

五類感染症(全数把握)

クリプトスポリジウム症

Cryptosporidiosis

井関基弘 所 正治

Key words : クリプトスポリジウム症, *Cryptosporidium*, 届出感染症, 人獣共通感染症, 下痢症

はじめに

本症は消化管寄生原虫である *Cryptosporidium* spp. の感染による疾患で、激しい水様下痢を主徴とする。1976年に初めて人体症例が報告された新興感染症であり、世界で年間2.5億～5億人が感染すると推定されている。小児下痢症、旅行者下痢症の原因として、特にエイズなど免疫不全患者における致死的慢性下痢の原因として重要である。人獣共通感染症でもあり、水道水やスイミングプールでの集団感染が起りやすいのも本症の特徴である。我が国では届出感染症(五類、全数把握)およびエイズ診断の指標疾患に指定されている。

この10数年間で本症に関する研究は大いに進展した。特に分子・遺伝子領域の研究成果には目をみはるものがあり、本原虫の種や遺伝子型の分類・同定、糞便検査における非顕微鏡的迅速簡便な診断キットの開発、水・食品からの微量な虫体の検出、検出された虫体の生死判定などに広く適用されるようになった。また、2004年にはヒトの下痢の原因として重要な2種(*C. hominis*と*C. parvum*)の全ゲノム構造も開示された^{1,2)}。しかし、本症に確実に効く治療薬はまだ見つかっていないし、下痢発症のメカニズムなど病態生理の分子機構なども不明な点が多い。

本稿では、本原虫の分類に関する最近の知見を中心に、本症の概略を紹介する。

1. 病原体

a. *Cryptosporidium* の種と遺伝子型

近年、*Cryptosporidium* の分類は大きく変わりつつあり、新しい種名が次々登場している。現時点で16種が知られ、そのうちヒトから検出されているのは8種である(表1)。これ以外に、遺伝子型は異なるが種名がまだ付けられていないものも多数あり、今後も新種記載は次々と増えるであろう。

従来の分類はオーシストの形態、宿主特異性、寄生部位特異性などでなされていた。しかし、直径5 μ m程度のオーシストに形態的有意差を見つかったり、感染実験で宿主特異性を証明することは難しく、1980年以前に報告されて現在も有効とされる種は5種にすぎない。例えば、ヒトを含む多種多様な哺乳類から検出され、オーシストの直径が5 μ m前後のものは、宿主特異性が証明されたネコとモルモット由来のものを除き、2000年まではすべて*C. parvum*として扱われてきた。

ところが1997年以降、*C. parvum*とされていた分離株の遺伝子型は宿主動物種によって異なることが明らかになってきた。当初はヒト型

Motohiro Iseki, Masaharu Tokoro: Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University 金沢大学大学院医学系研究科 寄生虫感染症制御学

表 1 *Cryptosporidium* の種と宿主, 寄生部位, オオシストの大きさ, ヒトへの感染性

種名	宿主	寄生部位	オオシストの大きさ(μm)	報告者	ヒト感染例
<i>C. andersoni</i>	ウシ	胃	7.4×5.6(7.9-6.6×6.5-5.3)	Lindsay ら, 2000	+
<i>C. baileyi</i>	ニワトリ	BF, 気管	6.2×4.6(6.3-5.6×4.8-4.5)	Current ら, 1986	
<i>C. bovis</i>	ウシ	腸	4.9×4.6(5.4-4.8×4.8-4.2)	Fayer ら, 2005	
<i>C. canis</i>	イヌ	腸	5.0×4.7(5.9-3.7×5.9-3.7)	Fayer ら, 2001	+
<i>C. felis</i>	ネコ	腸	5.0×4.5	Iseki, 1979	+
<i>C. galli</i>	ニワトリ, フィンチなど	前胃	8.3×6.3(8.5-8.0×6.4-6.2)	Pavilasek, 1999	
<i>C. hominis</i>	ヒト	腸	5.2×4.9(5.9-4.4×5.4-4.4)	Morgan-Ryan ら, 2002	+++
<i>C. meleagridis</i>	シチメンチョウなど	腸	5.2×4.6(6.0-4.6×5.3-4.2)	Slavin, 1955	++
<i>C. molnari</i>	海産魚	腸	4.7×4.5(5.5-3.2×5.0-3.0)	Alvarez-Pellitero ら, 2002	
<i>C. muris</i>	マウス	胃	7×4.5*	Tyzzer, 1907(1910)	+
	ドブネズミ	胃	8.4×6.3(9.8-7.5×7.0-5.5)	Iseki ら, 1986	
	ヒト	胃(?)	7.8±0.17×5.6±0.13	Katsumata ら, 2000	
<i>C. parvum</i>	ヒト, ウシ, ブタ, サルなど	腸	5.0×4.5(5.4-4.5×5.0-4.2)	Tyzzer, 1912	+++
(遺伝子型: ウシ型, シカ型, ブタ型, サル型, クマ型, マウス型, フェレット型, 有袋類型)					
<i>C. saurophilum</i>	トカゲ, ヤモリ	腸	5.7×4.7(5.7-5.3×5.7-4.2)	Koudela ら, 1997	
<i>C. scophthalmi</i>	海産魚(カレイ)	腸	4.4×3.9(5.0-3.7×4.7-3.0)	Alvarez-Pellitero ら, 2004	
<i>C. serpentis</i>	ヘビ	胃	6.2×5.3(6.6-5.6×5.6-4.8)	Levine, 1980	
<i>C. suis</i>	ブタ	腸	4.6×4.2(4.9-4.4×4.3-4.0)	Ryan ら, 2004	+
<i>C. wrairi</i>	モルモット	腸	5.4×4.6(5.6-4.8×5.0-4.0)	Vetterling ら, 1971	

BF: ファブリキウス嚢. *Tyzzer (1910)による. +++: 多い, ++: 少ない, +: まれ

(human genotype, または genotype 1)とウシ型(cattle genotype, または genotype 2)に大別されていたが, その後, イヌ型, ウシ型(A, B), ブタ型(I, II), サル型, クマ型, シカ型, マウス型など, 種々の新しい遺伝子型が報告されるようになった³⁾. 最近では, *C. parvum*のうち, 遺伝子型の違いと宿主特異性が証明されたものを独立種として扱うようになり, ヒト型は2002年に*C. hominis*, イヌ型は2001年に*C. canis*, ブタ型-Iは2004年に*C. suis*, ウシ型-Bは2005年に*C. bovis*と命名されている⁴⁻⁷⁾.

b. 感染と発症

ヒトから検出される種は*C. hominis*と*C. parvum*が大半で, 両種で95%以上(免疫機能正常者では98%, 免疫不全患者では80%)を占めるが, このほかに鳥類寄生性の*C. meleagridis*, ネコ寄生性の*C. felis*, イヌ寄生性の*C. canis*など6種と2遺伝子型の感染も知られている(表2)^{8,9)}. それぞれの種の宿主特異性は非常に高く, 例え

表 2 免疫機能正常者と免疫不全患者から検出された *Cryptosporidium* の種と遺伝子型(1999~2004)

種・遺伝子型	感染者数	
	免疫機能正常者	免疫不全患者
<i>C. hominis</i>	1,812(52%)	140(23%)
<i>C. parvum</i>	1,627(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(3%)
<i>C. suis</i>	1	1
<i>C. andersoni</i>	3	—
<i>C. muris</i>	—	3
シカ型	10(0.3%)	—
サル型	2	—
総計	3,514	597

(文献^{8,9)}より改変)

ば *C. hominis* がヒト以外から検出されることは極めてまれである。一方、どの種に感染してもヒトは下痢を発症するが、感染に必要な摂取オーシスト数、下痢の強さ、有病期間など、種によるヒトへの病原性の違いの詳細はまだ明らかでない。

最近、*C. hominis* と *C. parvum* のウシ型については亜遺伝子型(subgenotype)まで解析されるようになり、詳細な分子疫学調査が可能になった^{10,11}。水から検出されるオーシストについても1個からでも種と遺伝子型の判定ができるようになった¹²。

感染は患者や感染動物の糞便に排出されるオーシストの経口摂取による。オーシストの内部にはバナナ状のスποロゾイトが4個包蔵されており、*C. hominis* や *C. parvum* のような腸管寄生種では、小腸で脱嚢したスποロゾイトは粘膜上皮細胞に接着し、微絨毛に侵入して、無性生殖(シゾゴニー)と有性生殖を繰り返しながら増殖する。スποロゾイトは宿主細胞に侵入するための特殊なオルガネラ(apical complex)を有し、侵入に際して先端部から液を分泌する。この液の作用によって宿主細胞膜に接着し侵入するが、侵入後の虫体増殖に伴う激しい水様下痢発症の要因を含め、その分子レベルでのメカニズムはまだほとんどわかっていない。

c. オーシストの性状

感染極期の患者糞便には1日当たり数十億個のオーシストが排出される。感染力は非常に強く、1~数個の摂取でも感染し発症する。オーシストは水中や食品中で増殖することはない。徐々に弱って感染性を失うが、湿った状態で冷蔵すれば半年~1年程度は感染力を保つものもある。耐塩素性が強く、浄水場やスイミングプールで使用される塩素濃度では全く不活化されないため、水道水の飲用やプールでの集団感染が起こりやすい。また、病院で手指や器具の消毒に使われる各種消毒薬にも強い耐性を示すので院内感染の防止に留意する必要がある。70℃以上の加熱や乾燥では容易に死滅する。

2. 疫 学

1994~2003年に報告された16の疫学調査では、途上国の免疫機能正常な下痢患者における平均陽性率は12.7%で、更に無症候性感染者が4.5%みられるという¹³。先進国における平均陽性率は2.2%と報告されているが、我が国の最近5年間(2001~2005年)の届出患者数の合計は224人と非常に少ない。少ない理由は、本症診断のための検査が各医療施設で十分に実施されていないからで、適切な検査を実施している都立駒込病院の4年間(1997~2000年)のまとめでは、同病院で検査した海外旅行帰国下痢患者における陽性率は平均5.2%(16/309)である。日本人海外渡航者数が年間1,700万人を超え、外国人入国者数も600万人を超える現在、輸入感染例だけでもかなり多いと思われる。もちろん国内感染もあり、水道水やスイミングプールが原因の集団感染も再三発生している。国内での流行実態を把握するには下痢患者の適切な検査が欠かせない。

3. 病 態

潜伏期間は4、5日。激しい水様下痢が主症状で、腹痛、吐き気、嘔吐を伴い、約半数に38℃前後の発熱をみるが、下血はみられない。免疫機能が正常であれば下痢は1週間前後で治まるが、壮健な若者でも1日30回を超えるような下痢と強い腹痛、脱水などのために入院を余儀なくされる症例もある。免疫不全患者では、エイズのみならず免疫抑制療法を受けている患者や、先天性免疫不全症のX連鎖高IgM症候群などでも慢性化し重症になる。寄生部位は胃、胆嚢・胆管、膵管、呼吸器にまで広がり、慢性下痢に加えて硬化性胆管炎や呼吸器症状を呈する例もある。

HIV感染者の場合、CD4⁺T細胞数が100個以下の患者では重症になる。下痢は年余にわたって持続し、1日に70回とか1日に10~201というコレラのような激しい下痢をみることもある。本症はエイズ診断の指標疾患の一つであり、HIV陽性者で本原虫感染による下痢が1カ月以

上持続した場合にはエイズと診断する。

の鑑別が感染源を特定するうえで重要である。

4. 診 断

診断には糞便の顕微鏡検査でオーシストを検出すればよいが、通常の原因・虫卵検査法では検出できない。シヨ糖遠心浮遊法、抗酸性染色法、蛍光抗体法などの実施が必須である。ELISA 法や免疫クロマトグラフィを利用して糞便から *Cryptosporidium* の抗原を検出する簡便な診断キットが各種市販されており、米国の検査室では普通に使用されている。数分で結果が得られ、肉眼で判定できるので非常に便利であるが、国内では未認可で価格も高い。今後は、患者から検出されたオーシストの種や遺伝子型

5. 治 療

確実に効く治療薬は見つかっていない。パロモマイシン、アジスロマイシン、アルペンダゾールなどが原虫の増殖をある程度抑制し、症状の改善をみる症例もあるが、全く反応しない症例もある。最近、ニタゾキサニドの有効性が注目され、米国では本症による小児の持続性下痢の治療薬として使用されており¹⁴⁾、エイズ下痢患者における有効性・安全性の評価試験は現在進行中である¹⁵⁾。エイズ患者では HAAT (highly active antiretroviral therapy) の実施によって免疫能が回復すれば本症も治癒する。

■ 文 献

- 1) Xu P, et al: The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431: 1107-1112, 2004.
- 2) Abrahamsen MS, et al: Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304: 441-445, 2004.
- 3) Xiao L, et al: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 17: 72-97, 2004.
- 4) Morgan-Ryan UM, et al: *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol* 49: 433-440, 2002.
- 5) Fayer R, et al: *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol* 87: 1415-1422, 2001.
- 6) Ryan UM, et al: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol* 90: 769-773, 2004.
- 7) Fayer R, et al: *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol* 91: 624-629, 2005.
- 8) Caccio SM, et al: Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-437, 2005.
- 9) Leoni F, et al: Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol* 55: 703-707, 2006.
- 10) Abe N, et al: Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol Res* 99: 303-305, 2006.
- 11) Trotz-Williams LA, et al: Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from daily calves and humans in Ontario. *Parasitol Res* 99: 346-352, 2006.
- 12) Hashimoto A, et al: Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts in sewage by semi-nested PCR and direct sequencing. *Water Res* 40: 2527-2532, 2006.
- 13) Bushen OY, et al: Cryptosporidiosis. In: *Tropical Infectious Diseases; principles, pathogens, & practice* (second ed) (ed by Guerrant RL, et al), p 1003-1014, Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, 2006.
- 14) Cohen SM: Use of nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: a pediatric perspective. *Curr Med Res Opin* 21: 999-1004, 2005.
- 15) Rossignol JF: Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 887-894, 2006.

184 4. 原虫症, 寄生虫症

2) ベナンボックス注 1回 3 mg/kg 1日1回を2時間以上かけて点滴静注

B. 補助療法

PaO₂ < 70 mmHg, A-aDO₂ (肺泡気動脈血酸素分圧較差) > 35 mmHg の場合は上記処方例にプレドニンを併用する。

〔R〕処方例 1), 2), 3) の順に用いる。

1) プレドニン錠 (5 mg) 60-80 mg 分1-2 5日間

2) プレドニン錠 (5 mg) 30-40 mg 分1-2 5日間

3) プレドニン錠 (5 mg) 15-20 mg 分1-2 11日間

C. 発症予防

発症後の二次予防として, また, CD 4 < 200/μL 以下の HIV 感染者やステロイド長期投与のリスクのある症例に予防投与を行う。

〔R〕処方例 まず1) を用い, 副作用で使用できない場合は2) を用いる。

1) バクシム錠 (1錠/分1)

2) ベナンボックス注 (300 mg) 注射用水 40 mL 毎日1回, 超音波ネブライザーで吸入 (気道刺激性が強いので吸入前にベネトリンなどの気管支拡張薬を使用)

消化管・泌尿生殖器寄生原虫症

intestinal and urogenital protozoal diseases

所 正治 金沢大学大学院講師・寄生虫感染症制御学

本稿の治療法は腫トリコモナス症を除きすべて保険適用外である。また, *印の薬剤は未承認薬だが, 熱帯病治療薬研究班より治験薬として入手可能 (<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/parasitology/orphan/index.html>, ⇒ 196 頁も参照)。

I. ジアルジア症 (ランブル鞭毛虫症)

病態と診断

ジアルジア症 (giardiasis) はランブル鞭毛虫 (*Giardia intestinalis* または *G. lamblia*) による小腸および胆道系の感染症である。感染者の大部分は無症候性嚢子排出者となるが, 発症すると, 泥状・水様の下痢 (しばしば脂肪性), 腹痛, 鼓腸, おくび・放屁 (強い硫化水素臭) とともに悪心・嘔吐を示す。胆道感染による胆管・胆嚢炎, また, 慢性感染においては吸収不良・体重減少をみることがある。血便や高熱は通常認められない。旅行者下痢症, また, 施設内での集団感染の原因として注目さ

れ, 感染症法では5類疾患に指定されているため, 届出が必要である。

診断は便や十二指腸液の直接顕微鏡検査により, 活発に運動する栄養型もしくは嚢子を検出する。集嚢子法/特異蛍光抗体法/各種染色法が有効である。また, 便中抗原検出のためのキットが各種発売されているが診断薬としては未承認である。

治療方針

下記処方例1) または2) のニトロイミダゾール系薬単剤をベースに以下の治療が行われるが, 薬剤耐性株がしばしばみられるため, 効果が認められない場合には即座に他薬へと切り替える。また, 低ガンマグロブリン血症 (特に IgM および IgA) や分秘型 IgA 低下症を伴う免疫不全が背景にある場合には, しばしば難治性となるため, 1クルールの治療を下記の最長期間で実施する。

〔R〕処方例 下記のいずれかを用いる。

1) テラシクリル錠 (オクトロニダゾール) (250 mg) 3錠/分3-5 10日間

2) フェンダシクリル錠 (フェニダゾール) (200 mg) 12錠/分2 7日間

3) アリニル懸濁液* (Alinia, ニトラゾキサニド) (20 mg/mL) 1g (成分量として) 分2 3日間

4) エスガゾール錠 (メカベンダゾール) (200 mg) 2錠/分2-5 10日間

5) ヒューマチン錠 (Humatin, パロモナイシン) (250 mg) 8錠/分4 7日間

II. クリプトスポリジウム症 (cryptosporidiosis)

病態と診断

原因原虫であるクリプトスポリジウム *Cryptosporidium* spp. は, 世界中に分布し, 小児の下痢症, 旅行者下痢症の原因として, 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持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。感染症法の5類届出疾患 (全数把握) である。

症状は, 激しい水様性下痢, 腹痛, 悪心, 倦怠感である。発熱は時にみられるが高熱となることは少なく, 血便は認められない。免疫が正常であれば10日前後で自然治癒をみるが, 先天性免疫不全, 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再発を繰り返し, 胆管・胆嚢炎, 気管支炎・肺炎を合併, 時に死の転帰をとりうる。したがって本症の慢性化例では患者の免疫学的背景の確認は必須であり, また, AIDS 診断の指標疾患である。

クリプトスポリジウムのオーシストはシヨ糖遠心浮遊法/抗酸染色法/特異的免疫蛍光抗体法などによる顕微鏡的検査で糞便・十二指腸液・喀痰検体から形態的に検出可能である。便中抗原検出のためのキットが各種販売されているが診断薬としては未承認である。血清抗体価や生検による診断は通常困難である。

治療方針

ニタゾキサニドをベースとした単剤もしくは他の薬剤を加えたコンビネーション治療が下痢の期間短縮に有効とされるが、免疫不全症例での効果は未確定。したがって、免疫不全におけるクリプトスポリジウム症においては高カロリー輸液を含めた対症療法とともに原疾患の治療が最善であり、AIDSにおけるHAART (highly active antiretroviral therapy), また、骨髄移植などによる免疫機能の回復はクリプトスポリジウム症を終息させることが知られている。

治療期間は正常人では下記の最短期間が基本である。一方、免疫不全症例では再発がしばしば認められるため、たとえ症状緩和が認められても1クール14日間の治療の完了と再発の有無についてモニタリングの継続が望ましい。

処方例) 下記を適宜組み合わせる。

- 1) アリミダ懸濁液 (Alima, ニタゾキサニド) (20 mg/0.5ml) 1-2g (成分量として) 分2-3 14日間
- 2) シスロスポリン錠 (Zylosporin, シスロスポリン) (250mg) 分2錠 分1-3 14日間
- 3) ヒュマトリン錠 (Humatin, ヒュマトリン) (250mg) 分5-9錠 分3-5 14日間

■家族への説明のポイント

- ・便中のオーシストは排出直後から高い感染性を持ち、数個の経口摂取で感染が成立する。
- ・オーシストの排出は、有症期はもちろん下痢が終息しても1か月程度続くことがあるため要注意。
- ・患者の下着などは煮沸消毒が必要 (煮沸5分, 60°Cでは30分で不活化)。
- ・患者の入浴後は即座に風呂を洗浄する。
- ・オーシストの排出が続いている間はプールでの遊泳は原則禁止。

■看護・介護のポイント

- ・患者便による汚染器具, リネンなどは感染性材料としての取り扱いを要す。
- ・通常の消毒薬はすべて無効であり, 煮沸またはオートクレーブが望ましい。

III. イソスポーラ症とサイクロスポーラ症 (isosporiasis and cyclosporiasis)

病態と診断

ともにクリプトスポリジウムと同じ孢子虫綱コクシジウム類に属する原虫による下痢症だが、便中に排出される未成熟オーシストが環境中での成熟に約1週間を要し即座には感染性を持たない点, また, 有効な治療薬 (ST 合剤) が知られている点がクリプトスポリジウムとは異なる。サイクロスポーラ症は, 1994年に報告された *Cyclospora cayentanensis* による新興感染症で, 国内では主に旅行者下痢症として注目され, 米国では中南米からの輸入野菜による集団感染も知られている。一方, イソスポーラ症の病原体である *Isospora belli* は第一次世界大戦時の集団下痢症の原因として知られ, 和名は戦争イソスポーラである。イソスポーラ症はAIDS診断の指標疾患であり, 国内感染例も報告されている。

両者ともに小腸の上皮細胞内で増殖し, 主訴は下痢 (しばしば粘液性) である。発熱, 倦怠, 腹痛を伴い, 血便はみられない。免疫が正常であれば5-10日程度で自然治癒をみるが, AIDSやATL (成人T細胞白血病) などの免疫不全状態では間欠的な下痢症が年余にわたり続くこともあり, 吸収不良と体重減少をきたす。また, イソスポーラ症の重症化例では胆嚢・胆管炎, 脾炎を起こすことがある。

診断は便の直接顕微鏡検査でそれぞれ特徴的な形態のオーシストを検出する。両原虫ともオーシスト壁がUV励起によるブルーの自家蛍光を有し, 蛍光顕微鏡での観察が有用である。

治療方針

ST合剤が著効を示すが, 保険適用はない。AIDS患者では高率に再発がみられるが, 下記治療後, 週3回, 1回バクタ錠2錠の予防内服が効果的。

処方例)

- バクタ錠 (スルファメトキサゾール 400mg・トリメトプリム 80mg) 8錠 分4 10日間

IV. 腔トリコモナス症 (trichomoniasis)

病態と診断

腔トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*) による性行為感染症。女性では, 腔, バルトリン腺や子宮頸管, 尿路, また男性では尿道, 膀胱, 前立腺や精路への感染が起こりうる。症状としては悪臭の強い膿性・泡沫状の帯下の増加, 外陰部癢痒感・刺激感が典型的に認められるが, 無症候性感染もあり, 男性では大部分が自覚症状を伴わない。

診断は, 腔分泌物や尿沈渣の直接顕微鏡検査によ

る腔トリコモナスの検出が基本だが, 培養による高感度な検出も実施される。

治療方針

感染病巣の広がりによっては局所療法のみでは十分な治療効果を示さないことがあるため, 局所療法と内服薬の併用が効果的である。他の性感染症と同様にセックスパートナーの同時治療が原則。

A. 内服

【R 処方例】 下記のいずれかを用いる。

- 1) フラジール錠 (メトロニダゾール) (250 mg) 2錠/分2 10日間
- 2) パイシジン錠 (チニダゾール) (200 mg) 2錠/分2 7日間

B. 局所

【R 処方例】

フラジール腔錠 (250 mg) 1日1錠 腔内挿入 10-14日間

リーシュマニア症

leishmaniasis

木村英作 愛知医科大学教授・寄生虫学

病態と診断

リーシュマニア症は吸血性のサシチョウバエが媒介する原虫感染症で, 世界に1,200万人の感染者が存在する。日本では輸入症例のみである。リーシュマニア原虫は20数種類あり, 種により多彩な臨床症状を呈し, 診断・治療にも差異がある。

A. 病型

内臓型リーシュマニア症 (カラ・アザール) は発熱, 肝脾腫, 貧血, 顆粒球・血小板減少, 皮膚色素沈着などを呈する。治療されなければ90%以上で死亡する。病原体はドノバン・リーシュマニアなどでインド, バングラデシュなどに分布する。

皮膚型リーシュマニア症は, 自然治癒する局所的な丘疹・潰瘍から難治性の汎発性皮膚リーシュマニア症までさまざまな皮膚症状を示す。病原体は熱帯リーシュマニア, メキシコ・リーシュマニアなどで中近東, 南米などに分布する。

粘膜皮膚型リーシュマニア症は, 皮膚症状の消失後数年を経て, 残存原虫が鼻粘膜, 咽頭, 喉頭などに侵入し組織を破壊するタイプで, 鼻中隔欠損, 嚥下障害などを起こし重篤となる。病原体はブラジル・リーシュマニアなどである。

B. 診断

内臓型リーシュマニア症では穿刺により骨髓や脾臓に原虫を確認する。各種免疫診断があり市販の

キットもある。皮膚型では病変部辺縁の塗抹標本や生検標本より原虫を検出する。原虫種の同定には, 近年, 遺伝子診断が用いられる。

治療方針

内臓型リーシュマニア症では, 早期診断・治療が大切である。皮膚型リーシュマニア症と粘膜皮膚型リーシュマニア症は予後が大きく異なるので原虫種の鑑別・確定が必要となる。治療には5価アンチモン製剤 (ペントスタム) が第1選択である。最近, 内臓型リーシュマニア症に経口薬 (インパビド) が開発された。また, アンチモン製剤抵抗性の内臓型リーシュマニア症にはアムホテリシン B も用いられる。

A. 内臓型リーシュマニア症

【R 処方例】 下記のいずれかを用いる。

- 1) ペントスタム注 (100 mg/mL) 1回20 mg/kg 1日1回 (1日最大800 mg) 静注または筋注 28日間。静注は5%ブドウ糖液で10倍以上に希釈して用いる (本邦未発売)
- 2) インパビドカプセル (50 mg) 100 mg 分2 28日間 (本邦未発売)

B. 皮膚型リーシュマニア症

【R 処方例】 下記のいずれかを用いる。

- 1) ペントスタム注 (100 mg/mL) 1回10-20 mg/kg 1日1回 (1日最大800 mg) 静注または筋注 10-30日間。粘膜皮膚型リーシュマニア症に移行しうるブラジル・リーシュマニアなどの感染では皮膚病変治癒後も数日間全身投与を継続する (本邦未発売)
- 2) ペントスタム注 (100 mg/mL) 1回100-300 mg 1日1回 局注 10-20日間。潰瘍辺縁や結節性病変部に局注 (本邦未発売)

C. 粘膜皮膚型リーシュマニア症

ペントスタム注を内臓型リーシュマニア症と同様に用いる。

D. 副作用

ペントスタムの副作用は治療後期に出現することが多い。一過性の消化器症状のほか, 発疹, 筋肉痛, 血小板・顆粒球減少など, 時に重篤な肝, 心, 腎障害がある。インパビドの副作用としては, 消化器症状, 肝腎障害などがある。

* ペントスタム, インパビドは本邦未承認薬である。⇒ 196頁, 熱帯病稀用薬も参照。

世界的にみた感染症の検査法

赤痢アメーバ,
クリプトスポリジウム

NAKAMOTO KENTARO/TOKORO MASA HARU

仲本賢太郎/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

要旨 赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムはともに日和見感染症の原因原虫として、また施設内や水道水を通じた地域のアウトブレイクの原因原虫として重要だが、通常の検査において赤痢アメーバに対する血清抗体以外の検出法が使えないために、多くの症例が見逃されている可能性が指摘されてきた。検査法としては顕微鏡的検査とともにPCR法や各種のキットが使用可能だが、いずれも現在のところ保険適応外であり、早期治療や感染拡大防止の観点から早期の承認が望まれる。

はじめに

赤痢アメーバ症およびクリプトスポリジウム症は感染症法の五類感染症（全数把握届出疾患）に分類され、AIDS、先天性免疫不全における日和見感染症として重要な感染症であり、また、性行為感染症として同性愛者にしばしばみられる。さらに、両原虫は旅行者下痢症の原因原虫でもあり、発展途上国からの帰国者による輸入症例が報告される一方で、赤痢アメーバの障害者施設等における集団発生や、クリプトスポリジウムによる水道水を通じたアウトブレイクが国内においても知られている。

従来、これらの原虫は、糞便中に排出されたシスト/オーシストおよび腸粘膜生検材料中の栄養型の顕微鏡的検査によって検出されてきた。しかし、顕微鏡的検査には熟練が必要であり、実際、対応可能な検査機関は限られ、通常の検査メニューにこれらの原虫検出のための糞便検査が含まれ

ていないばかりか、しばしば検査自体が実施されていない現状がある。したがって、2006年の国内での報告数は赤痢アメーバ738例、クリプトスポリジウム14例だが¹⁾、他の先進国におけるクリプトスポリジウムが年間数千例に及ぶことも考慮すると、多くの症例が未検出のまま見過ごされている可能性があるものと考えられる。

近年、分子疫学の進歩に伴い、polymerase chain reaction (PCR) 法による遺伝子型同定を含めた高感度な検出法や特異抗体を用いた便中抗原検出をベースとした各種キットが、これらの原虫検出に使用可能となってきた。そこで本稿では、一般検査室においても利用可能なPCRとキットによる赤痢アメーバおよびクリプトスポリジウム検出の利点と問題点についてまとめる。

■赤痢アメーバ症

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は腸管

表1 各種原虫診断用キット

製品名	検出原虫	会社名	原理
<i>E. HISTOLYTICA II</i>	Eh**	TechLab	ELISA
Triage [®] Parasite Panel	Eh*/Cp*/Gi**	Biosite Diagnostics	EIA
ProSpecT [®] Entamoeba histolytica Microplate Assay	Eh	Remel	ELISA
ProSpecT [®] Cryptosporidium Microplate Assay	Cp	Remel	ELISA
<i>CRYPTOSPORIDIUM II</i>	Cp	TechLab	ELISA
ImmunoCard STAT! Crypto/Giardia	Cp/Gi	Meridian Bioscience	イムノクロマトグラフ
MERIFLUOR [®] Cryptosporidium/Giardia	Cp/Gi	Meridian Bioscience	直接蛍光抗体法
Crypto/Giardia Cel	Cp/Gi	Cellabs	直接蛍光抗体法
EasyStain [™] C&G FITC	Cp/Gi	BTF	直接蛍光抗体法
Aqua-Glo G/C Direct	Cp/Gi	Waterborne	直接蛍光抗体法
Aqua-Glo G/C Indirect	Cp/Gi	Waterborne	直接蛍光抗体法

*1: 赤痢アメーバ, *2: クリプトスポリジウム, *3: ジアルジア, *: 赤痢アメーバと *E. dispar* の鑑別不可

表2 赤痢アメーバの検出および非病原種との鑑別に用いられるプライマー

標的遺伝子	方法	プライマー配列	増幅サイズ(bp)	参考文献
SSurRNA	マルチプレックス PCR	EhL ACATTTTGAAGACTTTATGTAAGTA	427	3)
		EhR CAGATCTAGAAACAATGCTTCTCT		
		EdL GTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAA	195	
		EdR ACACCACTTACTATCCCTACC		

寄生原虫であり、シスト（嚢子）に汚染された飲食物等の経口摂取により感染が成立する。摂取されたシストは胃を経て小腸にて脱嚢し栄養型となり、その栄養型が大腸組織内に侵入することで赤痢アメーバ症を引き起こす。その病型はアメーバ赤痢、アメーバ性大腸炎などの腸アメーバ症と肝、肺、脳膿瘍などの腸管外アメーバ症に大別される。しかしながら、感染者のすべてが発症するわけではなく、その一部は無症候性のシストキャリアとして存在するため他者への感染源となる。感染者のほとんどは発展途上国に集中し、全世界では毎年5億人が本原虫に感染し、そのうち4万人が死亡すると見積もられている。一方、わが国における感染者数は年々増加し、発展途上国からの帰国者や男性同性愛者が主なハイリスクグループとなっている。

1. 病原種および非病原種の鑑別

従来、赤痢アメーバとして同定されていた原虫は、病原種の赤痢アメーバ (*E. histolytica*) と組

織侵入性がない非病原種 (*E. dispar*) の異なる2種に分類されるようになった²⁾。糞便中に排出された12~15 μ m のシストおよび栄養型を検出した場合、非病原種と無症候性のシストキャリアとの鑑別が重要となるが、両種は形態的に鑑別することができない。このため、アイソザイムパターンやPCRによる遺伝学的診断法、あるいは市販の検出キット (表1) を用いた両種の鑑別が必要となる。

2. 遺伝学的診断法

遺伝学的に *E. histolytica* を検出、もしくは *E. dispar* との鑑別を行うには小亜粒子リボゾームRNA (small subunit of ribosomal RNA: SSUrRNA) 遺伝子を標的とした、マルチプレックスPCR法が用いられる³⁾ (表2)。本法で用いられるEhLとEhRプライマーセットは *E. histolytica* のDNAを、EdLとEdRプライマーセットは *E. dispar* のDNAを1反応液中でそれぞれ特異的に増幅する。反応により得られる増幅産物は *E.*

表3 クリプトスポリジウムの検出および種鑑別に用いられるプライマー

標的遺伝子	方法	プライマー配列	増幅サイズ(bp)	参考文献	
SSurRNA	Directsequence	18SiF AGTGACAAGAAATAACAATACAGG	300	9)	
		18SiR CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC			
	nestedPCR-RFLP	SSU-F2 TTCTAGAGCTAATACATGCG	1,325	10)	
		nestedPCR-sequence SSU-R2 CCCATTTCCCTTCGAAACAGGA			
	COWP	PCR-RFLP	SSU-F3 GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAAG	820	
			SSU-R3 AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		
cry15 GTAGATAATGGAAGAGATTGTG					
COWP	directPCR-RFLP	cry9 GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG	580	11)	
		nestedPCR-RFLP BCOWPF ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCTC			
	BCOWPR	CGCACCTGTCCCACTCAATGTAAACCC	769	12)	
		cry15 GTAGATAATGGAAGAGATTGTG			
		cry9 GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG			

histolytica が 427bp, *E. dispar* が 195bp であり、サイズにより両種を鑑別可能である。

本法における *E. histolytica* 特異的プライマーセットは 10pg/mL のテンプレート DNA から、*E. dispar* 特異的プライマーセットは 100pg/mL の DNA から明瞭な増幅産物を得ることができ、クリプトスポリジウム、ジアルジア (ランブル鞭毛虫)、およびプラストシスチスなどの他の腸管寄生原虫由来の DNA と交差反応を示さないことが確認されている⁴⁾。

3. 各種診断キットを用いた

赤痢アメーバの検出

1) *E. HISTOLYTICA* II (TechLab)

E. histolytica および *E. dispar* に共通の adhesin (腸粘膜) 接着因子抗原に特異的なポリクローナル抗体を反応ウェル内に固着させた Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 用プレートにベルオキシターゼ標識した *E. histolytica* 特異的な抗接着因子モノクローナル抗体と検体溶解液を加える。室温で 2 時間反応させて、洗浄後に発色基質を加える。判定は 450nm で吸光度を測定し陰性コントロールの吸光度と比較することで行う。

本キットの検出感度は、0.2~0.4ng/ウェルの接着因子抗原が検出可能とされる。抗原として無

菌培養した赤痢アメーバ栄養型 (HM1-MISS cl-6 株) を用いた実験結果では、1 ウェルあたり 20~25 個以上の栄養型で肉眼的に明瞭な呈色反応を示すことが報告されている。標識抗体には *E. histolytica* 接着因子特異的モノクローナル抗体を使用しているため特異性は高い⁵⁾。

2) Triage® Parasite Panel (Biosite Diagnostics)

パネル中央の反応層には *E. histolytica/dispar* に特異的な 29kDa 抗原、ジアルジアに特異的な α -1-giardin 抗原、クリプトスポリジウムに特異的な protein disulfide isomerase 抗原のそれぞれに対して特異的に結合する抗体が所定の位置に太線状に固着させてある。この反応層に糞便検体懸濁濾過液を加えて反応させる。次に、アルカリフォスファターゼ標識してある上記 3 種の抗原に対する抗体混合液を加え、反応層に捕捉されている特異抗原と結合させる。洗浄後、発色基質液を加え、暗紫色の呈色反応を肉眼的に観察し、3 種それぞれの原虫について抗原の有無を判定する。

各抗原の検出感度は、*E. histolytica/dispar*; 4ng/mL, ジアルジア; 3ng/mL, クリプトスポリジウム; 6ng/mL が検出可能とされる。固着抗体、標識抗体ともにポリクローナル抗体ではあるが、精製されたそれぞれの組換え蛋白抗原を免疫しているために特異性は高い。判定までの所要時

間は20分程度で (*E. HISTOLYTICA II* は2時間半), 迅速診断が可能であり, 3種の原虫を同時に検出することができるため, スクリーニングに有用である。しかしながら, *E. histolytica/dispar* の共通抗原を使用するため両種の鑑別はできない。また, 1検体あたりのコストは *E. HISTOLYTICA II* が830円であるのに対し, 2,500円とかなり高額になる。

■クリプトスポリジウム症

病原性腸管寄生原虫クリプトスポリジウムはオーシストの経口摂取により感染し, オーシストから脱嚢したスポロゾイトが小腸の絨毛上皮細胞内に侵入することにより激しい水様下痢と腹痛を引き起こす。オーシストの感染力は非常に強く, 数個のオーシストの摂取でも感染が成立し, 通常の水道水に使用されている濃度の塩素には強い耐性を示すためプールや水道水汚染による集団感染の原因としても重要である。また, AIDSなどの免疫不全患者においては症状が慢性化, 重症化し死の転帰をとりうる。本原虫症のわが国における届出数は2000~2005年までの5年間でわずか230例余りである¹⁾。しかし, 本原虫のオーシストは直径5 μ mと顕微鏡検査での検出が非常に困難なため, 赤痢アメーバ以上に検査体制の保持が困難であり, また, 健康人が感染した場合, 10日程度で自然治癒することから, 多くの症例が見逃されている可能性がある。

1. クリプトスポリジウムの種および遺伝子型

本原虫はこれまでに, 哺乳類をはじめさまざまな生物から分離されているが, ヒトへの感染性は種および遺伝子型により異なる。ヒトから分離される種としては, ヒトのみを宿主とする *C. hominis* と幅広い哺乳類を宿主とする *C. parvum* の2種が健康人症例全体の97%以上を占めることが知られている²⁾。診断には糞便中のオーシストを顕微鏡下で検出するシヨ糖遠心浮遊法および抗酸性染色法が用いられているが, 熟練を要する。

一方, 遺伝学的診断法および標識抗体を用いた免疫染色, あるいは特異抗原を検出する診断キットが, 水道水を介したアウトブレイクや, 米国CDCによるテロに使用される危険性の指摘に伴って開発されてきた⁷⁾。

2. 遺伝学的診断法

遺伝学的診断には種および遺伝子型に共通な配列をプライマーとし, オーシストから抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCRを実施後, 増幅産物を制限酵素処理して断片サイズを解析する restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法やシーケンス法が用いられている。診断に用いられるターゲット遺伝子では特に小亜粒子リボソームRNA遺伝子, オーシスト壁蛋白質 (*Cryptosporidium* oocyst wall protein: COWP) 遺伝子について, ほほすべての種, および遺伝子型が網羅的に報告されており, 標準法となっている⁸⁾ (表3)。感度としては両者とも10個程度のオーシストからの検出が可能であり, ネステッドPCRを用いた場合には1個のオーシストからでも増幅産物を得ることが可能である。

3. 各種キットを用いたクリプトスポリジウムの検出

1) 蛍光抗体法

市販されている5種の蛍光抗体法を用いた検出キット (表1) はクリプトスポリジウムとジアルジアに特異的な蛍光標識モノクローナル抗体を用いており, 反応時間は室温もしくは37 $^{\circ}$ C下において約20~40分である。

これらのキットは主に環境水からのオーシスト/シストの検出を目的としており, まれに環境水中に含まれる酵母や藻類 (種は不明) と交差反応を起こすことが知られているが, 他の定性キットと比較して検出感度は高く, MERIFLUOR[®] *Giardia/Cryptosporidium* を用いた調査では, 2.5 \times 10²個/mL以下のオーシストしか含まないサンプルからも検出が可能であると報告され¹³⁾, 通常糞

便内に患者から排出されるオーシスト/シスト数ははるかに多量であるため臨床診断にも十分利用できる。また1検体あたりの費用はAqua-Glo G/C Direct (730円) から EasyStain™ C&G FITC の2,100円までさまざまである。

2) 酵素抗体法

CRYPTOSPORIDIUM II (TechLab) および ProSpecT® Cryptosporidium Microplate Assay (Remel) (表1) はともに *E. HISTOLYTICA II* と同様に96ウェルのELISA用プレートを用いた酵素抗体法によってクリプトスポリジウムを検出する。ウェル内には *CRYPTOSPORIDIUM II* ではオーシスト壁抗原に対する抗体を、ProSpecT® Cryptosporidium Microplate Assay では本原虫が宿主の腸管内で増殖する際に産生するクリプトスポリジウム特異抗原 (*Cryptosporidium* specific antigen: CSA) に対する抗体が固着させてある。判定までの所要時間は両キットともに2時間半程度である。

3) イムノクロマトグラフ法

ImmunoCard STAT! (Meridian Bioscience) は、前述した Triage® Parasite Panel 同様に、窓状の反応槽に露出させた膜上で反応を行い、クリプトスポリジウムおよびジアルジアを特異的に検出可能なイムノクロマトグラフ法である。反応槽には両原虫抗原に対する特異抗体が太線状に固着させてあり、検体懸濁液とコロイド色素結合抗体を反応させ膜上に展開することで、抗原とコロイド色素が結合した抗原抗体複合体が膜上の固着抗体と結合し、灰黒色のバンドとして可視化される。判定までの所要時間はおよそ15分であり、迅速診断が可能である。

246検体のヒト糞便検体のオーシストを用いた評価では、ProSpecT® Cryptosporidium Microplate Assay, ImmunoCard STAT! ともに感度は高く、 1.75×10^4 個/mL以上のサンプルで検出が可能であり、特異性においても99%以上と報告されている¹³⁾。 *C. parvum* を感染させた重症複合免疫不全 (SCID) マウス糞便のオーシス

トを材料にして、筆者らが行った ProSpecT® Cryptosporidium Microplate Assay の評価では、検出感度は 1.0×10^4 個/mL以上となり、病期の患者便に通常排出される 10^5 個/mL以上のオーシストは十分に検出可能である。

おわりに

原虫症検査において基本となる、顕微鏡を用いて糞便中のオーシスト/シストを検出する方法は1検体あたりの費用が300円以下と安価であるが熟練を要す。また、PCR法についてはサーマルサイクラーなどの設備の他、精度管理のための陽性コントロールが必要なため、一般検査室での実施にはしばしば困難が伴う。これらと比較すると、各種診断キットは、1検体あたりのコストがかかるのが難点だが、利用価値は高いものと考えられる。残念ながら、本稿で取り上げた赤痢アメーバ症、クリプトスポリジウム症の検出のための各種キットは、すべて臨床診断用としての保険適応が認められていないため、研究用として購入し使用する必要がある。保険適応が認められていない点は、赤痢アメーバの治療薬である metronidazole についても同様だが、いずれも早急な承認が望まれる。

文 献

- 1) 感染症発生動向調査
- 2) WHO: Amebiasis. *Weekly Epidemiol Rec* 72: 97-99, 1997.
- 3) Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E *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: 233-240, 2000.
- 4) 阿部仁一郎, 木俣 勲, 井関基弘: 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. *感染症学雑誌* 76: 921-927, 2002.
- 5) 小林正規, 鈴木 淳, 竹内 勤: 腸管原虫症の迅速診断. *化学療法の領域* 23(S-1): 141-147, 2007.
- 6) Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J *et al.*: Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-437, 2005.
- 7) CDC: Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup.

- MMWR Recomm Rep 49(RR-4) : 1-14, 2000.
- 8) 所 正治, 井関 基弘: クリプトスポリジウム症. *GI Research* 14 : 336-341, 2006.
- 9) Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA *et al.* : Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol* 83 : 825-830, 1997.
- 10) Xiao L, Escalante L, Yang C *et al.* : Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *J Parasitol* 83 : 825-830, 1999.
- 11) Spáno F, Putignani L, McLaughlin 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.
- 12) Pedraza-Diaz S, Amar C, Nichols GL *et al.* : Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg Infect Dis* 7 : 49-56, 2001.
- 13) Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ *et al.* : Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 41 : 623-626, 2003.

* * *

予防接種の手びき〈第11版〉

木村三生夫／平山宗宏／堺 春美 編著

A5判 610頁 定価6,825円 (本体6,500円+税5%) 表98点 図65点

関係方面の要望に応え、麻疹および風疹の定期予防接種実施の細目、インフルエンザ実施要領改正など、最新の動きを入れた第11版。

■主な目次

わが国の予防接種の歴史／予防接種法における接種年齢の解説／定期予防接種／予防接種制度／接種部位と皮下注射の手法／現行の予防接種まとめ／予防接種不適合者、接種要注意者／予防接種後健康状況調査・予防接種後副反応報告／予防接種健康被害救済制度／健康障害事例発生時の対応／副反応と因果関係／ワクチン、免疫グロブリン製剤、抗毒素ワクチンの添加物含有量／ワクチンの製造元・販売元一覧 (添加物含有量などのデータはすべて2006年6月1日に更新)

ワクチン接種の実際：百日咳、ジフテリア、破傷風／破傷風単独／麻疹／風疹／麻疹風疹混合ワクチン／おたふくかぜ／ポリオ／インフルエンザ／インフルエンザ生ワクチン／日本脳炎／BCG／ウイルス肝炎／A型肝炎／B型肝炎／水痘／肺炎球菌多糖体ワクチン／狂犬病／黄熱／コレラ／ワイル病、秋やみ／インフルエンザb菌結合型ワクチン／髄膜炎菌性髄膜炎 (流行性髄膜炎)／腸チフス／ベスト／ライム病ワクチン／ロタウイルスワクチン海外渡航時の予防接種／WHOの拡大予防接種計画、米国の予防接種

■付 録

予防接種法／定期の予防接種実施要領／インフルエンザ予防接種実施要領／予防接種後健康状況調査／予防接種法改正関連通知／結核予防法／学校保健法／感染症法／予防接種法による救済制度／医薬品副作用被害救済制度／ポリオ生ワクチン二次感染対策事業医薬品医療機器総合機構法による救済／B型肝炎母子感染防止事業関連統計／予診票



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.kindai-s.co.jp>

腸管感染症のすべて

Ⅲ 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症

3. 腸管原虫症の迅速診断

小林 正規* 鈴木 淳** 竹内 勤*¹⁾

わが国で診断される機会の多い腸管原虫症としては五類感染症に分類される赤痢アメーバ症、クリプトスポリジウム症、ジアルジア症がある。これら3種の原虫症を対象とした迅速診断法として、それぞれの原虫種に特異性の高い抗原を糞便材料から検出し、診断する市販キットを取り上げ紹介した。特異抗原検出キットによる診断の迅速性、利便性は高いが、抗原検出キット単独で検査する場合は抗原量が少ないと擬陰性になり易いこと、キットの抗原検出反応システムに影響を及ぼす他種腸管原虫や微生物の存在、そして不測の便成分が非特異反応を起こす可能性などを考慮し診断する必要がある。

Key Words : 腸管原虫症, 赤痢アメーバ症, クリプトスポリジウム症, ジアルジア症, 特異抗原検出キット

I はじめに

腸管寄生原虫の鑑別診断法には顕微鏡検査によって便や腸組織生検材料の生鮮あるいは固定染色標本中に検出された原虫を形態学的に鑑別する方法, polymerase chain reaction (PCR) 法による遺伝子診断法, そして免疫学的診断法などにより行われる免疫学的診断には市販の診断キットも利用でき, それらは特に迅速性に優れている。以上に基づき, 本稿では迅速診断法として, 原虫特異抗原を検出する診断キットについて述べる。

II 診断キットによる腸管原虫症の証明

現在, 3種の病原性腸管原虫症: 1. 赤痢

アメーバ症, 2. クリプトスポリジウム症, 3. ジアルジア症の診断のために, 特異抗原検出原理を応用した種々キットが市販されている。しかしながら, わが国ではいまだ検査診断用として保険薬価で承認されたキットは存在せず, これら診断キットは研究用として購入し, 用いることになる。

1. 赤痢アメーバ症診断キット

赤痢アメーバ症には腸アメーバ症と腸から腸外臓器に転移し病変を形成する腸外アメーバ症がある。腸アメーバ症には, 無症候性の持続感染アメーバ症と, 潰瘍形成, 粘血便, 下痢などの症状を伴う組織侵入性アメーバ症に大別される。無症候性のアメーバ症において顕微鏡検査を行う場合の留意点のひとつ

Rapid diagnosis of intestinal protozoan infections

* Seiki Kobayashi, Tsutomu Takeuchi 慶應義塾大学医学部熱帯医学・寄生虫学教室 ¹⁾ 教授

** Jun Suzuki 東京都健康安全研究センター微生物部寄生虫室

Ⅲ 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症

に、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica* [*E.h*]) と非病原性の *Entamoeba dispar* (*E.d*) の形態的な鑑別が困難な点がある。*E.h* と *E.d* との鑑別には、①分離培養株栄養型の種特異的な isoenzyme pattern (zymodemes) を基にした種の同定、②PCR法による種特異的 DNA 塩基配列部分の増幅と検出、③免疫学的手法による種特異抗原の検出などの方法が用いられる。ここでは③の方法に基づく市販キットの中で著者らが現在施設内アメーバ症の疫学調査に使用している米国 TECHLAB 社の *E.h* 特異抗原のみを検出する *E. histolytica II kit* と、かつて使用経験のある米国 BIOSITE 社の *E.h* と *E.d* に共通の特異抗原を検出する Parasite panel について紹介する。

2. クリプトスポリジウム症診断キット

クリプトスポリジウム症は激しい水様性の下痢を主訴とし、宿主が健常であれば多くは 7～10 日で自然治癒し、免疫不全状態であれば慢性化、重症化する日和見感染症である。感染は主に感染したヒトや家畜などの哺乳類の便に排出された感染型のオーシストに汚染された簡易上水道などからの水系感染による。ヒトから分離される、クリプトスポリジウム種はヒトに対する宿主特異性が極めて高い *Cryptosporidium hominis* (独立種となる以前は *C. parvum* genotype 1 あるいは human genotype として分類) と、人獣共通感染症型の *C. parvum* (genotype 2 あるいは bovine genotype) の二種が大半を占める¹⁾。診断は糞便中のオーシストを蔗糖浮遊法、抗酸染色法で検出する顕微鏡検査、オーシスト壁抗原に特異的に結合する標識抗体 (蛍光色素標識) を用いた直接蛍光抗体染色法 (イーグーステイン C&G FITC: 和光純薬; MeriFluor

Cryptosporidium/Giardia: Meridian Bioscience, Inc., OH, USA など数種のキットが市販されている) や PCR 法、そして *C. parvum* に特異性の高い抗原を検出する迅速診断キットなどで行われる。

クリプトスポリジウム症は AIDS (acquired immune deficiency syndrome) 患者で二番目に多く感染が見られる日和見原虫症であり、治療が難しいことから早期診断と予防が必要な感染症である。そのため、抗原検出迅速診断キットの種類も多く、ここでは金沢大学大学院医学系研究科寄生虫感染制御学教室牧野、仲本²⁾ により評価された 3 キット (ProSpecT Microplate Assay [*Alexon-Trend*, MN, USA], ProSpecT *Cryptosporidium Rapid Assay* [*Alexon-Trend*, MN, USA], ColorPac *Giardia/Cryptosporidium* [*Becton Dickinson*, NJ, USA]) と著者らが施設の腸管寄生原虫症の疫学調査に使用した一キット (*Cryptosporidium Test* [TECHLAB, VA, U.S.A]) について紹介する。

3. ジアルジア症診断キット

ジアルジア症の起原虫である *Giardia lamblia* は小腸上部 (十二指腸) や胆管に寄生するため脂肪吸収を阻害し、脂肪便性の下痢をひき起こす。国内では赤痢アメーバ症と同様、輸入感染症、性感染症や施設内感染症として感染者がみられる。診断は血清学的に抗体を検出し難いため、顕微鏡検査により胆汁や下痢便中の栄養型と糞便中の嚢子を検出、PCR 法による遺伝子診断、そして *G. lamblia* に特異性の高い抗原を検出する診断キットなどによって行なわれる。ここでは Triage Micro Parasite Panel, ColorPac *Giardia/Cryptosporidium*, 及び *Giardia II* (TECHLAB, VA, U.S.A) について紹介する。

PCR (polymerase chain reaction)

E.d (*Entamoeba dispar*)

E.h (*Entamoeba histolytica*; 赤痢アメーバ)

AIDS (acquired immune deficiency syndrome)

Ⅲ 腸管原虫特異抗原検出キットの特性

1. 単一種原虫抗原検出キット

① *E. histolytica* II kit (TECHLAB, VA, U.S.A), ② ProSpecT Microplate Assay (*Cryptosporidium*) (Alexon-Trend, MN, USA), ③ *Cryptosporidium* Test (TECHLAB, VA, U.S.A), ④ ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay (Alexon-Trend, MN, USA), ⑤ *Giardia* II (TECHLAB, VA, U.S.A) を以下にとりあげる。

1) 測定原理:

- ① *E. histolytica* II kit ; *E.h* と *E.d* に共通の adhesin ([腸粘膜] 接着因子) 抗原
- ② ProSpecT Microplate Assay (*Cryptosporidium*) ; クリプトスポリジウム原虫から産生される可溶性の *Cryptosporidium* specific antigen (CSA) 抗原
- ③ *Cryptosporidium* Test ; 原虫の細胞表面抗原
- ⑤ *Giardia* II ; ジアルジア栄養型から腸管腔に産生される cyst wall protein 1 (CWP1) 抗原を標的とする。

特異的に結合する抗体を予め enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 用プレートウェル内壁に固着させたウェルに、① *E. histolytica* II kit の場合だと酵素標識した *E.h* 接着因子に特異的に結合する抗体希釈液と検査材料(糞便等)の溶解液を加える。*E.h* 抗原陽性の場合、*E.h* 接着因子抗原はウェル内壁に固着させた抗体に捕捉され、同時に *E.h* 接着因子抗原に特異的な酵素標識抗体が結合する。よく洗浄後、基質を加え呈色させる。判定は反応停止液を加え、吸収波長 450nm の吸光度をプレートリーダーで測定し、陰性コントロールの吸光度と比較することで行う。② ProSpecT Microplate Assay

(*Cryptosporidium*), ③ *Cryptosporidium* Test, ⑤ *Giardia* II, のキットの場合も同様の測定原理に基づき標的抗原を検出する酵素抗体法である。判定まで①, ②, ③, ⑤ともに2時間半程要する。④ ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay はプラスチック材で覆われた反应用装置に開けられた円形窓に露出させた膜上に、クリプトスポリジウム抗 CSA 抗体が spot 状に固着させてあるシンプルなもので、反応膜の下槽には、余分な検体溶液や反应用試薬を吸収するゲル状物質が入っている。CSA 抗原捕捉後、添加する抗 CSA 抗体には biotin が標識され、biotin と結合する streptavidin には酵素が標識されている。基質を加え、呈色させる。反応に要する時間は15分程で迅速性に優れている。

2) 検出感度・反応特異性:

① *E. histolytica* II kit : 0.2 ~ 0.4ng/ 1 反应用ウェルの *E.h* 接着因子抗原が検出可能とされる。抗原材料として、無菌培養した *E.h* 栄養型 (HM1-IMSS cl6 株) を用いた著者らの実験結果からは、栄養型数が 20 ~ 25 以上で肉眼的にも明瞭な呈色反応 (OD450 = 0.113 ≤) を示した³⁾。嚢子の場合には嚢子壁が³⁾、嚢子内虫体の接着因子抗原と抗体との反応を遮断しているため、嚢子壁を破碎する必要がある。著者らは反応に先立ち、凍結融解 (1 ~ 2 回) を行っている。標識抗体には精製された *E.h* に特異的な接着因子抗原組み換え蛋白を免疫して得られたモノクローナル抗体を用いているため特異性は高い。

② ProSpecT Microplate Assay, ④ ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay : 牧野らによれば、実験的に SCID (重症複合不全症) マウスに *C. parvum* と *C. muris* を感染させて、その便材料を検査した結果からは② ProSpecT Microplate Assay, ④ ProS-

III 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症

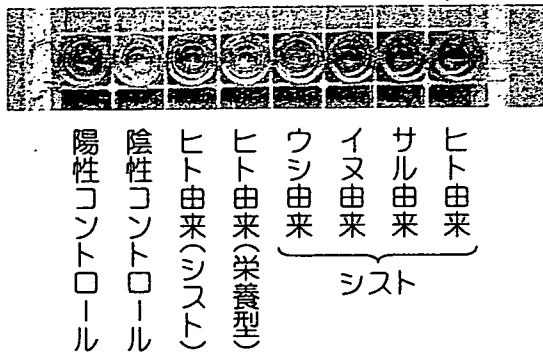


図1 ジアルジア抗原検出キット (GIARDIA II, TECHLAB, VA, U.S.A) による種々ジアルジア株抗原の検出例

Cyst wall protein 1 (CWP1) 抗原はヒト由来と動物 (ウシ, イヌ, サル) 由来の *Giardia* 種に共通の抗原であることがわかる。

pecT *Cryptosporidium* Rapid Assay, 後に述べる ⑥ ColorPac *Giardia/Cryptosporidium* ともに *Cryptosporidium* のオーシスト数が 10^4 個/mL 以上含まれる時, 陽性と判定された。但し, 検出感度比較のために実施された顕微鏡検査では, ショ糖遠心沈殿法 (10^2 個/mL 以上), 抗酸染色法 (10^3 個/mL 以上) と検出感度では抗原検出キットの方が劣っていた。特異性は, 3 種キットともに *C. parvum* の感染マウスの便では標的抗原検出が可能であったが, *C. muris* 感染マウスでは ⑥ ColorPac *Giardia/Cryptosporidium* のみが, 用いられている抗体が異なるせい, *C. muris* の抗原も検出可能であった。

④ *Cryptosporidium* Test: 陽性と判定されるためには約 78 ~ 156 個 / 1 反応用ウェル以上の *C. parvum* のオーシストが必要とされる。特異性に関しては著者らが行った施設の糞便スクリーニング検査の結果からはクリプトスポリジウム症患者は検出されなかったが, 多数の真菌胞子 (種は不明) が観察された検体では反応が弱陽性を示すことが確認されている。

⑤ *Giardia* II: 反応特異性の問題点としてはヒトから分離される *G. lamblia* と遺伝子型

の異なるイヌ, サル, ウシなどに認められるジアルジアとも反応 (図 1) することがあげられる [ジアルジアの PCR 法とその PCR 増幅産物の解析により, ジアルジアの遺伝子型が明らかになり, ヒトに特異的な遺伝子型と人畜共通の遺伝子型が判明している¹⁾]。被囊していない無菌培養した栄養型を用いて著者らが行った検出感度を調べた実験では, 陽性反応に必要な栄養型数は 200 ~ 500 個 / 1 反応用ウェル以上であった。

2. 複数種原虫抗原検出キット

⑥ ColorPac *Giardia/Cryptosporidium* (Becton Dickinson, NJ, USA), ⑦ Triage Micro Parasite Panel (BIOSITE, CA, USA)

1) 測定原理:

⑥ ColorPac *Giardia/Cryptosporidium*; 上に述べた ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay と同様, 反応用装置の窓状の反応槽に露出させた膜上で反応を行う方法であるが, 標的抗原検出にはイムノクロマトグラフ法が用いられている。複数の抗原を検出するため, 反応膜の所定の位置には予め avidin, マウス抗 *Cryptosporidium* 特異抗体, ヤギ抗マウス IgG 抗体がそれぞれ太線状に固着させてある。先ず, 試験管内で便検体希釈液と biotin 標識したウサギ抗 *Giardia* 特異抗体, コロイド色素が標識された抗 *Giardia*, 抗 *Cryptosporidium* 特異モノクローナル抗体を含む希釈液とを混合反応させる。その混合液をイムノクロマトグラフ法により, 膜上で展開させる。何れかの抗原が陽性的場合, 膜に太線状に固着させてある対応する抗体とコロイド色素が結合した抗原が高密度で結合, 可視化することで判定する方法である。

⑦ Triage Micro Parasite Panel; 上記の *Cryptosporidium* Rapid Assay と同様, 反応用装置の窓状の反応槽に露出させた膜上で反応を行う酵素抗体法である。装置中央には 3.7×39 mm の細長い反応槽 (窓) があり, *E.h/E.d* に特異的な 29kDa 膜抗原, *Giardia*

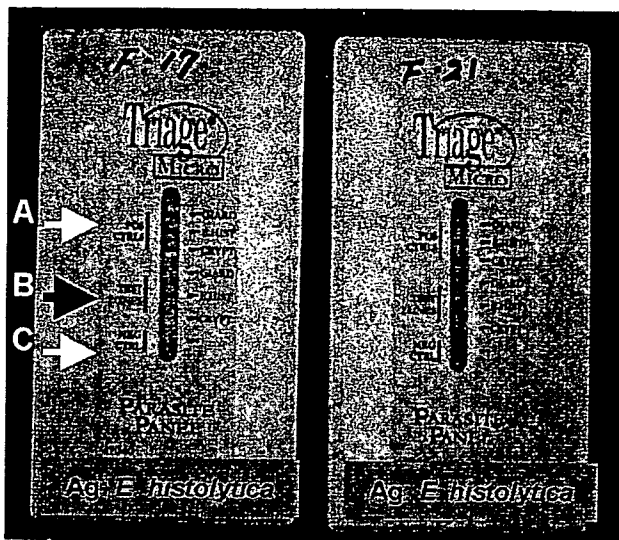


図2 3種腸管原虫抗原検出キット(Triage Micro Parasite Panel [BIOSITE, CA, USA])による、赤痢アメーバ抗原陽性例

A: 陽性コントロール(3種抗原似対応する3本のバンドが見られる) B: 太線状に塗布された *E. histolytica*/*E. dispar* 特異抗体と反応した施設赤痢アメーバ症例の便材料(2例)。C: 陰性コントロール(非特異反応のチェック)。

lamblia に特異的な alpha-1-giardin 抗原, *Cryptosporidium parvum* に特異的な protein disulfide isomerase 抗原に特異的に結合する3種の抗体がそれぞれ反応膜の所定の位置に太線状に固着されている。この反応槽に新鮮なあるいは新鮮なまま凍結保存された便の懸濁・濾過液を加え反応させる。もし、便溶液の中に上記3種原虫の何れかに特異的な抗原が存在すれば、その抗原と膜に固着させてある特異的な抗体が結合する。次に、酵素標識した *E.h/E.d*, *G. lamblia*, *C. Parvum* の3種抗原に特異的に結合する抗体混合液を加え、捕捉された特異抗原と反応させる。よく洗浄後、基質液を加え反応させ、呈色反応の有無を肉眼的に観察し、3種原虫各々について、抗原の陽性・陰性を判定する(図2)。判定までの時間は⑥、⑦ともに15分程で迅速診断に適している。

2) 検出感度・反応特異性:

⑥ ColorPac *Giardia/Cryptosporidium*: III 1. 2) を参照。

⑦ Triage Micro Parasite Panel: 各原虫抗原検出下限は a) *E.h/E.d*: 29 kDa 膜抗原; 4 ng/mL, b) *G. lamblia*: alpha-1-giardin 抗原; 3 ng/mL, c) *C. parvum*: protein disulfide isomerase 抗原; 6 ng/mL とされる。反応特異性は、膜に固着させた抗体と標識抗体とともに、ポリクローナル抗体ではあるが、*E. histolytica* II kit と同様3種原虫に特異性の高い組み換え蛋白抗原を各々精製し、その各々を免疫して得られた抗体を用いているため高い。

3) 抗原検出キットの有用性:

① *E. histolytica* II kit: *E.h* に感染すると、ELISA 法など感度の高い方法を用いれば、無症候であっても、多くは血清反応で擬陽性～陽性となる。しかしながら、組織侵入性のアメーバ症であっても宿主側に免疫グロブリン産生の低下をみるような免疫不全がある場合や、まれに virulence (病毒性) が極めて低い *E.h* 株による無症候性感染も見られ、血清反応が陰性となる場合もある。また、*E.d* 感染では殆どの場合、血清反応は陰性となる。このような症例では *E.h* 特異抗原検出キットによる検査が有用となる。また、嚢子や栄養型の検出が困難な水様性下痢便や時間が経過し栄養型の検出が困難な粘血便の検査、そして治療効果判定などに抗原検出キットによる検査は有用であり、一度に多数の検体が処理できること、*E.h* 感染を特定するための迅速性にも優れていることから疫学的調査にも適している。利点としては、a) 冷凍で長期保存された検体でも検査が可能。b) 便以外の肝膿瘍等の膿汁からの抗原検出も可能。c) 抗原蛋白が比較的安定で変性し難いためアメーバの生死に影響を受け難く、治療効果判定にも有用。d) 1 反应用ウェルごとに切り離せるため、個人検査から集団スクリーニング検査にまで対応できる、などがあげられる。

赤痢アメーバ症の検査において⑦ Triage Micro Parasite Panel が① *E. histolytica* II

Ⅲ 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症

kitと大きく異なるのは、*E.h/E.d*の両種に反応特異性がある点である。そのため、無症候例では*E. histolytica II* kitの併用やPCR法などによる種の鑑別が必要となる。判定までに要する時間は*E. histolytica II* kitは2時間半程度、Prasite Panelは20分程度と迅速性に関しては*E. histolytica II* kitより優れている。但し呈色反応を肉眼的に判定するため、弱い陽性反応を見落とす可能性もある。また、基質を加えてから5分後に反応の有無を判定するが、5分以降、急速に基質液が非特異的な呈色反応を起こすため、適正に判定できる時間が限られる。

⑦ Triage Micro Prasite Panel：このキットは*E.h/E.d*, *G. lamblia*, *Cryptosporidium* sp., の3種の腸管寄生原虫感染の有無を同時に検出できるため、下痢症のスクリーニングにも有用であるが、多数のTriage Micro Prasite Panelの反応を同時に判定できないことなどから、多数の検体のスクリーニング検査には用い難い点や、消費期限が6カ月と短く、著者らが購入した2002年当時のPrasite Panelの1テストあたりのコストが約2,500円と現在(2007年)の*E. histolytica II* kit(約580円)購入価格の約4.3倍も高いことなど、考慮すべき点は残る。

② ProSpecT Microplate Assay (*Cryptosporidium*), ③ *Cryptosporidium* Test, ④ ProSpecT *Cryptosporidium* Rapid Assay, ⑤ *Giardia II*, ⑥ ColorPac *Giardia/Cryptosporidium*：これらの利点としては顕微鏡検査のように検査に熟練を必要とせず迅速性が高いことなどがあげられるが、クリプトスポリジウム症では*C. parvum*以外の感染では擬陰性となりやすいことや、顕微鏡検査に比べ検出感度がやや低いことなどの留意点があり、より信頼性の高い検査を行うためには顕微鏡検査と併用することが推奨される。これら診断キットによる1検体当たりのコストは(1,100～2,850円)となる。

4) 抗原検出キットの問題点：

a) 一般的に抗原検出感度には限界があり抗原量が少ないと擬陰性となる。b) ① *E. histolytica II* kit, ② ProSpecT Microplate Assay (*Cryptosporidium*), ③ *Cryptosporidium* Test, のようなELISA用プレートをを用いた反応では反应用ウェル底を傷つけると擬陽性になり易い。c) ① *E. histolytica II* kitにおいて著者らの経験から、便に含まれる接着因子抗原以外の不明成分によって、2～3%の便材料で擬陽性となったロットがひとつ見つかっている。このようなロットで陽性になった場合、誤反応による擬陽性か否かの確認は難しい。d) 現在の所市販されている抗原検出キットの使用期限は6カ月～1年と短いため、期限内にキットを消費できない場合、1件あたりのコストが高くなる。

Ⅳ おわりに

わが国では、赤痢アメーバ症を始めとする腸管原虫症が³性感染症や日和見感染症として既に定着し、さらに感染拡大傾向を示している。しかしながら迅速診断が可能な腸管原虫抗原検出キットは、現在検査診断用としては認可されていないため、実際にはキットを有する公立の研究所や大学の研究室に依頼しなければならないのが現状である。今後、病院検査室で信頼性の高い迅速診断を行うためにも、簡便な腸管原虫抗原検出キットの保険薬価での承認が期待される。

文 献

- 1) 所 正治, 井関基弘：クリプトスポリジウム症。GI Research 14：20-25, 2006
- 2) 牧野陽子, 仲本賢太郎：クリプトスポリジウム症診断のための各種検査キットの評価とヒトおよびイヌにおける疫学調査。金沢大学医学部保健学科検査技術専攻2003年度卒業研究業績集
- 3) 小林正規ほか：赤痢アメーバの抗原検出法

- Clinical Parasitology. 16 : 16-18, 2005
 4) Niichiro Abe, et al. : Genotyping of Giardia isolates from humans in Japan using the

small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. Jpn J Infect Dis 58 : 57-58, 2005



抗菌薬の選択と使い方 外科領域 改訂4版

名古屋市立緑市民病院 元院長 品川 長夫 著

A 5判 456頁 定価 5,145円(本体 4,900円+税 5%)送料実費
 ISBN4-7532-2204-7 C3047

- ◎外科常用薬剤から抗菌薬の使用原則、感染症治療の要点、一次感染症、術後感染症まで、外科領域感染症における化学療法をわかりやすく解説！
- ◎術後感染予防については、理論と実際を詳述。また、院内感染防止対策に加え、巻末には付録として抗菌力一覧、略語一覧を付した。
- ◎臨床医はもちろん、抗菌薬の使用に携わる全ての医療従事者に必携の一冊！

おもな内容

- 第1章 外科常用薬剤
 - 第2章 薬剤耐性菌の発生機序
 - 第3章 抗菌薬の使用原則
 - 第4章 感染症治療の要点
 - 第5章 一次感染症
 - 第6章 術後感染症
 - 第7章 術後感染予防の理論
 - 第8章 術後感染予防の実際
 - 第9章 院内感染防止対策
 - 第10章 感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律
- 付録