

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08816

研究課題名（和文）裂頭条虫症とテニア症の革新的な鑑別診断法の開発

研究課題名（英文）Development of an innovative differential diagnosis method for diphyllbothriasis and taeniasis

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：寄生虫の鑑別診断を臨床現場や流行現場で実施するための方法を開発した。具体的には、LAMP法を用いた裂頭条虫3種ならびにテニア条虫3種の鑑別DNA検出法にICTによる増幅DNAの分別検出法を組合わせた検査法を開発を行った。LAMP法を用いた種特異的なDNA増幅検査法にはミトコンドリア遺伝子のCOX1を標的とした。また、プライマーの5'末端をFITC、Biotin、DIGで標識することでICTによる増幅DNAの分別検出を行った。裂頭条虫DNA、テニア条虫DNA、その他寄生虫DNAを用いた精度解析により、開発した検査法は特異度が高い検査法であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生虫を鑑別診断することは「臨床と公衆衛生」にとって非常に重要である。本研究課題で開発した鑑別診断法は寄生虫検査の経験のない人でも迅速かつ簡便に寄生虫を鑑別診断でき、さらに社会実装できる高感度なpoint-of-careテスト（POCT）である。また、本研究の成果はウイルス、細菌、原虫、吸虫、線虫などの感染症の、汎用性の高い簡便で迅速な病原体同定法の開発に容易に応用でき、社会に与えるインパクトは大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, differential diagnosis methods of parasites in clinical and endemic fields were developed. Differential diagnostic methods developed combines a differential DNA detection method for three Dibothriocephalus species and three Taenia species using the LAMP method with a method for differential detection of amplified DNA by ICT. The species-specific DNA amplification test using the LAMP method targeted the mitochondrial gene COX1. In addition, the 5' end of the primer was labeled with FITC, biotin, and DIG to enable differential detection of amplified DNA by ICT. Accuracy analyses by using Dibothriocephalus DNA, Taenia DNA, and other parasite DNA revealed that the differential diagnosis methods developed in this study have high specificity.

研究分野：寄生虫学

キーワード：裂頭条虫 テニア条虫 鑑別診断 POCテスト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、寄生虫症の正確な診断を行える医療機関は決して多くはない。そのため、大多数の寄生虫症は正確な診断さえできれば、わざわざ大きな病院を受診する必要もなく小規模な診療所でも数日で完治可能にも関わらず、適切で迅速な治療がなされていない。

裂頭条虫症は、現在の日本でも頻繁に報告(年約400例)され、申請者も臨床現場からしばしば相談を受ける寄生虫症である。本症は、魚の生食を好む日本人によくみられ、日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、*Dibothriocephalus dendriticus* などの成虫が寄生することにより引き起こされる。かつては北海道、東北、北陸を中心に発生が見られたが、現在は全国で報告されている。患者は、肛門から白いテープ状のものが出ていることで気づいたり、あるいは糞便中に白いテープ状のものを見つけたりすることで、不安となり病院を受診することが多い。

同様な経緯で病院を受診する寄生虫症に、テニア症がある。本症は、有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫の成虫が寄生することで引き起こされ、それぞれ豚肉、牛肉、豚レバーから感染する。本症は、日本では極めて散発的なものである。しかし、本来日本にはいないとされていたアジア条虫の集団感染が2010年以降関東地方で報告されている。また、有鉤条虫の幼虫はヒトに感染することができ、致死的な脳有鉤囊虫症を引き起こす。この有鉤囊虫症は、臨床上極めて重要な寄生虫疾患である。

裂頭条虫症、テニア症、ともに診断がつけば、プラジカンテルの内服により治療できる。ただし、プラジカンテルは虫体の融解を誘導するため、有鉤条虫に対して使用した場合、虫卵が小腸に遊離することになり、患者が幼虫に感染し有鉤囊虫症を引き起こすリスクが高くなる。

臨床上の問題は、上記の観点から有鉤条虫症を確実に鑑別しなければならないが、それが非常に難しいことである。診断は肛門から排出された寄生虫の形態でなされるが、経験の浅い人では種を特定することができない。また、糞便検査による虫卵検出も診断に有効だが、感度は非常に乏しい上、形態で種を同定することは不可能である。

公衆衛生上の問題は、日本の裂頭条虫症の発生状況を把握できないことである。条虫症が食品衛生法施行規則(2012年改正)で、食中毒事例として届出が義務づけられているが、2012年以降1例も届け出されていない。これは、レセプト情報・特定健診等情報データベース(厚生労働省;NDB)に登録されている条虫症例数(年約400例)と相反している。さらに、NDBには広節裂頭条虫症例が日本海裂頭条虫症例の約2倍登録されている。これは、日本でみられる裂頭条虫症の90%以上が日本海裂頭条虫症によるものであるという事実から乖離している。また、テニア症は全世界で流行しており、早急な解決が必要だが、対策策定が難しいことも問題である。これらの問題も寄生虫の鑑別診断ができないことに起因している。

さらに、グローバル化により、寄生虫症流行地からの生鮮食品の輸入や感染者の流入の増加に伴い、寄生虫の流行が懸念されるため、簡便で正確な診断方法が必要である。

2. 研究の目的

寄生虫を鑑別診断することは「臨床と公衆衛生」にとって非常に重要である。本研究課題の目的は、「寄生虫を正確に鑑別診断できる基盤を構築すること」、すなわち「寄生虫検査の経験のない人でも迅速かつ簡便に寄生虫を鑑別診断でき、さらに社会実装できる高感度な point-of-care テスト(POCT)を開発すること」である。そのために、寄生虫の鑑別診断を臨床現場あるいは流行現場で実施でき、特殊な装置を使用せずに実施でき、複数の寄生虫を同時に鑑別診断できる診断法を開発する。まずは条虫症に的を絞り、条虫の種特異的な DNA を増幅する方法を開発するとともに、イムノクロマトグラフィー(ICT)の手法を用いて、電気泳動をすることなしに増幅 DNA を分別検出する方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP)法を用いた裂頭条虫3種(日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、*Dibothriocephalus dendriticus*)ならびにテニア条虫3種(有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫)の鑑別同定法の開発

ミトコンドリア遺伝子の一つであるシトクロム c オキシダーゼ1遺伝子(COX1)を標的とし、LAMP法プライマー設計ソフトウェア(PrimerExplorerV5)を用いて各条虫に特異的なプライマーを複数設計した。設計したプライマーを用いた増幅解析ならびに特異度解析を行うことで診断用プライマーを選出した。その後、1反応液に全てのプライマーを混合し、最適な反応温度ならびに反応時間の検討を行うことで multiplex 化を行った。また、LAMP法によるDNA増幅の有無を視覚的に判断するために使用する検査色素(マラカイトグリーン、メチルグリーン、ヒドロキシナフトールブルー)の比較検討を行った。

(2) イムノクロマトグラフィー(ICT)法を用いた mLAMP 増幅産物の検出

mLAMP 増幅産物の検出には Milenia Biotec 社の HybriDetect 2T を用いた。この ICT スティックは DNA 検出部位(2ヶ所)にそれぞれ avidin ならびに抗 digoxigenin (DIG)抗体が塗布しており、金コロイド標識抗 fluorescein isothiocyanate (FITC)抗体が検出試薬として含まれている。そのため、mLAMP 増幅反応に biotin、DIG、FITC で標識したプライマーを用いることで、特異的増幅産物を分別検出することができる。しかしながら、HybriDetect 2T は2種の LAMP 増幅産物を検出することができるが、本研究

では3種の LAMP 増幅産物を分別検出する必要がある。そのため、広節裂頭条虫と *Dibothriocephalus dendriticus* を鑑別するためには LAMP 増幅産物の制限酵素 *HinfI* 処理による ICT 検出バンドの消失を指標とした。同様に、無鉤条虫とアジア条虫の鑑別には LAMP 増幅産物の制限酵素 *TaqI-v2* 処理による ICT 検出バンドの消失を指標とした。

(3) 鑑別診断法の精度解析

LAMP 法と ICT 法を用いた裂頭条虫ならびにテニア条虫の鑑別診断法の精度解析は、研究代表者ならびに研究協力者 (Kadek Swastika 医師・ウダヤナ大学・インドネシア、Dewi Masyithah Darlan 博士、スマトラ ウタラ大学・インドネシア、Paron Dekumyoy 博士・マヒドン大学・タイ、Wanchai Maleewong 博士・コンケン大学・タイ) の保有する寄生虫 DNA ならびにエタノール中で保存してある寄生虫虫体を用いて行った。

4. 研究成果

(1) multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP)法を用いた裂頭条虫 3 種 (日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、*Dibothriocephalus dendriticus*) ならびにテニア条虫 3 種 (有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫) の鑑別同定法の開発

各条虫に特異的なプライマーを複数種設計した後、DNA の増幅解析ならびに特異度解析を行うことで、各寄生虫に特異的なプライマーを選出することができた。また、反応温度 (60°C、63°C、65°C) ならびに反応時間 (30 分、60 分、90 分) の検討を行い、multiplex-LAMP に最適な条件 (63°C、60 分) を見出すことができた。さらに、mLAMP 反応による DNA 増幅の目視による判定にはヒドロキシナフトールブルー (HNB) が使用できることが明らかとなった (図 1 および図 2)。

(2) イムノクロマトグラフィー (ICT) 法を用いた mLAMP 増幅産物の検出

日本海裂頭条虫の特異的なプライマーを DIG ならびに FITC で、広節裂頭条虫ならびに *Dibothriocephalus dendriticus* の特異的なプライマーを biotin ならびに FITC で標識し、それらを用いて 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。また、LAMP 増幅産物を HybriDetect 2T で検査したところ、特異的に分別検出できた。広節裂頭条虫ならびに *Dibothriocephalus dendriticus* の LAMP 増幅産物を制限酵素 *HinfI* で処理した後、それらを HybriDetect 2T で検査したところ、増幅 DNA 内に *HinfI* 認識配列を持たない *Dibothriocephalus dendriticus* 由来の LAMP 産物では検出バンドの消失は確認されなかったが、増幅 DNA 内に *HinfI* 認識配列を持つ広節裂頭条虫由来の LAMP 産物では検出バンドの消失が確認された。これにより、制限酵素 *HinfI* で処理した LAMP 増幅産物を HybriDetect 2T で検査することで、広節裂頭条虫ならびに *Dibothriocephalus dendriticus* を鑑別診断できることが確認

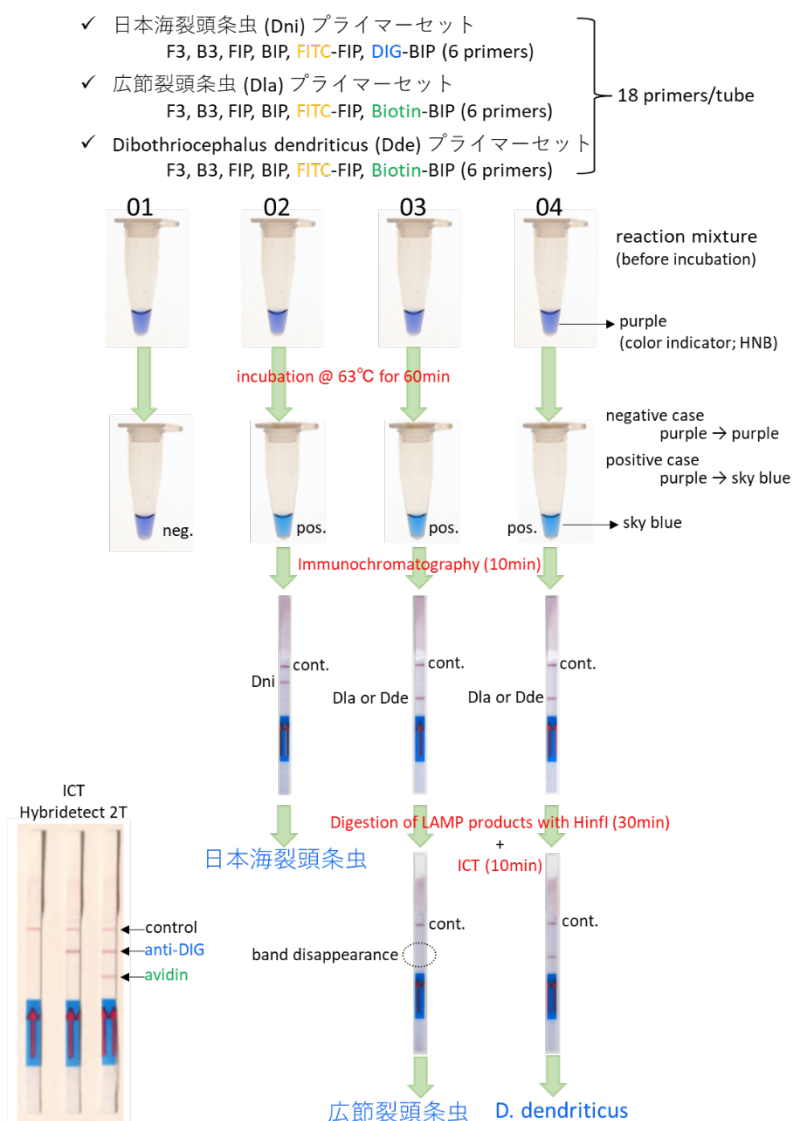


図1 裂頭条虫の鑑別診断法

された(図1)。

同様に、有鉤条虫の特異的プライマーをDIGならびにFITCで、無鉤条虫ならびにアジア条虫の特異的プライマーをbiotinならびにFITCで標識し、それらを用いて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。また、LAMP増幅産物をHybridetect 2Tで検査したところ、特異的に分別検出できた。無鉤条虫ならびにアジア条虫のLAMP増幅産物を制限酵素TaqI-v2で処理した後、それらをHybridetect 2Tで検査したところ、増幅DNA内にTaqI-v2認識配列を持たないアジア条虫由来のLAMP産物では検出バンドの消失は確認されなかったが、増幅DNA内にTaqI-v2認識配列を持つ無鉤条虫LAMP産物では検出バンドの消失が確認された。これにより、制限酵素TaqI-v2で処理したLAMP増幅産物をHybridetect 2Tで検査することで、無鉤条虫ならびにアジア条虫を鑑別診断できることが確認された(図2)。

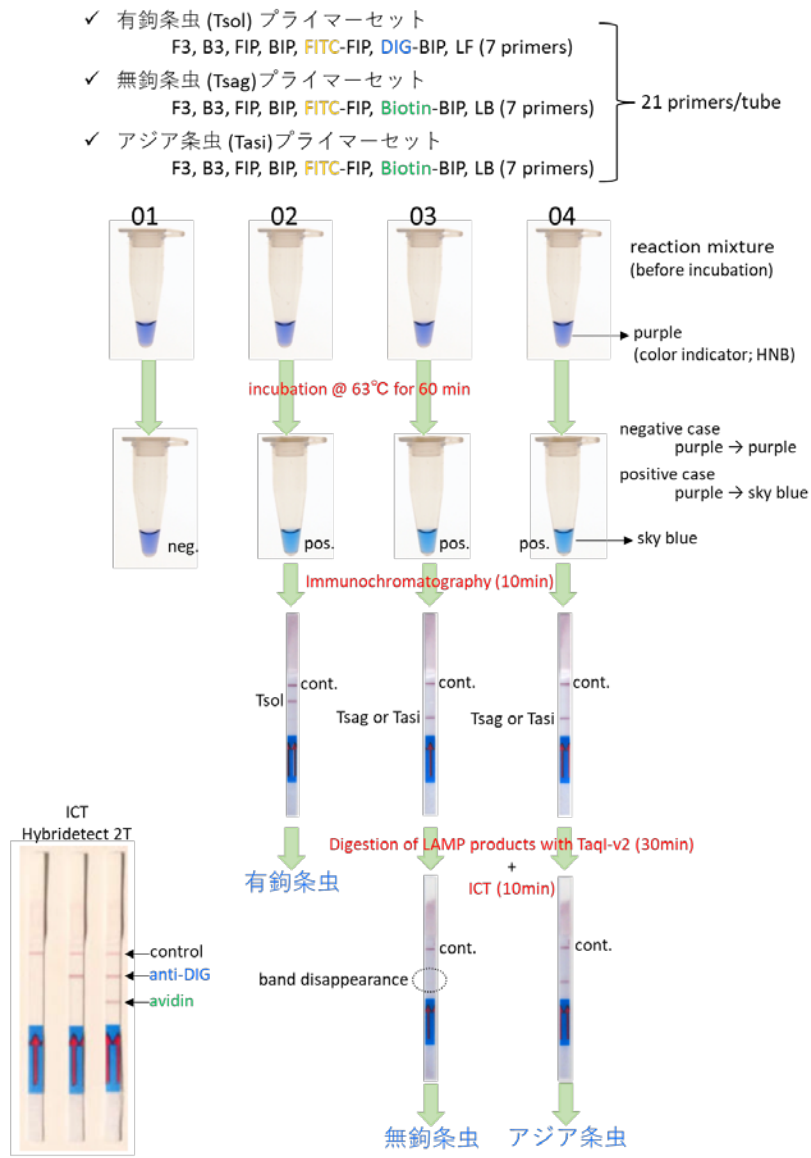


図2 テニア条虫の鑑別診断法

(3) 鑑別診断法の精度解析

本研究で開発した鑑別診断法の精度解析を、診断対象である条虫(日本海裂頭条虫、広節裂頭条虫、*Dibothriocephalus dendriticus*、有鉤条虫、無鉤条虫、アジア条虫)および他寄生虫(有棘顎口虫、旋毛虫、広東住血線虫、ブタ回虫、ヒト回虫、蟯虫、鉤虫、マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、ビルハルト住血吸虫、タイ肝吸虫、シナ肝吸虫、棘口吸虫、肺吸虫、肝蛭、ランブル鞭毛虫)DNA 検体を用いて行った。その結果、開発した鑑別診断法は非常に高感度か高特異性の診断法であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubo Kimitoshi, Kato Mototsugu, Sako Yasuhito	4. 巻 -
2. 論文標題 Dibothriocephalus nihonkaiensis Incidentally Detected at Colonoscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	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.cgh.2022.01.005	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 Yanagida Tetsuya, Swastika Kadek, Dharmawan Nyoman Sadra, Sako Yasuhito, Wandra Toni, Ito Akira, Okamoto Munehiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Origin of the pork tapeworm Taenia solium in Bali and Papua, Indonesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102285 ~ 102285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2021.102285	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 YAMASAKI Hiroshi, SUGIYAMA Hiromu, MORISHIMA Yasuyuki, SAKO Yasuhito	4. 巻 86
2. 論文標題 Molecular identification of Spirometra infections in companion animals and wildlife in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 409 ~ 412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.23-0475	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 Sadaow Lakkhana, Boonroumkaew Patcharaporn, Rodpai Rutchanee, Janwan Penchom, Sanpool Oranuch, Thanchomnang Tongjit, Morishima Yasuyuki, Sato Marcello Otake, Sako Yasuhito, Kobayashi Kaoru, Iwai Misako, Maleewong Wanchai, Yamasaki Hiroshi, Intapan Pewpan M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Development and evaluation of an immunochromatography-based point-of-care test kit for a rapid diagnosis of human cysticercosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food and Waterborne Parasitology	6. 最初と最後の頁 e00211 ~ e00211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fawpar.2023.e00211	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Maecello Otake Sato, サトウ 恵、迫 康仁
2. 発表標題 Next steps of eDNA towards the control of schistosomiasis
3. 学会等名 International Congress of Tropical Medicine and Malaria (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Marcello Otake Sato, サトウ 恵、迫 康仁
2. 発表標題 Environmental DNA and risk mapping in schistosomiasis
3. 学会等名 International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伴戸寛徳、迫 康仁、福田康弘、加藤健太郎
2. 発表標題 ヒトのiPS由来神経細胞内におけるトキソプラズマのステージ変換機構の解明
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ヴァレンシア ジョセフ、サトウ マルセロ オオタケ、パブロ アーチー、キムソン マリオ、セルバンテス エレノアー、ジズ マリオ、迫 康仁、サトウ 恵
2. 発表標題 環境DNA手法を用いたフィリピン、レイテ島、エキラン村における日本住血吸虫症の感染リスク評価
3. 学会等名 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 レヴォルテアド マーク ジューン、サトウ マルセルロ オオタケ、ジズ マリオ、セルバンテス エレノアー、パブロ アーチー、キムソン マリオ、迫 康仁、サトウ 恵
2. 発表標題 環境DNA手法を用いたフィリピン、レイテ島、エキラン村における日本住血吸虫中間宿主Oncomelania hupensis quadrasiのハザードマップ作成
3. 学会等名 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伴戸寛徳、迫 康仁
2. 発表標題 多包虫由来物質がヒトの肝細胞に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024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			
タイ	マヒドン大学	コンケン大学		
インドネシア	ウダヤナ大学	Sari Mutiara Indonesia大学	スマトラ・ウタラ大学	