

*Cryptosporidium*の分子疫学

泉山 信司, 小村 麻子, 八木田 健司, 遠藤 卓郎 (国立感染症研究所・寄生動物部)

Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* infections in Japan

S. IZUMIYAMA, M. OMURA, K. YAGITA and T. ENDO

(Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Japan)

## SUMMARY

Molecular characterization has provided insights into the epidemiology of *Cryptosporidium*, which is one of the major causes of protozoal diarrhea in humans worldwide. By PCR amplification and sequence analysis of 18S rDNA and poly-threonine genes of clinical isolates, it has been demonstrated that three large-scale outbreaks and more than 60% of sporadic cases in Japan were caused by human-adapted genotype I (syn. *Cryptosporidium hominis*). In this study, the isolates were further characterized by sequencing of glycoprotein cpgp40/15, which showed the highest intraspecific diversity. As a result of this analysis, 37 clinical isolates were placed in 9 distinct clusters. This suggests that this analytical method is a promising tool for outbreak characterization and traceback investigation. The 18S rDNA gene would be suitable as the target molecule for species identification and cpgp40/15 gene for subgenotype differentiation. The availability of molecular characterization of intestinal protozoa will have a major impact on our knowledge of *Cryptosporidium* epidemiology and point to new methods of control.

[目的] クリプトスポリジウムは激しい下痢を引き起こす消化管寄生性原虫で、強い塩素耐性を有することから水道を介して水系感染することで問題とされている。糞口感染であることから食品、接触による感染経路も存在するが、経路の特定や疫学調査には分子疫学の精度向上が求められている。従来のクリプトスポリジウムの分子疫学は専らヒト型あるいはウシ型の別を判定することが行われ、18S rDNA, poly-threonine等の領域が用いられていた。わが国で発生しているクリプトスポリジウム症はヒト型を中心としており、特に1996年の越生町の事例、2002年の北海道の事例、2004年の長野県のプールの事例ではいずれもヒト型であった。従ってヒト型をより詳細に型別することが強く望まれていた。

病原性細菌の分野ではパルスフィールドゲル電気泳動により高解像な識別を達成しているが、クリプトスポリジウムは試験管培養が困難であり、十分な解像力の得られる領域を用いたPCR-直接塩基配列決定が現実的な方法である。クリプトスポリジウムの遺伝子型別には種々の方法が報告されており、18S

rDNA, Poly-Tの他に、GAG-repeat microsatellite, cowp, actin, hsp, cpgp40/15等がある。本研究ではまず鋳型DNAが十分量保存されていた集団感染株を用いてこれらの配列を取得し、データベースに登録されている既知の配列との相同性を確認した。次に、最も変異の大きかった領域を対象としてわが国の患者株等より配列を取得し、系統樹解析を行ったので報告する。

[材料と方法] 本研究で使用したクリプトスポリジウムの保存DNAは、越生町で発生した1996年の集団感染より収集を開始し、2002年北海道、2004年長野での集団感染、輸入感染例、並びに国内散发事例より得た。ヒト以外ではウシからの分離株4株を含む。GenotypeはPoly-T並びに18S rDNAの塩基配列より過去に決定し、一部報告している (Yagita et al., 2001)。

本研究の遺伝子型別の対象として18S rDNA, poly-T, hsp, cowp, actin, GAG repeat microsatellite, cpgp40/15の一部領域を用いた。反応にはEx Taq hot

start version (Takara) を使用した。18S rDNA領域の増幅には18S rDNA遺伝子内の約850bpを増幅領域としたNested-PCRを行なった (Xiaoら, 1999)。Poly-T領域のPCRに使用したプライマーはポリスレオニン領域の約520bpを増幅するCRY-44およびCRY-373を用いた (Carraway et al., 1997, Yagita et al., 2001)。Actin領域のPCRは約1kbを増幅するプライマーを用いた (Sulaiman et al., 2002)。cowp領域のPCRは約500bpを増幅するプライマーcry-15とcry-9を用いた (Spano et al., 1997)。GAG repeat microsatelliteのPCRは約200bpを増幅した (Caccio et al., 2000)。CPGP40/15領域のPCRはLeavら (2002) ならびにWuら (2003) のプライマーを用いた。反応条件は基本的に各文献に記載のものに従った。

得られたPCR産物よりBigDye Terminator Cycle Sequencing kit V1.1あるいはV3.1, ならびにABI Prism 310 Genetic Analyzerあるいは3730xl DNA Analyzer (AppliedBiosystems) を用いて直接塩基配列決定を行なった。配列のアセンブルにSeqMan(Lasergene), アライメント作成にPileup (GCG Wisconsin package) を使用した。

**[結果及び考察]** 2002年の集団感染について18S rDNA, poly-T, hsp, cowp, actin, GAG repeat microsatellite, cpgp40/15の一部領域の塩基配列を取得し

た結果, 既存のデータベースに登録されている配列との不一致率 (Diversity) はそれぞれ0.2%, 0.2%, 0.3%, 0%, 0%, 2%, 6%が得られた。すなわちcpgp40/15領域において最も多様性があり, 詳細な型別に適していると期待が持てた。特に領域の前半にpoly-serineの3塩基の繰り返し配列があり, 繰り返しの増加が多様性に寄与していた。この結果に従いcpgp40/15領域を用いて他の国内分離株より配列を取得したところ, 実際に配列にリピート数の増減等の多様性が認められた。系統樹解析において集団感染の属するクラスターが明確に分離し (図1), 配列に差異のなかった従来のpoly-T領域に比較して大きな改善を見た。従来のクリプトスポリジウムの遺伝子型別では専ら種別を中心に行なわれてきたが, 今後は分子疫学情報の蓄積を目的にcpgp40/15領域を用いた詳細な方別を行なうことを提案したい。

#### [文献]

厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 「アジアで流行している感染症のわが国への侵入監視の強化に関する研究 (研究代表者: 渡辺治雄)」平成17年度研究報告書より, 分担研究報告書「クリプトスポリジウムを中心とした腸管寄生性原虫類の分子疫学」遠藤卓郎ら