

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**

はじめに 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*: Eh) を病原体とする大腸炎のうち、粘血便を特徴とする赤痢症状を示すものをアメーバ赤痢と呼ぶが、1999 年 4 月から施行された感染症新法では腸管外病変も含めてアメーバ赤痢と定義し、2003 年 11 月から 5 類感染症として全例報告の対象となっている¹⁾。今回、polymerase chain reaction (PCR) 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療の効果判定に有用であった 1 例を経験したので、本症診断の問題点などの考察を加えて報告する。

症 例

症 例：54 歳，男性。

生活歴：25 歳時に香港，マカオに 1 週間の旅行歴があった。同性愛や肛門性交の経験はない。

現病歴：2001 年 10 月 3 日に粘血便と全身倦怠感を主訴に当院消化器内科を受診した。大腸内視鏡検査で盲腸と直腸に多発性のびらんおよび不整形潰瘍を認めたが，上行結腸から S 状結腸にかけての粘膜面は正常であった。潰瘍部位の生検組織所見では軽度の非特異的炎症性変化を認めたが，便培養では結核菌を含めた有意な起炎菌が検出されなかったため，潰瘍性大腸炎の初期病変が疑われ，mesalazine 1,500 mg/day の服用が開始さ

れた。都合で治療は他院で継続することになったが，症状が改善しないため 2003 年 7 月 12 日から服薬を自己中断していた。9 月ごろより粘血便と全身倦怠感が増悪してきたために 10 月 3 日に再び当科を受診し入院となった。排便は 1 日 6~10 回の粘血便であったが，食事摂取と体重には変化を認めなかった。

入院時現症：身長 146 cm，体重 45.1 kg で，栄養状態は良好であった。発熱，貧血および黄疸はなく，腹部では腹壁は平坦・軟，圧痛は認められなかったが，腸雑音がやや亢進していた。血液検査所見では，赤沈の軽度亢進を認める以外，白血球数や CRP も正常であった。大腸内視鏡検査では，盲腸と直腸に多発性のびらんおよび不整形潰瘍を認めたが，これらの所見は 2 年前のそれと同様であった (Fig. 1)。しかし，生検組織 1 個から赤血球を貪食する泡沫状細胞質，赤色調類円形核を有するアメーバ栄養体の集簇が認められた (Fig. 2)。排便直後に便を検鏡すると運動性を示すアメーバ栄養体が確認され，コーン核染色では赤痢アメーバに特徴的なカリオソームも染色された。また，便抽出液についての Eh DNA に特異的なプライマーを用いた PCR 法では 472 bp の部位に明瞭なバンドが検出された (Fig. 3)。腸管外病変の合併は認められなかったため，10 月 30 日から metronidazole 1,500 mg/day を 2 週間経口投与したところ，投与後 4 日目には自覚症状が消失し，7 日目には PCR 法にても Eh DNA を検出できなくなり，以後症状の再発を認めていない。

* A Case of Amoebiasis Suggesting Usefulness for Diagnosis and Treatments by Detection of the Specific DNA Fragment for *Entamoeba histolytica* with a PCR Method.

要旨は第 193 回日本内科学会北陸地方会にて発表した。

** M. Fukura, H. Kawahara (助教授), M. Yamada, S. Takase (教授) (消化器機能治療学), Y. Oikawa (講師) (生体感染防御学): 金沢医科大学; M. Tokoro: 金沢大学寄生虫感染制御学。

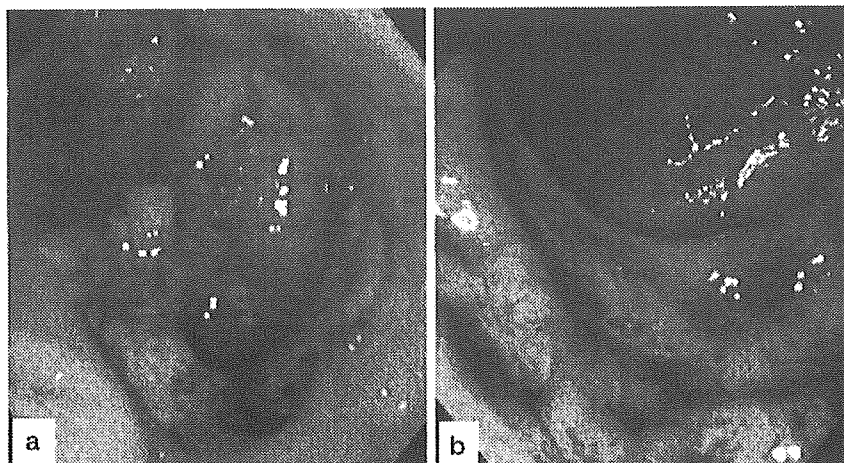


Fig. 1. 入院時大腸内視鏡検査所見

a: 盲腸, b: 直腸

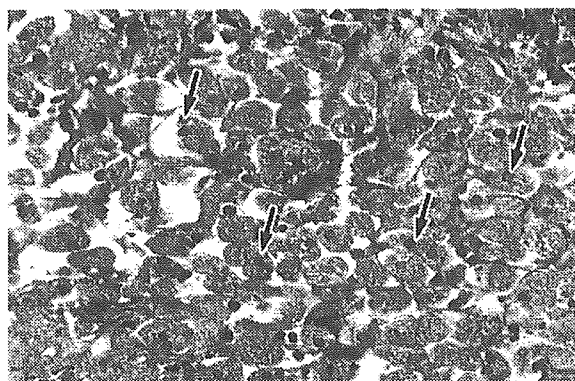


Fig. 2. 大腸生検組織所見

赤血球(→)を貪食したアメーバ栄養体が多数認められる。

考 察

びらんは上皮粘膜が欠損した状態を指し、周辺粘膜よりわずかに隆起し、その中央部は発赤調を示し、白苔はないかあっても小さいものをいう²⁾。大腸におけるびらんは種々の病態で出現するが、非特異的および特異的炎症性病変を念頭において検索を進めるのが一般的である。慢性の経過を示す炎症性腸疾患で、便中に有意な起炎菌が検出されない場合、潰瘍性大腸炎や Crohn 病などの非特異的大腸炎が診断の鑑別にあげられる。潰瘍性大腸炎にみられるびらんの特徴は、粘膜下の血管透見性消失あるいは発赤や浮腫を示す粘膜を背景に、びらんがびまん性ないし連続性に存在するこ

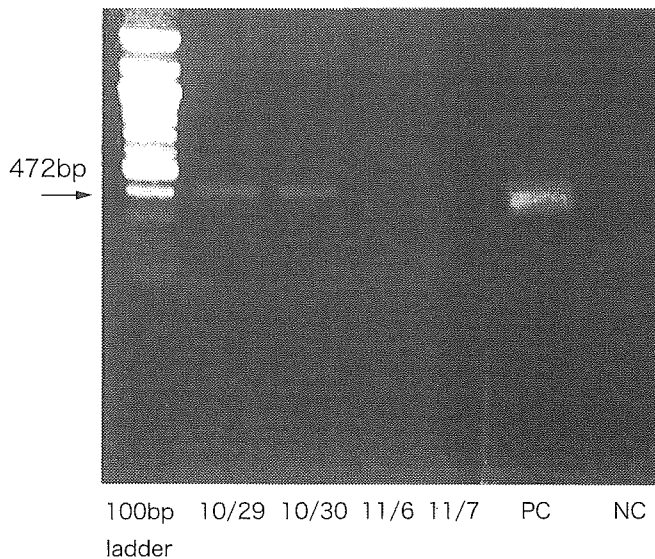


Fig. 3. 赤痢アメーバの PCR 結果

PCR 法で便中アメーバ遺伝子を検索すると、治療開始前には 472 bp の位置にバンドが明瞭に認められるが、治療 1 週間後には検出されない。

PC: positive control, NC: negative control

とである³⁾。一方、Crohn 病ではアフタ様と表される小潰瘍が腸管の長軸方向に沿って配列し、次第に癒合して縦走潰瘍を形成していくが、潰瘍周囲の介在粘膜には血管透見性を認め⁴⁾、discrete ulcer と表現されている⁵⁾。

本症例での大腸病変は小さな多発性びらんないし不整形潰瘍で、しかも潰瘍周囲の発赤が強かったため、潰瘍性大腸炎や Crohn 病との鑑別が困難

であった。しかし、この潰瘍性病変の分布は盲腸および直腸だけに限局し、2年の時間が経過しても大きな変化を認めなかった。このことは赤痢アメーバの特徴をよく反映した所見と考えられる。すなわち、経口摂取されたアメーバ嚢子は小腸下部で嚢を脱して栄養体となり回盲部で分裂・増殖する。一方、直腸付近ではアメーバ栄養体を含んだ便が停滞する部位である⁶⁾。これらのことから回盲部と直腸は赤痢アメーバでもっとも炎症性変化を示す部位と考えられている。

赤痢アメーバの確定診断はアメーバの検出によって行われるが、その方法には①検鏡による便中アメーバの検出、②生検組織中におけるアメーバの検出、③特異的抗体を用いた血清反応診断、④特異的プライマーを用いたPCR法などがあげられる。アメーバは保温された便を直接検鏡しないと検出がむずかしく、一般の細菌検査では検出されないため外来診療での診断を困難にしている。一方、生検組織中にアメーバ栄養体を証明するには、潰瘍底ないしその辺縁から正確に組織を採取する必要がある^{7,8)}。本症では多数の生検組織の1カ所において、粘膜表層の滲出物中にアメーバ栄養体がかろうじて付着していた。したがって、生検自体が適切に行われたとしても組織切片作成までの過程でアメーバ栄養体を失った可能性も十分に考えられ、組織生検だけでは確診手段としては十分とはいえない。

最近ではPCR法がアメーバの診断に用いられるようになってきているが、この方法はアメーバの遺伝子を増幅して検出するため、少量の検体でも検出感度は高い。そのうえ、アメーバ栄養体と嚢子のいずれでも検出結果に差はなく、また冷所で1週間程度は保存可能であるため、排便後ただちに検体処理する必要がない⁹⁾。さらに、プライ

マーの設定によっては形態的には区別のできない非病原性の *Entamoeba dispar* との鑑別も可能となってきている¹⁰⁾。本症では入院時に検出されたPCR法による赤痢アメーバ遺伝子が、治療開始後1週間で陰性となり、その後は症状の再発も認めていない。以上のことから、PCR法による糞便中アメーバ遺伝子の検出は赤痢アメーバの診断だけでなく、治療の効果判定にも有用であると考えられる。

PCR法による赤痢アメーバ遺伝子の検出には、糞便からのDNA抽出、PCRおよび電気泳動による結果判定などやや複雑な過程が必要であるが、海外旅行者および海外よりの入国者の増加によって症例数の増加が懸念されるため、今後PCR法のさらなる簡便化と普及が望まれる。

文 献

- 1) 竹内 勤：アメーバ赤痢。日医会誌 122(10 臨増)：84, 1999
- 2) 酒井義浩ほか：大腸びらんの診断概論。消内視鏡 3(2)：137, 1991
- 3) 松本誉之, 北野厚生：潰瘍性大腸炎。消内視鏡 3(2)：153, 1991
- 4) 牧山和也：クローン病とアフタ様びらん。消内視鏡 3(2)：161, 1991
- 5) 長廻 紘：4内視鏡診断。炎症性腸疾患, 武藤徹一郎ほか(編), 医学書院, 東京, p182-187, 1999
- 6) 牛尾恭輔ほか：寄生虫性感染症アメーバ性大腸炎。胃と腸 37(3)：415, 2002
- 7) 北野厚生ほか：アメーバ赤痢。胃と腸 32(3)：481, 1997
- 8) 宮岡正明ほか：アメーバ性大腸炎の内視鏡的検討。Prog Digest End 30：54, 1987
- 9) 阿部仁一郎ほか：赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の鑑別診断における Multiplex-PCR法の有用性。感染症誌 76(11)：921, 2002
- 10) Evangelopoulos A et al：A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann Trop Med Parasitol 94(3)：233, 2000

微生物側の要因

赤痢アメーバの病原性

TOKORO MASAHARU

所 正治

◎金沢大学大学院医学系研究科寄生虫感染症制御学

従来赤痢アメーバとされた原虫は、病原性の *Entamoeba histolytica* と非病原性の *E. dispar* の 2 種類に分類される。これら 2 種のアメーバは、シストおよび栄養型の顕微鏡検査による鑑別が困難なため、すでに 1925 年にブラントによって、その可能性が示唆されていたにもかかわらず、1978 年のサージェントなどのザイモデームによる再評価をきっかけとして議論され、ようやく 1997 年になって別種として分類されることになった。

E. dispar 感染では、重症 AIDS 患者らの易感染性宿主においても病原性を示唆する報告はないため、治療の必要はない。一方、*E. histolytica* 感染においてもまた、すべてが発症するわけではなく、多くの無症候性シストキャリアの存在が知られている。しかしながら、*E. histolytica* 感染時の取扱いは *E. dispar* とは異なり、基本的に全例が治療の適応である。これは、シストキャリアの約 10% が 1 年以内に発症する¹⁾ため、したがって、ザイモデーム、PCR、便中抗原の検出などによる *E. histolytica* の同定が重要となる。

では、*E. histolytica* による感染において無症候性シストキャリアの一部が、アメーバ赤痢(腸アメーバ症)を発症し、そして、また一部が血行性に肝膿瘍、脳膿瘍、肺膿瘍などの腸管外アメーバ症を発症するのは、いかなる理由によるのだろうか。

表 1 赤痢アメーバ症の病型

1. 無症候性赤痢アメーバ症(シストパッサー)
2. 腸アメーバ症 アメーバ赤痢(アメーバ性大腸炎)
3. 腸管外アメーバ症 肝膿瘍(腸管からの血行性播種) 肺膿瘍(血行性播種または肝膿瘍からの直接の穿破) そのほか 脳膿瘍(血行性播種) 皮膚潰瘍(肛門周囲、陰茎など)

か。この基本的な問いについての明確な答えはこれまでのところ得られていない。古くから、赤痢アメーバ症における発症の有無と病型の違いは宿主側の要因(アルコール摂取による肝障害、栄養状態、免疫にかかわる遺伝的要因など)に帰すると考えられてきたが、一方で、近年の赤痢アメーバの病原因子に関する研究の進展は、寄生原虫の腸管粘膜下への侵入と発症のメカニズムを徐々に明らかにしつつある。本稿では、これら寄生虫側の病原因子について概説し、臨床症状との関連について考察する。

■臨床症状

病型分類を表 1 に示した。

1. 無症候性シストパッサー

病原性赤痢アメーバの感染においても多くは自覚症状を伴わず、自然治癒する。一部は無症状の

表2 アメーバ赤痢の臨床像

1 週間以上の経過	94~100%
下痢	94~100%
血便	94~100%
腹痛	12~80%
体重減少	44%
発熱	10%

文献2)より改変

まま持続性感染化し、施設内集団感染などでは、感染源となりうる点で対策が重要である。

2. 腸アメーバ症

アメーバ赤痢の発症は、数週間にわたる下痢(粘血便)と腹痛のゆっくりとした増強によることが多く、体重減少が特徴的である(表2)。一方、発熱はまれであり、比較的急性発症で発熱を伴うことの多い細菌性下痢症とは異なる。肉眼的血便を認めない場合でも、便潜血反応はほとんどの場合(+)となる。また、粘血便性下痢症を伴わないアメーバ性大腸炎もあり、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患との鑑別が重要となる。確定診断には、便検体の顕微鏡的検査および内視鏡検査時の生検サンプルによる組織学的検査(図1)による栄養型・シスト検出がキーとなるが、1回(1カ所)のみのサンプリングでは3分の1以下の検出率なので繰り返しの検査が望ましいとされる²⁾。

3. 腸管外アメーバ症

肝膿瘍が大部分であり、肺、脳などの腸管外アメーバ症は非常にまれである。アメーバ性肝膿瘍は、成人男性に多く、典型的には発熱を伴う腹痛として発症する。他覚所見としては、右季肋部の圧痛が特徴的であり、時に咳嗽、肺音異常、黄疸を伴う³⁾(表3)。画像所見としては、CT、USで認められる肝臓における境界明瞭な占拠性病変が特徴的であり(図2)、時に胸部X線像において右横隔膜の挙上(図3)、右胸水の貯留が認められる。アメーバ性肝膿瘍の症例での糞便からの赤痢アメーバの検出は18%にとどまり、下痢症の合

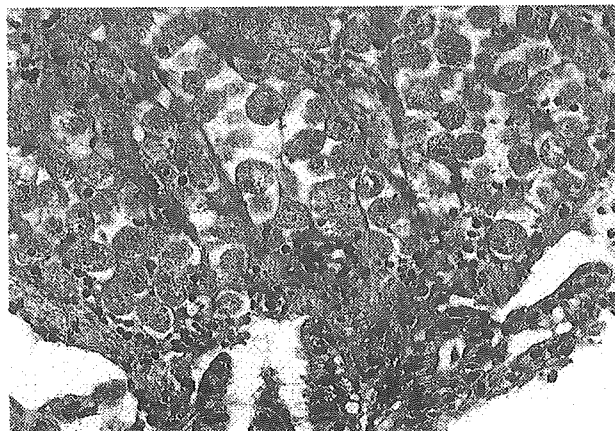


図1 大腸内視鏡検査時に潰瘍底より得られた生検組織による腸アメーバ症所見(HE染色 ×400)

粘膜下組織へ浸潤した多数の栄養体が認められ、一部の栄養型の細胞質には貪食された赤血球(赤血球貪食像)がみられる。

併も14~30%である³⁾(表3)。つまり、多くのアメーバ性肝膿瘍症例ではアメーバ赤痢の合併をみないことから、腸アメーバ症とアメーバ性肝膿瘍の病原因子は異なる可能性がある。肺膿瘍には、栄養型の血行性播種と肝膿瘍穿破による直接の波及がありうる。血行性播種としては、脳膿瘍が同様の機序で発生する。一方、肝膿瘍からは、心膜腔への穿破(特に左葉膿瘍)のほか、腹腔内への穿孔も起こりうるが、腸管の穿孔と異なり肝膿瘍の内容物は無菌的なことから腹腔内穿孔の症状は比較的マイルドである。

■赤痢アメーバの病原因子

経口摂取された赤痢アメーバのシストは、小腸または大腸内で脱囊する。大腸粘膜上の栄養型は腸内細菌を貪食し、分裂による増殖を続けながら定着する。この定着状態から、粘膜下層への侵入までの経過と現在までに判明している関連因子の概要を図4に示した。

1. 細胞外マトリックスの突破

大腸内に定着した病原性赤痢アメーバ *E. histolytica* からは非病原性の *E. dispar* の10~1,000倍のCP(cysteine proteinase)が分泌され

表3 アメーバ性肝膿瘍の臨床像

自覚症状		他覚所見	
発熱	67~87%	発熱	87~90%
腹痛	62~88%	肝圧痛	80~90%
下痢	14~30%	肝肥大	43~77%
咳嗽	10~11%	肺音異常	43~47%
体重減少	33~53%	黄疸	10~13%

文献2), および3)より改変

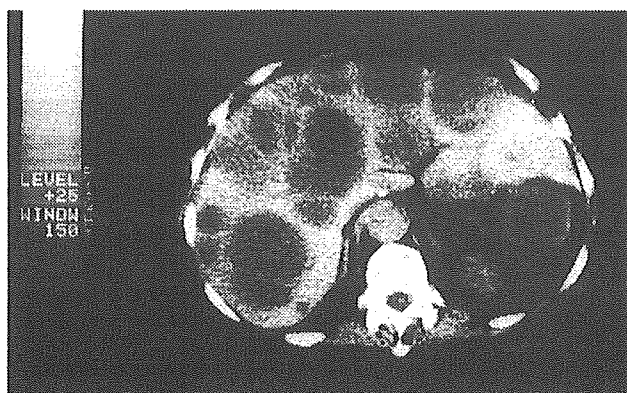


図2 アメーバ性肝膿瘍のCT像

大小の占拠性病変が右葉を中心に認められる。通常は薬剤治療により膿瘍は吸収され、ドレナージは必要ないが、左葉の肝膿瘍は心膜腔への穿破の危険性があり、ドレナージの適応である。

ている⁴⁾。赤痢アメーバのCPは細胞外マトリックスの成分であるコラーゲン、エラスチン、フィブリノーゲン、ラミニンに対する分解活性をもち、また、粘液中に存在する分泌型IgAも分解する。また、*E. histolytica* 感染既往患者の約80%がCPに対する抗体をもつことからCPは赤痢アメーバの病原因子として重要な役割を果たしていると考えられる²⁾。

2. 腸管粘膜上皮細胞への接着

赤痢アメーバの栄養型は、ガラクトース(およびN-acetylgalactose)に特異的に結合するGal/GalNAc lectinにより宿主細胞の細胞膜に接着する。Gal/GalNAc lectinは、粘膜上皮細胞以外にも、好中球、CHO細胞、Jurkat細胞などに接着し、接触性の細胞融解を誘導することが知られている²⁾。接触性細胞融解は、約70アミノ酸

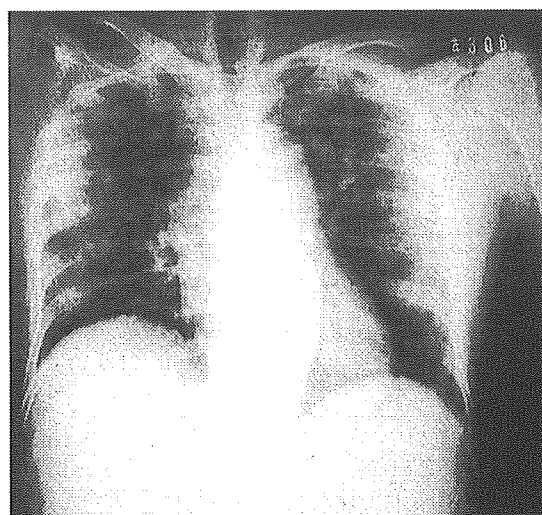


図3 肝膿瘍穿破による横隔膜下膿瘍の胸部X線像(右横隔膜の挙上)

の短いポリペプチドからなる少なくとも3種のアメーバポア(amoebic pore-forming peptides)による宿主細胞膜の透過性亢進(ペプチド分泌によるイオンチャンネル様のpore-forming)により誘導される⁵⁾。また、詳細なメカニズムは不明だが、接触性細胞融解は宿主細胞のアポトーシスの誘導によっても起こっている。

また、死に瀕した宿主細胞からは、IL-1 β の前駆体(pIL-1 β)、IL-1 β 、IL-8およびcyclooxygenase(COX)-2などのメディエーターが放出され、感染局所への好中球およびマクロファージの遊走を含む宿主免疫応答を引き起こす³⁾。

3. 腸管上皮細胞の崩壊

これらのメディエーターによる刺激は周辺の宿主細胞を活性化し(おそらく部分的にはnuclear factor- κ Bを介して)、また、CPはpIL-1 β の

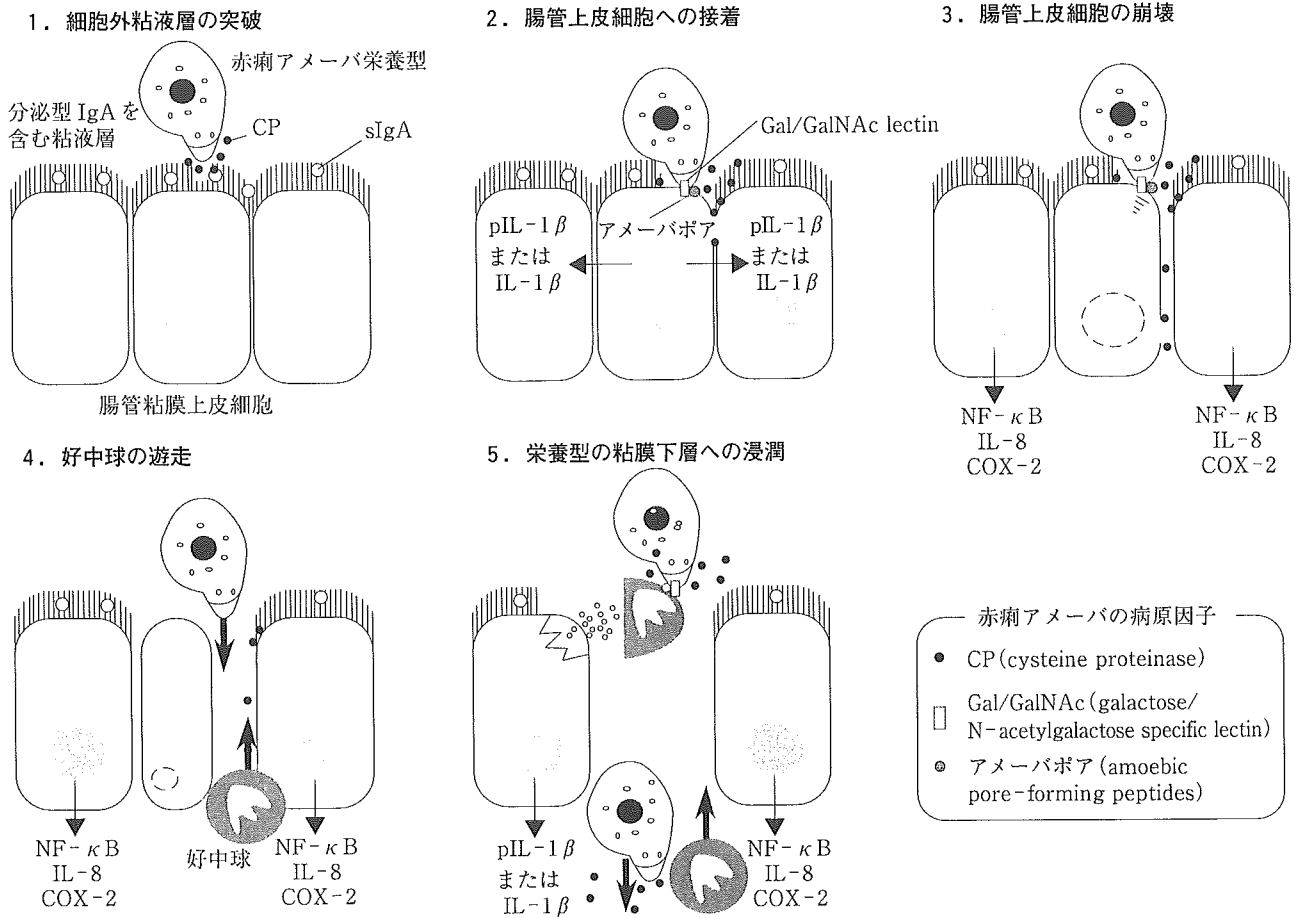


図4 赤痢アメーバによる組織侵入のスキーム

IL-1βへの変換を触媒し、さらにこの効果を高める⁶⁾。以上のプロセスを通じて腸管上皮細胞の細胞外マトリックスはCPによる溶解作用を受け、隣接細胞とのタイトジャンクションの間隙から栄養型の侵入が可能となる。

4. 好中球の遊走

炎症局所への好中球の遊走により、宿主細胞間のタイトジャンクションはさらに崩壊する。

5. 栄養型の粘膜下層への侵入

局所へ遊走した好中球は赤痢アメーバ栄養型の接触性細胞融解作用によって崩壊し、さらなる炎症局面拡大の原因となる。このように、局所においては宿主による炎症反応が赤痢アメーバによる粘膜上皮へのダメージに関与することが示されているが、同時に、アメーバの感染のコントロール

にはこの宿主免疫応答が重要であることもまた示唆されている³⁾。例えば、潰瘍性大腸炎と誤診されステロイドを投与された例では、局所の炎症の軽減と同時に、病期は明らかに延長する⁷⁾。

アメーバ性肝膿瘍の形成における赤痢アメーバによる接触性の細胞融解の役割ははっきりしていない。むしろ、炎症性細胞(マクロファージ、好中球など)による初期炎症反応が膿瘍形成において重要な役割を果たすことが示唆されている⁸⁾。実際、膿瘍内容物から赤痢アメーバの栄養型が検出されることはまれで、膿瘍周辺の組織に栄養型の浸潤像が認められることが多い。

赤痢アメーバの病原性の評価は、*E. histolytica* と *E. dispar* のように今となっては明らかな病原性株と非病原性株の分類上の取扱いの決定にすら時間がかかったことに象徴されるように、非常に

困難な仕事である。臨床からの *E. histolytica* 分離株の病原性は、培養期間の長さや培養条件(無菌培養かどうかなど)によって変化し、また、腸管壁への侵入と膿瘍の形成は必ずしも同一の病原性によって評価できるわけではなさそうである。しかしながら、本稿で示したように、多くの病原性因子がすでに解明され、また、宿主による炎症反応の病原性に果たす役割の一端も明らかになってきた。したがって、遠くない将来、病原性のメカニズムに基づいた、より効果的な治療、さらには感染および発症予防のアプローチが実現可能であろうと期待している。

- 1) Gathiram V, Jackson TF : A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 72 : 669-672, 1987.
- 2) Petri WA Jr. : Recent advances in amebiasis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33 : 1-37, 1996.
- 3) Stanley SL Jr. : Amoebiasis. *Lancet* 361(9362) :

1025-1034, 2003.

- 4) Que X, Reed SL : Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13 : 196-206, 2000.
- 5) Leippe M, Herbst R : Ancient weapons for attack and defense : the pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *J Eukaryot Microbiol* 51 : 516-521, 2004.
- 6) Zhang Z, Wang L, Seydel KB *et al.* : *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme(ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 37 : 542-548, 2000.
- 7) Reed SL : Clinical Manifestations and Diagnosis, AMEBIASIS, Series of Tropical Medicine : Science and Practice-Vol.2, p113-125, Ravdin JI eds., Imperial College Press, London, 2000.
- 8) Eckmann L, Reed SL, Smith JR *et al.* : *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 96 : 1269-1279, 1995.

予防接種の手びき

〈第十版〉

木村三生夫・平山宗宏・堺 春美 著 A5判630頁 定価6,825円(本体6,500円+税5%)

05年4月施行の「結核予防法」、「定期予防接種実施要領」に全面对応

◎BCGの定期予防接種が、0～6カ月未満の乳児へ

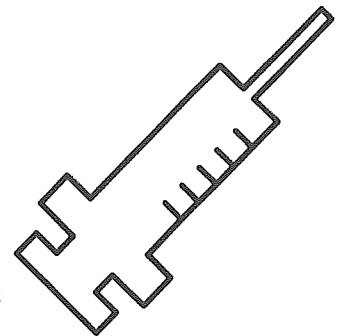
ツ反を廃止して、直接接種にした理由

接種を躊躇するときの考え方

接種局所の浸潤、膿瘍への対応、ほか

◎今後の予防接種の展望

◎付録 予防接種関連法令・通知を最新のものに更新



近代出版

〒150-0002 東京都渋谷区渋谷2-10-9
TEL 03-3499-5191 FAX 03-3499-5204
<http://www.aya.or.jp/~kindai-s>

知的障害者更正施設における赤痢アメーバ等 腸管寄生原虫の感染実態調査

東京都健康安全研究センター 微生物部

鈴木 淳・村田理恵・柳川義勢

慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

小林正規・竹内 勤

Key Words : 赤痢アメーバ, ジアルジア, 施設内感染

はじめに

1999年の感染症法施行により、下痢症の原因となる腸管寄生原虫症として赤痢アメーバ症、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症の症例数が報告されるようになり、その発生状況が明らかとなってきた。特に赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) に感染し、下痢、腹痛などの症状を示す患者報告数は年々増加傾向にあり、知的障害者施設においても赤痢アメーバ症の集団感染事例が報告¹⁾されている。

下痢症の原因となる腸管寄生原虫の人への感染は、主に無症状感染者の糞便中に排出される感染型原虫(シストまたはオーシスト)を手指や飲食物を介して経口摂取することに

より成立する。したがって、適切な糞便の処理や手洗いによりその感染拡大防止が可能であるが、自ら感染防止対策を行うことが困難な人が利用する施設においては、感染者の存在が施設内での集団感染につながるものが危惧される。そこで、知的障害者更生施設における赤痢アメーバを中心とした腸管寄生原虫感染実態調査を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

1) 調査対象施設

知的障害者更生施設6施設の協力のもと、平成15年10月～平成17年1月において赤痢アメーバ等腸管寄生原虫感染実態調査を

Epidemiological Study on Intestinal Protozoan Infections in Institutions for People with Intellectual Disabilities

Jun Suzuki*
Yoshitoki Yanagawa*

Rie Murata*
Tsutomu Takeuchi**

Seiki Kobayashi**

* Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

** Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

行った。

2) 調査対象者

本調査に同意の得られた知的障害者更生施設の利用者および利用者に陽性者が認められた場合には、その関係職員を対象に合計 646 名 (男性 362 名, 女性 284 名) について調査を実施した。検体は検査時に本人が特定できないように施設側で氏名の番号化を行ったうえ、検体番号, 性別, 年齢のみが記載されたものを供試した。

3) 検査材料

糞便約 5 g を検査材料とした。また, 検査を行うまでは 4°C で保存した。

4) 検査方法

①顕微鏡検査: ホルマリン・エーテル法により腸管寄生原虫の濃縮を行い, ヨード・ヨードカリ染色後, 顕微鏡下で形態的な同定検査を行った。

②赤痢アメーバ特異抗原の検出: *E. histolytica* II (TECHLAB 社) キットを用い赤痢アメーバ特異抗原の検出を行った。検査方法はキットの使用方法に準拠した。

③赤痢アメーバの分子生物学的同定

アメーバのシストが多数認められた場合, QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN 社) を用い DNA を抽出し, 小垂粒子リボゾーム RNA (SSUrRNA) をコードする遺伝子を標的とした Multiplex-PCR 法²⁾ により赤痢アメーバおよび *E. dispar* を識別した。

④ジアルジアの遺伝子型の検討:

顕微鏡検査でジアルジアが認められた場合, ③と同様に DNA を抽出した後, ジアルジアの遺伝子型の違いを検討するためグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) 遺伝子の部分領域 (約 220bp) を標的とした PCR³⁾ を行った。

PCR は GDHF3-primer (5'-TCCACCCCT CTGT CAACCTTTC-3') および GDHB5-primer (5'-AAT GTCGCCAGCAGGAACG-3') を用いて表 1 に示した PCR 反応液組成で行った。反応条件は熱変性 94°C 40 秒 (一回目は 3 分),

アニーリング 59°C 40 秒, 伸長反応 72°C 1 分間 (最終回は 7 分) を 35 回繰り返した。反応後は 3% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, PCR 増幅産物を確認した。得られた PCR 増幅産物を精製後, GDHF3-primer を用いた BigDye Terminator Cycle Sequencing 法によるシーケンス反応を行った。次に, ABI PRISM 310 genetic analyzer で塩基配列を決定後, ジアルジアの株間の塩基配列を比較検討した。

表 1 PCR 反応液の組成

Ex Taq DNA polymerase (5U/μL)*	0.2 μL
10 × PCR Ex Taq Buffer	5.0 μL
dNTP mixture (2.5mM each)	5.0 μL
GDHF3-primer (10μM each)	1.0 μL
GDHB5-primer (10μM each)	1.0 μL
Template DNA	10.0 μL
Distilled water	up to 50 μL un to 50 μL

*: タカラバイオ株式会社

結果および考察

今回, 感染実態調査を行った 6 施設, 646 名の結果を表 2 に示す。

ホルマリン・エーテル法による顕微鏡検査, *E. histolytica* II キットを用いた赤痢アメーバ特異抗原検出検査および PCR 法を用いた赤痢アメーバの遺伝子検出検査を行った結果, 6 施設いずれからも赤痢アメーバは認められなかった。しかし, 病原性はないが赤痢アメーバと同一の感染経路をとる大腸アメーバ, 小形アメーバの感染が 4 施設 (施設 A, B, E, F), 計 36 名 (重複感染者 3 名) に認められた。また, ジアルジア (5 類感染症) が 3 施設 (計 8 名) から認められた。また, 陽性者と接触した職員からはジアルジア等の腸管寄生原虫は認められなかった。

表2 施設別腸管寄生原虫の感染状況

	施設					
	A	B	C	D	E	F
検査件数	83	160	165	42	73	123
赤痢アメーバ陽性者数	0	0	0	0	0	0
大腸アメーバ陽性者数	7*	11	0	0	2	8**
小形アメーバ陽性者数	2	5	0	0	0	4
ジアルジア陽性者数	0	0	6	0	1	1

* : 小形アメーバとの重複感染者が2名

** : 小形アメーバとの重複感染者が1名

表3に示したように大腸アメーバおよび小形アメーバの感染が認められた施設利用者の年齢は20歳代から60歳代と様々な年代で感染が認められた。また、性別は88.9% (32/36) が男性であった。一方、ジアルジアの感染が認められた3施設利用者は男性が5名、女性が3名の合計8名であった。年齢は20歳未満が4名、20歳代が1名と比較的低年齢にその感染が認められた。

た結果、図1に示したように6検体すべてに増幅が認められた。そこで、得られたPCR増幅産物の塩基配列について解析したところ、塩基配列はすべて一致していた。このことから、施設Cにおけるジアルジアの感染経路は、同一である可能性は否定できないが、6名中、3名は女子児童で、入所している建物も異なるという条件から、少なくとも男性と女子児童では感染経路が異なると推察された。

図3 年代、性別における腸管寄生原虫の感染状況

年代	検査件数	ジアルジア		大腸アメーバ		小形アメーバ	
		男性	女性	男性	女性	男性	女性
20歳未満	48	1	3	0	0	0	0
20歳代	60	1	0	0	0	1	0
30 "	87	1	0	5	0	3	0
40 "	134	0	0	9	2	3	0
50 "	178	1	0	7	1	2	0
60 "	88	1	0	4	0	1	1
70歳以上	51	0	0	0	0	0	0
計	646	5	3	25*	3	10	1

* : 小形アメーバの重複感染者が3名

6名のジアルジア感染者が認められた施設Cにおけるジアルジアの遺伝子型を検討するため、GDH遺伝子を標的としたPCRを行っ

ジアルジアの感染が認められた8名とも下痢を起こしていない無症状感染者であると報告されたが、施設担当医の判断により駆虫

がなされたため、フォローアップの検査を行った結果、8名全員が陰性であった。

今回の調査により、ジアルジアの感染が確認され、必要に応じ駆虫できたことによりその蔓延防止に一定の成果が得られたと考えられた。施設利用者の中に赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫感染者がいた場合、他の施設利用者への感染が拡大することが明らかになっていることから、今後もこのような調査を継続していくことが重要であると考えられる。

文献

- 1) 小林正規, 他(2003): わが国における施設内赤痢アメーバ症の現状と問題点, 病原微生物検出情報, 24(4), 81-82.
- 2) 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(3), 233-240.
- 3) Abe N. et al. (2003): Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene, J. Vet. Med. Sci., 65(1), 29-33.