

## 2022年度 北陸大学特別研究助成【 奨励課題研究 】 報告書

代表者	所属	医療保健学部	職位	助教	氏名	松村 隆弘
-----	----	--------	----	----	----	-------

研究課題名	標準寄生虫検査プロトコル作成のための寄生虫関連下痢症調査
-------	------------------------------

交付額	200,000	円
-----	---------	---

## 研究成果の概要

標準寄生虫検査プロトコル作成の基盤となる国内の寄生虫感染症実態を把握するため、糞便検体が入手し易い入院患者のCDI検査の検体を用い調査を実施した。回収できた100検体の糞便からDNAを抽出し、エントアメーバ属（赤痢アメーバ含む）、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ブラストシスティス、微胞子虫を標的としたPCRを実施した。PCRの結果、3検体から微胞子虫が検出され、その他の寄生虫は検出されなかった。微胞子虫のPCR産物からサンガーシーケンス解析の結果、*Inodosporus* sp.、*Spraguea* sp.、*Pleistophora* sp.と近い相同性をもつ微胞子虫であることが確認された。これら3種はこれまでヒトへの感染事例はなく、病原性の有無については今後慎重に調査する必要がある。しかし、病原性を示す寄生虫が検出されなかったため、検体数を増やし引き続き調査を継続していく。

## 研究目的

## &lt;背景&gt;

日本の寄生虫事情は寄生虫感染者がインフラの向上に伴い激減し、学校保健法による健康診断での大規模な寄生虫検査も廃止されたという背景がある。このため、もはや寄生虫は国内に存在しないかのように考えられている。それに伴い、寄生虫検査を正確に実施できない臨床検査技師が増えている。そのため誰でも検査可能な寄生虫検査のプロトコルが必要である。一方で、国内での下痢関連寄生虫感染者の実態が見えない現状があり、プロトコル作成において現状の実態把握は優先課題であると考えに至った。

## &lt;経緯&gt;

はじめは寄生虫検査に自信のない臨床検査技師が増えてきていることを日本臨床検査技師会の活動を通して痛感し、現状把握をするために2020年度に中部圏の医療施設を対象とした寄生虫検査に関するアンケートを実施したことである。有効回答163件を集計した結果、自施設で検査を実施していない施設が70件、「自施設で検査を完結できる」と回答した施設は14件のみであった。できない理由として「検査がない」または「ほとんどない」ことが挙げられていた。それ故、現在の医療現場における寄生虫感染症の実態を明らかにし、標準寄生虫検査プロトコルを構築する必要があると考えに至った。また院内下痢症から寄生虫感染症の実態を検証しようとした経緯は私自身、石川県で入院患者の下痢便からジアルジア症を3例経験したことがきっかけとなり、想像以上に院内下痢症の中に寄生虫感染は存在しているのではないかと考えるようになったためである。

## &lt;目的&gt;

本研究では、国内のCDI検査残余糞便検体を使用して院内下痢症の寄生虫感染状況の実態を把握し、国内の状況に適した下痢関連寄生虫検査の標準プロトコルの作成を目的とする。課題として①院内下痢症の原因として寄生虫感染が関与しているのか。②国内の寄生虫感染症に必要な検査方法としてどのようなものを用いるのか。の2つの課題に取り組む。本奨励研究では「①院内下痢症の原因として寄生虫感染が関与しているか」を主に実施した。

## 研究の方法

対象は臨床検査室に糞便細菌検査のために提出された糞便検体100件を使用した。糞便検体の回収期間は2022年8月31日から10月19日であり、協力施設で設定されている保存期間1週間を過ぎた検体を回収した。材料のDNAの抽出にはニッポンジーンISOFEAL for Beads Beatingを使用し、同時に直接薄層塗抹法により病原体の有無を検査した。PCRによる病原体の検出対象はエントアメーバ属（赤痢アメーバ含む）、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ブラストシスティス、微胞子虫とし、各種プライマーセットはTable 1のとおりである。PCR陽性検体に対しサンガーシーケンス解析を実施し、DNAデータベースと照合し種同定を実施した。

本研究は、人を対象とする研究であり、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」ならびに、北陸大学研究に関する倫理審査規程に基づいて、北陸大学の人を対象とする研究倫理審査委員会の意見を聴き、学長の許可をすでに得ている。

Table 1 Primer sequences used in this

寄生虫名		Primer (5' → 3')	Gene
エントアメーバ	1st	F1 AAGATTAAGCCATGCATGTSKA	18S rRNA
		R1 GATACCTGTGTACGACTTCTY	
	2nd	F2 GACATCGGAGAGGGAGCT	
		R2 GCCTGCRGCCCAAGATG	
ジアルジア	1st	F1 TCCGGTYGATTCTGCC	18S rRNA
		R1 CTGGAATTACCGCGGCTGCT	
	2nd	F2 TCCGGTYGATTCTGCC	
		R2 CCCGTCTGCTGCTCGCG	
クリプトスポリジウム	1st	F1 TTCTAGAGCTAATCATGCG	18S rRNA
		R1 CCCAYTTCTCKGAARCAGGA	
	2nd	F2 GGAAGGGTTGTATTTATAGATAAAG	
		R2 AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	
ブラストシスティス	1st	F1 TCGTATGGGAGATAGTG	18S rRNA
		R1 TCTAAATGGTAAGATTACAC	
微胞子虫	1st	F1 CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC	18S rRNA
		R1 CCTCTCCGGAACCAACCTCTG	

## 研究成果

### <結果>

直接薄層塗抹法による顕微鏡検査では100検体中93検体を実施した。実施していない7検体はサンプル量が少ないため実施できなかった。顕微鏡検査の結果は全て陰性であった。PCR検査では、エントアメーバ属（赤痢アメーバ含む）およびジアルジア、クリプトスポリジウム、ブラストシスティスは陰性であった。一方で微胞子虫PCRでは3検体陽性となった。PCR陽性となった3検体のPCR増副産物に対しサイクルシーケンス解析を実施した。得られた塩基配列をNCBIのblastにてDNAデータベースと照合した結果、*Inodosporus* sp.、*Spraguea* sp.、*Pleistophora* sp.と近い相同性をもつ微胞子虫であることが確認された。

### <考察>

本研究でPCR陽性となった3種の微胞子虫についてはpubmed及び医中誌で検索したが、ヒト感染例報告はなかった。この3種は海洋系の生物が保有することが知られており、ヒトへの病原性は示されておらず<sup>1),2),3)</sup>、ヒトへの病原性の有無は不明であった。現在、ヒトに感染する微胞子虫は15種と言われ、下痢症を引き起こす微胞子虫として*Encephalitozoon bienersi*、*E. intestinalis* の2種が主に知られている<sup>4)</sup>。また、その15種の中には海洋系の生物由来の微胞子虫は含まれていないことも記されている。横山らによる報告では、魚類寄生微胞子虫類はヒトに対して病害が出るような健康被害はないことを提言している<sup>5)</sup>。しかしながら今回の対象被験者は入院患者または他院からの紹介患者であるため健常とは言い難く、下痢症の原因としてこれらの微胞子虫が関与している可能性もあるのではないかと考えている。一方で、食歴の調査はしていないため魚類等の摂食による消化管のただの通過により検出された可能性も考慮する必要がある。

100検体の糞便検体からヒトへ病原性を示す腸管寄生虫は検出されなかった。小松らの報告では1994年～2012年の間の人間ドックで寄生虫検査を実施した健常人の寄生虫陽性率は4.7%と高く<sup>6)</sup>、無症候キャリアが実在することは明かである。この報告より、免疫状態が低下している入院患者では寄生虫が活発化し、下痢を起こすと想定していたが、100検体では明らかにすることはできなかった。腸管寄生虫が検出されなかった要因としては本研究の共同研究施設は特定機能病院であり専門性の高い医療を要する患者が多いという一般病院とは異なる患者背景があることも考えられる。そのため施設による差があるかどうか、一般病院の患者検体と比較することも今後の課題として挙げる必要がある。現に日本における寄生虫保有者は少ないため、引き続き、検体数を増やすべく金沢医科大学中央臨床検査部と協力し、糞便検体からの腸管寄生虫の検出に取り組んでいく。今回検出された3種の微胞子虫についても、患者背景と照合させ、調査を進めていく。

### <引用文献>

- 1) Stentiford, G.D., Ross, S., Minardi, D., Feist, S.W. et al. Evidence for trophic transfer of *Inodosporus octospora* and *Ovipleistophora arlo* n. sp. (Microsporidia) between crustacean and fish hosts. *Parasitology*. 2018;145(8):1105-1117.
- 2) Mansour, L., Ben Hassine, O.K., Vivares, C.P. et al. *Spraguea lophii* (Microsporidia) parasite of the teleost fish, *Lophius piscatorius* from Tunisian coasts: evidence for an extensive chromosome length polymorphism. *Parasitol. Int.* 2013;62(1): 66-74.
- 3) Cheney, S.A., Lafranchi-Tristem, N.J. and Canning, E.U. Phylogenetic relationships of *Pleistophora*-like microsporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of trachipleistophora hominis infections. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2000;47(3):280-287.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention. Microsporidiosis. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Revised May 29, 2019. Accessed June 27, 2023. <https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/index.html>
- 5) 横山博、白樫正、山本充孝ほか：魚類寄生微胞子虫類はヒトに対して病害性がない。近畿大学水産研究所報告 2020;20:17-25.
- 6) 小松悦子、福田弥生、鶴原日登美ほか：寄生虫陽性率の経年的変化と寄生虫検査継続意義。人間ドック 2013 ; 28 : 641-645.

## 主な発表論文等

- 松村隆弘、他：中部圏支部臨床一般部門寄生虫検査アンケート報告 第2報. 令和4年5月第71回日本医学検査学会  
松村隆弘、他：中部圏医療施設における寄生虫検査の現状. 令和4年6月第33回日本臨床寄生虫学会大会  
松村隆弘、他：中部圏医療施設における寄生虫検査の現状. 日本臨床寄生虫学会誌 2022;33(1):84-86.  
松村隆弘：寄生虫検査のために遺伝子検査はどこまで必要なのか？. 日本臨床検査医学会誌 2023; 71(3):151-155.

## 組 織

分担・協力者	氏名	所属	職位	役割
協力者	吉野直美	金沢医科大学病院 中央臨床検査室	技師長	研究の統括、検体の保存、情報管理
協力者	村 竜樹	金沢医科大学病院 中央臨床検査室	職員	検体の保存、情報管理
協力者	杉永純一	金沢医科大学病院 中央臨床検査室	職員	検体の保存、情報管理