

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07090

研究課題名(和文) 実臨床データを利用した寄生虫症最適検査診断システムの構築

研究課題名(英文) Development of an optimal diagnostic system for parasitic diseases

研究代表者

丸山 治彦 (Maruyama, Haruhiko)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90229625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野に寄生虫症検査依頼のあった3,085症例の臨床情報と検査結果を分析した。検査依頼症例の症状・症候で最も多かったのが胸部症状または胸部異常画像所見で、全体の約3分の1を占めた。腹部症状、神経症状、眼病変がこれに続いた。末梢血好酸球増多または局所的好酸球浸潤をともなう症例は全体の54.5%であった。検査の結果最も寄生虫症の割合の高かった症候は皮膚爬行疹(70.2%)で、次いで皮下腫瘍(65.4%)、肝異常陰影(43.8%)が続いた。好酸球増多をともなう場合は陽性率はそれぞれ10%程度高くなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫や糸虫、吸虫による寄生虫症は疾患としては単純であり、正しく診断がつけばほとんどの場合に治療は容易である。ところがごく稀にしか遭遇しないため、一般臨床医にとっては典型的な苦手感染症になっている。本研究は、現在の日本の日常診療の中で、どのような訴えや所見がある場合にどのような寄生虫症の確率が高いのかを明らかにした。また同時に、虫体由来抗原または組換え寄生虫抗原を用いた信頼性の高い系を確立した。これらを組み合わせることにより、誰がどの医療機関を受診しても、正しく寄生虫症の診断に到達するような診断プロトコルの策定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed clinical information and test results at our laboratory of 3,085 patients, who had been suspected as having parasitic infections. The most frequent symptom was pulmonary complaints and/or chest abnormal imaging, followed by abdominal symptoms, neurological disorder, and visual disorders. Peripheral blood eosinophilia or local eosinophil infiltration were noted in 54.5% of patients. Based on our laboratory tests, including measuring anti-parasite antibodies, infection-positive ratio was most high in creeping eruption (70.2%), followed by subcutaneous tumor (65.4%), and abnormal hepatic imaging (65.4%). When eosinophilia was accompanied with these symptoms, positive ratios were higher by approx. 10%.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生虫症 症候 鑑別診断 好酸球増多 抗体検査

1. 研究開始当初の背景

感染症は、病気の成り立ち自体は比較的単純である。感染性の病原体—ウイルス・細菌・真菌・寄生虫など—によって病的な変化が引き起こされ、炎症や臓器機能の障害により種々の症状が発生する。診断は病原体の特定とほぼ同義であり、同定された病原体に有効な薬剤を投与することで根本的な治療が可能になる。寄生虫症も、血液や糞便などの臨床検体の中に虫体、虫卵やシストを見いだせば診断が確定する。しかしながら、病原体の検出が困難、あるいは事実上不可能な一群の寄生虫症は抗体検査によってしか診断できないので、積極的に疑わない限り決して診断されることはない。

今日の日本では寄生虫症にはごく稀にしか遭遇しないため、一般臨床医にとっては典型的な苦手感染症になっている。とくに人体内で成熟できない寄生虫の感染では臨床検体中に虫体は見出されず、臨床症状と抗体検査で診断せざるを得ない。一般に未だ流布している「寄生虫疾患は検便で診断するもの」というイメージは、今日の実情には全く即していない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内臓幼虫移行症に代表される病原体の直接検出が困難な寄生虫症を対象に、どういう症状の場合に何という寄生虫を疑うべきであり、その抗体検査の検出率はどの程度なのかを定量的に明らかにし、同時に信頼できる抗体検査系を提供して診断を円滑に進める仕組みを構築する。本研究の結果により、診断が難しい寄生虫症の明確で標準的な検査診断プロトコルが確立し、通常の診療の中で寄生虫症が適切に位置づけられる。寄生虫症診療ガイドライン等の形で広く周知を図ることにより寄生虫症の認知が進み、これまで気づかれなかった寄生虫症が掘り起こされて、患者は適切な治療を受けることができるようになる。

3. 研究の方法

本研究の対象疾患は動物由来の回虫類感染症、顎口虫症、マンソン孤虫症、肺吸虫症、肝蛭症で、組換え寄生虫抗原を用いた大規模検査に対応した抗体検査系の確立と、実臨床データに基づく鑑別診断フローの作製という、2つのサブプロジェクトから構成される。

(1) 組換え寄生虫抗原を用いた抗体検査系の確立

すでに診断抗原として報告されている寄生虫組換え抗原を作製し、寄生虫症診断目的で送付された血清を用いて抗体検査の性能を評価する。作製する抗原は以下の通りである。

トキソカラ：Tc-CTL-1/Tc-TES-26、ブタ回虫：As16、顎口虫：Gs 21/24、マンソン孤虫：SeCP、肺吸虫：PwCPs、肝蛭：CatL1

(2) 鑑別診断フローの作製

研究室が保有する全国の医療機関から送付された臨床データをもとに、患者を主要症状(呼吸器症状、腹部症状、神経症状等)や末梢血好酸球数などのデータによりいくつかの亜集団に分ける。そして、それぞれの亜集団内での寄生虫症の割合、どのような寄生虫症が多数を占めたか等を定量的に解析する。

4. 研究成果

(1) 大規模検査に対応した抗体検査系の確立

先行研究によって診断抗原として有用とされる組換え寄生虫抗原のうち、rCatL1 は明確な有効性を確認できた。予備的な実験の段階でトキソカラとブタ回虫抗原では十分な感度を得ることができず、顎口虫と肺吸虫では新鮮な虫体の入手が困難で組換え体を得ることができなかった。マンソン孤虫症については、別研究においてマンソン裂頭条虫の概要ゲノムが決定できたことから、発現解析から最も検出量の多い分泌タンパク(機能不明)を同定して組換え抗原を作製したが、患者血清と反応しなかった。また、既報のシステインプロテアーゼも患者血清との結合がみられなかった。

以上より、動物由来回虫感染症、肺吸虫症、マンソン孤虫症については従来通りの分泌排泄抗原または虫体粗抗原を用いた。

当初計画通りに研究が進んだのは肝蛭症の抗体検査系で、システインプロテアーゼの一種カテプシン L1 の組換えタンパク質(rCatL1)を大腸菌で作製し、既知血清との結合をELISA法で検討した。用いたリファレンス血清は、肝蛭症 10、非感染陰性対照 29、他の寄生虫症 119(肝吸虫症 9、肺吸虫症 24、住血吸虫症 10、マンソン孤虫症 19、顎口虫症 28、トキソカラ症 29)であった。

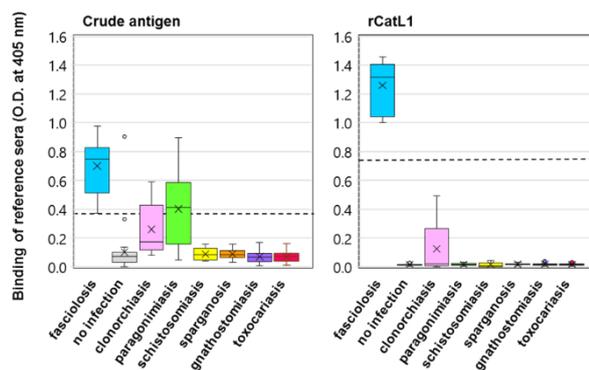


図1 リファレンス血清の結果

結果は図1に示すとおりで、従来用いられていた虫体粗抗原と違い、肝蛭症血清とそれ以外の寄生虫感染血清とのオーバーラップが全くみられなかった。リファレンス血清では、rCatL1-ELISA は感度特異度ともに 100%を得ることができた。

次にこの検査系が実際の診断にどの程度有用かを検討するため、2018年1月から2019年2月までに検査目的で受け取った全て血清サンプル311検体について、網羅的にrCatL1-ELISAを実施した(図2)。この検体には肝蛭症と診断されたものが7つ含まれており(図2黒丸)、rCatL1-ELISAではこのすべてが陽性となった。また、粗抗原のELISAではきわめて多数の疑陽性がみられたのに対し、rCatL1-ELISAでは3検体のみがカットオフを上回った。ところが、この3検体について臨床情報を見直したところ、画像データの再検討により1検体は肝蛭症の見落としであったことが分かった。これにより、実検体311サンプルによる感度は100%、特異度99.3%であった。

さらに、rCatL1は通常のプレートELISAだけでなくマルチドットELISAでも感染血清を検出することができた(図3)。これにより、イムノクロマトグラフィ法を用いた肝蛭症迅速診断キットの開発が十分可能であることがシメされた。

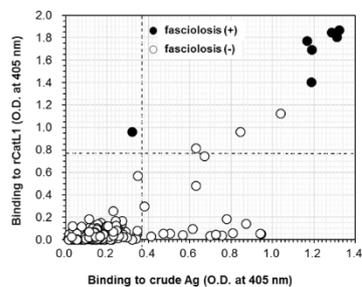


図2 311血清の肝蛭粗抗原および組換えCatL1抗原への結合

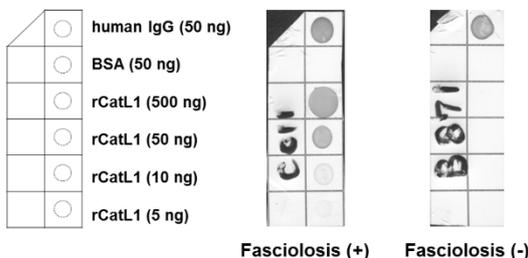


図3 組換えCatL1を用いたマルチドットELISA

(2) 実臨床データに基づく鑑別診断フローの作製

宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野に、2011年から2020年の10年間に寄生虫検査依頼のあった3,085症例の臨床情報と検査結果を分析した。主要症状による分類は表1に示すとおりで、好酸球増多以外に症状を欠くもの、胸部症状、腹部症状、皮疹、神経症状などである。

検査依頼症例の症状・症候で最も多かったのが胸部症状または胸部の画像所見異常で、全体の約3分の1を占めた。腹部症状、神経症状、ぶどう膜炎などの眼病変、肝異常画像、そして各種の皮疹がこれに続いた。好酸球増多は寄生虫症を疑う大きなきっかけであり、末梢血好酸球増多または局所の好酸球浸潤・膿瘍等をともなう症例は、全体の54.5%であった。

検査の結果、症例の数として寄生虫症が最も多かったのが胸部症状または胸部の画像所見異常で、好酸球増多をともなうものが寄生虫症全体の4割、好酸球増多をともなわないものでも全体の1割に達した。原因寄生虫は動物由来の回虫類(トキソカラまたはブタ回虫)か肺吸虫がほとんどであった。

次に症例数が多かったのが肝の異常陰影で、原因寄生虫は動物由来の回虫類、肝蛭、そして肺吸虫であった。今回の研究で、肺吸虫は皮下結節や腹膜の炎症性腫瘍など肺外病変を多く形成することが明らかとなり、これらの所見があるときに、肺吸虫症も鑑別入れる必要のあることが示された。

腹部症状は陽性の割合は高くなかったが、症例数は肝異常陰影に次いで多かった。原因寄生虫は、便検査陰性で末梢血好酸球数が高い時はトキソカラ症が多く、好酸球に関係なく呼吸器症状や爬行疹以外の皮疹、急激な体重減少など他の

表1 病型ごとの寄生虫症陽性率

	好酸球増多 局所浸潤	陽性	陰性	陽性率 (%)
好酸球増多のみ	+	20	106	15.9
胸部症状・異常陰影	+	329	422	43.8
	-	79	230	25.6
腹部症状	+	38	92	29.2
	-	36	115	23.8
肝異常陰影	+	53	32	62.4
	-	25	68	26.9
肝機能障害	+	4	29	12.1
	-	4	20	16.7
浮腫	+	10	55	15.4
	-	0	15	0.0
皮下腫瘍	+	8	3	72.7
	-	26	15	63.4
皮膚爬行疹	+	9	2	81.8
	-	24	12	66.7
その他皮疹	+	23	94	19.7
	-	8	29	21.6
頭蓋内病変	+	3	15	16.7
	-	3	59	4.8
髄膜炎	+	4	13	23.5
	-	0	16	0.0
脊髄炎	+	17	59	22.4
	-	10	40	20.0
ぶどう膜炎	+	5	5	50.0
	-	46	133	25.7
不明熱	+	2	36	5.3
	-	6	64	8.6
その他	+	10	38	20.8
	-	3	48	5.9

症状も呈するときには糞線虫症が比較的目立った。特に高齢者や免疫不全状態にある患者では、糞線虫症は未だ忘れてはならない疾患である。

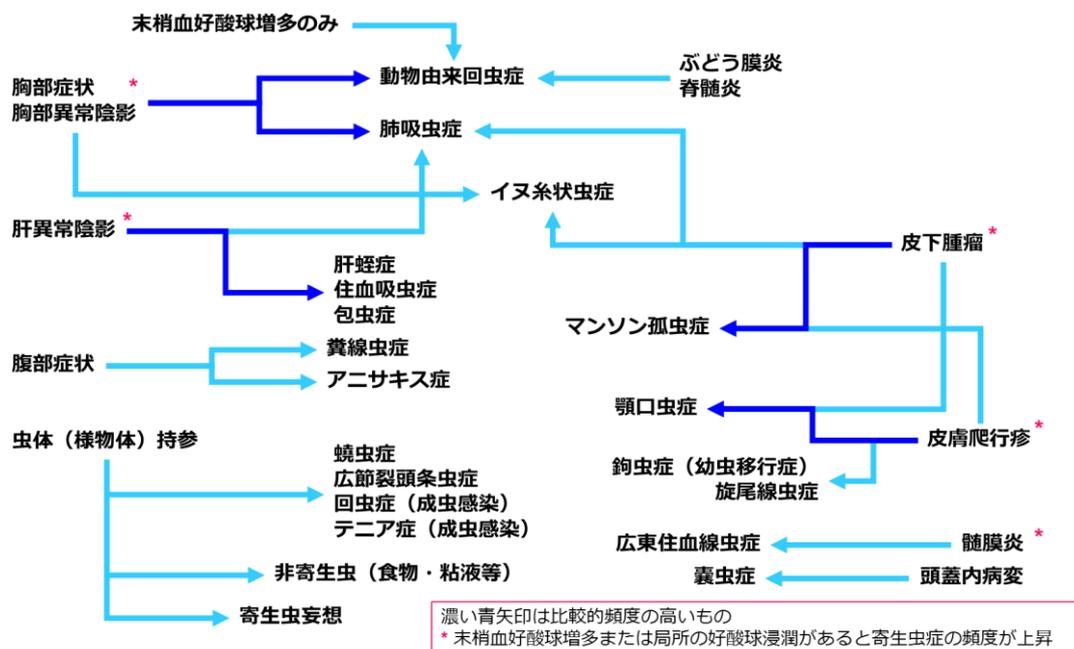
一方で、割合として最も寄生虫症率の高かった症候は皮膚爬行疹（70.2%）で、次いで皮下腫瘍（65.4%）、肝異常陰影（43.8%）が続いた。好酸球増多をともなう場合は陽性率はそれぞれ10%程度高くなった。皮膚爬行疹は顎口虫、マンソン孤虫、そしておそらく旋尾線虫によると考えられた（旋尾線虫に対する抗体検査は未対応）。皮下腫瘍はほとんどがマンソン孤虫が原因だったが、一部が肺吸虫、イヌ糸状虫、そして稀なものとして腎虫があった。神経症状は全体として寄生虫症の割合は低く、注意すべきものに動物由来の回虫類による脊髄炎、広東住血線虫による好酸球性髄膜炎、有鉤囊虫症があった。まれではあるが、肺吸虫症、住血吸虫症における頭蓋内病変もあった。

いわゆる症候・症状とは異なるが、家族や友人が肺吸虫症と診断されて受診した症例では、好酸球増多のあった22例すべてが肺吸虫陽性であった。この寄生虫は家族内や友人間での小規模集団発生がみられることは以前より指摘されていたが、それがあらためて確認された。また、「皮膚から寄生虫が出てきた」「体の中に寄生虫がいるのを感じる」等を主訴に受診する例がある。ごく稀に、皮膚から真に寄生虫が排出される症例は実在するが（寄生バエ、マンソン孤虫など）、このような「間違いなく寄生虫がいます」というような訴えは、客観的に寄生虫の存在を確認できないことがほとんどであり、いわゆる「寄生虫妄想」であると考えざるを得ない。

本研究で実際の症例から得られた、主な症状・症候と寄生虫症の関係を図4に示す。ここで明らかなのは、少なくとも日本国内においては臨床的に問題になる寄生虫症（蠕虫症のみ、原虫症を除く）の種類は実はそれほど多くはないということである。その中で、動物由来の回虫類感染症は比較的多彩な症状を示しうる。また肺吸虫症も意外に肺外病変が多い。皮下腫瘍・皮膚爬行疹も複数の寄生虫が原因になり得るが、生検で虫体が摘出されることがあり、その場合は形態学的鑑別または遺伝子検査によって虫種を確定できる。

寄生虫症で虫体・虫卵が得られないときには抗体検査が主要な検査法となる。本研究では組換え肝蛭抗原 CatL1 を用いた抗体検査法の高い信頼性を示すことができた。住血吸虫症、包虫症、糞線虫症についても実用段階の組換え抗原が存在する。今後は、動物由来の回虫類感染症、肺吸虫症、マンソン孤虫症、顎口虫症、広東住血線虫症で組換え抗原への移行をすすめるとともに、粗抗原の入手が事実上不可能な旋尾線虫タイプ X の診断抗原の開発が急務である。

図4 主な症候と寄生虫症の関係



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nguyen YTH, Hayata Y, Sonoda S, Nonaka N, Maruyama H, Yoshida A.	4. 巻 75
2. 論文標題 Establishment of a serodiagnosis system for the detection of <i>Toxocara</i> spp. and <i>Ascaris suum</i> infection in chickens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.102022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshida A, Doanh PN, Maruyama H	4. 巻 199
2. 論文標題 Paragonimus and paragonimiasis in Asia: An update.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Trop.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2019.105074.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kikuchi T, Maruyama H	4. 巻 75
2. 論文標題 Human proliferative sparganosis update.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.102036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ko PP, Sakaguchi K, Yoshida A, Maruyama H, Nonaka N, Nagayasu E.	4. 巻 72
2. 論文標題 First molecular identification of <i>Strongyloides vituli</i> in cattle in Japan and insights into the evolutionary history of <i>Strongyloides</i> parasites of ruminants.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101937.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Phoo Pwint Ko, Kazuo Suzuki, Marco Canales-Ramos, Myo Pa Pa Thet Hnin Htwe Aung, Wah Win Htike, Ayako Yoshida, Martin Montes, Kazuhiro Morishita, Eduardo Gotuzzo, Haruhiko Maruyama, Eiji Nagayasu.	4. 巻 78
2. 論文標題 1. Phylogenetic relationships of Strongyloides species in carnivore hosts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102151.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sugiyama Takutoshi, Ichikawa-Seki Madoka, Sato Hironobu, Kounosu Asuka, Tanaka Mio, Maruyama Haruhiko	4. 巻 82
2. 論文標題 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant Fasciola cathepsin L1 for the diagnosis of human fasciolosis caused by Fasciola hepatica/gigantica hybrid type	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102311 ~ 102311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Yoshifumi, Ikematsu Yuki, Nakanishi Takayuki, Ogawa Yuji, Taen Ryuichi, Nakashima Yasunori, Okabe Hironao, Yoshida Ayako, Maruyama Haruhiko	4. 巻 81
2. 論文標題 An outbreak of Paragonimus westermani infection among Cambodian technical intern trainees in Japan, exhibiting various extrapulmonary lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102279 ~ 102279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Mio, Kildemoes Anna O., Chadeka Evans Asena, Cheruiyot Benard Ngetich, Sassa Miho, Moriyasu Taeko, Nakamura Risa, Kikuchi Mihoko, Fujii Yoshito, de Dood Claudia J., Corstjens Paul L.A.M., Kaneko Satoshi, Maruyama Haruhiko, Njenga Sammy M., de Vruh Remco, Hokke Cornelis H., Hamano Shinjiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Potential of antibody test using Schistosoma mansoni recombinant serpin and RP26 to detect light-intensity infections in endemic areas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102346 ~ 102346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakashima Shinya, Takajo Ichiro, Maruyama Haruhiko, Nagayasu Eiji	4. 巻 105
2. 論文標題 Abdominal paragonimiasis after consumption of wild boar meat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 40～41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2021.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Nobuhiro, Tsubouchi Hironobu, Setoguchi Kensuke, Horiguchi Takanori, Shigekusa Takafumi, Tsuchida Shinpei, Matsuo Ayako, Oda Yasuharu, Yanagi Shigehisa, Maruyama Haruhiko, Nakazato Masamitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinico-radiologic Characteristics of Pulmonary Visceral Larva Migrans Caused by <i>Ascaris suum</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6109-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Tomoko, Cuong Ngo Chi, Hamaguchi Sugihiko, Kikuchi Mihoko, Katoh Shungo, Anh Le Kim, Anh Nguyen Thi Hien, Anh Dang Duc, Smith Chris, Maruyama Haruhiko, Yoshida Lay-Myint, Cuong Do Duy, Thuy Pham Thanh, Ariyoshi Koya	4. 巻 14
2. 論文標題 Meningitis patients with Angiostrongylus cantonensis may present without eosinophilia in the cerebrospinal fluid in northern Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 0008937～0008937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0008937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丸山治彦
2. 発表標題 日本における寄生虫症の動向と免疫診断について
3. 学会等名 第30回 日本臨床微生物学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山治彦
2. 発表標題 寄生虫症抗体検査のこれまでとこれから
3. 学会等名 第30回日本臨床寄生虫学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山治彦、鴻巣明日香、阿部愛、村瀬一典、菊地泰生、長安英治
2. 発表標題 現在のわが国における寄生蠕虫症の症状について
3. 学会等名 第29回日本臨床寄生虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruhiko Maruyama, Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida
2. 発表標題 Paragonimiasis among Asian immigrants in Japan
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山治彦
2. 発表標題 日本における寄生虫症の動向と免疫診断について
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------