

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者 国包章一 (国立保健医療科学院)

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. ヒトおよびペットショップのイヌ等におけるクリプトスポリジウムと ジアルジアの感染実態調査	15
井関基弘、阿部仁一郎	
2. 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	21
西尾 治、秋山美穂、都築英明、奥村正直、板垣朝夫	
3. 各種動物における <i>Cryptosporidium</i> の保有状況	47
黒木俊郎、遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、宇根有美、鳥羽道久	
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	61
黒木俊郎、遠藤卓郎、相楽裕子、坂本光男、八木田健司、泉山信司	
5. 消化管寄生性原虫感染症の血清疫学に関する検討	73
遠藤卓郎、黒木俊郎、八木田健司、河橋幸恵	
6. 北海道十勝地方のウシにおけるクリプトスポリジウム汚染実態調査	89
更科孝夫、長沢秀行、宇塚雄次、田邊茂之	
7. クリプトスポリジウムオーシストの細胞感染性評価のための前処理 方法の検討	99
平田 強、金子光美、森田重光	
8. 河川水中のクリプトスポリジウムの時間的変動の実測	113
大垣眞一郎、片山浩之	
9. 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と除去に 関する実態調査	121
平田 強、森田重光	
10. 原水濁度および凝集剤注入率の変化によるクリプトスポリジウムの 除去挙動	143
眞柄泰基、国包章一、秋葉道宏、金漢承	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	151
IV. 研究成果の刊行物・別刷	157

研究班の構成

主任研究者

国立保健医療科学院水道工学部長

国 包 章 一

分担研究者

金沢大学医学系研究科教授

井 関 基 弘

国立感染症研究所寄生動物部長

遠 藤 卓 郎

東京大学大学院工学系研究科長

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

国立感染症研究所村山分室感染症情報センター第六室長

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

国立保健医療科学院水道工学部主任研究官

秋 葉 道 宏

国立感染症研究所感染症情報センター

秋 山 美 穂

大阪市立環境科学研究所

阿 部 仁一郎

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

帯広畜産大学畜産学部助教授

宇 塚 雄 次

麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

宇 根 有 美

愛知県衛生研究所生物部

奥 村 正 直

東京大学大学院新領域創成科学研究科講師

片 山 浩 之

埼玉県衛生研究所地域保健

河 橋 幸 恵

国立保健医療科学院水道工学部協力研究員

金 漢 承

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

愛知県衛生研究所生物部

都 築 英 明

日本蛇族学術研究所

鳥 羽 道 久

帯広畜産大学原虫病研究センター教授

長 沢 秀 行

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

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括研究報告書

平成15年3月

主任研究者 国包章一 (国立保健医療科学院)

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 国立保健医療科学院水道工学部 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、浄水処理における除去技術等につき検討した。ヒトのクリプトスポリジウム等の感染率は、一般の下痢症患者に関する限りそれほど高くないことが、これまでと同様に今年度の調査でも示された。しかし、ペットショップで市販されている動物は、その種類等によっては、非常に高い割合でクリプトスポリジウム等に感染していた。また、クリプトスポリジウム及びジアルジアの感染経路に関する調査では、患者及び感染者のうち多くは海外での感染の可能性が高いと考えられたが、一部についてはプールでの感染が疑われた。クリプトスポリジウム保存株を用いた分子疫学的検討においては、このうちヒト由来の一部のものは動物型であったことから、クリプトスポリジウムはヒトからヒトへだけでなく、動物からヒトへの感染もあることが示唆された。さらに、本研究で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は、クリプトスポリジウム感染の評価手法として有効であることを確認するとともに、健康な分娩母牛と出生時の子牛のクリプトスポリジウム血清抗体価との間に、有意な相関があることを認めた。一方、多摩川河川水のクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度は、降雨時等においては短時間のうちに大きく変化することを明らかにした。また、ある浄水場において、長期間にわたり毎回試料水を 1,000L 採取して調査し、原水のクリプトスポリジウムの陽性率は 100%、ジアルジアの陽性率は 93%であったのに対して、ろ過水のクリプトスポリジウムの陽性率は 47%、ジアルジアの陽性率は 12%であり、いずれも浄水処理によって十分に除去されていることを明らかにした。さらに、水道の凝集-砂ろ過におけるクリプトスポリジウム除去率は、原水濁度等の条件によってある程度の範囲で変化することを室内実験で確認した。

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 部長
	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	国立感染症研究所村山分室感染症情報センター 感染症情報センター 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及びジアルジア感染実態の調査

ヒトのクリプトスポリジウム及びジアルジア感染実態を把握するため、金沢市内の2医療機関の小児下痢症患者等を対象として、糞便61検体につき検査を行った。また、これとは別にA県下のある病院で、高齢（60歳以上）の下痢症患者106名を対象に糞便検査を行い、クリプトスポリジウム感染状況につき調査するとともに、下痢症患者が多く居住している地域について、水道原水、及び、その水道原水となっている河川水が流入している海域で養殖されているホタテ貝（中腸腺）につき、それぞれ月1回程度の頻度で調査した。

このほか昨年度の研究に引き続き、国内で飼養されている爬虫類及び野外に生息する爬虫類のクリプトスポリジウム保有状況を把握するため、動物飼養施設9施設で飼育されている爬虫類のうち、カメ類51種151検体、トカゲ類47種181検体、ヘビ類64種185検体、ワニ類6種7検体の計168種524検体、及び、野外に生息する爬虫類のうちカメ類7種327検体、トカゲ類6種76検体、ヘビ類4種63検体の計17種466検体を対象として糞便検査を行った（以上、検体数は昨年度からの合計）。また、金沢市内のペットショップで市販されているイヌ347頭、フェレット22頭、オカメインコ10羽を対象に、クリプトスポリジウム及びジアルジア感染状況を調べて、ヒトへの感染源としての重要性につき検討した。

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

昨年度までに引き続き、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感染の疫学及び分子疫学的検討

昨年度までの研究に引き続き、クリプトスポリジウムの遺伝子型につき、ヒト 7 検体、ウシ 17 検体、ブタ 1 検体、イヌ 1 検体、ネコ 2 検体、ネズミ 2 検体、計 30 検体の糞便を対象に、PCR 法を用いて 18SrRNA 領域の塩基配列を調べ、型別の分類を行うとともに、その由来につき検討した。

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

本研究で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、埼玉県 O 町集団感染事例血清に適用して、その実用性につき検討した。

また、ウシ、特に子牛は、ヒトに対する感染源の一つとして有力であることから、この試験法を活用して、ウシの出生後におけるクリプトスポリジウム感染状況につき調査した。

2. クリプトスポリジウム細胞感染性評価のための前処理方法の検討

HCT-8 細胞を用いた *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株オーシストの細胞感染性試験におけるオーシストの前処理方法として、抗生物質、抗生物質+酸及び塩素の 3 通りの方法につき比較検討した。

3. 浄水処理における除去技術等の検討

1) 河川水中のクリプトスポリジウム等の濃度変動特性に関する検討

クリプトスポリジウム及びジアルジアの感染リスクを的確に評価するためには、その汚染ピーク時における濃度を実測に基づいて明らかにする必要があることから、多摩川の河川水を対象として、降雨流出時等に 2 時間ごとに試料水を自動採取して短時間の濃度変動につき調査した。

2) クリプトスポリジウム及びジアルジアの出現状況と除去性能の調査

クリプトスポリジウム及びジアルジアの水道原水中の濃度とその浄水処理による除去性能を明らかにするため、ある浄水場の原水及びろ過水を昨年度までに引き続き 9 ヶ月間にわたって月 1 回の頻度で調査した。

3) クリプトスポリジウム除去代替指標の検討

クリプトスポリジウムのろ過による除去特性につき比較検討するため、昨年度までに引き続き、凝集-砂ろ過室内実験装置を用いて原水濁度及び凝集剤注入率を変化させて実験した。

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及びジアルジア感染実態の調査

金沢市内の 2 医療機関の小児下痢症患者等を対象とした糞便 61 検体の検査では、クリプ

トスポリジウム及びジアルジアの感染例は認められなかった。また、A 県下のある病院の高齢（60 歳以上）下痢症患者 106 名を対象とした糞便検査でも、クリプトスポリジウム感染例は認められず、併せて調査した水道原水やホタテ貝からもクリプトスポリジウムは検出されなかった。

このほか、昨年度の研究に引き続いて行った動物飼養施設で飼育されている爬虫類の糞便検査において、クリプトスポリジウム保有例は、カメ類 151 検体のうち 3 検体（保有率 2.0%）、トカゲ類 181 検体のうち 20 検体（同 11.0%）、ヘビ類 185 検体のうち 21 検体（同 11.4%）、ワニ類 7 検体のうち 1 検体（同 14.3%）であり、飼養施設によって保有率は異なり、カメ類では 0～4%、トカゲ類では 0～20%、ヘビ類では 0～43%で、同じ飼養施設で感染が広がっていることを示唆していた。これに対して、野外に生息する爬虫類については全 466 検体中トカゲ類 2 検体からクリプトスポリジウムが検出されただけであり、保有率は極めて低かった。今回の調査で爬虫類から検出されたクリプトスポリジウムオーシストを、*C. parvum* のそれと形態的に鑑別することは非常に困難であったことから、それとこれらを正確に鑑別するためには DNA レベルでの解析が必要であると考えられた。

また、金沢市内で市販されているペットの感染率は、イヌ 347 頭についてはクリプトスポリジウムが 21.6%、ジアルジアが 25.1%で、両原虫とも陽性が 6.1%、フェレット 22 頭についてはクリプトスポリジウムが 53%、ジアルジアが 33%で、両原虫とも陽性が 13%、オカメインコ 10 羽についてはクリプトスポリジウムが 30%、ジアルジアが 0%で、両原虫とも陽性が 0%であった。

以上のように、本年度の調査でもヒトのクリプトスポリジウム及びジアルジア感染例は認められなかったものの、ペット動物では高い感染率であることが明らかとなり、また動物飼育施設の爬虫類もクリプトスポリジウム感染率が比較的高かったことから、今後もヒト及び身近な動物における疫学調査を続ける必要があると考えられる。

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来院したクリプトスポリジウム症患者は、平成 12 年度が 2 名、平成 13 年度が 1 名であったが、平成 14 年度には 0 名であった。また、ジアルジア症患者は、平成 12 年度が 4 名、平成 13 年度が 5 名であったのに対して、平成 14 年度には 4 名であった。このほかジアルジアに関しては、下痢症は認められないが感染が認められた者が平成 12 年度と 13 年度に各 1 名あったのに対して、平成 14 年度には 0 名であった。これらをまとめると、3 年間の調査期間中においてクリプトスポリジウム症患者は計 3 名、ジアルジア症患者は計 13 名、このほかジアルジア感染者が計 2 名で、両症につき合計 18 名の患者及び感染者が確認された。

これらの患者及び感染者のうち 12 名は海外渡航歴があり、海外での感染の可能性が高いと考えられた。また、海外渡航歴がない 6 名については海外渡航歴がなく、このうち 4 名は発症前にプールで水泳をしていたことから、プールでの感染が疑われた。

3) クリプトスポリジウム感染の疫学及び分子疫学的検討

昨年度までの研究に引き続き、クリプトスポリジウムの遺伝子型につき、ヒト、ウシ、

ブタ、イヌ、ネコ及びネズミの計 30 検体の糞便を対象に、18SrRNA 領域の遺伝子解析を UPGMA 法で行ったところ、プライマーba+84/ba-620 で増幅された部分については 4 つの型別に分けられ、ウシ、ヒト、ネコ、ネズミでそれぞれ異なったクラスターに属すると考えられた。プライマー18Shu+1130/18Shu-1729 で増幅されたものでは系統樹の初めの分岐で *C. parvum* と *C. muris* に分けられ、ウシ由来のものは ba よりも型別に優れていたが、ヒト由来では劣っていた。

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

感染初期及び感染 1 ヶ月後に採取された O 町のペア血清は IgG 抗体価の顕著な上昇を示し、感染が IgG 抗体価に及ぼす影響が明確に認められた。O 町においてランダムにサンプリングした感染初期、1 ヶ月後及び 1 年後の血清抗体価は、1 ヶ月後をピークにその後は低下していた。また、*C. parvum* の抗原特異性について、ヒト型及び動物型の抗原と両者の感染血清を用いて IgG 抗体価を比較したところ、両抗原の間に差は認められず、動物型抗原で両遺伝子型クリプトスポリジウム感染を検査できることが示された。しかしながら、IgM 抗体価に関しては、初期診断マーカーとしての有用性が認められなかった。

また、この試験法を活用してウシの血清抗体価を調べた結果、健康な分娩母牛と出生時の子牛の抗 *C. parvum* IgG 抗体価は有意な相関を示した。健康な出生時の子牛の抗体価は 1 及び 2 週齢でそれぞれ有意に減少した。出生後の *C. parvum* 感染子牛では、*C. parvum* オーシストの排出がそれぞれ約 1 ヶ月間、2 ヶ月間及び 3 ヶ月間持続する例が認められた。出生直後に *C. parvum* に感染した 1 及び 2 ヶ月齢の感染子牛の抗体価は 2 週齢の健康子牛に比べて有意に高く、3 及び 4 ヶ月齢の感染子牛の抗体価は、2 週齢の健康子牛、1 及び 2 ヶ月齢の感染子牛に比べて有意な高値を示した。

2. クリプトスポリジウム細胞感染性評価のための前処理方法の検討

クリプトスポリジウムの細胞感染性試験における前処理方法として、抗生物質処理、抗生物質+酸処理及び塩素処理の 3 通りの方法につき比較検討した結果、これらの 3 つの前処理方法の中では塩素処理による方法が、オーシストの脱囊率が最も高い (87%) こと、変動係数が最も低い (6.4%) こと、前処理が脱囊したスポロゾイドの活性を著しく低下させることがないこと、感染力の相対値に及ぼす影響が十分に無視できること、培養細胞系への微生物の汚染防止に優れていること等が認められた。

3. 浄水処理における除去技術等の検討

1) 河川水中のクリプトスポリジウム等の濃度変動特性に関する検討

多摩川河川水中において、クリプトスポリジウムは降雨流出時等に採取した 29 試料のうち 8 試料のみから検出され (陽性率 28%)、ジアルジアはすべての試料から検出された。これらの検出濃度を比較すると、クリプトスポリジウムはジアルジアの 1/10 程度と低かった。また、時には、降雨が認められないにもかかわらず、クリプトスポリジウムやジアルジアの濃度が、他の一般的な水質指標とともに上昇したケースもあった。

2) クリプトスポリジウム及びジアルジアの出現状況と除去性能の調査

ある浄水場の原水及びろ過水を 9 ヶ月間にわたって月 1 回の頻度で調査した結果を、平

成 13 及び 14 年度の調査結果とまとめると、原水のクリプトスポリジウムの陽性率は 100% (30/30) で濃度範囲は 110~1,900 個/1,000L (50%値: 450 個/1,000L、95%値: 1,600 個/1,000L)、ジアルジアの陽性率は 93% (28/30) で濃度範囲は 0.3~720/1,000L (50%値: 160 個/1,000L、95%値: 590 個/1,000L)、ろ過水のクリプトスポリジウムの陽性率は 47% (28/60) で濃度範囲は 0.3~11 個/1,000L (50%値: 約 0.3 個/1,000L、95%値: 7 個/1,000L)、ジアルジアの陽性率は 12% (7/60) で濃度範囲はいずれも約 0.5/1,000L 以下であった。

3) クリプトスポリジウム除去代替指標の検討

凝集-砂ろ過室内実験装置を用いて、クリプトスポリジウムのろ過による除去特性につき検討した結果、原水濁度が 2 度から 50 度まで増加するにつれて、クリプトスポリジウムの除去率は $2.6 \log_{10}$ から $1.8 \log_{10}$ まで低下した。また、凝集剤注入率の増加に伴って濁度除去率は $1.5 \log_{10}$ から $4.0 \log_{10}$ へと高くなったが、クリプトスポリジウム除去率は 2.3 - $2.6 \log_{10}$ とほとんど変わらなかった。

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、浄水処理における除去技術等につき検討した。

ヒトのクリプトスポリジウム等の感染率は、一般の下痢症患者に関する限りそれほど高くないことが、これまでと同様に今年度の調査でも示された。しかし、ペットショップで市販されている動物は、その種類等によっては、非常に高い割合でクリプトスポリジウム等に感染していた。また、クリプトスポリジウム及びジアルジアの感染経路に関する調査では、患者及び感染者のうち多くは海外での感染の可能性が高いと考えられたが、一部についてはプールでの感染が疑われた。クリプトスポリジウム保存株を用いた分子疫学的検討においては、このうちヒト由来の一部のものは動物型であったことから、クリプトスポリジウムはヒトからヒトへだけでなく、動物からヒトへの感染もあることが示唆された。さらに、本研究で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は、クリプトスポリジウム感染の評価手法として有効であることを確認するとともに、健康な分娩母牛と出生時の子牛のクリプトスポリジウム血清抗体価との間に、有意な相関があることを認めた。このほか、クリプトスポリジウムの細胞感染性試験における前処理方法としては、塩素処理が最も優れていることを明らかにした。

一方、多摩川河川水のクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度は、降雨時等においては短時間のうちに大きく変化することを明らかにした。また、ある浄水場において、長期間にわたり毎回試料水を 1,000L 採取して調査し、原水のクリプトスポリジウムの陽性率は 100%、ジアルジアの陽性率は 93%であったのに対して、ろ過水のクリプトスポリジウムの陽性率は 47%、ジアルジアの陽性率は 12%であり、いずれも浄水処理によって十分に除去されていることを明らかにした。さらに、水道の凝集-砂ろ過におけるクリプトスポリジウム除去率は、原水濁度等の条件によってある程度の範囲で変化することを室内実験で

確認した。

以上のように、最終年度に当たる本年度の研究では基本的に前年度までの研究を継続して実施し、各検討課題につきそれぞれ満足な研究成果を得ることができた。そして、本研究全体を通じて、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発生構造に関して、従来よりもはるかに正確に実態を把握することが可能になったと考えられる。しかしながら、水道水を介してのクリプトスポリジウム及びジアルジア感染リスクを支配する要因は多岐にわたっていることや、水中のクリプトスポリジウム等の定量試験を迅速に精度良く行うことが困難なことなどから、これらによる健康リスクに関して十分な評価方法を確立するまでには必ずしも至らなかった。これを達成するためには、クリプトスポリジウム株等の系統分類、感染実態の把握、水道原水の汚染状況やその濃度変動特性等について、より詳細に検討することが重要な研究課題となると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(別添参照)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 分担研究報告書

平成15年3月

分担研究報告書 1

ヒトおよびペットショップのイヌ等における
クリプトスポリジウムとジアルジアの感染実態調査

分担研究者 井関基弘
研究協力者 阿部仁一郎

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わる
健康リスク評価および管理に関する研究

ヒトおよびペットショップのイヌ等におけるクリプトスポリジウム
と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
研究協力者 阿 部 仁一郎 大阪市立環境科学研究所

研究要旨：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を把握することを目的として、金沢市内の2医療機関を受診した小児下痢症患者を中心に61検体の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、流行の実態と問題点を考察した。さらに、金沢市内のペットショップで市販されているイヌ347頭、フェレット22頭、オカメインコ10羽についても両原虫の感染状況を調べ、分離株の遺伝子解析をおこない、ヒトへの感染源としての重要性の有無を考察した。今回のヒト糞便検体からは両原虫は検出されなかった。一方、2002年の届出患者総数（全国）はクリプトスポリジウム症108例、ジアルジア症115例であった。ペット動物の検査では両原虫とも高率に感染が認められた。感染率は、犬ではクリプトスポリジウム21.6%、ジアルジア25.0%、フェレットではそれぞれ59%、27%、オカメインコではクリプトスポリジウム30%であった。今後もヒトおよび身近な動物における疫学調査を続け、水道水・環境水汚染に係わるデータを蓄積する必要がある。

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大規模な集団感染が起こる。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、2002年には北海道で（確定ではないが、1ホテルの簡易水道による汚染が原因として疑われている）数百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は重要な課題である。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り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。家畜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、ヒトやペット動物に関する広範な調査データやは極めて少ない。患者の発生状況や身近な動物における感染実態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。本研究はヒトおよびペット動物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

ヒトの検査は、金沢市内の1小児科病院と大学附属病院を受診した下痢症小児患の下痢便61検体を検査対象とした。全国的な流行の実態は文献的調査と厚生労働省/国立感染症研究所の感染症週報を参考にした。

ペット動物の検査は、金沢市内の1ペットショップで市販されているイヌ347頭、フェレット22

頭、オカメインコ 10 羽から、下痢の有無に関係なく採取した糞便材料を検査対象とした。

糞便検査には約 1g の糞便を用い、比重 1.2 のシヨ糖液によるシヨ糖遠心浮遊法でおこなった。また、ペット動物から検出された両原虫の分離株については、PCR 法で遺伝子を増幅し、遺伝子解析で型別の解析をおこなった。

C. 研究結果

1) ヒトにおける感染状況

今回検査をおこなったヒト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、2002 年の患者届出数はクリプトスポリジウム症 108 件、ジアルジア症 115 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 (2002 年)

	合 計	都 道 府 県 別
クリプトスポリジウム	108	北海道 35 ¹⁾ , 茨木 1, 千葉 5, 東京 3, 大阪 2, 兵庫 61 ²⁾ , 沖縄 1
ジアルジア	115	北海道 2, 宮城 1, 福島 2, 茨木 2, 群馬 1, 埼玉 1, 千葉 4, 東京 44, 神奈川 11, 山梨 4, 福井 1, 静岡 1, 愛知 3, 京都 11, 大阪 10, 兵庫 2, 島根 1, 岡山 3, 広島 4, 徳島 1, 愛媛 1, 高知 1, 福岡 2, 佐賀 1, 沖縄 1

※ 1) と 2) は北海道の同一宿泊施設での集団感染。

(厚生労働省/国立感染症研究所：感染症週報 3 (52), 2001)

2) ペットショップ市販動物における感染状況

ペットショップで市販されている動物における感染率は、イヌではクリプトスポリジウム 21.6%、ジアルジア 25.0%、フェレットではそれぞれ 59% と 27%、オカメインコではクリプトスポリジウムのみが検出され、その陽性率は 30% であった。イヌにおける陽性率を年齢にみると、クリプトスポリジウムの場合は 3 カ月齢未満の個体 24.5%、3 カ月～1 歳未満では 19.1%、1 歳以上では 10.0% であり、若齢個体ほど高値を示した。一方、ジアルジアの場合はその逆で、加齢とともに陽性率は高くなる傾向を示した。結果を表 2, 3 にまとめた。

3) 分離株の種と遺伝子型

動物から分離されたクリプトスポリジウムとジアルジアの種と遺伝子型は以下のとおりであった。

a) クリプトスポリジウム

イヌからの分離株は *C. parvum* のイヌ型、フェレットからのものは *C. parvum* のフェレット型であった。オカメインコからは 2 種が分離され、1 種は *C. baileyi* で、他の 1 種は形態的には *C. meleagridis* に似るが、遺伝子型は *C. meleagridis* や、セキセイインコ由来の *C. blagburni* と異なるもので、現在、解析中である。

b) ジアルジア

イヌからの分離株は *G. intestinalis* (= *G. lamblia*) であり、遺伝子型は Assemblage D に属するイヌ特異的なものであった。フェレットからの分離株は現在同定中である。

表2 ペットショップのイヌにおける *Cryptosporidium* と *Giardia* の感染状況
(金沢市, 市販, 2002)

齢(月)	検査頭数	陽性率 (%)		
		<i>Crypto.</i>	<i>Giardia</i>	<i>C + G</i> (内数)
<3	234	24.4	19.7	6
3~12	68	19	34	9
>12	40	10	40	0
不明	5			0
合計	347	21.6	25.1	6.1

表3 ペットショップのフェレットとオカメインコにおける *Cryptosporidium* と *Giardia* の感染状況

(金沢市, 市販, 2002)

	検査頭数	陽性率 (%)		
		<i>Crypto.</i>	<i>Giardia</i>	<i>C + G</i> (内数)
フェレット	22	53	33	13
オカメインコ	10	30	0	0

D. 考察

今回検査をおこなった小児下痢症患者の便 61 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なかった。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。一方、2002年の全国の届出総数はクリプトスポリジウム症 108 例、ジアルジア症 115 例であった。表1に示したように、患者発生は全国に広く分布している。

平成14年3月にはクリプトスポリジウムの集団感染が発生した。その概略は以下のとおりである。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ず、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 名中 18 名が同様の症状を呈していたという。さらに、同年4月、札幌市内の専門学校の生徒 300 名が上記と同じホ

テルに2泊し、170名が下痢（通院37名、入院1名）を発症、検査した12検体中6検体からクリプトスポリジウムが検出された。同ホテル従業員の検便では79名中16名からオーシストが検出された。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。

ここで問題となるのは、この集団感染で厚労省に届けられた患者数は、兵庫県と北海道を合わせて96例にすぎないということである。現行の法律では届出は病原体が確認された有症者に限られているので、このような結果を生ずることになる。感染症の予防という法律の目的と、水道の安全性管理など公衆衛生の立場から考えれば、無症状の病原体排出者を把握することも重要であり、同法律の見直しが必要であろう。

ペットショップで市販されているイヌなどにも両原虫が高率に感染していることが判明した。遺伝子型の解析から、ヒトへの感染性は低いものと考えられるが、エイズなど免疫不全患者には感染する可能性があり、今後さらに検討を要する。また、これらの動物の糞便が下水や河川水に流入するとすれば、水道原水の原虫検査が問題になるので、ペット動物の糞便の適正な処理を飼主に啓蒙する必要がある。

E. 結論

金沢市内の医療機関で採取した小児下痢症患者の便61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、2002年の全国の届出総数はクリプトスポリジウム症108例、ジアルジア症115例であった。届出は有症者に限られているし、下痢便の原虫検査が行き届いていないので、実際の感染者数はかなり多いものと考えられる。ペットショップで市販されているイヌ、フェレット、オカメインコからも両原虫は高率に検出された。遺伝子型の解析結果から、ヒトへの感染性は低いものと想定されるが、水道原水の汚染源になるので水質検査の際には注意を要する。ヒトおよび動物における両原虫感染の疫学調査をさらに拡大・継続する必要がある。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Abe N, Kimata I, Iseki M : Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog. J Vet Med Sci 64 (2) : 165-168, 2002.
- 2) Eun-Kyeong Jo, Hyung-Soek Kim, Min Young Lee, Motohiro Iseki, Jae-Ho Lee, Chang-Hwa Song, Jeong-Kyu Park, Tai Ju Hwang, Hoon Kook : X-linked Hyper-IgM syndrome associated with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptococcus neoformans* infections: the first case with molecular diagnosis in Korea. J Korean Med Sci 17(1) : 116-20, 2002.
- 3) Abe N, Sawano Y, Yamada K, Kimata I, Iseki M : *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. Vet Parasitol 108:185-193, 2002.
- 4) Abe N, Kimata I, Iseki M : Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci 65 (1) : 29-33, 2003.
- 5) 阿部仁一郎、木俣 勲、井関基弘 : 分子生物学的手法を用いた *Cryptosporidium* の種および遺伝子型鑑別法の比較と文献的考察. 感染症誌 76 (10) : 869-881, 2002.
- 6) 町田聡子、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊 : 重症複合免疫不全マウスによるオゾン処理した *Cryptosporidium parvum* オーシストの感染性評価. 環境技術 31 (6) : 473-479, 2002.

学会発表

- 1) 井芹 寧、森 雅佳、木俣 勲、藤本健二、池田暁子、井関基弘 : 噴射衝撃による水質浄化システムの開発. 第2回環境技術研究協会年次大会 (2002.6.14, 大阪)
- 2) 国友新太、大保忠司、佐々木賢一、五十嵐千秋、須田康司、鴻野 卓、木俣 勲、井関基弘 : パルス放電処理によるクリプトスポリジウムの不活化. 第53回全国水道研究発表会 (2002.5, 群馬)

分担研究報告書 2

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

研究協力者 秋山美穂、都築英明、奥村正直、板垣朝夫

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(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)

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（国立感染症研究所 感染症情報センター）

研究協力者：秋山美穂（国立感染症研究所 感染症情報センター）

都築英明、奥村正直（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

国内のヒトおよび各種動物から分離されたクリプトスポリジウムの 18s rRNA 部分の遺伝子解析を UPGMA 法で行ったところ、PCR 法のプライマー ba+84/ba-620 で増幅された部分については 4 つの型別に分けられ、ウシ、ヒト、ネコ、ネズミでそれぞれ異なったクラスターに属すると考えられた。

プライマー 18Shu+1130/18Shu-1729 で増幅されたものでは系統樹の初めの分岐で *C. parvum* と *C. muris* に分けられ、ウシ由来のものは ba よりも型別に優れていたが、ヒト由来では劣っていた。

クリプトスポリジウム汚染にかかわる健康リスク評価として、地域の高齢者下痢症患者 106 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されている河川水、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採取し、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、この地域にはクリプトスポリジウム汚染が無かったものと判断された。

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、野生動物等の報告もなされている。水道水汚染に際してクリプトスポリジウムの由来動物、感染経路の解明が迅速に行わなければならない。クリプトスポリジウム感染源の特定にはわが国におけるヒトのみならず各種動物の遺伝子配列を明らかにしておくことが極めて重要である。また、感染経路、伝播の解明には分子疫学的解析が有効な手段である。最も優れた分子疫学的解析方法を予め検討することが水道水によるクリプトスポリジウム汚染による健康被害発生に対しての感染源特定、感染部拡大防止策を行う当たり、極めて貴重なデータを提供できると考えてい

る。今回はクリプトスポリジウムの 18S 領域の遺伝子配列の決定とクリプトスポリジウムの遺伝子型別が行えるという 3 つの方法が報告されているものについて検討した。

また、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、その河川水が流入している海域を調査する代わりに養殖しているホタテ貝を検査し、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および海域のクリプトスポリジウム汚染の関連性を明らかにすることを目的とした。

1. 国内のヒトおよび各種動物から分離されたクリプトスポリジウムの遺伝子解析および遺伝子型別成績

a. 研究目的

国内のヒトおよび各種動物から分離されたクリプトスポリジウムの 18s rRNA 領域の遺伝子配列を調べ、ヒト、動物による特徴のある配列を見出すことを目的とした。

また、クリプトスポリジウムのヒトと動物との区別が可能であるという報告がなされているので、その 3 つの方法について、有効性を検討した。

b. 研究材料および方法

検査材料は、ヒト 7 件、ウシ 17 件、ブタ 1 件、イヌ 1 件、ネコ 2 件、ネズミ 2 件、計 30 件のクリプトスポリジウム陽性便を用いた。

ふん便からショ糖遠心沈殿浮遊法により回収したクリプトスポリジウムの DNA 抽出方法は本研究の平成 12 年度に報告した方法で実施した。

PCR 法は 18S rRNA 領域をコードする部分で設定したプライマー ba+84[5' -AACTGCGAATGGCTCATTAT-3']/ba-620[5' -ACAGAAATCCAACCTACGAGC-3'] (以下 ba)、18Shu+1130[5' -TTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAG-3']/18Shu-1729[5' -TACGGAAACCTGTGTACGACTTCTC-3'] (以下 Shu) を用いた。PCR 法による増幅産物はダイターミネーター法で塩基配列を決定し、ba は 18S rRNA の 110-589、Shu は 1079-1634 の部分を UPGMA 法で解析し系統樹を作成した。

遺伝子型別は、L1B13 は Widmer の方法¹⁾、CWU は Patel の方法²⁾、GAG は Caccio の方法³⁾を文献に従い行った。

c. 研究成績

18S rRNA 領域の遺伝子解析および型別結果は表 1. に示した。

ヒト由来のクリプトスポリジウム 7 件のうち、18S rRNA の配列の ba 領域(Cry)では 2 つの遺伝子型 (Cry-1, 2) に分けられ、4 件が Cry-1、2 件が Cry-2 で、1 件は PCR 陽性であったが、DNA 量が少なく遺伝子配列を決められなかった。3 つの型別検査を行うことができた 2 件(Cry-1)は L1B13, CWU, GAG で動物型と判定された。また、Cry-2 であっ