

[ノート]

兵庫県の簡易水道原水から検出された爬虫類由来のクリプトスポリジウム

辻 英高^{1*} 押部 智宏¹ 小野 一男² 山本 昇五³ 近平 雅嗣¹
増田 邦義⁴ 八木田 健司⁵ 泉山 信司⁵ 遠藤 卓郎⁵ 山岡 政興¹

Detection of *Cryptosporidium* derived from reptile in the source water of a public simple water supply , Hyogo Prefecture

Hidetaka TSUJI^{1*} , Tomohiro OSHIBE¹ , Kazuo ONO² , Shogo YAMAMOTO³ , Masatsugu CHIKAHIRA¹ ,
Kuniyoshi MASUDA⁴ , Kenji YAGITA⁵ ,
Shinji IZUMIYAMA⁵ , Takuro ENDO⁵ and Masaoki YAMAOKA¹

¹*Infectious Disease Research Division , Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences , 2-1-29 , Arata-cho , Hyogo-ku , Kobe 652-0032 , Japan ,*

²*Kobe Tokiwa College ,* ³*Hyogo Environmental Advancement Association ,*

⁴*Kobe Co-medical College and* ⁵*Department of Parasitology ,*

National Institute of Infectious Diseases

Cryptosporidium oocysts were detected in the source water from a public simple water supply at Yamasaki town in Hyogo Prefecture. The oocysts were existed in a considerably short period of time during September to October, 2001, and the detected number up to 102 per 10L. It was not proved that the health of the inhabitant was damaged by the pathogen in the investigation period. Although isolated oocysts were morphologically identified as *C.parvum*, the amplification results by the polymerase chain reaction were not completely in agreement with *C.parvum*, and became it clear that they were *Cryptosporidium* sp. derived from reptiles, which Xiao et al. showed in their studies by the sequence analysis of 18S rRNA gene locus.

はじめに

クリプトスポリジウムはApicomplexa 門 Sporozoasida 綱 , Eucoccidiorida 目 , Cryptosporidiidae 科に属する原生動物で , ヒトを含めた多種類の動物の消化管内に寄生する . 環境中ではオーシストで存在し , 経口摂取により体内に入ると消化管内で脱嚢したオーシスト中のスポロゾイトが , 主に小腸の上皮細胞に寄生する . スポロゾイトは上皮細胞の微絨毛に侵入し , 微絨毛内に形成された寄生胞内で無性生殖と有性生殖を繰り返して増殖する . 有性生殖により形成された新たなオー

¹感染症部 ²神戸常盤短期大学 ³ひょうご環境創造協会

⁴神戸総合医療介護福祉専門学校

⁵国立感染症研究所寄生動物部

* 別刷請求先 : 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

感染症部 辻 英高

シストは、糞便とともに体外に排出される¹⁾。クリプトスポリジウムは哺乳類、爬虫類、魚類などに寄生する多くの種類があることが知られており、げっ歯類における *C.muris* および *C.parvum* の発見以来、様々にその種類が分類されている^{1,2)}。Xiaoら³⁾は、オーシストの形態学、自然宿主、遺伝学的特徴などから、クリプトスポリジウムを哺乳類に寄生する *C.parvum* など7種、トりに寄生する *C.baileyi* など3種、爬虫類に寄生する *C.serpentis* など2種、および魚に寄生する *C.mohnari* の13種に分類しており、この他にも命名されていない種類や、同一種内の Genotype の存在などを遺伝学的に明らかにしているが、ヒトに下痢を起こすクリプトスポリジウムのほとんどは *C.parvum* と *C.hominis* である³⁾。*C.parvum* は1976年ヒトへの感染が報告され^{1,4)}、1980年代から後天性免疫不全症候群での致死性下痢症の原因として注目されるようになった^{5,6)}。1983年以降には、散発的下痢症のみではなく、集団感染事例が数多く報告されている¹⁾。

クリプトスポリジウムは環境中で数ヶ月間は感染力が保持され、また、直径4~5 μmと小型であるため通常の浄水処理では完全に除去できないこと、さらに、塩素に抵抗性であることから、水道水など水系を介しての集団感染が多い¹⁾。米国ミルウォーキー市で1993年に *C.parvum* によって汚染された水道水による大規模な集団感染が起きている⁷⁾。また、国内では *C.parvum* の水道原水やビルの受水槽への混入による集団感染事例が報告されている^{8,9)}。

水道水の定期検査で、2001年9月4日に兵庫県山崎町川戸地区の簡易水道の原水からクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。このオーシストは、形態学的にヒトの病原種である *C.parvum* と同定されたが、遺伝子分析によって爬虫類(ヘビ)に寄生する種類であることが明らかになった。これまで国内で水道原水から爬虫類由来のクリプトスポリジウムが検出された報告はない。国内初発例として簡易水道から検出されたクリプトスポリジウムに対する住民の健康調査と、オーシストの混入原因を究明するために行った水源付近の調査結果、および原水から検出されたオーシストの形態学的、遺伝学的分析結果について報告する。

材料と方法

1. 住民の健康被害調査

住民の健康被害を調査するため、2001年9月5日、簡易水道を利用する川戸地区141戸(571名)の住民に対して問診票を配布し、併せて、戸別訪問による健康状態の調査を行った。なお、簡易水道は、湧き水の浅井戸からポンプで原水を汲み上げた後、塩素処理して給水されており、当時の一日最大給水量は105 m³で、給水人口は613人であった¹⁰⁾。

2. 検体

クリプトスポリジウムが検出された水源近郊の揖保川河川水、および水源周辺を流れる農業用水をそれぞれ、2001年9月6日に採取した。また、9月8日、および9日に下痢症状を呈した2名の便を検体として供した。さらに9月27日に水源周辺の土壌、および、カメ(クサガメ; *Chinemys reevesii*)1個体と、2種類のカエル(トノサマカエル; *Rana nigromaculata*, アカガエル; *Rana japonica japonica*)をそれぞれ3個体ずつ採取した。簡易水道の原水は、2001年9月4日から11月28日の期間に、8回採取した。採取した原水は、感染症検査マニュアル¹¹⁾に従って、ポリエチレン製の採水袋に入れて試験機関へ搬入された。

3. 検体の集嚢子法

河川水、農業用水、および原水の集嚢子は既報^{2,13)}に準じて行った。すなわち、検体10Lをセルロースアセテート膜(孔径1.2 μm)で加圧し、濾過濃縮した。膜面上の捕捉物の回収にはペンシル型超音波発生器(HeatSystems・Ultrasonics, 50 W, 23 KHz)を用いて捕捉物を剥離させ、0.15 M リン酸緩衝食塩水(pH 7.6)中に懸濁させた。懸濁液はダイナビーズ抗 *Cryptosporidium* キット(Dynal)を用いて免疫磁気ビーズ(IMS)を用いて濃縮した。ヒト糞便はクリプトスポリジウム症の診断マニュアル¹⁴⁾に基づいてシヨ糖浮遊法を行って集嚢子した。土壌試料については、Walkerら¹⁵⁾の方法とシヨ糖浮遊法¹⁴⁾を組み合わせた。すなわち、あらかじめメッシュ(ポアサイズ1 mm)でろ過した試料25gに分散剤(10 mM Tris, 0.1% Tween 80, pH 7.2)100 mLを加え、スターラーで15分間攪拌後、3,000 rpm(1,680 × g)で10分間遠心した。上清を除き分散剤を加えて同様の操作を3回行った後、分液ロート中に沈渣と分散剤100 mLを入れ、20分間シェーカーで攪拌した。その後、12,000 rpm(18,200 × g)で10分間遠心して上清を除いた沈渣に、それぞれシヨ糖液(比重1.2)を攪拌しながら加え、遠沈管をシヨ糖液で満たして20分間放置後、液表面から20 mLずつ分取した。分取液に10倍量の精製水を加え、12,000 rpm(18,200 × g)で10分間遠心後、精製水10 mLで沈渣を集め、IMS法で濃縮した。また、カメ(1個体)の腸管内容物については約5gを、2種類のカエル(それぞれ3個体)については種類ごとに腸管内容物1gを用いて、それぞれシヨ糖浮遊法による集嚢子を行った。

4. オーシストの形態学的同定

オーシストの形態学的同定は既報^{11,13,14)}に準じて行った。すなわち、集嚢子した試料は、FITC (Fluorescein isothiocyanate) 標識抗 *Cryptosporidium* マウス IgM モノクローナル抗体液 (Crypt-a-Glo FL; Waterborne) および DAPI

(4', 6 - diamidino- 2-phenylindole; Sigma)による染色を行った。作製した標本は、微分干渉装置(BX-U-CD-3;OLYMPUS)付き落斜蛍光顕微鏡(BX60-34-FLB;OLYMPUS)を用いてB励起でオーシストに対する特異蛍光を観察し、さらに、UV励起でDAPIによるスポロゾイトの核の染色を確認した。また、ノマルスキー微分干渉装置を用いてスポロゾイトなどオーシストの構造を観察した。

5. オーシストのDNA抽出と精製

9月6日に採水した原水10Lからの集嚢子試料からDNAを抽出した。すなわち、IMS法で濃縮後の試料液を、12,000 rpm (11,900×g)で5分間遠心した沈査を蒸留水1mLで1回洗浄し、100µLのLysis buffer (10 mM Tris [pH8.0], 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20, 0.01% Proteinase K)を加え、55℃1時間、95℃10分間反応させた^{16,17)}。その後QIA amp DNA mini Kit (QIAGEN)を用いてオーシストのDNAを精製した。

6. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Polymerase Chain Reaction)

原水中のオーシストから抽出したDNAは、感染症検査マニュアル¹¹⁾に基づき、No.1及び2のプライマー (Table 1)を用いて、それぞれ*Cryptosporidium*の18SリボソームRNA (18S rRNA)¹⁶⁾、およびPolythreonin (Poly-T)¹⁸⁾遺伝子領域を増幅させた。さらに、No.3~6 (Table 1)を用いて、それぞれ18S rRNA^{19,20)}、*Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP)²¹⁾、およびThrombospondin related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1)²²⁾の各遺伝子領域についての増幅を調べた。PCRはそれぞれの文献に記載の反応条件で行った。DNAポリメラーゼはTakara Ex Taq (Takara)を使用し、

Thermal Cycler MP TP-3000 (Takara)を用いて増幅させた。なお、陽性対照として子牛から分離された*C.parvum*株^{13,14)}を用いた。

7. オーシストの遺伝子解析

原水検体から検出されたPCR産物はダイレクトシーケンシング法 (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI PRISM model 310; Applied Biosystems)で塩基配列を調べ、Sequence Similarity Search Served by GenomeNet (BLAST), <http://blast.Genome.jp/>に登録の配列と比較した。

結 果

1. 住民の健康調査

2001年9月5日に問診票、および、聞き取り調査によって2001年7月以降の健康調査を行った結果、住民2名が下痢を訴えたが、便は軟性だが水様性ではなかった。また2001年9月6日以降、新たな患者は発生しなかった。

2. 患者および水源周辺の検査

患者および水源周辺で行ったクリプトスポリジウムの検査結果をTable 2に示した。下痢症状を呈していた2名の糞便、水源近郊の揖保川河川水、および水源周辺を流れる農業用水からオーシストは検出されなかった。また、水源付近2箇所から採取された土壌、水源付近に生息するカメ、および、カエルの、いずれの試料からもクリプトスポリジウムのオーシストは検出されなかった。

Table 1 PCR primers used in this study

No.	Target gene	Primer sequence (5'– 3')	Position *	PCR product(bp)	Reference
1	18S rRNA	AGT GCT TAA AGC AGG CAA CTG CGT TAA CGG AAT TAA CCA GAC	729-745 1,282-1,262	554	Awad-El-Kariem F.M., et al.(16)
2	Poly-T	CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG		518	Carraway.M., et al.(18)
3	18S rRNA	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT C TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC G	1-25 1,750-1,726	1,751	Xiao.L., et al (20)
4	18S rRNA	AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG	602-622 1,039-1,019	438	Johnson.D.W., et al.(19)
5	COWP	CCC AAC ATT CCT GGT GTA GCT TC GAA CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG		1,033	Xiao.L., et al. (21)
6	Trap- C1	GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA CAA CTA GCC CAG TTC TGA CTC TCT GG		1,200	Spano.F., et al (22)

*; Position within the 18S rRNA gene locus of *C.parvum* (GenBank accession no.AF093489)

Table 2 Examination of Cryptosporidial oocyst about human stool and water samples near the source water

Kind of samples	Date of sampling	Amount of sample	Number of oocysts
River water ^{*1}	Sept.6	10L	0
Water for agricultural use ^{*2}	Sept.6	10L	0
Stool ^{*3}	Sept.8	-	Negative ^{*7}
Stool	Sept.9	-	Negative
Soil ^{*4}	Sept.27	25 g each	0
Frog ^{*5}	Sept.27	1 g each	0
Tortoise ^{*6}	Sept.27	5 g	0

- * 1; Ibo River
- * 2; Waterway that flows in the vicinity of the well hut
- * 3; Inhabitant of Yamasaki town
- * 4; Collected from the front and back of the well hut
- * 5; The bowels of frogs (*Rana nigromaculata* and *Rana japonica*)
- * 6; Internal organs of a tortoise(*Chinemys reevesii*)
- * 7; Quantitative evaluation was not executed

3. 原水中のオーシストの検出

原水中のオーシストの検出結果を Table 3 に示した。オーシストは2001年 9月 4 日から 11月 28 日の調査期間中, 10 L あたり最高 102 個が検出された。原水10 L あたりのオーシストは, 9月 27日に 1 個, 10月 9 日に 0.875 個と激減し, それ以降, 11月14 日, 11月28 日の2度の調査では検体の量をそれぞれ160, 180 Lに増やして調査したが, 検出されなかった。原水から検出されたオーシストの形態学的観察結果をFig.1: に, また, 対照としてウシ糞便から分離された*C.parvum*株^{13,14)}を用いて同様に操作した結果をFig.1:

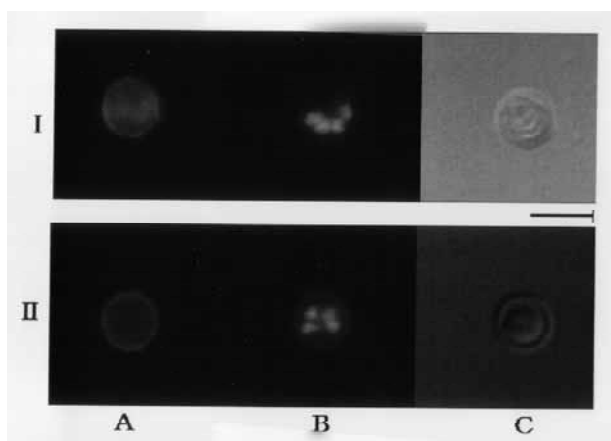


Fig.1 Morphological identification of *Cryptosporidium* oocyst from the source water by microscopy :
 ;*Cryptosporidium* oocyst isolated from the source water, ;Oocyst of *C.parvum* strain isolated from the feces of calf. A; FA staining, B; DAPI counter staining, C; Nomarski interference contrast photomicrograph Bar represents 5 μm
 Performed by Hyogo Environmental Advancement Association

Table 3 Detection of Cryptosporidial oocyst from the source water of a simple water supply in Yamasaki town

Date of sampling	Amount of sample	Number of oocysts	Number of oocysts/10L
Sept.4	10L	50 ^{*1}	50
Sept.6	10L	102 ^{*1}	102
Sept.11	10L	30	30
Sept.11	20L	150 ^{*2}	75
Sept.27	10L	1	1
Oct.9	80L	70	0.875
Nov.14	610L	0	0
Nov.28	180L	0	0

- *1; Performed by Hyogo Environmental Advancement Association
- *2; Performed by Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

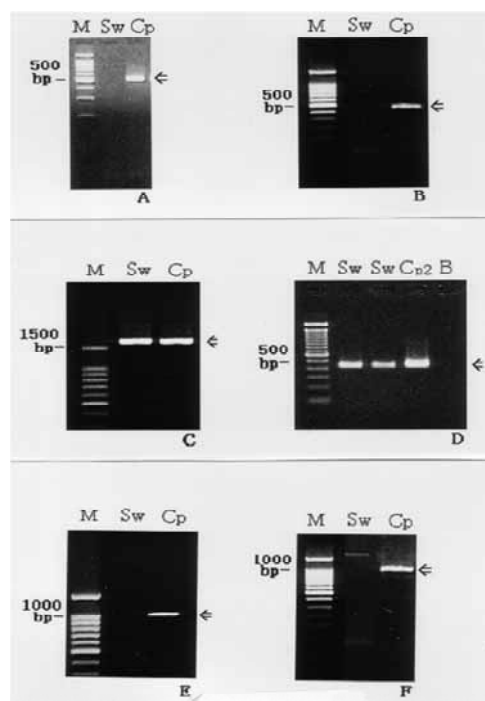


Fig.2 Agarose gel visualization of diagnostic polymerase chain reaction products of *Cryptosporidium* isolates from the source water of a simple water supply amplified with the primers designated in Table 1(No.1 ~ 6) : Amplification results of 18S rRNA gene(photogram A, C and D) , Poly-T gene(photogram B), COMP gene (photogram E) , and TRAP-C1 gene (photogram F) M; Molecular size marker, Sw; *Cryptosporidium* isolates from the source water, Cp,Cp2; *C.parvum* strains for positive control, B; Negative control, Each arrow shows the position of expected size of amplified fragment within the 18S rRNA gene(photogram A; 554 bp, C; 1,751 bp, D; 438 bp), Poly-T gene (photogram B; 518 bp), COMP gene (photogram E; 1,033 bp), and TRAP-C1 gene (photogram F; 1,200 bp). Photogram D was offered by Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

```

Query: 1  gatttctgttaattctcgtatatatactacggtagtatatgacattaacataattcat 60
          |||
Sbjct: 422 gatttctgttaattctcgtatatatactacggtagtatatgacattaacataattcat 481

Query: 61  attacttttatagtatatgaaattttactttgagaaaatagagtgcctaaagcaggcgt 120
          |||
Sbjct: 482 attacttttatagtatatgaaattttactttgagaaaatagagtgcctaaagcaggcgt 541

Query: 121  ttgccttgaatactccagcatggaataataaaggattttatcttcttattggttct 180
          |||
Sbjct: 542 ttgccttgaatactccagcatggaataataaaggattttatcttcttattggttct 601

Query: 181  aggaataaaaataatgattaataggacagttgggggcatttgtatttaacagtcagaggt 240
          |||
Sbjct: 602 aggaataaaaataatgattaataggacagttgggggcatttgtatttaacagtcagaggt 661

Query: 241  gaaattcttagatttgttaaagacaaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttctca 300
          |||
Sbjct: 662 gaaattcttagatttgttaaagacaaactactgcgaaagcatttgccaaggatgttctca 721

Query: 301  ttaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagcttaacca 360
          |||
Sbjct: 722 ttaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagcttaacca 781

Query: 361  taaactatgccgactagagattggaggttgttcttactc 400
          |||
Sbjct: 782 taaactatgccgactagagattggaggttgttcttactc 821

```

Fig.3 Comparative Alignment of the 18S ribosomal RNA gene locus of *Cryptosporidium* isolates and *Cryptosporidium* sp. (Isolate Y; W11) : 100% of homology was obtained for the base arrangement of *Cryptosporidium* from which the upper row was obtained in this case (Query) and the lower berth in the base arrangement of *Cryptosporidium* sp. genotype W11 (Sbjct). (BlastN Score = 793 bits (400), and Identities = 400/400 (100%))

に示した。原水から検出されたオーシストは直径約4.5 μmの類円形で、蛍光抗体法で緑色のオーシスト壁 (A), DAPI染色で青色の蛍光を発する4個のスプロゾイトの核 (B), ノマルスキー微分干渉像でスプロゾイト様の内容物 (C) が観察された。これらの形態学的な観察の結果から、原水から検出されたクリプトスポリジウムのオーシストは、*C.parvum*のオーシストと判定された。

4. PCRによるクリプトスポリジウム遺伝子の増幅

オーシストから抽出したDNAについて行ったPCRの結果をFig.2に示した。原水から検出されたオーシストのDNAはマニュアル¹¹⁾に基づいた18S rRNA (Fig.2:A), およびPoly-T (Fig.2:B)遺伝子領域のいずれも増幅されなかった。一方、18S rRNA遺伝子領域において、Xiaoら²⁰⁾のプライマー、および、Johnsonら¹⁹⁾のプライマーで増幅がみられ、それぞれ*C.parvum*のそれと一致した (Fig.2:C,D)。しかし、*C.parvum*に特異的なCOMP遺伝子領域 (Fig.2:E), およびTRAP-C1遺伝子領域 (Fig.2:F) は、いずれも増幅されなかった。

5. 原水から検出されたクリプトスポリジウムの18S rRNA遺伝子配列

Johnsonら¹⁹⁾のプライマー (Table 1) を用いたPCR増幅産

物の塩基配列について、GenBankに登録されている生物由来の配列との同源性検索の結果、米国でstormwaterから分離されたヘビ由来のクリプトスポリジウム (Isolate Y: *Cryptosporidium* sp. Genotype W11) の塩基配列²³⁾と100%一致した (Fig.3)。

考 察

クリプトスポリジウムの種の同定のための遺伝学的分析法として、PCR法やPCR-RFLP法、およびダイレクトシークエンス法が用いられている。これらの分析法のうちPCR法はクリプトスポリジウム症の主要な原因である*C.parvum*の検出や同定を目的としている^{24,25)}。しかし、ヒトには*C.parvum*以外の種も感染をおこすと報告^{1,5,6)}されており、感染の原因や感染経路を解明するためには、クリプトスポリジウムの種や遺伝子型を正確に同定する必要がある。

Awad-EI-Kariemら¹⁶⁾は18S rRNA領域についてPCRを行い、制限酵素*Mae*によるRFLP分析により、*C.parvum*を*C.baileyi*、および*C.muris*から区別している。また、Xiaoら²¹⁾はCOMP領域について制限酵素*Rsa*を用いたPCR-RFLP法によりクリプトスポリジウムを区別しているが、その中でデザインしたプライマーは*C.parvum*のそれぞれ human, monkey, bovine,

```

W11: 1   ggaaggg ttg ttt attagataaagaaccaatatttttggtgactcataataactttac
C.parvum: .....aa.....
W11: 61  ggaacacattta-tgtgacatatcatcaagtttctgacctatcagctttagacggtagg
C.parvum: .....a..a.....
W11: 120 gtat tggcctaccgtggctatgacgggtaacggggaat tagggt tgcattccggagagg
C.parvum: .....a.....
W11: 180  agcctgagaaacggctaccacatctaaaggaaggcagcaggcgcaaat tacccaatcct
C.parvum: .....
W11: 240  gacacagggaggtagtgacaagaaataacaa tacaggcccttacggctctgtaat tggaa
C.parvum: a t.....a t..t..t.....
W11: 300  tgagtaaagtataaacccctttacaagtaacaattggagggcaagtctgggtgccagcagc
C.parvum: .....t.....t.....
W11: 360  cgcggtaattccagctccaatagcgtatataaaagtgtgtgcagttaaaagctcgtagt
C.parvum: .....
W11: 420  tgatttctgtttaattctcgtat-----tattatactacggtagtatatgacatttaaca
C.parvum: .....aa t t a t a t a a a a .. t . g a . a - - - - t . . . . a . t . . . .
W11: 474  taattcatattact-----tttatagtatatgaaattttactttgagaaaattagagt
C.parvum: .....at t t t t . . . t.....
W11: 527  gcttaaagcaggcgtttgccttgaatactccagcatggaaataataa taaggattttatc
C.parvum: .....a a.....t.....a.....
W11: 587  tttcttat tggttctaggataaaaaataatgattaataggacagttggggcattttgtat
C.parvum: . . . t . . . . . a . . . . . g . . . . .
W11: 647  ttaacagtcagaggtgaaattcttagatttgttaaagacaaactactgccaagcattttg
C.parvum: .....a.....
W11: 707  ccaagga t g t c t c a t t a a t c a g a a c g a a g t t a g g g g a t c g a a g a c g a t c a g a t a c c g
C.parvum: .....t.....
W11: 767  tcgtagtcttaaccataaaactatgccgactagagattggaggtgttcccttactcctt
C.parvum: .....a.....

```

Fig.4 Alignment of the 18S ribosomal RNA gene of *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 in the database of GenBank(824 base) and comparative alignment of the partial sequence within the 18S ribosomal RNA gene locus of *C.parvum* : W11; *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 (GenBank accession no. AF262325) *C.parvum*.; *Cryptosporidium parvum* (GenBank accession no. AF093489) Dots indicate bases that are identical to the *Cryptosporidium* sp. Genotype W11. Sequence of the primer sets (Table 1 No.4) used for the analysis of base sequence indicate by the underline.

mouse, ferret, pig, marsupial Genotypeと*C.wairi*, および*C.meleagridis*は増幅できるが, *C.parvum* のdog Genotype, *C.felis*, *C.baileyi*, *C.serpentis*, *C.andersoni*, および*C.muris* は増幅できないとしている。Johnsonらのプライマー (Table 1) は, 18S rRNA 遺伝子領域内のposition 602 から1039 (*C.parvum*; AF093489)を増幅させるが, Champliandら²⁶⁾によって, このプライマーは, *C.parvum*, *C.meleagridis*, *C.muris*, *C.baileyi* の4種類のクリプトスポリジウムの18S rRNA遺伝子を増幅させることが確認されている。本事例で, 原水から分離されたオーシストは, 18S rRNAに設定されたJohnsonらのプライマーとのみ反応し, Poly-T, COMP, およびTRAP-C1 遺伝子の各領域の検出を目的としたプライマーとは反応しなかった。GenBank登録の*Cryptosporidium* sp. Genotype W11 (AF262325) の18S rRNA領域の塩基配列を, *C.parvum* (AF093489) の配列と比較したところ, Johnsonらのプライマーは, PCRによって, Genotype W11では435 bpを, また, *C.parvum*では438 bpを増幅させ (Fig. 4), 我々の結果と矛盾しない。

なお, Xiaoら²⁷⁾は*Cryptosporidium* の18S rRNA遺伝子の領域内には種によって塩基配列が異なる部位 (position; 182-189, 273-286, 636-656, 689-699)があることを報告し, これらの部位を標的としてPCR-RFLP法やダイレクトシーク

エンス法により種の同定を行っている。本事例で検出されたオーシストは, PCRで*C.parvum*とは近縁種であるが異なる種に属することが示唆され, シークエンス解析により, *Cryptosporidium* sp. Genotype W11と同じ配列をもつことが分かった。これらのことは, 未知の検体に対しては形態学的同定の後, PCRのみでなくシークエンス解析による種の同定が不可欠であることを示している。

本事例で原水から検出されたオーシスト数は最高 102 個/10 Lであり, 国内の水道水の原水あるいは浄水中にクリプトスポリジウムが混入した事例で検出されたオーシスト数 (1~8 個/10 L)²⁸⁾や, 国外で*C.parvum*による集団感染後の追跡調査において, 水道水などから検出されたオーシスト数 (1~9 個/10 L)²⁹⁾と比較すると高い数値を示した。*C.parvum*のオーシストを用いた感染実験において Dupontら³⁰⁾は, 50%のヒトが感染をおこす投与量 (ID_{50}) は 132 個であると推測している。また, 30 個の投与により, 5 人のうち 1 人が感染を引き起こしている。別の感染実験において ID_{50} は *C.parvum* の遺伝子型によって異なり, 9 個の投与量で感染が成立したと報告された³¹⁾。クリプトスポリジウムのヒトへの感染性を試験する方法として, 動物感染試験とヒト細胞株を用いた感染試験が示されて²⁸⁾いるものの, 集団感染の患者に由来するオーシストは, 実験動物に対して感染が成立しない

ことが報告されている³²⁾など、クリプトスポリジウムの感染性を評価する方法は確立されていない。

クリプトスポリジウムはその種によって宿主適合性を有し、爬虫類から分離されている *C. serpentis*, *C. saurophilum*, および *Cryptosporidium* sp. Genotype W11 は、宿主がヘビおよびトカゲのみ³⁾であり、ヒトからの分離例はない³⁾こと、本事例で検出されたクリプトスポリジウムのヒトへの感染性は下痢症患者からの病原体検出および健康調査によって証明されなかったことなどから、限りなく低いと思われる。しかし、HIV 患者など免疫機能が低下した人や、小児では *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* による感染例や、その他、*C. muris* による感染例も報告されており^{1,5)}、爬虫類由来のクリプトスポリジウムのヒトへの感染の可能性は排除できない。本事例のように自然環境に存在するクリプトスポリジウムが水源の汚染原因になり得ることから、ヒトのみならず環境試料についても多種類のクリプトスポリジウムを効率的に検出・同定できる方法を確立しておくことが必要であろう。

要 旨

兵庫県内の簡易水道原水から 2001 年 9 月にクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。水源から検出されたオーシストは 10 L あたり、最高 102 個に達し、9 月から 10 月の短期間に存在した。この期間、本病原体による住民の健康被害は証明されなかった。検出されたオーシストは形態学的には *C. parvum* と同定されたが PCR の結果は *C. parvum* と完全に一致せず、18S rRNA 領域のシーケンス解析により、Xiao らが示した爬虫類由来のクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* sp. Genotype W11) であることが明らかになった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県生活衛生課水道係、ならびに山崎および龍野健康福祉事務所の関係者に深謝いたします。

文 献

- 1) Current, W. L. and Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, 325-358(1991)
- 2) Xiao, L., Sulaiman, I., Fayer, R. and Lal, A. A.: Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **93**, 687-691(1998)
- 3) Xiao, L., Fayer, R., Ryan, J. and Upton, S. J.: *Cryptosporidium*

Taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 72-97(2004)

- 4) Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A. and Yardley, J. H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastro-enterology*, **70**, 592-598 (1976)
- 5) CDC: Cryptosporidiosis: Assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR*, **31**, 589-592(1982)
- 6) Hunter, P. R. and Nichols, G.: Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**, 145-154(2002)
- 7) MacKenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B. and Davis, J. P.: A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 161-167 (1994)
- 8) 黒木俊郎: クリプトスポリジウムによる集団下痢症発生事例. 病原微生物検出情報. **15**, No. 11 (1994)
- 9) 羽賀道信, 山田勉: 汚染された水道水によるクリプトスポリジウムの集団発生. 病原微生物検出情報. **17**, No. 9 (1996)
- 10) 兵庫県健康福祉部生活衛生課: 山崎町において発生したクリプトスポリジウム検出による給水停止事例について. 2002年3月
- 11) 小野一男, 辻 英高, 増田 邦義, 川村 隆: 「感染症検査マニュアル」クリプトスポリジウム症. 兵庫県立衛生研究所, 2000年4月
- 12) 小野一男, 辻 英高, 増田 邦義, Rai, S. K., 宇賀 昭二, 松村 武男, 川村 隆: 水系腸管病原性原虫 *Cryptosporidium* の検査法の検討. 兵庫県立衛生研究所年報, **32**, 101-112 (1997)
- 13) 小野一男, 辻 英高, 島田 邦夫, 増田 邦義, 遠藤 卓郎: 河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況. 感染症学雑誌, **75**, 201-208(2001)
- 14) 遠藤卓郎, 八木田健司, 増田剛太, 黒木俊郎: クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症診断のマニュアル. 国立感染症研究所, 東京 (2000)
- 15) Walker, M. J., Montemagno, C., Bryant, J. C. and Ghiorse, W. C.: Method detection limits of PCR and immunofluorescence assay for *Cryptosporidium parvum* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2281-2283(1998)
- 16) Awad-el-Kariem, F. M., Warhurst, D. C. and McDonald, V.: Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and

- endonuclease restriction. *Parasitology*, **109**, 19-22 (1994)
- 17) 古谷宏二, 八木田健司, 遠藤卓郎, 村上晋一, 都 築俊文, 木村浩男: クリプトスポリジウム原虫に関する研究 (第 1 報) 糞便内 *Cryptosporidium parvum* オーストの検出と同一のための PCR 法と免疫酵素染色法 北海道立衛生研究所報, **47**, 1-7 (1997)
- 18) Carraway, M., Tzipori, S. and Widner, 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)
- 19) Johnson, D. W., Pieniazek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L. and Rose, J. B.: Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3849-3855 (1995)
- 20) Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante A. A., Montali, R. J., Fayer, R. and Lal, A. A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1578-1583 (1999).
- 21) Xiao, L., Limor, J., Morgan, U. M., Sulaiman, I. M., Thompson, R. C. and Lal, A. A.: Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5499-5502 (2000)
- 22) Spano, F., Putignani, L., Guida, S. and 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.*, **90**, 195-198 (1998)
- 23) Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M. and Lal, A. A.: Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5492-5498 (2000)
- 24) McLaughlin, J., Pedraza-Diaz S., Amar - Hoetzeneder C. and Nichols G. L.: Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic Cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3153-3158 (1999)
- 25) McLaughlin, J., Amar-Hoetzeneder C. and Pedraza-Diaz S. and Nichols G. L.: Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3984-3990 (2000)
- 26) Champliand, D., Gobet, P., Naciri, M., Vagner, O., Lopez, J., Buisson, J. C., Varga, I., Harly, G., Mancassola, R. and Bonnin A.: Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1454-1458 (1998)
- 27) Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R. and Lal, A. A.: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3386-3391 (1999)
- 28) 日本水道協会: クリプトスポリジウム-解説と試験方法- . 東京 2003
- 29) Howe, A. D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K. S., Wright, P. and Hunter, P. R.: *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a Cryptosporidiosis outbreak. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 619-624 (2002)
- 30) DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B. and Jakubowski, W.: The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 855-859 (1995)
- 31) Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R. and DuPont, H. L.: Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.*, **180**, 1275-1281 (1999)
- 32) 山本徳栄: 水道水汚染によるクリプトスポリジウム症の集団発生. 埼玉医科大学雑誌, **28**, T-77-84 (2003)