

図1 光学的顕微鏡像

微分干渉像：(A) 未成熟オーシスト (C) 発育試験7日目，蛍光観察像 (UV 励起)：  
(B) 未成熟オーシスト (D) 発育試験7日目

表1 本法で用いられたプライマーのリスト

Primer Designation	Specificity	Sequence (5'-3')	Amplison Size (bp)	Designated Application
F1E(forward)	<i>Cyclospora</i> spp.	TACCCAATGAAAACAGTTT	636	1st PCR
R2B(reverse)	and <i>Eimeria</i> spp.	CAGGAGAAGCCAAGGTAGG		
ESSP841(forward)	<i>Eimeria</i> spp.	GTTCATATTTGTGGTTTCTAGGACCA	174	
CC719(forward)	<i>C. cayentanensis</i>	GTAGCCTTCCGCGTTCG	298	
	<i>C. cecepihathi</i>			2nd nested-multiplex
PLDC661(forward)	<i>C. colobi</i>	CTGTCGTGGTCATCGTCCGC	361	PCR
	<i>C. papionis</i>			
CRP999(reverse)	-	CGTCTCAAACCCCTACTGTCCG	-	-

査：特に異常なし。糞便寄生虫検査にて、サイクロスポーラまたはイソスポーラ様原虫検出。精査のためショ糖遠心浮遊法を実施し、蛍光顕微鏡のUV励起光による自家蛍光および形態よりサイクロスポーラのオーシストと同定された。また、便培養にて腸管病原性大腸菌 (2+)。

治療経過：3月16日よりST合剤 (バクタ顆粒®) 4g 経口を9日間投与。また、ビオスリー 3g 経口が同時に処方された。3月24日に再受診。自覚症状は80%改善とのことから、バクタ、ビオスリーが5日間追加処方された。29日に便検査が実施され、オーシスト陰性を確認。31日に終診とした。

#### 鏡検およびPCR法による検出：完治確認と種鑑別の評価

3月16日の初診時および3月29日の治療後の便検体について、オーシストの形態観察、発育試験、PCRによる検出が実施された。

3月16日のバクタによる治療前の糞便からショ糖遠心浮遊法により精製したオーシストの顕微鏡的検査では、顆粒状の内容物を包蔵する平均直径  $8.3\mu\text{m}$  ( $7.6\sim 8.7\mu\text{m}$ ) の円形のオーシストが多数検出された (図1A)。また、オーシストを5%重クロム酸カリウム溶液に移し、室温で1週間の発育試験を実施したところ、2コの楕円形のスポロシストの形成が認められた (図1C)。蛍光顕微鏡観察による自家蛍光は未成熟オーシストではオーシスト壁に (図1B)、また、発育試験後ではオーシスト壁とわずかにスポロシスト壁にもブルーの蛍光として認められた (図1D)。また、3月29日の治療後の便検体では、サイクロスポーラのオーシストは検出されなかった。

PCRでは、18S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子をターゲットとした nested-multiplex PCR を実施し

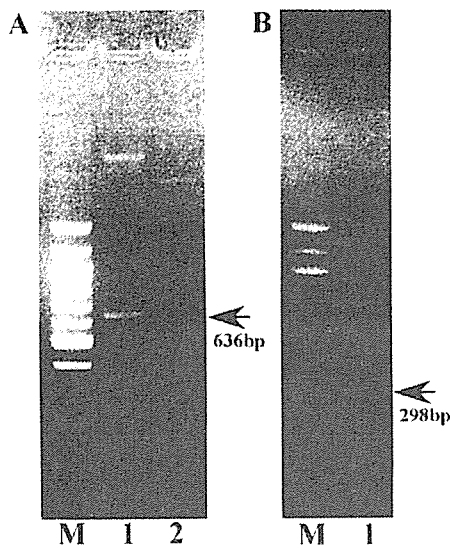


図2 PCR増幅産物のゲル泳動像  
 (A) 1st PCRの結果, M: 100 bp ladder,  
 1: 治療前, 2: 治療後  
 (B) Multiplex-PCRの結果, 治療前の1st PCR  
 サンプルをテンプレートに2nd PCRを実施

た。プライマー (表1) および PCR 条件は, Takara ExTaq DNA polymerase (TAKARA) を使用した他はすべて Orlandi らの原法<sup>1)</sup> に従い, テンプレートとしては, 糞便検体よりシヨ糖遠心浮遊法によって濃縮したオーシストから QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した genomic DNA を用いた。また, すべての増幅産物はダイレクトシークエンスによって全長の塩基配列を決定した。本法においては, ユニバーサルプライマーを用いた 1st PCR によって, *Cyclospora* spp. および *Eimeria* spp. 由来の増幅産物 (636bp) を検出可能である (表1)。また, 2nd PCR では *Cyclospora cayetanensis* に特異な増幅産物 (298bp), *C. cercopithecii*, *C. colobi*, *C. papionis* に特異な増幅産物 (361bp), そして, *Eimeria* spp. に特異な増幅産物 (174bp) のいずれかを検出可能なマルチプレックス PCR 法を用いる (表1)。治療前, 治療後の糞便検体からの PCR での検出試験では, 治療前では陽性, 治療後では陰性となった (図2A)。種鑑別のための 2nd PCR では, *C. cayetanensis* 特異的な増幅産物が認められ (図2B), この結果は, 1st PCR および 2nd PCR の増幅産物のシークエンス結果によって確認された。

## 考 察

*C. cayetanensis* が 1994 年に新種として記載されて以来<sup>2)</sup>, 本原虫が *Cryptosporidium* spp. のような人獣共通感染症である可能性は常に議論されてきた。現在, 本原虫がヒトのみを宿主とされているのは, 1999 年にハイチのサイクロスポロラ流行地域で実施されたブタ, ウシ, ウマ, ヤギ, イヌ, ネコ, モルモット, ニワトリ, アヒル, ハトを含む総数 327 サンプルの解析において, サイクロスポロラが検出されなかったという Eberhard らの報告をベースとし<sup>3)</sup>, 他のリザーバ探索のトライアルがこの知見を支持してきたことによる。しかし, 同年に同じく Eberhard らはエチオピアにおいて African green or velvet monkey, colobus monkey そして olive baboon の 3 種の霊長類から, *C. cayetanensis* と形態的に鑑別不可能な *Cyclospora* spp. を見出し, 遺伝子解析での *C. cayetanensis* との違いを理由に, それぞれに *C. cercopithecii*, *C. colobi*, *C. papionis* と新種名を提案した<sup>4)</sup>。これらの *C. cayetanensis* 近縁種の存在は, 2001 年の続報<sup>5)</sup>, さらに 2004 年の Legesse らの報告によって支持され<sup>6)</sup>, まず間違いないものと考えられるが, ヒトから分離され形態的観察で *C. cayetanensis* とされてきたこれまでの臨床検出例に, 果たしてこれらの *C. cayetanensis* 近縁種が含まれるか否かは, 分子疫学的なアプローチによる報告がわずかである現状では不明である。

この点を評価していく上で, 今回評価を行った 18S rRNA 遺伝子をターゲットとした 1st PCR プライマーセットによる増幅産物は, その塩基配列内に上記の *Cyclospora* spp. および *Eimeria* spp. のすべてを鑑別可能な変異を含むことから, 種鑑別の上で非常に有用な検査法と考えられた。しかしながら, 2nd multiplex PCR による種特異的な鑑別は, *C. cayetanensis* と上記の 3 種の *C. cayetanensis* 近縁種および *Eimeria* spp. のみを特異的に検出可能であり, おそらく存在するであろう上記 3 種以外の *C. cayetanensis* 近縁種を見逃す危険性がある。つまり, 臨床から分離されるサイクロスポロラにおける *C. cayetanensis* 近縁種の存在を確実に検出するためには, 1st PCR による増幅産物の全長配列決定が必須

である。

#### 結 語

本研究によって評価した Multiplex-PCR 法の 1st PCR による増幅産物 (636 bp) のシーケンス配列決定によるサイクロスポーラ検出は、臨床検体からの検出法としても、また、分子疫学的なシーケンスデータ収集法としても応用可能な優れた方法と考えられた。

#### 文 献

- 1) Orlandi, P. A. *et al.* (2003) : Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*, 69 (8), 4806-4813.
- 2) Ortega, Y. R. *et al.* (1994) : A new coccidian parasite (*Apicomplexa* : *Eimeriidae*) from humans. *J Parasitol*, 80 (4), 625-629.
- 3) Eberhard, M. L. *et al.* (1999) : Survey for *Cyclospora cayetanensis* in domestic animals in an endemic area in Haiti. *J Parasitol*, 85 (3), 562-563.
- 4) Eberhard, M. L. *et al.* (1999) : Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys : *C. cercopitheci* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg Infect Dis*, 5 (5), 651-658.
- 5) Eberhard, M. L. *et al.* (2001) : A survey for *Cyclospora* spp. in Kenyan primates, with some notes on its biology. *J Parasitol*, 87 (6), 1394-1397.
- 6) Legesse, M. *et al.* (2004) : Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Trop*, 90 (3), 231-236.

# G.I. Research

別刷

---

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 浜町花長ビル

特

集

消化管寄生虫症の最近の話題

Gastrointestinal  
Research

## クリプトスポリジウム症

所 正治\* 井関基弘\*

## Summary

日和見感染症の、また旅行者下痢症の起原虫として重要な病原性腸管内寄生原虫であるクリプトスポリジウムの研究は、分子疫学的な遺伝子型解析によるさまざまな報告の増加と、ゲノムプロジェクトによって見出された原虫の代謝経路の知見の蓄積によって、これまでには想像もできなかった幅広いアプローチによる、宿主特異性・病原性と遺伝子型との相関解析や、ラショナルドラッグデザインによる薬剤開発のための研究を可能にしはじめた。これらの知見にもとづく臨床での応用が可能な分類体系の構築および治療薬の開発は、今後の課題である。

## Key words

腸管寄生原虫 遺伝子型解析 代謝解析 ラショナルドラッグスクリーニング

## はじめに

病原性腸管寄生原虫クリプトスポリジウムは、経口摂取されたオーシストから脱囊したスポロゾイトが小腸の絨毛上皮細胞内に寄生することによって激しい下痢症を引き起こす。旅行者下痢症の原因原虫として、また感染源であるオーシストが通常の塩素殺菌に対して強い耐性をもっていることから、水道水汚染による集団下痢症の原因としても知られている。大規模なアウトブレイクとしては、日本国内では1996年に埼玉県越生町において発生した約9,000人の感染が、また海外では1993年の米国ミルウォーキーでの約40万人の感染が知られている。感染症新法の5類、全数把握届出疾患である本原虫症のわが国での届け出人数

は、2002年(108人)、2003年(8人)、2004年(91人)、2005年(9人)とわずかである。しかし、本原虫は通常の検査項目には含まれず、しかも健常人では1週間～10日ほどで自然治癒をみることから、ほとんどの症例が感冒性腸炎などとして見過ごされている可能性がある。実際、当教室における先天性免疫不全症例(低 $\gamma$ グロブリン血症、高IgM症候群など)における年余にわたる慢性下痢症での糞便検査においては、本原虫がしばしば検出され、未診断のままに経過している本原虫症は、わが国においても少なくはないものと考えられる。

一方、クリプトスポリジウム症は、AIDS、移植手術後、抗癌剤治療時などの免疫不全状態の宿主においては、慢性化、重症化し、時に死の転帰を取りうる危険な日和見感染症でもある。Highly

\* TOKORO Masaharu, ISEKI Motohiro/金沢大学大学院医学系研究科寄生虫感染症制御学

表 1. クリプトスポリジウムにおける遺伝子型同定法一覧

ターゲット遺伝子	適用
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 18 SrRNA</li> <li>・ Hsp 70</li> <li>・ COWP</li> <li>・ <math>\beta</math>-Tubulin</li> <li>・ ポリスレオニン T</li> <li>・ アクチン</li> </ul>	種および遺伝子型鑑別
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 60 kDa グリコプロテイン</li> <li>・ Microsatellites</li> <li>・ 核外二重鎖 RNA</li> </ul>	遺伝子型内のサブタイプ鑑別

Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) 以前の調査結果だが、AIDS 患者において診断される 2 番目に多い日和見感染症として、その死亡率が他の感染症に罹患した患者と比較して 2 倍以上であると報告され<sup>1)</sup>、クリプトスポリジウムは AIDS 診断の指標疾患でもある。AIDS における本症の危険性は、前記のミルウォーキーにおけるアウトブレイク後の 2 年間に約 400 人の AIDS 患者らが死亡したと報告されたことにも示されている<sup>2)3)</sup>。このように、免疫不全に合併するクリプトスポリジウム症では死亡が少ないが、その理由は何よりも治療薬が存在しないことにある。病期短縮の効果が認められるとされる paromomycin, アジスロマイシン, また 2005 年 6 月に米国食品医薬品局 (米国 FDA) によって抗クリプトスポリジウム薬として認可された nitazoxanide などが治療には用いられているが、いずれも免疫不全症例での効果は未確定であり、しばしば予後は不良である。したがって、AIDS におけるクリプトスポリジウム症に関しては、HAART による原疾患の治療がこれまでのところ唯一最善の方法とされている<sup>4)</sup>。このように、本原虫症については多くの課題があり、その解決に向けたさまざまな研究が進められている。

そのなかから本稿では、遺伝子型解析を中心とした分子疫学、および、ゲノムプロジェクトによっ

て明らかになってきた本原虫の代謝経路にもとづく創薬のアプローチに的を絞って概観する。

## 1 ■ 分子疫学

### 1) 遺伝子型同定法

クリプトスポリジウムには多くの種および遺伝子型が報告されているが、形態的には鑑別不可能なものも多く、浄水・環境水および臨床糞便検体のオーシストからの種の同定には、おもにジェノミック DNA をテンプレートとした PCR アンプリコンの制限酵素処理断片サイズの解析 (restriction fragment length polymorphism: PCR-RFLP) 法およびシーケンス法が用いられている。また、リアルタイム PCR を用いたより高感度な方法、さらに各種および遺伝子型内での亜型を検出するより解像度の高いいくつかの方法も報告されている (表 1)。これまで用いられてきたターゲット遺伝子はアセチル CoA シンターズ遺伝子<sup>5)</sup>、熱ショック蛋白質 (heat shock protein 70: Hsp 70)<sup>6)</sup>、オーシスト壁蛋白 (*Cryptosporidium* oocyst wall protein: COWP) 遺伝子<sup>7)</sup>、小亜粒子リボソーム RNA (small subunit of ribosomal RNA: SSUrRNA) 遺伝子<sup>8)</sup>、ポリスレオニン T (polyT) 遺伝子<sup>9)</sup>などであるが、これらのターゲット遺伝子のなかでは、とくに 18 S ribosomal RNA (SrRNA) 遺伝子、COWP 遺伝

子について多くのリファレンスが報告され、ほぼすべての種と遺伝子型の鑑別が可能であり、事実上のスタンダードとなっている。しかし、これらの方法には問題点も指摘されている。従来、クリプトスポリジウム感染においては、異なる遺伝子型（種）間の混合感染は、非常にまれであるとされてきた。この点は、宿主特異性の差異により混合感染の場合でも宿主内で1種のみが選択的に定着する可能性とともに<sup>10)</sup>、上記標準法による遺伝子型決定がユニバーサルプライマーを用いた nested PCR 法を用いているために、DNA サンプル中の混合感染の検出にバイアスのかかっている可能性が指摘されている。また、より高感度なりリアルタイム PCR を用いた方法では混合感染の検出率を 30%以上とした報告もあり、この点については今後の詳細な検討が必要である。

## 2) クリプトスポリジウムの疫学

表 2<sup>11)</sup>に、ヒト由来のクリプトスポリジウムの種および遺伝子型の集計を示す。ヒトから検出されるクリプトスポリジウムは、おもにヒトのみに感染する *Cryptosporidium hominis* (宿主特異性の違いから 2002 年 12 月に別種として確立、従来の *C. parvum* genotype 1, あるいは human genotype) と、幅広い哺乳類を宿主とする人獣共通感染症型の *C. parvum* (genotype 2, bovine genotype) の 2 種であり、健康人の症例では 97% 以上が、また免疫不全症例においても 80% 以上が上記 2 種によって占められる<sup>11)</sup>。その他、現在までに命名されているクリプトスポリジウムとその宿主は *C. meleagridis* (トリとおそらく哺乳類), *C. muris* (マウス), *C. canis* (イヌ), *C. felis* (ネコ), *C. bovis* (ウシ), *C. andersoni* (ウシ), *C. suis* (ブタ), *C. wrairi* (モルモット), *C. baileyi* (ニワトリ), *C. serpentis* (ヘビ), *C. saurophilum* (トカゲ), *C. molnari* (海産魚), *C. galli* (ニワトリ, フィンチ) など 13 種もあり、これらについてもヒトへの感染性の有無が問題とされてきた。

表 2. クリプトスポリジウムの遺伝子型  
同定報告にみる種および遺伝子型  
(1999~2004)

種および遺伝子型	報告数 (%)	
	正常人	免疫不全
<i>C. hominis</i>	1,798 (51%)	140 (23%)
<i>C. parvum</i>	1,606 (46%)	341 (57%)
<i>C. meleagridis</i>	36 (1%)	64 (11%)
<i>C. felis</i>	11 (0.3%)	33 (6%)
<i>C. canis</i>	12 (0.3%)	15 (2%)
<i>C. muris</i>	—	3
<i>C. suis</i>	—	1
cervine genotype	9 (0.2%)	—
monkey genotype	2	—
総計	3,496	597

(Caccio SM *et al*, 2005<sup>11)</sup>より改変引用)

表 2<sup>11)</sup>に示したように、*C. meleagridis* をはじめいくつものクリプトスポリジウムは明らかにヒトへの感染性を示し、それ以外でも、とくに免疫不全のヒトにおいては、ヒト以外の生物に宿主特異性をもつクリプトスポリジウムの感染が無視できないことが判明してきた。分子生物学的な手法を用いた種および遺伝子型の同定は、このように多様なクリプトスポリジウムのヒトへの感染性や病原性の評価を進めていくうえで非常に重要なツールであり、またヒトのみを宿主とするとされている *C. hominis* のリザーバとなりうる他種生物の探索、アウトブレイクにおける感染経路同定など疫学的にもクリプトスポリジウム研究においては欠かせないアプローチである。

## 2 ■ 創薬

### 1) 薬剤スクリーニング

1976 年に最初のヒト感染症例が報告<sup>12)</sup>されて以来、既存薬を含む数百を超える薬剤によって抗クリプトスポリジウム作用が解析されてきた。しかしながら、薬剤への高い抵抗性の故に「natural drug resistant」とも称されるクリプトスポリジウ

ムによる下痢症を完治する薬剤は現在まで見出されていない<sup>13)</sup>。一方、既存薬のスクリーニングにクリプトスポリジウムの代謝経路の知見を組み合わせたラショナルドラッグスクリーニングおよび新薬開発のためのラショナルドラッグデザインのアプローチは、2004年の *C. parvum*<sup>14)</sup>、*C. hominis*<sup>15)</sup>のあいつぐゲノムプロジェクトのデータ開示によって現実的な研究手法となってきた。

## 2) クリプトスポリジウムの細胞内オルガネラ構成と代謝経路

*C. parvum* と *C. hominis* は、ゲノムレベルで非常に相関性が高く(約 95~97%)、主要代謝酵素において片方の種のみ欠損を示すものは知られていない。そこで、ここからは両者をまとめて話を進めることとする。クリプトスポリジウムは、トキソプラズマやマラリア原虫とともに紅色植物の葉緑体由来とされるアピコプラスト (apicoplast) をもつアピコンプレクサ門に分類されている。ところが、クリプトスポリジウムには、アピコプラストが存在しない。核内遺伝子にコードされたいくつかのアピコプラスト遺伝子が残存しており、このことからクリプトスポリジウムにおいてはアピコプラストは二次的に失われたと考えられている。一方、ミトコンドリアについては、ミトコンドリア DNA が存在せず、TCA サイクル、酸化リン酸化も存在しないため、クリプトスポリジウムはミトコンドリアをもたない原虫に分類されてきた。しかし、シャペロニン 60 の局在する痕跡的な細胞内オルガネラが確認され、また、鉄硫黄クラスターの生合成関連酵素、オルタナティブオキシデース (AOX)、ピルビン酸：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADP<sup>+</sup>), オキシドレダクターゼなどの存在が報告されるにおよび、このミトコンドリア痕跡器官は何らかの生理的機能をもつものと考えられるようになってきた<sup>16)</sup>。また、細胞内寄生原虫であるクリプトスポリ

ジウムは、寄生適応に伴い多くの *de novo* 代謝経路を喪失し、核酸生合成経路、アミノ酸生合成経路はともにもたない。

## 3) 薬剤ターゲット

薬剤開発のターゲットとしては、これらの細胞内オルガネラの特異な構成、核酸やアミノ酸代謝の多くのステップの欠損とこれらのエッセンシャルな生体材料の取り込みが必須である点は、非常に重要である。たとえば、AOX については、詳細な酵素学的解析とともに、SCID マウスを用いた *in vivo* での薬剤評価のトライアルも実施されており、有効な薬剤シーズが報告されている<sup>17)</sup>。また、クリプトスポリジウムにおける含硫アミノ酸代謝経路は、ヒトに存在するシステイン合成経路、メチオニンリサイクル経路をともに喪失している。このことから、これらの基質のトランスポーター、関連代謝経路の阻害は、幅広い関連代謝によって厳密な細胞内基質濃度の制御をおこなっている哺乳類と比較して、クリプトスポリジウムにより大きなダメージを与えうる可能性がある<sup>18)</sup>。そこで、われわれは含硫アミノ酸およびプリン代謝経路をターゲットとした抗クリプトスポリジウム薬開発のアプローチを進め、いくつかの創薬シーズを見出している。

その他のクリプトスポリジウムに特異な代謝経路としては、アグマチンを中間代謝産物とするユニークなアルギニン脱炭酸酵素によるポリアミン生合成経路が注目されてきたが<sup>19)</sup>、いまだ薬剤シーズは報告されていない。また、デヒドロ葉酸還元酵素に着目した抗葉酸剤の試みではクリプトスポリジウムの抗葉酸剤耐性が確認されたが、この事実は、細菌などとは異なるクリプトスポリジウムのチミジル酸合成-デヒドロ葉酸還元酵素 (thymidylate synthase-dihydrofolate reductase) の特異性を示している<sup>20)</sup>。また、アピコンプレクサ門では通常アピコプラストに存在する脂肪酸合成 (タイプ II) が、アピコプラストを欠損す



るクリプトスポリジウムでは細胞質内の脂肪酸合成(タイプI)として保持されている点や<sup>21)</sup>, 形態的にはゴルジ装置がみられないものの, 小胞体分泌関連の遺伝子群(NSF/SNAP/SNARE/Rab)が見出されたことなど<sup>15)</sup>, クリプトスポリジウム独自のメカニズムを示唆する事実は多く, 今後の詳細な研究による解明を待たれている。

## おわりに

クリプトスポリジウムにおいては, 継代を可能とする培養系が確立されていないために, 栄養型からの精製蛋白質を用いた酵素学的解析や, 薬剤作用による細胞質中の中間代謝産物量の定量といった, ほかの細菌や原虫類であたりまえのように実施されている研究アプローチをとることが非常に困難であり, 研究上の大きな障害となってきた。しかしながら, 本稿に示したように, 分子疫学, ゲノムプロジェクトの進展は, ラショナルドラッグデザインのアプローチとともにクリプトスポリジウム研究のための貴重な情報とツールを提供しはじめた。今後は, これらの成果をベースに本原虫に対する治療法を確立することをめざし, 研究を推進していきたいと考えている。

## 文献

- Colford JM Jr, Tager IB, Hirozawa AM *et al* : Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival. *Am J Epidemiol* **144** : 807-816, 1996
- Vakil NB, Schwartz SM, Buggy BP *et al* : Biliary cryptosporidiosis in HIV-infected people after the waterborne outbreak of cryptosporidiosis in Milwaukee. *N Engl J Med* **334** : 19-23, 1996
- Hoxie NJ, Davis JP, Vergeront JM *et al* : Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Public Health* **87** : 2032-2035, 1997
- Petri WA Jr : Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* **19** : 523-526, 2003
- Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P *et al* : Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* **117** : 31-37, 1998
- Morgan UM, Xiao L, Monis P *et al* : Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology* **120** : 457-464, 2000
- Spano F, Putignani L, McLauchlin J *et al* : 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, 1997
- Xiao L, Morgan UM, Limor J *et al* : Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* **65** : 3386-3391, 1999
- Carraway M, Tzipori S, Widmer G : 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, 1997
- Akiyoshi DE, Mor S, Tzipori S : Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infect Immun* **71** : 5765-5771, 2003
- Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J *et al* : Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* **21** : 430-437, 2005
- Nime FA, Burek JD, Page DL *et al* : Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* **70** : 592-598, 1976
- Mead JR : Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist Updat* **5** : 47-57, 2002
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S *et al* : Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* **304** : 441-445, 2004

- 15) Xu P, Widmer G, Wang Y *et al* : The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* **431** : 1107-1112, 2004
- 16) Henriquez FL, Richards TA, Roberts F *et al* : The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol* **21** : 68-74, 2005
- 17) Suzuki T, Hashimoto T, Yabu Y *et al* : Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum* : phylogenetic and therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* **313** : 1044-1052, 2004
- 18) Nozaki T, Ali V, Tokoro M : Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv Parasitol* **60** : 1-99, 2005
- 19) Keithly JS, Zhu G, Upton SJ *et al* : Polyamine biosynthesis in *Cryptosporidium parvum* and its implications for chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol* **88** : 35-42, 1997
- 20) Atreya CE, Anderson KS : Kinetic characterization of bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase (TS-DHFR) from *Cryptosporidium hominis* : a paradigm shift for its activity and channeling behavior. *J Biol Chem* **279** : 18314-18322, 2004
- 21) Zhu G, Marchewka MJ, Woods KM *et al* : Molecular analysis of a Type I fatty acid synthase in *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* **105** : 253-260, 2000

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 (2)  
— *E. dispar* の施設内感染を中心として—

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

# 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 (2) — *E. dispar* の施設内感染を中心として—

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, *Entamoeba dispar*, ジアルジア, 施設内感染, 抗原検出キット

## はじめに

下痢症の原因となる赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫のヒトへの感染は、無症状を含む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と危惧される。

これまで腸管寄生原虫の蔓延防止を目的に知的障害者更生施設 6 施設、計 646 名の赤痢アメーバを中

心とした腸管寄生原虫感染実態調査を行い報告してきた<sup>1)</sup>。今回、さらに知的障害者更生施設 8 施設の協力により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 8 施設の協力のもと、平成 17 年 7 月～平成 18 年 3 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を対象に合計 667 名（男性 427 名、女性 240 名）

---

## Epidemiological Study on Intestinal Protozoan Infections in Institutions for People with Intellectual Disabilities (2)

Jun Suzuki\* Rie Murata\* Seiki Kobayashi\*\* Yoshitoki Yanagawa\*  
Tsutomu Takeuchi\*\*

\*Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

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

---

論文請求先：鈴木 淳 〒169-0073 新宿区百人町 3-24-1 東京都健康安全研究センター 寄生虫研究室

心浮遊法と抗酸染色，抗原検査で精査したが陰性であった。鏡検で認められた紅色の構造物はクリプトスポリジウムではなく，患者が現地で摂食した澱粉様の粒子か，酵母様物質と推定された。

患者の申告によれば，ツアー同行者の半数以上に同様症状がみられたが，投与された薬剤は解熱剤と睡眠薬のみであり，医療機関を受診することなく全員帰国した。旅行会社による旅行前ワクチン接種の推奨はなく，帰国時に有症者が多数みられるにも関わらず検疫所への申告は避けるよう助言があったそうである。われわれはアメーバ赤痢の診断と同時に保健所に届け出を出し，他の同行者の糞便検査を受け入れると提案したが，受診は個人に任せられ，精査は行われなかったようである。同行の旅行者にアメーバ赤痢の感染があった確証はないが，将来，肝膿瘍の合併を含めて重大な社会問題となる可能性が危惧される。

## 結 語

アメーバ赤痢による南米旅行者下痢症の症例を提

示した。病原性大腸菌，クリプトスポリジウムによる感染症と鑑別に難渋したが，メトロニダゾールが著効した。今後，このような輸入感染症が増加すると思われるが，海外旅行における正しい衛生知識の普及，とりわけ旅行業者への啓蒙が求められよう。

## 文 献

- 1) 安倍正史，他 (2002)：昭和大学医動物学教室への依頼検体における輸入寄生虫症例の検討。Clin Parasitol, 13, 145-147.
- 2) 熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究班 (2003) 寄生虫薬物療法の手引き.
- 3) 国立感染症研究所 (2006)：感染症情報センター，感染症報告数一覧 (その1：全数把握).
- 4) 野崎智義 (2005)：赤痢アメーバ症. 化学療法の領域, 21, 1467-1474.
- 5) Kaminsky, RG. (1991)：Parasitism and diarrhoea in children from two rural communities and marginal barrio in Honduras. Trans R Soc Trop Med Hyg, 85, 70-73.

表 1 施設別腸管寄生原虫の感染状況

	施設								計
	G	H	I	J	K	L	M	N	
検査件数	345	33	39	44	74	59	44	29	667
赤痢アメーバ陽性数	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>E. dispar</i> 陽性数	-	-	-	-	-	-	-	3	3
大腸アメーバ陽性数	13*	6	-	-	-	-	1	8**	28
小形アメーバ陽性数	17	-	1	-	-	1	-	6	25
ジアルジア陽性数	1	-	-	-	-	-	-	-	1

\*：小形アメーバとの重複感染者が 5 名

\*\*：小形アメーバとの重複感染者が 3 名，*E. dispar* との重複感染者 2 名

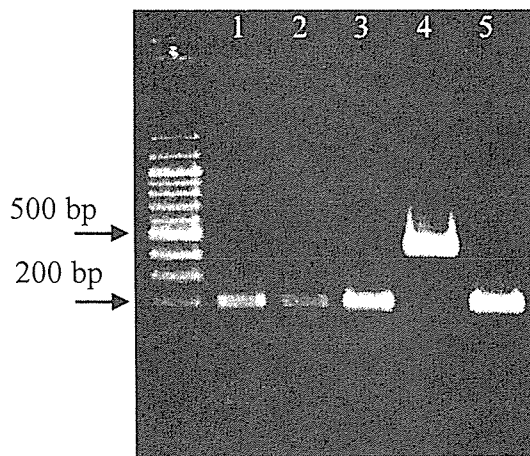


図 1 SSUrRNA を標的とした PCR 法による赤痢アメーバ，*E. dispar* 遺伝子の検出  
1～3：施設 N の糞便試料  
4：*E. histolytica* (HM1：IMSS)  
5：*E. dispar* (SAW1734RclAR)

について調査を実施した。

### 3) 検査材料

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糞便，血清を検査材料とした。また，検体は検査を行うまでは 4℃ 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 방법에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 を抽出した後，小亜粒子リボゾーム RNA (SSUrRNA) をコードする遺伝子を標的とした Multiplex-PCR 法により赤痢アメーバおよび *Entamoeba dispar* (以下 *E. dispar*) を識別した<sup>2)</sup>。

④ 赤痢アメーバ抗体の検出：赤痢アメーバ抗体検査は糞便検査 (①，②) において陽性だった場合に実施した。病原体検出マニュアル (国立感染症研究所 2003 年発行) に従い<sup>3)</sup>，プレート ELISA 法で行った。400 倍に希釈した血清を試料とし，96 穴プレートに固相化した赤痢アメーバ抽出抗原に対する反応性を調べた。405 nm における吸光度が陰性コントロールの 3 倍以上の値を示した場合，供試した検体を陽性とした。

⑤ 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 220 bp) を標的とした PCR を行った<sup>4)</sup>。PCR 増幅産物を精製後，BigDye Terminator Cycle Sequencing 法によるシークエンス反応を行い，ABI PRISM 310 genetic analyzer で塩基配列を解析し，ジアルジアの遺伝子型を決定した。

表2 施設 G, H, L, M, N の年代, 性別における腸管寄生原虫の感染状況

年 代	検査件数 (男性)	男 性				女 性			
		<i>E. dispar</i>	大腸ア メーバ	小形ア メーバ	ジアル ジア	<i>E. dispar</i>	大腸ア メーバ	小形ア メーバ	ジアル ジア
20歳未満	44 (28)	-	-	-	-	-	-	1	-
20歳代	81 (59)	3	7	5	-	-	1	1	-
30 "	107 (70)	-	4	1	-	-	1	2	-
40 "	108 (74)	-	7	5	1	-	-	-	-
50 "	120 (72)	-	7	7	-	-	1	-	-
60 "	68 (41)	-	-	2	-	-	-	-	-
70歳以上	17 (10)	-	-	-	-	-	-	1	-
不 明	4 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
計	549 (358)	3	25	20	1	0	3	5	0

### 結果および考察

今回、感染実態調査を行った8施設、667名の結果を表1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、施設Gにおいてジアルジア感染者が1名認められたが、8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、PCR法を用いた確認検査(図1)により、施設Nにおいて病原性はないが形態学的に赤痢アメーバに酷似した*E. dispar*の感染が3名に認められた。さらに赤痢アメーバと同一の感染経路をとると考えられる非病原性の大腸アメーバ、小形アメーバの感染が6施設(施設G, H, I, L, M, N)、計53名から検出された。施設Hでは男性13名中6名の利用者到大腸アメーバの感染が認められた。また、施設G, Nにおいて大腸アメーバ、小形アメーバの感染が認められた利用者は同一の生活棟であると報告された。

表2に示したように*E. dispar*の感染が認められた施設利用者は3例共に20歳代男性であったが、大腸アメーバ、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~60歳代と様々な年代で感染が認められた。また、性別は84.9%(45/53)が男性であった。

今回の調査において赤痢アメーバ抗原検出検査

(*E. histolytica* IIキット)で陽性であったが、その後の複数回の検便検査および赤痢アメーバ抗体検査で陰性を示す例が計7例(施設G:2例, 施設K:2例, 施設L:1例, 施設N:2例)に認められた。いずれも同一ロットの*E. histolytica* IIキットを使用していたが、施設Nの2例について別ロットによる検査では陰性であったことから、*E. histolytica* IIキットはロットにより偽陽性を示す場合があることが示唆された。

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を行い、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、施設Gで認められたジアルジアの遺伝子型はAssemblage Aであった。また、ジアルジア感染者は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、陰性であった。

今回の調査により、*E. dispar*の施設内感染が確認され、*E. histolytica* IIキットの使用で偽陽性を示す場合があることから、赤痢アメーバの検査においては、顕微鏡検査とPCR法による遺伝子検査など複数の検査法を組み合わせる必要があると考えられた。また、同一の生活棟において大腸アメーバ等の感染が認められたことから、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拡大が危惧される。したがって、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。

## 文 献

- 1) 鈴木 淳, 他 (2005) : 知的障害者厚生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. Clin Parasitol, 16 (1), 50-52.
- 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) 国立感染症研究所 (2003) : 病原体検出マニュアル. 233-234.
- 4) 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.



# 神奈川県におけるアライグマの駆除と アライグマ回虫の調査

国立感染症研究所 寄生動物部  
川中正憲・荒川京子・杉山 広・森嶋康之

**Key Words** : アライグマ, アライグマ回虫, 神奈川県, 外来生物法, 監視体制

## はじめに

アライグマ回虫 (*Baylisascaris procyonis*) は、アライグマの原産地である北米大陸において普通に認められる腸管内寄生虫で、基本的にアライグマ以外の動物では成虫になることはないが、ヒトがその虫卵を経口摂取すると幼虫移行による致命的な中枢神経障害を引き起こすことがある。米国では、1984年と1985年に相次いで幼児死亡例が確認され、最悪の「動物由来寄生虫症」と目されており、現在までに5名の死亡例を含む少なくとも13名の重症例が報告されている<sup>1)</sup>。

近年、わが国では展示用動物やペットに由来するアライグマの野生化が、農業被害や在来種の絶滅危惧(生物多様性に及ぼす悪影響)などの問題を引き起こし、特に、北海道、神奈川、岐阜、愛知、和歌山などの各県では深刻な事態となっている。このような状況から、2005年6月に施行された「外来生物法」ではアライグマを「特定外来生物」に指定し、野生

個体の積極的な駆除と、輸入、飼育、販売の原則禁止が求められることとなった。それと共に、野生アライグマの駆除作業に伴うアライグマ回虫による健康被害の予防対策も重要となっている。

われわれは1999年からアライグマ回虫に関する全国調査を開始し、動物園等の展示施設のアライグマ、ならびに捕獲された野生アライグマについての調査報告の収集や糞便検査等を実施した<sup>2)3)</sup>。その結果、動物園等での飼育群からはアライグマ回虫の寄生例が少なからず確認されたが、全国の野生アライグマからは、現在のところアライグマ回虫の寄生例は発見されていない。神奈川県は、首都圏にあって最も野生アライグマ問題が先鋭化している地域であることから、この調査を開始して以来7年間間にわたりアライグマの生息状況をフォローすると共に、直接アライグマ回虫の検査を実施してきた。「外来生物法」の施行に伴って野生アライグマの駆除が全国的に実施されつつある現在、神奈川県を国内でのアライグマ回虫問題の一典型として、現在の問題

## Surveillance of *Baylisascaris procyonis* Infection among Wild Raccoons in Kanagawa Prefecture, Japan

Masanori Kawanaka Kyoko Arakawa Hiromu Sugiyama Yasuyuki Morishima

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

論文連絡先：川中正憲 〒162-8640 新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所 寄生動物部