

表-1, HIV 感染と *C.parvum* ヒト型タイプ検出の関係

	ポリスレオニン シーケンス subtype	ポリスレオニン PCR/RFLP type
HIV 陽性 (n=10)	H2 (10)*	ヒト型 (genotype I)
健常者 グループ (n=9)	H1 (1) H3 (7) H4 (1)	

* ()内 検出数

図-4, 国内分離クリプトスポリジウム遺伝子型とその近縁関係

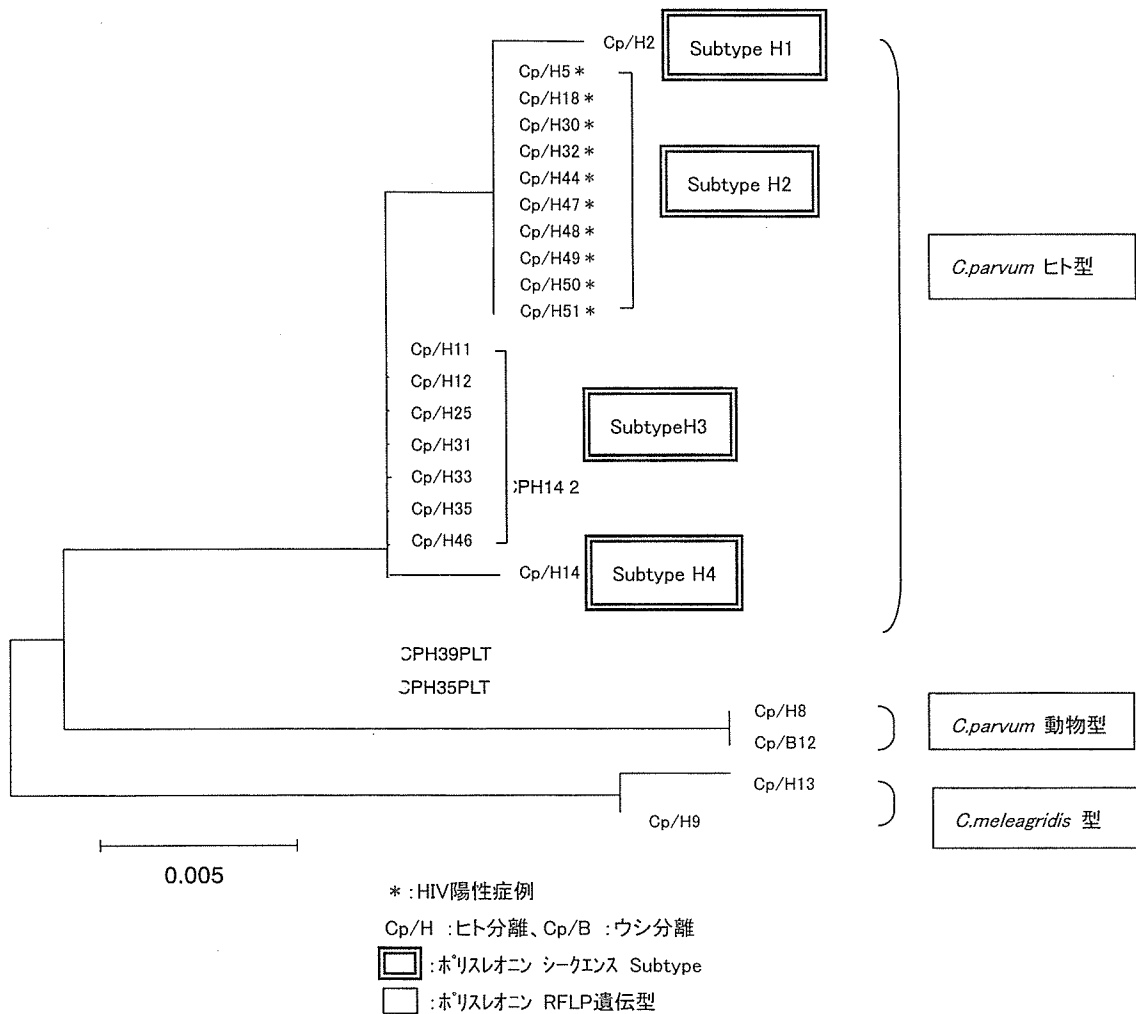
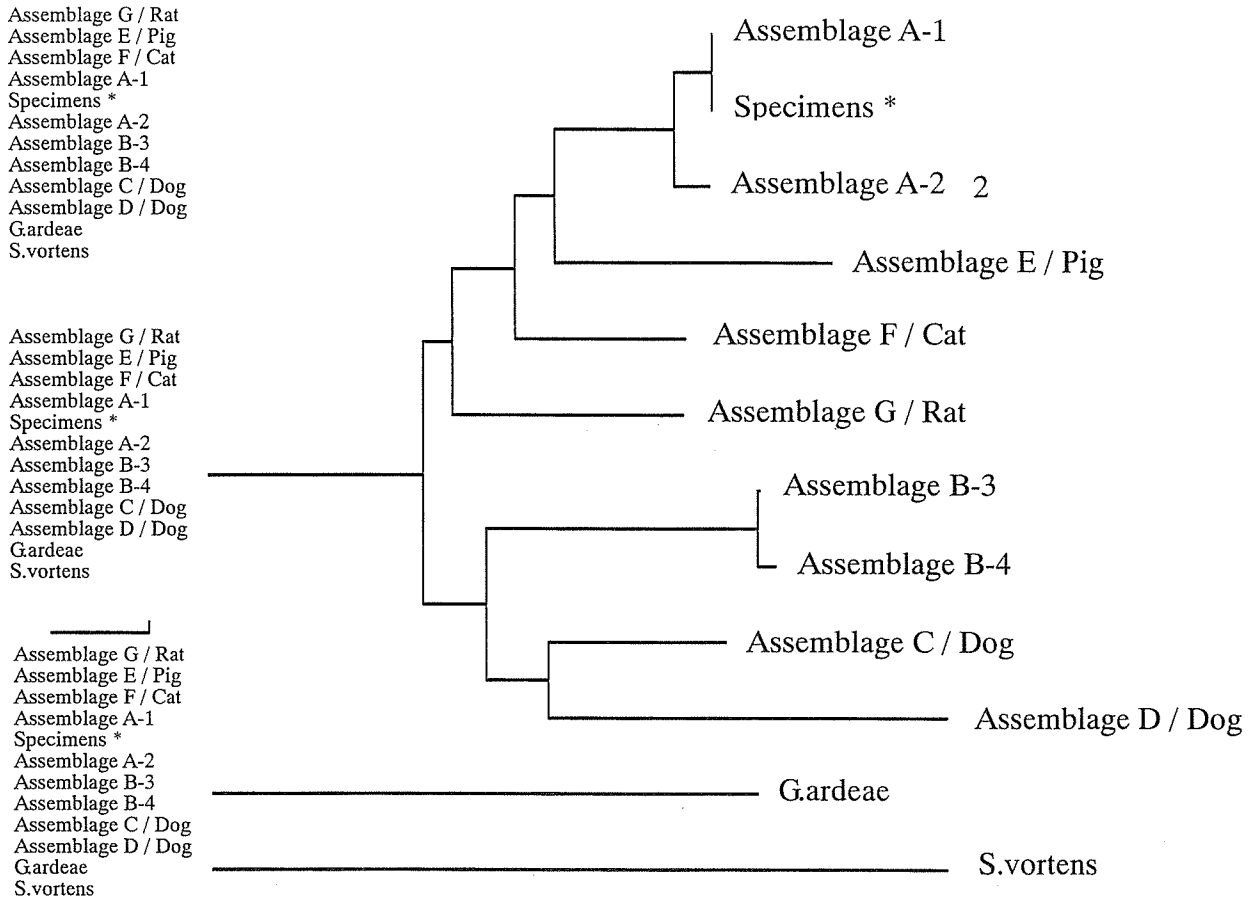


図-5、ジアルジア遺伝子型の GDH 領域におけるシーケンス比較

	*	20	*	40	*	60	*	
Assemblage G / Rat	:	TCCCTGGATGGACGATGCCGGCGCATCAACGTC	CAACCGCGGCTTCCGCGTCCAGTACAAC	TCTGCCCTCGGACCCCT				
Assemblage E / Pig	:	G.....T..C.....T.....T.....T.....T.....C..T.....						
Assemblage F / Cat	:	G.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....G.....						
Assemblage A-1	:	G.....T..C..T..A.....T.....T.....C.....						
Specimens *	:	G.....T..C..T..A.....T.....T.....T.....C.....						
Assemblage A-2	:	G.....T..C..T..A.....T.....T.....T.....C.....						
Assemblage B-3	:	C.....C.....A.....TA.....C..T.....G.....						
Assemblage B-4	:	C.....C.....A.....TA.....C..T.....G.....						
Assemblage C / Dog	:	C..A.....T.....T.....T.....T.....T.....C..T.....G.....						
Assemblage D / Dog	:	.A.....T.....T..A.....T..T.....T.....T.....G.....						
Gardeae	:	.A.....T.....T..A.....T..T.....T.....T.....G.....						
S.vortens	:	C..G...G.....CAAG..CAAG.....G.....G.....C..GA...G.....						
	80	*	100	*	120	*	140	*
Assemblage G / Rat	:	ACAAAGGCGGGCTCCGCTCCACCCCTCTGTTAATCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTCGAGCAGATCCTGAAG						
Assemblage E / Pig	:	...G.....C.....C.....T..A.....T.....						
Assemblage F / Cat	:	...G.....C.....C.....C.....C.....						
Assemblage A-1	:	...G..T..C.....C.....T.....T.....T.....						
Specimens *	:	...G..T..C.....C.....T.....T.....T.....						
Assemblage A-2	:	...G..T..C.....C.....T.....T.....T.....						
Assemblage B-3	:	...G..T..T.....C..C.....T.....T.....						
Assemblage B-4	:	...G..T..T.....C..C.....T.....T.....						
Assemblage C / Dog	:	...G.....C..T.....C..C..T..A.....T.....T.....						
Assemblage D / Dog	:	...T..C..T.....C..C..T.....T.....T.....T..A.....						
Gardeae	:	...G.....T..GA..G..C..C..G.....						
S.vortens	:	...G.....C..G.....G..CTGC.....G.....						
	160	*	180	*	200	*	220	*
Assemblage G / Rat	:	AACTCCCTCACCACGCTCCCGATGGGTGGTGGAAGGGTGGCTCCGACTTCGACCCGAAGGGCAAGTCAGACAACGA						
Assemblage E / Pig	:C.....C.....C.....T.....T.....						
Assemblage F / Cat	:C..C.....C.....C.....C.....						
Assemblage A-1	:C..C.....C.....T.....A.....C.....						
Specimens *	:C..C.....C.....T.....A.....C.....						
Assemblage A-2	:C..C.....C.....T.....A.....C.....						
Assemblage B-3	:T.....Y.....C.....T.....C.....T.....T.....G.....						
Assemblage B-4	:T.....C.....T.....C.....T.....T.....G.....						
Assemblage C / Dog	:C.....C.....C.....C.....C.....						
Assemblage D / Dog	:	..T..T.....C.....C.....T.....C.....T.....T.....						
Gardeae	:G.....C.....C.....C.....T.....G.....C.....T.....						
S.vortens	:G..G.....C.....C.....C..G.G.....G.....						
	240	*	260	*	280	*	300	*
Assemblage G / Rat	:	GGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCTTACATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCGGGGCTGACACCCAGCTCCCGCCGGCG						
Assemblage E / Pig	:T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....						
Assemblage F / Cat	:C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....						
Assemblage A-1	:C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....						
Specimens *	:C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....						
Assemblage A-2	:C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....						
Assemblage B-3	:T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....						
Assemblage B-4	:T.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....						
Assemblage C / Dog	:T.....A.....T.....T.....C.....T.....T.....T.....T.....						
Assemblage D / Dog	:T.....G.....T.....C..C..A.....T..C.....G.....T.....						
Gardeae	:G.....T.....C..G.....GT..CC..C..A.....CAGTT..G.....G..G.....						
S.vortens	:G.....T.....C..G.....GT..CC..C..A.....CAGTT..G.....G..G.....						
	*	320	*	340	*	360	*	380
Assemblage G / Rat	:	ACATCGGTGTCGGCGCCCGCAGATCGGCTACCTTTACGGGCGAGTACAAGCGCCTCAGGAACGAGTTCACGGGCGCTC						
Assemblage E / Pig	:C.....T.....T.....T..G.....A.....Y..G.....T.....						
Assemblage F / Cat	:C.....T.....G.....G.....G.....G.....C.....						
Assemblage A-1	:C.....G.....G.....A.....G.....G.....A.....						
Specimens *	:C.....G.....G.....A.....G.....G.....A.....						
Assemblage A-2	:C.....G.....G.....A.....G.....G.....A.....						
Assemblage B-3	:	..T..T..C.....GT.....T..T..G..TT..A.....T.....Y.....						
Assemblage B-4	:	..T..T..C.....GT.....T..T..G..TT..A.....T.....T.....						
Assemblage C / Dog	:T.....T.....G..TT.....A.....G.....A.....G.....						
Assemblage D / Dog	:T..C.....A.....T.....G..TT..C.....A..A..T.....						
Gardeae	:C.....G.....G..T.....C..T.....C.....TGC.....TCC.....GA.....T.....						
S.vortens	:C.....G.....A.....A..G.....C.....C..GGGCTC..C..GA.....G.....						

* Specimes : 本研究で調べられたシーケンス

図-6、渡航者検出ジアルジアの遺伝子型とその近縁関係



* Specimes : 本研究で検出された遺伝子型

Assemblage G / Rat
Assemblage E / Pig
Assemblage F / Cat
Assemblage A-1
Specimens *
Assemblage A-2
Assemblage B-3
Assemblage B-4
Assemblage C / Dog
Assemblage D / Dog
Gardeae
S.vortens

Assemblage G / Rat
Assemblage E / Pig
Assemblage F / Cat
Assemblage A-1
Specimens *
Assemblage A-2
Assemblage B-3
Assemblage B-4
Assemblage C / Dog
Assemblage D / Dog
Gardeae
S.vortens

* Specimes : 本研究で調べられたシーケンス

分担研究報告書 3

水源周辺環境に生息する脊椎動物の *Cryptosporidium* の保有

分担研究者 黒木俊郎、遠藤卓郎

研究協力者 八木田健司、泉山信司、宇根有美
林谷秀樹、森哲、鳥羽通久

水源周辺環境に生息する脊椎動物の *Cryptosporidium* の保有

分担研究者	黒木俊郎 遠藤卓郎	神奈川県衛生研究所 微生物部 国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	八木田健司 泉山信司 宇根有美 林谷秀樹 森 哲 鳥羽通久	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 麻布大学 獣医学部獣医学科 東京農工大学 農学部獣医学科 京都大学大学院 理学研究科 日本蛇族学術研究所

要旨

水源の周辺環境に生息する各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。また、国内の動物における保有状況と比較することと、ペットとして国内に持ち込まれる動物の環境汚染へのリスクを調べる目的で、ベトナムに生息する爬虫類および諸外国からの輸入哺乳類を調査の対象とした。その結果、国内の野外に生息する鳥類、爬虫類および魚類から *Cryptosporidium* は検出されなかった。一方、比較のために調査したベトナム産の爬虫類や種々の輸入哺乳類からは *Cryptosporidium* が検出された。その内訳は、ニシクイガメ 1 頭、サンビームヘビ 1 頭および、エゾリス 2 頭、リチャードソンジリス 2 頭から *Cryptosporidium* spp. が検出された。爬虫類から検出された *Cryptosporidium* sp. の 18S rRNA の塩基配列は *C. serpentis* のそれと、エゾリス由来株では *C. parvum* のフェレット由来の塩基配列と一致した。

A. はじめに

Cryptosporidium 属原虫は、魚から哺乳類に及ぶ広い範囲の脊椎動物を宿主としている。水道水源の周辺環境には様々な脊椎動物が生息しており、したがって、水道水源を汚染する *Cryptosporidium* の汚染源として種々の動物が関与している可能性がある。ところで、水試料からの *Cryptosporidium* オーストの試験法によれば、モノクロナール抗体を用いた蛍光染色法と形態による鑑別により行われている。検出されたオーストが類円形の $4 \times 6 \mu\text{m}$ 程度の大きさで、*C. parvum* との共通抗原が蛍光抗体試薬で染色されれば、それ以上詳細な種の鑑別が行われることなく *C. parvum* として扱われ

る。

C. parvum や同属に属する種が種々の動物に寄生していることはよく知られているところであるが、その保有状況や宿主特異性に関する情報は乏しい。しかしながら、本来的にはこれらの情報をもって水道水に係る *Cryptosporidium* の感染リスクの評価が行われるべきものと考えられる。そこで、当該研究事業においては汚染源となり得る動物種の把握とそれらにおける *Cryptosporidium* 保有状況を明らかにすることを目的として、水環境およびその周辺に生息する動物を中心に *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。

B. 研究方法

B-1. 調査の対象

1. 国内の野外に生息する爬虫類として、カメ類（ミシシッピーアカミミガメ 1 頭）、トカゲ類（ニホントカゲ 14 頭、ニホンカナヘビ 8 頭、ニホンヤモリ 2 頭）およびヘビ類（アオダイショウ 16 頭、シマヘビ 86 頭、ヤマカガシ 15 頭）を調べた。爬虫類は保有状況の地域特異性を除くために、広い地域の生息地から採取した（表 1）。捕獲後に収容容器内に排泄した糞便を調査の対象とした。あわせて、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）を調査した。捕獲あるいは購入後に解剖し、腸管内容物を取り出して調査の対象とした。
2. ペットとして国内に持ち込まれ、*Cryptosporidium* の感染源あるいは汚染源となる哺乳類として、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、シマリリス 20 頭、タイリクモモンガ 16 頭を調査した。輸入された哺乳類の生息地域と輸出国は表 3 に示した。哺乳類の各動物は、麻酔により死に至らしめた後に、解剖して大腸内容物を取り出し、これを調査の対象とした。
3. 水源の周辺環境に生息する脊椎動物として、鳥類では、カラス 14 羽、カワウ 11 羽、スズメ 53 羽、魚類としてコイ 7 匹を対象とし、これらの動物から糞便を採取し、あるいは腸管から内容物を採取して調査した。

B-2 *Cryptosporidium* の検出

Cryptosporidium 寄生の有無は糞便あるいは

腸内容物からのオーシストの検出によった。飼育容器の中などに排出された糞便を採取し、調査に用いるまで冷蔵保存した。腸管内容物は動物を解剖して腸管を取り出し、内容物を採取した。糞便あるいは内容物の少量を用いて FEA 法によりオーシストを精製した。沈渣をスライドガラスに塗抹し、*Cryptosporidium* に対する特異抗体による蛍光染色（Aqua-Glo, Waterborne）と DAPI による核染色を行った。落射型蛍光顕微鏡を用いて B 励起光下で観察し、暫定対策指針に記載された基準により *Cryptosporidium* オーシストの判定を行った。

B-3 遺伝学的解析

鏡検により *Cryptosporidium* が検出された試料について、18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。オーシストの DNA は精製オーシストから界面活性剤存在下で加熱により抽出し、ガラス粉末への DNA 吸着を利用した GeneClean キット（BIO 101 社）を用いて精製した。

18S rRNA 領域の増幅には 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'）プライマーを用いた。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（シーケエンサー）を用いて塩基配列の決定（ダイレクトシーケンス）を行った。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。得られた塩基配列は Blast サーチにより既存の塩基配列との比較を行った。

C. 結果

C-1. 爬虫類における *Cryptosporidium* 保

有状況

国内の野外に生息する爬虫類のうち、カメ類（ミシシッピーアカミミガメ 1 頭）、トカゲ類（ニホントカゲ 14 頭、ニホンカナヘビ 8 頭、ニホンヤモリ 2 頭）およびヘビ類（アオダイショウ 16 頭、シマヘビ 86 頭、ヤマカガシ 15 頭）を調査した。これらの爬虫類から *Cryptosporidium* は検出されなかった。

ベトナムの爬虫類について、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 頭を調べたところ、ニシクイガメ 1 頭とサンビームヘビ 1 頭から *Cryptosporidium* spp. が検出された。両種から検出された *Cryptosporidium* を遺伝子レベルで解析したところ、いずれも *C. serpentis* の塩基配列と一致した。

C-2. 輸入哺乳類における *Cryptosporidium* 保有状況

哺乳類では、エゾリス 2 頭（20%）とリチャードソンジリス 2 頭（10%）から *Cryptosporidium* spp. のオーシストが検出された。エゾリスから検出された *Cryptosporidium* はフェレット由来の *C. parvum* と塩基配列が一致した。一方、リチャードソンジリス由来株の遺伝子配列派特有なもので、これまでの検索結果からは既に報告された遺伝子情報の中に高い相同性を示すものが見つからなかった。現在、引き続き解析を進めている。参考までに、ジュウサンセンジリス 7 頭からは *Giardia* spp. が検出された。

C-3 鳥類、魚類における *Cryptosporidium* 保有状況

わが国に生息するカラス 14 羽、カワウ 11 羽、スズメ 53 羽および、コイ 7 匹の糞便あるいは腸管内容物について調べたところ、*Cryptosporidium* は検出されなかった。

D. 考察

Cryptosporidium を保有する脊椎動物が水道水源の周辺環境に生息すれば、即汚染源としての役割を果たすことになる。しかしながら、それらの多くは *C. parvum* ではなく、それぞれの宿主に固有の種と考えられるものの、オーシストが *C. parvum* と共通抗原を有し、大きさが近似していれば、水を対象とした現行の検査では *C. parvum* との鑑別は困難である。したがって、検出された場合には給水停止等の対応を取らなければならない。そこで今回の調査では、各種脊椎動物（魚類、爬虫類、鳥類）における *Cryptosporidium* の保有を調べ、検出された *Cryptosporidium* について遺伝子レベルでの解析を行った。

D-1 爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況

前回の厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「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、平成 12～15 年）において、筆者らは動物飼養施設の爬虫類および野外に生息する爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況調査を行い¹⁾、動物飼養施設の爬虫類ではカメ類は 2.0%、トカゲ類は 11.0%、ヘビ類は 11.4% の保有率であることを示した¹⁾。一方で、野外に生息する爬虫類ではカメ類 7 種 327 検体、トカゲ類 6 種 76 検体、ヘビ類 4 種 63 検体、合わせて 17 種 466 検体を調べ、ニホンヤモリ 1 検体から *Cryptosporidium* sp. が検出されたのみであり、今回の調査と合わせて野外に生息する爬虫類における *Cryptosporidium* の保有は極めて稀であることが明らかになった。その一方で、爬虫類に寄生する *Cryptosporidium* に関連する水道水の汚染事例が平成 13 年に兵庫県宍粟郡山崎町で発生し、分離株の遺伝子解析からヘビから分離された株と一致することが明らかとなっ

た。筆者らはこの事例をきっかけに、爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況と保有する *Cryptosporidium* の種あるいは株の特定を目的として調査を進めてきた。

これまでに、野外に生息する爬虫類を対象にした調査では、アオダイショウとシマヘビおよびヤマカガシでの感染の有無を検討した。本州にはこれ以外に5種のヘビ(ヒバカリ、ジムグリ、タカチホヘビ、シロマダラ、ニホンマムシ)が生息しており、このうちニホンマムシは水源周辺でも目撃されていた。今年度の調査ではマムシは調査対象とすることができず、今後の課題として残された。

これに対して、ベトナムの爬虫類からはニシクイガメとサンビームヘビにおいて *Cryptosporidium* spp.が検出された。遺伝子解析の結果、それらは *C. serpentis* の塩基配列と一致していた。調査検体数は少ないにもかかわらずこれらの爬虫類からは *Cryptosporidium* が検出されており、少なくとも国産の爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況とは異なることが明らかとなった。ちなみに、ニシクイガメとサンビームヘビはともにペット用として国内に持ち込まれる国内に持ち込まれる種で、管理次第によってはわが国で野生化するなり、本 *Cryptosporidium* 種が国産の爬虫類に広がる恐れも指摘される。

D-2 輸入哺乳類における *Cryptosporidium* の保有状況

ペットとして輸入された哺乳類を調べたところ、エゾリスとリチャードソンジリスから *Cryptosporidium* spp.が検出された。このうちエゾリスから検出された *Cryptosporidium* sp.は、フェレットに由来する *C. parvum* と18 s RNAの塩基配列が一致した。これまでのところ、フェレット由来の *Cryptosporidium* が健常者から報告された事実は無いが、少なくとも HIV/AIDS 患者への感染には注意が必要である。こうし

た哺乳類から国内の種々の動物へ *Cryptosporidium* の感染が拡大することや、輸入された動物そのものが水源の汚染源となる可能性もある。

D-3 鳥類、魚類における *Cryptosporidium* の保有状況

鳥類に寄生する *Cryptosporidium* は、*C. meleagridis*、*C. baileyi*、*C. galli* の3種が知られており、それぞれの種にはニワトリ、ウズラ、七面鳥が固有宿主として報告されている。また、これら以外の種が存在しているといった報告も散見される。鳥類における *Cryptosporidium* は家禽類について詳細に研究が行われてきたが、野鳥における感染の報告は数少ない。当該研究では、これまでにカラス14羽、カワウ11羽およびスズメ53羽を調べたが、*Cryptosporidium* は検出されなかった。さらに調査の対象とする種と検体数を増やし、水源の周辺環境における鳥類での保有状況を明らかにしていきたい。

魚類に寄生する *Cryptosporidium* としては、ヘダイの1種 (gilthead sea bream) とヨーロッパシーバス (European sea bass) から *C. molnari* が報告されている²⁾。しかし、魚類での *Cryptosporidium* の寄生は指摘されているところである³⁾。今回の調査では、コイを対象に *Cryptosporidium* の保有状況を調べたが、*Cryptosporidium* は検出されなかった。今後さらに調査個体数を増やしていく予定である。

E. 結論

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 *Cryptosporidium* の保有率は低いことが明らかとなった。ちなみに、今回の調査では国内の野外に生息する爬虫類のうち、カメ類1頭、トカゲ類24頭、およびヘビ類127頭を調査したが、*Cryptosporidium* は検出さ

れなかった。また、カラス 14 羽、カワウ 11 羽、スズメ 53 羽およびコイ 7 匹からも *Cryptosporidium* は検出されなかった。

一方、わが国を離れてベトナムの爬虫類では、ニシクイガメ 32 頭のうち 1 頭から、サンビームヘビ 19 頭のうち 1 頭から *Cryptosporidium* spp.が検出された。また、輸入哺乳類では、エゾリス 2 頭 (20%) とリチャードソンジリス 2 頭 (10%) から *Cryptosporidium* spp.のオーシストが検出された。

<参考文献>

- 1) 黒木俊郎、遠藤卓郎：各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況、平成 14 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）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、分担研究報告書、2004.
- 2) Alvarez-Pellitero, P., and A. Sitja-Bobadilla. 2002. *Cryptosporidium molnarin*. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. Int. J. Parasitol. 32:1007-1021.
- 3) Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):72-97.

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

G-1 発表

- 1) 黒木俊郎、宇根有美、遠藤卓郎：爬虫類のクリプトスポリジウム感染、野生動物医学会誌、2003.

G-2 学会発表

- 1) 大川美奈子、今井邦典、宇根有美、黒木俊郎、遠藤卓郎、石橋 徹、鈴木哲也、野村靖夫：ヒョウモントカゲモドキ由来のクリプトスポリジウムの感染性と病原性、第 136 回日本獣医学会学術集会、東京、2003

表1 調査対象とした国内の野外に生息する爬虫類の内訳

動物種	生息地	頭数
ニホントカゲ	神奈川県	14
	計	14
ニホンカナヘビ	東京都	3
	神奈川県	5
	計	8
ニホンヤモリ	東京都	1
	神奈川県	1
	計	2
アオダイショウ	東京都	5
	神奈川県	4
	滋賀県	3
	京都府	4
	計	16
シマヘビ	青森県	3
	神奈川県	6
	愛知県	2
	滋賀県	21
	京都府	13
	兵庫県	28
	岡山県	6
	広島県	7
	計	86
ヤマカガシ	青森県	5
	神奈川県	1
	愛知県	1
	滋賀県	1
	兵庫県	4
	岡山県	2
	広島県	1
	計	15
ミシシッピーアカミミガメ	東京都	1
	計	1

表2 各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況

動物	検査個体数	陽性数 (%)
野生爬虫類(国内)		
ニホントカゲ	14	0
ニホンカナヘビ	8	0
ニホンヤモリ	2	0
アオダイショウ	16	0
シマヘビ	88	0
ヤマカガシ	15	0
ミシシッピーアカミミガメ	1	0
野生爬虫類(ベトナム)		
ニシクイガメ	32	1 (3.1)
トッケイヤモリ	3	0
サンビームヘビ	19	2 (5.3)
オオミズヘビ	15	0
ヒロクチミズヘビ	22	0
野生鳥類		
カラス	14	0
カワウ	11	0
スズメ	53	0
魚類		
コイ(養殖)	7	0

表3 輸入哺乳類における *Cryptosporidium* 感染状況

動物種	生息地	輸出国	検体数	陽性数 (%)
アフリカヤマネ <i>Graphiurus murinus</i>	アフリカ大陸	米国	10	0
コロンビアジリス <i>Spermophilus columbianus</i>	北米	米国	10	0
エゾリス <i>Sciurus vulgaris orientalis</i>	シベリア、朝鮮	中国	10	2 (20)
フトオアレチネズミ <i>Pachyeuromys duprasi</i>	アフリカ大陸	エジプト	5	0
ジュウサンセンジリス <i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	北米	米国	10	0
ピグミージェルボア <i>Salpingotulus michaelis</i>	アフリカ大陸、 中近東、ロシア	パキスタン	39	0
リチャードソンジリス <i>Spermophilus richardsonii</i>	北米	米国	20	2 (10)
シマリス <i>Tamias sibiricus lineatus</i>	ロシア、中国、 朝鮮	中国	20	0
タイリクモモンガ <i>Pteromys volans</i>	ユーラシア大陸北部	中国	16	0

分担研究報告書 4

単離した *Cryptosporidium* オー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

分担研究者 平田 強、金子光美

研究協力者 森田重光、橋本 温

単離した *Cryptosporidium* 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

分担研究者：平田 強 麻布大学環境保健学部 教授
金子 光美 摂南大学工学部 教授
研究協力者：森田 重光 麻布大学環境保健学部 講師
橋本 温 阿南工業高等専門学校 講師

研究要旨

Cryptosporidium オーシスト 1 個の遺伝子が解析できる手法の実用化について検討し、種や遺伝子型を弁別することが可能な 18S rRNA 領域内をコードしているプライマー-DIAGF-1/DIAGR と DIAGF-1/DIAGR-1 を用いた Nested PCR 法を構築した。本法では *C. parvum* HNJ-1 株を用いた実験で 100%の陽性率を得ることができ、高感度に *Cryptosporidium* オーシスト 1 個を検出できた。続いて、本手法を相模川の河川水から単離した 39 個のオーシストに適用し、そのうち 32 サンプル (82.1%) で目的とする約 400bp のバンドが得られた。このうち十分量の DNA 増幅が見られた 22 サンプルについてシーケンスを試み、18 サンプル (81.8%) で成功した。検出された *Cryptosporidium* は、Anthroponotic *C. parvum* genotype 1 が 13 個 (72.2%)、Zoonotic タイプとして *C. parvum* genotype が 21 個 (5.6%)、*C. parvum* pig type が 4 個 (22.2%) であった。養豚排水から単離したオーシスト 17 個についても同じ手法を用いて試験し、そのうち 10 個でシーケンスまで成功したが、すべて animal type であり、人への感染性があるとされる *C. parvum* genotype 1, 2 は検出されなかった。このような手法は、*Cryptosporidium* 感染のリスク評価の質の向上に大きく貢献するものと期待される。

A. 研究の背景と目的

腸管寄生性原虫である *Cryptosporidium* は環境における生残力と化学消毒剤に対する耐性が非常に高く、わが国の水道で使用されている塩素濃度・滞留時間での十分な不活化は期待できない (志村ら, 2001)。また、多くの浄水場で用いられている凝集沈殿砂ろ過法 (急速砂ろ過法) で除去率は 2.5~3.0 log₁₀ 程度 (たとえば, LeChevallier and Norton 1995, Hashimoto *et al.* 2002) であり、米国や英国など、水道整備の進んでいる先進国においても水道水を介した集団感染事例が多発していることから、衛生上重要視されている。わが国においても、1994 年に神奈川県平塚市の雑居ビルで受水槽の不備による集団感染が (黒木ほか, 1994)、1996 年には埼玉県越生町で町営水道を感染源として人口 13,851 人中 8,812 人が感染するという大規模な集団感染が発生した (埼玉県衛生部, 1997)。また、1993 年には米国ウィスコンシン州ミルウォーキー市で 403,000 人もの感染者が発生する水道水を介した集団感染が報告されている (Mac Kenzie *et al.* 1995)。これらの集団感染の発生を契機に、水源水域の汚染の実態を把握するために各種水環境の

Cryptosporidium 汚染の実態調査が行われた (LeChevallier *et al.* 1991, Roach *et al.* 1993, 橋本ら, 1999, 小野ら, 2001, 保坂ら, 2002)。

Cryptosporidium の試験方法として, U.S.EPA は 1995 年に「ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water by a Fluorescent Antibody Procedure)」(U.S.EPA, 1995) を提示, わが国では厚生省 (現, 厚生労働省) が 1998 年に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」の別添 3 に試験方法を示している (厚生省, 1998)。これらの試験方法はいずれも, 大量の水をろ過などで濃縮し, 密度勾配遠心法や免疫磁気ビーズ法 (immunomagnetic separation : IMS 法) などで選択的に分離した後, 抗 *Cryptosporidium* 蛍光抗体 (immunofluorescence assay : IFA) で染色し, 顕微鏡観察によって同定・計数するのが基本であって, 汚染源の推定やヒトへの感染リスクを適正に評価する上で重要なヒトへの感染性についての情報を得られない。

近年, 臨床分野の研究の進展により *Cryptosporidium* の種や遺伝子型, ヒト感染性が明らかになりつつあり, *Cryptosporidium* の種として *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. wairi*, *C. felis*, *C. andersoni* などが報告されている。また, ヒトへの感染性を有するとされている *C. parvum* については, ヒトのみに感染するとされる genotype 1 と, ヒトおよび家畜をはじめとする多くの動物に共通に感染する genotype 2, さらにトリ由来とされヒトへの感染も報告されている genotype 3 (*C. meleagridis*) に分類される (Carraway *et al.* 1997, Spano *et al.* 1997, Morgan *et al.* 1997, Yagita *et al.* 2001)。このような遺伝子型に関する情報は, 水の感染リスクの評価や管理のための有力な情報の一つとなることから, PCR 法を基礎とする遺伝子解析手法を用いた環境水中の *Cryptosporidium* の検出 (Johnson *et al.* 1995, Stinear *et al.* 1996) や遺伝子型の解析 (Mayer and Palmer 1996, Xiao *et al.* 2000, Xiao *et al.* 2001, Jellison *et al.* 2002, Nichols *et al.* 2003) が行われるようになった。しかしながら, これらの方法では水試料濃縮物からの全抽出 DNA を用いて PCR 増幅させるために, 水中に存在する *Cryptosporidium* のうち, 優占的な遺伝子型のみが検出される確率が高く, その種や遺伝子型別の出現分布を把握することは困難である。

そこで本研究では, 各種水域から顕微鏡下で *Cryptosporidium* オーシストを個別に単離し, 1 個のオーシストをテンプレートとする PCR 法を実用化するとともに, 神奈川県的主要な水源である相模川水の河川水と養豚排水を対象に, *Cryptosporidium* の遺伝子型出現分布を調べた。

B. 研究方法

B-1 調査対象

1) 河川水

神奈川県的主要な水源の一つである相模川の河川水を調査対象とした。採水は 2003 年 10 月 30 日に行い, 水道原水の取水地点である相模大堰の 500m 上流の神奈川県高座郡寒川町宮山の左岸にて 190L を採水した。採水地点を Fig. 1 に示す。

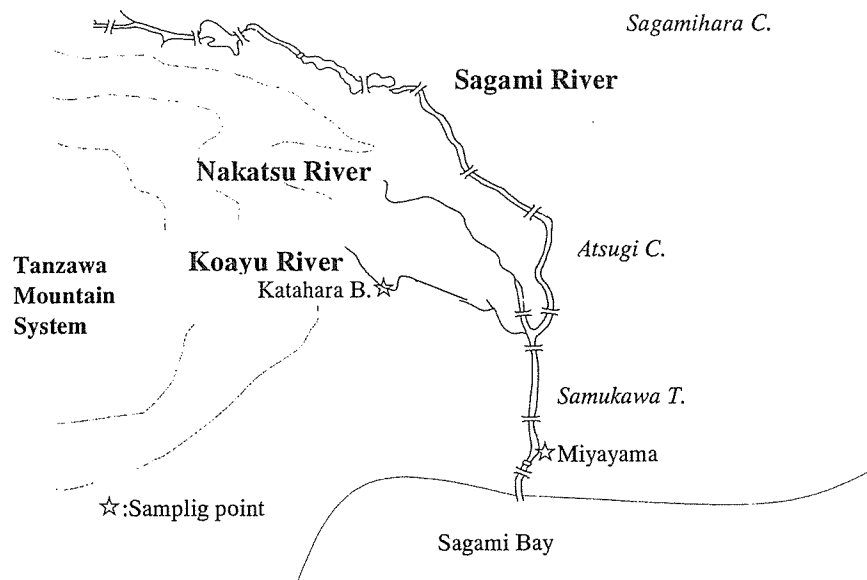


Fig. 1 Sampling sites of the Sagami River and the Koayu River.

2) 養豚排水

相模川水系における主要な *Cryptosporidium* 汚染源と推定されている神奈川県愛甲郡清川村の大規模な養豚場の排水処理施設の放流水（橋本ら, 1999）を調査対象とした。本排水は、相模川の支流である小鮎川の片原橋上流で放流されている。採水地点を Fig. 1 に示す。養豚排水は 2 L を採水した。

B-2 試料の前処理

1) 試料の濃縮

養豚排水 2～4 L を遠心分離（1,500×g, 15 分）し、上清を吸引除去して沈渣を回収した。回収した沈渣をステンレス製のふるい（孔径 32 μm）にのせ、0.1% (V/v) Tween 80 を含む 0.1M リン酸塩緩衝溶液（以下 PBS (T+) ; Phosphate Buffered Saline, pH7.4）を加えながら濾し、大きな夾雑物を除去して、試験に供した。

河川水はその全量を、酢酸セルロース製外圧型中空糸 UF 膜モジュール（膜表面積 0.3 m², 分画分子量 150,000, ダイセン・メンブレン・システムズ（株）製）にローラーポンプで加圧通水してろ過した。ろ過後、モジュール内に Milli Q 水約 50 mL を加え、手で十分に振とうして膜に捕捉された粒子を洗液とともに遠沈管（200 mL）に回収した。この操作を 3 回繰り返した後、モジュール内に PBS (T+) 50 mL および Milli Q 水約 50 mL で同様の操作を行い、洗浄液を回収した。回収した洗液を遠心分離（1,500×g, 15 分）し、上清を吸引除去して沈渣を回収した。

2) Percoll ショ糖密度勾配遠心法

濃縮した養豚排水および河川水は、遠沈管（50 mL）に 25 mL ずつ分注し、シリンジとシリコ

ンチューブを用いて下層に Percoll ショ糖 ($d=1.10$) を注入して遠心分離 ($1,500\times g$, 15 分) を行った。遠心分離の後、界面およびその上部水層をシリコンコーティングしたパスツールピペットを用いて新しい遠沈管 (50 mL) に分取し、PBS (T+) で全量 50 mL とした後、遠心分離 ($1,050\times g$, 15 分) を行った。遠心分離後、上清を吸引除去した。

3) 酢酸エチル法による脱脂

養豚排水の精製物は、PBS (T+) で全量 40 mL とし、PBS (T+) で予備平衡した酢酸エチル溶液 10 mL を加え、十分に振とうした後、遠心分離 ($1,500\times g$, 15 分) した。遠心分離後、酢酸エチル層、中間層および水層を吸引除去し、沈渣を回収した。河川水試料についてはこの操作は省略した。

4) 洗浄

各試料の濃縮物は、PBS (T+) で全量 50 mL とした後、遠心分離 ($1,500\times g$, 15 分) し、最後に Milli Q 水を加えて遠心分離 ($1,500\times g$, 15 分) した。

5) 免疫磁気ビーズ法による *Cryptosporidium* オーシストの選択分離

精製した試料は、それぞれ 5~10 本の IMS 用チューブに 10 mL 分取し、*Cryptosporidium* 用免疫磁気ビーズ (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* kit, DYNAL BIOTEC) を用いてオーシストを選択的に分離した。

6) 蛍光抗体染色

免疫磁気ビーズ法で処理した試料を 100 μ L ずつマイクロチューブ (1.5 mL) に取り、*Cryptosporidium* 用蛍光抗体 (Easy Stain™ C&G FITC, BTF DECISIVE MICROBIOLOGY) を 100 μ L 添加して 4 \square で 2 日間染色した。

7) オーシストの単離

倒立型落射蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE300, Nikon) のステージの上に置いたプラスチックシャーレ (f 90 mm) に撥水ペンで f 20 mm の円を描いた。その円内にマイクロピペットで Milli Q 水 200 μ L をのせ、さらに水滴内に染色した試料 10~30 μ L をゆっくり加えた。ここに 10% Triton X-100 溶液 0.5 μ L を加え、5~10 分間静置してオーシストが沈降したのち、B 励起 200 倍の倍率で観察し、ほぼ球形で直径 5 μ m 前後の青リンゴ色の蛍光を発するオーシストを探索した。ノマルスキー微分干渉像で内部構造物の存在が観察されたオーシストのみを、手製のガラスキャピラリー (ガラス製毛細管 (Calibrated Pipets 10 μ L, Drummond Scientific Company) をガスバーナーで加熱し、引き伸ばしたもの) を用いて単離した。単離したオーシストは、1 個ずつ PCR 緩衝液 (10 \times Taq Buffer (TaKaRa 社) 2.5 μ L, 滅菌 Milli Q 水 15.5 μ L) の入った PCR チューブ (0.2 mL) に吹き出した。

8) DNA の抽出

オーシストの入った PCR チューブは、 -80°C /室温で 3 回凍結融解処理のち、5 μ L の 10% Triton X-100 溶液を添加し、PCR 用サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler GP, TP500) にセットして、 100°C で 15 分間加熱した。

9) PCR

C. parvum HNJ-1 株（免疫正常下病患者分離株）オーシスト 1 個を用いて、18S rRNA 領域およびポリスレオニン領域内を標的とする 3 組の既知のプライマーペアを用いた PCR 法の検出能力を調べた。プライマーの配列、標的部および増幅産物の大きさを Table 1 に、PCR 反応条件を Table 2 に示す。

Table 1 Oligonucleotide primers tested.

Primers	Sequences of each primer pair (5'-3')	Target	Size of amplification products	Authors
DIAGF-1 DIAGR (CPBDIAGR)	GCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAA TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	18S rRNA	435 bp	Present study Johnson <i>et al.</i>
DIAGF-1 DIAGR-1	GCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAA CCAATCTCTAGTTGGCATAG	18S rRNA	405 bp	Present study
CPBDIAGF CPBDIAGR	AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	18S rRNA	435 bp	Johnson <i>et al.</i> (1995)
18SiF 18SiR	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC	18S rRNA	300 bp	Morgan <i>et al.</i> (1997)
Cry 44 Cry 373	CTCTTAATCCAATCATTACAAC AGCAGCAAGATATGATACCG	Poly-Threonine	515 bp	Carraway <i>et al.</i> (1997)

Table 2 Thermal characteristics and cited thermal cycling parameters of PCR primers for amplification of *Cryptosporidium*-specific DNA

Primer pair	Initial denaturation	Amplification cycles	Denaturing	Annealing	Elongating	Final extension
DIAGF-1/DIAGR	94°C, 5 min	40	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 1 min	72°C, 7 min
DIAGF-1/DIAGR-1	94°C, 5 min	40	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 1 min	72°C, 7 min
CPBDIAGF/CPBDIAGR	94°C, 5 min	40	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 1 min	72°C, 7 min
18SiF/18SiR	96°C, 2 min	35	96°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 7 min
Cry 44/Cry 373	94°C, 3 min	35	94°C, 30 sec	53°C, 1 min	72°C, 30 sec	72°C, 5 min

PCR は、凍結融解および加熱による DNA の抽出を行った PCR チューブに、PCR 反応液 25 μ L (20 μ M のプライマー各 2.5 μ L, 10 \times Taq Buffer 2.5 μ L, 2.5 mM の dNTP Mixture (TaKaRa 社) 4 μ L, Taq DNA polymerase (TaKaRa Ex TaqTM Hot Start Version) 1.25 U および滅菌 Milli Q 水 13.25 μ L) を加え、全量 50 μ L として行った。ポジティブコントロールには *C. parvum* HNJ-1 株の DNA を用いた。

Nested PCR では、1st.PCR の増幅産物をスピンカラム (Ultra CleanTM PCR Clean-up Kit, Mo Bio Laboratories, Inc.) を用いて精製し、TE Buffer で 50 μ L としたもの 1 μ L をテンプレートとし、Nested PCR 反応液 49 μ L (20 μ M のプライマー各 2.5 μ L, 10 \times Taq Buffer 5 μ L, 2.5 mM の dNTP Mixture 4 μ L, Taq DNA polymerase 1.25 U および滅菌 Milli Q 水 34.75 μ L) を加え、全量 50 μ L で行った。

PCR 反応は、PCR 用サーマルサイクラーを用いて、熱変性、アニーリング、伸長のサイクルをプライマーごとに検討した温度および反応時間で行った (Table 2)。PCR による特異的 DNA

の増幅の有無は、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の臭化エチジウムを添加した 2%アガロースゲル (NuSieve 3 : 1 agarose, BioWhittaker Molecular Applications, Inc.) で電気泳動を行い、トランスイルミネーター (BioDoc-It System, UVP) で可視化し、目的バンドの有無を基に確認した。

各プライマーの PCR の陽性率、標的部位の適切性、遺伝子解析への適応性を考慮して最適なプライマーペアを選択し、実環境試料の調査に供した。

10) シークエンス

遺伝子解析を行うために、Nested PCR の増幅産物をダイレクトシークエンスした。シークエンスは、増幅産物をゲルろ過した後、サンガー法 (Dynamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham 社) とオートシークエンサー (マルチキャピラリーシーケンサ RISA384, (株) 島津製作所) で行った。シークエンス作業は、(株) 島津製作所ジェノミックリサーチ室に依頼した。

11) 遺伝子型の特定

得られた塩基配列を BLAST (Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn), National Center for Biotechnology Information, U.S.A) を用いて GenBank の遺伝子データベースと比較し、相同性の高いものを探索した。GenBank の登録データと得られた塩基配列を clastal X (European Bioinformatics Institute, UK) で多重配列アライメントを行い、種または遺伝子型を特定した。

C. 研究結果及び考察

C-1 オーシスト 1 個を用いた PCR 法の確立

オーシスト 1 個をテンプレートとしたときの PCR の陽性率を Table 3 に示す。

Primer pair	Positive/Total	Percentage (%)
DIAGF-1/DIAGR (1st.)		
DIAGF-1/DIAGR-1 (Nested)	30/30	100
CPBDIAGF/CPBDIAGR	8/15	53
18SiF/18SiR	10/10	100
Cry 44/Cry 373	71/78	91

ポリスレオニン領域内をコードする Cry 44/Cry 373 のプライマーペアを用いた PCR では、78 サンプル中 71 サンプル (91%) で、標的部位の 515 bp の増幅産物を得ることができた。このプライマーペアで得られた増幅産物は、制限酵素 *Rsa*I を用いた RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析を行うことで *C. parvum* genotype 1, genotype 2 および genotype 3 (*C. meleagridis*) を弁別できる。しかし、*C. muris*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. andersoni* など、*C. parvum* 以外の種の検出が困難である。そこで、*C. muris*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. andersoni* など、*Cryptosporidium* を広く検出することが可能で、さらに種や遺伝子型を弁別することが可能な変異部位を増幅領域に含んでいる 18S rRNA 領域内を標的とする、18SiF/18SiR, CPBDIAGF/CPBDIAGR の各プライマーペアによる検討を行った。

18SiF/18SiR のプライマーペアを用いた PCR では、10 サンプル全て (100%), CPBDIAGF/

CPBDIAGR のプライマーペアでは 15 サンプル中 8 サンプル (53%) から、それぞれ 300 bp, 435 bp の目的バンドを得ることができた。しかし陽性率の高かった 18SiF/18SiR のプライマーペアは、変異部位とプライマーの位置が近く、シーケンス時に変異部位の解析が十分にできなかった。

そこで、18SiF/18SiR プライマーペアよりも広い範囲を増幅する CPBDIAGF/CPBDIAGR プライマーを基に、Forward プライマー (CPBDIAGF) を 3'方向に移動させた DIAGF-1 プライマーを設計し、試験に供した。DIAGF-1/CPBDIAGR (以下 DIAGR) を用いた PCR では、30 サンプルの全てでスミアが生じ、目的とする 430 bp のバンドは得ることができなかった。そこでさらに、Reverse プライマー (DIAGR) を 5'方向に移動させた Nested プライマーの DIAGR-1 を設計して DIAGF-1/DIAGR-1 による Nested PCR を行ったところ、30 サンプル (100%) の全てで目的とする 405 bp のバンドが得られた。

このプライマーペア DIAGF-1/DIAGR-1 では、大型種 (6~7 μ m) の *C. muris* と *C. andersoni* を検出できないが、これらは免疫正常なヒトへの感染性は低く、顕微鏡での弁別も可能であることから、特に問題とはならない。むしろ、ヒトへの感染性を有しているとされている様々な遺伝子型の *C. parvum* をはじめ、同じ小型の *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. felis* など多くの *Cryptosporidium* spp.を増幅できるメリットがある。また、本プライマーを用いた Nested PCR では、*Cryptosporidium* spp.の 18S rRNA 領域の一部 (*C. parvum* genotype 1 (GenBank accession code AY204241) を例にとると、18S rRNA 領域の全 1698 bp の 582~990 bp 間) (Fig. 2) の約 405 bp を増幅する (Fig. 3) が、この領域の 661~676 bp 間には宿主域に関連した多型が存在するので *Cryptosporidium* の種や遺伝子型の識別が可能で、この領域を用いた *Cryptosporidium* の種や遺伝子型の同定を行った例も報告されている (Morgan *et al.* 1997, Xiao *et al.* 1998, Pieniazek *et al.* 1999, Ward *et al.* 2002)。

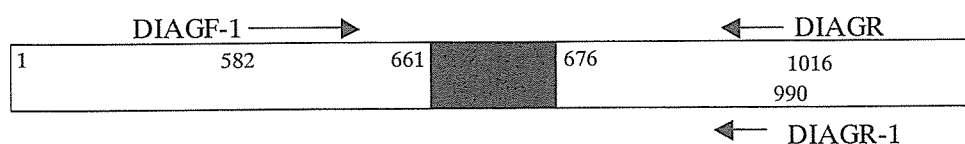


Fig. 2 Binding sites of the primers on the 18S rRNA gene used in this study.