

用した。系統樹描画は MEGA2 (Kumar et al., 2001) を用いて NJ 法で実行した。DDBJ/GenBank/EMBL データベースより同領域の登録配列を得て、遺伝子型の比較に用いた。

C 研究結果および考察

当該研究で得られた配列と引用した登録配列の 1 つ (Hokkaido2_AY167593) より作成したアライメントを図 1 に示した。多様な配列が得られ、配列が完全に一致する分離株が少なく、疫学的な解像度がこれまでの解析に比較して飛躍的に向上した。3 塩基単位の繰り返し配列の増減による変異が前半に存在し、後半の配列は塩基置換が多く認められた。

1996 年の越生町集団感染より得た配列 (H01、H02、完全一致) は別の AIDS 患者分離株の H05 と完全に一致したが、関連性は不明である。

2002 年の北海道集団感染より得た配列 (H35、H37、H39、完全一致) は、同じ施設で 1 ヶ月後に発生した集団感染の配列 (AY167593、八木ら 2005)、海外渡航者の H25、重複感染より得た配列の片方である H29U と完全に一致した。海外渡航者らとの関連性は不明であるが、時期をずらして同じ施設で発生した集団感染の間に関連性が高いことを遺伝子型別により示すことができた。

2004 年の長野県集団感染より得た配列 (Nagano、26 の糞便検体と 1 つの環境試料が完全一致) と完全一致する配列は存在しなかった。この配列は 3 塩基 TCA (セリン残基) の繰り返しが多くなることに特徴があった。一方、リピート以外の部位では、

他の近縁の配列との差異が無かった。いずれの集団感染でも近縁の登録配列と比較して配列が長くなる傾向にあった。

当該研究で得た配列とデータベース登録配列を用いて系統樹解析を行った (図 2)。 *C. meleagridis* の H08 分離株をルートに設定した。残りの分離株 (Genotype 1 (*C. hominis*) 並びに Genotype 2 (*C. parvum*)) は大きく分けて 8 つのクラスターに分岐し、国内分離株はこれらのクラスター広く分布した。3 つの集団感染は別々のクラスターに分かれた。文献上の呼称 (Ia~If と IIa、IIb) に従うと、それぞれ Ib、Ie、If に位置した (Alves ら 2003, Leav ら 2002)。その他の分離株の遺伝子型は一覧に示した (表 1)。1994 年平塚市集団感染の配列は現時点で入手できていないが、ウシ型との報告があり、当該研究で示した 3 つの集団感染の Ib、Ie、If とは異なる型であると予想された。

時間経過と分離年の関係を表 2 にまとめた。If 型が高頻度に分離されているが、多くは AIDS 患者に由来の試料であった。3 つの病院の別々の患者より、近い時期に全く同一の配列 (H30、H32、H48、H50、H51) が取得されており、患者間での蔓延を反映した可能性が考えられた。一方、数は少ないが Ia 型が定期的に繰り返し分離されており、If を除けば、今後も Ia 型が散発的かつ高頻度に分離されると予想された。長野の集団感染では時間的に前後する分離株に完全一致の配列がなかったが、越生町と北海道の集団感染では配列の完全一致が存在し、繰り返しになるが、越生町では H05、北海道では H25 と H29U が該当した。前後の関連性をより明らかとするには国内の散発事

例のデータ蓄積と配列の安定性の検証が重要になると考えられた。

従来のクリプトスポリジウムの遺伝子型別では専ら種別を中心に行なわれてきたが、今後は分子疫学情報の蓄積を目的に cpgp40/15 領域を用いた詳細な型別を行なうことをアジアネットワークグループに提案したい。

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、およびフィリピンへの技術供与がなされたことから、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。

[参考文献]

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.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 2001 Dec;17(12):1244-5.

八木欣平、高野敬志、山野公明、伊東拓也、澤田幸治、古屋宏二。2005。2002 年、北海道、クリプトスポリジウム症集団発生事例報告。IASR 26 (7) : 171-172.

Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2744-7.

Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki T, Itagaki T, Endo T. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res.* 87(11):950-955.

E 論文発表

1. 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.

1. 学会発表

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


```

h15 : CAGGATACCTCTCCCTCCAGGGTCTCAAAAAAAGCGTATCCACAGAA--A----- : 282
h18 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 345
h31 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 345
h12 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 333
h33 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 312
h07 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 303
h14 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 303
h26 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 345
h46 : CAG---GTTACTCCCTCCGGAGTCCCGGAGAGTACCGTGTCCACAGCAACTA----- : 345
b14 : CAGCCCACCTCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 297
b15 : CAGCCCACCTCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 297
h08 : CAGCCCACCTCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 297
b10 : CAGCCCACCTCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 297
h27 : CAGCCCACCTCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 297
b03cpgpnew : CAGCCCACCTCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 297
h291 : CAG---AATCTCCGCTCAGAGTAAAGGGGAAATACCGGAAATCATAGAA--G----- : 279
h43 : -----GTAATCGAGGCGTCCCGGACCTAGTACCCCAACTCAAGTGTGAAAAGGAGCCCGA : 262
h30 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
h34 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
h51 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
h32 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
h50 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
Nagano : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 360
h06 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 321
h48 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
h47 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 333
h11 : GAGGATGATATAAATAACAGAGTGTCAAGTTTCTCCGATCTGTACCCCAACTCAAG----- : 321
h25 : TCGATGAGACCAAGTCAAGGTTGGGAGGTTACCCGGGATGTAGACCCCAACTCAAGCTACTGAAAAGAACCCTGG : 364
Hokkaido2 : TCGATGAGACCAAGTCAAGGTTGGGAGGTTACCCGGGATGTAGACCCCAACTCAAGCTACTGAAAAGAACCCTGG : 364
h35 : TCGATGAGACCAAGTCAAGGTTGGGAGGTTACCCGGGATGTAGACCCCAACTCAAGCTACTGAAAAGAACCCTGG : 364
h37 : TCGATGAGACCAAGTCAAGGTTGGGAGGTTACCCGGGATGTAGACCCCAACTCAAGCTACTGAAAAGAACCCTGG : 364
h39 : TCGATGAGACCAAGTCAAGGTTGGGAGGTTACCCGGGATGTAGACCCCAACTCAAGCTACTGAAAAGAACCCTGG : 364
h29u : TCGATGAGACCAAGTCAAGGTTGGGAGGTTACCCGGGATGTAGACCCCAACTCAAGCTACTGAAAAGAACCCTGG : 364
h01 : GGCACCTGAAGACAATGAACAAGCCATAGAGTGTACCCAC-----CTCCCCAGGTCAAGGCTCCGATA--AAACCGA : 349
h02 : GGCACCTGAAGACAATGAACAAGCCATAGAGTGTACCCAC-----CTCCCCAGGTCAAGGCTCCGATA--AAACCGA : 349
h05 : GGCACCTGAAGACAATGAACAAGCCATAGAGTGTACCCAC-----CTCCCCAGGTCAAGGCTCCGATA--AAACCGA : 349
h24 : GGCACCTGAAGACAATGAACAAGCCATAGAGTGTACCCACCTTACCCAGGTCAAGGCTCCGATA--AAACCGA : 319
h09 : GGTCTACTCTATCCCAAT----- : 242

```

```

h15 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 351
h18 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 414
h31 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 414
h12 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h33 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 381
h07 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 372
h14 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 372
h26 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 414
h46 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 414
b14 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 366
b15 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 366
h08 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 366
b10 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 366
h27 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 366
b03cpgpnew : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 366
h291 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 348
h43 : AACTCCAGAATCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 342
h30 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h34 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h51 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h32 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h50 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
Nagano : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 429
h06 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 390
h48 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h47 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 402
h11 : -----CTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 390
h25 : ATCTTCAGAAGCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 444
Hokkaido2 : ATCTTCAGAAGCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 444
h35 : ATCTTCAGAAGCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 444
h37 : ATCTTCAGAAGCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 444
h39 : ATCTTCAGAAGCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 444
h29u : ATCTTCAGAAGCTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 444
h01 : ATCCACAGAAACTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 429
h02 : ATCCACAGAAACTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 429
h05 : ATCCACAGAAACTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 429
h24 : ATCCACAGAAACTACTCCAAGGGAAGATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 399
h09 : -----GATCTCTACTTTCTGCATCTGTTTGGGCAATACA-----TTGGGATCT : 297

```



```

*          660          *          680          *          700          *          720
h15 : AA TGA TGC CGCT TCAAA TAACCGAG -----CTCCGGGCAGGBC CAG TTAG TGA TTA TTT : 585
h18 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 651
h31 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 651
h12 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 639
h33 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 618
h07 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 609
h14 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 609
h26 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 651
h46 : TG TAA TAA TTAGT TAAAG TACCGTCAACTAGTCACAGT TACGT CAA TAC TGA TTA TTT : 651
b14 : TG TAA TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCCGGGT CAGCT TCA TAC TGA TTA TTT : 597
b15 : TG TAA TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCCGGGT CAGCT TCA TAC TGA TTA TTT : 597
h08 : TG TAA TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCCGGGT CAGCT TCA TAC TGA TTA TTT : 597
b10 : TG TAA TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCCGGGT CAGCT TCA TAC TGA TTA TTT : 597
h27 : TG TAA TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCCGGGT CAGCT TCA TAC TGA TTA TTT : 597
b03cpgpnew : TG TAA TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCCGGGT CAGCT TCA TAC TGA TTA TTT : 597
h291 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TGGCGG -----ATCCAGGT CAGCT CCA TAC TGA TTA TTT : 579
h43 : TT TAA TAA TTAGT TCAAA TAC -----GGA TACCGGGC CAGCT TCA TAC TGA TTT : 576
h30 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
h34 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
h51 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
h32 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
h50 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
Nagano : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 666
h06 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 627
h48 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
h47 : TG TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 639
h11 : TA TAG TAA TTAGT TGTTA TACCGTGGAT -----CGATGTC CAGCT AAA TAT TGA TTA TTT : 627
h25 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAC -----CCGGA TCCAGAGC CAGCT CAA TAC TGA TTT : 675
Hokkaido2 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAC -----CCGGA TCCAGAGC CAGCT CAA TAC TGA TTT : 675
h35 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAC -----CCGGA TCCAGAGC CAGCT CAA TAC TGA TTT : 675
h37 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAC -----CCGGA TCCAGAGC CAGCT CAA TAC TGA TTT : 675
h39 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAC -----CCGGA TCCAGAGC CAGCT CAA TAC TGA TTT : 675
h29u : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAC -----CCGGA TCCAGAGC CAGCT CAA TAC TGA TTT : 675
h01 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAAAGT TACGT -----CAGCGAT CAGCT GGG TAC TGA TTA TTT : 663
h02 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAAAGT TACGT -----CAGCGAT CAGCT GGG TAC TGA TTA TTT : 663
h05 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAAAGT TACGT -----CAGCGAT CAGCT GGG TAC TGA TTA TTT : 663
h24 : TA TAG TAA TTAGT TCAAA TAAAGT TACGT -----CAGCGAT CAGCT GGG TAC TGA TTA TTT : 633
h09 : AA TCGCTAA TCACT TCAAA TGAACCTCCGCTGAGCAAGCTTATCTAGACCGCT TGA TTA TTT : 534

```

```

*          740          *          760          *          780          *          800
h15 : GGA AACTGCT AACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 665
h18 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 731
h31 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 731
h12 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 719
h33 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 698
h07 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 689
h14 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 689
h26 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 731
h46 : GGA AATGCT AACTCT CAA A T TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 731
b14 : GGA ACCAGT AGCTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 677
b15 : GGA ACCAGT AGCTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 677
h08 : GGA ACCAGT AGCTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 677
b10 : GGA ACCAGT AGCTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 677
h27 : GGA ACCAGT AGCTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 677
b03cpgpnew : GGA ACCAGT AGCTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 677
h291 : GGA AGGTAGT AA---AC CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 656
h43 : GGA AATAGT AACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 656
h30 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
h34 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
h51 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
h32 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
h50 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
Nagano : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 743
h06 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 704
h48 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
h47 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 716
h11 : GGA ---AGT CGAACT CG C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 704
h25 : GGA TGGTACT GACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 755
Hokkaido2 : GGA TGGTACT GACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 755
h35 : GGA TGGTACT GACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 755
h37 : GGA TGGTACT GACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 755
h39 : GGA TGGTACT GACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 755
h29u : GGA TGGTACT GACTCT CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 755
h01 : GGA AACTAGT AA---C CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 740
h02 : GGA AACTAGT AA---C CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 740
h05 : GGA AACTAGT AA---C CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 740
h24 : GGA AACTAGT AA---C CAA C C TTTCT TCA C TTG T TAA T T T T T T T : 710
h09 : GGA ---CCTGACAAC TCACT TCAAA TGAACCTCCGCTGAGCAAGCTTATCTAGACCGCT TGA TTT : 608

```

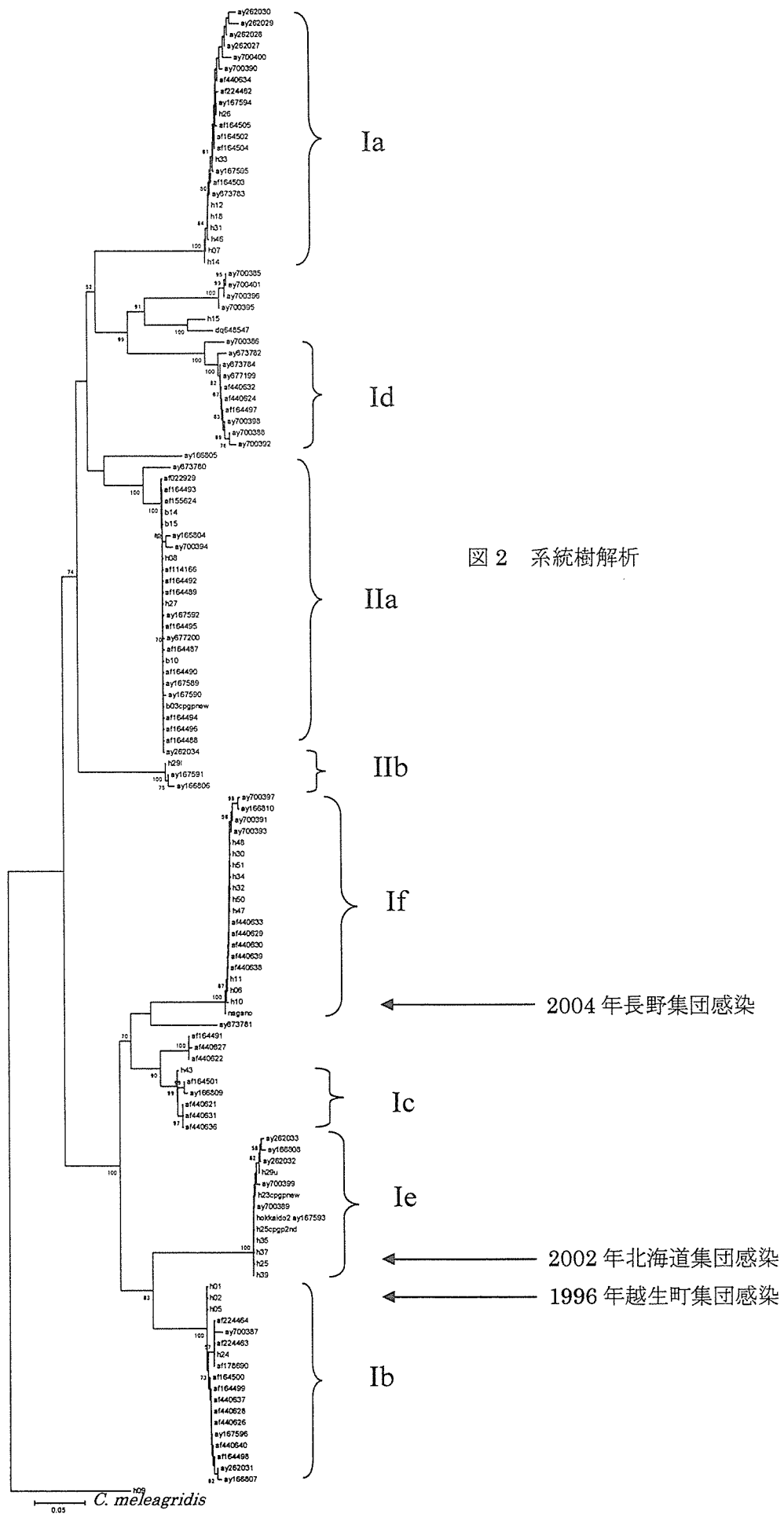



図2 系統樹解析

表 1 分離株の型別結果一覧

分離株名称	詳細	種	Genotype	Subgenotype cpgp40/15
H01, 1996	越生町集団感染	<i>C. parvum</i>	1	1b
H02, 1996	越生町集団感染	<i>C. parvum</i>	1	1b
H05, 1997	AIDS、M病院	<i>C. parvum</i>	1	1b
H06, 1997	-*	<i>C. parvum</i>	1	1f
H07, 1997	海外渡航者; Indonesia	<i>C. parvum</i>	1	1a
H08, 1997	-	<i>C. parvum</i>	2	2a
H09, 1998	海外渡航者; Indonesia	<i>C. meleagridis</i>		(<i>C. meleagridis</i>)
H11, 1998	海外渡航者; Nepal/Thailand	<i>C. parvum</i>	1	1f
H12, 1998	海外渡航者; India/Pakistan	<i>C. parvum</i>	1	1a
H14, 1998	海外渡航者; Thailand/Indonesia	<i>C. parvum</i>	1	1a
H15, 1998	海外渡航者; Kenya	<i>C. parvum</i>	2	2j
H18, 1998	AIDS、M病院	<i>C. parvum</i>	1	1a
H24, 1999	海外渡航者; India	<i>C. parvum</i>	1	1b
H25, 2001	海外渡航者; Singapore/Madagascar	<i>C. parvum</i>	1	1e
H26, 2001	東京	<i>C. parvum</i>	1	1a
H27, 2001	東京	<i>C. parvum</i>	2	2a
H29, 2001	海外渡航者; India/Bangladesh	<i>C. parvum</i>	1/2混合	1e/2b
H30, 2001	神奈川県; AIDS、S病院	<i>C. parvum</i>	1	1f
H31, 2001	-	<i>C. parvum</i>	1	1a
H32, 2002	AIDS、M病院	<i>C. parvum</i>	1	1f
H33, 2002	海外渡航者	<i>C. parvum</i>	1	1a
H34, 2002	-	<i>C. parvum</i>	1	1f
H35, 2002	北海道集団感染	<i>C. parvum</i>	1	1e
H37, 2002	北海道集団感染	<i>C. parvum</i>	1	1e
H39, 2002	北海道集団感染	<i>C. parvum</i>	1	1e
H43, 2003	-	<i>C. parvum</i>	2	1c
H46, 2003	海外渡航者India	<i>C. parvum</i>	1	1a
H47, 2003	AIDS、M病院	<i>C. parvum</i>	1	1f
H48, 2003	AIDS、T病院	<i>C. parvum</i>	1	1f
H50, 2003	AIDS; Giardia混合感染、I病院	<i>C. parvum</i>	1	1f
H51, 2003	東京; AIDS、I病院	<i>C. parvum</i>	1	1f
H54, 2004	長野集団感染	<i>C. parvum</i>	1	1f
B03, 1997	北海道ウシ分離株	<i>C. parvum</i>	2	2a
B10, 1997	北海道ウシ分離株	<i>C. parvum</i>	2	2a
B14, 1997	北海道ウシ分離株	<i>C. parvum</i>	2	2a
B15, 1998	北海道ウシ分離株	<i>C. parvum</i>	2	2a

*詳細情報不明

表 2 時間経過と分離の関係

	Ia	Ib	Ic	Ie	If	Ila	Ilb	Ilj	C. meleagridis
1996		H01,H02Ogo se							
1997	H07Indonesia	H05AIDS			H06	H08, B03,10,14Hok kaido			
1998	H12India/Pak istan, H14Thailand/ Indonesia, H18AIDS				H11Nepal/T hailand	B15Hokkaido		H15Kenya	H09Indonesia
1999		H24India							
2000									
2001	H26Tokyo, H31			H25Singapore/ Madagascar, H29India/Bang ladesh	H30AIDS	H27Tokyo	H29India/Ba ngladesh		
2002	H33Overseas			H35- 39Hokkaido	H32AIDS, H34				
2003	H46India		H43						
2004					H47AIDS, H48AIDS, H50AIDS, H51AIDS, H54Nagano				
2005									
2006									
Cases	8	3*	1	3*	10*	2	1	1	1

* 集団感染からの分離は1回、ウシからの分離は0回とカウント

平成 18 年度厚生労働科学研究費 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感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

動物由来クリプトスポリジウムの型別

分担研究者 中井 裕 東北大学大学院農学研究科

概要： わが国のイヌの *Cryptosporidium* の分子疫学的調査を実施し、東北地方の動物愛護センターに搬入されたイヌより *Cryptosporidium* のオーシストを分離した。分離オーシストの 18S rRNA 遺伝子配列は、米国分離株の配列と比較すると 2 塩基置換が認められたが、高い相同性を示し、系統樹解析の結果、*Cryptosporidium canis* のクラスターに属することが明らかとなった。本結果は、*C. canis* が東北地方に存在し、米国株とは異なる遺伝的多様性が存在することを示した。

アジアにおける *Cryptosporidium* の調査として、中国では河南農業大学の張龍現教授、ベトナムでは中央ベトナム獣医学研究所 Nguyen Thi Sam 研究員と共同研究を行った。中国に関しては、河南農業大学を訪問し、研究の打合せを行った。ベトナムに関しては、Sam 研究員と共同して、中央ベトナムにおけるウシの *Cryptosporidium* 感染調査を行い、*C. parvum* 型の感染率は 34%、*C. muris* 型の感染率は 5.6% であり、遺伝子解析の結果、*C. parvum* 型オーシストは *C. parvum* (bovine genotype) であることを明らかにした。

胃感染型 *Cryptosporidium* のカニクイザルに対する感染性を解析するため、東京大学医科学研究所奄美病害動物研究施設での感染実験の準備を行った。

A. 研究目的

アジアからの *Cryptosporidium* の侵入を監視するためには、国内における本原虫分布の現状を明確にしておく必要がある。また、本原虫は、イヌやウシなどから感染することが知られているため、わが国のイヌおよびウシの *Cryptosporidium* の分子疫学調査を行うこととした。また、アジアにおける *Cryptosporidium* の浸潤状況を把握するため、中国とベトナムを対象として、調査を行う。*Cryptosporidium* は大きく分けて、腸管感染型と胃感染型の種があるが、後者のヒトへの感染性は明確でない。そこで、カニクイザルを使用して、感染性のモニターを実施することとした。

B. 研究方法

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 頭について、シヨ糖浮遊法により糞便検査を行った。陽性サンプルに関しては、DNA を抽出し、PCR 法によって 18S rRNA 遺伝子を増幅し、ABI 310DNA シーケンサにより塩基配列を決定した。SCID マウスを用いて、感染性を観察した。動物実験は、東北大学動物実験指針に則って実施した。ベトナムにおいては、農家に飼養されるウシの、月齢、下痢の有無を記載して糞便サンプルを採取し、Ziehl Neelsen 変法によってオーシストを検出した。*C. parvum* 型オーシストが検出された 1 検体については、上記の方法で 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。

C.研究結果

わが国のイヌの *Cryptosporidium* の分子疫学的調査：

東北地方で捕獲されたイヌより *Cryptosporidium* のオーシストを分離した。イヌは肉牛および乳牛を飼育する農家が散在する中山間地の村で捕獲されたものであった。分離オーシストのサイズは、4.4x3.2 μ m と小型であった。18S rRNA 遺伝子配列は、Fayer ら (J. Parasitol, 87:1415-1422, 2001) の米国分離株の配列と比較すると2塩基置換が認められたが、高い相同性を示した。系統樹解析の結果、*Cryptosporidium canis* のクラスターに属し、*C. canis* と同定された。

アジアにおける *Cryptosporidium* の調査：

中国では河南農業大学の張龍現教授、ベトナムでは中央ベトナム獣医学研究所 Nguyen Thi Sam 研究員と共同研究を行った。中国に関しては、河南農業大学を訪問し、研究の打合せを行った。ベトナムに関しては、Sam 研究員と共同して、中央ベトナムにおけるウシの *Cryptosporidium* 感染調査を行い、*C. parvum* 型の感染率は34%、*C. andersoni* 型の感染率は5.6%であった。遺伝子解析の結果、*C. parvum* 型オーシストは *C. parvum* (bovine genotype) と100%の相同性を示した。

胃感染型 *Cryptosporidium* のカニクイザルに対する感染性を解析するため、東京大学医科学研究所奄美病害動物研究施設を来訪し、感染実験のための意見交換および準備を行った。

D.考察

わが国のイヌの *Cryptosporidium* の分子疫学的調査：

Cryptosporidium 陽性のイヌは、ウシ飼養地域で捕獲されたものであったが、検出されたオーシストは *C. canis* であり、感染にウシは関与していないと考えられた。18S rRNA 遺伝子配列は、米国分離株の配列と2塩基置換が認められ、異なる株であることが明らかとなった。Abe ら (J. Bet. Med. Sci, 64:165-168, 2002) は大阪におい

てイヌから *C. canis* の分離を報告している。彼らは18S rRNA 遺伝子配列の289bpを決定したが、本研究では全長の1741bpを決定しており、*C. canis* がわが国に存在することを明確に示すものであり、東北地方からの検出は初である。また、米国株と一部の配列が異なることを明らかにし、*C. canis* には遺伝的に異なる株が存在し、多様性があることが明らかとなった。なお、わが国の *C. canis* に関して、ヒトへの感染性は明確ではなく、今後の検討が必要である。

アジアにおける *Cryptosporidium* の調査：

ベトナムのウシにおいてもわが国同様に *C. parvum* (bovine genotype) が存在することから、ヒトへの感染の危険があることが明らかとなった。分離株に関しては、18S rRNA 遺伝子のDNA配列がわが国で分離されている株と同一であった。したがって、この株がわが国に侵入した場合、本遺伝子以外の遺伝子の解析によって鑑別する必要がある。*C. andersoni* 型に関しては、詳細な解析はできなかったが、*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。

E.結論

1. わが国には米国分離株と異なる18S rRNA 遺伝子を有する *C. canis* が存在する。
2. ベトナムにはわが国の分離株に類似した *C. parvum* (bovine genotype) が存在する。
3. ベトナムにはわが国同様にウシ固有種と考えられている *C. andersoni* 型が存在する。

F.研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh M, Matsubara-Nihei Y, Sasaki T, Nakai Y. Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. Parasitol. Res., 99(6), 746-748 (2006)
- 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)

- 2. 学会発表
なし

G.知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp, *Isospora belli*, *Giardia intestinalis* and *Blastocystis hominis* among Thai patients

Somchai Jongwutiwes¹, Chaturong Putaporntip¹, Takuya Iwasaki², Hiroji Kanbara³, Takuro Endo⁴

1. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
2. Division of Laboratory Medicine, National Iwate Hospital, Iwate, Japan
3. Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
4. Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

Summary of research activities

Protozoa	Year	Activities
<i>Cryptosporidium</i> spp	1 (2005)	-Collection of 67 samples and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene and the Cpg60/45/15 gene.
	2 (2006)	- Verification of sequences and subcloning of some isolates that potentially contain mixed population of <i>Cryptosporidium</i> spp. The work is ongoing.
<i>Isospora belli</i>	1 (2005)	- Identification of a diarrheal outbreak caused by <i>Cryptosporidium</i> spp. among orphanage children at King Chulalongkorn Memorial Hospital. The work is ongoing.
	2 (2006)	- Collection of 38 samples and partial analysis of <i>Isospora belli</i> from HIV-positive and HIV-negative patients in Thailand. - Complete genetic analysis and observation of <i>ex vivo</i> development of <i>Isospora belli</i> oocysts. - One publication in <u>The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2007 (in press)</u>
<i>Giardia intestinalis</i>	1 (2005)	- Evaluation of the collection procedure and retrospective analysis of the prevalence as shown in Table 1 of the report on <i>Blastocystis hominis</i> .
	2 (2006)	- Collection of 50 samples with clinical data. DNA extraction. Development of the PCR procedure for further genetic analysis. The work is ongoing.
<i>Blastocystis hominis</i>	1 (2005)	- Collection of samples and evaluation of appropriate <i>in vitro</i> cultivation condition.
	2 (2006)	- Collection and partial sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Preliminary report attached.

Title: MORPHOLOGIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ISOSPORA BELLI* OOCYSTS FROM PATIENTS IN THAILAND

Summary:

To investigate the extent of genetic heterogeneity in the genus *Isospora* infecting patients in Thailand, a total of 38 fecal samples containing *Isospora* oocysts from HIV/AIDS patients (n=30), corticosteroid-treated patients (n=3) and immunocompetent individuals (n=5) were recruited for analysis. Remarkable variation in the maximum width and length of oocysts both within and between isolates was observed. However, the average length-width ratio of oocysts was within the range for *I. belli* (>1.2). Ex vivo sporogonic development of freshly passed oocysts in feces from 3 of these isolates was observed longitudinally, showing that 27% of these oocysts underwent complete sporulation. Interestingly, 95% of sporulated oocysts contained 2 sporocysts in an oocyst with 4 sporozoites in each sporocyst while *Caryospora*-like oocysts, characterized by 8 sporozoites enclosed by a single sporocyst, were also detected (5%). The SSU rRNA, 5.8S, ITS-1 and ITS-2 were highly conserved, indicating that neither cryptic species nor extensive strain variation occurred.

Introduction:

Isospora belli is a coccidian protozoa in phylum Apicomplexa that parasitizes epithelium of upper small intestine of human causing diarrheal disease. The entire life cycle of *Isospora* consists of asexual development and sexual reproduction that take place in the same host. Transmission of *I. belli* oocysts seems to confine to anthroponotic cycle because human is the only known natural host.¹ The oocysts of *I. belli* usually require less than one day to a few days after passage from human intestine to complete sporogonic development and become infective.^{2,3} Although both immunocompetent individuals and immunosuppressed patients are susceptible to infections, the prevalence of isosporiasis seems to occur more frequently in the latter. After the pandemic of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection, human isosporiasis has been more commonly identified as an opportunistic infection of the gastrointestinal tract of those who have low CD4+ lymphocyte counts (usually <200 cells/ μ l).⁴⁻⁶

Human isosporiasis seems to be cosmopolitan in distribution, especially in tropical and subtropical regions such as Haiti, Mexico, Brazil, El Salvador, Venezuela and Southeast Asia.¹ However, the prevalence of this infection could be occasionally underestimated because oocysts are usually excreted in small numbers or may not be found at all in spite of actual infection.⁷ Moreover, the transparent appearance of *I. belli* oocysts could be overlooked in direct fecal smear.

It is of note that infection with *I. belli* usually produces more aggressive and prolonged period of symptoms in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) than in immunocompetent individuals.^{1,6} Among immunocompetent patients with isosporiasis, infants and young children seem to have more severe manifestations than in adults. Meanwhile, chronic diarrheal symptoms persisting for over a decade caused by *I. belli* infections have been reported in adults without concurrent immunosuppression.^{1,8} Although the gastrointestinal symptoms of patients with isosporiasis usually subside within a few days after initiation of treatment with combination of trimethoprim and sulfamethoxazole, relapses have been observed in about half of symptomatic cases.^{4,5} Hence, the spectrum of isosporiasis seems to be variable, partly depending on the host immune status whereas variation in virulence of parasite strains remains unknown.

Meanwhile, a number of distinct species have been characterized for *Cryptosporidium*, another enteric coccidian protozoa causing diarrheal illness in both humans and animals. Recent molecular epidemiological studies have revealed that cryptosporidia infecting humans belong to heterogeneous species.⁹⁻¹¹ Most of these species are responsible for zoonotic transmission while anthroponotic cryptosporidiosis is caused by *C. hominis*. The knowledge of speciation in cryptosporidia is of considerable importance for disease control and prevention, especially for those with immunosuppressive status, because no documented effective anti-cryptosporidial drug has been available.¹¹

Despite the increased significance of enteric coccidiosis, comparatively little has been known about species/strain variation in the genus *Isospora* infecting humans. To address this issue, we extracted the DNA from oocysts found in fecal samples of isosporiasis patients in Thailand and determined the sequences of the genes for small subunit ribosomal RNA, internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA. Additionally, we analyzed morphologic features of oocysts of *I. belli* from patients who had normal immune status and those with compromised immunity.

Materials and Methods:

Stool samples and background data. We recruited stool samples positive for *I. belli* oocysts among individuals attending King Chulalongkorn Memorial Hospital in Bangkok as a cross-sectional study between January 2002 and December 2004. Isosporiasis was diagnosed by the presence of characteristic oocysts in one or more stool samples by direct wet smear method, formalin-ethylacetate sedimentation or modified kinyoun acid fast stain. Stool samples and clinical data of *I. belli*-infected cases were obtained after informed consent which included age, sex, presenting symptoms, past history of illness and relevant laboratory tests such as complete blood count and CD4+ lymphocyte count. Eosinophilia was determined based on relative eosinophil count of more than 4 cells per 100 leucocytes. Diarrhea was defined as three or more unformed stools per day.

Aliquots of each *I. belli*-positive stool sample were preserved as described previously by adding approximately 4 volumes of absolute ethanol and stored at ambient temperature.¹² Whenever possible, fresh stool samples were collected for observing sporulation of oocysts. The ethical aspects of this study have been approved by the Institutional Review Board of Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Morphometry of oocysts. The dimension of each oocyst was determined by measuring maximum length and width under Olympus BX51 light microscope at a magnification of 400. At least 20 oocysts were measured for each sample.

Sporulation of oocysts. Fresh stool samples were directly diluted with an equal volume of sterile water. The stool suspension of each sample was applied onto >50 clean glass-slides, covered with 22x22 mm cover-slips and the edges of cover-slips were tightly sealed, incubated at 25-30°C and kept in humidifier boxes to minimize evaporation of fluid from the samples. In total 100 oocysts for each isolate were examined every 6 hours for 20 days under light microscope using 400x magnification.

DNA extraction. DNA of *I. belli* oocysts was extracted from either fresh stool samples or ethanol preserved specimens by the method described previously for the extraction of *Cryptosporidium* oocysts except that the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany) was used.¹¹ Prior to DNA extraction of preserved samples, ethanol was washed out with sterile water (3 times centrifugation at 1,600xg, 15 min without brake and the pellet was resuspended in 5 ml of water). The DNA purification procedure was essentially as described by the manufacturer's instruction manual. The purified DNA was dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 1