

In phase 1, there are some assessments applied before the study for both case - control groups as baseline study. For this time, qualitative research method is applied to collect data and information regarding surveillance system and malaria condition from village level until district level. Some information can be gained by indepth interview, document research, and observation. Interview is conducted with malaria programmers and village malaria agents

There are two main groups assessed. The first group is health workers who in charge in malaria case detection and malaria surveillance. Another group is Malaria Surveillance Agents/Village Malaria Volunteers. Malaria Surveillance Agents/Village Malaria Volunteers are community member that have been trained by health workers for detecting malaria case at village level and case investigation. Malaria Surveillance Agents earn fund from local government while Village Malaria Volunteers are voluntary works.

RESULTS AND DISCUSSION

Malaria Control Program in Wonosobo District.

Although the incidence of malaria in Wonosobo decreased, Wonosobo is still the highest among districts in Central Java Province. Wonosobo District has 13 villages in HCI category, 44 villages in MCI category and 32 villages in LCI category. During 2005, the local government support malaria control in wonosobo amounting 150 milion rupiah, approximately USD 15,000. This fund supports some activities regarding malaria control program. These activities are:

1. Case finding through Pasive Case Detection and Active Case Detection. PCD and ACD are conducted by health providers in health facilities and VMAs. By this activity, 30,056 clinical cases can be examined by laboratory (100%).
2. Vector Control activities by Indoor Residual Spraying (IRS) and Bed nets distribution. By this activity, Wonosobo successfully protects 26,677 houses and distributes 5,000 pieces of bed nets to the community.
3. In collaboration with NHIRD, there are some researches that have been conducted in Wonosobo. Some topics are drug efficacy, vector

control, and dynamic transmission survey.

Import cases are the most challenging problem in Wonosobo. Dominantly, many plantation workers get malaria in Borneo Island and Riau Province, and then they are going back to Wonosobo to get medication. This condition become a serious problem concerning health workers do not recognize these plantation workers. VMAs and Malaria cadres should detect potential cases among the community.

Malaria Control Program in Pekalongan District.

In Pekalongan, malaria incidence has decreased significantly every year. The API is decreased from 0.66 ‰ in 2002 to 0.06 ‰ in 2005. Pekalongan also has 1 HCI village. It is reported that there was outbreak in Lambur village in January 2000, with 46 positive cases and 0% of CFR. Some activities regarding malaria control program are:

1. Case finding and prompt treatment. This including blood examination, blood cross check, radical treatment and epidemiological investigation, follow up of malaria cases, etc. In 2005, there are 29,275 blood slides examined and 44 positive cases treated.
2. Vector control consists of surveillance of vector, IRS, larvaciding and biological control. There are 1668 houses sprayed and 210 bednets distrubeted in 2005.
3. Health promotion.
4. Training (case management and microscopy)
5. Partnership.

Pekalongan District Health Office gets 50 million Rupiah or 5,000 USD from local government in 2005 to support these activities.

Recently, Pekalongan district deal with import cases. Most of these cases are fishermen form Borneo Island who gets medication in Pekalongan's health facilities. Another import group is soldiers form ARMY who stay in barracks. Some of soldiers have symptomatic of malaria in other areas in Indonesia, and get examination and medication in Pekalongan.

Malaria Surveillance in Health Centers

There are 11 health centers in Wonosobo District who deal with malaria as health problems. Every HC has one officer in charge with malaria program. This officer manages VMA's report, collects data from VMAs and polyclinic, and then makes monthly and yearly reports. District health officer claims that laboratory supply is enough, but only 1 HC does not have microscope. This HC always send blood slides to nearest HC for blood examination. The condition of HC's laboratory is good. The microscopists have degree in health analysis. They also can analysis other health indicators.

In Pekalongan, there are 10 HCs that have malaria cases. Each HC has one health officer who in charge with malaria control program in sub-district level. This officer also conducts surveillance system together with VMAs. Job descriptions are same with Wonosobo district. The laboratory facilities are good, but the laboratory must share with warehouse and kitchen. The microscopists also have degree from health analysis. He claims that the number of blood slides that given by VMAs is decreased.

Village Malaria Agents (VMA)

Wonosobo district have 45 VMAs. These VMAs earn Rp. 120.000 or USD 12 per month from the local government to do some activities, as follows:

1. Case finding and treatment. This activity is the main job of VMA. VMA conducts ACD activity to detect clinical malaria cases in the field. Each VMA works in 2 or 3 villages.
2. Taking Blood Slide. If VMA found clinical cases, they will take blood slide, and then bring it to health center to examine by microscopist. If the result is positive, they will treat the patients will radical treatment.
3. Case follow up. VMA also has responsibility to follow up the positive malaria cases. They would visit the patients to control the medication and the condition of patient whether they still have symptom of malaria. They also take blood slide in the 3rd day. However, mostly VMAs do not conduct follow up cases until 28th day.
4. Simple epidemiology investigation. VMA also check health condition of family member of the patients whether they have clinical malaria also.

The health officers could not force the VMA to follow up cases until 28th day because the amount of local government is very low. So, many VMAs have other jobs as main job, for example farmer or trader. Although the salary as VMA is low, they still happy as VMA, because being a VMA has a position in social class. The community treats them respectfully.

There are 45 VMAs in Pekalongan. The local government supports them with Rp. 350.000 per month or USD 35 to do their job as VMA. Job descriptions are same with WMAs in Wonosobo.

Due to the number of malaria cases decline, it is hard to find malaria cases recently. So, the head of health centre order them with new tasks. The new tasks are *Aedes aegypti* larva surveillance and assistance in Village Health Clinic. VMAs in Pekalongan have a duty to check dengue mosquito larva inside house of the community. They also conduct health education to prevent dengue. As assistant in village health clinic, they assist midwife to help the community. They are also in charge in malaria treatment at the clinic.

Regarding the decreasing of malaria incidence in both districts, it is difficult to find malaria incidence among the community. This condition may lead to reducing of awareness to malaria cases. On the other hand, Wonosobo and Pekalongan districts have a good ecological condition for mosquito's breeding that may lead to incidence of malaria.

To gain National policy on Malaria Control Program, which is to eliminate malaria incidence in certain areas, the role of VMA can be expanded. To eliminate of malaria incidence take further action. One of the actions is to control population of mosquito. As an additional function, VMA can be useful to surveillance mosquito breeding place and mosquito larva.

Regarding imported cases in both districts, VMA can take care of new comers in village. They could take blood slide and check new comer's health status whether they have malaria symptom. If they are positive of malaria, the VMA has responsibility to follow up the cases until 28th day (for *falciparum*

cases) of 30th day (for vivax cases). It is important to re-train VMAs for follow up cases and mosquito's surveillance.

In addition, Wonosobo has some remote areas. In 2006, the local government in cooperation with provincial health office facilitates the development of Village Malaria Posts (VMP). VMP has important role to conduct malaria treatment in very remote areas which is far from health facilities. VMP is carry out by malaria cadre as a part of community participation action. Malaria cadre is the community member that has been trained for malaria case management. There are 440 Malaria cadres that have been trained in Wonosobo.

By increasing the function of VMA and VMP, the malaria incidence can be detected immediately and put prompt action to decline malaria incidence among the community.

By doing these activities, Community basis surveillance system can be applied. The awareness of malaria incidence can be increased. This must involve absolute collaboration between the community and health officer in Health Centre or district level.

Health Centre has an important rule in collecting and reporting data that has been collected by VMA, malaria cadre and also from polyclinic. These data are important to determine malaria status in village. Health Center also can manage and supervise VMA and Malaria Cadre. If VMA or Malaria cadre could not follow up cases completely, Health Center can conduct corrective action to ensure compliance of drug treatment of patients.

As well as Health Centre, District health office also collects and analyses data from HCs. Through this, District Health Office can measure the impact of malaria surveillance among the community. District also can support the community with technical assistants and arrange some budget from local government.

CONCLUSION AND PHASE 2 PLAN.

In conclusion, community basis surveillance system can detect malaria incidence directly from the community and also can increase the awareness of malaria incidence. Community basis surveillance system is carry out by Village Malaria Posts and Village Malaria Agents as a part of community participation. VMP and VMA would collaborate with Health Center and District Health Office.

Phase 2 of this study will conduct assessment for community basis surveillance system. There are some activities can be taken. These activities are:

1. In Wonosobo District (as a case group)

- Facilitate community participation through Village Malaria Post (VMP)
- Training VMP Cadres
- Training Village Malaria Agent
- Facilitate inter-collaboration intensified malaria control planning activities
- Facilitate local government (District Health Office) to develop a proper surveillance system that match with local specific conditions
- Monitoring activities to measure surveillance activities

2. In Pekalongan District (as a control group)

- Facilitate Village Malaria Agent
- Regular monitoring activities to measure surveillance activities

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究

主任研究者	渡辺 治雄	国立感染症研究所 副所長
分担研究者	遠藤 卓郎	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
	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	古屋 宏二	国立感染症研究所 寄生動物部

概要： *Cryptosporidium* は強い塩素耐性を有することから、1980 年半ばから水系感染症の病原体として問題となっているが、その後の調査研究により熱帯・亜熱帯地域における下痢症、特に小児下痢症の重要な病原微生物として認知されるに至っている。WHO は 2005 年にクリプトスポリジウム症およびジアルジア症を《Neglected Disease Initiative》の病原体リストに加えた。クリプトスポリジウムはわが国においても集団感染が発生しており、1994 年の平塚市、1996 年の越生町、2002 年の北海道、2004 年の長野での事例が知られている。平塚市の集団感染は *Cryptosporidium parvum* の bovine genotype と呼ばれる人獣に共通して感染する遺伝子型のクリプトスポリジウムが検出されたが、他の 3 事例では人に特異性を示す遺伝子型（human genotype : *C. hominis*）が原因していた。すなわち、これまでオーシストの排出源として家畜の重要性が指摘されてきたが、分子疫学的解析により実際の集団感染は human genotype が主な原因となっていることが明らかとなっている。ちなみに、平塚の事例も直接の汚染源は人であることが状況的に示されている。また、散発事例においても human genotype が多く検出される結果となっている。

当該研究事業では、腸管原虫類の蔓延するアジア地域からの情報入手に向けて、マラリアと併せてアジア原虫情報ネットの構築・維持を行う。今年度の研究において、クリプトスポリジウムの分子疫学的情報の精度向上に向けて直近の集団感染事例の分離株について種々の遺伝子の塩基配列を解析し、おのおのの遺伝子情報の疫学的有用性について検討した。遺伝子として 18S rDNA、Poly-Threonine、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15 等を解析対象として選択した。本分離株の解析結果から、各遺伝子は既存の登録配列との間で 94～100% の相同性を示した。また、CPGP40/15 遺伝子は genotype 内での subtyping に利用されており、集団感染等における患者分離株と環境株との相同性検討への応用が期待される。

フィリピンにおける患者由来の *Cryptosporidium* 分離株 15 株についての遺伝子解析の結果は、わが国と同様に human genotype が大半（11/15）を占めることが示された。そのほかに canine genotype および bovine genotype がそれぞれ 2 株ずつ検出された。一方、タイの状況は少し異なっており、多様な遺伝子型（種）が検出される傾向がみられ、他にはあまり例を見ない *C. muris* や *C. parvum* pig genotype の人体感染例が確認された。

クリプトスポリジウムの遺伝子解析方法はタイなどと共有が可能であることが示され、当該年度において東南アジア地域全体を対象とした分子疫学調査の基礎が構築されたものと判断された。

A. 研究目的

強い塩素耐性を有するクリプトスポリジウムは水系を介した集団感染症の病原体として問題とされているが、熱帯・亜熱帯地域における下痢症、特に小児下痢症の重要な病原微生物としても認知されるに至っている。WHOは2005年にクリプトスポリジウム症およびジアルジア症を《Neglected Disease Initiative》の病原体リストに加えている。

環境へのオーシストの排出源としてこれまで家畜の重要性が指摘されてきたが、実際の集団感染は専ら人に感染する遺伝子型 *C. parvum* (human genotype; *C. hominis*) を中心としていることが明らかとなっている。

クリプトスポリジウム症の主要な感染経路を把握することは公衆衛生上きわめて重要で、分子疫学的手法の開発と情報の収集は重要な手段となる。主な解析方法はPCRと直接塩基配列決定を中心とした分子疫学的手法に依存している。対象遺伝子として18S rDNA、Poly-Threonine、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15が採用され、これまでのところヒト型とウシ型の分別に関心が寄せられてきたが、今後はヒト型を詳細に解析する手法の重要性が増すものと考ええる。当該研究事業では、腸管原虫類の蔓延するアジア地域からの情報入手に向けて、マラリアと併せてアジア原虫情報ネットの構築・維持を行う。今年度の研究において、クリプトスポリジウムの分子疫学的情報の精度向上に向けて直近の集団感染事例の分離株について種々の遺伝子の塩

基配列を解析し、おのおのの遺伝子情報の疫学的有用性について検討した。

B. 研究方法

遺伝子として18S rDNA、Poly-Threonine、HSP、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15等を解析対象として選択した。わが国とタイおよびフィリピンの3カ国で遺伝子解析方法を統一し、各国の分離株について各種遺伝子領域の解析を進めている。

* 18S rRNA 領域の増幅：18S rRNA 遺伝子内の約850bpを増幅領域としたNested-PCR (Xiao ら、1999)。

1st PCR プライマー：5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' / 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'

2nd PCR プライマー：5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' / 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'を用いた。

反応条件：94℃で5分間の後、94℃30秒間、55℃30秒間、72℃30秒間を40サイクル

* ポリスレオニン領域のPCR：ポリスレオニン領域の約520bpを増幅

CRY-44 プライマー：5'-CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA C-3' / CRY-373：5'-AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3'

(Carraway ら、1997、Yagita ら、2001)。
反応条件：94℃で5分間の後、94℃30秒間、53℃30秒間、72℃30秒間を40サイクル

* Actin領域のPCR：約1kbを増幅

プライマー： 5'-ATG RGW GAA GAA
GWA RYW CAA GC / 5'-AGA ARC
AYT TTC TGT GKA CAA T (Sulaimanら、
2002)

反応条件： 94℃で5分間の後、94℃45秒間、
50℃45秒間、72℃45秒間を35サイクル。

* COWP領域のPCR：約500bpを増幅

cry-15プライマー： 5'-GTA GAT AAT
GGA AGA GAT TGT G / cry-9: 5'-GGA
CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G
(Spanoら、1997)

反応条件： 94℃で5分間の後、94℃45秒間、
50℃45秒間、72℃45秒間を35サイクル。

* GAG-repeat microsatellite の PCR：約
200bp を増幅

プライマー： 5'-CTA AAA ATG GTG
GAG AAT ATT C / 5'-CAA CAA AAT
CTA TAT CCT C (Caccio ら、2000)

反応条件： 94℃で5分間の後、94℃30秒
間、50℃30秒間、72℃60秒間を40サイ
クル

* CPGP40/15領域のPCR；

プライマー： 5'-ATG AGA TTG TCG
CTC ATT / 5'-TTA CAA CAC GAA
TAA GGC (Leavら、2002)

反応条件： 94℃で5分間の後、95℃40秒間、
55℃50秒間、72℃60秒間を40サイクル。

上記の条件で産物が得られなかった場
合は上記の反応を 1st PCRとみなし、そ
の産物を鋳型として下記のプライマーで
2次反応を行う。

2nd PCRプライマー： 5'-CCG TTA TAG

TCT CCG CTG TA / 5'-AAA GCA

GAG GAA CCG GCA (Wuら、2003)

反応条件： 94℃で5分間の後、94℃30秒間、
54℃30秒間、72℃60秒間を35サイクル。

PCR産物は2%アガロースで泳動像を確
認し、副産物が少ないなど良好なPCR産
物を選択し、直接塩基配列決定を行った。

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
て塩基配列を決定した。シーケンスプラ
イマーを適宜用意し、PCR産物全長にわ
たり両鎖の配列を取得した。得られた塩
基配列はBlastサーチによりDDBJ /
GenBank / EMBLに登録されている既存
の塩基配列との比較を行った。

C. 研究結果および考察

同一の集団感染における22検体を対象
に18S rDNAを標的としたPCRを行い、
それらの塩基配列が全て一致したことを
確認した。登録塩基配列との比較から、
本検体はAF481962との間で最も高い一
致率を示し、その一致率は99.9%
(788/789)であった。

糞便試料ならびに環境試料より得たオ
ーシストを用いて、CPGP40/15領域の
PCRを行い、その産物の塩基配列を比較
したところ、これらの間では完全な一致
を見た。登録塩基配列との相同性比較か
らAY700391との一致率が94.1%

(855/909) で、最も高い一致度であった。これらの間の配列の違いは、39bp の挿入と 15bp の欠損によるものであった。

同様に、糞便試料と環境試料を用いて GAG-repeat microsatellite 領域を標的とした PCR を行い、取得した塩基配列を比較し、完全一致を確認した。登録塩基配列との相同性比較から、AJ249587 との間で 98.5% (191/194) の一致率を得た。また、Poly-T 領域を標的とした PCR 産物の塩基配列は AB126002 との間で 99.6%

(478/480) の一致を見た。COWP 領域を標的とした PCR 産物の塩基配列は AF266272 との間で 100% (506/506) の一致率を得た。Actin 領域を標的とした PCR 産物の塩基配列は AF382337 との間で 100% (1059/1059) 一致した。

クリプトスポリジウムの塩基配列決定は世界的に行われており、分子疫学的解析が実行可能な環境が整いつつある。その中で CPGP40/15 遺伝子が genotype 内での subtyping に利用され始めており、

集団感染等における患者分離株と環境株との相同性の検討手段として有望と考えられる。本分離株の解析結果から、各遺伝子は既存の登録配列との間で 94～

100%の相同性を示した。その中で、CPGP40/15 遺伝子の配列は最も変異に富み（一致率が低い）、この配列の分解能は他の標的部位よりも高いことが確認された。系統樹解析ではヒト型ならびにウシ型が複数のクラスターに分離され、長野の事例から分離した株は If グループに属することが判明した（図 1）。

フィリピンにおける患者由来の *Cryptosporidium* 分離株 15 株についての遺伝子解析の結果は、わが国と同様に human genotype が大半 (11/15) を占めることが示された。そのほかに canine genotype および bovine genotype がそれぞれ 2 株ずつ検出された。前者の canine genotype はわが国ではこれまでに輸入例で 1 例報告されているに過ぎず、今後のフィリピンでの調査結果が注目される。

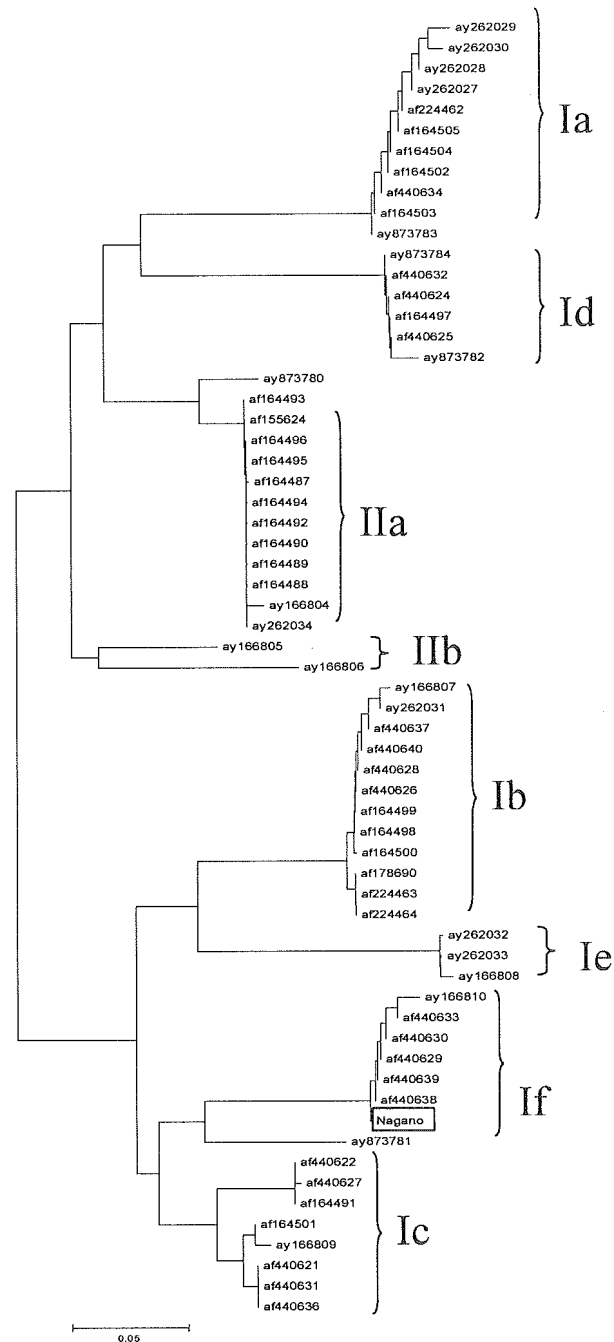


図1 CPGP40/15 遺伝子一部領域の系統樹解析

従来の遺伝子型別はヒト型 (I) 並びにウシ型 (II) に大別するものであったが、図では CPGP40/15 領域での系統樹解析により、それぞれが複数のクラスターを形成しており、より詳細な分別が可能であった。本研究で決定した配列 (Nagano) は If に属することが示された。

一方、タイ国において、下痢症は健常者にも免疫不全者にかかわらず多く認められる疾患である。HIV/AIDS感染者においては根本的な治療法が存在しないことから本疾患の集積が見られ、死亡原因ともなっている。当該研究では1997 - 2003年にチュラロンコン大学付属病院で治療を受けたHIV/AIDS患者由来の67株につき種の同定ならびに遺伝子型別を行った。標的とした塩基配列は18S rRNA遺伝子の種特異性の高い部分配列を使用した。さらに、より詳細な型別

(subgenotype) のためにCpg60/45/15遺伝子配列の解析を行った。18S rRNA遺伝子配列から*C. hominis* (*C. parvum* human genotype) (38.6%)、*C. meleagridis* (28.6%)、*C. parvum* (bovine genotype) (12.9%)、*C. canis* (10%)、*C. felis*, (2.8%)、*C. muris*, (1.4%)、*Cryptosporidium* (Pig1 genotype) (1.4%)と同定された。また、このうち*C. hominis*と*C. meleagridis*の重複感染患者が3件認められた。さらに*C. parvum* kangaroo genotypeが1株分離された。Cpg60/45/15遺伝子配列は*C. hominis*、*C. parvum*および*C. meleagridis*でPCR産物が得られたが、他種(株)では得られなかった。いずれにせよ、Cpg60/45/15遺伝子配列は多型性が高く、*C. hominis*でIa、IdおよびIeの3つのgenotype(亜型)に分けられた。*C. parvum*

では新型(II型)が得られ、*C. meleagridis*ではIIIa型が得られた。一方、病原種を異にしても臨床所見に大きな差が認められなかった。

タイ国においては*Isospora*症は健常者ならびに免疫不全者に感染者が見られ、中でもCD4+リンパ球の減少を伴うHIV-1感染者においては重要な感染症となっている。これまでに、2002 - 2004年の間にチュラロンコン大学付属病院を受診した78,743名の患者のうち38名(3名は外国人移住者)から*Isospora*を分離した。38名の内訳は30名がHIV陽性者、3名がステロイドによる長期治療者、5名が免疫学的に正常な患者であった。これらの分離株のうち26株についてSSSU rRNA (1,680bp)を標的とした遺伝子解析を行った。これらのオーシストの大きさは8 - 21 (13.5 ± 1.9) \times 17 - 37 (28.3 ± 3.0) μm であった。width and shape index (length by width) は1.3 - 3.3 (2.1 ± 0.3)であった。このようにオーシストの形状にかなりの変異が認められたが、いずれも形態学的には*I. belli*と同定され、*I. natanlensis* (<1.2)とは明らかに異なっていた。遺伝子解析の結果、分離株は2群(型)に分けられたものの、塩基配列の相同性は高いものであった。*Isospora*は他の孢子虫類の*Toxoplasma*や*Sarcocystis*などとも近縁関係にあることが示された。

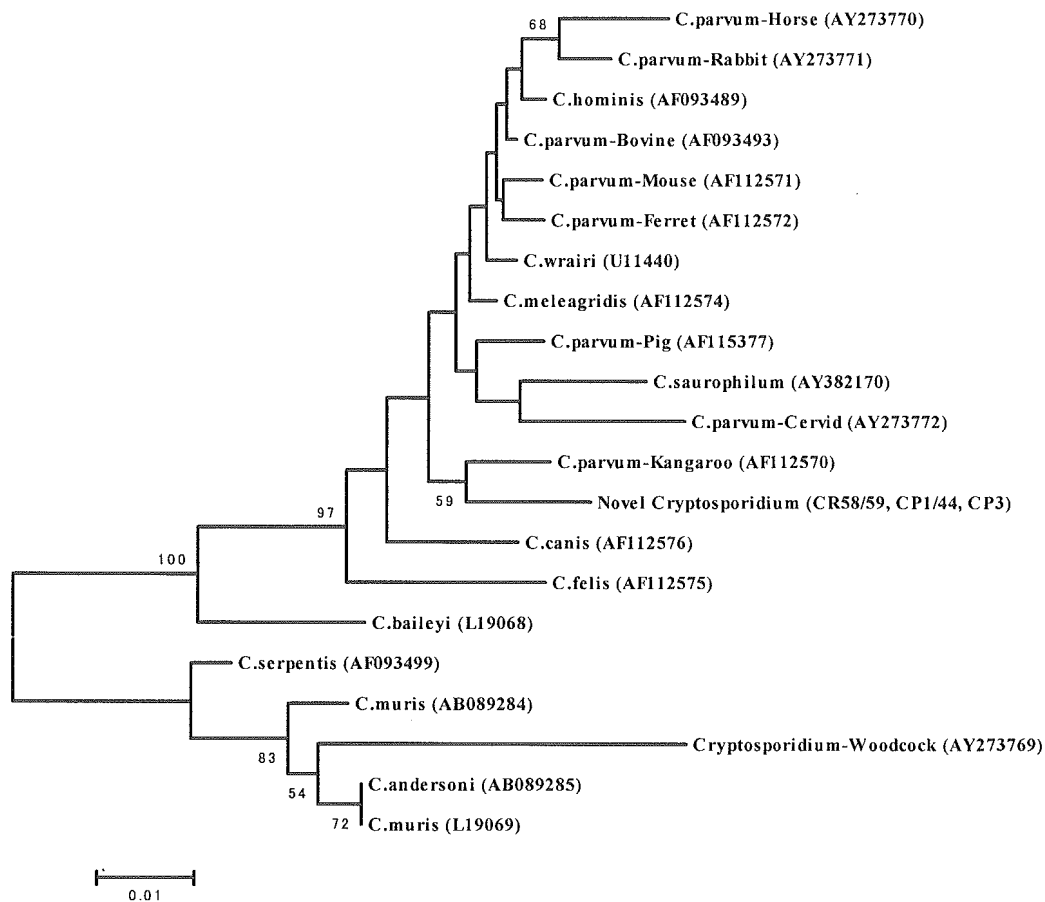


図 2. タイのクリプトスポリジウム分離株

D. 結論

クリプトスポリジウムの分子疫学は感染経路やリスク評価を行う手法として重要であり、方法の開発と情報の集積を継続的に行う必要がある。本研究では 2004 年の集団感染より得た分離株に対して 18S rDNA、Poly-Threonine、HSP、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15 遺伝子について直接塩基配列決定を行った。各遺伝子は既存の登録配列との間で 94～100%の相同性を示した。その中で CPGP 遺伝子の配列において最も低い相同率が得られたが、繰り返

し配列に増減が認められることから、分子疫学的な解析能力の向上が期待できた。

当該解析方法はタイ等の研究所と共有が可能であることが示され、東南アジア地域全体を対象とした分子疫学調査の基礎が構築されたものと判断された。

E. 参考文献

- Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J Parasitol.* 2002 Apr;88(2):388-94.
- Spano F, Putignani L, McLauchlin J,

- Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett*. 1997 May 15;150(2):209-17.
- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Nakada T, Takahashi Y. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Aug;69(8):4720-6.
- Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, O'Connor RM, Cevallos AM, Kindra G, Rollins NC, Bennish ML, Nelson RG, Ward HD. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3881-90.
- Caccio S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. 2000 Mar;120 (Pt 3):237-44.
- Carraway M, Tzipori S, Widmer G (1997) A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect Immun* 65:3958-3960
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Apr;65(4):1578-83.
- Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki T, Itagaki T, Endo T. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res*. 2001 Nov;87(11):950-5.
- F. 研究発表
1. 論文発表
- 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、クリプトスポリジウム症、日本医事新報、2005、4236 (33-36)
- 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、クリプトスポリジウム症、Medical Science Digest、平成17年31(1)
- In Thailand and the Philippines, manuscripts will be prepared after the completion of this study、together with Japanese coworkers.
2. 学会発表
- なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 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）

分担研究報告書

アジアで流行しているマラリア等の原虫疾患の我が国への侵入監視を目的とした
ネットワークの構築に関する研究

クリプトスポリジウムを中心とした腸管寄生性原虫類の分子疫学

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所寄生動物部

分担研究者 泉山 信司 国立感染症研究所寄生動物部

分担研究者 八木田健司 国立感染症研究所寄生動物部

研究協力者 黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所微生物部

概要

クリプトスポリジウムの分子疫学は感染経路やリスク評価を行う手法として重要であり、方法の開発と情報の集積を継続的に行う必要がある。本研究では2004年の集団感染より得た分離株に対して18S rDNA、Poly-Threonine、HSP、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15遺伝子について直接塩基配列決定を行った。各遺伝子は既存の登録配列との間で94～100%の相同性を示した。その中でCPGP遺伝子の配列において最も低い相同率が得られたが、繰り返し配列に増減が認められることから、分子疫学的な解析能力の向上が期待できた。

A. 研究目的

強い塩素耐性を有するクリプトスポリジウムは水系を介した集団感染症の病原体として問題とされているが、熱帯・亜熱帯地域における下痢症、特に小児下痢症の重要な病原微生物としても認知されるに至っている。WHOは2005年にクリプトスポリジウム症およびジアルジア症を《Neglected Disease Initiative》の病原体リストに加えた。

環境へのオーシストの排出源としてこれまで家畜の重要性が指摘されてきたが、実際の集団感染は人型を中心としている

ことが明らかとなっている。すなわち、クリプトスポリジウムはわが国においても集団感染が発生しており、1994年の平塚市での集団感染以降、1996年の越生町、2002年の北海道、2004年の長野県で発生したの事例が知られている。平塚市での集団感染では*Cryptosporidium parvum*のウシ型あるいはGenotype IIと呼ばれる人獣共通に感染する遺伝子型が検出され、他の3件は専ら人に感染する遺伝子型（Genotype I、あるいは*C. hominis*）が分子疫学の結果明らかとなっている。ちなみに、平塚の事例は雑居ビルの下水が

上水タンクを汚染して発生したことから、この事例においても直接の汚染源は人であることが示されている。また、散発事例においてもヒト型が多く検出される結果を得ている。

わが国のクリプトスポリジウム症に寄与している感染経路を把握することは公衆衛生のみならず水道分野等に多大な影響を及ぼすものであり、分子疫学的手法の開発と情報の収集は重要な課題である。主な解析方法はPCRと直接塩基配列決定を中心とした分子疫学的手法に依存している。対象遺伝子として 18S rDNA、Poly-Threonine、HSP、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15 が採用され、これまでのところヒト型とウシ型の分別に関心が寄せられてきたが、今後はヒト型を詳細に解析する手法の重要性が増すものと考ええる。

当該研究事業では、腸管原虫類の蔓延するアジア地域からの情報入手に向けて、マラリアと併せてアジア原虫情報ネットの構築・維持を企図している。今年度の研究において、クリプトスポリジウムの分子疫学的情報の精度向上に向けて直近の集団感染事例の分離株について種々の遺伝子の塩基配列を解析し、遺伝子情報の疫学的有用性について検討した。

B. 研究方法

クリプトスポリジウムは患者分離の 27 検体の糞便試料（埼玉県（10）、千葉県（17））と、床マットからかき出した 1 試料（長野県（1））より得た。糞便中のオーシストの形態は *Cryptosporidium* sp. の特徴を良く示し、オーシストの大きさは 5

μm の類円形で、内部にはスポロゾイトが観察され、特異蛍光抗体染色でアップルグリーンの FITC の蛍光色を発した。床マットからかき出したオーシストは壁のみの状態のものが多数観察されたが、内部のスポロゾイトが観察されるものが一部に認められた。

糞便試料中のオーシストの 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。床マットから得たオーシストでは DNA 調製前に磁気ビーズ法（Dynabeads anti-Cryptosporidium kit, Dynal）を行った。

遺伝子として 18S rDNA、Poly-Threonine、HSP、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15 を解析対象とした。反応には Ex Taq hot start version (Takara) と付属の緩衝液を使用した。

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 (Xiao ら、1999)。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。反応は、94℃で 5 分間の後、94℃30 秒間、55℃30 秒間、72℃30 秒間のサイクルを 40 回行った。

ポリスレオニン領域の PCR に使用した

プライマーはポリスレオニン領域の約520bpを増幅するCRY-44 (5'-CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA C-3') およびCRY-373 (5'-AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3')を用いた(Carraway ら、1997、Yagita ら、2001)。反応は、94℃で5分間の後、94℃30秒間、53℃30秒間、72℃30秒間のサイクルを40回行った。

Actin領域のPCRは約1kbを増幅するプライマー5'-ATG RGW GAA GAA GWA RYW CAA GCおよび5'-AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA Tを用いた

(Sulaiman ら、2002)。反応は、94℃で5分間の後、94℃45秒間、50℃45秒間、72℃45秒間のサイクルを35回行った。

COWP領域のPCRは約500bpを増幅するプライマーcry-15(5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G)とcry-9(5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G)を用いた(Spano ら、1997)。反応は、94℃で5分間の後、94℃45秒間、50℃45秒間、72℃45秒間のサイクルを35回行った。

GAG repeat MicrosatelliteのPCRは約200bpを増幅するプライマー5'-CTA AAA ATG GTG GAG AAT ATT Cと5'-CAA CAA AAT CTA TAT CCT Cを用いた(Caccio ら、2000)。反応は、94℃で5分間の後、94℃30秒間、50℃30秒間、72℃60秒間のサイクルを40回行った。

CPGP40/15領域のPCRは5'-ATG AGA TTG TCG CTC ATTと5'-TTA CAA CAC GAA TAA GGCを用いた(Leav ら、2002)。反応は、94℃で5分間の後、95℃40秒間、55℃50秒間、72℃60秒間のサイクルを40回行った。産物が得られなかった場合は、5'-CCG TTA TAG TCT CCG CTG TAと

5'-AAA GCA GAG GAA CCG GCA のプライマー、ならびに1st PCR産物を鋳型として用い、2nd PCRを実施した(Wu ら、2003)。反応は、94℃で5分間の後、94℃30秒間、54℃30秒間、72℃60秒間のサイクルを35回行った。

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。産物が得られたものから副産物が少ない等の状態の良いものを選択し、直接塩基配列決定を行った。すなわち、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を用いて塩基配列を決定した。シーケンスプライマーを適宜用意し、PCR産物全長にわたり両鎖の配列を取得した。得られた塩基配列はBlastサーチにより

DDBJ/GenBank/EMBLに登録されている既存の塩基配列との比較を行った。

C. 結果および考察

22 の糞便検体、1 つの環境試料(マット)より18S rDNA 一部領域で取得した塩基配列は全て一致した。最も高い一致率を示した登録塩基配列 AF481962 との一致率は99.9% (788/789) であった。

26 の糞便検体、1 つの環境試料よりCPGP40/15 領域で取得した塩基配列は全て一致し、登録塩基配列 AY700391 との一致率は94.1% (855/909) であった。この違いは挿入39bp、欠損15bpによるものであった。

25 の糞便検体、1 つの環境試料より gag repeat microsatellite 領域で取得した塩基配列は全て一致し、登録塩基配列 AJ249587 と 98.5% (191/194) 一致した。

13 の糞便検体、1 つの環境試料より PolyT 領域で取得した塩基配列は全て一致し、登録塩基配列 AB126002 と 99.6% (478/480) 一致した。

3 の糞便検体より COWP 領域で取得した塩基配列は全て一致し、登録塩基配列 AF266272 と 100% (506/506) 一致した。

3 の糞便検体より Actin 領域で取得した塩基配列は全て一致し、登録塩基配列 AF382337 と 100% (1059/1059) 一致した。

本分離株の解析結果から、各遺伝子は既存の登録配列との間で 94~100% の相同性を示した。その中で CPGP40/15 遺伝子の配列は最も相同率が低く、他と比較してより特徴を有すると考えられる配列が得られた。クリプトスポリジウムの塩基配列決定は世界的に行われており、登録数が 100 以上の領域もあり、分子疫学的解析が実行可能な環境が整いつつある。その中で CPGP40/15 遺伝子が genotype 内での subtyping に利用され始めており、集団感染等における患者分離株と環境株との相同性の検討手段として有望と考えられる。本分離株では繰り返し配列に増加が認められる特徴が示されており (図 1)、繰り返し配列は不安定で増減しやすいと一般に考えられることから分子疫学的な解析能力の向上が期待される。

系統樹解析ではヒト型ならびにウシ型が複数のクラスターに分離され、長野事例分離株は If グループに属することが判

明した (図 2)。

今年度は国立感染症研究所に保存されているクリプトスポリジウム 分離株の一連の遺伝子領域の塩基配列を決定し、データベースの充実を図った。今後は、参加各国と共同でアジア原虫情報ネットのデータベースの基本構造の構築を目標とし、作業の効率化に向けて相互補完的な遺伝子解析作業の分業化を図る予定である。

D. 結論

2004 年の長野のクリプトスポリジウム 集団感染事例より得た分離株を用いて 18S rDNA、Poly-Threonine、HSP、COWP、Actin、GAG repeat Microsatellite、CPGP40/15 遺伝子の直接塩基配列決定を行った結果、各遺伝子は既存の登録配列との間で 94~100% の相同性を示した。中でも CPGP40/15 遺伝子の配列において最も低い相同率が得られたが、繰り返し配列に増減が存在し、分子疫学的な解析能力の向上が期待できた。今後は、CPGP40/15 遺伝子配列を用いた subtyping との効率的な組み合わせを検討し、参加各国と共同でアジア原虫情報ネットのデータベースの基本構造を構築する。

E. 参考文献

Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. J Parasitol. 2002 Apr;88(2):388-94.

Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett*. 1997 May 15;150(2):209-17.

Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Nakada T, Takahashi Y. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Aug;69(8):4720-6.

Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, O'Connor RM, Cevallos AM, Kindra G, Rollins NC, Bennish ML, Nelson RG, Ward HD. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3881-90.

Caccio S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. 2000 Mar;120 (Pt 3):237-44.

Carraway M, Tzipori S, Widmer G (1997)

A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infect Immun* 65:3958-3960

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Apr;65(4):1578-83.

Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki T, Itagaki T, Endo T. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res*. 2001 Nov;87(11):950-5.

F. 研究発表

1. 論文発表

遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、クリプトスポリジウム症、日本医事新報、2005、4236 (33-36)

遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司、クリプトスポリジウム症、Medical Science Digest、平成17年31(1)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

AY700391	1:TTTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGCACCTTGAAAGATGTTTCTGTTGAGAGCTCAT	60
consensus	1:TTTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGCACCTTGAAAGATGTTTCTGTTGAGAGCTCAT	60
AY700391	61:CATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCA-----	92
consensus	61:CATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAT	120
AY700391	93:-----TCGTCAACAACAACCCCGCACCAGCTCCAAAGAAGGCAAGAGAAGCAG	141
consensus	121:CATCATCATCATCGTCAACAACAACCCCGCACCAGCTCCAAAGAAGGCAAGAGAAGCAG	180
AY700391	142:AAGGCAAAGAAGCAGAAGGCAAAGAAGCAGAAGGCAAAGAAGAAGAGGGCAGTGAAGAAA	201
consensus	181:AAGGCAAAGAAGCAGAAGGCAAAGAA-----GAAGAGGGCAGTGAAGAAA	225
AY700391	202:GCCAAGGTCCCACTAGTTCTTGAAGTGGAGTGGGGAGTGAAGGAAATGATCAAGGTGACT	261
consensus	226:GCCAAGGTCCCACTAGTTCTTGAAGTGGAGTGGGGAGTGAAGGAAATGATCAAGGTGACT	285
AY700391	262:CTAAAGGAGACGGAGCTAGTGAAGATGATAATAAAAATCAAGATGGTGACACTTCTTCCG	321
consensus	286:CTAAAGGAGACGGAGCTAGTGAAGATGATAATAAAAATCAAGATGGTGACACTTCTTCCG	345
AY700391	322:AATCTGTCACCCCAACTCAAGCTACTCCAAAGGAAGAATGTGGTACTTCATTTCATAATGT	381
consensus	346:AATCTGTCACCCCAACTCAAGCTACTCCAAAGGAAGAATGTGGTACTTCATTTCATAATGT	405
AY700391	382:GGTTCGGAGAAGGTACTCCAGCCACAACTTTGAAGTGTGGTGGTTACACTATCGTCTATG	441
consensus	406:GGTTCGGAGAAGGTACTCCAGCCACAACTTTGAAGTGTGGTGGTTACACTATCGTCTATG	465
AY700391	442:CACCAGAAAAGAACAATAGAGAACCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAGGTTAAGGCTG	501
consensus	466:CACCAGAAAAGAACAATAGAGAACCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAGGTTAAGGCTG	525
AY700391	502:TAACTTTGGAAAAGGGAAATGACAATACAATTAAAATCAAGGTTGACGGTAAGGAGTTTA	561
consensus	526:TAACTTTGGAAAAGGGAAATGACAATACAATTAAAATCAAGGTTGACGGTAAGGAGTTTA	585
AY700391	562:GCACTCTCTCTACTAGCTCAAGTAGTCCAACGTGTTAATAACGGTGGATCTGATGTCCAAG	621
consensus	586:GCACTCTCTCTACTAGCTCAAGTAGTCCAACGTGTTAATAACGGTGGATCTGATGTCCAAG	645
AY700391	622:CTAAATCAATATCAAAGAGATCACTCACAGAGGAAAGTGACGAAGTTGCGACCGTCGATT	681
consensus	646:CTAAATCAATATCAAAGAGATCACTCACAGAGGAAAGTGACGAAGTTGCGACCGTCGATT	705
AY700391	682:TGTTTGCCCTTTACTCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAGTGTGATG	741
consensus	706:TGTTTGCCCTTTACTCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAGTGTGATG	765
AY700391	742:ATGTATCCAAGAGAGACAAGTATAGTTTAGTTGCAGATGGCAAATCTTCTATACCGGCT	801
consensus	766:ATGTATCCAAGAGAGACAAGTATAGTTTAGTTGCAGATGGCAAATCTTCTATACCGGCT	825
AY700391	802:CAAACAGCGGCGCCGAAAATGGTATCTACAAATTGGATAGTGATGGTAAGTTAGTAGACA	861
consensus	826:CAAACAGCGGCGCCGAAAATGGTATCTACAAATTGGATAGTGATGGTAAGTTAGTAGACA	885
AY700391	862:AGGACAACAACGTTCTTTTGAAGG	885
consensus	886:AGGACAACAACGTTCTTTTGAAGG	909

図1 CPGP40/15 一部領域のアライメント

本研究で26の糞便検体、1つの環境試料より決定した配列（consensus）と、Blast 検索結果で最も高い一致率を示した配列（AY700391）のアライメントを図示した。一致部分は四角で囲っている。最初の不一致部分では分離株に配列の挿入個所があり、TCA（アミノ酸のセリンに対応）の13回の繰り返しが観察された。次の不一致の欠損部分（GCAGAAGGCAAAGAA、アミノ酸ではアラニン、グルタミン酸、グリシン、リジン、グルタミン酸）も繰り返し配列で、AY700391は3回に対して、consensusでは2回のみ観察された。後者の繰り返し単位を矢印で図示した。