

平成11年度厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

研究課題名

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

総括研究報告書

平成12年3月

主任研究者 国包章一 (国立公衆衛生院)

総括研究報告書

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

主任研究者 国包 章一 国立公衆衛生院水道工学部 部長

研究要旨 クリプトスポリジウム等の検査法の開発・改良を行うとともに、汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発を行った。検査法の開発に関しては、実験動物モデルにおける好適感染増殖部位、糞便試料の保存方法、免疫磁気分離用混合ビーズの実用性、中空糸膜モジュールを用いた濃縮方法、直接蛍光抗体法の実用性、DAPI染色における前処理法、PCR法による検出法の適用性、遺伝子配列の解析、鳥類のクリプトスポリジウム鑑別法等について検討した。これらの研究の成果として、検査精度や効率性・迅速性の面で優れたいくつかの新しい濃縮・分離・検出法を明らかにするとともに、現行検査法の改良すべき点についても指摘した。また、汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発に関しては、各種動物の感染状況の調査、相模川水系における汚染実態調査、浄水処理による除去特性の検討等を行った。これらにより、クリプトスポリジウム等による野生動物や水の汚染実態を解明するとともに、水環境や浄水処理過程でのモニタリングを目的とした代替指標の有効性についても明らかにした。

分担研究者	荒木 国興	国立公衆衛生院衛生微生物学部 部長
	井関 基弘	大阪市立大学医学部 助教授
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部 室長
	金子 光美	摂南大学工学部経営工学科 教授
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所細菌病理部 主任研究員
	笹井 和美	大阪府立大学農学部 講師
	西尾 治	国立公衆衛生院衛生微生物学部 室長
	平田 強	麻布大学環境保健学部 教授
	眞柄 泰基	北海道大学大学院工学研究科 教授
	山崎 省二	国立公衆衛生院衛生獣医学部 部長

A. 研究目的

クリプトスポリジウム等の原虫による水系汚染が世界的な問題となっている中で、原虫の迅速で的確な検査法が確立されていないため、水道システムにおける検査や制御に困難を来している現状にある。本研究においては、現在用いられている膜ろ過-アセトン法に

代わるオーシストの迅速で高い回収率をもった分離・濃縮法の開発、蛍光抗体法に代わる検査法の開発等、クリプトスポリジウム等の原虫検査法の開発・改良を行った。また、水系及びヒトを含む宿主動物における汚染状況を調査して実態を正確に把握するとともに、水道水の常時管理を可能とするため、クリプトスポリジウム等の代替指標を開発し、モニタリングシステムの構築を目指した。

B. 研究方法

1. 検査法の開発

1) 実験動物モデルの開発

クリプトスポリジウム症の実験動物モデルとして、無菌ヌードマウスの適性につき検討した。

2) 糞便検査のマニュアル化に向けた基本条件の検討

原虫検査用の糞便試料及び糞便塗抹標本の保存性につき検討した。

3) 濃縮・分離法の開発

(1) 免疫磁気分離用ビーズの実用性の検討

原虫濃縮法としての免疫磁気分離用混合ビーズの実用性につき評価した。

(2) 中空糸膜モジュールを用いた原虫濃縮方法の開発

中空糸限外ろ過（UF）膜モジュールを用いた大容量水試料中の原虫の効率的な濃縮法につき検討した。

4) 分別検出法の開発

(1) 直接蛍光抗体法用試薬の開発

直接蛍光抗体法によるクリプトスポリジウムオーシスト検出の可能性につき検討した。

(2) フローサイトメーターの活用等による検出精度と検出効率の向上及び DAPI 染色法の検討

二重染色法の適用、並びに、フローサイトメーターの活用によるクリプトスポリジウムオーシスト検出精度の向上につき検討した。また、DAPI 染色による染色効果を高めるための前処理方法につき検討した。

(3) PCR 法を応用した検出法の検討

PCR法を応用したヒト及び各種動物由来のクリプトスポリジウム検出法につき検討した。

(4) 鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体の作製

鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体につき検討した。

2. 汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発

1) 各種動物及びヒトにおける感染状況の調査

野生動物、家畜及びヒトのクリプトスポリジウム感染状況につき調査した。

2) 相模川水系における汚染とその汚染指標の検討

相模川水系におけるクリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシスト等による汚染状況につき調査し、ウェルシュ菌芽胞等の代替指標による監視の有効性につき回帰分析

により検討した。

3) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム等の除去特性の評価

浄水場の原水及び浄水中におけるクリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストの存在状況につき調査するとともに、これらの処理による除去率につき検討した。

4) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標の開発

室内実験により、クリプトスポリジウムオーシストの凝集沈殿等による除去特性を、人工微粒子や藻類の除去特性と比較検討した。

C. 研究結果及び考察

1. 検査法の開発

1) 実験動物モデルの開発

ウシ由来クリプトスポリジウムの実験動物モデルとして、無菌ヌードマウスが適していることを明らかにし、その好適感染増殖部位が大腸（盲腸・結腸）であることを確認した。

2) 糞便検査のマニュアル化に向けた基本条件の検討

アルカリペプトン液による糞便試料の保存が原虫の検出に当たって影響を及ぼさないこと、糞便塗抹標本が染色時の陽性対照として長期間使用できることを確認した。

3) 濃縮・分離法の開発

(1) 免疫磁気分離用ビーズの実用性の検討

ジアルジア/クリプトスポリジウム免疫磁気分離用混合ビーズの実用性を明らかにした。

(2) 中空糸膜モジュールを用いた原虫濃縮方法の開発

中空糸限外ろ過（UF）膜モジュールを用いた、クリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストの効率的な濃縮方法を新たに開発した。この方法によれば、簡易な操作で大量の試料水（浄水では数百～数千リットル）を濃縮することができ、しかも、従来法と同等か、それ以上の回収率が得られることを明らかにした。

4) 分別検出法の開発

(1) 直接蛍光抗体法用試薬の開発

クリプトスポリジウムオーシストを検出するための直接蛍光抗体法用試薬を新たに開発した。この試薬では非特異反応が認められたが、試料を前処理すればある程度まで抑えられることが明らかになった。

(2) フローサイトメーターの活用等による検出精度と検出効率の向上及び DAPI 染色法の検討

二重染色法を用いることによってクリプトスポリジウムオーシストの検出精度の著しい向上が図れること、さらに、二重染色法とフローサイトメーターによる測定を組み合わせることによって、検査の自動化が期待できることを明らかにした。また、DAPI 染色での染色率向上に、通電もしくはアセトンによる前処理が有効であることを明らかにした。

(3) PCR 法を応用した検出法の検討

ヒト及び各種動物由来のクリプトスポリジウムを検出するための PCR 法を確立した。ま

た、PCR 産物の確認試験として、簡便なマイクロプレートハイブリダイゼーション法とプローブを開発し、その検査法も併せて確立した。これらにより、ヒト、ウシ、ブタ及びマウス由来のクリプトスポリジウムの遺伝子配列には 3 種類があること、並びに、この手法が感染経路の解明等に寄与し得ることを明らかにした。

(4) 鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体の作製

鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体を作製するための基礎的準備が終了した。

2. 汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発

1) 各種動物及びヒトにおける感染状況の調査

クマネズミ、ドブネズミ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコの糞便からクリプトスポリジウムが検出された。また、一部のヒトの糞便からもクリプトスポリジウムが検出された。

2) 相模川水系における汚染とその汚染指標の検討

クリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストにつき、相模川水系の 13 地点において 1 年間にわたって月 1 回前後の頻度で調査したところ、いずれの調査地点でもこれらが検出された。さらに、これらの検出結果と、同時に測定した推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌、大腸菌群、好気性芽胞及び濁度との相関関係を調べたところ、クリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストのいずれについても推定ウェルシュ菌芽胞との相関が最も高かった。

3) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム等の除去特性の評価

ある浄水場の原水及び浄水中のクリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストにつき、1 年間にわたって月 1 回の頻度で計 13 回調査したところ、原水ではそれぞれ 13 試料及び 12 試料が陽性であった。また、浄水（2 系統）では計 26 試料中それぞれ 9 試料及び 3 試料が陽性であった。凝集沈殿+急速砂ろ過によるこれらの除去率は、おおむね $2 \sim 3 \log_{10}$ の範囲にあった。

4) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標の開発

クリプトスポリジウムオーシストのほか、その代替指標として開発された微粒子及び水道原水中に存在する数種の藻類を用いて、凝集沈殿及び凝集ろ過に関する一連の実験を行い、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標として、*Selenastrum capricornatum* やある特定のモデル粒子が有効であることを明らかにした。

D. 結論

クリプトスポリジウム等の検査法の開発・改良を行うとともに、汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発を行った。検査法の開発では、実験動物モデルにおける好適感染増殖部位、糞便試料の保存方法、免疫磁気分離用混合ビーズの実用性、中空糸膜モジュールを用いた濃縮方法、直接蛍光抗体法の実用性、DAPI染色における前処理法、PCR法による検出法の適用性、遺伝子配列の解析、鳥類のクリプトスポリジウム鑑別法等について検討し、多くの点につき満足な成果が得られた。これらの成果に基づき、現行検査法の改

良に活用できる内容に関して取りまとめた。本研究成果を生かした新しい検査法を採用することにより、検査精度の大幅な向上が図れるものと期待される。また、汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発では、各種動物の感染状況の調査、相模川水系における汚染実態調査、浄水処理による除去特性の検討等を行い、クリプトスポリジウム等による野生動物や水の汚染実態の解明、並びに、代替指標の開発に貢献し得る成果が得られた。これらの成果を活用することにより、今後、クリプトスポリジウム等による感染リスクの適切な評価及び管理が可能になるものと期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ・北澤弘美、国包章一、眞柄泰基(1999) 水道水源におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア実態調査結果の解析、水道協会雑誌、68(4)、pp.22-31.
- ・国包章一(1999) 水道におけるクリプトスポリジウム対策、厚生、54(10)、pp.17-19.
- ・北澤弘美、国包章一(2000) 水道水の微粒子計測、ぶんせき、No.2、pp.80-85.
- ・橋本 温、河井健作、西崎 綾、松本かおり、平田 強(1999) 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、水環境学会誌、22(4)、pp.282-287.
- ・小澤克行、竹馬大介、平田 強(1999) 脱糞法と DAPI/PI 染色法による *Cryptosporidium parvum* オーストの生育活性値に及ぼす酸前処理の影響、水環境学会誌、22(10)、pp.827-832.
- ・Hirata T, Chikuma D, Shimura A, Hashimoto A, Motoyama N, Takahashi K, Moniwa T, Kaneko M, Saito S and Maede S(2000) Effects of ozonation and chlorination on viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Science and Technology* 41(7), (*In press*).
- ・本山信行、小澤克行、平田 強、星川 寛、茂庭竹生、金子光美(2000) オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オースト不活化能に関する実験的検討、水道協会雑誌、69(1)、pp.19-26.
- ・大垣眞一郎、大瀧雅寛、平田 強、片山浩之、小熊久美子(2000) UV 照射および光触媒反応によるクリプトスポリジウムと大腸菌の不活化、東京大学工学部総合試験所年報、58、pp.65-70.
- ・Ohgaki S, Masago Y, Katayama H, Hirata T, Hashimoto A and Alam M Z B(2000) Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in a Watershed, The COE Symposium on Establishment and Evaluation of Advanced Water Treatment Technology Systems Using Functions of Complex Microbial Community, The University of Tokyo.
- ・平田 強(1999) クリプトスポリジウムの実態と対策、月刊浄化槽、No.284、pp.29-37.
- ・Y. Kanjo, I. Kimita, M. Iseki, S. Miyanaga, H. Okada, C. Banno, M. Matsumoto, Y. Shimada(2000) Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by *in vitro* excystation and animal infectivity. *Wat. Sci. Tech.*, 34(4), (*in press*).

- Z. Wu, I. Nagayo, A. Matsuo, S. Uga, I. Kimita, M. Iseki, Y. Takahashi(2000) Specific primer for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Molecul. Cell Prob.*, 200(14), (*in press*).
- N. Yamamoto, K. Urabe, M. Takaoka, K. Nakazawa, A. Goto, S. Kobayashi, M. Haga, H. Fuchigami, I. Kimata, M. Iseki(2000) Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *J. J. A. Inf. D.*, 74(6), (*in press*).
- 木俣 勲、井関基弘、村上 隆(1999) 水中に存在する *Cryptosporidium* オーシストの電子制菌装置による除去と不活化、*水処理生物学会誌*、35(1)、pp.59-66.
- 増田剛太、味澤 篤、根岸昌功、今村顕史、井関基弘、遠藤卓郎(1998) 下痢便からのクリプトスポリジウムの検出—駒込病院での成績、*臨床寄生虫学会誌*、10(1)、pp.72-74.
- 井関基弘、木俣 勲(1999) クリプトスポリジウム症—免疫不全患者における病態と治療の問題点、*日本医事新報*、No.3925、pp.7-13.
- 井関基弘(1999) 免疫不全患者における慢性クリプトスポリジウム症と免疫療法の可能性、*感染・炎症・免疫*、29(1)、pp.44-45.
- 井関基弘、木俣 勲(1999) クリプトスポリジウム症、*検査と技術*、28(2)、pp.108-114.
- 井関基弘、木俣 勲(1999) クリプトスポリジウム症、*Medical Practice*、16(11)、pp.1793-1795.
- 遠藤 卓郎、八木田健司(1999) 水質検査:我が国におけるクリプトスポリジウム問題、*東京都予防医学協会年報 1997 年度*、No.28、pp.219-221.
- Yagita K, et al.(1999) Typing of *Cryptosporidium parvum* oocysts using a system on PCR and RFLP analysis (*in preparation*).

2. 学会発表

- 大澤忠浩、桜井 豊、北澤弘美、国包章一(1999) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標としての藻類除去率、第 50 回全国水道研究発表会講演集、pp.114-115.
- 志村有通、竹馬大介、平田 強(1999) 遊離塩素の *Cryptosporidium parvum* 不活化効果、第 50 回全国水道研究発表会.
- 竹馬大介、志村有通、平田 強、本山信行、高橋和孝(1999) *Cryptosporidium parvum* オーシストのマウス感染性に及ぼすオゾンの影響、第 50 回全国水道研究発表会.
- Hirata T, Chikuma D, Shimura A, Hashimoto A, Motoyama N, Takahashi K, Moniwa T, Kaneko M, Saito S and Maede S (1999) Effects of ozonation and chlorination on viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. 8th Korea/Japan Symposium on Water Environment 1999 - Water Quality Management and Water Treatment Technologies, Cheju Island, Korea.
- Otaki M, Hirata T and Ohgaki S (1999) A study on aqueous microorganisms inactivation by photocatalytic reaction. 7th IAWQ Asian Waterqual '99 Taipei, Taiwan.
- Hashimoto A and Hirata T(1999) Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Sagami River, Japan. 7th IAWQ Asian Waterqual '99 Taipei, Taiwan.
- 橋本 温、遠藤卓郎、矢木田健司、平田 強(2000) 環境分離クリプトスポリジウムオー

- シストの PCR-RFLP 法による分子疫学的解析、第 34 回日本水環境学会年会。
- ・ 森田重光、志村有通、竹馬大介、鈴木めぐみ、平田 強、木村総一郎、本山信行(2000) オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化に対する水温の影響、第 34 回日本水環境学会年会。
 - ・ 志村有通、竹馬大介、平田 強(2000) 環境分離クリプトスポリジウムオーシストの PCR-RFLP 法による分子疫学的解析、第 34 回日本水環境学会年会。
 - ・ M. Iseki, I. Kimata, S. Uni, Y. Oga(1999) Evaluation of a newly developed direct immunofluorescent assay kit for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water specimens、第68回日本寄生虫学会。
 - ・ Y. Kanjo, I. Kimata, M. Iseki, S. Miyanaga, H. Okada, C. Banno, M. Matsumoto, Y. Shimada(1999) Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by *in vitro* excystation and animal infectivity. IWSA/IAWQ/I.O.A. Conference; Minimizing Risk from *Cryptosporidium* and other Waterborne Particles. Paris, April 19-22.
 - ・ 木俣 勲、井関基弘、浦上逸男(1999) 紫外線照射によるクリプトスポリジウムのオーシストの不活化、第55回日本寄生虫学会西日本支部大会。
 - ・ 宮本聡子、坂野千絵、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊、河野 孝 (1999) マウス感染試験による*Cryptosporidium parvum*のオーシスト不活化効果評価、第33回日本水環境学会。
 - ・ 松本みどり、島田 豊、河野 孝、貫上佳則、宮永聡子、坂野千絵、木俣 勲、井関基弘(1999) オゾン及びO₃/UV併用処理による*Cryptosporidium*の不活化効果、第50回全国水道研究発表会。
 - ・ 宮永聡子、坂野千絵、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊、河野 孝 (1999) 動物感染試験による*Cryptosporidium parvum*の不活化評価、第50回全国水道研究発表会。
 - ・ 国友新太、佐々木賢一、五十嵐千秋、黒川憲一、鴻野 卓、木俣 勲、井関基弘(1999) 加圧処理によるクリプトスポリジウムの不活化、第50回全国水道研究発表会。
 - ・ 宮永聡子、坂野千絵、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊、河野 孝 (1999) *Cryptosporidium parvum*のオーシスト不活化評価方法、第36回日本下水道研究発表会。
 - ・ 松本みどり、島田 豊、河野 孝、貫上佳則、宮永聡子、木俣 勲、井関基弘(1999) 促進酸化処理による*Cryptosporidium*オーシストの不活化効果、第36回日本下水道研究発表会。
 - ・ Z. Wu, I. Nagayo, A. Matsuo, S. Uga, I. Kimita, M. Iseki, Y. Takahashi(2000) Specific primer for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity、第 36 回日本下水道研究発表会。
 - ・ I. Kimata, M. Iseki, I. Urakami(2000) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ultraviolet irradiation and methods suitable for evaluation of effects、第69回日本寄生虫学会。
 - ・ 坂本照正、木俣 勲、井関基弘、八木正一(2000) 病原性微生物の検査方法に関する検討

- 新開発カートリッジによる多種同時検出へのアプローチ、第51回全国水道研究発表会.
- ・ Matsubayashi M., Sasai K., Tani H., Miyamoto T., Fukata T., Baba E., Lillehoj H., Nakanishi T., Matsuda H., Iseki M., Timata I., Yagita K., Endo T.(2000) Cross-reactivity of anti-eimeria chicken monoclonal antibodies with cryptosporidium parasites. 2nd Obihiro International Symposium on Strategies for research and control of emerging infectious diseases - *Toxoplasma, Cryptosporidium* and *Neospora* infection.
- ・ 山浦 常、荒木国興、戸塚恭一(2000) 赤痢アメーバ症の免疫学的診断法としてのdot-ELISA法の検討、第74回日本感染症学会総会、pp.94.
- ・ 西尾 治、秋山美穂、加藤由美子、鈴木 博、斎藤寛史、林留美子、山田靖治(2000) PCR法によるクリプトスポリジウムの検出について、74回日本感染症学会総会、pp.111.

3. 著書

- ・ 井関基弘(1999) クリプトスポリジウム症ー最新の動向と治療、長谷川修ら編、治療トピックス 100、南山堂、pp.398-403.
- ・ 井関基弘、木俣 勲(1999) 新興原虫感染症ークリプトスポリジウム症とサイクロスポーラ症、中山宏明ら編、現代感染症事情、医歯薬出版、pp.398-403.
- ・ 井関基弘(1999) クリプトスポリジウム症、大鶴正満ら監修、日本における寄生虫学の研究(6)、目黒寄生虫館、pp.571-585.
- ・ 井関基弘(1999) クリプトスポリジウム症とサイクロスポーラ症、竹田美文ら編、エマージングディゼイズ、近代出版、pp.335-372.
- ・ 井関基弘(1999) クリプトスポリジウム症、日本医師会編、感染症の診断・治療ガイドライン、医学書院、pp.108-111.
- ・ 井関基弘(1999) クリプトスポリジウム症、サイクロスポーラ症、山崎修道編、感染症予防必携、日本公衆衛生協会、pp.103-105、128-130.
- ・ 井関基弘、木俣 勲(2000) クリプトスポリジウム症、柴 孝也編、感染症治療ガイド、南山堂、pp.534-545.

平成11年度厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

研究課題名

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

分担研究報告書

平成12年3月

目次

1. 実験動物モデルの開発	1
分担研究者：山崎省二	
2. 原虫検出法の検討	3
分担研究者：荒木国興	
3. UF中空糸膜を用いた原虫濃縮方法の開発	13
分担研究者：平田 強、金子光美	
4. クリプトスポリジウムのオーシスト検出用に開発した直接蛍光抗体 法用試薬の改良と染色方法の検討	23
分担研究者：井関基弘	
5. クリプトスポリジウム等原虫類嚢子の検出方法の改良について	31
分担研究者：遠藤卓郎、黒木俊郎、平田 強	
6. 遺伝子操作法による原虫の検出法に関する研究	43
分担研究者：西尾 治	
7. 野生動物、特に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	65
分担研究者：笹井和美	
8. クリプトスポリジウム等病原微生物の河川水からの検出試験方法の 比較検討および各種動物における保有調査	69
分担研究者：黒木俊郎、遠藤卓郎	
9. 相模川水系における原虫汚染の実態と代替評価指標の検討	81
分担研究者：平田 強	
10. 浄水場における原水の原虫類出現状況と浄水処理による除去	105
分担研究者：平田 強	
11. 相模川河川水および養豚場放流排水中の <i>Cryptosporidium parvum</i> オーシストの遺伝子型の解析	121
分担研究者：平田 強、遠藤卓郎	
12. 直接ろ過によるクリプトスポリジウムオーシスト代替指標の検討	127
分担研究者：眞柄泰基、国包章一	

分担研究報告書 1

実験動物モデルの開発

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

国立公衆衛生院 衛生獣医学部 山崎省二

研究要旨

平成9年、10年にクリプトスポリジウムによる感染症の実験動物をモデルとして無菌ヌードマウスを検討し、実験動物モデルに適していることを報告した。その際、牛由来のクリプトスポリジウムを使用した。他の動物由来のクリプトスポリジウムは未検討であった。無菌ヌードマウスを用いるための費用、マンパワーの関係から多種の動物由来クリプトスポリジウムを用いることが不可能なため、牛以外のどの動物由来のクリプトスポリジウムを用いるか判断するために、高齢者で感染症下痢症を呈する患者便からクリプトスポリジウムの検出を行い遺伝子配列を調べ、どの動物由来のクリプトスポリジウムが感染しているか検討した結果、ブタ由来のクリプトスポリジウムの相同性が高いことが知られた。今後、ブタ由来のクリプトスポリジウムを用いた実験動物モデルを確立したい。

A. 研究目的

水道水由来のクリプトスポリジウム症は我国のみならず世界的な問題となった。クリプトスポリジウム症を研究するための実験動物モデルとして、無菌ヌードマウスを牛由来のクリプトスポリジウム用いた実験系を検討し、実験動物モデルとして適していることを昨年度までに報告した。牛以外の動物由来のクリプトスポリジウムの実験動物モデル系を開発する際に、どの動物由来のクリプトスポリジウムを用いるかを判断するために、どの動物由来のクリプトスポリジウムが人のクリプトスポリジウム症を引き起こしているかを知る目的で、高齢者で感染症下痢症を呈する患者便を用いてクリプトスポリジウムの検出、遺伝子配列等を検討した。

B. 研究方法

1998年1月から1999年7月に青森県の一定の病院内科で感染症下痢症と診断された60歳以上の患者便340検体を用い、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 蛍光抗体染色法でクリプトスポリジウムの検出を行った。また、FITC 蛍光抗体染色法で陽性を示した検体からクリプトスポリジウムのDNAを抽出し、西尾の方法で、polymerase chain Reaction (PCR) を行った。さらにPCRで陽性を示した検体につき、クリプトスポリジウムの遺伝

子配列をみた。

FITC 蛍光抗体染色法：和光純薬のクリプトスポリジウム検出キットを使用した。

DNA の抽出：検体を凍結融解（5 回）し、Lysis buffer を加え Proteinasek 処理後 50℃ で 1 時間、98℃ で 5 分加温した。

DNA の増幅：西尾の方法に従い PCR を行った。PCR primer はクリプトスポリジウムの 18S RNA をコードしている部分で設定し、Cryba+41, Cryba-620 を使用した。

遺伝子配列：DNA の精製は quick RCR Purification Kit (QLAGEN) を用いて行った。遺伝子配列は Direct Sequencing 法を用い Sequencer は ABI310 を使用し、ABI RRISM Big Pye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (PERKIN ELMER) を用いた。

C. 結果

感染症下痢症患者便からのクリプトスポリジウム検出率は検体 340 に対し、34 検体陽性となり 10%であった。RCR 陽性は 7 検体で 2%であった。7 検体の遺伝子配列は全て同一であった。ヒト、ウシ、ブタ由来のクリプトスポリジウム遺伝子配列を今回分離したクリプトスポリジウムの遺伝子配列と比較したところ、ブタで 87.7%と高い相同性が認められた。

これらの結果から、青森の一定地区のクリプトスポリジウム感染はブタ由来の可能性が高く、今後ブタ由来のクリプトスポリジウムに対する実験動物モデルの開発を行う。

なお、PCR 並びにクリプトスポリジウムの遺伝子配列に関する仕事は、国立公衆衛生院ウイルス室長 西尾治先生の協力を頂いた。これに深く感謝致します。

分担研究報告書 2

原虫検出法の検討

分担研究者 荒木国興

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

分担研究：原虫検出法の検討

分担研究者： 荒木 国興 国立公衆衛生院衛生微生物学部 部長

研究協力者： 山浦 常 東京女子医科大学中央検査部感染症対策科 講師
戸塚 恭一 東京女子医科大学中央検査部感染症対策科 教授
野上 貞雄 日本大学生物資源科学部獣医学科 教授
鈴木 荘介 名古屋空港検疫所支所 支所長
谷本 忠司 高知県中央家畜保健衛生所

研究要旨

人、牛、カモシカ、犬などの便から原虫の検出を試み、*Cryptosporidium parvum* が検出された海外渡航者及び牛の便は遺伝子解析に供与した。また、人への感染源になるかどうかを推測するためにクマネズミ由来の *C.parvum* の他の動物への感染実験を行ったが、スキットマウス及びモルモットには感染が認められなかった。一方、*Cryptosporidium*、*Giardia* の検査に必要な positive control の保存法及び2種原虫の検出に用いられている蛍光抗体染色試薬についても比較検討した。その結果、市販されているクリプトスポリジウム コントロールスライドは冷蔵庫に保管しておけば、使用期限より1年以上経過しても抗体酸染色法、蛍光抗体染色法による検査に支障のないことが分かった。また、*Giardia* では、2年以上保管するときは糞便を塗布したスライドを冷暗所に保存するより 10%ホルマリン液に入れて保存する方が嚢子に変形しないことが判明した。蛍光抗体染色試薬の検討では、Waterborne 社の A100FL Aqua-Glo G/C が *Giardia* / *Cryptosporidium* に対する蛍光が強く、2%DABCO グリセリンで封入し、遮光した状態で冷蔵庫に保管すれば約1年間は適度の蛍光を保っていたことから、両原虫の検査に最も適しているように思われた。

1 研究目的

わが国ではこれまでに人、牛、犬、ネズミ、猫、豚、ヒツジなどから *C.parvum* が検出されているが、人、牛以外の *C.parvum* が人への感染源になるかどうかについては明らかにされていない。人及び他の動物から得られた *C.parvum* の感染源の疫学的解析のために遺伝子診断法が行われるようになったが、異なる動物間だけでなく異なる地域における同一の動物間での差異についての検討は必ずしも十分ではない。特に、遺伝子診断で差が認

められてもその結果が人に対する病原性の差異を示すとは言い切れないので、動物モデルを用いた感染実験も重要と思われた。

また、人や動物の便を他の機関から供与してもらって検査するとき、一度に多数の検体を入手するのが難しいこともあるので、送付してもらうまでの保存状態や保存期間について検討しておく必要がある。そこで、渡航者の下痢便及び子牛の下痢便については、重クロム酸カリウム溶液を加えず、約2ヶ月間低温で保管しておいたものについて検討した。

クリプトスポリジウム以外の原虫による下痢症を考慮すれば、*Giardia* と赤痢アメーバの検査も重要なので、両原虫の検査法についても検討する。重篤な症状を呈するアメーバ症では原虫の検出が困難なこともあり、早期診断・早期治療の観点から免疫学的検査法が併用されている。しかし、市販の赤血球凝集反応 (IHA) のキットでは疑陰性が認められるため、使用されなくなった。したがって、IHA に代わる簡便な免疫学的検査法を確立し、誰にでも検査できるようにする必要がある。

研究方法

1 人及び動物の便からの原虫検出

1-1) ヨード法による *Giardia* の栄養型、嚢子の検出

便が少量のときは便を溶かした液を二枚のガーゼで濾過してから遠心 (2000 rpm で 7 分間) し、上清を捨ててから沈渣を少量の水とよく混和して約 15 μ l をスライドグラスに滴下する。ヨード液を1滴加え、混和してからカバーグラスを載せ 200 倍で鏡検した。ある程度の量があるときはホルマリン・エーテル法を改良したホルマリン・酢酸エチル法で得た沈渣について検査した。

1-2) 抗酸染色法による *Cryptosporidium* オーシストの検出

約 15 μ l の糞便液を予めヤギ血清を塗布してある直径 1cm のリングマークスライドに塗布し、風乾後メタノールで数分間固定してから使用時まで標本箱に入れて低温で保管した。術式は既に報告されている方法に準じた。すなわち、チール・カルボールフクシン液 (武藤化学株式会社) で 5 分間染色→水洗後に 5%硫酸で脱色 (15~30 秒) →水洗後に 0.3%メチレンブルーで液で 1 分間染色→水洗、風乾後にダイヤテックス (松浪硝子工業株式会社) で封入→400 倍で鏡検。

1-3) 蔗糖浮遊法による *Cryptosporidium* オーシストの検出

糞便約 0.5g に水 10ml を加えてよく攪拌し、ガーゼで濾過してから 2500rpm で 7 分間遠心する。上清を捨て、沈渣に比重 1.266 の蔗糖液を約 5ml 加え、よく攪拌してから試験管の最上部が盛り上がるまで蔗糖液を加え静置する。30 分後にカバーグラスに液を付着させ、スライドグラスに載せ 400 倍で鏡検。

1-4) 蔗糖浮遊法の改良法による *Cryptosporidium* オーシストの検出

国立感染症研究所の遠藤らが研修等で指導している方法に準じた。すなわち、遠心沈殿法で得た沈渣に約 3ml のリン酸緩衝液 (PBS) を加え攪拌してから 2ml の蔗糖液をトラス

ファーピペットで吸い取り、ピペットの先端を遠沈管の底につけ糞便層との境界面を乱さないように静かに注入する。2500rpm で 2 分間遠心後に上下の液の境界面をピペットで吸い取り別の遠沈管に移し、水を加えてよく攪拌してから 2500rpm で 7 分間遠心沈殿して沈渣を得る。この沈渣を抗酸染色法及び蛍光抗体法で検査する。

1-5) 直接塗抹法、ヨード法及びコーン染色法による赤痢アメーバの検出

患者の便に温めた生理食塩水を加え、混和してから赤痢アメーバの栄養型を検出するために 200 倍で鏡検した。嚢子の検出には、マッチ棒の頭ほどの便にヨード液を滴下し 200 倍で鏡検した。赤痢アメーバが疑われたときは確認のためコーン染色法を行った。

1-6) 蛍光抗体法による *Cryptosporidium* / *Giardia* の検出

市販の *Cryptosporidium*、*Giardia*、*Cryptosporidium* / *Giardia* の FITC 標識モノクロナル抗体などを用い、次の手順で行った。

糞便を塗布したスライドガラスに蛍光試薬を 25 μ l 滴下し、マイクロチップでリング内に広げる→遮光して 30 分間反応させる→PBS で試薬を洗い流す→2%DABCO グリセリンで封入（鏡検時まで冷蔵庫で保管してもよい）→400 倍で鏡検。

2 糞便及び positive control の保存方法についての検討

他機関に依頼した糞便は低温で約 2 ヶ月間保管したものを宅配便で送ってもらい、検査時まで重クロム酸カリウム液あるいは 10%ホルマリン液を加え、低温室で保管した。糞便を塗布したスライドガラスは標本箱に入れ低温室に保管し、作製後 1 年以上経過してから抗酸染色あるいは蛍光抗体法で検査した。10%ホルマリン液で保管した糞便も同様に検査したが、検査時には遠心洗浄（2500rpm で 7 分間、3 回）した。なお、2.5%重クロム酸カリウム液で保管した牛の糞便については 10 ヶ月目まで検討した。

3 蛍光抗体染色試薬の比較検討

Waterborne 社の A 100 F L Aqua-Glo *Giardia*/*Cryptosporidium*、Meridian 社の Merifluor DFA *Giardia*/*Cryptosporidium*、和光純薬のクリプトスポリジウム検出用キット、TechLab 社の *Giardia*/Crypto 直接免疫蛍光法試薬（カタログ No. T-4001）、*Giardia* 直接免疫蛍光法試薬（カタログ No. T-4002）、Crypto 直接免疫蛍光法試薬（カタログ No. T-4003）などについて蛍光強度、2%DABCO グリセリンで封入後の退色具合について比較検討した。

4 クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) の感染実験

クマネズミ由来の *C.parvum* の他の動物に対する感染性を検討するため、クマネズミから分離した 2 株の *C.parvum* オーシストを免疫抑制剤 Dexamathazone phosphate で処理した Wistar 系ラットに感染させて増殖した。これらの *C.parvum* オーシストを 3×10^5 個づつスキットマウス、Wistar 系ラット、モルモット各 10 匹に経口投与した。

5 dot-ELISA 法による赤痢アメーバ症の検査

IHA キットに代わる簡便な免疫学的検査法を確立するため、IHA 陰性のアメーバ症 7 例を含む 36 例のアメーバ症患者、24 例の他の寄生虫症患者及び健常人 40 例の血清について ELISA 法と dot-ELISA 法で検査し、有用性を検討した。術式は天野ら (1998) に準じたが、時間の短縮など一部改変した。すなわち、抗原を吸着させたニトロセルロース膜を湿润箱内のパラフィルムの上に置く→1:200 に希釈した患者血清を 70 μ l 加え 37 度で 40 分反応させる→リン酸緩衝液で 3 回洗浄→1:750 に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ウサギ血清を 70 μ l 加え 37 度で 40 分反応させる→リン酸緩衝液で 3 回洗浄→4-クロロ 1-ナフトール液で 7 分発色→蒸留水に入れ反応を停止する→数回洗浄後に風乾。

6 研究結果及び考察

1) 人及び動物における *Giardia* の検査結果

下痢、腹痛などの消化器症状で都内の病院を受診した患者 110 名の下痢便あるいは軟便についてヨード染色法及び蛍光抗体法 (Waterborne 社の A100 FL 1:4 希釈使用) で検査したが *Giardia* は検出されなかった。また、名古屋空港検疫所支所で採取した渡航者の下痢便、軟便について検査したが、*Giardia* は検出されなかった (表 1)。

表 1 渡航者の下痢便、軟便における *Giardia* の検査結果

滞在日数	検査数	陽性数 (%)
3 ~ 7	25	0
8 ~ 14	7	0
15 以上	4	0

* : 渡航先別で見ると東南アジア (インドネシア、タイ、フィリピンなど) 27 名、中国 3 名、ブラジル 2 名、チュニジア、サイパン、ウズベキスタン、韓国各 1 名であった。

今回の検査では *Giardia* は検出されなかったが、滞在日数が 7 日以内の渡航者が全体の約 7 割を占めていたためと思われる。既に報告されているが、今後このような調査を継続する場合は 2 週間以上国外に滞在した渡航者に限定して検査する方が効率的であろう。

次に下痢、軟便その他の疾患で動物病院を訪れた犬 65 匹及び都内で飼育されていた犬 33 匹の計 98 匹について上記の検査法で検査した結果、肛門嚢炎で受診した犬 1 匹から *Giardia* のシストが検出された (図 1 B 及び表 2)。

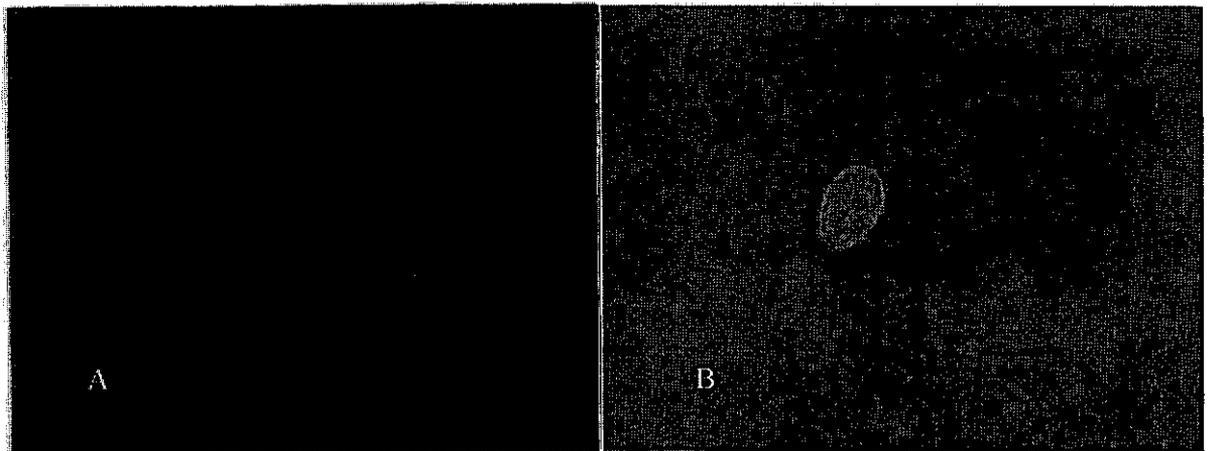


図1. 蛍光抗体法による人の便 (A) 及び犬の便 (B) からの *Giardia* のシスト

表2 犬の便における *Giardia* の検査結果

入手場所	検査数	陽性数 (%)
動物病院A	58	1 (1.7)
動物病院B	7	0
その他	33	0

これまでの3年間の人や動物の便の検査では、主に *Cryptosporidium* オーシストの検出に主眼をおいたが、今回の検査で犬から *Giardia* のシストが検出されたことから、今後は犬、猫、家畜、野生動物などの便についても *Giardia* の検査をする必要がある。糞便内の *Giardia* の検査には主にヨード染色法が用いられてきたが、図1Bに示したように蛍光抗体法で検査するとより検出しやすかった。シストの大きさが *C.parvum* オーシストの2倍以上あるので、200倍で容易に検査できるので、今後はできるだけヨード染色法と併用することが望ましい。

2) 人及び動物における *Cryptosporidium* オーシストの検査結果

都内の病院を受診した110名の患者の便について蔗糖浮遊法、抗酸染色法及び蛍光抗体法 (Waterborne社のA100 FL 1:4希釈使用) で検査したが *C.parvum* オーシストは検出されなかった。渡航者36名の便をホルマリン・酢酸エチル法で得た沈渣について抗酸染色法及び蛍光抗体法で検査した結果、滞在期間が2週間以上の渡航者1名の便から *C.parvum* オーシストが検出された (表3)。