

り保護された鳥獣および大阪市立天王寺動植物園に導入された鳥獣の糞便)

内訳：

鳥類 (41例)

ダチョウ (1例)、ジュケイ (1例)、コジュケイ (1例)、ベニジュケイ (1例)、ヒオドジュケイ (1例)、エミュー (1例)、コサンケイ (2例)、フサホロホロチョウ (1例)、パラワンクジャク (1例)、ニホンキジ (2例)、ニジキジ (1例)、ウチワキジ (3例)、セイラン (1例)、イズミ (10例)、ホオアカトキ (10例)、ヒドリガモ (4例)

ほ乳類 (54例)

(霊長類) チンパンジー (7例)、オラウータン (1例)、ブタオザル (2例)、カニクイザル (1例)、マンドリル (3例)、シシオザル (2例)、エリマキキツネザル (1例)、ドリル (3例)、フサオマキザル (2例)、サバンナモンキー (1例)、フクロテナガザル (2例)、ブラックザクエノン (2例) フランソワルトン (2例)

(その他) コアラ (8例)、マレーグマ (2例)、ホッキョクグマ (3例)、カイウサギ (2例)、ダマシカ (3例)、ホンシュウシカ (1例)、ヤギ (3例)、エランド (1例)、トカラヤギ (3例)、ヒツジ (2例)、バーバリーシープ (2例)、アミメキリン (3例)、アジアゾウ (3例)、フタコブラクダ (3例)、ラマ (1例)、ヌートリア (1例)

方法：

しよ糖浮遊法にて回収した粒子を微分干渉顕微鏡にて鏡検し、陽性が疑われるサンプルは蛍光抗体法 (直接法、Merifluor、および、間接法、Hydrofluor-Combo) にて確認し、オーシストを検出した。

結果：

今回、検査した野生鳥獣および動物園へ搬入された鳥獣からは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。現在も引き続き、調査続行中である。

## 研究 B 鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの迅速診断・鑑別法の確立

### 実験① コクシジウム亜綱に対するモノクローナル抗体を用いた解析

分担者が作製したコクシジウム亜綱に対するモノクローナル抗体を用いてクリプトスポリジウムとの共通抗原性を確認する。

方法：

クリプトスポリジウム感染型スポロゾイトを当該研究室で作製したモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により染色し、蛍光顕微鏡を用いて鏡検することにより共通抗原性を確認する。また、共通抗原蛋白質の性状をウェスタンブロットィング法にて解析する。

#### 結果：

6種の鶏型モノクローナル抗体、6D-12-G10、8E-1、HE-4、8D-2、5D-11、8C-3を用いて *Cryptosporidium muris* に対する共通抗原性を間接免疫蛍光染色法とウェスタンブロットィング法により解析した。蛍光顕微鏡による間接免疫蛍光染色では、*C. muris* スポロゾイトは 6D-12-G10 モノクローナル抗体に陽性反応を示した。*C. muris* 可溶性抗原のウェスタンブロットィング法による解析において、6D-12-G10 は 47.9kDa、5D-11 は 154.9 kDa のタンパク抗原を認識していることが判明した。また、*C. parvum* に対する共通抗原性の解析において、蛍光顕微鏡による間接免疫蛍光染色では、*C. parvum* スポロゾイトは 6D-12-G10 および、HE-4 モノクローナル抗体に陽性反応を示した。*C. parvum* 可溶性抗原のウェスタンブロットィングによる解析において、6D-12-G10 が *C. muris* と同様に 47.9 kDa のタンパク抗原を認識していることが判明した。これらの結果により、本鶏型モノクローナル抗体は、Apicomplexan に存在する共通のエピトープを認識している可能性が示唆された。

#### 実験② 鳥類のクリプトスポリジウムに特異的なモノクローナル抗体の作製

##### 方法:

今回、入手した *C. baileyi* 株をマウスに免疫し、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、定法に従いモノクローナル抗体を作製する。使用するマウスミエローマは P3-X63-Ag8.653 株と SP2/0-Ag14 株を用いる。クリプトスポリジウムは *C. baileyi* ハンガリー株を用いた。

##### 結果：

現在、マウスを免疫中であり、継続した実験を行う。

#### 学会発表

2nd Obihiro International Symposium on Strategies for research and control of emerging infectious diseases - *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Neospora* infection (平成12年9月1-4日、Obihiro)

CROSS-REACTIVITY OF ANTI-EIMERIA CHICKEN MONOCLONAL ANTIBODIES  
WITH CRYPTOSPORIDIUM PARASITES.

Matsubayashi M<sup>1</sup>., Sasai K., Tani H., Miyamoto T., Fukata T., Baba E., Lillehoj H.S.<sup>1</sup>,  
Nakanishi T.<sup>2</sup>, Matsuda H.<sup>3</sup>, Iseki M.<sup>4</sup>, Timata I.<sup>4</sup>, Yagita K.<sup>5</sup>, Endo T.<sup>5</sup>

Dept. Vet. Sci., Osaka Prefect. Univ., Sakai, Osaka, Japan

1 Immunol. & Dis. Resist. Lab., LPSI, USDA-ARS, Beltsville, MD., U.S.A.

2 Osaka Joshi-Gakuen Junior College, Osaka, Japan

3 Dept. Microbiol. & Hyg., Hiroshima Univ., Higashi-Hiroshima, Japan

4 Dept. of Med. Zool., Osaka City Univ. Med. Sch., Osaka, Japan

5 Dept. Parasitol., National Inst. Inf. Dis., Tokyo, Japan

研究会発表

平成11年度 近畿地区鶏病技術研修会 (平成12年2月4日、和歌山県) 抗 *Eimeria*  
*acervulina* 鶏型モノクローナル抗体を用いたコクシジウムの共通抗原性の解析

大阪女子学園短大 ○ 松林 誠、中西 輝雄

大阪府立大学 笹井和美、谷 浩行、宮本 忠、馬場栄一郎

岐阜大学 深田 恒夫

分担研究報告書 8

クリプトスポリジウム等病原微生物の河川水からの  
検出試験方法の比較検討および各種動物における保有調査

分担研究者 黒木俊郎、遠藤卓郎

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

### クリプトスポリジウム等病原微生物の河川水からの検出試験方法の 比較検討および各種動物における保有調査

本研究は、水道原水や水道水からのクリプトスポリジウムとジアルジアの検出方法の向上と、各種動物が環境への汚染源となる可能性を明らかにすることを目的とした。

水試料からの検出のための濃縮法と分離精製法について、河川水を用いて比較検討を行った。フィルターの種類は混合エステルタイプフィルター、セルロースアセテートタイプフィルター、ポリカーボネートフィルター、ポリエーテルスルホンフィルターおよびカセットフィルターとし、回収方法はアセトン溶解法、超音波法および振盪を、分離精製法はPercoll-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法を比較対象とした。カートリッジフィルター法+振盪+Percoll-シヨ糖浮遊法は、混合エステルタイプフィルター+アセトン溶解法+Percoll-シヨ糖浮遊法よりも*Cryptosporidium*オーシストの検出数がやや低かったが、*Giardia*シスト数はやや多いという結果が得られた。

原虫の鑑別に有用なDAPI染色で染色されるオーシストの割合を増加するための処理法を検討した。塩酸、エタノール、アセトン、DMSOによる前処理と染色時間の違いによる染色オーシストの割合は、アセトン処理後の染色時間を30分とした場合が43%でもっとも高かった。さらに通電による物理的処理でのオーシストの染色性の違いを検討したところ、250V、50msecの長さで2回作用させたときに56%のオーシストが染色された。

培養細胞による*Cryptosporidium*の検出方法への応用を検討するために、ヒト由来培養細胞(HCT-8)における*Cryptosporidium*の増殖性を調べたところ、接種後24~48時間で空のオーシストが認められたが、細胞内に寄生する原虫を確認することはできなかった。

タヌキ、ハクビシン、アライグマ、ネズミ等の野生動物並びにブタにおける*Cryptosporidium*と*Giardia*の保有調査では、タヌキの47頭中1頭(2.1%)、アライグマ7頭中1頭(14.3%)、クマネズミ72頭中26頭(36.1%)、ドブネズミ7頭中3頭(42.9%)から*Cryptosporidium*が検出された。ブタでは1~3カ月齢の200頭のうち60頭(30.0%)から*Cryptosporidium*が、26頭(13.0%)から*Giardia*が、6カ月齢の111頭のうち1頭(0.9%)から*Cryptosporidium*が検出された。検出された*Cryptosporidium parvum*のgenotypeはアライグマ由来はgenotype 2、クマネズミ由来はこれまでのタイプに一致せず、ブタ由来はブタ固有のタイプであった。

分担研究者	黒木俊郎 遠藤卓郎	神奈川県衛生研究所細菌病理部 国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	岡崎則男 古川一郎 八木田健司 亀岡洋祐	神奈川県衛生研究所細菌病理部 神奈川県衛生研究所食品獣疫部 国立感染症研究所寄生動物部 国立感染症研究所 遺伝子資源室

## A. 研究目的

河川水等の水試料から *Cryptosporidium* オーストを検出するには、試料を濃縮し、濃縮物中に含まれるオーストを他の懸濁粒子から分離・精製しなければならない。オーストの存在量を可能な限り正確に把握するには、回収率の高い濃縮方法と分離・精製方法を選択する必要がある。そこで、試験方法の評価を行う目的で濃縮方法と分離・精製方法の比較検討を行った（平成9年度報告書参照）。

水試料からのクリプトスポリジウム等の検出には、FITC を用いた蛍光抗体染色法と DAPI 染色を併用する。DAPI はオースト内のスポロゾイトの核を青白色に染めるため、微分干渉装置によるスポロゾイトの観察が困難な場合には、鑑別法として有用な手段である。しかし、核を有するオーストがすべて染色されるのではなく、微分干渉顕微鏡下でオースト内部にスポロゾイトが観察されてもしばしば核が染色されない場合がある。そこで、DAPI 染色により染色されるオーストの頻度を高めるための処理方法の検討を行った。さらに、各種処理法の DAPI 染色に与える効果を、簡便、迅速、正確に行う方法を検討するために、フローサイトメータによる測定法を試みた（平成10年度報告書参照）。また、近年バイオテクノロジーの1手法として、電気的パルスにより生細胞や細菌の細胞膜や細胞壁に穿孔を施す技術が確立されている。そこで、この方法を利用してスポロゾイトによる DAPI の取り込みの変化を検討した。

水道原水中や水道水中に存在する *Cryptosporidium* のリスク評価を行う場合などは、水試料中に存在する *Cryptosporidium* の種の鑑別や型別が必要となることが予想される。さらに株としての分離・保存には培養細胞による分離が有効な手段となりうる。そこで、培養細胞による *Cryptosporidium* の分離・継代手法を検討した。

ヒトに病原性を有する *Cryptosporidium parvum* の宿主域は広く、様々な哺乳動物の腸管に寄生するとされている。各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況を調査して、保有動物が河川等の汚染源として、あるいはヒトへの感染源としての役割を果たしているか否かの可能性を検討することは、水道水の安全性の確保や感染予防には極めて重要である。

*C. parvum* の遺伝学的解析は、種々の遺伝子を対象にして進められている。ヒトに感染するタイプはこれまでに genotype 1（ヒト型）と genotype 2（ウシ型）があり、genotype 1 に属する *C. parvum* はヒトだけで感染が成立するが、genotype 2 は宿主特異性が低く、ヒトやウシ、ヤギ、シカ等から検出されている。これに対してブタやイヌあるいはネズミからは、genotype 1 や genotype 2 とは明らかに異なる、それぞれ固有のタイプが存在することが明らかとなっている<sup>1)</sup>。そこで、野生動物と家畜における *C. parvum* の保有状況と寄生する *C. parvum* のタイプを把握し、河川等への汚染の原因や感染経路の解明に資するための資料を提供することを目的として行った。

## B. 研究方法

### 1. 水試料からの *Cryptosporidium* 等の検出における濃縮・回収方法と分離・精製方法の比較検討

#### 1) 河川試料の採取

試験法の検討のために神奈川県内の河川から試験用水を3回採取した（平成9年度報告書参照）。採取した河川水には *Cryptosporidium* オーストあるいは *Giardia* シストは添加せずに試験に供した。

#### 2) 試験方法

フィルターは混合エステルタイプフィルター、セルロースアセテートタイプフィルター、ポリカーボネートフィルター、ポリエステルスルホンフィルターおよびカセットフィルターを用いた。濃縮物の回収方法としてアセトン溶解法と超音波処理法および振盪法を、分離・精製法として Percoll-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法を取り上げ、これらを組み合わせて *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出数を比較した（表1、2、3および平成9年度報告書参照）。

### 2. DAPI 染色法の検討

#### 1) 使用 *Cryptosporidium* 株

大阪市立大学医学部 井関基弘教授より分与いただいた、SCID マウスに感染させて継代している *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用いた。マウス糞便中からシヨ糖浮遊法で精製したオーストを実験に用いた。

## 2) 各種試薬による前処理

表4に示す4種の化学物質と染色時間の条件でオーシストを染色した(平成10年度報告書参照)。

## 3) 電氣的パルスのDAPI染色への効果

SCIDマウスの便からオーシストを精製し、精製水に $10^3 \sim 10^4/ml$ に調製した。エレクトロポレーターはElectro square porator T820 (BTX Inc.)を用いた。パルスをかける条件として電圧、長さおよび回数を設定した。電圧は100V、150V、250V、500V、750Vあるいは1,000Vとし、パルスの長さは100~250Vでは50msec、500~1,000Vでは80 $\mu$ secとした。パルスの回数は1回あるいは2回とした。オーシスト浮遊液400 $\mu$ lをチャンバーに入れ、設定した条件でパルスかけたのち、メンブランフィルター上にオーシストを捕捉して通常の方法で蛍光染色とDAPI染色を施し、蛍光顕微鏡で観察した。

## 4) フローサイトメータによる染色効果の判定の試み

蛍光抗体 (Crypto a Glo, Waterborne) で染色したオーシストからの蛍光の検出には、PAS-Ⅲ型フローサイトメータ (Partec) を用いた(平成10年度報告書参照)。

## 3. 培養細胞を用いた *Cryptosporidium* の検出の検討

### 1) 使用した培養細胞と培養方法

細胞は Human ileocecal adenocarcinoma cell (HCT-8) を用いた。培養液は RPMI 1640 に 2.05mM L-glutamine, 5%FBS および 1%HEPES(pH7.3) を添加した<sup>2)</sup>。

### 2) 培養細胞への接種実験

細胞培養用フラスコ (25ml) に培養液を入れ、細胞を接種から3~4日間培養して80%程度まで増殖させ、これに10倍希釈次亜塩素酸ナトリウム溶液中に室温下で15分間処理した *C. parvum* HNJ-1 オーシストを約500個接種した。接種後、経時的に細胞の変化を観察した。

## 4. 各種哺乳動物における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有調査

### 1) 対象動物

野生動物における保有調査の対象は、神奈川県内で保護された傷病動物とした。その内訳は、アナグマ3頭、アライグマ7頭、イノ

シシ1頭、タヌキ47頭、ニホンカモシカ2頭、ニホンザル6頭、ニホンジカ17頭、ノウサギ1頭、ハクビシン15頭、ムササビ4頭の10種103頭であった。これらの動物は平成10年2月7日から平成12年2月5日までに神奈川県立自然保護センターに保護・搬送され、直ちにあるいは飼育中に糞便を採取した。調査の対象とした糞便は延べ232試料であった。

ネズミは、神奈川県内の住宅地あるいは雑居ビル等で平成10年11月29日から平成11年6月24日までに捕獲されたクマネズミ72頭とドブネズミ7頭であった。クマネズミ57頭とドブネズミ7頭は、大腸から内容物を採取して検査の対象とした。クマネズミ15頭は捕獲後ケージにて飼育し、複数回糞便を採取して検査した。飼育したクマネズミのうち、*Cryptosporidium* が検出されなかったネズミには dexamethasone 溶液(4mg/L)を飲用水として給水し、1週間後から糞便を採取して検査した。

家畜はブタを対象とした。11農家から神奈川県内のと畜場に出荷された1~3ヶ月齢の200頭のブタから大腸を採取し、その内容物を試料とした。さらに、1農家から出荷された肉用豚111頭の糞便をと畜場において採取した。

各種動物から採取された糞便や大腸内容物は、検査を行うまで冷蔵庫に保管した。

### 2) 寄生原虫の検出

検査試料の小指頭大を10%ホルマリン液あるいは精製水に浮遊してからガーゼろ過し、15ml遠沈管に入れ、10%ホルマリン液あるいは精製水を10mlになるように加え、さらに酢酸エチル3mlを加えて十分に攪拌した。試料浮遊液の入った遠沈管を3,000rpmで10分間遠心し、上清を捨てて沈渣を得た。沈渣に0.5ml程度の精製水を加え、少量をスライドグラス上で乾燥し、メタノール固定した後に蛍光色素 (Merifluor *Giardia* / *Cryptosporidium*, Meridian) で染色した。蛍光顕微鏡のB励起光下で観察し、FITCの特異蛍光を発する径4~6 $\mu$ mで固有の特徴を有する粒子を *Cryptosporidium* オーシストとし、FITCの特異蛍光を発する長径12~16 $\mu$ m程度、短径8~12 $\mu$ m程度で固有の特徴を有する類円形の粒子を *Giardia* シストとした。

## 2) *Cryptosporidium* オーストの精製と DNA の抽出

糞便あるいは大腸内容物の少量に精製水を加え、ガーゼでろ過した。これを 15ml の遠心管に入れ、滅菌精製水 10ml と酢酸エチル 3ml を加えて十分に攪拌した後、3,000rpm で 10 分間遠心して沈渣を集めた。沈渣はシヨ糖浮遊液 (比重 1.20) あるいは塩化セシウム (比重 1.15) を用いて精製した。沈渣にシヨ糖浮遊液を加えて混合し、3,000rpm で 10 分間遠心し、液面に浮遊したオーストを直径 8mm の白金耳で回収した。あるいは沈渣の精製水浮遊液 500 $\mu$ l に塩化セシウム液 700 $\mu$ l を加え、12,000rpm で 3 分遠心し、界面部に浮遊するオーストを回収した<sup>3)</sup>。回収したオーストは精製水で 2 回洗浄した。精製されたオーストに sodium dodecyl sulfate を終濃度 1% となるように加え、100 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱してオーストを溶解後、GeneClean kit (フナコシ) を用いて DNA を精製し、テンプレートとした。

## 4) *Cryptosporidium* の遺伝学的解析

遺伝学的解析は 18S rRNA の配列の検討と PCR-RFLP 法を行った。18S rRNA の特定部分の DNA 配列を PCR 法で増幅し、得られた産物の DNA 配列を解析した。プライマーは CPBDIAGF (5'-AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG-3') と CPBDIAGR (5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') を用いた<sup>4)</sup>。PCR 反応は PE2400 (Perkin Elmer) を用い、最初の熱変成を 98 $^{\circ}$ C で 5 分間とし、続いて熱変成を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒、アニーリングを 55 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長を 72 $^{\circ}$ C で 60 秒とするサイクルを 40 サイクル繰り返し、最後の伸長を 72 $^{\circ}$ C で 7 分間とした<sup>4)</sup>。得られた PCR 産物の一部は ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit を用いてシーケンサーにかけ、配列を決定した。

RFLP-PCR 法では、プライマーは cry44 (5'-CTCTTAATCCAATCATTACAAC-3') と cry373 (5'-AGCAGCAAGATATGATACCG-3') を用いた<sup>5)</sup>。PCR 法の条件は、最初の熱変成を 94 $^{\circ}$ C で 3 分間とし、続いて熱変成を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒、アニーリングを 53 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長を 72 $^{\circ}$ C で 30 秒とするサイクルを 40 サイクル繰り返し、最後の伸長を 72 $^{\circ}$ C で 3 分間とした。PCR 産物を Rsa I で切断し、切断パターンを観察した<sup>5)</sup>。

## C. 結果

### 1. 水試料からの *Cryptosporidium* 等の検出における濃縮・回収方法と分離・精製方法の比較検討

実際の河川水を試料として濃縮・回収方法と分離・精製方法を比較検討したところ、混合エステルタイプフィルター+アセトン溶解+Percoll-シヨ糖浮遊法の組み合わせでもっとも高い検出数であった。カートリッジフィルター+振盪+Percoll-シヨ糖浮遊法の組み合わせでは *Cryptosporidium* の検出数はやや少ないが、*Giardia* の検出数はやや多かった。(表 1、2、3 および平成 9 年度報告書参照)

### 2. DAPI 染色法の検討

#### 1) 各種試薬による前処理

塩酸、エタノール、アセトンおよび DMSO の 4 種の化学物質を用いて前処理を行い、DAPI の染色時間を 5 分間と 30 分間の 2 条件で染色を行ったところ、表 4 に示すような結果が得られた。このうち、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 分間静置した後には 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約 40% でもっとも高かった (平成 10 年度報告書参照)。

#### 2) 電気的パルスの DAPI 染色への効果

100V、50msec で 1~2 回通電しても、DAPI により染色される割合は対照群とほとんど差がなかった。ところが 150V、50msec を 1~2 回では 41%、250V、50msec を 2 回では 56% まで上昇した。750V および 1,000V、80 $\mu$ sec ではパルスの回数を増やしても DAPI により染色される割合は 15~20% にとどまった。

パルスによりオースト壁に何らかの障害が生じ DAPI が壁を通過してスポロゾイトの核が染色されることは認められたが、今回設定した実験条件では DAPI による染色を 100% とすることはできず、最大で 56% であった。パルスの回数を増やすなど、さらに実験条件を検討する余地は残されている。



表1 試験方法別の*Cryptosporidium*オーシスト数と*Giardia*シスト数

試験方法	<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>		10Lの濾過に要した フィルター枚数
	推定	確定	推定	確定	
1	21-34(28.7)	3-6(4.7)	11-18(14)	3-4(3.7)	1
2	0-5(2.7)	0-2(1)	—	—	1
3	0-3(1.7)	0	—	—	1
4	0	0	—	—	4
5	0	0	—	—	2
6	0	0	—	—	—

試験方法=1: 混合エステルフィルター+アセトン溶解+Percoll・シヨ糖浮遊法、2: 混合エステルフィルター+超音波処理+免疫磁気ビーズ法、3: セルロースアセテートフィルター+超音波処理+免疫磁気ビーズ法、4: ポリカーボネートフィルター+超音波処理+免疫磁気ビーズ法、5: ポリエーテルスルホンフィルター+超音波処理+免疫磁気ビーズ法、6: カートリッジフィルター+振盪+免疫磁気ビーズ法

表2 試験方法別の*Cryptosporidium* オーシスト数と*Giardia*シスト数

試験方法	<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>	
	推定	確定	推定	確定
1	16-19(17.5)	11-12(11.5)	12-18(15)	7(7)
2	3-7(5)	1-2(1.5)	5-8(6.5)	0-1(0.5)
3	3-5(4)	1-3(2)	11-13(12)	2(2)

試験方法=1: 混合エステルフィルター+アセトン溶解+Percoll・シヨ糖浮遊法、2: 混合エステルフィルター+超音波処理+免疫磁気ビーズ法、3: カートリッジフィルター+振盪+免疫磁気ビーズ法

表3 試験方法別の*Cryptosporidium* オーシスト数と*Giardia*シスト数

試験方法	<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>	
	推定	確定	推定	確定
1	17-26(22)	14-17(15.3)	6-11(8)	2-5(3)
2	14-17(15.6)	9-12(10.6)	11-18(14)	4-6(4.7)

試験方法=1: 混合エステルフィルター+アセトン溶解+Percoll・シヨ糖浮遊法、2: カートリッジフィルター+振盪+Percoll・シヨ糖浮遊法

### 3) フローサイトメータによる染色効果の判定の試み

DAPIが最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ になるようにオーシスト浮遊液に加え、5分間室温で静置して染色したオーシストは、フローサイトメータにより1832個がカウントされ、このうち20.85%がDAPIにより染色され、79.15%は染色されていない（平成10年度報告書参照）。

DAPIが最終濃度 $3\mu\text{g/ml}$ になるようにオーシスト浮遊液に加え、 $75^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱し、その後室温で1時間静置して染色したオーシストでは、95.47%が染色されていた（平成10年度報告書参照）。

### 3. 培養細胞を用いた *Cryptosporidium* の検出の検討

接種16時間後に細胞上のオーシストが細胞に吸着していることを確認することはできなかった。接種後24時間あるいは48時間後に培養上清を採取・遠心し、その沈渣を蛍光抗体で染色した後に微分干渉装置付き蛍光顕微鏡で観察すると、内部にスポロゾイトが認められない空のオーシストが多数みられた。また、培養細胞には集積部分が明確に認められた。このことから、スポロゾイトが脱囊して細胞に寄生していることが推測された。しかし、細胞内に寄生するスポロゾイトを確認するには至らなかった。

細胞内に寄生して増殖するスポロゾイトやメロゾイトを確認するために、スポロゾイトやメロゾイトを染色するための蛍光抗体が必要と思われる。

### 4. 各種哺乳動物における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有調査

野生動物においては *Cryptosporidium* をタヌキ1頭(2.4%)とアライグマ1頭(14.3%)から検出した。ネズミではクマネズミ66頭中23頭(34.8%)とドブネズミ7頭中3頭(42.9%)から *Cryptosporidium* を検出した。Dexamethasone を投与したクマネズミ6頭のうち、3頭から *Cryptosporidium* が検出された。したがって、クマネズミでは合わせて72頭中26頭(36.1%)から検出された(表6)。ブタの調査の結果は表7に示した。1~3ヶ月齢の200頭のブタでは60頭(30.0%)から *Cryptosporidium* が、26頭(13.0%)から

*Giardia* が検出された。11カ所の農家のうち、被験頭数の多かった4農家の検出率は *Cryptosporidium* が16.7~42.8%、*Giardia* が4.8~16.7%であった。農家Eから出荷された6ヶ月齢の111頭のブタでは、*Cryptosporidium* が検出されたのは1頭(0.9%)であり、*Giardia* は検出されなかった。

クマネズミ2頭とアライグマ1頭および1ヶ月齢のブタ2頭の糞便から精製した *Cryptosporidium* のオーシストを用いて、genotypeの解析を行ったところ、アライグマから検出された *Cryptosporidium* は18S rRNAの配列でも、polythreonin open reading frameをターゲットとしたcry44とcry373を用いたPCR-RFLP法でもgenotype2であった。ネズミから検出された *Cryptosporidium* は18S rRNAのこれまでに報告された配列といずれも完全に一致しなかった。PCR-RFLP法ではRsa Iにより切断されず、genotype1あるいは2のいずれでもなかった。ブタから検出された *Cryptosporidium* は、18S rRNAの配列はGen Bankに登録されたAF115377およびAF108861のDNA配列と一致し、PCR-RFLP法ではRsa Iにより切断されなかった。

### D. 考察

表流水を試料として、異なる濃縮・回収方法と分離・精製方法を組み合わせた試験方法による *Cryptosporidium* オーシストと *Giardia* シストの検出数の比較を行ったところ、混合エステルタイプフィルター+アセトン溶解法+Percoll・シヨ糖浮遊法で得られた結果が最も数値が高かった。一方、免疫磁気ビーズ法を用いた試験方法では低い数値の結果となった。これが免疫磁気ビーズ法そのものの問題に起因するか、試料に用いた表流水に含まれる懸濁粒子の影響であるか、あるいは技術的要因によるものかは今回の調査では明らかにならなかった。

混合エステルタイプフィルター+アセトン溶解+Percoll・シヨ糖浮遊法とカセットフィルター+振盪+シヨ糖浮遊法を比較すると、*Giardia* シストではほぼ同じ結果が得られたが、*Cryptosporidium* オーシストではカセットフィルター+振盪+シヨ糖浮遊法での検出数が少ない傾向であった。カセットフィルター+振盪+シヨ糖浮遊法では

表4. クリプトスポリジウムオーシストに対する各種処理法のDAPI染色への効果

処 理 法	count数	球 形 <sup>a</sup>		縫合線開放 <sup>a</sup>	
		無染色(%)	染色(%)	中身空(%)	染色(%)
精製水 DAPI5分間	268	214(79.8) <sup>b</sup>	27(10.1)	24(9.0)	3(1.1)
精製水 DAPI30分間	245	178(72.6)	32(13.1)	32(13.1)	3(1.2)
0.1N塩酸 DAPI5分	224	163(72.8)	17(7.6)	44(19.6)	0
95%エタノール DAPI5分	239	144(60.3)	50(20.9)	44(18.4)	1(0.4)
アセトン DAPI5分	306	172(56.2)	72(23.5)	61(20.0)	1(0.3)
アセトン DAPI30分	230	83(36.1)	89(38.7)	48(20.9)	10(4.3)
10倍希釈DMSO DAPI5分	344	203(59.0)	41(11.9)	95(27.6)	5(1.5)
50倍希釈DMSO DAPI5分	277	191(69.0)	35(12.6)	47(17.0)	4(1.4)
50倍希釈DMSO DAPI30分	269	115(42.8)	28(10.4)	115(42.8)	11(4.1)

a : オーシストの形態

b : オーシスト数 (%)

表5 パルスの条件と DAPI によりオーシストが染色される割合

pulse length	charging voltage (V)	No. of pulse	染色割合
50 msec	100	1	8.6
50 msec	100	2	10.3
50 msec	150	1	27.2
50 msec	150	2	41.0
50 msec	250	2	56.0
80 $\mu$ sec	500	1	16.7
80 $\mu$ sec	750	1	15.0
80 $\mu$ sec	750	2	20.0
80 $\mu$ sec	1000	1	13.8
80 $\mu$ sec	1000	2	15.5

表6 各種野生動物における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有状況

動物種	被験頭数	検出数(%)	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
アナグマ	3	0	0
アライグマ	7	1 (14.3)	0
イノシシ	1	0	0
クマネズミ	72	26 (36.1)	0
タヌキ	47	1 (2.1)	0
ドブネズミ	7	3 (42.9)	0
ニホンカモシカ	2	0	0
ニホンザル	6	0	0
ニホンジカ	17	0	0
ノウサギ	1	0	0
ハクビシン	15	0	0
ムササビ	4	0	0

表7 ブタにおける *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有状況

農家	月齢	被験頭数	検出数 (%)	
			<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
A	3	1	1	0
B	1	12	2 (16.7)	1 (8.3)
C	1~3	21	9 (42.8)	1 (4.8)
D	3	1	0	0
E	1	108	34 (31.5)	14 (13.0)
	6	111	1 (0.9)	0
F	1	48	13 (25.0)	8 (16.7)
G	3	2	1	0
H	3	1	0	0
I	3	2	0	0
J	3	2	0	0
K	1~3	2	0	1

表8 動物から検出された *Cryptosporidium* の genotypes

動物	18S rRNA	PCR-RFLP
アライグマ	2	2
クマネズミ	—	—
ブタ	ブタ	—

*Cryptosporidium* オーストだけが減少する何らかの原因があると考えられる。水試料からのクリプトスポリジウム等の検出は試料中に含まれる懸濁物質の影響を受けるが、今回の検討は1河川から採取した水試料を用いているだけであるため、免疫磁気ビーズ法あるいはカセットフィルターについて、他の河川の水試料で同じ様な傾向がみられるかどうかなど、異なる水試料での検討がさらに必要と考えられる。

水試料中のクリプトスポリジウムの検査において、FITC で標識したクリプトスポリジウム特異抗体による蛍光染色でオーストを染色するとともに、DAPI 染色を施してオースト中のスポロゾイトの核を染色する。通常、FITC の緑色に染色された  $5\mu\text{m}$  ほどの粒子について、微分干渉装置により形態を観察してクリプトスポリジウムオーストの鑑別が行われる。しかし、この観察が困難な場合には、DAPI 染色による核の観察は当該原虫の鑑別に補助的な役割を果たしており、有用な方法と考えられる。しかし、試料中のすべてのオーストが DAPI により染色されるわけではない。そこで、水試料中のクリプトスポリジウムの検査を簡便に、しかもより正確に行うためには、DAPI により確実に核が染色される方法を検討することが重要である。

検査において追加される操作を最小限にしなが、簡単でしかも確実な前処理法を見いだすことを目指して各種処理法を検討した。今回用いた各種化学物質による前処理と染色時間の条件では、染色されるオーストの割合は最も高い場合でも約 40%であった。無処理の場合に比べて染色される割合は増加したが、十分な結果ではなかった。アセトン等による処理の時間を延ばすことで染色される割合を増やすことが可能であると考えられるが、有機溶媒による処理ではオーストの縫合線が開放して、オースト壁だけの空のオーストが増えることが危惧される。電気的パルスによる DAPI 染色への効果も検討したところ、条件の設定によっては核が染色される割合を約 60%まで上げることができた。

化学物質による処理や電気的パルスを利用する方法の利点は操作が比較的簡便であるとともに、オーストあるいは内部のスポロゾイトの形態をほとんど変化させない点にある。一方、電気的パルスを利用する方法の問題は、専用の機器を準備しなければなら

ず、経済的な負担となることである。今回検討した方法では全てのオースト中の核を染色することはできなかったため、当初の研究の目的を達成することはできなかったが、簡単な処理で染色の割合を改善することができる可能性を示すことができた。

DAPI 染色への前処理法の効果を試行的にフローサイトメータを用いて検討したところ、極めて短時間に多量の粒子を測定することが可能であった。染色条件やフローサイトメータの測定条件の設定等について、さらに実験を重ねて検討する必要があるが、フローサイトメータを用いた測定は迅速、簡便、正確といった利便性を兼ね備えており、今後の活用が期待される。

今回調査したブタを飼養する養豚場の河川への影響に関する詳細な情報は得られていないが、高い保有率を有することは養豚場が河川への *Cryptosporidium* の汚染源となる可能性があることを示唆している。さらに、ブタの月齢により *Cryptosporidium* の保有率に差があり、1~3 カ月齢の幼獣における *Cryptosporidium* の保有率が高いが、6 カ月齢ではそれが低いという結果が得られた。すなわち、農家 E の 1~3 ヶ月齢のブタにおける検出率は 37%であるのに対し、6 ヶ月齢では 0.9%であった。このことから、ブタは生後早い時期に *Cryptosporidium* に感染してオーストを排出するが、成長とともに排出するオーストが減少する、あるいは消失することが予測された。

*Cryptosporidium* に対する有効な薬剤や消毒剤がないために、河川への汚染を防ぐためには性能の高い浄化装置の設置やブタの糞便の堆肥化等があげられる。しかし、このためには経済的な負担や多大な労働力を必要とするために効果を上げることが難しい状況がある。今回の調査では 1 養豚場のみの調査であるため、その普遍性を検証する必要はあるが、月齢により保有率が大きく異なっていた。このことは月齢の若いブタの糞便の処理を徹底するなど、汚染源対策を集中的に行うことが可能であることを示している。

わが国ではこれまでに様々な水道水の *Cryptosporidium* 汚染が報告されているが、汚染源はほとんど解明されていない。平成 8 年に神奈川県平塚市で発生した雑居ビルの簡易専用水道の汚染による集団下痢症の発生事例では、ビルの地下 1 階に設置された受水槽に隣接した雑排水槽および汚水槽の内容が混入したために多数の患者が発生した。

この事例では、ネズミ等の何らかの動物の糞便の混入が最初の患者の発生に関与したことも疑われたが、汚染源は特定することができなかった。その原因の一つは、当時の研究段階では疫学マーカーの解析ができなかったことにあった。

野生動物の *Cryptosporidium* および *Giardia* 保有調査では、保有率は低いがタヌキとアライグマから *Cryptosporidium* が検出された。また、クマネズミとドブネズミでは *Cryptosporidium* を高い率で保有していることが明らかとなった。これにより野生動物が汚染源となる可能性があることが示されたが、野生動物の種類と被験頭数が少ないため、さらにデータを蓄積する必要があるものと考えられる。簡易水道の *Cryptosporidium* 汚染が各地から報告されているが、こうした事例の発生地では下水や畜産排水などの混入がない場合が多く、原水採水場所の周辺に生息する野生動物が排出した糞便による汚染である可能性が考えられる。

保有率の調査は、排出された糞便に含まれるオーシストの検出に基づいて算定されるが、*Cryptosporidium* が寄生していても常時一定数のオーシストが排出されるわけではない。したがって、被験動物の糞便を1回調べただけでは保有率を実際よりも低めに算定する可能性が非常に高い。そこで、今回の調査では、野生動物が飼育された場合には複数回糞便を採取し、これを検査した。捕獲後、飼育することが可能であったクマネズミも複数回検査を行ったが、このうち糞便から *Cryptosporidium* が検出されなかった6頭については dexamethasone 溶液(4mg/L)を飲用水として給水し、1週間後から糞便を検査したところ、3頭から検出された。Dexamethasone を与える前には糞便中のオーシストが非常に少ないために検出されなかったが、dexamethasone により免疫機能が低下してオーシストの排出が顕性になったものと考えられる。

汚染源の解明には、遺伝学的手法等による疫学マーカーの解析が不可欠である。現時点では *C. parvum* には genotype により1(ヒト型)、2(ウシ型)およびイヌ固有タイプ、ブタ固有タイプとネズミ固有タイプが報告されている<sup>1,6,7)</sup>。これらのタイプを解析することは、感染源や感染経路の解明あるいは汚染源等の特定を行う場合に極めて重要である。

これまでの研究では、ブタには genotype2(ウシ型)とブタ固有のタイプの *Cryptosporidium* が寄生することが報告されている<sup>8)</sup>。今回の調査でブタから検出された *Cryptosporidium* は、Gen Bank に登録されている、ブタから検出された *Cryptosporidium* の DNA 配列と一致しており、遺伝学的にはブタ固有のタイプであった。このタイプの *Cryptosporidium* がヒトから検出されたとする報告がこれまでのところないため、もしもヒトでは感染が成立しないとすれば、水道水あるいは水道原水における *Cryptosporidium* のリスク評価を行う場合に、そのタイプ(genotype)を考慮しなければならないということも考えられる。

ヒトに寄生する *C. parvum* は、HIV 患者も含めて、genotype 1(ヒト型)、genotype 2(ウシ型)、イヌ固有のタイプおよび *Cryptosporidium felis* であり<sup>4)</sup>、ブタ固有のタイプはヒトから検出されていない。*C. parvum* の宿主特異性は genotype により異なることが明らかにされているが、ブタ固有のタイプがブタのみに寄生するのであるか、ブタ以外の哺乳動物でも感染が成立するかどうかは現時点では不明である。Genotype 2 やイヌ固有のタイプが HIV 患者から検出されることを考えると、今後調査が進めばブタ固有のタイプがヒトから検出される可能性も十分ありうる。多くの症例を検討することで、ブタ固有のタイプの宿主域を今後解明することが必要である。

今回調査した範囲ではアライグマ由来の *Cryptosporidium* は genotype 2 であったことから、ヒトの感染源ともなりうることを示唆された。アライグマにおける *Cryptosporidium* の感染はこれまでに報告があるが<sup>9,10)</sup>、genotype が解析された報告はない。アライグマは北米に生息する動物であるが、ペットとしてわが国に輸入され、飼養の放棄や逃走により国内で再び野生化したものである。*Cryptosporidium* の感染が輸入された段階で既にあり、これが代を越えて継続したものであるか、わが国において感染したものであるかは不明であるが、保有動物であることが裏付けられた。

ネズミから検出された *Cryptosporidium* の rRNA の配列はこれまでに報告された配列と一致するものがなく、genotype を明らかにすることができなかった。したがってこのタイプがヒトに感染するか、あるいはネズミ以外の動物が保有しているかなどは全く情

報を得ることができない。このタイプについては今後詳細に解析しなければならない。

ブタでは、農家により異なるが *Giardia* の保有率は 4.8~16.7%であった。ブタに寄生する *Giardia* がヒトに寄生する *G. duodenalis* と同じであるか、あるいはヒトで感染が成立するかも含めて、その種について今後詳細に検討する必要があるが、*Cryptosporidium* と同様に河川への汚染源となりうることを示唆された。

#### E. まとめ

厚生省の指針にある暫定的試験法の中で標準的試験法として位置づけられているのはメンブランフィルター+アセトン溶解+シヨ糖浮遊法の組み合わせであるが<sup>11)</sup>、この方法は今回の検討で比較した試験方法の中では最も高い検出数であった。水試料の性状等により結果が異なることも考えられるが、メンブランフィルター+アセトン溶解+シヨ糖浮遊法が試験方法として高く評価できるものと思われる。

水試料からのクリプトスポリジウムの検出を行う場合、FITC の特異蛍光を有する径 5 $\mu$ m 前後の粒子について、1)スプロゾイトが認められる、2)縫合線が認められる、3)DAPI 染色によりスプロゾイトの核が認められる、とした形態上のいずれかの特徴が見られれば、クリプトスポリジウムのオーシストと確定することができる。したがって、DAPI 染色によりクリプトスポリジウムのオーシストが確実に染色されれば、鑑別する上で非常に有用である。しかし、実際には実験系では 10%前後、実際の河川試料では 60%ほどが DAPI により染色されているに過ぎない。そこで、DAPI により確実に染色する方法を見出して迅速で簡便な検査方法を確立するために、各種処理法を検討した。各種処理法のうち、エタノールとアセトンによる処理が DAPI 染色に効果があった。効果の判定を顕微鏡下で行うと多大な手間と時間を要するため、フローサイトメータによる測定法を検討したところ、極めて迅速、簡便、正確に測定を行うことが出来た。処理法について、さらに有効な方法を探ることが必要であるとともに、フローサイトメータによる測定法の活用が期待される。

ブタやクマネズミあるいはドブネズミから高い率で *Cryptosporidium* が検出され、率は低いもののタヌキやアライグマからも検

出された。検出された *Cryptosporidium* の genotype は宿主により異なっていた。*Cryptosporidium* の genotype のヒトへの感染性、あるいは宿主域は不明な点も多く、今後は国内で患者から分離される *Cryptosporidium* がどのような genotype に属しているかを明らかにしなければならない。それとともに水道原水や水道水のリスク評価をする際に、そこに存在する *Cryptosporidium* の genotype を解析する必要性が生じる可能性についても検討しなければならないものと考えられる。

#### F. 参考文献

1. Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., et al: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65: 3386-3391.
2. Slifko, T.R., Friedman, D., Rose, J.B. and Jakubowski, W.: An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 3669-3675.
3. Arrowood, M.L., Donaldson, K.: Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium-chloride gradients. J Euk Microbiol. 1996;43:89S.
4. Pieniazek, N. J., Bornay-Llinares, F. J., Slemend, S. B. and et al.: New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. Emerging. Inf. Dis. 1999; 5: 444-449.
5. 遠藤卓郎：クリプトスポリジウム等原虫類の検査用マニュアル 厚生省新興・再興感染症研究事業 クリプトスポリジウム等の原虫類による食品および環境の汚染防止と感染対策に関する研究. 平成9年度報告書
6. Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A. and Thompson, C.A. : Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. J.Parasitol. 1997;

83: 825-830.

7. Morgan, U.M., Sargent, K.D., Deplazes, P., Forbes, D.A., and et al.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 1998 ; 117: 31-37.
8. Morgan, U.M., Buddle, J.R., Armson, A., Elliot, A. and Thompson R.C.: Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Aust. Vet. J.*, 1999; 77:44-47.
9. Snyder, D.E.: Indirect immunofluorescent detection of oocysts of *Cryptosporidium parvum* in the feces of naturally infected raccoons (*Procyon lotor*). *J. Parasitol.* 1988; 74: 1050- 1052.
10. Martin, H.D. and Zeidner N.S.: Concomitant cryptosporidia, coronavirus and parvovirus infection in a raccoon (*Procyon lotor*). *J. Wildl. Dis.* 1992; 28:113-115.
11. 厚生省生活衛生局水道環境部：水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について（通知）、生衛発第1039号、平成10年6月19日



分担研究報告書 9

## 相模川水系における原虫汚染の実態と代替評価指標の検討

分担研究者 平田 強

## 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

### 相模川水系における原虫汚染の実態と代替評価指標の検討

分担研究者 平田 強 麻布大学環境保健学部 教授

研究協力者 橋本 温 麻布大学大学院環境保健学研究科

#### 要 旨

平成9, 10年度に行った相模川水系原虫汚染実態調査データを用いて, 原虫汚染指標としての可能性が指摘されている推定ウェルシュ菌芽胞, 糞便汚染指標である大腸菌, 大腸菌群および好気性芽胞の4つの指標細菌と濁度の計5水質項目と原虫濃度との関係を単回帰および重回帰分析により解析した。単回帰分析で原虫汚染レベルとの間に最も有意な相関関係が認められたのは推定ウェルシュ菌芽胞であった。重回帰分析で説明変数を2変数とした場合, クリプトスポリジウムオーシストは推定ウェルシュ菌芽胞に加えて好気性芽胞が, 3変数とした場合は推定ウェルシュ菌芽胞に加えて大腸菌および大腸菌群が選択された。

有意な相関が認められた推定ウェルシュ菌芽胞および大腸菌と原虫濃度間の単回帰式を用いて, 原虫の年間許容感染リスク  $10^{-4}$ に相当する原水の指標濃度を試算した。その結果, 浄水処理による原虫除去を  $3\log_{10}$ と仮定すると, 原虫による年間感染リスクを  $10^{-4}$ 以下に維持する場合の推定ウェルシュ菌芽胞許容濃度は, クリプトスポリジウムの場合は  $8\text{cfu}\cdot 100\text{m}^{\text{l}^{-1}}$ , ジアルジアの場合は  $3\text{cfu}\cdot 100\text{m}^{\text{l}^{-1}}$ , 同様に大腸菌ではそれぞれ  $50$  および  $20\text{MPN}\cdot 100\text{m}^{\text{l}^{-1}}$ と計算された。

#### 1 はじめに

近年, 塩素消毒を行った水道水を感染源とするクリプトスポリジウムおよびジアルジアなどの原虫による集団感染が各国で発生している(Hayes *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1989; Joseph *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1991; MacKenzie *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1994; Atherton *et al.*, 1995; Bridgman *et al.*, 1995; Dworkin *et al.*, 1996; Fox and Lytle, 1996; Roefer *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1997; Solo-Gabriele and Neumeister, 1996)。わが国でも1996年に水道を介したクリプトスポリジウム症の集団感染が発生している(埼玉県衛生部, 1996)。水源汚染調査は米国, カナダ, 南アフリカ(LeChevallier *et al.*, 1991; Rose *et al.*, 1991; Roach *et al.*, 1993; Kfir *et al.*, 1995)など, 各国で行われている。たとえば米国17州の調査によると, 人為汚染のある地域38ヶ所と人為汚染の無い地域59ヶ所を含む111ヶ所のうち, クリプトスポリジウムは57ヶ所(51%), 人為汚染のある地域に限ると28ヶ所(74%)から, ジアルジアは14ヶ所(13%), 人為汚染のある地域では10ヶ所(26%)から,  $10^1\sim 10^2$ 個 $\cdot 100\text{m}^{\text{l}^{-1}}$ のレベルで検出されており(Rose *et al.*, 1991), 原虫汚染は相当広範囲にわたっていると考えられる。

一方, わが国では水環境の原虫汚染に関する情報が少なく, 定量的な情報としては神奈川県の水道水源の汚染状況調査(神奈川県衛生部, 1997, 1998)と厚生省の行った全国257ヶ所の水道水源についての全国調査(厚生省, 1997)の2件のみである。そこで本研究では神奈川県的主要な水源の一つである相模川水系を選び, その11地点について13ヶ月間にわたる原虫汚染実態調査を行うこととし, 1997年6月に開始し, 1998年6月に終了した。その結果については既に平成9, 10年度に報告した(平成9年度厚生科学研究補助金-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報告書, および, 平成10年度厚生科学研究補助金-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報告書)。

環境水の原虫汚染状況を把握することは公衆衛生上極めて重要ではあるが、その試験方法は煩雑かつ長時間を要するばかりでなく、操作に熟練を要する。このため多量の試料を日常的に検査するには多くの困難を伴う。仮に原虫試験を代替あるいは補完することのできる水質指標を導入することが可能であれば、多くの水環境の原虫汚染の可能性を効率的に把握することができ、水道水の微生物的安全性の評価が比較的容易になると考えられる。そこで、本年度は、これらの全調査データを用いて、従来から原虫汚染指標としての可能性が指摘されている推定ウェルシュ菌芽胞(Hirata *et al.*, 1991 ; Payment and Franco, 1993 ; Hirata *et al.*, 1991,1993), 糞便汚染指標である大腸菌・大腸菌群および好気性芽胞の4つの指標細菌濃度と濁度の計5水質項目と原虫濃度との関係を単回帰および重回帰分析により解析し、原虫汚染指標論を展開した。

なお、本研究で使用したデータはいずれも平成9, 10年度当厚生科学研究費補助金の報告書に記載済のものであるが、記述内容の理解を助けるため、それらの基礎的情報もあわせて記述した。

## 2 材料および方法

### 2.1 原虫濃度の測定

#### 1)調査水域と調査地点

調査地点を Fig.1 に示した。相模川本川では山梨県上野原町桂川橋の左岸, 神奈川県相模湖町相模湖公園の左岸, 相模原市当麻昭和橋の左岸, 厚木市金田の左岸, 東町の右岸および寒川町宮山の左岸の6地点, 支川の中津川では愛川町半原の右岸, 厚木市中河原才戸橋の右岸および第一鮎津橋の右岸の3地点, 小鮎川では清川村片原橋の右岸および厚木市元町の右岸の2地点の計11地点とした。これらの採水地点のうち, 相模川の寒川町宮山および中津川の愛川町半原は水道原水の取水地点である。

#### 2)試料の採水および濃縮

1997年6月~1998年6月までの13ヶ月間, 相模川の寒川町宮山では毎月1回以上, 上流部の桂川橋は調査期間中1回, その他の地点はほぼ2ヶ月に1回の頻度で調査を行った。各地点ともポリタンク(20l)5本に河川水を採水し, 採水量は各地点100lとした。採水後, 試料を研究室に持ち帰りその日の内に濃縮操作を行った。

持ち帰った試料の全量を1試料あたり, 数~十数枚のセルロースアセテート製メンブランディスクフィルター(孔径1.2 $\mu$ m, 直径142mm, Millipore製)でろ過した。ろ過したフィルターをポリプロピレン遠心管(50ml)に入れ(遠心管1本当たり2枚まで), これにアセトン50mlを加えてタッチミキサーで十分に攪拌してフィルターを完全に溶解させたのち, 1,050 $\times$ g, 10分間の条件で遠心分離した。遠心分離後, 上清のアセトンをアスピレーターで吸引除去し, 残った沈渣に再びアセトンを加えてタッチミキサーで溶解し, 遠心分離してアセトンを除去した。このアセトンによる洗浄を3回繰り返した後, 沈渣にPBS(0.1%Tween 80 含)を加えて50mlとし, 再び遠心分離して上清を吸引除去した。最後にPBS(0.1%Tween80 含)を適量加え, 濃縮試料とした。

#### 3)選択分離

濃縮試料を遠心分離した後の沈渣量が0.5ml以下となるように数本のポリ遠心管(50ml)に分取し, PBS(0.1%Tween 80 含)で20mlとしたのちPercoll-シヨ糖溶液(比重1.10)30mlを試料の下部にゆっくりと注入して, 試料層と高比重液層を形成させ, 遠心分離した。遠心分離後, 試料層および試料層と高比重液層の界面付近をポリ遠心管(50ml)に回収, PBSを加えて50mlとした後, 遠心分離して上清を吸引除去した。沈渣にPBS10~50mlを加えて間接蛍光抗体染色用試料とした。

#### 4)間接蛍光抗体染色

選択分離した試料の一定量をセルロースアセテート製メンブランディスクフィルター(孔径 $0.8\mu\text{m}$ , 直径 $25\text{mm}$ , ADVANTEC TOYO 製)で吸引ろ過した。ろ過後, 間接蛍光抗体染色キット(Hydrofluor-Combo, SDI 社製)の一次抗体(抗クリプトスポリジウムオーシスト表面抗原-ネズミ抗体および抗ジアルジアシスト表面抗原-ネズミ抗体)をろ過面に滴下し, 室温で30分間反応させた。反応後, フィルターをフィルターホルダーに戻し, PBS, 1%牛血清アルブミンおよび1%正常ヤギ血清, 各 $1\text{ml}$ をろ過して余剰な一次抗体を洗浄した。洗浄後, 同様の手順で二次抗体(FITC 標識-抗ネズミ抗体-抗体)を反応させ, 25分経過後に $0.4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)溶液を一滴滴下し, 5分間反応させた。反応後, 一次抗体と同様の方法で洗浄し, 30,60 および95%エタノール-グリセリン溶液それぞれ $500\mu\text{l}$ をゆっくり吸引してフィルターを脱水した。脱水後, フィルターを2%DABCO(1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane)グリセリン封入剤を滴下したスライドガラスにのせ, 孵卵器で $40^{\circ}\text{C}$ 前後に保温して透明化し, カバーガラスをかけてプレパラートを作成した。

#### 5)同定と計数

プレパラートにした試料の全面をノマルスキー微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡(BX-60, OLYMPUS 社製),  $10\times 20$ 倍の倍率で観察し, IB 励起でFITCに特異的な青リンゴ色の蛍光を発する $4\sim 6\mu\text{m}$ (クリプトスポリジウムオーシスト)または $9\sim 15\mu\text{m}$ (ジアルジアシスト)の類円形または楕円形粒子を検索した。これらの粒子を以下の判定基準で蛍光抗体染色で陽性であった粒子をクリプトスポリジウムオーシスト様またはジアルジアシスト様の蛍光抗体陽性粒子と判定した。また, それらの蛍光抗体陽性粒子のうち, 以下に示したクリプトスポリジウムあるいはジアルジアに特有の特徴が確認されたものをクリプトスポリジウムオーシストまたはジアルジアシストと確定し, 計数した。

##### クリプトスポリジウムオーシスト様蛍光抗体陽性粒子

1,000倍の蛍光像で以下の(1)~(4)のすべての特徴が確認されるものをクリプトスポリジウムオーシスト様蛍光抗体陽性粒子と判定した。

- (1) FITCによる青リンゴ色の蛍光が観察されること。
- (2) 直径が $4\sim 6\mu\text{m}$ であること。
- (3) 輪郭が強く染色された類円形(あるいはひしゃげた紙風船様)であること。
- (4) 内部に赤, オレンジなどの蛍光が観察されないこと。

##### クリプトスポリジウムオーシスト

クリプトスポリジウムオーシスト様蛍光抗体陽性粒子のうち, 1,000倍の蛍光像またはノマルスキー微分干渉像で次の(1), (2)または(3)のいずれかが観察され, かつ(4)が確認されるものをクリプトスポリジウムオーシストと確定した。

- (1) スポロゾイトが確認されること。
- (2) 縫合線が確認されること。
- (3) U 励起で青白色に染色されたスポロゾイトまたは特徴的な1~4個のスポロゾイトの核が観察されること。
- (4) クリプトスポリジウムオーシストとは明らかに異なる構造が観察されないこと。

##### ジアルジアシスト様蛍光抗体陽性粒子

1,000倍の蛍光像で以下の(1)~(3)のすべての特徴が確認されるものをジアルジアシスト様蛍光抗体陽性粒子と判定した。

- (1) FITCによる青リンゴ色の蛍光が観察されること。
- (2) 長径 $9\sim 15\mu\text{m}$ であること。
- (3) 輪郭が強く染色される楕円形で, その染色像がジアルジアに特徴的であること。