

成されたトランスクリプト（これまでに同定されていない遺伝子と考えられる）の数が 8,639 に上った。これは、現在公開されているブタ回虫のドラフトゲノムの品質が十分ではないことを示唆している。

各遺伝子の発現量比較をマッピングリード数で行ったところ、2012 年のライブラリと 2013 年のライブラリの間で大きなばらつきが観察された。これはリプリケート間の、ライブラリの作成やシーケンスプラットフォームの違いによるものであると考えられた。

以上の点を考慮しつつ解析した結果、好適宿主と非好適宿主の間で有意に発現量が異なる遺伝子数は 134 であり、そのうちブタで高発現しているものは 72 遺伝子、モルモットで高発現しているのは 62 遺伝子であった。モルモットで高発現しているものには、macrophage migration inhibitory factor、C-type lectin domain containing protein、Ov39 antigen-like のような、宿主免疫調節に関わると予想される遺伝子や、プロテアーゼインヒビター遺伝子が含まれていた。一方、ブタで高発現しているリストには、生殖や成長に関わる遺伝子群が含まれていた。

D. 考察

宮崎大学医学部寄生虫学研究室で 1986 年以来実施している寄生虫抗体検査では、ごく初期を除いて常に動物由来の回虫類感染症が陽性症例の首位を占める。しかしながら近年は減少傾向にあり、2000 年頃は年間 100 例近かったのが、2009～2011 年は年間 50 例弱、2012～2013 年には年間 40 症例を切るようになってきている（表 1）。動物由来回虫症にはトリや牛の筋肉やレバーを生食して感染すると考えられているので、平成 24 年 7 月からの牛レバーの生食用販売・提供禁止も影響している可能性がある。

動物由来の回虫類とは、具体的にはトキソカラ（イヌ回虫またはネコ回虫）またはブタ回虫である。両者で症状や治療法には大きな違いはないが、予防という観点からは異なっている。トキソカラであればイヌやネコを、ブタ回虫症であればブタを、牛やトリの飼育環境から遠ざけることが発生予防になる。

臨床的に動物由来の回虫類に感染したと考えられる患者血清 120 サンプルについて解析した結果、トキソカラ症と確定できるものが 102 例、ブタ回虫症が 10 例、確定できないもの 8 例となった。不明の 8 例はトキソカラ幼虫 ES 抗原への結合性があり、なんらかの寄生虫に感染しているか、あるいは何か他抗原との交叉反応であろうと考えられる。

いずれにせよトキソカラ症の方がブタ回虫症よりも 10 倍程度多いと予測されることから、肥育農場において、イヌまたはネコへの対策が必要になるであろう。今後は、牛やトリの抗体検査を実施することで、どの程度食肉用の家畜・家禽が感染しているかを検討する必要がある。

われわれは、幼虫移行症の基礎研究をすすめる目的で、ブタ回虫をブタあるいはモルモットに感染させ、それぞれの宿主内での遺伝子発現の違いを明らかにしようとした。現時点でいくつかの候補遺伝子が上がっており、ブタ回虫を含めて、回虫類の幼虫が非好適宿主内で長期間生存できるメカニズムの解明につながると期待できる。

ブタ回虫の遺伝子発現研究で明らかになったことは、現在公開されているブタ回虫のドラフトゲノムにはまだまだ改善の余地があるということで、われわれのデータによれば、現在の予測遺伝子数より 8,000 個以上多い遺伝子をブタ回虫は持っている可能性がある。

研究コミュニティの活性化とゲノム情報の整備は互いに刺激し合う関係にある。回虫類に限らず、蠕虫類一般のゲノム情報を整備することは新たな蠕虫研究を刺激することになり、それが還元されてさらにゲノム情報が整備される。次世代型、あるいは次次世代型シーケンサの投入により、今後ますます、蠕虫類感染症の分子研究を推進する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H: Identification of a Bacteria-Like Ferrochelataase in *Strongyloides venezuelensis*, an Animal Parasitic Nematode. PLOS ONE 8 (3): e58458, 2013

2. Kikuchi T, Koga M, Shimizu S, Miura T, Maruyama H, Kimura M: Efficacy and safety of paromomycin for treating amebiasis in Japan. *Parasitol Int.* 62 (6): 497-501, 2013
3. 丸山治彦、大前比呂思：吸虫症 別冊日本臨牀神経症候群（第2版）907-911. 2013年12月30日

2. 学会発表

1. 本部エミ、吉田彩子、長安英治、黒木美香、丸山治彦：動物由来回虫症に対するアルベンダゾールの有効性の検討 第24回日本臨床寄生虫学会学術大会、2013年6月15日、奈良市
2. 長安英治、吉田彩子、本部エミ、黒木美香、丸山治彦：寄生虫症血清診断から見た肺吸虫症の最近の動向 第24回日本臨床寄生虫学会学術大会、2013年6月15日、奈良市
3. Yoshida A, Poulsen CS, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P : Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. 24th International Conference of the WAAVP, 25-29 August, 2013, Perth
4. Yoshida A, Skallerup P, Poulsen CS, Nejsum P, Maruyama H, Thamsborg SM : Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs as a model for human infection. *Forum Cheju* 16, 30-31 August, 2013, Seoul
5. Poulsen CS, Yoshida A, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, Nejsum P : Migratory pattern of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* in pigs. 8th European Congress on Tropical Medicine and International Health, 10-13 September, 2013, Copenhagen
6. 茂野佐弓、相原茉里、早田弥生、吉田彩子、本川和幸、三澤尚明、堀井洋一郎、野中成晃、丸山治彦：肉用牛における動物由来回虫に対する抗体保有率の検討 第66回日本寄生虫学会南支部大会・第63回日本衛生動物学会南支部大会 合同大会、2013年11月2-3日、由布市
7. 本部エミ、吉田彩子、長安英治、黒木美香、堀井洋一郎、丸山治彦：動物由来回虫症に対するアルベンダゾールの有効性と安全性 第66回日本寄生虫学会南支部大会・第63回日本衛生動物学会南支部大会 合同大会、2013年11月2-3日、由布市
8. 吉田彩子、早田弥生、茂野佐弓、相原茉里、本川和幸、堀井洋一郎、野中成晃、丸山治彦：肉用牛及び肉鶏における動物由来回虫に対する抗体保有率の検討 第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27-28日、松山市
9. Hombu A, Yoshida A, Nagayasu E, Kuroki M, Maruyama H : Assessment on Effectiveness and Safety of Albendazole for Ascarid Infections. 第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27-28日、松山市
10. 丸山治彦：食肉由来の人獣共通寄生虫疾患 牛臨床寄生虫研究会 2013年10月5日、宮崎市
11. 丸山治彦：寄生虫疾患の臨床検査 第3回一般検査研究班研修会・宮崎県臨床検査技師会 2014年1月26日、宮崎市

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（新興・再興感染症研究事業）

平成25年度分担研究報告書

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フマル酸呼吸と呼ばれる 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た事から、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事によって宿主内の環境に適応している事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事により、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重要な課題である。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。実際にこれ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事が明らかになった。さらに NADH-フマル酸還元酵素系を構成する複合体 I をキナゾリンで阻害する事により培養系での原頭節が殺滅される事が判り、この系が抗寄生虫薬の格好なターゲットになると考えられた。特にこの 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 23 年度までに、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ベイ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。続いて 24 年度はモデル系である回虫ミトコンドリアの複合体 II の結晶解析を行い、そのフマル酸還元活性を示すための基本構造についての情報を得た。さらに回虫と特異的阻害剤との共結晶からさらに強力な阻害活性を持つ薬剤の分子設計について検討が行われた。これらの回虫の共結晶と 23 年度に得られたエキノコックス複合体 II の一次構造の情報は複合体 II をターゲットとした阻害剤の実験を行う上で非常に有益な情報となると考えられた。そこで 25 年度は NADH-フマル酸還元系の中でも特に複合体 II を阻害する化合物から特異的かつ強い阻害活性をもつ薬剤が見出す事を目的に研究を進めた。

(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. エキノコックスミトコンドリアの単離

北海道衛生研究所の八木博士らの協力で感染 4 ヶ月後のコットンラットより 104 g のシストが得られた。これから原頭節を調製し、さらにミトコンドリアの単離を行った。原頭節 (6 mL) に 4 倍量の MSE 緩

衝液 (複合体 II 阻害剤のマロン酸 10% を添加) に懸濁し、グラス-グラスホモジナイザーにより破碎を行った。平均 16 ストロークで完全に原頭節を破碎する事ができた。このホモジェネートを 800 g、4°C で 10 分間遠心分離を行い、未破壊の原頭節などを除いた。上清をさらに 8000 g、4°C で 10 分間遠心を 2 回行い、その沈澱をミトコンドリア画分として回収した。このミトコンドリアは MSE 緩衝液 (マロン酸 1%) に懸濁した (2 ml)。Lowry 法でタンパク質濃度を測定した結果、湿重量 100 g のシストより 40 mg の酵素活性を良好に保ったミトコンドリアを回収する事ができた。これらのミトコンドリアを使用して分光光度計を用いて、各阻害剤のコハク酸-ユビキノ還元酵素 (SQR) 活性に対する IC_{50} (50% 阻害濃度)、もしくは一定の濃度下での阻害率 (%) の測定を行った。キノン結合部位の阻害剤としてはフルトラニルとその 31 種の誘導体、シッカニン、アトベニン A5、フェルレノールと 17 種の誘導体、新規薬剤 X とその誘導体が生物医化学教室にある阻害剤のライブラリーから選択した。またエキノコックス複合体 II への薬剤効果の選択性はブタの複合体 II の SQR 活性に対する IC_{50} との比で示した。

1. フルトラニルとその 31 種の誘導体

フルトラニルは回虫の複合体 II との共結晶の立体構造が明らかにされており、その情報とエキノコックスのアミノ酸配列を比較から阻害活性がより強い誘導体の構造が予測可能であると考えられた。フルトラニル自身は 26 μ M で選択性は 1.7 倍であった。回虫の SQR 活性に対するフルトラニルの IC_{50} は 58 nM で選択性は 790 倍であり、その阻害パターンはかなり異なっていた。

これは回虫ではキノン結合部位を形成する CybL のトリプトファンがフルトラニルと強い相互作用を示す CH- π 結合をとっているのに対し、エキノコックスではメチオニンに置換されている事、またキノン結合部位を構成するサブユニットである CybS と CybL のアミノ酸配列の相同性が 27.4 %、31.8 %と低い事から構造が大きく異なっていると考えられた。31 種類の誘導体中、ベンゼン環のトリフルオロメチル基がヨード基に置換された 2 種類のみが IC₅₀ 4.6 μ M (選択性 0.6 倍)、6.1 μ M (選択性 1.0 倍) とフルトラニルよりも低い IC₅₀ であった。しかし、これら誘導体を含めても IC₅₀ は高く、選択性も低い事からフルトラニルの優先順位は低いと考えられた。

2. シッカニン

シッカニンは抗真菌薬であり水虫に対する軟膏として以前は市販されていた薬剤である。標的は真菌ミトコンドリアの複合体 II であり、我々の測定では SQR に対する IC₅₀ は 72 nM, アフリカトリパノソーマ *Trypanosoma brucei* には 370 nM, リーシュマニアの一種 *Leishmania tarentolae* には 190 nM で nM オーダーの阻害活性を示している。エキノコックス複合体 II の SQR に対するシッカニンの IC₅₀ は 3.0 μ M で選択性は 287 倍であった。IC₅₀ は低くはないが選択性はかなり高い事から新規の誘導体によっては有望な薬剤が得られる可能性があると考えられる。

3. アトペニン A5

北里研究所との共同研究で見出したアトペニンは広範囲の生物の複合体 II に対して強い阻害活性を示す薬剤であり、ウシの SQR に対する IC₅₀ は 4.0 nM, 回虫に対して

も 12 nM という低濃度で阻害する事が判っている。エキノコックス複合体 II の SQR に対する IC₅₀ は 52 nM であった。この結果は確認したキノン結合部位阻害剤の中では最も強い阻害活性である。しかしながら選択性は 0.07 倍と低い事から哺乳類の感染への応用のためには今後の構造の検討がさらに必要と考えられた。

4. フェルレノールと 17 種の誘導体

フェルレノールはキノン結合部位の阻害剤であり alternative oxidase (AOX) の阻害剤として我々の研究室が見出した化合物である。このフェルレノールとライブラリーにある 17 種類の誘導体についてエキノコックスの SQR に対する阻害活性を調べた。フェルレノールの IC₅₀ は 690 nM であった。17 種類の誘導体については 500 nM 濃度で阻害率は 0~10 % であり高い有効性は認められなかった。

5. 新規薬剤 X とその誘導体

ミトコンドリア呼吸酵素のキノン結合部位を阻害する事が知られており、すでに他の研究ではマウスへの投与も行われている新規薬剤 X は IC₅₀ が 995 nM とある程度の阻害活性を示した。そこでその誘導体を調べたところ、中には IC₅₀ が 100 nM 前後とより高い阻害を示す化合物を見出す事ができた。さらに、選択性も新規薬剤 X は 300 倍であったが、その誘導体の中には 2,000 倍を超える複数の化合物が認められた。また構造活性相関を調べたところ、阻害活性と選択性を上昇させる構造上の特徴を見出す事ができた。この新規薬剤 X とその誘導体はエキノコックス幼虫の培養系や感染マウスへの投与などの in vivo 実験でさらにその有効性の確認が期待できる。

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目的である。

標的となるミトコンドリアでのエネルギー代謝の観点から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ため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と考えられる。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、化学療法の格好の標的と考えられる。

回虫成虫複合体 II を特異的に阻害するフルトラニルが回虫 CybL のトリプトファン 69 と C-H π 相互作用している事が 24 年度に明確に示されたが、エキノコックスでは哺乳類同様にメチオニンであった。エキノコックスの SQR に対するフルトラニルの IC₅₀ が 26 μ M で回虫の 58 nM とは大きく異なる事はこの構造の違いで説明が可能である。さらにフルトラニル誘導体の中にも阻害活性と選択性を向上させるものは無く、回虫の構造活性相関をモデルとしてエキノコックスへの有効性を予測する事には限界があると考えられた。また、エキノコックスと他の生物の SQR に対する IC₅₀ を比較し

てみると、新規薬剤 X は回虫や哺乳類での阻害活性は弱いですがエキノコックスでは nM オーダーで阻害している一方、シッカニンは線虫類や原虫では nM オーダーで阻害してもエキノコックスでは 3.0 μ M と高い IC₅₀ となっており、感受性が大きく異なっている。

以上のように、キノン結合部位の阻害剤ライブラリーのスクリーニングからアトベニン A5 と新規薬剤 X の 2 種の化合物が非常に高い効果を示した。特に新規薬剤 X では選択性の高い誘導体も見出され、構造活性相関から得られた情報から、さらに強力で選択性の高い誘導体を合成できる可能性がある。今後はシッカニン、アトベニン A5、新規薬剤 X とその誘導体を *in vivo* 実験で使用する候補薬化合物とし、より有望なリード化合物を見出して行きたいと考えている。

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-フマル酸還元系の末端酸化酵素であるフマル酸還元酵素活性を持つ複合体 II を阻害する複数のキノン結合部位阻害剤を見出す事ができた。

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、阻害剤に対しても他の生物とは感受性が異なる事が明らかになった。この事は前年度までに cDNA の塩基配列決定から複合体 II の各サブユニットにおけるアミノ酸配列レベルでの相違とも一致する。今後、各阻害剤の構造活性相関を検討し、*in vivo* 実験で有効性を確認して行く中からエキノコックス複合体 II に特異的で強い阻害活性を持った新規薬剤を見出す可能性が一層高くなった

と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K. (2013) *J. Biochem.* 153, 267-273
2. Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum* – a parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle. Goto, M., Amino, H., Nakajima, M., Tsuji, N., Sakamoto, K. and Kita, K. (2013) *Gene* 516, 39-47
3. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target. Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E. O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, M. L., Harada, S. and Kita, K. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 4580-4585
4. Synergy of ferrous ion on 5-aminolevulinic acid mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*. Komatsuya, K., Hata, M., Balogun, E. O., Hikosaka, K., Suzuki, S., Takahashi, K., Tanaka, T., Nakajima, M., Ogura, S., Sato, S. and Kita, K. (2013) *J. Biochem.*, 154, 501-504
5. The alternative oxidases: simple oxidoreductase proteins with a complex function. Young, L., Shiba, T., Harada, S., Kita, K., Albury, M. S. and Moore, A. L. (2013) *Biochem. Soc. Transac.* 41, 1305-1311

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金 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」
平成25年度分担報告書

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 今年度は日本住血吸虫症の保虫宿主（イヌ）を対象とした酵素抗体法（ELISA）の開発を試みた。昨年度までに実施した患者およびスイギュウを対象とした研究で有用性を検討した5種類の組換え体抗原と同感染症陽性および各種陰性犬血清との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。その結果、組換え体抗原SjTPx-1あるいは、Sj7TRの有用性が指摘された。これまでの成績との考察から、SjTPx-1を抗原とする患者と保虫宿主に共通の血清診断法開発の可能性が示唆された。一方、Sj7TRは媒介介虫感染ステージで発現しており、中間宿主監視用抗原としての有用性が示唆された。

目的とする。

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（Kato-Katz法）も感度が低く、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、また新興寄生虫病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

B. 研究方法

今年度はイヌを対象とした血清診断法（ELISA法）の開発を試みた。抗原には、これまでに患者およびスイギュウを対象とした研究で有用性を検討した Thioredoxin peroxidase-1 (SjTPx-1) と、4種類のタンデムリピート抗原（TRP）分子（Sj1TR、Sj2TR、Sj4TR および、Sj7TR）を使用した。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・ネグロスオクシデンタル州（住血吸虫症流行地）で飼育されていた虫卵陽性犬の血清 5 検体（陽性血清）（2）同地域で飼育されていた虫卵陰性犬の血清 38 検体（流行地陰性血清）（3）帯広畜産大学・原虫病研究センター（住血吸虫症非流行地）で飼育されていたイヌの血清 13 検体（陰性血清）（4）イヌ糸状虫症実験感染犬血清 10 検体および、イヌバベシア症実験感染犬血清 8 検体（他の寄生虫症感染犬血清）。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 1μg/well、血清希釈は 1:200 倍、各抗原の陰性限界値（cutoff OD value）は陰性血清 13 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。虫卵陽性は糞便 DNA を材料として、寄生虫ミトコンドリア NADH 脱水素酵素（SjND1）遺伝子を標的とする PCR 法（Stool-PCR）で判定した。この他、Sj7TR の各発育期での発現を特異抗体を用いた蛍光抗体法で観察した。

(倫理面への配慮)

これらの研究は、分担研究者が所属する研究機関で定めた動物実験指針、遺伝子組換え実験指針および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) Stool-PCR 法で評価したネグロスオクシデンタル州でのイヌの日本住血吸虫症感染率は12% (5/43 頭) で、うち2頭がKato-Katz法でも虫卵陽性と判定された。(2) 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 \leq 60%であったため評価の対象から除外した。SjTPx-1および、Sj7TRはST \sim 80%の高感度を示した。SjTPx-1および、Sj7TRの特異度は、ともに98%と高かった。また、それぞれ $>$ 80%および $>$ 98%の陽性的中率および陰性的中率を示した。(3) イヌ糸状虫症およびイヌバベシア症実験感染犬血清は、それぞれ、5検体がSEAと陽性反応を示した。一方、組換え体抗原とは、後者1検体がSjTPx-1と弱陽性を示したのみであった。

これらの成績から、組換え体抗原SjTPx-1および、Sj7TRのイヌを対象としたELISA抗原としての有用性が示唆された。また、前年度までの研究成績とあわせて考察すると、SjTPx-1を抗原とするヒトおよび保虫宿主での共通血清診断法開発の可能性が示唆された。一方、Sj7TRは媒介貝感染ステージで発現しており、中間宿主監視用抗原としての有用性が示唆された。

Table 1. Sj-ELISA 抗原の特性

抗原	ST (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)
SEA	100	73	25	100
TPx-1	100	98	83	100
Sj7TR	80	98	80	98

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., and Kawazu, S. Recent advances in the diagnosis and control of *Schistosoma japonicum* infection in animals. Jpn. J. Vet. Parasitol. 12(1): 44-50 (2013)
- 2) Angeles, JM., and Kawazu, S. Insights into

animal schistosomiasis: From surveillance to control. In A. Miele (Ed.) *Schistosomiasis: Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. New York: Nova Publishing Inc., in press.

2. 学会発表

- 1) Angeles JM., Kirinoki M., Goto Y., Asada M., Leonardo L., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Development of recombinant antigen-based serological diagnosis for the detection of *Schistosoma japonicum* infection in water buffaloes. 第115回日本獣医学会 2013年3月28日 東京
- 2) Angeles JM., Kirinoki M., Goto Y., Asada M., Hakimi H., Leonardo L., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Localization and expression profiling of a 31 kDa antigenic repetitive protein Sjp_0110390 in *Schistosoma japonicum* life stages. 第82回日本寄生虫学会 2013年3月30日 東京
- 3) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Leonardo L., Asada M., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Development of recombinant antigen-based serological diagnosis for the detection of *Schistosoma japonicum* infection in water buffaloes. 第24回世界獣医寄生虫学会議 (WAAVP) 2013年8月26日 Perth, Australia
- 4) Angeles JM, Goto Y., Leonardo L., Kirinoki M., Hakimi H., Rivera PT., Villacorte E., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Detection of canine schistosomiasis japonica using recombinant thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins. 第54回日本熱帯医学会大会 2013年10月5日 長崎
- 5) Angeles JM., Goto Y., Kirinoki M., Leonardo L., Asada M., Hakimi H., Villacorte E., Rivera PT., Inoue N., Chigusa Y., and Kawazu S. Development of serological techniques for the diagnosis of zoonotic *Schistosoma japonicum* infection through the use of recombinant proteins. 第62回米国熱帯医学会年会 2013年11月15日 Washington, DC, 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」

平成25年度分担報告書

寄生蠕虫症(条虫症)の検査・診断法開発に関する研究

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 中村 健 北里大学医学部寄生虫学教室

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 Intapan P. Maleewong タイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室

研究協力者 松岡裕之 自治医科大学医動物学部門

研究委託者 小林行治・小林 薫・高山勝好 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、ならびに顎口虫症の抗体検査用イムノクロマトキットの開発と評価を行った。マンソン孤虫症については、キットの操作性をより簡便にするために改良を加え、さらに、この改良したキットと従来法であるELISAにおける感度、特異性、陽性予測値、陰性予測値を比較検討した。その結果、イムノクロマトキットはELISAに比して特異性や陽性予測値が高く、また検査手技の簡便さと迅速性の観点から、検査室、あるいは外来での使用が可能と考えられた。一方、顎口虫症については、大腸菌で発現させた遺伝子組換え有棘顎口虫メタロプロテアーゼ(MMP)の抗原としての特異性をウエスタンブロットで検討した。その結果、組換え抗原は顎口虫症患者血清と特異的に反応することが確認されたために、イムノクロマトキットを試作したが、感度向上のために改善する必要があることが判明した。

一方、寄生蠕虫の網羅的な遺伝子鑑別法の確立に関しては、国立感染症研究所に送付されてくる臨床検体を活用して鑑別法を確立した。裂頭条虫類のPCR-RFLP法による簡易鑑別法、テニア属条虫のpyrosequencing法による迅速診断法の他、単包虫症の原因種である*Echinococcus ortleppi*や鉤頭虫の一種*Corynostoma sp.*の近縁種との遺伝子鑑別法などを確立した。

(1) マンソン孤虫症イムノクロマトキットの
評価

A. 研究目的

マンソン孤虫症はマンソン裂頭条虫(*Spirometra erinaceieuropaei*)の幼虫(=プレロセルコイド)の寄生によって引き起こされる幼虫移行症で、ヒトはそのプレロセルコイドが寄生し

た地鶏、ヘビ、あるいはカエルなどの肉を加熱不十分な状態で摂取すること感染し、このような食習慣を有するアジアを中心に患者の発生がみられる。わが国では、最近の 10 年間に 80 例近い症例が報告されている。マンソン孤虫は、脳、皮下組織、乳房、眼部や鼠径部など全身に移行するので、抗体産生が著明である。したがって、本症の検査診断法として、血清中、あるいは髄液中のマンソン孤虫に対する IgG 抗体を検出するのが有効であるが、標準化された方法はない。そこで、マンソン孤虫 PBS 粗抗原やマンソン孤虫のパラミオシン、あるいはシステインプロテアーゼを比較検討したところ、システインプロテアーゼが抗体検出用抗原として、感度、特異性とも優れていたことから、システインプロテアーゼを抗原に用いたイムクロマトキット(iSparga kit)を作成し(図1)、従来、汎用されてきた ELISA と比較検討を行った。



図1. マンソン孤虫症検査キット。

B. 研究方法

マンソン孤虫から生化学的手法によって精製されたシステインプロテアーゼを用いて、昨年度イムクロマトキットを試作したが、実際の操作

では二次抗体と発色液を滴下する際、難点があったため、操作性を向上させるためにデバイスを改良した。ただし、抗原量、二次抗体の種類や濃度に変更はない。

感度、特異性の評価には、マンソン孤虫が抽出された確定症例(日本人 13 症例)、また、陰性血清対象として、健常者血清(59 例)とマンソン孤虫症以外の寄生虫症確定症例の患者血清(74 例)、総数 146 血清サンプルを用いた。

血清の採取や使用に当たっては、国立感染症研究所の医学倫理審査委員会で承認された指針(No. 177)、ならびにタイ・コンケン大学医学部における医学倫理審査委員会で承認を得た指針(No. HE561396)に準拠した。

C. 研究結果

マンソン孤虫症陽性血清(13 検体)と陰性対照血清(133 検体)に分け、イムクロマトキットと ELISA による反応性を調べた。

その結果、有病率 8.9%(13 /146)では、イムクロマトキット、ELISA ともマンソン孤虫症 13 例全例とも陽性であったことから、感度はいずれも 100%であった。しかし、特異性については、イムクロマトキットでは 97.0%と ELISA の 86.5%より優れていた。さらに、陽性予測値も 76.5%と ELISA の 64.9%よりは高く、言い換えれば、イムクロマトキットを用いた検査で陽性であれば、マンソン孤虫症である確率が高いことが判明した。

今後、第三者医療機関に本キットを分与することにより、検査診断の標準化のための適用事例を集積することが必要であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

1. 国際学会

1. Yamasaki H., Sugiyama H., Morishima Y. Current situation of food-borne parasitic helminthiases in Japan. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013, Yokohama.

2. 国内学会

なし

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

(2) 顎口虫症イムノクロマトキットの開発

A. 研究目的

顎口虫類(*Gnathostoma* spp.)の幼虫寄生によって惹起される顎口虫症は幼虫移行症として世界的に重要な寄生虫症で、タイ・中国を含む東南アジア～東アジア、またメキシコやペルーなど伝統的に生魚料理を食する習慣のある国で発生している。わが国では、輸入ドジョウを感染源とする顎口虫症例や海外渡航先で感染し、帰国後発症するいわゆる輸入寄生虫症例として重要である。顎口虫症はその治療のために、類似症状を呈するマンソン弧虫症と鑑別する必要があり、その鑑別診断には血清中の顎口虫に対する IgG 抗体検出

が有効である。本研究では、顎口虫症の研究実績が多いタイ・コンケン大学医学部寄生虫学教室、同大・新興感染症診断研究センターとの共同研究として、遺伝子組換え抗原を用いた顎口虫症の迅速検査キットの開発と評価を行った。

B. 研究方法

昨年度の研究から、抗体検出用の抗原として、有棘顎口虫のメタロプロテイナーゼ (MMP) が有望であることが判明したために、平成 25 年度は大腸菌で組換え MMP を発現させ、ウエスタンブロットによる反応性を評価するとともに、イムノクロマトキットの試作をタイの企業に依頼した。

キットに用いた抗原濃度、血清の希釈倍率やと二次抗体の濃度はウエスタンブロットの結果に基づいて至適化された。操作は希釈血清と二次抗体を滴下する 2 段階からなり、結果判定は 2~4 分後に行った。

評価に用いた血清は、タイの顎口虫症流行地で採取した顎口虫症患者血清 27 例、陰性対照としてタイ人健常者 10 例、それに顎口虫症以外の寄生虫症患者血清 23 例を用いた。血清の採取や使用については、前述のとおり医学倫理審査委員会より承認された指針に準拠した。

C. 研究成果

遺伝子組換え MMP を用いて作成したイムノクロマトキットの評価試験を行った結果、顎口虫症患者では陽性反応が得られた。しかしながら、顎口虫症以外の寄生虫症患者で false positive となった血清があったことから、現時点での評価は、感度 70.4%、特異性 57.6%とまだ満足できる段階にはないことが判明した。今

後、抗原濃度や二次抗体の種類や濃度など、一層の改善が必要であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

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求められる。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 遺伝子を基本としたが、寄生虫種によっては 12S rRNA 遺伝子なども対象とし、塩基配列に関する基礎的な情報を蓄積するとともに、新規に RFLP 解析、あるいは pyrosequencing 法による鑑別法を検討した。この方法は、従来の電気泳動法とは異なり、段階的に相補鎖を合成し、その反応副産物であるピロリン酸を ATP sulfurylase によって ATP に変え、ルシフェラーゼ存在下で

ルシフェリンと反応させ、化学発光の強度から塩基配列を決定するものである。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た臨床検体(虫体や病理組織標本)を用いた。

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、無鉤条虫などの条虫が多く、これらについてはすでに塩基配列法や multiplex PCR 法を確立していたが、より簡便な PCR 産物の制限酵素切断パターン (RFLP) 解析法を考案した。テニア属条虫の鑑別法として新規に pyrosequencing 法を開発した。その他、*Onchocerca lupi* と動物由来オンコセルカ、鉤頭虫の一種 *Corynosoma* sp. や単包虫の一種 *Echinococcus ortleppi* の DNA sequencing 法による鑑別法を確立した。

昨今の食習慣の多様化や国際的な人的移動など生活環境の変化に伴い、様々な寄生虫感染症が発生している。また、国外の医療機関からも遺伝子解析に基づいた寄生虫鑑別の重要性が増すと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

1. 国際学会

1. Yamasaki H., Sugiyama H., Morishima Y. Current situation of food-borne parasitic helminthiases in Japan. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013, Yokohama.

月 15 日、2013 年、奈良市.

2. 国内学会

1. 村井謙治, 鈴木麻衣, 鈴木彰人, 石島聡子, 渡辺由希子, 乾 啓洋, 高宮信三郎, 山崎 造, 内藤俊夫, 美田敏宏, 磯沼 弘. 駆虫により咽頭違和感が消失した無鉤条虫症の 1 例. 第 24 回日本臨床寄生虫学会大会. 6

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

平成 25 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	市村静江	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

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、本邦で年間に 7,000 名程度の患者発生があるアニサキスと、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、検査法・診断法の確立に継続して取り組んだ。まず肺吸虫については、我々が作製したミトコンドリア・16S リボゾーム DNA を標的とする nested PCR による同定法の応用を検討し、外国人肺吸虫症例の原因種同定に本法が適用できることを改めて示した。また本法がアジア産肺吸虫と同様に、アメリカ産肺吸虫の同定にも適用できる可能性を示した。アニサキスについては、虫体の分子同定で原因種が明らかにされた患者の血清を更に集積した。これらの血清試料を用いて、我々が作製した迅速診断キットの反応性を検討し、ELISA による抗体価測定に代替し得ることを示した。

1. 肺吸虫の種同定法に関する検討

1-1. 外国人肺吸虫症例の原因種同定：ミトコンドリア・16S リボゾーム DNA を標的とする nested PCR

A. 研究目的

ウエステルマン肺吸虫の 2 倍体型と 3 倍体型とは生物学的な特徴が異なり、これを原因として病態像に大きな相違が生じることから、感染の原因となる虫体の型別判定（2 倍体型・3 倍体型）が治療方針の決定に重要となる。このために患者由来の虫卵を出発材料としてミトコンドリア・16S リボゾーム DNA の塩基配列が解読され、この配列を基にした型別判定が行われてきた。一方で当該領域の塩基配列は、我が国に分布するもう一つの人体

寄生種である宮崎肺吸虫だけでなく、東南アジアに分布して人に感染するヒロクチ肺吸虫の同定にも適用できた。これらの同定に必要な塩基配列の獲得には nested PCR が必須で、ウエステルマン肺吸虫（2 倍体型・3 倍体型）と宮崎肺吸虫との共通配列から新たに作製したプライマー・ペア（PwDTF2 および PwDTR3）が、second round の PCR に有用であった。この様な過去 2 年間の知見を背景として、今年度は外国人肺吸虫症例の原因種同定に本法が適用できるのか、喀痰内虫卵を用いて改めて検討した。

B. 研究方法

症例は 28 歳と 26 歳のタイ人姉妹。数年前に来日し、以後は日本に在住している。姉妹

は2010年から咳嗽・血痰を自覚し、その血量が徐々に増大したことから、2012年7月に至って長野県立須坂病院を受診した。画像検査では肺に浸潤影・腫瘤影が認められ、血清検査を受けて肺吸虫症と確定された。姉の肺胞洗浄液から肺吸虫卵が少数であるが検出されたので、この虫卵由来のDNAを出発材料としてミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的とするnested PCRを行い、原因虫種の同定を試みた。

C. 研究結果

肺胞洗浄液は塗抹後に染色封入標本とされて届けられた。鏡下に観察された虫卵は数個に過ぎなかったが、これらの虫卵を標本から掻き取り、DNAを調製してnested PCRを実施したところ、463 bpの増幅産物が得られた（プライマー配列を除いたPCR産物の鎖長）。その配列を解読したところ、ウエステルマン肺吸虫（3倍体型）の配列と完全に一致した。更にPCR産物を制限酵素 *Bsr*DI で処理したところ、予想サイズ（332 bp および 131 bp）に切断された。以上の結果から、症例はウエステルマン肺吸虫（3倍体型）の感染であることが判明した。

D. 考察

感染源に関して患者姉妹に食歴を尋ねたところ、来日前のタイにおいても、また来日後も、淡水産のカニを用いたサラダを継続的に摂食していた（「ソムタム・プー」と云うタイ料理）。タイにおける淡水産カニの生食歴から、当初は東南アジアの重要種・ヒロクチ肺吸虫による感染が疑われたが、本検討によりウエステルマン肺吸虫（3倍体型）の感染であることが判明した。タイのウエステルマン肺吸虫は人体感染せず、しかも姉妹はウエステルマン肺吸虫（3倍体型）が分布する本邦以外の東アジア諸国への渡航歴がないことから、感染源は本邦産の淡水産カニ（モクズガニ・サワガニ）と結論された。

当研究部では、臨床の現場から肺吸虫症患者の原因種同定の依頼が届くことが多い。今回の検討でも明らかなように、我々が開発し

たnested PCRはその目的に極めて有効であった。従って本法を活用することで、今後も依頼検査の要望に積極的に応じていきたいと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

1. 国際学会

なし

2. 国内学会

1. 鹿児島崇, 山崎善隆, 坂口幸治, 斉藤博, 久保恵嗣, 杉山 広. ウエステルマン肺吸虫症の姉妹例. 第132回日本内科学会信越地方会, 長野, 2013年6月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1-2. アメリカ産肺吸虫の種同定への適用

A. 研究目的

我々が開発したミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的とするnested PCRが、アジア産肺吸虫の種同定に有用であったことから、本法がアメリカ大陸に分布する人体寄生種のケリコット肺吸虫（米国・カナダに分布）およびメキシコ肺吸虫（メキシコからペルーに至る中南米各国に分布）の同定にも適用できるのか、予備的な検討を試みた。

B. 研究方法

米国・ミズーリ州のケリコット肺吸虫流行地で本虫の中間宿主ザリガニを採集し、本虫

のメタセルカリアを分離した。また南米のエクアドル・オレリャナ県のメキシコ肺吸虫流行地で本虫の中間宿主カニを採集し、本虫のメタセルカリアを分離した。これらメタセルカリアから常法に従ってDNAを調製し、これをテンプレートに、肺吸虫の16SリボゾームDNAにユニバーサルと言われるプライマー・ペア (T7-1 および SP6-1)、更に我々が作製したプライマー・ペア (PwDTF2 および PwDTR3) を用いてPCRを行い、増幅産物が得られるかを検証した。

C. 研究結果

ケリコット肺吸虫のDNAを用いた場合、T7-1 および SP6-1 をプライマーとしたPCRでは増幅産物が得られず、PwDTF2 および PwDTR3 をプライマーとしたPCRで463 bpの増幅産物が得られた (プライマー配列を除いたPCR産物の鎖長、図1)。一方、メキシコ肺吸虫のDNAを用いた場合、T7-1 および SP6-1 をプライマーとしたPCRでは増幅産物が得られず、PwDTF2 および PwDTR3 をプライマーとしたPCRで458 bpの増幅産物が得られた (同)。

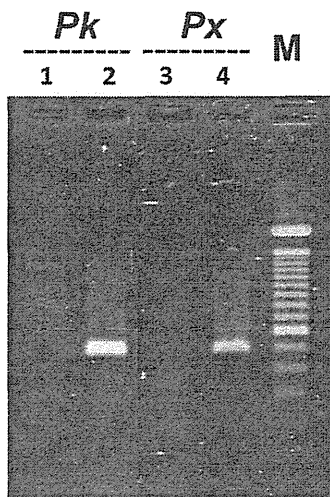


図1. ケリコット肺吸虫 (レーン1および2) およびメキシコ肺吸虫 (レーン3および4) のDNAを用いたPCR. プライマー・ペアには T7-1 および SP6-1 (レーン1および3) あるいは PwDTF2 および PwDTR3 (レーン2および4) を用いた. M はマーカー (100-bp ラダー, Invitrogen) .

D. 考察

ケリコット肺吸虫およびメキシコ肺吸虫からPCR産物を得るために、我々が作製したプライマー・ペア (PwDTF2 および PwDTR3) は極めて有用であることが明らかとなった。得られた増幅産物の配列を解読したので、今後詳細に比較検討し、ミトコンドリア・16SリボゾームDNAを標的としたPCRにより、ケリコット肺吸虫およびメキシコ肺吸虫が同定できるのか、確認したいと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

1. 国際学会
なし
2. 国内学会
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. アニサキス症の迅速診断キット開発に向けての検討

A. 研究目的

わが国では魚介類の生食が極めて一般的なため、年間に7,000件ものアニサキス症例が発生すると推定されている。患者は、食歴や症状などに基づいてアニサキス症と推定され、内視鏡下に生検鉗子で胃に穿入する虫体が摘出されて、確定診断に至る (胃アニサキス症)。一方で胃アニサキス症と強く疑われても、虫体が検出されない事例もある。このような場合には、免疫血清学的な手技が補助的な診断法として利用されてきた。すなわち、アニサ

キスの第3期幼虫（感染幼虫）由来の抗原を用いた micro-ELISA（以下、ELISA）が実施され、患者血清中の抗体（IgG 等）検出が試みられてきた。

本研究では、ELISA に代替するアニサキス症の迅速な血清診断法の確立を目途とし、イムノクロマトグラフィ法を応用した診断キット（以下、ICT キット）を作製した。この ICT キットを用いて、虫体の分子同定により原因種が明らかにされた胃アニサキス症患者の血清診断を試み、ICT キットの診断能力を検討・評価した。また、ImmunoCAP Lab Tests（Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden）による抗アニサキス IgE の測定結果が、臨床家によるアニサキス症の診断に利用されていることから、我々の症例についてもこの値を測定した。

B. 研究方法

1) 供試虫体および血清試料

感染研・寄生動物部において、依頼検査により診断が確定されたアニサキス症例の虫体および血清試料を検討に用いた（表 1）。これらの患者材料は、東京都および佐賀県に所在する医療機関より、2011年6月（症例1）から2013年10月（症例11）までの間に、提供されたものである。患者は医療機関の近隣に在住すると考えられるが、個人情報に関する詳細は不明である。また当該部で確定診断した *Crassicauda giliakiana*（旋尾線虫 X 型幼虫）の感染による症例の血清試料を比較検討に用いた。なお患者材料の使用については、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会に申請して承認を得た。

2) 虫体材料の分子同定

アニサキス症患者由来の虫体から DNA を調製し、線虫類にユニバーサルなプライマー・ペア（NC5 および NC2）を用いてリボソーム DNA の ITS 領域を増幅させ、産物の配列を解読して、原因虫種を分子同定した。

3) 抗原の調製と ICT キットの作製

東京の鮮魚店で購入した北海道産のスケト

ウダラから、アニサキス幼虫 (*Anisakis simplex sensu stricto* の第3期幼虫) を採取した。得られた虫体は滅菌生食液で洗浄後、液体培地 RPMI 1640 中で飼育・培養し（12時間、37°C、5% CO₂）、遠心後の上清を回収して分泌排泄抗原（ES 抗原）とした。この抗原を用いて ICT キットを作製した。

4) ELISA による抗体価測定と ICT キットの評価

上述の ES 抗原を使用して ELISA を行ない、全症例の抗体価を改めて測定した（吸光度で表示）。ICT キットによる抗体価の判定にあたっては、キット・デバイスの膜面にある判定ラインを肉眼で観察して、発色程度に基づいて陰性（レベル0）から強陽性（レベル8）の9段階に判別し、この数値（0～8）で各血清試料の反応強度を表現した。

5) 抗アニサキス IgE の測定

業者に委託して、各症例の抗アニサキス IgE 値を ImmunoCAP Lab Tests により測定した。測定結果は単位値（kU/L）に換算された後の数値で報告されたので、この値をもって各症例の IgE のレベルとした。なおこの値が 0.35 を超える場合に、陽性（でアニサキス症）と判定されている。

C. 研究結果

1) 検出虫体の分子同定結果

今年度に確認したアニサキス症の2例（症例10および11）は、何れも激しい腹部症状（胃痛・心窩部痛）により来院した有症事例であった。なお症例1及び症例7は、検診時・健診時の内視鏡検査で虫体が検出された無症事例である。

内視鏡検査の結果、症例9および11からは各2隻の虫体が、その他の症例からは1隻の虫体が検出された。これら合計13隻の虫体は分子同定の結果、総て *A. simplex sensu stricto* と同定された。

2) ELISA による抗体価の測定結果

アニサキス症患者の血中抗体価を ELISA に

より測定したところ、吸光度は0.006から0.435までの値を示した(表1)。

C. giliakiana (旋尾線虫X型幼虫)感染による症例の血中抗体価をELISAにより測定したところ、吸光度は0.153, 0.251および0.656であった(表2)。

表1. micro-ELISAおよびICTによる胃アニサキス症患者の血清診断結果

症例	住居地	主訴	原因種 ¹⁾	ELISA ²⁾	ICT ³⁾	RAST ⁴⁾
1	東京	無症	As	0.006	0	0.38
2	東京	腹痛	As	0.044	1	0.57
3	佐賀	腹痛	As	0.220	4	0.28
4	東京	腹痛	As	0.397	5	24.50
5	東京	腹痛	As	0.208	4	9.42
6	東京	腹痛	As	0.196	2	0.88
7	東京	無症	As	0.435	7	2.94
8	東京	腹痛	As	0.237	4	34.20
9	佐賀	腹痛	As	0.367	5	3.64
10	東京	腹痛	As	0.039	0	ND
11	佐賀	腹痛	As	0.202	4	ND

- 1) As: *Anisakis simplex* sensu stricto
- 2) 吸光度
- 3) レベル: 各血清試料の反応強度を示す。
- 4) ImmunoCAP Lab Testsによる抗アニサキスIgEの測定。RAST-アニサキス (kU/L); ND:測定せず。

表2. micro-ELISAおよびICTによる*Crassicauda giliakiana* (旋尾線虫Type I型幼虫)感染症患者の血清診断結果

症例	住居地	主訴	原因種 ¹⁾	ELISA ²⁾	ICT ³⁾	RAST ⁴⁾
12	神奈川	腹痛	Cg	0.251	3	ND
13	神奈川	爬行症	Cg	0.656	7	ND
14	大阪	爬行症	Cg	0.153	2	16.40

- 1) Cg: *Crassicauda giliakiana*
- 2) 吸光度
- 3) レベル: 各血清試料の反応強度を示す。
- 4) ImmunoCAP Lab Testsによる抗アニサキスIgEの測定。RAST-アニサキス (kU/L); ND:測定せず。

3) ICTキットによる抗体価の測定結果

アニサキス症患者の血清のレベルは0から7を示した。ICTキットの反応は、ELISAの吸光度の傾向と良く一致した(表1)。

C. giliakiana (旋尾線虫X型幼虫)感染による症例の血清のレベルは2, 3および7であった。ICTキットの反応も、アニサキス症患者の場合と同様に、ELISAの吸光度の傾向と良く一致した(表1)。

4) ImmunoCAP Lab Testsによる抗アニサキスIgEの測定結果

アニサキス症患者のIgEレベルは、0.28から34.20までの値を示したが、1例(症例3, 0.28)を除き、いずれも陽性レベルとされる0.35を超えた。しかしながらこの値とELISAやICTキットにより得られた値との間には、相関する関係はないと考えられた。なお、*C. giliakiana* (旋尾線虫X型幼虫)感染による症例も、1例だけではあるがIgEレベルを測定したところ、16.40と高い値を得た(表2)。

D. 考察

本研究の結果、ICTキットの反応とELISAの結果とは、良く一致する傾向があることが分かった。従って、ELISAによる抗体価測定に代替させて、ICTキットが使用できるのではないかと考えられた。

その一方で、*C. giliakiana*による症例の血清を用いた場合も、ICTキットの反応はELISAの結果と良く一致した。中には、アニサキス症患者の値と同等値(レベル7)、あるいは更に高値(吸光度0.656)を示す症例が含まれていたことから、我々が作製したICTキットは、特異性の観点から改良が必要かと考えられた。

これに加えて、ImmunoCAP Lab Testsによる抗アニサキスIgEの測定結果は、ELISAやICTキットにより得られた値との間に、相関する関係を示さなかった。ただし*C. giliakiana* (旋尾線虫X型幼虫)感染による1症例でIgEレベルが相当に高いなど、ImmunoCAP Lab Testsもアニサキス症の診断に置いて、絶対的ではないと考えられた。

アニサキス症の血清診断が真に必要なのは、胃アニサキス症ではなく、腸アニサキス症および消化管外アニサキス症と考えられる。更にアニサキス・アレルギーの場合も、血清診断が重要であることは論を待たない。これらの患者血清を入手して一層の検討を加え、アニサキス症の血清診断に関する具体的方法は速やかに確立し、更にICTキットのデバイスを作製すべきであろうと考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

1. 国際学会

1. Sugiyama, H., Morishima, Y.,
Umehara, A., Kawakami, Y., Ohmae, H.,
Yamasaki, H. Identification of anisakid
nematode species in clinical specimens
by using nested polymerase chain
reaction. Joint International Tropical
Medicine Meeting 2013, Bangkok,
December 11-13, 2013.

2. 国内学会

1. 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 八木
田健司, 大前比呂思. 寄生虫による食中毒の
届出に関わる法改正. 第34回衛生微生物技術
協議・レファレンス会議, 名古屋, 2013年7
月12日.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし