

3) ケア方法との関係

ソフトコンタクトレンズの衛生状態とケア方法との関係を調べた(ケア方法等に関するアンケート結果の詳細は29ページ資料(5)参照)。

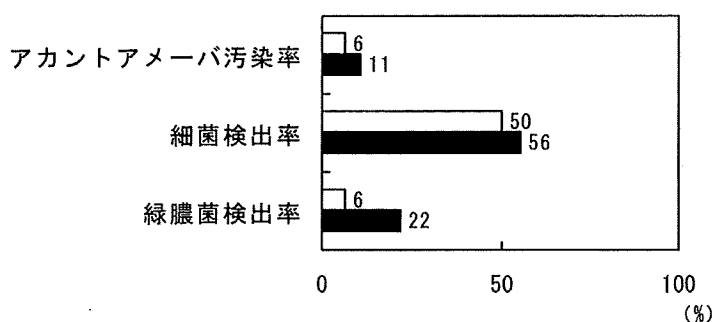
①石鹸での手洗いとレンズのこすり洗いを必ず行い、レンズケースを3ヶ月以内に交換するという3点の注意点を守ってケアを行っていた人は注意点を守っていなかった人に比べてアカントアメーバ汚染率、細菌検出率ともに低かった

日本コンタクトレンズ学会は、レンズケアの基本的な注意点として以下の3点を挙げている(日本コンタクトレンズ学会ホームページ(<http://www.clgakkai.jp/>)より)。

- レンズを取り扱う前は必ず手指を石鹸で洗うこと
- こすり洗いをすること
- レンズケースは1.5~3ヶ月に一度新しいものと交換すること

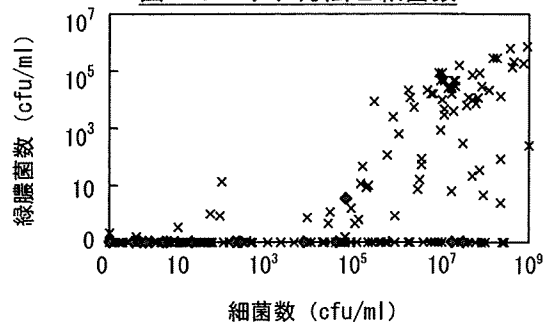
レンズケアを行う上でこれらの3点の注意点を守っていたかどうかとアカントアメーバ汚染率及び細菌検出率の関係を調べたところ、これらの3点の注意点全てを守ってケアを行っていた人は、3点いずれかもしくは3点全てを守っていなかった人に比べてアカントアメーバ汚染率、細菌検出率ともに低く(図14)、細菌数も少ない傾向がみられた(図15)。一方で、これらの注意点を守ってケアを行っていたにもかかわらずアカントアメーバや細菌が検出された人もいたことから、正しい方法でケアを行えていない人がいる、もしくは、使用者のケアだけではこれらの微生物を完全に除去できていない可能性があった。

図14. ケア方法とレンズの衛生状態



□ 3点を守ってケアを行った人 (n=32)
 ■ 3点を守ったケアを行わなかった人 (n=353)

図15. ケア方法と細菌数



◆ 3点を守ってケアを行った人 (n=32)
 × 3点を守ったケアを行わなかった人 (n=353)

②過酸化水素タイプの消毒剤には浸漬前のこすり洗いに関する表示がなかったが、アカントアメーバを除去するためには消毒剤の種類にかかわらずこすり洗いが重要である

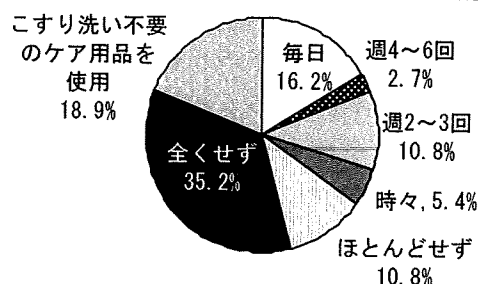
アカントアメーバ汚染が確認された40名のうち5名が過酸化水素タイプの消毒剤を使用していたが、5名はいずれも定期的なこすり洗いを行っておらず、うち3名は「ほとんどしなかった」、1名は「全くしなかった」との回答だった。

過酸化水素タイプの消毒剤を使用していた人(37名)全体をみても、こすり洗いを「毎日した」と答えたのはわずか16.2%であり、こすり洗いを「ほとんどしなかった」もしくは「全くしなかった」と答えた人が46.0%、「こすり洗い不要のケア用品を使用していたためこすり洗いをしなかった」人が18.9%いた(図16)。

日本コンタクトレンズ学会は、消毒剤の種類にかかわらず必ずこすり洗いを行うよう推奨しているが、今回アカントアメーバに対する消毒効果のテストでテスト対象とした過酸化水素タイプの2銘柄 (No. 9、10) はいずれも、浸漬後 (装用前) にこすり洗いをする旨の表示はあったが、浸漬前にこすり洗いをするという旨の表示はなかった。

過酸化水素タイプの消毒剤は MPS に比べてアカントアメーバに対する消毒効果が高かったが (図5)、アカントアメーバを除去するためには消毒剤の消毒効果だけでは不十分であり、消毒剤の種類に関わらずこすり洗いを併用することが重要であると考えられた。

図16. こすり洗いの有無
(過酸化水素タイプを使用していた37名)



③ケア前の手洗いやこすり洗いを行わなかったり、レンズケースを交換しないなど、誤った方法でケアをしている人が多かった

ケア前の手洗いについては、毎回石鹸で手洗いをしている人は34.5%であり、手洗いを毎回は行っていない、もしくは全くしていない人が3割程度を占めていた (図17)。また、こすり洗いについては、「毎日行っていた」人は全体の約半数であり、「ほとんどしない」「全くしない」と答えた人が合わせて12.2%いた (図18)。コンタクトレンズ関連角膜炎の全国調査結果 (注10) によると、コンタクトレンズケースがアカントアメーバに汚染されていた症例が多いが、レンズケースを3ヶ月以内ごとに交換している人は約3割であり「ほとんど交換せず」「全く交換せず」と答えた人が10.7%いた (図19)。ケア用品の添付文書や外箱には使用方法が記載されているが、約1割は「添付文書等を読んでいない」もしくは「ほとんど守っていない」との回答であり、メーカー側が推奨する正しいレンズケアの方法が使用者側に徹底されていない可能性があった (図20)。

図17. ケア前の手洗い

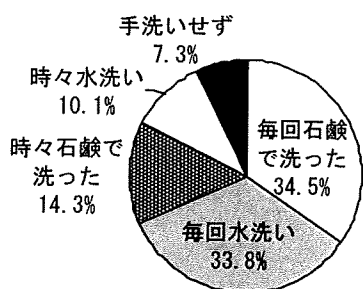


図18. こすり洗いの頻度

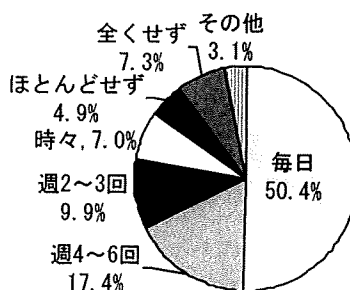


図19. レンズケース交換の頻度

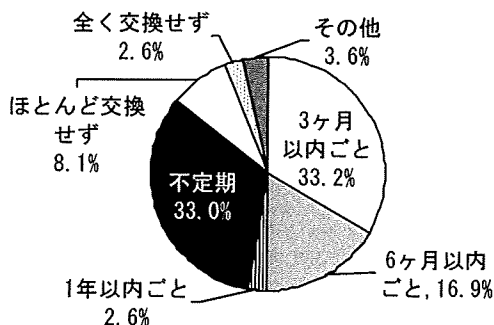
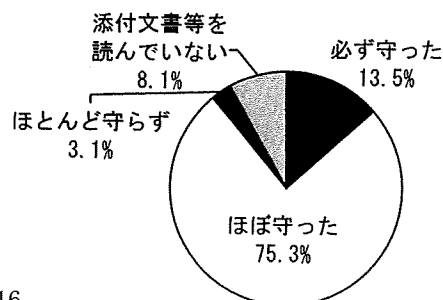


図20. 添付文書等に記載された装用方法を守ったか



④約半数がコンタクトレンズ装用による何らかの目のトラブルを経験していたが、定期的に検査を受けていない人が多かった

調査対象とした 385 名のうち、コンタクトレンズを装用して目調子が悪くなったことがある人が全体の半数近い 49.1 % (189 名) いた (図 21)。感じた症状は、異物感 (31.9 %、123 名)、充血 (26.8 %、103 名) が多かった (図 22)。アcantアメーバ汚染が確認された 40 名のうちコンタクトレンズを装用して目調子が悪くなったことがあると答えた人は 55.0 % (22 名)、細菌が検出された 230 名のうち目調子が悪くなったことがある人は 46.9 % (108 名) であり、レンズの汚染が確認された人の半数程度は現状では目のトラブルを生じていなかった。

一方、3 ヶ月に 1 回以上の頻度で定期検査を受診している人は全体の 38.4 % (148 名) であり (図 23)、定期検査を「ほとんど受けない」、「全く受けない」という人も 12.5 % (48 名) いた。

コンタクトレンズ関連角膜炎感染症の全国調査結果によるとコンタクトレンズ装用による角膜炎感染症で入院治療を要した重症例の約 3 割が定期検査をほとんどあるいは全く受けていなかった (注 10)。また、使い捨てソフトコンタクトレンズ装用者を対象とした調査では、3 ヶ月ごとに眼科専門医による定期検査を受診することによりコンタクトレンズによる眼障害発現率が低下したと報告されており、定期検査受診の重要性が指摘されている (注 30)。しかし、本テストの結果から、使用者の定期検査に対する意識はあまり高くないことが分かった。

(注 30) 糸井素純、金井淳：使い捨てソフトコンタクトレンズの定期検査の必要性。日本コンタクトレンズ学会誌 43：142-145, 2001

図 2 1. コンタクトレンズを装用して

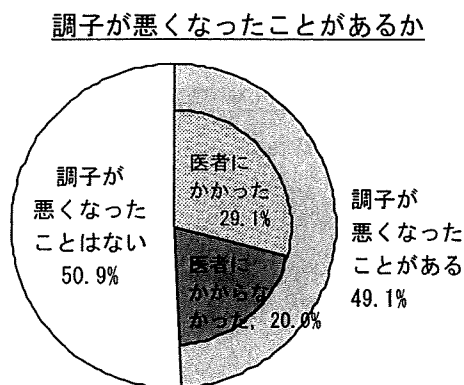


図 2 2. 自覚症状 (複数回答)

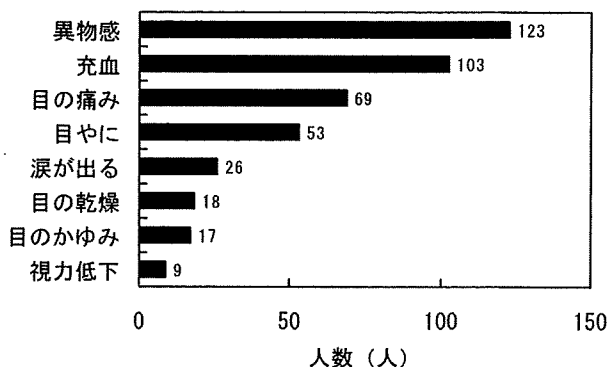
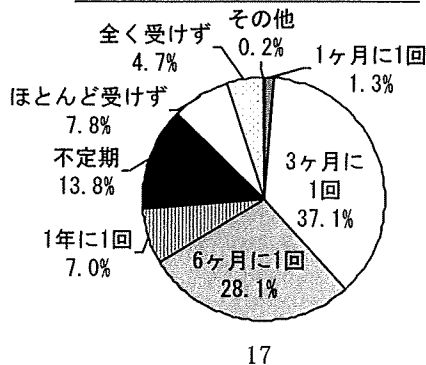


図 2 3. 定期検査受診の頻度



7. 消費者へのアドバイス

- (1) こすり洗いを行わないと消毒剤の消毒効果だけではアcantアメーバを完全に消毒することはできない。消毒剤の種類にかかわらず、石鹼での手洗いやレンズのこすり洗いを毎日行い、レンズケースを定期的に交換するなど、正しい方法でケアを行うようにしよう

アcantアメーバ角膜感染症はコンタクトレンズ装用者に多い重篤な疾患である。

今回、2週間交換タイプのソフトコンタクトレンズ装用者を対象にレンズの衛生状態を調査したところ、装用者の約1割にアcantアメーバ汚染が確認された。また、ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアcantアメーバに対する消毒効果を調べたところ、アcantアメーバに対する消毒効果はマルチパーパスソリューションよりも過酸化水素やポビドンヨードを用いた商品の方が高かったが、消毒剤の消毒効果のみではアcantアメーバを完全に消毒することはできないことが分かった。

また、石鹼での手洗い、レンズのこすり洗い及びレンズケースの定期的交換をしていると回答した人の中にもアcantアメーバ汚染が確認された人がおり、正しい方法でこすり洗い等ができていない可能性があったことから、使用する消毒剤の種類にかかわらず、①専門家にケア方法の指導を受け、②脱着時は手や指を良く洗い、③すすぎ液でレンズの表面をこすり洗いし、よく流す、④レンズケースは洗って乾かしたものに新しい液を入れて使う、⑤レンズケースは定期的な交換を行う、など、日々のケアを正しく行うようにしよう。

- (2) 定期的に専門医のいる医療機関で検査を受け、目とレンズの状態をチェックしてもらうようにしよう

本テストで調査対象とした人のうち3ヶ月に1度以上の頻度で定期検査を受けていたのは4割未満であった。

ソフトコンタクトレンズは薄くて装用感が良いため、障害が起こっていることに気付かなく、異物感や痛みなどの自覚症状を感じた時には既に症状が悪化しているケースが多いとされる。異常を感じていなくても、眼科専門医のいる医療機関で3ヶ月に1度は検査を受け、目とレンズの状態を確認してもらうようにしよう。

8. 業界への要望

- (1) ソフトコンタクトレンズ用消毒剤そのもののアcantアメーバに対する消毒効果は限界があると考えられることから、商品にアcantアメーバ角膜感染症を防ぐための注意喚起表示を徹底するよう要望する。また、アcantアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法や消毒効果を向上させるような成分の組成を検討するよう要望する

アcantアメーバ角膜感染症は重篤かつ難治性の角膜疾患であり、患者の85～90%はソフトコンタクトレンズ装用者が占めるとされる。

今回、2週間交換タイプのソフトコンタクトレンズ装用者を対象にレンズの衛生状態を調査したところ、全体の約1割にアcantアメーバ汚染が確認された。また、ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアcantアメーバに対する消毒効果を調べたところ、消毒剤の消毒効果のみではアcantアメーバを完全に消毒することはできないことが分かった。

ソフトコンタクトレンズ用消毒剤、特にMPSは、消毒剤の消毒効果のみではアcantアメーバを完全に消毒できず、こすり洗い等のケアによる消毒効果の補完が必要であること等、アcantアメーバ角膜感染症を防ぐための注意喚起表示を行うよう要望する。

また、こすり洗いをしていると回答した人の中にもアcantアメーバ汚染が確認された人がいたことや商品間で消毒効果に差がみられたことから、アcantアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法や既存の有効成分の消毒効果をさらに向上させるような配合成分の組成の検討を要望する。

(2) 装用者に対し、コンタクトレンズの適切な使用方法の教育・啓発をさらに徹底するよう要望する

今回調査対象とした385名中約1割にアcantアメーバ汚染がみられ、また、約6割からは細菌が検出された。一方、ケア前の手洗いやレンズのこすり洗い、レンズケースの定期的な交換など適切な方法でコンタクトレンズのケアを行っていない人はレンズの衛生状態も悪い傾向がみられた。

使用者が正しい使用方法・ケア方法を遵守するよう、商品の表示の改善など、対策を行うよう要望する。

また、こすり洗いをしていると回答した人の中にもアcantアメーバ汚染が確認された人がおり、正しい方法でこすり洗いができていない人がいる可能性があったことから、アcantアメーバを除去するためのこすり洗いの方法について検討し、適切な方法を使用者に教育啓発するよう要望する。

9. 行政への要望

(1) ソフトコンタクトレンズ用消毒剤そのもののアcantアメーバに対する消毒効果は限界があると考えられることから、商品にアcantアメーバ角膜感染症を防ぐための注意喚起表示を徹底させるよう要望する。また、アcantアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法やアcantアメーバに対する消毒効果の試験方法等について専門家による検討を開始するよう要望する

アcantアメーバ角膜感染症は重篤かつ難治性の角膜疾患であり、患者の85～90%はソフトコンタクトレンズ装用者が占めるとされる。

今回、2週間交換タイプのソフトコンタクトレンズ装用者を対象にレンズの衛生状態を調査したところ、全体の約1割にアcantアメーバ汚染が確認された。また、ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアcantアメーバに対する消毒効果を調べたところ、消毒剤の消毒効果のみではアcantアメーバを完全に消毒することはできないことが分かった。

ソフトコンタクトレンズ用消毒剤、特にMPSは、消毒剤の消毒効果だけではアcantアメーバを完全に消毒できず、こすり洗い等のケアによる消毒効果の補完が必要であること等、アcantアメーバ角膜感染症を防ぐための注意喚起表示を徹底させるよう要望する。

また、石鹸での手洗い、こすり洗い及びレンズケースの定期的交換をすべて行っていると回答した人の中にもアcantアメーバ汚染が確認された人がいたことから、レンズケース汚

染の実態を把握するとともに、アカントアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法及びアカントアメーバに対する消毒効果の試験方法等について専門家による検討を開始するよう要望する。

(2) 装用者に対し、コンタクトレンズの適切な使用方法の教育・啓発をさらに徹底するよう医師及び業界への指導を要望する

今回、調査対象とした385名中約6割から細菌が検出され、ソフトコンタクトレンズ使用者の半数以上は衛生的な状態でレンズを装用できていないことが分かった。一方、ケア前の手洗いやレンズのこすり洗い、レンズケースの定期的な交換など適切な方法でコンタクトレンズのケアを行っていない人はレンズの衛生状態も悪い傾向がみられた。使用者が正しい使用方法・ケア方法を遵守するよう、医師による注意喚起を徹底すると共に商品の表示を改善するよう業界指導を要望する。また、定期検査の受診についても使用者に対する啓発を行うよう業界指導を要望する。

【要望先】

消費者庁 消費者情報課 地方協力室
一般社団法人 日本コンタクトレンズ協会

【情報提供先】

厚生労働省 医薬食品局 安全対策課
厚生労働省 医薬食品局 審査管理課
日本コンタクトレンズ学会
社団法人 日本眼科医会
財団法人 日本眼科学会

本件問い合わせ先

商品テスト部：042-758-3165

10. テスト方法

本テストは日本コンタクトレンズ学会との共同研究により実施した。各機関の実施項目は表7の通りである。

表7. テスト項目及び実施機関

テスト項目	テスト実施機関	
①ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒効果	日本コンタクトレンズ学会	
②ソフトコンタクトレンズの衛生状態調査	検体回収	国民生活センター
	アカントアメーバ (培養試験)	国民生活センター
	アカントアメーバ (リアルタイムPCR法)	日本コンタクトレンズ学会
	細菌類	国民生活センター
ケア方法等に関するアンケート調査	国民生活センター	

(1) ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒効果

試験は日本コンタクトレンズ学会が実施した。

1) アカントアメーバに対する消毒効果のテスト^(注31)

①試験菌株

試験菌株は、*Acanthamoeba castellanii* (ATCC50514) を用いた。栄養体はPYG培地 (ATCC medium 712) を用い、25℃で培養した。シストは、栄養体の培地をシスト化培地 (Neff's constant-pH encystment medium; Neff, et al., 1964) に交換し、25℃で2週間静置してシスト化させた。

②試験方法

- i) 前培養した栄養体又はシストをフラスコから回収し、遠心分離 (800 rpm, 10 min) 後、1/4 リンゲルにて懸濁 (5×10^6 /ml) した。テスト対象銘柄^(注32) にアメーバ懸濁液を 1/100 量加え (5×10^4 /ml)、25℃で0^(注33)、2、4、8、24時間静置した。
- ii) 反応後の試験液 (各種レンズ消毒剤) とDey-Engley Neutralizing Broth (Sigma, St. Louis, MO)^(注34) を 1:9 の割合で混和し、中和させた。さらにPYG培地で10倍階段希釈し、アメーバの最終濃度を 5×10^3 ^(注35)、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 /mlとした。それぞれの希釈液を96穴組織培養プレートの4穴に、各穴200 µlずつ入れ、25℃で培養した。
- iii) 栄養体は1週間、シストは2週間培養し、アメーバの増殖の有無を顕微鏡下で確認した。増殖の認められた穴の数を集計し、Spearman-Kärber法^(注36) (4系列) にてアメーバの生存数を計算した。この結果からlog reduction (アメーバを何log減少させることができたか) を求めた。

(注31) 参考文献: Neff, R. J., S. A. Ray, W. F. Benton, and M. Wilborn. : Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. *Methods in Cell Physiol.* 1: 55-83, 1964

(注32) テスト対象銘柄のうち、過酸化水素タイプ及びポビドンヨードタイプについては、アメーバ、消毒液の混和と同時に中和錠又は白金ディスクによる中和を開始し、2時間以上の試験を行った。0時間 (コントロール) の試験には、あらかじめ中和錠又は白金ディスクを用いて中和させた液を用いた。白金ディスクを用いる製剤については専用の容器を用いた。

(注33) 0時間 (コントロール) では、アメーバ、各種消毒液、Dey-Engley Neutralizing Brothを同時に混和したものを試験に用いた。

(注34) Dey-Engley Neutralizing Broth (中和液) : PHMBを中和する成分としてポリソルベートを0.5%含む。

(注 35) 5×10^3 /mlの穴には、アメーバの増殖のため、PYG培地を 80 μ l加えた。

(注 36) Spearman-Kärber式： \log_{10} (平均生存数) $= x_0 - d/2 + d \times \sum (r_i/n_i)$

x_0 ： \log_{10} (全ての穴で増殖が認められた最低希釈段階の逆数)

d ： \log_{10} (希釈係数)；ここでは $d=1$

r_i ：各希釈段階で増殖が認められた穴の数。全ての穴で増殖が認められた最低希釈段階を $i=0$ とする。

n_i ：各希釈段階の穴の総数；ここでは $n_i=4$

2) レンズケースに消毒剤を注ぎ足して使用した場合の消毒効果

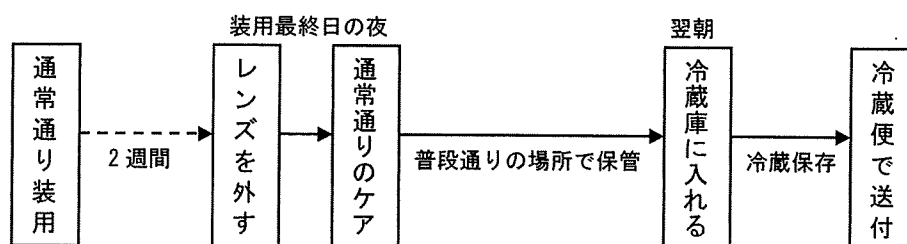
試験菌株はアカントアメーバ角膜炎患者より分離した臨床分離株（吉田株）を用いた。試験菌株を納豆菌塗布無栄養寒天培地で 14 日間培養し、シストリッチな状態にした。この菌液をおおよそ 10^3 /mlの濃度になるように生理食塩水に懸濁したものを試験菌液とした。試験菌液 1 に対してテスト対象銘柄を 9 の割合になるように混合し、24 時間室温で放置した。24 時間後、上記混合液 0.05 ml を納豆菌塗布無栄養寒天培地に接種し、アメーバ増殖の有無を光学顕微鏡で観察した。

(2) ソフトコンタクトレンズの衛生状態調査

1) レンズの回収

レンズ回収の協力者は、国民生活センターホームページ上で募集した。2 週間交換型ソフトコンタクトレンズを普段通りの方法で 2 週間装用し、装用最終日はレンズを外した後、普段通りのケアを行った。ケアを行った後、コンタクトレンズ及びケア用品が入ったままの状態のレンズケースを冷蔵便で回収した。装用最終日のケア終了後の検体は冷蔵庫で保管した（図 24）。レンズの回収は 2009 年 6 月～9 月に実施した。

図 24. レンズ回収までの流れ（夜消毒して翌朝装用する場合）



2) アカントアメーバ

①培養試験

レンズとケア用品が入ったレンズケースをフラッシュミキサーで十分に攪拌し、ケース内のケア用品を回収した。両眼分のケア用品を合わせて 1 試料とした。

オートクレーブ滅菌した大腸菌^(注 37)を塗布したサブロー寒天培地（栄研化学㈱）及びクロモアガーカンジダ生培地（関東化学㈱）にレンズケースから回収したケア用品 50 μ lを滴下し、27 $^{\circ}$ Cで 2 週間培養した。光学顕微鏡で観察し、アメーバの有無を確認した。

(注 37) L-乾燥標品より復元した。NBRC-3301 株を使用した。

②リアルタイム PCR による定量試験

試験は日本コンタクトレンズ学会が実施した。

Template DNAは、モニターより回収したコンタクトレンズ保存液 200 μ lに、QIAamp DNA

Mini kit (株キアゲン) を用いて調製し、最終的に 50 μ l の精製水で溶出した。TaqMan Probe および Primer の設計は文献^(注 38)に基づいて行い、TaqMan Probe は 5' -FAM、3' -BHQ-1 で修飾した。RT-PCR は、QuantiTect Probe PCR (株キアゲン) を用いて、以下の条件で行った。装置は Lightcycler 1.5 (ST300) (ロシュ・ダイアグノスティックス株) を用いた。反応液組成及び反応条件は以下の通り (表 8、9)。

(注 38) Delphine Riviere, Florence Menard Szczebara, Jean-Marc Berjeaud, Jacques Frere, Yann Hechard : Development of real-time PCR assay for quantification of Acanthamoeba trophozoites and cysts, J. Microbiol. Methods. 64 : 78-83, 2006

表 8. 反応液組成 (20 μ l 系)

成分	容量
2×QuantiTect Probe Master Mix	10 μ l
Primer TaqAcF1 (10 μ M)	1 μ l
Primer TaqAcR1 (10 μ M)	1 μ l
Probe TacAcP1 (10 μ M)	0.4 μ l
Template DNA	6 μ l
RNase free water	1.6 μ l

表 9. 反応条件

ステップ	時間 (分)	温度 (°C)	ランプ速度 (°C/秒)	サイクル数
PCR 初期活性化	15	95	20	—
変性	0	95	20	50
アニーリング/エクステンション	0.5	60	20	

3) 細菌類

①細菌数

回収したケア用品 1 ml に SCDLP ブイヨン培地 9 ml を加えたものを接種原液とした。接種原液から適宜希釈列を作り、ペトリフィルム培地好気性菌測定用 AC プレート (住友スリーエム株) を用いて細菌数を測定した (培養温度 : 35 \pm 1 °C、培養時間 : 48 \pm 2 時間)。

②緑膿菌

①の接種原液から適宜希釈列を作り、NAC 寒天培地 (栄研化学株) に塗布して菌数を調べた (培養温度 35 \pm 1 °C、培養時間 : 48 \pm 2 時間)。

③大腸菌群

①の接種原液から適宜希釈列を作り、ペトリフィルム培地 *E. coli* 及び大腸菌群測定用 EC プレートを用い、大腸菌群の有無を調べた (培養温度 : 35 \pm 1 °C、培養時間 : 24 \pm 2 時間)。

4) ケア方法等に関するアンケート調査

レンズ回収の協力者に対し、普段のコンタクトレンズケア方法等に関するアンケート調査を郵送で実施した。アンケート用紙はレンズ回収後に送付、回収した。

11. 資料

(1) ソフトコンタクトレンズ用消毒剤に係る通知等

1) 「ソフトコンタクトレンズ及びソフトコンタクトレンズ用消毒剤の製造（輸入）承認申請に際し添付すべき資料の取扱い等について」（一部抜粋）

（平成 11 年 3 月 31 日付医薬審第 645 号）

- 化学消毒剤の製造（輸入）承認申請書の記載及び申請に際し添付すべき資料の取扱いについて
承認申請に際し添付すべき資料については、昭和 55 年 5 月 30 日薬発第 700 号厚生省薬務局長通知「医薬部外品等の製造又は輸入の承認申請に際し添付すべき資料について」によるほか、次に示す資料を添付すること。（中略）

【ソフトコンタクトレンズとの適合性に関する資料】

グループ I 及びグループ IV からそれぞれ一種のレンズを選択し、以下の資料を添付すること。

・消毒効果に関する資料

眼科領域で問題となるような各種細菌、真菌、ウイルス及びアメーバに対する効果に関する試験。なお、細菌及び真菌に対する試験は、International Organization for Standardization 発行の「Manuscript for ISO/FDIS 14729, Ophthalmic optics-Contact lens care products-Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lens, 2001」^(注 39) 又は U. S Food and Drug Administration が示している「Guidance for industry: Premarket notification (510(k)) guidance document for contact lens care products.」^(注 40) に準拠して実施すること。

(注 39) 試験菌種は 3 種類の細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*) と 2 種類の真菌 (*Candida albicans*, *Fusarium solani*)。

(注 40) 試験菌種は 3 種類の細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) と、2 種類の真菌 (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*)。

2) 「ソフトコンタクトレンズ用消毒剤の消毒効果に係る自主点検について」（一部抜粋）

（平成 15 年 7 月 2 日薬食審査発第 0702006 号）

●自主点検

課長通知に示された試験法等に準拠し、試験を実施したうえで消毒効果についての評価を行うこと。なお、承認申請時の添付資料において既に課長通知により提示した試験法により試験を実施した場合であっても、消毒剤としての妥当性を再確認すること。

この場合、細菌等効果が現れやすい菌種においてはログ 3 以上の菌数の減少が、真菌等効果が現れにくい菌種にあってはログ 1 以上の菌数の減少が確認されること。

(2) コンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査結果より (注10)

日本コンタクトレンズ学会と日本眼感染症学会が共同で実施したコンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査結果 (途中経過) の概要をまとめた。

- 調査対象：全国 224 施設
 - コンタクトレンズ装用が原因と考えられる角膜感染症で入院治療を要した症例
- 調査期間：平成 19 年 4 月～平成 20 年 8 月中旬
- 症例数：233 例 (男性 129 例、女性 104 例)
- 年齢：9～90 歳 (平均 28 歳)

1) 起炎菌

起炎菌の塗抹検鏡結果を表 10 に、分離培養結果を表 11 に示す。アカントアメーバは塗抹検鏡あるいは分離培養により 55 例 (24 %) から確認されている。

表 10. 塗抹検鏡結果 (181 例)

菌種	アカントアメーバ	グラム陽性球菌	グラム陽性桿菌	グラム陰性球菌	グラム陰性桿菌	糸状菌
角膜病巣	40	14	13	4	25	1
結膜囊	0	2	1	0	1	0
眼脂	0	1	0	0	4	0
コンタクトレンズ	5	2	0	1	3	0
レンズケース	7	8	6	4	22	2
その他	0	0	0	0	0	0

表 11. 分離培養結果 (218 例実施、微生物が検出されたのは 144 例 (66 %))

菌種	アカントアメーバ	黄色ブドウ球菌	表皮ブドウ球菌	コリネバクテリウム	緑膿菌	セラチア	その他のグラム陰性桿菌	アスペルギルス
角膜病巣	32	3	4	6	47	3	4	0
結膜囊	0	1	2	4	1	1	0	0
眼脂	0	0	1	1	7	1	0	0
コンタクトレンズ	0	2	2	1	8	2	6	0
レンズケース	17	1	2	4	26	12	21	1
その他	1	0	1	0	2	0	0	0

2) 使用していたレンズ及び消毒剤

使用していたレンズは、2 週間頻回交換ソフトコンタクトレンズが 127 例 (54.5 %) で過半数を占めていた (図 25)。また、使用していた消毒剤又は保存液は、MPS が 126 例 (54.1 %) で半数以上を占めていた (図 26)。

図 25. 使用していたレンズ

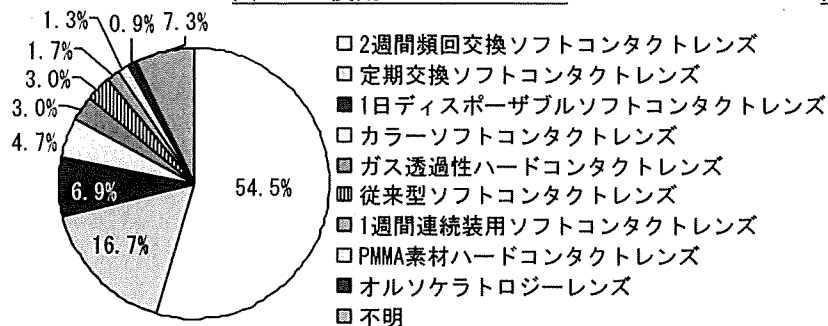
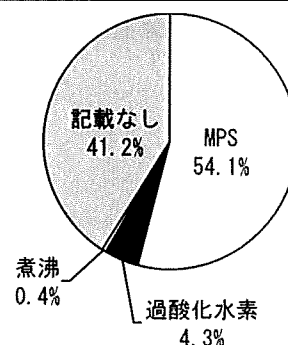
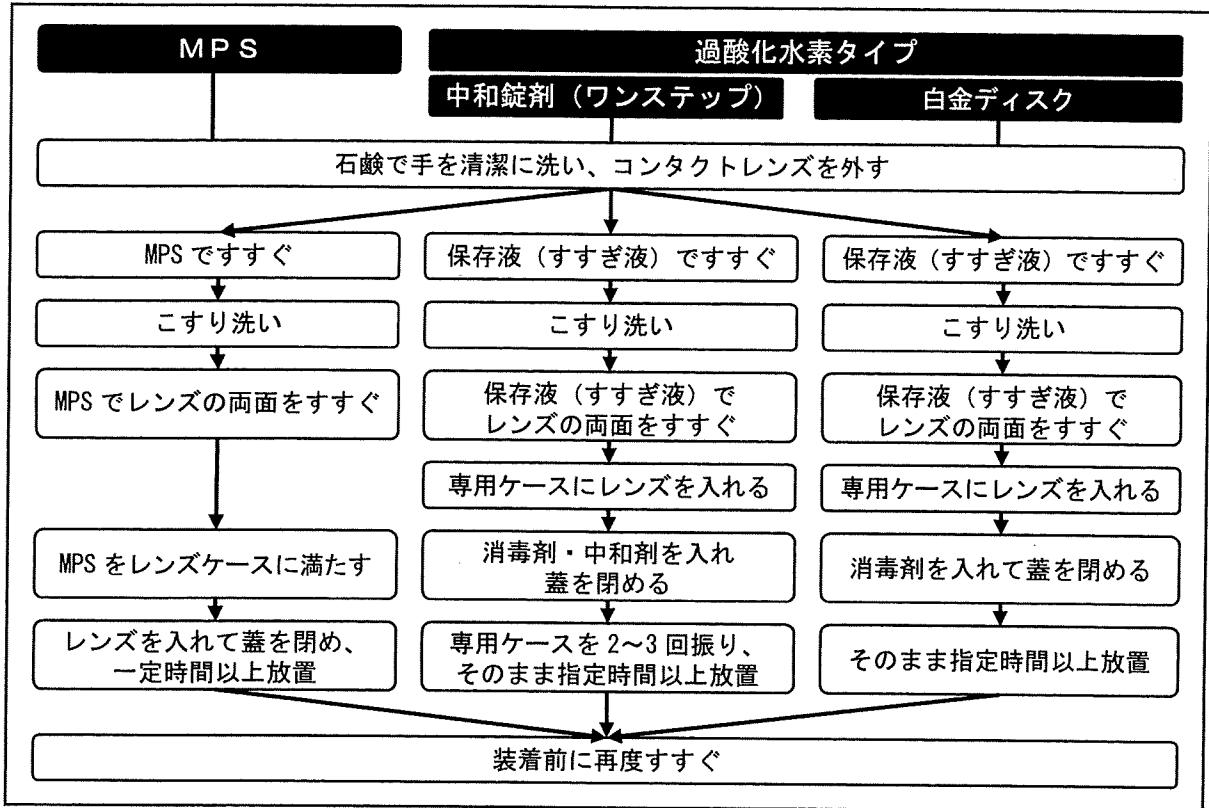


図 26. 使用していた消毒剤

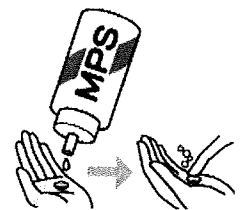


(3) ソフトコンタクトレンズの正しいケア方法



<正しいこすり洗いの方法>

- ①清潔な手でコンタクトレンズを目から外して保存液ですすぐ、利き手と反対の手のひらの上にコンタクトレンズを載せ、クリーナーあるいはMPSを数滴たらす。
- ②利き手の人差し指の腹をコンタクトレンズに当て、軽く押さえながら手のひらの上でコンタクトレンズを一定方向にやさしく動かし、表面を約20~30回こする。
※円を描くように動かすとレンズが破損することがあるので指は一定方向に動かすこと。
※ゴシゴシこするのではなく力を入れずにやさしくこすること。
※片面20~30回ずつが基本だが、高含水ソフトコンタクトレンズ等傷つきやすいレンズの場合は5~10回にする。
- ③外側をこすり終えたらひっくり返して同じように内側をこすり洗いをする。
- ④最後に保存液あるいはMPSでよくすすぐ。



<レンズケースのケア方法>

コンタクトレンズを取り出した後、保存液を捨て、レンズケース全体を流水（水道水）もしくはMPSで洗う。水を切り、清潔な場所にふたと本体を伏せて自然乾燥させる。レンズケースは1~3ヶ月に一度新品と交換する。

参考：日本コンタクトレンズ学会ホームページ (<http://www.clgakkai.jp/index.html>)
 アイアカデミー (<http://www.eyecademy.net/index.html>)
 コンタクトレンズ教室 (http://www.aki-net.co.jp/contact_lens/index.html)

(4) 回収したソフトコンタクトレンズ及びケア用品

レンズは、平均年齢 21.2 歳の学生 385 人から 1 組ずつ回収した(男性 132 人、女性 253 人)。

レンズ及びケア用品の銘柄名はレンズ回収協力者の申し出情報による。

1) 回収したレンズ

回収したレンズは表 12 の通りである。装用最終日から試験実施日までの日数は平均 5.2 日(最短 1 日、最長 31 日)であった。レンズの使用日数は平均 13.2 日(最小 5 日、最大 49 日)であった。

表 12. 回収したレンズの概要

分類	レンズ銘柄名	メーカー名	組数
グループ I (83 組 2 枚)	2 ウィークフレッシュ	(株)アイレ	5 組
	ネオサイト 14	(株)アイレ	9 組
	2 ウィークアクエア	クーパービジョン・ジャパン(株)	13 組 1 枚
	シード 2weekFineα	(株)シード	8 組
	シード 2weekFineα (トーリック)	(株)シード	1 組
	ノプト 2weeks メディアル	(株)日本オプティカル	4 組
	ソフレレンズ 38	ボシュロム・ジャパン(株)	2 組
	メダリストプラス	ボシュロム・ジャパン(株)	41 組 1 枚
グループ II (47 組 3 枚)	プレシジョン UV	チバビジョン(株)	3 組
	メダリスト II	ボシュロム・ジャパン(株)	27 組
	メダリスト 66 トーリック	ボシュロム・ジャパン(株)	17 組 3 枚
グループ III	該当レンズなし	—	—
グループ IV (132 組 2 枚)	2 ウィークアクエア+A	クーパービジョン・ジャパン(株)	3 組
	2 ウィークバイオメディックス	クーパービジョン・ジャパン(株)	5 組
	シード 2weekPure	(株)シード	12 組
	2 ウィークアキュビュー	ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)	79 組
	2 ウィークアキュビューディファイン	ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)	12 組
	フォーカス 2 ウィークレンズ	チバビジョン(株)	1 組
	メニコンフォーカス	(株)メニコン	6 組
	ロート i. Q. 14 アスフェリック	ロート製薬(株)	11 組 1 枚
	ロート i. Q. 14 トーリック	ロート製薬(株)	3 組 1 枚
シリコーン ハイドロゲルレンズ (118 組 3 枚)	エアオプティクス 2 ウィーク (グループ I)	チバビジョン(株)	12 組
	アキュビューアドバンス (グループ I)	ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)	42 組 1 枚
	アキュビューオアシス (グループ I)	ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)	40 組
	アキュビューオアシス乱視用 (グループ I)	ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)	4 組 1 枚
	メダリストプレミア (グループ III)	ボシュロム・ジャパン(株)	2 組 1 枚
	メニコン 2 ウィークプレミオ (グループ I)	(株)メニコン	18 組

2) 使用していたケア用品

使用していたケア用品は表 13 の通りである。MPS を用いていた人が最も多く、全体の 87.0 % (385 名中 335 名) を占めていた。過酸化水素タイプの消毒剤を使用していた人は 37 名 (9.6 %)、ポビドンヨードタイプの消毒剤を用いていた人は 7 名 (1.8 %) であった。その他の 6 名 (1.6 %) は消毒剤を使用しておらず、コンタクトレンズ用保存液もしくは精製水でケアを行っていた。

表 13. 使用していたケア用品

分類	ケア用品名	メーカー名	人数 (人)
MPS (335 名)	フレッシュ 2	(株)アイレ	1
	ソフトコンタクトケアレンズコート	旭化成アイミー(株)	2
	ワンボトルケア	旭化成アイミー(株)	4
	コンフォートケア	エイエムオー・ジャパン(株)	6
	コンプリートダブルモイスト	エイエムオー・ジャパン(株)	31
	コンプリート 10 min	エイエムオー・ジャパン(株)	14
	バイオクレンゼロ	(株)オフテクス	9
	バイオクレンワン	(株)オフテクス	22
	シードゥソフトケア	(株)シード	4
	フレッシュルックケア 10 ミニッツ	チバビジョン(株)	6
	オプティ・フリー	日本アルコン(株)	43
	オプティ・フリープラス	日本アルコン(株)	30
	OPTI-FREE RepleniSH	日本アルコン(株)	2
	フォレストリーフ	(株)ファシル	2
	レニュー	ボシュロム・ジャパン(株)	33
	レニューマルチプラス	ボシュロム・ジャパン(株)	51
	エピカコールド	(株)メニコン	16
	ロート C キューブソフトワンクール	ロート製薬(株)	13
	ロート C キューブソフトワンクール i	ロート製薬(株)	11
	ロート C キューブソフトワンモイス	ロート製薬(株)	3
ロート C キューブソフトワンモイスト	ロート製薬(株)	7	
ロート C キューブソフトワンモイスト i	ロート製薬(株)	25	
過酸化水素タイプ (37 名)	コンセプトクイック	エイエムオー・ジャパン(株)	2
	コンセプトワンステップ	エイエムオー・ジャパン(株)	10
	バイオクレンケムセプト NEX	(株)オフテクス	2
	エーオーセプト	チバビジョン(株)	8
	エーオーセプトクリアケア	チバビジョン(株)	15
ポビドンヨードタイプ (7 名)	エファールワンステップ	(株)オフテクス	3
	バイオクレンエファール	(株)オフテクス	4
その他 (6 名)	(コンタクトレンズ用保存液)	—	4
	(コンタクトレンズ用精製水)	—	2

(5) コンタクトレンズの使用法に関するアンケート結果一覧 (n=385)

1. コンタクトレンズの装着歴について		2. 本調査で回収したコンタクトレンズについて	
問1. コンタクトレンズの装着歴	問2. 2週間交換型以外に使用したことのあるコンタクトレンズの種類(複数回答可)	問3. 3週間交換型ソフトコンタクトレンズの装着歴	問4. 処方を受けた場所
1年未満	ハードコンタクトレンズ	1年未満	眼科専門施設の販売店
1年〜5年未満	ソフトコンタクトレンズ	1年〜5年未満	眼鏡店
5年〜10年未満	ソフトコンタクトレンズ	5年〜10年未満	コンタクトレンズ専門店
10年以上	ソフトコンタクトレンズ	10年以上	通販販売
その他	その他	その他	インターネット販売
未回答	未回答	未回答	薬局
合計	合計	合計	合計
21	21	21	21
5.5	5.5	5.5	5.5

2. 本調査で回収したコンタクトレンズについて		3. 普段の使用法	
問7. コンタクトレンズの装着時間(1日あたり)	問8. 消毒を行った頻度	問9. 消毒用のハッカージェルに記載された注意事項を守ったか	問10. レンズのごすり傷を行ったか
1時間以上	毎日消毒した	ほとんど守らなかった	毎日コンタクトを洗った
4時間〜8時間未満	週に1〜3回消毒した	ほとんど守らなかった	週に1〜3回コンタクトを洗った
8時間〜16時間未満	週に4〜6回消毒した	ほとんど守らなかった	週に1〜3回コンタクトを洗った
16時間以上	毎日消毒した	ほとんど守らなかった	週に1〜3回コンタクトを洗った
合計	合計	合計	合計
50	50	50	50
14.0	14.0	14.0	14.0

3. 普段の使用法		4. ソフトコンタクトレンズ装用による目のトラブルについて	
問13. 1ヶ月のレンズの使用期間	問12. レンズケース交換の頻度	問14. 通常コンタクトレンズを週何日くらい装着するか	問15. 定期検診を受けているか
1ヶ月を超える	ほとんど交換していない	毎日	1ヶ月に1回検診を受けている
2週間を超え3週間以内	ほとんど交換していない	週1〜2日	3ヶ月に1回検診を受けている
3週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	週3〜4日	6ヶ月に1回検診を受けている
4週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	週5日	1年に1回検診を受けている
5週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	週6日	下定期に受けている
合計	合計	合計	合計
219	219	219	219
37.7	37.7	37.7	37.7

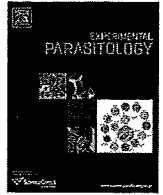
3. 普段の使用法		4. ソフトコンタクトレンズ装用による目のトラブルについて	
問13. 1ヶ月のレンズの使用期間	問12. レンズケース交換の頻度	問16. 目のトラブルが起きた経験	問17. 問16で「ある」と回答した人のみ回答 (n=189)
1ヶ月を超える	ほとんど交換していない	ある	右目
2週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	ある	左目
3週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	ある	両目
4週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	ある	両目
5週間を超え1ヶ月以内	ほとんど交換していない	ある	両目
合計	合計	合計	合計
219	219	189	189
37.7	37.7	49.1	49.1

分類	銘柄 (No.)	商品名	製造者又は 販売者名	含有成分	使用方法	うたい文句等
	9	コンセプトワックス	エイエムアイ・システムズ	【清毒液】過酸化水素3.0w/v% 【調整剤】 pH調整剤 【中和剤】1錠中カタラゼ4300 単位、等炭化剤、緩衝剤、増粘剤、着色剤、コーティング剤	<p>【使用方法】</p> <p>①レンズを交換する際は、必ず右側の手で手を洗い、よくすすいでください。 本剤ご使用の際には、必ず専用ワックスアップケース（以下、「専用ケース」とする）を使用してください。</p> <p>①レンズをセットする ②消毒液を入れる ③中和剤を入れる ④ワックスを1錠入れる ⑤ワックスを3回ゆっくりに擦る ⑥6時間以上放置 ⑦洗浄剤が溶けて、徐々に専用ケース内の液がうすいピンク色になります。そのまま6時間以上放置します。</p> <p>⑧装着前に3回ゆっくりに擦る ⑨6時間以上放置した上で、専用ケース内の液がうすいピンク色になっている（＝中和が行われている）ことを確認してください。専用ケースを逆さまにし、ゆっくりに専用ケースを3回ゆっくりに擦り返してから、レンズを装着してください。</p> <p>⑩使用後の専用ケースは、湯水でよく洗った後、自然乾燥してください。</p> <p>レンズ装着前に、「コンセプトワックス液」をこのように流すことにより、レンズをよりきれいに使用できます。（汚れの付着には個人差があります。）</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・きちんと消毒、レンズをリフレッシュ。 ・うるおい処方 ・しっかりと消毒して、レンズの透明感アップ、H₂O₂（過酸化水素）が目に見えない細菌や雑菌をしっかりと消毒、新しいレンズのよくな快適さを実現します。 ・うるおい処方、だから快適な装着感が続きます。レンズにうるおいを与えて、目になじみやすくします。 ・ワックスアップだけのシンプレックス、消毒液と中和剤と一緒に専用ワックスアップケースに入れ、6時間以上おこなうだけのシンプレックス。また、中和が始まるとビタミンB₁₂が溶けて液がうすいピンク色になるから、中和忘れの心配がありません。 ・防腐剤が入っていません。瞳に安心です。デリケートな瞳にもやさしい処方です。 ・シリコーン素材のソフトレンズにも使用できます。全てのソフトコンタクトレンズ（グリーン〜ブルーIV）に安心して使用できます。ただし、虹彩付きソフトコンタクトレンズ（レンズの虹彩部分に着色しているカラーソフトレンズ）には使用できません。
過酸化水素タイプ	10	エーオセプト	チバビジョン	<p>【有効成分】過酸化水素3.42w/v% 【中和剤】1個中、白金 【調整剤】 1.5mg 【配合成分】 安定化剤、緩衝剤、pH調整剤、等炭化剤</p>	<p>【使用方法】</p> <p>①レンズを取り扱う前には必ず手指を石けんでよく洗い、清潔にしてください。 ②レンズホルダーには必ずレンズホルダーとレンズカップを組み立ててください。レンズホルダーの先に中和剤が付きにくいようにしてください。 ③中和剤の先に中和剤が付きにくいようにしてください。 ④同様のレンズホルダーはエーオセプトを購入すること、新しいものと交換してください。 ⑤使用後のレンズホルダーは必ず手を石けんでよく洗い、清潔にしてください。</p> <p>①レンズホルダーの左右のバスケットにレンズを入れ、清潔にしてください。（「L」と表示してあるバスケットのレンズホルダーに左のレンズをセットし、バスケットのふちでレンズをはさみ込まないようにフタを閉めます。） ②消毒液をレンズカップの内縁まで入れ、入れすぎたり、入れずたりしないようにしてください。 ③消毒液を入れすぎると、中和されでいない消毒液がフタからもれ出ることがあります。 ④レンズを入れ、6時間以上放置します。 ⑤常温で消毒・中和を行ってください。低温下（10℃以下）で消毒した場合は、中和剤に10分程度以上かかる場合があります。 ⑥冬場はなるべく暖かい部屋でご使用ください。 ⑦消毒・中和が6時間以上経過していないレンズは使用しないでください。 ⑧液がもれるためレンズホルダーを傾けないでください。 ⑨消毒・中和後のレンズを24時間以上保存した場合は、装着前に再度消毒・中和を行ってください。 ⑩レンズを装着前に、ソフトコンタクトレンズ用保存液（ソフトウェーブアブラスなど）でこすり洗いしてから、目に装着。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・レンズクリア 瞳に優しい、防腐剤フリー ・H₂O₂パワーでしっかり消毒 ・防腐剤フリーで瞳にやさしい ・消毒と中和が同時にかんたんケア ・エーオセプトはH₂O₂（過酸化水素）パワーでカビや細菌をしっかり消毒。ディスプレイバックアップ消毒液をそそぐだけで、消毒と中和が同時に行われ、中和忘れのない安心ケアです。レンズ装着前にソフトコンタクトレンズ保存液でこすり洗いをすることにより、レンズはいつも清潔。だから快適な装着感が一日中続きます。
ポピドンヨードタイプ	11	バイオクレンエフ	（株）オプテックス	<p>エフアールA（消毒薬）：（有効成分）ポピドンヨード4.0mg/ml エフアールB（中和剤）：（有効成分）炭酸重碳酸ナトリウム 2.4mg/1錠、洗剤、緩衝剤、賦形剤、増粘剤、コーティング剤 エフアールC（消毒・すすぎ液）：（指示指定成分）ホウ酸、エデト酸塩</p>	<p>1. 溶解・すすぎ液を消毒薬の線まで満たし、消毒薬が溶けるまで振り混ぜる。 2. コンタクトレンズを入れ、消毒薬が溶けるまで振り混ぜる。 3. そのまま4時間以上又は一晩放置後、コンタクトレンズを取り出し、溶解・すすぎ液でよくすすぐ。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・レンズを交換する日まで使いはじめの快適さがつづきます ・消毒成分PVP-I、ポピドンヨード配合 <p>特長</p> <ul style="list-style-type: none"> ①高い消毒効果と安全性 ②高い消毒効果と安全性 ③高い消毒効果と安全性 ④高い消毒効果と安全性 ⑤高い消毒効果と安全性 ⑥高い消毒効果と安全性 ⑦高い消毒効果と安全性 ⑧高い消毒効果と安全性 ⑨高い消毒効果と安全性 ⑩高い消毒効果と安全性



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction

Naoko Kato-Hayashi^{a,*}, Masashi Kirinoki^a, Yukio Iwamura^b, Tamotsu Kanazawa^c, Viroj Kitikoon^d, Hajime Matsuda^e, Yuichi Chigusa^a

^aLaboratory of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan

^bCenter for Arts and Humanities, Ibaraki Prefectural University of Health Sciences, Ibaraki, Japan

^cDepartment of Parasitology and Tropical Public Health, University of Occupational and Environmental Health, Fukuoka, Japan

^dDepartment of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^eInstitute of International Education and Research, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2009

Received in revised form 6 November 2009

Accepted 16 November 2009

Available online 3 December 2009

Keywords:

Schistosoma mansoni

S. haematobium

S. japonicum

S. mekongi

PCR

Multiplex

Mitochondrial DNA

cox1

ABSTRACT

Recent increasing number of travelers, immigrants and foreign workers from schistosomiasis endemic area has thus resulted in the importation of schistosomiasis to non-endemic countries. To avoid ova-induced pathogenicity, sensitive and specific diagnostic means at an early stage of infection are therefore crucial. In this study, we developed polymerase chain reaction (PCR) primers specific for human schistosome species. The PCR products were obtained in a species-specific manner (479 bp, *Schistosoma mansoni*; 365 bp, *S. haematobium*; 614 bp, *S. japonicum*; 303 bp, *S. mekongi*) and were detectable from 0.01 pg of total worm DNA (*S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*). The primer sets were also available for multiplex use. Although some difficulties were experienced in amplifying the parasite DNA from the infected animals, schistosome DNA could be detected from one day post infection. The PCR method described herein will therefore be beneficial to detect human schistosomiasis, after some improvements in this method.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis affects about 200 million people worldwide, and more than 650 million live in endemic areas (WHO, 2005). Moreover, the threat is now spreading globally in non-endemic areas, such as Western countries (Houston et al., 2004; Bierman et al., 2005; Bottieau et al., 2006) and Japan. Recently, increases in the number of travelers, migrants and foreign workers have resulted in the importation of schistosomiasis. Because the main pathogenicity of this disease is severe hypersensitivity (e.g., acute Katayama syndrome and chronic granulomatous diseases) caused by the parasite eggs trapped in the host tissues, the early detection and treatment of this disease are therefore crucial to avoid any subsequent fatalities. The current frequently used diagnostic methods are the detection of parasite eggs and parasite-specific antibodies. The former is distinguishable between species based on the egg morphology and it shows direct evidence of an actual schistosome infection. However, this diagnostic modality is not feasible during the prepatent period when parasite eggs are not

detectable. Furthermore, stool examinations such as the Kato-Katz method are insensitive in individuals with only light infections (Doenhoff et al., 2004) and the egg excretion reduced/suppressed with the time course of infection (Cheever et al., 1994) and/or by the host immune status (Hermeto et al., 1994; Montes et al., 2004). The latter has a high sensitivity and it is applicable for mass examinations by means of ELISA. However, it has a rather low specificity due to cross reactions and the existence of antibodies per se shows an unclear state of infection. Namely, according to Hayashi et al. (2000), anti *Schistosoma japonicum* antibody has been detected by ELISA even 33 years after treatment. Moreover, the clue antigens for antibody production tend to be associated with egg deposition (Hillyer and Bruce, 1980; Doenhoff et al., 2004). In this context, there is a need to establish new diagnostic measures that are independent of the pathogenic eggs.

Recently, several investigators have launched new molecular based approaches for detecting schistosomiasis: schistosome DNA in human clinical samples such as feces (Pontes et al., 2002, 2003; Gobert et al., 2005), sera (Pontes et al., 2002) and urine (Sandoval et al., 2006a). The existence of parasite DNA in the host is direct evidence of an actual infection. The data from experimental animals have suggested that potentially effective diagnostic

* Corresponding author. Fax: +81 282 86 6431.

E-mail address: nkato@dokkyomed.ac.jp (N. Kato-Hayashi).

tools can be developed for use during the prepatent period (Sandoval et al., 2006b; Suzuki et al., 2006; Xia et al., 2009). Furthermore, the detection of parasite DNA may also be a helpful guideline for selecting the optimal treatment for schistosomiasis.

In this study, we developed new PCR primers for the identification and differentiation of major human schistosomes: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* and *S. mekongi*, using the currently available genetic information and assessed their potentiality/availability.

2. Materials and methods

2.1. Parasite materials and the extraction of parasite DNA

Adult worms of *S. mansoni* (Puerto Rican strain), *S. haematobium* (Kenyan strain), *S. japonicum* (Japanese Yamanashi strain) and *S. mekongi* (Laotian strain) used for template DNA were obtained from either experimentally infected mice or Mongolian gerbils. The infected animals were maintained at the Center for Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University. The handling and care of all experimental animals in this study strictly complied with the Guidelines for Animal Experiments of Dokkyo Medical University according to the Japanese law. Originally, *S. mekongi* was provided from Mahidol University, Thailand in 2000 and *S. haematobium* was provided from the University of Occupational and Environmental Health, Japan in 2004, and, thereafter, they were maintained in our laboratory. Adult worms of each species were picked up from either the mesenteric or portal veins of all experimental animals, washed with PBS several times and then were stored at -80 °C until use.

The total DNA of adult worms was extracted using commercially available DNA extraction Kits (e.g., Easy-DNA™ Kit, Invitrogen™, USA). The adult worms were lyophilized and minced with scissors, and then were processed according to the manufacturer's instructions.

2.2. Primer design, PCR and sequencing

The complete sequences of the mitochondrial gene of *Schistosoma* spp. were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>): *S. mansoni* (GenBank Accession No. AF216698, Le et al., 2000), *S. haematobium* (GenBank Accession No. DQ157222, Littlewood et al., 2006), *S. japonicum* (GenBank Accession No. AF215860, Le et al., 2000) and *S. mekongi* (GenBank Accession No. AF217449, Le et al., 2000). The sequences of the cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene of *Schistosoma* spp. were compared using CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>). Candidate primers were checked not to form primer dimer and then *in silico* PCR was performed by FastPCR (<http://www.biocenter.hel>

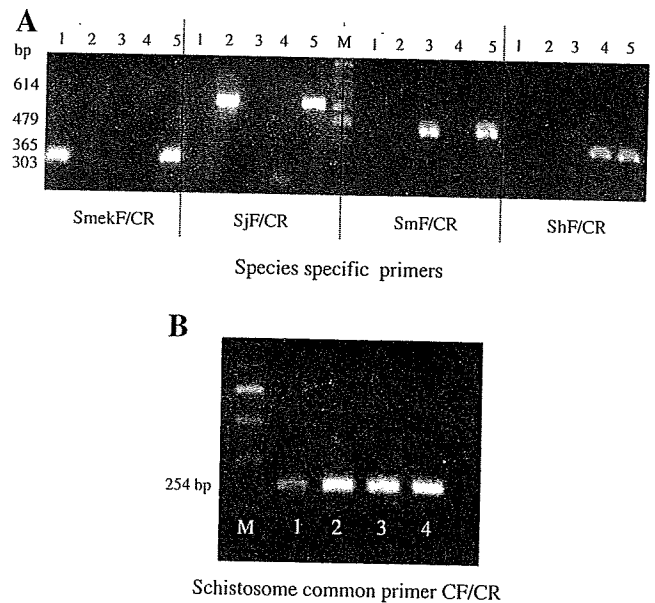


Fig. 1. Specificity tests for the schistosome species-specific primers (A) and common primer (B) using different DNA. Lane M, 100 bp molecular marker; Lane 1, *Schistosoma mekongi*; Lane 2, *S. japonicum*; Lane 3, *S. mansoni*; Lane 4, *S. haematobium*; Lane 5, mixed four species.

sinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm). The primer pairs were specific for *S. mansoni* (SmF/CR), *S. haematobium* (ShF/CR), *S. japonicum* (SjF/CR), *S. mekongi* (SmF/CR) and common *Schistosoma* spp. (CF/CR) are shown in Table 1. Basically, PCR was carried out in a final volume of 20 µl with 2 µl of 10× PCR Buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 U of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen™, USA), 0.5 µM of each primer (Tsukuba Oligo Service Co., Ltd., Japan) and 1 µl of template DNA. The reactions were performed initially at 94 °C for 2 min, then 35 cycles, each consisting of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 60 s and a final cycle of 72 °C for 7 min.

The PCR products were electrophoresed in 2% agarose (Certified™ Low Range Ultra Agarose, BIO-RAD Laboratories, USA) in tris-acetate-EDTA gels with 0.3 µg/ml ethidium bromide, and then were visualized in an UV transilluminator.

The PCR products were purified using the Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen, USA), and then the samples were prepared to undergo DNA sequencing by BigDye® Terminator FS Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). DNA sequencing was performed using the ABI Prism 3100 genetic analyzer, and the data were analyzed by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Table 1
Primer sets for cox1 gene amplification of *Schistosoma* spp.

Parasite	Primers		PCR Product length (bp)
	Name	Sequence 5' → 3'	
<i>S. mansoni</i>	SmF	TCCITTTATCAATTTGAGAGG	479
	CR	CCAACCATAAACATATGATG	
<i>S. haematobium</i>	ShF	AGTCGTGTCGATTTTAAGAC	365
	CR	CCAACCATAAACATATGATG	
<i>S. japonicum</i>	SjF	CCGTTTTTTTTGAGTATGAG	614
	CR	CCAACCATAAACATATGATG	
<i>S. mekongi</i>	SmekF	GTTAATATCATTGCCTGTAC	303
	CR	CCAACCATAAACATATGATG	
<i>Schistosoma</i> spp. Four species common	CF	GATCGTAAATTTGGW'ACTGC	254 (<i>S. mansoni</i> : 253)
	CR	CCAACCATAAACATATGATG	

W: mixture of A and T.