

[症 例]

Cyclospora cayetanensis と *Plesiomonas shigelloides* の混合感染の症例報告
ならびに糞便塗抹検査の重要性について

石川恵子

浦安市川市民病院 検査科

(平成14年10月7日受付, 平成15年7月6日受理)

当院外来を受診したタイ, カンボジア旅行後の27歳男性の糞便より, *Cyclospora cayetanensis* と *Plesiomonas shigelloides* を検出した1症例を経験した。

サイクロスポーラは下痢を起こす腸管寄生原虫でオーシストの経口感染により発症する。本邦での検出例はまだ少ない。*Plesiomonas shigelloides* は海外渡航者からの分離頻度が高い食中毒指定菌であり, 汚染水や汚染食品の経口感染により腸炎を引き起こす。本症例は両者の混合感染である。

海外渡航者による輸入感染症では複数の微生物による混合感染事例も少なくないため, 原虫などの細菌以外の微生物も対象とした多岐にわたる検査を行う必要がある。

塗抹検査は培養検査や集原虫法の前段階として行われ, 多くの微生物を検出, 推定するためのスクリーニング検査として, きわめて重要な検査法である。

Key words: *Cyclospora cayetanensis*, *Plesiomonas shigelloides*, 輸入感染症, 混合感染, 塗抹検査

Cyclospora cayetanensis は孢子虫綱のCoccidium類に属する腸管寄生原虫であり, オーシストの経口感染により発症する。激しい下痢が主症状で, 腹痛, 嘔気, 嘔吐を伴うことが多いが, 血便はみられない。世界中に分布し, 海外渡航者下痢症や日和見感染症として問題となる。我が国では1996年タイ, カンボジアへ旅行した学生から第一例目が検出されている。その後も数例の報告がある¹⁻⁵⁾。

Plesiomonas shigelloides は熱帯地域を中心とする水域(主に淡水, まれに海水)に生息し, 汚染水や汚染食品の経口感染により腸炎を引き起こす。厚生労働省の食中毒菌に指定されている。主に海外渡航者から検出されることが多い⁶⁾。

当院, 内科外来受診の渡航者下痢症患者の糞便より両者を検出した混合感染の一症例を経験したので報告する。

I. 症 例

患 者: 27歳, 男性。

主 訴: 下痢, 腹痛, 発熱。

家族歴: 特記すべきことなし。

既往歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 2002年8月7~11日まで, タイ, カンボジアに旅行。帰国後より嘔気, 臍上部の腹痛, 頻回の下痢, 38℃程度の発熱等の症状が続いたため, 8月15日に当院内科外来を受診した。

初診時所見: 身長170cm, 体重63kg。血圧120/80mmHg, 体温37.8℃, 白血球数4,400/ μ l, CRP 1.4 mg/dl。血液検査ではCRPの軽度上昇がみられた他は, 異常はみられなかった。

経過: Fosfomycin (FOM) と整腸剤が投与された。起炎微生物判明後, Sulfamethoxazole / Trimethoprim (ST) とLevofloxacin (LVFX) の併用に変更となった。患者は健康な男性であり, 2回目の受診時(3日後)に便性は軟便となり, その他の症状はみられなかった。3回目の受診時(初診から10日後)には軽快した。感染原因については旅行先で生水や生食はなるべくしないようにしていたそうだが, 飲食した

著者連絡先: (〒279-0001) 千葉県浦安市当代島3-4-32

浦安市川市民病院 検査科 石川恵子

TEL 047-351-3101 内線245

FAX 047-352-6237

物については具体的な情報を得ることができなかった。

II. 微生物学的検査

1. 塗抹検査

初診時に提出された糞便は泥状下痢便で血液の混入はなかった。

新鮮薄層生標本の直接塗抹鏡検で8~10 μm の球形の原虫が400倍で数視野に1個みられた。蔗糖浮遊法を一応行ったが、集原虫法を行わなくとも検出可能な原虫数であった。糞便を希釈し、計算盤を用いて原虫数を測定したところ、下痢便1ml当り約6,000~8,000個の原虫数となった。原虫内部は桑実状構造をしていた。これは排泄直後の感染性のない未成熟シストである(図1)。この原虫は抗酸染色により赤く染色された(図2)。蛍光顕微鏡で観察するとブルーの自家蛍光を発した。主治医には初診当日、直ちに、サイクロスポーラが疑われる腸管寄生原虫が検出されたと報告を行った。

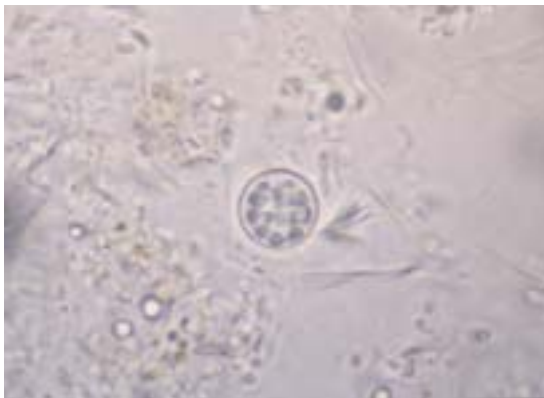


図1 *Cyclospora* の未成熟シスト (生標本) $\times 1000$

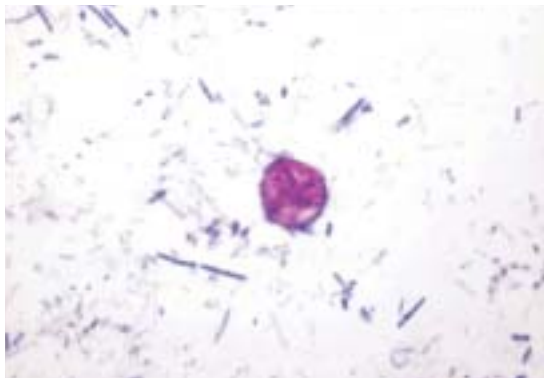


図2 抗酸菌染色した*Cyclospora* の未成熟シスト $\times 1000$

さらに2.5%重クロム酸カリウムで27~28 $^{\circ}\text{C}$ 、10日から14日間発育させると2個のスポロシストが確認された(図3, 4)。これは感染性がある成熟シストである。

原虫の形態より *C. cayetanensis* のオーシストと同定した。糞便のグラム染色では、赤血球、白血球はみられず、グラム陰性桿菌等の多数の細菌がみられたが、特記すべきものはみられなかった。グラム染色で原虫は確認できなかった。

再診時提出検体で直接塗抹と蔗糖浮遊法およびMGL法を行ったが、原虫は検出されなかった。その後も原虫は検出されていない。

2. 分離培養

初診時に提出された糞便はドルガリスキー寒天培地以下BTB培地(BD)、SS培地(栄研)、CIN培地(OXOID)、ピプリオ寒天培地(栄研)、CCDA培地



図3 *Cyclospora* の成熟シスト (生標本) $\times 1000$
2.5%クロム硫酸で発育させた原虫。



図4 *Cyclospora* の成熟シスト (メチレンブルー) $\times 1000$

(OXOID) で分離培養を行った。

SS培地の37℃一夜培養に乳糖非分解性、半透明無色のS型集落が多数、純培養状に発育した。BTB培地には乳糖分解性の集落と乳糖非分解性の集落が同量(2+)発育した。ピブリオ寒天培地、CCDA培地には集落の発育はみられなかった。

3. 同定, 感受性

BTB培地に発育した乳糖分解性の集落は、エンテロチューブII (BD) (Code.75340) による同定の結果 *Escherichia coli* と同定された。病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)凝集反応陰性、オーソVT1/VT2(オーソ)陰性。SS培地に発育した乳糖非分解性集落とBTB培地に発育した非乳糖分解性の集落は同一菌であり、糖発酵グラム陰性杆菌、オキシダーゼ陽性、オキシフェームチューブII (BD) (code.76541) による同定の結果 *P. shigelloides* となった。

当院では自動機器 MicroScan WalkAway (Dade Behring) を使用しているが、糞便分離菌の場合は感受性検査を行うまでにある程度の菌種の推定ができていたため、同定、感受性同時測定のコンプパネルは使

用せず、感受性検査にのみ使用している。感受性パネルはMIC 5Jを使用した(表1)。

初めに投与されたFOMはMIC 16 μ g/ml 判定I、変更後のLVFXはMIC <0.5 μ g/ml 判定Sであった。

後日、再診時提出検体から本菌は検出されなかった。投与した薬剤のため、常在菌もまったく発育しなかった。

III. 考察

サイクロスポーラは健康な成人であっても長く下痢が続くことがある²⁾。我が国での検出例はまだ少ないが、今までわかっていなかっただけで実際にはもっと多いものと推測され、十分な検査が行われれば検出例はもっと増えると思われる。クリプトスポリジウムやランブル鞭毛虫と同じく塩素に強く^{2,3)}、水道水が汚染すると集団感染の危険があるため、今後の動向には注意が必要である。

P. shigelloides は当院でも年に数例みられるが、海外渡航者から検出されることが多い。海外渡航歴のな

表1 薬剤感受性成績 (Microscan MIC 5 J Panel)

| 薬剤 | 薬剤略号 | MIC 値 μ g/ml | 判定 |
|------------------------------|----------|---------------------|----|
| Ampicillin | ABPC | >16 | R |
| Piperacillin | PIPC | >64 | R |
| Cefazolin | CEZ | <1 | S |
| Ceftazidime | CAZ | 4 | S |
| Cefpirome | CPR | 4 | S |
| Cefmetazole | CMZ | <2 | S |
| Cefepime | CFPM | 4 | S |
| Cefozopran | CZOP | <1 | S |
| Cefaclor | CCL | <2 | S |
| Flomoxef | FMOX | <1 | S |
| Imipenem/Cilastatin | IPM/CS | <0.5 | S |
| Meropenem | MEPM | <0.5 | S |
| Clavulanic acid/Amoxicillin | CVA/AMPC | <1 | S |
| Sulbactam/Cefoperazone | SBT/CPZ | <4 | S |
| Aztreonam | AZT | <2 | S |
| Amikacin | AMK | 8 | S |
| Gentamicin | GM | 4 | S |
| Minocycline | MINO | <1 | S |
| Levofloxacin | LVFX | <0.5 | S |
| Sulfamethoxazole/Trimethopri | ST | <0.5 | S |
| Fosfomycin | FOM | 16 | I |

R: 耐性, S: 感性, I: 中間

い患者からの検出例が当院で1例みられ、輸入魚貝類の喫食が原因であった。複数菌感染例では病原性大腸菌、腸炎ビブリオ、エロモナス等と一緒に検出されている。

今症例は混合感染であったが、投薬により早期に症状は改善し、予後は良かった。

当院では1999年感染症新法制定以前まで原虫寄生虫検査は一般検査の糞便検査として行われていたが(現在も検査項目としては一般検査)、依頼件数が非常に少なく、検出例も2~3年に1例という状態であった。臨床側が寄生虫症を疑って検査を依頼しないため、技師は経験不足となっており、寄生虫検査に対する取り組みも消極的であった。微生物検査室においても、下痢便等にグラム染色は行っていたが、原虫については特に依頼がある場合以外は考慮していなかった。

1999年感染症新法が制定され、当院は第2種感染症指定病院となった。この法律には感染症類型として、たくさん感染症が取り上げられている。多くの感染症に対応するための対策作りが早急な課題となった。コストがかからず直ちにできる簡便迅速法として、塗抹検査の充実に取り組んだ。便から検出される原虫として赤痢アメーバ、ランブル鞭毛虫、クリプトスポリジウムが、4類全数把握に含まれていることから、これらも視野に入れた検査を行うこととした。

まず始めに、微生物検査室に提出された感染症が疑われる全ての糞便材料に、スクリーニング検査として、グラム染色ではなく直接塗抹新鮮生標本の鏡検を行った。固形便は生理食塩水で溶解し、粘血便は数カ所を採り、水様便は遠心した沈渣にカバーガラスをかけて、それぞれ200倍で全視野を400倍で数視野、さらに油浸1,000倍で数視野を観察する。汚染に注意し、必要に応じて懸滴標本を行った。生標本の観察は見慣れれば検体の状態を瞬時に知ることができる、どの方法よりも早い迅速検査法である。カンピロバクターも慣れれば生標本での判定が可能であった。

次にグラム染色や蔗糖浮遊法、MGL法などの集卵、集原虫法検査を行うわけだが、微生物検査室では現在、インフルエンザ抗原などの迅速検査やサーベイランスなど業務量が増えており、両者を全ての糞便検体に行うことは時間的にできないため、生標本で得られた炎症所見と、糞便の外観、渡航歴等の患者情報より検査の必要性の有無を判断した。

1999年4月より2002年9月までに、微生物提出糞便検体より、20例の原虫、寄生虫卵が検出された。(ランブル鞭毛虫10、横川吸虫卵6、クリプトスポリジウム1、サイクロスポーラ1、鞭虫卵2) これらの原虫、

寄生虫はその他の病原細菌との混合感染例もあった。

塗抹検査で検出可能な細菌の中ではキャンピロバクターの塗抹検出率が培養陽性例の約70%となった。患者情報や臨床所見などからMethicillin resistant *Staphylococcus aureus*の推定が可能であった症例も数例あった。今回のサイクロスポーラ検出はこの検査手順で可能となった。本邦第1例目と同じタイ、カンボジア旅行者であった。

検査材料のサンプリングも重要であり、採便管や綿棒による採便(直腸スワブ)では検体量が少なく、十分な検査ができない。当院ではどうしても採便できない場合を除き、深底のシャーレや蓋付の滅菌尿コップに採便している。下痢をしている患者ならば外来でも採便が可能である。原則として、土日、祭日、夜間であっても検体受付をし、直ちに検体処理(分離培養)をしているため、保存液や保存培地入り容器は使用していない。

糞便の塗抹検査は今のところ、判定が難しいため、土日、祭日、夜間や筆者不在の通常ルーチン時に行われることは少ないのが現状である。技師の教育および意識改革が今後の課題である。

IV. 結 語

今回の症例のように海外渡航者による輸入感染症では、複数の微生物による混合感染の事例も少なくないため、原虫などの細菌以外の微生物も対象とした多岐にわたる検査を行う必要がある。

この症例を経験して、あらためて塗抹検査の重要性を痛感した。塗抹検査は微生物検査の中で核となる最も重要な検査項目であり、培養検査よりも迅速性に優れ、迅速抗原検出法と共に、感染症の診断治療にすぐに役に立つ検査である。そのため、これらの検査には積極的に取り組み感染症診断能を上げる努力をして、臨床に貢献してゆきたい。

謝 辞

当院内科主治医の塩田 潤先生、御指導いただきました順天堂大学総合診療科客員教授 渡邊一功先生、確認していただきました東京女子医科大学感染対策部山浦 常先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 宮本豊一, 野崎 司. 2000. 知っておきたい感染症, 第11回日本臨床微生物学会, 14-15.
- 2) 井関基弘, 木俣 勲. 1998. クリプトスポリジウム症, サイクロスポーラ症. 臨床検査 42: 541-546.
- 3) 井関基弘. 1997. 新しい腸管寄生原虫の検査. 検査

- と技術 25 : 335-341.
- 4) 石坂重昭. 1997. サイクロスポーラ感染症. 感染症学雑誌 27 : 106-111.
 - 5) 藤田紘一郎. 1999. 新しく見つかった寄生虫. 感染症学雑誌 29 : 21-25.
 - 6) 三瀬勝利. 1998. この夏注目される食中毒菌. Medical technology 26 : 730-763.
 - 7) 豊川真弘, 浅利誠志. 1983. 新たに認識された食中毒菌の原因菌, Vibrio科. 臨床検査 27 : 746-751.
 - 8) 坂本光男, 相楽裕子. 2000. 微生物検査のサンプリング, 各種サンプリングの実際, 多量の常在菌を含む検体. 臨床検査 44 : 519-522.

Isolation of *Cyclospora cayetanensis* and *Plesiomonas shigelloides* from an episode of a mixed infection

Keiko Ishikawa

Department of clinical laboratory, Urayasu-Ichikawa Shimin Hosp.

A 27-year-old man arrived our hospital after a trip to Thailand and Cambodia. *Cyclospora cayetanensis* and *Plesiomonas shigelloides* were isolated in his excrement.

Cyclospora is an intestinal parasitic protozoa that causes diarrhea by oral infection of oocyst. Only a few case has been reported in this country. *Plesiomonas shigelloides* is a food poisoning bacterium that is highly isolated from foreign travelers, and causes intestine infection through the polluted water and foods. This case was a mixed infection of those.

Travelers who returned from abroad often have plural import infection, therefore it is necessary to examine all possible pathogens such as bacteria, protozoa and so on.

Smear inspection that is usually done prior to the cultivation inspect and the collective protozoa method is an easy and very important method to detect the pathogeneses.