

人獣共通寄生虫病の血清診断システムの開発と 幼虫移行症の病態解明

協力研究者 丸山治彦 宮崎大学医学部 教授

研究要旨 宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2012 年においても、動物由来回虫類感染症が多数あった。これらの原因虫種はイヌ回虫かブタ回虫と考えられ、これまでに組換えブタ回虫抗原 As16 と組換えイヌ回虫抗原 rTcAg を組み合わせた抗体検査により、イヌ回虫症が 90% 程度であることを示した。しかしながらこれは「トキソカラ感染症」であって、イヌ回虫かネコ回虫かは不明である。したがって、今年度は、イヌ回虫感染とネコ回虫感染に病態の違いがあるのかどうか、ブタを用いた感染実験で検討した。その結果、幼虫包蔵卵投与後は両者ともに肝臓から肺へと移行したが、ネコ回虫はイヌ回虫と比べて極めて移行速度が速く、短時間で虫体は肺より先へ到達することがわかった。このことは、臨床的に肝臓や肺に病変が強くなるのがイヌ回虫感染症、好酸球増多のみみとめて画像所見に乏しいのはネコ回虫感染症である可能性を示唆している。

A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による抗体スクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を基本とした寄生虫症診断システムを構築し、多くの寄生虫病の診断に関わってきた。総検体数は年間 500 前後で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している。

抗寄生虫抗体陽性で、臨床的に感染ありと判断される症例は年間 100 例近くにのぼり、その中では肺吸虫症と動物由来の回虫類感染症が多数を占める。動物由来の回虫とは具体的にはトキソカラとブタ回虫であり、トキソカラ症とブタ回虫症の鑑別については、これまでの研究によって組換え抗原を用いた抗体検査法である程度鑑別できる見通しが立った。

しかしながら、未だにトキソカラがイヌ回虫なのかネコ回虫なのかという問題が残されている。イヌ回虫とネコ回虫は同属に分類されている通りきわめて近縁であり、抗体での鑑別は少なくとも現時点では不可能である。また、ネコ回虫の遺伝子やタンパク質についての情報は限定的にしか得られていないため、イヌ回虫とネコ回虫で、それぞれに特異的な抗原を探すのは

困難である。

そこで、イヌ回虫症とネコ回虫症の違いを病態の面から明らかにするために、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて感染実験を実施した。ブタで幼虫の体内移行などにおける病態の違いを明らかにできれば、ヒトで発生している幼虫移行症の病態解明に大きく貢献できることになる。

B. 研究方法

1. ブタと寄生虫

ブタの感染実験は、コペンハーゲン大学獣医学部 Stig Milan Thamsborg 教授（Danish Centre for Experimental Parasitology, Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen）で実施した。虫卵はイヌ回虫とネコ回虫ともに、Claudia Bohm, Institute of Parasitology, University of Veterinary Medicine, Hannover より供与いただいた。

2. 感染

虫卵は、イヌ回虫またはネコ回虫に感染したイヌまたはネコの糞便から分離し、定法により

培養して幼虫包蔵卵とした。

1) 感染 31-32 日後の評価

ブタには幼虫包蔵卵を 10,000 個経口的に投与し、31-32 日後の各臓器（肺、肝臓、腸間膜リンパ節、心、脳、眼、横隔膜、舌、筋肉）から虫体を回収した。肝臓と腎臓は、破碎前に表面の白点 white spot のカウントもおこなった。感染 22、28 日後には採血して末梢好酸球を測定した。

2) 感染 4 日および 14 日後の評価

幼虫包蔵卵 100,000 個を経口投与して 4 日後は肺と肝臓から、14 日後には肺、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、腎臓、横隔膜、脳、筋肉から虫体を回収した。

3. 虫体の回収法

臓器からの虫体回収は消化法と寒天法のどちらか、あるいは両方を実施した。消化法は人工消化法を用いた。1% ペプシン HCl 人工消化液で破碎した臓器を消化し、臓器中に含まれる虫体を回収した。寒天法は、破碎した臓器を 1% 寒天液に懸濁して布に塗り広げ、寒天の凝固後に布ごと緩衝液中でインキュベートして、遊出してきた虫体を回収した。

虫体回収は、感染 4 日後、14 日後、31-32 日後に実施した。31-32 日後では、

C. 研究結果

1. 感染 31-32 日後（虫卵 10,000 個投与）

1) 末梢血好酸球

感染後の末梢血好酸球はイヌ回虫感染群の方がネコ回虫感染群よりも有意に高かった。しかしながら、感染 28 日後には非感染群と同程度までに下がっていた（推移は図 1 の通り）。

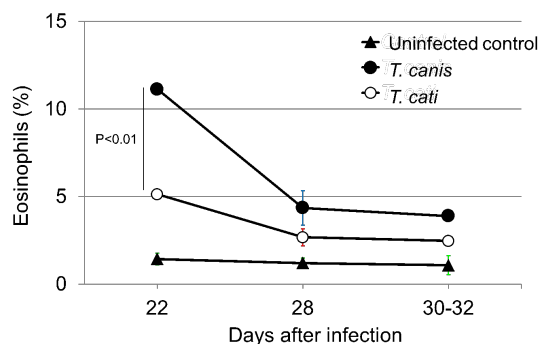


図 1 末梢好酸球数

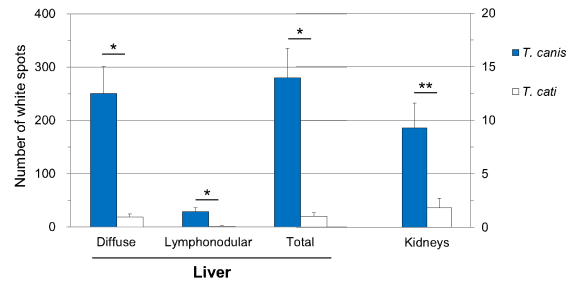


図 2 肝および腎表面の白点 white spot

2) 白点

臓器表面の白点は炎症巣を示し、感染の有無を肉眼的にとらえることができる。肝臓および腎臓表面の白点は、イヌ回虫感染群の方が明らかに高い値を示し、ネコ回虫感染群は有意に少ない数の白点しか認めることができなかった。

3) 回収虫体数

感染約 1 か月後における回収虫体数は下表の通りで、リンパ節はネコ回虫の方が多かったが、最も幼虫が集積していると思われた肺からは、イヌ回虫の方が多く回収された。肝臓からの回収虫体数が少ないのは、イヌ回虫・ネコ回虫ともに、すでに肝臓を通り抜けた後だったためと考えられた。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	0.1	0
Lungs	3.0	0.6
LN	1.7	4.2
Diaphragm	0.1	0
Brain	0	0
Muscle	0	0.1

表 1 感染 31-32 日後の回収虫体数（臓器 100 g 当たり）

2. 感染 14 日後（虫卵 100,000 個投与）

感染 14 日後は、対象のすべての臓器で回収虫体数はイヌ回虫がネコ回虫を上回り、とくに肺ではイヌ回虫はネコ回虫の倍近い値であった。またネコ回虫感染ブタの肝臓からは虫体を回収することができなかった（表 2、図 3、図 4）。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	31	0
Lungs	122	67
LN	57	54
Spleen	0	0
Kidneys	0	0
Diaphragm	2	0
Brain	1	0
Muscles	0	0

表 2 感染 14 日後の回収虫体数 (臓器 100g 当たり)



図 3 イヌ回虫感染 14 日後のブタの肝臓



図 4 ネコ回虫感染 14 日後のブタの肝臓

3. 感染 4 日後 (虫卵 100,000 個投与)

感染 31-32 日後および感染 14 日後にはネコ回虫を肝臓から回収することができなかった。その理由として、ネコ回虫が肝臓をバイパスしていることが考えられたため、もっと早期の感染 4 日後に肝臓、肺、腸間膜リンパ節から体内移行幼虫を回収した。

その結果、ネコ回虫感染でも肝臓から虫体が

回収され、さらに、肺ではイヌ回虫よりも多数の虫体を回収することができた (表 3)。

Organ	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
Liver	700	60
Lungs	42	128*
LN	3540	2240

表 3 感染 4 日後の全回収虫体数

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トキソカラ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。

昨年度までの研究で、トキソカラ症とブタ回虫症を血清学的に鑑別する手法はある程度確立でき、症例数を増やして検討を続ける予定である。しかしながら、新たな問題として、トキソカラ症の実態がイヌ回虫症なのかネコ回虫症なのかという点が残されている。どちらも非好適宿主内では幼虫のまま止まるため、トリなどの食肉を介したヒトへの感染が起きる可能性は等しく存在する。近年、子犬のイヌ回虫症は減少しているため、トキソカラ症の原因としてイヌ回虫に加えてネコ回虫についても考慮する必要があるであろう。

ブタ回虫とトキソカラは交差反応が強いとはいえ一定以上抗原性に違いがあり、抗体による鑑別が可能であった。実際 As16 抗原はホモログがイヌ回虫には存在しない。イヌ回虫とネコ回虫の場合は、抗原性はもっと近いと考えられるので、抗体による鑑別はきわめて難しいと予想される。しかもネコ回虫は EST やゲノム情報に乏しく、特異的な診断抗原の探索もできない。

そこで本研究では、ヒトと生理学的に近いとされるブタを用いて、イヌ回虫とネコ回虫の病態の違いを検討した。その結果、同じトキソカラとはいえ、イヌ回虫とネコ回虫では大きな違いがあることが明らかになった。

もっとも大きな違いは肝臓から回収される虫体数であり、検討した範囲 (4 日後、14 日後 31-32 日後) では常にイヌ回虫感染の方が多くの虫体が回収された。とくに感染 14 日後と 31-32 日後では、ネコ回虫感染では肝臓からは全く幼虫を回収することはできなかった。

きわめて興味深いのは感染 4 日後で、このタイミングでは逆に、ネコ回虫では多数の幼虫を

	<i>T. cati/T. canis</i>	
	Liver	Lungs
4 days	0.086	3.048
14 days	0	0.549
31 days	0	0.200

表 4 イヌ回虫とネコ回虫の回収虫体数の比

肺から回収することができた。回収実験の結果を表 4 にまとめたが、この表から明らかなのは、ネコ回虫感染では幼虫は肝臓を短時間で完全に通り抜け、きわめて速やかに肺に到達していることである。一方イヌ回虫では、多くの幼虫が肺にいる時も一定数の幼虫が肝臓にとどまっている。

さらに、ネコ回虫感染においても 4 日後には肝臓からも幼虫が回収されていることから、感染 14 日後以降にネコ回虫幼虫が肝臓から回収されないのは、肝臓を通らないのではなく速やかに肝臓を離れて肺に到達するからと考えられる。肺から先は回収実験で明らかに示すことはできなかったが、おそらく筋肉や中枢神経系などに分散しているものと考えられる。

以上のような体内移行の違いが人体内でも起こっているとすると、ネコ回虫感染では肝臓に画像上の変化が認められないことが考えられる。実際にいわゆるトキソカラ症の中に、肺と肝臓の両方に異常陰影のある症例と、好酸球性肺炎のみを示す症例が存在し、数としては圧倒的に肺炎のみ示す方が多い。これらの症例がネコ回虫症であるとする証拠はないが可能性は指摘できるであろう。

本研究が示すのは、ネコ回虫感染ブタでは肝臓や腎臓に白点がないために、食肉検査をすり抜けているのではないかという新たな問題点である。ネコ回虫が肺も素早く通り抜けて筋肉内に移行しているとすると、ヒトへの感染源としてきわめて大きな役割を演じている可能性がある。今後、ネコ回虫の遺伝子情報などを整備し、イヌ回虫とネコ回虫の鑑別を進めていく必要がある。

E. 結論

どちらもトキソカラ症であるイヌ回虫感染症とネコ回虫感染症の病態の違いを、ブタを用い

た感染実験で明らかにすることができた。ネコ回虫は、感染後素早く肝臓を通り抜け肺に到達し、肝臓に炎症巣を形成しなかった。一方イヌ回虫は肝臓にとどまる時間が長く、強い炎症を引き起こした。臨床病型との関連が疑われた。

F. 研究発表

著書

1. 丸山治彦：アニサキス症（今日の治療指針 2013、山口徹、北原光夫、福井次矢編）、pp.262-263、医学書院（東京）（2013 年 1 月 1 日）

総説

1. 丸山治彦、木村幹夫：我が国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際 日本臨床 70 (12): 2205-2217, 2012
2. 丸山治彦、名和行文：肺吸虫症と神経系 神経内科 77 (3): 259-266, 2012
3. 丸山治彦：小児にみられる吸虫症 小児科臨床 65 (3): 384-390, 2012
4. 吉田彩子、長安英治、丸山治彦：動物由来回虫類感染症のわが国における最近の動向 Clinical Parasitology 23: 105-108, 2012

原著論文

1. Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. Parasitol Int. 2013 Feb;62(1):57-65.

学会発表

1. Nagayasu E, Ogura Y, Ito T, Yoshida I, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Genome and transcriptome analysis of *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. International Symposium on Genome Science “Expanding Frontiers of Genome Science (2013.1), Tokyo, Japan.
2. Nagayasu E, Ishikawa S, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki, Y, Maruyama H: Bacteria-like ferrocyclase in animal parasitic nematodes. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (2012.9), Awaji, Japan.

3. Yoshida A, Nejsum P, Skallerup P, Thamsborg SM, Maruyama H: Serological diagnosis of Ascarid Visceral Larva Migrans with recombinant antigens. ESCCAP Toxocara 2012, 3-5 October 2012, Budapest
 4. Yoshida A, Poulsen CS, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P: Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. ESCCAP Toxocara 2012, 3-5 October 2012, Budapest
 5. 吉田彩子、辻尚利、山崎浩、丸山治彦：ブタ回虫症血清診断抗原候補分子としてのリコンビナント As16 の有用性 第 65 回日本寄生虫学会南支部大会・第 62 回日本衛生動物学会南支部大会 合同大会、2012 年 11 月 10 11 日、長崎市
 6. 長安英治、丸山治彦：線虫類における動物寄生関連遺伝子の探索 第 20 回分子寄生虫ワークショップ (2012.8), 神戸市
 7. 長安英治、小椋義俊、伊藤武彦、吉田彩子、林哲也、丸山治彦：ゲノム概要配列が未知の寄生虫研究における次世代型シーケンサの活用 法 第 10 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012.10), 前橋市
 8. 長安英治、丸山治彦：ゲノム/トランスクリプトーム情報に基づく動物寄生関連遺伝子の探索 第 10 回日本寄生虫学会東日本支部会、第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 (2012.10), 前橋市
- 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