

平成12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

クリプトスポリジウム及びジアルジアの
診断、治療及び疫学に関する研究
(水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に
係る健康リスク評価及び管理に関する研究)

総括研究報告書

平成13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

クリプトスポリジウム及びジアルジアの診断、治療及び疫学に関する研究（水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスク評価及び管理に関する研究）

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 水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスクの的確な評価方法を確立するため、ヒト等の感染実態の把握と評価、感染リスクの評価と解析、感染系の確立と感染力の評価、及び、浄水処理におけるクリプトスポリジウム除去代替指標につき検討した。感染実態から見てクリプトスポリジウム症等の発生率は必ずしもそれほど高くないが、遺伝子解析ではヒト由来クリプトスポリジウムの中に動物型のものであることが認められた。ペットとして飼われているイヌとネコや野外放牧牛も、ある程度の割合でクリプトスポリジウム症に感染していることが明らかになった。水道水を通じてのクリプトスポリジウム症感染リスクを、特定の水道水の実測データを用いて計算した結果、その濃度が0.013オーシスト/l以上の日を除くことにより、年間感染リスクの95%値が 10^{-4} 以下となることが示された。感染系の確立及び感染力の評価に関しては、クリプトスポリジウムの細胞培養の可能性、クリプトスポリジウム脱嚢試験方法の適正化の必要性を明らかにした。また、水道のろ過におけるクリプトスポリジウムオーシスト除去の代替指標として、緑藻類*Scenedesmus quadricauda*が有効であることを明らかにした。

分担研究者	井関 基弘	金沢大学医学部 教授
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部 室長
	大垣真一郎	東京大学大学院工学系研究科 教授
	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
	更科 孝夫	帯広畜産大学畜産学部 教授
	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

A. 研究目的

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症新法）において、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症は全数届出の四類感染症に指定されており、また、わが国でもこれまでに水道水を介して大規模な集団感染が起きたことから、厚生労働

省（旧厚生省）では「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」を定めて、水道水質管理の徹底につき指導しているところである。しかしながら、クリプトスポリジウム等の健康リスク評価に関わる科学的な情報がまだ十分でないため、確実な予防対策を立てることが困難な状況にある。本研究では、水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスクの適切な管理に向けて、水系の汚染状況や浄水処理における挙動と関連付けた健康リスクの的確な評価方法を確立し、これをもって水道水の安全確保と国民の健康増進に寄与するものである。

B. 研究方法

1. ヒト等の感染実態の把握と評価

1) ヒト等のクリプトスポリジウム症及びジアルジア症感染実態の調査

大阪市内の2医療機関で入院患者及び外来患者を対象に、下痢便123検体、軟便408検体、有形便265検体の合計796検体につき糞便検査を行い、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の感染状況につき調査した。検体の大半は成人由来のものであった。また、これとは別にある病院で、高齢者（60歳以上）578名及び乳幼児（2歳以下）下痢症患者86名を対象に糞便検査を行い、クリプトスポリジウム症の感染状況につき調査した。このほか動物に関しても、ある動物管理センターに引き取られたイヌ60頭とネコ120頭の糞便検査を行い、クリプトスポリジウム症の感染状況につき調査した。また、北海道十勝管内9牧場の9～39月齢の野外放牧雌牛359頭を対象に、糞便へのクリプトスポリジウムオーシスト排出状況を調査した。

2) クリプトスポリジウム症及びジアルジア症感染経路等の検討

横浜市立市民病院に来院した下痢症患者等を対象に、海外渡航歴の有無、国内旅行歴の有無、飲用水の種類、水浴等の有無、動物飼育の有無等につきアンケート調査を行い、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の感染経路や感染に至る背景を検討した。

3) クリプトスポリジウムの遺伝子解析

クリプトスポリジウムの遺伝子型につき、ヒト由来のもの4件をはじめ計17件を用いて検討した。また、クリプトスポリジウムの遺伝子レベルでの分類を明らかにするため、18SrRNAの遺伝子解析を行った。

4) クリプトスポリジウム及びジアルジアに対する酵素免疫法による血清抗体価試験の応用

クリプトスポリジウム及びジアルジアに対する酵素免疫法による血清抗体価試験の適用可能性につき検討した。クリプトスポリジウムに関しては、2次反応に抗ヒトIgGを用いた場合と抗ヒトIgMを用いた場合につき、患者陽性血清、無症状者血清及び正常ヒト血清を用いて試験した。また、ジアルジアに関しては、患者陽性血清等が得られなかったことから、スナネズミによる動物感染モデルを利用して試験した。

2. 感染リスクの評価と解析

神奈川県寒川町の水道水中におけるクリプトスポリジウム濃度の実測データを用いて、1年間を通じてのヒトのクリプトスポリジウム感染リスクをモンテカルロ法によって計算

し、その濃度と感染リスクの関係につき解析した。

3. 感染系の確立及び感染力の評価に関する検討

1) クリプトスポリジウムの細胞培養方法の検討

ヒト結腸腺癌由来の Caco-2 細胞及びヒト回盲腺癌由来の HCT-8 細胞を宿主としたクリプトスポリジウムの感染実験を行い、接種量と感染個体数の関係や、原虫の増殖特性につき検討した。

2) クリプトスポリジウム脱嚢試験方法の検討

クリプトスポリジウムオーシストの脱嚢試験における酸性 HBSS による前処理の有無、前処理時間及び脱嚢処理時間の影響を、2 種類の脱嚢液により、新鮮な無処理オーシストを用いた場合と UV 照射オーシストを用いた場合につき評価した。

4. 浄水処理におけるクリプトスポリジウム除去代替指標の検討

凝集-砂ろ過の室内実験装置を用いて、クリプトスポリジウムオーシストと緑藻 *Scenedesmus quadricauda* のろ過による除去特性を比較検討した。

C. 研究結果及び考察

1. ヒト等の感染実態の把握と評価

1) ヒト等のクリプトスポリジウム症及びジアルジア症感染実態の調査

大阪市内の 2 医療機関で入院患者及び外来患者を対象に、合計 796 検体につき糞便検査を行った結果、全てクリプトスポリジウム症及びジアルジア症陰性であった。また、これとは別にある病院で糞便検査を行った結果、高齢者 578 名の 1%がクリプトスポリジウムに感染していたが、乳幼児下痢症患者 86 名では全てクリプトスポリジウム感染は認められなかった。このほか、ある動物管理センターに引き取られたイヌとネコは、いずれもその 5%がクリプトスポリジウム症に感染していた。また、北海道十勝管内 9 牧場の 9~39 月齢の野外放牧雌牛 359 頭を対象に、糞便へのクリプトスポリジウムオーシスト排出状況を調査した結果、4 牧場の 7 頭（約 2%）で陽性と認められた。検出されたクリプトスポリジウムは全て *Cryptosporidium muris* で、陽性牛が認められた牧場は地域的に広く分散していた。

2) クリプトスポリジウム症及びジアルジア症感染経路等の検討

横浜市立市民病院に来院した下痢症患者等を対象にアンケート調査を行ったところ、クリプトスポリジウム症患者 2 名はいずれも海外で感染した可能性が高く、また、ジアルジア症患者 5 名のうち 2 名も海外で感染した可能性が高かったが、残り 3 名の感染経路等は明らかにできなかった。

3) クリプトスポリジウムの遺伝子解析

クリプトスポリジウムの遺伝子型につき、ヒト由来のもの 4 件をはじめ計 17 件を用いて検討した結果、特にヒト由来のものではヒト型でなく動物型のものが大半を占めており、動物からヒトへの感染が示唆された。また、クリプトスポリジウム 18SrRNA の遺伝子解析を行って系統樹を作成した。

4) クリプトスポリジウム及びジアルジアに対する酵素免疫法による血清抗体価試験の応用
クリプトスポリジウム及びジアルジアに対する酵素免疫法による血清抗体価試験の適用可能性につき検討した。その結果、クリプトスポリジウムに関しては、2次反応に抗ヒト IgM を用いることによって、患者陽性血清と無症状者血清を正常ヒト血清と明確に区別することができた。

2. 感染リスクの評価と解析

神奈川県寒川町における水道水中のクリプトスポリジウム濃度の実測データを用いて、1年間を通じてのヒトのクリプトスポリジウム感染リスクをモンテカルロ法によって計算した結果、その濃度が0.013 オーシスト/l 以上の日を除くことにより、年間感染リスクの95%値が 10^{-4} 以下となることが示された。

3. 感染系の確立及び感染力の評価に関する検討

1) クリプトスポリジウムの細胞培養方法の検討

Caco-2 細胞及び HCT-8 細胞を宿主としたクリプトスポリジウムの感染実験を行い、いずれの場合も、感染が容易に成立することを確認したが、接種量と感染個体数の相関が得られず、また、48時間後には原虫の増殖が停止し、その後は比較的速やかに消失した。

2) クリプトスポリジウム脱嚢試験方法の検討

クリプトスポリジウムオーシスト脱嚢試験における脱嚢率は、酸性 HBSS による前処理の有無や脱嚢処理時間だけでなく、脱嚢の判定方法及び脱嚢液の種類によって大きな差があり、脱嚢試験方法の適正化が必要であることが示唆された。

4. 浄水処理におけるクリプトスポリジウム除去代替指標の検討

凝集-砂ろ過の室内実験において、緑藻 *Scenedesmus quadricauda* はクリプトスポリジウムオーシストと類似した除去特性を示し、ろ過におけるクリプトスポリジウムオーシスト除去の代替指標として有効であることが明らかとなった。

D. 結論

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスクの的確な評価方法を確立するため、ヒト等の感染実態の把握と評価、感染リスクの評価と解析、感染系の確立と感染力の評価、及び、浄水処理におけるクリプトスポリジウム除去代替指標につき検討した。感染実態から見てクリプトスポリジウム症等の発生率は必ずしもそれほど高くないが、遺伝子解析ではヒト由来クリプトスポリジウムの中に動物型のものもあることが認められた。ペットとして飼われているイヌとネコや野外放牧牛も、ある程度の割合でクリプトスポリジウム症に感染していることが明らかになった。水道水を通じてのクリプトスポリジウム症感染リスクを、特定の水道水の実測データを用いて計算した結果、その濃度が0.013 オーシスト/l 以上の日を除くことにより、年間感染リスクの95%値が 10^{-4} 以下となることが示された。感染系の確立及び感染力の評価に関しては、クリプトスポリジウムの細胞培養の可能性、クリプトスポリジウム脱嚢試験方法の適正化の必要性を明らかにした。また、水道のろ過におけるクリプトスポリジウムオーシスト除去の代替指標として、緑藻 *Scenedesmus*

*quadricauda*が有効であることを明らかにした。

本年度は3ヶ年計画の研究の初年度に当たるので、次年度における研究では本年度の研究成果をさらに発展させるとともに、水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスクに関して、汚染源から発症に至るまでの主な要因を見極めることにより、その確な評価手法の確立を併せて検討する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto, N., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Gotoh, A., Haga, M., Fuchigami, H., Kimata, I., Iseki, M.(2000) Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. J. J. A. Inf. D., 76, pp.518-525.
- Wu, Z., Nagano, I., Matsuo, A., Uga, S., Kimata, I., Iseki, M., Takahashi, Y.(2000) Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Molecul. & Cell Probes*, 14, pp.33-39.
- Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., Miyana, S., Okada, H., Banno, C., Matsumoto, M., Shimada, Y.(2000) Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. *Water Sci. & Technol.*, 41, pp.119-125.
- 井関基弘、木俣 勲(2000) 感染症治療ガイド、クリプトスポリジウム症、治療、82(増刊号)、pp.943-945.
- 井関基弘、木俣 勲(2000) クリプトスポリジウム症、小児科、41、pp.1099-1105.
- 井関基弘、木俣 勲(2000) クリプトスポリジウム症?免疫不全小児における難治性慢性下痢、小児科診療、63、pp.1055-1058.
- 井関基弘、木俣 勲(2000) 病気のはなし：クリプトスポリジウム症、検査と技術、28、pp.108-114.
- 平田哲生、座覇 修、金城福則、斎藤 篤、当真 弘、佐藤良也、中村 広、井関基弘(2000) 最近経験したサイクロスポーラ症の1例、病原微生物検出情報、21、pp.194-195.
- 井関基弘、木俣 勲(2000) 感染性食中毒 10：原虫、治療学、34、pp.759-761.
- Hirata T, Shimura A, Chikuma D, Morita S, Kimura S, Motoyama N and Hoshimawa H (2001) The effect of temperature on the efficacy of ozonation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Water Science and Technology*, 41(7) (In press).
- 志村有通、竹馬大介、森田重光、平田 強(2001) 塩素の *Cryptosporidium parvum* オーシスト不活化効果とその濃度依存性、水道協会雑誌、70(1)、pp.26-33.

2. 学会発表

- Kimata, I., Iseki, M., Urakami, I.(2000) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ultraviolet irradiation. 12th German-Japan Symposium on Protozoal Diseases, July 2000, Bonn.
- Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., et al.(2000) Effect of co-existing substances on the inactivation

Cryptosporidium spp. oocysts with ozone. 4th International Conference of Water Quality Control, July 2000, Poland.

- Hermida F. M., 木俣 勲、井関 基弘(2000) 培養細胞 (HCT-8) 系を用いたクリプトスポリジウムの培養と原虫増殖の定量法の検討、第 33 回日本原生動物学会、2000 年 11 月.
- 木俣 勲、井関基弘、児玉義勝(2000) 抗クリプトスポリジウム卵黄抗体の作成と *Cryptosporidium* 感染 SCID マウスにおけるその免疫治療効果、第 56 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2000 年 10 月.
- 増田剛太、今村顕史、味沢 篤、根岸昌功、井関基弘、遠藤卓郎(2000) 旅行者下痢症症例からのクリプトスポリジウムの検出、第 10 回臨床寄生虫学会、2000 年 6 月.
- 八木田健司、泉山信司、橋 祐司、増田剛太、井関基弘、古谷宏二、遠藤卓郎(2000) クリプトスポリジウムの PCR-RFLP 解析による Genotyping、第 55 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2000 年 10 月.
- 大垣眞一郎、片山浩之、平田 強、河村清史、保坂三継、金子光美 (2000) 許容感染リスクについて、第 3 回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp.161-162.
- 真砂佳史、大垣眞一郎、片山浩之、橋本 温、平田強 (2000) 相模川流域の水供給におけるクリプトスポリジウム起因のリスク評価、土木学会第 55 回年次学術講演会講演概要集、pp.VII-78.
- 小林康宏、金 漢承、秋葉道宏、国包章一(2001) クリプトスポリジウムオーシスト除去指標に関する研究、第 52 回全国水道研究発表会、pp.166-167、2000 年 5 月.
- 宇塚雄次、田邊茂之、長沢秀行、更科孝夫(2001) 北海道十勝地方の公共牧場の健康牛におけるクリプトスポリジウムの汚染実態調査、第 48 回日本衛生動物学会・寄生虫学会北日本支部合同大会.
- 西尾 治、秋山美穂、加藤由美子、鈴木 博、斉藤寛史、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、日本感染症学雑誌、74(9)、pp.796.
- Morita S, Suzuki M, Motoyama N, Morioka T, Hoshikawa H, Fujiwara M and Hirata T (2001) The effects of temperature and intensity on the efficacy of ultraviolet irradiation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Proceedings of IWA Asia-Pacific Regional Conference* (Accepted).

平成12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

クリプトスポリジウム及びジアルジアの
診断、治療及び疫学に関する研究
(水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に
係る健康リスク評価及び管理に関する研究)

分担研究報告書

平成13年3月

目 次

1. ヒトにおけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの感染実態調査	1
分担研究者：井関基弘	
2. 北海道十勝地方の公共牧場の健康牛におけるクリプトスポリジウムの汚染実態調査	7
分担研究者：更科孝夫	
3. 水系によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染の実態の把握	15
分担研究者：黒木俊郎、遠藤卓郎	
4. クリプトスポリジウム感染の疫学並び分子疫学に関する研究	25
分担研究者：西尾 治	
5. 消化管寄生性原虫感染症の血清疫学に関する検討	39
分担研究者：遠藤卓郎、黒木俊郎	
6. クリプトスポリジウムの感染リスクと環境水中における濃度変動に関する研究	53
分担研究者：大垣真一郎	
7. <i>Cryptosporidium parvum</i> の細胞培養に関する基礎的検討	59
分担研究者：遠藤卓郎、黒木俊郎	
8. <i>Cryptosporidium parvum</i> オーシストの脱嚢試験方法の改良	71
分担研究者：平田 強、金子光美	
9. クリプトスポリジウムオーシスト除去の代替指標に関する研究	85
分担研究者：眞柄泰基、国包章一	

分担研究報告書 1

ヒトにおけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの
感染実態調査

分担研究者 井関基弘

分担研究報告書

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係わる 健康リスク評価および管理に関する研究

ヒトにおけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの感染実態調査

分担研究者	井 関 基 弘	金沢大学医学部 教授
研究協力者	木 俣 勲	大阪市立大学医学部 助手
	阿 部 仁一郎	大阪市立環境衛生研究所保健疫学課 研究員
	平 山 幸 雄	大阪社会医療センター 保健主幹

研究要旨：クリプトスポリジウムおよびジアルジアのヒトにおける感染実態を把握することを目的として、大阪市内の2医療機関で入院患者および外来患者を対象に糞便検査を実施した。今年度の検査数は下痢便 123 検体、軟便 408 検体、有形便 265 検体の合計 796 検体であり、検査はシヨ糖遠心浮遊法で行なった。結果は全て陰性であった。今回の検体は大半が成人由来のものであったので、今後は小児病院等における下痢患者の検体も調査対象に含めて実施する予定である。

A. 研究目的

クリプトスポリジウムのオーシストやジアルジアのシストは耐塩素性なので、水道水が汚染されると集団感染が起こる。飲料水によるクリプトスポリジウムの集団感染の発生は、欧米では1980年代の中頃から報告されるようになり、1993年には米国のミルウォーキーで30万4千人が発症して大問題になった。わが国でも、1994年には神奈川県平塚市で461人、1996年には埼玉県越生町で約1万人の集団感染例を経験した。このことから、耐塩素性原虫に対する水道水の安全管理が緊急の課題となり、浄水処理場においても下水処理場においても水質検査や処理工程の改善などの対策がとられるようになった。しかし、浄水処理や下水処理を通常の処理法で綿密におこなっても、オーシストやシストを完全に除去することは困難であり、水道の原水や流入下水が多数の原虫で汚染された場合は処理水にも漏れてくることになる。最近の調査では、わが国においても河川水や下水からクリプトスポリジウムやジアルジアがかなり頻りに検出されることが明らかになった。

その主要な汚染源は患者なのか感染動物なのか。ウシ、イヌ、ネコ、ネズミなどにおける疫学的調査報告はかなり蓄積されてきたが、ヒトに関するデータは極めて少ない。患者の発生状況を的確に把握することは、水道水の健康リスク評価や安全管理を考える上で欠かせない。そこで、本研究はヒトにおける感染の実態を明らかにすることを目的として糞便検査を実施した。

B. 研究方法

大阪市内の2医療機関で一般検査室に提出される糞便材料を検査対象とした。入院患者および外来

患者が含まれ、糞便提出の理由は術前・術後の潜血検査を目的とするものが大半であり、感染性胃腸炎の疑いや、虫卵・原虫の検査を目的とする検体は極めて少なかった。その中から任意に選択した下痢便 123 検体、軟便 408 検体、有形便 265 検体の合計 796 検体について、クリプトスポリジウムとジアルジア検出のための検査を実施した。

検査には約 1g の糞便を用い、比重 1.2 のシヨ糖液によるシヨ糖遠心浮遊法でおこなった。

(倫理面への配慮)

一般検査室での検査終了後に廃棄される糞便検体を、検査部責任者の許可を得て分与してもらい、患者の氏名や基礎疾患等の個人情報が出漏れないよう配慮した。

C. 研究結果

今回検査をおこなった 796 検体からはクリプトスポリジウムもジアルジアも検出されず、全て陰性であった。

D. 考察

今回の調査ではすべて陰性であったが、検査した下痢便はまだ 123 検体にすぎず、しかも、検査対象は種々の基礎疾患を有して入院している成人の検体が大半を占めることから、この結果で国内における流行の実態を云々することはできない。今後、さらに検査対象や検査地域の範囲を広げ、検体数を大幅に増やして検査を継続する必要がある。

クリプトスポリジウム症とジアルジア症は、1999 年 4 月から施行された感染症新法で届出感染症に指定された。しかし、国内の医療機関における両症の認識や検査は全く不十分であり、とくにクリプトスポリジウムの検出には特殊な検査法が必要なことから、日常的に的確な検査を実施している施設は極めて少ない。ちなみに、昨年 (2000 年) の届出数は赤痢アメーバ症が 367 例であるのに対して、ジアルジア症は 93 例、クリプトスポリジウム症は僅か 3 例である。これはクリプトスポリジウム症患者が実際に少ないのではなく、十分な検査がなされていないことを反映しているものと思われる。

原虫症の検査・診断を熱心に行っている都立駒込病院では、途上国旅行後の下痢症患者からだけでも、97 年に 4/65 (6.2%)、98 年に 3/67 (4.5%)、99 年には 5/89 (5.6%) と、3 年間で 12 例 (平均陽性率 5.4%) をみつけている (増田剛太ら、学会発表)。平成 12 年の日本人海外渡航者数は 1,781 万人、外国人入国者数は 527 万人。いずれもその約半数は途上国である。途上国旅行のあと国内で下痢を発症するケースは少なくない。途上国旅行後の下痢症患者におけるクリプトスポリジウム症の陽性率を約 5% とするならば、年間の国内発症患者数は途上国旅行者だけでも 1,000 人を下らないのではなかろうか。海外での感染のみならず、国内でウシなどから感染するケースも当然存在する。医療機関や空港検疫所での原虫検査の徹底と、全国的な疫学調査の実施が望まれる。英国や米国では毎年約 3,000 例程度が届け出られている。

E. 結論

大阪市内の 2 医療機関で採取した下痢便 123 検体を含む糞便 796 検体についてクリプトスポリジウムとジアルジアの検出を試みたが、すべて陰性であった。国内における流行の実態を把握するには調査をさらに拡大・継続する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, N., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Gotoh, A., Haga, M., Fuchigami, H., Kimata, I., Iseki, M. : Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *J. J. A. Inf. D.*, 76: 518~525, 2000.
- 2) Wu, Z., Nagano, I., Matsuo, A., Uga, S., Kimata, I., Iseki, M., Takahashi, Y. : Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Molecul. & Cell Probes* (2000) 14: 33-39, 2000.
- 3) Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., Miyanaga, S., Okada, H., Banno, C., Matsumoto, M., Shimada, Y. : Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. *Water Sci. & Technol.*, 41: 119-125, 2000.
- 4) 井関基弘, 木俣 勲 : 感染症治療ガイド, クリプトスポリジウム症. 治療 82 (増刊号) : 943-945, 2000
- 5) 井関基弘, 木俣 勲 : クリプトスポリジウム症. 小児科 41 : 1099-1105, 2000
- 6) 井関基弘, 木俣 勲 : クリプトスポリジウム症一免疫不全小児における難治性慢性下痢. 小児科診療 63 : 1055-1058, 2000
- 7) 井関基弘, 木俣 勲 : 病気のはなし, クリプトスポリジウム症. 検査と技術 28 : 108-114, 2000
- 8) 平田哲生, 座禰 修, 金城福則, 斎藤 篤, 当真 弘, 佐藤良也, 中村 広, 井関基弘 : 最近経験したサイクロスポーラ症の1例. 病原微生物検出情報 21 : 194-195, 2000
- 9) 井関基弘, 木俣 勲 : 感染性食中毒10. 原虫. 治療学 34 : 759-761, 2000

2. 学会発表

- 1) Kimata, I., Iseki, M., Urakami, I. : Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ultraviolet irradiation. 12th German-Japan Symposium on Protozoal Diseases. (July, 2000, Bonn).
- 2) Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., et al. : Effect of co-existing substances on the inactivation *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone. 4th International Conference of Water Quality Control. (July, 2000, Poland).
- 3) Hermida F. M., 木俣 勲, 井関基弘 : 培養細胞 (HCT-8) 系を用いたクリプトスポリジウムの培養と原虫増殖の定量法の検討. 第33回日本原生動物学会 (2000年11月)
- 4) 木俣 勲, 井関基弘, 児玉義勝 : 抗クリプトスポリジウム卵黄抗体の作成と *Cryptosporidium* 感染 SCID マウスにおけるその免疫治療効果. 第56回日本寄生虫学会西日本支部大会 (2000年10月)
- 5) 増田剛太, 今村顕史, 味沢 篤, 根岸昌功, 井関基弘, 遠藤卓郎 : 旅行者下痢症症例からのクリプトスポリジウムの検出. 第10回臨床寄生虫学会 (2000年6月)
- 6) 八木田健司, 泉山信司, 橘 祐司, 増田剛太, 井関基弘, 古谷宏二, 遠藤卓郎 : クリプトスポリジウムの PCR-RFLP 解析による Genotyping. 第55回日本寄生虫学会東日本支部大会 (2000年10月)

分担研究報告書 2

北海道十勝地方の公共牧場の健康牛における
クリプトスポリジウムの汚染実態調査

分担研究者 更科孝夫

分担研究報告書

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係わる 健康リスク評価および管理に関する研究

北海道十勝地方の公共牧場の健康牛におけるクリプトスポリジ ウムの汚染実態調査

分担研究者 更科孝夫 帯広畜産大学畜産学部 教授
研究協力者 長沢秀行 帯広畜産大学原虫病研究センター 教授
宇塚雄次 帯広畜産大学畜産学部 助教授
田邊茂之 帯広畜産大学畜産学部 助手

研究要旨

水道水源汚染の可能性を検討するために、2000年6～9月の4カ月間、北海道十勝管内の9牧場の9～39カ月齢の野外放牧雌牛359頭の糞便のクリプトスポリジウム・オーシストの排泄状況を調査した。その結果、9牧場中4牧場(44.4%)、359頭中7頭(1.95%)に陽性牛が認められた。検出された全てのクリプトスポリジウムは形態学および遺伝子学的に *C. muris* と特定された。陽性牛は年齢が15～21カ月齢で、全てが健康で有形便を排泄していた。また、OPG(糞便1g中のオーシスト数)は400～2,400であった。陽性牛が認められた地域は広く分散し、特定の地域に集中する傾向は認められなかった。また、陽性牛が認められた牧場の地形はいずれも丘陵地や山麓地であった。

1) 研究目的

1970年代以降、クリプトスポリジウムは世界各国でヒト、哺乳動物、鳥類、は虫類、魚類など広い宿主域に感染し、人獣共通感染症を引き起こす原虫であることが知られるようになった。ヒトの本原虫による感染症の特徴は、有効な治療薬がない下痢症の集団発生であり、世界各国で大規模な水系集団感染例が報告され、わが国も例外ではなくなった。1996年の厚生省の対策指針によると、本原虫による水道水源汚染の評価は、ヒトや哺乳動物の糞便汚染の有無で行うことになっている。従って、各種哺乳動物の本原虫オーシストの排泄状況を調査することは、公衆衛生上重要な課題となる。我々は水道水源汚染の可能性を検討するために、北海道十勝管

内に広く分布する9カ所の公共牧場において、野外放牧牛の糞便へのクリプトスポリジウム・オーシストの排泄状況を調査した。

2) 研究方法

本症の感染には季節的発生傾向はないとされることから、調査期間は2000年6～9月の4カ月間とした。この期間に、北海道十勝管内の9カ所の公共牧場に放牧された9～39カ月齢の健康なホルスタイン種雌牛359頭を対象とした。直腸検査用手袋を用い、清潔なプラスチック容器に糞便5gを採取し、ウシの品種、性別、年齢を記録した。糞便からのオーシストの回収には、シヨ糖不連続密度勾配分離法を用いた。すなわち、糞便5gをPBS(0.025M)で50mlにメスアップした後、2500rpmで10分間遠心沈殿を行い、上清を捨てた。次に比重1.103と1.064のシヨ糖液の重層上に沈渣を重層し、これらのシヨ糖液の重層間にトラップされたオーシストを回収した。次にIFT(Immunofluorescence Test)を行い、蛍光抗体顕微鏡で鏡検し、形態学的に*Cryptosporidium muris*を判定した。最終的に、分離されたオーシストからDNAを抽出した後、PCR-RFLP法により、遺伝子学的に*C. muris*を特定した(制限酵素Vsp Iを使用)。

(倫理面への配慮)

クリプトスポリジウム症は、人獣共通感染症であるため、地域の家畜保健衛生所および農業共済組合家畜診療所との連携が必要である。従って、家畜の陽性例が検出されても、直接農家名が公表されることはないように配慮した。また、地域名はアルファベット記号に留まるように配慮した。

3) 研究結果

表1に放牧牛のクリプトスポリジウム・オーシストの調査地、調査頭数および陽性頭数を示した。最終的に9牧場中4牧場(44.4%)に本原虫の陽性牛が認められた。TN, NS, TK, SBおよびHOの5牧場では陽性牛は認められなかった。SOおよびCR牧場ではそれぞれ1頭(2.78%)および1頭(2.33%)の陽性牛が認められた。とくにOHおよびSH牧場ではそれぞれ2頭(5.00%)および3頭(7.50%)と陽性牛が多かった。合計では9牧場の359頭中7頭(1.95%)に陽性牛が認められた。陽性牛が認められた牧場は、十勝北部が2カ所、西部が1カ所および南部が1カ所と地域的に広く分散し、特定の地域に集中する傾向は認められなかった。また、陽性牛が認められた牧場の地形はいずれも丘陵地や山麓地であった。

表2にクリプトスポリジウムの種と寄生数ならびに陽性牛の健康状態を示した。今回検出された全てのクリプトスポリジウムは形態学および遺伝子学的に *C. muris* と特定された。陽性牛は年齢が15~21カ月齢で、全てが健康で有形便を排泄していた。また、OPG（糞便1g中のオーシスト数）は400~2,400であった。

表1. 放牧牛のクリプトスポリジウム・
オーシストの調査地、調査頭数および陽性頭数

調査地			頭数 (ホルスタイン)		
牧場名	調査場所	地形	放牧頭数	調査頭数	陽性頭数(%)
SO	北部	丘陵地	2,323	36	1 (2.78)
TN	東部	丘陵地	1,114	37	0 (0)
OH	西部	丘陵地	1,512	40	2 (5.00)
CR	南部	丘陵地	487	43	1 (2.33)
NS	西部	丘陵地	1,212	39	0 (0)
TK	南部	丘陵地	1,452	38	0 (0)
SB	南部	丘陵地	684	39	0 (0)
SH	北部	山麓地	1,527	40	3 (7.50)
HO	南部	丘陵地	731	47	0 (0)
合計			11,042	359	7 (1.95)

注：SO, OH, NS, TK, SB, SH, HO：内陸部, TK, CR：海岸部

表2. クリプトスポリジウムの種と寄生数ならびに陽性牛の健康状態

No.	種	牧場	品種	性別	年齢	健康状態	糞便性状	OPG ¹⁾
1	<i>C. muris</i>	SO	ホルスタイン	雌	18M	良好	有形便	ND
2	<i>C. muris</i>	CR	ホルスタイン	雌	21M	良好	有形便	1,500
3	<i>C. muris</i>	OH	ホルスタイン	雌	21M	良好	有形便	400
4	<i>C. muris</i>	OH	ホルスタイン	雌	18M	良好	有形便	1,700
5	<i>C. muris</i>	SH	ホルスタイン	雌	18M	良好	有形便	2,400
6	<i>C. muris</i>	SH	ホルスタイン	雌	15M	良好	有形便	2,000
7	<i>C. muris</i>	SH	ホルスタイン	雌	18M	良好	有形便	1,800

¹⁾ OPG：糞便1g中のクリプトスポリジウム・オーシスト数

※ 参考成績

なお、今回の調査とは別に、参考成績として下痢を呈した肉用黒毛和牛の子牛4/17頭(23.5%)において、形態学的に *C. parvum* のみが検出された。陽性子牛の日齢は51~64日齢であり、削瘦を呈し、下痢便を

排泄していた。OPG（糞便 1g 中のオーシスト数）は 100～63,000 であった。

表 1. 下痢子牛のクリプトスポリジウム・オーシストの調査頭数および陽性頭数

牧場名	頭数 (和牛)	
	調査頭数	陽性頭数(%)
AR	17	4 (23.53)

表 2. クリプトスポリジウムの種と寄生数ならびに陽性の下痢子牛の健康状態

No.	種	牧場	品種	性別	日齢	健康状態	糞便性状	OPG ¹⁾
1	<i>C. parvum</i>	AR	和牛	雄	63	削瘦	下痢便	100
2	<i>C. parvum</i>	AR	和牛	雌	64	削瘦	下痢便	63,000
3	<i>C. parvum</i>	AR	和牛	雄	59	削瘦	下痢便	3,000
4	<i>C. parvum</i>	AR	和牛	雄	51	削瘦	下痢便	200

¹⁾ OPG：糞便 1g 中のクリプトスポリジウム・オーシスト数

1) 考察

今回、北海道十勝管内の 9 牧場の 9～39 カ月齢の健康放牧雌牛 359 頭を調査したところ、359 頭中 7 頭 (1.95%) に *C. muris* のオーシストが検出された。ウシにおけるクリプトスポリジウムのオーシストの全国平均陽性率は 2.14% (1 カ月齢未満で 2.65%, 1 カ月齢以上で 1.60%) と報告されている。また、食肉センターに搬入された健康牛を対象とした調査では、宮城県で 4.7%, 静岡県で 2.8%, 兵庫県では 1.7% との報告がある。これらの報告と比較して、今回の十勝管内のウシにおけるオーシストの排泄状況は、ほぼ全国の平均的レベルにあることが明らかとなった。

また今回、十勝管内の各地域に広く分散して *C. muris* の不顕性感染牛が認められたことは、末端の預託農家がさらに広く分散して本原虫によって汚染されていることを示唆し、清浄化などの面で、今後に大きな問題を残すものと考えられる。

C. muris はヒトからの検出例が少なく、ヒトにおける公衆衛生上の重要種は *C. parvum* である。ウシの *C. parvum* は生後 1～2 週齢の新生子牛に最も高いとする報告が多く、今後は、若齢牛群における *C. parvum* および *C. muris* 両種の寄生の変化に重点を置いた調査を行う必要がある。

2) 結論

北海道十勝管内に広く分布する 9 カ所の公共牧場において、9～39 カ

月齡の野外放牧雌牛 359 頭の糞便へのクリプトスポリジウム・オーシストの排泄状況を調査し、9 牧場中 4 牧場 (44.4%)、359 頭中 7 頭 (1.95%) に陽性牛が認められた。検出された全てのクリプトスポリジウムは形態学および遺伝子学的に *C. muris* と特定された。今後は 9 カ月齡以下の若齡牛群を対象とした調査を行う必要がある。

3) 研究発表

宇塚雄次，田邊茂之，長沢秀行，更科孝夫：北海道十勝地方の公共牧場の健康牛におけるクリプトスポリジウムの汚染実態調査．第 48 回日本衛生動物学会・寄生虫学会北日本支部合同大会（2001 年 9 月予定）

分担研究報告書 3

水系によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染の
実態の把握

分担研究者 黒木俊郎、遠藤卓郎