

- 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。

6) 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 μ L を採取し、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。

7) 水試料からの *Cryptosporidium* の検出に影響する要因

(1) 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。

(2) 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。

(3) *Cryptosporidium* オーシストの添加回収試験

採水当日に、16 試料の各試料に 130 個のオーシストを添加した。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 日後およびお 6 日後にそれぞれ 4 試料ずつの回収試験を行った。

(4) 回収法

試料 10L を径 149mm 孔径 1 μ 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-シヨ糖浮遊法、2 試料は免疫磁気ビーズ法でオーシストを精製した。精製した試料は径 25mm、孔径 1 μ 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) 野外に生息する爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況

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 117 匹中 35 匹 (29.9%) から検出された。

検出された *Cryptosporidium* の 18srRNA の塩基配列は *Cryptosporidium* sp. 983 と一致した。

2) ベット用輸入げっ歯類からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出

ベ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、それぞれデグー 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、ビグミージェルボア 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%) であった。

3) 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* のオーシ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。

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。

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が鋭く鮮明であり、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。

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が緩慢で、PCR の非特異産物が産生されていた。

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。

4) *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・ショ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。

採水当日の回収率は、採水当日は Percoll・ショ糖法では 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・ショ糖法では 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。1980 年代から飲料水を介した集団発生が報告され、大規模な集団発生を起こすことが知られている *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 μm 程度と小さく、浄水場での確実な処理が必要となる。このような状況において、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。

平成 13 年に兵庫県山崎町 (当時) の簡易水道から *Cryptosporidium* のオーシストが検出された事例が発生し、分離された *Cryptosporidium* のオーシストの遺伝子型を解析したところ、*Cryptosporidium* 983 の 18s rRNA の塩基配列 AY120913 と一致することが明らかとなった。この遺伝子型を持つ *Cryptosporidium* はヘビに寄生することが知られているが、情報は断片的であり、宿域、地域的分布、病原性などの詳細な性状に関する情報はわずかであった。当然、わが国の野外に生息するどのヘビが宿主となるかはまったく知られていなかった。そこで、これまで全国の野外からヤマカガシ、シマヘビ、アオダイショウなどのヘビを収集し、*Cryptosporidium* の寄生状況を精査したところ、ヤマカガシが比較的高率に *Cryptosporidium* を保有していることが明らかとなった。その一方で、本州、四国および九州において主要なヘビであるシマヘビやアオダイショウからは *Cryptosporidium* は検出されなかった。これらの結果から、平成 13 年の兵庫県の事例はヤマカガシが汚染源である可能性が高いことが示唆された。

広い範囲の種や遺伝子型を検出可能な遺伝学的手法を用いる場合は、水試料中の *Cryptosporidium* を糞便汚染の指標として捕らえて検査することが可能となる。たとえば、平成 13 年の兵庫県のヘビの糞便汚染による *Cryptosporidium* 混入事例では、ヒトに感染しないとされている *Cryptosporidium* が検出され、これにより水源の汚染源対策が取られた。これにより、ヘビのみならず、その他の小動物の水源への侵入や種々の動物の糞便汚染を防ぐこと

が出来るようになり、結果的に供給水道の安全性が高められることとなった。

現行の水試料から *Cryptosporidium* の検出法は、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 法などの遺伝学的手法を用いた検査法が研究者らにより検討されている。

PCR 法は操作は簡便であるが、検査終了までに時間を要する。これに対してリアルタイム PCR 法は短時間で終了することができる。さらに、TaqManPCR 法では、プローブにより標的配列を検出するため感度と特異度がともに高い。

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、産物のサイズが小さく、非特異産物も産生されず、感度も良好な Taq-Man PCR システムが見出された。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、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。その原因として、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るといった要因が考えられる。Percoll-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法では、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。このことは、上記の原因 1) よりも 2) が影響を及ぼしている可能性があることを示唆している。原因は何であるにしろ、試料を冷蔵保存すると回収率が低下することが示されたことから、試料水からの *Cryptosporidium* の検出は採水当日にできるだけ早く実施することが、回収率を維持するために必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

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、森ロー、遠藤卓郎：国内に生息するへび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：国内に生息するへび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

3. 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎：クリプトスポリジウムおよびジアルジア感染症の感染経路の検討、第 67 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2007 年 10 月 6 日 東京

F. 健康危機情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

下水および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。

2006 年 10 月から 2008 年 12 月の間、下水および下水処理水中の *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。下水中のオーシストの濃度レベルは不検出～2700 oocysts/L, シストの濃度レベルは 3900～8000 cysts/L であった。6 月と 12 月のオーシスト濃度は他の月と比べ有意に高く、集水域で小規模なアウトブレイクが発生した可能性が示唆された。下水処理水中のオーシストの濃度レベルは 0.10～5.9 oocysts/L, シストの濃度レベルは 23～250 cysts/L であり、両原虫の除去率はオーシストが 0.398～2.86 log₁₀, シストが 1.12～3.03 log₁₀ であった。

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、オーシスト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不検出～66000 cysts/L であり、両原虫の除去率はオーシストが 0.0691～4.14 log₁₀, シストが 1.04～4.00 log₁₀ 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都下の下水処理場および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下水処理および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 調査試料

2006年10月から2008年12月の間、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。この下水処理場では標準活性汚泥法を用いて処理している。採取量は流入水2.0L、放流水40Lとした。

B-1-1 流入下水

流入下水は2L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。

B-1-2 下水処理水

下水処理水は20Lポリタンク2本に採取した。採取した放流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-1-3 畜産排水

畜産排水は2L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デーションディ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-1-4 畜産排水処理水

排水処理水は10L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

下水あるいは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、うち400mLをポリプロピレン製遠沈管(以下遠沈管)8本に50mL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25mLをアスピレーターで吸引除去した。

下水処理水あるいは畜産廃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100mL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100mL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100mL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300W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2mm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50mL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7.5mL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50mL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80μL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 μ L 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 μ m あるいは 8~12 μ m 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 μ m あるいは 8~12 μ m の粒子の個数を計数した。

C. 結果と考察

C-1 下水中のオーシストおよびシストの濃度

下水中のオーシスト濃度を図 1 に示す。本研究で調査した 2006 年 10 月から 2008 年 12 月の流入下水中のオーシスト濃度は不検出~2700 oocysts/L であった。このうち、2007 年は 6 月 (2700 oocysts/L) と 11 月 (300 oocysts/L)、2008 年は 6 月 (99 oocysts/L) と 12 月 (90 oocysts/L) のオーシスト濃度が他の月と比べ有意に高く、集水域で小規模なアウトブレイクが発生した可能性が示唆された。2008 年 6 月の下水濃縮物中のオーシストの優占種をダイレクトシーケンシングで調べたところ、ヒトのみに感染する *Cryptosporidium hominis* であることが明らかとなった。この結果はヒト集団でアウトブレイクが発生したことを裏付けるものであると考えられる。

下水中のシスト濃度を図 2 に示す。本研究で

調査した流入下水中のシスト濃度は 3900~8000 cysts/L (回収率が 10% 以下のデータも含めると 3900~110000 cysts/L) であり、オーシスト濃度の調査で観測されたようなピークはみられず、また、全体的にオーシストよりも濃度が高かった。

C-2 下水処理水中のオーシストおよびシストの濃度

下水処理水中のオーシスト濃度を図 3 にシスト濃度を図 4 に示す。オーシスト濃度は 0.10~5.9 oocysts/L、シスト濃度は 23~250 cysts/L であった。

C-3 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。廃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-4 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不検出～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-5 除去率

流入下水および処理水中のオーシスト, シストの濃度から下水処理による除去率を求めた (図 5 および図 6)。その結果, オーシストの除去率は $0.398 \sim 2.86 \log_{10}$, シストの除去率は $1.12 \sim 3.03 \log_{10}$ となった。

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 $0.0691 \sim 4.14 \log_{10}$, 算術平均値は $2.27 \log_{10}$ であった。同様に, シストの除去率の範囲は $1.04 \sim 4.00 \log_{10}$, 算術平均値は $2.43 \log_{10}$ であった。

処理施設 C のオーシストの除去率が $0.0691 \log_{10}$ 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-6 回収率

図 7 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, シストをシヨ糖浮遊法で精製して定量する場合は, シヨ糖液の比重を 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 8 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, 下水および処理水, 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 流入下水中のオーシスト濃度は不検出～2700 oocysts/L, シスト濃度は 3900～8000 cysts/L であり, 処理水中のオーシスト濃度は $0.10 \sim 5.9$ oocysts/L, シスト濃度は $23 \sim 250$ cysts/L であった。
- ② 流入下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 $0.398 \sim 2.86 \log_{10}$, シストが $1.12 \sim 2.61 \log_{10}$ であった。
- ③ 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 $12 \sim 99000$ oocysts/L, シスト濃度は $0.0 \sim 66000$ cysts/L であった。
- ④ 流入下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 $0.398 \sim 2.86 \log_{10}$, シストが $1.12 \sim 3.03 \log_{10}$ であった。
- ⑤ 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 $0.0691 \sim 4.14 \log_{10}$, シストが $1.04 \sim 4.00 \log_{10}$ であった。
- ⑥ シストをシヨ糖浮遊法で精製して定量する場合は, シヨ糖液の比重を 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

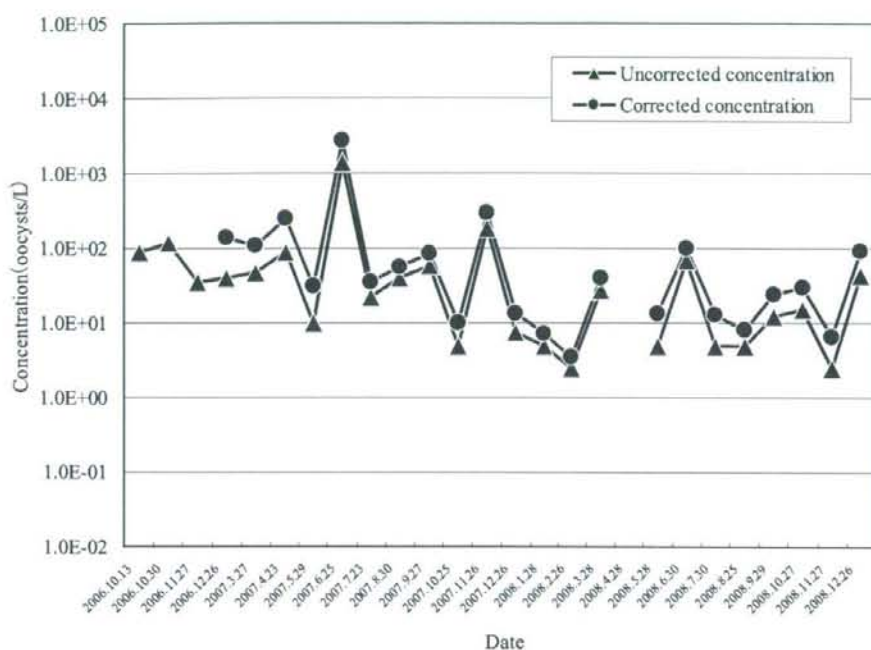


図1 流入下水中の *Cryptosporidium* 濃度

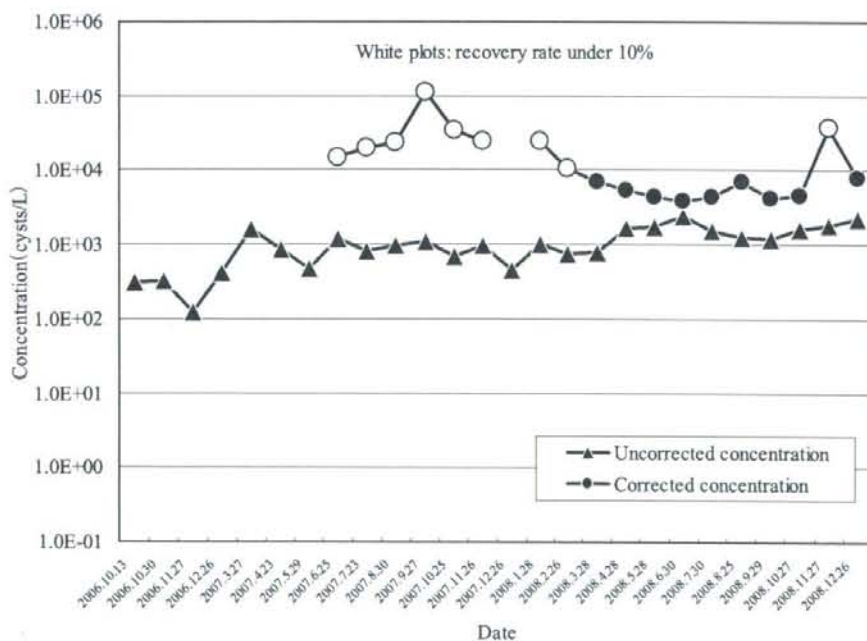


図2 流入下水中の *Giardia* 濃度

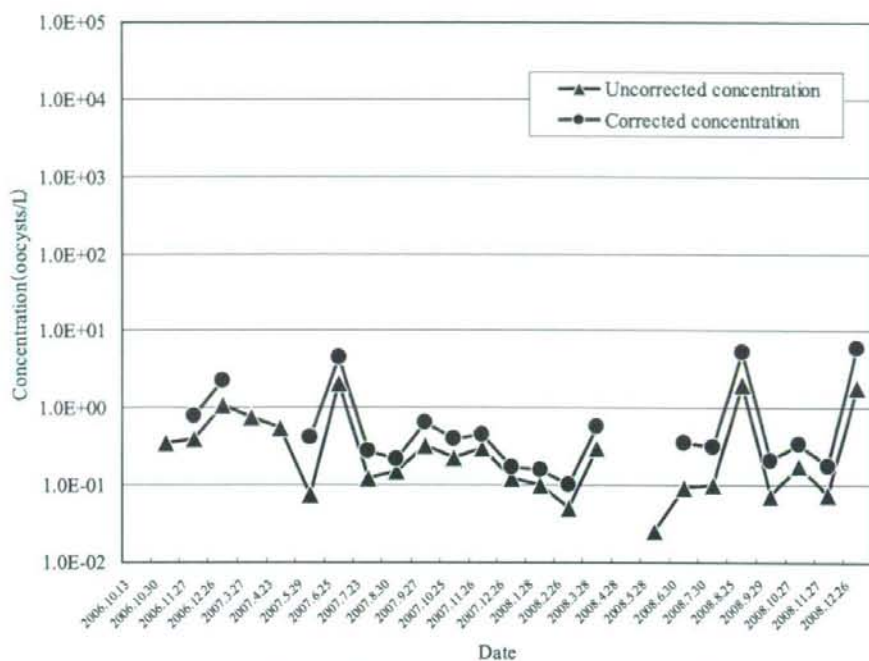


図3 下水処理水中の *Cryptosporidium* 濃度

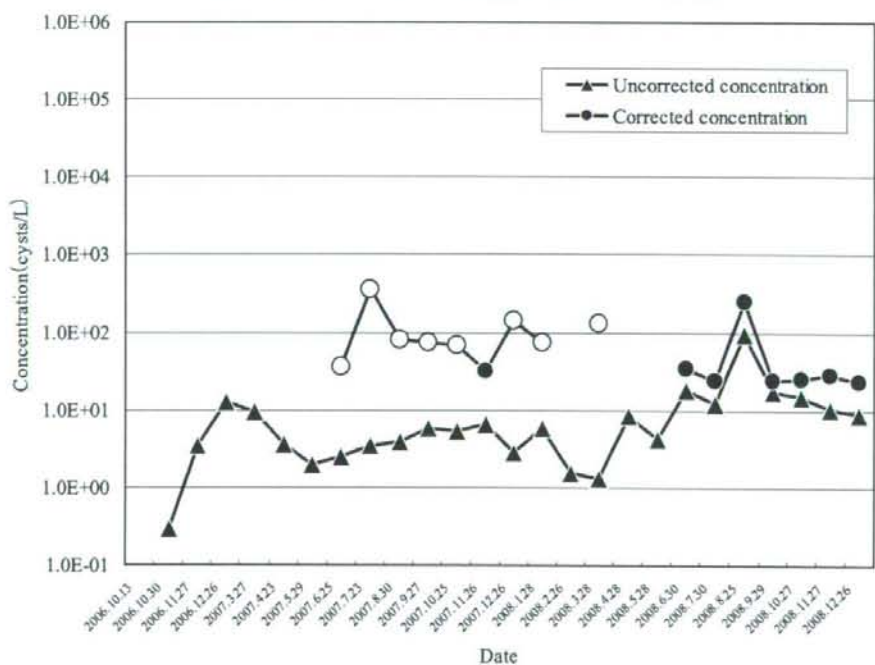


図4 下水処理水中の *Giardia* 濃度

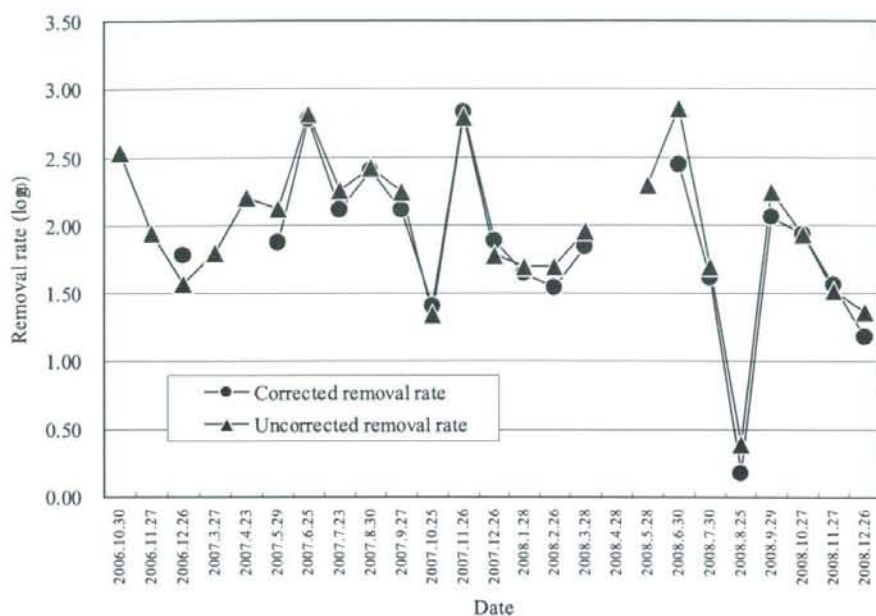


図5 下水処理による *Cryptosporidium* の除去率

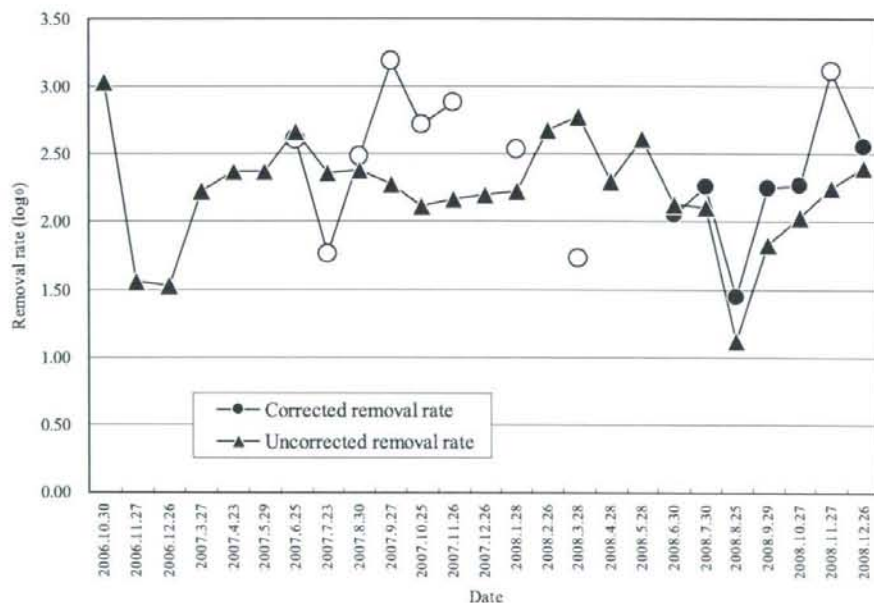


図6 下水処理による *Giardia* の除去率

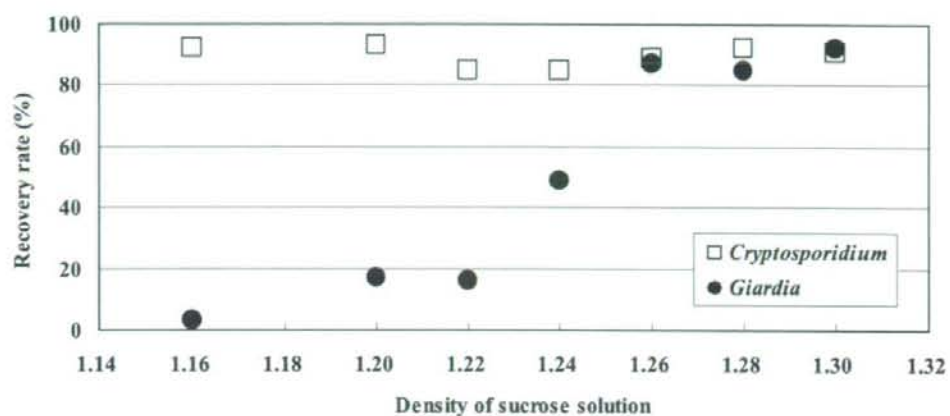


図7 ショ糖比重と回収率との関係

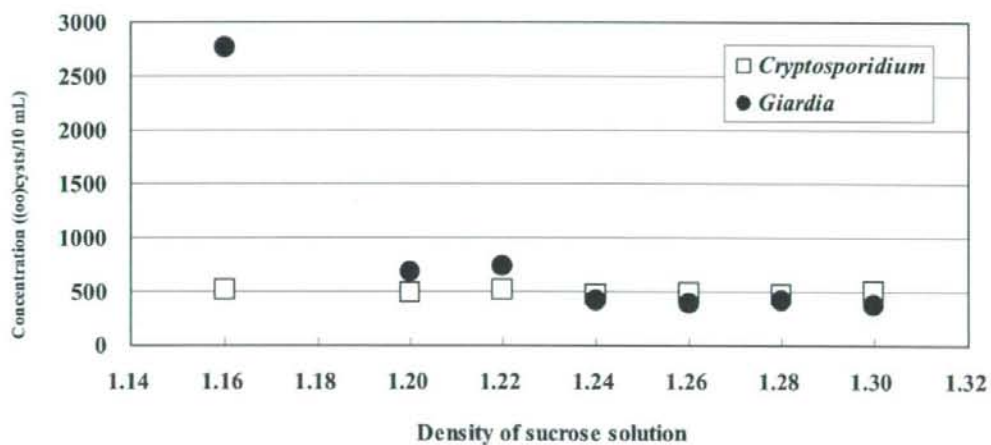


図8 ショ糖比重と定量値との関係

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 ₁₀)
		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 ₁₀)
		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

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」
総合研究報告書（平成18～20年度）

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
研究分担者：森田 重光 麻布大学 生命・環境科学部
研究分担者：片山 浩之 東京大学大学院 工学系研究科
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、表流水および底泥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）の季節及び日変動濃度とその遺伝子型を明らかにした。

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0～788 oocysts/10L、0～204 cysts/10L、底泥中のオーシスト、シスト濃度はそれぞれ、0～22 oocysts/g-dry 及び0～13 cysts/g-dry 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、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 であった。

河川水及び底泥中で検出されたオーシストの遺伝子型は、*C. parvum* が54試料、*C. suis* が49試料、*C. andersoni* が5試料、*C. Pig genotype II* が2試料、*C. meleagridis* が1試料であり、同定された111試料中104試料（94%）がヒトへの感染報告が存在する遺伝子型（*C. parvum*、*C. suis* 及び *C. meleagridis*）であった。また、シストの遺伝子型は、*Giardia lamblia* assemblage AI が20試料と *G. lamblia* assemblage B が3試料であり、同定された23試料すべて（100%）がヒトへの感染性を有する遺伝子型であった。

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及びその支川の小山川等において、クリプトスポリジウム及びジアルジアによる汚染実態の把握と遺伝子型の解析を試みた。

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中心に4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1,214万人で、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。また、小山川の流域には、クリプトスポリジウム及びジアルジアの排出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おり、流域内総人口は約15.6万人、衛生処理人口は7.4万人（衛生処理率46.6%）である。また、流域内の家畜頭数は、乳用牛約5,800頭、肉用牛約13,000頭、豚約18,000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。特に二次支川であるA川は、同流域内で家畜が集中している地域（乳用牛約1,900頭、肉用牛約2,700頭、豚約5,100頭）に位置している。

B-2 試料の採取

定期調査として、平成18年9月から平成21年2月にかけて計16回の採水調査を実施した。また、汚濁河川として考えられるA川において、平成20年10月に、3時間毎の連続採水（6:00～18:00）による原虫濃度の日変動調査を行った。

B-3 回収率算定用トレーサーの添加

試験の精度管理として、試料に代替トレーサー（Color Seed C&G, BTF）を添加し、回収率を算定した。

B-4 試料の濃縮及び精製

濃縮及び精製は、「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法」（厚生労働省、健水発第0330006号通知、2007.）に準じて行った。平成18年9月から平成19年8月の調査までは、河川水40Lと円筒状コアサンプラー（直径5cm×高さ10cm）にて採取した底泥試料をそれぞれアセトン溶解性のメンブレンフィルター（直径293mm、孔径1.2 μ m、Millipore）を用い

て全量加圧ろ過したのち、メンブレンフィルターをアセトンにより完全溶解して除去し、オーシスト及びシストを含む沈渣を遠心分離により回収した（メンブレンフィルター加圧ろ過-アセトン溶解法）。一方、平成19年10月以降の調査では、河川水10Lを親水性PTFEメンブレンフィルター（直径142mm、孔径1.0 μ m、Advantec）を用いて全量加圧ろ過したのち、メンブレンフィルターを、界面活性剤添加ピロリン酸ナトリウム溶液とフットボール型攪拌子を入れた遠沈管内で激しく攪拌し、オーシスト及びシストを含む捕捉物を洗い出して回収した（親水性PTFEメンブレンフィルター法）。

B-5 オーシスト及びシストの検出

Dynabeads GC-Combo (Invitrogen) を用いた免疫磁気ビーズ法により精製した試料を2等分したのち、半量の試料に含まれるオーシスト及びシストを染色して定量した。また、残りの半量に含まれるオーシストを染色して単離に供した。

B-5-1 オーシスト及びシストの定量

精製した試料を撥水ペン（Dako）により直径約1cmの円を描いた親水性PTFEメンブレンフィルター（直径25mm、孔径1.0 μ m、Advantec）を用いて吸引ろ過した。メンブレンフィルター上でDAPI染色液（4',6-diamidino-2-phenylindole, 0.4 μ g/mL）と蛍光抗体染色液（Easy Stain, BTF）による染色を行ったのち、スライドガラス上にメンブレンフィルターを載せ、カバーガラスをかけてプレパラートを作製した。作製したプレパラートを微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡（IX71, OLYMPUS）により観察した。オーシストについては、類円形で、その長径が5 μ m前後の緑色の蛍光を発する粒子を探索した。シストについては、卵円形で、その長径が8～18 μ m、短径5～8 μ mの緑色の蛍光を発する粒子を探索した。その結果、陽性と判定されたオーシスト及びシストを計数した。

B-5-2 オーシスト及びシストの単離

精製した試料に蛍光抗体染色液（Easy Stain, BTF）を添加し、4℃で一晩以上染色した。染色後の試料をGLASS BASE DISH（ディッシュ直径35mm、カバーガラス直径12mm, IWAKI）に滴下し、微分干渉装置

付き落射蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U, Nikon) により観察した。オーシストの定量の場合と同様に、緑色の蛍光を発する粒子を探索し、陽性と判定されたオーシスト及びシストをガラスキャピラリー (Calibrated Micropipets 10 μ L, Drummond Scientific Company) により単離した。

B-6 代替トレーサーの定量

代替トレーサーが含まれる精製物は、オーシスト及びシストの定量の場合と同様に、プレパラートを作製し、顕微鏡下 (IX71, OLYMPUS) でオーシスト及びシストの形態と類似した粒子を探索し、B 励起光下で緑色、かつ、G 励起光下で赤色の蛍光を発する粒子をトレーサーと判断して計数した。

B-7 DNA 抽出

単離したオーシスト及びシストを滅菌超純水 18 μ L が入った PCR 用マイクロチューブに吐き出し、そのマイクロチューブを -80 $^{\circ}$ C と室温での凍結融解処理を 3 回繰り返して、10% Triton X100 5 μ L を加えて、サーマルサイクラーで 99 $^{\circ}$ C、15 分間の加熱処理を行った。

B-8 Nested PCR

DNA を抽出したオーシストを 18S rRNA 領域を対象とした Nested PCR に供した。First PCR では、5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' および 5'-CCCATTCCTTCGAAACAGGA-3' の 2 種類のプライマーを用いて約 1325bp を増幅させ、Second PCR では、5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' と 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' を用いて約 830bp を増幅させた (Xiao *et al.*, 1999 及び Xiao *et al.*, 2000)。シストは Glutamate dehydrogenase (GDH) 領域を対象とし、Semi-Nested PCR に供した。First PCR は 5'-ATCTTCGAGAGGATGCTTGAG-3' および 5'-AGTACGCGACGCTGGGATACT-3' を用いて約 768bp を増幅させ、Second PCR では 5'-ATCTTCGAGAGGATGCTTGAG-3' と 5'-GGATACTTNTCCYGAACCTC-3' を用いて約 750bp を増幅させた (Homan *et al.*, 1998 及び Itagaki *et al.*, 2005)。PCR 酵素には AmpliTaq[®] (Applied Biosystems) または

KOD-Plus- (TOYOBO) を使用し、PCR 反応液の組成および PCR 条件は標準プロトコルにしたがった。Nested PCR 後の試料は、2% アガロースゲルを用いた電気泳動に供したのち、エチジウムブロマイドで染色し、目的の長さの PCR 産物が生成されているかを確認した。

B-9 ダイレクトシーケンシング

電気泳動によって陽性と判定された試料は、QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて PCR 産物を精製したのち、ダイレクトシーケンシングによって塩基配列を解読した。得られた塩基配列情報を Clustal W を用いてアラインメントしたのち、近隣結合法 (neighbor-joining analysis) によって系統樹を作成し、オーシストおよびシストの遺伝子型を決定した。

B-10 河川水の分析

河川水の水質指標項目として、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌、濁度を測定した。これらの項目の分析は、上水試験方法 (2001 年) に準じて行った。

C. 結果及び考察

C-1 河川水、底泥中におけるオーシスト及びシスト濃度

原虫の検出結果を表-1 に示す。河川水中のオーシストは、113 試料中 85 試料 (75%) から検出され、最大で 788 oocysts/10L の濃度を示した。シストは、113 試料中 84 試料 (74%) から検出され、最大濃度は 204 cysts/10L であった。河川別の陽性率は、オーシストの場合、利根川で 70% (31/44)、小山川で 66% (21/32)、A 川で 89% (33/37) であり、シストの場合、利根川で 77% (34/44)、小山川で 47% (15/32)、A 川で 95% (35/37) であった。全体的な傾向として、冬季に原虫濃度が高い値を示した。

河川別のオーシストとシストの最大濃度は、利根川ではそれぞれ 24 oocysts/10L 及び 32 cysts/10L であったのに対し、小山川では 96 oocysts/10L 及び 26 cysts/10L、A 川では 788 oocysts/10L 及び 204 cysts/10L となり、二次支川である A 川において高濃度で検出される傾向が見られ、支川では人為的負荷

の影響を大きく受けていることが明らかとなった。また、利根川において小山川合流後、小山川においてはA川合流後の濃度が高い値を示したことから、支川の汚濁状況が本川にも影響を及ぼすことが示唆された。さらに、2007年10月中旬及び2009年2月下旬のA川では、上流から中流、下流にかけてオーシスト及びシスト濃度の上昇が顕著であったことから、A川を流下する過程でオーシスト及びシストが混入したと考えられた。河川水中のオーシスト及びシスト濃度の上昇の要因のひとつに、降雨が挙げられている。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。A川流域に位置する寄居雨量観測所のデータによると、2007年10月中旬及び2009年2月下旬の降水量は、それぞれ、採取日の前々日0mm/day, 0mm/day, 前日1mm/day, 0mm/day, 当日0mm/day, 0mm/dayであり、目立った降雨は観測されていない。このことから、2007年10月中旬及び2009年2月下旬のA川においてオーシスト及びシスト濃度が上昇した要因としては、降雨による洗い流しの影響より生活排水処理施設や家畜飼育施設からの排出の影響の方が強いことが示唆された。底泥中のオーシストとシストの最大濃度は、それぞれ22 oocysts/g-dry 及び13 cysts/g-dry であり、どちらも小山川高橋地点において検出された。

平成19年4月より適用された「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」(厚生労働省、2007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、嫌気性芽胞菌を挙げている。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、オーシスト及びシストが検出された場合、大腸菌、嫌気性芽胞菌の幾何平均濃度は、それぞれ 10^3 CFU/100mL、 10^2 CFU/100mL程度であったのに対し、オーシスト及びシストが検出されなかった場合、それぞれ 10^2 CFU/100mL、 10^1 CFU/100mL程度であり、その濃度に差がみられたことから、オーシスト及びシストの微生物指標となっていることが示唆された(表-2及び表-3)。なお、幾何平均濃度を求めるにあたり、大腸菌、嫌気性芽胞菌が不検出の場合は、定量

下限の1/10値を代入して算定した。

C-2 オーシスト及びシスト濃度の日変動

A川における日変動調査の検出結果を表-4に、各種指標菌の結果を表-5に示す。A川上～中流域におけるオーシスト及びシスト濃度の日変動は、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。クリプトスポリジウムは各時間帯で常に検出されており、定期調査におけるA川での陽性率が極めて高いこと、および降雨等の突発的な要因もなかったこと等を考慮すると、A川流域は定常的に原虫によって汚染されていることが示唆された。また、生活排水処理水の影響を強く受ける下流域において、オーシスト及びシスト濃度の日変動は、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。クリプトスポリジウムはほとんど検出されなかったが、ジアルジアの濃度が全体的に高かったことから、本調査時期において、流域内に感染者がいたものと推察された。

C-3 単離したオーシストとシストのNested PCR およびダイレクトシーケンシングの結果

河川水および底泥中から単離したオーシスト526試料をNested PCRに供した結果、111試料(21%)が陽性となった。そのすべてをダイレクトシーケンシングに供した結果、111試料すべて(100%)で塩基配列の解読に成功した。得られた塩基配列と、GenBankに登録されている主要な配列約40を用い、Xiaoらが提言している遺伝子型名を付した系統樹を作製した結果を図-2に示す。また、この系統樹に基づき、単離したオーシスト111試料の遺伝子型を同定した結果を表-6に示す。同定された遺伝子型の内訳は、*Cryptosporidium parvum*が54試料、*C. suis*が49試料、*C. andersoni*が5試料、*C. Pig genotype II*が2試料、*C. meleagridis*が1試料であった。河川別の内訳は、利根川では*C. parvum*が38試料、*C. andersoni*が1試料、小山川では*C. suis*が3試料、*C. andersoni*が3試料、*C. Pig genotype II*が2試料、*C. parvum*が12試料、

A川では *C. suis* が46試料, *C. andersoni* が1試料, *C. meleagridis* が1試料であり, 底泥中では *C. parvum* が4試料であった。

同定されたオーシストの遺伝子型のうち, ヒトへの感染が報告されているのは, *C. parvum* および *C. suis*, *C. meleagridis* であり, 111試料中104試料(94%)がヒトへの感染報告が存在する種や遺伝子型であった。

また, 単離したシスト78試料を Nested PCR に供した結果, 23試料(29%)が陽性となり, 23試料すべて(100%)で塩基配列の解読に成功した。オーシストと同様の手順で系統樹を作成した結果を図-3に示す。同定された遺伝子型は, *Giardia lamblia* assemblage AI が20試料と *G. lamblia* assemblage B が3試料であり, 同定された23試料すべて(100%)がヒトへの感染性を有する遺伝子型であった(表-7)。

C-4 異なる濃縮法による回収試験

河川水を試料として, 濃縮法別にそれぞれ5試料について, 代替トレーサーを添加し, 濃縮から精製までの一連の工程の回収試験を行った(表-8)。メンブレンフィルター加圧ろ過-アセトン溶解法では, オーシスト, シストのトレーサーの平均回収率は, 河川水が40Lの場合, それぞれ7.5%(5~10%), 11.5%(5~18%)であり, 河川水が10Lの場合, それぞれ5.7%(4~7%), 3.7%(2~5%)であった。一方, 親水性PTFEメンブレンフィルター法では, オーシスト, シストのトレーサーの平均回収率は, 河川水が10Lの場合, それぞれ50.6%(32~59%), 40.8%(26~53%)であり, アセトン溶解法と比べて高い回収率が得られた。

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並びにその支川の小山川等を対象に, 表流水及び底泥中に含まれるクリプトスポリジウムとジアルジアの濃度分布と, その遺伝子型を明らかにした。その結果を要約すると, 以下のとおりである。

1) 定期調査をH18年9月からH21年2月

にかけて16回実施したところ, 河川水中のオーシストは, 113試料中85試料(75%)から検出され, 最大で788 oocysts/10Lの濃度を示した。一方, シストは, 113試料中84試料(74%)から検出され, 最大濃度は204 cysts/10Lであった。

- 2) 河川別のオーシストの最大濃度は, 利根川ではそれぞれ24 oocysts/10L及び32 cysts/10Lであったのに対し, 小山川では96 oocysts/10L及び26 cysts/10L, A川では788 oocysts/10L及び204 cysts/10Lとなり, 二次支川において高濃度で検出される傾向が見られた。また, 利根川において小山川合流後, 小山川においてはA川合流後の濃度が高い値を示したことから, 支川の汚濁状況が本川にも影響を及ぼすことが示唆された。
- 3) A川における原虫濃度の日変動を調査したところ, A川上~中流域におけるオーシスト及びシスト濃度の日変動は, 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。クリプトスポリジウムは各時間帯で常に検出され, 定期調査におけるA川での陽性率が極めて高いこと, および降雨等の突発的な要因もなかったこと等を考慮すると, A川流域は定常的に原虫によって汚染されていることが示唆された。生活排水処理水の影響を強く受ける下流域では, オーシスト及びシスト濃度の日変動は, 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, クリプトスポリジウムはほとんど検出されなかったが, ジアルジアの濃度が全体的に高かったことから, 本調査時期において, 流域内にジアルジア症感染者がいたものと推察された。
- 4) 単離したオーシスト526試料のうち111試料(21%)が同定され, その内訳は, *C. parvum* が54試料, *C. suis* が49試料, *C. andersoni* が5試料, *C. Pig genotype II* が2試料, *C. meleagridis* が1試料であった。同定されたオーシストの遺伝子型のうち, ヒトへの感染が報告されて