

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 クリプトスポリジウム症患者の感染に関与する要因等

症例	性別	年代	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	20	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	10	下痢	バングラデッシュ、 インド	関西、 神奈川県内	水道水	食堂の水、 井戸水(海外) 水道水(関西)、 湧水(県内)	なし	海外であり	
3.	男	20	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与する要因等

症例	性別	年代	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	40	下痢、腹痛、 悪心、嘔吐、発熱	なし	オトキャンプ 他に海釣り	水道水 (浄水器)	飲用なし	イヌ	スイミングクラブ	キャンプ 同行者に下痢なし
2	女	70	軟便	ハワイ (2年前)	栃木県	水道水	井戸	なし	あり	健康診断で陽性
3	男	30	下痢 (水様)	ケニア	不明	水道水	不明	なし	あり	
4	女	60	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	40	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	30	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	30	下痢、腹痛 (水様)	なし	なし	水道水	—	ネコ	なし	レタス、 キャベツ生食
9	女	10	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	30	下痢 (水様)	なし	なし	水道水	—	イヌ	プール	
11	男	50	下痢 (水様) 腹痛	台湾	なし	不明	—	なし	なし	氷入り飲み物
12	男	20	下痢 (水様)	インド	なし	不明	井戸水、氷	なし	なし	屋台で食事
13	男	20	下痢 (水様)	台湾	なし	不明	不明	不明	不明	台湾へ留学 同性愛者
14	女	20	発熱、軟便	インド	なし	不明	生水	不明	ガンジス川 で水泳	赤痢に感染 屋台で食事
15	男	20	下痢 (泥状)	インド	なし	不明	不明	不明	不明	露店で食事

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、河橋幸恵

## 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)

河橋幸恵(埼玉県衛生研究所 地域保健)

### 概要

当該研究は、給水地域住民の血清抗体価調査を通して、水道水中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、前年度の研究で確立したELISAを基本に、血清試料としては国内第2例目となった埼玉県O町集団感染事例血清を加え、ELISAの実用性を中心に検討を進めた。

IgG 低抗体価であった感染初期血清の IgM 抗体価は感染との関係が明確ではなく、抗体陽性/陰性の境界が設定できなかつたことで、初期診断マーカーとしての有用性は見られなかつた。また、一般健常者血清の IgM 抗体価は IgG 程度に低く、感染を示唆する結果は得られなかつた。C. parvum の抗原特異性について、ヒト型およ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型クリプトスポリジウム感染を検査できるという実用性が示された。O町集団感染事例に関する解析結果として、感染初期および感染1ヶ月に採取された O 町のペア血清は、顕著な IgG 抗体価の上昇を示し、感染と IgG 抗体価の関係が明確となった。また、O町においてランダムにサンプリングされた感染初期、1ヶ月後ならびに1年後の血清抗体価は、1ヶ月後をピークに、その後低下を示し、集団感染後の対応措置によりクリプトスポリジウム感染のリスクが大きく低減したことを表していた。

### A. 研究目的

原虫類による水源汚染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、汚染に係る健康リスクを評価する。前年度、国内第一例のH市集団感染事例に関してELISAによるIgG抗体調査を行い、患者における高IgG抗体価を確認し、さらに同ELISAにより一般の健常者においては抗体陽性率が低いことを明らかにした。また調べた地域に関しては、水源の汚染状況、または汚染要因としての畜産の振興は、抗体価との関係を認めなかつた。本年度は、国内第2例目となったO町集団感染事例において経時採取された血清も利用して、IgM抗体価、ELISAの抗原特異性、IgG抗体価の経時的変化を調べることにより、ELISAの実用性を詳細に検討するとともに、O町集団感染事例の血清疫学的解析を行った。

### B. 研究方法

材料および方法

#### 被検血清

集団感染に関連した血清として、前年度と同様、平成6年の神奈川県H市で起きた集団感染事例に関連した血清(以下H市血清と略す)、ならびに、平成8年の埼玉県O町で起きた集団感染事例に関連した血清(以下O町血清と略す)を用いた。その他に、感染血清として、散发発症例の患者の血清も用いた。また、前年度と同様に、埼玉、栃木、福井、兵庫、高知ならびに鹿児島県にて採取された一般健常者血清を用いた。

## ELISA 抗原

前年度と同様のウシ由来のクリプトスポリジウムのスポロゾイト抽出抗原を用いた。また、本年度はヒト由来のクリプトスポリジウムを用いて、同様な抽出方法によりそのスポロゾイト抽出抗原を調整し、合わせて実験に供した。

## 原虫の精製

抗原材料には、抗原の必要量、均一性の確保の点を考慮し、多量の材料確保が保証できる仔牛由来オーシストを用いることとした。なお仔牛下痢便材料は岩手大学農学部板垣匡教授より分与頂いた。また、東京都清瀬小児科病院増田剛太院長より分与頂いた免疫不全患者便を用いてオーシストを分離しヒト由来オーシストとして、抗原性の比較実験に供した。

オーシスト精製は酢酸エチルによる脱脂操作と塩化セシウムによる比重遠心法を組み合わせ、脂肪分が多くシヨ糖浮遊法では十分な精製ができなかった仔牛下痢便からも高純度のオーシストが得られるように工夫した。

なお、上記2種類のオーシストについては、ポリスレオニン遺伝子ならびに18Sr RNA 遺伝子の解析から、ウシ由来オーシストは遺伝型として *C. parvum* 動物型 (genotype 2)、一方、ヒト由来オーシストは *C. parvum* ヒト型 (genotype 1) であることを確認した。

- 1) 患者/患畜下痢便1ml に脱イオン水7ml および酢酸エチル 2ml を加え、15 秒間激しく液を混和
- 2) 1,500g、10 分間遠心
- 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  $\mu$  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  $\mu$  l を静かに重層
- 6) 12,000rpm、3 分間、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  $\mu$  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) 1,500g、10 分間、4°C で遠心
- 9) 上清を除去し、沈渣を得る

## 抗原の調整

高度に精製したオーシストを脱囊処理し、スポロゾイトを放出させた後、その浮遊液を直接超音波処理することで細胞粗抽出液を調整した。

- 1) 前処理液: HBSS に 1 規定の塩酸を加え pH2.8 に調整する。脱囊液: 10ml の HBSS 胆汁酸 150mg、トリプシン 50mg を添加 (30 分以内に使用)
- 2) 前処理液 1ml にオーシスト浮遊液を 100  $\mu$  l 加え 37°C、5 分間保温
- 3) 1000xg、4°C、10 分間遠心
- 4) 上清を 100  $\mu$  l 程度残したところに脱囊液を 1ml 加え、沈渣を再浮遊
- 5) 37°C、1 時間保温
- 6) 浮遊液に HBSS を 1ml 加え攪拌後、1000xg、4°C、10 分間遠心
- 7) 上清を除去し、100  $\mu$  l 程度の HBSS に再浮遊
- 8) 顕微鏡にて脱囊を確認後、-80°C で凍結保存
- 9) ある程度細胞数が溜まったところで、氷冷しながら凍結保存試料を溶解し、 $10^7 \sim 10^8$  の細胞を一つの試験管にまとめ、4°C にて遠心分離し上清を回収

10) 上清中の蛋白質濃度を吸光度計により測定  
ELISA による抗体測定

本年度は、検出用 2 次標識抗体として、抗ヒト IgG-パーオキシダーゼ標識抗体 (ICN,#55221) ならびに抗ヒト IgM-パーオキシダーゼ標識抗体 (ICN;#55255) を用いた。なお、これらの標識抗体の使用条件は、前年度の報告にあるとおりである。また、これまで用いていた BSA/T 溶液は非特異反応を抑制する効果が弱いことから、ブロッキング剤としてカゼインタンパクを成分とする溶液に変更した。なお、抗体希釈はこの溶液を用いた。

- 1) 粗抽出抗原を炭酸緩衝液で  $5\mu\text{g}$  蛋白質/ml に調整し、その  $50\mu\text{l}$  をマイクロプレートの各ウェルに入れ一昼夜、 $4^{\circ}\text{C}$  で吸着
- 2) 洗浄液  $250\mu\text{l}$  で 3 回洗浄
- 3) ブロッキング溶液  $250\mu\text{l}$  を加え、2 時間、 $37^{\circ}\text{C}$  にて保温
- 4) 洗浄液  $250\mu\text{l}$  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  $50\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに添加 (各検体あたり 2 ウェルを使用)
- 6) 1 時間、 $37^{\circ}\text{C}$  で保温 (1 次反応)
- 7) 洗浄液  $250\mu\text{l}$  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 (ICN) あるいは同標識抗ヒト IgM (ICN) を  $50\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに添加
- 9) 1 時間、 $37^{\circ}\text{C}$  で保温 2 次反応)
- 10) 洗浄液  $250\mu\text{l}$  で 5 回洗浄
- 11) 酵素基質液  $100\mu\text{l}$  を各ウェルに加え、 $37^{\circ}\text{C}$  にて発色
- 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

### C. 研究結果

#### 1、H市血清および一般健常者におけるIgM抗体価

ELISAによりIgG抗体陽性が認められたH市血清(感染およそ18日後に採取)、および一般健常者の血清に関するIgM抗体価測定結果を表-1および表-2に示した。

表-1、H市血清におけるIgM抗体価測定結果(IgG抗体価は前年度結果)

氏名	摂食日	発症日	血液採取日	Cp検査結果	症状	OD/IgM	OD/IgG
A	8/26	8/31	9/12	検査なし	有り	0.258	0.557
B	8/26	8/31	9/12	不検出	有り	0.205	1.266
C	8/26	9/1	9/12	不検出	有り	0.186	1.606
D	8/26	9/2	9/12	不検出	有り	0.125	0.953
E	8/26	9/2	9/12	検査なし	有り	0.334	1.358
F	8/26	9/1	9/12	検出	有り	0.056	0.161
G	8/26	9/2	9/12	検出	有り	0.405	1.771
H	8/26	9/1	9/12	検査なし	有り	0.231	0.657
I	8/26	8/31	9/12	不検出	有り	0.233	1.791
J	8/26	8/31	9/12	不検出	有り	0.164	1.730
K	8/26	9/1	9/12	不検出	有り	0.175	1.008
L	8/26	9/2	9/12	不検出	有り	0.235	0.805
M	摂食せず		9/12	検査なし	無し	0.026	0.087
N	摂食せず		9/12	検査なし	無し	0.044	0.114

表-2、一般健常者の血清におけるIgM抗体価測定結果(IgG抗体価は前年度結果)

県名	試料数	抗 Cp IgM 抗体価		抗 Cp IgG 抗体価	
		平均 OD 値	平均+2SD	平均 OD 値	平均+2SD
兵庫	126	0.072	0.158	0.097	0.165
埼玉	229	0.095	0.213	0.119	0.269
栃木	169	0.079	0.179	0.100	0.212
福井	26	0.103	0.209	0.136	0.262
高知	247	0.096	0.204	0.088	0.180
鹿児島	38	0.106	0.214	0.105	0.185

H市血清では、有症者12名のOD値は全般に低く(0.056~0.405、平均0.361、SD=0.090)、飲食をしなかった無症状者2名では0.05以下(0.026および0.044)であった。IgG抗体陰性と判断された患者(F)は、IgMについても患者中最低の抗体価(0.056)であり、飲食しなかった者と同レベルであった。前年度調べたIgGの場合とは異なり、全体的にIgMにおける抗体価分布は低く、か



つ陽性と陰性の差が少ないという結果であった。

一方、一般健常者血清の IgM 抗体価をみると、県による平均 OD 値は 0.072~0.106 であり、概ね IgG の場合と同様であった。6 県全体でまとめると、平均 OD 値=0.089、SD=0.054 となり、平均値+2SD は 0.197 と計算された。この値を H 市患者血清の OD 値と照し合せると、有症者 12 名中 5 名は抗体陰性と判断され、血清 IgM 抗体価から感染を判断することは難しいことが示された。

## 2、ELISA における抗原特異性

本年度、ヒト型クリプトスポリジウム感染事例(O町)ならびに動物型感染事例(H市)より採取された2種類の感染血清、および各遺伝型の *C. parvum* より調整した抗原を用いることが可能となったことから、クリプトスポリジウムの抗原特異性、即ちクリプトスポリジウムの遺伝型と抗原性の関係を検討した。*C. parvum* の感染事例では、ヒト型(genotype1)ならびに動物型(genotype2)の2つの遺伝型がヒト感染事例のおよそ半数づつを占めていることから、同一抗原(ヒト型あるいは動物型)で両方の遺伝型クリプトスポリジウムの感染血清を検査可能とすることが、ELISA の実用性を考える上で重要である。図-3 に H 市血清を2種類の抗原を用いて調べた結果、図-4 には O 町血清を同様にして調べた時の結果を示した。

図-1、H 市血清に対するヒト型および動物型クリプトスポリジウム抗原の反応性

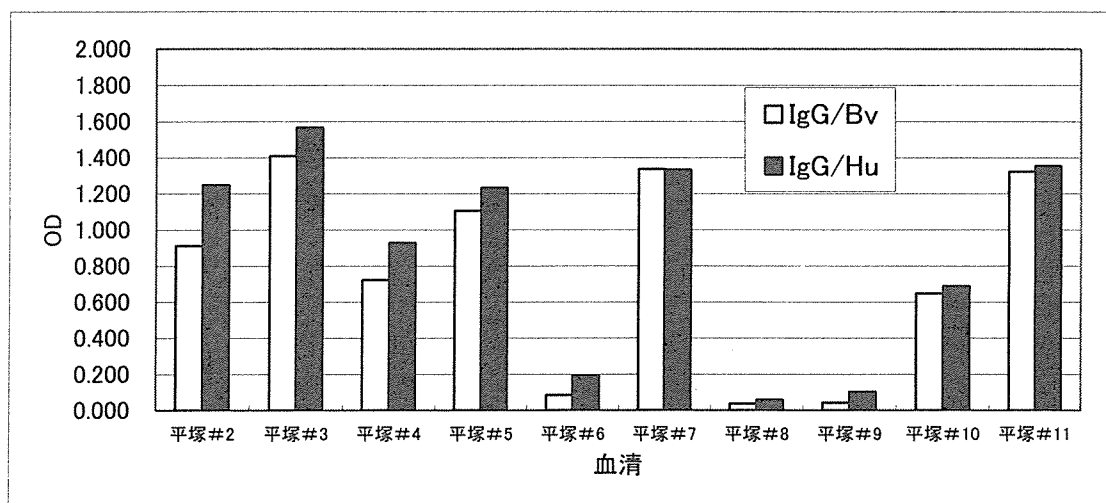
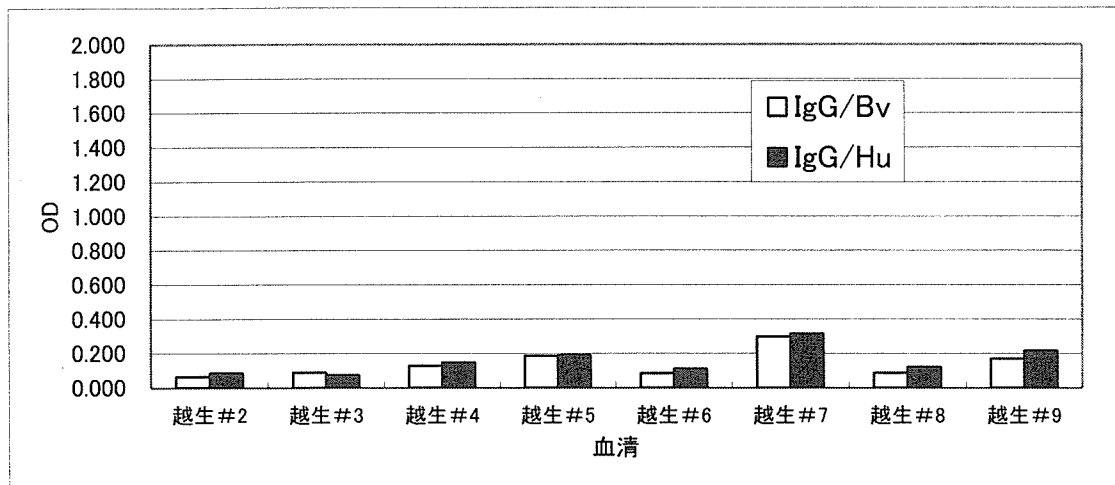


図-2、O 町血清に対するヒト型および動物型クリプトスポリジウム抗原の反応性



動物型クリプトスポリジウム感染事例で得られた H 市血清は、クリプトスポリジウムの動物型抗原 (Bv) とヒト型抗原 (Hu) の間で、ほぼ同様の反応性を示し、抗原の遺伝型の違いは抗体の陽性 / 陰性結果には影響しないことが明らかとなった。特に #5 の血清は、有症者でありながら、動物型抗原を用いた時に OD が陰性群と変わらないという症例の血清であったが、抗原がヒト型でも反応性は動物型と同じことが確認されたことで、その低抗体価の理由は、個人の免疫学的な特性に求められるものと思われた。

ヒト型クリプトスポリジウム感染事例で得られた O 町血清は、6月20日に採取されたもので、これは本集団感染における患者数の推移で見られた 2 回目のピークに相当する時期であった。なお、#5~9 は本集団感染患者より分離したオーシストを抗原として用いた間接蛍光抗体法により、抗体陽性 (>x40) と判断された血清であった。1回目の患者ピークは6月10日で学童主体であり、2回目は成人主体という調査結果が得られており、本研究で用いた成人由来血清は6月20日前後発症の血清と推定される。即ち、感染後日数は H 市の事例からみて、およそ 1 週間と想定される。これらの血清 IgG 抗体価は、H 市の感染血清と比較して全体に低く、間接蛍光抗体法により陽性と判断された血清も含め、ほとんどが抗体陰性の範囲にあった。しかし、抗原性が異なっても抗体価は変わらないことから、H 市血清の場合と同様、抗原の違いによる ELISA の反応性への影響は認められず、抗原特異性はほとんどないという結果を得た。

### 3、O 町ペア血清における抗クリプトスポリジウム抗体価測定結果

予備的に調べた O 町血清では全般に低抗体価が示されたことから、感染と抗体価の関係を確認するために、同一患者より採取されたペア血清を用いて抗体価の変動を調べた。表-3 に用いたペア血清 10 名分の疫学データを示した。年齢は 22~36 歳。1名を除き、下痢、腹痛、発熱等の自覚症状があった。1回目の採血は6月20、21日に行われており、2回目の採血は、1回目の採血から約 1 ヶ月後、ほぼ集団感染が沈静化した 7 月 19 日に行われた。なお、被検血清に関しては、間接蛍光抗体法により2回目採血時においてほとんどの患者の抗体価上昇が認められている。

表-3、〇町ペア血清の疫学データ

試料番号	性別	年齢	オーシスト IF	採血日	症状
1-1	男	28	<20	6.20	あり
1-2			160	7.19	
2-1	女	22	<20	6.20	あり
2-2			<20	7.19	
3-1	女	29	40	6.20	あり
3-2			80	7.19	
4-1	男	35	40	6.20	あり
4-2			80	7.19	
5-1	女	23	<20	6.20	あり
5-2			80	7.19	
6-1	男	28	20	6.20	あり
6-2			320	7.19	
7-1	男	35	20	6.20	あり
7-2			80	7.19	
8-1	女	36	20	6.20	なし
8-2			160	7.19	
9-1	女	31	20	6.20	あり
9-2			160	7.21	
10-1	女	36	40	6.21	あり
10-2			160	7.19	

図-3には、抗原としてウシ由来抗原を用いた時の、ペア血清における IgG 抗体価測定結果を示した。1 回目採血の OD 値は 0.174~0.486 であり、前年度の H 市血清抗体価測定結果から設定されたカットオフ値 OD=0.3 を参考にすると、OD>0.3 となる抗体陽性試料は 2/10 試料のみであった。これに対し、2 回目採血の OD 値は 0.401~2.442 と無症状者 1 名を含むすべての血清で 0.3 を超えて強抗体陽性を示した。2 回目 OD / 1 回目 OD の値は最大で 17.3、最小でも 2.2 となり、クリプトスポリジウム感染による IgG 抗体価の上昇は顕著であった。

図-4には、ペア血清における IgM 抗体価測定結果を示した。1 回目採血は感染およそ 1 週間後と想定されるが、その時点での OD 値は 0.103~0.360 であり、IgG の結果と大きく変わらず、感染血清ではあるが全般に抗体価は低値を示した。OD 値は 2 回目採血時においても 0.183~0.536 で、2 回目 OD / 1 回目 OD の値は最大で 3.6 に止まった。Cp 感染による抗体価は上昇を認めるものの、その割合は IgG と比較して大きく減ずることが示された。IgM の場合、1 回目採血の低抗体価は感染直後の一過性の上昇の後に続く低値と見るよりは、感染に対する免疫反応性そのものが弱いことが原因と推察された。

図-3、O町抗クリプトスポリジウム・ペア血清 IgG 抗体価測定結果

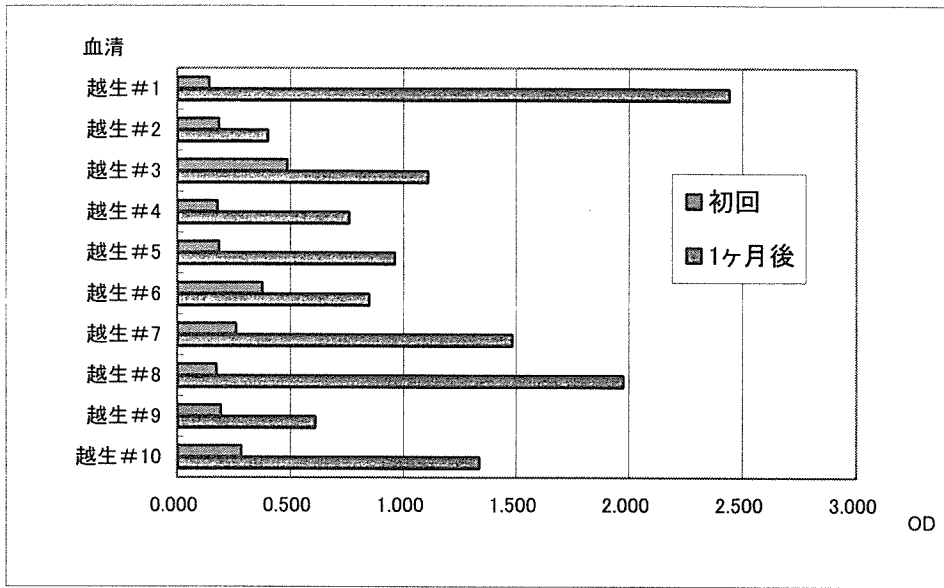
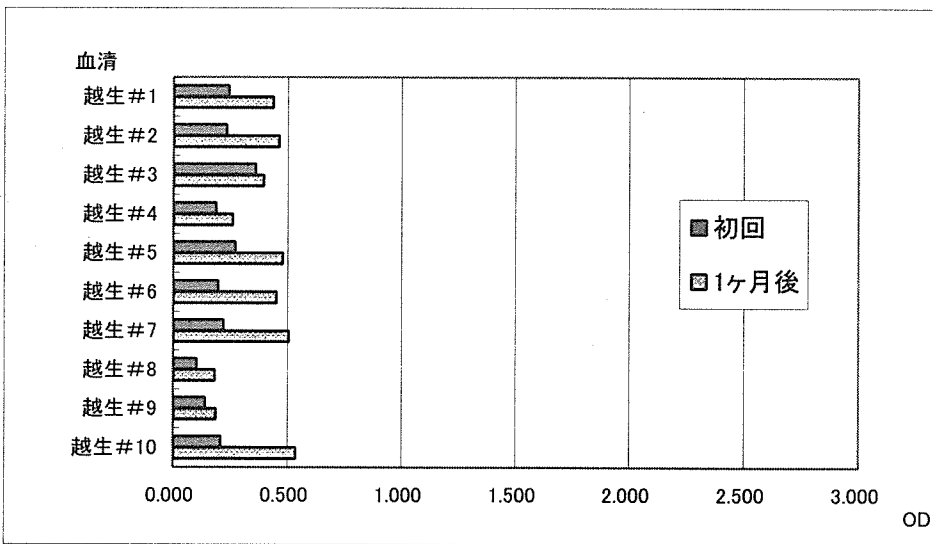


図-4、O町抗クリプトスポリジウム・ペア血清 IgM 抗体価測定結果



#### 4、O町感染事例における IgG 抗体価の経時変化

ペア血清において顕著な抗体価上昇が認められたことから、次に集団におけるクリプトスポリジウム感染後の IgG 抗体価の経時変化を明らかにする目的で、O町の特定地域において、集団発生直後(6月15日～26日)、1ヵ月後(7月15～21日)および1年後(翌年6月25日～7月9日)の3つの時期に不作為に採取された血清を調べた。6月15日～26日は、第1回目の患者数ピーク(6月10日頃)の後に現われた第2のピーク(6月19日頃)の前後5日間程度にあたる。

各時期につき30試料を調べた結果を図-5および図-6に示した。第1回目の患者ピーク後の血清は、平均年齢36.0歳(8歳～71歳)で16歳以下の学童・学生を6名含み、OD値は0.161～1.052(平均OD値0.435、SD=0.208)を示した。1ヶ月後の血清は、平均年齢42.6歳(10歳～86歳)で16歳以下の学童・学生は2名含み、OD値は0.384～1.815(平均OD値0.962、SD=0.406)

を示し、すべての血清は 0.3 を超えた。集団感染 1 年後の血清は、平均年齢 55.9 歳 (24 歳~74 歳) で 16 歳以下の学童・学生は 0 名であった。OD 値は 0.201~1.109 (平均 OD 値 0.484、SD=0.190) へと低下し、ほぼ 1 年前の感染直後のレベルに戻った。

図-5、O 町感染事例における IgG 抗体価の経時変化

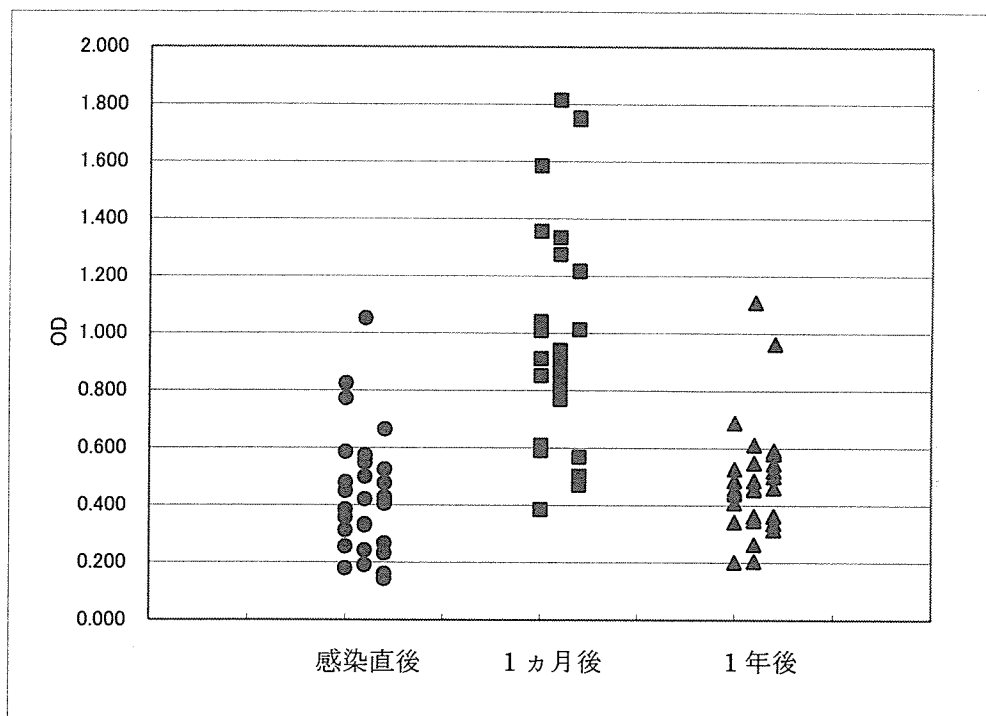
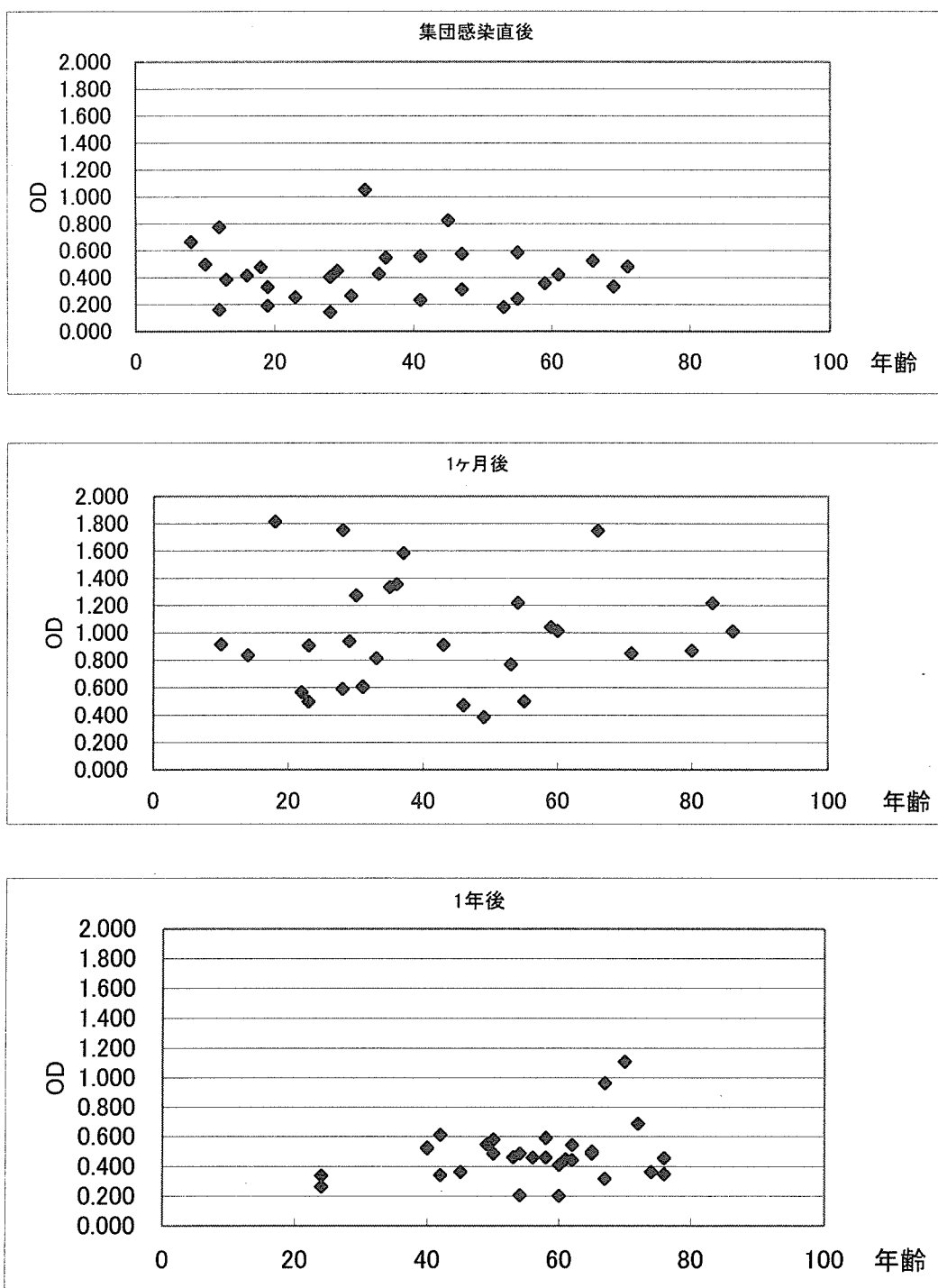


図-6 には、各血清採取時期における血清提供者と年齢との関係に関して、時期別にまとめた結果を示した。第 1 回目の患者数ピーク、即ち 6 月 10 日以後、およそ 2 週間にかけて採取された血清の抗体価は、学童に限らず既に全年齢層で高い傾向にあった。ペア血清で調べた試料の採取地域は不明であるが、その抗体価が採取時低かったことを考えると、当該の調査地域では、集団感染の最も早い時期に住民全体で感染が生じたという可能性があり得る。1 ヶ月後の血清は全年齢層で抗体価の上昇が認められ、ペア血清の検査結果を追試する結果となった。さらに 1 年後の血清は、学童年齢がなく、ほとんどが 40 歳を超える点で他の 2 つの時期と年齢構成が異なるが、調べた限りで年齢による差は特に見られなかった。ただし、全体としてやや高い抗体価を示しており、完全には抗体が陰性化していない可能性も示された。

図-6、O町血清の血清採取時期による血清提供者年齢とIgG抗体価の関係



#### D. 考察

昨年度、国内のクリプトスポリジウム集団感染に関連したH市の感染血清、ならびに一般健常者から提供のあった血清を用いることで、抗クリプトスポリジウムIgGに関するELISA法を確立した。本

年度は、さらに感染と抗体価との関係を明らかにすること、ELISA の実用性をしらべることを目的として、1)IgM と感染との関係を明らかにする、2)ELISA の抗原特異性を明らかにする、3)IgG 抗体価の経時的変化を明らかにするとともに、O 町の集団感染に関して血清疫学的検討を加えた。

IgM は、一般に感染初期の免疫反応としてウイルス感染などでは知られ、その診断価値が認められている。クリプトスポリジウム感染の場合は、ボランテアに対する感染実験で、初回感染において IgM の上昇、また持続性があることが報告されている。今回、国内で発生した集団感染事例の血清を調べた結果では、IgG ほどには感染との関係が明確ではなかった。また、一般健常者の血清に関しては、高抗体価は認められず、血清採取時点での感染を示唆するような結果は得られなかった。今回感染血清においても弱陽性反応を示した理由としては、既に IgM レベルが低下したか、あるいは IgM の免疫応答が弱いなどの理由が考えられる。今回の調査では、感染のごく初期(3~7日)の血清学的診断の可能性について検討することは不可能であり、IgM の有用性は残念ながら今後の問題として残された。現実的に考えれば、感染との関係、また ELISA の実用性から、血清抗体の検査対象としては IgG に主眼をおくべきものと思われる。ELISA の実用性としては、国内事例を含めヒト Cp 感染のほとんど(特に集団感染)は *C. parvum* のヒト型(genotype1)あるいは動物型(genotype2)のどちらかが原因となっていることから、両遺伝型の感染血清を検査する能力が求められる。本研究では、2 種類の抗原に関しては感染血清の抗原特異性はないという結果が得られており、抗原確保の容易な動物型 Cp 抗原で 2 種類の遺伝型による感染事例を検査できることが示された。

平成 8 年の O 町のクリプトスポリジウム感染事例は、水道水を介する集団感染として患者数およそ 8,000 人を超える大規模事例であった。集団感染当初より原因究明の準備として血清保存が図られたことが幸いし、詳細な血清疫学調査が行われ、間接蛍光抗体法により感染に伴う IgG 抗体価の上昇が認められた。本年度、ELISA により、その感染血清抗体価を調べることは大きな目的であったが、感染による顕著な IgG 抗体価の上昇が起こることをペア血清で確認することができた。またこの結果は、オーシストを用いた間接蛍光抗体検査の結果と概ね一致しており、ELISA の実用性が証明された。なお、感染初期に採取された血清の中には間接蛍光抗体で抗体陽性となる血清が散見されたが、これは、抗原性、即ちスポロゾイト抗原とオーシスト抗原の差に起因するものと考えられた。

抗クリプトスポリジウム IgG 抗体価は、国内の 2 つの事例調査結果から、感染後 3 週間から 1 ヶ月の間に上昇し、O 町の調査結果からは 1 年以内に低下するものと考えられた。集団感染に関連した事例報告で、IgG 抗体価はおよそ 1~3 ヶ月に上昇、ピークを迎え、その後低下していく傾向がみられていることから、高 IgG 抗体価の意味するところは、数ヶ月以前に起きた感染の証左と考えられる。O 町における抗体価変動は、概ねこのようなパターンと一致しており、水道を県水に切替えたことでクリプトスポリジウム暴露が短期間に抑えられたことを反映しているものと推察される。抗体価を経時的に調査した地域では、第 1 回目の採血時で既に高い抗体価が見られたが、これは感染の拡大に地域的な差があったことを示唆するという意味で、興味深い点である。また 1 年後の血清がやや高抗体価の傾向にあったという点に関しては、間接蛍光抗体検査においても同様な結果が認められており、汚染水道水の供給の時間的なズレ、さらには住民の年齢構成など、地域的な特性が抗体価の違いに表れる可能性を示すものと思われる。今回、地域的な抗体価の差までは詳

細な検討に及ばなかったが、血清学的に感染の拡大をトレースし、より詳細な疫学的情報を得ることは極めて有用と思われ、このような点も含め O 町の血清に関しては、さらに詳細な解析が望まれる。なお、抗体価の持続性に関しては、集団感染後、高抗体価が 2 年半に渡って続いた事例も報告されており、これには事例後の浄水場の不十分な施設改善による持続的なクリプトスポリジウム暴露の可能性が指摘されている。O 町に関しては、原因究明後、直ちに給水が県水に切替えられたことで集団感染は終息し、その後感染リスクが大きく低下したことは、本研究でも得られた血清抗体価調査結果が実証した。血清疫学的なモニタリングは実用的な健康リスク評価の手段であり、これからの水道事業のリスク管理に極めて有益であると考えられる。

## E. 結論

国内で発生した2件の集団感染事例を血清疫学的に調査し、ELISA がクリプトスポリジウム感染を判定する手段として有用、かつ実用的であることが確認された。集団感染発生直後の原因究明に応用するには、さらに多くの事例解析を要するが、事例後数週間の時点で、あるいは継続的なモニタリングをとおして、感染の有無を確認する手段としては信頼性の高い情報を提供するものと思われる。国内の一般健常者の抗体陽性率は諸外国と比較するとかなり低いところにあるが、これまでの調査結果を見る限り、実際的に低い感染リスクを反映していると考えて良いものと思われる。

## 参考文献

1. Frost, F.J., Calderon, R.L., Muller, T.B., Curry, M., Rodman, J.S., Moss, D.M. and Cruz, A.A. (1998), A two-year follow-up survey of antibody to *Cryptosporidium* in Jackson County, Oregon following an outbreak of waterborne disease. *Epidemiol. Infect.*, **121**, 213-217.
2. Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Caillies, J.Z., Camus, D. and Dei-Cas, E. (2001), Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3472-3480.
3. 黒木俊郎、渡辺祐子、浅井良夫、山井志朗、遠藤卓郎、宇仁茂彦、木俣勲、井関基弘 (1996)、神奈川県内で集団発生した水系 *Cryptosporidium* 症、*感染症学雑誌*, **70**, 132-139.
4. McDonald, A.C., Kenzie, W.R., Addiss, D.G., Gradus, M.S., Linke, G., Zembrowski, E., Hurd, M.R., Arrowood, M.J., Lammie, J.P. and Priest, J.W. (2001), *Cryptosporidium*-specific antibody responses among children residing in Milwaukee during the 1993 waterborne outbreak. *J. Infect. Dis.*, **183**, 1373-1379.
5. McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, Z. and Nichol, G.L. (2000), Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. In the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. In 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3984-3990.
6. Moss, D.M., Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., DuPont, H.L., Arrowood, M., Hightower, A.W. and Lammie, P.J. (1998), The antibody response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigen following experimental infection in humans. *J. Infect. Dis.*, **178**, 827-833.



7. Priest, J.W., Kwon, J.P., Moss, D.M., Roberts, J.M., Arrowood, M., Dworkin, M.S., Juranek, D.D. and Lammie, P.J.(1999), Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J. Clin. Microbiol.*, **37**,1385-1392.
8. Priest, J.W., Li, A., Khan, M., Arrowood, M., Lammie, P.J., Ong, C.S., Roberts, J.M., and Renton, J. (2001), Enzyme immunoassay detection of antigen-specific immunoglobulin G antibodies in longitudinal serum samples from patients with cryptosporidiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**,415-423.
9. 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
10. 山田文也、生嶋昌子、河橋幸恵、山本徳栄、大関瑤子、羽賀道信(1998)、*Cryptosporidium parvum* による集団下痢症発生 1 年後の血清学的調査について. 埼玉県衛生研究所報, **32**,67-70.
11. 山田文也、生嶋昌子、河橋幸恵、大関瑤子、田邊博義(1999), 一般住民を対象としたクリプトスポリジウム抗体調査. 埼玉県衛生研究所報, **33**,63-65.

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

誌上発表

1. 泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎. フローサイトメトリーによるジアルジア (*Giardia lamblia*) 脱嚢活性の迅速評価法. *Cytometry Research*. 10(2):25-30, 2000.
2. Kenji Yagita, Shinji Izumiyama, Hiroshi Tachibana, Gouta Masuda, Motohiro Iseki, Koji Furuya, Yosuke Kameoka, Toshiro Kuroki, Tadashi Itagaki and Takuro Endo. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitology Research*. 87:950-955, 2001.
3. Kazuo Ono, Hidetaka Tsuji, Shiba K. Rai, Akio Yamamoto, Kuniyoshi Masuda, Takuro Endo, Hak Hotta, Takashi Kwamura and Shoji Uga. Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(9):3832-3836, 2001.
4. Shinji Izumiyama, Ichiro Furukawa, Toshiro Kuroki, Shiro Yamai, Hiromu Sugiyama, Kenji Yagita and Takuro Endo. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infections in Weaned Piglets and Fattening Porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease*. 54:23-26, 2001
5. 小野一男、辻 英高、島田邦夫、増田邦義、遠藤卓郎. 河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況. *感染症学会誌*. 75(3):201-208, 2001.
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. 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. *日本臨床寄生虫学会誌*.

- 12(1):89-91, 2001.
7. 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。家畜および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, 2001.
  8. 泉山信司、八木田健司、佐野 茂、遠藤卓郎。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 (242-247), 2001.
  9. 泉山信司、古川一郎、黒木俊郎、八木田健司、遠藤卓郎。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 (471-476), 2001.
  10. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司。水系によるクリプトスポリジウムとジアルジア感染の実態。用水と廃水。44(4):14-18, 2002.

#### 学会発表

1. Matsubayashi, M., Sasai, K., Tani, H., Miyamoto, T., Fukata, T., Yagita, K., and Endo, T. Studies on a Common Epitope Recognition of Cryptosporidium Parasites with Chicken Monoclonal Antibodies to Eimeria. 12<sup>th</sup> Japanese - German Symposium on Protozoan Diseases. Sep. 2000.
2. 八木田健司、泉山信司、橘 裕司、増田剛太、井関基弘、古屋宏二、遠藤卓郎。クリプトスポリジウムの PCR-RFLP 解析による Genotyping。第 60 回日本寄生虫学会東日本大会 2000 年 10 月。
3. 八木田健司、泉山信司、橘 裕司、増田剛太、井関基弘、古屋宏二、遠藤卓郎。PCR-RFLP 解析によるクリプトスポリジウム分離株の Genotyping。第 41 回日本熱帯医学会 2000 年 11 月。
4. 増田剛太、今井顕史、味沢 篤、根岸昌功、井関基弘、遠藤卓郎。旅行者下痢症症例からのクリプトスポリジウム検出 第 11 回日本臨床寄生虫学 2000 年 6 月。
5. 八木田健司、泉山信司、橘 裕司、遠藤卓郎。クリプトスポリジウムの Genotyping。第 1 回環境技術研究会 2001 年 6 月。
6. 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。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 2001 年 10 月。
7. 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。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 2001 年 11 月。
8. 八木田健司、泉山信司、増田剛太、井関基弘、遠藤卓郎。ヒト分離クリプトスポリジウムの分子疫学 2002 年 3 月。

分担研究報告書 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

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 14 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

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

健康な分娩母牛と出生時の子牛の抗 *C. parvum* IgG 抗体価（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 および 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* オーシスの排出がそれぞれ約 1 カ月間、2 カ月間および 3 カ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 および 2 カ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 および 4 カ月齢の感染子牛の抗体価は、2 週齢の健康子牛、1 および 2 カ月齢の感染子牛に比べて有意な高値を示した。

2. 子牛における *C. parvum* の感染動態に関する実態調査

2-A. 研究目的

子牛の *Cryptosporidium* 感染症の多発農場においては、哺育期（生後約 3 カ月間）に *C. parvum* が感染・発症した場合に激しい下痢症を引き起こす。哺育期には抗 *C. parvum* IgG 抗体は母牛の移行抗体と感染抗体の混在により複雑な変化を示すと考えられている（北野ら，1991）。子牛の *C. parvum* の感染動態を調査するために、まず健康な分娩母牛と新生子牛の血清抗体価を調査し、次に *C. parvum* 感染子牛の同一個体について血清抗体価とふん便の *C. parvum* オーシストの経時的調査を行った。

2-B. 研究方法

*C. parvum* による下痢症が多発する 1 農場で、初乳を摂取した黒毛和種の *C. parvum* 感染子牛 28 頭を対象とした。下痢便を認めた新生子牛の血清とふん便を約 1 カ月間毎に 4 回採取した。また 2 農場において分娩