

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

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 | 神奈川県衛生研究所細菌病理部 | 黒木 俊郎 |
|       | 国立感染症研究所寄生動物部  | 遠藤 卓郎 |
| 研究協力者 | 横浜市立市民病院感染症部   | 相楽 裕子 |
|       | 国立感染症研究所寄生動物部  | 八木田健司 |

研究要旨：

クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内における水系感染の発生の有無を調べるために、横浜市立市民病院に来院した下痢症患者等に対して感染要因に関するアンケートを実施し、感染者の感染に至る背景を探った。アンケートの内容は渡航歴の有無、旅行の有無、飲用水の種類、水浴等の有無、動物飼養の有無などとした。クリプトスポリジウム症患者 2 名は、海外で感染した可能性が高かった。ジアルジア症患者および感染者 5 名のうち、2 名は渡航歴がなく国内での感染が疑われたが、感染経路を明らかにすることはできなかった。2 名は海外での感染の可能性が高く、1 名は 2 年前に渡航歴があったが感染との関連は明らかとはならなかった。

A. 研究目的

クリプトスポリジウムおよびジアルジアの感染は、糞便とともに排出されたオーシストあるいはシストを経口的に摂取することにより起こる。患者や感染動物との接触により手指等を介して感染する場合があるが、オーシストやシストに汚染された食品、飲料水等の摂取あるいはオーシストやシストが環境を汚染してプールや河川等におけるレクリエーション活動により感染が起きることが知られている。

国内においては、クリプトスポリジウムあるいはジアルジアが水系により感染したことが明らかとなっている症例は平塚市の雑居ビルの簡易専用水道を介した集団発生事例と埼玉県越生町の町営水道を介した集団発生事例だけであり、散发事例においては感染経路はほとんど解明されていない。そこで本調査は、クリプトスポリジウムあるいはジアルジア感染患者の感染前の行動等を調べて感染経路を明らかにすることを試みることで、国内において水系感染により患者が発生している状況を探ることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) クリプトスポリジウムおよびジアルジアの検査

下痢症患者の糞便は、診断の目的で横浜市立市民病院検査部において生物顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて常法により検査が行われた。本調査では診断の結果に基づいて対象者とした。

### 2) 感染経路等の推定のためのアンケート

横浜市立市民病院感染症部に下痢症で受診した患者のうち、クリプトスポリジウムあるいはジアルジア感染症と診断された患者に対して、アンケートを実施した。

アンケート票の内容は以下のようにした。項目 1 から 8 は、横浜市立市民病院感染症部で独自にすべての下痢症患者を対象に行っているアンケートの内容であり、項目 11 から 18 は今回の調査のために作成したアンケートの内容とした。したがって、クリプトスポリジウムあるいはジアルジア感染患者に対しては両方のアンケート調査票に回答するように依頼した。

#### アンケート調査の項目

1. 下痢の期間
2. 思い当たる食べ物
3. 下痢の状態
4. 症状
5. 他医療機関での受診の有無
6. 動物の飼育
7. 家族等の下痢の有無
8. アレルギーの有無
  
9. 自宅以外の家の訪問（帰省などを含む）、国内旅行、キャンプ、ハイキングなどに有無
10. 外出先での飲水の種類
  - 1) 水道水
  - 2) 簡易水道などの小規模水道
  - 3) 井戸水
  - 4) 湧水
  - 5) 河川水、沢水
  - 6) その他
  - 7) 不明
11. 水泳や水浴、水遊びの有無
12. 家畜の飼育の有無
13. 動物園や牧場への外出の有無
14. 動物園や牧場での動物の接触
15. 自宅で使用している飲料水の種類
  - 1) 水道水
  - 2) 簡易水道などの小規模水道
  - 3) 井戸水
  - 4) 湧水

- 4) 河川水、沢水
- 5) その他
- 6) 不明

#### 16. 普段と違う事項の有無

(倫理面への配慮)

研究の対象者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されないようにし、不利益を与えないように十分配慮した。

### C. 研究結果

クリプトスポリジウムに感染した下痢症患者 2 名、ジアルジアに感染した下痢症患者および感染者 5 名が調査期間中に横浜市立市民病院感染症部を受診した。各症例の感染に關与する要因等を表 1 および 2 に示した。

#### 1) クリプトスポリジウム感染症例

##### (1) 症例 1

22歳、男子学生。2001年2月25日から3月24日までアフリカを個人的に旅行した。南アフリカ、ジンバブエ、マダガスカルを回り、再び南アフリカに戻った。2001年3月19日より下痢が始まり、3月21日より水様便が1日10回のペースで続いたため、帰国後の3月26日に横浜市立市民病院感染症部を受診した。クリプトスポリジウム感染確定診断後、患者と連絡が取れず、アンケート票へ記載は依頼できなかった。

##### (2) 症例 2

19歳、男子学生。2001年3月2日から4月3日までバングラディッシュ（2001年3月2日から3月10日）、インド（2001年3月10日から4月3日）を旅行した。3月20日のインド滞在時から1日5～6回の下痢（非血性）が出現し、3月22日に現地の病院で細菌性腸炎の診断で抗菌薬を2日間内服し、一時改善した。その後4月2日より再び下痢が出現し、帰国後症状が改善しないため4月9日に横浜市立市民病院感染症部を受診した。アンケートには、バングラディッシュおよびインド旅行中に食堂の水や井戸水を飲用したとし、またこの旅行以前（2001年1月下旬）に神奈川県丹沢でキャンプをし、そこで湧き水を飲用したと回答した。

#### 2) ジアルジア感染症例および感染保有例

##### (1) 症例 1

43歳、男性。2000年11月17日より水様性下痢が1日5～10回、11月24日には下痢が10回以上となり、腹痛、悪心、嘔吐、38℃の発熱を伴った。11月25日に近医を受診し、整腸剤等を投与されたが下痢が続き、1週間で体重が8kg減少した。11月28日に横浜市立市民病院消化器科に紹介され、レボフロキサシン 300mg と整腸剤を4日分処方されたが、下痢は続いた。11月30日に感染症部に移り、検便にてランブル鞭毛虫栄養型、シストが検出された。メトロニダゾール 750 mg を10日間投与し、症状は軽快した。

患者は横浜市在住で、海外渡航歴はない。2000年10月中旬に家族ほか10数名と神奈川県丹沢湖上流でオートキャンプをしたが、生水の飲用は行わなかった。同行者に発病者はいなかった。週4回市内のスポーツクラブで水泳をしている。自宅では浄水器付き水道水を使っている。自宅では犬を1匹飼っている。

#### (2) 症例2

75歳、女性。健康診断でランブル鞭毛虫シストが検出された。2000年11月10日に老人検診でランブル鞭毛虫シストが陽性となり、12月4日の再検時にも陽性のため横浜市立市民病院感染症部に紹介された。以前は便秘であったが、10月から軟便が1日に1回が続いていた。メトロニダゾール750mgを7日間投与し、症状は軽快した。

横浜市内に在住している。自宅では水道水を飲用している。下痢が始まる1ヵ月前までに水泳をしたが詳細は不明。2年前にハワイに渡航したが特記事項はない。2000年8月13日に栃木県で法事に参加し、井戸水で入れ歯を洗った。動物は飼っていない。

#### (3) 症例3

35歳の男性。ケニア国籍。HIV感染症のため通院中。2001年2月7日から3月14日まで帰国。2月10日頃から1日に5回の水様性下痢が始まり、日本に戻ってからも続いていた。3月19日に定時受診をし、糞便検査にてランブル鞭毛虫栄養型およびシストが検出された。細菌培養は陰性。ロペラミド2カプセルで下痢は消失した。3月27日よりメトロニダゾール750mgを7日間服薬した。

#### (4) 症例4

65歳の女性。2001年3月14日に健康診断を受け、検便にてランブル鞭毛虫シストが検出されたため、4月12日に近医より横浜市立市民病院に紹介された。胃腸炎症状はない。同日、メトロニダゾール750mgを7日間処方した。

自宅では水道水を使用している。下痢が始まる前の2月に動物園に行ったが動物に触れていない。渡航歴はない。

#### (5) 症例5

20歳、男性の学生。2001年3月14日から4月4日にインドを個人的に旅行。3月17日より水様性下痢が始まり、1日に10回以上を数えた。腹痛を伴い、発熱感があった。次第に下痢は改善し、4月4日には水様性下痢が1日3回になった。4月5日より水様性下痢が1日に1-2回となった。帰国時に成田で検疫を受け、4月6日に保健所より赤痢菌 (*S. sonnei*) が検出されたとの連絡があり、横浜市立市民病院感染症部を受診した。レボフロキサシン300mg、5日間を処方し、外来治療とした。4月7日より下痢は消失した。当日の検便でランブル鞭毛虫シストが検出され、4月12日よりメトロニダゾール750mg、7日間を開始した。4月12日より39℃の発熱が出現し、4月13日に再診した。マラリア原虫陰性のため、自宅療養していたが解熱せず、4月16日に入院した。4月17日に発疹が出現し、麻疹と判明した。4月20日に解熱し、退院した。4月16日の検便ではランブル鞭毛虫は陰性であった。

## D. 考察

本研究は、クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内感染の中から水系感染の存在を探

り、その概要を明らかにすることを目的とした。これまでに国内で発生あるいは診断されたクリプトスポリジウム症あるいはジアルジア症の症例で水系感染によることが解明されたのはクリプトスポリジウム症の集団発生事例に限られ、散発例では一部の事例<sup>1-3)</sup>を除いてほとんど解明されておらず、国内の散発事例において水系感染例が存在するか否かについての確実なデータが得られていなかった。これは、伝染病予防法下ではクリプトスポリジウム症およびジアルジア症が届出の対象となっていなかったために症例の存在そのものの把握が非常に困難であったことに加え、多くの症例について積極的に感染経路等が解明されなかったことが挙げられる。また現行の感染症法下においては診断した医師は届け出なければならないが、感染経路等の疫学調査がほとんど実施されていないことが大きく関わっている。さらに、クリプトスポリジウムやジアルジアが患者や感染者との接触、汚染された食品や飲料水の摂取、汚染された環境からの摂取といった種々の経路から感染する可能性があるために特定が非常に難しいことも、解明が進まない原因となっている。これまでも、増田らにより国内で発症したクリプトスポリジウム症 2 例について報告されており<sup>4)</sup>、このうち 1 例は海外渡航歴がなく国内で感染したものと考えられるが、感染経路を明らかにすることはできなかった。

クリプトスポリジウムとジアルジアは便とともに排出されたオーシストあるいはシストを経口的に摂取することにより感染が成立する。これらの原虫の感染は、患者や原虫保有者との接触により感染するヒト-ヒト感染<sup>5-7)</sup>、汚染された食品<sup>8-10)</sup>や飲料水<sup>11-18)</sup>を介した感染が知られている。さらに、汚染されたプールや河川、湖沼での水泳や水浴での感染<sup>19-21)</sup>や海外旅行での感染<sup>22,23)</sup>も報告され、こうした活動をすることで感染リスクが高くなるとされている。

本研究の調査期間中にクリプトスポリジウム症患者 2 名、ジアルジア症患者および感染保有者 5 名が横浜市立市民病院感染症部を受診した。このうち、クリプトスポリジウム症患者はアフリカ、インド、バングラディッシュ等を旅行し、またジアルジア症患者の 1 人もインドを旅行しており、発症時期から旅行中に感染したことが推定された。特にクリプトスポリジウム症の症例 2 とジアルジア症の症例 5 の患者は、現地の飲料水を飲用する、川で水泳をするといった、感染のリスクが高い行動を取っていた。ジアルジア症の症例 5 はジアルジアに加えて赤痢菌と麻疹にも感染していた。これに対して、ジアルジア症患者および原虫保有者 5 名のうち 2 名（症例 1 および 4）は海外渡航歴がなく、国内において感染したことが予想された。しかし、どのような経路で感染したかはアンケートで調べた限りでは明確にはならなかった。

本研究で用いるために作成したアンケート票では、患者が日常使用する飲料水や旅行先で飲用した飲料水に関する設問を設定した。選択肢には水道水の他に簡易水道などの小規模水道、井戸水、湧水、河川水および沢水を挙げ、水系感染の可能性を探るための重要な情報を得ることを試みた。この設問の問題点は患者が飲用する飲料水についてどの程度その種類を認識しているかにあり、特に旅行先ではほとんど識別していないのではないかと懸念された。しかしこれまでの調査では、自宅での浄水器の使用や旅行先でのミネラルウォーターや食堂の水の飲用、井戸水の使用などといった期待以上の回答が得られた。これは飲用する水に対して関心が高いことの表れと考えられた。

国内におけるクリプトスポリジウム症およびジアルジア症は年間の報告数が非常に少なく、疫学調査が難しい状況にある。これに対して英国は欧州の中でも特にクリプトスポリジウム症に対する検査態勢が確立されており、患者数の変動を把握し、疫学解析が積極的に行われている。英国においてクリプトスポリジウム症はサルモネラ症と同程度に発生する、ごく一般的な感染症であると報告されている<sup>24)</sup>。クリプトスポリジウム症は年間を通じて患者が発生するが、その分布は春と秋にそれぞれ発生数のピークが形成される二峰性である<sup>18)</sup>。春の感染のピークはウシ型 (genotype 2) によるものが多く、ウシやヒツジの繁殖により生まれた幼獣との関連が高く、便とともに排出されたオーシス

トが井戸等を汚染して患者が発生するとされている。これに対して秋の患者の増加はヒト型 (genotype1) による感染が多くを占め、夏期休暇中に海外で過ごした人々が旅行先で感染して帰国後に発症するとされている。

国内のクリプトスポリジウム症およびジアルジア症の解析を充実させるためには、検査法の普及と検査態勢の充実、症例の確実な届出、積極的な疫学調査、収集された情報等の解析態勢が必要である。これらにより患者数を把握してその変動を解析し、さらに迅速に感染経路や感染源あるいは汚染源等を明らかにすることで、クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の発生の実態把握と原因への対策を策定することが可能となる。

本研究は、クリプトスポリジウム症とジアルジア症の国内感染の特に水系感染による患者の発生状況を探ることを目的とした。この状況の調査により水道水等のクリプトスポリジウムおよびジアルジアに関する安全性、や健康リスク評価のための基礎情報を提供することが可能となるものと思われる。本年度の調査では十分な症例数を対象とすることができなかったが、今後とも調査を継続して行く予定である。

#### D. 文献

- 1) 井関基弘、木俣勲、宇仁茂彦、金子修：当教室で確定診断したクリプトスポリジウム症の 10 例. *Clinical Parasitol.* 1994; 5: 33-35.
- 2) 塩田恒蔵、織田正、有菌直樹：輸入クリプトスポリジウム症の 1 例. *感染症誌.* 1994; 68: 941-945.
- 3) 品田雅博、檜崎昇：健常者に発症したクリプトスポリジウム症の 1 例. *日本内科学会雑誌.* 1992; 83: 123-124.
- 4) 増田剛太、他：日本人に発症した 2 例のクリプトスポリジウム症. *感染症誌.* 1991; 65: 1614-1619.
- 5) Steketee, R.W., Reid, S., Cheng, T., et al: Recurrent outbreak of giardiasis in a child day care center, Wisconsin. *Am. J. Pub. Health* 1989; 79: 485-490.
- 6) White, K.E., Hedberg, C.W., Edmonson, L.M., Jones, D.B.W., Osterholm, M.T. and MacDonald, K.L.: An outbreak of giardiasis in a nursing home with evidence for multiple modes of transmission. *J. Infect. Dis.* 1989; 160: 298-304.
- 7) Tangermann, R.H., Gordon, S., Wiesner, P and Kreckman, L.: An outbreak of cryptosporidiosis in a day-center in Georgia. *Am. J. Epidemiol.* 1991; 133: 471-476.
- 8) Porter, J.D.H., Gaffney, C., Heymann, D. and Parkin, W.: Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *Am. J. Pub. Health* 1990; 80: 1259-1260.
- 9) Mintz, E.D., Hudson-Wragg, M., Mshar, P., Cartter, M.L. and Hadler, J.L.: Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 250-253.
- 10) Millard, P.S., Gensheimer, K.F., Addiss, D.G., et al: An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA* 1994; 272: 1592-1596.
- 11) Navin, T.R., Juranek, D.D., Ford, M., Minedew, F.D., Lippy, E.C. and Pollard R.A.: Case-control study of waterborne giardiasis in Reno, Nevada. *Am. J. Epidemiol.* 1985; 122: 269-275.
- 12) Hayes, E.B., Matte, T.M., O'Brien, T.R. et al: Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 320: 1372~1376.
- 13) Moorehead, W.P., Guasparini, R., Donovan, C.A., Mathias, R.G., Cottle, R. and Baytalan, G.:

- Giardiasis outbreak from a chlorinated community water supply. Can. J. Pub. Health 1990; 81: 358-362.
- 14) Isaac-Renton, J.L., Corderio, C., Sarafis, K. and Shahriari, H.: Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. J. Infect. Dis. 1993; 167: 431-440.
  - 15) MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., et al: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply, N. Eng. J. Med., 331:161-167, 1994.
  - 16) 黒木俊郎、渡辺祐子、浅井良夫ほか:神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症. 感染症誌, 1996;70:132~140.
  - 17) 埼玉県衛生部: クリプトスポリジウムによる集団下痢症一越生町集団下痢症発生事件一報告書, pp200, 1997.
  - 18) McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. and Nichols, G.L.: Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 3984-3990.
  - 19) Joce, R.E., Bruce, J., Kiely, D., Noah, N.D., et al: An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. Epidemiol. Infect. 1991; 107: 497-508.
  - 20) Sorvillo, F.J., Fujioka, K., Nahlen, B., Tormey M.P., Keabajian, R. and Mascola, L.: Swimming-associated cryptosporidiosis. Am. J. Pub. Health 1992; 82: 742-744.
  - 21) Centers for Disease Control and Prevention: Surveillance for waterborne-disease outbreaks - United States, 1993-1994. MMWR, 45(SS-1) pp31, 1996.
  - 22) Jokipii, L., Pohjola, S. and Jokipii A.M.M.: Cryptosporidiosis associated with traveling and giardiasis. Gastroenterol. 1985; 89: 838-842.
  - 23) Sterling, C.R., Seegar, K. and Sinclair, N.A.: *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. J. Infect. Dis. 1986; 153: 380-381.
  - 24) Public health laboratory service study group: Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. BMJ. 300: 774-777, 1990.

分担研究報告書 4

クリプトスポリジウム感染の疫学並びに分子疫学  
に関する研究

分担研究者 西尾 治



**研究課題：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：クリプトスポリジウム感染の疫学並びに分子疫学に関する研究**

分担研究者： 国立公衆衛生院 衛生微生物学部 ウイルス室長 西尾 治  
研究協力者： 愛知県衛生研究所 生物部 斎藤 寛史、林 留美子  
研究協力者： 都立駒込病院 感染症科 増田 剛太

**研究要旨**

クリプトスポリジウム遺伝子診断法(PCR)の開発と分子疫学的解析を平成9年度から継続している。本年度は水道水、河川水におけるクリプトスポリジウムの汚染状況、ヒトおよびペットにおけるクリプトスポリジウムの保有に関する疫学的調査、ヒトおよび各種動物から検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型別並びに昨年度までに開発したPCR法によるクリプトスポリジウム18SrRNAの部分の遺伝子配列を決定した。

水道水、河川水からはクリプトスポリジウムは検出されず、安全であった。

高齢者(60歳以上)および2歳以下の乳幼児における下痢症患者のクリプトスポリジウムの保有状況を調べたところ、高齢者の1%がクリプトスポリジウムを保有し、6月から8月の間が好発期であり、この時期は生食品を摂食する機会が多いことによると考えられた。一方、2歳以下の乳幼児からは検出されなかった。

ペットとして飼育されたイヌおよびネコは共に5%がクリプトスポリジウムを保有していた。またイヌおよびネコからのクリプトスポリジウムでヒト型のものも見られたことは、ペットとヒトが密接に生活していることによると推察された。今後ペットからの感染に関して明らかにしなければならないと考えている。

ヒトからのクリプトスポリジウムの遺伝子型別から、クリプトスポリジウム感染はヒトからヒトのみならず動物からヒトへの感染が示唆された。

クリプトスポリジウム18SrRNA部分の遺伝子配列の系統樹からは小さく3つに分けられたが、動物種別は困難であった。

**A. 研究目的**

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。わが国においても過去に水道水汚染による健康被害が少数例ながら見られている。

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。

本研究では水道水のクリプトスポリジ

ウム汚染の実態を把握すると共に、A 県の海水域の河川水、およびその地区の住民のうち、下痢症患者からのクリプトスポリジウムの検出を行い、下痢症患者からの検出状況を明らかにすること、さらにヒトと密接に生活しているネコおよびイヌにおけるクリプトスポリジウム保有状況について検討した。

クリプトスポリジウムによる患者発生時には感染源の疫学的解析、由来動物、感染ルート等の解明に分子疫学的解析が不可欠であるものの、わが国では遺伝子配列の解明は殆ど行われていない。そこで遺伝子診断として PCR 法の改良と、遺伝子配列を決定し分子疫学的解析並びに遺伝子型を明らかにすることを目的として行った。

## I. T の水道水および A の河川水からのクリプトスポリジウム検出状況

### a. 研究方法

2000 年 7 月から 2001 年 3 月まで毎月 1 回採取した。水道水は東京都下の T 地点の 20 l、河川水は青森県の A 河川水 3 l についてメンブランフィルターを用い加圧濾過し、メンブランフィルター上から浮遊物を回収し、遠心後、クリプトスポリジウムに対するモノクローナル抗体を用い、蛍光抗体染色し、蛍光顕微鏡で検出を行った。

### b. 研究結果および考察

今回の研究では東京都下の水道水および A 県の河川水からはクリプトスポリジ

ウムは検出されなかったことから、検査を行ったこれらの水道水並びに河川水はクリプトスポリジウム汚染が無かったものと推察される。今後さらに水道水の安全性を確保するために、継続して監視する必要があると考えられる。

## II. 乳幼児並びに高齢者下痢症患者におけるクリプトスポリジウムの保有状況

### a. 研究材料

定点病院小児科・内科を受診し、下痢症と診断された 1999 年 4 月から 2000 年 2 月までの 0 歳から 2 歳の乳幼児 86 名と、1998 年 1 月から 2000 年 12 月までの 60 歳以上の高齢者 578 名のふん便検体（1 名 1 検体）を用いた。

### b. 研究方法

ふん便検体はシヨ糖遠心沈殿浮遊法によりクリプトスポリジウムを回収し、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。蛍光抗体染色法でクリプトスポリジウム陽性の検体は以下の操作を実施した。

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法はシヨ糖遠心沈殿浮遊法によりクリプトスポリジウムを回収したものを凍結融解 5 回（-70℃に凍結し、ついで 60℃の温水に入れ、急速解凍した）を行った。その後 2 倍濃度の Lysis buffer（240mM NaCl, 50mM Tris-HCL, 20mM EDTA, pH7.4, 1% Sarkosyl）を等量加え、Proteinase K（1mg/ml）を加え、50℃, 60 分間、98℃, 5 分間行い、直ちに on ice した。次いで

等量のフェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコールを加え、10 分間混合した後、12,000rpm. 20 分間遠心し、その上清を新しいチューブに取った。それにクロロフォルムを等量加え、10 分間混合した後、8,000rpm. 10 分間遠心し、その上清を新しいチューブに取り、エタノールを 2.5 倍量と、0.1 量の 3M 酢酸ナトリウムを加え、-70°C以下に 30 分置き、その後 15,000rpm. 30 分間遠心し、液層を除いた。続いて 70% エタノールを 500  $\mu$ l 加え、15,000rpm. 30 分間遠心し、液層を除いた後、乾燥させた後、T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> を加え、56°C, 10 分間加熱処理し DNA を溶解し、使用時まで-40°Cに保存した。

PCR 法は抽出 DNA を用いた。primer はクリプトスポリジウムの 18SrRNA をコードしている部分で設定された 1st PCR primer は ba + 303 (5' -GACGGTAGGGTATTGGCCTAC-3' ) / -741 (5' -CCATGCTGGAGTATTCAAGGCA-3' ) を、2nd PCR primer は ba + 336 (5' -ACGGGTGACGGGAATYAGGGTT-3' ) /

-741 を使用した。PCR 条件は 94°C 3 分の後、94°C 40 秒、55°C 1 分、72°C 2 分を 40 サイクル行い、72°C 15 分を 1 サイクル、その後 4°Cで保存した。

DNA 増幅の確認はアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、写真撮影により確認した。

### c. 研究結果

乳幼児下痢症患者 86 名は全てクリプトスポリジウム陰性であった。

高齢者下痢症患者 578 名中 6 名 (1%) が陽性であった。年別のクリプトスポリジウムの検出者のうち 98 年は 197 名中 5 名 (2.5%)、99 年は 254 名中 0 名、2000 年は 127 名中 1 名 (0.8%) の患者からクリプトスポリジウムが検出され、98 年が高い陽性率であった。年齢別陽性者は 60 歳代では 246 名中 5 名 (2%)、80 歳以上は 138 名中 1 名 (0.7%) が陽性であった。しかし、70 代の 194 名は全て陰性であった(表 1)。

表 1. クリプトスポリジウム検出者の概要

| 検体          | 性別 | 年齢 | 採取年月     | FITC<br>(個/5 $\mu$ l) | PCR* |
|-------------|----|----|----------|-----------------------|------|
| A0 - 113/98 | F  | 65 | 98 年 6 月 | 1                     | +    |
| A0 - 155/98 | M  | 62 | 98 年 6 月 | 1                     | +    |
| A0 - 286/98 | F  | 61 | 98 年 7 月 | 1                     | +    |
| A0 - 512/98 | F  | 63 | 98 年 8 月 | 1                     | +    |
| A0 - 812/98 | F  | 63 | 99 年 8 月 | 1                     | +    |
| A0 - 681/99 | F  | 82 | 00 年 1 月 | 1                     | +    |

\*Primer : ba+303/-741

月別陽性者は 6 月および 8 月 5 名から検出され、この間の患者数は 223 名であった。また 1 月に 1 名にクリプトスポリ

ジウム保有を認めた。

#### d. 研究考察

クリプトスポリジウムの好発時期は6月から8月であり、この時期は生ものをより多く摂食することによると推察された。また60歳代のヒトは乳幼児あるいは70歳以上の高齢者よりも生水等の非加熱食品の喫食機会が多いことによると推察された。しかし、ふん便中に含まれていたクリプトスポリジウムはいずれも少数個であった。このことからクリプトスポリジウムが体内で一次増殖したものの、二次増殖は殆ど生じなかったとも推測され、今回の下痢症患者ではクリプトスポリジウムが検出されたが、下痢症の病因であると即断できないと考えられた。

乳幼児下痢症患者のクリプトスポリジウム罹患率は、先進国では1%~3.2%、途上国では3%~13%との報告がされているが、今回の調査で2歳以下の乳幼児はいずれも陰性であった。日本は諸外国に比べ水道水の管理、安全確保は格段に高く、乳幼児ではクリプトスポリジウム感染症が極めて少ないと言える。

高齢者下痢症患者では60歳代が多く、好発時期は6月から8月でこの時期は生食品の摂食機会が多いことによる推察された。また1998年はクリプトスポリジウム罹患率が高かった。この感染要因を調べたところ水道水の水源は同一でなく、さらに共通の生食品を見出すことはできなかった。したがって明らかにすることはできなかった。

今後、生食品を含めたクリプトスポリジウム汚染状況を明らかにする必要性があると考えられる。

### Ⅲ. イヌ及びネコにおけるクリプトスポリジウムの保有状況

#### a. 研究方法

1996年6月~2000年5月の間に動物管理センターに引き取られたイヌ60頭およびネコ120頭から採取したふん便を用いた。ふん便0.5gをMGL法で粗精製後、シヨ糖浮遊法によりクリプトスポリジウムを検出した。

#### b. 研究結果および考察

ペットとして飼われていたイヌ、ネコは共に5%がクリプトスポリジウムを保有していた。この事はイヌやネコがウシやブタ等の家畜と同様にヒトへの感染源となりうる可能性が示唆された。今後ペットにおけるクリプトスポリジウムの保有状況とヒトへの感染の有無について明らかにする必要性がある。

### Ⅳ. ヒトおよび各種動物から得られたクリプトスポリジウムの遺伝子型別成績

#### a. 研究材料

遺伝子型別に用いたクリプトスポリジウムはヒトからの4件、ウシ8件、イヌ1件、ネコ2件、ネズミ2件、計17件を用いた。

用いた17件は全て18SrRNA部分を増幅するプライマーで陽性であった(表2) L1B13<sup>1)</sup>, CWU<sup>2)</sup>, GAG<sup>3)</sup>による型別はそれぞれ文献に従って行い、遺伝子型を判定した。

ヒトからのクリプトスポリジウムの4

件のうち、LIB13では3例がG2で動物型、1例がG1ヒト型とG2の動物型との混合であったが、G1が多く含まれていた。LIB13で動物型であった3例中2例はCWUおよびGAGによる遺伝子型別においても動物型であった。しかし1例はCWUではPCR陰性で、GAGではPCR産物が少なく遺伝子型を決めることができなかった。またLIB13でヒト型が優性であったヒト01/98はCWUでG1(ヒト型)、GAGではH2(ヒト型 type2)であった。

ウシ由来のクリプトスポリジウム8例ではLIB13ではG2で動物型が6例、G2とG1の両者が認められた2例はG2の動物型が主であった。CWUでは全て動物型(G2)で、GAGにおいても7例が動物型のC1で、1例はPCR陽性であったが、遺伝

子配列が決定できていない。

イヌ由来の1例はLIB13およびCWUでいずれもヒト型で、GAGによる型別はできていない。

ネコ2例ではLIB13ではヒト型(G1)で、CWUでは動物型(G2)で一致しなかった。またGAGの型別では1例はPCR陽性で、遺伝子配列が決められなく、1例はPCR陰性であった。

ネズミの1例はLIB13による型別ではG1であったが、CWU、GAGの型別はできていない。

ネズミの*C. muris*ではLIB13、CWUがPCR陰性で型別できなかった。しかし、GAGではウシと同じC1であった。

尚、GAGの遺伝子配列の結果は表3に示した。

表2. ヒトおよび各種動物から得られたクリプトスポリジウムの遺伝子型別

| 検体        | PCR<br>(ba+84/ - 620) | LIB13<br>遺伝子型 | CWU<br>遺伝子型 | GAG<br>遺伝子型 |     |
|-----------|-----------------------|---------------|-------------|-------------|-----|
| ヒト 01/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C2  |
| ヒト 02/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C2  |
| ヒト 01/99  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | —           | 未検査 |
| ヒト 01/98  | <i>C. parvum</i>      | +             | G1 > G2     | G1          | H2  |
| ウシ 01/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C1  |
| ウシ 02/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C1  |
| ウシ 03/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2 > G1     | G2          | C1  |
| ウシ 04/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C1  |
| ウシ 01/99  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C1  |
| ウシ 02/99  | <i>C. parvum</i>      | +             | G1          | G2          | C1  |
| ウシ 01/98  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | 未検査 |
| ウシ 02/98  | <i>C. parvum</i>      | +             | G2          | G2          | C1  |
| イヌ 01/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G1          | G1          | 未検査 |
| ネコ 01/00  | <i>C. parvum</i>      | +             | G1          | G2          | 未検査 |
| ネコ 01/99  | <i>C. parvum</i>      | +             | G1          | G2          | —   |
| ネズミ 01/98 | <i>C. parvum</i>      | +             | G1          | —           | 未検査 |
| ネズミ 01/99 | <i>C. muris</i>       | +             | —           | —           | C1  |

— : PCR 陰性

表 3. クリプトスポリジウムのマイクロサテライト領域 (Primer GAG+001/ - 240) の塩基配列

| 株 名                       | 位置 | 塩 基 配 列   | 位置  |
|---------------------------|----|---|-----|
| H1/AJ249586               | 1  | ATGGTGGAGAATATTCAGGAGGTTTTTAAAGATGAAAAATTAAGGAAAAGGAA-----      | 55  |
| H2/AJ249587               | 1  | .....-----  | 55  |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/98 | 1  | ..... T. G. ....  | 55  |
| C1/AJ249582               | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| <i>C. parvum</i> ウシ 01/00 | 1  | ..... C. G. .... AAGGA  | 60  |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/00 | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| <i>C. parvum</i> ウシ 03/00 | 1  | ..... C. .... G. .... AAGGA                                     | 60  |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/99 | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/98 | 1  | ..... C. .... C. G. .... AAGGA                                  | 60  |
| <i>C. muris</i> ネズミ 01/99 | 1  | ..... C. .... G. .... AAGGA                                     | 60  |
| C2/AJ249583               | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/00 | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| <i>C. parvum</i> ヒト 02/00 | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| C3/AJ249584               | 1  | ..... G. .... AAGGA   | 60  |
| C4/AJ249585               | 1  | ..... G. ....-----  | 55  |
| H1/AJ249586               | 56 | -GAATGAAAGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAAGAAGAA-----GAAGAAGAAAAG     | 108 |
| H2/AJ249587               | 56 | -..... GAAGAA .....   | 114 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/98 | 56 | -..... GAAGAA .....   | 114 |
| C1/AJ249582               | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 01/00 | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/00 | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 03/00 | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/99 | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/98 | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| <i>C. muris</i> ネズミ 01/99 | 61 | A..... G. . . . G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. . | 117 |
| C2/AJ249583               | 61 | A.....----- G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. .     | 105 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/00 | 61 | A.....----- G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. .     | 105 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 02/00 | 61 | A.....----- G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. .     | 105 |
| C3/AJ249584               | 61 | A.....----- G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. .              | 102 |
| C4/AJ249585               | 56 | -.....----- G. . . . G. . . . G. . . . GAG-----GG. . . G. .     | 99  |

|                           |     |  |     |
|---------------------------|-----|--|-----|
| H1/AJ249586               | 109 | GAAGAGGAGGAAGAGGAAGAAGAGGAAAAGGAAGAGGAAGGAAAAGAAAAGAAGGAGAT                | 168 |
| H2/AJ249587               | 115 | .....  | 174 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/98 | 115 | .....  | 174 |
| C1/AJ249582               | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 01/00 | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/00 | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 03/00 | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/99 | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/98 | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| <i>C. muris</i> ネズミ 01/99 | 118 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .          | 177 |
| C2/AJ249583               | 106 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . . A. . . . | 165 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/00 | 106 | ..... A. AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .       | 165 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 02/00 | 106 | ..... A. AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . .       | 165 |
| C3/AJ249584               | 103 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . . A. . . . | 162 |
| C4/AJ249585               | 100 | ..... AA. G. . A. . G. . G. . A. . G. . . . . A. . . . A. . . . . A. . . . | 159 |
|                           |     |  |     |
| H1/AJ249586               | 169 | GATGAAGAAGATGATGGAGAAAAG   | 192 |
| H2/AJ249587               | 175 | .....  | 198 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/98 | 175 | .....  | 198 |
| C1/AJ249582               | 178 | .....  | 201 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 01/00 | 178 | .....  | 201 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/00 | 178 | .....  | 201 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 03/00 | 178 | .....  | 201 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/99 | 178 | .....  | 201 |
| <i>C. parvum</i> ウシ 02/98 | 178 | .....  | 201 |
| <i>C. muris</i> ネズミ 01/99 | 178 | .....  | 201 |
| C2/AJ249583               | 166 | .....  | 189 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 01/00 | 166 | .....  | 189 |
| <i>C. parvum</i> ヒト 02/00 | 166 | .....  | 189 |
| C3/AJ249584               | 163 | .....  | 186 |
| C4/AJ249585               | 160 | .....  | 183 |

c. 研究考察

クリプトスポリジウムの遺伝子型別か

ら、ヒトでは動物型とヒト型の両者が認められ、ヒトからヒトと動物からヒトへ

の感染が示唆された。動物由来と考えられる LIB13 および CWU で動物由来と判定されたものは GAG では C2 型で、今回調べたウシ、イヌ、ネコ、ネズミではこの遺伝子型は見られていないため、由来動物は明らかにすることができなかった。

ウシでは LIB13 で動物型とヒト型との混合感染と思われるものも少数例に認められたが、CWU, GAG で全て動物型であり、特に GAG は C1 型で、この型はネズミの *C. muris* で見られている。しかしこのネズミでは LIB13 および CWU での型別の PCR は陰性で、ウシとはこの部分で異なっていると推測され、ウシとは同一でないと推測された。

イヌおよびネコでは LIB13 ではヒト型で、CWU ではイヌがヒト型、ネコが動物型を示し、調べる検査法により遺伝子型の違いが認められた。また GAG の結果が得られなかったため、明確にすることが

できなかった。これらの動物はヒトと密接に生活していることから、ヒトからの感染も考えられるが、今後この点に関してはさらに例数を増やすとともに詳細な分子疫学的な解析が必要であると考えている。

## V. クリプトスポリジウム 18SrRNA 領域系統解析

### a. 研究材料

クリプトスポリジウム 18SrRNA の遺伝子配列の決定にはヒト 5 件、ウシ 3 件を用い、クリプトスポリジウム 18SrRNA 部分の位置 303 から 741 部分を PCR で増幅し、その PCR 産物を精製後、ダイターミネーター法によりクリプトスポリジウム 18SrRNA の 335 から 695 の部分について塩基配列を決定した。その系統樹を図 1 に、遺伝子配列を表 4 に示した。



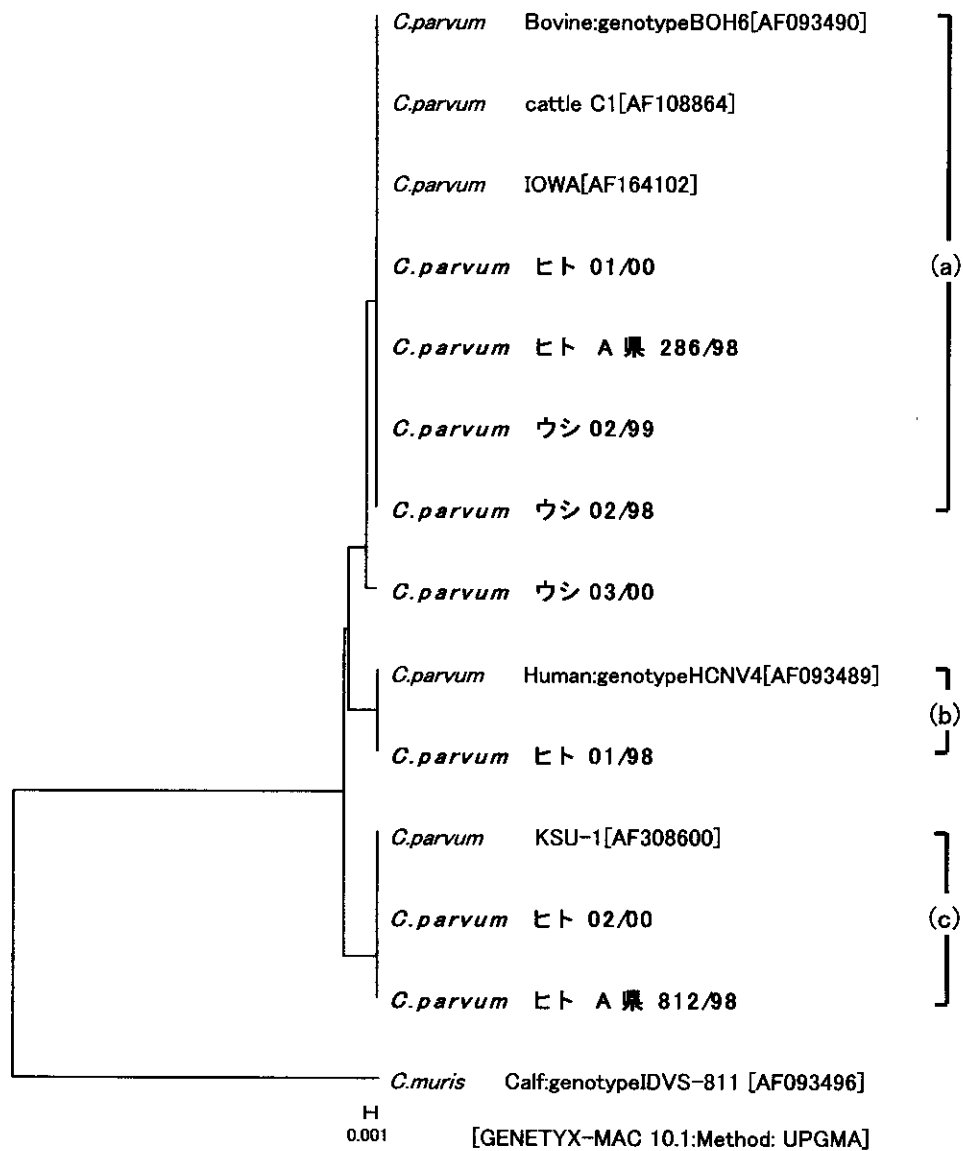


図1.クリプトスポリジウム 18S rRNA 領域系統樹

表 4. クリプトスポリジウムの 18SrRNA 領域塩基配列

|          |    |  |     |
|----------|----|--|-----|
| (a)      | 1  | TTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCGC | 60  |
| ウシ 03/00 | 1  | .....  | 60  |
| (b)      | 1  | .....  | 60  |
| (c)      | 1  | .....  | 60  |
| (a)      | 61 | GCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTT | 120 |
| ウシ 03/00 | 61 | .....  | 120 |
| (b)      | 61 | .....  | 120 |
| (c)      | 61 | .....  | 120 |

|          |     |  |     |
|----------|-----|--|-----|
| (a)      | 121 | TGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCA | 180 |
| ウシ 03/00 | 121 | .....  | 180 |
| (b)      | 121 | .....  | 180 |
| (c)      | 121 | .....  | 180 |
| (a)      | 181 | AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCA   | 240 |
| ウシ 03/00 | 181 | .....  | 240 |
| (b)      | 181 | .....  | 240 |
| (c)      | 181 | .....  | 240 |
| (a)      | 241 | GTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTAAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATAT   | 300 |
| ウシ 03/00 | 241 | .....  | 300 |
| (b)      | 241 | .....  | 300 |
| (c)      | 241 | .....  | 297 |
| (a)      | 301 | TTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTT—AGTATATGAAATTTTACT   | 357 |
| ウシ 03/00 | 301 | ..... C..... —.....  | 357 |
| (b)      | 301 | ..... T. T. ... TTT.....                                     | 360 |
| (c)      | 298 | ..... C..... T..... —.....                                   | 354 |

(a) Bovine:genotypeBOH6[AF093490], cattle C1[AF108864], IOWA[AF164102]

ヒト 01/00, ヒト A 県 286/98, ウシ 02/99, ウシ 02/98,

(b) Human:genotypeHCNV4[AF093489], ヒト 01/98

(c) KSU-1[AF308600], ヒト 02/00, ヒト A 県 812/98

## b. 研究成績および考察

この部分は PCR 法でより広く各種動物由来のクリプトスポリジウムを検出するために設定された部分であることから、ヒト、ウシとの間に、あるいは両者間での違いは殆ど見られなかったが、小さい違いとして a、b、c の 3 つのクラスターに分けられた。a と b との違いは僅かに 2 塩基の違いと a に比べ b が 1 コドンの挿入が認められたに過

ぎなかった。a と c との間には 2 塩基の違いが見られたのみであった。

a はヒト 01/00 (LIB13 および CWU で動物型、GAG で動物型の C2)、ヒト A 県 286/98、ウシ 02/99 (LIB13 でヒト型、CWU で動物型、GAG で動物型の C1)、ウシ 02/98 ( LIB13 および CWU で動物型、GAG で動物型の C1) で、ウシ 02/99 以外は他の遺伝子型別 (ヒト A 県 286/98 は型別試験を行っていない) で

動物型と判定されたものに認められた (表2、図1)。

bのヒト 01/98 は LIB13、CWU、GAG でいずれもヒト型であった。この配列はヒトから検出されているものと同一であり、ヒト特異的な配列である可能性も考えられるが今後さらに例数を増やし明らかにして行きたい。

cはヒト 02/00 (LIB13、CWU で動物型、GAG で動物型の C2) とヒト A 県 812/98 (型別試験が行われていない)に見られた。

このことから a、c 共に動物型が見られ、この部分ではクリプトスポリジウムの遺伝子型別および動物種別には用いることができないと考えられる。今後さらに広い範囲について行い動物種別の特異的な配列を見出したいと考えている。

## B. 研究まとめ

本研究では水道水、河川水におけるクリプトスポリジウムの汚染状況、ヒトおよびペットにおけるクリプトスポリジウムの保有に関する疫学的調査、ヒトおよび各種動物から検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型別並びに昨年度までに開発した PCR 法によるクリプトスポリジウム 18S r RNA の部分の遺伝子配列を決定した。

水道水、河川水からはクリプトスポリジウムは検出されなかった。

高齢者 (60 歳以上) および 2 歳以下の乳幼児における下痢症患者のクリプトスポリジウムの保有状況を調べたところ、高

齢者では 1% がクリプトスポリジウムを保有し、6 月から 8 月が好発期であった。乳幼児は全て陰性であった。

ペットのイヌおよびネコは 5% がクリプトスポリジウムを保有していた。

ヒトからのクリプトスポリジウムの遺伝子型別から、クリプトスポリジウム感染はヒトからヒトのみならず動物からヒトへの感染が示唆された。またペットではヒト型のものも見られた。

クリプトスポリジウムの 18SrRNA 部分の遺伝子配列からは小さく 3 つに分けられたが、動物種別は困難であった。

## C. 参考文献

- 1) Widmer G. et. al., Molecular and Biochemical Parasitology, 108:187-197 (2000)
- 2) Patel S. et. al., Communicable Disease and Public Health, 1(4): 231-3(1998)
- 3) Caccio S. et. al., Parasitology, 120:237-244(2000)

## D. 学会発表

- 1) 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：PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出について、第 74 回日本感染症学会総会、P111、平成 12 年、4 月 20 日、福岡
- 2) 斎藤寛史、林 留美子、西尾 治他：イヌ及びネコにおけるクリプトスポリジウムの保有状況と PCR 法による検出について、平成 12 年度日本獣医公衆衛生学会、平成 13 年、2 月、P473、2001、奈良

3)秋山美穂、加藤由美子、西尾治、斎藤寛史、林 留美子、山田靖治、増田剛太：  
ヒトおよび動物から検出されたクリプト  
スポリジウムの遺伝子型について、第75  
回日本感染症学会総会、P91、平成13年、  
3月、奈良

#### E. 発表論文

1) 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：  
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)  
796(2000)