

図-1、ジアルジア症の近年の動向・感染地別報告数の割合

- ・ 感染症発生動向調査事業年報(2000-2004 年度)の統計を利用した。感染地別集計は 2001-2004 年度統計に基づく。
- ・ 縦軸左は感染地(国内・国外)による報告数の割合を示す。

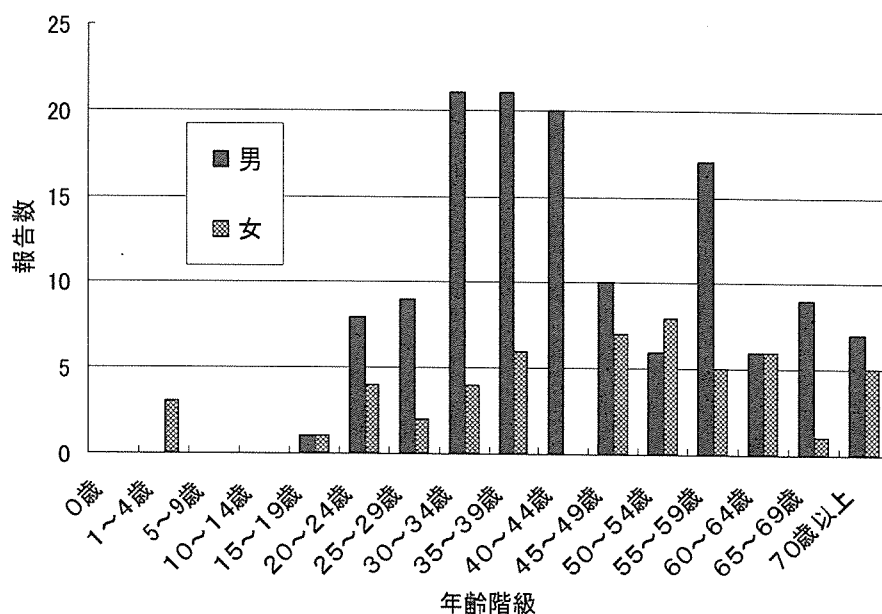
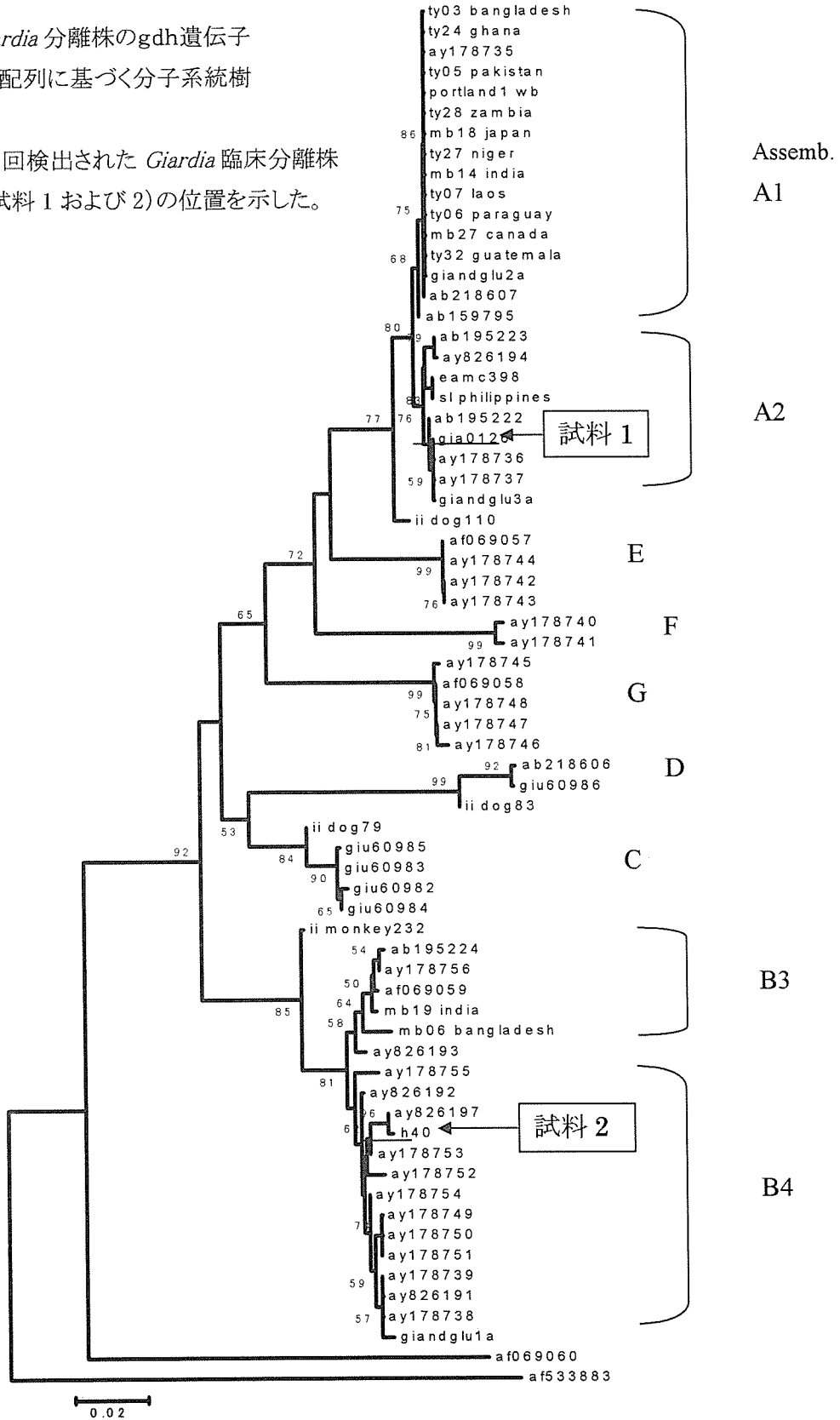


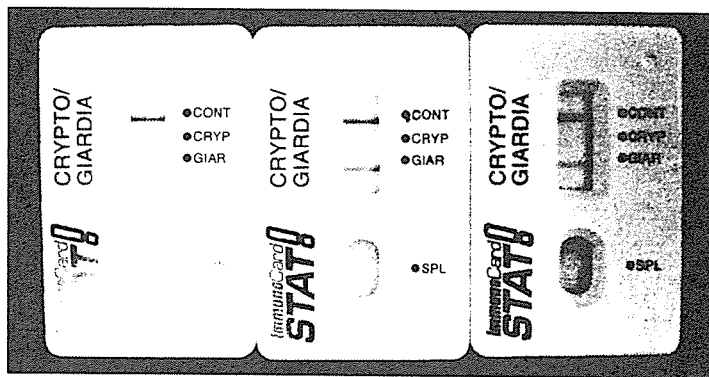
図-2、ジアルジア症の近年の動向・国内感染例の性別と年齢階級分布

- ・ 感染症発生動向調査事業年報(2001-2004 年度)の統計より、国内感染例の性別および年齢階級別集計された資料を用いた。

図-3 *Giardia* 分離株のgdh遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹

- ・ 今回検出された *Giardia* 臨床分離株 (試料 1 および 2) の位置を示した。

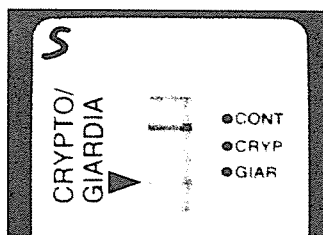




Cp (GT2)	10,000oocysts	1,000	100	/assay
Gi(Asm2)	—	1,000cysts	100	/assay

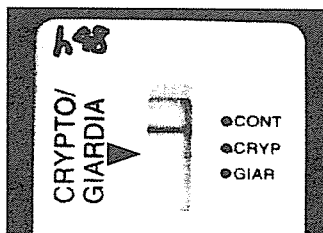
図-4、市販のクリプトスポリジウム・ジアルジア検出用免疫クロマト法キット
ImmunoCard STAT の感度試験結果

- ・ シストは *Giamblia* 感染スナネズミより、オーシストは *C.parvum* 感染ヌードマウス(BALB/c nu/nu)より、その糞便から精製した。



Giardia 陽性試料 Assemb.A2

新鮮便、未固定HIV陽性患者



Cryptosporidium 陽性試料 Genotype 1

重クロム酸固定、HIV陽性患者

図-5、ImmunoCard STAT による臨床材料の検査結果

試料	ソース	遺伝子型	備考
1	HIV 陽性者	A2	
2	HIV 陽性者	B4	Cp重複感染
3	健康診断受診者	A1	3,4 は前年度
4	健康診断受診者	A1	検出

表-1、国内感染の臨床例より検出した *Glamblia* の遺伝子型別結果

調査地	試料数	<i>Giardia</i> 属	<i>Cryptosporidium</i> 属
岩手県	65	4 (6.2%)	0
秋田県	33	5 (15.2%)	0

表-2、東北地方の野生ニホンカモシカにおける *Giardia* 属ならびに *Cryptosporidium* 属の検出率

各種動物における *Cryptosporidium* の保有状況

分担研究者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所微生物部

研究要旨

兵庫県で発生した簡易水道のクリプトスポリジウム汚染事例から検出されたヘビ由来クリプトスポリジウムの保有動物を探索したところ、これまでにヤマカガシがクリプトスポリジウムに感染していることが明らかになった。今年度はこれまでの調査で情報が少なかった四国を中心にデータの収集に努めた。

ペットとして輸入される小型哺乳類は平成 16 年に輸入が禁止されたが、未だに輸入が継続している。今年度は 8 種のげっ歯類の腸管内容物 139 検体を対象にして調査した。種によっては *Cryptosporidium* あるいは *Giardia* を高率に保有していた。

研究協力者

泉山信司 国立感染症研究所寄生動物部
宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科
加藤行男 麻布大学獣医学部獣医学科
林谷秀樹 東京農工大学農学部獣医学科
橋本 温 阿南工業高等専門学校
市原 眞一 徳島県立佐那河内いきもの
ふれあいの里ネイチャー
センター

A. 研究目的

水源域には多くの脊椎動物が生息しているが、それらの動物は *Cryptosporidium* の宿主となりうるため、本原虫の保有動物としてオーシストを環境中に排出する可能性がある。

野生動物に寄生する *Cryptosporidium* の情報は非常に乏しいのが現状である。そこで、水道における *Cryptosporidium* 汚染のリスク評価において不可欠な、環境中に存在する *Cryptosporidium* の種あるいは遺伝子型とその宿主に関する情報の収集を目的として、種々の動物における *Cryptosporidium* の保有状況を継続的に調

べてきた。今年度は鳥類および爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況を調査した。また、昨年度と同様に海外からペットとして輸入されるげっ歯類における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有も調査した。

B. 研究方法

B-1 調査の対象

爬虫類では、ヤマカガシ 76 匹（関東地方 11 匹、中国地方 47 匹、四国地方 14 匹、九州地方 4 匹）、シマヘビ 8 匹、アオダイショウ 2 匹、マムシ 2 匹、ジムグリ 1 匹、シロマダラ 1 匹から得られた糞便を検体とした。

国内の脊椎動物における保有状況と比較するとともに、ペットとして国内に持ち込まれ、*Cryptosporidium* の感染源あるいは汚染源となる可能性がある哺乳類として、デグー 20 匹、フトオアアレチネズミ 10 匹、ジャンガリアンハムスター 30 匹、ステップレミング 9 匹、シマリス 30 匹、ピグミージェルボア 10 匹、ゴールデンハムスター 20 匹、ロボロフスキーハムスター

10 匹の合計 139 匹を対象に *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有を調べた。哺乳類の各動物は、麻酔により死に至らしめた後に解剖して大腸内容物を取り出し、これを調査の対象とした。

B-2 *Cryptosporidium* の検出

Cryptosporidium の保有は糞便あるいは腸内容物からのオーシストの検出によった。採取された材料は検査に用いるまで冷蔵保存した。糞便あるいは腸内容物の少量を用いて FEA 法によりオーシストを精製した。得られた沈渣をスライドガラスに塗抹して乾燥し、*Cryptosporidium* に対する特異抗体による蛍光染色 (Aqua-Glo, Waterborne) と DAPI 染色を行った。落射型蛍光顕微鏡を用いて B 励起光下で観察し、暫定対策指針に記載された基準により *Cryptosporidium* のオーシストの判定を行った。

B-3 遺伝学的解析

鏡検により *Cryptosporidium* が検出されたヤマカガシの試料は -20°C で冷凍保存しており、これらの試料について 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。オーシストの DNA は QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) を用いて精製した。メーカー推奨のプロトコルの始めに 5 回の凍結融解、15 分間の煮沸、1 時間の Protease K 溶解を追加し、オーシスト由来の DNA の回収に努めた。

18S rRNA 領域の増幅には 18S rRNA 遺伝子内の約 850bp を増幅領域とした Nested-PCR を行なった。プライマーは 1st PCR に 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' ならびに 5'-CCC ATT TCC TTC GAAACA GGA-3' を、2nd PCR に 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' ならびに 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3' を用いた (Xiao et al., 1999)。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、泳動像を確認した。次いで QIAquick PCR

purification キット (Qiagen) を PCR 産物に用いて残留プライマーを除去した後、この精製 DNA を試料として ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems) ならびに ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてダイレクトシーケンスを行なった。得られた塩基配列は Blast サーチにより既存の塩基配列との比較を行った。

C. 結果

ヘビにおける *Cryptosporidium* の調査ではヤマカガシだけから *Cryptosporidium* が検出された。調査したヤマカガシ 76 匹中 20 匹 (26.3%) から検出された。その内訳は、関東地方では 11 匹中 5 匹 (45.5%)、中国地方では 47 匹中 12 匹 (45.5%)、四国地方では 14 匹中 3 匹 (21.4%) からの検出であった。九州地方の 4 匹からは検出されなかった (表 1)。

今年度までに千葉県および熊本県で捕獲されたヤマカガシの冷凍保存糞便試料から検出された *Cryptosporidium* の 18srRNA の塩基配列は *Cryptosporidium* sp. 983 と一致した。これはこれまでに調査した中国地方で捕獲されたヤマカガシから検出された遺伝子型と同一であった。

ペットとして輸入されたげっ歯類における *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出は、デグー 0 匹、19 匹 (95.0%)、フトオアレチネズミ 0 匹、0 匹、ジャンガリアンハムスター 20 匹 (66.7%)、0 匹、ステップレミング 0 匹、0 匹、シマリス 14 匹 (46.7%)、0 匹、ピグミージェルボア 0 匹、0 匹、ゴールデンハムスター 0 匹、0 匹、ロボロフスキーハムスター 0 匹、5 匹 (50.0%) という結果であった。

D. 考察

本年度 (平成 18 年度) の調査では、爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況、および海外からペットとして輸入され

るげっ歯類における *Cryptosporidium* と *Giardia* の保有を調査した。

平成 13 年に兵庫県において発生した簡易水道の *Cryptosporidium* 汚染事例から分離された *Cryptosporidium* の遺伝子型は *Cryptosporidium* sp. 938 と一致していた。昨年度および今年度の調査では、同じ遺伝子型を有する *Cryptosporidium* がヤマカガシから検出された。

厚生労働科学研究「クリプトスポリジウム等による水系感染症に係る健康リスク評価及び管理に関する研究」(主任研究者 国包章一)において、ヘビ、特にヤマカガシにおける *Cryptosporidium* 保有を調査したところでは、地域において保有率が異なり、中国地方では 35%であった。これに対して関東地方では 3%と大きく異なっていた。しかし、今年度の結果はこれまでの調査結果と異なり、関東地方の 14%と中国地方の 35%の中に保有率の幅が収まっていた。これはヤマカガシの *Cryptosporidium* 保有が地域によりそれほど異なるということはなく、ほぼ同程度であることが示唆された。

種により保有率は異なるが、げっ歯類では高率に *Cryptosporidium* および *Giardia* を保有していることが今年度の調査においても確認された。アメリカモモンガ、オオエジプトアレチネズミ、エゾリス、バナナリス、フサオジャービルでの保有率が高かった。これらのげっ歯類はペットとして日本に輸入され、一般の家庭で飼育されることになる。こうしたげっ歯類が感染源あるいは汚染源となつて *Cryptosporidium* を伝播する、あるいは汚染事例の原因となることが懸念される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、関東および九州の関係の方々のご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

E. 参考文献

黒木俊郎、遠藤卓郎：水源周辺環境に生息する脊椎動物の *Cryptosporidium* の保有状況、「クリプトスポリジウム等による水系感染症に係る健康リスク評価及び管理に関する研究」平成 17 年度研究報告書 2006.

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

なし

2. 学会発表

1. 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、三宅芳枝、宇根有美、林谷秀樹、中臺文、森哲、黒尾正樹、片山亮、鳥羽通久、森口一、遠藤卓郎：国内に生息するヘビにおけるクリプトスポリジウムの保有 第 57 回全国水道研究発表会 2006 年 5 月 24-26 日 長崎

2. 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎、宇根有美：国内に生息するヘビのクリプトスポリジウム感染 第 66 回日本寄生虫学会東日本支部大会 2006 年 10 月 21 日 東京

表1 ヤマカガシにおける *Cryptosporidium* の保有状況

地域	17年度まで		18年度		合計	
	no.	+	no.	+	no.	+
東北	7	0(0)			7	0(0)
関東	32	1(3.1)	11	5(45.5)	43	6(14.0)
信越・北陸	-		-		-	
東海	2	0(0)			2	0(0)
近畿	10	1(10.0)			10	1(10.0)
中国	54	19(35.2)	47	12(25.5)	101	31(30.7)
四国			14	3(21.4)	14	3(21.4)
九州	1	1(100)	4	0(0)	5	1(20.0)
合計	106	22(20.8)	76	20(26.3)	175	42(24.0)

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>
デグー	20	0	19 (95.0)
ジャンガリアンハムスター	30	20 (66.7)	0
フトオアレチネズミ	10	0	0
ピグミージェルボア	10	0	0
シマリス	30	14 (46.7)	0
ステップレミング	9	0	0
ゴールデンハムスター	20	0	0
ロボロフスキーハムスター	10	0	5 (50.0)
合計	139	34 (24.4)	24 (17.3)

下水処理によるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの除去に関する研究

分担研究者 森田 重光 麻布大学環境保健学部

A. 研究目的

Cryptosporidium や *Giardia* をはじめとする原虫類は世界中に分布しており、主として水環境から検出される。先進国でも水を介した集団感染を引き起こしており、微生物衛生上の深刻な課題となっている。

衛生施設の整った国では、糞便とともに排出された *Cryptosporidium* オーシストや *Giardia* シストの多くは下水処理場へ流入する。処理場で処理された下水処理水は河川や海洋に放流されるため、下水処理による除去が十分でないと水道水やレクリエーション水(河岸、海浜利用等)を通してヒトに摂取され、新たな感染をひき起こす可能性が高まる。これまでに世界各国から *Cryptosporidium* 集団感染の発生が報告されており、1993 年には米国の Milwaukee で患者数 40 万人という極めて大規模な *Cryptosporidium* 集団感染事故が発生している (Mackenzie et al., 1994)。また、わが国でも 1996 年に埼玉県越生町で水道水の不十分な処理を原因とし、13,800 人の住民のうち、実に 7 割以上に当たる 8,812 人が *Cryptosporidium* に感染する事故が発生している (埼玉県衛生部, 1997)。

下水中に *Cryptosporidium* オーシストが存在していることは検出法が開発された 1980 年代後半から知られており、その濃度は集水域の人口やその地域に住む人の感染率、食肉処理施設の有無などによって異なる。また、下水処理水からも検出されており、*Cryptosporidium* の感染リスクなどを評価するためには下水処理による *Cryptosporidium* オーシストの除去率を把握する必要がある。

また、下水中の *Giardia* シスト濃度は *Cryptosporidium* オーシスト濃度よりも数倍から数十倍高い傾向があることが知られており、*Cryptosporidium* と同様に下水処理水からも検出されている。したがって、*Giardia* の感染リスクを評価するためには下水処理による *Giardia*

シストの除去率を把握する必要がある。

そこで本研究では、都下の下水処理場で流入下水および放流水を採取し、*Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度レベルを明らかにするとともに、流入下水中の濃度と放流水中の濃度から下水処理による両原虫の除去率を算出した。

これまでに報告されているこれら *Cryptosporidium* オーシストの濃度レベルに関する研究では、試料をシヨ糖浮遊法や免疫磁気ビーズ法などの何らかの精製工程を経てから抗体染色法で染色して顕微鏡観察して計数する方法が用いられている。これらの精製工程では夾雑物が除去されるが *Cryptosporidium* も損失する。したがって、試料中の濃度レベルを定量的に評価するためには損失分(回収率)を補正する必要がある。しかし、これまで回収率を補正したデータはほとんど報告されていない。

そこで本研究では、*Cryptosporidium* オーシストの回収率の補正方法についても検討した。

B. 研究方法

B-1 調査試料

2006 年 10 月から都内の下水処理場において月 1 回の頻度で流入下水および放流水を採取した。採取量は流入下水 2.0 L、放流水 40 L とした。

1) 流入下水

流入下水は 2 L ポリタンクに採取し麻布大学へ搬送した。採取した流入下水は 4°C のインキュベータ内で保存し、採取後 1 週間以内に精製した。

2) 放流水

放流水は 20 L ポリタンク 2 本に採取した。採取した放流水には直ちに 28 mM チオ硫酸ナトリウム溶液を 5 mL ずつ添加し残留塩素を中和した。放流水は麻布大学へ搬送後直ちに濃縮

し、濃縮物を4℃のインキュベータ内で保存した。濃縮物は1週間以内に精製した。

B-2 回収率算出用トレーサーの添加

精製工程におけるオーシストの損失を補正するために用いる代替トレーサーとしてクリプトレーサー1号（日本光研工業株式会社製）を用いた。クリプトレーサー1号はポリメチルメタアクリレート製の微粒子で *Cryptosporidium* 除去性能評価用のトレーサーとして開発された。粒径、比重およびゼータ電位は *Cryptosporidium* オーシストとほぼ同じである。このトレーサーを精製前の試料に既定量添加し、精製後に定量することで回収率を求めた。本実験ではトレーサー懸濁液の濃度が200個/mLとなるようにPBSで希釈調製し、1試料につき1.00~10.0 mL添加した。

B-3 *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃縮・精製

1) 濃縮

流入下水を入れたポリタンクにミキサーを挿入し試料を十分に混合した後に、うち400 mLをポリプロピレン製遠沈管（以下遠沈管）8本に50 mLずつ分注し、ここにトレーサー懸濁液を625 μ Lずつ添加してボルテックスミキサーで攪拌した。その後、遠心分離（1,500 \times g, 15分間, 4℃）し、上清25 mLをアスピレーターで吸引除去した。

放流水は試料を入れた各タンクにトレーサー懸濁液を5.00~10.0 mLずつ添加し、ミキサーでよく混合した後、全量を酢酸セルロース製外圧型中空糸限外ろ過膜モジュール（DAICEN MEMBRANE-STSTEMS, LTD）へ加圧ポンプを用いて通水しろ過した。ろ過後、モジュール内の液量が100 mL程度になるまで空気を圧送し、残った溶液を用いて膜表面に捕捉された物質を洗浄した。そして、その洗浄液を2本の遠沈管に分注した。その後、モジュール内へカプセル誘出液を約100 mL注入して振盪洗浄し、その洗浄液を2本の遠沈管に分注した。さらにモジュール内に精製水を約100 mLずつ2回に分けて注入し、その洗浄液を2本の遠沈管に分注した。これらの操作で得られた計8本の遠沈管を遠心分離し、沈渣を2本の遠沈管にまとめた。そして再び遠心分離し、上清を吸引除去して1本の遠沈管に沈渣をまとめた。

2) 超音波処理

試料中に存在する *Cryptosporidium* オーシス

トや *Giardia* シストは夾雑物に吸着あるいは抱合されている可能性があるため、流入生下水および放流水を出力300 Wの超音波洗浄機（ULTRASONIC GENERATOR, SHARP製）に3分間かけて、夾雑物からオーシストおよびシストを遊離させた。

3) ショ糖密度勾配遠心法

超音波処理を行った試料を直ちにボルテックスミキサーで攪拌した後、内径2 mmのシリコンチューブを先端につけたシリンジを用いて各遠沈管の底へショ糖溶液（比重1.22）を全量が50 mLとなるまで慎重に注入し界面を形成させた。これらの遠沈管を遠心分離した後、液面から界面下7.5 mLまでの溶液をシリコンコーティングしたパスツールピペットを用いて新しい遠沈管に分取した。これにPBS（+）を加えて全量を50 mLとした後、遠心分離して上清を吸引除去する操作を繰り返し、ショ糖を除去した。

4) 酢酸エチル処理

一般に下水は油脂成分を多く含む。この油脂成分によって *Cryptosporidium* オーシストや *Giardia* シストの表面が覆われると染色性が低下する可能性がある。そこで、流入下水は酢酸エチルを用いて脱脂した。すなわち、2.3.3の方法で濃縮・精製した試料にPBS（+）を加えて全量を40 mLとし、あらかじめリン酸塩緩衝液（以下PBS）で予備平衡とした酢酸エチル10 mLを加えてボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、遠心分離した。その後、沈渣以外を吸引除去し、沈渣を新しい遠沈管に移した。なお、放流水は油脂成分をほとんど含まないため脱脂しなかった。

B-4 染色

1) DAPI 染色

2.3に示す方法で精製した試料をボルテックスミキサーで良く攪拌した後、複数枚（1試料につき十数枚程度）のセルロースアセテート製メンブランフィルター（孔径3.0 μ m, 直径25 mm, ADVANTEC TOYO製）を用いて吸引ろ過した。フィルターの縁には撥水ペン（DAKO Pen DAKO製）を用いて円を描き、さらにその内側に直径約15 mmの円を描いた。試料をろ過した後、10 mLのPBSで洗浄し、半数のフィルターに0.4 μ g/mL DAPI（4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride n-Hydrate）染色液を100 μ L滴下した。反応時

間は3分間とし、その後2 mLのPBSで洗浄した。

2) 蛍光抗体染色

全てのフィルターにPBSで3倍希釈した*Cryptosporidium*, *Giardia*用直接染色抗体試薬(Easy Stain™ C&G FITC, BTF, LTD)を80 µL滴下し、暗所、室温、湿潤条件下で45分間反応させた。反応後、2 mLの洗浄液(Easy Stain™ Fixing Buffer)で洗浄し、30%および90%エタノール-グリセリン溶液をそれぞれ500 µLずつ吸引してフィルターを脱水した。脱水後、フィルターを2% DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane)グリセリン封入剤を滴下したスライドガラスにのせ、カバーガラスをかけてプレパラートとした。

B-5 オーシスト、シストおよびトレーサーの定量

1) オーシスト、シストの定量

ノマルスキー微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡(BX-60, OLYMPUS社製)を用いてプレパラートにした試料を観察した。まず、B励起光下200倍で観察し、アップルグリーン色の蛍光を発する4~6 µmあるいは9~15 µmの類円形または楕円形の蛍光粒子を検索した。該当した蛍光粒子は400倍および1,000倍の微分干渉像で*Cryptosporidium* オーシストあるいは*Giardia* シストであるか否かの判定を行った。*Cryptosporidium* オーシストあるいは*Giardia* シストと判定したものを計数し、さらにWU励起光下でDAPI染色性を観察した。すなわち、WU励起光下で*Cryptosporidium* オーシスト、*Giardia* シスト内に青白色の蛍光を発する1~4個の粒子が確認されるものをDAPI陽性とし、蛍光粒子が確認されないものをDAPI陰性とした。

2) トレーサーの定量

Cryptosporidium オーシスト、*Giardia* シストの定量後にクリプトトレーサー1号を定量した。プレパラートにしたフィルターの全面をWU励起光下200倍で検鏡し、強い青色の蛍光を発する約5 µmの粒子の個数を計数した。

C. 結果と考察

C-1 流入下水中の*Cryptosporidium* オーシスト濃度

流入下水中の*Cryptosporidium* オーシスト濃度およびDAPI陽性率の結果を表1に示す。米国の4下水処理場で生下水中の*Cryptosporidium*

オーシスト濃度を定量したところ、その範囲は850~13,700 oocysts/L、算術平均濃度は5,180 oocysts/Lであったと報告されている(Madore *et al.*, 1987)。また、米国Floridaで採取された生下水中の*Cryptosporidium* オーシストの濃度範囲は<61~12,000 oocysts/L (Rose *et al.*, 1996)、英国Strathclydeの6下水処理場で採取された生下水中の濃度範囲は不検出~6,000 oocysts/Lであったと報告されている(Robertson *et al.*, 2000)。わが国では19都道府県の67ヶ所の下水処理場において生下水中の*Cryptosporidium* オーシスト濃度が調査され、73試料のうち7試料から*Cryptosporidium* オーシストが検出され、その濃度範囲は8~50 oocysts/Lであったと報告されている(諏訪他, 1998)。

本研究で調査した流入下水中の*Cryptosporidium* オーシスト濃度は4.0~12.0 oocysts/100 mLであり、欧米における調査結果よりは低いものの、国内の調査結果よりは若干高い結果となった。

感染者のオーシスト排泄量は1日あたり 10^9 個に及ぶが(Fayer *et al.*, 1997)、一般には感染後数週間で治癒することから、ヒトを放出源とする場合のオーシスト濃度の上昇は一時的であると考えられる。しかし、本研究で調査した流入下水中の*Cryptosporidium* オーシスト濃度は4ヶ月間ほぼ同じレベルであったことから、放出源はヒトではなくブタなどの家畜類の集団が感染と治癒を繰り返し、常に一定量のオーシストを排出し続けているのではないかと推測された。この推測を検証するためには検出されたオーシストの種および遺伝子型の解析が必要である。現在、関連するデータを蓄積しているところである。

流入下水から検出されたオーシストのDAPI陽性率は47.2~55.6%であった。家畜排せつ物法の施行にともない、家畜排せつ物は処理されてから下水道に流されるようになったため、オーシストが処理によるストレスを受けているのではないかと考えられた。

C-2 流入下水中の*Giardia* シストの濃度

流入下水中の*Giardia* シスト濃度およびDAPI陽性率の結果を表2に示す。Rose *et al.* (1996)は米国Floridaで生下水中の*Giardia* シストを定量し、濃度範囲は100~13,000 cysts/100 L、幾何平均濃度は3,900 cysts/100 Lであったと報告している。また、Robertson *et al.* (2000)は英国

Strathclyde の 6 下水処理場において生下水中の *Giardia* シスト濃度を調査し、濃度範囲は 10~52,500 cysts/L であったと報告している。

本研究で調査した流入下水中の *Giardia* シスト濃度は 12.5~42.0 cysts/100 mL であり、欧米における調査結果と同等か若干低い結果であった。

Giardia シストの DAPI 陽性率は 36.8~95.9% となり、*Cryptosporidium* オーシストと比べて同等か高い値であった。

G-3 放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度

放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度および DAPI 陽性率の結果を表 3 に示す。放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 0.35~1.08 oocysts/L であった。米国の 11 下水処理場における調査では 4~3,960 oocysts/L のオーシストが検出されており (Madore *et al.*, 1987), 本研究の調査結果よりも 10 倍以上高い値であった。また、前述のわが国の 67 ヶ所の下水処理場における実態調査では、74 試料の処理水うち 9 試料からオーシストが検出され、その濃度範囲は 0.05~1.60 oocysts/L と本研究の結果と同等の濃度レベルであった。

DAPI 陽性率は 0~9.10% と流入下水から検出された *Cryptosporidium* オーシストの陽性率 (47.2~55.6%) よりも明らかに低かった。この結果から、約 8 時間の下水処理でオーシストが何らかのダメージを受けているものと考えられた。

G-4 放流水中の *Giardia* シスト濃度

放流水中の *Giardia* シスト濃度および DAPI 陽性率の結果を表 4 に示す。放流水中の *Giardia* シスト濃度は 0.3~12.4 cysts/L であった。Rose *et al.* (1996) は二次処理水中の濃度範囲は 14~2,300 cysts/100 L, 幾何平均濃度は 88 cysts/100 L であったと報告している。また、Robertson *et al.* (2000) は一次処理水から 145~15,100 cysts/L, 二次処理水からも最大で 7,600 cysts/L の *Giardia* シストが検出されたと報告している。本研究の定量結果は、これらの既報告値と同等か若干低いレベルであった。

DAPI 陽性率は 12 月 26 日に採取した試料を除いては 8.30, 24.6% となり、流入下水から検出されたシストの陽性率 (36.8~95.9%) よりも低かった。この結果から、*Cryptosporidium* オーシストと同様、下水処理の工程で *Giardia* シストがダメージを受けることが明らかとなった。一方、12 月

26 日の放流水中の *Giardia* の DAPI 陽性率は 56.6% と他の試料に比べ高くなった。下水処理場の処理能力に関する定量的なデータは取得していないが、サンプリング前日からサンプリング日にかけては強く雨が降っており、放流水の濁度は他の日に採取した 3 試料よりも高かった。DAPI 陽性率が高くなった理由の一つとして、流入下水量の増加に伴い処理能力が低下したものと推測された。なお、12 月以降のサンプリングでは、濁度および 260 nm 吸光度を測定することにした。

G-5 回収率

本研究では全試料にトレーサーを添加したが、精製工程において酢酸エチルを用いて脱脂処理した試料の回収率は 10% 以下であった。このように回収率が低くなる理由としては、精製工程に不備がある、あるいは精製技術が未熟で実際に回収率が低いことが考えられる。また、トレーサーが *Cryptosporidium* オーシストと同じ挙動をとらず見かけ上回収率が低下することも考えられる。これまで、既知個数の *Cryptosporidium* オーシストを用いて行った添加回収試験の結果から、当研究室で採用している精製法の回収率は約 20~70% であることが明らかとなっている。したがって精製工程の不備に回収率が低下する原因があるのではなく、トレーサーが *Cryptosporidium* オーシストと同じ挙動をとらないことに起因しているのではないかと推測された。

そこで、シヨ糖浮遊法および酢酸エチル抽出法におけるトレーサーの回収率を算出した。その結果、シヨ糖浮遊法によるクリプトトレーサー 1 号の回収率は 80% 以上であったが、酢酸エチル抽出法の回収率を求める実験ではトレーサー粒子の径が明らかに小さくなり回収率が 10% 程度と低くなってしまった。この理由としては、クリプトトレーサー 1 号はポリメチルメタアクリレート製の粒子であるため酢酸エチルで溶解してしまい、顕微鏡観察で 5 μ m の粒子として認識できなかったためであると考えられた。

そこで、11 月の試料からは酢酸エチル抽出をせずに精製することとした。その結果、流入下水中に添加したクリプトトレーサー 1 号の平均回収率は 29.0%, 放流水中に添加したクリプトトレーサー 1 号の平均回収率は 48.3% となった。諏訪 他 (1998) は添加実験の結果から、流入下水中の *Cryptosporidium* オーシストの回収率

は約 14%，処理水では約 46%であったと報告している。精製工程は若干異なるものの、これらの値は、本研究で算出された回収率とほぼ同等であった。この回収率を用いて、流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度を補正すると、流入下水中のオーシスト濃度は 12.1～41.4 oocysts/100mL，放流水中のオーシスト濃度は 0.72～2.24 oocysts/100mL となった（表 5, 6）。

クリプトレーサー1号を精製工程の回収率を求めるためのトレーサーとして用いる場合、クリプトレーサー1号の比重が 1.19 であることから比重 1.20 以下のショ糖やパーコールを用いた浮遊法には適用できない。また、抗原処理されていないため免疫磁気ビーズ法の回収率も求めることができない。しかし、*Cryptosporidium* オーシストを添加する方法と違い特別な微生物取り扱い施設や設備を必要とせず、また、安価であり、顕微鏡観察も容易であるなどの優れた特徴を有している。精製工程で半分以上の *Cryptosporidium* オーシストが損失することから、環境試料中の *Cryptosporidium* オーシストを定量する場合は回収率の補正が必要不可欠であると考えられる。

G-6 除去率

流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト、*Giardia* シストの濃度および DAPI 陽性率から下水処理による除去率等を求めた（表 7, 8）。その結果、*Cryptosporidium* オーシストは 97.3～99.7%除去、*Giardia* シストは 97.0～99.9%除去となった。これまで報告されている *Cryptosporidium* の除去率は、0%～99.9%（Madore *et al.*, 1987, Mayer and Palmer, 1996, Rose *et al.*, 1996, Chauret *et al.*, 1999, Bukhari *et al.*, 1997），*Giardia* の除去率は 0%～99.9%（Casson *et al.*, 1990, Mayer and Palmer, 1996, Bukhari *et al.*, 1997, Rose *et al.*, 1996, Chauret *et al.*, 1999, Wiandt *et al.*, 2000）と幅があるが、いずれも概ね 90～99%程度である。これらの結果と本研究の結果とを比較すると、本研究で調査した下水処理場の *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シスト除去能力は上記下水処理場と同等かそれ以上であることがわかる。

DAPI 陽性率から下水処理による不活化率を算出すると *Cryptosporidium* オーシストは 85.8, 100%, *Giardia* シストは 0～90.2%であった。さらに、除去率と DAPI 陽性率から算出した不活化率を合わせたものを下水処理による総合的

な不活化率とすると、*Cryptosporidium* オーシストは 99.9, 100%, *Giardia* シストは 97.0～99.99% 不活化されることになる。

以上の結果から、下水とともに処理場に流入した *Cryptosporidium* オーシスト、*Giardia* シストは、処理工程でいずれも高い効率で除去あるいは不活化されることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト、*Giardia* シストの濃度を調査した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 4.0～12.0 oocysts/100mL，*Giardia* シスト濃度は 12.5～42.0 cysts/100mL となり、放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 0.35～1.08 oocysts/L，*Giardia* シスト濃度は 0.30～12.4 cysts/L となった。
- 2) *Cryptosporidium* オーシストの回収率トレーサーとして、使用条件は限定されるもののクリプトレーサー1号が有効であることを確認した。流入下水中の *Cryptosporidium* オーシストの回収率は約 30%，放流水中の回収率は約 50%であった。
- 3) 得られた平均回収率を用いて、流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度を補正すると、流入下水中のオーシスト濃度は 12.1～41.4 oocysts/100mL，放流水中のオーシスト濃度は 0.72～2.24 oocysts/100mL となった。
- 4) 流入下水および放流水中濃度から下水処理による両原虫の除去率を算出したところ、*Cryptosporidium* オーシストでは 97.3～99.7%，*Giardia* シストでは 97.0～99.9%であった。
- 5) DAPI 陽性率から不活化率を算出したところ、*Cryptosporidium* オーシストでは 85.8, 100%，*Giardia* シストでは 0～90.2%であった。
- 6) 下水処理による総合的な不活化率を除去率と DAPI 陽性率から求めた不活化率とを合わせたものとすれば、*Cryptosporidium* オーシストは 99.9, 100%，*Giardia* シストは 97.0～99.99%不活化されることが明らかとなった。

E. 参考文献

- Bukhari Z., Smith H. V., Sykes N. and Humphreys S. W. (1997) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. *Wat. Sci. Technol.*, 35, 385-390.
- Casson L. W., Sorder C. A. and Sykora J. L. (1990) *Giardia* in wastewater-effect of treatment. *Res. J. Water Pollut.*, 62, 670-675.
- Chauret C., Springthorpe S. and Satter S. (1999) Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Canadian Microbiol.*, 45, 257-262.
- Fayer R., Speer C. A. and Dubey J. P. (1997) The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R. ed., *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Boca Raton, FL, CRC press, 2-41.
- Mackenzie W. R., Hoxie N. J., Proctor M. R., Stephen Gradus M., Blair K. A., Peterson D. E., Kazmierczak J. J., Addiss D. G., Fox K. R., Rose J. B. and Davis J. P. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Eng. J. Med.*, 331, 3, 161-167.
- Madore M. S., Rose J. B., Gerba C. P., Arrowood M. J. and Sterling C. R. (1987) Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and select surface waters. *J. Parasitol.*, 73, 702-705.
- Mayer C. L. and Palmer C. J. (1996) Evaluating of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2081-2085.
- Robertson L. J., Paton C. A., Campbell A. T., Smith P. G., Jackson M. H., Gilmour R. A., Black S. E., Stevenson D. A. and Smith H. V. (2000) *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Wat. Res.*, 34, 8, 2310-2322.
- Rose J. B., Dickson L. J., Farrah S. R. and Carnahan R. P. (1996) Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Wat. Res.*, 30, 11, 2785-2797.
- 埼玉県衛生部 (1997) クリプトスポリジウムによる集団下痢症, 越生町集団下痢症発生事件, 報告書.

諏訪守, 鈴木穰 (1998) 下水処理場等におけるクリプトスポリジウムの検出方法の検討及び実態調査, 土木研究所資料第 3533 号.

Wiandt S., Grimason A. M., Baleux B. and Bontoux J. (2000) Efficiency of wastewater treatment plants at removing *Giardia* sp. cysts. In: Chorus I., Ringelband U., Schlag G. and Schmoll O. (eds) *Water, Sanitation and Health. Resolving Conflicts between Drink-water Demands and Pressures from Society's Wastes*, pp 35-42, IWA Publishing, London.

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 学会発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 流入下水中の *Cryptosporidium* 濃度および DAPI 陽性率

採取日	試料量 (mL)	検出個数 (oocysts)	濃度 (oocysts/100mL)	DAPI陽性率 (%)
2006.10.13	400	36	9.0	47.2
2006.10.30	400	48	12.0	50.0
2006.11.27	400	14	3.5	55.6
2006.12.26	400	16	4.0	—

表 2 流入下水中の *Giardia* 濃度および DAPI 陽性率

採取日	試料量 (mL)	検出個数 (cysts)	濃度 (cysts/100mL)	DAPI陽性率 (%)
2006.10.13	400	122	30.5	95.9
2006.10.30	400	128	32.0	84.4
2006.11.27	400	50	12.5	36.8
2006.12.26	400	168	42.0	47.6

表 3 放流水中の *Cryptosporidium* 濃度および DAPI 陽性率

採取日	試料量 (L)	検出個数 (oocysts)	濃度 (oocysts/L)	DAPI陽性率 (%)
2006.10.30	40	14	0.35	7.1
2006.11.27	40	16	0.40	0.0
2006.12.26	40	43	1.08	9.1

表 4 放流水中の *Giardia* 濃度および DAPI 陽性率

採取日	試料量 (L)	検出個数 (cysts)	濃度 (cysts/L)	DAPI陽性率 (%)
2006.10.30	40	12	0.30	8.3
2006.11.27	40	140	3.50	24.6
2006.12.26	40	497	12.40	56.6

表 5 流入下水中の *Cryptosporidium* 濃度 (回収率補正)

採取日	濃度 (oocysts/100mL)	
	回収率補正なし	回収率補正有
2006.10.13	9.0	31.0
2006.10.30	12.0	41.4
2006.11.27	3.5	12.1
2006.12.26	4.0	13.8

表 6 放流水中の *Cryptosporidium* 濃度 (回収率補正)

採取日	濃度 (oocysts/L)	
	回収率補正なし	回収率補正有
2006.10.30	0.35	0.72
2006.11.27	0.40	0.83
2006.12.26	1.08	2.24

表 7 *Cryptosporidium* の除去率・不活化率

採取日	濃度 (oocysts/100mL)		除去率 (%)	DAPI陽性率 (%)		不活化率 (%)	除去率・不活化率 (%)
	流入下水	放流水		流入下水	放流水		
2006.10.13	9.0 (31.1)	—	—	47.2	—	—	—
2006.10.30	12.0 (41.4)	0.035 (0.072)	99.7 (99.8)	50.0	7.1	85.8	99.9 (99.9)
2006.11.27	3.5 (12.1)	0.040 (0.083)	98.9 (99.3)	55.6	0.0	100.0	100.0 (100.0)
2006.12.26	4.0 (13.8)	0.108 (0.224)	97.3 (98.3)	—	9.1	—	—

括弧内は回収率補正済みの値

表 8 *Giardia* の除去率・不活化率

採取日	濃度 (cysts/100mL)		除去率 (%)	DAPI陽性率 (%)		不活化率 (%)	除去率・不活化率 (%)
	流入下水	放流水		流入下水	放流水		
2006.10.13	30.5	—	—	95.9	—	—	—
2006.10.30	32.0	0.030	99.9	84.4	8.3	90.2	99.99
2006.11.27	12.5	0.350	97.2	36.8	24.6	33.1	98.1
2006.12.26	42.0	1.240	97.0	47.6	56.6	0.0	97.0

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」
平成 18 年度 分担研究報告書

利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染の実態調査

分担研究者：秋葉 道宏 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
研究協力者：西澤 博 国立保健医療科学院 水道工学部

研究要旨

水道水源のクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源河川である利根川及びその支川の小山川の 6 地点を選定し、表流水及び底泥中の遺伝子型別濃度分布を明らかにした。オーシスト、シスト濃度は、河川水中ではそれぞれ 2～28 オーシスト/40L、1～29 シスト/40L、底泥中ではそれぞれ 1～5 オーシスト/g-dry、1～3 シスト/g-dry であった。河川水、底泥中で検出されたオーシストの種・遺伝子型は全てヒトへ感染性を示す *C. parvum* bovine genotype であった。シストは、*G. lamblia* assemblage A のサブグループ I、*G. lamblia* assemblage B であり、2つのタイプともにヒトへの感染性を示す種であった。河川では、2つのタイプが検出されたが、底泥で検出されたのは assemblage B のみであった。

A. 研究目的

水道水を介したクリプトスポリジウム及びジアルジア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。クリプトスポリジウム及びジアルジアは、ヒトや哺乳動物（ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ネズミ等）の消化管内で増殖し、感染症をもたらす。これらの感染した動物の糞便に混じってクリプトスポリジウムオーシスト（以下オーシストという）及びジアルジアシスト（以下シストという）が河川等の水道水源を汚染し、浄水施設でオーシスト及びシストを十分に除去又は不活化できなければ、水道水を経由して感染症が発生する

ことになる。

最近、クリプトスポリジウム及びジアルジアの分子疫学的研究の進展に伴い、クリプトスポリジウム症の集団感染患者、海外旅行者や国内の下痢症患者等からの分離株について遺伝子型による群別と宿主特異性が検討されている。例えば、国内の集団発生事例においては、1996 年埼玉県越生町、2002 年北海道-兵庫県、2004 年長野県の 3 つの事例が *C. hominis*、1994 年神奈川県平塚市が *C. parvum* による感染であると報告されている。現在まで、クリプトスポリジウム属は、15 種が知られているが、ヒトへの感染を示す種、遺伝子型は、*C. hominis* (*C.*

parvum genotype I)、*C. parvum* (genotype II) の2種の報告例が最も多く、その他 *C. muris*、*C. meleagridis*、*C. felis*、*C. canis*、*C. suis* の5種及びどの種にも属さない2つの株が報告されている。一方、ジアルジア属は5種が知られているが、ヒトへの感染を示す種は *G. lamblia* のみであり、この種の遺伝子型は、7~8型(assembly)に分けられ、ヒトへの感染を示すのは、assembly A と assembly B に限られていると報告されている。このように、クリプトスポリジウム及びジアルジアの感染患者からの分離株については、分子疫学情報が蓄積されつつある。しかしながら、水道原水中のクリプトスポリジウム及びジアルジアについて、種や遺伝子型の知見は乏しく、水道水のクリプトスポリジウム、ジアルジア汚染による健康リスク評価を行う際に支障をきたしている。

そこで本研究では、道水源河川におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源である利根川及びその支川の小山川の6地点を選定し、表流水及び底泥の遺伝子型別濃度分布を明らかにした。また、クリプトスポリジウム、ジアルジア汚染の指標項目として、大腸菌、大腸菌群、嫌気性芽胞菌、濁度を選び、その指標性について検討を行った。

B. 研究方法

B-1 調査地点と流域状況

調査地点は、利根川中流域に位置する利根大堰を中心に4地点と利根川の支川である小山川2地点を選定した。利根大堰は、上水、工業用水、農業用水の大規模取水(導水)地点となっている。調査は、平成18年9

月、12月、平成19年2月の計3回実施した。利根川は、群馬県最北部に端を発し、関東平野を北西から南東へと流れ、千葉県と茨城県との県境で太平洋へと、一部は東京湾へと注ぐ。流域は、首都圏を擁した関東平野を抱え、流域内人口1,214万である。土地利用は、山地等約69%、水田や畑等の農地約25%、宅地等の市街地約6%となっている。小山川は、その流域内には、クリプトスポリジウム及びジアルジアの汚染源として考えられる生活排水処理施設、家畜飼育施設が点在している。流域内の総人口は約15.6万人であり、下水道、農業集落排水、合併処理人口を合計した衛生処理人口は7.4万人(衛生処理率46.6%)である。また、流域内には、牛の飼育戸数210戸、豚の飼育戸数30戸が点在しており、家畜頭数は、乳用牛約5,800頭、肉用牛約13,000頭、豚約18,000万頭であり、埼玉県内で最も家畜の密度が大きい地域である。

B-2 試料の採取

河川水は表流水を40L採水した。底泥は円筒状(直径5cm×高さ10cm)のコアサンプラーを用いて同一地点で3ヶ所採泥を行い、底泥の表層10cmを均一に混合し、そのうち1gを滅菌水1Lに懸濁(往復振とう機を用いて10分間、160rpm振とう)させた。

B-3 試料のろ過、濃縮及び精製

オーシスト及びシストの濃縮・精製は「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験法」に準じて行った。まず、河川水と底泥懸濁水をそれぞれアセトン溶解性のフィルター(直径293mm, 孔径1.2 μ m, MILLIPORE)にローラーポンプを用いて加圧通水で全量ろ過した。ろ過したフィルターをアセトンで溶解

させ、オーシスト及びシストを含む懸濁物質を遠心分離により回収した。回収した試料は、高密度 Pwcoll-ショ糖密度勾配遠心法、免疫磁気ビーズ法 (Dynabeads GC-Combo, DYNAL)により濃縮・精製を行った。

B-4 オーシスト及びシストの検出

濃縮・精製した試料を蛍光抗体 (Easy Stain™ BTF DECISIVE MICROBIOLOGY) を添加し、4°Cで2日間染色した。倒立顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U, Nikon)によって蛍光染色 FITC と微分干渉像で観察した。微分干渉像で内部構造の存在が確認することができ、さらにオーシストについては、球形で直径5μm前後の緑色の蛍光を発している粒子を探索した。シストについては、楕円形で5~8μm×8~12μm程度の緑色に発光している粒子を探索した。その結果陽性だと判断できたオーシスト及びシストをガラスキャピラリー (Calibrated Pipets 10μL, Drummond Scientific Company)で単離・計測した。

B-5 DNA 抽出

単離したオーシスト及びシストを、溶解液 18μl (組成: 10×Taq Buffer 2.5μl、滅菌超純水 15.5μl)が入った PCR用マイクロチューブに吐き出し、このマイクロチューブを-80°Cと室温で凍結融解処理を3回行い、10%Triton-X100 を5μl 加え、サマーサイクラーで99°C、15min 加熱処理を行った。

B-6 Nested PCR 法による遺伝子解析

オーシストについては small-subunit ribosomal DNA (SSUrDNA)領域を対象とした Nested-PCR を使用した。First PCR は Primer1 と Primer2 を用いて 18SrDNA 領域内の約 1325bp を対象に増幅をした。加熱処

理後の PCR 用マイクロチューブに反応液 (表-1)を25μl 加え、サマーサイクラーで PCR 反応 (表-2)させた。プライマーセットは表-3 に示した。Second PCR は Primer3 と Primer4 を用いて First PCR で増幅した DNA 領域内の約 819~825bp (種や遺伝子型により違う)を再増幅させた。マイクロチューブに反応液 (表-4)を加え、サマーサイクラーで PCR 反応 (表-2)させた。

シストについては Glutamate dehydrogenase (GDH) 領域を対象とした Nested-PCR で増幅させた。First PCR は *gdh1* と *gdh4* を用いて Glutamate dehydrogenase 遺伝子内の約 768bp を対象に PCR で増幅をした。加熱処理後の PCR 用マイクロチューブに反応液 (表-5)を25μl 加え、サマーサイクラーで PCR 反応 (表-6)させた。プライマーセットは Homan 及び Izmyrn によるものを用いた。Second PCR は *gdh1f* と *gdh4r* を用いて First PCR 産物をテンプレートとして GDH 遺伝子内の約 750bp を対象に PCR で増幅させた。マイクロチューブに反応液 (表-7)を加え、サマーサイクラーで PCR 反応 (表-8)させた。増幅した DNA 断片は、2% アガロースゲルの電気泳動によって確認した。塩基配列は、シーケンス解析 (株式会社バイオマトリックス研究所)によって決定し、BLAST (Nucleotide-nucleotide BLAST, National Center for Biotechnology Information, U.S.A)の相同性検索と Clustal W を用いて多重配列アライメントから種や遺伝子型の同定を行った。

B-7 河川水及び底泥の分析

河川水、底泥の試料については、それぞれ水質及び底質指標項目を測定した。河川水については、大腸菌群、大腸菌、嫌気性