

消化管寄生性原虫症におけるイムノクロマト法の有用性の検討

浅野由紀子 八木田健司*1 鳥谷竜哉 奥山正明*2 高見俊才*3 大瀬戸光明*3 井上博雄

Evaluation of utility of a rapid immunochromatographic assay for the cryptosporidiosis and giardiasis

Yukiko ASANO, Kenji YAGITA*1, Masaaki OKUYAMA*2, Syunsai TAKAMI*3,
Mitsuaki OSETO*3, Hiroo INOUYE

Cryptosporidium and *Giardia* are an intracellular protozoan parasite causing gastrointestinal disease and diarrhoea in human. Those intestinal protozoan parasites disease has been classified as a category V notifiable-diseases in the National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease in Japan. However, because the reported case is very little, we deduced that intestinal protozoan parasites disease are still unclear as the etiologies of gastroenteritis. To evaluate the incidence of intestinal protozoan parasite from patients with infectious gastroenteritis, rapid immunochromatographic (IC) assay for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* were examined from fecal samples which detected neither viruses nor bacteria. Among 227 fecal samples, *Cryptosporidium* was detected from two (0.9 %) and *Giardia* was detected from one (0.4 %) samples. The report demonstrate that this IC method is quick, simple, and suitable for a large amount of sample than the microscopy method or nested-PCR. IC method should be used for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* where the prevalence of these protozoan parasites is a public health problem.

Keywords : *Cryptosporidium*, *Giardia*, protozoan parasites disease, immunochromatographic assay,
National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease

はじめに

消化管寄生性原虫感染症である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接種す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的下痢や嘔吐などの様々な胃腸炎症状を呈する^{1,2)}。両疾患ともに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全数把握対象疾患に定められており、鏡検による原虫の証明により、当感染症を診断した医師は7日以内に保健所へ届け出ることとなっている。

一方、感染性胃腸炎は、細菌やウイルス、寄生虫などの感染性病原体による嘔吐、下痢を主症状とする感染症の総称である。起因病原体は、細菌ではカンピロバクター、サルモネラ、腸炎ビブリオ、下痢原性大腸菌などで、ウイルスでは、ノロウイルス、ロタウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス、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中心である。本疾患は、通常初冬

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1 国立感染症研究所 寄生動物部

*2 西条保健所

*3 元衛生環境研究所

から急激に増加し、年末から年始にかけて一度大きなピークを迎え、春にもう一つ小さなピークを形成した後にだらだらと減少する流行パターンをとる。初冬から春先の患者数が多発する時期は主にウイルス性のものが原因となり、夏季には細菌性のものが原因と考えられている。当所では感染症発生動向調査事業に基づき、県内の患者の動向を把握するとともに、病原体定点から搬入される患者検体(糞便検体)を用いて起因病原体の検索を実施しているが、約半数の患者の起因病原体は判明していない³⁾。

愛媛県内では平成11年4月の調査開始以降、クリプトスポリジウム症は1例、ジアルジア症は4例の届出に留まっているが³⁾、烏谷らの調査によって、起因病原体不明の感染性胃腸炎患者の中に、潜在的に消化管寄生性原虫感染症が含まれていることが明らかとなっており、原虫感染症の実態が把握できていないことが示唆された⁴⁾。そこで今回、より簡便なイムノクロマト(IC)法を用いて同様の調査を行い、感染症発生動向調査事業におけるIC法の有用性を確認したので報告する。また、原因不明の集団下痢症発生時におけるIC法の有用性の検討を目的として、平成18年に県内で発生した*Cryptosporidium meleagridis*が原因と推測された集団下痢症事例⁵⁾における糞便検体についても検査を行ったので併せて報告する。

材料と方法

1 検査材料

(1)感染症発生動向調査事業における病原体検査検体

平成16年1月～12月及び平成19年1月～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451件(平成16年:263件,平成19年:188件)のうち、検査が可能であった227件(平均年齢3.9歳,平成16年:129件 平均年齢4.3歳,平成19年:98件 平均年齢3.6歳)を対象とした。患者便は密閉容器に採取後、-30℃で保存したものを検査に供した。

(2) *C.meleagridis* による集団下痢症事例検体

平成18年8月20～24日に愛媛県内で発生した*C.meleagridis*が原因と推測された集団下痢症事例において、当所の病原体検査により、顕微鏡検査でクリプトスポリジウムオーシストが確認できた3検体(平均年齢16歳)についてIC法を実施した。患者便は-30℃で密閉容器に保存していたものを使用した。

2 検査方法

(1)イムノクロマト(IC)法

市販のImmunoCard STAT! (Meridian Diagnosis)

を用いた。試験キット添付の操作手順に従い、結果の判定についてもキット添付の判定基準に従った。即ち、糞便検体を十分に混和後、1.5ml遠心管に20～50μl分取し、滅菌蒸留水を便試料の5倍量を加えて混和し、5倍希釈糞便検体を作成した。キット添付チューブにSample treatment bufferを2滴添加し、作成した5倍希釈糞便検体を60μl加え、さらにA液2滴、B液2滴を添加してよく混和した。調整した試料を、デバイス注入口へ全量注入し、15分後にバンドの有無を判定した(図1)。

(2)蛍光抗体染色法

IC法で陽性となった糞便試料のクリプトスポリジウム及びジアルジア検査は、病原体検出マニュアル⁶⁾に従い、患者便を遠心沈殿法(MGL変法)で集嚢子後、免疫磁気ビーズ法(IMS法)による濃縮・精製を追加して、蛍光抗体法でオーシスト及びシストの確認を行った。IMS法はDynabeads GC-combo(DYNAL Biotech)を説明書に従って使用し、蛍光抗体染色は分離精製後の試料50μlをスライドガラス上で乾燥させ、EasyStain C+G FITC kit(BTF Pty Ltd)で染色後にDAPI(4',6-Diamino-2-phenylindole)染色を施した。顕微鏡観察にはOLYMPUS BX51を用い、FITCの特異蛍光はB励起条件下で、DAPIはUV励起条件下で行い、さらに微分干渉装置を用いて内部構造の観察を行った。

(3)PCR

糞便からのDNAの抽出は、糞便試料を液体窒素中で30秒間凍結後、70℃の水浴中で溶解するFreeze-thaw操作を5回繰り返した。その後、QIAamp DNA Stool Mini kit(QIAGEN)をマニュアルに従って使用し、DNA

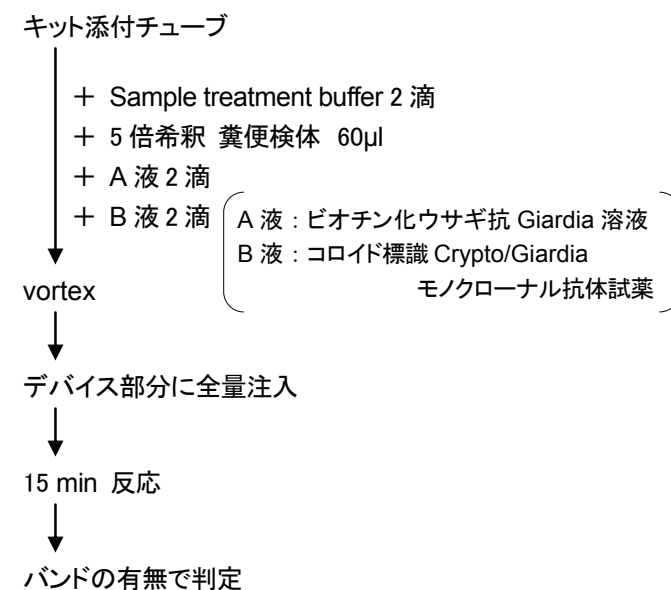


図1 ImmunoCard STAT! の操作手順

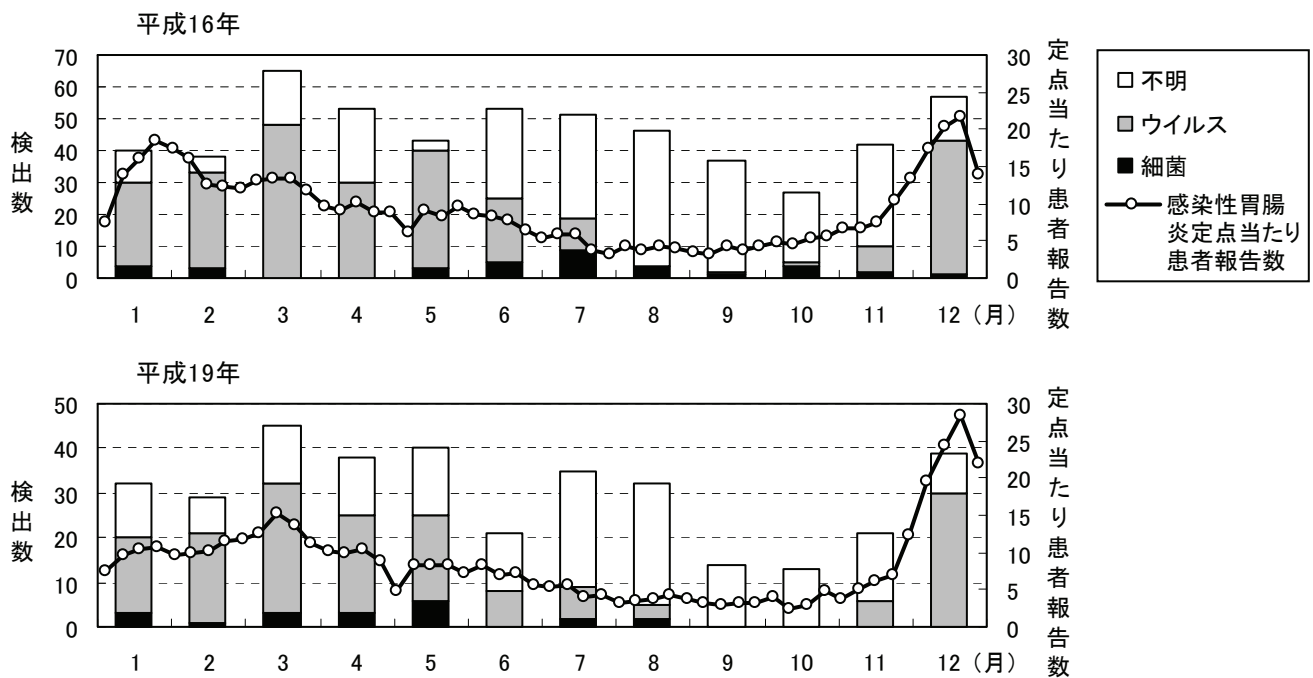


図2 感染性胃腸炎患者からの月別病原体検出数(上:平成16年,下:平成19年)

を精製した。

クリプトスポリジウムのPCRはXiaoらの方法⁷⁾に準じ、SSU rRNA遺伝子を増幅するnested PCRを行った。

ジアルジアのPCRはSulaimanらの方法⁸⁾に準じ、triose-phosphate isomerase (TPI) 遺伝子を増幅するnested PCRを行った。

結果

1 平成16年感染性胃腸炎患者

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(定点当たり486.95人/年)であり、1991年の調査開始以降では平成18年に次いで2番目に大きな流行規模であった。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2上 折れ線グラフ)。

2 平成19年感染性胃腸炎患者

平成19年に県内37定点医療機関から報告された感染性胃腸炎患者数は16329人(定点当たり441.32人/年)であり、1991年の調査開始以降では4番目に多く、比較的大きな流行規模であった。前年12月初旬に冬季のピークを迎えた後、平成19年に入ってから、春季にやや患者数が増加し、一度患者数が減少した後、冬季に急増するというほぼ例年とおりの動向を示した(図2下 折れ線グラフ)。

3 検出病原体

病原体定点から搬入された検体数は911件(平成16年:552件,平成19年:359件)であった。1ヶ月あたりの搬入検体数は、平成16年は概ね40~50件,平成19年は30件程度であった。病原体検出率は、感染症胃腸炎患者数が多い冬季(1~5月及び12月)は、ほぼ60%を超えているが、患者数が減少する夏季(8~10月)は20%を下回った(図2 棒グラフ)。検出された病原体の内訳は、ウイルスが45%、細菌が6%であり、残りの49%は起因病原体が検出されておらず、この割合は例年ほぼ同様である(図3)。

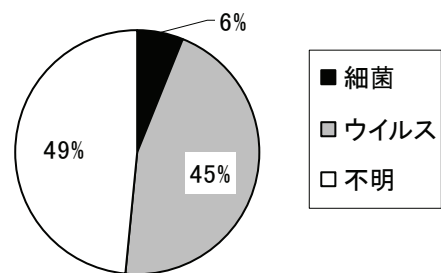


図3 平成16,19年の病原体検出率(n=991)

表1 感染性胃腸炎患者からのIC法による原虫検出率

区分	検出数	検出率
<i>Cryptosporidium</i> 陽性	2/227	0.9%
<i>Giardia</i> 陽性	1/227	0.4%

表2 感染症発生動向調査事業検体における患者情報

IC結果	No.	年齢	性別	発症日	受診日	症状
<i>Cryptosporidium</i> 陽性	S-1	11歳	女児	H16. 4. 1	H16. 4. 15	下痢・腹痛・発熱(36.8℃)
	S-2	9歳	男児	H19. 2. 2	H19. 2. 5	胃腸炎症状、下痢
<i>Giardia</i> 陽性	S-3	3歳	男児	H16. 11. 20	H16. 11. 24	下痢・発熱(38℃)

4 病原体検査検体におけるIC法によるクリプトスポリジウムとジアルジアの検査結果

ウイルス及び細菌が検出されなかった441件中、検査が可能であった227件(平成16年:129件, 平成19年:98件)を対象にクリプトスポリジウム及びジアルジアのIC法を実施した。その結果、クリプトスポリジウム陽性2件(検出率0.9%)、ジアルジア陽性1件(検出率0.4%)であった(表1, 図4)。

クリプトスポリジウム陽性となったのは、平成16年4月1日に下痢、発熱(36.8℃)、腹痛の症状を呈し、医療機関を平成16年4月15日に受診した11歳女児と、平成19年2月2日に胃腸炎症状と下痢の症状を呈し、医療機関を平成19年2月5日に受診した9歳の男児であった(表2)。IC法で陽性となった2検体について顕微鏡検査及びnested-PCRを実施したところ、顕微鏡検査でクリプトスポリジウムオーシストを確認できたのは11歳女児の1件のみで、18S-rRNA領域のnested-PCRではクリプトスポリジウム遺伝子を2検体とも検出できなかった(表3)。

ジアルジア陽性となったのは、平成16年11月20日に下痢、発熱(38℃)の症状を呈し、平成16年11月24日に医療機関を受診した3歳の男児であった(表2)。IC法で陽

性となった検体について顕微鏡検査及びnested-PCRを実施したところ、顕微鏡検査でジアルジアシストを確認し、nested-PCRにおいてジアルジア遺伝子を検出した(表3)

5 *C.meleagridis* 検出検体によるIC法の検査結果

平成18年に愛媛県内で発生した*C.meleagridis* が原因と推測された集団下痢症事例検体のうち、顕微鏡検査でクリプトスポリジウムオーシストが確認できた3検体についてIC法を実施した。検査の結果、症状が比較的軽く、糞便中へのオーシストの排出量が多く、さらに18S-rRNA領域のnested PCRでクリプトスポリジウム遺伝子が検出された1検体のみ、クリプトスポリジウム陽性であった。オーシストの排出量が少なく、DNAが抽出できなかった2検体はIC法においてもクリプトスポリジウム陰性であった(図5, 表4)。

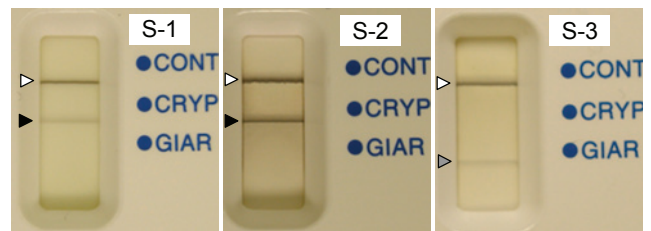


図4 IC法陽性検体の検査結果

▷ コントロールライン ▶ *Cryptosporidium* 陽性ライン ▷ *Giardia* 陽性ライン

表3 IC陽性検体における顕微鏡検査及びnested-PCRの結果

No.	顕微鏡検査	nested-PCR	IC	
			<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
S-1	+	-	+	-
S-2	-	-	+	-
S-3	+	+	-	+

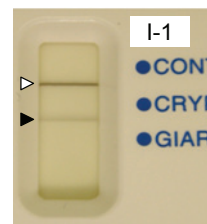


図5 *C.meleagridis* 検体のIC結果

▷ コントロールライン ▶ *Cryptosporidium* 陽性ライン

表4 *Cryptosporidium meleagridis* 集団下痢症事例の患者情報及び検査結果

No.	年齢	性別	症状	発病日	検体採取日	顕微鏡検査	PCR	IC
								<i>Cryptosporidium</i>
I-1	17	男	腹痛、吐き気、下痢(4回) 頭痛、臥床	H18.8.21	H18.8.27	+	+	+
I-2	16	男	悪寒	H18.8.21	H18.8.27	+	-	-
I-3	16	男	腹痛	H18.8.21	H18.8.27	+	-	-

考察

クリプトスポリジウム症とジアルジア症は、感染症法に基づき、平成11年4月以降の患者数が把握されており、平成18年末までに全国でクリプトスポリジウム症は257人、ジアルジア症は759人の届出があった⁹⁾。平成17年のわが国における人口10万人当たりの発生率は、クリプトスポリジウム症は0.01人、ジアルジア症は0.07人であり、各国の発生状況(クリプトスポリジウム症 0.3~21.7人、ジアルジア症 1.5~30.0人)と比較すると極端に少ない発生となっている¹⁰⁾。また、これまでに国内で報告された患者の年齢階級別の割合をみると、クリプトスポリジウム症においては、10歳代が最も多く55%を占めており、次いで20歳代が21%を占め、ジアルジア症においては、20歳代が最も多く26%、次いで30歳代が23%、50歳代が17%を占めている。両疾患ともに国内では成人を中心に発生し、10歳未満の小児の割合はクリプトスポリジウム症では12%、ジアルジア症では1%程度と極端に低い(図6)。しかしながら両疾患ともに海外では小児における感染症として認識されており、米国では両疾患ともに、10歳未満の年齢階級における発生が最も多く、次いで10歳未満の患者との接触の多い30~39歳が多いと報告されている^{11,12)}。このことから、国内では起因病原体不明の感染性胃腸炎患者、特に小児における感染性胃腸炎患者の中に当原虫性下痢症が潜在的に含まれ、発生の実態が把握できていない可能性が推測される。また、平成16年には愛媛県内で感染性胃腸炎と診断され起因病原体が不明であった糞便検体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を実施したところ、ジアルジア1例(検出率0.7%)を検出した経験⁴⁾があり、今回はさらに実態を調査することを目的としてIC法による調査を実施した。

今回、簡便なIC試薬を用いてさらに調査したところ、細菌及びウイルスが検出できなかつた糞便検体227件中、ク

リプトスポリジウム陽性となったのは2件(検出率0.9%)、ジアルジア陽性は1件(0.4%)であり、両原虫による下痢症の発症率は1.3%であった。クリプトスポリジウム症は、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)及び平成16年(1件80例)に発生した集団感染によるもので、それらを除くと年間10例前後の報告しかなく、愛媛県内においても集団下痢症事例から検出した1例のみの届出で、非常に稀な疾患であると認識していた。しかしながら、今回の調査で検出率が0.9%であったことから、小児における感染性胃腸炎の起因病原体の一つであることが判明した。ジアルジア症については国内で年間100例前後の報告があるが、約半数が国外での感染事例であること、また患者の96%が20歳以上の成人であること等により、国内では海外渡航者下痢症の意味合いが強いと考えられている。しかし、海外では小児におけるジアルジア症が数多く報告されていることに加え、下水処理場の流入水から高濃度(3500個/L)のジアルジアが検出されることから(未発表データ)、県内でも小児を中心に相当数のジアルジア症が発生している可能性を推察していたが、今回の調査では検出率0.4%と、小児で特に検出率が高い傾向は見られなかつた。

クリプトスポリジウム陽性となったS-1は、その後の顕微鏡検査でクリプトスポリジウムオーシストが検出されたが、nested-PCRによるクリプトスポリジウム遺伝子は検出されなかつた。この検体は平成16年に採取され、その後-30℃で長期間保存し、確認検査の際に凍結溶解を繰り返したため、DNAの抽出は不可能であったと考えられる。また、S-2については、顕微鏡検査でオーシストは観察されず、nested-PCRでもクリプトスポリジウム遺伝子は検出されなかつた。当検体も検体採取されてから約10ヶ月間長期凍結保存されている検体であり、そのためにDNAの抽出は不可能であったと推測される。また、Johnston SPら

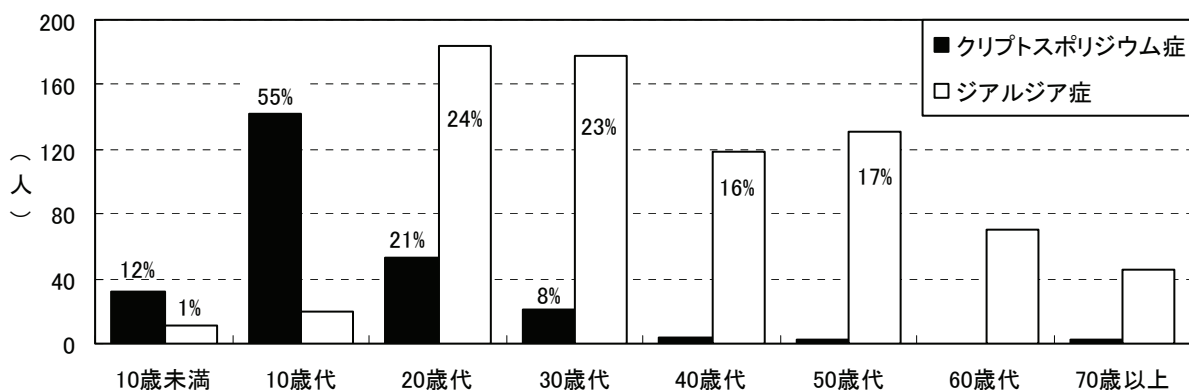


図6 国内における年齢階級別クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の報告数
(H11.4~H18.12 クリプトスポリジウム症 n=257, ジアルジア症 n=759)

の報告¹³⁾では、症状の回復直後と推察された検体からは完全な状態のオーシストが排出されず、顕微鏡検査ではオーシストの形状が完全な状態でしか観察されないために偽陰性と判定される可能性を示唆している。さらに、八木田らの報告¹⁰⁾では、顕微鏡検査においてクリプトスポリジウムオーシストを観察できない程度まで検体を希釈しても、IC法では陽性となることが証明されている。IC法はクリプトスポリジウム蛋白が微量でも存在すれば陽性となるため、S-2については糞便中のオーシスト排出量が非常に少ない検体あるいは検体中に排出されているオーシストの形状が変形した検体であったと考えられる。IC法により、ジアルジア陽性となったS-3は、顕微鏡検査によって多数のシストが観察されており、nested-PCRでもジアルジア遺伝子を検出した。このジアルジア遺伝子型は、その後の遺伝子解析で遺伝子型がヒト以外にも広範囲の哺乳類に寄生し、人畜共通感染症として認識されている *Assemblage B* に属していたことが確認されている¹⁴⁾。

クリプトスポリジウムは多くの遺伝子型が確認されており、免疫機能が正常なヒトへの病原性が明らかとなっている遺伝子型は、*C.hominis* および *C.parvum* が大部分を占めているが、トリ型である *C.meleagridis* も少数ながら報告されている¹⁴⁾。平成18年に県内で発生した *C.meleagridis* が原因であると推測された集団下痢症事例⁵⁾の保存検体のうち、顕微鏡検査でクリプトスポリジウムオーシストが確認できた3検体についてIC法を実施したところ、1件のみがクリプトスポリジウム陽性であった。IC法でクリプトスポリジウム陽性となったI-1は、症状が他の症例に比べ比較的重い患者から採取された糞便で、糞便中へのオーシストの排出量が多く、nested-PCRによりクリプトスポリジウム遺伝子を検出した検体であった。一方、IC法陰性であったI-2, 3は糞便約300mgをIMS処理後にオーシストを1～数个程度確認できた検体で、nested-PCRでもクリプトスポリジウム遺伝子は検出されなかった。今回使用したICキットは、*C.parvum* 蛋白を抗原として作成されたモノクローナル抗体を使用していることから(添付文書より)、本キットで *C.meleagridis* を検出するにはある程度の抗原量が必要となる可能性が考えられた。

クリプトスポリジウムとジアルジアは塩素消毒に抵抗性を示し、水道や食品を介した集団下痢症の原因となる可能性があることから、感染症法において五類感染症の全数把握対象疾患となっている。今回使用したIC法は、試薬の使用期限が1年程度と短く、1検体当たりの単価も蛍光抗体法と比較すると高価で、一般の診療所などで常備することはあまり実用的ではない。しかしながら、顕微鏡検

査やPCRのように特別な施設を必要とすることなく、手技も簡便で、20分弱の短時間で結果が判明することから、ウイルス、細菌共に検出されない原因不明の集団下痢症発生時におけるスクリーニング用試薬として保健所等に配備することは、迅速な原因究明及び感染拡大防止に有用であると思われた。また、英国ランカシャー地方では感染症サーベイランス事業における原虫症(ジアルジア症)の診断基準にEIAを加えた結果、当該疾患の発生率がコントロール地区に比べ約8倍になったとの報告¹⁵⁾もあり、本邦においてもIC法を感染症発生動向調査に活用すれば、国内での消化管寄生性原虫感染症の実態が把握できるものと期待される。愛媛県内の小児科定点医療機関からの感染性胃腸炎患者は年間15000例程度報告されている。また、病原体定点からの糞便検体のうち約半数は起因病原体が不明であるが、今回の調査によって消化管寄生性原虫感染症が1.3%存在していることが証明され、県内において年間相当数の患者発生の可能性は否定できない。今後、さらに調査が進み、消化管性原虫感染症の実態が明らかとなることを期待する。

まとめ

- 1 起因病原体不明感染性胃腸炎患者を対象に、IC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率を調査した結果、原虫検出率は1.3%であった。
- 2 クリプトスポリジウム症において稀な遺伝子型である *C.meleagridis* においては、IC法はオーシストの排出量が多い検体では判定が可能であることが確認できた。
- 3 原因不明集団下痢症発生時の原因究明の際には迅速に大量検体の処理が可能なIC試薬を保健所等へ配備することは有益であると考えられた。
- 4 消化管寄生性原虫症発生の実態を把握するためには、簡便に結果が判明するIC法は有益であり、迅速性の高い検査法を導入することで感染経路の解明、感染拡大防止にも有益である。

本研究は、平成19年度厚生労働科学研究費補助金(広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究)によりなされたものである。

文献

- 1) 遠藤卓郎ほか:モダンメディア, 50, 73-77(2004)
- 2) 遠藤卓郎ほか:モダンメディア, 51, 75-80(2005)
- 3) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書平成19年, 122-129,愛媛県感染症情報センター(2007)

- 4) 烏谷竜哉ほか:愛媛衛環研年報, 8, 12-16(2004)
- 5) 浅野由紀子ほか:愛媛衛環研年報, 9, 21-26(2006)
- 6) 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所 <http://www.nih.go.jp/niid/reference/pathogen-manual-60.pdf>
- 7) Xiao L et al.: Appl Environ Microbiol. 65, 1578-1583(1999)
- 8) Sulaiman IM et al.: Emerg Infect Dis. 9, 1444-1452(2003)
- 9) 感染症発生動向調査事業年報, <http://idsc.nih.gov/jp/idwr/index.html>
- 10) 八木田健司ほか: 消化管寄生性原虫症に関する検査法および分子疫学的研究, 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」(主任研究者: 寺嶋淳)平成19年度総括・分担報告書.249-264(2008)
- 11) MMWR Surveill Summ.2007 Sep 7;56(7):1-10.
- 12) MMWR Surveill Summ.2007 Sep 7;56(7):11-18.
- 13) Johnston SP et al.: J Clin Microbiol.41,623-626(2003)
- 14) Yagita K et al.: Parasitol Res.87,950-955(2001)
- 15) H Ellam et al.: Euro Surveill.13(37),4-8(2008)