

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08953

研究課題名(和文) 劇症型アニサキス症の病態形成機構の解明と原因分子の同定

研究課題名(英文) Study on forming mechanism and causes of symptomatic anisakiasis

研究代表者

水上 一弘 (Mizukami, Kazuhiro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：60548139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アニサキス症には、腹部症状を有する劇症型と、無症状で偶然発見される無症候型がある。劇症化の原因を解明するため、まず感染したアニサキス虫体の種を調べたが、虫体の種類と腹部症状に関連はなかった。次に問診により、劇症型患者の1/3にアニサキス罹患歴があるが、無症候型患者には罹患歴がないことが明らかになった。さらにアニサキスをマウスに感染させ、血中IgEを測定したところ、単回感染ではIgEは上昇しないが複数回感染で総IgE、アニサキス特異的IgEが徐々に上昇した。以上より、アニサキス症の劇症化はアニサキス種によるものよりも、複数回感染による宿主の感受性の増加によるアレルギー反応であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：> It is known that there are two types of anisakidosis, namely symptomatic and asymptomatic anisakidosis. To understand how these distinct disease symptoms are caused, we investigated the species of Anisakis from patients with anisakidosis, however there was no correlation between the species and abdominal symptoms. We found that one third of symptomatic patients had past medical history of anisakidosis but asymptomatic patients had no previous history. When we infected mice with anisakis and measured blood IgE levels, total IgE and anisakis antigen-specific IgE levels were gradually elevated by multiple infections but not by single infection. These results suggest that symptomatic anisakidosis is caused by allergic inflammation directed against the larval antigen.

研究分野：消化器内科

キーワード：アニサキス症 アレルギー 劇症型因子 無症候型アニサキス症 PCR-RFLP法

### 1. 研究開始当初の背景

海棲ほ乳類を終宿主とするアニサキスは、幼虫期にサバやイカなどの多数の魚介類の体内に寄生する。ヒトがこれらを生食した場合、その幼虫が胃壁に穿入し激しい腹痛を引き起こすが、アニサキス症である。魚を生食する習慣のある我が国では、アニサキス症は年間2,000例発症する最も重要な寄生虫性疾患のひとつである。

激しい腹痛を伴うものを劇症型アニサキス症というが、一方で上部消化管内視鏡検査の普及に伴い、腹部症状のない、検査で偶発的に発見される、無症候型アニサキス症が増加している。無症候型も虫体は胃に穿入しているが、どうして腹痛の有無が生じるのであろうか。

近年の分子生物学的手法の発展によりアニサキス属線虫は9種に分類できるようになった。その種類により生息域に特徴があり、太平洋系群のサバには、*Anisakis simplex sensu stricto* (*A. simplex s.s*)が、日本海系群のサバには *Anisakis pegreffii* (*A. pegreffii*)が優先的に生息していることが明らかになっている(図1、文献より)。

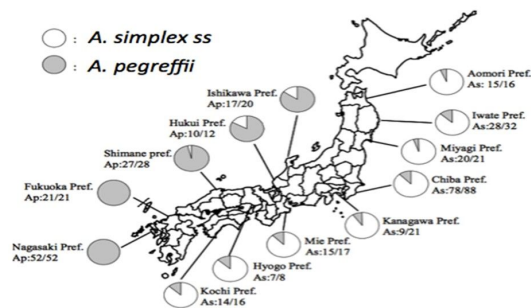


図1. 日本近海のアニサキス種の分布(文献より)

ある報告では、腹痛を発症した劇症型アニサキス症において、内視鏡的に摘出された虫体は、99%が太平洋側のサバから検出される *A. simplex s.s* であった( )ということで、アニサキス症の劇症化には、虫体の種類が関係しているという指摘がある。しかしながら、サバに生息するアニサキスの大部分が *A. pegreffii* である九州北部出身である申請者の近隣でも、アニサキス症はよく経験され、長崎県の病院でもアニサキス症の受診があるとの情報を入手したため、これらの仮説を検証する余地があると考えた。

### 2. 研究の目的

日常診療で遭遇したアニサキス症症例を、前向きに蓄積していき、劇症型アニサキス症の病態形成機構を解明し、病因や原因分子を同定することで、劇症化のリスク管理を行える新たなシステムを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 劇症型アニサキス患者と無症候型アニサキス症感染者から得られたアニサキス虫体のサンプリングを行った。サバに寄生するアニサキスの種が異なる2地域、すなわち *A. simplex s.s* が多い太平洋側に位置する大分県6施設、*A. pegreffii* が多く生息する日本海側に位置する長崎県4施設に協力を仰ぎ、劇症型、無症候型問わず、内視鏡的に摘出されたアニサキス虫体を回収し、エタノール固定で保存した。併せて、宿主側の因子として患者背景を把握するため、以下の情報を入手した。

患者情報  
年齢、性別、病歴、既往歴、薬歴、アニサキス歴、アレルギー歴

現病歴聴取  
腹部症状の有無、摂取した魚種、入手経路、調理名、摂取時間、発症時間、症状詳細、随伴症状、症状推移

内視鏡所見  
虫体の数、刺入部位、その他特記すべき内視鏡所見

(2) (1) で得られたアニサキス虫体の種類の解析を行った。アニサキス幼線虫からDNAを抽出し、リボソームDNAのITS1, 5.8S rRNA および ITS2 (ITS1-5.8S-ITS2) 領域(約900bp)を標的としたPCRを行い、PCR増幅産物のシーケンス解析や制限酵素 (*HinfI* および *HhaI*) によるPCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) パターンによりアニサキスの種を決定した。

(3) BALB/c マウスにアニサキスを単回投与する群、2週間ごとに複数回投与する群、無感染群(コントロール群)に分け、サバから摘出した生きたアニサキスを3匹ずつ2週間ごとに投与した。2週間ごとに血清を回収し、総IgE値、アニサキス特異的IgE抗体価をELISA法により測定した(図2)。

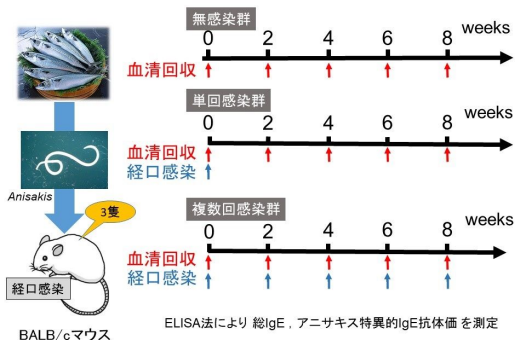


図2. アニサキス経口感染免疫実験

### 4. 研究成果

(1) アニサキス症患者から摘出されたアニサキス種を表1を示す。全53隻中40隻(75%)で *A. simplex s.s*、11隻(21%)で *A. pegreffii* が、2隻(4%)で *A. typica* が認

められた（ヒトの胃に感染した *A. typica* の日本での検出例は、世界初であった）。既報の通り、*A. simplex s.s* が高い寄生率を示すものの、他の種類でも腹痛を呈することが示唆された。逆に無症候型でも *A. simplex s.s* の寄生率が高かったことから、アニサキス症の症状を規定する因子は、虫体の種類よりも他にあることが示唆された（表 1）。

表 1 . 地域別の劇症型アニサキス症及び無症候型アニサキス症患者から抽出されたアニサキス虫体の種類

大分					
劇症			無症候		
<i>A. simplex ss</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. typica</i>	<i>A. simplex ss</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. typica</i>
74	9	1	16	1	1
長崎					
劇症			無症候		
<i>A. simplex ss</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. typica</i>	<i>A. simplex ss</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. typica</i>
12	6	0	0	1	0

(2) また、表 2 に宿主側であるアニサキス症に罹患した患者背景を、腹部症状別（劇症型/無症候型）に示す。性別、年齢、胃の穿入部位に明らかな差は認められなかった。アニサキス罹患歴について、劇症型を来たした患者の 31% が、過去にアニサキス症既往を有している一方で、無症候型では過去にアニサキス症の経験がないことから、劇症化の機序は、繰り返し感染することによる、アニサキスに対するアレルギー応答ではないかと考えられた。

表 2. 腹部症状別の患者背景(宿主)の特徴

	劇症型	無症候型	P値
症例数	37	12	
男性	27	7	n.s.
年齢	60.9±14.2(26-80)	64.4±10.1(51-83)	n.s.
胃穿入部位 上部	16 (35%)	3 (23%)	n.s.
中部	25 (54%)	7 (54%)	
下部	5 (11%)	3 (23%)	
アニサキス罹患歴	12 (31%)	0 (0%)	P=0.0478

(3) マウスを用いたアニサキス経口感染による免疫実験の結果を図 3, 4 に示す。アニサキスを単回経口感染させたマウスでは、総 IgE 値の上昇は認めなかったが、複数回感染させることで、徐々に総 IgE 値は上昇した。アニサキス特異的 IgE 抗体価でも同様の結果が得られた。以上より、アニサキスに繰り返し感染することで IgE レベルが徐々に上昇し、アニサキスに対して宿主は感受性を増すことが予想された。アニサキス症の劇症化には、アニサキス抗原に対するアレルギー応答が関与することが示唆された。

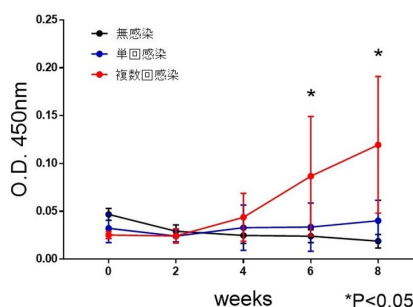


図 4. アニサキス経口感染免疫実験によるアニサキス特異的IgE抗体価の変化

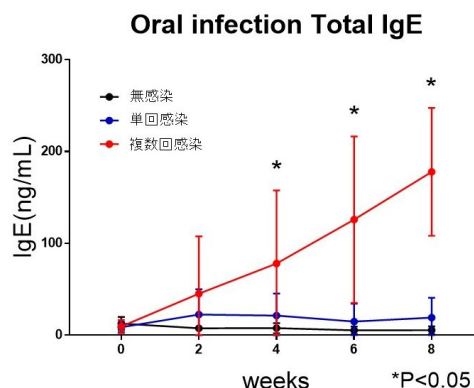


図 3. アニサキス経口感染免疫実験による総IgE値の変化

#### < 引用文献 >

Duiason KM, Yoshinaga T, Ogawa K. Distribution of Anisakis species larvae from fishes of the Japanese waters. Parasitol Int 60: 223-226, 2011.

Umehara A, Kawakami T, Araki J et al. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. Parasitol Int 56: 211-215, 2007.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

飛騨野 真也、水上 一弘、佐知 望美、  
神山 長慶、小林 隆志、アニサキス症

の最近の知見と動向、医学と薬学、査読無、74巻、2017、1387 - 1392

Mizukami K, Ogawa R, Okamoto K, Shuto M, Fukuda K, Sonoda A, Matsunari O, Hirashita Y, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Objective Endoscopic Analysis with Linked Color Imaging regarding Gastric Mucosal Atrophy: A Pilot Study, Gastroenterology Research and Practice, 査読有, 2017 DOI:10.1155/2017/5054237

Kodama M, Okimoto T, Mizukami K, Murakami K, Endoscopic atrophic classification before and after H. pylori eradication is closely associated with histological atrophy and intestinal metaplasia, Endoscopy International Open, 査読有, 2015 DOI: 10.1055/s-0034-1392090

〔学会発表〕(計27件)

Hidano S, Kondo T, Mizukami K, Nakatani M, Kamiyama N, Sachi N, Murakami K, Hirose O and Kobayashi T. Analysis of a fluorescent material in Anisakis larvae. 第11回寄生虫感染免疫研究会、2018

水上 一弘 他、ヒト感染アニサキス症における病態形成メカニズムの検証、第59回日本消化器病学会大会、2017

水上 一弘 他、アニサキス症の発症要因および内視鏡所見と臨床症状の関連の検討、第93回日本消化器内視鏡学会総会、2017

Sachi N, Hidano S, Ito H, Mizukami K, Shirakami K, Kamiyama N, Murakami K and Kobayashi T. Analysis of pathogenic mechanism regulating the manifestation of Anisakidosis. 第10回寄生虫感染免疫研究会、2018

水上 一弘 他、劇症型アニサキス症における病態形成メカニズムの検証、第86回日本寄生虫学会大会、2017

Mizukami K et al. The available of Linked Color Imaging, which is a new image-enhanced endoscopy can discriminate the gastric mucosal status, especially gastric mucosal atrophic borders, Digestive Disease Week 2017, 2017

伊藤 秀幸、飛弾野 真也、白神 浩平、水上 一弘 他、胃アニサキス症の病態

形成機構の解明、第69回日本寄生虫学会南日本支部大会、2016

白神 浩平、飛弾野 真也、中村 匠子、野口 香緒里、水上 一弘 他、九州産サバの水揚げ地別のアニサキス寄生率・筋肉移行率および寄生アニサキス種の解析、第68回日本寄生虫学会南日本支部大会第65回日本衛生動物学会南日本支部学会合同大会、2015

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 一弘 (MIZUKAMI, Kazuhiro)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号： 60548139

(2) 研究分担者

村上 和成 (MURAKAMI, Kazunari)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号： 00239485

(3) 連携研究者

小林 隆志 (KOBAYASHI, Takashi)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号： 30380520

(4) 研究協力者

阿部 寿徳 (ABE, Hisahori)  
小野 英樹 (ONO, Hideki)  
石田 哲也 (ISHIDA, Tetsuya)  
永井 敬之 (NAGAI, Takayuki)  
香川 浩一 (KAGAWA, Koichi)  
藤岡 利生 (FUJIOKA, Toshio)  
大仁田 賢 (OHNITA, Ken)  
大場 一生 (OHBA, Kazuo)  
岡本 健太 (OKAMOTO, Kenta)  
吉田 亮 (YOSHIDA, Ryo)  
卜部 繁俊 (URABE, Shigetoshi)  
高森 謙一 (TAKAMORI, Kenichi)  
本田 徹郎 (HONDA, Tetsuro)