

表4 某県下のと畜場搬入牛におけるクリプトスポリジウム汚染調査

		検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)
と畜場 A	成 牛	148	2 ¹⁾	1.4
	幼 牛	5	1 ²⁾	20.0
と畜場 B	成 牛	23	0	0
	幼 牛	1	0	0
参考資料 ³⁾	成 牛	512	24 ¹⁾	7

1. *C. muris*
2. *C. parvum*
3. 獣医学雑誌 61 巻, 1998 年

ブタに関しては某県下の 2 ヲ所のと畜場施設に搬入された 80 頭について調査したが、いずれの施設においてもクリプトスポリジウムの感染は認められなかった(表 5)。

表5 某県下のと畜場搬入豚におけるクリプトスポリジウム汚染調査

	検査頭数	陽性率 (%)
と畜場 A	52	0
と畜場 B	28	0

愛玩動物における汚染調査：

イヌ・ネコについては動物愛護センターに収容されたものを対象にクリプトスポリジウム汚染実態調査が行われた。1 施設では 101 頭中に感染犬は認められなかったが、他の施設では 120 頭中の 1 頭から *C. parvum* が検出された。また、ネコに関しては調査頭数が限られたが、37 頭のうち 2 頭 (5.4%) から *C. parvum* の感染が認められた。

表6 イヌ・ネコにおけるクリプトスポリジウムの汚染状況調査

地 域	動物種	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)	
某 市	イヌ	101	0	0	
某 県	イヌ	120	1	0.8	
	ネコ	37	2	5.4	
動物種	性 別	年 齢	体 重	便性状	虫 種
イヌ #1	メ ス	1 ヲ月	1.0 kg	正 常	<i>C. parvum</i>
ネコ #1	メ ス	2 歳	2.5	正 常	<i>C. parvum</i>
ネコ #2	オ ス	1 歳	1.0	正 常	<i>C. parvum</i>

以上の結果をまとめて表-7 に示した。

表7 動物におけるクリプトスポリジウム汚染状況のまとめ

	陽 性 率	
	<i>C. parvum</i>	<i>C. muris</i>
ウ シ 農場飼育 と畜場搬入	0 - 20.0	0 - 3.4
	0 - 20.0	0 - 1.4
ブ タ	0	0
イ ヌ	0 - 0.8	0
ネ コ	5.4	0

考 察

C. parvum の感染率はウシ、特に仔ウシに高い傾向が認められることが知られている。今回の調査においても同様の傾向が明らかとなった。これらの経済動物での本症の蔓延が水道水源の汚染につながることは指摘するまでもない。クリプトスポリジウムのような原虫類の感染経路は糞-口感染（糞便中のオーシストを経口的に摂取することで感染する形態のこと）であることから、動物の飼育形態によって感染率の高低があることが知られている。すなわち、畜舎での集密飼育ではクリプトスポリジウム症が発生すれば、飼育動物に広く蔓延するであろうことは容易に推測される。その一方で、畜産排水施設の整備などにより水資源汚染への対策は可能と考えられる。他方、放牧飼育においては動物間の接触の機会が希薄となることから、群れの中での感染は広がり難い。ただし、広範な牧野が汚染される懸念があり、水源汚染の観点からは対策が難しい恨みがある。多くの場合、わが国の飼育形態は前者の畜舎内における集密飼育と考えられる。某県下の農場の汚染実態調査によれば、クリプトスポリジウムの汚染は31農場のうち7農場であった（表1）。約23%の農場の汚染を高いと見るか、低いと判断するかは異論のあるところであるが、汚染源対策としてはこのような汚染農場を放置するのではなく、むしろ積極的に特定して感染動物の淘汰を含めて衛生管理の徹底、集中的な清浄化対策を推進することが重要と考えられる。

一方、低いながらネコやイヌなど都会生活でもヒトとの接触の多い愛玩動物において、感染が認められることには注意が必要である。また今後の汚染防止対策の一環として、これらの動物に留まらず、ヒトにおける潜在的な感染実態の把握も重要と考える。

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの調査と
鑑別用モノクローナル抗体の作成

分担研究者 笹井和美

平成 11 年 4 月 10 日

1. 研究課題名：

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの調査と鑑別用モノクローナル抗体の作成

2. 分担者： 笹井和美

大阪府立大学・農学部・獣医内科学講座

E-mail: ksasai@vet.osakafu-u.ac.jp

3. 研究の概要

クリプトスポリジウムはコキシジウム亜綱に属する原虫で、ほ乳類、鳥類、は虫類等、幅広い宿主の消化管に寄生する。人畜における症状は類似しており、下痢、腹痛、発熱、嘔吐を起こし、治療法は対症療法に限られ、人畜自身が持つ免疫力による自然治癒に頼るしかない現状である。本疾病の原因はクリプトスポリジウムのオーシストの経口接種であり、家畜飼育農場からオーシストを含んだ汚水の水道水への汚染およびヒトからヒト、ヒトから動物、動物からヒト等の接触感染も報告されており、感染人畜糞便および処理済み下水からのオーシストの簡易迅速診断法を開発することは急務である。クリプトスポリジウムのオーシストは従来の塩素を中心とした消毒法では死滅せず、感染人畜からは一日あたり十億から一兆個以上のオーシストが排泄され、ヒトおよび動物の感染は数百個のオーシストの経口接種で起こりうることから、オーシストを大量に排泄する可能性のあるウシ等の家畜の診断鑑別および病畜の汚物の完全な処理等が特に重要であると考えられる。また、発症の予防にはワクチンによる免疫力の強化が重要である。また、鳥類に寄生するクリプトスポリジウムのうち、*C. meleagridis*は人に寄生する*C. parvum*と形態学的に類似しており、水道水におけるクリプトスポリジウムの検出法である微分干渉顕微鏡を用いた検査では、鑑別診断は不可能である。以上の観点から、当該研究においては、簡易迅速診断およびワクチンタンパク解析のために、モノクローナル抗体を作製し、診断・鑑別技術およびワクチン開発の基礎的研究を行う。また、申請者はクリプトスポリジウムと同じコキシジウム亜綱に属する*Toxoplasma*、*Neospora*および*Eimeria*を共通して認識し、原虫の宿主細胞への侵入を抑制する数種のモノクローナル抗体の作製に成功した。これらのモノクローナル抗体のクリプトスポリジウムへの交差反応の有無を検討し、共通抗原が存在すれば、クリプトスポリジウムのワクチン開発の一助となると考える。

4. この研究に関連する国内・国外における研究状況及びこの研究の特色・独創的な点

クリプトスポリジウム症は全世界で発生し、激しい下痢を主徴とする疾病である。ヒトを含めた様々の動物に感染可能なことから、感染源は自然界に無数に存在する。感染人畜との接触、感染人畜の汚物と接触した食物や水道水を介した感染等、感染経路は複雑であり、また、感染人畜からオーシストが多量に排出されるが、感染は少数のオーシストの経口接種で起こることから、大規模な集団発生が世界各地で散発する現状である。国外における研究は、申請者が1993年に留学していた米国農務省ベルツビル研究所の原虫部門が中心となり、診断・鑑別およびワクチン開発等の研究が行われているが、実用化にはほど遠い状態である。国内では厚生省・農林水産省の各種研究機関におい

て、疫学的な調査は行われているが、診断・鑑別およびワクチン開発に結びつくような研究は進んでいない現状である。また、野生動物はクリプトスポリジウムの汚染源のうちでヒトがコントロールできない唯一のものであり、自然環境の中でのクリプトスポリジウム汚染状況を把握することは、クリプトスポリジウムによるヒトの食中毒を制御する一つの方法である。現在、クリプトスポリジウム診断用のキットが輸入され、使用されているが、非特異的な擬陽性が認められ、迅速に診断・鑑別することは非常に困難な状態である。当該研究においては、野生鳥獣のクリプトスポリジウムの疫学調査を行うと共に、申請者がすでに作製に成功したコクシジウム亜綱の原虫を認識し、原虫の宿主細胞への侵入を抑制するモノクローナル抗体のクリプトスポリジウムへの応用と新たに鳥類クリプトスポリジウムに対して特異的なモノクローナル抗体の作製を行うことにより、クリプトスポリジウムの簡易迅速診断・鑑別およびワクチン開発の基礎的知識を得る。

5. 申請者がこの研究に関連して現在までに行った研究状況

申請者は、クリプトスポリジウムと同じコクシジウム亜綱に属する人畜共通寄生原虫である*Toxoplasma*、*Neospora*および*Eimeria*に対するモノクローナル抗体を作製した(Sasai et al., 1996)。コクシジウム亜綱に分類される原虫の生活環および宿主感染様式は類似する点が多く、ヒトおよび動物に感染して発熱、下痢を引き起こす。原虫が宿主細胞に感染する際に、前端にあるコーノイドと呼ばれるドリル様の器官を用いて穴を開けて侵入する特徴がある。申請者は*T. gondii*や*N. caninum*の侵入型タキゾイトおよび全種類の鶏コクシジウムの侵入型スポロゾイトのコーノイドに対して一様に反応するモノクローナル抗体(MAB)を作成した。近年、培養細胞を用いて侵入抑制試験を行ったところ、このMABが*E. acervulina*スポロゾイトの細胞侵入を抑制することが判明した(Sasai et al., 1998)。以上の研究成果をもとにして、既存のモノクローナル抗体のクリプトスポリジウムとの共通抗原の有無および診断・鑑別への応用、また、コクシジウム亜綱に対するモノクローナル抗体作製技術のクリプトスポリジウムへの応用による簡便診断・鑑別およびワクチン抗原タンパクの解析用のモノクローナル抗体作製を試みる。

6. 研究計画・方法

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの疫学調査および迅速診断・鑑別を目的として以下の研究を行う。

研究A. 鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの疫学調査

下痢を主徴とする野生鳥類の糞便における、クリプトスポリジウムオーシストの陽性率を調査する。

サンプル総数 50羽分

(平成10年11月より平成11年3月までの5カ月間に大阪府下全域で鳥獣保護獣医師により保護された鳥獣)

内訳:

アヒル 1羽、ウグイス 2羽、オオミズナ 1羽、オカメインコ 1羽、カルガモ 1羽、キジバト 1羽、キビタキ 1羽、クシサギ 1羽、ケリ 1羽、ゴイサギ 1羽、コノハズク 1羽、コブハクチョウ 1羽、ジュズカケバト 1羽、ジョウビタキ 1

羽、シロハラ 1羽、スズメ 1羽、ダイサギ 1羽、チョウサギ 1羽、ツグミ 1羽、ドバト 14羽、ハシボソガラス 1羽、ヒドリガモ 1羽、ヒヨドリ 3羽、フクロウ 2羽、ホシハジロ 2羽、ムシクイ 1羽、メジロ 4羽、ユリカモメ 2羽

方法：

酢酸エーテル・ホルマリニン法により沈殿、しよ糖浮遊法にてオーシストを採取し、鏡検することにより、オーシストを検出した。

結果：

クリプトスポリジウム属のオーシストは検出されなかった。現在、サンプル採取領域を近畿一円に広げ、現在も調査続行中である。

研究B 鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの迅速診断・鑑別法の確立

実験・ コクシジウム亜綱に対するモノクローナル抗体を用いた解析

申請者が作製したコクシジウム亜綱に対するモノクローナル抗体を用いてクリプトスポリジウムとの共通抗原性を確認する。

方法：

クリプトスポリジウム感染型スポロゾイトを当該研究室で作製したモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により染色し、共焦点レーザー顕微鏡を（既存施設）用いて鏡検することにより共通抗原性を確認する。また、共通抗原蛋白質の性状をウェスタンブロッティング法にて解析する。

結果：

6種の鶏型モノクローナル抗体、6D-12-G10、8E-1、HE-4、8D-2、5D-11、8C -3を用いて*Cryptosporidium muris* に対する共通抗原性を間接免疫蛍光染色法とウェスタンブロッティング法により解析した。レーザー顕微鏡による 間接免疫蛍光染色では、*C. muris* スポロゾイトは全てのモノクローナル抗体に陽性反応を示した。*C. muris* スポロゾイト可溶化抗原のウェスタンブロッティングにおいて、6D-12-G10 は47.9 kDa、5D-11 は154.9 kDaのタンパクを認識していることが判明した。これらの結果により、本鶏型モノクローナル抗体は、Apicomplexanに存在する共通のエピトープを認識している可能性が示唆された。

実験・ 鳥類のクリプトスポリジウムに特異的なモノクローナル抗体の作製

方法：

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムをマウスに免疫し、エライザによりマウスがクリプトスポリジウムを認識したのを確認し、定法に従いモノクローナル抗体を作製する。使用するマウスミエローマはP3-X63-Ag8.653株とSP2/0-Ag14株を用いる。クリプトスポリジウムは杏林大学・医学部・熱帯病寄生虫学講座の松井利明先生より分与を受けたものを使用する。

結果：

現在、鳥類に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをエライザ法および間接免疫蛍光法によりスクリーニング中である。

7. 考察

今回の研究において、野生鳥類のクリプトスポリジウムの検出を試みたところ、50サンプルにおいて陽性は認められなかった。今回の疫学調査は期間が冬季であったため、サンプル数が若干少なかったことから、大阪府下において調査を続行すると共に近畿一円に調査範囲を広げて、野生鳥類のクリプトスポリジウム寄生の実態を明らかにする。詳細なデータは公表されていないが、近畿圏の野生鳥類および飼育鳥類においてクリプトスポリジウム症が発生しているため、野生鳥類および飼育鳥類（鶏等の家畜も含む）の感染状況を早急に調査し、実態を掴む必要がある。

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムはヒトに対する感染性はないが、現在の水道原水の検査方法である微分干渉法ではヒトに寄生するものとの鑑別は不可能である。その結果、水道原水に鳥類のクリプトスポリジウムが存在していても、人体に影響がないにもかかわらず、現在の技術では鑑別は不可能であり、安定した水道供給に支障を来す。そこで、鳥類のクリプトスポリジウムに特異的なモノクローナル抗体を作製し、ヒトに寄生するクリプトスポリジウムと鳥のものとの鑑別診断できれば、より安定かつ安全な水道水の供給に繋がると考えられる。本年度の研究においては、モノクローナル抗体の作製には至っていないが、作製の基礎的準備は修了しており、引き続き研究を続けることにより、鑑別診断が可能なモノクローナル抗体の作製を行い、その有用性を確認する予定である。

クリプトスポリジウムは適切な治療がなく、水道水等の感染源を無くすことが、ヒトへの感染防御の第一段階である。しかし、クリプトスポリジウムに一度感染したヒトおよび動物が、感染に抵抗性を示すことから、ワクチン開発もクリプトスポリジウムの感染を未然に防ぐ重要な手段である。そこで、報告者が作製したアイメリア、トキソプラズマ、およびネオスポーラを含むコクシジウム亜綱に共通抗原性を有するモノクローナル抗体を用いて、クリプトスポリジウムとの共通抗原性を検討したところ、共通抗原性が確認できたため、モノクローナル抗体が認識する抗原を分子生物学的手法を用いて解析し、ワクチン開発の一助とする。