

- Bonnin, A., Dubremetz, J.F., Camerlynck, P., 1991. Characterization of microneme antigens of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa, Apicomplexa). *Infect. Immun.* 59, 1703–1708.
- Bonnin, A., Dubremetz, J.F., Camerlynck, P., 1993. A new antigen of *Cryptosporidium parvum* micronemes possessing epitopes cross-reactive with macrogamete granules. *Parasitol. Res.* 79, 8–14.
- Bonnin, A., Gut, J., Dubremetz, J.F., Nelson, R.G., Camerlynck, P., 1995. Monoclonal antibodies identify a subset of dense granules in *Cryptosporidium parvum* zites and gamonts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 395–401.
- Bonnin, A., Ojcius, D.M., Souque, P., Barnes, D.A., Doyle, P.S., Gut, J., Nelson, R.G., Petersen, C., Dubremetz, J.F., 2001. Characterization of a monoclonal antibody reacting with antigen-4 domain of gp900 in *Cryptosporidium parvum* invasive stages. *Parasitol. Res.* 87, 589–592.
- Cevallos, A.M., Bhar, N., Verdon, R., Hamer, D.H., Stein, B., Tzipori, S., Pereira, M.E., Keusch, G.T., Ward, H.D., 2000. Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 68, 5167–5175.
- Constantinou, C.C., Lillehoj, H.S., Matsubayashi, M., Hosoda, Y., Tani, H., Matsuda, H., Sasai, K., Baba, E., 2003. Analysis of cross-reactivity of five new chicken monoclonal antibodies which recognize the apical complex of *Eimeria* using confocal laser immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.* 118, 29–35.
- Constantinou, C.C., Lillehoj, H.S., Matsubayashi, M., Tani, H., Matsuda, H., Sasai, K., Baba, E., 2004. Characterization of stage-specific and cross-reactive antigens from *Eimeria acervulina* by chicken monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 403–408.
- Colford Jr., J.M., Tager, I.B., Hirozawa, A.M., Lemp, G.F., Aragon, T., Petersen, C., 1996. Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival. *Am. J. Epidemiol.* 144, 807–816.
- Crabb, J.H., 1998. Antibody-based immunotherapy of cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 40, 121–149.
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P., 1997. General biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–41.
- Hu, K., Roos, D.S., Murray, J.M., 2002. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.* 156, 1039–1050.
- Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S., Takada, S., 1989. Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75, 218–222.
- Jenkins, M.C., O'Brien, C., Trout, J., Guidry, A., Fayer, R., 1999. Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine* 17, 2453–2460.
- Kato, S., Jenkins, M.B., Ghiorse, W.C., Bowman, D.D., 2001. Chemical and physical factors affecting the excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* 87, 575–581.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Toivio-Kinnucan, M., 1991. Ultrastructure of developing *Isospora suis* in cultured cells. *Am. J. Vet. Res.* 52, 471–473.
- Lindsay, D.S., Speer, C.A., Toivio-Kinnucan, M.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., 1993. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.* 54, 103–106.
- Lumb, R., Smith, K., O'Donoghue, P.J., Lanser, J.A., 1988. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol. Res.* 74, 531–536.
- Nina, J.M., McDonald, V., Dyson, D.A., Catchpole, J., Uni, S., Iseki, M., Chiodini, P.L., McAdam, K.P., 1992. Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. *Infect. Immun.* 60, 1509–1513.
- Nishinaka, S., Akiba, H., Nakamura, M., Suzuki, K., Suzuki, T., Tsubokura, K., Horiuchi, H., Furusawa, S., Matsuda, H., 1996. Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 1053–1056.
- Perryman, L.E., Kapil, S.J., Jones, M.L., Hunt, E.L., 1999. Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrums induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine* 17, 2142–2149.
- Petersen, C., Gut, J., Leech, J.H., Nelson, R.G., 1992. Identification and initial characterization of five *Cryptosporidium parvum* sporozoite antigen genes. *Infect. Immun.* 60, 2343–2348.
- Pozio, E., Rezza, G., Boschini, A., Pezzotti, P., Tamburrini, A., Rossi, P., Di Fine, M., Smacchia, C., Schiesari, A., Gattei, E., Zucconi, R., Ballarini, P., 1997. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. *J. Infect. Dis.* 176, 969–975.
- Reynaud, C.A., Bertocci, B., Dahan, A., Weill, J.C., 1994. Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv. Immunol.* 57, 353–378.
- Riggs, M.W., 1997. Immunology: host response and development of passive immunotherapy and vaccines. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 129–161.
- Riggs, M.W., McNeil, M.R., Perryman, L.E., Stone, A.L., Scherman, M.S., O'Connor, R.M., 1999. *Cryptosporidium parvum* sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal antibody is a beta-mannosylated glycolipid. *Infect. Immun.* 67, 1317–1322.
- Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J., Bentley, D.L., 1997. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J. Immunol.* 158, 1787–1795.
- Robert, B., Antoine, H., Dreze, F., Coppe, P., Collard, A., 1994. Characterization of a high molecular weight antigen of *Cryptosporidium parvum* micronemes possessing epitopes that are cross-reactive with all parasitic life cycle stages. *Vet. Res.* 25, 384–398.

- Sagodira, S., Buzoni-Gatel, D., Iochmann, S., Naciri, M., Bout, D., 1999. Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine* 17, 2346–2355.
- Sam-Yellowe, T.Y., 1996. Rhoptry organelles of the Apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today* 12, 308–316.
- Sasai, K., Lillehoj, H.S., Hemphill, A., Matsuda, H., Hanioka, Y., Fukata, T., Baba, E., Arakawa, A., 1998. A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of *Eimeria*, *Neospora*, and *Toxoplasma*. *J. Parasitol.* 84, 654–656.
- Sasai, K., Lillehoj, H.S., Matsuda, H., Wergin, W.P., 1996. Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in vitro. *J. Parasitol.* 82, 82–87.
- Slifko, T.R., Friedman, D., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1997. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3669–3675.
- Uni, S., Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Takada, S., 1987. Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach. *Parasitol. Res.* 74, 123–132.
- Weir, S.C., Pokorny, N.J., Carreno, R.A., Trevors, J.T., Lee, H., 2001. Improving the rate of infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture using centrifugation. *J. Parasitol.* 87, 1502–1504.
- Woodward, M.P., Young Jr., W.W., Bloodgood, R.A., 1985. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods* 78, 143–153.



(65) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法による水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型判別手法の開発

Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in water by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

真砂 佳史\*<sup>†</sup>、小熊 久美子\*、片山 浩之\*、大垣 眞一郎\*

Yoshifumi MASAGO\*, Kumiko OGUMA\*, Hiroyuki KATAYAMA\* and Shinichiro OHGAKI\*

ABSTRACT; A new genotyping method of *Cryptosporidium*, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by DNA sequencing, was developed to genotype *Cryptosporidium* spp. in river water. The DGGE method could successfully discriminate nine species of *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. sp.* strain 938, *C. andersoni*, *C. serpentis* and *C. saurophilum*. The sequential combination of the QProbe PCR method for quantification; and the DGGE method and DNA sequencing for genotyping, enabled the simultaneous quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in the same water sample. This method was applied to analyze *Cryptosporidium* in the Koyama River, a tributary of the Tone River, both for the total concentration of organisms, and for their genotype. Seven *Cryptosporidium* genotypes (*C. andersoni*, *C. sp.* strain 938, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. sp.* PG1-26, *C. sp.* t03, *C. sp.* t04) were found in 11 positive samples (positive ratio = 69%). A bovine specific species, *C. andersoni*, was found most frequently (7 samples). The genotypes infectious to human accounted for only 16% of the concentration of all genotypes. These results showed that this detection method could provide valuable information on *Cryptosporidium* in river water both in the quantity and in the genotypes, which is essential for the precise assessment of waterborne risk to human health.

KEYWORDS; *Cryptosporidium*, genotyping, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

## 1. 研究の背景

1984年に、テキサス州で最初のクリプトスポリジウムによる感染症患者が報告されて<sup>1)</sup>以来、クリプトスポリジウムによる大規模な感染症集団発生が世界各地で発生している。これまでに発生した中で最も大きな被害を出したのは、1993年3月にアメリカ合衆国ウィスコンシン州ミルウォーキー市で発生した事例である<sup>2,3)</sup>。この事例では、人口161万人のうち403,000人が発症したと報告されている<sup>2,3)</sup>。この集団発生による経済的な損失は総計9,620万ドルに達したと試算されている<sup>4)</sup>。後の調査により、この集団発生の原因となったのは、ヒトに特異的に感染する*C. hominis* (*C. parvum* genotype I)であったことが示されている<sup>5)</sup>。国内でも、1996年に埼玉県越生町全町民13,800人中8,800人以上が感染したという事例が報告されている<sup>6)</sup>。本事例も、ミルウォーキー市の事例と同様に、水道水が*C. hominis*により汚染されたことが原因となって発生したことが確認されている<sup>7)</sup>。

クリプトスポリジウムの分類に関しては、2004年の報告に限っても、その分類方法や総数がまちまちである<sup>8-11)</sup>が、例えばXiaoら<sup>8)</sup>の分類法にしたがうと、現在クリプトスポリジウム属には13の種が存在して

\* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

(Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

† 現在の所属：東北大学大学院工学研究科土木工学専攻

(Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

おり、その宿主は哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類と多岐にわたる。この中で、ヒトへの感染のほとんどは、*C. parvum* (*C. parvum* genotype II) または *C. hominis* によるものであるとされている。これ以外の種では、*C. meleagridis*<sup>7,12-17)</sup>、*C. felis*<sup>15,18)</sup>、*C. canis*<sup>15,18)</sup>、*C. muris*<sup>19)</sup>、*C. sp. pig genotype*<sup>20)</sup>、*C. sp. deer genotype*<sup>21)</sup>、*C. sp. monkey genotype*<sup>22)</sup> がヒトに対して感染した例が報告されている。このように、一口にクリプトスポリジウムといっても、その中には多くの種が存在し、ヒトに対して感染力を持つ種はそのうちごく一部である。したがって、環境中、例えば水中のクリプトスポリジウムの動態を評価するにあたり、その種・遺伝子型について調査することが重要である。

これまでも、水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別のための手法が開発されてきた（例えば restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法<sup>23,24)</sup>、single strand conformational polymorphism (SSCP) 法<sup>25-27)</sup>、クローニング-シーケンシング法<sup>23,24,28,29)</sup>）。しかし、これらの手法には、技術的、あるいは実用的な面で限界があることが指摘されている。例えば RFLP 法では、その識別能力が増幅領域内部に存在する制限酵素が切断する部位の数に依存しているため、識別可能な種・遺伝子型に限界が存在する<sup>30-33)</sup>。SSCP 法は、1 本鎖の状態で電気泳動を行うという特質上、単一の種が複数のバンドを形成する<sup>25)</sup>ため、多数の種を対象とした判別手法の確立には至っていない。クローニング-シーケンシング法は、1 つの試料から得られた多数のクローン DNA についてシーケンシングを行う必要があるため、多数の検体からの検出には非常に費用がかかる。現在、これらの問題を解決し得る新しい種・遺伝子型の判別手法の確立が望まれている。

以上の背景を受けて、本研究では、クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の類別に Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法を適用し、シーケンシング法と組み合わせることで、水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を判別する手法を開発した。そして、その手法を実河川水に対して適用することで、開発した手法の有用性を評価すると共に、国内の河川水中に存在するクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を調査した。

## 2. 実験手法

### 2. 1. DGGE 法による種・遺伝子型の類別力調査

#### (1) 供試したクリプトスポリジウムの種・遺伝子型

国立感染症研究所 寄生動物部の遠藤 卓郎氏より分与していただいた、*C. parvum* (Accession No.: AF161856)、*C. hominis* (同 AF093491)、*C. canis* (同 AF112576)、*C. meleagridis* (同 AF112574)、*C. felis* (同 AF112575)、*C. sp. strain 938* (同 AY120913)、*C. andersoni* (同 AB089285)、*C. serpentis* (同 AF093502)、*C. saurophilum* (同 AF112573) のゲノム DNA を用いた。分与されたゲノム DNA を、QProbe PCR 法で使用するプライマーで増幅し、DGGE 法に供する試料とした。PCR 条件は既報<sup>33)</sup>にしたがった。DGGE 法によりこれら 9 種類のゲノム DNA を類別できるかどうかを調査するため、試験には、これら 9 種類のゲノム DNA を単独で使用した試料と、全てのゲノム DNA を混合した試料の両方を用いた。

#### (2) DGGE 法による種・遺伝子型の類別手法

DGGE 法で解析対象とする遺伝子増幅領域は、クリプトスポリジウムに対して特異的であるのと同時に、種・遺伝子型の差による遺伝子配列の違いが大きい領域である必要がある。本研究では、クリプトスポリジウムの 18S rRNA 遺伝子のうち 295bp (*C. parvum* IOWA 株の場合) を増幅するプライマー<sup>28)</sup>を使用した (表 1)。この増幅領域は、シーケンシング法による種・遺伝子型の判別に適用例があり<sup>28)</sup>、また QProbe PCR 法で増幅する領域の内部に位置するため、QProbe PCR 法で得られた増幅産物に対して適用することが可能である。

GC クランプは、Muyzer ら<sup>34)</sup>のもの (表 1) を使用した。この GC クランプを、フォワードプライマーにつけたものと、リバースプライマーにつけたものをそれぞれ用意し、予備実験を行った。その結果、フォワードプライマーに GC クランプをつけた試料は、DGGE において明瞭なバンドを生成したのに対し、リバ



表1 DGGE に用いたプライマーおよび GC クランプの塩基配列

Name	Sequence	Position in 18S rRNA	
		gene of <i>C. parvum</i> (AF164102)	Reference
フォワード	AGT GAC AAG AAA TAA CAA TAC AGG	445 – 468	28
リバース	CCT GCT TTA AGC ACT CTA ATT TTC	716 – 739	
GC クランプ	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC		34
	GGG GCG GGG GCA CGG GGG G		

ースプライマーに GC クランプをつけた試料は、バンドを生成しなかった。そこで、以下の実験では、フォワードプライマーの 5'末端に GC クランプをつけたものを用いた。

DNA の増幅には T3 Thermocycler (Whatman Biometra, Goettingen, Germany) または GeneAmp9600 (Applied Biosystems, 東京) を用いた。PCR 反応液 (50 $\mu$ L) の組成は、2.5[U] AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, 東京)、10 $\times$ PCR バッファー5[ $\mu$ L]、dNTP 各 200[nM]、MgCl<sub>2</sub> 2[mM]、テンプレート DNA (QProbe PCR 産物) 1 [ $\mu$ L]とし、各プライマー濃度は 500[nM]とした。温度条件は、94 $^{\circ}$ C5 分の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C30 秒、60 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C30 秒のサイクルを 30 回行い、最後に 72 $^{\circ}$ C5 分で伸長を行った。

ゲルの作成および電気泳動は、Dcode システム (Bio-Rad, 東京) を用いて行った。変性剤 (ホルムアミド、尿素) 濃度範囲は 5%~25%とし (変性剤濃度 100%とは、ホルムアミド 20[mL/50mL gel sol.]、尿素 7[M]に相当する)、泳動条件は、130[V]、60[ $^{\circ}$ C]で 10[hour]とした。泳動後、ゲルを Vistra Green (GE healthcare, 東京) で染色し、蛍光イメージアナライザーFluorImager595 (GE healthcare, 東京) で画像を取り込み、付属のソフトウェアで画像解析を行った。

## 2. 2. 小山川における現地調査

### (1) 調査地点の概要

測定試料は、小山川中流部の高橋 (埼玉県深谷市大字矢島) にて採取した。調査は、2004 年 8 月から 10 月までの 3 ヶ月間に合計 4 回行った。各測定日に 1 時間半間隔で連続的に 4 つの試料を採取することで、合計 16 の試料を得た。小山川は、利根川の支流のひとつで、武蔵水路の取水口である利根大堰の上流約 15km の地点で利根川右岸に流入している。試料採取地点の上流側に位置する市町村 (埼玉県本庄市、上里町、美里町、児玉町、神川町、岡部町) の市町村の人口は合計 156,000 人であった (平成 15 年 6 月)。

### (2) 河川水の濃縮および夾雑物の除去

試料水を、ポリエチレン製 MF 中空糸膜モジュール (孔径 0.1[ $\mu$ m]、有効濾過面積 4,000[cm<sup>2</sup>]、三菱レイヨン、東京) で濾過した。濾過時間は約 1 時間とし、濾過速度は、U.S.EPA<sup>35,36</sup>が推奨している 2 [L/min]という上限を超えていないことを確認した。これにより、おおよそ 30~70[L]の河川水を膜に通水し、その中に含まれている懸濁物質を回収することができた。

得られた懸濁液を遠心分離 (1,050 $\times$ g、10 [min]) により濃縮し、高密度 Percoll-ショ糖溶液を用いた密度勾配遠心法と免疫磁気ビーズ法を組み合わせた手法 (PS-IMS 法)<sup>37</sup>により精製した。本手法は、八木ら<sup>38</sup>の手法を改変したもので、大容量の水試料に対して適用しても、高いオーシスト/シスト回収率を得ることができるとされている。免疫磁気ビーズを用いたクリプトスポリジウムの精製には、U.S.EPA により定められた手法<sup>36</sup>に従い、Dynabeads CG-Combo Kit (DynaL Biotech, Oslo, Norway) を用いた。

### (3) DNA 抽出および濃縮

25% (w/w) の Chelex 100 樹脂 (Bio-Rad, California, U.S.A.) 懸濁液 100 [μL] を、精製済みの試料 100[μL] に添加し、凍結融解 (-80℃、95℃、5 回) によりオーシストからゲノム DNA を抽出した。次に、抽出液全量を、遠心式 MF 濾過ユニット (GHP Nanosep MF centrifugal device, Pall, 東京) に移し、10,000×g で 5 分間遠心分離して Chelex 100 樹脂および夾雑物を取り除いた。濾液を DNA 精製キット (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, 東京) で精製したのち、液全量を遠心式フィルターユニット (Microcon YM-100, Millipore, 東京) に移し、500×g で 25 分間遠心分離した。最後に、フィルター部分に 10[μL] の超純水を加えてから上下逆向きにセットし、500×g で 3 分間遠心分離して濃縮 DNA を得た。最終液量は約 10[μL] となった。

### (4) クリプトスポリジウムの検出、種・遺伝子型の判別

QProbe PCR 法により、試料中のクリプトスポリジウム濃度を定量した。実験条件は既報<sup>33)</sup>にしたがった。ただし、プライマー濃度をフォワードプライマー濃度 600[nM]、リバースプライマー濃度 200[nM]に変更した。その結果、検出下限は 0.83[oocyst/tube]、定量下限は 2.5[oocyst/tube] にそれぞれ改善された。

DGGE 法は、2. 1. (2) で示した手法で行った。必要に応じて PCR と DGGE を繰り返し、DGGE で単一のバンドが観察されるまで、DNA の精製を行った。得られた DNA 断片を、Montage PCR m96 プレート (Millipore, 東京) で精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 東京) を用いたシーケンシング反応を行った。反応後の液を Montage SEQ プレート (Millipore, 東京) で精製してシーケンシングに供した。シーケンシングは、ABI 3100 (Applied Biosystems, 東京) で行った。

### (5) ポアソン分布を基にした最尤法 (MPN 法) による種・遺伝子型ごとの濃度推定

(4) で示した手法は、ある試料中に存在する全ての種・遺伝子型を合わせたの濃度と、その試料中に存在する種・遺伝子型を検出できるが、個々の種・遺伝子型の濃度を知ることができない。そこで、以下の手法で、河川水中のそれぞれの種・遺伝子型の存在濃度を推定した。

ある種・遺伝子型の河川水中の存在濃度は、時間によらず一定で、 $x$ [oocyst/100L] であるとする。また、濃縮および精製操作における回収率は考慮せず、また検出下限は 1[oocyst/sample] であるとする。このとき、ある試料 (検査水量  $V$ [L]) 中から、その種・遺伝子型が検出される確率  $P_{positive}$ 、および検出されない確率  $P_{negative}$  は、ポアソン分布の確率分布関数より、それぞれ以下の式 (1) で計算できる。

$$P_{positive}(x, V) = 1 - \exp\left(-\frac{x \times V}{100}\right), \quad P_{negative}(x, V) = \exp\left(-\frac{x \times V}{100}\right) \quad \text{式 (1)}$$

ただし、 $x$ : 河川水中のクリプトスポリジウム濃度 [oocyst/100L]、 $V$ : 試料水量 [L]

最尤法の原理により、河川水中に存在する、ある種・遺伝子型の濃度の推定値は、下式 (2) の  $-LN$  の値を最小にする  $x$  に等しい。

$$-LN = -\sum_{i=1}^n \ln(F(x, V_i)) \quad \text{式 (2)}$$

ただし、 $V_i$ :  $i$  番目の試料の試料水量 [L]、 $n$ : 試料数 (ここでは  $n=16$ )

$$F(x, V_i) = \begin{cases} P_{positive}(x, V_i) & \text{when the } i \text{ th sample was positive for } \textit{Cryptosporidium} \\ P_{negative}(x, V_i) & \text{when the } i \text{ th sample was negative for } \textit{Cryptosporidium} \end{cases}$$

この操作を、小山川の試料から検出された全ての種・遺伝子型に対してそれぞれ行い、個々の存在濃度の推定値を算出した。



### 3. 実験結果

#### 3. 1. DGGE 法による種・遺伝子型の類別能力の評価

図1に、DGGE により得られたゲルの画像を示す。全ての配列が、変性剤濃度がおよそ 8%~20%のところバンドを生成した。全てのバンドが作成した変性剤濃度域にあったことと、バンドの生成位置が濃度域全体に分散していたことから、この実験条件が、本研究で評価対象とした DNA 領域に対する DGGE 法として適していることが確認された。

ほとんどの種は、明瞭な1本のバンドを生成したが、*C. andersoni* は、明瞭な1本のバンドのみが見られた試料（レーン7）と、1本の濃いバンドと、2本の薄いバンドの計3本を生成した試料（レーン8）が見られた。小山川で得た試料においても同様の傾向が見られたことから、この種については、同じ塩基配列ではあるが、なんらかの要因で3本のバンドを生じることがあることが示された。

それぞれの種・遺伝子型のバンドの位置を見ると、いくつかの種が近い位置（変性剤濃度）にバンドを生成したことがわかる。たとえば、*C. parvum*、*C. hominis*、*C. canis* が非常に近い位置にバンドを生成した。しかし、9種類を混合した試料（レーン11）を見ると、それぞれが違う位置にバンドを生成していることから、仮に同一試料にこれらの種・遺伝子型が混在していても、それを類別することが可能であるといえる。

以上より、本研究で開発した DGGE 法により、今回使用した 9 種類の種・遺伝子型をそれぞれ他の種由来のバンドと識別することが可能であるといえる。

#### 3. 2. 小山川における調査結果

表2に、各試料の検査水量、QProbe PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出結果、および検出された

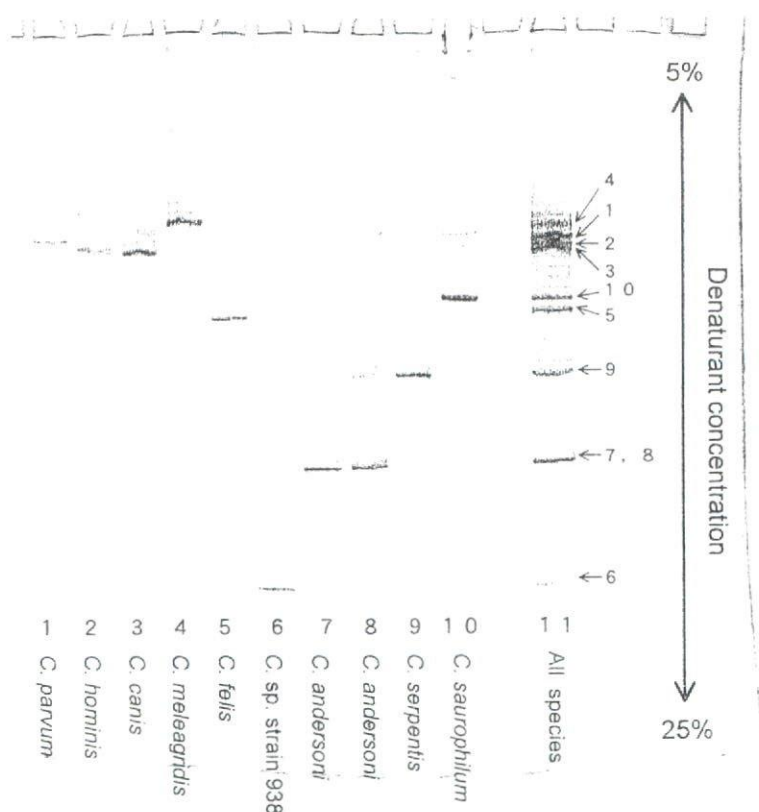


図1 DGGE 法による種・遺伝子型の類別 (DGGE ゲル写真)

(種名の上の数字は本文中のレーン番号を示す。

レーン11右側の数字は、それぞれのレーン番号の試料と同じであることを示す。)

表2 小山川でのクリプトスポリジウム調査結果

採水開始時間	検査水量 [L]	検出結果 <sup>a</sup>	検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型 <sup>b</sup>
8/3 11:00	45.2	—	
8/3 12:30	32.0	—	
8/3 14:00	43.3	+	<i>C. hominis</i> <sup>c</sup> C. sp. 938
8/3 15:30	33.5	+	C. sp. 938
8/26 11:00	56.3	—	
8/26 12:30	43.1	—	
8/26 14:00	37.8	—	
8/26 15:30	65.1	+	<i>C. andersoni</i>
9/16 10:30	41.6	+	<i>C. andersoni</i>
9/16 12:00	47.4	+	<i>C. parvum</i> <sup>c</sup> C. sp. 938
9/16 13:30	47.4	+	<i>C. andersoni</i>
9/16 15:00	66.1	+	C. sp. PG1-26
10/27 10:45	30.9	59	<i>C. andersoni</i> C. sp. 938 C. sp. t03 C. sp. t04
10/27 12:15	53.4	+	<i>C. andersoni</i>
10/27 13:45	23.8	+	<i>C. andersoni</i> <i>C. parvum</i> <sup>c</sup>
10/27 15:15	44.9	14	<i>C. andersoni</i>

a —：非検出、+：検出、ただし濃度は定量下限（2.5[oocysts/sample]）以下のため不明、数値：検出、定量下限以上（値は濃度 [oocysts/100L]）

b それぞれの種の遺伝子配列：

*C. parvum* (AF164102)、*C. hominis* (AY204231)、*C. andersoni* (AB089285)、

C. sp. 938 (AY120913)、C. sp. PG1-26 (AY271721)、C. sp. t03 (AB231612)、C. sp. t04 (AB231613)

c 網掛け部は、ヒトへの感染が報告されている種を示す。

クリプトスポリジウムの種・遺伝子型を示す。クリプトスポリジウムは、16 試料中 11 試料から検出された（試料陽性率 69%）。また DGGE-シーケンシング法により、合計 7 種類の遺伝子配列が検出された。そのうち 3 種類は既存の 3 つの種（*C. parvum* (AF164102)、*C. hominis* (AY204231)、*C. andersoni* (AB089285)）の遺伝子配列と一致した。2 種類（*C. sp. 938* (AY120913)、*C. sp. PG1-26* (AY271721)）は、まだどの種にも分類されていない遺伝子型であり、残りの 2 種類（*C. sp. t03* (AB231612)、*C. sp. t04* (AB231613)）は、*C. sp. 1665* と相溶性の高い（共に 97%）未知の配列であった。同一試料に複数の種・遺伝子型が含まれていたのは陽性 11 試料中 4 試料で、そのうち 3 試料は 2 種類の遺伝子配列、残りの 1 試料では 3 種類の遺伝子配列が検出された。最も多く検出されたのは、ウシに特異的に感染するとされる *C. andersoni*（7 試料、44%）で、以下 *C. sp. 938*（4 試料、25%）、*C. parvum*（2 試料、13%）の順となった。*C. hominis*、*C. sp. PG1-26*、*C. sp. t03*、*C. sp. t04* の近縁種はそれぞれ 1 試料ずつからのみ検出された。ヒトへの感染が報告されている種・遺伝子型では、*C. parvum* と *C. hominis* の 2 種類が、計 3 試料（19%）から検出された。

図 2 に、ポアソン分布に基づいた最尤法（MPN 法）により推定した、個々の種・遺伝子型の濃度を示す。最も濃度が高かったのは、検出数が最も多かった *C. andersoni*（16 試料中 7 試料から検出）で、1.3 [oocysts/100L] であった。次いで、*C. sp. 938*（同 4 試料）の 0.63 [oocysts/100L]、*C. parvum*（同 2 試料）の 0.30 [oocysts/100L] の順となった。全ての種を合わせたクリプトスポリジウム濃度は 2.8[oocysts/100L] であったのに対し、ヒトに対する感染力のある種のみ濃度は 0.44[oocysts/100L] であり、全体の約 16% であった。



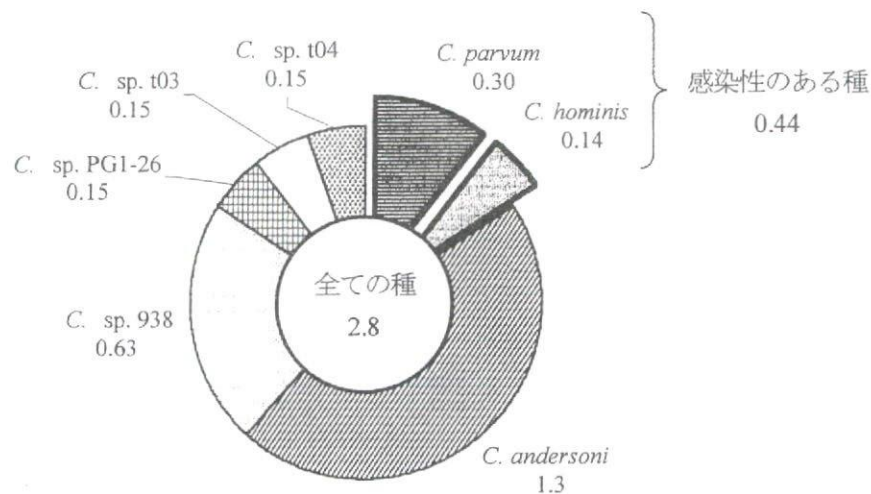


図2 小山川における種・遺伝子型ごとの存在濃度  
(ポアソン分布を基にした最尤法 (MPN 法) での推定結果、単位 [oocysts/100L])

#### 4. 考察

##### 4. 1. 小山川におけるクリプトスポリジウムの存在状況

本研究では、自然由来のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を類別する手法として、DGGE 法を初めて適用した。その結果、河川水中に存在するクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を、精度よく検出、判別することができた。また、定量値として、検出されたクリプトスポリジウム全体の濃度だけではなく、個々の種・遺伝子型ごとに、その存在濃度を推定することができた。これにより、以下の知見を得ることができた。

小山川において、ウシに特異的に感染する *C. andersoni* が、クリプトスポリジウム全体の約半数を占めることが明らかとなった。これにより、この地域におけるクリプトスポリジウムの汚染源として、ウシが重要な位置を占めることが示唆された。

また、これまでまだ種として分類されていない遺伝子型が4種類 (*C. sp. 938*, *C. sp. PG1-26*, *C. sp. t03*, *C. sp. t04*) 検出され、濃度に換算して全体の3分の1程度を占めることがわかった。これらの遺伝子型に関しては、*C. sp. 938* がヘビ<sup>39)</sup>、*C. sp. PG1-26* がブタ<sup>40)</sup>から検出されたという報告がある程度で、宿主特異性や、ヒトへの感染性に関する情報はまだ得られていない。残り2つ (*C. sp. t03*, *C. sp. t04*) は、これまでに報告されていない新しい種である可能性がある。さらに、同一試料に複数 (最大4種類) の種・遺伝子型が混在していたことをあわせて考えると、小山川におけるクリプトスポリジウムによる汚染が、様々な起源により発生する複合的なものである可能性が示された。

さらに、クリプトスポリジウム症患者からの単離株の大部分を占める *C. parvum* や *C. hominis* が、河川水中においては約16%しか存在していないことが示された。これは、クリプトスポリジウムによる水系感染症のリスクを評価する上で、重要な知見である。現在クリプトスポリジウム検出手法として広く用いられている顕微鏡観察<sup>35,36)</sup>や、定量的PCR法<sup>33,42-45)</sup>では、検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型に関する情報を得ることができない。このような定量結果を基にした感染症リスク評価においては、検出されたクリプトスポリジウムが等しくヒトに対する感染性を持つ、と仮定することが多い。しかし、今回の調査において、ヒトに対する感染性を持つクリプトスポリジウムが、全体の6分の1程度しか存在しなかったことから、リスク評価に用いるデータを収集するにあたっては、定量だけではなく、DGGE法やクローニング、RFLP法のような、種・遺伝子型を判別する手法を組み合わせることが重要であることが示された。

#### 4. 2. クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別における DGGE 法の有用性

DGGE 法の最大の利点は、本手法が遺伝子群集解析に広く適用されていることからわかるように、多数の遺伝子配列を含む試料を、個々の遺伝子配列ごとに類別できる点にある。特に、同一の遺伝子配列が複数の試料に連続して存在する場合には、生成したバンドの位置を確認するだけで、その種・遺伝子型を判断することが可能である。また、RFLP 法と異なり、試料中に未知の遺伝子配列が含まれていた場合でも、それを既知のものと識別することが容易である。したがって、今回のように、得られる遺伝子配列が未知であるような場を対象とした調査を行う場合には、特に適した手法であると考えられる。実際、小山川における調査の結果、新しい遺伝子配列が検出され、また同一試料に最大 3 種類の種・遺伝子型が混在している場合でも、それぞれを判別することができた。

一方、DGGE 法の欠点としては、RFLP 法と比較して時間を要する点が挙げられる。しかし本研究での調査のように、迅速に結果を出すことが必要ではない場合は、この点に関しては問題ない。次に、DGGE 法により得られたバンドの位置だけでは、その遺伝子配列がどの種・遺伝子型によるものであるのかが判断できないことが挙げられる。これはすなわち後段にシーケンシングが必要である、ということの意味している。確かにシーケンシングにより最終的な結果を得るまでにはさらに時間が必要であるが、遺伝子配列を解読することで、試料に含まれる全ての種・遺伝子型の判別が可能であり、また未知の遺伝子配列を検出することも可能であることを考慮すると、より詳細な結果が得られるという点で、優れた性質であるということもできる。さらに、DGGE 法に適用できる塩基長には制限があり、最大で 500bp 程度であるとされている<sup>4)</sup>。この点は、プライマーの設計や選択の際に、種による配列の差が十分にある領域を増幅部位とすることで解決できる。実際に本研究では、約 300bp を増幅対象としたプライマーを選択して、多くの種を類別できることを示した。

以上より、クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別に DGGE 法を適用することで、先に述べた RFLP 法よりも精度が高く、またクローニングとシーケンシングを組み合わせた手法よりも経済的な調査結果を得ることができることが示された。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、クリプトスポリジウムの DNA を分与してくださった国立感染症研究所 寄生動物部の遠藤 卓郎、八木田 健司、泉山 信司の諸氏に深く謝意を表す。

なお本研究は、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」(代表・国包章一)の補助を受けて行われた。

#### 参考文献

- 1) D'Antonio, R.G., Winn, R.E., Taylor, J.P., Gustafson, T.L., Current, W.L., Rhodes, M.M., Gary, G.W. and Zajac, R.A.: A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, Vol. 103, Iss. 6, pp.886-888, 1985.
- 2) MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. and Davis, J.P.: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water-supply. *New England Journal of Medicine*, Vol. 331, Iss. 3, pp. 161-167, 1994.
- 3) MacKenzie, W.R., Schell Wl Blair, K.A., Addiss, D.G., Peterson, D.E., Hoxie, N.J., Kazmierczak, J.J. and Davis, J.P.: Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin - recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 21, Iss. 1, pp. 57-62, 1995.
- 4) Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P. and Haddix, A.C.: Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 9, Iss. 4, pp. 426-431, 2003.
- 5) Sulaiman, I.M., Lal, A.A. and Xiao, L.H.: A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 48, pp. 24S-27S, 2001.
- 6) 埼玉県衛生部: 「クリプトスポリジウムによる集団下痢症」一越生町集団下痢症発生事件一報告書, 1997.
- 7) Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T. and Endo, T.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitology Research*, Vol. 87, Iss. 11, pp. 950-955, 2001.



- 8) Xiao, L.H., Fayer, R., Ryan, U. and Upton, S.J.: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 17, Iss. 1, pp. 72-97, 2004.
- 9) Fayer, R.: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, Vol. 126, Iss. 1-2, pp. 37-56, 2004.
- 10) Ramirez, N.E., Ward, L.A. and Sreevatsan, S.: A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, Vol. 6, Iss. 8, pp. 773-785, 2004.
- 11) Carey, C.M., Lee, H. and Trevors, J.T.: Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, Vol. 38, Iss. 4, pp. 818-862, 2004.
- 12) McLaughlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. and Nichols, G.L.: 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. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38, Iss. 11, pp. 3984-3990, 2000.
- 13) Pedraza-Diaz, S., Amar, C. and McLaughlin, J.: The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 189, Iss. 2, pp. 189-194, 2000.
- 14) Pedraza-Diaz, S., Amar, C.F.L., McLaughlin, J., Nichols, G.L., Cotton, K.M., Godwin, P., Iversen, A.M., Milne, L., Mulla, J.R., Nye, K., Panigrahl, H., Venn, S.R., Wiggins, R., Williams, M. and Youngs, E.R.: *Cryptosporidium meleagridis* from humans: Molecular analysis and description of affected patients. *Journal of Infection*, Vol. 42, Iss. 4, pp. 243-250, 2001.
- 15) Xiao, L.H., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H. and Lal, A.A.: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 183, Iss. 3, pp. 492-497, 2001.
- 16) Chalmers, R.M., Elwin, K., Thomas, A.L. and Joynton, D.H.M.: Infection with unusual types of *Cryptosporidium* is not restricted to immunocompromised patients. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 185, Iss. 2, pp. 270-271, 2002.
- 17) Hajdusek, O., Ditrich, O. and Slapeta, J.: Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, Vol. 122, Iss. 3, pp. 183-192, 2004.
- 18) Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J. and McLaughlin, J.: Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 50, Iss. 3, pp. 293-296, 2001.
- 19) Katsumata, T., Hosea, D., Ranuh, I.G., Uga, S., Yanagi, T. and Kohno, S.: Short report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 62, Iss. 1, pp. 70-72, 2000.
- 20) Xiao, L.H., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Vivar, A., Lal, A.A. and Gilman, R.H.: Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 185, Iss. 12, pp. 1846-1848, 2002.
- 21) Ong, C.S.L., Eisler, D.L., Alikhani, A., Fung, V.W.K., Tomblin, J., Bowie, W.R. and Isaac Renton, J.L.: Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: First report of human infections with a cervine genotype. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, Iss. 3, pp. 263-268.
- 22) Mallon, M.E., MacLeod, A., Wastling, J.M., Smith, H. and Tait, A.: Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 3, Iss. 3, pp. 207-218, 2003.
- 23) Xiao, L.H., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R. and Lal, A.A.: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 8, pp. 3386-3391, 1999.
- 24) Xiao, L.H., Escalante, L., Yang, C.F., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R. and Lal, A.A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 4, pp. 1578-1583, 1999.
- 25) Gasser, R.B., Zhu, X.Q., Caccio, S., Chalmers, R., Widmer, G., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Pozio, E. and Browning, G.F.: Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions. *Electrophoresis*, Vol. 22, Iss. 3, pp. 433-437, 2001.
- 26) Gasser, R.B., Abs, E.L.-Osta Y.G. and Chalmers, R.M.: Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, Iss. 5, pp. 2719-2730, 2003.
- 27) Gasser, R.B., Abs, E.L.-Osta Y.G., Prepens, S. and Chalmers, R.M.: An improved 'cold SSCP' method for the genotypic and subgenotypic characterization of *Cryptosporidium*. *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 18, Iss. 5, pp. 329-332, 2004.
- 28) Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A. and Thompson, R.C.A.: Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *Journal of Parasitology*, Vol. 83, Iss. 5, pp. 825-830, 1997.
- 29) Ward, P.I., Deplazes, P., Regli, W., Rinder, H. and Mathis, A.: Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. *Parasitology*, Vol. 124, Iss. 4, pp. 359-368, 2002.
- 30) Sulaiman, I.M., Xiao, L.H. and Lal, A.A.: Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 10, pp. 4431-4435, 1999.

- 31) 阿部仁一郎、木俣 勲、井関 基弘: 分子生物学的手法を用いた *Cryptosporidium* の種および遺伝子型鑑別法の比較と文献的考察. 感染症学雑誌, Vol. 76, Iss. 10, pp. 869-881, 2002.
- 32) Jiang, J.L. and Xiao, L.H.: An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp.. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 50, pp. 542-547, 2003.
- 33) 真砂佳史, 小熊久美子, 片山浩之, 大垣眞一郎: 消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による水中のクリプトスポリジウムの定量および種別判定手法の開発. 環境工学研究論文集, Vol. 41, pp. 311-319, 2004.
- 34) Muyzer, G., Dewaal, E.C. and Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, Iss. 3, pp. 695-700, 1993.
- 35) U.S.EPA: USEPA Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/IFA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC EPA 821-R-98-010, 1999.
- 36) U.S.EPA: USEPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/IFA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA 821-R-99-006, 1999.
- 37) 真砂 佳史, 片山 浩之, 大垣 眞一郎: 大容量の河川水からの *Cryptosporidium* および *Giardia* の濃縮・精製手法の検討, 第 53 回全国水道研究発表会梗概集, pp. 632-633, 2002.
- 38) 八木 正一, 中西 正治, 小田 琢也, 山本 稔, 井上 亘: クリプトスポリジウム試験分離精製操作法の比較検討, 第 52 回全国水道研究発表会梗概集, pp. 628-629, 2001.
- 39) Xiao, L.H., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X.C. and Fayer, R.: Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, Vol. 32, Iss. 14, pp. 1773-1785, 2002.
- 40) Ryan U.M., Samarasinghe B., Read C., Buddle J.R., Robertson I.D. and Thompson R.C.A.: Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, Iss. 7, pp. 3970-3974, 2003.
- 41) Cotton, R.G.H.: Current Methods of Mutation Detection. *Mutation Research*, Vol. 285, Iss. 1, pp. 125-144, 1993.
- 42) MacDonald, L.M., Sargent, K., Armson, A., Thompson, R.C.A. and Reynoldson, J.A.: The development of a real-time quantitative-PCR method for characterisation of a *Cryptosporidium parvum* in vitro culturing system and assessment of drug efficacy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Vol. 121, Iss. 2, pp. 279-282, 2002.
- 43) Fontaine, M. and Guillot, E.: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 214, Iss. 1, pp. 13-17, 2002.
- 44) Fontaine, M. and Guillot, E.: An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 54, Iss. 1, pp. 29-36, 2003.
- 45) Higgins, J.A., Trout, J.M., Fayer, R., Shelton, D. and Jenkins, M.C.: Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. *Water Research*, Vol. 37, Iss. 15, pp. 3551-3560, 2003.



## 話題の感染症

## クリプトスポリジウムの最近の知見

Recent progress in *Cryptosporidium* research

黒木俊郎<sup>1)</sup>：泉山信司<sup>2)</sup>：遠藤卓郎<sup>2)</sup>  
 Toshiro KUROKI      Shinji IZUMIYAMA      Takuro ENDO

## 要旨

クリプトスポリジウムは世界中に広く分布しており、種々の動物の消化管に寄生し、ヒトを含めた一部の動物で下痢症の原因となっている。免疫不全者では重篤な下痢症を惹起し、本原虫に対する有効な治療法がないために時として致命的となる。さらに本原虫のオーシストは強い塩素耐性を示すために、しばしば水道を介した集団下痢症を引き起こしている。こうしたことから、クリプトスポリジウムは臨床あるいは公衆衛生学的に現在最も注目される原虫となっている。

近年、クリプトスポリジウムの研究にも遺伝学的手法が盛んに取り入れられ、DNAレベルでの解析が行われており、すでに全ゲノムの塩基配列も明らかにされている。こうした技術や情報が普及することで、各種遺伝子の塩基配列の相違と生物学的特徴に基づいてクリプトスポリジウム属の種の同定や型別を比較的容易に行うことができるようになってきている。

## はじめに

クリプトスポリジウムは20世紀初頭に発見され、その宿主域と病原性が徐々に明らかにされながら現在に至っている。すなわち、Tyzzerが1907年にマウスの胃に寄生する原虫を *Cryptosporidium muris* と命名した<sup>1)</sup>。次いで、1912年にマウスの小腸から *C. parvum* を報告した<sup>2)</sup>。その後、1970年代に

は家畜への病原性が示され、1976年には *C. parvum* が正常な女兒と免疫不全患者から分離され<sup>3,4)</sup>、ヒトでの病原性が明らかにされた。その後しばらくは、日和見感染症としてもっぱら免疫不全患者の慢性下痢症の原因とされていたが、1983年の水道を介した集団感染を契機として健常者においても多くの症例が見出されるようになり、現在では小児下痢症、渡航者下痢症、人獣共通感染症あるいは水系感染症の病原体として重要視されるに至っている。

## I. クリプトスポリジウムの生物学

クリプトスポリジウムは孢子虫類に属する偏性細胞寄生性原虫であり、哺乳類から鳥類、爬虫類あるいは魚類まで広い範囲の脊椎動物に寄生がみられる。寄生部位の上皮細胞に虫嚢を形成し、その内部で無性生殖を行って増殖する。やがて有性生殖期に移行して、オーシスト壁と呼ばれる殻をかぶったオーシスト(写真1)が形成されて便とともに外界に排出される。オーシストにはバナナ状の形態をした4個体のスポロゾイトが入っている。排出された時点で感染力を持つが、環境中で増殖することはない。このオーシストを経口的に摂取すると、寄生部位の上皮細胞に感染する。

現在、クリプトスポリジウム属では13種の種名が有効とされて確定し、あるいは新種として提案されている(表1)<sup>5)</sup>。これらは寄生部位により腸管寄生性(intestinal *Cryptosporidium*)と胃寄生性(gastric *Cryptosporidium*)の2つのグループに分けられる。オーシストの大きさは前者が4~6 μmに

1) 神奈川県衛生研究所 微生物部  
 ☎ 253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1  
 2) 国立感染症研究所 寄生動物部  
 ☎ 162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

1) Kanagawa Prefectural Institute of Public Health  
 (1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa)  
 2) National Institute of Infectious Diseases  
 (1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo)

対し、後者が6~8 $\mu$ mである。それぞれのグループに属する種は形態が類似しており、形態学的な鑑別は困難である。さらに、特定の遺伝子の塩基配列が異なる遺伝子型がそれぞれのグループで知られるようになった。腸管寄生性クリプトスポリジウムと胃寄生性クリプトスポリジウムは遺伝子レベルでも系統樹上で分岐しており、それぞれの分岐の先に種や遺伝子型が分布している。

近年では塩基配列の解析が容易となり、さらに特異遺伝子配列も絞られ、クリプトスポリジウムの遺伝学的解析が急速に進められている。種の決定や遺伝子型別に用いられる遺伝子には、18S rDNA, heat shock protein (hsp), actin, oocyst wall protein (OWPあるいはCOWP)の4種の遺伝子がある。これら遺伝子の塩基配列情報は充実しつつあり、種や遺伝子型の特定および汚染源の調査追跡等に利用されている。その他にpoly-threonine, glycoprotein, microsatellite, internal transcribed spacer, beta tubulin, thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), dihydrofolate reductase (DHFR), acetyl coAといった多様な遺伝子の解析も行われている。

*C. parvum*にはヒトに由来する遺伝子型であるヒト型 (genotype1あるいはhuman genotype : *C. hominis*とする提案もされている)とヒトを含む広く哺乳動物に感染する遺伝子型であるウシ型 (genotype2あるいはbovine genotype)が知られている。その他に*C. parvum*あるいは*C. parvum*-like原虫に属するものには、ブタ(2種)、ヒツジ、ウマ、ウシ、ウサギ、有袋類、フクロネズミ(2種)、フェレット、キツネ、シカ(2種)、マスカラット(2



写真1 *Cryptosporidium parvum*のオーシスト(微分干渉像)

種)、リス、クマ、シロアシネズミ、オポッサム(2種)といった20以上の遺伝子型があり、それぞれ分離された動物に由来する名称で呼ばれている。2004年9月現在でgene bankに登録されている主要な配列約160を用い、Xiaoら<sup>5)</sup>が提言している遺伝子型名を付した系統樹を作製した(図1)。米国の研究グループは、ヒト型に続いてこれらの遺伝子型を種として独立させることを検討している。この研究グループの提案によれば、これまでウシ型と呼ばれていた遺伝子型に属する株だけが*C. parvum*に該当することになる。今後しばらくの間は、種や遺伝子型をめぐってさまざまな場面で混乱が生じることが避けられないであろう。例えば、遺伝子型が種として独立すれば、クリプトスポリジウム症の起原種が複数になることになり、思わぬところへの影響も考えておかねばならない。

この他に、鳥類に寄生するクリプトスポリジウムではアヒル、ガチョウ(2種)、爬虫類ではヘビといった遺伝子型も報告されている。また、胃寄生性クリプトスポリジウムでは鳥類のウッドコック、爬虫類のトカゲ、カメといった遺伝子型がある。

表1 報告されているクリプトスポリジウム属の種と宿主

種	主な宿主	まれな宿主
腸管寄生性		
<i>C. parvum</i>	ウシ、ヒツジ、ヤギ ヒト	シカ、ネズミ、ブタ
<i>C. hominis</i> * <sup>1</sup>	ヒト、サル	ジュゴン、ヒツジ
<i>C. canis</i> * <sup>1</sup>	イヌ	ヒト
<i>C. felis</i>	ネコ	ヒト、ウシ
<i>C. wrairi</i>	モルモット	
<i>C. baileyi</i>	ニワトリ、シチメンチョウ	オカメインコ、ウズラ、 ダチョウ、カモ
<i>C. meleagridis</i>	シチメンチョウ、ヒト	インコ
<i>C. saurophilum</i>	トカゲ類	ヘビ類
胃寄生性		
<i>C. muris</i>	げっ歯類、フタコブラクダ	ヒト、mountain goat、 Rocky hyrax
<i>C. andersoni</i>	ウシ、フタコブラクダ	
<i>C. galli</i>	フィンチ類、ニワトリ、 ヨーロッパオオライチョウ、 ギンザンマシコ	
<i>C. serpentis</i>	ヘビ類、トカゲ類	
<i>C. molnari</i> * <sup>2</sup>	魚類	

文献5)を参考に作成。

\*1 : *C. parvum*の遺伝子型から種として独立させることが提案されている。

\*2 : *C. molnari*は遺伝子レベルの解析が行われておらず、寄生部位に基づいて胃寄生性とした。



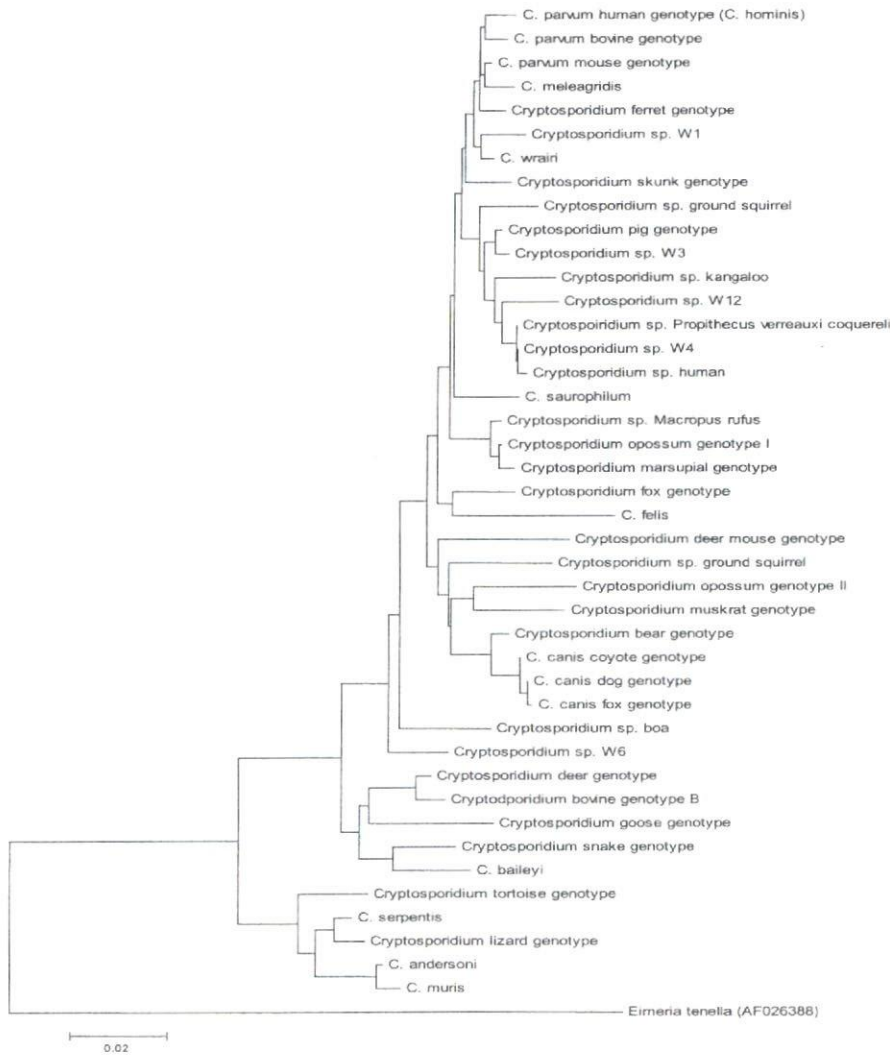


図1 クリプトスポリジウム属原虫の系統樹

## II. 哺乳類のクリプトスポリジウム

哺乳類に寄生するクリプトスポリジウムには、*C. parvum* の他に *C. wairi*, *C. felis*, *C. muris*, *C. andersoni* が知られている。さらに、2000年に *C. parvum* のイヌ遺伝子型を *C. canis* として、2001年にヒト型を *C. hominis* として独立種とすることが提案された<sup>6,7)</sup>。

クリプトスポリジウムの宿主特異性について、1980年代後半に種々の動物由来の株を用いて盛んに交差感染実験が行われた。感染が成立するか否かの結果は株により異なり、整合性の取れた結果は得られなかった。そのため、*C. parvum* は人獣共通感染症であるか疑問であるという意見も出された。ところが、1990年代初めに *C. parvum* とされるものの中に複数の遺伝子型の存在が示され、遺伝子型に

より宿主適合性が異なることが明らかになってきた。交差感染実験において実験者によって結果が異なっていたのは、用いた株の遺伝子型が異なっていたためであったと推測される。

クリプトスポリジウムの宿主特異性は比較的高いとされている。ヒト型ではヒトとサル類が宿主であり、一部ヒツジやジュゴンから報告されている。また、実験レベルでは幼齢のブタやウシおよびヒツジへの感染が可能とされている。ウシ型はヒトを含む150種以上の哺乳類から検出されており、宿主特異性は例外的に低い。この遺伝子型の株が人獣共通感染症の主たる原因原虫と考えてよい。免疫状態が正常なヒトから検出されるクリプトスポリジウムはヒト型とウシ型がほとんどであるが、*C. canis* や *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris* もわずかに検出されている。HIV/AIDS患者では、これら以外の種や遺

伝子型に感染していたとする報告もある。有袋類やマウス、ブタ、フェレットなどの遺伝子型の宿主特異性に関するデータは、今後詳細に収集・解析される必要がある。

### Ⅲ. 鳥類のクリプトスポリジウム

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムは *C. baileyi*, *C. meleagridis* および *C. galli* が知られている。*C. baileyi* はニワトリや七面鳥を主な宿主とし、*C. meleagridis* は七面鳥などを宿主とするが、後者は免疫機能が正常なヒトから検出されることがある。両種は小腸やファブリキウス嚢、総排泄腔の上皮細胞に寄生する。*C. galli* はニワトリやフィンチ類などを宿主とし、胃の上皮細胞に寄生する。

### Ⅳ. 爬虫類のクリプトスポリジウム

爬虫類に寄生するクリプトスポリジウムは *C. serpentis* と *C. saurophilum* の2種が知られている。この2種以外に複数のクリプトスポリジウムの存在が報告されているが<sup>8)</sup>、種の確定には至っていない。今後、詳細な解析が必要である。また、爬虫類に寄生するクリプトスポリジウムの宿主特異性に関して未だ十分な解析は行われていないが、その中で *C. serpentis* において、ヘビ類とトカゲ類では寄生する株の遺伝子型が異なることが示されている<sup>9)</sup>。宿主特異性に関する研究分野でも、今後の研究に待たれるところが多い。

### Ⅴ. 両生類と魚類のクリプトスポリジウム

両生類のクリプトスポリジウムとして、*Limnodynastes tasmaniensis* (Spotted marsh frog : オーストラリアに生息するミナミガエル科の1種) とある種のヒキガエルに寄生するものが記載されているが、形態に関する記載が不十分であるために種名が有効と認められていない。

魚類にはヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) およびヨーロッパ産バス (*Dicentrarchus labrax*) に寄生する *C. molnari* がある。本原虫は宿主の胃に寄生するが、遺伝子解析が行われていないために、*C. muris* や *C. galli*, *C. serpentis* との類縁性は明らかで

はない。最近、グッピー (*Poecilia reticulata*) に寄生する *C. molnari* に類似したクリプトスポリジウムの記載もある。

### Ⅵ. ヒトのクリプトスポリジウム症の症状と治療法

一般論として、クリプトスポリジウムは種々の動物に寄生するが、原虫種や遺伝子型に、また宿主側の種や年齢、免疫など身体の状態により臨床症状が異なり、どの宿主でも下痢を主体とした症状を呈するというものではないようである。むしろ、症状が見られない動物のほうが多いようで、その中でヒトは症状がみられるグループに分類される。さらに、患者の免疫状態により臨床経過は甚だしく異なる。

ヒトのクリプトスポリジウム症の潜伏期は4～10日程度で、主な症状は下痢(主として水様性)、腹痛、39℃を超えない発熱、悪心、嘔吐、倦怠感などであり、下痢は軽度のものから1日に20回以上の激しいものまでみられる。通常、症状は1～2週間程度で治まる。オーシストを排出するものの、症状を呈しない例があることも知られている。成人よりも小児のほうが、また初感染のほうが再感染よりも症状が重い。HIV/AIDS患者などの免疫不全者では慢性、消耗性の下痢を呈し、時として致死的となる。通常は小腸のみに感染するが、HIV/AIDS患者では呼吸器や胆道系での感染も報告されている。

クリプトスポリジウム症の症状には患者の免疫状態による差はないが、症状が持続する期間と転帰は異なり、HIV/AIDS患者やその他の免疫不全患者では症状が長期に持続し、時に死に至ることがある。米国疾病予防センター(CDC)ではCD4+T細胞数が180～200を下回ると症状の長期化や重篤化が起きやすいとしている。

これまでにクリプトスポリジウム症の治療に関する多くの研究が行われてきたが、それにもかかわらず効果を示す薬剤が見出されていないため、治療は対症療法となる。免疫不全者に対する有効な治療法は免疫機能を回復することであり、HIV/AIDS患者ではCD4+T細胞数の改善を目指した治療が最も効果があるとされている。



## VII. ヒトのクリプトスポリジウム症の疫学

ヒトのクリプトスポリジウム症の主な原因原虫は、前述のように *C. parvum* のヒト型とウシ型である。ヒト型はヒト-ヒト間の感染環を有し、ほぼヒトの間でのみ伝播する。ウシ型はヒト-動物間の感染環により、ヒトと動物の間で感染が成立する。原因となった原虫の遺伝子型を解析することで、感染源あるいは汚染源をある程度推測することができる。

クリプトスポリジウムはオーシストを経口的に摂取する糞-口感染であるが、感染経路として直接的に患者（患畜）との接触による感染と、飲食物を介した経路が知られている。前者では、家族内感染、託児所（day-care centers）での集団感染、病院内感染、広義の性感染症、感染動物との接触（ペットや家畜、実験動物、牧場訪問）などの事例が報告されている。後者の例としては、野菜、アップルサイダー（プレスしたリンゴの実入りジュース）や牛乳などを介したものと、水道水汚染による集団発生、河川や湖、プールでの水泳などを介した感染があり、特に水道水やプールを介した感染が問題になっている。

クリプトスポリジウムのオーシストは塩素耐性を示す。そのため、水道水に混入した場合でも不活化されることはない。水道水を介した下痢症の集団発生が1983年から世界中で毎年のように報告されており、わが国でも神奈川県平塚市の事例や埼玉県越生町の事例など、複数の事例がある。水道水を介した事例ではどちらかの遺伝子型に偏るということではなく、ヒト型あるいはウシ型が検出されている。さらに、2004年8月には長野県の合宿施設の埼玉県と千葉県の利用者200人あまりが下痢を呈する事例が発生したが、千葉県では発症者が利用したプールを介して2次感染も起きている。

クリプトスポリジウム症は輸入感染症としても重要である。海外において、衛生状態の悪い国や地域のみならず、多くの患者が発生している先進国もある。そのため、海外旅行中に感染し、旅行中あるいは帰国後に発症する例がある。英国ではクリプトスポリジウム症患者が年に3,000～6,000例に及び、患者の発生には春と晩夏から秋にかけての2つのピークがある。このうち晩夏から秋のピークは夏季

休暇を過ごした海外で感染したことによるものと推測されている。この時期の患者から分離される原虫はヒト型が多い傾向がある。一方、春のピークは感染に対する感受性の高い子ウシの多い時期にあたり、ヒトがオーシストに接触する機会が増えると推測されている。そのため、この時期はウシ型が優勢となる。

わが国ではクリプトスポリジウム症は感染症法の平成15年の改正により5類感染症（全数把握）に規定されており、患者を診察した医療機関は保健所への報告が義務付けられている。感染症法の施行以降の報告数は、1999年は4例（1999年4月以降）、2000年は3例、2001年は11例、2002年は109例、2003年は8例、2004年は91例であり、集団下痢症が発生した2002年と2004年を除いて毎年10例前後の患者が報告されているにとどまっている。しかしながら、この疫学統計がわが国の汚染実態を的確に表現しているとするのは、いささか早計に過ぎるのではないかと考えられる。統計上で患者数が少ない背景には大学医学部を含め多くの医療機関にクリプトスポリジウム症の診断技術が普及していない状況があると推察される。

クリプトスポリジウム症はHIV/AIDS患者にとっては非常に危険な感染症の1つであり、感染予防に特別な配慮をしなければならない。また、クリプトスポリジウムによる下痢が1カ月以上続く場合には逆に発症が疑われ、AIDS発症の指標疾患の1つとされている。CDCではHIV/AIDS患者に対して、クリプトスポリジウム感染の予防方法として（1）手を洗う、（2）便に接するような性行為は避ける、（3）家畜に触れない、（4）ペットの便や容器などに触れない、（5）食べ物を洗うか加熱調理する、（6）水泳や入浴時に水を飲まないように注意する、（7）安全な水を飲む、（8）旅行中（特に開発途上国）は特別な注意を払うという項目を挙げている。エイズ患者は食品や水に対して十分注意を払う必要があるが、さらにさまざまな動物に由来するクリプトスポリジウムに感染する危険性があるため、動物との接触も慎重でなければならない。ペットとして飼育される動物の種類は近年ではイヌやネコあるいはその他の哺乳類にとどまらず、数多くの爬虫類や両生類、魚類を入手することが可能になっている。ペットや家畜として飼育されている哺乳類だけではなく、それ

以外の動物にも十分な注意を払う必要がある。

## 文 献

- 1) Tyzzer, E. E. : A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. Proc Soc Experimental Biol Med 5: 12-13, 1907.
- 2) Tyzzer, E. E. : *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protisten 26: 394-412, 1912.
- 3) Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology. 70:592-598, 1976.
- 4) Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E.: Overwhelming watery diarrhea associated with a *cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology. 70:1156-1160, 1976.
- 5) Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S. J.: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev. 17:72-97, 2004.
- 6) Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J. P.: *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. J Parasitol. 87:1415-1422, 2001.
- 7) Morgan-Ryan U.M., et al.: *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. J Eukaryot Microbiol. 49:433-440, 2002.
- 8) Upton, S.J., McAllister, C.T., Freed, P.S., Barnard, S.M.: *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. J Wildl Dis. 25: 20-30, 1989.
- 9) Xiao, L., et al.: Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. Appl Environ Microbiol. 70:891-899, 2004.





● 国内にある感染症

## 水系原虫症

黒木 俊郎\*  
くろき としろう

Point

- 水系原虫症の代表的な原因病原体には腸管寄生性のクリプトスポリジウム、ランブル鞭毛虫、サイクロスポラ、イソスポラ、微胞子虫および赤痢アメーバと自由生活性アメーバのネグレリアがあげられる。
- 海外の衛生状態の悪い国や地域では多くの水系原虫症患者が発生しているが、先進国でも多数の症例が報告されている国がある。
- 患者や感染者あるいは感染動物の糞便とともに排出された腸管寄生性原虫のシストやオーシストが水系を汚染し、これを経口的に摂取することで感染する。
- 病原体に汚染された飲料水の摂取のみならず、河川や湖沼、プールなどでの水泳や水浴でも感染し、患者が発生する。
- ネグレリアは自然環境、特に温水環境に分布し、偶発的にヒトに感染することで発症する。

Key Words 原虫, 水系感染, 渡航者下痢症, 原発性アメーバ性髄膜炎

### はじめに

水系感染症の原因原虫として、腸管寄生性のクリプトスポリジウム、ランブル鞭毛虫、サイクロスポラ、イソスポラ、微胞子虫および赤痢アメーバならびに自由生活性アメーバであるネグレリアがあげられる。これらの原虫の特徴を表1に示した。ネグレリアを除く原虫はヒトをはじめとする動物の腸管に寄生する。感染型であるオーシスト、シストあるいは胞子が糞便とともに排出され、直接あるいは水や食品を介して摂取されると感染する。これらの感染型は殻で被われており、多くの消毒薬に耐性を示す。水道水の微生物学的安全性は塩素消毒により保たれているが、一部の原虫ではデータが十分ではないものの腸管寄生性原虫類

は耐塩素性を示すため、塩素消毒が施された水道水においても不活化されずに生存する。そのため、(オー)シストが水道水を汚染し、散発的にあるいは時に多数の患者が集団で発生することから、公衆衛生上の重要な問題として捉えられている。

### クリプトスポリジウム

クリプトスポリジウム属には14種が知られている。種により宿主域は異なり、*C. hominis* (*C. parvum* genotype I) がヒト-ヒト間の感染環を有し、ヒトでの罹患率をもっとも高い。広範囲の宿主域を有する *C. parvum* (*C. parvum* genotype

\* 神奈川県衛生研究所 微生物部

表1 おもな水系原虫症の特徴

疾患	病原体	分類上の位置	感染型 (大きさ)	寄生部位	症状	治療
クリプトスポリジウム症	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>C. hominis</i> など	孢子虫	オーシスト (4~6 μm)	小腸	下痢, 腹痛 39度を越えない発熱, 嘔吐, 倦怠感など	対症療法 エイズ患者では免疫機能の回復
サイクロスポラ症	<i>Cyclospora cayentanensis</i>	孢子虫	オーシスト (8~10 μm)	小腸	水様性下痢, 腹痛, 食欲不振, 悪心, 嘔吐, 鼓腸, 体重減少など	ST合剤
イソスポラ症	<i>Isospora belli</i>	孢子虫	オーシスト (25~30 μm)	小腸	水様性下痢, 腹痛など	ST合剤
ジアルジア症	<i>Giardia lamblia</i>	鞭毛虫	シスト (5~8 μm × 8~12 μm)	十二指腸, 小腸上部, 時に胆管, 胆嚢の内腔	下痢, 腹痛, 食欲不振, 鼓腸, 脂防便など	メトロニダゾールまたはチニダゾール
微孢子虫症	<i>Enterocytozoon bienewisi</i> など	微孢子虫	孢子 (1~2 μm)	小腸など	下痢, 脱水, 体重減少など	<i>E. bienewisi</i> にはST合剤, メトロニダゾールが有効とする報告がある。
赤痢アメーバ症	<i>Entamoeba histolytica</i>	葉状根足虫	シスト (10~20 μm)	大腸 時に腸外に寄生 (肝, 脳, 肺など)	① 不顕性キャリア ② 急性アメーバ性大腸炎 ③ 劇症大腸炎 ④ アメーバ性膿瘍	メトロニダゾールまたはチニダゾール
ネグレリア症 (原発性アメーバ性髄膜脳炎)	<i>Naegleria fowleri</i>	葉状根足虫	栄養体 シスト (10 μm)	鼻腔, 脳	脊髄脳炎による頭痛, 発熱, 悪寒, 嘔吐, けいれん, 昏睡など	アンホテリシンB