

平成10年度厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

研究課題名

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び
類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

総 括 研 究 報 告 書

平成11年3月

主任研究者 国包章一 (国立公衆衛生院)

総括研究報告書

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び 類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

主任研究者 国包 章一 国立公衆衛生院水道工学部 部長

研究要旨 クリプトスポリジウム等の検査法の開発・改良を行うとともに、汚染状況の調査や代替指標の開発を行った。

検査法の開発では、実験動物モデルの開発、糞便検査のマニュアル化に向けた基本条件の検討、ジアルジア/クリプトスポリジウム ビーズの実用性の検討、中空糸膜モジュールを用いた原虫濃縮方法の開発、直接蛍光抗体法用試薬の開発、DAPI染色法の検討とフローサイトメーターによる染色効果の判定、PCR法による検出、及び鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体の作製について検討し、ほぼ満足できる成果を得た。一方、汚染状況の調査と代替指標の開発では、各種動物及びヒトにおける感染状況の調査、相模川水系における汚染とその汚染指標の検討、及び浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標の開発を行い、動物及びヒトの汚染状況を確認したほか、環境水中ではウェルシュ菌が、浄水処理過程では藻類が代替指標となる可能性を示唆する結果を得た。

分担研究者	真柄 泰基	北海道大学工学研究科 教授
	荒木 国興	国立公衆衛生院衛生微生物学部 部長
	西尾 治	国立公衆衛生院衛生微生物学部 室長
	山崎 省二	国立公衆衛生院衛生獣医学部 部長
	金子 光美	摂南大学工学部経営工学科 教授
	平田 強	麻布大学環境保健学部 教授・学部長
	井関 基弘	大阪市立大学医学部 助教授
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所細菌病理部 主任研究員
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部 室長
	笹井 和美	大阪府立大学農学部 講師

A. 研究目的

クリプトスポリジウム等の原虫による水系汚染が世界的な問題となっている中で、原虫の迅速で的確な検査法が確立されていないため、水道システムにおける検査や制御に困難を来している現状にある。本研究においては、現在用いられている膜ろ過-アセトン法に替わるオーシストの迅速で高い回収率をもった分離・濃縮法の開発、蛍光抗体法に替わる検査法の開発等、クリプトスポリジウム等の原虫検査法の開発・改良を行う。また、水系及び人を含む宿主動物における汚染状況を調査して実態を正確に把握するとともに、水道水の常時管理を可能とするために、クリプトスポリジウム等の代替指標を開発し、モニタ

リングシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

1. 検査法の開発

1) 実験動物モデルの開発

昨年度開発した実験動物モデルである無菌ヌードマウスへのクリプトスポリジウム感染の生態を明らかにするため、オーシストの経口投与後1、3、5ヶ月にヌードマウスを解剖し、クリプトスポリジウムの感染・増殖部位を調べた。

2) 糞便検査のマニュアル化に向けた基本条件の検討

空港検疫所で渡航者の下痢便から原虫を検査する際には、細菌検査後の検体を用いなければならない。細菌検査では、便をアルカリペプトン液中で37℃6時間放置するので、この条件が2種類の原虫検査に支障をきたすか否かを検討した。

また、クリプトスポリジウム感染動物及びジアルジア症患者の糞便塗抹標本の保存性・染色性について検討した。

3) 濃縮・分離法の開発

(1) ジアルジア/クリプトスポリジウム ビーズの実用性の検討

新たに開発されたジアルジア及びクリプトスポリジウム免疫磁気分離用ビーズの有効性を明らかにするため、ジアルジアシスト・クリプトスポリジウムオーシストを添加した精製水と環境水とを用いて、ビーズとジアルジアシストとの結合能力、ジアルジアとクリプトスポリジウムの分離能力を評価するとともに、回収率及び操作性についてシヨ糖浮遊法との比較を行った。

(2) 中空糸膜モジュールを用いた原虫濃縮方法の開発

メンブレンフィルターアセトン溶解法による原虫濃縮の問題点を解決するため、酢酸セルロース製、分画分子量150,000DaltonのUF中空糸膜を用いる新たな濃縮方法を開発した。開発に当たっては、膜モジュールへの通水方向、ろ過可能水量、及び膜からの剥離回収に関する検討を行った。

4) 分別検出法の開発

(1) 直接蛍光抗体法用試薬の開発

平成9年度に開発した直接蛍光抗体法用試薬の蛍光強度を強めること、非特異反応を低減させることを目的に、試薬の改良を検討した。まず、抗体1分子あたりに標識するFITC分子の数を増やした試薬を作製し、評価試験を実施した。次に、*C. muris*ではなく、新たに*C. parvum*のオーシストを用いて単クローン抗体を作製し、それにFITCを標識した試薬を試作して評価を行った。

一方、*C. parvum*のオーシストを抗原としてマウスを免疫し、より特異性の高い単クローンの作製を試みた。その際、蛍光標識単クローン抗体の染色特性評価はフローサイトメーターを用いて行った。

(2) DAPI染色法の検討とフローサイトメーターによる染色効果の判定

原虫の検出及び鑑別に有効なDAPI染色では、核が染色されないオーシストが多数観察される。そこで、DAPI染色により染色されるオーシストの割合を増加させるための処理法として、塩酸、エタノール、アセトン、DMSOによる前処理について検討した。また、染色効果の判定法としてフローサイトメーターを用いる方法を検討した。

(3) PCR法による検出

検出感度を高めるため、DNAの抽出に改良を加え、さらにDNAを一本鎖にするのに必要な加熱処理時間の検討を行った。また、プライマーは18Sのribosomal RNAをコードしている部分で3組設定し、それらについて比較検討した。

さらに、各種動物由来のクリプトスポリジウムの18S ribosomal RNAをコードしている遺伝子の一部の配列を決定し、UPGMAソフトを用いてクリプトスポリジウムの系統樹を作成した。

(4) 鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体の作製

鳥類に寄生するクリプトスポリジウムはヒトに対する感染性はないが、現在の水道水の検査方法である微分干渉法ではヒトに寄生するものとの鑑別は不可能である。そこで、両者を鑑別診断するために、鳥類に寄生するクリプトスポリジウムをマウスに免疫し、エライザによりマウスがクリプトスポリジウムを認識したのを確認し、定法に従い鳥類のクリプトスポリジウムに特異的な単クローン抗体を作製する。

2. 汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発

1) 各種動物及びヒトにおける感染状況の調査

都内のビルに生息しているクマネズミとドブネズミの糞便、成田空港検疫所で保管しておいた渡航者の下痢便、東京女子医科大学の消化器内科を受診した患者の下痢便及び軟便の原虫検査を行った。

また、飼育中及びと畜場搬入のウシ、と畜場搬入のブタ、動物愛護センターに収容されたイヌとネコ、野生鳥類を対象にクリプトスポリジウム汚染状況の調査を行った。

2) 相模川水系における汚染とその汚染指標の検討

相模川水系のクリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシスト濃度を調査した。また、大腸菌、大腸菌群、推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞及び濁度を同時に調査し、原虫汚染の代替指標としての有効性を回帰分析で評価した。

3) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標の開発

クリプトスポリジウム除去指標として、水道原水に含まれる各種藻類に着目し、浄水処理過程におけるその除去性をクリプトスポリジウムオーシストと比較した。

まず、4種の藻類の純粋培養株とクリプトスポリジウムオーシストを用い、それら

の粒子のゼータ電位を測定するとともに、ジャーテストを行って凝集沈殿による除去性の比較を行った。次に、3水道事業体、8浄水場における過去5～6年間の原水、沈殿水、ろ過水（又は浄水）の生物試験結果から凝集沈殿、砂ろ過による藻類除去率を算出し、これらの数値と既存の研究で報告されているクリプトスポリジウムの除去率とを比較した。

C. 研究結果及び考察

1. 検査法の開発

1) 実験動物モデルの開発

クリプトスポリジウムオーシストを経口投与した無菌ヌードマウスにおいて、クリプトスポリジウムの感染・増殖像が認められたのは、感染後1ヶ月では胃・盲腸・結腸・直腸、感染後3ヶ月では盲腸・結腸、感染後5ヶ月では盲腸のみであった。このことから、ヌードマウスにおけるクリプトスポリジウムの好適感染増殖部位は大腸（盲腸・結腸）であることが明らかになった。

2) 糞便検査のマニュアル化に向けた基本条件の検討

アルカリペプトン液に原虫の存在を確認した糞便を入れ、37℃ 6時間、6℃で1週間保管してから抗酸染色によるクリプトスポリジウムオーシストの検出を試みたところ、赤く染まったオーシストが確認された。次に、ギムザ液及びヨード・ヨードカリ液を用いてジアルジアの栄養型の染色を試みたところ、特徴のある栄養型が確認された。さらに、直接蛍光抗体染色試薬で検査したところ、アップルグリーンに染まった原虫が確認され、アルカリペプトン液による影響は見られなかった。

また、スライドグラス上に塗抹した原虫を含む糞便のメタノール固定標本を冷蔵庫に保管した場合、抗酸染色及び蛍光抗体染色の陽性対照として約10ヶ月間使用できることを確認した。

3) 分離・濃縮法の開発

(1) ジアルジア/クリプトスポリジウム ビーズの実用性の検討

ヒト由来*Giardia* sp. 4株および*Giardia muris* 1株の計5株を用いてビーズとジアルジアシストとの選択結合性を評価した結果、特殊な抗原性を有する1株に対する結合率が低かったのを除き、その実用性が明らかになった。

次に、精製水及び環境水濃縮物へのジアルジアシスト・クリプトスポリジウムオーシスト添加系でのビーズの分離能力を評価した結果、ジアルジアシストはショ糖浮遊法よりも免疫磁気分離法で高い計数値あるいは高い回収率を示す傾向があり、ジアルジアビーズが良好にジアルジアシストを回収できていると考えられた。一方、クリプトスポリジウムオーシストでは様子が異なり、精製水への添加系ではほぼ良好な回収結果が得られたが、環境水濃縮物への添加系ではショ糖浮遊法に比べて回収率が低い傾向が認められた。このことは、ビーズを用いる免疫磁気分離法では、ジアルジアビーズとクリプトスポリジウムビーズを混合した場合、ジアルジアの回収率には影響しないが、クリプトスポリジウムの回収率を若干低下させる場合があることを示してお

り、高い定量性を要求されるときは、ビーズ添加量を増やす、磁気分離時の濃縮物量を少なくするといった操作上の工夫が必要である可能性が示唆された。

(2) 中空糸膜モジュールを用いた原虫濃縮方法の開発

水中の原虫濃縮方法として、中空糸膜モジュールを用いる方法を実用性に係る種々の観点から検討した。その結果、外圧方式でろ過すると、特殊な誘出液を使用することなく、単なる手動振盪による水洗浄で中空糸膜附着物を容易に剥離回収できることが明らかになった。また、ろ過可能水量については、モジュール内に充填する中空糸膜面積を調整することにより単一のモジュールで大量の試料水のろ過が可能であった。この方法による濃縮物と従来法（メンブレンフィルター—アセトン溶解法）による濃縮物から、シヨ糖浮遊法と免疫磁気分離法で原虫を選択分離し、回収率を比較検討したところ、この方法で従来法と同等か、それ以上の回収率が得られることが明らかになった。この方法の導入により、受託機関への検体送付を水試料によらずろ過済モジュールで行えるほか、アセトン使用を避けることができる。しかし、欠点として、従来法に比べて濃縮物量が多くなる傾向が認められた。

4) 検出法の開発

(1) 直接蛍光抗体法用試薬の開発

平成9年度に開発した直接蛍光抗体法用試薬の蛍光強度を強めるために、抗体1分子当たりに標識する FITC分子の数を増やした試薬を作製し、評価試験を実施したところ、従来と同じ希釈濃度における蛍光強度は著しく強くなったが、ブロッキングの条件を変えても藻類との非特異反応は低減されなかった。*C. muris* ではなく、新たに *C. parvum* のオーシストを用いて単クローン抗体を作製し、それに FITC を標識した試薬を試作して評価した結果でも、蛍光強度は十分であったが、藻類との非特異反応は低減されなかった。そこで、非特異反応を減らすために、抗体分子の Fc部位を切断した F' ab抗体にFITC を標識した試薬を作製し、その試薬について適性希釈濃度の選定やブロッキングの条件、染色時間設定等を検討しながら評価を進めている。

一方、特異性の高い単クローンの作製では、染色特性の良好な2クローンを入手することができた。そのうちの1クローンについて、さらに原虫類6属11種、藻類5属5種に対する交差反応性の有無を検討した。その結果、今回選択された単クローン抗体は *C. parvum* と同属の *C. muris* と *C. baileyi* に対しては交差反応性を示したが、その染色強度は *C. parvum* に比べて明らかに微弱であった。他の原虫類、あるいは藻類に対しては非特異反応を示すことはなかった。また、河川水にクリプトスポリジウムのオーシストを添加したものを試料として行った染色試験でも概ね良好な成績を得ており、実用化が期待できるものと判断された。

(2) DAPI染色法の検討とフローサイトメーターによる染色効果の判定

塩酸、エタノール、アセトン、DMSOによる前処理とDAPIの染色時間を変えて染色されるオーシストの割合を調べたところ、エタノールとアセトンによる前処理でDAPI染色に対する効果が見られた。特に、アセトン中に10分間静置した後にDAPIの染色時間

を30分とした場合は、スポロゾイトの核が染色される割合が40%ほどで最も高かった。

また、染色効果の判定にフローサイトメーターを用いると、極めて迅速、簡便、正確に測定を行うことができた。

(3) PCR法による検出

抽出したDNAを一本鎖にするのに必要な最適加熱処理時間は、98℃、10分であった。用いたプライマーのうちでは、Set Aが有用であり、ウシ、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタ及びネズミ由来のクリプトスポリジウムを検出することができた。

各種動物由来（ウシ4件、ヒト3件、ブタ1件、マウス1件）のクリプトスポリジウムの18S ribosomal RNAをコードしている領域の遺伝子配列を決定した結果からは、クリプトスポリジウムがヒト・ウシ由来のもの、マウス由来のもの、ブタ由来のもの大きく3つに分かれることが示唆された。

(4) 鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体の作製

本年度は、単クローン抗体の作製に至っていないが、作製の基礎的準備は終了しており、引き続き研究を続けることにより、鑑別診断が可能な単クローン抗体の作製を行い、その有用性を確認する。

2. 汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発

1) 各種動物及びヒトにおける感染状況の調査

都内のビルに生息しているクマネズミ38匹中の7匹、ドブネズミ4匹中の1匹からクリプトスポリジウムオーシストが検出され、ネズミが重要な感染源になることが示唆された。

31農場のウシ205頭の調査では、7農場、41頭にクリプトスポリジウム・パルバム (*C. parvum*) の感染が認められた。感染は1ヵ月齢未満の仔ウシに集中していた。*C. parvum* 以外にクリプトスポリジウム・ムリス (*C. muris*) の感染は2農場、7頭のウシで確認された。*C. muris*の感染は、*C. parvum*と異なり、一ヶ月齢未満の仔ウシには認められず、感染ウシは全て1ヶ月齢以上であった。また、牧場によっては汚染が全く認められない例も見られた。と畜場搬入ウシの調査でも、これと類似した結果が得られた。

ブタに関しては、と畜場に搬入された80頭について調査したが、クリプトスポリジウムの感染は認められなかった。

イヌについては、ある動物愛護センターでは101頭中に感染は認められなかったが、他の施設では120頭中の1頭から*C. parvum*が検出された。

ネコに関しては、37頭のうち2頭に*C. parvum*の感染が認められた。

野生鳥類では、大阪府下で鳥獣保護獣医師によって保護された28種50羽を対象に調査したところ、クリプトスポリジウム属のオーシストは検出されなかった。

渡航者の下痢便60検体からは、今回、クリプトスポリジウムとジアルジは検出されなかった。消化器内科を受診した患者48名の下痢便及び軟便からは、クリプトスポリジウムは検出されなかったが、4名の患者の軟便からジアルジアシストが検出された。

2) 相模川水系における汚染とその汚染指標の検討

相模川水系 11 地点の調査で推定クリプトスポリジウムオーシストは全ての地点で、確定クリプトスポリジウムオーシストは 10 地点で、また、ジアルジアシストは確定、推定共に全ての地点で検出された。それぞれの濃度の幾何平均値は推定クリプトスポリジウムオーシスト 34 個・100l⁻¹ (1 ~ 21,000 個・100l⁻¹)、確定クリプトスポリジウムオーシスト 24 個・100l⁻¹ (1 ~ 11,000 個・100l⁻¹)、推定ジアルジアシスト 30 個・100l⁻¹ (1 ~ 80,000 個・100l⁻¹)、確定ジアルジアシスト 12 個・100l⁻¹ (1 ~ 20,000 個・100l⁻¹)であった。

原虫濃度と各指標項目濃度との間の単回帰分析ではクリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシスト共に推定ウェルシュ菌芽胞との間に最も高い相関が認められた。また、推定及び確定クリプトスポリジウムオーシストを目的変数とする重回帰分析では推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞及び大腸菌の組合せが、推定ジアルジアシストを目的変数とする重回帰分析では推定ウェルシュ菌芽胞と大腸菌、確定ジアルジアシストでは推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌及び好気性芽胞が最適な組合せとして選択された。

特に推定ウェルシュ菌芽胞は原虫濃度の変化ともよく一致し、最も有効な代替指標であることが強く示唆された。

3) 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標の開発

4 種の藻類の純粋培養株とクリプトスポリジウムオーシストの電気的特性と凝集沈殿による除去性の比較を行った結果によると、クリプトスポリジウムオーシストよりも電氣的に凝集しにくく、かつ凝集沈殿での挙動が近似している藻類、*Microcystis viridis*、*Microcystis aeruginosa*、*Selenastrum capricornutum* の 3 種がクリプトスポリジウムオーシストの代替粒子となる可能性が示唆された。

また、浄水場における原水、沈殿水、ろ過水（又は浄水）の生物試験結果をもとに算出した藻類除去率を、既存のクリプトスポリジウム除去率と比較したところ、藻類の除去率とクリプトスポリジウムオーシストの除去率は同程度の数値を示し、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標としての藻類除去率の適用可能性が明らかになった。

D. 結論

クリプトスポリジウム等の検査法の開発・改良、及び汚染状況の調査、モニタリングシステムの開発を実施した結果、次のことが判明した。

1. 検査法の開発

- 1) 実験動物モデルとして開発した無菌ヌードマウスにおけるクリプトスポリジウムの好適感染増殖部位は大腸（盲腸・結腸）であることを確認した。
- 2) アルカリペプトン液による糞便試料の保存が原虫の検出に当たって影響を及ぼさないこと、糞便塗抹標本が染色時の陽性対照として約10ヶ月使用できることを確認した。
- 3) 新たに開発されたジアルジア／クリプトスポリジウム免疫磁気分離用混合ビーズの実用性が明らかになった。

- 4) 中空糸膜モジュールを用いる原虫濃縮方法について検討し、簡易な操作で、従来法（メンブレンフィルターアセトン溶解法）と同等か、それ以上の回収率が得られることを明らかにした。
- 5) 蛍光強度強化と非特異反応低減を目的に、昨年度開発した直接蛍光抗体法用試薬を改良中である。また、*C. parvum* のオーシストから特異性の高い単クローンを作製し、実用性を評価した。
- 6) DAPI 染色による染色率を向上させる前処理として、エタノールとアセトンによる処理に効果が認められた。また、染色効果の判定にフローサイトメーターが極めて有効であることが確認できた。
- 7) PCR 法による検出に関して改良を加えた結果、検出感度を高めることができた。また、ウシ、ヒト、ブタ及びマウス由来クリプトスポリジウムの 18S ribosomal RNA をコードしている遺伝子配列を明らかにした。
- 8) 鳥類のクリプトスポリジウム鑑別用単クローン抗体を作製するための基礎的準備が終了した。

2. 汚染状況の調査及びモニタリングシステムの開発

- 1) クマネズミ、ドブネズミ、ウシ、イヌ、ネコからクリプトスポリジウムが検出された。ブタと鳥類からは、今回クリプトスポリジウムの検出はなかった。ヒトでは、一部からジアルジアが検出されたが、クリプトスポリジウムは検出できなかった。
- 2) 相模川水系では、ほとんどの調査地点でクリプトスポリジウム及びジアルジアが検出されたが、それらの原虫類の代替指標としてはウェルシュ菌芽胞が最も有効であることが強く示唆された。
- 3) 凝集沈殿実験や既存のデータの解析によって、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標として、水道原水に含まれる藻類の除去率の適用可能性が明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ・国包章一(1998) 第1部飲料水-第3章水道水のリスク対策技術-第3節膜処理, 水のリスクマネジメント実務指針, サイエンスフォーラム, 171-178.
- ・橋本温, 平田強(1998)相模川水系におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染レベル, 水環境学会誌, 21(2), 119-122.
- ・橋本温, 河井健作, 西崎綾, 松本かおり, 平田強(1999)相模川水系のジアルジア汚染とその汚染指標の検討, 水環境学会誌, 22(4), 282-287.
- ・平田強, 橋本温(1997)水中のクリプトスポリジウムの存在量, 環境技術, 26(9), 561-566.
- ・木俣 勲, 宇仁茂彦, 井関基弘, 大賀嘉信(1998)クリプトスポリジウムのオーシスト検出用蛍光抗体試薬の開発, 感染症誌, 72(増), 192.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)原虫による食品汚染 1 クリプトスポリジウム問題による水系汚染, HACCP, 4(10), 53-57.

- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)原虫による食品汚染 2 食品汚染とクリプトスポリジウム, HACCP, 4(12), 52-55.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)原虫による食品汚染 3 原虫類—新たな食品汚染, HACCP, 5(2), 51-53.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)原虫類と食品汚染, 食品衛生研究, 48(1), 9-18.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)原虫類, 食中毒予防必携, 287-304.
- ・遠藤卓郎, 八木田健司(1998)多様化する食品とその安全性-飲料水, 臨床栄養, 92(5), 508-510.
- ・古屋宏二 (他) (1998)クリプトスポリジウム原虫に関する研究, 糞便内 *Cryptosporidium parvum* オーシストの検出と同定のための PCR 法と免疫酵素染色法, 北海道衛生研究所報 (1997 年度), 1-7.
- ・遠藤卓郎 (他) (1997)クリプトスポリジウムの検査法, 環境技術, 26(9), 555-560.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1997)クリプトスポリジウム症, 治療, 79(12), 90-91.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1997)クリプトスポリジウムの検査法, 検査と技術, 25(3), 215-220.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1999)水質検査 我が国におけるクリプトスポリジウム問題, 東京都予防医学協会年報 1997 年度, 28, 219-221.
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司, 斎藤融子他(1997)インターネットを利用した「検査のための寄生虫図鑑」, 46(8), 55-59.

2. 学会発表

- ・北澤弘美, 国包章一(1998) クリプトスポリジウム等の水道水源調査データの解析, 第 1 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 119-120.
- ・小澤克行, 平田強, 本山信行, 金子光美他 3 名(1998)オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化, 第 3 2 回水環境学会年会
- ・小澤克行, 竹馬大介, 平田強, 本山信行, 金子光美他 2 名(1998)オゾンによる *Cryptosporidium parvum* の不活化に関する基礎的研究, 第 4 9 回全国水道研究発表会
- ・金子光美(1998)日本におけるクリプトスポリジウム対策 (測定法と制御対策), 日本オゾン協会技術特別講演会
- ・本山信行, 平田強, 茂庭竹生, 金子光美(1998)オゾンによるクリプトスポリジウムの不活化, 第 7 回日韓水環境シンポジウム
- ・本山信行, 竹馬大介, 小澤克行, 平田強, 茂庭竹生, 金子光美(1999)オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化, 日本オゾン協会第 8 回年次学術講演会
- ・Kaneko Mitsumi(1998)Preventive measures against pathogenic organism dsaster in sewage, 7th WEF/JSWA joint seminar on sewage treatment technology
- ・平田強, 橋本温, 大垣眞一郎, 矢野一好(1998)膜ろ過法によるクリプトスポリジウムの除去, 日本膜学会第 14 回ニューメンブレンテクノロジーシンポジウム'98 講演集, 3-2-1-3-2-7.
- ・橋本温, 平田強(1998)環境水濃縮物からのクリプトスポリジウムオーシスト分離法としての IMS 法の検討, 日本水環境学会第 32 回年会

- ・馬場記代美, 木村憲司, 宇賀昭二, 平田強(1998)免疫磁気ビーズ法を用いたクリプトスポリジウムオーシストの回収, 日本水環境学会第 32 回年会
- ・小澤克行, 竹馬大介, 平田強, 本山信行, 高橋和孝, 茂庭竹生, 金子光美(1998)オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化-脱囊および DAPI/PI 染色による評価, 日本水環境学会第 32 回年会
- ・平田強, 橋本温, 大垣眞一郎, 矢野一好(1998)膜ろ過法によるクリプトスポリジウムの除去, 第 14 回ニューメンブレンテクノロジーシンポジウム
- ・橋本温, 平田強(1998)相模川水系におけるクリプトスポリジウム汚染の実態, 第 1 回日本水環境学会シンポジウム
- ・小澤克行, 竹馬大介, 平田強(1998)オゾンによるクリプトスポリジウムの不活化, 第 1 回日本水環境学会シンポジウム
- ・竹馬大介, 小澤克行, 本山信行, 高橋和孝, 平田強(1998)オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化-pH の影響に関する実験的検討, 日本水処理生物学会第 35 回大会
- ・井関基弘, 木俣 勲, 宇仁茂彦, 高橋三佳, 松本昭子, 大賀嘉信, 大庭千早, (1998)クリプトスポリジウムのオーシスト検出用に開発した直接蛍光抗体法試薬の評価, 第 54 回日本寄生虫学会西日本支部大会
- ・ ISEKI,M., I,KIMATA., S,UNI., Y,OGA.(1999)Evaluation of a newly developed direct immunofluorescent assay kit for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water specimens, 第 68 回日本寄生虫学会大会
- ・ Yagita K, et al.(1999)Typing of *Cryptosporidium parvum* oocysts using a system on PCR and RFLP analysis (in preparation).
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)水系のクリプトスポリジウムとその対策(水中の健康関連微生物研究委員会), クリプトスポリジウムの検査法, 第 1 回日本水環境学会シンポジウム
- ・遠藤 卓郎, 八木田健司(1998)クリプトスポリジウムのフローサイトメーターによる検出, 第 58 回日本寄生虫学会東日本大会 .
- ・ Sasai K., Matsubayashi M., Lillehoj H.S., Matsuda H., Nakai Y., Shimizu S., Miyamoto T., Fukata T., Baba E., Arakawa A, (1999)Cross-reactivity of anti-*Eimeria* chicken monoclonal antibodies with *Cryptosporidium* parasites. TOKAI JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE, 23(6), 1.
- ・ Sasai K., Matsubayashi M., Lillehoj H.S., Matsuda H., Nakai Y., Shimizu S., Miyamoto T., Fukata T., Baba E., Arakawa A, (1998)Cross-reactivity of anti-*Eimeria* chicken monoclonal antibodies with *Cryptosporidium* parasites, 11th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, Program and Abstracts of Papers, 50.
- ・松林 誠, 笹井和美, 谷 浩行, 宮本 忠, 深田恒夫, 馬場栄一郎, 松田治男, 井関基弘, 木俣 勲, H. S. Lillehoj , 八木田健司, 遠藤卓郎, (1999)抗 *Eimeria acervulina* 鶏型モノクローナル抗体を用いた *Cryptosporidium muris* の共通抗原性の解析, 第 1 2

7回日本獣医学会講演要旨集, 87.

平成10年度厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

研究課題名

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び
類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

分 担 研 究 報 告 書

平成11年3月

目次

1. 凝集沈殿による培養藻類細胞及びクリプトスポリジウムオーシストの除去性に関する検討	分担研究者：眞柄泰基	1
2. 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標としての藻類除去率	分担研究者：眞柄泰基	1 1
3. 原虫検出法の検討	分担研究者：荒木国興	2 1
4. 遺伝子操作法による原虫の検出法に関する研究	分担研究者：西尾 治	2 7
5. 実験動物モデルの開発と検査法のマニュアル化	分担研究者：山崎省二	3 7
6. 相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染とその汚染指標の検討	分担研究者：平田 強	4 1
7. <i>Giardia/Cryptosporidium</i> ビーズの実用性の検討	分担研究者：平田 強、遠藤卓郎	4 9
8. 中空糸膜モジュールを用いた新しい原虫濃縮方法の検討	分担研究者：平田 強、金子光美	5 5
9. クリプトスポリジウムのオーシスト検出のための直接蛍光抗体法用試薬の開発	分担研究者：井関基弘	6 3
10. 水試料からのクリプトスポリジウム等の検出法の検討	分担研究者：黒木俊郎、遠藤卓郎	6 5
11. クリプトスポリジウム汚染調査のためのオーシストに対する単クローン抗体作製と蛍光抗体染色への応用	分担研究者：遠藤卓郎	7 1
12. 家畜等及びと畜場搬入動物のクリプトスポリジウム汚染実態調査	分担研究者：遠藤卓郎	7 9
13. 鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの調査と鑑別用モノクローナル抗体の作成	分担研究者：笹井和美	8 3

分担研究報告書 1

凝集沈殿による培養藻類細胞及び
クリプトスポリジウムオーシストの
除去性に関する検討

分担研究者 眞柄泰基

分担研究報告書

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び 類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

凝集沈殿による培養藻類細胞及びクリプトスポリジウムオーシストの除去性に関する検討

分担研究者	眞柄 泰基	北海道大学大学院工学研究科	教授
主任研究者	国包 章一	国立公衆衛生院水道工学部	部長
研究協力者	北澤 弘美	国立公衆衛生院水道工学部	室長

研究要旨 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウムの代替指標を開発するため、水道原水中に比較的良好に存在し、しかも浄水中に漏出しやすい4種の藻類の純粋培養株とクリプトスポリジウムオーシストを用い、ジャーテストを行って凝集沈殿による除去率の比較を行った。また、pHを変えて各藻類細胞とクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位の変化を測定し、粒子の電気的特性を把握した。その結果、クリプトスポリジウムオーシストよりも電氣的に凝集しにくく、かつ凝集沈殿での挙動が近似している藻類、*Microcystis viridis*、*Microcystis aeruginosa*、*Selenastrum capricornutum* の3種がクリプトスポリジウムオーシストの代替粒子となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

水道原水中に比較的良好に存在し、しかも浄水中に漏出しやすい数種の藻類を対象とし、藻類細胞のゼータ電位及び藻類の凝集沈殿による除去特性をクリプトスポリジウムオーシストと比較して、浄水処理過程において藻類をクリプトスポリジウムの代替指標として用いることができるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. 供試藻類及びクリプトスポリジウムオーシスト

水道原水中に比較的良好にみられ、浄水中に漏出しやすく、かつクリプトスポリジウムオーシストと同程度の大きさをもつ藻類として、藍藻類の *Microcystis viridis*、*Microcystis aeruginosa*、緑藻類の *Selenastrum capricornutum* を選定した。また、形状は異なるが、浄水中に漏出しやすい珪藻類の代表として *Nitzschia palea* も使用した。

各藻類は、(財)地球・人間環境フォーラムより分譲を受けたもので、14日～30日程度30℃で無菌培養した細胞を実験に使用した。

使用した藻類の特徴は次のとおりである。

- ・ *Microcystis viridis* (NIES-102) : 藍藻類 形状 ; 球状、大きさ ; 直径 4 ~ 7 μm
- ・ *Microcystis aeruginosa* (NIES-44) : 藍藻類 形状 ; 球状、大きさ ; 2.5 ~ 9.5 μm
- ・ *Selenastrum capricornutum* (NIES-35) : 緑藻類 形状 ; 三日月型または鎌形、
大きさ ; 長さ 15 ~ 30 μm 幅 3 ~ 5 μm
- ・ *Nitzschia palea* (NIES-487) : 珪藻類 形状 ; 殻面は先被針状 殻環面は細長い矩形、
大きさ ; 長さ 15 ~ 70 μm 幅 2.5 ~ 5 μm

クリプトスポリジウムオーシストは、市販（関東化学 #74002）のホルマリン固定されているものを使用した。

2. ゼータ電位の測定

凝集作用に関係の深い粒子の電気的特性を把握するため、藻類細胞及びクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位 (Z.P) を pH を変化させて測定した。測定には、顕微鏡電気永動測定法ゼータメーター (PEN KEN 社 ; LAZER ZEE METER MODEL 501) を使用した。

3. 凝集沈殿実験

凝集沈殿実験はジャーテストにより行った。人工濁質としてカオリンを使用し濁度 10 度、 NaHCO_3 でアルカリ度 40 度とした水に、藻類細胞並びにクリプトスポリジウムオーシストを粒子濃度が 1000cells/mL となるように添加し、凝集後の pH が約 5 ~ 10 の範囲になるように 1N- H_2SO_4 または 1N- NaOH で調整後、ジャーテストを行った。凝集剤はポリ塩化アルミニウム (Al_2O_3 として 10%) を使用し、凝集剤注入率は 30ppm とした。

ジャーテストの攪拌条件は、予備攪拌 120rpm、5min、急速攪拌 120rpm、5min 緩速攪拌 40rpm、25min、静置 30min とした。

ジャーテスト終了後、上澄液をサイホンで採取し濁度を計測した。さらにその上澄液 100mL を遠心沈殿法で 100 倍に濃縮後、濃縮した液の 0.05mL 中の残存細胞数を、界線入りスライドグラスを用いて位相差顕微鏡により計測し、凝集沈殿による除去率を算出した。

C. 研究結果及び考察

1. ゼータ電位の測定結果

1) 藻類細胞及びクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位

pH を変化させた場合の各藻類細胞とクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位を図-1 ~ 5 に示す。

M. viridis のゼータ電位は pH2 付近で約 0mV で、pH が高くなるにつれて緩やかに低下した。pH6 以上でゼータ電位はほぼ横ばいとなり、- 20 ~ - 30mV の値となった。

M. aeruginosa のゼータ電位は pH による変化がほとんどなく、- 30mV 付近の値であった。

S. capricornutum のゼータ電位は pH2 付近で約 -10mV であり、pH が高くなるに連れて大きく低下し、pH6 付近で約 -45mV となり、それ以上の pH ではほぼ横ばいとなった。

N. palea のゼータ電位は、測定した pH の範囲において -10 ~ 25mV の値であった。

クリプトスポリジウムオーシストは pH2 付近では約 -10mV のゼータ電位であり、pH が高くなるに連れて徐々に低下して、pH9 付近では約 -40mV であった。

2) 藻類細胞とクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位の比較

藻類細胞とクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位をまとめて図-6 に示す。全体的に、藻類細胞・クリプトスポリジウムオーシスト共に pH の上昇に伴ってゼータ電位は低下する傾向にあったが、その変動幅には違いが認められた。

水道原水の一般的な pH 域である pH6 ~ 8 においては、藻類細胞・クリプトスポリジウムオーシスト共に pH に伴うゼータ電位の変化は小さかった。しかし、ゼータ電位の値にはかなりの違いがあり、測定した中では *N. palea* のゼータ電位が最も高かった。*M. viridis* のゼータ電位はやや高かったものの、クリプトスポリジウムオーシストと同程度といえる。*M. aeruginosa*、*S. capricornutum* のゼータ電位はクリプトスポリジウムオーシストよりも低かった。*N. palea* はゼータ電位が高いため、凝集沈殿において比較的除去されやすいと考えられる。また、*M. aeruginosa*、*S. capricornutum* の細胞はクリプトスポリジウムオーシストよりも電気的な反発力が大きく、凝集沈殿においてクリプトスポリジウムオーシストより除去されにくいと考えられる。

2. 凝集沈殿実験

藻類細胞又はクリプトスポリジウムオーシストを添加した試料水で、pH を変えてジャーテストを行った結果を図-7 ~ 11 に示す。また、凝集沈殿による藻類の除去率を表-1 に、クリプトスポリジウムオーシストの除去率を表-2 に示す。

1) 上澄液濁度

4 種の藻類を添加した試料水の上澄液濁度は、pH6 ~ 8 で最も低下し、濁度 1 度以下になった。pH6 以下では微小なフロックができる程度で、濁度も 5 度前後までの低下にとどまる場合が多かった。また、pH 9 以上では凝集剤を加えてもフロックは形成されず、濁度の低下は認められなかった。

クリプトスポリジウムオーシストを添加したものは、pH6 ~ 7 で最も上澄液濁度が低下し、濁度は 0.1 程度となった。pH が上昇するにつれて上澄液濁度の低下が見られなくなり、pH9 付近では凝集せず、濁度は下がらなかった。

いずれの試料水においても、pH6 ~ 8 において良好なフロックが形成され、上澄液濁度は概ね 1 度以下となった。

2) 藻類細胞及びクリプトスポリジウムオーシストの除去率

M. viridis、*M. aeruginosa*、*S. capricornutum* 添加した試料水では、上澄液濁度が低下す

ると上澄液に残留する細胞数も減少し、藻類細胞は濁質とともに凝集沈殿した。これらの藻類の除去率は、pH6～8の範囲において99%以上となった。

クリプトスポリジウムオーシストを添加した試料水でも、これとほぼ同様の結果が得られた。

N. palea を添加した試料水では、pH5及び9付近で上澄液濁度が低下しなかったにもかかわらず、実験を行った全てのpHの範囲においてほぼ99%以上の除去率が得られた。*N. palea* が他の3種の藻類細胞と比べて形状が異なること、大きさもやや大きいことなどが原因で、静置している間に沈降したのではないかと考えられる。

今回の実験では全体的に高い除去率が得られたが、これは、精製水を使用して試料水を調製したことで、凝集を阻害する要因が少なかったためと考えられる。

D. 結論

- 1 4種の藻類細胞のゼータ電位をクリプトスポリジウムオーシストと比較すると、*N. palea* は若干高く、*M. viridis* はクリプトスポリジウムオーシストとほぼ同じ程度であり、*M. aeruginosa*、*S. capricornutum* は低い値であった。
- 2 4種の藻類細胞とクリプトスポリジウムオーシストの凝集沈殿による除去性を比較すると、*M. viridis*、*M. aeruginosa*、*S. capricornutum* の3種の除去性がクリプトスポリジウムオーシストの除去性と近似していた。
- 3 クリプトスポリジウムオーシストよりも電氣的に凝集しにくく、かつ凝集沈殿での挙動が近似している藻類として *M. viridis*、*M. aeruginosa*、*S. capricornutum* の3種がクリプトスポリジウムの代替粒子となる可能性が示唆された。

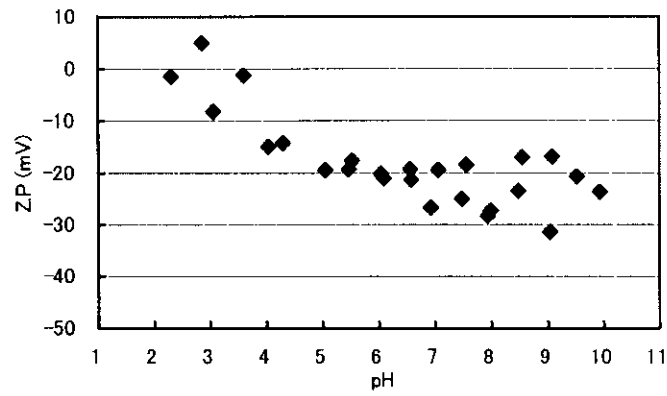


図-1 藻類細胞のゼータ電位 *M. viridis*

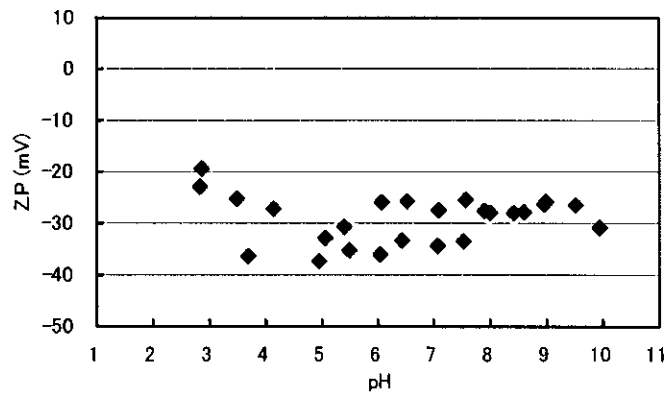


図-2 藻類細胞のゼータ電位 *M. aeruginosa*

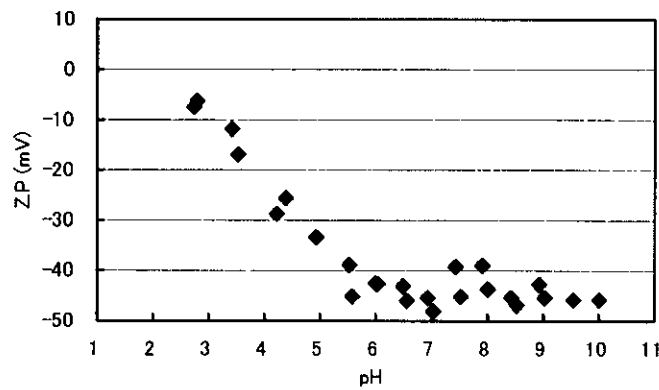


図-3 藻類細胞のゼータ電位 *S. capricornutum*