asahi, H.: *Plasmodium falciparum*: Chemically defined medium for continuous intraerythrocytic growth using lipids and recombinant albumin. Exp. Parasitol. 121, 22-28, 2009.

Izumiyama, S., Omura, M., Takasaki, T., Ohmae, H. and Asahi, H.: *Plasmodium falciparum*: Development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. Exp. Parasitol. 121, 144-150, 2009.

2. 学会発表

Kwansa-Bentum, B., 北村 圭、熊谷 貴、下河原理恵子、朝日博子、Wilson, MD. 太田伸生: Preliminary studies on molecular epidemiology of chloroquine resistant malaria parasites in Ghana. 第78回日本寄生虫学会大会 東京、2009年3月

Asahi, H.: Chemically defined medium for continuous intraerythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. 第78回日本寄生虫学会大会 東京、2009年3月

北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum, K, 三田村俊英、坪井敬文、朝日博子、太田伸生、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* におけるオートファジー関連遺伝子の機能解析: 第20回日本生体防御学会学術総会 2009年7月 東京

Kwansa-Bentum, B., Asahi, H., Kitamura, K., William K.A., Kumagai, T., Izumiyama, S. and Ohta, N.: Comparative study of *Plasmodium falciparum* growth in three different serum-free media after exposing parasite to chloroquine or artemisinin. 第50回日本熱帯医学会大会 総会, 2009年10月、沖縄、

桑原奈々、杉原徳彦、宮下 勉、金谷光恵、山崎 浩、朝日博子、上野正純、福富裕之、杉原壽彦、プラジカンテルを用いた駆虫で頭節を回収し得た無鉤条虫症の一例、日本衛生検査所協会学術研究発表会 2009年11月、東京

Asahi, H., Izumiyama, S., Kwansa-Bentum, B. and Tolba, M.E.: Identification of components of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* that interact with growth-promoting lipids. American Society of Tropical Medicine and

Hygiene 58th Annual Meeting, in Washington, DC, USA, November 2009

Kwansa-Bentum, B., Kitamura, K., William K.A., Kumagai, T., Izumiyama, S., Asahi, H., Wilson, M.D. and Ohta, N.: Comparative study of *Plasmodium falciparum* growth in serum-free media and expression levels of Pfcrt gene after exposure to drug. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting, in Washington, DC, USA, November 2009.

知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得：(予定) 日本住血吸虫症の免疫診断に有用な人工抗原(仮題)：出願者 未定
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Fig. 1 DETECTION OF SPECIFIC IgG IN URINE FROM SJ-INFECTED USING rSJT226

R, infected with Ascaris and/or hook worm; N, noninfected

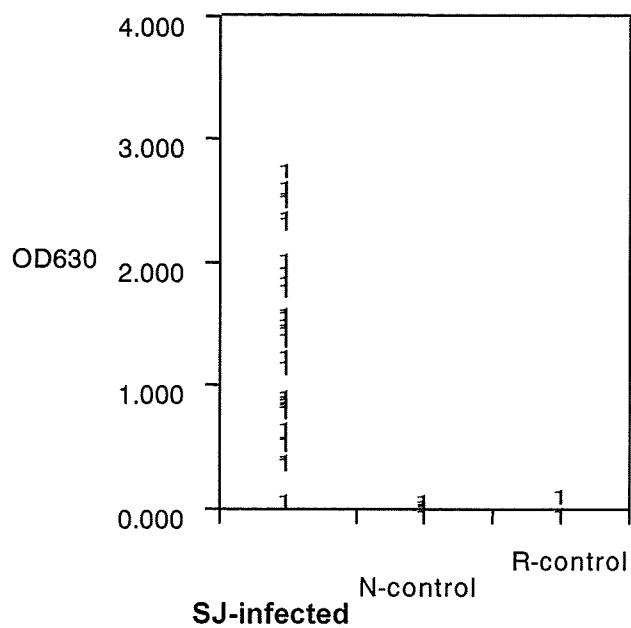
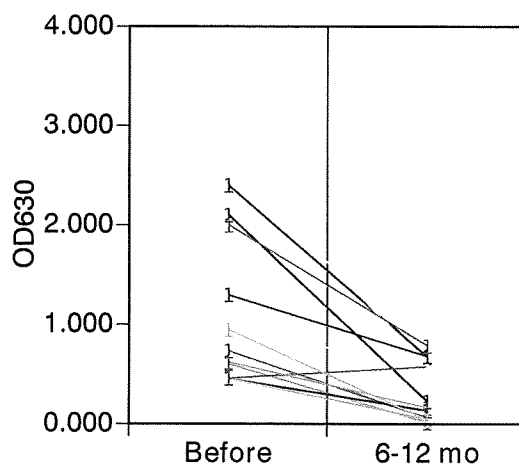


Fig. 2 CHANGES IN ANTI-rSJT226 IgG LEVELS IN URINE AFTER TREATMENT



Negative:
7/13 (53.8%)

Table 1. SJT226 circulating antigen in sera from individuals infected with *SJ* and other parasites

Infection	No. of cases	No of positive (%)
Schistosomiasis	78	57 (73.0)
Paragonimiasis	21	0
Clonorchiasis	21	1 (4.7)
Healthy subjects	88	0

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）

（総括・分担）研究報告書

顧みられない病気に関する研究

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	赤尾信明	東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫学
研究協力者	松岡裕之	自治医科大学医動物学教室
研究協力者	Guita R. Elefant	サンパウロ熱帯医学研究所
研究協力者	小林行治・小林薫	アドテック株式会社
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	チリ大学歯学部
研究協力者	Ruben Mercado	チリ大学医学部寄生虫学教室

研究要旨：幼虫移行症として重要なイヌ回虫症・ネコ回虫症（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）の遺伝子診断キット開発に関する研究を行った。前者については、前年度に引き続いて遺伝子組換え抗原を用いた診断キットを試作し、健常人血清とトキソカラ症患者血清を用いて評価を行った。後者については、cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) 遺伝子をターゲットとした遺伝子診断法を確立するために、国内外で収集、採取した裂頭条虫標本を用いて cox 1 遺伝子の多型や種内変異を解析し、cox1 遺伝子の増幅に必要な種特異的プライマー設計の基礎的情報を得た。

(1) トキソカラ症迅速血清診断キットの開発

A. 研究目的

ヒトのトキソカラ症はイヌ回虫やネコ回虫など *Toxocara* 属線虫の幼虫寄生によって惹起される寄生虫感染症で、世界的に重要な幼虫移行症の一つである。トキソカラ症は幼虫の寄生部位によって臨床症状が異なり、幼虫が肝臓や肺などの内臓に移行し、寄生した場合（＝内臓トキソカラ症）には肝疾患や呼吸器症状が見られる。脳に寄生することもあり、この

場合には中枢神経症状を呈し、また眼部に寄生した場合（＝眼部トキソカラ症）には、視力低下や硝子体混濁、さらに重症化すると失明することもある。本症の診断は、本症に特徴的な臨床症状が認められないために、間接的な診断法として血清中や硝子体液中の抗イヌ回虫 IgG 抗体を検出する血清検査が有効である。その血清検査には、in vitro 培養されたイヌ回虫幼虫から分泌、あるいは排泄された物質が血清診断抗原として汎用されている。しかし、この分泌・排泄物抗原はトキ

ソカラ症以外の寄生虫症と交差反応を示すことがあり、特異性の点で難点がある。また、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もある。

本研究の目的は抗原に関して、交差反応性がなく、品質の精度管理が一定し、かつ安定的な供給が可能であることを条件とした遺伝子組換え抗原（以下、レコンビナント抗原）を用いたトキシカラ症の血清検査キットを開発することにある。本研究成果は、簡便な検査キットとして、ヒトのトキシカラ症の臨床診断に役立てることが可能となり、また標準化検査法として普及させることにより、厚生労働行政に反映させることが期待される。

B. 研究方法

昨年度の研究で、キットの支持体であるイムノクロマト・スティックにレコンビナント抗原、あるいは合成ペプチド抗原を吸着させたキットを試作し、反応性を比較したところ、レコンビナント抗原の方が合成ペプチド抗原に比して、特異性や反応性が優れていたことから、本年度はレコンビナント抗原を用いた抗トキシカラ抗体測定キットに絞り、評価と改良を行った。

1) 抗原濃度の検討：レコンビナント抗原は 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3段階の濃度でイムノクロマト・スティックを作成し、基礎的反応系を構築した。

2) キットの評価：健常人血清（日本人、50 検体）とトキシカラ症と診断された患者血清（ブラジル人、50 検体）、計 100 検体についてイムノクロマトキットの反

応性を評価した。同時に、従来の検査法である plate-ELISA による検査結果とも比較した。

3) 検出感度の向上：前項 2) の結果に基づいてキットの改善を行った。とくに眼部トキシカラ症の場合には抗体産生が一般に低く、検出感度を高めるために二次抗体の種類や濃度について検討した。

C. 研究成果

1) 抗トキシカラ抗体測定キットの基礎反抗系の確立：レコンビナント抗原の濃度を 3 段階（100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に調製して、発色度を検討したところ、すべての抗原濃度で健常人血清はすべて陰性であり、非特異的反応は認められなかった。一方、トキシカラ症患者血清では抗原濃度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最も安定した反応性が得られ、その発色度は plate-ELISA による検査結果との間に高い相関が見られた。この結果から、イムノクロマトキットに用いるレコンビナント抗原の至適濃度は 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として、キットを試作した。

2) 抗トキシカラ抗体測定キットの評価試験：日本人健常人血清（50 検体）とブラジル人トキシカラ症患者血清（50 検体）の計 100 検体を用いてイムノクロマトキットの反応性を検討した。その結果、健常人血清 50 検体は plate-ELISA、イムノクロマトキットともすべて陰性であり、非特異反応は認められなかった。一方、臨床的、血清学的にトキシカラ症と診断されたブラジル人患者 50 例のうち、われわれが開発したレコンビナント抗原を用いた plate-ELISA では 50 例中 15 例が陽性と判定され、その 15 例中 14 例はイムノ

クロマトキットでも陽性であった。レコンビナント抗原を用いた plate-ELISA による吸光度とイムノクロマトキットによる発色度との間には高い相関関係が見られた。ただ、レコンビナント抗原を用いた plate-ELISA とイムノクロマトキットで陰性と判定された 11 例の眼部トキソカラ症を含む症例(35 例)では、IgG 抗体産生が低かったことから、検出感度を高める工夫を行った。

3) 抗トキソカラ抗体測定キットの改善：前項で述べた問題を改善するために、二次抗体の種類や濃度について検出感度を高める検討を行った。その結果、二次抗体の濃度を現行の 2,000 倍から 1,000 倍に変更することによって、感度上昇に改善が認められた。

D. 考察と結論

以上の研究成果から、トキソカラ症抗体検査測定キットに用いるレコンビナント抗原の濃度や二次抗体の至適濃度など基礎反応系を確立することができた。今後はより多くの被検血清を用いて評価試験を継続して行うとともに、トキソカラ症以外の寄生虫症との交差反応性についても検討する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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

(2) 裂頭条虫症の遺伝子診断法の確立

A. 研究目的

裂頭条虫症や複殖門条虫症（以下、裂頭条虫症）は裂頭条虫科に属する条虫類（*Diphyllobothrium* / *Diplogonoporus*）の成虫寄生によって引き起こされる寄生虫感染症で、ヒトはその幼虫（＝プレロセルコイド）が寄生する第 2 中間宿主の魚類を生で摂取することによって感染する。裂頭条虫症は、古来より生魚を好む日本人の食習慣を反映して頻発していたが、最近では、感染源となる魚の輸送・流通システムの急速な進歩に伴って発生件数が増加傾向にある。

裂頭条虫症の原因になる種は、日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、太平洋裂頭条虫、*Diphyllobothrium dendriticum*、海洋性裂頭条虫に加え、鯨複殖門条虫が知られている。裂頭条虫症の診断は自然排出された虫体や駆虫によって得られた条虫の形態に基づいて行われているが、形態が互いに酷似するために、正確な鑑別には高度な専門知識や標本作成技術が要求される場合が多い。そこで、より簡単に鑑別できる PCR 診断キットを開発することが本研究の目的である。本年度は、PCR 診断の標的遺伝子として cytochrome c oxidase subunit 1 遺伝子（以下、cox1 遺伝子）の多型や種内変異を検討し、種特異的プライマー設計するための基礎情報収集を行った。研究成果として、遺伝子診断キットの供給体制を構築することは、検査診断基準の標準化やガイドラインの

策定が可能となり、厚生労働行政に反映することが期待される。

B. 研究方法

研究材料として、国立感染症研究所寄生動物部（以下、感染研）に依頼検査として送付されてくる裂頭条虫検体 (n=27)、国立科学博物館（以下、科博）で保管されている標本(n=7)、さらに裂頭条虫症の流行地である南米チリで採取した標本 (n=65) 計 99 サンプルを用いて解析を行った。被検材料は成虫、幼虫、あるいは虫卵のいずれかであり、基本的には 70～80%エタノールで固定されたものであるが、一部にはホルマリン固定標本も含まれていた。PCR 用のゲノム DNA は市販のキットを用いて条虫サンプルより調製し、PCR によって増幅された *cox1* 遺伝子の塩基配列に基づいて裂頭条虫を分子同定するとともに、*cox1* 遺伝子の多型について検討した。

C. 研究成果

cox1 遺伝子の塩基配列解析から、99 サンプルは、日本海裂頭条虫 (n=25)、広節裂頭条虫 (n=4)、太平洋裂頭条虫 (n=2)、*D. dendriticum* (n=59) と鯨複殖門条虫 (n=9) の 5 種類であると分子同定された。個々の裂頭条虫の *cox1* 遺伝子について比較すると、日本海裂頭条虫と鯨複殖門条虫の *cox1* 遺伝子には著明な多型が見られた。日本海裂頭条虫では少なくとも 11 個のハプロタイプが検出され、塩基レベルでは 0.1～1.8%の種内変異が認められた。鯨複殖門条虫の *cox1* 遺伝子では、少なくとも 8 個のハプロタイプが検出されたが、

最大で 1.6 %程度で塩基置換が認められた。一方、広節裂頭条虫の *cox1* 遺伝子に関しては、チリ産の 4 検体はすべて同一配列であり、またヨーロッパやロシアに分布する広節裂頭条虫の *cox1* 遺伝子とも同一配列であり、遺伝子多型は検出されなかった。最も個体数が多く *D. dendriticum* と同定されたチリ産個体 (n=59) については、現在までに少なくとも 2 個のハプロタイプが検出されているが、これらのハプロタイプは極東ロシア産 *D. dendriticum* とは別のハプロタイプであり、2.8 %の塩基配列に違いが認められた。太平洋裂頭条虫に関しては被検数が少なく、*cox1* 遺伝子の多型については議論できなかった。

D. 考察と結論

裂頭条虫症の原因となる条虫種の PCR 診断キットを開発するため、基礎になる遺伝子情報の蓄積を行った。日本海裂頭条虫と鯨複殖門条虫の *cox1* 遺伝子のように遺伝子多型が数多く存在した種もいたが、種として高度に保存されている塩基配列部位も多く存在することが確認され、その塩基配列に基づいて種特異的プライマーを設計することが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamasaki H, Kuramochi T. (2009) A case

- of *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection possibly linked to salmon consumption in New Zealand. *Parasitology Research* 105: 583-586.
- 2) Mercado R, Yamasaki H, Kato M, Muñoz V, Sagua H, Torres P, Castillo D. (2010) Molecular identification of the *Diphyllobothrium* species causing diphyllbothriasis in Chilean patients. *Parasitology Research* 106:995-1000.
 - 3) Shirakawa K, Yamasaki H, Ito A, Miyajima H. (2010) Cerebral sparganosis: The wandering lesion. *Neurology* 74:180.
 - 4) 山崎 浩, 川中正憲, 荒川京子, 森有加, 杉山 広, 森嶋康之, Ruben Mercado, 加藤基恵 (2010) 南米チリより DNA 鑑別依頼のあった裂頭条虫について. *Clinical Parasitology* 20: 27-29.
 - 5) 小出照子, 山崎 浩, 渡辺伸元, 木許泉, 河邊太加志 (2010) 虫体の遺伝子解析により診断された日本海裂頭条虫症の兄妹例. *日本小児科学会雑誌* 114: (印刷中).
 - 6) 姜 朱美, 住田菜穂子, 福田 均, 杉山広, 山崎 浩 (2009) 皮膚二核顎口虫症. *皮膚科診療* 31:977-980.
2. 学会発表
- 1) 山崎 浩, 川中正憲, 荒川京子, 森有加, 杉山広, 森嶋康之, Ruben Mercado, 加藤基恵. 南米チリより DNA 鑑別依頼のあった裂頭条虫について. 第 20 回日本臨床寄生虫学会 2009 年 6 月 20 日、大阪.
 - 2) 山崎浩, 森有加, 杉山広, 森嶋康之, 川中正憲. 病理組織標本中に検出された寄生蠕虫の DNA 鑑別診断について. 第 69 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2009 年 10 月 3 日、東京.
 - 3) 桑原奈々, 杉原徳彦, 宮下勉, 金谷光恵, 山崎 浩, 朝日博子, 上野正純, 福富裕之, 杉原壽彦. プラジカンテルを用いた駆虫で頭節を回収した得た無鉤条虫の一例. 日本衛生検査所協会学術研究発表会、2009 年 11 月 26 日、東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

平成 21 年度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)
「顧みられない病気に関する研究」班
分担研究報告書

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	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	梅原梓里	麻布大学生命・環境科学部
研究協力者	小林行治	アドテック株式会社研究開発部
研究協力者	小林 薫	アドテック株式会社研究開発部

研究要旨：「生もの嗜好」という日本人が持つ伝統的な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（時に内臓も）加熱せずに生で賞味する人が増加していることに起因して、種々の食品媒介寄生蠕虫による感染事例の報告が目立つようになってきた。このような食品媒介寄生蠕虫の中から、年間に推定 2,000 人以上もの患者が発生するアニサキスと、年間の患者数は少ないが重篤な症状を惹起する肺吸虫を選び、昨年度に継続して、診断法の開発に関する検討を進めた。まずアニサキスについては、近年の国際的な研究成果の適用を鑑み、我が国で発生するアニサキス症の主要原因虫種を同胞種レベルで同定する為の手法の開発・改良に取り組んだ。また肺吸虫については、迅速で簡便な診断キットの作製に取り組み、併せてキットの精度管理に必要な試料の収集に努めた。その結果、新たに構築したミスマッチ・プライマーを PCR に用いれば、*Anisakis simplex* の同胞種・交雑種が容易に鑑別できることを明らかにした。また肺吸虫に関しては、ES 抗原を用いた原因種別の診断キット（免疫クロマトグラフィー法）を作製し、本キットが感染の診断に有用であることを示した。

1. アニサキス症原因虫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ことが国際的にも一般的となってきた。日本産の虫体に関して同胞種レベルで解

析され、患者由来虫体のほとんどは *A. simplex* s. str. であることが明らかにされた。一方、人への感染源となる魚介類からは、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* の両者が検出されている（ただし漁獲の地域により両種の検出比率は異なる）。興味深いことに、魚由来の検出虫体について、リボソーム DNA の介在配列（以下、ITS 領域）の塩基配列を精査読すると、両種の配列を兼ね備えた遺伝子型の存在が確認された。この遺伝子型は既に、Hybrid genotype（以下、交雑種）として欧州で報告されていたものに相当する（Martin-Sanchez et al., 2005）。

我々が昨年度に開発した *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* との分子鑑別法では、この交雑種を同胞種の中の *A. pegreffii* として同定してしまう。今年度はこの点を改良し、交雑種を *A. pegreffii* から区別するための方法について検討した。

B. 研究方法

新潟で水揚げされた日本海産のサバと福岡で水揚げされた東シナ海産のサバを鮮魚店から購入し、体腔・内臓・筋肉を検索してアニサキス虫体を検出した。虫体を光学顕微鏡下に観察し、胃の形態・尾突起の有無から *Anisakis* I 型と確認されたものを選んで、常法に従い DNA を抽出した。*(A. simplex)* の各同胞種は、感染幼虫期では形態に基づく鑑別が困難で、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 による切断パターンの解析、すなわち RFLP 解析を行い、また塩基配列を解読して、いずれの同胞種か、あるいは交雑種かに分類した。交雑種とされた虫体につ

いては、改めてミトコンドリア DNA の *cox1* 遺伝子を PCR 増幅し、制限酵素 *Sfc*I を用いた切断パターンの解析と、一部はさらに塩基配列の解読を行い、*A. simplex* s. str. タイプ、あるいは *A. pegreffii* タイプのいずれかに分類した。

虫種鑑別に用いる PCR 法を確立する為に、ITS 領域の塩基配列を反映したプライマーを設計・作製し、PCR 法でその特異性を検討した。まず *A. pegreffii* だけから増幅産物を得るプライマーとしては、昨年度に構築した APE1 を用いた。この APE1 は、*A. pegreffii* の当該領域の配列を、1 箇所だけ異なる塩基に置換して作製した mismatch・プライマーである。今回はこれと同様に、*A. simplex* s. str. のみから増幅産物を得るような mismatch・プライマーを設計・作製した (図 1)。これら mismatch・プライマー (いずれもフォワード・プライマー) とペアを組むリバーズ・プライマーには、線虫類の ITS 領域を増幅するユニバーサルなリバーズ・プライマー NC13N を使用した。これらのプライマーを用いて、虫体由来の DNA をテンプレートとして検討を行った。

```

APE1          GAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGGC (23-mer, Tm = 64.0°C)
Ap ---CATTGATGAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGTC----
As ---CATTGATGAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGTT----

ASI1          GAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGGT (23-mer, Tm = 60.5°C)
ASI2          GAGCAGTAGCTTAAGGCAGATGCT (23-mer, Tm = 58.7°C)
ASI4          GATGAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGGT (26-mer, Tm = 62.1°C)
ASI3 CATTGATGAGCAGTAGCTTAAGGCAGAGGT (30-mer, Tm = 63.3°C)

```

図 1. *A. simplex* s. str. (As) および *A. pegreffii* (Ap) の ITS 領域における塩基配列、および各配列に基づいて作製した mismatch プライマーの塩基配列。mismatch プライマー APE1 は Ap の配列に基づいて作製し、さらに 3' 末端から 2 塩基目を意図的に置換した (T から G)。As のためには、4 種類の mismatch プライマー ASI1, ASI2, ASI3, ASI4 を同様に構築し、検討に供した。

C. 研究結果

サバから得た *Anisakis* I 型虫体は、2 種類

の同胞種 (*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii*) と交雑種に分類された。さらに交

雑種は、ミトコンドリア DNA・*cox1* 遺伝子の配列に基づき、*A. simplex* タイプと *A. pegreffii* タイプに分類された。これら各虫体の DNA 試料を、以下の検討の材料とした。

まず、従来作製のミスマッチ・プライマーである APE1 を用いて、PCR を行った (アニール温度: 68°C)。その結果、予想通りに *A. pegreffii* の DNA から約 400bp の産物が増幅された (図 2)。交雑種の DNA から、そのタイプに係わらず、約 400bp の産物が増幅された。これに対して、*A. simplex s. str.* の DNA からは、増幅は全く認められなかった。

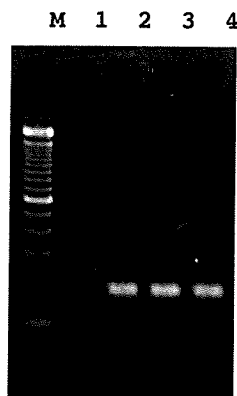


図 2. *A. pegreffii* の配列に基づいて作製したミスマッチ・プライマー APE1 の性状解析. *A. simplex s. str.* (AS, レーン 1), *A. pegreffii* (Ap, レーン 2), 交雑種 (As タイプ, レーン 3) および交雑種 (Ap タイプ, レーン 4) から DNA を調整した。ミスマッチ・プライマー (APE1) をユニバーサルなリバースプライマー (NC13NR) と組み合わせて PCR 増幅を試みた。レーン M は DNA マーカー (100bp ラダー)。

A. simplex s. str. の配列に基づくミスマッチ・プライマーは、今回、4 種類を作製した (図 1; ASI1, ASI2, ASI3, ASI4)。APE1 を用いた PCR と同様の条件 (アニール温度: 68°C) で、これら 4 種類のプライマーの反応性を検討した。その結果、ASI4 を用いた PCR の場合に、*A. simplex s. str.* の DNA から約 400bp の産物が確実に増幅され、また *A. pegreffii* の DNA からは増幅が全く認められなかった (図 3)。

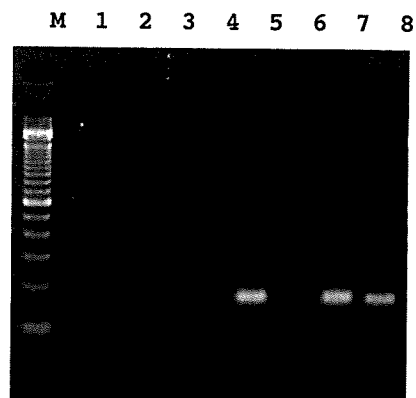


図 3. *A. simplex s. str.* の配列に基づいて作製した 4 種類のミスマッチ・プライマーの性状解析. *A. simplex s. str.* (レーン 1, 3, 5 および 7) および *A. pegreffii* (レーン 2, 4, 6 および 8) から DNA を調整した。ミスマッチ・プライマー 4 種 (ASI1, レーン 1 および 2; ASI2, レーン 3 および 4; ASI4, レーン 5 および 6; ASI3, レーン 7 および 8) のいずれかとユニバーサルなリバースプライマー (NC13NR) とを組み合わせて PCR 増幅を試みた。

そこで ASI4 を選び、交雑種の DNA も用いて PCR を行った。その結果、交雑種からはタイプによらず、約 400bp の産物が増幅された (図 4)。

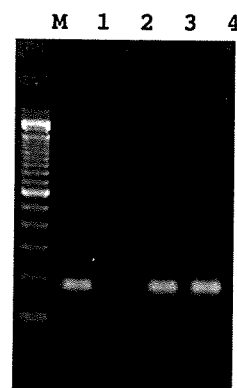


図 4. ミスマッチ・プライマー ASI4 の性状解析. *A. simplex s. str.* (AS, レーン 1), *A. pegreffii* (Ap, レーン 2), 交雑種 (As タイプ, レーン 3) および交雑種 (Ap タイプ, レーン 4) から DNA を調整した。ミスマッチ・プライマー (ASI4) をユニバーサルなリバースプライマー (NC13NR) と組み合わせて PCR 増幅を試みた。

D. 考察

同胞種の塩基配列に基づいたミスマッチ・プライマー (APE1 あるいは ASI3) を個別に使用する PCR で, *A. simplex* の同胞種である *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* とが, 正確に鑑別された。さらに交雑種からは, いずれのミスマッチ・プライマーを用いた場合でも, そのタイプに係わらず予想サイズの産物が増幅された。*A. simplex* の同胞種や交雑種の同定・鑑別には, 塩基配列の解読ではなく, より簡便な PCR-RFLP 法が, 好んで用いられている。しかしながら PCR-RFLP では, 電気泳動でのバンドパターン判読の前に, 制限酵素による PCR 産物の切断が必要であった。今回開発した PCR 法では, 1 回の PCR 反応 (とそれに続く電気泳動) だけで, *A. simplex* の同胞種, さらに交雑種が鑑別された。迅速同定法として, 極めて有用であると考えられた。

E. 結論

A. simplex の 2 種類の同胞種に各々特異的なミスマッチ・プライマーを用いることで, 同胞種の鑑別だけでなく, 交雑種であるとの判定も 1 回の PCR で鑑別できることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 梅原 梓里, 荒木 潤, 川上 泰, 内田明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析: 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. 獣医寄生虫学会誌, 8:52, 2009.

2. 学会発表

1. 梅原 梓里, 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 荒木 潤, 川上 泰, 黄 鴻堅, 内田明彦. 台湾でタチウオから検出されたアニサキス幼虫の

分子同定. 第 78 回日本寄生虫学会大会, 東京, 2009 年 3 月.

2. 梅原 梓里, 荒木 潤, 川上 泰 3 内田明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析: 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. 第 147 回日本獣医学会学術集会, 宇都宮, 2009 年 4 月.

2. 肺吸虫症の迅速診断キット開発に向けての検討

2-1. 既存診断キットの改良と評価

A. 研究目的

肺吸虫症は, アジア・アフリカ・中南米の諸国で動物由来寄生蠕虫症 (人獣共通寄生蠕虫症) として重視され, 対策が必要とされてきた。その原因としては, これらの地域から既に 10 種類に及ぶ虫種が報告されている。我が国では, ウェステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫の 2 種が人体寄生種として重要な役割を担っている。これらの肺吸虫症の診断には, 従来から免疫血清学的手法が適用されてきた。特に我が国では, 国立感染症研究所 (以下, 感染研) が国立予防衛生研究所時代から製造と供給を続けた診断用皮内反応抗原が診断用抗原として知られ, 国内外における肺吸虫症の疫学調査や臨床の現場における迅速な個別診断に大きく貢献してきた。しかしながら, この皮内反応抗原は, 1996 年に法律上の事由から供給が停止された。その結果, 本症の診断は, 感染研を含む一部の研究所や大学の研究室, さらに最近では民間の検査機関に委ねられることになった。これらの機関では, 体外診断法として血清学的検査 (主に micro-ELISA, あるいは dot-ELISA) を実施し, 感染の有無を判定している。しかしながら血清の送付や判定結果の回答待ちに手間や時間を要することから, 臨床の現場では, 迅速で簡便な診断キットの開発を待ち望むとの声が