

称号及び氏名	博士（獣医学）	古屋敷 早希（長野 早希）
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	Genetic and biological analyses of <i>Cryptosporidium andersoni</i> novel type（ <i>Cryptosporidium andersoni</i> novel type の遺伝子解析および生物学的性状解析）	
論文審査委員	主査	笹井 和美
	副査	三宅 眞実
	副査	山崎 伸二

## 論文要旨

### 緒言

*Cryptosporidium* はアピコンプレックス門に属する原虫で、様々な脊椎動物に胃腸炎を引き起こす医学・獣医学領域において重要な寄生虫である。ヒトでは1976年に初めて、免疫不全患者に *Cryptosporidium parvum* の感染が認められ、人獣共通感染症の病原体として認識された。当初は免疫不全患者のみに感染すると考えられていたが、後に健常者にも急性下痢を引き起こすことが分かり、1990年代にはイギリスとアメリカで大規模な水系由来集団感染を起こしたことから、現在、水系感染症の病原体として重要視されている。*Cryptosporidium* 感染の症状は主に水様性下痢で、重症度は無症状～致命的に至るまで様々である。特効薬がないため、回復には宿主の免疫状態が重要で、免疫不全患者では慢性的な下痢による体重減少と脱水で、死に至る恐れがある。

*Cryptosporidium* には現在30の種と、70のゲノタイプが報告されているが、種の分類は現在も更新されており、ゲノタイプと同定されたものが種として分類されたり、新しい宿主から新種が毎年のように報告されている。現在のところ、牛に感染する種は *C. parvum*、*C. bovis*、*C. ryanae*、*C. suis*、及び *C. andersoni* の5種である。これらはオーシストの大きさと感染部位によって大きく2つのグループに分かれ、小型のオーシストを

形成する *C. parvum*、*C. bovis*、*C. ryanae*、及び *C. suis* は小腸に感染し、大型のオーシストを形成する *C. andersoni* は第4胃に感染する。*C. andersoni* は、第4胃に感染して消化吸収不良を引き起こし、体重増加率や泌乳量の低下といった産業的損害を与えるとされる。また、**HIV** 陽性患者や子どもにも感染することが報告されている。

*C. andersoni* はマウスには感染しないことが報告されているが、近年日本において、18S rRNA 遺伝子配列が *C. andersoni* と一致するにも関わらず、マウスに感染する株が検出され、*C. andersoni* novel type と名付けられた。しかし、その分布や感染性などの詳細はまだ明らかにされていない。

そこで、本研究では *C. andersoni* novel type の性状を明らかにするために、1) COWP (Cryptosporidium oocyst wall protein) 遺伝子と 18S rRNA 遺伝子を用いた *C. andersoni* novel type の更なる遺伝子解析、2) *C. andersoni* novel type の疫学調査、3) *C. andersoni* novel type のマウスへの感染性の調査、の3点について検討した。

## 第1章 佐賀で検出された *C. andersoni* novel type の遺伝的・生物学的性状解析

本研究までに、*C. andersoni* novel type は北海道と宮城県で検出されていた。今回、佐賀県で *Cryptosporidium* が検出され、それが *C. andersoni* novel type である可能性が高いと思われたため、遺伝子解析とマウスへの感染性を調べた。

検出された株は、佐賀県で飼育された2歳齢の去勢牛の便から得られ、大阪市食肉衛生検査所で採取された。シヨ糖浮遊法による顕微鏡検査を行ったところ、7×5μm の大型 *Cryptosporidium* オーシストが認められた。検体のオーシストを再度シヨ糖浮遊法で精製し、COWP 遺伝子と 18S rRNA 遺伝子の両遺伝子の遺伝子解析と、マウスへの感染実験を行った。感染実験では、SCID (severe combined immune deficiency) マウス

(C.B-17/Icr-SCID Jcl、雌、5週齢) 3匹に  $1 \times 10^6$  個のオーシストを胃内接種し、一日分の糞便を採取してシヨ糖浮遊法による糞便検査を行い、OPD (oocyst per day) を計測した。

感染実験では、全てのマウスでオーシストの排出が認められ、OPD は  $1 \times 10^6$  個に達し、持続的な排出が認められた。遺伝子解析では、COWP 遺伝子は牛由来オーシスト及び SCID マウス排出オーシストの全てで既報の *C. andersoni* と 100% 一致した。18S rRNA 遺伝子において、Forward および Reverse シークエンスの両方において同一箇所を起点とするシークエンス波形の乱れが認められ、2つのゲノタイプのオーシストの混合感染の可能性が考えられた。

混合感染の有無を明らかにするために、単離オーシストの遺伝子解析を行った。オー

シスト1個のCOWP遺伝子と18S rRNA遺伝子を同時に増幅できるように、既存のPCR条件を調整してModified multiplex PCRを設計した。全20検体の単離オーシストのうち8検体で遺伝子の増幅に成功し、全ての検体のCOWP遺伝子は既報の*C. andersoni*のものと一致した。18S rRNA遺伝子は、既報の配列(Type A)と、それにチミンが挿入した配列(Type B)の2種類が得られ、2つのゲノタイプのオーシストが混合感染していたことが判明した。全8検体のうち、Type AとType Bはそれぞれ4検体ずつ得られた。

以上の結果から、佐賀県で検出された*Cryptosporidium*は*C. andersoni* novel typeであり、18S rRNA遺伝子において既報の配列と、1塩基変異した配列の2種類のゲノタイプのオーシストが混合感染していることが判明した。

## 第2章 *C. andersoni* novel typeの全国的な疫学調査

第1章から、*C. andersoni* novel typeは北海道・宮城県以外に佐賀県でも検出されたことがわかった。今まで、日本において*Cryptosporidium*の疫学調査は行われてきたが、遺伝子解析を実施した報告はなく*C. andersoni* novel typeが他の地域に存在するのかわからない。そこで、全国的な分子疫学調査を行った。調査の目的として、**1)** *C. andersoni* novel typeが全国的に分布しているのかどうか、**2)** 日本の他の*C. andersoni* novel typeの株にType AとType Bの混在はあるのかどうか、**3)** 日本の牛における*Cryptosporidium*の罹患率ほどの程度か、の3点を挙げた。

糞便検体として、日本の1道20県を産地とする牛から得られた全205検体で、大阪市食肉衛生検査所に搬入されたものを用いた。品種は和牛70頭、交雑種牛112頭、乳牛23頭で、採取した牛の月齢は17.1-37.4ヶ月齢であった。糞便はショ糖浮遊法にて顕微鏡検査を行い、陽性であったものはCOWP遺伝子と18S rRNA遺伝子の遺伝子解析を行った。また、精製して $1 \times 10^6$ 個以上のオーシストが得られた株はSCIDマウスへの感染実験を行った。

*Cryptosporidium*は、全205検体のうち12検体(罹患率5.9%)で検出され、その産地は北海道、静岡、愛知、山口、香川、佐賀、及び熊本の1道6県であった。オーシストは大型で、COWP遺伝子の配列は既報の*C. andersoni*のものと100%一致した。また、18S rRNA遺伝子においては第1章の佐賀株で見られたような2種のシーケンス波形が見られた。また、マウスへの感染実験を行った全ての株(5株)で感染が認められた。

Type AとType Bの混在を確かめるために、マウスへの感染実験をおこなった5株で単離オーシストの遺伝子解析を行った。第1章と同じ方法で、Modified multiplex PCRを使用し、1株につき10個のオーシストの遺伝子解析を行った。結果、全てのオーシ

ストの COWP 遺伝子は既報の *C. andersoni* の配列と一致し、18S rRNA 遺伝子は Type A と Type B のいずれかと一致した。

以上の結果から、*C. andersoni* novel type は Type A と Type B が混在して全国的に分布しており、調査した地域で、罹患率は **5.9%**であったことがわかった。

### 第3章 *C. andersoni* novel type の少数投与での感染実験

*C. andersoni* novel type の詳細な生物学的性状解析を目的として、マウスを使用した *C. andersoni* novel type の少数オーシスト投与での感染実験を行った。*Cryptosporidium* の特徴として、免疫不全患者に感染しやすく重症化しやすいという性質があるため、まず、成熟した免疫正常マウスと SCID マウスでの感染実験を行った。また、*C. parvum* での感染実験では哺乳マウスで易感染性が見られるため、哺乳マウスの免疫正常マウスと SCID マウスの感染実験も行った。

成熟マウスには  $1 \times 10^3$  及び  $10^4$  を各 5 匹のグループに胃内接種し、哺乳マウス及び免疫正常マウスには  $1 \times 10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、及び  $10^5$  個を、SCID マウスには  $1 \times 10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、及び  $10^5$  を胃内接種した。成熟マウス群は接種後 4 日目から糞便を採取し、哺乳マウス群及び免疫正常マウスは接種後 2 ないし 5 週目に、SCID マウスは 2 ないし 10 週目に糞便を採取し、ショ糖浮遊法にて糞便中のオーシストを検査した。また陰性の確認には 18S rRNA 遺伝子の PCR を使用した。

結果、*C. andersoni* novel type の感染オーシスト数は  $10^3$  個（成熟正常マウス・哺乳 SCID マウス）および  $10^4$  個（成熟 SCID マウス・哺乳正常マウス）であり、免疫能および成熟期と哺乳期の間で感染に必要なオーシスト数に大きな差異は認められなかった。

### 総括

- ・佐賀県で検出された *Cryptosporidium* は *C. andersoni* novel type であり、18S rRNA 遺伝子において、1 塩基の異なる 2 つのゲノタイプが混在していた。
- ・*C. andersoni* novel type は全国的に広く分布しており、佐賀株で確認されたゲノタイプの混在が認められた。
- ・*C. andersoni* novel type の感染成立オーシスト数は、 $1 \times 10^3$  ないし  $10^4$  個で、成熟マウスと哺乳マウス、免疫正常マウスと SCID マウスの間に大きな差はなかった。

## 審査結果の要旨

*Cryptosporidium* はアピコンプレックス門に属する原虫で、様々な脊椎動物に胃腸炎を引き起こす医学・獣医学領域において重要な寄生虫である。発見当初は免疫不全患者のみに感染すると考えられていたが、後に健常者にも急性下痢を引き起こすことが分かり、1990年代にはイギリスとアメリカで大規模な水系由来集団感染を起こしたことから、現在、水系感染症の病原体として重要視されている。特効薬がないため、回復には宿主の免疫状態が重要で、免疫不全患者では慢性的な下痢による体重減少と脱水で、死に至る恐れがある。

*Cryptosporidium* には現在 30 の種と、70 のゲノタイプが報告されているが、種の分類は現在も更新されており、ゲノタイプとされていたものが種として分類される場合や新しい宿主から新種が毎年のように報告されている。現在のところ、牛に感染する種は 5 種である。これらはオーシストの大きさと感染部位によって大きく 2 つのグループに分かれ、小型のオーシストを形成する *C. parvum*、*C. bovis*、*C. ryanae*、及び *C. suis* は小腸に感染し、大型のオーシストを形成する *C. andersoni* は第 4 胃に感染する。*C. andersoni* は、第 4 胃に感染して消化吸收不良を引き起こし、体重増加率や泌乳量の低下といった産業的損害を与えるとされる。また、HIV 陽性患者や子どもにも感染することが報告されている。

*C. andersoni* はマウスには感染しないことが報告されているが、近年日本において、18S rRNA 遺伝子配列が *C. andersoni* と一致するにも関わらず、マウスに感染する株が検出され、*C. andersoni* novel type と名付けられた。しかし、その国内分布や感染性などの詳細はまだ明らかにされていない。

そこで、本研究では *C. andersoni* novel type の性状を明らかにするために、1) COWP (*Cryptosporidium* oocyst wall protein) 遺伝子と 18S rRNA 遺伝子を用いた *C. andersoni* novel type の更なる遺伝子解析、2) *C. andersoni* novel type の疫学調査、3) *C. andersoni* novel type のマウスへの感染性の調査、の 3 点について検討した。

第 1 章では、佐賀県で検出された *Cryptosporidium* の大型のオーシストの遺伝学的及び生物学的性状の解析を実施した。遺伝学的解析は、*Cryptosporidium* の同定で解析される COWP 遺伝子と 18S rRNA 遺伝子を対象とした。生物学的解析として、マウスへの感染実験を実施した。分離株はマウスに感染性を有する過去に国内では北海道と宮城県でのみ検出された *C. andersoni* novel type であり、COWP 遺伝子は既報の塩基配列と 100% 一致した。18S rRNA 遺伝子は、既報の塩基配列と 100% 一致するオーシストと 1 塩基が異なるオーシストの 2 つのゲノタイプを有するオーシストが混合感染していることが判明した。

第 1 章から、*C. andersoni* novel type は北海道・宮城県以外に佐賀県でも検出されたことがわかった。第 2 章では、今まで、日本において *Cryptosporidium* の疫学調査は行わ

れてきたが、遺伝子解析を実施した報告はなく *C. andersoni* novel type が他の地域に存在するのかは不明である。そこで、1道20県を産地とする牛から得られた全205検体を用いた遺伝学的及び生物学的解析を実施した。*Cryptosporidium* は、全205検体のうち12検体（罹患率5.9%）で検出され、その産地は北海道、静岡、愛知、山口、香川、佐賀、及び熊本の1道6県であった。検出されたオーシストは大型で、COWP 遺伝子の配列は既報の *C. andersoni* のものと100%一致した。また、18S rRNA 遺伝子においては第1章の佐賀株で見られたような2種のシーケンス波形が見られた。また、マウスへの感染実験を行った全ての株（5株）で感染が認められた。

第3章では、*C. andersoni* novel type の詳細な生物学的性状解析を目的として、マウスを使用した少数オーシスト投与での感染実験を行った。*Cryptosporidium* の特徴として、免疫不全患者に感染しやすく重症化しやすいという性質があるため、まず、成熟した免疫正常マウスと SCID マウスでの感染実験を行った。また、*C. parvum* での感染実験では哺乳マウスで易感染性が見られるため、哺乳マウスの免疫正常マウスと SCID マウスの感染実験も行った。*C. andersoni* novel type の感染オーシスト数は  $10^3$  個（成熟正常マウス・哺乳 SCID マウス）および  $10^4$  個（成熟 SCID マウス・哺乳正常マウス）であり、初回感染時においては、宿主の免疫能および成熟期と哺乳期の間で感染に必要なオーシスト数に大きな差異は認められなかった

本研究は、マウスに感染性を有する *C. andersoni* novel type が国内に蔓延しており、分離株は18S rRNA 遺伝子の塩基配列が既報と100%一致するオーシストと1塩基が異なるものの2つのゲノタイプを有するオーシストが混合感染していることを明らかにした。さらに、マウスへの初回感染においては、宿主の年齢及び免疫能による影響がないことを明らかにした。本研究で実施した国内での疫学調査やその生化学性状に関する重要な知見は、子供や免疫機能が正常でない人での感染が報告されている *C. andersoni* の防疫等に寄与することが予想される。これらの成績は獣医学ならびに医学に大きく貢献するものと評価できる。本論文の審査および最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。