

令和2年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究

研究代表者 松井 佳彦（北海道大学大学院工学研究院）

微生物(寄生虫等)に関する研究

耐塩素性病原微生物の顕微鏡検査を遺伝子検査で補い、浄水場の対策に反映された例

研究分担者	泉山 信司	(国立感染症研究所寄生動物部)
研究協力者	鎌田 智子	(神奈川県内広域水道企業団技術部)
研究協力者	古川 紗耶香	(青森市企業局水道部)
研究協力者	藤瀬 大輝	(川崎市上下水道局 水管理センター水道水質課)
研究協力者	橋本 温	(県立広島大学生命環境学部)
研究協力者	黒木 俊郎	(岡山理科大学獣医学科)
研究協力者	井上 亘	(神戸大学理学研究科生物学専攻)
研究協力者	中嶋 直樹	(神奈川県衛生研究所)

研究要旨

水道におけるクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の検査は、水道原水 10L 中のわずか1つを顕微鏡で検出する、容易ではない検査が行われている。ある河川水原水では、上流に民家や畜産施設がほぼ無く、クリプトスポリジウムやジアルジアの検出がないとされてきたが、特異蛍光抗体で染色されるジアルジア大の粒子が観察されていた。その粒子は、従来の鑑別基準での核の配置とは異なっていたので、ジアルジアとは判断されていなかった。遺伝子検査を行うと RT-PCR が陽性となり、げっ歯類で報告のある *Giardia microti* の塩基配列が得られた。その塩基配列はヒトでの感染報告例が見当たらず、直ちに高いリスクが生じるとは言わずに済むようであった。取水地点より上流を調査すると、河川水と野生のネズミの糞便から同じ塩基配列が検出された。河川の過去の冷凍試料にさかのぼって検査すると、時々試料からクリプトスポリジウムの RT-PCR 陽性と塩基配列が得られた。耐塩素性病原微生物の排出源が想定外に明らかとなったことから、免疫不全等の健康弱者が感染し重篤化する可能性、ヒトで感染する種や株が野生動物の間で流行する可能性を考慮し、浄水処理の徹底、すなわちろ過池の濁度の監視や洗浄の徹底と、紫外線処理の導入といった対策が行われた。以上は遺伝子検査を併用して顕微鏡検査の結果を補い、野生動物由来の糞便汚染とジアルジアの流行を検知し、浄水場の対策に反映することで、水道水質の向上に資することのできた例であった

A.研究目的

非血性の水様下痢を呈するクリプトスポリジウム症とジアルジア症は、糞便中に排出されたオ

ーシストとシストの経口摂取により糞口感染する。

いずれも塩素消毒に抵抗性があることから、水道水を介した感染が生じて問題となる。国内で

は、クリプトスポリジウムによる集団感染が町水道と貯水槽水道、ジアルジアは貯水槽水道において発生している^{1,2)}。海外でもクリプトスポリジウムやジアルジアの水系集団感染が報告され、これらの対策が必要であることに、未だ変わりが無い³⁻⁶⁾。大きな集団感染だけでなく、低濃度の汚染から散発的な感染が生じてしまうことも問題になる。10L中に最大で0.08個のクリプトスポリジウム濃度の水道水を給水人口6万人に対して供給し、218人の患者発生が英国で報告されている⁷⁾。

つまり、わずか1個であっても感染確率が高く、水道における耐塩素性病原微生物の対策としては、汚染の濃度が低ければ良いとか、少数の感染は無視して良いという話ではなく、可能な範囲で除去や不活化することが望ましいと言える⁸⁻¹¹⁾。クリプトスポリジウムやジアルジアの検出を糞便汚染の指標と捉えることも可能で、ヒト感染しづらい病原体であれば、浄水場の対策をしなくてよいということでもない。対策には国内でよく使われている急速ろ過以外に、緩速ろ過、膜処理、紫外線処理と、これらの組み合わせが用いられることがある¹²⁾。ろ過の性能が低下したり、ろ過池に濃縮された汚染が水道水に入らないような、ろ過池の管理も必要とする。病原体の検査はリアルタイムな結果を得ることができないので、濁度計でろ過池をリアルタイムに監視したり、丁寧なるろ過の開始と終了、洗浄の徹底といった対策が行われている。

水道のクリプトスポリジウム等検査法は、検出に顕微鏡検査を基本としているが、遺伝子検査も使用可能となっている¹²⁾。水道原水になる河川水から汚染が顕微鏡で検出された際に、上流の汚染源を遺伝子で追跡された事例が報告されている^{13,14)}。単に蛍光抗体で染色されたオーシストやシストが顕微鏡下に検出されただけでなく、その種類や遺伝子型、塩基配列と言った情報が増えるほど、検査の精度・確度の向上や、

排出源の情報が得られる。そしてその結果を根拠として、排出源の対策や指導に活用されているが、浄水場の対策に活用された例は国内に見当たらなかった。

ある河川水の検査において、ジアルジアの大きさだが、内部構造が *Giardia lamblia* とは異なって見える粒子が検出された。従来の顕微鏡検査の鑑別基準で判断すれば、ジアルジアではないことになってしまうが、遺伝子検査により確認を行い、ジアルジア属の遺伝子の配列が得られた。本研究では顕微鏡の結果を遺伝子の結果で補い、浄水場の対策に反映され、水質の向上に貢献できた例であったことから報告する。

ジアルジアはヒトに感染する種類として、*G. lamblia* assemblage A または B がもっぱらとされ、まれにイヌの C と D、偶蹄類の E が報告されることがある¹⁵⁾。他に *G. agilis*、*G. ardeae*、*G. microti*、*G. muris*、*G. psittaci*、*G. varani* の種もあるが、ヒト感染は知られていない。クリプトスポリジウムはヒトに感染する種類として、*Cryptosporidium hominis* と *C. parvum* が多く、それ以外の種も検出される¹⁶⁾。当初、宿主域は狭いと考えられていたが、クリプトスポリジウムは150種以上の宿主から検出され、例えば *C. parvum* や *C. ubiquitum* はヒトを含め宿主域が広いことが明らかとなっている。げっ歯類を中心に感染する *C. muris* の場合、免疫不全者に感染が集積する恐れがあり、健康弱者への配慮は必要であろう¹⁷⁾。

B. 研究方法

B1 河川水からの原虫検出

着水井もしくはその上流域の河川より10Lを採水し、検査指針¹²⁾に準拠して(オー)シストを精製した。すなわち、PTFE フィルター法で濃縮し、免疫磁気ビーズ法(Dynabeads GC-Combo)でクリプトスポリジウムとジアルジアを精製した。同じサンプルから検鏡と遺伝子検査の両方を行う場合は、精製を終えた段階でサンプルを等分

した。検鏡法に蛍光抗体染色液(アーク・リソース製 ARK Fluor Ab C/G)を使用した。遺伝子検査法に、クリプトスポリジウムの SSU rDNA を標的とする RT-PCR(CY230、タカラバイオ)、ジアルジアの SSU rDNA を標的とする RT-PCR(CY231、タカラバイオ)、*G. muris* の SSU rDNA を標的とする RT-PCR(下記)、 β ジアルジン遺伝子を標的とするリアルタイム PCR とジアルジア属を広く検出できる SSU rDNA を標的としたコンベンショナル PCR を使用した^{18,19)}。

B2 *G. muris* を検出する RT-PCR 法の新規開発
ジアルジアの SSU rDNA を標的とする RT-PCR(CY231)は、ジアルジア属のうち *G. lamblia*、*G. microti*、*G. psittaci* が検出可能と予測され、*G. muris* は対象とされていなかった。ジアルジア属を広く検出できるコンベンショナル PCR を試して 245bp 程度の *G. muris* 配列(図 1 の A03、B10)を得たが、一部サンプルからは違う生物の遺伝子が多く増幅された¹⁹⁾。そこで新規に *G. muris* に特異的な RT-PCR 法を開発した。プライマー、プローブはソフトウェア「Edesign」の Web インターフェースを用いて設計し、既知の配列を参考に一部混合塩基にした²⁰⁾。増幅領域は図 1 に、反応条件とプライマー、プローブは表 1 に示した。

この RT-PCR 法に使用できる陽性コントロールとして、図 1 の A03(245bp)、B10(246bp)の配列をプラスミドベクター pEX-A2J2 に挿入した人工遺伝子 2 種を作製した(ユーロフィンジェノミクス、東京)。

B3 汚染源調査

日本においては *G. microti* の検出報告例が見あらず、海外での既知の宿主(マスカラット、野ネズミ類)から、日本の宿主を予想した²¹⁻²⁴⁾。日本に生息する野ネズミ類のうち、その上流域に生息が予想される、近縁の野ネズミ類(アカネズ

ミ、ヒメネズミ、ハタネズミ、ヤチネズミ)4 種をターゲットとして、シャーマントラップによる捕獲を行った。

捕獲調査は 2018 年の 6 月(3 日間)、8 月(2 日間)、10 月(2 日間)の全 3 回行った。この捕獲調査は関係法規を順守し、関係省庁に所定の手続きをしてから行った。

捕獲地点は、浄水場の集水区となっている上流域(図 2)で、河川から *G. microti* が検出されたことのある 3 地点(地点 A、B、C)と、検出されたことのない 1 地点(D)を選択した。捕獲した野ネズミ類は、現場で写真撮影、体長・尾長・耳長などを測定、糞便の回収を行った後に、放逐した。ネズミの種類は、記録した形態と、一部は SSU rDNA の一部配列から判別した。

糞便サンプルから精製操作後に等分し、検鏡検査と遺伝子検査を行った。野ネズミ類の捕獲と検鏡検査の一部は、エヌエス環境株式会社に委託した。

捕獲第 1 日目もしくは 2 日目に各地点の河川の採水と検査を行った。

B4 紫外線処理の検討

施設能力 3 万 m³/日以上で紫外線処理または膜処理を実施している 14 の水道事業体に、導入経緯、導入費用、ランニングコスト等を回答してもらえる範囲で聞き取りを行った。聞き取り内容を参考にして、当浄水場への導入コストを試算した。

B5 洗砂機と濁度管理の対策

既存の洗砂機(5 槽式、洗砂量 4m³/h、使用水量 50m³/h)を用いて、使用水量の増量や、洗砂機を 2 機連結しての 2 回洗砂を行い、洗浄水の濁度を検討した。新規の洗砂機(2 タンク式、洗砂量 4m³/h、使用水量 40m³/h 以下)も導入した。

ろ過池の濁度管理は、コストや維持管理性を考えて、全 12 ろ過池に個別に濁度計を設置す

るのではなく、ろ過池のサンプリングを切り替えられる監視システムを北系、南系の系統別に導入した。切り替えは、遠方もしくは現場での手動、又はタイマーによる自動切り替えを可能とした。

C. 結果及び考察

C1 河川水からの原虫検出

河川水の水道原水からクリプトスポリジウム等の顕微鏡検査を行い、ジアルジアサイズのシスト壁らしきものは観察されるが、核の配置が従来とは異なり、ジアルジアとは言い難いシスト様粒子(図 3A)の存在する状況が続いた。

遺伝子検査を導入すると、検鏡検査では陰性でも、ジアルジアの RT-PCR が陽性となった。遺伝子の非特異的な増幅を疑い、塩基配列を確認すると、確かにジアルジア属の遺伝子であった。配列の一致率は、データベース上の近縁の配列(AF006676)を基準として、混合塩基を一致とみなせば、99.6% (=224/225bp)であった。系統樹解析の結果から *G. microti* (図 4)と推定された。

2017 年 4 月の検出から毎月 1 回以上着水井のジアルジアの検査を行っており、2019 年 7 月までに遺伝子検査を行った 28 ヶ月計 33 サンプルのうち、20 サンプルでジアルジア遺伝子の増幅が確認された。一部抜粋して 2018 年 8 月から 2019 年 7 月分の検査結果を表 2 に示した。他にも河川上流域の複数地点からも遺伝子増幅産物を得た。シーケンスに成功した着水井 14 サンプルと上流域 24 サンプルは、全て上記の *G. microti* と同じ配列であった。なお、*G. lamblia* 遺伝子は検出されなかった。

C2 *G. muris* を検出する RT-PCR 法の新規開発

検鏡検査を繰り返すうちに、核の DAPI 像や微分干渉像より、ジアルジアと断定、もしくは推定されるシストを確認した(図 3B)。使用中の RT-PCR は *G. muris* を検出しないとされていたことか

ら、*G. muris* の RT-PCR 法を開発し、*G. muris* も検出された。

試行した範囲で着水井 3 サンプル、浄水場上流域 2 サンプル、後述のネズミ調査地点の河川水 1 サンプル、捕獲されたネズミ 3 個体から、新規 RT-PCR が陽性となり、増幅産物の塩基配列も *G. muris* 配列が得られた(表 3)。合計 9 つの配列は 2 種類に分かれ、A03 系統は 4 サンプル、B10 系統は 5 サンプルあった(図 1)。環境中からは 2 種類の配列が取得されたが、ネズミの糞便からは片方の B10 系統の配列しか得られておらず、ネズミの捕獲検査数が不足したか、あるいはネズミ以外にも排出源の存在する可能性が懸念された。

以上のとおり、検鏡法の定期検査では原虫を確定できなかったところを、遺伝子検査で補うことができた。増幅産物の塩基配列を読み取ることによって結果を確認し、必要によりプライマー、プローブを変更することで特異性を修正した。

C3 汚染源調査

浄水場の集水区となっている上流域(図 2)の汚染実態を調査した。具体的には、前述の上流の河川水の検査と、宿主と予想されるげっ歯類の感染状況を 4 地点(A から D)で調査した。

野ネズミ類は 83 匹(再捕獲個体は含まない)捕獲され、うち 47 匹分の糞を精製して原虫検査を行った。検鏡検査でジアルジアと断定できるシスト(図 5 右)が見られた 3 検体と、同程度の大きさのシスト壁らしき蛍光のみが見られた 14 検体、計 17 検体を表 4 に示した。*G. microti* 遺伝子が検出されたのは 17 検体中、4 検体であった(表 4)。ネズミから検出した *G. microti* と捕獲地点周辺河川や着水井で検出した *G. microti* の塩基配列は、混合塩基を一致とみなせば、全期間、全地点でほぼ同じ(99~100%)であった。わずかに違いがありそうに見えても、シーケンスエラーと考えられた。

個体番号 034 はジアルジアシストが観察されたにも関わらずジアルジア RT-PCR (CY231) による検査結果が陰性であった(表 4)。その相違より CY231 が反応しない *G. muris* であることを疑い、 β ジアルジン領域を増幅するリアルタイム PCR を表 4 の 17 検体に試したところ、3 検体で確かな増幅があった。さらに、本研究で開発の *G. muris* を検出する RT-PCR を行い、増副産物の塩基配列を確認し、当該 3 検体は *G. muris* 陽性であることを確認した。

その他のシスト壁しか見えない試料については、治癒の途中で濃度が低く、溶解するなどして内容の栄養体が糞便中から失われたのかもしれない。仮に中身が空のシスト壁であってもジアルジアであるなら、検出率が 36% (=17/47) と高く、げっ歯類の間での大流行が懸念された。遺伝子の検出された陽性率では、*G. microti* が 9% (=4/47)、*G. muris* が 6% (=3/47) と、決して低くない数字であった。野ネズミとはいえ感染流行が大きくなれば、水道原水から見つかるほどに汚染が生じてしまうと考えられた。

ジアルジアが検出される野ネズミの種類は、以下の通りであった(表 5)。海外ではマスカラットの他、野ネズミ類では *Apodemus* 属(アカヒメネズミに近縁)・*Microtus* 属(ハタネズミに近縁)・*Myodes* 属(ヤチネズミに近縁)からの *G. microti* の検出報告があるが、国内では見当たらず、少なくともハタ/ヤチネズミが日本における *G. microti* の宿主の一部であると判明した¹⁹⁾。例数は少ないが、*G. microti* は高率に感染しており、ハタネズミが 100% (=陽性 2/2 個体)、ヤチネズミが 67% (=2/3) の検出率であった。アカネズミとヒメネズミには *G. microti* の検出がなかった。*G. muris* の検出はアカネズミに限られ(13% = 3/24)、同じげっ歯類でも棲み分けや流行状況の相違が想像された。

検出された位置関係は以下の通りであった(図 2)。地点 A と C は *G. microti* 陽性のハタ/ヤ

チネズミが捕獲され、着水井、周辺河川からもほぼ同じ配列の *G. microti* が検出された。すなわち地点 A と C のハタ/ヤチネズミが、浄水場の上流域を汚染させていると示唆された。下流の地点 B は河川からは *G. microti* が検出されたものの、ハタ/ヤチネズミが捕獲されなかったため、現場の流行状況が不明であった。*G. microti* が河川水から検出されたことのない地点 D は、ヤチネズミからも *G. microti* は検出されなかった。以上の通り、河川とネズミからの検出と、位置関係は、およそ対応していた。

ジアルジアの検鏡像について触れておくと、ネズミ由来の *G. microti* と *G. muris* のシストは、大きさと見た目に特に違いが無く、核の配置が若干異なる程度であった。着水井では、2017 年のジアルジア検出より以前から、検査担当者が四ツ目タイプと呼称するシスト様粒子(図 3A)を観察していた。このような核が互いに離れた生物は、4 つの核が片側に寄っている *G. lamblia* ではないと認識していた。一方、*G. microti* 陽性のネズミ糞便中に、四ツ目タイプが存在(図 5 左)した。文献的にはこれら四ツ目タイプとよく似たものの(表 6)が、*G. microti* の「mature cyst」・「binary cyst」として記載されており²¹⁻²⁴⁾、本研究の顕微鏡観察と遺伝子検査の結果に矛盾しないことを確認した。今後の検査では、形態に思い込みを持ち過ぎないことが必要と考えられた。

C4 紫外線処理の検討

水道原水に想定していなかった汚染源が明らかとなったことから、長期的な対策が検討された。協力を得た 14 の水道事業体に、外部への情報提供をしないという前提で聞き取りを行い、ここでは詳細を記載しない。

ろ過施設と紫外線処理を併用している事業体の導入経緯は、原水及び上流で原虫が確認されたため、ろ過施設等に不具合が生じたときの補完施設として設置したとの回答がほとんどであ

った。一方で膜処理施設を導入した事業者は、上流に汚染の恐れがある施設が存在しているため、恒久的な対応として安全性を考慮し、既存施設を補完するのではなく施設の老朽化にあわせ浄水処理方法を膜処理方法に変更したとの回答が多く見られた。

聞き取り結果から紫外線処理施設、膜処理施設のイニシャル、ランニングコストを試算した。イニシャルコストは、紫外線処理施設で膜処理施設の3から4分の1程度、ランニングコストは年間で2分の1程度となった(2017年時点)。導入費用、ランニングコスト共に紫外線処理施設が安価であった。

工事の規模についても考慮された。当該浄水場は基幹施設であるため、既存のろ過池を継続利用しながら膜処理施設を新たに建設するには十分な敷地が無く、ろ過池を撤去して膜処理施設にすることは困難と考えた。一方で既にある緩速ろ過池に紫外線を補完する工事は建設方法によりこの問題を解決できると考えられた。

また、膜処理による浄水の味の変化が懸念された。当該浄水場は緩速ろ過池と良質な原水を活用し、おいしい水道水を供給する施設の一つと称されてきた。これを踏まえて、水質に影響を及ぼすことがないことに加え、費用面・規模などを総合的に判断し、紫外線処理施設を現在ある緩速ろ過池に原虫対策のマルチバリアとして追加する方針が決定された。

紫外線導入の決定後は紫外線処理装置メーカーを、①設置スペース、②コスト、③メンテナンス性、が特に重視された。①設置スペースは現在浄水場内にある塩素混和池棟に余裕をもって収まるのが条件であった。②コストはイニシャルコスト(装置代、設置工事代等)だけでなく、15年分のランニングコスト(点検費、電気代)を足したトータルコストで比較された。そして③メンテナンス性(作業性、部品入手の容易性)も加味して検討し、当該浄水場の浄水処理環境に適し、かつコ

ストパフォーマンスのよい紫外線処理装置が仕様とされた。

C5 洗砂機と濁度管理の対策

結果には詳細を書かないが、過去にさかのぼって冷凍試料から RT-PCR を行った結果、クリプトスポリジウムの遺伝子配列も検出された。浄水場の取水上流には下水の放流や畜産はほぼなかったが、森林地帯の野生動物に由来する汚染を無視できないと判明したことから、短期的にも、対策を強化したい状況であった。

既存の洗砂機について、使用水量の増量、あるいは2機連結による2回洗砂を行うと、通常の洗砂法よりは効果があった。しかし、洗浄水を2度以下にすることはできなかった。そこで新機種を導入し、設置後のテストで洗浄水2度以下の基準を満たした。既存機は、水車状の回転板にて砂と洗浄水を同時に次槽へ送り、5槽繰り返す構造である。それに対し、新機種は1つ目のタンクで砂を洗浄し、2つ目のタンクへは独立して新しい洗浄水を注入できることから、より高い洗浄効果が得られると考えられた。

濁度管理は、監視システムの導入によりろ過池1池ごとの濁度監視とすることにより、ろ過水の濁度上昇への迅速な対応に加え、ろ過池の削り取り後の濁度管理の徹底と、1池毎の丁寧な対応が可能となった。以上の通り、当該浄水場では原虫リスクに着実な対応を行い、安全安心な浄水の供給が行われていた。

D. 結論

水道原水の定期検査で、特異蛍光抗体で染色されるジアルジア大の粒子が観察されたが、核の配置が従来の鑑別基準から外れていたため、ジアルジアとは判断されていなかった。遺伝子検査で RT-PCR が陽性となり、げっ歯類の *Giardia microti* の塩基配列が得られた。文献的には、そのような核の配置が報告されていたの

で、矛盾はなかった。取水地点より上流を調査し、河川水と野生のネズミの糞便から同じ塩基配列が検出された。*G. muris* の塩基配列も検出され、従来の鑑別基準にある核の配置をしたジアルジアが観察されることもあった。過去の冷凍試料からクリプトスポリジウムの塩基配列も検出された。耐塩素性病原微生物の排出源が想定外に明らかとなったことから、ろ過池の濁度の監視や洗浄の徹底と、紫外線処理の導入が進められた。遺伝子検査を併用して顕微鏡検査の結果を補い、野生動物由来の糞便汚染とジアルジアの流行を検知し、浄水場の対策に反映、水道水質の向上に資することのできた例であった。

E. 参考文献

1. 埼玉県衛生部, 「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 (平成 9 年 3 月)
2. 岸田一則、石田篤史、本邦初のジアルジア集団感染事例について、平成 23 年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、茨城県土浦市
3. Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J, Långmark J, Löfdahl M, Omberg M, Reuterwall C, Samuelsson E, Widgren K, Wallensten A, Lindh J. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. *Emerg Infect Dis.* Vol.20, No.4, pp.581-589 (2014)
4. Nygård K, Schimmer B, Søbstad Ø, Walde A, Tveit I, Langeland N, Hausken T, Aavitsland P. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health.* 2006 May 25;6:141.
5. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007 Mar;5(1):1-38.
6. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 2011 Dec 15;45(20):6603-14.
7. Mason BW, Chalmers RM, Carnicer-Pont D, Casemore DP. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in North-West Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. *J Water Health.* 2010 Jun;8(2):299-310.
8. USEPA. Appendix N Infectivity Dose-Response Analysis, pp.N1-N18. In *Economic Analysis for the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule.* United States Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. EPA-821-R-06-001 (2005)
9. World Health Organization; Water, Sanitation and Health Team. 5. Effect assessment: dose-response relation, pp.57-67. In *Risk assessment of Cryptosporidium in drinking water.* The World Health Organization, Geneva, Switzerland (2009) (<http://www.who.int/iris/handle/10665/70117>, 2021 年 3 月 24 日時点)
10. Messner MJ, Berger P. *Cryptosporidium* Infection Risk: Results of New Dose-Response Modeling. *Risk Anal.* Vol.36, No.10, pp.1969-1982 (2016)
11. Rose, J. B., Haas, C. N., & Regli, S. (1991). Risk assessment and control of water borne giardiasis. *American Journal of Public Health,* 81(6), 709-713.
12. 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課長.

- 「水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について」の一部改正について、薬生水発 0529 第 1 号(令和元年 5 月 29 日)
13. 國枝 晴子,下陸 舞,久野 草太郎,及川 智,江原 和宏,荒井 活人,木村 慎一,吉澤 健一、荒川水系原虫類調査によるクリプトスポリジウム汚染源の特定及び汚染リスクの評価、水道協会雑誌, 2017, 86(11), 13-18.
 14. 泉山信司、秋葉道宏、松下拓、片山浩之他、「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究－微生物分科会－」、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)(研究代表者、松井佳彦)より平成 27 年度分担研究報告書
 15. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011 Jan;24(1):110-40.
 16. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. Acta Trop. 2018 Aug;184:1-14.
 17. Furio MM, Wordell CJ. Treatment of infectious complications of acquired immunodeficiency syndrome. Clin Pharm. 1985 Sep-Oct;4(5):539-54.
 18. 武田万里子、新谷保徳、林広宣、三輪雅幸、リアルタイム PCR 法を用いた *Giardia* の測定方法の確立と環境水への適用、第 54 回日本水道協会関西地方支部研究発表会、2010 年
 19. Helmy YA, Spierling NG, Schmidt S, Rosenfeld UM, Reil D, Imholt C, Jacob J, Ulrich RG, Aebischer T, Klotz C. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. Parasites Vectors. 2018 Mar 27;11(1):213.
 20. Kimura Y, Soma T, Kasahara N, Delobel D, Hanami T, Tanaka Y, de Hoon MJ, Hayashizaki Y, Usui K, Harbers M. Edesign: Primer and Enhanced Internal Probe Design Tool for Quantitative PCR Experiments and Genotyping Assays. PLoS One. 2016 Feb 10;11(2):e0146950.
 21. Feely DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. J Protozool. 1988 Feb;35(1):52-4.
 22. Boeck, WC. Mitosis in *Giardia microti*. University of California Publications in Zoology, 1917, 18: 1.
 23. Feely DE, Chase DG, Hardin EL, Erlandsen SL. Ultrastructural evidence for the presence of bacteria, viral-like particles, and mycoplasma-like organisms associated with *Giardia* spp. J Protozool. 1988 Feb; 35(1):151-8.
 24. van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol. 1998 Apr;84(2):294-300.
- F.研究発表
誌上发表
1. 泉山信司、最近の感染確率に基づく、水道水からクリプトスポリジウムを除去・不活化する目標の再計算、水道協会雑誌、89(8), 2-7, 2020
 2. 橋本温、中本佳奈、鈴木裕之、土岡宏彰、泉山信司、ハイドロキシアパタイト粉体ろ過法の効率と大腸菌試験への適用性、環境技術、2020, 49(2), 31-37
- 口頭発表
1. Motomu Inoue, Shinji Izumiya, Toshinobu Suzaki. Semi-permeability assay

- of *Cryptosporidium* oocyst wall using saturated sodium chloride solution. Joint online meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists. November 2020, Kobe, Japan.
2. 泉山信司、井上亘、橋本温、国内の水道原水におけるクリプトスポリジウムの検出状況、

環境技術学会、2020年6月、京都市(オンライン)

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

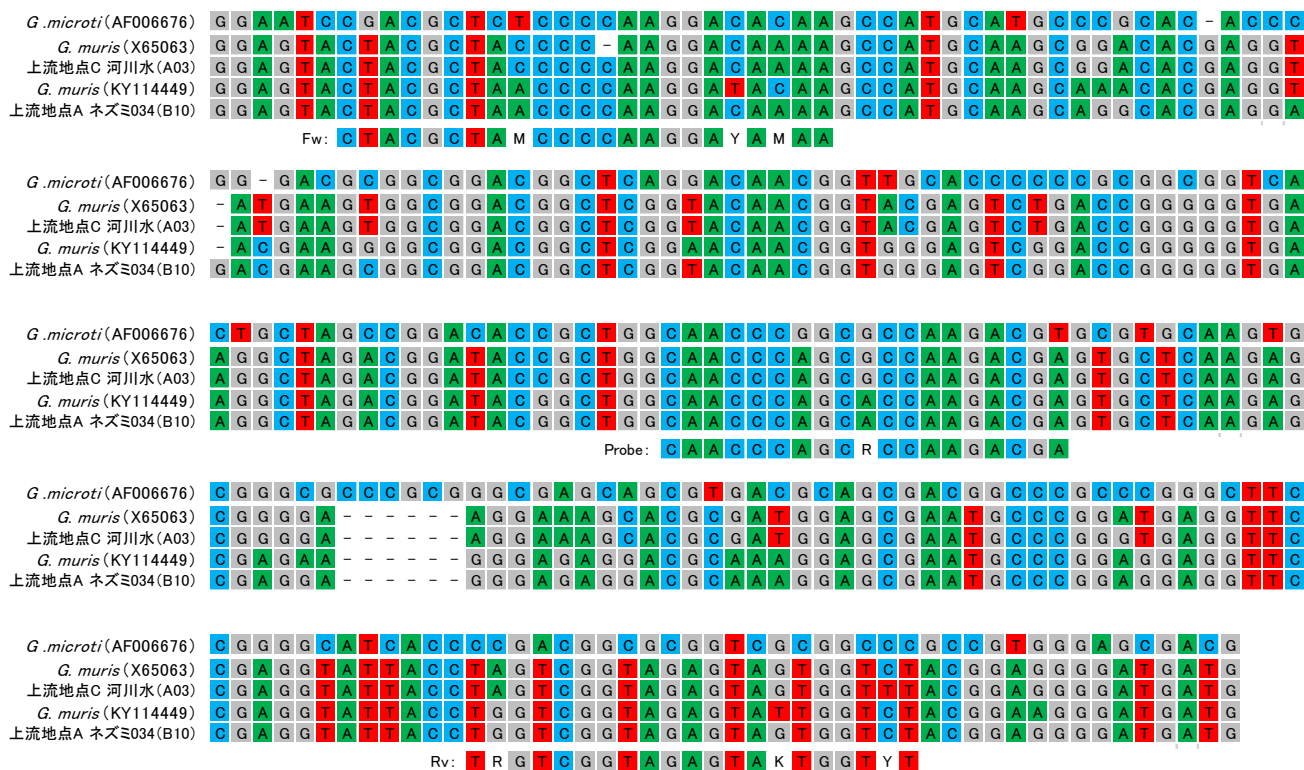


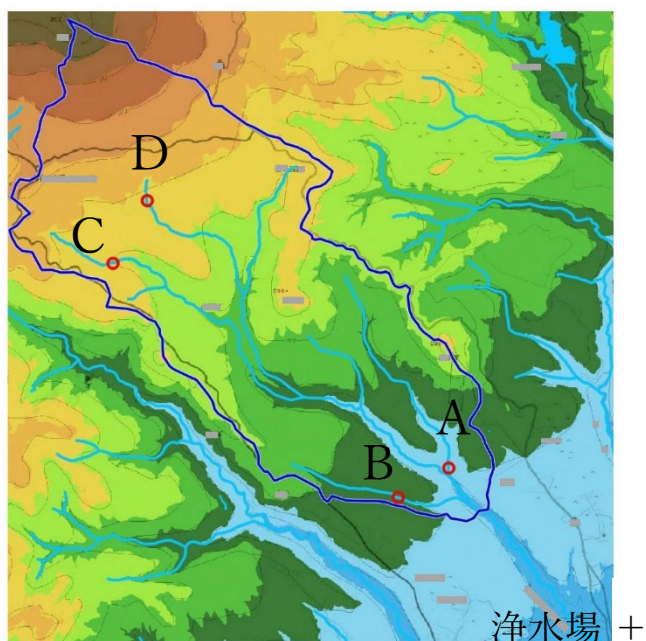
図1 *Giardia muris* の配列比較とRT-PCR 増幅領域

G. muris は2種類の配列が取得され、以後 A03 系統、B10 系統と呼び分けている

表1 *Giardia muris* 増幅条件

【プライマー・プローブの塩基配列】			
Fw プライマー: CTACGCTAMCCCCAAGGAYAMAA (兼シーケンスプライマー)			
Rv プライマー: ARACCMTACTCTACCGACYA (兼シーケンスプライマー)			
プローブ: 5'-(FAM)-CAACCCAGCRCCAAGACGA-(MGB)-3'			
【反応系】			【反応条件】
Distilled Water	9	μL	50cycle 95°C,10分 95°C,15秒 55°C,20秒 72°C,40秒
Taq Man Universal Master Mix	12.5	μL	
Fw プライマー(25μM)	0.5	μL	
Rv プライマー(25μM)	0.5	μL	
プローブ(5μM)	0.5	μL	
cDNA サンプル	2	μL	
反応液量		25	μL

A) 地図



B) 模式図

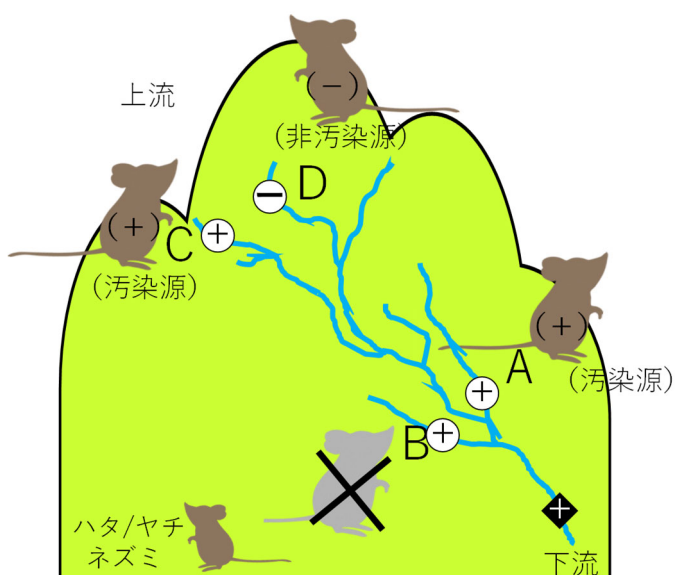
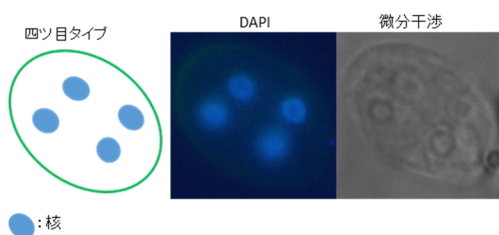


図2 ネズミ調査地点の位置関係と *Giardia microti* 検出結果の模式図

A) 地図上の地点 A は標高 102m から地点 D は標高 550m の山間部で、青の枠線は水源保護区域を意味する。赤○の地点 A から D がネズミの捕獲・糞便検査と、河川水の検査を行った地点。右下に浄水場+がある。B) 模式図、河川を意味する線上の+と-は、河川水中のジアルジア検出状況を意味する。ネズミ上の+と-は糞便中のジアルジア検出を意味する。A から D の 4 地点中、B 地点のネズミの色が薄くバツ印なのは、ネズミが捕獲されていないことを意味する。図にある通り、河川水とネズミからのジアルジア検出は、概ね対応した。

A) 核の配置が四つ目タイプ



B) 従来の鑑別基準の核の配置

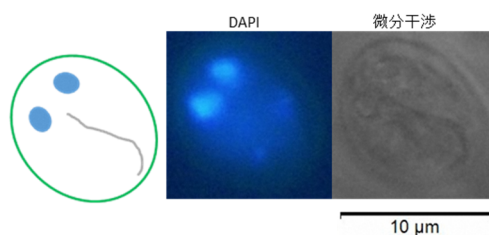


図3 浄水場着水井から検出したシスト様粒子(A)とジアルジアシスト(B)の模式図、DAPI染色像、微分干渉像
A) 実験感染や単一のシストを取り出して確認できたわけではないが、もっぱら図の通りにシスト内に核が分散して存在する試料から、*Giardia microti* の配列が検出された。B) *Giardia* の 2 ないし 4 つの核の配置は、ラグビーボール状のシストの中で、片側に寄っていると考えられていた。

図4 ジアルジア rRNA 系統樹

解析長は 237~243bp

コンベンショナル PCR で *G. muris* は 2 種類の配列が取得され、それぞれ図1と表3の A03 系統と B10 系統に対応する。

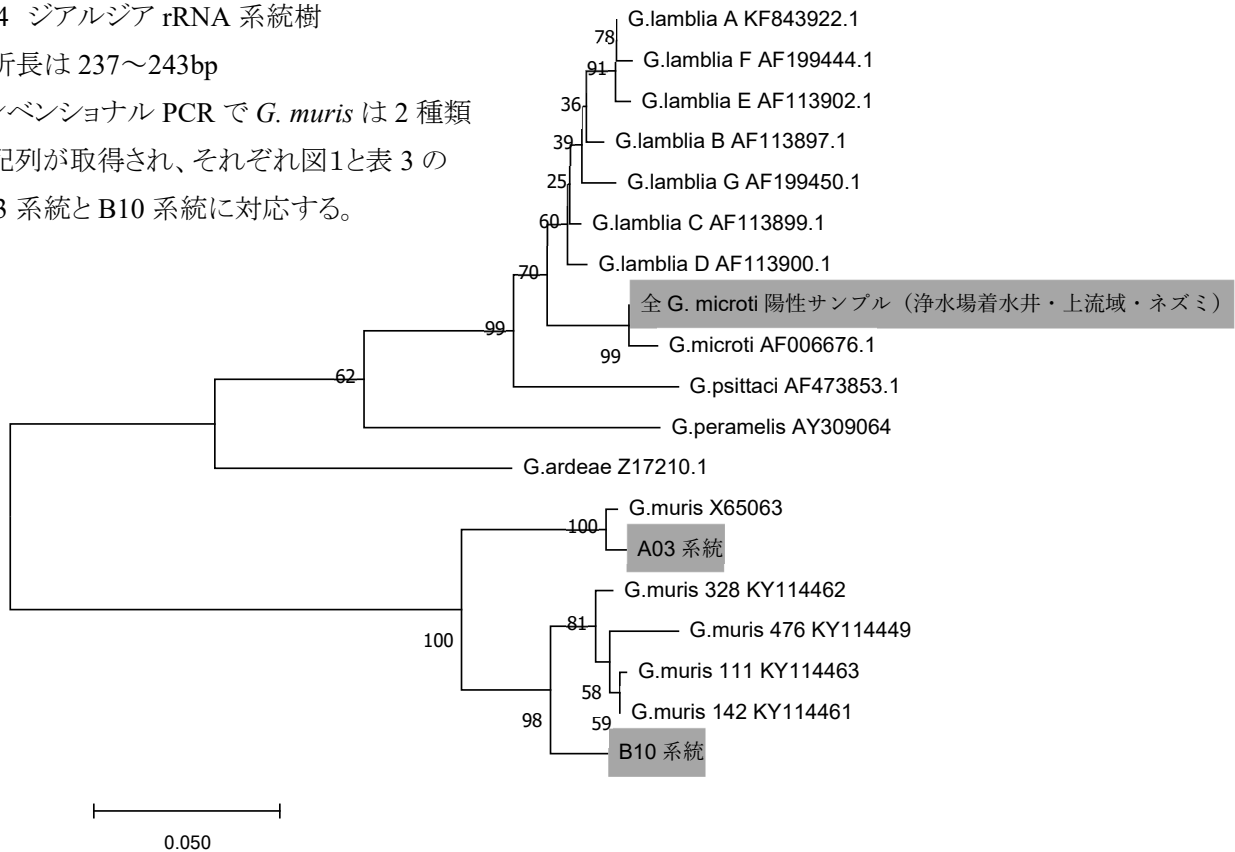


表2 着水井からの検出結果(2018/08~2019/07)

採水日	ジアルジア			
	遺伝子検査(CY231)		検鏡検査	
	増幅	シーケンス	DAPI	微分干渉
2018/08/07	±*1	×	-	-
2018/09/12	-	/	-	-
2018/10/4	+	<i>G. microti</i>	+	+
2018/11/12	+	<i>G. microti</i>	+	+
2018/12/10*2	+	<i>G. microti</i>	+	-
2019/01/21	+	<i>G. microti</i>	-	-
2019/02/12	-	/	-	-
2019/03/18	-	/	-	-
2019/04/22	+	<i>G. microti</i>	-	-
2019/05/20	+	<i>G. microti</i>	-	-
2019/6/24	±	×	+	+
2019/7/22	-	/	+	+

*1、+: 増幅もしくは観察あり、±: 微増幅、-: 増幅もしくは観察なし、×: RT-PCR 微増幅のため、シーケンスできなかったもの。*2、2018/12/10 の試料において新規 *G. muris* RT-PCR を試行し、RT-PCR が陽性、*G. muris* (A3 系統) の配列が得られた。

表3 *Giardia muris* の塩基配列一

採取日	試料内容	配列
2017/5/17	水源地	A03
2017/5/30	地点 C 事前調査	A03
2017/6/12	浄水場着水井	B10
2017/8/1	浄水場着水井	A03
2018/6/21	ネズミ 034	B10
2018/8/7	ネズミ 050	B10
2018/8/7	ネズミ 048	B10
2018/8/8	地点 C 第2回河川水	B10
2018/12/10	浄水場着水井	A03

* 新規開発の RT-PCR は増幅効率重視の 140bp 弱と解析長が短く、その範囲で 100% 一致したことから、A03 系統と B10 系統に分類している。

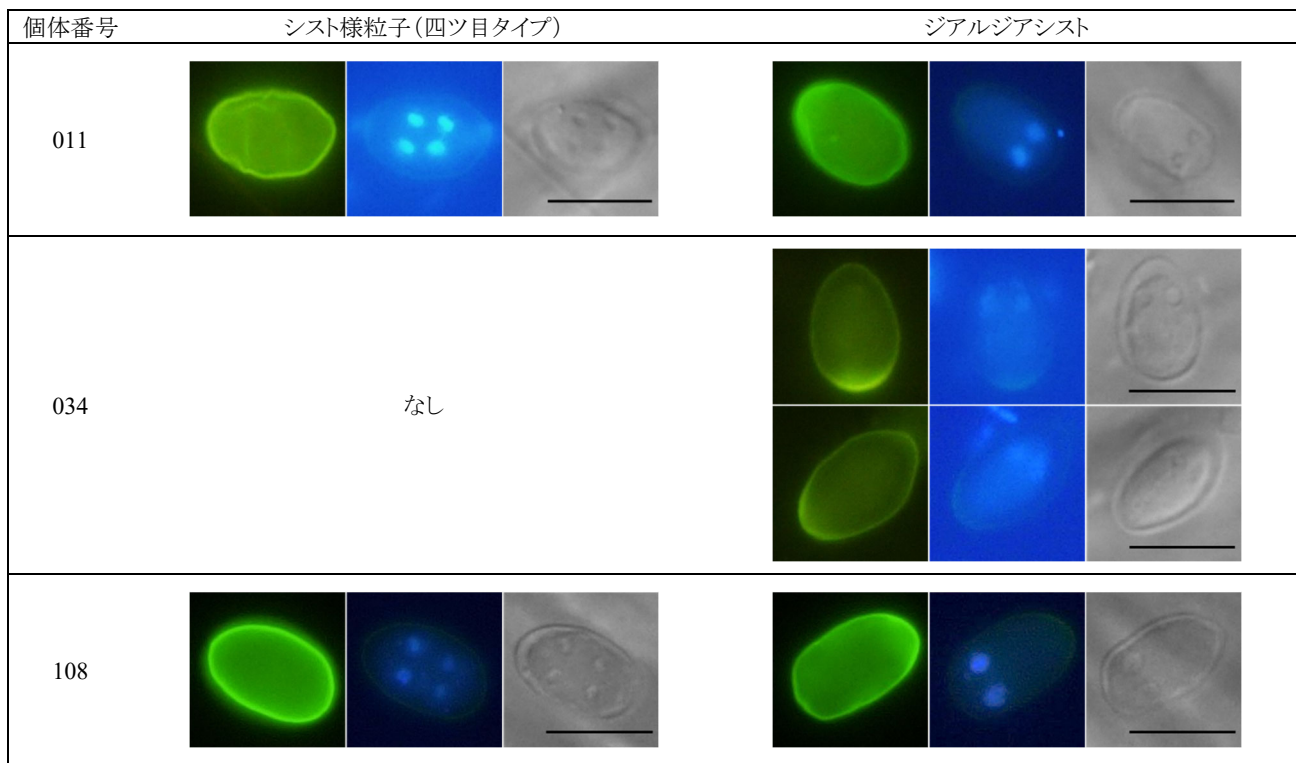


図5 ネズミ糞中のシスト様粒子(左列)、ジアルジアシスト(右列)

スケールバーは10 μ m

表4 シストもしくはシスト壁が観察されたネズミと遺伝子検査結果一覧(17匹分抜粋)

個体番号	回	地点	ネズミ推定種	検鏡結果	CY231 RT-PCR	β ジアルジンリアルタイム PCR ¹⁸⁾	新規 <i>G. muris</i> RT-PCR
002	第1回	A	ハタ	シスト壁のみ	<i>G. microti</i>	±*	
011	第1回	A	ハタ	シストと断定	<i>G. microti</i>	±	
015	第1回	A	アカ	シスト壁のみ	—	—	
017	第1回	B	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
020	第1回	C	アカ	シスト壁のみ	—	—	
021	第1回	D	アカ	シスト壁のみ	—	—	
034	第1回	A	アカ	シストと断定	—	+	<i>G. muris</i> (B10 系統)
048	第2回	A	アカ	シスト壁のみ	—	+	<i>G. muris</i> (B10 系統)
049	第2回	A	アカ	シスト壁のみ	—	—	
050	第2回	A	アカ	シスト壁のみ	—	+	<i>G. muris</i> (B10 系統)
054	第2回	C	ヤチ	シスト壁のみ	<i>G. microti</i>	—	
059	第2回	C	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
067	第2回	D	ヤチ	シスト壁のみ	—	—	
075	第2回	A	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
107	第3回	B	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
108	第3回	C	ヤチ	シストと断定	<i>G. microti</i>	—	
110	第3回	C	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	



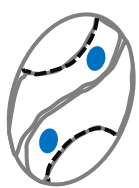
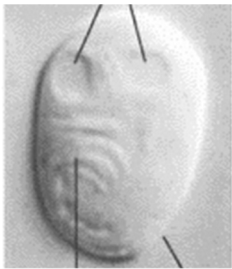

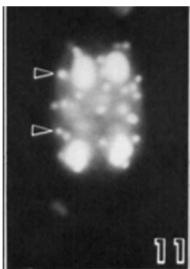
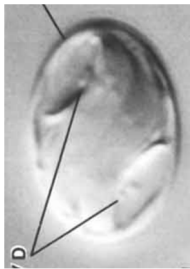
* +: 増幅、±: 微増幅、—: 増幅なし

表 5 捕獲された全てのげっ歯類の種類(n=83)と、一部検査を行い検出されたジアルジアの種類の詳細

地点	回	河川水中の <i>G. microti</i>	ハタネズミ		ヤチネズミ		アカネズミ			ヒメネズミ		ネズミ合計							
			捕獲	検査	<i>G. microti</i> 陽性	捕獲	検査	<i>G. microti</i> 陽性	<i>G. muris</i> 陽性	捕獲	検査	<i>G. microti</i> 陽性	捕獲	検査	<i>G. microti</i> 陽性	<i>G. muris</i> 陽性			
A	第1回	+*1	2	2	2	0	0	—	11	3	0	1	0	0	—	13	5	2	1
	第2回	+	0	0	—	0	0	—	4	4	0	2	1	1	0	5	5	0	2
	第3回	±	0	0	—	0	0	—	4	3	0	—	1	1	0	5	4	0	—
		地点計		2	2	2	0	0	0	19	10	0	3	2	2	0	23	14	2
B	第1回	+	0	0	—	0	0	—	2	1	0	—	3	3	0	5	4	0	—
	第2回	—	0	0	—	0	0	—	2	2	0	—	0	0	—	2	2	0	—
	第3回	+	0	0	—	0	0	—	3	2	0	—	2	2	0	5	4	0	—
		地点計		0	0	0	0	0	0	7	5	0	—	5	5	0	12	10	0
C	第1回	—	0	0	—	0	0	—	2	2	0	—	2	2	0	4	4	0	—
	第2回	+*2	0	0	—	1	1	1	7	2	0	—	4	2	0	12	5	1	—
	第3回	+	0	0	—	1	1	1	1	1	0	—	6	3	0	8	5	1	—
		地点計		0	0	0	2	2	2	10	5	0	—	12	7	0	24	14	2
D	第1回	—	0	0	—	0	0	—	3	2	0	—	4	1	0	7	3	0	—
	第2回	—	0	0	—	1	1	0	10	2	0	—	3	1	0	14	4	0	—
	第3回	—	0	0	—	0	0	—	0	0	0	—	3	2	0	3	2	0	—
		地点計		0	0	0	1	1	0	13	4	0	—	10	4	0	24	9	0
		ネズミ計	2	2	2	3	3	2	49	24	0	3	29	18	0	83	47	4	3
浄水場 着水井	第1回	+	/		/		/			/		/							
	第2回	±																	
	第3回	+																	

*1、+：増幅もしくは観察あり、±：微増幅、—：増幅もしくは観察なし *2、*G. muris* (B10 系統)も検出された

表 6 *Giardia microti* の論文に掲載されているシストの図・写真(転載)

<p>シストの タイプ</p>	 <p>一般的にジアルジアと 認識されるシスト</p>	<p style="text-align: center;">成熟</p>  <p>四ツ目タイプに類似のシスト (mature cyst, binary cyst)</p>  <p>(横アングル)</p>
<p>文献の 図・写真</p>	 <p>参考文献 21</p>	 <p>参考文献 22</p>  <p>参考文献 23</p>  <p>参考文献 21</p>
<p>備考</p>	<ul style="list-style-type: none"> •binary cyst に対して single individual cyst と呼ばれることもある^{21), 22)} •宿主の小腸や盲腸で多く見られる²¹⁾ •シスト内に、分化して吸着円板を備えた 2 体の栄養体を含む²¹⁾ •脱シスト前に栄養体が分化して成熟するのは他の種では見られず、<i>G. microti</i> だけである²⁴⁾ •大腸や糞中に多く見られる²¹⁾ 	

