

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

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)

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 国包章一 (国立公衆衛生院)

目次

研究班の構成	1
I. 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)	3
国包章一	
II. 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	13
井関基弘	
2. 北海道十勝管内の健康若齢牛におけるクリプトスポリジウム感染 実態	19
更科孝夫	
3. 各種動物における <i>Cryptosporidium</i> の保有状況	25
黒木俊郎、遠藤卓郎	
4. 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	33
黒木俊郎、遠藤卓郎	
5. 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	45
西尾 治	
6. クリプトスポリジウムの分子疫学的調査方法	61
遠藤卓郎、黒木俊郎、西尾 治	
7. 消化管寄生性原虫感染症の血清疫学に関する検討	81
遠藤卓郎、黒木俊郎	
8. 大量の水を対象とした原虫濃縮回収装置の開発	97
平田 強	
9. 環境水中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度変動とその 感染リスクに関する基礎的検討	103
大垣真一郎	
10. 実稼働している浄水場の原水およびろ過水における原虫の出現濃度 分布に関する調査	117
平田 強、金子光美	
11. 大孔径膜の原虫除去特性の検討	129
平田 強	
12. クリプトスポリジウムの除去指標としての藻類の検討	137
眞柄泰基、国包章一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	149
IV. 研究成果の刊行物・別刷	157

研究班の構成

主任研究者

国立公衆衛生院水道工学部長

国 包 章 一

分担研究者

金沢大学医学系研究科

井 関 基 弘

国立感染症研究所寄生動物部原生動物室長

遠 藤 卓 郎

東京大学大学院工学系研究科教授

大 垣 眞一郎

摂南大学工学部教授

金 子 光 美

神奈川県衛生研究所細菌病理部主任研究員

黒 木 俊 郎

帯広畜産大学畜産学部教授

更 科 孝 夫

国立公衆衛生院衛生微生物学部室長

西 尾 治

麻布大学環境保健学部教授

平 田 強

北海道大学大学院工学研究科教授

眞 柄 泰 基

研究協力者

国立公衆衛生院水道工学部主任研究官

秋 葉 道 宏

国立公衆衛生院衛生微生物学部

秋 山 美 穂

国立感染症研究所寄生動物部

泉 山 信 司

島根県衛生研究所微生物部

板 垣 朝 夫

岩手大学農学部

板 垣 匡

帯広畜産大学畜産学部助教授

宇 塚 雄 次

麻布大学獣医学部

宇 根 有 美

兵庫県衛生研究所微生物部

小 野 一 男

東京大学大学院工学系研究科講師

片 山 浩 之

国立公衆衛生院衛生微生物学部

加 藤 由美子

国立公衆衛生院水道工学部特別研究員

金 漢 承

愛知県衛生研究所生物部

斎 藤 寛 史

横浜市立市民病院感染症部

坂 本 光 男

横浜市立市民病院感染症部

相 楽 裕 子

帯広畜産大学畜産学部助手

田 邊 茂 之

帯広畜産大学原虫病研究センター教授

長 沢 秀 行

愛知県衛生研究所生物部

林 留美子

神奈川県衛生研究所食品獣疫部

古 川 一 郎

麻布大学環境保健学部講師

森 田 重 光

国立感染症研究所寄生動物部

八木田 健 司

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

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)

平成13年度 総括研究報告書

平成14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及びジアルジア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、濃縮・精製手法、浄水処理における除去技術等につき検討した。今年度の調査においても、ヒトのクリプトスポリジウム症及びジアルジア症の感染率は必ずしもそれほど高くないことが認められたが、畜産農家で飼育されている1歳未満の若齢牛や動物飼養施設で飼育されている爬虫類は、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となった。クリプトスポリジウムの分子疫学情報を広く活用するため、関連情報をまとめて国立感染症研究所のホームページに掲載し、インターネットによる情報発信を行った。また、酵素免疫法によるクリプトスポリジウム血清抗体価試験法により、全国の6県におけるヒトの血清抗体価につき調査し、陽性/陰性のカットオフ値 $OD=0.300$ とすることによって両者を判別できることを明らかにした。濃縮・精製手法に関しては、大孔径中空糸膜（90%除去孔径 $2.0\mu m$ ）を用いることにより、水中のクリプトスポリジウムをほぼ100%捕集・濃縮できること、PSIMS法（Percoll ショ糖浮遊-免疫磁気ビーズ法）により、試料中の濁質量に関係なくクリプトスポリジウム及びジアルジアの安定した濃縮・精製が可能であることを明らかにした。浄水処理における除去技術等に関しては、ある浄水場における *C. parvum* の除去率が $2.37 \log_{10}$ 以上、*G. lamblia* の除去率が $2.31 \log_{10}$ 以上であること、大孔径中空糸膜（90%除去孔径が $2.0\mu m$ ）のクリプトスポリジウム除去能力が約 $7 \log_{10}$ と極めて高いこと、クリプトスポリジウムオーシストと緑藻 *Scenedesmus quadricauda* の凝集-砂ろ過における除去特性がほぼ同じであることを明らかにした。

分担研究者	井関 基弘	金沢大学医学系研究科 教授
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部 室長
	大垣眞一郎	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い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

金沢市内のある医療機関を受診した外来患者及び健康成人を対象に、下痢便 47 検体、有形便 91 検体の合計 138 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。また、これとは別のある病院で高齢（60 歳以上）の下痢症患者 80 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するとともに、同地域の河川水やその河川水が流入する海域で養殖されているホタテ貝についても、クリプトスポリジウムの検査を行った。

このほか、北海道十勝管内畜産農家 60 戸の 0～9 ヶ月齢の健康な若齢雌牛 157 頭を対象に糞便を採取し、クリプトスポリジウム症感染状況を調査した。また、動物飼養施設で飼育されている爬虫類、カメ類 25 種 39 検体、トカゲ類 30 種 78 検体、ヘビ類 34 種 45 検体、ワニ類 2 種 2 検体、計 91 種 164 検体、及び、カメ類 3 種 7 検体、トカゲ類 3 種 30 検体、ヘビ類 2 種 3 検体、計 8 種 40 検体を対象に、クリプトスポリジウムの保有状況を調査した。

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

昨年度に引き続き、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

昨年度に引き続き、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 2 件、ウシ由来のもの 1 件、ネズミ由来のもの 2 件及びネコ由来のもの 1 件の計 6 件を用いて

18SrRNA 塩基配列による解析を行うとともに、クリプトスポリジウムに関する分子疫学情報を一般に公開して調査等に役立てるため、情報の整理・加工及びインターネットを通じたホームページによる情報発信を行った。

4) 酵素免疫法によるクリプトスポリジウム血清抗体価試験の応用

昨年度に開発した酵素免疫法によるクリプトスポリジウム血清抗体価試験法を IgG 抗体用に改良し、国立感染症研究所感染症情報センター血清バンクに保存されている血清試料等を用いて、全国の 6 県におけるヒトの血清抗体価につき調査した。

2. クリプトスポリジウム及びジアルジアの濃縮・精製手法に関する検討

1) クリプトスポリジウムの濃縮手法の検討

大孔径中空糸膜（90%除去孔径 2.0 μ m 及び 3.6 μ m）を用いて水中のクリプトスポリジウムオーシストの濃縮手法につき検討し、それぞれの場合における回収率を比較評価した。

2) クリプトスポリジウム及びジアルジアの精製手法の検討

大容量の環境水試料からクリプトスポリジウム及びジアルジアを濃縮して、これらを精度良く検出する方法につき検討し、PS 法（Percoll ショ糖浮遊法）、IMS 法（免疫磁気ビーズ法）、SIMS 法（高比重ショ糖浮遊－免疫磁気ビーズ法）及び PSIMS 法（Percoll ショ糖浮遊－免疫磁気ビーズ法）による精製手法を比較した。

3. 浄水処理におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア除去技術等の検討

1) クリプトスポリジウム及びジアルジア除去性能の調査

浄水処理におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの除去性能を明らかにするため、ある浄水場の原水及び浄水を 9 ヶ月間にわたって月 1 回の頻度で調査した。

2) 大孔径膜のクリプトスポリジウム除去性能の検討

90%除去孔径が 2.0～2.2 μ m の範囲にある 4 種類の中空糸精密ろ過膜を試作し、クリプトスポリジウムオーシストの除去特性を比較評価した。

3) クリプトスポリジウム除去代替指標の検討

昨年度に引き続き、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

金沢市内のある医療機関の受診者を対象に合計 138 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、ある病院の高齢下痢症患者 80 名を対象に糞便検査を行った結果、全てクリプトスポリジウム症陰性であり、同地域の河川水やその河川水が流入する海域で養殖されているホタテ貝についても、クリプトスポリジウムは全く検出されなかった。

北海道十勝管内畜産農家 60 戸の健康な若齢雌牛 157 頭を対象に、クリプトスポリジウム症感染状況を調査した結果、3 農家 6 頭から *Cryptosporidium parvum*、2 農家 3 頭から

Cryptosporidium muris の糞便内排出が確認された。陽性牛の年齢は、*C. parvum* が 8 日～2 ヶ月齢、*C. muris* が 8～9 ヶ月齢であった。また、動物飼養施設の爬虫類 91 種 164 検体及び野外で生息する爬虫類 8 種 40 検体を対象に、クリプトスポリジウムの保有状況を調査した結果、飼養されている爬虫類では保有率が高く、ヘビ類が 45 検体中 11 検体で 24.4%、トカゲ類が 28 検体中 4 検体で 14.3%であったが、野外で生息するものでは保有率が低く、トカゲ類のヤモリ 1 検体から検出されただけであった。

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今年度来院した下痢症患者等のうち、クリプトスポリジウム症患者 1 名は海外渡航歴がなかった。ジアルジア症患者及び感染者 6 名のうち 3 名は海外での感染の可能性が高く、残り 3 名は海外渡航歴がなく国内での感染が疑われた。昨年度と今年度を合わせた両感染症患者で海外渡航歴がない 6 名のうち 4 名は、発症前にプールで水泳をしていた。

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検討した結果、ヒト由来のもの 2 件とウシ由来のもの 1 件は同じ塩基配列であったが、ネズミ由来のもの 2 件は別のクラスターに属しており、ネコ由来のもの 1 件はこれらとは全く異なるクラスターに属していた。

このほか、クリプトスポリジウムに関する分子疫学情報を一般に公開して調査等に役立てるため、これまでに得られている情報を整理・加工し、国立感染症研究所のホームページに掲載してインターネットによる情報発信を行った。

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

全国の 6 県におけるヒトのクリプトスポリジウム血清抗体価につき調査し、陽性/陰性のカットオフ値 $OD=0.300$ を決定するとともに、集団感染患者の OD 値は 1 例の陰性者 ($OD=0.161$) を除いて $0.557\sim 1.791$ の範囲に分布し、その中間項平均は $OD=1.171$ であることを明らかにした。

2. クリプトスポリジウム及びジアルジアの濃縮・精製手法に関する検討

1) クリプトスポリジウムの濃縮手法の検討

孔径 $2.0\mu\text{m}$ の中空糸膜を用いて水中のクリプトスポリジウムオーシストを濃縮した場合、オーシスト漏出率はわずか 0.8%でほとんどすべてを捕集することができたが、孔径 $3.6\mu\text{m}$ の中空糸膜を用いた場合のオーシスト漏出率は 60%程度にとどまった。

2) クリプトスポリジウム及びジアルジアの精製手法の検討

PSIMS 法を用いて大容量の環境水試料からクリプトスポリジウム及びジアルジアを濃縮すれば、試料中の濁質量に関係なく安定した回収率 (クリプトスポリジウム: 64%、ジアルジア: 69%) が得られることが示された。しかし、MF カートリッジフィルターによるろ過及び遠心分離による濃縮過程では、既存の方法と比べて十分な回収率が得られないことがわかった。

3. 浄水処理におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア除去技術等の検討

1) クリプトスポリジウム及びジアルジア除去性能の調査

ある浄水場において9ヶ月間にわたって調査した結果、*Cryptosporidium parvum* については原水9試料すべて(100%)が陽性でその濃度範囲は110~1,700個/1,000L、浄水では18試料中12試料(67%)が陽性でその濃度範囲は0.7~190個/1,000L、*Giardia lamblia* については原水9試料中8試料(89%)が陽性でその濃度範囲は31~600個/1,000L、浄水では18試料中3試料(17%)が陽性でその濃度範囲は0.3~0.5個/1,000Lであった。これらに基づき浄水処理による除去率を計算すると、*C. parvum* が2.37 log₁₀以上、*G. lamblia* が2.31 log₁₀以上となった。

2) 大孔径膜のクリプトスポリジウム除去性能の検討

90%除去孔径が2.0~2.2μmの範囲にある4種類の中空糸精密ろ過膜のうち2.0μmの膜が、約7 log₁₀と他の膜に比べて高いクリプトスポリジウムオーシスト除去能力を有していることが確認された。

3) クリプトスポリジウム除去代替指標の検討

原水中のクリプトスポリジウムオーシストもしくは緑藻 *Scenedesmus quadricauda* の濃度が増加した場合、その濃度に比例して凝集-砂ろ過水中の濃度もほぼ同じ程度に高くなり、清澄期における両者の除去率もほぼ同じで2.0~2.5 log₁₀の範囲にあった。

D. 結論

水道水のクリプトスポリジウム及びジアルジア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、濃縮・精製手法、浄水処理における除去技術等につき検討した。

ヒト等の感染実態の把握と評価に関しては、今年度の調査においても、ヒトのクリプトスポリジウム症等の感染率は必ずしもそれほど高くないことが認められ、水道水を介してよりはむしろプールでの水泳との関係が示唆された。しかし、畜産農家で飼育されている1歳未満の若齢牛や動物飼養施設で飼育されている爬虫類は、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となった。このほか、クリプトスポリジウムに関する分子疫学情報を一般に公開して調査等に役立てるため、これまでに得られている情報を整理・加工し、国立感染症研究所のホームページに掲載してインターネットによる情報発信を行った。またIgG抗体を用いた酵素免疫法によるクリプトスポリジウム血清抗体価試験法により、全国の6県におけるヒトの血清抗体価につき調査し、陽性/陰性のカットオフ値OD=0.300とすることによって両者を判別できることを明らかにした。

濃縮・精製手法に関しては、大孔径中空糸膜(孔径2.0μm)を用いることにより、水中のほとんどすべてのクリプトスポリジウムオーシストを捕集・濃縮できること、PSIMS法(Percoll ショ糖浮遊-免疫磁気ビーズ法)により、試料中の濁質量に関係なくクリプトスポリジウム及びジアルジアの安定した濃縮・精製が可能であることを明らかにした。

浄水処理における除去技術等に関しては、ある浄水場における*C. parvum*の除去率が2.37 log₁₀以上、*G. lamblia*の除去率が2.31 log₁₀以上であること、大孔径膜(90%除去孔径が2.0μm)のクリプトスポリジウムオーシスト除去能力が約7 log₁₀と極めて高いこと、クリプトス

ポリジウムオーシストと緑藻*Scenedesmus quadricauda*の凝集-砂ろ過における除去特性がほぼ同じ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2年度目に当たるので、最終年度にあたる次年度の研究では本年度まで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要因を見極めてその的確な評価手法の確立を図りたい。

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

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)

平成13年度 分担研究報告書

平成14年3月

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 (金沢大学医学系研究科 教授)

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、金沢市内の1医療機関を受診した外来患者および健康成人を対象に糞便検査を実施した。また、両原虫症の国内における報告について文献的調査を行い、流行実態と問題点を考察した。今年度の検査数は下痢便47検体、有形便91検体の合計138検体であり、検査はショ糖遠心浮遊法で行なった。今回の糞便検査では結果は全て陰性であった。一方、厚生労働省への2001年の届出数はクリプトスポリジウム症が9例、ジアルジア症は135例であった。都立駒込病院における海外旅行帰国下痢患者からのクリプトスポリジウム検出率は1997年から2000年までの4年間の平均で5.2% (16/309) であり、全国的確な検査がなされれば、実際の感染者数は届出数をはるかに超えるものと思われる。また、2002年2月には北海道洞爺湖のホテルの簡易水道が感染源と疑われる129名の集団感染が発生している。ジアルジアの検出率は高知医科大学の外来・入院患者の検便で約1% (17/1,790) と報告されている。全国的な流行実態を把握するには国内における両原虫症の検査態勢をさらに充実させる必要がある。

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繁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、ヒトに関する調査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。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た。

B. 研究方法

金沢市内の1医療機関で一般検査室に提出される下痢便を検査対象とした。また、一般健康人における不顕性感染者の実態を知るため、成人の有形便についても検便を実施した。さらに、全国的な流

行の実態を把握するために文献的調査をおこない、問題点を考察した。

糞便検査数は下痢便 47 検体、有形便 91 検体の合計 138 検体であり、検査には約 1gの糞便を用い、比重1.2のショ糖液によるショ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ないように配慮した。

C. 研究結果

今回検査をおこなった 138 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。一方、2001年の患者届出数はクリプトスポリジウムが 9 件、ジアルジアが 135 件であった。都道府県別発生数を表 1 に示す。なお、届出は有症者に限られ、無症状病原体保有者は含まれない。

表 1 クリプトスポリジウム症とジアルジア症の届出患者数 (2001年)

	合 計	都 道 府 県 別
クリプトスポリジウム	9	東京 5, 神奈川 3, 兵庫 1
ジアルジア	135	宮城 2, 茨木 3, 埼玉 3, 千葉 2, 東京 58, 神奈川 12, 富山 1, 福井 3, 静岡 2, 滋賀 1, 京都 17, 大阪 16, 兵庫 5, 奈良 1, 岡山 1, 香川 2, 愛媛 1, 高知 2, 宮崎 1, 沖縄 2

(厚生労働省：感染症週報 3 (52), 2001)

都立駒込病院が実施した海外旅行後の下痢症患者の検査では、1997年から2000年の4年間のクリプトスポリジウム陽性率は平均 5 %と報告されている。ショ糖遠心浮遊法で検査したもので、年度別の検査数、陽性者数、陽性率を表 2 に示す。

表 2 都立駒込病院でのクリプトスポリジウム検査結果 (旅行者下痢症患者)

	1997	1998	1999	2000	合 計
陽性数/検査数	4/65	3/67	5/89	4/88	16/309
陽性率 (%)	6.2	4.5	5.6	4.6	5.2

(増田ら、臨床寄生虫学会誌 12 (1) : 89-91, 2001)

平成14年3月にクリプトスポリジウムの集団感染が発生した。以下、厚生労働省健康局水道課および兵庫県衛生研究所の小野一男氏からの連絡を略記する。兵庫県洲本市の高校生が2月19日～23日まで修学旅行で北海道ニセコ高原に行き、高原のホテルや洞爺湖湖畔のホテルで宿泊または飲食した。旅行参加者 212 名中 129 名が3月1日～2日をピークとして食中毒様症状を発症し、31 名が医療機関を受診した。有症者の検便で原因となる食中毒菌やウイルスは検出されなかったため、クリプトスポリジウムの検査を実施したところ、有症者 67 名中 61 名の糞便からオーシストが検出された。オーシストの遺伝子型はヒト型であった。また、この高校生と同時期に同じ宿泊施設を利用していた兵庫

県内の1団体について保健所が調査したところ、24中18名が同様の症状を呈していたという。感染源は特定されていないが、ホテルの簡易水道が強く疑われる例である。

ジアルジア症に関しては、高知医科大学付属病院で1998年～2001年の間、外来および入院患者のうち寄生虫学的検査依頼のあった1,790名について検査を行ない、17名(0.95%)からシストが検出されている(私信、高知医大付属病院検査部 森本徳仁)。陽性者のうち下痢症状を有するものは2名、海外渡航歴のあるものは3名であった。陽性者の年齢は46～71歳(平均61歳)で、すべて中高齢者であった。アンケート調査で回答の寄せられた12名の83%は飲用水には上水道を使用、イヌ飼育者は5名であったという。

D. 考察

今回の検便では、平成12年度と同様、すべて陰性であった。しかし、検査した下痢便は平成12年度と合わせても163例にすぎず、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に対する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、2001年の届出数は赤痢アメーバ症が416例であるのに対して、クリプトスポリジウム症は僅か9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、最近4年間で16例(平均陽性率5.2%)をみつけている。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。

わが国では食中毒発生時の検査項目にクリプトスポリジウムやジアルジアなど原虫症が含まれていないのも問題である。今回の兵庫県事例も、1996年の埼玉県越生町事例も、調査を実施した研究施設にクリプトスポリジウム検査の経験者がいて、たまたまクリプトスポリジウムまで検査を広げた結果、本症が把握できたのである。食中毒の検査項目に原虫検査を早急に加え、保健所や医療機関、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。

E. 結論

金沢市内の1医療機関で採取した下痢便47検体、一般健康成人の有形便91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。一方、2001年の有症者の届出数はクリプトスポリジウム9例、ジアルジア135例であった。2002年3月には集団感染が発生し129名が発症した。旅行者下痢患者からのクリプトスポリジウム検出率は約5%であった。ある病院の検査ではジアルジアの検出率は約1%であり、無症状感染者が88%であった。国内における流行の実態を把握するには食中毒の検査項目に両原虫を加えることが必須であるとともに、疫学調査をさらに拡大・継続する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki

T, Itagaki T, Endo T : Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res* 87: 950-955, 2001.

- 2) 増田剛太、今村顕史、味澤 篤、根岸昌功、八木多健司、遠藤卓郎、井関基弘：下痢症患者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 12 (1) : 89-91, 2001.
- 3) 山本徳栄、森田久男、広瀬義文、中澤清明、高岡正敏、中川善雄、斉藤正樹、坂本照正、井関基弘：水試料に添加したクリプトスポリジウムのオーシストの回収率についての検討。埼玉県衛生研究所報 35 : 70-75, 2001.

2. 学会報告

- 1) 坂本照正、中村澄夫、会沢勝夫、木俣 勲、井関基弘：病原微生物の検査方法に関する検討一 DAPI 染色方法について一。日本水処理生物学会誌 21 (別巻) 115, 2001.
- 2) 稲田康志、木俣 勲、石本知子、三輪雅幸、井関基弘：クリプトスポリジウム試験へのプロテインラベリング法の応用。日本水処理生物学会誌 21 (別巻) 117, 2001.
- 3) Matsubayashi M, Sasai K, Tani H, Miyamoto T, Fukata T, Baba E, Lillehoj HS, Nananishi T, Iseki M, Kimata I : Immunological cross-reactivity of chicken anti-*Eimeria* monoclonal antibodies with *Cryptosporidium* species. VIIIth International Coccidiosis Conference. July 9-13, 2001, Palm Cove, Australia.

3. 総説

- 1) 井関基弘：クリプトスポリジウム症。最新医学 56 (9) : 1969-1974, 2001.
- 2) 井関基弘：クリプトスポリジウム症。内科 87 (6) : 1379-1382, 2001.
- 3) 井関基弘：クリプトスポリジウム症の生態。化学療法の領域, 17 (4) : 745-751, 2001.
- 4) 井関基弘：クリプトスポリジウム症，ジアルジア症。小児科診療 64 (7) : 1061-1065, 2001.

分担研究報告書 2

北海道十勝管内の健康若齢牛における
クリプトスポリジウムの感染実態

分担研究者 更科孝夫
研究協力者 長沢秀行、宇塚雄次、田邊茂之

平成 13 年度分担研究報告書
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

北海道十勝管内の健康若齢牛におけるクリプトスポリジウム感染実態

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

水系感染の可能性を検討するために、2001年の6～7月に、北海道十勝管内の60戸の農家で飼育される0～9カ月齢の健康な若齢雌牛を対象に、各農家より1～7頭のウシを無作為に抽出し、合計157頭の直腸便を採取し、*Cryptosporidium* の感染実態を調査した。その結果、3農家6頭のウシから *C. parvum*、2農家3頭のウシから *C. muris* オーシストのふん便内排出が確認された。*Cryptosporidium* 陽性牛の年齢は *C. parvum* が8日～2カ月齢で、*C. muris* は8～9カ月齢であった。それぞれのふん便1g中のオーシスト(OPG)は *C. parvum* が100～294,500個/g、*C. muris* は500～38,000個/gであった。*C. parvum* 陽性牛はE農家に集中して検出され、この農家のウシでは *C. parvum* あるいは *C. muris* が排出されていることが確認された。*C. parvum* はヒトへの感染が可能であり、水系感染源としての可能性が最も高いことから、今後の注意が強く喚起される。

A. 研究目的

孢子虫類に属する *Cryptosporidium parvum* および *C. muris* は、脊椎動物の新生子に幅広い宿主域を有す。とくに *C. parvum* オーシストは罹患子牛の下痢便に大量に排出され、ヒトに経口的に感染し激しい下痢を起こす。ヒトの *Cryptosporidium* の感染経路は、ヒトからヒト、または動物からヒトへの直接感染と水道水を介した水系感染が知られている。*C. parvum* オーシストは通常の水道水の塩素濃度では全く不活化されず、数個のオーシストの摂取で感染が成立する。そのため、水道水が汚染された場合に大規模な集団感染が発生する。1993年に米国ウィスコンシン州のミルウォーキー市で *C. parvum* オーシストに汚染された市営水道水

を飲用した 40 万 3,000 人が *Cryptosporidium* 症を発症し、約 400 人が死亡している。日本では、1994 年に神奈川県平塚市で水道受水槽に汚染水が混入し、461 人が発症している。また、1996 年にも埼玉県入間郡越生町で汚染した水道水を飲用した約 8,000 人が発症している。1996 年の厚生省の対策指針によると、*Cryptosporidium* による水系感染の評価は、ヒトや哺乳動物のふん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 *Cryptosporidium* オーシストの排出状況を調査することは、公衆衛生上重要な課題となる。我々は水系感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 60 戸の農家において、0~9 カ月齢の若齢雌牛 157 頭を対象に、ふん便への *Cryptosporidium* オーシストの排出状況を調査した。

B. 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、2001 年 6~7 月に十勝管内の 60 戸の農家で、0~9 カ月齢の健康な若齢雌牛を対象に、各農家より 1~7 頭を無作為に抽出し、合計 157 頭の直腸便を採取し、*Cryptosporidium* の感染状況を調査した。直腸検査用手袋を用い、清潔なプラスチック容器にふん便 5g を採取し、ウシの品種、性別、年齢を記録した。ふん便からのオーシストの回収には、ショ糖不連続密度勾配分離法を用いた。すなわち、ふん便 5g を PBS (0.025M) で 50ml にメスアップした後、2,500rpm 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 のショ糖液の重層上に沈渣を重層し、これらのショ糖液の重層間にトラップされたオーシストを回収した。次に免疫蛍光抗体法 (IFA) (Cellabs 社製蛍光抗体キット, Crypto-Cell If Test) を行い、蛍光抗体顕微鏡で鏡検し、形態学的に *C. parvum* と *C. muris* を同定した。オーシスト内のスポロゾイトを確認するために、IFA で陽性となったサンプルに対し、DAPI 染色法 (核染色) を追加した。最終的に、分離されたオーシストから DNA を抽出した後、PCR 制限酵素断片長多型法 (PCR-RFLP 法) により、遺伝子学的に *C. parvum* と *C. muris* を特定した (制限酵素 *Vsp1* を使用)。

(倫理面への配慮)

Cryptosporidium 症は、人獣共通感染症であるため、調査に際しては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。

C. 研究結果

表1に0~9カ月齢の若齢牛におけるオーシスト陽性牛、農家、日齢・月齢、種名およびOPGを示した。60農家中3農家6頭のウシから *C. parvum* が、60農家中2農家3頭のウシから *C. muris* のオーシストのふん便内排出が確認された。*Cryptosporidium* 陽性牛の年齢は *C. parvum* が8日~2カ月齢(中央値26日齢)で、*C. muris* は8~9カ月齢(中央値8カ月齢)であった。それぞれのOPGは *C. parvum* が100~294,500個/g、*C. muris* は500~38,000個/gであった。*C. parvum* 陽性牛はE農家に集中して検出され、この牧場のウシでは *C. parvum* あるいは *C. muris* が排出されていることが確認できた。

表1. 0~9カ月齢の若齢牛における検出結果

検体番号	農家	日齢・月齢	種名	OPG ¹⁾
1	F	8日齢	<i>C. parvum</i>	8,750
2	E	19日齢	<i>C. parvum</i>	141,000
3	E	20日齢	<i>C. parvum</i>	187,750
4	E	22日齢	<i>C. parvum</i>	294,500
5	E	29日齢	<i>C. parvum</i>	9,250
6	H	2カ月齢	<i>C. parvum</i>	100
7	E	8カ月齢	<i>C. muris</i>	38,000
8	E	8カ月齢	<i>C. muris</i>	500
9	G	9カ月齢	<i>C. muris</i>	33,750

注1) OPG: フン便1g当たりのオーシスト数

D. 考察

Xiao, et al. の報告に従って、制限酵素を利用し *C. muris* および *C. parvum* の分類が可能となる。今回もPCR-RFLP法における同定とオーシストの形態学的方法による同定結果は一致した。*C. parvum* はさらに genotype I型、II型に分類されるが、今回はすべてII型に分類された。*C. parvum* の genotype I型はヒトにのみ感染性を有し、II型がウシを含む多くの動物種に感染するという Carraway, et al. の報告を考慮すると、これはPCR-RFLP法による同定が妥当であったことが窺える。

今回の調査で、0~2カ月齢の子牛における *C. parvum* の陽性率は12.0%であり、カナダ(59%)やスペイン(56.9%)の酪農家の下痢子牛を含む場合の検査結果に比べて低かった。成牛のキャリアーが感染源となると疑われたが、*C. parvum* のオーシストは年長のウシでは認められなかった。最近の北海道の報告では、*C. parvum* のオーシストは十勝と釧路管内の河川の60%(6/10)、さらに採取された水材料の50%(14/28)