

200500659B

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（クリプトスポリジウム症等  
感染リスクの評価手法の確立に関する研究）

平成15～17年度 総合研究報告書

平成18年3月

主任研究者 国包章一（国立保健医療科学院）

## 目 次

研究班の構成	1
I. 総括研究報告書	3
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（クリプトスポリジウム症等感染リスクの評価手法の確立に関する研究）	
	国包章一
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	15
III. 研究成果の刊行物・別刷	25

## 研 究 班 の 構 成

### 主任研究者\*

国立保健医療科学院水道工学部長

国 包 章 一

### 分担研究者\*

国立保健医療科学院水道工学部室長

秋 葉 道 宏

金沢大学医学系研究科客員教授

井 関 基 弘

国立感染症研究所寄生動物部長

遠 藤 卓 郎

東北大学大学院工学研究科教授

大 村 達 夫

東京大学大学院工学系研究科講師

片 山 浩 之

立命館大学理工学部客員教授

金 子 光 美

神奈川県立衛生研究所微生物部主任研究員

黒 木 俊 郎

麻布大学環境保健学部教授

平 田 強

北海道大学創成科学研究機構特任教授

眞 柄 泰 基

### 研究協力者\*

大阪市立環境科学研究所

阿 部 仁 一 郎

国立感染症研究所寄生動物部

泉 山 信 司

岩手大学農学部

板 垣 匡

麻布大学獣医学部

宇 根 有 美

麻布大学獣医学部獣医学科

加 藤 行 男

弘前大学農学生命科学部

黒 尾 正 樹

兵庫県立健康環境科学研究センター

辻 英 高

金沢大学医学系研究科

所 正 治

日本蛇族学術研究所

鳥 羽 通 久

阿南工業高等専門学校

橋 本 温

東京農工大学農学部

林 谷 秀 樹

国立感染症研究所寄生動物部

八木田 健 司

東京大学大学院工学系研究科

眞 砂 佳 史

神奈川県立衛生研究所

三 宅 芳 枝

鳥取大学獣医学科

村 瀬 俊 之

日本蛇族学術研究所

森 口 一

京都大学大学院理学研究科

森 哲

麻布大学環境保健学部

森 田 重 光

日本獣医畜産大学獣医学部

本 籙 良

国立保健医療科学院水道工学部

李 華 芳

東北大学大学院工学研究科

渡 部 徹

\*主任研究者、分担研究者及び研究協力者の所属等は、最後に本研究を担当した当時のものである。

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（クリプトスポリジウム症等  
感染リスクの評価手法の確立に関する研究）

平成15～17年度 総括研究報告書

平成18年3月

主任研究者 国包章一（国立保健医療科学院）

## 総括研究報告書

### 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 (クリプトスポリジウム症等感染リスクの評価手法の確立に関する研究)

主任研究者 国包 章一 国立保健医療科学院水道工学部 部長

**研究要旨** クリプトスポリジウムの検出・同定のための新たな分子生物学的な手法を開発し、これらの手法などを用いて、水道水の汚染によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染リスクに関して、汚染源からヒトの感染に至るまでの主要なプロセスにつき、フィールド調査を主体として総合的な観点から実証的な検討を行った。この結果、クリプトスポリジウムの汚染源として、ヒトや身近な動物が重要であることがわかった。水道水源河川におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度レベルは、降雨のほか、畜舎排水や生活排水による負荷によって大きく変動することが示された。また、クリプトスポリジウムの感染リスクを評価するにあたっては、種や遺伝子型を考慮することが重要であることを明らかにした。これらの研究成果により、クリプトスポリジウム及びジアルジア感染リスクに関して、従来よりもはるかに正確なリスク評価が可能になった。

分担研究者	秋葉 道宏	国立保健医療科学院水道工学部 室長
	井関 基弘	金沢大学医学系研究科 客員教授
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部 部長
	大村 達夫	東北大学大学院工学研究科 教授
	片山 浩之	東京大学大学院工学系研究科 講師
	金子 光美	立命館大学理工学部 客員教授
	黒木 俊郎	神奈川県立衛生研究所微生物部 主任研究員
	平田 強	麻布大学環境保健学部 教授
	眞柄 泰基	北海道大学創成科学研究機構 特任教授

#### A. 研究目的

水道水を介したクリプトスポリジウム感染症の集団発生は、国内外を問わず、世界各地で問題となっている。世界保健機関（WHO）では、クリプトスポリジウムを含む病原微生物による感染症は、水道水に関係する最も普遍的で広範囲にみられる健康リスクであるととらえ、ヒトや動物が排泄する糞便が主たる汚染源であるとしている。このような状況の中、水道水の健康リスクを低減し、安全性を確保するためには、クリプトスポリジウム等感染症リスク評価手法を確立することが急務となっている。本研究では、水

水道のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスクの評価手法を確立するため、クリプトスポリジウム等の分子疫学的情報に関するデータベースを構築して、水道原水の汚染状況の的確な評価、水道水の汚染状況と関連づけた感染リスク評価に係る情報を提供し、これをもって水道水の安全確保と国民の健康増進に貢献するものである。

## B. 研究方法

### 1. ヒト等のクリプトスポリジウム及びジアルジアの感染実態の調査と遺伝子解析

#### 1) ヒト

感染症週報（厚生労働省／国立感染症研究所）に掲載された全国の届出患者数を参考に、国内における 2003～2005 年のクリプトスポリジウム及びジアルジアの感染実態を把握した。2004 年夏に長野県内のスポーツ施設でクリプトスポリジウム症の集団発生が見られたことから、水道施設（水源の井戸水等）、スポーツ施設内の浴場（排水管のヘアークャッチャー内の残渣）、プール（排水溝の沈殿物、ろ過装置のろ過砂）、下痢を発症した施設利用者による糞便汚染があったとみられる地点の足拭きマットの検査を実施し、感染経路等につき検討した。感染患者から分離された株についても、種の同定と遺伝子型解析を行った。また、国内医療機関等より下痢症患者の糞便試料を入手し、遺伝子型、**subgenotype** の解析を行った。ジアルジア症患者から分離した株についても遺伝子型の解析を行った。

#### 2) 水道水源周辺環境等に生息する動物及び国内外ペット動物

哺乳類（国内の野外に生息するニホンジカ 11 頭、国内 2 カ所の動物園で飼育されているニホンザル 49 頭、海外からペットとして輸入されたアフリカヤマネコ 10 頭、アフリカチビネズミ 20 頭、アメリカアカリス 19 頭、アメリカモモンガ 10 頭、アレチネズミ 8 頭、エゾリス 20 頭、オオエジプトアレチネズミ 10 頭、オオミユビトビネズミ 16 頭、カイロトゲマウス 31 頭、キンイロスパイニーマウス 13 頭、コロンビアジリス 30 頭、シナイスナネズミ 4 頭、シマリス 45 頭、ジュウサンセンジリス 10 頭、ゼブラマウス 11 頭、タイリクモモンガ 26 頭、ダウリアハタリス 10 頭、デグー 27 頭、デブスナネズミ 9 頭、ババナリス 30 頭、フトオアレチネズミ 5 頭、ピグミージェルボア 69 頭、ヒメミユビトビネズミ 8 頭、フサオジャービル 10 頭、フトオアレチネズミ 10 頭、ミミナガハリネズミ 10 頭、リチャードソンジリス 40 頭）、爬虫類（国内の野外に生息するカメ類ミシシッピーアカミミガメ 1 匹、トカゲ類ニホントカゲ 14 匹、ニホンカナヘビ 8 匹、ニホンヤモリ 2 匹、ヘビ類アオダイショウ 47 匹、シマヘビ 166 匹、ヤマカガシ 106 匹、マムシ 7 匹、ジムグリ 5 匹、ベトナムで入手したニシクイガメ 32 匹、トッケイヤモリ 3 匹、サンビームヘビ 19 匹、オオミズヘビ 15 匹、ヒロクチミズヘビ 22 匹）、鳥類（水道水源の周辺環境に生息するカラス 14 羽、カワウ 11 羽、スズメ 53 羽、関東の傷病動物等収容施設 2 カ所に収容された 15 目 33 科 85 種の鳥計 444 検体）、魚類（水道水源の周辺に生息するコイ 7 匹）の糞便、腸管内容物中のクリプトスポリジウム、ジアルジア（両者、あるいはどちらか一方）を検査し、感染状況を評

価した。また、クリプトスポリジウム、ジアルジアの検出が確認された糞便、腸管内容物の一部については、遺伝子型の解析を行った。

このほか、金沢市内のペットショップで市販されているオカメインコ、フェレット及び大阪市内で保護されたタヌキ、青森県の動物病院を受診したイヌ、ネコ、ウシ、6ヶ所のイヌ繁殖施設で飼育されているイヌ及び下北半島の野生のニホンザルから分離したクリプトスポリジウム、あるいはジアルジア株の遺伝子解析を行い、ヒトへの感染源としての重要性につき検討した。

## 2. 水道水経路による曝露量の評価

### 1) クリプトスポリジウム集団感染に見られる特徴

わが国で発生したクリプトスポリジウムによる大規模集団感染事例3例（1994年平塚市雑居ビルでの水系感染、1996年越生町の町営水道を介した感染、2002年兵庫県高校生の北海道旅行での罹患例）について、文献調査（報告書など）、関係者への聞き取り調査を行い、集団感染が発生する以前に認められた散発下痢症患者について検討した。これを前兆現象と位置づけて、発症者数から原水あるいは飲料水中のオーシスト濃度を推定した。すなわち、発症者数、調査母数、発生した期間から一日あたりの発症割合を求めた。これにオーシストと発症確率の関係である、1オーシストあたり9%の発症確率（EPA、2003）を用いて浄水中のオーシスト濃度を逆算した。一日毎の発症者数など、実数が掲載されていない値については報告書のグラフから数値を読み取った。3つの大規模集団感染の特徴を明らかにすることで、耐塩素性病原微生物の対策、そのあるべき検査システムについて模索した。

### 2) 単離したクリプトスポリジウム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並びに相模川水系における汚染実態の把握

環境水中のクリプトスポリジウムオーシスト濃度が低い場合でも、遺伝子型の解析を可能とする試験方法を開発し、河川水、下水、養豚排水処理水の遺伝子型濃度分布を明らかにした。本研究で開発した試験方法は、試料水をPercoll蔗糖密度勾配遠心法により選択濃縮を行い、選択分離としては免疫磁気ビーズを使用し、個々のオーシストを蛍光顕微鏡下でガラスキャピラリーにより個々のオーシストを単離した。なお、一次濃縮は、モジュールによる濃縮（河川水の場合）又は遠心濃縮（下水の場合）により行った。遺伝子型別試験方法は、18S rRNAを対象に、プライマーDIAGF-1/DIAGRとDIAGF-1/DIAGR-1を用いたsemi-nested PCR-ダイレクトシーケンス法とした。陽性コントロールは*Cryptosporidium parvum* HNJ-1株とした。

また、相模川水系の支流並びに排水路（吐口）のクリプトスポリジウムの負荷量を明らかにするため、相模川の最下流に位置する水道原水取水地点（寒川町宮山）を基点に、その上流側にあつて常時水が流入している支流3川（中津川、小鮎川、玉川）と、相模川本川に流入している排水路（吐口）7箇所を選び、クリプトスポリジウム濃度、流量（流量データは、吐口については実測、本川及び支流の流量については国土交通省等公的機関か

ら入手したものをを用いた)を測定した。

### 3) 水道水中のクリプトスポリジウムによる感染リスクの評価

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った。

調査地点として、利根川利根大堰付近並びにその支流である小山川高橋付近を選定した。利根川利根大堰付近には、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った。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、高さ約25cm)でろ過した後、濁質成分を回収し、ろ液は排水口より廃棄する装置である。また同時に1L程度の河川水を採取し、その水試料は冷却装置によって冷蔵保存されるようになっている。この装置を用いた試料採取法の確立を行った。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。採取した試料は、QP-PCR法を用いてクリプトスポリジウムの定量と遺伝子型の判定を行った。

既存のクリプトスポリジウムの浄化残率のデータ、およびそこで実測されているクリプトスポリジウムの定量データを用いて、クリプトスポリジウムの濃度分布の決定方法の評価を行った。さらに、評価された手法を用いて、利根川河川水中のクリプトスポリジウムの現地調査結果から、リスクを計算した。

### 4) 河川流域におけるクリプトスポリジウム感染症のリスク評価

#### ①流域の地理情報にもとづいた水道水源(河川)における病原微生物濃度の予測

阿武隈川流域を対象に、地理情報(人口、年齢構成、土地利用等)から、病原微生物の発生と挙動を予測するためのモデルを開発した。国土数値情報(国土交通省提供)から、標高・傾斜度メッシュと土地利用メッシュを利用し、3次メッシュ(総メッシュ数6,000)で解析を行った。負荷源として、阿武隈川中流域に位置する下水処理場を取り上げ、ここから常に1個/Lの濃度でクリプトスポリジウムが排出されているケースを仮定した。この放流水濃度の仮定は、処理人口15.2万人の中におおよそ5名の感染者がいるケースに相当する。河川水中でのクリプトスポリジウムの不活化は無視する。これらの仮定のもとで、河川水中のクリプトスポリジウム濃度を、処理水放流点から約40km下流の地点(福島市の水道原水取水点)で評価した。

#### ②河川および内湾底泥中のクリプトスポリジウム存在量調査

河川水中でのクリプトスポリジウムの挙動を正確に予測するためには、河川底泥に存在するオーシスト量を把握する必要がある。そこで、2005年10月から2006年2月までの5ヶ月間に、松島湾を対象として、湾内5地点および流入河川である高城川3地点で採取した底泥0.5gからDNAを直接抽出し、QProbe PCR法によりクリプトスポリジウムの検出と定量を行った。一部の調査時には河川水20Lも採取し、そのクリプトスポリジウム濃度を測定した。



### ③下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染症のリスク評価

下水処理水を受容した河川水を水道水源として利用する水利用システムは、下水処理水を水道水源の一部として再利用するケースに類似している。そこで、阿武隈川を対象として、下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染症のリスクを評価した。感染症のリスクは、流量が  $25\text{m}^3/\text{s}$  以下となる渇水日に河川からの取水が制限され、水道原水の不足を補うために下水処理水を再利用するシナリオのもとで評価された。河川水中のオーシスト濃度は、大腸菌群数の 100 万分の 1 あるいは 500 万分の 1 と仮定し、リスク算出のための用量-反応モデルには指数モデルを用いた。感染リスクと同時に、消毒副生成物トリハロメタンによる発ガンのリスクも評価した。具体的には、1 日ごとの水道水中 THM 濃度から年間総曝露量を算出し、U.S.EPA が提案する Slope Factor を用いて発ガンリスクを算出した。最後に、健康被害の指標である DALY（障害調整生存年）を用いて、感染リスクと発ガンリスクの比較を行った。

#### （倫理面での配慮）

ヒト等の糞便試料を用いて遺伝子型解析を行ったが、試料提供者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されるような情報は公表しない等、試料提供者の不利益を与えないように十分に配慮した。

## C. 研究成果及び考察

### 1. ヒト等のクリプトスポリジウム及びジアルジアの感染実態の調査と遺伝子解析

#### 1) ヒト

2003～2005 年のクリプトスポリジウム症及びジアルジア症の届出患者数は、2003 年がクリプトスポリジウム症 8 例、ジアルジア症 99 例、2004 年がクリプトスポリジウム症 91 例、ジアルジア症 84 例、2005 年がクリプトスポリジウム症 9 例、ジアルジア症 80 例であった。2004 年のクリプトスポリジウム症の届出患者数が多いのは、長野県内スポーツ施設利用者で集団感染が発生したことによる。この集団感染事例の現地調査を実施したところ、下痢を発症した施設利用者による糞便汚染があったとみられる体育館の足拭きマット等からクリプトスポリジウムが検出されたことから、施設利用者間での感染があった可能性が示唆された。患者から分離した原虫は、*Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) ヒト型であった。この集団感染事例も含め、国内における集団感染及び散発事例は、いずれも *C. parvum* ヒト型であった。国内の下痢症患者から分離したクリプトスポリジウムの *subgenotype* は、*C. hominis* 3 株が Ia、Ib、Ie、*C. parvum* bovine genotype 2 株がいずれも II a であった。また、先天性免疫不全症の慢性下痢症患者 2 例からクリプトスポリジウムが検出された。1 例は *C. hominis* であったが、他の 1 例は *C. hominis* と *C. parvum* bovine genotype の二つの遺伝子型が検出された。ヒトから分離したジアルジア 17 株は、14 株が人畜共通感染性の Assemblage A-I、2 株がヒトのみに感染するとされる Assemblage A-II であり、4 株が人畜共

通感染性の Assemblage B であった。

## 2) 水道水源周辺環境等に生息する動物及び国内外ペット動物

クリプトスポリジウムが検出されたのは、海外からペットとして輸入された哺乳類（アメリカアカリス 11/19、アメリカモモンガ 5/10、エゾリス 5/20、オオエジプトアレチネズミ 4/10、カイロトゲマウス 6/31、コロンビアジリス 7/30、シマリス 11/45、デグー4/27、デブスナネズミ 2/9、ババナリス 12/30、フサオジャービル 2/10、ミミナガハリネズミ 1/10、リチャードソンジリス 2/40）、国内の野外に生息するへび類（ヤマカガシ 13/106）、ベトナムで入手した爬虫類（ニシクイガメ 1/32、サンビームヘビ 1/119）、水道水源の周辺に生息する鳥類（キジバト 2/35、ドバト 1/42、スズメ 1/22、ヒヨドリ 1/16）であった。ヤマカガシの遺伝子型（18S rRNA の塩基配列）を解析すると、*Cryptosporidium* sp.938 であり、平成 13 年兵庫県山崎町の簡易水道の汚染事例で分離されたクリプトスポリジウムの遺伝子型と一致した。このことから、この簡易水道の汚染事例の汚染源はヤマカガシであることが強く推察された。ベトナムで入手したニシクイガメ、サンビームヘビの遺伝子型はいずれも *C. serpentis* であった。キジバトとドバトから検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型は、いずれも *C. meleagridis* であり、これは国内外ではじめての検出例であった。金沢市内ペットショップで市販されているオカメインコから分離したクリプトスポリジウム 2 株は、*C. meleagridis* と *C. baileyi* であった。また、大阪市内で保護されたタヌキから検出されたクリプトスポリジウムの分離株の遺伝子型は *C. parvum* のウシ型であり、ヒトに感染性を有するものであった。

一方、ジアルジアが検出されたのは、海外からペットとして輸入された哺乳類（アメリカアカリス 13/19、エゾリス 1/20、オオミユビトビネズミ 3/16、カイロトゲマウス 9/31、コロンビアジリス 9/30、ジュウサンセンジリス 7/10、デグー27/27、リチャードソンジリス 11/40）であった。金沢市内ペットショップで市販されているフェレットから分離したジアルジア 1 株は Assemblage A-I であり、ヒトに感染性を有するものであった。青森県の動物病院を受診したイヌ及び繁殖施設で飼育されているイヌから検出されたジアルジアの多くは、Assemblage A-I であった。

## 2. 水道水経路による曝露量の評価

### 1) クリプトスポリジウム集団感染に見られる特徴

浄水中のオーシスト濃度は、飲水量を 1 L と仮定した場合、この間の浄水中には 0.01 ないし 0.02 個/L 程度のオーシストが存在していたものとの計算結果を得た。仮に、通常の浄水処理により、2 ないし 3-log の粒子除去が保証されていたものとする、その原水には 1 ～20 個/L 程度のオーシストが存在していたことになる。すなわち、この程度の原水汚染がある状況下で浄水処理の不備等が重なると集団感染へと発展する可能性があるといえる。換言すれば、この前兆現象ともいべき原水のオーシスト濃度の高まりを的確に把握するシステムが構築されれば、集団感染は未然に防ぐことができる事が示された。一方、浄水

処理に不備が生じなければわずかな患者が発生しつづける恐れも否定できず、この程度の原水濃度のクリプトスポリジウムが検出できる検査システムの構築が必須と考える。これまで、クリプトスポリジウム等による集団感染は予見不能な突然の汚染により引き起こされるものと説明されてきたが、当該研究が示すように予見が可能などの結論を得た意義は大きいと考えられた。

## 2) 単離したクリプトスポリジウム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並びに相模川水系における汚染実態の把握

本研究で検討した semi-nested PCR-ダイレクトシーケンス法は陽性コントロールとした用いた HNJ-1 株のオーシスト 1 個を確実に検出できることが明らかになった。この手法を用いて、下水、養豚排水処理水、水道原水取水点付近の河川水から単離したオーシストの遺伝子解析の成功率及び優占型別は、それぞれ約 50%、*C. parvum* genotype 1 (ヒト型)、約 60%、*C. parvum* pig genotype 1 or 2 (ブタ型)、46%、*C. parvum* genotype 1 (ヒト型) であった。

支流並びに吐口調査では、相模川本川に対するクリプトスポリジウム汚染負荷の大部分が 3 つの支流によるものであり、そのうち中津川と小鮎川の寄与度が大きく、この 2 つの支流で、本川へのクリプトスポリジウム負荷の 90% 程度を占めると推測された。河川水では、損傷したクリプトスポリジウムの存在率が下水に比べて高く、また同じ河川では下流に行くほど損傷したクリプトスポリジウムの比率が高くなる傾向が認められた。これは、河川における環境ストレスの影響と考えられた。

## 3) 水道水中のクリプトスポリジウムによる感染リスクの評価

QP-PCR 法の開発において、さまざまな実験条件を試みた結果、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。Nested PCR 法によるクリプトスポリジウム検出の結果、利根大堰の 94 試料中 33 試料（陽性率 35%）、小山川の 18 試料中 12 試料（同 67%）からクリプトスポリジウムが検出された。検出された全ての試料を DGGE-Sequencing に供した結果、利根大堰、小山川合わせて、12 種類の種・遺伝子型 (*C. parvum* IOWA (AF164102)、*C. parvum* KSU-1 (AF308600)、*C. hominis* (AY204231)、*C. andersoni* (AB089285)、*C. felis* (AF159113)、*C. baileyi* (L19068)、*C. sp.* 944 (AY382170)、*C. sp.* 938 (AY120913)、*C. sp.* PG1-26 (AY204231)、*C. sp.* PG1-26 の近縁種、*C. sp.* 6876 (AY504514) の近縁種、*C. sp.* 1665 (AY120915) の近縁種) が検出された。両河川ともに、最も頻繁に見られたのは *C. andersoni* (利根大堰 17 試料、小山川 7 試料) であった。利根大堰では、以下 *C. parvum* IOWA isolate (13 試料)、*C. baileyi* (9 試料) の順となった。一方、小山川では、*C. sp.* strain 938 (4 試料)、*C. parvum* IOWA isolate (3 試料) の順となり、利根大堰で頻繁に見られた *C. baileyi* は検出されなかった。ヒトに特異的に感染する *C. hominis* は、小山川の 1 試料のみから検出された。両河川から検出された種・遺伝子型は、検出頻度の低い種・遺伝子型に多少違いが見られたものの、それほど差は見られなかった。ヒトへの感染が報告されている種・遺伝子型の中では、*C. parvum* IOWA 株 (AF164102)、*C. parvum* KSU-1 株 (AF308600)、*C. hominis* (AY204231)、*C. felis* (AF159113) の 3 種・4 遺伝子

型が検出された。クリプトスポリジウムが検出された試料の中で、これらの種・遺伝子型を含んでいたのは、利根大堰の試料で16% (94 試料中 15 試料)、小山川の試料では22% (18 試料中 4 試料) であった。

クリプトスポリジウム濃度は、12月～8月ではおおよそ1 [oocysts/100L]以下であったのに対し、10月、11月は $10^1$  [oocysts/100L]オーダーであり、他の月と比較して十～数十倍程度濃度が高かった。一ヶ月の中の1日だけの値を用いて議論しているため、必ずしも今回の定量結果がそれぞれの月を代表しているとはいえないが、9～11月の3回連続して濃度が高い傾向が見られたことから、クリプトスポリジウムは、秋に高濃度で存在する可能性が高いといえる。降雨によって引き起こされる時間レベルの濃度変動に着目すると、雨天時に採取した2回(5月、6月)のデータを見ると、降雨に伴い濁度が上昇しているときに、クリプトスポリジウムが検出される傾向が見て取れた。この結果は、これまで疫学調査等で得られていた知見の証左となると思われる。ヒトへの感染性が報告されている種・遺伝子型の検出は、*C. parvum* IOWA isolate が4～9月、*C. parvum* KSU-lisolate が4～6月に検出されたが、他の季節には全く検出されなかった。

利根川河川水を原水とする浄水場を仮想し、その浄水場で処理された浄水を飲用水として摂取することにより発生する、クリプトスポリジウム症の感染リスクをモンテカルロ法により評価した。その結果、感染リスクは、USEPA が推奨している $10^{-4}$ 以下という許容レベルを下回っていることがわかった。

#### 4) 河川流域におけるクリプトスポリジウム感染症のリスク評価

##### ①流域の地理情報にもとづいた水道水源(河川)における病原微生物濃度の予測

2001年の降水量データを用いて流出解析を行った結果、福島市における河川流量の実測値を(冬季を除き)再現することができた。ただし、今回の計算には降雪と融雪の作用が考慮されていないために、冬季には実測値に現れないピークが計算値で出現した。また、福島市における阿武隈川のクリプトスポリジウム濃度については、流量に応じて変化が見られるが、平均で0.01個/Lと算出された。同じ地点での河川水の大腸菌群数は、平均で4300MPN/100mLと報告されており、河川水中でクリプトスポリジウムは、大腸菌群数の約1/5,000,000も低い濃度で存在していた。

##### ②河川および内湾底泥中のクリプトスポリジウム存在量調査

クリプトスポリジウムは、河川底泥12試料中4試料(33%)、内湾底泥10試料中3試料(30%)から検出された。それぞれの最大濃度は、1660 oocysts/g、154 oocysts/gであった。一方、河川水試料(6試料)からはクリプトスポリジウムが全く検出されなかった。これにより、河川底泥の再懸濁により、河川水中のクリプトスポリジウム濃度が急激に上昇する可能性が示された。さらに、内湾の測定地点の中で、河口に近い地点の方が、遠い地点より高濃度であったことから、汚染源から排出されたクリプトスポリジウムが、河川を經由して内湾に移動する中で、拡散しながら沈降し、底泥に蓄積している可能性が示された。クリプトスポリジウム濃度と、そのほかの測定項目(抽出DNA濃度、河川水中の大腸菌群

数、糞便性大腸菌群数)との間には関連は見られなかった。

### ③下水処理水再利用に伴うクリプトスポリジウム感染症のリスク評価

河川水中のオーシスト濃度を大腸菌群数の 500 万分の 1 と仮定した場合には、再利用水量の増加（再利用水量が多いほど、渇水低減効果が大きい）による感染リスクの増加は見られなかった。一方、オーシスト濃度を大腸菌群数の 100 万分の 1 と仮定した場合には、渇水低減効果が 600%・day を超えると感染リスクの増加が見られた。クリプトスポリジウム感染症による DALY は 0.001～0.2 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。このことより、下水処理水再利用における健康被害を議論する場合には、クリプトスポリジウム感染症よりも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。

## D. 結論

水道水の汚染によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染リスクに関して、分子生物学的な手法などを用いることにより、汚染源であるヒト及び動物の感染状況、下水・畜産排水の汚染と河川における流出特性、水道水を通じた曝露と感染リスク等につき検討した結果、結論として以下のようなことが言える。

ここ数年、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の年間届出患者数は、それぞれ多くても 100 例に満たない。しかし、2004 年にも長野県で、水の汚染が原因で *Cryptosporidium parvum* ヒト型による 300 名弱の集団感染が起きている。このようなことから、特にクリプトスポリジウムについては潜在的な感染者が多数いて、散発的な感染が各所で起きていることが推察される。また、野生動物はさほどでもないが、ペットとして輸入されている動物は、種の違いを問わず広くしかも高い割合でクリプトスポリジウム及びジアルジアに感染している。これらの中には、ヒトに対して感染性を有するものも含まれている。このことから、ペットが、クリプトスポリジウム及びジアルジアのヒトへの重要な感染源として機能していることが推察される。なお、農家で飼育されているウシやブタが広くクリプトスポリジウムに感染していることは、本研究グループによる先の研究結果からすでに明らかである。

上記のようなヒト及び動物の感染状況を反映して、各地の河川では、濃度レベルはさほど高くないが、ヒトへの感染性を有するものを含めてクリプトスポリジウムが検出されている。このうち利根川の利根大堰における調査では、クリプトスポリジウム濃度の特異的な季節変化や降雨時におけるその濃度上昇が認められている。阿武隈川の調査で、河川底泥中におけるクリプトスポリジウムの蓄積が認められていることから、降雨時における濃度上昇は、底泥に含まれていたものの再懸濁による寄与が大きいと考えられる。しかしながら、底泥への蓄積や降雨流出の過程で、いずれの種も同じような挙動を示すのかあるいは相互に異なった挙動を示すのか、といったことについてはまだよくわかっていない。また、相模川水系における調査により、河川水では下水処理水に比べて損傷を受けたクリプ

トスポリジウムが多いこと、並びに、下水処理水ではヒト型、養豚排水ではブタ型のクリプトスポリジウムが多いことなどの知見は注目すべきである。

水道水を通じた曝露及び感染リスクに関しては、浄水処理による除去などが満足に行われている限り、1996年の埼玉県越生町での大規模集団感染のような事例が発生することはあり得ず、クリプトスポリジウムによる年間の感染リスクも一般に特に問題となるレベルではないと考えられる。ただ、内外の過去の集団感染事例を解析した結果によれば、事前に低レベルではあるが水道水の汚染がほぼ共通して認められており、このような低レベルのクリプトスポリジウムによる汚染を、感度良く監視できるシステムの構築が期待される。

以上が研究成果の要点であり、本研究で開発した semi-nested PCR-ダイレクトシーケンス法や QProbe-PCR 法を含め、分子生物学的な手法を駆使することによって、水道水の汚染によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染の機構について、その全容をほぼ解明することができた。さらに、このことによって、水道水の汚染によるクリプトスポリジウム及びジアルジア感染について、従来よりもはるかに正確なリスク評価が可能となった。今後は、汚染源からヒトの感染に至るまでの各プロセスに関してより詳細な検討を行い、リスク評価の定量性をさらに高めることが必要である。

#### **E. 健康危険情報**

なし

#### **F. 研究発表**

(別添参照)

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）**

##### **1. 特許所得**

なし

##### **2. 実用新案登録**

なし

##### **3. その他**

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 1. 発表論文

#### 平成17年度

- 1) Abe N, Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M : Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. Jpn J Infect Dis, 2006 (in press)
- 2) Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Lillehoj HS, Matsuda H, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, and Baba E : Cross-reactivities with *Cryptosporidium* spp. by chicken monoclonal antibodies that recognize avian *Eimeria* spp. Vet Parasitol, 128: 47-57, 2005.
- 3) T. Izumi, Y. Itoh, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama: Detection System of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator in River Water Arch Environ Contami Toxicol, 2006 (in press)
- 4) Tadashi Itagaki, Shisuka Kinoshita, Mikiko Aoki, Naoyuki Itoh, Hideharu Saeki, Naoto Sato, Junya Uetsuki, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Takuro Endo: Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. Veterinary Parasitology, 133, 283-287, 2005.
- 5) 真砂佳史, 小熊久美子・片山浩之・大垣眞一郎 : Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法による水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型判別手法の開発、環境工学研究論文集、42、591-600(2005)
- 6) T. Watanabe, K. Hashimoto, Y. Abe and T. Omura: Evaluation of Health Risks in the Wastewater Reclamation in the Abukuma Watershed, Japan. Journal of Water Environment Technology, 2006 (in press)
- 7) T. Watanabe, K. Hashimoto, Y. Abe and T. Omura: Evaluation of Health Risks in the Wastewater Reclamation in the Abukuma Watershed, Japan. Journal of Water Environment Technology, 2006(in press).

#### 平成16年度

- 1) Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, and Baba E : Identification of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. Vet Parasitol 129: 165:168 (2005).
- 2) Abe N, Read C, Thompson RCA, and Iseki M: Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. J Parasitol 91: 179-182(2005).
- 3) Abe N, Iseki M: Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol Res 92:523-6(2004)
- 4) Matsubayashi M, Abe N, Takami K, Kimata I, Iseki M, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, and Baba E: First record of *Cryptosporidium* infection in raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*



*viverrinus*). Vet Parasitol 120:271-5(2004)

- 5) 稲田康志、木俣勲、塩田貞光、石本和子、井関基弘：プロテインラベリング法で蛍光標識したクリプトスポリジウムオーシストのオーシスト検出検査および除去試験への適用。水道協会雑誌、73(6)：14-31(2004)
- 6) T. Izumi, Y. Itoh, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama.: Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator for *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Ricer Water. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 72:29-37, 2004.
- 7) Y. Masago, K. Oguma, H. Katayama, T. Hirata and S. Ohgaki: *Cryptosporidium* monitoring system at a water treatment plant based on waterborne risk assessment, Water Science and Technology, 51, Iss. 1, 293-299, 2004.
- 8) 真砂 佳史、小熊久美子、片山 浩之、大垣 眞一郎：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。環境工学研究論文集、41、311-319(2004)

#### 平成15年度

- 1) Abe N, Takami K, Kimata I, and Iseki M : Molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolates from a banded mongoose, *Mungos mungo*. J Parasitol 90(1): 167-171, 2004.
- 2) Y. Masago, K. Oguma, H. Katayama, T. Hirata and S. Ohgaki: *Cryptosporidium* monitoring system at a water treatment plant based on waterborne risk assessment, Water Science and Technology, 51, Iss. 1, 293-299, 2004.
- 3) Abe N, Kimata I, and Iseki M : Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci 65(1): 29-33, 2003.
- 4) Takashima Y, Xuan X, Kimata I, Iseki M, Kodama Y, Nagane N, Nagasawa H, Matsumoto Y, Mikami T, Otsuka H: Recombinant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) expressing p23 protein of *Cryptosporidium parvum* induces neutralizing antibodies in rabbit. J Parasitol 89: 276-282, 2003.
- 5) Abe N, Kimata I, and Iseki M : Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from ferrets in Japan. Parasitol Res 89:422-424, 2003.
- 6) 黒木俊郎、宇根有美、遠藤卓郎：爬虫類のクリプトスポリジウム感染、野生動物医学会誌、8(1): 27-34(2003)

#### 2. 著書・総説等

#### 平成17年度

- 1) 所正治、井関基弘：クリプトスポリジウム。日本臨床増刊号「血液・尿化学検査、免疫学的検査第6版」、日本臨床。大阪、256-258(2005)

- 2) 所正治、井関基弘：食を介する感染症 6. クリプトスポリジウム症. 化学療法の領域、21、517-521(2005)
- 3) 金子光美編、国包章一、遠藤卓郎、平田強、片山浩之：水道の病原微生物対策、丸善、東京、pp247(2006)
- 4) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司：いま、知っておきたい話題 クリプトスポリジウム症、日本醫事新報、No.4236、33-36(2005)
- 5) 黒木俊郎、泉山信司、遠藤卓郎：[話題の感染症] クリプトスポリジウムの最近の知見、モダンメディア、51(4)、75-80 (2005)
- 6) 黒木俊郎：これだけは知っておきたい国際感染症、水系感染症、Modern Physician 25(5):610-614 (2005)

#### 平成16年度

- 1) 井関基弘、所正治：クリプトスポリジウム症. 木村哲、喜田宏（編）「人獣共通感染症」医薬ジャーナル社. 大阪、321-439(2004)
- 7) 井関基弘：クリプトスポリジウム症. 「感染症の診断・治療ガイドライン2004」. 日本医師会、192-195(2004)
- 8) 井関基弘、所正治：クリプトスポリジウム症. 小児科、45：471-486(2004)
- 9) 所正治、井関基弘：飲料水からうつる寄生虫症. 治療、86：2715-2708(2004)
- 10) 吉川尚男、井関基弘：クリプトスポリジウムの特異な細胞内寄生様式について. 顕微鏡、39:48-52(2004)
- 11) 遠藤卓郎、黒木俊郎：クリプトスポリジウム・ジアルジア感染症 ―話題の疾患と治療. 感染・炎症・免疫 35(3)、77-79(2005)
- 12) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. <特集ヒトと動物の新興感染症> クリプトスポリジウム症、Medical Science Digest、31(1)、27-30(2005)
- 13) 遠藤卓郎、泉山信司：病原微生物対策への理解に向けて～Safe Drinking-Water for the Control of Microbial Hazards～、用水と廃水、46(7)、43-49(2004)
- 9) 遠藤卓郎、黒木俊郎、泉山信司. <話題の感染症>ジアルジア症 モダンメディア 50(4)、73-77(2004)
- 10) 遠藤卓郎、八木田健司. 第5章 総論および原虫類、食品衛生指針 微生物編 2004、518-534(2004)
- 11) T. Endo and Y. Morishima.: Major helminth zoonoses in water, in Waterborne Zoonoses (ed. WHO), pp.291-304, 2004 (IWA Publishing).
- 12) 黒木俊郎：クリプトスポリジウム-公衆衛生の観点から-. 臨床獣医、緑書房、28-31(2004)

#### 平成15年度

- 1) W.Koster, T.Egli, N.Ashbolt, K.Botzenhart, N.Burlion, T.Endo, P.Grimont, E.Guillot, C.Mobilat,

L.Newport, M.Niemi, P.Payment A.Prescott, P.Renaud and A.Rust. Analytical Methods for Microbiological Water Quality Testing. Chapter 8. Assessing Microbial Safety of Drinking Water - Improving Approaches and Methods. World Health Organization, OECD, 237-292, 2003.

- 2) 秋葉道宏：浄水の生物学、須藤隆一編、水環境保全のための生物学、東京、産業用水調査会 183-205(2004)

### 3. 学会発表

#### 平成17年度

- 1) 所正治、山村一志、仲本賢太郎、井関基弘：*Giardia intestinalis* の遺伝子解析、第4回分子寄生虫・マラリアフォーラム（2005.11、東京）
- 2) 荒井朋子、所正治：クリプトスポリジウムの細胞培養系における増殖評価のためのリアルタイムPCRによる定量トライアル、第13回分子寄生虫ワークショップ（2005.8、帯広）
- 3) 泉山信司、遠藤卓郎：我が国で発生した *Cryptosporidium* 集団感染に関する考察、日本臨床寄生虫学会第16回大会（2005.6、東京）
- 4) 泉山信司、黒木俊郎、押部智宏、辻英高、八木田健司、遠藤卓郎：クリプトスポリジウム症の潜伏期間の再検討、日本寄生虫学会（2005.4、米子）、
- 5) 泉山信司、八木田健司、藤原正弘、遠藤卓郎：紫外線照射による *Cyclospora cayentanensis* の発育阻止、日本寄生虫学会東日本大会（2005.10、東京）
- 6) 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、三宅芳枝、遠藤卓郎：野鳥におけるクリプトスポリジウムの保有、獣医疫学会第17回学術集会（2006.3、つくば）
- 7) Hirata T and Hashimoto A : Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts isolated from Sewage and River Water. 13th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (2005.9, Swansea, UK)
- 8) 李華芳、秋葉道宏、国包章一：Survey of Contamination with *Cryptosporidium* in the Tone River、第40回日本水環境学会年会（2006.3、仙台）
- 9) Masago Y, Oguma K, Katayama H and Ohgaki S (2005) Quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in river water by quenching probe PCR and denaturing gradient gel electrophoresis, 13th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (2005.9, Swansea, UK)
- 10) T. Watanabe, Y. Abe, T. Miura and T. Omura: Effects of sunlight, temperature and suspended solids on inactivation of poliovirus in river water. 13th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (2005.9, Swansea, UK)
- 11) 渡部徹、三浦尚之、大村達夫：水環境中のウイルスによる感染リスク評価、第8回日本水環境学会シンポジウム（2005.9、大津）

## 平成16年度

- 1) 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、宇根有美、鳥羽道久、遠藤卓郎：爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況、日本原生動物学会(2004.11)
- 2) 泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎、藤原正弘：Giardia の紫外線消毒における付着濁質の影響、環境技術学会(2004.9)
- 3) T.Endo and S.Izumiyama: What is learned Cryptosporidiosis outbreak cases in Japan. The Japan-U.S. Governmental Conference on drinking water management and wastewater control (2004.7、Hawaii)
- 4) 泉山信司、八木田健司、下河原理江子、朝倉登喜子、遠藤卓郎：温水環境より分離した Naegleria 属アメーバの遺伝子型別、日本寄生虫学会(2004.4)
- 5) 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、宇根有美、鳥羽通久、遠藤卓郎：爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況。第137回日本獣医学会学術集会 (2004)
- 6) 松本悠一、今井邦典、大川美奈子、宇根有美、黒木俊郎、石橋 徹、鈴木哲也、野村靖夫：ヒョウモントカゲモドキ由来のクリプトスポリジウムのヘビへの感染性と病原性。第137回日本獣医学会学術集会 (2004)
- 7) 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、宇根有美、鳥羽通久、遠藤卓郎：爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況。日本原生動物学会第37回大会 (2004)
- 8) Hashimoto A, Sugimoto H, Morita S, and Hirata T: Molecular characterization of a single *Cryptosporidium* oocyst in sewage by semi-nested PCR, IWA 4th World Water Congress, Congress and Exhibition Abstract book Paper ID23644, 268(2004, Marrakech)
- 9) 橋本温、杉本ひとみ、森田重光、平田強：河川から単離したクリプトスポリジウムオーシストの遺伝子解析。平成16年度土木学会全国大会第59回年次学術講演会(2004.9、豊田)
- 10) 橋本温、杉本ひとみ、森田重光、平田強：Nested PCR-ダイレクトシーケンス法による相模川の *Cryptosporidium* の遺伝子型判別、第55回全国水道研究発表会 (2004.6、京都)
- 11) 貝森繁基、森田重光、平田 強：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 (2004.3、札幌)
- 12) 杉本ひとみ、橋本温、森田重光、平田強：下水から単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型の解析、第38回日本水環境学会年会 (2004.3、札幌)
- 13) 森田重光、平田強：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 (2004.3、札幌)
- 14) 真砂 佳史、小熊 久美子、片山 浩之、大垣 眞一郎、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。第41回環境工学研究フォーラム(2004.11、宮崎)
- 15) Y. Masago, K. Oguma, H. Katayama and S. Ohgaki; Temporal Concentration Variability of