

Tabel 1. Malaria condition in Central Java, Wonosobo and Pekalongan Districts.

Province/District	Population	No of HC	No of Village	HCI Village 2005	API 2000	API 2001	API 2002	API 2003	API 2004	API 2005	API 2006
Central Java (Province)	33,569,012	532	8496	109	1.74	1.46	1.44	0.51	0.15	0.07	0.06
Wonosobo (Case)	751,416	9	95	13	5.16	3.9	4.7	4.4	1.38	0.62	0.18
Pekalongan (Control)	798,605	8	102	1	1.35	1.12	0.66	0.68	0.44	0.06	0.02

Source: Central Java malaria report

Although malaria incidence already decline, malaria is still a threat to public health status in both districts for two reason. Firstly, both districts have ecological environment conditions that support for malaria incidence, such as Anopheles mosquito as malaria vector and potential mosquito breeding places (rice farms, stagnant river, etc). Secondly, both district also receptive areas for migrants. Wonosobo almost receive migrant workers from Borneo Island (which is an endemic areas) every year due to Ramadhan time. Pekalongan has army barracks, always receives army who had duty from very high malaria endemic areas in eastern Indonesia regions.

Therefore, there is a need to conduct an active surveillance system to monitor malaria incidence and to prevent the outbreak in very low endemic areas. The surveillance activities require active participation from the community by using existing VMAs that have been established since 1990.

Phase 1 study assessed the ability of health provider and VMAs to carry out surveillance system, start from the community until district level. It is recommended to increase the awareness of the community and VMAs, to conduct surveillance training for VMAs, and to facilitate malaria program officer at health centers and district level to supervise and monitor community base surveillance system.

As a continue study from phase 1 study, there are several intervention activities that will be conducted in case groups (Wonosobo District).

Intervention activities are training, on the job training, monitoring and evaluation activities. There are no intervention activities conducted in control groups (Pekalongan District).

Purpose and objectives:

Since malaria incidence has decreased, an existing surveillance system results limited epidemiological indicators to detect malaria incidences. Therefore, surveillance activities need to expand. Improved surveillance system should be able to detect malaria incidence by the community members.

The purpose of this study is to establish an adequate surveillance system from village level that requires collaboration with VMAs district/provincial level.

The objectives for this study are:

- To establish surveillance and early warning outbreak system.
- To monitor malaria incidence and malaria risk factors.
- To explore proper indicators could detect changing malaria epidemiology.

The benefits of this research for Malaria Control Program are:

- To develop collaboration with the community to detect malaria cases at village level
- To develop broader functions of Village Malaria Agents
- To conduct need assessment for Malaria surveillance system
- To support elimination of malaria incidence in certain areas in Indonesia

METHODOLOGY

In phase 1, there were some assessments applied for both case - control groups as baseline study. Qualitative research method was conducted to

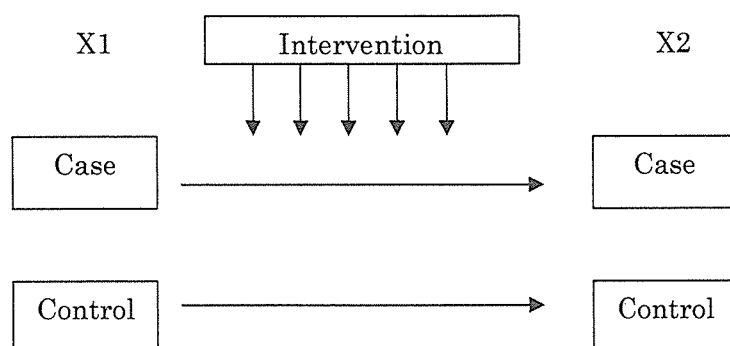
collect data and information regarding surveillance system and malaria condition from village level until district level.

Phase 2 study is to implement some activities among case groups (Wonosobo District) as intervention actions. Those interventions are trainings to VMAs, active monitoring and evaluation activities and on the job trainings by malaria program manager at health center and district level. Training to VMAs includes malaria case detection, migrant surveillance, malaria diagnosis and treatment, etc.

Study design:

This Study uses *quasi experimental* study design with case and control groups.

The study design can be described as follows:



Case Groups are VMAs and health workers in Wonosobo District. There are several intervention activities that will be conducted in these groups. Intervention activities are training, on the job training, monitoring and evaluation activities.

Control Groups are malaria village volunteer and health workers in Pekalongan District. No interventions activities conducted in these groups

RESULTS AND DISCUSSION

There are 2 main activities for intervention phase, which are training for VMAs and Supervision.

Training activities

a. Participants

After discussion with malaria program manager of Wonosobo district, it is decided to focus the activities in Wadaslintang Subdistrict due to the highest malaria incidence within Wonosobo District. Tirip and Somogedhe villages are chosen as research sites. Training is conducted to 18 VMAs (10 VMAs from Tirip and 8 VMAs from Somogedhe villages). Table 2 shows number of VMA trained.

Tabel 2. Number of VMA trained in Tirip and Somogedhe Villages, Wonosobo District.

No	Health Center	Village	Neighborhood	No of VMA
1	Wadaslintang I	Tirip (API 2004 10.34 ‰)	1. Kemutug 2. Kedawung 3. Jurutengah 4. Limbangan 5. Karangjambe	2 2 2 2 2
2	Wadaslintang II	Somogedhe (API 2004: 22.54‰)	1. Kajoran 2. Karangsari 3. Kaburikan 4. Kalianget	2 2 2 2
	Total	2	9	18

These areas have been chosen due to highly endemic areas in Wadaslintang Subdistrict, the remoteness, and these activities had supports from local authorities.

b. Preparation Process

Before training for VMA conducted, Malaria program manager from province and district, came to the health center and to village, for preparing process.

In this discussion, malaria program officers disseminated these activities to local authorities and VMAs, also decided training's schedule.

Detail information can be seen as follow:

1. Meeting preparation in district level.

Venue : Wonosobo DHO

Aim :

- Disseminate concept of community base surveillance system.
- Get support from District Health Office and health centers.
- Prepare staffs for action
- Design training's syllabus

Participant : Malaria program officers from province, district, and health centers.

Result :

- Commitment from persons to involve for these activities.
- Selection project sites.
- Arrange plan of action.

2. Meeting in Wadaslintang Subdistrict.

Venue : Wadaslintang Subdistrict.

Aim :

- Disseminate concept of community base surveillance system.
- Get support from cross sectors in subdistrict level

Participant : Family Planning and Community Empowerment, Family Welfare Empowerment, Education, Agriculture, Fishery, Forestry, Religious.

Result :

Commitment from cross sectors to support community base surveillance and training VMA in Somogedhe and Tirip villages.

3. Meeting in village level.

a. Tirip village.

Venue : Tirip village

Aim :

- Dissemination.
- Getting support from formal and informal leaders

Participant: Village leader, religious leader, informal leaders, Family Welfare Empowerment, village malaria workers, volunteers.

Result :

- Commitment.
- Schedule.

b. Somogede village.

Venue : Somogede village

Aim :

- Dissemination.
- Getting support from formal and informal leaders

Participant: Village leader, religious leader, informal leaders, Family Welfare Empowerment, village malaria workers, volunteers

Result :

- Commitment.
- Schedule.

b. Training syllabus

Training conducted for 4 days in health center. Syllabus includes:

- Malaria symptom, includes fever, shiver, chill, and also symptom of complicated malaria. It is important for VMAs to recognize all the symptoms, then taking necessary actions. Uncomplicated cases will be treated properly. VMAs are trained to refer complicated cases to health centre.
- Malaria diagnosis, includes anamnesis and Rapid Diagnostic Tests (RDTs). VMAs were trained to use RDTs, begin with taking blood smear until reading the results. VMAs will be supplied with RDTs.
- Treatment. VMAs were trained to treat positive cases with ACT (Arthemisinin Combination Therapy).
- Follow up cases. Every positive case should be monitored until 28th day. VMAs will visit the patient, start from 3rd day. After that, VMAs also check the environmental condition surrounding patient's house, especially looking for breeding places. There would be any necessary actions to reduce breeding places.

- Counseling. Simple counseling is needed to suggest patient to take drug due to side effect of ACT (nausea, vomit, headache) and the number of pill taken (8 pills per day)
- Migrant surveillance. VMAs have responsibility to look after malaria incidence in the village. Despite indigenous cases, mainly the community get infected by the workers who came from other endemic areas, especially Borneo Island. Therefore, VMAs were trained to investigate migrant workers, taking blood smear, and conducting health education for migrant workers and neighborhood.
- Reporting and recording. This is an important part from surveillance activities. VMAs were trained to fill surveillance report forms, then deliver those to health center. VMAs also were taught simple epidemiology analysis, such as mapping and cases distribution.
- Health education. VMAs will be able to increase awareness of the community regarding malaria incidence.

Supervision

After finished their training, VMAs will conduct their duty in their own places. Every month, they reports to malaria program officer in health centers. Malaria program officers send report to district level.

Indeed, after six months, malaria program officer from provinces conducted evaluation process to gain information about VMA's activities regarding community base surveillance system. Some results gained are malaria cases detected by VMAs.

a. Malaria cases detected.

All VMAs are equipped with RDTs for malaria diagnosis. For each community member who manifest clinical symptom, VMA will test with RDT. If the result is positive, VMA will treat them with ACT.

Table 3. Number of malaria cases detected by VMAs

No	Neighborhood	Clinical Cases	Positive Cases
1	Kemutug	38	1
2	Kedawung	36	0
3	Jurutengah	47	1
4	Limbangan	42	0
5	Karangjambe	46	0
6	Kajoran	38	1
7	Karangsari	56	1
8	Kaburikan	25	0
9	Kalianget	55	6
	Total	383	10

As can be seen from table 3, VMAs successfully detected 383 clinical cases of malaria within 6 months after training. Even though only 10 positive cases found, this condition describe the awareness of the community to malaria symptoms. As comparison, health center only can detect 1 positive case at the same time period from those neighborhood. The access to health facility become shorten, so that the community members with malaria symptom will get examination immediately by VMAs.

b. VMA's activities

Supervision that conducted by provincial malaria program officer finds that most VMAs still understand the symptom of malaria such as fever, shivery, chill, headache, muscle pain, nausea and vomit. They also still can take blood smear and use RDTs correctly for malaria diagnosis. Blood slide will be deliver to health centre. These blood slides will be checked by microscopist at health center.

However, it is difficult to distinguish between Active Case Detection (ACD) and Passive Case Detection (PCD). ACD is an active activities from VMAs to find case amongst the community. VMAs will travel around the neighborhood, asking to the family whether any family member who fever, then VMA will take blood smear and RDT. PCD is case detected passively by family with fever symptom come to VMAs houses or health posts. VMAs will

take blood smear in that posts and diagnosed the patient with RDTs. Mostly all positive cases will get treatment within a day.

Specially for migrant from other islands (especially migrant workers from Borneo Island), they will take blood slide and checked with RDT whether the migrant workers shown any symptoms or not. This is useful to detect malaria case earlier before malaria transmitted to other people amongst the community.

VMAs often conduct health education to the community members. Health educations were conducted during posyandu (regular mobile health services to remote areas), religious activity (mostly moslem) at houses or mosque, and family welfare and empowerment meetings. These indicate that VMAs can increase the awareness of all community member to malaria incidence,

Activities In Pekalongan District

As an control area, there are no intervention activity applied in this region. However, provincial health officer also conducted supervision and monitoring to this district. The findings are: there was only 19 positive malaria cases (out of 13,708 blood slide taken) reported during same time period.

CONCLUSION AND PHASE 3 PLAN

As preliminary action, it is important to have socialization and dissemination of the program to stakeholders, local authorities and partners and also VMAs themselves. Support from them will ensure the whole process, includes trainings and implementation actions by VMAs.

VMAs have important roles in community base surveillance system. VMAs are member of the community who have special training from health officer to conduct malaria case finding, diagnosis and treatment. VMAs are able to find malaria clinical amongst the community faster than health center due to VMA's residency is the neighborhood. The accessibility is more closer. Hence, necessary action can be taken immediately, such treatment with prompt medication (ACT). Furthermore, VMAs are trained to use RDT's as

malaria diagnosis. RDTs will give results within 15 to 30 minutes. VMAs also were equipped with RDTs. Hence, positive patients will be get cure within a day. VMAs also took blood slide from all migrant workers from endemic areas and tested with RDTs. This action is a necessary activity on community base surveillance system.

VMAs activities were recorded in certain surveillance forms. VMAs also trained to conduct simple epidemiology analysis, especially to imply early warning system. The system will work properly if the records are reported to health centers. Health centers will analyze the record and make a feed back to VMAs.

VMAs also have a important role to increase the awareness of the community by doing health education. Health educations are conducted regularly during existing community meeting such as religion activities, posyandu, and others.

Phase 3 plans

In Phase 3, it is important to evaluate community base surveillance system. Evaluation process will be conducted comprehensively, regarding sustainability of this system. Support from local government will needed continuously. Therefore, advocacy will be conducted.

It is important to narrowed evaluation process to find proper indicator to detect malaria incidence in very low endemic areas. Hence, these activities will conducted in other district, with more improved system.

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わが国への侵入監視の強化に関する研究

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
	中井 裕	東北大学大学院農学研究科
国内研究協力者	小村麻子	国立感染症研究所 寄生動物部
	亀岡洋祐	医薬基盤研究所生物資源研究部
外国研究協力者	Somchai	Faculty of Medicine, Chulalongkorn
	Jongwutiwes	University
	Filipinas F. Natividad	Research and Biotechnology Division, St. Luke's Medical Center,

概要： *Cryptosporidium* は強い塩素耐性を有することから、1980 年半ばより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、注意を喚起している。わが国においてはクリプトスポリジウム症の集団感染が複数発生しており、1994 年の平塚市、1996 年の越生町、2002 年の北海道、2004 年の長野県での事例が知られている。1 番目の事例では人獣に共通して感染する *Cryptosporidium parvum* のウシ型、他 3 事例では人に特異的な *C. parvum* のヒト型 (syn. *C. hominis*) が分子疫学的解析により検出されていた。オーシスト排出源としての家畜や愛玩動物の重要性が指摘されるが、わが国ではむしろ人の中での流行が問題と考えられ、感染における寄与率の評価あるいは病原体の追跡等を目的とした分子疫学的手段や背景データの整備が重要な課題となっている。

当該研究事業ではアジア地域の腸管原虫類の情報入手に向け、分子疫学的手段とデータの整備を行ない、マラリアと併せてアジア原虫情報ネットの構築・維持を目指している。今年度の研究において、国内分離株を対象に cpgp40/15 を用いたサブタイピングを実施した結果、ヒト型による集団感染はそれぞれ異なる配列を有し、系統樹解析では異なるクラ

スターに分布した。この結果は従来より高解像な解析を達成しており、将来分離される株に対する解析を継続することで、疫学的情報のより一層の充実を図ることが期待される。

フィリピンにおけるクリプトスポリジウム症並びにジアルジア症は若年層に多くことが改めて確認された。特にクリプトスポリジウム症は9月の雨季に患者が増加する事が継続的な調査の結果として明らかとなった。その他に、ジアルジア症は男性に多い傾向が認められた。PCR-RFLPによる分子疫学的解析ではヒト型 (*C. hominis*)、ウシ型 (*C. parvum*) の他に、イヌ型 (*C. canis*) が検出された。

国内東北地方ではイヌから *C. canis* の配列が取得され、ヒトの症例数は少ないとしても、愛玩動物の感染ルートにも一応の注意が必要であることを確認した。併せて、ベトナムのウシより *C. parvum* (ウシ型) 並びに *C. andersoni* の配列が取得された。

イソスポラ (*Isospora*) 症は比較的希な疾患であるが、タイにおいて HIV 陽性患者を中心に集中的な解析を行った。オーシストの形態、特に縦横のサイズが大きく変化に富んでいたが、18S rRNA、ITS-1、5.8S rRNA、ITS-2 領域の配列は保存性が高かった。

A. 研究目的

クリプトスポリジウム飲料水等を介した水系集団感染を引き起こすことから問題とされており、ジアルジア、イソスポラ等といったその他の腸管寄生性原虫類もクリプトスポリジウムに準じて注意が払われている。これらは熱帯・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性微生物であり、原虫によっては水系感染のみならずヒト-ヒト間の感染も重要である。一方、環境へのオーシスト/シストの排出源として家畜や愛玩動物の重要性が指摘されるが、その一方で感染寄与率の推定に資するべき情報は少ない。

当該研究では分子疫学的手法の改善を通して疫学情報の充実と蓄積を目指している。これまでクリプトスポリジウムでは 18S rRNA 等の塩基配列決定によりヒト型、ウシ型の分別が行なわれてきたが、疫学調査においてはより詳細な遺伝子型別が求められる。今年度の研究において、過去に国内分離されたクリプトスポリジウムを対象として *cpgp40/15* 領域を用いた詳細な型別を実施するとともに、当面のところフィリピンならびにタイにおいて同一の解析システムの導入を試行している。これら基盤として、アジア地域全域を対象とした原虫情報ネットの構築・維持を行なう。

B. 研究方法

フィリピンでは 3456 検体の糞便試料からクリプトスポリジウムオーシストの検索を蛍光抗体染色 (Merifluor、Meridian diag.) を用いて実施した。保存状態がよく PCR 増幅が可能であった試料については 18S rRNA の RFLP によりクリプトスポリジウムの種別を行なった。タイのイソスポラは King Chulalongkorn Memorial Hospital で診療にかかった HIV 陽性患者を中心とした 38 名より得た。このうち 26 検体について 18S rRNA、ITS-1、5.8S rRNA、ITS-2 の配列を決定した。日本では 1996 年より収集を開始した国内分離のクリプトスポリジウムの保存 DNA 試料を対象とした。イヌのクリプトスポリジウム検査では、東北地方の動物愛護センターに搬入されたイヌ 294 頭 (およびネコ 31 頭) を対象に糞便検査を行い、陽性サンプルについては 18S rRNA の塩基配列を決定した。

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。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 T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産物はアガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。得られたPCR産物よりBigDye Terminator Cycle Sequencing kit V1.1あるいはV3.1を用いて定法に従い直接塩基配列決定を行なった。

C.結果及び考察

国内分離株を対象にcpgp40/15を用いたサブタイピングを実施した結果、ヒト型による集団感染はそれぞれ異なる配列を有しており、系統樹解析では異なるクラスターに分布した(図1)。この結果は従来より高解像な解析を達成しており、将来分離される株に対する解析を継続することで、疫学的情報のより一層の充実を図ることが期待される。

フィリピンにおけるクリプトスポリジウム症並びにジアルジア症は、3456検体中それぞれ69検体(3.9%)、67検体(2.0%)が陽性であった。そのうち3検体は重複感染であった。18歳未満ではクリプトスポリジウム陽性率が2.9%、18歳以上は0.24%と有意な差が認められた。一方ジアルジアではそれぞれ18歳未満が2.0%、18歳以上が1.9%と差は認められなかった。クリプトスポリジウムでは年齢を0から3歳、ジアルジアでは4から9歳に陽性者が多く見られた。特にクリプトスポリジウム症は9月の雨季に患者が増加(2.6%)する事が他の時期(0.89%)との比較で明らかとなった。その他に、ジアルジア症は男性に多い傾向が認められた。クリプトスポリジウムの

PCR-RFLPによる分子疫学的解析ではヒト型(*C. hominis*)、ウシ型(*C. parvum*)、他にイヌ型(*C. canis*)が検出された。

当該研究では東北地方のイヌより*C. canis*の配列を得た。他にわが国では阿部ら(2002)が大坂においてイヌから*C. canis*の分離を報告しており、わが国においても*C. canis*が土着していると考えられた。国内外で*C. canis*の人からの分離例が報告されており、注意が必要である。

ベトナムではウシのクリプトスポリジウムの遺伝子解析の結果、*C. parvum*ウシ型の感染率は34%であった。*C. andersoni*の感染率は5.6%であった。*C. andersoni*は英国において健康なヒトから回収された例があり、ヒトへの感染性を含めて今後詳しい解析を行う必要がある。

タイのHIV陽性患者を中心にイソスポラ(*Isospora*)の解析を行った。今回、30例のHIV/AIDS患者、3例のステロイド治療患者、免疫健全者5例からイソスポラを分離し、形態的な比較を行ったところ、かなりの変異を観察した。すなわち、オーシストの長径の平均は $28.3 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であったが、17から $37 \mu\text{m}$ の範囲にあった。短径は平均が $13.5 \pm 1.9 \mu\text{m}$ であったが、8~ $21 \mu\text{m}$ の範囲にあった。縦横比は 2.1 ± 0.31 であった。一方、SSU rRNA, 5.8S, ITS-1 and ITS-2の各遺伝子領域を比較したところ、いずれもよく保存されていた。また、タイにおいてはブラストシスティスが高率に検出される。しかしながら、病原性に関しては不明である。そこで、2001年から2005年にかけてチュラロンコン大学で集められた糞便108,851検体を対象にretrospectiveな解析を行った。その結果、確かにブラストシスティスは頻繁に検出されたが、大半の感染者に胃腸症の症状は認められなかった。これまでに、70検体から本原虫を培養分離し、SSU rRNA遺伝子の解析を行い、4つの亜型を得た。しかしながら、目下のところいずれの亜型も明らかに病原性との関連付けられるものは無かった。

D.結論

クリプトスポリジウムの分子疫学的手法としてcpgp40/15領域の有効性が国内分離

株の解析で示された。既にタイの結果との共有が可能で基礎が構築されたことから、アジア地域全体を対象として発展させることが公衆衛生に寄与するものと期待される。一方、タイでは HIV/AIDS 間次亜塩素酸ナトリウムにおいて *Isospora* 症が見られ、わが国との違いを見せていた。また、フィリピンにおいては本事業の成果として、原虫性下痢症に関する国内ネットワークが構築された。

参考文献

Abe N., Kimata I., Iseki M., 2002, Identification of Genotypes of *Cryptosporidium parvum* Isolates from a Patient and a Dog in Japan. *J.Bet.Med.Sci*, 64:165-168.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「アジアで流行している感染症のわが国への侵入監視の強化に関する研究（研究代表者：渡辺治雄）」平成 17 年度研究報告書より、分担研究報告書「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」遠藤卓郎ら

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.

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.

E. 研究発表

論文発表

1. Satoh M, Matsubara-Nihei Y, Sasaki T, Nakai Y. Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan.

2. Sam Thi Nguyen, Duc Tan Nguyen, Duc Quyet Le, Luc Ngoc Le Hua, Thoai Van Nguyen, Hajime Homma and Yutaka Nakai. Prevalence of *Cryptosporidium* Infection and First Identification of *Cryptosporidium parvum* from Cattle in Central Viet Nam. *Veterinary Parasitology* (submitted).
3. T. Izumi, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama. Detection System of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator in River Water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 559-566, 2006.
4. C. C. Buerano^{1,2}, C. B. Lago¹, R.R. Matias¹, B. B. de Guzman¹, S. Izumiyama³, K. Yagita³, and F. F. Natividad¹ *Cyclospora* and *Isospora* in Diarrheic Patients from the Philippines. *JJID* (submitted)
5. S. JongwutiweS*, C. Putaporntip, M. Charoenkorn, T. Iwasaki, AND T. Endo. Morphologic and Molecular Characterization of *Isospora Belli* Oocysts from Patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* (submitted).

学会発表

1. 泉山信司、小村麻子、八木田健司、遠藤卓郎、*Cryptosporidium* の分子疫学、日本原生動物学会（平成 18 年 11 月）
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

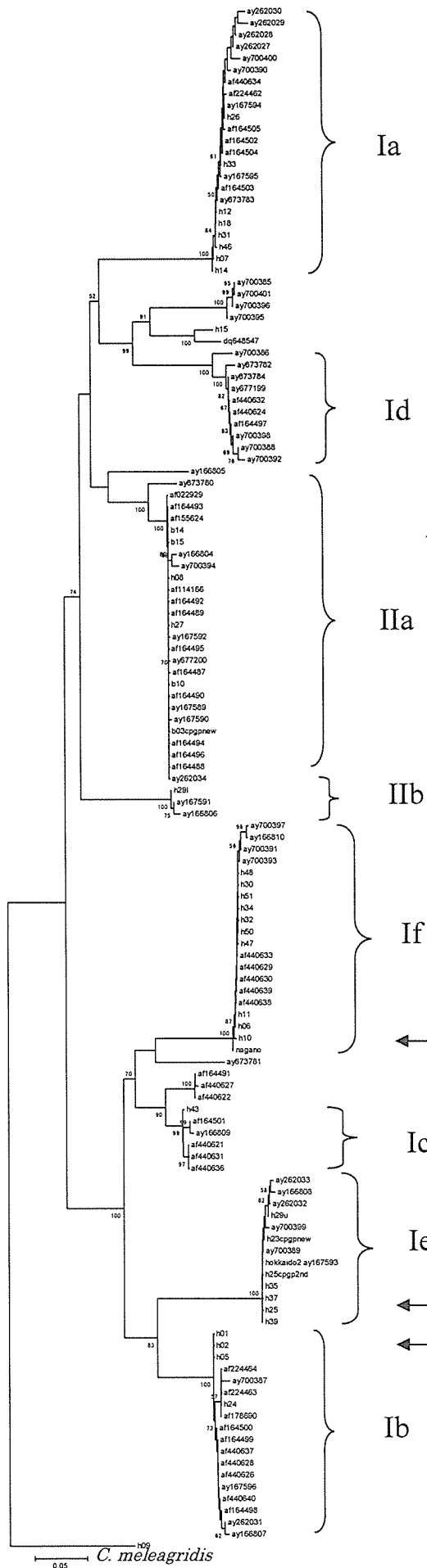


図 1 クリプトスポリジウム国内分離株の cpgp 領域による系統樹解析

← 2004年長野集団感染

← 2002年北海道集団感染

← 1996年越生町集団感染

Table 1 Clinical profiles of isosporiasis and morphometry of *Isospora belli* oocysts

Patient profiles	n	age range (mean±SD)	CD4+ cell/μl range (mean±SD)	Eosinophil(%) range (mean±SD)	Oocyst dimension*		
					length(μm) range (mean±SD)	width(μm) range (mean±SD)	Shape index range (mean±SD)
HIV infection (18 males, 12 females)							
Diarrhea							
≤3 weeks	5	33-52 (35.6±11.0)	89-134 (104.3±25.7)	0.4-9.1 (5.4±3.6)	38-33 (27.2±2.6)	8-19 (12.8±1.8)	1.3-3.0 (2.2±0.3)
>3 weeks - <1 year	22	25-50 (36.7±6.9)	8-480 (60.4±52.9)	0.1-14.0 (4.5±3.3)	37-35 (28.4±2.9)	8-21 (13.7±1.9)	1.3-3.3 (2.1±0.3)
≥1 year	3	21-37 (27.7±8.3)	25-484 (80.3±53.6)	2.0-5.5 (3.5±1.8)	38-34 (28.4±3.8)	10-19 (13.8±2.2)	1.4-3.0 (2.1±0.4)
Corticosteroid treatment (1 male, 2 females)							
No symptom	1	37	ND	0.8	30-37 (31.7±2.0)	12-18 (14.0±1.6)	1.9-2.7 (2.4±0.2)
Diarrhea							
≤3 weeks	1	51	ND	0	23-32 (28.3±2.6)	10-15 (12.8±1.2)	1.8-3.1 (2.2±0.3)
>3 weeks	1	23	ND	1.0	23-30 (27.4±2.1)	11-16 (13.4±1.3)	1.4-2.6 (2.1±0.3)
Immunocompetence (3 males, 2 females)							
No symptom	1	37	ND	12.0	25-31 (28.0±1.9)	11-17 (14.0±1.9)	1.5-2.5 (2.0±0.3)
Dyspepsia							
Diarrhea	1	31	ND	11.1	25-35 (30.3±2.6)	12-16 (13.7±1.2)	1.6-2.5 (2.2±0.3)
<1 year	2	29-32 (30.5±2.1)	ND	8.0-9.0 (8.5±0.7)	20-32 (27.0±2.4)	9-18 (12.6±2.2)	1.5-3.1 (2.2±0.4)
≥1 year	1	57	730	16.0	26-30 (28.4±1.4)	12-17 (15.6±1.7)	1.6-2.3 (1.8±0.2)

* Measurement under 400x magnification from 20 oocysts from each isolate. ND = not determined.

Table 1 Coprodiagnosis of parasitic infections in patients at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok from 2001-2005

	2001	2002	2003	2004	2005	Total (%) [*]
Protozoa						
<i>Blastocystis hominis</i>	234	489	636	681	777	2,817 (25.17)
<i>Giardia intestinalis</i>	257	243	256	253	257	1,266 (11.31)
<i>Entamoeba coli</i>	115	65	136	138	148	602 (5.38)
<i>Endolimax nana</i>	89	92	120	108	163	572 (5.11)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	14	37	51	66	80	248 (2.22)
<i>Sacocystis hominis</i>	20	27	32	17	5	101 (0.90)
<i>Trichomonas hominis</i>	36	9	14	9	19	87 (0.78)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	21	34	8	9	7	79 (0.71)
<i>Isoospora belli</i>	10	17	21	18	11	77 (0.69)
microsporidium	2	11	4	2	0	19 (0.17)
<i>Chilomastix mesnili</i>	1	1	1	1	3	7 (0.06)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1	2	0	1	1	5 (0.04)
<i>Iodamoeba buetschlii</i>	0	4	0	0	1	5 (0.04)
Helminths						
<i>Strongyloides stercoralis</i>	741	483	453	445	517	2,639 (23.58)
<i>Opisthorchis viverrini</i>	375	199	265	234	146	1,219 (10.89)
hookworm	251	152	173	147	147	870 (7.77)
<i>Taenia saginata</i>	30	44	31	37	63	205 (1.83)
<i>Trichuris trichiura</i>	17	18	36	38	52	161 (1.44)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	9	11	7	11	28	66 (0.59)
<i>Enterobius vermicularis</i>	5	32	14	2	1	54 (0.48)
<i>Echinostoma</i> spp.	25	13	4	8	2	52 (0.46)
<i>Capillaria philippinensis</i>	6	7	3	6	4	26 (0.23)
<i>Hymenolepis nana</i>	1	0	2	2	8	13 (0.12)
<i>Fasciolopsis buski</i>	0	2	0	0	1	3 (0.03)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	0	1	0	0	0	1 (0.01)
Total positives	2,276	2,014	2,300	2,286	2,460	11,194
Total examined	18,281	15,756	20,510	22,208	32,096	108,851
%Positive	12.45	12.78	11.21	10.29	7.66	10.28

* per cent of all positives for parasites.

Table 3. Isolates and genotypes of *Cryptosporidium* spp. from pediatric patients in the Philippines.

Isolate code	Location	Polythreonine gene		18S rRNA gene	
		RFLP	Sequencing	RFLP	Sequencing
NCR 038	Luzon		<i>C. parvum</i>		
NCR 044	Luzon	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>		
NCR 060	Luzon		<i>C. hominis</i>		
NCR 070	Luzon	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>		
NCR 076	Luzon		<i>C. hominis</i>		
NCR 111	Luzon	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>		
NCR 134	Luzon	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>		
NCR 192	Luzon	<i>C. hominis</i> & <i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i> & <i>C. parvum</i>		
NCR 234	Luzon	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	
NCR 306	Luzon			<i>C. parvum</i>	
NCR 320	Luzon			<i>C. parvum</i>	
NCR 332	Luzon			<i>C. parvum</i>	
NCR 398	Luzon	<i>C. parvum</i>			
NCR 826	Luzon			<i>C. hominis</i>	
NCR 887	Luzon			<i>C. hominis</i>	
LUZ 272	Luzon	<i>C. hominis</i>		<i>C. hominis</i>	
LUZ 419	Luzon			<i>C. parvum</i>	
VIS 046	Visayas				<i>C. canis</i>
VIS 152	Visayas			<i>C. hominis</i>	<i>C. canis</i>
VIS 682	Visayas			<i>C. hominis</i>	
MIN 016	Mindanao	<i>C. hominis</i>		<i>C. hominis</i> & <i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i>
MIN 176	Mindanao	<i>C. hominis</i>			

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

アジアで流行している感染症のわが国への侵入監視の強化に関する研究
分担研究報告書

cpgp40/15 領域を用いたクリプトスポリジウムの分子疫学

分担研究者	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
	遠藤卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	小村麻子	国立感染症研究所 寄生動物部
	亀岡洋祐	医薬基盤研究所生物資源研究部

概要： クリプトスポリジウムは激しい下痢を引き起こす消化管寄生性原虫で、強い塩素耐性を有することから水道を介して水系感染することで問題とされている。クリプトスポリジウムを含む腸管寄生性原虫類は基本的に糞・口感染によって伝播し、汚染された飲食物のみならず原虫の種類によっては接触感染も知られている。当該研究事業では、これら腸管原虫性疾患の蔓延するアジア地域との人的交流、あるいは食品等の物流を介した感染症の拡散防止に向けて、分子疫学の精度向上に努めている。従来のクリプトスポリジウムの分子疫学は専らヒト型あるいはウシ型の別を判定することが行われ、18S rDNA、Poly-T 等の領域が用いられていた。わが国で発生しているクリプトスポリジウム症はヒト型を中心としており、特に1996年の越生町の事例、2002年の北海道の事例、2004年の長野の事例ではいずれもヒト型であった。ヒト型をより詳細に型別し、分子疫学の精度を向上させることが現在求められている。当該研究では cpgp40/15 遺伝子に着目し型別を進めた結果、多様な配列が得られた。系統樹解析ではこれらの事例が別々のクラスターに分岐し、従来より高解像な型別が可能となった。アジアネットワークの参加グループでは cpgp40/15 領域を用いた型別を行い、継続的なデータの蓄積と情報交換を行なうのが適当と考える。

A 研究目的

クリプトスポリジウムは激しい下痢を引き起こす消化管寄生性原虫で、強い塩素耐

性を有することから水道を介して水系感染することで問題とされている。糞口感染であることから食品、接触による感染経路も

存在するが、経路の特定や疫学調査には分子疫学の精度向上が求められている。従来のクリプトスポリジウムの分子疫学は専らヒト型あるいはウシ型の別を判定することが行われ、18S rDNA、poly-threonine等の領域が用いられていた (Yagita et al., 2001)。わが国で発生しているクリプトスポリジウム症はヒト型を中心としており、特に1996年の越生町の事例、2002年の北海道の事例、2004年の長野県のプールの事例ではいずれもヒト型であった。従ってヒト型をより詳細に型別することが強く望まれていた。

病原性細菌の分野ではパルスフィールドゲル電気泳動により高解像な識別を達成しているが、クリプトスポリジウムは試験管培養が困難であり、十分な解像力の得られる領域を用いた PCR-直接塩基配列決定が現実的な方法である。クリプトスポリジウムの遺伝子型別には種々の方法が報告されており、18S rDNA、Poly-T の他に、GAG-repeat microsatellite、cowp、actin、hsp、cpgp40/15 等がある。鋳型 DNA が十分量保存されていた集団感染株を用いた型別の結果、cpgp40/15 の配列において変異が大きいと予想された (遠藤ら 2006)。当該研究ではこれまで蓄積していたわが国の患者株等より cpgp40/15 遺伝子を用いた遺伝子型別を行なったので報告する。

B 研究方法

本研究で使用したクリプトスポリジウムの保存 DNA は、越生町で発生した1996年の集団感染より収集を開始し、2002年北海道、2004年長野での集団感染、輸入感染例、並びに国内散発事例を含む。ヒト以外では

ウシからの分離株 4 株を含む。Genotype は Poly-T 並びに 18S rDNA の塩基配列より過去に決定し、一部報告している (Yagita et al., 2001)。

cpgp40/15 領域の増幅は Nested-PCR を行なった。1st PCR に CL2F (5' -ATG AGA TTG TCG CTC ATT-3')、CL2R (5' -TTA CAA CAC GAA TAA GGC-3')、2nd PCR に CPGPWF (5' -CCG TTA TAG TCT CCG CTG TA-3')、CPGPWR (5' -AAA GCA GAG GAA CCG GCA T-3') を用いた (Leav et al., 2002, Wu et al., 2003)。試薬は Ex Taq hot start version (TakaraBio) を使用した。一次反応のプログラムは 95°C2min の後、94°C40 秒、49°C50 秒、72°C1 分の反応を 45 サイクル行い、最後に 72°C10 分の伸長反応を行った。二次反応のプログラムは 94°C5min の後、94°C30 秒、54°C30 秒、72°C1 分の反応を 35 サイクル行い、最後に 72°C10 分の伸長反応を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。混合感染であることを予め知っていた試料の 1st PCR より 2 本のバンドを得たが、それぞれのバンドから 2nd PCR を行ない単一のバンドを得た。

得られた PCR 産物より BigDye Terminator Cycle Sequencing kit V1.1 あるいは V3.1、ならびに ABI Prism 310 Genetic Analyzer あるいは 3730xl DNA Analyzer (AppliedBiosystems) を用いて直接塩基配列決定を行なった。PCR 産物の精製は QIAquick PCR purification キット (Qiagen) を使用した。配列のアセンブルに SeqMan(Lasergene)、アライメント作成に Pileup (GCG Wisconsin package) を使