

在日外国人 101 人（アジア系：87、中南米系：12、アフリカ系：2）に対して、血圧測定と心臓の超音波検査を行ったところ、13 人で高血圧が指摘され、特に 61 歳以上の高齢者では、半数が高血圧と診断された。また、19 例で弁機能の異常が指摘されたが、明らかな弁膜症、僧帽弁狭窄尿と診断されたのは 1 例にとどまった。中南米出身者 12 名中で、大動脈弁の異常や左室肥大を指摘された例はなく、アジア系受診者でみられたこのような病変は、慢性原虫症ではなくむしろ放置された高血圧症と関連が深いと思われた。心臓の収縮能の低下は、弁膜症ではなく、虚

血性心疾患との関連が疑われ、心電図をあわせて検査する必要性が認識された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. その他

なし

平成 19 年度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
分担研究報告書

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

分担研究者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所微生物部

わが国に労働を目的として、多くの外国人が来日し、長期間滞在している。それらの国々の中にはクリプトスポリジウムやランブル鞭毛虫の保有率が高い国も含まれている。クリプトスポリジウムやランブル鞭毛虫は食品や水を介して感染する下痢症の主要な原因微生物として注目されており、その感染症はわが国では渡航者下痢症や輸入感染症と扱われることが多い。これまでに海外における長期滞在邦人を対象にした寄生原虫保有実態調査が行われたことはあったが、わが国に滞在する外国人におけるクリプトスポリジウムやランブル鞭毛虫の保有実態が調査されることはまれであった。そこで、本研究では外国人を対象に両原虫の保有状況を調査した。今年度は 114 人を対象に検査した結果、保有者はいなかった。今後さらに調査を続けることにより、詳細な保有状況を把握することが必要である。

クリプトスポリジウムおよびランブル鞭毛虫の検出は顕微鏡による観察により行われる。この手法では、検出された原虫の遺伝子型や種の解析を行うことはできない。そこで、遺伝学的手法によるクリプトスポリジウムの検査法の検討を行った。

A. はじめに

クリプトスポリジウムとランブル鞭毛虫はともに腸管に寄生し、下痢症の原因となる原虫である。世界中に分布し、特に衛生状態の悪い地域では保有率が高いことが知られ、下痢症の主要な原因微生物であり、ランブル鞭毛虫では感染者数が世界中で数億人に

達するとされている。

わが国では、クリプトスポリジウム症とランブル鞭毛虫によるジアルジア症は感染症法で 5 類感染症（全数把握）に指定されており、診断した場合は 7 日以内に所管の保健所に届け出ることが義務付けられている感染症である。クリプトスポリジウムは年に 10

例前後が報告されているが、集団下痢症事例が発生したことがあり、このような場合は100例程度の患者数が報告されている。ジアルジア症は年に100例前後の報告がなされている。

国内の患者の感染状況に関する報告は少ないが、平成14年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスク評価及び管理に関する研究」（主任研究者：国包章一 国立保健医療科学院水道工学部長）において実施された調査では、クリプトスポリジウム症およびジアルジア症患者の一部は海外、特に衛生状態が良好でないと推測される地域において感染した可能性が高いことが明らかとなっている¹⁾。感染症法による患者報告に添付された感染地情報においても、同様の状況となっている²⁾。

海外においては、地域や国によっては両病原体の保有率が非常に高い地域が存在し、また、保有率が高くないとも、患者が常在している国や地域がある。したがって、海外から労働力としてわが国を訪れ、滞在している人々の中にはこれらの病原体を保有している可能性が高いヒトも含まれていることも予想することができる。そこで、本調査では外国人労働者を対象にした健康診断において、クリプトスポリジウムおよびランブル鞭毛虫の検出を試み、感染の実態を明らかにすることを目的として調査を実施した。

クリプトスポリジウムおよびランブル鞭毛虫の検査は、一般的に便を対象にしてクリプトスポリジウムオーシストおよびランブル鞭毛虫シストの検出を顕微鏡による形態観察によ

って行う。この検査法では観察手法の習熟や訓練等が必要となり、技術継承の課題となっている。そこで、糞便検査において使用可能な遺伝学的手法を用いた検査法の検討を行った。

B. 研究方法

1) 調査の対象

2007年12月22日と2008年1月6日に実施した健診を受診した114人のうち、糞便検査を希望した47人の糞便を対象にした。提供された糞便試料は検査実施まで冷蔵した。

検診受診者から提供された糞便材料は識別番号が付され、糞便材料からは個人を特定することができないように管理した。

2) クリプトスポリジウムおよびランブル鞭毛虫の検出

糞便を対象にして、ホルマリン・酢酸エチル法（FEA法）を一部変えて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の検出を行った。便の約1gを精製水に浮遊し、ガーゼろ過した。FEA法では10%ホルマリン液を使用するが、今回は精製水を使用した。検出された場合にはDNA抽出を行って遺伝子型別を行うことになるが、糞便中のクリプトスポリジウムのオーシストあるいはランブル鞭毛虫のシストをホルマリンで固定してしまうと、DNA抽出が困難になるために10%ホルマリン液に代えて精製水とした。

ガーゼろ過試料を15ml遠沈管にて3000rpmで15分間遠心したのちに上清を捨て、沈渣を得た。沈渣に10ml

の精製水と 2ml の酢酸エチルを加え、激しく攪拌して液を混和させた。これを 3000rpm で 10 分間遠心した。遠心後、酢酸エチル層と精製水層の間の夾雑物を酢酸エチルとともに取り除き、さらに精製水層を捨てた。さらに綿棒にて管壁に残った夾雑物を取り除いた。得られた沈渣に適量の精製水を加えて試料とした。

得られた沈渣の少量を、スライドグラス上に DAKO ペンにて描いた円の中に塗抹し、インキュベータ内で乾燥させた。乾燥後、メタノールにて塗抹試料を固定した。クリプトスポリジウムのオーシストとランブル鞭毛虫のシストに対する特異抗体を有する蛍光抗体染色液 (Aqua-Glo Giardia/Cryptosporidium, Waterborne) と DAPI 液にて染色を行った。すなわち、蛍光抗体染色液をリン酸緩衝液 (pH7.4) にて 20 倍に希釈し、その 20 μ L を試料に滴下した。湿箱に入れて室温で 25 分間静置した。染色が終了する 5 分前に DAPI 液 10 μ L を加えた。染色終了後、試料をリン酸緩衝液で静かに洗浄し、マウント液 (2% DABCO 加グリセリン液) の適量を滴下し、カバーグラスをかけた。落射型蛍光顕微鏡を用いて B 励起光下で観察し、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の検出を行った。

3) 遺伝学的手法を活用した検査法の検討

文献上でこれまでに報告されている、遺伝学的手法を用いたクリプトスポリジウムの検査法を検索し、それぞれの手法を検討した。

C. 結果

1) クリプトスポリジウムおよびランブル鞭毛虫の保有

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。

2) 検査法の検討

クリプトスポリジウムを対象にした遺伝学的手法のうち、TaqMan PCR 法に注目した。TaqMan PCR 法に関する検討は複数の報告がある^{3~11)}。それぞれのシステムについて、プライマーおよびプローブの塩基配列、標的遺伝子、文献を表にまとめた。

D. 考察

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^{1,2)}。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、時として致命的となる。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-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¹³⁾。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。乾燥には弱いですが、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、デイク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¹⁴⁾。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¹⁵⁾。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¹⁶⁾。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¹⁷⁾。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¹⁸⁾。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¹⁹⁾。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²⁰⁾。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²¹⁾。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²²⁾。

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²³⁾。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²⁴⁾。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²⁵⁾。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²⁶⁾。

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²⁷⁾。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²⁸⁾。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²⁹⁾。

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。

E. 文献

1. 黒木俊郎、遠藤卓郎：水系によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染の実態の把握、平成14年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスク評価及び管理に関する研究、分担研究報告書2003.
2. 国立感染症研究所感染症情報センター：クリプトスポリジウム症およびジアルジア症、病原微生物検出情報、22（7）、2001.
3. Higgins JA, Fayer R, Trout JM, Xiao L, Lal AA, Kerby S, Jenkins MC.: Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. J Microbiol Methods. 2001;47(3):323-37.
4. Fontaine M, Guillot E.: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiol Lett. 2002; 214(1): 13-7.
5. Fontaine M, Guillot E.: An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. J Microbiol Methods. 2003;54(1):29-36.
6. Keegan AR, Fanok S, Monis PT, Saint CP.: Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. Appl Environ Microbiol. 2003;69(5):2505-11.
7. Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA.: Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. Appl Environ Microbiol. 2003;69(9):5178-85.
8. Fontaine M, Guillot E.: Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. FEMS Microbiol Lett. 2003;226(2):237-43.
9. Di Giovanni GD, LeChevallier MW.: Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(3):1495-500.
10. King BJ, Keegan AR, Monis PT, Saint CP.: Environmental temperature

- controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3848-57.
- 1 1 . Miller WA, Gardner IA, Atwill ER, Leutenegger CM, Miller MA, Hedrick RP, Melli AC, Barnes NM, Conrad PA.: Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). *J Microbiol Methods.* 2006 Jun;65(3):367-79. Epub 2005 Sep 21.
 - 1 2 . L. Xiao, R. Fayer, U. Ryan, S. J. Upton: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004;17:72-97.
 - 1 3 . World Health Organization: The world health report, 1996, 1996.
 - 1 4 . Current WL, Garcia LS.: Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4(3):325-58.
 - 1 5 . de Carvalho TB, de Carvalho LR, Mascarini LM.: Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(5):269-73.
 - 1 6 . Carvalho-Almeida TT, Pinto PL, Quadros CM, Torres DM, Kanamura HY, Casimiro AM.: Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(1):27-32.
 - 1 7 . Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Gonzalez Varas A, Pérez Córdón G, Velasco Soto JR, Sánchez-Moreno M, Rodríguez Gonzalez I, Rosales Lombardo MJ.: Intestinal parasitism in Peruvian children and molecular characterization of *Cryptosporidium* species. *Parasitol Res.* 2006; 98(6): 576-81.
 - 1 8 . Neira-Otero P, Muñoz-Saldías N, Sanchez-Moreno M, Rosales-Lombardo MJ.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol Res.* 2005;97(1):63-7.
 - 1 9 . Miller SA, Rosario CL, Rojas E, Scorza JV.: Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health.* 2003;8(4):342-7.
 - 2 0 . Chacín-Bonilla L, Sánchez-Chávez Y.: Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(3):347-52.
 - 2 1 . Lindo JF, Validum L, Ager AL, Campa A, Cuadrado RR, Cummings R, Palmer CJ.: Intestinal parasites among young children in the interior of Guyana. *West Indian Med J.* 2002;51(1):25-7.
 - 2 2 . Esteban JG, Aguirre C, Flores A, Strauss W, Angles R, Mas-Coma S.: High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(1):50-5.

23. Cross JH, Alcantara A, Alquiza L, Zaraspe G, Ranoa C.: Cryptosporidiosis in Philippine children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1985;16(2):257-60.
24. Wongstitwilairoong B, Srijan A, Serichantalergs O, Fukuda CD, McDaniel P, Bodhidatta L, Mason CJ.: Intestinal parasitic infections among pre-school children in Sangkhlaburi, Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(2):345-50.
25. Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Soeparto P, Ranuh IG.: Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(4):628-32.
26. Morse TD, Nichols RA, Grimason AM, Campbell BM, Tembo KC, Smith HV.: Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol Infect*. 2007;135(8):1307-15.
27. Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwati SK, Revathi G, Hart CA.: Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(1):78-82.
28. Addy PA, Antepim G, Frimpong EH.: Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* and parasites in infants with diarrhoea in Kumasi, Ghana. *East Afr Med J*. 2004;81(7):353-7.
29. Magambo JK, Zeyhle E, Wachira TM.: Prevalence of intestinal parasites among children in southern Sudan. *East Afr Med J*. 1998; 75(5): 288-90.

F. 健康危機管理情報
なし

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 *Cryptosporidium* 用 TaqMan PCR システムの特徴

TaqMan プローブ PCR プライマー	塩基配列	標的遺伝子	文献
FG-pro	FAM / CCAATCACAGAATCATCAGAAATCGACTGGTATC / TAMRA	452bp DNA	4
FG-F	CGCTTCTCTAGCCTTTCATGA		
FG-R	CTTCACGGTGTGTTTGCCAAT		
KAR	FAM / ACCAGACTTGCCCTCC / TAMRA	18S rRNA	6
18SiF	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG		
18SiR	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC		
COWP P702	HEX / TGCCATACATTGTTGCTCCTGACAAATTGAAT / BHQ-1	COWP	7
F	CAAATTGATACCGTTTGTCTCTCTG		
R	GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT		
CPHSP2P2	FAM / TGTTGCTCCATTATCACTCGGTTTAGA / TAMRA	<i>hsp70</i>	9
CPHSPT2F	TCCTCTGCCGTACAGGATCTCTTA		
CPHSPT2R	TGCTGCTCTTACCAGTACTCTTATCA		
EUK3	FAM / AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC / BHQ1	18S rRNA	10
18SiF	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG		
18SiR	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC		
Crypt-276p	FAM / CATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGG / TAMRA	18S rRNA	11
Crypt-193f	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCA		
Crypt-374r	CTCCCTCTCCGGAATCGAA		

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：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

分担研究者 春木宏介¹・赤尾信明²・研究協力者 千種雄一³

- 1 獨協医科大学越谷病院 臨床検査部
- 2 東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野
- 3 獨協医科大学熱帯病寄生虫病センター

研究要旨

日本国内における在留外国人を対象に寄生虫感染症の罹患状況の調査、サーベイランス体制確立に向けて健康診断を実施した。神奈川県大和市にて2度にわたって健康診断ならびに寄生虫検査を実施した。受診者の約1割に軽度肝機能障害をみとめ高血圧患者も多数認められた。また高脂血症は約3割に認められた。マラリア迅速診断キット(OptiMal)を用いた検査では、検査した105検体すべてが陰性であった。また住血吸虫検査もすべて陰性であった。エコー検査では特に重篤異常は観察されなかった。

A. 研究目的

少子高齢化に伴う労働者不足が将来深刻な問題となることが予想される中、外国人労働者の増加は今後引き続き増加することが予想される。現在約150万人が滞在中と考えられるがその多くは寄生虫疾患が蔓延している開発途上国からの労働者でありその健康管理体制の確立ならびに寄生虫疾患の保有率を知ることは労働者にとっても日本人にとっても重要な課題と考えられる。初年度である今年には長期滞在外国人を中心に健康診断ならびに寄生虫検査を施行することとなった。

B. 研究方法

1 一般健康診断

研究協力者の小林米幸医師の小林国際クリニック（神奈川県大和市西鶴間）において在留外国人およびカトリック大和教会（神奈川県大和市南林間）において信者を対象に検診を実施した。実施に当たっては事前にインフォームドコンセントを行い、ヘルシンキ宣言を尊重し、個人の人権擁護、研究によって生じる不利益について説明ならびに書面による自由意志による参加であることとの了解を得た。

検診は平成18年12月22日と平成19年1月6日の2回実施した。インフォームドコンセントの説明ののち受信者は採血に向かった。そののち春木により問診ならびに血圧測定を行った。

2. 検体の採取（生化学検査）

採血した血液は三菱メディエンス志村ラボに当日速やかに移送され遠心分離後、血清生化学検査を施行した。終了後冷蔵にて防衛医科大学校に搬送し事後の検査に供した。EDTA 添加試験管で採血した血液は薄層塗抹標本を作製し、ギムザ染色を施行した。残りの血液はマラリア迅速診断キット (OptiMAL®, DiaMed 社) を用いて検査した。

3 特殊検査

1) マラリア原虫検出キット

方法: DiaMed OptiMal を使用し検体検査を行なった。

OptiMal はマラリア原虫の pLDH を検出するキットで熱帯熱マラリアとその他のマラリアを診断できるという特性を有する。基質をコーティングされたウェルにバッファーを1滴入れる。そこにサンプル 10 μ l を加え攪拌する。そこにディップスティックをさしこみ 10 分間反応させる。ディップスティックを取り出しバッファー3滴をあらかじめ入れておいたウェルに差し込む。10 分間室温に放置し判定する。3本の線が現れた場合には熱帯熱マラリアと診断し、2本ではその他のマラリア、1本では陰性と判断する。線が1本も現れない場合には失敗であるので再検査が必要となる。

2) 住血吸虫血清抗体検出検査

被検者血清中の抗-日本住血吸虫特異抗体価を酵素抗体法（以下 ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay）にて計測した。抗原の調製および反応手技は Matsuda et al. (1984) に準じた。

抗原として日本住血吸虫卵抽出抗原を用いた。虫卵は日本住血吸虫感染マウスの腸管より消化法により精製して得た。虫卵の 0.02 % NaN_3 含有炭酸緩衝液 (0.05 M, pH 9.6,) 可溶性分画のタンパク質濃度を Bradford 法により測定し、タンパク質濃度が 10 μ g/ml になるよう調製した。この虫卵抽出液を 96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μ l ずつ分注し、37°C、2 時間静置後、4°C で一晚静置して抗原を吸着させた。

血清は BSA/T-PBS (1%ウシ血清アルブミン、0.05% Tween20 を含む PBS) で 200 倍に希釈して用いた。2 次抗体には HRP 標識した抗-ヒト IgG(H+L) (MP Bio, 55252) を BSA/T-PBS で 1,000 倍に希釈して用いた。発色基質として ABTS* を使用した。

陽性対照血清には、フィリピンの日本住血吸虫症患者プール血清を使用した。陰性対照血清には海外渡航歴のない日本人ボランティアのプール血清を使用した。また、陳旧性日本住血吸虫症患者血清は、過去に感染歴があり、既に治療済みの日本人ボランティアのプール血清を使用した。カットオフ値は 0.2 とした。

* ABTS :

2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)

** 参考文献

Matsuda H, Tanaka H, Blas BL, Noseñas JS, Tokawa T, Ohsawa S. Evaluation of ELISA with ABTS, 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid), as the substrate of peroxidase and its application to the diagnosis of schistosomiasis. Jpn J Exp Med. 1984 Jun;54(3):131-138.

3) 腹部超音波検査

研究協力者である獨協医科大学千種教授が中心となり主として肝臓を中心にエコー検査を行った。使用機器はポータブル超音波診断装置（フクダ電子 UF-4000）、プローブ：フクダ電子 FUT-C111 3.5MHz 60R で画像はソニー UP-890MD に取り込み保存した。

C. 研究結果

1. 一般健康診断

1) 受診者

一般健康診断は 2007 年 12 月 22 日に神奈川県大和市、小林国際クリニックおよび 2008 年 1 月 6 日に神奈川県大和市大和カトリック教会において行なわれた。参加者はそれぞれ 49 名（男性 16 名、女性 33 名）、60 名（男性 29 名、女性 31 名）であった。国別ではフィリピン人が最も多く 47 名（男性 15 名、女性 32 名）、ついでタイ人 17 名（男性 4 名、女性 13 名）、ベトナムおよびスリランカ各 12 名（ベトナム：男性 6 名、女性 6 名）（スリランカ：男性 12 名）、ペルー 9 名（男性 2 名、女性 6 名、不明 1 名）、ドミニカ 2 名（男性 2 名）、ブラジル（男性）、スペイン（男性）、韓国（女性）、ナイジェリア（男性）、カンボジア（女性）、タンザニア（男性）各 1 名であった。日本人も 4 名参加した（男性 2 名、女性 2 名）（表 1）。

2) 診察および問診

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）。

2 生化学検査

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）、C K（基準値 M:60-270, F:40-150IU/l）、A S T（基準値 10-40IU/l）、A L T（基準値 5-45IU/l）、L D H（基準値 120-240IU/l）、A L P（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。

1) 肝機能異常

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。

2) 腎機能異常

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。

3) 高脂血症

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。

4) 高尿酸血症

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。

3 特殊検査

1) マラリア原虫抗原検査

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赤尾の報告に詳細が記載されて

いる

結果:107検体においてすべて陰性という結果が得られた。

2) 住血吸虫血清抗体検出検査

結果は、FigureおよびTableを参照。

3) 腹部超音波検査

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なかった。

D. 考察

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

今回の健診では寄生虫関連としてはマラリアと住血吸虫の検査を除いては一般の健康診断を行なった。初回でもあり現場の混乱もあったがおおむね良好に行なうことができた。マラリアと住血吸虫に関する陽性者は存在しなかったが、軽度の肝障害、高尿酸血症、高脂血症および高血圧を認める

ものが多く在留外国人の健康状態を知ることができたという意味で貴重な結果といえた。

F. 健康危険情報

検診で高血圧症を認めた健診受診者は医療機関を受診し治療を受けるべきである。

G. 研究論文

口演

Haruki K, Kimura M. What would you like to enjoy eating in Japan? Sushi, Sashimi, or Bear meat? Country Report: Japan. Country I Focus, 7th Asia Pacific International

Conference on Travel Medicine, 24-27 February, Melbourne, Australia, 2008.

論文

春木宏介 マラリアの診断と治療
Medical Practice 2008 In press

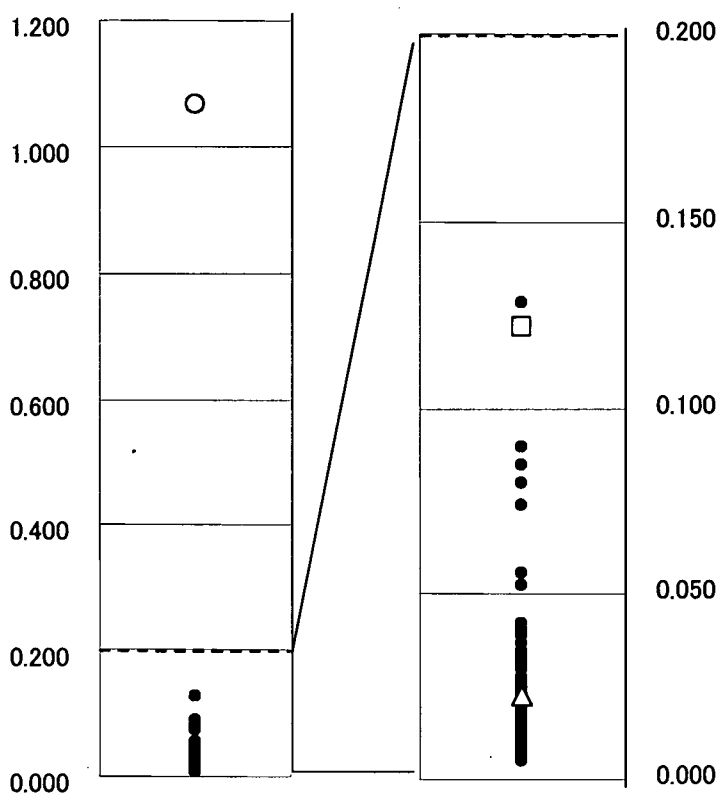
春木宏介 寄生虫

感染症内科クリニカルスタンダード
2008 In press

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当項目なし

Figure

ELISA values of each subject were shown as solid circles (n = 105). Broken line indicates the cut off limit (OD = 0.2). ○ : ELISA value of the positive control. □ : ELISA value of the pooled serum from schistosomiasis patients of obsolete cases. △ : ELISA value of the negative control.



Table

Results of control sera, and statistics value of ELISA result of 105 subjects.

	ELISA value
negative control	0.023
obsolete case	0.122
positive control	1.065
average	0.023
SD	0.019
median	0.016
max	0.128
min	0.005

表1 第一回および第二回受診者内訳

	男性	女性	不明	合計
フィリピン	16	33	0	49
タイ	4	13	0	17
ベトナム	6	6	0	12
スリランカ	12	0	0	12
ペルー	2	6	1	9
ドミニカ	2	0	0	2
ブラジル	1	0	0	1
スペイン	1	0	0	1
韓国	0	1	0	1
カンボジア	0	1	0	1
タンザニア	1	0	0	1
ナイジェリア	1	0	0	1
日本	2	2	0	4

表 2 受診者の問診による疾患別分類

疾患	
高血圧	17名
眼疾患	1名
胸痛	1名
背部痛	1名
心疾患	1名
消化器症状	11名
内分泌代謝疾患	7名
婦人科関連	2名
呼吸器疾患	3名
アレルギー疾患	1名
泌尿器関連	1名
神経系	5名

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
赤尾信明	医動物学	芝紀代子	臨床検査技師イエロー・ノート臨床編	メジカルビュー	東京	2007	138-183
赤尾信明	医動物学	芝紀代子	臨床検査技師グリーン・ノート臨床編	メジカルビュー	東京	2007	62-71

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyahira Y.	Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8(+) T cell immunity - An infection model for developing T cell vaccine.	Parasitology International	57	38-48	2008. Epub 2007.
Akao N, Ohta N.	Toxocariasis in Japan.	Parasitology International	56	87-93	2007
Cho S, Egami M, Ohnuki H, Saito Y, Chinone S, Shichinohe K, Suganuma M, Akao N.	Migration behaviour and pathogenesis of five Ascarid parasites, <i>Toxocara canis</i> , <i>Baylisascaris procyonis</i> , <i>B. transfuga</i> , <i>Ascaris suum</i> , and <i>A. lumbricoides</i> in the Mongolian gerbil, <i>Meriones unguiculatus</i> .	Journal of Helminthology	81	43-47	2007
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	125	1426-1427	2007