

表 - 4、国内における15歳以下の年齢層でのクリプトスポリジウムならびにジアルジア  
感染者数の統計(感染症発生動向調査事業年報より)

報告年	原虫	年齢階級				総計**	
		0	1-4Y	5-9Y	10-14Y	Crypto	Giardia
2006	Crypto	1	1	1	0	3	
	Giardia	0	2	0	2		4
2005	Crypto	0	0	0	1	1	
	Giardia	0	1	2	1		4
2004	Crypto	0	0	29*	21*	—	
	Giardia	0	0	0	0		0
2003	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	2	1	2		5
2002	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	0	0	0		0
2001	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	0	0	1		1
2000	Crypto	0	0	0	0	0	
	Giardia	0	1	1	0		2

\*は集団感染事例

\*\*は集団感染事例除く

平成 20 年度厚生労働科学研究

「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」

クリプトスポリジウム研究班

分担研究報告

研究分担者	神奈川県衛生研究所微生物部	黒木俊郎
研究協力者	神奈川県衛生研究所微生物部	古川一郎
研究協力者	国立感染症研究所寄生動物部	泉山信司

水試料の *Cryptosporidium* 検査は、*Cryptosporidium* の汚染状況を把握し、水道水の原材料となる河川水等の品質を確認し、微生物学的に安全な水道水を生産・供給し、さらに水道水を介した *Cryptosporidium* 感染を予防するために重要な試験である。現行の試験法は顕微鏡を用いて *Cryptosporidium* の内部構造の観察により確定した上でオーシストを計数するため、信頼性が高く、且つ原水の品質の把握や水道水にオーシストが混入した場合のリスクの強度の推定を可能にしている。しかしその一方で、顕微鏡検査には習熟と検査時間を要するため、迅速簡便に結果が得られる試験法が望まれているのも事実である。そのため、遺伝学的手法である PCR 法やリアルタイム PCR 法の報告が研究者によりなされているが、未だ現場での試験法への導入はなされていない。本研究では、既報の Taq-Man PCR 法から 5 種類を選び、これらの評価を行った。増幅曲線、検量線、アガロースゲル電気泳動像等を比較した結果、18SrRNA を標的遺伝子として設計されている Miller らのシステムが最適であると判断した。

一方で、現行の試験法の回収率に影響を与える可能性がある、試料の保存期間について検証した。130 個のオーシストを添加した河川水試料を冷蔵保存して経日的に回収率を調べたところ、Percoll・シヨ糖浮遊法、免疫磁気ビーズ法のいずれの精製法においても回収率が日を追って低下することが判明した。このことから、試料水からの *Cryptosporidium* 検出は試料採取当日に実施されることが推奨された。

A. はじめに

現行の表流水からの *Cryptosporidium* の検出は、微分干渉装置付蛍光顕微鏡観察により行われている。特に、微分干渉観察は顕微鏡操作と形態観察に習熟することが必須で、検査時間を要するだけでなく、判断に個人差が生じる恐れがあることから、より客観的と思われる遺伝子検査法への期待がもたれている。実際に、PCR 等を用い

た遺伝子検査法の導入を目的とした PCR 法やリアルタイム PCR 法の複数のシステムが報告されている。こうした方法が導入されれば、*Cryptosporidium* の検出までの時間が短縮され、簡便に検査を進めることが可能となることが期待される。

水試料からの *Cryptosporidium* や *Giardia* の検査は、濃縮、精製、染色、標本作製および顕微鏡観察の手順を踏んで行

われるが、検出率を高めるためには特別の配慮が必要となっている。これまで水試料の保存期間は短くすることを原則としてきたが、実際には採取の翌日以降に検査が行われることもあり、試料の保存が結果に与える影響が懸念されていた。

そこで本調査では、これまでに報告されている Taq-Man PCR 法の検出感度を検証し、検査への導入を判断する際の基礎資料となる情報を提供することとした。また、保存期間が水試料からの *Cryptosporidium* の回収率に与える影響を調査した。

## B. 材料と方法

### 1) *Cryptosporidium* DNA の調製

*Cryptosporidium* はヌードマウスで継代されている株を使用した。マウスの糞便中のオーシストを塩化セシウム浮遊法により精製した。オーシストを TE 緩衝液に浮遊し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結融解を 5 回繰り返した。Proteinase/DTT 溶解液  $50\ \mu\text{L}$  を加え、 $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分溶解した。次に超音波発生器で 1 分間破壊し、 $75^{\circ}\text{C}$  で 1 分間加熱してから激しく振盪した。最終的に溶液  $5\ \mu\text{L}$  あたり 6,000 オーシストとなった。原液  $5\ \mu\text{L}$  に精製水  $45\ \mu\text{L}$  を加え、段階希釈した。各希釈液を TaqMan 法の試料とした。

### 2) Taq-Man PCR 法

既報の Taq-Man PCR 法による *Cryptosporidium* 検出法より以下の論文に記載された 5 システムを検討の対象とした (表 1)。

1. GD Di Giovanni, MW LeChevallier: Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. Appl Environ Microbiol, Mar. 2005;71: 1495-1500.
2. M Fontaine, E Guillot: Development of

a Taq-Man quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiol. letter. 2002;214:13-17.

3. WAMiller, IA Gardner, ER Atwill, CM Leutenegger, MA Miller, RP Hedrick, AC Melli, NM Barnes, PA Conrad: Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). J Microbiol Methods. 2006;65:367-79.
4. AR Keegan, S Fanok, PT Monis, CP Saint: Cell culture-Taq-Man PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. Appl Environ Microbiol. 2003;69:2505-11.
5. King BJ, Keegan AR, Monis PT, Saint CP: Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. Appl Environ Microbiol. 2005;71:3848-57.

PCR 用 Master Mix は Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) を用い、プライマー濃度、プローブ濃度および反応条件は既報に従った。リアルタイム PCR 装置は Light cycler (Roche) を用いた。

### 3) Taq-Man PCR 法の増幅産物の確認

各 Taq-Man PCR システムの反応後、PCR 産物の確認を行った。反応チューブから  $5\ \mu\text{L}$  を 1.2% アガロースゲルで泳動した。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、UV 下で観察した。

### 4) 水試料の採取

相模川から、河川水 10L を 17 試料、ユニオンコンテナ (10L) に採取し、室温



で研究所に搬送した。

#### 5) 試料の保存

採水当日に検査の対象とした3試料は、処理まで室温に置いた。その他の試料は冷蔵保存した。

#### 6) *Cryptosporidium* オーストの添加回収試験

採水当日に、16試料の各試料に130個のオーストを添加した。5試料は添加当日に回収試験を行い、その他の試料は冷蔵保存し、1日後、2日後および6日後にそれぞれ4試料ずつの回収試験を行った。

#### 7) 回収法

試料10Lを径149mm孔径1 $\mu$ mの混合エステルタイプメンブランフィルターで加圧ろ過し、ろ過後フィルターをアセトンで溶解した。これを2回遠心洗浄後、PBSに置換した。各実験日に4試料ずつをろ過し、2試料はPercoll-ショ糖浮遊法、2試料は免疫磁気ビーズ法でオーストを精製した。精製した試料は径25mm、孔径1 $\mu$ mのセルロースアセテート製メンブランフィルター上で免疫染色およびDAPI染色を行い、微分干渉装置付蛍光顕微鏡で計数した。

### C. 結果

1) 水試料からの *Cryptosporidium* の検出における遺伝子解析 (Taq-Man PCR法) の利用

いずれのシステムにおいても、*Cryptosporidium* のオースト数が今回検討した0.24個から2,400個の範囲でリニアリティが得られた。各システムによる検量線は以下のとおりであった。

$$1: y = -3.39x + 37.36$$

$$2: y = -2.84x + 34.43$$

$$3: y = -3.50x + 34.39$$

$$4: y = -3.14x + 32.01$$

$$5: y = -3.33x + 33.39$$

Di Giovanni らのシステムは、産物のサイズが300bp強と大きく、リアルタイムPCR法としては不利なサイズであった。実際に、0.24個の場合の蛍光シグナルの立ち上がりは40サイクル程度を必要とやや遅かった(図1-1、2)。

Fontaine らのシステムは産物のサイズが100bp強と小さく、リアルタイム法には有利なはずであるが、0.24個の検出に40サイクル程度が必要で、やや遅かった(図2-1、2)。

Miller らのシステムは、産物のサイズが200bp弱とリアルタイムPCR法に有利であった。0.24個の反応の立ち上がりは37サイクル程度と少し早く、蛍光シグナルの立ち上がりは鋭く鮮明であり、PCRの非特異産物が産生されておらず、検量線の直線性が保たれていた。さらに、唯一蛍光シグナルの上昇がプラトーに達していた。ただし、蛍光の絶対量が少なかった(図3-1、2)。

Keegan らのシステムは、産物のサイズが300bpと他に比べてリアルタイムPCR法としては不利であったが、0.24個の蛍光シグナルの立ち上がりは33サイクル程度と、検討したシステムの中で最も早かった。検量線の直線性が保たれていたが、蛍光シグナルの立ち上がりは緩慢で、PCRの非特異産物が産生されていた(図4-1、2)。

King らのシステムは、産物のサイズが300bp程度と大きく、産物の長さがリアルタイムPCR法には不利であった。0.24個の蛍光シグナルの立ち上がりは37サイクル程度と他のシステムよりもやや早かった。検量線の直線性は低濃度まで保たれていた

が、蛍光シグナルの立ち上がりが悪く、非特異産物が産生されていた(図5-1, 2)。

## 2) *Cryptosporidium* の検出に影響する要因としての水試料の保存期間の検討

河川水の検体を17試料採水し、バックグラウンドとして1試料は *Cryptosporidium* 検査を実施したが、オーシストは検出されなかった。残りの16試料にオーシストを130個ずつ添加し、採取日、冷蔵1日目、冷蔵2日目、冷蔵6日目に Percoll-シヨ糖法とビーズ法の各精製法で2試料ずつから *Cryptosporidium* の検出を行った。結果を図6に示した。

採水当日の回収率は、採水当日は Percoll-シヨ糖法では44.6%、免疫磁気ビーズ法では49.2%であった。採水から6日後まで冷蔵保存したところ、Percoll-シヨ糖法では33.1%から20.8%に、免疫磁気ビーズ法では23.5%から8.1%にまで回収率は低下した。

## D. 考察

水道水の微生物学的安全性は、浄水場における凝集沈殿ろ過処理による除去と塩素消毒により担保されている。ところが、*Cryptosporidium* は塩素耐性を示すため、水道水の塩素消毒では不活化されない。さらに、直径5 $\mu$ m程度と小さく、浄水場での確実な処理が求められている。このような状況にあることから、水道水や水道原水における *Cryptosporidium* の汚染状況の把握は、水道水の管理上重要な項目となっている。

現行の水試料から *Cryptosporidium* の検出は、試料の濃縮、精製、免疫蛍光染色、顕微鏡観察というステップを経て行われる。検査の操作は煩雑であり、さらに顕微鏡観察には訓練による技術の習得が必要である。

そのため、簡便にかつ迅速に *Cryptosporidium* を検出するために、PCR法やリアルタイムPCR法などの遺伝子工学的手法を用いた検査法が検討されている。

PCR法は操作が簡便であるが、電気泳動法により産物の確認工程があり、検査終了までに時間を要し、実験室環境を汚染する可能性がある。これに対してリアルタイムPCR法は短時間で終了し、実験室環境の汚染もない。さらに、プローブにより標的配列を検出するため特異度が高い。

今回の調査では、これまでに報告されている *Cryptosporidium* 検出用に開発された5法のTaqManPCRシステムの評価を行った。MillerらのTaqManPCRシステムは、産物のサイズが小さく、非特異産物も産生されず、感度も良好であることなどから、今回検討したシステムの中で最も優れたシステムであると考えられた。このシステムは標的遺伝子を18S rRNAとしており、オーシスト中のコピー数が多いことから良好な感度を得ることができることが推測された。今後、実際の水試料からの *Cryptosporidium* 検出での性能を検討する必要がある。

試料水からの *Cryptosporidium* の検出は、オーシストの計数を行わなければならないため、回収率は重要になる。今回の調査では、回収率に大きな影響が生じることが懸念されていた試料水の保存について検討した。その結果、試料水を冷蔵保存することで回収率が低下することが示された。回収率低下の原因として、1) オーシストが夾雑物とともに容器に沈殿し、底部に張り付いてしまう、2) 保存中に夾雑物とオーシストが付着、結合してしまい、夾雑物とオーシストの分離が困難となった、3) オーシストの活性が失われてシヨ糖が内部に浸透した、4) オーシストの表面抗原が分解され抗体の結合が弱まった、5) 雑菌

が繁殖して試料水中の夾雑物が増したといった理由が考えられた。Percoll・シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法を比較した場合、採水当日の検査での結果はほぼ同じであったが、6日後の検査では免疫磁気ビーズ法の結果が Percoll・シヨ糖浮遊法の結果よりも低くなった。これは、上記の原因のうち4) が影響を及ぼしている可能性があることを示唆した。原因は何であるにしろ、試料水からの *Cryptosporidium* 検査は採水当日に実施することが強く推奨される結果となった。

#### E. 結論

水試料からの *Cryptosporidium* 検出法として、リアルタイム PCR 法の活用を意図して論文報告された 5 システムの Taq-Man PCR 法の評価を行った。Miller らのシステムは検討したシステムの中で最も良好な結果が得られた。

*Cryptosporidium* 検査の回収率に影響を与える要因として水試料の保存の影響を検討した。河川水に *Cryptosporidium* のオーシストを添加し、冷蔵保存した試料を日を追って検査したところ、Percoll・シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法のいずれの精製法においても回収率は減少した。このことから、水試料からの *Cryptosporidium* オーシストの検出のための試験は採水当日に実施することが推奨された。

#### F. 研究発表

1. Toshiro Kuroki, Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Yumi Une, Hideki Hayashidani, Masaki Kuro-o, Akira Mori, Hajime Moriguchi, Michihisa Toriba, Toru Ishibashi, Takuro Endo (2008): Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in

snakes in Japan. *Parasitology Research* 103: 801-805.

2. 高木正明、鳥海宏、遠藤卓郎、山本徳栄、黒木俊郎 (2008): プール水を介したクリプトスポリジウム症集団発生事例、感染症学雑誌、82 (1): 14-19.

#### G. 健康危機情報

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 *Cryptosporidium* 検出用 Taq-Man PCR 法の特徴

プライマー	プローブ	標的遺伝子	Crossing Point *	slope	反応効率	非特異産物	Reference
CPHSPT2F/CPHSPT2R	CPHSP2P2	heat shock protein	25.78	-3.393	97%	なし	1
FG-F/FG-R	FG-Pro	heat shock protein	24.33	-2.843	125%	あり	2
Crypt-193f/Crypt-374r	Crypt-276p	18S rRNA	22.55	-3.497	93%	なし	3
18SIF/18SIR	KAR	18S rRNA	21.02	-3.143	108%	あり	4
18SIF/18SIR	EUK3	18S rRNA	22.09	-3.329	100%	あり	5

\*: Second Derivative Maximum



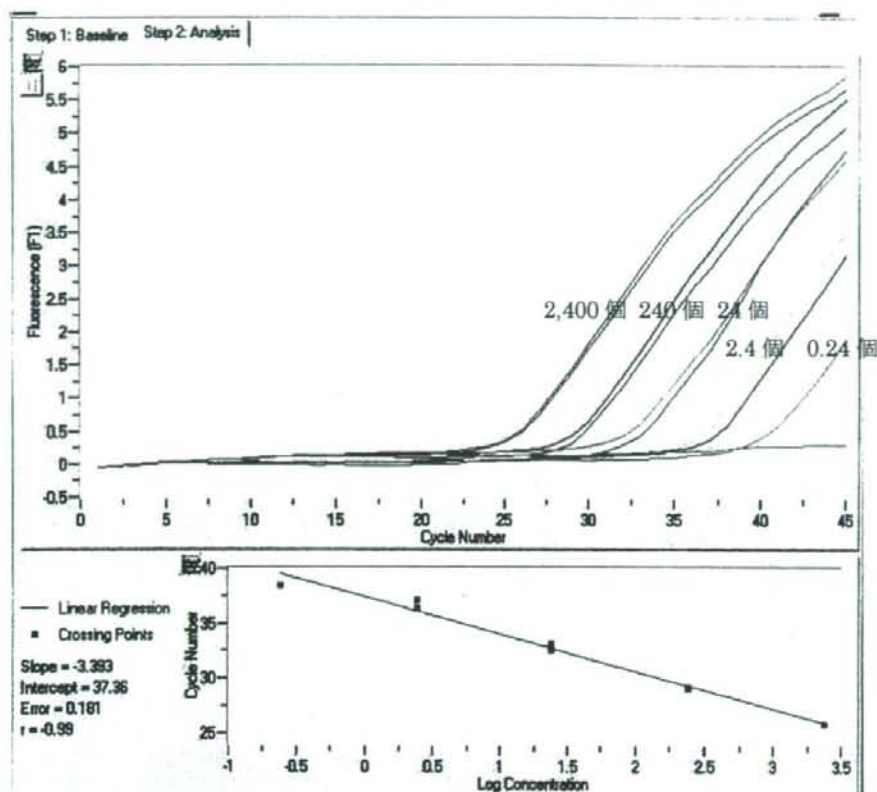


図 1-1 抽出 DNA サンプルの 10 倍段階希釈液における増幅曲線および検量線



図 1-2 CPHSPT 2F/2R による PCR 増幅産物の電気泳動像



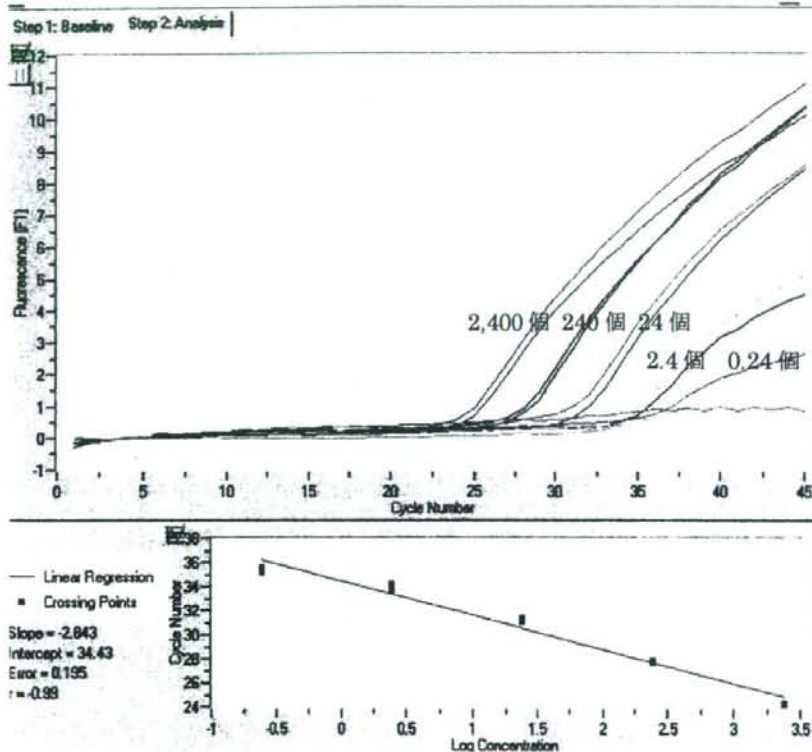


図 2-1 抽出 DNA サンプルの 10 倍段階希釈液における増幅曲線および検量線

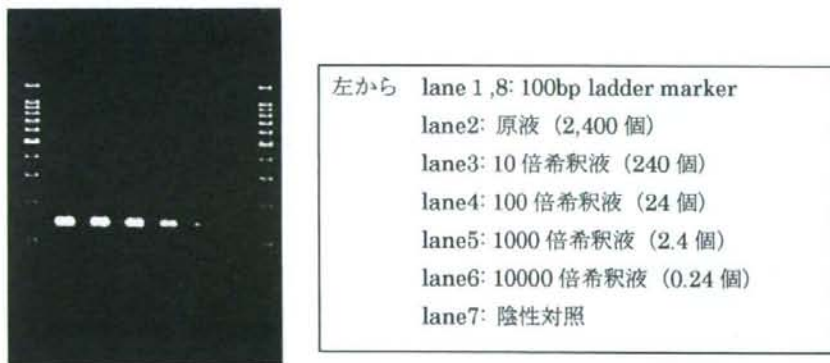


図 2-2 FG-F/R による PCR 増幅産物の電気泳動像

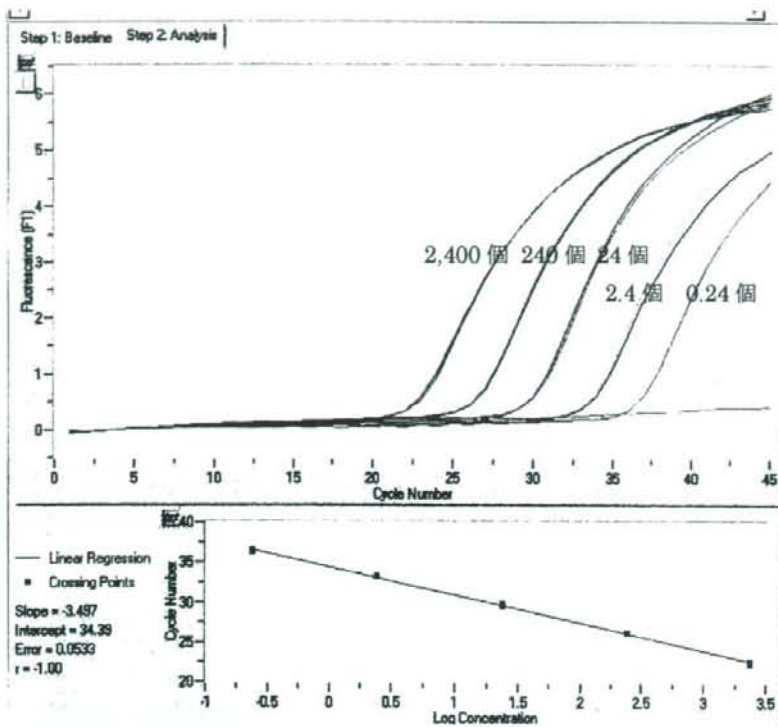


図 3-1 抽出 DNA サンプルの 10 倍段階希釈液における増幅曲線および検量線

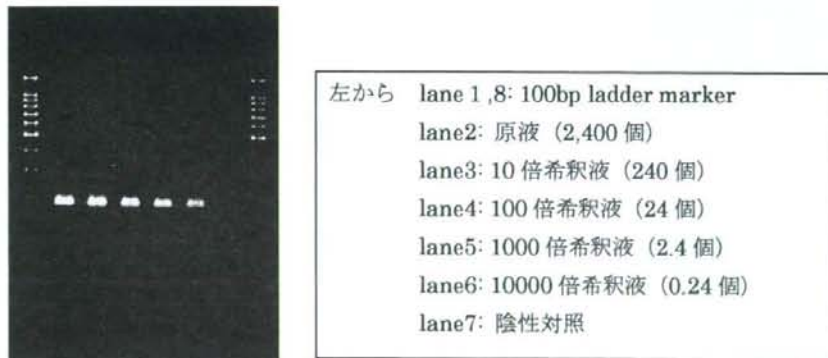


図 3-2 Crypt-193f/374r による PCR 増幅産物の電気泳動像

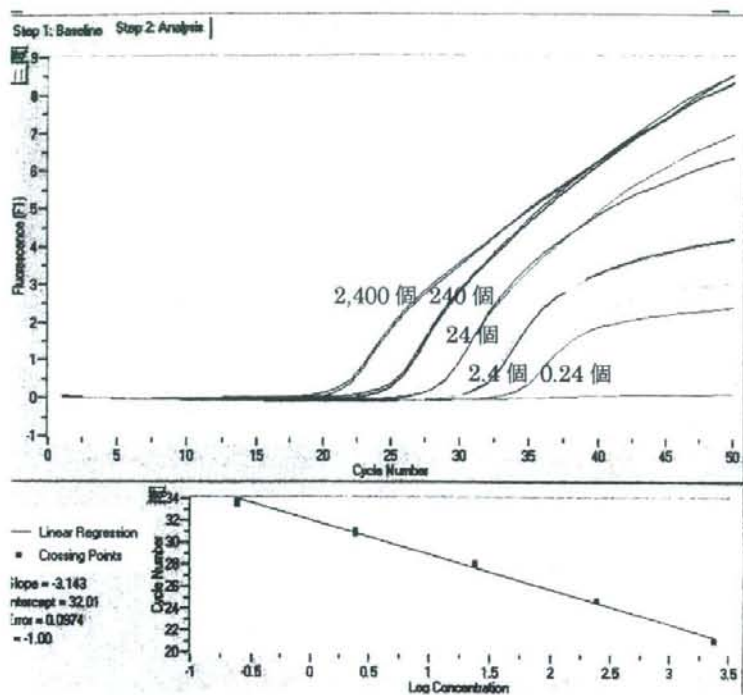
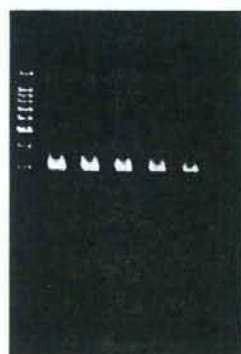


図 4-1 抽出 DNA サンプルの 10 倍段階希釈液における増幅曲線および検量線



左から lane1: 100bp ladder marker  
 lane2: 原液 (2,400 個)  
 lane3: 10 倍希釈液 (240 個)  
 lane4: 100 倍希釈液 (24 個)  
 lane5: 1000 倍希釈液 (2.4 個)  
 lane6: 10000 倍希釈液 (0.24 個)  
 lane7: 陰性対照

図 4-2 18S rRNA による PCR 増幅産物の電気泳動像

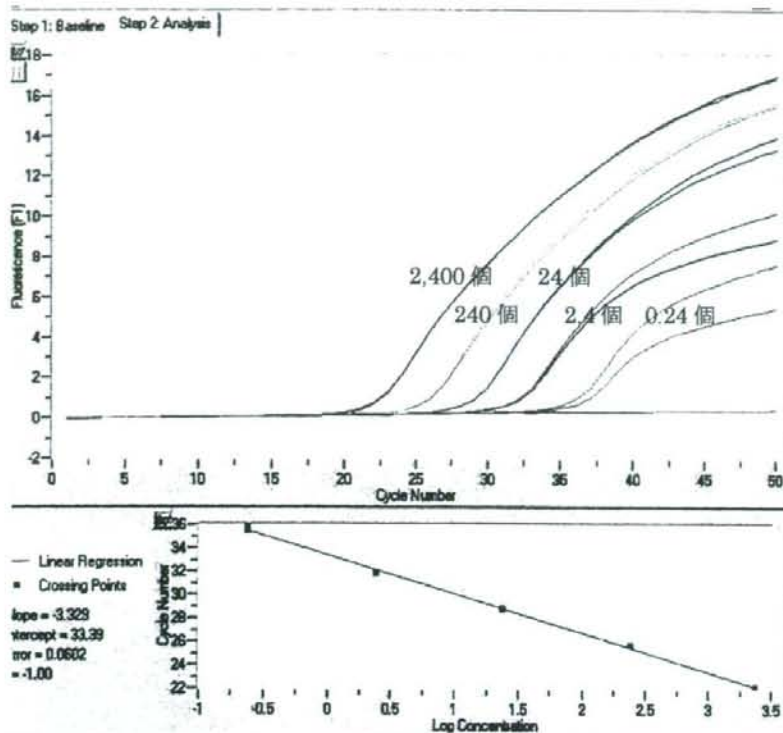


図 5-1 抽出 DNA サンプルの 10 倍段階希釈液における増幅曲線および検量線



左から lane1: 100bp ladder marker  
 lane2: 原液 (2,400 個)  
 lane3: 10 倍希釈液 (240 個)  
 lane4: 100 倍希釈液 (24 個)  
 lane5: 1000 倍希釈液 (2.4 個)  
 lane6: 10000 倍希釈液 (0.24 個)  
 lane7: 陰性対照

図 5-2 18S rRNA による増幅産物の電気泳動像



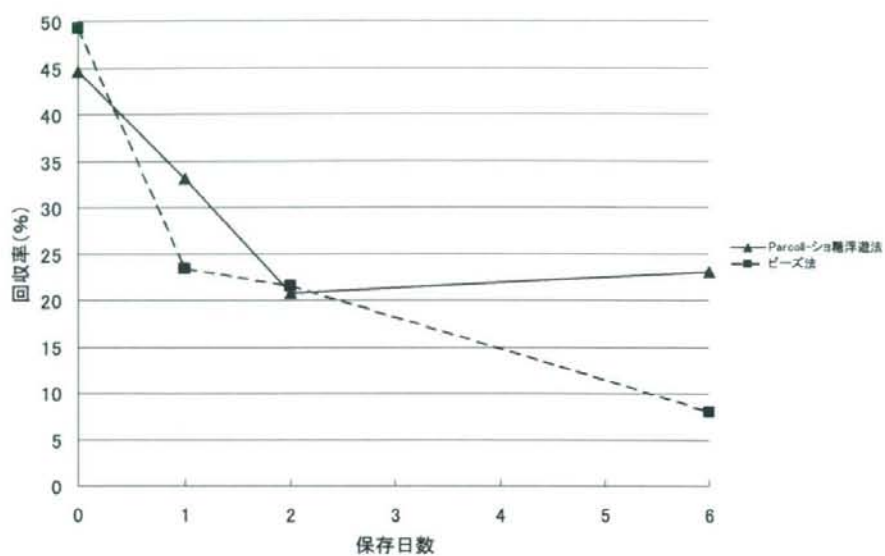


図6 河川水からの *Cryptosporidium* 検出率の経日的変化

## 畜産排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

研究分担者：森田 重光 麻布大学 生命・環境科学部  
研究分担者：秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部  
研究協力者：原本 英司 国立保健医療科学院 水道工学部  
研究協力者：岸田 直裕 国立保健医療科学院 水道工学部

### 研究要旨

*Cryptosporidium* の比重は 1.06~1.08 であることからシヨ糖浮遊法で用いられるシヨ糖液の比重は 1.15~1.20 であることが多い。しかし、シヨ糖の比重を変化させた回収実験の結果から、*Giardia* シスト（以下シストという）をシヨ糖浮遊法で精製して定量するためには、シヨ糖液の比重を 1.25 とする必要があることが明らかとなった。

また、神奈川県内と愛知県内の計 4 箇所の畜産排水処理施設で排水と排水処理水を採取し、*Cryptosporidium* オーシスト（以下オーシストという）およびシスト濃度を定量した。排水中のオーシストの濃度レベルは 2000~170000 oocysts/L、シストの濃度レベルは 5600~1100000 cysts/L であった。排水処理水中のオーシストの濃度レベルは 12~99000 oocysts/L、シストの濃度レベルは 0.0~66000 cysts/L であり、両原虫の除去率はオーシストが 0.0691~4.14 log<sub>10</sub>、シストが 1.04~4.00 log<sub>10</sub> であった。

### 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。

これまでに報告されている *Cryptosporidium* オーシスト（以下オーシストという）および *Giardia* シスト（以下シストという）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、顕微鏡観察して計数する方法が用いられている（U.S.EPA, 1995, U.S.EPA, 1999）。しかし、これらの精製工程では夾雑物が除去されるがオーシストやシストも損失する。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を補正する必要があるが、これまで回収率で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、回収率を算出して精製工程における損失を補正する定量方法を開発した。

さらに、開発した定量法を用いて神奈川県と愛知県の畜産排水処理施設で流入水および処理水を採取し、オーシストおよびシストの濃度レベルを明らかにするとともに、流入水中の濃度と処理水中の濃度から畜産排水処理による両原虫の除去率を算出した。

### B. 研究方法

#### B-1-1 畜産排水

畜産排水は 2 L ポリタンクに採取し麻布大学へ搬送した。搬送後、4℃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。

なお、A 処理施設および B 処理施設ではオキシジェンデッチ法で処理しており、また、C 処理施設および D 処理施設では活性汚泥法で処理している。

#### B-1-2 畜産排水処理水

排水処理水は 10 L ポリタンクに採取した。採取した処理水にはチオ硫酸ナトリウム溶液を添加し残留塩素を中和した。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トレーサとして ColorSeed (BTF Pty.) を用いた。ColorSeed はオーシストおよび *Giardia* シストを Texas Red で染色したものである。

## B-3 オーシストおよびシストの濃縮・精製

### B-3-1 濃縮

畜産排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、ここにトレーサを100~200 (oo)cysts 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×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。

畜産排水処理水は試料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、トレーサとして ColorSeed を100~200 (oo)cysts 添加した。

### B-3-2 超音波処理

試料中に存在するオーシストや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、試料水を出力300 W の超音波洗浄機（ULTRASONIC GENERATOR, SHARP）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。

### B-3-3 ショ糖密度勾配遠心法

超音波処理し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1.20~1.30）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。

### B-4 蛍光抗体染色

全てのフィルタに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 Pty）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を脱水した。脱水後、フィルタを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グラスにのせ、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の定量

#### B-5-1 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）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8~12 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倍の微分干渉像でオーシストあるいはシストであるか否かを判定した。

#### B-5-2 トレーサの定量

オーシスト、シストの定量後に ColorSeed を定量した。すなわち、プレパラートにしたフィルタの全面をG励起光下200倍で検鏡し、強い赤色の蛍光を発する4~6 µm あるいは8~12 µm の粒子の個数を計数した。



## C. 結果と考察

### C-1 畜産排水および処理水中のオーシスト濃度

畜産排水および処理水中のオーシスト濃度を表 1 に示す。オーシストは全ての試料から検出された。排水中の濃度レベルは 2000~170000 oocysts/L (幾何平均値: 34000 oocysts/L), 各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 12000 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 50000 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 120000 oocysts/L, 処理施設 D で 160000 oocysts/L であり, 調査対象の全農場でクリプトスポリジウム症が蔓延していることが示唆された。

処理水中の濃度レベルは 12~99000 oocysts/L (幾何平均値: 180 oocysts/L) であった。各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 120 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 110 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 99000 oocysts/L, 処理施設 D で 12 oocysts/L となり, 処理施設 C では他の施設に比べ非常に高濃度に検出された。処理施設 C では採水時にバルキングが生じていたため, 沈澱槽での沈降作用が損なわれ, オーシストが放流水中に高濃度に残存したものと考えられる。

### C-2 畜産排水および処理水中のシストの濃度

畜産排水および処理水中のシスト濃度を表 2 に示す。シストは全ての排水から検出され, 濃度レベルは 5600~1100000 cysts/L であった。各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 23000 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 160000 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 730000 cysts/L, 処理施設 D で 49000 cysts/L であり, ジアルジア症も全ての農場で蔓延していることが示唆された。

処理水中の濃度範囲は 0.0~66000 cysts/L (幾何平均値: 320 cysts/L) であった。各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 75 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 230 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 66000 cysts/L, 処理施設 D で 0.0 cysts/L となった。

### C-3 除去率

各畜産排水処理施設の両原虫の除去率を表 1 および表 2 に示す。処理施設 E では放流水中のシストが不検出であったため, 検出下限値より除去率を算出した。オーシストの除去率の範囲

は 0.0691~4.14 log<sub>10</sub>, 算術平均値は 2.27 log<sub>10</sub> であった。同様に, シストの除去率の範囲は 1.04~4.00 log<sub>10</sub>, 算術平均値は 2.43 log<sub>10</sub> であった。

処理施設 C のオーシストの除去率が 0.0691 log<sub>10</sub> と低くなったが, 採水時にバルキングが生じていたためであると考えられる。

### C-4 回収率

図 1 に示すように ColorSeed のオーシストは全ての比重において 80% 以上回収することができるが, シストでは比重 1.24 付近から回収率が向上し, 比重 1.26 以上のときに回収率が 80% 以上となった。この結果から, シストをショ糖浮遊法で精製して定量する場合は, ショ糖液の比重を 1.26 とする必要があることが明らかとなった。

またシストを回収率で補正すると, 図 2 に示すように比重が低くなるほど補正したシスト濃度が高くなった。試料中に中身の詰まったシストと空のシストが混在しているとすると, 低比重液を用いた密度勾配遠心法では, 軽い空のシストのみ回収してしまい, 中身の詰まった重いシストを損失してしまう可能性がある。一方, 内部標準としてスパイクした ColorSeed のシストは全て中身の詰まった重いシストであるため低比重液では回収できない。このため, 低比重液を用いた密度勾配遠心法では試料由来のシストと ColorSeed のシストの挙動に違いが生じ, ColorSeed のシストの定量値から算出した回収率を用いて試料由来のシストの濃度を補正すると過大評価となってしまうのではないかと推測された。

## D. 結論

本研究では, 畜産排水および処理水中のオーシスト, シストの濃度レベルを調査した結果, 以下の知見が得られた。

- ① 畜産排水中のオーシスト濃度は 2000~170000 oocysts/L, シスト濃度は 5600~1100000 cysts/L であり, 処理水中のオーシスト濃度は 12~99000 oocysts/L, シスト濃度は 0.0~66000 cysts/L であった。
- ② 畜産排水および処理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, オーシストが 0.0691~4.14 log<sub>10</sub>, シストが 1.04~4.00 log<sub>10</sub> であった。



- ③ *Giardia* シストをショ糖浮遊法で精製して定量する場合は、ショ糖液の比重を 1.26 とする必要がある。

E. 参考文献

- U. S. EPA, ICR protozoan method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure, EPA/814-B-95-003 (1995)
- U. S. EPA, Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration-IMS/FA, EPA-821-R-99-006 (1999)

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

*Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの精製方法の検討, 日本水環境学会年会 (2009.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

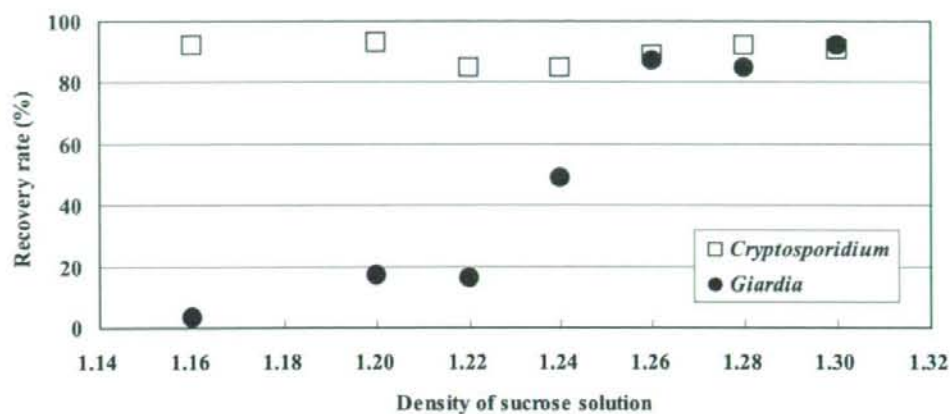


図1 ショ糖比重と回収率との関係

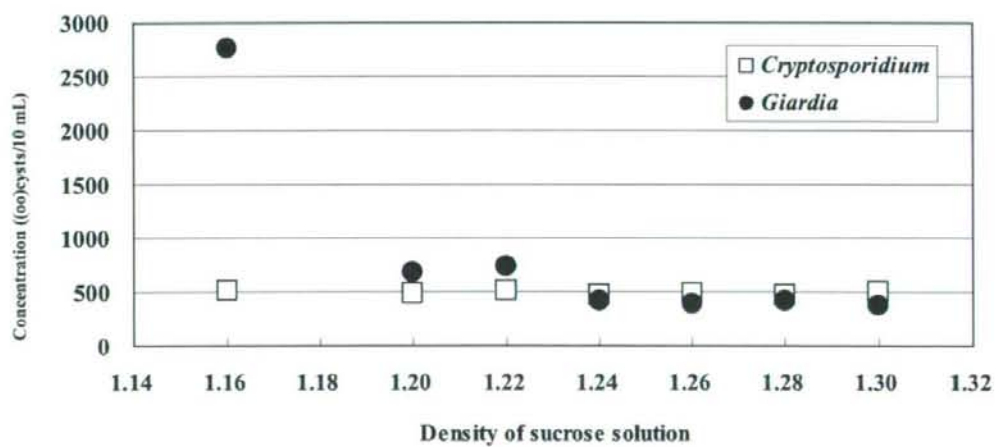


図2 ショ糖比重と定量値との関係

表 1 畜産排水および処理水中の *Cryptosporidium* 濃度とその除去率

Sampling site	Sampling date	Concentration (oocysts/L)		Removal rate (log <sub>10</sub> )
		Raw	Treated	
Treatment Plant A	Dec-07	2.0E+03	1.7E+02	1.07
	Feb-08	2.7E+04	3.0E+01	2.96
	Oct-08	6.2E+04	1.0E+03	1.77
	Nov-08	5.9E+03	4.4E+01	2.12
Treatment Plant B	Dec-07	1.9E+04	1.5E+01	3.09
	Feb-08	3.2E+04	2.4E+02	2.13
	Oct-08	1.7E+05	2.8E+02	2.78
	Nov-08	6.0E+04	1.5E+02	2.60
Treatment Plant C	Aug-08	1.2E+05	9.9E+04	0.0691
Treatment Plant D	Aug-08	1.6E+05	1.2E+01	4.14

表 2 畜産排水および処理水中の *Giardia* 濃度とその除去率

Sampling site	Sampling date	Concentration (cysts/L)		Removal rate (log <sub>10</sub> )
		Raw	Treated	
Treatment Plant A	Feb-08	2.4E+04	8.5E+00	3.46
	Oct-08	8.9E+04	9.5E+02	1.97
	Nov-08	5.6E+03	5.2E+01	2.03
Treatment Plant B	Feb-08	8.9E+04	2.7E+02	2.53
	Oct-08	1.1E+06	1.1E+02	4.00
	Nov-08	4.1E+04	4.4E+02	1.96
Treatment Plant C	Aug-08	7.3E+05	6.6E+04	1.04
Treatment Plant D	Aug-08	4.9E+04	0.0E+00	>3.74

### 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

研究分担者：秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部  
研究協力者：原本 英司 山梨大学大学院 医学工学総合研究部  
研究協力者：中野 雅之 国立保健医療科学院 水道工学部  
研究協力者：岸田 直裕 国立保健医療科学院 水道工学部  
研究協力者：金 京柱 国立保健医療科学院 水道工学部

#### 研究要旨

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並びにその支川の小山川等において、表流水に含まれる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）、ジアルジアシスト（以下シストという）の季節変動と、二次支川における日変動濃度を明らかにした。

定期調査における河川水中のオーシスト、シスト濃度は、それぞれ 0～344 oocysts/10L, 0～204 cysts/10L であり、冬期に高い濃度を示した。利根川の二次支川である A 川でのオーシスト、シスト濃度の日変動は、上～中流域ではそれぞれ 0～36 oocysts/10L, 0～10 cysts/10L であり、最大濃度はそれぞれ 9:00 及び 18:00 に計測された。また、生活排水処理水の影響を強く受ける下流域ではそれぞれ、0～2 oocysts/10L, 28～270 cysts/10L であり、最大濃度はそれぞれ 12:00 及び 18:00 に計測された。

#### A. 研究目的

水道水を介したクリプトスポリジウム症の集団発生は、国内外を問わず世界各地で問題となっている。我が国においても、主要な水道水源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が行われており、主要河川における汚染の実態が徐々に明らかとなっている。特に、汚濁した流入河川では、本川に比べ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）の濃度が高いことが報告されており、支川でのオーシスト及びシストによる汚染実態を把握することは非常に重要である。しかし、点源汚染の影響が強い支川における原虫の濃度変動や、水道水源に存在するクリプトスポリジウムの遺伝子型に関しては未だ知見が乏しく、水道水の原虫汚染による健康リスクの評価を行う際に支障をきたしている。

そこで本研究では、水道水源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並びにその支川の小山川等において、表流水に含まれるクリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシストの季節変動と、二次支川における日変動濃度を明らかにした。

#### B. 研究方法

##### B-1 調査地点と流域状況

調査地点を図-1に示す。調査地点は、利根川中流域に位置する利根大堰を含む2地点、利根川の一次支川である小山川で2地点、二次支川であるA川において6地点を選定した。調査流域内の利根大堰は上水、工業用水、農業用水の大規模取水（導水）地点となっている。利根川の流域内人口は