

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05273

研究課題名(和文) 有鉤条虫の撲滅を目指した流行調査と土壌伝播蠕虫の網羅的検出法の開発

研究課題名(英文) Epidemiological survey of human taeniasis/cysticercosis and animal cysticercosis and development of comprehensive detection method for soil-transmitted helminths.

研究代表者

迫 康仁 (Sako, Yasuhito)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：40312459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア共和国・バリ州で、テニア症ならびに有鉤囊虫症について、ヒトと家畜の疫学調査を実施した。ヒトの調査では、有鉤囊虫症血清検査で陽性を示す住民はいなかったが、6名のテニア症(有鉤条虫)患者を見出すことが出来た。家畜の調査では、細頸囊虫が多数のブタに感染していることが明らかとなった。また、テニア症患者の抗テニア成虫抗体を検出するための抗原は、その調整に使用する成虫のロットに影響を受けることが明らかとなった。さらに、Dot-ELISA法とLAMP法を使用した簡便なヒトテニア条虫の鑑別DNA検査法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Field survey of human taeniasis/cysticercosis and animal cysticercosis has been conducted in Bali, Indonesia. In human survey we could not find cysticercosis sero-positive case but could find six Taenia solium taeniasis patients. In animal survey, we found that pigs had been exposed to Taenia hydatigena infection. Additionally, we demonstrated that the antigen quality for the detection of anti-Taenia adult antibody of taeniasis patient was affected by the taenia adult worm used for antigen preparation. Furthermore, we developed a simple DNA detection test to differentiate human taenia parasites by loop-mediated isothermal amplification in combination with dot enzyme-linked immunosorbent assay.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：テニア条虫 有鉤囊虫 血清検査 DNA検査 中間宿主 疫学調査

1. 研究開始当初の背景

有鉤囊虫症は、有鉤条虫の幼虫である囊虫が筋肉、皮下、脳などに寄生することにより引き起こされる最も致死率の高い寄生虫症である。その感染源は、成虫である有鉤条虫が寄生しているヒトであり、糞便中に含まれる虫卵を経口的に摂取することにより感染する。十数年前までは『ブタ肉食文化を持つ低所得国のみで蔓延している風土病的な慢性感染症』と認識されていた。しかし現在は、もはや『対岸の火事』ではなくなった。非流行地域と考えられていた地域（例えば中東地域）でも、流行国からの労働者の受け入れに伴い、アウトブレイクが発生しているためである。また、海外駐在中に有鉤条虫に感染し、本邦で有鉤囊虫症を発症した日本人例も報告されている。

有鉤囊虫の『流行状況を正確に把握すること』と『信頼性の高い検査法を開発すること』は、有鉤囊虫症を撲滅し国際保健医療に貢献するためにも、また、有鉤囊虫症の日本への予期せぬ流入を防ぐためにも、非常に重要である。そこで、我々は、アジア（インドネシアやタイなど）において、有鉤囊虫症の流行調査を実施してきた。また、この間、有鉤囊虫症患者や感染家畜の発見手段である血清検査法¹⁾と条虫の種鑑別同定法である LAMP 法を用いた検査法²⁾を開発してきた。これらの検査法は非常に特異性・感度が高く、特別な機材を調達することのできない調査現場で使用可能である。

2010年までに調査した地域では、散発的な有鉤囊虫症例を見出すことができたが、感染源である有鉤条虫症患者を発見することができなかった。そのため、未だに、“どのようにして有鉤囊虫症が風土病として定着しているか”の解明には至っていない。しかしながら、ようやく2011年の調査で有鉤囊虫症患者と有鉤条虫症患者が共住している流行地をインドネシア、タイで発見した。この発見により、『どのようにして有鉤囊虫症が風土病として定着しているのか』、逆に言えば、『どのようにすれば有鉤囊虫症の有効な撲滅対策を進められるか』の解答を得るための研究ができるようになった。幸いにも流行規模はまだ小さいため、現時点で対策に乗り出せば撲滅できる可能性は非常に高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発展途上国を中心に蔓延する風土病であり、致死率の高い有鉤囊虫症の撲滅を目指した対策方法を確立することである。我々の十数年にわたる流行調査により、世界に先駆けて『中間宿主である有鉤囊虫症患者・患畜と終宿主である有鉤条虫症患者が共住している希有な地域』が発見され、撲滅に向けた対策研究を実施できる段階となった。本研究では、①有鉤囊虫症の感染源である有鉤条虫症患者の迅速高感度な新規検出法の開発、②住環境の衛生度の指標であ

る土壌伝播蠕虫の網羅的検出法の開発、③それらを用いた流行調査を実施し、有鉤囊虫と有鉤条虫の伝播経路の解明を行い、『有鉤囊虫症が風土病として定着している』要因を明確にすることにより、有鉤囊虫症の撲滅を目指した対策方法を確立する。

3. 研究の方法

(1)疫学調査：ヒトおよび家畜（主にブタ）における有鉤囊虫症およびテニア症の疫学調査を、インドネシア共和国・バリ州で実施した。有鉤囊虫症に関しては、我々が開発した有鉤囊虫症免疫検査法を用いて、抗体陽性の有無を調査した。テニア症に関しては、調査地域住民に対する聞き取り調査や糞便検査を実施した。

(2)テニア症血清検査法の開発：現在テニア症患者の検査は、糞便からの虫卵検出により行っている。この方法は、感度が低く、時間を要し、また、ある程度の経験が必要であるため、疫学調査には不向きである。そこで、テニア症の患者の抗テニア条虫抗体を検出する検査法の開発を試みた。具体的には、テニア症患者から排出された有鉤条虫ならびに無鉤条虫成虫の片節から抽出したタンパク質を抗原とした ELISA 法による検査法を開発を行った。

(3)簡便なテニア条虫鑑別 DNA 検査法の開発：有鉤条虫、無鉤条虫ならびにアジア条虫を高感度かつ特異的に鑑別検出する事は、テニア症のコントロールに必須である。我々は、LAMP 法を基にした高感度かつ特異的に鑑別検出法を開発してきたが、その検査法には1検体につき3つの反応系が必要であった。そこで、より検査を簡便化するために1つの反応系であるマルチプレックス LAMP 法を開発を行った。具体的には、有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫に特異的なプライマーをそれぞれ、fluorescein isothiocyanate (FITC)、digoxigenin (DIG)、tetramethylrhodamine (TAMRA)で標識し、それらプライマーの混在下で LAMP 反応を行った後、特異的増幅産物を各標識物に対する特異抗体を用いた Dot-ELISA 法にて検出する検査法を開発した。

4. 研究成果

(1)平成27年度疫学調査：事前調査(住環境、ブタの飼育形態など)をもとに4村(Banjar Batudawa Kaja, Banjar Apad Sari, Banjar Gargita Sari, Banjar Bahel)を調査フィールドとして選定した。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名の有鉤条虫症患者(Banjar Bahel)を見出すことが出来た。また、同地区で飼育されているブタとイヌに対して、我々が開発した有鉤囊虫症免疫検査法を用いて抗体陽性の有無を調べた結果、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1）。



図1 剖検により見出された細頸囊虫

(2)平成 28 年度疫学調査：5 村 (Banjar Buana Kusuma, Banjar Juntal Kelod, Banjar Bantas, Banjar Pandan Sari, Banjar Bahel) を調査フィールドとして選定した。調査地域住民に対する聞き取り調査や糞便検査の結果、5名の有鉤条虫症患者 (B. Bahel 1名, B. Buana Kusuma 3名, B. Pandan Sari 1名) を見いだすことが出来た。また、同地区で飼育されているブタより血清を分離し、有鉤囊虫に対する抗体陽性の有無を調べた結果、陽性1個体および極めて弱い陽性4個体を見出した。それらを剖検したところ、有鉤囊虫の感染を確認できなかったが、2頭のブタに細頸囊虫が感染していることを確認した。

(3)平成 29 年度疫学調査：3 村 (Banjar Tegal Panti, Banjar Bhuana Kusuma, Banjar Bahel) で調査する予定であったが、調査地にあるアグン山が約 50 年ぶりに噴火する可能性が出てきたため、調査の数日前に立ち入り禁止となってしまった。そこで、調査予定地に近い同県の Serena 地区の 3 村 (Banjar Darma Laksana, Banjar Ijogading, Banjar Kaler) を急遽調査地として選定し、調査を実施した。調査地域住民に対する聞き取り調査や糞便検査の結果、テニア症患者を見いだすことが出来なかった。興味深いことに、土壌媒介性寄生虫の虫卵も全て陰性だった。また、同地区で飼育されているブタより血清を分離し、有鉤囊虫抗原ならびに細頸囊虫抗原を用いて抗体陽性の有無を調べた結果、有鉤囊虫抗原に対しては全て陰性であったが、細頸囊虫抗原に対して陽性を示したものが6例あった。それらを剖検したところ、5頭のブタに細頸囊虫が感染していることを確認した。この結果より、今回新たに調査に導入した細頸囊虫抗原が、細頸囊虫感染の検出に有用であ

ることが明らかとなった。

(4)テニア症血清検査法の開発：有鉤条虫および無鉤条虫より抽出したタンパク質を抗原として、ELISA 法によりテニア症患者血清から抗テニア条虫抗体を検出することが出来るか否かを解析した。その結果、テニア症患者の抗体を検出することが出来た（図 2）。また、両種の抗原とも、ELISA 法の抗原として使用できることが明らかとなった。加えて、タンパク質抽出に使用した条虫片節のロッ

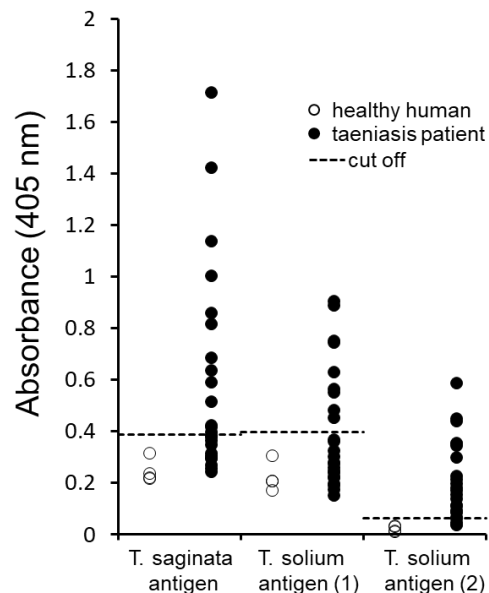


図2 テニア条虫抗原を用いたELISA

ト間で、吸光度のバックグラウンドならびに感度に差があることが明らかとなった。今後、この差を低減するための詳細な解析が必要である。

(5)簡便なテニア条虫鑑別 DNA 検査法の開発：有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫に特異的なプライマーをそれぞれ、FITC、DIG、TAMRA で標識し、それらプライマーの混在下で LAMP 反応を行った後、アガロース電気泳動により LAMP 産物を分離したところ、各種に特異的な鎖長を持つ LAMP 産物を確認できた（図 3）。また、各標識産物に対する特異抗体を用いて、LAMP 産物を特異的に検出する dot-ELISA 法を実施したところ、LAMP 産物を特異的にかつ

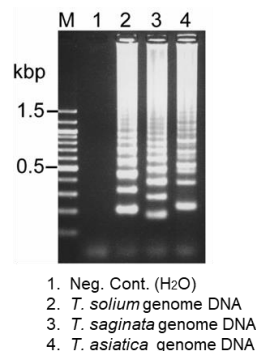


図3 マルチプレックスLAMP産物の電気泳動像

簡便に検出することが出来た (図 4)。アジア条虫からの LAMP 産物に関しては、電気泳動像は特異的増幅を示していたが、dot-ELISA 法では、無鉤条虫の LAMP 産物を検出するための抗 DIG 抗体により弱陽性を示していた (図 4, レーン 4)。これは、マルチプレックス LAMP 法に使用したプライマー配列が無鉤条虫とアジア条虫の COX1 遺伝子間

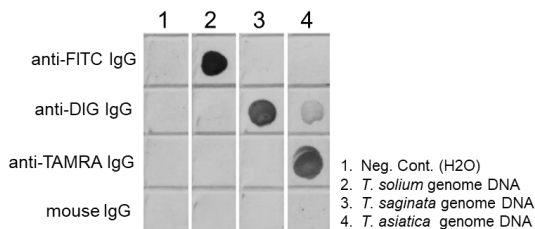


図4 dot-ELISA法によるマルチプレックスLAMP産物の検出

で高い相同性を持つためと考えられた。無鉤条虫の FIP プライマーは、アジア条虫の COX1 増幅領域内に設計されているため、DIG 標識無鉤条虫 FIP プライマーがアジア条虫増幅 DNA にアニーリングする可能性があり、抗 DIG 抗体でも認識されたと考えられた。一方、アジア条虫の標識 FIP プライマーは、無鉤条虫の COX1 増幅領域外に設計されているため、TAMRA 標識アジア条虫 FIP プライマーが無鉤条虫増幅 DNA にアニーリングすることが無く、抗 TAMRA 抗体で認識されなかったと考えられた。さらに、各条虫の片節およびテニア症患者糞便より抽出した複数の DNA 検体を用いて、マルチプレックス LAMP 法および dot-ELISA 法の評価を実施した結果、本法は極めて種特異的であること、検出感度も従来の方法と同程度であることが明らかとなった。今回開発した方法により、反応系間のコンタミネーションリスクを軽減した簡便なヒトテニア科条虫の DNA 鑑別検査が可能となった。

<引用文献>

- 1) 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
- 2) 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

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Sato MO, Sato M, Yanagida T, Waikagul J, Pongvongsa T, Sako Y, Sanguankiat S, Yoonuan T, Kounnavang S, Kawai S,

Ito A, Okamoto M, Moji K: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiatica*, their hybrids and other helminthic infections occurring in a neglected tropical diseases' highly endemic area in Lao PDR. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006260

- ② Yamashita M, Imagawa T, Sako Y, Okamoto M, Yanagida T, Okamoto Y, Tsuka T, Osaki T, Ito A: Serological validation of an alveolar echinococcosis rat model with a single hepatic lesion. *J Vet Med Sci* 2017;79:308-313
- ③ Sasaki M, Sako Y: The putative serine protease inhibitor (serpin) genes encoded on *Echinococcus multilocularis* genome and their expressions in metacestodal stage. *Vet Parasitol* 2017;233:20-24
- ④ Nkouawa A, Dschanou AR, Moyou-Somo R, Sako Y, Ito A: Seroprevalence and risk factors of human cysticercosis and taeniasis prevalence in a highly endemic area of epilepsy in Bangoua, west Cameroon. *Acta Trop* 2017;165:116-120
- ⑤ Swastika K, Dharmawan NS, Suardita IK, Kepeng IN, Wandra T, Sako Y, Okamoto M, Yanagida T, Sasaki M, Giraudoux P, Nakao M, Yoshida T, Eka Diarthini LP, Sudarmaja IM, Purba IE, Budke CM, Ito A: Swine cysticercosis in the Karangasem district of Bali, Indonesia: An evaluation of serological screening methods. *Acta Trop* 2016;163:46-53
- ⑥ Nkouawa A, Sako Y, Okamoto M, Ito A: Simple Identification of Human *Taenia* Species by Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination with Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:1318-1323
- ⑦ Santivanerz 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 Diagnosis of Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2015;53:3859-3863
- ⑧ Sako Y, Takayanagui OM, Odashima NS, Ito A: Comparative study of paired serum and cerebrospinal fluid samples from neurocysticercosis patients for the detection of specific antibody to *Taenia solium* immunodiagnostic antigen. *Trop Med Health*

〔学会発表〕（計4件）

- ① サトウ マルセロ オオタケ、サトウ恵、
Tiengkhan Pongvongsa、Surapol
Sanguankiat、Tipparayat Yoonuan、
Kounavang Senchan、Jitra Waikagul、
迫 康仁、柳田哲矢、川合 覚、伊藤 亮、
岡本宗裕、門司和彦. ラオス・サワナ
ケート県における3種の Taenia; Taenia
solium, T. saginata and T. asiatica
感染の発生 第86回 日本寄生虫学会
大会 2017年5月28日～5月29日、札
幌、日本
- ② 佐々木瑞希、迫 康仁. 多包虫は宿主
の補体活性を阻害する - 多包虫セリン
プロテアーゼインヒビターのはたらき
- 第85回 日本寄生虫学会大会
2016年3月19日～3月20日、宮崎、日
本
- ③ 柳田哲矢、Swastika Kadek、Dharmawan
Noman、Wandra Toni、佐藤 宏、迫 康
仁、伊藤 亮、岡本宗裕. バリ島およ
びニューギニア島における有鉤条虫の
遺伝的多様性とその起源 第85回 日
本寄生虫学会大会 2016年3月19日～3
月20日、宮崎、日本
- ④ Nkouawa Agathe、Ito Akira、Sako
Yasuhito. Development of a simple
identification of human Taenia
species by using multiplex LAMP and
dot-ELISA. 64th American Society of
Tropical Medicine & Hygiene Annual
Meeting, 2015年10月25日、フィラデ
ルフィア、米国

〔図書〕（計2件）

- ① 迫 康仁（分担）（2016年）：人獣共
通感染症、医薬ジャーナル社、
pp. 511-515.
- ② 迫 康仁（分担）（2018年）：シンプ
ル微生物学、南江堂、pp. 381-395.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迫 康仁 (SAKO, Yasuhito)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：40312459

(2) 分担研究者

岡本宗裕 (OKAMOTO, Munehiro)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号：70177096

柳田哲矢 (YANAGIDA, Tetsuya)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：40431837

伊藤 亮 (Ito, Akira)
旭川医科大学・医学部・客員教授