

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:68-71.

平成26年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 アジアにおける人獣共通寄生虫感染症対策：迅速診断・蔓延度推定の技術確立と感染撲滅に向けた国際保健医療貢献

迫 康仁

依 頼 稿 (報告)

平成 26 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 アジアにおける人獣共通寄生虫感染症対策：迅速診断・ 蔓延度推定の技術確立と感染撲滅に向けた国際医療貢献

迫 康 仁*

【研究の背景と目的】

本研究課題では、有鉤条虫の幼虫（囊虫）ならびに多包条虫および単包条虫の幼虫（包虫）の寄生によって起こる人獣共通寄生虫症を対象としている。囊虫は脳内、筋肉内および皮下などに寄生し「有鉤囊虫症」を、包虫は主に肝臓に寄生し「エキノコックス症」を引き起こす。

有鉤条虫は、ヒトの消化管でのみ成虫に発育する寄生虫である。食物連鎖により、ヒトとブタの間でのみ生活環が完結しているため、「安全な食材提供」と「十分な加熱調理」により撲滅が可能である。しかしながら、地球規模で、特に経済的発展途上国で対策が遅れているため未だに蔓延している。有鉤囊虫症は、偶発的に経口摂取された虫卵（六鉤幼虫を包蔵し、有鉤条虫感染者から排泄される）が、脳、筋肉内、皮下などで囊虫に発育分化し、寄生することにより引き起こされる¹⁾。

一方、多包条虫および単包条虫は、キツネやイヌなどの消化管内で成虫となる。ヒトは、キツネならびにイヌ（成虫）とネズミ（多包虫）、イヌ（成虫）とヒツジ（単包虫）の感染循環において、キツネ、イヌから排出された虫卵（六鉤幼虫）を経口摂取することにより感染する。その後、六鉤幼虫は、主に肝臓内で包虫に発育分化し、ヒトはエキノコックス症（包虫症）を発症する²⁾。

本研究課題の最終目標は、テニア科に属する人獣共

通感染寄生虫症の対策に役立つ技術革新を行い、致死性の有鉤囊虫症および肝エキノコックス症を撲滅することである。そのために、コントロールモデルとして、バリ島（有鉤囊虫症）およびモンゴル（エキノコックス症）を対象地として対策研究を行う。

本研究では、ヒトならびに家畜の検査法の開発研究とポイント・オブ・ケア・テストとしての実用化に向けた評価研究を遂行し、同時にそれらを用いたフィールド調査を実施し詳細な流行地域の特定・感染者や感染動物の発見位置情報を利用した寄生虫感染伝播動向の解析・流行地域住民の感染リスク要因の推定をする。さらに、旭川医科大学が文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラムに採用され実施している「オール北海道先進医学・医療拠点形成」事業や文部科学省科学技術戦略推進費などのサポートを受け開発した、ヒト有鉤囊虫症およびエキノコックス症の迅速検査キットの円滑な臨床現場への導入や国際的な展開を実現するために必要な性能評価を実施する。

本稿では、ヒトならびに家畜の検査法の研究概要を紹介し、2015年にインドネシア共和国・バリ州で実施したテニア症および有鉤囊虫症の調査について報告する。

【ヒトの検査法】

有鉤囊虫症検査およびエキノコックス症（多包虫症、単包虫症）検査として、幼虫に対する特異抗体を検出する血清検査を開発してきた。有鉤囊虫症では囊虫液

*旭川医科大学 寄生虫学講座

に存在する 10–26kDa の糖タンパク質を^{3,4)}、多包虫症では多包虫細胞内タンパク質である約 60kDa の ezrin-radixin-moesin-like proteins (elp) 分子がシステインプロテアーゼによる分解を受けた結果生じる 18kDa の Em18 分子を^{5–7)}、単包虫症では包虫液に存在する約 8kDa の Antigen B/1 分子を⁸⁾、種特異的検査用抗原として使用している。さらに、それぞれの組換え抗原を用いた ELISA 法、イムプロット法ならびにイムノクロマトグラフィー法 (ICT) による検査法も開発されている^{7–11)}。イムノクロマトグラフィー法を用いた検査法はキット化され、研究用試薬として市販されている (図 1)。本研究では、この迅速検査キットの性能評価を実施する。

ヒトテニア症の高感度特異的な検査として、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたテニア条虫 DNA を検出する検査法を開発してきた^{12–14)}。テニア症の検査は糞便検査により虫卵を検出する方法と排出された片節などの形態を観察する方法が一般的であるが、それらの方法は、感度が低くまた種特異的ではないという問題があるためである。しかしながら、LAMP 法を用いた DNA 検出法は高感度かつ種特異的であるが、1 種の条虫に対し 1 つの検査反応チューブを必要とするため、検体が多数の場合、操作が煩雑になるという問題がある。そこで本研究では、1 つの反応チューブで 3 種の条虫を検査できるマルチプレックス LAMP 法と各増幅 DNA 産物の選択的検出法を開発する。



図 1 研究用試薬として市販されている検査キット

【家畜の検査法】

有鉤囊虫症においては、ブタがヒトテニア症の感染源として重要である。つまり、ブタに寄生している有鉤囊虫をヒトが経口摂取することにより、テニア症が引き起こされてしまう。したがって、有鉤囊虫感染ブタを検出し排除することは、有鉤囊虫症のコントロールに必要不可欠である。我々は、ブタ有鉤囊虫症検査として、ヒトの検査に用いている抗原に対する抗体を検出する血清検査が極めて有用であることを見出した。しかしながら、この検査法は高感度であるが、特異性については十分な検証がなされていない。つまり、ブタは、有鉤囊虫以外にそれに近縁な細頸囊虫にも寄生されるが、それに対する抗体が有鉤囊虫抗原に対して交差反応を示すか明らかとなっていない。本研究では、交差性に関する詳細な解析を実施する。

【フィールド調査報告】

2015 年 9 月 17 日から 20 日にかけて、インドネシア共和国・バリ州・ギャニャール県ならびにカラングス県 (図 2) で、テニア症および有鉤囊虫症の調査を、国際共同研究パートナーであるウダヤナ大学 (インドネシア共和国・バリ州・デンパサール) を中心として実施した。

1. ギャニャール県

ヒトの糞便の顕微鏡検査ならびに聞き取り調査を主とした調査を Banjar Pamesan (Banjar とはバリ特有の村組



図 2 フィールド調査を実施した地域

織)で実施した。その結果、5名のテニア症疑診患者を見出すことが出来た。その後、患者に対しインドネシア共和国側の医師から駆虫が施され、それぞれの患者から1虫体、合計5虫体を回収することが出来た。形態的に無鉤条虫と推察できたが、DNA検査による種同定作業を現在実施している。

2. カランガスム県

ヒトならびに家畜(ブタ、イヌ)を対象とした調査を実施した。また、調査フィールドとして、インドネシア共和国側研究者の事前調査(住環境、ブタの飼育形態など)の情報に基づき、新規の2村(Banjar Samuh/Pule, Banjar Ulun Desa)ならびに2013年と2014年に調査を実施した1村(Banjar Bahel)を選定した。

ヒトの糞便の顕微鏡検査ならびに聞き取り調査の結果、1名のテニア症疑診患者(Banjar Bahel)を見出すことが出来た。その患者に対しインドネシア共和国側の医師から駆虫が施され、1虫体を回収することができた。形態的に有鉤条虫と推察できたが、DNA検査による種同定作業を現在実施している。

また、環境衛生状態の指標の1つである土壌媒介蠕虫(回虫、鞭虫、鉤虫)に関しては、住民の糞便から回虫虫卵および鞭虫虫卵が主に検出された。現在インドネシア共和国側の研究者による詳細な解析が実施されている。

家畜(ブタ、イヌ)に関しては、ヒト有鉤囊虫症の特異抗原を用いたELISA法により血清抗体調査を実施した。調査地では、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定し検査結果を判定することが困難であったため、目視による判定を行った。ブタ122検体ならびにイヌ14検体を検査した結果、ブタ6検体が極めて弱い陽性反応を示した。これまでの血清検査で得られた知見と照合すれば、これらの検体は有鉤囊虫症である可能性は極めて低いと考えられたが、他の寄生虫に感染している可能性を否定できないため、解剖による検査(弱陽性5検体および陰性1検体)を実施した。その結果、有鉤囊虫に感染しているブタはいなかったが、弱陽性を示した2検体に有鉤囊虫に近縁な細頸囊虫が感染していたことが明らかとなった(図3)。有鉤囊虫非感染ブタから血清抗体の弱陽性反応が検出された原因として、細頸囊虫に対する抗体が有鉤囊虫抗原に交差反応を示した可能性、約8週間前後血清中に存在する初乳由来の移行抗体¹⁵⁾を検出した可能性、

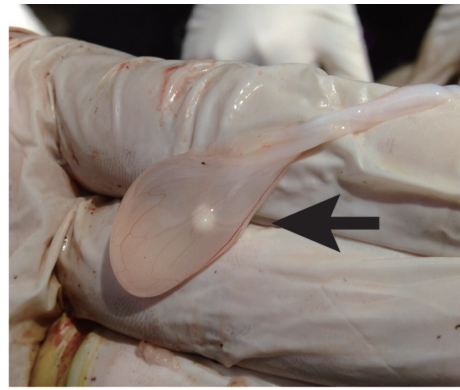


図3 剖検により見出された細頸囊虫

剖検による検査で検出不能な初期の感染を検出した可能性、過去の感染(治癒ケース)を検出した可能性などが考えられた。

【今後の展望】

有鉤囊虫症ならびにエキノコックス症のポイント・オブ・ケア・テストである検査キットの性能評価のために必要な検体を、日本国内で確保することは極めて困難である。したがって、今後、国際共同研究パートナーを中心とした流行地調査に、検査キットによる抗体検査を追加し、その結果と実際の罹患患者の相関を解析したいと考えている。加えて、有鉤囊虫症の感染源として重要なテニア症患者の簡便な検査法も開発し、また、家畜の血清検査に用いる抗原の特異性に関しても、有鉤囊虫ならびに細頸囊虫のブタ感染実験を実施し、感染ブタより得られる血清(標準血清)を用いて解析する予定である。

本研究の目的を達成するために必要な試料(ヒト血清や糞便、家畜血清、寄生虫)を確保するには、有鉤囊虫症やエキノコックス症流行国の研究者との国際共同研究を通じた密接な連携が必要不可欠である。今後も、日本側の技術を提供しながら共同研究を実施し、良好な関係を構築していきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Mahanty S, Garcia HH. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol* 2010 ; 91 : 172-184.
- 2) McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003 ; 362 : 1295-1304.
- 3) Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY,

- Liu YH, Kamhawi S, Lightowers MW, Schantz PM. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998 ; 59 : 291-294.
- 4) Sako Y, Itoh S, Okamoto M, Nakaya K, Ito A. Simple and reliable preparation of immunodiagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis. *Parasitology* 2013;140: 1589-1594.
- 5) Ito A, PM Schantz, JF Wilson. Em18, a new serodiagnostic marker for differentiation of active and inactive cases of alveolar hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 1995 ; 52 : 41-44.
- 6) Ito A, M Nakao, Sako Y. Echinococcosis: serological detection of patients and molecular identification of parasites. *Future Microbiol* 2007 ; 2 : 439-449.
- 7) Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Gottstein B, Lightowers MW, PM Schantz, Ito A. Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 2760-2765.
- 8) Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Sato N, Vuitton DA, Piarroux R, Lightowers MW, Craig PS, Ito A. Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 1082-1088.
- 9) Sako Y, Fukuda K, Kobayashi Y, Ito A. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2009 ; 47 : 252-254.
- 10) Sako Y, Tappe D, Fukuda K, Kobayashi Y, Itoh S, Frosch M, Gruner B, Kern P, Ito A. Immunochromatographic test with recombinant Em18 antigen for the follow-up study of alveolar echinococcosis. *Clin Vaccine Immunol* 2011 ; 18 : 1302-1305.
- 11) Santivanez SJ, Rodriguez ML, Rodriguez S, Sako Y, Nkouawa A, Kobayashi Y, Sotomayor AL, Peralta JE, Valcarcel M, Gonzalez AE, Garcia HH, Ito A. Evaluation of a New Immunochromatographic Test Using Recombinant Antigen B8/1 for the Diagnosis of Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2015;53:3859-3863.
- 12) Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Wandra T, Swastika IK, Nakao M, Yanagida T, Nakaya K, Qiu D, Ito A. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 3350-3352.
- 13) Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol* 2009 ; 47 : 168-174.
- 14) Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Giraudoux P, Raoul F, Nakaya K, Xiao N, Qiu J, Qiu D, Craig PS, Ito A. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: Application to a field survey. *Parasitol Int* 2012; 61 : 723-725.
- 15) Gonzalez AE, Verastegui M, Noh JC, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Garcia HH, Tsang VC, Gilman RH, Wilkins PP. Persistence of passively transferred antibodies in porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Cysticercosis Working Group in Peru. Vet Parasitol* 1999 ; 86 : 113-118.