

海外輸入寄生虫感染症（2）原虫症

第2次世界大戦後、40余年の間にわが国の寄生虫症は急速に減少した。しかし、日本人特有の食生活や習慣のために、いぜんとしてあとを絶たない寄生虫症や、逆に増加したものや、さらに新しく出現したものもある。発展途上国からの帰国者や、来日外国人が増加する今日、輸入寄生虫症の中でも重症化することもある輸入原虫疾患のマラリア、ジアルジア症、アメーバ赤痢について紹介する。

マラリア

第2次世界大戦後の混乱期に世界的に猛威をふるったマラリアは、いまでは日本を含め欧米諸国、新興工業諸国(NIBS)では終息した。しかし1970年代に熱帯・亜熱帯諸国に起った本症の再燃は DDT による環境汚染防止のため残留噴霧の中止、クロロキンによる感染源対策を軸としたWHOのマラリア根絶計画の挫折（薬剤耐性マラリアの出現）によるものとされている。これらの地方では現在なお猛威をふるい、年間2.1-2.2億人の患者がいるといわれている。

1) 病原体と感染経路

人のマラリアの病原体は熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵型マラリア原虫の4種類あり、いずれもマラリア原虫に感染したハマダラカが人を吸血する際に感染する。ハマダラカは汚水では育たず、きれいな水のある川、水田や内海に面し波の立たない汽水に産卵し夕方から夜間にかけて吸血活動をする(図1)。

2) わが国における発生状況

大友らの1972-1981年間の調査によると、年平均70例(表1)、また高田は1981年以降は毎年50-60例あると報告しているが、実際にはそれより多いと言われている。三日熱マラリアが最も多く

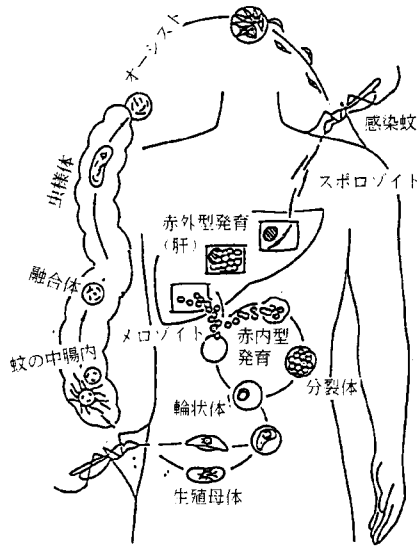


図1 マラリア原虫の人体内における生活史

その72%はパプア・ニューギニアを含む東南アジアで感染し、悪性の熱帯熱マラリアの54%はアフリカでの感染である。診断の遅れによる熱帯熱マラリアによる死亡は7.6% (15人)、三日熱の再発頻度は15.2%で両者とも欧米諸国の治療成績より低いとされている。

表1 1972~1981年の国内における虫種別マラリア発生数

年	熱帯熱	三日熱	卵型	四日熱	混合	不明	計
1972	11	1	34	2	0	1	48
1973	15	3	38	2	0	0	56
1974	27	0	33	5	0	5	70
1975	22	0	17	0	1	3	43
1976	17	3	10	1	2	1	34
1977	17	0	19	2	3	1	42
1978	17	3	38	0	2	3	63
1979	22	1	36	1	3	3	66
1980	29	3	58	1	1	2	94
1981	21	1	54	1	2	6	86
合計	198	15	125	15	11	24	497
%	28.4	61.0	2.2	2.0	3.0	3.4	100.0

内は定数数 Ohtomo, H. Japan, Proc. of the 12th SEAMIC Workshop 1987より引用

3) マラリアの診断法

マラリアの診断は直接診断法と間接診断法とあ

るが、確定診断は直接赤血球内にマラリア原虫を証明することである。通常、血液塗沫標本を染色し観察する。ロマノウスキー染色法の変法であるギムザ染色法が、マラリア診断法の標準法である。

pH7.2のリン酸緩衝液(PBS)を使用すること、薄めの液で時間を長くして染めることがこつである。

また最近の免疫学の進歩によりマラリアの間接診断法が実地に試みられている。核DNA染色の目的でフォイルゲン染色、アクリジンオレンジ、Hoechst 33258および33342、DAPIなどが使われているがこれらは蛍光顕微鏡を必要とする。またごく最近ではマラリアの早期診断としてDNAプローブ法が研究されている。この方法の利点は顕微鏡下の原虫検出には1検体について10-15分かかかるが、DNAプローブ法では1000検体が1日でできるということである。しかし放射性同位元素を使うという点で問題がある。

マラリアの血清診断は群馬大学医学部寄生虫学教室(電話:0272-31-7221)で常時受け付けている。

4) 治療と予防

薬剤耐性マラリアが広範な地域に出現したため治療が以前にも増して困難になっている。抗マラリア剤の第1選択薬はクロロキシンで、第2選択薬としてファンシダール、これらが効かないときにはキニーネが使われている。最近米国のWalter Reed研究所の開発したメフロキシン、中国でヨモギから作ったチンハオスが使われている。

予防には、ハマダラカとの接触を避けることが大切で、流行地では十分に冷房の効いたホテルを利用し、現地住民の住宅地域を夕方散歩しないことが肝要である。マラリアの予防内服には副作用の少ないクロロキシンが推薦されている。

ジアルジア症(ランブル鞭毛虫症)

海外から持ち込まれる寄生虫症でマラリア、赤痢アメーバ症について多いのがジアルジア症である。水系伝染病として熱帯・亜熱帯の衛生設備の不完全な地域に多いとされてきた。しかし、近年欧米諸国で集団発生がみられ、一種のSTDとして、あるいは免疫不全に伴う日和見感染寄生虫病として注目されている。

1) 病原体と感染経路

ジアルジア症の病原体はランブル鞭毛虫で、本

原虫には栄養型と嚢子の2時期がある。栄養型は逆水滴状で左右対象で2個の核と4対の鞭毛をもち、大きさ10-12 μ m、幅5-7 μ mで鏡検するとあたかもお猿さんの顔を見ているようである。人の十二指腸や小腸上部、ときに胆嚢や胆管などの粘膜上に寄生し活発に運動している。嚢子は長径8-12 μ m、短径6-8 μ m楕円形で成熟嚢子には4個の核のほか、楯板などがみられる(図2)。

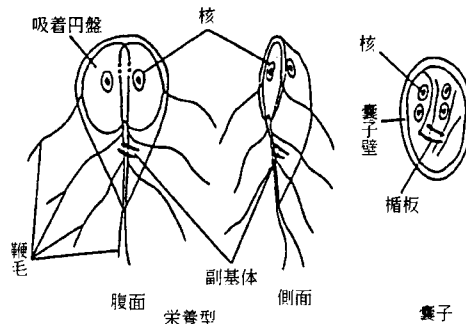


図2 ランブル鞭毛虫

人はこの嚢子を経口摂取して感染する。栄養型は一般に粘膜内に侵入しないと考えられていたが下痢症の強い患者から粘膜内侵入が認められている。少数感染の場合はほとんど無症状である。このとき糞便中に持続的に嚢子を排泄しており、嚢子保有者と呼ばれ、感染者の大部分はこれである。多数感染すると下痢、Vataer乳頭部の腫大、胆嚢炎ないし肝炎様症状を起こし、腹痛、食欲不振、体重減少、肝機能異常値を示すことがある。

2) わが国における発生頻度

木村らが1983-1986年に大阪国際空港検疫所において、入国時に下痢を申告した海外旅行者を調査したところ、インド、ネパールで10日以上滞在して下痢、腹痛、発熱などを申告した者の12.5-14%にランブル鞭毛虫陽性者がみついている。最近の輸入ジアルジア症の特徴としては、20歳代の男性が多く、なかでもインド、ネパールのトレッキング旅行者に多くみられ、その半数に赤痢、サルモネラなどの病原菌や他の腸管寄生原虫との混合感染がみられたと報告されている。

3) 診断

糞便中に嚢子(下痢・泥状便では栄養型の排出を見ることもある)、十二指腸液、胆汁中に栄養型を検出して確定診断をする。嚢子排泄数は変動するので、検便は日を変えて少なくとも3回実施するとよい。顕微鏡検査は生鮮標本によっても検

出は難しくないが、ヨード・ヨードカリ染色、鉄ヘマトキシリン染色、集嚢子法などを行うとよい。

4) 治療

ジアルジア症の治療にはキナクリン、メトロニダゾール、チニダゾール、フラゾリドンが有効とされているが、いずれの薬剤も副作用に注意すべきである。前2者は悪心、嘔吐、胃腸障害、時に神経障害があり、後2者には神経障害はない。薬剤の投与後一旦嚢子の排出がなくなっても2～3週間後に再び検出されることがある。

アメーバ赤痢

(アメーバ赤痢の検査法、感染経路、性状等については技術情報Vol. 10, No. 1, 1986に記載した)。

戦後の急速な環境の改善と上下水道の普及につれて本症の発生も急速に低下し、1970年代初期には全国の届出患者数は十数人前後となり、わが国での原発症例はなくなるものと思われていた。ところが1979年から80年代にかけて急速に増加し、1985年には136人となった。

1) 県下の発生状況

愛知県衛生研究所が1982年～1992年に取り扱ったアメーバ検査は検査数で397件で、主として患者との接触者および回復者の検査である(表2)。肝臓瘍からの検出が2例で、その1例は戦争中に満州・シベリアにいたことがある。また豊田保健所管内の外国人研修センターで7名の嚢子保有者が発見された。平成2年より大腸粘膜バイオプシーからの診定が増加しており年1～2例みられている。

表2 県下のアメーバ発生件数および検査数

	'82	'83	'84	'85	'86	'87	'88	'89	'90	'91	'92	合計
発生件数	2	2	0	1	4	5	1	0	4	3	4	26
検査数	30	2	0	10	32	137	81	0	16	28	31	397

検査数には回復者検便を含む

2) 原虫嚢子の染色法(コーン氏固定・染色同時法変法)

染色機構は明らかでないが、固定と染色が同時に行われ、原虫類の細胞構造を明瞭にそめわけ、原虫の同定や原虫性疾患の診断に有用である。

試薬

(1) 基本液

90%エタノール	170 ml
100%メタノール	160 ml
酢酸	20 ml
液状石炭酸	20 ml
1%リンタングステン酸	12 ml
蒸留水	618 ml

(2) クロラゾール・ブラックE溶液

クロラゾール・ブラックE粉末	5g
基本液	1ℓ

クロラゾール・ブラックEを基本液に溶解するには以下のようにする。

- ① クロラゾール・ブラックE粉末5gを乳鉢に入れ3分間磨砕する。
- ② 少量の基本液を加え、滑らかなペースト状になるまで磨砕する。
- ③ さらに基本液を加えて5分間磨砕を続ける。
- ④ 数分間静置する。
- ⑤ 液状部を別容器に移す。
- ⑥ 沈渣に基本液を加えて上と同様の磨砕を続け、粉末全体が溶けるまで繰り返す。
- ⑦ この色素溶液を熟するまで4～6週間、室温下で静置する。数日以内に黒色沈澱物と黒桜桃色液状体が分離する。後者を染色液として使う。
- ⑧ 使用に臨み濾過する。

手技

- ① スライドグラスに薄く糞便を塗抹する。
- ② クロラゾール・ブラックE溶液に①が乾燥しないうちにいれ2～4時間固定・染色する。
- ③ 濾紙で軽く余分の染色液を除去する。
- ④ 95%エタノールで10～15秒脱色・脱水する。
- ⑤ 100%エタノールで2回、5分ずつ脱水する。
- ⑥ キシロールで2回、5分ずつ透徹する。
- ⑦ 封入

染色態度

原虫の核膜内面のクロマチン顆粒、カリオソーム、類染色質体、細胞内線維様構造、鞭毛、中央小体等が黒青色ないし青緑色に分別染色される。染色態度はハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色とほとんど同じであるので、従来の同染色による図版が本法の染色の場合も参考になる。

(生物部 山田靖治)

薄層クロマトグラフィー／高速原子衝撃質量分析法 (TLC/FABMS)

(1) 食品残留抗生物質オキシテトラサイクリンの同定

【はじめに】薄層クロマトグラフィー (TLC) は、特別な装置や設備を必要とせず簡便な操作で混合物の分離をするのに優れた方法である。しかし、TLCから得られる化合物同定のための情報はRf値のみであり、TLCのみによって化合物を同定することは大きな危険が伴う。そこで、より確実な同定を行なうために、TLC展開後そのスポットをかきとり、抽出し、固定相担体を除去した後に、紫外外部吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル、質量分析等が実施されている。しかし、これらの操作は煩雑で長時間を要するうえに、抽出操作中の試料の損失も無視できない。そこで近年、高速原子衝撃質量分析法 (FABMS) と組み合わせたTLC/FABMSが開発され、種々の化合物の同定に応用されている^{1, 2)}。本稿ではTLC/FABMSの概略とその食品残留オキシテトラサイクリンの同定への応用について述べる。

【TLC/FABMSについて】本法は、試料混合物をTLCで分離し、そのTLCプレートにMSイオン源中に直接挿入し、FABマスペクトルを測定する手法である。他のクロマトグラフィー結合型MS (ガスクロマトグラフィー/MS、液体クロマトグラフィー/MS等) と異なり、MSとの結合に複雑なインターフェイスを必要としない利点を有している。

FABMSは1981年Barberによって開発された質量分析法で³⁾、ステンレス製サンプルホルダー (TLC/FABMSの場合はTLCプレート) 上に塗布した試料にアルゴン、キセノン等の中性の原子ビームを照射し、その衝撃で試料分子をイオン化し試料の分子量等の構造情報を得る手法である (図1)。この手法の大きな特徴は、試料にマトリックスと呼ばれる粘稠性の液体を添加し、マスペクトルを測定することである。マトリックス素材として最も広く利用されているのはグリセリンであるが、分子イオン種およびフラグメントイオン

これは化学的に中性、安定であり、適度の粘稠性、揮発性と溶解性を有するために、最も基本的なマトリックスとして使用されることが多い。マトリックスの役割は、衝撃表面における試料薄層の形成と、衝撃点における試料濃度の維持にあるといわれる。その他のマトリックス素材としては、ポリエチレングリコール、チオグリセリン、トリエタノールアミン、ジチオエリスリトールとジチオスレイトールの混合物 (マジックビューレット) 等が用いられている。これらのマトリックスのうち、質の良いマスペクトル、すなわち、試料の分子イオン種およびフラグメントイオンを含み、試料の構造情報を十分に与えるマスペクトルを得るためには、試料分子に適合したマトリックスを選択することが重要である。

【食品残留オキシテトラサイクリンの同定】代表的なテトラサイクリン系抗生物質であるオキシテトラサイクリン (OTC、分子量460、図2) は、畜産物中への残留がしばしば認められ、著者らの調査でも病畜中に検出された抗生物質のうち20%を占めている⁴⁾。また、近い将来個々の抗生物質の残留基準の設定も十分に考えられることから、迅速かつ的確なOTCの同定法が必要であると見え、OTCの同定にTLC/FABMSを応用した。

上述のごとくマトリックスの選択を誤ると良好なマスペクトルが得られないので、グリセリン、チオグリセリン、トリエタノールアミン等8種類のマトリックスについて検討を行なった。これらのうちトリエタノールアミン等3種類のマトリックスは、全く分子イオン種を生成しなかった。また、他の5種類は明確な分子イオン種を生成したが、チオグリセリンを除く4種類のマトリックスはOTCの分子イオン種の現われる領域にマトリックス由来のイオンが現われ、微量のOTCに適用したときに、これらのイオンがOTCの分子イオン種

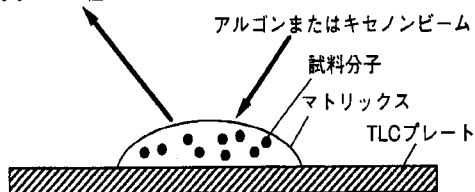


図1 TLC/FABMSの概略

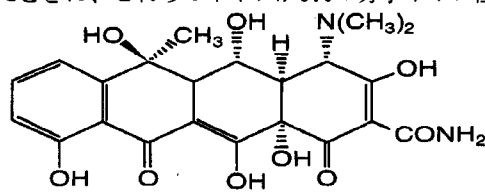


図2 オキシテトラサイクリン (OTC、分子量460)

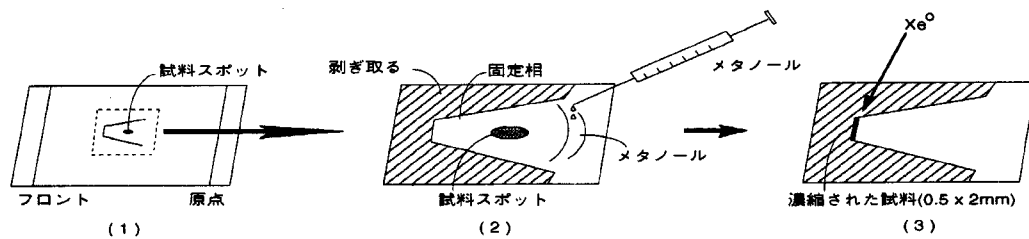


図3 試料濃縮法

の検出を妨害する。従って最終的にチオグリセリンをマトリックスとして選択した。

展開したTLC上のOTCのスポットにマトリックスを塗布すると、OTCの拡散が起こり、濃度が低下し、TLCプレート上にスポット当たり5 μg 以上のOTCが存在しなければマススペクトルを得ることはできなかった。そこで、TLC展開後目的とするスポットをプレート上で濃縮することを試みた。すなわち、(1)展開したTLC上のOTCスポットの周囲を四角形に切り取る。続いて(2)スポットの周囲の固定相を台形状に残して剥がし取り、(3)少量のメタノールをその下底から塗布することにより浸透するメタノールと共に試料が上底に移動し濃縮される(図3)。このようにしてOTCを濃縮した後にマトリックスを塗布しTLC/FABMSを測定すると、0.1 μg /スポットで明確な分子イオン種を検出でき、OTCと同定することができた。

そこで以上の結果を考慮して、スキーム-1に示す同定法をデザインした。クリーンアップ法およびTLC条件については、著者らが以前に報告したC18カートリッジによる方法および逆相TLC条件を用いた³⁾。この方法を実際試料に応用するた

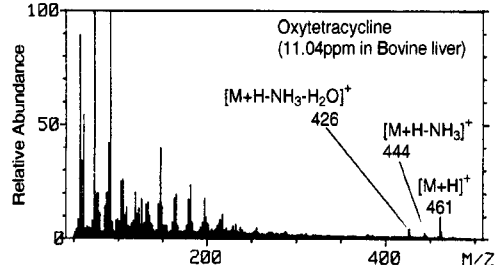
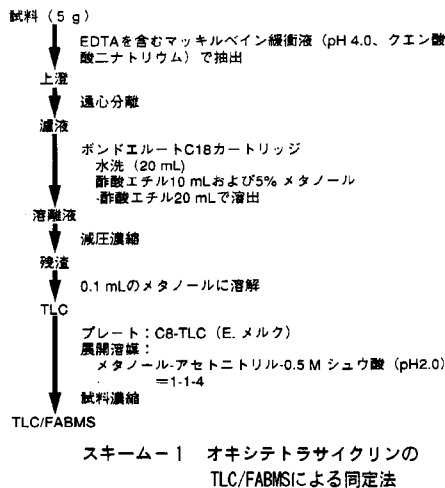


図4 牛肝臓中に残留したオキシテトラサイクリンのTLC/FABマススペクトル

めに、牛の筋肉、肝臓、腎臓にOTCが0.1 ppmになるように添加し、同定を試みた。その結果、肝臓、腎臓、筋肉の各組織から明確な分子イオン種を検出し、本法が0.1 ppmレベルの残留OTCの同定に有効なことが証明できた。そこで、本法を実際に液体クロマトグラフィーによってOTCが検出された牛の肝臓に適用した。図4にOTCのTLC/FABマススペクトルを示すようにm/z 461に分子量を示す分子イオン種([M+H]⁺)と m/z 444と426にテトラサイクリン系抗生物質であることを示すフラグメントイオン([M+H-NH₃]⁺、[M+H-NH₃-H₂O]⁺)が認められ、OTCと同定することができた。

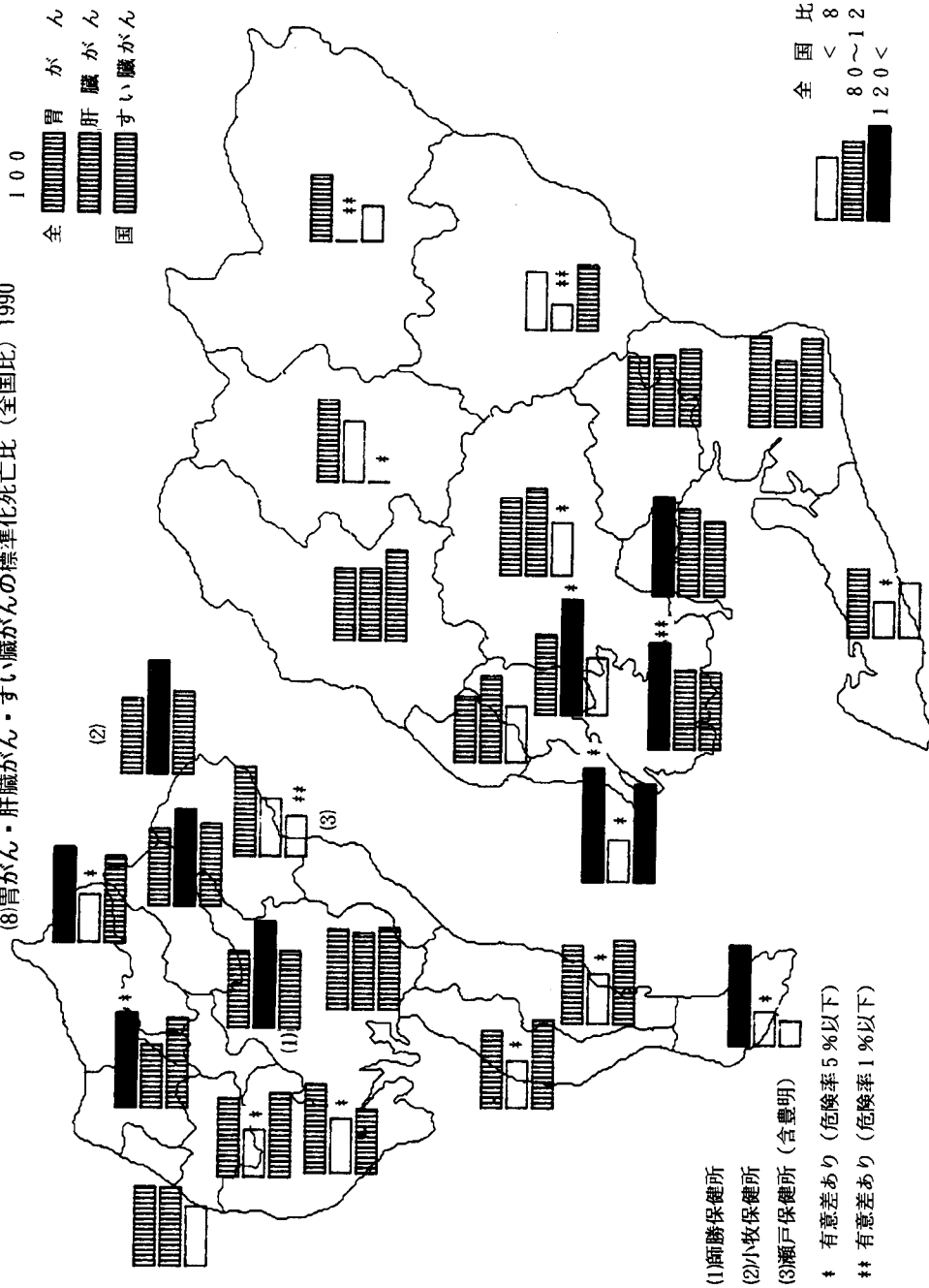
【まとめ】以上TLC/FABMSとこれを食品残留抗生物質オキシテトラサイクリンの同定に応用した例を概説したが、TLCの簡便さにMSの同定能力を付加させた本法は動物組織中に残留する薬物の同定に有効な手法であるばかりでなく、食用色素等の食品添加物の同定にも有用と考えられる。次の機会には食用色素への応用を紹介する予定である。

【参考文献】1) K.-I. Harada *et al.*, *Bio. mass spectrom.*, 20, 522 (1991). 2) H. Oka *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 6, 89 (1991). 3) M. Barber *et al.*, *Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325 (1981). 4) H. Oka *et al.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 894 (1991). 5) Y. Ikai *et al.*, *J. Chromatogr.*, 411, 313 (1987).

(食品薬品部 岡 尚男)

〔I〕地域特異性

(8)胃がん・肝臓がん・すい臓がんの標準化死亡比(全国比) 1990



- (1)新藤保健所
- (2)小牧保健所
- (3)瀬戸保健所 (含豊明)

* 有意差あり (危険率5%以下)
 ** 有意差あり (危険率1%以下)

(注) 人口データは1985年のものを使用した
 (厚生省地域保健医療計画支援システムより)
 (保健情報室)

この図を見てご意見・ご感想などありましたら、ご連絡下さい。