


財団法人日中医学協会  
2005年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2006年 3月 9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 森嶋康之 

所属機関名： 国立感染症研究所

所属部署： 寄生動物部 職名： 研究員  
〒162-8640

所在地： 東京都新宿区戸山1-23-1

電話： 03-5285-1111 内線： 2734

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

青海省の実態にあわせたエキノコックス症感染源診断システムの構築

3. 成果の概要（100字程度）

エキノコックス症の流行地である青海省において、感染源動物の調査および制圧計画で利用可能な疫学的ツールとして糞便内抗原の検出システムを構築した。本法は感度80%、特異度98%であった。同省での活用が期待される。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 森嶋康之 職名： 研究員

所属機関： 国立感染症研究所 部署： 寄生動物部

中国側研究者氏名： 何多龍 職名： 科長

所属機関： 青海省地方病予防控制所 部署： 寄生虫病予防控制科

## 青海省の実態にあわせたエキノコックス症感染源診断システムの構築

研究者氏名 森嶋 康之  
所属機関 国立感染症研究所寄生動物部 研究員  
共同研究者名 何 多龍  
所属機関 青海省地方病予防控制所  
寄生虫病予防控制科 科長

### 要 旨

単包条虫・多包条虫の両種によるエキノコックス症が流行する青海省において、ヒトへの感染源となる終宿主動物を正確かつ効率よく検査する方法の開発を目的として糞便内抗原検出法の構築を試みた。この方法は、ニワトリ抗エキノコックス成虫虫体抗体を吸着抗体、ウサギ抗エキノコックス成虫排泄分泌抗体を一次抗体とするサンドイッチ ELISA で、代替終宿主を用いて単包条虫および多包条虫を用いた実験感染材料では感染後 3～5 日目から特異抗原を検出しはじめ、以後感染終了まで常に陽性の結果が得られた。野外材料を用いた場合の検討では感度 80%、特異度 97.5%と評価された。検査特性値の向上を図ってピオチンによる一次抗体の標識を試みたが、感度は 95.0%まで上昇したものの、むしろ特異度が 85.0%に低下した。エキノコックスに近縁な条虫類との交差反応に関し、青海省のイヌで想定される胞状条虫感染について実験感染材料を用いて検討を加えたところ、感染期間中の OD 値は非感染時と比べ高い傾向を示した。軽度感染例から得られた OD 値はカットオフ値を上回ることにはなかったが、重度感染例の OD 値は時として弱い偽陽性の結果を示した。単包条虫実験感染材料を用いて糞便内 DNA 検出法との感度比較を行ったところ、本法が DNA 検出より高い感度を持つことが示された。実際の疫学調査への適用に際し、感度および特異度をさらに向上させるとともに、現地でも使用可能な簡易キット化が望まれる。

**Key Words** エキノコックス, 終宿主, 診断, 糞便内抗原, 酵素標識抗体検出法

### 緒 言:

エキノコックス *Echinococcus* 属の条虫はテニア科に属する人獣共通寄生虫で、ヒトはイヌ科動物の腸管に寄生する成虫由来の虫卵を経口的に摂取して感染する。牧畜のさかんな青海省では、家畜間（イヌ - 有蹄類）で生活環が維持される単包条虫 *E. granulosus* が引き起こす単包性エキノコックス症が公衆衛生上重要な問題と認識されてきた。それに加え、地域によっては悪性な多包性エキノコックス症の原因である多包条虫 *E. multilocularis* も分布し、両症が同所的かつ高度に流行していることが報告されている [1]。

エキノコックス症の制圧計画の策定からその進捗状況、実施後の効果の評価に至るまで、ヒトへの感染源となるイヌの保虫率等ベースラインとなるデータを提供する疫学調査が果たす役割は大きい。そこで感染源動物を正確に検査する方法が必須のツールとなる。これまで青海省では感染源動物の検査法として剖検、試験的駆虫（アレコリンパージ）、虫卵検査などが用いられてきた。ところが、これらの方法は、多大な労力を要したり、検査者自身が感染の危険に曝露されたり、あるいは近縁な他種条虫類との鑑別が困難であったりと、それぞれ実用面における種々の欠点を抱えている。そこで本研究では、検体処理能力が高く、かつ安全な方法として、免疫学的検査法である糞便内抗原検出法に着目した。糞便内抗原は、宿主腸管内に寄生するエキノコックス成虫の分泌物あるいは代謝産物を抗原として補足するもので、感染初期からの検出が可能で、さらに腸管内に寄生する虫体の排除にともなって速やかに糞便中から消失するなど、実際の感染を正確に反映するとされ、日本国内でも近年、エキノコックス症流行地である北海道において

活用が進んでいる [2]。本研究は、この検出システムを青海省の疫学的状況に即した形態に構築し、同省のエキノコックス症制圧計画に資することを目的として実施した。

## 材料と方法：

### 1) 糞便内抗原検出の方法

宿主糞便内に排泄されるエキノコックス由来抗原の検出は、標的抗原を吸着抗体と一次抗体でトラップし、酵素標識抗体法を用いて検出する、いわゆるサンドイッチ ELISA 法によって行った。

抗体の作製に用いた抗原は、代替終宿主 [3] から回収した多包条虫成虫を用いて得た。すなわち、成虫の培養上清を排泄分泌抗原、培養終了後の成虫を虫体抗原とし、これらでニワトリおよびウサギを免疫した。免疫動物から得られた抗体は KAPTIV-GY (TECNOGEN S.C.p.A, Italy) で精製し、それぞれニワトリ抗多包条虫成虫抗体を吸着抗体、ウサギ抗多包条虫排泄分泌抗体を一次抗体とした。

糞便検体の調整ならびに抗原の検出は森嶋 [2] にしたがって行った。カットオフ値は、日本国内のエキノコックス非流行地で飼育されるイヌの糞便 20 検体を陰性対照として使用し、被検糞便検体と同様の方法で測定して得た OD 値の平均に標準偏差の 3 倍を加えたものとした。

感度と特異度の向上を目的として抗体の標識法に関する検討を加えた。Biotin Labeling Kit-NH<sub>2</sub> (同仁化学) を用いて一次抗体をラベルし、通常抗体による検出との比較を行った。

### 2) 糞便内抗原検出法の評価

構築した糞便内抗原検出法の評価は以下の方法で行った。代替終宿主を用いて多包条虫および単包条虫の実験感染を行い (それぞれ約 10 万個と約 7 万個の原頭節を経口投与)、多包条虫は感染後 23 日目まで、単包条虫は感染後 30 日目まで経日的に糞便を採取し、感染にともなう糞便内抗原の検出状況の変化について検討した。単包条虫感染の 1 個体に対しては感染後 17 日目に条虫駆虫薬 (プラジクアンテル) を経口投与し (50 mg/kg)、駆虫にともなう糞便内抗原が受ける変化を観察した。また、この実験感染で得られた材料を用いて、最近エキノコックス感染源動物を対象に高特異度の検査法として試みられている糞便内 DNA の検出と感度の比較を行った。糞便内 DNA は QIAamp DNA Mini Stool Kit (QIAGEN GmbH, Germany) を使って抽出し、12S rRNA 領域を標的部位とするプライマーペア (P60.for および P375.rev.) を用いて検出を行った。

本法の検査特性値は、北海道産キツネおよび青海省 (海南藏族自治州、果洛藏族自治州) において得たイヌ糞便合計 100 検体 (陽性 20 検体・陰性 80 検体) を用いて調べた。さらに他種寄生虫との交差反応の有無をみるため、青海省のイヌで最も普通な条虫種である胞状条虫 *Taenia hydatigena* 感染例について検討した。ヒツジ由来の胞状条虫幼虫 (細頸囊尾虫 *Cysticercus tenuicollis*) をイヌ 2 頭に経口投与し (感染強度による糞便内抗原検出法の結果への影響を見る目的でそれぞれ 6 および 18 虫体を投与)、感染後 63 日目まで経日的に採集した糞便を本法により検査した。

## 結 果：

### 1) 実験感染個体における糞便内抗原の検出状況

図 1 に多包条虫 (EM1~5) ならびに単包条虫 (EG1~3) 実験感染例において検出された糞便抗原の経日的変化を示した。陰性対照 20 検体から算出されたカットオフ値 (0.192) にもとづくと、本法では多包条虫・単包条虫ともに感染後 3~5 日目までに OD 値が陽転した。その後の経過では、多包条虫感染の 1 個体 (EM5) を除き、OD 値はほぼ感染後 10~12 日目までにピークに到達後、細かな上下変動を繰り返しつつ維持された。ピーク値を見ると、多包条虫に比べ単包条虫でより高い OD 値が記録された (ただし EG3 は感染後 19 日目に斃死)。また、単包条虫感染個体 (EG2) で感染後 27 日目に実施した駆虫処理後、OD 値はその翌日には速やかに陰転した。以上、いずれの個体も実験終了時まで (駆虫処理個体では駆虫時ま

で) 糞便内抗原の検出結果は常に陽性を示し続けた。

## 2) 検査特性値に関する検討

北海道産キツネおよび青海省由来イヌ糞便 100 検体 (保虫率 20%) を用いて検出を行った場合の検査特性値は、感度 80.0%、特異度 97.5%、陽性予測値 88.9%、陰性予測値 95.1%であった (表 1A)。一方、一次抗体としてピオ

チン化抗体を用いた場合は、感度 95.0%、特異度 85.0%、陽性予測値 61.3%、陰性予測値 98.6%となり、非ピオチン化一次抗体を用いたときと比較して感度は向上したが特異度の低下が認められた (表 1B)。

図1. 実験感染代替終宿主における糞便内抗原の検出

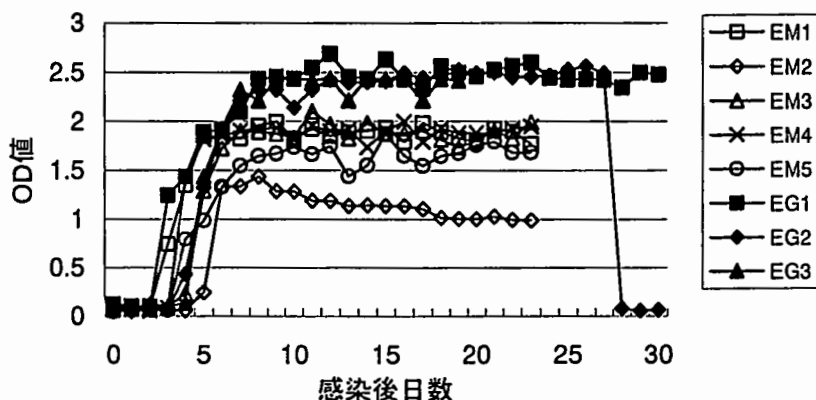


表 1. 糞便内抗原の検出による感染診断 (A. 通常抗体、B. ピオチン化抗体)

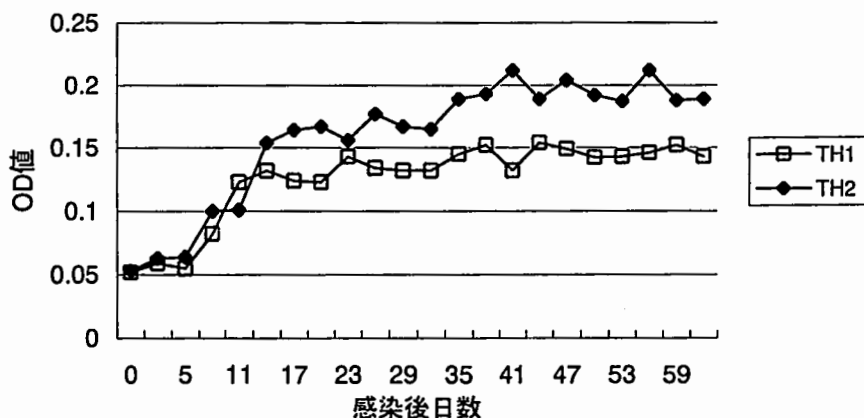
A		感染		合計
		陽性	陰性	
抗原	陽性	16	2	18
	陰性	4	78	82
合計		20	80	100

B		感染		合計
		陽性	陰性	
抗原	陽性	19	12	31
	陰性	1	68	69
合計		20	80	100

## 3) 近縁寄生虫感染時の糞便内抗原の検出

図 2 に胞状条虫実験感染例において検出された糞便内抗原の経日的変化を示した。感染終了時 (感染後 63 日目) に実施した剖検では、6 虫体投与個体から 5 虫体 (TH1)、18 虫体投与個体から 16 虫体 (TH2) をそれぞれ回収した。これらの糞便について実施した糞便内抗原の検出結果は、前者の OD 値は常にカットオフ値である 0.192 を下回ったものの、感染前検体のものと比べてやや高値を示した。同様の傾向は後者でも認められ、その OD 値はさらにカットオフ値近辺まで上昇し、ときとしてカットオフ値を超えて弱い陽性結果を示した (図 2)。

図2. 胞状条虫感染犬における糞便内抗原の検出



## 4) 糞便内 DNA 検出法との感度比較

代替終宿主を用いた実験感染例 (図 1 の EG2) について糞便内 DNA の検出を試みたところ、DNA 検出による陽転時期は本法より早く、感染翌日にはすでに検出された。しかしながら、糞便内抗原は駆虫処理を行うまで常に陽性結果を示したのに対し、糞便内 DNA は常に一定して検出されるのではなく、陽性の結果は間欠的にしか得られず、感染当日から感染後 27 日目までの感染期間を通じての感度は 26% と計算された。

## 考 察：

最近発表された青海省の地方病防治条例においてエキノコックス症は対象地方病 6 種のうちの一つに指定され、公衆衛生上の重要疾病であることが再確認されている。現在、青海省地方病予防控制所が行うエキノコックス症感染源動物の調査では、試験的駆虫（アレコリンパージ）、剖検ならびに虫卵検査のいずれかを実施している。これらに克服困難な欠点があることは先述のとおりで、新たな疫学調査ツールの導入が緊急の課題として挙げられてきた。本研究で構築した糞便内抗原検出法は、従来の方法を十分に代替しうる感度と特異度をもち、今後は本法を用いて疫学調査を展開することが可能となった。

しかしながら、正確な検査を行うにあたり、本法がより高い感度を備えることは言うまでもない。そこで感度の向上を企図して一次抗体の修飾を試みたが、感度は向上したものの特異度を低下させる結果となった。この原因として、アミノ基をビオチン標識したことにより抗原認識部位が修飾され、非特異的吸着が増加したことが考えられる。今後は、架橋標的を SH 基とする、あるいは別の標識法（たとえば金コロイド法）を試みるなど、抗体の標識法に関する検討を進めていく。

もう一つの問題として、本法で用いる抗体の近縁条虫種との交差反応が指摘される。有蹄類家畜を中間宿主とするテニア属の条虫は、牧畜が主要な産業の一つとなっている青海省において常に留意すべき寄生虫である。これらは被毛粗剛や感染臓器の廃棄など経済上の損失を引き起こすが、基本的には動物寄生種で、公衆衛生上問題視されることはない。しかし、単包条虫と同様の生活環をもつので調査対象群が汚染されている可能性があり、特異度の低い方法を適用したのでは検査結果が攪乱される恐れがある。今回の胞状条虫に関して行った検討では重度感染例で偽陽性が認められた。反応の程度はカットオフを「陰性対照の平均+5 倍標準偏差」と高く設定することで排除可能なレベルであったが、それにともなって真の陽性個体を偽陰性と判定する危険が生じる。カットオフ値は「誤診する確率」が低ければ低いほど理想的であるが、それは統計学上の問題でなく、対象集団固有の特性を加味した上で設定されるべきであろう。エキノコックスの終宿主となる動物を対象とした診断は、ヒトへの感染源の評価でもあり、偽陰性が少ないほど優れるといえる。しかし、青海省では上記の理由から特異度をさらに高める努力をしなければならない。今回の実験感染で得られた胞状条虫の虫体は一部を凍結保存してあるので、これを材料として作製した抗原カラムを用いて抗体の再精製を行い、非特異吸着する抗体を取り除き、特異抗体の濃度を増すことで特異度の向上を試みる予定である。

最後に、今回開発を試みた糞便内抗原検出法はマイクロプレートを用いた方法で、基本的に実験室内での実施を前提とする。青海省における調査でより有効に活用するためには、調査現場での迅速な診断を可能とする dot-ELISA 等の簡易キット化を進めることが望まれる。

## 参考文献：

1. 吳献洪, 何多龍, 劉巴睿, 張静宵, 馬霄, 劉培進, 劉海青, 蔡輝霞, 趙延梅, 劉玉芳, 曾誠, 胡蘭省, 王虎: 青海省人体重要寄生虫病地区分布調査, 中国寄生虫学与寄生虫病雜誌 23, 220-224 (2005).
2. 森嶋康之: 北海道における多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の動物疫学, 北海道大学大学院獣医学研究科博士論文 (2000).
3. Kamiya M, Sato H: Complete life cycle of the canid tapeworm, *Echinococcus multilocularis*, in laboratory rodents, FASEB Journal 4, 3334-3339 (1990).

作成日：2006年3月9日