

B. 研究方法

1. 組換え抗原による幼虫移行症の虫種決定

(1) 組換え抗原

組換えブタ回虫抗原 rAs16 は農業食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域の辻尚利博士から、組換えトキソカラ抗原 rT.canisAg は国立感染症研究所・寄生動物部・蠕虫室の山崎浩博士から供与いただいた。

(2) 患者血清

患者血清は、宮崎大学医学部寄生虫学分野において 2005 年以前に動物由来の回虫類による幼虫移行症と診断された患者、他の寄生虫疾患（肺吸虫症とアニサキス症）と診断された患者、およびどの寄生虫にも感染していないと判定された患者の血清を用いた。

本研究における患者血清の使用に際しては、ヘルシンキ宣言の趣旨に則り、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。本研究は、宮崎大学医学部医の倫理委員会による審査を受け、宮崎大学医学部の承認を受けている。

(3) 粗抗原および組換え抗原に対する患者血清の結合

抗体と血清の結合は通常酵素抗体法により評価し、非感染者血清の吸光度の平均+3SD をカットオフ値とした。患者が感染したのがイヌ回虫なのかブタ回虫なのかという推定は、それぞれの抗原に対する吸光度の比をとって、吸光度（イヌ回虫抗原）／吸光度（ブタ回虫抗原）が 2.0 以上であればイヌ回虫、吸光度（ブタ回虫抗原）／吸光度（イヌ回虫抗原）が 2.0 以上であればブタ回虫とした。

(4) ブタ回虫抗原特異的エピトープ

イヌ回虫感染とブタ回虫感染を抗体検査によって鑑別することが可能であるためには、検査にもちいるそれぞれの虫種由来の抗原が、種特異的なエピトープを持っていることが必要である。そこで、ブタ回虫症の診断用抗原として有望な rAs16 がブタ回虫特異的なエピトープを持っているかどうかをブタ回虫感染ブタ血清をもちいて吸収試験（阻害試験）により検討した。

ブタ回虫感染ブタ血清は、コペンハーゲン大学の Stig Milan Thamsborg 教授（Danish Centre for Experimental Parasitology, Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences）から供与いただいた。血清は、ブタに虫卵を経口投与

して 58、102 日後に採取したものをもちいた。宿主としてマウスやラット等の小動物でなくブタを採用したのは、ブタは生理学的にヒトと近いとされることが理由である。

アッセイは、あらかじめブタ血清をインヒビター抗原でインキュベートした後に、rAs16 との結合をアッセイした。抗原のコーティング濃度は 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、血清の希釈倍率は 1,000 倍とした。

2. 回虫類の非固有宿主における感染動態

(1) 感染および感染動物の飼育管理

イヌ回虫、ネコ回虫、およびブタ回虫卵はコペンハーゲン大学の Stig Milan Thamsborg 教授から供与いただき、定法により幼虫包蔵卵を形成させた。モルモット（Hartley 系、メス）およびブタ（Danish Landrace/Yorkshire/Duroc 交雑種、回虫非感染であることを確認済）には、幼虫包蔵卵を 10,000 個を経口投与した。感染動物の飼育は、Danish Centre for Experimental Parasitology の個別飼育区域でおこなった。

(2) モルモットにおけるブタ回虫感染実験

モルモットにブタ回虫幼虫包蔵卵を 5,000 個または 10,000 個を経口投与して、7、9、11、13 日後に、肺、小腸、大腸からはバールマン法で、肝臓と全身の筋肉からは消化法にて体内移行幼虫を回収した。肺または消化管からバールマン法によって回収した第三期幼虫を *in vitro* で培養し、第四期幼虫へ脱皮するか否かを検討した。

さらに、モルモットに経口投与後に消化管粘膜から体内へ侵入せずにそのまま排出される虫卵／幼虫数を調べる目的で、ブタ回虫の幼虫包蔵卵を 10,000 個を経口投与して 24 時間の便を集め、便検査により EPG/ELG を決定して通過虫卵／幼虫数を推定した。

(3) ブタにおけるイヌ回虫およびネコ回虫感染実験

イヌ回虫とネコ回虫の非固有宿主内における生態の違いを検討するため、イヌ回虫卵またはネコ回虫卵 100,000 個をブタへ経口投与した。感染 14 日後に解剖し、肉眼所見による違いを記載した後、肺、肝臓、リンパ節、中枢、心臓、眼球、舌、横隔膜、腎臓、脾臓などの臓器から消化法またはアガー法（バールマン法の一つ）により幼虫を回収した。

C. 研究結果

1. 寄生虫症患者血清の組換えブタ回虫/イヌ回虫抗原に対する反応性

最初に、回虫類による幼虫移行症診断のゴールドスタンダードともいえる、幼虫の ES (分泌排泄) 抗原の各種血清に対する反応性を検討した。もちいた血清の種類は、非感染者血清・回虫類による幼虫移行症患者血清、肺吸虫症患者血清、アニサキス症患者血清である。

結果は、幼虫移行症患者血清はブタ回虫幼虫の ES 抗原 (AsLL3-ES) あるいはイヌ回虫幼虫の ES 抗原 (Tc-ES) に、さまざまな程度に反応したが、非感染血清は結合しなかった。注目すべきは、肺吸虫症患者血清およびアニサキス症患者血清も ES 抗原に結合したことである (図 1)。とくにアニサキス症患者血清のブタ回虫幼虫の ES 抗原の結合は血清診断上無視できないレベルであった。日本人には抗アニサキス抗体陽性の潜在的既往者が多数いることが報告されており、幼虫 ES 抗原の使用の限界を示すデータと考えられる。

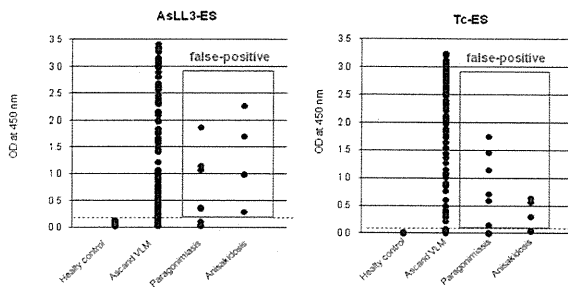


図 1 幼虫 ES 抗原と患者血清の反応性

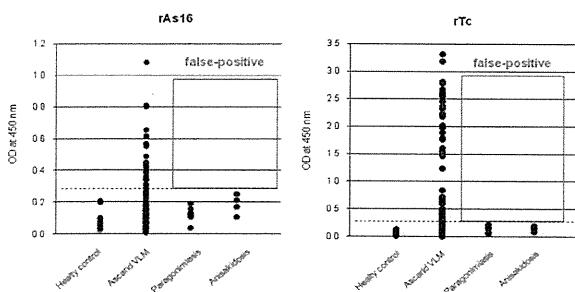


図 2 組換え抗原と患者血清の反応性

一方、同様の結合試験を組換え抗原でおこなうと、吸光度が全体として低くなり、幼虫移行症患者血清であっても陰性と判断される例が出現した。しかしながら、肺吸虫症患者血清およびアニサキス症患者血清の偽陽性反応は消失し、診断の特異性は高くなった (図 2)。したがって、少なくとも現段階では、組換え抗原は陽性症例

をすくい上げるスクリーニング検査ではなく、虫種決定のための精査にもちいられるべきだと考えられた。

2. 幼虫 ES 抗原および組換え抗原による幼虫移行症の原因虫種の推定

幼虫移行症患者血清 120 サンプルの、ブタ回虫幼虫の ES 抗原 (As-ES) とイヌ回虫幼虫の ES 抗原 (Tc-ES) への結合を比較し、それぞれの血清がどちらの幼虫による感染なのかを推定した。その結果、イヌ回虫と判断されたものが 64 例 (53.3%)、ブタ回虫と判断されたものが 9 例 (7.5%) で、どちらも判定できないものが 47 例 (39.2%) に達した (図 3)。

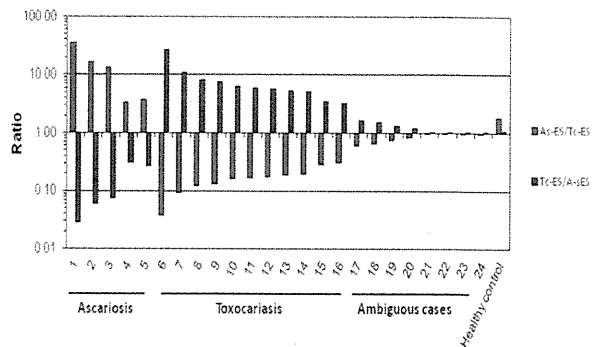


図 3 イヌ回虫およびブタ回虫幼虫 ES 抗原と患者血清の反応

そこで次にこのどちらも判定できなかった 47 サンプルについて、イヌ回虫とブタ回虫の組換え抗原に対する反応性を比較した。すると、組換えイヌ回虫抗原 (rTcAg) への反応が強く、イヌ回虫症と判断されたものが 26 例、組換えブタ回虫抗原 (rAs16) への反応が強く、ブタ回虫症と判断されたものが 1 例、どちらも判定できなかったものが 20 例であった。結果として、120 サンプルのうち、イヌ回虫症が 90 症例 (75.0%)、ブタ回虫症が 10 例 (8.3%)、虫種不明が 20 例 (16.7%) となった (図 4)。

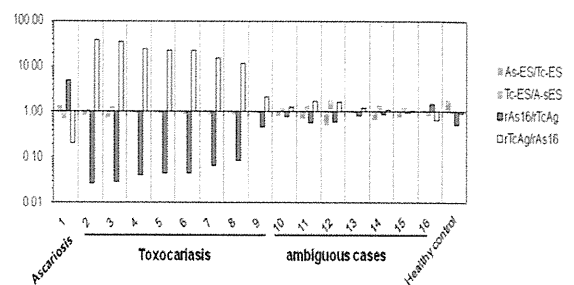


図 4 組換えイヌ回虫およびブタ回虫抗原と患者血清の反応

3. 組換えブタ回虫抗原 rAs16 特異的エピトープ

前項までで述べた結果はヒト血清をもちいたものであり、患者が実際に感染していたのが何の寄生虫なのか（イヌ回虫かブタ回虫か、あるいは全く別の寄生虫か）を厳密な意味で確定させることは不可能である。そこで、幼虫移行症全体の中からブタ回虫症を見分けることが可能か否かを、ブタ回虫感染ブタ血清をもちいて検討した。

ブタ回虫感染ブタ血清の、ブタ回虫幼虫の ES 抗原 (AsLL3-ES)、イヌ回虫幼虫の ES 抗原 (Tc-ES)、そして組換えブタ回虫抗原 rAs16 への結合をみた。AsLL3-ES に対しては全例陽性で、吸光度も Tc-ES より高値であった。Tc-ES に対しては陰性のブタもみられた。抗 rAs16 抗体は、ヒトの場合と同じように吸光度は低かったが全例陽性であった (図 5)。

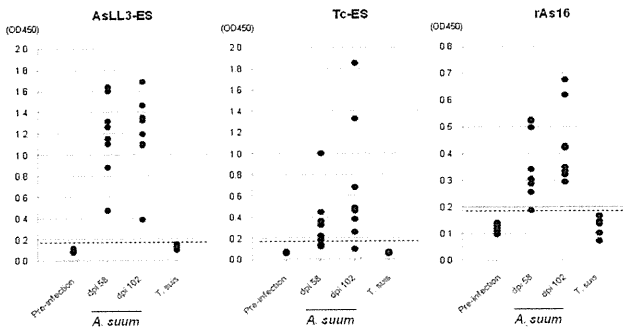


図 5 ブタ回虫感染ブタ血清と組換え抗原との反応性 (dpi は感染後の日数を示す)

この抗 rAs16 抗体がブタ回虫特異的なエピトープを認識しているか否かを確認する目的で、ブタ血清をあらかじめイヌ回虫 ES 抗原 (Tc-ES) と反応させて結合試験を実施した。その結果、ブタ回虫感染ブタが産生している抗 rAs16 抗体の rAs16 への結合は、rAs16 によって完全に阻害されたが、Tc-ES からは何の影響も受けないことがわかった (図 6)。従ってブタ回虫感染ブタが産生している抗 rAs16 抗体は、イヌ回虫抗原には存在しないエピトープを認識していることが明らかとなった。

4. モルモットにおけるブタ回虫感染

モルモットにブタ回虫の幼虫包蔵卵を 5,000 個経口投与して、7、9、11、13 日後にベールマン法によって肺と小腸から幼虫を回収した。その結果、肺からの回収数は 7 日後がピークで 30-60 隻、9 日後には 20 隻前後に過ぎなかった。小腸からはほとんど虫体は回収できなかつた。つま

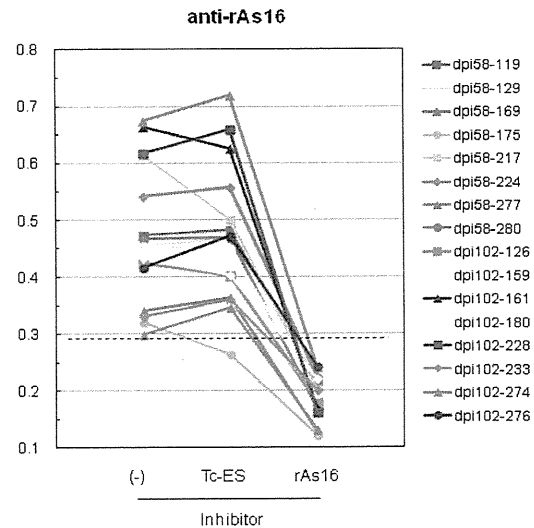
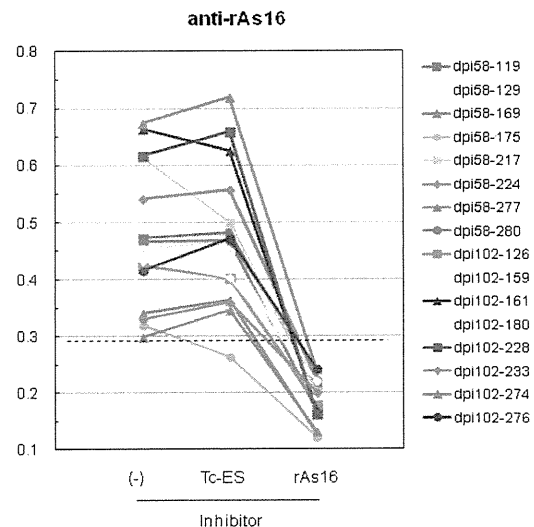


図 6 ブタ回虫感染ブタ血清と rAs16 との結合におけるトキソカラ抗原と rAs16 の阻害効果



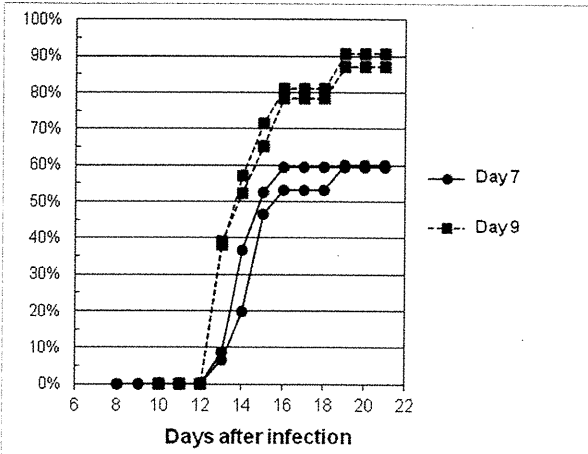
り回収率はせいぜい 1%であり、ほとんどの虫体は肺と小腸以外へ移行したと考えられた。

そこで次に、投与虫卵数を 10,000 個に増やし、肺と小腸以外に、大腸、肝臓、全身の筋肉からも虫体の回収を試みた。結果は表 2 の通りで、肝臓や全身の筋肉からも幼虫は回収されず、やはり全体としての回収率は 1-2%に過ぎなかつた。

表 2 モルモットから回収されたブタ回虫幼虫の臓器分布

臓器	Day 7 (n=3)	Day 9 (n=3)	Day10 (n=1)	Day 11 (n=3)	Day 13 (n=1)
肺	179 53 66	39 61 64	17	5 49 3	5
小腸	0 0 0	0 0 0	0	0 0 2	0
肝臓	2 1 0	0 0 0	0	0 0 0	0
大腸	0 0 0	0 0 1	1	0 3 3	12 0
全身	0 0 0	3 5 5	0	2 1 0	2

以上より、経口投与された虫卵が孵化しなかったか、あるいは孵化した幼虫が消化管粘膜から体内へ侵入せずにそのまま排出された可能性があると考え、ブタ回虫の幼虫包蔵卵を 10,000 個経口投与して 24 時間の便を集め、便検査を実施した。しかしながら、便中に見いだされた虫卵/幼虫も 100-400 に過ぎず、95%以上の幼虫は回収できないままであった。



以上のように回収数が予想よりはるかに少なかったことから、ブタ回虫の幼虫がモルモットの体内環境からきわめて有害な影響を受けている可能性が考えられた。そこで、モルモットの肺から回収された幼虫を培養し、正常に発育できる能力を保持しているのかを、脱皮を指標に検討した。

結果は図 7 に示す通りで、感染 7 日後に回収された幼虫も 9 日後に回収された虫体ともに脱皮して第四期幼虫へ発育することができた。ただし、感染 7 日後に回収した幼虫が脱皮する割合は 9 日後に回収した虫体よりも低かった。

図 7 モルモットから回収されたブタ回虫幼虫の *in vitro* における発育 (縦軸は脱皮して第四期幼虫に進んだ虫体の割合)

5. ブタにおけるイヌ回虫とネコ回虫感染

ネコ回虫とイヌ回虫はともにトキソカラ属の線虫であり、両者の感染を抗体によって区別することは不可能である。しかしながら種が違う以上、生物学的な性質の違いが病態の違いに現れたり、おもな感染経路の違いがあることは十分に考えられる。そこで、イヌ回虫とネコ回虫をブタに感染させて、体内移行幼虫の分布を比較した (表 3)。

表 3 感染 14 日後にブタから回収されたイヌ回虫またはネコ回虫幼虫の臓器分布

Digestion method		
臓器	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
肝臓	31	0
肺	122	67
リンパ節	57	54
脾・腎・心	0	0
脳	1	0
眼球	0	0
横隔膜	2	0
舌	0	3
筋肉	0	0
Agar method		
臓器	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
肝臓 (3hrs)*	10	0
肝臓 (24hrs)*	85	0
肺 (3hrs)*	11	50
肺 (24hrs)*	162	123

*インキュベート時間

その結果、イヌ回虫もネコ回虫も一定数の幼虫を回収することができたが、ネコ回虫は、回収の方法に関わらず肝臓からはまったく回収することができなかった。肺からはイヌ回虫と同程度の虫体が回収されていることから、イヌ回虫は肝臓を通過して肺に到達しているのに対し、ネコ回虫は肝臓をバイパスして肺に到達しているものと考えられた。

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とイヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症で、両者で全体の 80%を超えている。

現行の血清診断では、抗原として虫体粗抗原と一部分泌排泄抗原 (ES 抗原) を用いているが、抗原の供給が安定しておらず品質が一定の抗原を大量に準備することができないこと、ならびに抗体陽性と判定される場合でも、原因虫種が何なのか確定できないことがあることが、問題点として指摘される。

以上のような問題点を解決するために、われわれは組換え抗原をもちいた検査システムの構築を進めている。組換えタンパク質であれば一定の品質の抗原を大量に準備することが可能であり、用いるタンパク質を注意深く選ぶことで、真の感染のみを検出する系を確立することも可能だからである。

前年度までの研究において、ブタ回虫の体内移行幼虫の cDNA ライブラリから得られた As16 と組換えイヌ回虫抗原 rTcAg の組み合わせで感染虫種を絞れる見通しが付いており、実際に患者血清 120 サンプルについて組換え抗原による

虫種鑑別を実施したところ、どうしても鑑別できなかったサンプル数を 20 (16.7%) までに押さえることが可能となった (図 4)。

ただし、臨床サンプルをもちいた検討では真の原因虫種は確定できないので、感染実験によって検査の感度と特異性を確認する必要がある。通常はマウスやラットなどの小動物で検討するが、今回われわれはブタをもちいることにした。これは、ブタはヒトの回虫とごく近縁のブタ回虫の宿主になり得ることから、回虫類に対する免疫生理学的にヒトとブタは類似している可能性が高いかと考えたらである。

ブタ血清をもちいたアッセイにより、ブタ回虫感染ブタが産生している抗 *rAs16* 抗体は、イヌ回虫には存在しないエピトープを認識していることが明らかとなった (図 6)。これは *rAs16* による血清診断が合理的であることを意味しており、今後はイヌ回虫感染ブタが産生する抗 *rTcAg* 抗体がブタ回虫には存在しないエピトープを認識していることを明らかにできれば、このふたつの組換え抗原を使った検査システムにより虫種鑑別が可能であると証明できる。すでにブタをもちいた感染実験が進行中であり、今後の成果が期待できる。

一方、動物を用いた基礎研究として取り組んでいる幼虫移行症の病態解明では、モルモットを用いたブタ回虫感染実験と、ブタを用いたイヌ回虫・ネコ回虫感染実験を実施した。

ブタ回虫の非好適宿主として通常はウサギが使われるが、われわれがモルモットを用いた理由は、ウサギでは少ないとはいえ成虫まで成長するブタ回虫がみられるという文献による。

感染では 5,000 個ないし 10,000 個の幼虫包蔵卵を経口投与したが、モルモット体内から回収できた幼虫数は全部合わせても 1-2%程度であった。投与した虫卵ないし孵化した幼虫が消化管を通過してしまった可能性を考えて便検査もおこなったが、それでも投与虫卵数の 1 割に満たない数しか回収できなかった。つまり少なくとも 90%以上のブタ回虫幼虫が、モルモット体内のどこかへ「行方不明」となった (表 2)。

虫体の行き先としては、回収をおこなった臓器 (肺・肝臓・消化管・筋肉) 以外の臓器組織、具体的には、腹腔や胸腔、脾臓や腎臓等、あるいは消化管に所属するリンパ管やリンパ節が考えられる。とくに腹部リンパ管とリンパ節は消

化管のリンパを回収する通路であり、消化管粘膜から侵入した幼虫の通り道ともなる。したがって、この部位に大多数の虫体が捕獲されていたなら回収率の低下が説明されるであろう。実際、ブタにトキソカラ線虫を感染させた場合には、感染 2 週後でも比較的多数の虫体が腹腔リンパ節から回収された (表 3)。

ブタにおけるイヌ回虫とネコ回虫の感染では、きわめて興味深い結果が得られた。すなわち、ブタに感染後に回収できた幼虫数にはイヌ回虫とネコ回虫で極端な違いはなかったが、ネコ回虫では肝臓からまったく虫体を回収することができなかったのである (表 3)。肺からは虫体を回収することができたことを考えると、ネコ回虫はブタ体内では肝臓を通らずに肺へ到達しているものと考えられた。その経路として、消化管に所属するリンパ管から静脈を介した経路がもっとも疑わしい。なぜならば、前述の通り腹腔リンパ節からは多数の虫体が得られているからである。

E. 結論

ブタ回虫の体内移行期に発現している ES 抗原の組換えタンパク質 *As16* とイヌ回虫の組換え抗原 *rTcAg* の組み合わせで、幼虫移行症診断システムの開発が可能であることが示された。

モルモットにおけるブタ回虫感染実験およびブタにおけるイヌ回虫・ネコ回虫感染実験により、動物由来の回虫類の非好適宿主内における行動について新たな知見が得られた。

F. 研究発表

著書

1. 丸山治彦：幼虫移行症 (イヌ糸状虫症、動物由来の回虫症、顎口虫症、旋尾線虫症を含む) (今日の治療指針 2012、山口徹、北原光夫、福井次矢編)、pp.246-247、医学書院 (東京) (2012 年 1 月 1 日)
2. 丸山治彦：肺吸虫症 (感染症事典、感染症事典編集委員会 p. 552-557、オーム社 (東京)、2012 年 1 月 10 日)
3. 木村幹男、丸山治彦：抗原虫薬・抗蠕虫薬 (治療薬ハンドブック 2012、高久史磨監修、p. 1321-1329、じほう (東京)、2012 年 1 月 15 日)

総説

1. 丸山治彦：寄生虫疾患の各種診断法と漏らさないための検査システムの提案 *Clinical Parasitology* 22: 24-39, 2011

原著論文

1. Yoshida A, Nagayasu E, Horii Y, Maruyama H: A novel C-type lectin identified by EST analysis in tissue migratory larvae of *Ascaris suum*. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-011-2677-9, 2011

症例報告

1. Izumikawa K, Kohno Y, Izumikawa K, Hara K, Hayashi H, Maruyama H, Kohno S: Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Jpn J Infect Dis.* 64 (5): 428-32. 2011
2. Yamazaki H, Yamaguchi K, Iwase T, Niki T, Kusunose K, Tomita N, Taketani Y, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Fukunaga Y, Nakanishi H, Maruyama H, Matsuoka H, Sata M: A patient who developed toe necrosis due to poor blood circulation after an interdigital tick bite. *Journal of Cardiology Cases* 4, e106—e109, 2011
3. 河野仁寿、近藤晃、金沢祐星、原耕平、泉川欣一、泉川公一、河野茂、丸山治彦、林洋子：好酸球増多を伴った糞線虫症の1例 長崎医学会雑誌 86 (3): 129-133. 2011

学会発表

1. 吉田彩子、長安英治、堀井洋一郎、丸山治彦：ファージディスプレイ法を用いたブタ回虫症血清診断用抗原候補分子の検索、第80回日本寄生虫学会大会（東京）
2. 吉田彩子、Peter Nejsun, Stig Milan Thamsborg、丸山治彦：ブタ回虫体内移行期幼虫の発育決定分子の同定を目指して、第5回蠕虫研究会（宮崎）
3. Yoshida A, Nejsun P, Thamsborg SM: Identification of key molecules for the development of *Ascaris suum* by comparing transcriptome of migrating larvae in adequate host and inadequate host., *NORDFORSK WORKSHOP 2011: Nordic Network on Veterinary Parasitology*
4. 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦、ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム解析、第80回日本寄生虫学会大会（東京）

5. 長安英治、糞線虫フェロケラターゼ（鉄挿入酵素）の同定とその起源・役割についての考察、第5回蠕虫研究会（宮崎）
6. Chakraborty G, Nagayasu E, Yoshida A, Maruyama H: Development of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid and sensitive detection of *Strongyloides*, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 September 2011, Sapporo)
7. Nagayasu E, Ogura Y, Ito T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptome sequencing of *S. venezuelensis*, an animal parasitic nematode. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 September 2011, Sapporo)
8. Maruyama H: Genome and transcriptome analysis of *Strongyloides venezuelensis*, an intestinal nematode of rats. (Symposium: What Makes Worms Parasitic? - Understanding the Molecular Basis for Parasitism), XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 September 2011, Sapporo)
8. 長安英治、糞線虫の持つプロテオバクテリア様フェロケラターゼ遺伝子の解析、第19回分子寄生虫ワークショップ（神戸）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

エキノкокスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要不可欠である事から特異的な阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる。本研究はエキノкокスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。これまでの研究で蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノкокスにおいてもその生存に必須である事を見出し、特異的な阻害効果を示すリード化合物を見出す可能性は高い。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえ蠕虫のモデル系としての回虫、また寄生原虫としてマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法法の標的として捉えたいと考えている。

エキノкокス症はわが国でも患者数が減少せず、一方北海道におけるキタキツネの感染率は50%を超えている。この条虫感染症の最大の問題点は効果的な治療薬がない事であり、病原体である多包虫を殺滅する薬剤の開発は性質の類似している単包虫も含め、国際的な視野からも意義深い研究である。本研究では、これまでに我々が得て来た寄生虫ミトコンドリアに特異的なエ

ネルギー代謝系を標的とした薬剤開発を進め、エキノкокス症に対する有効な治療薬のリード化合物を見出す事を目的としている。

B. 研究方法

条虫類に属するエキノкокスは同じく寄生蠕虫に属する線虫類の回虫と同様に腸管寄生虫であり、その生活環から考えて、低酸素の環境下に嫌氣的呼吸鎖を利用して可能性があると予想された。実際に昨年度までの研究でミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、特に回虫などで見られる嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元酵素系を中心とする呼吸系の解析を進めるため、活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、研究の進んでいる回虫成虫ミトコンドリアとその性質を比較した。その結果エキノкокスでは実際に NADH-フマル酸還元酵素系が機能し、阻害剤の効果から少なくとも幼虫の生存に必須であることが明らかになった。しかも NADH-フマル酸還元酵素系の末端酸化酵素である複合

体Ⅱのフマル酸還元酵素活性は回虫成虫の活性よりさらに高い値を示した。そこでエキノコックス複合体Ⅱの特徴を調べる目的でミトコンドリアより複合体Ⅱの精製を試み、各サブユニットのN末端解析およびPCRを用いたホモロジープロービングから全てのサブユニットおよび複合体Ⅱの生合成に関わるアセンブリーファクターのcDNAのクローニングを行ない、その一次構造上の性質を明らかにした。

(倫理面への配慮)

本研究は大部分が *in vitro* の実験系であり、倫理面の問題はない。また、コットンラットを用いた感染実験は北海道大学、北海道立衛生研究所の動物実験倫理規定に基づいて行った。

C. 研究結果

1. エキノコックス複合体Ⅱの精製とN末端分析

複合体Ⅱは細菌では細胞質膜に、また真核生物ではミトコンドリア内膜に局在しており、基本的に4つのポリペプチドから構成されている。分子量約70 kDaの最も大きいサイズのサブユニット(Fp)は補欠分子族としてFADを含み、これと分子量約30 kDaで3種の異なるタイプの鉄-イオウクラスターを含むIpサブユニットから比較的親水性の触媒部位が形成されている。この触媒部位はSQRではコハク酸からフェナジンメトスルフェート(PMS)など水溶性の電子受容体への、逆にQFRでは水溶性の電子供与体である還元型メチルピオロゲンからフマル酸への電子伝達を担っている。この触媒部位が膜に安定に局在するためには2つの小さな疎水性のサブユニットが必要であり、多くの生物種の酵素でヘム*b*を

含むことからシトクロム*b*サブユニット(CybLおよびCybS)と呼ばれている。シトクロム*b*は複合体Ⅱとユビキノンやロドキノンなど膜中に存在する疎水性の電子伝達成分との電子の受け渡しに必要であり、複合体としてはシトクロム*b*が膜アンカーとして膜内に局在し触媒部位はマトリックス側に突出した形をとっている。

これまでの研究でエキノコックスを感染させたコットンラットの肝臓より原頭節を分離し、その組織・細胞を破碎して遠心分離を繰り返す事によって、生化学的解析に充分耐え得るミトコンドリア画分の調製法を確立した。しかしその量は極めて少なく、カラムクロマトグラフィーを用いた通常の方法では複合体Ⅱを精製する事は困難であった。そこでこれまでに微量のタンパク質複合体を活性を保持したままの状態で分離する事が可能なHigh resolution Clear Native Electrophoresis(hrCNE)を用いた精製法の確立し、全てのサブユニットを分離してN末端分析を行なった。その結果、Fp(VSTVGKDYTI)、Ip(ASTGPMKKF)、CybL(KGSTSEEVRL)およびCybS(AKLGTAQPQV)の全サブユニットのN末端が決定できた。

2. エキノコックス複合体Ⅱ全サブユニットおよびアセンブリーファクターcDNAのクローニング

最近、複合体Ⅱを構成する上記の4サブユニット以外に複合体Ⅱのアセンブリーに必要な2種のタンパク質が哺乳類ミトコンドリアで報告され、それぞれSuccinate dehydrogenase assembly factor(SDHAF)としてSDHAF1、SDHAF2と名付けられた。そこでこれまでに、コットンラットに感染させて得た宿主組織を含むエキ

ノコックス幼虫から cDNA を調製し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を構成する Fp, Ip, CybL, CybS の 4 つのサブユニットおよび 2 つのアクセソリーファクター SDHAF1, SDHAF2 についてサンガー研究所の EST データおよびゲノムデータをもとに ORF の特異的プライマーにより増幅し、配列を決定した。この配列をもとに、それぞれの遺伝子から 5'-RACE, 3'-RACE にて特異的 DNA 断片が増幅し、それぞれについてクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、全てのサブユニットと SDHAF1, SDHAF2 の完全長 cDNA の塩基配列を決定する事ができた。各サブユニットの配列は前述したペプチドより決定した N 末端のアミノ酸配列を含み、またこれらの配列は報告されている同じ扁形動物に属する住血吸虫の配列に最も近かった。

各サブユニットに関してさらに詳しく調べた所、Fp は最も保存性が高く、FAD を共有結合している His も保存されていた。Ip に関しては 2 種の存在 (Emlp1 および Emlp2) が明らかになったが、両者の配列の中では鉄イオウクラスターの結合に関わる 3 カ所の Cys に富む領域の中で真中の領域に興味深い違いが見つかった。すなわち 2 番目の保存された Cys の次のアミノ酸は Manson 住血吸虫 (Sm)、ヒト、回虫 (As) では Ala であるが、Emlp1 では Leu, Emlp2 では Phe (下線部) であった。

Emlp1	CILCL <u>CC</u> SASCPS
Emlp2	CILCF <u>CC</u> SAACPS
Smlp	CILCACCCSTSCPS
Humlp	CILCACCCSTSCPS
Aslp	CILCACCSASCPS

この事は Ala から疎水性の異なる Leu と

Phe に変る事によって鉄イオウクラスターの酸化還元電位が変化し、キノールからフマル酸への電子伝達をより進行し易くしている可能性がある。

また Ip とともにキノン結合部位を形成する CybL と CybS は Fp, Ip に比較して種特異性が高い傾向があり、これは他の生物種のアンカーサブユニットと同様の性質であった。この中で CybL に関して阻害剤との相互作用の観点から興味深い性質が見出されたので、「考察」で議論する。

D. 考察

エキノコックス症はその治療にアルベンダゾールなどが一部用いられているが、特効薬と呼ぶにはほど遠い。途上国に限らず、先進国にもその感染は多く見られ、わが国でも北海道の多包条虫症はキタキツネの高い感染率と相まって、大きな問題となっている。このエキノコックスの特異的な代謝系を標的として新規の薬剤開発をめざすのが本研究の最終的目的である。

この目的のためにエキノコックスの生活環を考えると、ほとんど酸素を利用していないと考えられる。すなわち成虫は酸素分圧の低い腸管に寄生し、また唯一外界に接する虫卵のステージはエネルギーを必要とする発生は終わっているので酸素は必要としない。また幼虫の生息する肝臓などの環境も包虫の状態では酸素の供給は低い。そこで低酸素環境下で機能する NADH-フマル酸還元系が生活環を通してエキノコックスの生存に必須であり、化学療法の好適な標的と考えられる。

我々は回虫成虫の酵素に関して、京都工芸繊維大学の原田繁春教授のグループとの共同研究によって最近結晶解析が進めており、回虫成虫複合体 II を特異的に阻害する

フルトラニルが CybL の Trp69 (下図の AsCybL の下線) と C-H π 相互作用している事を見出しているが、エキノコックスでは哺乳類同様に Met であった。

EmCybL PHILIYSPPLCMRNSFLHR
SmCybL PHLQVYSSPLVMRFSFLHR
HumCybL PHITIYSWSLPMAMSICHR
AsCybL PHLTIYKPQMTWMVSGLHR

これはエキノコックス幼虫からミトコンドリアを調製し調べたコハク酸-ユビキノ還元酵素活性がフルトラニルで阻害されない結果と一致する。一方、エキノコックスやマンソン住血吸虫ではその Met から 4 番目の位置に Phe がある。ここはヒトでは Ile であるが、Phe も CH- π や π -カチオンなどの強い相互作用が可能であるため、エキノコックスの複合体 II に選択的な阻害剤開発が期待できる。

この様に、今後の解析により構造予測からエキノコックスの酵素を特異的に阻害する化合物をインシリコで探索する事が可能になった。

E. 結論

本研究はエキノコックスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本研究の結果、蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノコックスにおいてもその生存に必須である事を見出した。しかもエキノコックスの複合体 II は宿主哺乳類や回虫とは異なった性質を持ち、今回の結果から各サブユニットにおける相違がアミノ酸レベルで明らかになり、これを標的とした新規薬剤開発の可能性が一層高くなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K. *Mitochondrion*, (2011) 11, 273-278
- 2) Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. Hikosaka, K., Watanabe, Y., Kobayashi, F., Waki S., Kita, K. and Tanabe, K. *Parasitol. Int.* (2011) 60, 175-180
- 3) Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, S., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K. and Ōmura, S. *Tetrahedron*, (2011) 67, 6582-6586
- 4) Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. Nara, T., Hashimoto, M., Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
- 5) Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y.,

Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T. Biochem. Biophys. Res. Commun. in press

- 6) Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. Biochim. Biophys. Acta in press

学会発表

- 1) 北 潔 「寄生虫ミトコンドリアの多様性：薬剤標的として」第84回日本生化学会大会 平成23年9月
- 2) 前田桂、畑昌幸、小松谷啓介、上田貴志、中野明彦、竹尾 暁、坪井敬文、

室伏きみ子、北潔、佐々木成江
「熱帯熱マラリア原虫におけるミトコンドリア DNA polymerase の解析」
第84回日本生化学会大会 平成23年9月

- 3) Kita, Kiyoshi
「The roles of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase/quinol-fumarate reductase) of *Plasmodium* studied by gene targeting of the Fp subunit」
5th Eijkman International Symposium, 2011, November (Jakarta)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

人獣感染症としての住血吸虫症のモニタリング法の開発

研究分担者 河津信一郎 帯広畜産大学・原虫病研究センター 教授

研究要旨 日本住血吸虫症の血清診断法を改良すること目的に、同寄生虫のゲノムデータベースから、分泌抗原、タンデムリピート抗原等の血清診断抗原候補分子を選抜して、それらの大腸菌組換え体抗原を応用した酵素抗体法（ELISA）の開発を試みた。5種類の組換え体抗原と同吸虫症陽性および、各種陰性血清とのELISAでの反応性を、虫卵粗抗原（SEA）での反応性と比較して評価した結果、組換え体抗原SjTPx-1あるいは、Sj7TRを用いたELISAの有用性が示唆された。

A. 研究目的

日本住血吸虫は、中間宿主となる淡水産巻貝（オンコメラニア属貝）から泳ぎ出した感染型幼虫（セルカリア）がヒトを含む哺乳類終宿主に経皮感染し、日本住血吸虫症の原因となる。患者は、腸間膜静脈に寄生す成虫が産出した虫卵が肝臓に蓄積し、肝硬変を経て、死に至る。日本住血吸虫症は、かつてわが国でも広島県や甲府盆地などの農村を中心に流行したが、住民、地方行政組織、および寄生虫病研究者の感染症撲滅に向けた連携によって、1996年に終息した。即ちわが国は、アジア諸国の中で、日本住血吸虫症撲滅の経験を唯一有する。日本住血吸虫症の制御・撲滅には、住民の検診と治療、中間宿主貝対策、および保虫宿主（ヒト以外の宿主動物）対策を並行しておこなう必要がある。一方、同感染症が蔓延する東南アジア諸国では、スイギュウ、イヌおよび野鼠が保虫宿主として重要視されているが、それらの感染ベースラインも調査されておらず、保虫宿主対策の著しい遅れが問題となっている。ヒトでの集団検診に用いられる糞便検査法（セロファン厚層塗抹法）も感度が低くまた特殊な技能を必要とすることから、これに代わる、汎用性が高くかつ高感度な診断法の開発が待たれている。

このような背景から、この分担課題では、東南アジアにおける日本住血吸虫症流行の疫学的背景を整理して的確な感染症情報を入手するため、また新興寄生虫症の出現に対応するため、ヒトおよび動物での同感染症の流行を正確かつ同時にモニタリングする手法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

今年度はヒトを対象とした血清診断法の改良をおこなった。日本住血吸虫症の血清診断法としては、虫卵周囲沈降反応（OPCT）と酵素抗体法（ELISA）が現在用いられているが、どちらも寄生虫卵を抗原とすることから、抗原の安定確保と診断時の擬陽性出現（特異性）に問題がある。そこでこれらを解決するため、2009年に公表された日本住血吸虫ゲノムデータベースから、分泌抗原、タンデムリピート抗原（TRP）等の血清診断抗原候補分子を選抜して、それらの大腸菌組換え体抗原を応用したELISAの開発を試みた。分泌抗原には過去に有用性が指摘された Thioredoxin peroxidase-1（SjTPx-1）を、TRP抗原にはTRPサーチプログラムでゲノムデータベースを評価して見出した4種類の分子（Sj1TR、Sj2TR、Sj4TRおよび、Sj7TR）を用いた。これら抗原を大腸菌組換え体タンパク質として発現・精製してELISAでの有用性を以下の血清サンプルを用いて評価した。（1）フィリピンレイテ島の虫卵陽性患者血清 35 検体（陽性血清）（2）国内の渡航歴を持たない健康人血清 38 検体（陰性血清）（3）フィリピンカガヤン州の虫卵陰性者血清 15 検体（流行地陰性血清）（4）フィリピンカガヤン州の患者治療（1年）後血清 4 検体（5）原病患者血清（熱帯熱マラリア 3 検体、三日熱マラリア 1 検体、赤痢アメーバ症 4 検体）計 8 検体（6）他の吸虫症患者血清（ウエステルマン肺吸虫症 11 検体、肝吸虫症 10 検体、鞭虫症 1 検体）計 22 検体。組換え体抗原の濃度は 200ng/well、対照として使用した虫卵粗抗原（SEA）の濃度は 1 μ g/well、血清希釈は 1:400

倍、各抗原の陰性限界値 (cutoff OD value) は陰性血清 38 検体の ELISA OD 値の mean+3SD とした。その他 ELISA の方法は定法でおこなった。

(倫理面への配慮)

これらの研究は、関連する指針および分担研究者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続をおこなって実施した。

C. 研究結果

(1) 組換え体抗原および SEA の感度 (ST%)、特異度 (SP%)、陽性的中率 (PPV%) および、陰性的中率 (NPV%) を Table 1 に示した。Sj1TR、Sj2TR および、Sj4TR は ST<70%であったため評価の対象から除外した。SEA、SjTPx-1 および、Sj7TR は >85%の高感度を示したが、SEA は擬陽性が多く特異度が 72%と低かった。SjTPx-1 および、Sj7TR の特異度は、それぞれ 97%および、100%と高かった。これらの組換え体抗原は 90%以上の陽性的中率および、陰性的中率を示した。

(2) 患者治療後血清の SEA 抗原に対する ELISA OD 値は全て陽性、SjTPx-1 および、Sj7TR 抗原に対するそれらは全て陰性を示した。(3) 原虫病患者血清では、SEA がアメーバ患者の 2 検体と陽性反応を示した。原虫病患者血清の SjTPx-1 および、Sj7TR に対する ELISA OD 値は全て陰性を示した。(4) 他の吸虫症患者血清では、SEA が 8 検体と陽性反応を示したのに対して、組換え体抗原では SjTPx-1 が肝吸虫症患者の 3 検体と cutoff OD value を僅かに超える陽性反応を示したに留まった。同血清の Sj7TR に対する ELISA OD 値は全て陰性を示した。

これらの成績から、組換え体抗原 SjTPx-1 および、Sj7TR の ELISA 抗原としての有用性が示唆された。また、これらの抗原を用いた ELISA では、虫卵排泄中の患者と治療後の虫卵陰性者を識別できる可能性も示唆された。

Table 1. Sj-ELISA 抗原の特性

抗原	ST(%)	SP(%)	PPV(%)	NPV(%)
SEA	97	72	59	98
TPx1	86	97	91	94
7TR	86	100	100	94

ST: Sensitivity; SP: Specificity

PPV: Positive Predictive Value

NPV: Negative Predictive Value

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S. Human antibody response to thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins as immunodiagnostic antigen candidates for *Schistosoma japonicum* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85: 674-679 (2011)

2. 学会発表

1) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Leonardo L., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., and Kawazu S. Development of ELISA for Detection of *Schistosoma japonicum* Human Infection Using Thioredoxin Peroxidase-1 and Tandem Repeat Proteins. 第 80 回日本寄生虫学会 2011 年 7 月 17 日 東京

2) Angeles JM, Goto Y., Kirinoki M., Asada M., Leonardo L., Tongol-Rivera P., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Utilization of ELISA Using Thioredoxin Peroxidase-1 and Tandem Repeat Proteins for Diagnosis of *Schistosoma japonicum* Infection Among Water Buffaloes. 第 52 回日本熱帯医学会大会 2011 年 10 月 5 日 東京

3) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Leonardo L., Tongol-Rivera P., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Human antibody response to thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins as immunodiagnostic antigen candidate for *Schistosoma japonicum* infection. 第 60 回米国熱帯医学会年会 2011 年 12 月 5 日 Philadelphia, PA, USA

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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)
(総括・分担)研究報告書

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 中村 健 北里大学医学部予防医学系
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 Wanchai Maleewong タイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室
研究協力者 Pewpan Maleewong タイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室
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: 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マンソン孤虫症を対象とし、その迅速血清診断イムノクロマトキットの開発に関する研究を実施した。診断キットに用いた抗原は、マンソン孤虫(プレロセルコイド)の PBS 抽出可溶性画分、精製したパラミオシンとシステインプロテアーゼ(CP)の 3 種類を抗原候補として、その特異性や検出感度を検討した。その結果、CP が特異性、検出感度とも優れていたことから、それを用いたイムノクロマトキットを試作し、日本人とタイ人の健常者、マンソン孤虫症患者、ならびにそれ以外の寄生虫症患者の血清を用いてキットの評価を行った。その結果、キットはマンソン孤虫症患者血清と高い特異性を示し、臨床症状が酷似した顎口虫症とも鑑別に有用であることが判明し、目的とするイムノクロマトキットを開発することができた。一方、寄生蠕虫症病原体の網羅的な遺伝子診断鑑別法の確立については、臨床検体を活用することによって鑑別法を確立することができた。

(1) 幼虫移行症としてのマンソン孤虫症
迅速血清診断キットの開発

A. 研究目的

マンソン孤虫症はマンソン裂頭条虫の幼虫(=プレロセルコイド)が食品(地鶏・ヘビ・カエルなど)を介して感染する寄生蠕虫症である。アジアを中心に患者が発生し、わが国でも最近の 10 年間に 77 例の症例が報告されている。マンソン孤虫はヒトでは、脳、皮下織、乳房、胸腔、腹腔、眼部、鼠径部など全

身に体内移行するので、移行部位によって症状も様々である。

本症の検査診断は、血清中の抗マンソン孤虫抗体を検出するのが有効とされ、その血清診断には、マンソン孤虫 PBS 可溶性画分が診断用抗原として汎用されてきた。しかし、この PBS 抗原の場合、検出感度は高いが、マンソン孤虫症以外の寄生虫症と交差反応を起こすことが多く、特異性の面では問題があった。

そこで、本研究では、高い検出感度と種特異性を有する血清診断抗原を検索し、それを用いたマンソン孤虫症の簡便で迅速なイムノクロマト(IC)キットを開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) 抗原候補分子の特異性: マンソン孤虫の抗原分子候補としてパラミオシン(PM)とシステインプロテアーゼ(CP)、ならびに、従来から汎用されているPBS抗原も比較の対象とした。PMとCPは生化学的手法によって精製した。精製されたこれらのタンパク質は抗原として、酵素抗体法を用いて健常者血清、マンソン孤虫症患者血清やその他の寄生虫症患者血清との反応性を比較検討し、いずれのタンパク質が抗原として有用であるかを検討した。

2) ICキットの試作と評価: キットの用いる抗原が決定したのち、ICキットに用いる抗原濃度、被検血清の希釈倍率、さらに二次抗体の種類や濃度など基礎条件の至適化を行った。つぎに、試作品キットの検出感度や特異性を検討するために、健常者血清、マンソン孤虫症患者血清、さらに、その他の寄生虫症患者血清を用いて評価試験を行った。

C. 研究成果

1) 抗マンソン孤虫抗体検出キットの基礎反応系の確立: PM、CPおよびPBS抽出抗原の3種類について酵素抗体法を用いて、検出感度と特異性を検討した結果、PMとPBSを抗原に用いた場合、健常者血清で陽性になる例はなかったが、マンソン孤虫症のみならず、ほかの寄生虫症患者血清との間

に非特異的反応(false positive)が多く見られたが、CPは検出感度、特異性とも最も優れていた。そこで、CPを用いたICキットを作成し、血清中の抗マンソン孤虫抗体を捕捉可能な抗原濃度、二次抗体の濃度、ならびにそれらの反応に基づいた反応系を確立した。以上の結果から、CPを用いたICキット試作品が出来たので、それを用いた評価試験をタイで実施した。その理由は、マンソン孤虫症による臨床症状が類似する顎口虫症患者血清を用いた評価が重要であり、顎口虫症はわが国では症例が少なく、ICキットの評価に十分な血清が得られない。ところが、タイは顎口虫症の流行国のひとつであるために、キットの特異性評価に必要な顎口虫症患者血清が活用できることが理由であった。

2) マンソン孤虫症ICキットのタイにおける検討: 健常者、マンソン孤虫症、顎口虫症の他、タイで見られる寄生虫症患者血清、計80サンプルについて、ICキットの反応性を検討したところ、健常者血清はすべて陰性、マンソン孤虫症患者血清2例中1例陽性(陰性の1例は感染初期の眼部マンソン孤虫症)であった。さらに、マンソン孤虫症以外の寄生虫症患者血清とは、抗体価の高い血清で非特異的反応が見られたが、臨床症状が異なることから、鑑別には問題はないと考えられた。日本人血清、タイ人血清、いずれもマンソン孤虫症キットとは反応性は酷似し、十分、臨床現場での使用が可能と考えられた。

D. 考察と結論

マンソン孤虫CPを抗原に用いたICキットの評価試験は概ね、検出感度、特異性とも

優れたキットであると考えられた。

今後、第三者医療機関にキットを分与することによって、実用化と検査・診断の標準化のための評価試験の継続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。

(2) 条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正確な鑑別や同定は、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、形態学的に類似した寄生虫の鑑別には高度な専門知識が要求される。また、虫体の変性、あるいは石灰化した場合には寄生虫の形態的特徴が失われ、形態学的鑑別は一層困難となる。そこで、遺伝子解析に基づいて、寄生虫種を同定・鑑別する方法が最も正確であるために、臨床検体を研究材料として、網羅的な遺伝子鑑別法の確立を目的とした。

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を蓄積した。研究材料は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、基本的には cox1 遺伝子を増幅するためのプライマーを至適化するとともに、塩基配列解析も実施した。さらに、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ついても、寄生虫の種類ごとにプライマーの設定を含めた 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臨床検体は、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*, *Oncocerca lupi*)、肝毛細虫、マンソン弧虫、有棘顎口虫、有鉤囊虫など多岐にわたったが、多くの種類について、cox1 遺伝子解析に基づいた鑑別法を確立することができた。

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多岐にわたる寄生虫を鑑別診断するのに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、同定可能になった寄生虫種の範囲がさらに広まった。

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、国立感染症研究所感染症情報センター発行の病原微生物検出情報(2011年4月号)に情報提供し、感染予防策対策を周知徹底させた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamasaki H., Ohmae H., Kuramochi T. Complete mitochondrial genomes of *Diplogonoporus balaenopterae* and *Diplogonoporus grandis* (Cestoda: Diphyllbothriidae) and clarification of their taxonomic relationships. *Parasitology International* 61: 2012 (in press).
- 2) Ikeda T., Tamura D., Sato Y., Ichihashi K., Matsuoka H., Yamasaki H. Two pediatric cases of *Diphyllbothrium nihonkaiense* Infection in Summer 2010. *Pediatrics International*, 54 : 2012 (in press).
- 3) Koonmee S., Intapan P.M., Yamasaki H., Sugiyama H., Muto M., Kuramochi T., Kularbkeaw J., Kanpittaya J., Maleewong W., Nawa Y. Molecular identification of a causative parasite species using formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues of a complicated human pulmonary sparganosis case without decisive clinical diagnosis. *Parasitology International* 60: 460-464, 2011.
- 4) 山崎 浩, 森嶋康之, 八木田健司. 生食のリスク. 食肉・野生動物の生食と寄生虫症. *公衆衛生* 76: 30-36, 2012.
- 5) 水野泰孝, 竹下 望, 加藤康幸, 森嶋康之, 山崎 浩. パモ酸ピランテル単回投与による駆虫に抵抗性を示したアメリカ鉤虫症の1例. *Clinical Parasitology* 22: 65-67, 2011.
- 6) 中村(内山)ふくみ, 小林謙一郎, 岩渕千太郎, 山崎 浩, 大西健児. 当院で経験した4例のアジア条虫症について. *Clinical Parasitology* 22, 72-74, 2011.
- 7) 山崎 浩, 武藤麻紀, 森嶋康之, 杉山広, 川中正憲, 中村(内山)ふくみ, 大亀路生, 小林謙一郎, 大西健児, 川合 覚, 奥山 隆, 斎藤一幸, 宮平靖, 野内英樹, 松岡裕之, 春木宏介, 三好洋二, 赤尾信明, 秋山純子, 荒木 潤. 2010年に関東地方で発生が相次いだアジア条虫症について. *Clinical Parasitology* 22, 75-78, 2011.
- 8) 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広, 武藤麻紀. 2010年6月以降に続けて関東地方で発生が確認された新興寄生虫感染症としてのアジア条虫症. *病原微生物検出情報* 32: 106-107, 2011.
- 9) 中村(内山)ふくみ, 小林謙一郎, 岩渕千太郎, 大西健児, 山崎 浩. 豚あるいは牛レバー刺し摂食によるアジア条虫症の4例. *病原微生物検出情報* 32:107-108, 2011.
- 10) 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* 53:887-890, 2011.
- 11) 太田和義, 山崎 哲, 高井哲成, 本城

裕美子, 吉井重人, 山田正美, 記野秀人, 武藤麻紀, 山崎 浩. マス生食によると思われた日本海裂頭条虫症の1例. 日本内科学会雑誌 100: 3336-3338, 2011.

2. 学会発表

- 1) Yamasaki H., Muto M., Morishima Y., Sugiyama H. Present status of *Taenia asiatica* infection as an emerging disease in Japan. 1st Symposium on current perspectives of *Taenia asiatica* researches. Osong, Chungbuk, Korea. October 25-27, 2011.
- 2) 山崎 浩, 武藤麻紀, 森嶋康之, 杉山広, 川中正憲, 中村(内山)ふくみ, 大亀路生, 小林謙一郎, 大西健児, 川合 覚, 奥山 隆, 斎藤一幸, 宮平靖, 野内英樹, 松岡裕之, 春木宏介,

三好洋二, 赤尾信明, 秋山純子, 荒木潤. 2010年に関東地方で発生が相次いだアジア条虫症について. 第22回日本臨床寄生虫学会大会. 2011年7月18日, 東京.

- 3) 水野泰孝, 竹下 望, 加藤康幸, 森嶋康之, 山崎 浩. パモ酸ピランテル単回投与による駆虫に抵抗性を示したアメリカ鉤虫症の1例. 第22回日本臨床寄生虫学会大会. 2011年7月18日, 東京.
- 4) 中村(内山)ふくみ, 小林謙一郎, 岩渕千太郎, 山崎 浩, 大西健児. 当院で経験した4例のアジア条虫症について. 第22回日本臨床寄生虫学会大会. 2011年7月18日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし

平成 23 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）
「顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究」班
分担研究報告書

食品媒介性蠕虫症（線虫と吸虫）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	柴田勝優	国立感染症研究所寄生動物部
同	武藤麻紀	国立感染症研究所寄生動物部
同	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
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

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、鶏肉や獣肉、さらにその内臓を加熱せずに生で賞味する人が増加している。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一層目立つようになってきた。このような寄生蠕虫の中から、年間に推定 2,000 名以上の患者が発生するアニサキスと、年間の患者数は平均 50 名と少ないが、感染すれば時に重篤な症状が惹起される肺吸虫を選択して、検査法・診断法の開発に関する検討に取り組んだ。まず肺吸虫については、病態像が異なる本邦産人体寄生種の迅速鑑別を目的に、ミトコンドリア 16S リボゾーム RNA 遺伝子に注目し、この領域を効率よく増幅する新規プライマーを設計して、これを用いた nested PCR の系を構築した。この系によることで、ウェステルマン肺吸虫の 2 型と宮崎肺吸虫とが、迅速で確実に鑑別できるようになった。アニサキスについても迅速な血清診断法の確立を目途に、人体寄生の主要病原種である *Anisakis simplex sensu stricto* の分泌排泄抗原（ES 抗原）を用いて、免疫クロマトグラフィ法を応用した診断キットの作製を試みた。アニサキス症等の患者血清を用いてキットの反応性を検討したところ、micro-ELISA により得られる結果と一致することが分かった。

1. 肺吸虫の種同定・型別判定に有用な新規プライマーの作製と nested PCR への応用

A. 研究目的

我が国には 3 種類の肺吸虫、すなわちウェステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫が分布している。淡水産の甲殻類である

サワガニは、これら 3 種類の肺吸虫に共通する第 2 中間宿主である（大平肺吸虫に関しては、かつて佐渡肺吸虫とされたタイプがサワガニから分離される）。これら 3 種類の肺吸虫のうち、人体寄生種として重要なのは、ウェステルマン肺吸虫および宮崎肺吸虫の 2 種である。興味深いことに我が国のウェステルマ

ン肺吸虫は、染色体構成から2倍体型と3倍体型の2型に分類される。両型は共に、サワガニからメタセルカリア（以下Mc）が検出されるが、生物学的な性状は相互に異なり、これに起因してか、感染時の病態像にも差異を認める。すなわち3倍体型は人体内で成虫に発育して、肺実質に形成される虫嚢内に定着し、長期にわたり安定して産卵を続ける。患者に認める症状としては、発咳、特に血痰の喀出が特徴となる。一方の2倍体型は、産卵が可能な成虫にまで時に発育するが、虫嚢内に定着せず（あるいは虫嚢を形成せず）、虫体は胸腔内を徘徊する。このため患者には、胸水貯留や気胸が特徴的な症状として発現する。もう一種類の人体寄生種である宮崎肺吸虫は、生物学的性状がウェステルマン肺吸虫（2倍体型）に類似し、従って患者に認める臨床症状も、胸水貯留や気胸が特徴となる。このように本邦に分布する人体寄生性の肺吸虫に感染すると、種（型）に応じた病態が患者に発現する。

東京では食用の目的に、肺吸虫の第2中間宿主であるサワガニが魚屋で販売されている。このようなサワガニを喫食し、肺吸虫に感染したと考えられる症例が、我が国に長期間滞在するアジア系外国人を中心に報告されてきた。そこで、食用に市販されるサワガニを購入し、肺吸虫Mcの寄生状況に関する検査を続けてきた。検査にあたって、肺吸虫が寄生するならば、寄生状況を種別・型別に知りたいと考えた。しかし検出されたMcは、いずれも生殖器が未だ発達せず、種・型を判定するに足る形態学的特徴に乏しかった。そこで、遺伝子配列の差異に基づく解析（配列の解読を含む）を試みた。具体的な方法としては、まずMcからDNAを抽出し、リボゾームDNA・ITS2領域の配列をPCR増幅させた。この領域は種の鑑別に有用とされ、従来から宮崎肺吸虫とウェステルマン肺吸虫との鑑別等に利用されてきた領域である。この方法で、ウェステルマン肺吸虫と同定された個体に関しては、さ

らにミトコンドリア16SリボゾームRNA遺伝子の部分配列を増幅させた。この領域は種内変異の検出に有用とされ、ウェステルマン肺吸虫の2倍体型と3倍体型との判別等に利用されてきた。このような二段階の方法で検討した結果、東京で食用に市販されるサワガニから、ウェステルマン肺吸虫（2倍体型と3倍体型）および宮崎肺吸虫という人体寄生種（型）の総てを検出することができた。

上述のように、本邦産人体寄生性肺吸虫のMcを用いて種同定・型別判定を行なう場合は、まず種鑑別を先行させ、次にウェステルマン肺吸虫と鑑別された材料について、型別判定を行なっていた。より簡便で、かつ迅速な方法の確立が必要ではないかと考え、この課題に今年度は取り組んだ。目的を達成する為に、従来は余り関心が向けられていなかった宮崎肺吸虫のミトコンドリア16SリボゾームRNA遺伝子の配列に注目した。先ず、宮崎肺吸虫の当該領域の配列を明らかにした。次に、この配列情報を活用して、宮崎肺吸虫とウェステルマン肺吸虫（2倍体型・3倍体型）とを鑑別するための新たなプライマー・ペアを作製した。さらに、このプライマー・ペアを用いたPCRおよびnested PCRの系を確立した。Mcのような生鮮材料だけでなく、保存や管理の状態が厳しい臨床材料からテンプレートDNAを調製した場合でも、種同定・型別判定の目的を達成する方法の確立を目指した。

B. 研究方法

宮崎肺吸虫の分布地である和歌山県紀北地方でサワガニを採集し、本虫のメタセルカリアを分離した。常法に従いDNAを調製し、これをテンプレートに、ユニバーサルなプライマー・ペア（T7-1およびSP6-1）でミトコンドリアDNA・16SリボゾームRNA遺伝子の部分配列をPCR増幅した。得られたPCR産物の塩基配列を常法に従い解読した。また、宮崎肺吸虫の配列をウェステルマン肺吸虫（2倍体型・3倍体型）の当該領域の配列と比較し、