

Fig. 6. - Effect of chlorophyll-a (■), 0.6 % 2ME-treated spinach ferredoxin (Fd) (○), *Clostridium pasteurianum* Fd (△) and *C. pasteurianum* rubredoxin (Rd) (✱), and complexes of chlorophyll a with spinach Fd (●), *C. pasteurianum* Fd (▲) and *C. pasteurianum* Rd (✱) on the growth of *E. dispar*, and control (□). The growth kinetics of the *E. dispar* AS 16 IR strain in the YIGADHA-S medium are shown (mean numbers of amoebae in duplicate cultures are plotted). *: the mean of the growth-kinetic level was significantly higher than that of the control (* $p < 0.01$ by Dunnett's test). R: the significant difference was retained by Dunnett's test ($p < 0.05$).

the cell membrane and organelles (e.g.,mitosomes) similar to that of the spinach leaf cells. The GPF was assumed to be composed of a heat-stable substance and some other common simple inorganic substances. It was feasible to isolate the GPF from acetone-soluble fractions of Cp-rich leaf cells as bands of low molecular weight proteins complexed with chlorophyll containing Fe, S and Mo atoms.

The results of this study indicate that the protein bands may be derived from Fe-S (e.g., Fd) or Mo-Fe-S proteins [e.g., molybdoferredoxin, which is a common component of nitrogenase (present in rhizobium species)]. It appears that the GPF requires to form a complex with chlorophyll because the growth-promoting effects of purified Fd from spinach, *C. pasteurianum* and *E. histolytica* strain HM-1: IMSS clone 6 (the Fd consists of 4Fe-4S centre) on *E. dispar* AS 16 IR were not remarkable (data not shown). We found that the complex of chlorophyll-a with 0.6 % 2ME-treated Fd containing a 2Fe-2S centre from spinach and that containing 4Fe-4S centre from *C. pasteurianum* have a growth-promoting effect on *E. dispar* AS 16 IR. This effect was also observed with 0.6 % 2ME-treated Rd, which has the most simple Fe-S centre (1 Fe and 4 cysteine-residues without inorganic S), without chlorophyll-a. It is not clearly understood why complex formation must occur between chlorophyll-a and the components (Fe-S centres and cysteine residues) of bacterial and plant Fd to produce a growth-promoting

effect is not clearly understood. However, it is considered that the complex of chlorophyll-a with the Fd component (MW greater than 100,000 by gel permeation chromatography) may be efficiently taken up by amoeba cells as a compact mass by a process, such as pinocytosis, and the complex may be degraded until an appropriate size of the Fe-S compound is obtained. We speculate that the Fe-S compounds are utilized as components of some essential Fe-S proteins such as amoebic Fd, which is an essential redox protein involved in oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl CoA in *E. dispar*; this is similar to that reported in *E. histolytica* (McLaughlin & Aley, 1985). It is reported that the amitochondrial protozoan parasite *E. histolytica*, which is closely related to *E. dispar*, contains numerous fermentation enzymes that are similar to bacterial enzymes, including the pyruvate Fd oxidoreductase. Fd and alcohol dehydrogenase E, derived from concomitant enteric bacterial DNA by horizontal transfer (Rosenthal *et al.*, 1997).

We succeeded in developing a more stable axenic cultivation system by adding the complex of chlorophyll with a component of Fe-S protein (e.g., Fd from spiderwort) treated with 2ME to the YIGADHA-S medium. We achieved an improved axenic cultivation system for *E. dispar* by using cellular components of protozoan, mammalian and plant cells as well as intact bacteria. However, we recognize that it is difficult to develop an axenic cultivation system for *E. dispar* that is at par

with the well-established cultivation system of *E. histolytica* for use in biological studies such as biochemical and immunological studies, etc.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the staff of Nihonbashi Laboratory, Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan for their cooperation in the analysis using the SEM-EDX III Type N/H. This work was supported by a Keio Gijuku Fukuzawa Memorial Fund for the Advancement of Education and Research and a Health Sciences Research Grant-in-Aid for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases.

REFERENCES

- CLARK C.G. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1995, 42, 590-593.
- DIAMOND L.S., HARLOW D.F. & CUNNICK C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1978, 72, 431-432.
- DIAMOND L.S. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. *Journal of Parasitology*, 1982, 68, 958-959.
- DIAMOND L.S., CLARK C.G. & CUNNICK C.C. Y1-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1995, 42, 277-278.
- GORHAM P.R. Preparation of chloroplasts and disintegrated chloroplasts, in: *Methods in Enzymology* vol. 1. Colowick S.P. & Kaplan N.O. (eds), Academic Press, New York, 1955, 22-25.
- GUTTERIDGE W.E., KNOWLER J. & COOMBS J.D. Growth of *Trypanosoma cruzi* in human heart tissue cells and effects of aminonucleoside of puromycin, trypanidin and aminopterin. *Journal of Protozoology*, 1969, 16, 521-525.
- HOGEBOM G.H. Fractionation of cell components of animal tissues, in: *Methods in Enzymology* vol. 1. Colowick S.P. & Kaplan N.O. (eds), Academic Press, New York, 1955, 16-19.
- KEISTER D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983, 77, 487-488.
- KOBAYASHI S., IMAI E., HAGHIGHI A., KHALIFA S.A., TACHIBANA H. & TAKEUCHI T. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxy-acetone-serum medium. *Journal of Parasitology*, 2005, 91, 1-4.
- KOBAYASHI S., IMAI E., TACHIBANA H., FUJIWARA T. & TAKEUCHI T. *Entamoeba dispar*: cultivation with sterilized *Critidia fasciculata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1998, 45, 35-38.
- KOBAYASHI S., IMAI E., HAGHIGHI A., TACHIBANA H. & TAKEUCHI T. Cultivation of *Entamoeba dispar*: growth-promoting effect of ferredoxin. *Archives of Medical Research*, 2000, 31 (Suppl.), S210-S211.
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- LEON-AVILA G. & TOVAR J. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology*, 2004, 150, 1245-1250.
- MCLAUGHLIN J. & ALEY S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *Journal of Protozoology*, 1985, 32, 221-240.
- OKAMOTO S., WAKU M., KOBAYASHI H., SATO N., ISHIDA A., TANABE M., TAKEUCHI T., FUKUSHIMA S., YAMADA T. & IKEDA Y. *Trichomonas foetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1998, 21, 89-91.
- OPPERDOES F.R., BAUDHUIN P., COPPENS I., DE ROE C., EDWARDS S.W., WEIERS P.J. & MISSET O. Purification, morphometric analysis, and characterization of glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, 1984, 98, 1178-1184.
- QI H.Y., KOBAYASHI S., FUJIWARA T., NOZAWA S., OHTA H., KIGUCHI K., TOJO R., KOBAYASHI J., SUMI K., YANO A. & TAKEUCHI T. Occurrence of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in Japan. *Japanese Journal of Parasitology*, 1995, 44, 473-480.
- ROBINSON G.L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1968, 62, 285-294.
- ROSENTHAL B., MAI Z., CAPLIVSKI D., GHOSH S., DE LA VEGA H., GRAF T. & SAMUELSON J. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179, 3736-3745.
- ROWBOTHAM T.J. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 1983, 36, 978-986.
- TOVAR J., LEON-AVILA G., SANCHEZ L.B., SUTAK R., TACHEZY J., VAN DER GIEZEN M., HERNANDEZ M., MULLER M. & LUCOQ J.M. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 2003, 426, 172-176.
- VARGAS M.A., ISIBASI A., KUMATE J. & OROZCO E. Non-pathogenic *Entamoeba histolytica*: functional and biochemical characterization of a monoxenic strain. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1990, 40, 193-201.

Reçu le 14 juin 2005

Accepté le 4 novembre 2005

知的障害者更正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 (2) — *E. dispar* の施設内感染を中心として—

東京都健康安全研究センター 微生物部

鈴木 淳・村田理恵・柳川義勢

慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

小林正規・竹内 勤

Key Words : 赤痢アメーバ, *Entamoeba dispar*, ジアルジア, 施設内感染, 抗原検出キット

はじめに

下痢症の原因となる赤痢アメーバ等の腸管寄生原虫のヒトへの感染は、無症状を含む感染者の糞便中に排出される感染型原虫(シストまたはオーシスト)を手指や飲食物を介して経口摂取することにより成立する。したがって、適切な糞便の処理や手洗いによりその感染防止が可能であるが、自ら感染防止対策を行うことが困難な人が利用する施設においては、感染者の存在が施設内での集団感染につながるものと危惧される。

これまで腸管寄生原虫の蔓延防止を目的に知的障害者更正施設6施設、計646名の赤痢アメーバを中

心とした腸管寄生原虫感染実態調査を行い報告してきた¹⁾。今回、さらに知的障害者更正施設8施設の協力により腸管寄生原虫感染実態調査を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

1) 調査対象施設

知的障害者更正施設8施設の協力のもと、平成17年7月～平成18年3月において赤痢アメーバ等腸管寄生原虫感染実態調査を行った。

2) 調査対象者

本調査に同意の得られた知的障害者更正施設の利用者を対象に合計667名(男性427名, 女性240名)

Epidemiological Study on Intestinal Protozoan Infections in Institutions for People with Intellectual Disabilities (2)

Jun Suzuki* Rie Murata* Seiki Kobayashi** Yoshitoki Yanagawa*
Tsutomu Takeuchi**

*Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

**Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

論文請求先: 鈴木 淳 〒169-0073 新宿区百人町3-24-1 東京都健康安全研究センター 寄生虫研究室

表1 施設別腸管寄生原虫の感染状況

	施設								計
	G	H	I	J	K	L	M	N	
検査件数	345	33	39	44	74	59	44	29	667
赤痢アメーバ陽性数	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>E. dispar</i> 陽性数	-	-	-	-	-	-	-	3	3
大腸アメーバ陽性数	13*	6	-	-	-	-	1	8**	28
小形アメーバ陽性数	17	-	1	-	-	1	-	6	25
ジアルジア陽性数

*：小形アメーバとの重複感染者が5名

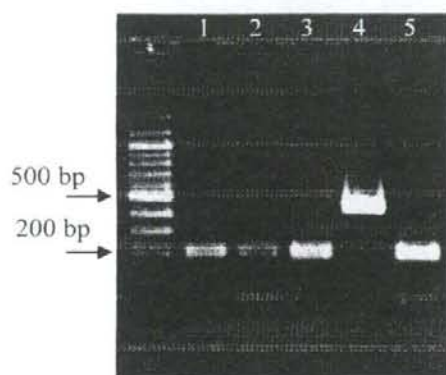
**：小形アメーバとの重複感染者が3名、*E. dispar* との重複感染者2名

図1 SSUrRNA を標的とした PCR 法による赤痢アメーバ、*E. dispar* 遺伝子の検出
1～3：施設Nの糞便試料
4：*E. histolytica* (HM1：IMSS)
5：*E. dispar* (SAW1734RcIAR)

について調査を実施した。

3) 検査材料

検体は検査時に本人が特定できないように施設側で氏名の番号化を行ったうえ、検体番号、性別、年齢のみが記載された糞便、血清を検査材料とした。また、検体は検査を行うまでは4℃で保存した。

4) 検査方法

①顕微鏡検査：ホルマリン・ユーテル法により腸管寄生原虫の濃縮を行い、ヨード・ヨードカリ染色後、顕微鏡下で形態的な同定検査を行った。

②赤痢アメーバ特異抗原の検出：*E. histolytica* II (TECHLAB 社) キットを用い赤痢アメーバ特異抗原

の検出を行った。検査方法はキットの使用法に従った。

③赤痢アメーバの分子生物学的同定：アメーバのシストが多数認められた場合、QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN 社) を用い DNA を抽出した後、小画粒子リボソーム RNA (SSUrRNA) をコードする遺伝子を標的とした Multiplex-PCR 法により赤痢アメーバおよび *Entamoeba dispar* (以下 *E. dispar*) を識別した²⁾。

④赤痢アメーバ抗体の検出：赤痢アメーバ抗体検査は糞便検査(①、②)において陽性だった場合に実施した。病原体検出マニュアル(国立感染症研究所 2003 年発行)に従い³⁾、プレート ELISA 法で行った。400 倍に希釈した血清を試料とし、96 穴プレートに固相化した赤痢アメーバ抽出抗原に対する反応性を調べた。405nm における吸光度が陰性コントロールの3倍以上の値を示した場合、供試した検体を陽性とした。

⑤ジアルジアの遺伝子型の検討：顕微鏡検査でジアルジアが認められた場合、③と同様に DNA を抽出した後、ジアルジアの遺伝子型を検討するためグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) 遺伝子の部分領域(約 220bp) を標的とした PCR を行った⁴⁾。PCR 増幅産物を精製後、BigDye Terminator Cycle Sequencing 法によるシークエンス反応を行い、ABI PRISM 310 genetic analyzer で塩基配列を解析し、ジアルジアの遺伝子型を決定した。

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 "	126 (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II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ことが必要であると考えられた。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.

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. PCR primers targeting 18S rRNA gene

Method	Name	Primers	Amplicon size (bp)	Ref.
PCR	SSU-F1	AACTGGTGGTCTCCGCAAGTC	1750	3
	SSU-R1	TGATCTCTGACAGGTCACCTAAC		
Direct sequences	18S2	AGTACAGCAAAATACAAATACAGG	400	4
	PCR-SSCP	CTCTGTTAAGGCACTCAATTTTC		
nested PCR-RFLP	SSU-F2	TTCTAGAAGCTAATACATGCG	1323	5, 13
	SSU-R2	CCCATTTCTTTGAAAACAGGA		
	SSU-F3	GGAAAGGGTTTATTTATTAGATAAAG		
	SSU-R3	AAGGAGTAAGGAAACACCTCCA		
nested PCR-RFLP	ExCry1	GCCAGTATCATATGCTGTTCTC	340	8
	ExCry2	ACTTTAAATAGAAATGCCCC		
	NesCry3	CGGAAAAAAGCTGCAATTTATGGAAGG		
	NesCry4	GGATGATTCAGAGGATATGCTCTCC		
nested PCR	18S-F2	GACATATGATTAAGTTCTGACCC	700	12
	18S-R2	CTGAAGGAGTAAAGGAAACACC		
	18S-F1	CTTATCAAGCTTATAGACGGTAAAG		
	18S-R1	TCTAAGAAATTCACCTCTGACTG		
PCR	CPB-DIAGF	AGACTCTGATTTGATTTCTTG	415	3
	CPB-DIAGR	TAAGGTGCTGAAGGATAAAG		
nested PCR-RFLP	N-DIAGF2	CAATTGAGGCAAGCTGCTGCGAG	667	10
	N-DIAGR2	CCTTCTGATGCTGAGCTGCTGATG		
	CPB-DIAGF	AGACTCTGATTTGATTTCTTG		
	CPB-DIAGR	TAAGGTGCTGAAGGATAAAG		

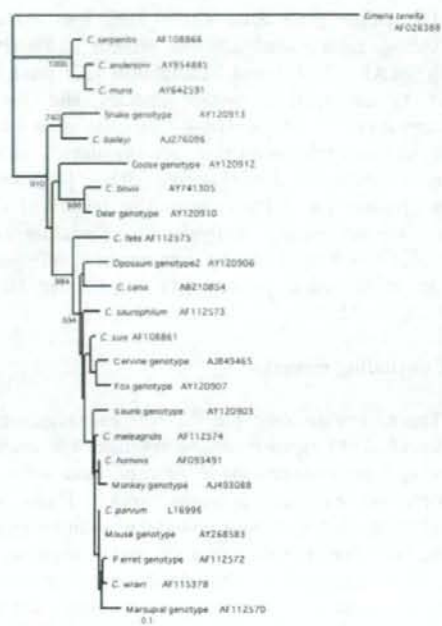
3.1. 18SrRNA gene: The optimum method of genotyping *Cryptosporidium* spp. has involved the use of the 18SrRNA gene to date, since its locus consists of five copies on the genome, which achieves high detection sensitivity. The locus was originally analyzed by a PCR-RFLP method using oocysts from environmental 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 Vsp1 and Dral1 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].

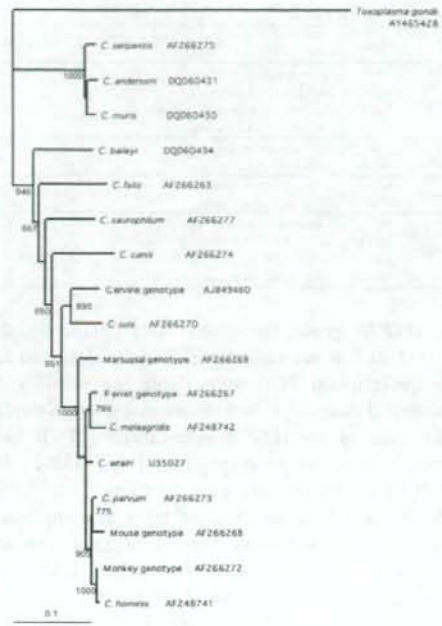
Table 2. PCR primers targeting COWP gene

Method	Name	Primers	Amplicon size (bp)	Ref.
PCR-RFLP	ooc-15	GTAGATAAAGGAAAGGATGTTG	180	14
	ooc-9	GAAGCTGAAATACAGGATATCTTG		
nested PCR-RFLP	BCOWPF	ACCCCTCTCAACAACTTTTCTCTC	700	17
	BCOWRF	CCGACCTTTCCCACTCAATTAACCC		
nested PCR-RFLP	oocry 1	AAATTAACAAATGACCCACAGTA	429	18
	oocry 4	CCATGATGATGCTGAAATTTTGTAT		
	oocry 1	CTGTGATATCTGACAAE		
	oocry 2	GGCACTAATGATCTCTCT		
PCR-RFLP	Direct sequences	PCOWPF	GTGTACAGTCTGATCTGACAC	435
		GTGTACAGTCTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
		GTGTCACTGATCTGACAC		
nested PCR-RFLP	Direct sequences	PCOWRF	GGACATAGTCTGATGTTG	435
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
		GGACATAGTCTGATGTTG		
nested PCR-RFLP	Direct sequences	PCOWPF	CTCTCCAGCTTCAATGTTCC	18
		CTCTCCAGCTTCAATGTTCC		
		CCACCAAGCTGAGAAATGTC		
		CTCTCAATCCAGAAATGTC		
PCR-RFLP	Direct sequences	PCOWRF	GGGACTCTTCACTGAGGAC	141
		GGGACTCTTCACTGAGGAC		
		GGGACTCTTCACTGAGGAC		
		GGGACTCTTCACTGAGGAC		

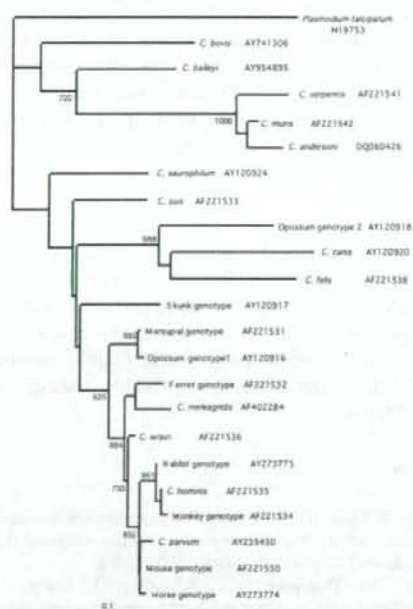
3.2. COWP gene: For primer sets (Table 2), COWP PCR was initially carried out using a Cry 9/15 primer set [14], and then improved to a more sensitive nested PCR method using a novel outer BCOWPF/R primer set [17]. Oocry 3/4 and oocry 1/2 primer sets, which were also designed for a single-tube nested 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/R 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].



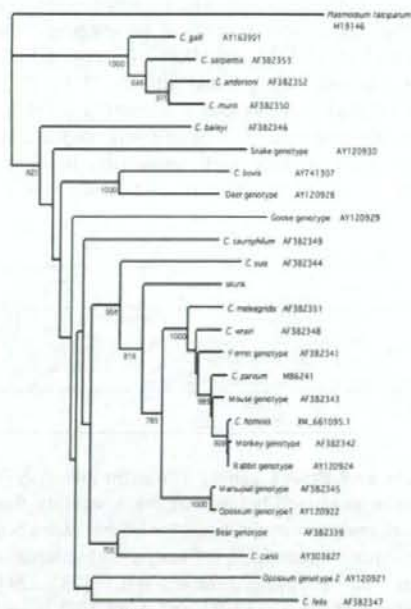
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 1 Phylogenetic relationship among *Cryptosporidium* species and genotypes inferred by NJ analysis (A): 18S rRNA 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	ATGCTCTGAAGGTCACGCTATTGGTATGA	2,010	20
	HSP-R1	TTAGTGTGACCTCTCAACAGTTGG		
	HSP-F2	TACTTCAATGCTGTGGTATATGGAGAAA		
	HSP-R2	CAACAAGTGGACATTAAGATCC		
PCR-RFLP	Cshp1	AACAATCTCTGCCCCTACAGG	580	21
	Cshp4	AAGAGCATCTTGATCTTCT		
Direct sequence	Cshp2386F	CTGTTCCTATGGTGGCTGCTG	300	19
	Cshp2672R	CTCTTGGTGTCTGGTGGAAATA		
	HSPF4	GGTGGTGGTACTTTTATGATGATG		
	HSPR4	GCCTGAACCTTTGGAAATACG		
Direct sequence	HSPF3	OCTGTGATCACTCACTGGGTGG	325	22
	HSPR3	CTCTGTGCTCAACAGATCC		

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	ATGAGGAGTGAAGAAAGATAAAGCTATCAAGC	1,995	23
		Act-R1	AGAAGACAC/TTTCTGTGTGACAAAT		
		Act-F2	CAAGCA/TTTGAAGTTTGTATCAAA		
		Act-R2	TTTCTGTGTGACAAAT/ATGCAATTTGG		
poly-T	PCR-RFLP	crp 44	CTCTTAATCAATCATTAAC	520	24
		crp 37	CAGCAAGATATGAAATCCG		

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 18S rRNA 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, Handoyo 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, Tchacko 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 cayatanensis*, 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 cayatanensis*) 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(ビオスリー[®])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 cayatanensis* 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 金沢市宝町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

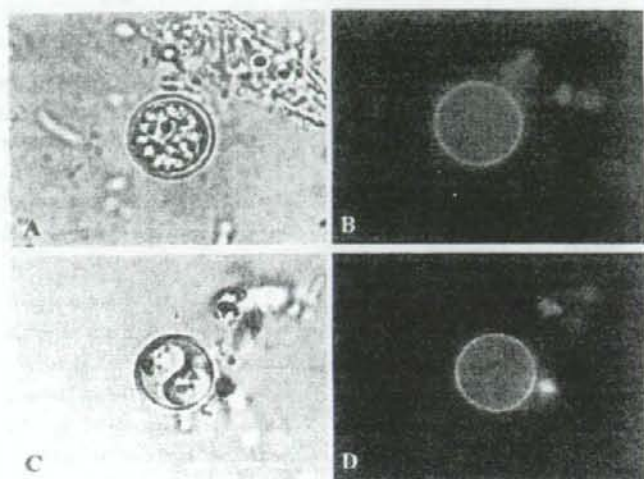


図1 光学的顕微鏡像

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

Flare Designator	Species	Sequence (5' to 3')	Region (bp)	Reference Application
F16000001	<i>C. parvum</i>	TACGATGTAAGACATT	126	Lo PK
F2000001	<i>C. parvum</i>	CAGGDAAGCAAGGAGG	126	Lo PK
F20000001	<i>C. parvum</i>	GTCTATTCTTGTGATTCAGGACCA	174	Lo PK
C20000001	<i>C. parvum</i>	CGACCTCTGGGCTCC	204	Lo PK
F16000001	<i>C. parvum</i>	CTGTGTCATATATATCCAC	182	Lo PK
C20000001	<i>C. parvum</i>	TATTCGAACTGATCTGTC	182	Lo PK

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、ピオスリー 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、ピオスリーが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

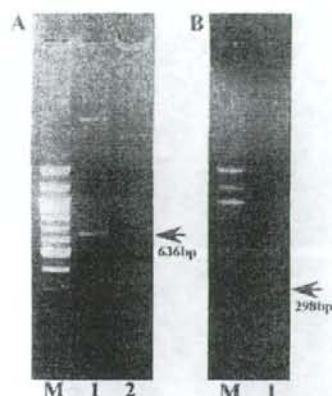


図2 PCR増幅産物のゲル泳動像
 (A) 1st PCRの結果, M: 100bp ladder,
 1: 治療前, 2: 治療後
 (B) Multiplex-PCRの結果, 治療前の1st PCR
 サンプルをテンプレートに2nd PCRを実施

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クエ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 の増幅産物のシークエ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 *Cryptosporidium* 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するとされているのは, 1999 年にハイチのサイクロスポロ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, サイクロスポロ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⁾, まづ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. のみの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ロラにおける *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로스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. cercopithecus* 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 (5), 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

消化管寄生虫症の最近の話題

Gastrointestinal
Research

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糞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、しかも健康人では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) 法およびシークエ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 シンテース遺伝子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、より高感度なリアルタイム 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
canine 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* をはじめいくつか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するとされている *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⁾のあいづく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同性が高く(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、酸化的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ズ(AOX)、ピルビン酸：ニコチンアミドアデニンヌクレオチド(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* での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¹³⁾、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なら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

- 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
- 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
- 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
- Petri WA Jr : Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 19 : 523-526, 2003
- Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P *et al* : Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* 117 : 31-37, 1998
- Morgan UM, Xiao L, Monis P *et al* : Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium muris* from various hosts. *Parasitology* 120 : 457-464, 2000
- 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
- Xiao L, Morgan UM, Limor J *et al* : Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65 : 3386-3391, 1999
- 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
- 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
- Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J *et al* : Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21 : 430-437, 2005
- Nime FA, Burek JD, Page DL *et al* : Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70 : 592-598, 1976
- Mead JR : Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist Updat* 5 : 47-57, 2002
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S *et al* : Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304 : 441-445, 2004