

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の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

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

種名	宿主	寄生部位	オーシストの大きさ(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)	Pavlassek, 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*	Tyzzler, 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)	Tyzzler, 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. *Tyzzler(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プロゾイトが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、小腸で脱囊したスプ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。スプ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10~20回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。

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

の鑑別が感染源を特定するうえで重要である。

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、アルベ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), p1003-1014, 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.

PCR法によるサイクロスポーラの検出と種の同定

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・吉田知代・荒井朋子・井関基弘

藤田保健衛生大学病院 臨床検査部

古川 博

同 リウマチ感染症内科

小松八千代

PCR法によるサイクロスポーラの検出と種の同定

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・吉田知代・荒井朋子・井関基弘

藤田保健衛生大学病院 臨床検査部

古川 博

同 リウマチ感染症内科

小松八千代

Key Words : *Cyclospora cayetanensis*, cyclosporiasis, polymerase chain reaction

はじめに

従来、ヒトから検出されるサイクロスポーラ・カエタネンシス (*Cyclospora cayetanensis*) はヒトのみを宿主とすると考えられてきたが、同時に、他には乳類のリザーバーが存在する可能性も議論されてきた。はたしてヒトに感染するサイクロスポーラに zoonosis タイプが存在するのか。この問いへの答えには、ヒトのサイクロスポーラ症例から分離された原虫の遺伝子レベルでの種鑑別が必要となる。今回われわれは、インドネシアからの帰国者のサイクロスポーラ症例を経験し、治療前後の糞便検体を用いた PCR 法による完治の確認および種鑑別の評価を実施したので報告する。

症 例

患者：69歳，男性。

主訴：軟便・腹部不快感。

家族歴・既往歴：特記事項なし。

現病歴：2006年2月4日～3月5日までインドネシアのジャカルタに滞在。3月2日より水様下痢（2回/日程度）が発症。帰国後も軟便（1日1回）と腹部不快感が持続した。3月10日に近医受診。糞便寄生虫検査にて原虫様シスト/オーシストが検出され、また、便培養にて病原性大腸菌（+）。酪酸菌製剤（ビオスリー®）を処方されるが改善せず、3月16日藤田保健衛生大学大学病院紹介受診。

初診時検査所見：血液検査・生化学的検査・尿検

Detection and Identification of *Cyclospora cayetanensis* by a Nested-Multiplex PCR Analysis

Masaharu Tokoro* Hiroshi Furukawa** Yachiyo Komatsu*** Tomoyo Yoshida*
Tomoko Arai* Motohiro Iseki*

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

**Department of Laboratory Medicine, Fujita Health University Hospital

***Division of Rheumatology and Infection Diseases, Department of Medicine, Fujita Health 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

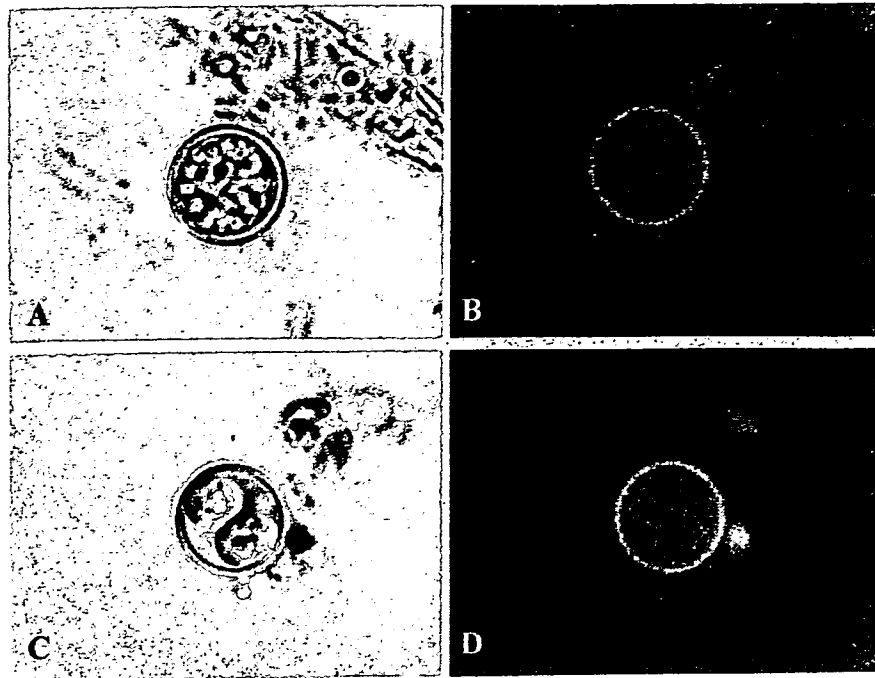


図1 光学的顕微鏡像

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')	Amplikon Size (bp)	Designed Application
F12(forward)	<i>Cyclospora</i> spp.	TACCCAATGAAAACAGTTT	636	1st PCR
R12(reverse)	and <i>Eimeria</i> spp.	CAAGAGAAGCCAAAGTADG		
ESSP84(forward)	<i>Eimeria</i> spp.	GTCTCAATTTGTTTCTAGGACCA	174	
CC719(forward)	<i>C. cayentanensis</i>	GTAOCCTCCOCCTTGG	298	
	<i>C. cervophthalci</i>			2nd nested-multiplex
FLDC661(forward)	<i>C. colubii</i>	CTGTCTGGTTCATCGTCCOC	361	PCR
	<i>C. papillaria</i>			
CBP992(reverse)		CGTCTTCAAACCCOCTACTGTTCG		

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。精査のためシヨ糖遠心浮遊法を実施し、蛍光顕微鏡のUV励起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、ピオスリー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、ピオスリーが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ヨ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 μ m(7.6~8.7 μ 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

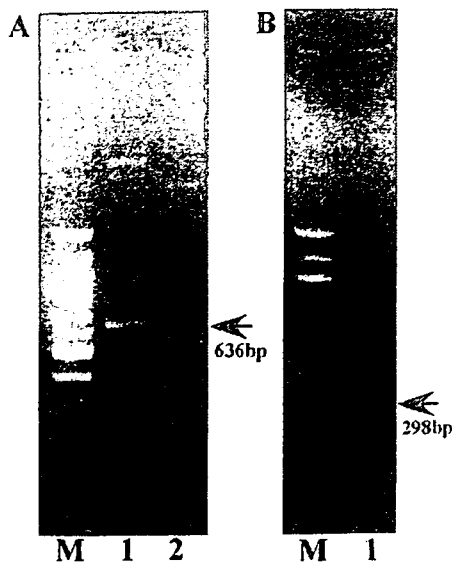


図2 PCR増幅産物のゲル泳動像
 (A) 1st PCRの結果, M: 100bp ladder,
 1: 治療前, 2: 治療後
 (B) Multiplex-PCRの結果, 治療前の1st PCR
 サンプルをテンプレートに2nd PCRを実施

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¹⁾ 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²⁾, 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ー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, サイクロスポーラが検出されなかったという Eberhard らの報告をベースとし³⁾, 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⁴⁾。これらの *C. cayetanensis* 近縁種の存在は, 2001 年の続報⁵⁾, さらに 2004 年の Legesse らの報告によって支持され⁶⁾, 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ーラにおける *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 (636bp) 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. cercopithecii* 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 γ 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"> • 18 SrRNA • Hsp 70 • COWP • β-Tubulin • ポリスレオニン T • アクチン 	種および遺伝子型鑑別
<ul style="list-style-type: none"> • 60 kDa グリコプロテイン • Microsatellites • 核外二重鎖 RNA 	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¹⁾, 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²⁾³⁾. 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⁴⁾. 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⁵⁾, 熱ショック蛋白質 (heat shock protein 70: Hsp 70)⁶⁾, オーシスト壁蛋白 (*Cryptosporidium* oocyst wall protein: COWP) 遺伝子⁷⁾, 小亜粒子リボソーム RNA (small subunit of ribosomal RNA: SSUrRNA) 遺伝子⁸⁾, ポリスレオニン T (polyT) 遺伝子⁹⁾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¹⁰⁾、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2¹¹⁾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¹¹⁾。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*, 2005¹¹⁾より改変引用)

表2¹¹⁾に示したように、*C. meleagridis* をはじめいくつか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¹²⁾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

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¹³⁾。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*¹⁴⁾、*C. hominis*¹⁵⁾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同性が高く(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⁺)、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¹⁶⁾。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* 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¹⁷⁾。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る可能性がある¹⁸⁾。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¹⁹⁾、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²⁰⁾。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²¹⁾, 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¹⁵⁾, 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

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.

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¹⁾。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

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

*：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

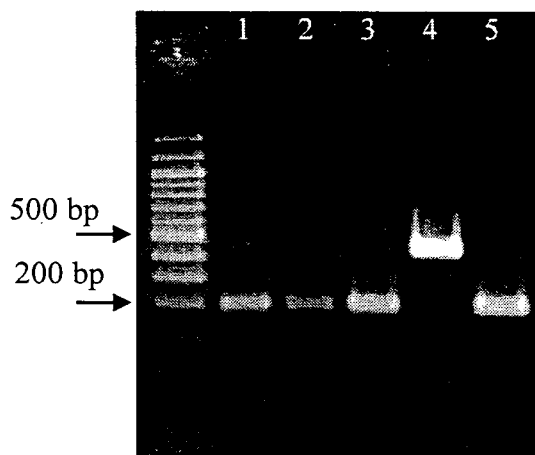


図1 SSUrRNA を標的とした PCR 法による赤痢アメーバ，*E. dispar* 遺伝子の検出
1～3：施設Nの糞便試料
4：*E. histolytica* (HM1：IMSS)
5：*E. dispar* (SAW1734RclAR)

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、小亜粒子リボソーム 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²⁾。

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³⁾、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。405nm 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 220bp) を標的とした PCR を行った⁴⁾。PCR 増幅産物を精製後、BigDye Terminator Cycle Sequencing 法によるシーケンス反応を行い、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。