

かった。これらの結果を基に、国立公衆衛生院で行われた「ウイルスコース」の研修生、「クリプトスポリジウム研修」の研修生の中で希望した者に positive control として供与した。今後はできるだけ多くの原虫を集め、検査機関に供与したい。

4 終わりに

動物の糞便から検出された *C.parvum* のオーシスト、人の糞便から検出された *G.iardia* の栄養型とシストをスライドグラス上に塗布し、原虫の positive control としてどの程度の期間使用可能か調べた結果、約 10 ヶ月間は問題がないことが分かった。今後は約 20 ヶ月間ほど冷蔵庫に保管して有用性について検討したい。

なお、本研究を行う上で、ネズミの捕獲に協力してくれたアペックス産業の元木 貢氏、渡航者の下痢便の検査に協力してくれた成田空港検疫所の林 義則先生、太多和浄一先生、小野崎郁夫先生、鶴田憲一先生、原虫 (*C.parvum* のオーシスト、*G.iardia* のシスト及び栄養型) を供与してくれた愛知県食肉衛生検査所の山内俊平先生、細井美博先生、東京医科学研究所感染免疫内科の木村幹男先生に深謝致します。

分担研究報告書 4

遺伝子操作法による原虫の検出法に関する研究

分担研究者 西尾 治

研究課題：水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

分担研究：遺伝子操作法による原虫の検出法に関する研究

国立公衆衛生院 西尾 治

研究要旨

クリプトスポリジウム遺伝子診断法の開発を昨年度より継続して行っており、本年度は 18S ribosomal RNA をコードしている部分で、3組のプライマーを選定し検討したところ、Set A ではヒト、ウシ、ネコ、ヒツジ、ブタおよびマウスからのクリプトスポリジウム遺伝子の増幅が行えた。今回開発した PCR 法は昨年度に比べ DNA の抽出、PCR の前加熱処理に改良を加え、その結果検出感度が高くなり、set A のプライマーを用いることにより極めて有用であると考えられた。

ウシ、ヒト、ブタおよびマウスの遺伝子配列を明らかにしたところ、ヒトとウシは極めて類似しており、ヒトの感染源としてウシからのものが推測される結果を得た。マウスはヒト・ウシとブタの中間に位置し、ブタはウシ・ヒトおよびマウスとかなり異なった遺伝子配列であった。今後感染ルートの解明のためにヒトを含め各種動物のクリプトスポリジウムの遺伝子配列を調べ、基礎的データの蓄積を継続して行う必要がある。

A. 目的

クリプトスポリジウムによる水道水汚染が世界的な問題となっている。現在わが国ではクリプトスポリジウムの診断は蛍光抗体法および微分干渉による形態観察を行うことになっている。蛍光抗体法、特に微分干渉法による診断は時として困難を来すことがある。遺伝子診断法、すなわち PCR 法は少数の DNA で診断が行え、外殻が壊れていても、DNA が存在すれば PCR 法が可能である。

ヒトから検出されたクリプトスポリジウム原虫はヒトのみならずウシ、イヌ、ネコ等に感染することが知られている。またブタ、ヒツジ、ネズミ、鳥類等の動物にもクリプトスポリジウム感染が起きている。

顕微鏡を用いた形態学的診断あるいはクリプトスポリジウムに対するポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法による診断では動物種あるいは遺伝子型については知ることができない。

クリプトスポリジウムの感染源の疫学的解析あるいは由来動物、感染ルートの解明には分子疫学的解析が不可欠である。しかしわが国では、ヒトのみならず動物のクリプトスポリジウム遺伝子配列は、昨年度本研究で私がヒトとウシについてクリプトスポリジウムの外殻蛋白をコードしている DNA の配列を調べ報告したが、それ他では殆どなされていない。ヒトとウシの外殻蛋白部分をコードしている遺伝子についてその配列を調べたところ、ヒトとウシでは殆ど違いが見られなかった。

そこで本年度は PCR 法においてはより検出感度を上げる目的で DNA の抽出法、PCR の前加熱処理を改良するとともに、クリプトスポリジウムの 18S ribosomal RNA をコードしている遺伝子について、ヒト、ウシ、ブタ、ネズミからの遺伝子配列を決定し、今後の分子疫学的解析に寄与することとした。

B. 研究方法

1. PCR 法について

a) クリプトスポリジウム原虫から DNA の抽出法

原虫から DNA の抽出は、ウシからの 7 件、ヒト 3 件、ネコ 1 件、ヒツジ 2 件、ブタ 2 件、マウス 1 件、計 16 件を用いた。

DNA の抽出は表 1 に示したように、はじめに 10% 糞便乳剤とし、それを 1,000 rpm.5 分遠心した上清から浮遊法でクリプトスポリジウムを集め、次いで PBS を 10 倍量加え遠心し、ペレットに原虫を集め PBS で再浮遊させた。

表 1 P C R の 方 法

A. DNA の抽出法	
1.	浮遊法で <i>Cryptosporidium</i> を集める
2.	3,000rpm, 15min. Cf. ペレットを PBS(-) に再浮遊させた。
3.	凍結融解 5 回
4.	2 倍濃度の Lysis buffer を加え、それに Proteinase K (1mg/ml) を加え、 50° C, 90min, 98° C, 5min, その後 on ice
5.	フェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコール (25:24:1) 処理
6.	クロロフォルム処理
7.	エタノール沈殿
8.	70% Etoh で洗淨
9.	乾燥
10.	T ₁₀ E ₁ を加え、56° C, 10 min. on ice, -40° C 保存

図 1. PCR 法

DDW	30 μ l
10X Buffer	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
Primer	1 μ l
Primer	1 μ l
抽出 DNA	2 μ l

↓ 98° C, 10 min on ice
Taq 1 25 unit 加える

94° C,	3 min.	1 回	
94° C,	1 min	}	40 回
50° C,	1 min		
72° C,	2 min		
72° C,	15 min	1 回	
4° C,	hold		

↓
電気泳動で判定

その後凍結融解を5回行った(5回行くと、原虫の多くは壊されていた)。次いで Lysis buffer による溶解、Proteinase 処理、フェノール・クロロフォルム処理を行い、エタノール沈殿で DNA を回収した。PCR 法は図 1 に示したように行った。なお、PCR に用いたプライマーは 18S の ribosomal RNA をコードしている部分で、3組を設定しそれについて検討した。

2) 遺伝子配列の決定

分子疫学的解析はウシからの4件、ヒト3件、ブタ1件およびマウスから1件、計9件のクリプトスポリジウムの 18S ribosomal RNA をコードしている gene の 106 番目から 447 pb について遺伝子配列を PCR で増幅したものをダイターミナター法でダイレクトシーケンシングで遺伝子配列を決定し、それを UPGMA ソフトを用い系統樹を作製した。

C. 研究結果

1). 加熱処理時間の検討

原虫の DNA は 2 本鎖で、PCR を行うにはそれを 1 本鎖にする必要がある。そこで 1 本鎖にするのに最適な時間の検討を行ったところ、98° C で 10 min であったので、PCR の前加熱処理はこの条件で行うことにした(表 2)。

表 2. PCR 前加熱処理の時間

	原液	1/10	1/100	1/1000
0 min	+++	+	-	-
10 min	+++	++	-	-
20 min	+++	+	-	-
30 min	++	+	-	-
60 min	+	-	-	-

2) プライマーの検討

PCR に用いたプライマーは 18S ribosomal RNA をコードしている部分で 3 組設定した。

成績は表3に示したとおりであった。Set Aではウシの1例を除いて（この例は全てのプライマーで陰性であったので、クリプトスポリジウムのDNAが少ないかったことも考えられる）、ウシ、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタおよびネズミからのクリプトスポリジウムをPCR法で検出することができた。

しかし、set Bでは増幅するDNAが長いこともあって（1,328bp）、ウシでは2件、ヒトでは1件、ヒツジで1件から検出されたに過ぎなかった。また、set Cではウシは2件、ヒトおよびマウスは全て陰性、ヒツジおよびブタは1例を除き陽性であった。

3) 分子疫学解析

分子疫学的解析はウシからの4件、ヒト3件、ブタ1件およびマウスから1件、計9件のクリプトスポリジウムのribosomal RNAをコードしている領域の106番目から376pbについて遺伝子配列を決定し、UPGMAソフトを用い系統樹を作製し、その成績を図2に示した。

表3. プライマー別のPCR結果

No	検 体	Set A	Set B	Set C
		CrybaR+41, CrybaR-620	CrybaR+347, Cryba-1675	CryFR+001, CryFR-532
1	ウシ、AI,9.7.18	+	-	-
2	Cattle, AI,9.11.5 (Japan)	+	-	-
3	ウシ, AI, 10,11,20	+	-	-
4	Calf, AI,9,11,5 (Japan)	+	+	+
5	ウシ、AI,9,28	-	-	-
6	Calf, AI,10,5,22 (Japan)	+	+	+
7	Calf, AI,10,4,7 (Japan)	+	-	+
8	Human, (Sa, Japan)	+	+	-
9	Human, (A, Japan)	+	-	-
10	Human, (Sa, Japan)	+	-	-
10	ネコ-2	+	-	-
12	ヒツジ-3	+	-	+
13	ヒツジ-4	+	+	+
14	ブター-5	+	-	+
15	Pig4 (Japan)	+	-	-
16	Mouse (Ya, Japan)	+	-	-

プライマー：Cryba は *Cryptosporidium parvum* 18S ribosomal RNA gene

CryFR は *Cryptosporidium felis* 18S ribosomal RNA gene

プライマー：Set A {CrybaR+41 5'-AGA TTA AGC CAT GCA TGT CT-3'

CrybaR-620:5'-ACA GAA ATC CAA CTA CGA GC-3'}

Set B {CrybaR+347 5'-TCT CAG GCT CCC TCT CCG GAA-3'

CrybaR-1675:5'-CTG CAG GTT CAC CTA CGG AA-3')
Set C {CryFR+001:5'-AGG AGA AGT CGT AAC AAG GT-3'
CryFR-532:5'-TGC TAT TTG CGT TGA GAG AT-3'}

(Japan) 表しているものは今回遺伝子配列を明らかにしたもので、遺伝子配列から大きく分けると、Pig4(Japan)とそれ以外のもの2つである。さらに Pig4(Japan)を除くと、小さく6つに分けられた。すなわち C.parvum(L16997)のグループ、Calf,AI9,11,5 グループ、Cattle, AI,9,11.5(Japan), mouse(Ya Japan), C.baileyi(USA.L19068), C.parvum(UK.X6434)の6つである。Hman(Sa)はC Parvum(16997)とほぼ同じであり、C. Parvumのカナダのものとはほぼ同じ配列で極めて相同性の高いものであった。日本のCalf C. AI9.11 5(Japan)、Calf AI,10,4,7,アメリカのもの(C. parvum,USA)、日本のヒト(Human Ya, A)は同一の遺伝子配列であった。Calf,AI,10.5.22(Japan)は上記5株とは少し異なり、さらに Cattle AI,9,11,5 それらとも少し異なっていた。Mouse (Ya Japan)は CattleAI,9.11.5(Japan)とC.baileyi(USA)との中間型であった。

D. 研究考察

クリプトスポリジウム原虫の遺伝子診断法の開発および分子疫学解析のための遺伝子配列について研究を行っている。昨年度の本研究ではクリプトスポリジウムのPCR法が行えることを明らかにするとともに、外殻蛋白をコードしている遺伝子の配列をウシとヒトについて行ったところ全く同じであることを報告している。

クリプトスポリジウム原虫のDNA抽出には凍結融解を5回行うことにより、外殻がほぼ壊され、次いでLysis bufferによって完全に破壊される共に、可溶化し、その後Proteinase処理を行うことにより、DNAの抽出はほぼ完全に行われると考えられた。

PCR用プライマーは18s ribosomal RNAをコードしている部分で、3組を設定し、検討したところ、Set 1のプライマーがウシ、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタおよびマウスからのクリプトスポリジウム原虫のDNAを増幅することができ、このプライマーは多くの動物のクリプトスポリジウムを検出することができ、有用性が高いと判断された。

Set 2はウシ、ヒトおよびヒツジの遺伝子を増幅したものの、検出率は低く、これは増幅する遺伝子が1,329bpと長かったこともその要因の一つと考えられる。またSet Cのプライマーはウシ、ヒツジ、ブタの遺伝子を増幅したが、このプライマーの最大の欠点は非特異バンドが多く見られ、判定に困難を来すことである。

今回、Set Aのプライマーで増幅されたDNAのうち、ウシ、ヒト、マウス、ブタの遺伝子配列を決定した。その結果ブタ4から得られたものはほかのものに比べ8コドン多く、ウシ・ヒトと違いが見られた。しかしヒツジのクリプトスポリジウムがPCRで増幅されたものの、未だ遺伝子配列の決定が出来ていないので、PCRで増幅されたものが目的とする遺伝子であるか否かの検討が必要と考えている。

日本のウシとヒトとの間には全く同一の遺伝子配列のものも見られた。このヒトとウシとの関係は詳細に検討する必要があるもの、ヒトの感染源として家畜のクリプトスポリジウム感染対策がヒトの感染防御に重要であると推察される。また、マウスはウシ・ヒトとブタとの中間に位置し、ブタはそれらとことなり、8コドン多く、遺伝子の挿入あるい

はウシ・ヒトの欠損が認められた。すなわち、今回の研究結果からクリプトスポリジウム遺伝子の違いからからはヒト・ウシ、マウスおよびブタと大きく3つに分けることができるようであり、さらにの部分と各種動物についての明らかにする必要がある。

クリプトスポリジウムによる健康被害が起こった時には、その感染ルートの解明が感染拡大阻止に不可欠である。分子疫学的解析が解明の手段となりうる。従って日本および諸外国のヒトおよび各種動物のクリプトスポリジウムの遺伝子配列を明らかにし、基礎的データを集積しておくことが肝要である。このような研究は日常的に継続して行う必要がある。

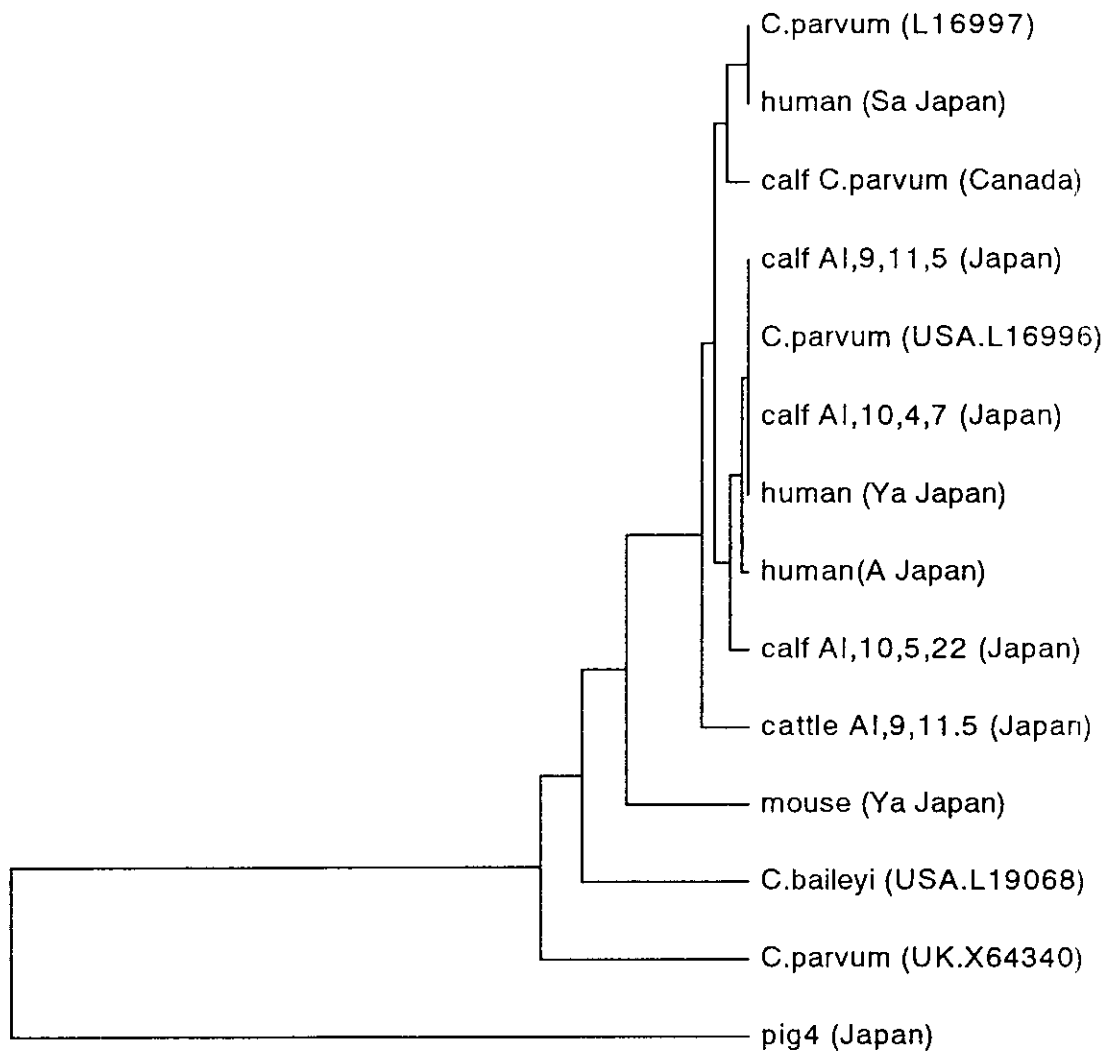


Fig.2 Phylogenetic Tree of *Cryptosporidium*

pig4 (Japan) T.TAT...GG .A.CTTGC-..... .T.....	49
C.baileyi (USA.L19068) T.CTT...AA .C-CTTAC-..... .C.....	48
calf C.parvum (Canada) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
calf AI,10,4,7 (Japan) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
human (Ya Japan) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
calf AI,9,11,5 (Japan) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
C.parvum (USA.L16996) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
human(A Japan) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
calf AI,10,5,22 (Japan) A.CTG...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
C.parvum (L16997) T.CTT...AA .C.TTTACT..... .C.....	50
human (Sa Japan) T.CTT...AA .C.TTTACT..... .C.....	50
mouse (Ya Japan) T.CTT...AA .C-TTTACT..... .C.....	49
C.parvum (UK.X64340) T.CTT...AA .C--AAAAC..... .C.....	48
cattle AI,9,11.5 (Japan) T.CTT...AA .C.TT-ACT..... .C.....	49
Consensus	AGTTATAGTT WAYWKGATR R TMTYWRMYT ACATGGATAA CYGTGGTAAT	50

pig4 (Japan) TG .A.A.C.CCGC-T... .G..G.....	98
C.baileyi (USA.L19068) GA .A.G-A.CCGCTC... .G..T.....	97
calf C.parvum (Canada) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
calf AI,10,4,7 (Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
human (Ya Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
calf AI,9,11,5 (Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
C.parvum (USA.L16996) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
human(A Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
calf AI,10,5,22 (Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
C.parvum (L16997) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	99
human (Sa Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	99
mouse (Ya Japan) GA .T.G-A.CTGTTT... .A..T.....	98
C.parvum (UK.X64340) GA .A.A-A.CCATGC... .G..T.....	97
cattle AI,9,11.5 (Japan) GA .A.A-A.TCGTAT... .G..T.....	98
Consensus	TCTAGAGCTA ATACATGCKR AWARGMCIYR ACTTYDYGGA ARGGKTGTAT	100

pig4 (Japan)A..... G..T..AA..... .T.....	148
C.baileyi (USA.L19068)G..... A--C--TC-- -----.C.....	136
calf C.parvum (Canada)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
calf AI,10,4,7 (Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
human (Ya Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
calf AI,9,11,5 (Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
C.parvum (USA.L16996)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
human(A Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
calf AI,10,5,22 (Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
C.parvum (L16997)G..... A--T--AA-- -----.C.....	138
human (Sa Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	138
mouse (Ya Japan)G..... A--T--TA-- -----.T.....	137
C.parvum (UK.X64340)G..... G--A--GC-- -----.T.....	136
cattle AI,9,11.5 (Japan)G..... A--T--AA-- -----.C.....	137
Consensus	TTATTAGATA AARAACCAAT RGGHGADMGC CCTCTATGGT GAYTCATAAT	150

pig4 (Japan) CT..A...G..... .TTGCGC... C..TGCT... ..A.A..	198
C.baileyi (USA.L19068) TA..G...A..... --TTTAT--. T..CATA... ..G.T..	178
calf C.parvum (Canada) TA..G...A..... --TTAAT--. T..CATA... ..G.T..	179
calf AI,10,4,7 (Japan) TA..G...A..... -TTAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
human (Ya Japan) TA..G...A..... -TTAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
calf AI,9,11,5 (Japan) TA..G...A..... -TTAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
C.parvum (USA.L16996) TA..G...A..... -TTAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
human(A Japan) TA..G...A..... -TTAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
calf AI,10,5,22 (Japan) TA..G...A..... -TTAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
C.parvum (L16997) TA..G...A..... -ATTAAT--. T..CATA... ..G.T..	181
human (Sa Japan) TA..G...A..... -ATTAAT--. T..CATA... ..G.T..	181
mouse (Ya Japan) TA..G...A..... -TTTTAT--. T..CATA... ..G.T..	180
C.parvum (UK.X64340) TA..G...G..... .TCTGAT--. C..CATA... ..G.T..	181
cattle AI,9,11.5 (Japan) TA..G...A..... --TAAAT--. T..CATA... ..G.T..	180
Consensus	AACTTYWCGR ATCRCATGGC CWYDNRYCGG YGAYRYWTCA TTCAARTWTC	200

pig4 (Japan)	..-..... .A...T..T <td>247</td>	247
C.baileyi (USA.L19068)	...-..... .G...A..C <td>227</td>	227
calf C.parvum (Canada)	...-..... .G...A..C <td>228</td>	228
calf AI,10,4,7 (Japan)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
human (Ya Japan)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
calf AI,9,11,5 (Japan)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
C.parvum (USA.L16996)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
human(A Japan)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
calf AI,10,5,22 (Japan)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
C.parvum (L16997)	...-..... .G...A..C <td>230</td>	230
human (Sa Japan)	...-..... .G...A..C <td>230</td>	230
mouse (Ya Japan)	...-..... .G...A..C <td>229</td>	229
C.parvum (UK.X64340)	...-..... .G...A..C <td>230</td>	230
cattle AI,9,11.5 (Japan)G...A..C <td>230</td>	230
Consensus	TGACCCTATC ARCTTTWGAY GGTAGSGTAK TGGSCTACCR TGGYWWYRAC	250

pig4 (Japan)	297
C.baileyi (USA.L19068)	277
calf C.parvum (Canada)	278
calf AI,10,4,7 (Japan)	279
human (Ya Japan)	279
calf AI,9,11,5 (Japan)	279
C.parvum (USA.L16996)	279
human(A Japan)	279
calf AI,10,5,22 (Japan)	279
C.parvum (L16997)	280
human (Sa Japan)	280
mouse (Ya Japan)	279
C.parvum (UK.X64340)	280
cattle AI,9,11.5 (Japan)	280
Consensus	GGGTAACGGG GAATTAGGGT TCGATTCCGG AGAGGGAGCC TGAGAAACGG	300

pig4 (Japan) C.....	CG.C.	347
C.baileyi (USA.L19068) T.....	TG.C.	327
calf C.parvum (Canada) T.....	TA.T.	328
calf AI,10,4,7 (Japan) T.....	TA.T.	329
human (Ya Japan) T.....	TA.T.	329
calf AI,9,11,5 (Japan) T.....	TA.T.	329
C.parvum (USA.L16996) T.....	TA.T.	329
human(A Japan) T.....	TA.T.	329
calf AI,10,5,22 (Japan) T.....	TA.T.	329
C.parvum (L16997) T.....	TA.T.	330
human (Sa Japan) T.....	TA.T.	330
mouse (Ya Japan) T.....	TA.T.	329
C.parvum (UK.X64340) T.....	TG.C.	330
cattle AI,9,11.5 (Japan) T.....	TA.T.	330
Consensus	CTACCACATC YAAGGAAGGC AGCAGGCGCG CAAATTACCC AATCCYRAYA		350

pig4 (Japan)	.G.....	T.....	G.CCT.	TT.G..C..A	397
C.baileyi (USA.L19068)	.A.....	G.....	G.CTA-	AC-G..C..G	374
calf C.parvum (Canada)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	375
calf AI,10,4,7 (Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	376
human (Ya Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	376
calf AI,9,11,5 (Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	376
C.parvum (USA.L16996)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	376
human(A Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	376
calf AI,10,5,22 (Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	376
C.parvum (L16997)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	377
human (Sa Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	377
mouse (Ya Japan)	.A.....	G.....	A.TTA-	AT-T..T..G	376
C.parvum (UK.X64340)	.A.....	G.....	G.CTA-	AC-G..C..G	377
cattle AI,9,11.5 (Japan)	.A.....	G.....	A.TTT-	TT-G..T..G	377
Consensus	CRGGGAGGTA GTGACAAKAA ATAACAATAT CAGGRCYWA WYGKGYTTR				400

pig4 (Japan)A.C.A.T.....T.....A..G..G.A..C.....	447
C.baileyi (USA.L19068)T.A.G.A.....C.....T..A..T.G..T.....	424
calf C.parvum (Canada)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	424
calf AI,10,4,7 (Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
human (Ya Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
calf AI,9,11,5 (Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
C.parvum (USA.L16996)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
human(A Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
calf AI,10,5,22 (Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
C.parvum (L16997)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	427
human (Sa Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	427
mouse (Ya Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	426
C.parvum (UK.X64340)G.A.G.A.....C.....T..G..T.T..T.....	427
cattle AI,9,11.5 (Japan)T.A.G.A.....C.....T..A..T.T..T.....	427
Consensus	TAATTGGAAT GAGTDMARTW TAAAYCCCTT WACRAGKADC AAYTGGAGGG	450
pig4 (Japan)G..	468
C.baileyi (USA.L19068)G..	445
calf C.parvum (Canada)G..	445
calf AI,10,4,7 (Japan)G..	447
human (Ya Japan)G..	447
calf AI,9,11,5 (Japan)G..	447
C.parvum (USA.L16996)G..	447
human(A Japan)A..	447
calf AI,10,5,22 (Japan)A..	447
C.parvum (L16997)G..	448
human (Sa Japan)G..	448
mouse (Ya Japan)G..	447
C.parvum (UK.X64340)G..	448
cattle AI,9,11.5 (Japan)A..	448
Consensus	CAAGTCTGGT GCCAGCARCC G	471

Fig.3 Sequence alignments of the 18S rRNA PCR fragment

分担研究報告書 5

実験動物モデルの開発と検査法のマニュアル化

分担研究者 山崎省二

研究課題：水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の
監視と制御に関する研究

分担研究：実験動物モデルの開発と検査法のマニュアル化

分担研究者 山崎 省二 国立公衆衛生院衛生獣医学部長

要旨

クリプトスポリジウム感染症の実験動物モデルをさぐるため、無菌ヌードマウスに牛由来のクリプトスポリジウム *Parvum* を経口胃内投与した結果、下痢便を呈し、投与後3週から5ヶ月まで、投与マウス糞便内に $10^5 \sim 10^6$ コ/1グラムのレベルでオーシストが排出され、クリプトスポリジウムの感染成立が認められたことを今までに報告したが、今回はこれに続き、無菌ヌードマウスにクリプトスポリジウムを単独感染させた際の生体内のクリプトスポリジウム感染増殖部位を検査したところ、大腸とりわけ盲腸がクリプトスポリジウムの感染増殖部位であることが知られた。

これらのことから無菌ヌードマウスはクリプトスポリジウム感染症の都合のよい実験動物モデルとなることが知られた。

A. 研究目的

クリプトスポリジウム、ジアルジア等原虫による水道水汚染が近年世界的に問題となっている。日本においても神奈川県等で水道水のクリプトスポリジウム汚染があり、特に一昨年、埼玉県で水道水汚染による住民の約63%が感染した大規模な集団発生が起きている。しかし、このクリプトスポリジウムの迅速、簡便で信頼のおける検査法が確立していないため、水道原水や浄水システムにおけるクリプトスポリジウムの検査や制御に困難をきたしている。さらに、クリプトスポリジウムの生体での感染や増殖の機構を探る実験動物モデルがなく、人・動物における汚染の生態・実態に関する情報が極めて少ない。またクリプトスポリジウムを単独で増殖させる手段がないため、迅速で信頼のおける検査法が確立しない。

そこで、始めに実験動物モデルを開発し、開発したモデルを用いて、クリプトスポリジウム感染の生態を調べるとともにクリプトスポリジウムを単独で増殖させ、検査法のマニュアル化を検討する。

B. 研究方法

BALB/C 系統の無菌ヌードマウスに牛便由来のクリプトスポリジウム *Parvum* のオーシストを塩素処理し、経口ゾンデを用いて、 10^4 コ/マウス経口胃内投与した。投与後毎週、クリプトスポリジウム単独投与ヌードマウスの新鮮便を採取し、クリプトスポリジウムの検査を行った。また投与後1ヶ月、3ヶ月、5ヶ月にヌードマウスを解剖し、常法に従い処理し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して組織学的に検索し、クリプトスポリジウムの感染・増殖部位を調べた。

C. 結果及び考察

無菌ヌードマウスに牛由来クリプトスポリジウムを経口胃内投与すると、始めに下痢を起こし、投与後3週から5ヶ月 $10^4 \sim 10^6$ コ/1グラムのレベルでクリプトスポリジウムが検出され、クリプトスポリジウム感染の成立が再確認された。

ヌードマウスの各臓器におけるクリプトスポリジウムの感染増殖状況

感染後1ヶ月のヌードマウスは、胃・盲腸・結腸・直腸にクリプトスポリジウムが認められ、空腸・回腸・肝臓・肺・胆管・気管支粘膜には認められなかった。胃の胃底腺部の一部に比較的強い感染・増殖像が見られ(図-1)、感染・増殖部の周囲は粘膜の剥離、炎症細胞の強い浸潤等の病変が認められた。

感染後3ヶ月のヌードマウスは盲腸、結腸に感染・増殖像が認められ、胃・空腸・回腸・直腸・肝臓・肺・胆管・気管支粘膜には認められなかった。盲腸(図-2)・結腸では腸腺の粘膜上皮細胞に感染像が見られるが、増殖の程度は低く、また、盲腸粘膜に強い炎症像を認めるが、結腸では軽度であった。

感染後5ヶ月のヌードマウスは盲腸に局限した感染像が認められたが、炎症像は軽度であった。胃・空腸・回腸・結腸・直腸・肝臓・肺・胆管・気管支粘膜には認められなかった。

これらの結果から、ヌードマウスにおけるクリプトスポリジウムの好適感染増殖部位は大腸(盲腸・結腸)であることが知られた。また感染初期には胃での感染が見られたことは興味ある所見であった。

今後、無菌ヌードマウスに人便由来あるいは牛以外の家畜由来のクリプトスポリジウム *Parvum* を感染させ、生体におけるクリプトスポリジウムの生態につき検討するとともに、この実験動物モデルを利用して便内に長期に大量に排出されるクリプトスポリジウムを精製し、これを精製抗原とし抗クリプトスポリジウム抗体を作製し、免疫学的あるいは分子生物学的検査法のより正確で簡便なマニュアル化を検討したい。

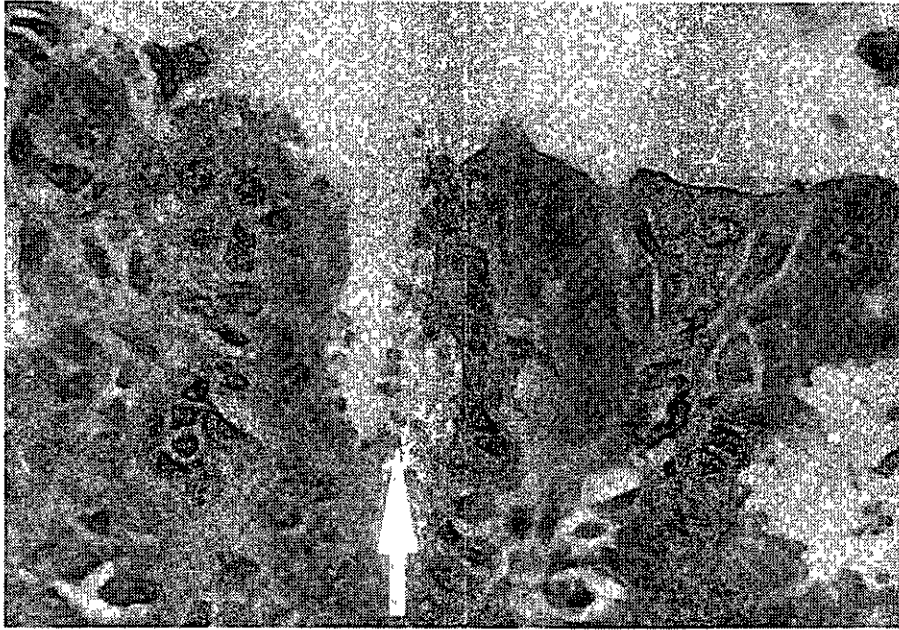


図-1 ヌードマウス胃底腺部のクリプトスポリジウム感染像

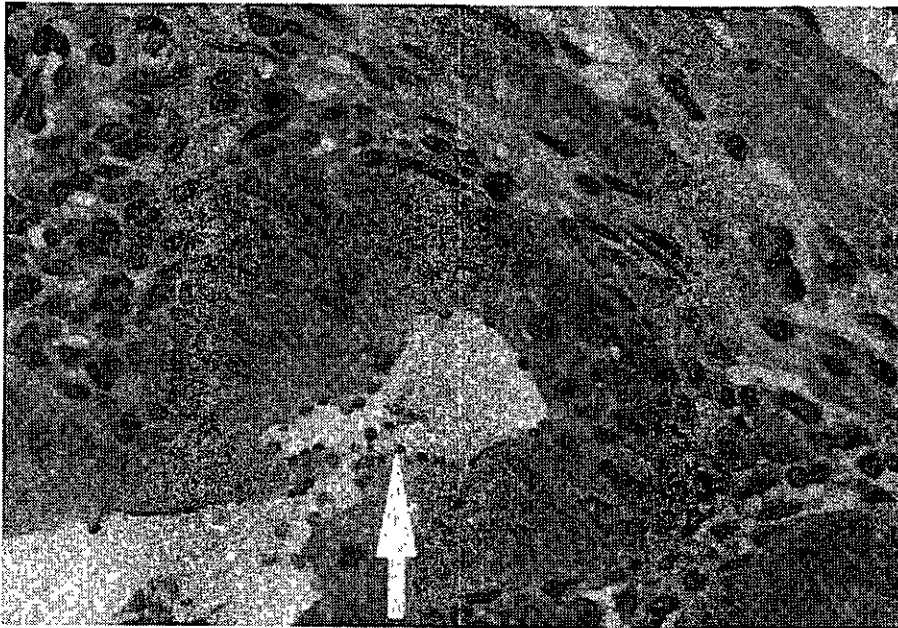


図-2 ヌードマウス盲腸部のクリプトスポリジウム感染像

分担研究報告書 6

相模川水系のクリプトスポリジウムおよび
ジアルジア汚染とその汚染指標の検討

分担研究者 平田 強

分担研究報告書

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び 類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア 汚染とその汚染指標の検討

麻布大学環境保健学部 平田 強
麻布大学大学院 橋本 温

研究要旨

環境水における原虫類の出現状況と原虫汚染指標に関する調査を行なった。対象水域として相模川水系を選定、本川とその支流に11ヶ所の測定点を設定した。調査項目は、原虫類としてクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシスト、指標細菌として、ウエルシュ菌芽胞、好気性芽胞、大腸菌群、大腸菌、それに濁度の計7項目とした。クリプトスポリジウムオーシストは11地点のうち10地点から検出され、陽性データの平均値は、推定値で34オーシスト/100L、確定値で24オーシスト/100Lであった。ジアルジアシストは全11地点が陽性で、陽性データの幾何平均値は推定値30オーシスト/100L、確定値12オーシスト/100Lであった。全地点の陽性データを用いて、単回帰および重回帰分析を行った。単回帰分析で原虫類との間に高い相関が認められたのは、ウエルシュ菌芽胞と大腸菌であった。重回帰分析では、原虫濃度の説明変数として、ウエルシュ菌芽胞、大腸菌、好気性芽胞の3つが選択された。

1. はじめに

クリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストによる表流水の汚染は世界中から報告され、わが国も例外ではない¹⁻³⁾。水中のこれらの原虫濃度は一般に低く、細菌のように培養ができないため、多量の試験水を濃縮しなければならない。また、濃縮後の操作も煩雑であり、計数や判別に高倍率の顕微鏡観察が必須で、長時間を要する上に高度の熟練を必要とする。このため、多数の試料を日常的に検査することは困難である。このような原虫試験より簡便に測定できる原虫汚染指標を導入できれば、より効率的に原虫汚染状況を把握できる。

水中の腸管系病原微生物の汚染指標として従来から大腸菌および大腸菌群が用いられてきたが、これらの指標細菌は原虫と比較して河川水中での死滅速度⁴⁾や下水処理工程での除去性⁵⁾が著しく高く、原虫の汚染指標としては十分に機能しない可能性がある。原虫汚染の代替指標としてウエルシュ菌芽胞、好気性芽胞および濁度などが候補としてあげられているが、十分な知見は得られていない⁴⁻¹⁰⁾。

そこで相模川水系を対象にクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストの汚染状況調査を行い、同時に大腸菌、大腸菌群、推定ウエルシュ菌芽胞、好気性芽胞の各濃度および濁度を測定して、それらと原虫濃度との関係について回帰分析を行い、指標性について検討した。

2. 調査方法

2.1 調査水域と調査地点

調査は1997年4月～12月までの9ヶ月間にわたり相模川水系で行った。採水地点をFig.1に示した。ここに示した採水地点の1996年11および12月と1997年4および5月のデータについては前報¹⁾で報

告したが、本研究では採水地点を一部変更し、調査を行った。また、小鮎川片原橋では上流に放流されている養豚排水処理水についても原虫濃度を測定した。

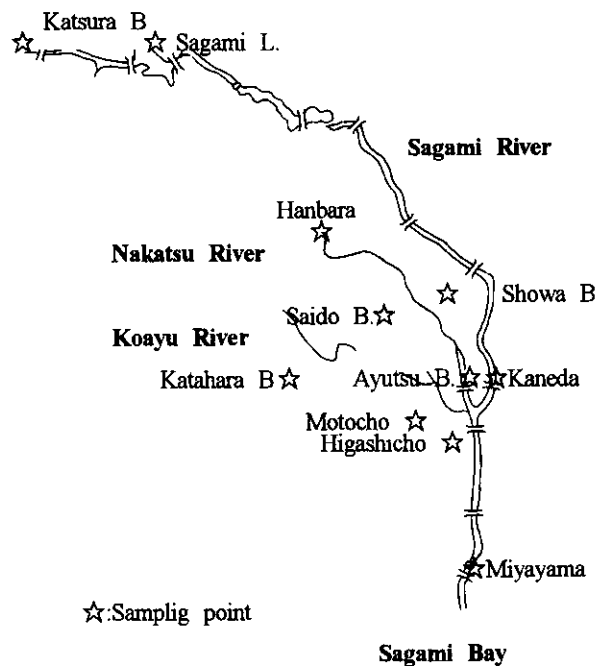


Fig.1 Sampling points of Sagami river and its tributaries

2.2 試料の採水

河川水 20~100l をポリタンクに採水し、研究室に持ち帰り分析に供した。

2.3 原虫試験^{1,5,11)}

前報¹⁾と同様の方法で原虫試験を行った。試料水量は汚染レベルに応じて 20~100l とした。採水した試料をろ過濃縮し、シヨ糖浮遊法で選択分離して数枚から十数枚の染色用フィルターにろ過して間接蛍光抗体染色した。染色用フィルター上のオーシストおよびシストを落射蛍光顕微鏡で判別、計数し、100l 当たりの推定および確定クリプトスポリジウムオーシストまたはジアルジアシスト濃度を算出した。

2.4 指標項目¹²⁾

指標項目として、大腸菌・大腸菌群(コリラート MPN 5 本法)、推定ウェルシュ菌芽胞(ハンドフォード改良寒天培地 3 重層またはメンブランフィルター法)、好気性芽胞(標準寒天培地混釈法)および濁度(波長 660nm による吸光度法)を測定した。

2.5 回帰分析

試料水 100l 当たりの推定または確定クリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト濃度の対数値を目的変数とし、大腸菌、大腸菌群、推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞の各濃度および濁度の対数値を説明変数とする単回帰および重回帰分析を行った。なお、細菌指標濃度は原虫とそろえて 100l 当たりの濃度に換算し、その対数値を回帰分析に用いた。

回帰および重回帰モデルとして(1)式を用いた。

$$C = a_1 t_1 + \dots + a_n t_n + b \quad \dots \dots (1)$$

ここで C:原虫濃度の対数値(log(個・100l⁻¹)), a_n:回帰係数または偏回帰係数(a₁:推定ウェルシュ菌芽胞,

a_2 :好気性芽胞, a_3 :大腸菌, a_4 :大腸菌群, a_5 :濁度), i_n :指標濃度または濁度の対数値(i_1 :推定ウェルシュ菌芽胞, i_2 :好気性芽胞, i_3 :大腸菌, i_4 :大腸菌群, i_5 :濁度) ($\log_{10}(\text{cfu or MPN}\cdot 100\text{l}^{-1})$ or $\log_{10}(\text{度})$), b :定数説明変数の選択は総当たり法で行い, F 検定(有意水準 1%)と自由度 2 重調整寄与率(r^2)で評価した。F 検定で有意性が認められたもののうち, 自由度 2 重調整寄与率の最も高くなる説明変数の組合せを最適な組合せとして選択した。

回帰分析は目的変数および説明変数のすべてがそろった試料のデータ組のみを用いて行った。このためデータ組数は目的変数毎に異なり, 推定クリプトスポリジウムオーシストでは 57 組, 確定クリプトスポリジウムオーシストでは 48 組, 推定ジアルジアシストでは 58 組, 確定ジアルジアシストでは 42 組であった。

3 結果

3.1 河川水中の原虫および指標項目濃度

Table 1 に原虫および指標項目の濃度を示した。

3.1.1 クリプトスポリジウムオーシスト

推定クリプトスポリジウムオーシストは調査した 11 地点のすべてで, 確定クリプトスポリジウムオーシストは中津川半原を除く 10 地点で検出された。陽性試料の推定クリプトスポリジウムオーシストの幾何平均値は $34 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($1\sim 21,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$, 77 試料中 63 試料, 陽性率 82%), 確定クリプトスポリジウムオーシストの幾何平均値は $24 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($1\sim 11,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$, 77 試料中 51 試料, 陽性率 66%)であった。採水地点の約 50m 上流で養豚排水処理水が放流されている小鮎川片原橋では 9 回の調査で幾何平均値, 推定 $4,900 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($360\sim 21,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$) 確定 $2,100 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($190\sim 11,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$)と常に高濃度で検出され, 養豚排水処理水からも幾何平均値, 推定 $4,700 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$ ($2,400\sim 10,000 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$, 3 試料中 3 試料, 陽性率 100%) 確定 $2,200 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$ ($1,000\sim 10,000 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$, 3 試料中 3 試料, 陽性率 100%)と多数のクリプトスポリジウムオーシストが検出された。一方, 中津川半原では 9 回の調査のうち推定クリプトスポリジウムオーシストが検出されたのは 1 回のみで, その濃度は $7 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ であった。

3.1.2 ジアルジアシスト

ジアルジアシストは推定, 確定ともに調査した 11 地点のすべてで検出された。その濃度は推定, 確定ともにクリプトスポリジウムオーシストと同レベルであり, 陽性試料の推定ジアルジアシストの幾何平均値は $30 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($1\sim 80,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$, 77 試料中 68 試料, 陽性率 88%), 確定ジアルジアシストの幾何平均値は $12 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($1\sim 20,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$, 77 試料中 51 試料, 陽性率 66%)であった。クリプトスポリジウムオーシストと同様, 小鮎川片原橋では 9 回の調査で幾何平均値, 推定 $1,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($10\sim 80,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$), 確定 $540 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$ ($14\sim 20,000 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$)と常に高濃度で検出され, 養豚排水処理水からも幾何平均値, 推定 $12,000 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$ ($3,000$ および $47,000 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$, 3 試料中 2 試料, 陽性率 67%), 確定 $5,500 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$ ($1,000$ および $30,000 \text{ 個}\cdot \text{l}^{-1}$, 3 試料中 2 試料, 陽性率 67%)と多数のジアルジアシストが検出された。一方, 9 回の調査でクリプトスポリジウムオーシストが 1 回のみ検出された中津川半原では推定ジアルジアシストが 2 回(幾何平均値 $3 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$), そのうち確定ジアルジアシストは 1 回($1 \text{ 個}\cdot 100\text{l}^{-1}$)のみ検出された。

3.1.3 指標項目

すべての調査地点で細菌指標が検出され, その濃度は幾何平均で大腸菌, 大腸菌群はそれぞれ $10^0\sim 10^5$, $10^2\sim 10^6 \text{ MPN}\cdot 100\text{ml}^{-1}$, 推定ウェルシュ菌芽胞 $10^0\sim 10^2 \text{ cfu}\cdot 100\text{ml}^{-1}$, 好気性芽胞はどの調査地点も $10^3 \text{ cfu}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ のレベルであった。また, 濁度は 1~9 度であった。