

感染性胃腸炎患者から検出された消化管寄生性原虫の分子疫学的検討

烏谷竜哉 竹内潤子*¹ 泉山信司*² 奥山正明 高見俊才 大瀬戸光明 井上博雄

Detection and Genotyping of intestinal protozoan parasites from a patient with infectious gastroenteritis

Tatsuya KARASUDANI, Junko TAKEUCHI*¹, Shinji IZUMIYAMA*², Masaaki OKUYAMA
Syunsai TAKAMI, Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUYE

Infectious gastroenteritis has been classified as a category V sentinel-reporting disease in the National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease in Japan. The intestinal protozoan parasites are still unclear as the etiologies of gastroenteritis while viruses and bacteria are well investigated. To evaluate the incidence of intestinal protozoan parasite from patients with infectious gastroenteritis, nested-PCR assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* were examined from fecal samples which detected neither viruses nor bacteria. Among 144 fecal samples, *Giardia* was detected from one (0.7%) samples. The patient was a three years old Japanese boy living in Ehime, who showed diarrhea and fever. The genotype of *G. intestinalis* was distinguished by a phylogenetic analysis. *G. intestinalis* isolate originated from the patient was found to have Assemblage B. *Cryptosporidium* was not detected in this examination.

Keywords : infectious gastroenteritis, intestinal protozoan parasite, *Cryptosporidium*, *Giardia*, triose phosphate isomerase (TPI), Assemblage B.

はじめに

感染性胃腸炎は、ウイルス、細菌などの感染性病原体による嘔吐、下痢を主症状とした感染症の総称であり、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、感染症法)における五類感染症の定点把握対象疾患に定められている。本疾患の起因病原体は、ウイルス、細菌、寄生虫など多様であり、ウイルスではノロ、サボ、ロタ、腸管アデノ、アストロなど、細菌ではカンピロバクター、病原性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオなど、寄生虫ではクリプトスポリジウム、ジアルジア、アメーバ赤痢などがあげられる。当所は感染症発生動向調査事業に基づく基幹地方感染症情報センターとして、県内の患者の動向を把握するとともに、病原体定点等から搬入される患者検体(糞便)を用いて起因病原体の検索を実施している¹⁾。感染性胃腸炎においては、初冬から春先にかけて患者数が増加する時期はウイ

ルスが高率に検出されるのに対し、細菌は年間を通じて検出され夏期の検出数がやや増えることから、冬～春はウイルス性、夏は細菌性によるものが多いと考えられている²⁾。しかし、検体の半数以上からは病原体が検出されないことも事実である。

一方、クリプトスポリジウム症やジアルジア症などの消化管寄生性原虫感染症は、五類感染症の全数把握対象疾患に位置付けられ、診断した医師は7日以内に最寄りの保健所に届出ることとなっている。県内ではジアルジア症は毎年1例程度の届出があるが、一部の医療機関からの報告に限られており、難治性の下痢症により当該医療機関に転院してはじめてジアルジア症と診断された症例もあることから、原虫感染症の実態が把握できているとは考えにくい。

そこで今回、感染性胃腸炎患者における消化管寄生性原虫の寄与を調査する目的で、ウイルス及び細菌のいずれも検出されなかった患者糞便から直接DNAを抽出し、ジアルジアおよびクリプトスポリジウムの検出を試みた。その結果、感染性胃腸炎患者1例からジアルジアを検出し、その分子疫学的検討を行ったので報告する。

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1 現愛媛県西条保健所

*2 国立感染症研究所 寄生動物部

材料と方法

1. 検査材料

平成16年1月から平成16年12月の間に、病原体定点において感染性胃腸炎と診断され、当所の病原体検査においてウイルス及び細菌のいずれも検出されなかった263件のうち、DNA抽出が可能であった144件を対象とした。患者便は、密閉容器に採取され搬入されたものを検体とし、検査に供するまでは-30℃で保存した。

2. 糞便からのDNA抽出

DNAの抽出はSulaimanらの方法³⁾に従い、アルカリ分解後フェノール-クロロホルム抽出を行い、さらに市販のキットを用いて精製を行った。すなわち、100μlの糞便に1M KOH 33.3μl及び1M ジチオスレイトール 9.3μlを加えて65℃15分間インキュベート後、25%塩酸 4.3μl及び2M Tris-HCl (pH8.3) 80μlで中和した。次に250 μlのフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (Invitrogen) を加えて激しく混和し、5000g 5分間遠心した。得られた上清について、QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN) をマニュアルに従って使用し、DNAを精製した。

3. クリプトスポリジウム及びジアルジアのPCR

クリプトスポリジウムのPCRはXiaoらの方法⁴⁾に従い、SSU rRNA遺伝子を増幅するnested PCRを行った。1st PCRは1325bpの増幅産物を得るプライマー5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'及び5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'を使用した。PCR反応液は、50 μl中に1×AmpliTaq Gold buffer, 0.2 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 200 nMプライマー, 1.25 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 鋳型DNA 5μlを含むように調整した。PCR反応にはGeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使用し、95℃10分間の後、94℃45秒, 55℃45秒, 72℃60秒を35回繰り返し、最後に72℃7分間の伸長反応を行った。2nd PCRは819-825bpの増幅産物を得るプライマー5'-GGAAGGGTTGTATTTATTA GATAAAG-3'及び5'-AAGGAGTAAGGAACAACC

TCCA-3'を使用し、1st PCRの増幅産物1μlを鋳型とするほかは、1st PCRと同じ組成の反応液及びPCR条件で行った。

ジアルジアのPCRはSulaimanらの方法³⁾に従い、triose-phosphate isomerase (TPI) 遺伝子を増幅するnested PCRを行った。1st PCRは605bpの増幅産物を得るプライマー5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3'及び5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3'を使用し、2nd PCRには530bpの増幅産物を得るプライマー5'-CCCTTCATCGGIGGTA ACTT-3'及び5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'を使用した。PCR反応液の組成はクリプトスポリジウムのPCRと同じで、PCRサイクルは1st, 2ndともに95℃10分間の後、94℃45秒, 50℃45秒, 72℃60秒を35回繰り返し、最後に72℃7分間の伸長反応を行った。

5. シーケンス解析及び系統樹解析

PCR増幅産物はQIAquick PCR purification kit (QIAGEN) 精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により増幅産物の塩基配列を決定した。解析には、シーケンスエディタとしてGeneDoc Ver2.6 (Nicholas et al.)⁵⁾ を、マルチプルアラインメントの作成にはClustal X (Thompson et al.)⁶⁾ を使用し、系統樹はMEGA Ver3.1 (Kumar et al.)⁷⁾ を用いてNeighbor joining法にて作成した。系統樹解析に用いた*Giardia*のTPI遺伝子の塩基配列は、GenBankからダウンロードした。

6. ジアルジアシストの形態観察

糞便中のジアルジアシストは、蛍光抗体法による特異蛍光及び微分干渉顕微鏡像により確認した。蛍光抗体染色は、糞便とEasyStain C+G FITC kit (BTF Pty Ltd) のIgG1抗体溶液とを等量混合したものをB励起条件下、落射蛍光顕微鏡で観察し、さらに微分干渉装置を用いて粒子サイズの測定と微細構造の観察を行った。

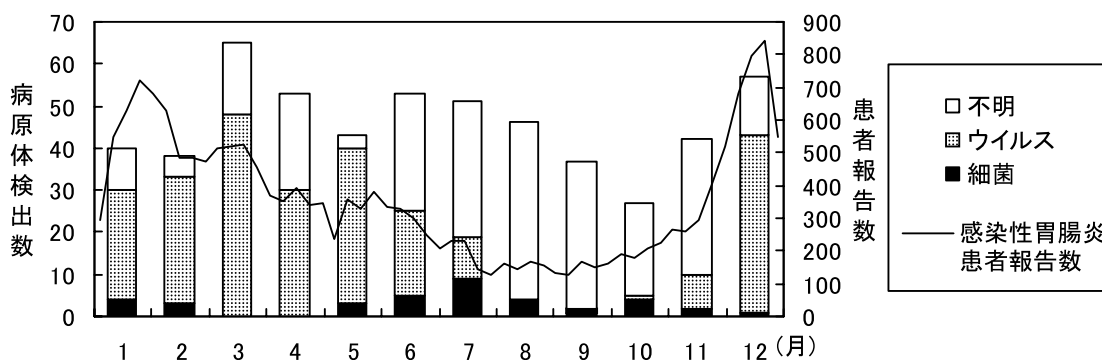


図1 平成16年感染性胃腸炎患者からの月別病原体検出数

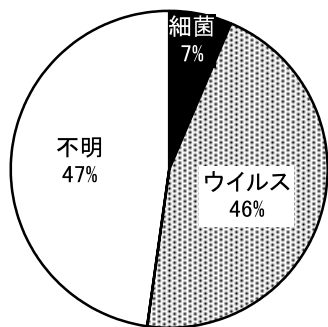


図2 平成16年感染性胃腸炎患者からの病原体検出状況(N=552)

結 果

1. 平成16年度感染性胃腸炎患者報告数と検出病原体

愛媛県感染症発生動向調査に基づき、平成16年に県内39定点医療機関から報告された感染性胃腸炎患者数は18991人であり、過去10年間では最も大きな流行規模であった¹⁾。本疾患は例年12月に流行のピークを迎えるが、平成16年は前年12月の増加が遅く1~2月にピークを迎えたため、年始と年末に2度のピークが観察された(図1折れ線グラフ)。

病原体定点から搬入された検体数は552件であり、1ヶ月あたり概ね40~50件であった。月別の病原体検出率は、感染症胃腸炎患者数が多い1~5月及び12月は、4月を除いて70%を超えたが、患者数が減少する夏場、特に8~10月は20%を下回った(図1棒グラフ)。平成16年に検出された病原体の内訳は、ウイルスが46%、細菌が7%であり、残りの47%は起因病原体が検出されなかった(図2)。

2. クリプトスポリジウム及びジアルジアの検出結果

ウイルス及び細菌が検出されなかった144件を対象に、クリプトスポリジウム及びジアルジアのnested-PCRを

表1 感染性胃腸炎患者からの原虫検出率

区 分	検出数	検出率
<i>Cryptosporidium</i>	0 / 144	0.0%
<i>Giardia</i>	1 / 144	0.7%

行った。その結果、クリプトスポリジウムは検出されなかったが、ジアルジアが1例(0.7%)から検出された(表1)。

ジアルジアが検出された患者は3歳男児で、平成16年11月20日に発病し、11月24日に近医を受診した症例であった。受診時の症状は38℃の発熱及び下痢症状で、病原性大腸菌の疑いで糞便が搬入された。糞便の蛍光抗体染色及び微分干渉顕微鏡像を図3に、ジアルジアのTPI遺伝子を増幅するnested-PCRの結果を図4に示した。

3. ジアルジアTPI遺伝子の系統樹解析

ジアルジアが検出された患者便から得たTPI遺伝子増幅産物の塩基配列を決定し、データベースからダウンロードした配列と併せて系統樹解析を実施した。その結果、本症例の遺伝子型はAssemblage Bに属し、B IV型に分類されているヒト由来株Ad-19の塩基配列と100%一致した(図5)。

考 察

クリプトスポリジウム症やジアルジア症は、水や食品を介して原虫のオーシストあるいはシストを経口摂取す

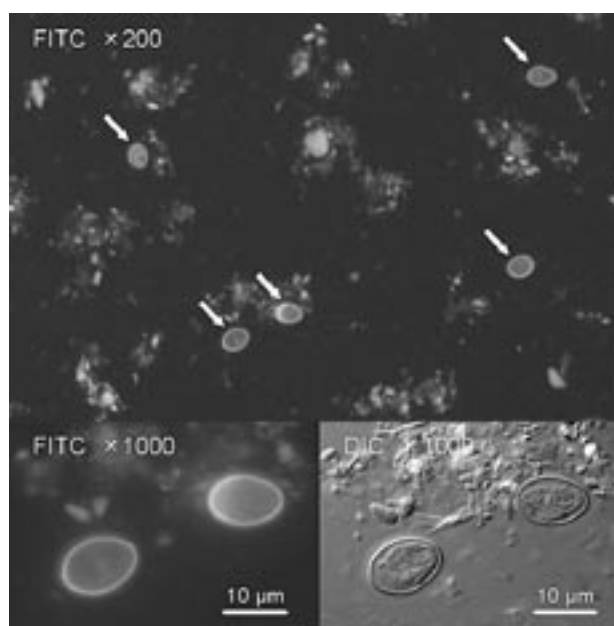


図3 検出された*Giardia*の顕微鏡像

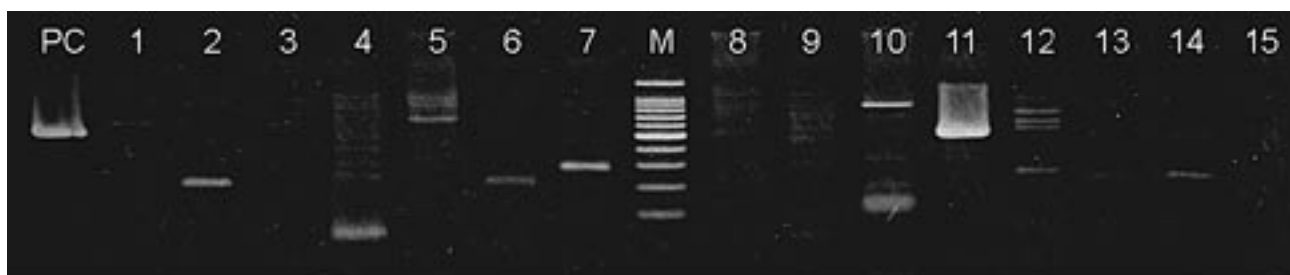


図4 *Giardia* TPI遺伝子のnested-PCR泳動像

PC: 陽性コントロール, M: 100bp Ladder, lane1-15: 検体, lane11が陽性検体

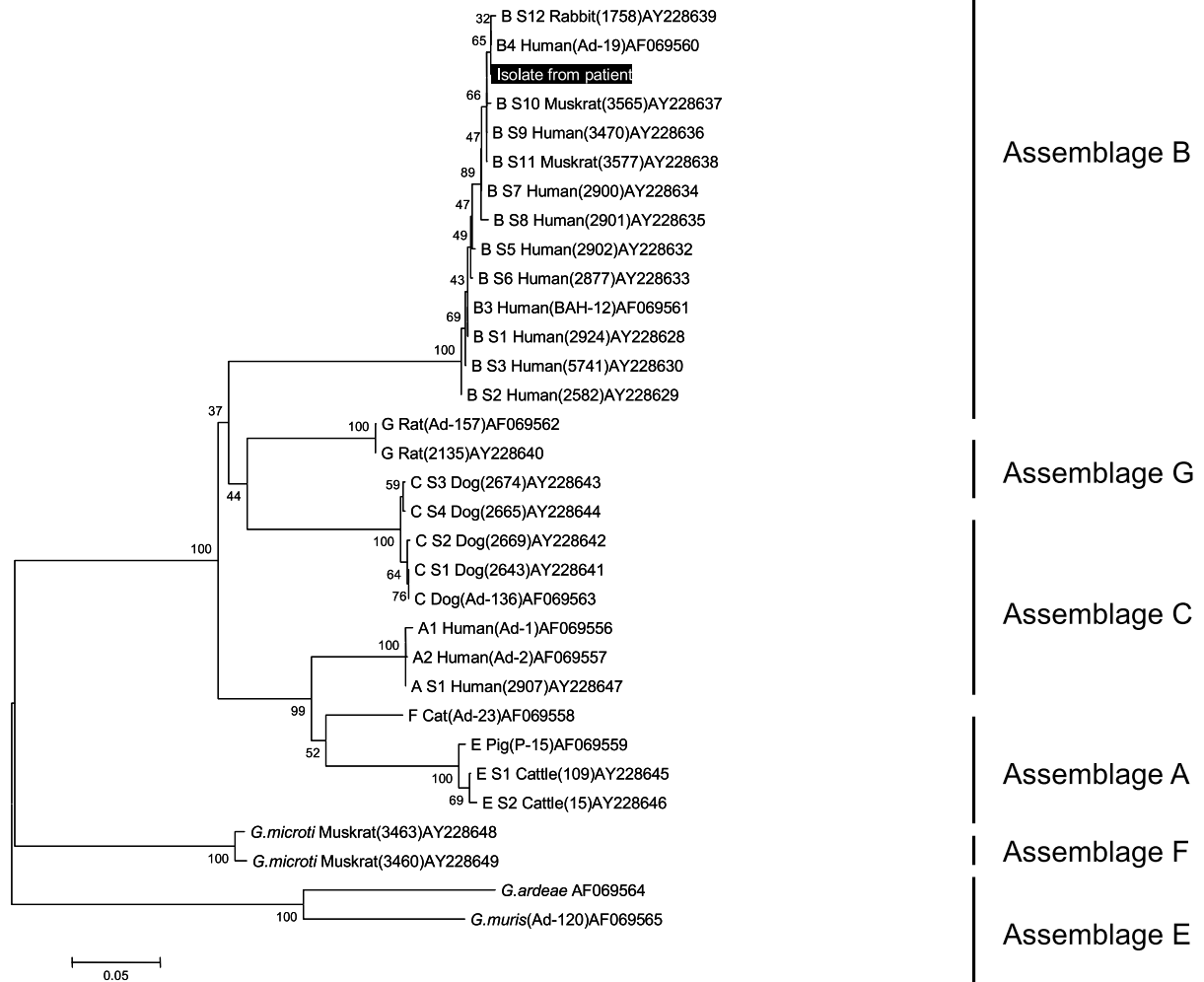


図5 Trise phosphate isomerase 遺伝子の系統樹

ることによって感染し、症状は無症状のものから一過性あるいは持続性の下痢を引き起こすものまで、様々な臨床症状を示す。両疾患とも感染症法に基づき、平成11年以降の患者数が把握されており（感染症発生動向調査）、平成16年末までにクリプトスポリジウム症は228例、ジアルジア症は587例の報告がある⁸⁾。

クリプトスポリジウム症においては、国内で報告されている患者の大部分は平成14年（3件、100例）及び16年（1件、80例）に発生した4件の集団感染によるもので⁹⁾、それらを除いた届出は48例となり、国内感染例はそのうちの6割程度と更に少ない。今回用いたSSU rRNA遺伝子を標的としたnested-PCR法では、100μlの糞便に10個程度のオーシストがあれば検出できることを確認している。今回の調査で、144件の糞便からクリプトスポリジウムが1例も検出されなかったことから、本疾患は県内

においても稀であると考えられる。

一方、ジアルジア症は国内で毎年100例前後の患者が報告されているが、クリプトスポリジウム症とは異なり集団感染事例は知られていない。平成11～16年の報告では20歳以上が97%を占め、海外感染と国内感染がほぼ半数となっており⁸⁾、渡航者下痢症として注目されている疾患である。しかし、今回の調査でジアルジアが検出された事例は、全国的にも報告が少ない3歳の幼児であった。検査対象が小児科診療を主とした医療機関からの糞便であったため、幼児の検体が大部分を占めた結果と考えられる。しかし、県内で平成16年までに届出のあった4例のうち1例が1歳児であったことを合わせて考えると、幼児の胃腸炎患者にはジアルジア症が少なからず含まれている可能性がある。海外では小児に多い感染症として知られており、米国の罹患率調査でも1～9歳に最大

のピーク、次いで小児たちと接触の機会の多い30～39歳になだらかなピークの二峰性の分布が見られている¹⁰⁾。国内では検査対象が海外渡航者などに偏っている可能性が指摘されており、検査範囲を広げることで本感染症の実態が明らかになると考えられる。

ジアルジア (*Giardia intestinalis*) の遺伝子型は、現在のところA, B, C, D, E, F, Gの7つのAssemblageが提唱されており、ヒトに感染するのはAssemblage AとBに限られている。このうち、Assemblage AのサブグループA IIはヒトのみに感染するが、サブグループA IとAssemblage Bはヒト以外にもイヌ、ネコ、ウシ、ブタ、げっ歯類などの広範囲の哺乳動物にも寄生するため、人獣共通感染症として認識されている^{11, 12, 13)}。また、症状の重篤度と遺伝子型について、Assemblage AよりもAssemblage Bのほうが病原性が強いとの報告があるが¹⁴⁾、現在も結論は得られていない。今回検出されたジアルジアの遺伝子型はAssemblage Bに属し、データベースに登録されているAd-19株とTPI遺伝子の塩基配列が100%一致した。本症例の感染経路は不明であるが、病原体保有者あるいは保有動物から感染したものと推察される。国内で感染した症例のうち、遺伝子型が明らかとなった報告例は少なく、無症状病原体保有者からAssemblage A IIが2例、下痢症患者からAssemblage Bが2例（うち1例はHIV陽性者）あるのみである^{15, 16)}。一方で、我々は平成16年6月～9月にかけて下水中からジアルジアの検出を試みている。その結果、今回の患者と塩基配列が全く一致するAssemblage Bのほか、3種類のAssemblage A IIと2種類のAssemblage Bを検出しており（未発表データ）、複数の遺伝子型がヒトの間で伝播している可能性が示唆される。今後、感染経路の推定や、症状の重篤度と遺伝子型の関係を議論するうえで、さらに多数の症例の解析が望まれる。

クリプトスポリジウムのオーシストやジアルジアのシストは塩素消毒に対する強い耐性を持ち、湿った状態では数ヶ月程度生存するとされている。国内においてジアルジア症による集団発生事例の報告はないが、海外では飲料水を介した水系感染や、プールなどの遊泳による感染が後を絶たない。また、動物と触れ合うことで感染する事例も十分考えられることから、原因不明の下痢症集団発生事例においては、これらの原虫の可能性を考慮に

入れた検査を実施すべきである。

まとめ

1. 感染性胃腸炎と診断され、ウイルス及び細菌のいずれも検出されなかった144例について、nested-PCR法を用いてクリプトスポリジウム及びジアルジアの検出を試みた。その結果クリプトスポリジウムは検出されなかったが、ジアルジアが1例(0.7%)から検出された。
2. ジアルジアが検出された患者は、発熱及び下痢症状で医療機関を受診した3歳男児であった。
3. 検出されたジアルジアの遺伝子型は、ヒト以外の哺乳類にも寄生するAssemblage Bであった。

文 献

- 1) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書平成16年、34-35、愛媛県感染症情報センター（2004）
- 2) 感染症発生動向調査週報（IDWR）、5（11）、14-16（2003）
- 3) Sulaiman IM et al. : Emerg Infect Dis. 9, 1444-1452（2003）
- 4) Xiao L et al. : Appl Environ Microbiol. 65, 1578-1583（1999）
- 5) Nicholas KB et al. : EMBnet. News. 4, 14（1997）
- 6) Thompson JD et al. : Nucleic Acids Res. 25, 4876-4882（1997）
- 7) Kumar S et al. : Bioinformatics. 17, 1244-1245
- 8) 感染症発生動向調査事業年報、<http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>
- 9) 病原微生物検出情報、26, 165-166（2005）
- 10) Hlavsa MC et al. : MMWR Surveill Summ. 54, 9-16（2005）
- 11) 遠藤卓郎ほか：モダンメディア、50, 73-77（2004）
- 12) 阿部仁一郎：生活衛生、49, 98-107（2005）
- 13) Thompson RCA et al. : Parasitol Today, 16, 210-213（2000）
- 14) Homan WL et al. : Int. J. Parasitol. 31, 822-826（2001）
- 15) Abe N et al. : Jpn J Infect Dis. 58, 57-58（2005）
- 16) Matsubayashi M et al. : J Vet Med Sci. 67, 337-340（2005）