

[ノート]

兵庫県内の集団下痢症患者から分離された *Cryptosporidium parvum* 株の 遺伝子型別分析

押 部 智 宏^{1*} 辻 英 高¹ 近 平 雅 嗣¹
池 野 まり子¹ 山 岡 政 興¹

Genotype analysis of *Cryptosporidium parvum* Isolated from the Patients
in Hyogo Prefecture of Diarrheal Cryptosporidiosis Outbreak

Tomohiro Oshibe¹, Hidetaka Tsuji¹, Masatugu Chikahira¹, Mariko Ikeno¹ and
Masaoki Yamaoka¹

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

SUMMARY

A Cryptosporidiosis outbreak in Hyogo prefecture occurred in March 2002. The poly-threonine (poly-T) gene of these *Cryptosporidium* isolates (Cp Hyogo isolates) were investigated by using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) genotyping techniques, as well as the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene. DNA sequencing analysis of the 18S rRNA, the thrombospondin-related protein 2 (TRAP-C2), the 60-kDa glycoprotein (GP60, also known as gp15/45) genes were performed for subgenotyping classification. Cp Hyogo isolates were classified into human genotype (by poly-T, COWP), subgenotype A (by 18S rRNA), subgenotype A (by TRAP-C2) and subgenotype I e (by GP60). These findings would help to analyze *Cryptosporidium* outbreak.

I はじめに

クリプトスポリジウムは、孢子虫類に属する原虫で、

ヒトや動物の腸管粘膜に寄生する。現在、オーシストの形態学的特徴や宿主特異性などから、少なくとも8種の独立種が存在し¹⁾、このうち *Cryptosporidium parvum* (Cp) は、飲料水や食品を介してヒトに感染し、水様性下痢を起こすことが知られている。

近年、形態学的特徴などによる分類だけでなく、種々の遺伝子の塩基配列に基づいて分類する研究が急速に進んでいる^{2,3)}。Cp は、ヒト、ウシ、サル、マウス、フェレット、イヌ、ブタ由来株の18S rRNA 遺伝子などの

¹感染症部

* 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 押 部 智 宏

塩基配列に基づき、それぞれの動物由来の遺伝子型として分類され²⁾、さらに 18S rRNA, thrombospondin-related protein 2 (TRAP-C2) 及び 60-kDa glycoprotein (GP60) 遺伝子などの塩基配列に基づく亜遺伝子型 (Subgenotype) 分類が提唱されている^{7, 10, 12)}。

2002年3月に北海道への修学旅行に参加した兵庫県内の高校生ら129名が下痢を発症し、61名の患者糞便から *Cp* を分離した。今回、著者らはこの分離株 (*Cp* 兵庫株) の遺伝学的な特徴の詳細を明らかにするため、制限酵素切断長多形 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) による遺伝子型別及び塩基配列による Subgenotype 分類について検討したので報告する。

II 材料と方法

1. 材料

2002年3月の集団感染事例⁴⁾における有症患者の糞便を供試した。検体は、2.5%重クロム酸カリウム水溶液を添加し、混和後、4℃で保存した。

2. オーシストの分離

糞便から遠心沈殿法、シヨ糖浮遊法で分離した⁵⁾ オーシストの一部をスライドガラスに載せ、蛍光抗体染色、DAPI染色を行い、顕微鏡で染色像、微分干渉像を確認した。オーシストの確認後、滅菌精製水で遠心洗浄し、その後の試験に供した。また、必要に応じて、マイクロキャピラリーを用いて顕微鏡下でオーシストを単離した。

3. Polymerase chain reaction (PCR) 及び RFLP

2% TritonX-100 含有 TE buffer に浮遊したオーシストを、-80℃で3回凍結融解を繰り返した後、100℃で15分加熱処理してDNAを抽出した⁵⁾。poly-threonine (poly-T), 18S rRNA, TRAP-C2, *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) 及び GP60 遺伝子は、Table 1 に示すそれぞれのプライマーを使用したPCR法で増幅した。PCR法には、Ex Taq (Takara) を用い、Thermal Cycler MP TP-3000 (Takara) を使用した。

増幅した poly-T, COWP 遺伝子は、QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) で精製後、制限酵素 *Rsa* I (Roche Diagnostics) で37℃、4時間処理し、10~20%ポリアクリルアミドゲル密度勾配電気泳動法により解析した。

4. 塩基配列決定および相同性検索

供試した兵庫株4株中2株の18S rRNA, TRAP-C2, COWP, 及び GP60 遺伝子は、それぞれダイレクトシーケンス法 (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver.2.0, ABI PRISM model 310; Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) の BLASTn を用いて相同性を検索した。

5. Subgenotype

18S rRNA 及び TRAP-C2 遺伝子の Subgenotype は、Sulaiman の方法^{7, 10)}に基づいて分類した。18S rRNA 遺伝子では、80番目付近のTの反復配列が、11個であるものをA型、10個であるものをB型、8個であるもの

Table. 1 PCR primer sets used in this study

Target gene	Name	Primer sequence	PCR product (bp)	Annealling Temperature (°C)	Reference
18S rRNA gene	CPB-DIAGF	5'-AAG CTC CTA GTT GGA TTT CTG-3'	435	55	6
	CPB-DIAGR	5'-TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG-3'			
TRAP-C2 gene		5'-CAT ATT CCC TGT CCC TTG AGT TGT-3' 5'-TGG ACA ACC CAA ATG CAG AC 3'	369	48	7
COWP gene	CRY-15	5'-GTA GAT AAT GGA GAT TGT G-3'	550	55	8
	CRY-9	5'-GGA GTG AAA TAC AAG CAT TAT CTT G-3'			
poly-T gene	CRY-44	5'-CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA-3'	518	53	9
	CRY-373	5'-AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3'			
GP60 gene*	AL3531	5'-ATA GTC TCC GCT GTA TTC-3'		50	10
	AL3534	5'-GCA GAG GAA CCA GCA TC-3'			
	AL3532	5'-TCC GCT GTA TTC TCA GCC-3'		50	
	AL3533	5'-GAG ATA TAT CTT GGT GCG-3'			

* AL3531/AL3534 was primary pair. AL3532/AL3533 was secondary pair for nested PCR.

をC型, 6個であるものをD型と判定し, A~D型の4つに分類した. TRAP-C2遺伝子は, 280番目の塩基がTの場合はA型, 同じCはB型と判定し, A, B型の2型に分類した (Table 2).

GP60遺伝子は, その塩基配列に基づいて Sulaiman¹⁰⁾ は, ヒト型をA~I型の9つ, Peng¹²⁾ は, ヒト型をIa~Ieの5つ, ウシ型をIIaとIIbの2つに分類している.

決定した *Cp* 兵庫株の GP60 遺伝子塩基配列を BLASTn 検索により, Sulaiman¹⁰⁾ 及び Peng¹²⁾ の分類にあてはめて解析した (Table 2).

Table 2 Sources and Classification of Subgenotype used in this study

Target Gene	Classification	Author	Reference
18SrRNA	A,B,C,D	Sulaiman et al.	10
TRAP-C2	A,B	Sulaiman et al.	7,10
GP60	Ia~Ie, IIa~IIb	Peng et al.	12
	A,B,C,D,E,F,G,H,I	Sulaiman et al.	10

III 結 果

1. PCR-RFLP による遺伝子型

Cp 兵庫株 4 株の poly-T 及び COWP 遺伝子の PCR-RFLP を Fig. 1 に示した. *Cp* 兵庫株の poly-T 遺伝子の RFLP は, 4 株共 400bp と 67bp 付近に 2 本の合計 3 本認められた. 一方, COWP 遺伝子の RFLP は 280bp, 130bp, 110bp に切断産物がみられた. 分離 4 株の RFLP パターンは, それぞれの遺伝子共に同一であり, 対照のウシ型とは異なり, いずれもヒト型^{8), 9)}と一致した.

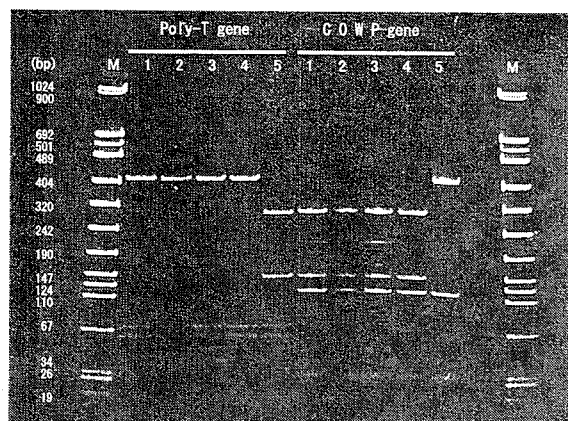


Fig. 2 PCR-RFLP patterns of poly-T, COWP PCR products digested with *Rsa* I M, size maker; Lane1, Hyogo isolate-CP02001; Lane2, Hyogo isolate-CP02002; Lane3, Hyogo isolate-CP02003; Lane4, Hyogo isolate-CP02004; Lane5, positive control (bovine genotype)

2. 塩基配列決定および相同性検索結果

決定した 18S rRNA (400bp), TRAP-C2 (369bp) 及び COWP (494bp) の各遺伝子の塩基配列について BLASTn 検索を行った結果, 下記の *Cp* のヒト型株として GenBank に登録されている塩基配列とそれぞれ一致した. (18S rRNA 遺伝子: GenBank under accession no. AF108865, TRAP-C2 遺伝子: GenBank under accession no. AF082522, COWP 遺伝子: GenBank under accession no. AF266272)

3. Subgenotype

Cp 兵庫株の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列では, 80 番目付近の T の反復配列が 11 個認められ, Sulaiman¹⁰⁾ の方法では, Subgenotype は A 型であった. また, 同様に TRAP-C2 遺伝子では, 280 番目の塩基が T で, Subgenotype は A 型であることが判明した.

GP60 遺伝子の解析では, 決定した塩基配列 (457bp) について BLASTn 検索した結果, *Cp* 兵庫株は Sulaiman¹⁰⁾ が提唱する分類法では B 型で, Peng¹²⁾ の分類では Ie 型であるとして Sulaiman が登録した株の塩基配列 (GenBank under accession no. AF402290) と一致した. これらの結果を, Table. 3 にまとめて示した.

Table. 3 Subgenotyping results of Hyogo isolates in this study

Target Gene	Subgenotype of Hyogo isolates
18S rRNA	A
TRAP-C2	A
GP60	Ie
	B

IV 考 察

集団下痢症の原因となった *Cp* 兵庫株は, 今回 5 種類の遺伝子を解析した結果, いずれも遺伝子型がヒト型であることが判明した. ヒト型は, ウシやマウスには感染せず, ヒト-ヒト間の感染環が形成されていると考えられており¹¹⁾, また, 異なる患者由来の複数の *Cp* 兵庫株が全てヒト型であったことから, 単一あるいは共通の *Cp* 感染者の糞便に汚染された飲料水あるいは食品を介した集団発生の可能性が強く示唆された.

今回, シークエンス解析に比べて簡便な PCR-RFLP 法による分析を行った. Poly-T 及び COWP 遺伝子と制限酵素 *Rsa* I を組み合わせた方法^{5, 8, 9)}を用いたところ, ヒト型とウシ型との判別が明瞭であり, 有用であることが確認された.

文 献

近年、様々な *Cp* 遺伝子の塩基配列の解析により Subgenotype の分類が行われている。Sulaiman¹⁰⁾ は、*Cp* ヒト型株62株における18S rRNA 遺伝子解析の結果、A型39株、B型2株、C型6株、D型2株、その他は型別不能であり、TRAP-C2 遺伝子の解析では、A型36株、B型24株、その他は型別不能と報告した。*Cp* 兵庫株は、いずれの遺伝子による分類においても多数を占めるA型に属していた。

GP60遺伝子は、宿主腸管細胞への接着あるいは侵入に関与し zoite 表面に存在する15k-Da と45k-Da の糖タンパクの前駆タンパク (gp60) をコードしており、この遺伝子の一部領域の遺伝学的多型性¹³⁾を利用して、Subgenotype 分類が試みられている。Peng¹²⁾ は中国、グアテマラ、インド、ケニア、ポルトガル、スロベニアの各国から分離された臨床株30株について、GP60遺伝子の型別を行った。その結果、Ie型はグアテマラで3株、ポルトガルで1株認められた。また、その他の型についても国によってそれぞれの分布に偏りがあることを示した。Leav¹⁴⁾ は南アフリカでHIV感染患者から分離した*Cp* 株20株についてGP60遺伝子を解析し、Ia型が1株、Ib型が4株、Ic型が5株、Id型が5株で、Ie型は5株であったと報告した。Alves¹⁵⁾ は、ポルトガルのHIV感染患者から分離した*Cp* 株23株について、Ib型が4株、Ic型が5株で、Ie型は2株であり、Ia、Id型はなかったと報告した。

これらの報告から、Subgenotype の分類にGP60遺伝子を用いることによって、国や地域による分布及び流行の特徴を明らかにできるものと思われた。

一方、国内の臨床株3株について、ヒト型のIa型、Ie型とウシ型のIa型が報告されている¹⁶⁾。今のところ国内の*Cp* の患者由来株数は少なく、GP60遺伝子の型別報告例は限られているが、今後、これらの型別データが蓄積されれば、これから起こりうる散发事例や今回の事例を含む集団発生における感染源、感染経路の解明への手掛かりとなることが考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただいた現、神戸総合医療介護福祉専門学校増田邦義氏、現、神戸常盤短期大学の小野一男氏に感謝いたします。

なお、この論文内容は、平成14年度日本獣医公衆衛生学会近畿地区および年次大会に発表した。

- 1) Fayer, R.: *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*, p1-42, CRC Press, Boca Raton (1997)
- 2) Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R. and Lal, A.A.: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3386-91 (1999)
- 3) Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C.A. and Lal, A.A.: *Cryptosporidium* Systematics and Implication for Public Health, *Parasitology Today*, **16**, 287-92 (2000)
- 4) 押部智宏, 辻英高, 小野一男, 増田邦義: クリプトスポリジウムの集団感染事例-兵庫県, 病原微生物検出情報, **23**, 145 (2002)
- 5) 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の診断マニュアル. p.1-33, 国立感染症研究所, 東京 (2000)
- 6) Johnson, D.W., Pieniazek, N.J., Griffin, D., Misener, L. and Rose, J.B.: Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocyst in Water Samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3849-3855 (1995)
- 7) Sulaiman, I.M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C.B., Arrowood, M. and Lal, A.A.: Differentiating Human From Animal Isolates of *Cryptosporidium parvum*, *Emerging Infectious Diseases*, **4**, 681-685 (1998)
- 8) Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P. and Crisanti, A.: PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrari* and *C. parvum*, and between *C. parvum* of human and animal origin, *FEMS Microbiol. Lett.*, **15**, 209-217 (1997)
- 9) Carraway, M., Tzipori, S. and Widmer, 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)
- 10) Sulaiman, I.M., Lal, A.A. and Xiao, L.: A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites., *J. Eukaryot. Microbiol.*,

- Suppl : 24S-27S. (2001)
- 11) Peng, M.M., Xiao, L., Freeman, A.R., Arrowood, M.J., Escalante, A.A., Weltman, A.C., Ong, C.S., MacKenzie, W.R. and Lal, A.A. and Beard, C.B.: Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 567-573 (1997)
 - 12) Peng, M.M., Matos, O., Gatei, W., Das, P., Pavlinic, M.S. and Bern, C. Sulaiman, I.M. and Glaberman, S., Lal, A.A. and Xiao, L. : A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions., *J. Eukaryot. Microbiol. Suppl*: 28S-31S (2001)
 - 13) Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R., Ward, H.D. : Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15., *Infect Immun.*, 68, 4108-4116 (2000)
 - 14) Leav, B.A., Mackay, M.R., Anyanwu, A., O'Connor R.M., Cevallos, A.M., Kindra, G., Rollins, N.C., Bennish, M.L., Nelson, R.G. and Ward, H.D. : A analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa, *Infect. Immun.*, 70, 3881-3890 (2002)
 - 15) Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O. and Antunes, F. : Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal, *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2744-2747 (2003)
 - 16) Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Nakada, T. and Takahashi Y. : Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses, *Appl Environ Microbiol.*, 69, 4720-4726 (2003)

(受理 2003年11月25日)