

裂頭条虫の簡易分子同定法について

坪川大悟¹⁾, 生野 博²⁾, 武井勝明²⁾, 中村 健¹⁾, 山崎 浩³⁾

¹⁾ 北里大学医学部寄生虫学

²⁾ 株式会社ビー・エム・エル細菌検査部

³⁾ 国立感染症研究所寄生動物部

Key Words : *Diphyllobothrium*, broad tapeworm, molecular diagnosis, RFLP

はじめに

本邦ではサケ・マスの生食に起因する裂頭条虫症は全国で見られ、近年、その報告は増加傾向にある¹⁾。その原因種のほとんどは日本海裂頭条虫であるが^{1,2)}、まれに、輸入症例として広節裂頭条虫症の報告もある³⁾。裂頭条虫は種類によっては形態が酷似するために、種を正確に同定するにはDNA解析による分子同定が不可欠である。これまでに裂頭条虫種の分子同定法として、エタノール固定標本から調製したDNAをstarting materialsとしたDNAシーケンシング法⁴⁾やmultiplex PCR法⁵⁾が確立されている。また、ホルマリン固定標本由来のDNAを材料としたDNAシーケンシング法⁶⁾も報告されている。本研究では、ホル

マリン固定の裂頭条虫を対象に、DNAシーケンシング法に替わるより簡便なPCR増幅産物の制限酵素切断パターン解析法を確立したので、考察を加えて報告する。

材料および方法

研究に用いた裂頭条虫は、平成24年から平成25年の2年間に、種の鑑別目的で全国の医療機関から(株)ビー・エム・エルに送付されたホルマリン固定標本77検体であり、内訳は、平成24年47検体(男性34名、女性12名、不明1名)と平成25年30検体(男性11名、女性18名、不明1名)である。患者の年齢分布は20代から40代が46例と全体の約6割を占めた。症例患者の居住地

Molecular identification of human *Diphyllobothrium* species based on PCR-RFLP

Daigo Tsubokawa¹⁾, Hiroshi Ikuno²⁾, Katsuaki Takei²⁾, Takeshi Nakamura¹⁾, Hiroshi Yamasaki³⁾

¹⁾ Department of Parasitology, Kitasato University School of Medicine

²⁾ Department of Bacteriology, BML Inc.

³⁾ Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

論文請求先: 坪川大悟 〒252-0374 相模原市南区北里1-15-1 北里大学医学部寄生虫学

は関東が29例と最も多く、次いで北海道(15例)、中部(14例)、近畿(12例)、東北(3例)、九州(2例)の順であった。

分子同定用のゲノムDNAは、10%ホルマリンで固定された虫体(1片節程度)からDNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)を用いて抽出し、ミトコンドリアゲノムでコードされるcytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) 遺伝子断片(249 bp)をPCRによって増幅した。用いたプライマーは、日本海裂頭条虫のcox1 遺伝子の880~1128の領域の塩基配列に基づいてデザインしたもので、forward primer (5'-ACAGTGGGTTTAGATGTAAAGACGG C-3')とreverse primer (5'-AGCTACAACAAACC AAGTATCATG-3')である⁶⁾。また、ホルマリン固定標本由来のDNAを効率的に増幅するKOD FX DNA polymerase (東洋紡)を用いた。cox1 遺伝子の880~1128(249bp)の領域を増幅した理由は、データベースに多く登録されている733~1128の領域では増幅産物の大きさが396 bpとな

り、ホルマリン固定標本由来のDNAでは増幅が困難であるためである。さらに、PCR増幅産物は、図1で示したように種特有の制限酵素切断部位を有することから、restriction fragment length polymorphism (RFLP)による切断パターンを解析した。

結果および考察

被検材料77検体中75検体で249 bpのcox1 遺伝子断片がPCRによって増幅された。増幅されなかった2検体は、ホルマリン固定によるDNA損傷が原因と考えられた。増幅産物の大きさを249 bpから183 bp(946~1128の領域)に短くすることによって1検体(#6)は増幅が確認された。そこで、PCRで増幅された76検体についてRFLP解析を行い、結果の一部を図2に示した。76検体は全てBspHIで切断されたが(図2)、AgeIでは切断されなかったことから、検査した虫体は全て日本海裂頭条虫 *Diphyllobothrium nihonkaiense* と

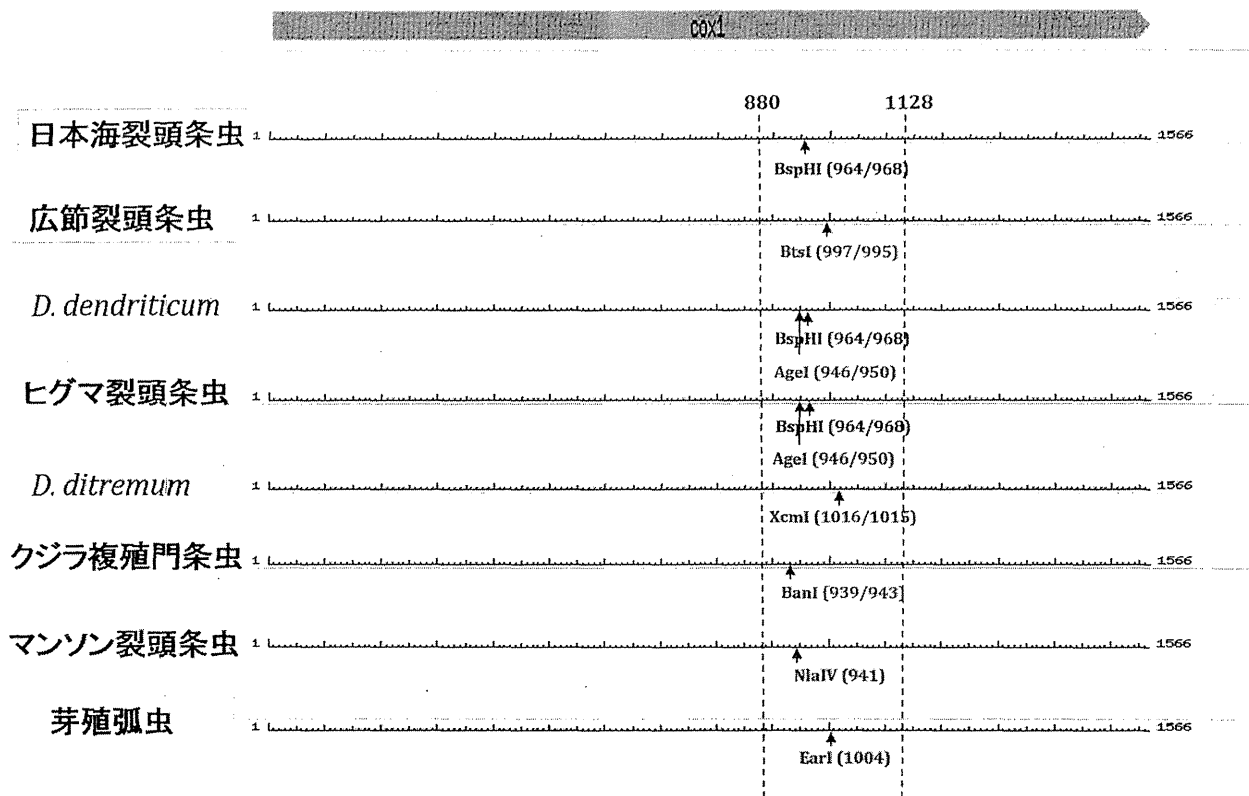


図1 裂頭条虫科の条虫類のcox1 遺伝子の増幅領域と制限酵素サイト

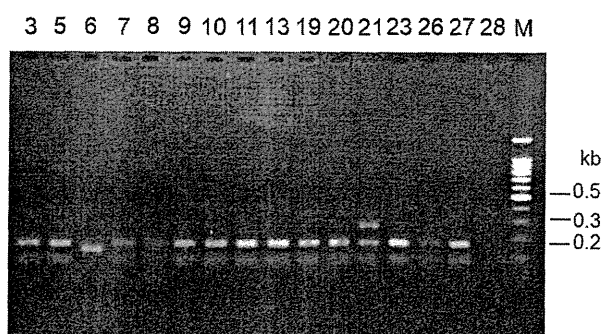


図2 PCR増幅産物の制限酵素BspHIによる切断パターン。
検体6は183 bp, その他は249 bpのcox1遺伝子断片。

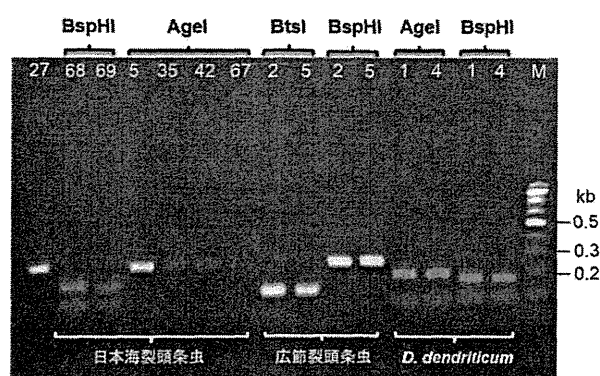


図3 RFLP解析による裂頭条虫3種の種鑑別

同定された。広節裂頭条虫の場合には、BspHIでは消化されず、BstIで消化され、*Diphyllobothrium dendriticum* の場合には、BspHIとAgeI両方で切断され、日本海裂頭条虫とは異なる切断パターンを示したことから種の鑑別は容易であった(図3)。このRFLPによる結果はDNAシーケンス解析による鑑別結果とも一致したことを確認した。

わが国では、日本海裂頭条虫以外に、クジラ複殖門条虫*Diplogonoporus balaenopterae*やマンソン裂頭条虫*Spirometra erinaceieuropaei*による感染例もあり、本研究で用いたプライマーペアは、これらの種でも249 bpのcox1遺伝子断片が増幅された(データ未提示)。従って、裂頭条虫と思われ

た検体であれば、このプライマーペアによる増幅を試み、その後、可能性の高い種に特有の制限酵素処理を試みることで鑑別できることが判明した。

DNA解析に基づいた裂頭条虫の正確な種同定は、より信頼性の高い疫学的情報の蓄積に不可欠である。そのために、分子同定法が確立されているが^{4,6)}、これらの多くはエタノール固定標本由来のDNAを用いた方法である。本研究で確立した方法は、ホルマリン、あるいはエタノール固定標本を問わず、いずれの標本から調製したDNAにも適用可能であり、簡便な種の鑑別法と考えられる。

文献

- 1) 有菌直樹, 他(2011): 裂頭条虫症をめぐる諸課題. 臨床と微生物, 38, 366-369.
- 2) 山崎 浩(2013): 食品による寄生動物感染症 8 蠕虫感染症(3) 条虫. 防菌防黴, 41, 227-236.
- 3) 山田 稔, 他(2011): 京都における日本海裂頭条虫症の発生状況の解析と輸入広節裂頭条虫症例について. Clin Parasitol, 22, 79-81.
- 4) Yamasaki H, et al. (2009): A case of *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection possibly linked to salmon consumption in New Zealand. Parasitol Res, 105, 583-586.
- 5) Wicht B, et al. (2010): Multiplex PCR for differential identification of broad tapeworms (Cestoda: *Diphyllobothrium*) infecting humans. J Clin Microbiol, 48, 3111-3116.
- 6) 村田知香代, 他(2007): 裂頭条虫症の1例. Clin Parasitol, 18:69-71.

ミトコンドリア DNA 解析に基づいた裂頭条虫類の簡易同定法

山崎 浩¹⁾, 坪川大悟²⁾, Mercado Rubén³⁾, 倉持利明⁴⁾

- 1) 国立感染症研究所寄生動物部第二室 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
- 2) 北里大学医学部寄生虫学 〒252-0374 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1
- 3) チリ大学医学部寄生虫学教室 Av. Las Palmeras 299, Santiago, Chile
- 4) 国立科学博物館動物研究部 〒305-0005 茨城県つくば市天久保 4-1-1

【抄録】本邦で発生する裂頭条虫症のほとんどはサケ・マスの生食に起因する日本海裂頭条虫症であるが、輸入症例として広節裂頭条虫症も報告されている。その原因種である裂頭条虫類は形態が類似し、分類が困難であるため、近年では DNA 解析に基づいた種々の分子同定法が確立されている。ここでは、ホルマリン固定標本にも適用できる裂頭条虫類の種同定を目的とした簡便な方法を紹介する。

キーワード；日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、*Diphyllobothrium dendriticum*、ミトコンドリア DNA、制限酵素切断パターン

A simple method for identifying the diphyllbothriids based on mitochondrial DNA analysis

Hiroshi Yamasaki¹⁾, Daigo Tsubokawa²⁾, Rubén Mercado³⁾, Toshiaki Kuramochi⁴⁾

- 1) Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan
- 2) Department of Parasitology, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0374, Japan
- 3) Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Chile, Av. Las Palmeras 299, Int. Parque Quinta Normal, Santiago, Chile
- 4) Department of Zoology, National Museum of Nature and Science, 4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

Abstract: Diphyllbothriasis occurring in Japan is extensively due to the infection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* associated with the consumption of raw or undercooked salmon. However, rarely, imported cases infected with *Diphyllobothrium latum* have also been reported. The identification of the causative diphyllbothriid cestodes is difficult due to their morphological similarities, so that molecular identification has recently been performed. Here we describe a simple method for identifying the diphyllbothriid cestodes based on the mitochondrial DNA analysis.

Key Words: *Diphyllobothrium nihonkaiense*, *Diphyllobothrium latum*, *Diphyllobothrium dendriticum*, mitochondrial DNA, RFLP

【はじめに】

わが国で発生する裂頭条虫症のほとんどはサケ・マスの生食に起因する日本海裂頭条虫 (*Diphyllobothrium nihonkaiense*) によるが、まれに、広節裂頭条虫 (*Diphyllobothrium latum*) による輸入症例や太平洋裂頭条虫 (*Diphyllobothrium pacificum*) などによる感染事例が報告されている¹⁻³⁾。

裂頭条虫類は形態が互いに酷似するために形態に基づいた分類は困難である。そこで、近年では、DNA 解析に基づいた種々の分子同定法が確立されている³⁻⁸⁾。本研究では、ヒト寄生裂頭条虫のうち、わが国で症例の多い日本海裂頭条虫を中心に、広節裂頭条虫や *Diphyllobothrium dendriticum* との種の鑑別を目的とした簡便な方法を紹介する。

【材料と方法】

1. 検査材料

検査材料は図 1 に示したように、裂頭条虫の成虫と幼虫(プレロセルコイド)である。日本海裂頭条虫の成虫は国立感染症研究所寄生動物部、または(株)BML に同定目的で送付された虫体で、全て日本人感染者から得られたものである。広節裂頭条虫の成虫はチリ人感染者から得られた虫体である⁷⁾。また、広節裂頭条虫と *D. dendriticum* のプレロセルコイドは南米チリに棲息するニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) やギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) から採取したものである。図示したように、成虫、プレロセルコイドとも形態で同定することは難しい。虫体はいずれも採取後、PBS で洗浄し、70% エタノール、または 10%ホルマリンで固定し、

DNA 調製時まで保存した。

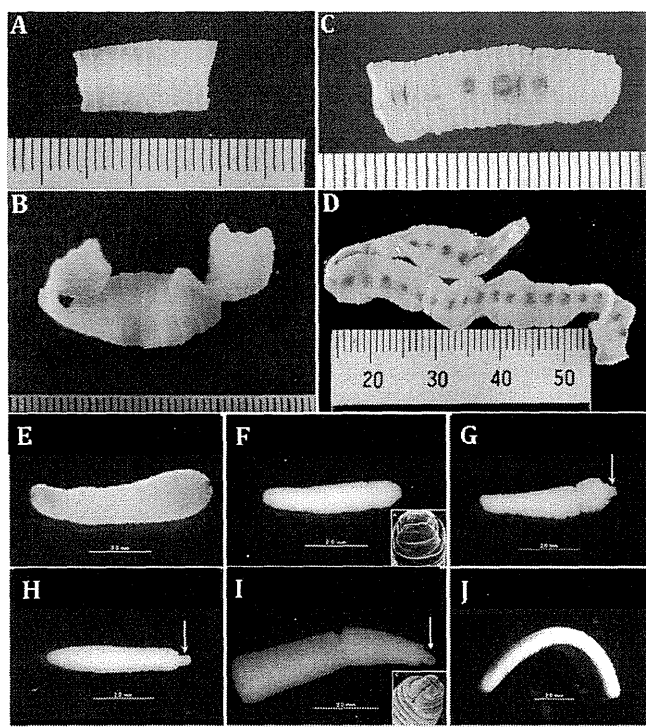


図 1. 検査に用いた裂頭条虫成虫とプレロセルコイド. 日本海裂頭条虫(A,B), 広節裂頭条虫(C-G), *D. dendriticum* (H-J). プレロセルコイドでは、頭節が突出するか、陥没するかでは種の同定は困難。

2. 分子同定

エタノール固定、あるいはホルマリン固定された虫体のゲノム DNA は、成虫の場合 1 片節程度(可溶化しやすいように細切する)、プレロセルコイドは 1 隻から、市販のキット(DNeasy Blood & Tissue kit, Qiagen)を用いて調製した。標的遺伝子はミトコンドリアゲノムでコードされる cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝子(以下、*cox1*)とした⁴⁾。ホルマリン固定材料では DNA が分解されているので、PCR 産物の大きさが 250 bp 程度になるようにプライマーを設計した。増幅領域は裂頭条虫類の *cox1* 遺伝子(全長 1,566 bp)の 880~1128 の領域で、裂頭条虫の種間で比較的相同性の高い領域である⁶⁾。その配列は forward primer (5'-ACAGTGGGTTTAGATGTAAAGACGGC-3')、reverse primer (5'-AGCTACAACAAACCAAGTATCATG-3')である。エタノール固定材料由来のゲノム DNA を鋳型として PCR を行う場合には、DNA polymerase は *TaKaRa Ex Taq*, Hot Start version(タカラバイオ)を用いた。PCR は、94°C、30 sec、58°C、30 sec、72°C、1 min、35 cycles + 72°C、5 min、1 cycle を基本とした⁴⁾。一方、ホルマリン固定材料のゲノム DNA を用いる場合には、増幅効率のよい KOD FX DNA polymerase (東洋紡)を用いた⁷⁾。

図 2 は裂頭条虫科(Diphyllobothriidae)条虫の *cox1* 遺伝子における種特異的な 1 cutter の

制限酵素切断部位を示したものである。種の同定は PCR によって増幅された *cox1* 遺伝子断片(249 bp)が図 2 に示した制限酵素のいずれかで、切断されるか否か(restriction fragment length polymorphism, RFLP)によって鑑別した。

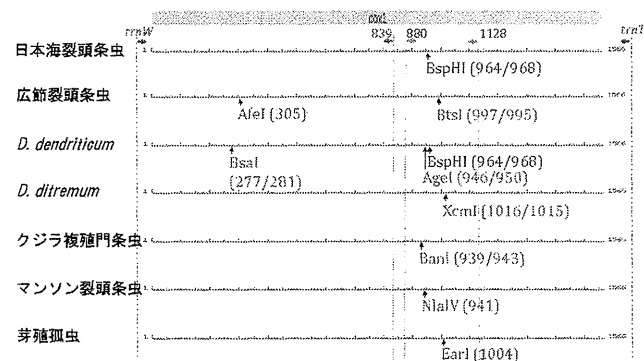


図 2. 裂頭条虫科条虫 *cox1* 遺伝子における種特異的な制限酵素の切断部位。

【結果と考察】

図 3 には日本人 31 名から得られた裂頭条虫の RFLP 解析結果を示している。BspHI 処理によって PCR 産物が 2 つの断片に切断されたことから、これらの裂頭条虫は全て日本海裂頭条虫と同定された。

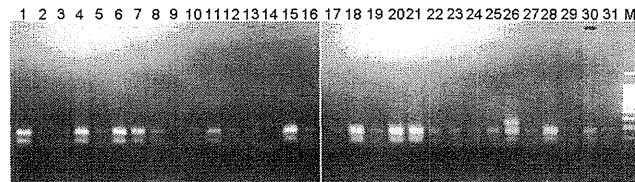
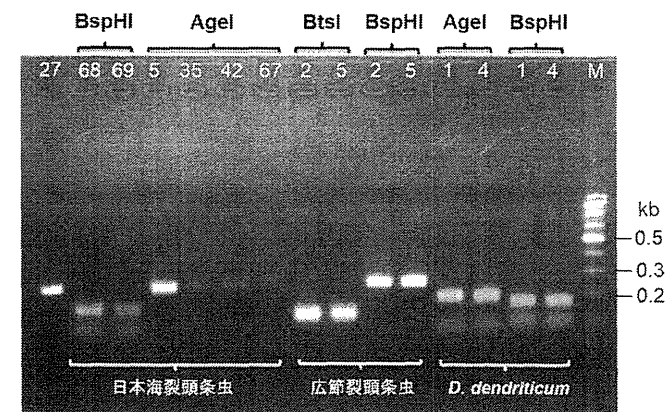


図 3. BspHI 消化による日本海裂頭条虫の解析例。

さらに、これらの日本海裂頭条虫が *D. dendriticum* でないことは、AgeI を用いた RFLP 解析でも確認された(図 4, レーン 5, 35, 42, 67)。

図 4. ヒト寄生裂頭条虫 3 種の RFLP 解析例



(文献⁸⁾から転載)。

一方、広節裂頭条虫の場合には、BspHI で消化され、BspHI では消化されない(図 4, レーン 2, 5)。また、*D. dendriticum* の場合には、BspHI と AgeI 両方で切断されることから(図 4, レーン 1, 4)、3 種の裂頭条虫は容易に鑑別することができた。この RFLP による同定結果は *cox1* 遺伝子の塩基配列解析による結果と当然一致した。これらの結果の詳細は末尾の文献⁸⁾を参照されたい。

また、エタノール固定材料から調製したゲノム DNA を用いる場合、図 2 に示した *trnW* 遺伝子と *trnT* 遺伝子のプライマーペア、*trnW/F*(5'-CACTAAGTGATGTAAGGTCATTTGATG-3') と *trnT/R*(5'-AGTATTCTAATTAACCTATAAAGC-3')による *cox1* 遺伝子全長 (~1.7 kb, 図 5A,B)、あるいは *trnW/F* と *cox1/R*(5'-ATAGAAAACATAGCAAATAAAYAACCC-3')の組合せによる 5'側の約 900 bp (図 5C)を増幅することができる。その場合にも、BspHI、AfeI、AgeI、あるいは BsaI で消化することによって種の同定が可能である。

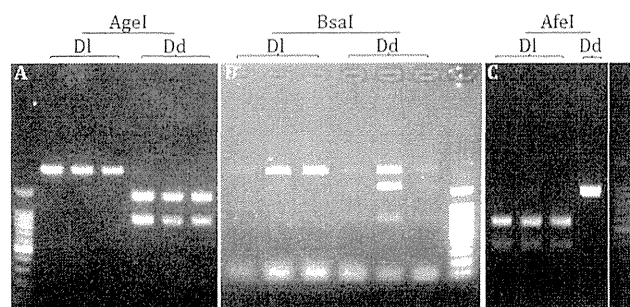


図 5. *cox1* 遺伝子の全長、または 5'側領域を用いた RFLP 解析例。広節裂頭条虫は AgeI や BsaI では切断はされないが、AfeI では切断される。*D. dendriticum* は AgeI や BsaI で消化されるが、AfeI では切断されない。DI, 広節裂頭条虫; Dd *D. dendriticum*。

本研究で用いたプライマーペアは日本海裂頭条虫や広節裂頭条虫など *Diphyllobothrium* 属の他に、クジラ複殖門条虫(*Diplogonoporus balaenopterae*) や マンソン裂頭条虫(*Spirometra erinaceieuropaei*)、さらにはテニア科条虫の無鉤条虫(*Taenia saginata*)や有鉤条虫(*Taenia solium*)の *cox1* 遺伝子増幅にも適用可能なので(データ未提示)、このプライマーペアを用いて増幅を試み、その後、制限酵素処理を行うことで鑑別できる。

[おわりに]

裂頭条虫に限らず、DNA 解析に基づいた寄生虫の種同定は診断のみならず、信頼性の高い疫学的情報の蓄積にも重要である。本研究で確立した方法は、ホルマリン、あるいはエタノール固定を問わず、簡便な裂頭条虫種の鑑別法と言える。

[謝辞]

日本海裂頭条虫の材料を多数ご提供いただ

いた(株)ビー・エム・エル 細菌検査部の生野 博氏に深謝する。

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤 B 海外学術調査(平成 23~25 年度, 23406010)、ならびに厚生労働省科学研究費補助金「新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業」(H23-新興-一般-014)、ならびに平成 26 年度厚生労働科学研究委託費「新興・再興感染症に対する革新的医薬品など開発推進研究事業」(H26-新興実用化-一般-009)により行われた。

[文献]

- 1) Arizono N, Yamada M, Nakamura-Uchiyama F, *et al.* Diphyllbothriasis associated with eating raw Pacific salmon. *Emerg Infect Dis*, 15:866-870, 2009
- 2) 山崎 浩. 食品による寄生動物感染症 8 蠕虫感染症(3) 条虫. 防菌防黴, 41:227-236, 2013
- 3) 山田 稔, 大西弘太郎, 手越達也, 他. 京都における日本海裂頭条虫症の発生状況の解析と輸入広節裂頭条虫症例について. *Clin Parasitol*, 22:79-81, 2011
- 4) Yamasaki H, Kuramochi T. A case of *Diphyllobothrium nihonkaiense* infection possibly linked to salmon consumption in New Zealand. *Parasitol Res*, 105:583-586, 2009
- 5) Wicht B, Yanagida T, Scholtz T, *et al.* Multiplex PCR for differential identification of broad tapeworms (Cestoda: *Diphyllobothrium*) infecting humans. *J Clin Microbiol*, 48:3111-3116, 2010
- 6) 村田知香代, 猪浦一人, 鈴木光江, 他. 裂頭条虫症の 1 例. *Clin Parasitol*, 18:69-71, 2007
- 7) Mercado R, Yamasaki H, Kato M, *et al.* Molecular identification of the *Diphyllobothrium* species causing diphyllbothriasis in Chilean patients. *Parasitol Res*, 106:995-1000, 2010
- 8) 坪川大悟, 生野 博, 武井勝明, 他. 裂頭条虫の簡易分子同定法について. *Clin Parasitol*, 25:89-91, 2014

ホルマリン固定パラフィン包埋切片内に検出された寄生虫の分子同定

山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広

国立感染症研究所寄生動物部第二室 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

[抄録] 病理組織標本中に虫体断端や寄生虫と鑑別を要する組織が見出されることがあるが、その形態的所見によって正確に寄生虫種を同定することは困難である。そこで、病理組織標本中の虫体を DNA 解析に基づいて分子同定する方法とその実例を紹介する。

キーワード; ホルマリン固定パラフィン包埋切片、寄生虫、分子同定

Molecular identification of etiologic parasites detected in formalin-fixed paraffin-embedded specimens

Hiroshi Yamasaki, Yasuyuki Morishima, Hiromu Sugiyama

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Abstract: Molecular techniques for identifying causative parasites detected in formalin-fixed paraffin-embedded specimens and the selected examples are introduced.

Key Words: formalin-fixed paraffin-embedded specimens, parasites, molecular identification

[はじめに]

生検材料の病理組織切片中に寄生虫の断端や原虫、あるいは寄生虫か否か鑑別を要する構造物が見出されることがある。その組織所見から寄生虫種を同定することは確定診断や治療に重要であるが¹⁾、正確に寄生虫種を同定することが困難なこともある。そこで、ホルマリン固定パラフィン包埋切片標本中に見いだされた寄生虫を同定するにあたり、著者らが最近、実際に分子診断した例を紹介する。

[材料と方法]

1. 検査材料

検査材料は病理組織標本作製のために 10%ホルマリンで固定され、パラフィン包埋切片がスライドガラス上に貼り付けられた無染色標本、あるいは酢酸カーミン染色された圧平標本や HE 染色標本を用いた。切片の厚さは通常 4~5 μm であるが、10 μm の切片も用いてもいい。無染色切片の虫体断端から DNA を調製する際、必要な切片数は虫体組織の大きさにもよ

るが、5 枚程度あれば十分である。アニサキスや顎口虫など線虫類では 1 枚の切片でも解析に必要な DNA 量は調製可能である。

また、無染色切片だと虫体部位の特定が困難なので、同一切片を HE 染色しておくこと、虫体部位を特定しやすい。言うまでもないが、カバーガラスで組織がマウントされている標本から DNA を調製する場合は、予め 60°C 程度に温めたキシレンにプレパラートを浸漬して包埋剤を融解し、カバーガラスを外しておく。

2. 分子同定

無染色切片から DNA を抽出するには、まず、染色標本を参考に虫体部位を特定する。部位が特定されたら、その部分を取り囲むようにスライドガラスの反対側の面に油性マーカーでマークする。切片から DNA を抽出するには複数のキットが市販されているが、著者らは無染色切片用には DEXPAT(タカラバイオ)、染色標本には DNA Isolator PS kit (和光純薬)や 0.05 N NaOH²⁾、あるいは SDS/proteinase K 溶液を

用いている。

DEXPAT はキシレンでパラフィンを除去する必要がなく、操作が簡便である。DNA 抽出に必要な DEXPAT 量は掻き取る組織の大きさに応じて多少加減する。虫体部位の上に DEXPAT 液をのせ、滅菌チップの先端で組織を掻き取り、エッペンチューブに移す。DEXPAT には PCR を阻害する inhibitor 吸着用の樹脂が含まれているが、樹脂とともに組織を回収する。その後、100°C で 15~60 分間、組織を可溶化させる(完全には可溶化しない)。遠心後、上から固化したパラフィン層、DNA を含む中間層、樹脂と未消化組織を含む沈査の 3 層に分かれるので、DNA を含む中間層を回収し、鋳型 DNA として用いる。得られた DNA は微量なので、エタ沈メイト(和光純薬)などで DNA を濃縮してもよい。また、最初の切片を掻き取るのに用いた DEXPAT 液を 2 つ目の切片上に移し、その液で組織を掻き取るようにすると、DEXPAT の増加による DNA 濃度の低下が避けられる。

検査の標的遺伝子は寄生虫の種によって異なる。DNA データベースに多く登録されている遺伝子を選ぶことは当然である。著者らは、ミトコンドリアゲノムでコードされる cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝子(以下、*cox1*)や核 DNA の ITS 領域などを対象としている。PCR によって増幅される遺伝子の大きさは、ホルマリン固定による DNA の分解を考慮して、増幅産物の大きさが 150~300 bp になるようプライマーを設計している。400~450 bp でも増幅できる場合も経験しているが、300 bp 以下が無難である。

PCR 増幅には、増幅効率のよい KOD FX DNA polymerase (東洋紡)を用いている。PCR の基本プロトコルは、94°C 30 s、58°C 30 s、72°C、1 min、35 cycles plus 72°C 5 min、1 cycle で行っているが、寄生虫ごとに最適条件を決める必要がある。また、1 回目の PCR で増幅産物が確認できない場合には、その PCR 反応液を鋳型として nested PCR を行うなどの工夫が必要である。nested PCR でも増幅産物が検出されない場合、その可能性として、i) その組織は寄生虫ではない、ii) 増幅産物のサイズが大きすぎる、iii) DNA が抽出されていないなどが考えられる。そこで、ii) の可能性を排除するには、増幅産物のサイズをより短くするよう工夫する(最低でも 100~150 bp)。また、iii) の可能性を排除するために、法医学で汎用され

ている TH01 locus と呼ばれる遺伝子²⁾をコントロールとして用いている。TH01 locus はヒトの第 11 番染色体にある tyrosine hydroxylase 遺伝子内にある AATG の 4 塩基からなる反復配列で、その反復数に個人差がある。両親で反復数が異なることが多いので、その PCR 産物(約 180 bp) は 12%ポリアクリルアミドゲルでは 2 本のバンドとして、2%アガロースゲルでは 1 本のバンドとして確認される。増幅に用いるプライマーペアは TH01F(5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3') と TH01R(5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3')で、PCR は 25 μL の系で、human genomic DNA (白血球由来) 1 μL、各プライマー 0.5 μL、DNA polymerase として *TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* (タカラバイオ) 0.5 μL、反応は 94°C 1 min、60°C 30 sec、72°C 30 sec、30 cycles で行う。TH01 の増幅が確認できれば、DNA 調製の問題は排除できる。

PCR による標的遺伝子が増幅された後、種の同定は、増幅産物の塩基配列の相同性検索、分子系統解析、あるいは制限酵素による切断パターン(RFLP)解析などによって行う。以下に示す 8 症例における PCR プロトコルの詳細と同定法は末尾の文献を参照されたい。

[結果と考察]

パラフィン包埋切片から抽出された DNA を用いて種同定された最近の実例を以下に示す。

症例 1 : 患者は日本人男性。南米ペルーを旅行中、現地で生魚を使った郷土料理「セビツェ」を喫食し、帰国後、右下肢に軽度の圧痛を伴う移動性線状爬行疹が出現と消長を繰り返した。生検組織標本中に体表面の皮棘や大きな側索を有する顎口虫幼虫の断端が認められた(図 1)。そこで、顎口虫の種を同定するために、切片 1 枚から種鑑別用の *cox1* 遺伝子の 2 領域(201 bp, 300 bp)と ITS-2 領域(300 bp)の PCR 増幅を試みた。その結果、1 回目の PCR でそれぞれの DNA 断片が増幅され、増幅産物の塩基配列解析に基づいたホモロジー検索と分子系統解析から、本虫体は南米に分布する二核顎口虫(*Gnathostoma binucleatum*)と同定され(図 2)、本邦初の確定症例として報告した³⁾。

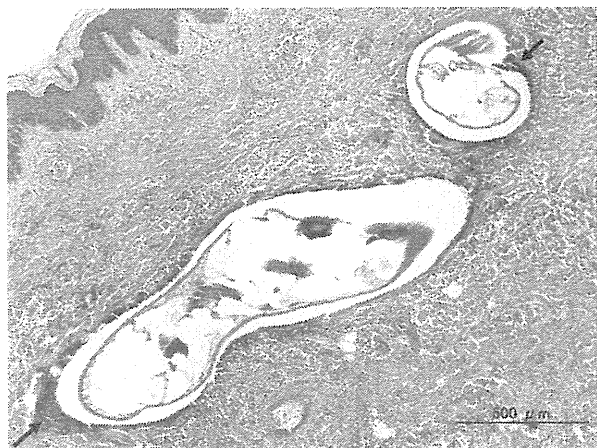


図 1. 右下肢腓腹部の生検組織中に検出された顎口虫幼虫の断端。

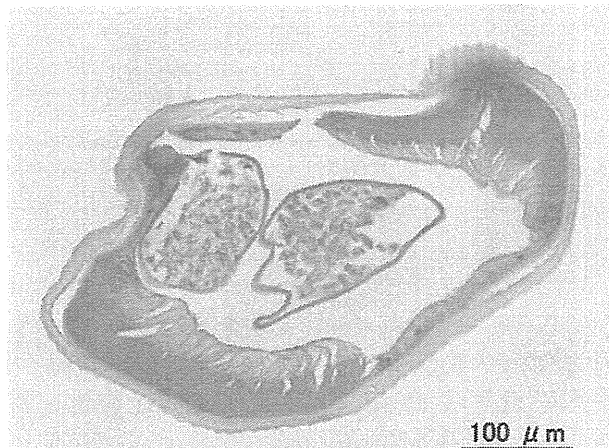


図 3. 摘出された *Dirofilaria* 属線虫の断端。

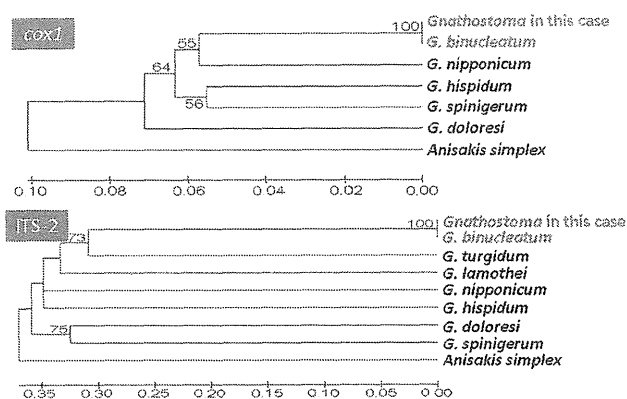


図 2. *Cox1* 遺伝子ならびに ITS-2 領域の塩基配列に基づいた分子系統解析。

症例 2 : 患者は関東在住の 84 歳、日本人女性。右眼窩下の皮下結節から虫体が摘出された。その組織標本の所見として、体表に規則正しく配列する小さな external longitudinal ridge が観察され、さらに厚い隔壁で囲まれた子宮を有することから *Dirofilaria repens* の雌成虫ではないかと考えられた(図 3)。

そこで、種を同定するために虫体切片から DNA を抽出し、*cox1* 遺伝子内の 2 領域を PCR で増幅し(148 bp と 151 bp)、その塩基配列を解析した。その結果、本虫体はアルバニアやイタリアから報告されている *D. repens* の *cox1* 遺伝子と 97% 以上の高い相同性が認められたことから *D. repens* と同定された(図 4)。

(151 bp)
 JPN: TTTATTGATGGTTTATCAGTCTTT
 ALB: **G**A*****A*****
 ITA: **G**A*****A*****
 (148 bp)
 JPN: TAATCCTTTATTGTATCAACATTTGT ...
 ALB: *****G*****G*****
 ITA: *****G*****G*****

JPN, 本症例; ALB, アルバニア産; ITA, イタリア産。

図 4. *Cox1* 遺伝子 2 領域の塩基配列の比較。

本虫感染による人体症例は欧州、アジアを中心に世界で約 400 例報告されているが、本症例は日本国内では初の確定例として報告した 4)。

症例 3 : 患者は 28 歳、トルコ人男性。右結膜部から虫体が摘出された。体表の external longitudinal ridge の形態などから動物寄生性のオンコセルカが疑われた(図 5)。そこで、パラフィン切片から DNA を抽出し、*cox1* 遺伝子断片 (199 bp) と NADH dehydrogenase subunit 5 遺伝子断片(229 bp)の塩基配列を解析した。その分子系統解析から、本虫体は *Onchocerca lupi* と同定された(図 6)。

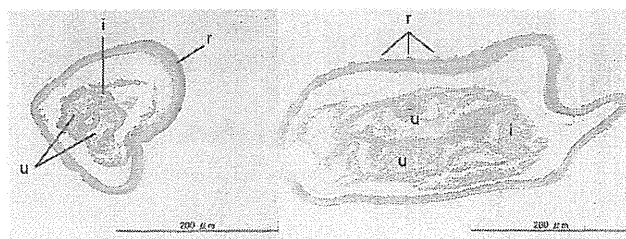


図 5. 摘出された虫体断端。 i, intestine; r, external longitudinal ridge; u, uterus.

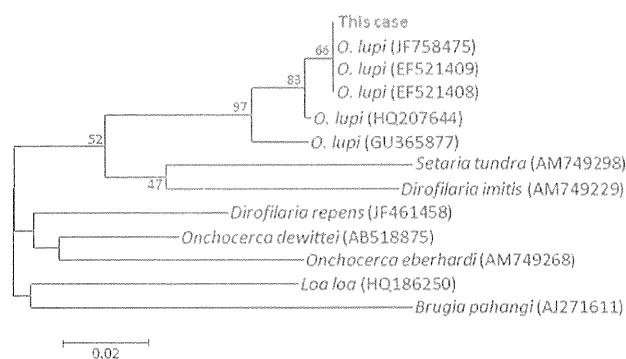


図 6. *Cox1* 遺伝子に基づいた分子系統解析. 本症例の虫体は *O. lupi* と同じ clade に含まれた.

本虫による人体寄生例は極めて少なく、世界で 3 例目の確定症例として報告した⁵⁾.

症例 4 : 患者は中部圏在住の 59 歳、日本人男性。扼絞性イレウスが疑われ、開腹手術によって小腸の病巣部が摘出された。その病理組織内に検出された虫体はその形態からアニサキス亜科幼虫であることが示唆されたが(図 7)、種の同定には至らなかった。そこで、この組織切片から DNA を調製し、ITS-1 領域(172 bp)を増幅し、増幅産物の RFLP 解析と塩基配列解析を行った。RFLP 解析では、本虫体は *HinfI* で切断されず、また塩基配列解析から 102 と 118 番目の塩基がともに thymine であったことから、*Anisakis simplex sensu stricto* と同定された(図 8)⁶⁾。

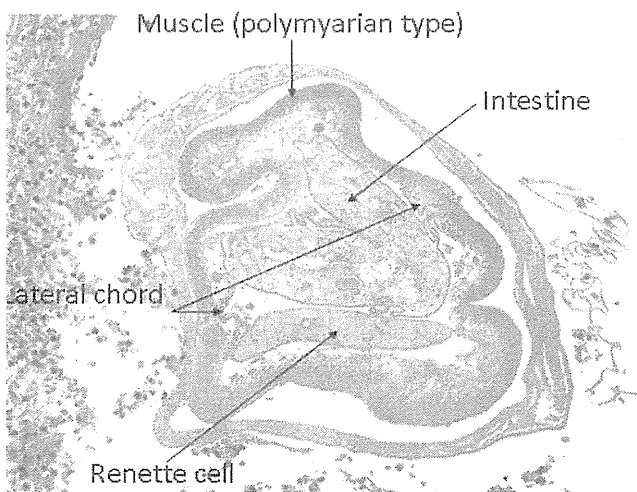


図 7. アニサキス亜科幼虫の断端.

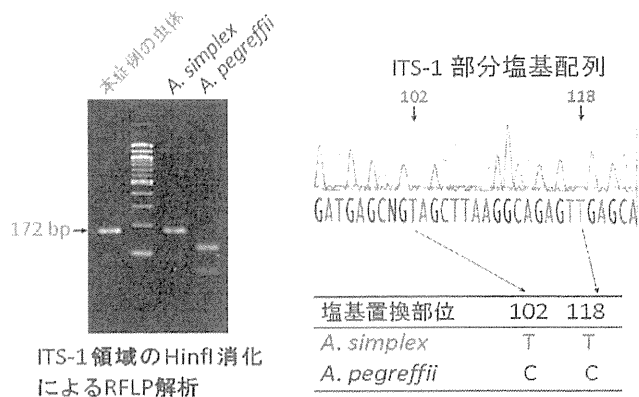


図 8. ITS 領域の RFLP 解析と塩基配列.

A. simplex sensu stricto の ITS-1 は *HinfI* で切断されない。一方、*A. pegreffii* では切断される。なお、102 と 118 番目の塩基が C または T の double peak となる hybrid genotype と呼ばれる個体も見いだされる。

症例 5 : 患者は 37 歳、タイ人男性。1995 年に開胸手術によって摘出された肺病巣内に条虫の幼虫(孤虫)が検出され、当時は芽殖孤虫(*Sparganum proliferum*)が疑われた(図 9)⁷⁾。2011 年、保存されていたパラフィンブロックから切片を作成し、*cox1* 遺伝子の 2 領域を PCR で増幅し(151 bp、156 bp)、その塩基配列解析を行った。その結果、マンソン裂頭条虫(*Spirometra erinaceieuropaei*)に対する相同性が 97.0~98.1%、一方、芽殖孤虫とは 86.7~89.0%の相同性であったことから、本虫体はマンソン裂頭条虫と同定された(表 1)⁸⁾。

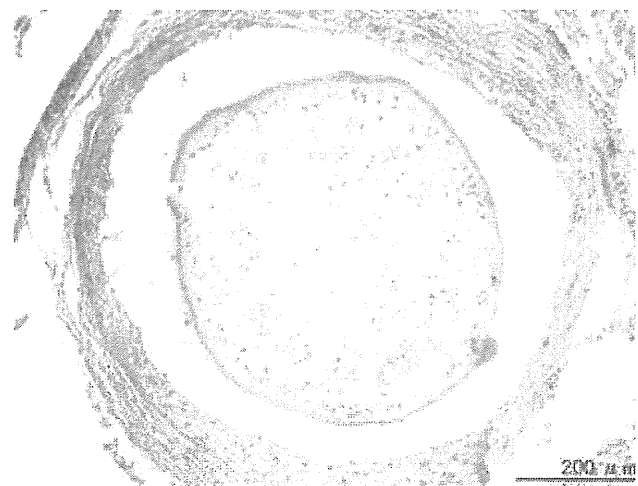


図 9. 肺病巣部に検出された孤虫の断端.

表 1. *Cox1* 遺伝子 2 領域の相同性の比較

worm	<i>Cox1</i> sequence homology against			
	<i>S. erinaceieuropaei</i>		<i>S. proliferum</i>	
region of <i>cox1</i>	650-800	965-1120	650-800	965-1120
percentage	97.0%	98.1%	89.0%	86.7%

症例 6：患者は 53 歳、沖縄在住の日本人男性。右前頭葉から 6~7cm 大の嚢胞が摘出された。その病理組織所見から嚢胞壁が複雑に入り込んだ有鉤嚢虫(racemose 型)と診断された(図 10)。有鉤嚢虫には、アジアに分布するアジア型と中南米とアフリカに分布するアフロ・アメリカ型の 2 つの遺伝子型が存在するために、いずれの遺伝子型かを同定するために組織切片から DNA を抽出し、*cox1* 遺伝子(145 bp)の塩基配列解析を行った。その結果、723 番目の塩基が cytosine であったことからアジア型と同定された(図 11)⁹⁾。

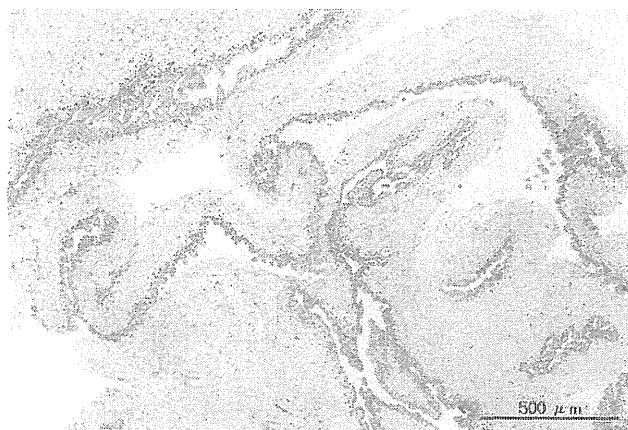
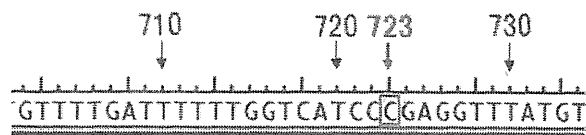


図 10. 右前頭葉病巣部の病理組織所見.



Asian genotype of *T. solium*

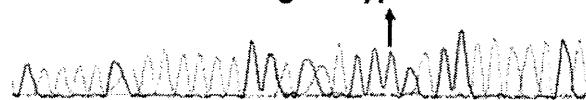


図 11. *cox1* 遺伝子断片(145 bp)の塩基配列解析. 723 番目の塩基が C なのでアジア型と同定された.

症例 7：患者は 45 歳、中国人男性。2009 年、駆虫によって裂頭条虫片節が排出され、虫体は塩酸固定後、酢酸カーミンで圧平染色標本が作製された。その標本や虫卵の形態から当初、広節裂頭条虫(*Diphyllobothrium latum*)と同定されたが(図 12)¹⁰⁾、著者らはその同定結果に疑問を持った。2011 年、その染色標本を用いて分子同定する機会を得、PCR で増幅された *cox1* 遺伝子断片(249 bp)の塩基配列に基づいて Blast 検索を行った。その結果、本虫体は日本海裂頭条虫(*Diphyllobothrium nihonkaiense*)の *cox1* 遺伝子と 99~100% の高い相同性を示し、一方、広節裂頭条虫の *cox1* 遺伝子とは 92% の相同性であったことから、日本海裂頭条虫と同定された。この症例は日本海裂頭条虫による中国における最初の確定症例として、また分子同定の重要性の例として報告した¹¹⁾。

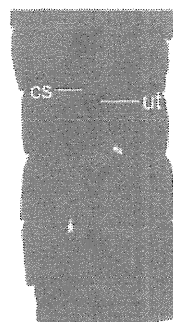
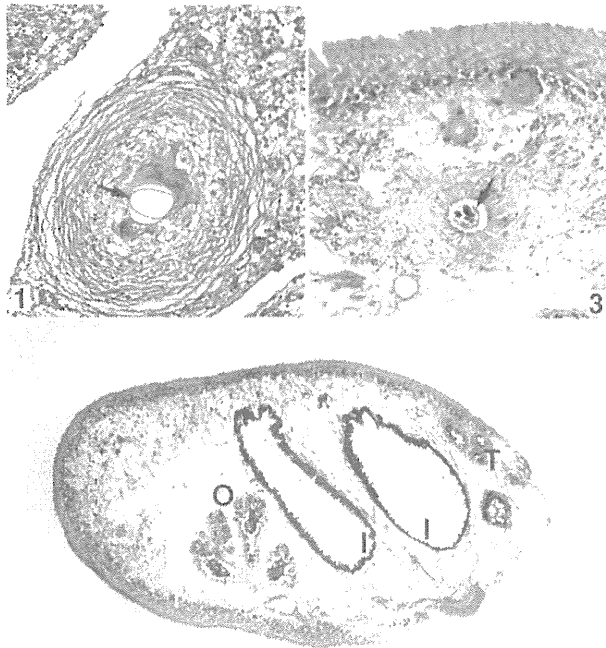


図 12. 分子同定に用いた酢酸カーミン染色標本.

症例 8：患者は 27 歳、在日タイ人女性。右下腹部大網から楕円形の肺吸虫と思われる虫体が摘出された。また、その周辺組織の病理組織標本中に虫卵を中心とした巨細胞や肉芽腫が観察された(図 13)。肺吸虫の種の同定を行うために HE 染色切片から SDS/proteinase K 溶液を用いて DNA を抽出し、ITS-2 領域(461 bp)と *cox1* 遺伝子断片(396 bp)を増幅し、その塩基配列解析を行った。その結果、ITS-2 領域と *cox1* 遺伝子の塩基配列は宮崎肺吸虫の同領域とそれぞれ 100% と 99.7% の相同性を示したことから、本虫体は宮崎肺吸虫(*Paragonimus skrjabini miyazakii*)と同定された¹²⁾。



2
 図 13. 大網から得られた病巣組織と摘出された肺吸虫成虫の組織切片所見 (文献¹²⁾より転載).

【おわりに】

パラフィン包埋標本中に検出された寄生虫を DNA 解析によって種を同定することは確定診断と治療のために極めて重要である。また、ここで紹介した方法は多くの研究室で保存されているホルマリン固定標本、パラフィンブロックあるいはプレパラート染色標本を用いた retrospective な研究にも応用できる。実際、60 年以上もホルマリンに浸漬された標本でも分子同定が可能であった¹³⁾。

【謝辞】

本研究は、厚生労働科学研究費補助金 新興再興感染症研究事業 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業(H23-25 新興一般-014) ならびに平成 26 年度厚生労働科学研究委託費「新興・再興感染症に対する革新的医薬品など開発推進研究事業」(H26-新興実用化一般-009)により行われた。

【文献】

1) Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, *et al.* Significance of molecular diagnosis using histopathological specimens in cestode zoonoses. *Trop Med Health*, 35:307-321, 2007
 2) Edward A, Civitello A, Hammond HA,

et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 49:746-756, 1991
 3) 山崎 浩, 杉山 広, 森嶋康之, 他. 南米ペルーで *Gnathostoma binucleatum* に感染した邦人の顎口虫症の 1 例. *Clin Parasitol*, 19:127-129, 2008
 4) 物部 寛子, 野村 務, 出月 健夫, 他. *Dirofilaria repens* 感染による皮下結節症例. *Clin Parasitol*, 23:49-52, 2012
 5) Deniz HI, Yaman A, Morishima Y, *et al.* *Onchocerca lupi* infection in Turkey. A unique case of a rare human parasite. *Acta Parasitol*, 58:384-388, 2013
 6) 伊藤元博, 土屋十次, 立花 進, 他. PCR 法にて同定した消化管外アニサキス症による絞扼性イレウスの 1 例. *日腹救急医誌* 29:925-929, 2009
 7) Wiwanitkit V. A review of human sparganosis in Thailand. *Int J Infect Dis*, 9:312-316, 2005
 8) Koonmee S, Intapan MP, Yamasaki H, *et al.* 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. *Parasitol Int*, 60:460-464, 2011
 9) 山崎 浩, 杉山 広, 森嶋康之, 他. Racemose 型有鉤囊虫による脳囊虫症の 1 例. *Clin Parasitol*, 21:29-32, 2010
 10) Li YH, Wen JS, Shu J, *et al.* A human case caused by *Diphyllobothrium latum* in Heilongjiang Province. *Chinese J Parasitol Parasitic Dis*, 27:296,302,2009
 11) Chen SH, Ai L, Zhang Y, *et al.* Molecular detection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* in humans, China. *Emerg Infect Dis*, 20:315-318,2014
 12) 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 他. 開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の 1 例. *Clin Parasitol*, 14:57-60,2003
 13) Yamasaki H, Muto M, Yamada M, *et al.* Validity of the bear tapeworm *Diphyllobothrium ursi* (Cestoda: Diphyllobothriidae) based on morphological and molecular markers. *J Parasitol*, 98:1243-1247, 2012

ネパール人留学生の単包虫症の1例

田中照久¹⁾, 平田哲生¹⁾, 新垣伸吾¹⁾, 東新川実和¹⁾, 岸本一人¹⁾, 外間 昭²⁾,
 金城福則³⁾, 林 裕樹⁴⁾, 尾下陽大⁴⁾, 石野信一郎⁴⁾, 白石祐之⁴⁾, 西巻 正⁴⁾,
 當間 弘⁵⁾, 森嶋康之⁶⁾, 杉山 広⁶⁾, 山崎 浩⁶⁾, 藤田次郎¹⁾

- 1) 琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学
- 2) 琉球大学医学部附属病院光学医療診療部
- 3) 社会医療法人仁愛会浦添総合病院消化器病センター
- 4) 琉球大学大学院医学研究科消化器・腫瘍外科学
- 5) 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学
- 6) 国立感染症研究所寄生動物部

Key Words : エキノコックス, 単包虫症, ネパール

はじめに

包虫症は単包虫症と多包虫症がある。単包虫症は本邦においては輸入例がほとんどであり、年数例の報告しかなく比較的稀な疾患である。今回、

腹痛・発熱を契機に診断されたネパール人留学生の単包虫症の1例を経験したので報告する。

Case report: A case of hepatic cystic *Echinococcosis* in a Nepalese female

Teruhisa Tanaka¹⁾, Tetsuo Hirata¹⁾, Shingo Arakaki¹⁾, Miwa Higashiarakawa¹⁾,
 Kazuto Kishimoto¹⁾, Akira Hokama²⁾, Fukunori Kinjo³⁾, Yuki Hayashi⁴⁾, Akehiro Oshita⁴⁾,
 Shinichiro Ishino⁴⁾, Masayuki Shiraishi⁴⁾, Tadashi Nishimaki⁴⁾, Hiromu Toma⁵⁾,
 Yasuyuki Morishima⁶⁾, Hiromu Sugiyama⁶⁾, Hiroshi Yamasaki⁶⁾, Jiro Fujita¹⁾

- 1) *Department of Infectious, Respiratory, and Digestive Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus*
- 2) *Department of Endoscopy, Ryukyu University Hospital*
- 3) *Center of Gastroenterology, Urasoe General Hospital*
- 4) *Department of Digestive and General Surgery, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus*
- 5) *Department of Parasitology and International Health, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus*
- 6) *Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases*

論文請求先: 田中照久 〒903-0215 中頭郡西原町字上原 207 琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学

症例

患者：在日2年のネパール人23歳女性。

主訴：右季肋部痛，発熱

既往歴・内服歴：特記事項なし

動物飼育歴：過去に犬一匹

現病歴：平成X年9月激しい右季肋部痛・発熱にて前医受診した。受診時の血液検査ではWBC 13200/ μ l, CRP 11.29 mg/dlと炎症反応が上昇しており，総ビリルビン 1.8 mg/dl, γ -GTP 47 IU/Lと胆道系酵素の軽度上昇を認めた。腹部超音波検査では肝臓に径9 cm大の嚢胞を2個認め，一方は内容が高エコーに描出され感染性肝嚢胞を疑わせる所見であった。腹部造影CT検査においても胆嚢を挟むように2個の肝嚢胞を認め，一方は腹腔内に突出している状態であった（図1）若い女性の巨大な肝嚢胞であり，留学生であることも考慮してエキノコックス抗体（EIA法），アメーバ抗体を外注検査に提出したが陰性であった。入院にて抗生剤を使用していたが，エキノコックス抗体が陰性であったことから通常の感染性肝嚢胞の診断となり経皮的嚢胞ドレナージによる治療を行った。穿刺液は感染胆汁様色であり，抗生剤投与中であったためか細菌培養検査は陰性，穿刺液の直接鏡検は施行しなかった。ドレナージチューブからの嚢胞造影検査にて総胆管が描出され，胆管との交通が確認された。その後症状軽快を認め退院となったが，嚢胞は依然として残存してお

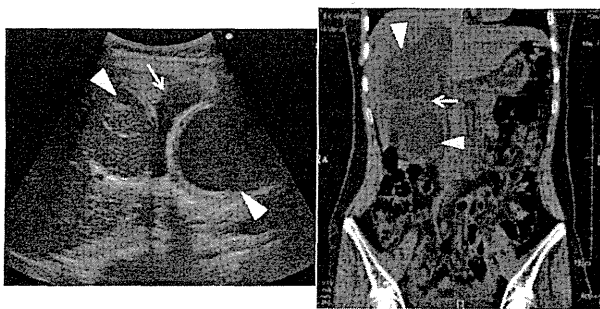


図1 前医での腹部超音波検査・腹部造影CT胆嚢（矢印）を挟むように2個の肝嚢胞（矢頭）を認めた

り，ときどき嚢胞の圧排による症状と考えられる背部痛・心窩部痛も認めていたため嚢胞切除術目的に当院へ紹介となった。

当院受診後，画像・病歴より単包虫症が強く疑われたため，国立感染症研究所に検査依頼し，血清のWestern blot法にて単包条虫の特異抗体陽性となった。また当院で行った頭部胸部CT検査にて，脳病変・肺病変は認めなかった。前医の検査結果より肝嚢胞と胆道系との交通が考えられたため，経皮的な治療であるPAIR（Puncture, Aspiration, Injection, Re-aspiration）は適応外であると判断し，手術療法を行う方針となった。術前4日前よりアルベンダゾール（800 mg/day）内服を開始し手術を行った。

腹腔内に突出した嚢胞は厚い被膜に覆われており周囲の大網・横行結腸・十二指腸と強固に癒着していたため，嚢胞切除，肝右葉・胆嚢合併切除を行った。嚢胞内容液の直接鏡検にて単包条虫の原頭節を多数確認した（図2）。国立感染症研究所に依頼しDNA解析をおこなったところ *E. granulosus sensu stricto* (G3 genotype) が検出された。



図2 単包条虫の原頭節

術後経過は良好であり，術後12日目に退院となった。術中に嚢胞液の腹腔内漏出を認めたためアルベンダゾールを術後3ヵ月程度内服継続する方針とし，転居に伴い他院へ紹介とした。

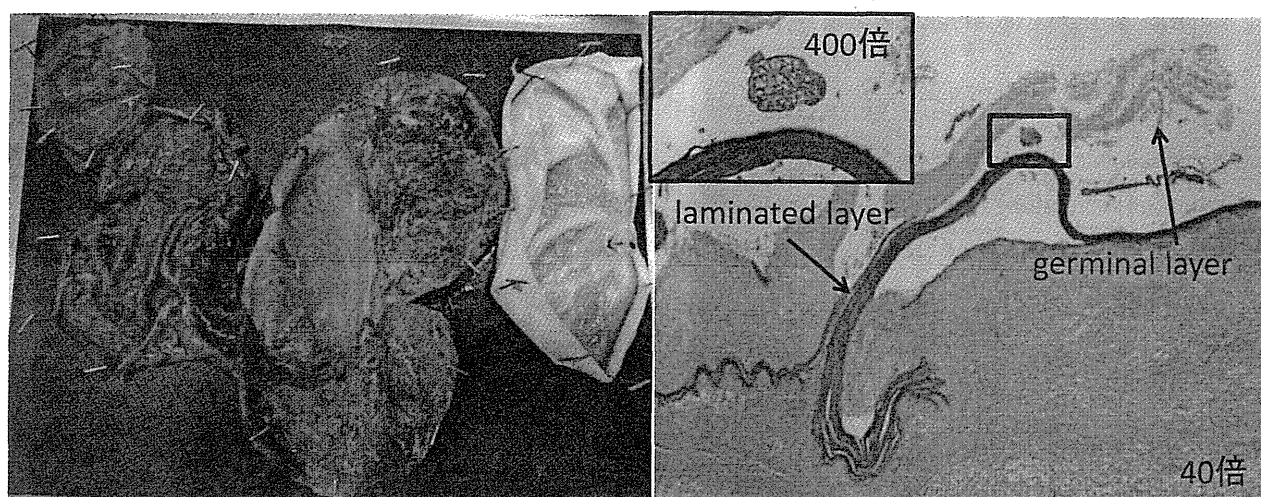


図3 手術標本・病理

手術標本： 2個の嚢胞を周囲組織とともに切除した。

病理： 寄生虫由来の germinal layer と laminated layer を認め、周囲には宿主由来と寄生虫由来の結合織を認めた。また嚢胞内腔側には原頭節も観察された。

考察

単包条虫は全世界的に分布・流行しており、ネパールも侵淫地に含まれる。主にイヌを終宿主、ヒツジなどの大型家畜を中間宿主として生活環を完成している。

ネパールの飼い犬の単包条虫感染率は 6-15% といわれており¹⁾、犬飼育歴がある今回の症例においても犬からの感染の可能性が考えられた。しかしながらネパールでは、これまで *E. granulosus* の genotype として G1, G5, G6 の報告がある²⁾ が、今回の症例で認めた G3 genotype の報告はなく、周辺地域への旅行歴などについて調査中である。

単包虫症の診断は免疫血清学的検査 (ELISA 法, Western Blot 法) や画像所見から総合的に行うが、今回の症例においては初回の抗体検査は陰性であった。前医での検査依頼先に問い合わせたところ、エキノコックス抗体 (EIA 法) 検査は多包条虫のみ対応しており単包条虫は診断できないとの回答であった。単包虫症と多包虫症は画像上明らかに異なるが、寄生虫学に精通していない医師においてはエキノコックス抗体陰性ならば単包

条虫・多包条虫伴に陰性であると判断してしまう可能性がある。そのため単包虫症が検出できない注意書き等が必要であると思われた。

また PAIR による治療は、嚢胞内感染がある場合や胆管・腹膜・胸膜に穿破している場合は禁忌となる³⁾。肝臓にできた嚢胞の 90% は胆管と交通しており、5-15% は胆道に直接穿破しているとされている⁴⁾。今回の症例においても画像診断上胆管交通が考えられたため PAIR は行わなかった。

結語

日本では比較的稀な単包虫症の 1 例を経験した。単包虫症を疑う場合は専門施設に血清免疫学的検査を依頼する必要があると考えられた。侵淫地出身、侵淫地への渡航歴や居住歴などがあり、肝嚢胞性疾患を認める場合は、当疾患を鑑別に挙げるのが重要である。

文献

- 1) Joshi, et al. (1997) : Epidemiology of echinococcosis in Nepal. South East Asian

- Journal of Tropical Medicine and Hygiene 28, 26–31.
- 2) L. H. Zhang, *et al.* (2000) : Three genotypes of *Echinococcus granulosus* indentified in Nepal using mitochondrial DNA markers. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene 94, 258–260.
 - 3) World Health Organization : PAIR ; Puncture, Aspiration, Injection, Re-aspiration. An option for the treatment of cystic Echinococcosis. WHO/CDS/CSR/APH/2001.6.
 - 4) Ivan P, *et al.* (2000) : Hydatid disease ; Radiologic and pathologic features and complications. Radiographics 20, 795–817.

ネパール人の単包虫症： *Echinococcus ortleppi* による心寄生例

森嶋康之，市村静江，山崎 浩，杉山 広

国立感染症研究所寄生動物部

Key Words : *Echinococcus ortleppi*, 単包虫症, 心臓, ネパール

はじめに

ヒトの単包虫症は単包条虫 *Echinococcus granulosus* の幼虫（包虫）によって引き起こされる人獣共通寄生虫症の一つで，世界的に広く発生が認められる。わが国でもかつては原発を疑う症例が報告されてきたが，現在，国内における生活環の定着は確認されておらず，流行地出身の在日外国人や同地への滞在歴を有する日本人に発見される輸入寄生虫症である¹⁾。

原因種である単包条虫は，かつては中間宿主や塩基配列の違いにもとづき，10 の分離株あるいは遺伝子型に分けられてきたが，最近のミトコンドリア DNA を用いた分子系統学的研究により，狭義の単包条虫 (*E. granulosus sensu stricto*, 従来の分類基準による genotypes G1~G3) をはじめとする 5 つの独立種に整理された^{2,3)}。しかしながら，それらの種と人体感染時における病態との関係はいまだ明らかにされていず，いわゆる単包虫症

の原因種として，種複合体 (*E. granulosus complex*) あるいは広義の単包条虫 (*E. granulosus sensu lato*) と一括されている。今回，単包虫の寄生により心タンポナーデを発症した患者が手術を受け，その切除病巣を用いて原因種の詳細な鑑別を行う機会を得たので結果を報告する。

摘出病巣を用いた遺伝子解析と結果

患者は兵庫県内に居住する在日 16 年のネパール人男性 (42 歳) である。2013 年 5 月，労作性呼吸困難を発現して受診し，経胸壁心エコー図検査にて心タンポナーデと診断された。CT 検査においては，右心室の 7×5cm 大の嚢胞性腫瘍が確認されたほか，肝臓にも石灰化した腫瘍 1 個が認められている。診断ならびに治療を目的として切除された病巣は単嚢胞で，内腔に白色嚢胞壁やゼリー状の内容物を有し，嚢胞内腔液の沈渣には少量であるが原頭節が検出され，包虫であることが

Cardiac hydatid cyst due to *Echinococcus ortleppi* in a Nepalese

Yasuyuki Morishima, Shizue Ichimura, Hiroshi Yamasaki, Hiromu Sugiyama

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

論文請求先: 森嶋康之 〒162-8640 新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所寄生動物部

確認された。さらに詳細な種を調べることを目的として遺伝子解析を試みた。

出発材料は嚢胞内沈渣とし、市販の DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, キアゲン) を用いて DNA を抽出し、テンプレートとして用いた。ミトコンドリア DNA の *nad1* 領域および 12S ribosomal RNA 領域の部分配列を標的部位として、既報のプライマーセット^{4,5)}を用いて PCR 反応をおこなった。その結果、2 つの領域からそれぞれ 488bp (*nad1*) および 315bp (12S rRNA) の増幅産物が得られ、その塩基配列をダイレクトシーケンスにより解読したところ、今回の症例の原因となった種は *E. ortleppi* (従来分類基準の *E. granulosis* genotype G5) と最も高いホモロジーを示し (*nad1* : 99.8%, 12S rRNA : 100%), 系統樹

解析においても *E. ortleppi* と同じクレードに含まれていた (図 1A, B)。

考察

本症例には興味深い 2 つの事項が含まれる。第一点は心臓寄生例であること、もう一点は *E. ortleppi* を原因種とすることである。

人体における単包虫の寄生部位は主として肝臓であり、肺がそれに次ぐ。ヨーロッパあるいは中国における統計によれば、心臓を寄生部位とする単包虫症は、前者(原発 459 例)が 1.1% (5 例)、後者(原発・転移とも 15,289 例)で 0.03% (4 例)と報告されている⁶⁾。既述のとおり、本症例は肝臓にも石灰化した病巣を有していた。そのため心臓と肝臓のいずれが原発であるかは明らかでな

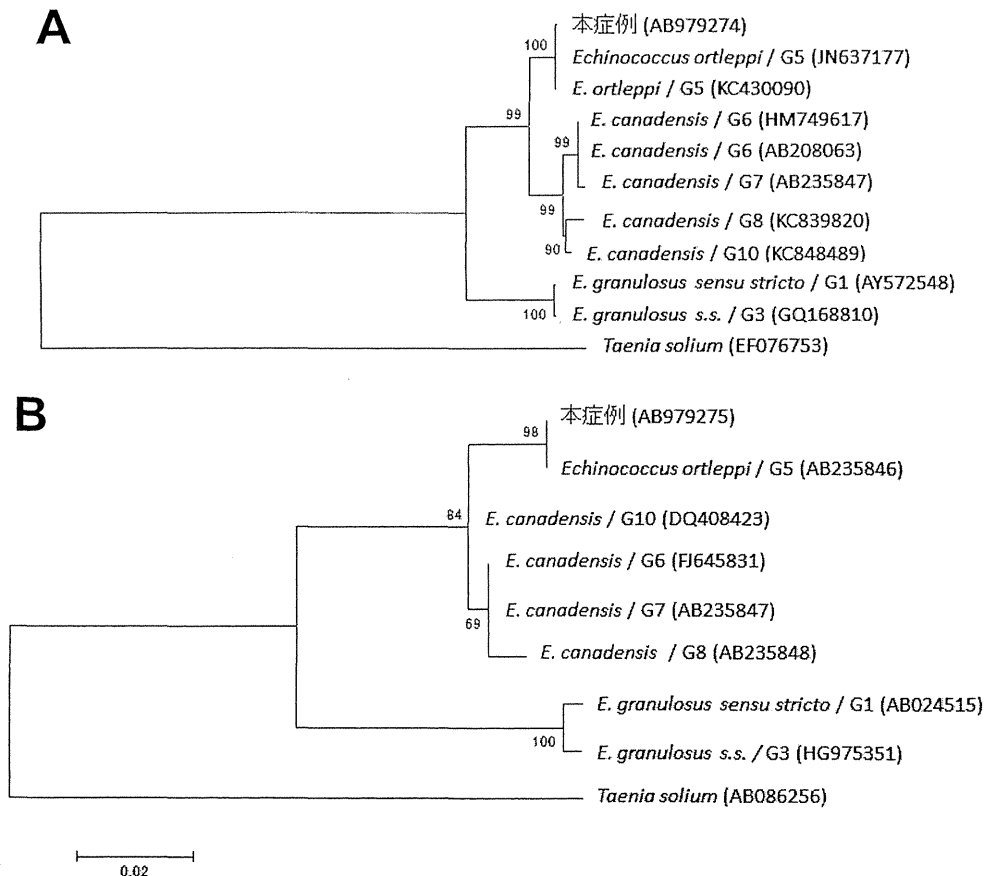


図 1 DNA 解析にもとづく本症例の単包条虫の系統関係

系統樹は *nad1* 領域および 12S ribosomal RNA 領域の部分塩基配列にもとづいて最尤法で作成した。本症例の原因種は、いずれ領域においても *Echinococcus ortleppi* と同じクレードに含まれた。

いが、いずれにせよ単包虫の心臓寄生例はまれと
いうことができる。

本症例患者の出身国であるネパールには複数
種の単包条虫が分布することが知られる。すなわ
ち、*E. granulosus* s.s. (G1)・*E. ortleppi*・*E. canadensis*
(G6) の 3 種が各種中間宿主から分離されてき
た⁷⁻⁹⁾。しかしながら、これまで報告されてきた
ネパールにおける人体症例は *E. ortleppi* を除く 2
種によるものであり、*E. ortleppi* 感染例は本症例
が初めてのものとなる。また、ネパールのみなら
ず、世界的に見ても *E. ortleppi* の人体感染例は非
常に少ない。たとえば、世界各地から集められた
単包虫症の遺伝子型に関する文献検討では、ヒト
の単包虫症の原因種は *E. granulosus* s.s. (G1~G3)
が 9 割近くを占め、*E. canadensis* (G6/7) が約 1
割でそれに次ぎ、*E. ortleppi* が原因となった症例
はごくわずかにすぎない。このような差異には、
汎存種である *E. granulosus* s.s. (とりわけ G1) と
それ以外の種の地理的分布の違いが大きく寄与
すると考えられるが、*E. granulosus* s.l.各種のヒト
への感染性や病態との関連を解明とあわせ、個々
の症例についての遺伝子解析を行い、さらに情報
を収集していくことが必要である。

文 献

- 1) 土井陸雄, 他 (2003) : 単包虫症-わが国にお
ける患者発生動向と対策. 日本公衆衛生雑誌,
50, 1066-1076.
- 2) Nakao, M. *et al.* (2007) : A molecular phylogeny
of the genus *Echinococcus* inferred from
complete mitochondrial genomes. *Parasitology*,
134, 713-722.
- 3) Hüttner, M. *et al.* (2008) : Genetic
characterization and phylogenetic position of
Echinococcus felidis Ortleppi, 1937 (Cestoda:
Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*,
38, 861-868.
- 4) Bowles, J. *et al.* (1993) : NADH dehydrogenase
1 gene sequences compared for species and
strains of the genus *Echinococcus*. *Int J Parasitol*,
23, 969-972.
- 5) von Nickisch-Roseneck, M. *et al.* (1999) :
Modification of universal 12S rDNA primers for
specific amplification of contaminated *Taenia*
spp. (Cestoda) gDNA enabling phylogenetic
studies. *Parasitol Res*, 85, 819-825.
- 6) Pawlowski, Z. S. *et al.* (2001) : Chapter 2.
Echinococcosis in humans: clinical aspects,
diagnosis and treatment. In WHO/OIE Manual
on Echinococcosis in Humans and Animals: a
Public Health Problem of Global Concern,
Eckert, J. *et al.* eds. World Organization for
Animal Health, Paris, pp. 20-71.
- 7) Ito, A. *et al.* (1998) : An imported case of cystic
echinococcosis in Japan diagnosed by imaging
and serology with confirmation of *Echinococcus*
granulosus-specific DNA sequences. *Am J Trop
Med Hyg*, 58, 790-792.
- 8) Zhang, I. H. *et al.* (2000) : Three genotypes of
Echinococcus granulosus identified in Nepal
using mitochondrial DNA markers. *Trans R Soc
Trop Med Hyg*, 94, 258-260.
- 9) Joshi, D. D. *et al.* (2010) : Histopathological and
molecular confirmation of porcine cystic
echinococcosis (CE)/hydatidosis in Nepal. *J Inst
Med (Nepal)*, 32, 54-58.
- 10) Alvarez Rojas, C. A. *et al.* (2014) : *Echinococcus*
granulosus sensu lato genotype infecting humans
- reviews of current knowledge. *Int J Parasitol*
44, 9-18.



Creeping eruption due to *Spirurina* type X larva

Teruhiko Makino, Naoya Mori, Hiromu Sugiyama, Megumi Mizawa, Yuri Seki, Ko Kagoyama, Tadamichi Shimizu

Lancet 2014; 384: 2082

Department of Dermatology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan (T Makino MD, N Mori MD, M Mizawa MD, Y Seki MD, K Kagoyama MD, T Shimizu MD), and Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Japan (H Sugiyama PhD)

Correspondence to: Dr Teruhiko Makino, Department of Dermatology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan (tmakino@med.u-toyama.ac.jp)

A 42-year-old Japanese man presented to our hospital in March, 2014, with a 2 day history of an erythematous eruption on his abdomen. He had eaten small raw squid (hotaruika or firefly squid, *Watasenia scintillans*; figure) a week before, and 2 days later developed severe abdominal pain. An oesophagogastroduodenoscopy at the time showed no abnormalities and the abdominal pain improved within a few days, but he developed an itchy abdominal rash 9 days after eating the raw squid. Physical examination showed a linear oedematous rash with small vesicles and crusts in the centre of his abdomen about 6 cm in length (figure). Blood tests showed eosinophilia (22.7%; normal 0.2–8.9%), white blood cells ($10.7 \times 10^9/L$; $4.3\text{--}9.4 \times 10^9/L$), and raised serum IgE (1.98 mg/L; <0.41 mg/L). Because we suspected a creeping eruption caused by parasitic larvae such as gnathostomiasis, sparganosis mansonii, or larval spiruriniasis, we excised the lesion completely. Histological examination showed intraepidermal blistering and infiltration of inflammatory cells throughout the dermis, mainly infiltrating eosinophils and lymphocytes, especially around the vessels and cutaneous appendages. In the deep dermis we saw a parasitic larva about 80 μm wide with an oesophageal gland and lateral cords seen in cross-section. The cuticle was about 2 μm thick and had no spines and the somatic musculature was of the polymyarian–coelomyarian type. The patient's serum reacted with a type X larva but healthy control serum did not. We diagnosed a creeping eruption due to the larva of *Spirurina* type X. The patient had no further symptoms during 3 months' follow-up.

Spirurina are classified into types I to XIII. Only type X larvae have been identified as pathogenic to humans.¹ The type X larva is 5.43–9.80 mm long and 74–110 μm

wide.¹ The intermediate hosts are small squid and fish, such as *W. scintillans*, *Todarodes pacificus* (Japanese flying squid), *Arctoscopus japonicus* (sailfin sandfish), and *Gadus macrocephalus* (Pacific cod).² A recent molecular study identified the type X larva as *Crassicauda giliakiana*. The final hosts of the nematode are marine mammals such as *Berardius bairdii* (Baird's beaked whale).³ The type X larva is thought to survive for only a short time in the human body, because humans are an inappropriate host for their growth. Clinically, the patient first notices abdominal pain several days after eating raw squid or fish, which can sometimes progress to acute ileus,⁴ caused by enteritis or mesenteritis due to invasion of the type X larva into the intestinal wall or abdominal cavity. The type X larva then migrates to the nearest cutaneous tissue to the intestine.² 1–4 weeks later, a creeping eruption develops on the abdomen. Ocular involvement has also been reported.⁵ Treatment is surgical excision of the skin lesion to remove the larva, but the rash usually resolves within 2 months even if no treatment is done. There is no evidence that anthelmintic agents are effective for type X larvae.

Approximately 50 cases with creeping eruptions due to type X larva have been reported in Japan, probably because the Japanese have a long tradition of eating raw squid and fish. We speculate that this condition will be encountered in other countries in the near future because of the increasing consumption of raw squid and fish as sushi or sashimi.

Contributors

TM and TS cared for the patient. NM and KK did the histological examination. HS did the immunohistochemistry examination and HS, MM, and YS identified the larva. All authors contributed to writing the report. Written consent to publish was obtained.

References

- Hasegawa H. Larval nematodes of the superfamily Spiruroidea—a description, identification and examination of their pathogenicity. *Acta Med Biol* 1978; 26: 79–116.
- Otaki N, Fukushima K, Takuno T, Ando K, Kagei N. Two cases of creeping diseases due to spirurina larva with a review of recorded cases. *Jpn J Clin Dermatol* 1995; 44: 88–94.
- Sugiyama H, Morishima Y, Arakawa K, Kishiro T, Kawanaka M. Recent advances in the studies on larval spirurini nematode. *Jpn Soc Syst Parasitol Circ* 2007; 25: 4–7.
- Miyake T, Ikoma H, Hoshima M, Yamane E, Hasegawa H, Arizono N. Case of acute ileus caused by a spirurina larva. *Pathol Int* 2004; 54: 730–33.
- Chuang CK, Nakajima Y, Sato S, Kagei N, Araki K. A case of spirurid larva infection in the anterior chamber of the human eye. *Int J Parasitol* 1993; 23: 647–49.

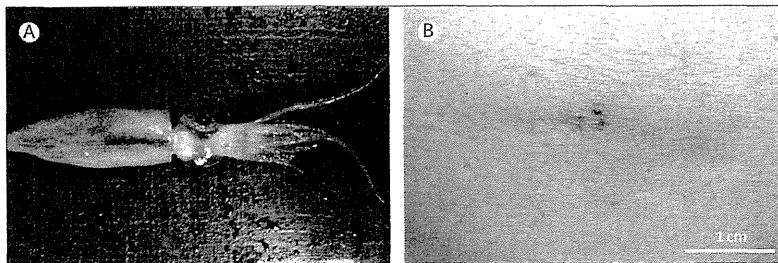


Figure: Creeping eruption due to *Spirurina* type X larva
(A) *Watasenia scintillans*, the firefly squid, is one of the intermediate hosts of *Spirurina* type X larva.
(B) Erythematous lesion on the patient's abdomen.