

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

Clinical Parasitology (2006.03) 16巻1号:76～78.

陳旧型全身性有鉤囊虫症の1例(続報)
—石灰化病巣のミトコンドリアDNA解析—

山崎浩, 迫康仁, 中尾稔, 伊藤亮, 長瀬輝顕, 清重佳郎, 鈴木守, 中谷和宏, 伊藤幸夫

陳旧型全身性有鉤囊虫症の1例（続報） —石灰化病巣のミトコンドリアDNA解析—

旭川医科大学 寄生虫学

山崎 浩・迫 康仁・中尾 稔・伊藤 亮

山形県立新庄病院 耳鼻咽喉科

長瀬輝頭

済生会山形済生病院 整形外科

清重佳郎

群馬大学

鈴木 守

旭川医科大学 動物実験施設

中谷和宏

順天堂大学医学部 法医学

伊藤幸夫

Key Words : 有鉤囊虫症, 石灰化病巣, ミトコンドリアDNA解析, 有鉤囊虫アジア型

A Case of Obsolete Systemic Cysticercosis (II) : Mitochondrial DNA analysis of extremely calcified lesions

Hiroshi Yamasaki* Yasuhito Sako* Minoru Nakao* Akira Ito*
Teruaki Nagase** Yoshiro Kiyoshige*** Mamoru Suzuki****
Kazuhiro Nakaya***** Yukio Itoh*****

**Department of Parasitology, Asahikawa Medical College*

***Department of Otolaryngology, Yamagata Prefectural Shinjo Hospital*

****Department of Orthopaedic Surgery, Saiseikai Yamagata Hospital*

*****Gunma University*

******Animal Laboratory for Medical Research, Asahikawa Medical College*

******Department of Forensic Medicine, Juntendo University School of Medicine*

論文請求先：山崎 浩 〒078-8510 旭川市緑が丘東2-1-1-1 旭川医科大学 寄生虫学

緒言

有鉤囊虫の寄生によって惹起される囊虫症は、わが国においては主に輸入症例として散発的に症例が報告されている。共著者の一人、長瀬は昨年の本学会において画像所見に基づいて全身性有鉤囊虫症と診断した症例を報告したが、血清学的検査や石灰化病巣の病理組織学的検査では有鉤囊虫症を裏付ける所見は得られなかった¹⁾。そこで、同症例の病理組織学的検査のために作製されたパラフィン包埋標本を用いてミトコンドリア DNA 解析を試みた結果、有鉤囊虫遺伝子の検出に成功し、石灰化病巣が有鉤囊虫 (アジア型) に起因することが明らかになった。強い石灰化のために有鉤囊虫の特徴的な形態観察が困難であった本症例のような場合、ミトコンドリア DNA 解析が有鉤囊虫症の確定診断にきわめて有効であることが実証された例として、ここに報告する。

症例

臨床症状ならびに経過に関しては、長瀬ら (2004)¹⁾ を参照されたい。

ミトコンドリア DNA 検査

臀部の筋肉内より外科的に摘出された石灰化組織は病理組織学的検査のために、ホルマリン固定、迅速脱灰法による処理を経て、パラフィン包埋標本が作製された。そのパラフィンブロックの一部をミトコンドリア DNA 解析に用いた。計 3 個のパラフィンブロックそれぞれから厚さ 5 μm の切片を 4 枚ずつ作製し、DNA Isolator PS kit (和光純薬) を用いて DNA の抽出を行った。手順の概略は以下のとおりである。エッペンドルフチューブ内に入れたパラフィン切片にキシレンを加えて組織切片を分離したのち、組織切片を 50°C、20 分間プロテアーゼ処理することにより可溶化し、さらにイソプロパノールを加えて DNA を沈殿させ、最終的に 10 μl の 10mM Tris-HCl/1mM EDTA (pH8.0) に可溶化した溶液をテンプレート DNA として PCR に用いた。PCR で増幅を試みた標的遺伝子は有鉤囊虫の cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝子 (*cox 1*) と cytochrome *b* 遺伝子 (*cob*) である。図 1 のパネル A には *cox 1*、パネル B には *cob* の増幅結果をそれぞれ示した。*Cox 1* の場合、984bp の断片はすべての

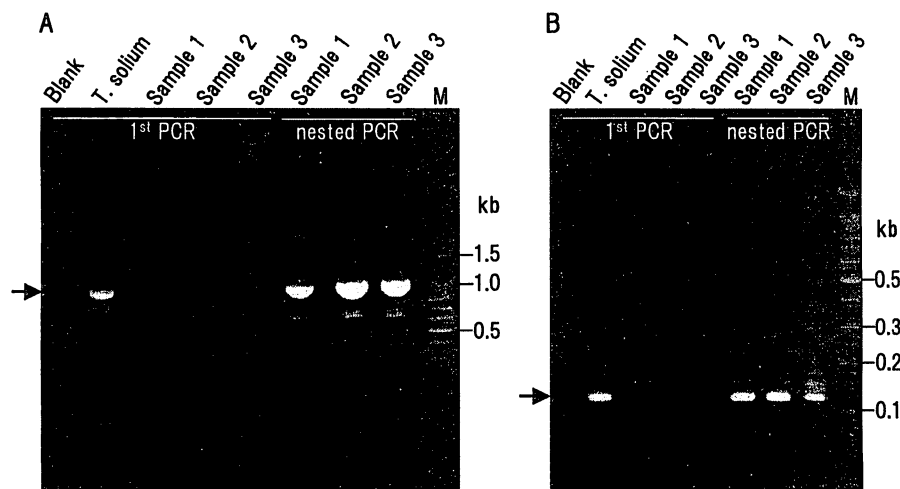


図 1 PCR による有鉤囊虫ミトコンドリア DNA の増幅

A : cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝子 ; B : cytochrome *b* 遺伝子。
Nested PCR によって 3 個の石灰化病巣 (Sample 1-3) から 984bp の *cox 1* (A) と 126bp の *cob* (B) が増幅された。Blank, テンプレート DNA を含まない ; *T. solium*, positive control.

A		268	450 453	460
Sample 1	TGATAAGAGGAT.....	TTTGCATTAGCTG.....	
Sample 2	TGATAAGAGGAT.....	TTTGCATTAGCTG.....	
Sample 3	TGATAAGAGGAT.....	TTTGCATTAGCTG.....	
有鉤囊虫(中国)	TGATAAGAGGAT.....	TTTGCATTAGCTG.....	
有鉤囊虫(キジコ)	TGATAGGAGGAT.....	TTTACATTAGCTG.....	
無鉤囊虫	TGGTTGGTGGGT.....	GTTGCATTGGCGG.....	
アジア条虫	TGGTTGGTGGGT.....	GTTGCATTAGCGG.....	

B		250	260 264	270
Sample 1	TTATCTTACTTTTTGTTCAATGGCCCG.....		
Sample 2	TTATCTTACTTTTTGTTCAATGGCCCG.....		
Sample 3	TTATCTTACTTTTTGTTCAATGGCCCG.....		
有鉤囊虫(中国)	TTATCTTACTTTTTGTTCAATGGCCCG.....		
有鉤囊虫(キジコ)	TTATCTTACTTTTTGTTCAATGGCCCG.....		
無鉤囊虫	TTGTTTTATTTTTGTTCAATGGCTCG.....		
アジア条虫	TTGTTTTACTTTTTGTTCAATGGCTCG.....		

図2 増幅されたミトコンドリア DNA の塩基配列比較

A: cytochrome *c* oxidase subunit 1 遺伝子; B: cytochrome *b* 遺伝子。石灰化病巣由来の *cox 1* と *cob* 両遺伝子の塩基配列 (Sample 1-3) はいずれも有鉤囊虫のアジア型の塩基配列と一致している。

石灰化組織から検出することができたが, *cox 1* 全長を含む 1.8kb の遺伝子断片は nested PCR においても増幅することはできなかった (図示はしていない)。パネル B の *cob* の場合も *cox 1* 同様, サイズの小さな遺伝子断片 (126bp) は増幅されたが, *cob* 全長を含む 1.3kb の遺伝子の増幅は困難であった。ホルマリン固定によるミトコンドリア DNA の断片化がその理由と考えられた。さらに, 増幅された PCR 産物が有鉤囊虫遺伝子であるか否かを確認するために, PCR 増幅産物の塩基配列解析を行った。ところで, 有鉤囊虫にはアジア地域に分布するアジア型 (Asian genotype) と中南米・アフリカに分布するアメリカ・アフリカ型 (American/African genotype) の 2 つの遺伝子型が存在し²⁾³⁾, 両遺伝子型でよく保存された塩基が遺伝子全体にわたって散在する。図2は2つの遺伝子型の鑑別に重要なマーカー塩基を含む領域の塩基配列を示している。*cox 1* の場合 (パネル A), 268 番目と 435 番目の塩基が鑑別マーカーであり, 石灰化病巣から増幅されたものではそれぞれアデニンとグアニンであり, また, パ

ネル B に示した *cob* の場合には 264 番目の塩基がシトシンであったことから, 3 個の石灰化病巣すべてが有鉤囊虫アジア型に由来するものであることが遺伝子レベルで明らかになった。囊虫症の場合, 病巣組織の変性や石灰化のために, 有鉤囊虫に特徴的な形態が観察されないことがしばしばある^{4)~7)}。そのような場合, 病理組織標本を用いたミトコンドリア DNA 解析が高い診断的価値を有することを最近報告したが⁸⁾⁹⁾, 今回のように強い石灰化を伴った病巣の解析においてもミトコンドリア DNA 解析の有効性が実証された。

文 献

- 1) 長瀬輝頭, 他 (2004): 陳旧型全身性有鉤囊虫症の 1 例, 日本臨床寄生虫学会誌, 15, 24-26.
- 2) Nakao, M. *et al.* (2002): A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology*, 124, 657-662.
- 3) Yamasaki, H. *et al.* (2002): DNA differential diagnosis of human taeniid cestodes by base excision sequence scanning thymine-base reader analysis with mitochondrial genes. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3818-3821.
- 4) 福井秀明, 他 (1979): 有鉤囊虫症の 1 例, 神経内科, 11, 294-297.
- 5) 友杉哲三, 他 (1983): CT スキャンで発見された脳有鉤囊虫症の 1 症例, 脳神経外科, 11, 323-329.
- 6) 平木祥夫, 他 (1987): 人体有鉤囊虫症の 1 例, 臨床放射線, 32, 849-852.
- 7) 久保山一敏, 他 (1994): 脳および全身皮下・筋肉内に多数の虫体寄生をみとめた有鉤囊虫症と思われる 2 症例. 一単純 Xp, CT scan, 頭部 MRI での検討一. 日本臨床寄生虫学誌, 5, 153-156.
- 8) Yamasaki, H. *et al.* (2004): Solitary neurocysticercosis case caused by Asian genotype of *Taenia solium* confirmed by mitochondrial DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3891-3893.
- 9) Yamasaki, H. *et al.* (2005): Molecular identification of *Taenia solium* cysticercus genotype in the histopathological specimens. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 36, (Suppl 4) 131-134.