

表者:松井佳彦)より研究報告書

「Cycleave プローブを用いた RT-PCR 法によるクリプトスポリジウム等検査法の開発(泉山信司、遠藤卓郎、猪又明子、碓井圭名子)」

- 16) Kishida N, Miyata R, Furuta A, Izumiyama S, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Noda N, Akiba M. Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR). *Water Res.* 2012 Jan 1;46(1):187-194.
- 17) Fayer R. and Xiao L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, pp.11, IWA Publishing, London, UK.

F. 研究発表

論文発表

1. Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K., Virus inactivation during coagulation with aluminum coagulants, *Chemosphere*, **85**(4), 571-576, 2011.
2. Kishida N, Miyata R, Furuta A, Izumiyama S, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Noda N, Akiba M. Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR). *Water Res.* 2012 Jan 1;46(1):187-94.
3. 猪又明子, 百田隆祥, 泉山信司, 勝山志乃, 岸田直裕, 秋葉道宏, 遠藤卓郎, 環境水中のクリプトスポリジウム検出を目的とした RT-LAMP 改善法の実用性評価、日本水処理生物学会誌 Vol.47 No.1 2011 pp.9-18.
1. J. Sangsanont, H. Katayama, F. Kurisu, and H. Furumai, Viral Inactivation Profile After Ozonation In Continuous Quench Flow Reactor. 6th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Rotorua, New Zealand, September, 2011 (Peer-reviewed, accepted as oral presentation)
2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Sato, S., Effective removal of virus by high-basidity polyaluminum coagulation treatment, Proceedings of Particle Separation Conference, Berlin, Germany, 18–20 June 2012.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Tatsuki, Y. and Matsui, Y., A new approach to estimate norovirus removal performance in a membrane filtration process by using virus-like particles and immuno-PCR method, Proceedings of AWWA/AMTA 2012 Membrane Technology Conference & Exposition, Glendale, AZ, USA, 27 February–1 March 2012.
4. 白崎伸隆, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, 凝集剤中のアルミニウム形態がウイルスの処理性に与える影響, 第 63 回全国水道研究発表会, 2012.
5. 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 第 46 回日本水環境学会年会, ウイルス除去に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, 2012.
6. 田附雄一, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 遺伝子組み換えにより発現したウイルス外套タンパク粒子と新規 immuno-PCR 法を用いたヒトノロウイルスの膜ろ過性の評価, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012.
7. 白崎伸隆, 佐藤翔太, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, アルミニウム系凝集剤の高塩基度化によるウイルスの効果的除去, 第

- 66 回土木学会年次学術講演会, 2011.
8. Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsushita, T. and Matsui, Y., Virus removal by adsorption on super-powdered activated carbon, Proceedings of the 4th IWA-ASPIRE Conference, Tokyo, Japan, 2–6 October 2011.
 9. 佐藤翔太, 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 高塩基度ポリ塩化アルミニウムが示すウイルスの高い除去性, 第 62 回全国水道研究発表会, 2011.
 10. 鈴木英明, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 安藤直哉, 超微粉化活性炭を用いたウイルスの吸着除去, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011.
 11. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, アルミニウム系凝集剤によるウイルスの不活化, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011.
 12. 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 凝集剤中のアルミニウム形態がウイルスの凝集沈殿処理に与える影響, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011.
 13. S. Izumiyama, A. Inomata, N. Kishida, S. Katsuyama, T. Momoda, K. Usui, M. Akiba, K. Yagita, T. Endo, Development of nucleic acid amplification assays for highly sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples, Proceedings of Intestinal and Free-Living Protozoan Parasites Meeting, The 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, p.8, January 12, 2011, Tokyo Japan.
 14. Kishida N, Miyata R, Furuta A, Izumiyama S, Morita S, Tsuneda S, Sekiguchi S, Noda N, Akiba M. Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source by alternatively binding probe competitive polymerase chain reaction (ABC-PCR). 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, WaterMicro 2011. Rotorua, September 2011.
 15. 高藤俊, 泉山信司, 粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮法の検討, 日本水道協会 第 62 回全国水道研究発表会, 2011
 16. 岸田直裕, 今野祥顕, 浅見真理, 秋葉道宏, 原本英司, 泉山信司, 水道水源における原虫汚染の全国実態調査, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012.
 17. 泉山信司, 岸田直裕, 秋葉道宏, 遠藤卓郎, クリプトスポリジウム等検査への遺伝子検出法導入の課題について, 第 11 回 環境技術学会研究発表大会, 2011 年 9 月, 大阪市
 18. 八木田健司, 泉山信司, 宮崎誠生, 迅速診断を目的とした抗ジアルジアモノクロナール抗体の作製, 第 80 回日本寄生虫学会大会, 2011 年 7 月, 東京都
 19. 泉山信司, 八木田健司, 森田重光, 宮崎誠生, 蛍光抗体染色用抗クリプトスポリジウムモノクロナール抗体の開発, 第 81 回日本寄生虫学会大会, 2012 年 3 月, 兵庫県
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- なし

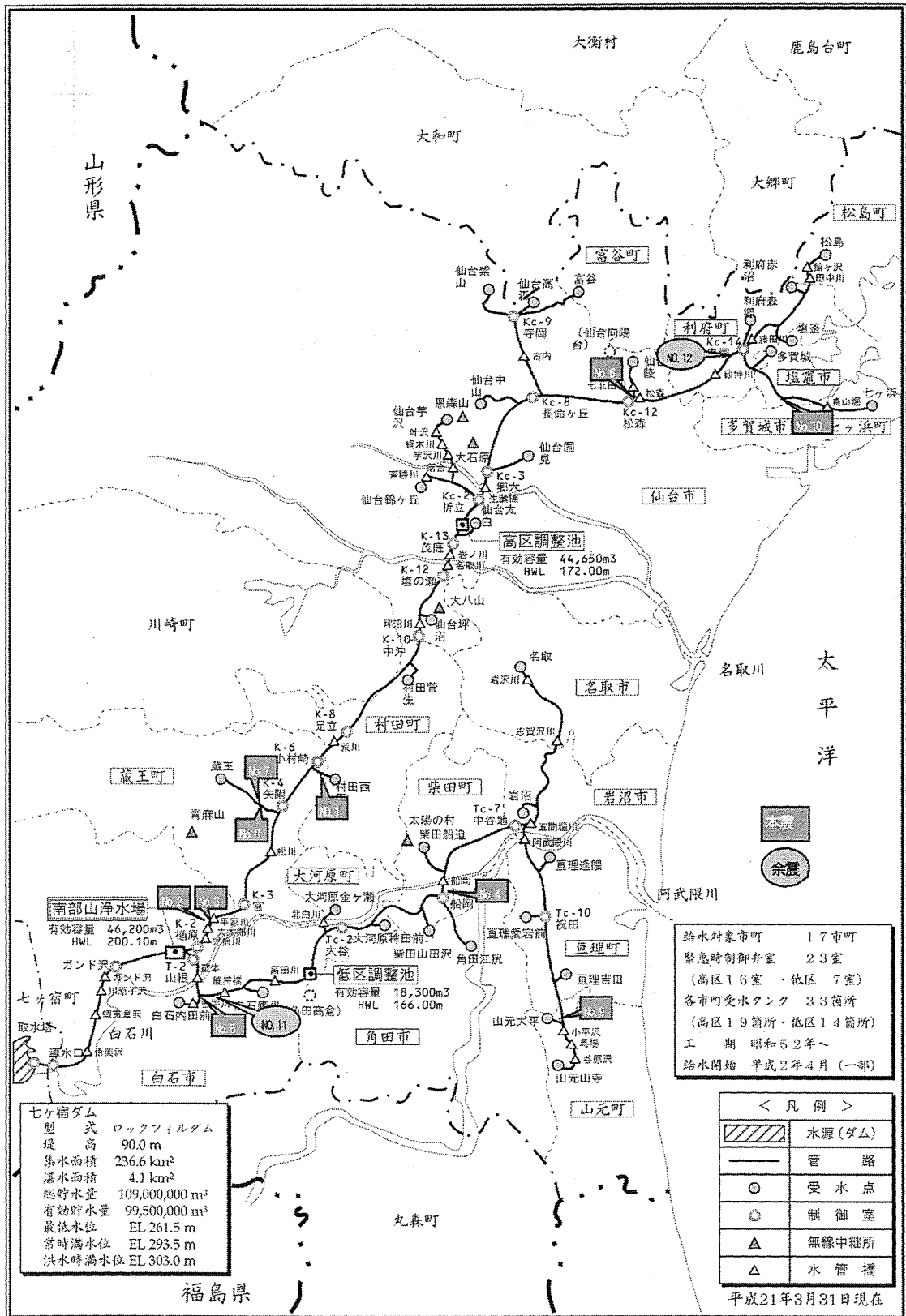


図1 宮城県仙南・仙塩広域水道の東日本大震災による漏水箇所

表1 各受水点の水質検査結果(本震)

高区											
	受水池	採水日	採水時間	天候	気温(°C)	水温	色度	濁度	残留塩素	pH	その他
1	村田西原	3月21日	17時15分	曇	6.8	5.7	<5	<2	0.2	6.8	16:30到達
2	村田菅生	3月22日	13時00分	曇	8.5	8.8	<5	<2	0.2	6.8	
3	仙台坪沼	3月22日	13時23分	晴	9.5	5.7	<5	<2	0.2	6.8	
4	仙台太白	3月22日	13時40分	曇	7.5	5.6	<5	<2	0.2	7	
5	蔵王	3月22日	19時00分	雨	3.3	6	<5	<2	0.1	7	
6	仙台芋沢	3月24日	18時45分	晴	1.9	7.5	5以上	<2	0.1	欠測	
7	仙台錦ヶ丘	3月24日	20時00分	晴	0.4	7	5以上	<2	0.1	欠測	
8	富谷	3月28日	11時40分	晴	11	7.8	<5	<2	0.4	7	
9	仙台国見	3月28日	15時00分	晴	9	8.8	<5	<2	0.5	7	
10	仙台森郷	3月28日	18時55分	晴	4	8.2	<5	<2	0.1	6.8	
11	多賀城	3月30日	11時20分	晴	13.5	6.1	<5	<2	0.5	6.8	
12	利府赤沼	3月30日	18時57分	曇	6	6.5	<5	<2	0.5	6.8	
13	松島	3月31日	10時40分	晴	9.1	6.4	<5	<2	0.5	7	
14	塩釜	3月31日	11時25分	晴	10.2	6.1	<5	<2	0.5	7	
15	仙台中山	3月31日	11時25分	曇	9.5	7	<5	<2	0.5	6.8	
16	仙台紫山	3月31日	13時50分	曇	8	6.2	<5	<2	0.5	6.8	
17	七ヶ浜	4月1日	11時00分	晴	9	8.6	≤5	<2	0.5	6.8	
18	仙台高森	4月1日	14時25分	晴	12	7.4	<5	<2	0.4	6.8	
19	松陵	4月1日	15時15分	晴	9.8	8	<5	<2	0.5	6.8	
低区											
	受水池	採水日	採水時間	天候	気温(°C)	水温	色度	濁度	残留塩素	pH	その他
1	鷹巣	3月15日	15時35分	雨	4.2	5.5	<5	<2	0.3	6.8	10分間捨水 沈殿物なし
2	内田前	3月15日	16時00分	雨	3.8	5.1	<5	<2	0.2	6.8	15分捨水 外観異常なし
3	金ヶ瀬	3月16日	18時00分	雪	0.2	5.5	<5	<2	0.2	6.8	
4	稗田前	3月17日	9時35分	晴	4.8	5.5	<5	<2	0.2	6.8	
5	山田沢	3月17日	10時10分	晴	6.7	6.1	<5	<2	0.2	6.8	
6	角田江尻	3月18日	9時30分	晴	2	6.9	<5	<2	0.2	7	
7	柴田船迫	3月21日	18時15分	曇	6.8	7.1	<5	<2	0.1	6.8	
8	亙理逢隈	3月21日	21時45分	曇	7.2	6.3	<5	<2	0.1	7	
9	亙理愛宕前	3月21日	23時16分	曇	4.5	7.6	<5	<2	0.1	6.8	
10	亙理吉田	3月22日	3時05分	曇	6.4	7.6	<5	<2	0.1	7	
11	岩沼	3月23日	12時45分	晴	12.2	7	<5	<2	0.1	6.8	
12	名取	3月25日	8時45分	曇	5.8	6	<5	<2	0.4	6.8	
13	山元大平	4月1日	15時00分	晴	11	7.4	<5	<2	0.6	6.8	
14	山元山寺	4月1日	19時50分	晴	6	7.1	<5	<2	0.5	6.8	

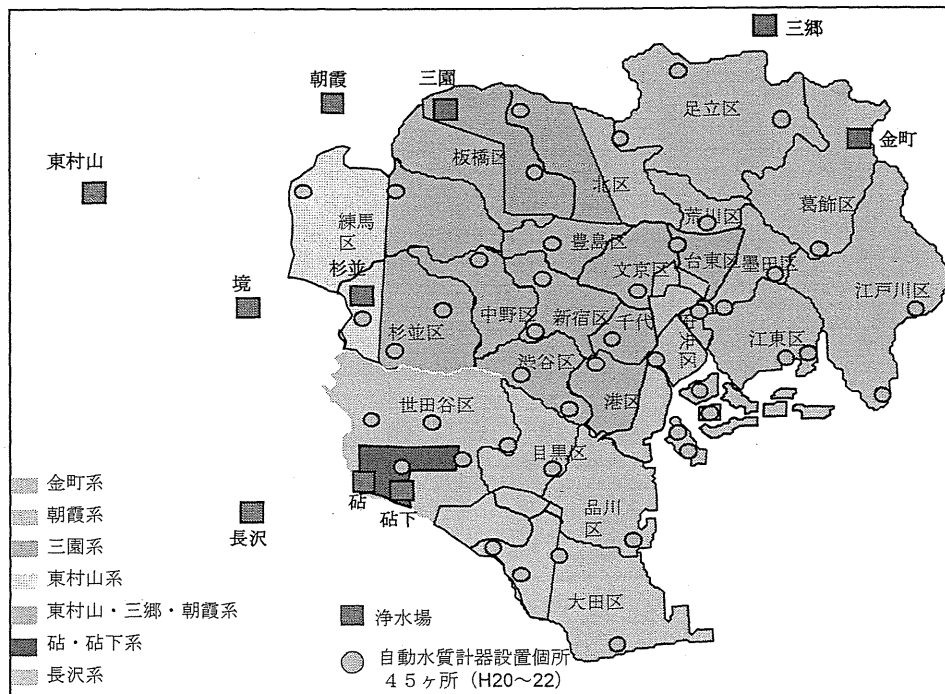


図 2 東京都水道局浄水場の位置と都内区部給水栓自動水質計器設置箇所

図 3 浄水場別原水従属栄養細菌数経日変化 (平成 20 年度年間平均)

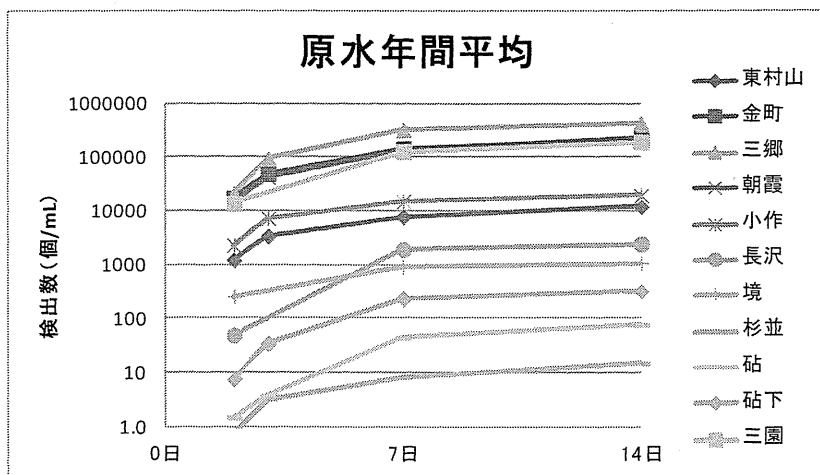


表 2 浄水場浄水年度別従属栄養細菌月別データ (7日培養)

浄水

平成20年度	浄水処理	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
東村山	急速	0.0	0.0	3.0	0.0	4.0	0.5	0.0	0.5	0.0	2.2	1.0	0.0
金町	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
三郷	急速+高度	2.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.5
朝霞	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
小作	急速ろ過	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
長沢	急速ろ過		0.0			0.0							
境	緩速ろ過	7.5	5.5	1.0	0.5	0.0	2.5	8.0	7.0	7.5	7.0	9.0	5.0
杉並	塩素消毒		0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	2.0	0.0	0.0	0.5	0.5
砧	膜処理		3.5			3.0			2.0			3.0	
砧下	膜処理		6.5			5.5			8.5			3.0	
三園	高度のみ	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0
平均		1.0	1.1	0.5	0.0	1.0	0.5	1.0	1.5	0.7	2.7	1.3	0.8

浄水

平成21年度	浄水処理	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
東村山	急速	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	2.0	0.0	0.0	1.5
金町	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
三郷	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0
朝霞	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
小作	急速ろ過	0.0	0.0	0.0	8.5	3.0	4.0	14.0	5.5	3.5	0.0	0.0	0.0
長沢	急速ろ過					0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
境	緩速ろ過	8.0	7.0	4.5	3.0	3.0	1.5	3.5	10.0	2.5	4.5	6.5	8.5
杉並	塩素のみ	0.0	0.5	0.5	2.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	0.0	1.5
砧	膜処理	2.5	1.5	2.0	27.0	1.5	2.0	1.0	1.0	2.5	0.5	2.0	0.0
砧下	膜処理	1.0	3.5	3.5	6.0	6.0	1.5	7.5	2.0	1.0	2.0	2.0	0.0
三園	高度のみ	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	5.0	0.0	1.0
平均		1.2	1.3	1.2	5.0	1.3	0.9	2.5	1.9	1.2	1.4	1.0	1.1

浄水

平成22年度	浄水処理	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
東村山	急速+高度	0.0	0.0	0.0	4.0	0.5	1.0	9.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
金町	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
三郷	急速+高度	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
朝霞	急速+高度	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
小作	急速ろ過	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
長沢	急速ろ過	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
境	緩速ろ過	6.5	0.5	2.0	0.5	0.0	1.5	6.0	2.5	4.0	7.5	12.0	18.0
杉並	塩素消毒	0.0	0.0	0.5	1.5	0.0	0.0	0.5	0.5	1.5	1.0	0.0	
砧	膜処理	1.5	3.5	3.5	0.0	2.5	2.5	0.5					
砧下	膜処理	1.0	0.0	1.0	2.0	2.0	4.0	4.5	4.5	2.0	4.0	3.0	0.5
三園	高度のみ	1.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.5	1.5	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0
平均		0.9	0.5	0.6	0.7	0.5	0.9	2.2	0.9	1.1	1.4	1.7	2.3

図4 都内区部給水栓水における培養日数ごとの従属栄養細菌数の変化

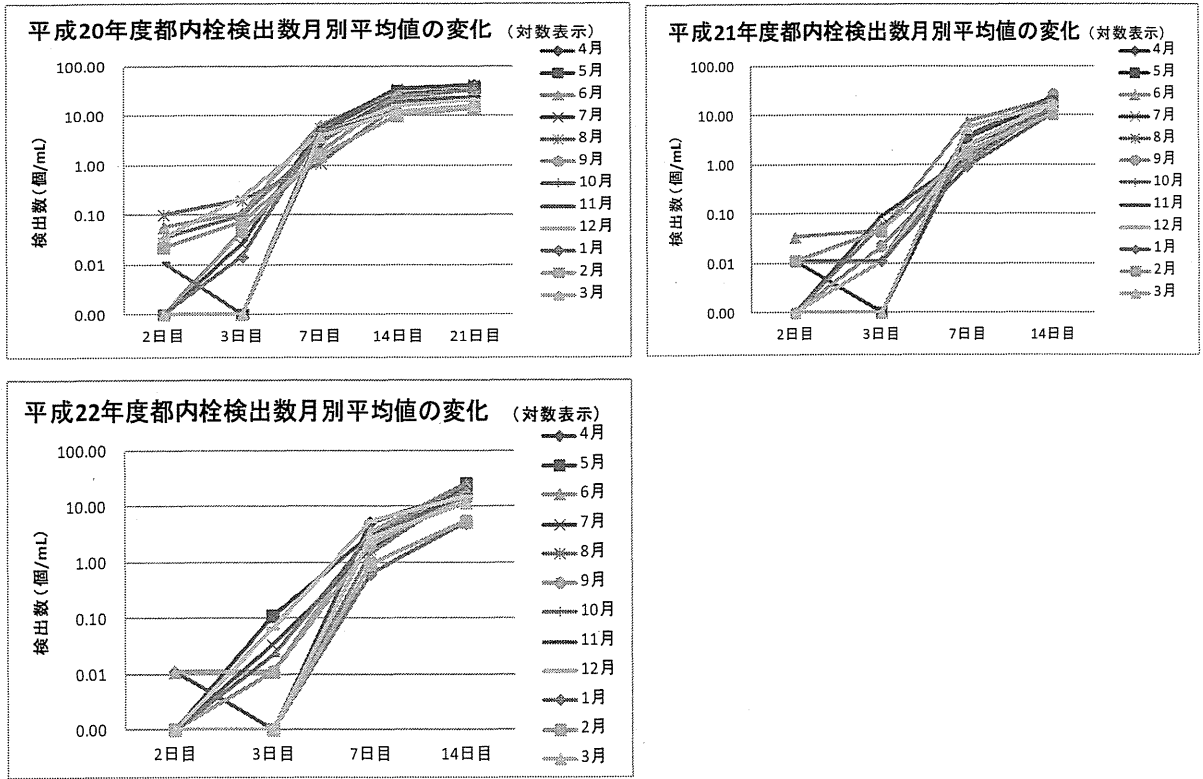


表3 都内区部給水栓水における培養日数ごとの従属栄養細菌の陽性率

都内栓45箇所陽性率(%)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
2日目	0.0	0.0	11.1	0.0	6.7	0.0	4.4	2.2	6.7	0.0	2.2	0.0
3日目	0.0	0.0	21.7	5.0	17.4	9.1	5.6	0.0	26.1	2.9	7.1	0.0
7日目	62.2	73.3	93.3	77.8	57.8	44.4	51.1	62.2	68.9	60.0	55.6	55.6
14日目	97.8	97.8	100.0	100.0	100.0	97.1	97.7	95.6	97.8	95.6	100.0	93.3
21日目	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.0	100.0	100.0	97.8	97.8	100.0	93.3

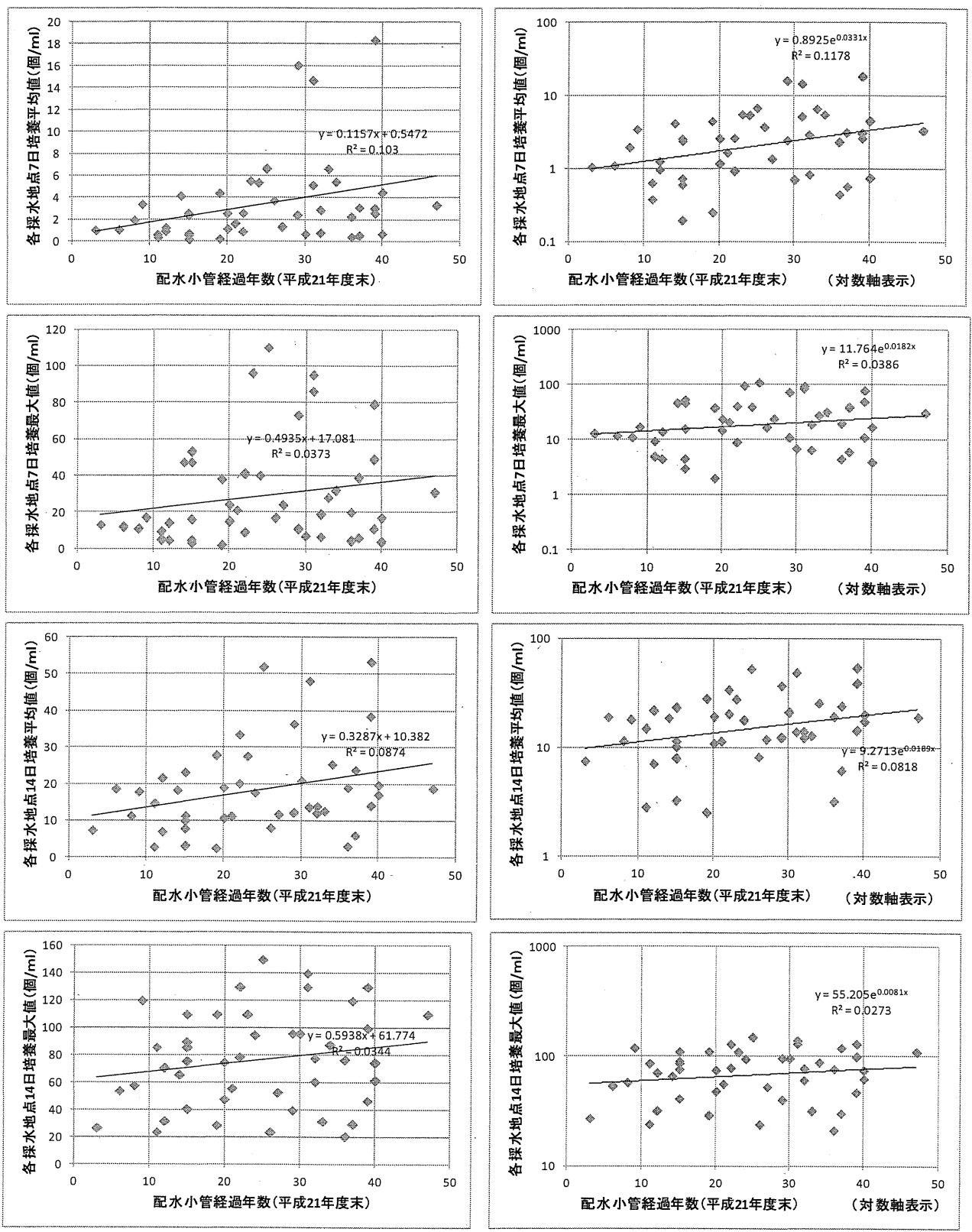
平成21都内栓45箇所陽性率(%)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
2日目	0.0	2.2	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	0.0
3日目	0.0	0.0	4.4	4.4	2.2	4.4	2.2	2.2	2.2	2.2	6.7	0.0
7日目	60.0	51.1	68.9	28.9	46.7	46.7	55.6	62.2	71.1	64.4	60.0	51.1
14日目	93.3	88.9	95.6	93.3	95.6	95.6	95.6	95.6	100.0	95.6	100.0	97.8

平成22年度都内栓45箇所陽性率(%)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
2日目	2.2	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3日目	0.0	2.2	2.2	6.7	0.0	2.2	0.0	4.4	8.9	0.0	0.0	0.0
7日目	51.1	62.2	64.4	48.9	40.0	44.4	55.6	53.3	64.4	42.2	46.7	42.2
14日目	97.8	100.0	97.8	95.6	97.8	100.0	97.8	95.6	95.6	91.1	91.1	95.6

図5 自動水質計器が設置されている地点の配水管年数と従属栄養細菌検出数の分布
 (従属栄養細菌平成20~21年度各地点毎の平均または最大値、配水管年数平成21年度末時点)



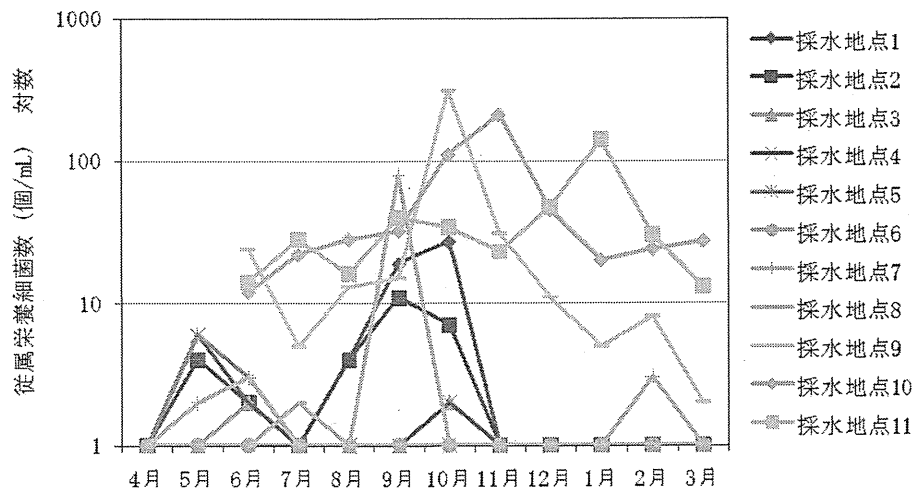


図6 平成19年度の従属栄養細菌検出結果

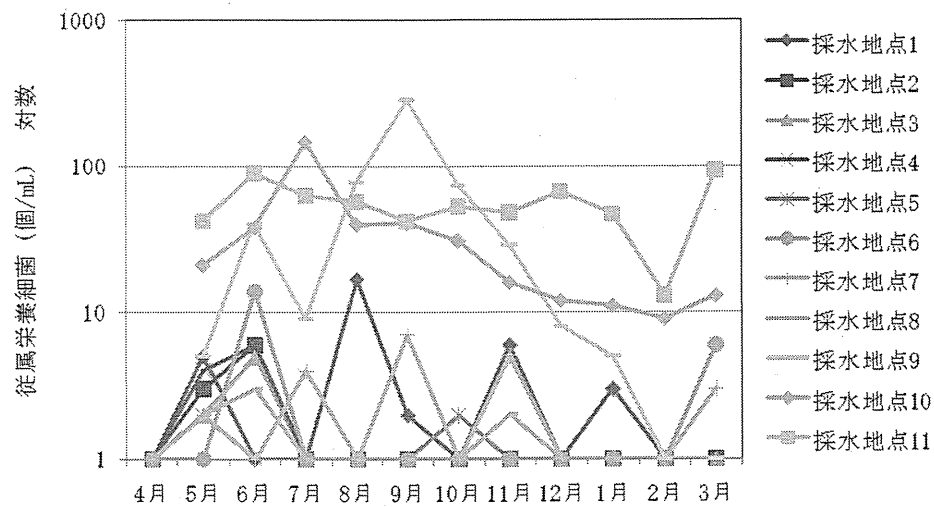


図7 平成20年度の従属栄養細菌検出結果

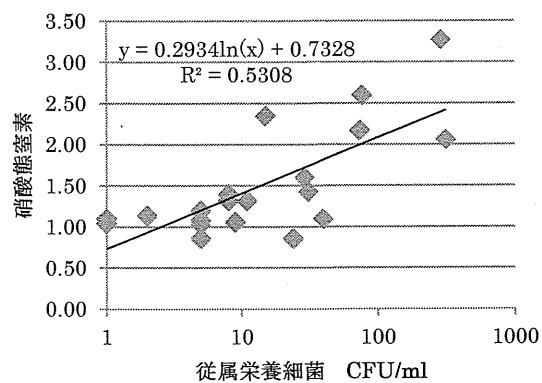


図8 採水地点9の硝酸態窒素と従属栄養細菌数の相関

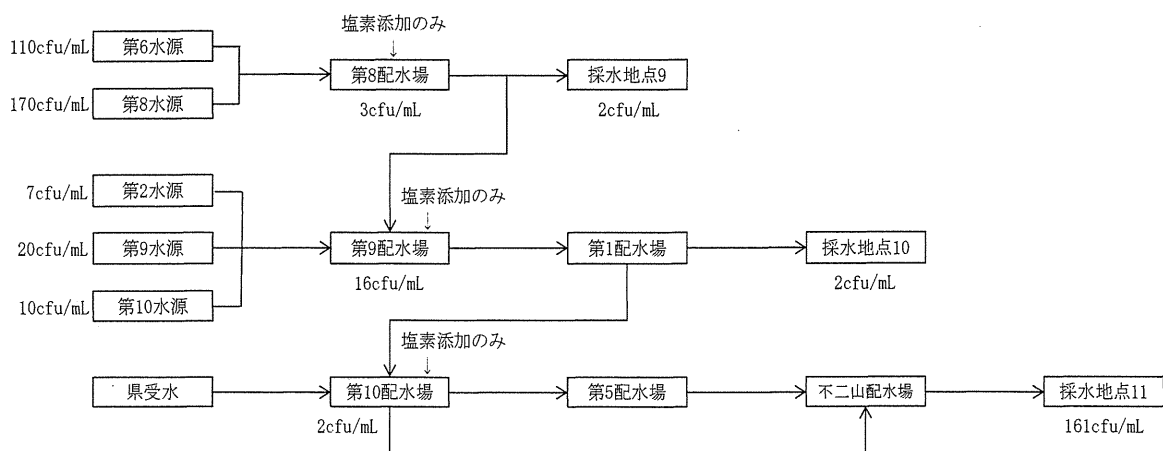


図 9 採水地点 9～11 の配水系統図と測定値との対応

図中の数値は平成 23 年度末に測定した従属栄養細菌数 (cfu/ml)

第 8 配水場から第 9 配水場への配水量は 1 割程度、第 1 配水場から第 10 配水場への配水量は 5 割程度、第 10 配水場から不二山配水場への配水量は 3 割程度

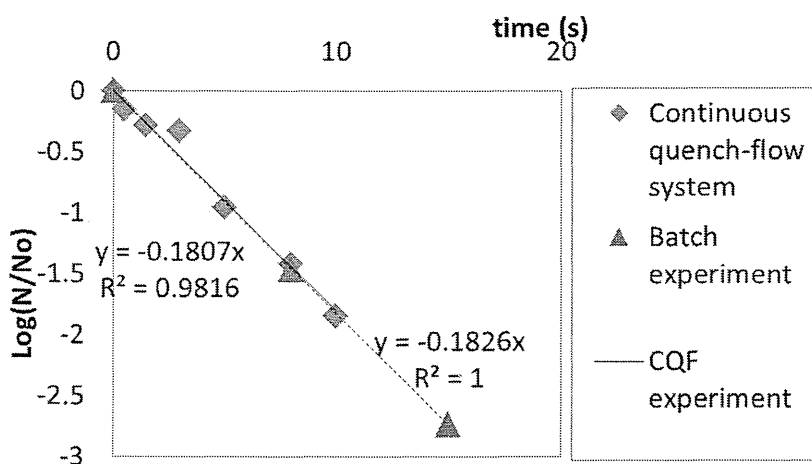


図 10 塩素 2.5 mg/L における大腸菌ファージ Qβ の不活化曲線

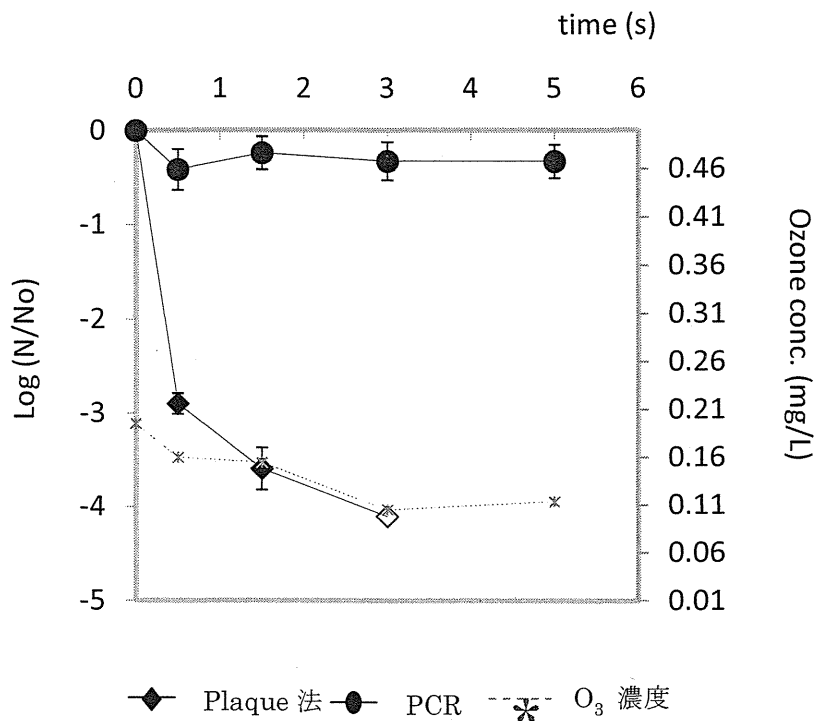


図 11 オゾン 0.20 mg/L におけるポリオウイルスの不活化曲線

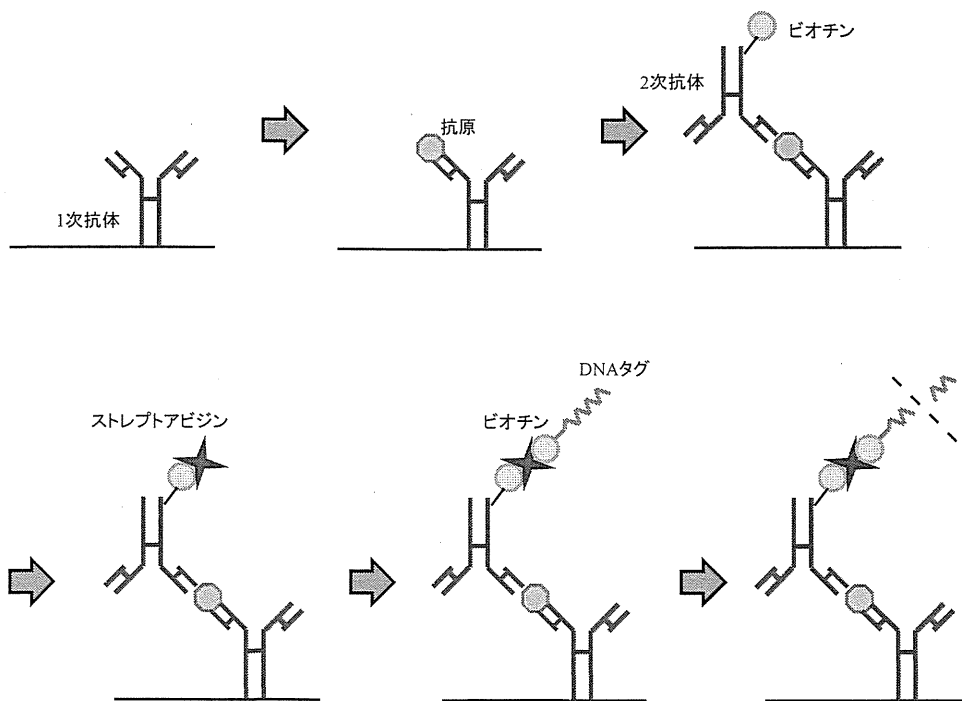


図 12 immuno-PCR のフローイメージ図

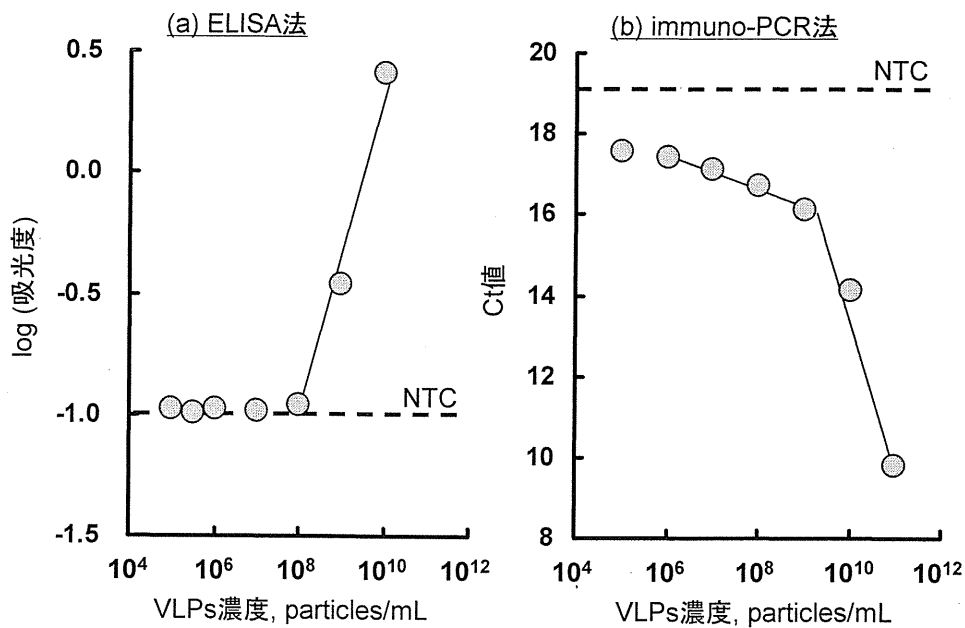


図 13 従来の ELISA 法と本研究で構築した immuno-PCR 法による VLPs の検量線 (NTC : 陰性対照)



図 14 問題となった支持体の浮き上がり箇所メインフィルターの支持体 (矢印部分) を濾紙から不織布に変更し強度を上昇させた。加えて、製造時の締め付け圧力の不備を解消させた。

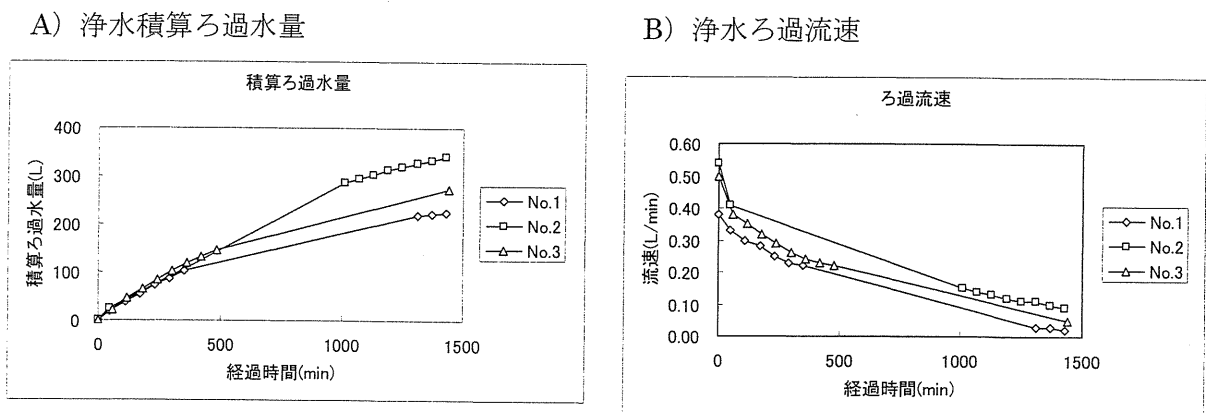


図 15 浄水ろ過水量の検討

表 4 固定オーシストを用いた捕捉性能の評価（浄水 100L ろ過）

実験No.	採水日	計測オーシスト数（一部試料中）	平均計測オーシスト数	捕捉性能（%）	平均捕捉性能（%）
1	9月5日	82	88	114	97
		94			
2	9月7日	69	67	87	
		65			
3	9月14日	66	69.5	90	
		73			
添加数確認	—	79	77	—	
		75			

表 5 固定オーシストを用いた回収率の評価（原水 10L ろ過）

実験No.	採水日	計測オーシスト数	平均計測オーシスト数	回収率（%）	平均回収率（%）
1	10月11日	76	76	54	66
2	10月11日	91	91	65	
3	10月11日	89	89	63	
4	10月13日	114	114	81	
添加数確認	—	149	140.3	—	—
		150			
		122			

表 6 粉体ろ過装置の洗浄方法について

検体	実測値 蛍光ビーズ(個)	蛍光ビーズ(個)	蛍光ビーズ(個)/3ml
①蛍光ビーズ検体	505/463 (100 μ l \times 2 回観察)	平均値 484/100 μ l	14520/3ml
②洗浄後検体	0/0/0/1/1/1 (500 μ l \times 6 回観察)	3/3ml	3/3ml
③999L 洗浄後検体	0/0/0/0/1/1 (500 μ l \times 6 回観察)	2/3ml	2/3ml
④スポンジ洗浄後検体	0/0/0/0/0/1 (500 μ l \times 6 回観察)	1/3ml	1/3ml

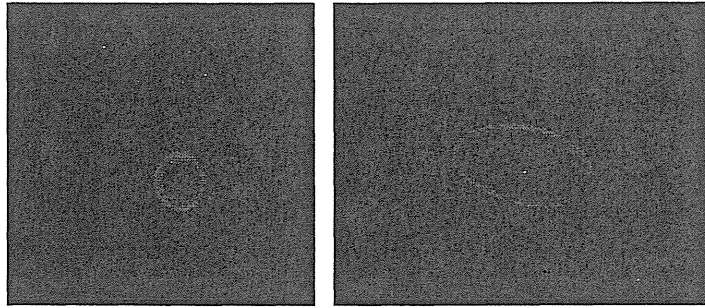


図 16 原水より添加回収され国産蛍光抗体試薬で染色されたクリプトスポリジウムとジアルジア

市販品	DABCO/PBS	封入剤(グリセロール 0%)	封入剤(グリセロール 10%)	封入剤(グリセロール 15%)
0 秒	0 秒	0 秒	0 秒	0 秒
60 秒後	15 秒後	45 秒後	60 秒後	60 秒後

図17 各封入剤における FITC 蛍光像

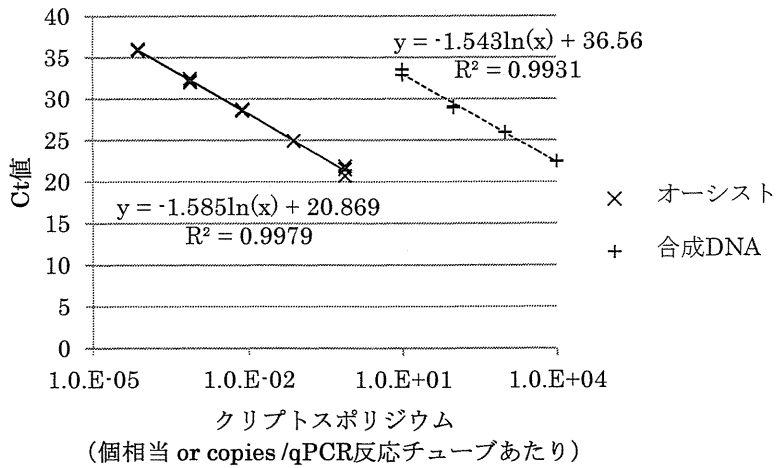


図18 TaqMan法によるクリプトスポリジウム定量の検量線

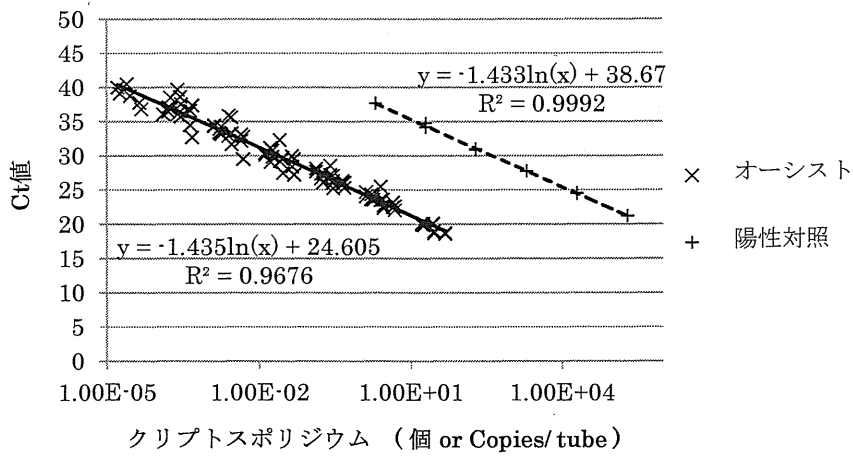


図19 サイクリングプローブ法によるクリプトスポリジウム定量の検量線

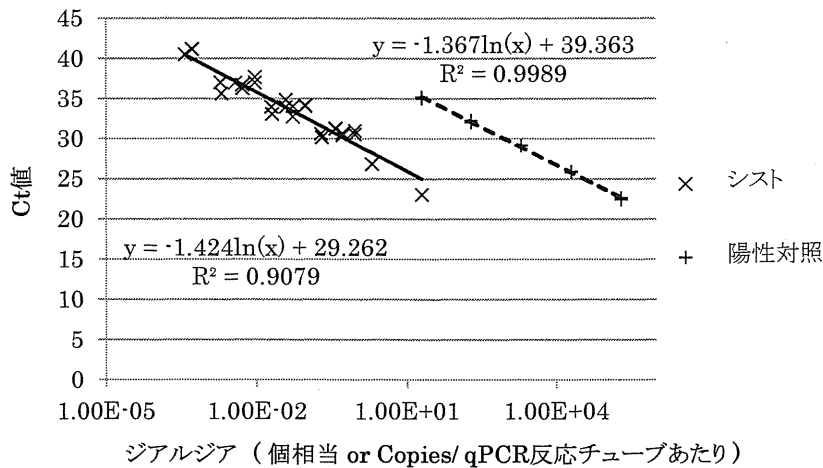


図20 サイクリングプローブ法によるジアルジア定量の検量線

表 7 顕微鏡法と遺伝子検査法による試料毎の検出の比較

試料 No.	顕微鏡検査 (oocysts/5L)	qPCR (oocysts/5L)	RT-LAMP (Tt 値, min)
1	5	0.32	47
2	1	-	-
3	1	0.15	33
4	-	0.36	39
5	2	-	-
6	2	0.020	33
7	-	-	-
8	2	-	-
9	2	1.1	27
10	2	-	-
11	10	-	-
12	222	0.11	33
13	2	0.89	30
14	-	-	-
15	1	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	1.1	31
19	-	3.2	29
20	-	-	-
21	23	1.3	39
22	-	1.2	30
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	33	6.0	33
28	1	3.4	29
29	5	-	-
30	1	-	-

表 8 各手法の陽性・陰性サンプル数

	顕微鏡 陽性	顕微鏡 陰性
遺伝子検査法 陽性	9	4
遺伝子検査法 陰性	6	11

表 9 オーシスト濃度によって検査間の不一致が生じる理論的確率

2 分割前の オーシスト数	顕微鏡に全 部入る確率	遺伝子に全 部入る確率	両方に 1 個 以上入る確率	結果が一致 しない確率
0	(0%)	(0%)	(0%)	0%
1	50%	50%	0%	100%
2	25%	25%	50%	50%
3	13%	13%	75%	25%
4	6.3%	6.3%	88%	13%
5	3.1%	3.1%	94%	6.3%
6	1.6%	1.6%	97%	3.1%
7	0.78%	0.78%	98%	1.6%
8	0.39%	0.39%	99%	0.78%
9	0.20%	0.20%	100%	0.39%
10	0.10%	0.10%	100%	0.20%

表 10 試料水中 1 個と低濃度な場合に、試料を 2 分割して一方を試験（あるいは分割せず 50% 回収率で試験）する場合の、複数回検査することの意味

試験 回数	複数回の結果が 全部陰性の確率	いずれか 1 回は陽 性となる確率
1	50%	50%
2	25%	75%
3	13%	88%
4	6.3%	94%
5	3.1%	97%
6	1.6%	98%
7	0.78%	99%
8	0.39%	100%
9	0.20%	100%
10	0.10%	100%

表 11 水道原水から検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型の分布

遺伝子型	感染性*
<i>C. suis</i>	あり**
<i>C. felis</i>	あり**
<i>C. andersoni</i>	なし
<i>C. sp. pig genotype II</i>	なし
<i>C. sp. cervine genotype</i>	あり**
<i>C. sp. avian genotype III</i>	なし
<i>C. sp. muskrat genotype</i>	なし

*ヒトへの感染報告例, **稀

表 12 実検体試験における qRT-PCR 法および顕微鏡法の結果

サ ン プ ル 名	定量値		顕微鏡法
	Ct 値	(oocysts/PCR tube)	(/10L)
採水地点 A	35.61	0.0007	3 oocysts
採水地点 B	35.93	0.0006	6 oocysts
Kit 添付陽性対照(x10 希釈)	28.56	0.0757	
陰性対照	—	—	

表 13 河川水原虫検出結果(クリプトスポリジウム)

地点		採水月 日	検鏡 結果	LAMP (Tt 値)		RT-RCR (Ct 値、配列)		
				5µl	2µl	2µl	シーケンス結果	
クリプトスポリジウム	相模川	社家	3/2	1	—	—	—	
			4/4	1	44.06	38.24	38.76	<i>Cryptosporidium parvum</i>
			5/12	0	—	—	—	
			1/4	3	26.48	27.06	29.46	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	相模川	社家右岸	3/2	0	—	—	—	
			4/4	6	34.00	36.48	34.42	<i>Cryptosporidium parvum</i>
			5/12	4	45.00	42.4	39.10	<i>Cryptosporidium parvum</i>
			7/5	1	34.12	33.30	34.25	<i>Cryptosporidium parvum</i>
			8/1	3	—	—	—	
			1/4	14	28.36	30.42	31.43	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	中津川		3/2	0	53.36	46.00	39.27	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	中津川		4/4	19	38.42	41.12	35.66	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	小鮎川	第二鮎津橋	3/2	28	50.42	46.54	38.26	<i>Cryptosporidium parvum</i>
			4/4	9	32.36	31.12	34.46	<i>Cryptosporidium parvum</i>
			1/4	0	27.36	27.36	29.93	<i>Cryptosporidium parvum</i>
		片原橋	11/24	32	26.30	26.00	27.85	<i>Cryptosporidium parvum</i>
酒匂川	飯泉	3/2	0	42.06	39.42	37.72	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
		4/4	0	—	—	—		
		7/5	0	—	—	36.68	<i>Cryptosporidium parvum</i>	

試料濃縮量はすべて 10L。

「—」は陰性、空欄は試験未実施

表 14 河川水原虫検出結果(ジアルジア)

地点		採水月 日	検鏡 結果	LAMP (Tt 値)		RT-RCR (Ct 値、配列)		
				5µl	2µl	2µl	シーケンス結果	
ジアルジア	相模川	社家	3/2	0	42.00	56.24	38.65	<i>Giardia intestinalis</i>
			4/4	0	—	—	—	
			5/12	2	(42.12)	(44.18)	33.80	<i>Giardia intestinalis</i>
			1/4	0	—	—	—	
	相模川	社家右岸	3/2	0	—	—	—	
			4/4	1	38.06	—	38.98	<i>Giardia intestinalis</i>
			5/12	0	—	52.06	40.93	<i>Giardia intestinalis</i>
			7/5	0	—	—	—	
			8/1	0	51.48	—	(-)	
			1/4	1	—	—	—	
	中津川		3/2	0	49.06	—	(41.65)	<i>Giardia intestinalis</i>
			4/4	0	59.06	58.30	(41.87*)	<i>Giardia intestinalis</i>
	小鮎川	第二鮎 津橋	3/2	1	—	—	—	
			4/4	2	—	—	—	
			1/4	0	—	—	—	
	片原橋	11/24	1	—	—	—		
酒匂川	飯泉	3/2	0	—	—	—		
		4/4	0	—	59.36	39.00	<i>Giardia intestinalis</i>	
		7/5	2	—	—	—		

試料濃縮量はすべて 10L。

「—」は陰性、空欄は試験未実施

()再試験結果 *逆転写反応液量5µlで実施

表 15 畜産処理施設排水原虫検出結果

地点	採水月 日	試料量 (ml)	検鏡結 果	LAMP (Tt 値)		RT-PCR (Ct 値、配列)			
				5µl	2µl	2µl	シーケンス結果		
クリプト	原水1	12/7	1	93	33.06	32.00	35.93	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
		1/18		197	30.30	31.24	33.85	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
	原水2	12/8	1	12	34.18	38.12	38.01	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
		1/18			—	—			
					49.3*1				
				35	32.42*2		—		
	—*3	—*3							
	—*3	51.30*3							
処理水	12/8	500	55	25.42	25.12	28.93	<i>Cryptosporidium parvum</i>		
	1/18		1200	26.30	27.12	30.89	<i>Cryptosporidium parvum</i>		
ジアルジア	原水1	12/7	1	0	—	—	—		
		1/18		0	—	—	—		
	原水2	12/8	1	0	—	—	—		
		1/18		0	—	—	—		
	処理水	12/8	500	0	—	—	—		
		1/18		0	—	—	—		

「—」は陰性、空欄は未実施

*1*2 別試験分、*2 阻止剤あり、*3 追試分