

分担研究報告書 5

消化管寄生性原虫感染症の血清疫学に関する検討

分担研究者 遠藤卓郎、黒木俊郎

消化管寄生性原虫感染症の血清疫学に関する検討

分担研究者： 遠藤 卓郎（国立感染症研究所 寄生動物部 原生動物室）
黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所 細菌病理部）

研究協力者： 八木田健司（国立感染症研究所 寄生動物部）
岡崎 則男（神奈川県衛生研究所 細菌病理部）
古川 一郎（神奈川県衛生研究所 食品獣疫部）

研究概要：

血清抗体価の調査は地域住民を対象とすることから、多数検体の試験に適した酵素免疫法 EIA（Enzyme Immunoassay）の一つである ELISA 法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）の有用性に注目し、これを血清疫学の中心的手法として技術的開発を進めた。ELISA は抗原を変えることで同一血清に関して多種類の原虫に対する抗体を検出することが可能である。水系感染の可能性のある原虫類、即ちクリプトスポリジウム、ジアルジアを始め赤痢アメーバ、サイクロスポラ、イソスポラ、トキソプラズマ等の感染を同時に検査することで、集団感染において原因病原体をスクリーニングする方法として有用な方法となり得る。一方、抗原の調整、検出抗体の種類が結果に大きく影響するので、試験条件の最適化を図ることが重要である。そのため今年度は赤痢アメーバの ELISA 法を基本に、クリプトスポリジウムならびにジアルジアを対象とした試験条件を検討した。クリプトスポリジウムに関しては患者陽性血清を試験し、正常ヒト血清との判別条件に関するデータが得られた。ジアルジアに関しては感染動物モデルを利用した条件設定を行い、ヒト血清試験への準備を進めた。クリプトスポリジウムならびにジアルジアの陽性血清は現在のところ入手困難であるが、ELISA 法の確立には必須である。さらに医療関係機関の協力を得て入手に努めたいと考えている。

研究目的

消化管寄生性原虫類であるクリプトスポリジウムならびにジアルジアは、国内外において水系集団感染の原因病原体として重要視されている。これらの病原体による集団感染時の感染の規模、また日常的な水使用に伴う感染の可能性あるいは健康被害の可能性を把握すること、即ち健康に及ぼすリスクを評価することは感染予防対策上重要であり、また浄

水施設の機能評価において必須な情報となる。本研究の目的は水源の汚染度と給水地域の住民の血清抗体価を調査し、その関係を明らかにすることにより健康リスク評価を行うこと、また得られた血清疫学的情報が水道水の衛生管理に還元されるようなシステムを考案することにある。

研究方法

1、赤痢アメーバの血清診断

材料および方法

原虫の培養

抗原調整用として赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* /HK-9 株 (ATCC 30015)を用いた。原虫は 10ml の TYI-S 培地 (ATCC1141) を用いて 13ml ホウ酸ガラス試験管で密栓状態にし 35℃、嫌氣的培養を行った。なお TYI-S 培地の組成ならびに調整法は以下のとおりである。

1) TYI-S-33/ATCC 1141 Medium

TYI Broth	87 ml
Vitamine Mixture 18	3 ml
Heat- inactivated Bovine Serum	10 ml
Bovine (Adult) Serum is heat-inactivated by exposure to 56C for 3 hrs.	

2) TYI Broth

TYI Base Stock	77 ml
10x Glucose Buffer Stock	10 ml
L-Cysteine·HCl (Sigma C7880)	0.1 g
Ascorbic acid	0.02 g
Adjust pH at 6.8 by adding 1N NaOH and sterilize by filtration prior to use.	

3) TYI Base Stock

Trypticase peptone (BBL 211922)	20.0 g
Yeast extract (BBL 211929)	10.0 g
NaCl	2.0 g
Ferric Ammonium Citrate (Sigma 5879)	22.8 mg
Distilled Water	770.0 ml
Sterilize by filtration and distribute in 77 ml aliquots to 100 ml screw-capped bottles. Store at -20C.	

4) 10x Glucose Buffer Stock

K ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g

Glucose	10.0 g
Distilled Water	100.0 ml
Filter sterilize and store at 4C	

抗原の調整

ほぼ単層に増殖した対数増殖期の栄養体を材料に用いた。栄養体から凍結溶解により抽出した可溶性蛋白質を抗原として調整した。以下にその方法を示す。

- 1) 培養上清を除去した後、試験管に氷水で冷却した PBS を 8ml 程度加えて栄養体を剥離する。剥離しにくい場合は試験管ごと氷冷する。
- 2) 試験管を転倒混和して栄養体を浮遊させ、4℃で遠心する (1,000xg、5 分間)。
- 3) 上清を除去し冷却した PBS を 5ml 加え再浮遊後、10ml スピッツ管に移し、4℃で遠心する (1,000xg、5 分間)。
- 4) 3) をもう一度繰返す。
- 5) 上清を除去し、栄養体をペレットのまま -80℃で凍結保存する。
- 6) 凍結保存試料を氷水中で溶解し、 $10^7 \sim 10^8$ の細胞を一つの試験管にまとめ、4℃にて遠心分離し上清を回収する。
- 7) 上清中の蛋白質濃度を吸光度計により測定する。

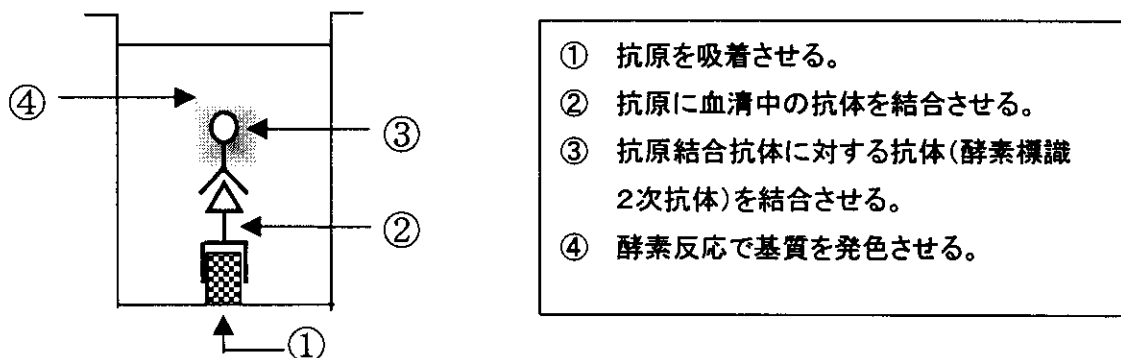
被検血清

陽性群としてアメーバ症の確定された 22 名ならびに陰性対照群として原虫の感染が認められない非感染者 40 名の血清を用いた。

ELISA (酵素免疫法) による抗体測定

血中の抗体を検出方法には多種あるが、本研究では多量検体処理に有用なマイクロプレートを利用した ELISA を検討した。本法は抗原を吸着させたプレートに被検血清を加え、抗原と結合した抗体を、その抗体に対する抗体 (酵素標識されている) と反応させ検出することが基本となっている (図-1)。

図-1 ELISA の原理



ELISA 用試薬類の調整

1) 炭酸緩衝液	1M NaHCO ₃	43.3 ml
	1M Na ₂ CO ₃	6.7 ml
	NaN ₃	0.2 g
	Distilled Water	950 ml
2) 洗浄液 (PBS/T)	0.15M Na ₂ HPO ₄	1.500 ml
	0.15M KH ₂ PO ₄	500 ml
	Tween20	5 ml
	NaCl	68 g
	Distilled Water	8,000 ml
3) 血清希釈液 (BSA/T)	BSA (SIGMA, Fraction V)	1 g
	PBS/T	100 ml
4) 基質液 (発色液)	0.1M Na ₂ HPO ₄	25 ml
	0.1M Citric acid	25 ml
	ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid))	15 mg
	30% H ₂ O ₂	5 l

方法

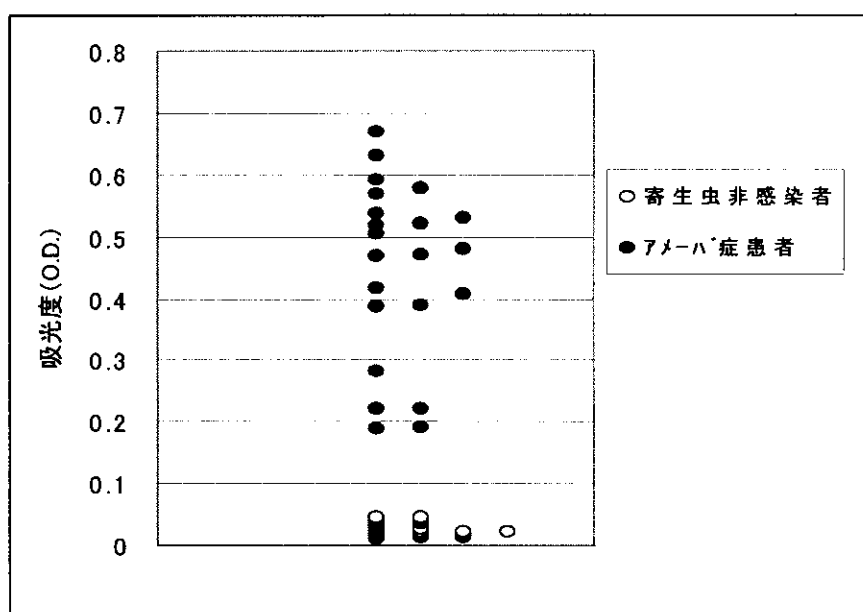
- 1) 抗原液を炭酸緩衝液で蛋白質濃度 2~5 g/ml に調整し、マイクロプレートに 100 μ l 入れて 37°C、2 時間抗原の吸着を行う。
- 2) 250 μ l の洗浄液 (PBS/T) で 3 回洗浄する。
- 3) 血清希釈液 (BSA/T) で 200 倍に希釈した血清を 100 μ l ずつプレートウェルに入れ、40 分間反応させる (1 次反応)。
- 4) 250 μ l の洗浄液 (PBS/T) で 3 回洗浄する。ペーパータオルで充分水をきる。
- 5) 抗ヒト IgG-horseradish peroxidase 標識抗体 (Cappel/Peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG whole molecular) を血清希釈液で 8,000~10,000 倍に希釈し、100 μ l ずつプレートウェルに入れ、40 分間反応させる (2 次反応)。
- 6) 250 μ l の洗浄液 (PBS/T) で 3 回洗浄する。ペーパータオルで充分水をきる。
- 7) 酵素基質液を 100 μ l ずつ入れ、室温で発色状態を観察する。7 分後に 1.25% ぶっ化ナトリウムを 50 μ l 加え反応を停止する。波長 414nm で吸光度 (O.D.) を測定する。

結果

寄生虫の感染が認められない非感染者 40 名とアメーバ症の確定された患者 22 名の血清中 IgG 抗体測定結果を図-2 に示す。非感染者の O.D. 値は 0.016~0.045 の範囲にあり、平均値および標準誤差 (SD) は 0.025 \pm 0.01 であった。平均値+2SD は 0.045 となり、非感染者の測定値はすべて平均値+2SD 以下となった。一方、アメーバ症患者の O.D. 値は 0.190

～0.670 の範囲にあり、平均値および標準誤差 (SD) は 0.445 ± 0.145 であった。アメーバ症患者の最小測定値 0.190 は非感染者の平均値+2SD である 0.045 を超えており、アメーバ症患者の測定値は非感染者のものより有意に高かった。陽性群 (アメーバ症患者) と陰性群 (非感染者) の 2 分割値であるカット・オフ値として 0.1 (O.D) を選択した場合、アメーバ症患者は 100%陽性と判定された。この ELISA による定量的検査によれば、赤痢アメーバ感染を感度、特異性とも極めて高い診断率を得ることが可能であると期待される。

図-2、アメーバ感染者および寄生虫非感染者における抗アメーバ IgG 測定結果



2、ジアルジアの血清診断

ジアルジア感染の確認されたヒト血清の入手が困難であったので、小型げっ歯類であるスナネズミを用いた動物感染モデルを利用して、ジアルジア血清診断の条件設定を行った。

材料および方法

原虫の培養

抗原調整用としてジアルジア *Giardia lamblia* /WB 株(ATCC 30957)を用いた。培養法は赤痢アメーバの場合とほぼ同様である。培地組成がやや異なるので、相違点のみ下記に述べる。

1) TYI-S-33/ Medium

TYI Broth	87 ml
Heat- inactivated FCS	10 ml

FCS is heat-inactivated by exposure to 56°C for 30min.

2) TYI Broth

TYI Base Stock	77 ml
10x Glucose Buffer Stock	10 ml
L-Cysteine·HCl (Sigma C7880)	0.2 g
Ascorbic acid	0.02 g

Adjust pH at 7.2 by adding 1N NaOH and sterilize by filtration prior to use.

3) TYI Base Stock および 4) 10x Glucose Buffer Stock

赤痢アメーバの場合と同様。

抗原の調整

調整法は赤痢アメーバの場合に準じた。

スナネズミのジアルジア感染

スナネズミ (系統 MON/Jms/Gbs) に *G. lamblia* /WB 株を 10^4 程度経口感染させた。糞便中にシストが排出されることで感染を確認した (約 1 週間後)。

被検血清

感染から約 1 ヶ月後、シスト排出が認められなくなった時点で採血を行い、血清を得た。なお、原虫非感染のスナネズミからも血清を採取し、正常 (陰性) 血清として用いた。

ELISA (酵素免疫法) による抗体測定

基本的には赤痢アメーバの場合と同様である。しかし、スナネズミ血清中の抗体を検出するための検出抗体、即ち抗スナネズミ IgG 抗体が市販されておらず入手不可能なため、本研究では抗ラット IgG 抗体を代用することとした。それにより、非特異反応を下げるために 1 次反応前にブロッキングを行った。

- 1) 抗原液を炭酸緩衝液で蛋白質濃度 $5\sim 40\mu\text{g/ml}$ に調整し、マイクロプレートに $100\mu\text{l}$ 入れて 37°C 、2 時間抗原の吸着を行う。
- 2) $250\mu\text{l}$ の洗浄液 (PBS) で 3 回洗浄する。
- 3) ブロッキング溶液を $200\mu\text{l}$ 入れて 37°C 、1 時間保温する。
- 4) $250\mu\text{l}$ の洗浄液 (PBS) で 3 回洗浄する。
- 5) 血清希釈液 (BSA) で 50~200 倍に希釈したスナネズミ血清を $100\mu\text{l}$ ずつウェルに入れ、60 分間反応させる (1 次反応)。
- 6) $250\mu\text{l}$ の洗浄液 (PBS) で 3 回洗浄する。ペーパータオルで充分水をきる。
- 7) 抗ラット IgG-horseradish peroxidase 標識抗体 ((Cappel/Peroxidase conjugated goat anti-rat IgG whole molecular) を血清希釈液で 500~2000 倍に希釈し、 $100\mu\text{l}$ ずつプレートウェ

- ルに入れ、60分間反応させる（2次反応）。
- 8) 250 μ lの洗浄液（PBS）で3回洗浄する。ペーパータオルで充分水をきる。
 - 9) 酵素基質液を100 μ lづつ入れ、室温で発色状態を観察する。反応を停止後、吸光度（O.D.）を測定する。

結果

正常スナネズミ血清（陰性対照）と感染後約4週間でシスト排出がほぼ止まった感染スナネズミの血清を調べた。測定条件として吸着蛋白質濃度 40 g/ml、血清希釈倍率 50 倍、検出用抗ラット IgG 抗体希釈倍率 1000 倍において、感染スナネズミ血清の吸光度は陰性対照血清のおよそ 10 倍の値を示した。

3、クリプトスポリジウムの血清診断

材料および方法

原虫の回収

抗原調整用としてクリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum* 国内ヒト分離株 HNJ-1 を用いた。ヌードマウスにオーシストを経口感染後、糞便中に排出されたオーシストをシヨ糖浮遊法により精製し材料とした。

抗原の調整

C. parvum の抗原にはオーシストより脱囊させたスポロゾイトを含む細胞粗抽出液を以下の方法で調整した。

1. 前処理液：HBSS に 1 規定の塩酸を加え pH2.8 に調整する。脱囊液：10ml の HBSS 胆汁酸 150mg、トリプシン 50mg を溶かす。30 分以内に使用する。
2. 前処理液 1ml にオーシスト浮遊液を 100 1 加え 37 $^{\circ}$ C、5 分間保温する。
3. 遠心（1000xg、4 $^{\circ}$ C、10 分間）する。
4. 上清を 100 1 程度残したところに脱囊液を 1ml 加え、沈渣を再浮遊する。
5. 37 $^{\circ}$ C、1 時間保温する。
6. 浮遊液に HBSS を 1ml 加え攪拌後、遠心（1000xg、4 $^{\circ}$ C、10 分間）する。
7. 上清を除去し、100 1 程度の HBSS に再浮遊する。
8. 顕微鏡にて脱囊を確認後、-80 $^{\circ}$ C で凍結保存する。
9. 凍結保存試料を氷水中で溶解し、 $10^7 \sim 10^8$ の細胞を 1 つの試験管にまとめ、4 $^{\circ}$ C にて遠心分離し上清を回収する。
10. 上清中の蛋白質濃度を吸光度計により測定する。

被検血清

糞便検査によりクリプトスポリジウム陽性であった旅行下痢症患者の血清およびクリプトスポリジウムとの接触が頻繁と考えられた無症状者の血清を用いた。なお陰性対照としてクリプトスポリジウムとの接触歴のない正常人血清を用いた。

ELISA (酵素免疫法) による抗体測定

基本的に赤痢アメーバの場合と同様である。なお、以下の条件を追加変更した。

ブロッキング： ジアルジアの ELISA と同様に行った。

1次反応： 被検血清としてクリプトスポリジウム陽性患者血清、クリプトスポリジウムとの接触が頻繁と考えられた無症状者の血清ならびに正常ヒト血清

2次反応： 検出抗体として抗ヒト IgG-horseradish peroxidase 標識抗体 (Cappel 社/Peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG whole molecular または Jackson Immunoresearch 社 / Peroxidase-conjugated affinipure goat anti-human IgG(H+L)および抗ヒト IgM-horseradish peroxidase 標識抗体 (Jackson Immunoresearch 社/Peroxidase-conjugated affinipure goat anti-human IgM, Fc5__ fragment specific)

結果

2次反応に抗ヒト IgG を使用し、吸着蛋白質濃度を 5~50 g/ml、被検血清を最大 200 倍希釈、検出抗体を最大 8000 倍希釈して行ったが、2種類の抗ヒト IgG とも患者血清ならびに無症状者血清は正常ヒト血清よりも低い抗体価が示される場合があり、クリプトスポリジウム感染と抗体価との関係は明らかではなかった。一方、抗ヒト IgM を用いた場合は、吸着蛋白質濃度 10 g/ml、被検血清 200 倍希釈、検出抗体 1000 倍希釈の条件で患者血清ならびに無症状者血清は、調べた正常ヒト血清すべてに対し高い抗体価を示した。

考察

本研究の目的は第一に水源の汚染度と給水地域の住民の血清抗体価を調査し、その関係を明らかにすることにある。水源における原虫検出数の違いが、その給水地域の住民の抗体価に影響するのかどうかという問題は、わが国を含め大規模な水道施設を運用している水道先進国共通の問題となっており、その解決が急がれている。

今年度は血清疫学の中心的手法として ELISA 法の開発を検討した。基本とした赤痢アメーバの血清診断法はほぼ確立されたものであり、現在は主に腸管外アメーバ症の診断方法

に活用されている。消化管原虫類に対する血清診断法として広く応用が可能であると考え、この赤痢アメーバの ELISA 法を基本的な技術として、抗原および検出抗体を適宜選択し、各種原虫類に応じた ELISA 系を確立することを目標とした。

今回、動物モデルを用いたジアルジア症の血清学的診断において、抗体価が感染を表現するという関係が認められており、この結果をもとに陽性対照となる患者血清を用いた上で、ヒト血清の測定条件を調整することを考えている。特にヒトでは、持続的、不顕性感染が問題の一つとなっていることが知られており、これらキャリアーを血清診断で調べる工夫が必要である。診断上有用な特異抗原の検索なども今後の課題に含める。

クリプトスポリジウムの血清疫学については、クリプトスポリジウムの接触あるいは感染が明らかな血清が、IgM において高い抗体価を示し感染と抗体価の関係が明らかであった。患者に関しては旅行中の体調変化から、感染後およそ1ヵ月経過した時点での血清であり、一方の無症状者の場合は数年に亘って本原虫の接触が続いていることから、IgG の上昇が予測されたが、IgG と感染との関係は不明確であった。クリプトスポリジウム感染では IgG 抗体価の上昇を見ないまま、IgA および IgM の高抗体価の持続が見られる場合があることが知られている (Ungar ら、1989; Casemore、1987; Newman ら、1994)。Okhuysen ら (1998) はボランティア実験で初回感染では IgM と IgA の上昇が認められたが、IgG 抗体価に変化が見られなかったことを報告している。診断指標としての IgM の重要性をさらに検討する必要があると考えられる。なお平成8年埼玉県越生町における集団感染の際、間接蛍光抗体法を用いて感染初期と回復期の血清 (ペア血清) が調べられている (埼玉衛研、1997)。発症者全体としては IgG 抗体価の上昇が認められたものの、患者の約20%で IgG 抗体価の上昇が見られなかった。

クリプトスポリジウムの水系感染と関連した血清疫学に関しては、Priest ら (1999) がスポロゾイト表面抗原 (27kDa および 17kDa) を用いて米国内のクリプトスポリジウム集団感染時の住民を調査している。そこでは 1) 集団感染後期 (下痢等を発症約1~2ヵ月後、あるいは汚染された水を4週間飲用していた後) の血清は、集団感染前期 (発症約4週間前から、発症後10日以内) の血清より有意に IgG 抗体保有率が上昇していたこと、2) ELISA 法はウエスタン・プロット法よりも感度、特異性が良かったことを報告している。また Renton ら (1999) は Priest らと同様な方法を用いて、カナダにおいて水源により地域住民を3グループに分け、12ヵ月間の血清調査を行っている。井戸水を使用する地域住民を第1群、汚染の可能性が低い表流水を使用する地域住民を第2群、クリプトスポリジウムが頻繁に検出される表流水を使用する地域住民を第3群として調査を行った。その結果、1) 年間を通じクリプトスポリジウムが検出されなかった井戸水使用の第1群の抗体保有率は約33% (24.6~40.7%)、クリプトスポリジウムがまれに検出された第2群では53.5% (49.2~61.8%)、たびたび検出された第3群では52.5% (34.9~75.6%) であり、第1群の抗体保有率は有意に低かった。2) 第3群の近くで集団感染が発生した際、第3群の抗体保有率が集団感染の前後で34.9%から69.5%へと上昇したことが報告されている。すなわち、住

民の抗体保有率は飲料水の汚染状況を端的に反映しているものと判断される。今後、本研究により条件設定された上述の検査方法を用いて、河川汚染度の異なる水源流域を対象に住民の抗体保有率調査を進めるべく準備している。

なお、米国やカナダでの調査に使われた抗原（27kDa および 17kDa）に対する IgG 抗体はボランティア実験において発症予防に關与するとの結果が示されている（Moss 等、1998）。また、その議論の延長上で「抗体価保有率の低い地域は集団感染の危険性が高い」との指摘をする向きもある。しかし、上記のような指摘、すなわち、抗体保有率調査の結果を用いて集団感染の危険性を評価することに蓋然性は無く、過去の汚染実態の把握に限定して解釈すべきものとする。抗体保有率の低い地域で集団感染が起きたという事実は、高い地域で集団感染が（完全に、あるいは高度に）抑制されることを意味しないからである。現に、感染後の発症予防に有効とはいえないとする前者の意見に反対の報告もなされている（Millard ら、1994）。

参考文献

埼玉県衛生部（1997）、クリプトスポリジウムによる集団下痢症－越生町集団下痢症発生事件－報告書、pp134－141、平成9年3月

Isaac-Renton,J., Blatherwick,J., Bowie,W.R., Fyfe,M., Khan,M., Li,A., King, A., McLean,M., Medd,L., Moorehead,. Wong,C.S and Robertson,W., (1999), Epidemic and endemic seroprevalence of antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in residents of three communities with different drinking water supplies, Am.J.Trop.Med.Hyg.,60,578.

Moss,D.M., Chappell,C.L., Okhusen,P.C., DuPont,H.L., Arrowood,M.J., Hightower,A.W. and Lammie,P.J.(1998), The antibody response to 27-,17-,and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. J.Infec.Dis.,178,827.

Millard,P.S., Gensheimer,K.F., Addis,D.G., Sonsin,D.M., Beckett,G.A., Houck-Jankoski,A., and Hudson,A., (1994), An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-apple cider, J.Am.Med.Assoc., 272,1592.

Okhuysen,P.C., Chappell,C.L., Sterling,C.R., Jakubowski,W., and DuPont,H.L., (1998), Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*, Infec. Immun.,66,441.

Priest,J.W., Kwon,J.P., Moss,D.M., Roberts,J.M., Arrowood,M.J., Dworkin,M.S., Juranek,D.D., and Lammie,P.J., (1999) , Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibody that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens, J.Clin.Microbiol.,37,1385.

Casemore,D.P., (1987), The antibody response to *Cryptosporidium*: Development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons, J.Infec.,14,125.

Ungar,L.P., Mulligan,M., and Nutman,T.B., (1989), Serological evidence of infection in U.S. volunteers before and during peace crops service in Africa, Arch.Intern.Med.,149,894.

Newman,R.D.,Shu-Xian,Z.,Wuhib,T.,Lima,A.A.M.,Guerrant,R.,and Sears,C.L.,(1994), Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in urban community in Northeast Brazil,Ann.Intern.Med.,120,500.

分担研究報告書 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

分担研究者 大垣真一郎

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る 健康リスク評価及び管理に関する研究

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

分担研究者 大垣 眞一郎 東京大学大学院工学系研究科 教授
研究協力者 片山 浩之 東京大学大学院工学系研究科 助手

A. 研究目的

日本においては、平常時の飲料水由来の *Cryptosporidium* 感染症が衛生上問題となることはあまりないと考えられる。しかしながら、大雨、雪解けなどに際して、牛や人間の糞便などを含む排水が河川へ流入することなどによる突発的な河川水中の *Cryptosporidium* の濃度上昇や、浄水の不具合における除去性低下については、十分な検討がなされていない。

本研究では、突発的な *Cryptosporidium* の濃度上昇の年間感染リスクに対する寄与率をモデル計算によって示し、*Cryptosporidium* の濃度変動の重要性について考察する。また、環境水中の *Cryptosporidium* の濃度変動を測定することにより、突発的に *Cryptosporidium* 濃度が増加する具体的な環境条件について調査する。

B. 研究方法

1. 水供給におけるクリプトスポリジウム起因のリスクの計算

1997年4月から1998年6月までの13ヶ月間の寒川町宮山でのクリプトスポリジウム濃度の測定データ(13回)¹⁾を用いた。晴天時のクリプトスポリジウム濃度分布を推定し、降雨時には20[mm/day]までは降水量に比例してクリプトスポリジウム濃度は増加するとし、それ以上の降雨時の濃度上昇は20[mm/day]のときと等しいと仮定した。モンテカルロ法により、各測定地点の水を原水とした浄水の摂取による年間感染リスクを計算した(図-1、各分布形に従う乱数を発生させ、一日の感染リスクを計算:365回繰り返して年間感染リスク:1000回)。感染可能なクリプトスポリジウムの割合の分布、浄水処理による除去のモデル、一日の生水摂取量の分布については、Teunisらのリスク計算フレームワーク³⁾を使用した。

また、突発的な濃度上昇時の年間感染リスクにおける寄与率を調べるため、浄水中のクリプト濃度が一定値(0.01-0.05[oocysts/L])を超えている日(約1日/年)の感染リスクを除いた年間感染リスクを計算した。

2. 環境水試料からのクリプトスポリジウムの簡易検出法の開発

河川水などのクリプトスポリジウム濃度の突発的な上昇などの濃度変動を実測するためには、ク

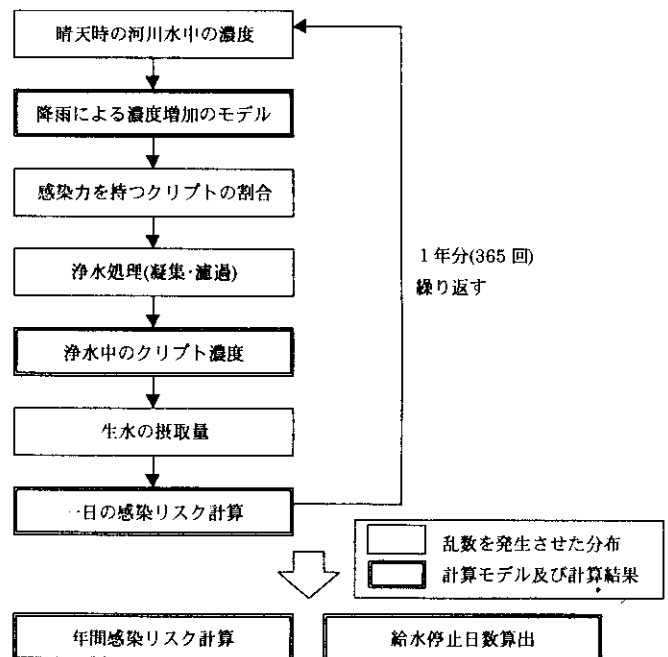


図1 リスク計算シミュレーションの流れ

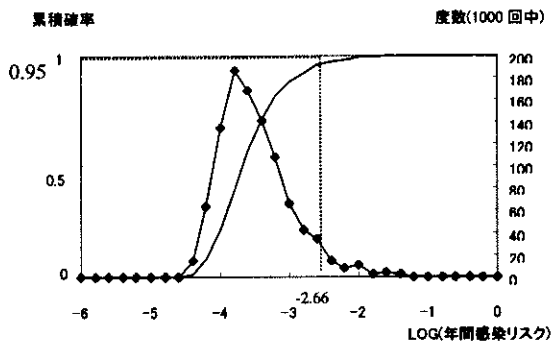


図2 年間感染リスクの分布と累積確率(寒川町宮山)
— 累積確率 —●— 度数

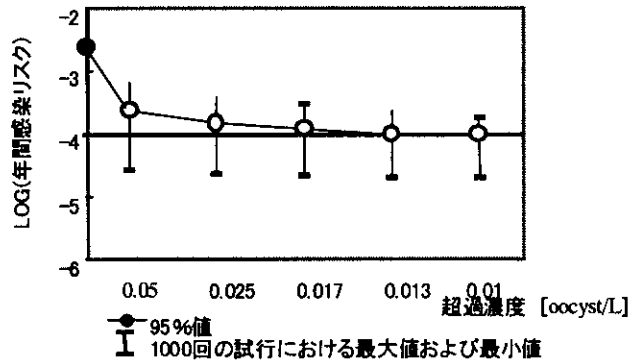


図3 高濃度の日のリスクを除いた場合の年間感染リスク

リプトスポリジウムの簡便な測定法が必要となる。そこで、フローサイトメトリーを用いたオーシストの観察法について検討した。

オーシスト濃縮液に対し間接蛍光抗体染色（以下 FITC 染色）を行った後、フローサイトメーターで観察を行い、フローサイトメーター上での蛍光の見え方を調べた。さらに、染色後に超音波破碎 (TAITEC VP-60S (100V, 最大 10A), 運転条件: Constant, Output level 7, 2[min]) を行ない、オーシストとサンプル中の粒子を分離して観察することを試みた。

C. 研究結果及び考察

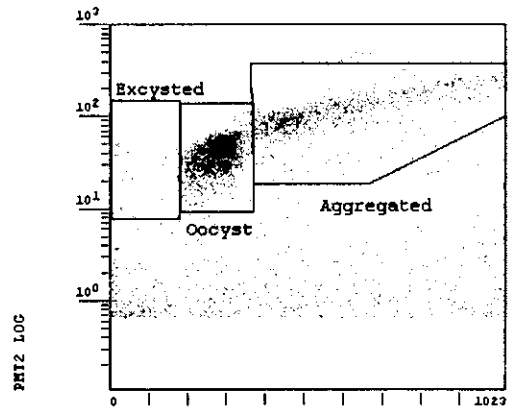
1. 年間感染リスクの評価

結果を図2に示す。計算した1000年分の年間感染リスクは $10^{-1.44}$ から $10^{-4.53}$ と大きく変動し、累積確率が95%となるような年間感染リスク(95%値)は $10^{-2.66}$ であった。

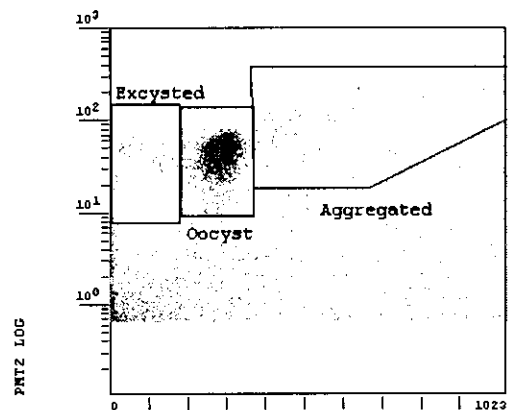
図3に、高濃度の日のリスクを除いた場合の年間感染リスクを示す。クリプトスポリジウム濃度が0.05[oocysts/L]を越える日のリスクを除くことによって、年間感染リスクの95%値が1log程度低減した。クリプトスポリジウム濃度が0.05[oocysts/L]を越える日数が年間1日程度(95%値としては年間3日)であることを考慮すれば、年間感染リスクは極めて少ない日数の感染リスクによってその大部分が占められていることがわかる。また、95%値の年間感染リスクは、クリプトスポリジウム濃度が0.013[oocysts/L]以上の日を除くことによって 10^{-4} 以下になった。このことから、年間感染リスクが 10^{-4} 以下になるための条件として、最大クリプトスポリジウム濃度が0.013[oocysts/L]以下(80Lで検出されない)であることが示唆された。

2. フローサイトメトリーを用いたクリプトスポリジウムの観察

フローサイトメトリーによって得られた結果を図4に示す。図の縦軸(PMT2 LOG)は蛍光強度、横軸(FS: 前方散乱光)は粒子のサイズをそれぞれ表し



1) 超音波処理なし



2) 超音波処理後

図4 クリプトスポリジウムのフローサイトメトリーによる測定結果

ている。図のプロット一つが観測された粒子一つに相当する。前処理なしでは蛍光を発するがサイズが大きい（7μm以上）粒子が多く見られたのに対し、超音波処理をすれば4-6μmの範囲に蛍光を持つ粒子が集中して現れていることがわかる。他の粒子に付着していたクリプトスポリジウムが超音波により分散されて観測されていると考えられる。今後は、環境水などの試料を濃縮したものについても、クリプトスポリジウムの観察が可能であるかを検討する必要がある。

D. 結論

相模川流域の寒川町宮山のクリプトスポリジウム実測データから年間感染リスクをモンテカルロ法によって計算し、以下の知見を得た。

1. 計算した1000年分の年間感染リスクは $10^{-1.44}$ から $10^{-4.53}$ と大きく変動し、95%値は $10^{-2.66}$ であった。
2. クリプトスポリジウム濃度が0.05 [oocysts/L]を越える日のリスクを除くことによって、年間感染リスクの95%値が1log程度低減した。
3. 年間感染リスクは極めて少ない日数(3日以下)の感染リスクによってその大部分が占められていることがわかった。
4. 年間感染リスクが 10^{-4} 以下になるための条件として、最大クリプトスポリジウム濃度が0.013[oocysts/L]以下(80Lで検出されない)であることが示唆された。

簡便なクリプトスポリジウム測定法の開発の一環として、フローサイトメトリーによって培養して得られたクリプトスポリジウムオーシストを測定することができた。今後は環境試料への適用を検討する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 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, p161-162
 - 2) 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、VII-78

参考文献

- 1) 厚生省, 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針, 1998
- 2) 橋本 温, 河井 健作, 西崎 綾, 松本 かおり, 平田 強, 水環境学会誌, 22(4), pp.282-287, 1999
- 3) Teunis, P. F. M. and Havelaar, A. H., RIVM Report no. 284 550 006, 1999

分担研究報告書 7

*Cryptosporidium parvum*の細胞培養に関する基礎的検討

分担研究者 遠藤卓郎、黒木俊郎

Cryptosporidium parvum の細胞培養に関する基礎的検討

分担研究者 国立感染症研究所寄生動物部 遠藤 卓郎
神奈川県衛生研究所細菌病理部 黒木 俊郎

研究協力者 国立感染症研究所寄生動物部 八木田 健司
神奈川県衛生研究所細菌病理部 岡崎 則男

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評価及び管理に関する研究の一環として、クリプトスポリジウムの培養細胞への感染実験の条件設定を検討した。リスク評価に向けての基礎資料として、分離株の同定や保存、疫学調査のための抗原の確保など研究室レベルでの多くの整備が必要で、中でもクリプトスポリジウムは宿主特異性が強く、株によっては実験動物への感染が成立しないため、その代替法として試験管内培養法の検討が必須である。

ヒト結腸腺癌由来の Caco-2 細胞およびヒト回盲腺癌由来の HCT-8 細胞 (ATCC No. HTB-37、CCL-244) を宿主細胞としたクリプトスポリジウムの感染実験は比較的容易に成立することが示された。しかしながら、実験系は定性的で、接種量と感染個体数との相関は得られなかった。培養細胞中でのクリプトスポリジウムの発育は比較的速やかに進行し、接種後 24 時間にはすでに schizogony (胞子虫類における無性生殖の多分裂様式) を完了することが確認された。その後、2 日目までは形成された一次メロゾイトが近傍の宿主細胞へ感染・定着する傾向が見られた。また、一部では第二世代シゾン (4-メロゾイト形成) への発育も観察された。しかしながら、48 時間以降では原虫の増殖は認められず、その後は比較的速やかに消失した。目下のところ、原因は不明である。培養法の適用範囲は広く、オーシストの感染性評価、薬剤感受性試験、あるいは感染実験や DNA 解析に先立つ原虫数の増幅などへの用途が期待される。

研究目的

Cryptosporidium parvum (以下、クリプトスポリジウム) などの下痢原性原虫類による水道水汚染問題では水道水に係る健康リスク評価が重要課題となっている。その前

提として住民における原虫症罹患率の把握や疾病伝播（感染）に係る水道水の寄与率を正確に把握することが求められるが、現在、分離株の同定や保存、疫学調査のための抗原の確保など研究室レベルでの多くの整備が急がれる状況にある。中でもクリプトスポリジウムでは分離株保存の確立が必要となっている。クリプトスポリジウムは宿主特異性が強く、株により実験動物への感染が成立しないためその代替法として試験管内培養法の検討が必須である。培養法の適用範囲は広く、オーシストの感染性評価、薬剤感受性試験、あるいは感染実験やDNA解析に先立つ原虫数の増幅などへの用途が期待される。本研究ではクリプトスポリジウムの細胞培養の基礎的検討を行った。

研究方法

オーシストの調整

予め *C. parvum* (HNJ-1 株) オーシストを経口投与し、継代飼育しておいたヌードマウスの糞便を採取し、精製水に懸濁してガーゼ濾過後、酢酸エチル処理した。その後、ショ糖濃度勾配法および塩化セシウム法によりオーシストを分離・精製し、使用するまで冷蔵保存した。

オーシストの脱囊処理

精製したオーシストを再蒸留水で2回洗浄後、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液（アンチフォルミン、和光純薬）中で37℃、5分間静置して表面消毒をした。そのオーシストを0.01% Tween 80水溶液で2回洗浄し、ハンクス液（以下HBSS）（Gibco）に再浮遊した。浮遊液の一部を10倍量のHBSS（pH 2.75）に加え、37℃、5分間加温した。遠心回収したオーシストをHBSS、1.5%胆汁酸（Sigma）および0.5% トリプシン（1:250）（Gibco）から成る脱囊誘発液（前処理液）に浮遊し、37℃、5～60分間反応させた。反応終了後、等量のHBSSを加えて遠心洗浄し、沈渣中のオーシストをHCT-8細胞、あるいはCaco-2細胞の培養フラスコに移行した。

細胞培養

ヒト結腸腺癌由来のCaco-2細胞およびヒト回盲腺癌由来のHCT-8細胞（ATCC No. HTB-37、CCL-244）を使用した。培養液にはそれぞれMEM、RPMI-1640培地（Gibco）を基礎培地とした。これに必要なに応じて5-10% FBS（Gibco）、100U/mlのpenicillin-G、100 μ g/mlの硫酸streptomycinおよび0.25 μ g/mlのamphotericin B等を添加した。また、一部の実験では、強化培地としてRPMI 1640培地に50 mM glucose、35 ascorbic acid、1.0 μ g/ml folic acid、4.0 μ g/ml 4-aminobenzoic acid、2.0 μ g/ml calcium pantothenate および0.1U/ml insulinを添加したものをを用いた。培養条件は37℃、5%炭酸ガス下とした。宿主細胞の培養にはプラスチックフラスコ（25 cm²、IWAKI）を用い、サブコンフルエントの状態にあるHCT-8細胞をEDTA-トリプシン溶液

(Gibco) で剥離した。これを希釈し、カバーグラス (径 12 mm、IWAKI) を入れたプラスチックシャーレに接種 (1.5×10^5 /ml) して培養した。一定時間培養の後に宿主細胞としてクリプトスポリジウムの感染実験に供した。

蛍光抗体染色

クリプトスポリジウム接種後、一定時間培養したカバーグラス上の細胞シートを PBS で 1 回洗浄後、メタノール固定 (10 分間) した。標本を風乾し、使用まで結露を避けて冷蔵庫保存した。染色に先立って、PBS に浸漬し、次いでブロッキング試薬 (1% BSA あるいは 10% NGS 添加 PBS) に 30 分間浸漬した。その後、市販の抗-オーシスト単クローン抗体 (Crypto-A-Glo、Waterborne) および抗-sporozoite 蛍光抗体 (Sporo-Glo、ベリタス) を用いて常法に従って染色し、顕微鏡観察に供した。

クリプトスポリジウムの培養細胞への接種

カバーグラス上でサブコンフルエントに達した HCT-8 細胞 (培養 3 日目) あるいは Caco-2 細胞 (培養 7 日目) を培地で洗浄し、無処理あるいは脱囊処理後のオーシスト ($10^3 \sim 10^5$ 個/ml) を接種した。2 ないし 4 時間後、あるいは 24 時間後に細胞を洗浄し、侵入しなかったクリプトスポリジウムおよび脱囊後のオーシスト壁を除去した。クリプトスポリジウム接種から 24、48 および 72 時間後に固定し、蛍光抗体染色を施した。あわせて一部の試料については Giemsa 染色あるいは電子顕微鏡試料作製に供した。

クリプトスポリジウム感染細胞の継代

クリプトスポリジウム接種後、72 時間培養した HCT-8 細胞をトリプシン-EDTA で剥離し、10 倍に希釈してカバーグラス入りプラスチックシャーレで継代培養した。24、48 および 72 時間培養後に細胞シートを蛍光抗体染色した。さらに、72 時間培養後の細胞を再度継代し、48 時間培養後に蛍光抗体染色を実施した。

成績と考察

1. 脱囊誘発処理と感染性

クリプトスポリジウムの感染に際しては、次亜塩素酸ソーダを用いたオーシストの無菌化処理によりオーシストの脱囊活性が向上し、処理後のオーシストを培養細胞上に添加するだけで感染が成立することが知られている。したがって、既報 (Upton et al., 1994; Slifko et al., 1997) では、無処理のオーシストを細胞に接種して増殖させている。しかしながら、人工腸液で前処理することで極めて効率に脱囊させることが可能となることから、同期的 (短時間) にクリプトスポ