

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 糞線虫症の免疫診断法：その試みと意義

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 良也, 城間, 祥行, 大鶴, 正満 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015851

糞線虫症の免疫診断法—その試みと意義—

佐藤 良也^{***} 城間 祥行^{**} 大鶴 正満^{***}

* 琉球大学医学部寄生虫学講座

** 泉崎病院

*** 琉球大学医学部付属地域医療研究センター

(1991年4月1日 受付、1991年7月16日 受理)

I. 緒 言

沖縄を含む南西諸島は、古くから知られた糞線虫症の高浸淫地域である。沖縄では、今日なお多数の住民が本線虫の感染を受けており、また、本症は時として致命的な重症化を来すという点で臨床的にも看過できない重要な疾患のひとつである。著者らは、これまでの調査、研究を通して、沖縄の糞線虫症に関していくつかの重要な問題点を明らかにしてきた。そのひとつに、糞便検査による本症の診断が従来言われてきたよりもかなり困難であることがあげられる^{1,2)}。また、沖縄では本線虫保有者の多くがATL病原ウイルスのキャリアーであること³⁾や、完全駆虫が困難であること⁴⁾など、その対策にあたってかかえる問題点は多い。とり分け本症の重症化対策は、日常の臨床に携わる者にとって大きな関心事であると思われる。本症が宿主の免疫低下状態のもとで重症化することは既に良く知られた事実であるが、種々の消耗性疾患の増加傾向、免疫学の発展にともなう免疫抑制療法の普及、さらに腎移植など、臓器移植に向けた気運の高まり、感染者の高齢化にともなう抵抗力の低下など、本症重症化の危険因子は、今後、益々増加するものと考えられる。このため、本線虫感染の有無を的確に検査する方法を確立することは、かかる重症化予防対策にとって基本的に重要な問題である。

本稿では、糞便を用いた糞線虫症検査の現状と問題点、および著者らがこれまでにこなってきた免疫診断の試みと意義について紹介する。

II. 糞便検査の現状と問題点

寄生虫症の検査は、一般に糞便や他の生体材料から虫卵や虫体を検出することによる。糞線虫症の場合にも、糞便中に幼虫を検出することによって診断し、このため各種の糞便検査法が実施されてきた(表1)。

表1 糞線虫症の糞便検査法

- | |
|--|
| 1. 直接塗抹法 Direct wet mounts |
| 2. ホルマリン・エーテル沈殿法
Formalin-ether sedimentation(NGL method) |
| 3. 口紙培養法 Filter paper strip culture
(Harada-Mori method) |
| 4. ウォッチグラス培養法 Watch glass culture |
| 5. 寒天板培養法 Agar plate culture |

直接塗抹法は、糞便量約3mgをスライドグラス上で1滴の生理食塩水と混和し、カバーグラスをかけて直接鏡検する簡単な方法である。手軽な方法として一般の検査室で良く利用されるが、後述するごとく、この方法で検出される例は少ない。

ホルマリン・エーテル沈殿法は、約1gの糞便材料を用い、これを10%ホルマリンに溶かした後、エーテル粒子の浮力を利用して糞便内の未消化物を虫卵や幼虫から分離して取り除く方法であり、一般の虫卵検査では最もよく使われている。糞線虫症の検査でも比較的検出率は良く、たとえ幼虫が糞便材料内で死滅した場合でも検査可能であること、ホルマリンで固定してあるため検査の際に感染する危険がないことな

どの利点もある。

試験管内口紙培養法は、約20×150mmに裁断した短冊状の口紙に糞便を薄く塗布し、これを少量の水を入れた試験管内に立てて培養する方法である。この方法で使用する糞便量は0.5g程度であり、決して多くない。数日で幼虫が試験管内の清浄な水の中に泳ぎ出してくるので、これを顕微鏡下で観察する。本法は、糞線虫症の最も合理的な検査法として従来から推奨されてきた。しかし、本法は糞便内で幼虫が生存していることが絶対条件であり、低温もしくは高温状態に長時間放置された検体では極端に検出率が低下する。また、我々は検査依頼された糞便材料の中に活発に運動する幼虫を顕微鏡下で確認しながら、これを直ちに培養検査にまわしても結果が陽性にならない例をしばしば経験することから、本法では幼虫の生死以外に何らかのデリケートな要因も介在すると考えている。

ウォッチグラス培養法は、数gの糞塊をウォッチグラスに取り、これに少量の水を加えた後、高さ2-3mmに水を張ったペトリ皿内に入れて蓋をし、培養する方法である。数日後、糞塊の周囲やペトリ皿内の水を注意深く検査すると、糞塊の周囲には発育中の自由生活世代の虫体を、ペトリ皿の水中には主にフィラリア型の幼虫を見出すことができる。この他に大量の糞便を炭末と混合し培養する方法もあるが、操作が繁雑でルーチンの検査には向かない。

最近、沖縄では普通寒天平板を用いた培養法が本症の有効な検査法として用いられている。これは、細菌培養のための普通寒天培地上に数gの糞塊を乗せ、培養する方法である。糞塊から這い出した幼虫が寒天板上に残す匍匐痕跡を検出する。本法では、幼虫の匍匐痕跡に沿って独得な細菌コロニーが発育することが診断に有力な手掛かりを与える。このような細菌コロニーの発育は、糞便や喀痰の培養検査に際してしばしば認められること、これが糞線虫幼虫によるものであることは既に知られていたが^{5,6)}、Arakakiら(1988)は、これを本線虫症の検査法として応用し、良好な検査結果が得られると報告した⁷⁾。他方、本法は非常に敏感な方法であることを反映して、

わずか数条の匍匐痕を認めるのみで、幼虫の存在を確認することが困難な場合もある。同様な匍匐痕は、鉤虫や一過性のラブジチス感染の際にも認められるので、匍匐痕のみから、これを本線虫感染者と判断することのないよう注意も必要であろう。たとえそれがわずかな可能性であっても、治療を必要としないラブジチス感染者を本症患者として治療することのないようにしなければならない。

以上に述べたごとく、本症の診断のために様々な糞便検査法が実施されてきた。しかしながら、これらの方法をもってしても、糞線虫の検査にとって満足する検出効果が得られないことが多い。直接塗抹法や口紙培養法は、本来、使用する糞便量が少ないことから、検出率は決して高くないことが知られている。例えば、直接塗抹法の場合、慢性感染者の約半数は5枚以上の標本を作成して、くり返し検査しなければ実際に感染を確認することはできないと言われ、約15%の例では20回以上の検査を重ねる必要があったと報告されている⁸⁾。また、別な調査によれば、この方法で感染者の9割を検出するためには、検体ごとに10時間以上に及ぶ観察が必要であると報告されている⁹⁾。口紙培養法でも、同様の結果が得られている。図1には口紙培養法

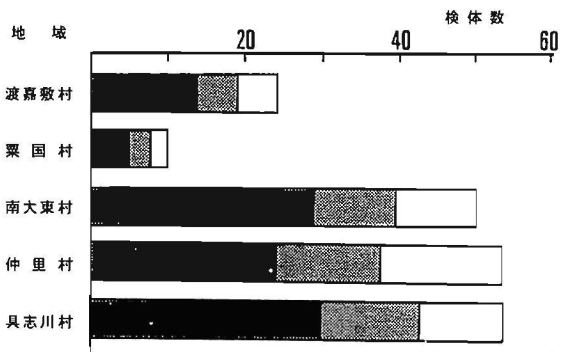


図1 口紙培養法における幼虫検出回数（陽性試験管数）¹⁾

糞便検体毎に3本の培養試験管を用意し、幼虫が陽性であった試験管数別の検体数を示した。3本中1本しか陽性とならない検体が半数以上を占めることから、本法でもくり返し検査することが基本的に重要であることが分かる。
 ■:1本のみ陽性, ▨:2本陽性, □:3本全て陽性

で陽性となった糞便検体数を陽性となった培養試験管数別に示した。糞便検体ごとに3本ずつの試験管培養を行なった場合、3本全てが陽性となる例は少なく（全体の1/4以下）、半数以上の検体で3本中1本の培養試験管しか陽性とならないことが分かる。また、検査を3日間続けた場合でも、そのうちの1回しか陽性とならなかった例が陽性者全体の半数以上を占めることが確認されている¹⁾。表2には、著者らが沖縄の住民を対象に、異なる方法を併用して3日間検査をくり返した結果をまとめて示した。

表2 各種糞便検査法の検出率の比較¹⁾

検査回数	検出率		
	塗抹法	沈殿法	培養法
1回	26.8	54.9	43.9%
2-3回	57.3	79.3	75.6

直接塗抹法、ホルマリン・エーテル沈殿法、口紙培養法で3日間（3回）検査を行ない、1回でも陽性となった人合計82名を100とした割合で示した。ホルマリン・エーテル沈殿法の検出率が一番良いが、この場合でも1回だけの検査で検出されるのは約半数である。

合計82名の本線虫保有者を見出すことができたが、このうち1回目の検査で陽性となったのは、直接塗抹法でわずか26.8%、口紙培養法とホルマリン・エーテル沈殿法で各々43.9、54.9%であった。検査を3日間くり返すことにより、検出率が各々57.3、75.6、79.3%にまで増加したが、いずれの方法でもそれ単独では100%の検出率を得るに至らないことが分かる。

沖縄では、最近まで住民の感染率は1-2%程度と見積もられていた。しかし、過去におけるこれらの陽性率は口紙培養法による1回のみ検査で、しかも検体ごとに1本の培養試験管で検査された場合の成績である。上記の事実を照らしてみると、その値は実際の感染率をかなり下回るものであることが容易に予想できる。これを確認するために、我々がいくつかの地域で詳細な調査を実施したところ、得られた陽性率は過去

と同じ地域で実施された調査での陽性率に較べて著しく高いものとなった（図2）¹⁰⁾。

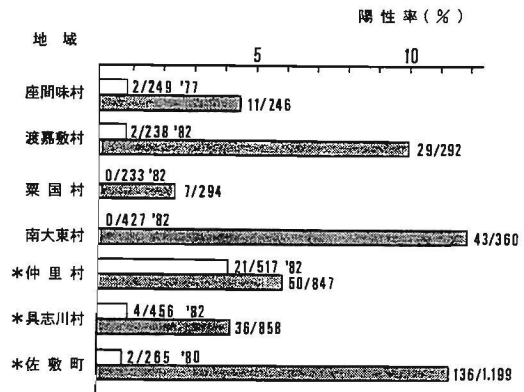


図2 沖縄県住民の糞綿虫陽性率の比較^{10),11)}

県下8地域において、最近、我々が実施した調査での陽性率を、同じ地域で過去に実施された調査の結果と比較したもの。過去の成績（□）は、口紙培養法による1回のみ検査で得られたものであるが、我々の調査（▨）では、ホルマリン・エーテル沈殿法など、いくつかの方法を組み合わせ、3日間検査をくり返した。種々の方法でくり返し検査することにより、過去の陽性率を大幅に上回る陽性率が得られる。なお、*の地域は、糞便検査に先立ち血清学的検査をスクリーニング法として導入した地域である。この場合、抗体陽性であって、その後の糞便検査を受けない者が少数あることから、計算によって推定感染率を求めると、仲里村で9.1%、具志川村で5.8%、佐敷町で14.0%となり、図に示した陽性率を若干上回ることになる。また、血清学的検査を導入することにより、糞便検査のみで実施した過去の調査に比べて受検者数が大幅に増加することにも注目したい。

以上に述べたごとく、糞便検査による本線虫症の検査は、比較的困難な面をまだ多く含んでおり、現在の段階で満足すべき検出効果をあげるためには、かなりの回数くり返し検査することが基本的に重要であると思われる。その原因は、本症の場合、糞便中に含まれる幼虫の数が極端に少ないことにある。体長わずか2-3mmのこの微小寄生虫は、1隻の雌成虫が1日に産出する虫卵の数が多くても50個程度と見積もら

れており、例えば蛔虫の雌が1隻で1日あたり百万個近くもの産卵をするのに比べると極めて少数である。大まかな計算では、仮に数十隻の本線虫が感染しているとして、この患者の糞便中に含まれる幼虫の数は1g当たりゼロないし数隻にしかならない。加えて、本線虫の感染様態は宿主の免疫応答によって大きな影響を受けていることは明らかであり、強い免疫応答のもとでは成虫の排虫促進、自家感染防御のほか、産卵抑制、孵化幼虫が粘膜内での組織反応に捕捉されるなどの免疫効果が発揮されていると考えられる。このため、糞便内への幼虫の排出はしばしば不規則で間欠的であると言われる。図3には、本症における感染動態と免疫応答の関係について我々の考えを示した。体内では、免疫応答の強弱と感染虫体数の増減が裏腹な関係で周期的にくり返されると考えられる。重症化はかかる免疫統御のバランスが崩れることによって引き起こされる。このような観点から、軽感染者にあっては検査に供した糞便材料中に幼虫が含まれていないケースがしばしばあると考えなければならない。かつてJones (1954) は、胆汁の検査で本線虫の感染が確認された患者100名について糞便検査を実施したところ、5回以上の検査を実施したにも拘らず、糞便中に幼虫が確認できたのは、このうちのわずか20名であったと報告している^{1,2)}。これはごく初期の報告であり、当時の糞便検査の精度が現在よりも大分低いことを考慮しても、糞便検査ではかなりの検出不能な例が存在することを示している。現在では、通常の糞便検査で検出されるのは良くても実際の感染者の約6割程度と言われており、事実、我々が血清学的方法で調査した場合でも、本線虫に対する高いレベルの抗体が検出され、感染が強く疑われる者のなかで、幼虫を糞便内に確認できるのは約50%程度である。今後、本症の糞便検査法がいかに鋭敏なものに改良されようと、本来、糞便による検査には常に一定の検出限界が存在することを認識しておく必要がある。通常、糞便検査の検出限界を越えるような軽感染者は臨床的に問題になるものではないが、本症の場合、かかる軽感染

者であっても、ひとたび免疫抑制状態を来させば、突如として重症化するリスクを負っていることを忘れる訳にはいかない。以上のような糞便検査の問題点をふまえ、次に本線虫症の血清学的診断法の現状と意義について紹介する。

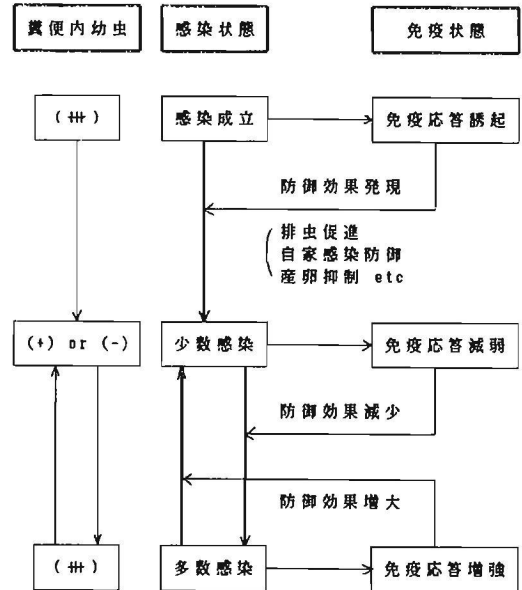


図3 宿主免疫応答と感染動態、糞便内幼虫数との関連

感染成立後、虫体数の増加とともに強い免疫応答が発現する。この免疫応答は消化管内からの成虫の排虫促進、自家感染防御、成虫の産卵抑制などのかたちで強い防御効果を発揮し、その結果、次第に虫体数は減少する。時にこのまま自然治癒することもあるが、多くの場合、軽微な不顕性感染として長期間持続する。軽感染状態が長く続くと、宿主の免疫応答も次第に減弱する。これにともなって自家感染が増強し、再び多数感染の状態へ移行する。体内では、このような多数感染と少数感染の状態が防御免疫と密接に関連したかたちで長期間にわたりくり返される。また、糞便内の幼虫数も感染状態に応じた増減をくり返すと考えられる。

III. 糞線虫症の免疫診断法

糞線虫症の血清診断の試みは、これまで内外を問わずあまり実施されていない。その理由と

して、本症は宿主の正常な免疫機能のもとでは一般に非病原性であると考えられていたことや、十分な量の抗原を確保することが当初から難かしいと考えられたことなどがあげられる。これまでに、表3に示したようないくつかの方法が本症の血清診断法として試みられている。

表3 糞線虫症の免疫診断法

検 査 法	抗 原	文 献
皮内反応 Skin test	<i>S. stercoralis</i>	13, 14, 15)
	<i>S. ratti</i>	16)
	<i>S. fuelleborni</i>	17)
間接蛍光抗体法 Indirect fluorescent antibody test	<i>S. stercoralis</i>	18, 19, 20)
	<i>S. stercoralis</i> & <i>S. ratti</i>	21)
酵素抗体法 Enzyme-linked immunosorbent assay	<i>S. stercoralis</i>	22)
	<i>S. stercoralis</i> & <i>S. ratti</i>	23)
	<i>S. ratti</i>	24, 25)
間接凝集反応 Indirect agglutination test	<i>S. stercoralis</i>	26)

一般に寄生虫病の血清診断を試みるにあたり、次の2つの条件が不可欠である。そのひとつは、感染者の大多数において検出可能なレベルの血清抗体が産生されていること、第2に、検査に使用し得る特異抗原が十分な量確保出来ることである。本線虫は消化管内寄生のかたちをとってはいるが、成虫は粘膜内に深く入りこんで寄生しており、また、しばしば自家感染を起こし、幼虫が血行性に体内移行していると考えられることから、他の組織、血液寄生性の寄生虫と同様、宿主に強い免疫応答が惹起されているものと予想される。他方、寄生虫は、一般に細菌やウイルスのように試験管やシャーレ内で培養、維持することができず、多くの場合、実験的に感染させた動物から虫体を採取する方法によらなければならない。本線虫はヒト以外にイヌやネコに感染することが知られているが、イヌやネコでは本線虫に対する感受性が著しく低く、高いレ

ベルの感染を維持するのが困難である²⁷⁾。従って、いかにして抗原としての虫体を安定的に確保するかは、本症の血清診断にあたって最初に解決しておかなければならない深刻な問題である。

A) 抗原の調製

前述したごとく、本線虫は動物を用いた実験感染で虫体を集めることが困難であること、たとえある程度の虫体が得られたとして、虫体が極めて微細であり、これから十分な量の診断抗原を調製することは困難と考えられる。国外では、ヒトから得た虫体をステロイド投与で免疫力を弱めたイヌに感染させ、そこから多数の虫体を集める努力がなされている²⁸⁾。また、糞線虫には多くの近縁な種類があり、ヒトの糞線虫を用いる代わりに動物由来の糞線虫種を用いることも行なわれている。表3には、ヒト糞線虫(*S. stercoralis*)以外で抗原として使用された動物由来の糞線虫種を示した。この場合、実験室内での継代、維持が容易なネズミの糞線虫(*S. ratti*)が用いられることが多い。写真1は、ネズミの糞線虫抗原に対する患者血清の反応性を免疫プロット法で検討したものである。患者血清は、ネズミの糞線虫抗原に対していずれも良好な反応性を示すことが分かる。寄生虫病の血清反応では、このような種間を越えた交叉反応を利用して検査する場合も多い。また、最近ではごく微量の抗原で実施できる鋭敏な血清検査法も種々開発されており、これらが本症の血清診断を現実的なものとした。

一方、沖縄では、比較的重症の本症患者が今でも散見されることから、我々の場合、患者糞便から直接フィラリア型幼虫を集め、抗原として用いている²⁹⁾。幼虫の大量採取を目的として、我々は通常的口紙培養法に準じ、横長の大型の口紙に型通り糞便を塗布し、これを何枚も重ねて円筒状に巻き上げたものを、水を張った適当な容器内に立て、28℃で培養する方法を行なっている。同じものを数個分用意することによって、患者のほぼ全便を培養することが可能である(写真2)。数日すると、容器内の水中に無

数の幼虫が泳ぎ出してくるので、これを毎日集める。この方法によって写真3に示したような大量の、しかも抗原抽出に適した清浄な幼虫浮遊液を得ることができる。これをよく洗浄後、ホモジナイザーで磨砕し、高速遠心した上清を抗原とする。必要に応じ、沈査を更に界面活性剤を加えたPBSで抽出し、その上清を予備の抗原として保存する。

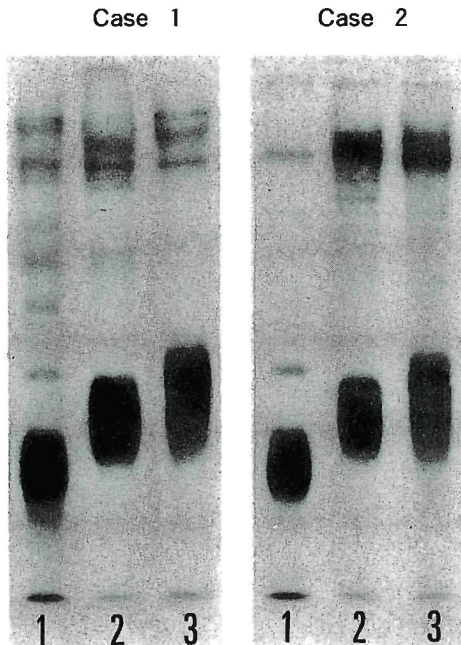


写真1 免疫プロット法による患者抗体の反応性

2名の患者血清のヒト糞線虫 (*S. stercoralis*; lane 1) およびネズミの糞線虫2種 (*S. venezuelensis*; lane 2, *S. rattii*; lane 3) 抗原に対する反応性を比較したものの。患者血清はヒト糞線虫と同様、ネズミの糞線虫抗原に対しても強い交差反応性を示す。この交差反応を利用して、ヒトの糞線虫の代わりにネズミの糞線虫を診断用抗原として用いることができる。

得られた抗原液と患者血清の間で寒天ゲル内沈降反応を実施すると、写真4に示したごとく、患者血清との間で明らかな沈降線の形成を認め、患者血清での特異抗体の存在と抽出抗原での抗原活性の存在を確認することができる。しかし、ゲル内沈降反応は比較的多量の抗原を必要とし、

鋭敏性にも欠けることから、本症のルーチンな血清検査法としては適当な方法でない。このため、微量の抗原で実施し得る方法を以下に試みた。

B) 酵素抗体法 (ELISA)

本法は、マイクロプレートのウエル内壁に抗原を吸着させ、これに患者血清を反応させた後、反応した抗体を酵素標識二次抗体によって検出するものである。抗体価を血清の希釈倍数として示すのではなく、決められた血清濃度での反応の強さを酵素反応 (発色反応) の強さとして比較できる (写真5)。このため、マイクロプレートを用いる本法では、使用する患者血清、抗原はごくわずかで済む。

我々の方法では、1検体当りの抗原量は約3 μ gである。図4には、この方法で測定した患者の血清抗体レベルを対照者のそれと比較して示した。患者群は寒天板培養法のくり返し検査で感染が確認された住民計107名である。患者群で明らかに高い抗体レベルが検出される。このような検討では、通常、対照群の平均値+3SDをもって陽性基準とするが、この結果から得られる陽性基準値はOD値で約0.5であった。これを基準値とした場合、患者で血清抗体陰性と判定される者 (false-negative) はわずかに4.7% (5/107)である。図5は、沖縄の2地域で1,757名の住民を対象に実施した血清検査の結果を示した。上記の陽性基準値で見ると、住民の大多数は基準値以下の陰性と判定され、陽性反応と判断される者は全体の約20%であった。これらの陽性反応を呈した者が本線虫の感染を受けている可能性が強いと判断されるが、実際どの程度に本線虫の感染が確認されるかについては後述する。酵素抗体法は、反応の鋭敏性、特異性において優れた方法であり、本症の血清診断法として最もよく利用されている。本法は、あらかじめ決めておいた血清濃度で検査を実施するため、検体ごとに血清希釈系列を準備する必要がない。従って、一度に多数の検体を検査するような集団検査におけるスクリーニング法として非常に便利であると考えられる。他方、本法は

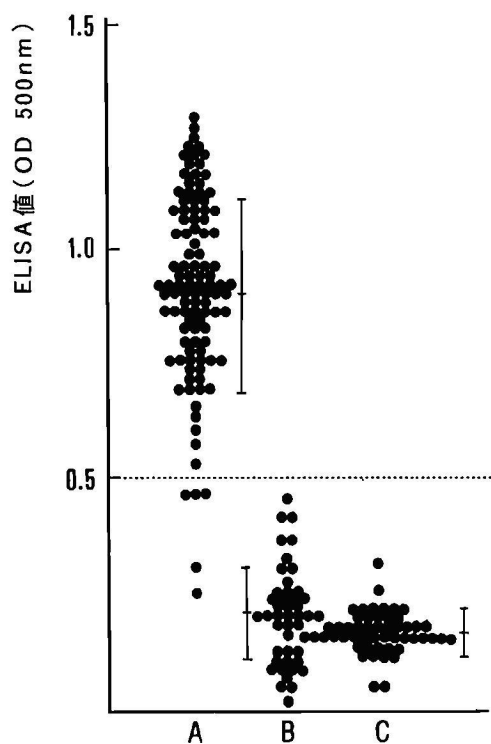


図4 酵素抗体法による糞線虫感染者および対照者の抗体レベル¹¹⁾

感染者で明らかに高いレベルの血清抗体が検出される。破線は沖縄県の非感染者の平均+3SDで求めた陽性基準値を示す。

A：感染者血清（大里村住民） B：陰性者血清（沖縄県住民） C：陰性者血清（新潟県住民）

1) 抗原のマイクロウエルへの感作、2) 患者血清の反応、3) 酵素標識抗体の反応、4) 基質反応といったいくつかの複雑な実験手順を含んでおり、検査には最低でも半日を必要とする。このため、一般の検査室において随時持ち込まれる個々の患者血清を検査する方法としては、検査手順の複雑さの面で問題が残る。我々は、血清学的診断を一般の検査室でのルーチンな検査として実施できるよう、さらに簡便な間接凝集反応による検査法を検討した。

C) 間接凝集反応

本法は、ヒツジ赤血球など、適当な担体に抗

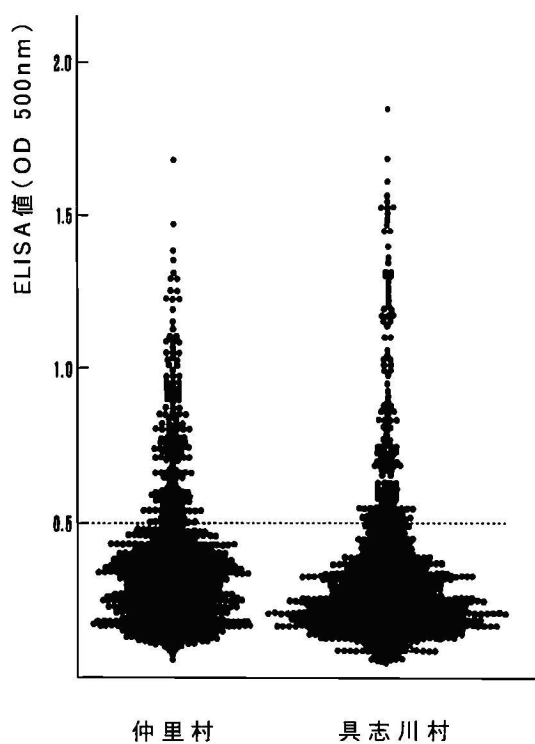


図5 久米島住民のELISA抗体値の分析¹⁰⁾

合計1,757名の住民血清についてELISA抗体値を測定し、プロットしたものの。破線は沖縄における陽性反応基準値を示す。およそ20%が基準値を越える抗体値を示した。その後の糞便検査はこれら抗体陽性者について実施すればよい。

原を吸着させ、これを患者抗体と反応させて凝集の有無を見るものである。担体粒子に抗原を感作するのに多大の時間を要するが、あらかじめ抗原感作粒子を作成しておけば、患者血清と抗原感作粒子を混ぜるだけの簡単な操作で検査が実施できる。これに要する時間はわずか数分で済み、2-3時間後には結果の判定もできる。また、本法では、酵素抗体法で使用するようなマイクロリーダーやプレートウォッシャーなどの特別な機材も必要としないなど、通常の病院検査室で実施するうえで多くの利点を備えている。本法は、もともとBoyden(1951)³⁰⁾によってヒツジ赤血球を担体とした間接赤血球凝集反

応として開発されたものであるが、赤血球は長期間の保存に耐えないことから、様々な人工粒子を担体粒子として使用することが試みられている。我々は、最近、富士レビオ社が開発したゼラチン粒子を担体とした本症の間接凝集反応を試みた^{26,31)}。写真6には、ヒツジ赤血球とゼラチン粒子を用いた間接凝集反応を比較して示した。抗原は、前記の酵素抗体法に用いたと同じものを用い、抗原濃度100 μ g/mlとしたものを等量の3%濃度の担体に感作し、使用した。ゼラチン粒子を用いた間接凝集反応は、従来のヒツジ赤血球間接凝集反応とはほぼ同等、もしくはそれ以上の鋭敏性を示す結果が得られた。また、得られた凝集抗体価は、前述の酵素抗体法による抗体レベルとも密接な相関を示した。(図6)。

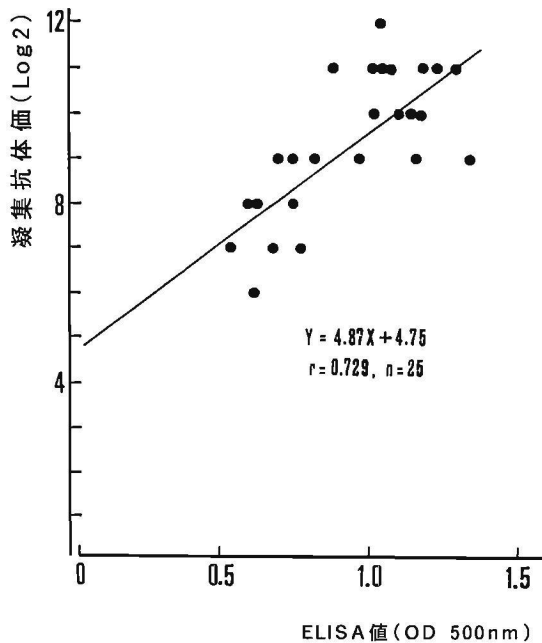


図6 ゼラチン粒子凝集反応と酵素抗体法による抗体値の関係²⁶⁾

糞線虫感染者25名について測定した凝集抗体価とELISA値の間には有意 ($p < 0.01$) の相関が認められる。

図7には、92名の患者血清と60名の対照者血清について、本法で測定した凝集抗体価を示した。血清希釈倍数で64倍を越える抗体価を示す

のは患者血清のみであり、対照者ではその82%が8倍以下の凝集抗体価であった。間接凝集反応は、通常、8倍以下の血清希釈度では非特異反応が強くあらわれることから、16倍以上の抗体価をもって陽性と判定される場合が多い。仮にこれを陽性判定基準とすると、患者群において抗体陰性 (false-negative) と判定されるのはわずか2.2% (2/92)、逆に抗体陽性 (false-positive) と判定される対照者は1/60 (1.7%) であった。本法の最大の利点は、前述したごとく、特別な実験機材を必要としない簡便性にある。本法で使用するゼラチン粒子はゼラチンとアラビアゴムで作成した均一な微細粒子であり、抗原吸着後、適当な安定剤を加えて凍結乾燥し、長期間保存できること、粒子自体が抗原性に乏しく、従ってヒツジ赤血球を用いる場合のようにあらかじめ血清を担体で吸収したり、非働化するなどの面倒な前処理が必要ないなどの利点を有している。また、従来の人工粒子は無色であるが、本粒子は鮮やかな紫色に着色しており、凝集パターンの判定が非常に容易である。我々は、本法のために写真7に示すような検査キットを作成し、いくつかの病院検査室で糞線虫症の血清診断法として試用しつつある。

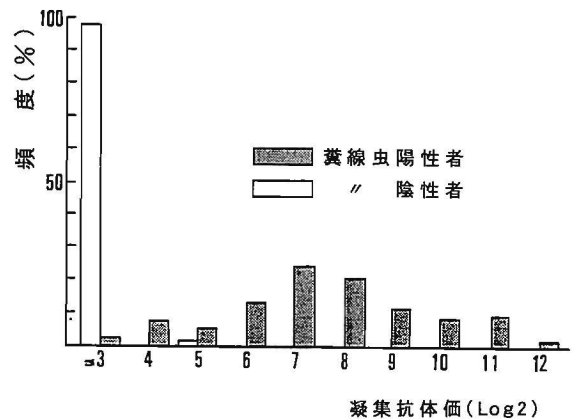


図7 糞線虫感染者および対照者におけるゼラチン粒子凝集抗体価の比較²⁶⁾

抗体価は2峰性をもって分布し、ピークのひとつは陰性反応域に、もうひとつは陽性反応域に認められる。そして、感染者のほとんどが陽性ピークに、対照者は陰性ピークに含まれるのが分かる。

IV. 血清診断法の応用と意義

本症の血清診断を実施することの最大の目的は、初めに述べたように、糞便検査による診断の限界を補うことにある。言うまでもなく、血清診断は間接診断であり、抗体陽性者がすなわち感染者を意味しない。表4には、沖縄の3地

表4 酵素抗体法を応用した糞線虫症集団検査の結果 (1989-1990)¹¹⁾

地 域	酵素抗体法	糞便検査	推定陽性率
	陽性数/検査数 (%)	陽性数/検査数 (%)	
仲里村	191/858 (11.8)	36/73 (49.3)	5.8
具志川村	144/849 (19.0)	59/93 (53.8)	9.1
佐敷町	332/1,199 (27.7)	136/268 (50.7)	14.9
計	577/2,906 (19.9)	222/434 (51.0)	10.1

血清学的スクリーニングの結果、糞便検査が必要と認められる者は1-3割程度である。これら抗体陽性者の約8割は糞便検査を受検しており、そのうち約半数に実際に本線虫の感染が確認できた。抗体陽性者全員が糞便検査を受けたと仮定して、計算によって求められる推定陽性率もかなり高いものである。

なお、この調査では任意に選び出した抗体陰性者41名中感染が確認された者はなかった。

域で酵素抗体法を実際の集団検診の場にスクリーニング法として応用した際の結果をまとめて示した。これらの方法で抗体陽性と判断された者で、その後の糞便検査で実際に幼虫が確認されたのは51%であった。残りの抗体陽性者は恐らく糞便検査での検出限界を越えるような軽感染者、および感染既往者と思われる。ごく少数の非特異的陽性者 (false-positive) も含まれるかも知れない。いずれにしても、血清検査法を本症の診断に応用することは、感染の疑いのある者だけを選び出すという点にその目的がある。このことは、とり分け多数の検体を一度に検査する必要のある集団検査で有効である。なぜならば、集団検査における検出率の低さは、往々にして多数の糞便検体を一度に検査することに

由来する検査精度の低下が原因となる。従って、血清学的スクリーニングで検査対象者を少数に絞りこむことができれば、その後の糞便検査を精度の高い徹底したものにすることができる。また、近年、わが国では各種寄生虫病の著しい減少傾向を反映して、かかる集団検診において糞便検査を受診する対象者は著しく少なくなってきている。この傾向は、今後、益々顕著になるものと予想される。この点、血清検査であれば、成人病検診などの目的で集められた多数の住民血清を用いて検査することができ、続いて抗体陽性者に対して感染の疑いがある旨連絡することによって高い受検率をあげることもできる(図2)。これまでに我々が実施してきた調査では、抗体陽性であることを連絡した住民の8割以上が実際に糞便検査を受けており、この中にはかつて一度も糞便検査を受けたことがない者も多数含まれている。集団検診の目的は、これによって多数の住民の感染状況を調べ、その治療等をもって本症の対策に当てるというのであれば、検査対象者のわずかに数割程度しか糞便検査を受検しないという現在の集団検診のシステムそのものを見直す必要があると考えている。

また、本症の血清学的検査を実施することは、個々の症例の検査にあっても、次のような効果が期待できる。沖縄では、これまでに多くの本症重症化症例の発生をみているが、その中には不用意な免疫抑制療法を受けたり、悪性疾患の経過中、本症に対する十分な注意が払われなかったために重症化した例も多い。そして、その背景には多くの場合、糞便検査によって本線虫の感染が確認できなかったことがある。我々は、沖縄で本症が重症化するような何らかのリスクを負っている患者では、本症の血清学的な検査を行っておくことが基本的に重要であると考えている。たとえ糞便検査で感染が確認されない場合であっても、ステロイド療法など、何らかの免疫低下を来す恐れのあるケースでは血清抗体を調べ、もし陽性であれば、本症に対する注意深い経過観察が必要となってくる。

寄生虫病の血清学的検査は、糞便検査と比べてどちらが効果的かという観点から評価されが

ちであるが、これらは並列的に比較されるべき性格のものでなく、糞便検査の検出限界を補い、これを効率化するための手段として使われてこそ有効である。このような立場から、今後沖縄において実施すべき糞線虫症の集団検査、および個々の症例の検査システムについて、我々の考えを図8にまとめて示した。

以上に述べた検査、診断上の効果に加え、血清学的検査は本症の病態や治療効果の検討にも応用される。前にも述べたが、本症は宿主の著明な免疫低下状態のもとで重症化する。今日まだ、その免疫学的背景は不明であるが、宿主の血清抗体を測定することによって、その患者の重症化のリスクを推測できるかどうか興味ある問題である。糞便内に多数の幼虫を排出しながら、血清中に高レベルの抗体を検出し得ないような患者は、現に重症化しつつあるか、あるいは

は将来重症化する危険性の大きい患者と考えることができるか否か、我々はまだ適当な判断材料を得ていない。これまでのところ、血清抗体レベルと糞便内幼虫数でみた感染の度合いの間には何ら相関が見られないこと^{2,2)}、過剰感染を来たした症例のなかで血清抗体が検出できなかった例や逆に高い抗体レベルが維持されていた例など^{3,2,3,4)}、患者の抗体レベルと病態に関する報告はまちまちである。サルを用いた感染実験でも血清抗体レベルと重症化の間には必ずしも関連がみられないことが報告されている^{3,5)}。この点について、我々もマウスを用いた実験モデルで研究を進めているが、免疫欠損マウス（ヌードマウス）に大量の血清抗体を移入しても、このマウスに何ら有効な防御免疫を賦与できないことを確認している^{3,5)}。

このような高いレベルの血清抗体のもとでも

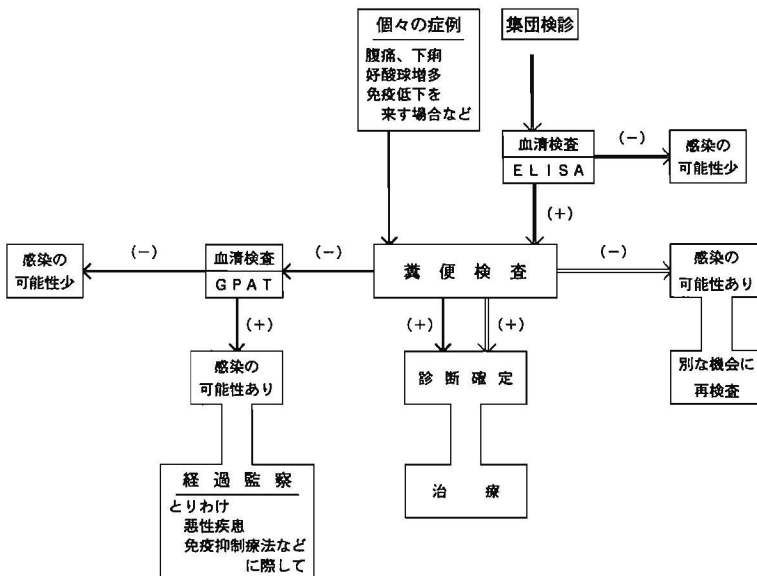


図8 糞線虫症の診断および集団検査のためのフローチャート

本症が疑われるケースや本症の検査が必要とされる個々のケースは、まず糞便検査を行ない、陰性者にはさらに血清学的検査を実施する。一方、集団検診では、糞便検査に先がけて血清検査を行ない、抗体陽性者にはさらに糞便検査をくり返して実施し、感染の有無を確認する。個々の症例の場合、簡単に実施できる間接凝集反応が、集団検査では一度に多数の検体を検査できる酵素抗体法が便利である。血清学的検査を実施することによって、集団検査では糞便検査の対象者を感染の恐れのある者だけに絞ることができる。また、個々の症例の検査では、糞便検査の結果いかに拘らず、抗体陽性であれば注意深い経過観察の必要性が示唆される。このことは、特に免疫抑制療法を受けるなど、重症化のリスクを負っている者では、是非ともチェックすべき検査事項である。(ELISA：酵素抗体法、GPAT：間接凝集反応)

重症化する症例が存在することから、我々は、本症の重症化にとって宿主の免疫応答が誘起されるか否かが直接的な問題でなく、その免疫応答のもとで虫体に対していかに有効なエフェクター機構が発動されているかが重要であると考えている。このことは、同じ免疫不全症のなかでも、沖縄のATL患者の間で重症化した本症々例がしばしば報告されるのに対し、国外ではAIDS患者の間で重症化する例が少ないという指摘との関連で、今後明らかにすべき興味ある問題を含んでいる。

最後に、本症は比較的治療が難しく、これまでに種々の治療薬による駆虫が試みられてきた。沖縄では、より安全で治療効果の高い薬剤の適用、および駆虫方法の検討が活発に進められており、その成果が期待されている。他方、これまでの様々な治療成績をみる限り、ある駆虫薬剤に対する評価は必ずしも一定していないことが目につく。一般に治療から後検査までの期間が短い場合、治療効果は高く、効果判定が後になるにつれて治癒率は低下する。これは本症においてしばしばみられる再発のためである。かかる治療後の効果判定に血清学的検査を応用することも試みられている。Grove(1982)は、サイアベンダゾールで治療後6カ月目の血清検査を行ない、その多くで著明な血清抗体価の低下を報告している³⁷⁾。しかし、その中の約20%に相当する例で、6カ月後の抗体価が約1/2に低下するのみであり、これらの例では完全に治癒したのか、あるいは治療により虫体数が激減したために生じた一時的な抗体価の下降であったのかはまだ明らかではない。我々は現在、治療1年後の抗体価の比較を行っており、血清抗体価の変動をもって駆虫効果の判定に応用し得るか否かさらに検討を進めている。

V. 結 言

沖縄の糞線虫症対策を考えるにあたり、その基本となる検査法上の問題点について述べた。糞便検査では、種々の検査法を組み合わせたくり返しの検査を実施することが、目下のところ

最良の方法である。しかも、本症の場合、その結果が陰性であっても、感染の可能性を否定し得ないと考えることが最も重要である。

かかる問題を解決する手段として、我々は2つの血清学的検査法を確立した。これらの方法は、各々の検査特性に応じて、集団検査におけるスクリーニング法としてまた、個々の症例の重症化対策を図る手段として有効であると考えられる。血清学的検査法が、今後、集団検査のスクリーニング法として実際の糞線虫症対策に応用されるか否かは、これに関わる行政、もしくはその関係者のポリシーに委ねられるとして、日常の臨床に携わる者にとっても、本線虫に対する血清抗体を検査することは本症の重症化予防という立場から、糞便検査以上に大切なことと思われる。今後、かかる血清学検査法が広く応用され、本症の効果的な予防対策が図られることが期待される。

沖縄では今日、汚染された土壌からの本線虫の新しい感染は殆んどないと考えられ、従って本症の流行は、あまり時を待たずして次第に終息するものと考えられる。しかしながら、沖縄において臨床に携わる者にとって、本症は今しばらくはup-to-dateな対応が必要な寄生虫病である。

本編で紹介した研究は、以下の研究助成を受けて実施された。

文部省科学研究費：特定研究1（昭和57-59年度）、一般研究C（昭和59-60、61-62年度、平成1-2年度）、総合研究A（昭和61-63年度）；厚生科学研究費：医療研究事業（昭和59-61年度）；沖縄県疾病研究財団研究助成（昭和63年度）；大山健康財団研究助成（平成1年度）

VI. 参考文献

- 1) 佐藤良也、真栄城純子、川平稔、鈴木信、高井昭彦、長谷川英男、安里龍二、池城毅：Micro-ELISAによる糞線虫症集団検診の試み、寄生虫誌 33（6）：501-508,1984.
- 2) 佐藤良也：沖縄における糞線虫症浸淫の実

- 態、医学のあゆみ 147 (7) : 603, 1988
- 3) Sato, Y. and Shiroma, Y.: Concurrent infections with *Strongyloides* and T-cell leukemia virus and their possible effect on immune responses of host. Clin. Immunol. Immunopathol. 52: 214-224, 1989.
 - 4) Shiroma, Y., Kiyuna, S. and Sato, Y.: Clinical studies on human strongyloidiasis in Okinawa, Japan. Jpn. J. Parasitol. 39(3): 277-283, 1990.
 - 5) Harris, R.A., Musher, D.M., Fainstein, V., Young, E.J. and Clarridge, J.: Disseminated strongyloidiasis. Diagnosis made by sputum examination. J. Am. Assoc. 244: 65-66, 1980.
 - 6) Panosian, K.J., Marone, P. and Edberg, S.C.: Elucidation of *Strongyloides stercoralis* by bacterial-colony displacement. J. Clin. Microbiol. 24: 86-88, 1986.
 - 7) Arakaki, T., Hasegawa, H., Asato, R., Ikeshiro T., Kinjo, F., Saito, A. and Iwanaga, M.: A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. J. Trop. Med. 16: 11-17, 1988.
 - 8) Grove, D.I.: Strongyloidiasis in Allied ex-prisoners of war in south-east Asia. Brit. Med. J. 280: 598-601, 1980.
 - 9) Pellelier, L.L.: Chronic strongyloidiasis in World War II Far East ex-prisoners of war. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 55-61, 1984.
 - 10) Sato, Y.: Epidemiology of strongyloidiasis in Okinawa. in: Collected Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiasis. Vol. III, (Yokogawa, M., Hayashi, S., Kobayashi, N., Kojima, S., Suzuki, N. & Kunii, C. ed), pp 20-31, The Asian Parasite Control Organization, Tokyo, 1986.
 - 11) Sato, Y., Toma, H., Takara, M. and Shiroma, Y.: Application of enzyme-linked immunosorbent assay for mass examination of strongyloidiasis in Okinawa, Japan. Int. J. Parasitol. 20(8): 1025-1029, 1991.
 - 12) Jones, C.A. and Abadie, S.H.: Studies in human strongyloidiasis. II. A comparison of the efficiency of diagnosis by examination of feces and duodenal fluid. Am. J. Clin. Pathol. 24: 1154-1158, 1954.
 - 13) Dafalla, A.A., Satti, M.H. and Nur, A.O.: Cutaneous larva migrans in Northern Kordofan, Sudan; a preliminary report. J. Trop. Med. Hyg. 80: 63-67, 1977.
 - 14) Rifaat, M.A., Salem, S.A., Abdel-Aar, T.M. and Attia, M.M.: Effect on temperature on the serological activity of the antigen of *Strongyloides stercoralis*. J. Egyptian Soc. Parasitol. 9: 81-87, 1979.
 - 15) Sato, Y., Otsuru, M., Takara, M. and Shiroma, Y.: Intradermal reactions in strongyloidiasis. Int. J. Parasitol. 16: 87-91, 1988.
 - 16) Tribouley-Duret, J., Tribouley, J. and Pautrizel, R.: Interet des tests d'allergic cutanee pour le diagnostic de la strongyloïdose. Bull. Soc. Pathol. Exo. 69: 360-367, 1976.
 - 17) Brannon, M.J.C. and Faust, E.C.: Preparation and testing of a specific antigen for diagnosis of human strongyloidiasis. Am. J. Trop. Med. 29: 229-239, 1949.
 - 18) Coudert, J., Ambroise-Thomas, P., Kien, T.T. and Pathier, M.A.: Diagnostic serologique de l'anguillulose humaine par immunofluorescence (resultats preliminaires). Bull. Soc. Pathol. Exo. 61: 74-80, 1969.
 - 19) Dafalla, A.A.: The indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of

- strongyloidiasis. *J. Trop. Med. Hyg.* 75: 109-111, 1972.
- 20) Genta, R.M. and Weil, G.J.: Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. *Lab. Invest.* 47: 87-90, 1983.
- 21) Grove, D.I. and Blair, A.J.: Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 344-349, 1981.
- 22) Sato, Y., Takara, M. and Otsuru, M.: Detection of antibodies in strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 51-55, 1985.
- 23) Neva, F.A., Gam, A.A. and Burke, J.: Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. *J. Inf. Dis.* 144: 427-432, 1981.
- 24) Tribouley-Duret, J., Tribouley, J., Appriou, M. and Megraud, R.N.: Application de test E. L. I. S. A. au diagnostic de la strongyloidose. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 53: 641-648, 1978.
- 25) Carroll, S.M., Karthigasu, K.T. and Grove, D.I.: Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 706-709, 1981.
- 26) Sato, Y. and Ryumon, I.: Gelatin particle indirect agglutination test for serodiagnosis of human strongyloidiasis. *Jpn. J. Parasitol.* 39: 213-219, 1990.
- 27) Sandground, J.H.: Some studies on susceptibility, resistance, and acquired immunity to infection with *Strongyloides stercoralis* (Nematoda) in dogs and cats. *Am. J. Epidemiol.* 8: 507-538, 1928.
- 28) Grove, D.I., Heenan, P.J. and Northern, C.: Persistent and disseminated infections with *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed dogs. *Int. J. Parasitol.* 13:483-490, 1983.
- 29) 佐藤良也、高井昭彦、真栄城純子、大鶴正満、城間祥行：糞線虫症診断用抗原の調製と酵素抗体法による免疫診断の試み、*琉大医学会誌* 6：35-49, 1983.
- 30) Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.* 93: 107-120, 1951.
- 31) Sato, Y., Toma, H., Kiyuna, S. and Shiroma, Y.: Application of gelatin particle indirect agglutination test for mass examination of strongyloidiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85(4): 515-518, 1991.
- 32) Genta, R.M., Douce, R.W. and Walzer, P.D.: Diagnostic implications of parasite-specific immune responses in immunocompromised patients with strongyloidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 23: 1099-1103, 1986.
- 33) Badaro, F., Carvalho, E.M., Santos, R.B., Gam, A.A. and Genta, R.M.: Parasite-specific humoral immune responses in different clinical forms of strongyloidiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 149-150, 1987.
- 34) Sato, Y., Inoue, F., Matsuyama, R. and Shiroma, Y.: Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 403-406, 1990.
- 35) Genta, R.M., Schad, G.A. and Hellman, M.E.: *Strongyloides stercoralis*: parasitological, immunological and pathological observations in immunosuppressed dogs. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 34-41, 1986.
- 36) Sato, Y. and Toma, H.: Effects of spleen cells and serum on transfer of

immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in hypothymic (nude) mice. Int. J. Parasitol. 20: 63-67, 1990.

- 37) Grove, D.I.: Treatment of strongyloidiasis with thiabendazole: an analysis of toxicity and effectiveness. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 114-118, 1982.

写真2 糞便の大量培養法

写真3 糞線虫幼虫浮遊液

大量培養された糞便から集めたフィラリア型幼虫。この幼虫を磨碎して抗原抽出を行う。

写真4 患者血清と抽出抗原を用いたゲル内沈降反応

周囲のウェルには3倍に濃縮した患者血清 (No 1-4) と対照血清 (C)を、また、中央のウェルには抽出抗原を入れてある。患者血清との間でのみ沈降線 (抗原抗体複合体) の形成が認められる。本法は抗原抗体反応の存在を直接確かめられる簡便な方法であるが、使用する抗原量がかかなり多く、また、被検血清を濃縮する必要があるなど、鋭敏性に欠ける面があり、本症の診断法には向かない。

写真5 酵素抗体法 (ELISA)

マイクロプレートを用いたmicro-ELISA法。それぞれのウェルには50倍に希釈した血清検体を入れ、反応させる。抗原抗体反応量に応じて橙色の発色反応を呈するので、その発色の程度を吸光度 (OD) として測定し、その値から陽性判定を行なう。沖縄県住民血清の間で多数の陽性反応を認めるが、本症の非流行地である新潟県住民血清では陽性反応を呈するものはない。

写真6 間接凝集反応

ゼラチン粒子 (GP) とヒツジ赤血球 (SRBC) を担体とした凝集反応パターンを比較して示した。担体がウェルの底に点状に沈澱するのは凝集陰性パターン、底面全体に膜状に沈澱するのが陽性パターンである。血清の希釈倍数が上がるにつれて陽性パターンから陰性パターンに転じるのが分かる。陽性反応を示す最大希釈倍数をもって凝集抗体価とする。患者血清 (No 1-9) は1例を除いていずれも強い陽性反応を示すが、対照血清 (No 10-12) では陽性パターンを認めない。血清の希釈系列の1列目 (1:8) には抗原を感作していない担体粒子 (Tc) のみを入れ、コントロールとしてある。

写真7 ゼラチン粒子凝集反応検査キット

キット内容として、凍結乾燥した抗原感作粒子①、未感作コントロール粒子②、粒子溶解液③、血清希釈液④をセットとしてあり、これにリジットタイプのマイクロプレート⑤ (これは小数の検体を検査するのに都合が良いように2列分離型のモジュールタイプを使用する)、ドロッパー⑥を添えてある。他に、血清希釈用ループ⑦が必要であるがこれは通常の検査室であれば常備されているものである。本法は、最低限これだけのものがあれば実施できる。

