

採取した表流水 10 L をメンブランフィルター法でろ過し、濃縮、シヨ糖遠心浮遊法および免疫磁気ビーズ法で原虫を精製した。これを Tris-EDTA buffer + 10% SDS 中で 37°C 24 時間 処理し、PCI 処理およびエタノール沈殿にて DNA 試料を調整した。ジアルジアに関しては glutamate dehydrogenase (GDH) 領域 small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 領域を nested-PCR により増幅し、またクリプトスポリジウムに関しては Polythreonine 領域を PCR により増幅し、遺伝子解析を行なった。

C. 結果

C-1 国内外のクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症の統計調査

感染症対策の大きな柱として、近年、主要な感染症を notifiable infectious diseases と位置づけ、公衆衛生上その動向を正確に監視し把握するサーベランスに対する努力が世界的には行われている。国によりどの疾患をその対象にするか、またデータの質的な違い、例えばある病気の統計データに関して有症者のみとするか、あるいは不顕性感染者も含めるかは異なっており、また、診断基準に求められる検査法の種類(虫体、DNA、抗原あるいは抗体、どの方法で何を対象に検出するか)も異なっているのが現状で、国際的基準で統計が出されている訳ではない。しかしながら、各国の感染症発生動向を掴む上では、web 上での公表データという利点も考慮すれば、非常に有用な情報ソースとなっている。

web 上での公開情報を材料に、現在までに調べることのできた範囲でみると、北米、欧州、オセアニア諸国でクリプトスポリジ

ウム症ならびにジアルジア症両疾患のサーベランスを行なう国が多く、一方アジアでは今後の問題となっている現状が示された(表-2)。これは、これらの欧米先進国において盛んな畜産業が感染リスクの一つとなっていること、また水系集団感染(飲料水、プール等)の発生も多く、公衆衛生上重要視すべき理由があるものと思われた。報告数で比較すると、国内ではクリプトスポリジウム症~12 case(集団感染時があった場合は約 100 例に達する)/年、ジアルジア症 80~140 case/年であるのに対し、国外では国による差が大きいが、クリプト症最多は米国、英国の 3,000~6,000 case/年、ジアルジア症は米国の 19,000~21,000 case/年で国内状況との著しい差が見られた。米国ではクリプトスポリジウム症の場合、顕微鏡検査による虫体の証明に加え、ELISA 等による免疫学的手法による抗原検出、また組織学的検索による虫体の証明が診断基準となっており、これらの基準で診断された有症者および不顕性感染者も統計に表れてくる。またジアルジアの場合は、例えば集団感染で下痢症を呈し実験室診断されてはいなくても、実験室診断で確定されたケースに関連したことが判明すれば probable case として統計に表れる。一方、我が国では診断基準が両疾患において有症者に限られ顕微鏡的に原虫が証明された確定症例のみが統計に表れる点で、米国とは大きく異なっていた。北欧諸国は報告数で比較すると我が国に近い状況であったが、10 万人あたり報告数では、我が国の場合クリプト症がほぼ 0.01、またジアルジア症が 0.1 と最低であり、北欧諸国との間でもその数十倍の差が認められた(表-3)。10 歳以下の低年齢児におけ

る報告の割合が、諸外国ではおよそ30%以上であるのに対し、我が国では数%である点も顕著な差であった(表-4)。年齢分布をグラフ化すると我が国の特徴は明らかで、両疾患とも20-30歳にピークが現れた。これは諸外国の年齢分布と比較すると、10歳以下の低年齢児における報告が統計上ほとんどないことが明確であった(図-1)。

C-2 免疫クロマト法による原虫症の迅速検査

1) 原因不明とされた下痢症検体におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジア検出結果

感染性胃腸炎と診断され愛媛県衛生研究所搬入後、ウイルス及び細菌のいずれも検出されなかった、いわゆる原因不明下痢症と判断された検体における免疫クロマト検査の結果を表-5 および6に示した。2004年分として調べることが可能であったのは129検体で、年齢分布は1ヶ月~30歳代にわたったが、ピークは1~2歳にあり、10歳以下が全体の91.5%を占めた。即ち小児下痢症集団を対象とした検査と考えられた。2004年の検体に関しては、既にPCRによる検査でジアルジアが1例検出されている(烏谷ら、2005)。本症例は3歳男児で11月に発症していることが判明している。免疫クロマト法により新たに検査を行なった結果では、PCR陽性であったこの症例において改めてジアルジアが検出されたことに加えて、11歳女児の検体(4月に発症)においてもクリプトスポリジウム感染が1例検出された。本症例はPCR検査では陰性であったが、免疫クロマト法陽性の結果を受け、改めて蛍光抗体染色法で顕微鏡的に調べたところ、クリプトスポリジウムのオー

シストが確認された。2004年の免疫クロマト検査による原虫検出率としては、129検体に対し1.6%(2/129)という結果となった。次に、2007年は98検体が検査可能であり、年齢分布は1ヶ月~30歳代、ピークは2007年と同様1~2歳にあり、10歳以下が全体の93.9%を占めていた。2007年の検体に関しては免疫クロマト法に先立ってのPCRによる検査は行なわれていない。免疫クロマト法により検査を行なった結果では、9歳男児の検体(2月に発症)でクリプトスポリジウム感染が1例検出された。免疫クロマト法陽性の結果を受け改めて蛍光抗体染色法で調べたが、顕微鏡的にクリプトスポリジウムのオーシストを確認することはできなかった。また同検体に対しPCRを行なったが、結果は陰性であった。2007年の免疫クロマト検査による原虫検出率は、98検体に対し1.0%(1/98)という結果であった。2004年ならびに2007年の2年分の結果をまとめると、原因不明の検体総数227のうちクリプトスポリジウム陽性2例およびジアルジア陽性1例を検出し、原虫の検出率としては1.3%(3/227)となった。

2) 集団感染事例

表-7に結果を示した。*C. parvum* ヒト型(genotype1)感染による2004年長野集団発生事例に関して、患者発生地域の検査機関においてオーシストが確認された5検体を検査に供した。これらは顕微鏡的ならびにPCRにて陽性と判定されていた検体である。免疫クロマト法による検査の結果、これら5検体すべてにおいてクリプトスポリジウムが検出された。また極めて稀と考えられる*C. meleagridis*感染による2006年の愛媛集団発生事例に関しては、顕微鏡的にオー

シストが確認可能であった3検体を検査に供した。このうちオーシスト数が多く、18S rRNA領域のnested PCRで陽性と判定された1検体は、免疫クロマト法においてもクリプトスポリジウムが検出された。一方、オーシスト数がかなり少なくPCRでは陰性であった2検体については、免疫クロマト法においても結果は陰性であった。

3) 免疫クロマト法の感度の検討

前年度の試験では不明であった *C. parvum* 動物型 (genotype2) に対する免疫クロマト法の反応性を調べた。クリプトスポリジウム感染マウスより採取直後の糞便ならびに下痢症状の子牛より採取した糞便の凍結保存試料を用いて試験を行なった結果を図-2に示したが、マウスならびに子牛由来の試料では、*C. parvum* ヒト型の検出の場合と同様、免疫クロマト法にて明確にクリプトスポリジウムが検出された。

また、オーシストが検出されない試料でも免疫クロマト法で陽性反応が出ることを実験的に検証するために、免疫クロマト法にてクリプトスポリジウム陽性となった長野集団発生事例の試料を用いて、まず1:4の割合で糞便を水で希釈した後12,000rpmで3分間遠心し、回収した上清を材料として原液あるいは100倍に希釈したものを免疫クロマト法で試験した。図-3に結果を示したが、回収した上清中にはオーシストは検出されないという条件を確認した上で試験を行ない、1/100に希釈した上清においても明確にクリプトスポリジウムが検出されるという結果が得られた。

C-3 北上川水系における原虫汚染状況調査

表-8に検出結果を示した。直接蛍光抗体法では60試料中11試料(18.3%)、4地点から、PCR法では18試料(30.0%)、全5地点から *Giardia* が検出され、

Cryptosporidium は両方法ともに検出されなかった。本流上流点および支流の試料においては、PCRによる *Giardia* 陽性数が蛍光抗体法による陽性数よりも増加したが、本流下流点では、蛍光抗体法陽性7試料中でPCR陽性であったのは1試料のみであった。本流下流域は近くに下水処理場があり、水質的な影響がPCRに現れた可能性が考えられた。蛍光抗体法による検出率が高かった本流下流側地点では、*Giardia* シストは12月から5月および8月の水位が低下した時期に検出された。DNA解析の結果、今回検出された *Giardia* は全て人獣共通感染性で宿主域の広い *G. intestinalis* の assemblage A であった。

D. 考察

国による診断基準、検査法の違いがあることを前提に、国内と国外におけるクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症の発生動向を比較した。専ら欧米諸国との比較に限定されるが、上下水道の整備、保育所等の利用、夏場の水遊び等、生活様式あるいは生活習慣は我が国と欧米諸国との間には大差がないと考えられる中で、統計上大きな差が見られた。その原因としては、1)国内下痢症における寄生虫学的検査が十分に行われないという検査体制の不備、および2)実際に国内の発生状況は国外に比較して低く維持されている可能性、の2点に大別されると考えられる。1)に関しては現在の診断基準に定められている虫体の顕微

鏡的検出法が一般的な検査室で可能とはいわがたく、ウイルス・細菌が陰性と判断された場合は原因不明として病原検索が終了してしまう現状が指摘される。MGL法と直接蛍光抗体染色法を組み合わせた検出法は、蛍光顕微鏡を要し、また抗体検査キットのコストがかかるという欠点があるものの、現在最も信頼性が高い方法と考えられ一般検査室への導入が進めば検出率向上につながる事が予想される。また他国と同様に抗原検出等、より簡便な他の検査法の利用も検討すべき点と思われる。2) に関しては、現状における判断は難しく、両疾患の感染率に関する積極的な調査研究からデータを積み重ねていくことが必要である。ジアルジアに関しては、終戦後の調査で全国的に一般人の2~9%という高い感染率が見られたが(亀谷、1965)、その後の調査は下痢症を対象としたもので1998年~2001年にかけての高知県内病院における調査(1,790名対象)で検出率0.95%を認めている(森本ら、2003)他、1996年~2000年にかけての感染性腸炎研究会による調査(4,273例対象)で1.1%の検出率を認めている(小花ら、2002)。クリプトスポリジウムに関しては、先述の感染性腸炎研究会の調査で検出率0.07%、1990年~2000年にかけての都内病院における調査(1,257例対象)で検出率1.8%(増田、2001)という報告がある。

国内の発生動向における顕著な特徴として、10歳以下の低年齢層における感染が発生していないことが示された。欧米諸国では、従来言われているようにクリプトスポリジウムならびにジアルジア症は小児下痢症の主要な原因となっており、それが統計にも表れている。我が国程度に報告数の

少ない北欧諸国でも状況は同じであり、人口からみた発生率は我が国より高い。即ち、発生率の低さ、とりわけ低年齢層における発生数の少なさは我が国特異的な状況となっている。従って、国内の現状を正確に把握しようとするれば、この低年齢層における実態を明確にすることが大きな課題となると考えられる。本研究ではその端緒として、国内感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の対象が専ら小児下痢症となっており、かつその中で原因不明の症例が50%程度になることが知られていることから、この原因不明症例を対象とした原虫検索を試みた。また、新たな検査法の試みとして簡便かつ迅速な検査が可能な免疫クロマト法を導入し、検査法としての有用性も併せて評価した。

今回調べた原因不明の検体総数227のうち、クリプトスポリジウム陽性2例およびジアルジア陽性1例を検出し、原虫の検出率としては1.3%という結果が得られ、原因不明とされる試料の中に原虫が検出されること、また、統計で表れている以上の発生例が実際には低年齢層に存在することが示唆された。低年齢層における近年の調査データとしては、1964年の堀による関東地方における一般住民を対象とした調査結果(堀、1965)として、10歳以下の子供355名に対しジアルジア1.1%の検出率が報告されて以後、年齢分布データのある報告においては10歳以下の感染例を示すものではなく実態は不明である。今回の結果を踏まえれば、全国的な低年齢層の感染実態把握の必要性が指摘される。

発生動向調査における迅速探知を担保できるような検査法として、今回免疫クロマ

ト法を導入したが、実際の発生動向調査に用いられる試料、さらに集団発生に関連する試料に対して従来の顕微鏡あるいはPCR法に比較して十分な検出力を有しているものと考えられた。クリプトスポリジウム陽性試料に関して顕微鏡およびPCRで陰性となる試料があったが、実験的にはオーシストが極めて少なく他の方法では検出限界以下となりうる条件でも、免疫クロマト法で検出可能ということが示された。これは本法が抗原分子に反応するという原理に基づいていることで解釈可能であり、検便による原虫の証明には通常2-3回の検査が必要とされることから抗原のみの陽性結果は合理的に説明される。検出可能な原虫の範囲は、ヒト感染例の知られる*C. parvum*のヒト型および動物型、ならびに*C. meleagridis*、また*Glambria*のAssem. A1、A2およびBすべてが検出可能であることから汎用性は高く、さらに検査室以外の臨床現場での診断にも適用可能であることから、免疫クロマト法の有用性は高いものと考えられる。コストの問題は残るが、場所を問わず迅速に結果を出すという情報の迅速探知能力には大きな価値があると思われる。

低年齢層の感染例が存在するという実態があるとして、そこで問題となるのはその感染源が何であるか、これを明らかにする必要がある。小児感染例の数が全体として僅かであるとしても、学童の感染が長野のプールを介した集団感染につながったこと、あるいは国外では児童福祉施設における集団感染が度々発生していることを考えれば、低年齢層に関連する感染源を明らかにし、感染リスクを低減させ流行を防止する対策をとることは重要である。現状では、成人

における性的接触感染を除き、海外渡航、接触感染（患者、感染した動物）、経口感染（汚染された水および食品の摂取）は低年齢層にも当てはまる。また感染の要因として、水遊び等は成人よりも大きな要素として考慮すべきかも知れない。河川の汚染状況は時期、場所によって変動があるものの、水系感染の主要な要因となるものである。今回行なった北上川の汚染調査では、ジアルジアの調査流域全体における汚染が確認されたが、流域周辺のニホンカモシカを含めて野生動物のジアルジア感染率はそれほど高くはないことから、ヒトや犬猫、ウシなどが汚染源になっている可能性が高いと思われた。採水地点の本流下流域は近くに下水処理場があり、高いシスト検出数が見られたことから、予想される高汚染域との接触を防ぐことは重要である。また夏場でも汚染があること、さらに検出されたジアルジアがヒト感染性の知られるAssem. Aであったことなど、水系環境を介したヒトへの感染にも注意の目を向けるべき点があることが示唆された。また発生動向調査からはウシとの接触が国内における主要な感染要因となっており、低年齢層で感染が発生した場合にはペット飼育、牧場体験等の動物との接触も重要な要因として検索すべきものと思われる。

E. 結論

クリプトスポリジウム症およびジアルジア症は、国内においては発生率の低い感染症ではあるが、感染リスクは存在し、集団感染へと拡大する可能性を潜ませる公衆衛生上問題となる疾患である。現状としては、国内の低年齢層における実態が不明なこと

が我が国の統計結果の解釈を難しくしており、適切な検査法に基づきこれらの疾患の発生動向を正確に把握する必要がある。これは他の AIDS 患者等リスクグループにもあてはまることであり、適確な実態把握により効率的な感染防止対策の策定が可能となる。その方法の一つとして、免疫クロマト法の有用性が本研究では示された。今後の研究としては、全国的な低年齢層における感染実態を究明することを主要課題として計画している。

F. 参考文献

小花光夫、相楽裕子、青木知信、金 龍起、滝沢慶彦、角田隆文、入交昭一郎、山下和予 (2002) 感染症腸炎の動向-1996～2000 年における感染性腸炎研究会の調査成績より、感染症学雑誌、76 : 355-368.

亀谷 了 (1965) 日本における人体寄生虫の浸淫および分布の概説、日本における寄生虫学の研究、森下薫ら編、第 5 巻、311-353.
烏谷竜哉、竹内潤子、泉山信司、奥山正明、高見俊才、大瀬戸光明、井上博雄(2005)感染性胃腸炎患者から検出された消化管寄生性

原虫の分子疫学的検討、平成 17 年度愛媛衛環研年報、8

堀 栄太郎 (1965) 関東地方における腸管寄生原虫の疫学的調査、寄生虫学雑誌、14 : 6-14.

増田剛太 (2001) 原虫性下痢症の発生動向、病原微生物検出情報、22 : 162-163.

森本徳仁、小松千津、片岡浩己、小倉克己、杉浦哲朗 (2003) 当院における *Giardia lamblia* の検出状況、臨床病理、51 : 633-636.

G. 健康危惧情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表-1、諸外国における notifiable infectious diseases 統計情報を公開する web サイト

国名	担当機関	情報ソース(URL)
Belgium	Science Institute of Public Health	http://www.iph.fgov.be/epidemiologie/index.htm
German	Robert Koch Institut	http://www.rki.de/cln_048/nn_196882/DE/home/homepage
Ireland	Health Protection Surveillance Center	http://www.ndsc.ie/hpsc/Notifiable_disease/
Scotland	Health Protection Scotland	http://www.hps.scot.nhs.uk/index.aspx
United Kingdom	Health Protection Agency	http://www.hpa.org.uk/infections/default.htm
Hungary	National Center for Epidemiology	http://www.oek.hu/oek.web?lang=eng
Czech Republic	National Institute of Public Health-Prague	http://www.szu.cz/cema/hpcema.htm
Croatia	Croatian National Institute of Public Health	http://www.hziz.hr/epidemiology/news/index.htm
Iceland	Directorate of Health	http://www.landlaeknir.is/pages/950
Finland	National Public Health Institute	http://www3.ktl.fi/stat/Database/TTRTen/TTRTen.asp?lang=1
Norway	Norwegian Institute of Public Health	http://www.msis.no/emsisexternalweb/
Sweden	Swedish Institute of Infectious Disease Control	http://www.smittskyddsinstitet.se/in-english/
Canada	Public Health Agency of Canada	http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/list_e.html
United States	Centers for Disease control and Prevention	http://www.cdc.gov/epo/dphsi/phs/infdis2007r.html
Malaysia	Disease Control Division, Ministry of Health	http://www.dph.gov.my/survelans/
Philippines	Department of Health	http://www.doh.gov.ph/research_statistics
Hong Kong	Center for Health Protection	http://www.chp.gov.hk/dns_submenu.asp?lang=en&pid=10&id=26
Korea	Korean Center for	http://dis.cdc.go.kr/Statistics/Statistics/info.asp
China	Chinese Center for Disease control and Prevention	http://www.chinacdc.cn/n272562/n276018/index.html
Japan	Infectious Disease Surveillance Center NIID	http://idsc.nih.go.jp/idwr/CDROM/Main.html
Australia	Australian Government Department of Health and Ageing	http://www9.health.gov.au/cda/Source/CDA-index.cfm
New Zealand	Institute of Environmental Science and Research LTD	http://www.surv.esr.cri.nz/index.php

表-2、各国の Nationally Infectious Diseases サーベランスの状況 (2000-2006)

国名	赤痢アメーバ症	クリプトスポリジウム症	ジアルジア症	マラリア
Belgium	○	○	○	
German		○	○	○
Ireland		○	○	○
Scotland		○	○	
United Kingdom	○	○	○	
Hungary	○			○
Netherland				○
Czech Republic				○
Croatia				○
Iceland	○		○	
Finland	○	○	○	
Norway			○	
Sweden	○	○	○	○
Canada	○	○	○	○
United States		○	○	○
Malaysia				○
Philippines				○
Hong Kong	○			○
Korea		○		○
Japan	○	○	○	○
Australia		○		○
New Zealand		○	○	○

○ サーベランスの対象となっている

表-3、(A)公表されている各国のクリプトスポリジウム感染報告数(2005年)

国名	報告数	国名	発生率*
United States	5,659	United States	1.93
United Kingdom	4,529	Australia	15.80
Australia	3,212	New Zealand	21.70
German	1,309	Canada	1.85
New Zealand	889	Ireland	14.60
Scotland	709	Belgium	3.40
Canada	575	Sweden	0.76
Ireland	570	Finland	0.27
Belgium	357	Japan	0.01
Sweden	69		
Finland	14		
Korea	1		
Japan	12		

*10万人あたりの報告数

(B) 公表されている各国のジアルジア感染報告数(2005年)

国名	報告数	国名	発生率
United States	19,733	United States	7.82
German	4,519	Canada	13.08
Canada	4,056	Belgium	13.70
United Kingdom	2,926	New Zealand	30.00
Belgium	1,435	Sweden	12.69
New Zealand	1,231	Finland	5.65
Sweden	1,149	Ireland	1.50
Norway	423	Japan	0.07
Finland	296		
Scotland	197		
Ireland	57		
Iceland	43		
Japan	86		

表-4、(A) クリプトスポリジウム感染者数に占める10歳以下の年齢層の割合 (2004-2006)

国名	2006	2005	2004
Australia	49.6	58.6	60.8
Belgium	34.7	32.9	32.5
Canada	未公表	未公表	45.4
Finland	16.7	35.7	21.4
Ireland	79.3	74.6	75.9
New Zealand	48.6	53.5	60
Sweden	25.1	12.9	25.4
United Kingdom	43.3	47.6	47.8
United States	未公表	24.3	16.5
Japan	未公表	0	31.5

(B) ジアルジア感染者数に占める10歳以下の年齢層の割合 (2004-2006)

国名	2006	2005	2004
Belgium	25	26	23.9
Canada	未公表	未公表	24.9
Finland	25	32.1	33.3
Ireland	27.7	24.6	28.3
New Zealand	29.2	26.7	27.7
Norway	32.7	24.8	9.1
Sweden	31.9	32.2	37.3
United Kingdom	16.2	15.2	16.5
United States	未公表	21.6	22.1
Japan	未公表	3.4	1.1

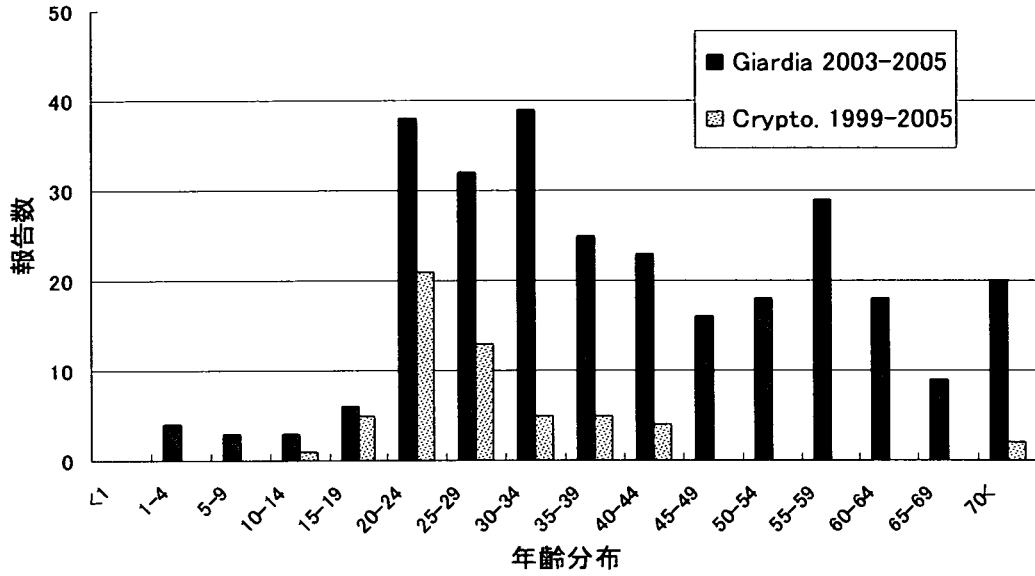
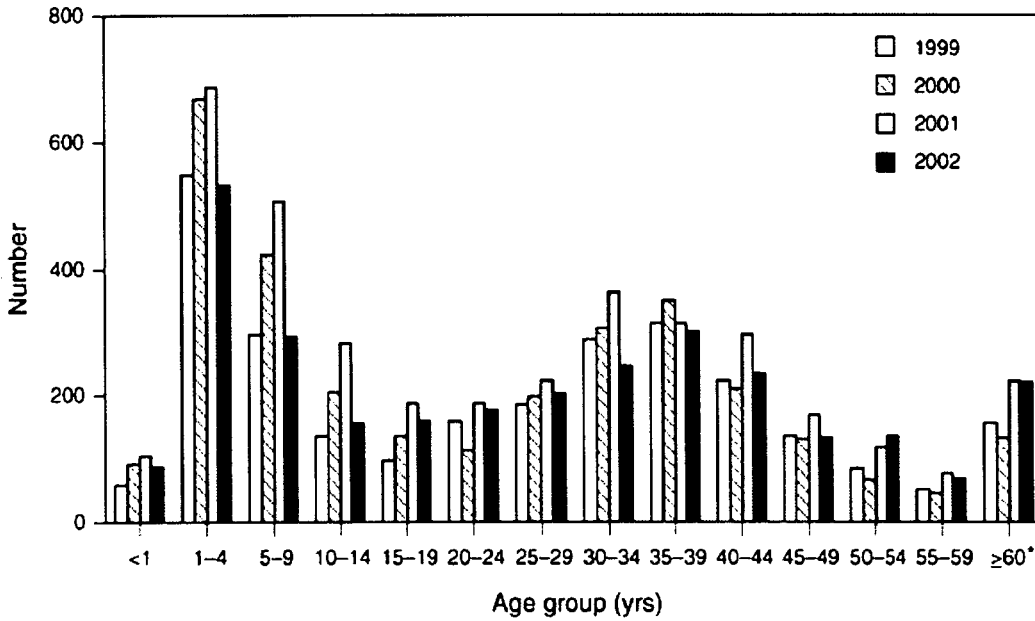


図-1、(A) 年齢階級別国内クリプトスポリジウム症報告数(1999-2005)およびジアルジア症報告数(2003-2005)
 クリプトスポリジウム症は集団感染事例関連を除く



(B) 年齢階級別および年別米国内クリプトスポリジウム症報告数(1999-2002)
 Surveillance Summaries, Cryptosporidiosis Surveillance—United States
 1999-2222, MMWR, 54, SS-1, 2005 より

表-5、原因不明下痢便試料からの原虫検出結果

2004 年分調査		検体数=129	
	PCR*	IC**	
Giardia 検出	1	1	3 歳男児、2004/11/20 発症、下痢・発熱(38℃)
Giardia 不検出	128	128	
Cryptosporidium 検出	0	1	4 歳女児、2004/4/1 発症、下痢・腹痛・発熱(38℃)
Cryptosporidium 不検出	129	128	
*PCR 法		**Immuno CARD STAT!	
Giardia: TPI gene			
Cryptosporidium: 18SrDNA			
2007 年分調査		検体数=98	
	PCR	IC	
Giardia 検出		0	
Giardia 不検出		98	
Cryptosporidium 検出	1 [§]	1	9 歳男児、2007/2/2 発症、胃腸炎・下痢症状
Cryptosporidium 不検出		97	

[§] Immuno CARD 検査後確認

表-6、原因不明下痢便試料の年齢別原虫検出結果

2004 年分		2007 年分	
IC 検査(N=129) 年齢分布		IC 検査(N=98) 年齢分布	
年齢	検査数	年齢	検査数
1-5 ヶ月	6	1-5 ヶ月	8
6-11 ヶ月	18	6-11 ヶ月	15
1 歳	15	1 歳	17
2 歳	13	2 歳	12
3 歳	16	3 歳	6
4 歳	17	4 歳	12
5 歳	9	5 歳	4
6 歳	10	6 歳	3
7 歳	5	7 歳	7
8 歳		8 歳	4
9 歳	5	9 歳	2
10 歳	4	10 歳	2
11 歳	3	11 歳	2
12 歳	4	12 歳	0
13 歳	1	13 歳	3
14 歳	1	14 歳	1
20 歳代	1	20 歳代	0
30 歳代	1	30 歳代	0

Giardia(+):3 歳

Crypto(+):11 歳

Crypto(+):9 歳

表-7、集団感染事例関連試料における免疫クロマト法の検出結果

事例	原因種	試料	顕微鏡検査	PCR	Immuno CARD
2004年 長野県 集団感染	<i>C. parvum</i> (ヒト型)	ST 1	+	+	+
		ST 2	+	+	+
		ST 3	+	+	+
		ST 4	+	+	+
		ST 5	+	+	+
2006年 愛媛県 集団感染	<i>C. meleagridis</i>	EH1	+	+	+
		EH2	+	-	-
		EH3	+	-	-

+: 検出 -: 不検出

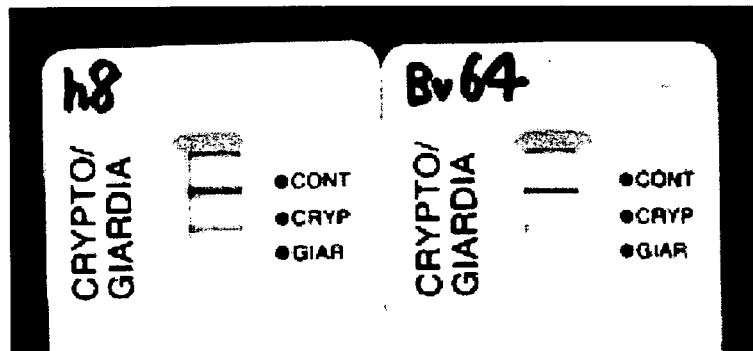


図-2、*C. parvum* 動物型 (genotype2) に対する免疫クロマト法の反応性
 左: 感染マウス糞便試料、右: 下痢症子牛糞便試料
C. parvum ヒト型同様、動物型も検出可能であった

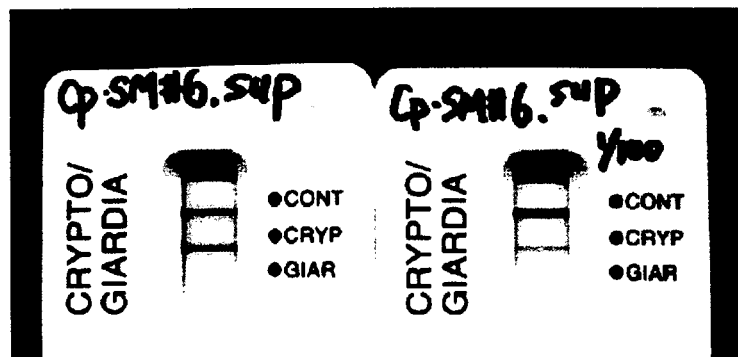


図-3、*C. parvum* ヒト型 (genotype1) を検出した糞便の希釈液上清 (オーシストを含まない) に対する免疫クロマト法の反応性
 左: 上清原液、右: 上清 100 倍希釈
 微量抗原の存在が検出可能であった

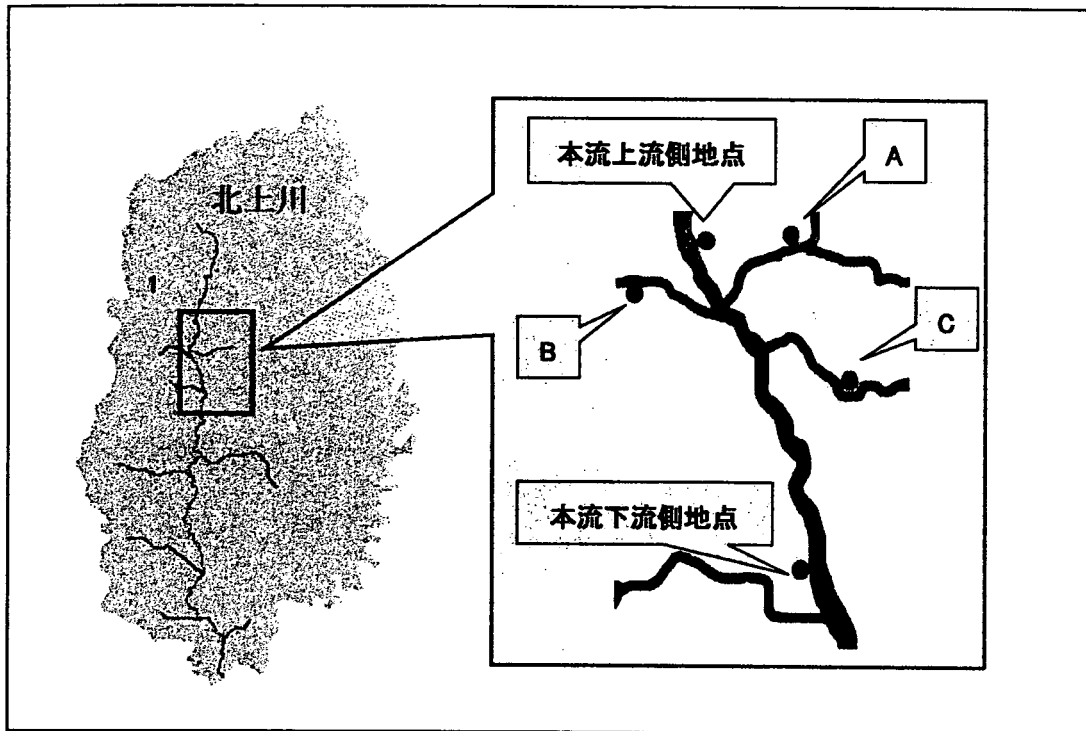


図-4、岩手県北上川の原虫調査地点
本流2地点と支流3地点を示す

表-8、各採水地点におけるジアルジア検出状況

採水地点	検出法	2004年(月)				2005年(月)								陽性	%	
		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8			
本流上流	蛍光抗体法	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8.3
	PCR法	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	4	33.3
支流 A	蛍光抗体法	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2	16.5	
	PCR法	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	4	33.3	
支流 B	蛍光抗体法				+									1	8.3	
	PCR法	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	5	41.7	
支流 C	蛍光抗体法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.0	
	PCR法	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	4	33.3	
本流下流	蛍光抗体法	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7	58.3	
	PCR法	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1	8.3	

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」

野外に生息するヘビにおける *Cryptosporidium* の保有状況 および遺伝学的手法を用いた検査法に関する検討

分担研究者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所微生物部

研究要旨

平成 13 年に兵庫県で発生したヘビ由来の *Cryptosporidium* による簡易水道の汚染事例から、ヘビにおける *Cryptosporidium* 感染状況を調査してきたが、本年度もさらに調査地域を拡大して、これまでに十分なデータがそろっていない東北地方（福島県）、北陸地方（福井県）および九州地方（長崎県および鹿児島県）のヘビの調査を実施した。ヤマカガシの *Cryptosporidium* 保有は福井県は 100%、福島県は 55.0%であったが、九州で捕獲された 17 匹のヤマカガシからは *Cryptosporidium* は検出されなかった。検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型は *Cryptosporidium*938 と一致した。

Cryptosporidium の調査研究において、遺伝子レベルでの様々解析が行われている。水試料の検査においても PCR を用いた報告が散見される。そこで、PCR 法について糞便検査および水試料での検査のそれぞれについて考察した。また、糞便からの *Cryptosporidium* の検出には種々の検査法が用いられるが、検出感度が高い上に誤判定が少ないとされている蛍光抗体法はわが国では現在検査室レベルで用いることができない。そこで、*Cryptosporidium* 検査法の問題点について、提言を行った。

A. 研究目的

水試料からの *Cryptosporidium* の検出は蛍光抗体染色と微分干渉装置付顕微鏡による内部構造の観察により行われている。この方法では水試料中の *Cryptosporidium* の存在を確認することはできるが、種や遺伝子型まで決定することはできず、そのため原水等を汚染している *Cryptosporidium* がヒトに病原性を発揮する種や遺伝子型であるかどうかの判定をすることはできない。そのため、例えばヒトに健康被害をもたらさない *Cryptosporidium* が原水や上水を汚染していたとしても、浄水場での処理を徹底

して行うことが求められ、さらに上水での汚染が明らかになれば水道法上は給水を停止しなければならない。実際に、平成 13 年に兵庫県山崎町で発生した簡易水道の *Cryptosporidium* 汚染事例では、試料水からオーシストが発見されたために給水が停止された。その後、試料から検出されたオーシストの遺伝子型を解析したところ、ヘビ由来の *Cryptosporidium* であることが明らかとなった。水源等での汚染防止のためには、汚染源となる動物の種類や保有率等のデータを蓄積することが重要であることから、これまで全国規模で *Cryptosporidium* を

保有するへび種の特異性や保有状況の把握を進めてきた。今年度は、東北地方、北陸地方および九州地方のへびについて調査を行った。

水試料からの *Cryptosporidium* の検出は顕微鏡観察により行われているが、技術の習得や観察手法の周知等が必要であり、検査法の普及や検査システムの拡大の妨げとなっている。こうした問題点を減らすことの一手段として、PCR 法等の遺伝学的手法を用いた検査法により検査の迅速化や簡略化が試みられている。しかし、現段階では未だに確定した方法は確立されていない。本研究では、TaqMan PCR 法に注目し、これまでに報告されている複数のシステムを比較した。

Cryptosporidium 症は水系感染する代表的な原虫感染症である。汚染された水道水の摂取や、プール等での水泳により集団で発生することが知られている。こうした集団発生事例を迅速にできるだけ正確に把握することは、原因を速やかに把握し、感染事例の拡大を抑え、患者の発生を防ぐためには不可欠である。そのためには、患者の便試料から *Cryptosporidium* のオーシストを検出するための検査法が普及していなければならない。*Cryptosporidium* の検査では蛍光抗体染色法が最も感度が高く、また正確に診断することができる手法であるとされている。しかし、わが国においては蛍光抗体染色法は診断試薬としての認可が得られていないため、臨床診断の現場では使用することができない。そこで、臨床検査における *Cryptosporidium* の検査法の問題点について言及し、蛍光抗体染色法の普及の提言を行った。

B. 研究方法

B-1 調査の対象

爬虫類では、ヤマカガシ 41 匹（福島県 20 匹、福井県 4 匹、佐賀県 1 匹、長崎県 15 匹、鹿児島県 1 匹）、シマヘビ 7 匹（福井県 6 匹、鹿児島県 1 匹）、マムシ 7 匹（福島県 7 匹）、計 55 匹を検体とした。へびの腸管内容物を胃、小腸、大腸の臓器別に採取し、検査を行うまで冷蔵した。

B-2 *Cryptosporidium* の検出

Cryptosporidium の保有は糞便あるいは腸内容物からのオーシストの検出による。採取された材料は検査に用いるまで冷蔵保存した。糞便あるいは腸内容物の少量を用いて FEA 法によりオーシストを精製した。得られた沈渣をスライドグラスに塗抹して乾燥し、*Cryptosporidium* に対する特異抗体による蛍光染色（Aqua-Glo Giardia/Cryptosporidium, Waterborne）と DAPI 染色を行った。落射型蛍光顕微鏡を用いて B 励起光下で観察し、厚生労働省の指針に記載された基準により *Cryptosporidium* のオーシストの判定を行った。

B-3 遺伝学的解析

鏡検により *Cryptosporidium* が検出されたヤマカガシの試料は -20°C で冷凍保存しており、これらの試料について 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。オーシストの DNA は QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) を用いて精製した。メーカー推奨のプロトコルの始めに 5 回の凍結融解、15 分間の煮沸、1 時間の Protease K 溶解を追加し、オーシスト由来の DNA の回収に努めた。

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。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 (Xiao et al., 1999)。PCR 産物は 2%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、泳動像を確認した。次いで QIAquick PCR purification キット (Qiagen) を PCR 産物に用いて残留プライマーを除去した後、この精製 DNA を試料として ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems) ならびに ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてダイレクトシーケンシングを行なった。得られた塩基配列は Blast サーチにより既存の塩基配列との比較を行った。

C. 結果

C-1 野外に生息する爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況

これまでの調査によりヤマカガシが *Cryptosporidium* を保有し、調査した地域では 20%前後の保有率であることが明らかになっている。今年度は、これまでに十分なデータがそろっていない東北地方 (福島県)、北陸地方 (福井県) および九州地方 (長崎県および鹿児島県) のヤマカガシを中心に保有率の調査を行った。

東北地方産の 20 匹のうち 11 匹 (55.0%)、北陸地方産の 4 匹のうち 4 匹 (100%) から *Cryptosporidium* が検出されたが、九州地方産の 17 匹からは検出されなかった。

東北地方と北陸地方のヤマカガシそれぞれ

匹と 4 匹から検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型は、これまでヤマカガシから検出された遺伝子型である *Cryptosporidium* sp. 983 と一致した。

C-2 水試料からの *Cryptosporidium* の検出における遺伝子解析の利用

水試料からの *Cryptosporidium* の検出は、これまでは上水からの検出に重点が置かれていたが、原水における汚染を把握することへと移行している。しかし、原水は上水とは異なり、夾雑物が多く、顕微鏡観察を難しくしている。そのため、検査担当者は検査実施のための訓練や顕微鏡操作法の熟知が必要となる。一方で、PCR 法等を用いた検出や塩基配列を利用した型別が試行的に行われている。そこで、水試料からの *Cryptosporidium* の検出における遺伝子解析法の有用性を検討した。

糞便検査におけるクリプトスポリジウムの遺伝学的手法を用いた検査と、水試料からのクリプトスポリジウムの同様の検査は同じ観点から実施することはできない。ヒトに寄生するクリプトスポリジウムの種あるいは遺伝子型は限られている。これに対して、水試料中に混入するクリプトスポリジウムの種や遺伝子型は汚染源となる動物が多様であるため、限定されない。従って、遺伝学的検査法を実施する場合には検査の目的を明確にすることが不可欠である。遺伝学的検査法として PCR あるいはリアルタイム PCR 法を利用する場合、増幅される種あるいは遺伝子型は使用する PCR システムにより異なる。利用する PCR システムの選定は、そのシステムにより検出される種あるいは遺伝子型を踏まえた上で決定することになる。

C-3 蛍光抗体染色法の普及の提言(疫学情報の収集の問題点)

患者の発生をいち早く把握することは、感染拡大の防止、患者発生の原因の究明等を的確に実施するために必要である。医療機関において、活用できる検査法は抗酸染色等に限られており、もっとも感度が高いとされている蛍光抗体法は検査法として未だに認可されていない。そこで、疫学情報の収集と糞便検査における問題点を整理し、解決策を探る。

クリプトスポリジウムの検査法にはFEA法、シヨ糖浮遊法、抗酸染色法、蛍光抗体法があり、これらの検査法を組み合わせで行われる。これらのうち、医療において利用できるのはFEA法、シヨ糖浮遊法、抗酸染色法であり、蛍光抗体法はわが国では認可されていないために利用できない。ところが、便を対象にしてクリプトスポリジウム検査法で最も高い検出率が得られるのは蛍光抗体法とされている。

Cryptosporidium 症は感染症法の疾病の分類では5類感染症(全数把握)に規定されている。これは *Cryptosporidium* 症の診断を行ったすべての医療機関は診断後7日以内に所管の保健所に届出をしなければならない疾病と定められていることになる。

Cryptosporidium 症が全数把握の疾病に規定されているのは、水道水を介した集団発生が世界中で多数発生している感染症であり、公衆衛生上極めて重要な感染症であることを示している。平成8年(1996年)に米国ミルウォーキーで発生した水道水を介した *Cryptosporidium* 症の集団発生事例では、感染者は403000人に上ると推定され、史上最大の下痢症の集団発生事例とされている。

わが国においても、これまでに平成6年の神奈川県平塚市の雑居ビルの簡易専用水道を介した集団発生事例や平成8年の埼玉県越生町の町営水道を介した集団発生事例、北海道や兵庫県での集団発生事例、長野県でのプールを介した集団発生事例とこの事例に関連した千葉県での二次感染事例などが知られている。

世界の諸外国における集団発生事例や国内での集団発生事例が報告され、こうした多くの事例があるという重要性から、*Cryptosporidium* 症は5類感染症(全数把握)に規定されている。こうしたことから勘案して、検査体制を充実させることが適切であると考えられる。*Cryptosporidium* 症の毎年の報告状況を詳しく検討すると、報告が上がる自治体は限定されているように見受けられる。これは、人口が多い地域に感染症が集中しやすいという状況もあるが、一方で、*Cryptosporidium* 検査が可能な医療機関や登録検査所が限られているということも推測することができる。蛍光抗体染色法が利用可能になれば検査法が普及し、患者報告数が増加して、より正確に患者発生状況を把握することができるようになることが期待される。

D. 考察

平成13年に兵庫県山崎町(当時)の簡易水道から *Cryptosporidium* のオーシストが検出された事例が発生し、分離された *Cryptosporidium* のオーシストの遺伝子型を解析したところ、*Cryptosporidium* 983の18s rRNAの塩基配列AY120913と一致することが明らかとなった。この遺伝子型を持つ *Cryptosporidium* はヘビに寄生することが知

られているが、情報は断片的であり、宿主域、地域的分布、病原性などの詳細な性状に関する情報はわずかであった。当然、わが国の野外に生息するどのヘビが宿主となるかはまったく知られていなかった。そこで、これまで全国の野外からヤマカガシ、シマヘビ、アオダイショウなどのヘビを収集し、*Cryptosporidium* の寄生状況を精査したところ、ヤマカガシが比較的高率に *Cryptosporidium* を保有していることが明らかとなった。その一方で、本州、四国および九州において主要なヘビであるシマヘビやアオダイショウからは *Cryptosporidium* は検出されなかった。これらの結果から、平成 13 年の兵庫県の事例はヤマカガシが汚染源である可能性が高いことが示唆された。

Cryptosporidium は脊椎動物に広く分布し、哺乳類、鳥類、爬虫類および魚類に寄生することが知られている。腸管寄生性種は形態が類似しており、オーシストの形態観察では種を鑑別することは不可能である。さらに、汚染源として様々な動物が水環境あるいはその周辺に存在するため、検出される種や遺伝子型は多種多様である。そのため、水試料から遺伝学的手法 (PCR 法など) を用いて *Cryptosporidium* を検出する場合、限定された種や遺伝子型のみを検出するシステムではなく、出来る限り多くの種や遺伝子型を検出するシステムが望まれる。一方で、ヒトに対する病原性を考慮して、ヒトに感染することが知られている種や遺伝子型だけを検出できるシステムを利用することも選択することが出来る。蛍光抗体試薬が反応を示す種あるいは遺伝子型の範囲と、PCR 等の遺伝学的手法の検出可能なそ

れが完全に一致することはないと考えられるため、蛍光抗体染色を用いる従来の形態観察による検査の結果と遺伝学的手法による検査では、得られる結果に差が生じることを十分に認識しておく必要がある。

広い範囲の種や遺伝子型を検出可能な遺伝学的手法を用いる場合は、水試料中の *Cryptosporidium* を糞便汚染の指標として捕らえて検査することが可能となる。たとえば、平成 13 年の兵庫県のヘビの糞便汚染による *Cryptosporidium* 混入事例では、ヒトに感染しないとされている *Cryptosporidium* が検出され、これにより水源の汚染源対策が取られた。これにより、ヘビのみならず、その他の小動物の水源への侵入や種々の動物の糞便汚染を防ぐことが出来るようになり、結果的に供給水道の安全性が高められることとなった。

ヒトに感染することが知られている種や遺伝子型に限定して検出可能な遺伝学的手法を用いる場合は、ヒトの感染リスクを除くために検査を実施することとなる。ヒトの糞便検査に遺伝学的手法を取り入れる場合は、こちらを選択する。ヒトに感染が知られているクリプトスポリジウムには、*C. parvum* や *C. hominis* の他に *C. canis*、*C. felis*、*C. meleagridis*、*C. muris* や腸管寄生性 *Cryptosporidium* のブタ型、シカ型、サル型がある。このうち、下痢症患者から検出される頻度が高いのは、*C. parvum*、*C. hominis* および *C. meleagridis* であり、これらの種を捉えることができる PCR システムを用いれば、ほぼすべてのクリプトスポリジウムによる下痢症の患者を診断することができ、あるいは集団発生事例の患者を把握することができる。

E. 結論

東北地方および北陸地方で採取された24匹のうち15匹から *Cryptosporidium* が検出されたが、九州地方の17匹からは検出されなかった。検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型は、これまでヤマカガシから検出された遺伝子型である *Cryptosporidium* sp. 983 と一致した。検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型は *Cryptosporidium*938 と一致した。

PCR 法は糞便検査で用いる場合と水試料からの検出で用いる場合は、検出すべき *Cryptosporidium* の種あるいは遺伝子型の範囲が異なることから、それぞれの試験にあった PCR システムを選択する必要がある。また、検査室レベルで用いることができる検査法として、蛍光抗体染色法が最も優れているとされており、早期に利用可能とな

ることが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎：クリプトスポリジウムおよびジアルジア感染症の感染経路の検討、第67回日本寄生虫学会東日本支部大会、2007年10月6日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし