

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of nested PCR products.

Lane M : 100 bp molecular marker.

Lane 1-4 : Environmental samples.

Lane 5-6 : Negative control.

Lane 7-8 : Positive control (*C. parvum* HNJ-1) .

このように、本プライマーペアを用いた Nested PCR 法は *Cryptosporidium* の種や遺伝子型の識別に応用可能と判断し、河川水等の実環境試料から単離したオーシストの遺伝子解析への適用を試みた。

C-2 環境水中の *Cryptosporidium* の遺伝子型

1) 河川水

Cryptosporidium 濃度

河川水中の *Cryptosporidium* 濃度は 5.3 oocysts/10 L であった。橋本ら (1999) は同地点で 18 回調査し、そのうち 15 回で *Cryptosporidium* を検出、その濃度は 1~67 oocysts/10 L、幾何平均値は 9 oocysts/10 L であった。本研究でも、同様の汚染状況であった。

遺伝子型分布

39 個のオーシストについて PCR および Nested PCR を行った。Nested PCR で増幅が確認されたのは 32 サンプル (82.1%) で、このうち十分量の増幅産物が得られた 22 サンプルについてシーケンスを試み、18 サンプル (81.8%) でシーケンスに成功した。単離したオーシストのうち、シーケンスまで成功したのは 18/39 (46.2%) であった (Table 4)。

Table 4 Nested PCR and direct sequence using singly isolated *Cryptosporidium* oocyst

Samples	No. of tested	Nested PCR*			Sequenced successfully	Success from manipulation to
		++	+	-		
<i>C. parvum</i> HNJ-1	30	30	0	0	3/3 (100)	—
Surface water	39	22	10	7	18/22 (81.8)	18/39 (46.2)
Discharge of pig farm	17	11	2	4	10/11 (90.9)	10/17 (58.8)

* ++: Amplified sufficiently. +: Amplified but insufficient for DNA sequencing.
—: Failed to amplify.

塩基配列が得られた 18 サンプルについて GenBank の登録データとの相同性を調べるとともに、clustal X を用いて多重配列アライメントを行った。結果を Fig. 4 に示す。*C. parvum* genotype 1 (AY204234, AY204241 etc.), *C. parvum* genotype 2 (AF161859 etc.), *C. parvum* pig genotype 1 (AF108861 etc.) および *C. parvum* pig genotype 2 (AY271721) の 4 つのグループに大別でき (Table 5), *C. parvum* genotype 1 が 13 個 (72.2%) と半数以上を占めた。その他, *C. parvum* genotype 2 が 1 個 (5.6%), *C. parvum* pig type が 4 個 (22.2%) であった (Fig.5)。

Table 5 Distribution of *Cryptosporidium* genotype/species in surface water. (Miyayama, the Sagami River)

Genotypes/Species		GenBank code	Number of isolate		
Anthroponotic	<i>C. parvum</i> genotype 1	T11 AY204234, etc.	10	13	14
		T10 AY204241, etc.	3		
Zoonotic	<i>C. parvum</i> genotype 2	AF161859, etc.	1	5	4
Animal	<i>C. parvum</i> pig genotype 1	AF108861, etc.	3		
		<i>C. parvum</i> pig genotype 2	AY271721		
Total			18		

本調査は 1 回のみであり、詳細な検討を行うためには継続した調査が必要ではあるが、今回の調査で *C. parvum* genotype 1 が最も高い頻度で検出されたことから、本河川における主な汚染源はヒトに由来する排水等であると推測された。

2) 養豚排水

Cryptosporidium 濃度

養豚排水中の *Cryptosporidium* 濃度は、400 oocysts/100 mL であった。橋本と平田 (1998) の調査で、濃度は 1,000~10,000 oocysts/100 mL, 幾何平均値は 2,200 oocysts/100 mL と報告されている。今回の調査では濃度がやや低かったものの、下水や河川水と比べてはるかに高濃度の *Cryptosporidium* が検出された。

遺伝子型分布

養豚排水から 17 個の *Cryptosporidium* オーシストを単離した。全てのサンプルについて PCR および Nested PCR を行った。Nested PCR で増幅が確認されたのは 13 サンプル (76.5%) で、そ

のうち十分量の増幅産物が得られた 11 サンプルについてシーケンスを行い、10 サンプル (90.9%) でシーケンスに成功した。単離したオーシストのうち、シーケンスまで成功したのは 10/17 (58.8%) であった (Table 4)。

塩基配列が得られた 10 サンプルは、それぞれ GenBank の登録データとの相同性を調べるとともに、clustal X を用いて多重配列アライメントを行った。結果を Fig. 4 に示す。*C. parvum* pig genotype 1 (AF108861 etc.), *C. parvum* pig genotype 2 (AY271721), *C. parvum* isolate from roof rat (AB042403) の 3 つのグループに大別できた (Table 6)。

Table 6 Distribution of *Cryptosporidium* genotype/species in discharge from pig farm. (Katahara, the Koayu River)

Genotypes/Species		GenBank code	Number of isolate	
Animal	<i>C. parvum</i> pig genotype 1	AF108861, etc.	6	
	<i>C. parvum</i> pig genotype 2	AY271721	3	10
	<i>C. parvum</i> isolate from roof rat	AF112571	1	
Total			10	

養豚排水から検出された *Cryptosporidium* は全て動物タイプであり、ヒトに感染の可能性のある種や遺伝子型は検出されなかった。内訳は、*C. parvum* pig type が 9 個 (90%), *C. parvum* isolated from roof rat が 1 個 (10%) であった (Fig. 5)。

これまで相模川水系では、養豚排水が主要な汚染源と考えられていたが (橋本ら, 1999), 今回の相模川の調査で最も多く検出されたのは *C. parvum* genotype 1 であり、養豚排水の相模川クリプトスポリジウム汚染への寄与度は 1/4 かそれ以下であり、他の汚染源が大きく貢献している可能性が示唆された。

River group 1	ACTAT-TTTTTTTTT-AG
<i>C. parvum</i> genotype 1	ACTAT-TTTTTTTTT-AG
River group 2	ACTATATATTTT----AG
<i>C. parvum</i> genotype 2	ACTATATATTTT----AG
River group 3	ACTATAATTTTTATT-AG
<i>C. parvum</i> pig genotype 1	ACTATAATTTTTATT-AG
River group 4	ACTTTAC-----AG
<i>C. parvum</i> pig genotype 2	ACTTTAC-----AG
Pig group 1	ACTATAATTTTTATT-AG
<i>C. parvum</i> pig genotype 1	ACTATAATTTTTATT-AG
Pig group 2	ACTTTAC-----AG
<i>C. parvum</i> pig genotype 2	ACTTTAC-----AG
Pig group 3	ACTAT-----TTTTAG
<i>C. parvum</i> isolate from roof rat	ACTAT-----TTTTAG

Fig. 4 Alignments of the *Cryptosporidium* SSU-18S rRNA gene.

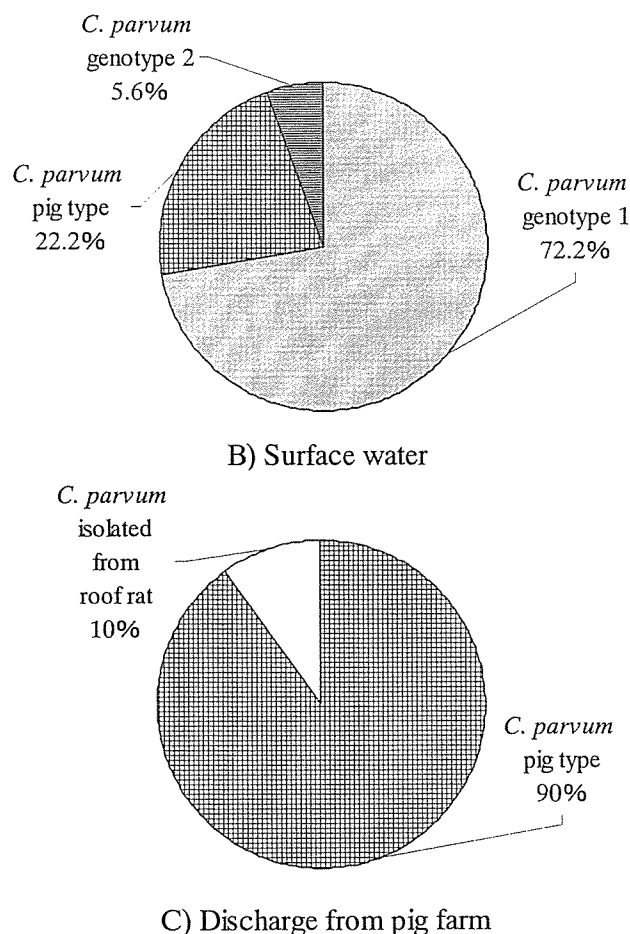


Fig. 5 Genotypes of *Cryptosporidium* isolated from environmental samples.

D. 結論

本研究で実用化した Nested PCR-ダイレクトシーケンス法を用いて河川水および養豚排水から単離した個々のオーシストについて遺伝子型の解析を行い、調査水域における *Cryptosporidium* の種や遺伝子型の分布状況を把握した。これは従来の蛍光抗体染色法では得ることのできなかつた、宿主特異性に基づくヒトへの感染性に関するものであり、水における *Cryptosporidium* 感染リスクの評価レベルの向上に大きく貢献するものと期待される。

<参考文献>

- 1) Carraway M, Tzipori S and Widmer G (1997) 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(9), 3958-3960
- 2) Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati D, Rabodonirina M, Nevez G, Cailliez J C, Camus D and Dei-Cas E (2001) Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates Obtained from Humans in France, *J. Clin. Microbiol.*, 39(10), 3472-3480

- 3) 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 回水環境学会シンポジウム 講演集, 121-122
- 4) 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, 水環境学会誌, 22(4), 282-287
- 5) Hashimoto A, Kunikane S and Hirata T (2002) Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan, *Wat. Res.*, 36, 519-526
- 6) 保坂三継, 落合由嗣, 矢野一好, 眞木俊夫 (2002) 多摩川におけるクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの汚染実態調査, 用水と廃水, 44(4), 295-303
- 7) Jellison K L, Hemond H F and Schauer D B (2002) Sources and Species of *Cryptosporidium* Oocysts in the Wachusett Reservoir Watershed, *AEM*, 68(2), 569-575
- 8) Johnson D W, Pieniazek N J, Griffin D W, Misener L and Rose J B (1995) Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water Samples, *AEM*, 61(11), 3849-3855
- 9) 厚生省 (1998) 水道水におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針
- 10) 黒木俊郎 (1994) クリプトスポリジウムによる集団下痢症発生事例 - 神奈川県, 病原微生物検出情報一月報, 15(11), 6-7
- 11) Learmonth J J, Ionas G, Pita A B and Cowie R S (2003) Identification and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand, *Water Sci. Technol.*, 47(3), 21-26
- 12) LeChevallier M W, Norton W D and Lee R G (1991) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies, *AEM*, 57(9), 2610-2616
- 13) LeChevallier M W and Norton W D (1995) *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water, *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, 87, 54-68
- 14) Mac Kenzie W R, Schell W L, Blair K A, Addiss D G, Peterson D E, Hoxie N J, Kazmierczak J J and Davis J P (1995) Massive Outbreak of Waterborne *Cryptosporidium* Infection in Milwaukee, Wisconsin : Recurrence of Illness and Risk of Secondary Transmission, *Clin. Infect. Dis.*, 21, 57-62
- 15) Mayer C L and Palmer C J (1996) Evaluation of PCR, Nested PCR, and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Species in Wastewater, *AEM*, 62(6), 2081-2085
- 16) McLaughlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S and Nichols G L (2000) Molecular Epidemiological Analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom : Results of Genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 Fecal Samples from Humans and 105 Fecal Samples from Livestock Animals, *J. Clin. Microbiol.*, 38(11), 3984-3990
- 17) Morgan U M, Constantine C C, Forbes D A and Thompson R C A (1997) Differentiation between Human and Animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rRNA sequencing and direct PCR analysis, *J. Parasitol.*, 83(5), 825-830
- 18) Nichols R A B, Campbell B M and Smith H V (2003) Identification of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in United Kingdom Noncarbonated Natural Mineral Waters and Drinking Waters by Using a Modified Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay, *AEM*, 69(7), 4183-4189
- 19) 小野一男, 辻 英高, 島田邦夫, 増田邦義, 遠藤卓郎 (2001) 河川水からの *Cryptosporidium* と

- Giardia* の検出状況, 感染症学雑誌, 75(3), 201-207
- 20) Pieniazek N J, Bornay-Llinares F J, Slemenda S B, da Silva A J, Moura I N S, Arrowood M J, Ditrich O and Addiss D G (1999) New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-Infected Persons, *Emerg Infect. Dis.*, 5(3), 444-449
 - 21) Roach P D, Olson M E, Whitley G and Wallis P M (1993) Waterborne *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in the Yukon, Canada, *AEM*, 59(1), 67-73
 - 22) 埼玉県衛生部 (1997) クリプトスポリジウムによる集団下痢症 –越生町集団下痢症発生事件– 報告書
 - 23) 志村有通, 竹馬大介, 森田重光, 平田 強 (2001) 塩素の *Cryptosporidium parvum* オーシスト不活化効果とその濃度依存性, 水道協会雑誌, 70(1), 26-33
 - 24) Spano F, Putignani L, Mclauchlin J, Casemore D P and Crisanti A (1997) PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin, *FEMS Microbiol. Letters.*, 150, 209-217
 - 25) Stinear T, Matusan A, Hines K and Sandery M (1996) Detection of a Single Viable *Cryptosporidium parvum* Oocyst in Environmental Water Concentrates by Reverse Transcription-PCR, *AEM*, 62(9), 3385-3390
 - 26) U.S.EPA (1995) ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water
 - 27) Ward P I, Deplazes P, Regli W, Rinder H and Mathis A (2002) Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe, *Parasitology*, 124, 359-368
 - 28) Xiao L, Sulaiman I, Fayer R and Lal A A (1998) Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(5), 687-692
 - 29) Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M and Lal A A (2000) Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool, *AEM*, 66(12), 5492-5498
 - 30) Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk T K, Gradus S and Lal A (2001) Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater, *AEM*, 67(3), 1097-1101
 - 31) Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka Y, Kuroki T, Itagaki T and Endo T (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan, *Parasitol Res.*, 87, 950-955

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

H-1 論文発表

なし

H-2 学会発表

- 1) 森田重光, 平田 強 (2003.9) 紫外線の原虫不活化効果, 第6回日本水環境学会シンポジウム, 神戸.
- 2) 猪又明子, 橋本 温, 保坂三継, 平田 強 (2003.9) わが国の水道原水並びに浄水における原虫汚染の実態, 第6回日本水環境学会シンポジウム, 神戸.
- 3) 貝森繁基, 森田重光, 平田 強 (2004.3) 紫外線照射した*Cryptosporidium parvum*オーシストにおけるDNAの損傷と光・暗回復, 第38回日本水環境学会年会, 札幌.
- 4) 杉本ひとみ, 橋本 温, 森田重光, 平田 強 (2004.3) 下水から単離した*Cryptosporidium*オーシストの遺伝子型の解析, 第38回日本水環境学会年会, 札幌.
- 5) 森田重光, 平田 強 (2004.3) 電子線による微生物不活化に及ぼす汚泥の影響, 第38回日本水環境学会年会, 札幌.

1. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書 5

河川水中のクリプトスポリジウム濃度変動の実測と 水系感染リスクの評価

分担研究者 片山浩之、秋葉道宏、国包章一

河川水中のクリプトスポリジウム濃度変動の実測と水系感染リスクの評価

主任研究者： 国包 章一 国立保健医療科学院 水道工学部
分担研究者： 片山 浩之 東京大学大学院 工学系研究科
秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部

A. 研究目的

Rose ら(2000)は、1971 年から 1994 年までの水系感染症の発生と激しい降雨との関係について調査を行い、水系感染症のアウトブレイクの 20~40%は激しい降雨と関連があると報告した。また Curriero ら(2001)は、アメリカにおける水系感染症の集団発生と気象条件の関係についてシミュレーションを行い、水系感染症の発生と大雨などの気象条件には密接な関係があると報告した。これまでの研究により、環境水中の *Cryptosporidium* 濃度は日によって大きく異なり、その濃度分布は対数正規分布に近い (Hashimoto et al., 2002)ことがわかっている。また、浄水摂取による年間感染リスクのシミュレーションにより、1 年の中で最もリスクの高い数日分のリスクが年間感染リスクに大きな影響を与えている可能性が示唆されている (Masago et al., 2002)。

過去に発生した大規模なアウトブレイクの原因には、大きく分けて以下の 2 つが考えられている。

- ・ 自然由来の水源濃度の上昇
大雨、雪解けなどによる、牛や人間の糞便などを含む排水の河川への流入
- ・ 給排水システムの構造上および運転上の問題
浄水場での事故や逆洗水の再利用、下水処理場と浄水の取水口の位置関係など

そこで本研究では、降雨等の環境条件により引き起こされる環境水中の *Cryptosporidium* の濃度変化を定量的に評価し、短期間の非常に高いリスクが年間感染リスクにどのような影響を与えるのかを調査する。

B. 実験方法

B-1. 新しい *Cryptosporidium* 検出手法の開発

Cryptosporidium は多くの種を持ち (Xiao et al., 2004)、また一般に健常なヒトに感染するとされている *Cryptosporidium parvum* および *Cryptosporidium hominis* についても、その遺伝子型により感染力が大きく異なることが報告されている (Messner et al., 2001)。したがって、*Cryptosporidium* の検出にあたっては、定量だけでなくその感染力や遺伝子型に関する情報を同時に得ることが望まれている。

環境水中の *Cryptosporidium* を定量する手法としては、顕微鏡観察 (USEPA, 2001) や、フローサイトメトリーを用いた手法 (Vesey et al., 1993)、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法 (Higgins et al., 2001, Fontaine and Guillot, 2002) 等が開発・実用化されている。また遺伝子型を判定する手法としては、PCR-RFLP 法や DNA の塩基配列を解析する手法が開発されている。しかし、定量と遺伝子型の判定を 1 つのサンプルから行う手法は、顕微鏡観察で検出されたオーシストを PCR にかける手法が提案されている (杉本ら, 2004) が、測定に多大な時間と労力を要するため適用には困難を伴う。そこで本研究では、Quenching Probe/Primer PCR 法 (以下 QP-PCR 法) を用いて、オーシストの定量と遺伝子型の判定を行う手法の開発を行う。

1) QP-PCR 法の原理

QP-PCR 法は、蛍光色素 BODIPY の近傍にグアニンがくると蛍光が消える現象を利用する手法である (Torimura et al., 2001, Kurata et al., 2001)。末端のシトシンを BODIPY で修飾したプライマーあるいはプローブを用いて PCR を行い、蛍光量が一定割合まで減少するサイクル数から対象の DNA の存在量を測定

する手法である。プライマーを修飾する手法を Quenching Primer PCR 法 (QPrimer 法)、プローブを修飾する手法を Quenching Probe PCR 法 (QProbe 法) と呼ぶ。

この手法は TaqMan プローブを用いた手法と違い増幅する配列の長さ(現在のところ)制限がないので、得られた PCR 産物を RFLP やシーケンシングといった遺伝子解析に適用できるという利点を持つ。また QPrimer 法では、既存のプライマーをそのまま使用できるという利点もある。

2) QPrimer 法の定量性評価

QP-PCR の適用可能性を評価するために、定量性の高さ、検出下限についての評価を行った。

プライマーは、Xiao *et al.* (1999a,b) により開発された Nested-PCR 用のプライマーセットを用いた(表 1)。Forward と Reverse のプライマーの組み合わせ(4通り)を全て試し、アガロースゲル電気泳動により検出下限を評価した。

QProbe 法の評価に先立ち、プローブの設計を行った。まずプライマーで増幅される部分の配列 126 種をデータベース (DDBJ) より検索し、その全ての配列で共通な部分を抽出した。次にその中で Tm 値、二次構造のとりにくさ等の条件でプローブとする配列を決定した(表 1)。

B-2. 環境水中の微生物濃度等の変動の定量的評価

これまでのように月に一回もしくは週に一回の試料採取では捉えられなかった日内の変動について、経時的に(8時間から24時間)連続して100L程度の水の濁質を採取することによって水質変動を調べることが目的とする。利根川における水質変動を調べるため、その濁質を大量にかつ経時的に補足する。また、病原微生物濃度が大きく変動すると予想される降雨時のデータ収集を試みる。同時に、基礎的な

表 1 プライマーとプローブの塩基配列

	Sequence	Reference
<u>Inner Forward</u> (QPrimer)	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	
Inner Reverse	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	Xiao <i>et al.</i> , 1999a,b
Outer Forward	TTCTAGAGCTAATACATGCG	
<u>Outer Reverse</u>	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA	
QProbe	CGAACCCCTAATTCCCCGTTACCC	

水質データを取得するため、少量の水も採取する。

(独) 水資源機構利根導水総合管理所内に自動試料採取装置を設置し、経時的に水試料および濁質の採取を行う。利根大堰によって装置の概要を図 1 に示す。ポンプを用いて送水し、MF 膜モジュール(三菱レイヨン、10cm 円筒、高さ 25cm 程度)で濾過した後、濁質成分を回収し、濾液は排水口より廃棄する。また同時に 1 L 程度の河川水を採取する。水試料は、水冷装置によって冷蔵保存される。装置の運転開始は、携帯電話を用いての遠隔操作により行い、サンプル流の操作は電磁弁を用いて制御する。サンプリング終了後は、ポンプの電源を切り、後日サンプル(濁質成分)を回収する。なお、ポンプの電源は常時は切っているが、採水時には携帯電話を用いて遠隔操作で電源を入れることが可能である。

測定項目を表 2 に示す。

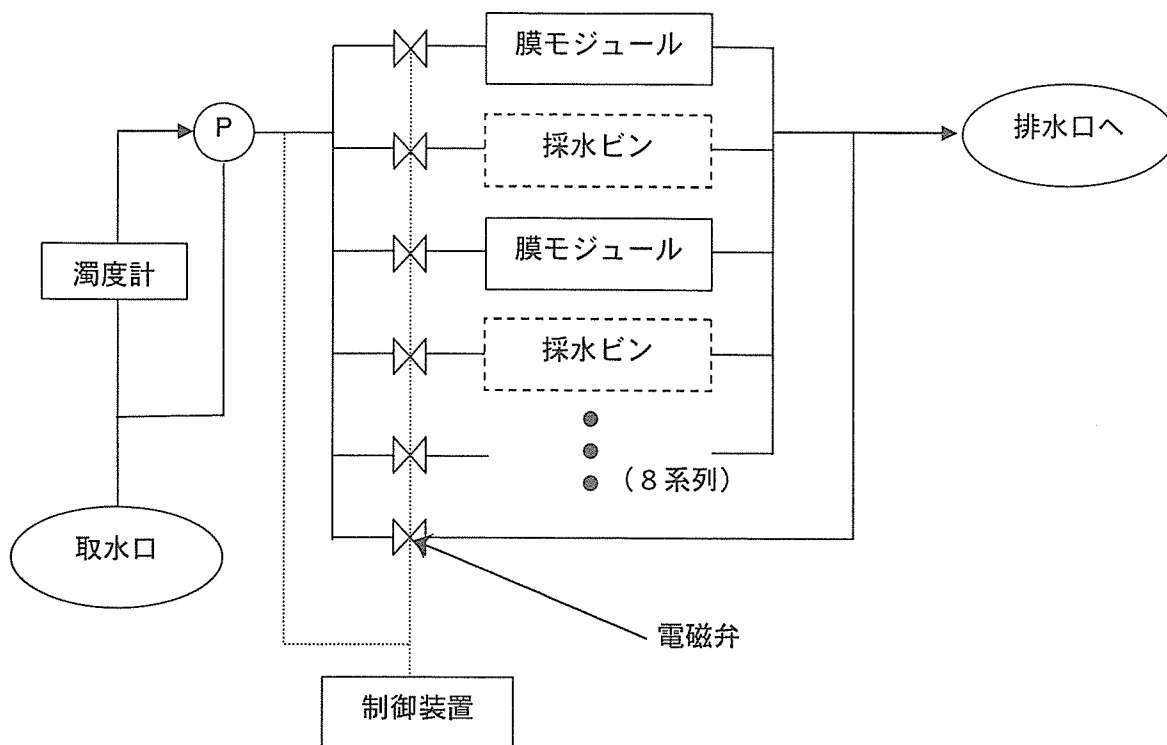


図1 サンプルング装置の概略図

表2 測定項目

物理的指標	化学的指標	微生物指標
濁度	NH ₄ -N	TC
降水量	NO ₃ -N	FC
	NO ₂ -N	E. coli
	PO ₄ -P	AS
	E260	
	TOC	

C. 結果

C-1. QPrimer 法の定量性評価結果

図2に検量線の一例を示す。定量下限は2[copies/sample]であった。しかし、テンプレートを含まないサンプル（NTC）でも、38サイクルくらいで消光が見られた。QPrimer法では、対象とする産物以外にも、例えばプライマーダイマーが生成されると蛍光が減少してしまうため、後半のサイクルにおいてこのような現象が見られたと考えられる。プライマーによってはNTCの消光を遅らせることができるようであるが、今回のプライマーでは、環境サンプルのようにテンプレートが非常に少ない場合は、QPrimer法の適用は困難であるといえる。

C-2. QProbe 法の定量性評価結果

図3に増幅曲線（一例）を示す。10¹[copies/tube]オーダーまで消光が見られた。また、添加したコピー数が少なくなるにつれて、消光率の最大値が小さくなる傾向が見られた。これは、QPrimer法と同様

に QProbe 法でもプライマーダイマーが生成されたため、後半のサイクルにおいて産物の生成が十分には行われなかったことが原因として考えられる。

そこで、非特異産物の生成を抑制するため、(1) アニール温度の上昇 (2) ポリメラーゼの変更、の2点に関して条件検討を行った。その結果を以下にまとめる。

- (1) アニール温度の上昇により、ある程度非特異産物の生成を抑制することができたが、63℃においてもまだ産物量に差が見られた。
- (2) ポリメラーゼを BD Titanium Taq Polymerase から KOD Plus DNA Polymerase に変更することで、プレート量による最大消光率 (=最終産物量) の差が見られなくなった (図4)。また、この場合においても十分な定量性を確保していることを確認した (図5)。

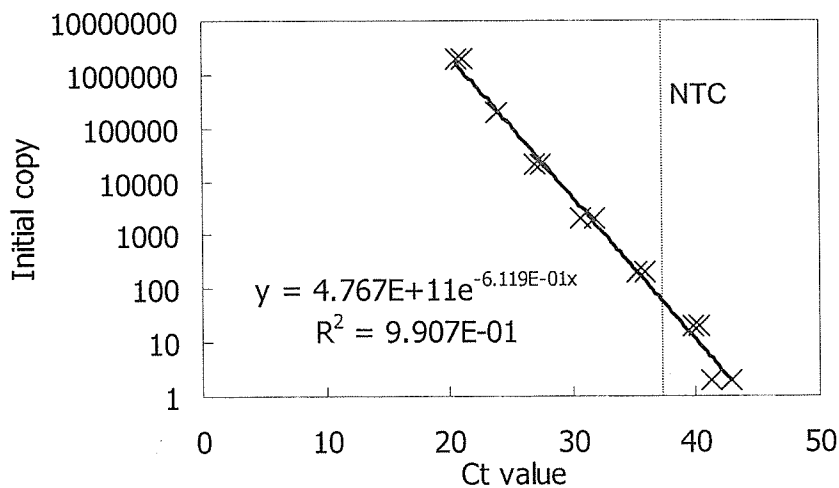


図2 QPrimer PCR の検量線

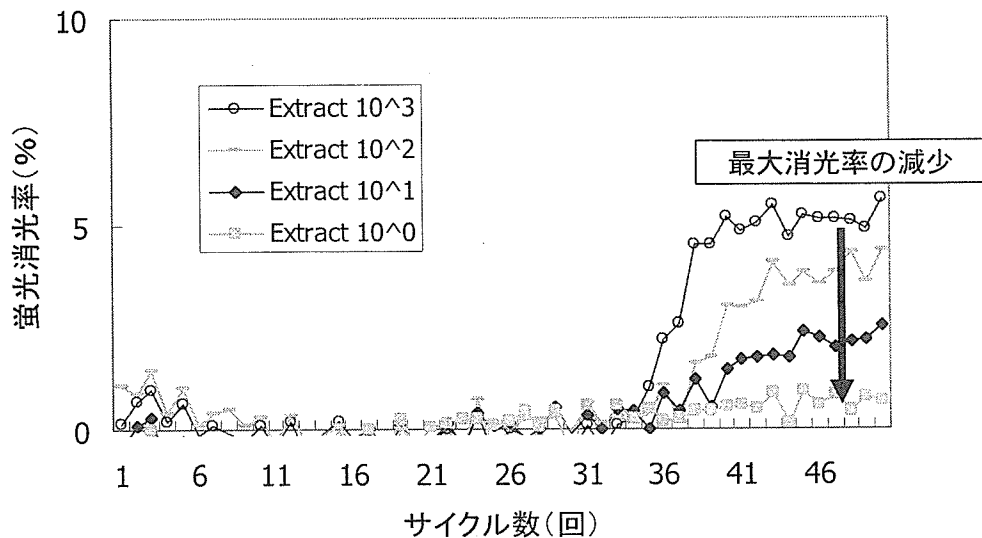


図3 QProbe 法の増幅曲線 (BD Titanium Taq)

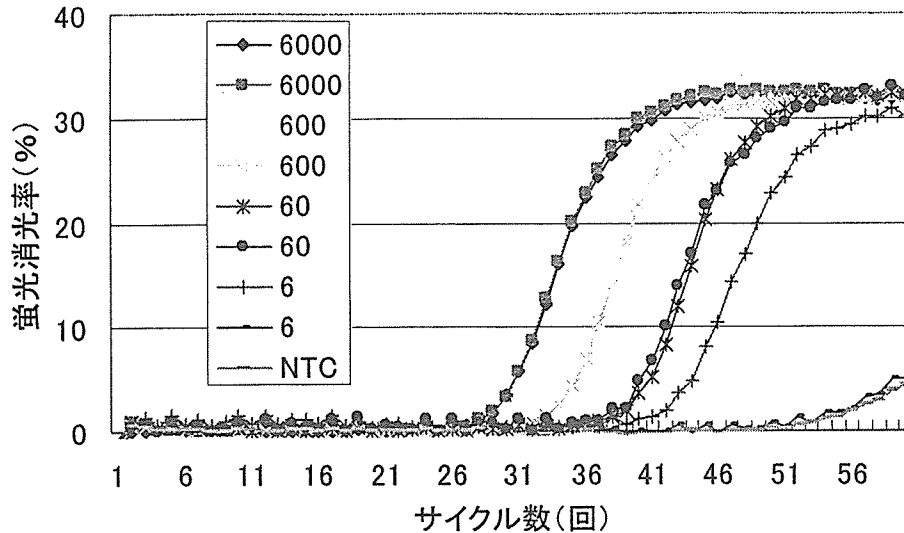


図4 QProbe法の増幅曲線 (KOD Plus)

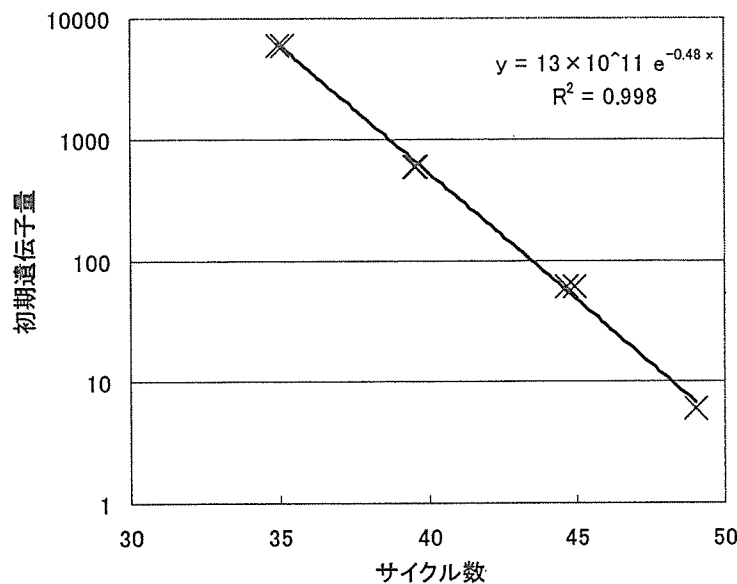


図5 QProbe法の検量線 (KOD Plus)

C-3. クリプトスポリジウム測定法の確立

Q-Primer法では、非特異産物の生成によりNTCでも消光が見られたため、本手法への適用は不可能であることがわかった。QProbe法では、非特異産物の生成により最終段階での消光率が低下する現象が見られたが、ポリメラーゼを変更することで解決することができた。以上より、KODポリメラーゼを用いたQProbe法により、低コピーからの増幅および定量が可能であることが示された。

C-4. 環境水中の微生物濃度等の変動の定量的評価

11月に利根大堰にサンプリング装置を設置し、11月27日に試運転を行い、12月26日と1月14日にそれぞれサンプルを採取した。これまでに、指標の測定は終了し、*Cryptosporidium* および *Giardia* については磁気ビーズ法による精製後の状態で冷凍保存してある。

図6および表4にこれまでの各種指標の測定結果を示す。化学指標はTOCで多少ばらつきが見られた程度で、ほとんど時間変動はなかった。微生物指標も、1月のサンプルを除いてほとんど変動は見られなかった。

11月に利根大堰にサンプリング装置を設置し、3回(11/27, 12/26, 1/14,) 試料を採取した。11/27のサンプルは、化学指標の測定は行ってない。また、12/26には装置の不調でうまく濾過試料を採取できなかったのも指標の測定のみ行った。他のサンプルについては、指標の測定は終了し、*Cryptosporidium* および *Giardia* については磁気ビーズ法による精製後の状態で冷凍保存してある。化学指標はTOCで多少ばらつきが見られた程度で、ほとんど時間変動はなかった。微生物指標では、1月のサンプルで経時的な増加が見られた。

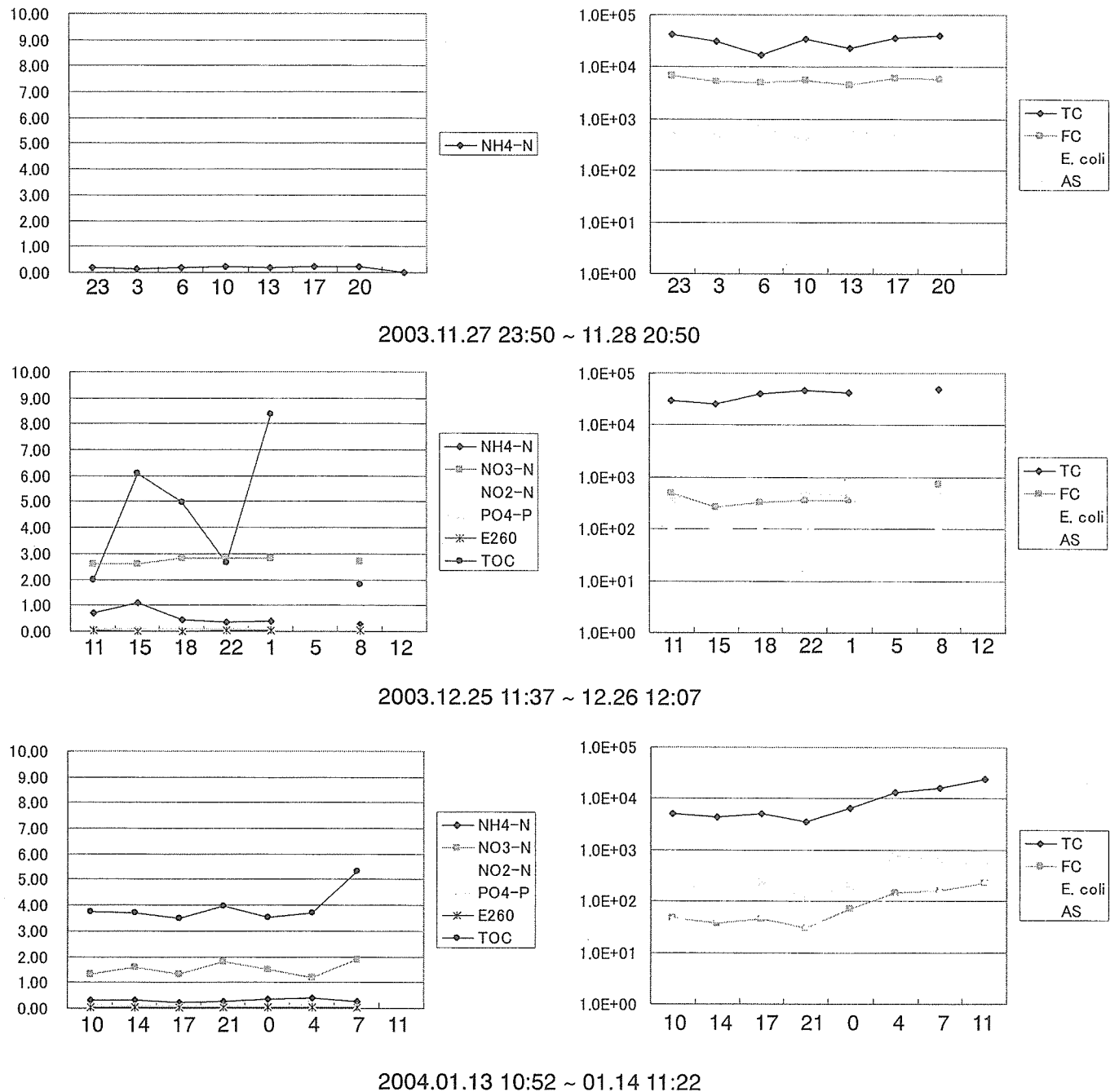


図6 化学・生物指標の測定結果

<参考文献>

- 1) Curriero F.C., Patz J.A., Rose J.B. and Lele S. (2001). The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Am. J. Public Health*, **91**(8), 1194-1199.
- 2) Hashimoto A. and Hirata T. (1999). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Sagami river, Japan.. *Proc. of Asian Waterqual '99: 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference*, 956-961
- 3) Hashimoto A, Kunikane S and Hirata T (2002). Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Water Research* **36**(3):519-526
- 4) Higgins JA, Fayer R, Trout JM, Xiao LH, Lal AA, Kerby S and Jenkins MC (2001). Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *Journal Of Microbiological Methods* **47**(3):323-337
- 5) Kurata S, Kanagawa T, Yamada K, Torimura M, Yokomaku T, Kamagata Y and Kurane R (2001). Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY(R) FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Research* **29**(6):e34
- 6) Masago Y, Katayama H, Hashimoto A, Hirata T and Ohgaki S (2002). Assessment of risk of infection due to *Cryptosporidium parvum* in drinking water. *Water Science and Technology* **46**(11-12):319-324
- 7) Messner MJ, Chappell CL and Okhuysen PC (2001). Risk assessment for *Cryptosporidium*: A hierarchical Bayesian analysis of human dose response data. *Water Research* **35**(16):3934-3940
- 8) Rose J.B., Daeschner S., Easterling D.R., Curriero F.C., Lele S. and Patz J.A. (2000). Climate and waterborne disease outbreaks. *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, **92**(9), 77-87.
- 9) Torimura M, Kurata S, Yamada K, Yokomaku T, Kamagata Y, Kanagawa T and Kurane R (2001). Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Analytical Sciences* **17**(1):155-160
- 10) USEPA (2001). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/IFA. EPA-821-R-01-025
- 11) Vesey G, Slade JS, Byrne M, Shepherd K, Dennis PJ and Fricker CR (1993). Routine Monitoring Of *Cryptosporidium* Oocysts In Water Using Flow-cytometry. *Journal of Applied Bacteriology* **75**(1):87-90
- 12) Xiao LH, Escalante L, Yang CF, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R and Lal AA (1999a). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(4):1578-1583
- 13) Xiao LH, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R and Lal AA (1999b). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied And Environmental Microbiology* **65**(8):3386-3391
- 14) Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev.* **17**(1):72-97
- 15) 杉本 ひとみ, 橋本 温, 森田 重光, 平田 強 (2004). 下水から単離した *Cryptosporidium* オーストの遺伝子型の解析. 第 3 8 回日本水環境学会年会講演集 p. 106.

D. 研究発表

D-1. 論文発表

- 1) Masago Y., Katayama H., Hashimoto A., Hirata T. and S. Ohgaki : Assessment of risk of infection due to *Cryptosporidium parvum* in drinking water, *Water Science and Technology*, **46**(11-12), 319-324(2002).

D-2. 学会発表

- 1) Kim H.-S., Akiba M., and Kunikane S.: The effect of turbidity and coagulation dose on the removal *Cryptosporidium* oocysts in drinking water treatment, IWA-Asia Pacific Regional Conference. Bangkok. October 2003; 2Q4C10.

G. 知的財産権出願・登録状況

なし

分担研究報告書 6

下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染リスクの評価

分担研究者 大村達夫

研究協力者 渡部 徹

下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染リスクの評価

分担研究者： 大村 達夫（東北大学大学院工学研究科土木工学専攻）

協力研究者： 渡部 徹（東北大学大学院工学研究科土木工学専攻）

研究要旨

近年、下水処理水再利用は多くの地域で導入されており、水道水源としての再利用も検討されつつある。しかし、下水処理水再利用によるクリプトスポリジウムや消毒副生成物による健康被害の発生が懸念されるため、それら健康被害のリスクを総合的に評価し、システムの最適化を行うことが必要である。本研究では、下水処理水再利用を取り入れた水利用モデルを構築し、下水処理水再利用に伴い発生するクリプトスポリジウム感染リスクおよび消毒副生成物による発ガンリスクを評価した。また、DALY（障害調整生存年）という健康指標を用いて2つのリスクの総合化を行った。河川水中のオーシスト濃度を大腸菌群数の100万分の1あるいは500万分の1と仮定した場合、クリプトスポリジウム感染によるDALYはそれぞれ0.08～0.2年程度、0.001年程度であり、発ガンによるDALY（9年程度）に比べて明らかに小さい値であった。

A. 研究目的

近年、下水処理水再利用は多くの地域で導入されており、水道水源としての再利用も検討されつつある¹⁾。しかし、下水処理水再利用によるクリプトスポリジウムや消毒副生成物による健康被害の発生が懸念されるため、それら健康被害のリスクを総合的に評価し、システムの最適化を行うことが必要である。本研究では、下水処理水再利用を取り入れた水利用モデルを構築し、下水処理水再利用に伴い発生するクリプトスポリジウム感染リスクおよび消毒副生成物による発ガンリスクを評価することを目的とする。また、これら2つの異なる健康リスクを、DALY（障害調整生存年）²⁾という健康指標を用いて2つのリスクの総合化を試みる。

B. 研究方法

B-1. 下水処理水再利用シナリオ

河川水を水道水源として利用する都市の水利用モデルおよび下水処理水再利用シミュレーションの方法は筆者らが開発した手法³⁾を用いた。この方法では、渇水日（流量25m³/s以下）に水道原水である河川からの取水が制限され、再利用シナリオ1では取水制限による不足分の50%が、シナリオ2では100%が下水処理水により補充される。

B-2. 渇水低減効果

渇水の規模を示す指標の一つとして累加不足率（単位：%・day）がある⁴⁾。これは毎日の節水率の累積和である。下水処理水再利用による渇水低減効果は、再利用を行った場合の年間累加不足率の減少分として定義する。

B-3. 感染リスク評価

感染リスク評価は*Cryptosporidium parvum*を対象とした。感染リスク算出における仮定⁵⁾は表1に示す通りである。リスクの算出のための用量-反応モデルは（1）式で表される指数モデル⁶⁾を用いた。ただし、 P ：1回の曝露で感染する確率、 D ：曝露量、 k ：パラメータ（ $k \square \square \square \square$ ）である。

$$P(D) = 1 - \exp\left(-\frac{D}{k}\right) \quad \dots (1)$$

表 1 感染リスク算出における仮定

項目	仮定
オーシスト濃度	河川水中 大腸菌群数の100万分の1 および500万分の1
浄水処理除去率	感染者糞便中 10 ⁹ 個/g (1人200g/日排泄) 凝集・沈殿・砂濾過 99~99.7% 消毒 0%
下水処理除去効率	二次処理まで 96.60% 消毒 0%
水利用者の摂取水量	1日2・

B-4. 発ガンリスク評価

発ガンリスク算出の対象とした消毒副生成物は、クロロホルム、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、ブロモホルムのトリハロメタン (THM) 4物質である。シミュレーションでは、河川水由来の THM は対数正規分布に従うと仮定し、阿武隈川の THM 生成能測定データ (総 THM 生成量の平均値 107 μ g/L, 最大値 410 μ g/L, 最小値 23 μ g/L, n=12) を元にして算出した。また河川水については浄水過程で30%の THM 前駆物質が除去されることとした⁷⁾。下水処理水由来の THM は THM 生成能測定実験および揮発率測定実験の結果 (表 2) を使用した。ここで、揮発率測定実験は揮発性物質である THM の貯水池での揮発を想定している。THM 生成能測定実験では下水二次処理水に段階的に塩素を注入し、遊離残留塩素濃度が 1mg/L のときの THM 濃度を GC/MS で測定した。シミュレーションでは1日ごとに水道水中 THM 濃度を算出し、年間総曝露量から U.S.EPA が提案する Slope Factor⁸⁾を用いて年間発ガンリスクを求めた。ただし、クロロホルムの場合は Slope Factor が提案されていない。したがって、参照用量および LOAEL⁸⁾に基づいて許容濃度を超える時の発ガン確率が 0.01 であるとして発ガンリスクを求めた。

表 2 THM 生成能および揮発率測定実験の結果

	Chloroform	BDCM	DBCM	Bromoform	TTHM
THM 生成能 [μ g/L]	166.8	129.2	46.7	4.5	347.2
揮発率 [%]	58.2	71.4	67.5	66.4	65.9

B-5. DALY による評価

感染リスクと発ガンリスクを同一の尺度で比較するための指標として、本研究では DALY (障害調整生存年) を用いることとした。DALY は損失生存年数 (YLL) と障害生存年数 (YLD) の合計値である (図 1)。YLL は早期死亡による損失余命を示したもので、病気に影響を受けない場合の期待余命と特定の病気での死亡による寿命の損失年数から推定される。YLD は、障害の発生期間に日常生活への障害負担を定量化した係数 (健康を 1, 死を 0) を掛けたものであり、非致命的健康影響を示す。

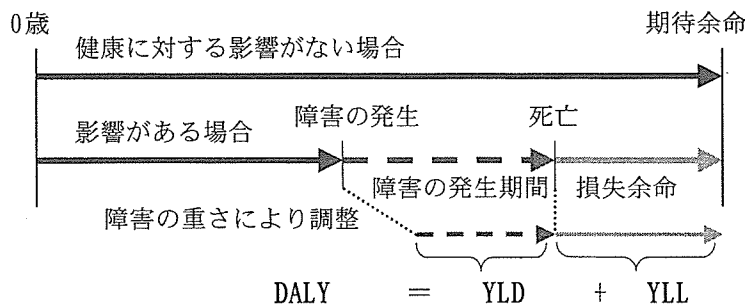


図 1 DALY の概念図

C. 研究結果および考察

C-1. リスク評価

図2, 3はそれぞれ河川水中のオーシスト濃度を大腸菌群数の100万分の1, 500万分の1と仮定し, 下水処理水を再利用したときの感染リスクと渇水低減効果の関係をプロットしたものである。渇水低減効果が大きいほど再利用水量が多かった年と見ることができるが, オーシスト濃度が大腸菌群数の500万分の1の場合は再利用水量の増加による感染リスクの増加は見られず, 再利用なしの場合とほぼ同じ範囲に分布している。一方, オーシスト濃度が大腸菌群数の100万分の1の場合は, 渇水低減効果が600%・dayを超えると感染リスクが増加することがわかる。

発ガンリスクの算出結果はシナリオ1, 2ともに再利用なしの場合と同じ範囲(4.5×10^{-6} 程度)にあり, 下水処理水再利用の影響は見られなかった。また, 消毒の強化やTHM前駆物質の変動を想定して下水処理過程の消毒で生成するTHM濃度を2倍にして計算してみたが, この場合も影響はほとんど見られなかった。これは下水処理水のTHM生成能が河川水と同程度, あるいはそれ以下のレベルにあり, 水道水のTHM濃度が河川水のTHM生成能に依存しているためと考えられる。

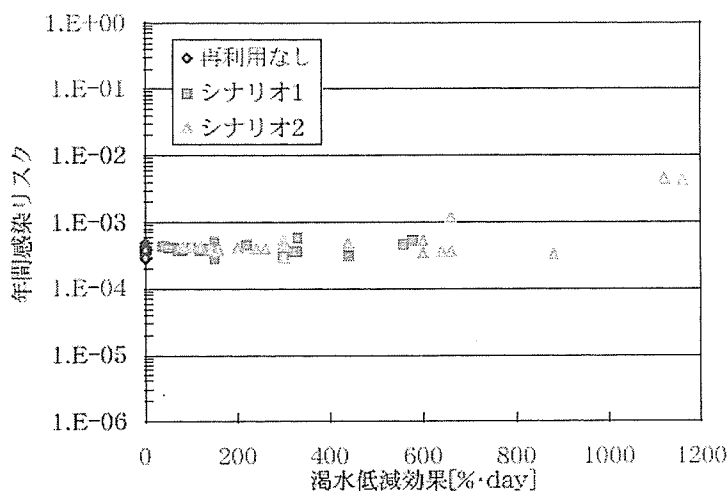


図2 感染リスクと渇水低減効果の関係
(河川水中オーシスト濃度を大腸菌群数の100万分の1とした場合)

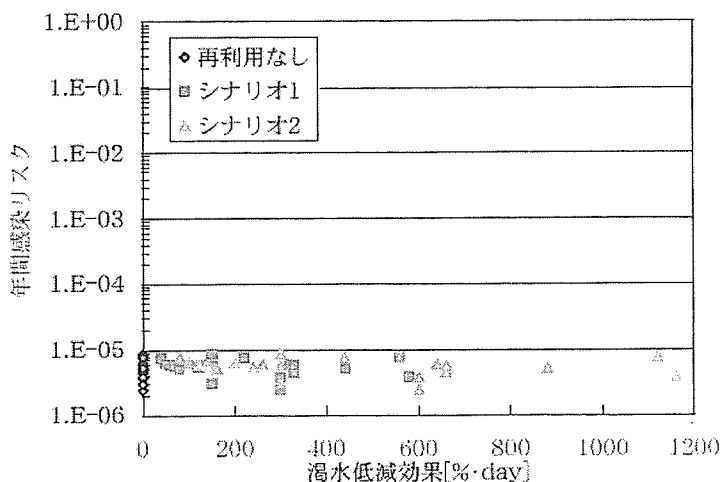


図3 感染リスクと渇水低減効果の関係
(河川水中オーシスト濃度を大腸菌群数の500万分の1とした場合)

C-2. DALY による下水処理水再利用の評価

図 4 はオーシスト濃度が大腸菌群数の 100 万分の 1 の場合の DALY である。ここでは、シナリオ 1, 2 のほかに下水処理水による補充率が 20, 40, 60, 80% の場合についても計算を行った。図には各補充率で得られる DALY の平均値を示した。この図 4 の場合、感染に起因する DALY は 0.08~0.2 程度であり、補充率が増えるに従い DALY は増加している。しかしながら、発ガンに起因する DALY はその 100 倍ほどであり、合計の DALY には補充率の大小による影響はほとんど見られない。

図 5 はオーシスト濃度が大腸菌群数の 500 万分の 1 の場合である。この場合、感染、発ガンの各リスクにおいて補充率の増加による影響がほとんど見られなかったことから、DALY の合計値も再利用なし（補充率 0%）とほぼ同等である。つまり、補充率 0% のときを現状の DALY であると考えた場合、下水処理水再利用の導入による健康被害の増大は起こらない。また、DALY 合計値のうち感染に起因する DALY は 0.001 年程度、発ガンに起因する DALY は 9 年程度であったため、発ガンによる健康被害の方が遙かに社会的優先度が高い懸案事項であると言える。

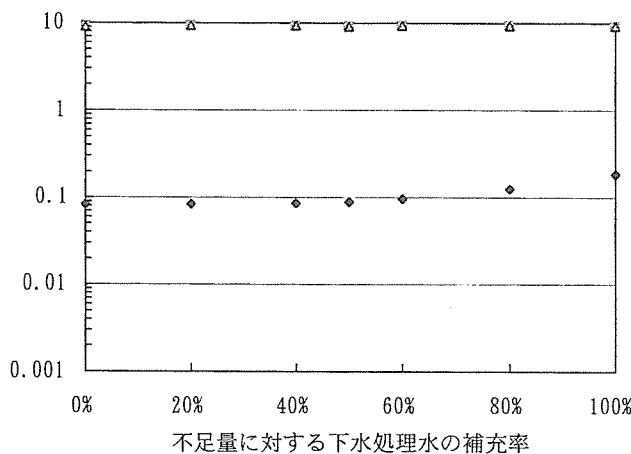


図 4 下水処理水補充率と DALY の関係
(河川水中オーシスト濃度を大腸菌群数の 100 万分の 1 とした場合)

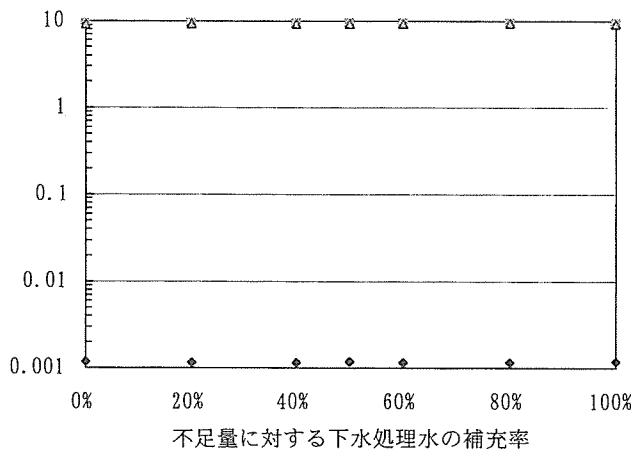


図 5 下水処理水補充率と DALY の関係
(河川水中オーシスト濃度を大腸菌群数の 500 万分の 1 とした場合)

E. 結論