

200500659A

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17年度 総括・分担研究報告書

平成18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)	3
	国包章一
II. 分担研究報告書	
1. ヒト等のクリプトスポリジウムとジアルジアの感染実態の調査と遺伝子型解析	15
	井関基弘、所 正治、阿部仁一郎
2. 水源周辺に生息する脊椎動物のクリプトスポリジウムの保有状況	21
	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、鳥羽通久、森口 一、村瀬敏之、三宅芳枝
3. 相模川水系におけるクリプトスポリジウムオーシストの出現状況	29
	平田 強、金子光美、森田重光
4. 利根川水系におけるクリプトスポリジウムとジアルジア汚染実態の調査	41
	国包章一、秋葉道宏、片山浩之、真柄泰基、李 華芳
5. 河川および内湾底泥中のクリプトスポリジウム存在量調査	53
	大村達夫、渡部 徹、真砂佳史
6. クリプトスポリジウム集団感染の前兆現象	61
	遠藤卓郎、泉山信司
7. 水道水中の感染リスクの評価	75
	片山浩之、真砂佳史
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99
IV. 研究成果の刊行物・別刷	103

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客員教授

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

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

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

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

東北大学大学院工学研究科

真 砂 佳 史

神奈川県立衛生研究所

三 宅 芳 枝

鳥取大学獣医学科

村 瀬 俊 之

日本獣医畜産大学獣医学部

本 籐 良

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

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17年度 総括研究報告書

平成18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及びジアルジアによる汚染に起因する感染リスク評価に関して、ヒト等の感染実態の調査、水道水源の汚染実態の調査、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。この結果、ヒト及び身近な動物から分離したクリプトスポリジウム及びジアルジア株を subgenotype レベルまで解析することにより、汚染源の特定や感染性などについて、より有益な情報を得られることが明らかになった。水道水源河川におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度レベルは、畜舎排水や生活排水による負荷によって大きく変動することが示された。降雨時におけるクリプトスポリジウムの濃度レベル上昇は、河川底泥に含まれていたものの再懸濁による寄与が大きいと考えられた。一方、水道におけるクリプトの大規模な集団感染を回避するためには、集団感染に先行する持続的な汚染、あるいはそれに伴う散發的な患者を如何に捉えるかが重要であると考えられた。利根川を水源とする浄水場を仮想し、その浄水場で処理された浄水を飲料水として摂取することにより発生する、クリプトスポリジウム症の感染リスクをモンテカルロ法により評価すると、感染リスクは、USEPA が推奨している許容レベル 10^{-4} 以下を満たしていることが明らかになった。

分担研究者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院水道工学部 室長
	井関 基弘	金沢大学医学系研究科 客員教授
	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による汚染に起因する感染リスク評価手法を確立するため、ヒト等の感染実態の調査、水道水源河川の汚染実態の調査、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い、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) ヒト等

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 2005 年のクリプトスポリジウム及びジアルジアの感染実態を把握した。一方、昨年度までの解析で、国内の下痢症患者、大阪市内のタヌキから分離した *Cryptosporidium hominis* または *Cryptosporidium parvum bovine genotype* と決定された株について、その遺伝子型をさらに詳細にするため、**subgenotype** の解析を行った。また、本年度新たにクリプトスポリジウム症の患者 2 例及びジアルジア症の患者 2 例の検体について、遺伝子型を解析した。

2) 水源周辺に生息する脊椎動物のクリプトスポリジウムの保有状況

関東に位置する 2 ヶ所の傷病動物収容施設に収容された傷病鳥類 14 目 27 科 61 種の全 179 検体、国内の野外に生息する爬虫類シマヘビ 33 匹、ヤマカガシ 65 匹、アオダイショウ 4 匹の全 104 検体、ペットとして輸入される小型哺乳類カイロトゲマウス 11 頭、キンイロスパイニーマウス 13 頭、アレチネズミ 8 頭、デブスナネズミ 9 頭、アメリカモモンガ 10 頭、デグー 9 頭、ピグミージェルボア 20 頭、シマリス 10 頭、バナナリス 10 頭、フサオジャービル 10 頭、フトオアレチネズミ 10 頭、ミミナガハリネズミ 10 頭、オオエジプトアレチネズミ 10 頭、リチャードソンジリス 10 頭、コロンビアジリス 10 頭、ダウリアハタリス 10 頭、エゾリス 10 頭、タイリクモモンガ 10 頭、ゼブラマウス 11 頭の全 201 検体から採取した糞便あるいは腸管内容物を試料として、クリプトスポリジウムの保有状況を調査した。また、クリプトスポリジウムが検出された試料については、遺伝子型を解析した。

2. 水道水源河川の汚染実態の調査と遺伝子解析

1) 相模川水系におけるクリプトスポリジウムオーシストの出現状況

相模川の最下流に位置する水道原水取水地点（寒川町宮山）を基点に、その上流側にあって常時水が流入している支流 3 川（中津川、小鮎川、玉川）と、相模川本川に流入して

いる排水路（吐口）の表流水のクリプトスポリジウム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、河川水中のオーシストの遺伝子型別濃度分布を明らかにした。また、相模川水系の支流や吐口のクリプトスポリジウムの負荷量を推定した。なお、流量のデータは、本川及び支流の流量については、国土交通省等公的機関から入手し、吐口については実測した。

2) 利根川水系におけるクリプトスポリジウム、ジアルジア汚染実態の調査

水道水源河川のクリプトスポリジウム、ジアルジア汚染レベルの上昇の要因を明らかにするため、利根川とその上流に位置する支流の小山川の河川水を 40～60L 採取し、クリプトスポリジウム、ジアルジアの個数を測定し、濃度変動を明らかにした。利根川については、河川水中のクリプトスポリジウム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、オーシストの遺伝子型を解析した。なお、調査は 2004 年 12 月から 2005 年 11 月までの 1 年間実施した。

3) 河川および内湾底泥中のクリプトスポリジウム存在量調査

降雨期に発生するクリプトスポリジウムの濃度上昇の要因を明らかにするため、宮城県高城川下流 3 地点（St. 6～8）および高城川が流入する松島湾内 5 地点（St. 1～5）で採取した底泥 0.5g から、DNA を直接抽出し、QProbe PCR 法によりクリプトスポリジウムの検出および定量を行った。一部の調査では、底泥採取と同時に河川水を 20L 採取し、水中のクリプトスポリジウム濃度を測定した。なお、調査は 2005 年 10 月から 2006 年 2 月までの 5 ヶ月間実施した。

3. 水道水経路による曝露量の評価

1) クリプトスポリジウム集団感染の前兆現象

クリプトスポリジウム集団感染が大規模になる以前の状況を明らかにするため、1992 年カナダのノースバトルフォードの事例、1993 年米国ミルウォーキーの事例、1996 年埼玉県越生町の事例を取り上げて、それぞれの事例の報告資料を収集解析し、オーシスト濃度の計算を行った。

2) 水道水中の感染リスクの評価

既存のクリプトスポリジウムの浄化残率のデータ、およびそこで実測されているクリプトスポリジウムの定量データを用いて、クリプトスポリジウムの濃度分布の決定方法の検討を行った。また、評価された手法を用いて、昨年度に実施した利根川河川水中のクリプトスポリジウムの現地調査結果から、リスクを計算し、河川水を水道水源として利用した場合に、水道水の飲用によって生じるクリプトスポリジウム症の感染リスクを評価した。

（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) ヒト等

2005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9例及び80例であった。しかし、実際の感染者数は、この届出患者数よりもはるかに多いと考えられた。一方、国内の下痢症患者から分離したクリプトスポリジウム分離株のsubgenotypeは、*C. hominis*の3株がIa、Ib、Ic、*C. parvum bovine genotype*の2株がいずれもIIaであった。大阪市内のタヌキから分離した株の*C. parvum bovine genotype*は、IIa～IIfの6型とは異なる新型であったことから、ヒトへの感染性の有無は不明である。クリプトスポリジウム症の患者2例の遺伝子型を解析したところ、1例は、ヒトへ特異的に感染する*C. hominis*であったが、他の1例は、*C. hominis*と人畜共通感染性の*C. parvum bovine genotype*の混合感染であった。ジアルジア症の患者2例の遺伝子型を解析したところ、2例とも人畜共通感染性のAssemblage Bであった。

2) 水源周辺に生息する脊椎動物のクリプトスポリジウムの保有状況

鳥類では、14目27科61種179検体を調べたところ、クリプトスポリジウムは検出されなかった。へビ類ではヤマカガシのみ65匹中13匹(20.0%)でクリプトスポリジウムが検出された。ヤマカガシから検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型(18S rRNAの塩基配列)は、*Cryptosporidium* sp. 938であり、平成13年兵庫県山崎町の簡易水道の汚染事例で分離されたクリプトスポリジウムの遺伝子型と一致した。このことから、この簡易水道の汚染事例の汚染源はヤマカガシであることが強く推察された。

ペットとして輸入される小型哺乳類の中で、クリプトスポリジウムが検出されたのは、カイロトゲマウス1/11、デブスナネズミ2/9、アメリカモモンガ5/10、バナナリス2/10、フサオジャービル2/10、ミミナガハリネズミ1/10、オオエジプトアレチネズミ4/10、コロンビアジリス1/10、エゾリス3/10であり、ジアルジアが検出されたのは、カイロトゲマウス2/11、デグー9/9、リチャードソンジリス6/10、エゾリス1/10であった。クリプトスポリジウムおよびジアルジアの保有率は種により異なるが、アメリカモモンガ、オオエジプトアレチネズミ、エゾリス、バナナリス、フサオジャービルなどげっ歯類では保有率が高かった。これらのげっ歯類はペットとして国内に輸入され、一般の家庭で飼育されており、クリプトスポリジウムの感染源となることが明らかになった。

2. 水道水源河川の汚染実態の調査と遺伝子解析

1) 相模川水系におけるクリプトスポリジウムオーシストの出現状況

相模川本川に対するクリプトスポリジウム汚染負荷の大部分が3つの支流によるものであり、排水路の寄与度は無視できるほど小さいことが明らかになった。支流の中では中津

川と小鮎川の寄与度が大きく、この2つの支流で、本川へのクリプトスポリジウム負荷の90%程度を占めると推測された。中津川、小鮎川流域には他の支流に比べて畜産業が多く、河川水のクリプトスポリジウム濃度も高いことから、家畜由来のクリプトスポリジウム汚染が考えられた。

2) 利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染実態の調査

クリプトスポリジウム、ジアルジアの汚染レベルは、小山川が利根川に比べ高く、日内の濃度変動も大きいことがわかった。利根川で検出されたクリプトスポリジウムオーシストの種・遺伝子型は、*C. parvum bovine genotype* (ヒトへの感染性あり)、*C. meleagridis* (同あり)、*C. muris* (同あり)、*C. parvum pig genotype I* (同なし)、*C. parvum pig genotype II* (同なし)、*C. baileyi* (同なし)、*C. andersoni* (同なし)であり、ヒトへ感染を示す種・遺伝子型の存在が明らかになった。また、*C. parvum bovine genotype* は、冬季のみ検出された。

3) 河川および内湾底泥中のクリプトスポリジウム存在量調査

クリプトスポリジウムは、河川底泥12試料中4試料(33%)、内湾底泥10試料中3試料(30%)から検出された。それぞれの最大濃度は、1660 oocysts/g、154 oocysts/gであった。一方、河川水試料(6試料)からはクリプトスポリジウムが全く検出されなかった。これにより、河川底泥の再懸濁により、河川水中のクリプトスポリジウム濃度が急激に上昇する可能性が示された。さらに、内湾の測定地点の中で、河口に近い地点の方が、遠い地点より高濃度であったことから、汚染源から排出されたクリプトスポリジウムが、河川を經由して内湾に移動する中で、拡散しながら沈降し、底泥に蓄積している可能性が示された。クリプトスポリジウム濃度と、そのほかの測定項目(底泥から直接抽出したDNA濃度、河川水中の大腸菌群数、糞便性大腸菌群数)との間には関連は見られなかった。

3. 水道水経路による曝露量の評価

1) クリプトスポリジウム集団感染の前兆現象

国内外の3つの集団感染より計算した前兆期のオーシスト濃度は、飲水量1Lを仮定した場合、浄水において0.01ないし0.02個/L程度であった。通常の浄水処理による除去率を2ないし3-logと仮定した場合、原水中のオーシスト濃度は1~20個/Lに相当した。集団感染が発生するには原水中にオーシストが存在し、これに浄水処理の不備が重なることで顕在化することが発生に至る道筋と推察された。

2) 水道水中の感染リスクの評価

相模川を原水とした浄水のクリプトスポリジウムの定量結果に対してその分布の推定を試みた結果、ここで開発したPLN-MPN法は、MPN法と比較して、より現実に近い推定値を与えることがわかった。また、パラメータの推定にあたり、 σ を正しく仮定することが重要であることを示した。リスク評価を行うことを前提とした場合、 σ の値が未知であるならば、 σ を大きめの値として仮定し、濃度分布の95%値や算術平均値を大きめに推定する方が望ましい。また、利根川河川水を水源とする浄水場を仮想し、その浄水場で処理さ

れた浄水を飲用水として摂取することにより発生する、クリプトスポリジウム症の感染リスクについて、モンテカルロ法を用いて評価した。その結果、感染リスクは、USEPAが推奨している許容レベル 10^{-4} 以下を満たしていることが明らかになった。

D. 結論

最終年度の研究においては、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起因する感染リスク評価に関して、ヒト等の感染実態の調査、水道水源の汚染実態の調査、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。その結果、2005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9例及び80例であった。しかし、実際の感染者数は、この届出患者数よりもはるかに多いと考えられた。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、ヒトへ感染を示す種・遺伝子型が存在していた。クリプトスポリジウム及びジアルジア分離株をsubgenotypeのレベルまで解析することにより、汚染源の特定や感染性などについて、より有益な情報を得られることが明らかになった。一方、水道水源周辺で生息するヤマカガシ、シマヘビ、アオダイショウ等ヘビ類のうち、ヤマカガシのみがクリプトを保有していた。水道水源河川におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度レベルは、畜舎排水や生活排水による負荷によって大きく変動することが示された。水道におけるクリプトの大規模な集団感染を回避するためには、集団感染に先行する持続的な汚染、あるいはそれに伴う散発的な患者を如何に捉えるかが重要であると考えられた。利根川を水源とする浄水場を仮想し、その浄水場で処理された浄水を飲料水として摂取することにより発生する、クリプトスポリジウム症の感染リスクをモンテカルロ法により評価すると、感染リスクは、USEPAが推奨している許容レベル 10^{-4} 以下を満たしていることが明らかになった。

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17年度 分担研究報告書

平成18年3月

分担研究報告書 1

ヒト等の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

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、従来のクリプトスポリジウム遺伝子型解析法の簡便化および混合感染の検出を可能にするための新規プライマーセットを開発し、その評価をおこなった。さらに、ヒトおよび動物から検出された分離株について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。2005年の届出患者総数（全国）はクリプトスポリジウム症9例、ジアルジア症80例であった。今回開発した新規プライマーセットは *C. hominis* および *C. parvum* の bovine genotype に特異的なものであり、特異性と感度は高く、従来法で検出不可能だったレベルでの両者の混合感染の検出が可能であることが示された。実際、今年度の検査で陽性を示した臨床検体2例のうち1例は混合感染例であった。また、昨年度までの解析で *C. hominis* または *C. parvum* bovine genotype と決定された9株について、今回 subgenotype を解析したところ、タヌキからの分離株は *C. parvum* bovine type ではあるが、subgenotype は従来の報告にはみられない新型であることが判明し、ヒトへの感染性は不明となった。ジアルジアの遺伝子型解析では、今回ヒトから分離された2株はともに Assemblage B 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とジアルジアは下痢起因腸管寄生原虫であり、ヒト、家畜、コンパニオンアニマル、野生動物などに広く感染がみられる。ヒトに感染するクリプトスポリジウムは *Cryptosporidium hominis* (2002年までは、*C. parvum* の genotype 1あるいは human genotype と呼ばれていた) が最も多いが、*C. parvum* の bovine genotype や *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis* など、いくつかの種と遺伝子型の感染も知られている。これらは形態的に鑑別することはできないがヒトへの感染性や病原性は互いに異なる。ジアルジアの場合も、ヒトおよび各種動物から検出される虫体は形態的には同一であるが、遺伝子型は多様で、ヒトへの感染性や病原性は互いに異なる。したがって、これらの原虫が患者や水道水、水道水源などから検出されたとき、その感染源や汚染源を特定するには、分離した原虫の遺伝子型解析が欠かせない。

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。また、従来のクリプトスポリジウム遺伝子型解析法の簡便化と、混合感染の検出を容易にするために、新規プライマーセットを開発し、その評価をおこなう。さらに、昨年度までの解析で *C. hominis* または *C. parvum* bovine genotype と決定された株について、今回、その遺伝子型をさらに詳細にするため、subgenotype 解析をおこなうこととした。

B. 研究方法

- 1) 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。
- 2) クリプトスポリジウムの遺伝子型解析法として、ヒト感染例の90%以上を占める重要な2種 (*C. hominis* と *C. parvum* bovine genotype) をターゲットとした各遺伝子型特異プライマーを新規に作成した。すなわち、ゲノムデータに基づいて作成したユニバーサルプライマーを用いて、クリプトスポリジウムの4種 (*C. hominis*, *C. parvum* bovine genotype, *C. parvum* ferret genotype, *C. meleagridis*) の methionine adenosyltransferase 遺伝子とその前後部分のシーケンスを決定し、*C. hominis*, *C. parvum* bovine genotype のそれぞれに特異的な配列を選び出し、各特異プライマーを設計した。これらのプライマーセットによる遺伝子型検出の感度、特異性、混合感染検出の感度などについて、これまでに保存された分離株と実際の臨床検体を用い、従来法 (PCR-RFLP法) との比較を実施した。
- 3) subgenotype の解析は、*C. parvum* の 60kDa 糖蛋白 (GP60) 遺伝子のシーケンス解析により、昨年度までの解析で *C. hominis* または *C. parvum* bovine genotype と決定された9株 (ヒト由来5株、ウシ由来3株、タヌキ由来1株) について実施した。
- 4) 今年度に検出されたクリプトスポリジウム症患者2例とジアルジア症患者2例の検体について遺伝子型を解析した。

C. 研究結果

1) ヒトにおける感染状況

2005年の届出患者数はクリプトスポリジウム症9人、ジアルジア症80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は昨年の91人に比べて大きく減少した。また、ジアルジア症患者は、前年の届出数(84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 (2005年)

	患者数	都道府県別
クリプトスポリジウム	9	北海道 4, 東京 1, 神奈川 2, 大阪 2
ジアルジア	80	北海道 3, 秋田 1, 茨木 5, 栃木 1, 埼玉 1, 千葉 2, 東京 13, 神奈川 19, 新潟 2, 山梨 1, 岐阜 2, 静岡 5, 愛知 1, 大阪 8, 奈良 3, 広島 1, 徳島 1, 福岡 5, 長崎 3, 大分 1, 長崎 3, 大分 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 7 (51・52), 2005

2) クリプトスポリジウム分離株の遺伝子型決定のための新規プライマーセットの開発と評価

今回開発した *C. hominis*, *C. parvum* bovine genotype 特異的各プライマーセットは、ゲノムレベルで97%以上の相同性を示す互いのDNA テンプレートとも、近縁の遺伝子型・種のクリプトスポリジウムとも交叉反応を示さず、高い特異性を示した。また、10ngの各DNA テンプレートからの検出が可能であり、混合感染モデルにおいても、この特異性と感度は維持された。さらに、従来法

(PCR-RFLP法)との比較では、従来法で検出不可能だったレベルでの混合感染を検出可能であることが示された。また、従来法で遺伝子型が決定されてきた臨床分離株32検体をサンプルとした本法の評価では、遺伝子型決定の結果は完全に一致した。

3) クリプトスポリジウム分離株の subgenotype の解析

国内のウシから分離した *C. parvum* bovine genotype 3株の subgenotype はすべて IIa であったが、ヒトから分離した *C. hominis* 3株の subgenotype はそれぞれ異なり、Ia、Ib、Ie と同定された。一方、ヒトから分離した *C. parvum* bovine genotype 2株の subgenotype はすべて IIa であった。また、昨年度大阪市内のタヌキから分離された株は *C. parvum* bovine genotype ではあるが、subgenotype は、これまでに報告されている IIa ~IIf の6型とは異なる新型であった。

4) クリプトスポリジウムとジアルジアの今年度臨床分離株の遺伝子型解析

先天性免疫不全症で慢性下痢の患者2例からクリプトスポリジウムが検出され、遺伝子型は1例は *C. hominis* であったが、他の1例は *C. hominis* と *C. parvum* bovine genotype の混合感染であった。また、海外旅行後の下痢患者2例から検出されたジアルジアの遺伝子型は、人獣共通感染性の Assemblage B であった。

D. 考察

2005年の全国の届出患者総数は、クリプトスポリジウム症9人、ジアルジア症80人であり、クリプトスポリジウム症は前年の届出数(91人)に較べて大幅に減少した。これは、前年度のような集団感染が起こらなかったことも要因の一つではあるが、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。

ジアルジア症の届出患者数は、2001年の135人をピークに年々減少する傾向にある。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、クリプトスポリジウム症と同様、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の遺伝子型解析用に今回開発した方法は、ヒト感染例の大半を占める重要な2種(*C. hominis*と*C. parvum* bovine genotype)をターゲットとした各遺伝子型特異プライマーによる1ステップPCRによる方法である。プライマーセットさえ準備すれば通常のPCRプロトコルによって実施可能であり、従来法(PCR-RFLP法)で必要だった制限酵素やシーケンスの設備を必要としない。また、本法は従来法では検出できなかったレベルでの混合感染を検出することが可能であり、実際、今年度の臨床検体のなかに *C. hominis* と *C. parvum* bovine genotype の混合感染例を見つけることができた。今後、本法を臨床分離検体の一次スクリーニングに活用することにより、遺伝子型決定の迅速化とともに、労力、費用の軽減が期待される。

GP60 遺伝子のシーケンス解析によるクリプトスポリジウム分離株の subgenotype 解析では、ヒトから分離した *C. hominis* 3株はそれぞれ Ia、Ib、Ie と同定され、これまで国内では Ia と Ie しか報告されていなかったが、今回、Ib 型も分布することが明らかになった。また、*C. parvum* bovine genotype の5分離株(ヒト由来2株、ウシ由来3株)の subgenotype はすべて IIa であった。一方、大阪市内のタヌキから分離された株は *C. parvum* bovine genotype であり、ヒトへの感染性があるのではないかと危惧されたが、subgenotype はこれまでに報告されている IIa ~IIf の6型とは異なる新型であったことから、ヒトへの感染性の有無は不明となった。このように、検出された株について

subgenotype のレベルまで解析すれば、感染源・汚染源の特定やヒトへの感染性・病原性などについて、より有益な情報をえることができる。

今年度当方で患者から検出したクリプトスポリジウム症2例の分離株について遺伝子解析をしたところ、1例はヒト特異的に感染する *C. hominis* であり、他の1例は *C. hominis* と人獣共通感染性の *C. parvum* bovine genotype の混合感染であることが判明した。また、ジアルジア症の2例から分離された株の遺伝子型は2例とも人獣共通感染性の Assemblage B であった。これら4患者について今回は感染源を特定することはできなかったが、このような遺伝子型情報を丹念に蓄積していくことが今後の感染予防対策樹立に欠かせないであろう。

E. 結論

両原虫症の2005年の全国の届出患者総数は多くはない。しかし、これは臨床検査施設における原虫の検査が不十分なためであり、実際の感染者数は報告数よりもはるかに多いものと思われるので、各医療施設に対して、下痢患者の原虫検査を日常的に実施するよう指導することが強く望まれる。今回クリプトスポリジウムの遺伝子型解析用に開発した方法は、従来法（PCR-RFLP法）よりも簡便であり、しかも混合感染検出の感度も優れている。今後、本法を臨床分離検体の一次スクリーニングに活用することにより、遺伝子型決定の迅速化とともに、労力、費用の軽減が期待される。また、両原虫とも、分離株について subgenotype のレベルまで解析することにより、感染源・汚染源の特定やヒトへの感染性・病原性などについて、より有益な情報をえることができる。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

1. 論文発表

- 1) Abe N, Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M : Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol Res*, 2006 (in press)
- 2) Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Lillehoj HS, Matsuda H, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, Baba E : Cross-reactivities with *Cryptosporidium* spp. by chicken monoclonal antibodies that recognize avian *Eimeria* spp. *Vet Parasitol* 128:47-57, 2005.
- 3) 山本徳栄、砂押克彦、山口正則、森田久男、森永安治、川名孝雄、高木正明、鳥海 宏、所 正治、井関基弘 : クリプトスポリジウム症患者におけるオーシスト排出数の推移と排出期間. *日本臨床寄生虫学会誌* 16 (1) : 73-75, 2006.

2. 学会報告

- 1) 所 正治、山村一志、仲本賢太郎、井関基弘 : *Giardia intestinalis* の遺伝子型解析. 第4回分子寄生虫・マラリアフォーラム (2005.11、東京)
- 2) 荒井朋子、所 正治 : クリプトスポリジウムの細胞培養系における増殖評価のためのリアルタイムPCRによる定量トライアル. 第13回分子寄生虫ワークショップ (2005.8、帯広)

3. 著書・総説

- 1) 所 正治、井関基弘 : クリプトスポリジウム. 日本臨床増刊号「血液・尿化学検査、免疫学的検査第6版」、日本臨床、大阪、2005.7、p256-258.
- 2) 所 正治、井関基弘 : 食を介する感染症6. クリプトスポリジウム症. *化学療法の領域* 21 : 517-521, 2005 .

分担研究報告書 2

水源周辺に生息する脊椎動物の *Cryptosporidium* の保有状況

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

加藤行男、林谷秀樹、本籐 良、森 哲

鳥羽通久、森口 一、村瀬敏之、三宅芳枝

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

分担研究者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所微生物部
分担研究者 遠藤卓郎 国立感染症研究所寄生動物部

汚染源の把握を目的として、爬虫類と鳥類における *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。爬虫類はシマヘビ 33 匹、ヤマカガシ 65 匹、アオダイショウ 4 匹を調査の対象とした。ヤマカガシのみから *Cryptosporidium* が検出された。鳥類は、関東に位置する 2 ヶ所の傷病動物収容施設に収容された傷病鳥から採取した糞便 179 検体を調査の対象とした。*Cryptosporidium* は検出されなかった。

昨年に引き続き、ペットとして輸入される小型哺乳類を調査した。19 種のげっ歯類の腸管内容物 201 検体を調査した。種によっては *Cryptosporidium* あるいは *Giardia* を高率に保有していた。

研究協力者

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
宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科
加藤行男 麻布大学獣医学部獣医学科
林谷秀樹 東京農工大学農学部獣医学科
本籐 良 日本獣医畜産大学獣医学部
獣医学科
森 哲 京都大学大学院理学研究科
弘前大学
鳥羽通久 日本蛇族学術研究所
森口一 日本蛇族学術研究所
村瀬敏之 鳥取大学獣医学科
三宅芳枝 神奈川県衛生研究所微生物部

A. はじめに

水源域には多くの脊椎動物が生息しているが、それらの動物は *Cryptosporidium* の宿主となりうるため、本原虫の保有動物としてオーシストを環境中に排出する可能性がある。

野生動物に寄生する *Cryptosporidium* の情報は非常に乏しいのが現状である。そこで、水道における *Cryptosporidium* 汚染

のリスク評価において不可欠な、環境中に存在する *Cryptosporidium* の種あるいは遺伝子型とその宿主に関する情報の収集を目的として、種々の動物における *Cryptosporidium* の保有状況を継続的に調べてきた。今年度は鳥類および爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。また、昨年度と同様に海外からペットとして輸入されるげっ歯類における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有も調査した。

B. 研究方法

1) 調査の対象

鳥類の糞便は関東に位置する 2 ヶ所の傷病動物等の収容施設に収容された傷病鳥類および中国地方に飛来した渡り鳥を対象とした。鳥類が排泄した糞便 179 検体を調査材料とした (表 1)。

爬虫類では、アオダイショウ 4 頭、シマヘビ 33 頭、ヤマカガシ 65 頭から得られた糞便を検体とした。

国内の脊椎動物における保有状況と比較するとともに、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可能性がある哺乳類として、カイロトゲマウス 11 頭、キンイロスパイニーマウス 13 頭、アレチネズミ 8 頭、デブスナネズミ 9 頭、アメリカモモンガ 10 頭、デグー 9 頭、ピグミージェルボア 20 頭、シマリス 10 頭、バナナリス 10 頭、フサオジジャービル 10 頭、フトオアレチネズミ 10 頭、ミミナガハリネズミ 10 頭、オオエジプトアレチネズミ 10 頭、リチャードソンジリス 10 頭、コロンビアジリス 10 頭、ダウリアハタリス 10 頭、エゾリス 10 頭、タイリクモモンガ 10 頭、ゼブラマウス 11 頭、計 201 頭を調査した。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。

2) *Cryptosporidium* の検出

Cryptosporidium の保有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。採取された材料は検査に用いるまで冷蔵保存した。糞便あるいは腸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。得られた沈渣をスライドグラスに塗抹して乾燥し、*Cryptosporidium* に対する特異抗体による蛍光染色 (Aqua-Glo, Waterborne) と DAPI 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* のオーシストの判定を行った。

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 QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) を用いて精製した。メーカー推奨のプロトコルの始めに 5 回の凍結融解、15 分間の煮沸、1 時間の Protease K 溶解を追加し、オーシスト由来の DNA の回収に努めた。

18S rRNA 領域の増幅には 18S rRNA 遺伝子内の約 850bp を増幅領域とした Nested-PCR を行なった。プライマーは 1st PCR に 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' ならびに 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3' を、2nd PCR に 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' ならびに 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3' を用いた (Xiao et al., 1999)。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 (Qiagen) 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 BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems) ならびに ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてダイレクトシーケンシングを行なった。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

鳥類では、表 1 に示した 14 目 27 科 61 種に由来する 179 検体を調べたところ、*Cryptosporidium* は検出されなかった。

ヘビにおける *Cryptosporidium* の調査ではヤマカガシだけから *Cryptosporidium* が検出された。ヤマカガシにおいて、調査した 65 匹中 13 匹 (20.0%) から検出された。その内訳は、関東地方では 22 匹中 1 匹 (4.5%)、中国地方では 39 匹中 11 匹 (28.2%)、九州地方で 1 匹中 1 匹からの検出であった。近畿地方の 3 匹からは検出されなかった (表 2)。

ヤマカガシから検出された *Cryptosporidium* の 18srRNA の塩基配列は *Cryptosporidium* sp. 983 と一致した。

ペットとして輸入されたげっ歯類における *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出は、カイロトゲマウスではそれぞれ 1/11 (9.1)、