

に、アンモニアはグルタミンの合成などに利用される。したがって、メチオニョーリアーゼは毒性の高い含硫アミノ酸の濃度を調節するだけでなく、エネルギー代謝・アンモニア固定などにも寄与していると予想される。メチオニョーリアーゼは赤痢アメーバだけでなく、前述の寄生原虫のなかで、トリコモナスにも存在する⁴⁾。したがって、赤痢アメーバ・トリコモナスに共通した代謝経路に必須な分解系であると考えられる。興味深いことに、系統発生解析によると赤痢アメーバとトリコモナスのメチオニョーリアーゼはその起源が異なり、前者は古細菌から後者は真性細菌から祖先遺伝子をそれぞれ独立して水平転移により獲得したと考えられる⁸⁾。

メチオニョーリアーゼを標的とした 新規抗赤痢アメーバ薬剤

前述の硫黄同化的システイン生合成経路と同様の理由で、赤痢アメーバのメチオニョーリアーゼも合理的な創薬標的である。著者らはメチオニョーリアーゼに分解された後で毒性を発揮することを期待してメチオニンのフルオロ置換体の抗赤痢アメーバ効果を検証した。大腸菌組換え蛋白質を用いたアッセイで、トリフルオロメチオニンはメチオニョーリアーゼに対してメチオニンとほぼ同等の親和性と比活性を示し、メチオニョーリアーゼのよい基質となることがわかった。さらに、赤痢アメーバの *in vitro* 培養に用いたところ、メトロニダゾールの約2倍のEC50を示した⁸⁾。さらに、ハムスターを用いた肝膿瘍モデルを用いた感染実験でも腹腔内あるいは皮下投与により有意な肝膿瘍の縮小ならびに治癒が観察された(未発表)。現在、マウスの腸管感染モデルを用いてトリフルオロメチオニンの有効性をさらに確認するとともに、関連誘導体を合成し抗赤痢アメーバ作用を評価している。トリフルオロメチオニンは、前述の腔トリコモナスに対しても *in vitro* および *in vivo* で有効性が確認されており¹³⁾、これら嫌気性原虫の新規治療薬として共通して用いることができると考えられる。トリフルオロメチオニンによる作用点は実験的に明らかにされていないが、プ

ロドラッグであるこの化合物からメチオニョーリアーゼによりトリフルオロメタンチオール(CF₃SH)がつけられ、非酵素的にカルボノチオニックジフルオライド(CSF₂)ができ、これがさまざまな分子の一級アミンをクロスリンクし、殺虫作用を示すと予想される。哺乳動物にはメチオニョーリアーゼは存在せず、しかも本プロドラッグから代謝されたCSF₂は哺乳細胞より前に原虫細胞の重要生体分子に結合するという2点が、本化合物を有望な抗赤痢アメーバ・トリコモナス薬剤のリードとして考慮する根拠となっている。

おわりに

以上、著者らの研究グループが赤痢アメーバ症に対する新規創薬を模索しながら解析を進めている原虫特異的代謝経路についての研究の現況を概略した。寄生原虫は生物進化に伴う寄生適応の過程で、自分の寄生環境にふさわしい代謝経路を取捨選択しているはずである。とくに食食という特殊な細胞機能をもつ赤痢アメーバは進化の過程で細菌・真菌をはじめとするさまざまな微生物を食食し、その遺伝情報ごとに取り込む機会が多かったことが予想される。実際多くの代謝系酵素がさまざまな祖先生物から水平転移により獲得されていることが示されている。しかし、寄生に有利であるという理由で原虫が選択した代謝経路を逆に創薬の標的にすることも可能なことを本稿は示すことができたと考える。こういったアプローチはいわば寄生体と寄生体を駆逐する人間との知恵比べなのかもしれない。

謝辞：本研究は、一部、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業(さきがけ)、ヒューマンサイエンス振興財団の創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業(AIDS 医薬品等開発研究)、厚生労働省の新興再興感染症研究事業からの補助金によりなされた。

文献

- 1) WHO PAHO UNESCO Report. Epidemiological Bulletin, PAHO, 1997.
- 2) 厚生労働省健康局：病原微生物検出情報, 24(4)：79-87, 2003.

- 3) Wassmann, C. et al. : *J. Biol. Chem.*, 274(37) : 26051-26056, 1999.
- 4) Nozaki, T. et al. : *Adv. Parasitol.*, 59 : 2004. (in press)
- 5) Ali, V. et al. : *J. Biol. Chem.*, 279 : 16863-16874, 2004.
- 6) Fahey, R. C. et al. : *Science*, 224 : 70-72, 1984.
- 7) 野崎智義, 竹内 勤 : 蛋白質・核酸・酵素, 47 (1) : 21-29, 2002.
- 8) Tokoro, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, 278 : 42717-42727, 2003.
- 9) Nozaki, T. et al. : *Mol. Biochem. Parasitol.*, 97 : 33-44, 1998.
- 10) Nozaki, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, 274 : 32445-32452, 1999.
- 11) Nozaki, T. et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, 1429 : 284-291, 1998.
- 12) Nozaki, T. et al. : *Mol. Biochem. Parasitol.*, 107 : 129-133, 2000.
- 13) Coombs, G. H. and Mottram, J. C. : *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 : 1743-1745, 2001.

* * *

腸管寄生原虫検出における MIF 変法の評価

金沢大学大学院 医学系研究科 寄生虫感染症制御学
所 正治・井関基弘

Key Words : Merthiolate-Iodine-Formalin, mercurochrome, intestinal protozoa

緒言

MIF (Merthiolate-Iodine-Formalin) 染色固定法は、1951年に Sapero らによって報告されて以来¹⁾、虫卵、シスト等の簡便な染色固定法として知られてきたが、近年はあまり使用されなくなってきた。その原因としては、原法で赤色色素の染色材料として提示されていた Tincture Merthiolate No. 99, 1:1000 (Lilly 社) が製造中止となり、替わって使われるようになった Eosin Y による変法が原法に比較して染色性の点で問題があったことが挙げられ、実際に、糞便検体における赤痢アメーバ、ジアルジア (ランブル鞭毛虫) 等のシストの Eosin Y による染色が黄褐色となり、ヨード染色とのコントラストが付きにくいことをわれわれも経験してきた。しかしながら、本法は、染色と固定を簡便な手技によって同時に行うことが可能であり、また、これにより数年の保存に耐える半永久標本を作成可能な点、原虫の栄養型に関しても検出可能である点など、迅速診断およびフィールドでの検体処理検査に非常に重要な利点を備えている。そこで、この染色性の改

善のために、われわれは Eosin Y の Br のひとつを Hg に置換した構造を持つ Mercurochrome (図 1) に注目し、原法の Merthiolate (tincture of merthiolate) を Mercurochrome に変更した Mercurochrome-Iodine-Formalin 法 (MIF 変法) による腸管寄生原虫検出の評価を実施した。

材料と方法

MIF 変法には I 液および II 液: ルゴール液 (10% ヨードカリウム・5% ヨード液) をあらかじめ作成し (表 1)、使用直前に I 液 (940 μ l) と II 液 (60 μ l) を混合したものに約 100 μ l (0.1g) の濾過済みの糞便検体を添加混合し、30 分後から沈渣部分を使用

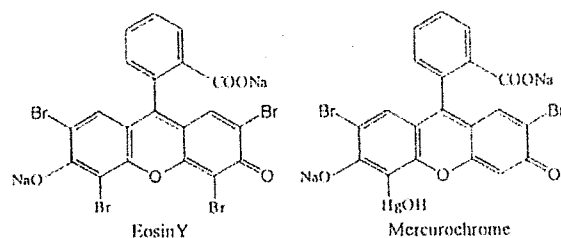


図 1 色素成分の構造

Assessment of Modified Merthiolate-Iodine-Formalin (MIF) Stain Method for Detecting Intestinal Protozoan Parasites: Efficacy of Replacement of Merthiolate with Mercurochrome

Masaharu Tokoro Motohiro Iseki

Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

論文請求先: 所 正治 〒920-8640 金沢市宝町 13-1 金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学

表1 MIF 変法の試薬調整

I液. "MF" solution:	
20ml	0.2% marcurochrome solution*
2.5ml	Formaldehyde solution
0.5ml	Glycerine
25ml	distilled water
Total 48ml	
II液. Fresh Lugol's iodine solution (5% Iodine)	
1.0g	Potassium iodine
0.5g	Powdered iodine crystals
10ml	distilled water
Total 10ml	
I液、II液ともに褐色ビンで室温保存。	
使用前にI液とII液を94:6の割合で混合し、10の割合の標検体と混合する。	
*日本薬局方2%マーキュロクロム液を蒸留水で希釈して作成するか、または、mercurochrome (mercury dibromofluorescein) 結晶がSigmaより購入可能。	

して顕微鏡下での観察を行った。栄養型としては、TYI-S-33 培地での無菌培養ジアルジア (portland-1 株) および、BI-S-33 培地での無菌培養赤痢アメーバ (HM 1:IMSS c 16 株) を用いた。また、シストには、重クロム酸カリウム液に保存されていたジアルジア、赤痢アメーバ各陽性検体を用いた。

結果

栄養型、シストともにMIF変法によるサンプルは鏡検による同定が可能だった。赤痢アメーバの栄養型においては、赤褐色に染色された微細細胞質内構造をともなう偽足とともに核内のカリオソームが認められ (図2a), また、シストでは、核、類染色質体 (図2b, c) が確認された。一方、ジアルジアにおいては、栄養型における吸着円盤、鞭毛、カリオソームをともなう核を認め (図2d, e)、シストでは、赤褐色に染まった細胞質構造内に黄褐色に明

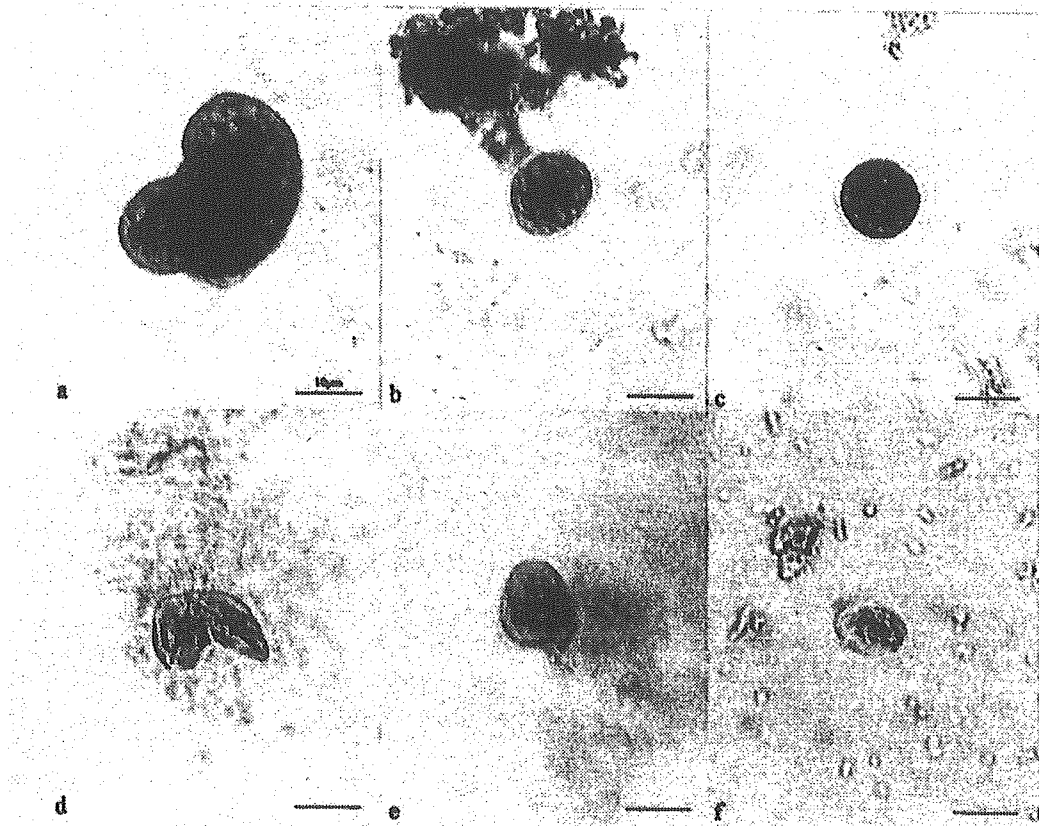


図2 MIF 変法による染色固定象

赤痢アメーバ: a. 栄養型, b. シスト, c. シスト, ジアルジア: d. 栄養型, e. 栄養型 (分裂中の2個体), f. シスト

るく染まった曲刺を認めた (図 2 f)。

考察

本法においては、いくつかの重要な注意点のあることも確認された。

1) MIF の I 液と II 液混合後の染色性低下の問題

ルゴール液との混合後、20 分ほどで MIF 液内に沈殿が生じる。原法においても指摘されている点だが²⁾、これによりヨードの染色性は極端に低下するため、用時調整が望ましい。

2) 栄養型の固定後の変性

シストに関しては長期の観察が可能だが、栄養型については、固定後、急速に変性が始まる。特に赤痢アメーバの栄養型では 48 時間程度で、辺縁部が凝集するように不明瞭化したものが出現し始める。したがって、栄養型の観察は、可能な限り固定後早期に行うことが望ましい。

3) フォルマリンによる DNA 変性

MIF 変法により固定した標本からの DNA 抽出、PCR での検出トリアルでは、24 時間後のサンプルであっても、フォルマリンによる DNA 損傷が無視できないことが判明した。しかしながら、mercurochrome による染色は Eosin Y による染色時

に問題となる細胞質内構造の染色によるコントラストを改善し、鏡検時の観察に有用であることが確認された。糞便検体においては、薄赤色に染まったバックグラウンドの中に原虫の栄養型・シストが明瞭に浮かび上がるように認められ、倍率 100 倍での鏡検においても十分に検出可能である。したがって、上記の制限を念頭に本法を使用することで、MIF 変法は腸管寄生原虫の検出において非常に有用なツールとして活用可能である。

謝辞：MIF 原法に関する資料、サンプルをご提供いただいた京都府立医科大学大学院寄生病態学、山田 稔先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Sapero, J. J. *et al.* (1951) : An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. *Science*, 114 (2969), 550-551.
- 2) Sapero, J. J. *et al.* (1953) : The MIF stain-preservation technique for the identification of intestinal protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 613-619.

教育講演 I

臨床で問題になる腸管寄生
原虫の分類に関する知見

金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学
所 正治・井関基弘

Key Words : genotype, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba*, taxonomy

近年、原虫類の分類は従来の形態学的分類から遺伝子型解析に基づく分類へと大きく変わりつつある。遺伝子型の決定 (genotyping) による種の鑑別をはじめとして、種内での詳細な亜型分類が実施されるようになり、これまで解明されていなかった病型と遺伝子型の相関解析や、地理的分布の解析を含めた多様なアプローチが可能となってきた。また、疫学的にも、フィンガープリンティングによる感染源の特定や、人獣共通感染症でのリスク評価など、遺伝子型同定の重要性が認識されつつある。本稿では、腸管寄生原虫の中からクリプトスポリジウム、ジアルジア (ランブル鞭毛虫) およびアメーバ類の遺伝子型決定のアプリケーションに関して、近年の知見を紹介する。

クリプトスポリジウム *Cryptosporidium* spp.

ほ乳類に寄生するクリプトスポリジウムの種と宿主およびオーシストのサイズを表1に示した。ヒ

トから分離される株は、主にヒトにのみ感染する *C. hominis* と、幅広いほ乳類を宿主とする *C. parvum* bovine genotype であり、その他に鳥類から分離される *C. meleagridis* の感染例も報告されている。これらの種を形態的に鑑別することは不可能であり、同定には遺伝子型解析が必須である。クリプトスポリジウムの種および遺伝子型の鑑別は *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene¹⁾, small subunit of ribosomal RNA (SSUrRNA) gene²⁾, Polythreonine (polyT) gene³⁾ 等をターゲットに設計された PCR 用プライマーを用い、オーシストから抽出された genomic DNA をテンプレートにした PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法、あるいは PCR-ダイレクトシーケンス法によって行われている。ここにあげた遺伝子の塩基配列についてはほぼすべての遺伝子型のリファレンスが GeneBank から利用可能である。クリプトスポリジウムにおいては、臨床検体から分離される genomic DNA の配

Recent Progress on Genotyping in Pathogenic Intestinal Protozoan Parasites

Masaharu Tokoro Motohiro Iseki

Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

論文請求先：所 正治 〒920-8640 金沢市宝町13-1 金沢大学大学院 医学系研究科寄生虫感染症制御学

表1 ほ乳類に寄生する *Cryptosporidium* の種および遺伝子型の一覧

種名	宿主と寄生部位	オーシストの大きさ (μm)
<i>C. hominis</i>	ヒト (腸)	5.2×4.9 (5.9-4.4×5.4-4.4)
	ヒト、ウシ、ブタなど (腸)	
	[遺伝子型]	
<i>C. parvum</i>	ウシ、サル、マウス、 フェレット、有袋類型など	5.0×4.5 (5.4-4.5×5.0-4.2)
<i>C. felis</i>	猫 (腸)	5.0×4.5
<i>C. wrairi</i>	モルモット (腸)	5.2×4.6 (6.0-4.5×5.3-4.2)
<i>C. suis</i>	ブタ (腸)	4.6×4.2 (4.9-4.4×4.3-4.0)
<i>C. canis</i>	犬 (腸)	5.0×4.7 (5.9-3.7×5.9-3.7)
	マウス (胃)	
<i>C. muns</i>	ドブネズミ (胃)	7×4.5
	ヒト (胃?)	
<i>C. andersoni</i>	ウシ (胃)	7.4×5.6 (7.9-6.6×6.5-5.3)

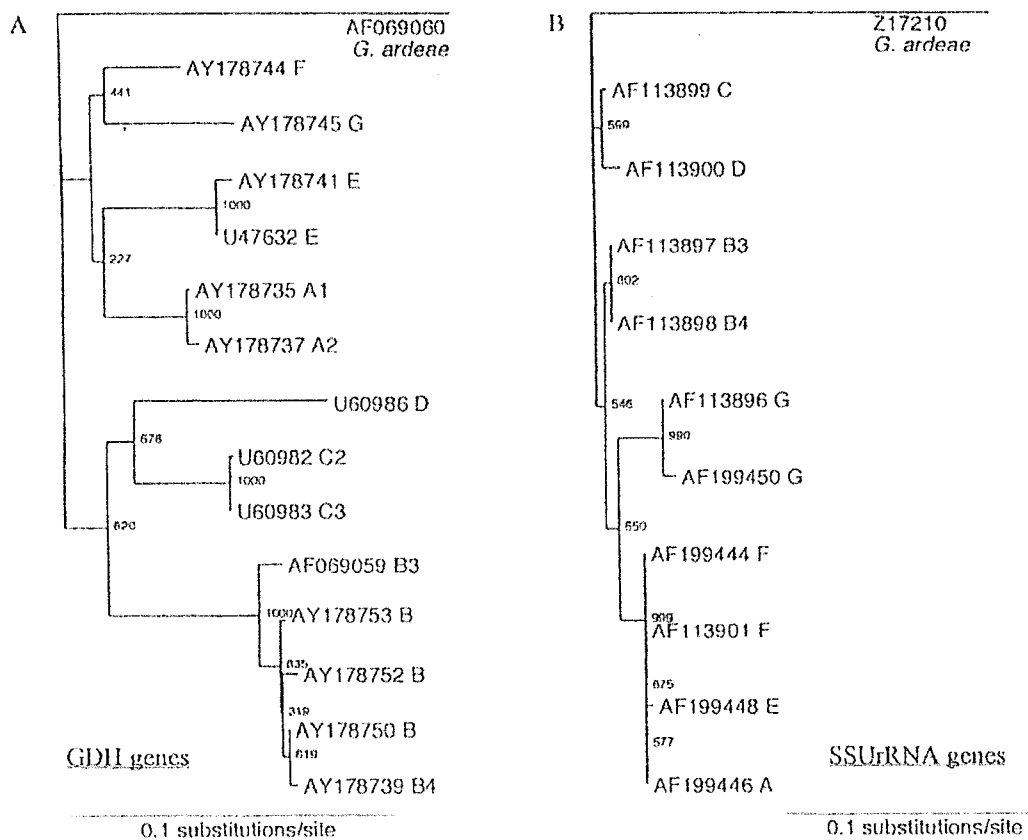


図1 リファレンスの塩基配列を用いたジアルジアの系統樹解析

(A) glutamate dehydrogenase (GDH) gene,

(B) small subunit of ribosomal RNA (SSUrRNA) gene. 各項目は accession no. および Assemblage をしめす。解析には CLUSTAL W (ver. 1.83) を使用し、Neighbor-Joining 法、アウトグループとして *G. ardeae* を用いた。各ノードの数字はブートストラップ値 (1000 replicates) を示す。

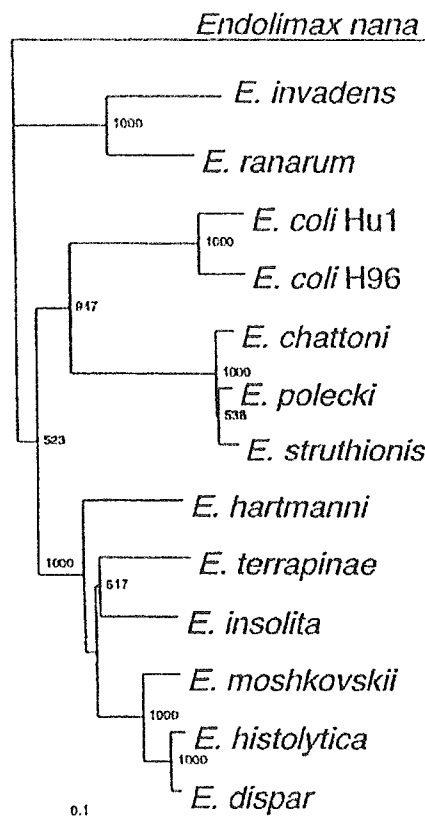


図2 リファレンスのSSUrRNA gene塩基配列を用いた *Entamoeba* 属の系統樹解析
アウトグループとして小形アメーバ (*Endolimax nana*) を用いた (方法, 図1参照)。

列はいずれかのリファレンス配列とほぼ100%の相同性を示し、したがって、これらの遺伝子型分類はほぼ確立していると考えられる。

ジアルジア (ランブル鞭毛虫) *Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*)

クリプトスポリジウムと比較して、ジアルジアにおける遺伝子型分類は発展途上にある。その理由のひとつに、分離される *G. intestinalis* の種々の遺伝子に認められる microheterogeneity の存在があげられる。ほ乳類由来のジアルジアは、形態的にはすべて同一であるが、その遺伝子型は Assemblage A ~ G の7種に分類され、ヒトのみ、ヒトと動物の両方、および動物のみから検出される型がある。さらに、われわれの経験では、これらのリファレンス配列と臨床検体のシストから分離された genomic DNA の

ターゲット遺伝子の塩基配列はしばしば一致せず、図1に示したような系統樹解析を用いた遺伝子型解析が必要となる。現在、リファレンス配列が最も多く報告されているのは、glutamate dehydrogenase (GDH) gene⁴⁾ と SSUrRNA gene⁵⁾ であり、この2種の遺伝子ではAからGのすべての遺伝子型のリファレンスが参照可能である。この他にも、triose phosphate isomerase (TPI), beta-giardin, elongation factor 1 alpha (ef 1 alpha) などの遺伝子をターゲットとした遺伝子型決定の報告があるがリファレンスの数が少なく、一部の遺伝子型のみしか用いることが出来ない。ジアルジアに関してはこの分類体系は暫定的なものであり、今後、遺伝子型決定の報告の増加につれて現在の分類体系を発展させていく中で、臨床症状、地理的分布などとの相関の知見が蓄積されていくものと考えられる。

アメーバ類 *Entamoeba* spp.

病原性の *Entamoeba histolytica* については、非病原性の *E. dispar* と形態的に鑑別できないことから、SSUrRNA gene をターゲットとした特異的プライマーセットによるマルチプレックスPCRによる鑑別が用いられている⁶⁾。一方、しばしば臨床糞便検体中に認められる *E. histolytica*/*E. dispar* 以外のシスト (大腸アメーバ, 小形アメーバなど) については、核の数や構造およびシストのサイズなどに頼った形態学的な鑑別が行われてきたが近年、*Entamoeba* 属各種および小形アメーバ (*Endolimax nana*) の SSUrRNA gene のシーケンス情報が報告され⁷⁾、PCRとダイレクトシーケンスによる同定が可能となってきた (図2)。基本的に、非病原性とされてきたこれらアメーバ類のヒトでの感染状況はこれまでのところほとんど報告されてこなかった。しかし同定方法の確立により、今後、報告の増加とそれともなう新たな知見が期待される。

遺伝子型解析による分類法は、形態的に鑑別不可能な種内の亜型の存在を明らかにするが、病原性や病型、薬剤感受性等の評価を可能にするには、一部を除いては未だ十分なデータが得られているとは言えない。しかしながら、糞便検体に見出される原虫の遺伝子型同定を、病原性の有無にかかわらず進め

ていく地道な作業を通じて、将来、臨床現場において治療・診断の有用なツールとなりうる遺伝子型分類体系を築き上げることは十分可能なものと期待している。

文 献

- 1) Spano, F. *et al.* (1997) : PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 150, 209-217.
- 2) Xiao, L. *et al.* (1999) : Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3386-3391.
- 3) Carraway, M. *et al.* (1997) : A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect. Immun.*, 65, 3958-3960.
- 4) Read, C.M. *et al.* (2004) : Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.*, 4, 125-130.
- 5) Thompson, R.C.A. *et al.* (2000) : Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16, 210-213.
- 6) Evangelopoulos, A. *et al.* (2000) : A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 94, 233-240.
- 7) Jeffrey, D.S. *et al.* (1999) : Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 1740-1751.

クリプトスポリジウム症患者における オーシスト排出数の推移と排出期間

埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当

山本徳榮・砂押克彦・山口正則

同 水・食品担当

森田久男・森永安司・川名孝雄

長野県北信保健所

高木正明・鳥海 宏

金沢大学大学院 寄生虫感染症制御学

所 正治・井関基弘

Key Words : cryptosporidiosis, *Cryptosporidium hominis*, oocyst excretion

緒言

平成 16 年 8 月下旬、長野県においてクリプトスポリジウム症の集団感染が発生した（以下、長野事件）。管轄する北信保健所および関係機関が連携し、詳細な調査を実施した結果、長野県内の 1 スポーツ施設を利用した全 12 グループの 592 名のうち、埼玉県と千葉県内の各 2 グループの 288 名が、下痢等の消化器症状を呈していることが判明した。また、

両県の有症者の糞便から *Cryptosporidium* sp. のオーシストが検出された。そこで、長野県は本原虫による水系感染を疑い、埼玉衛研に対し当該施設の飲料水なども検体およびホテルの調理施設従業員 7 名の糞便について検査を依頼した。それらの検査結果は、全て陰性であった。一方、厚生労働省の調査団は現地入りし、長野県との合同調査を実施した。その結果、1 人の患者が下痢便を失禁し、その清掃に使用した手洗い場、汚染部位の床材およびプール濾

Duration and Number of Oocyst Excretion in Patients Infected with *Cryptosporidium Hominis*

Norishige Yamamoto* Katsuhiko Sunaoshi* Masanori Yamaguchi* Hisao Morita**
Yasushi Morinaga** Takao Kawana** Masaaki Takagi*** Hiroshi Toriumi***
Masaharu Tokoro**** Motohiro Iseki****

*Department of Clinical Microbiology, Saitama Institute of Public Health

**Department of Food Chemistry and Drinking Water, Saitama Institute of Public Health

***Nagano Prefectural Hokushin Public Health Center

****Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

論文請求先：山本徳榮 〒338-0824 さいたま市桜区上大久保 639 埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当

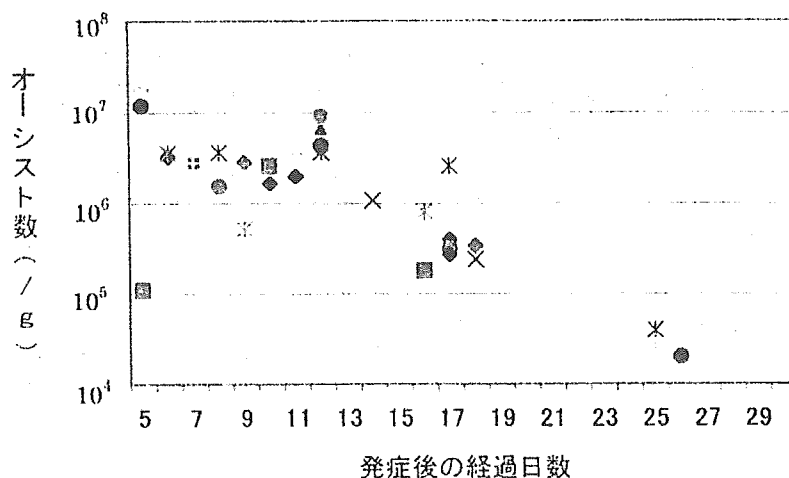


図1 患者便におけるオーシスト排出数の推移

表1 患者便におけるクリプトスポリジウムの排出期間

患者	最終陽性確認日*	陰性確認日*
1	60	95
2	60	67
3	59	66
4	58	65
5	58	65
6	57	64
7	40	無し
8	39	46
9	33	60
10	33	66
11	33	47
12	31	46
13	26	47

* 発症日からの経過日数

過装置内の砂等が、本原虫によって汚染されていたことが究明された。

本研究では、この事件における埼玉県内の患者を対象として、オーシスト排出数の推移と排出期間、分離株の遺伝子解析、臨床症状等について検討した。

材料と方法

埼玉県内のグループ A (18 ~ 37 歳) に対し、陽性者については陰性確認をするまでの期間、任意で糞便を提出することを保健所を介して依頼した。協力が得られた有症者 20 名については、各 1 ~ 6 回にわたり糞便検査を実施した。

検査方法は、定法に従いショ糖遠心浮遊法でオーシストを濃縮し、直接蛍光抗体法と DAPI 染色を行い、その蛍光像と微分干渉像の観察によって検出・同定した。オーシスト数の算定は、あらかじめ秤量した患者便を既知量の PBS で適度に希釈して蛍光抗体染色を行い、蛍光像と微分干渉像で形態を確認しながらオーシスト数を記録し、糞便 1g あたりの個数を算定した。

オーシストの遺伝子解析には、埼玉県内のグループ A とグループ B の患者由来、1996 年に埼玉県で発生したクリプトスポリジウム症の集団感染 (以下、越生事件)¹⁾ における患者由来および HNJ-1 のオーシストを用いた。まず、TRAP-C1 (Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1) 領域を標的とするプライマー CpE, CpZ および制限酵素 *Rsa* I による PCR-RFLP 法²⁾ を実施した。また、18 S rRNA 領域を標的とするプライマー 18 SiF, 18 SiR³⁾ により遺伝子を増幅し、それを DNA 塩基配列解析装置 ABI PRISM 310 によって解析し、塩基配列を決定した。

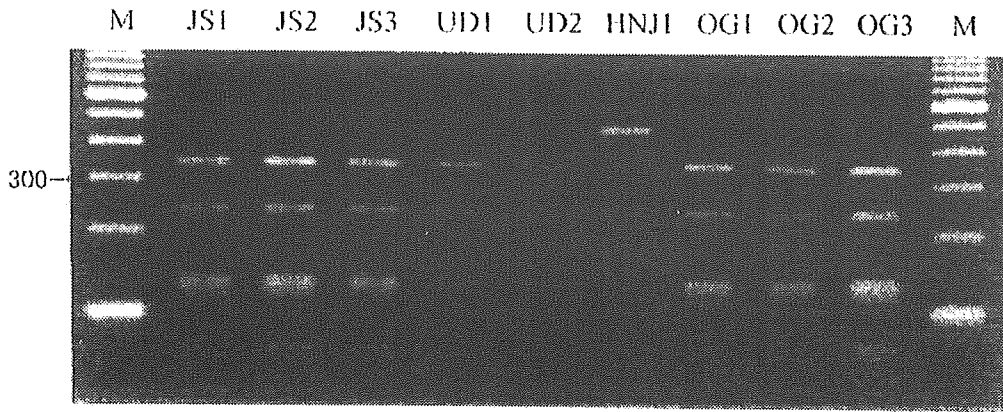


図2 患者便由来の *C. parvum* (*C. hominis*) における PCR-RFLP

TRAP-C1 遺伝子を CpE と CpZ で増幅，制限酵素 *Rsa* I で消化した。

JS1～3：グループ A，UD1～2：グループ B，OG1～3：越生患者

M：100-bp ladder

C. hominis：340bp，260bp，130bp，110bp HNJI：456bp，263bp，177bp，126bp

患者の臨床症状は，保健所で聞き取りを行った調査票を集計し解析した。

結果

1) 患者便におけるオーシスト数

発症から5日目に検査した3例ではそれぞれ約 1.1×10^5 ， 1.2×10^7 ， 1.7×10^7 個/g であり，6日目に検査した2例では $3.2 \sim 3.6 \times 10^5$ 個/g であった。また，12日目に検査した6例では $1.6 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^7$ (平均 6.6×10^6) 個/g であり，発症から5～12日間は， 10^5 個/g 台のオーシストが持続して検出された。その後は暫減する傾向が見られ，17，18日目には 10^5 個/g 台，25日目に 4×10^4 個/g，31日目には 6×10^3 個/g 検出された (図1)。それ以降の検体では，換算値の誤差が増大することから，算定不能とした。

2) オーシストの排出期間

発症日の翌日を1日目として，60日目までオーシスト陽性を確認できたのは2例，59日目1例，58日目2例，57日目1例などであった (表1)。これらの検体採取日から陰性と判定した採取日までの期間は7～35日間あり，陽性期間は60日を超える可能性が示唆された。

3) オーシストの遺伝子解析

長野事件における患者由来のオーシストは，PCR-RFLP法 (図2) およびDNA塩基配列の解析によって *Cryptosporidium hominis* (= *C. parvum* の genotype 1) であることが判明した。なお，越生事件における患者由来のオーシストは *C. hominis*，HNJ-1は *C. parvum* の genotype 2 であった。

4) 臨床症状

入院したのは1症例のみで，8月26日に下痢，27日に発熱，倦怠感，29日には悪心，40℃の発熱を呈した。31日には下痢 (5～6回)，37.3℃の微熱，悪心，食欲不振を訴えて入院し，9月4日に退院した。

糞便検査で陽性であった18歳から23歳の大学生18名の調査票を解析した結果，下痢回数は10～40回 (平均19.3回)，発熱は100%で平均は38.4℃，嘔吐38.9%，吐き気77.8%，腹痛88.9%および頭痛は83.3%にみられた。なお，下痢の回数については，調査票では1日の最高回数とは限定されていなかった。

5) 糞便の性状

発症から9日，10日目に検査した4例のうち，2例は有形便であったのに対し，他の2例はいずれも水様便であったが，その1週間後には有形便となっ

た。また、11日、12日目に検査した9検体のうち、軟便は5検体で有形便は4検体であった。一方、1症例では14日目でも泥状で、18日目では軟便であった。なお、12日目の糞便において有形便であるにも拘わらず、 1.4×10^7 個/gのオーシストが検出された例があった。

考察

今回検討したクリプトスポリジウム症患者の集団では、糞便中に排出されるオーシスト数は、発症から約2週間は 10^6 個/g台であり、 10^7 個/gを超える例もあった。さらに、オーシストの排出期間は、越生事件では発症から44日目までしか確認できなかったが、今回の検討では発症から60日目まで確認され、長期間にわたり感染源になることが明らかとなった。Jokipiiらの報告では、緩解してから2ヵ月後の患者からオーシストを検出している⁹⁾。一方、米国の健康な成人ボランティアに対する感染実験では、オーシスト10個の経口投与で感染が成立している⁹⁾。

本原虫のオーシストは、塩素剤など各種消毒剤に強い抵抗性があることから、スイミング・プールにおける集団感染例が多数報告されている。米国CDCのMMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) における報告を集計すると、プール水によるクリプトスポリジウム症の集団感染事例は、1995年～2002年までの間に1997年を除いて毎年発生し、その総数は37件、患者総数は11,315名である。また、英国⁶⁾ やオーストラリア⁷⁾ でも複数の集団感染事例が報告されている。オランダでは、5ヵ所の屋内プールにおけるフィルターの逆洗浄水について調査した結果、153サンプルのうち*Cryptosporidium* は7検体(4.6%)、*Giardia* は9検体(5.9%)で検出され、両原虫が検出されたのは2検体(1.3%)であった。また、プール水からも両原虫が検出されている⁸⁾。

したがって、緩解した患者がプールを使用する場合、肛門周囲を充分洗浄すること、さらに、プールの濾過装置の維持管理を徹底するなどの対応策が重要と考えられた。ちなみに、米国のいくつかの州では下痢終息後も4週間はプールの使用を禁止している。

長野事件における患者由来のオーシストは、遺伝子解析の結果*C. parvum* の genotype 1であり、Morganら⁹⁾ がこれを新種と提唱した*C. hominis* であった。*C. hominis* の主要な宿主はヒトとサルである¹⁰⁾。英国における調査では、プールでの集団感染、飲料水による集団感染および散発事例における患者1,705名のうち645名(37.8%)は*C. parvum* の genotype 1 (= *C. hominis*) であったと報告されている⁶⁾。

臨床症状は、大学生18名のみの調査票では、発熱は100%で平均は38.4°Cであったが、越生事件では発症した小・中学生1,013人のうち、発熱した469人(47.1%)の平均体温は37.8°C(36.7～40.3°C)であった。

今回の長野事件においては、下痢症患者の病原体を速やかに究明することができた。通常、検査室で実施している糞便検査法では、*Cryptosporidium* のオーシストを検出することが困難である。しかし、千葉市立病院の臨床検査技師が鏡検時に本原虫を疑い、千葉市環境保健研究所で同定がなされていた。埼玉衛研ではその情報に基づいて検査方法を選択し、迅速に対応することが可能となり、感染の拡大防止を図ることができた。

謝辞：情報や検体収集等に関しては、県感染症対策室、生活衛生課および保健所等関係者にご協力をいただきました。深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Yamamoto, N. *et al.* (2000) : Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *J. J. A. Inf. D.*, 74, 518-526.
- 2) Spano, F. *et al.* (1998) : *Cryptosporidium parvum* : PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp. Parasitol.*, 90, 195-198.
- 3) Morgan, U. M. *et al.* (1997) : Differentiation between

- human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J. Parasitol.*, 83, 825-830.
- 4) Jokipii, L. *et al.* (1986) : Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.*, 315, 1643-1647.
 - 5) Okhuysen, P. C. *et al.* (1999) : Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.*, 180, 1275-1281.
 - 6) McLauchlin, J. *et al.* (2000) : Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom : results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3984-3990.
 - 7) Puech, M. C. *et al.* (2001) : A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales associated with swimming at public pools. *Epidemiol. Infect.*, 126, 389-396.
 - 8) Schets, F. M. *et al.* (2004) : *Cryptosporidium* and *Giardia* in swimming pools in the Netherlands. *J. Water. Health.*, 2, 191-200.
 - 9) Morgan-Ryan, U. M. *et al.* (2002) : *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 49, 433-440.
 - 10) Xiao, L. *et al.* (2004) : *Cryptosporidium* taxonomy : recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 72-97.

日本臨牀 63巻 増刊号7 (2005年7月28日発行) 別刷

広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査

—その数値をどう読むか—

[第6版]

(3)

VIII. 免疫学的検査

E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

クリプトスポリジウム

所 正治 井関基弘

については佐藤ら⁷⁾の文献を参照されたい。最近では分離菌の同定や迅速・早期診断の方法として、病原菌のDNAを標的としたPCR法が野兎病に対しても実用化されつつあり^{8,9)}、今後の検査への応用が期待される。野兎病の検査依頼は大原研究所で随時受け付けている。

■ 文献

- 1) 大原菅一郎ほか：大原総合病院年報 29: 1-6, 1986.
- 2) Sato T, et al: J Clin Microbiol 28: 2372-2374, 1990.
- 3) 佐藤 信ほか：衛生検査 24: 29-32, 1975.
- 4) Sarchi GI: Z Bakteriolog Parasit Infect Hyg Abt Orig 117: 367-376, 1930.
- 5) 上野龍夫, 斉藤武郎：感染症 11: 109-112, 1973.
- 6) 佐藤 信, 大原菅一郎：大原総合病院年報 25: 1-5, 1982.
- 7) 佐藤 信ほか：大原総合病院年報 35: 1-10, 1992.
- 8) Junhui Z, et al: J Med Microbiol 45: 477-482, 1996.
- 9) Sjopstedt A, et al: J Clin Microbiol 35: 1045-1048, 1997.

VIII 免疫学的検査 E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

クリプトスポリジウム

Cryptosporidium

所 正治 井関基弘

Key words: クリプトスポリジウム, *Cryptosporidium*, 抗原検出, 抗体検出, 酵素イムノアッセイ

はじめに

クリプトスポリジウムは腸管寄生原虫で、ヒトが感染すると激しい下痢を起こし、糞便に多数のオーシストが排出される。診断は糞便からオーシストを検出すればよい。種々の検出方法があり、蛍光抗体法も用いられる。また、最近ではオーシストそのものを検出するのではなく、原虫の可溶性抗原を酵素イムノアッセイ法で糞便から検出する診断用キットも各種市販されている。

感染すると本原虫特異的血清抗体価が上昇する。本症では抗体価が上昇した頃には症状が消失するので、抗体検査の診断的意義はないが、地域住民における流行の実態を把握するには血清学的疫学調査が有用である。

1. クリプトスポリジウム症の概略

病原体は *Cryptosporidium hominis* や *C. parvum* など、腸上皮細胞の微絨毛内で増殖し、有性生殖で形成された成熟オーシスト(直径約 5 μm の短楕円形)が糞便に多数排出される。オーシストの経口摂取で感染し、激しい水様下痢を起こす。免疫機能正常者では下痢は1週間前後で終息するが、エイズなど免疫不全患者では慢性化・重症化し、致死的になる。確実に効く治療薬はない¹⁾。

熱帯・温帯を問わず世界中に広く分布し、年間2.5億～5億人が感染。我が国では途上国旅行による輸入感染例が多いが、国内感染も少なくない。水道水汚染による大規模な集団感染も発生しているし、エイズや先天性免疫不全患者

における死亡例もみられる。届出感染症(5類、全数把握)、エイズ診断の指標疾患に指定されており、人獣共通感染症である。

2. 診断のための免疫学的検査

a. 蛍光抗体法によるオーシストの検出

診断には、普通は、糞便の顕微鏡検査でオーシストを検出する方法がとられる。しかし、オーシストが小さく、通常の原因・虫卵検査法では検出できないので、簡易迅速シヨ糖浮遊法、シヨ糖遠心浮遊法、抗酸性染色法など特殊な検査法が用いられる²⁾。手技は簡単で、試薬のコストは安いですが、顕微鏡観察は×400または×600の倍率で行う必要があり、オーシストの判定には多少の熟練が要求される。また、これらの方法ではインタクトなオーシストは検出できるが、スポロゾイトが脱囊した後のオーシストは検出できない。

一方、蛍光抗体法であれば、コストは高くつくが、顕微鏡観察は×200の倍率でも検出できるので観察時間を短縮できるし、特異性が高いので判定を誤る危険性も低い。また、脱囊後のオーシストも検出できるので、検出効率も高くなる。下記に示した直接蛍光抗体法用の試薬キットが市販されている。ただし、両者とも診断薬としての認可がまだなされていないので、研究用として使用することになる。

1) MeriFluor™ *Cryptosporidium/Giardia*

Meridian Bioscience社(米国)の製品で、取扱業者はアベバイオロジカルリサーチ社(電話: 044-966-3151)。クリプトスポリジウムのオーシスト壁とジアルジア(ランブル鞭毛虫)のシス

ト壁に対する2種類のモノクローナル抗体にFITCを標識した混合試薬を使い、2種の原虫を同時に検出できる。糞便塗抹から染色終了までの所要時間は約1時間。感度、特異性ともに優れている。

キットには必要な試薬のほか、陽性対照、陰性対照、染色用スライドグラスなども含まれており、50検体用の価格は米国で280ドル。国内販売価格は約6万円で、1検体あたり1,200円かかるが、利用価値は高い。

2) クリプトスポリジウム検出キット™

和光純薬工業社の製品で、オーシスト壁に対するモノクローナル抗体にFITCを標識したものの。もともと水道水や河川水からの検出を目的に開発されたものであるが、糞便からの検出にも使用できる。水試料50回用の価格は6万円であるが、糞便検査には試薬の使用量が少ないので約200検体の検査が可能で、1検体あたりの価格は300円程度になる。

b. 原虫特異的抗原の糞便からの検出

顕微鏡による検査には時間と労力がかかるし、オーシストの形態的特徴に十分慣れないと判定を誤る。そこで、肉眼的に判定ができる迅速診断法が開発され、最近では種々のキットが市販されている。糞便内の原虫特異的抗原(オーシストではなく、可溶性抗原物質)を酵素イムノアッセイ法(enzyme immunoassay: EIA)で検出する方法で、発色の有無(または強弱)を肉眼的に判定できるので、熟練を必要とせず、診断は誰にでもできる。

原理は、各原虫種の抗原に特異的に反応する抗体を線状あるいはドット状に吸着させたメンブレンに、糞便溶解液を載せて糞便内の原虫抗原を捕捉させ、酵素標識抗体を反応させ、基質を加えて発色させる方法あるいは免疫クロマトグラフィ法である。

検出感度も特異性も優れている。国内での価格は高く、診断薬としての認可もされていないが、顕微鏡検査に代わるものとして、今後、積極的に導入すべきものである。以下に代表的なものを紹介する。

1) Triage™ Parasite Panel

Biosite Diagnostics社の製品。1枚の小さなパネル上で赤痢アメーバ、ジアルジア、クリプトスポリジウムの3種を同時に検出できる。新鮮または凍結保存した糞便を使い、検査所要時間は約15分。判定は、パネル中央部に記載されている3種の原虫名の各箇所(青黒い線)が出現するか否か、肉眼で行う³⁾。価格は20検体で510ドル。輸入すると国内では1検体あたり約3,000円になる。

なお、赤痢アメーバの場合、病原性の*Entamoeba histolytica*か非病原性の*Entamoeba dispar*かをこのキットで鑑別することはできない。

2) ColorPAC™ Giardia/Cryptosporidium

Becton Dickinson社の製品。1枚の小さなパネルに装着した膜上でジアルジアとクリプトスポリジウムの2種を同時に検出できる。ホルマリンで保存した糞便を使用し、所要時間は約10分。膜上の所定の位置に線状の発色があるかどうかを肉眼で判定する⁴⁾。価格は30検体分で554ドル。

3) ProSpecT™ Cryptosporidium

Alexon・Trend社の製品で、Rapid AssayキットとMicroplate Assayキットとがある。前者は直径2cm、高さ2.5cmほどのデバイスの上面に装着したメンブレンフィルター上で反応を行い、膜面の所定箇所に直径約2mmの青いドットが出現するか否かで判定する⁵⁾。所要時間は約20分。価格は20検体で317ドル。後者はマイクロプレートを用い、発色(黄色)の有無・強弱を肉眼または分光光度計で判定する。所要時間は約2時間。価格は24検体用で199ドル、96検体用で638ドル。

新鮮便、凍結保存便のほか10%ホルマリンで固定した便も使える。また、ジアルジアを同時に検出できるマイクロプレートキットもあり、価格は96検体用で811ドル。

3. 疫学調査のための免疫学的検査

感染するとクリプトスポリジウム特異的IgM、IgG、IgAなどの血清抗体価が上昇する。ただ、抗体価が上昇した頃には下痢は終息するので、

血清検査は診断のためには無意味である。

感染により上昇した IgG 抗体は半年から 1 年は陽性を示すので、血清学的疫学調査で抗体保有率を調べることにより、その地域・集団における長期的な流行の実態、累積感染者数、感染の危険度を把握することができる。一方、糞便検査による疫学調査では、オーシストの排出は感染後約 1 カ月で終息するので、調査した時点での感染者数を知ることはできるが、長期的な汚染の実態を知ることはできない。

抗体価の測定には間接蛍光抗体法、酵素抗体法などが用いられる。クリプトスポリジウム感染に対する免疫応答の詳細に関しては、近年のレビューを参照されたい⁶⁾。

a. 顕微鏡的抗体検査

間接蛍光抗体法や酵素抗体法を用い、抗原には精製したオーシスト、オーシストから脱囊させたスポロゾイト、感染させた動物の腸の凍結切片やパラフィン包埋切片などを使用する。

著者らの経験では、実験的に感染させたマウスの血清では抗体価の判定は容易であるが、ヒトや動物の場合は難しい。なぜなら、後者の場合は、10 倍や 20 倍希釈血清ではほぼ全例が陽性反応を示し、希釈倍率が高くなるにつれて連続的に陽性個体数が減少する。実験動物と違っ

て陰性対照の選定が困難なため、何倍以上の希釈をもって真の陽性と判定するかの設定が難しい。疫学調査で抗体保有率を示す場合には注意を要する。

b. マイクロプレート酵素抗体法

精製したオーシストを凍結融解・超音波破碎したものを抗原とし、96 穴マイクロプレートで血清を反応させ、吸光度で判定する。多数の検体を調べるのに適しているが、この場合も陽性限界(閾値)の OD 値設定には注意を要する。

おわりに

我が国の病院検査室では原虫・寄生虫症診断のための検査が全くおろそかにされている。顕微鏡検査には、ある程度の熟練を要するし、時間と労力がかかり、人員不足のために十分な対応がとれないのが実情である。しかし、診断がつかなければ適正な治療ができず、放置すれば患者の命にもかかわる。

最近では、顕微鏡検査に代わるものとして、肉眼で判定できる迅速診断用キットが各種市販されており、信頼度も高い。価格は高いが、国内でも検査診断薬として早急に認可し、日常検査に積極的に導入する必要がある。また、より安価な検査キットの開発も欠かせない。

文献

- 1) 井関基弘：日本臨牀 61(増刊号 2)：608-612, 2003.
- 2) 井関基弘, 木俣 勲：臨床検査 42: 541-546, 1998.
- 3) Sharp S, et al: J Clin Microbiol 39: 332-334, 2001.
- 4) Garcia LS, Shimizu RY: J Clin Microbiol 38: 1267-1268, 2000.
- 5) Parisi MT, Tierno PM Jr: J Clin Microbiol 33: 1963-1965, 1995.
- 6) Riggs MW: Microbes Infect 4: 1067-1080, 2002.

〈症 例〉

PCR 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療効果の判定に
有用であったアメーバ赤痢の1例

福羅匡普 川原 弘 山田真善
高瀬修二郎 及川陽三郎 所 正治