

原虫寄生ウイルスを利用したクリプトスポリジウム原虫の疫学および検出系の開発

村越ふみ

東京大学農学生命科学研究科 博士課程

(現 帯広畜産大学 日本学術振興会 特別研究員 (PD))

緒言

クリプトスポリジウム原虫の中でも、特に *Cryptosporidium parvum* (以下 *C. parvum*) は、様々な哺乳類の腸管に寄生し、重篤な下痢症を呈す。新興感染症である本原虫症は発展途上国のみならず先進国でも深刻な問題である。その理由として、本原虫の外環境耐性型の形態である「オーシスト」は、浄水、下水の消毒に用いられる塩素消毒に対して強い耐性を持つことが挙げられる。日本においては、1994年に神奈川県で400人、1996年に埼玉県で8,700人もの、飲料水を介した集団感染が発生している。さらに、河川や未処理の飲用水からも本原虫は日常的に検出されており、飲料水から本原虫症に感染するリスクは本国でも無視できないことは明らかである。畜産の現場においても本原虫症は問題となる。感染子牛は、激しい下痢による生育不良や斃死を引き起こすとともに、何百万もの原虫を糞便中に排出する。*C. parvum* は河川や接触を介してヒトや子牛に経口感染する。本原虫症に対する有効な薬剤は存在しないため、症状を軽くする対症療法のみとなる。したがって、発生源の迅速な特定による対策の必要性が訴えられている。

クリプトスポリジウム原虫の発生源の特定には、本原虫の60 kDa glycoprotein (GP60) 遺伝子が用いられる。GP60 遺伝子の配列多様性により、*C. parvum* はIIa~IIIまでの8種のサブタイプに分かれることが知られ、セリンのリピート数によって更に詳細に分けられる¹⁾。しかし、本邦において行われた疫学調査の結果、本原虫のサブタイプは全てIIaA15G2R1サブタイプ (IIaサブタイプであり、15個のTCA、2個のTCG繰り返し配列を持つサブタイプ) であることが報告されている²⁻⁶⁾。したがって、GP60 遺伝子に代わる、詳細に発生源を特定できるサブタイピング遺伝子が求められている。

本実験では *C. parvum* に共生している dsRNA virus である *Cryptosporidium parvum virus 1* (CSpV1)

(*Partitiviridae* 科)⁷⁾に着目した。このウイルスは、RNAポリメラーゼをコードする dsRNA1 とカプシドタンパク質をコードする dsRNA2 を持つ。RNA ウイルスは塩基配列の校正機能を持たないためにその宿主である原虫の遺伝子よりも変異が入りやすい。そこで本原虫共生ウイルスである CSpV1 の遺伝子配列を本原虫の感染地推定に用いることか調べた。

実験方法

北海道 (釧路、石狩、足寄)、岩手県、沖縄県、鹿児島県 (種子島) において採取された *C. parvum* 陽性糞便および、日本の基準株である *C. parvum* HNJ-1 株を実験に供試した。集めた *C. parvum* 陽性糞便からショ糖浮遊法によってオーシスト (虫体) を精製し、そこから DNA および RNA を抽出した。DNA 配列によって、得られた原虫が *C. parvum* サブタイプ IIa であることを確認した後、ウイルス RNA を逆転写、配列を増幅することにより、CSpV1 の dsRNA1 および dsRNA2 領域の配列を解読した。その後、MEGA6.0.6 を用いて ML 系統樹を作成した。

結果

1. CSpV1 は本邦の *C. parvum* に高頻度に保持されていた

合計24個の *C. parvum* 陽性検体を得た (北海道: 11 検体、岩手県: 5 検体、沖縄県: 5 検体、鹿児島県: 2 検体、HNJ-1 株)。そのサブタイプを解析した所、全ての *C. parvum* のサブタイプは IIaA15G2R1 であり、GP60 遺伝子に基づいたサブタイピングにおいて本邦の *C. parvum* は、ほぼクローナルであるという既報が裏付けられた。さらに、*C. parvum* 陽性検体全てから CSpV1 のウイルス配列が検出されたため、本ウイルスが原虫検出系に使用できることが示唆された。また、*C. parvum* の DNA を標的とした PCR 解析において CSpV1 の配列は検出さ

れなかったため、CSpV1は宿主ゲノムに組み込まれてはおらず、ウイルスとして、*C. parvum*が保持していることが示唆された。本研究によって得られたCSpV1配列はGenBankのデータベースに登録した(LC014992–LC015015)。

2. CSpV1のdsRNA1配列の系統解析

dsRNA1について、ORFのほぼ全長である約1570 bpの配列を解読した。配列中には、サンプルごとに様々な塩基置換がみられたが、そのほとんどは同義置換であった。図1は、日本、アメリカ、オーストラリアで検出された*C. parvum*に存在するCSpV1のdsRNA1配列(113 bp)を用いた系統樹である。その結果、日本のサンプルは日本のクレードを形成した。したがって、dsRNA1配列の系統樹によって、*C. parvum*の検出地が国レベルで推定できることが明らかとなった。そこで、更に詳細に調べるため、ORFのほぼ全長である1446 bpを用いて系統樹を作成した(図2)。その結果、本邦で検出されたCSpV1

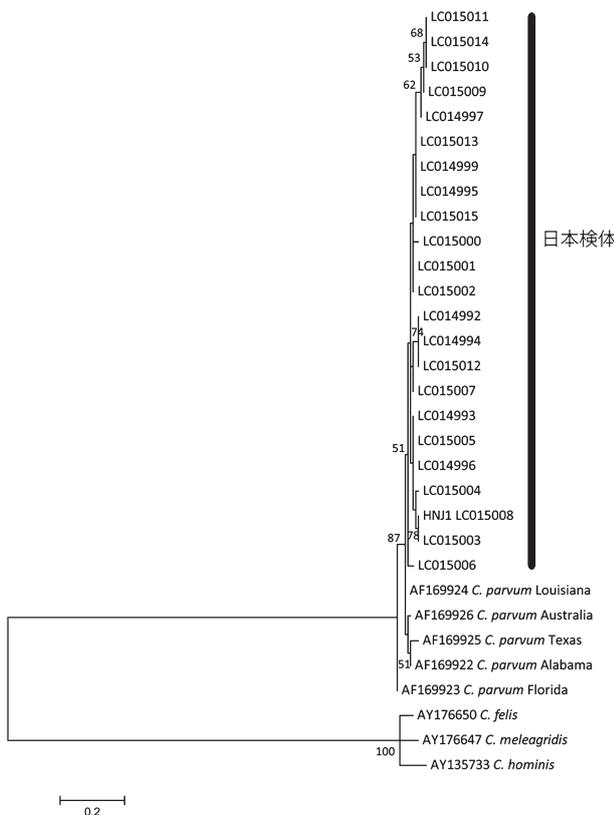


図1 アメリカ、オーストラリア、日本の*C. parvum*から検出された、CSpV1 dsRNA1のML系統樹。130 bpの塩基対を解析に用い、ブートストラップ値は50%以上の値が得られたもののみを表記した(塩基置換モデルおよびパラメーター: T92+I)。

配列の系統樹は大きく北海道、北海道以外のクレードに分かれた。さらに、本州・沖縄・鹿児島クレードにおいて、沖縄由来、鹿児島由来、岩手由来の検体はそれぞれサブクレードを形成した。CSpV1のdsRNA1の配列を用いた系統樹は、宿主である*C. parvum*の検出地域を反映していることが明らかとなった。

3. CSpV1のdsRNA2配列の系統解析

dsRNA2について、ORFのほぼ全長である約950 bpの配列を解読した。dsRNA1と比較して塩基置換の数が少なく(~8塩基置換)、dsRNA2の系統樹では感染地推定は行えなかった。

考 察

図2において、本州・沖縄・鹿児島クレードに石狩と釧路由来の検体が含まれたが、ブートストラップの値は低いため、2検体については由来地域の議論はできなかった。今後、検体を増やして系統樹を形成することによって、この問題は解決する可能性がある。種子島由来のLC015012は北海道由来の検体とクレードを形成した。興味深いことに、種子島の畜産農家は北海道から子牛を購入しているため、本結果は北海道の*C. parvum*が、子牛によって種子島に運ばれたことを反映している可能性がある。また、北海道にて検出されたCSpV1配列は地域ごとにサブクレードを形成しなかった。その理由として北海道は畜産が盛んであり、地域をまたいで子牛が出入りし、その子牛とともに、*C. parvum*およびCSpV1が移動していることによるものと予想された。

本研究において、CSpV1の配列情報を用い、*C. parvum*感染地の推定が行えることが明らかとなった。今後は更なる解析を行い、短期的な*C. parvum*の移動が、CSpV1によって推定できるかを確かめていく必要がある。

要 約

ヒトおよび家畜に下痢症を引き起こすことで問題となるクリプトスポリジウム原虫は、しばしば大規模な集団感染を引き起こすが、本邦の原虫株に適用可能な発生源の迅速な特定ツールは存在しない。そこで、本原虫に共生している2分節のdsRNAウイルスである、Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)に着目した。

本原虫ウイルスはポリメラーゼをコードするdsRNA1とカプシドタンパク質をコードするdsRNA2を持つ。

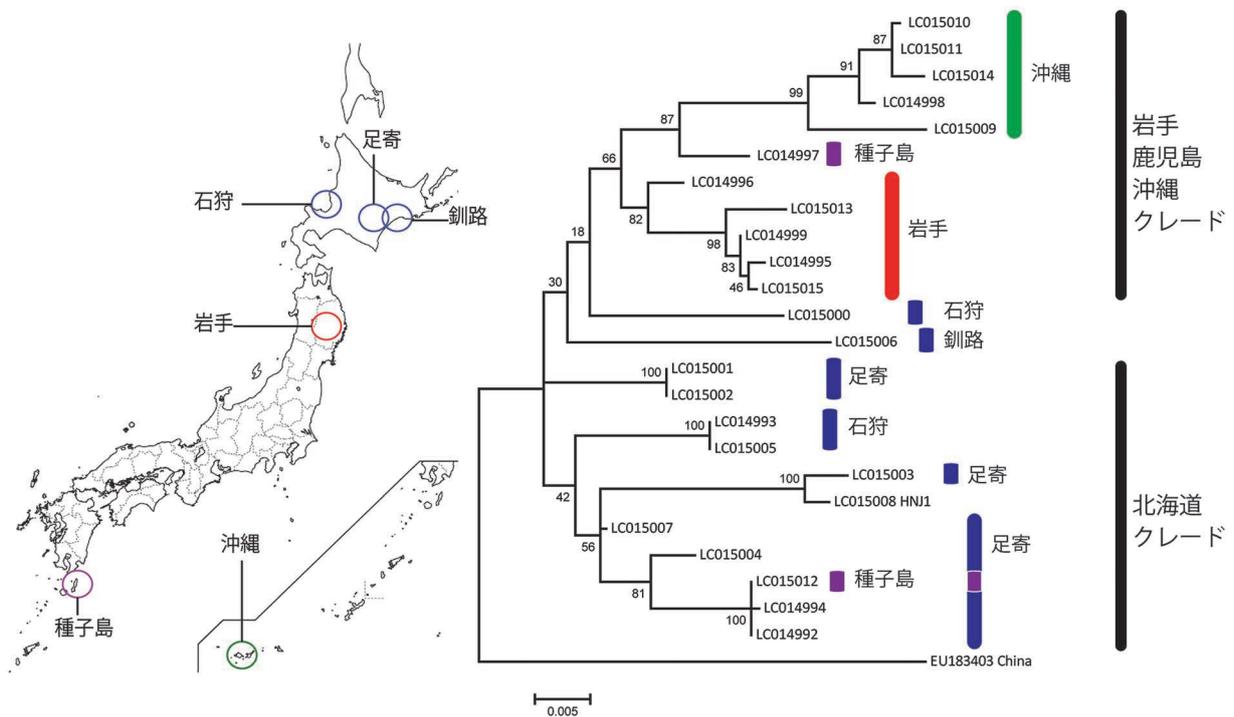


図2 日本の *C. parvum* から検出された、CSpV1 dsRNA1のML系統樹。130 bpの塩基対を解析に用い、ブートストラップ値は50%以上の値が得られたもののみを表記した(塩基置換モデルおよびパラメーター: T92+I+I)。

疫学調査の結果として、*C. parvum* 陽性サンプル全てにおいてCSpV1が検出され、本ウイルスが原虫の疫学に用いることができることが示唆された。そこで、日本の標準株である HNJ-1株および、ウシ糞便から採取した北海道、岩手県、沖縄県、鹿児島県由来の *C. parvum* 陽性検体におけるCSpV1のdsRNA配列からML系統樹を作成した。日本由来 *C. parvum* から検出されたCSpV1配列はオーストラリアや米国から検出された *C. parvum* 由来のCSpV1配列と異なるクレードを形成し、本ウイルス配列によって、由来国が明らかになることが示唆された。更に細かく解析を行うと、本邦で検出されたCSpV1配列の系統樹は大きく北海道、北海道以外のクレードに分かれた。さらに、北海道以外のクレードは、岩手および沖縄・種子島サブクレードに分かれ、沖縄検体もまとまっ

たクレードを形成した。以上から、CSpV1dsRNAを用い、*C. parvum* 感染地の推定が行えることが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) L. Xiao: *Exp. Parasitol.*, **124**, 80–89, 2010.
- 2) Z. L., Wu, et al: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4720–4726, 2003.
- 3) N. Abe, et al.: *Parasitol. Res.*, **99**, 303–305, 2006.
- 4) M. Ichikawa-Seki, et al.: *Parasitol. Int.*, **64**, 161–166, 2014.
- 5) F. Murakoshi, et al.: *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 837–840, 2013.
- 6) F. Murakoshi, et al.: *Vet. Rec.*, **175**, 353, 2014.
- 7) M. L. Nibert, et al.: *Arch. Virol.*, **154**, 1959–1965, 2009.