

Table 1 Best-fit parameters and the likelihood function for each distribution

Distribution	Source water (oocysts/L)		Finished water (oocysts/L)		
	Parameter(s)		LF(θ)	Parameter(s)	LF(θ)
Poisson	$\lambda = 0.624$		978.7	$\lambda = 1.23 \times 10^{-3}$	410.1
PLN	$\mu = -0.720, \sigma = 0.709, \alpha = 0.293$		268.9	$\mu = -8.01, \sigma = 1.71, \alpha = 3.48 \times 10^{-3}$	207.4
NB	$\beta = 2.14$		270.6	$\beta = 0.333$	205.6

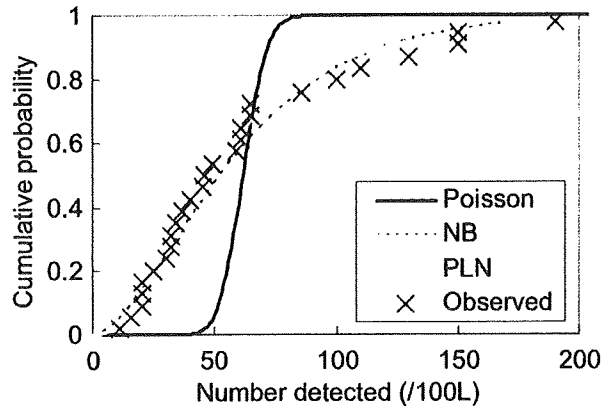


Figure 2 Estimated distributions and the observed data of the source water concentration

However, it was difficult to judge which was better, PLN or NB. In this study, PLN was adopted for the concentration distribution of *Cryptosporidium* in water. The median and the 95th percentile of the concentration of the source water and the finished water were 487, 1,562, 0.33 and 5.56 oocysts/1,000 L respectively.

Comparison between PLN and LN

Table 2 shows the best-fit parameters and the arithmetic mean of each distribution. For the source water there was no difference between the two methods of substitution, because all samples were positive (i.e. there was no need for substitution) and little difference was observed between the results of the LN and PLN. However, the PLN showed a lower median value ($\mu = -8.01$ for PLN and -7.39 or -7.67 for LN) and a higher variability ($\sigma = 1.71$ for PLN and 1.14 or 1.46 for LN) for the purified water. This was due to the substitution of all ND samples with the same concentration, which reduced the variability of the concentration. The arithmetic mean of the PLN was found to be larger (1.44 oocysts/1,000 L) than those of the LN (1.18 or 1.35 oocysts/1,000 L) suggesting that the substitution of the concentration could lead to the underestimation of the annual risk of infection.

Efficacy of the treatment

The estimated value of σ (Table 1) for the concentration of source and purified water was 0.71 and 1.71 respectively; this suggested that the purified water showed a greater variability.

Table 2 Evaluation of the effect of substituting N.D. data

	Source water (oocysts/L)			Finished water (oocysts/L)		
	μ	σ	Arith. Mean	μ	σ	Arith. Mean
0.5 oocyt	-0.731*	0.727*	0.627*	-7.39	1.14	1.18×10^{-3}
Cumul. Prob.				-7.67	1.46	1.35×10^{-3}
PLN	-0.720	0.709	0.626	-8.01	1.71	1.44×10^{-3}

*No difference due to the absence of N.D. samples.

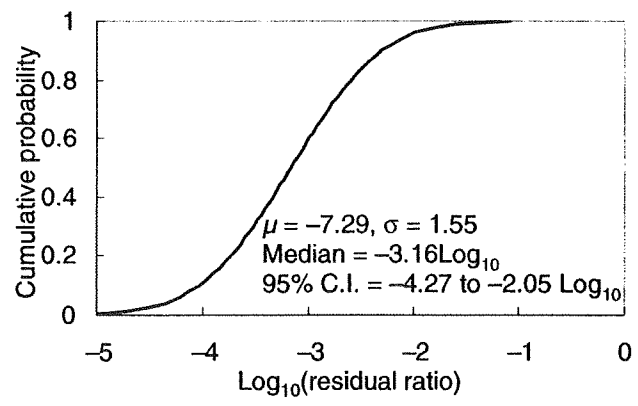


Figure 3 Distribution of treatment efficacy

ity than the source water. Therefore, it can be considered that the efficacy of *Cryptosporidium* removal by conventional water treatment was also variable. Based on this assumption, the distribution of the remaining ratio was estimated from the difference between the estimated distributions of the source and the finished water concentration.

According to the reproducibility of the normal distribution, the remaining ratio can be assumed to follow log-normal distribution, and the parameters μ and σ can be calculated by those of the concentration of the surface and finished water. Figure 3 shows the estimated distribution of the remaining ratio for the conventional water purification. The parameters were $\mu = -7.29$ and $\sigma = 1.55$. It was clear that the treatment efficacy was very variable (median $-3.16 \log_{10}$, 95% CI -4.27 to $-2.05 \log_{10}$).

Annual risk of infection

Figure 4 shows the distribution and statistics of the natural logarithm of the annual risk of infection for each model. The median and the 95th percentile of the annual risk were found to be (a) $-3.26 \log_{10}$ (1 case in 1,820 people) and $-2.58 \log_{10}$ (1 case in 1,295 people) for the first case (log-normal distributed water consumption) and (b) $-2.69 \log_{10}$ (1 case in 488 people) and $-2.58 \log_{10}$ (1 case in 384 people) for the second case (constant water consumption) respectively. The variability seemed to be very small for both cases, partly because the distribution of the finished water was directly used as an input, i.e. no additional assumptions (such as the efficacy of the water treatment) were required.

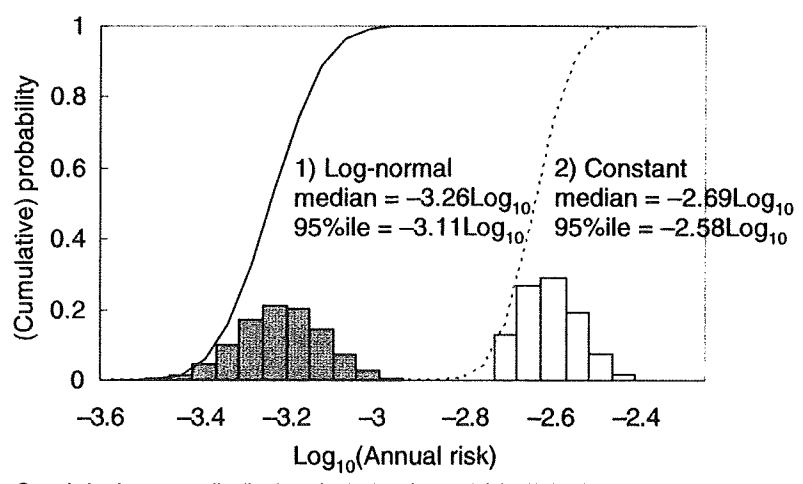


Figure 4 Cumulative frequency distribution of calculated annual risk of infection

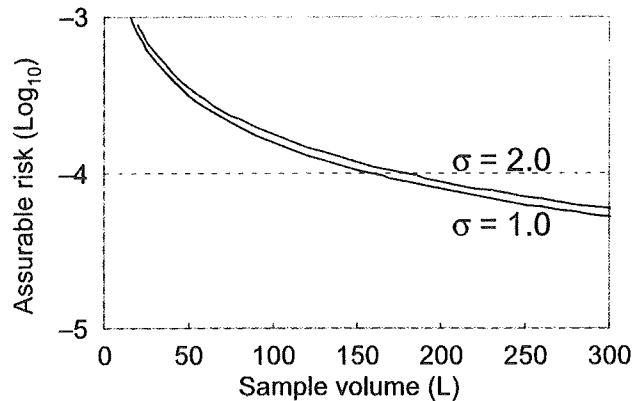


Figure 5 Assurable annual risk of infection by daily monitoring

Required water volume for daily monitoring

In this assessment, the result of the risk assessment derived from the second model (constant water consumption) was applied to calculate the required water volume for the daily monitoring of the finished water. First, the relationships between the parameters of the log-normal distribution (μ and σ) and the expected value of the annual risk of infection were evaluated. The point estimation was conducted because the range of the annual risk of infection was very small (95% C.I. = -2.79 to $-2.58 \log_{10}$). The arithmetic mean of log-normal distributions was given by:

$$\text{A.M.} = \exp(\mu + \sigma^2/2) \quad (3)$$

Thus, the equation of the relationship between the parameters was found to be:

$$\mu = \frac{\sigma^2}{2} \leq -9.64 \quad (4)$$

The range of the parameter σ was set between 1.0 to 2.0 (corresponding to 50 to 2,540 of the ratio of the 95th percentile to the 5th percentile of the distribution), which is supposed to cover all possible variability of the oocyst concentration in water. Under these conditions, the annual risk of infection could be calculated as a function of the sampling volume and the positive ratio.

Figure 5 shows the relationships between the sampling volume and the arithmetic mean of the annual risk without any positive results. As a result, negative results for all 180 L of the finished water samples were found to be needed to assure an annual infection risk of less than 10^{-4} . However, when LN was directly used to calculate the detection probability, the required sample volume increased up to 2,473 L, which was more than 13× as large as the result obtained by PLN. This result indicated that the calculation of the detection probability using a continuous distribution, such as a log-normal distribution, could lead to the overestimation of the volume required for daily monitoring to assure water safety.

Conclusions

In this study, the water volume necessary for daily monitoring was determined to assure that the annual risk of *Cryptosporidium* infection via tap water was at an acceptable level. The Poisson log-normal distribution showed just as good a fit to the observed data of *Cryptosporidium* in source and finished water as did the negative binomial distribution. PLN showed a better fit for the source water, while NB was better for the finished water. Comparing the fitted distributions, PLN was found to give higher probability for high con-

centration (Figure 2), suggesting that the PLN may have led to more conservative estimates for the annual risk assessment. The distribution of the treatment efficacy of the conventional water treatment process was found to follow a log-normal distribution with a median value of $-3.16 \log_{10}$ (95% CI = -4.27 to $-2.05 \log_{10}$).

Using the PLN distribution fitted to the concentration of the finished water, the maximum annual risk, assurable by 365 successive negative results, was computed. A water volume of 180 L was found to assure an annual risk of infection of below 10^{-4} . For comparison, the same analysis was conducted using the cumulative probability function of the LN. The required water volume was found to be 2,473 L/d, suggesting that the use of cumulative probability of the continuous distribution for the probability of detection could lead to the overestimation of the volume required for daily monitoring.

Microscopic observation of *Cryptosporidium* has sometimes been pointed out to be unfavourable, because little information can be obtained on the viability and the genotype of the detected oocysts, despite considerable investment in terms of skills, time and cost. The monitoring procedure developed in this study does not require any quantitative information, suggesting the possibility of using molecular techniques, such as cell culture PCR, as the routine monitoring method for *Cryptosporidium* in water.

Acknowledgements

This study was partly supported by “Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology”, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

References

- Brown, S. and Holgate, P. (1971). Table of Poisson log normal distribution. *Sankhya Ser. B.*, **33**, 235–248.
- Greenwood, M. and Yule, G.U. (1920). An inquiry into the nature of frequency distributions representative of multiple happenings with particular reference to the occurrence of multiple attacks of disease or of repeated accidents. *J. Roy. Stat. Soc. A Sta.*, **83**(2), 255–279.
- Haas, C.N. and Scheff, P.A. (1990). Estimation of averages in truncated samples. *Environ. Sci. Technol.*, **24**(6), 912–919.
- Haas, C.N., Crockett, C.S., Rose, J.B., Gerba, C.P. and Fazil, A.M. (1996). Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *J. Am. Wat. Wks Ass.*, **88**(9), 131–136.
- 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**(3), 519–526.
- Shaban, S.A. (1988). Poisson-log-normal distributions. In: *Lognormal Distributions: Theory and Applications*, E.L. Crow and K. Shimizu (eds.), Marcel Dekker, New York and Basle, pp. 195–210.
- Teunis, P.F.M., Medema, G.J., Kruidenier, L. and Havelaar, A.H. (1997). Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. *Wat. Res.*, **31**(6), 1333–1346.
- Yano, K. et al. (2000). The amount of the tap water consumption: from the results of questionnaire survey. *Proc. of the 3rd JSWE Symposium*, 159–160 (in Japanese).

(34) 消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による
水中のクリプトスポリジウムの定量および種別判定手法の開発

Development of Quantification and Genotyping methods for *Cryptosporidium* in
water by Quenching Probe PCR followed by RFLP

真砂 佳史*、小熊 久美子*、片山 浩之*、大垣 眞一郎*
MASAGO Yoshifumi*, OGUMA Kumiko*,
KATAYAMA Hiroyuki* and OHGAKI Shinichiro*

ABSTRACT;

A new method was developed to quantify *Cryptosporidium* in water. Quenching Probe PCR (QProbe-PCR) technique could successfully amplify approximately 1280bp of *Cryptosporidium* 18S rDNA from a sample with as low as 60 [oocysts/tube] of *Cryptosporidium parvum* bovine genotype. QProbe-PCR showed high accuracy and high sensitivity compared to Real Time PCR with TaqMan probe.

QProbe-PCR has an advantage that the PCR products can be applied for molecular characterization. A restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used to distinguish *Cryptosporidium* species and genotypes. Five species (*C. parvum* bovine genotype, *C. parvum* human genotype, *C. meleagridis*, *C. felis* and *C. muris*) could be distinguished by the RFLP with restriction enzymes *Ssp* I, *Vsp* I and *Sty* I. The *Sty* I successfully differentiated *C. muris* calf genotype (also known as *C. andersoni*) and *C. muris* mouse genotype. Database-based analysis revealed that 8 species out of 10 could be distinguished by RFLP with these three restriction enzymes.

QProbe-PCR-RFLP techniques can provide information on the genotype as well as the quantity of *Cryptosporidium* from the same sample. This technique can be a useful tool for waterborne risk assessment of Cryptosporidiosis.

KEYWORDS; *Cryptosporidium*, Genotyping, Quenching Probe PCR (QProbe-PCR), Real time PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

1. はじめに

クリプトスポリジウムは水系感染性の病原微生物で、塩素消毒に対して非常に強い耐性を持つことが知られており、先進国においても水道水質管理における重大な問題とされている。1993年、米国 Wisconsin 州 Milwaukee において、水道水中のクリプトスポリジウムにより 40 万人以上が感染した事例¹⁾が報告されている。また国内においても、1996年6月に埼玉県越生町において町民約 14,000 人の 7 割以上が感染したという事例などがある²⁾。

現在、クリプトスポリジウムは分類学上 13 種存在するとされている³⁾。そのうちヒトに感染するのは、主に *C. parvum* と *C. hominis* であるが、他にも *C. muris*⁴⁾、*C. meleagridis*⁵⁾⁶⁾、*C. felis*⁶⁾⁷⁾、*C. canis*⁶⁾⁷⁾ が健康なヒトに感

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

染した例も報告されている。また、*C. parvum* の遺伝子型の差によるヒトに対する感染力の違いについての調査⁸⁾により、同じ *C. parvum* であっても、その遺伝子型により感染力が大きく異なることが明らかとなっている。以上より、水中のクリプトスポリジウムの検出においては、ヒトへの感染リスク評価の観点から、定量だけでなく、その種や遺伝子型に関する情報を同時に得ることが強く望まれている。

これまでに、水中のクリプトスポリジウムの定量や種の同定のため多くの手法が開発されてきた。クリプトスポリジウムの定量手法としては、蛍光抗体染色したオーシストを顕微鏡観察により検出・計数する手法⁹⁾や、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法¹⁰⁾¹¹⁾等が挙げられる。一方、種の同定手法としては、PCR-RAPD 法¹²⁾や PCR-SSCP 法¹³⁾、PCR-RFLP 法¹⁴⁾¹⁵⁾、シーケンシング法¹⁴⁾¹⁵⁾などが開発されている。定量と遺伝子型の判定を同一の試料から行う手法としては、顕微鏡観察により検出されたオーシストを顕微鏡下で摘出して PCR にかける手法が提案されている¹⁶⁾が、測定に多大な時間と労力を要するため、多数のサンプルに対して適用することは困難であると考えられる。

2001 年、消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法である Quenching Probe/Primer PCR 法（以下 QP-PCR 法）が開発された¹⁷⁾¹⁸⁾。QP-PCR 法とは、蛍光色素 BODIPY（グアニンと結合することにより蛍光が消える特徴を持つ）を 5'-あるいは 3'-末端に標識したプローブやプライマーを用いて PCR を行い、試料全体の蛍光量が一定割合まで減少するのに必要なサイクル数を求めることで、試料中の対象 DNA 存在量を測定する手法である。QP-PCR 法は大きく分けて、BODIPY で標識したプローブを用いる Quenching probe PCR 法（以下 QProbe-PCR 法）と、BODIPY で標識したプライマーを用いる Quenching primer PCR 法（以下 QPrimer-PCR 法）の 2 種類がある。本手法は、既存のリアルタイム PCR 法で用いられている TaqMan PCR 法と比較して、より長い塩基配列に対して適用できるとされている。このことは、得られた PCR 産物の遺伝子解析に際して非常に優れた点であるといえる。

本研究では、クリプトスポリジウムの 18S rDNA を対象とした QProbe-PCR 法により、水中のクリプトスポリジウムを高精度・高感度で定量する手法を開発した。さらに、得られた PCR 産物を Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)法に適用することで、検出されたクリプトスポリジウムの種の判別を行う手法を開発した。

2. 実験方法

2.1. QProbe-PCR 法による水中のクリプトスポリジウム定量手法の開発

(1) 供試したクリプトスポリジウムの種および鋳型 DNA 溶液の調整

QProbe-PCR の定量性評価のための添加オーシストには、*Cryptosporidium parvum* IOWA 株 (Waterborne, New Orleans, U.S.A.)を用いた。

添加 DNA 溶液は以下の手法で調整した。まずオーシスト濃縮液 100 μ L に同量の 25% (w/v) Chelex 100 樹脂 (Bio-Rad, 東京)を添加し、凍結融解 (-80 $^{\circ}$ C5 分、95 $^{\circ}$ C5 分)を 5 回行って、オーシストから 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, 東京)に移し、10,000 \times 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。さらに、濾液全量を Microcon YM-100 (日本ミリポア, 東京)を用いて濃縮し、適量の超純水を加えて添加 DNA 溶液とした。

(2) 使用したプライマーおよびプローブ

Xiao ら¹⁴⁾¹⁵⁾が設計した、クリプトスポリジウムの幅広い種の 18S rDNA を増幅できるとされているプライマーを用いた。本来このプライマーは Nested PCR 用に設計されたものであり、Forward primer と Reverse primer がそれぞれ 2 つずつ存在するため、QProbe-PCR 法に適用できる組み合わせは合計 4 種類あることになる。そこで、予備実験として、それぞれの組み合わせに対して実際に PCR により鋳型 DNA を増幅し、産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。その結果、Inner-Forward プライマーと Outer-Reverse プライマーの組

み合わせが、一番効率良く鋳型 DNA を増幅でき、またプライマーダイマーの生成が少ないことが確認できたため、以降の評価ではこの組み合わせを用いた。

次に、QProbe-PCR 法で用いたプローブの設計を行った。QProbe-PCR 法は、蛍光色素 BODIPY がグアニンと結合することで蛍光が消光する現象を利用するため、プローブのどちらかの末端がシトシンである必要がある。そこで、以下の手順でプローブの設計を行った。はじめに、本プライマーと同じ配列部位を持つ遺伝子を、DDBJ データベース¹⁹⁾から NCBI-BLAST 2.0²⁰⁾により検索し、系統樹作成ソフト ClustalW 1.7²¹⁾を用いて、その全ての塩基配列に共通の部分抽出した。次に、抽出した塩基配列の中から、プローブの Tm 値がプライマーの Tm 値より 5°C 程度高くなること、プローブが二次構造をとりにくいこと、プライマーダイマーを生成しにくいこと、以上 3 点を基準に、最適なプローブの塩基配列を決定した。Table 1 に選択したプライマーと、設計した Quenching Probe の塩基配列を示す。

Table 1. Primers for amplifying 18S rDNA of *Cryptosporidium* and Designed QProbe

Name	Sequence	Reference
Forward Primer	5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'	14), 15)
Reverse Primer	5'- CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA -3'	
QProbe	5'- CGA ACC CTA ATT CCC CGT TAC CC - BODIPY -3'	This study

(3) PCR 条件の決定と QProbe-PCR 法の定量性の評価

DNA の増幅および蛍光の検出には LightCycler (Roche Diagnostics, 東京)を用いた。QProbe PCR 法では、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性のないポリメラーゼを使う必要があるため、DNA ポリメラーゼには KOD -Plus- (東洋紡, 大阪)を用いた。反応液の総量は 20 μ L とした。PCR バッファー、MgSO₄、dNTP はポリメラーゼに付属のものを使用し、Mg²⁺濃度は 1mM、dNTP 濃度は各 200nM とした。プライマー濃度は、Forward プライマーを 1000nM、Reverse プライマーを 300nM とし、また QProbe 濃度は 100nM とした。

定量性の評価の前に、PCR の最適条件を決定するため、アニーリング温度を 55°C~60°C の範囲で変化させて PCR を行い、検出精度と定量下限を調査した。その他の温度条件は、94°C5 分の熱変性の後、94°C30 秒、アニーリング時間 30 秒、68°C60 秒のサイクルを 60 回行い、最後に 68°C5 分で伸長を行った。

得られた最適条件を用いて、QProbe PCR 法の定量性評価を行った。各チューブへの添加 DNA 溶液は、2.1.(1) で作成した DNA 溶液を、1 チューブあたり 6 $\times 10^3$ ~6 $\times 10^0$ [oocysts]となるように段階的に希釈して作成した。

(4) 閾値の決定方法

各サイクルで測定した蛍光強度の変化から検出サイクルを算出するため、以下の手順で、陽性と判定する消光率の閾値(Threshold line)を設定した。まず、各サイクルにおける蛍光の消光率のグラフを作成した。次に、閾値を 1%~99%の範囲内で 1%刻みで順に上げていき、それぞれの境界値から得られた検出サイクルを用いて検量線を作成した。そして、その中から最も高い相関係数を与える値を求め、最終的な閾値とした。この閾値は PCR を行う度に作成した。

2.2. RFLP 法および T-RFLP 法によるクリプトスポリジウムの種の判別

(1) 供試したクリプトスポリジウムの種

種の判別手法の評価には、国立感染症研究所 寄生動物部の遠藤 卓郎氏より分与していただいた *C. parvum* ウシ型 (Accession No.: AF161856)、同ヒト型 (同 AF093491)、*C. meleagridis* (同 AF112574)、*C. felis* (同 AF112575)、

C. muris, *C. sp. strain 938* (同 AY120913) のゲノム DNA を用いた。これらの種は、*C. sp. strain 938* を除き全て健全なヒトへの感染が報告された種である。ただし、*C. muris* は、ウシ型かネズミ型かの情報は得られておらず、また *C. sp. strain 938* については、増幅部位の一部分の配列情報のみデータベースに登録されていた。

(2) 試料の準備

QProbe-PCR の増幅産物を、アガロースゲル電気泳動で観察したところ、鋳型 DNA 量が少ないサンプルでは十分な濃さのバンドを得ることができなかった。そこで、RFLP 法に適用する前に、同じプライマーで再度 PCR を行って、産物を増幅した。この時の PCR 反応液(50 μ L)の組成は、2.5U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, 東京)、10 \times PCR バッファー5 μ L、dNTP 各 200nM、MgCl₂ 3mM とし、各プライマー濃度は 500nM とした。温度条件は、94 $^{\circ}$ C5 分の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C30 秒、57 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C60 秒のサイクルを 30 回行い、最後に 72 $^{\circ}$ C5 分で伸長を行った。

(3) RFLP 法によるクリプトスポリジウムの種および遺伝子型の判定

RFLP 法は、PCR により増幅された DNA を制限酵素で切断し、その断片をアガロースゲル電気泳動により観察する手法である。そして、得られた断片長パターンをデータベースと照合することで、得られた DNA がどの種のものかを判別することができる。Xiao ら¹⁴⁾¹⁵⁾は、制限酵素として *Ssp I* と *Vsp I* を用いて、クリプトスポリジウムの種および遺伝子型のグループ分けを行った。そこで、本研究で用いたプライマーセットにより得られる PCR 産物を、これら 2 種類の制限酵素により切断することで、種および遺伝子型の判別を試みた。さらに、*C. muris* の遺伝子型 (ウシ型、ネズミ型) の判別のため、*Sty I* を用いた RFLP を併せて行った。Table 2 に、現在存在する 13 のクリプトスポリジウムの種のうち、18S rDNA の配列がデータベースに登録されている 10 種に対して、今回用いた 3 つの制限酵素で切断した場合に得られる断片長を示す。断片長パターンの類型化にあたり、断片長に 5% 以上の差があれば、アガロースゲル電気泳動により識別できるとした。

2.2.(2) で得られた PCR 産物を、3 種の制限酵素 (*Ssp I*, *Vsp I*, *Sty I*) でそれぞれ切断 (37 $^{\circ}$ C、2 時間以上) した。切断後、アガロースゲル電気泳動により断片を観察した。そして得られたパターンを Table 2 のデータベースと照合して、種の判定を行った。

Table 2. RFLP database of *Cryptosporidium* species

Species	Host	Accession No.	RFLP in base pairs (sorted)				
			<i>Ssp I</i>	Type	<i>Vsp I</i>	Type	<i>Sty I</i>
<i>C. canis</i>	dog	AF112576	543, 417, 159, 105, 33, 20	A	623, 550, 104	a	712, 565
<i>C. parvum</i>	mammals	AF161856	543, 449, 159, 108, 12, 11	B	628, 550, 104	a	717, 565
<i>C. wrairi</i>	guinea pig	AF115378	543, 449, 159, 109, 11, 11	B	628, 550, 104	a	717, 565
<i>C. parvum</i> *	human	AF093491	543, 449, 159, 111, 12, 11	B	561, 550, 104, 70	b	720, 565
<i>C. meleagridis</i>	turkey	AF112574	543, 449, 158, 108, 11, 11	B	549, 456, 171, 104	c	716, 564
<i>C. felis</i>	cat	AF112575	688, 426, 155, 33, 14	C	658, 395, 159, 104	d	747, 569
<i>C. baileyi</i>	chicken	AF093495	697, 572	D	620, 545, 104	a	709, 560
<i>C. serpentis</i>	snake	AF151376	816, 414, 33, 14	E	729, 548	e	714, 563
<i>C. muris</i>	mouse	AF093497	831, 448	F	731, 548	e	716, 513
<i>C. muris</i> *	calf	AF093496	829, 448	F	730, 547	e	562, 453, 262

*: "*C. parvum* human genotype" and "*C. muris* calf genotype" were renamed to be "*C. hominis*²²⁾" and "*C. andersoni*²³⁾", respectively.

3. 実験結果

3.1. QProbe-PCR 法による水中のクリプトスポリジウムの定量

アニーリング温度を変化させて、検出感度および定量下限を調査した結果、アニーリング温度が 57°C 以下のときは、初期添加量 6×10^3 [oocysts/tube] の試料の Ct 値が約 32 サイクル前後だったのに対し、それ以上では 40 サイクル前後まで低下し、また、低濃度の試料では産物の生成が見られなかった。一方、アニーリング温度が 57°C より低いときは、非特異産物の増幅により、プローブの消光率（対象 DNA の産物生成量）が低下した。以上の結果より、57°C の場合が、精度・感度両方の面から見て最適であると判断した。

Figure 1 に、この条件下における、各 PCR サイクルで測定した蛍光の減少量の、初期蛍光強度に対する割合を示す。図中の“Threshold Line”とは、2.1.(4) で述べた手法で作成した「閾値」を指す。また Figure 2 に、この図から得られた検出サイクルと添加した鋳型 DNA 量の関係から得た検量線を示す。

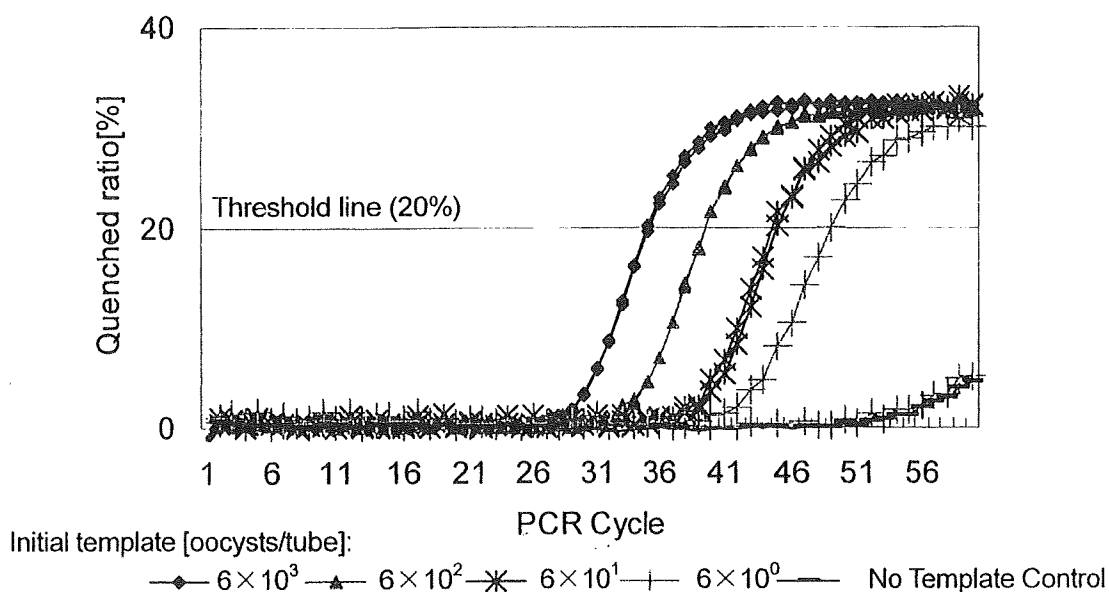


Figure 1. Amplification plots of *Cryptosporidium* 18S rDNA by QProbe-PCR with annealing temperature at 57°C (n=2 for each condition except NTC).

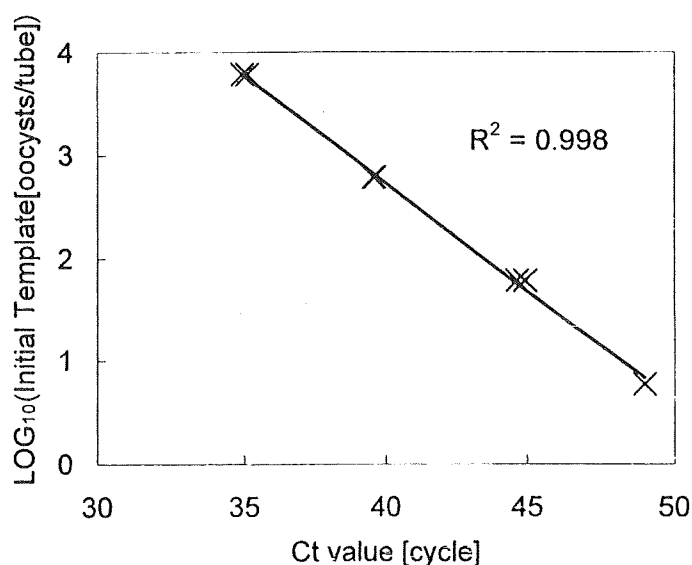


Figure 2. Standard line for QProbe PCR derived from amplification plots in Figure 1.

Figure 1において、初期添加 DNA 量 $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^1$ [oocysts/tube] の試料については、全て鋳型 DNA を検出することができた。しかし、 6×10^0 [oocyst/tube] の試料は、2つのうち1つからのみ産物由来の消光を検出できた。以上より、今回の試験における本手法の検出下限は 6×10^1 [oocysts/tube] であるといえる。また、Figure 2を見ると、今回行った濃度域全域において、検量線の決定係数が 0.998 と非常に高かった (有意確率 $p < 0.001$)。したがって、本手法により、初期 DNA 添加量を、非常に精度良く測定することができたといえる。

以上の結果より、今回開発した 18S rDNA をターゲットとした QProbe-PCR 法により、水中のクリプトスポリジウムを高精度・高感度で定量できることが示された。

3.2. RFLP 法による種および遺伝子型の判別

Figure 3 に、実際にアガロースゲル電気泳動により得られた断片長パターンを示す。Ssp I および Vsp I の *C. muris*、および Sty I の *C. meleagridis*、*C. felis*、*C. sp. strain 938* では、切断されずに残った産物のバンドが 1280bp 付近に薄く見られた。また、全ての制限酵素に対する *C. meleagridis* の断片長パターンにおいて、予想より短い領域に 2 本 (約 350bp と約 230bp 付近) のバンドが見られた。これに関しては、制限酵素を加えていない系 (No enzyme control, Figure 3d) においても同じ長さのバンドが見られたことから、PCR で生じた非特異産物に由来するバンドであると判断した。

C. parvum ウシ型、ヒト型および *C. meleagridis* は、Ssp I の切断に対して同じような断片長パターン (534bp, 449bp, 159bp, Type B) を示した (Figure 3a)。一方 *C. felis* と *C. muris* は、それぞれ他とは異なるパターン (そ

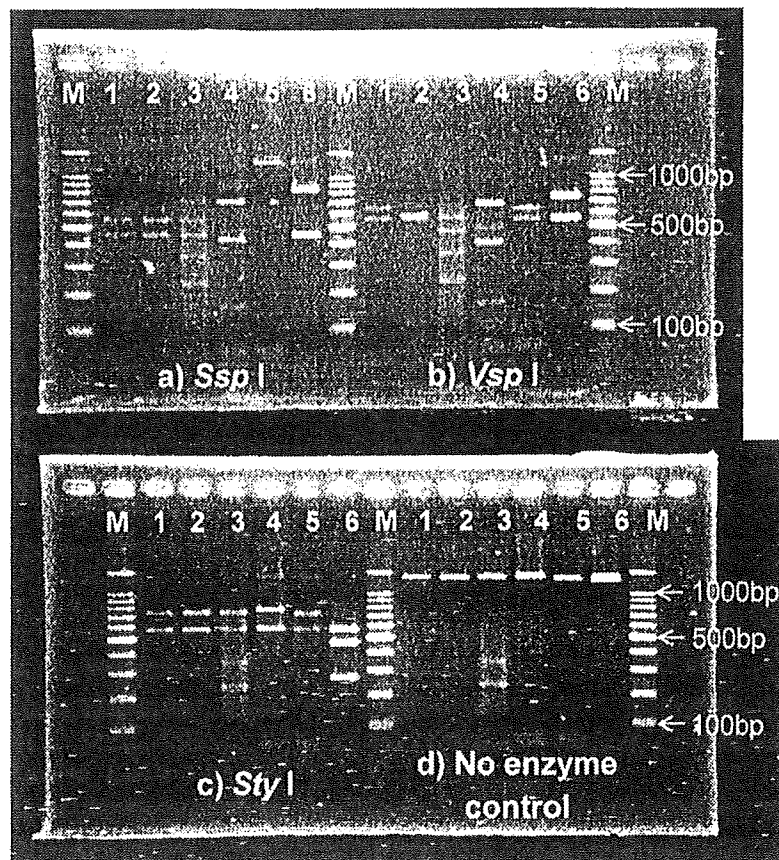


Figure 3. Restriction fragments patterns of *Cryptosporidium* spp. by agarose gel (2%) electrophoresis.

- | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1: <i>C. parvum</i> bovine genotype | 2: <i>C. parvum</i> human genotype | 3: <i>C. meleagridis</i> |
| 4: <i>C. felis</i> | 5: <i>C. sp. strain 938</i> | 6: <i>C. muris</i> |
| M: 100bp DNA Ladder | | |

れぞれ Type C、Type F) を示しており、今回用いた種の中での判別が可能であった。C. sp. strain 938 に関しては、今回増幅した領域全域についての塩基配列が得られていないため、理論上の断片長パターンはわからないが、一部の塩基配列に関する情報から、少なくとも 33bp の断片が存在することが予想された。Ssp I の断片長パターン (Figure 3 a) を見ると、1250bp 付近にバンドが見られるだけで、33bp の断片はプライマーダイマーと重なって確認できなかった。以上より、この株に関しては、33bp の断片を生じている可能性はあるが、それ以外の場所では切断されないことがわかった。

Figure 3b) の Vsp I による切断断片長パターンを見ると、C. parvum ウシ型と C. sp. strain 938 で同様のパターン (628bp, 550bp, Type c) が見られた他は、それぞれ独自のパターンを示した。

Sty I による切断断片長パターン (Figure 3c) は、長い方の断片長が種によって多少異なるものの、C. muris を除く全ての種で似ていた (707~747bp と 564~569bp)。C. muris は、全ての種で共通な断片長である約 560bp のバンドの他に、450bp 付近と 260bp 付近にバンドが見られた。Table 2 の C. muris のウシ型とネズミ型の断片長パターンと比較することにより、この C. muris はウシ型である可能性が高いと考えられる。

以上より、制限酵素 Ssp I、Vsp I を用いた RFLP 法により、遺伝子配列がわかっている 4 つの種または遺伝子型 (C. parvum ヒト型、ウシ型、C. meleagridis、C. felis) をそれぞれ区別することができた。また、新たに Sty I を用いることで、C. muris の遺伝子型 (ウシ型、ネズミ型) の判定が可能であることがわかった。

4. 考察

4.1. QProbe-PCR 法によるクリプトスポリジウムの定量について

本研究で開発したクリプトスポリジウムの 18S rDNA を対象とした QProbe-PCR 法は、非常に高い精度 (決定係数 $R^2=0.998$) を持っていることが明らかとなった。また定量下限については、今回の試験結果から 6×10^1 [oocysts/tube] としたが、 6×10^0 [oocysts/tube] の試料からも定量性のある検出結果が得られていること、また、今回はそれ以下の添加量では試験していないことから、実際の定量下限はより低い可能性もある。

比較のため、同じ塩基配列のプライマーおよびプローブを使用して、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法による定量を試みた。このとき、PCR 反応液の作成には PCR Master Mix を使用し、温度条件は QProbe-PCR 法と同じとした。その結果、初期添加量 $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^0$ [oocysts/tube] のいずれの試料からも蛍光を検出することができなかった。また、他の遺伝子配列に対する TaqMan プローブを用いた手法²⁴⁾²⁵⁾の定量下限は、およそ 5 [oocyst/tube] であった。したがって、今回開発した QProbe-PCR 法は、検出精度・検出感度の両方の面において、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法と同等であるといえる。

さらに、一般に、TaqMan プローブを用いた手法は、増幅する塩基配列の長さをあまり長くできないと言われている。実際、QProbe 法で用いた増幅部位に対して、TaqMan プローブを用いた手法では意味のある蛍光が得られなかった。一方、QProbe-PCR 法を用いた本手法は、約 1280bp の DNA を対象にすることができた。これは、以下の 2 つの面で優れた特徴であるといえる。まず、得られた PCR 産物を、今回行った RFLP 法やその他の遺伝子工学的手法に適用することで、遺伝子配列に関する情報を得られるという点である。本研究では、この点に関して、RFLP 法によりクリプトスポリジウムの種や遺伝子型の判定を行えることを示した。次に、プローブの設計に際し、TaqMan プローブの配列を決定する場合と比較して、配列選択の自由度が高いという点が挙げられる。これにより、二次構造のとりにくさやダイマーの生成しにくさの面で、より優れたプローブを設計しやすくなる。今回作成した系において 1280bp の長さの配列を対象にできたのも、この特徴に負うところが大きいと考えられる。

ただし、本手法は、既存の TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法と同様、試料中のクリプトスポリジウムの DNA を測定対象としているため、検出されたクリプトスポリジウムの生死や、ヒトへの感染力を評価することはできない。

4.2. RFLP 法による種の判別について

制限酵素 *Ssp*I、*Vsp*I を用いた RFLP 法により、ヒトへの感染例が報告されている 5 つの種または遺伝子型 (*C. parvum* ヒト型、ウシ型、*C. meleagridis*、*C. felis*、*C. muris*) を識別することができた。また、*Sty*I を用いることで、*C. muris* の遺伝子型 (ウシ型、ネズミ型) の判定することができることがわかった。そこで、今回用いなかったその他の種 (*C. canis*、*C. wrairi*、*C. baileyi*、*C. serpentis*、*C. muris* ネズミ型) についても、*Ssp*I、*Vsp*I、*Sty*I による RFLP 法により、種ごとの識別が可能であるかを調べた。

Table 2 の切断パターンの類型を見ると、10 種のうち、*C. parvum* と *C. wrairi* を識別することはできないものの、残りの 8 種については、断片長パターンからの種の判定が可能であることがわかった。したがって、この 3 種の制限酵素を用いた RFLP 法により、現存する種の多くを判別することができると考えられる。

4.3. 本手法の適用可能性について

本研究で開発した、QProbe-PCR 法と RFLP 法を組み合わせた手法により、純粋な系において、試料中に存在していたクリプトスポリジウムの存在量と、その種および遺伝子型を、同時に測定することが可能であることが示された。既存の手法では、これらの情報を同時に得ることは不可能とされていた。例えば TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法では、定量評価は可能であるが、得られる増幅産物が短いため、種や遺伝子型の判別を行うことができない。また PCR-RFLP 法などの既存の種の判別手法では、鋳型 DNA を、定量的でない PCR 法により増幅するため、定量的な情報を得ることができない。

本手法の限界として、多数の種が同一試料に含まれていた場合、断片長パターンの相違が見極めにくくなり、全ての種を識別できない可能性が懸念される。しかし、実河川水および湖沼水試料に対して行ったクリプトスポリジウム検出結果²⁴⁾を見ると、陽性であった 25 試料のうち、複数の種または遺伝子型が含まれていたのは 10 試料で、それらは全て 2 種類の混合であった。Table 2 の切断パターンから考えると、2 種の混合であった場合は、理論的には、どの組み合わせであってもそれぞれを識別できると思われる。

また、本手法も、PCR を用いる他の手法と同様に、PCR バイアス等により、試料中に存在する全ての種を、元の存在割合を保ったまま検出することは不可能である。したがって、仮に試料水中に多数の種が存在した場合でも、その中で優占している種のみを検出してしまう可能性がある。しかし、一般に水道水源中のクリプトスポリジウム濃度は非常に低く、同一試料から多数のオーシストが検出されることは稀なため、このようなことが発生する確率は低いと考えられる。

以上より、今回開発した手法を水道水源に適用すれば、試料中のクリプトスポリジウムの存在量についての情報と、その種あるいは遺伝子型についての情報を同時に得ることができる。水道水摂取による感染リスクを評価するうえで非常に重要な手法を得たといえる。

謝辞： 本研究を行うにあたり、クリプトスポリジウムの DNA を分与してくださった国立感染症研究所 寄生動物部の遠藤 卓郎、八木田 健司の両氏、および QProbe-PCR 法の手法確立にあたり多大な協力を頂いた環境エンジニアリング株式会社の十川 英和、蔵田 信也の両氏に深く謝意を表す。

なお本研究は、厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「クリプトスポリジウム等による水系感染症に係わる健康リスク評価及び管理に関する研究」(代表・国包章一)の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. and Davis, J.P.: A Massive Outbreak In Milwaukee Of *Cryptosporidium* Infection Transmitted Through The Public Water-supply, *New England Journal of Medicine*, Vol. 331, Iss. 3, pp. 161-167, 1994.
- 2) 埼玉県衛生部：「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, 1997.
- 3) Xiao, L.H., Fayer, R., Ryan, U. and Upton, S.J.: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public

- health, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 17, Iss. 1, pp. 72-97, 2004.
- 4) Katsumata, T., Hosea, D., Ranuh, I.G., Uga, S., Yanagi, T. and Kohno, S.: Short report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 62, Iss. 1, pp. 70-72, 2000.
 - 5) Pedraza-Diaz, S., Amar, C.F.L., McLauchlin, J., Nichols, G.L., Cotton, K.M., Godwin, P., Iversen, A.M., Milne, L., Mulla, J.R., Nye, K., Panigrahl, H., Venn, S.R., Wiggins, R., Williams, M. and Youngs, E.R.: *Cryptosporidium meleagridis* from humans: Molecular analysis and description of affected patients, *Journal of Infection*, Vol. 42, Iss. 4, pp. 243-250, 2001.
 - 6) Xiao, L.H., Bem, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H. and Lal, A.A.: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru, *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 183, Iss. 3, pp. 492-497, 2001.
 - 7) Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J. and McLauchlin, J.: Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England, *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 50, Iss. 3, pp. 293-296, 2001.
 - 8) Messner, M.J., Chappell, C.L. and Okhuysen, P.C.: Risk assessment for *Cryptosporidium*: A hierarchical Bayesian analysis of human dose response data, *Water Research*, Vol. 35, Iss. 16, pp. 3934-3940, 2001.
 - 9) U.S. EPA: Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration / IMS / IFA, 2001.
 - 10) Higgins, J.A., Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L.H., Lal, A.A., Kerby, S. and Jenkins, M.C.: Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 47, Iss. 3, pp. 323-337, 2001.
 - 11) Fontaine, M. and Guillot, E.: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 214, Iss. 1, pp. 13-17, 2002.
 - 12) Morgan, U.M., Constantine, C.C., O'Donoghue P., Meloni, B.P., O'Brien, P.A. and Thompson, R.C.A.: Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates From Humans and Other Animals Using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 52, Iss. 6, pp. 559-564, 1995.
 - 13) Gasser, R.B., Zhu, X.Q., Caccio, S., Chalmers, R., Widmer, G., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Pozio, E. and Browning, G.F.: Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions, *Electrophoresis*, Vol. 22, Iss. 3, pp. 433-437, 2001.
 - 14) Xiao, L.H., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R. and Lal, A.A.: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 8, pp. 3386-3391, 1999.
 - 15) Xiao, L.H., Escalante, L., Yang, C.F., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R. and Lal, A.A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 4, pp. 1578-1583, 1999.
 - 16) 杉本ひとみ, 橋本温, 森田重光, 平田強: 下水から単離した *Cryptosporidium* オーストの遺伝子型の解析, 第38回日本水環境学会年会講演集, p. 106, 2004.
 - 17) Torimura, M., Kurata, S., Yamada, K., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kanagawa, T. and Kurane, R.: Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base, *Analytical Sciences*, Vol. 17, Iss. 1, pp. 155-160, 2001.
 - 18) Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y. and Kurane, R.: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY® FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, Iss. 6, pp. e34, 2001.
 - 19) Miyazaki S., Sugawara H., Gojobori T., Tateno Y.: DNA Data Bank of Japan (DDBJ) in XML, *Nucleic Acids Research*, Iss. 30, Vol. 1, pp. 13-16, 2003.
 - 20) Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, pp. 3389-3402, 1997.
 - 21) Thomopson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.: CLUSTALW, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.
 - 22) Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A. and Xiao, L.H.: *Cryptosporidium hominis* n. sp (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 49, Iss. 6, pp. 433-440, 2002.
 - 23) Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R. and Blagburn, B.L.: *Cryptosporidium andersoni* n. sp (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 47, Iss. 1, pp. 91-95, 2000.
 - 24) Fontaine, M. and Guillot, E.: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 214, Iss. 1, pp. 13-17, 2002.
 - 25) Fontaine, M. and Guillot, E.: An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples, *Journal Of Microbiological Methods*, Vol. 54, Iss. 1, pp. 29-36, 2003.
 - 26) Xiao, L.H., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T.K., Gradus, S. and Lal, A.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, Iss. 3, pp. 1097-1101, 2001.

EVALUATION OF HEALTH RISKS IN THE WASTEWATER RECLAMATION IN THE ABUKUMA WATERSHED, JAPAN

T. Watanabe*, K. Hashimoto*, Y. Abe* and T. Omura*

*Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aoba-yama 06, Sendai 980-8579, Japan

ABSTRACT

Wastewater reclamation is an effective countermeasure to the shortage of water. However, there is concern that the wastewater reclamation causes health risks of infection by pathogens and cancer by disinfection by-products such as trihalomethanes (THMs). Since it is difficult to discuss these risks together, the Disability-Adjusted Life Years (DALY) has been employed to integrate them with the unit of lost lifetime. Health risks of infection and cancer in Fukushima city with population of 0.3 million were evaluated with the DALY in the wastewater reclamation as a drinking water source. The damage [%•day] from the shortage of water was quantified by the product of the percent of deficiency to the water supply demand [%] and the period of deficiency [days]. In the current situation of water utilization without reclamation, the DALY for total population was about 11 years. The reclamation of the secondary effluent without disinfection brought no increase of DALY when the damage between 0 and 300 %•day was reduced. On the other hand, the DALY drastically increased when the reduction of the damage was over 300 %•day. If the secondary effluent was disinfected with chlorine, the maximum damage of 1200 %•day could be reduced by its reclamation without any increase of DALY.

KEYWORDS

Wastewater reclamation; shortage of water; health risks; pathogens; disinfection by-products; Disability-Adjusted Life Years (DALY)

INTRODUCTION

The shortage of water is recognized as one of the most serious problems on the global environment. United Nations (UN) reported that one third of the world population in 1995 was suffering from the shortage of water and two thirds in 2025 would be doing due to the increase of the water demand. For the countermeasure to the shortage of water, the wastewater reclamation has been introduced to the water utilization system for purposes of toilet flushing, car washing and irrigation in the urbanized area. In Singapore, the wastewater treated with membrane technologies has been provided for the drinking water named "newater". If the shortage of water becomes more serious, the wastewater reclamation as a drinking water source will be popular in the future.

Since pathogens are often detected from the secondary effluent (Omura *et al.*, 1989; Havelaar *et al.*, 1993; Yano *et al.*, 1993), an appropriate disinfection of the effluent is necessary before its reclamation to prevent the increase of the infectious risk. Watanabe *et al.* (2003) concluded that the infectious risk by poliovirus 1 did not increase in reclaiming the secondary effluent disinfected with chlorine as a part of the drinking water source. However, it is well-known that carcinogenic substances such as

trihalomethanes (THMs) are produced when the secondary effluent is disinfected with chlorine. Therefore, the cancer risk as well as the infectious risk in the wastewater reclamation should be evaluated and decreased to the acceptable level.

The objective of this study is to evaluate both health risks of infection and cancer in the wastewater reclamation with a health index of the Disability-Adjusted Life Years (DALY). The DALY was developed by Murray and Lopez (1996) for the investigation on Global Burden of Disease (GBD) with World Health Organization (WHO). This index has the advantage to quantify the burden for population which will be evaluated from both of fatal diseases such as cancer and nonfatal diseases such as infectious diseases in the same unit of the lost lifetime [years]. The lifetime lost by nonfatal diseases is determined according to the disability caused by the diseases.

MATERIALS AND METHODS

Wastewater reclamation

Prediction of the river discharge at the intake point. The wastewater reclamation is simulated in Fukushima city located at the middle reach of the Abukuma river in Japan. In this city with the population of 0.3 million, the Abukuma river is used as a drinking water source. Fukushima city often suffer from the shortage of water due to low discharges of the Abukuma river, especially in summer season. In order to predict the shortage of water in this city, Watanabe *et al.* (2003) categorized the river discharge observed from 1980 to 1999 at the intake point of the water treatment plant into 20 levels and derived the matrix of simultaneous probability of discharge levels on consecutive two days from categorized data. With the derived matrix of probability, they proposed the method to predict the shortage of water by reproducing the river discharge level at the intake point day by day. In this study, the shortage of water in Fukushima city is predicted with the matrix of probability in the same manner.

Scenarios on the wastewater reclamation. The wastewater is reclaimed as a part of drinking water source. The daily dosage of the drinking water is assumed to be 2 L for all individuals in Fukushima city. According to the statistical analysis of river discharge at the intake point by the Ministry of Land, Infrastructure and Transportation in Japan, the discharge below 25 m³/s is very rare. Therefore, this situation is regarded as the shortage of water. In such case, the intake from the Abukuma river is restricted by the river discharge level (Watanabe *et al.*, 2003), and the wastewater is reclaimed as a drinking water source in two scenarios A-1 and A-2. In scenario A-1, the wastewater reclamation covers a half of the shortage of drinking water source. In scenario A-2, all of the shortage is replaced by the reclaimed wastewater.

Damage from the shortage of water. The damage [%•day] from the shortage of water is quantified by the product of the percent of deficiency to the water supply demand [%] and the period of deficiency [days] (Ikebuchi, 2001).

Evaluation of the infectious risk

Pathogen and dose-response model. Rotavirus is employed for the evaluation of infectious risk in the wastewater reclamation. The infectious risk caused by rotavirus is evaluated with dose-response model

proposed by Rose and Gerba (1991).

Assumptions for the evaluation of infectious risk. The concentration of rotavirus is assumed to be 50,000 times lower than that of total coliforms (Kaneko, 1997). The concentration of total coliforms in the river is predicted on the basis of the river discharge with the marix of probability (Watanabe *et al.*, 2003). Infected persons excrete rotavirus at the concentration of 10^6 PFU/g of feces for 30 days (Kaneko, 1997). The concentration of rotavirus in the wastewater is calculated from the number of infected persons and the discharge volume of wastewater (360 L/d/person). Ninety percents of rotavirus in the wastewater are removed by primary and secondary wastewater treatments (Kaneko, 1997). Moreover, 99.9% of rotavirus in the secondary effluent is inactivated by the chlorine disinfection (Vaughn *et al.*, 1986). The viral concentration in the drinking water source is calculated from those in the reclaimed wastewater and the river water. The removal efficiency of rotavirus by the conventional water treatment ranges from 1.7 to 2.9 log (Watanabe *et al.*, 2003). The inactivation efficiency of rotavirus in the drinking water by the chlorine disinfection after the water treatment is assumed to be 3log (Vaughn *et al.*, 1986).

Relative sensitivity to the infection. Figure 1 shows the relative sensitivity for Japanese to intestinal infectious diseases caused by pathogens including rotavirus (Watanabe *et al.*, 1999). The sensitivity for infants and children between 0 and 4 years old is quite higher than those for any other age groups. The sensitivity is considered in the evaluation of infectious risk (Watanabe *et al.*, 1999).

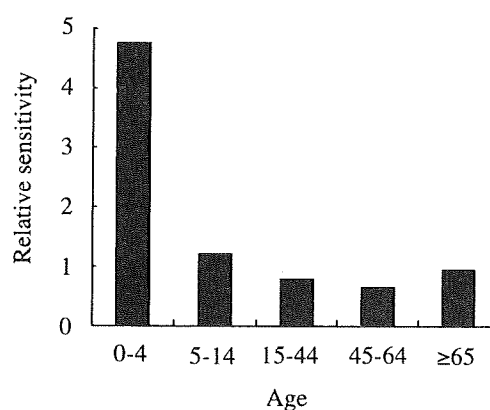


Figure 1. Relative sensitivity to intestinal infectious diseases for Japanese.

Evaluation of the cancer risk

Assumptions for the evaluation of cancer risk. Trihalomethanes (THMs) consisting of chloroform, bromodichloromethane (BDCM), dibromochloromethane (DBCM) and bromoform are employed as disinfection by-products causing cancer risk. Since it is known that THMs cause cancer in liver, the risk for the liver cancer is evaluated. The concentrations of THMs in the drinking water are calculated from THMs production capacities in the reclaimed wastewater and the river water. When the secondary effluent without disinfection in the wastewater treatment is reclaimed, THMs production capacity in the reclaimed wastewater is 333.0 $\mu\text{g/L}$ (Table 1). On the other hand, if the reclaimed secondary effluent is disinfected in the wastewater treatment, the THMs production capacity is assumed to be 113.8 $\mu\text{g/L}$ considering the volatilization of THMs during the storage of the wastewater before its reclamation. The THMs production capacity in the river water is determined with Monte Carlo method based on the observed data which is well-expressed by the lognormal distribution with the average of 107 $\mu\text{g/L}$. Moreover, it is assumed that 30% of THMs production capacity is reduced in the conventional water treatment process (Tambo, 1983).

Table 1. THMs production capacity in the secondary effluent [$\mu\text{g/L}$].

	Chloroform	BDCM	DBCM	Bromoform	Total THMs
With volatilization	47.1	37.5	24.1	5.1	113.8
Without volatilization	112.7	131.0	74.3	15.1	333.0

Calculation of cancer risk. According to Integrated Risk Information System (IRIS) published online by the U.S. EPA, cancer risks for lifetime exposure (70 years) to THMs except chloroform can be evaluated from the concentration in the drinking water with the slope factor. In case of chloroform, the U.S.EPA estimated the reference dose of 0.01mg/kg/d as a daily exposure that is likely to be without an appreciable risk of deleterious effects during a lifetime. If the person with the weight of 50 kg drinks 2 L of the water every day, the concentration in the drinking water should be lower than 0.25mg/L. The cancer risk for chloroform is evaluated on the basis of the occurrence probability of the concentration higher than 0.25mg/L.

Relative sensitivity to liver cancer. Figure 2 shows the relative sensitivity to the liver cancer for each age group. This sensitivity is calculated on the basis of the cases of liver cancer reported by Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan. Unlike the sensitivity to the infection (Figure 1), senior people have the high sensitivity to the liver cancer. This sensitivity is considered in the evaluation of cancer risk in the same manner as the evaluation of infectious risk.

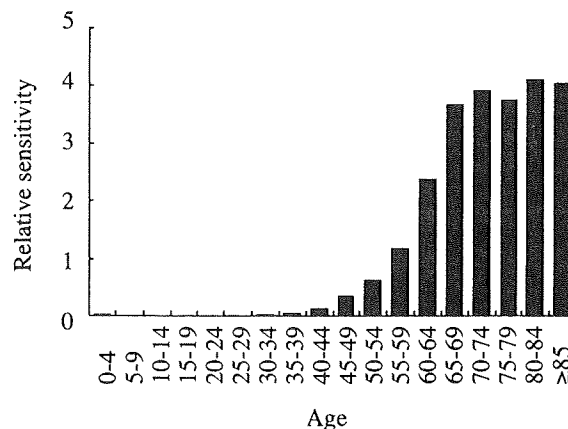


Figure 2. Relative sensitivity to liver cancer for Japanese.

Evaluation of health risks by the DALY

What is DALY? The Disability-Adjusted Life Years (DALY) is the sum of the Years of Life Lost (YLL) and the Years Lived with a Disability (YLD). The YLL indicating the lifetime lost by the fatal disease can be calculated on the basis of the life expectancy reported by Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan. The disability caused by fatal or nonfatal disease is quantified with the YLD by decreasing the lifetime according to its severity proposed by Murrey and Lopez (1996).

Calculation of the DALY based on the infectious risk. It was reported by Gerba *et al.* (1996) that 60% of persons infected by rotavirus would be asymptomatic. The DALY is calculated only for symptomatic persons. Since Gerba *et al.* (1996) proposed 0.01% as the fatality ratio for rotavirus infection, the YLL for the infection is negligible. Symptomatic persons will suffer from the diarrhea for seven days (Gerba *et al.*, 1996). Since this duration of disability is quite lower than that for cancer, both of the time discounting rate and the age-weighting factor are not considered in the calculation of YLD. Number of symptomatic persons in an age group is calculated as the product of three valuables of the infectious risk, the relative sensitivity to intestinal infectious disease (Figure 1) and the population in the age group. The DALY lost by rotavirus infection is calculated by multiplying the YLD and total number of symptomatic persons.

Calculation of the DALY based on the cancer risk. The fatality rate for liver cancer was estimated as 84% from numbers of patients and deaths reported by the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan. Based on this fatality rate and the survival data observed in a Japanese hospital, the death rate (P_i) for liver cancer in the i th year after the medical treatment is calculated as shown in Figure 3. The symptom of liver cancer develops, the medical treatment is performed at the age of a , and then the expectation of DALY ($DALY_i$) lost by liver cancer for the individual (Figure 4) is calculated as by the following formula:

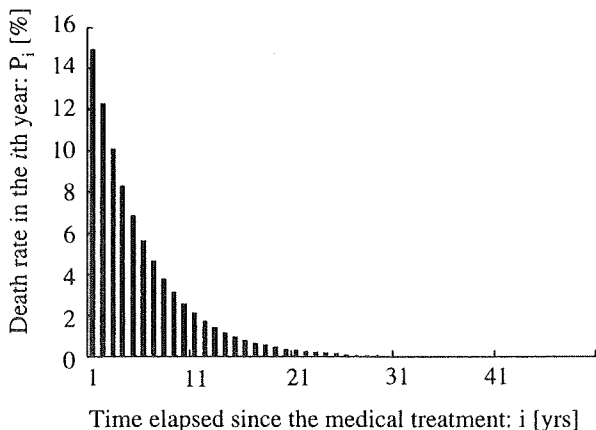


Figure 3. Death rate in the i th year after the medical treatment for liver cancer.

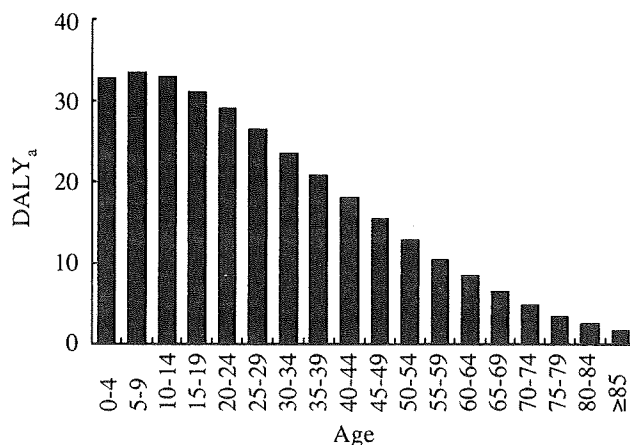


Figure 4. Expectation of DALY ($DALY_a$) lost by liver cancer for the individual.

$$DALY_a = \sum_i P_i (YLL_i + YLD_i) \tag{1}$$

where, YLL_i is the YLL for the death at the age of $a+i$ and YLD_i is the YLD during i years. The DALY lost by the liver cancer for the population is obtained by totalizing products of four valuables of the cancer risk, the relative sensitivity to liver cancer (Figure 2), the population and $DALY_a$ for all age groups.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Health risks of infection and cancer in the wastewater reclamation

Infectious risk in the wastewater reclamation. Figure 5(a) shows the annual infectious risk in reclaiming the secondary effluent without disinfection. When the secondary effluent was not reclaimed, that is in

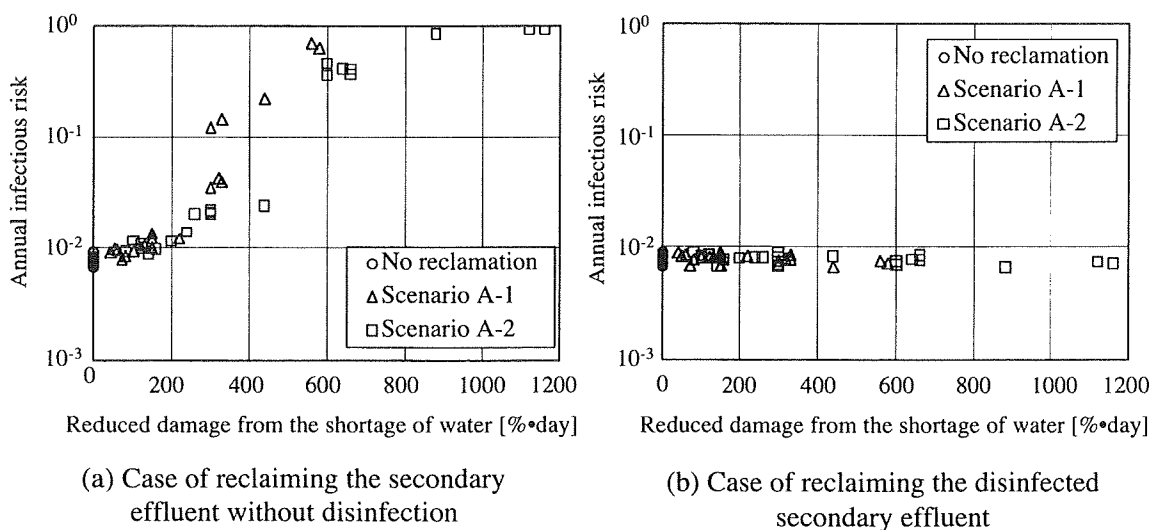


Figure 5. Relationship between the annual infectious risk caused by rotavirus and the reduced damage from the shortage of water in the wastewater reclamation.

the current situation of water utilization, the infectious risk ranged from 6.0×10^{-3} to 1.0×10^{-2} . This infectious risk is higher than that (about 1.0×10^{-3}) generally reported (Kaneko, 1996). One of reasons for this high risk is that the actual dosage of drinking water may be lower than 2L. Another reasons is that rotavirus has the higher capacity of infection than any other viruses (e.g., poliovirus, coksackie virus, adenovirus). When the reduced damage from the shortage of water was over 200%•day, the infectious risk drastically increased. If the reduced damage was over 1000%•day, almost of all individuals was infected by rotavirus. Figure 5(b) shows the annual infectious risk in reclaiming the disinfected secondary effluent. In this case, the infectious risk did not increase regardless of the reduced damage from the shortage of water. It became obvious that the reclamation of the secondary effluent disinfected with chlorine brought no increase of infectious risk caused by rotavirus.

Cancer risk in the wastewater reclamation. Figure 6 illustrates the annual risk of cancer caused by chloroform in reclaiming the disinfected secondary effluent. The cancer risk was almost constant regardless of the reduced damage from the shortage of water. Annual cancer risks caused by other THMs were also constant. The average risk of cancer caused by chloroform (3.2×10^{-6}) was higher than those for other three substances (BDCM: 6.3×10^{-7} , DBCM: 6.8×10^{-7} , bromoform: 7.7×10^{-8}). When the secondary effluent without disinfection was reclaimed, the cancer risk was almost the same as that shown in Figure 6.

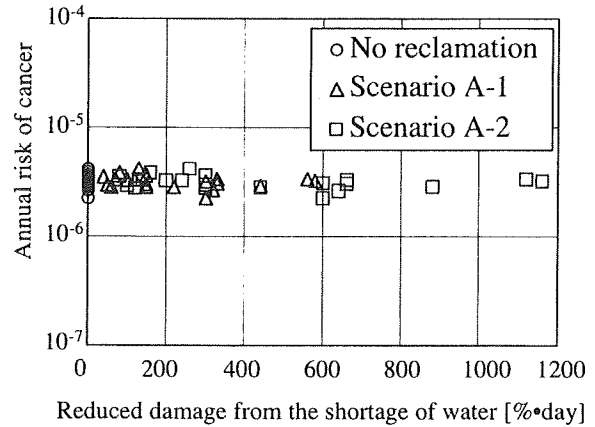


Figure 6. Relationship between the annual risk of liver cancer caused by chloroform and the reduced damage from the shortage of water in reclaiming the disinfected secondary effluent.

Evaluation of the wastewater reclamation with the DALY

DALY lost by rotavirus infection. Figure 7(a) shows the DALY lost by rotavirus infection for total

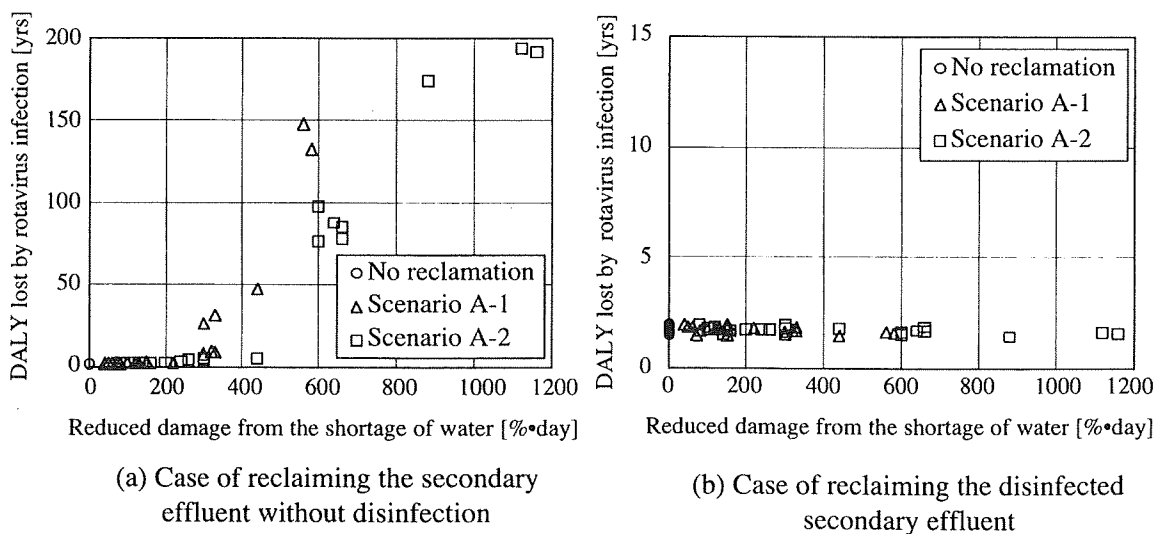


Figure 7. Relationship between the DALY lost by rotavirus infection for total population and the reduced damage from the shortage of water in the wastewater reclamation.

population (0.3 million) when the secondary effluent without disinfection was reclaimed. The maximum DALY for total population was 194 years. In this case, The DALY for each individual was estimated as 5 hours and 40 minutes. In case of no reclamation, DALYs for total population and each individual were 1.7 years and 3 minutes, respectively. Therefore, more than 190 years of lifetime in Fukushima city would be lost by the wastewater reclamation. Figure 7(b) shows the DALY lost by rotavirus infection for total population in reclaiming the disinfected secondary effluent. The DALY in this case was the same as that in case of no reclamation.

DALY lost by cancer. Figure 8 illustrates the DALY lost by liver cancer in reclaiming the disinfected secondary effluent. Since the cancer risk did not increase in the wastewater reclamation as shown in Figure 6, the DALY lost by liver cancer was also constant (9.2 years). The similar result was obtained in case of reclaiming the secondary effluent without disinfection.

Comparison of the DALY lost by infection with that lost by cancer. Figure 9(a) illustrates the comparison of the DALY lost by rotavirus infection with that lost by liver cancer for total population in reclaiming the secondary effluent without disinfection. The sum of these two DALYs is also illustrated in this figure. When the damage from the shortage of water between 0 and 300%·day was reduced, the sum of DALYs was constant (about 11 years). On the other hand, if the reduced damage was over 300%·day, the sum drastically increased corresponding to the increase of DALY lost by infection. Figure 9(b) shows DALYs lost by cancer and infection in reclaiming the disinfected secondary effluent. In this case, the maximum damage of 1200 %·day could be reduced by its reclamation without any increase of DALY. Therefore, if 99.9% of rotavirus in the secondary effluent is inactivated by chlorine disinfection, the same health risks as that in

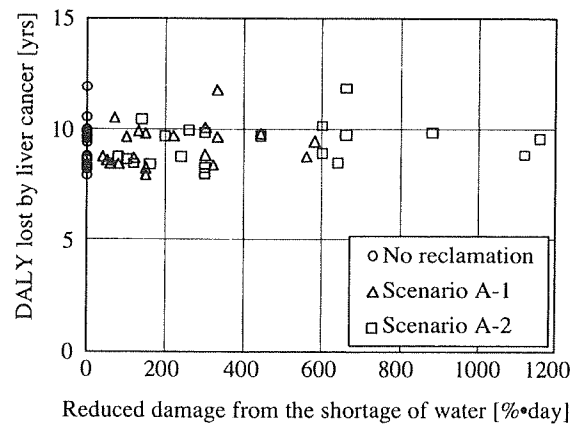


Figure 8. Relationship between the DALY lost by liver cancer for total population and the reduced damage from the shortage of water in reclaiming the disinfected secondary effluent.

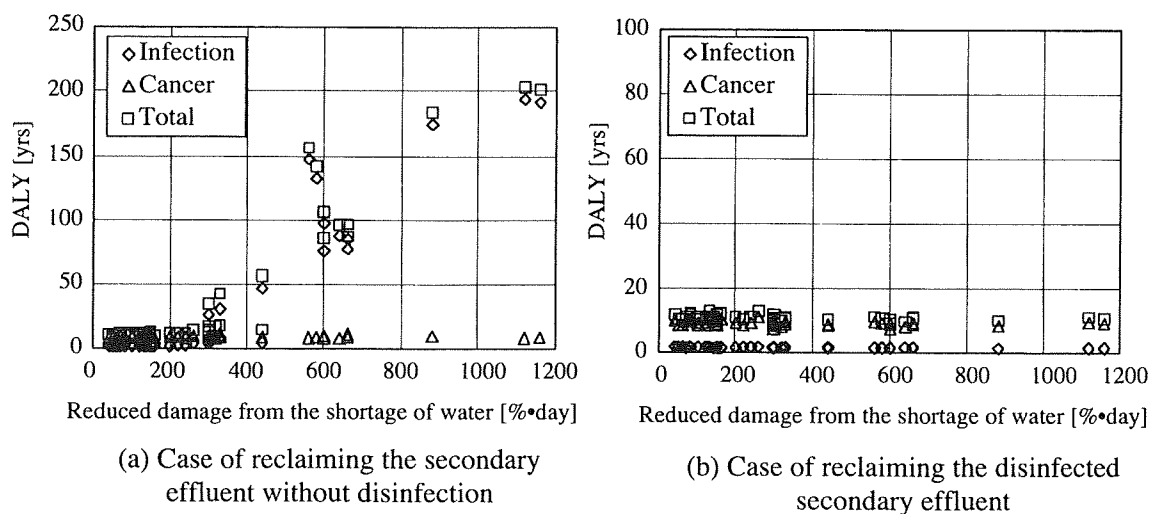


Figure 9. Comparison of the DALY lost by rotavirus infection with that lost by liver cancer for total population in the wastewater reclamation.