

例、PCR法が4例、顕微鏡下凝集試験法(MAT法)が56例、Dipstick法が1例であった(複数報告あり)。Dipstick法は届出基準にない方法だが、適切抗体検査法と判断された。MAT法による56例では、ペア血清による抗体の陽転が10例、ペア血清による抗体価の有意上昇が36例で認められていた(複数報告あり)(表18)。2008年には、病原体の分離同定が18例あり、検体は18例とも血液であった。PCR法は3例あり、検体はすべて血液であった。MAT法は35例であった(複数報告あり)。MAT法による35例では、ペア血清による抗体の陽転が5例、ペア血清による抗体価の有意上昇が27例で認められていた(複数報告あり)

エ) 感染原因・感染経路

感染源、感染の機会として、農作業、清掃作業が20例、河川、下水、水田に関連が27例、ネズミなど動物に関連するものが14例あり、2008年には、河川や水田に関連する例が33例、動物などに関連するものが6例報告された。

オ) 感染地域

2006-07年には、国内例が56例、国外例が3例(マレーシアボルネオ島2例、フィジー1例)、2008年には、国内例が41例、国外例が1例(タイ)であった(表19)。国内発生例では、2006-07年に、沖縄県(27例)、宮崎県(12例)、東京都(6例)、新潟県(3例)、宮城県、埼玉県、和歌山県、佐賀県、熊本県(各1例)から報告があり、2008年は、沖縄県(30例)、東京都(4例)、鹿児島県(3例)、秋田県、新潟県、静岡県、宮崎県(各1例)から報告された。いずれの年も沖縄県で最も発生が多かった。

カ) 死亡例の報告の有無

2006-07年には死亡例が2例(ともに50歳代男性)報告されたが、2008年には死亡例の報告はなかった。

6. エキノコックス症

2006-07年の対象報告数例は38例、2008年は23例であった。

ア) 男女別年齢分布

性別では、2006-07年は、男性が23例、女性が15例で、男性が多かったが、2008年は、男性12例、女性11例で男女はほぼ同数であった。年齢分布では、2006-07年は、10歳～80歳代までに発生があり、60歳代、70歳代が各10例で最も多かった。2008年にも、20歳～80歳代まで広い年齢層で発生がみられ、70歳代が6例で最多であった(表20)。

イ) 症状

2006-07年には、肝腫大が8例、腹痛が7例、黄疸が4例、貧血が1例みられ、肝臓画像異常が22例あった(表21)。2008年には、肝腫大が2例、腹痛が2例あり、肝臓画像異常が14例で見られたが、黄疸、貧血、発熱、腹水、るいそうなどの症状は認められなかった。また、「症状なし」が6例あった。

ウ) 診断に要した検査

2006-07年には、包虫の検出が17例あり、検体は肝臓の摘出ないし切除が11例、肝生検が2例、切除肺が1例であった。他に、ELISA抗体の検出が23例、ウエスタンブロット法による抗体検出が25例あった。2008年には、包虫の検出が10例あり、検体は肝臓の摘出ないし切除が8例、肝生検と骨病変が各1例であった。ELISA抗体の検出が13例、ウエスタンブロット抗体検出が18例であった(表22)。

エ) 感染原因・感染機会

感染原因として、湧き水飲用などの経口感染と記された例が、2006-07年には25例、2008年には16例、動物などの記載が2006-07年には11例あったが、2008年にはみられなかった。

オ) 感染地域

2006-07年は、北海道が35例、国外感染が3例(中国2例、ウズベキスタン1例)あり、2008年は北海道が22例、国外が1例(英国)であった。北海道での感染者は全員が多包虫症であり、英国での感染者は単包虫症であった(表23)。

か) 死亡報告例の有無

死亡例の報告はなかった。

7. 日本脳炎

2006-07年の対象報告数例は17例、2008年は3例であった。

ア) 男女別年齢分布

性別では、2006-07年は、男性が9例、女性が8例であったが、2008年は男性3例のみであった。年齢分布は、2006-07年には、9歳以下、10歳代、40歳～80歳代に発生があったが、2008年には、50歳代が2例、60歳代が1例であった(表24)。

イ) 症状

2006-07年では、意識障害が17例、発熱が16例、項部硬直が9例、頭痛が8例、痙攣が5例、筋硬直、脳神経麻痺、不随意運動が各4例、嘔吐、易興奮性、運動失調が各2例みられた。2008年は、発熱と意識障害が3例すべてに見られ、筋硬直が2例、頭痛、嘔吐、項部硬直、痙攣が各1例に見られた(表25)。

ウ) 診断に要した検査

2006-07年には、病原体の分離同定が2例、IgM抗体検出が4例、ペア血清でHI抗体有意上昇と中和抗体陽転が各1例、ペア血清でCF抗体検出が2例あった。2008年には、病原体の分離同定、PCR法によって診断した例はなく、ペア血清でHI抗体を検出した例、ペア血清で中和抗体の陽転認められた例が各3例であった(複数報告あり)(表26)。

エ) 感染原因・感染機会

2006-07年には、蚊と記された例が6例、不明が11例あり、2008年には、蚊と記された例が2例、不明が1例であった。

オ) 感染地域

感染地域は、2006-07年は、熊本県が4例、福岡県が3例、石川県と島根県が各2例、茨城県、愛知県、鳥取県、山口県、高知県、大分県が各1例であった。2008年は、茨城県が2例、奈良県が1例であった(表27)。

か) 死亡報告例の有無

2006-07年に死亡例が2例(40歳代と80歳代の女性)報告された。

D. 考察

感染症法に基づき、2006年4月～07年12月と2008年1～12月の間に報告された症例を対象として、疫学情報、症状、診断方法などについて集計・分析した。

E型肝炎の届出症例では、成人男性患者が大多数を占めた。かつては輸入感染症と考えられていたが、感染症法のもとで1999年以降に報告された症例の大半は国内感染例であり、今回の調査期間においても国内感染が約3/4を占め、特に北海道での感染例が多かった。症状は、成書の記載の通り、他のウイルス性急性肝炎と相違がなかった。検査診断は、主に、IgM抗体検査又はPCR法により実施されていたが、2008年にはPCR法による症例が相対的に増加した。

感染原因として、ブタ、イノシシなどの肉や内臓の喫食が考えられる(喫食歴がある)例が41%を占めた。我が国では、ブタとイノシシの抗体保有率が高く、これらの動物が保有しているE型肝炎ウイルス(HEV)とヒト由来のHEVが遺伝学的に極めて似ていることから、これらがHEVの保有宿主と考えられている。

オウム病については、届出症例の男性と女性の数にはほとんど差がなく、すべての年齢層から症例が出ていたが、40歳～50歳代に症例が多かった。また、多くの症例でインコとの接触(飼育)が確認されていた。

本症による死亡例の報告もあるため、肺炎や呼吸器症状を伴う発熱の診療に際しては、小鳥の飼育や小鳥との接触の有無、飼育鳥の健康状態を質問することも必要であろう。本症の検査方法としては、従来から補体結合反応によるオウム病抗体がよく用いられている。しかし、これはクラミジア属特異的検査であり、オウム病クラミジア感染の確定診断はでき

ないことに注意が必要である。

日本紅斑熱については、2006-07年には女性症例が男性症例よりやや多かったが、2008年は男女にほとんど差がなかった。ともに50歳代以降が中心で、60歳～70歳代に症例が多かった。症状では、発熱と発疹（紅斑を含む）が90%以上の症例にみられ、肝機能異常が70%以上に、刺し口が60～70%に見られた。一方で、DICが16～18%に見られ、死亡例も2例報告されていたため、重症化に注意すべきことが確認された。診断に要した検査法としては、血清抗体検査が大部分を占めたが、少数例で病原体の分離同定がなされ、PCR法が、2006-07年には147例中16例、2008年には135例中49例で実施され、PCR法の実施が増加していた。感染地域としては近畿地方以南が多かったが、千葉県からも7例の報告があった。近年、中部地方、関東地方からも発生が報告されており、発熱と発疹のみられる患者では、本症を鑑別診断に加え、行動歴や職業を確認し、刺し口を丹念に捜すことが重要と考えられる。

ライム病については、調査期間内の男性症例が16例、女性症例が12例でやや男性に多かった。症例は中高年に多いが、9歳以下の症例も報告された。症状では、遊走性紅斑が28例中19例（68%）で、発熱が12例（43%）で見られたが、神経症状は6例のみで見られ、眼症状や循環器症状がみられた症例はなかった。診断のための検査法としては、大多数の症例でウエスタンブロット法が実施されていた。感染地域は、米国の4例、ドイツの2例を除いて国内感染であり、北海道が最も多かった。

レプトスピラ症については、男性に圧倒的に多く（男女比は88:13）、9歳以下～60歳代の幅広い年齢層に見られた。症状では、発熱が101例中98例、筋肉痛が63例、結膜充血が57例、黄疸が45例、腎不全が41例にみられた。診断のための検査法としては、大多数の症例

でMAT法が行われており、約3割の症例では病原体の分離同定がなされていたが、PCR法が実施された例は1割未満であった。感染地域は、4例を除いて、国内感染であり、従来報告が多かった沖縄県が過半数を占めた。しかし、本症はいかなる地域でも発生し得る疾患であるうえ、死亡例の報告が2例あったことから、診断が遅れば重症化し、不幸の転機をとる可能性を考えて対処しなければならない。発熱に加え、筋肉痛、黄疸、結膜充血、腎不全などの認められる患者では、農作業、下水道作業・清掃作業などの経験に注意して問診することが重要と考えられた。

エキノコックス症は、調査期間内に57例の報告があり、国外感染例4例を除いて、すべて北海道での感染例であった。患者の年齢層は50歳代～80歳代が多かったが、10歳代の発生報告が2例、20歳代が8例あった。症状として、肝臓画像異常が36例記載されていた一方で、腹水や黄疸を示した報告例がなかったことから、エキノコックス症は早期に診断されているものと推測された。確定診断は、血清学的診断の他に、切除ないし摘出組織からの包虫の検出が24例（42%）でなされていた点が注目された。

日本脳炎患者の届出は20例であった。症状は意識障害と発熱がほぼ全例で記載されていた。従来発生が多発地域とはみなされていなかった茨城県での感染例が2例報告されていたため、今後の発生動向に注意が必要である。

従来から言われていることではあるが、前回および今回の届出疾患の集計・分析からも、感染症の診断においては、主訴、主要症状に加え、職業、渡航歴・旅行歴、ペット飼育の有無などを聴取することの重要性が再確認された。十分な問診から疑われた感染症について、適切な検査方法により診断を行うことが必要である。届出様式には診断確定に適した

検査方法が記載されているので、届出基準の確認が、適切な検査診断につながることも期待できる。

一方、確定診断するための検査方法の中には、日常診療では用いられない特殊な検査法も多くあるため、実施体制の整備が不可欠であり、検査実施可能な機関を診療現場に周知することが届出を促進するための必要条件になると考えられる。

また、届出症例の集計・分析から、発生状況、症状などに関して、従来とは異なる知見が得られる可能性もある。このため、注意深く継続してデータを見ていく必要があると考えられる。届出症例の集計・分析から有用な情報を得るためには、実際に診断されながら、なんらかの理由で届出されない症例を減少させて届出数を増加させる必要がある。発生動向調査のデータは、すべて診断した医師からの届出によるものである。日常診療の多忙な時間を割いて届け出ることが、診療現場に有用な情報となってフィードバックされなければ、届出の動機が失われるであろう。診療現場に

有益な情報を還元し、公衆衛生上の感染症対策につながる情報を提供できるよう、さらに対象感染症を増やし、長期に集計・分析を続ける必要がある。

E. 結論

感染症発生動向調査で報告されているデータの集計・分析により得られる情報は、臨床現場での動物由来感染症の診断に役立つものと考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定なし

G. 研究発表

なし

表 1. E 型肝炎届出症例の男女別年齢分布

2006-2007 年				2008 年			
年齢	男	女	合計	年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0	0-9y	0	0	0
10-19y	0	0	0	10-19y	1	0	1
20-29y	4	4	8	20-29y	0	0	0
30-39y	9	3	12	30-39y	6	2	8
40-49y	15	6	21	40-49y	10	0	10
50-59y	17	8	25	50-59y	12	2	14
60-69y	16	1	17	60-69y	8	1	9
70-79y	11	5	16	70-79y	2	0	2
80-89y	2	1	3	80-89y	0	0	0
90y-	0	0	0	90y-	0	0	0
合計	74	28	102	合計	39	5	44

表 2. E 型肝炎届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年
肝機能異常	79	27
全身倦怠感	76	28
黄疸	62	24
食欲不振	53	21
発熱	46	11
肝腫大	18	9
その他	15	1

表 3. E 型肝炎の診断方法と遺伝子型

診断方法	2006-07年	診断方法	2008年
PCR+IgM	18	PCR+IgM	8
PCR	13	PCR	19
IgM	71	IgM	16

遺伝子型	例数	遺伝子型	例数
G1	1	G1	0
G2	0	G2	0
G3	5	G3	5
G4	9	G4	6

表 4. E型肝炎の推定感染原因食品

2006-07年

食品など	例数
豚肉(生肉,レバー等)	16
猪肉(生肉,レバー等)	10
シカ肉	5
ヒツジ肉	1
トリ肉	2
ウマ肉	1
レバー(種類不明)	2
焼肉(肉種類不明)	5
その他	4
記載なし・不明	32

重複あり

2008年

食品など	例数
豚肉(生肉,レバー等)	12
猪肉(生肉,レバー等)	3
シカ肉	3
ヤギ肉	1
トリ肉	1
ウマ肉	1
クマ肉	1
焼肉(肉種類不明)	2
その他	1
記載なし・不明	14

重複あり

表 5. E型肝炎の感染地域

感染地域	2006-07年	2008年
国内例	77	33
国外例	24	10
国内 or 国外	1	1

表 6. オウム病届出症例の男女別年齢分布

2006-07年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	1	1
10-19y	1	3	4
20-29y	1	0	1
30-39y	3	3	6
40-49y	6	5	11
50-59y	10	3	13
60-69y	2	2	4
70-79y	0	2	2
80-89y	1	1	2
90y-	1	0	1
合計	25	20	45

2008年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0
10-19y	0	0	0
20-29y	0	0	0
30-39y	0	2	2
40-49y	0	0	0
50-59y	0	1	1
60-69y	0	1	1
70-79y	3	1	4
80-89y	0	1	1
90y-	0	0	0
合計	3	6	9

表 7. オウム病届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年
発熱	44	9
肺炎	29	9
咳	27	8
呼吸困難	10	4
関節痛	8	3
頭痛	7	1
筋肉痛	7	3
粘液性痰	3	2
意識障害	3	3
DIC	0	3
その他	10	1

表 8. オウム病の感染原因と感染地域

感染原因	2006-07年	2008年
インコ飼育	25	5
ハト	7	2
オウム	1	1
その他	6	0
記載なし・不明	6	2

感染地域	2006-07年	2008年
国内例	43	9
国外例	1	0
国内 or 国外	1	0

表 9. 日本紅斑熱届出症例の男女別年齢分布

2006-07年

年齢	男	女	合計
0-9y	3	0	3
10-19y	1	0	1
20-29y	0	2	2
30-39y	0	0	0
40-49y	4	2	6
50-59y	11	13	24
60-69y	20	17	37
70-79y	19	33	52
80-89y	2	19	21
90y-	1	0	1
合計	61	86	147

2008年

年齢	男	女	合計
0-9y	3	2	5
10-19y	0	1	1
20-29y	2	2	4
30-39y	2	0	2
40-49y	5	2	7
50-59y	12	8	20
60-69y	13	15	28
70-79y	26	22	48
80-89y	6	12	18
90y-	1	1	2
合計	70	65	135

表 10. 日本紅斑熱届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年	その他の症状	2006-07年	2008年
発熱	145	133	全身倦怠感	7	5
発疹	139	126	リンパ節腫脹	5	2
肝機能異常	110	104	筋肉痛&or 関節痛	4	3
刺し口	109	83	意識障害	3	0
頭痛	48	48	食欲不振	2	2
DIC	27	22	ショック	2	0
その他	36	29	タンパク尿	2	0
			血小板減少症	1	5
			低 Na 血症	0	2
			腎機能障害,腎不全	0	2

表 11. 日本紅斑熱の診断に要した検査法

診断方法：2006-07年	例数	診断方法：2008年	例数
分離同定	5	分離同定	8
PCR	16	PCR	49
血清抗体検査	133	pcr 血液	33
IgM ペアで陽転	8	pcr 皮膚生検	20
IgM ペアで有意上昇	19	pcr 痂皮	9
IgM 抗体陽性	26	pcr 記載なし	1
血清抗体ペアで陽転	31	血清抗体検査	95
血清抗体ペアで有意上昇	42	IgM 抗体ペアで陽転	41
その他	4	IgM 抗体ペアで有意上昇	45
		その他	3

表 12. 日本紅斑熱の感染地域

感染地域	2006-07年	感染地域	2008年
鹿児島県	29	三重県	34
三重県	27	熊本県	18
和歌山県	23	和歌山県	16
島根県	13	島根県	13
熊本県	13	鹿児島県	11
愛媛県	12	宮崎県	8
広島県	6	高知県	7
宮崎県	5	千葉県	7
兵庫県	5	愛媛県	5
高知県	4	広島県	4
長崎県	4	兵庫県	4
徳島県	3		

2006-07年

青森県, 千葉県, 鳥取県: 1 例

2008 年

鳥取県, 徳島県, 長崎県: 2 例

宮城県, 神奈川県: 1 例

表 13. ライム病届出症例の男女別年齢分布

2006-07 年

年齢	男	女	合計
0-9y	2	0	2
10-19y	1	0	1
20-29y	0	0	0
30-39y	3	1	4
40-49y	4	2	6
50-59y	1	2	3
60-69y	3	3	6
70-79y	0	1	1
80-89y	0	0	0
90y-	0	0	0
合計	14	9	23

2008 年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0
10-19y	0	0	0
20-29y	1	0	1
30-39y	0	0	0
40-49y	0	0	0
50-59y	0	0	0
60-69y	1	3	4
70-79y	0	0	0
80-89y	0	0	0
90y-	0	0	0
合計	2	3	5

表 14. ライム病届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年
遊走性紅斑	15	4
発熱	9	3
筋肉痛	8	2
神経症状	6	0
循環器症状	0	0
眼症状	0	0
関節炎	3	2
筋肉炎	0	1
慢性萎縮性肢端皮膚炎	0	0
慢性脳脊髄炎	0	0
その他		0
他 頭痛	1	0
他 慢性疲労症候群	1	0

表 15. ライム病の感染地域

感染地域	2006-07年	感染地域	2008年
国内	17	国内	5
北海道	9	北海道	1
長野県	2	神奈川県	1
神奈川県	1	長野県	1
新潟県	1	茨城県	1
岐阜県	1	福岡県	1
三重県	1		
福岡県	1		
鹿児島県	1		
国外	6	国外	0
米国	4		
ドイツ	2		

表 16. レプトスピラ症届出症例の男女別年齢分布

2006-07年

2008年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0
10-19y	5	0	5
20-29y	6	1	7
30-39y	10	0	10
40-49y	4	0	4
50-59y	12	4	16
60-69y	8	1	9
70-79y	7	1	8
80-89y	0	0	0
90y-	0	0	0
合計	52	7	59

年齢	男	女	合計
0-9y	1	0	1
10-19y	4	1	5
20-29y	9	2	11
30-39y	7	0	7
40-49y	4	0	4
50-59y	8	0	8
60-69y	3	1	4
70-79y	0	1	1
80-89y	0	1	1
90y-	0	0	0
合計	36	6	42

表 17. レプトスピラ症届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年
発熱	58	40
筋肉痛	37	26
結膜充血	35	22
黄疸	30	15
タンパク尿	22	15
腎不全	27	14
出血症状	8	5
その他	20	16

表 18. レプトスピラ症の診断に要した検査法

診断方法	2006-07年	2008年
分離同定	14	18
PCR	4	3
凝集法 MAT	56	35
抗体有意上昇	36	27
抗体陽転	7	5
その他の検査法	1	1

表 19. レプトスピラ症の感染地域

感染地域	2006-07年	感染地域	2008年
国内	56	国内	41
沖縄県	27	沖縄県	30
宮崎県	12	東京都	4
東京都	6	鹿児島県	3
新潟県	3	秋田県	1
鹿児島県	2	新潟県	1
宮城県	1	静岡県	1
埼玉県	1	宮崎県	1
静岡県	1		
和歌山県	1		
佐賀県	1		
熊本県	1		
国外	3	国外	1

2006-07年 国外例

マレーシア : 2 例
 フィジー : 1 例

2008年 国外例

タイ : 1 例

表 20. エキノコックス症届出症例の男女別年齢分布

2006-07年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0
10-19y	2	0	2
20-29y	3	1	4
30-39y	3	0	3
40-49y	1	1	2
50-59y	3	2	5
60-69y	4	6	10
70-79y	6	4	10
80-89y	1	1	2
90y-	0	0	0
合計	23	15	38

2008年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0
10-19y	0	0	0
20-29y	3	1	4
30-39y	0	1	1
40-49y	0	1	1
50-59y	2	2	4
60-69y	1	2	3
70-79y	4	2	6
80-89y	2	2	4
90y-	0	0	0
合計	12	11	23

表 21. エキノコックス症届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年
肝腫大	8	2
腹痛	7	1
黄疸	4	0
貧血	1	0
発熱	0	0
腹水	0	0
るいそう	0	0
肝臓画像異常	22	14
その他	6	3

表 22. エキノコックス症の診断に要した検査法など

診断方法	2006-07年	2008年
包虫の検出	14	10
検体：肝臓摘出/切除	11	8
検体：肝臓生検	2	1
検体：その他	1	1
ELISA 法	23	13
Western blot 法	25	18
その他	1	0

表 23. エキノコックス症の感染地域

感染地域	2006-07年	感染地域	2008年
国内	35	国内	22
北海道	35	北海道	22
国外	3	国外	1
中国	2*	英国	1
ウズベキスタン	1		

*1 例は豪州,ニュージーラント

の可能性もあり

表 24. 日本脳炎届出症例の男女別年齢分布

2006-07 年

年齢	男	女	合計
0-9y	1	0	1
10-19y	1	0	1
20-29y	0	0	0
30-39y	0	0	0
40-49y	3	2	5
50-59y	1	1	2
60-69y	3	2	5
70-79y	0	2	2
80-89y	0	1	1
90y-	0	0	0
合計	9	8	17

2008 年

年齢	男	女	合計
0-9y	0	0	0
10-19y	0	0	0
20-29y	0	0	0
30-39y	0	0	0
40-49y	0	0	0
50-59y	2	0	2
60-69y	1	0	1
70-79y	0	0	0
80-89y	0	0	0
90y-	0	0	0
合計	3	0	3

表 25. 日本脳炎届出症例の症状

症状	2006-07年	2008年
意識障害	17	3
発熱	16	3
項部硬直	9	1
頭痛	8	1
痙攣	5	1
筋硬直	4	2
脳神経麻痺	4	0
不随意運動	4	0
嘔吐	2	1
易興奮性	2	0
運動失調	2	0
その他	2	1

表 26. 日本脳炎の診断に要した検査法

診断方法	2006-07年	2008年
分離同定	2	0
PCR	0	0
IgM 抗体検出	4	0
ペアで HI 抗体検出	7	3
ペアで HI 抗体有意上昇	1	0
ペアで中和抗体陽転	1	3
ペアで CF 抗体検出	2	0
その他	4	0

表 27. 日本脳炎の感染地域

感染地域	2006-07年	感染地域	2008年
熊本県	4	茨城県	2
福岡県	3	奈良県	1
石川県	2		
島根県	2		
愛知県	1		
鳥取県	1		
茨城県	1		
山口県	1		
大分県	1		
高知県	1		

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究」
分担研究報告書

動物由来寄生虫感染症の実態把握

研究分担者 赤尾信明 東京医科歯科大学大学院国際環境寄生虫病学分野
協力研究者 Katarina Macuhova 同上
協力研究者 藤浪裕士 同上
協力研究者 佐原啓二 静岡県東部食肉衛生検査所

研究要旨 伴侶動物由来寄生虫症の中でも症例報告数の多いトキソカラ症の国内発生状況を把握するために、一般臨床医がアクセス可能な血清抗体検査体制の確立と、感染源たる砂場や待機宿主の汚染状況を的確に把握するための検査手技開発を目指し研究を実施した。その結果、濾紙採血血液を用いた迅速抗体検査キットを開発し、実用に供することが出来ることを確認した。また、LAMP法によって砂場や待機宿主からイヌ回虫あるいはネコ回虫特異的DNAを検出するための検査方法を確立した。これらの成果はトキソカラ症の臨床疫学を理解する上で有用な手法となると期待される。

A. 研究目的

平成19年度から開始した、動物由来感染症の実態把握に資する研究班の研究において、一般開業医からのアクセス可能な抗体検査システムの構築を確立してきた。最終年度の平成21年度においては、動物由来寄生虫感染症、就中、イヌ・ネコ回虫症の感染源として重要な砂場における回虫汚染状況の実態調査を行うと共に、砂場を汚染する動物回虫類虫卵の虫種同定方法に関する特異的検査方法の確立と、その汚染度を把握するための効率的な砂の採取方法について検討した。また、待機宿主を介したヒトへの感染源として注目されている、ウシについて、肝臓病変を有するウシの血清疫学調査と共に、肝臓からの効率的な虫体あるいは虫体DNA検出方法の基礎的検討を行った。

また、ヒトに好酸球性髄膜脳炎を惹起す

る広東住血線虫症の疫学調査を継続して実施すると共に、国内に分布する広東住血線虫の由来・種内変異について検討を行った。

B. 研究方法

1. 砂場におけるトキソカラ属虫卵の汚染状況調査

ア) 調査方法

昨年度の本研究事業において、東京都内及びその近郊にある19公園の砂場33カ所から砂を採取し、トキソカラ属虫卵の汚染状況を調査した。その結果を元に、本年度は、昨年度に調査した公園砂場から2カ所を選択し、砂のサンプリング方法とサンプル数による虫卵検出効率を検討した。対象とした砂場は、昨年度の調査で、多数の虫卵を検出したA砂場と中程度の虫卵汚染と判定したB砂場である（図1）。対

象砂場を水平方向には 13 ヲ所に区分し、垂直方向には表層 (0 - 1cm)、浅層 (2 - 4cm)、中層 (5 - 10cm)、深層 (10cm 以下) の 4 区画を設定してそれぞれから砂を採取した。

採取した砂はよく攪拌し、そこから 200g を量りとり、室温で一晩乾燥させた。充分乾燥させた砂を直径 1mm の金属メッシュのふるいにかけて、得られた細砂を更に 150・m のメッシュにかけて微細砂を得た。こうして得られた砂を約 2g ずつ試験管に入れ、0.05 % Tween20 水 (水道水 500mL + Tween20 250・L) を試験管の 1/3 まで加え、パラフィルムで蓋をして 1 分間攪拌した後、試験管の上端から 3mm まで 0.05 % Tween20 加蒸留水を追注した後、80 × g で 10 分間遠心し、上清を吸引除去した。次に試験管に比重 1.200 のシヨ糖液 (蒸留水 550ml + スクロース 500g) を加え攪拌し、さらにシヨ糖液を加え、190 × g で 10 分間遠心し、シヨ糖液を管口まで満たし、気泡が入らないように注意しながら管口をカバーガラスで覆い一晩放置した。翌日、光学顕微鏡 (× 40 倍) で虫卵の有無を観察した。

1) 感染力検定

浮遊法で得られた虫卵は、0.5 % ホルマリンで保存した後、3000rpm、5 分で遠心し、上清を捨て、50 % 次亜塩素酸を入れた試験管に移した後、蒸留水を重層し、5 分間放置し、3000rpm で 5 分間遠心した。その後、蒸留水と次亜塩素酸の境界目に集まった虫卵を新しい試験管に移しとり、蒸留水で 7 回洗浄した。こうして得られた卵殻周囲の蛋白を除去した虫卵を 300 個ずつ 3 匹のマウス (ICR, 日本クレア) にそれぞれ経口投与した。マウスは 3 週間飼育した後、感染の成立の有無を脳の圧平標本と人工消化液 (水道水 II + ペプシン 5g + 塩酸 7ml) で消化した筋肉・肝臓・心臓・肺

臓における幼虫の存在、ELISA 法による血清抗体価、塗抹標本における好酸球数によって評価した。

イヌを駆虫して得られたイヌ回虫雌成虫から得た虫卵を、同様にして 300 個ずつマウスに感染させ、陽性対照とした。

2) 虫種同定

砂場から検出された虫卵の虫種の同定には、昨年度の報告書に記載した方法で実施した。即ち、虫卵 1 個ずつをチューブに取り、50 m M NaOH により DNA を抽出し、イヌ回虫及びネコ回虫特異配列をプライマーとして用いた PCR を実施した。PCR 法は以下の方法で行った。用いたプライマー (表 1) は、イヌ回虫は Tcan と NC2 で、ネコ回虫は Tcat と NC2 を使い、反応条件は、initialization : 94 °C 5 分、denaturation : 94 °C 30 秒、annealing : 59 °C 30 秒、elongation : 72 °C 30 秒、final elongation : 72 °C 2 分で 35 サイクル行った。

さらに、PCR 法よりも感度が高く、かつ高価な機器を必要としない LAMP 法を試み、その測定条件と感度を検討した。LAMP 法にはイヌ回虫とネコ回虫それぞれについて、rDNA の ITC2 および 28S 領域を含む 4 種類のプライマーを用いた (表 1)。反応条件は、63 °C 90 分で行った。こうしてそれぞれの方法による検出感度の違いを検討した。

2. 待機宿主肝臓からのトキソカラ特異 DNA 検出方法の基礎的検討

市販のニワトリ (ブロイラー) の肝臓を細切し、50mL のチューブに 1g ずつ量りとり、そこに生きたイヌ回虫の幼虫を 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 30 隻加えたのち、人工消化液を 20mL 加え、37 °C の恒温振盪器で消化した。5 時間後、3000rpm で 5 分間遠心し上清を捨て、蒸留水で沈渣を洗浄し、50mM NaOH を 10mL 加え、上述の

ごとく DNA を抽出した。PCR 法と LAMP 法による特異 DNA の検出方法は砂場からのトキソカラ属虫卵 DNA 検出と同様の方法で行った。

また、ウシ肝臓に幼虫を注入し、 -30°C で 24 時間凍結後、DNA 抽出を行い、PCR 法と LAMP 法による幼虫 DNA 検出を比較した。

3. 肝臓病変を有するウシの血清疫学調査

ウシ肝臓の生食によるトキソカラ症が報告されている 2) ことから、静岡県下で飼育されている肥育牛を対象に、静岡県東部食肉衛生検査所において肝臓白斑症と診断されたウシ 18 検体と肝臓白斑症が見られない対照群 20 検体について、イヌ回虫幼虫排泄物抗原に対する血清抗体価を ELISA 法により測定した。被検血清は 1:100 希釈、二次抗血清 (HRP 抗ウシ IgG, Cappel) は 1:2000 に希釈し、発色には ABTS (和光純薬, 東京) を用いた。

4. 国内医療機関から依頼のあったトキソカラ抗体検査成績

平成 21 年 1 月 11 日から平成 22 年 2 月 17 日の間に、トキソカラ症が疑われ東京医科歯科大学国際環境寄生虫学分野に抗体検査の依頼のあった症例は延べ 53 検体であった。また、濾紙検体送付によりトキソカラ抗体検査を実施したものは 9 検体であった。

C. 研究結果

1. 公園砂場からのトキソカラ属虫卵の検出

調査した 2ヶ所の砂場から検出される虫卵分布は以下ようになった。

水平方向の虫卵分布について Wilcoxon の順位和検定を行ったところ、有意な差は求められなかった。一方、垂直方向の虫卵

分布を Steel-Dwass の多重検定を行ったところ、表層に分布する虫卵数は、浅層、中層、深層に分布する虫卵に較べ有意に増加していた ($P < 0.05$)。

2. 砂場から回収された虫卵のマウスに対する感染力の検定

砂場から得られた虫卵 300 個を感染させたマウスからのイヌ回虫幼虫回収数を表 1 に示す。砂場由来の回虫卵を経口投与させた 3 匹のマウスのうち、2 匹の脳から幼虫が 3 隻検出された。また、いずれのマウスの筋肉からも多くの幼虫が検出され、その回収率は 25.6 % とイヌ回虫卵を投与した陽性対照マウスの 18.7 % と同じ程度であった。また、末梢血好酸球数の増加や、血清中のイヌ回虫幼虫排泄物抗原に対する抗体も非感染対照マウスと比較して優位に上昇しており (イヌ回虫卵投与群 1.565 ± 0.457 , ネコ回虫卵投与群 0.856 ± 0.123 , 砂場回収虫卵投与群 1.030 ± 0.267 , 非感染対照群 0.112 ± 0.094) の上昇も見られ、砂場から見つかる幼虫包蔵卵はマウスへの感染力を有していたと考えられた。

3. 砂場由来回虫卵投与マウスの脳から回収された幼虫の虫種同定

砂場から出た虫卵を感染させて得られた幼虫を PCR 法で検査したところ、砂場由来虫卵感染マウス脳内に見られた 3 隻の幼虫は全てイヌ回虫であることが確認された (図 3)。

4. PCR 法あるいは LAMP 法による待機宿主肝臓からのイヌ回虫幼虫検出に関する基礎的検討

ニワトリ肝臓に人工的に幼虫を添加 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 30 隻) した場合には、LAMP 法では 3 回の検査中 1 回は 2 隻から、2 回は 3 隻から検出する事

ができた。一方、PCR法では肝臓 1g 中に 30 隻入れた場合にも回虫 DNA を検出する事ができなかった（表 2）。

また、幼虫 1 隻から効率よく DNA を抽出するための至適 NaOH の量を検討したところ、表 3 に示すように、LAMP 法を行った場合には、Falcon tube に 10mL の NaOH 添加でも虫体 DNA が感出された。PCR 法の感度は LAMP 法に較べ低かった。

さらに、ウシ肝臓 5 g に幼虫を添加し、人工胃液で消化後に DNA 抽出を行い、PCR 法と LAMP 法による幼虫 DNA 検出を行ったところ、LAMP 法では幼虫 1 隻から DNA を検出することが出来た（表 4）。

5. 肝臓白斑症を有するウシ血清中のイヌ回虫幼虫排泄物抗体検査

屠畜検査時の肉眼検査において、肝臓白斑症と診断された 54 頭のウシから採取された血清について、ELISA 法により血清中のイヌ回虫幼虫排泄物抗原に対する抗体を測定した。54 頭の血清抗体分布は二峰性を示し、うち 9 頭は極めて高い吸光度を示した（図 4）。

6. 国内医療機関から依頼のあったトキソカラ抗体検査結果

昨年度の報告書作成後、我々の研究室で実施したトキソカラ抗体検査依頼件数は延べ 53 検体であった。このうち、トキソカラ抗体が陽性と判定された症例は 12 検体であった。この中には脊髄腫瘍が疑われ、末梢血中の好酸球増多を呈した 2 例の患者が含まれていた。これら 2 症例は寒天ゲル内二重拡散法でも非常に強い沈降線を認めた（図 5）。

濾紙採血によって検体を採取して抗体検査を行った 12 検体については、いずれもトキソカラ抗体は陰性であった。

D. 考察

トキソカラ属虫卵に汚染された砂場の検査では、1 砂場からどの程度のサンプルを採取するかがしばしば問題になる。サンプリング数を多くすればするほど正しい汚染状況を把握することが出来るが、これまでの顕微鏡を用いて直接虫卵を確認する方法では検査に非常な労力と時間を要し、1 砂場当たり 3, 4 カ所から採取した砂を混ぜて検査をしたとしても、この方法でも 1 砂場を検査するには 3, 4 日の日数を必要としていた。

本年度の研究事業では砂場の虫卵汚染度を明らかにするために、2 カ所の砂場について虫卵の水平分布と垂直分布について調査した。その結果、砂場に分布する虫卵は表層から多く回収されることが明らかになり、砂のサンプリングには表層のみを対象に行えばよいことが判明した。また、虫卵の汚染をより短時間に、かつ正確に知る方法として、幼虫特異 DNA 検出手技を確立した。この新しい検査手法については現在アメリカ寄生虫学雑誌に投稿中である。

今回、砂場から回収された虫卵はそのほとんどが幼虫包蔵卵であった（図 6）。その為、これらの虫卵が感染力を保持しているか否かについてマウスを用いて検討したところ、砂場由来回虫卵を投与されたマウス 3 頭共に好酸球数の増加、血清抗体の上昇が確認され、感染力を持った虫卵が砂場に散布されていることが確認された。また、3 頭中 2 頭の大脳から幼虫が 3 隻回収された。昨年度に実施した PCR 検査では、砂場から見つかる虫卵の PCR 法による検査で、検査に供した虫卵はすべてネコ回虫卵であると報告した。しかし、砂場から回収された虫卵をすべて PCR 法で検査することは不可能であった。即ち、昨年度の研究で PCR 法に供した虫卵数は検出できた虫卵の約半数（56%）で、さらにその内 DNA

を抽出し得たものは 37 %に過ぎず、検査されていない虫卵についてはその虫種は不明であった。

今年度の調査においては検出された虫卵をマウスに投与し、中枢神経系に移行した幼虫を対象に PCR 法を実施することによって、砂場を汚染する動物由来回虫にイヌ回虫卵が混入していないかを確認する方法を確立した。これは、従来から、ネコ回虫幼虫は非固有宿主体内では中枢神経系しづらいが、イヌ回虫幼虫は筋肉へ移行する幼虫数と同程度の割合で大脳に移行することが知られていることを利用している 1)。

今回、大脳に移行した 3 隻の幼虫を顕微鏡下に回収し、PCR 法を行ったところ、いずれの幼虫もイヌ回虫であることが確認できた。即ち、砂場を汚染しているトキソカラ属虫卵の多くはネコ回虫卵であるが、少数ながらイヌ回虫卵も含まれていることを証明することが出来た。これまでの多くの調査では、砂場から見つかる虫卵の大きさ、卵殻表面のピットホールの数などの形態的特徴からネコ回虫卵であるとされてきた。今回の報告で述べた手法を用いることによって、砂場におけるイヌ回虫卵の汚染状況を正確に把握することが可能であると考えられる。

トキソカラ症の感染源としては、砂場を汚染する虫卵だけではなく、待機宿主となるニワトリやウシの生肉、生肝の生食による感染経路も重要である 2, 3)。そこで、市販されているこれらの肝臓を調査するための基礎的検討を行った。PCR 法では肝臓に予め 30 隻のイヌ回虫幼虫を混入させておいても幼虫 DNA を検出することは出来なかったが、LAMP 法では肝臓 5 g あたり 1 隻の幼虫の混入でも確実に検出することが出来た。今後、肝臓白斑症と診断され、血清中のトキソカラ抗体が上昇していた個体を対象に、虫種特異的 DNA 検出を実施

していく予定である。

本研究期間において確立した、砂場からの幼虫 DNA 検出手技ならびに待機宿主肝臓からの幼虫 DNA 検出手技により、トキソカラ症の疫学情報がさらに蓄積されていくことが期待される。

E. 結論

3 年間にわたる研究において、濾紙採血検体によるトキソカラ抗体検査法を確立し、一般臨床家からの検査依頼に対応できるようになった。また、トキソカラ症の感染源である砂場の虫卵や待機宿主からの幼虫検出の新たな検査手技を確立することが出来た。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 引用文献

- [1] 織田清. 移行性幼線虫症の研究, 特に猫蛔虫と犬蛔虫について. 京都府医大誌. 1976; 517-532.
- [2] 酒井健二, 岡島泰一郎, 大内和弘. 鶏肝の生食により発症したと考えられる内臓幼虫移行症の 1 例. 内科. 1983;51:963-7.
- [3] Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitology International*. 2008;57:525-9.

H. 発表論文

- [1] 赤尾信明. 肝イヌ回虫症. 日本臨牀. 2010; 印刷中.
- [2] 赤尾信明. creeping disease の原因となる寄生虫. 皮膚科診療カラーアトラス: 講談社; 2010. 印刷中
- [3] Katarina M, Kumagai T, Akao N, Ohta N.

Loop-mediated isothermal amplification assay for detection and discrimination of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs directly from sand samples. *Journal of Parasitology*. 2010; 投稿中.

[4] Ayi I, Akao N. Evaluation of a new anti-*Entamoeba histolytica* antibody detection kit - INSTANTTMCHK-*Amoeba*. *Ghana Medical Journal*. 2010;投稿中.

[5] 赤尾信明. ヒトの犬・猫回虫症 犬や猫の回虫がヒトに感染するとどうなるか?. *Clinic Note*. 2009;52(November):66-68.

[6] 赤尾信明. 小児のイヌ・ネコ回虫症 (トキシカラ症). *小児科臨床*. 2009;62(4):697-702.

[7] 赤尾信明. 原虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト. 東京: 南江堂; 2010.印刷中

[8] 赤尾信明. 寄生虫感染症の検査. 感染症専門医テキスト. 東京: 南江堂; 2010.印刷中

[9] 赤尾信明. イヌ回虫症 (トキシカラ症). 岸本寿男, 山田章雄編. *ズーノーシスハン*

ドブック. 東京: メディカルサイエンス社; 2009. p. 83-85.

[10] 菅沼真澄, 七戸和博, 友田弥里, 鈴木晟幹, 赤尾信明, 太田伸生. 動物から感染するヒトの回虫症. *臨床福祉ジャーナル*. 2009;6(1):39-43.

[11] 大友弘士, 赤尾信明. 抗微生物薬の治療効果の判定 2.マラリア. *検査と技術*. 2009;37(10増刊号):977-982.

[12] Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Somura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, kawabata H, Watanabe H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58:1227-1230.

I. 知的財産権の出願・登録状況
該当項目なし

表 1 用いたプライマーの配列 (左が5' 末端, 右が3' 末端)

P	Tcan : AGTATGATGGGCGCGCCAAT
C	Tcat : GGAGAAGTAAGATCGTGGCACGCGT
R	NC2 : TTAGTTTCTTTTCTCCGCT
L A M P	イ B3 : CTGGAGGCCGTATCGTGA
	ヌ F3 : TGTGATTAACGCGCAAGGT
	回 BIP : TCGCACAAGAAATGGCTGT
	虫 CGTAGCAACGCAACATACTCA FIP : CCTTGCAAGGTACGCTGT ACATGTGGTGCATTCCGGTGAG
ネ コ 回 虫	B3 : GCGCATTCTTCTTCAAGCA
	F3 : CCACGTACCTTGCCAAGAC
	BIP : ACGATATGGCCTCCAGCAA GCCGATGACGTTACCTCCAACC
	FIP : GGAACACATACGCCAATGGC CATGCACAAGAAATCGCTGTCTG