

芽胞菌、濁度を、底泥については、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌、強熱減量、含水比、粒度分布を測定した。これらの項目の分析は、全て上水試験法(2,000年)、建設省河川砂防技術基準(案)同解説・調査編(2,000年)に準じて行った。

### C. 結果及び考察

#### C-1 河川水、底泥中のオーシスト及びシストの濃度

河川水中のオーシスト、シストの濃度及び水質測定結果を示した。河川水中のオーシスト、シストは9月ではそれぞれ6試料中の4試料(陽性率66%、濃度範囲2~5個/40L)、6試料中の2試料(陽性率33%、濃度範囲1~2個/40L)、12月ではそれぞれ6試料中の1試料(陽性率16%、濃度8個/40L)、6試料中の1試料(陽性率16%、濃度2個/40L)、2月ではそれぞれ6試料中の5試料(陽性率83%、濃度範囲2~28個/40L)、6試料中の4試料(陽性率66%、濃度範囲6~29個/40L)であった。このことより、オーシスト、シストの検出率および濃度が高い値を示したのは2月であり、次いで9月、12月の順であった。河川水中のオーシスト、シストの季節変動は、冬季に高い値を示すことが多く報告されている。その理由として、冬季には河川流量が減少、発生源となる生活排水処理施設での除去率の低下、河川水の水温の低下に伴う自己減衰率の低下等が上げられる。調査地点の最下流である芽吹大橋地点の月別の平均流量をみると、9月203m<sup>3</sup>/sec、12月185 m<sup>3</sup>/sec、2月60 m<sup>3</sup>/secと大きく変動し、2月は9月の1/3以下となっており、オーシスト、シスト検出率および濃度が高い値を示した一因であると考え

られる。

今回、9月の調査日の2日前より利根川流域全体で降雨が観測されており、小山川近傍の三峰雨量観測所のデータによると、降雨量は前々日19mm、前日23mm、当日26mmであった。9月の濁度は、利根大堰地点を除く各地点で、他の月と比べ高い値を示した。特に、いろは地点では、25.3度(12月0.1度、2月0.5度)と高い値を示した。河川水中のオーシスト、シスト汚染レベルの上昇の要因の1つに、降雨が上げられており、その理由として放牧等の家畜飼育施設での家畜や野生動物の糞便の洗い流しによるとされている。降雨により濁度が上昇するため、オーシスト、シストの水質指標項目の1つとされているが、今回のそのような関係は見られなかった。

平成13年に改定された「水道水中のクリプトスポリジウム暫定対策指針」(厚生労働省、2001年)の中で、水道原水のクリプトスポリジウム汚染の可能性の有無を判定するための指標として、大腸菌、嫌気性芽胞菌を上げている。河川水中のオーシスト、シストの検出の有無で比較すると、3回の調査でともに検出された芽吹大橋地点では、嫌気性芽胞菌は10<sup>3</sup>レベルと高い値を保っていた。また、9月と2月で検出、12月不検出の板東大橋地点、高橋地点では、9月と2月で嫌気性芽胞菌が高い値を示しており、他の微生物指標に比べオーシスト、シストのよい微生物指標であることがわかった。

#### C-2 底泥中のオーシスト、シストの濃度

底泥中のオーシスト、シストの濃度及び底質測定結果を示した。底泥中のオーシスト、シストは9月ではそれぞれ4試料中の

2 試料 (陽性率 50%、濃度範囲 1~5 個/g-dry)、4 試料中の 2 試料 (陽性率 50%、濃度範囲 3 個/g-dry)、12 月ではそれぞれ 6 試料中の 1 試料 (陽性率 16%、3 個/g-dry)、シストは不検出、2 月ではそれぞれ 6 試料中の 1 試料 (陽性率 16%、濃度範囲 5 個/g-dry)、6 試料中の 3 試料 (陽性率 50%、濃度範囲 2~3 個/g-dry)であった。調査地点別に比べると、利根大堰地点では 3 回の調査を通じてオーシスト、あるいはシストが検出された。この地点は、堰が設けられているため、オーシスト、シストが沈降・堆積により集積したことが一因であると考えられる。また、オーシスト、シストが検出された底泥では、強熱減量が高い傾向を示した。指標微生物を見ると、利根大堰地点では、嫌気性芽胞菌は  $10^3 \sim 10^4$  と高いレベルであった。

### C-3 河川水及び底泥中のオーシスト、シストの種と遺伝子型

河川水及び底泥中から単離したオーシストとシストの種と遺伝子型を表-10 に示した。各地点の河川水、底泥で検出されたオーシストを単離し、Nested PCR 法により種と遺伝子型を解析すると、全て *C. parvum* bovine genotype であった。*C. parvum* bovine genotype は人獣共通感染であり、ヒトへの感染性を示す種である。さらに多重アライメントと系統樹の非加重接合法で判別すると(図-2、3)、*C. Parvum* KSU-1 type と *C. parvum* IOWA type の 2 タイプに分けることができた。河川水については、この 2 つのタイプが存在していたが、底泥は *C. Parvum* KSU-1 type のみであった。

検出したシストの遺伝子型は、*G. lamblia* assemblage A のサブグループ I、*G. lamblia* assemblage Bであった(図-4)。これらのシス

トは、広い宿主域を持つ人獣共通感染である。河川では、51試料中assemblage A I が20試料、assemblage Bが1試料であり、ほとんどがassemblage A I であった。また、河川で 2 つのタイプが検出されたのは2月のみであった。底泥では4試料中2試料がassemblage Bであり、assemblage A I は検出されなかった。

### D. 結論

本研究では、水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、表流水及び底泥について遺伝子型別濃度分布を明らかにした。その結果を要約すると、以下のとおりである。

- 1) 調査は9月、12月、2月の3回実施したが、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。河川では、2月においては全ての地点でオーシストが検出され、濃度も最高値を示した。
- 2) 河川水、底泥における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、嫌気性芽胞菌が他の微生物指標と比べ優れていることがわかった。
- 3) 河川水、底泥で検出されたオーシストを単離し、Nested PCR 法により種と遺伝子型を解析すると、全てヒトへの感染性を示す *C. parvum* bovine genotype であった。さらに多重アライメントと系統樹の非加重接合法で判別すると、*C. Parvum*

KSU-1 type と *C. parvum* IOWA type の 2 タイプに分けることができた。河川水については、この 2 つのタイプが存在していたが、底泥は *C. Parvum* KSU-1 type のみであった。

- 4) 検出したシストの遺伝子型は、*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、51 試料中 assemblage A I が 20 試料、assemblage B が 1 試料であり、ほとんどが assemblage A I であった。底泥では 4 試料中 2 試料が assemblage B であり、assemblage A I は検出されなかった。

#### E. 参考文献

真砂佳史、米国におけるクリプトスポリジウム症、モダンメディア、53(2)、2007

八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎、クリプトスポリジウムの遺伝子型別と事例解析、病原微生物検出情報、10-12、2005  
国土交通省河川局：河川整備基本方針より、2006。

Xiao L H, Escalante L, Yang C F, Sulaiman I, Escalante A A, Montali R J, Fayer R, Lal A A: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol. 1999;65:1578-1583.

Lihua Xiao, Kerri Alderisio, Josef Limor, Michael Royer, and Altaf A. Lal : Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool. Appl

Environ Microbiol. 2000 December; 66(12): 5492-5498.

Ferguson C, Deere D, Sinclair M, Chalmers RM, Elwin K, Hadfield S, Xiao L, Ryan U, Gasser R, El-Osta YA, Stevens M: Meeting report: Application of genotyping methods to assess risks from cryptosporidium in watersheds. Environ Health Perspect. 2006 Mar;114(3):430-4.

Homan WL, Gilsing M, Bentala H, Limper L, van Knapen F: Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. Parasitol Res. 1998 Sep;84(9):707-14.

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、529、2006。

五十嵐公文ほか: 利根川・江戸川水系における原虫類共同調査。平成 12 年度日本水道協会関東地方支部水質研究発表会講演集、16-18、2001。

保阪三継ぐほか: 水道水並び水源河川等における原虫類の検出状況。東京都衛生研究年報、52、254-259、2001。

中西正治ほか: 淀川におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの水源調査。第 52 回全国水道研究発表会講演集、558-559、2001。

関東農政局利根川水系土地改良調査管理事務所、水源情報提供システム。

(<http://tonecho.st.wakwak.ne.jp/login.asp>)

Hiroaki SAKAI, Yoshinori TSUSHIMA, Hideyuki NAGASAWA, Rio John T. DUCUSIN, Shigeyuki TANABE, Yuji UZUKA and Takao SARASHINA:

*Cryptosporidium* Infection of Cattle in the  
Tokachi District, Hokkaido. J Vet Med Sci.  
2003 Jan;65(1):125-7.

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

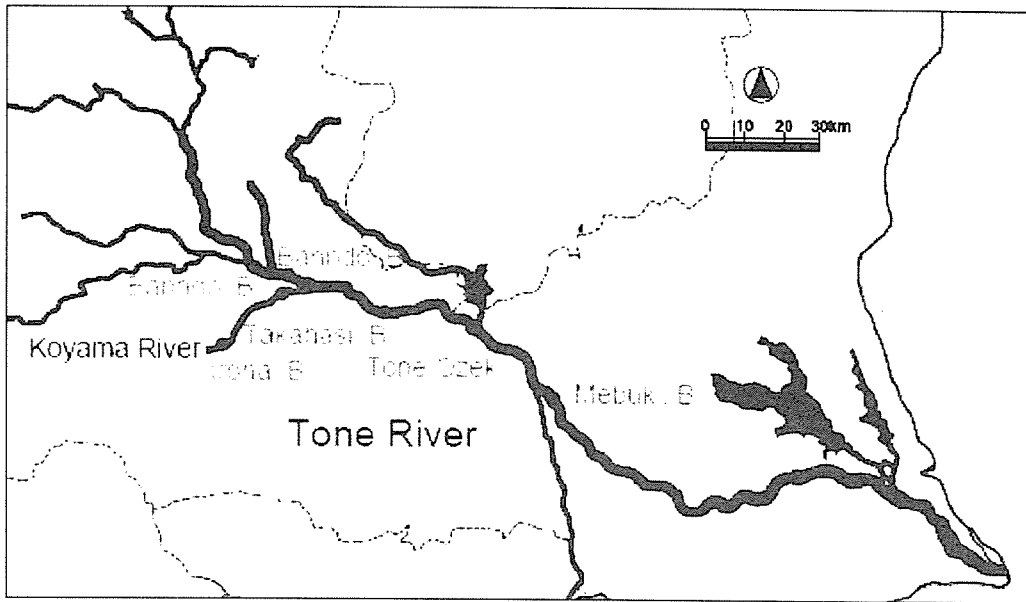


図-1 利根川水系における調査地点

表-1. PCR 反応組成液 (Composition of PCR reaction mixture)

d-H <sub>2</sub> O	8.25 $\mu$ l
10 $\times$ Taq Buffer	2.5 $\mu$ l
2.5mM dNTP mixture	4.0 $\mu$ l
Primer1 (10pmol/ $\mu$ l)	5.0 $\mu$ l
Primer2 (10pmol/ $\mu$ l)	5.0 $\mu$ l
Taq DNA polymerase (5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	25.0 $\mu$ l

表-2. PCR 反応条件 (PCR reaction conditions)

Initial PCR activation step	94°C	3min	
↓			
Denaturation	94°C	45sec	} 35cycles
Annealing	55°C	45sec	
Extension	72°C	1min	
↓			
Final extension	72°C	7min	

表-3. プライマーセット (Primer for the PCR used in this study)

Primer	sequence (5' -3' )	Base pair (mer)	Target
Primer1	TTCTAGAGCTAATACATGCG	20	18SrRNA (SSUrRNA)
Primer2	CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA	21	
Primer3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	26	18SrRNA (SSUrRNA)
Primer4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	22	

(Xiao *et al.* 1999, 2000)

表-4. PCR 反応組成液 (Composition of PCR reaction mixture)

First PCR products	2.0 $\mu$ l
d-H <sub>2</sub> O	28.75 $\mu$ l
10 $\times$ Taq Buffer	5.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP mixture	4.0 $\mu$ l
Primer3 (10pmol/ $\mu$ l)	5.0 $\mu$ l
Primer4 (10pmol/ $\mu$ l)	5.0 $\mu$ l
Taq DNA polymerase (5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

表-5. First PCR 反応組成液 (Composition of PCR reaction mixture)

d-H <sub>2</sub> O	13.25 $\mu$ l
10 $\times$ Taq Buffer	2.5 $\mu$ l
2.5mM dNTP mixture	4.0 $\mu$ l
gdh1 Primer (10pmol/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
gdh4 Primer (10pmol/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
Taq DNA polymerase (5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	25.0 $\mu$ l

表-6. First PCR 反応条件 (PCR reaction conditions)

Initial PCR activation step	94°C	7min	
↓			
Denaturation	94°C	1min	} 45cycles
Annealing	55°C	1min	
Extension	72°C	1min	
↓			
Final extension	72°C	7min	

表-7. Second PCR 反応組成液 (Composition of PCR reaction mixture)

d-H <sub>2</sub> O	33.75 $\mu$ l
10 $\times$ Taq Buffer	5.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP mixture	4.0 $\mu$ l
gdh1f Primer (10pmol/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
gdh4r Primer (10pmol/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
PCR 産物	2.0 $\mu$ l
Taq DNA polymerase (5unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

表-8. Second PCR 反応条件 (PCR reaction conditions)

Initial PCR activation step	94°C	5min	
↓			
Denaturation	94°C	30sec	} 35cycles
Annealing	53°C	45sec	
Extension	72°C	1min	
↓			
Final extension	72°C	10min	

表-9. 河川水中のオーシスト及びシストの濃度と水質指標項目

調査地点	採取日	オーシスト (個/40L)	シスト (個/40L)	嫌気性芽胞菌 (CFU/100mL)	大腸菌 (CFU/100mL)	大腸菌群 (CFU/100mL)	濁度 (度)
<b>利根川</b>							
板東大橋	2006/09/13	4	2	282	6,800	219,333	12.4
	2006/12/11	0	0	72	93	4,167	2.4
	2007/02/13	8	6	228	7	3,600	2.4
上武大橋	2006/09/13	2	0	110	4367	148,333	7.8
	2006/12/11	0	0	80	67	8433	1.7
	2007/02/13	0	0	118	120	9400	2.5
利根大堰	2006/09/13	0	0	414	1,847	135,000	6.8
	2006/12/11	0	0	286	147	63,000	11.6
	2007/02/13	12	9	144	100	87,000	3.2
芽吹大橋	2006/09/13	5	1	392	993	107,000	9.3
	2006/12/11	8	2	160	740	58,333	2.6
	2007/02/13	29	29	192	160	26,767	3.7
<b>小山川</b>							
いろは橋	2006/09/13	0	0	100	553	117,667	25.3
	2006/12/11	0	0	10	40	34,667	<0.1
	2007/02/13	2	0	0	13	2,067	0.5
高橋	2006/09/13	3	0	422	4,867	210,333	4.7
	2006/12/11	0	0	84	793	42,667	2.0
	2007/02/13	21	18	244	387	49,667	2.3



表-10. 底泥中のオーシスト及びシストの濃度と底質指標項目

調査地点	採取日	オーシスト (個/g-dry)	シスト (個/g-dry)	嫌気性芽胞菌 (CFU/g-dry)	大腸菌 (CFU/g-dry)	大腸菌群 (CFU/g-dry)	含水比 (%)	強熱減量 (%)	土質分類
<b>利根川</b>									
板東大橋	2006/09/13	0	0	279	464	56,512	24.5	1.2	砂
	2006/12/11	0	0	4,324	220	518,919	30.6	1.2	細粒分まじり砂
	2007/02/13	0	1	60	0	4,911	23.3	1.1	砂
上武大橋	2006/09/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	2006/12/11	0	0	8,825	502	96,414	52.6	5.9	礫まじり砂質粘性土
	2007/02/13	5	3	20,773	997	290,378	61.2	8.5	礫まじり砂質粘性土
利根大堰	2006/09/13	5	3	11,463	10	10,415	34.4	4.1	細粒分質砂
	2006/12/11	3	0	1,945	3	1,037	38.5	4.4	細粒分質砂
	2007/02/13	0	2	4,699	8	6,589	35.3	3.5	細粒分質砂
芽吹大橋	2006/09/13	0	0	1,313	103	10,415	22.6	1.5	砂
	2006/12/11	0	0	5	4	1,037	21.6	0.7	砂
	2007/02/13	0	0	58	8	6,589	22.6	1.0	砂
<b>小山川</b>									
いろは橋	2006/09/13	1	3	1,299	794	237,158	8.5	1.1	礫
	2006/12/11	0	0	15	3	4,825	18.5	1.4	砂質礫
	2007/02/13	0	0	42	4	6,309	18.1	1.2	礫質砂
高橋	2006/09/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	2006/12/11	0	0	199	34	4,793	14.5	0.8	砂質礫
	2007/02/13	0	0	2,418	14,087	2,772,544	25.7	2.7	細粒分砂質礫

表-11 単離したオーシストとシストの種及び遺伝子型

調査地点	採取日	河川水		底泥	
		<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<b>利根川</b>					
板東大橋	2006/09/13	(0/4)	(0/2)	不検出	不検出
	2006/12/11	不検出	不検出	不検出	不検出
	2007/02/13	bovin genotype: ksu-1(6/8)	assenblage A I (1/5)	不検出	(0/1)
上武大橋	2006/09/13	(0/2)	不検出	-	-
	2006/12/11	不検出	不検出	不検出	不検出
	2007/02/13	不検出	不検出	bovin genotype: ksu-1(2/2)	(0/1)
利根大堰	2006/09/13	不検出	不検出	(0/5)	(0/3)
	2006/12/11	不検出	不検出	bovin genotype: ksu-1(2/2)	不検出
	2007/02/13	bovin genotype: ksu-1(10/12)、IOW(1/12)	assenblage A I (4/9)	不検出	assenblage B (1/1)
芽吹大橋	2006/09/13	(0/5)	(0/1)	不検出	不検出
	2006/12/11	bovin genotype: ksu-1(5/8)	(0/2)	不検出	不検出
	2007/02/13	bovin genotype: ksu-1(17/29)、IOW(3/29)	assenblage A I (10/29)、B(1/29)	不検出	不検出
<b>小山川</b>					
いろは橋	2006/09/13	不検出	不検出	(0/1)	assenblage B (1/3)
	2006/12/11	不検出	不検出	不検出	不検出
	2007/02/13	bovin genotype: ksu-1(2/2)	不検出	不検出	不検出
高橋	2006/09/13	(0/3)	不検出	-	-
	2006/12/11	不検出	不検出	不検出	不検出
	2007/02/13	bovin genotype: ksu-1(10/21)、IOW(1/21)	assenblage A I (5/18)	不検出	不検出

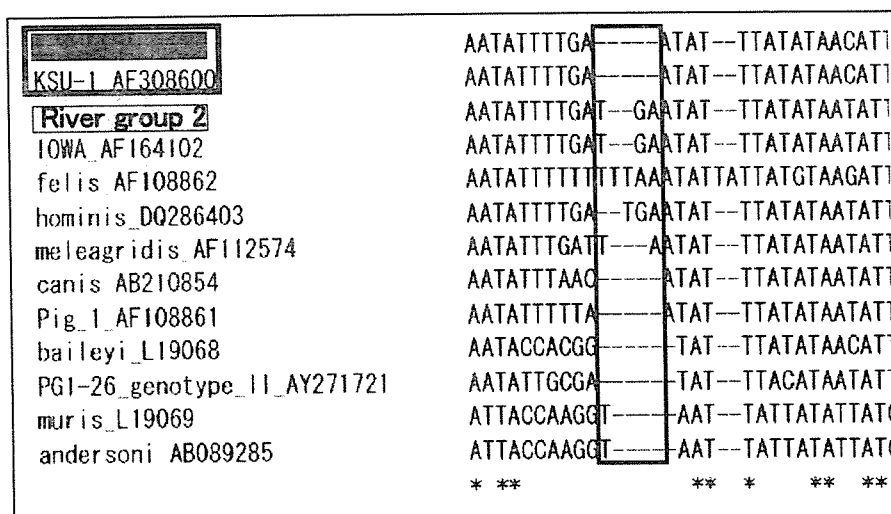


図-2 *Cryptosporidium* の 18SrDNA 塩基配列による種と遺伝子型のアライメント

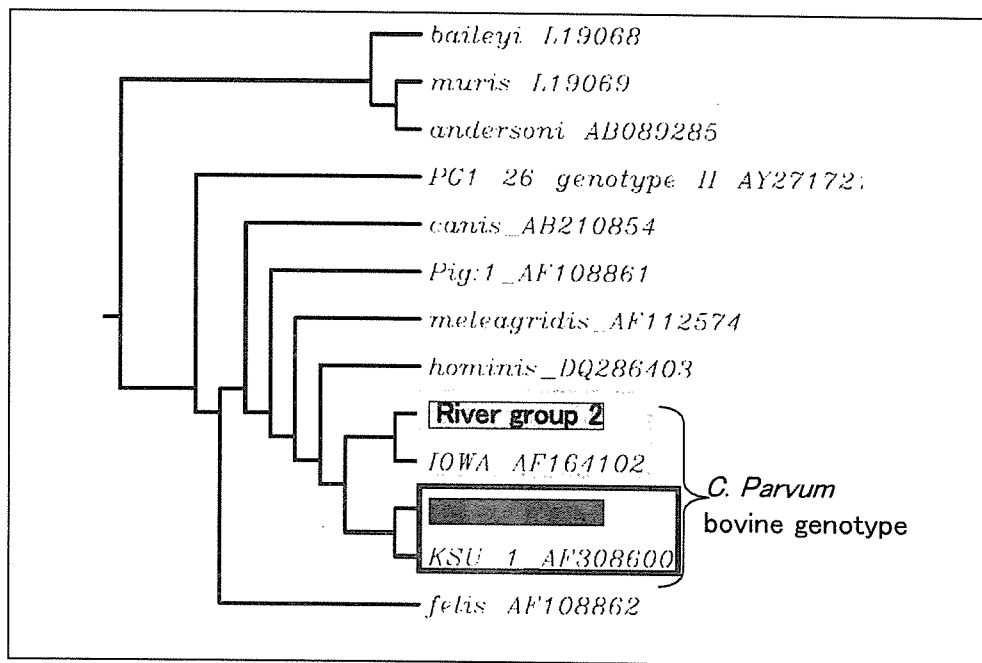


図-3 *Cryptosporidium* の 18SrDNA 塩基配列による種と遺伝子型の系統樹 (非加重結合法)

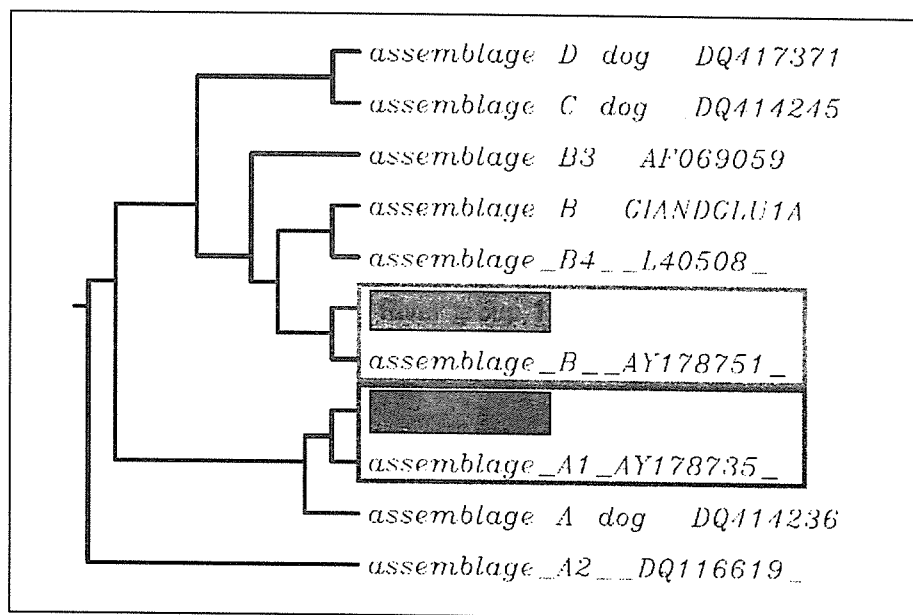


図-4 *G. lamblia* 遺伝子型の系統樹 (非加重結合法)

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 18 年度)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Terajima J, Tosaka N, Ueno K, Nakashima K, Kitsutani P, Gaynor MK, Park SY, Watanabe H.	Shigella sonnei outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii.	Jpn J Infect Dis.	59	282-3	2006
Iguchi A, Iyoda S, Terajima J, Watanabe H, and Osawa H.	Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the Escherichia coli O157:H7 chromosome.	Gene	372	199-207	2006
Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Mitobe J, Miura M, Watanabe H.	Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing Escherichia coli in Japan.	Foodborne Pathogens and Disease.	3	68-73	2006
Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, Tashiro K, Tobe T, Ohnishi M, Nakayama K, Morimoto T, Terajima J, Watanabe H, Kuhara S, Hayashi T.	Complexity of the genomic diversity in enterohemorrhagic Escherichia coli O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai OligoDNA microarray and the Whole Genome PCR scanning.	DNA Res.	13	3-14	2006
Tanaka D, Shima T, Isobe J, Watahiki M, Matsumoto M, Endoh M, Okuno R, Ogata K and Nagai Y.	Epidemiology and Molecular Analysis of Group A Streptococci from Patients Involved in Food-Borne Disease Outbreaks in Japan between 1996 and 2003.	Jpn J Infect Dis.	509	202-3	2006

Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, Hayashi Y, Nakano M, Fukushima R, Katai A, Tanaka T, Hata M, Matsumoto M, Takahashi M, Sakae K.	Development of a rapid strain differentiation method for methiicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames.	J. Appl. Microbiol.	101	938-47	2006
久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、濱野米一、勢戸和子、山崎涉、河原隆二、依田知子、石橋正憲、塚本定三、堤 千津、足立和人	学校給食によるカンピロバクタ一集団食中毒-大阪府	病原微生物検出情報	27	172-173	2006
Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K	Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities.	Arch Virol	151	1635-1641	2006
Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N	Investigation of norovirus replication in a human cell line	Arch Virol	151	1291-1308	2006
Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N	Genetic and antigenic diversity among noroviruses	J Gen Virol	87	909-919	2006

Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Liang, and Mary K. Estes	High efficiency cross-reactive monoclonal antibody production by oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles.	Microbiol. Immunol.	50	883-888	2006
Miyoshi T, Uchino K, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Sibata H, Fujii F and Tanaka T.	Characterization of Norovirus outbreaks during a non-epidemic season.	Jpn. J. Infect. Dis.	59	140-141	2006
Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Teranaka Y, Sugimoto M, Sakai Y, Sibata H, Fujii F and Tanaka T.	Combined genogroup I and II Norovirus infection at a nursery.	Jpn. J. Infect. Dis.	59	2007-272	2006
Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K	Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities.	Arch Virol	151	1635-1641	2006
Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N	Genetic and antigenic diversity among noroviruses.	J Gen Virol	87	909-919	2006
田中智之、三好龍 也、内野清子、武田 直和.	世界的に見たノロウイルスの現 状。	臨床と微生物	33	385-391	2006

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和.	新興・再興感染症の感染制御の実際 8. ノロウイルス.	治療学	40	79-82	2006
小林宣道、田中智之.	ノロウイルス感染症.	Pharma Medica	24	21-25	2006