症　例

パプアニューギニアで感染し虫卵の遺伝子学的同定により セイロン鉤虫症と診断した１例

[1] 市立奈良病院感染制御内科，[2] 奈良県立医科大学病原体・感染防御医学講座，
[3] 同　感染症センター（*現　国立国際医療研究センター病院国際感染症センター）
片浪　雄一[1]*　中村（内山）ふくみ[2][3]　佐藤　公俊[1]
王寺　幸輝[2]　吉川　正英[2]　三笠　桂一[3]

（平成 29 年 2 月 13 日受付）
（平成 29 年 3 月 28 日受理）

Key words: *Ancylostoma ceylanicum*, Papua New Guinea, PCR

序　文

ヒトの鉤虫症は，主にアメリカ鉤虫（*Nacator americanus*）あるいはズビニ鉤虫（*Ancylostoma duodenale*）を原因とする寄生虫症で，感染幼虫が経皮感染した部位の点状皮膚炎，幼虫の肺移行に伴う一過性の呼吸器症状（単純性肺好酸球増多症），成虫の寄生・吸血による消化器症状，貧血が見られる[1]．症状の有無は感染する鉤虫の数に依存し少数感染では無症状である．セイロン鉤虫（*Ancylostoma ceylanicum*）はイヌやネコに感染が見られるが，アメリカ鉤虫・ズビニ鉤虫と同じようにヒト体内で成虫に発育し鉤虫症の原因となる人獣共通寄生虫である[2]．

鉤虫症の診断は，糞便中の虫卵を検出することによる．しかし，虫卵の形態で鉤虫種を鑑別するのは困難であり，培養によって得られた感染幼虫の形態を詳細に観察することで種の同定が行われてきた[3]．近年，東南アジアの鉤虫症流行地でヒトに感染している鉤虫種を遺伝子学的に同定したところ，アメリカ鉤虫に次いでセイロン鉤虫が多いことが報告された[2]．今回，パプアニューギニアからの帰国後，健康診断で好酸球数増多と検便により寄生虫症が疑われ，虫卵の遺伝子学的同定でセイロン鉤虫症と診断した１例を経験したので報告する．

症　例

患者：26 歳，男性．

主訴：なし．

現病歴：生来健康．青年海外協力隊員としてパプアニューギニアのマヌス州ロレンガウに２年間滞在した．現地では農業関連のプロジェクトに携わり，畑での作業や巡回中は裸足で歩いていた．帰国後健診の糞便検査で鉤虫卵が検出されたため，精査加療目的で当院に紹介となった．パプアニューギニア滞在中，下腿の点状皮膚炎の記憶はなく，呼吸器症状，腹痛，腹部違和感，下痢などの症状はなかった．健診後，当院を受診するまでの１カ月間も無症状であった．

既往歴：１年前に三日熱マラリア．

喫煙歴：なし．

飲酒歴：なし．

海外渡航歴：６年前にタイ．４年前にメキシコ，アメリカ，カナダ．３年前にインド．

トラベラーズワクチン接種歴：A 型肝炎ワクチン，B 型肝炎ワクチン，破傷風トキソイド（接種時期不明）．

初診時現症：身長：149cm，体重：48kg，体温 36.8℃，血圧：98/59mmHg，脈拍数：62/分・整，呼吸数：16 回/分，SpO_2：96%（室内気）．眼瞼結膜に貧血を認めず，眼球結膜に黄染認めず．頭頸部に異常所見なし．呼吸音はラ音聴取せず．心音では心雑音や過剰心音を聴取せず．腹部は平坦，軟で圧痛なし．四肢には浮腫なし．皮膚に皮疹や皮膚炎は認めなかった．

初診時検査（Table 1）：白血球数は正常範囲内で，好酸球数増多（好酸球 20.9%；好酸球数 1,636/μL）を認める以外，異常所見はなかった．

初診後経過：当院初診時に再度糞便検査を施行した．飽和食塩水浮遊法で鉤虫の虫卵を認めた（Fig. 1 a）．厚層セロファン法で虫卵数を定量化したところ，糞便 1g あたり約 220 個であった．パモ酸ピランテル

別刷請求先：（〒145-0065）東京都大田区東雪谷 4―5―10
東京都保健医療公社荏原病院感染症内科
中村（内山）ふくみ

10mg/kg，単回投与で治療を行い，治療後 28 日目の糞便検査で虫卵の陰性化を確認した．同時に行った血液検査で好酸球数は基準値内に低下していた（好酸球 4.9%；好酸球数 317/μL）．

鉤虫種の同定

形態学的に鉤虫種を同定するために，原田・森濾紙培養法を行い感染幼虫の回収を試みた．培養 7 日目に幼虫が 1 個体得られたが（Fig. 1b），発育不良で死滅しており，典型的なフィラリア型幼虫が得られなかったため，形態観察による種の同定は不可能であった．

同時に虫卵を材料とした遺伝子学的同定を試みた．飽和食塩水浮遊法で虫卵を分離し，15 個の虫卵から DNA を抽出した．以降の解析は長谷川らの方法[4]に準じ，リボゾーム DNA（rDNA）の internal transcribed spacers（ITS）-1/ITS-2 領域およびミトコンドリア DNA の *cytochrome c oxidase subunit 1*（*Cox1*）遺伝子を標的として PCR を行った．増幅された PCR 産物をゲルから抽出し，ABI-PRISM 3130 で遺伝子配列を解析した．その結果，rDNA 領域の 1738 塩基対と *Cox1* 遺伝子の 828 塩基対が解読できた．これらの配列について EBI の FASTA にて相同性検索を行ったところ，いずれもセイロン鉤虫との相同性が最も高かった．さらに ITS-1 と ITS-2 について，DNA Data Bank of Japan：DDBJ の BLAST で相同性検索をかけたところ，いずれもセイロン鉤虫に 100% 一致した．これらの遺伝子学的所見から，本患者に寄生していた種はセイロン鉤虫と確定診断した．なお今回得られたセイロン鉤虫の遺伝子配列は，DDBJ の DNA データベースに登録した（ITS 領域を含む rDNA：LC 036567，*Cox1*：LC036568）．

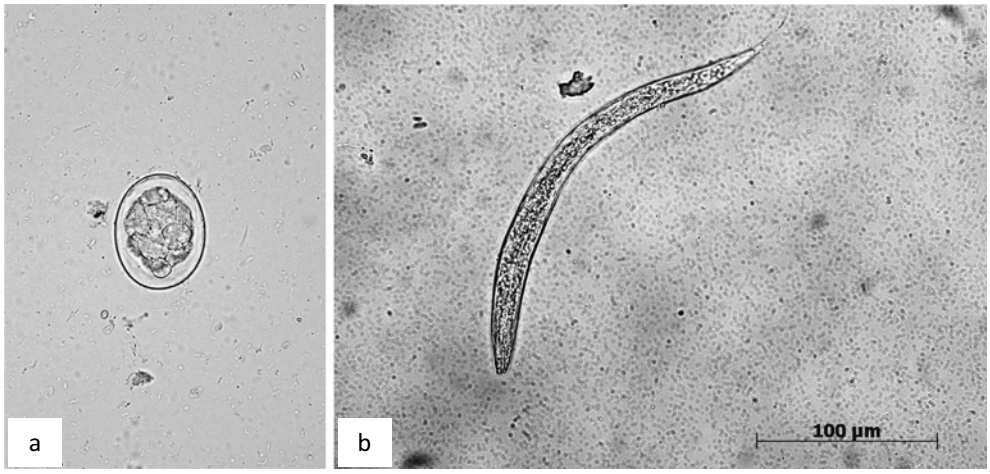
Table 1 Laboratory data on the initial visit

Hematology		Biochemistry	
WBC	7,830 /μL	TP	7.0 g/dL
Neutrophils	46.1 %	Alb	4.4 g/dL
Monocytes	5.1 %	T-Bil	1.0 mg/dL
Lymphocytes	27.6 %	AST	16 IU/L
Eosinophils	20.9 %	ALT	10 IU/L
Basophils	0.3 %	LDH	158 IU/L
RBC	473×10^4 /μL	ALP	217 IU/L
Hb	15.1 g/dL	γ-GTP	161 IU/L
Hct	44.7 %	BUN	13.9 mg/dL
PLT	32.6×10^4 /μL	Cre	0.75 mg/dL
		Na	143 mEq/L
		K	4.2 mEq/L
		Cl	0.15 mEq/L
		CRP	8.8 mg/dL

考　察

セイロン鉤虫はイヌやネコを終宿主とする鉤虫で，1911 年に Looss によって記載され，当初は前年に発見されたブラジル鉤虫のシノニムと考えられていた．さらなる形態的・生物学的研究により別種と証明された[2]．セイロン鉤虫のヒト感染例は，1970 年代までに，イヌやネコの感染率が高いインドや東南アジアを中心に報告され，この他の地域では，ブラジル，日本，パプアニューギニアからの報告があった[2]．2000 年初頭に糞便中の虫卵から遺伝子学的検査によって鉤虫種の鑑別が可能になると，改めて本虫の疫学調査が行われ，ヒトに感染している鉤虫種のうちアジアでは 2 番目に多い種であることが明らかとなった[2]．2012 年にカンボジアの農村で行われた調査では，57% が鉤虫症に感染しており，そのうち 52% がセイロン鉤虫に感染

Fig. 1 A hookworm egg and a larva obtained from the patient's faeces
a: A hookworm egg found in a faeces sample after formalin-ethyl acetate sedimentation.
b: A larva obtained from the Harada-Mori filter paper method. Unfortunately it had failed to grow fully into a filariform larva.



していたと報告された[5]．また，パプアニューギニアと同じメラネシアに含まれるソロモン諸島で2013年と2014年に行われた疫学調査でも，セイロン鉤虫はアメリカ鉤虫についで2番目に多い種であると報告されている[6]．パプアニューギニアでのヒトセイロン鉤虫症は，1962年に西ニューギニア（パプアニューギニアおよびインドネシア）で奉仕活動を行った海兵隊の感染例が報告されている[7]．最近のパプアニューギニアにおけるセイロン鉤虫症の疫学データはないが，本症例は滞在歴と現地での生活状況から同国で感染したと考えられる．

近年，本症例以外に6例のヒトセイロン鉤虫感染症が報告されている[8)~13)]．このうち3例[8)~10)]は台湾，マレーシアからの報告で，流行国内での感染と考えられ，3例はフランス[11)]，日本[12)]，オーストラリア[13)]からの報告で，それぞれミャンマー，ラオス，ソロモン諸島で感染した輸入症例である．ミャンマーで感染した症例では，半ズボンでヤンゴンの公園に座った後，地面と接触した部位の皮疹を自覚し，その後，発熱，呼吸困難，嘔吐，血便，体重減少といった症状が出現し，血液検査で末梢血好酸球数増多（WBC　17,430/μL，好酸球55%，好酸球数9,586/μL）を指摘されている．これは典型的な鉤虫症の経過を示しており，糞便検査で鉤虫卵が検出され，培養で得られた幼虫の遺伝子解析によりセイロン鉤虫症と診断された[11)]．ラオスで感染した患者は遷延する下痢に末梢血好酸球数増多（WBC 27,900/μL，好酸球74%，好酸球数20,646/μL）を合併しており，糞便検査で鉤虫卵が検出され，ダブルバルーン内視鏡で得られた成虫の口腔の内腹・外腹歯，雄の交接嚢の形態的特徴と遺伝子解析によりセイロン鉤虫症と診断された[12)]．また，ソロモン諸島で感染した症例はソロモン地域支援ミッションのために渡航していたオーストラリア人兵士で，4週間持続する腹痛を訴え，末梢血好酸球数増多（好酸球数6,200/μL）を指摘されている．糞便検査で鉤虫卵が検出され，治療後に糞便から採取された成虫の形態的特徴からセイロン鉤虫症と診断された[13)]．一方，本症例では皮膚症状，呼吸器症状，消化器症状のいずれも認められず，帰国後健診の好酸球数増多で寄生虫感染が疑われ，糞便検査で得られた虫卵の遺伝子解析で診断に至った．鉤虫症の症状は，感染している成虫の数に依存することが知られており，糞便中の虫卵数を定量化して感染強度を推測する[14)]．WHOは1gの糞便中に2,000～3,999個の鉤虫卵を認めた場合をmoderate-intensity，4,000個以上の場合をheavy-intensityと定義している．本症例では好酸球数増多の程度がそれほど高くなく（20.9%，1,636/μL），糞便1gあたりの虫卵数が約220個であったことから，感染強度は低く無症状であったと考えられる．

本症例のように無症状であっても渡航歴のある患者に末梢血好酸球数増多が見られる場合は，寄生虫の中でも蠕虫感染を疑う手掛かりである．糞線虫，フィラリア，鉤虫，住血吸虫，回虫，トキソカラ（イヌ回虫，ネコ回虫）感染は好酸球数増多の程度が高いことが知られている[15)]．途上国への渡航者の4.8%に帰国後に末梢血好酸球数増多が認められ，その程度が16%以上であれば渡航に関連した疾患である確率が60%を超え，その疾患が蠕虫感染である陽性的中率が46.6%という報告がある[16)]．帰国後健診で末梢血好酸球数増多が見られた場合には，無症状であっても現地での活動・生活状況と分布している寄生虫の疫学情報を参考に，適切な糞便検査や免疫診断を行う必要がある．

本患者に寄生していた鉤虫は，虫卵の遺伝子学的検査によりセイロン鉤虫と同定した．感染幼虫の形態からの種同定を試みたが，7日間の培養で1個体しか幼虫が得られず，発育途中で死滅していた．鉤虫卵は低温に弱く，培養の成否は検体の保存条件による．本症例では培養を開始するまでの間，患者検体は冷蔵で輸送・保管されていたため虫卵が死滅したと考えられる．寄生虫の形態学的同定には，適切な検体の取り扱いが必要であるが，今日では検体取り扱いの機会がほとんどなく，寄生虫学的な手法を実践・指導できる技師・寄生虫学者も少なくなっている．一方，遺伝子学的検査による病原体同定の技術は進歩し，その信頼性は高まっているが，検体の汚染，DNAのコンタミネーションによる偽陽性や反応阻害物質の存在，不十分な核酸抽出，不適切な検体採取・搬送・保存による偽陰性が起こり得る[17)]．それぞれの検査法の特徴を理解し，複数の方法を用いて寄生虫を適切に同定することが重要であろう．

謝辞：幼虫，虫卵の同定および虫卵の遺伝子検査と論文作成に協力して頂いた大分大学医学部生物学教室，長谷川英男先生に深謝いたします．

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文　献

1) 三笠桂一，青木信樹，青木洋介，阿部修一，岩田　敏，尾内一信，他：JAID/JSC感染症治療ガイドライン―呼吸器感染症―．感染症誌　2014；88：1―109.
2) Traub　RJ：*Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. Int J Parasitol 2013；43：1009―15.
3) 吉田幸雄，有薗直樹：鉤虫．図説人体寄生虫学第8版．南山堂，東京，2011；p. 108―19.
4) Hasegawa H, Modrý D, Kitagawa M, Shutt KA, Todd A, Kalousová B, *et al.*：Humans and great apes cohabiting the forest ecosystem in central african republic harbour the same hookworms.

PLoS Negl Trop Dis 2014；8：e2715.
5) Inpankaew T, Schär F, Dalsgaard A, Khieu V, Chimnoi W, Chhoun C, *et al.*：High prevalence of Ancylostoma ceylanicum hookworm infections in humans, Cambodia, 2012. Emerg Infect Dis 2014；20：976—82.
6) Bradbury RS, Hii SF, Harrington H, Speare R, Traub R.：Ancylostoma ceylanicum Hookworm in the Solomon Islands. Emerg Infect Dis. Forthcoming 2017. Available from：https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/2/16-0822_article.
7) Anten JF, Zuidema PJ：Hookworm infection in Dutch servicemen returning from West New Guinea. Trop Geog Med 1964；64：216—24.
8) Chung CS, Lin CK, Su KE, Liu CY, Lin CC, Liang CC, *et al.*：Diagnosis of *Ancylostoma ceylanicum* infestation by single-balloon enteroscopy (with video). Gastrointest Endosc 2012；76：671—2.
9) Hsu YC, Lin JT：Images in clinical medicine. Intestinal infestation with *Ancylostoma ceylanicum*. N Engl J Med 2012；366：e20.
10) Ngui R, Lim YA, Ismail WH, Lim KN, Mahmud R：Zoonotic *Ancylostoma ceylanicum* infection detected by endoscopy. Am J Trop Med Hyg 2014；91：86—8.
11) Brunet J, Lemoine JP, Lefebvre N, Denis J, Pfaff AW, Abou-Bacar A, *et al.*：Bloody diarrhea associated with hookworm infection in traveler returning to France from Myanmar. Emerg Infect Dis 2015；21：1878—979.
12) Kaya D, Yoshikawa M, Nakatani T, Tomo-Oka F, Fujimoto Y, Ishida K, *et al.*：*Ancylostoma ceylanicum* hookworm infection in Japanese traveler who presented chronic diarrhea after return from Lao People's Democratic Republic. Parasitol Int 2016；65：737—40.
13) Speare R, Bradbury RS, Croese J：A Case of Ancylostoma ceylanicum Infection Occurring in an Australian Soldier Returned from Solomon Islands. Korean J Parasitol 2016；54：533—6.
14) Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Buss P：Hookworm："the great infection of mankind". PLoS Med 2005；2：e67.
15) Page KR, Zenilman J：Eosinophilia in a patient from South America. JAMA 2008；299：437—44.
16) Schulte C, Krebs B, Jelinek T, Nothdurft HD, von Sonnenburg F, Löscher T：Diagnostic Significance of Blood Eosinophilia in Returning Travelers. Clin Infect Dis 2002；34：407—11.
17) 大楠清文，江崎孝行：これからの微生物検査 遺伝子検査 微生物の検出，同定，薬剤耐性遺伝子など．臨床と微生物 2004；31：610—22.

A Japanese Patient with *Ancylostoma ceylanicum* Infection on Returning from Papua New Guinea Diagnosed by Molecular Identification of the Parasite Eggs

Yuichi KATANAMI[1)*], Fukumi NAKAMURA-UCHIYAMA[2)3)], Masatoshi SATO[1)], Yukiteru OUJI[2)], Masahide YOSHIKAWA[2)] & Keiichi MIKASA[3)]

[1)]Department of Infectious Diseases, Nara City Hospital, [2)]Department of Pathogen, Infection and Immunity and [3)]Center for Infectious Disease, Nara Medical University, *Present Affiliation : Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine

We report herein on a Japanese patient with *Ancylostoma ceylanicum* infection on returning from Papua New Guinea who was diagnosed by molecular identification of the parasite eggs. The patient was a 26-year-old male who stayed at Lorengau city, Manus Province, Papua New Guinea for 2 years. He was providing guidance about agricultural technology and doing his work barefoot with local residents. After returning from Papua New Guinea, hookworm eggs were detected during a feacal examination as part of a health checkup and he was referred to our hospital for further examination and treatment. He had not had any health problem such as dermatitis, fever or respiratory or abdominal symptoms during his stay in Papua New Guinea. On admission to our hospital, the laboratory data revealed a normal WBC count with hypereosinophilia (20.9%). Feacal examination with the Kato cellophane thick smear technique showed 220 eggs/g feces of hookworm eggs. For species identification, DNA extracted from eggs obtained by the floatation method with saturated sodium chloride solution were subjected to a PCR assay specific for the mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit 1* (*Cox1*), ribosomal internal transcribed spacers (ITS) -1 and ITS-2 genes. The *cox1* region was very close to, and ITS-1/ITS-2 region were shown to have a 100% sequence identity with the *A. ceylanicum* sequence. The patient was treated with a single dose of pyrantel pamoate (10 mg/kg). No eggs were found in further feacal examinations and the eosinophilia improved to a normal level at 4 weeks after the treatment.

Eosinophilia in returning travelers is one of the clues for suspicious helminth infections even though the patients are asymptomatic. Physicians should recognize the possibilities of helminth infection including hookworm and proceed to appropriate parasitological examinations considering the countries the travelers' have visited, their living environment, their activities while there, and the endemic parasite species.

〔J.J.A. Inf. D. 91：759～763, 2017〕

平成29年 9 月20日