

PCR-RFLP手順

シヨ糖浮遊法によるオーシスト調製

↓

GeneCleanによるDNA調製

↓

PCR

↓

GeneCleanによる脱塩

↓

Rsa IIによる消化

↓

アガロースゲル電気泳動

試薬	容量
蒸留水	33.5 μ l
10xTaq用バッファー	5.0 μ l
dNTPs	4.0 μ l
20 μ M プライマー	1.0 μ l x2
TaqDNAポリメラーゼ	0.25 μ l
Taq Start(抗Taq抗体)	0.25 μ l
25mM MgCl ₂	4.0 μ l
精製DNA溶液	1.0 μ l
計	50.0 μ l

Step 1 : 94°C、3.0 分	
Step 2 : 94°C、0.5 分	
Step 3 : 53°C、0.5 分	
Step 4 : 72°C、0.5 分	Step 2-4 : 40回繰返し
Step 5 : 72°C、5.0 分	

プライマーはCarraway (*Infect Immun* 65: 3958-60, 1997)らの報告に基づいて、ポリスレオニン領域 (GenBank U83169)の518bpを増幅するCRY-44 (5'-CTCTTAATCCAATCATTACAAC-3') およびCRY-373 (5'-AGCAGCAAGAT ATGATACCG-3')を用いた。

[Poly-Threonine領域のPCR-RFLP解析]

Poly-Threonine領域を増幅するためのPCR (Polymerase chain reaction) 反応液は液量を50 μ lとした。Taq DNAポリメラーゼにはEX-TAKARA (宝酒造)を用い、専用緩衝液およびMgCl₂溶液は酵素に添付のものを用いた。今回のPCRでは抗Taq DNAポリメラーゼ抗体 (Taq Start、クロンテック社)を用いたホットスタート法を採用することで、非特異反応を抑えた。あらかじめTaq StartをTaqDNAポリメラーゼと充分混和し、5分間室温にて反応させ、その後他の試薬類を添加した。

プライマーには、Poly-Threonine推定遺伝子内の518bpを増幅領域とするCRY-44 (5'-CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA C-3')ならびにCRY-373 (5'-AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3')を用いた。このプライマー設計は基本的にCarrawayらの報告に基づいているが、CRY-373はGenBank U83169に報告されている配列にアニールできるようにCRY-37を一部改変したものである⁽⁴⁾。

PCR反応液は、上記の表の組成になるように調整した。反応にはProgrammable Thermal Controller (MJ Research社)を用い、上記の表の温度プログラムで反応を行った。反応後、2%アガロースで産物を電気泳動しDNA増幅を確認した。PCR産物はGeneCleanで精製し、最終的に30 μ lに濃縮した液を解析用DNA試料とした。26 μ lのDNA試料と1 μ lの制限酵素 (*Rsa* I) および3 μ lの制限酵素用10×緩衝液を混合し、37°Cで2時間の消化処理を行った。2%アガロースによる電気泳動でPCR産物の切断パターン (RFLP)を調べた。

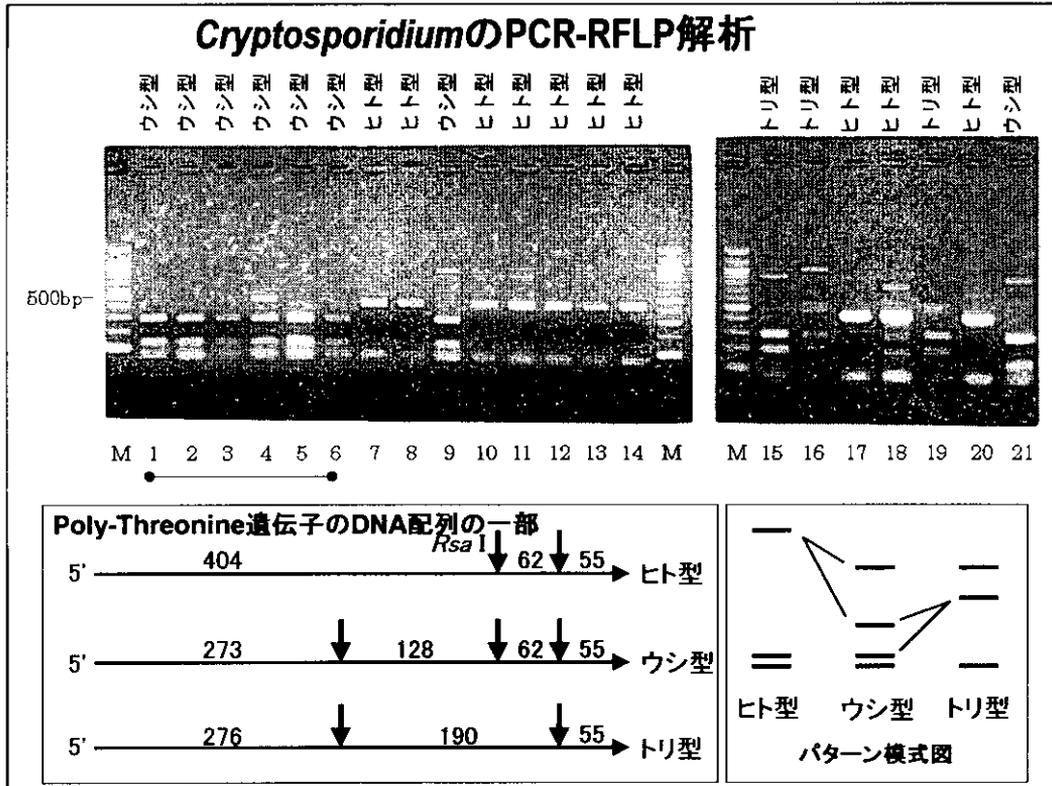


図 クリプトスポリジウムのPCR-RFLPによる解析(抜粋)

ウシおよびヒトから分離したクリプトスポリジウムを鋳型としてPoly-T領域をターゲットとしたCry373 (AGCAGCAAGATATGATACCG)およびCry44 (CTCTTAATCCAATCATTACAAC)プライマーで増幅し、得られた518bpの産物を*Rsa*Iで制限処理し、その一部をアガロースゲル電気泳動で分離した。PCR-RFLP解析像として、3つの型が見られる。レーン1から6と9がゲノタイプ2(ウシ型)、レーン21はレーン9と同じ産物。レーン7、8、10-14、17、18、20はゲノタイプ1(ヒト型)。レーン15、16、19はゲノタイプ3(新しい型)。レーン1-6はウシ由来、レーン7-20はヒト由来のクリプトスポリジウムを用いた。レーンMはサイズマーカー(100-bp ladder)。写真の下に模式図としてその切断パターンの詳細を記した。

18S rRNA塩基配列決定

シヨ糖浮遊法によるオーシスト調製

↓

GeneCleanによるDNA調製

↓

PCR

↓

QIAquick PCR purification kit

↓

ABI Prism 310による塩基配列決定

↓

Blastを用いた塩基配列の比較

試薬	容量
蒸留水	33.5 μ l
10xTaq用バッファー	5.0 μ l
dNTPs	4.0 μ l
20 μ M プライマー	1.0 μ l x 2
TaqDNAポリメラーゼ	0.25 μ l
Taq Start (抗 Taq 抗体)	0.25 μ l
25mM MgCl ₂	4.0 μ l
精製DNA溶液	1.0 μ l
計	50.0 μ l

Step 1 : 94°C, 3.0 分	
Step 2 : 94°C, 0.5 分	
Step 3 : 53°C, 0.5 分	
Step 4 : 72°C, 0.5 分	Step 2-4 : 40回繰返し
Step 5 : 72°C, 5.0 分	

プライマーは18S rRNAの435bpを増幅するCPB DIAGF (5'-AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG-3') およびDIAGR (5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') を用いた。

[18S rRNA塩基配列解析]

PCR反応液は表の通りに調整した。プライマーには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') を用いた。

反応液の調製と増幅は次の手順で行った。あらかじめ別のチューブ内でTaq DNAポリメラーゼとTaqStartを混和し、5分間室温で反応させ、そして残りの試薬を添加した。反応には試料以外に、陽性および陰性対照各1本を用意した。あらかじめ鋳型DNA以外の反応液を混合し、各反応チューブにこの容液を49 μ lずつ分注しておいた。ここに陰性対照では滅菌水を、陽性対照および試験用チューブにはDNA溶液を各1 μ lずつ加えた。チューブの底を軽くたたいて混和し、軽く遠心した。ミネラルオイルを1滴添加し、再び軽く遠心した。PCR反応は表にある温度プログラムで行った。

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) 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⁽²⁵⁾。得られた塩基配列はBlastを用いて塩基配列の比較を行った。

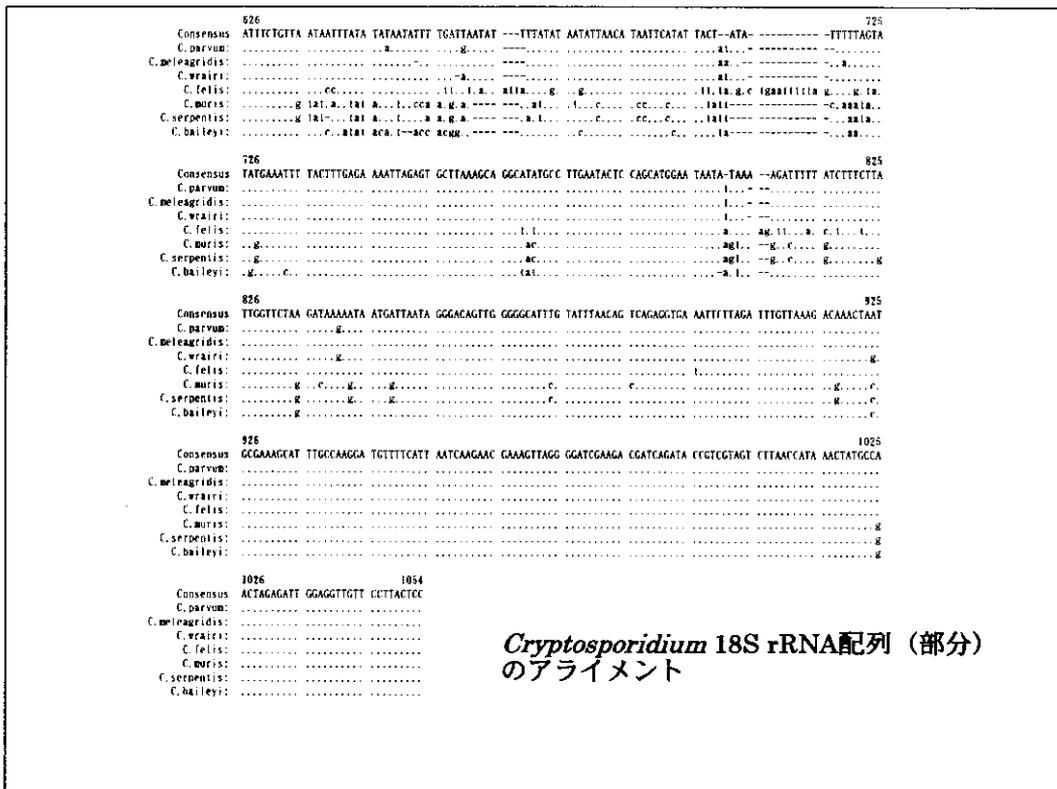


図 *Cryptosporidium* 18S rRNA領域配列のアライメント

このアライメントには、*C. parvum*(AF093493)、*C. meleagridis*(AF112574)、*C. wrairi*(AF115378)、*C. felis*(AF112575)、*C. muris*(AF093496)、*C. serpentis*(AF093499)、*C. baileyi*(AF093495)の配列を用いた。配列の位置は*C. muris*の登録された配列の先頭を+1として計算されている。この図を作成するに当たり、GCGパッケージのpileupソフトウェアによりアライメントを行い、prettyソフトウェアを用いて出力した結果を整形した。

この領域には種を決定するに十分な多型が見られるが、一方で感染源の識別には解像度が将来的には不足する可能性もある。

表1 ヒト由来分離株および同定結果一覧

株番	寄主詳細	報告地または	種	サブタイプ	発表
Cp/H01	ヒト A集団感	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H02	ヒト A集団感	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H03	ヒト A集団感	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H04	ヒト A集団感	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H05	ヒト 後天性免	関東地方	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H06	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H07	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H08	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H09	ヒト 海外旅行	アジア	<i>C. meleagridis</i>	-	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H10	ヒト	関東地	<i>C. meleagridis</i>	-	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H11	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H12	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H13	ヒト	関東地	<i>C. meleagridis</i>	-	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H14	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H15	ヒト 海外旅行	アフリカ	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H16	ヒト 先天性免	近畿地方	<i>C. felis</i>	-	2002.3.29寄 生 虫 学
Cp/H17	ヒト 先天性免	近畿地方	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H18	ヒト 後天性免	関東地方	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H19	ヒト B集団感	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H20	ヒト 海外旅行	アジア	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H21	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H22	ヒト 海外旅行	アジア	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H24	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/H25	ヒト 海外旅行	アジア・ア	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	未発表、八
Cp/H26	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	未発表、八
Cp/H27	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表、八
Cp/H28	ヒト 海外旅行	アフリカ	<i>C. parvum</i>	Dog type	2002.3.29寄 生 虫 学
Cp/H29	ヒト 海外旅行	アジア	<i>C. parvum</i>	Genotype 1/2	2002.4感 染 症 学 会
Cp/H30	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	未発表、八
Cp/H31	ヒト	関東地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	未発表、八
Cp/N10	ヒト		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表、
Cp/N11	ヒト		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表、
Cp/N18	ヒト	中部地	<i>C. parvum</i>	Genotype 1	未発表、

新規の結果が得られ次第、この表は更新いたします（最終更新日 2002.3.27）。

表1にヒトから分離した33株とそのDNA型をまとめた。これらはヒト型（Genotype1）、ウシ型（Genotype2）およびその他に分かれた。ヒト型を示したものは22株見られたが、その中には集団感染症例の他、免疫不全患者3症例が含まれた。またウシ型を示したものは7株で、やはり免疫不全とは無関係の症例であったが、これには集団感染症例が含まれた。その他には *C. meleagridis* タイプを示したものは3株、*C. felis* タイプが1株、そして *C. parvum* Dog type が1株あった。なお、ヒト型とウシ型の重複感染が1例あった。

（本研究の詳細は2002.4の感染症学会にて発表予定）

表2 ヒト以外を由来とする分離株および同定結果一覧

株番号	宿主	報告地または種	種	サブタイプ	発表
Cp/B01	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B03	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B05	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B06	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B10	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B11	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B12	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B13	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B14	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B15	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B16	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B17	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B18	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/B19	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	Yagita et al. 2001 ⁽¹⁴⁾
Cp/N02	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N03	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N04	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N05	ウシ	中部地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N06	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N07	ウシ	東北地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N08	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N09	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N17	ウシ		<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表
Cp/N21	ウシ		<i>C. muris</i>	-	未発表
Cp/N01	ブタ	中部地	<i>C. parvum</i>	Genotype 2	未発表

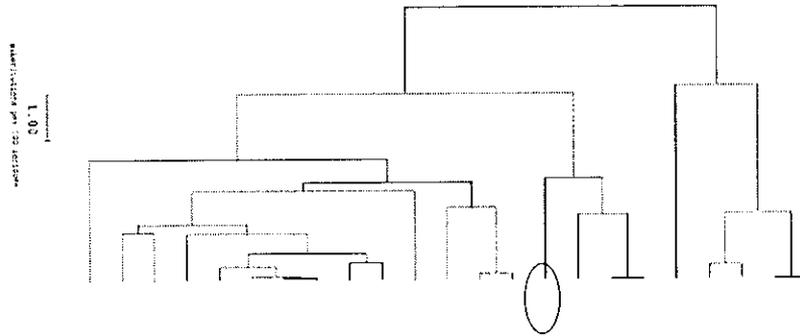
新規の結果が得られ次第、この表は更新いたします（最終更新日 2002. 3. 27）。

表2にウシ等から分離した25株とそのDNA型をまとめた。分離株の多くはタイプ2（ウシ型と称する）に収束された。他には*C. muris*が1株分離された。

（本研究の詳細は後日発表予定）

系統樹解析例

Growtree Phylogram of: pileup_3350_17396.distances, Tree Tree_1
November 3, 2003 16:30



神奈川県の河川水から分離された*Cryptosporidium* sp.のサンプルCについて、18S rRNA塩基配列決定を行った。Blastサーチの結果、100%一致する配列は登録されていなかったので、分子系統樹による解析を試みた。サンプルCは(スイスのウシより単離された)AF280053に近く、ヒト型の*C. parvum*であるAF297503より若干離れているという結果が得られた。

(本研究の詳細は横浜市水道局と共同で学会発表予定)

他の遺伝子型別方法

DNA塩基配列決定

- ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 (Internal Transcribe Spacer region)⁽¹⁸⁾
- Hsp70 (70kDa heat shock protein)⁽¹⁹⁾
- Microsatellite (GAG repeat)⁽²⁴⁾
- small double-stranded RNA (small double-stranded virus like RNA)⁽²⁰⁾

PCR-RFLP

- β -Tubulin⁽²¹⁾
- OWP (Outer Wall Protein)⁽⁸⁾
- TRAP-C1/2 (Thrombosporidin-Related Adhesive Protein of Cryptosporidium)⁽⁹⁾
- Cpgp40/15 (40KDa/15KDa Glyco-Protein)⁽²²⁾

PCR-SSCP

- SSU rRNA, hsp70⁽²³⁾

さまざまな手法が報告されている。

これらの一部を比較検討した報告がある⁽¹⁷⁾。

まとめ

- 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を行い、遺伝学的多様性を利用した株の同定法を検討した。この結果は日本にある原虫の遺伝学的多様性を明らかにし、後の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。万一の集団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やかに行い、そしてしかるべき処置を行うことで続く感染を防止することが被害を最小限に抑える重要な手段と考えられる。

文献一覧

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

分担研究報告書 7

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
研究協力者 八木田健司、板垣 匡、小野一男

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)

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)
黒木 俊郎 (神奈川県衛生研究所 細菌病理部)

協力研究者 八木田健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)
板垣 匡 (岩手大学 農学部)
小野 一男 (兵庫県衛生研究所 微生物部)

当該研究は給水地域住民の血清抗体価の調査を通して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を行うことを目的としている。本年度は厚生労働省による水道水源のクリプトスポリジウム等の検出状況報告（平成 9 年 8 月）および農林水産省統計情報部公表による畜産統計（平成 13 年度 5 月）を参考に県を抽出し、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、クリプトスポリジウムに対する血清抗体価を測定した。測定方法は昨年度の当該研究事業で開発した ELISA 法をさらに IgG 抗体用に改良したもので、クリプトスポリジウムの集団感染事例において採取された患者血清を用いて陽性/陰性の判断基準となるカットオフ値 OD = 0.300 を決定した。ちなみに、集団感染患者における OD 値は 1 例の陰性者（OD = 0.161）を除き、0.557～1.791 の範囲に分布し、その中間項平均は OD = 1.171 であった。

クリプトスポリジウム症と無関係に集められた血清における抗体価（OD 値）は、畜産業の振興具合と無関係に各県で同様の傾向を示し、OD 値の平均が 0.088～0.136 の範囲であったことが示すようにほとんどの血清がカットオフ値以下の値であった。兵庫県淡路島の結果などが示すように、抗体価（OD 値）は加齢と共に上昇する傾向が認められた（ $Y=0.0012X + 0.0537, r^2 = 0.0599$ ）。興味あることに全国で抗体陽性と判断された血清が 9 件認められ、そのうちの 5 件が埼玉県に集中していた。各県における抗体陽性者は人口 100 人あたり 0.4 人から 0.8 人であったのに対し、埼玉県では 2.2 人と他県と比べ人口比で 2.8 倍から 5.5 倍高い値を示した。埼玉県の血清が採取された時期は越生町のクリプトスポリジウム集団感染以降であり、この結果が集団感染を反映したものである可能性も指摘できる。今後とも抗体保有率調査を充実させるべく、調査対象を広げる予定である。

A. 研究目的 原虫による水源の汚染度と給水地域住民の血清抗体価との関係を明らかにすることで、汚染に係わる健康リスク評価を行う。前年度の研究結果として、赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムおよびジアルジアを対象とした ELISA 法による血

清抗体価の測定法の諸条件を明らかにした。本年度は、抗原の調整と ELISA 系の条件を再検討することで、IgG 抗体価測定が可能となった。また、集団感染事例および散発感染事例において採取された血清を利用することにより、カットオフ値を設定した。本測定系を用い、クリプトスポリジウムによる水源汚染の状況ならびに畜産等汚染要因を考慮のうえ調査地域を選定し、その一般住民を対象としたクリプトスポリジウムに対する血清抗体価を調査した。

B. 研究方法

被検血清

1) 陽性対照血清

平成 6 年に神奈川県で発生したクリプトスポリジウム集団感染事例の患者 12 名、ならびに神奈川県における散発発症事例の患者 1 名より採取した血清を実験に供した。患者血清の使用に際しては、勤務先を通して文章で使用目的を説明し、各個人から研究協力および血清の使用許可を得た。

2) 一般健常者血清

兵庫県の島部、都市部及び農村部の 3 地点からの血清、ならびに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のうち、埼玉県、栃木県、福井県、高知県、鹿児島県の計 6 県の血清を用いた。これらの血清は 1997 年から 1999 年の間に採取されたもので、クリプトスポリジウム症やその他の原虫性疾患を対象とした研究目的で集められたものではないことを確認した。感染症情報センター血清バンク保存血清の選択は平成 9 年に行われた厚生労働省によるクリプトスポリジウム等汚染実態調査で水源での汚染状況、および農林水産庁統計による畜産業振興状況の全国的なランク付を参照した（表 1）。なお、兵庫県の一部の血清を除いて血清試料は 20～50 歳代の成人由来で、性別は不問とした。これらの血清に関しては、血清の保管・管理担当部局に対して本研究での使用目的、および範囲を説明し、了解を得た。また、血清の分与に際しては識別番号等のみを記載することとし、個人にかかる情報が届かないよう工夫を依頼した。

表-1 調査対象の各県とその特徴

	水源汚染調査結果	備考
埼玉県	非検出	畜産業ランク全国中位***
栃木県	クリプトスポリジウム検出*（鬼怒川）	畜産業ランク全国上位
福井県	非検出	畜産業ランク全国下位
兵庫県	クリプトスポリジウム検出**（複数河川）	牛飼育頭数全国上位
高知県	非検出	牛飼育頭数全国下位
鹿児島県	ジアルジア検出*（万之瀬川）	豚飼育頭数全国 1 位

* 平成 9 年度 厚生労働省全国水道水源調査報告より

** 県独自調査結果より

*** 平成 13 年度 農林水産省統計情報部-畜産統計より

原虫の精製

予備的実験において、当該研究所でマウスへの継代接種により維持されている *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株と仔ウシ由来の野外株との抗原性を比較したところ、野外株を抗原とした場合に良好な抗原-抗体反応が得られたことから本研究では、仔ウ

シ由来オーシストを用いることとした。なお感染仔ウシ下痢便材料は岩手大学農学部から入手したもので、遺伝子解析により genotype II であることを確認した。

オーシストの精製は MGL 法の変法（精製水で糞便の懸濁液を作製、酢酸エチルによる脱脂）により遠心濃縮し、得られた沈渣につ

き塩化セシウムによる密度勾配遠心法で回収した。以下にその手順を示す。

- 1) 仔ウシ下痢便 1 ml に脱イオン水 7 ml および酢酸エチル 2ml を加え 15 秒間激しく液を混和する。
- 2) 1,500g、10 分間、4℃で遠心。
- 3) 上層の酢酸エチル層、界面部分さらに水層部分を吸引除去。
- 4) 沈渣を脱イオン水 2ml に再浮遊。
- 5) 比重 1.15 の塩化セシウム (21.75g の塩化セシウムを 103.25ml の脱イオン水に溶かす) 500 μ l を 1.5ml の微量遠心管に入れ、その上に沈渣の再浮遊液 500 μ l を静かに重層。
- 6) 12,000rpm、3 分間、4℃で遠心。
- 7) 上層 (水層部) と界面のすべて、および塩化セシウム層 200 μ l を新しい 12ml スピッツ管に移し、脱イオン水を 10ml まで加えてボルテックスで十分混和。
- 8) 1,500 g、10 分間、4℃で遠心。
- 9) 上清を除去し、沈渣を回収。

抗原の調整

前年度と同様、オーシストより脱囊させたスポロゾイトからの粗抽出成分を抗原とした。今年度は抽出の効率を高めるために凍結融解後に超音波処理を加えた。以下にその手順を示す。

- 1) 用時調整の脱囊前処理液 (HBSS に 1 規定の塩酸を加え pH2.8 に調整)、脱囊液 (10ml の HBSS に 150mg の胆汁酸、50mg のトリプシンを溶解) を準備。
- 2) 前処理液 1ml にオーシスト浮遊液 100 μ l を加え、37℃で 5 分間保温。
- 3) 1,000xg、5 分間、4℃で遠心。
- 4) 上清を 100 μ l ほど残して除去した後、脱囊液 1ml を加え沈渣を再浮遊。
- 5) 37℃で 1 時間保温。
- 6) 浮遊液に HBSS を 1ml 加え攪拌後、1,000xg、5 分間、4℃で遠心。
- 7) 上清を除去し、PBS (-) 200~300 μ l

に再浮遊。

- 8) 37℃に保温し脱囊を誘発。
- 9) -80℃/37℃で凍結融解を 5 回反復。
- 10) 冷水中で 15 秒間の超音波処理を行い、スポロゾイトの形が消失するまで (5 回程度) 反復。
 - 11) 12,000rpm、5 分間、4℃で遠心。
 - 12) 粗抽出抗原液として上清を回収。
 - 13) 吸光度計にて蛋白質濃度を測定。

ELISA による IgG 抗体価測定

従来用いていた BSA/T 溶液は非特異反応を抑制するブロッキング効果が弱いことから、カゼインタンパクを成分とする溶液をブロッキング剤として用いることとした。なお、この溶液は抗体希釈液としても用いた。以下に ELISA の手順を示す。

- 1) 粗抽出抗原を炭酸緩衝液で 5 μ g 蛋白質/ml に調整し、その 50 μ l をマイクロプレートの各ウェルに入れ 4℃で一昼夜吸着。
- 2) 洗浄液 250 μ l で 3 回洗浄。
- 3) ブロッキング溶液 250 μ l を加え、37℃で 2 時間保温。
- 4) 洗浄液 250 μ l で 3 回洗浄。
- 5) ブロッキング溶液で 200 倍希釈した被検血清を 50 μ l づつ各ウェルに添加。なお、1 検体あたり 2 ウェルを使用。
- 6) 1 時間、37℃で保温 (1 次反応)。
- 7) 洗浄液 250 μ l で 5 回洗浄。
- 8) ブロッキング溶液で 4,000 倍希釈した抗ヒト IgG-horseradish peroxidase 標識抗体 (XX 社) を 50 μ l づつ各ウェルに添加。
- 9) 1 時間、37℃で保温 (2 次反応)。
- 10) 洗浄液 250 μ l で 5 回洗浄。
 - 11) 酵素基質液 100 μ l を各ウェルに加え、37℃で発色。
 - 12) 陽性対照として用いた患者血清の吸光度 (O.D.) が 0.3 に達した時点で、試料の吸光度を測定。

ELISA 用試薬溶液類の調整

炭酸緩衝液	1 M	NaHCO ₃	43.	3 ml
	1 M	Na ₂ CO ₃	6.	7 ml
		NaN ₃	0.	2 g
		Distilled water	950	ml
洗浄液 (PBS/T)	0.15M	NaHPO ₄	1,500	ml
	0.15M	KH ₂ PO ₄	500	ml
		Tween 20 (Sigma)	5	ml
		NaCl	68	g
		Distilled water	8,000	ml
ブロッキングおよび血清希釈液	0.15M	NaHPO ₄	150	ml
	0.15M	KH ₂ PO ₄	50	ml
		Blocking Reagent (Roche)	5	ml
		Distilled water	800	ml
発色用基質液	0.1M	NaHPO ₄	25	ml
	0.1M	Citric acid	25	ml
		ABTS (Sigma)	15	ml
	30%	H ₂ O ₂	5	l

C. 結果

陽性対照血清を用いた反応

平成 6 年の集団感染患者の血清試料 12 件を用いた結果を表-2 にまとめた。12 名 (A ~L) は、感染源のあったビル内の施設で 8/26 飲食を共にしており、5~7 日後に下痢症等を訴えた。2 名 (M および N) は同席したものの当日飲食しなかった者で、これら 14 名は同一の職場に勤務していた。年齢は 19~28 歳であった。血清は発症後 10~12 日後に採

取され、同時にクリプトスポリジウムに関する糞便検査が行われた。

図-1 には OD 値を横軸に上記 14 名の OD 測定値をプロットした結果を示した。同時に測定した一般正常人 (A 県) の血清測定値も比較のためにプロットした。

表-2 ELISA 測定結果

氏名	年齢	摂食日	発症日	血液採取日	C p検査結果	症状	ELISA
A	23	8/26	8/31	9/12	検査なし	有り	0.557
B	20	8/26	8/31	9/12	不検出	有り	1.266
C	21	8/26	9/1	9/12	不検出	有り	1.606
D	21	8/26	9/2	9/12	不検出	有り	0.953
E	28	8/26	9/2	9/12	検査なし	有り	1.358
F	22	8/26	9/1	9/12	検出	有り	0.161
G	19	8/26	9/2	9/12	検出	有り	1.771
H	22	8/26	9/1	9/12	検査なし	有り	0.657
I	18	8/26	8/31	9/12	不検出	有り	1.791
J	20	8/26	8/31	9/12	不検出	有り	1.730
K	20	8/26	9/1	9/12	不検出	有り	1.008
L	21	8/26	9/2	9/12	不検出	有り	0.805
M*	24	摂食せず	-	9/12	検査なし	無し	0.087
N*	19	摂食せず	-	9/12	検査なし	無し	0.114

*同日、同席するも摂食歴なし。

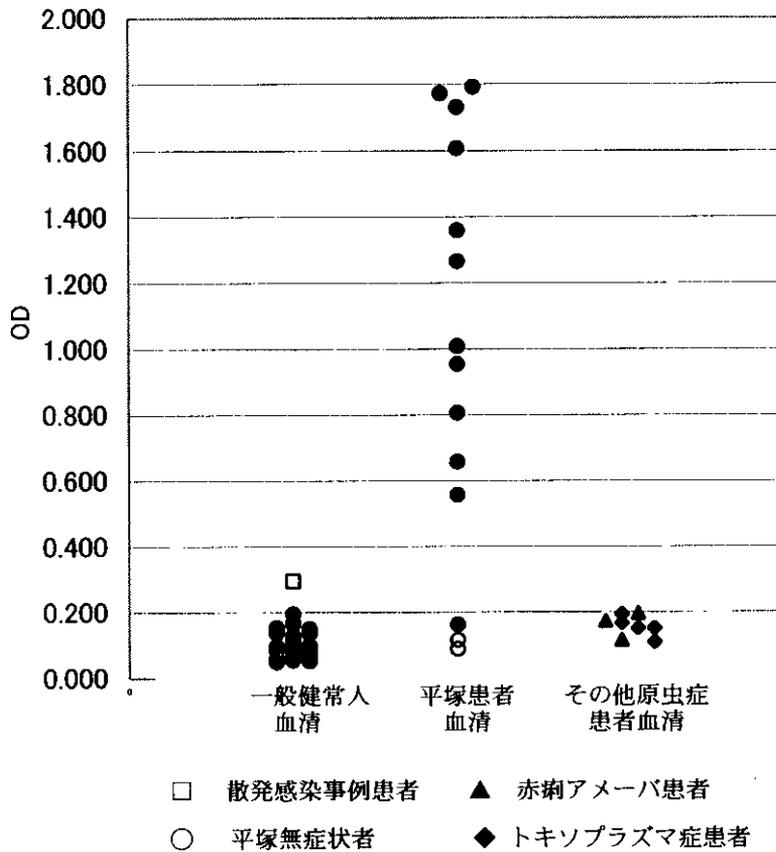
有症者 12 名のうち 9 名が検便検査に応じていたが、オーシスト陽性者は 2 名で、他 7 名は不検出であった。下痢等有症者 12 名中 11 名 (91.7%) は OD 値 0.5 以上 (0.557~1.791; 中間項平均:OD = 1.171) の強陽性を示した。有症者の中の 1 名 (F) は検便でオーシスト陽性であったにもかかわらず、OD 値は 0.161 と低い値にとどまった。これに対し、当日は酒席に同席したものの飲食をしなかった 2 名は無症状で、その血清 OD 値も 0.2 以下と陰性であった。一方、クリプトスポリジウムの散発発症例の抗体価は OD = 0.295 であった。

陰性対照群として 5 つの県で採取された

一般健常人血清から無作為抽出により 31 件を取り出して抗体価を測定したところ、その OD 値は 0.048~0.194 の範囲に分布した。これらの平均値は 0.102、標準偏差 (SD) は 0.038 と計算された。また、陰性対照群の平均 OD 値 + 2SD は 0.178 と計算された。例外的に OD 値の低かった患者 F の OD 値は陰性対照群の平均 OD 値+2SD よりもさらに低い値であった。

以上の結果から、抗体陽性 / 陰性を分けるカットオフ値 (2 分割値) は陽性対照群の中間項平均 OD 値-2SD=0.288 と陰性対照群の平均 OD 値+2SD=0.178 の間に設定すべきものと考えられた。

図-1 クリプトスポリジウム集団感染患者と健常者集団における抗-クリプトスポリジウム抗体測定結果



兵庫県の血清調査結果

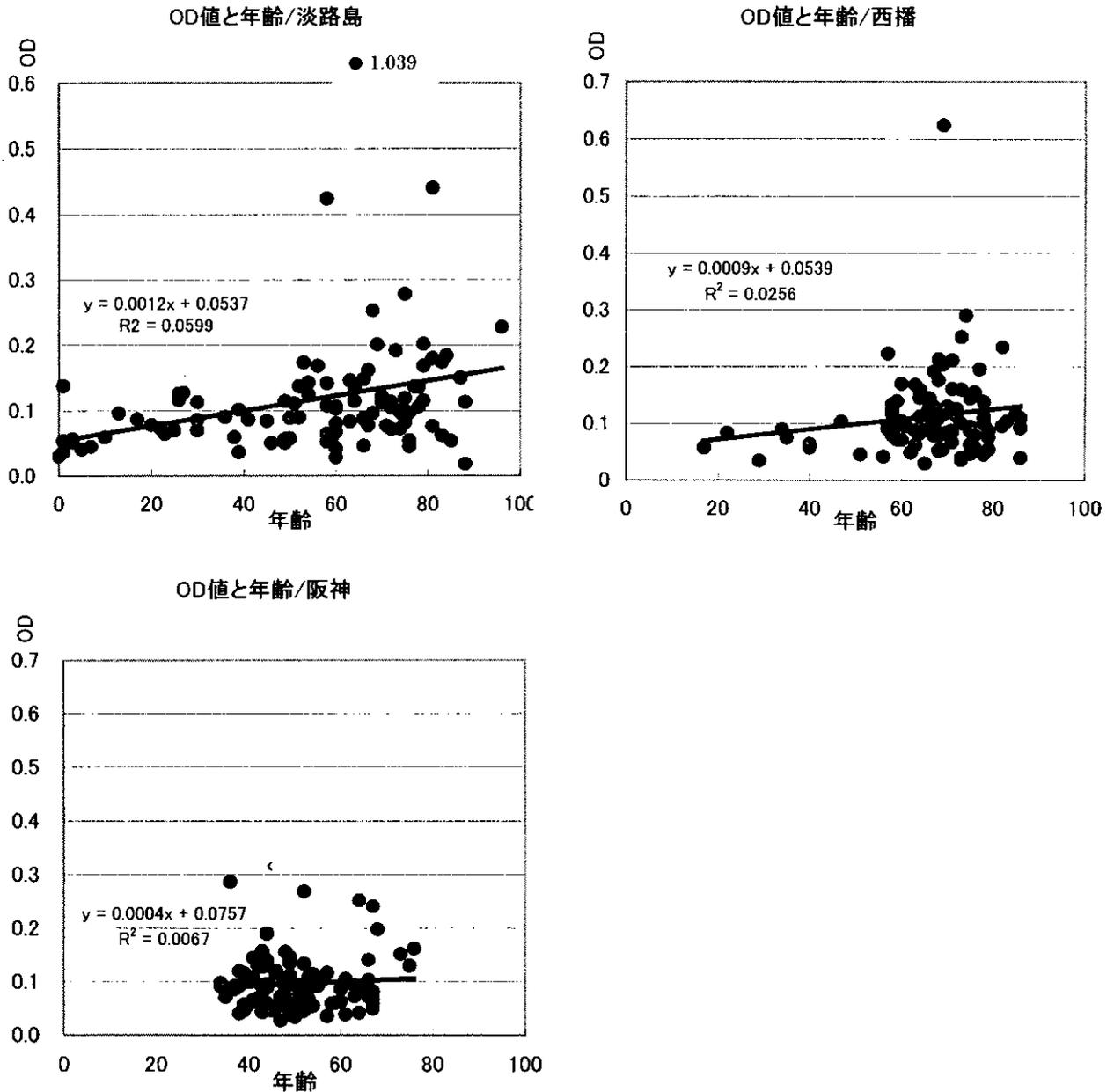
兵庫県衛生研究所ならびに県内医療機関の協力を得て、県内の3地域より血清を採取した。下記の3地点でそれぞれおよそ100試料を調べた。なお、兵庫県に関しては年齢の制限を設けずに血清採取がなされた。これら3地域における水源域におけるクリプトスポリジウムの汚染状況は下記のようなであった。

1. 淡路島: 島部全河川からクリプトスポリジウム検出
2. 京阪神: 都市部大河川からクリプトスポリジウム検出
3. 西播: 農村部大河川からクリプトスポリジウム検出

リジウム検出

図-2に各地域の年齢と血清抗体価(OD値)の関係を示した。各地域ともほとんどの血清のOD値は陽性対照を下回ったが、上述の【陽性対照群の中間項平均OD値-2SD=0.288】を越える血清もわずかながら認められた。淡路島の抗体分布図で明らかのように、加齢に伴ってOD値が上昇する傾向が認められた($y = 0.0012x + 0.0537; r^2 = 0.0599$)。この傾向は西播および京阪神においても同様の傾向が認められた。仮のカットオフ値よりも高い値を示した被験者は58、68、69および81才の計4名に認められた。

図-2 兵庫県 3 地域の年齢と OD 値の関係

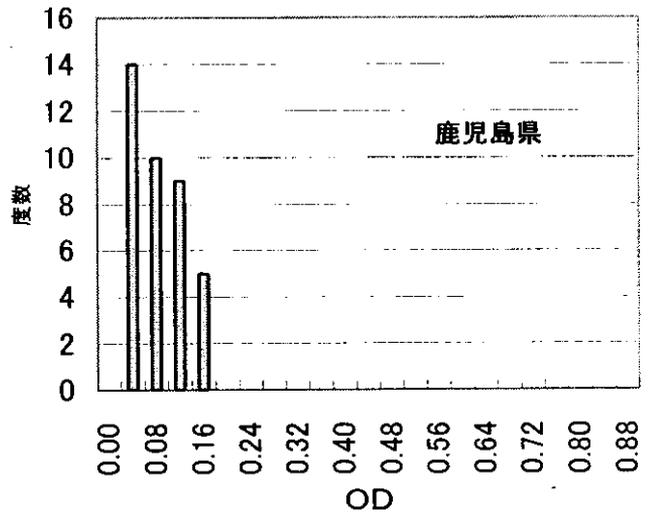
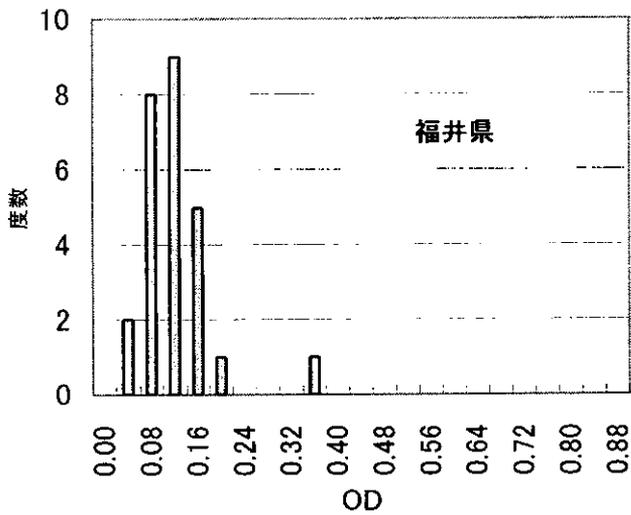
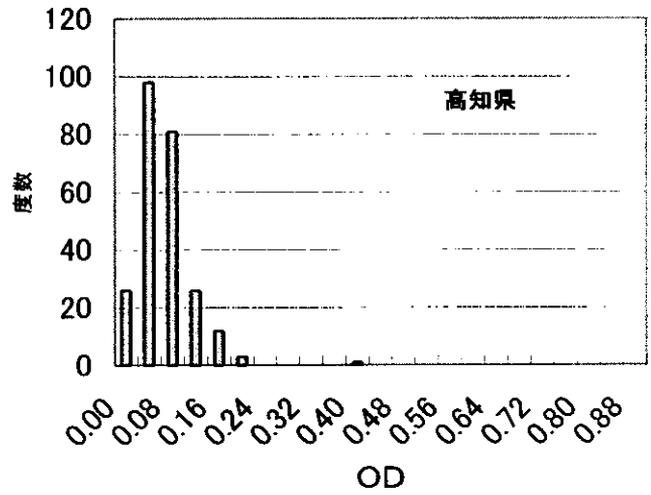
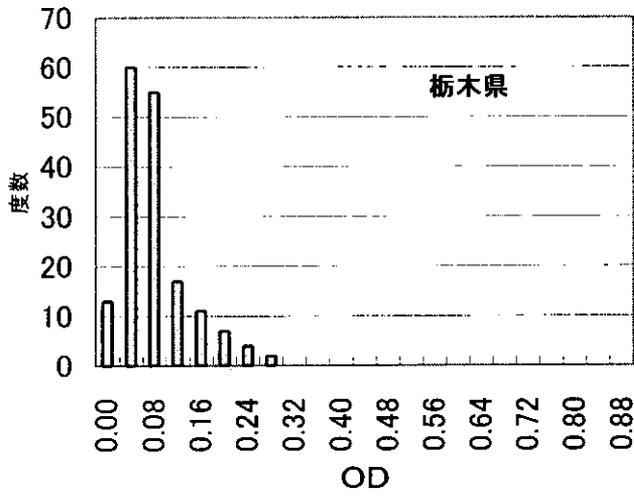
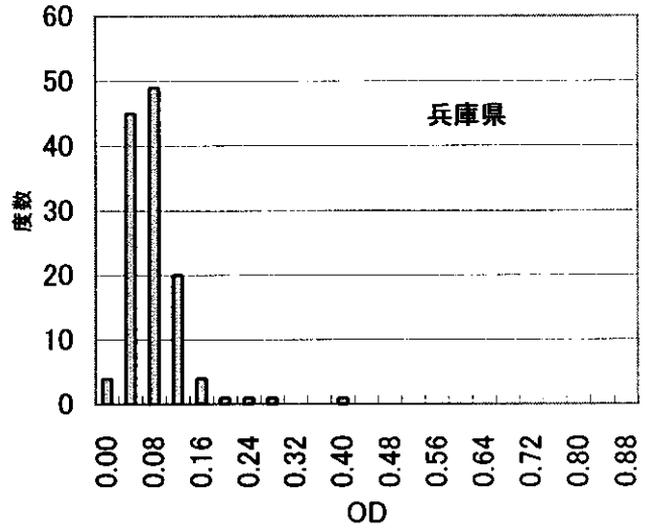
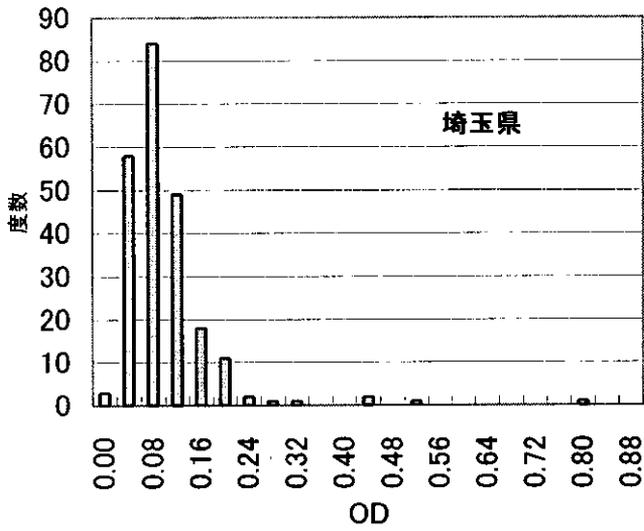


各県の調査結果

兵庫県、埼玉県、栃木県、福井県、高知県ならびに鹿児島県の年齢 20-59 歳における血清の OD 値に関してヒストグラム解析した。図-3 に各県のデータを示した。また表-3 に県

別の平均 OD 値、SD ならびに平均値 $\pm 2SD$ の上限値等をまとめた。なお、本集計表は年齢制限を設けた関係で兵庫県の 3 名の抗体陽性者は反映されていない。

図-3 各県のOD値ヒストグラム



各県における抗体価の分布状況（ヒストグラム）を見ると、鹿児島を除きほぼ正規性をしており、県による特段の差異は認められなかった。福井、鹿児島両県では被験血清数が少ないため得られた結果が正しく地域を表現しているとは言い難いが、この集計に限れば鹿児島県において抗体価の低い血清試料が若干多かった。一方、福井県では若干抗体価が高い方向に移行する傾向であった。

表-3 に示すように、各県で得られた OD 値の【平均値+2SD】は仮のカットオフ値である陽性対照群の【平均値 - 2SD】よりも低く、平均 OD 値はカットオフ値の 50%以下であった。一方、鹿児島県を除きカットオフ値を超える血清試料が見られたが、その数は埼玉県で 5 件と最も多かった（60 歳以上を含めれば兵庫県で 4 件）。

表-3 県別の 20 才から 59 才の健常人における抗-クリプトスポリジウム IgG 抗体価 (OD 値)

県名	試料数	平均 OD 値	SD	平均+2SD	OD 値=0.3 を超える試料数
兵庫	126	0.097	0.034	0.165	1
埼玉	229	0.119	0.075	0.269	5
栃木	169	0.100	0.056	0.212	1
福井	26	0.136	0.063	0.262	1
高知	247	0.088	0.046	0.180	1
鹿児島	38	0.105	0.040	0.185	0

D. 考察

本年度の課題の第一は、患者血清中の抗-クリプトスポリジウム IgG 特異抗体を正確に測定する ELISA 法の確立にあった。前年度までに確立された ELISA 法では IgM 抗体の測定が可能であったが、IgG の評価には不适当であった。今回は抗原として野外株である仔ウシ由来のオーシストを用いること、ならびにとブロッキング試薬としてカゼインを用いることで著しい改善を見た。今回、抗原として用いたオーシストは遺伝子解析の結果、従来から用いていたマウス継代株と同一の遺伝子型であることが示されており、野外株が優れていたこと理由は目下のところ不明である。新たな反応条件下で集団感染患者と一般健常人との抗体価比較を行ったところ、後述するように両者間で OD 値に 10 倍程度と大きな差があり陽性 / 陰性の 2 分割化が容易となった。本研究事業によって特

異性の高い IgG 抗体価測定方法が開発されたことで、今後の疫学調査に威力を発揮するものと期待される。

本改良法を用いて国内の集団感染事例に関する IgG 抗体価を調べた結果、患者血清では高い抗体価（中間項平均 OD 値 = 1.171）が示された。また、散发例患者における抗体価も OD = 0.295 と高い値を示したことから、一方、一般健常人における平均 OD 値に 2 倍の標準偏差を加えた値が 0.178 と計算されたこと、および集団感染時に感染原因と考えられる飲食がなかった同席者の OD 値が 0.100 前後であったことから、陽性 / 陰性の 2 分割値（カットオフ値）OD = 0.178 ~ 0.295 の間に設定されるべきものと考えられた。なお、本 ELISA 法は特異性に優れており、赤痢アメーバ症やトキソプラズマ症患者との間に交差反応は全く認められないことを確認した。

本年度の研究において調査対象とした地