

高校の寮生における集団下痢症事例からのクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium meleagridis*) の検出について

浅野由紀子 烏谷竜哉*¹ 奥山正明 高見俊才 大瀬戸光明 井上博雄
山本浩二*² 青陰純子*¹ 佐伯紀之*³ 藤原正方*¹ 白石光伸*¹ 内田和彦*¹
佐伯裕子*¹ 鈴木美紀子*¹ 山本 公*¹ 宇高雅稔*⁴ 菅 恭三*¹ 松浦榮美*¹
木村真理*⁴

An outbreak of gastroenteritis associated with *Cryptosporidium meleagridis*
among high school students of dormitory in ehime, Japan

Yukiko ASANO, Tatsuya KARASUDANI*¹, Masaaki OKUYAMA, Syunsai TAKAMI
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUYE, Kouji YAMAMOTO*², Junko AOKAGE*¹
Noriyuki SAIKI*³, Masakata FUJIWARA*¹, Mitsunobu SHIRAIISHI*¹, Kazuhiko UCHIDA*¹
Hiroko SAIKI*¹, Mikiko SUZUKI*¹, Tadashi YAMAMOTO*¹, Masatoshi UDAKA*⁴
Kyouzou KAN*¹, Shigemi MATSUURA*¹, Mari KIMURA*⁴

In August 2006, the outbreak of gastroenteritis occurred among high school students of the baseball and soccer members lived in a dormitory. During August 20 to 23, 19 of 34 boarding students became ill with diarrhea, abdominal pain, and vomiting. Of 19 fecal samples from symptomatic individuals, three samples showed positive for *Cryptosporidium* with fluorescence microscopy. PCR products targeting the 18S rRNA gene were obtained from only one individual who showed positive for *Cryptosporidium* oocysts. Sequencing of the PCR products produced sequences identical to that of *C. meleagridis*. This report suggested the first outbreak case that *C. meleagridis* is potential causative agent.

Keywords : outbreak, gastroenteritis, high school students, *Cryptosporidium*, PCR, 18S rRNA,
Cryptosporidium meleagridis

はじめに

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) は孢子虫類に属し、従来、ウシ、ブタ、ネコ、ネズミなどの腸管内寄生原虫として知られていたが、1976年に初めてヒトでの感染例が報告された。1980年代に入ってから免疫機能不全者での致死性下痢症の原因病原体として注目され、さらに免疫機能正常者に対しては出血を伴わない下痢症の原因となることが明らかとなった¹⁾。1980年代中頃から水系汚染に伴う集団感染事例が報告され始め、最大規模であったのは1993年に米国ウィスコンシン州ミルウォーキー市で40万人を超える住民がクリプトス

ポリジウムに感染し、数百名が死亡した事例である²⁾。わが国で最初に報告された集団発生事例は、1994年に神奈川県平塚市の雑居ビルの受水槽汚染によって460人余りの患者が発生した事例³⁾で、次いで1996年に埼玉県越生町で町営水道が原因となって8800人余りが下痢を発症した事例⁴⁾はよく知られている。

クリプトスポリジウム症は1999年4月から「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、感染症法)において、五類感染症全数把握疾患に定められており、診断した医師は7日以内に最寄りの保健所へ届け出ることとなっている。調査開始以降、全国では平成17年末までに239人の届出⁵⁾があったが、そのほとんどは2002年(100人)及び2004年(80人)に発生した4件の集団感染事例からであり、それらを除く散発

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地
*1 愛媛県今治保健所 *2 保健福祉部薬務衛生課
*3 愛媛県八幡浜保健所 *4 元愛媛県今治保健所

事例の届出は59人で、毎年10例前後の報告にとどまっている⁶⁾。

愛媛県内では、2001、2002年に上水道（浄水）からクリプトスポリジウムが検出され、水道給水停止措置がとられた事例が2件あったが、これまでにクリプトスポリジウム症の患者は報告されていなかった。

2006年8月下旬、高校の運動部員が寄宿する寮において、複数の学生が下痢、腹痛等の症状を訴える集団発生事例があった。調査の結果、有症者の便から腸管寄生性原虫クリプトスポリジウムが検出され、遺伝子解析の結果ヒトからの検出が稀な *Cryptosporidium meleagridis* であることが判明したので、その概要を報告する。

対象と方法

1 検査対象

疫学調査は今治保健所で行った。有症者のうち、最初に医療機関を受診した6名について8月24日に糞便を採取し、細菌検査及びウイルス検査を実施するとともに、5名に原虫検査を行った。その後の追跡調査で判明した有症者16名（初回検査5名を含む）及び無症状者4名については、8月27、28日に糞便を採取し、原虫検査を行った。原因究明のため、寮生が使用した水道水3箇所、井戸水1箇所の計4箇所について、8月26日に蛇口から水試料各20Lを採取し、原虫検査を行った。細菌検査は今治保健所で、原虫検査及びウイルス検査は衛生環境研究所で実施した。

2 クリプトスポリジウム検査

糞便試料のクリプトスポリジウム検査は、病原体検出マニュアル⁷⁾に従い患者便を遠心沈殿法（MGL変法）で集嚢子後、蛍光抗体法でオーシストの確認を行った。本法で陰性であった試料については、集嚢子後に免疫磁気ビーズ法（IMS法）による濃縮・精製を追加して蛍光抗体染色を行った。IMS法はDynabeads GC-combo（DYNAL Biotech）を説明書に従って使用し、蛍光抗体染色は分離精製後の試料50 μ lをスライドグラス上で乾燥させ、EasyStain C+G FITC kit（BTF Pty Ltd）で染色後にDAPI（4',6-diamino-2-phenylindole）染色を施した。顕微鏡観察にはOLYMPUS BX51を用い、FITCの特異蛍光はB励起条件下で、DAPIはUV励起条件下で行い、さらに微分干渉装置を用いて内部構造の観察を行った。

水試料については、「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成10年6月19日付け衛水第49号 厚生労働省健康局水道課長通知）に基づき、浄水20Lを孔径3 μ m

のポリカーボネートフィルターで加圧濃縮したものを超音波剥離し、IMS法で分離・精製した後、蛍光抗体法で染色した。

3 遺伝子検査

遺伝子型の同定は、QIAmp DNA Stool kitを用いて便から直接DNAを抽出後、Xiaoらの方法⁸⁾に準じ、18S rRNA遺伝子を増幅するnested PCRを行った。1st PCRは約1325bpの増幅産物を得るプライマー 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'及び5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'を使用した。PCR反応液は、50 μ l中に1 \times AmpliTaq Gold buffer, 0.2 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 200 nM プライマー, 1.25 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 鋳型 DNA 5 μ lを含むように調製した。PCR反応にはGeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)を使用し、95 $^{\circ}$ C 10分間の後、94 $^{\circ}$ C 45秒、55 $^{\circ}$ C 45秒、72 $^{\circ}$ C 60秒を35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C 7分間の伸長反応を行った。2nd PCRは819-825bpの増幅産物を得るプライマー 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'及び5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'を使用し、1st PCRの増幅産物1 μ lを鋳型とするほかは、1st PCRと同じ組成の反応液及びPCR条件で行った。

PCR増幅産物はQIAquick PCR purification kit (QIAGEN)で精製後、Cy 5.5 dye terminator cycle sequencing kit (Visible Genetics)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、Gene Rapid 4x4 (Amersham Pharmacia Biotech)により増幅産物の塩基配列を決定した。相同性検索にはNCBIのBlastを使用し、塩基配列の解析にはシーケンスエディタとしてGeneDoc Ver2.6 (Nicholas et al.)を、マルチプルアラインメントの作成にはClustal X (Thompson et al.)を使用した。

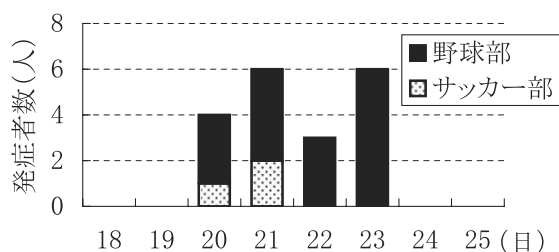


表1 有症者の症状 (n=19)

症状	下痢	腹痛	嘔吐	頭痛	吐き気	悪寒
有症者数	13	12	2	2	1	1
有症率(%)	68.4	63.2	10.5	10.5	5.3	5.3

結果

1 経緯

2006年8月24日、愛媛県内の医療機関から保健所に、下痢・腹痛等の症状を呈した高校の寮生6名を診察したとの通報があった。保健所で調査を実施したところ、高校の運動部員が寄宿する寮において、寮生34名中19名が、8月20～23日にかけて下痢、腹痛などを発症していたことがわかった（図1）。有症者の主な症状は、下痢68%、腹痛63%、嘔吐11%、頭痛11%であった（表1）。数回の下痢のあと腹痛が数日続く例が比較的多く、中には下痢が5日間続く重症例もあったが、数日の腹痛のみで終わるなどの軽症例が1/3を占めた。所属するクラブによって発症率に差があり、野球部員20名中16名（80%）、サッカー部員14名中3名（21%）で、野球部員の発症率が有意に高かった。寮生以外の生徒からは同様の有症者は認められなかった。

病原体検索のため、24日に医療機関を受診した6名の検便を直ちに実施し、細菌検査、ウイルス検査、原虫検査を行った。その結果、原虫検査が可能であった5名中1名から腸管寄生性原虫クリプトスポリジウムが検出された。そこで、同原虫による集団下痢症の可能性を念頭に、8月27、28日両日の在寮者20名（初回検査5名を含む有症者16名、無症状者4名）についてクリプトスポリジウム検査を実施したところ、有症者16名中3名（うち1名は初回検査陽性者）からクリプトスポリジウムが検出され、無症状者4名（寮生3名、寮管理人1名）からは同原虫は検出されなかった（表2）。

なお、24日の検便で6名中3名から大腸菌 O25（ベロ毒素陰性）が検出されたが、便の性状、患者の症状などから、保健所では今回の集団感染をクリプトスポリジウムによるものと判断し、以後の対応を行った。

2 疫学調査

寮生は、高校、練習場、寮をマイクロバスで移動する共同生活を送っており、食事はすべて共通であった。朝食及び夕食は寮に隣接する施設 A、昼食は施設 B を利用していたが、両施設とも寮生以外の利用者から有症苦情等の情報は寄せられなかった。共通の食生活を送っている寮生のなかで野球部員の発症率が有意に高いことから、食事を介した感染の可能性は低いと判断した。飲料水は、部活動中は学校（貯水槽あり）及び練習場の水道水を未処理のまま水出し麦茶として直接飲用し、入浴は施設 A で井戸水を使用した風呂を利用していた。水系感染の有無を確認するため、学校水道水（貯水槽あり）、寮水道水（貯水槽あり）、施設 A 調理場水道水（水道直結）、施設 A 風呂用井戸水の4ヶ所についてクリプトスポリジウム検査を実施したが、すべて陰性であった。な

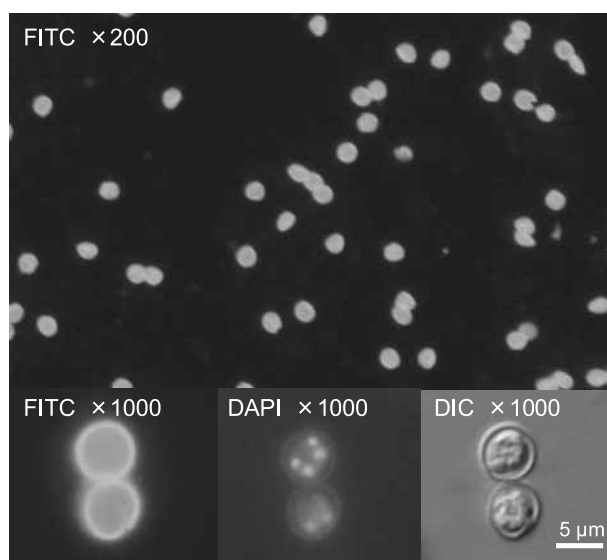


図2 検出された *Cryptosporidium* の顕微鏡像

表2 有症率及びクリプトスポリジウム検出率

区分	部活動	人数	有症者		クリプトスポリジウム検査*		
			有症者数	有症率(%)	検査数	検出者数	検出率(%)
寮関係	野球部員	20	16	80.0	19 (16)	3 (3)	15.8 (18.8)
	サッカー部員	14	3	21.4			
	寮管理人	1	0	0	1	0	0.0
	計	35	19	54.3	20 (16)	3 (3)	15.0 (18.8)
通学者	野球部	2	0	0			
	サッカー部	1	0	0			
	無所属	11	0	0			
	計	14	0	0			
総計		49	19	38.8	20 (16)	3 (3)	15.0 (18.8)

* ()内は有症者数を再掲

お、練習場及び施設 B は貯水槽がない水道直結であり、施設 A 水道水と同じ水質と考えて検査は実施しなかった。以上の調査結果から、今回の事例は食事や水道を介した感染ではなく、何らかの原因で寮生に拡がった施設内の二次感染による集団下痢症と推察された。

寮生の生活状況をさかのぼって調査したところ、発症約1週間前の8月14～16日の盆休み期間中は寮生全員が全国各地に帰省していた。寮内に同病原体が持ち込まれた原因の一つとして、盆休み中の帰省先で寮生が感染し、帰寮後の寮生活で感染が拡がった可能性が推察された。

3 遺伝子解析結果

有症者のうち、検査を実施した16名中3名からクリプトスポリジウムが検出され、そのうちの1名は集嚢子後の希釈液に大量の原虫が見られたが、残りの2名はIMS法による濃縮・精製後に数個の原虫が見られるのみで便中への排出は極めて少量であった。この3件について18S rRNA 遺伝子を増幅する nested PCR を行い遺伝子型の決定を試みたが、増幅産物が得られたのは排出量の多かった1件のみであった。この1件について塩基配列を決定し、データベースと比較したところ、*Cryptosporidium meleagridis* (AF112574) と100%一致し(図3)、今回の事例は本原虫による極めて稀な集団感染事例と考えられた。

本原虫が検出された3名の症状を比較すると、便中に多量の排出が見られた1名は症状が重く、1日4回の下痢と腹痛、吐き気、頭痛で臥床し、腹痛が第5病日まで続いた。一方、便への排出が少なかった2名は比較的症

状が軽く、腹痛のみが第6病日まで続いた症例と、悪寒を1日だけ訴えた症例であった(表3)。

考 察

クリプトスポリジウム患者の病原体診断は感染症法では「鏡検による原虫(オーシスト)の証明による病原体の検出」となっており、通常、遠心沈殿法やショ糖浮遊法により集嚢子操作を行い、蛍光抗体法、抗酸染色、ネガティブ染色などの染色標本を作製する方法が用いられている。しかしながら、集嚢子操作のみでは夾雑物が除去されず、その後の鏡検が困難な場合がある。オーシストの分離精製過程でIMS法を加えることで、水検体だけでなく糞便検体からでも検出率が高くなることは報告⁹⁻¹¹⁾されているため、今回はIMS法を組み合わせで行った。今回の事例においても、MGL変法の集嚢子操作だけでは、有症者16名中オーシスト量が非常に多かった1名(検出率6%)のみ検出可能であったが、MGL変法とIMS法を組み合わせることにより、3検体(検出率19%)から検出し、検出率が向上した。クリプトスポリジウムは病原性が高く、オーシストを10個程度摂取しただけで感染することがある^{12,13)}。また、クリプトスポリジウム患者(*C. hominis*)は急性期には $10^6 \sim 10^7/g$ のオーシストを排出し、症状が消失した後も暫減しながら1～2ヶ月排出し続ける¹⁴⁾。症状消失後のオーシスト排出期間が長期間に及ぶこと、ごく少数のオーシストで発病の可能性があること等を考慮すると、クリプトスポリジウム患者発生後の2次感染を防ぐためにはできる

表3 有症者の検査結果

No.	年齢	発症日	所属クラブ	症状	クリプトスポリジウム 検査結果	医療機関 受診
1	15	8月20日	野球部	下痢(1回)、腹痛(7日)	—	+
2	15	〃	野球部	下痢(3回)、腹痛(5日)	—	
3	15	〃	野球部	下痢(2回)、腹痛(1日)	—	
4	16	〃	サッカー部	嘔吐(3回)		
5	17	8月21日	野球部	下痢(4回)、腹痛(5日)、嘔気、頭痛、臥床	++ (<i>C. meleagridis</i>)	+
8	16	〃	野球部	下痢(2-4回、5日)、腹痛(5日)	—	+
6	16	〃	野球部	腹痛(6日)	+	
7	16	〃	野球部	悪寒	+	
9	16	〃	サッカー部	下痢(3回)		
10	16	〃	サッカー部	下痢(3回)		
11	15	8月22日	野球部	腹痛(3日)、頭痛	—	+
12	15	〃	野球部	下痢(1回)、腹痛(1日)	—	+
13	16	〃	野球部	下痢(1回、3日)、腹痛(1日)	—	+
14	15	8月23日	野球部	下痢(3回)	—	
15	15	〃	野球部	下痢(2回)	—	
16	15	〃	野球部	腹痛(1日)	—	
17	16	〃	野球部	下痢(2回)	—	
18	15	〃	野球部	腹痛(3日)	—	
19	15	〃	野球部	腹痛(3日)	—	

```

*   20   40   60   80  100  120
ACTTTACGGATCACAATTTATGTCACATATCATTCAAGTTTCTGACCTTATCAGCTTACGACGGTAGGATTTAGCCCTACCGTGGCAATGACGGGGAATTAGGGTTTCGATTCCGG
:
C.meleagridis(turkey,AF112574) :
C.meleagridis(human,AF329187) :
EHIME_2006 :
:
:
:
C.meleagridis(human,AF329186) :
C.meleagridis(human,AF329185) :
C.hominis(human,AF159110) :
C.parvum(bovine,AF093494) :
:
:
*   140  160  180  200  220  240
GAGAGGGCGCTTGAGAAACGGCTTACCACATCTAAGGAAGGCAGCGCGCCGCAATTACCCCAATCCTAATACAGGGGAGGTGACAAAGAAAATPACCAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTA
:
C.meleagridis(turkey,AF112574) :
C.meleagridis(human,AF329187) :
EHIME_2006 :
:
:
C.meleagridis(human,AF329186) :
C.meleagridis(human,AF329185) :
C.hominis(human,AF159110) :
C.parvum(bovine,AF093494) :
:
:
*   260  280  300  320  340  360
ATTGGNATGAGTTAAGTATAAACCCTTTACAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGGGTAATTCAGTCCCAATAGCGTATATAAAAGTTGTTCCAGTTAAAGACG
:
C.meleagridis(turkey,AF112574) :
C.meleagridis(human,AF329187) :
EHIME_2006 :
:
:
C.meleagridis(human,AF329186) :
C.meleagridis(human,AF329185) :
C.hominis(human,AF159110) :
C.parvum(bovine,AF093494) :
:
:
*   380  400  420  440  460  480
TCGTAGTTGGATTTCTGTAAPAAATTTATATAAATTTGATTAAATTTATATAATTAACAATAATTCATATTTACTPAAATTTATTTAGTATATGAATAATTTACTTTTGAGAAAT
:
C.meleagridis(turkey,AF112574) :
C.meleagridis(human,AF329187) :
EHIME_2006 :
:
:
C.meleagridis(human,AF329186) :
C.meleagridis(human,AF329185) :
C.hominis(human,AF159110) :
C.parvum(bovine,AF093494) :
:
:
*   500  520  540  560  580
TAGAGTGTAAAGCGGCATATGCCTTGAATCTCCAGCAATGGAAATAATTAAGATTTTTTAAGATTTTTTAATTTTCCTTAATGGTTCCTAAGATPAAAATAATGAATTAATAGGACAGTTGGGGCCA
:
C.meleagridis(turkey,AF112574) :
C.meleagridis(human,AF329187) :
EHIME_2006 :
:
:
C.meleagridis(human,AF329186) :
C.meleagridis(human,AF329185) :
C.hominis(human,AF159110) :
C.parvum(bovine,AF093494) :
:

```

図 3 *Cryptosporidium* 遺伝子型における 18S rRNA 領域のシーケエンスの相同性

だけ検出感度の高い検査法を選択する必要があると考える。

クリプトスポリジウム属は多数の種が報告されており、この中で、*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris* はヒトに対して病原性が確認されている^{15,16)}。免疫機能が正常なクリプトスポリジウム症患者から検出される遺伝子型は、*C. hominis* (ヒト型) 及び *C. parvum* (ウシ型) が大部分を占めている¹⁵⁻²⁰⁾。一方、今回の事例から検出された *C. meleagridis* はクリプトスポリジウムの七面鳥型として知られており、ニワトリやオウムなどから検出され広く鳥類を宿主とするが、免疫機能が正常なヒトからも少数ながら検出されており、ヒトへの病原性が明らかになっている²¹⁾。しかしながら、集団感染事例については、*C. hominis*, *C. parvum* が多く、これまでに国内で発生した5件中3件は *C. hominis* で、2件は *C. parvum* が原因であった²²⁾。世界的にも同様の傾向があり、集団発生事例からの多くは *C. hominis*, *C. parvum* であると報告されており、*C. meleagridis* が原因となった集団感染事例は世界的にもほとんど知られていない。

今回の事例では、調査の初期にクリプトスポリジウムが検出されたことから、当該原虫を念頭に置いた調査及び衛生指導を実施し、結果的にその後の感染拡大はみられないまま事態は終息した。しかし、有症者からの検出率が19%と低いこと、3名中2名は便への排出量が極めて少なかったこと等、過去に報告されたクリプトスポリジウムによる集団感染事例とは異なる点が多い。これが、本遺伝子型の特徴であるのか、クリプトスポリジウム以外の他の病原体の関与によるものかは、今回の事例で明らかにすることはできなかった。しかし、集団下痢症事例から稀な遺伝子型である *C. meleagridis* が検出された今回の事実を踏まえ、当該原虫の存在を念頭に置いた検査体制を整備することで、今後、本原虫のヒトへの病原性等についてより詳細な知見が得られることを期待したい。

まとめ

1 2006年8月下旬、高校の運動部員が寄宿する寮において、複数の学生が下痢、腹痛等の症状を訴える集団発生事例があった。有症者16名中3名(検出率19%)からクリプトスポリジウムを検出した。

2 遺伝子増幅が可能であった1件について18S rRNA 遺伝子領域の塩基配列を決定したところ、*Cryptosporidium meleagridis* (AF112574) と100%一致した。

3 寮生が使用した飲料水等からクリプトスポリジウムは検出されず、感染源は特定されなかった。

4 *C. meleagridis* が原因となった集団感染事例はほとんど知られていないが、本遺伝子型もヒトに対する集団下痢症の起病病原体となる可能性が示唆された。

文献

- 1) Clark DP and Sears CL. : Parasitology Today. 12, 221-225 (1996)
- 2) Mac Kenzie WR et al. : N Engl J Med. 331, 161-167 (1994)
- 3) 黒木俊郎他 : 感染症学雑誌. 70, 132-139 (1996)
- 4) 埼玉県衛生部 : クリプトスポリジウムによる集団下痢症報告書 (1997)
- 5) 感染症発生動向調査事業年報. <http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>
- 6) 病原微生物検出情報. 26, 165-166 (2005)
- 7) 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所, <http://www.nih.go.jp/niid/reference/pathogen-manual-60.pdf>
- 8) Xiao L et al. : Appl Environ Microbiol. 65, 1578-1583 (1999)
- 9) Rochelle PA et al. : Appl Environ Microbiol. 65, 841-845 (1999)
- 10) Pereira MDGC et al. : Appl Environ Microbiol. 65, 3236-3239 (1999)
- 11) Power ML et al. : Vet Parasitol. 112, 21-31 (2003)
- 12) DuPont HL et al. : N Engl J Med. 332, 855-859 (1995)
- 13) Okhuysen PC et al. : J Infect Dis. 180, 1275-1281 (1999)
- 14) 病原微生物検出情報. 26, 170-171 (2005)
- 15) Xiao L et al. : Clin Microbiol Rev. 17, 72-97 (2004)
- 16) 黒木俊郎他 : モダンメディア. 51, 75-80 (2005)
- 17) McLauchlin J et al. : J Clin Microbiol. 38, 3984-3990 (2000)
- 18) Guyot K et al. : J Clin Microbiol. 39, 3472-3480 (2001)
- 19) Ajampur SS et al. : J Clin Microbiol. 45, 915-920 (2007)
- 20) Meamar AR et al. : Appl Environ Microbiol. 73, 1033-1035 (2007)
- 21) Yagita K et al. : Parasitol Res. 87, 950-955 (2001)
- 22) 病原微生物検出情報. 26, 172-174 (2005)