

写真1 *E. histolytica* 嚢子(cyst) (鉄ヘマトキシリン染色) (巻頭カラー2頁参照)
未成熟の嚢子で類染色質体が観察できる。
大きさは12~20 μ m程度で球形。

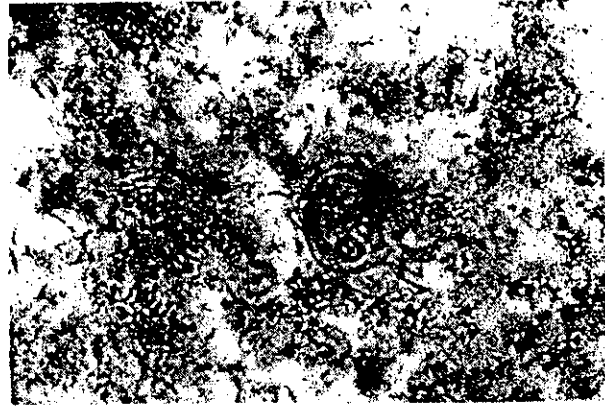


写真2 *E. histolytica* 栄養型虫体(トリクローム染色)
(巻頭カラー2頁参照)
長径25~45 μ m程度で核の中央に特徴的な点状のカリオソームを見る。*E. dispar* の栄養型も光顕レベルではこれと同様の性状を示す。

査するなどの注意が以前より払われてきた。しかしながら根本的に *E. histolytica* と *E. dispar* は光学顕微鏡レベルでは鑑別できず、従来の方法では形態的鑑別は事実上不可能となった。

現時点で形態学的に同定可能なのは *E. histolytica* のみで、上記の WHO の Expert Meeting に際しての討論でも *E. dispar* の光学顕微鏡レベルでの形態的同定は不可能であることが確認されている。實際上臨床面で必要なのはまず *E. histolytica* の確実な同定なので、*E. dispar* を強いて同定しなくとも良いことにはなるが、*E. dispar* のみが検出されたときも混合感染による *E. histolytica* の存在を確実に見出すことは疑わしい臨床症状があった場合、特に重要となる。

WHO の Expert Meeting において形態的に *E. histolytica* 感染を強く疑わせる所見として挙げられたのは、①組織内に見い出された栄養型虫体、②下痢便中の赤血球を捕食している栄養型虫体、である。*E. dispar* の非病原性はこの原虫が組織内侵入能力がない所に起因しているので、大腸生検標本内や肝臓瘍穿刺液にアメーバの栄養型虫体が検出されれば *E. histolytica* である可能性が非常に高くなる。下痢便に見い出された赤血球を捕食しているアメーバ栄養型も同様に組織内に侵入した可能性が高いので、*E. histolytica* と同定できることとなる。

以上より考えれば、腸アメーバ症に対する内視鏡検査の重要性は言うまでもない。内視鏡レベルでの腸アメーバ症に特徴的な所見は既に上田¹⁾によって記載されているが、内視鏡下での生検もわが国で

は従来からかなり広く行われてきたので、今後も *E. histolytica* 感染の診断法として重視されるべきであろう。

E. histolytica、*E. dispar* の形態的同定法として電子顕微鏡観察は実際的ではなく能率も悪いが、筆者らの予備的な検討によると微細構造のレベルでは両種のアメーバに歴然たる差異がみられる。すなわち *E. dispar* のグリコーゲン含量は非常に高く、単位蛋白濃度あたり10倍以上に達する。これが電顕的にみた場合にはグリコーゲン顆粒の存在様態の大きな差異となっている。すなわち *E. histolytica* では食胞など細胞内オルガネラの発達が著しく、グリコーゲン顆粒は一様にその間隙部分に存在しているが、*E. dispar* では食胞などオルガネラの発達は非常に悪く、細胞質の中心部にのみ局在する。その周囲を多量のグリコーゲン顆粒と思われる顆粒が取り囲むという形を作っている。

III. 血清学的診断法

血清学的診断法は用いる方法や評価基準の如何によつては *E. histolytica* と *E. dispar* 感染を鑑別するのに有用となる。まず感染者の糞便中のアメーバの isoenzyme profile の差異に着目して赤痢アメーバの病原株、非病原株を定義した Sargeant²⁾ は *E. histolytica* の感染は基本的には抗体産生を伴うこと、一方 *E. dispar* 感染の場合は抗体産生が起こらないことを鑑別の要点の一つとした。これに従えば、特異的

参考資料

- 臨床病理 -

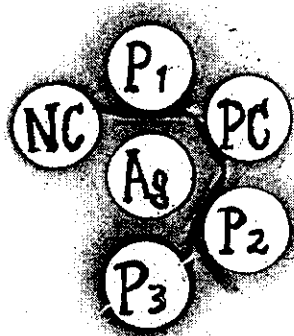


写真3 ゲル内沈降反応 (GDP)

Ag : 抗原(HM-1株より調製したもの), NC : 陰性コントロール, P₁ : 患者血清, PC : 陽性コントロール, P₂ : 患者血清をPBSで2倍希釈したもの, P₃ : P₁を同量の抗原で吸収したもの

な抗体が検出されれば *E. histolytica* の感染を強く疑うに足ると結論できる。しかし時に *E. histolytica* の感染時であっても抗体が detect できないこともある。アメーバが組織内に侵入した直後では当然抗体産生が低いことがあるし、また腸アメーバ症 (intestinal amebiasis) の場合は現行の方法でも陽性率は90%以下のことが多い。またさらに加えるに *E. dispar* 感染の時にも頻度は低く、数%にしか達しないが抗体が detect されることがある。

以上のような制限はあるものの、血清学的診断は上述のように *E. histolytica* 感染による invasive amebiasis (*E. histolytica* の組織内侵入によるアメーバ症) を診断するのに有用である。現行の血清学的診断法はそれぞれ特徴を有しているが、ゲル内沈降反応 (gel diffusion precipitin test ; GDP ; 写真3) が最もアメーバによる臨床症状の推移に対応すると言われている。特にこの反応が negative であった場合 invasive amebiasis をほぼ確実に除外診断できる。またこの方法は後述する isoenzyme pattern による *E. histolytica* の同定にほぼ一致する。ゲル内沈降反応の他には酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA), 間接蛍光抗体法 (IFA), 間接赤血球凝集反応 (IHA) などがよく使用される。このうち ELISA は感度も高く、多数の検体を一時に扱えるので広く使用されている。また筆者の教室において、奥沢³⁾ は *E. histolytica* の可溶性分画に存在する蛋白抗原とフェノール抽出によって得た抗原を比較検討し興味ある事実を見出ししている。すなわち前者の抗原

(CRAR 抗原と命名された) に反応する抗体は主に慢性期や再発症例に多く検出されるのに対して、後者の抗原 (PHEX 抗原) に対応する抗体は急性期にのみ検出できる。このような抗原と ELISA を組み合わせることによって、amebiasis の病期までをも推定できることが明らかになった。

血清反応によって診断する場合注意すべきことは、まず腸アメーバ症の場合は上述のように抗体価も低いことがあり、かつ陽性率そのものも低いことである。従って時に血清反応のみで確定診断するのが困難な場合がある。他方アメーバ性肝膿瘍の場合は血清抗体価が高いのが普通で陽性率も高く、95~98%程度にまで達することもある。この場合、血清反応は確定診断法としての意義を有している。従って適当な画像診断と血清反応を組み合わせることによってアメーバ性肝膿瘍の診断は可能となる。

以上の血清反応はキットとしても ELISA や IFA は入手できるが、信頼度の高い GDP は抗原を入手してオクタロニー法に準じて自分で実施するしかない。抗原は *E. histolytica* の無菌培養株から調製するが、日本では筆者の研究室から供与できる。

また血清学的方法の一つとしてモノクローナル抗体を利用した免疫染色による同定法などもしばしば使用されている。わが国では東海大学の橘らが *E. histolytica* に特異的なモノクローナル抗体を用いてアメーバの同定を試みた。

最近の趨勢の一つとして血清反応の応用例として重視されるべきものに糞便中の抗原を同定することによって診断を行おうとするものがある。既にこの方法はキット化され、わが国でも一部輸入され試用されている。血液中の adhesin (アメーバは大腸組織内に侵入する際、粘膜上皮細胞の糖鎖構造を認識するレクチン様蛋白質) を定量して診断しようとする方法もキット化され、広く試用されはじめている。

IV. Isoenzyme analysis による診断法

Isoenzyme analysis による *E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別は当初 Sargeant²⁾ が赤痢アメーバの病原株 (pathogenic zymodeme), 非病原株 (nonpathogenic zymodeme) の定義づけに用いた方法であり、Robinson 培地によって初代培養したアメーバ栄養型虫体の lysate を使用して hexokinase, phosphoglucosyltransferase などの isoenzyme pattern を澱粉ゲル電気泳動で調べ、その泳動像によって pathogenic, non-

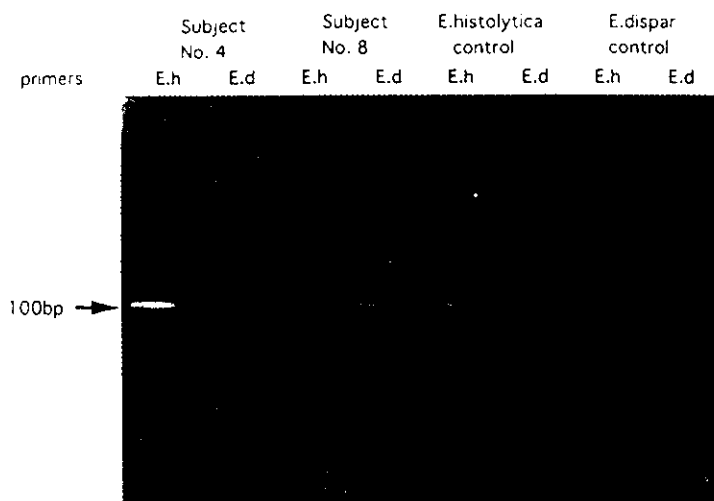


写真4 糞便中の嚢子より抽出した DNA を使用した
E. histolytica と *E. dispar* の PCR による鑑別
(詳細は文献⁴⁾を参照)

pathogenic zymodeme を区別, 同定したものである。この isoenzyme pattern による区別はアメーバを分離した症例の臨床的特徴に対応することが多数の分離株を使用して確かめられたため, この方法は信頼度の高いものと思われ, その後最近に至るまでこの方法は分離株の性状を決定するのに多く用いられ, 例えば *E. histolytica* と *E. dispar* の同一症例における混合感染は殆どないなどというデータが得られてきた。しかしここ数年来の研究で, 培地中の澱粉などが isoenzyme pattern による zymodeme の決定に影響を与え得ることや, 糞便中のアメーバを培地で初代培養することによってアメーバの構成比が変化すること, すなわち混合感染が予想以上に多いのに isoenzyme pattern による分析ではそれを見逃す恐れのあることなどが明らかになってきた。しかしこのような限界があることを認識し, 血清学的方法などと併用すれば *E. histolytica* 感染を確認する良い補助診断法となりうる。

V. Polymerase chain reaction による診断法

Polymerase chain reaction (PCR) は現在感染症の診断法としてその感度などの点で次第に中心的な位置を占めるようになりつつある。この方法は患者からの種々の試料中の病因となっている微生物に特異的な核酸の塩基配列を増幅するもので, 信頼度も通常は高い。アメーバ感染の診断にはこれまで肝膿瘍の穿刺液に含まれる栄養型虫体, あるいは糞便中の

嚢子を培養して栄養型として DNA を抽出したのちに PCR を行って特異的な配列を増幅させ, それを検出して診断するのが普通であったが, 上述のように一旦糞便中のアメーバを培養するとアメーバの population に変化が現れることを否定できない。従って PCR によっても misleading な結果に終わる可能性が存在する。このような事情があるので糞便中のアメーバから直接 DNA を抽出して PCR を行う必要がある。下痢便中からは赤血球を捕食している栄養型虫体が見い出される確率が高いため, 最も PCR を応用するについて問題となるのは嚢子のみしか検出されない時である。嚢子からの DNA の抽出はなかなか困難で従来の方法では false negative が多くあったが, 筆者ら⁴⁾は糞便に Triton X-100 を添加し, 90℃ で 10 分間処理することによって DNA を抽出することに成功した。この方法の詳細は筆者らの論文を参照されたいが, *E. histolytica*, *E. dispar* の各々に特異的な primer を使用することによって的確に嚢子の段階で種の同定を可能とした(写真4)。このような方法は今後より広く応用されるものと思われる。

おわりに

E. histolytica, *E. dispar* が独立した生物種であることが確認されて以来, アメーバ感染症の臨床, 疫学, 治療のみならず診断に関する考え方に大きな変革が起きた。少なくとも *E. dispar* のみの感染が確認

参考資料

—臨床病理—

されれば治療は必要ないとされたことは、今後の臨床の現場で両者を的確に同定する必要が現れたことを意味している。本稿に述べたように、PCRなどに頼らなくても *E. histolytica* 感染の診断は可能であるが、*E. dispar* の感染の有無を確認するにはどうしても糞便中抗原の同定やPCRを必要とする。今後より一層検査方法が単純化され、臨床やフィールドで容易に行えるように工夫がなされるべきであろう。

文 献

- 1) 上田 治, 他 : 最近しばしば遭遇する原虫症—腸アメーバ症 20例の検討. 日本医事新報 No. 3659 :

33~43, 1994

- 2) Sargeant PG, et al : The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 72 : 519~521, 1978
- 3) 奥沢英一, 竹内 勤 : アメーバ症の血清診断. 臨床検査 36 : 480~485, 1992
- 4) Sanuki J, et al : Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. Parasitol Res 83 : 96~98, 1997

(竹内 勤)

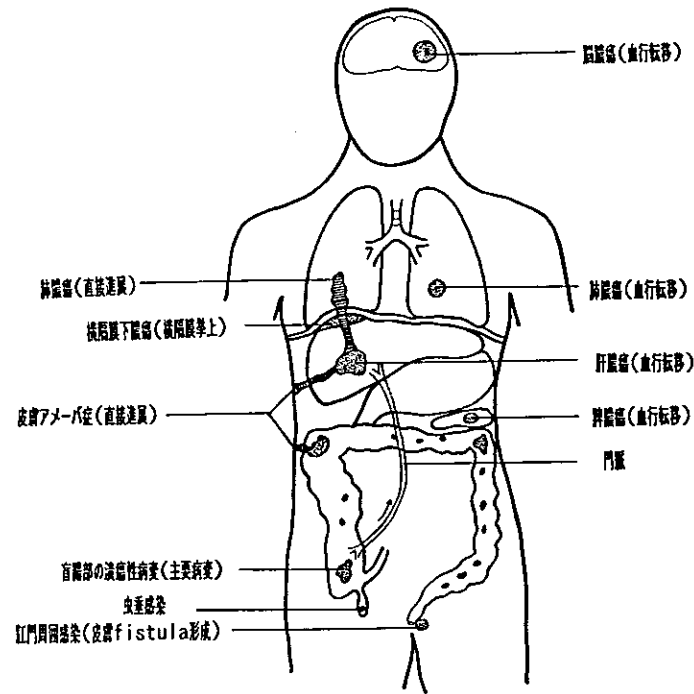
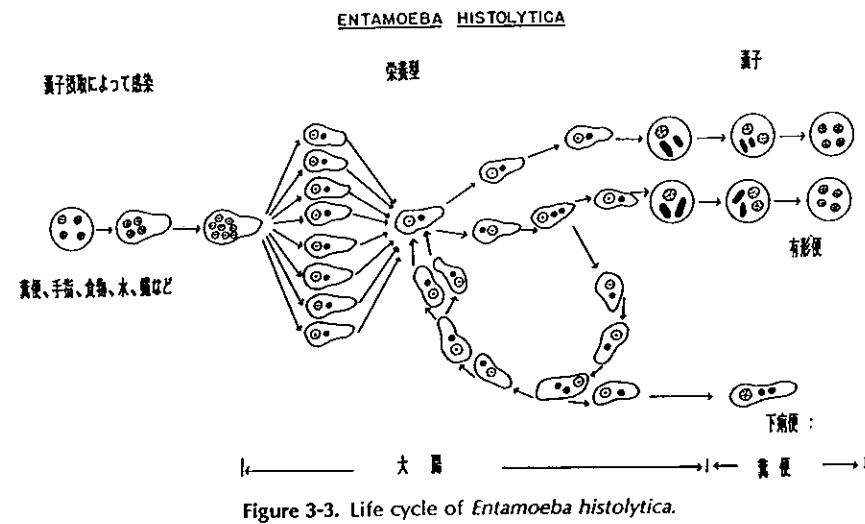
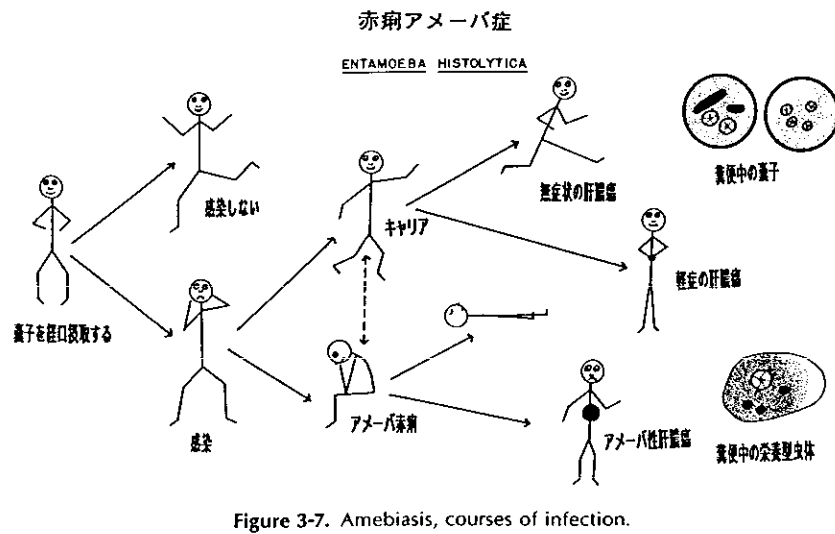


表1 赤痢アメーバ症の治療

1) メトロニダゾール	
① 750mg/日	分3×10日 (成人)
20~30mg/kg/日	分3×10日 (小児)
② 1.25~2.0g/日	分3×7~10日 (成人)
40~50mg/kg/日	分3×7~10日 (小児)
アメーバ性大腸炎には①, アメーバ赤痢, 肝膿瘍には原則として②を用いる。適正な抗生物質(テトラサイクリン, パロモマイシンなど)を腸アメーバ症の場合は併用すること行われる	
2) チニダゾール	
① 1.2g/日	分3×7日
② 1.5~2.0g/日	分3×7日
いずれも成人量, 腸アメーバ症には①, 肝膿瘍には②を用いる	
3) アヒドロエメチン	
① 1mg/kg/日	最大投与量 65mg/日×10日
筋注で最大全投与量は650mg以下(成人量)におさえる。重症赤痢, 肝膿瘍に用いる。本剤は腸管内のアメーバには効果がないので, メトロニダゾールなどによる後療法を必要とする	
4) ジロキサニドフロエイト	
1.5g/日	分3×10日
シストキャリアのみに使用する	

(竹内 勲: 赤痢アメーバ, 金子清俊, 辻 守康編集, 医学教育出版社, 1996より引用)



参考資料

42 人体寄生原虫学 (著者: 吉田幸夫、南山堂より)

第15項

トキソプラズマ (A) 基礎

トキソプラズマは世界に広く分布し、日本においても重要な寄生虫の一つである。通常、成人の20~30%が感染していると思われるが、ほとんどが不顕性感染の形をとり症状を現さない。しかし重要なことは本虫が妊婦に初感染したとき虫体が胎児に移行し重篤な症状を示すこと、および免疫不全の際に本症が顕性化することで、AIDSの重要な合併症の一つとなっている。本虫の終宿主はネコであり、人畜共通感染症としても重要である。

【学名】 トキソプラズマ *Toxoplasma gondii*
(Nicollé and Manceaux, 1908)

【歴史】 1908年、Nicollé and Manceaux はチュニスでヤマアラシの1種 *Ctenodactylus gundi* から本虫を発見し *Leishmania gondii* と名付けたが、翌年、新属 *Toxoplasma* を設け、これに配した。ヒトからの最初の発見は1922年の Janku, あるいは1937年の Wolf とされる。日本では1911年に峰が福岡のモグラから見出し、1954年には宮川らが小児から報告したが、確実な人体例は松林(1956)の報告とされる。

本虫は長らく栄養型と嚢子しか知られていなかったため、分類学上の位置が不明であった。ところが1965年に Hutchison はトキソプラズマを感染させたネコの糞便をマウスに食べさせたところ感染が起こったので、ネコの糞便の中に本虫の感染型が出現するとした。その後、Hutchison ら(1970)、Frenkel ら(1970)の研究によりトキソプラズマの終宿主はネコであり、その小腸粘膜上皮細胞の中で有性生殖を行い、糞便の中にオーシストが現れ、それが次の感染源になることが明らかになった(図95)。すなわち本虫はコクシジウムの1種であり、従来ネコの便の中に見られていた *Isospora bigemina* の小形株とされていたものは、実はトキソプラズマのオーシストであったのである。

【宿主】 ネコ科の動物が終宿主となり、ヒトをはじめ200種以上の哺乳類や鳥類が中間宿主になる。

【疫学】 トキソプラズマのヒトにおける不顕性感染率は地域および年齢によって異なる。小林(1989)^{註1}によると、1974年の調査では東京の妊婦の抗体陽性率は25.3%であったが、1988年以降は妊婦で平均15.9%、一般人は10~30歳で6~10%と減少の傾向を示している。またブタやネコの感染率も次第に低下している。

【形態と生活史】

1. 急増虫体 *tachyzoite* 終宿主の小腸粘膜以外の細胞内および中間宿主の細胞内で盛んに分裂増殖している時期の虫体をいう(*tachy* は *speedy* の意)。形態は図96に示すごとく半月形(*toxón* は弧状の意)で後方は鈍円、前方はやや尖る。長径4~7 μm 、短径2~3 μm 、光学顕微鏡では中央の大きな核と細胞内顆粒くらいしか判別できないが、電子顕微鏡で見ると図99に示すような孢子虫特有の構造が認められる。この虫体は内部出芽

endodyogeny(母虫体の中に新しい2個の娘虫体が生じ、これが母虫体を破壊して出てくる)という特殊な方式で増殖する。

2. 緩増虫体 *bradyzoite* 慢性感染になると抗体の影響を受けやすい部位では急増虫体は減少する。しかし影響を受けにくい筋肉や脳では嚢子 *cyst* を形成する(図97)。これは球形(大きなものは直径100 μm)で被膜につつまれ、中に多数の緩増虫体を蔵する。この虫体は形態的には *tachyzoite* と同じであるが、内部出芽でゆっくりと増殖しているので *bradyzoite* (*brady* は *slow* の意)と名づけられた。

3. オーシスト *oocyst* 終宿主が図95に示したいずれかの方法で本虫の初感染を受けると、腸の粘膜上皮の中でイソスポーラ(前項図90)と同様の有性生殖を行い、1~3週間の間だけ糞便内にオーシストを排出する。これは外界で発育し(20°Cで3~4日を要す)、中に8個のスポロゾイト *sporozoite* を生ずる(図98)。オーシストの大きさは12×10 μm である。

【感染】 ヒトが本虫に感染するのは以下に述べる如く、上述の3つの型がすべて感染可能である。

1. 急増虫体による感染 経口摂取した場合、急増虫体は消化液に弱いのでほとんど感染しない。しかし実験中の事故などで大量の虫体が眼、鼻、有傷皮膚などに接触すると侵入し、急性感染を起こす。

2. 嚢子による感染 ブタやヒツジの肉を生で食べ、その中に存在する嚢子を摂取すると、中の緩増虫体が遊離し、消化管壁に侵入して感染する。緩増虫体は急増虫体より消化液に対する抵抗力が強い。

3. オーシストによる感染 ネコの糞便中に出たオーシストをヒトが経口摂取するとスポロゾイトが遊離し、腸管壁から侵入し急増虫体となって増殖する。

4. 胎盤感染 上述のいずれかの方法によって妊婦がトキソプラズマの初感染を受けた場合、急増虫体となって増殖し、虫血症 *parasitemia* を起こし、これが胎盤を通して胎児に移行すると先天性トキソプラズマ児を分娩することになる。再感染の場合は既に免疫を獲得しているのでこのようなことはないとされている。この胎盤感染が医学上最も重要である。

【註1】 小林昭夫(1989): 最新医学, 44: 744-751.

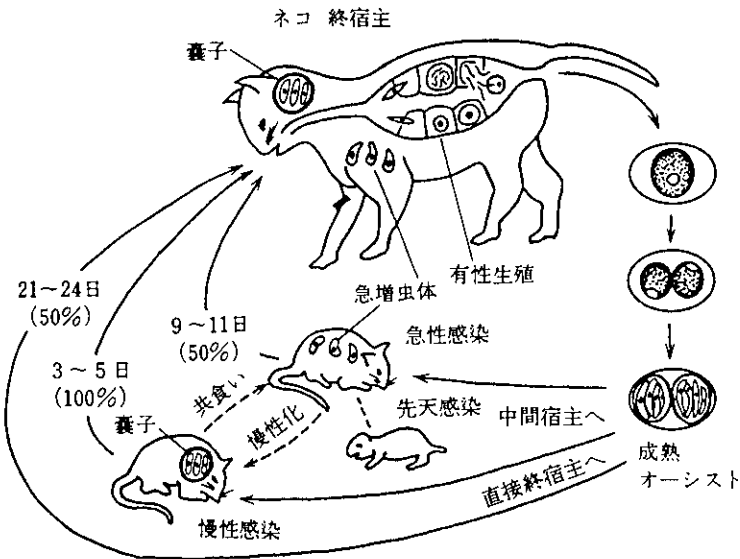


図95. トキソプラズマの生活史
図中の日数はネコがそれぞれの型を摂取してからオーシストを排出するまでの期間、(%)はそれぞれの場合の感染率を示す(Frenkelら, 1970にその後の知見を追加).

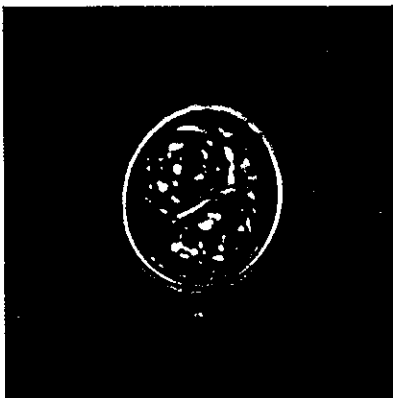


図98. トキソプラズマのオーシスト
感染ネコの糞便中に検出、無染色.

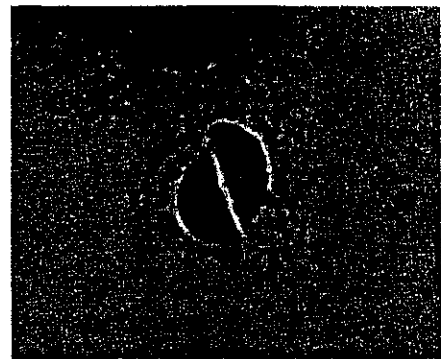


図96. トキソプラズマの急増虫体
感染マウスの腹水を塗抹、ギムザ染色.

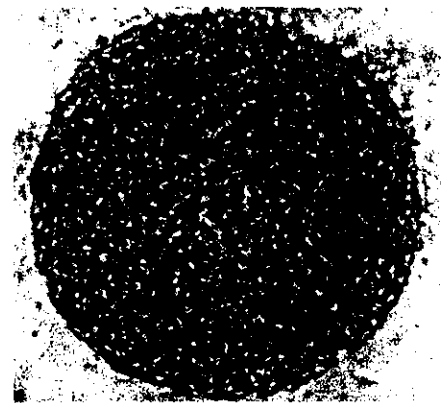


図97. トキソプラズマの嚢子
多数の緩増虫体を含む、感染マウスの脳より、ギムザ染色.

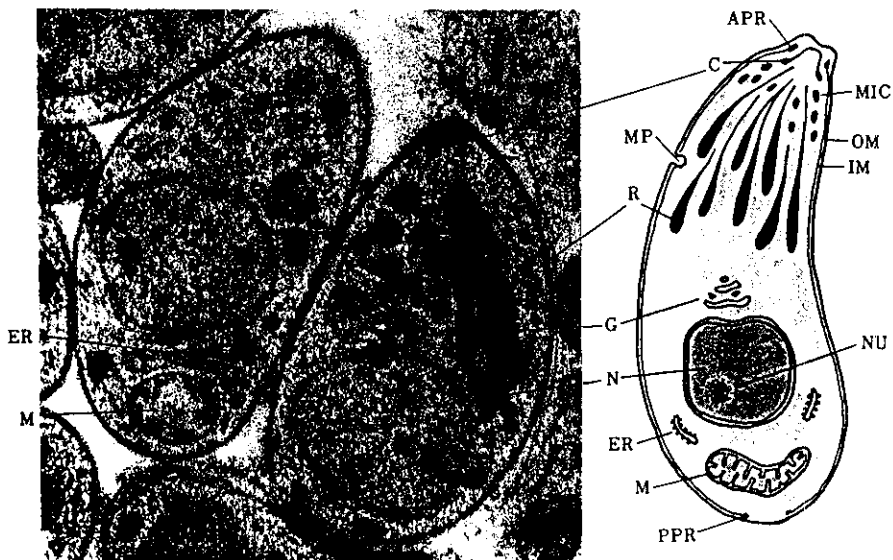


図99. トキソプラズマの tachyzoite の電顕像

APR. 前極輪 anterior polar ring, C. 円錐体 conoid, ER. 小胞体 endoplasmic reticulum, G. ゴルジ装置 Golgi body, IM. 内膜 inner membrane, M. mitochondrion, MIC. microneme, MP. micropore, OM. 外膜 outer membrane, N. 核 nucleus, NU. 仁 nucleolus, PPR. 後極輪 posterior polar ring, R. rhoptry, APRとPPRの間に20数本の subpellicular microtubules が走っている。
(赤尾博士の厚意による)

第16項

トキソプラズマ (B) 臨床

先天性トキソプラズマ症がわが国で時々発見され、産婦人科および小児科領域で問題となる。症状は無症状から死に至るまで区々である。診断には種々の免疫学的方法が考案されている。

【症 状】

1. 先天性トキソプラズマ症

妊娠中の母体が本虫の初感染を受けると、母体は無症状に経過するが、急増虫体が胎盤を通して胎児に移行し先天性トキソプラズマ症を起こすことがある。

先天性トキソプラズマ症の4大徴候は、(1)網脈絡膜炎 retinochoroiditis(図100)、(2)水頭症 hydrocephalus(図101,102,103,104)、(3)脳内石灰化像(図105,106)、(4)精神・運動障害、である。その他、全身症状として発熱、リンパ節腫脹、黄疸、貧血、肝・脾腫、リコールの変化などがみられる。これらの患児の約12%は4年以内に死亡するといわれるが、生存者でも精神薄弱、小頭症(図108)、運動障害など後遺症を残す場合が多い。

2. 後天性トキソプラズマ症

生後ヒトが本虫に感染して抗体陽性となってもほとんどの場合無症状(不顕性感染)に経過する。しかし免疫能が低下すると顕性化し、リンパ節炎、発熱、網脈絡膜炎などの症状を発する。また米国の統計ではAIDS患者の3.5%にトキソプラズマ脳炎が併発したという。そしてこの場合は脳に膿瘍を形成するのが特徴とされている。わが国のAIDSおよび抗癌・抗免疫療法中の患者で本症脳炎を合併した例は現在までに7例報告がある。

【診 断】 虫体が検出されれば確実であるが虫体検出は困難な場合が多い。一方、本症には種々の免疫学的診断法が考案されている。先天性トキソプラズマ感染児では早期薬剤投与がその後の発症を予防するので早期診断が重要である。

1. 虫体検出 患者の脳脊髄液の沈渣やリンパ節の剖面の塗抹標本を位相差顕微鏡で見ると(図107)、ギムザ染色をして虫体を検出する(図96)。またこれら材料をマウス腹腔内に注射し原虫を増殖させるか、マウスの抗体価の上昇を見て判断する。

2. 免疫学的診断法 種々の方法があるが、AIDS患者に本症が合併した場合は下記の診断基準がしばしば適用できないことが判明したので注意を要する。

1) 色素試験(Sabin-Feldman dye test, DT): 本法の原理は、生きた急増虫体はアルカリ性メチレン青によく染まるのであるが、accessory factor(特定のヒトの血清)と称する補体様因子とともに抗体を作用させると染色性を失う、という現象を利用したものである。一応50%以上の虫体が染まらないときの血清希釈が16倍以上を陽性とする。本法は最も信頼性の高い方法であるが、

生きた虫体の常時保有、accessory factorの検定などの点から特定の施設でのみ実施可能である。

2) 間接赤血球凝集反応(IHA): ヒツジその他の動物の赤血球にトキソプラズマ抗原を吸着させておき、被検血清と合わせる。もし抗体が存在すれば血球を凝集させる。抗体価256倍以下陰性、512倍疑陽性、1,024倍以上陽性とされているが、本症と診断するには4,000倍以上を示すか、検査毎に抗体価が上昇している必要がある。診断用キットが販売されている。

3) 間接ラテックス凝集反応(ILA): 上記IHAの赤血球の代わりにラテックス粒子を用いるもので非特異反応が少なくDTとの一致率が高い。ヒトの場合32倍以上、ネコヤブタの場合64倍以上を陽性としている。診断用キットが販売されている。

4) 酵素抗体法(ELISA): 検査用プレートの各穴にトキソプラズマ抗原を付着させ、倍数希釈被検血清を加える。血清中に抗体があれば抗原と結合する。洗浄後、酵素をラベルした抗ヒトIgGを加え、ついで発色させる。上記のDTおよびILAの検出率によく一致する。

5) IgM: 抗トキソプラズマIgM抗体は感染後5~7日で産生され、その後短時間で低下する。したがってこれの高値は最近の感染を意味する。一方IgG抗体は少し遅れて産生され長期間持続する。

【治 療】 本症の治療は困難で、種々の意見があるが、次のような方法が用いられている。①ピリメサミンとサルファモノメトキシシンの併用: 前者1~2mg/kg/日、後者20~40mg/kg/日、分2、3日間、引続き半量を2~4週間投与する。妊婦には禁忌。②スピラマイシン: 30mg/kg/日、分4、4週間。効果は①より少ないが、妊婦やサルファ剤過敏症には本剤を用いる。③骨髄抑制を予防するため葉酸製剤(ロイコボリン)6~12mg/日、筋注、週2回、治療期間中用いる。上記薬剤は嚢子には効かない。

【予 防】 わが国各地のブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ヤギなどの筋肉から10~30%に本虫の嚢子が検出される。また子猫の約1%から本虫のオーシストが見い出されるので感染源はかなり多いと思われる。したがって適齢期の女性は妊娠の前に検査を受け、抗体陽性であれば一応安心してよいが、陰性であれば妊娠期間中、ヒツジヤブタの生肉、ネコの糞便などに注意を払う必要がある。妊娠期間中に反応が陽転し、検査毎に抗体価が上昇するようなら治療の対象になる。

講習会「エイズに伴う原虫感染症」(1998年度)
1998年12月12-13日, 1999年1月23-24日
於. 慶応大学医学部

クリプトスポリジウム症

大阪市立大学医学部 井関基弘
545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3
TEL 06-6645-3760, FAX 06-6645-3762
E-mail: isekim@med.osaka-cu.ac.jp

1999年4月からクリプトスポリジウム症は「届出感染症」に指定される。感染力が強く、集団感染を起こしやすいし、治療が困難で、免疫不全患者では重症になるからである。

人体症例が初めて報告されたのは1976年であるが、当時、これほど重要な感染症になるとは誰も予想しなかった。1982年にアメリカのCDCが「エイズの重症下痢患者に本症が多くみられ、種々の抗原虫剤、抗生物質、抗真菌剤を投与しても、この原虫の増殖を抑えることができない」と報告したことで、エイズ患者を担当する臨床医やクリプト研究者に大いに注目されるようになった。その後の疫学調査で、本症は世界中に分布し、一般の下痢患者や家畜にもかなりの率で感染していることが明らかになり、エイズなど免疫不全患者の日和見感染症、小児下痢症、旅行者下痢症の原因として重要であることが認識されるようになった。人獣共通感染症で、感染源は身近に多数存在する。

近年とくに注目されるようになったのは、水道による集団感染が先進諸国で頻発しているからである。1985年頃から報告されはじめたが、1993年に米国のミルウォーキーで、通常の浄水処理を行ない、飲料水安全基準をすべてクリアした水道水が給水されたにもかかわらず、2週間に40万3千人もの大規模な患者発生をみるに及んで、大騒ぎになったのである。わが国でも、1996年6月に約9千人の集団下痢が埼玉県で発生し、一躍、各方面の注目を集めることになった。

1. クリプトスポリジウムとは

腸管寄生原虫類の1種で、ヒトの下痢の原因になるのは *Cryptosporidium parvum* (クリプトスポリジウム・バルブム)。ヒトやウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ネズミなどの腸粘膜上皮細胞の微絨毛内に寄生して無性生殖と有性生殖で激しく増殖し、糞便の中に直径約5 μ mの球形のオーシストと呼ばれる型が多数排出される。オーシストは丈夫な膜(オーシスト壁)を持っており、その中にスポロゾイトというバナナ状の虫体が4個と、残体と呼ばれる液胞と顆粒の集塊1個とが入っている。

ヒト、ウシ、ネズミなどの胃に寄生する *C. muris* もあるが、下痢の原因にはならないようである。オーシストは大型で、7~8 \times 6 μ mの楕円形である。

ニワトリなど鳥類には *C. baileyi* (オーシストは6 \times 4.2 μ mの楕円形) や、*C. meleagridis* (オーシストは直径約5 μ mの球形) がかなり高率に寄生している。ヘビや淡水魚、海産魚などに寄生する種類もある。

鳥類や爬虫類、魚類に寄生する種は通常は哺乳類には感染しない。しかし、エイズ患者に

参考資料

ニワトリの *C. baileyi* が感染して死亡した例が欧州で報告されている。

オーシストは浄水場における塩素消毒や病院などで日常使用される消毒剤では死滅しない。しかし、乾燥や70℃以上の加熱では容易に死滅する。

2. 感染経路・症状・治療

オーシストが口から入ると感染する。30個程度の摂取で発症することが判明し、1個でも発症することがあるのではないかと考えられている。汚染された河川や池、プールなどの水を飲めば感染するし、感染した人や動物の糞便からも感染する。感染の極期にはヒトでは1日に10億個、ウシなどでは100億個ものオーシストが排出される。オーシストは水道水や下水処理における塩素消毒では全然死なないので、水道水が汚染されると大規模な集団感染がおこる。アメリカでは市販のアップルジュースやサラダによる集団発生も報告されている。

潜伏期間は普通は4～5日。症状は激しい水様下痢と腹痛である。発熱や吐き気、嘔吐を伴うこともある。初期症状は下痢を伴うインフルエンザ (intestinal flu) とよく似ているが、頭痛やセキ、ノドの痛みなどの呼吸器症状はない。血便もみられない。下痢は1～2日で終わる人もあれば1～2週間続く人もあるが、免疫機能が正常であれば放置しても自然に治る。下痢が治まったあともオーシストの排出は1～2週間持続する。初感染時や幼児、とくに低栄養児では症状が重く、再感染では軽症あるいは無症状で経過することもある。自然治癒するとはいえ、壮健な若者でも1日に30～70回にもおよぶ激しい下痢のために入院加療を要することもある。

エイズ患者のように免疫力が低下している人が感染すると、コレラの様な下痢がいつまでも続き、高カロリー輸液などをおこなっても衰弱が著しく、寄生部位も胆管、胆嚢、膵管、呼吸器にまで拡がり、しばしば致命的になる。この原虫症に確実に効く治療薬はまだ無い。硫酸パロモマイシンが有効な症例もある。

3. 診断法

診断には糞便検査でオーシストを検出すればよい。顕微鏡観察に少し慣れれば、手技は簡単で、短時間で確実に診断を下すことができる。下痢便のスクリーニングには簡易迅速蔗糖浮遊法、それで検出されない場合は蔗糖遠心沈澱浮遊法を実施し、永久標本としては抗酸染色法を行なう。蛍光抗体直接法用の試薬も開発されている。

参考文献

- 1) 井関基弘 (1997) : クリプトスポリジウム症, サイクロスポーラ症. 山口恵三編「新興再興感染症」44-49, 日本医事新報社.
- 2) — — (1998) : 水と食品によるクリプトスポリジウムおよびサイクロスポーラの集団感染. 日本食品微生物学会雑誌, 14 : 179-185.
- 3) — — (1998) : クリプトスポリジウム症. 臨床病理 特集108号「検査微生物学 (II), ウイルスと原虫・寄生虫感染症の検査診断」: 191-197.
- 4) — — (1997) : 新しい腸管寄生原虫の検査. 検査と技術, 25 : 335-341.
- 5) — ・木俣 (1998) : 技術解説: クリプトスポリジウム症, サイクロスポーラ症. 臨床検査 42 : 541-546.

参考資料

ニューモシスチス・カリニ 肺炎

京都府立医科大学医動物学教:
塩田 恒三

ニューモシスチス・カリニ *Pneumocystis carinii* (以下Pcと略) は大きさ約 5 μ m の病原体で、発育期と形態の違いから栄養型と嚢子に大別される。Pcは肺胞上皮に接着して肺胞腔内に寄生し組織侵入性はない。健常者では肺胞マクロファージの食食能によりPcの増殖は抑制されるが、AIDS や免疫抑制剤投与などによる免疫不全状態の患者では著しく増殖し、A-Cブロックに起因する呼吸不全を起こす。Pc肺炎は典型的な日和見感染症(opportunistic infection)の一つである。本肺炎は両側性瀰漫性に起こり、動脈血酸素分圧の著しい低下と間質性～スリガラス状胸部X線像の変化を特徴的所見とする。発病は急激で進行が早く治療をしないと死に至るが、ST合剤やペンタミジンなどの使用による予防と治療は可能である。

生活史

- 1) PcはI型肺胞上皮に接着して寄生する。
- 2) 栄養型は発育して8個の娘細胞を持つ成熟嚢子となる。
- 3) 娘細胞は脱嚢して栄養型となり、1生活史で8倍に増殖する。

Pcの栄養型と嚢子はI型(扁平)肺胞上皮に接着寄生し、成熟した嚢子内には8個の娘細胞(嚢子内小体とも言う)が形成されている。娘細胞は脱嚢して、アメーバ形の小型栄養型から大型栄養型へと発育し、さらに外皮が肥厚して球状の未熟嚢子となる。未熟嚢子内で核の2分裂を3回繰り返し、8個の娘細胞となり成熟嚢子へと発育する。栄養型の合体や2分裂が推察されているが、形態学的な直接証明がまだなされていない。

分類・形態

Pcの分類学上の位置はまだ未決定である。Pcの純培養が成功せず純粋なPcが得られないこと、生活史がまだ完全に解明されていないこと等による。現在判明している形態と生活史および薬剤に対する感受性等は原虫説を支持するが、嚢子壁の構造と成分、遺伝子の塩基配列は真菌とホモロジーが高いこと等は真菌説を支持する。

栄養型はアメーバ形で大きさは2-8 μ m、ギムザ染色標本では赤紫色の1個の核を認める。Cellufluor染色やGMS染色では染まらない。

嚢子は球形で大きさは4-8 μ m、ギムザ染色では内部に1個から8個の核を認めるが、嚢子壁は染まらない。嚢子壁は真菌類の細胞壁と構造および成分が近似している。電子顕微鏡で観察すると、嚢子壁の2カ所が内部へ膨隆(肥厚)して観察される。この肥厚部はcellufluor染色やメテナミン銀染色(GMS染色)をした嚢子に染め出される、いわゆる括弧状構造物であり、真菌類には認められずPCに特異的な構造であることから、確定診断に用いられる。

感染経路・疫学

Pc肺炎は全年齢層にみられ、感染経路は咳、くしゃみ、会話などによる飛沫感染(気道感染)と考えられる。AIDS(acquired immune deficiency syndrome)に併発するPc肺炎発症率は20%以上

参考資料

と高い。また再発（再燃）率も30%以上と高い。この理由はAIDS患者に多用されるペンタミジンの吸入療法において、ペンタミジンが肺の上葉の抹消にまで到達しにくい、などによるものと考えられる。AIDS以外の基礎疾患のもとに併発する本肺炎の発症率は10-20%であり、免疫不全状態が持続する間は再発の可能性がある。

症状

- 1) Pc肺炎はAIDS患者を除いては急激に発病する。
- 2) 動脈血酸素分圧は正常値の約半分に低下する。
- 2) 胸部X線所見は両側肺野の間質影ないしスリガラス状陰影を示す。

Pc肺炎発症のリスクの高い基礎疾患として、白血病、悪性リンパ腫、膠原病、腎移植後、骨髄移植後、ATL、AIDS、その他免疫抑制剤が長期大量に投与された疾患などがある。好発時期は、ATLとAIDSをのぞく基礎疾患を有する患者では、抗癌・抗免疫療法を開始してから、2-4カ月頃である。発症に先立ち、37-41度のスパイクフィーバーがみられ、その1-10日後に両側性瀰漫性間質性肺炎様所見を呈して突如発症する。ラ音聴取、喀痰の出ない乾性咳、多呼吸、頻脈、体動時息切れなどが起こり、胸部X線所見は両側肺野に瀰漫性の間質影、間質・粒状影、そしてスリガラス状陰影へと変化していく。PaO₂は正常値（90-100mmHg）の約1/2（50mmHg前後）に低下する。PaCO₂は異常値を示すことは少ない。血液・生化学値は特異的に変化することは少ない。AIDS患者ではまれに、脈管系を介すると考えられるPcの全身臓器への播種がおこる。

病理

- 1) 剖検肺は肉眼的に灰白調あるいは肝臓様。
- 2) 組織学的には、肺胞内はPcの栄養型、嚢子、変性した宿主の細胞などからなる泡沫様物質 honeycombed materials（HEやPAS染色で赤く染色される）で充満している。急性例では肺胞隔壁の変化に乏しい。

肉眼的所見 本肺炎で死亡したヒトの肺は含気に乏しく、硬度を増し灰白調あるいは肝臓様である。

炎症の場は主に肺胞腔内であり中隔の変化は乏しいが、AIDS患者などの本肺炎が比較的緩徐に進行した例では、肺胞隔壁の肥厚、リンパ球や形質細胞の浸潤、膠原線維の増殖、II型肺胞上皮の腫大、脱落、再生、肺胞腔内への出血などがみられる。

診断

- 1) 免疫不全患者に発病する肺炎（日和見感染症）。
- 2) A-C blockと胸部X線所見。
- 3) 気道より採取した検査材料よりPcを検出する。

免疫不全患者に上記症状を認めた場合は、Pc肺炎である可能性がある。直ちに治療薬の投与を開始した場合にも、Pcを直接検出する確定診断を行う。治療薬投与後有効な場合でも数日間

参考資料

は検査材料中にPcが検出される。

1. 確定診断

a. 検査材料の採取：

- (1) 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) (検出率90-95%)。
- (2) 誘発喀痰 (induced sputum) 3%食塩水をネブライザーで約10分吸入した後、喀出した痰を用いる (同50-70%)。
- (3) 喀痰 Pc肺炎では出にくいだが、努めて喀出痰を集める (同20-40%)。他に経皮的肺吸引や気管支鏡的肺生検などが用いられる。開胸的肺生検や閉鎖的肺生検は侵襲が大きい。

b. 検査材料の処理：

喀痰類、気道吸引物、BALFは喀痰液化剤 (dithiothreitol: SPUTASOL等) で液化し (数mlのBALFは無処理で)、3000rpm、10分遠沈し、沈さをスライドガラスに塗抹、風乾、メタノール固定する。

c. 染色法

- (1) cellufluor (calcofluor white) 蛍光色素染色 (Fungi-Fluor kit; Polysciences, Inc.)。嚢子壁と括弧上構造物を淡青色に染める。検出率はGMS染色と同等。水洗時に塗抹材料を洗い流さないように注意が必要。
- (2) メテナミン銀染色 Gomori's methenamine silver nitrate (GMS) stain, Grocott's variation。嚢子壁と括弧上構造物を黒褐色に染める。
- (3) ギムザ染色 Giemsa stain。栄養型と嚢子の核を赤色に染める。
- (4) トルイジンブルーO (TBO) 染色 Chalvardjian's toluidine blue-O (TBO) stain。嚢子壁を淡紫色の染める。括弧上構造物は染まりにくい。
- (5) 抗Pcモノクローナル抗体を用いた間接免疫蛍光法や酵素抗体法 (MONOFLUO Kit P.CARINI; DIAGNOSTICS Pasteur等)
- (6) 位相差顕微鏡による生 (未染色) 標本の観察。多数の嚢子が存在する場合は検出可能。

2. PCR (Polymerase chain reaction) 法による遺伝子診断

Pcに特異的なプライマーを用い、検体中のPcのDNAをPCRで増幅させて検出する。特異性 (100%) および感度 (BALFはほぼ100%、喀痰類は約80%) とともに非常に優れているが、時間がかかりコストが高つくので一般の検査室で日常行うにはまだ問題がある。しかし、喀痰では一般の (細胞診による) 染色法での検出率が低いので、PCR法の有用性はある。

参考資料

TABLE 1. Comparison of PCR with cellufluor staining for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia

Case No.	Age	Sex	Back ground		Days after beginning of the examination																			
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	19	22	42	50	
1	20	F	ALL	PCR	-	(+)	-																	
				Cel	-	(+)	-																	
2	41	M	MDS	PCR	<+>																			
				Cel	<->																			
3	54	M	ALL	PCR	(+)	+	+	+																
				Cel	(+)	+	+	-																
4	60	F	CML	PCR	(+)	<+>	<->															-		
				Cel	(-)	<->	<->																	-
5	55	M	ML	PCR	(+)	-	+				-		-		-									
				Cel	(+)	-	+			-		-		-										
6	42	M	ATL	PCR	(+)			+					+								+	-		
				Cel	(+)			-							-								-	-
7	66	M	BCC	PCR	(+)			<->	<->	<->	<->		<->	<->		<->	<->	<->		<->				
				Cel	(+)			<->	<->	<->	<->		<->	<->		<->	<->		<->	<->		<->		
8	18	M	RT	PCR	<+>	(+)	<->	<+>	<+>															
				Cel	<+>	(-)	<->	<->	<->															
9	16	M	AA	PCR	(+)																			
				Cel	(+)																			
10	72	M	Pemph- igus	PCR	(+)	<+>	<+>	(+)	(+)			(+)	(+)	(+)	<+>	<+>	(+)	*						
				Cel	(+)	<->	<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)							

Cel: Cellufluor stain, (): BALF, < >: Tracheal aspirate, *: Died

TABLE 2. Comparison of PCR and cellufluor staining results for 50 respiratory samples from 10 patients with PCP

Sample	Total	No. positive/total no. (%)		
		Proven cases		Unproven cases (PCR)
		PCR	Cellufluor	
BAL	43	15/15 (100)	11/15 (73)	0/28
Tracheal aspirate	67	9/21 (43)	3/21 (14)	0/46
Expectorated sputum	45	7/14 (50)	3/14 (19)	0/31
Total	155	31/50 (62)	17/50 (34)	0/105

参考資料

「HIV感染症に関する臨床研究班」主催日和見原虫感染症の講習会
実習資料

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、大腸アメーバ (*Entamoeba coli*)

1. *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) 栄養型

ロビンソン培地の管底から一滴スライドグラスにとり、カバーグラスをかぶせて検鏡する。はじめ弱拡大で大きさ (12~30 μm)、光沢をよく記憶する。強拡大では外肉、内肉、運動の状況をよくみる。培地には米粉が加えられており、顕微鏡下に多数観察される。アメーバはこれを活発に貪食しており、取り込まれた米粉とアメーバ内オルガネラとを間違えない様よく注意して観察する。

2. *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) 嚢子

材料はアメーバ症患者の糞便中に排出された赤痢アメーバ嚢子をホルマリン固定したものである。これをスライドグラスに一滴とり、カバーグラスを載せて検鏡する。嚢子は青白い光沢を持った屈折性の球形の物体(10x 15 μm)として観察される。まず弱拡大で検鏡し、みつかったら強拡大になおして観察する。類染色質体が存在するものもある。嚢子の大きさと光沢の具合をよく観察する。ついでヨード・ヨードカリ液 (ヨード1.0g、ヨードカリ2.0g、水50cc) を1滴滴下し染色する。この標本で核をはっきり見ることができる。また、核分裂のすすんでいない嚢子ではグリコーゲン胞をみることがある。

3. *Entamoeba coli* (大腸アメーバ) 嚢子

赤痢アメーバ嚢子と全く同様にして観察。赤痢アメーバより一般に大きな嚢子 (15 x 30 μm)がみられる。核内のカリオソーム及び核膜下クロマチン顆粒の状態、嚢子の大きさ、核の数等について大腸アメーバと赤痢アメーバとを比較し両者の区別を行う。

4. アメーバ性大腸潰瘍の組織切片標本 (モルモット)

初期の病変は粘膜下組織にアメーバの増殖がみられ、粘膜表面の欠損部は狭く flask-shaped ulcer と呼ばれる潰瘍が特徴である。進行した病変では粘膜表面の欠損が拡大し灰白色の滲出液が表面を覆う。隣接した潰瘍と癒合しないこと、粘膜下病変との間に基部が存在することが特徴である。組織内に見られるのは栄養型のみで、周辺にハローが認められる。宿主側の反応としては、細胞浸潤が軽度であることがアメーバ症の特徴の1つである。

参考資料

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*)1. *Toxoplasma gondii* (tachyzoite)

- a) 生鮮標本：マウスを用いて継代維持しているRH株で、腹腔内を生理食塩水で洗ったものを観察する。Tachyzoiteは三日月型で $6\cdot8\times 2\cdot3\mu\text{m}$ のサイズで、運動性があり体をひねったりして少しずつ動くのが見られる。腹腔細胞（マクロファージ、リンパ球等）と大きさを比較する。
- b) Giemsa 染色標本：a)のsampleをGiemsa染色したもので、核や細胞内顆粒、さらにはapical complexが観察される。

2. *Toxoplasma gondii* (cyst & bradyzoite)

- a) 生鮮標本：トキソプラズマ（Beverley株）感染マウスの脳の懸濁液をカバーグラスで圧平し観察する。シストは径 $20\cdot50\mu\text{m}$ の球形で中にbradyzoiteがつまっている。
- b) Giemsa 染色標本：a)の標本をGiemsa染色したものである。cyst及びbradyzoiteは紫色に染まってみえる。

3. *Toxoplasma gondii* (oocyst)

ネコ糞便中のoocystを観察する。径 $12\cdot14\mu\text{m}$ の楕円形で、immaturのものはsporoblast、matureのものは2個のsporocystがみえ、中に各々4個のsporozoiteを含む。

4. 急性トキソプラズマ感染ヒトリンパ節切片（HE染色）

急性トキソプラズマ感染によるリンパ節症を示す患者のリンパ節標本である。肉眼的にはリンパ節腫大がみられる。組織学的にはリンパ小節周辺部及び髄索にエオジン好性の大きな細胞質を持つ類上皮細胞（RES系細胞）の増生を示す細胞集塊が多数認められる。

講習会「エイズに伴う原虫感染症」(1998年度)
1998年12月12-13日, 1999年1月23-24日
於. 慶応大学医学部

クリプトスポリジウム症の検査 (実習)

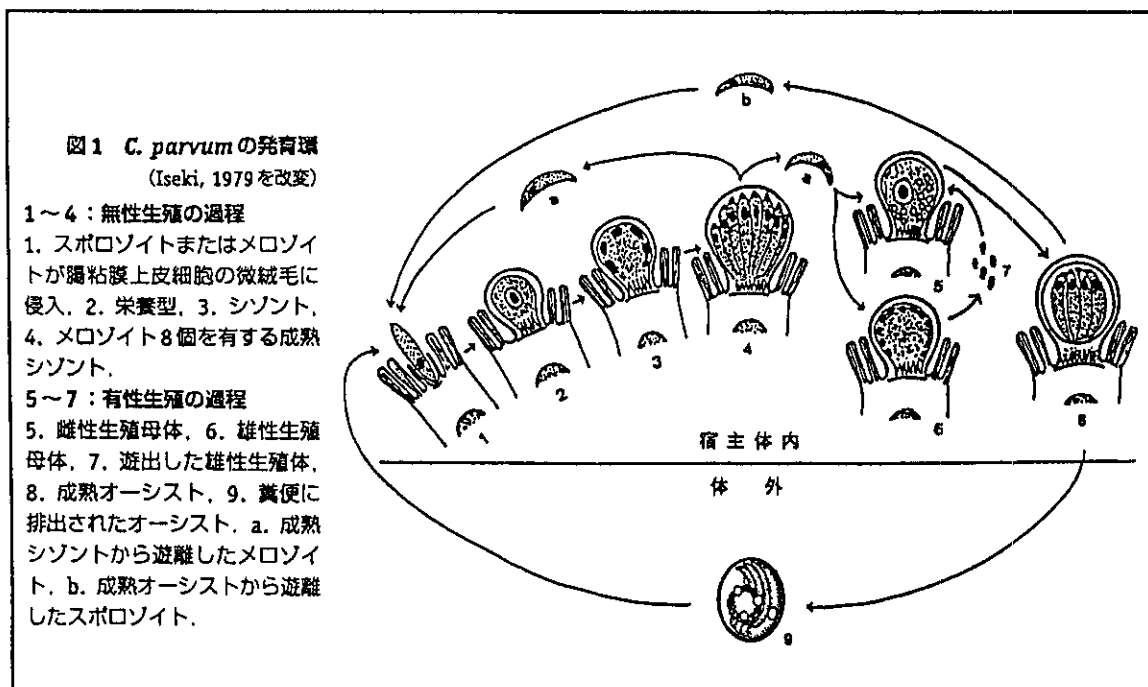
大阪市立大学医学部 井関基弘

クリプトスポリジウム症は激しい水様下痢を主徴とする。免疫機能が正常な患者では1～2週間で自然治癒するが、HIV感染者やエイズ患者のように免疫機能が低下している場合は下痢は年余にわたって持続し、感染部位も腸管にとどまらず、胆管、胆嚢、膵管、呼吸器にまで拡がり重症になる。現在、本原虫症に有効な治療薬はない。エイズの感染症として重要である。

診断には糞便検査でオーシストを検出すればよい。実習として下記の4方法のうち1～3を実施する。

1. 簡易迅速蔗糖浮遊法
2. 蔗糖遠心沈澱浮遊法
3. 抗酸染色法
4. 直接蛍光抗体法

試薬の調製や手技、鏡検時の注意点などについては、出版社の許可をえて、次頁以下に示した。



参考資料

臨床病理 特集108号 (1998)

「検査微生物学 (II) ウイルスと原虫・寄生虫感染症の検査診断」

II. 原虫・寄生虫感染症の検査診断 各論

1. 原虫性疾患

d. クリプトスポリジウム症

キーポイント

- 診断には糞便からオーシストを検出すればよいが、ホルマリン・エーテル法など通常の虫卵・原虫検査法では検出できない。
- 蔗糖遠心沈殿浮遊法，抗酸染色法，蛍光抗体法などが必須である。
- 重症例では胃液，胆汁，喀痰などからも検出される。
- 腸粘膜層生検材料のヘマトキシリン・エオシン染色標本では虫体は刷子縁に顆粒状物体として見えるが，確定には蛍光抗体染色や顕微鏡観察が必要である。

キーワード クリプトスポリジウム，クリプトスポリジウム症，検査法

はじめに

クリプトスポリジウム症は腸管寄生原虫である *Cryptosporidium* の感染によって起こる下痢症で，世界中に分布し，感染率は下痢起因病原体の中でも上位にランクされる。まだ確実に有効な治療薬はないので，免疫機能が正常な患者では免疫力による自然治癒を待つしかなく，免疫機能の低下した患者，特に HIV 感染者やエイズ患者が感染した場合は，激しい下痢が長期間持続し，難治性で致死的になることも少なくない¹⁾。小児下痢症，旅行者下痢症の原因としても重要である。

近年，先進諸国では汚染された水道水による集団感染が頻発し，大きな問題になっている。わが国も例外ではなく，1996年には埼玉県で約9000人の集団感染が発生した。

本症は1999年4月から届出感染症に指定される。検査法は簡単なので，下痢症の病原体検索に際してルーチン検査の一つとして定着させていただきたい。

I. クリプトスポリジウムの種 (species) とオーシストの形態

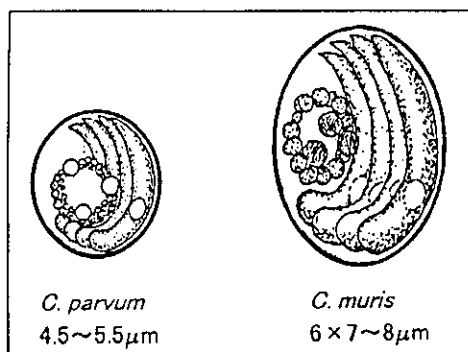
Cryptosporidium は多くの動物に寄生している。哺乳類には腸に寄生する *C. parvum* や *C. wrairi*，胃に寄生する *C. muris*，ニワトリには *C. baileyi*，シチメンチョウには *C. meleagridis*，ヘビには *C. serpentis*，魚類には *C. nasorum* などが知られており，まだ種名が付けられていないものも数種ある。

ヒトに感染し下痢の原因として重要なのは *C. parvum* であるが，*C. muris* 感染もみられるし，エイズ患者では本来ヒトには感染しないはずの *C. baileyi* が感染して死亡した例もある。したがって，糞便材料からオーシストが検出された場合には種の鑑別が必要になるが，オーシストは5 μ m前後と小さく，基本的形態は互いによく似ているので，顕微鏡的に種を同定するのは極めて困難である。現在，PCR法による鑑別法が開発されつつある。

オーシストの基本構造を図1に示した。オーシスト壁の中にはバナナ状のスプロゾイトが4個と，液胞と顆粒の集塊からなる残体1個とが包蔵される。

参考資料

—臨床病理—

図1 *Cryptosporidium* のオーシストの構造

オーシストの大きさは *C. parvum* であれば長径 5~5.5 μm の短楕円形, *C. muris* は長径 7~8 \times 短径約 6 μm の楕円形, *C. baileyi* は長径約 6 μm \times 短径 4.5 μm の楕円形を示す。鏡検に際して $\times 1000$ の倍率で長径と短径を計測するよう心掛ける。

感染はオーシストの経口摂取による。小腸粘膜上皮細胞の微絨毛の中で無性生殖と有性生殖を繰り返しながら激しく増殖し、感染力のあるオーシストが糞便に多数排出される²⁾。

II. 検査材料と検体の保存

A. 糞便

通常は水様下痢便や泥状下痢便が検査対象になるが、下痢終息後の軟便や普通便にも 2 週間程度は多数のオーシストが排出されるので検査が必要になる。検体が微量では適切な検査ができない。下痢便の場合は少なくとも 5ml 以上、普通便でも 2g 程度は必要である。

検査には新鮮な検体を使用するにこしたことはないが、オーシストは変性しにくいので、容器にフタをして冷蔵保存すれば 1~2 週間後でも使用できる。また、10%ホルマリン水や MIF (merthiolate-iodine-formalin) 液, SAF (sodium acetate-acetic acid-formalin) 液などで固定した糞便からも検出可能である。MIF 液および SAF 液の処方文献⁹⁾を参照されたい。固定液を糞便の約 10 倍量加え、よく攪拌して室温に保存すればよい。固定すればオーシストは当然死滅する。オーシストを生きた状態で長期間保存したい場合には 2.5% の重クロム酸カリウム液を糞便量の 2 倍以上加えて攪拌し、冷蔵保存すれば 2~3 ヶ月は保存できる。冷凍すると解凍時にオーシストは崩壊し、検出できなくなる。

B. 胃液・胆汁・喀痰

エイズ患者などにおける重症感染例では胃液や胆汁、喀痰などからも検出される。検体の取り扱いは糞便に準ずるが、単なる診断目的であれば、糞便検査だけで十分である。

C. 腸粘膜層の生検材料

本症の診断には糞便検査を最優先すべきであるが、下痢の原因究明のために腸生検材料パラフィン切片のヘマトキシリン・エオシン (H & E) 染色がなされることがある。病理切片の鏡検による確定診断は困難なことがあるので、未染色切片を脱パラして抗クリプトスポリジウム抗体を用いて蛍光抗体染色をするか、脱パラしたあと、電顕用に固定・包埋して電顕観察で確認する必要がある。

III. 検査室内および下水の汚染防止対策

患者の糞便には極めて多数のオーシストが排出される。1 ml 当たりには $10^6 \sim 10^7$ 個という例も少なくない。したがって、1 μl 程度の微量の糞便でも数千個~数万個が含まれていることになる。しかもオーシストの感染力は非常に強く、数個~数 10 個の経口摂取で感染・発症するので、患者糞便による汚染には十分注意する必要がある。

オーシストは検査室などで使用される各種消毒液に対する抵抗性が細菌やウイルスに比べて著しく強く、通常の使用濃度では不活化できない。乾燥や 70°C 以上の加熱では簡単に死滅するので、消毒には乾燥か加熱で対応する。

検査で糞便が付着した器具や検体の残り、アスピレートした廃液などもすべて煮沸してから廃棄する。生きたオーシストが下水に入ると環境水を汚染し、水系感染の原因になる。

IV. 検査方法

A. 糞便からの検出

本症の診断は糞便材料からオーシストを検出するのが最も簡単で確実である。しかし、直接塗抹法やホルマリン・エーテル法など、通常の虫卵・原虫検査法では検出できない。オーシスト検出には次に示す 4 方法があるので、状況に応じて選択する。

1. 簡易迅速蔗糖浮遊法

手技は最も簡単で、日常検査として下痢便のスクリーニングに適している。少量の下痢便と比重 1.3 の蔗糖液とをスライドグラスに採り、両者をカバー

表1 簡易迅速蔗糖浮遊法

〔試 薬: Sheatherの蔗糖液(比重は約 1.3)〕	
サッカロース(試薬 1級)	100 g
蒸留水	64 ml
液状フェノール	1 ml
加温しながらスターラーで搅拌溶解する。室温で長期間保存可能。	
〔手 技〕	
1) スライドグラスに下痢便の少量(25 μ l 程度)と、その横に約2倍量の蔗糖液を採る。	
2) 18 \times 18 mmのカバーグラスの角で両者をよく混和し、そのカバーグラスを液面に載せる。	
3) 約5分間静置してから \times 400~600の倍率で鏡検する。顕微鏡のコンデンサーを下げてコントラストを付け、ピントは液の最上層すなわちカバーグラスの下面に合わせる。	
〔所 見〕	
オーシストは液との比重差で液面に浮上する。直径約5 μ mの類円形のオーシストは背景よりも明るく白く見え、薄くピンク色を帯びてみえることもある。内部には特徴的な残体の顆粒が必ず存在する。オーシストの大きさはほぼ均一である。類似の酵母などは薄緑色を帯び、大小不同なので鑑別は容易である。	
〔注 意〕	
粘液を多く含む便のときは、オーシストは粘液に埋没しているのので、あらかじめ水か生理食塩水を2倍量程度加え、ピペットで十分に搅拌してから実施するのがよい。	

グラスの角で混和し、そのカバーグラスを試料に載せて5分間ほど静置してから鏡検する。オーシストの比重は1.06程度なので液の最上層に浮遊し、特徴的な鏡検像を示すので、検出や酵母などとの鑑別も容易である。本症が原因の下痢であれば、前述のように多数のオーシストが排出されるので、大半の症例はこの方法だけでも診断をつけることができる。手技は表1に示した。

2. 蔗糖遠心沈殿浮遊法

比重 1.2の蔗糖液を使ってオーシストを浮遊・濃縮して鏡検する方法である。糞便を比重 1.2の蔗糖液に懸濁して遠心するとオーシストは液面に浮遊し、比重が 1.2以上の夾雑物や蔗糖液が内部に浸透した夾雑物など大半の夾雑物は管底に沈殿する。オーシストは濃縮され、鏡検に際して視野中の夾雑物が少ないので検出が容易であり、簡易迅速蔗糖浮遊法に比べて 50~100倍程度の糞便量を使用するので検出効率もよくなる。手技は簡単で結果は 20~30分で出せる。

虫卵検査に用いられる飽和食塩水(比重 1.2)や原虫のシスト検出に用いられる33%硫酸亜鉛液(比重 1.18)でもオーシストは浮遊する。蔗糖液が奨用されるのは、蔗糖液とオーシスト内部の液との屈光性の差によるものと思われるが、鏡検に際してオーシストの内部が白く、あるいは薄いピンク色に輝くよう



写真1 蔗糖遠心沈殿浮遊法によるオーシストの所見
(巻頭カラー3頁参照)

に見えるし、内部の残体の顆粒も明瞭に見えて検出しやすいからである(写真1)。他の浮遊液ではそのような所見は得られない。手技は表2にまとめた。

なお、粘液や脂肪を多量に含む便、乳幼児の乳成分を多量に含む便などは、そのままでは便の大半が浮遊するので鏡検できない。粘液便は粘液溶解剤で、脂肪便はエーテルで、乳成分は蛋白溶解剤で前処理してから使用するのがよい。

3. 抗酸染色法

抗酸染色法ではオーシストは赤染し、類似の形態を示す酵母や夾雑物は青く染まるので検出および鑑