

●海外における医療・検査事情

アフリカトリパノソーマ症診断の現状と 迅速確定診断法の必要性

Current situation of African trypanosomoses and needs for point-of-care definitive diagnostic methods

いの うえ のほる
井 上 昇
Noboru INOUE

I. アフリカトリパノソーマ症

アフリカトリパノソーマ症はサハラ砂漠以南のアフリカで風土病として今もなお恐れられている原虫感染症である(写真1)。ヒトでは末期になると中枢神経系が侵され昏睡症状を呈するため、アフリカ睡眠病(African sleeping sickness)とも呼称される。ヒトに病原性を有するアフリカトリパノソーマは慢性睡眠病を引き起こす *Trypanosoma brucei gambiense* と急性睡眠病を引き起こす *T. b. rhodesiense* の2種のみで、前者は西～中央アフリカ諸国、後者は東アフリカ諸国で流行している。ヒトの病態は感染初期の血液・リンパ液感染期(ステージ1)と感染後期中枢神経感染期(ステージ2)の2つのステージに分けることができる¹⁾。現在使用されている抗トリパノソーマ薬には強い副作用があり、病態ステージによって有効な薬剤が異なる。可能な限り患者の受



写真1 血液中のトリパノソーマ

けるリスクを軽減し、安全に治療するためにはトリパノソーマの感染を確実に証明するだけでなく、病態ステージの判定も重要となる²⁾。現在ステージ1と2の鑑別は脳脊髄液中のトリパノソーマ寄生の有無、白血球数増加、タンパク濃度増加などを指標に実施されている¹⁾。不衛生な医療環境下では腰椎穿刺による脳脊髄液の採取が患者に二次感染などの高いリスクを与えるが、ステージ2の患者に使用する抗トリパノソーマ薬(ヒ素化合物)は、投与された患者のうち約10%に脳炎などの致命的な副作用を示すため、不要な投薬は絶対に避けなくてはならない。よって、このような危険な診断法でも代替法が無い以上は実施せざるを得ない状況にある。一方、家畜や野生動物では人獣共通感染症である *T. b. rhodesiense* に加え、*T. b. brucei*、*T. congolense*、*T. evansi*、*T. vivax* などが感染し、食欲減退、発熱、貧血、水腫、流産、悪液質などを主徴とするトリパノソーマ症を引き起こす。しかし、一般臨床症状のみでは他の家畜感染症と区別し難く、ヒトで認められる病態ステージも不明瞭である。よって感染家畜は適切な治療を怠ると急性症状を呈して斃死するか、慢性感染となって著しく生産性が低下し、周囲への感染源となる。

アフリカトリパノソーマは細胞表面に抗原変異を頻繁に繰り返す GPI アンカー性糖蛋白質を高密度発現しているため、特定の抗原型のみでの免疫では有効な防御免疫を得ることができない。よって、今のところ有効な予防ワクチンはない^{3,4)}。加えて、現在使用されている抗トリパノソーマ薬のほとんどが40年以上前から使用され続けているため、副作用、有



写真2 トラップを用いたツェツェバエの駆除

効性、薬剤抵抗性原虫の出現などの問題が多い^{5,6)}。したがって、現在トリパノソーマ症制圧のために取り得る方策は、適切な確定診断法の実施による感染動物やヒトの早期摘発と媒介昆虫であるツェツェバエの駆除のみである(写真2)²⁾。

II. トリパノソーマ症診断法の現状と問題

トリパノソーマ症は回帰熱、頭痛、関節痛、脾腫など感染初期の臨床所見のみでは他の感染症との鑑別が困難である。したがって確定診断では患者(患者)の血液または脳脊髄液中に寄生するトリパノソーマを顕微鏡検査で検出するのが一般的である。動物とヒトのトリパノソーマ症流行地は熱帯アフリカ、熱帯～亜熱帯アジア諸国、中南米などの開発途上国であるため、確定診断も非常に限られた施設・設備・技術・経済的環境下で実施しなくてはならない。そのため診断法は低コストで簡便であることが最優先され、これらの条件を満たせば検出感度や精度を犠牲にせざるを得ない現状にある。現行のトリパノソーマ症診断法については家畜感染症の治療と予防に関する国際標準法を定めている国際獣疫事務局(OIE, World Organisation for Animal Health)発行の家畜疾病標準診断法およびワクチンマニュアルに詳しい⁷⁾。以下に同マニュアルに記載されている家畜トリパノソーマ症標準診断法についてその概要を述べるが、ヒトの場合も同様の診断法が実施されている。

1. 塗抹鏡検法

血液・リンパ節生検材料・脳脊髄液などの検体か

ら薄層あるいは厚層塗抹標本を作製し、鏡検によってトリパノソーマを検出する方法である。生鮮塗抹標本から活発に遊泳するトリパノソーマを検出する場合と、標本を乾燥・固定・染色したのち鏡検する場合とがある。前者の方がより容易にトリパノソーマを検出できるが、標本を保存できないため、作製後ただちに鏡検する必要がある。塗抹法は簡便かつ安価に確定診断が可能な手法であるため最も一般的に実施されているトリパノソーマ検出法であるが、検査に時間がかかり検出感度も低く、血液中のトリパノソーマ数が10,000匹/ml以下の場合、検出がかなり困難である²⁾。ヘマトクリット遠心法および陰イオン交換カラム法は鏡検法に前処理を加えることで検体中のトリパノソーマを濃縮し、検出感度を2～10倍向上させる方法である⁸⁻¹⁰⁾。ヘマトクリット遠心法は比較的簡便なため臨床現場では塗抹法と同時に実施されることが多い方法で、ヘパリン処理ヘマトクリット管に採取した感染血液を遠心し、白血球層に集まったトリパノソーマを鏡検にて検出する。

2. 実験動物接種法

感染が疑われる血液・リンパ節生検材料・脳脊髄液などの検体を0.5ml程度実験動物(主としてマウスが用いられる)に接種し、定期的に尾端から血液を一滴採取して生鮮塗抹標本を作製・鏡検し、実験動物体内で増殖したトリパノソーマを検出する方法である。実験動物に対する病原性が強い分離株では高感度検出が可能であるが、例えばヒト慢性睡眠病原体の*T. b. gambiense*はマウスに対する病原性が極めて低いなど、種や株によってマウスに対する病原性が異なっているために実際の成功率は低い。加えて手間、時間およびコストがかかるため、サンプルからの原虫分離を目的とする研究目的以外ではほとんど行われない。

3. 血清診断法

凝集反応、蛍光抗体法並びに酵素抗体法(ELISA)などがある。凝集反応では固定染色したトリパノソーマ原虫を用いる方法と、モノクローナル抗体あるいは原虫表面抗原を固層化したラテックス粒子を用いる方法がある^{11,12)}。市販キットもInstitute of Tropical Medicine, Antwerpから入手可能であり、簡便・安価であるため普及しているが、抗体検出法

では現在進行中の感染と過去の感染を区別することが困難であるため、確定診断ができない¹³⁾。蛍光抗体法および ELISA 法は凝集反応より検出感度が高く、比較的精度が高い抗体検出が可能であるが、試薬の保存や調製、実験操作が煩雑でコストも高いため一般には普及していない。しかしながら ELISA 法は多検体を同時に検査可能であるため、疾病流行状況の調査や家畜の群単位での管理には有効な手段である。トリパノソーマ抗原検出 ELISA 法および抗体検出 ELISA 法が報告されているが、トリパノソーマ可溶性抗原を用いた抗体検出 ELISA 法が一般的である¹⁴⁾。

4. 遺伝子検出法

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によるトリパノソーマ遺伝子検出法は、検体中のトリパノソーマ DNA を高感度検出できるため、鏡検法に代わるトリパノソーマ確定診断法として注目されている¹⁴⁾。PCR 法は検体中のトリパノソーマを証明できるのみならず、トリパノソーマ亜種および種の同定も可能であるため、適切な治療薬を選択することが可能となり、実用化されれば非常に優れた診断法となり得る。しかしながら遺伝子検出法の実施には安定的な電力供給や実験室などのインフラストラクチャーに加え、高価な遺伝子増幅装置や試薬、分子生物学の実験技術の習得が必要である。したがって熱帯アフリカやアジア諸国のフィールド診断法として PCR 法を普及させるには技術や装置の簡便化、低コスト化ならびに人材への技術トレーニングが必須である。

Ⅲ. 流行地の様子 (ザンビア共和国の例)

ザンビア共和国は国土面積が日本の約 2 倍であるのに対して人口は 10 分の 1 である。銅以外に特筆すべき天然資源を産出しない後発開発途上国 (いわゆる最貧国) であるが、貧しいゆえに平和な国でもある。私は北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター (CZC) 杉本千尋教授との共同研究で 2008 年から毎年 1～2 回ザンビア東北部における動物とヒトのアフリカトリパノソーマ症発生状況調査を実施している。ここでは調査中に体験したトリパノソーマ症流行現場の様子を思いつくまま紹介する。

1. 医療現場

現在重点的に調査を実施しているチャマ (Chama) 村はザンビア北東部に位置し、首都ルサカからは 900km 程度離れている (図 1)。雨期になると未舗装道路が酷いぬかるみとなり、自動車による通行が困難になるため「陸の孤島」になるような場所である。村の病院 (チャマ病院) は僻地にしては大きく、いつも大勢の人々が診察の順番を待っていた (写真 3)。近隣の村々から何日もかけてバスや自転車でやってくる人もいようである。余談であるが、私自身も 2009 年にちょっとした自動車事故で肘に強い打撲を受けてしまい、チャマ病院の外来患者となった経験がある (写真 4)。同じく胸部を強打した友人のザンビア人研究者は素人目にも旧式の撮影装置で胸部 X 線検査を受けたが、私は聴診器と血圧計しかない事務所のような診察室で医師の問診を受けた (写真 4)。その時の会話を要約すると下記のとおりである。

医師：「痛みますか？」

筆者：「とても痛いです」

医師：「見たところ骨折は無いようですね」

筆者：「たぶん…」

医師：「内出血がありますね、まあ打撲症にはよくあることです」

筆者：「腕と肘が腫れて曲げると痛いです。」

医師：「痛いでしょう？でもすぐ良くなると思いますよ」

筆者：「だといいんですが…」



図 1 ザンビアの地図



写真3 チャマ病院の正門（左上）、診察を待つ人々（右上）、採血中の患者（左下）、風乾中の厚層血液塗抹標本（右下）



写真4 事故現場（上）とチャマ病院の診察室（下）

結果、無料で痛み止めの錠剤を6～7粒処方してもらうことができた。制度は良く分からないが、ザンビアの僻地医療は国のサポートで患者負担がゼロの

ようだ。外国人の私とその恩恵を受けて良いかどうかなど、細かい事を言わない点もおおらかで良い。肘の打撲はその後2～3週間で完治したので貴重な薬を無駄に消費しなかった医師の判断は正しかったと思う。慢性的な物資不足のためか、診察前後に見せてもらった検査室には血液生化学検査機器やプレートリーダーなど、簡単な検査機器類はそろっているようであったが、あまり有効利用されているようには見受けられなかった。チャマ村付近では散発的に *T. b. rhodesiense* による急性睡眠病が発生しているため、日常的にトリパノソーマ症診断のための血液塗抹検査が実施されている。チャマ病院では生鮮塗抹標本ではなく、固定染色した厚層塗抹標本を鏡検する方法を実施していた（写真3）。写真では塗抹標本をそのまま風乾しているが、ハエが多い場合はカバーをかけるべきである。さもなくば、飢えたハエの群れが塗抹血液を食べてしまい、標本が台無しになってしまうのである。

2. 獣医療現場

以上が調査中に垣間見た医療の現場であるが、私の専門は獣医学であるため、調査中相手にするのはもっぱら家畜や野生動物である。アフリカでは貨幣経済が浸透した現代においてもなお、家畜が特別な

財産として冠婚葬祭などで取引されることが多い。その場合の家畜（特にウシ）は牛乳や肉を得るための手段を越えた特別な、象徴的意味を持っているのである。かつて南アフリカ共和国から私の研究室に留学していた学生から聞いた話であるが、ヨハネスブルクのような東京と変わらない大都会に住んでいる人のために、結婚式でウシの取引を代行する商売があるそうである。贈る側も贈られる側もウシを飼う土地など所有していない場合は両者とも実際のウシを見ること無く、贈られた側はそれらを業者に頼んで現金化してもらおうそうだ。たとえヴァーチャルでもウシをやり取りすることがセレモニーとして重要なのだ。そのような文化的背景もあってか、大切な家畜を守る獣医師の社会的地位や人々の尊敬の度合いはかなり高いようである。

病院を構えておれば自ら出向いてきて、あれこれと病状を説明してくれた上に採血の際にはおとなしく腕を出してくれる人間とは違い、動物からの検査材料採取は少々骨が折れる。四輪駆動車に小型発電機や顕微鏡、消毒薬や手洗い用の水、ゴミ袋まで、ありとあらゆる試薬や器具機材を積み込み、散在する農家を巡りながらサンプリングを実施する。たどり着いた農家の庭先に仮設検査ラボを設置し、仲間がウシやヤギと格闘して採ってきた血液をその場で

処理し、顕微鏡検査を実施するのが通常の検査方法である（写真5）。採血作業は言うまでも無いが、一日中野外で顕微鏡検査を続けるのも案外大変な作業である。トリパノソーマを探して顕微鏡下の血液を凝視し続けるため100検体を越えると集中力も途切れがちになり、検出感度も下がっているように思う。それにもかかわらずトリパノソーマ症の診断では顕微鏡検査によって原虫を直接検出することが、その正確性から国際的に認められたゴールドスタンダードであり、これが実施されなければいくらPCRや血清診断法の結果がそろっていても質の高い疫学調査データとは認められない。他に言及すべき事項として、第一にバイオハザード対策がある。トリパノソーマ症はもちろん、狂犬病、炭疽、ブルセラ症、破傷風など、厄介な人獣共通感染症が常在している地域でのサンプリングはリスクの高い作業であるため、バイオハザード対策にも可能な限り配慮する必要があるが、動物相手の野外作業では完璧を期するのが困難な場面も多い。また、遺伝子検出用のDNA抽出や血清採取は野外ではできないため、実験室に持ち帰ってから実施することになる。それまでの数日間、クーラーボックスに保冷材を入れて血液サンプルの劣化を最小限にとどめる必要があるが、宿に保冷剤を冷やす冷凍庫が無いこともあり、



写真5 ウシおよびヤギからの採血風景（上左右）、野外での血液塗抹検査用に準備した光学顕微鏡とヘマトクリット遠心機（左下）、検査風景（右下）

その場合は室温保存するしかない。このようにアフリカの僻地ではインフラストラクチャーや物資の不足がわれわれ日本人の想像をはるかに超えている状況が日常茶飯事であるため、万が一現地でも調達できなくてもサンプリングや検査ができるよう準備するのが鉄則である。言うまでも無いが、準備する物資には車の燃料やスペアタイヤ、けん引用のワイヤーロープなども含む。

IV. LAMP 法への期待

LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) 法は 2000 年に納富らによって報告された新しい DNA 増幅法である¹⁵⁾。反応原理などの詳細は他の文献に記載されているので省略するが、簡単に LAMP 法の特徴を列記すると (1) 一定温度での DNA 合成反応で高価な装置が不要、(2) 反応が生体由来物質による阻害を受けにくい、(3) 高い特異性、(4) 高感度、(5) 反応時間が短い、(6) 目視による簡易検出が可能、などである^{15~17)}。これらのすぐれた特徴は、施設・設備・技術・経済的な理由から PCR 法の実施が困難だった地域で、近い将来最先端の高感度・特異的遺伝子検出法を利用できる道を開いた。しかし前述したようにアフリカの何もない僻地で LAMP 法が利用できるようになるまでには、まだまだ解決しなくてはならない問題点が多数ある。まず、患者(患者)からのサンプリングから LAMP による検出までを可能な限り少ないステップ、かつ最小限の検査器具を使って実施できるよう、検査手技をデザインする必要がある。さらに試薬類は長期室温保存可能にする必要もあるだろう。反応装置は何処にでもある単 2 や単 3 の乾電池か太陽電池で動作し、操作法もシンプル、耐衝撃性に優れた生活防水対応のようなものができれば良い。加えて検査単価や装置は可能な限り安価である必要もある。これらの課題は標的遺伝子の選択やプライマー配列の決定、試薬の組成などを検討することとは別に、実用的 LAMP 法の開発にあたってぜひ解決すべきことではないだろうか。近い将来トリパノソーマ症の LAMP 診断法がアフリカ各地で利用され、患者(患者)の早期発見・早期治療が可能となる日が来ることを祈念して本稿の結びの言葉としたい。

謝 辞

挿入した写真は北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、杉本千尋教授のご支援によって撮影することができました。この場をお借りして心からお礼申し上げます。ザンビア大学ナマンガラ博士およびチョータ氏の現地調査に関するご協力に感謝します。

文 献

- 1) WHO, *Control and surveillance of African trypanosomiasis.*, in *WHO Technical Report Series No. 881*. World Health Organization : Geneva, 1998.
- 2) Büscher, P. and V. Lejon, *Diagnosis of human African trypanosomiasis*, in *The Trypanosomiasis*, I. Maudlin, P.H. Holmes, and M.A. Miles, Editors. CABI Publishing : Cambridge. p. pp. 203-218, 2004.
- 3) Donelson, J.E., *Antigenic variation and the African trypanosome genome*. *Acta Trop*, **85** (3) : 391-404, 2003.
- 4) Donelson, J.E., K.L. Hill, and N.M. El-Sayed, *Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes*. *Mol Biochem Parasitol*, **91** (1) : 51-66, 1998.
- 5) Geerts, S., et al., *African bovine trypanosomiasis : the problem of drug resistance*. *Trends Parasitol*, **17** (1) : 25-28, 2001.
- 6) Stich, A., M.P. Barrett, and S. Krishna, *Waking up to sleeping sickness*. *Trends Parasitol*, **19** (5) : 195-197, 2003.
- 7) OIE, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE : Paris, 2008.
- 8) Lanham, S.M. and D.G. Godfrey, *Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose*. *Exp Parasitol*, **28** (3) : 521-534, 1970.
- 9) Lumsden, W.H., et al., *Trypanosoma brucei : Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias : Adaptation for field use*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **73** (3) : 312-317, 1979.
- 10) Woo, P.T., *The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis*. *Acta Trop*, **27** (4) : 384-386, 1970.
- 11) Magnus, E., T. Vervoort, and N. Van Meirvenne, *A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. b. gambiense trypanosomiasis*. *Ann Soc Belg Med Trop*, **58** (3) : 169-176, 1978.
- 12) Pathak, K.M., et al., *Evaluation of various diagnostic techniques for Trypanosoma evansi infections in naturally infected camels*. *Vet Parasitol*, **69** (1-2) : 49-54, 1997.
- 13) Penchenier, L., et al., *Interpretation of the CATT (Card Agglutination Trypanosomiasis Test) in the screening for human trypanosomiasis due to Trypanosoma brucei gambiense*. *Ann Soc Belg Med Trop*, **71** (3) : 221-228, 1991.
- 14) Chappuis, F., et al., *Options for field diagnosis of human*

- african trypanosomiasis*. Clin Microbiol Rev, **18** (1): 133-146, 2005.
- 15) Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Res, **28** (12): E63, 2000.
- 16) Kaneko, H., et al., *Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances*. J Biochem Biophys Methods, **70** (3): 499-501, 2007.
- 17) Mori, Y., et al., *Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation*. Biochem Biophys Res Commun, **289** (1): 150-154, 2001.