

に検出されている。同様に *C. parvum* オーシストがホンジュラスのサン・ペドロ・スーラ市の飲料水に検出されている。従って、今回の不顕性感染牛のふん便は牛舎内の感染源となるばかりでなく、汚水と共に河川へ流出し飲料水を汚染する可能性も考えられる。

今回の調査で *C. parvum* と *C. muris* の混合感染はみられなかった。また、*C. parvum* 陽性牛が 0~2 カ月齢群に集中し、*C. muris* 陽性牛が 8 カ月齢以上群に分布したことから、両原虫の間に宿主年齢に依存する要求性の差があることが考えられた。この差は両原虫種の寄生部位の違い (*C. parvum* : 小腸上皮微絨毛内, *C. muris* : 胃底腺上皮微絨毛内) , また Quilez, et al. が報告している年齢に伴う宿主免疫状態の変化が作用しているものと推測できる。

E. 結論

2001 年の 6~7 月に、北海道十勝管内の 60 農家の 0~9 カ月齢の健康ホルスタイン雌牛を対象に、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* の感染実態を調査した。オーシストの回収にはショ糖連続密度勾配分離法を用いた。回収したオーシストに対し、蛍光抗体法と DAPI 染色で形態学的に同定を行った。次にオーシストから DNA を抽出し、PCR-RFLP 法で遺伝子学的にも同定を行った。結果的に 3 農家 6 頭のウシから *C. parvum* が、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 カ月齢で、*C. muris* は 8~9 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できた。

F. 研究発表

1. 更科孝夫, 宇塚雄次, 田邊茂之, 長沢秀行: 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)
2. 更科孝夫, 坂井宏明, 津島良典, 長沢秀行, 田邊茂之, 宇塚雄次: 健康牛のクリプトスポリジウム感染の実態調査. 用水と廃水, 44 (4) 提出
3. Sakai, H., Tsushima, Y., Nagasawa, H., Ducusin, R.J.T., Tanabe, S., Uzuka, Y. and Sarashina, T.: *Cryptosporidium* infection of cattle in Tokachi district, Hokkaido. *The Journal of Veterinary Medical Science*, submitted.

各種動物における*Cryptosporidium*の保有状況

分担研究者 黒木俊郎、遠藤卓郎
研究協力者 八木田健司、泉山信司、宇根有美、
古川一郎

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

各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況

分担研究者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所細菌病理部
	遠藤卓郎	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部
	泉山信司	国立感染症研究所寄生動物部
	宇根有美	麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室
	古川一郎	神奈川県衛生研究所食品獣疫部

各種爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。対象としたのは、動物飼養施設で飼育されている爬虫類ではカメ類 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 検体であり、野外に生息する爬虫類はカメ類 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 検体であった。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（24.4%）、トカゲ類が 28 検体中 4 検体（14.3%）であった。野外で生息する爬虫類では保有率が低く、トカゲ類であるヤモリ 1 検体から検出されただけであった。

A. 研究の目的

Cryptosporidium には爬虫類に寄生する種が知られている。これらの *Cryptosporidium* は哺乳類には寄生することはないとされているため、医学的な臨床上的の問題はない。しかし、オーシストの形態が *C. parvum* に類似し、共通の抗原を有しているものがある。そのため、FITC を用いた蛍光抗体染色と微分干渉像による観察ではこれらを *C. parvum* と鑑別するのは非常に困難である。そのため、爬虫類に由来する *Cryptosporidium* が浄水より検出された場合であっても *C. parvum* が検出されたものとして給水を停止せざるを得ない。

一方、爬虫類に寄生する *Cryptosporidium* については、種が確定されていない、宿主（域）が不明である、各種爬虫類における保有状況が明らかになっていないなど、関連する情報は非常に乏しいのが現状である。

そこで、国内で飼養されている爬虫類および野外に生息する爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況を把握し、さらにそれらの種あるいはタイプを解析して、爬虫類に寄生する *Cryptosporidium* のデータの集積を目的として調査を行った。

B. 研究方法

1) 調査の対象

爬虫類を飼育する 4 施設で飼養されていた爬虫類、個人が飼養していた爬虫類および野外に生息していた爬虫類を対象とした。その内訳は、飼養されていた爬虫類としてカメ類 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 検体であった。また、野外に生息する爬虫類として、神奈川県内および静岡県内で捕獲したものを対象とした。その内訳はカメ類 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 検体であった。

2) *Cryptosporidium* の検出

糞便から FEA によりオーシストを精製し、沈渣をスライドガラスに塗抹、乾燥して *Cryptosporidium* に対する特異抗体による蛍光染色 (Aqua-Glo, Waterborne) と DAPI 染色を行った。落射型蛍光顕微鏡を用いて B 励起光下で観察し、暫定対策指針に記載された基準により *Cryptosporidium* オーシストの判定を行った。

3) 遺伝学的解析

鏡検により *Cryptosporidium* が検出された試料について、18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。オーシストの DNA は精製オーシストから界面活性剤存在下で加熱により抽出し、ガラス粉末への DNA 吸着を利用した GeneClean キット (BIO 101 社) を用いて精製した。

18S rRNA 領域の増幅には 18S rRNA 遺伝子内の 435bp を増幅領域とした CPB DIAGF (5' -AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG-3') ならびに DIAGR (5' -TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG-3') プライマーを用いた。PCR 産物は 2%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、泳動像を確認した。次いで QIAquick PCR purification キットを PCR 産物に用いて残留プライマーを除去した後、この精製 DNA を試料として ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (シーケンサー) を用いてダイレクトシーケンスを行なった。シーケンスプライマーには PCR に使用した DIAGF および DIAGR を使用した。得られた塩基配列は Blast サーチにより既存の塩基配列との比較を行った。

C. 結果

1) 爬虫類における *Cryptosporidium* の保有

動物施設等において飼養されている爬虫類では、164 検体中 40 検体 (24.4%) から *Cryptosporidium* spp. が検出された。検出率は目により異なり、トカゲ類 (79 検体中 28 検体、35.4%) が最も検出率が高く、次いでヘビ類 (45 検体中 11 検体、24.4%)、カメ類 (38 検体中 1 検体、2.6%) と続いた。施設別では、A 施設ではヘビ類が 19 検体中 2 検体 (10.5%)、トカゲ類が 21 検体中 3 検体 (14.3%) から検出され、カメ類の 16 検体とワニ類の 1 検体からは検出されなかった。B 施設ではヘビ類が 7 検体中 3 検体 (42.9%)、トカゲ類が 6 検体中 1 検体 (16.7%)、カメ類が 22 検体中 1 検体 (4.5%) から検出され、ワニ類の 1 検体からは検出されなかった。C 施設ではヘビ類が 19 検体中 6 検体 (31.6%) から検出され、トカゲ類の 1 検体からは検出されなかった。D 施設ではトカゲ類だけの調査であったが、27 検体中 8 検体 (29.6%) から検出された。個人が飼養していたトカゲ類は 24 検体中 16 検体 (66.7%) から検出された。

ヘビ類、トカゲ類およびカメ類のそれぞれ 1 検体から *Cryptosporidium* 様粒子が検出されているが数が少なく、確定に至っていない。

野外に生息する爬虫類では、ニホンヤモリの 1 検体から *Cryptosporidium* sp. が検出された。他の爬虫類からは検出されなかった。

2) 遺伝学的解析

D 施設で飼養されているヒョウモントカゲモドキから検出された *Cryptosporidium* sp のオーシストの 18S rRNA 遺伝子を対象に DNA 配列を調べたところ、Xiao et al が報告した *Cryptosporidium* CSP06 と 100%一致した。他の爬虫類から検出された *Cryptosporidium* については現在解析を継続的に行っている。

D. 考察

動物飼養施設や個人が飼養する爬虫類および野外に生息する爬虫類を対象に *Cryptosporidium* の保有を調べた。野外に生息する爬虫類では保有は少なかったが、飼養されている爬虫類からは高率に *Cryptosporidium* が検出された。

今回の調査で検出された *Cryptosporidium* のオーシストの大きさは 5 μ m 前後で、*C. parvum* のオーシストと形態的に鑑別することは非常に難しい。爬虫類由来のオーシストと *C. parvum* のオーシストを鑑別するには DNA レベルの解析が必要である。したがって、水道原水あるいは水道水に爬虫類由来の *Cryptosporidium* のオーシストが混入した場合、顕微鏡を用いた検査では鑑別ができないため、給水停止や浄水処理の徹底等の対策を実施しなければならない。

検出された *Cryptosporidium* のうち遺伝子レベルの解析を行ったオーシストはヒョウモントカゲモドキに寄生していた *Cryptosporidium* であった。この *Cryptosporidium* は *Cryptosporidium* CSP06 の 18S rRNA 遺伝子と塩基配列が 100%一致した。CSP06 株はサバクオオトカゲ (*Varanus griseus*, Desert monitor) から検出された *Cryptosporidium* であり、種として命名されていない。

爬虫類に寄生する *Cryptosporidium* は知られているが報告数は少なく、種が確定しているのはヘビに寄生する *C. serpentis* だけである。トカゲから検出される *C. saurophilum* は新種として提案されているが遺伝学的な解析が進められている段階であり、CSP06 株と同一であるか否かは明らかとなっていない。その他に爬虫類から検出された報告のある *Cryptosporidium* は暫定的な名称が付されているか、単に形態的な特徴が記載されているに過ぎず、詳細な調査はほとんど行われていない。

これまでのところ *C. serpentis* あるいは爬虫類に寄生するその他の *Cryptosporidium* がヒトから検出されたとする報告も、あるいはヒトに対する病原性が確認されたとする報告もない。健康人には爬虫類由来の *Cryptosporidium* が寄生し、さらに病原性を発現することはないと考えられるが、AID 患者等の免疫不全者においては爬虫類由来 *Cryptosporidium* が寄生したり、あるいは病原性を示す可能性を完全に否定することはできない。爬虫類に寄生する *Cryptosporidium* の詳細な解析を行うとともに、免疫不全者から検出される *Cryptosporidium* の種やタイプを明らかにして本来の宿主を特定することで、爬虫類由来 *Cryptosporidium* の宿主域の解明を進め、汚染源あるいは感染源対策の策定に必要な情報の提供を行うことが重要と考える。

表1 調査の対象とした爬虫類

飼養動物	ヘビ類
カメ類	アオダイショウ 4 検体
アカアシガメ	アカダイショウ 2 検体
インドセタカガメ	アニメニシキヘビ
インドホシガメ 4 検体	ウスリーマムシ 2 検体
エジプトリクガメ 3 検体	ウラコアガラガラヘビ
エロンガータリクガメ 2 検体	カーベットニシキヘビ
ガラバゴスゾウガメ	カリフォルニアキングスネーク
ガルフコーストハコガメ	キイロアナコンダ
ケヅメリクガメ	キイロネズミヘビ
スッポン	コロンビアレインボウボア
スッポンモドキ	サキシママダラ
セマルハコガメ 2 検体	サバクナメラ
ニシキハコガメ	サハラツノクサリヘビ
ニホンイシガメ 2 検体	シマヘビ 3 検体
ニホンクサガメ 2 検体	シロクチニシキヘビ
ハナガメ	シロヘビ
ハミルトンガメ	シンリンガラガラヘビ
バンケーキリクガメ 2 検体	タイワンコブラ
ヒラリーカエルアタマガメ 3 検体	チョウセンナメラ
ヘビクビガメ sp	ツシマムシ
ベルセオレガメ	トウブダイヤガラガラヘビ 2 検体
ホウシャガメ 3 検体	パインスネーク
ミシシッピーアカミミガメ	バシフィックボア
ミツユビハコガメ	ハブ
ムツアシガメ	ビルマアオハブ
ワニガメ	ビルマニシキヘビ
	ボアコンストラクター
	ボールニシキヘビ 2 検体
	ボールパイソン
	ミドリニシキヘビ 2 検体
	ミルクヘビ
	メキシコマムシ
	ニホンヤマカガシ 2 検体
	ライノセラサダー
トカゲ類	ワニ類
アオジタトカゲ	キューバワニ
アメリカドクトカゲ	ニシアフリカコビトワニ
エリマキトカゲ	
オウカンミカドヤモリ 2 検体	
オマキトカゲ	
オマキトカゲモドキ	
オビトカゲモドキ 2 検体	
グリーンイグアナ 2 検体	
グリーンバシリスク	
コモドオオトカゲ	
サバンナオオトカゲ 2 検体	
ザラクビオオトカゲ 2 検体	
ジュウジカクシトカゲ	
チュウゴクワニトカゲ	
トゲオイグアナ	
トッケイ	
ナイルオオトカゲ	
ニシアフリカトカゲモドキ	
ノドジロオオトカゲ	
ハナブトオオトカゲ	
ハリトカゲ sp 5 検体	
ヒョウモントカゲモドキ 38 検体	
フィリピンホカケトカゲ	
プレートトカゲ	
ベルコーカサスカメレオン	
ホカケトカゲ	
マダガスカルヒルヤモリ	
ミスオオトカゲ 3 検体	
メキシコドクトカゲ	
ヨロイトカゲ	
	野外生息動物
	カメ類
	スッポン
	ニホンクサガメ 4 検体
	ミシシッピーアカミミガメ 2 検体
	トカゲ類
	ニホンカナヘビ 2 検体
	ニホントカゲ 24 検体
	ニホンヤモリ 4 検体
	ヘビ類
	シマヘビ
	ニホンヤマカガシ 2 検体

表2 爬虫類における *Cryptosporidium* spp.の保有状況

飼養動物	検体数	検出数	野外生息動物	検体数	検出数
カメ類	39	1(2.6%)	カメ類	7	0
A施設	17	0	トカゲ類	30	1(3.3%)
B施設	22	1(4.5%)	ヘビ類	3	0
トカゲ類	78	28(35.9%)			
A施設	20	3(15.0%)			
B施設	6	1(16.7%)			
C施設	1	0			
D施設	27	8(29.6%)			
その他	24	16(66.6%)			
ヘビ類	45	11(24.4%)			
A施設	19	2(10.5%)			
B施設	7	3(42.9%)			
C施設	19	6(31.6%)			
ワニ類	2	0			
A施設	1	0			
B施設	1	0			

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
研究協力者 相楽裕子、坂本光男、八木田健司、
泉山信司

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

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

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	神奈川県衛生研究所細菌病理部
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	相楽 裕子	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
	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部
	泉山 信司	国立感染症研究所寄生動物部

昨年度に続き今年度も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。今年度に受診した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。ジアルジア症患者および感染者 6 名のうち、3 名は海外での感染の可能性が高く、3 名は渡航歴がなく国内での感染が疑われた。昨年度と今年度の合わせた両感染症患者の海外渡航歴がない 6 名のうち、4 名は発症前にプールで水泳をしていた。

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、散発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昨年度の調査で使用したものと同じであり、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 1 名、ジアルジアに感染した下痢症患者 5 名および感染者 1 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。

患者の概要は昨年度と今年度の症例をまとめてクリプトスポリジウムの症例は表 1 に、ジアルジアの症例は表 2 に示した。

1) クリプトスポリジウム感染症例

症例 29歳男性

1998年7月よりHIVのため横浜市立市民病院感染症科に通院。99年1月より3TC, d4T, NFV開始。CD4 >500, VL 1000台。7月27日より頸部リンパ節腫脹、発熱、扁桃白苔出現、8月3日に精査加療のため入院。ミノマイシンで解熱、リンパ節、扁桃所見も軽快したが、8月5日より水様性下痢5~6回/日出現。8月7日に検便でクリプトスポリジウムが検出された。整腸剤で下痢は軽快し、8月10日に退院、外来通院となった。

背景としては、海外渡航歴はなく、キャンプやハイキングへも出かけていない。週に3回、市内のスポーツクラブのプールで水泳をする。家畜との接触や牧場への出入りはない。自宅では市営水道を使用している。7月始めにパートナーに会った。

2) ジアルジア感染症例

(1) 症例1

44歳男性

2001年6月8日夜より腹痛、水様性下痢(非血性、30回/日)が出現した。6月10日に救急外来を受診した。来院時体温36.6℃、腹部平坦、右下腹部に圧痛あり。糞便培養では有意菌検出されず。LVFX300mg分3、3日間の投与で下痢は改善傾向となった。6月14日の検便で、*G. lamblia*シストを検出した。6月15日よりmetronidazoleを750mg、7日間内服した。6月27日と7月11日の2回、検便を施行したが、いずれも*G. lamblia*陰性にて駆虫を確認した。

初診時検査データ：WBC 7100, Hb 17.5, Ht 49.3, Plt 26.1万, TP 8.2, BUN 23.5, CRN 1.10, CRP 10.8。

背景は、海外渡航歴はない。4月中旬に神津島に出かけた。5月中旬にスポーツジムのプールへ行った。ペットや家畜との接触はない。自宅では水道水を飲用している。

(2) 症例2

36歳男性

2000年4月 2001年3月にタンザニア、3月末から5月初めにネパール、5月上旬 6月上旬には中国を訪れた。症状はないが帰国後に検査を希望して6月21日に受診した。便の培養は陰性であった。検便にて*G. lamblia* シストを検出した。6月2日よりメトロニダゾールを750mg、7日間投与した。7月12日の検便は陰性であった。

背景として、ネパールの山中で生野菜を摂食し、当地の簡易水道水をできるだけ煮沸して飲用した。中国ではタンクに貯めた水をろ過、煮沸して飲用した。下痢が始まる1ヶ月前までに海に出かけた。

(3) 症例3

36歳男性

7月11日より水様便が50回以上、軽度腹痛、倦怠感が著明であった。7月12日に水様便が15回あり、受診した。体温は36.6℃。体重が75kgから73kgに減少した。急性胃腸炎の診断で輸液1000ml、LVFX 300mgを2日分投与されたが、下痢は続いた(水様便10回/日)。7月12日に検便したところ、*G. lamblia* 栄養体を検出した。7月16日よりメトロニダゾールを750mg、7日間投与したところ、下痢は軽快した。8月13日と9月14日の検便は陰性であった。

初診時検査データ：WBC 6720, Hb 17.9, Ht 49.3, Plt 29.3万, TP 7.6, BUN 22.0, CRN 0.74, CRP 0.6。

背景として、海外渡航歴はない。下痢が始まる1ヶ月前までに特に外出はしていない。自宅で高齢の猫を飼っている。自宅では水道水を飲用している。6月始めからダイエットのためにレタスやキャベツといった生野菜を摂食していた。

(4) 症例4

18歳女性

2001年7月29日から8月29日にかけてインドへ個人旅行をした。8月30日より倦怠感、下痢(水様性が3回/日)が続いていた。9月4日深夜より全身に掻痒感が出現し、起床時に顔面が腫脹、躯幹、四肢に蕁麻疹様発疹が現れ、黒色便が出現したため、当日外来を受診した。発疹は皮膚科で蕁麻疹と診断された。体温は37.7℃、腹部平坦、左下腹部に圧痛があった。9月7日よりメトロニダゾールを750mg、7日間投与し、下痢は改善されたが、10月2日、11月27日の両日に*Salmonella* O7群と*G. lamblia* シストがともに検出された。

初診時検査データ：WBC 7520, Hb 12.6, Ht 37.9, Plt 21.8万, TP 6.7, BUN 8.6, CRN 0.57, CRP 0.9。

インドでは氷の入った果物ジュースを飲用した。

(5) 症例5

34歳女性

2001年8月26日午後より水様性下痢(非血性、7-8回/日)が出現した。近医を受診し、投薬を受け9月1日には症状が改善した。9月3日より再び水様性下痢(非血性、7-8回/日)が出現し、悪心、嘔吐、腹痛も伴っていた。しばらく様子を見ていたが改善せず、9月10日に受診した。

受診時体温 36.5℃、腹部平坦、右下腹部に圧痛あり。糞便培養からは有意菌は検出されなかった。CPF を 600mg 分 3、3 日間の投与にて症状は改善した。9 月 14 日に検便を施行し、*G. lamblia* シスト、栄養体を検出した。9 月 19 日よりメトロニダゾールを 750mg 分 3、7 日間投与した。その後来院されず、駆虫は未確認となった。

背景として、海外渡航歴はない。8 月上旬にプールへ行った。自宅ではイヌを飼っている。動物園や牧場には行かず、家畜との接触もない。自宅では水道水を飲用している。

(6) 症例 6

58 歳男性

2001 年 10 月 15 日から 20 日に台湾を旅行した。10 月 21 日朝より微熱、水様性下痢（非血性 5 回/日）が出現し、同日救急外来を受診した。腹痛、悪心、嘔吐はなかった。受診時体温 37.2℃、腹部は平坦で圧痛はなかった。糞便培養からは *Salmonella* 07 群を検出した。LVFX の 300mg 分 3、3 日間の投与で症状は改善傾向となった。10 月 22 日に検便を施行し、*G. lamblia* シストを検出した。10 月 29 日よりメトロニダゾールを 750mg 分 3、7 日間投与した。11 月 12 日の検便にて *G. lamblia* 陰性であり駆虫を確認した。尚、11 月 11 日、12 日に糞便培養も施行し、*Salmonella* の陰性化も確認した。

初診時検査データ：WBC 9300, Hb 15.4, Ht 44.8, Plt 14.7 万, TP 7.1, BUN 14.9, CRN 0.69, CRP 0.4。

背景は、台湾のホテルでウイスキーに氷を入れて 2 回ほど飲んだ。他には茶を飲用した。自宅ではペットを飼育しておらず、動物園や牧場にも行かず、家畜との接触もない。自宅では水道水を飲用している。

D. 考察

本研究は、昨年度から引き続き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。今年度はクリプトスポリジウム感染下痢症患者 1 名とジアルジア感染下痢症患者 5 名および感染者 1 名が横浜市立市民病院感染症部を訪れた。受診時にアンケート票により海外渡航や国内旅行、飲用水の種類、動物との接触等、クリプトスポリジウムあるいはジアルジア感染に関連する事項の調査を行った。表 1 および表 2 に示したように、昨年度と今年度のこれまでの調査でクリプトスポリジウム感染下痢症患者 3 名、ジアルジア感染下痢症患者 9 名および症状を呈さないジアルジア感染者 2 名の合わせて 14 名に対してアンケート調査を実施した。

アンケート調査の結果では、クリプトスポリジウム感染下痢症患者では 3 名のうち 2 名 (66.7%) が、ジアルジア感染下痢症患者および感染者では 11 名のうち 7 名 (63.6%) が、両感染症患者合わせて 14 名のうち 9 名 (64.3%) が発症前あるいは受診前に海外渡航していた。渡航先はハワイの 1 例を除いて、アフリカ諸国とアジア諸国であった。これらの患者と感染者は渡航先で感染した可能性が高いと考えられた。渡航先での行動としては、水や氷の入ったジュースやウイスキーの飲用と川等での水泳が回答されており、こうした行動はクリプトスポリジウムやジアルジアの感染様式から考えて、感染リスクを高めていると推測された。

海外渡航歴の無いクリプトスポリジウム感染下痢症患者 1 名とジアルジア感染患者および感染者 5 名のうち 4 名 (66.7%) が下痢を発症する前にプールやスポーツジムで泳いだと回答した。これらの患者の発生とプールでの水泳が関連していることが強く疑われた。しかし、クリプトスポリジウム

とジアルジア以外の原因による下痢症患者のプールに関する情報が得られていないために比較することができなかった。また、アンケートの結果では海外渡航歴のない6名は全員が自宅で水道水を飲用していると回答した。したがって水道水の飲用という要因を慎重に扱いながら、今後下痢症患者全般にわたりアンケート調査を実施して、クリプトスポリジウム感染あるいはジアルジア感染と水泳との関連性を検討しなければならない。

クリプトスポリジウムやジアルジアの感染は、オーシストあるいはシストに汚染された飲料水の摂取あるいは汚染された食品の摂取等によるが、水泳等の野外活動や行楽 (recreation) に関連した感染も諸外国で多く報告されている¹⁻⁹⁾。Porter et al は、感染者のプール内での排便がプール利用者にかきたジアルジア症集団感染に強く関連しているとした事例を報告した¹⁰⁾。米国では1999年に47施設のプール等で排出された固形便293検体を調べたところ、クリプトスポリジウムオーシストは検出されなかったが、ジアルジアシストは13検体(4.4%)から検出された¹¹⁾。このようにプール等での排便事故によりプール水がオーシストやシストに汚染され、水泳中に感染するものと推測される。

E. 結論

昨年度から調査しているクリプトスポリジウムやジアルジア感染患者の感染経路について、プールでの水泳が感染に関与している可能性があるという結果が得られた。クリプトスポリジウムやジアルジアによる下痢症患者における下痢の発症と水泳との関連性を検討するには、両病原体以外による下痢症患者の発生と水泳との関連性と比較する必要がある。来年度は比較を行って、関連性の解析を行う予定である。

F. 文献

1. Puech MC, McAnulty JM, Lesjak M, Shaw N, Heron L, Watson JM. A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales associated with swimming at public pools. *Epidemiol Infect.* 2001 Jun;126(3):389-96.
2. Stafford R, Neville G, Towner C, McCall B. A community outbreak of *Cryptosporidium* infection associated with a swimming pool complex. *Commun Dis Intell.* 2000 Aug;24(8):236-9.
3. Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Andrews RM, Bailey M, Black J, Dharmage SC, Kirk MD. An outbreak of cryptosporidiosis in an urban swimming pool: why are such outbreaks difficult to detect? *Aust N Z J Public Health.* 2000 Jun;24(3):272-5.
4. Levy DA, Bens MS, Craun GF, Calderon RL, Herwaldt BL. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1995-1996. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.* 1998 Dec 11;47(5):1-34.
5. MacKenzie WR, Kazmierczak JJ, Davis JP. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. *Epidemiol Infect.* 1995 Dec;115(3):545-53.

6. Wilberschied L. A swimming-pool-associated outbreak of cryptosporidiosis. *Kans Med.* 1995 Summer;96(2):67-8. No abstract available.
7. McAnulty JM, Fleming DW, Gonzalez AH. A community-wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *JAMA.* 1994 Nov 23-30;272(20):1597-600.
8. Sorvillo FJ, Fujioka K, Nahlen B, Tormey MP, Kebabjian R, Mascola L. Swimming-associated cryptosporidiosis. *Am J Public Health.* 1992 May;82(5):742-4.
9. Joce RE, Bruce J, Kiely D, Noah ND, Dempster WB, Stalker R, Gumsley P, Chapman PA, Norman P, Watkins J, et al. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect.* 1991 Dec;107(3):497-508.
10. 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.
11. CDC Recreational Waterborne Disease Working Group, Prevalence of parasites in fecal material from chlorinated swimming pools--United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001 May 25;50(20):410-2.

表1 クリプトスポリジウム症患者の感染に関する要因等 (平成12~13年度)

症例	性別	年齢	症状	海外渡航	国内旅行	飲用水		動物	水泳等	備考
						自宅	旅行先			
1	男	22	下痢 (水様)	南アフリカ、 ジンバブエ、 マダガスカル	不明	不明	不明	不明	不明	
2	男	19	下痢	バングラデシュ、 インド	神戸、 丹沢	水道水	食堂の水、 井戸水(海外) 水道水(神戸)、 湧水(丹沢)	なし	海外であり	
3	男	29	下痢 (水様)	なし	なし	市営水道	—	なし	スポーツクラブ	HIV

表2 ジアルジア症患者および感染者の感染に関する要因等（平成12~13年度）

症例	性別	年齢	症状	海外渡航	国内旅行	飲用水		動物	水泳等	備考
						自宅	旅行先			
1	男	43	下痢、腹痛、 悪心、嘔吐、 発熱	なし	丹沢湖で オートキャンプ 他に海釣り	水道水 (浄水器)	飲用なし	イヌ	スミングクラブ	キャンプ 同行者に 下痢なし
2	女	75	軟便	NY (2年前)	栃木県 真岡市	水道水	井戸 (真岡)	なし	あり	井戸水で入れ歯 を洗浄 健康診断で陽性
3	男	35	下痢 (水様)	ケニア	不明	水道水	不明	なし	あり	
4	女	65	なし	なし	なし	水道水	—	動物園 (接触なし)	なし	健康診断で陽性
5	男	20	下痢 (水様)	インド	なし	水道水	ミネラルウォーター	なし	ガンジス川で 水泳	細菌性赤痢、 麻疹にも感染
6	男	44	下痢、腹痛 (水様)	なし	神津島	水道水	不明	なし	スポーツジム	
7	男	36	なし	タンザニア ネパール 中国	なし	不明	簡易水道 タンク	不明	海	
8	男	36	下痢、腹痛 (水様)	なし	なし	水道水	—	ネコ	なし	ダイエットで レタス、キャベツ 生食
9	女	18	下痢 (水様)	インド	なし	不明	不明	不明	不明	氷入り果物ジュース
10	女	34	下痢 (水様)	なし	なし	水道水	—	イヌ	プール	
11	男	58	下痢(水様) 腹痛	台湾	なし	不明	—	なし	なし	氷入りウイスキー 2回

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
研究協力者 秋山美穂、加藤由美子、斎藤寛史、
林留美子、板垣朝夫

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および分子疫学に関する研究

分担研究者： 西尾 治 国立公衆衛生院 衛生微生物学部
研究協力者 秋山美穂、加藤由美子 国立公衆衛生院 衛生微生物学部
齋藤寛史、林 留美子 愛知県衛生研究所 生物部
板垣朝夫 島根県衛生研究所 微生物部

研究要旨

クリプトスポリジウム 18s rRNA 部分のヒトと動物の分子疫学を行ったところヒト、ウシの間では差が見られなかったが、ネズミ、ネコとは異なっていた。クリプトスポリジウムの汚染にかかわる健康リスク評価として、或る地域の高齢者下痢症患者 80 名のふん便と、下痢症患者の多くが居住している地域に水道水として供給している河川水、並びにその河川水が流入している海域で養殖されているホタテ貝の中腸腺を毎月 1 回採取し、それらからクリプトスポリジウムの検出を行なったところ、全て陰性であった。このことからその地域にはクリプトスポリジウムの汚染が無かったものと判断された。

また、東南アジアから輸入されている二枚貝の中腸腺からクリプトスポリジウムの検出を行なったところ全て陰性であった。

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きた。水道水の感染源として、ウシ、イヌ、ネコ、野生動物等が関与しているとの報告もなされてきている。

本研究では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分子疫学的解析を行うと共に、高齢者下痢症患者からのクリプトスポリジウムの検出、さらに高齢者下痢症患者の多くが居住している地区に水道水として供給している河川水、高齢者下痢症患者および河川を調査した近くの海域の汚染を調べる代わりに養殖しているホタテ貝に

おけるクリプトスポリジウムの汚染状況を把握し、下痢症患者発生状況、河川水、その河川水が流入している海域汚染の指標としての貝との関連性を明らかにすることを目的とした。

さらに、わが国には大量の二枚貝（シジミ、アサリ、ハマグリ、赤貝等）が輸入されている。それらは主に東南アジアから、多くは生のままで輸入されている。輸出国の下水道の整備がわが国よりかなり劣っており、そのためにクリプトスポリジウムの汚染が海域でも起きていると推測される。従って、東南アジアから輸入された生鮮二枚貝におけるクリプトスポリジウムの汚染実態について調査研究をおこなった。

1. ヒトおよび動物から得られたクリプトスポリジウムの18s rRNA領域の遺伝子配列について

A. 研究目的

ヒト、ウシ、ネコ、ネズミのクリプトスポリジウム18s rRNA領域の遺伝子配列を調べ、ヒトおよび動物との違い、あるいは特徴のある配列を明らかにし、分子疫学的調査を行なう基礎データを得ることを目的としている。

B. 研究方法

ヒトから検出されたクリプトスポリジウム2件、ウシからの1件、ネズミ2件およびネコ1件を用い、18s rRNA領域の22-1,729の部分でPCRを増幅した後、ダイターミネーター法で遺伝子配列を決定し、1,079-1,633の部分でUPGMA法で解析を行った。

C. 研究成績

ヒト2件、ウシ1件は共に同じ配列であった。ネズミ2件はそれぞれ異なるクラスターに属していた(図1、2)。ネコはヒト、ウシおよびネズミともかなり異なるクラスターに属していた。

D. 研究考察およびまとめ

遺伝子解析の結果から、ヒトとウシの配列はほぼ同一であったことから、ウシとヒトとの間でクリプトスポリジウムの感染が起きていると推察されるが、今後、他の領域の配列も調べ明らかにすべきであると考えている。

またネズミの1例はヒト、ウシと近縁な配列を持っていたので、今後ヒト、ウシ、ネズミとの相互関係についても明らか

かにしなければならない。

さらにネズミのほかの例、ネコはヒト、ウシと異なるクラスターに属していたが、これがそれぞれの動物の特徴的な配列であるか否かについて例数を増やし、明らかにしていきたい。

2. 高齢者下痢症患者からのクリプトスポリジウムの検出

A. 研究目的

高齢者はクリプトスポリジウムに対する感受性が壮年期のヒトよりも高いことが知られている。そこで下痢症患者便からクリプトスポリジウム検出を行い、クリプトスポリジウムとの関連性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究材料と方法

平成13年4月から平成14年3月の間にA県下の公立病院の内科に受診したもので、60歳以上で下痢症を伴っていた80名からのふん便(直採)を検査材料とした。

クリプトスポリジウムの検出方法は検査材料を遠心し、その沈殿の10 μ lをスライドグラスに塗布したのち、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。

C. 研究成績

検査した下痢症患者の年齢分布は表1に示した。60歳代から90歳代の80名からクリプトスポリジウムは見出されなかった。