

を用いて試験したが、時間がかかることやプレートリーダーが必要であるなどから、簡易診断法の開発が不可欠であった。今回合成抗原を用いて SWAP や SEA と同等以上に特異抗体検出が ICT で可能になり、15分程度の時間で判定が出来るようになった。今後はこの ICT kit を大量に作製し、フィールド調査および臨床検査でその有用性を評価する必要がある。また循環抗原を検出する kit も間もなく作出できる予定であることから、併せて病態と循環抗原および特異抗体の動態との関連から、本合成抗原および検査キットの有用性を評価出来るであろう。また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、rSJ226 および合成抗原を用いて、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が作出できた。簡易迅速な診断キット

を用いて、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ができることから、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, 2011

Asahi, H., Yamashita, T. B-cell epitopes on the 22.6 kDa tegumental membrane-associated antigen of *Schistosoma japonicum* and application to immunodiagnosis. (tentative authors and title), in preparation, 2011.

Kwansa-Bentum, B., Irene Ayi, I., Suzuki, T., Otchere, J., Kumagai, T., Anyan, W.K., Asahi, H., Akao, N., Wilson, M.D., Boakye, D.A., and Ohta, N. Complianace to artesunate-amodiaquine regimen: perspectives and practices of health professionals after five years of implementing-based combination

therapy in Ghana. Trop. Med. Internat. Health. submitted, 2011.

Asahi, H., Izumiyama, S, Tolba, M.E., Kwansa-Bentum, B, *Plasmodium falciparum*: Differing effects of nonesterified fatty acids and phospholipids on intraerythrocytic growth in serum-free medium. Exp. Parasitol.127, 708-713, 2011

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

Asahi, H., Izumiyama, S., Tolba, M.E., Kwansa-Bentum, B. : Differing effects of non-esterified fatty acids and phospholipids on intraerythrocytic growth of

Plasmodium falciparum in serum-free medium. 第80回日本寄生虫学会大会 東京、2011年3月

Asahi, H., Genome-wide gene expression of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in different developmental stages of the parasite. ICOPA XII, in Melborun, Australia, August 2010.

Abe, M., Kimura, S., Fukutomi, H., Asahi, H., Yagita, K., Shirakura, T., Zhao, Seki, T., Nakamura, M., Shiokawa, A., and Tanaka, K. High rate existence of pathogenic protozoa latent infection in long term hospitalized patients, a pilot study at autopsy. ICOPA XII, in Melborun, Australia, August 2010.

朝日博子: 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)の赤血球内分化増殖に伴う発現遺伝子の解析, 第79回寄生虫学会大会、旭川、2010年5月

Kwansa-Bentum, B., 朝日博子、熊谷貴、北村 圭、Anyan,W.K., 太田伸生: Expression level of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant transporter gene after exposing

parasite to chloroquine in vitro. 第7
9回寄生虫学会大会、旭川、2010年
5月

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合成抗原(仮
題):出願者 未定
- 2.実用新案登録:なし
- 3.その他:なし

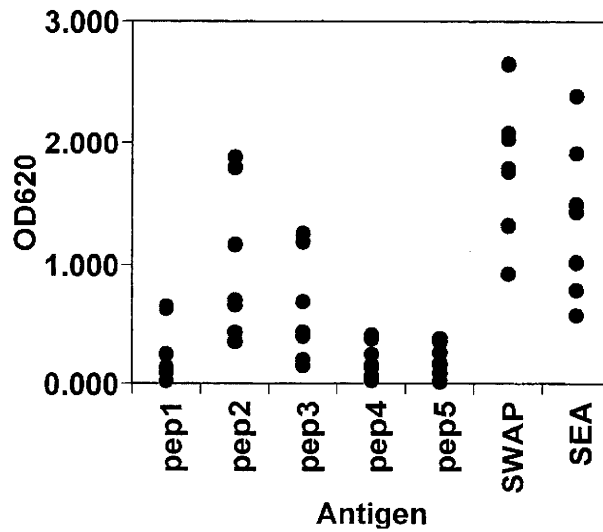


Fig.1. DETECTION OF SPECIFIC IgG IN SJ PATIENT'S SERA USING SYNTHESIZED ANTIGENS, pep1~pep5.

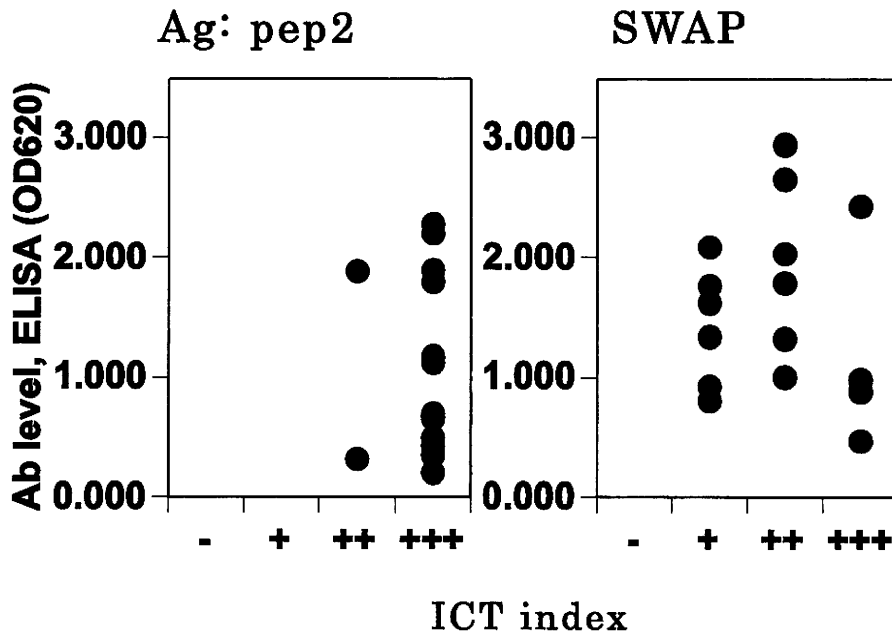


Fig.2. INDEX OF SERA FROM PATIENTS OF VARIED ANTIBODY LEVELS.

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
研究協力者	丸山治彦・吉田彩子	宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野
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	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	Guita R. Elefant	サンパウロ熱帯医学研究所
研究協力者	中村 健	北里大学医学部予防医学系
研究協力者	小林行治・小林 薫	アドテック株式会社研究開発部

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）、ならびにマンソン弧虫症の迅速イムノクロマト血清検査キット開発に関する研究、ならびに寄生虫症の遺伝子鑑別診断法の確立に関する研究を行った。トキソカラ症については健常者血清、トキソカラ症患者血清、ならびに国内の臨床検体を用いて評価を実施した。マンソン弧虫症については、マンソン弧虫由来の3種類の抗原についてイムノクロマト血清検査キットに用いる抗原の適正を比較検討し、特異性が認められた2種類の抗原を用いて検査キットの試作と評価を行った。寄生虫症の遺伝子診断鑑別法の確立については、虫体や病理組織標本中に検出される寄生虫を含めた臨床検体を研究材料として遺伝子増幅と塩基配列解析による鑑別法を確立した。

（1）トキソカラ症迅速イムノクロマト血清検査キットの開発

A. 研究目的

トキソカラ症はトキソカラ属（*Toxocara*）のイヌ回虫やネコ回虫の幼虫がヒトに寄生することによって惹起される重要な幼虫移行症の一つで、世界中で患者発生が見られる。トキソカラ症の診断は、イヌ回虫やネコ回虫に対する特異的 IgG 抗体を検出する血清検査が有効

であることから、遺伝子組換え抗原（以下、レコンビナント抗原）を開発した。

この抗原は種特異性が高く、安定した品質と供給が可能である利点を有することから、これを用いた簡易で、かつ迅速なイムノクロマト血清検査キット（以下、ICT キット）を開発することが目的である。

前年度に試作した ICT キットは、抗体価の低い眼部トキソカラ症の検出が困難であり、改善の必要性があった。そこで、

今年度は、検出感度を向上させた改良型 ICT キットを作成して、健常者血清、トキソカラ症患者血清で再評価を行うと同時に、国内でトキソカラ症、あるいはブタ回虫による幼虫移行症と診断された臨床例についても検出感度と種特異性を検討した。

B. 研究方法

陰性対照として日本人健常者血清（50 検体）、陽性対照としてブラジル人のトキソカラ症患者血清（50 検体）を用いて、改良型 ICT キットの再評価を実施した。さらに、宮崎大学医学部において、トキソカラ症、あるいはブタ回虫による幼虫移行症と診断された血清（38 検体）についてもレコンビナント抗原を用いた ELISA と改良型 ICT キットにおける反応性を比較検討した。

C. 研究成果

1) 改良型 ICT キットを用いて健常者血清の反応性を検討したところ、旧 ICT キットでは 50 検体中、非特異的反応は 1 例も検出されなかったが、改良型 ICT キットでは検出感度を上げたことによって、健常者血清 6 例で非特異的反応が認められた。これら 6 例は ELISA による吸光度が陰性・陽性判定のボーダーライン上にある血清であった。

2) ブラジル人トキソカラ症患者血清との反応では、旧 ICT キットでは陽性率が 26% (50 検体中 14 検体) であったが、改良型 ICT キットでは陽性率が 74% に上昇した。さらに、抗体価が低い眼部トキソカラ症血清 11 例中 7 例も検出可能とな

った。

3) 国内でトキソカラ症、あるいはブタ回虫幼虫移行症と診断された検体との反応に関しては、改良型 ICT を用いた場合、38 検体中 32 例 (84%) で陽性反応が示された。しかしながら、レコンビナント抗原を用いた ELISA で陽性と判定されたにもかかわらず、改良型 ICT キットでは陰性と判定された検体が 4 例検出された。

D. 考察

今回、ICT キットの検出感度を上げることによって、健常者血清の数例で非特異的反応が検出された。この原因として、レコンビナント抗原はイヌ回虫由来抗原 (TePG) と発現ベクター由来タンパク (TRX) との融合タンパクであるために、TRX に対する反応性ではないかと考えられた。今後、TRX のみを用いた ICT キットでの再検討が必要と考えられた。

一方、トキソカラ症患者血清については、検出感度の向上に伴い、従来、検出困難だった眼部トキソカラ症も検出可能となった。しかし、前述の健常者血清で検出された非特異的反応との関連性も含めて今後再検討する必要がある。

国内のトキソカラ症やブタ回虫幼虫移行症患者血清と反応性では、改良型 ICT キットによる陽性率は概ね 70% であったが、ELISA で陽性と判定されたにもかかわらず、改良型 ICT キットで陰性と判断された検体が 4 例あり、この矛盾については今後の検討課題と考えられた。

E. 結論

改良型 ICT キットの検出感度について

はさらなる改善と評価が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nkouawa A., Sako Y., Itoh S., Kouojip-Mabou A., Nganou C.N., Knapp J., Yamasaki H., Nakao M., Moyou-Somo R., Ito A. Serological studies of neurologic helminthic diseases in Southern Cameroon: toxocariasis, paragonimiasis, cysticercosis. PLoS Neglected Tropical Diseases 4:e723, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

(2) マンソン孤虫症迅速イムノクロマト血清検査キットの開発

A. 研究目的

マンソン孤虫症はマンソン裂頭条虫の幼虫 (= 弧虫) がヒトに寄生することによって惹起される幼虫移行症の代表的なもので、ヘビ、カエル、あるいは地鶏を生食する習慣を持つ地域で発生が見られる。わが国では、最近の 10 年間に約 80 例近い症例が報告されている。マンソン孤虫症では、幼虫が皮下に寄生すると、移動性線状性爬行疹が見られるが、幼虫が脳内や内臓深部にも移行することがある。マンソン孤虫症の診断は、マンソン

弧虫に対する特異的 IgG 抗体検出が有効であり、その検査にはマンソン孤虫の PBS 抽出抗原を用いた酵素抗体法 (ELISA) が汎用されている。そこで、本研究では、前項のトキシカラ症 ICT キット開発の実績から、マンソン弧虫症についても ICT キットを開発し、検査の標準化を行うことを目的とした。

B. 研究方法

マンソン弧虫より生化学的手法によって精製されたパラミオシン (以下、PM) とシステインプロテアーゼ (以下、CP) について、抗原としての有用性を検討するために、マンソン弧虫症との鑑別診断が必要となる顎口虫症について、PM、CP 両抗原に対する反応性を ELISA で比較検討した。さらに、ELISA で種特異性が高いと判断された抗原について ICT キットを試作し、特異性を検討した。

一方、マンソン孤虫症血清診断抗原として汎用されてきた PBS 抽出抗原についても ICT キット作成を試みるとともに、抗原性を有する分子の同定を試みた。

C. 研究成果

PM と CP の 2 種類の抗原候補はいずれも homologous なマンソン孤虫症患者血清 (14 検体) すべてと陽性反応を示したが、heterologous な顎口虫症患者血清 (8 検体) とは、PM 抗原で 8 例中 6 例、CP 抗原で 8 例中 2 例で交差反応が検出された。この結果から、PM 抗原は ICT キットの抗原候補から除外した。また、PBS 抽出抗原については、従来から種特異性が高いことが判明していたために、PBS 抽出抗原と

CPの2種類を用いたICTキットを試作し、評価を行った。その結果、PBS、CP両抗原とも Manson 孤虫症患者血清すべてと陽性反応を示し、さらに、陰性対照としての健常者血清とは全く非特異的反応は認められなかった。さらに、PBS抽出抗原に含まれる抗原性を有する分子については、現在、二次元電気泳動による解析を実施中である。

D. 考察

Manson 孤虫症の血清診断抗原として、PBS、CP両抗原はいずれも同程度の感度と特異性を示したが、PMは顎口虫症患者と非特異的反応が認められた。これは Manson 孤虫と顎口虫のパラミオシン分子の高い相同性によると考えられた。

一方、PBS、CP両抗原は Manson 孤虫と顎口虫との間では抗原分子に違いがあることが推測された。また、PBS抗原は多成分から構成されており、二次元電気泳動と患者血清を用いたウェスタンブロットによって抗原分子を特定し、さらに質量分析によって抗原分子を同定する必要性が考えられた。

E. 結論

Manson 孤虫症のICTキット作成に当たって、抗原候補としてPBS抗原、ならびにCP抗原が感度、特異性とも優れていることが証明された。

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

(3) 寄生蠕虫症の遺伝子診断法の確立

A. 研究目的

寄生蠕虫症における原因種の鑑別や同定は、確定診断の根拠を与え、適切な治療を行うためにきわめて重要である。しかしながら、形態学的に類似した寄生虫では正確な鑑別を行うには高度な専門知識が要求される。また、虫体組織が変性、あるいは石灰化することもあり、このような場合には寄生虫の形態的特徴が失われ、形態学的鑑別はきわめて困難となる。そこで、遺伝子増幅法 (PCR) に基づいて、より正確に寄生虫種を同定・鑑別する方法を網羅的に確立することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

遺伝子診断の標的遺伝子はミトコンドリアゲノムにコードされる cytochrome c oxidase subunit 1 遺伝子 (以下、cox1 遺伝子) として、cox1 遺伝子の種間差や種内変異 (地理的変異、遺伝子多型を含む) など、塩基配列に関する基礎的な情報収集を行った。すなわち、国立感染症研究所寄生動物部に依頼検査目的で送付されてくる臨床検体 (虫体や病理組織標本) を用いて cox1 遺伝子の塩基配列解析を行った。また、ホルマリン固定病理組織標本中に検出される寄生虫の鑑別法に

については、プライマー領域の設定など PCR 条件を詳細に検討した。

C. 研究成果

国内外の医療機関から提供された多くの臨床検体、具体的には日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、アジア条虫、無鉤条虫、有鉤条虫、フィラリアの一種 (*Dirofilaria repens*)、肝毛細虫、マンソン弧虫、有棘顎口虫、有鉤囊虫について、cox1 遺伝子の塩基配列情報や個々の寄生虫の鑑別法の条件などを検討した。

その結果、日本海裂頭条虫は検査した個体ごとに遺伝子配列が異なるほど遺伝子多型に富むことが判明し、近縁の広節裂頭条虫と鑑別可能な種特異的プライマーを設計することができた。

ホルマリン固定病理組織標本については、ホルマリン固定によって DNA が分解されていても、種鑑別に必要な DNA 断片が効率よく増幅されることが証明され、多岐にわたる寄生虫の鑑別診断法の基礎となった。

D. 考察

昨今の食習慣の多様化、国際的人的移動など生活環境の変化に伴い、検出される寄生虫疾患も多様化している。この遺伝子解析に基づいた寄生虫鑑別法の確立は、駆虫虫体をはじめ病理組織標本中に検出される寄生虫など広く応用することが可能な重要な検査法と考えられた。

E. 結論

ミトコンドリア DNA を標的にした PCR と塩基配列解析によって、広範囲にわた

る寄生虫の分子同定が可能になった。

F. 健康危険情報

アジア条虫症に関する研究成果の一部は、感染予防策対策を周知徹底させる目的から、国立感染症研究所感染症情報センターから発行される病原微生物検出情報 (2011 年 4 月号) に掲載予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dang T. C., Nguyen T. H., Do T. D., Uga S., Morishima Y., Sugiyama H., Yamasaki H. A human case of subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens* in Vietnam: histologic and molecular confirmation. *Parasitology Research*, 107:1003-1007, 2010.
- 2) 小出照子、山崎 浩、渡辺伸元、木許 泉、河邊太加志. 日本海裂頭条虫症の兄妹例. *日本小児科学会誌* 114: 1065-1068, 2010.
- 3) 山崎 浩. 免疫血清検査と遺伝子検査で確認できる寄生虫と依頼方法. *Medical Practice* 27: 1527-1531, 2010.
- 4) 青笹直彦、常深祐一郎、大藤由佳、甲斐浩道、森村壮志、柿沼 誉、玉置邦彦、佐藤伸一、前田卓哉、山崎 浩. 有棘顎口虫による幼虫移行症の 1 例. *皮膚科の臨床*. 2011 (印刷中).
- 5) 山崎 浩、杉山 広、森嶋康之、大前比呂思、椎木創一、奥山久仁男、国島文史. Racemose 型有鉤囊虫による脳有鉤囊虫症の 1 例. *Clinical Parasitology* 21: 29-32, 2011.

- 6) 西尾福真理子、吉川正英、王寺幸輝、石坂重昭、笠原 敬、三笠桂一、福井 博、久保里美、平 康二、山崎 浩。2009 年に経験した日本海裂頭条虫症の 5 例。Clinical Parasitology 21: 26-28, 2011.
- 7) 荒木 潤、安部正史、白倉哲郎、田中和生、下間 祐、井廻道夫、森本栄治、中村揚介、山崎 浩。自然排虫された幼若裂頭条虫の鑑別例。Clinical Parasitology 21: 37-39, 2011.
- 8) 安倍正史、木村 聡、白倉哲郎、荒木 潤、山崎 浩、光谷俊幸、太田秀一、諸星利男、九島巳樹、田中和生。病理解剖遺体調査で遭遇した寄生虫学的に興味ある 2 症例について。Clinical Parasitology 21: 50-54, 2011.
2. 学会発表
- 1) 山崎 浩、川中正憲、荒川京子、斉藤典子、加藤基恵、Ruben Mercado。南米チリのギンザケに寄生する裂頭条虫属プレロセルコイド。第 79 回日本寄生虫学会大会、2010 年 5 月 20-21 日、北海道旭川市。
- 2) 石井 明、田中篤太郎、川路博史、大橋寿彦、道伝 整、山崎 浩。病理組織標本のミトコンドリア DNA 検査により確定されたアジア型有鉤囊虫症について。第 79 回日本寄生虫学会大会、2010 年 5 月 20-21 日、北海道旭川市。
- 3) 西尾福真理子、吉川正英、王寺幸輝、石坂重昭、笠原 敬、三笠桂一、福井 博、久保里美、平 康二、山崎 浩。2009 年に経験した日本海裂頭条虫症の 5 例。第 21 回日本臨床寄生虫学会 2010 年 6 月 19 日、栃木県下野市。
- 4) 山崎 浩、杉山 広、森嶋康之、大前比呂思、椎木創一、奥山久仁男、国島文史。Racemose 型有鉤囊虫による脳有鉤囊虫症の 1 例。第 21 回日本臨床寄生虫学会、2010 年 6 月 19 日、栃木県下野市。
- 5) 荒木 潤、安部正史、白倉哲郎、田中和生、下間 祐、井廻道夫、森本栄治、中村揚介、山崎 浩。自然排虫された幼若裂頭条虫の鑑別例。第 21 回日本臨床寄生虫学会、2010 年 6 月 19 日、栃木県下野市。
- 6) 安倍正史、木村 聡、白倉哲郎、荒木 潤、山崎 浩、光谷俊幸、太田秀一、諸星利男、九島巳樹、田中和生。病理解剖遺体調査で遭遇した寄生虫学的に興味ある 2 症例について。第 21 回日本臨床寄生虫学会、2010 年 6 月 19 日、栃木県下野市。
- 7) Yamasaki H., Kawanaka M, Arakawa K, Kato M., Muñoz V., Sagua Hernan., Castillo D., Mercado R. The origin of *Diphyllobothrium latum* from Chile based on mitochondrial DNA analysis. 第 12 回国際寄生虫学会議、2010 年 8 月 15-20 日、メルボルン、オーストラリア。
- 8) 山崎 浩。寄生虫感染症の遺伝子診断における最近の進歩。静岡県寄生虫症研究会第 15 回研究総会、2010 年 9 月 11 日、静岡県浜松市。
- 9) Mercado R., Yamasaki H., Maulen N., Fredes F., Ramirez C., Gómez H., Cerva J.L., Gil L. C., Castillo D. Diferenciación molecular y morfológica de huevos de

Diphyllobothrium de casos humanos y animales de Chile.

第13回チリ寄生虫学会国際シンポジウム、2010年11月18-19日、サンチアゴ、チリ。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成 22 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
同	梅原梓里	麻布大学生命・環境科学部
同	小林行治	アドテック株式会社研究開発部
同	小林 薫	アドテック株式会社研究開発部
同	T.S. シン	シッキムマニパール医科大学微生物学部

研究要旨：「生もの嗜好」という日本人が持つ伝統的な食文化と密接に関連して、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・その内臓を加熱せずに生で賞味する人が増加しているが、この新たな食習慣も加わり、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択して、診断法の開発に関する検討に継続して取り組んだ。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、保存状態が悪い臨床検体にも応用できる様なプライマーを設計・作製した。また肺吸虫については、迅速で簡便な診断キットを作製し、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、新たに構築したプライマーを PCR に用いれば、*Anisakis* I 型・II 型に属する少なくとも 4 種類のアニサキス虫体から確実に増幅産物が得られ、それを利用して分子同定ができることを明らかにした。また、ホルマリン固定が長期に及ぶ臨床検体に応用して、アニサキス虫体が共に *Anisakis simplex* sensu stricto であることも明らかにした。肺吸虫に関しては、免疫クロマトグラフィー法に基づく迅速診断キットを、ヒロクチ肺吸虫の ES 抗原を用いて作製し、本キットがインドなどの海外における肺吸虫症の血清診断に有用との可能性を示した。またヒロクチ肺吸虫による脳肺吸虫症のインドにおける第一例を見出して報告した。

1. アニサキス症原因虫種の分子鑑別に有用なプライマーの設計

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の発生がある。本

症の主要な病原虫は *Anisakis simplex* とされてきた。この *Anisakis simplex* 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*, 以下 As), *A. pegreffii* (以下 Ap), *A. simplex*

Cの3種類の同胞種に細分類することが、最近では国際的な基準となっている。この新しい分類基準に従い、本邦の患者に由来する虫体が分子同定された。その結果、人体症例の原因虫は、大半がAsであり、Apはごく一部の症例から検出されるに過ぎないことが明らかとなった。なお*A. simplex* Cによる人体症例は、未だに報告がないと思われた。

AsとApとの形態鑑別は、幼虫期だけでなく、成虫期においても困難とされる。従って両者の鑑別は、最近では例えば、リボソームDNAの介在配列領域（以下、ITS領域）に塩基配列の違いを検出することで、実施されている。鑑別の目的でITS領域をPCR増幅する場合には、線虫類に広く応用可能とされるユニバーサルなプライマーペア（例えばNC5およびNC2）が、第一選択的に利用されてきた。しかしながら、このユニバーサルなプライマーは、例えば500bp以上の産物の増幅を前提に設計され、従って長期のホルマリン固定など、保存状態が悪い虫体を出発材料とした場合は、PCR産物が増幅されないという欠点もあった。この欠点を補う為に、短い配列領域を増幅する新たなプライマーペアを設計し、その評価を行なった。

今回は検討に当たり、AsおよびApに加えて、*A. typica*（以下At）および*A. physeteris*（以下Ah）から、DNAを調整した。Atは、AsおよびApと近縁で、幼虫期にはこの2種との形態鑑別が困難な種類である。この為、As、ApおよびAtは、*Anisakis* I型と総称される。一方、Ahは*Anisakis* II型のメンバーとされ、幼虫期でも形態学的特徴から、*Anisakis* I型の各虫体と鑑別が可能とされる。このAhは、少数の事例に留まるが、人体症例からの検出報告があり、我が国では医学的・公衆衛生学的にも重要な種類とみなされている。

B. 研究方法

新潟産マサバ、福岡産マサバ、台湾産タチウオおよび静岡産キンメダイからアニサキス虫体

を検出して、70%エタノールで固定した。これを出発材料にDNAを調整し、このDNAをテンプレートに、ユニバーサルなプライマーペア（NC5およびNC2）でPCR増幅した。得られた各PCR産物の塩基配列を解読し、それぞれの虫体がAs、Ap、At、Ahであることを確認（分子同定）した。その上で各配列を相互に比較し、4種類のアニサキスに共通する配列領域を選んで、フォワードプライマーAniTIF1

（GTTGAACAACGGTGACCAATTTGGC）およびリバースプライマーAniTIR1

（GTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTC）を設計した。この新たなプライマーペアが、上記4種類の各虫体DNAから、予想サイズ・予想配列の産物を増幅するのか、PCR増幅を試み、産物の塩基配列を解読して確認した。

更に、臨床検体に認めたアニサキス虫体を材料に、新たに作製したプライマーペアでPCRを試み、その能力を評価した。この検討には、以下の検体から常法によりDNAを調整し、これをテンプレートとして用いた。

- 1) 絞扼性イレウス患者の切除回腸・病理組織標本（ホルマリン固定・パラフィン包埋）に認めたアニサキス虫体の断端。
- 2) アニサキス食中毒患者の胃から摘出されたホルマリン固定のアニサキス虫体（高橋ら、2010）。

C. 研究結果

1) 魚由来虫体を用いた検討

魚由来の4種類の虫体（As、Ap、At、Ah）からDNAを調整した。これをテンプレートとし、新たに設計したプライマーペア（AniTIF1およびAniTIR1）を用いて、PCR増幅を試みた。その結果、何れのテンプレートからも、予想サイズ・予想配列のPCR産物が得られた（表1）。

2) 臨床材料由来の虫体を用いた検討

各臨床材料から虫体DNAを調整し、これをテンプレートとして、新たに設計したプライマー

ペアを用い、PCR 増幅を試みた。しかしながら産物を得ることはできなかった。そこで、ユニバーサルなプライマーペア (NC5 および NC2) を用い、ITS 領域の PCR 増幅を試みた。更に、この PCR 産物をテンプレートとし、新たに設計したプライマーペアを用いて、PCR 増幅を試みた (nested-PCR)。その結果、何れの産物からも PCR 産物が得られた。この PCR 産物を用いて配列解読を試みたところ、原因種は何れも As である事が分かった。

表 1. 新たに設計したプライマーペアで得られた増幅産物のサイズ

種	増幅産物 (bp)	
	Pr (+) ¹⁾	Pr (-)
As ²⁾	259	208
Ap	259	208
At	214	163
Ah	245	194

¹⁾ Pr (+) : PCR 産物のサイズ
Pr (-) : PCR 産物のサイズ (プライマー配列を除く)

²⁾ As : *A. simplex sensu stricto* (I 型)
Ap : *A. pegreffii* (I 型)
At : *A. typica* (I 型)
Ah : *A. physeteris* (II 型)

D. 考察

アニサキス虫体のリボソーム DNA・ITS 領域を確実に増幅する為に、短い配列を標的とする新たなプライマーペアを設計し、その能力を評価した。その結果、今回新たに設計したプライマーペアを用いた (nested-) PCR で、ホルマリン固定を経た臨床材料からも、PCR 産物が得られることを明らかにした。この PCR 産物を配列解読し、今回の 2 症例は、原因が共に As であることを明らかにした。今回の検討により、臨床材料の解析に有用なプライマーが作製できた。今後は、今回検討できなかった種類のアニサキス虫

体 (*Anisakis* I 型では *A. ziphidarum*, *Anisakis* II 型では *A. brevispiculata* および *A. paggiae* など) も対象に加え、このプライマーの有用性を更に検討したいと考えている。

E. 結論

アニサキス虫体のリボソーム DNA・ITS 領域を確実に増幅する為に、新たなプライマーペアを設計した。その結果、このプライマーペアを用いた (nested-) PCR で、ホルマリン固定を経た臨床材料からも、PCR 産物が増幅され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. 高橋 岳, 三井良雄, 小泉信人, 杉山 広, 刺身を原因食品として千葉市で発生したアニサキスによる食中毒. 病原微生物検出情報, 31, 142, 2010.

2. 学会発表

1. 杉山 広. 我が国のアニサキスとアニサキス症: 主要原因虫種と患者発生数の解析. 第 151 回日本獣医学会学術集会, 府中, 2011 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし.

2. 肺吸虫症の迅速診断キット開発に向けての検討

2-1. ヒロクチ肺吸虫 ES 抗原を用いたキットの作製と評価

A. 研究目的

免疫クロマトグラフィー法に基づく抗体検出キットを作製し、このキットで本邦の肺吸虫症患者 (ウェステルマン肺吸虫・宮崎肺吸虫に感

染)が迅速・簡便・的確に診断できることは既に報告した。この迅速診断キットを海外の流行地で使用することも視野に入れ、東南アジアに分布する人体寄生種・ヒロクチ肺吸虫の抗原を用いたキットを作製した。またインドの研究者から依頼検査として、肺吸虫症を疑うインド人の血清が、喀痰と共に届いた。そこで、従来法である micro-ELISA と平行して、このキットを用いた検査を実施し、キットの診断能力(感度・特異性)を確認しながら、先方からの依頼に応えた。

B. 研究方法

1) ヒロクチ肺吸虫ES抗原の調整とこれを用いたキットの作製

キット作製に用いる抗原には、原因虫種の鑑別にも有用とされる ES 抗原を選んだ。まず抗原の調整のために、ネコ(肺吸虫の好適終宿主)にヒロクチ肺吸虫のメタセルカリアを感染させ、成虫が肺に定着したことを糞便内虫卵検査で確認した後に、感染動物を安楽殺して成虫を回収した。回収虫体を滅菌生食液で洗浄後、液体培地 RPMI1640 を満たしたシャーレの中で、37℃・数時間培養した。この培養液をタンパク濃度が至適となるように限外濾過膜で濃縮し、キットの作製に使用する ES 抗原とした。

2) 供試血清

依頼検査として以下の検体が届いた。検体にはコード番号が振られており、患者個人の特定はできなかった。

・ IN-13, -16, -21 (表 1): 呼吸器症状を呈したインド人の血清。喀痰中の虫卵の形態とそれを出発材料に解読した遺伝子配列から、原因種をヒロクチ肺吸虫と同定した (Singh *et al.*, Ind. J. Med. Microbiol., 27, 123-127, 2009)。

・ IN-71: 脳肺吸虫症患者の血清 (Singh *et al.*, Trop. Parasitol., 1, 39-41, 2011; 次項 2-2 参照)。

・ IN-6: 呼吸器症状を呈したインド人の血清。

肺吸虫卵・血中抗体は共に陰性(陰性対照: Singh *et al.*, Ind. J. Med. Microbiol., 27, 123-127, 2009)。

3) キットの評価

供試血清を用いた反応の後、キット・デバイスのニトロセルロース膜面を肉眼的に観察し、判定ラインの発色程度に応じて強陽性、陽性、弱陽性、陰性の4段階に分け、供試血清の反応を表現した。得られた成績を micro-ELISA で得た成績と比較した(表 1)。

C. 研究結果

1) micro-ELISA による抗体価の測定結果

患者血清の抗体価を micro-ELISA により測定した(抽出粗抗原を使用)。その結果、原因種とは異なる宮崎肺吸虫の抗原に対して、高い吸光度を示した。一方、原因種であるヒロクチ肺吸虫の抗原を用いた場合は、宮崎肺吸虫抗原に対する値と同程度の高い吸光度を示すか (IN-16, IN-21 および IN-71)、あるいは逆に低い吸光度(約半分)に留まった (IN-13, 表 1)。

表 2. インド人肺吸虫症患者の血清診断結果の比較

Case (IN -#)	micro-ELISA			IC kit			Egg
	PhEx	PmEx	PwEx	PhES	PmES	PwES	
13	0.735	1.344	0.628	+++	+++	++	Ph
16	1.527	1.669	ND	+++	+++	++	Ph
21	1.360	1.494	ND	+++	+++	+	Ph
71	0.756	0.773	ND	+++	++	+	Ph
06	0.194	0.153	0.157	-	-	-	Neg

1) PhEx: ヒロクチ肺吸虫抽出粗抗原; PmEx: 宮崎肺吸虫抽出粗抗原; PwEx: ウェステルマン肺吸虫抽出粗抗原; PhES: ヒロクチ肺吸虫 ES 抗原; PmES: 宮崎肺吸虫 ES 抗原; PwES: ウェステルマン肺吸虫 ES 抗原

2) +++: 強陽性; ++: 陽性; +: 弱陽性; -: 陰性

3) ND: 実施せず、4) Neg: 虫卵は検出されず

2) キットの評価

原因種であるヒロクチ肺吸虫のES抗原を用いたキットでは、何れの患者血清も強い反応を示した(発色程度が強かった)。一方、異種である宮崎肺吸虫のES抗原を用いたキットでは、同種抗原のキットの場合と同等か、それより弱い反応に留まった。更に、ウェステルマン肺吸虫のES抗原を用いたキットでは、何れの患者血清も、反応の程度が最も弱くなった。しかしながら、患者血清で結果が陰性となった検体は、1例も認めなかった。なおIN-6は、何れの抗原に対しても陰性となった(micro-ELISAでも陰性)。

D. 考察

本研究の結果、ヒロクチ肺吸虫のES抗原を用いた免疫クロマトグラフィー法に基づくキットで、ヒロクチ肺吸虫症の患者を的確に診断できることが分かった。また特異性に関しては、キットの方がmicro-ELISAよりも高い場合があった。しかしながら、本キットを用いて原因種を確定するには、抗原の精製、反応系の改良など、更に検討を進める必要があると考えられた。その一方で、原因種とは異なるウェステルマン肺吸虫の抗原を用いたキットでも、反応の程度は低いものの、ヒロクチ肺吸虫症の患者を検出できた。原因種が明らかでない地域で血清診断を行なう時には、抗原の交差性が反映されるという本キットの特徴が、逆に利点になると考えられた。原因種が不明な海外の肺吸虫流行地などで、本キットを用いて患者の診断が可能か、今後、検討を試みたいと考えている。

インドでも、東北部のマニプール州とナガランド州には、肺吸虫症の患者が多数居住すると考えられる。この地域に住む住民、特に少数民族は、カニの生食を好み、またカニを潰した時に出る絞り汁を解熱の目的に飲用すると聞く

(民間療法)。患者は主としてこの様な習慣に起因して、肺吸虫に感染していると思われるが、呼吸器症状の類似性から、しばしば薬剤耐性の肺結核と誤診されている。迅速で簡便な本キッ

トは、この様な患者の診断・類症鑑別に、特に有用と思われた。

インドの肺吸虫症の原因であるヒロクチ肺吸虫は、中国南部から東南アジアを経て、インド北東部に分布する。このようにヒロクチ肺吸虫の分布域は広く、患者数も多いと予想された。従って本キットの潜在的な必要性は高いと考えられる。本キットの本格的な製造と現地への有効な配布方法について、今後検討を進める必要があると考えている。

E. 結論

ヒロクチ肺吸虫のES抗原を用いて作製した免疫クロマトグラフィー法に基づくキットで、ヒロクチ肺吸虫症患者を的確に診断できることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表および学会発表共になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。

2-2. 血清パネルの構築時に見出した脳肺吸虫症のインドにおける第一例

A. 研究目的

肺吸虫症の迅速診断キットを開発・改良する為に、特にこの3年間、肺吸虫症患者に由来する血清の集積に努めてきた。この間にインド東北部のナガランド州において、共同研究者がインド人男児の脳肺吸虫症例を経験した。病原虫種の確定を目的に、虫卵と患者血清が送付されてきた(依頼検査)。虫卵を用いた分子同定とELISA等による抗体価測定を試みることで、依頼に応じた。

B. 研究材料・研究方法

症例は 8 歳のインド人男児、ナガランド州トゥエンサン県に在住。1 ヶ月にわたり発咳、発熱、頭痛、右肢の運動障害が続き、結核による髄膜脳炎との診断で、3 週間にわたる抗結核薬の投与を受けた。しかしながら効果がなく、そこで頭部 CT 検査が実施されたところ、水腫を周囲に伴う鶏卵大の等密度病変が、左側頭葉に見付かった。画像診断は結核腫であったが、ツベルクリン反応陰性で、喀痰中の抗酸菌も否定された。一方で、末梢血には好酸球が多く (17%)、喀痰中に肺吸虫卵が検出された。この虫卵と患者血清が依頼検査材料として送られてきた。

C. 研究結果

届いた虫卵は 3 個だけで、何れも蓋が外れており、形態同定は困難であった。そこで虫卵を出発材料に DNA を調整し、常法に従ってリボソーム DNA・ITS2 領域を PCR 増幅、当該領域の配列を解読した。その結果、得られた配列は、既報のヒロクチ肺吸虫 (インド・マニプール産) の配列と一致することが分かった。

ヒロクチ肺吸虫の成虫抽出粗抗原を用いた micro-ELISA を行ない、またヒロクチ肺吸虫の ES 抗原を用いた迅速診断キットでも抗体検出を試みた。その結果、どちらの方法でも、本虫に対する抗体価が十分に高いことが分かった (前項 2-1 参照)。以上の結果から本事例は、脳肺吸虫症と肺肺吸虫症との合併事例と診断した。原因はヒロクチ肺吸虫であった。

D. 考察

患者から得た虫卵を出発材料に遺伝子配列を解読した結果から、本事例の原因はヒロクチ肺吸虫と同定された。血清検査の結果もこれを支持した。肺吸虫症の流行地では、虫体が時に患者の神経系 (脳・脊髄) に迷入して、重篤な症状を発現させる事が知られている。最近の調査の結果、肺吸虫の高度汚染地が、インド東北部

のナガランド州およびマニプール州に存在することが明らかになった。本事例はナガランド州の症例で、インドにおける脳肺吸虫症の第 1 例と考えられた。インドにおいても、臨床諸家の肺吸虫症に対する関心を惹起すれば、今後は脳肺吸虫症を含めた肺外肺吸虫症の事例が、次々と発掘されるものと考えられた。

現在、血清を用いた迅速診断キットの開発と改良に努めている。この為には、肺吸虫症患者の血清パネルを充実させる必要がある。従って、肺吸虫症との疑いがある患者材料は、本事例と同様に依頼検査の検体として、積極的に受け入れている。このような取り組みを続けることで、原因虫種が確定された血清パネルが、より一層充実するものと期待された。

E. 結論

インドにおける脳肺吸虫症の第一例を発見した。原因はヒロクチ肺吸虫であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Singh, T.S., Khamo, V. and Sugiyama, H. Cerebral paragonimiasis mimicking tuberculoma: First case report in India. *Tropical Parasitology*, 1, 39-41, 2011.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。

腸管寄生吸虫症の遺伝子診断法の開発に関する研究

研究分担者 森嶋康之 (国立感染症研究所 寄生動物部)

研究協力者 杉山 広 (国立感染症研究所 寄生動物部)

研究協力者 山崎 浩 (国立感染症研究所 寄生動物部)

研究要旨

横川吸虫をはじめとするメタゴニムス属吸虫感染症は日本国内で最もよく認められる寄生蠕虫症である。その予防対策を立案する上で感染種の正確な種同定が重要であるが、本症が通常診断される糞便検査では、同科に属する吸虫類の虫卵が形態学的に類似することから、感染種を特定することが困難であった。今年度は、マルチプレックス PCR 法による遺伝子診断法を実際の臨床検体に対して適用し、首都圏での感染実態の把握を行った。

A. 研究目的

日本国内における各種寄生蠕虫症の発生が年々減少している中、魚介類を感染源とする異形吸虫科に属する吸虫類の感染は依然として多発している。これは、もともと日本人が持つ魚介類に対する生食嗜好の高さに加え、低温流通体系の整備によって汚染魚が広範囲に流通するようになったことが原因と考えられている。さらに、海外旅行者が現地で魚介類を生食して感染する例も多い。

そこで本研究は、通常の顕微鏡検査では種同定が困難なこれらの種を正確に鑑別する分子同定法の確立を目指し、一定の成果をおさめてきた。

今年度は顕微鏡検査において実際にメタゴニムス症と診断された臨床検体を対象として、開発したマルチプレックス PCR 法に

よる感染種の鑑別を行って本症の感染実態調査を行った。

B. 研究方法

本研究に用いた臨床検体 124 例は、いずれも一般の健康診断あるいは人間ドック受診時の検査においてメタゴニムス属吸虫卵陽性と判定された関東地方南部居住者に由来する糞便である。検出虫卵数等の具体的な情報はなかったため、受領後 0.5g を用いてホルマリンエーテル法による再検査を行い、虫卵の含有状況を確認してから以後の検討に用いた。

検体からの寄生虫 DNA の抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) を用いて行い、*cox1* 領域を標的としたマルチプレックス PCR 法による鑑別を

行った。

C. 研究結果

今回使用した「メタゴニムス虫卵陽性」124例すべてで虫卵が確認され、検出状況は平均13個（1～87個、中央値7個）であった。

全例についてマルチプレックス PCR 法による感染虫種の鑑別を実施したところ、宮田吸虫が50例（40.3%）、横川吸虫が58例（46.8%）、両種混合が16例（12.9%）と判定された。

D. 考察

異形吸虫科に属する吸虫類は、日本人から高頻度に検出される寄生蠕虫であるにもかかわらず、正確な種同定が行われてこなかった。今回開発したマルチプレックス PCR 法によって、国内分布が知られるメタゴニムス属の迅速かつ簡便な鑑別が可能となった。

集卵検査法（ホルマリンエーテル法）によって確認された検体中の虫卵含有状況ならびに前年度実施の感染実験材料を用いた検

討結果とをあわせて考えると、今回開発したマルチプレックス PCR 法はメタゴニムス属吸虫の感染診断として現在実施しうる最も感度の高い検査法といえることができる。臨床診断や疫学調査に本法を用いて正確な種同定を行い、その結果をフィードバックすることによって、本症の感染予防にも資することが期待される。

E. 結論

メタゴニムス属の遺伝子診断を目的としたマルチプレックス PCR 法を用い、首都圏における本属吸虫感染の実態調査を行った。

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

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表