

表2 施設 G, H, L, M, N の年代, 性別における腸管寄生原虫の感染状況

| 年 代 | 検査件数 (男性) | 男 性 | | | | 女 性 | | | |
|-------|--------------|------------------|--------|--------|-------|------------------|--------|--------|-------|
| | | <i>E. dispar</i> | 大腸アメーバ | 小形アメーバ | ジアルジア | <i>E. dispar</i> | 大腸アメーバ | 小形アメーバ | ジアルジア |
| 20歳未満 | 44 (28) | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| 20歳代 | 81 (59) | 3 | 7 | 5 | - | - | 1 | 1 | - |
| 30 " | 107 (70) | - | 4 | 1 | - | - | 1 | 2 | - |
| 40 " | 108 (74) | - | 7 | 5 | 1 | - | - | - | - |
| 50 " | 120 (72) | - | 7 | 7 | - | - | 1 | - | - |
| 60 " | 68 (41) | - | - | 2 | - | - | - | - | - |
| 70歳以上 | 17 (10) | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| 不 明 | 4 (4) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 計 | 549 (358) | 3 | 25 | 20 | 1 | 0 | 3 | 5 | 0 |

結果および考察

今回、感染実態調査を行った8施設、667名の結果を表1に示す。

ホルマリン・エーテル法による顕微鏡検査、*E. histolytica* IIキットを用いた赤痢アメーバ特異抗原検出検査およびPCR法を用いた赤痢アメーバの遺伝子検出検査を行った結果、施設Gにおいてジアルジア感染者が1名認められたが、8施設いずれからも赤痢アメーバは認められなかった。しかし、PCR法を用いた確認検査(図1)により、施設Nにおいて病原性はないが形態学的に赤痢アメーバに酷似した*E. dispar*の感染が3名に認められた。さらに赤痢アメーバと同一の感染経路をとると考えられる非病原性の大腸アメーバ、小形アメーバの感染が6施設(施設G, H, I, L, M, N)、計53名から検出された。施設Hでは男性13名中6名の利用者に大腸アメーバの感染が認められた。また、施設G, Nにおいて大腸アメーバ、小形アメーバの感染が認められた利用者は同一の生活棟であると報告された。

表2に示したように*E. dispar*の感染が認められた施設利用者は3例共に20歳代男性であったが、大腸アメーバ、小形アメーバの感染が認められた施設利用者の年齢は20歳代～60歳代と様々な年代で感染が認められた。また、性別は84.9%(45/53)が男性であった。

今回の調査において赤痢アメーバ抗原検出検査

(*E. histolytica* IIキット)で陽性であったが、その後の複数回の検便検査および赤痢アメーバ抗体検査で陰性を示す例が計7例(施設G:2例, 施設K:2例, 施設L:1例, 施設N:2例)に認められた。いずれも同一ロットの*E. histolytica* IIキットを使用していたが、施設Nの2例について別ロットによる検査では陰性であったことから、*E. histolytica* IIキットはロットにより偽陽性を示す場合があることが示唆された。

ジアルジアの遺伝子型を検討するため、GDH遺伝子を標的としたPCRを行い、得られたPCR増幅産物の塩基配列について解析したところ、施設Gで認められたジアルジアの遺伝子型はAssemblage Aであった。また、ジアルジア感染者は無症状感染者であると報告されたが、施設担当医の判断により駆虫がなされたため、フォローアップの検査を行った結果、陰性であった。

今回の調査により、*E. dispar*の施設内感染が確認され、*E. histolytica* IIキットの使用で偽陽性を示す場合があることから、赤痢アメーバの検査においては、顕微鏡検査とPCR法による遺伝子検査など複数の検査法を組み合わせる必要があると考えられた。また、同一の生活棟において大腸アメーバ等の感染が認められたことから、施設利用者の中に赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫感染者がいた場合、他の施設利用者への感染拡大が危惧される。したがって、今後もこのような調査を継続していくことが重要である。

文 献

- 1) 鈴木 淳, 他 (2005) : 知的障害者厚生施設における赤痢アメーバ等腸管寄生原虫の感染実態調査. Clin Parasitol, 16 (1), 50-52.
- 2) Evangelopoulos, A. *et al.* (2000) : A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann Trop Med Parasitol, 94 (3), 233-240.
- 3) 国立感染症研究所 (2003) : 病原体検出マニュアル. 233-234.
- 4) Abe, N. *et al.* (2003) : Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci, 65 (1), 29-33.

Minireview

Genotyping of *Cryptosporidium* species: current status and future direction

Masaharu Tokoro^{a,*}, Kentaro Nakamoto^a, Amjad I. A. Hussein^{a,b}, Tomoko Arai^a

^aDepartment of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640, Japan

^bChemical, Biological and Drug Analysis Center, An-Najah National University, Nablus, West-Bank, Palestine

Abstract

Molecular epidemiology has provided novel insights into the genetic diversity of the genus *Cryptosporidium*, one of the major causative protozoan parasites of diarrhea in humans and various animals worldwide. Genetic analysis using various target loci on genomic DNA has revealed that *Cryptosporidium* consists of at least 15 species and various genotypes with different host specificities and pathogenicities. Although it is currently unclear how such diversity was produced and what physiological significance is related to these differences, consideration of the evolutionary history together with phylogenetic analyses of gene sequences will likely provide useful insights for future study of the heterogeneity of this parasite.

Key words: *Cryptosporidium*; Molecular epidemiology; Genotyping; Phylogenetic analysis; Small subunit ribosomal RNA; *Cryptosporidium* oocyst wall protein; 70 kDa Heat shock protein; Actin; Polythreonine.

1. Introduction

Due to advances in molecular epidemiological techniques, 15 species of *Cryptosporidium* are thus far regarded as valid: *C. muris* in rodents; *C. andersoni* and *C. bovis* in cattle; *C. parvum* in ruminants and humans; *C. wrairi* in guinea pigs; *C. hominis* in humans; *C. meleagridis*, *C. baileyi* and *C. galli* in birds; *C. serpentis* and *C. aurophilum* in snakes and lizards; *C. molnari* in fish; *C. felis* in cats; *C. canis* in dogs; and *C. suis* in pigs. At least 7 species (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* and *C. muris*) and 2 genotypes (monkey and cervine) of *Cryptosporidium* have been reported from human clinical cases (reviewed in [2]).

The current tools for genotyping of *Cryptosporidium* spp. involve the combination of polymerase chain reaction (PCR) targeting various gene loci, e.g., 18S ribosomal RNA (18SrRNA), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP), 70 kDa heat shock protein

(HSP70), actin and polythreonine (Poly-T) genes, with restriction fragment length polymorphism (RFLP) or direct sequencing. These methods have been widely used because of their high sensitivity for detecting the genomic DNA of this parasite and the existence of valuable research data reported from a wide range of organisms, e.g., pets, livestock, wild animals and humans.

This review summarizes the essential aspects of the molecular epidemiological approach to *Cryptosporidium* spp. and also the availability of primers and reference sequences held in GenBank of each target gene locus.

2. Significance of reference DNA sequences in genetic analysis

As shown in Tables 1 to 4 and Fig. 1, numerous molecular techniques have been developed for the differentiation of *Cryptosporidium* genotypes and species. Although various RFLP methods have been used in the genotyping of *Cryptosporidium*, the reference sequences, which are available from GenBank, are indispensable in its molecular epidemiological analysis. The RFLP method is an epidemiologically important method that determines the genotype of isolates; however, the results seem to lack applicability

* Corresponding author. Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University 13-1, Takaramachi, Kanazawa 920-8640, Japan.

Tel: +81-76-265-2823 Fax: +81-76-234-4242.

E-mail: tokoro@med.kanazawa-u.ac.jp

to the evaluation of the origin or biological significance of heterogeneity in *Cryptosporidium*. That is to say, only an accumulation of reference sequence data of various gene loci in the genotyping of this parasite is considered to reveal its detailed population structure, geographical distribution and evolutionary process.

This review therefore focuses on the use of DNA sequences and the PCR method to obtain amplicons from genomic DNA of *Cryptosporidium* isolates.

3. Various target loci for the genotyping of *Cryptosporidium* spp.

The genotyping methods currently used differ with respect to the genetic locus targeted.

Table 1. PCRprimers targeting 18S rRNA gene

| Method | Name | Primers | Amplicon size (bp) | Ref. |
|------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|-------|
| PCR | SSU-F1 | AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC | 1,750 | 5 |
| | SSU-R1 | TGATCCTTCTGCAGGTTCACTAGG | | |
| Direct sequence | 18SIF | AGTGACAAGAAATAACAATACAGG | 300 | 4 |
| | 18SR | CCTGCTTAAAGCACCTAATTTTC | | |
| nested PCR-RFLP | SSU-F2 | TTCTAGAGCTAATACATGGG | 1,325 | 5, 13 |
| | SSU-R2 | CCCATTTCCTTCGAAACAGGA | | |
| | SSU-F3 | GGAAAGGGTGTATTATTAGATAAAG | | |
| Direct sequences | SSU-R3 | AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | 820 | |
| | ExCry1 | GCCAGTAGTCATATGCTTGCTCT | 840 | 8 |
| ExCry2 | ACTGTTAAATAGAAATGCCCCC | | | |
| nested PCR-RFLP | NesCry3 | GCGAAAAAATCGACTTTATGGAAAGG | 590 | |
| | NesCry4 | GGAGATTCAAGGCATATGCCTGC | | |
| nested PCR | 18SICF2 | GACATATCAATCAAGTTCTGACC | 760 | 12 |
| | 18SICR2 | CTGAAGGAGTAAGGAACAACC | | |
| | 18SICF1 | CCTATCAGCTTACAGCGTAGG | | |
| | 18SICR1 | TCTAAGAATTTCACTCTGACTG | | |
| PCR | CPB-DIAGF | AAGCTCGTAGTTGGATTCTG | 435 | 3 |
| | CPB-DIAGR | TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG | | |
| nested-PCR RFLP | N-DIAGF2 | CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAG | 667 | 10 |
| | N-DIAGR2 | CCTTCTATGTCTGGACTCGTGAAGT | | |
| | CPB-DIAGF | AAGCTCGTAGTTGGATTCTG | | |
| | CPB-DIAGR | TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG | | |

3.1. 18SrRNA gene: The optimum method of genotyping *Cryptosporidium* spp. has involved the use of the 18SrRNA gene to date, since its locus consists of five copies on the genome, which achieves high detection sensitivity. The locus was originally analyzed by a PCR-RFLP method using oocysts from environmental samples [3], and subsequent detailed studies revealed sequences of the locus for all 15 species and for over 30 genotypes, as indicated in Fig. 1 (A) [1, 5, 6, 8, 10, 11, 12]. For primer sets (Table 1), the most commonly used combination is SSU-F1/R1 with SSU-F2/R2 or SSU-F3/R3 [13], while for nested primers sets, ExCry1/2 and NesCry3/4 can detect *Cryptosporidium* at the single-oocyst level [8]. With the latter amplicon, RFLP analysis using *VspI* and *DraI* can differentiate *C. parvum* isolates from *C. baileyi* and *C. serpentis* [8], although this RFLP analysis can not classify all human pathogenic *Cryptosporidium* species [9]. The nested primer sets of N-DIAGF2/GR2 and CPB-DIAGF/R, however, which were designed based on a CPB-DIAGF/R single primer set [3], can identify almost all species and genotypes by nested PCR-RFLP

using 5 or fewer oocysts [10].

Table 2. PCR primers targeting COWP gene

| Method | Name | Primers | Amplicon size (bp) | Ref. |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------|------|
| PCR-RFLP Direct sequence | ery15 | GTAGATAATGGAAGAGATTGTG | 580 | 14 |
| | ery9 | GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG | | |
| nested PCR-RFLP | BCOWPF | ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCTCTC | 769 | 17 |
| | BCOWPR | CGCACCTGTTCCCACTCAATGEAAACCC | | |
| nested PCR-RFLP Direct sequence | oocry 3 | AGATTAACAGAATGCCACCAGGTA | 923 | 15 |
| | oocry 4 | CCATGATGATGTCTGGATTTTGTA | | |
| | oocry 1 | CCTGGATATCTCGACAAT | | |
| | oocry 2 | GCGAACTAATCGATCTCTCT | | |
| PCOWPF | | GTGTACAGTCTGATACTGCACC | 435 | |
| | | GTGTACAGTCTGACACTGCACC | | |
| | | GTGTCAATCAGATACTGCCCC | | |
| | | GCGTACAGTCAGATACTGCTCC | | |
| | | GTGTTCAATCAGACACAGCTCC | | |
| | | GTGTACAATCAGATACCGCTCC | | |
| | | GGACATACTGGTTGTGTTG | | |
| | | GGACATATAGGTTGAGTTG | | |
| | | GGACATACTGGTTGAGTTG | | |
| | | GGGCATACAGGTTGTGTTG | | |
| nested PCR-RFLP Direct sequence | PCOWPIF | GGGCAGACAGGTTGAGTTG | 341 | 18 |
| | | GGACAAACAGGTTGAGTTG | | |
| | PCOWPIR | GGGCACCTCTTAGCTGGAGC | | |
| | | GGGCATTCTTTAGCTGGAGC | | |
| | GGACATTCTTTTCAGGAGC | | | |
| | GGACATTCTTTTCAGGAGC | | | |
| | GGACATTCTTTTCAGGAGC | | | |
| | GGGCATTCTTTTCAGGAGC | | | |
| | GGGCATTCTTTTCAGGAGC | | | |
| | GGGCATTCTTTTCAGGAGC | | | |

3.2. COWP gene: For primer sets (Table 2), COWP PCR was initially carried out using a Cry 9/15 primer set [14], and then improved to a more sensitive nested PCR method using a novel outer BCOWPF/ R primer set [17]. Oocry 3/4 and oocry 1/2 primer sets, which were also designed for a single-tube nested PCR method targeting the COWP gene, achieve high sensitivity in obtaining a PCR amplicon from 250fg *C. parvum* genomic DNA template [15]. However, neither the BCOWPF/R nor oocry 3/4 primer set can detect the genomic DNA templates of *C. felis*, *C. canis* or *C. suis*. In contrast, the Cry 9/15 primer set can amplify all 17 species and genotypes of *Cryptosporidium*, which are shown in Fig. 1 (B)[9, 14], although it should be noted that a comparatively low level PCR amplification was obtained from genomic DNA templates of *C. canis*, *C. felis*, *C. baileyi*, *C. muris*, *C. andersoni* and *C. serpentis*, possibly due to the sequence polymorphism of the primer region of Cry 9/15 [16]. To overcome this difficulty with low-level amplification of COWP genes, PCOWF/R and PCOWIF/IR primer sets were designed, consisting of 6 and 5 different primer sets, respectively [18]. For COWP-based genotyping, RFLP analysis using Cry 9/15 can not differentiate the isolates of: (i) *C. muris*, *C. andersoni*, and *C. serpentis*; (ii) *C. parvum* ferret genotype and *C. wairi*; (iii) *C. parvum* bovine and mouse genotypes; or (iv) *C. parvum* human and monkey genotypes [16]. However, a Cry 9/15 primer set is considered useful for the genotyping of human clinical isolates of *Cryptosporidium* spp. even with the RFLP method [13].

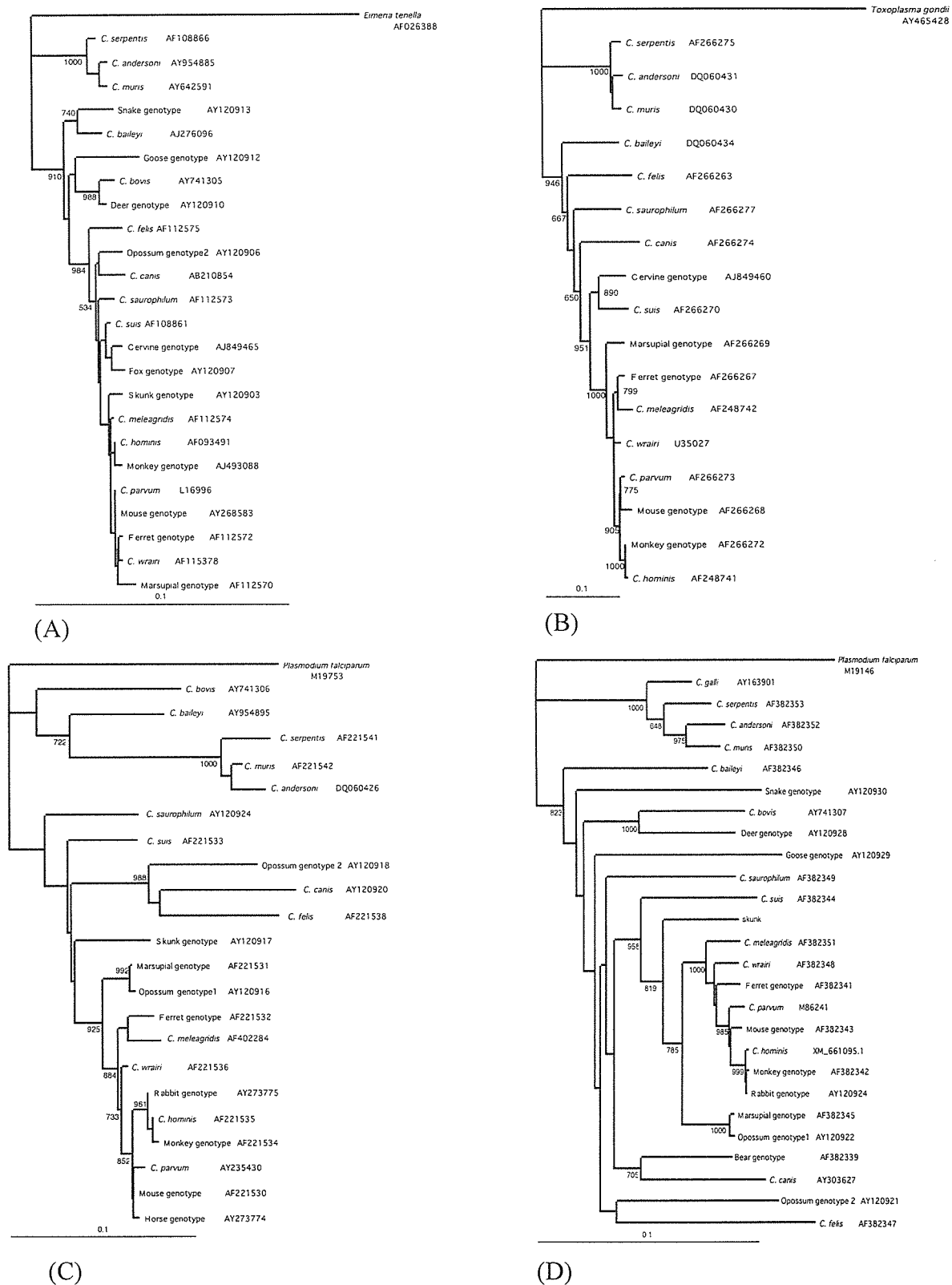


Fig. 1 Phylogenetic relationship among *Cryptosporidium* species and genotypes inferred by NJ analysis (A): 18SrRNA gene, (B): COWP gene, (C): HSP70 gene and (D): actin gene. As an out-grope, *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, which are coccidian parasites, were used respectively. Values on branches are bootstrapping using 1,000 replicates. Numbers, shown after names of species or genotypes, indicate the GenBank accession numbers.

Table 3. PCR primers targeting HSP70 gene

| Method | Name | Primers | Amplicon size (bp) | Ref |
|-----------------------------|-----------|---------------------------------|--------------------|-----|
| Direct sequence | HSP-F1 | ATGCTGAAAGTCCAGCTAATTGGTAITGA | 2,010 | 20 |
| | HSP-R1 | TTAGTCGACCTCTTCAACAGTGG | | |
| | HSP-F2 | TA CTTCAATG CTGTTGGTGTATGGAGAAA | 1,950 | |
| | HSP-R2 | CAACAGTTGGACCAATTAGATCC | | |
| PCR-RFLP Direct sequence | Cshp1 | AGCAATCCTCTGCCGTACAGG | 580 | 21 |
| | Cshp4 | AAGAGCATCCTTGATCTTCT | | |
| Direct sequence | Cshp2386F | CTGTTGCTTATGGTGCTGCTG | 300 | 19 |
| | Cshp2672R | CCTCTTGGTGTGGTGAATA | | |
| Direct sequence | HSPF4 | GGTGGTGGTACTTTTGATGTATC | 450 | 22 |
| | HSPR4 | GCCTGAACCTTGGAAATACG | | |
| | HSPF3 | CGTGTACTACTACTTGGGTGG | 325 | |
| | HSPR3 | CTCTTGCCATACCAGCATCC | | |

3.3. HSP70 gene: For primer sets (Table 3), the Cshp2386F/2672R primer set was initially designed for reverse-transcription PCR to evaluate the viability of cryptosporidial oocysts in environmental water samples [19]. In order to use HSP70 gene-targeting PCR as a diagnostic tool of human cryptosporidiosis, HSP-F1/R1 and HSP-F2/R2 primer sets were developed, which can amplify the HSP70 gene locus of most apicomplexan parasites, and the sets have been used as a standard nested-PCR method for the HSP70 gene [20]. Due to the universal characteristic of the primer sets, reference sequence information from various organisms has accumulated, as shown in Fig. 1 (C); however, the amplicon size (1,950 bp) is too long for amplification of genomic DNA of isolates in clinical laboratories. The development of HSPF4/R4 and HSPF3/R3 nested PCR primer sets improved the product size to 325bp [22]. Also and the Cshp1/4 primer can also amplify a 580 bp product from the genomic DNA of only one oocyst [21]. In exchange for achieving high sensitivity, however, Cshp1/4 can not detect the DNA of *C. suis*, *C. felis*, *C. muris* or *C. canis* [9].

Table 4. PCR primers targeting actin and poly-T genes

| Target Gene | Method | Name | Primers | Amplicon size (bp) | Ref. |
|-------------|-----------------|--------|--------------------------------------|--------------------|------|
| Actin | Direct sequence | Act-F1 | ATGA/GGA/TGAAGA/AGA/TA/AGC/TA/TCAAGC | 1,095 | 23 |
| | | Act-R1 | AGAAG/JACAG/TTTCTGTGT/GACAAT | | |
| | | Act-F2 | CAAGCA/TTTG/AGTTGTTGAT/CAA | 1,096 | |
| | | Act-R2 | TTTCTGTGT/GACAATA/TG/CA/TTGG | | |
| poly-T | PCR-RFLP | cry 44 | CTCTTAATCCAATCATTACAAC | 520 | 24 |
| | | cry 37 | CAGCAAGATATGAATACCG | | |

3.4. Actin and Poly-T genes: The actin and Poly-T loci have been examined because of the possibility that phylogenetic analysis results using only the 18SrRNA locus may not accurately reflect the evolutionary relationship of *Cryptosporidium* spp. [23, 24]. Widespread use of the Act-F1/R1 and Act-F2/R2 nested PCR primers (Table 4) targeting the actin gene have produced reference sequence information for various species and genotypes, as shown in Fig. 1 (D). In Poly-T genes, the length polymorphism of multiple polythreonine motif was expected and analyzed by Cry37/44 primer set, which could not detect *C. muris* and *C. serpentis* [24, 7].

3.5. Other gene loci: Other gene loci including thrombospondin-related adhesive protein 1 (TRAP-C1) [25], TRAP-C2 [26] and beta-tubulin [27] have been used to differentiate certain species and for the genotyping of *Cryptosporidium*. Currently more detailed analyses for sub-genotyping are available, utilizing extra-chromosomal double strand rRNA [28] and 60 kDa glycoprotein (GP60) gene. The results of GP60 gene sub-genotyping analysis, in particular, have provided new insight into the subtypes of *C. hominis* (Ia, Ib, Ic, Id, Ie) and *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIff) [29, 30, 31, 32, 33].

4. Concluding remarks

This review demonstrates that reference sequences of various loci of *Cryptosporidium* spp. from various hosts, ranging from mammals to reptiles, have been fully reported in excellent previous works. Thus, future genotyping studies should undertake accurate analysis using these previous data, and any novel sequence data should be deposited in public databases to contribute to further advances in this field. Even though extensive molecular epidemiological data is now available, the evolutionary process and the biological significance of the heterogeneity in *Cryptosporidium* remain to be elucidated. Therefore, with regard to the future perspective of the research on *Cryptosporidium*, the evolutionary and physiological significance of intra-species heterogeneity are likely to be important topics for researchers in the next decade.

Acknowledgements

This work was partly supported by a grant for Grant-in-Aid for Scientific Research (18406007) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and also by a grant for research on emerging and reemerging infectious diseases (17211101) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- [1] Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2592-5.
- [2] Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 2005; 21:430-7. Review.
- [3] Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:3849-55.
- [4] Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RC. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol* 1997; 83:825-30.

- [5] 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; 65:1578-83.
- [6] Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3386-91.
- [7] Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:4431-5.
- [8] Sturbaum GD, Reed C, Hoover PJ, Jost BH, Marshall MM, Sterling CR. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:2665-8.
- [9] Jiang J, Xiao L. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J Eukaryot Microbiol*. 2003; 50:542-7.
- [10] Nichols RA, Campbell BM, Smith HV. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:4183-9.
- [11] Nichols RA, Campbell BM, Smith HV. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:5428-35.
- [12] Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2003 Jul; 69:4302-7.
- [13] Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:72-97.
- [14] 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; 150:209-17.
- [15] Homan W, van Gorkom T, Kan YY, Hepener J. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. *Parasitol Res* 1999; 85:707-712.
- [16] Xiao L, Limor J, Morgan UM, Sulaiman IM, Thompson RC, Lal AA. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:5499-502.
- [17] Pedraza-Diaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:49-56.
- [18] Gomez-Couso H, Freire-Santos F, Amar CF, Grant KA, Williamson K, Ares-Mazas ME, McLauchlin J. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int J Food Microbiol* 2004; 91:279-88.
- [19] Rochelle PA, Ferguson DM, Handojo TJ, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:2029-2037.
- [20] Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:2385-2391.
- [21] Gobet P, Toze S. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 200:37-41.
- [22] Morgan UM, Monis PT, Xiao L, Limor J, Sulaiman I, Raidal S, O'Donoghue P, Gasser R, Murray A, Fayer R, Blagburn BL, Lal AA, Thompson RC. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. *Int J Parasitol* 2001; 31:289-96.
- [23] Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J Parasitol* 2002; 88:388-394.
- [24] Carraway M, Tzipori S, Widmer G. 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 Immunol* 1997; 65:3958-60.
- [25] Spano F, Putignani L, Guida S, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium* - 1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp Parasitol* 1998; 90:195-8.
- [26] Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, Ong CS, Mac kenzie WR, Lal AA, Beard CB. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis* 1997; 3:567-73.
- [27] Widmer G, Tchack L, Chappell CL, Tzipori S. Sequence polymorphism in the beta-tubulin gene reveals heterogeneous and variable population structures in *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:4477-81.
- [28] Khramtsov NV, Chung PA, Dykstra CC, Griffiths JK, Morgan UM, Arrowood MJ, Upton SJ. Presence of double-stranded RNAs in human and calf isolates of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* 2000; 86:275-82.
- [29] Strong WB, Gut J, Nelson RG. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immunol* 2000; 68:4117-34.
- [30] Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantic-Pavlinic M, Bern C, Sulaiman IM, Glaberman S, Lal AA, Xiao L. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J Eukaryot Microbiol* 2001; 28S:31S.
- [31] 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; 41:2744-7.
- [32] Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol* 2005 Jun; 43:2805-9.
- [33] Abe N, Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol Res* 2006; 99:303-5.

(Reviewed by Takashi Asai and Motohiro Iseki.)

PCR法によるサイクロスポーラの検出と種の同定

金沢大学大学院医学系研究科 寄生虫感染症制御学

所 正治・吉田知代・荒井朋子・井関基弘

藤田保健衛生大学病院 臨床検査部

古川 博

同 リウマチ感染症内科

小松八千代

Key Words : *Cyclospora cayetanensis*, cyclosporiasis, polymerase chain reaction

はじめに

従来、ヒトから検出されるサイクロスポーラ・カエタネンシス (*Cyclospora cayetanensis*) はヒトのみを宿主とすると考えられてきたが、同時に、他には哺乳類のリザーバーが存在する可能性も議論されてきた。はたしてヒトに感染するサイクロスポーラに zoonosis タイプが存在するのか。この問いへの答えには、ヒトのサイクロスポーラ症例から分離された原虫の遺伝子レベルでの種鑑別が必要となる。今回われわれは、インドネシアからの帰国者のサイクロスポーラ症例を経験し、治療前後の糞便検体を用いた PCR 法による完治の確認および種鑑別の評価を実施したので報告する。

症 例

患者：69歳、男性。

主訴：軟便・腹部不快感。

家族歴・既往歴：特記事項なし。

現病歴：2006年2月4日～3月5日までインドネシアのジャカルタに滞在。3月2日より水様下痢(2回/日程度)が発症。帰国後も軟便(1日1回)と腹部不快感が持続した。3月10日に近医受診。糞便寄生虫検査にて原虫様シスト/オーシストが検出され、また、便培養にて病原性大腸菌(+)。酪酸菌製剤(ピオスリー[®])を処方されるが改善せず。3月16日藤田保健衛生大学大学院病院紹介受診。

初診時検査所見：血液検査・生化学的検査・尿検

Detection and Identification of *Cyclospora cayetanensis* by a Nested-Multiplex PCR Analysis

Masaharu Tokoro* Hiroshi Furukawa** Yachiyo Komatsu*** Tomoyo Yoshida*
Tomoko Arai* Motohiro Iseki*

*Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University

**Department of Laboratory Medicine, Fujita Health University Hospital

***Division of Rheumatology and Infection Diseases, Department of Medicine, Fujita Health University

論文請求先：所 正治 〒920-8640 金沢市室町13-1 金沢大学大学院医学系研究科 寄生虫感染症制御学

Clinical Parasitology Vol. 17 No. 1 2006

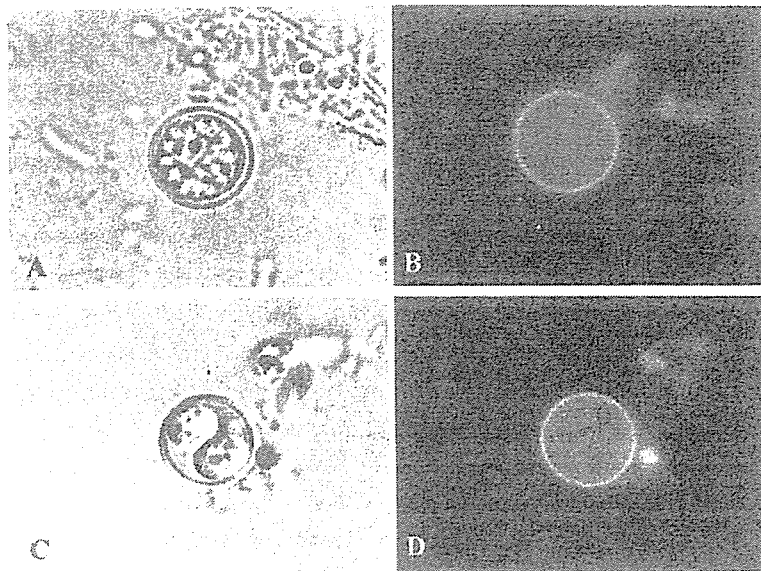


図1 光学的顕微鏡像

微分干渉像：(A) 未成熟オーシスト(C) 発育試験7日目，蛍光観察像(UV励起)：
(B) 未成熟オーシスト (D) 発育試験7日目

表1 本法で用いられたプライマーのリスト

| Primer | Species | Sequence (5'-3') | Amplified Size (bp) | Application |
|-------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| 21E(forward) | <i>Cyclospora</i> spp. | TACCCAGTGAAGACGCTT | 436 | 1st PCR |
| 23E(reverse) | and <i>Eimeria</i> spp. | TAAGGAGAAACCAAGGAGG | | |
| E52M4(forward) | <i>Eimeria</i> spp. | GTCATATTTCGATTCAGGACCA | 174 | |
| CE418(reverse) | <i>C. parvum</i> | GTAGCTCCGCGGTTCG | 254 | |
| | <i>C. caryophora</i> | | | 2nd nested-multiplex |
| FLDC0512(reverse) | <i>C. volu</i> | CTGTCTGGATGATGTCCTGC | 361 | PCR |
| | <i>C. parvum</i> | | | |
| OP29(reverse) | - | GGTCTGTAAAGCCGATCTGCTG | - | - |

査：特に異常なし。糞便寄生虫検査にて、サイクロスポーラまたはイソスポーラ様原虫検出。精査のためショ糖遠心浮遊法を実施し、蛍光顕微鏡のUV励起光による自家蛍光および形態よりサイクロスポーラのオーシストと同定された。また、便培養にて腸管病原性大腸菌(2+)。

治療経過：3月16日よりST合剤(バクタ顆粒[®])4g経口を9日間投与。また、ビオスリー3g経口が同時に処方された。3月24日に再受診。自覚症状は80%改善とのことから、バクタ、ビオスリーが5日間追加処方された。29日に便検査が実施され、オーシスト陰性を確認。31日に終診とした。

鏡検およびPCR法による検出：完治確認と種鑑別の評価

3月16日の初診時および3月29日の治療後の便検体について、オーシストの形態観察、発育試験、PCRによる検出が実施された。

3月16日のバクタによる治療前の糞便からショ糖遠心浮遊法により精製したオーシストの顕微鏡的検査では、顆粒状の内容物を包蔵する平均直径8.3 μ m(7.6~8.7 μ m)の円形のオーシストが多数検出された(図1A)。また、オーシストを5%重クロム酸カリウム溶液に移し、室温で1週間の発育試験を実施したところ、2コの楕円形のスポロシストの形成が認められた(図1C)。蛍光顕微鏡観察による自家蛍光は未成熟オーシストではオーシスト壁に(図1B)、また、発育試験後ではオーシスト壁とわずかにスポロシスト壁にもブルーの蛍光として認められた(図1D)。また、3月29日の治療後の便検体では、サイクロスポーラのオーシストは検出されなかった。

PCRでは、18S ribosomal RNA(rRNA)遺伝子をターゲットとしたnested-multiplex PCRを実施し

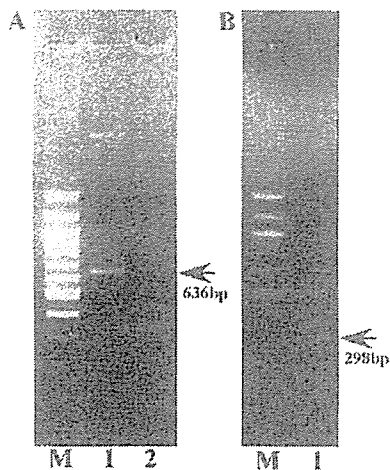


図2 PCR増幅産物のゲル泳動像
 (A) 1st PCRの結果, M: 100 bp ladder,
 1: 治療前, 2: 治療後
 (B) Multiplex-PCRの結果, 治療前の1st PCR
 サンプルをテンプレートに2nd PCRを実施

た。プライマー (表1) および PCR 条件は, Takara ExTaq DNA polymerase (TAKARA) を使用した他はすべて Orlandi らの原法¹⁾ に従い, テンプレートとしては, 糞便検体よりショ糖遠心浮遊法によって濃縮したオーシストから QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した genomic DNA を用いた。また, すべての増幅産物はダイレクトシーケンスによって全長の塩基配列を決定した。本法においては, ユニバーサルプライマーを用いた 1st PCR によって, *Cyclospora* spp. および *Eimeria* spp. 由来の増幅産物 (636bp) を検出可能である (表1)。また, 2nd PCR では *Cyclospora cayentanensis* に特異な増幅産物 (298bp), *C. cercopitheci*, *C. colobi*, *C. papionis* に特異な増幅産物 (361bp), そして, *Eimeria* spp. に特異な増幅産物 (174bp) のいずれかを検出可能なマルチプレックス PCR 法を用いる (表1)。治療前, 治療後の糞便検体からの PCR での検出試験では, 治療前では陽性, 治療後では陰性となった (図2A)。種鑑別のための 2nd PCR では, *C. cayentanensis* 特異的な増幅産物が認められ (図2B), この結果は, 1st PCR および 2nd PCR の増幅産物のシーケンス結果によって確認された。

考 察

C. cayentanensis が 1994 年に新種として記載されて以来²⁾, 本原虫が *Cyclosporida* spp. のような人獣共通感染症である可能性は常に議論されてきた。現在, 本原虫がヒトのみを宿主とされているのは, 1999 年にハイチのサイクロスポーラ流行地域で実施されたブタ, ウシ, ウマ, ヤギ, イヌ, ネコ, モルモット, ニワトリ, アヒル, ハトを含む総数 327 サンプルの解析において, サイクロスポーラが検出されなかったという Eberhard らの報告をベースとし³⁾, 他のリザーブ探索のトライアルがこの知見を支持してきたことによる。しかし, 同年に同じく Eberhard らはエチオピアにおいて African green or velvet monkey, colobus monkey そして olive baboon の 3 種の霊長類から, *C. cayentanensis* と形態的に鑑別不可能な *Cyclospora* spp. を見出し, 遺伝子解析での *C. cayentanensis* との違いを理由に, それぞれに *C. cercopitheci*, *C. colobi*, *C. papionis* と新種名を提案した⁴⁾。これらの *C. cayentanensis* 近縁種の存在は, 2001 年の続報⁵⁾, さらに 2004 年の Legesse らの報告によって支持され⁶⁾, まず間違いないものと考えられるが, ヒトから分離され形態的観察で *C. cayentanensis* とされてきたこれまでの臨床検出例に, 果たしてこれらの *C. cayentanensis* 近縁種が含まれるか否かは, 分子疫学的なアプローチによる報告がわずかである現状では不明である。

この点を評価していく上で, 今回評価を行った 18S rRNA 遺伝子をターゲットとした 1st PCR プライマーセットによる増幅産物は, その塩基配列内に上記の *Cyclospora* spp. および *Eimeria* spp. のすべてを鑑別可能な変異を含むことから, 種鑑別の上で非常に有用な検査法と考えられた。しかしながら, 2nd multiplex PCR による種特異的な鑑別は, *C. cayentanensis* と上記の 3 種の *C. cayentanensis* 近縁種および *Eimeria* spp. のみを特異的に検出可能であり, おそらく存在するであろう上記 3 種以外の *C. cayentanensis* 近縁種を見逃す危険性がある。つまり, 臨床から分離されるサイクロスポーラにおける *C. cayentanensis* 近縁種の存在を確実に検出するためには, 1st PCR による増幅産物の全長配列決定が必須

である。

結 語

本研究によって評価した Multiplex-PCR 法の 1st PCR による増幅産物 (636bp) のシーケンス配列決定によるサイクロスポーラ検出は、臨床検体からの検出法としても、また、分子疫学的なシーケンスデータ収集法としても応用可能な優れた方法と考えられた。

文 献

- 1) Orlandi, P. A. *et al.* (2003) : Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*, 69 (8), 4806-4813.
- 2) Ortega, Y. R. *et al.* (1994) : A new coccidian parasite (Apicomplexa : Eimeriidae) from humans. *J Parasitol*, 80 (4), 625-629.
- 3) Eberhard, M. L. *et al.* (1999) : Survey for *Cyclospora cayentanensis* in domestic animals in an endemic area in Haiti. *J Parasitol*, 85 (3), 562-563.
- 4) Eberhard, M. L. *et al.* (1999) : Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys : *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg Infect Dis*, 5 (5), 651-658.
- 5) Eberhard, M. L. *et al.* (2001) : A survey for *Cyclospora* spp. in Kenyan primates, with some notes on its biology. *J Parasitol*, 87 (6), 1394-1397.
- 6) Legesse, M. *et al.* (2004) : Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Trop*, 90 (3), 231-236.

特

集

Gastrointestinal
Research

消化管寄生虫症の最近の話題

クリプトスポリジウム症

所 正治* 井関基弘*

Summary

日和見感染症の、また旅行者下痢症の起原虫として重要な病原性腸管内寄生原虫であるクリプトスポリジウムの研究は、分子疫学的な遺伝子型解析によるさまざまな報告の増加と、ゲノムプロジェクトによって見出された原虫の代謝経路の知見の蓄積によって、これまでには想像もできなかった幅広いアプローチによる、宿主特異性・病原性と遺伝子型との相関解析や、ラショナルドラッグデザインによる薬剤開発のための研究を可能にしはじめた。これらの知見にもとづく臨床での応用が可能な分類体系の構築および治療薬の開発は、今後の課題である。

Key words

腸管寄生原虫 遺伝子型解析 代謝解析 ラショナルドラッグスクリーニング

はじめに

病原性腸管寄生原虫クリプトスポリジウムは、経口摂取されたオーシストから脱囊したスポロゾイトが小腸の絨毛上皮細胞内に寄生することによって激しい下痢症を引き起こす。旅行者下痢症の原因原虫として、また感染源であるオーシストが通常の塩素殺菌に対して強い耐性をもっていることから、水道水汚染による集団下痢症の原因としても知られている。大規模なアウトブレイクとしては、日本国内では1996年に埼玉県越生町において発生した約9,000人の感染が、また海外では1993年の米国ミルウォーキーでの約40万人の感染が知られている。感染症新法の5類、全数把握届出疾患である本原虫症のわが国での届け出人数

は、2002年(108人)、2003年(8人)、2004年(91人)、2005年(9人)とわずかである。しかし、本原虫は通常の検査項目には含まれず、しかも健常人では1週間~10日ほどで自然治癒をみることから、ほとんどの症例が感冒性腸炎などとして見過ごされている可能性がある。実際、当教室における先天性免疫不全症例(低 γ グロブリン血症、高IgM症候群など)における年余にわたる慢性下痢症での糞便検査においては、本原虫がしばしば検出され、未診断のままに経過している本原虫症は、わが国においても少なくはないものと考えられる。

一方、クリプトスポリジウム症は、AIDS、移植手術後、抗癌剤治療時などの免疫不全状態の宿主においては、慢性化、重症化し、時に死の転帰を取りうる危険な日和見感染症でもある。Highly

*TOKORO Masaharu, ISEKI Motohiro/金沢大学大学院医学系研究科寄生虫感染症制御学

表 1. クリプトスポリジウムにおける遺伝子型同定法一覧

| ターゲット遺伝子 | 適用 |
|---|---------------|
| <ul style="list-style-type: none"> ・ 18 SrRNA ・ Hsp 70 ・ COWP ・ β-Tubulin ・ ポリスレオニン T ・ アクチン | 種および遺伝子型鑑別 |
| <ul style="list-style-type: none"> ・ 60 kDa グリコプロテイン ・ Microsatellites ・ 核外二重鎖 RNA | 遺伝子型内のサブタイプ鑑別 |

Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) 以前の調査結果だが、AIDS 患者において診断される 2 番目に多い日和見感染症として、その死亡率が他の感染症に罹患した患者と比較して 2 倍以上であると報告され¹⁾、クリプトスポリジウムは AIDS 診断の指標疾患でもある。AIDS における本症の危険性は、前記のミルウォーキーにおけるアウトブレイク後の 2 年間に約 400 人の AIDS 患者らが死亡したと報告されたことにも示されている²⁾³⁾。このように、免疫不全に合併するクリプトスポリジウム症では死亡が少ないが、その理由は何よりも治療薬が存在しないことにある。病期短縮の効果が認められるとされる paromomycin, アジスロマイシン, また 2005 年 6 月に米国食品医薬品局 (米国 FDA) によって抗クリプトスポリジウム薬として認可された nitazoxanide などが治療には用いられているが、いずれも免疫不全症例での効果は未確定であり、しばしば予後は不良である。したがって、AIDS におけるクリプトスポリジウム症に関しては、HAART による原疾患の治療がこれまでのところ唯一最善の方法とされている⁴⁾。このように、本原虫症については多くの課題があり、その解決に向けたさまざまな研究が進められている。

そのなかから本稿では、遺伝子型解析を中心とした分子疫学、および、ゲノムプロジェクトによ

って明らかになってきた本原虫の代謝経路にもとづく創薬のアプローチに的を絞って概観する。

1 分子疫学

1) 遺伝子型同定法

クリプトスポリジウムには多くの種および遺伝子型が報告されているが、形態的には鑑別不可能なものも多く、浄水・環境水および臨床糞便検体のオーシストからの種の同定には、おもにジェノミック DNA をテンプレートとした PCR アンプリコンの制限酵素処理断片サイズの解析 (restriction fragment length polymorphism: PCR-RFLP) 法およびシーケンス法が用いられている。また、リアルタイム PCR を用いたより高感度な方法、さらに各種および遺伝子型内での亜型を検出するより解像度の高いいくつかの方法も報告されている (表 1)。これまで用いられてきたターゲット遺伝子はアセチル CoA シンターゼ遺伝子⁵⁾、熱ショック蛋白質 (heat shock protein 70: Hsp 70)⁶⁾、オーシスト壁蛋白 (*Cryptosporidium* oocyst wall protein: COWP) 遺伝子⁷⁾、小亜粒子リボソーム RNA (small subunit of ribosomal RNA: SSUrRNA) 遺伝子⁸⁾、ポリスレオニン T (polyT) 遺伝子⁹⁾などであるが、これらのターゲット遺伝子のなかでは、とくに 18 S ribosomal RNA (SrRNA) 遺伝子、COWP 遺伝

子について多くのリファレンスが報告され、ほぼすべての種と遺伝子型の鑑別が可能であり、事実上のスタンダードとなっている。しかし、これらの方法には問題点も指摘されている。従来、クリプトスポリジウム感染においては、異なる遺伝子型(種)間の混合感染は、非常にまれであるとされてきた。この点は、宿主特異性の差異により混合感染の場合でも宿主内で1種のみが選択的に定着する可能性とともに¹⁰⁾、上記標準法による遺伝子型決定がユニバーサルプライマーを用いた nested PCR 法を用いているために、DNA サンプル中の混合感染の検出にバイアスのかかっている可能性が指摘されている。また、より高感度なりアルタイム PCR を用いた方法では混合感染の検出率を 30%以上とした報告もあり、この点については今後の詳細な検討が必要である。

2) クリプトスポリジウムの疫学

表 2¹¹⁾に、ヒト由来のクリプトスポリジウムの種および遺伝子型の集計を示す。ヒトから検出されるクリプトスポリジウムは、おもにヒトのみに感染する *Cryptosporidium hominis* (宿主特異性の違いから 2002 年 12 月に別種として確立、従来の *C. parvum* genotype 1, あるいは human genotype) と、幅広い哺乳類を宿主とする人獣共通感染症型の *C. parvum* (genotype 2, bovine genotype) の 2 種であり、健康人の症例では 97%以上が、また免疫不全症例においても 80%以上が上記 2 種によって占められる¹¹⁾。その他、現在までに命名されているクリプトスポリジウムとその宿主は *C. meleagridis* (トリとおそらく哺乳類), *C. muris* (マウス), *C. canis* (イヌ), *C. felis* (ネコ), *C. bovis* (ウシ), *C. andersoni* (ウシ), *C. suis* (ブタ), *C. wrairi* (モルモット), *C. baileyi* (ニワトリ), *C. serpentis* (ヘビ), *C. saurophilum* (トカゲ), *C. molnari* (海産魚), *C. galli* (ニワトリ, フィンチ) など 13 種もあり、これらについてもヒトへの感染性の有無が問題とされてきた。

表 2. クリプトスポリジウムの遺伝子型
同定報告にみる種および遺伝子型
(1999~2004)

| 種および遺伝子型 | 報告数 (%) | |
|-----------------------|-------------|-----------|
| | 正常人 | 免疫不全 |
| <i>C. hominis</i> | 1,798 (51%) | 140 (23%) |
| <i>C. parvum</i> | 1,606 (46%) | 341 (57%) |
| <i>C. meleagridis</i> | 36 (1%) | 64 (11%) |
| <i>C. felis</i> | 11 (0.3%) | 33 (6%) |
| <i>C. canis</i> | 12 (0.3%) | 15 (2%) |
| <i>C. muris</i> | — | 3 |
| <i>C. suis</i> | — | 1 |
| cervine genotype | 9 (0.2%) | — |
| monkey genotype | 2 | — |
| 総計 | 3,496 | 597 |

(Caccio SM *et al.*, 2005¹¹⁾より改変引用)

表 2¹¹⁾に示したように、*C. meleagridis* をはじめいくつものクリプトスポリジウムは明らかにヒトへの感染性を示し、それ以外でも、とくに免疫不全のヒトにおいては、ヒト以外の生物に宿主特異性をもつクリプトスポリジウムの感染が無視できないことが判明してきた。分子生物学的な手法を用いた種および遺伝子型の同定は、このように多様なクリプトスポリジウムのヒトへの感染性や病原性の評価を進めていくうえで非常に重要なツールであり、またヒトのみを宿主とされている *C. hominis* のリザーバとなりうる他種生物の探索、アウトブレイクにおける感染経路同定など疫学的にもクリプトスポリジウム研究においては欠かせないアプローチである。

2 | 創薬

1) 薬剤スクリーニング

1976 年に最初のヒト感染症例が報告¹²⁾されて以来、既存薬を含む数百を超える薬剤によって抗クリプトスポリジウム作用が解析されてきた。しかしながら、薬剤への高い抵抗性の故に「natural drug resistant」とも称されるクリプトスポリジウ

ムによる下痢症を完治する薬剤は現在まで見出されていない¹³⁾。一方、既存薬のスクリーニングにクリプトスポリジウムの代謝経路の知見を組み合わせたラショナルドラッグスクリーニングおよび新薬開発のためのラショナルドラッグデザインのアプローチは、2004年の *C. parvum*¹⁴⁾、*C. hominis*¹⁵⁾のあいつぐゲノムプロジェクトのデータ開示によって現実的な研究手法となってきた。

2) クリプトスポリジウムの細胞内オルガネラ構成と代謝経路

C. parvum と *C. hominis* は、ゲノムレベルで非常に相関性が高く(約 95~97%)、主要代謝酵素において片方の種のみ欠損を示すものは知られていない。そこで、ここからは両者をまとめて話を進めることとする。クリプトスポリジウムは、トキソプラズマやマラリア原虫とともに紅色植物の葉緑体由来とされるアピコプラスト (apicoplast) をもつアピコンプレクサ門に分類されている。ところが、クリプトスポリジウムには、アピコプラストが存在しない。核内遺伝子にコードされたいくつかのアピコプラスト遺伝子が残存しており、このことからクリプトスポリジウムにおいてはアピコプラストは二次的に失われたと考えられている。一方、ミトコンドリアについては、ミトコンドリア DNA が存在せず、TCA サイクル、酸化リン酸化も存在しないため、クリプトスポリジウムはミトコンドリアをもたない原虫に分類されてきた。しかし、シャペロニン 60 の局在する痕跡的な細胞内オルガネラが確認され、また、鉄硫黄クラスターの生合成関連酵素、オルタナティブオキシダーゼ (AOX)、ピルビン酸：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADP⁺)、オキシドレダクターゼなどの存在が報告されるにおよび、このミトコンドリア痕跡器官は何らかの生理的機能をもつものと考えられるようになってきた¹⁶⁾。また、細胞内寄生原虫であるクリプトスポリ

ジウムは、寄生適応に伴い多くの *de novo* 代謝経路を喪失し、核酸生合成経路、アミノ酸生合成経路はともにもたない。

3) 薬剤ターゲット

薬剤開発のターゲットとしては、これらの細胞内オルガネラの特異な構成、核酸やアミノ酸代謝の多くのステップの欠損とこれらのエッセンシャルな生体材料の取り込みが必須である点は、非常に重要である。たとえば、AOX については、詳細な酵素学的解析とともに、SCID マウスを用いた *in vivo* で薬剤評価のトライアルも実施されており、有効な薬剤シーズが報告されている¹⁷⁾。また、クリプトスポリジウムにおける含硫アミノ酸代謝経路は、ヒトに存在するシステイン合成経路、メチオニンリサイクル経路をともに喪失している。このことから、これらの基質のトランスポーター、関連代謝経路の阻害は、幅広い関連代謝によって厳密な細胞内基質濃度の制御をおこなっている哺乳類と比較して、クリプトスポリジウムにより大きなダメージを与えうる可能性がある¹⁸⁾。そこで、われわれは含硫アミノ酸およびプリン代謝経路をターゲットとした抗クリプトスポリジウム薬剤開発のアプローチを進め、いくつかの創薬シーズを見出している。

その他のクリプトスポリジウムに特異な代謝経路としては、アグマチンを中間代謝産物とするユニークなアルギニン脱炭酸酵素によるポリアミン生合成経路が注目されてきたが¹⁹⁾、いまだ薬剤シーズは報告されていない。また、デヒドロ葉酸還元酵素に着目した抗葉酸剤の試みではクリプトスポリジウムの抗葉酸剤耐性が確認されたが、この事実は、細菌などとは異なるクリプトスポリジウムのチミジル酸合成-デヒドロ葉酸還元酵素 (thymidylate synthase-dihydrofolate reductase) の特異性を示している²⁰⁾。また、アピコンプレクサ門では通常アピコプラストに存在する脂肪酸合成 (タイプ II) が、アピコプラストを欠損す

るクリプトスポリジウムでは細胞質内の脂肪酸合成(タイプ I)として保持されている点や²¹⁾, 形態的にはゴルジ装置がみられないものの, 小胞体分泌関連の遺伝子群 (NSF/SNAP/SNARE/Rab)が見出されたことなど¹⁵⁾, クリプトスポリジウム独自のメカニズムを示唆する事実は多く, 今後の詳細な研究による解明を待たれている。

おわりに

クリプトスポリジウムにおいては, 継代を可能とする培養系が確立されていないために, 栄養型からの精製蛋白質を用いた酵素学的解析や, 薬剤作用による細胞質中の中間代謝産物量の定量といった, ほかの細菌や原虫類であまりまへのように実施されている研究アプローチをとることが非常に困難であり, 研究上の大きな障害となってきた。しかしながら, 本稿に示したように, 分子疫学, ゲノムプロジェクトの進展は, ラショナルドラッグデザインのアプローチとともにクリプトスポリジウム研究のための貴重な情報とツールを提供しはじめた。今後は, これらの成果をベースに本原虫に対する治療法を確立することをめざし, 研究を推進していきたいと考えている。

文 献

- 1) Colford JM Jr, Tager IB, Hirozawa AM *et al* : Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival. *Am J Epidemiol* 144 : 807-816, 1996
- 2) Vakil NB, Schwartz SM, Buggy BP *et al* : Biliary cryptosporidiosis in HIV-infected people after the waterborne outbreak of cryptosporidiosis in Milwaukee. *N Engl J Med* 334 : 19-23, 1996
- 3) Hoxie NJ, Davis JP, Vergeront JM *et al* : Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Public Health* 87 : 2032-2035, 1997
- 4) Petri WA Jr : Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 19 : 523-526, 2003
- 5) Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P *et al* : Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* 117 : 31-37, 1998
- 6) Morgan UM, Xiao L, Monis P *et al* : Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology* 120 : 457-464, 2000
- 7) Spano F, Putignani L, McLauchlin J *et al* : 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* 150 : 209-217, 1997
- 8) Xiao L, Morgan UM, Limor J *et al* : Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65 : 3386-3391, 1999
- 9) Carraway M, Tzipori S, Widmer G : 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, 1997
- 10) Akiyoshi DE, Mor S, Tzipori S : Rapid displacement of *Cryptosporidium parvum* type 1 by type 2 in mixed infections in piglets. *Infect Immun* 71 : 5765-5771, 2003
- 11) Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J *et al* : Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21 : 430-437, 2005
- 12) Nime FA, Burek JD, Page DL *et al* : Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70 : 592-598, 1976
- 13) Mead JR : Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist Updat* 5 : 47-57, 2002
- 14) Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S *et al* : Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304 : 441-445, 2004

- 15) Xu P, Widmer G, Wang Y *et al* : The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431 : 1107-1112, 2004
- 16) Henriquez FL, Richards TA, Roberts F *et al* : The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol* 21 : 68-74, 2005
- 17) Suzuki T, Hashimoto T, Yabu Y *et al* : Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum* : phylogenetic and therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 1044-1052, 2004
- 18) Nozaki T, Ali V, Tokoro M : Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv Parasitol* 60 : 1-99, 2005
- 19) Keithly JS, Zhu G, Upton SJ *et al* : Polyamine biosynthesis in *Cryptosporidium parvum* and its implications for chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol* 88 : 35-42, 1997
- 20) Atreya CE, Anderson KS : Kinetic characterization of bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase (TS-DHFR) from *Cryptosporidium hominis* : a paradigm shift for its activity and channeling behavior. *J Biol Chem* 279 : 18314-18322, 2004
- 21) Zhu G, Marchewka MJ, Woods KM *et al* : Molecular analysis of a Type I fatty acid synthase in *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 105 : 253-260, 2000

8

Biochemistry and Metabolism of *Toxoplasma gondii*

T. Asai and S. Tomavo

- 8.1 Introduction
- 8.2 Carbohydrate metabolism
- 8.3 Glycolipid anchors
- 8.4 Nucleotide biosynthesis

- 8.5 Nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase)
- References

8.1 INTRODUCTION

That *Toxoplasma gondii* and all other parasites of the phylum Apicomplexa reside and replicate exclusively within eukaryotic cells suggests that these parasites depend on the metabolism of their hosts and that they have evolved metabolic pathways reflecting their intracellular lifestyle. In addition, these parasites may display specific or alternate metabolism as documented by the recent discovery of novel metabolic pathways in the remnant and vestigial plastid (apicoplast) found in many apicomplexan parasites. Evidence for unique parasite metabolic pathways has direct implications for understanding the parasite's requirements for intracellular growth. Further, these pathways may provide unique targets for compounds designed to inhibit and eradicate infection caused by these important human and animal pathogens.

While targeting unique parasite pathways is an attractive strategy, in practice the procurement of enough pure parasites for biochemical study or purification of parasite components such as enzymes is extremely difficult. Biochemical and metabolic studies of *T. gondii* have also been difficult to execute because of continuous problems with contamination of parasite preparations with host-cell components. Accordingly, only a few studies of biochemistry and metabolism of *T. gondii* have been reported.

Recent advances in gene engineering technology and molecular biology, including the genome database projects, are clearing many obstacles. For instance, it is now easy to obtain a predicted amino acid sequence of an enzyme of *T. gondii* from the genome database (<http://www.ToxoDB.org/>). These data can be used to clone or synthesize the gene, and to produce a recombinant enzyme to characterize the enzyme. Bioinformatic schemes

for several metabolic pathways of *T. gondii* have been compiled and released to the public at the genome database.

This chapter discusses aspects of metabolism, including carbohydrate metabolism, glucose metabolism during tachyzoite–bradyzoite differentiation, glycolipid anchors, nucleotide biosynthetic pathways, and NTPase, a peculiar enzyme unique to *T. gondii* and the closely related parasite *Neospora caninum*. It will also focus on new insights into distinct metabolic pathways, their evolutionary roots, and their contribution to *Toxoplasma gondii* survival during intracellular development and differentiation. In addition to this chapter, metabolism of the apicoplast and mitochondrion is discussed in Chapter 9. Chapter 19 encompasses a comprehensive discussion of amino-acid and nucleotide pathways with comparison to other Apicomplexa.

8.2 CARBOHYDRATE METABOLISM

8.2.1 Developmentally regulated expression of amylopectin in *T. gondii*

One evolutionary hallmark of the close relationship between the photosynthetic micro-organisms and apicomplexan parasites is defined by the existence of a storage polysaccharide named amylopectin in the cytoplasm of some apicomplexans. Another reflection of this relationship is the presence of a vestigial plastid ‘apicoplast’, discussed in Chapter 9. In contrast to plants, which contain starch defined as a branched amylopectin and amylose in the chloroplasts, the encysted bradyzoite and sporozoite forms of apicomplexans such as *T. gondii* (Coppin *et al.*, 2005), *Eimeria* (Karkhanis *et al.*, 1993), and *Cryptosporidium* (Harris *et al.*, 2004) accumulate amylopectin, a polymer of linear glucose that is not present in *Plasmodia* and *Babesia* species. It has been speculated that the disappearance of amylopectin in *Eimeria* sporozoites resulted in the inability of the parasite to establish successful

infection in mice (Augustine, 1980; Nakai and Ogimoto, 1983). In *T. gondii*, the bradyzoites accumulate abundant amylopectin granules and numerous micronemes. In contrast, the tachyzoites lack amylopectin, and fewer micronemes are present (Figure 8.1). Amylopectin is probably consumed when the encysted and dormant bradyzoites switch into the rapidly replicating tachyzoites. It is postulated that amylopectin provides an energy source, as its degradation to glucose can provide metabolic intermediates or substrates for glycolysis or mitochondrial oxidative phosphorylation.

8.2.2 *T. gondii* displays a uniquely simple pathway for amylopectin synthesis

Using bioinformatic searches, several gene candidates encoding enzymes that are probably involved in amylopectin biosynthesis were identified (Coppin *et al.*, 2005). These putative enzymes can be grouped in two classes:

1. Enzymes that are involved in amylopectin synthesis, such as amylopectin synthase, branching enzymes, UDP-glucose pyrophosphorylase, isoamylase, indirect debranching enzyme, α -1,4-glucanotransferase, and glycogenin
2. Enzymes for amylopectin degradation, like α -amylase, dikinase or R1 protein, phosphorylase, and α -glucosidase. Based on the presence of these enzymes, metabolic pathways and enzymes involved in amylopectin synthesis in *T. gondii* are probably similar to those of starch synthesis in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 8.2).

Surprisingly, all of these genes are present in *Toxoplasma* genome as a unique copy, suggesting that redundant genes are not required for the synthesis of a genuine crystalline amylopectin in this protozoan parasite (Ball and Morell, 2003; Coppin *et al.*, 2005). This is in violation of the current dogma that suggests that redundancy of genes is required to build a crystalline starch in plants. Even in the simplest unicellular picophytoplanktonic green algae, *Ostreococcus tauri*, there is multiplicity

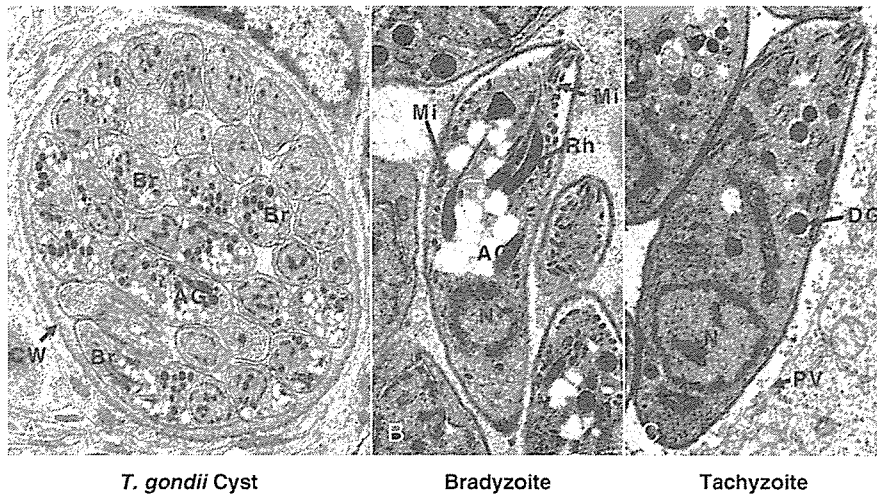


FIGURE 8.1 Transmission electron micrographs of bradyzoites (Br) within a tissue cyst (A). Note the presence of the cyst wall (CW) and numerous amylopectin granules (AG) in the cytoplasm of the bradyzoites. Panels B and C shows a higher magnification of ultrastructural morphology of bradyzoite and tachyzoite which lacks amylopectin granules. Rh, rhoptry; DG, dense granules; Mi, micronemes and M, mitochondrion; N, nucleus; CW, cyst wall; PV, parasitophorous vacuole. This figure is reproduced in color in the color plate section.

of genes and redundancy of isoenzymes involved in starch synthesis (Ral *et al.*, 2004).

Only UDP-glucose pyrophosphorylase and UDP-glucose utilizing amylopectin synthase are found in *T. gondii*. Comparative genomic analyses involving the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki *et al.*, 2004), the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and the bacteria *Escherichia coli* revealed that both *C. merolae* and *T. gondii* contain a UDP-glucose utilizing glycogen (starch) synthase-like sequences and glycogenins. These enzymes are specific for the eukaryote UDP-glucose based pathway. In addition, UDP-glucose utilizing glycogen synthase activity has been detected in the crude extract from *T. gondii* while only ADP-glucose dependent activity is present in *Chlamydomonas* lysates (Coppin *et al.*, 2005). *T. gondii* also contains an indirect debranching enzyme, a bifunctional enzyme that carries both α -1,4-glucanotransferase and amylo-1,6-glucosidase activities in fungi and animals (Figure 8.2).

However, the characteristic most typifying the amylopectin biosynthetic pathway in *T. gondii* is the presence of genes that are of plant origin. Among the genes that distinguish plant starch metabolism from those of the animal, fungal, and bacterial glycogen pathways are the isoamylase and R1 (glucan water dikinase activity)-like sequences in *T. gondii*. This suggests that both plant- and animal-like amylopectin biosynthetic pathways are required for the synthesis of crystalline amylopectin in the parasite (Figure 8.2).

8.2.3. Evolutionary origins of enzymes of amylopectin biosynthesis

Both plant- and animal-like metabolisms are probably involved in amylopectin biosynthesis in *T. gondii*. This is likely a signature of the evolutionary origin of apicomplexan parasites. These parasites contain a vestigial plastid 'apicoplast' that is derived from a secondary endosymbiosis with the engulfment of a unicellular algae (McFadden *et al.*,