

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等による水系感染症に係わる
健康リスク評価及び管理に関する研究

平成15年度総括・分担研究報告書

平成16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等による水系感染症に係わる健康リスク評価及び管理に関する研究	5
	国包章一
Ⅱ．分担研究報告書	
1． ヒト、イヌ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および分離株の遺伝子型解析	13
	井関基弘、所 正治、阿部仁一郎
2． クリプトスポリジウムならびにジアルジア症の遺伝子型解析と分子疫学的研究	19
	遠藤卓郎、黒木俊郎、八木田健司、泉山信司、加島準子
3． 水源周辺環境に生息する脊椎動物の <i>Cryptosporidium</i> の保有	31
	黒木俊郎、遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、宇根有美、林谷秀樹 森 哲、鳥羽通久
4． 単離した <i>Cryptosporidium</i> オーシストの遺伝子型解析手法の実用化と水環境試料への適用	41
	平田 強、森田重光、橋本 温
5． 河川水中のクリプトスポリジウム濃度変動の実測と水系感染リスクの評価	57
	片山浩之、秋葉道宏、国包章一
6． 下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染リスクの評価	67
	大村達夫、渡部 徹
Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表	75
Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷	79

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

国立保健医療科学院水道工学部主任研究官

秋 葉 道 宏

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

東北大学大学院工学研究科教授

大 村 達 夫

東京大学大学院新領域創成科学研究科講師

片 山 浩 之

摂南大学工学部教授

金 子 光 美

神奈川県立衛生研究所微生物部主任研究員

黒 木 俊 郎

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

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

麻布大学獣医学部

宇 根 有 美

日本寄生虫予防会

加 島 準 子

金沢大学医学系研究科

所 正 治

日本蛇族学術研究所

鳥 羽 通 久

阿南工業高等専門学校

橋 本 温

東京農工大学農学部

林 谷 秀 樹

国立感染症研究所寄生動物部

八木田 健 司

京都大学大学院理学研究科

森 哲

麻布大学環境保健学部

森 田 重 光

東北大学大学院工学研究科

渡 部 徹

総括研究報告書

クリプトスポリジウム等による水系感染症に係わ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 部長

研究要旨 水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に起因する感染リスク評価に関して、感染実態の調査、並びに、その遺伝子型解析と水道水経路による暴露量の評価を行った。ヒトのクリプトスポリジウム等の感染率は、小児下痢症患者に関する限りそれほど高くないことが明らかとなった。国内下痢症患者 43 名より検出されたクリプトスポリジウム分離株の遺伝子型別は、*Cryptosporidium parvum*(*C. parvum*) のヒト型およびウシ型、*C. canis*(*C. parvum* イヌ型)、*C. meleagridis*、*C. felis* が検出され、わが国においても多様な病原種（遺伝子型）の存在が示された。また、免疫学的な状況（免疫不全の有無）によるクリプトスポリジウム検出頻度は、健常者グループの感染者では、上記 5 種が検出されたが、HIV/AIDS 感染を含む免疫不全者グループでは *C. parvum* ヒト型および *C. felis* の 2 種に限って検出され、HIV/AIDS 感染者では *C. parvum* ヒト型のみが検出された。水道水源周辺の環境に生息する爬虫類、鳥類および魚類を調査したが、ウシやブタ等の家畜と比べ、野生動物におけるクリプトスポリジウムの保有率は低いことが明らかとなった。さらに、ペットショップで市販されているイヌからクリプトスポリジウムが高率で検出されたが、遺伝子型の解析結果から、ヒトへの感染性の低いものであることが明らかとなった。一方、本研究で開発した Nested PCR-ダイレクトシークエンス法は、*C. parvum* HNJ-1 株を用いた実験で 100%の陽性率が得ることができ、高感度にクリプトスポリジウムオーシスト 1 個を検出できた。また、本研究で開発した自動試料採取装置を利根川に設置し、経時的に連続して 100L 程度の水の濁質成分を採取することが確認できた。さらに、下水処理水を水道原水の一部として再利用した場合のクリプトスポリジウムの感染リスクは、河川の濁水の程度に応じてその混入率が高くなるものとし、また河川水中のクリプトスポリジウムオーシスト濃度を大腸菌群数の 100 万分の 1 と仮定した場合、年間の下水処理水混入率が 600%・day を超えるとクリプトスポリジウム感染リスクが増加することが明らかとなった。

分担研究者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院水道工学部	主任研究官
	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
	大村 達夫	東北大学大学院工学研究科	教授

片山 浩之	東京大学大学院新領域創成科学研究科 講師
金子 光美	摂南大学工学部 教授
黒木 俊郎	神奈川県立衛生研究所微生物部 主任研究員
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

水道水を介したクリプトスポリジウム感染症の集団発生は、国内外を問わず、世界各地で問題となっている。世界保健機関（WHO）では、クリプトスポリジウムを含む病原微生物による感染症は水道水に関係する最も普遍的で広範囲にみられる健康リスクであるととらえ、ヒトや動物が排泄する糞便が主たる汚染源であるとしている。このような状況の中、水道水の健康リスクを低減し、安全性を確保するためには、クリプトスポリジウム等感染症リスク評価手法を確立することが急務となっている。本研究では、水道水のクリプトスポリジウム等汚染に係わる健康リスクの低減化を図るため、クリプトスポリジウム等の分子疫学的情報に関するデータベースの構築を検討し、水道原水の汚染状況の的確な評価手法、水道水の汚染状況と関連づけた感染リスク評価手法に係わる情報を提供し、これをもって水道水の安全確保と国民の健康増進に貢献するものである。

B. 研究方法

1. 感染実態の調査と遺伝子解析

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中心に153検体の糞便検査を行い、クリプトスポリジウム及びジアルジアの感染状況につき調査した。また、これとは別に国内の下痢症患者43名より検出されたクリプトスポリジウム分離株の遺伝子型別を行い、特に感染者側の因子として免疫学的な状況（免疫不全の有無）による検出頻度を検討した。

このほか、国内の水道水源周辺環境に生息する爬虫類（カメ1頭、トカゲ24頭、ヘビ127頭）、鳥類（カラス14羽、カワウ11羽）、及び魚類（コイ7匹）の感染状況を調査した。また、ペットとして国内への持ち込みが予想されるベトナムの爬虫類（ニシクイガメ32頭、トッケイヤモリ3頭、サンビームヘビ19頭、オオミズヘビ15頭、ヒロクチミズヘビ22頭）、輸入哺乳類のアフリカヤマネ10頭、コロンビアジリス10頭、エゾリス10頭、フトオアレチネズミ5頭、ジュウサンセンジリス10頭、ピグミージェルボア39頭、リチャードソンジリス20頭、シマリス20頭、タイリクモモンガ16頭の感染状況についても調査を行った。また、金沢市内のペットショップで市販されているイヌ42頭の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、分離株の遺伝子解析を行い、ヒトへの感染源としての重要性につき検討した。

2) 単離したクリプトスポリジウムオーシストの遺伝子型解析手法の実用化と水環境試料へ

が検出された。

ペットショップで市販されているイヌからクリプトスポリジウムが高率で検出されが、遺伝子型の解析結果から、ヒトへの感染性の低いものであることが明らかとなった。

本研究で開発した Nested PCR-ダイレクトシーケンス法は、*C. parvum* HNJ-1 株を用いた実験で 100%の陽性率が得ることができ、高感度にクリプトスポリジウムオーシスト 1 個を検出できた。

2. 水道水経路による暴露量の評価

1) 河川水中のクリプトスポリジウム等の濃度変動の実測

本研究で開発した自動試料採取装置を 11 月に利根大堰に設置し、試運転を行ったところ、経時的に連続して 100L 程度の水の濁質成分を採取することが確認できた。その後実際に、11 月 27 日、12 月 26 日、1 月 14 日にそれぞれサンプルを採取した。クリプトスポリジウムおよびジアルジアについては磁気ビーズ法による精製後の状態で冷凍保存してある。化学指標は TOC で多少ばらつきが見られた程度で、ほとんど時間変動はなかった。微生物指標も、1 月のサンプルを除いてほとんど変動は見られなかった。

2) 下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染リスクの評価

下水処理水を水道原水の一部として再利用した場合のクリプトスポリジウムの感染リスクは、河川の濁水の程度に応じてその混入率が高くなるものとし、また河川水中のクリプトスポリジウムオーシスト濃度を大腸菌群数の 100 万分の 1 仮定した場合、年間の下水処理水混入率が 600%・day を超えるとクリプトスポリジウム感染リスクが増加することが明らかとなった。また、DALY（障害調整生存年）を健康指標に用いて、クリプトスポリジウム感染リスクとトリハロメタン類 4 物質による発ガンリスクを比較すると、発ガンのリスクが大きな値となった。

D. 結論

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染の感染リスク評価に関して、感染実態の調査とその遺伝子型解析と水道水経路による暴露量の評価を行った。ヒトのクリプトスポリジウム等の感染率は、小児下痢症患者に関する限りそれほど高くないことが明らかとなった。国内下痢症患者 43 名より検出されたクリプトスポリジウム分離株の遺伝子型別は、*Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) のヒト型およびウシ型、*C. canis* (*C. parvum* イヌ型)、*C. meleagridis*、*C. felis* が検出され、わが国においても多様な病原種（遺伝子型）の存在が示された。水道水源周辺の環境に生息する爬虫類、鳥類および魚類を調査したが、ウシやブタ等の家畜と比べ、野生動物におけるクリプトスポリジウムの保有率は低いことが明らかとなった。一方、本研究で開発した Nested PCR-ダイレクトシーケンス法は、*C. parvum* HNJ-1 株を用いた実験で 100%の陽性率が得ることができ、高感度にクリプトスポリジウムオーシスト 1 個を検出できた。また、本研究で開発した自動試料採取装置を利根大堰に設置し、試運転を行ったところ、経時的に連続して 100L 程度の水の濁質成分を採取すること

が確認できた。さらに、下水処理水を水道原水の一部として再利用した場合のクリプトスポリジウムの感染リスクは、年間の下水処理水混入率が600%・dayを超えるとクリプトスポリジウム感染リスクが増加することが明らかとなった。

本年度は、3ヶ年の研究計画の1年目に当たるので、次年度の研究では、本年度までの研究成果をさらに発展させるとともに、クリプトスポリジウム及びジアルジアに関して、感染源や感染ルート、水道原水の汚染レベル、水道水の汚染状況を関連づけた感染リスク評価の確立を図りたい。

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(予定も含む)

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書 1

ヒト、イヌにおけるクリプトスポリジウムとジアルジアの
感染実態調査および分離株の遺伝子型解析

分担研究者 井関基弘
研究協力者 所 正治、阿部仁一郎

分担研究報告書
クリプトスポリジウム等による水系感染症に係わる
健康リスク評価および管理に関する研究

ヒト、イヌにおけるクリプトスポリジウムとジアルジアの
感染実態調査および分離株の遺伝子型解析

分担研究者 井 関 基 弘 金沢大学医学系研究科
研究協力者 所 正 治 金沢大学医学系研究科
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153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42頭について両原虫の感染状況を調べ、分離株の遺伝子型解析をおこない、ヒトへの感染源としての重要性の有無を考察した。ヒトからは1検体(29歳、男)からクリプトスポリジウムが検出されたが、その感染源と遺伝子型は特定できなかった。一方、2003年の届出患者総数(全国)はクリプトスポリジウム症8例、ジアルジア症99例であった。犬における陽性率はクリプトスポリジウム19%、ジアルジア2.4%で、下痢症状を伴うものではなく、遺伝子型はいずれもイヌ型であった。届出患者数が少ないのは、原虫検査を実施している医療施設が極めて少ないためであり、実際の患者数は届出数よりもはるかに多いものと考えられる。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先進国においても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。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繁に検出されることが明らかになっている。

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、前年に引き続き、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、分離株の遺伝子型解析をおこないヒトへの感染の危険性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小児下痢患者を中心に採取した糞便153検体を対象とした。全国の届出患者数は厚生労働省/国立感染症研究所の感染症週報を参考にした。

イヌの検査は、金沢市内の1ペットショップで市販されている個体のうち、下痢症状の有無に関係なく採取した42頭の糞便材料を対象とした。

糞便検査には、ショ糖遠心浮遊法と、蛍光抗体法（Merifluor™ *Crypto/Giardia* 検出キット，Meridian Bioscience社製を使用）の両法を用いた。ただし、糞便採取量の少ない検体（40検体）については塗抹標本を蛍光抗体法のみで検査した。また、イヌ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、遺伝子型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

ヒトでは153検体中1検体からクリプトスポリジウムが検出された。患者は消化器内科を受診した29歳男性で、診断時には下痢症状を呈していなかったため、届出はなされていない。また、感染源も特定できなかった。一方、2003年の患者届出数はクリプトスポリジウム症8件、ジアルジア症99件であった。都道府県別発生数を表1に示す。ジアルジア症患者は、北海道から沖縄まで、全国に広く分布していることが判る。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（2003年）

	合計	都道府県別
クリプトスポリジウム	8	東京6，大阪1，長崎1
ジアルジア	99	北海道3，宮城1，山形2，福島2，茨木1，栃木1，埼玉2，千葉2，東京29，神奈川19，石川1，山梨3，岐阜3，静岡1，愛知1，京都6，大阪8，兵庫1，奈良2，鳥取2，岡山3，香川1，愛媛1，福岡2，長崎2，熊本1，宮崎1，沖縄1

厚生労働省/国立感染症研究所：感染症週報5(52)，2003

2) ペットショップで市販のイヌにおける感染状況

クリプトスポリジウムは42頭中8頭（19%）から検出された。陽性を示したイヌの齢はすべて3カ月未満のものであり、それ以上の齢の13個体は陰性であった。3カ月齢未満のイヌ29頭の陽性率は28%ということになる（表2）。

ジアルジアは6カ月齢の1頭のみから検出された。前年の調査結果（陽性率25.1%，87/347）に較べて陽性率が著しく低かったのは、ペットショップにおいてジアルジアの治療薬（メトロニダゾール）の投与がなされるようになったためと考えられた。

3) 分離株の遺伝子型

a) クリプトスポリジウム

ヒト検体は糞便採取量が少なく、塗抹標本しか作製しなかったため、遺伝子解析は実施できなかった。イヌからの分離株は *C. parvum* のイヌ型であった。

b) ジアルジア

イヌからの分離株の遺伝子型は Assemblage D に属するイヌ特異的なものであった。

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, 2003)

年齢 (月)	検査頭数	陽性数・陽性率 (%)	
		<i>Crypto.</i>	<i>Giardia</i>
<3	29	8 (28)	0 (0)
≥3	13	0 (0)	1 (8)
合計	42	8 (19)	1 (2.4)

D. 考察

今回検査をおこなったヒトの便 153 検体から検出されたのは、クリプトスポリジウムが1検体のみであったが、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、2003年の全国の届出総数はクリプトスポリジウム症 8 例、ジアルジア症 99 例で、前年の届出数（クリプト 108、ジアルジア 115）に比べて今年はいずれも減少している。

クリプトスポリジウムの場合、今年は前年のような集団感染が発生しなかったことが減少の要因であろうが、実際の感染者数はこの届出数よりもはるかに多いものと推測される。何故なら、下痢患者が受診してもクリプトスポリジウム検査を実施する医療施設が極めて少ないので、感染が見落とされている可能性が高いからである。1997年以降毎年実施しているエイズ日和見原虫症診断の実技研修会を通じて、本症の検査診断能力を身につけた検査技師はすでに多数育成されている。これを活かして日常的に原虫検査を実施するよう、各医療施設に対して指導することが強く望まれる。

ジアルジア症が減少した理由は、SARS の流行やイラク戦争で海外渡航者数が減少したために、輸入感染例が減ったことが一因と考えられる。しかし、そもそも本症には無症状感染者も多く見られることから、実際の感染者数はこの届出数よりもずっと多いはずである。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。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については、前年の調査結果同様、クリプトスポリジウム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で問題になるので、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ヒトの便 153 検体について、クリプトスポリジウムとジアルジアの検査をおこない、1検体からクリプトスポリジウムが検出された。一方、2003年の全国の届出総数は

クリプトスポリジウム症 8 例、ジアルジア症 99 例であった。届出は有症者に限られているし、大きな医療施設においてすら原虫検査の実施が行き届いていないので、実際の感染者数は届出数よりもはるかに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からもクリプトスポリジウムが高率に検出され、昨年よりは減少したもののジアルジアも検出された。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、水道水源の汚染源になるので水質検査の際には注意を要する。今後もヒトおよび動物における両原虫感染の分子疫学的調査をさらに拡大・継続してデータを蓄積する必要がある。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Abe N, Kimata I, Iseki M : Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci 65(1): 29-33, 2003.
- 2) Takashima Y, Xuan X, Kimata I, Iseki M, Kodama Y, Nagane N, Nagasawa H, Matsumoto Y, Mikami T, Otsuka H : Recombinant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) expressing p23 protein of *Cryptosporidium parvum* induces neutralizing antibodies in rabbit. J Parasitol 89:276-282, 2003.
- 3) Abe N, Iseki M : Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. Parasitol Res 89:422-424, 2003.
- 4) Abe N, Takami K, Kimata I, Iseki M: Molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolates from a banded mongoose, *Mungos mungo*. J Parasitol 90 (1):167-171, 2004.

学会発表

- 1) Tokoro M, Iseki M : A novel one-step polymerase chain reaction method for identification of co-infection with different genotypes of *Cryptosporidium*. 11th International Conference of Infectious Diseases, Mexico, Mar. 4-7, 2004.
- 2) 井関基弘, 岡本雅子, 阿部仁一郎 : ペットショップの子犬等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状況と分離株の遺伝子解析. 第72回日本寄生虫学会大会 (2003. 3, 久留米)
- 3) 木俣 勲, 井関基弘 : 市販の糞便内クリプトスポリジウム抗原検出用キット3種の評価. 第72回日本寄生虫学会大会 (2003. 3, 久留米)
- 4) 木俣 勲, 阿部仁一郎, 井関基弘 : 遺伝子型の異なる *Cryptosporidium parvum* オーストの HCT-8 細胞への感染性と紫外線感受性. 第59回日本寄生虫学会西日本支部大会 (2003. 11, 金沢)
- 5) 所 正治, 仲本賢太郎, 野崎智義, 阿部仁一郎, 木俣 勲, 井関基弘 : クリプトスポリジウムのアデノシルメチオニン合成酵素の解析. 第59回日本寄生虫学会西日本支部大会 (2003. 11, 金沢)
- 6) 井関基弘 : クリプトスポリジウム症、サイクロスポーラ症、微孢子虫症—背景とこれからの課題. 第59回日本寄生虫学会西日本支部大会・特別講演 (2003. 11, 金沢)

分担研究報告書 2

クリプトスポリジウムならびにジアルジア症の遺伝子型解析と 分子疫学的研究

分担研究者 遠藤卓郎、黒木俊郎、真柄泰基

研究協力者 八木田健司、泉山信司、加島準子

クリプトスポリジウムならびにジアルジア症の遺伝子型解析と分子疫学的研究

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 微生物部）
真柄泰基（北海道大学 大学院工学研究科）
協力研究者： 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）
加島準子（日本寄生虫予防会）

研究要旨

分子疫学的研究の基礎資料とすべく、下痢症患者 43 名より検出されたクリプトスポリジウム分離株の遺伝子型別を行った。その結果、*Cryptosporidium parvum* のヒト型およびウシ型、*C. canis* (*C. parvum* イヌ型)、*C. meleagridis*、*C. felis* が検出され、わが国においても多様な病原種（遺伝子型）の存在が示された。その検出頻度を見ると、*C. parvum* ヒト型が 29 株と最も高く、ウシ型 7 株、*C. meleagridis* が 5 株とこれに次いだ。

感染者側の因子として、免疫学的な状況（免疫不全の有無）によるクリプトスポリジウム検出頻度を検討した。免疫学的に異常が無いと思われる健常者（健常者グループ）の感染者では、*C. parvum* のヒト型およびウシ型、*C. canis* (*C. parvum* イヌ型)、*C. meleagridis*、*C. felis* の前 5 種が検出された。一方、HIV/AIDS 感染を含む免疫不全者（免疫不全者グループ）においては予想に反し *C. parvum* ヒト型および *C. felis* の 2 種に限って検出された。さらに、興味あることに HIV/AIDS 感染者では *C. parvum* ヒト型のみが検出された。

ポリスレオニン領域の塩基配列の変異から、わが国で最も高頻度に検出される *C. parvum* ヒト型には少なくとも 4 種類の遺伝子亜型（H1～H4）が存在していることが示された。この遺伝子亜型の検出には偏りが認められ、これまでのところ HIV/AIDS 感染者からは H2 のみが検出された。一方、健常者グループにおける感染者からは H2 を除く 3 種類の遺伝子亜型が検出された。今回の研究で解析された *C. parvum* ヒト型のうち最も古い分離株は 1996 年に分離された株で、少なくともそれ以降は同タイプが HIV/AIDS 感染者の間に定着・流行してきたことが示唆される。また、健常者グループでは H3 型が優占種であった。H3 型が分離された患者の多くは海外渡航歴があり、海外で優勢な遺伝子亜型の可能性が指摘された。合わせて、当該研究事業では海外渡航者を中心としたジアルジア分離株の遺伝子型別を行った。その結果、これまで遺伝子解析の終了した分離株はいずれもヒトを含めた広範な哺乳類から検出される Assemblage A の Group1 (A1) と一致した。本遺伝子型のわが国への定着状況、水系汚染状況については今後の検討課題である。

A. 研究目的

クリプトスポリジウムは細胞偏性寄生性原虫（孢子虫類）で、広く脊椎動物に寄生が見られる。現在、クリプトスポリジウム属には 14 種ほどが記載・登録されており、人からは *C. parvum* を主体として *C. felis*、*C. meleagridis*、*C. canis* (*C. parvum* イヌ型)、*C. muris* などの寄生が報告されている。これらの中には HIV/AIDS 等の免疫不全患者からのみ分離されたも

のも含まれているが、遺伝子解析が進むにつれてクリプトスポリジウムの分類は流動的となっている。*C. parvum* がいわゆるヒト型（遺伝子型1）とウシ型（遺伝子型2）に分けられるようになったのは1995年以降のことで、前者は人のみを宿主として生活環が確立しており、後者は人を含め広く哺乳動物の間で感染が認められるとされている。近年では、遺伝子レベルでの違いと、宿主特異性の違いに注目してヒト型を *C. parvum* から独立させて *C. hominis* とする説が受け入れられつつある。現在では多量の遺伝子情報が報告されるに至ったが、その解釈あるいは整理方法が確立していない状況にある。そのため、かえって分類学的な（命名上の）混乱が生じているが、その一方で疫学的にはこの多様性がきわめて有用な情報となっている。このような混乱はクリプトスポリジウムに限るものではなく、ジアルジア (*Giardia lamblia*, *G. intestinalis*, *G. duodenalis* はいずれも synonym。わが国では従前の *G. lamblia* を用いるのが一般。) においてはさらに情報が錯綜しており、種の概念がつかめない状態に陥っている。そのため、ジアルジアの分類（型別）に関しては遺伝子情報をもとに後述のような“Assemblage”としてまとめる努力がされている。

本研究事業ではこれらの原虫の人分離株を用いて遺伝子型を特定し、感染様式、地域性、宿主動物との関連性については、これら原虫の伝播に水道水がどの程度寄与するものかを検討したいと考えている。本年度は国内の HIV/AIDS 感染者由来の分離株を中心に、塩基配列の差異に基づいて詳細な遺伝子型別を行った。また、ジアルジアに関しては輸入感染症として持ち込まれるジアルジアの遺伝子情報のデータベースかに向けた検討を行った。

B. 研究方法

クリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出された糞便材料は、ホルマリン-酢酸エチル法により粗精製処理を行った。原虫数が少ない、また挟雑物が多い場合は、シヨ糖浮遊法あるいは塩化セシウム法により粗精製試料をさらに精製した。精製試料は1% SDS 溶液中で30分間加熱処理し、その後プロテアーゼ処理、フェノール/クロロフォルム処理を行ない、粗精製 DNA 試料を得た。これをさらに Gene Clean Kit を用いて精製し、PCR 用の DNA 試料とした。

クリプトスポリジウムの遺伝子解析は、ポリスレオニン領域（約520bp）に関してプライマー CRY-44 (5'-CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA C-3') およびCRY-373 (5'-AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3') を用いてPCR/RFLP とシーケンス解析を行った。なお、RFLP 解析には制限酵素 Rsa I を用いた。また、18S rRNA 領域（約420bp）に関してはプライマー DIAGF (5'-AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG -3') およびDIAGR (5'-TAA GGT GCT GAA GGA GTAAGG -3') を用いてシーケンス解析を行った。

ジアルジアの遺伝子解析はGDH(Glutamate Dehydrogenase)遺伝子の部分塩基配列約770bpをプライマーGDH1 (5'-ATC TTC GAG AGG ATG CTT GAG -3') およびGDH2 (5'-AGT ACG CGA CGC TGG GAT ACT-3')を用いてPCRで増幅し、その産物について制限酵素Dde Iを用いたRFLP解析および同プライマーを用いたシーケンス解析を行った。

C. 研究結果

C-1 国内におけるヒト分離クリプトスポリジウムの遺伝子型

蛍光抗体法によりオーシスト陽性と診断された患者試料（43 試料）よりオーシストを精製

し、DNA 抽出、ポリスレオニン領域の PCR/RFLP 解析および、18S rRNA およびポリスレオニン領域の塩基配列の決定を行った。その結果、43 試料のうち 1 例については *C. parvum* ヒト型と動物型の重複感染が認められ、分離株数として総計 44 株が得られた。なお、分離株数を数えるにあたり、3 件の集団感染事例由来の分離株については複数の患者から分離株を得てそれぞれが同一の遺伝子型を示すことを確認し、患者数に関わらず集団感染事例数にあわせて 3 株と勘定した。遺伝子解析の結果から、*C. parvum* のヒト型およびウシ型、*C. canis* (*C. parvum* イヌ型)、本来鳥類を宿主とする *C. meleagridis* および ネコ由来の *C. felis* の 5 遺伝子型が検出された。ちなみに、平成 6 年の平塚の事例は *C. parvum* ウシ型、平成 8 年の越生の事例ならびに平成 13 年の兵庫の事例（北海道への旅行先での集団感染事例；原因は不明）の両事例は *C. parvum* ヒト型により引き起こされたものであった。遺伝子型の検出状況は、*C. parvum* ヒト型が 29 株（66%）と最も多く、次いで *C. parvum* ウシ型が 7 株（16%）であった。さらに、5 株が *C. meleagridis*、2 株が *C. felis*、残りの 1 株が *C. canis* と型別された（図-1）。43 事例のうち海外渡航とリンクする事例が 16 件あり、その主な渡航先は東南アジアおよび東アジア地域であった。また、この中の 1 名に上述の重複感染が認められた。なお、HIV/AIDS 患者を含む免疫不全患者（免疫不全グループ）におけるクリプトスポリジウム感染者は 12 例（HIV/AIDS 感染者 10 名、先天性免疫不全患者 2 名）で、その中にははっきりとした渡航歴を持つ患者はいなかった。免疫不全グループ由来の分離株は先天性免疫不全患者由来の 1 株が *C. felis*、他は全て *C. parvum* ヒト型に型別された。

C-2. *C. parvum* ヒト型における遺伝子多型性と疫学的特徴

ヒト型のクリプトスポリジウム感染した患者 29 名のうち、健常者グループに属する感染者が 18 名、他の 11 名は免疫不全グループに属する患者であった。後者では、先天性免疫不全患者の 1 例を除いた 10 例が全て HIV/AIDS 感染者であった。また、健常者グループにおけるクリプトスポリジウム症においても *C. parvum* ヒト型の検出頻度は高く 50%を超えていた（図-2）。

これらにつき、分離株のさらに詳細な遺伝子情報（個体識別）を得る目的で、ポリスレオニン領域の塩基配列の決定とその比較を行った。これまでのところ、HIV/AIDS 感染者由来株の 10 例全株と健常者グループ由来の 9 株の計 19 例について解析が終了しているが、*C. parvum* ヒト型はさらに 4 つの亜型（H1~H4）に分けられることが明らかとなった。図-3 に *C. parvum* ヒト型 H1~H4 の 4 種類の塩基配列、対象として *C. parvum* ウシ型（図中の B12）の塩基配列を比較した結果を示した。この領域内に見られる変異はわずかで、比較した 480 塩基中 H1~H4 の間での変異は数塩基の置換が見られる程度であった。図-4 にはヒト型とそれ以外の遺伝子型の遺伝的な系統関係を表した。

HIV/AIDS 感染者と健常者グループ由来の *C. parvum* ヒト型の遺伝子亜型とその検出率を表-1 にまとめた。健常者グループからの分離株に関してこれまで 9 株につき解析が終了しているが、それらから 3 種類の亜型が検出された。すなわち平成 8 年の越生における集団感染事例由来の分離株は H1 型、また、旅行者下痢関連の分離株 1 例が H4 型に型別された。残りの 7 例はいずれも H3 型で、健常者グループ間では H3 型が最も頻繁に検出された。また 1998 年以來ほぼ毎年、灌漑旅行歴を有する下痢症患者から検出されていることも明らかとなった。なお、平成 13 年兵庫県の集団感染例は H3 型の感染によるものであった。

これに対し、興味深いことに、1996 年から今日までに得られた HIV/AIDS 患者 10 例のポリスレオニン領域の塩基配列は、すべてが H2 型であった。これらの HIV/AIDS 症例は東京都内医療機関（3 ヶ所）、および神奈川県内の医療機関（1 ヶ所）で診断されたものであった。

以上のように、*C. parvum* ヒト型の H2 型はこれまでのところ健常者グループから検出されておらず、その限定的な感染経路の特定が急がれる。

C-3. 海外帰国者から検出されたジアルジアの遺伝子型

アフリカ、東アジア、東南アジア諸国に派遣された海外青年協力隊より検出されたジアルジアは、現在までの途中経過ではあるが、8 分離株のシーケンス解析の結果からはすべて標準株の *G. lamblia* WB 株と一致し、遺伝型としては Assemblage A 中の Group1 (A1) であることが明らかとなった。図-5 に本研究で明らかとなったシーケンスとこれまでに報告のある種々の Assemblage のシーケンスを比較した結果を示した。また、このデータを基に Assemblage 間の遺伝的近縁関係を系統樹として図-6 に表した。これまでに様々な宿主より検出されている Assemblage の塩基配列との一致率は、以下の通りである。ヒトを含めた哺乳類に広く感染性を有する遺伝型である Assemblage A1 に対する配列の一致率は 100%、ヒトのみに感染性が限定される A2 との間では 98% の一致率と、両遺伝型とは極めて近縁な関係にある。Assemblage A1 と同様な宿主域を有する B3 および B4 とは 89%、イヌの分離株に代表される C およびラットの分離株に代表される G とは 90%、D とは 87%、またブタの分離株に代表される E とは 92%、ネコの分離株に代表される F とは 93% の一致率であった。ちなみに、本属の別種である *G. ardeae* とは 80% であった。

D. 考 察

ヒトにおけるクリプトスポリジウム感染では、集団感染、散発例のいずれにおいても *C. parvum* ヒト型およびウシ型が高頻度に分離され、ごく稀に他種の感染が見られた。*C. parvum* ヒト型は現在のところヒトからのみ検出されるもので (Patel, S et al., 1998; McLauchlin, J et al., 2000)、一部では新種 *C. hominis* を提唱するむきもある。本研究の結果からは、国内の現状としてヒトの感染に最も関連しているのは *C. parvum* ヒト型であり、他の種や遺伝子型に比較して□ 人への感染性が強いあるいは、□ 環境の汚染度が高い可能性が推測される。いずれにせよ、今後の研究に待たれる。

当該研究により *C. parvum* ヒト型に関するさらなる知見として遺伝子型存在が明らかとなり、わが国ではその中の H2 タイプが HIV/AIDS 感染者に限定的に分布するという特徴が示された。一方、国外の HIV/AIDS 感染者では *C. parvum* ヒト型、ウシ型を始め、*C. meleagridis* 型など多数の遺伝子型が検出されており (Pieniazek, N, et al., 1999; Morgan, U, et al., 2000)、わが国の状況と趣を異にしている。一般論として、HIV/AIDS 感染者等の免疫不全グループが易感染状態にあることを考えれば、本症が水系感染等を主な感染経路とするのであればこれら免疫不全グループからはむしろ多様な遺伝子型のクリプトスポリジウムの分離が期待される。ところが、わが国の HIV/AIDS 感染者間には H2 型のみが認められたことから、その感染経路がきわめて特異なものである可能性が指摘される。今後、精力的に水道原水等から分離されるクリプトスポリジウムの遺伝子型別情報を収集・解析することで、クリプトスポリジウム感染に係る水道水の寄与率を推し量ることが可能となるものと期待される。

わが国では大半のジアルジア症が旅行者下痢として検出されることから、国内での感染例に関する分子疫学的情報はきわめて限られる。本研究では、輸入ジアルジア症を対象に遺伝子解析を行い、遺伝子型 Assemblage A1 によるものであるという結果が得られた。関連した報告としては、Abe ら (2003) が国内のジアルジア感染イヌを調査し、感染ジアルジアの遺伝子型がこれまでのところイヌのみから検出される Assemblage D であることを明らか

にしている。今後の課題として、国内における患者サーベイランスや家畜、野生動物、ペットを対象にした調査、および水源調査をすすめ、ヒト感染関連の遺伝子型の特定とその疫学的特徴を明らかにすることが必要と思われる。

<参考文献>

- 1) Abe N., Kimata I. and Iseki M (2003) 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.
- 2) McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. and Nichols, 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 (11) :3984-3990.
- 3) Morgan UM., et al., (1995) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. *Am. J. Trop. Hyg. Med.*, 52(6):559-564.
- 4) Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Silaaiman, I., Thompson, R.C., Ndiritu, W., Lal, A., Moore, A. and Deplazes, P. (2000) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (3) :1180-1183.
- 5) Patel, S., Pedraza-Diaz, S., McLauchlin, J., and Casemore, D.P. (1998) Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborn outbreaks. Outbreak Control team South and West Devon 1995. Incident Management team and Further epidemiological and Microbiological Studies Subgroup North Thames 1997. *Commun. Dis. Public health*, 1 (4) :231-233.
- 6) Peng MM., Xiao L., Freeman AR., Arrowood MJ., Escalante AA., Weltman AC., Ong CSL., MacKenzie WR., Lal AA. and Beard CB (1997). Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases* 3(4):567-573.
- 7) Pieniazek, N.J., Bornay-Llinares, F.J., Slemenda, S.B., Da Silva, A.J., Moura, I.N.S., Arrowood, M.J., Ditrich, O. and Addiss, D.G. (1999) New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (3) :444-449.

図-1、国内分離クリプトスポリジウム遺伝型とその検出率

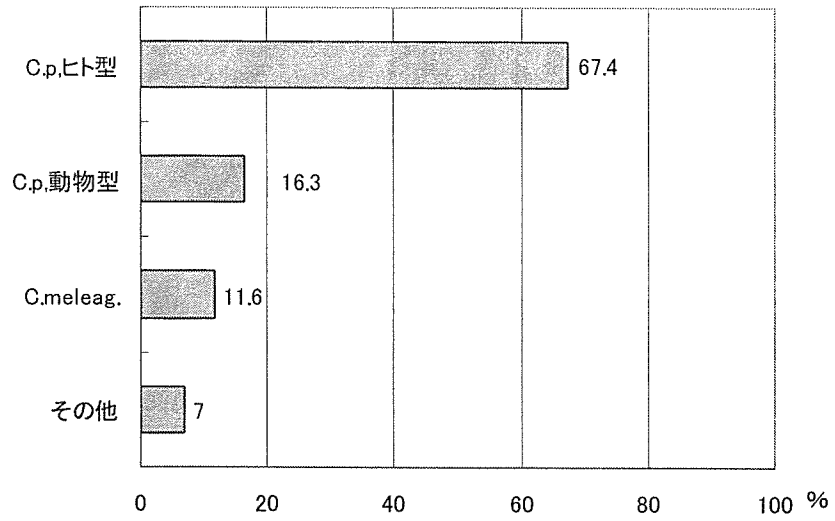


図-2、免疫不全とクリプトスポリジウム遺伝型の検出率

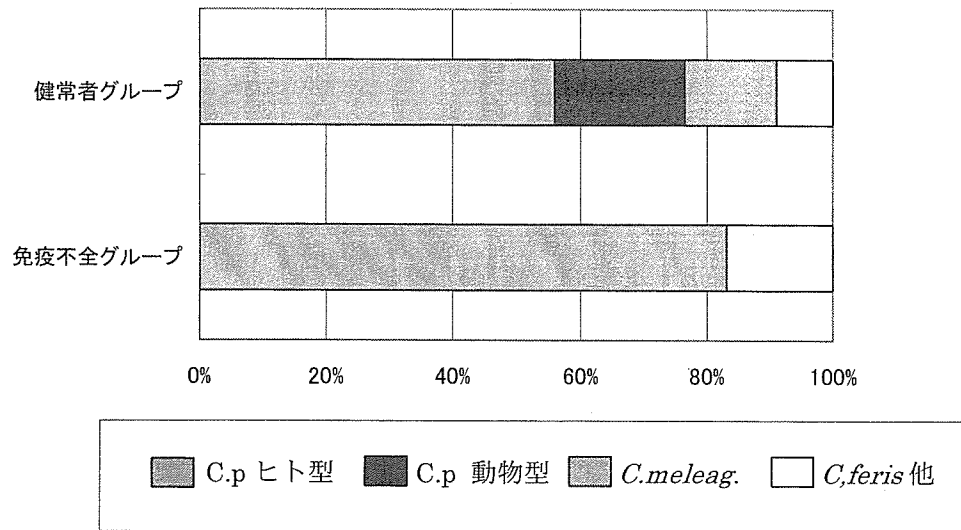


図-3、*C. parvum* ヒト型 (H1-4) ポリスレオニン領域のシーケンス比較

		*	20	*	40	*	60	*		
		CAACAAC TCAAAAACCGACAACAACAACAACAACAAGGTTCCAGGCAAGCCACCAATAGCCACAACAAC								
Cp/H2	:							: 70	Subtype H1
Cp/H14	:							: 70	Subtype H4
Cp/H5	:							: 70	Subtype H2
Cp/H11	:							: 70	Subtype H3
Cp/H8	:A.....T.....							: 70	Cp動物型
Cp/B12	:A.....T.....							: 70	Cp動物型
		80	*	100	*	120	*	140		
		GACAACATTGAAGCCAATAGTTACAACAACAACAACAAGCAACAACAACAACAACAACAGTGCCA								
Cp/H2	:C.....							: 140	
Cp/H14	:							: 140	
Cp/H5	:							: 140	
Cp/H11	:							: 140	
Cp/H8	:	A.....A.....							: 140	
Cp/B12	:	A.....A.....							: 140	
		*	160	*	180	*	200	*		
		ACAACAACAAC TACTACTAAGAGAGACGAAATGACAACAACAACAACACCACCATTACCTGATATCGGTG								
Cp/H2	:A.....							: 210	
Cp/H14	:							: 210	
Cp/H5	:A.....							: 210	
Cp/H11	:							: 210	
Cp/H8	:	.G.....T.....C.....G.---							: 207	
Cp/B12	:	.G.....T.....C.....G.---							: 207	
		220	*	240	*	260	*	280		
		ACATTGAAATTACACCAATCCCAATTGAAAAGATGTTGGATAAGTATACAAGAATGATTTATGACTATAA								
Cp/H2	:							: 280	
Cp/H14	:							: 280	
Cp/H5	:							: 280	
Cp/H11	:							: 280	
Cp/H8	:C.....							: 277	
Cp/B12	:C.....							: 277	
		*	300	*	320	*	340	*		
		CAGTGGTTTATTATTAGACTCTAATGATGAACCAATCCAGGTTCTCAAGCAGGACAAATAGCTGATACA								
Cp/H2	:							: 350	
Cp/H14	:C.....							: 350	
Cp/H5	:							: 350	
Cp/H11	:							: 350	
Cp/H8	:							: 347	
Cp/B12	:							: 347	
		360	*	380	*	400	*	420		
		AGCAATTTATTCCCAACTCAAAC TACAAGAGTACTGGTTTACCAATTGATCCAATGGTTGGTCTTCCAT								
Cp/H2	:							: 420	
Cp/H14	:							: 420	
Cp/H5	:							: 420	
Cp/H11	:							: 420	
Cp/H8	:GT.....							: 417	
Cp/B12	:GT.....							: 417	
		*	440	*	460	*	480			
		TTGATCCAAAATCAGGTAATTTAGTACATCCATATACCAATCAAACAATGTCTGGTTTAT								
Cp/H2	:							: 480	
Cp/H14	:							: 480	
Cp/H5	:							: 480	
Cp/H11	:							: 480	
Cp/H8	:							: 477	
Cp/B12	:							: 477	