

の存在が重要である。すなわち、ヌクレオチド三リン酸からヌクレオチド一リン酸にならなければ経路が成り立たない。NcNTPaseはヌクレオチド二リン酸を加水分解できないことから、*N. caninum*の場合、NTPaseがプリンヌクレオチドのサルベージ経路の初段を触媒する酵素であるとは考えにくい。なぜなら、NcNTPaseだけでは経路が完結しないからである。むしろその他の生理的機能、たとえば parasitophorous vacuole 膜の物質輸送、parasitophorous vacuole内を構成する蛋白質群の多次構造の組立など、エネルギーを必要とする反応に関与するものと考えられる。

*N. caninum*の人体寄生例の検索に用いる抗原としては、*N. caninum*に特異的で他の感染体の抗原と交叉反応をおこさない抗原がベストであることは言うまでもない。そしてこの種の検索には大量の抗原を必要とし、また細胞内寄生原虫である*N. caninum*の培養は多大な経費と労力を必要とすることから、遺伝子組換え体抗原の使用が最も現実的な選択である。しかし遺伝子組換え体は発現・精製が容易でなければならない。したがって、疎水性の高い膜表面抗原など発現が困難なものを除くと、宿主の免疫系が良く反応する使用可能な抗原はかなり限定される。ジチオスレイトールにより活性化されるNTPaseは*T. gondii*と*N. caninum*に特異的であり、遺伝子組換え体の発現・精製ともに容易である。*T. gondii*のNTPaseは宿主細胞に感染後虫体外に放出される水溶性の酵素⁹⁾で疎水性の極端に高い部分が存在しない。これらの性質はNcNTPaseにも共通であると考えられる。また*T. gondii*のNTPaseは虫体より精製されたNativeなもの及び遺伝子組換え体ともに*T. gondii*感染者のIgG抗体と良く反応する¹⁶⁾。これは感染後虫体外にNTPaseが放出されることに起因すると考えられる。NcNTPaseも感染後虫体外に放出されることから*N. caninum*感染宿主のIgG抗体もNcNTPaseと良く反応することが考えられる。今回用いた遺伝子組換え体抗原は、酵素活性を還元させてよりNativeな抗原に近い高次構造のものをを用いIgG抗体との反応性の向上を考慮した。したがって、NcNTPaseの遺伝子組換え体に対して*T. gondii*感染者すなわち

色素試験陽性者の血清が反応しなければ、人体寄生例の検索用抗原として用いることが可能と考えられる。以上の観点から今回の結果を見ると、2例の陽性者があったがその他の71例は陰性であった。この結果は、健常人とほとんどの*T. gondii*感染者のIgG抗体はNcNTPaseと反応しないことを示している。この陽性の2例は当然*N. caninum*感染が疑われたが、両虫体の全抗原を用いたウエスタンブロット法による精査の結果、両感染者ともにNcNTPase以外の*N. caninum*のどの抗原とも反応しないが、多数の*T. gondii*抗原と反応することから、両名の*N. caninum*感染は否定された。NcNTPaseと*T. gondii*のNTPaseのアミノ酸配列は約69%の相同性があることから、2例の陽性者の免疫系は両抗原の共通配列部分を強く認識したものと考えられる。NcNTPaseを用いた*N. caninum*感染者の検索は多少の疑陽性者の出現は考慮しなければならないが、NcNTPaseは*T. gondii*の感染者のIgG抗体と殆ど反応しないことから、最初のスクリーニング用の抗原として十分利用可能と考えられる。

結 論

*Toxoplasma gondii*に特異的と考えられていたジチオスレイトールにより活性化されるヌクレオシド三リン酸加水分解酵素(NTPase)が最近新種として登録された細胞内寄生原虫*Neospora caninum*にも存在ことを明らかにした。この酵素(NcNTPase)の遺伝子の塩基配列及び酵素学的性質を調べたところ、*T. gondii*に二つあるNTPaseアイソザイムのうちNTPase-Iに近いことがわかった。このNcNTPase遺伝子組換え体を作製し、ヒトIgG抗体との反応性を酵素抗体法(ELISA)で調べた。健常人30名のIgG抗体とNcNTPaseは反応せず、色素試験陽性者(*T. gondii*感染者)73名のうち2名のIgG抗体だけがNcNTPaseに反応し陽性であったが、のこり71名のIgG抗体は全く反応しなかった。このことから、NcNTPaseは*N. caninum*のエイズなど免疫不全患者における人体寄生例の検索に有用な抗原であることが示唆された。

参考文献

- 1) Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ: Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 193:1259-1263, 1988
- 2) Speer CA, Dubey JP: Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool* 36: 458-463, 1989
- 3) Lindsay DS, Speer CA, Toivio-Kinnucan MA, Dubey JP, Blagburn BL: Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res* 54:103-106, 1993
- 4) Marsh AE, Barr BC, Sverlow K, Ho M, Dubey JP, Conrad PA: Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *J Parasitol* 81:530-535, 1995
- 5) Dubey JP: *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of human and animals. *Parasitic Protozoa*. (Ed) Kreier JP, Academic Press Inc, San Diego, p.5-57, 1993
- 6) 浅井隆志, 竹内勤: ニューモシスチス・カリニ及びトキソプラズマの生物学: 特集 AIDS. カレントセラピー, 14:1284-1288, 1996
- 7) Asai T, O'Sullivan WJ, Tatibana M: A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 258: 6816-6822, 1983
- 8) Asai T, Kanazawa T, Kobayashi S, Takeuchi T, Kim T: Do protozoa conceal a high potency of nucleoside triphosphate hydrolysis present in *Toxoplasma gondii*. *Comp Biochem Physiol* 85B: 365-368, 1986
- 9) Asai T, Miura S, Sibley LD, Okabayashi H, Takeuchi T: Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 270: 11391-11397, 1995
- 10) Asai T, Howe DK, Nakajima K, Nozaki T, Takeuchi T: *Neospora caninum*: Tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity. *Exp Parasitol* 90: 277-285, 1998
- 11) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 12) Sibley LD, Niesman IR, Asai T, Takeuchi T: *Toxoplasma gondii*: Secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into parasitophorous vacuole. *Exp Parasitol* 79: 301-311, 1994
- 13) Asai T, Suzuki Y: Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *FEMS microbiology letters* 72: 89-92, 1990
- 14) Asai T, Mizuno F, Kojima S, Takeuchi T, Kobayashi A, Suzuki Y: High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 30: 1291-1293, 1992
- 15) Sabin AB, Feldman HA: Dyes as microchemical indication of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*) *Science* 108: 660-663, 1948
- 16) Nakajima-Nakano K, Makioka A, Yamashita N, Matsuo N, Asai T: Evaluation of serodiagnosis of toxoplasmosis by using the recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*. *Parasitol Int* 48:215-222, 2000



Entamoeba histolytica と *E. dispar* の PCR による鑑別法の確立

橘 裕司¹⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾東海大学医学部 感染症学部門

²⁾慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

研究要旨

赤痢アメーバ症は、男性同性愛のHIV感染者における合併症としてわが国では特に重要な疾病である。病原体である *Entamoeba histolytica* の他に、形態的に鑑別困難で非病原性の *E. dispar* もヒトに感染するため、*E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別が必要である。我々はこれまでに、両者のペルオキシレドキシンをコードする遺伝子の一部を比較し、その塩基配列の差に基づいたPCRによる鑑別法を報告している。本年度は、*E. dispar* のペルオキシレドキシンについて完全長のcDNAをクローニングして解析したところ、5'末端側に *E. histolytica* にはない30塩基の挿入配列を見いだした。この部分を挟み込む位置にプライマーを設定することで、1組のプライマーを用いたPCRによっても、制限酵素で切断することなく、増幅産物の大きさの違いから簡便に *E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別が可能であった。この方法はシストの鑑別だけでなく、肝膿瘍液からの *E. histolytica* DNA の検出にも応用でき、赤痢アメーバ症の確実な診断法として有用であると思われる。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：橘 裕司

An improved PCR test for distinguishing between *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*

Hiroshi Tachibana¹⁾ and Tsutomu Takeuchi²⁾

¹⁾ Department of Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine, ²⁾ Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

目 的

わが国では赤痢アメーバ症が増加傾向にあるが、その第一の理由として、赤痢アメーバ症が男性同性愛者における性行為感染症として伝播していることがあげられる^{1,2)}。最近ではその中にHIV感染者の症例が増加してきており、赤痢アメーバ症の発症が契機となってHIV感染が判明した例も報告されている^{3,4)}。欧米の男性同性愛者にも高いアメーバ感染率が認められるが、HIV感染者における日和見感染症として赤痢アメーバ症は重視されていない。それは欧米の男性同性愛者に分布しているのが主に病原性のない *Entamoeba dispar* であることによる⁵⁾。

すなわち、従来シストの形態から赤痢アメーバと同定されてきたものには、病原性の *Entamoeba histolytica* と非病原性の *E. dispar* が存在することが明らかになり、*E. histolytica* による感染が赤痢アメーバ症で、*E. dispar* 感染のみの場合には治療の必要がないと考えられるようになった^{6,7)}。しかし、*E. histolytica* 感染でも必ずしも発症するとは限らず、逆に、消化器症状を呈する患者から検出されたからといって *E. histolytica* であると断定することも出来ない⁷⁾。また、HIV感染者では抗赤痢アメーバ抗体が検出できなかった例も報告されている^{8,9)}。従って、*E. histolytica* 感染か *E. dispar* 感染かの鑑別は虫体の生物学的性状に基づいて行われる必要がある。

我々はこれまでに、赤痢アメーバ症の特異的な診断に応用できるようなモノクローナル抗体の作製やDNA診断法の開発に取り組んできた。*E. histolytica* に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体4G6が認識する抗原は核と細胞質に局在する分子量30 kDaの蛋白質であったが¹⁰⁾、この蛋白質をコードするcDNAをクローニングして塩基配列を決定した。そして、*E. dispar* にも対応する遺伝子が存在するものの、両者のゲノムDNAの配列に比較範囲内で約5%の差があることを見いだした¹¹⁾。このような差に基づいて、両者のゲノムDNAをPCRで増幅した後、制限酵素による切断パターンを比較して、両者の鑑別が可能であることを示した。さらに、それぞれに特異的なプライマーを用いることで、より正確に鑑別できること

を報告した¹²⁾。その後、30 kDaの蛋白質は遺伝子データベースとの比較からペルオキシレドキシシンと同定された^{13,14)}。

本年度は、*E. dispar* のペルオキシレドキシシンについて完全長のcDNAをクローニングして *E. histolytica* と比較解析するとともに、*E. histolytica* と *E. dispar* の鑑別のためのより簡便なPCR法の構築について検討した。

方 法

1. 細胞培養

E. dispar SAW1734Rc1AR 株の栄養型虫体はBCSI-S培地で *Pseudomonas aeruginosa* と共棲培養された¹⁵⁾。*E. dispar* のSAW142, MBB10, SH-7, PRIKU-44, PRIKU-55の各株と *E. histolytica* のSH-8株はRobinson培地で細菌共棲培養された。また、*E. histolytica* のHM-1:IMSS, HK-9, H-303:NIH株の栄養型虫体はBI-S-33培地で無菌培養された。

2. 遺伝子クローニング

E. dispar SAW1734Rc1ARの栄養型虫体からpoly(A) RNAを単離し、cDNAを合成してλgt11に組み込み、cDNAライブラリーを作製した。ECL 3'-oligolabeling and detection kitを用い、オリゴヌクレオチドp14 (5'-TTCTTGAAACTCCTGTTTCTAC-3') をプローブとしてスクリーニングを行った。長いインサートを含むクローンはpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。不完全長のクローンの5'末端の伸長は5'-Full RACE Core Set (Takara) を用いて行った。プライマー pEd14ASP (5'-PAACTCCTGTTTCTA-3') をcDNA合成に使用した。p2 (5'-GTGAAGTTATTGGAGTGAGT-3') と pEhd19AS (5'-ATTTGTGCTTTTTCAAATGTGT-3')、p13 (5'-AGGAGGAGTAGGAAAATTAGG-3') と pEd21AS (5'-CTTTAATTCTTGGACAACAACA-3') をそれぞれ1回目と2回目のinverse PCRに使用し、PCR産物をpCR2.1にクローニング後、塩基配列を決定した。

3. ノーザンブロット解析

E. dispar SAW1734Rc1ARのpoly(A) RNAを1.2% アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N+ 膜

(Amersham) にプロットした。プライマー pEd30For (5'-ATGTCCTTGTAAATCAACAAAAAG-3') と pEd30Rev (5'-TTAATGIGTITGTTAAATATTTCTTG-3') によって、*E. dispar* SAW1734Rc1AR のゲノム DNA から増幅した PCR 産物をプローブとして使用した。プローブの標識、ハイブリダイゼーション、検出は Gene Images AlkPhos direct labelling and detection system (Amersham) によって行った。

4. 培養虫体ゲノムDNAのPCR増幅

E. dispar と *E. histolytica* のゲノム DNA は既に報告した方法で抽出し¹¹⁾、プライマー pEd30For と pEd21AS によって PCR 増幅した。PCR は熱変性が 94℃ で 30 秒 (サイクル 1 のみ 210 秒)、アニーリングが 56℃ で 60 秒、伸長反応が 72℃ で 60 秒とし、35 サイクル行った。PCR 産物は 5% NuSieve 3:1 agarose ゲルを用いて電気泳動した。

5. 臨床検体からのPCR増幅

筆者らの研究室に診断目的で持ち込まれた肝臓瘍液 12 検体と糞便から濃縮されたシスト 6 検体を使用した。DNA を抽出し、*E. histolytica* と *E. dispar* の有無をそれぞれプライマー p11 と p12、p13 と p14 を用いた従来の PCR 法によって確認した^{16,17)}。プライマー pEd30For と pEd21AS による PCR 増幅は前項で述べた方法によって行った。

結果

1. *E. dispar* のベルオキシレドキシンをコードする cDNA のクローニングと解析

E. dispar の cDNA をオリゴヌクレオチドプローブ p14 でスクリーニングして得られたクローンのうち、インサートのサイズの大きかった 4 つのクローンについて塩基配列を調べたところ、それぞれのクローン間で違いが認められた。4 つのク

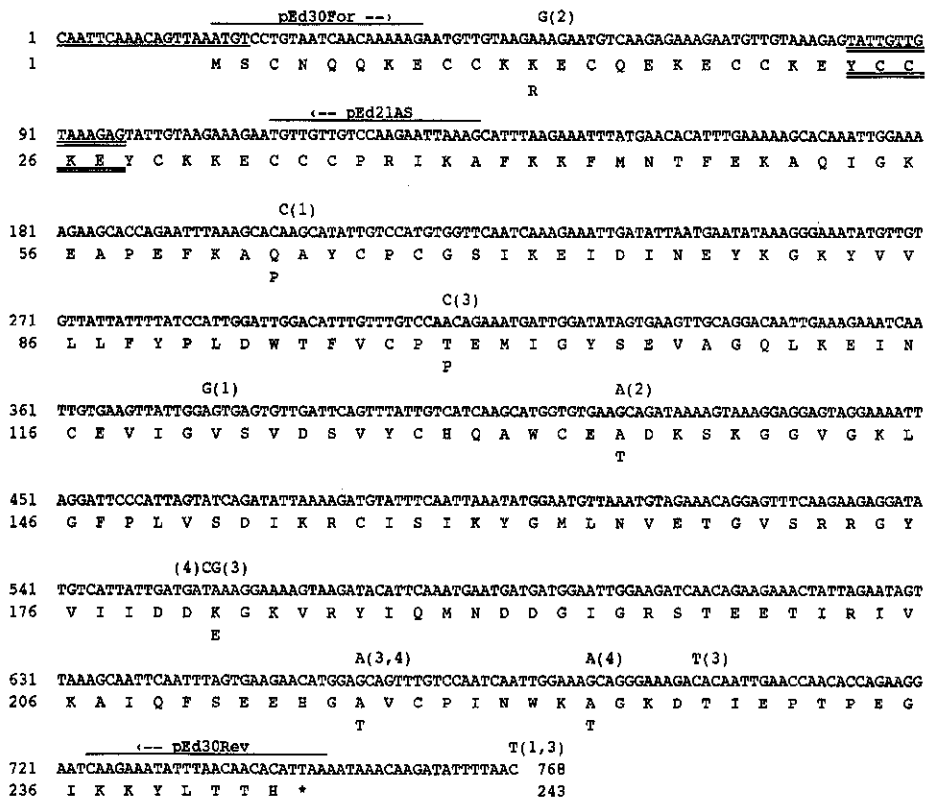


図1 *E. dispar* のベルオキシレドキシンをコードする 4 つの cDNA の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

クローンによって異なる塩基配列、アミノ酸配列はそれぞれ上段、下段に示され、括弧内の数字はクローン番号を示している。下線は PCR によって決定された 5' 末端の塩基配列を示す。二重下線は反復 (クローン 1)、欠失 (クローン 4) が見られた箇所を示す。遺伝子増幅に用いられたオリゴヌクレオチドが対応する位置と方向が矢印で示されている。

ローンのコンセンサス配列を図1に示した。243アミノ酸をコードしており、予想される分子量は27558 Daであった。4つのクローンの最も大きな違いは読み取り枠のサイズに3種類見られたことである。すなわち、クローン1では"YCCKE"をコードする15塩基の繰り返しが見られ、クローン4ではこの配列が欠失していた。更に11箇所において塩基の置換が見られ、そのうちの7箇所ではアミノ酸の置換に対応していた。コンセンサス配列は、以前に直接シーケンス法によって決定されたSAW142株のゲノムDNAの部分配列と比較すると、重複する部分では完全に一致していた。5'側の非翻訳領域にATTCAのモチーフ配列が認め

られた。また、*E. dispar*のペルオキシレドキシシ遺伝子のノーザンプロット解析を行ったところ、約0.9kbのバンドが認められた(図2)。

E. dispar ペルオキシレドキシシのアミノ酸配列を *E. histolytica* のそれと FASTA Program で比較したところ、90.5% (220/243) が一致し、93.8% (228/243) の類似性が認められた(図3)。ペルオキシレドキシシの活性に必要な2つのシステイン残基は保持されていた。主な違いは、システインに富むN末端領域において、*E. dispar* では *E. histolytica* にない10アミノ酸からなる挿入配列が存在することであった。そして、このアミノ酸配列も"YC(C/K)KE"の繰り返しであった。

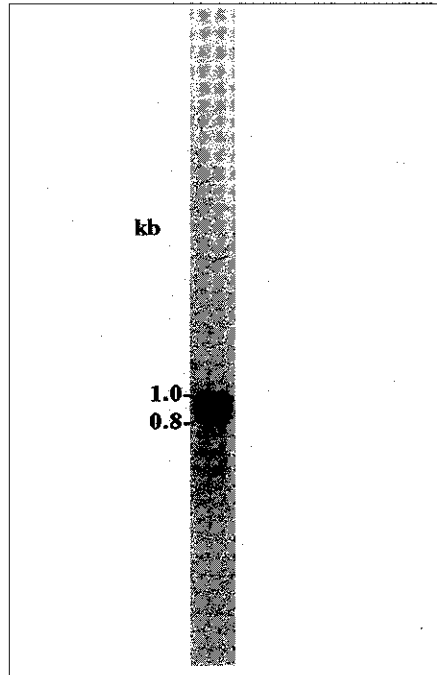


図2 *E. dispar*のペルオキシレドキシシ遺伝子のノーザンプロット解析

```

Ed  MSCNQKQKCCCKKECOEKECCKEYCCKEYCKKECCCPRIKAFKFKFMNTFEKAQIGKEAPEFKAQAYCPCGSIKEIDINEYKGGYVLLFYF  90
    |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
Eh  MSCNQKQKCCCKKECOEKECCKE-----CCCPRIKAFKFKFINTFEKAQIGKEAPEFKAPAYCPCGSIKEIDINEYRGGYVLLFYF  80

Ed  LDWTFVCPTEMIGYSEVAGQLKEINCEVIGVSVDSVYCHQAWCEADKSKGGVGKLGFPPLVSDIKRCISIKYGMLNVE TGVSRRGYVIIDD  180
    |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
Eh  LDWTFVCPTEMIGYSELAGQLKEINCEVIGVSVDSVYCHQAWCEADKSKGGVGKLTFFPLVSDIKRCISIKYGMLNVEAGIARRGYVIIDD  170

Ed  KGVRYIQMNDGIGRSTEETIRIVKAIQFSEEHGAVCPINWKAGKDTIEPTPEGIKKYLTH  243
    |||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
Eh  KGVRYIQMNDGIGRSTEETIRIVKAIQFSDEHGAVCPINWKPGKDTIEPTPDGIKKYLTAH  233
  
```

図3 *E. dispar* (上段)と *E. histolytica* (下段)のペルオキシレドキシシのアミノ酸配列のFASTA Programによる比較
|は同一、:は類似のアミノ酸を示す。*はペルオキシレドキシシの活性に必須のシステイン残基を示す。

2. PCRによる*E. dispar*と*E. histolytica*のペルオキシレドキシシ遺伝子の増幅

*E. dispar*に異なったサイズのペルオキシレドキシシ遺伝子が存在することと、*E. histolytica*にない挿入配列が存在することを確認するため、*E. dispar*と*E. histolytica*の様々な株のゲノムDNAをプライマー pEd30For と pEd21AS を用いてPCR増幅した。5% NuSieve 3:1 agarose ゲルによる電気泳動パターンを図4に示した。*E. dispar* SAW1734RclAR 株では、予想された118塩基対の増幅産物が主要なバンドとして検出された(レーン1)。それに加えて、133塩基対の産物も弱いバンドとして認められた。しかし、103塩基対のバンドは認められなかった。118塩基対と133塩基対のバンドは、*E. dispar*の他の株でも観察された。しかし、133塩基対のバンドはSH-7株では弱く(レーン4)、SAW142株では103塩基対のバンドも認められた(レーン2)。一方、*E. histolytica*のゲノムDNAをPCR増幅すると、すべての株で予想された88塩基対の産物が主要なバンドとして検出された。

3. 臨床検体を用いたPCR法の評価

プライマー pEd30For と pEd21AS を用いたPCRにより、臨床検体からの*E. histolytica*と*E. dispar*のペルオキシレドキシシ遺伝子の検出を試みた。シスト6検体については4例が*E. histolytica*、2例

が*E. dispar*と判定された。肝膿瘍液12検体では、8例が*E. histolytica*陽性でアメーバ性と判定され、4例はPCR陰性で非アメーバ性と判定された。この結果は、2組のプライマー(p11とp12、p13とp14)を用いたPCRの結果と一致していた。

考 察

今回、*E. dispar*のペルオキシレドキシシをコードする完全長のcDNAをクローニングし、*E. histolytica*の遺伝子と比較することができた。*E. histolytica*のペルオキシレドキシシについては、我々を含め3つの研究室でその遺伝子がクローニングされたが、他の生物のペルオキシレドキシシに比べると、N末端にシステインに富んだ約40残基が多く存在することが明らかにされている^{13, 18)}。この部分を除いて発現させた組換え型の蛋白質では、過酸化水素を不活化する働きが半分になることが最近報告された¹⁹⁾。*E. dispar*ではこの部分がさらに長く、より多くのシステインが含まれていることから、*E. histolytica*のペルオキシレドキシシより活性が高い可能性も考えられる。また、*E. dispar*のペルオキシレドキシシには複数の遺伝子が存在し、少なくとも3種類の長さの遺伝子が存在することが明らかになったが、ゲノムDNAのPCR増幅の結果から、中間のサイズのものが最も

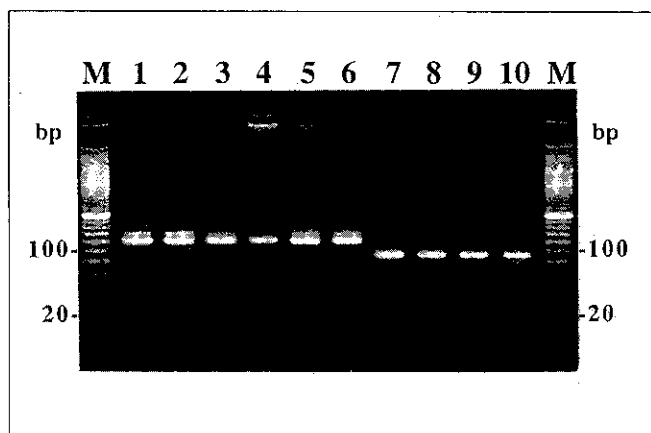


図4 PCR増幅されたペルオキシレドキシシ遺伝子のアガロースゲル電気泳動像

E. dispar (レーン1~6)と*E. histolytica* (レーン7~10)のゲノムDNAを鋳型とし、プライマー pEd30For と pEd21AS を用いて35サイクル増幅した。増幅産物の10 μ lを5%NuSieve 3:1 agaroseで解析した。各レーンは1, SAW1734RclAR; 2, SAW142; 3, MBB10; 4, SH-7; 5, PRIKU-44; 6, PRIKU-55; 7, HM-1:IMSS; 8, HK-9; 9, H-303:NIH; 10, SH-8. M, DNAサイズマーカー(20塩基対ラダー)

多く存在し、その他のサイズの遺伝子は株によってその量比が異なっていると考えられる。

我々はこれまでに、ペルオキシレドキシンをコードするゲノムDNAの増幅によって *E. histolytica* と *E. dispar* を鑑別する2つの方法について報告してきた。すなわち、1組のプライマーを用いて増幅した後、制限酵素による切断パターンの差によって鑑別する方法^{11,20)}、もう一つはそれぞれの種に特異的な2組のプライマーを用いて別々に増幅する方法である^{12,17)}。今回、*E. dispar* には *E. histolytica* にはない30塩基の挿入配列が存在することを見いだした。この配列を挟み込む部位にプライマーを設定することで、1組のプライマーを用いても、*E. histolytica* と *E. dispar* では異なるサイズの増幅産物が得られることがわかった。この方法を用いれば、1つの検体に対して2組の増幅反応を行ったり、制限酵素処理を行ったりする必要がなく、増幅産物のサイズが100塩基対より大きい小さいかによって、容易に判定を行うことができる。また、従来のPCR法は糞便中のシスト、肝膿瘍液、大腸生検組織など様々な臨床検体に応用できることを既に報告したが^{16,17)}、今回構築したPCRの系も予備的検討において臨床検体に対して有効であった。従って、このPCR法は赤痢アメーバ症の確実でより簡便な診断法として利用できると考えられる。

結 論

Entamoeba dispar のペルオキシレドキシンをコードする遺伝子を解析し、*E. histolytica* にはない挿入配列の存在を明らかにした。この差異に着目し、赤痢アメーバ症の特異診断のための簡便なPCR系を構築した。

参考文献

- 1) Takeuchi, T., Okuzawa, E., Nozaki, T., et al.: High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection., *J. Infect. Dis.* 159:808, 1989.
- 2) 橘 裕司: 赤痢アメーバ症, *Today's Therapy* 21: 99-101, 1997.
- 3) 増田剛太, 根岸昌功, 味澤 篤, 他: 赤痢アメーバ症・ジアルジア症の臨床, pp253-259, 日本の感染性腸炎II(入交昭一郎他監修), 葉根出版, 東京, 1996.
- 4) 吉川晃司, 相楽裕子: 赤痢アメーバ症で発見されたHIV感染症の6例, *感染症学雑誌* 71: 987, 1997.
- 5) Burchard, G. D., Hufert, F. T. and Mirelman, D.: Characterization of 20 *Entamoeba histolytica* strains isolated from patients with HIV infection., *Infection* 19:164-169, 1991
- 6) Diamond, L. S. and Clark, C. G.: A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925., *J. Euk. Microbiol.* 40:340-344, 1993
- 7) WHO: Amebiasis, *Weekly Epidemiological Record* 72:97-99, 1997
- 8) Ohnishi, K., Murata, M. and Okuzawa, E.: Symptomatic amebic colitis in a Japanese homosexual AIDS patient., *Intern. Med.* 33:120-122, 1994
- 9) Sanuki, J., Okuzawa, E., Imai, E., et al.: Concurrent infection of homosexual men with human immunodeficiency virus and *Entamoeba histolytica* in Japan: serodiagnosis of amebic infection., *Jpn. J. Parasitol.* 44:421-425, 1995
- 10) Tachibana, H., Kobayashi, S., Kato, Y., et al.: Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000-Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody., *Infect. Immun.* 58:955-960, 1990
- 11) Tachibana, H., Ihara, S., Kobayashi, S., et al.: Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction., *J. Clin. Microbiol.* 29:2234-2239, 1991
- 12) Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M., et al.: Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction., *J. Inf. Dis.* 164:825-826, 1991
- 13) Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., et al.: Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:7017-7021, 1994
- 14) McGonigle, S., Dalton, J. P. and James, E. R.: Peroxidoxins: a new antioxidant family., *Parasitol. Today* 14:139-145, 1998
- 15) Kobayashi, S., Imai, E., Tachibana, H., et al.: *Entamoeba dispar*: Cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*., *J. Eukaryot. Microbiol.* 45:3S-8S, 1998

- 16) Tachibana, H., Kobayashi, S., Okuzawa, E., et al.: Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction., *Int. J. Parasitol.* 22:1193-1196, 1992
- 17) Rivera, W. L., Tachibana, H. and Kanbara, H.: Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:916-921, 1998
- 18) Bruchhaus, I. and Tannich, E.: Analysis of the genomic sequences encoding the 29-kDa cysteine-rich protein of *Entamoeba histolytica*., *Trop. Med. Parasitol.* 44:116-118, 1993
- 19) Bruchhaus, I., Richter, S. and Tannich, E.: Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*., *Biochem. J.* 326:785-789, 1997
- 20) Tachibana, H., Kobayashi, S., Paz, K. C., et al: Analysis of pathogenicity by restriction-endo-nuclease digestion of amplified genomic DNA of *Entamoeba histolytica* isolated in Pernambuco, Brazil., *Parasitol. Res.* 78:433-436, 1992



平成11年度「エイズに伴う日和見原虫感染症」に関する講習会開催について

竹内 勤¹⁾、田辺 将信¹⁾、浅井 隆志¹⁾、小林 正規¹⁾、三浦左千夫¹⁾、井関 基弘²⁾、塩田 恒三³⁾、山浦 常⁴⁾、木村 哲⁵⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

²⁾大阪市立大学医学部 医動物学教室

³⁾京都府立医科大学 医動物学教室

⁴⁾東京女子医科大学 感染症対策課

⁵⁾東京大学大学院医学系研究科 感染制御学、感染症内科

研究要旨

1、2年次に引き続いて「エイズに伴う日和見原虫感染症」に関する講習会を2度にわたって開催した。内容は前年度と同様で、アメーバ、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、ニューモシステイス・カリニの生物学、疫学、臨床的事項、診断、治療に関する講義をまず初日に行い、第二日目に関連する実習を行なった。参加者数は第一回目(平成11年12月18日～19日)では83名、第二回目(平成12年1月22日～23日)では53名である。対象はエイズ診療の拠点病院の中央検査部門に所属する医師、または検査技師としている。今年度はクリプトスポリジウムのオーシストが含まれる患者の固定糞便などを参考に供与したので、アンケートで判断するかぎり好評であり、かつこの種の講習会の継続を希望する回答が多く見られた。

分担研究者：竹内 勤、木村 哲

研究協力者：田辺将信、浅井隆志、小林正規、三浦左千夫、井関基弘、塩田恒三、山浦 常

Summary of training course on opportunistic protozoan infections associated with AIDS, 1999

Tsutomu Takeuchi¹⁾, Masanobu Tanabe¹⁾, Takashi Asai¹⁾, Seiki Kobayashi¹⁾, Sachio Miura¹⁾, Motohiro Iseki²⁾, Tsunezo Shiota³⁾, Hisashi Yamaura⁴⁾ and Satoshi Kimura⁵⁾

¹⁾Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University, ²⁾Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School, ³⁾Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural University of Medicine, ⁴⁾Department of Infection Control, Tokyo Women's Medical College, and ⁵⁾Department of Infection Control and Prevention, Department of Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

目的

エイズの日和見感染症のうち、ニューモシステイス・カリニを含む原虫感染症は地域差はあるものの、その頻度あるいは診断・治療の困難さからみて無視されるべきではない。わが国の医学、臨床検査学の教育の中でも感染症は次第に重視されるようになりつつあるものの、原虫感染症はその中では軽視されてきており、十分な教育は残念ながら行なわれてきていない。従って、エイズやその他の原因による種々の免疫不全を伴った疾患における日和見原虫感染症の検査・診断でも懸念があるのは否めない。

本研究班が発足して以来、われわれは以上の状況に鑑み、全国のエイズ診療の拠点病院の、特に中央臨床検査部の医師、あるいは臨床検査技師を対象として、日和見原虫感染症に関する講習会を開催してきた。本年度も計2回にわたって開催し、日和見原虫感染症に関する生物学、臨床的側面、診断、治療についての講義と実習を組合せて実施した。

対象及び実施経過

1. 講習会の講義、実習内容

前年度に好評だったので、事前に講義、実習資料を送付し、参加者が事前に予習できるように計らった。送付した資料は昨年度同様であり、変更点はなく、本報告に添付していない。講義は前年度と同様赤痢アメーバ、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、ニューモシステイス・カリニを対象として、初日の午後各60分間行なった。講義の内容は前年度のアンケートの希望に応じて、検査項目のみならず、各病原体の生活環や生物学的特徴、感染経路、病原機構、病態を含み、さらに疫学的な側面まで言及するようにした。

講義の担当者は以下のとおりである。

日和見原虫感染症総論	竹内 勤	(慶大医学部)
赤痢アメーバ	竹内 勤	(慶大医学部)
トキソプラズマ	浅井隆志	(慶大医学部)
クリプトスポリジウム	井関基弘	(大阪市大医学部)
ニューモシステイス	塩田恒三	(京都府立医大)

実習は各個人に顕微鏡がわたるように配慮し、

二日目の午前より終日行なった。実習の責任者は田辺将信(慶大医学部)であり、全体の進行状況管理した。実習においては初年度、二年度のアンケート結果に従い、できるだけ多数を監督者として配置し、顕微鏡観察の結果を確認したうえで次に進むよう配慮した。種々の制約のため一部はやはりデモンストレーションとせざるを得なかったが、クリプトスポリジウム診断の簡易シヨ糖浮遊法や抗酸染色は担当の井関博士の好意で全員が行なえるようにした。また塩田博士の好意でニューモシステイスの蛍光染色による検出も蛍光顕微鏡を慶大熱帯医学・寄生虫学教室より運び、観察できるようにした。さらに昨年同様、実習では試薬の作成方法や、モノクローナル抗体を利用した抗原検出のコマーシャルキットの展示まで行い、参加者の便宜を計った。

2. 講習会の経過

今年度も全国のエイズ診療の拠点病院359施設の中央臨床検査部の責任者あて参加者推薦依頼をだし、基本的には1施設より1名とした。しかし実際上は、かなりの施設より複数参加希望者があり、ほとんどの場合受け入れた。当方の実習施設が100名しか収容できないため、推薦依頼の時は上記のような形しかとれなかったが、今回まで6回実施した限り、複数を受け入れても定員を越えることはなかった。また推薦依頼に対して全く返答のない施設も当初からかなり多数、100カ所近くあり、今後のエイズ診療を考える際留意すべきことと思われた。

参加者は第1回目が83人、第2回目が53人、計136人であり、基本的には初年度、二年度と同様であった。参加者の地域も昨年同様北海道から鹿児島にわたったが、今年度は大学病院、国立病院など比較的規模の大きい病院からの参加者が目立った。実習後のアンケートによれば、やはりクリプトスポリジウムや運動中のアメーバの栄養型虫体を初めて見たと云う反応が多く、4/5近くに達していた。今後の医師、臨床検査技師の教育に際して考えなければならない事のひとつと思われた。特に感染症新法が施行され、情報の体系化が行なわれつつある折から、このような講習会の必要性は今後もあるものと認識された。

以下に本年度の参加者の反応をアンケートより抜粋して記載する。

- まず意義については肯定するものが實際上全てで、初めて見たという反応から、繰り返し複数回参加したが、やはり心許なくできればマニュアルや標本を作成してもらいたいと云う意見が多くあった。
- 講習会の開催地区についても西日本を希望する向きは依然として多く、大阪市大のほうでクリプトスポリジウム始めとする講習を行なう用意はあるようであったが、今後の問題として考えるべきと思われた。
- 時期の事も再三指摘されたが、研究費の執行との兼ね合いもあり、年内に少なくとも1回開催するのが精一杯のところであった。
- 昨年同様に講義に対しては時間が足りない、実習ももっとゆっくりやりたいと云う希望が少なからずあった。
- 最も多いのはやはり継続実施で、今後の懸案として残るものとする。

まとめ

今回で3年間、計6回にわたり日和見原虫感染症に関する講習会を開催した。参加者の反応を見るに、それなりの成果は上がったものと思っている。今後のフォローをどうするか考える必要があらう。

(注)今年度の講義、実習資料はニューモシスティス・カリニについてのみ少しく改変されているので、そのみを参考資料として添付する。その他の原虫に関しては使用した資料は昨年度と基本的に同じなので、添付していない。

「参考資料」

ニューモシスチス・カリニ

京都府立医科大学医動物学教室 塩田恒三

ニューモシスチス・カリニ *Pneumocystis carinii* Delanoe et Delanoe, 1912 (以下カリニと略) は大きさ約5 μm 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。カリニ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貪食能によりカリニ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。カリニ肺炎 (*Pneumocystis carinii* pneumonia, ニューモシスチス・カリニ肺炎) 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ないしスリガラス状胸部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、予防と治療は可能である。

1. 生活史

- 1) カリニはI型(扁平)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。

カリニの栄養型と嚢子は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。未熟嚢子内では核の2分裂が3回繰り返され、8個の核が形成される。これらの核はミトコンドリアなどと共に嚢子最内層の細胞膜(単位膜)から伸展した膜に取り囲まれて、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。

2. 分類・形態

カリニの分類学上の位置はまだ未決定である。カリニの純培養が成功せず純粋なカリニが得られないこと、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。

栄養型は不定形で大きさは2~8 μm 、ギムザ染色標本では赤紫色の1個の核を認める。透過型電子顕微鏡 (TEM) では外皮 (細胞表層) は単位膜とその外側の厚さ20~30nmのグルコース、マンノース、ガラクトースの豊富な糖蛋白の層よりなる。この糖蛋白はPcの主要な表面抗原であり、またこの層にはI型肺胞上皮との接着寄生に重要な、フィブロネクチン等をリガンドとするインテグリンファミリーに属する接着分子が発現している。栄養型の内部には、1個の核とミトコンドリア、小胞体、リボソーム、グリコーゲン顆粒、微少管、液胞などを認める。

嚢子は球形で大きさは4~8 μm 、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。TEM (透過形電子顕微鏡) では嚢子壁は3層からなり50~200nmと厚く、真菌類の細胞壁と構造および成分が近似している。最外層は栄養型と同じである。電子密度の低い中間層の2カ所が内部へ膨隆 (肥厚) して観察される。メテナミン銀染色後の嚢子をTEMで観察すると、この肥厚部に銀が多量沈着していることから、光顕でメテナミン銀染色やcellufluor蛍光色素染色をした嚢子に染め出される、いわゆる括弧状構造物はこの肥厚部である。娘細胞はこの肥厚部に出来た裂け目から脱嚢する。

3. 肺の呼吸生理・防御機能とカリニの病原性

- 1) 毛細管内赤血球と肺胞腔内の空気との間のガス交換は、それらの酸素および炭酸ガス分圧差による拡散によって、肺胞毛細管膜を介して行われる。
- 2) カリニは肺胞毛細管膜の肺胞腔側に付着してA-Cブロック (alveolar-capillary block) を引き起こし、低酸素血症を招来させる。

呼吸によるガス交換が正常に行われるために必要な因子として、1) 肺胞腔への正常な空気の入出力、2) 肺胞毛細管への正常な血流、3) 正常な肺胞上皮細胞と基底膜、が挙げられる。ガス交換は、肺胞毛細管内赤血球および血漿と肺胞腔内の空気との間のガス分圧差による拡散によって、肺胞毛細管膜 (肺胞膜) を介して行われる。

外来性異物の侵入に対して、肺には咳反射、気道線毛上皮運動による排除作用などの物理的防御機構のほかに、免疫防御機構が存在する。肺に侵入したカリニに対しては、主役を担う肺胞マクロファージ、好中球、リンパ球などが介する細胞性免疫が関与して増殖は抑制される。この免疫機構がなんらかの原因で障害を起こした時に肺胞マクロファージの貪食能が低下し、カリニの異常な増殖が起こって肺胞腔内に蓄積し本肺炎が起こる。

カリニ肺炎症例の臨床診断時の動脈血酸素分圧 (PaO₂) は、多くが45~60mmHg

参考資料

と著しく低下し、低酸素血症を示す。これは増殖したカリニが肺胞膜を覆い、酸素の拡散抵抗が高くなるためである。また重度感染肺では多くの肺胞は増殖したカリニで充満し、空気の入りが防げられて換気障害も起こる。一般にカリニ肺炎では酸素吸入の効果が小さいのは上記の理由による。

4. 分布

カリニは全世界に広く分布している。ヒト以外にイヌ、ネコ、ネズミ、サル、ウシ、ウマなど50種以上の哺乳動物の肺から検出されている。ヒトの場合は全年齢層に認められる。動物のカリニのヒトへの感染性についてはまだ不明である。

5. 感染経路・疫学

カリニ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) に併発するカリニ肺炎発症率は20%以上と高い。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。

6. 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、肺胞腔内はカリニの栄養型、嚢子、変性した宿主の細胞などからなる泡沫様物質 honeycombed materials 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。

組織学的所見 肺胞腔内には泡沫様物質が認められ、HEやPAS染色で赤く染色される。GMSとHEの二重染色では泡沫様物質の中に黒色に染色される約5 μ mの嚢子を観察することができる。栄養型の数は嚢子の10倍以上あるが、これらの染色法では小さな核が赤く染まるのみである。合成樹脂包埋ギムザ染色標本で観察すると、軽度感染肺では栄養型と嚢子が数個から数十個の集塊をなして肺胞壁に付着している。胸部X線写真で発病初期に間質性肺炎像を呈するのは、これらのカリニが肺胞隔壁に付着して、あたかも肺胞隔壁が肥厚しているように見えるためである。隔壁の変化はほとんど認めない。重度感染肺ではカリニは肺胞上皮の上に高く積み重なり、あるいは肺胞

腔に充満し、これらのカリニに浸出液中のフィブリン、変性したマクロファージおよび好中球などが加わって大きな集塊を形成している。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。

7. 症状

- 1) カリニ肺炎は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。
- 3) 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。

カリニ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カリニの全身臓器への播種がおこる。

8. 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体よりcellufluor (calcofluor white) 蛍光色素染色やメテナミン銀染色等を用いてカリニの嚢子を検出する。

免疫不全患者に前記臨床症状を認めた場合は、カリニ肺炎である可能性が強い。直ちに治療薬の投与を開始した場合にも、カリニを直接検出する確定診断を行う。カリニ肺炎と確定診断された例で、治療薬投与後有効な場合でも数日間は検体中にカリニが検出される。一方、治療薬投与にも関わらず肺炎症状の軽快しない例では、持続的にカリニが検出される例が多い。

参考資料

A. 確定診断

1) 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) 喀痰カリニ肺炎では出にくいとされているが、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。

2) 検査材料の処理：喀痰類、BALFは喀痰液化剤 (dithiothreitol: SPUTASOL等) で液化した後、3000rpm, 10分遠沈し、沈さをスライドグラスに塗抹、風乾、メタノール固定する。

3) 染色法

- (1) cellufluor (calcofluor white) 蛍光色素染色 (Fungi-Fluor kit; Polysciences, Inc.等)
- (2) メテナミン銀染色 Gomori's methenamine silver nitrate (GMS) stain, Grocott's variation
- (3) ギムザ染色 Giemsa stain
- (4) トルイジンブルー-O (TBO) 染色 Chalvardjian's toluidine blue-O (TBO) stain
- (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

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

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い。

C. 免疫血清学的診断

血中に循環しているPcの抗原様物質はOuchterlony 法や免疫電気泳動法により証明され、診断に用いられている。

9. 治療

- 1) ST合剤の内服または静注。
- 2) ペンタミジンの吸入、静注または筋注。

カリニ肺炎は治療薬を投与しないとほぼ前例が死亡する。発病後数日で呼吸不全に陥る例が多いが、早期に適切な治療と処置を施せば救命することができる。治療にはST合剤とペンタミジンが主に使われ、有効な例では数日から1週目には呼吸器症状が改善される。

(1) スルファメトキサゾール sulfamethoxazole 400mg + トリメトプリム trimethoprim 80mg の合剤 (ST合剤) の内服または点滴静注用合剤。合剤12錠 (分4) ま

たは12アンプル(分3)/日, 14日間続ける。症状が改善したら漸減する。本剤は葉酸代謝阻害作用があるので副作用として骨髄抑制, 他に肝障害, 腎障害, 消化器症状があらわれることがある。AIDS患者ではさらに全身の発疹, 発熱などの過敏症状が強く現れることがある。

(2) ペンタミジン pentamidine isethionate. 4.0mg/kg/日, 点滴静注あるいは筋注し, 14日間続ける。症状が改善したら漸減する。副作用として腎機能障害, 肝機能障害, 血液学的異常, 低血糖, 筋注では更に注射局所の激痛, 硬結, 壊死などがある。AIDSに併発した本肺炎症例には本剤の吸入療法が多用されている。本剤は肺胞腔内に留まり体内に吸収され難いことから, 直接殺カリニ的に働くとともに, 副作用も少ないとされる。しかし, 肺上葉の抹消への本剤の浸透は悪く, 再燃(再発)の原因の1つになっていると考えられる。

10. 予防

1) ST合剤の服用。

2) ペンタミジンの吸入。

(1) ST合剤1日2錠を毎日服用する。最近, 同剤1回2錠を週3回服用または同剤1日1錠を毎日服用にても予防効果が認められている。

(2) ペンタミジンの吸入。HIV(human immunodeficiency virus)のキャリアーではCD4+T細胞が200/ μ l以下になると本肺炎発症予防に, 2週間に1回, 300mgの吸入が行われている。

参考資料

表1. Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST合剤) 投与を受けた *Pneumocystis carinii* 肺炎患者

No.	年齢	性	基礎疾患名	ST合剤投与開始前の発熱	ST合剤投与開始日		ST合剤投与開始後の肺炎症状と転帰
					胸部レ線像	PaO ₂ (mmHg)	
1	30	女	腎移植後	4日前37.7℃	スリ硝子状	53	11日目軽快
2	22	男	腎移植後	1日前39.2℃	びまん性	60	14日目軽快
3	25	男	腎移植後	9日前39.8℃	びまん性粒状	60	17日目軽快
4	57	男	悪性リンパ腫	1日前39.0℃	間質影	45	14日目軽快
5	23	女	白血病	1日前36.8℃	間質影	/	10日目軽快
6	45	女	腎移植後	2日前39.5℃	スリ硝子状	45	10日目軽快
7	33	男	腎移植後	4日前37.3℃	スリ硝子状	65	25日目死亡
8	47	男	腎移植後	8日前38.0℃	びまん性	49	19日目死亡
9	23	女	腎移植後	6日前41.0℃	スリ硝子状	66	11日目死亡
10	48	男	腎移植後	4日前39.0℃	スリ硝子状	55	19日目死亡
11	26	男	腎移植後	4日前38.5℃	肺炎像	/	9日目死亡
12	20	女	悪性リンパ腫	9日前37.0℃	スリ硝子状	47	32日目死亡

表2. Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST合剤) 投与開始後の *Pneumocystis carinii* (Pc) 肺炎患者の Pc 検出状況

No.	陽性材料	ST合剤投与開始後の日数																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20...45	
1.	BAL ¹⁾ 2ml	-(S) ²⁾	-(S)	+								治 ³⁾										
2.	BAL 13ml				+																	
3.	喀出痰 2ml				-	+	+			+	-	-	-		治							
4.	BAL 2ml						+							-(S)	治							
5.	BAL 3ml		+									治										
6.	喀出痰 3ml	+	+	-	-	-	-	-			治											
7.	吸引痰 1ml	+																				
8.	吸引痰 1ml	+	+	-																	死	
9.	BAL 50ml		+		+(S)									死								
10.	吸引痰 5ml				+											+					死	
11.	BAL 4ml				+					-(S)		死										
12.	BAL 4ml		+			-(S)					-(S)											

BAL¹⁾: 気管支肺胞洗浄液, (S)²⁾: 喀出痰, 治³⁾: 肺炎症状軽快

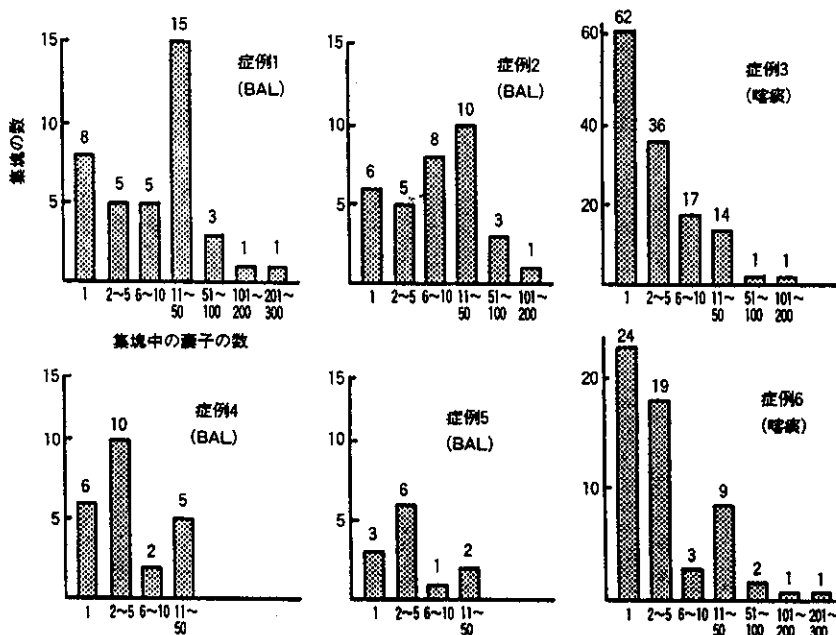


図5. *Pneumocystis carinii* (Pc) 肺炎患者の検査材料中に認められたPc嚢子の集塊の検出状況

TABLE 2. 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	-	(+)	-																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	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																										
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	<->																		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	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																																																																								
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	(+)	+	+	-															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	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																																																																																																																						
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	(-)	<->	<->															-	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	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																																																																																																																																																																				
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	(+)	-	+			-			-		-								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	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																																																																																																																																																																																																																		
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	(+)			-													-		-	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	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																																																																																																																																																																																																																																																																	
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	<+>	(-)	<->	<->	<->	<->																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
9	16	M	AA	PCR	(+)																	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
				Cel	(+)																	-																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
10	72	M	Pemph- igus	PCR	(+)	<+>		<+>	(+)	(+)			(+)	(+)	(+)	<+>	<+>	(+)	*																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
				Cel	(+)	<->		<+>	(+)	(-)			(+)	(-)	(+)	<->	<+>	(+)	*																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												

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

TABLE 3. 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