

200400619A

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  
(クリプトスポリジウム症等感染リスクの評価手法の確立に関する研究)

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17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(クリプトスポリジウム症等感染リスクの評価手法の確立に関する研究)	5
国包章一	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト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および各種動物から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、板垣 匡	
3. わが国で発生したクリプトスポリジウム集団感染に関する考察	37
遠藤卓郎、黒木俊郎、泉山信司、辻 英高	
4. 水源周辺環境に生息する脊椎動物の <i>Cryptosporidium</i> の保有状況	61
黒木俊郎、遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、宇根有美 加藤行男、林谷秀樹、本籐 良、森 哲、黒尾正樹 鳥羽通久、森口 一、三宅芳枝	
5. 単離した <i>Cryptosporidium</i> 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	71
平田 強、橋本 温、森田重光	
6. 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	85
国包章一、片山浩之、秋葉道宏、真砂佳史、李 華芳	
7. 流域の地理情報にもとづいた水道水源(河川)における病原微生物濃度の予測	103
大村達夫、渡部 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	111
IV. 研究成果の刊行物・別刷	117

## 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室長

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

東京大学大学院工学系研究科講師

片 山 浩 之

立命館大学理工学部客員教授

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

北海道大学創成科学研究機構特任教授

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

岩手大学農学部

板 垣 匡

麻布大学獣医学部

宇 根 有 美

麻布大学獣医学部獣医学科

加 藤 行 男

弘前大学農学生命科学部

黒 尾 正 樹

兵庫県立健康環境科学研究所センター

辻 英 高

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

東京大学大学院工学系研究科

眞 砂 佳 史

神奈川県立衛生研究所

三 宅 芳 枝

日本蛇族学術研究所

森 口 一

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

日本獣医畜産大学獣医学部

本 籐 良

国立保健医療科学院水道工学部

李 華 芳

東北大学大学院工学研究科

渡 部 徹

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（クリプトスポリジウム症等  
感染リスクの評価手法の確立に関する研究）

平成16年度 総括研究報告書

平成17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 (クリプトスポリジウム症等感染リスクの評価手法の確立に関する研究)

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曝露量の評価を行った。2004年におけるクリプトスポリジウム症及びジアルジア症の届出患者数は、それぞれ91例及び84例であり、特にクリプトスポリジウム症は前年の8人に比べて大幅に増加した。これは、長野県内スポーツ施設利用者で集団感染が発生したことによる。患者から分離した原虫は、*Cryptosporidium. parvum* ヒト型であった。この集団感染事例も含め、国内における集団感染及び散発事例は、すべて *C. parvum* ヒト型であることが明らかとなった。また、ヒトから分離したジアルジア 17株は、14株が人畜共通感染性の Assemblage A-I、2株がヒトのみに感染するとされる Assemblage A-II であり、4株が人畜共通感染性の Assemblage B であった。一方、水道水源周辺環境等に生息する哺乳類、鳥類および爬虫類を調べたが、クリプトスポリジウムが検出されたのは鳥類のみであった。また、金沢市内ペットショップで市販されているオカメインコとフェレットから検出された両原虫は、いずれもヒトに感染性を有するものであった。青森県の動物病院を受診したイヌ及び繁殖施設で飼育されているイヌから検出されたジアルジアのうち多くは、Assemblage A-I であった。大阪市内で保護されたタヌキから検出されたクリプトスポリジウムの分離株の遺伝子型は *C. parvum* のウシ型であり、これもヒトに感染性のあるものであった。また、海外からペットとして輸入されるげっ歯類は高率にクリプトスポリジウム、ジアルジアを保有していることが明らかになった。一方、我が国におけるクリプトスポリジウム症の集団感染3事例を対象として、潜伏期間に関する情報の解析を行い、越生町の感染原因を飲水行動の観点から評価した結果、気温の上昇に伴う水道水摂取量の増加が一因であることを明らかにした。また、東京都内の下水から検出されたクリプトスポリジウムで最も多いのは *C. parvum* genotype 1 であり、相模川水中では、すべて *C. parvum* Pig genotype 1 であった。利根川並びにその支流である小山川のクリプトスポリジウム濃度の時間変動について調査した結果、水中のクリプトスポリジウム濃度は、最大で10倍程度のばらつきを持つことがわかった。降雨との関係に着目すると、降雨に伴い濁度が上昇しているときに、クリプトスポリジウムが検出される傾向が見られた。さらに、2001年の降水量デ

ータを用いて土地利用にもとづいた流出解析を行った結果、福島市における阿武隈川流量の実測値を（冬季を除き）おおむね再現することができ、また、このときのクリプトスポリジウム濃度は、流量に応じて変化するが、平均で 0.01 個/L と算出された。

分担研究者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院水道工学部 室長
	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	東京大学大学院工学系研究科 講師
	金子 光美	立命館大学理工学部 客員教授
	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	北海道大学創成科学研究機構 特任教授

## 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て、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. ヒト等のクリプトスポリジウム及びジアルジアの感染実態の調査と遺伝子解析

#### 1) ヒト

感染症週報（厚生労働省/国立感染症研究所）に掲載された全国の届出患者数を参考に、国内における 2004 年の両原虫の感染実態を把握した。2004 年夏に長野県内のスポーツ施設でクリプトスポリジウム症の集団発生が見られたことから、水道施設（水源の井戸水等）、スポーツ施設内の浴場（排水管のヘアークャッチャー内の残渣）、プール（排水溝

の沈殿物、ろ過装置のろ過砂)、下痢を発症した施設利用者による糞便汚染があったとみられる地点の足拭きマットの検査を実施し、感染経路等につき検討した。また、感染患者から分離された株について、種の同定と遺伝子型解析を行った。一方、国内医療機関等より原虫検査において陽性の糞便試料を入手し、遺伝子型解析を行った。また、大阪在住の無症候性感染者(2株)と東京在住の HIV 陽性下痢患者(1株)から分離したジアルジアの遺伝子型解析を行った。

## 2) 水道水源周辺環境等に生息する動物及び国内外ペット動物

国内の水道水源周辺環境等に生息する哺乳類(ニホンジカ 11 頭、ニホンザル 49 頭)、爬虫類(シマヘビ 21 頭、ヤマカガシ 15 頭、アオダイショウ 2 頭、ジムグリ 5 頭、ニホンマムシ 5 頭)、鳥類(ドバト、キジバト、スズメ、ツバメ、ヒヨドリ、カルガモ)の糞便中のクリプトスポリジウムを検査し、感染状況を評価した。一方、金沢市内のペットショップで市販されているオカメインコ、フェレット及び海外からペットとして輸入されるげっ歯類(アメリカアカリス 19 頭、コロンビアジリス 10 頭、デグー 18 頭、リチャードソンジリス 10 頭、シマリス 15 頭、ピグミージェルボア 10 頭、バナナリス 20 頭、オオミユビトビネズミ 16 頭、ヒメミユビトビネズミ 8 頭、シナイスナネズミ 4 頭、カイロトビマウス 20 頭、アフリカチビネズミ 20 頭)のクリプトスポリジウム感染状況を調べて、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。また、青森県の動物病院を受診したイヌ、ネコ、ウシや 6ヶ所のイヌ繁殖施設で飼育されているイヌ、下北半島の野生のニホンザルから検出されたジアルジアについても調査した。

## 2. 水道水経路による曝露量の評価

### 1) わが国で発生したクリプトスポリジウム集団感染に関する考察

1996 年、埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウム症の大規模な集団感染の感染原因を明らかにするため、わが国の集団感染 3 事例(1994 年平塚市雑居ビルでの水系感染、1996 年越生町の町水道を介した感染、2002 年兵庫県高校生の北海道旅行での罹患例)について潜伏期間に関する情報を解析し、感染原因を飲水行動の観点から評価した。

### 2) 下水及び河川水中のクリプトスポリジウムの遺伝子型に関する調査

東京都内の下水処理場(処理水量 63 万  $\text{m}^3/\text{日}$ )の下水及び相模川下流の神奈川県寒川町宮前付近で採取した河川水中に存在するクリプトスポリジウムのオーシストを単離し、個々のオーシストについて 18S-rRNA 領域を標的とした Semi-nested PCR 法を行い、増幅された遺伝子を解析し、環境水中のクリプトスポリジウムの種や genotype を調べた。

### 3) 環境水中における挙動の調査

利根川並びにその支流である小山川に、経時的に連続して 100L 程度の水を採取する装置を設置して 3 時間ごとのクリプトスポリジウム、指標微生物、濁度等を測定し、その濃度変動を定量的に評価した。

### 4) 流域の地理情報にもとづいた水道水源(河川)における病原微生物濃度の予測

阿武隈川流域を対象流域として設定し、土地利用にもとづいた流出解析モデルの構築を

行った。病原微生物負荷源としては、阿武隈川中流域に位置する下水処理場を取り上げ、下水処理放流点から約 40km 下流に位置する福島市の流量とクリプトスポリジウム濃度を評価した。なお、下水処理場（処理水量 45,000 m<sup>3</sup>/日）から排出されるクリプトスポリジウムは、1 個/L の濃度であると仮定した。

（倫理面での配慮）

ヒト等の糞便試料を用いて遺伝子型解析を行ったが、試料提供者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されるような情報は公表しない等、試料提供者の不利益を与えないよう十分に配慮した。

## C. 研究成果及び考察

### 1. ヒト等のクリプトスポリジウム及びジアルジアの感染実態の調査と遺伝子解析

#### 1) ヒト

2004 年におけるクリプトスポリジウム症及びジアルジア症の届出患者数は、それぞれ 91 例及び 84 例であり、特にクリプトスポリジウム症は前年の 8 人に比べて大幅に増加した。これは、長野県内スポーツ施設利用者で集団感染が発生したことによる。この集団感染事例の現地調査を実施したところ、下痢を発症した施設利用者による糞便汚染があったとみられる体育館の足拭きマット等からクリプトスポリジウムが検出されたことから、施設利用者間での感染があった可能性が示唆された。患者から分離した原虫は、*Cryptosporidium parvum* ヒト型であった。この集団感染事例も含め、国内における集団感染及び散発事例は、すべて *C. parvum* ヒト型であることが明らかとなった。また、ヒトから分離したジアルジア 17 株は、14 株が人畜共通感染性の Assemblage A-I、2 株がヒトのみに感染するとされる Assemblage A-II であり、4 株が人畜共通感染性の Assemblage B であった。

#### 2) 水道水源周辺環境等に生息する動物及び国内外ペット動物

水道水源周辺環境等に生息する哺乳類 60 検体、鳥類 265 検体、爬虫類 48 検体のクリプトスポリジウムの保有状況を調べたところ、鳥類のみ 5 検体（キジバト 2 検体、ドバト 1 検体、スズメ 1 検体、ヒヨドリ 1 検体）からクリプトスポリジウムが検出された。キジバトとドバトの 1 検体ずつから検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型は、いずれも *C. meleagridis* であり、これは国内外ではじめての検出例であった。金沢市内ペットショップで市販されているオカメインコから分離したクリプトスポリジウム 2 株は、*C. meleagridis* と *C. baileyi* で、またフェレットから分離したジアルジア 1 株は Assemblage A-I であり、いずれもヒトに感染性を有するものであった。大阪市内で保護されたタヌキから検出されたクリプトスポリジウムの分離株の遺伝子型は *C. parvum* のウシ型であり、これもヒトに感染性のあるものであった。一方、海外からペットとして輸入されるげっ歯類は高率にクリプトスポリジウム、ジアルジアを保有していることが明らかになった。青森県の動物病院を受診したイヌ及び繁殖施設で飼育されているイヌから検出されたジアルジアのうち多くは、Assemblage A-I であった。



## 2. 水道水経路による曝露量の評価

### 1) わが国で発生したクリプトスポリジウム集団感染に関する考察

潜伏期間に関する情報を整理し、Log-Logistic 分布を適用し発症日数を求めた結果、平均で6日、中間値が6日であり、患者の95%が8日までに発症していたことを明らかにした。また、越生町の集団感染について飲水行動の観点から評価すると、気温の上昇に伴う水道水摂取量の増加が集団感染に寄与した可能性が大きいと考えられ、水系感染における飲水行動の重要性を改めて示唆する結果となった。

### 2) 下水及び河川水中のクリプトスポリジウムの遺伝子型に関する調査

東京都内の下水から検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型で最も多いのは *C. parvum* genotype 1 (85.1%)、次いで *C. parvum* Isolate from human (6.4%) *C. meleagridis* (6.4%)、*C. parvum* genotype 2 (2.1%) であった。相模川河川水から検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型はすべて、*C. parvum* Pig genotype 1 であった。

### 3) 環境水中における挙動の調査

利根川並びにその支流である小山川のクリプトスポリジウム濃度の時間変動について調査した結果 (2004年10月および11月)、水中のクリプトスポリジウム濃度は、最大で10倍程度のばらつきがあることがわかった。この変動幅は、ジアルジアと同程度であり、微生物指標の変動幅よりも大きいことから、水中の両原虫は、微生物指標と比較して、より大きな変動を持っていることが示された。降雨によって引き起こされる時間レベルの濃度変動に着目すると、降雨に伴い濁度が上昇しているときに、クリプトスポリジウムが多く検出される傾向が見られた。

### 4) 流域の地理情報にもとづいた水道水源 (河川) における病原微生物濃度の予測

2001年の降水量データを用いて土地利用にもとづいた流出解析を行った結果、福島市における阿武隈川流量の実測値を (冬季を除き) おおむね再現することができ、また、このときのクリプトスポリジウム濃度は、流量に応じて変化するが、平均で0.01個/Lと算出された。

## D. 結論

本年度の研究においては、ヒト及び動物の糞便試料から得られた多くのクリプトスポリジウム株とジアルジア株につき、その遺伝子型を特定した。この結果、クリプトスポリジウム及びジアルジアのいずれの場合も、その遺伝子型は、ヒトの糞便から分離した株はもとより、動物の糞便から分離した株についても、ヒト型のものがその多くを占めていた。特に野生動物やペット動物のうちでもサル、イヌ、フェレットなどが、ヒトに感染性を有するクリプトスポリジウムやジアルジアを保有していることは、今後の対策のあり方を考える上で重要である。また、利根川などにおける現場調査により、河川水中のクリプトスポリジウム濃度の時間変動特性がしだいに明らかになってきている。これらの知見は、今後、河川を水源とする場合の水道原水についてのクリプトスポリジウム検査において、適

切な試料採取のタイミングを見極める上でも大いに参考となるものである。

本年度は、3ヶ年の研究計画の2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

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(クリプトスポリジウム症等  
感染リスクの評価手法の確立に関する研究)

平成16年度 分担研究報告書

平成17年3月

## 分担研究報告書 1

ヒト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および  
各種動物から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

## ヒト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 および各種動物からの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、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。また、ヒトおよび身近な動物から検出された分離株の遺伝子解析をおこない、動物からの分離株についてはヒトへの感染源としての重要性の有無を考察した。2004年の届出患者総数（全国）はクリプトスポリジウム症 91 例、ジアルジア症 84 例であった。クリプトスポリジウム症についてはスイミングプールにおける集団感染の発生在国内で初めて確認され、その分離株は *C. hominis* (syn. *C. parvum* の genotype 1) であった。一方、金沢市内のペットショップで市販されているオカメインコから検出されたクリプトスポリジウムは *C. meleagridis* と *C. baileyi* の 2 種で、大阪市内で保護されたタヌキから検出された分離株の遺伝子型は *C. parvum* のウシ型であり、いずれもヒトに感染性のあるものであった。ジアルジアの遺伝子型解析では、ヒトから分離された 3 株のうち 2 株はヒトにのみ感染するとされる Assemblage A-II であり、1 株は人獣共通感染性の Assemblage B であった。また、金沢市内のペットショップのフェレットから検出されたジアルジアは Assemblage A-I グループに属し、これもヒトに感染性を有するものであった。今後もヒトおよび身近な動物における両原虫の分子疫学調査を続け、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り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。患者の発症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

ヒトにおける両原虫症の感染実態は、厚生労働省/国立感染症研究所の感染症週報に掲載された全国の届出患者数を参考にした。クリプトスポリジウムの種の同定と遺伝子型解析は、2004年夏に長野県内のスポーツ施設で感染したと思われる集団感染発生時の患者から分離された10株（糞便検査を担当した埼玉県衛生研究所の山本徳栄氏から分与）、金沢市内のペットショップで市販されているオカメインコから検出された2株、そして大阪市内で捕獲されたタヌキから検出された1株について実施した。ジアルジアの遺伝子型解析は、ヒトから分離した3株（2株は大阪在住の無症候性感染者から、1株は東京在住のHIV陽性下痢患者から分離）および金沢市内のペットショップで市販されているフェレットから分離した1株について実施した。

## C. 研究結果

### 1) ヒトにおける感染状況

2004年の届出患者数はクリプトスポリジウム症91人、ジアルジア症84人であった。都道府県別患者数を表1に示す。クリプトスポリジウム症の患者数が埼玉県と千葉県に多いのは、両県のスポーツクラブのグループ（各2グループ）が長野県の1スポーツ施設を利用した際に集団感染したためであり、とくに千葉県の場合は、長野で感染したスイミングクラブの会員が千葉のプールで泳いで、二次集団感染が発生したことによる。なお、届出は病原体が検出された有症者に限られるので、検査をしなかった有症者や無症状の病原体保有者は届出患者数には含まれていない。

ジアルジア症患者は、前年の届出数（99人）に比べてやや減少しているが、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。

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（2004年）

	合計	都道府県別
クリプトスポリジウム	91	北海道 1, 埼玉 28, 千葉 54, 東京 8
ジアルジア	84	北海道 3, 青森 1, 岩手 2, 山形 1, 福島 1, 茨木 2, 栃木 1, 群馬 1, 埼玉 1, 千葉 13, 東京 17, 神奈川 3, 新潟 2, 福井 1, 岐阜 1, 静岡 1, 愛知 2, 三重 1, 滋賀 2, 大阪 8, 兵庫 5, 奈良 2, 和歌山 1, 岡山 4, 徳島 1, 福岡 2, 長崎 1, 沖縄 4

厚生労働省/国立感染症研究所：感染症週報6(52・53), 2004

### 2) クリプトスポリジウム分離株の種と遺伝子型

長野県で集団感染した埼玉県の患者の糞便から分離された10株は、遺伝子型解析の結果、すべて *Cryptosporidium hominis* と同定された。ちなみに、*C. hominis* は2002年12月に新種として報告された種であり、従来は *C. parvum* の genotype 1 あるいは *C. parvum* の human genotype と呼ばれていた。

オカメインコからは形態的に異なる2種類のオーシスト（直径約5μmの短楕円形のもの、長径約6μmの楕円形のもの）が検出された。遺伝子型解析により、前者は *C. meleagridis*、後者は *C. baileyi* であることが判明した。

大阪市内のタヌキから検出されたオーシストの遺伝子型は *C. parvum* のウシ型であった。

### 3) ジアルジア分離株の遺伝子型

ヒトから分離した3株のうち、無症候性感染者から分離した2株の遺伝子型は Assemblage A-II に属し、HIV陽性の下痢患者から分離した1株は Assemblage B に属するものであった。一方、金沢市内のペットショップのフェレットから検出された株は Assemblage A-I に属するものであった。

#### D. 考察

2004年の全国の届出患者総数は、クリプトスポリジウム症 91 人、ジアルジア症 84 人であり、クリプトスポリジウム症は前年の届出数（8人）に比べて大幅に増加している。これは、8月下旬に長野県内のスポーツ施設を利用した埼玉県と千葉県の各2グループにおいて集団感染が発生したことによる。ちなみに、集団感染発生時に同施設利用者（12グループ、572人）を対象に実施した聴き取り調査では、下痢などを発症した有症者数は上記4グループの284人であったという（埼玉衛研、山本徳栄氏からの私信）。

届出患者数が聴き取り調査における有症者数に比べて著しく少ない理由は、届出は病原体が検出された有症者に限られ、検査を受けなかった有症者や無症状の病原体保有者は除外されるからである。また、下痢患者が受診しても、クリプトスポリジウムの検査を実施する医療施設が全国的に極めて少ないので、本症の感染が見落とされている可能性が高い。実際の感染者数は届出数よりもはるかに多いものと思われる。各医療施設に対して、日常的に原虫検査を実施するよう指導することが強く望まれる。

2004年、スイミングプールにおけるクリプトスポリジウムの集団感染が国内で初めて確認された。千葉県健康増進課の記者発表（9月18日）によれば、長野での集団感染発生に続いて、千葉県内の2箇所のプールで46人が発症し、両プールの水からオーシストが検出されたという。プール汚染の原因は、長野のスポーツ施設で合宿中に発症した千葉のスイミングスクールのメンバーが、千葉に戻ってから、この2箇所のプールを利用したことによる。発症した46人は長野の合宿には参加しておらず、プールで二次集団感染が起こったことになる。

スイミングプールや水遊び施設における集団感染は欧米では以前から問題になっていたが、国内では今回が初めての事例である。本症の場合、下痢症状が終息したあとも、約1カ月にわたって毎日多数のオーシスト（ $10^6$ 個/g）が糞便に排出される。したがって、集団感染の発生を防止するには、下痢発症中はもちろん、下痢終息後も4週間は患者のプール使用を禁止する必要がある。今後、幼稚園や学校のプールなどにおいても、本症の水系感染防止を念頭においた安全管理対策の樹立が必須の課題となる。

ジアルジア症の届出患者数は、2001年には135人であったが、2002年は115人、2003年は99人、2004年は84人と、年々減少しつつある。減少の理由として、SARS騒動、イラク戦争、経済不況などの影響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、クリプトスポリジウムやジアルジアに関しては無症状の病原体排出者を把握することも非常に重要であり、同法律の見直しが必要である。

クリプトスポリジウム分離株の遺伝子型解析では、集団感染した埼玉県の患者の糞便から分離された10株はすべて *C. hominis* と同定された。本種はヒトにのみ感染する種であり、集団感染の汚染源は動物ではなく、ヒトであると結論付けることができた。一方、ペットショップで市販されているオカメインコや、民家近くで保護されたタヌキから分離された株は、いずれもヒトにも感染性を有する遺伝子型であった。

ジアルジア *Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) の分離株の遺伝子型解析では、無症候感染者から分離された2株はヒトにのみ感染するとされる Assemblage A-II であり、下痢患者

からの1株は人獣共通感染性の Assemblage B であった。また、ペットショップのフェレットからの分離株の遺伝子型は Assemblage A-I グループに属し、これもヒトに感染性を有するものであった。

人獣共通感染性のクリプトスポリジウムとジアルジアの株が、市販のペットや身近な野生動物から検出されたことは重要な知見である。ペットや野生動物の糞の適切な処理を住民に啓蒙する必要があるし、ジアルジアについては薬剤治療が可能であるから、ペットショップにおいて検査と投薬を実施するよう指導すべきであろう。

今後もヒトおよび身近な動物における疫学調査を続け、分離された株については遺伝子型解析を実施してヒトへの感染源を特定したり、ヒトへの感染性の有無を把握することも大切である。

## E. 結論

2004年の全国の届出患者総数は、クリプトスポリジウム症 91 例、ジアルジア症 84 例であった。長野県ではクリプトスポリジウムの集団感染が発生し、千葉県ではスイミングプールにおける集団感染が国内で初めて報告された。集団感染した患者からの分離株は *C. hominis* であった。市販のオカメインコからは *C. meleagridis* と *C. baileyi*、野生のタヌキからは *C. parvum* の cattle genotype が検出された。また、市販のフェレットから検出されたジアルジアの遺伝子型は Assemblage A-I グループに属するものであった。これら動物から検出された株は全てヒトにも感染性を有するものであることが判明したので、今後もヒトおよび各種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, Iseki M : Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol Res 92:523-6, 2004.
- 2) Matsubayashi M, Abe N, Takami K, Kimata I, Iseki M, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, Baba E : First record of *Cryptosporidium* infection in a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). Vet Parasitol 120:171-5, 2004.
- 3) Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, Baba E : Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. Vet Parasitol 129:165-168, 2005.
- 4) Abe N, Read C, Thompson RCA, Iseki M : Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. J Parasitol 91:179-182, 2005.
- 5) Abe N, Kimata I, Tokoro M : Genotyping of *Giardia* isolates from humans in Japan using the small subunit ribosomal RNA and glutamate dehydrogenase gene sequences. Jpn J Infect Dis 58:57-58, 2005.
- 6) 稲田康志、木俣 勲、塩田貞光、石本知子、井関基弘 : プロテインラベリング法で蛍光標識したクリプトスポリジウムオーシストのオーシスト検出検査および除去試験への適用. 日本水道協会雑誌 73 (6) : 14-21, 2004.

### 著書・総説

- 1) 井関基弘、所 正治 : クリプトスポリジウム症. 木村哲・喜田宏 (編) 「人獣共通感染症」, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2004, p. 321-328.
- 2) 井関基弘 : クリプトスポリジウム症. 「感染症の診断・治療ガイドライン 2004」, 日本医師会, 2004, p. 192-195.
- 3) 井関基弘・所 正治 : クリプトスポリジウム症. 小児科 45 : 471-476, 2004.
- 4) 所 正治・井関基弘 : 飲料水からうつる寄生虫症. 治療 86 : 2704-2708, 2004.
- 5) 吉川尚男・井関基弘 : クリプトスポリジウムの特異な細胞内寄生様式について. 顕微鏡 39 : 48-52, 2004.



## 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、板垣 匡

平成 16 年度 厚生科学研究 新興・再興感染症研究事業 (H15-新興-16)  
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  
(クリプトスポリジウム症等感染リスクの評価手法の確立に関する研究)

### 分担研究報告書

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

主任研究者： 国包 章一 (国立保健医療科学院 水道工学部)  
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)  
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)  
板垣 匡 (岩手大学農学部 獣医寄生虫病学)

#### 研究要旨

国内におけるクリプトスポリジウムならびにジアルジアによる感染症例を分子疫学的に解析した。本年度は平成 16 年 8 月下旬に発生した長野県を感染地とする数県にまたがるクリプトスポリジウム集団感染の事例調査を行い、患者由来ならびに環境由来の原虫の遺伝子型別結果から本事例が *C. parvum* ヒト型による感染であったことを明らかにした。国内においては集団感染および散発事例とも、*C. parvum* ヒト型による場合が多いことがこれまでの調査結果から示された。

ジアルジアの遺伝子型別検査からは、国内への輸入例のほとんどは *Assemblage A* によるもので、さらに国内感染例からもこの *Assemblage A* が確認された。感染源調査の一環として行われた動物由来のジアルジア型別調査では、イヌ、ネコ、ウシおよび野生ニホンザル由来のジアルジアが調べられ、人畜共通性のある *Assemblage A* がイヌにおいて、また *Assemblage B* がニホンザルにおいて感染率が高いことが示された。さらに国立感染症研究所・感染症情報センターにより報告される「感染症発生動向調査週報-IDWR」のデータから、ジアルジアに関しては国内感染例の割合が全体の 40% 前後であることが示され、国内における感染要因／経路の解明が急がれる。

#### A. 研究目的

本研究は、分子疫学的方法によりヒト感染に関連性のあるクリプトスポリジウムならびにジアルジアの遺伝子型を特定し、データベースとして提供することを目的としている。これにより感染様式、地域性、宿主動物との関連性等の特性解析や感染媒体としての水道水の寄与率、健康リスク評価および感染防止対策の構築に資するものである。本年度は、平成 16 年 8 月末に発生したクリプトスポリジウム集団感染事例の原因究明を目的として分子疫学的調査を行った。また国内ジアルジア感染の要因を明らかにするために、臨床検査試料およびイヌを中心とした動物由来試料を用いて分離株の遺伝子型別解析を行った。

#### B. 研究方法

##### クリプトスポリジウム集団感染調査

平成 16 年 8 月下旬、長野県にて集団感染事例が報告された。本事例では県外からの各種スポーツの合宿を目的とした学生および児童(水泳スクールの生徒)らが同一のホテル

ル（合宿施設）から帰宅した時点で下痢、嘔吐、発熱、腹痛等を発症した。患者発生は埼玉県ならびに千葉県より報告があり、水系集団感染の可能性が示されたことから患者の検便ならびに宿泊施設の環境調査が行われた。患者検便の結果、埼玉、千葉両県内で合計 33 試料がクリプトスポリジウム・オーシスト陽性と判明し、それらがさらに遺伝子型解析に供された（表-1）。なお、千葉県では当該事例に関連した児童によるものと思われる県内の複数の水泳プールで二次汚染が起き、それによる患者の発生が見られた。それらの患者試料も解析に供した。また感染源特定のために行われた環境調査では、ホテル付属施設であるプールの濾過槽のろ材（砂）、宿泊ホテルの大浴場に設置されていたヘアキャッチャー内残渣、プール排水溝沈殿物、プール周辺にあった池の底泥、体育館トイレ付近に設置されていた足拭きマット（便のお漏らし事故による汚染箇所）、およびその汚染されたマットを掃除した雑巾が検査された。

### 国内散发事例

前年度より引き続き国内医療機関等より依頼された原虫検査において、クリプトスポリジウム等陽性材料について遺伝子型別を行った。ジアルジアに関しては、一般検査として糞便検査を行っている検査機関からジアルジア陽性の糞便材料を入手し、その遺伝子型解析を行った。

### イヌ等動物感染のジアルジア調査

青森県の動物病院を受診したイヌおよび 6 ケ所のイヌ繁殖施設（a-f）で飼育されていたイヌより検出されたジアルジア 24 試料を調べた。また青森県の動物病院を受診したネコ由来 3 試料、岩手県内 2 ケ所の牧場にて飼育されていたウシ由来 5 試料さらに下北半島の野生ニホンザル由来の 3 試料も調べた。

### 遺伝子型解析

糞便試料は必要に応じ MGL 法等によりシスト/オーシストの粗精製を行った。分離したクリプトスポリジウム（オーシスト）は SDS—過熱法により DNA を抽出後、ポリスレオニン領域の PCR 産物（約 520bp）について制限酵素 Rsa1 を用いた RFLP 解析ならびにその塩基配列解析、および 18S r RNA 領域（420bp）に関する塩基配列解析を行った。ジアルジア（シスト）に関しては、クリプトスポリジウムと同様にして DNA を抽出後、GDH（Glutamate dehydrogenase）遺伝子内約 770bp を PCR 増幅し、産物に関して制限酵素 Dde1 による RFLP 解析および塩基配列解析を行った。

### 国内発生動向調査報告との関係

国立感染症研究所・感染症情報センターより、各週で各種感染症報告数を集計発表している「感染症発生動向調査週報 - IDWR」の発生動向総覧 [<http://idsc.nih.gov.jp/idwr/pdf-j.html>] に基づいて、報告数と推定感染地に関するデータを、平成 15 および 16 年度分について解析した。なお、IDWR の集計データに関しては IDWR に注意書きされているように、その集計データに関しては「当該週に診断された報告症例の集計です。しかし、迅速に情報還元するために期日を決めて集計を行いますので、当該週に診断された症例の報告が、集計の期日以降に届くこともあります。それらについては、発生動向総覧では扱いませんが、翌週あるいはそれ以降に、巻末の表の累積数に加えられることとなります。」との注意書きがあり、各年度の報告累積数と本解析に用いた報告数は一部に一致しない場合がある。

## C. 研究結果

### クリプトスポリジウムの分子疫学

患者報告のあった埼玉県ならびに千葉県からのクリプトスポリジウム陽性試料について遺伝子型解析を行った結果、ポリスレオニン領域の PCR/RFLP 解析では、すべて

の試料が陽性対照である *C. parvum* ヒト型と切断パターンが一致した (図-1)。また一部の PCR 産物についてその塩基配列を調べたところ、*C. parvum* ヒト型 (H1 サブタイプ) と 100%一致することが明らかとなった (図-2)。埼玉県および千葉県と異なる地域から各々 10 例を超すクリプトスポリジウム症例が検査されたが、両地域の症例が同時期、同一の施設における同一の原虫感染が原因であることが明らかにされたことで、本事例は複数県にまたがる集団感染事例と判断された。さらに長野県には行かずにクリプトスポリジウムに感染した千葉県の水泳スクール生徒も同一の株に感染したものと考えられ、本事例では、感染地外における 2 次感染が拡大したことが示された。また感染源特定のために行われた環境調査では、ホテル付属施設であるプールの濾過槽のろ材 (砂) ならびに体育館トイレ付近に設置されていた足拭きマット (下痢便により汚染されていた)、さらにその汚染されたマットを掃除した雑巾よりクリプトスポリジウムが検出され、感染源は水泳プールとその周辺であることが明らかとなった。足拭きマットの試料からは PCR 産物が得られ、型別試験の結果 *C. parvum* ヒト型であることを確認した。

本年度の長野県の事例が *C. parvum* ヒト型であったことから、埼玉/越生 (平成 8 年)、北海道-兵庫県 (平成 14 年) を含め国内の 3 事例は *C. parvum* ヒト型による感染であり、*C. parvum* 動物型による感染は現在のところ神奈川県/平塚の 1 事例 (平成 6 年) のみで、国内の集団感染においては *C. parvum* ヒト型による感染例の方が多い傾向が示された。なおヒト型サブタイプを見ると、越生と長野県の事例は H1 サブタイプ、北海道-兵庫県の事例は H2 サブタイプであった。

本年度の散発事例では *C. felis* ならびに *C. meleagridis* を 1 株ずつ検出した。これまでの症例 42 例をまとめると、遺伝子型による検出率は、*C. parvum* ヒト型が 27 株 (64%) で最も多く、次いで *C. parvum* 動物型と *C. meleagridis* 型がそれぞれ 6 株、さらに *C. felis* が 3 株、*C. parvum* イヌ型が 1 株となる (表 - 2)。

#### ジアルジアの遺伝子型別

ヒト感染例で調べた試料はアフリカ、東アジア、東南アジア諸国からの帰国時健診で検出されたもの、あるいは一般健康診断等で検出されたジアルジアであり、14 試料について遺伝子型別を行った。PCR/RFLP 解析の結果、3 種類の遺伝子型に分類された。図 - 3 に制限酵素 Dde1 によるそれらの切断パターンを示した。PCR 産物の塩基配列解析の結果、それらは Assemblage A (A1) および Assemblage B (B3) であると同定された。PCR/RFLP では Assemblage B (B3) に 2 つのパターンが含まれることが示された。表 - 3 に 14 試料の遺伝子型別の結果を示す。Assemblage A (A1) の試料のうち 4 試料は渡航歴 (インド、ラオスおよびビエンチャン、ウルグアイ、カナダ) があり、残りの 2 試料は国内感染と考えられた。カナダ渡航歴のある感染者は、キャンプ地での飲水を経験していた。後者の国内感染と考えられる 2 例は神奈川県および高知県からの報告であるが、両例とも感染経路を推定させる情報はなかった。また Assemblage B (B3) の 2 試料に関しては、いずれも渡航歴 (インドおよびバングラデッシュ) のあるものであった。

一方、動物由来のジアルジアに関する遺伝子型解析結果では、イヌ由来 24 試料中 14 試料が Assemblage A、1 試料がイヌ特異的な Assemblage C、6 試料が同様にイヌ特異的な Assemblage D であり、残り 3 試料は Assemblage A と D の重複感染であった (表 - 4)。人畜共通性の Assemblage A は 17 試料より検出されており、ヒトに対する感染源としてのイヌの重要性が示唆された。なお繁殖施設別にみると、施設 a および b からは Assemblage A、施設 c からは Assemblage D、施設 d、e、f からは Assemblage A および D が検出された。ネコ由来の 3 試料はすべて Assemblage F であった。ウシ由来の 5 試料中 1 試料が Assemblage A であったが、残り 4 試料は Assemblage E であった。野生ニホンザル由来の 3 試料はいずれも人畜共通性の Assemblage B が検出され、イヌと同様にヒトへの感染源として注意する必要がある。図 - 4 には本調査結果のヒト感染