

平成22年5月28日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700609

研究課題名(和文)

家庭の水道水から感染する消化管寄生原虫における食環境整備の基礎研究

研究課題名(英文)

Fundamental study for controlling a food environment against intestinal protozoa contaminated in tap water

研究代表者

松林 誠 (Matsubayashi Makoto)

大阪夕陽丘学園短期大学 准教授

研究者番号：00321076

研究成果の概要(和文)：

クリプトスポリジウム、サイクロスポーラ、ジアルジア等の原虫類は、感染・汚染源となる動物種、さらに人を含めた宿主体内での侵入過程は未だ不明である。これらの点を解決する基礎データを得るため、汚染源として家畜を調査し、検出された原虫について遺伝子配列解析により種を同定した。また、体内で原虫がどのように増殖し、環境中に糞便と共に放出されるのかを解明するため、わが国においても多数の感染者が報告されているクリプトスポリジウムをターゲットに、その感染機序を解析した。その結果、21都道府県の成牛213頭中、7都道府県12頭(5.9%)から *Cryptosporidium* が検出された。8都道府県の成豚129頭からは、本原虫は検出されなかった。牛から検出された全株はマウスへの感染性を有し、諸外国で報告されている株とは生物学的性状が異なる *C. andersoni* novel type であることが分かった。我が国の牛において、*Cryptosporidium* 感染は広く分布していることが示唆された。また、本調査により、糞便由来・環境由来感染となる *Eimeria* 原虫に加え、回虫、鞭虫、毛細線虫が検出されたことから、牛・豚において飼育環境改善の必要性が示唆された。

C. parvum の侵入型虫体の微細構造を解析した結果、スポロゾイトには apical rings、electron dense collar、および central microtubules が観察された。subpellicular microtubules は無く、スポロゾイト全体の膜間に longitudinal ridges が観察された。抗 α -tubulin を用いた免疫電顕では、これらの細胞骨格器官が反応し、分子量約 50-kDa (pI. 6.24) の抗原が検出された。このことから、宿主細胞の上皮のみに感染し、増殖するクリプトスポリジウムは、他の原虫の侵入型虫体とは異なる骨格構造を持つことが判明した。また、これらの侵入型虫体は、脱囊後速やかに死滅するが判明し、感染部位である腸管内では即時に宿主細胞へと侵入することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Host range as a reservoir about *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, and *Giardia*, and invasive process of the parasites into host cells remains unsolved. To obtain fundamental data

about these unresolved issues, I examined feces of domestic animals including cattle and pigs, and detected parasites were genetically identified. And to clarify the invasive process of *Cryptosporidium*, I analyzed the zoites of invasive stage in detail. As a result, of 213 cattle samples from 21 prefectures, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Capillaria bovis*, and *Trichuris* spp. infections were detected in 13 (6.1%), 163 (76.5%), 15 (7.0%), and 8 (3.8%), respectively. All the isolates of *Cryptosporidium* spp. were genetically identified as *C. andersoni*, and biologically identified as a novel type. Of 129 pig samples from 8 prefectures, *Eimeria* spp., *Trichuris suis*, *Ascaris suum*, and *Metastrongylus* spp. infections were found in 52 pigs (40.3%), 32 (24.8%), 19 (14.7%), and 3 (2.3%), respectively. Our results indicate that environmentally resistant eggs or oocysts of the parasites are widespread on Japanese farms. By ultramicroscopy of *C. parvum* zoites, three apical rings, an electron-dense collar, and two thick central microtubules were seen at the apical end of sporozoites. *C. parvum* α tubulin antigen was 50-kDa molecular weight by western blotting and these apical cytoskeletal structures observed by electron microscopy were composed of α tubulin by immunoelectron microscopy. It was found that infectivity *in vitro* of this sporozoite declined within 2 hr, suggesting that invasion into host cells after excystation was rapidly accompanied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：食品微生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食環境、水道水、クリプトスポリジウム、下痢、原虫、

1. 研究開始当初の背景

近年、食品や水を介して、これまでに馴染みのなかった感染症が報告されている。寄生虫感染症では、クリプトスポリジウム、サイクロスポーラ、ジアルジア等の原虫類は、微小かつ環境中において長期間感染性を保持し、塩素などの各種消毒剤に耐性を持つ。そのため、河川や飲水などに混入すると除去す

ることが難しい。水を介して感染することは、私達の日常の食生活に影響を与えることを意味している。例えば、クリプトスポリジウム原虫について、わが国では、1994年に約500人、1996年に約9000人、2002年に約200人、2004年に約300人の集団感染事件が発生している。これらの原虫類の中には、人と動物に共通に感染性を有するものもあり、地理

的にも宿主域においても広い範囲で存在していると考えられる。日常、水を使用することなく生活することは不可能であり、安全な水の確保は、食環境整備の重要な課題である。

2. 研究の目的

食水系原虫感染症は、公衆衛生学的にも食品衛生学的にも重要度が高いにも拘らず、感染・汚染源となる動物種、さらに人を含めた宿主体内での侵入過程は未だ不明である。そこで、これら不明な点を解決する基礎データを得るため、2つの方向からアプローチを行う。(1) まず汚染源として、特に野外において糞便を大量に排出する家畜・ペットなどの動物を調査し、さらに、遺伝子配列解析により感染宿主域を分析評価する。(2) また、感染した体内で原虫がどのように増殖し、環境中に糞便と共に放出されるのかを解明するため、わが国においても多数の感染者が報告されているクリプトスポリジウムをターゲットにその感染機序を解明する。これらの解析データは、汚染源の特定と感染源の治療・根絶、予防を目指し、そして、その結果、水および食環境の保全が維持できると考えられた。

3. 研究の方法

調査対象は、各都道府県の牛・豚について、飼育地域、年齢、病態などを記録し、糞便を採取する。ショ糖遠心浮遊法にて虫体を回収し、微分干渉顕微鏡にて形態の観察を行う。原虫が検出された場合、陽性糞便から原虫を精製する。その後、遺伝子解析のため、原虫DNAを精製し、種の鑑別が可能な領域をPCRにて増幅させ、DNA塩基配列のシークエンス解析を行った。また、免疫不全マウスを用いて、精製原虫の感染性を評価した。

また、*C. parvum* について、宿主細胞侵入

型虫体の侵入に関わる器官を詳細に解析した。つまり、虫体の内部構造を可視化するため、各種海面活性剤により処理し、電子顕微鏡により観察した。また、各種細胞骨格認識抗体を用いて、免疫電顕により侵入型虫体の骨格構造の分布、および局在を同定した。また、2次元電気泳動によるウエスタンブロッティングにより、原虫細胞骨格タンパク質を同定した。また、腸管内での虫体の動態を観察するため、脱囊後虫体を培養液にて浮遊し、経時的に形態を観察し、生死を評価した。

4. 研究成果

21都道府県の成牛213頭中、7都道府県13頭(6.1%)から、*Cryptosporidium* が検出された。8都道府県の成豚129頭からは、本原虫は検出されなかった。牛から検出された株は外国で報告されている株とは生物学的性状が異なり、*C. andersoni* novel type であることが分かった。我が国の牛において、*Cryptosporidium* 感染は広く分布していることが示唆された。また、本調査により、糞便由来・環境由来感染となる *Eimeria* 原虫に加え、回虫、鞭虫、毛細線虫が検出されたことから、牛・豚において飼育環境改善の必要性が示唆された。

C. parvum の侵入型虫体の微細構造を解析した結果、スポロゾイトの先端に3つの apical rings、直下に electron dense collar、および後端へと延びる2本の central microtubules が観察された。subpellicular microtubules は無く、スポロゾイト全体の膜間に longitudinal ridges が観察された。抗 α tubulin を用いた免疫電顕では、これらの細胞骨格器官が反応し、オーシスト可溶性抗原を用いたウエスタンブロッティングでは、 α tubulin と推測される分子量約50-kDa (pI. 6.24) の抗原が検出された。このことから、宿主細胞の上皮のみに感染し、増殖する

クリプトスポリジウムは、他の原虫の侵入型虫体とは異なる骨格構造を持つことが判明した。また、小腸の宿主細胞に感染する侵入型虫体は、脱嚢後速やかに死滅することが判明し、腸管内では即時に宿主細胞へと侵入することが示唆された。また、電子顕微鏡観察による死滅段階の虫体の詳細な解析により、*in vitro* での無細胞培養後のメロゾイトと報告されている形態は、死滅段階虫体である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件) 6件全て査読あり

1. Nagano S., Matsubayashi M., Kita T., Narushima T., Kimata I., Iseki M., Hajiri T., Tani H., Sasai K., Baba E. Detection of a mixed infection of a novel *Cryptosporidium andersoni* and its subgenotype in Japanese cattle. *Veterinary Parasitology*. 2007. 149: 213-218.
2. Matsubayashi M., Takase H., Kimata I., Nakagawa H., Tani H., Sasai K., Baba E. Electron microscopic observation of cytoskeletal frame structures and detection of tubulin on the apical region of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Parasitology*. 2008. 135: 295-301.
3. Sasai K., Fetterer R. H., Lillehoj H., Matusra S., Constantinoiu C. C., Matsubayashi M., Tani H., Baba E. Characterization of monoclonal antibodies that recognize the *Eimeria tenella* microneme protein MIC2. *Journal of Parasitology*. 2008. 94: 1432-4.
4. Matsubayashi M., Nagano S., Kita T., Narushima T., Kimata I., Iseki M., Hajiri T., Tani H., Sasai K., Baba E. Genetical survey of novel type of *Cryptosporidium andersoni* in cattle in Japan. *Veterinary Parasitology*. 2008. 158: 44-50.
5. Matsubayashi M., Kita T., Narushima T., Kimata I., Tani H., Sasai K., Baba E. Coprological survey of parasitic infections in pigs and cattle in slaughterhouse in Osaka, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2009. 71: 1079-83.
6. Matsubayashi M., Ando H., Kimata I., Nakagawa H., Furuya M., Tani H., Sasai K. Morphological changes and viability of *Cryptosporidium parvum* sporozoites after excystation in cell-free culture media. *Parasitology*. In press.

[学会発表] (計3件)

1. 松林 誠、高瀬弘嗣、木俣 勲、中川英紀、谷浩行、笹井和美、馬場栄一郎。
Cryptosporidium の細胞骨格構造の電子顕微鏡学的解析。第145回日本獣医学会学術大会。2008。講演要旨集、183。
2. Matsubayashi M., Nagano S., Kita T., Narushima T., Isao Kimata I., Iseki M., Hajiri T., Tani H., Sasai K., Baba E. Molecular Characterization of the Novel Type of *Cryptosporidium andersoni* Detected in Japan. 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Disease. 2008. Program and Abstracts of Papers, 58.
3. 松林 誠、長野早希、木俣 勲、木太俊雅、古家 優、谷 浩行、笹井和美。
Cryptosporidium andersoni novel type の成熟および哺乳マウスにおける感染性について。

第 65 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2009.

講演要旨、47-48.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oig.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松林 誠 (Matsubayashi Makoto)

大阪夕陽丘学園短期大学

研究者番号 : 00321076

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし