

200726036A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立

(H19-新興-一般-007)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮 平 靖

平成19(2008)年3月

目次

I.	総括研究報告書	
	慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立 宮平靖	・・・ 1
II.	分担研究報告	
1.	シャーガス病感染制御手法の新規開発 宮平靖	・・・ 59
2.	マラリア感染制御手法の新規開発 宮平靖	・・・ 62
3.	脳マラリア感染制御手法の新規開発 宮平靖	・・・ 66
4.	消化管原虫およびマラリア原虫検査 赤尾信明 春木宏介	・・・ 68
5.	日本住血吸虫症の簡易診断法に関する研究 大前比呂思	・・・ 74
6.	在日外国人における慢性循環器疾患の罹患状況に関する研究 大前比呂思 春木宏介	・・・ 77
7.	在住外国人におけるクリプトスポリジウムおよび ランブル鞭毛虫の保有調査および迅速検査法の検討 黒木俊郎	・・・ 80
8.	慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立 春木宏介 赤尾信明	・・・ 90
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 98
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

慢性寄生虫感染症の侵入監視及びその健康管理体制の確立

主任研究者 宮平 靖 防衛医科大学校

研究要旨

急増する在留外国人の出身国では、国内では発生が無いまたは撲滅された感染症群が流行している可能性がある。その中で、慢性感染する感染症群の国内流入の可能性が指摘されているが詳細は明らかではない。本研究では慢性感染する寄生虫症/原虫症の在留外国人における罹患状況の把握とその監視体制の確立、迅速診断/治療法の開発や健康管理/教育体制の整備、地方自治体と協調し本健康事案に対するガイドライン作成を行い厚生労働行政に寄与する。在留外国人の多い地方自治体をモデルケースに解析を進めている。まず慢性感染する寄生虫症/原虫症に着目し、在留外国人の方々を対象に生活歴、家族歴、病歴調査を行っている。続いて、出身地ごとに現地での上記寄生虫症/原虫症の流行現況に関し詳細な疫学データを収集する。対象者には、公式説明会の開催、戸別訪問を通し、調査研究の意義と必要性を十分に説明と十分な質疑応答を重ね、インフォームド・コンセントの下に調査研究への参加協力を得ている。研究対象者に対する人権擁護上の配慮に努め、個人情報等の管理については遺漏の無きよう周知徹底を図り、個人情報の守秘義務の遵守を確認し進めている。採血（抗体検査、DNA 検査等）および検便、検尿（寄生虫卵、原虫嚢子等の検索）を実施しており、慢性寄生虫症/原虫症の罹患率を確定すると共に、必要に応じて超音波検査や心電図などの簡便な画像・機能検査も行って病態の把握にも努めている。検便、検尿に関しては、古典的な診断手法がゴールド・スタンダードであると思われるが、血清を検体材料とする抗体検査、DNA 検査に関しては、新規迅速診断手法の開発も視野に入れ、新たな技術革新を模索する。特に、シャーガス病、リーシュマニア症の血清学的診断法の信頼性は十分ではないことから、将来の感染血液検出手法への応用も念頭に置き、感度、特異度ともに高い診断手法を開発する。また、新規治療法の開発研究については、既存薬剤療法との投与プロトコールの改良等結果重視の観点からアプローチし、一方、予防的/治療的免疫療法の開発研究について、マラリア、シャーガス病、リーシュマニア症、住血吸虫症に対し、旧来の免疫療法の殻を打ち破る T 細胞免疫応答の誘導手法に着目したアプローチで、感染制御手法の新規開発を目指している。

分担研究者

赤尾信明	東京医科歯科大学	准教授
大前比呂思	国立感染症研究所	室長
黒木俊郎	神奈川県衛生研究所	主任研究員
春木宏介	獨協医科大学	教授

A. 研究目的

特別永住者を除く在留外国人は、平成17年度において150万人を超えた。一般国民の隣人となった在留外国人の慢性感染症の罹患状況の調査、監視体制の確立、迅速診断/治療法の開発や健康管理/教育体制の整備、地方自治体と協調した本健康事案に対するガイドライン作成は、安全・安心な社会の形成のために必要不可欠である。日本は、世界の中でも感染症の大規模流行が少ない、極めて衛生的な国である。50、60年ほど前までは多くの乳幼児が下痢によって落命していた時代からはまさに隔世の感があると言ってよいであろう。しかし、この厚生労働行政の成功は逆に、日本の常識が世界の非常識、世界の常識が日本の非常識といった傾向を生み、多くの日本人はトリインフルエンザ等日本国土へ侵入する可能性の高い感染症のニュースにより、国外の感染症の動向を感じるだけである。専門家の間では周知のことであるが、多くの国々においては日本ではかつて存在したことが無い感染症、またはかつては流行していたが既に撲滅に成功した感染症が流行蔓延している。ある種の感染症は、検疫体制の強化により水際で日本への侵入を防ぎうるが、人的交流の拡大とともに人により持ち込まれる慢性感染症の実態の把握は困難である。本

研究で調査対象とする寄生虫症/原虫症は慢性感染症を構成するひとつの疾患群であり、外国人の急激な在留数の増加により国内へ持ち込まれている可能性が指摘されている。米国は移民の国家と言われるとおり世界中の多くの人々が永住を希望し、またそれを受け入れている国である。しかし、シャーガス病を例にとっても、献血時に本症を念頭に置いたスクリーニングテストは実施されておらず、中南米からの移民増加により輸血、臓器移植を介した感染危険性の増大が議論されているが(Kirchhoff LV, N. E. J. M., 329:639, 1993)、大規模な調査研究に着手できない理由は不法就労者が多く、疾患の実態把握以前に在留外国人の実数すら把握できないという現状が影響しているものと考えられる。わが国でも不法就労者は存在する可能性はあるが米国ほどではなく、本研究の遂行に当たって重要な前提条件となる合法的に在留する外国人が大半を占めるという特色がある。世界的に見て対策手法のあり方につき明快な統一見解の無い本健康事案に対し、代表的な慢性感染症である寄生虫症/原虫症を選び対策ガイドラインの作成までを目指す本研究を遂行するにあたり、わが国は最適な環境を備えていると言えるであろう。さらに解析を行う研究者は上記、マラリア、シャー

ガス病、リーシュマニア症、土壌伝播寄生虫症、住血吸虫症の研究領域で広範な業績を残してきており、日本国内において急増する在留外国人の本疾患群への罹患状況の把握からガイドライン作成までを一貫して解析遂行出来る研究組織であると自負している。疫学、行政、教育の側面からの解析に加えて、新規予防的/治療的免疫療法の開発研究にもエフォートを投入し、マラリア、シャーガス病、住血吸虫症等慢性疾患の対策手法としては最もコスト・エフェクティブなワクチン手法の開発を目指す統合的調査研究を行えるという特色を有している。

B. 研究方法

B-1. 本研究の主要テーマである在留外国人の方々の慢性寄生虫症/原虫症の罹患状況の把握のため、その名簿作成を進めている。続いて、作成した名簿を基に在留外国人の方々の調査研究への参加協力を得ているところである。さらに、地域ごとの説明会、戸別訪問等での説明を試みる。在留外国人の方々の大半は、日本において職業を有していると考えられることから、職場への協力要請も積極的に行っていく。

B-2. 調査研究への同意を得られた方々を対象に、出身国、出身地、出身

地での感染症情報、疾患特に感染症罹患歴、家族歴、現病歴等の情報を得ることを進めている。調査研究への同意を得るにあたり、四カ国語(日本語/英語/中国語/スペイン語)並書の説明文書(参考資料 1)と母国語の通訳の方同席のうえ、同意書(参考資料 2)に御署名をしていただいた。

B-3. 血清学的診断手法、DNA 診断法の遂行を目的とする採血、また寄生虫学的診断法の遂行を念頭に置いた検便、検尿を行っている。血液検体は、マラリア、トリパノソーマ等検査のために薄層塗抹標本、厚層塗抹標本を作製の後、残りの血液は血清分離の後、検査実施まで適切に凍結保存している。便、尿検体は、採取日または翌日までには速やかに検査を終了できるように、迅速な作業遂行を原則としている。さらに、より多くの在留外国人の方々から検体を得ることができるよう努める。寄生虫/原虫の微量抗原、微量遺伝子の検出を念頭に置いた診断手技の実効性についてもあらゆる可能性を検討する。検診時には、検診票(参考資料 3)に各所見を記入し各検査および検体の収集を進めている。

B-4. 新規迅速診断手法の開発研究に関しては、血清学的免疫診断、DNA 診断手法等を改変、応用し、対象とする各寄生虫症/原虫症個々の疾患に対し推進している

B-5. 新規治療手法の開発研究に関しては、免疫学的アプローチから計画を推進している。慢性感染症に対する対策手法としては、薬剤療法ももちろん重要ではあるが、コスト・エフェクティブなアプローチとしてはワクチン開発が最適であると考えられる。慢性感染症に対するワクチンとして予防ワクチンと治療ワクチンがあり、各寄生虫症/原虫症に応じた戦術が重要となる。住血吸虫症に関しては、抗体応答誘導が感染予防には重要と考えられ、新規標的抗原の同定から防御免疫応答の解析等を推進している。また、マラリアやシャーガス病に対してはT細胞免疫応答の誘導手法開発を念頭に置き、研究計画を構成し進めている。これら感染症は、細胞内寄生と言う性質上、感染制御の目的を達成する上で抗体応答誘導のみでは限界があると思われることから、新しい概念であるT細胞の免疫応答を予防的/治療的ワクチン手法へと応用することを目指している。

B-6. 在留外国人の方々が罹患する慢性寄生虫症/原虫症の監視体制の確立、健康管理/教育体制の整備に関しては、在留登録された外国人の方々へ四カ国語(日本語/英語/中国語/スペイン語)並書の健康管理手帳を独自に作成し配布(参考資料4)しているが、インターネット、電子メール等の媒体を用

いて転入/転出する方々の把握に努める。在留外国人の方々のコミュニティーに複数人の健康管理を担当する主要協力者を募り、その方々を通じ新規転入者の慢性寄生虫症/原虫症罹患調査の遂行、転出先の情報収集等に力を注ぐ。

B-7. 在留外国人の方々については、日本語/英語だけでなく出身地の言葉で書かれた感染症情報を入手し、それらを用いて積極的に啓蒙活動を行う。

B-8. 隣人である日本人を対象にした教育講演を主催し、在留外国人数の増加に伴う先入観の排除、不要な不安の払拭に努めてゆく。

B-9. 平成21年度には、2年間の研究に基づいて、本健康事案に対する対策ガイドラインを調査対象地方自治体の担当者らとともに作成し、その合理性、信頼度を調査した後に全国の自治体へ配布する。

C. 研究結果

本研究の主要テーマである在留外国人の方々の慢性寄生虫症/原虫症の罹患状況の把握のため、在留外国人の方々の健康診断を実施した。平成18年12月に実施した検診では51名、平成19年1月の検診では63名の受診者があり、初年度の受診者総数は114名であった。この内、血液あるいは血清、糞便のいずれかの検体を回収し得たのは

107 名であった。受診者の性別、年齢、国籍、滞在期間などについては、表 1-5 および図 1-9 に示す通りであった。そして、下記 C-4-8 に述べる結果が得られた。

また、マラリア症やシャーガス病に対する T 細胞免疫応答の誘導手法によるワクチン開発については、下記 C-1-3 に述べる結果が得られた。

C-1. 実験シャーガス病を用いた T 細胞免疫応答誘導手法（ワクチン手法）開発研究については、組換えウイルスベクターを用いた研究を推進した。用いた組換えウイルスベクターは、いずれも高度に弱毒化されたアデノウイルス（Ad）、ワクシニアウイルス（MVA）、インフルエンザウイルス（FLU）である。*T. cruzi* 由来 TSSA 抗原上に見出された CD8 陽性 T 細胞誘導配列にメチオニンを加えた配列である MANYNFTLV の配列より、組換え体を「MANY」と命名している。これら組換えウイルスベクター三種を組み合わせた免疫手法は、単独または二種免疫手法に比べて抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導能が優れていた。三種免疫では、(1) FLUMANY 初回, AdMANY 二回, MVAMANY 終回免疫、(2) AdMANY 初回, FLUMANY 二回, MVAMANY 終回免疫は、(3) AdMANY 初回, MVAMANY 二回, FLUMANY 終回免疫に比較して、より

高レベルの抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞分化を誘導することが明らかになった。また、(1)の免疫条件では(2)の免疫条件に比較して、より多くの IFN- γ 産生細胞を誘導することが明らかになった。そして、感染実験においても(1)の三種免疫手法は二種免疫手法に比べて、血中出现原虫数および生存マウス数においても、高い感染防御能を誘導した。

C-2-1. TSSA エピトープである H-2K^b 拘束性 ANYNFTLV 配列、およびこの配列を GFP の C 末端に融合させたものを HSP70 プロモーターにより発現するコンストラクトを作製し、ネズミマラリア原虫である *P. yoelii* の DHFR 領域に相同組換えにより導入した。各組換えマラリア原虫はクローニング後、ゲノム DNA を抽出し *Bgl II* で切断後、サザンブロッティングにより組込み部位の確認を行った。さらに赤内型における増殖および致死株としての性質を保持していることも確認した。また、GFP 発現マラリア原虫については、赤血球内での GFP 発現および、血中原虫密度と GFP 発現率の相関も確認した。

C-2-2. TSSA 発現マラリア原虫由来粗抗原によるエピトープ特異的 CD8T 細胞の誘導

組換えマラリア原虫が TSSA エピトープを発現しているかを確認するために、各組換えマラリアを感染させたマウスより感

染赤血球を分離し、これを粗抗原としてアジュバントと混合し、マウスの足蹠に皮下注射、二週後に膝下リンパ節を取り出し、TSSA エピトープ特異的 CD8T 細胞の誘導を IFN- γ 産生を指標として ELISPOT アッセイにて検討した。さらに二度の特異抗原刺激による増殖誘導を行った。その結果、抗原特異的 CD8T 細胞が誘導されており、これらの組換えマラリア原虫が目的のエピトープを発現していることが確認された。

C-2-3. 次に各組換えマラリア原虫をマウスに感染させた後、血中原虫密度が 20-40 % になった時点でクロロキン投与を行ない、治癒後に抗原特異的 CD8T が誘導されているかを同じく ELISPOT アッセイにより検討した。その結果、組換えマラリア感染によってもエピトープ特異的 CD8T が誘導されることが確認された。

C-2-4. エピトープ特異的 CD8T 細胞をさらに効果的に誘導する目的で、組換えアデノウイルスと組換えワクシニアウイルスを用いた prime-boost 接種を行った。組換えアデノウイルス接種二週間後、組換えワクシニアウイルス接種三週間後に各組換えマラリア原虫を免疫マウスに感染させ、血中原虫密度および生存率について検討したところ、コントロールとなるエピトープを持たないマラリア原虫に感染したマウスに対し、TSSA エピトープ発現マラリア感染マウスにおいては

血中原虫密度に有意差は認められなかったが、生存率の改善が認められた。

C-3. ネズミマラリア株の一つ、*P. berghei* ANKA を C57BL/6 マウスに感染させたときには、脳組織への血液成分の漏出が確認されたが、*P. berghei* NK65 を C57BL/6 マウスに感染させた場合には、ほとんど漏出がみられなかった。このことから、ANKA 株の C57BL/6 マウスへの感染が脳マラリア発症のモデルとして有用であることが確認できた。

C-4. マラリア原虫抗原検査は、OptiMAL を用いてマラリア抗原検査を実施し得たのは 105 検体であった。いずれの回の検査でも、陽性対照血液(熱帯熱マラリア陽性患者血液)でのみ 2本の陽性バンドが出現したが、検診受診者の血液はすべて陰性と判定された。本検査結果については分担研究者である春木の報告書の中でもふれられている。糞便検査のための検体が回収できたのは、第1回目検診時 30 検体、第2回目検診時 17 検体であった。これら 47 検体をホルマリン・エーテル法により糞便内の虫卵を検査したところ、1例から鉤虫卵を検出した。この検体はフィリピンから来日した女性のものであった。残りの糞便を用いて濾紙培養法を行ったがフィラリア型幼虫は見つからなかった。また、22×22mm カバーガラス1枚中には6個の鉤虫卵が認められ、その計測値の平均は

67.0±0.9×38.7±1.1μm であった。沈渣のヨード染色標本ではいずれの検体からも原虫類の嚢子は検出されなかった。血清寄生虫抗体スクリーニング検査では、抗体陽性と判定されたのは9検体(8.6%)、疑陽性35検体であった。dot-ELISAによるスクリーニング検査結果は、赤痢アメーバについて33検体(31.4%)、肺吸虫について3検体(2.9%)、顎口虫について2検体(1.9%)、多包虫について1検体(1.9%)、それぞれ陽性が認められた。赤痢アメーバ抗体陽性者に対して、赤痢アメーバHK-1抗原を用いて寒天ゲル内二重拡散法を実施したところ、33検体すべてで沈降抗体は確認できなかった。その他の抗体陽性者については、現在さらに精密検査を実施中である。

C-5. フィリピンの日本住血吸虫症浸淫地、レイテ島で得られた虫卵陽性者の尿(Sj-Urine)を陽性コントロールとした。同じくレイテ島で得られた住血吸虫に感染していない回虫、鉤虫卵養成者の尿(N-1)50検体、2008年1月の外国人健診で得られた尿(N-2)41検体について検討した。その結果、N-1及びN-2の検体で、陽性となった例はみられなかった。また、rSj 22.6を用いて、N-1及びN-2の尿検体を分析したところ、やはり、陽性となった例はみられなかった。N-2については、採取した血清で、日本住血

吸虫の虫卵を用いたELISAも併せて行ったが、41例中陽性を示した例は1例もみられず、尿を用いた解析結果と一致した。

C-6. 血圧測定と心臓の超音波検査の両方を受けた101人について検討したところ、高血圧を示した例は13例にのぼり、特に61歳以上の11例では、6例が高血圧症と診断された。一方、超音波検査で弁膜症や左室肥大が疑われる例は、30歳以下の年齢層では14例中1例にとどまったが、それ以上の全年齢層でみられ、特に加齢とともに増加する傾向はみられなかった。また、対象となった在日外国人101人は、アジア系：87人、中南米系：12人、アフリカ系：2人であった。そこで、アジア系と中南米系での比較を試みたが、中南米系の被験者が少なく傾向の違いについて論じることはできなかった。ただ、シャーガス病で生じる心肥大や左室肥大は、今回の心臓超音波検査で、中南米出身者からはみつからない。

C-7. クリプトスポリジウムおよびランブル鞭毛虫の保有について、糞便検査に便を提出したのは47人であり、内訳は2007年12月22日の健診受診者のうち30人、2008年1月6日の健診受診者のうち17人であった。出身国の内訳はフィリピン17人、タイ11人、ベトナム7人、スリランカ3人、

ドミニカ 2 人、ペルー 2 人、ブラジル、ナイジェリア、タンザニア、韓国および日本は各 1 人であった。また、日本での滞在年数は 5 年未満が 6 人、5～10 年未満が 9 人、10～15 年未満が 8 人、15～20 年未満が 16 人、20 年以上が 6 人、不明が 2 人であった。年齢分布は 20～76 歳で平均 47.1 歳、中央値は 46 歳であった。年代別には 20 歳代が 4 人、30 歳代が 11 人、40 歳代が 14 人、50 歳代が 8 人、60 歳以上が 8 人、不明が 2 人であった。これらの便を集嚢子法により精製し、スライドグラス上で蛍光抗体染色を施した後に蛍光顕微鏡を用いて精査したところ、クリプトスポリジウムのオーシストおよびランブル鞭毛虫のシストはいずれも検出されなかった。

C-8. 診察は血圧測定および問診を行なった。収縮期血圧が 140 以上の高血圧と判断された人数は 17 名（約 16%）であったが多くは収縮期のみ 140 以上で拡張期は多くの例で 90 未満であり緊張による収縮期血圧の上昇も疑われた。拡張期血圧も上昇している軽症—中等度高血圧は 6 名、収縮期 180 以上、拡張期 110 以上の重症高血圧と判断された例は 3 名おり、この 3 名については医療機関を受診することを強く勧めた。

問診による疾患は胆嚢切除術を受けたもの 2 名、両目に翼状片を認めた

もの 1 名、片頭痛 3 名、胃の疾患にて治療中 2 名、腹痛 6 名、生理不順および不眠 1 名、喘息加療中 3 名、甲状腺疾患 2 名、小児期のてんかんの既往 1 名、糖尿病 2 名、痛風 2 名、高血圧加療中 4 名、高脂血症 1 名、花粉症 1 名、生理痛 1 名、背部痛 2 名、心疾患 1 名、十二指腸潰瘍 1 名、めまい 1 名、胸痛 1 名、排尿時痛 1 名であった（表 2）。

生化学検査は採血後専用容器で当日中に三菱メディエンス志村ラボに送られ即日測定した。項目は総蛋白（基準値 6.7-8.3g/dl）、アルブミン（基準値 3.8-5.3g/dl）、CK（基準値 M:60-270, F:40-150IU/l）、AST（基準値 10-40IU/l）、ALT（基準値 5-45IU/l）、LDH（基準値 120-240IU/l）、ALP（基準値 100-325IU/l）、クレアチニン（基準値 M:0.61-1.04mg/dl F:0.47-0.79mg/dl）、尿酸（基準値 M:3.8-7.0 F:2.5-7.0mg/dl）、尿素窒素（基準値 8-23mg/dl）、中性脂肪（基準値 30-149mg/dl）、総コレステロール（基準値 120-219mg/dl）、ナトリウム（基準値 137-149mEq/l）、カリウム（基準値 3.5-5.0mEq/l）、クロール（基準値 98-108mEq/l）、CRP（基準値 0.30mg/dl 以下）の 16 とした。表 3、4 診察したが採血を受けなかったもの 6 名、診察は受けなかったが採血を受けたものが 1 名であった。

肝機能異常として、ASTおよびALTの軽度上昇を認めた例が11例認められたが値としては異常高値を示したものはなかった。

腎機能異常として、1例のみクレアチニンが1.23とやや高値を示した例があり尿酸も高いことから要治療と考えられた。

高脂血症として、診察が午後の例も多く食事の影響を考えると中性脂肪のデータの客観性は乏しいと考えられた。しかしながらコレステロール値が基準値を超えた症例は29例と27%の受診者を占めた。

高尿酸血症として、高尿酸血症は9例(8%)に認められうち3例は8以上と高値であった。要治療と考えられた。

マラリア原虫抗原検査は、OptiMALを用いてマラリア抗原検査を実施し得たのは105検体であった。陽性対照血液(熱帯熱マラリア陽性患者血液)でのみ2本の陽性バンドが出現したが、検診受診者の血液はすべて陰性と判定された。本検査結果については分担研究報告書報告4. 消化管原虫およびマラリア原虫検査に詳細が記載されている。107検体においてすべて陰性という結果が得られた。

腹部超音波検査は、軽度の肝腫大1例、軽度の脂肪肝5例、胆石(5個)1例を認めたほかには住血吸虫に特異

的な所見を示した例はいなかった。

D. 考察

本研究の主要テーマである在留外国人の方々の慢性寄生虫症/原虫症の罹患状況の把握についての考察は、下記D-4~8に述べる結果が得られた。

また、マラリア症やシャーガス病にするT細胞免疫応答の誘導手法によるワクチン開発については、下記D-1~3に述べる結果が得られた。

D-1. 実験シャーガス病モデルを用いた三種組換えウイルスベクター組合せ免疫手法は、従来知られてきた二種免疫原組合せ手法より抗原特異的CD8陽性T細胞誘導能に優れていた。感染実験においてもこの結論を支持する結果が得られ、新たなワクチン手法として注目される。

D-2. TSSA エピトープ発現組換えマラリア原虫由来粗抗原を用いて免疫したマウスにおいてTSSA抗原特異的CD8T細胞が誘導されていたことから、組換えマラリア原虫においてTSSA エピトープが発現していることが確かめられた。また、原虫感染によっても抗原特異的CD8T細胞が誘導された。このことは、ナチュラルコースの感染によっても抗原特異的CD8T細胞が誘導されることを示している。

現在最も免疫誘導効率の高いワクチン手法である組換えアデノウイルスと組

換えワクシニアウイルスを用いた prime-boost 接種を行った後、各組換えマラリア原虫を免疫マウスに感染させ、血中原虫密度および生存率について検討したところ、コントロールとなるエプトープを持たないマラリア原虫に感染したマウスに対し、TSSA エプトープ発現マラリア感染マウスにおいては血中原虫密度に有意差は認められなかったが、生存率の改善が認められた。

MHC クラス I を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してエプトープ特異的 CD8T 細胞が感染防御能を示す機構は明らかではないが、誘導されたエプトープ特異的 CD8T 細胞によって産生される IFN- γ が感染赤血球を殺滅する可能性が考えられ、現在その機構の解析を行っている。

D-3. ネズミマラリア *P. berghei* ANKA 株の C57BL/6 マウスへの感染実験系において、TSSA 抗原特異的 CD8⁺T 細胞を予め静脈から移入したマウスに遺伝子改変マラリアを感染させ、CD8⁺T 細胞の機能を解析しつつある。

D-4. 初年度は、健診システムの構築と検査項目の選択に重点をおき検討を行った。マラリア感染の有無については迅速診断キット OptiMAL®で検査したが、陽性者は見られなかった。OptiMAL®は流血中の原虫感染率が 0.002%程度以上の場合陽性反応が見られるといわれているので、今回の結果からは完全にマ

ラリア感染者がゼロであるとは断定できないが、少なくとも、有症者でかつ抗原陽性者を見いだすことは出来なかった。次年度については、過去の感染をよりの確に判断できる抗体検査法の併用を考慮すべきだと考えられた。

糞便検査を実施し得た47検体の中で、1検体から鉤虫卵が検出された。鉤虫感染は慢性貧血の原因となり、小児の重症例では栄養不良、発育障害を引き起こすといわれている。今回、鉤虫卵が検出された検体について濾紙培養法を行ったが、フィラリア型幼虫が検出できなかった。これは検体がすでにホルマリン水で固定されていたためだと考えられた。そのため、検出された鉤虫卵の虫種を決定することは出来なかった。通常、東南アジアに分布する種類はズビニ鉤虫であるといわれているが、来年度にはホルマリン固定された虫卵による虫種の同定についても検討を加えていきたい。

寄生虫抗体スクリーニング検査で、赤痢アメーバ抗体陽性者が 105 名中33名 (31.4%)に見られた。これらの検体についてはさらに寒天ゲル内二重拡散法を用いて沈降抗体の有無を検討したが、明らかに沈降線を形成した検体は認められなかった。今回の dot-ELISA の感度・特異性に関しては次年度以降に検討の余地があると思われる。肺吸虫、顎口虫、多包虫抗原に対して陽性を示した検体については現在さらに詳細な検

討を加えており、改めて報告したい。

D-5. 抗 SWAP 抗体と抗 SEA 抗体、レコンビナント蛋白 rSj 22.6 とも、日本住血吸虫以外の消化管寄生蠕虫感染に対しては反応を示さず、尿による免疫診断に利用できることが示された。特に、実験的に住血吸虫の生活環を維持していないと入手できない粗抗原を用いる必要がないレコンビナント蛋白 rSj22.6 による診断は、今後の検査診断体制を考えると期待できる。

ところで、2008 年 1 月の外国人健診で尿が採取された 41 例のうち 28 例は、日本住血吸虫症浸淫地を国内に持つフィリピンの出身であったが、尿及び血清による免疫診断で住血吸虫症が疑われた例はみられなかった。しかしながら、問診によれば、日本住血浸淫地であるミンダナオ島やレイテ島などの出身者は、今回の健診の受診者にはみられず、また、浸淫地を訪問したことがある例もわずかであった。

D-6. 在日外国人においても日本人と同様、高血圧については、加齢とともに罹患率が増加する傾向がみられた。なかには、40 歳代、50 歳代で 100mmHg 以上を示しながらも、治療を受けていない例もあり、そのような被験者では AR や LVH などの変化が超音波検査でも確認された。

弁の機能異常を疑われた例は、他

院で MS と診断され継続的なフォローを受けている 1 例を除けば、軽度の変化を示したのみであった。今回は、ドップラー法を併用しての詳細な検査を行う時間的余裕がなく、詳細な検討はできなかったため、多くの例では精密検査では異常なしと判断される可能性が高いと思われる。しかし、一次健診の段階で心臓超音波検査が行われることは少なく、他に直接比較できる調査結果は乏しいものの、101 人中 19 人で何らかの弁の異常が疑われるは、従来のがわが国での健診成績と比して、頻度としてたいへん多いと言えよう。このことが、途上国における溶連菌感染の蔓延と弁膜症罹患率の高さを意味するのか、或いは、被験者の約半数は病院受診者であったという今回の被験者集団の偏りを示すかについては不明である。

また、EF の低下していた例では、弁膜症の進行によるというよりも、心室前壁や心室中隔の運動が部分的な障害、すなわち虚血性心疾患がその原因と考えられた。今後はあわせて心電図検査も行い、虚血性心疾患についても十分に鑑別する必要があると思われる。

D-7. 今回の健診では、47 人から糞便の提出があったが、検査の結果、クリプトスポリジウムもランブル鞭毛虫も検出されなかった。

クリプトスポリジウムはコクシジウム類に属する腸管寄生性原虫の1種で、世界中に分布する。小児下痢症、渡航者下痢症、人獣共通感染症あるいは水系感染症の病原体として重要視されている。

現在、クリプトスポリジウム属では13種の種名が有効とされて確定し、あるいは新種として提案されている。これらは寄生部位により腸管寄生性 (*intestinal Cryptosporidium*) と胃寄生性 (*gastric Cryptosporidium*) の2つのグループに分けられる。オーシストの大きさは前者が4-6 μ mに対し、後者が6-8 μ mである。それぞれのグループに属する種は形態が類似しており、形態学的な鑑別は困難である。さらに、特定の遺伝子の塩基配列が異なる遺伝子型がそれぞれのグループで知られるようになった。腸管寄生性クリプトスポリジウムと胃寄生性クリプトスポリジウムは遺伝子レベルでも系統樹上で分岐しており、それぞれの分岐の先に種や遺伝子型が分布している。

近年では塩基配列の解析が容易となり、さらに特異遺伝子配列も絞られ、クリプトスポリジウムの遺伝学的解析が急速に進められている。種の決定や遺伝子型別に用いられる遺伝子には、18S rDNA、heat shock protein (*hsp*)、actin、oocyst wall protein (OWP あるいは

COWP)の4種の遺伝子がある。これら遺伝子の遺伝子配列情報は充実しつつあり、種や遺伝子型の特定および汚染源の調査追跡等に利用されている。

C. parvum にはヒトに由来する遺伝子型であるヒト型 (genotype1 あるいは human genotype : *C. hominis* とする提案もされている) とヒトを含む広い哺乳動物に感染する遺伝子型であるウシ型 (genotype2 あるいは bovine genotype) が知られている。その他に *C. parvum* あるいは *C. parvum-like* 原虫に属するものには、ブタ (2種)、ヒツジ、ウマ、ウシ、ウサギ、有袋類、フクロネズミ (2種)、フェレット、キツネ、シカ (2種)、マスカラット (2種)、リス、クマ、シロアシネズミ、オポッサム (2種) といった20以上の遺伝子型があり、それぞれ分離された動物に由来する名称で呼ばれている。

ヒトに感染して下痢症の原因となるクリプトスポリジウムは、*C. parvum* のうちヒト型とウシ型が主体である。このほかに症例数は少ないが *C. meleagridis* が検出されることがある。さらに、稀な事例として *C. muris* 感染などが報告されている。

ヒトのクリプトスポリジウム症の潜伏期は4~10日程度で、主な症状は下痢 (主として水様性)、腹痛、39 $^{\circ}$ Cを越えない発熱、悪心、嘔吐、倦怠感

などであり、下痢は軽度のものから1日に20回以上の激しいものまでみられる。通常、症状は1~2週間程度で治まる。オーシストを排出するものの、症状を呈しない例があることも知られている。成人よりも小児の方が、また初感染の方が再感染よりも症状が重い。HIV/AIDS患者などの免疫不全者では慢性、消耗性の下痢を呈し、時として致死的となる。通常は小腸のみに感染するが、HIV/AIDS患者では呼吸器や胆道系での感染も報告されている。

クリプトスポリジウム症の症状には患者の免疫状態による差はないが、症状が持続する期間と転帰は異なり、HIV/AIDS患者やその他の免疫不全患者では症状が長期に持続し、時に死に至ることがある。米国疾病予防センター（CDC）ではCD4+T細胞数が180-200を下回ると症状の長期化や重篤化が起きやすいとされている。

クリプトスポリジウムはオーシストを経口的に摂取する糞一口感染であるが、感染経路として直接的に患者（患者）との接触による感染と、飲食物を介した経路が知られている。前者では、家族内感染、託児所（day-care centers）での集団感染、病院内感染、広義の性感染症、感染動物との接触（ペットや家畜、実験動物、牧場訪問）などの事例が報告されている。後者の

例としては、野菜、アップルサイダー（プレスしたリンゴの実入りジュース）や牛乳などを介したものと、水道水汚染による集団発生、河川や湖、プールでの水泳などを介した感染があり、特に水道水やプールを介した感染が問題になっている。

クリプトスポリジウム症は海外において、衛生状態の悪い国や地域のみならず、多くの患者が発生している先進国もある。そのため、海外旅行中に感染し、旅行中あるいは帰国後に発症する例がある。

ランブル鞭毛虫は世界中に分布しているが、特に熱帯から亜熱帯にかけての衛生状態の悪い地域では多くの患者がみられる。WHOの報告では、アジア、アフリカおよびラテンアメリカにおいて、2億人が罹患し、毎年新たに50万人が発症しているとしている。一方で、先進国においても患者が散発例あるいは集団発生例としてみられ、特に水道水を介した集団感染やレクリエーション関連の下痢症あるいは保育所（child-care center）における集団下痢症が多く発生し、再興感染症のひとつとされている。

ランブル鞭毛虫症の症状は、無症状や軽度のものから重篤な状態まで広範囲にわたる。主な症状は軽度であれば下痢や腹痛、食欲不振、悪心、腹部不快感、鼓腸等であり、重篤になると

痙攣性の栄養不良等であり、下痢では水様便や粘性便、泥状便で、時に血液が混じることがあるが、ランブル鞭毛虫症特有の悪臭を放つ脂肪便も時に経験される。小児は成人よりも症状が重くなる傾向がある。胆管や胆嚢に寄生すると、上腹部痛や発熱、肝腫大、肝機能障害、黄疸といった胆嚢炎様症状がみられることがある。

便とともに排出されたシストを経口的に摂取すると感染する。シストは体外に排出されてから増殖することは無いが、シスト壁に被われているために環境に対して抵抗を示す。水道やプールに用いられる塩素消毒に対しては抵抗を示す。乾燥には弱い、湿った状態あるいは水中では2ヶ月は生存するとされている。

クリプトスポリジウムの保有率は欧州や北米では1~4%であり、アフリカ、アジア、オーストラリア、中南米では3~20%とされている。特に発展国では無症状者での保有率は1%に満たないほどに少ない。しかし、デイケアセンターでは高い保有率が観察される。発展途上国では無症状者であっても10~30%に達している。一方、ランブル鞭毛虫は発展途上国では一般的に見られる原虫で、特に幼児では保有率が高く、下痢症患者の543%（平均20%）から検出されると報告されている。

中南米におけるクリプトスポリジウムとランブル鞭毛虫の保有率に関する報告が散見される。ブラジルにおいて0~6才の小児279人を調査したところ、クリプトスポリジウムの保有率は15.05%、ランブル鞭毛虫は26.88%であったと報告されている。ブラジルにおける別の調査では、クリプトスポリジウムについて7歳以下の小児64人の保有率は20.3%、成人23人では4.3%であったとされた。ペルーでの小児489人を対象にした寄生虫感染調査ではクリプトスポリジウムの保有率は1%、ランブル鞭毛虫は26.4%であった。チリで実施されたクリプトスポリジウムの保有率調査では小児68人中4人（5.9%）から検出された。ベネズエラでの小児45人を対象にした調査では、クリプトスポリジウムの保有率は89%、ランブル鞭毛虫の保有率は24%であった。さらに別のベネズエラでの303人を対象に実施された寄生虫調査では、クリプトスポリジウムの保有率は8.8%であり、年齢別には0~6歳では9.5%、7~12歳では5.2%、13~18歳では9.1%、19~45歳では8.3%、46歳以上では16.0%であった。多くの報告では小児における保有率が高いという結果が得られているが、本調査では46歳以上で保有率が高くなっている。ガイアナでは12歳以下の小児85人の腸管寄

生性寄生虫調査ではクリプトスポリジウムは検出されなかったが、ランブル鞭毛虫は10.5%に検出された。ボリビアでの5～19歳の年齢層の377人を対象にした調査では、クリプトスポリジウムの保有率は31.6%であったが、年齢の低い集団で保有率が高い傾向があり、5～16歳では29.0～35.7%であったのに対し、17～19歳では10.0%であった。

東南アジアにおいても、クリプトスポリジウムとランブル鞭毛虫の保有に関する多くの報告がある。フィリピンにおいて下痢症の6～20ヶ月の小児では2.9%からクリプトスポリジウムが検出された。タイでの就学前の小児では、下痢症の236人においてクリプトスポリジウムは0.8%、ランブル鞭毛虫は13.6%に検出されたのに対し、無症状の236人ではクリプトスポリジウムは2.5%、ランブル鞭毛虫は23.3%に検出された。インドネシアにおいてクリプトスポリジウムについて下痢症患者917人を検査したところ、2.8%にクリプトスポリジウムが検出され、年齢層別には0～11歳では2.9%、12～23歳では6.3%、24～59歳では1.7%、60歳以上では1.0%であった。同じ調査において、無症状者1043人ではクリプトスポリジウムは1.4%から検出され、年齢層別には0～11歳では3.0%、12～23歳では1.1%、24～59

歳では0.9%、60歳以上では0%であった。マラウイにおいて、下痢症の5歳未満の小児848人を対象にクリプトスポリジウムの保有を調査したところ、5.9%に検出された。

アフリカにおいても、アジアや東南アジアと同様に、クリプトスポリジウムとランブル鞭毛虫を対象にした調査が実施されている。ケニアでは、5歳以下の下痢症患者4899人からクリプトスポリジウムは4%に検出され、0～5歳のいずれの年齢層でも2～5%の保有率であった。ガーナでは5歳以下の下痢症患者162人を調査し、クリプトスポリジウムの保有率は8.0%、ランブル鞭毛虫は3.7%であった。さらに、下痢症でない入院患者122人では、クリプトスポリジウムの保有率は0.8%であり、ランブル鞭毛虫は検出されなかった。スーダンにおいて6～16歳の275人を対象にランブル鞭毛虫の保有率を調査したところ、9.8%であった。

世界の多くの国々において、クリプトスポリジウムとランブル鞭毛虫は下痢症の一般的な原因微生物となっている。多くの人々がわが国に職を求めて入国している現状では、病原体が人々とともに持ち込まれることは容易に想像することができる。わが国における保有率および患者発生数を抑えるためにも、実態の把握は欠かせな

いと思われる。

D-8. 今回の健康診断では高血圧、高脂血症、高尿酸血症といった生活習慣病に罹患している受診者が多く認められた。一方マラリア、住血吸虫に関するデータは陰性がすべてであった。このことは母集団が約100名と少ないことも影響していると考えられる。今後母数の増加によって陽性者が出ることも十分考えられマラリアおよび住血吸虫の検査については引き続き観察する必要があると考えられた。また生活習慣病に関する結果は在留外国人が十分な医療を受けられていないことも示唆される。

E. 結論

衛生基盤がしっかりと整備された現代の日本で、慢性寄生虫症/原虫症罹患者の流入が国内で再流行を引き起こす可能性は高くないと考えられるが、在留外国人の慢性感染症の罹患状況の調査、監視体制の確立は国民の先入観や根拠の無い不安の払拭に寄与し、健康管理/教育体制の整備は予測外の感染事例の可能性を未然に防ぎ、作成ガイドラインは本事案に対する先駆的な対策マニュアルとなる成果が期待される。また、輸血や臓器移植によって感染する可能性があるシャーガス病やマラリアに関して、国内において実態調査を行うとともに新規

迅速診断技術を開発することは、安全な献血・輸血システムを確立するうえでも重要であり、新規治療手法の開発研究は、研究資金の不足から遅滞している寄生虫症/原虫症の研究領域発展に寄与し、新規予防/治療的免疫療法の開発研究は、本領域に留まらない、ウイルス感染症、細菌感染症、腫瘍のような他領域の制御手法へと応用される成果が期待できる。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究論文

1. Miyahira Y.: Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8⁺ T cell immunity - An infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int*, 2008; 57(1):38-48. Epub 2007.
2. Akao N, Ohta N. Toxocariasis in Japan. *Parasitology International*. 2007;56(2):87-93
3. Cho S, Egami M, Ohnuki H, Saito Y, Chinone S, Shichinohe K, Suganuma M, Akao N. Migration Behaviour and Pathogenesis of Five Ascarid Parasites, *Toxocara canis*, *Baylisascaris procyonis*, *B. transfuga*, *Ascaris suum*, and *A. lumbricoides* in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Journal of*

Helminthology 2007;81:43-47.

4. Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N, Morio T, Mochizuki M.

Identification of human herpesvirus 6 variant A in a patient with ocular toxocariasis. Archives of Ophthalmology. 2007;125:1426-1427.

5. Maeda T, Yamada H, Akao N, Iga M, Endo T, Koibuchi T, Odawara T, Iwamoto A, Fujii T. Unusual radiological findings of *Fasciola hepatica* infection with a huge cystic and multilocular lesions. Internal Medicine. 2008;47:449-452.

6. 赤尾信明. 医動物学. In: 紀代子 芝, editor. 臨床検査技師 イエロー・ノート臨床編. 東京: メジカルビュー; 2007. p. 138-183.

7. 赤尾信明. 変貌するトキソカラ症と新しい動物モデル(1). 東獣ジャーナル. 2007;45(11): 16-18.

8. 赤尾信明. 医動物学. In: 紀代子 芝, editor. 臨床検査技師 グリーン・ノート臨床編. 東京: メジカルビュー; 2007. p. 62-71.

9. 赤尾信明. 変貌するトキソカラ症と新しい動物モデル(2). 東獣ジャーナル. 2007;45(12): 15-17.

10. 大友弘士, 赤尾信明. 感染症に及ぼす地球温暖化の影響. 新感染症学(下)-新時代の基礎・臨床研究-: 日本臨牀 2007. p. 653-658.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当項目なし

表 1. 第 1 回検診 (51 名)

国籍	性別	年齢	訪日 後年 数
フィリピン	女性	42	11
フィリピン	女性	44	3
フィリピン	女性	59	?
フィリピン	女性	41	17
フィリピン	女性	46	2
フィリピン	女性	48	18
フィリピン	男性	4	4
フィリピン	男性	43	24
フィリピン	男性	45	10
タイ	女性	36	5
タイ	女性	39	15
タイ	女性	41	9
タイ	女性	38	15
タイ	女性	38	7
タイ	女性	35	6
タイ	女性	35	7
タイ	女性	48	17
タイ	女性	46	1
タイ	女性	34	16
タイ	女性	45	2
タイ	女性	45	17
タイ	女性	45	14
タイ	男性	44	17
タイ	男性	48	15
タイ	男性	38	?
タイ	男性	53	18
ベトナム	女性	71	11
ベトナム	女性	71	14
ベトナム	女性	34	12
ベトナム	女性	24	2
ベトナム	女性	?	18
ベトナム	男性	41	19
ベトナム	男性	?	12
ベトナム	男性	53	5

国籍	性別	年齢	訪日 後年 数
ベトナム	男性	59	24
ベトナム	男性	70	5
ベトナム	?	56	24
韓国	女性	38	13
カンボジア	女性	25	20
日本	女性	13	12
ナイジェリア	男性	38	11
ペルー	女性	54	18
ペルー	女性	30	9
ペルー	女性	54	13
ペルー	女性	36	17
ペルー	男性	71	17
ドミニカ	男性	73	17
ドミニカ	男性	20	4
ブラジル	男性	76	18
?	女性	9	8
?	?	?	?