

表1. 高齢者下痢症患者における
クリプトスポリジウム検出状況

年 齢	検 体 数	検出者数
60～69	23	0
70～79	36	0
80～89	18	0
90～	3	0
計	80	0

D. 考察およびまとめ

平成12年4月から平成13年3月までの同地域の60歳以上の高齢者からのクリプトスポリジウムの検出率は1%に認められた。今年度は全て陰性で、クリプトスポリジウム感染が起因となる下痢症患者は見られなかった。

3. A県の河川水からのクリプトスポリジウム検出状況

A. 研究目的

クリプトスポリジウムによる下痢症患者の発生と河川水の汚染状況との関連性を明らかにすることを目的としてA県の高齢者下痢症患者が受診した近くの河川水におけるクリプトスポリジウムの汚染状況について調査を行った。

B. 研究方法

河川水を毎月1回3lまたは6lを採取し、濾過膜で透過後、その膜の表面を書き取り、遠心したのち、蛍光抗体染色でクリプトスポリジウムの検出を行った。

C. 研究成績

平成13年1月から平成14年3月の間に採取した河川水からクリプトスポリジウムは検出されなかった。なお、表2には採取した月日、採取量並びに方法を示した。

表2. A県河川水におけるクリプトスポリジウム汚染状況

検体 (採取日)	濃縮方法	検査河 川水量	蛍光抗体 染色法
01.01.16.	陽電荷膜法	3L	—
01.02.19.	陽電荷膜法	3L	—
01.03.21.	陽電荷膜法	3L	—
01.04.17.	陽電荷膜法	3L	—
01.04.17.	陽電荷膜法	3L	—
01.05.23.	陽電荷膜法	3L	—
01.05.23.	陽電荷膜法	3L	—
01.06.19.	陽電荷膜法	3L	—
01.07.17.	陽電荷膜法	3L	—
01.08.20.	陽電荷膜法	6L	—
01.09.11.	陽電荷膜法	6L	—
01.10.16.	陽電荷膜法	6L	—
01.11.20.	陽電荷膜法	6L	—
01.12.11.	陰電荷膜法	6L	—
02.01.23.	陰電荷膜法	6L	—
02.02.19.	陰電荷膜法	6L	—
02.03.19.	陰電荷膜法	6L	—

D. 考察およびまとめ

河川水からクリプトスポリジウムは検出されなかったことから、調査を行った地域での河川水にクリプトスポリジウムの汚染は無かったものと推察されることから、水道水においても同様にクリプトスポリジウムの混入が無かったものと推測される。

さらに、同地域での高齢者下痢症患者からクリプトスポリジウムは検出され

ていないことから汚染がなかったものと判断される。しかし、検査した河川水の量が少なかったため、陰性となった可能性も推測されるが、いずれにしてもクリプトスポリジウムの汚染があったとしてもその量的なものは極めて少なかったと推察された。

今後も同地域での河川水および下痢症患者のふん便からクリプトスポリジウムの検出を行い、クリプトスポリジウムの汚染の有無を監視することが必要である。

4. ホタテ貝におけるクリプトスポリジウムの汚染実態

A. 研究目的

クリプトスポリジウムによる下痢症患者の発生と海域の汚染を調べることを目的とし、海域で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について調査を行った。

B. 研究方法

ホタテ貝は平成10年1月から平成14年3月までの間(平成12年4月から9月の間を除く)に毎月1回10個を採取した。ホタテ貝の中腸腺を摘出し、リン酸緩衝液で50%乳剤とした後、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、蛍光抗体染色法で検出を行った。

C. 研究成績

平成10年1月から平成14年3月の間(平成12年4月から9月の間を除く)に採取したホタテ貝からクリプトスポリジウムは検出されなかった。

D. 研究考察

ホタテ貝からクリプトスポリジウムが検出されなかったことから、ホタテ貝を養殖している海域でクリプトスポリジウムの汚染が無かったものと推察される。また、同地域での高齢者下痢症患者、その地域に水道水として供給している河川水においてもクリプトスポリジウムが検出されていなかったことから、この地域で汚染が無かったものと判断される。

表3. A県養殖ホタテ貝のクリプトスポリジウム汚染状況

年月日	検査材料 個数	蛍光抗体染色法
98.01.07.	10	-
98.02.04.	10	-
98.03.04.	5	-
98.04.03.	10	-
98.05.15.	10	-
98.06.03.	10	-
98.07.03.	10	-
98.08.06.	10	-
98.09.02.	10	-
98.10.08.	10	-
98.11.09.	10	-
98.12.02.	10	-
99.01.06.	10	-
99.02.03.	10	-
99.03.03.	10	-
99.04.08.	10	-
99.06.02.	10	-
99.07.07.	10	-
99.08.09.	10	-
99.09.01.	10	-
99.10.14.	10	-
99.11.17.	10	-
99.12.09.	10	-
00.01.06.	10	-
00.02.10.	10	-
00.03.07.	10	-
00.11.15.	10	-

00.12.18.	10	-
01.01.16.	10	-
01.02.19.	10	-
01.03.21.	10	-
01.04.17.	10	-
01.05.23.	10	-
01.06.19.	10	-
01.07.17.	10	-
01.08.20.	10	-
01.09.11.	10	-
01.10.16.	10	-
01.11.20.	10	-
01.12.11.	10	-
02.01.23.	13	-
02.02.19.	10	-
02.03.19.	10	-

5. 入魚介類（ハマグリ、赤貝、カキ等）におけるクリプトスポリジウム汚染実態

A. 研究目的

生鮮貝類は主に東南アジアから毎年14万トン以上が輸入されている。貝類は大量に海水を吸い込むことから、河川に含まれているクリプトスポリジウムが海水を汚染し、貝類に蓄積している可能性がある。そして貝類の生食あるいは加熱不十分で食することにより感染が起こる危険性が予測される。また貝の処理等により、わが国の河川を汚染し、水道水にクリプトスポリジウムが混入する危険性がある。

そこで、わが国に輸入されている貝類のクリプトスポリジウムの汚染状況を調べることにした。

B. 研究材料と方法

検査した材料は平成11年4月から平成13年6月の間にわが国に輸入された

74件を用いた。検査に用いた輸出国、貝種は表4に示した。

貝類の中腸腺を摘出し、リン酸緩衝液で20%程度の乳剤とした後、ショ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、蛍光抗体染色法で検出を行った。

C. 研究成績

検査を行った74件は全て陰性であった。

D. 研究考察およびまとめ

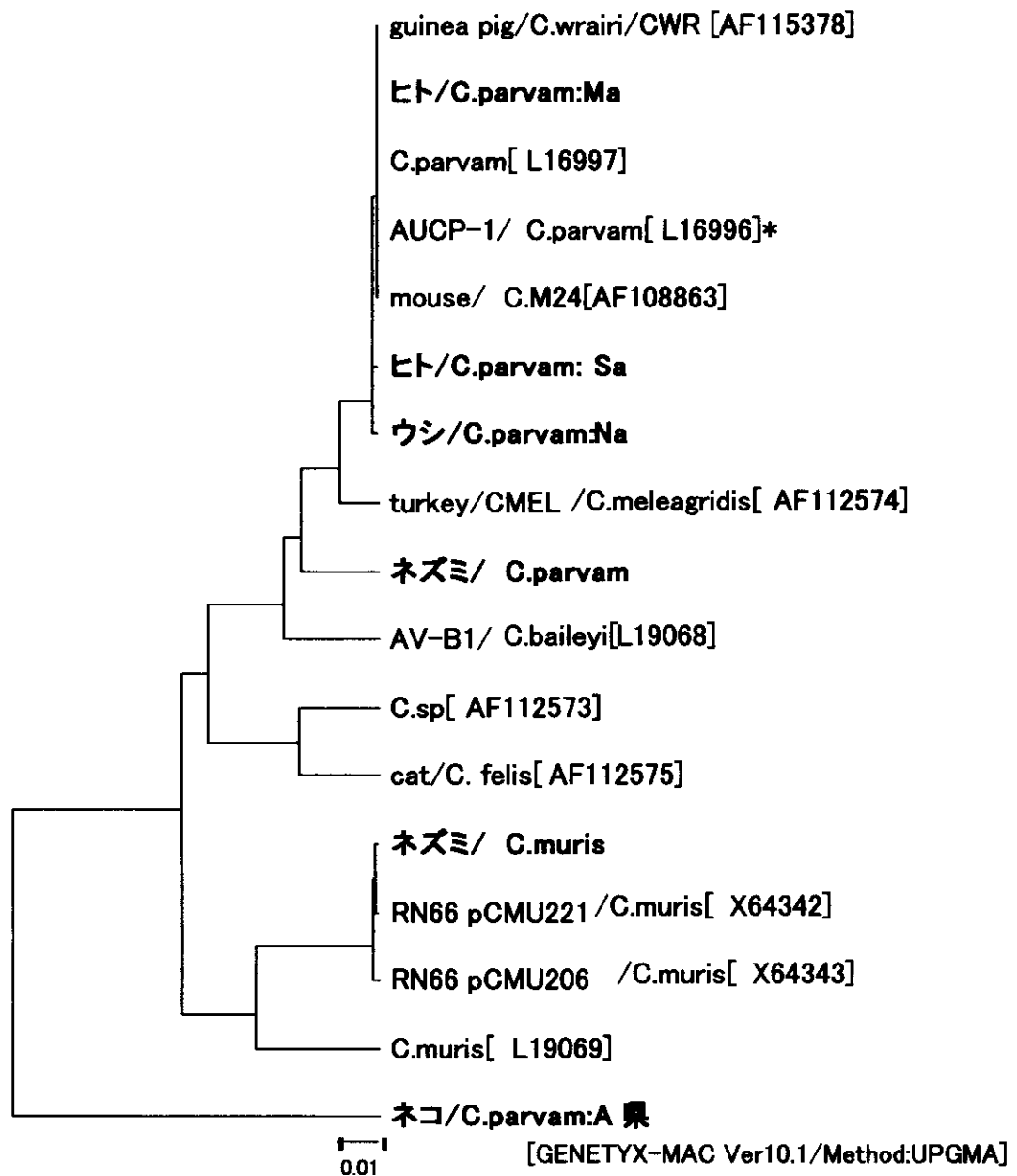
東南アジアではわが国に比べ下水処理施設の普及は相当程度低く、そのためクリプトスポリジウムは河川、海水中に混入しており、その海域で生育している貝類にクリプトスポリジウムが蓄積されている危険性が高いと予測された。しかしながら、今回調査した中国、韓国、北朝鮮の海域で生育された貝類からはクリプトスポリジウムは検出されなかった。これら貝類では小型球形ウイルスに10%程度に汚染されているのに対し、クリプトスポリジウムは蓄積されないのか、あるいは貝類が生育している海域でのクリプトスポリジウムの汚染がないのか今後明らかにしなければならないと考えている。

表 4. 輸入食品のクリプトスポリジウム
汚染状況

国名	種類	検体数	検出数
中国	ハマグリ	12	0
	アサリ	2	0
韓国	赤貝	33	0
	平貝	2	0
	トリ貝	4	0
	ハマグリ	10	0
北 朝 鮮	平貝	10	0
	ハマグリ	1	0
計		74	0

B. 発表論文

1) 秋山美穂、加藤由美子、西尾治、斎藤寛史、林留美子、山田靖治：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、日本感染症学雑誌、75(8)、619 (2001)



* cattle /*C.parvum*[AF108864],ferret/CPF/*C.parvum*[AF112572],
 GCH1/*C.parvum*[AF161859],rhesus monkey/CPRM1/*C.parvum*[AF112569]
 Homo sapiens H7/*C.parvum*[AF108865],IOWA/*C.parvum*[AF164102]
 MT/*C.parvum*[AF161856],UPP/*C.parvum*[AF161857]

図 1. 国内から検出された *Cryptosporidium* の 18S rRNA 領域の系統樹

図2 国内から検出された *Cryptosporidium* の 18S rRNA 領域の遺伝子配列

ヒト/ <i>C.parvam</i> :Sa	1	CGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGG	50
ヒト/ <i>C.parvam</i> :Ma	1	50
ネズミ/ <i>C.muris</i>	1	50
ネズミ/ <i>C.parvam</i>	1	50
ウシ/ <i>C.parvam</i> :Na	1	50
ネコ/ <i>C.parvam</i> :A 県	1T.....	50
<i>C.parvam</i> [L16997]	1	50
<i>C.sp</i> [AF112573]	1	50
cat/ <i>C.felis</i> [AF112575]	1	50
AUCP-1/ <i>C.parvam</i> [L16996]	1	50
ba-L19068/ <i>baileyi</i>	1	50
mouse/ <i>C.M24</i> [AF108863]	1	50
turkey/ <i>C.meleagridis</i> [AF112574]	1	50
GP/ <i>C.wrairi</i> /CWR [AF115378]	1	50
<i>C.muris</i> [L19069]	1	50
RN66 pCMU206/ <i>C.muris</i> [X64343]	1	50
RN66 pCMU221/ <i>C.muris</i> [X64342]	1	50

*****.*****

ヒト/ <i>C.parvam</i> :Sa	51	AGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACCAGGTCCAGAC	100
ヒト/ <i>C.parvam</i> :Ma	51	100
ネズミ/ <i>C.muris</i>	51	100
ネズミ/ <i>C.parvam</i>	51	100
ウシ/ <i>C.parvam</i> :Na	51	100
ネコ/ <i>C.parvam</i> :	51	100
<i>C.parvam</i> [L16997]	51	100
<i>C.sp</i> [AF112573]	51	100
cat/ <i>C.felis</i> [AF112575]	51	100
AUCP-1/ <i>C.parvam</i> [L16996]	51	100
ba-L19068/ <i>baileyi</i>	51	100
mouse/ <i>C.M24</i> [AF108863]	51	100
turkey/ <i>C.meleagridis</i> [AF112574]	51	100
GP/ <i>C.wrairi</i> /CWR [AF115378]	51	100
<i>C.muris</i> [L19069]	51	100
RN66 pCMU206/ <i>C.muris</i> [X64343]	51	100
RN66 pCMU221/ <i>C.muris</i> [X64342]	51	100

ヒト/C.parvam:Sa	101	ATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTG	150
ヒト/C.parvam:Ma	101	150
ネズミ/C.muris	101	150
ネズミ/C.parvam	101	150
ウシ/C.parvam:Na	101	150
ネコ/C.parvam:A 県	101	..G.....G.....	150
C.parvam[L16997]	101	150
C.sp[AF112573]	101	150
cat/C.felis[AF112575]	101	150
AUCP-1/C.parvam[L16996]	101	150
ba-L19068/baileyi	101	150
mouse/C.M24[AF108863]	101	150
turkey/C.meleagridis[AF112574]	101	150
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	101	150
C.muris[L19069]	101	150
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	101	150
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	101	150
		.**.*****	

ヒト/C.parvam:Sa	151	GTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTGTCTGGTTAATTCCGTT	200
ヒト/C.parvam:Ma	151	200
ネズミ/C.muris	151	200
ネズミ/C.parvam	151	200
ウシ/C.parvam:Na	151	200
ネコ/C.parvam:A 県	151	200
C.parvam[L16997]	151	200
C.sp[AF112573]	151	200
cat/C.felis[AF112575]	151	200
AUCP-1/C.parvam[L16996]	151	200
ba-L19068/baileyi	151	200
mouse/C.M24[AF108863]	151	200
turkey/C.meleagridis[AF112574]	151	200
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	151	200
C.muris[L19069]	151	200
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	151	200
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	151	200

ヒト/C.parvam:Sa	201 AACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGACATAAGAAATATTATATTTT	250
ヒト/C.parvam:Ma	201	250
ネズミ/C.muris	201GT.AT.....T.AT.T..C.	250
ネズミ/C.parvam	201G.T.G.....T..T.TAA..	250
ウシ/C.parvam:Na	201	250
ネコ/C.parvam:A県	201T..G.....C..A.T.CT...GT.TCGGCC.AG	250
C.parvam[L16997]	201	250
C.sp[AF112573]	201A...TC.T.T..A	250
cat/C.felis[AF112575]	201AT..A.A.	250
AUCP-1/C.parvam[L16996]	201	250
ba-L19068/baileyi	201AT.AT.TC..A	250
mouse/C.M24[AF108863]	201	250
turkey/C.meleagridis[AF112574]	201	250
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	201	250
C.muris[L19069]	201GT.AT.....T...T.C.A	250
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	201GT.AT.....T.AT.T..C.	250
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	201GT.AT.....T.AT.T..C.	250

*****.**.*****.**,.....*.*.....

ヒト/C.parvam:Sa	251 TTATCTGT--CTTCTT-AGAGGGACTTTGTATGTTAATACAGGGAAGTT	297
ヒト/C.parvam:Ma	251	297
ネズミ/C.muris	251 A...TA--T.....-.....CG...C...CG.GA.....	296
ネズミ/C.parvam	251 .CT.T.TAGT.....-.....	299
ウシ/C.parvam:Na	251	297
ネコ/C.parvam:A県	251 C.G.T.TCT-----.-.....G...A...C...A.....	293
C.parvam[L16997]	251	297
C.sp[AF112573]	251 ..T-----GTC.TC.T.....	294
cat/C.felis[AF112575]	251 ..T.TAT.TGTC.TC.T.....	300
AUCP-1/C.parvam[L16996]	251	297
ba-L19068/baileyi	251 .CTGT-----.....-.....G.....C..GA.....	294
mouse/C.M24[AF108863]	251	297
turkey/C.meleagridis[AF112574]	251T...--.....-.....	297
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	251	297
C.muris[L19069]	251 .CT.A.C.T-----C.T.....CG..CC...CG.GA.....	295
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	251 A...TA--T.....-.....CG...C...CG.GA.....	296
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	251 A...TA--T.....-.....G...C...CG.GA.....	296

.....* *****.**.***.*.*****

ヒト/C.parvam:Sa	298	TTAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCGCGC	347
ヒト/C.parvam:Ma	298	347
ネズミ/C.muris	297	.G.....A....	346
ネズミ/C.parvam	300	349
ウシ/C.parvam:Na	298	347
ネコ/C.parvam:A 県	294	CA.A.....T.....T..A....	343
C.parvam[L16997]	298	347
C.sp[AF112573]	295	.G.....	344
cat/C.felis[AF112575]	301	350
AUCP-1/C.parvam[L16996]	298	347
ba-L19068/baileyi	295	344
mouse/C.M24 [AF108863]	298	347
turkey/C.meleagridis[AF112574]	298	347
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	298	347
C.muris[L19069]	296	.G.....A....	345
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	297	.G.....A....	346
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	297	.G.....A....	346
		..*.*****.*****.***.***	

ヒト/C.parvam:Sa	348	CGCTACACTGATGCATCCATCAAGTATATATTCCTGTTTCGAAGGAAATG	397
ヒト/C.parvam:Ma	348	397
ネズミ/C.muris	347A.G.....C.TGC..CGA.G.A-.G..	395
ネズミ/C.parvam	350T.TG.....	399
ウシ/C.parvam:Na	348	397
ネコ/C.parvam:A 県	344T..G.G...GGT.CC.GACT.GAGA...TTGGG-	392
C.parvam[L16997]	348	397
C.sp[AF112573]	345TA..TA.....-CG.A.G..AT	393
cat/C.felis[AF112575]	351T.AT.CTG..TCG.A.G..AT	400
AUCP-1/C.parvam[L16996]	348	397
ba-L19068/baileyi	345T.....TCTCC--.....	392
mouse/C.M24 [AF108863]	348	397
turkey/C.meleagridis[AF112574]	348ATA..C.TGT..C-.....	396
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	348	397
C.muris[L19069]	346G.G.....C.TGT..CGA--A.G..AT	393
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	347A.G.....C.TGC..CAA.G.A-.G..	395
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	347A.G.....C.TGC..CGA.G.A-.G..	395
		*****.***.***.***.....	

ヒト/C.parvam:Sa	398	GGTAATCT-TTTGAATATGCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTAT	446
ヒト/C.parvam:Ma	398-	446
ネズミ/C.muris	396-A...G.....T.....	444
ネズミ/C.parvam	400-.....G.....	448
ウシ/C.parvam:Na	398-	446
ネコ/C.parvam:A 県	393	--.....-G...G.T.....T.GCG....T.....	439
C.parvam[L16997]	398-	446
C.sp[AF112573]	394	..GT.ATCT.....	443
cat/C.felis[AF112575]	401	..GT.ATCT.....	450
AUCP-1/C.parvam[L16996]	398-	446
ba-L19068/baileyi	393-A.....A.....	441
mouse/C.M24[AF108863]	398-	446
turkey/C.meleagridis[AF112574]	397-	445
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	398-	446
C.muris[L19069]	394	..GT.ATCT.A...G.....	443
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	396-A...G.....T.....	444
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	396-A...G.....T.....	444
	*...*...*...*...*...*...*...*...*...*...*	

ヒト/C.parvam:Sa	447	TGATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCT-TGCGCT	495
ヒト/C.parvam:Ma	447-	495
ネズミ/C.muris	445T.....-	493
ネズミ/C.parvam	449-	497
ウシ/C.parvam:Na	447-	495
ネコ/C.parvam:A 県	440	.CGC.A.....T.....NGTCATTAGCT....A.	489
C.parvam[L16997]	447-	495
C.sp[AF112573]	444T.....-----	463
cat/C.felis[AF112575]	451T.....-----	470
AUCP-1/C.parvam[L16996]	447-	495
ba-L19068/baileyi	442C.....-	490
mouse/C.M24[AF108863]	447-	495
turkey/C.meleagridis[AF112574]	446-	494
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	447-	495
C.muris[L19069]	444T.....-----	463
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	445T.....-	493
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	445T.....-	493
	*...*...*...*...*...*	

ヒト/C.parvam:Sa	496	GATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTTCCGATTGA	545
ヒト/C.parvam:Ma	496A.....	545
ネズミ/C.muris	494A.....	543
ネズミ/C.parvam	498A.....	547
ウシ/C.parvam:Na	496T.....A.....	545
ネコ/C.parvam:A 県	490CT.AAT.....G	539
C.parvam[L16997]	496A.....	545
C.sp[AF112573]	463	-----	463
cat/C.felis[AF112575]	470	-----	470
AUCP-1/C.parvam[L16996]	496A.....	545
ba-L19068/baileyi	491A.....	540
mouse/C.M24[AF108863]	496A.....	545
turkey/C.meleagridis[AF112574]	495A.....	544
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	496A.....	545
C.muris[L19069]	463	-----	463
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	494A.....	543
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	494A.....	543
		

ヒト/C.parvam:Sa	546	ATGATCCGGT	555
ヒト/C.parvam:Ma	546	555
ネズミ/C.muris	544	G.....	553
ネズミ/C.parvam	548	557
ウシ/C.parvam:Na	546	555
ネコ/C.parvam:A 県	540	549
C.parvam[L16997]	546	555
C.sp[AF112573]	463	-----	463
cat/C.felis[AF112575]	470	-----	470
AUCP-1/C.parvam[L16996]	546	555
ba-L19068/baileyi	541	G.....	550
mouse/C.M24[AF108863]	546	555
turkey/C.meleagridis[AF112574]	545	554
GP/C.wrairi/CWR [AF115378]	546	555
C.muris[L19069]	463	-----	463
RN66 pCMU206/C.muris[X64343]	544	G.....	553
RN66 pCMU221/C.muris[X64342]	544	G.....	553
		

分担研究報告書 6

クリプトスポリジウムの分子疫学的調査方法

分担研究者 遠藤卓郎、黒木俊郎、西尾 治
研究協力者 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)
分担研究報告書

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)

クリプトスポリジウムの分子疫学的調査方法

分担研究者	遠藤 卓郎 黒木 俊郎 西尾 治	(国立感染症研究所 寄生動物部) (神奈川県衛生研究所 細菌病理部) (国立公衆衛生院 衛生微生物部)
研究協力者	八木田健司 泉山 信司	(国立感染症研究所 寄生動物部) (国立感染症研究所 寄生動物部)

近年クリプトスポリジウムの研究分野で分子疫学調査に利用可能な遺伝情報が蓄積されつつある。本研究でも積極的にPoly-Threonine領域におけるPCR-RFLP法および18S rRNA領域の塩基配列を利用している。これまでにわが国でヒトおよびウシから分離された*Cryptosporidium* sp. を対象として、Poly-Threonine領域のPCR-RFLPによる解析および18S rRNA塩基配列による解析を行い報告した。また報告以外にも型別が行われており、わが国における分子疫学の基礎資料として方法論および結果をここにまとめることとした。
この *Cryptosporidium* の分子疫学情報を一般に公開し調査等に役立てるため、インターネットでの公開を前提とした情報の準備と加工、および情報発信を行った。

A. 研究目的 近年、クリプトスポリジウムの研究分野で分子疫学調査に利用可能な遺伝情報が蓄積されつつある^{1~13)}。本研究業務においてもPoly-Threonine領域でのPCR-RFLP法および18S rRNA領域の塩基配列を利用し、報告してきた^{4,13,14)}。これらの遺伝子情報に限らず、その他の多くの遺伝子情報の入手先を示し、一覧を可能とすることは今後の分子疫学調査に貢献するものと考えられる。本報告ではクリプトスポリジウムに関する基礎資料として遺伝子解析に関する方法および結果を整理し、インターネットの公開を前提とした情報の準備と加工、

および情報発信を行った。

B. 研究方法

[インターネットに向けた情報の準備と加工]

すべての情報は Microsoft PowerPoint を使用してスライド形式にまとめ、これを Web ページ用の閲覧形式に変換した。作成されたファイルは、当面 国立感染症研究所のサーバーに保存し、<http://www.nih.go.jp/~tendo/atlas/Japanese/genotype.html> より閲覧可能な状態とした。このアドレスで表示される最初の画面とページ内での操作方法を図 1 に示した。内容

は 13 ページからなり、これのノート形式による印刷物を添付資料として 末尾に添付した。

ちなみに掲載している内容はプライバシーに対して十分に配慮しており、患者の氏名や年齢、発生地は除外した。またサーバーには個人に係るオリジナル情報を保存していいないことから、セキュリティー面からは万全の対策がとられている。

C. 結果

添付した印刷物の 8~9 ページにある通り、これまでにわが国で分離された *Cryptosporidium* の遺伝子型別の結果が一覧表の形式で記載されている。また *Cryptosporidium* の分子疫学に必要な手技が記載されており、分子生物学的手技の経験があればこれらの情報を元の実験することが可能である。また、同ホームページには、手技がより詳しく記載されている『クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症の診断マニュアル』が掲載されており、相補する関係となっている。

D. 考察

Cryptosporidium の分子疫学にはデータベースとしてのまとまった形での情報の蓄積が必要であり、またその利用のための公開する要望があった。そこで本研究ではこれまで国内で分離されたクリプトスポリジウムの分子疫学的調査・検討の結果をまとめ、インターネットを介して情報発信を行うこととした。この情報は疫学調査の基礎資料として有効に活用されるものと期待される。集団感染発生においては原因となっている病原体の同定、感染源および感染経路の特定を速に行い、しかるべき処置を行うことが続く感染を防止することが被害を最小限に抑える有効手段と考えられ、遺伝子解析には本ホームページは有効利用されるものと確信する。

Cryptosporidium の検査に際しては培養が不可能なため、PFGE 等をはじめとする疫

学手法の適用が困難である。そのため、*Cryptosporidium* の疫学調査には PCR による特異遺伝子の増幅は必須の手段となっている。未知の配列の出現や新しい宿主への感染といった情報を丹念に蓄積することで将来的な解析能力の増強に努めて行かなければならないものとする。従って、材料や遺伝子情報の入手は各方面との協力関係の上に成り立つものとする。本報告は情報交換に向けた窓口として、また広くネットワークの構築の基礎と位置づけている。また、遺伝子解析等に関しては、緊急時対応に答えるべく準備している。

参考文献

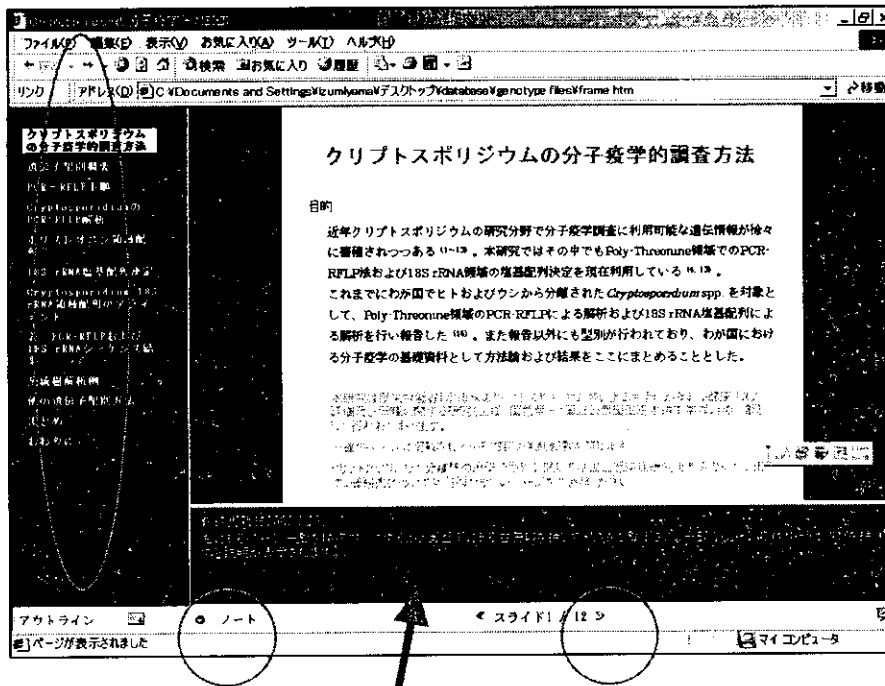
1. Awad el Kariem, F.M., Warhurst, D.C. and McDonald, V. 1994. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitology*. **109**:19-22.
2. Bonnin, A., Fourmaux, M.N., Dubremetz, J.F., Nelson, R.G., Gobet, P., Harly, G., Buisson, M., Puygauthier, Toubas, D., Gabriel, Pospisil, G., Naciri, M. and Camerlynck, P. 1996. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**:207-211.
3. Carraway, M., Tzipori, S. and Widmer, G. 1996. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:712-716.
4. Carraway, M., Tzipori, S. and Widmer, G. 1997. A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect. Immun.* **65**:3958-3960.
5. Leng, X., Mosier, D.A. and Oberst, R.D.

1996. Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Vet. Parasitol.* **62**:1-7.
6. Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A. and Thompson, R.C. 1997. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J. Parasitol.* **83**:825-830.
 7. Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S., Mac, Kenzie, W.R., Lal, A.A. and Beard, C.B. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg. Infect. Dis.* **3**:567-573.
 8. Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P. and Crisanti, A. 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**:209-217.
 9. Spano, F., Putignani, L., Guida, S. and Crisanti, A. 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp. Parasitol.* **90**:195-198.
 10. Sulaiman, I.M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C.B., Arrowood, M.J. and Lal, A.A. 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:681-685.
 11. Webster, K.A., Pow, J.D., Giles, M., Catchpole, J. and Woodward, M.J. 1993. Detection of *Cryptosporidium parvum* using a specific polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* **50**:35-44.
 12. Xiao, L., Sulaiman, I., Fayer, R. and Lal, A.A. 1998. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **93**:687-691.
 13. Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R. and Lal, A.A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1578-1583.
 14. Yagita K., Izumiyama S., Tachibana H., Masuda G., Iseki M., Furuya K., Kameoka Y., Kuroki T., Itagaki T. and Endo T. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.* **87**:950-955.
 15. Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R. and Lal, A.A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3386-3391.
 16. Le Blancq, S.M., Khramtsov, N.V., Zamani, F., Upton, S.J. and Wu, T.W. 1997. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**:463-478.
 17. Sulaiman, I.M., Xiao, L. and Lal, A.A. 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4431-4435.
 18. Morgan UM, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Sargent KD, Elliot A, and Thompson RC. 1999. Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitology* **118**:49-58.
 19. Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol* **66**:2385-2391.
 20. Xiao L, Limor J, Bern C, Lal AA; Epidemic Working Group. 2001.

- Tracking *Cryptosporidium parvum* by sequence analysis of small double-stranded RNA. *Emerg Infect Dis* 7:141-145.
21. Widmer G, Tchack L, Chappell CL, Tzipori S. 1998. Sequence polymorphism in the beta-tubulin gene reveals heterogeneous and variable population structures in *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 64:4477-4481.
 22. O'Connor RM, Thorpe CM, Cevallos AM, Ward HD. 2002. Expression of the highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* Cpgp40/15 gene in genotype I and II isolates. *Mol Biochem Parasitol* 119:203-215.
 23. Gasser RB, Zhu X, Caccio S, Chalmers R, Widmer G, Morgan UM, Thompson RC, Pozio E, Browning GF. 2001. Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions. *Electrophoresis* 22:433-437.
 24. Caccio S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 120:237-244
 25. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol* 61:3849-3855.
- E. 研究発表**
- 論文発表
1. 八木田等。(2002) クリプトスポリジウムの抗体測定法の開発。(in preparation).
 2. 八木田等。(2002) クリプトスポリジウムの血清疫学に関する研究。(in preparation).
 3. K. Yagita, S. Izumiyama, H. Tachibana, G. Masuda, M. Iseki, K. Furuya, Y. Kameoka, T. Kuroki, T. Itagaki and T. Endo. (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.*, 87, 950-955.
 4. K. Ono, H. Tsuji, S. K. Rai, A. Yamamoto, K. Masuda, T. Endo, H. Hotta, T. Kawamura and S. Uga. (2001) Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9), 3832-3836.
 5. S. Izumiyama, I. Furukawa, T. Kuroki, S. Yamai, H. Sugiyama, K. Yagita and T. Endo. (2001) Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infections in Weaned Piglets and Fattening Porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54, 23-26.
 6. 増田剛太、今村顕史、味澤 篤、根岸昌功、八木田健司、遠藤卓郎、井関基弘。(2001)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。*Clinical Parasitology*, 12(1), 89-91.
 7. 泉山信司、古川一郎、黒木俊郎、八木田健司、遠藤卓郎。(2001) 相模川および酒匂川流域におけるクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストの汚染調査。*環境技術*, 30(6), 63-67.
 8. 泉山信司、八木田健司、佐野 茂、遠藤卓郎 (2001) 水道におけるクリプトスポリジウム等原虫類検査のための連続ローター開発。*環境技術*, 30(3), 66-71.
 9. 泉山信司、中井 裕、板垣 匡、小野敏夫、大塚孝康、黒木俊郎、八木田健司、遠藤卓郎 (2001) 家畜およびと畜場搬入動物等のクリプトスポリジウム汚染実態調査。*動物の原虫病*, 16(1), 18-23.
- 口頭発表
1. 八木田健司、泉山信司、相楽裕子、坂本光男、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2002) *C.parvum* 遺伝子型 1 および遺伝子型 2 によるヒト重複感染例 第76回日本感染症学会 (東

- 京都 文京区、4月11-12日)
2. 辻 英高、押部智宏、小野一男、近平雅嗣、増田邦義、山本昇五、八木田健司、遠藤卓郎 (2002) 簡易水道から検出された爬虫類由来のクリプトスポリジウム 第76回日本感染症学会 (東京都 文京区、4月11-12日)
 3. 坂本光男、相楽裕子、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2002) 当院における腸管寄生虫症の検討 第76回日本感染症学会 (東京都 文京区、4月11-12日)
 4. 八木田健司、泉山信司、増田剛太、井関基弘、遠藤卓郎 (2002) ヒト分離クリプトスポリジウムの分子疫学 第71回日本寄生虫学会大会 (神奈川県 伊勢原市、3月29-30日)
 5. 八木田健司、泉山信司、亀岡洋祐、橘 裕司、増田剛太、井関基弘、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2001) クリプトスポリジウムの遺伝子型別 日本原生動物学会第34回大会 (兵庫県 神戸市、11月16-18日)
 6. 八木田健司、亀岡洋祐、橘 裕司、増田剛太、井関基弘、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2001) クリプトスポリジウムの遺伝子型別 第61回日本寄生虫学会東日本大会 (千葉県 千葉市、10月20日)
 7. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司 (2001) 水試料中の病原微生物検出に係る分子生物学的手法の利用と限界—原虫類検査法を中心として— 日本水環境学会 (福岡県 北九州市、9月10-11日)
 8. 八木田健司、泉山信司、橘 裕司、遠藤卓郎 (2001) クリプトスポリジウムの Genotyping 第1回環境技術研究協会年次大会 (大阪府 大東市、6月8日)

この索引をクリックして任意のページに移行することが出来ます。



“ノート”をクリック（選択）すると、下部の説明文が大きくなります。

この“>”をクリックすると、次のページに進みます。

図1 ページの操作方法概要

クリプトスポリジウムの分子疫学的調査方法

目的

- 近年クリプトスポリジウムの研究分野で分子疫学調査に利用可能な遺伝情報が徐々に蓄積されつつある^(1~13)。本研究ではその中でもPoly-Threonine領域でのPCR-RFLP法および18S rRNA領域の塩基配列決定を現在利用している^(4, 13)。これまでにわが国でヒトおよびウシから分離された*Cryptosporidium* spp. を対象として、Poly-Threonine領域のPCR-RFLPによる解析および18S rRNA塩基配列による解析を行い報告した⁽¹⁴⁾。また報告以外にも型別が行われており、わが国における分子疫学の基礎資料として方法論および結果をここにまとめることとした。

本研究は厚生労働省「水道水のクリプトスポリジウム等による汚染にかかわる健康リスク評価及び管理に関する研究(主任 国包章一:国立公衆衛生院水道工学部)」の一部として行われております。

一連のページに記載されている内容の無断転載を禁じます。このページは専門家を対象に編纂されたものです。

クリプトスポリジウム分離株の遺伝子型別に関しては国立感染症研究所で協力いたします。連絡先については画面下のノートをご参照ください。

最終更新日2002.3.27

左にあるページ一覧を順次クリックするか、画面下にある右矢印を押して続きをご覧下さい。一部のページではノートボタンを押すと説明が表示されます。

本研究は情報の収集に多くの方々のご協力を得て行われております。この場を借りて、感謝申し上げます。

連絡先

国立感染症研究所 寄生動物部 遠藤卓郎
〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
Tel. 03-5285-1111 Ext.2731 Fax. 03-5285-1173
e-mail: tendo@nih.go.jp

遺伝子型別概要

- 一般に18S rRNA塩基配列は必須遺伝子であることからその配列はよく保存されており、種や属を超えた分子系統学的な分類に頻繁に用いられている⁽¹⁵⁾。rRNAはタンパク合成のために必須であることからゲノムに存在するコピー数が一般に多く、増幅に有利である。クリプトスポリジウムの場合、ゲノムに5コピー存在することが示されている⁽¹⁶⁾。1つのオーシストには半数体のスポロゾイトが4つ含まれており、1つのオーシストには計20コピーの鋳型が存在することになる。
- Poly-Threonine遺伝子はCarrawayらがPCR-RFLPのために選択した領域で、スレオニン残基に富んだペプチドをコードした遺伝子である⁽⁴⁾。本遺伝子が発現（タンパク質へ翻訳）しているか否かは現時点では不明であるが、発現していない場合にはむしろ株内の塩基配列の多様性が期待されるので、疫学調査における感染経路の特定にはかえって都合がよいといえる。一般に発現していない遺伝子配列では変異が生じて生命現象に影響しないため、変異が蓄積されやすい傾向がある。

更新履歴

2002.3.27 表1および2更新。

2002.2.23 新規作成