

表 1-1 鳥類における *Cryptosporidium* の保有状況

目	科	種	検出検体数	
ガンカモ	ガンカモ	アヒル	0/1	
		カルガモ	0/12	
		キンクロハジロ	0/3	
		コガモ	0/4	
		コブハクチョウ	0/2	
		スズガモ	0/4	
		ホシハジロ	0/3	
キジ	キジ	コジュケイ	0/1	
キツツキ	キツツキ	コゲラ	0/1	
コウノトリ	サギ	アオサギ	0/1	
		アマサギ	0/1	
		ゴイサギ	0/4	
		ササゴイ	0/1	
スズメ	アトリ	ウソ	0/1	
		カワラヒワ	0/1	
	カラス	オナガ	0/3	
		ハシブトガラス	0/2	
		ハシボソガラス	0/2	
		シジュウカラ	シジュウカラ	0/3
	セキレイ	セグロセキレイ	0/1	
		ハクセキレイ	0/1	
	ツバメ	イワツバメ	0/2	
		ツバメ	0/13	
	ハタオリドリ	スズメ	0/22 (1 検体解析中)	
	ヒタキ	エゾムシクイ	0/1	
		センダイムシクイ	0/1	
		キビタキ	0/3	
		ツグミ	0/4	
		シロハラ	0/1	
		トラツグミ	0/2	
		ヒバリ	ヒバリ	0/1
		ヒヨドリ	ヒヨドリ	0/16 (1 検体解析中)
	ムクドリ	ムクドリ	0/7	
メジロ	メジロ	0/4		

表 1-2 鳥類における *Cryptosporidium* の保有状況

目	科	種	検出検体数
チドリ	カモメ	アジサシ	0/1
		ウミネコ	0/2
		ユリカモメ	0/3
	シギ	ヤマシギ	0/1
		セイタカシギ	0/1
	チドリ	ケリ	0/1
		シロチドリ	0/1
		メダイチドリ	0/1
		ミヤコドリ	0/1
		ツル	クイナ
ハト	ハト	アオバト	0/4
		キジバト	1/35(4.0%) (1 検体解析中)
		ドバト	1/42 (2.8%)
フクロウ	フクロウ	アオバズク	0/2
		オオコノハズク	0/1
		フクロウ	0/2
ブッポウソウ	カワセミ	アカショウビン	0/1
		カワセミ	0/1
ペリカン	ウ	カワウ	0/12
ホトトギス	ホトトギス	ツツドリ	0/4
ミズナギドリ	ウミツバメ	クロコシジロウミツバメ	0/1
	ミズナギドリ	オオミズナギドリ	0/4
		ハシボソミズナギドリ	0/4
ワシタカ	ハヤブサ	チョウゲンボウ	0/2
	ワシタカ	オオタカ	0/2
		サシバ	0/1
		ツミ	0/4
		トビ	0/1

表2 輸入げっ歯類における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有状況

種名	調査頭数	検出頭数 (%)	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
アメリカアカリス	19	11 (57.9%)	13 (68.4%)
コロンビアジリス	10	6 (60%)	9 (90%)
デグー	18	4 (22.2%)	18 (100%)
リチャードソンジリス	10	0 (0%)	5 (50%)
シマリス	15	11 (73.3%)	0 (0%)
ピグミージェルボア	10	0 (0%)	0 (0%)
バナナリス	20	10 (50%)	0 (0%)
オオミユビトビネズミ	16	0 (0%)	3 (18.8%)
ヒメミユビトビネズミ	8	0 (0%)	0 (0%)
シナイスナネズミ	4	0 (0%)	0 (0%)
カイロトビマウス	20	5 (25%)	7 (35%)
アフリカチビネズミ	20	0 (0%)	0 (0%)

分担研究報告書 5

単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型解析手法の
実用化と水環境試料への適用

分担研究者 平田 強、金子光美

研究協力者 橋本 温、森田重光

単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型解析手法の実用化と 水環境試料への適用

分担研究者：平田 強（麻布大学環境保健学部 教授）
分担研究者：金子光美（立命館大学工学部 客員教授）
研究協力者：橋本 温（阿南工業高等専門学校 講師）
研究協力者：森田重光（麻布大学環境保健学部 講師）

A はじめに

水道を介した *Cryptosporidium* 症の集団感染が報告され、我が国を含む先進国において問題となっている。このため、下水や水道原水など、汚染源や水環境の *Cryptosporidium* の汚染調査が各地で行なわれているが、これらの調査で用いられている試験方法は、水試料を濃縮し、シヨ糖浮遊法や免疫磁気ビーズ法で選択分離した後、抗 *Cryptosporidium* 抗体を用いた蛍光抗体法で染色して顕微鏡下で確認された *Cryptosporidium* の数を計数する方法が主である。このため、*Cryptosporidium* の種やヒトへの感染性の把握ができない。種やヒトへの感染性を正確に判断することができる試験方法を構築し、導入することが必要である。

近年、分子生物学的手法の導入により、*Cryptosporidium* の遺伝子型を同定して種やヒトへの感染性を明らかにする研究が進んでいる。これまでに報告されている *Cryptosporidium* の種には *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. wrairi* などがあり、ヒトへの感染性があるとされている *C. parvum* には宿主域の異なる少なくとも2つの genotype が存在する。1つは宿主をヒトのみに限定している *C. parvum* genotype 1 であり、2つ目はヒトと動物の両方を宿主とする人獣共通感染症起因株の *C. parvum* genotype 2 である。また *C. meleagridis* に関してもヒトへの感染が報告されている。これらの種および genotype は 18S-rRNA をコードとする DNA 領域にそれぞれ特異的な塩基配列を持つ (Pieniazek N.J. 1999)。この特徴を利用して *Cryptosporidium* の種や遺伝子型の分布調査がいくつか行なわれているが、いずれも水試料濃縮物から直接抽出した DNA を試料として解析している。このため、水試料中の *Cryptosporidium* のうち、優占している遺伝子型のみが検出され、少数しか存在していない遺伝子型は検出されない可能性が高く、種や遺伝子型の出現分布を把握するには必ずしも適切ではない。そこで本研究では、環境試料中の *Cryptosporidium* の種や genotype を調べることを目的に、下水及び相模川河川水中に存在する *Cryptosporidium* のオーシストを1個ずつ単離して、個々のオーシストについて 18s-rRNA 領域を標的とした Semi-nested PCR 法を行い、増幅された遺伝子の解析を行った。

B 方法

B-1 調査試料の採水

1) 下水

東京都内の大規模な下水処理場（処理水量 63 万 m³/日）の下水を対象とした。本処理場の集水域は都市部の人口集中地（中央区、千代田区、港区および新宿区）であり、平日と休日間の人口

変化が大きく、流入水量、水質に大きな変動がある。その変動の影響を少なくするため、採水はすべて休日の翌々日、14～15時の水量の多い時間帯に行い、採水量4Lを冷蔵して麻布大学に送付した。

2) 河川水

神奈川県的主要な水源である相模川を対象とした。採水は神奈川県寒川町宮山付近で行い、約200Lを採水した。約25 km上流にある片原橋付近（支流の小鮎川）では主要な汚染源であると考えられている養豚場の処理排水が放流されている。またこの地点の500m下流には水道原水の取水地点がある。採水地点の地図を図1に示す。

B-2 試料の精製

1) 試料の濃縮

①下水

採取した下水は、遠沈管（225mL）に分取し、1500×gで15分間遠心を行い上清をアスピレーターで吸引除去して沈渣を回収した。回収した沈渣を目開き32μmの金属メッシュの上に乗せ、界面活性剤添加0.1M PBS（1%Tween80）を加えながら指でこし、夾雑物を除去して、ろ液を回収した。

②相模川の河川水

採水した河川水を中空糸UFモジュール（DAICEN MEMBRANE SYSTEMS LTD.）を用いてその全量をろ過し、モジュール内の濃縮物を遠沈管（225mL）に回収した。その後、モジュール内を界面活性剤添加0.1M PBS（1%Tween80）で洗浄し、洗液も回収した。

2) ショ糖浮遊法

濃縮した試料を20mLずつ遠沈管（50mL）に分取し、シリンジとシリコンチューブで下層にPercoll ショ糖溶液（比重1.10）を注入し、界面を崩さないように遠心分離機で1500×gで10分間遠心を行った。シリコンコーティングしたピペットで界面より上層を新しい50mL遠沈管に分取し、よく攪拌して界面活性剤添加0.1M PBS（1%Tween80）を加えて40mLとした。その遠沈管（50mL）に酢酸エチルを10mL加えて1500×gで10分間遠心し、酢酸エチル層及び上清を吸引除去して、沈渣を回収した。

3) 免疫磁気ビーズ法

ショ糖浮遊法及び酢酸エチルで処理した試料を10mLずつIMS用チューブに分取し、これにビーズ用bufferと*Cryptosporidium*用ビーズ（Dynabeadsanti-Cryptosporidium Kit, DYNAL製）を加え、ローターで1時間回転させ反応させた後、ビーズを磁石で回収した。その後塩酸で回収したビーズからオーシストを分離し、最後に水酸化ナトリウムで中和した。

4) 蛍光抗体染色法

免疫磁気ビーズ法で処理した試料に*Cryptosporidium*用蛍光抗体染色液（Easy Stain, BTF Pty Ltd）を添加し、冷蔵庫（4℃）に入れ、2日間以上暗所で染色した。

5) 顕微鏡下でのオーシストの単離

プラスチックシャーレに撥水ペンで直径20mmの円を描き、その中に滅菌超純水を50μl及び10%Triton-X100を約1μlをのせ、その上に蛍光抗体染色した試料を50μl添加した。約10分静置しオーシストを沈降させた後、倒立型蛍光顕微鏡でアップルグリーンの蛍光を発する*Cryptosporidium* オーシスト様粒子を探した。蛍光を確認した後、微分干渉像で内部構造を有するオーシストのみをガラスキャピラリーを用いて単離した。単離したオーシストは、オーシスト

溶解液 18 μ l (組成: 10 \times Taq Buffer 2.5 μ l, 滅菌超純水 15.5 μ l) の入ってる PCR 用マイクロチューブ (200 μ l) にふき出し, -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

B-3 PCR 法

1) 1st PCR

単離したオーシストの入った PCR チューブごと -80 $^{\circ}$ C, 室温の凍結融解処理を 3 回行った後, 10% Triton-X100 を 5 μ l 添加し, サーマルサイクラーで 100 $^{\circ}$ C で 15min 加熱した。加熱後, PCR 反応液 25 μ l (組成: Taq ポリメラーゼ 0.25 μ l, 10 \times Taq buffer 2.5 μ l, dNTPs 4 μ l, 20 μ M プライマー各 2.5 μ l, 滅菌超純水 13.25 μ l) を加え, サーマルサイクラーで, 94 $^{\circ}$ C, 5min の変性処理の後, 94 $^{\circ}$ C, 30sec の変性, 55 $^{\circ}$ C, 30sec のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C, 1min の反応サイクルを 40 回行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C, 7min の伸長を行った。

本研究では, 18S-rRNA をコードする DIAGF-1 (5'-GCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAA-3') および DIAGR (5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') を用いた。本プライマーは 18S-rRNA の 582~1424 塩基間 (C. parvum clone OX1a 18S-rRNA AY204241 を基準とする) の 435bp を増幅する。この間には *Cryptosporidium* 属に特異的で, かつ種ごとの鋳型を含む部位があり, *Cryptosporidium* を種または genotype レベルで識別することが可能である。

2) Nested PCR

1st PCR の増幅産物を Ultra Clean[™] PCR Clean-up[™] Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) で精製し, その中の 1 μ l をテンプレートとした。PCR 反応液 49 μ l (組成: Taq ポリメラーゼ 0.25 μ l, 10 \times Taq buffer 5.0 μ l, dNTPs 4 μ l, プライマー各 2.5 μ l, 滅菌超純水 34.75 μ l) を加え, サーマルサイクラーで 1st PCR と同条件で反応させた。

Nested PCR では Reverse 側のみ 1st PCR のプライマーよりも内側の 18S-rRNA をコードする DIAGR-1 (5'-CCAATCTCTAGTTGGCATAG-3') を用いた。このプライマーペアでは 408 bp の増幅産物が得られる。

3) 電気泳動

Nested PCR で得られた増幅産物をエチジウムブロマイド染色した 2% アガロースゲルで電気泳動し, 紫外線を照射して, 約 400 bp 付近にバンドが観察されたものを陽性とした。

4) シークエンス

十分な増幅産物量が得られた試料についてシークエンスを行った。シークエンスは株式会社島津製作所ジェノミックリサーチ室に依頼した。

B-4 シークエンスデータのホモロジー解析

シークエンスから得られた塩基配列を BLAST (Basic local alignment search tool) を用いて GenBank にすでに登録されている配列と比較し, 相同性の高いものを探索した。比較する多型は 18S rRNA 領域の全 1698 bp 中でも宿主域に関連した多型が存在し, *Cryptosporidium* の種や遺伝子型の識別が可能である 661~676 bp 間とした。その部位の *Cryptosporidium* の各 genotype ごとの配列データのアライメント結果を表 1 に示した。

C 結果および考察

C-1 下水

1) *Cryptosporidium* の濃度

2004 年 2~9 月に月 1 回ずつ, 計 8 回行った調査の結果を表 2 に示す。

採取した全ての試料から *Cryptosporidium* オーシストが検出された。濃度範囲は 0.5~13.3 oocysts/L であり、幾何平均濃度は 2.4 oocysts/L であった。

2) Semi-Nested PCR とシーケンス

単離した 8 回分のオーシスト (全 118 個) について 18S rRNA 領域の 661~676 bp 間を標的とした PCR および Nested PCR を行った。5 回分 (全 63 個) の試料について Nested PCR による増幅産物が得られ、その陽性率は 50.0%~64.7% であった。得られた増幅産物についてシーケンスを行ったところ、5 回分の内 4 回分 (全 47 個) の試料で目的部位の塩基配列が得られた。その割合は 8 月の試料のみ 18.2% と低かったが、他の 3 回分 (全 45 個) の試料では 87.9%~100% と高い割合であった。

3) 遺伝子型の分布

シーケンスに成功した試料について BLAST を用いて Gen Bank に登録されているデータと照合した。*Cryptosporidium* は 4 つのタイプに大別され、その内訳は、ヒトを固有の宿主とする *C. parvum* genotype 1 (AY204234, AY204241, AY204231 etc.), ヒトでのみ感染が報告されている *C. parvum* isolate from human (AY30084), また、ヒトと動物の両方を宿主とする *C. parvum* genotype 2 (AF161859 etc.) と *C. meleagridis* (AF356790 etc.) であり (表 2), すべてヒトへの感染報告のあるものであった。

各種および genotype の出現割合を図 2 に示す。最も多く検出されたのは、我が国の *Cryptosporidium* 患者から最も高感度に分離されている *C. parvum* genotype 1 であり、臨床データと一致した傾向であった。

今回行ったのと同じ手法で 2003 年度にも調査が行われているので (図 3, 杉本, 2004), そのデータと比較すると、2004 年度は 85.1% であったのに対し、2003 年度は 51.4% と比率は異なっているが、2003 年度も 2004 年度もともに *C. parvum* genotype 1 が最も多く検出された。また、*C. parvum* isolate from human, *C. parvum* genotype 2, *C. meleagridis* も両年を通じて検出されているが *C. parvum* genotype 2 は 2003 年度に比べ、検出割合が著しく低かった。また 2004 年度は、2003 年度に検出されている *C. parvum* pig type と *C. parvum* isolate from mouse が検出されなかった。

2003 年度と 2004 年度に検出された種および genotype の個数をあわせたものの出現比率を図 4 に示す。ヒトに感染性のある種 (*C. parvum* genotype 1, *C. parvum* isolate from human, *C. parvum* genotype 2, *C. meleagridis*) が大半を占め (93.4%), その中でも *C. parvum* genotype 1 が 64.5% と最も多く存在していた。また本研究で検出された他の *C. parvum* isolate from human, *C. parvum* genotype 2, *C. meleagridis* も 2003 年度にも検出されていることから (杉本, 2004), 突発的に環境中に排出されているのではなく、年間を通じて存在していると考えられる。

図 5 は 2003 年度と 2004 年度に検出された *Cryptosporidium* の種および genotype ごとに時系列変化で表したものである。*Cryptosporidium* が検出された 11 回分の試料のうち 9 回分の試料から *C. parvum* genotype 1 が検出されている。そのうち 7 回分に関しては、*C. parvum* genotype 1 が最も多く検出されており、年間を通じてのみならず月ごとにみても優占種であると考えられた。次いで多く検出されているのは *C. parvum* genotype 2 であり、11 回分の試料のうち 7 回分から検出されている。*C. parvum* isolate from human, *C. meleagridis* についても頻りに検出されている。下水中に存在する *Cryptosporidium* の大半はヒトへの感染性があるものであった。通常、ヒトが *Cryptosporidium* に感染すると約 2 週間で完治するといわれているが、月ごとにヒ

トへの感染性を有する種および genotype が検出されていることから、ヒトへの感染が頻繁に起こっていることが示唆される。その患者数は今回の調査では、検出された個数が多い時で約 50 万人に 1 人であった。

以上のことから、本研究で用いた方法は、下水中の種およびヒトへの感染性を識別するのに有用であり、また種および genotype の分布を把握することが可能であると考えられる。

C-2 河川水

1) *Cryptosporidium* の濃度

11 月 9 日に採水した試料から *Cryptosporidium* オーシストが検出され、その濃度は 1.6 oocysts/ 10L であった。

2) Semi-Nested PCR とシーケンス

単離した 32 個のオーシストについて PCR および Nested PCR を行ったところ、16 サンプル (50.0%) で増幅が確認された。それら 16 サンプルについて、シーケンスしたところ 5 サンプル (31.3%) がシーケンスに成功した。単離からシーケンスまでの最終的な成功率は 15.6% であり、下水の成功率 40% と比較すると低い結果となっている。これは河川水中のオーシストは、排出されてから採水地点へ流下する間に、日照、水温、その他物理的ストレスの影響によりオーシストに損傷が生じているためであると考えられる。

3) 遺伝子型の分布

シーケンスに成功したサンプルについて、BLAST を用いて Gen Bank に登録されているデータと照合した結果、5 サンプルすべてが *C. parvum* pig genotype 1 (AF108861) であった。

相模川水系における主要な *Cryptosporidium* 汚染源は、養豚排水であると考えられていた。今回の結果を見てみると、解析したすべてのオーシストが、*C. parvum* pig genotype 1 だったことから養豚排水による汚染の可能性が高いと考えられる。しかし過去のデータを見てみると、*C. parvum* genotype 1 が多く検出されたこともある (杉本, 佐藤 2004)。これは、*Cryptosporidium* 汚染源がヒト由来の排水による可能性が高いことを示唆している。以上のことから、相模川水系の *Cryptosporidium* 汚染源は複数あることが強く考えられる。

D まとめ

本研究では下水 (2004 年の 2~9 月の月 1 回ずつ計 8 回) および相模川の河川水 (2004 年の 11 月) の *Cryptosporidium* の遺伝子型調査を行った。その結果、以下のことが明らかになった。

1. 下水から検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型で最も多いのは *C. parvum* genotype 1 であり、85.1% であった。次いで *C. parvum* Isolate from human, *C. meleagridis* がともに 6.4% であり、*C. parvum* genotype 2 が 2.1% であった。
2. 2003 年度の結果と比較すると、ヒトを固有の宿主とする *C. parvum* genotype 1 が最も多く検出されている点で同じ傾向がみられており、下水中の主要な *Cryptosporidium* は *C. parvum* genotype 1 であることが示唆される。
3. *C. meleagridis*, *C. parvum* Isolate from human, *C. parvum* genotype 2 に関しても 2003 年度にも同様に下水中から検出されており、これら種および genotype も下水中に常に存在しているものと考えられる。
4. 河川水から検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型はすべて、*C. parvum* Pig genotype 1 であった。

5. 相模川の *Cryptosporidium* 汚染は養豚排水によるものであると考えられている。2003 年度に行った養豚排水の調査では *C. parvum* pig genotype 1 が最も多く検出されており (杉本, 2004), 今回調査した河川水から検出された *Cryptosporidium* は養豚排水によるものと考えられる。しかし, 同じ河川水を 2003 年度に調査したときは *C. parvum* genotype 1 が最も多く検出されていたことから, 汚染源からの負荷変動が大きく影響しているものと考えられる。今後の更なる調査が望まれる。

E. 参考文献

- ・ 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
- ・ 厚生省 (1998) 水道水におけるトスポリジウム暫定対策指針
- ・ 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
- ・ Yamasita H, Nakajima H, Saino H (2003) 下水中のクリプトスポリジウムによる健康リスク管理, 国土技術政策総合研究所試料, 123, 209, 211~219
- ・ Rebecca A. Guy, Pierre Payment, Ulrich J. Krull, and Paul A. Horgen (2003) Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage, *AEM*, 69, 9, 5178~5185
- ・ 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
- ・ 杉本ひとみ (2004) 下水および河川水から単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子解析, 麻布大学院修士論文
- ・ 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

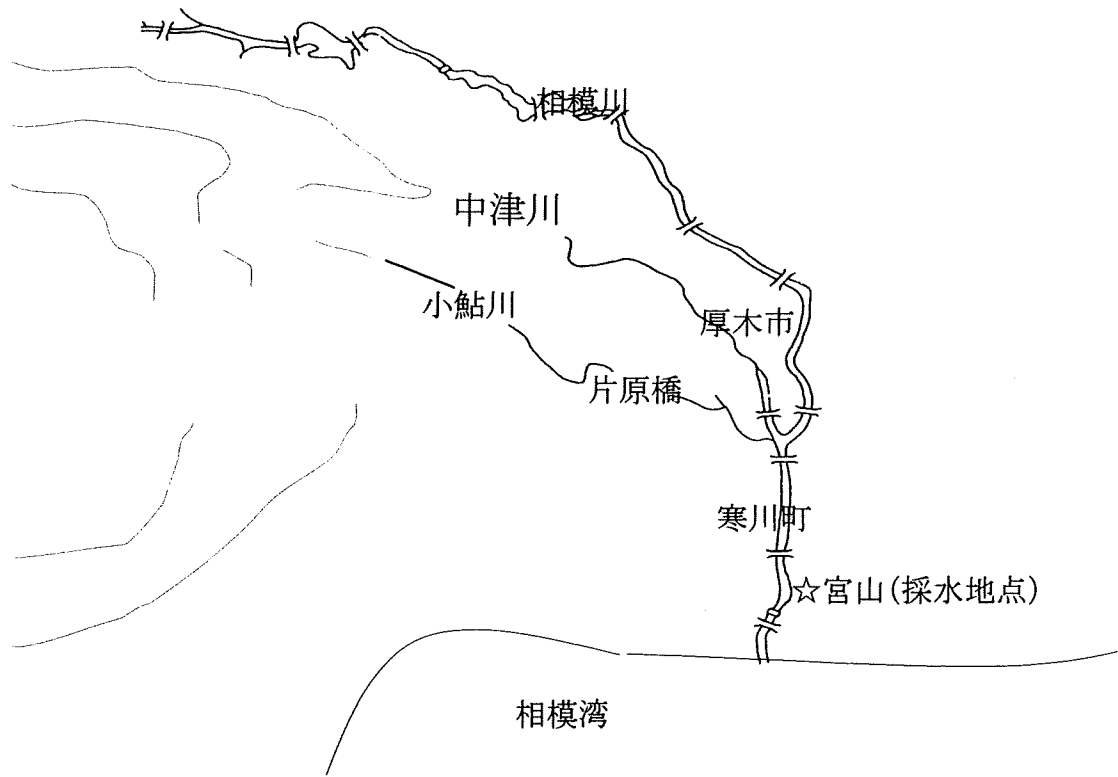


図1 相模川の河川水, 養豚排水の採水地点

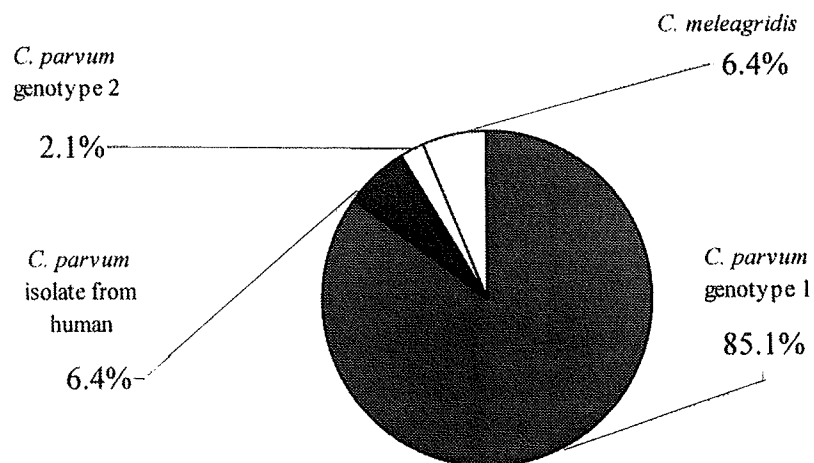


図2 下水から単離した *Cryptosporidium* の遺伝子型の内訳 2004

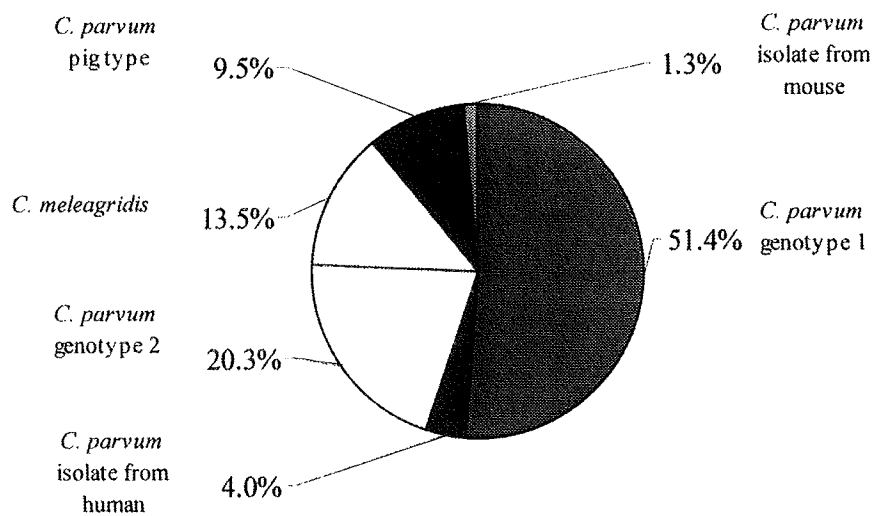


図3 下水から単離した *Cryptosporidium* の遺伝子型の内訳 2003
(杉本, 2004)

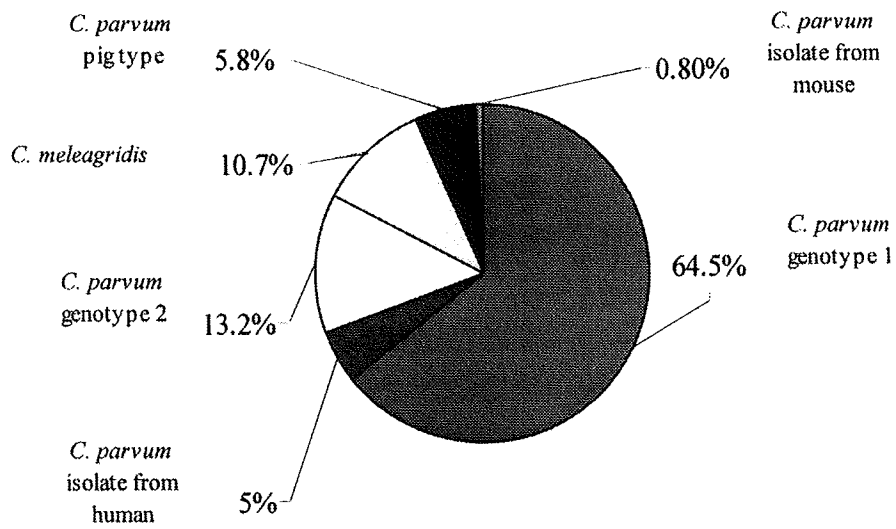


図4 下水から単離した *Cryptosporidium* の遺伝子型の内訳 2003+2004

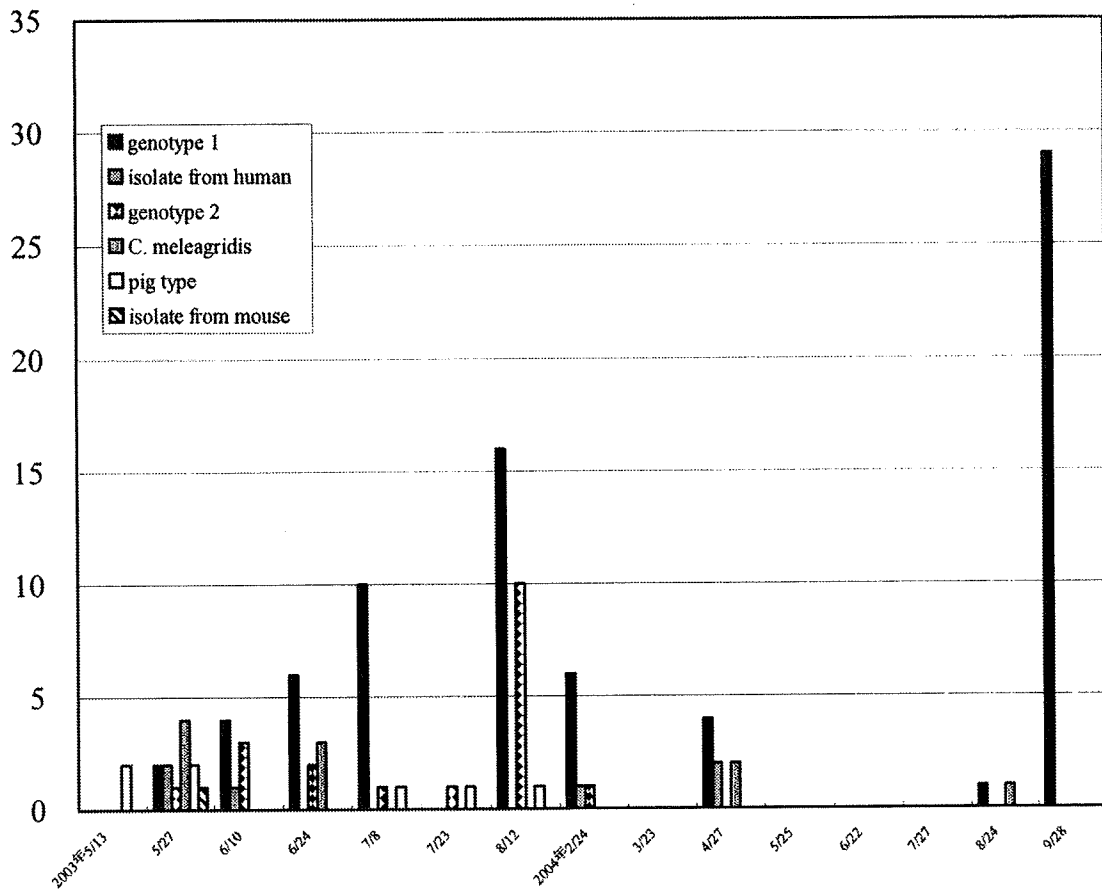


図5 下水試料から検出された *Cryptosporidium* の種および genotype

表 1 検出された *Cryptosporidium* の遺伝子配列

<i>C. parvum</i> genotype 1 (AY204234)	AATTCATATT ACTATTTTT TTTTAGTA
<i>C. parvum</i> genotype 1 (AY204241)	AATTCATATT ACTATTTTT TTTT-AGTA
<i>C. parvum</i> genotype 1 (AY204231)	AATTCATATT ACTATT—T TTTTAGTA
<i>C. parvum</i> Isolated from human (AY030084)	AATTCATATT ACTATATT-A TTATTAGTA
<i>C. parvum</i> genotype 2 (AF161859)	AATTCATATT ACTATAT—A TT-TTAGTA
<i>C. meleagridis</i> (AF356790)	AATTCATATT ACTAAA—T TTATTAGTA
<i>C. parvum</i> Pig genotype 1 (AF108861)	AATTCATATT ACTATAATTT TTATTAGTA

表 2 実験結果

採水日	2/24	3/23	4/27	5/25	6/22	7/27	8/24	9/28	幾何平均濃度			
調査水量 (mL)	4090	4000	3900	4010	4090	3910	3920	3930	(oocysts/L)			
単離したオーシスト数(穀のみの数)	15	3	13	9	2	6(1)	17(1)	53(1)				
オーシスト濃度(oocysts/L)	3.8	0.8	3.3	2.3	0.5	1.5	4.3	13.3	2.4			
Nested PCR の陽性数	8	0	8	0	0	3	11	33	全 63			
Nested PCR の陽性割合	53.3%	-	61.5%	-	-	50.0%	64.7%	62.3%				
シーケンスの陽性数	8	-	8	-	-	0	2	29	全 47			
シーケンスの陽性割合	100%	-	100%	-	-	-	18.2%	87.9%				
シーケンスの陽性数/単離したオーシスト数	8/15	-	8/13	-	-	-	2/17	29/53	小計			
シーケンスの陽性数/単離したオーシスト数 の割合	53.3%	-	61.5%	-	-	-	12.0%	54.7%				
genb	f <i>C. parvum</i> /Species	Gen Bank 登録番号	個数									
ヒト由来	Genotype 1	AY204234									43	
		AY204241	6	-	4	-	-	-	1	29		40
		AY204231, etc										
Isolated from human	AY030084	1	-	2	-	-	-	-	-	3		
ヒト、動物由来	Genotype 2	AF161859, et	1	-		-	-	-	-	-	1	4
	<i>C. meleagridis</i>	AF356790, etc.	-	-	2	-	-	-	1	-	3	

計 47

表 3 解析結果 2003

採水日		GenBank 登録番号	5/13	5/27	6/10	6/24	7/8	7/23	8/12	小計
ヒト由来	genotype 1	AY204234 AY204241 AY204231, etc.		2	4	6	10		16	38
	Isolated from human	AY030084		2	1					3
ヒト, 動物由来	genotype 2	AF161859, etc.		1		2	1	1	10	15
	<i>C. meleagridis</i>	AF356790, etc.		4	3	3				10
動物由来	Pig genot y	AF108861, etc.	2	2	p		1			5
	Pig genot y	AY271721			p			1	1	2
	Isolated from mouse	AF112571		1						1
シーケンスの陽性数/単離したオーシスト数			2/18	17/17	9/22	11/15	20/26	8/12	40/80	計 74

2004. 杉本

分担研究報告書6

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

分担研究者 片山浩之、秋葉道宏

研究協力者 真砂佳史、李 華芳

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
研究協力者： 真砂 佳史 東京大学大学院 工学系研究科
： 李 華芳 国立保健医療科学院 水道工学部

A. 研究目的

大規模なクリプトスポリジウム症集団発生の要因については、主に疫学的な方面からの研究がなされており、大雨による水中濃度の増加がその大きな要因のひとつとなり得ることが指摘されている (Rose *et al.*, 2000, Curriero *et al.*, 2001, Masago *et al.*, 2002)。しかし、水中のクリプトスポリジウム濃度変動を実測に基づいて評価した例は少なく (Kistemann *et al.*, 2002)、更なる知見の蓄積が必要である。

本研究の目的は、以下の2点である。一つは、国内の水道水源中のクリプトスポリジウムの濃度変動を実測により評価することで、降雨等の環境条件が水中のクリプトスポリジウム濃度にどのような変化をもたらすのかを明らかにすることである。もう一つは、検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判定を行うことで、濃度変動をもたらした起源の探索を試みることである。

B. 現地調査の概要

利根川並びにその支流である小山川において、河川水中のクリプトスポリジウムの濃度を測定し、その挙動を調査した。この現地調査の目的は、以下の2点である。

一つは、本研究で開発した、QProbe PCR法とPCR-DGGE法を組み合わせた水中のクリプトスポリジウム測定手法の実用性を検証することである。実際に河川水に対して本手法を適用することで、水中からの検出・定量、並びに試料中に存在したクリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別がどの程度可能であるかを評価することである。

もう一つは、様々な要因で引き起こされるクリプトスポリジウムの濃度変動を実測し、その要因を探ることである。クリプトスポリジウム濃度を含めた河川水質の変動は、一般にその時間周期や発生要因により、大きく次の4つに分類できる。

- 1) 経年変化 : 生活様式の変化、土地利用形態の変化、水循環システムの変化
- 2) 季節変動 : 季節(四季、梅雨など)、農業、畜産の生活サイクル
- 3) 日変動 : 曜日、天候
- 4) 時間変動 : 降雨の強さ、点源汚染源からの突発的な排出

このうち、1)～3)の変動に関しては、従来行われている散発的な試料採取で評価することが可能である。しかし4)の変動を評価するには、数時間おきに複数の試料を採取する必要がある。水道水中のクリプトスポリジウムによる感染リスクを考えるにあたっては、この濃度の時間変動を把握することが重要であるが、通常行われている調査では評価することができない。

本調査では、月1回程度の調査において、3時間程度の時間間隔で8つの試料を連続して採取することにより、時間レベルの短い周期で発生する濃度変動を実測により評価した。現地調査に先立ち、3～3.5時間間隔でクリプトスポリジウム測定用の試料を採取する装置の開発を行った。その装置を用いて、実際に水道水源として利用されている利根川の河川水を試料として採取し、クリプトスポリジウムお

よび各種水質指標の測定を行った。得られた測定結果から、水質の季節変動と、降雨によって引き起こされる数時間レベルの変動を評価した。また、クリプトスポリジウム濃度、およびその変動を指標とする水質項目について調査した。

C. 実験方法

C-1 対象河川、調査地点

調査対象河川として、利根川を選択した。この河川を測定対象とした理由は、首都圏において水道水源として実際に利用されている水であり、水道水摂取による感染リスクを評価するという現地調査の目的に即した地点であるからである。測定試料は、利根川中流部の利根大堰と、利根大堰の上流側にある支流の一つである小山川にて採取した。図1に対象地域の地図を示す。

利根大堰での現地調査にあたり、自動的に試料を連続採取する装置（以下試料採取装置）の開発を行った。開発した装置の概略を以下に示す。図2に、本装置の試料採取部分の模式図を示す。試料採取装置は、独立行政法人水資源機構 利根導水総合管理所の敷地内に設置した。試料採取は、2003年12月から2004年11月までの12ヶ月間に、24時間の試料採取をほぼ月1回ずつ、合計12回行った。

小山川の測定試料は、小山川中流部の高橋（埼玉県深谷市大字矢島）にて採取した。調査期間は、2004年8月から10月までの3ヶ月間であり、合計4回の試料採取を行った。調査は、利根大堰での試料採取と同じ日に行い、利根大堰における8試料のうち、最後の2試料の採取とほぼ同じ時間帯に行っ

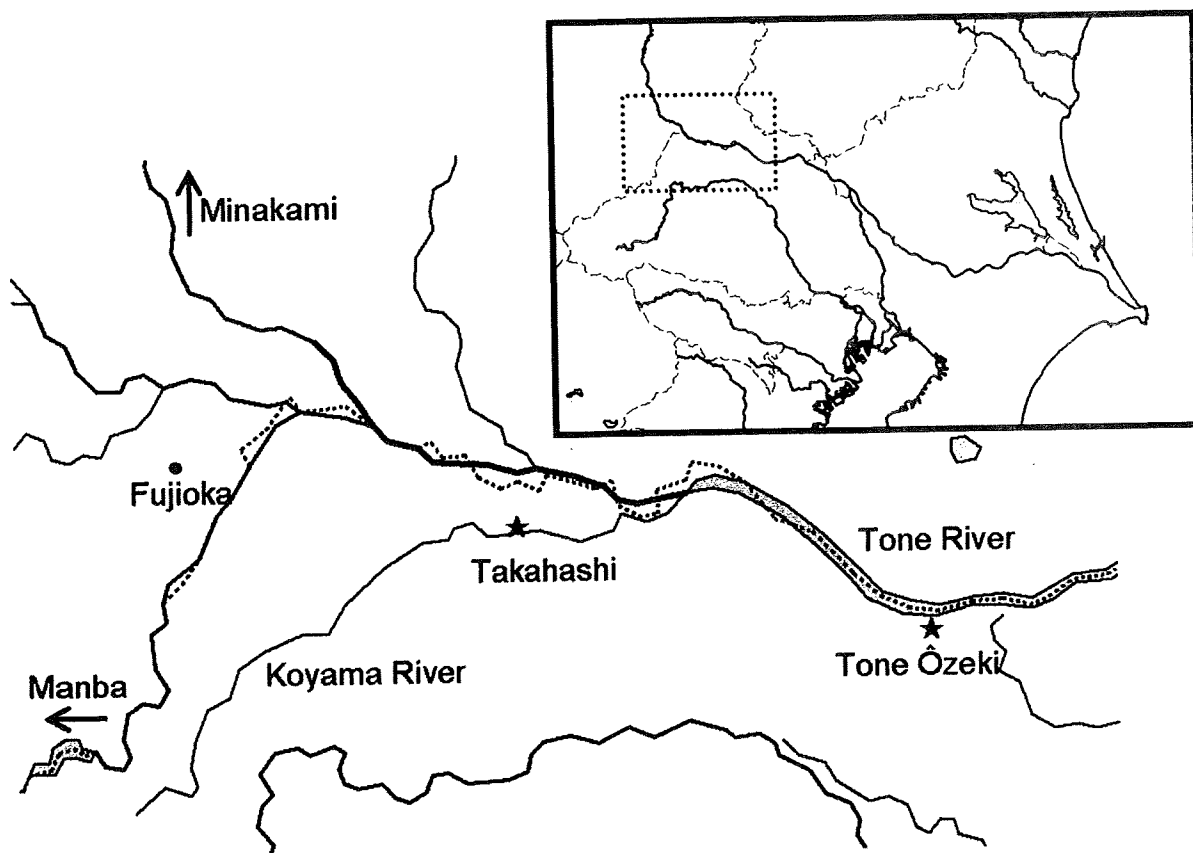


図1 測定地点の地図

（星印は採水地点、丸印は降水量の測定地点を示す。万場および水上は、この図の範囲外に位置しているため、その大まかな方向を矢印で示した）

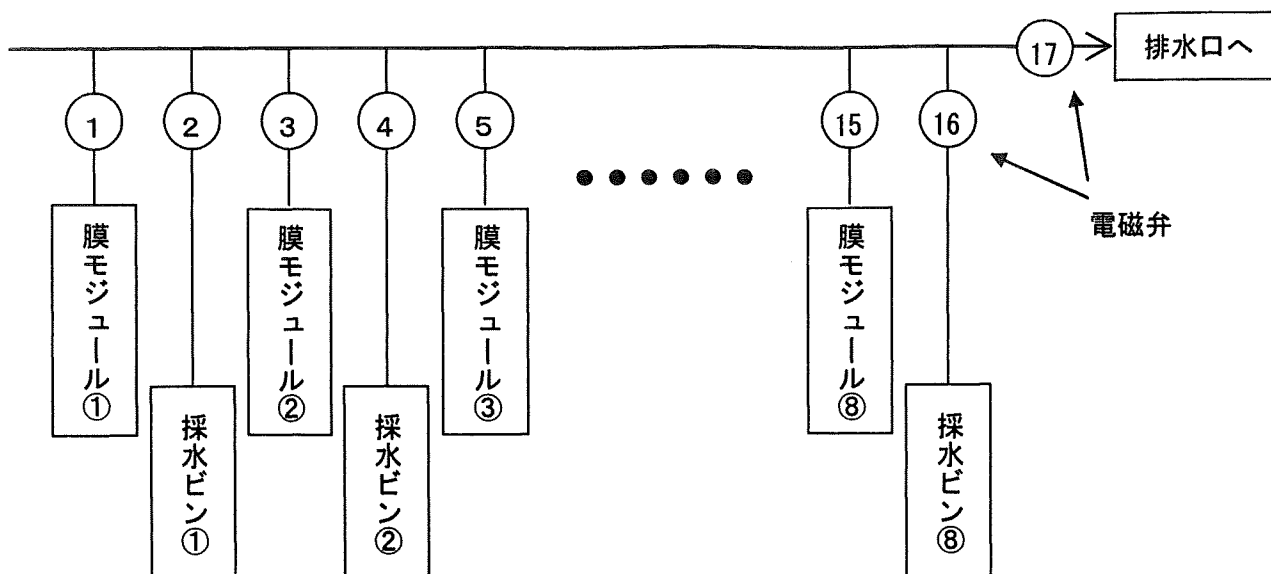


図2 試料採取装置の概略図

た。試料採取間隔は1時間半とし、1回の試料採取で4試料を得た。また、6月および7月には、それぞれ1試料ずつを採取した。

C-2 試料採取装置の概略

クリプトスポリジウム測定用の試料を、ポリエチレン製MF中空糸膜モジュール（孔径 0.1 [μm]、有効濾過面積 4,000 [cm²]、三菱レイヨン）で濾過した。濾過時間は1時間とし、膜モジュール出口に積算流量計を設置することにより、濾過水量を記録した。濾過速度は、U.S. EPA が推奨している2 [L/min] 以下という範囲 (1999a, b)に入っていることを確認した。これにより、原水の濁度にかかわらず、おおよそ50~100[L]の河川水を膜に通水し、その中に含まれている懸濁物質を回収することができた。濾過終了後、1Lのポリビンに、その他の水質項目測定用の水試料を1[L]採取した。このポリビンは、4℃の恒温槽に漬けられており、試料を回収するまでの間、冷蔵保存しておくことが可能である。以上の操作を、3時間~3時間半おきに繰り返すことで、合計8つの試料を採取した。試料水の流れは、各枝に取り付けた電磁弁を、シーケンサーで制御することで操作した。試料採取後、できるだけ早く現地に行き、膜モジュールおよびポリビンを回収して、以下の各測定に供した。

C-3 クリプトスポリジウムの測定手法

(1) 河川水の濃縮および夾雑物の除去

得られた濃縮液を遠心分離 (1,050×g、10 [min]) によりさらに濃縮し、高密度 Percoll-ショ糖溶液を用いた密度勾配遠心法と免疫磁気ビーズ法を組み合わせさせた手法 (PS-IMS 法、真砂ら、2002) により精製した。本手法は、八木ら (2001)の手法を改変したもので、大容量の水試料に対して適用しても、高いオーシスト/シスト回収率を得ることができるとされている。免疫磁気ビーズを用いたクリプトスポリジウムの精製には、U.S. EPA により定められた手法 (1999b) に従い、Dynabeads CG-Combo Kit (DynaL Biotech) を用いた。

(2) DNA 抽出および濃縮

25%(w/w)の Chelex 100 樹脂懸濁液 100 [μL]を、精製済みの試料が入った 1.5mL マイクロチューブに入れ、凍結融解 (-80°C、95°C、5 回) によりゲノム DNA を抽出した。次に、抽出液全量を、遠心式 MF 濾過ユニット (GHP Nanosep MF centrifugal device, 日本ポール) に移し、10,000×g で 5 分間遠心分離して Chelex 100 および夾雑物を取り除いた。濾液を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)で精製したのち、液全量を Microcon YM-100 (日本ミリポア) に移し、500×g で 25 分間遠心分離した。最後に、膜ユニットに 10 [μL]の超純水を加えてから上下逆向きにセットし、500×g で 3 分間遠心分離して濃縮 DNA を得た。最終液量は約 10 [μL]となった。

(3) QProbe PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出・定量

表 1 に、用いた手法を簡単にまとめたものを示す。DNA の増幅および蛍光の検出には LightCycler (Roche Diagnostics)を用いた。最終的なクリプトスポリジウムの検出判定は、Nested PCR 法により行った。2 回目の PCR では、Morgan ら(1997)が開発したプライマーおよび PCR 条件 (表 2) を用いた。

(4) DGGE-Sequencing による検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判定

ゲルの作成および電気泳動は、Dcode システム (Bio-Rad)を用いて行った。操作は付属のマニュアルにしたがった。変性剤 (ホルムアミド、尿素) 濃度範囲は、5%~25%とし、泳動条件は、130 [V]、10 時間とした。泳動後、ゲルを Vistra Green (Amersham Pharmashia)で染色し、蛍光イメージアナライザー FluorImager595 (Molecular Dynamics) で画像を取り込み、付属のソフトウェアで画像解析を行った。必要に応じて PCR-DGGE を繰り返し、DGGE で単一のバンドのみが観察されるまで、DNA の精製を行った。

表 1 QProbe PCR 法の PCR 条件

Sequences of Primers and QProbe			
Forward	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG		
Reverse	CCT GCT TTA AGC ACT CTA ATT TTC		
QProbe	CGA ACC CTA ATT CCC CGT TAC CC – BODIPY		
Polymerase		Composition of PCR mixture	
KOD -Plus-		Polymerase	0.4 μL
PCR cycles		10 × PCR buffer	2 μL
No. of cycles	60 cycles	dNTP	200 nM each
Hot start	94°C, 5 min.	Mg ²⁺	1 mM
Denaturing	94°C, 30 sec.	BSA	0.25 mg/mL
Annealing	57°C, 30 sec.	Forward primer	600 nM
Extension	68°C, 75 sec.	Reverse primer	200 nM
Final extension	68°C, 5 min.	QProbe	100 nM
		Total volume	20 μL