

cancer cells. 第 32 回日本分子生物学会
(横浜), 12 月 9 日-12 日, 2009.

33. 藤倉大輔、上出利光、宮崎忠昭 :
Functional role of CLIPR-59 in TNF
mediated pro-apoptotic signal. 第 32
回日本分子生物学会 (横浜), 12 月 9 日
-12 日, 2009.

34. Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto,
Kyeonghwa Bae, Toshimitsu Uede :
Regulation of T Cell Responses by a
Distinct Subset of Resident Splenic
Macrophages. 1st International
Conference on Immune Tolerance,
(Boston, MA), 10 月 25-27 日, 2009.

35. 近藤正敏、元永知恵、北村良久、嶋
田 貴 志、宮 崎 忠 昭 : Enterococcus
faecalis FK-23 の肥満抑制効果。日本乳
酸菌学会 2009 年度大会 (甲府) 7 月 6 日・
7 日, 2009.

36. 塩崎拓也、岩井淳、河岡義裕、高田
礼人、喜田宏、宮崎忠昭 : インフルエン
ザウイルスの病原性に関わる宿主細胞因
子の同定とその機能解析。シオノギイノ
ベンションフェア (札幌市) 8 月 26 日,
2009.

37. Tomoki Ito, Tanenobu Harada,
Tadaaki Miyazaki : Anti-viral effect of
gingyo-gedoku-san against influenza A
viruses. 第 8 回東アジア感染制御カン
ファレンス (東京) 11 月 12・13 日, 2009.

38. 上原 純、宮崎 忠昭 : DAP3 と LKB1
による anoikis 誘導機構。第 32 回日本分
子生物学会年会 (横浜) 12 月 9・12 日,
2009.

39. 伊藤智樹、原田種展、宮崎忠昭 : 銀
翹解毒散によるインフルエンザウイルス
の増殖抑制効果。第 25 回日本環境感染学
会 (東京) 2 月 5・6 日, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

輸入熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬を用いた最適な治療法による医療対応の確立に関する研究

所 属 (財)結核予防会新山手病院

研究者 木村 幹男

研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 輸入熱帯病・寄生虫症に対する国内未承認薬を導入し、それを用いた治療研究を行なった。寄生虫症については近年の疫学的特徴に関して、従来の診断法のみならず分子診断法も用いて検討し、さらに組換え抗原を用いた診断法の開発も試みた。さらに、動物感染モデルによる検討も行なった。これらの疾患の疫学、薬剤耐性、診断・治療法は絶えず変化しつつあり、国内で最適な医療を行なうためには、種々の面からの総合的研究が必要である。

研究分担者

- (1) 東京大学医科学研究所先端医療研究センター
感染症分野 小田原 隆 → 三浦 聡之
- (2) 国立国際医療センター戸山病院国際疾病センター
工藤 宏一郎 → 加藤 康幸
- (3) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
太田 伸生
- (4) 京都府立医科大学大学院医学研究科
寄生病態学分野 有菌 直樹
- (5) 宮崎大学医学部感染症学講座
寄生虫病学分野 丸山 治彦
- (6) 国立医薬品食品衛生研究所薬品部
坂本 知昭
- (7) 国立感染症研究所ウイルス第一部
倉根 一郎
- (8) 獨協医科大学越谷病院臨床検査部(平成 20～21 年度の 2 年間)
春木 宏介
- (9) ノバルティスファーマ(株)(平成 19～20 年度の 2 年間)
草野 正弘 → 前田 敏郎

A. 研究目的

近年、日本人海外渡航者数は徐々に増加しつつある。2001 年 9 月の米国同時多発テロ、それに続く米国のアフガニスタン侵攻、さらに 2003 年のイラク戦争や重症急性呼吸器症候群(SARS)流行の影響を受けて、日本人出国者数は一時減少したが、

その後増加に転じて 2006 年には 1,753 万人、2007 年には 1,729 万人となっている。この中には熱帯/亜熱帯地域への渡航者も多く含まれることから、日本人渡航者もそれらの地域特有の感染症に曝露され、帰国後に国内で発病する例が増加すると予想される。しかし、国内の医療機関では熱帯病の診断経験が不十分で、治療薬が国内未承認薬であることも多く、不幸な転帰を辿る症例の発生が危惧される。また、国内で感染する寄生虫症においても、治療薬剤の一部が国内未承認であり、同じような事態の発生が危惧される。しかし、国内でのこれらの患者数は必ずしも多くないために、国内製薬企業は収益性の問題から薬剤の開発には消極的である。本研究班は、熱帯病・寄生虫症の治療における国内未承認薬(稀少疾病治療薬)を海外から導入し、国内患者に対して欧米先進国と同等のレベルで治療を行なえるようにするための体制構築を目指している。

上記の目標のためには、欧米先進国や日本における熱帯病・寄生虫症の最新の疫学状況、それらの診断や治療の最新動向、治療薬剤の評価、需要、および入手可能性を絶えず把握しておく必要がある。さらに、輸入薬剤の保管や供給の体制、薬剤使用機関についても、絶えず点検や見直しなどが必要となる。また新規薬剤の導入に際しては、日本人患者に対する安全性を担保するために、品質検査を行なって我が国の製剤基準に合致することの確認を行なうが、それらの手段は時代とともに

変遷するので、常に最適な方法を採用する必要がある。また、狂犬病ヒト免疫グロブリンの様に入手が困難な薬剤については、有効期限が過ぎてからも抗体価が保たれているかどうかの検討が必要である。

研究班の保管薬剤を使用した症例については、担当医師に治療報告書の提供を求めるが、治療報告書を確実に回収し、薬剤の治療効果や副作用を適切に評価し、国内での今後の治療のために役立たせる必要がある。また国内承認薬を用いた治療についても症例を詳細に検討し、本研究班の経験として蓄積して行く必要がある。

熱帯病・寄生虫症に関して、国内の医療現場では診断に難渋することも多いので、全国の医療従事者を対象とした診断の支援も必要である。それには従来の標準的診断法を用いるのが基本であるが、最近進歩が著しい分子診断法や抗原診断法の適切な評価を行い、それらを応用することも必要となる。また、今後の診断法の発展のために、特異抗体の検出を可能にするべく、組換え抗原を用いた免疫診断法の開発も行なう必要がある。

この様に、本研究班は種々の方面からの研究を遂行し、熱帯病・寄生虫症に対して、国内未承認薬の使用を含めて最適な治療が行われるのを可能とする体制の構築を目指すものである。

B. 研究方法

国内未承認薬

2007年1月～2009年12月の3年間における薬剤の輸入量、使用症例数、治療報告書の回収、重篤有害事象報告を検討した。また、薬剤を安定的に供給するための実証的必要性から、有効期限が短い薬剤や研究班全体として使用例数の多い薬剤の把握に務め、その対策を検討した。また、限りある薬剤を効果的に各薬剤使用機関に配備する方法を検討した。

薬剤の品質検査

平成19年度はパロモマイシンの製造並びに流通に関する情報収集を行い、「新規輸入製剤における品質確保の基準とそのあり方に関する提案例」に基づき、必要な試験評価項目の選定を行った。また、適切にこれらの項目を評価可能な分析手法として、非破壊分析が可能な近赤外分光(NIRS)法並びにクロマトグラフィーを選定した。平成20年度はパロモマイシンのクロマトグラフィー分析につ

いて、紫外部に吸収をもつ化合物を用いた誘導体化法を採用した。誘導体化剤として2,4-ジニトロフルオロベンゼンを用いた。平成21年度はHPLC装置に蒸発光散乱検出器(ELSD)およびHILICカラムを接続し、ミルテフォシンの分析条件の最適化研究を行った。

国立感染症研究所で保管されている狂犬病ヒト免疫グロブリンBerirab P(Aventis Behring、2004年8月31日入荷)につき、有効期限から2年、3年、4年を過ぎた時点で段階希釈し、RFFIT(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test)法にて中和抗体を測定し、標準血清との比較から国際単位に換算し、抗体価の安定性評価を行なった。

熱帯病・寄生虫症の治療

メトロニダゾール注射薬を使用した赤痢アメーバ症およびクロストリジウム・ディフィシル腸炎、スチボグルコン酸ナトリウムを使用したリーシュマニア症、トリクラベンダゾールを用いた肝蛭症、ニタゾキサニドを用いたクリプトスポリジウム症につき、薬剤の有効性と安全性に重点をおいた解析を試みた。資料は主に治療報告書の記載を用いたが、必要に応じて、詳細を主治医に問い合わせて補完した。

さらに国立国際医療センター(研究分担者：工藤→加藤)で2005年10月～2009年9月にアーテメター/ルメファントリン合剤(0、8、24、36、48、60時間後にそれぞれ4錠)を使用したマラリア症例につき、体重、治療開始前原虫数、発熱消失時間、原虫消失時間などを含め、効果と安全性に焦点をあてて検討した。

寄生虫症の疫学

宮崎大学(分担研究者：丸山)では普段から血清抗体での診断を主とし、multiple-dot ELISA法によるスクリーニングおよび96-well microtiterplate ELISA法による精査を行なっているが、今回、2007～2009年における同大学での寄生虫検査の受託数、陽性症例数、患者が受診した医療機関の都道府県などを解析した。また、近年における肺吸虫症の年次推移、国籍別割合、性別年齢別分布につき、さらに最近の寄生虫症の特徴につき解析した。

京都府立医科大学(研究分担者：有菌)では、ニューモシステイス肺炎の診断は、気管支肺胞洗浄液または喀痰材料を用い、ゴモリメテナミン銀およびセルフルオール蛍光染色法でスクリーニング

を行うとともに、疑わしい例に対しては PCR 法を実施した。下痢症における原虫嚢子または寄生虫卵の検索は、直接塗抹法とともにシヨ糖遠心浮遊法またはホルマリンエーテル法を実施した。赤痢アメーバ症疑いの症例については、上述の検査の他、便中の赤痢アメーバ抗原検出のため *E. histolytica* II (TechLab) を使用した。無症候性嚢子排出者に対しては *Entamoeba dispar* との鑑別のため嚢子から DNA 抽出を行い、peroxiredoxin 遺伝子および 18S rDNA を標的とした PCR を実施した。各種の蠕虫症については、各検体に応じた検査法を実施した。一部の蠕虫症については、形態学的同定の他、DNA 診断およびゲノタイプ解析を行った。虫体 DNA の抽出は QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany) を用い、internal transcribed spacer (ITS) 領域、mtDNA *cox1*、*cox2*、*nd2*、*nd3* などの遺伝子をターゲットとして PCR 法を行い、PCR 産物の塩基配列分析を行った。

輸入マラリアの疫学

東京大学医科学研究所に集められた 2005～2008 年の 4 年間のマラリア治療報告書を用い、性別、年齢、国籍、渡航先、滞在期間、渡航理由、予防内服の有無と実施状況、原虫の種類、治療方法と副作用などについて集計した。

組換え抗原作製と患者血清との反応

研究分担者丸山は、ブタ回虫の As-CTL1 と As16 の組換えタンパク質を作製し、患者血清との反応を検討した。そして、トキソカラの組換え抗原 TcES と組み合わせて幼虫移行症診断キットの開発を目指した。また、東京医科歯科大学(研究分担者：太田)では、旋尾線虫感染の診断抗原の確保が困難である実状に照らして、ゲノム情報が得られない本虫の診断抗原の組換え抗原作製を forward genetics の手法から試みた

マラリア迅速キットの評価

当研究班の薬剤使用機関である 22 施設にマラリア診断キットである Entebe MC (Laboratorium Hepatika)、Malaria Ag P./Pan、Malaria Ag (Standard Diagnostics) の 3 種類を配布し、海外からの帰国者でマラリアを疑う患者に用いることを依頼した。同時にギムザ染色の結果も入手した。ギムザ染色陰性であるがキット陽性となった場合には、さらにギムザ染色を継続して行い、虫体発見を試みた。

近年、サルマラリアである *P. knowlesi* によるヒト感染が注目されていることから、マラリア診断キットの交差反応について Malaria Ag P./Pan、

Malaria Ag、OptiMAL-IT、Entebe MC、Pan-R MC、BinaxNowMalaria の 6 種類を検証した。サルマラリアとしては *P. knowlesi*、*P. cynomolgi* および *P. inui* を用い、それぞれのキットの使用方法に準じて判定を行った。

トキソカラ症

トキソカラ症に関して、イヌ回虫の実験的感染システムを利用して、イヌ回虫幼虫の非固有宿主体内移行経過と、血清または局所体液中の抗体価推移との相関を検討した。特に眼内移行例に対する免疫診断の標準化を試みた。環境中のトキソカラ虫卵汚染の実態スクリーニングの方法として、都市部公園砂場の虫卵汚染を DNA 診断として検討することを試みた。

倫理面への配慮

平成 21 年 8 月より、国内未承認薬を用いる臨床研究が「臨床研究に関する倫理指針」を完全遵守することを目指し、研究代表者が自らの機関の倫理審査委員会での承認を取得し、各薬剤使用機関ではこれを元に自らの倫理審査委員会で承認を得る様、依頼した。また、薬剤保管機関である東京大学医科学研究所では、その治験審査委員会において、「国内未承認薬を緊急避難的に使用する場合」として、審査・承認を受けている。ヒト血清の使用、遺伝子組換え実験、動物実験に際しては、各所属機関で実施の承認を受け、ガイドラインなどを遵守した。

実際の症例で薬剤を使用するに当たっては、研究班が作成した和文あるいは英文の薬剤使用説明書を患者に示し、所定の薬剤使用承諾書に患者の署名を得ている。その後に必要となる薬剤使用登録書、重篤有害事象報告書、治療報告書には患者氏名の記載は求めず、イニシャルのみである。さらに、それらの書類の保管は厳重に行ない、研究班関係者以外が閲覧することは不可能となっている。

C. 研究結果

国内未承認薬

3 年間における薬剤使用登録書の提出は 289 例であり、治療報告書の提出は 206 例で、報告率は 71%と良好であった。マラリアでは、熱帯熱マラリアに対してアーテメター/ルメファントリン合剤が 21 例に使用され、アトバコン/プログアニル合剤の 10 例よりも多かった。主に重症マラリアに使

われるキニーネ注射薬は熱帯熱マラリア 5 例に使われたが、アーテスネート坐薬は熱帯熱マラリア 14 例に使われ、使用が大幅に増加した。クロロキンは三日熱/卵形/四日熱マラリア 25 例に使われ、プリマキンは三日熱/卵形マラリア 44 例、さらにニューモシスチス肺炎 4 例にも使われた。

メトロニダゾール注射薬は赤痢アメーバ症 29 例に使われたが、さらにクロストリジウム・ディフィシル腸炎 15 例にも使われた。パロモマイシンは赤痢アメーバ症 84 例に使用されたが、他にジアルジア症 2 例にも使われた。比較的最近導入されたスルファジアジンとピリメタミンはトキソプラズマ症 9 例に使われた。スチボグルコン酸ナトリウムはリーシュマニア症の 1 例、ミルテフォシンは別のリーシュマニア症 1 例に使用され、ニタゾキサニドはクリプトスポリジウム症 4 例に使用された。

3 年間のうち、薬剤の投与が原因で死亡したと考えられる症例は認めなかった。

薬剤の品質検査

平成 19 年度の研究結果として、硫酸パロモマイシンの二次微分スペクトルで観察された 9 つの吸収のうち、8 つの吸収について官能基の帰属を行うことができ、定性確認のための特徴的な吸収を選定することができた。また、UHPLC/MS による製剤中のパロモマイシンの定量法開発では、高精度・高感度な質量分析法を提案することができた。平成 20 年度の研究結果として、特異性高く誘導体化パロモマイシンを検出することができた。真度、精度など、直線性にも優れた定量法を提案することができた。一方で、硫酸パロモマイシンの NIR スペクトルの詳細な検討およびクロマトグラフィーの検討結果から、製剤に含まれる少量の添加剤に由来するスペクトル形状のばらつきがあることが推察され、相違が認められる可能性のある波数範囲部分を除いた 3 つの吸収を定性的基準波数として提案することができた。平成 21 年度の研究結果として、高精度で頑健性の高い HILIC 分離-ELSD によるミルテフォシン定量のための基本条件を設定することができた。また、類似構造物との最適な分離条件を見出した。

有効期限から 2 年、3 年、4 年経過した段階での狂犬病ヒト免疫グロブリン Berirab P を用い、原液の 150 IU/mL から希釈系列を作成し、それぞれについて中和抗体を測定したところ、最長の 4 年

を過ぎたものでも、製造段階で表示された抗体価が良好に維持されていることが明らかとなった。

熱帯病・寄生虫症の治療

メトロニダゾール注射薬を使用した赤痢アメーバ症については、平成 19 年度に 28 例、平成 20 年度に 10 例の解析を行なった。本薬剤を用いた症例の殆どは、国内承認薬であるメトロニダゾール経口薬の内服が不可能となった症例であり、重症例が多かった。また、基礎疾患として HIV 感染症がある例もみられた。症例の多くでメトロニダゾール経口薬の使用歴や大腸切除がみられ、純粹に本注射薬の効果を判定するのは困難であったが、主治医の判断として、本薬剤が奏功したと思われる症例が多かったこと、死亡例においては原疾患の悪化が考えられたことなどから、本薬剤の使用価値は高く、重症化が疑われる症例では早期の積極的な投与を考慮すべきであると思われた。また、本薬剤を用いたクロストリジウム・ディフィシル腸炎 10 例の解析では、効果については、著効 3 例、有効 4 例、無効 1 例、不明 2 例との記載であった。また、副作用については、“なし” 7 例、不明 3 例で、“あり” の報告はみられなかった。転帰については、全治 4 例、軽快 2 例、死亡 3 例、不明 1 例であったが、死亡例については、薬剤の副作用を示唆する記載はみられなかった。

国立国際医療センターでは、対象期間中に熱帯熱マラリアの日本人患者 10 例、三日熱マラリア患者 1 例にアーテメター/ルメファントリン合剤を使用した。10 例のうち 7 例は合併症のない熱帯熱マラリアで、本薬剤は初期治療薬として使われたが、発熱消失時間や原虫消失時間はメフロキンなどの他の抗マラリア薬と比べて、短い傾向がみられた。転帰としては 1 例を除く 6 例が治癒に至った。再燃を生じた 1 例では、薬剤の服用が全て食前あるいは食間であったこととの関連が考えられ、アトバコン/プログアニル合剤による再治療で治癒に至った。10 例中他の 3 例は重症マラリアで、うち 2 例は同センター医師の個人輸入によるアーテスネート注射薬、1 例はキニーネ注射薬とアーテスネート坐薬による治療の後、スイッチ薬として用いられた。他に、本薬剤を用いた三日熱マラリア 1 例は治癒に至った。本薬剤によると思われる重篤な副作用は見られなかった。

トリクラベンダゾールを用いた肝蛭症については、計 24 例に達したが、全てが有効と判定され、

重篤な副作用の報告はなかった。クリプトスポリジウム症でニタゾキサニドを用いた 5 例の解析では、免疫不全状態改善の治療が奏功したのか、本薬剤が奏功したのか不明であった。また、リーシュマニア症でスチボグルコン酸ナトリウムを使用した 5 例の解析では、治療法が様々であり、効果についても明らかではなかった。

寄生虫症の疫学

2007～2009 年の 3 年間に於いて、宮崎大学医学部寄生虫学教室が受託した寄生虫疾患診断依頼は総計 1,110 件で、ほとんどが抗体検査であった。検査の結果陽性と判定されたものは計 428 件で、研究期間を通しての陽性率は 38.6%であった。内訳はイヌ回虫またはブタ回虫による内臓幼虫移行症が 222 例(50.6%)、次が肺吸虫症の 123 例(28.0%)であった。他に、ドロレス顎口虫症の 20 例、マンソン孤虫症と住血吸虫症の各 13 例と続いた。この様に、わが国の寄生虫疾患では幼虫移行症が重要であることが示された。また、肺吸虫症ではときに外国人症例の多発することがあった。タイ出身の肺吸虫症患者について吸収試験で虫種の決定を行い、感染地を推定したところ、検討した 8 例中少なくとも 1 例はタイで感染したことが明らかであった。

京都府立医科大学では、2007～2009 年に 185 件の寄生虫症例および節足動物刺咬症例の診断サポートと治療情報の提供を行った。原虫症では赤痢アメーバ症(7 例)、ランブル鞭毛虫症(3 例)などが見られた。輸入原虫症としてはサイクロスポーラ症 1 例を見出した。線虫症は 22 例で、アニサキス症(9 例)、回虫症(3 例)、鉤虫症(3 例)などであった。アニサキス症は DNA 診断により、いずれの症例も *Anisakis simplex sensu stricto* の感染であることが明らかとなった。鉤虫症のうち 2 例は国外感染が疑われ、DNA 診断の結果、イヌ鉤虫およびセイロン鉤虫の感染と判明した。また後者は、パモ酸ピランテルに良好に反応することが明らかとなった。吸虫症では肺吸虫症、肝吸虫症、日本住血吸虫症の陳旧例がそれぞれ 1 例見られた。条虫症は 52 例で、日本海裂頭条虫症(41 例)、無鉤条虫症(5 例)などであった。

輸入マラリアの疫学

4 年間に研究班で集積した報告書は 97 例であった。性別では、男性 70 例、女性 27 例と男性が多かった。年齢分布は 21～50 歳が 64 例(66%)を

占めた。国籍では日本が最も多く 60 例、インド、イギリスの順であったが、外国人の割合は 36%であった。渡航先は国別ではパプアニューギニアが最も多く 19 例、インド 13 例、ナイジェリア 8 例と続いた。予防内服は 20 例が行っており、うち 15 例が完全に行っていた。薬剤ではメフロキンが最も多く 9 例であった。マラリアの種類では三日熱マラリアが 57 例、熱帯熱マラリアが 28 例、卵形マラリアが 6 例の順で、混合感染も 4 例に認められた。治療では、クロロキンとプリマキンによる治療が最も多く、ついでクロロキン単剤、メフロキンとプリマキンの組み合わせが同数であった。アトバコン/プログアニル合剤、アーテメター/ルメファントリン合剤はそれぞれ 16 例(単剤 11 例)、7 例で用いられた。キニーネは 8 例で用いられており、アーテスネート坐薬も 9 例で使用された。

組換え抗原作製と患者血清との反応

ブタ回虫の As-CTL1 と As16 の組換えタンパク質を作製し、患者血清との反応を検討した。その結果、どちらの組換え抗原もブタ回虫感染の診断用抗原として有望との結果であり、特に TcES に対する反応との比をみることで、本疾患の診断がなされる可能性が示された。

旋尾線虫症免疫診断のための組換え抗原作成を試み、有望な標的と考えて作製したガレクチンではまだ十分でないことが判明したが、今後も組換え抗原作製を追究する上で、一定の方向づけがなされた。

マラリア迅速キットの評価

マラリア迅速キットは 12 例で使用された。うち 9 例は 3 種すべてのキットで陽性と判定され、3 例が陰性であった。陽性を示した 9 例では、全てがギムザ染色による判定と一致した。このことから、症例数は少ないが現時点での感度、特異度はともに 100%であった。

サルマラリアについては、6 種類の迅速キットのうち、OptiMAL-IT では *P. knowlesi* が熱帯熱マラリアと判定され、Entebe MC では *P. knowlesi*、*P. cynomolgi* および *P. inui* が三日熱マラリアと判定され、Pan-R MC では *P. inui* が弱いながら熱帯熱マラリアと判定された。他の原虫種とキットとの組み合わせでは、全て非熱帯熱マラリアとの判定であった。

トキソカラ症

トキソカラ症の眼内移行例に関しては、房水中の

特異的 IgG 抗体価は眼内の炎症経過と相関が高いことが観察された。しかし、駆虫薬の眼内注入でも病状の改善には直結せず、幼虫の存在と症状とは必ずしも並行しないと考えられた。環境中のトキソカラ虫卵汚染は PCR と LAMP で感度、特異度ともに満足な結果が得られた。

D. 考察

以前にはマラリアでの薬剤使用が多かったが、最近では赤痢アメーバ症での使用が増加している。国内承認薬であるメトロニダゾール経口薬は腸管からの吸収が良好であり、経口投与が可能でありさえすれば注射薬の必要性はない。しかし近年、特に HIV 感染症に合併した赤痢アメーバ症で、重症化して経口投与不能となる例が目立っており、その様な症例において本研究班が導入した注射薬の価値が明らかとなっている。また、メトロニダゾール(経口あるいは注射)などによる急性期治療の後に投与する luminal drug (パロモマイシン)については、本研究班に対して供給依頼が増えている。しかし、最近の論文で luminal drug の有効性を示したものはなく、その必要性の再検討が急務である。本研究班は現在、繰り返して発病している症例、便中に嚢子が持続的に排泄されている症例、免疫不全者などで再発時に重症化のリスクが高い症例に限定することを徹底し始め、最近では使用例が減少する傾向にある。

なおクロストリジウム・ディフィシル腸炎に対して、人道的観点からメトロニダゾール注射薬を使用した症例が見られたが、現段階での解析では本薬剤は有効性に優れ、安全性に特別な問題があるとは思えなかった。今後も症例が増える可能性を考え、その使用基準や使用法をより明確にする必要がある。

2001 年末にメフロキンはマラリアの治療薬および予防薬としても国内で承認された。それまでの国内承認治療薬はキニーネ経口薬とスルファドキシシン/ピリメタミン合剤の 2 種類のみであり、しかもそれらは使いやすい薬剤ではなかったので、メフロキンの承認に期待が高まった。しかし、今や世界の殆どの流行地で散発的であっても熱帯熱マラリア原虫のメフロキン耐性がみられ、特にタイ・ミャンマーおよびタイ・カンボジア国境地帯では耐性率が 50%を超えている。日本人渡航者でも耐性原虫が見つかり、今後さらに増加する

ことも予想される。また、メフロキンは精神神経系副作用がありうるので、その点からも本研究班が導入している抗マラリア薬の重要性は高い。

世界的に、マラリア流行地における熱帯熱マラリアの治療薬としてアーテミシニン系薬あるいはそれを含む合剤の評価が高まりつつある。特に、熱帯熱マラリアによる重症マラリアの治療には、従来のキニーネ注射薬に比べてアーテスネート注射薬の方が致死率低下の点で優れていることが報告された。また、本研究班で導入しているアーテスネート坐薬が、重症マラリアの初期治療として使用価値があることが示されたが、本研究では少数例ではあるが、同様な印象を得ている。ただし、坐薬としての性格上、吸収にばらつきがありうることに注意が必要である。また本研究においても、合併症のない熱帯熱マラリアに対するアーテメター/ルメファントリン合剤は、アーテミシニン系薬であるアーテメターの迅速な原虫殺滅作用により、発熱消失時間や原虫消失時間が短かった。さらに、安全性にも特段の問題はなく、優れた薬剤であると思われた。

当研究班が導入している国内未承認薬は、欧米先進国で承認薬となっているものが殆どであるが、我が国での製剤基準に合致することの確認が必要である。今回、パロモマイシンを対象とした簡便迅速な簡易検定法が適用可能であることが判明し、ミルテフォシンについても、新しい分離モードを用いた分析条件を提案することができたのは、導入薬剤の品質検査を行なう上での大きな進歩である。

本研究班は平成 19 年度、我が国で初めて狂犬病ヒト免疫グロブリンを正式に導入した。狂犬病はインドを初めとして途上国に広く分布しており、日本人渡航者でも感染の危険のある者は多い。しかし本薬剤は高価格であり、時に入手不可能となることもある。今回、有効期限から 4 年を経過した免疫グロブリンが表示された抗体価を保っていることが示された。使用期限終了後の薬剤を使うことの法的検討が必要であるが、使用期限内の製品がない場合には、疾患の重篤性を鑑み、行政との協議の上、緊急避難的に使うことも選択肢の一つとなりうると思う。

マラリア、特に熱帯熱マラリアでは診断の見逃しが患者の予後を悪くさせる。しかも、古典的顕微鏡法では熱帯熱マラリア原虫は目立たず、特に検査に熟練していない者は見逃す危険がある。そ

のため他の補助的診断法、すなわち抗原検出法やPCR法の併用が望まれてきた。今回、少数例であるが、海外で市販されているマラリア迅速検査キット(抗原検出法)を試用したところ、使用価値があると思われた。また、いくつかのキットでの反応パターンから、最近ヒト感染が問題となっているサルマラリア診断の手がかりが得られる可能性が示された。

今でも国内で多くの寄生虫感染症例が発生しているが、過去には土壤媒介性寄生虫症が多かったことを考えると、疫学状況は変化していると言える。なかでもイヌ回虫・ブタ回虫を中心とする幼虫移行症が多いことが注目される。また、ホタルイカを食することによる旋尾線虫症もある。これらは治療抵抗性のことが多く、重要臓器に迷入して重篤な症状を示すことがあるので、早期にしかも確実に診断する方法の確立が急務である。幼虫移行症では虫体の摘出が困難なことが多く、血清診断が頼りとなる。しかし、虫体からの抽出粗抗原を用いた抗体測定では虫種間の交差反応から、虫種特異性の問題があり、さらに、抗原を得るには大量の虫体を必要とすることが多い。その点、世界中で組換え抗原を用いた抗体測定法が望まれてきた。本研究で、2種類のブタ回虫組換え抗原を作成し、患者血清のそれら組換え抗原に対する結合と、イヌ回虫幼虫ES抗原に対する結合との比をみることで、ブタ回虫幼虫移行症を診断できる可能性が示され、今後の進展に期待が持たれる。また旋尾線虫の組換え抗原に関しても、今後研究を進める価値があることが明らかとなった。

本研究班はその前身も含め、従来からホームページや「寄生虫薬物治療の手引き」を介して国内医療機関への支援を行ってきたが、後者については平成22年3月に改訂7.0版を発行したので、今後、国内の関係者に広く配付する。また、本研究班は症例に関する診断や治療の相談にも対応してきた。それらについては、欧米の関係医療機関、旅行者感染症のサーベイランスを行なっているTropNetEurop(ヨーロッパ)やGeoSentinel(国際旅行医学会)との緊密な関係を生かしている。本研究班は今後も海外との関係を保ちつつ、多方面での研究を継続し、輸入感染症・寄生虫症の治療が欧米先進国レベルで行なえるような体制の構築に努力を続ける予定である。また、平成22年4月より新研究班が発足すれば、厚生労働省「臨床研究に

関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)」に規定する臨床研究保険を付帯し、国内での熱帯病・寄生虫症患者に最適な治療を提供し続ける予定である。

E. 結論

熱帯病・寄生虫症の疫学、薬剤耐性、診断や治療の方法などは時とともに変化している。それにとともに、本研究班にも柔軟かつ適切な対応が求められている。本研究班での臨床経験を蓄積し、欧米の関連機関からの情報提供も受け、我が国においてこれらの疾患の治療が最先端のレベルで行なえる体制を確立するべく、今後も多方面からの研究を続ける必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Kimura M, Nakamura T, Nawa Y. Experience with intravenous metronidazole to treat moderate-to-severe amebiasis in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:381-385.
- ・ 木村幹男, 春木宏介. 特徴ある感染症対策 - Post-exposure Prophylaxis:PEP を中心に、暴露前予防 (Pre-exposure Prophylaxis:PrEP). マラリア (予防の現況). *臨床と微生物* 2008;35:677-684.
- ・ 木村幹男, 高崎智彦, 狩野繁之. 特集 感染症の新しい検査法と最近のトピックス. II. 各論. マラリア, デング熱. *小児科診療* 2008;71:137-144.
- ・ 丸山治彦, 吉田彩子, 小田原隆, 木村幹男. 熱帯病・寄生虫症に対する国内未承認薬の輸入・保管と治療体制 (特集 オーファンドラッグの今). *月刊薬事* 2008;50:885-890.
- ・ 丸山治彦. 肺吸虫症 (特集・寄生虫感染症). *化学療法の領域* 2008;24:1343-1350.
- ・ Sakamoto T, Hiyama Y. Rapid method for determining of nitazoxanide in tablets using reversed-phase ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and high-performance liquid chromatography. *Pharmazie* 2008;63:503-507.

2. 学会発表

- ・ Kimura M, Tada Y, Okabe N. Travelers' risk of malaria by destination country: a study

from Japan. 11th Conference of the
International Society of Travel Medicine,
Budapest, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

塩基配列登録(DDBJ)(ともに研究分担者・有菌)

Diplogonoporus grandis

18S rDNA: AB353272

ITS1: AB298510 - AB298514

cox1: AB298515 - AB298519

nd3: AB298520 - AB298522

Diphyllbothrium nihonkaiense

18S rDNA: AB374225

ITS1: AB375171 - AB365175

cox1: AB374999 - AB3745004

nd3: AB375005 - AB375017

輸入熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬を用いた最適な治療法による医療対応の確立に関する研究

所 属 (財)結核予防会新山手病院

研究者 木村 幹男

研究要旨 輸入熱帯病・寄生虫症に対する国内未承認薬を導入し、それを用いた治療研究を行なった。寄生虫症については近年の疫学的特徴に関して、従来の診断法のみならず分子診断法も用いて検討し、さらに組換え抗原を用いた診断法の開発も試みた。これらの疾患の疫学、薬剤耐性、診断・治療法は絶えず変化しつつあり、国内で最適な医療を行なうためには、多方面からの総合的研究が必要である。

研究分担者

- (1) 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 三浦 聡之
- (2) 国立国際医療センター戸山病院国際疾病センター 加藤 康幸
- (3) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 太田 伸生
- (4) 京都府立医科大学大学院医学研究科 寄生病態学分野 有菌 直樹
- (5) 宮崎大学医学部感染症学講座 寄生虫病学分野 丸山 治彦
- (6) 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 坂本 知昭
- (7) 国立感染症研究所ウイルス第一部 倉根 一郎
- (8) 獨協医科大学越谷病院臨床検査部 春木 宏介

A. 研究目的

近年、日本人海外渡航者数は徐々に増加しつつある。2001年9月の米国同時多発テロ、それに続く米国のアフガニスタン侵攻、さらに2003年のイラク戦争や重症急性呼吸器症候群(SARS)流行の影響を受けて、日本人出国者数は一時減少したが、その後増加に転じて2006年には1,753万人、2007年には1,729万人となっている。この中には熱帯/亜熱帯地域への渡航者も多く含まれることから、日本人渡航者もそれらの地域特有の感染症に曝露され、帰国後に国内で発病する例が増加すると予想される。しかし、国内の医療機関では熱

帯病の診断経験が不十分で、治療薬が国内未承認薬であることも多く、不幸な転帰を辿る症例の発生が危惧される。また、国内で感染する寄生虫症においても、治療薬剤の一部が国内未承認であり、同じような事態の発生が危惧される。しかし、国内におけるこれらの疾患の患者数は必ずしも多くないために、国内製薬企業は収益性の問題から薬剤の開発には消極的である。本研究班は、熱帯病・寄生虫症の治療における国内未承認薬(稀少疾病治療薬)を海外から導入し、国内患者に対して欧米先進国と同等のレベルで治療を行なえるようにするための体制構築を目指している。

上記の目標のためには、欧米先進国や日本における熱帯病・寄生虫症の最新の疫学状況、それらの診断や治療の最新動向、治療薬剤の評価、需要、および入手可能性を絶えず把握しておく必要がある。さらに、輸入薬剤の保管や供給の体制、薬剤使用機関についても、絶えず点検や見直しなどが必要となる。また新規薬剤の導入に際しては、日本人患者に対する安全性を担保するために、品質検査を行なって、我が国の製剤基準に合致することの確認を行なうが、それらの手段は時代とともに変遷するので、常に最適な方法を採用する必要がある。また、狂犬病ヒト免疫グロブリンの様に入手が困難な薬剤については、有効期限が過ぎてからも表示された抗体価が保たれているかどうかを調べておく必要がある。

研究班の保管薬剤を使用した症例については、担当医師に治療報告書の提供を求めるが、治療報告書を確実に回収し、薬剤の治療効果や副作用を

適切に評価し、国内での今後の治療のために役立たせる必要がある。また国内承認薬を用いた治療についても、症例を詳細に検討し、本研究班の経験として蓄積して行く必要がある。

熱帯病・寄生虫症に関して、国内の医療現場では診断に難渋することも多いので、全国の医療従事者を対象とした診断の支援も必要である。それには従来の標準的診断法を用いるのが基本であるが、最近進歩が著しい分子診断法や抗原診断法を応用することも必要となる。また、今後の診断法の発展のために、組換え抗原を用いた抗体測定法の開発も行なう必要がある。

本研究班はこの様な種々の方面からの総合的研究を遂行し、熱帯病・寄生虫症に対して、国内未承認薬の使用を含めて最適な治療が行われるのを可能とする体制の構築を目指すものである。

B. 研究方法

薬剤の輸入、使用、副作用報告、治療報告書

今年度における薬剤の輸入量、使用症例数、治療報告書の回収、重篤有害事象報告を検討した。また、薬剤を安定的に供給するための実際の必要性から、有効期限が短い薬剤や研究班全体として使用例数の多い薬剤の把握に務め、その対策を検討した。また、限りある薬剤を効果的に各薬剤使用機関に配備する方法を検討した。

薬剤の品質検査

ミルテフォシンの定量性を検討するため、以下の操作を行なった。ミルテフォシン(Aldrich 製)のアセトニトリル溶液 100 µg/ml を調製し、その 20 µl を HPLC に注入した。HILIC カラムは、Waters 社製 Atlantis HILIC Silica カラム(4.6 mm x 50 mm、粒径 3 µm)を用いた。移動相はアセトニトリル/水の混液(1:1、pH 6.5)により分離を行った。移動相の流速は 0.5 ml/min、ELSD の温度は 40℃ に設定した。また、ミルテフォシンのアセトニトリル溶液について、100 µg/ml の濃度に対する 80～120%の濃度の溶液を調製し、ミルテフォシン濃度と ELSD 検出器から得られる信号強度の相関性を評価した。

また、将来的に製剤中のミルテフォシンの分析を行う際の分離能を検討するため、構造類似化合物との分離条件の最適化を行った。アルキル鎖の炭素数の異なる 2 種類の化合物、テトラデシルホスホコリン(アルキル鎖炭素数 14)、オクタデシル

ホスホコリン(アルキル鎖炭素数 18)を選定し、内標準物質としての可能性を検討するため L- α -Lecithin も併せてその分離性を検討することとした。移動相の条件はアセトニトリルと酢酸アンモニウム液の混液をベースとし、親水性相互作用に影響を与えと考えられる条件(アセトニトリル含量および塩の添加量)を変化させて各化合物間の分離性能を比較した。まず文献などを参考とし、100 mM の濃度の酢酸アンモニウムを添加することとし、アセトニトリルとの組成比を 3:7 および 1:5 とした 2 種類の移動相を検討した。また、塩の添加量を初期検討濃度の 1/10 である 10 mM 酢酸アンモニウムを調製とし、前述した 2 種類の移動相条件のうち、分離特性が良好な移動相組成において検討することとした。

国立感染症研究所で保管されている狂犬病ヒト免疫グロブリン Berirab P(Aventis Behring、2004 年 8 月 31 日入荷)につき、有効期限から 4 年過ぎていたものを段階希釈し、RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) 法にて中和抗体を測定し、標準血清との比較から国際単位に換算し、抗体価の安定性評価を行なった。

熱帯病・寄生虫症の治療

2007 年以降にメトロニダゾール注射薬を使用した *C. difficile* 腸炎の症例につき、治療報告書を用いて診断根拠、基礎疾患、合併症、メトロニダゾール経口薬使用の有無、メトロニダゾール注射薬の投与法、効果、転帰、副作用などの検討を行なった。

さらに国立国際医療センター(分担研究者：加藤)で 2005 年 10 月～2009 年 9 月にアーテメター/ルメファントリン合剤(0、8、24、36、48、60 時間後にそれぞれ 4 錠)を使用したマラリア症例につき、体重、治療開始前原虫数、発熱消失時間、原虫消失時間などを含め、効果と安全性に焦点をあてて検討した。

寄生虫症の血清診断と分子診断

宮崎大学(分担研究者：丸山)では普段から血清抗体での診断を主とし、multiple-dot ELISA 法によるスクリーニングおよび 96-well microtiterplate ELISA 法による精査を行なっているが、今回、2009 年における同大学での寄生虫検査の受託数、陽性症例数、患者が受診した医療機関の都道府県などを解析した。また、近年における肺吸虫症の年次推移、国籍別割合、性別年齢

別分布につき、さらに最近の寄生虫症の特徴につき解析した。

京都府立医科大学(研究分担者：有菌)でも、2009年の1年間における寄生虫症診断依頼症例のまとめをおこなった。ニューモシスティス肺炎の診断は、気管支肺胞洗浄液または喀痰材料を用い、ゴモリメテナミン銀およびセルフルオール蛍光染色法でスクリーニングを行うとともに、疑わしい例に対してはPCR法を実施した。下痢症に対しては、直接塗抹法とともにショ糖遠心浮遊法またはホルマリンエーテル法を併用し、原虫または虫卵の検出を行った。赤痢アメーバ症疑いの症例については、上述の検査の他、便中の赤痢アメーバ抗原検出のため *E. histolytica* II (TechLab) を使用した。無症候性嚢子排出者に対しては *Entamoeba dispar* との鑑別のため嚢子からDNA抽出を行い、peroxiredoxin 遺伝子および18S rDNAを標的としたPCRを実施した。各種の蠕虫症については、各検体に応じた検査法を実施した。一部の蠕虫症については、形態学的同定の他、DNA診断およびゲノタイプ解析を実施した。DNA抽出はQIAmp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany)を用い、internal transcribed spacer (ITS)領域、mtDNA *cox1*、*cox2*、*nd2*、*nd3*などの遺伝子をターゲットとしてPCR法を行い、PCR産物の塩基配列を解析した。

組換え抗原作製と患者血清との反応

研究分担者丸山は、幼虫移行症診断のための組換え抗原作成を以下のごとく行なった。沖縄県および宮崎県内で採取されたブタ回虫から虫卵を分離して幼虫包蔵卵を形成させ、ウサギに投与し、感染5～6日後にウサギ肺から幼虫を回収した。次いで幼虫からpolyA⁺ RNAを抽出・精製して逆転写反応をおこない、クロンテック社のCreator SMART システムによりcDNAライブラリを作製した。得られたcDNAクローンの塩基配列を決定し、公開されているブタ回虫データベースと比較した。成虫や虫卵で発現の報告がないものは体内移行期幼虫に特異的に発現している可能性が高く、診断用抗原の候補として組換えタンパク質を作製した。これらの組換え抗原と動物由来回虫類による幼虫移行症患者血清との反応を試みたが、血清は、イヌ回虫由来ES抗原とブタ回虫由来ES抗原に対する反応性の比較から、ブタ回虫感染推定血清、イヌ回虫感染推定血清として用いた。

東京医科歯科大学(分担研究者：太田)では、幼虫移行症の一種である旋尾線虫症診断のための組換え抗原作製を試みた。すなわち、富山県内漁港と契約して、この2年間の漁期間中に新鮮な旋尾線虫7,015個体入手した。ホタルイカの内臓を取り出し、人口消化液にて寄生している幼虫を回収した。旋尾線虫40尾より可溶性粗抗原を作製し、過去に旋尾線虫症と診断した患者血清を用いて、その粗抗原に対するウェスタンブロット検査を行った。患者の臨床型により抗体産生が異なる可能性があったので、皮膚爬行型と腸閉塞型の両方の患者血清を用いた。患者血清が共通して反応した幼虫タンパク質を選んで、そのアミノ酸配列を検査するために質量分析を行った。質量分析の結果から診断抗原の候補を選び出し、部分配列データから推測されるタンパク質の配列を他の線虫ゲノムデータと照会して、縮重プライマーを設計して遺伝子クローニングをおこなった。遺伝子クローニングデータをもとに、組換えタンパク質を大腸菌で作製し、感染者血清との反応性を調べた。

マラリア迅速キットの評価

当研究班の薬剤使用機関である22施設にマラリア診断キットであるEntebe MC (Laboratorium Hepatika)、Malaria Ag P./Pan、Malaria Ag (Standard Diagnostics)の3種類を配布し、海外からの帰国者でマラリアを疑う患者に用いることを依頼した。同時にギムザ染色の結果も入手した。ギムザ染色陰性であるがキット陽性となった場合には、さらにギムザ染色を継続して行い、虫体発見を試みた。Malaria Ag キットはマラリアの病状と一致するため、マラリアの診断で治療が開始された場合、治療開始後24、48、72、120時間後に検査を行った。

近年、サルマラリアである *P. knowlesi* によるヒト感染が注目されていることから、マラリア診断キットの交差反応について Malaria Ag P./Pan、Malaria Ag、OptiMAL-IT、Entebe MC、Pan-R MC、BinaxNowMalaria の6種類を検証した。サルマラリアとしては、*Macaca fuscata* 由来の *P. knowlesi* (ATCC 30158)、*P. cynomolgi* (ATCC 30129) および *P. inui* (ATCC 30200) を用い、それぞれのキットの使用方法に準じて判定を行った。

倫理面への配慮

表1 2009年1～12月における国内未承認薬剤の使用症例数

薬剤	疾患名	症例数	治療報告書提出
クロロキン	三日熱マラリア	8	6
	卵形マラリア	1	0
プリマキン	三日熱マラリア	11	8
	卵形マラリア	2	0
	ニューモシスチス肺炎	2	2
アトバコン/プログアニル合剤	熱帯熱マラリア	2	1
アーテメター/ルメファントリン合剤	熱帯熱マラリア	10	7
	三日熱マラリア	4	4
キニーネ注射薬	熱帯熱マラリア	1	1
アーテスネート坐薬	熱帯熱マラリア	3	2
メトロニダゾール注射薬	赤痢アメーバ症	6	4
	偽膜性腸炎	5	4
	赤痢アメーバ症	23	18
パロモマイシン	ジアルジア症	1	1
	トキソプラズマ脳炎	4	2
スルファジアジン	トキソプラズマ脳炎	4	2
ピリメタミン	肝蛭症	1	1
トリクラベンダゾール	皮膚リーシュマニア症	1	1
ミルテフォシン			
計		89	64

平成21年8月より、国内未承認薬を用いる臨床研究が「臨床研究に関する倫理指針」を完全遵守することを目指し、研究代表者が自らの機関の倫理審査委員会での承認を取得し、各薬剤使用機関ではこれを元に自らの倫理審査委員会承認を得る様、依頼した。また、薬剤保管機関である東京大学医科学研究所では、その治験審査委員会において、「国内未承認薬を緊急避難的に使用する場合」として、審査・承認を受けている。ヒト血清の使用、遺伝子組換え実験、動物実験に際しては、各所属機関で実施の承認を受け、ガイドラインなどを遵守している。

実際の症例で薬剤を使用するに当たっては、研究班が作成した和文あるいは英文の薬剤使用説明書を患者に示し、所定の薬剤使用承諾書に患者の署名を得ている。その後に必要となる薬剤使用登録書、重篤有害事象報告書、治療報告書には患者氏名の記載は求めず、イニシャルのみである。さらに、それらの書類の保管は厳重に行ない、研究班関係者以外が閲覧することは不可能となっている。

C. 研究結果

薬剤の輸入、使用、副作用報告、治療報告書

今年度の薬剤輸入および薬剤使用は従来と同様に、抗マラリア薬、および抗赤痢アメーバ症薬

が多かった(表1)。抗マラリア薬ではアーテメター/ルメファントリン合剤の使用が多かった。メトロニダゾール注射薬については、当初予定しなかったクロストリジウム・ディフィシルによる偽膜性大腸炎5例に対して、人道的立場から使用せざるを得なかった。また、赤痢アメーバ症で急性期治療が終了してから再発予防に用いるluminal drugであるパロモマイシンが23例で使われたが、昨年度の40例よりも減少した。トキソプラズマ症の薬剤であるスルファジアジンとピリメタミンはトキソプラズマ脳炎4例で使用された。それには先天性トキソプラズマ症も含まれたが、本疾患の治療は1年の長期にわたるものであり、研究班が最後まで薬剤を提供すべきものか否かにつき、問題提起がなされた。狂犬病ヒト免疫グロブリンの使用例はなかったが、現在の製品の有効期限が2010年8月であることから、3本の注文を行なった。

治療報告書の回収は、薬剤使用登録書の提出89例のうち64例(72%)でなされ、過去2年間と比べて多かった。薬剤との関連が疑われる副作用報告は6例にみられた。軽度なものでは、パロモマイシンによる下痢が2例、クロロキンによる悪心・嘔吐が1例、アーテメター/ルメファントリン合剤あるいはメトロニダゾール注射薬による肝機能異常が各1例、中等度のものではミルテフォシ

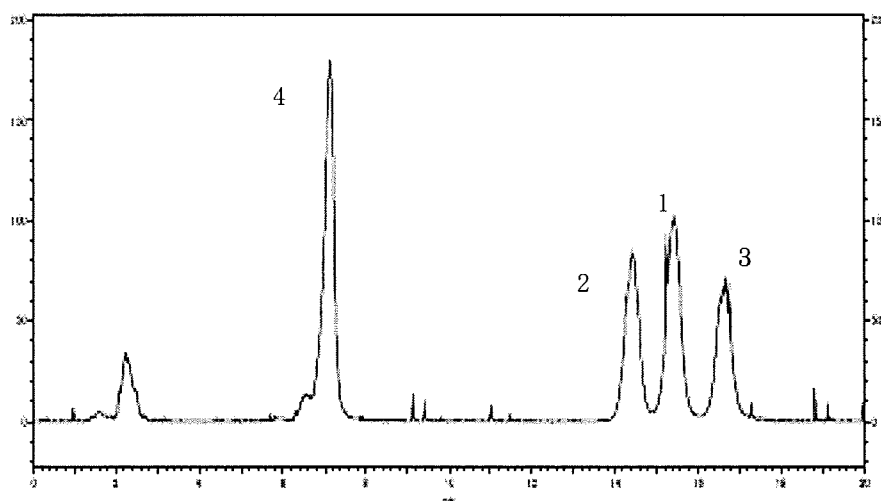


図1 移動相条件 アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム (5:1) における4分析種のクロマトグラム
(4) L- α -レシチン、7.18 min、(2) オクタデシルホスホコリン、14.20 min、(1) ミルテフォシン、15.25 min、(3) テトラデシルホスホコリン、16.40 min

ンによる嘔吐・下痢・食欲不振で投与中止した1例が見られた。メトロニダゾール注射薬投与中あるいは投与後の死亡が3例報告されたが、原疾患による悪化で、薬剤との因果関係はないと考えられた。

昨年度と同様、アーテスネート坐薬および使用が増えつつあるアーテメター/ルメファントリン合剤、さらに狂犬病ヒト免疫グロブリンは、有効期限が長い製品の確保に難渋した。

薬剤の配備については、緊急性を有する重症マラリアに用いるキニーネ注射薬の1~2日分、アーテスネート坐薬の1症例分を、事前に各薬剤使用機関に配送することとした。

薬剤の品質検査

ミルテフォシンの定量性に関し、以下の結果を得た。基準濃度の80%~120%の範囲における直線性(濃度-シグナル強度(対数)比)では、一次回帰式 $y = 33941x - 915964$ 、相関係数0.9914であり、真度に補正が必要ではあるが、比較的良好な直線性を示した。また、シグナル強度の相対標準偏差(RSD) (n = 30)は0.45%であった、以上の検討により、ミルテフォシン定量のための基本条件を設定することができた。

ミルテフォシン構造類似化合物との分離に関し、移動相であるアセトニトリル/100 mM 酢酸アンモニウムの組成比につき、(7:3)および(5:1)の2種類を用い、内標準物質として用いるL- α -レシチンの他に、ミルテフォシン(アルキル鎖炭素

数16)、オクタデシルホスホコリン(アルキル鎖炭素数18)、テトラデシルホスホコリン(アルキル鎖炭素数14)の3種類の化合物の分離を検討した。

移動相の組成比7:3では、4種類の分析種が4分以内で検出され、レシチンについて十分な分離が得られたが、3つの分析種間において十分な分離が得られなかった。一方で、移動相組成比5:1では、テトラデシルホスホコリンの分離が良好であったが、主薬成分であるミルテフォシンとオクタデシルホスホコリンの分離が不完全であった。分析時間は15分であった。移動相の組成比については、分離性を優先し、移動相組成比5:1を用いることとした。

続いて移動相組成比5:1において、塩の濃度を10 mMに変更した場合では、4分析種の溶出に約16分要し、塩濃度100 mMのときと比較して分析

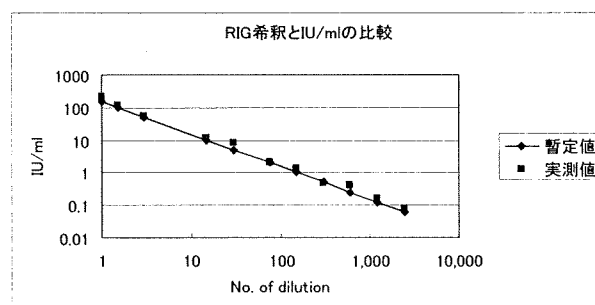


図2 有効期限を4年過ぎた狂犬病ヒト免疫グロブリンの抗体価

表2 メトロニダゾール注射薬を使用した *C. difficile* 腸炎の10例

年齢	性別	診断根拠	基礎疾患	合併症	メトロニダゾール		効果	転帰	副作用
					経口薬	注射薬			
83	男	便中CDトキシシン	膀胱癌(手術)、早期胃癌(内視鏡手術)、肺癌(放射線)、食道癌(放射線)	麻痺性イレウス	+	250 mgを1日3回、4日間	有効	軽快	なし
?	男	臨床診断		呼吸不全、急性腎不全、DIC、ショック、肺炎/ARDS	+	500 mgを1日3回、4日間	無効	不明	なし
62	男	便中CDトキシシン	急性リンパ性白血病、慢性腎不全	全身状態悪化	+	500 mgを1日2回、4～5日間	不明	死亡	なし
78	女	便中CDトキシシン、内視鏡、便培養	腹腔鏡下S状結腸・回盲部切除術		+	500 mgを1日3回、9日間	著効	全治	なし
79	男	便中CDトキシシン	脾臓癌(手術)		+	500 mgを1日3回、3日間、間隔を空けて同量を3日間	著効	全治	なし
38	女	腹部造影CT	子宮筋腫(手術)		+	500 mgを1日3回、5日間	有効	全治	なし
86	男	便中CDトキシシン	胃癌、大腸癌(ともに手術)	消化管出血	+	500 mgを1日3回、4日間	有効	死亡	不明
43	女	便中CDトキシシン、腹部CT	子宮頸癌(手術、化療、放射線)	麻痺性イレウス	-	500 mgを1日3回、12日間	不明	死亡	不明
77	男	便中CDトキシシン、腹部造影CT	肺小細胞癌および脳髄膜転移	敗血症性ショック	+	500 mgを1日3回、3日間	著効	全治	なし
50	?	便中CDトキシシン	SLE、慢性腎不全、食道憩室術後		-	500 mgを1日2回、8日間	有効	軽快	不明

に要する時間に大きな違いは見られなかったが、それぞれのピークの分離性に著しい改善が認められた(図 1)。一方、塩効果検討の際に対照として用いた移動相(アセトニトリル/水(5:1))では、4つの分析種の溶出まで約20分を要したことから、最終的にアセトニトリル/10 mM酢酸アンモニウム(5:1)を移動相とすることとした。

有効期限から4年経過している狂犬病ヒト免疫グロブリン Berirab P を用い、原液の 150 IU/mL から希釈系列を作成し、それぞれについて中和抗体を測定したところ、製造段階で表示された抗体価が良好に維持されていることが明らかとなった(図 2)。

熱帯病・寄生虫症の治療

メトロニダゾール注射薬を使用した *C. difficile* 腸炎 11 例につき、治療報告書を入手できたが、うち 1 例では 1 回投与後に死亡したので除外し、10 例の解析を行なった。国籍は不明 1 例を除き、他は全て日本であった。薬剤使用時期は 2007～2009 年であり、年齢は 43～86 歳(不明 1 例)、性別は男性 6 例、女性 3 例(不明 1 例)であった(表 2)。診断根拠としては、最も確実と思われる便中 CD トキシン検出が 8 例、腹部 CT 検査が 2 例、内視鏡検査が 1 例、臨床診断が 1 例であった(複数回答可)。基礎疾患としては悪性腫瘍が多かったが、全身性エリテマトーデスもみられた。合併症

としてイレウスが 2 例にみられ、ショック、消化管出血その他、全身状態の悪い症例が多くみられた。メトロニダゾール注射薬の他に経口薬も使用されたものが大半であった。メトロニダゾール注射薬の用法・用量については、500 mg の 1 日 3 回投与が多かったが、腎機能低下を考慮してか、500 mg の 1 日 2 回投与、250 mg の 1 日 3 回投与もみられた。投与期間は 3～12 日間であった。本薬剤の効果については、著効 3 例、有効 4 例、無効 1 例、不明 2 例との記載であった。また、副作用については、“なし” 7 例、不明 3 例で、“あり” の報告はみられなかった。転帰については、全治 4 例、軽快 2 例、死亡 3 例、不明 1 例であったが、死亡例については、薬剤の副作用を示唆する記載はみられなかった。

国立国際医療センターでは、対象期間中に熱帯熱マラリアの日本人患者 10 例、三日熱マラリア患者 1 例にアーテメター/ルメファントリン合剤を使用した。10 例のうち 7 例は合併症のない熱帯熱マラリアで、本薬剤は初期治療薬として使われたが、発熱消失時間や原虫消失時間はメフロキンなどの他の抗マラリア薬と比べて、短い傾向がみられた(表 3)。転帰としては 1 例を除く 6 例が治癒に至った。再燃を生じた 1 例では、薬剤の服用が全て食前あるいは食間であったこととの関連が考えられ、アトバコン/プログアニル合剤によ

表 3 合併症のない日本人熱帯熱マラリア患者におけるアーテメター/ルメファントリン合剤の使用

年齢	性別	体重 (Kg)	最高体 温 (°C)	治療開 始病日	原虫数 (/μl)	予防 内服	FCT (h)	PCT (h)	再燃*
50	男	86	39.7	2	194,000 (3.70%)	なし	62	62	あり (21 日目)
58	男	84	40.1	3	133,000 (2.78%)	なし	48	36	なし
39	男	65	39.6	2	21,000 (0.45%)	なし	24	20	なし
46	男	68	39.6	2	13,000 (0.28%)	なし	24	24	なし
22	男	65	40.6	2	86,000 (0.22%)	なし	36	8	なし
24	女	49	39.1	3	6,400 (0.20%)	中断	22	41	なし
27	女	46	39.1	3	34,000 (0.72%)	なし	25	39	なし
中央値	—	65	39.6	2.5	34,000	—	25	36	—

治療 28 日目までの判定

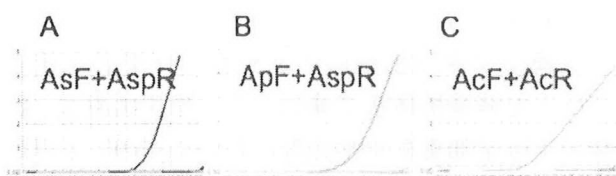


図3 アニサキスI型幼虫のreal-time PCR
A、B、CはそれぞれAss、Ap、AsC個体のPCR増幅例

り再治療で治癒に至った。10例中他の3例は重症マラリアで、うち2例は同センター医師の個人輸入によるアーテスネート注射薬、1例はキニーネ注射薬とアーテスネート坐薬による治療の後、スイッチ薬として用いられた。他に、本薬剤を用いた三日熱マラリア1例は治癒に至った。副作用については、1例でGPTが314 IU/Lに達したが、マラリアによる肝機能障害の可能性がある、重症マラリアでキニーネ注射薬、アーテスネート坐薬、さらに本薬剤を用いた症例は黒水熱を生じたが、本薬剤との関連性は明らかでなかった。他の副作用はいずれも軽微であった。

寄生虫症の血清診断と分子診断

宮崎大学では2009年に寄生虫症検査の受託を442件受けた。そのうち新規診断依頼は331件であり、38都道府県の医療機関から依頼があった。331件のうち寄生虫症の診断が得られたのは117件であり、35.3%を占めた。依頼された検査としては免疫診断が98%以上を占め、残りが病理組織での診断や虫体・虫卵の同定であった。診断確定例では幼虫移行症の一種であるイヌ回虫・ブタ回虫症が44例で最も多く、次いで肺吸虫症の39例であった。肺吸虫症を国籍で見ると、1999年より日本人症例数はほぼ横ばいであったが、外国人症例は年々増加傾向が見られた。外国人症例には女

性が多く、国籍では韓国、中国、タイが多かった。肺吸虫症の虫種では37例がウエステルマン肺吸虫で、2例が宮崎肺吸虫であった。性別年齢分布では、日本人症例では中高年男性が多く、平均年齢は日本人で58.3歳、外国人で39.2歳であった。他に珍しい症例としては、有鉤条虫症に続発する有鉤囊虫症、イノシシ由来のオンコセルカ症などもみられた。

京都府立大学では、2009年1～12月の期間に、臨床施設から72例の診断依頼を受けた。2008年に引き続き、2009年も裂頭条虫症の多さが際立っていた。輸入感染例としては無鉤条虫症、鉤虫症の他、外国でマダニの刺咬やトコジラミの刺咬を受けた例にも遭遇した。また、非定型的鉤虫症の2例を経験した。うち1例はマレーシアでの感染が推定され、形態および虫体DNAでITS2およびcox1領域をPCR増幅した後の塩基配列解析で、セイロン鉤虫症と診断され、別の1例は、大腸粘膜生検組織に幼若成虫の断端を認め、組織から抽出したDNAでITS2およびcox1領域の塩基配列解析にて、イヌ鉤虫症と診断された。

アニサキスには*Anisakis simplex sensu stricto* (Ass)、*A. pegreffii* (Ap)、*A. simplex* C (AsC)、*A. typica* (At)が知られているが、ITS1-5.8S rRNA-ITS2領域の中で、Ass、Ap、AsCの間で塩基配列に違いが見られる領域を用い、それぞれの種に特異的なプライマーを作製した。そして、3種のプライマーセットを用いて検体DNAをリアルタイムPCR法で増幅することにより、種の同定を行なったが(図3)、ヒト由来虫体では22例中全てがAss、サケ・マス由来虫体でも39例中全てがAssであった。これに対して、サバ由来虫体ではAss以外にApが多く認められた。

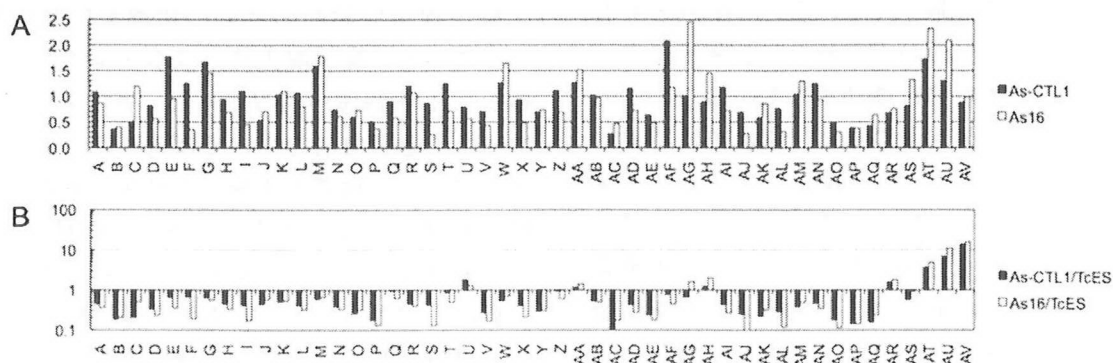


図4 内臓幼虫移行症患者血清と組換えブタ回虫ES抗原との反応
A: As-CTL1とAs16に対する結合(単位は吸光度)
B: As-CTL1とAs16のTcESに対する吸光度の比

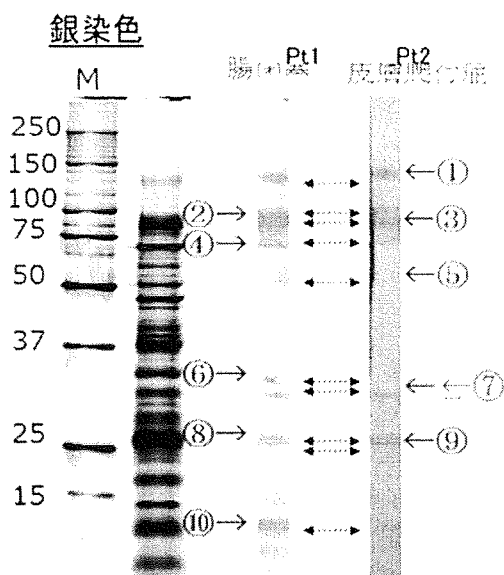


図5 旋尾線虫の可溶性粗抗原と患者血清との反応

日本海裂頭条虫症と広節裂頭条虫症とは、形態学的鑑別が困難である。そこで、虫体 DNA を用いて ITS1、cox1、nd3 領域を PCR 増幅し、塩基配列解析を行なったが、20 例の全てが日本海裂頭条虫症と判明した。また、サケ・マス類における日本海裂頭条虫の検出を試みたところ、5～8 月のサクラマス 6 匹中 1 匹から検出され、シロサケ 8 匹、カラフトマス 2 匹からは検出されなかった。無鉤条虫症は 9 例みられたが、うち 6 例では海外での感染が疑われた。

組換え抗原作製と患者血清との反応

ブタ回虫の体内移行期幼虫の cDNA ライブラリを作製し、ランダムに 1722 クローンの塩基配列を決定し、175 種類のユニークな配列を得た。これらの配列データを、ブタ回虫の幼虫包蔵卵や成虫および他種線虫の EST データベースと比較したところ、ブタ回虫以外の線虫類と相同性を有するものや、これまで公開されているどの配列とも有意の相同性がないものが得られた。公開データベースにブタ回虫体内移行期幼虫の EST はないことから、これらはブタ回虫の肺移行期幼虫に特異的な配列と考えられた。以上の配列の中から、イヌ回虫の C-タイプレクチンのブタ回虫ホモログと考えられるタンパク質 As-CTL1 と、ブタ回虫感染に対するワクチン候補 As16 の組換え抗原を作製した。これらを選んだ理由は、両者とも肺から回収した幼虫の cDNA ライブラリ中のクローンの出現頻度が高く、患者の免疫系が強く感作されてい

る可能性が高いと考えたからである。

組換えブタ回虫抗原の幼虫移行症患者血清との反応を酵素抗体法で検討した。患者血清は、宮崎大学医学部寄生虫学分野において 2005 年以前に診断目的で送付され、 -80°C に保管されていたもので、この中から抗体検査の結果に加えて、病歴、各種画像、生食歴等から、確実に動物由来の回虫類による幼虫移行症であろうと診断された 48 症例を選んだ。選択後は対応表を破棄し、連結不可能匿名化して使用した。

これら患者血清の、イヌ回虫第 3 期幼虫の ES 抗原 (TcES) ならびにブタ回虫体内移行期幼虫の ES 抗原 (AsES) に対する結合を吸光度で比較すると、AsES よりも TcES に強く反応したものが 33 検体、AsES と TcES に同程度に反応したものが 11 検体、AsES の方に強く結合したものが 4 検体であった。一方、これを吸光度そのままではなく、ブタ回虫抗原 AsES に対する吸光度とイヌ回虫抗原 TcES に対する吸光度の比をとってみた。幼虫 ES 抗原は診断的価値がきわめて高いとされ、原因虫種の推定に役立つとされる。AsES と TcES の比が 5.0 を超えるのは 3 検体で、それらはブタ回虫感染患者の血清と推定され、残りの検体はイヌ回虫 (もしくはトキソカラ) 感染患者の血清であると推定された。

次にこれらの血清検体と組換えブタ回虫抗原 As-CTL-1 と As16 との反応を見た。吸光度の比較では、トキソカラ感染推定血清とブタ回虫感染推定血清との結合に有意な差はみとめられなかった (図 4)。しかしながら、イヌ回虫幼虫の ES 抗原との比をとると、ブタ回虫感染血清と推定された 3 検体では高い値をとることが示された。As-CTL-1 と As16 の比較では、As16 の方が高い値を示した。

旋尾線虫症診断のための組換え抗原作製について述べる。旋尾線虫幼虫はホタルイカ 7,015 個体から 140 個体が回収できた。寄生率は 2.0% であった。患者血清を用いて粗抗原に対するウェスタンブロット検査を実施した結果、患者血清が比較的共通して反応するバンドが 10 種類 (18.2～127.9 kDa) 同定できた (図 5)。これらをすべて質量分析にかけたところ、10 本中 3 種は相同な既知タンパク質がヒットせず、3 種は大腸菌タンパク質とのみ相同性が確認された。他の 4 種は多種線虫との相同性が見られたので、この中に目指す診断

各種診断キットによる
人獣共通感染性サル・マラリアの判定結果

診断キット	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. cynomolgi</i>	<i>P. inui</i>
1) OptiMAL-IT	Pf	non-Pf	non-Pf
2) Entebe MC	Pv	Pv	Pv
3) SD, Ag	non-Pf	non-Pf	non-Pf
4) SD, Ag Pf/Pan	non-Pf	non-Pf	non-Pf
5) Pan-R MC	non-Pf	non-Pf	weak Pf
6) BinaxNow	non-Pf	non-Pf	non-Pf

Pf:熱帯熱マラリア原虫 Pv:三日熱マラリア原虫

表 4 サルマラリア原虫と各種イムノクロマト
キットの反応

抗原を求めることにした。このうち、31.0 kd のガレクチンはフィラリアの患者抗体が反応すること、フィラリアの食道腺に分布していることなどの論文情報があつたため、このタンパク質を標的とすることにした。

縮重プライマーを設計して旋尾線虫幼虫 RNA から得られた DNA を鋳型に PCR を行ったが、全長を含む遺伝子のクローニングには成功しなかった。しかし、フィラリア系線虫のガレクチン遺伝子と高い相同性が見られることが分かった。これをもとに組換えタンパク質を作製して、旋尾線虫患者血清との反応性を検討したが、用いた患者血清ではすべて反応は見られなかった。組換えタンパク質に抗原性が欠失している可能性を考えて、部分配列上は極めて高い相同性を示したイヌ糸状虫ガレクチンと反応する患者血清を用いて検討したところ、弱いながら陽性反応が見られたことから、免疫原性を保持した旋尾線虫ガレクチンを組換えタンパク質として作成したことが確認できた。

マラリア迅速キットの評価

マラリア迅速キットは 12 例で使用された。うち 9 例は 3 種すべてのキットで陽性と判定され、3 例が陰性であった。陽性を示した 9 例では、全てがギムザ染色による判定と一致した。また陰性 3 例中 2 例において、後日マラリア以外の確定診断が得られた。このことから、症例数は少ないが現時点での感度、特異度はともに 100% であった。治療経過を検討すると、Malaria Ag キットでの陽性は、原虫感染率 0.2~0.3% で陰性化する傾向が見られた。

6 種類の迅速キットのうち、OptiMAL-IT では *P. knowlesi* が熱帯熱マラリアと判定され、Entebe MC では *P. knowlesi*、*P. cynomolgi* および *P. inui* が三日熱マラリアと判定され、Pan-R MC では *P. inui* が弱いながら熱帯熱マラリアと判断された(表 4)。それ以外のキットと原虫種との組み合わせでは全て、非熱帯熱マラリアと判定された。

狂犬病啓発資料の作成

1950 年に学術映像として作製された「狂犬病 - 男児症例の記録」を DVD 化した。一男児の発病初期から死亡に至るまでの臨床画像を示した貴重なもので、映像時間は 15 分である。また、” Rabies - A fatal but preventable disease ” は Rabies in Asia Foundation が作製し、主にアジアにおける狂犬病の専門家 19 名が、狂犬病のウイルス学、病理学、臨床、予防など全てのから画像付き解説をおこなっている DVD であり、映像時間は 45 分にわたる。

D. 考察

以前には、研究班導入薬剤はマラリアでの使用が多かったが、最近では赤痢アメーバ症での使用が増加している。国内承認薬であるメトロダゾール経口薬は腸管からの吸収が良好であり、経口投与が可能でありさえすれば、注射薬の必要性はない。しかし近年、特に HIV 感染症に合併した赤痢アメーバ症で、重症化して経口投与不能となる例が目立っており、その様な症例において、本研究班が導入した注射薬の価値が明らかとなっている。メトロニダゾール(経口あるいは注射)のなどによる急性期治療の後に投与する luminal drug (パロモマイシン) については、本研究班に対して供給依頼が増えている。しかし、最近の論文で luminal drug の有効性を示したものを見つけることはできない。本研究班は、繰り返して発病している症例、便中に嚢子が持続的に排泄されている症例、免疫不全者などで再発時に重症化のリスクが高い症例に限定することを徹底し始め、最近では使用例が減少する傾向にある。

クロストリジウム・ディフィシル腸炎に対するメトロニダゾール注射薬使用例が目立ち、人道的観点から使用せざるを得なかったが、現段階での解析では、有効性に優れ、安全性に特別な問題があるとは思えなかった。今後も症例が増える可能性を考え、その使用基準や使用法をより明確にす

る必要がある。

2001 年末にメフロキンがマラリアの治療薬および予防薬としても国内で承認された。それまでの国内承認治療薬はキニーネ経口薬とスルファドキシシン/ピリメタミン合剤の2種類のみであり、しかもそれらは使いやすい薬剤ではなかったもので、メフロキンの承認に期待が高まった。しかし、今や世界の殆どの流行地で、散発的であっても熱帯熱マラリア原虫のメフロキン耐性がみられ、特にタイ・ミャンマーおよびタイ・カンボジア国境地帯では耐性率が 50%を超えている。日本人渡航者でも耐性原虫が見つかり、今後さらに増加することも予想される。また、メフロキンは精神神経系副作用がありうるので、その点からも本研究班が導入している抗マラリア薬の重要性は高い。

世界的に、マラリア流行地における熱帯熱マラリアの治療薬としてアーテシニン系薬あるいはそれを含む合剤の評価が高まりつつある。特に、熱帯熱マラリアによる重症マラリアの治療には、従来のキニーネ注射薬に比べてアーテスネート注射薬の方が致死率低下の点で優れていることが報告された。また、本研究班で導入しているアーテスネート坐薬が、重症マラリアの初期治療として使用価値があることが示されたが、本研究では少数例ではあるが、同様な印象を得ている。また本研究においても、合併症のない熱帯熱マラリアに対するアーテメター/ルメファントリン合剤は、発熱消失時間や原虫消失時間が短く、安全性にも特段の問題はなく、優れた薬剤であると思われる。両薬剤に関して、今後の使用例の評価を行ないつつ、その使用基準をより明確にする必要がある。

本研究班は平成 19 年度、我が国で初めて狂犬病ヒト免疫グロブリンを正式に導入した。狂犬病はインドを初めとして途上国に広く分布しており、日本人渡航者でも感染の危険のある者は多い。しかし本薬剤は高価格であり、時に入手不可能となることもある。今回、有効期限から 4 年を経過した免疫グロブリンが表示された抗体価を保っていることが示された。使用期限終了後の薬剤を使うことの法的検討が必要であるが、使用期限内の製品がない場合には、疾患の重篤性を鑑み、緊急避難的に使うことも考えるべきであろう。また今回、狂犬病に関する啓発資料を作成したが、こ

れらにより本疾患に関する知識が浸透し、曝露時の適切な処置、曝露前の適切な予防処置により、我が国の旅行者を狂犬病から守ることが必要と思われる。

今でも国内で多くの寄生虫感染症例が発生しているが、過去には土壤媒介性寄生虫症が多かったことを考えると、疫学状況は変化していると言える。なかでもイヌ回虫・ブタ回虫を中心とする幼虫移行症が多いことが注目される。また、ホタルイカを食することによる旋尾線虫症もある。これらは治療抵抗性のことが多く、重要臓器に迷入して重篤な症状を示すことがあるので、早期にしかも確実に診断する方法の確立が急務である。幼虫移行症では虫体の摘出が困難なことが多く、血清診断が頼りとなる。しかし、虫体からの抽出粗抗原を用いた抗体測定では虫種間の交差反応から、虫種特異性の問題がある。また、虫体が入手できないと、抗原を得ることができない。その点、世界中で組換え抗原を用いた抗体測定法が望まれてきた。本研究で、2 種類のブタ回虫組換え抗原を作成し、患者血清のそれら組換え抗原に対する結合と、イヌ回虫幼虫 ES 抗原に対する結合との比をみることで、ブタ回虫幼虫移行症を診断できる可能性が示され、今後の進展に期待が持たれる。また、旋尾線虫ガレクチンの組換え蛋白に、イヌ糸状虫ガレクチンとの反応性を有する血清が弱いながら反応したことは、今後研究を進める価値があることを示す。

サルマラリアである *P. knowlesi* 感染がヒトで報告されたが、ヒトと動物との密な接触が原因と思われる。このような地球環境の変貌による動物からヒトへの伝播は、マラリア以外の感染症についても注意が必要である。世界的にも見ても *P. knowlesi* に特異的な検査試薬がない現在、本研究で示した数種のマラリア迅速キットとの反応性のパターンが *P. knowlesi* 感染を疑う手がかりとなる可能性もあり、今後も追究する意味があると思われる。

本研究班はその前身も含め、従来からホームページや「寄生虫薬物治療の手引き」を介して国内医療機関への支援を行ってきたが、後者については平成 22 年 3 月に改訂 7.0 版を発行したので、今後、国内の関係者に広く配付する。また、症例に関する診断や治療の相談にも対応してきた。それらについては、欧米の関係医療機関、旅行者感