

## カリシウェブの整備

研究分担者 染谷雄一、片山和彦（国立感染症研究所ウイルス第二部）

**要旨** ノロウイルス（NoV）、サポウイルス（SaV）の遺伝子型を判定するためには、分子系統解析が必須である。しかし、遺伝子型の判定基準の策定は模索の段階にある事に加え、データベース上の NoV、SaV の塩基配列データは、日々新規登録、更新が行われ、刻々と変化している。本分担研究は遺伝子解析に用いる CaliciWeb 骨格デザインを構築および、カリシウイルスデータベースの構築を行った。

研究協力者 三瀬 敬治（札幌医科大学・医学部・衛生学）

### A. 研究目的

ノロウイルス（NoV）は、約 7500 塩基のプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。NoV のゲノムには 3 つの蛋白質コード領域（open reading frame: ORF）が存在しており、ORF1；非構造蛋白質、ORF2；構造蛋白質 1（VP1）、ORF3；構造蛋白質 2（VP2）をコードしている。NoV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、ゲノム塩基配列の相同性に基づきいくつかのグループ、遺伝子型に分類されている。これまでに、非構造蛋白質の RNA 依存性 RNA 合成酵素（RNA dependent RNA polymerase, RdRp もしくは polymerase）をコードする領域を用いた遺伝子型分類や、VP1 領域を用いた遺伝子型分類が報告されている。特に我々の構築した VP1 領域を用いた遺伝子型分類は、NoV 粒子の抗原性をよく反映するため、遺伝子型分類の主流となってきた。

最近、流行の主流を担っている NoV は、VP1 領域のタイピングによって GII/4 に分類されるウイルスである。オランダの研究グループは、この GII/4 を細分化するため RdRp 領域を用いたタイピングを行い、流行株を区別している。彼らは、RdRp の遺伝子配列の違いが NoV の複製効率に関与し流行株出現の一因となる可能性を示唆し、RdRp によるタイピング

を推進しようとしている。NoV は RdRp 領域と VP1 領域の間でゲノムの組換え（リコンビネーション）を起こすことが知られている。この領域は ORF1, 2 junction と呼ばれており、リコンビネーションのホットスポットとして認知されている。NoV のゲノムリコンビネーションは、NoV の宿主への適合やウイルス病原性の変化等を理解する上で重要な現象だが、NoV の遺伝子型分類を混沌とした状態に陥れている。リコンビナント株は ORF1, 2 junction 上流の RdRp 領域を用いた遺伝子型分類と、下流の VP1 領域を用いた遺伝子型分類で異なる結果を与えるからである。ゲノムリコンビネーションの問題は、NoV ばかりでなく、サポウイルスにも認められており、カリシウイルス科の特徴である可能性がある。

本研究では、世界三大データベース（DDBJ, Genbank, EMBL）上に点在しているカリシウイルスゲノムデータを集積し、サブデータベースをカリシウェブ上に作製すること、このサブデータベースをウェブ上で共有することにより、日本国内ばかりでなく、世界のカリシウイルス研究者が共通の情報を元に遺伝子解析ができるように解析ツールを備えたウェブページの作成を試みた。

### B. 結果および考察

フロントページ素案（図 1）は、CaliciWeb タイトル、コンテンツ一覧、コンテンツに移動するため

のボタンからなり、初めて訪れても戸惑うことなく目的のページへ移動できるようにデザインした。各コンテンツ、ボタンにはロールオーバーを採用し、マウスクリックに対応した操作感が得られるようにした。コンテンツとして、News、Database、Analyze、Tools、Forum、Links をアップし、それぞれロールオーバーで CaliciWeb ニュースページ、データベース検索ツール、DDBJ、MEGA ソフトウェア日本語ホームページ、CaliciWeb ディスカッションボード、国立感染症 IASR ホームページへリンクさせた。

2006/07 シーズンのノロウイルスによる食中毒及び感染症の発生の増加を受け、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会で取りまとめられた「ノロウイルス食中毒対策（提言）」が厚生労働省より平成19年10月12日付け食安発第1012001号「ノロウイルス食中毒対策について」として都道府県知事等宛に通知された。その中で、調理従事者からの食品汚染を原因とする食中毒と判断する場合には、「患者と調理従事者等から検出されたウイルスの遺伝子型が同一であることを確認することが求められ、シーケンス解析が行政的にも必要となってきた。一方、食品流通の国際化、大規模化、広域化に伴いノロウイルスの原材料汚染による広域散発食中毒事例の発生も危惧され、その探知に有効な実験室内解析手法は塩基配列の比較であると考えられる。現在、CaliciWebに求められている最も重要な機能は、全国で検出されたノロウイルスの塩基配列データを迅速に収集し、比較・解析するシステムである。しかし、本研究では、データ登録の際に生じるセキュリティの問題、解析ツールを組み込むことによるWebページ構築の複雑化を避け、データベースに特化したページ構成を行ってきた。この簡略化により、毎日、世界3大データベースからカリシウイルスのゲノム情報をサンプリングし、カード型データベースとして蓄積するカリシウイルスサブデータベ

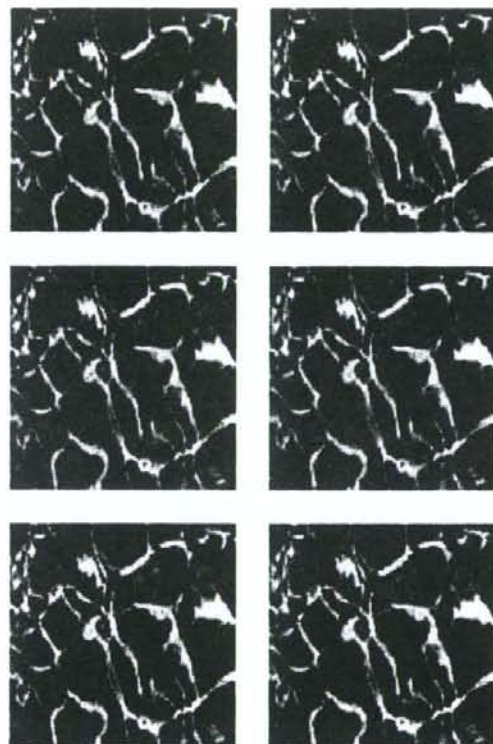
ースの構築に成功した。サブデータベースはキーワードなどによる検索ツールがインターフェースになっており、必要とするデータをスプレッドシート形式でダウンロードすることができる。ダウンロードしたデータは、ユーザーが必要に応じて加工し、分子疫学に用いなければならない。しかし、今後は、既存のWeb上解析ツール、例えばDDBJ上にあるClustal Wなどの活用、国立感染症研究所情報センターが行っている病原微生物検出情報と情報共有ができるよう、総合情報サイトとして再構築を進める必要がある。

#### C. まとめ

1. オートパイロットプログラムによる、DDBJ からカリシウイルスデータの収集、サブデータベース構築に、部分的に成功した。
2. カリシウェブページ上からサブデータベース検索が行える検索プログラムの構築に成功した。
3. カリシウェブフロントページデザインを行った。
4. 衛生研究所のデータベースに関する要望に添ったカリシウェブの骨格デザインを完成させた。

# CaliciWeb

Contents : News / Database / Analyze / Tools / Forum / Links



このページは、カリシウイルスの遺伝子解析のために、厚生労働省科学研究費の補助を受け、国立感染症研究所（NIID）ウイルス第2部と札幌医科大学衛生学教室によって構築されました。

Copyright © -- NIID & Sapporo Medical Univ. -- All rights reserved.



## カリシウエブを利用した Norovirus 遺伝子型分類法の標準化

研究分担者 片山和彦、染谷雄一（国立感染症研究所ウイルス第二部）

**要旨** ノロウイルス (NoV) の遺伝子型を判定するためには、分子系統解析が必須である。しかし、遺伝子型の判定基準の策定は、未だ模索の段階にある。本研究では、NoV の遺伝子型判定基準の策定を行うために、まず、Capsid N/S 領域の遺伝子型分類の標準化を行った。次に、カリシウイルスゲノム全長を対象とした分子遺伝学的解析を行い、ゲノム組換えを考慮に入れたカリシウイルスの遺伝子型分類法の検討を行った。

研究協力者 鈴木 義幸（国立遺伝学研究所）、  
三瀬 敬治（札幌医科大学・医学部・衛生学）

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、約 7500 塩基のプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。NoV のゲノムには 3 つの蛋白質コード領域 (open reading frame; ORF) が存在しており、ORF1; 非構造蛋白質、ORF2; 構造蛋白質 1 (VP1)、ORF3; 構造蛋白質 2 (VP2) をコードしている。NoV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、ゲノム塩基配列の相同性に基づきいくつかのグループ、遺伝子型に分類されている。これまでに、非構造蛋白質の RNA 依存性 RNA 合成酵素 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp もしくは polymerase) をコードする領域を用いた遺伝子型分類や、VP1 領域を用いた遺伝子型分類が報告されている。特に我々の構築した VP1 領域を用いた遺伝子型分類は、NoV 粒子の抗原性をよく反映するため、遺伝子型分類の主流となってきた。

最近、流行の主流を担っている NoV は、VP1 領域のタイピングによって GII/4 に分類されるウイルスである。オランダの研究グループは、この GII/4 を細分化するため RdRp 領域を用いたタイピングを行い、流行株を区別している。彼らは、RdRp の遺伝子

配列の違いが NoV の複製効率に関与し流行株出現の一因となる可能性を示唆し、RdRp によるタイピングを推進しようとしている。NoV は RdRp 領域と VP1 領域の間でゲノムの組換え (リコンビネーション) を起こすことが知られている。この領域は ORF1, 2 junction と呼ばれており、リコンビネーションのホットスポットとして認知されている。NoV のゲノムリコンビネーションは、NoV の宿主への適合やウイルス病原性の変化等を理解する上で重要な現象だが、NoV の遺伝子型分類を混沌とした状態に陥れている。リコンビナント株は ORF1, 2 junction 上流の RdRp 領域を用いた遺伝子型分類と、下流の VP1 領域を用いた遺伝子型分類で異なる結果を与えるためである。

NoV は、現在までに VP1 領域の遺伝子型分類を用いて、すでに 36 種類以上のタイプが報告されているが、さらに新たな遺伝子型の発見報告が続いている。しかし、新たな遺伝子型を定義する共通の決まりがなく、研究者は、独自の方法で、新たな遺伝子型を判定し、独自に命名した遺伝子型番号を付けるため、NoV の遺伝子型分類そのものが混沌とした状況に陥っている。そこで、本研究は、NoV の遺伝子型判定基準の策定を行う事を目的として施行された。

## B. 結果及び考察

<Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類> VP1 の N 末端領域のバーシャルシーケンスを用いたタイピングは、PCR のゴールドスタンダードとなっている SK primer series による増幅産物から得られた塩基配列情報を用いて行う。できる限り完全長塩基配列の報告されている株と論文として報告され、データベースから塩基配列が取得可能な株、更に、Fields Virology 5<sup>th</sup> edition に記載されているゲノタイプ標準株も含めて基準配列ファイルを作成し、CaliciWeb 上に公開した。このファイルに任意の Capsid N/S 領域の配列を加えることにより、NJ 法による分子系統樹を作製すれば、容易に遺伝子型分類を行う事ができる。

<CDC の提唱する遺伝子型分類> CDC は、前述の VP1 の N-terminal & S region (N/S region) 領域を用いたタイピングでは遺伝子型分類が正確にできないとして、VP1 領域全長の塩基配列をアミノ酸配列に変換して、最尤法でタイピングする方法を構築して報告した。本法と N/S 領域を用いた方法との違いは、Alphatron 株のクラスターの位置、解析に要求する塩基配列・アミノ酸配列の長さであるが、抗原性の違いを予測する目的でタイピングを行うのであれば、どちらの方法で行っても分子系統関係に大差はない事が明らかとなった。

ノロウイルスの遺伝子型分類を行うための Capsid N/S 領域の基準塩基配列は、感染情報センターの IASR

(<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>) 上に公開すると共に、CaliciWeb

(<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/newst/>) 上にも公開した。さらに、この基準配列ファイルを用いて NoV の遺伝子型分類を行う方法をスライドにまとめ、同様に CaliciWeb 上に公開した。

カリシウイルスのゲノム全長を対象とした分子系統解析の結果、非構造蛋白質領域 (nonstructural proteins) と、構造蛋白質領域 (structural proteins (VP1 + VP2)) のジャンクション領域で、合計 14 配

列の間においてゲノムの組換えが示唆された。

また、非構造蛋白質領域で作成された系統樹と構造蛋白質領域を更に VP1 と VP2 に分け、そのうちの VP1 だけで作成された系統樹と比較することによって得られた。更に、VP1 の N-terminal 領域の核酸配列 (従来より、Capsid N/S 領域と名付けられ、核酸塩基配列を用いた NoV の遺伝子型分類に用いられてきた領域) を用いた解析でも、同様の結果が得られた。従って、構造蛋白質領域 (VP1 + VP2) の系統樹、VP1 だけの系統樹、VP2 だけの系統樹、の 3 者の間で矛盾はなく、更に Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた系統樹とも矛盾が無かった。カリシウイルスにおいて、非構造蛋白質コード領域と構造蛋白質コード領域のジャンクション領域でゲノムの組換えが起きていることが証明された。

## C. 結論

1. Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類を行うために FASTA フォーマットで用意した基準配列は、感染情報センターの IASR (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>) 上に公開すると共に、CaliciWeb (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/news/>) 上にも公開した。
2. この基準配列ファイルを用いて NoV の遺伝子型分類を行う方法をスライドにまとめ、同様に CaliciWeb 上に公開した。
3. NoV の遺伝子型分類法のガイドラインを示した。
4. Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類は、VP1 全長アミノ酸配列を用いた分類と矛盾を生じなかった。
5. 非構造蛋白質コード領域と構造蛋白質コード領域のジャンクション領域に認められる genome recombination は、Norovirus、Sapovirus のみならず、カリシウイルス全体に認められる現象である可能性が高い。
6. カリシウイルスの遺伝子型分類は、非構造蛋白質コード領域と構造蛋白質領域で異なる結果を導くことがある。

7. 非構造蛋白質のアミノ酸配列とウイルスの病原性に関係がある場合、また、非構造蛋白質領域が宿主域の決定に関係する場合は、これらに関与する蛋白質コード領域を対象とした genotyping 方法を構築し、標準化する必要がある。



平成 20 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」  
平成 18-20 年度総括分担報告書

消化管寄生性原虫症に関する検査法および分子疫学的研究

研究分担者： 八木田 健司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究協力者： 浅野 由紀子 愛媛県衛生研究所 衛生研究課  
佐々木 美江 宮城県保健環境センター 微生物部  
村上 光一 福岡県保健環境研究所 保健科学部  
板垣 匡 岩手大学農学部 応用獣医  
泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

概 要

本研究では、消化管寄生性原虫であるクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症発生の迅速把握を可能にするような検査のあり方を検討した。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の比較からは、わが国は報告数および発生率ともに諸外国よりも低いという特異的な状況が明らかとなり、特に諸外国では主要な感染グループである 10 才以下の低年齢層における感染が、国内では統計上ほとんど表れていないことが明らかとなった。低年齢層の実態解明の重要性が明らかになったことから、国内 3 県において感染症発生動向調査の感染性胃腸炎において原因不明とされた下痢症検体の原虫症検査を実施し、数%であるが原虫感染が含まれることが判明し、これら原虫の感染実態は統計を上回ることが示唆された。検査にあたり試用された免疫クロマト法等迅速検査キットは、検査コストの高さが問題ではあるが、個別検査機能という長所を活かして下痢症における原虫検査の一般化につながるものと考えられた。検査の経済性を含め、現実的な検査システムを確立し、実態を反映する統計情報を発信することが重要である。また、分子疫学的な情報の蓄積も問題解決に重要な情報を提供することから、継続的な研究が必要と考えられる。

## 1. 研究目的

消化管寄生性原虫であるクリプトスポリジウムならびにジアルジアは、従来、旅行者下痢症、輸入下痢症の原因としてとらえられてきた。しかし近年はその国内感染が問題となりつつあり、また集団感染防止の観点から、両疾患ともに現在感染症法の第5類に分類され、発生動向調査により疾患の発生動向を把握することが求められている。国内においては発生率の低い感染症ではあるが、その感染リスクは存在し、集団感染へと拡大させる可能性を潜ませる公衆衛生上の問題を孕んでいる。このような状況の中、原虫による感染および環境等の汚染を迅速に探知する必要性が高まっていることを受け、本研究では、まず国内外のこれら原虫症に関するサーベランスデータを基に、国内の実態に関する問題点を明らかにする。さらに、現在の発生動向調査の中で原虫感染が関連しながら検査の対象となっていない感染性胃腸炎に関して、その中で原因不明となった検体の原虫調査を行い、実態と統計との乖離を明らかにする。関連して、国内感染の原因解明が遅れているジアルジア感染に関して、野生動物等環境由来のジアルジア、およびヒト感染ジアルジアの遺伝学的解析を行いその疫学的な特徴を整理した。

## 2. 研究方法

### 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

我が国を含め各国がweb上で公開している保健・感染症関連研究施設からの感染症サーベランスに関する統計データを主に利用した。国内統計情報に関しては、国立感染症研究所、感染症情報センターが公表する感染症発生動向調査事業年報

(<http://idsc.nih.go.jp/idwr/CDROM/Main.html>)を用いた。これらのデータから年次報告数、10万人あたり報告数、年齢階級別報告数、その他の項目に関して比較を行なった。

### 2) 免疫クロマト法等迅速検査キットを用いた原因不明下痢症検体の原虫症検査

国内の3つの県を選択し、調査を行った。感染症法に基づく感染症発生動向調査で感染性胃腸炎と診断され、病原体検査ではウイルス及び細菌のいずれも検出されなかった検体を原因不明検体とし、それらの原虫検査を抗原検出キットを用いて行った。検査キットはイムノクロマト方式の Meridian 社製の Immuno Card STAT! Cryptosporidium/ Giardia Test Kit (Immuno Card STAT!)および CORIS 社製でディップスティック型の Crpto/Giardia Duo-Strip (Duo-Strip)、マイクロプレート ELISA キットとして Remel 社製の ProSpect Giardia/Cryptosporidium Microplate Assay (Prospect) を用いた。

### 3) ジアルジア症の遺伝子診断

ヒトあるいは動物の糞便検体中の原虫検査を Merifluor (Meridian 製) 直接蛍光抗体を用いて行い、陽性が確認された試料を用いて DNA を抽出、PCR およびシーケンス解析を行った。解析には GDH (Glutamate dehydrogenase) 遺伝子の部分配列を用いた。

## 3. 結果

### 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

感染症発生動向調査事業年報(2000-2006年度)の統計から、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、幼児一学童期での感染がほとんど報告がないこと、35歳前後にピーク的な集中が見られる傾向にあるのに対し、国外では国による差が大きい、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(表-1)。諸外国の統計データと比較すると、報告数および発生率ともに諸外国よりもわが国は低いという特異的な状況を明らかに、特に諸外国では感染報告数のおよそ 1/3 を占める 10 才以下の低年齢層における感染が、国内では統計上ほとんど表れていない点が注目された(表-2 および図-1)。

### 3) 免疫クロマト法等迅速検査キットを用いた原因不明下痢症検体の原虫症検査

発生動向調査における感染性胃腸炎患者は、10 歳以下が全体のおよそ 90%を占める小児下痢症であった。国内 3 県において迅速検査キットによる検査試行を行ったところ、2004 年から 2008 年の検体のべ 323 検体よりクリプトスポリジウム 4 例、ジアルジア 1 例が抗原陽性となった(表-3 および表-4)。

感染性胃腸炎としては水との接触が増える夏場(6 月~9 月)にも報告されているが、この期間にクリプトスポリジウムあるいはジアルジアが検出されることはなかった。検査のための検体保管方法としては、搬入直後の新鮮便あるいはその凍結保存便、また 10%乳剤でも利用可能であることが示された。

検査キット間の性能比較を 3 つの検体において調べた結果を表-5 に示す。S-1 検体に関しては顕微鏡、ImmunoCard STAT!ならびに ELISA で陽性、PCR と Duo-Strip で陰性、S-2 検体に関しては、ImmunoCard STAT!と

Duo-Strip で陽性、顕微鏡、PCR ならびに ELISA で陰性、S-3 検体に関しては顕微鏡、PCR、ImmunoCard STAT!ならびに ELISA で陽性、Duo-Strip のみ陰性であった。上記 3 検体の検査結果からは、抗原が存在する条件でありながら、Duo-Strip の感度は低い傾向にあること(S-1 および S-3)、また S-2 の結果からは、ImmunoCard STAT!と Duo-Strip の特異性に関する疑問が指摘された。

### 4) 低年齢層における国内統計と原因不明検体からの検出結果との比較

感染症発生動向調査事業年報より、15 歳以下の低年齢層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報告数を 2000 年~2006 年のデータをもとに集計した(表-6)。クリプトスポリジウム症は、集団感染事例を除いて、いわゆる散发事例としてみると年間 0~4 例、2004 年を除いた場合の 6 年間の総数は 4 例で年平均は 0.7 例/年と算出された。一方、同様にジアルジア症の年変動をみると、ジアルジア症は散发事例のみで考えられるので、年間 0~5 例、7 年間の総数は 16 例で年平均は 2.3 例/年と算出された。

これに対し、統計上には表れていない原因不明検体からの検出数は、県により調べた年や検体数が異なるので 3 県全体でまとめるみると、調べたのべ 4 年間でクリプトスポリジウムは 4 例で年平均が 1.0 例/年、ジアルジアは 1 例で年平均 0.25 例/年と算出された。年平均の検出率は地域による差みられるが、国内全体として考えた場合、その高さから実態としては統計を上回る感染が発生していることが示唆された。

## 2) ジアルジア症の遺伝子診断

国内でヒト感染した遺伝子型として Assemblage A2 ならびに B4 を検出した。ヒト特異的遺伝子型の A2 の検出は、ヒトを感染源とする伝播が存在することを示唆するものであった。一方、東北地方生息の野生ニホンカモシカより 10% 前後の割合でジアルジアが検出され (表-7)、遺伝子型は人畜共通感染型の Assemblage A1 と同定された。これまでの野生および飼育動物からの人畜共通感染型 A1 および B4 の検出結果と合わせ、感染源としての動物の調査の重要性が指摘された。

北上川水系における原虫汚染状況調査を実施したところでは、直接蛍光抗体法により 60 試料中 11 試料 (18.3%)、4 地点から、また PCR 法では 18 試料 (30.0%)、全 5 地点から *Giardia* が検出された。*Cryptosporidium* は両方法ともに検出されなかった。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。表-8 に検出結果を示した。

## 4. 考 察

国内のクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症の対策は、感染症法による届出を基本とした発生動向調査が一つの感染防止策としてある。統計データからは、国内における感染リスクは低いように見えるが、本研究から明らかに、我が国の統計上の実態は諸外国とかけ離れていることに注意することが必要である。報告数、発生率ともに著しく低いのが我が国の特色で、この状況が、実際に原虫感染者が少ないのか、リスクは低いのか、それとも検査体制が不适当で多くの感染例は見逃されているのか、究明する必要がある。特に低年齢層の実態は、長野県でのプールを介した学童

の集団感染事例 (高木ら 2008) が起きたことを考えると、早急に調べる必要がある。

パイロット的研究として、本研究において国内 3 県ではあるが、小児下痢症が主体となっている感染性胃腸炎の発生動向調査における原虫症の調査を行った。効率を図るために、原因不明となった検体に集中して、迅速検査法である免疫クロマト法を用いて個別検査にも対応できる原虫検出を試みた。その結果、1.0% 程度の割合ではあるが、原因不明試料中に原虫が検出された。この検出率は、検体の性状、質、保管状態が必ずしも迅速検査法に適したものではなかったことを考えれば、低めの数字と考えられる。また、調査地域の大きさからすれば、全国レベルで考えた場合、現在の統計を上回することは十分予想される。本研究の結果からは、感染性胃腸炎の原因検索として原虫をも対象とすべき必要があることが明らかである。発生動向という即時的情報を得るには、現状の検査法では対応が難しいことが予想され、より簡便迅速な方法の導入が求められるが、今回試用した免疫クロマト法は、その要求に応える有用性を備える方法の一つと考えられる。本研究でも明らかであったが、各種検査キット間には感度、特異性の差が見られるが (Garcia ら 1997, 2003, Johnston ら 2003, Weitzel ら 2006)、この点に関してはコストの問題も含め現場で求められる条件に適したものを選択するのが現実的であると思われる。

感染リスクの解明は感染防止対策上の大きな課題であるが、水系環境汚染に関するデータとして、東北地方の北上川の流域調査から、ヒト感染性タイプのジアルジアによる流域汚染と下水放流による高度汚染の可能性が指摘された。関連して、国内のヒトのジアルジア症は人畜共通型である場合が多く、環境からの感

染を念頭に入れる必要がある。

適切な検査法に基づき国内の発生動向を正確に把握することは、種々の感染リスクを低減し、流行の阻止につながると考えられる。低年齢層あるいはその他のリスクグループに関してさらに広範な調査が必要である。

## 5. 参考文献

高木 正明, 鳥海 宏, 遠藤 卓郎, 山本 徳栄, 黒木 俊郎 (2008) プール水を介したクリプトスポリジウム症集団発生事例、感染症誌 82: 14~19.

Garcia L.S. and Shimizu R.Y. (1997) Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol., 35:1526-1529.

Garcia L.S., Shimizu R.Y., Novak S., Carro M. and Chan F. (2003) Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. J Clin Microbiol., 41:209-212.

Johnston S.P., Ballard M.M., Beach M.J., Causer L. and Wilkins P.P. (2003) Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol., 41:623-626.

Weitzel T., Ditttrich S., Mohl I., Adusu E. and Jelinek T. (2006) Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. Clin Microbiol Infect., 12:656-659.

## 6. 結 論

感染症対策において迅速な検査結果を情報提供することは、最重要課題である。下痢症診断において原虫検査は一般的とは言えない現状で、集団感染等のリスクをいかに把握するかが問題となっている。その解決策の一つとして、迅速検査法を感染性胃腸炎検体について試行した本研究では、国内の低年齢層におけるクリプトスポリジウムならびにジアルジアの感染が統計以上に発生していることが示唆された。検査の経済性を含め、現実的な検査システムを確立し、実態を反映する統計情報を発信することが求められる。また、分子疫学的な情報の蓄積も問題解決に重要な情報を提供することから、継続的な研究が必要と考えられる。

## 7. 健康危機情報

なし

## 8. 研究発表

なし

## 9. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表-1、(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	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-2、(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

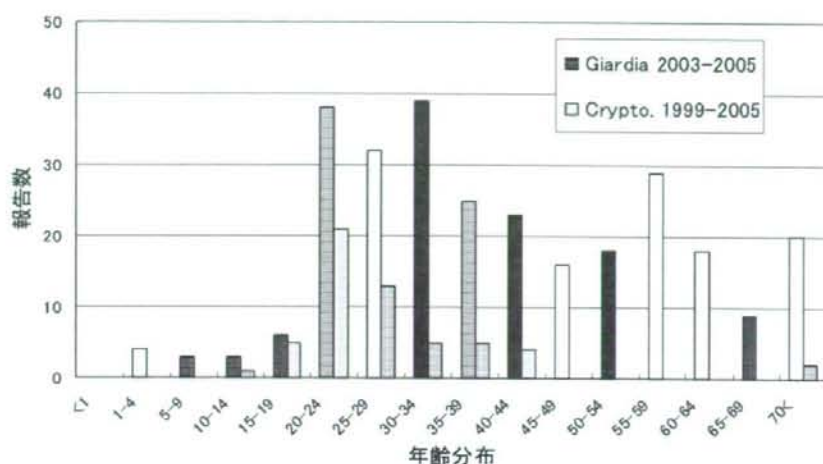


図-1、年齢階級別国内クリプトスポリジウム症報告数(1999-2005)およびジアルジア症報告数(2003-2005)  
クリプトスポリジウム症は集団感染事例関連を除く

表-3、A 県における感染性胃腸炎発生動向調査で原因不明となった検体の  
の ImmunoCard STAT!による検査結果(2004 および 2007)

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: TP1 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 <sup>§</sup>	1	9 歳男児、2007/2/2 発症、胃腸炎・下痢症状
Cryptosporidium 不検出			97

<sup>§</sup> Immuno CARD検査後確認



表-4、B 県における感染性胃腸炎発生動向調査で原因不明となった検体の ImmunoCard STAT!による検査結果(2006-2008)

年	性別	年齢	発病月	検査材料	ImmunoCard STAT!		備 考
					Crypt	Giardia	
2006	女	0	5	10%乳剤	-	-	
	女	0	6	10%乳剤	-	-	
	男	0	9	10%乳剤	-	-	
	女	0	10	スワブ	-	-	
	男	0	10	10%乳剤	-	-	
	男	1	6	10%乳剤	-	-	
	女	1	6	10%乳剤	-	-	
	女	1	6	10%乳剤	-	-	
	男	1	7	スワブ	-	-	
	女	1	10	10%乳剤	-	-	
	男	1	11	10%乳剤	-	-	
	女	2	3	10%乳剤	-	-	
	女	2	11	10%乳剤	-	-	
	女	3	5	10%乳剤	-	-	
	男	3	6	10%乳剤	-	-	
	女	5	6	10%乳剤	-	-	
	男	6	6	10%乳剤	-	-	
	女	8	5	10%乳剤	-	-	
	女	11	6	10%乳剤	-	-	
2007	男	11	6	10%乳剤	-	-	
	男	0	8	10%乳剤	-	-	
	男	0	9	10%乳剤	-	-	
	男	0	10	10%乳剤	-	-	
	男	1	8	10%乳剤	-	-	
	女	1	10	10%乳剤	-	-	
	男	2	5	10%乳剤	-	-	
	女	2	8	10%乳剤	-	-	
	男	2	10	10%乳剤	-	-	
	女	2	10	10%乳剤	+	-	粘血便
	男	3	6	10%乳剤	-	-	
	男	3	11	10%乳剤	-	-	
	男	4	2	10%乳剤	-	-	
	女	5	11	スワブ	-	-	
	男	7	5	スワブ	-	-	
	女	8	10	10%乳剤	-	-	
	女	8	10	10%乳剤	-	-	
	男	8	11	10%乳剤	-	-	
2008	男	10	10	10%乳剤	-	-	
	女	0	12	便	-	-	
	男	1	12	スワブ	-	-	
	男	3	1	スワブ	-	-	
	男	8	12	便	+	-	発熱 38℃、水様便
	男	9	1	スワブ	-	-	
	男	9	12	便	-	-	

表-5、A 県における感染性胃腸炎発生動向調査で原因不明となった検体の各種迅速検査  
キットによる検査結果の比較

発生動向調査散発事例											
No.	年 齢	性 別	症状	顕微鏡 DFA	PCR *	ImmunoCardSTAT!		Duo-Strip		ProSpect (目視)	ProSpect (OD**)
						Crypto	Giardia	Crypto	Giardia		
S-1	11	女 児	下痢・腹痛・ 発熱(36.8℃)	Crypto	—	+	—	—	—	+	0.391
S-2	9	男 児	胃腸炎症状、 下痢	—	—	+	—	+	—	—	0.004
S-3	3	男 児	下痢・発熱 (38℃)	Giardia	+	—	+	—	—	+	3.342

\* *Cryptosporidium* : 18S rRNA gene (Xiao)  
 \* *Giardia* : TP1 gene (Suliman)  
 \*\* Negative control O.D. =0.004

表-6、国内における 15 歳以下の年齢層でのクリプトスポリジウムならびにジアルジア  
感染者数の統計(感染症発生動向調査事業年報より)

報告年	原虫	年齢階級				総 計**	
		0	1-4Y	5-9Y	10-14Y	Crypto	Giardia
2006	Crypto	1	1	1	0	3	
	Giardia	0	2	0	2		4
2005	Crypto	0	0	0	1	1	
	Giardia	0	1	2	1		4
2004	Crypto	0	0	29*	21*	—	
	Giardia	0	0	0	0		0
2003	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	2	1	2		5
2002	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	0	0	0		0
2001	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	0	0	1		1
2000	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	1	1	0		2

\*は集団感染事例

\*\*は集団感染事例除く

表-7、東北地方の野生ニホンカモシカにおける *Giardia* 属ならびに  
*Cryptosporidium* 属の検出率

調査地	試料数	<i>Giardia</i> 属	<i>Cryptosporidium</i> 属
岩手県	65	4 (6.2%)	0
秋田県	33	5 (15.2%)	0

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				2005年								陽性	%
		9	10	11	12月	1	2	3	4	5	6	7	8月		
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 18—20 年度厚生労働科学研究  
「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」  
クリプトスポリジウム研究班  
分担研究報告

研究分担者 神奈川県衛生研究所 黒木俊郎

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、ヤマカガシがクリプトスポリジウムに感染していることが明らかになった。これまでの調査で情報が少なかった東北地方（福島県）、北陸地方（福井県）、四国および九州地方（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。

ペットとして輸入される小型哺乳類は平成 16 年に輸入が禁止されたが、未だに輸入が継続している。18 年度に 8 種のげっ歯類の腸管内容物 139 検体を対象にして調査した。種によっては *Cryptosporidium* あるいは *Giardia* を高率に保有していた。

平成 19 年度と 20 年度においては、水試料からの *Cryptosporidium* の検査における検査結果に影響を与える要因の検討および遺伝子レベルの検査法としてのリアルタイム PCR 法の基礎的検討を行った。

#### A. はじめに

水道水の微生物学的安全性は浄水場における微生物の除去と塩素消毒により担保されている。しかし、*Cryptosporidium* は塩素耐性を示し、水道水に混入した場合には塩素により不活化することはできない。したがって、原水での *Cryptosporidium* の存在を把握し、原水の品質を把握すること、あるいは水道水中の混入の有無を確認することが必要である。

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、試料水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、全国規模で *Cryptosporidium* を保有するヘビ種の特定や保有状況の把握を行った。

海外からげっ歯類がペットとして輸入されていることから、ヒトの *Cryptosporidium* 症の感染源、あるいは環境への汚染源としての評価を行うために、げっ歯類の *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有状況を調査した。

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 法やリアルタイム PCR 法といった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。PCR 法やリアルタイム PCR 法が導入されれば、*Cryptosporidium* の検出までの時間が短縮され、簡便に検査を進めることが可能となることが期待される。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。

水試料からの *Cryptosporidium* や *Giardia* の検査は、濃縮、精製、染色、標

本作製および顕微鏡観察の手順を踏んで行われる。このうち、特に濃縮と精製のステップは操作が煩雑であるために、検出率を高めるためには特別の配慮が必要となっている。さらに、試料の保存方法等などが原虫の検出率に関与している可能性がある。

## B. 材料と方法

### 1) 調査の対象

爬虫類では、ヤマカガシ 117 匹（東北地方 20 匹、関東地方 11 匹、北陸地方 4 匹、中国地方 47 匹、四国地方 14 匹、九州地方 21 匹）、シマヘビ 15 匹（平成 18 年度の 8 匹、北陸地方 6 匹、九州地方 1 匹）、アオダイショウ 2 匹（平成 18 年度）、マムシ 2 匹（北陸地方 7 匹、四国地方 2 匹）、ジムグリ 1 匹（四国地方）、シロマダラ 1 匹（四国地方）の計 55 匹を検体とした。ヘビの腸管内容物を胃、小腸、大腸の臓器別に採取し、検査を行うまで冷蔵した。

国内の脊椎動物における保有状況と比較するとともに、ペットとして国内に持ち込まれ、*Cryptosporidium* の感染源あるいは汚染源となる可能性がある哺乳類として、デグー 20 匹、フトオアレチネズミ 10 匹、ジャンガリアンハムスター 30 匹、ステップレミング 9 匹、シマリス 30 匹、ピグミージェルボア 10 匹、ゴールデンハムスター 20 匹、ロボロフスキーハムスター 10 匹の合計 139 匹を対象に *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有を調べた。哺乳類の各動物は、麻酔により死に至らしめた後に解剖して大腸内容物を取り出し、これを調査の対象とした。

## 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った。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ガ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, 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、暫定対策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。

## 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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スを行なった。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。

## 4) Taq-Man PCR 用の *Cryptosporidium* DNA の調製

*Cryptosporidium* はヌードマウスで継代されている株を使用した。マウスの糞便中のオーシストを塩化セシウム浮遊法により精製した。オーシストを TE 緩衝液に浮遊し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結融解を 5 回繰り返した。Proteinase/DTT 溶解液  $50\mu\text{L}$  を加え、 $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分溶解した。次に超音波発生器で 1 分間破壊し、 $75^{\circ}\text{C}$  で 1 分間加熱してから激しく振盪した。最終的に溶液  $5\mu\text{L}$  あたり 6,000 オーシストとなった。原液  $5\mu\text{L}$  に精製水  $45\mu\text{L}$  を加え、103 まで段階希釈した。各希釈液を TaqMan 法の試料とした。

## 5) Taq-Man PCR 法の検討

既報の Taq-Man PCR 法による *Cryptosporidium* 検出法のうち 6 システムを検討の対象とした。今回検討したシステムは以下の論文に記載されているものとした。

1. GD Di Giovanni, MW LeChevallier: Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. Appl Environ Microbiol, Mar.