

多摩川水系の貝類からみたクリプトスポリジウム汚染実態と感染防止対策に関する調査・
実験研究

2005年

笹原 武志

北里大学医学部微生物・寄生虫学 講師

目 次

| | |
|---------------------------|----|
| 要約 | 1 |
| 1. 目的 | 2 |
| 2. 材料および方法 | 2 |
| 2.1 クリプトスポリジウムの継代とオシストの調整 | 2 |
| 2.2 河川水の採水 | 3 |
| 2.3 貝類の採取 | 4 |
| 2.4 河川水の資料調整 | 5 |
| 2.5 貝類の資料調整 | 5 |
| 2.6 オシストの定義 | 5 |
| 2.7 クリプトスポリジウムの遺伝子解析 | 5 |
| 2.8 感染性評価試験 | 6 |
| 2.9 オシストの感染性不活性 | 7 |
| 3. 結果 | 8 |
| 3.1 被験試料の回収率 | 8 |
| 3.2 河川水におけるクリプトスポリジウム汚染調査 | 8 |
| 3.3 貝類におけるクリプトスポリジウム汚染調査 | 8 |
| 3.4 PCR-RFLP法による鑑別 | 9 |
| 3.5 PCRダイレクトシケン法による鑑別 | 9 |
| 3.6 クリプトスポリジウム感染性評価 | 9 |
| 3.7 銅管による感染症不活性 | 10 |
| 4. 考察 | 10 |
| 5. 文献 | 14 |
| Figure legends | 20 |

図表は巻末に収録しています

[研究組織]

笹原武志¹⁾、中村 健¹⁾、佐藤義則¹⁾、青木正人²⁾

¹⁾北里大学医学部微生物・寄生虫学、²⁾北里環境科学センタ

〒2288555 神奈川県相模原市北里 1151

要 約

クリプトスポリジウム汚染が水系ばかりかその水域に棲息する貝類にも及んでいる。我々は 2003 年から 2 年間にわたり多摩川水系下流域の河川水およびその河口付近に棲息する貝類についてクリプトスポリジウム汚染実態調査ならびに検出されるクリプトスポリジウムの遺伝子解析と感染性評価試験を実施した。その結果、(1)1 年を通していずれの調査地点からもクリプトスポリジウムが検出され、そのオーシスト数は 18 個～221 個/100ℓであった。また、ムラサキイガイやイワガキなどの二枚貝にも河川水のクリプトスポリジウム汚染が拡大していることを本邦で初めて明らかにした。(2)河川水および貝類のクリプトスポリジウムは RFLP(restriction fragment length polymorphism)法による解析の結果、*Cryptosporidium muris* と判定された。更に、PCR-ダイレクトシーケンス法によって詳細に解析したところ、各サンプルからは *C. parvum* cattle type、*C. muris* そして *C. andersoni* が共通して同定され、更に、河川水からは *C. parvum* human type も同定された。これらの成績から、首都圏を流れる多摩川の河川水およびその下流域に棲息する貝類を汚染しているクリプトスポリジウムには共通性があり、その種が近年、宮城県や北海道にて報告されている *C. andersoni* を含む *C. parvum* cattle type や *C. muris* であることを初めて明らかにした。(3)今回検出された *C. parvum* cattle type はヒトやマウスに感染するとされているが、河川水および貝類から回収されたクリプトスポリジウムには SCID マウスへの感染性を認めなかったことから、ヒトへの感染性は低いものと考えられた。(3)銅管に充填された *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストは 24 時間後に変性し、その感染性を失活することが確認された。銅製品は水系のクリプトスポリジウム汚染という環境負荷の低減に寄与するものと考えられ、給水用配管などへの応用が期待される。

1. 目的

クリプトスポリジウムはヒトを含む哺乳類の腸管に感染する原虫であり、非血性水様下痢や腹痛を主症状とするクリプトスポリジウム症を起こし、この患者の糞便中にはオーシストが排出される¹⁾。このオーシストは南極を除く世界中の表流水から検出されており²⁾、わが国においても首都圏や牧畜地域を流れる河川水系においてその汚染が確認されている³⁾⁻⁷⁾。多摩川は2000年⁵⁾⁶⁾、そして相模川は1996年⁵⁾⁷⁾に初めてその汚染が明らかにされている。オーシストは浄水処理レベルの塩素消毒では十分な不活化は期待できない為に⁸⁾、その汚染は河川水系を浄水の水源としているわが国をはじめとする国々において深刻な問題である。

クリプトスポリジウム症は2003年に改正された感染症法では五類感染症に類型化され、2004年度の患者届出数は91名である。過去5年間のクリプトスポリジウム症患者届出数と比べるとクリプトスポリジウム症患者数は増加傾向にある⁹⁾。その背景の1つに河川水系におけるクリプトスポリジウム汚染の拡大が推測されている。

環境水中に排出されたクリプトスポリジウムのオーシストは水系に棲息する魚介類の体内にも取込まれる可能性があり、これまでにカキ(*Crassostrea*)やアサリ(*Ruditapes*)そしてイガイ(*Mytilus*)など15種類にも上る海水産二枚貝においてクリプトスポリジウム汚染が明らかにされている¹⁰⁾⁻²²⁾。その為にこれらの貝類は環境水系におけるクリプトスポリジウム汚染の生物指標の一つに数えられるようになってきている。しかし、河川水系に棲息する貝類についてクリプトスポリジウム汚染実態の調査は殆ど行われておらず、これまでに僅かにカワホトトギスガイ(*Dreissena polymorpha*)での汚染調査とシジミ(*Corbicula*)を用いた汚染実験に関する報告のみである¹⁵⁾¹⁶⁾²³⁾²⁴⁾。多摩川水系にも巻貝をはじめシジミやカキなどの二枚貝が棲息することが確認されているが²⁵⁾、これらの貝類についてのクリプトスポリジウム汚染実態調査は行われていない。

我々は2003年6月から2004年5月にかけて多摩川下流域の河川水と一年を通して採集できた二枚貝についてクリプトスポリジウム汚染実態調査を行い、更に、2004年7月から2005年1月にかけて河川水と貝類から検出されるクリプトスポリジウムについて種及び遺伝子型の遺伝子解析そして感染性評価試験を行った。

2. 材料および方法

2.1 クリプトスポリジウムの継代とオーシストの調整

Cryptosporidium parvum HNJ-1株は北里大学バイオセイフティ

安全管理規程に基づき、北里大学医学部附属遺伝子高次機能解析センターの感染実験エリア（P2）にて飼育されている SCID マウス（C.B-17/Icr-scidjcl、10 週齢の雄、日本クレア、東京）に経口感染させ継代維持した。

糞便からのオーシスト精製は 76.29g/dl ショ糖溶液（比重=1.20）を用いたショ糖密度勾配遠心法⁸⁾（25℃で 2000rpm, 10 分間）に従って実施した。オーシストは 200µg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, Missouri, USA)含む滅菌蒸留水に 10⁷ 個/ml の割合に浮遊し、4℃にて保存した。

2.2 河川水の採水

多摩川は山梨県と埼玉県の間境にある笠取山の源流を発し、東京都多摩地区及び東京都と神奈川県の間境を流下して東京湾に注いでいる、全長 138km の一級河川である。本調査の採水地点はこれまでにクリプトスポリジウム汚染があると報告されている多摩川水の下流域の 3 地点とした（Fig. 1）。即ち、A 地点は多摩川原橋より 200m 下流、B 地点は田園調布堰上、C 地点は大師橋より 1 km 下流である。

河川水の調査は 2 回に分けて実施された。即ち、第 1 回目の調査は 2003 年 6 月から 2004 年 5 月にかけて隔月に 3 地点で、そして第 2 回目の調査は 2004 年 7 月から 2005 年 1 月にかけて合計 5 回 B 地点でそれぞれ河川水を採水した。

河川水 200（一部の試験では 1000）をポリプロピレン製タンクに採水し、試験まで 4℃にて保存した。

2.3 貝類の採取

多摩川河口の汽水域および付近の海水に年間を通して棲息する 4 種類の二枚貝、即ち、Fig. 2 に示すイワガキ（*C. nippona*）、ムラサキガイ（*M. galloprovincialis*）、ヤマトシジミ（*C. japonica*）、そしてコオキナガイ（*Laternula boschasina*）を実験材料に供した。

貝類の調査は 2 回に分けて実施された。即ち、第 1 回目の調査は 2003 年 6 月から 2004 年 5 月にかけて月毎に 3 地点でこの 4 種類の貝類を採取した。一方、第 2 回目の調査は 2004 年 5 月から 2005 年 1 月にかけて合計 7 回行い、コオキナガイを除く 3 種類の貝類を採取した。

採取した貝類は翌日調整するまで水槽に入れ、エアレーションを行い室温にて飼育した。

2.4 河川水の試料調製

採取した河川水は目的に応じてセルロース混合エステル(MF)製

(SSWP14250、孔径 3 μ m、Millipore Co., Bedford, Massachusetts, USA)、またはポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製(LSWP14250、孔径 5 μ m、Millipore Co.) の2種類のメンブランフィルター(径 142mm)を適宜使い分けて加圧ろ過した。MF製フィルターは蛍光抗体染色や遺伝子解析に、そしてPTFE製フィルターは感染評価試験にそれぞれ使用するオーシストを回収するために使用した。

加圧ろ過後、MF製フィルターは50mlポリプロピレン製遠心管に入れ、アセトン50mLを加えてボルテックスミキサーで攪拌し完全に溶解した。更に、0.1% Tween 80含有リン酸緩衝生理的食塩水(PBS、Sigma-Aldrich Inc.)を用いて3,000rpm 10分間で3回遠心洗浄した。最終的に沈渣は0.1%Tween含有PBSに浮遊した。一方、PTFE製フィルターは50mlポリプロピレン製遠心管に入れ、1%PEF溶液(誘出液、蒸留水10当たり0.2gピロリン酸ナトリウム・10水塩、0.3gエチレンジアミン四酢酸3ナトリウム、0.1g Tween80を含有)15mlとフットボール型攪拌子を加えてボルテックスミキサーで攪拌した。その懸濁液を新しい遠心管に移した後、新たに誘出液10mlを入れて同様の攪拌操作を2回繰り返した。最終的に回収された懸濁液は3,000rpmで10分間遠心され、その沈渣は0.1%Tween含有PBSに浮遊した。

各浮遊液からクリプトスポリジウムのオーシストはショ糖密度勾配遠心法⁸⁾に従って精製した。

MF製フィルターとPTFE製フィルターを用いたクリプトスポリジウムオーシストの回収率を測定した。即ち、A地点で採取した河川水20lに 2×10^5 個の*C. parvum* HNJ-1株のオーシストを添加し、これを前述の如く各フィルターにて加圧ろ過・濃縮後、ショ糖密度勾配遠心法⁸⁾によりオーシストを分離精製して回収し、その数を蛍光抗体染色後に計数した。オーシストの回収率(%)は、(回収された平均オーシスト数/添加されたオーシスト数) $\times 100$ の式より算出し、3回の反復実験の平均値として示した。

2.5 貝類の試料調製

採取した貝類は貝殻から組織を取出して貝毎に秤量した。1回の調整に使用した貝の数は、イワガキ10個、ムラサキイガイ20個、ヤマトシジミ20個、コオキナガイ2個であった。貝類の組織は蒸留水10mlと一緒にステンレス製ホモジナイズカップに入れ、4,000rpmで5分間ホモジナイズした。貝組織のホモジネートは蒸留水を用いて3,000rpm10分間で3回遠心洗浄した。沈渣は0.1%Tween含有PBSに浮遊した。各浮遊液からクリプトスポリジウムのオーシストはショ糖密度勾配遠心法⁸⁾に従って精製した。

4種類の貝類を用いたクリプトスポリジウムオーシストの回収率

を測定した。即ち、貝組織に 5×10^5 個の *C. parvum* HNJ-1 株のホルマリン死菌オーシストを添加し、これを前述の如く各フィルターにて加圧ろ過・濃縮後、ショ糖密度勾配遠心法⁸⁾によりオーシストを分離精製して回収し、その数を蛍光抗体染色後に計数した。オーシストの回収率(%)は前述の式より算出し、3回の反復実験の平均値として示した。

2.6 オーシストの定量

各被検試料から回収されたオーシストは、FITC 標識マウス抗 *C. parvum* オーシストモノクローナル抗体 (クリプトスポリジウム検出キット、和光純薬工業、大阪) を用いて免疫蛍光染色後、最終的に 50 μ l の PBS に浮遊した。この浮遊液の 1/100 に相当する 0.5 μ l について落射型蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E400、ニコン、東京) を用いて倍率 $\times 400$ 倍で観察し、蛍光染色されたオーシストを計数した。得られた数値を 100 倍し、さらに各被検試料に関する回収率で補正した値をもって実際のオーシスト数とした。その際、河川水は 100 l、貝類は組織重量 (イワガキとムラサキイガイは 100g、ヤマトシジミは 20g、コオキナガイは 2g)、そしてマウス腸管当たりのオーシスト数として示した。

2.7 クリプトスポリジウムの遺伝子解析

クリプトスポリジウムの種及び遺伝子型は Xiao らの PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)法²⁶⁾そして Morgan らの PCR ダイレクトシーケンス法²⁷⁾によって解析した。

C. parvum HNJ-1 株および河川水由来のオーシストはドライアイス・エタノールにて凍結後、98 $^{\circ}$ C 温浴にて融解する操作を 6 回繰り返した。その後、ゲノム DNA は DNA 抽出カラム (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) を用いて精製し、Diethyl Pyrocarbonate (DEPC, Sigma) 処理滅菌水 30 μ l に溶出した。精製した DNA 試料は解析まで -80 $^{\circ}$ C に凍結保存した。

PCR-RFLP 法を行うために、まず、DNA 試料について Table 1 に示すクリプトスポリジウム 18S rRNA 特異的プライマー (RFLPF1&R1, RFLPF2&R2) を用いて Nested PCR を行った。1st PCR の反応液は、Multiplex PCR mixture (Qiagen) 25 μ l に 50 μ M RFLPF1&R1 の各プライマー 0.5 μ l、被検試料 15 μ l、そして DEPC 処理滅菌水 9 μ l を加え全量を 50 μ l とした。PCR の反応は次の条件で行った。即ち、ステップ 1 は HotStar Taq DNA polymerase 活性化を促す為に 95 $^{\circ}$ C 15 分加熱した。ステップ 2 は熱変性 95 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 90 秒、エクステンション 72 $^{\circ}$ C 90 秒という一連の反応を 40 サイクル行った。ステップ 3 は最終エクステンションと

して 72°C 10 分加熱した。サーマルサイクラーは Takara PCR Thermal Cycler (Takara Biomedical, Otsu)を使用した。次いで、1st PCR 産物(1,325bp)は QIAquick PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製した。2nd PCR の反応液は、Multiplex PCR mixture (Qiagen) 12.5 μ l に 50 μ M RFLPF2&R2 の各プライマー 0.25 μ l、精製した 1st PCR 産物 3 μ l、そして DEPC 処理滅菌水 9 μ l を加え全量を 25 μ l とし、前述の反応条件で PCR を行った。2nd PCR 産物 (819~825bp) は DNA 抽出カラムにて精製後、制限酵素、*SspI* 及び *VspI* (Toyobo Co., LTD., Osaka) を用いて 37°C 2 時間消化した。消化した PCR 産物は 2%アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーターで観察した。Xiao らの類型化基準²⁶⁾に基づき、制限酵素断片の泳動パターンよりクリプトスポリジウムの種および遺伝子型を決定した。

PCR ダイレクトシーケンス法を行うために、DNA 試料について Table 1 に示すクリプトスポリジウム 18S rRNA 特異的プライマー (18SiF&R) を用いて PCR を行った。PCR の反応液は、Multiplex PCR mixture (Qiagen) 25 μ l に 50 μ M 18SiF&R の各プライマー 0.5 μ l、DNA 試料 15 μ l、そして DEPC 処理滅菌水 9 μ l を加えて全量を 50 μ l とした。前述の反応条件のアニーリング温度を 60°C に変更して同様に PCR を行った。得られた PCR 産物 (300bp) は DNA 抽出カラムにて精製後、BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster city, California, USA) とサーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応産物はエタノール沈殿により精製後、ABI PRISM 310 genetic analyzer (PE Biosystems, Foster city, California, USA) を用いてダイレクトシーケンスを行った。得られたシーケンスは GenBank 登録データベースとの相同性を検索し、クリプトスポリジウムの種および遺伝子型を決定した。検索に使用した GenBank データは AF108864(*C. parvum* cattle type)、AF108865(*C. parvum* human type)、AF112571(*C. parvum* mouse type)、AF115378(*C. wrairi*)、AF112572(*C. parvum* ferret type)、AF112574(*C. meleagridis*)、AF112569(*C. parvum* rhesus monkey type)、AF112570(*C. parvum* kangaroo type)、AF115377(*C. parvum* pig type)、AF112576(*C. canis*)、AF108862(*C. felis*)、L19068(*C. baileyi*)、AB089285(*C. andersoni*)、X64342(*C. muris*)であった。

2.8 感染性評価試験

河川水及び貝類から回収したオーシストの感染性試験は SCID マウスを用いて行った。即ち、被検オーシスト或いは *C. parvum*

HNJ-1 株のオーシスト 10 個を含む 50 μ l を 1 群 3 匹の SCID マウスに経口投与し、継時的に糞便を採取した。糞便は秤量後、滅菌滅菌水 5 ml に入れてホモジナイズし、前報⁸⁾に従ってショ糖密度勾配遠心法によりオーシストを精製した。回収されたオーシストは免疫蛍光染色して計数した。得られた数値は回収率で補正し、糞便 100mg 当たりの数値で示した。

マウス糞便からのオーシストの回収率は以下のとおりに測定した。即ち、正常 SCID マウスの糞便 1 個を滅菌滅菌水にホモジナイズし、そのホモジネートに 1×10^5 個の *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストを添加後、ショ糖密度勾配遠心法によりオーシストを精製し、回収されたオーシスト数を計数した。オーシストの回収率(%)は前述の式より算出し、3 回の反復実験の平均値として示した。

観察が終了したマウスは炭酸ガスにて斃死させ、回腸末端の 1 cm を切り出し、4%パラホルムアルデヒドによる固定後、パラフィン包埋した。薄切した組織切片はヘマトキシリン・エオジン(H&E)にて組織染色した。

2.9 オーシストの感染性不活化

実験には長さ 500mm で内径 13~15mm の各被検配管（銅管、ステンレス管、硬質塩ビ管、塩ビライニング鋼管、ポリエチレン管、架橋ポリエチレン管、ポリブテン管）および対照（control）となるガラス製試験管を使用した。1 群 3 本の各配管に *C. parvum* HNJ-1 株のオーシスト 6×10^6 個を添加した滅菌水 40 ml を充填し、25°C で水平に振盪（100rpm）した。24 時間後に各配管からオーシストを回収した。銅管については回収した蒸留水中に溶出した Cu^{2+} 濃度を ICP-MS 分析装置にて測定し、mg/l で示した。

回収したオーシスト 1×10^4 個を 1 群 6 匹の Balb/c 系の乳飲みマウス（7 日齢、日本クレア）に経口感染させ、7 日後に摘出した腸管をガラス製ホモジナイザーに入れてホモジナイズし、ショ糖密度勾配遠心法によりオーシストを精製した。回収されたオーシストは免疫蛍光染色して計数した。得られた数値は回収率で補正し、腸管当たりの平均オーシスト数として示した。

マウス腸管からのオーシストの回収率は以下のとおりに測定した。即ち、3 匹の正常乳飲みマウス（14 日齢、日本クレア）の腸管を同様にホモジナイズし、それぞれのホモジネートに 1×10^5 個の *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストを添加後、ショ糖密度勾配遠心法によりオーシストを精製し、回収されたオーシスト数を計数した。オーシストの回収率(%)は前述の式より算出し、3 回の反復実験の平均値として示した。

回収されたオーシストの一部はノマルスキー微分干渉装置付き顕微鏡（BX60、オリンパス、東京）を用いて $\times 1,000$ 倍で形態学的観

察を行い、オーシストの壁に傷害を受けたり、スポロゾイトの脱囊によって空洞化をおこしたものを変性オーシストとした。オーシスト 100 個当たりの変性オーシストの数を計数して変性率 (%) を算出した。

3. 結果

3.1 被検試料の回収率

被検試料をショ糖密度勾配遠心法によってオーシストを精製した場合のオーシストの回収率を測定した。河川水をセルローズ膜溶解法及び PTFE フィルター法で濃縮した場合の回収率は、それぞれ 27.2%、そして 30.1%であった。次いで、貝類からの回収率はヤマトシジミで 1.69%、コオキナガイで 2%、イワガキで 2.12%、そしてムラサキイガイで 1.86%であった。マウス腸管からの回収率は 39.4%であった。

3.2 河川水におけるクリプトスポリジウム汚染調査

多摩川本流の多摩川原橋から大師河口付近までの 3 地点において、2003 年 6 月から 2004 年 5 月にかけて隔月にクリプトスポリジウム汚染を調査した。その結果は Fig. 3 に示す如くであり、いずれの月においても全ての調査地点においてクリプトスポリジウムは検出された。年間を通して各地点で検出されたオーシストの数の平均値は A 地点で 82.8 ± 68.6 個/100ℓ、B 地点で 119.6 ± 66.6 個/100ℓ、そして C 地点で 67.5 ± 30 個/100ℓであり、B 地点（田園調布堰上）で最も多くのクリプトスポリジウム汚染が認められた。2004 年 12 月に A 及び B 地点で検出されたオーシストの数は最高値（221 個/100ℓ）であった。

3.3 貝類におけるクリプトスポリジウム汚染調査

多摩川河口付近には一年を通して棲息する 4 種類の二枚貝について 2003 年 6 月から 2004 年 5 月にかけて毎月クリプトスポリジウム汚染を調査した。その結果は Fig. 4 に示す如くであり、月当たりにオーシストが検出される頻度は岩礁に棲息するイワガキやムラサキイガイで高く、砂底に棲息するヤマトシジミやコオキナガイで低い傾向であった。ムラサキイガイからはいずれの月においてもオーシストが検出され、特に、7 月から 10 月にかけてオーシストの数は 400 個/100g 以上の高値を示した。各貝から検出されたオーシストの平均数はヤマトシジミで 35 個/20g、コオキナガイで 34 個/2g、イワガキで 116 個/100g、そしてムラサキイガイで 425 個/100g であっ

た。

3.4 PCR-RFLP 法による鑑別

2004年6月に採取されたイワガキとムラサキイガイそして河川水（B地点）について Nested PCR を行った。いずれのサンプルからも約 830bp のクリプトスポリジウム PCR 産物が得られた。これらの PCR 産物について制限酵素（*Vsp1* 及び *Ssp1*）消化を行い、制限酵素断片（RFLP）の電気泳動パターンを検討し、*Vsp1* 消化の結果を Fig. 5A に、*Ssp1* 消化の結果を Fig. 5B に示した。いずれのサンプルにおいても *Vsp1* 処理では 731bp そして 102bp、そして *Ssp1* 処理では 448bp そして 385bp の PCR 断片が確認され、このパターンは Xiao らの類型化基準²⁶⁾から *C. muris* と判定された。一方、対照の *C. parvum* HNJ-1 株について *Vsp1* 処理では 625bp そして 104bp、そして *Ssp1* 処理では 448bp、254bp、そして 109bp の PCR 断片が確認され、このパターンは前述の類型化基準から *C. parvum* cattle type と判定された。

2004年5月から2005年1月にかけて採取した貝類及び河川水（B地点）について Nested PCR を行った結果、いずれのサンプルにおいてもクリプトスポリジウムの PCR 産物が認められた。得られたクリプトスポリジウムの PCR-RFLP パターン解析の結果を要約し、Table 2 に示した。2種類の貝類および河川水いずれのサンプルからも全て *C. muris* と判定された。

3.5 PCR-ダイレクトシーケンス法による鑑別

2004年11月から12月にかけて採取したムラサキイガイ及び河川水（B地点）のサンプルからはクリプトスポリジウムの PCR 産物が全て認められた。しかし、ダイレクトシーケンスが成功率は貝類で 40~50% そして河川水で 60% と低かった（Table 3）。次いで、シーケンスの相同性を検索した結果、貝類と河川水では *C. parvum* cattle type と *C. muris* そして *C. andersoni* が共通して検出された。河川水ではその他に *C. parvum* human type がさらに検出された。（Table 3）。なお、対照とした *C. parvum* HNJ-1 株は既報²⁸⁾のとおり *C. parvum* cattle type と判定された。

3.6 クリプトスポリジウムの感染性評価

2003年10月に採取したムラサキイガイ及び2004年5月から11月にかけて採取した河川水（B地点）から回収したオーシストの約10個を SCID マウスに経口接種し、経時的に糞便中に排泄されるオーシストの数を測定した。その結果は Fig. 6 に示す如くであり、ムラサキイガイ及び河川水から回収したオーシストを接種した群では

いずれにおいても6週間経ても全くオーシストを検出できなかった。一方、*C. parvum* HNJ-1株のオーシストを接種した対照群では接種3週目に300個/糞便100mg、6週目に12000個/糞便100mgのオーシストが検出された。

接種6週後、対照群の回腸組織を観察したところ、これまで所見²⁹⁾と同様に、クリプトスポリジウムの増殖に伴う小腸絨毛の萎縮の他に杯細胞や栄養吸収細胞数の著明な減少、そして陰窩底にあるパネート細胞の消失などの所見が認められた。一方、ムラサキイガイ及び河川水から回収したオーシストを接種した群ではそのような回腸組織の変化は全く認められなかった。

3.7 銅管による感染性不活化

各被検配管及びガラス製試験管に24時間充填した*C. parvum* HNJ-1株のオーシストの乳飲みマウスに対する感染性を検討した。その結果、銅管とステンレス管を比較した場合、Fig. 7Aに示す如く、銅管における腸管内オーシスト数は対照群のそれに比べて有意に減少し、その減少数は-1.31 logであった。なお、この実験で溶出したCu²⁺濃度は充填6時間目で1.7 mg/l、そして24時間目で2.3mg/lであった。一方、ステンレス管ではその様な減少は認められなかった。次いで、硬質塩ビ管、塩ビライニング鋼管、ポリエチレン管、架橋ポリエチレン管及びポリブテン管について同様に検討を行った結果、各材質の配管について腸管内のオーシスト数は対照群のそれと同程度であった (Fig. 7B)。

各材質の配管から回収されたオーシストの変性率は銅管で25%に達したのに対し、その他の配管では0.5~1.6%と僅かであった。

4. 考察

多摩川水系におけるクリプトスポリジウム汚染が初めて確認されたのは2000年であり、その汚染レベルは多摩川原橋から下流域にかけて高濃度であったことが示されている⁵⁾⁶⁾。今回、我々はこの汚染レベルが高いとされる多摩川原橋から下流の3箇所の調査地点を2003年6月~2004年4月にかけて調査し、いずれの調査地点においてもクリプトスポリジウムを検出したことから、この下流域のクリプトスポリジウム汚染が2000年以降持続的に存在している実態を明らかにした。しかし、検出されたオーシストの数を1000当たり換算して比較した場合、先の調査結果⁵⁾⁶⁾の20~1100個により少ない35~220.8個であったことをから、この下流域のクリプトスポリジウムの汚染レベルは僅かではあるが低下傾向にあると考えられた。

また、先の 2001 年 1 月の調査結果においてこの下流域のクリプトスポリジウム汚染濃度がこれまでの報告で最高の値（630~1100 個/100ℓ）を示し⁵⁾⁶⁾、今回の 2003 年 12 月の調査においても同様に二カ所の調査地点で最高値（220 個/100ℓ）となるオーシストを検出したことから、この下流域では 12 月から 1 月の冬季にかけてクリプトスポリジウムのオーシスト濃度が増加する傾向にあることがうかがわれた。

河川水系から検出される病原微生物はその下流の汽水や海水域に棲息する魚介類等の生物に取込まれることがある。特に、貝類はこれまでにクリプトスポリジウムを含む *Cyclospora cayetanensis* や *Giardia duodenalis* などの原虫^{20)・22)}、*Vibrio vulnificus* や *V. cholerae* O1 などの細菌^{30) 31)}、そして Hepatitis A virus や Astrovirus などのウイルス³²⁾など多くの腸管病原微生物を取込むことが明らかにされている。今回、多摩川の河川水と併せてその水系に棲息する貝類についてもクリプトスポリジウム汚染調査を同時に行い、河川水でのクリプトスポリジウム汚染がその下流域に棲息するムラサキイガイを中心とする二枚貝にも及んでいることをわが国で初めて確認することができた。河川水のクリプトスポリジウム汚染状況は 4 種類の二枚貝の中でもムラサキイガイのそれと最も良く一致していたことから、今後、河川水系のクリプトスポリジウム汚染調査にその下流域に棲息するムラサキイガイを生物学的指標として加えることは有用であると考えられる。

クリプトスポリジウムの汚染はイガイ^{10)・17)21)22)}、アサリ¹²⁾¹⁴⁾¹⁸⁾²²⁾、カキ^{12)・14)18)19)22)}、ザルガイ¹¹⁾¹⁴⁾などの海水産二枚貝において数多く報告され、その中でもイガイが最も報告例が多い。今回の調査によってもクリプトスポリジウムのオーシストはムラサキイガイ、次いでイワガキから高頻度に検出された。しかし、ヤマトシジミやコオキナガイからの検出は低頻度であった。これらの二枚貝は棲息様式により岩礁に付着するムラサキイガイやイワガキと砂底にもぐるヤマトシジミやコオキナガイに大別できることから、二枚貝によるオーシストの取込み効率には貝類の棲息様式がかなり影響を及ぼしていると考えられる。

二枚貝以外に夏場だけ河口の岩場で採取することができる巻貝のクボガイ (*Chlorostoma lischkei*) とレイシダマシモドキ (*Muricodrupa fusca*) についてもクリプトスポリジウムの汚染調査を 2004 年 6 月から 8 月にかけて行ったところ、オーシストは全く検出されなかった（成績示さず）。このことから、巻貝によるオーシストの体内への取込み効率は二枚貝のそれに比べるとはるか低いものと考えられた。実際に、レイシダマシモドキを使ってオーシストの 3 時後の取込みを *in vitro* で測定したところ、その取込み率は

0.16%であり、これまでに報告³³⁾されているヤマトシジミでの取込み率(90%)に比べ極めて低いものであり、現在、この推定は正しいであろうと考えている。

わが国の河川汚染クリプトスポリジウムの遺伝子解析は主にPCR-RFLP法で行われ、その殆どが*C. parvum* cattle typeであるとされている³⁾⁴⁾³⁴⁾。しかし、今回の調査において河川水と貝類(ムラサキガイとイワガキ)をPCR-RFLP法で検査したところ、予想に反し、いずれの検体からも*C. muris*と判定されるクリプトスポリジウムが検出され、河川水とその下流域に棲息する貝類には共通して*C. muris*が存在することが明らかとなった。しかし、PCR-ダイレクトシーケンス法によってさらに詳細に解析したところ、いずれのサンプルからも*C. parvum* cattle typeと*C. muris*そして*C. andersoni*が共通して検出され、更に、河川水からはその他に*C. parvum* human typeも検出された。これらの成績から、河川の下流域に棲息する二枚貝にも河川水と同じクリプトスポリジウムのオーシストが取込まれていることを初めて明らかにすることができたと考えられる。そしてこれらのサンプルには複数種のクリプトスポリジウムが混在している可能性があり、そのような河川水や貝類についてPCR-RFLP法により正確にクリプトスポリジウムの種や遺伝子型を同定することはできないと考えられた。

河川水系のクリプトスポリジウム汚染の原因として野生動物の糞便や家畜として飼育されているウシやブタなどの糞便、そしてヒト由来の下水や処理水の流入が指摘されている³⁾⁷⁾。今回、多摩川の河川水およびその下流域に棲息する貝類において*C. muris*、*C. parvum* cattle typeそしてヨーロッパにおいてウシへの感染は多く報告されている*C. andersoni*³⁵⁾⁴⁰⁾が共通して同定されたことから、多摩川水系においてウシの糞便の流入が示唆された。また、*C. muris*や*C. andersoni*は成牛に、そして*C. parvum* cattle typeは生後10週前後の仔牛にそれぞれ感染することから⁴¹⁾、この河川水系のクリプトスポリジウム汚染には仔牛や成牛の糞便が深く関わっていることが推定された。更に、今回、河川水においてのみ同定された*C. parvum* human typeは相模川でも多く検出されるという報告³⁴⁾を加味すると、橋本⁷⁾や保坂⁶⁾らが指摘しているように、これらの河川においてはヒト由来の下水や処理水の流入も重要な汚染源になっていると考えられた。

*C. andersoni*は実験用ラットへの感染性および遺伝子解析に基づき、ネズミやウシの皺胃に感染する*C. muris*から新しいクリプトスポリジウムの種として最近独立したものである⁴²⁾⁴⁴⁾。*C. andersoni*のウシへの感染はヨーロッパに多く報告されている³⁶⁾⁴⁰⁾⁴³⁾。わが国においては2003年以降、宮城県や北海道の牧場で飼育されている

ウシから *C. andersoni* が検出されている⁴²⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾。今回の調査成績は *C. andersoni* 汚染が関東首都圏を流れる河川水系にも広がっている可能性を示唆するものと考えられる。

今回、河川水およびムラサキイガイから回収されたクリプトスポリジウムにはマウスに感染性を有する *C. parvum cattle type* や *C. muris* が含まれていたにも拘わらず、SCID マウスに対して感染性は認められなかった。その理由としてはオーシストの接種量の少なさの他に、河川水中のオーシストが排泄されてからかなりの時間が経過したことにより変性していた可能性が挙げられる。今回、新鮮なクリプトスポリジウムでのシーケンスの成功率は 100%であったのに対し、河川水およびムラサキイガイでのそれはそれぞれ 60%そして 40~50%と低かったことから、今回の感染性が認められなかった原因としてはオーシストの変性が推測された。

クリプトスポリジウム汚染は河川から海水へと拡散し、周辺海域に棲息するアザラシやジュゴンなどの哺乳類にもクリプトスポリジウムの感染が拡大しているという報告がある²⁰⁾。今回、多摩川の河川水にはヒトに感染性を有する *C. parvum human type* や *C. parvum cattle type* が存在するが明らかにされたことから、河川汚染クリプトスポリジウムのヒトへの感染性評価が今後さらに必要となると考えられる。現在、我々はヒトへの感染性を評価する為のヒト由来小腸細胞株を用いたリアルタイム PCR 法に基づく *in vitro* 感染実験系の開発を進めている。

クリプトスポリジウムのオーシストは浄水処理レベルの塩素消毒では十分な不活化は期待できない。その為に、その汚染は河川水系を浄水の水源としているわが国をはじめとする国々において深刻な問題である。今回、給水・給湯用配管の材質を銅にすることによってクリプトスポリジウム感染性を低下させることを確認したことから、給水・給湯用配管に銅管を普及させることによりクリプトスポリジウムの感染防止対策の一助になることが期待される。

5. 文献

- 1)Chen, X.M., Keithly, J.S., Paya, C.V., LaRusso, N.F.: Cryptosporidiosis. N. Engl. J. Med., 2002;346:1723-1731.
- 2)White, A.C.Jr (2005): Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, and other species). In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., ed. Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition. Elsevier Inc, Pennsylvania, USA, pp.3215-3228.
- 3)Ono, K., Tsuji, H., Rai, S.H., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T, Uga, S: Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan. Appl. Environ. Microbiol., 2001;67:3832-3836.
- 4)Tsushima, Y., Karanis, P., Kamada, T., Xuan, X., Makala, L.H.C., Tohya, Y., Akashi, H., Nagasawa, H: Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci., 2003;65:585-589.
- 5)保坂三継 (2003) : 原虫類によるわが国水環境の汚染状況、水環境学会誌、26(1)、pp.2~7.
- 6)保坂三継、落合由嗣、矢野一好、眞木俊夫 (2002) : 多摩川におけるクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの汚染実態調査、用水と排水、44(4)、pp.295~303.
- 7)橋本 温、河井健作、西崎 綾、松本かおり、平田 強 (1999) : 相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染とその汚染指標の検討、水環境学会誌、22(4)、pp.282~287.
- 8)笹原武志、青木正人、関口朋子、高橋 晃、佐藤義則、北里英郎、井上松久 (2003) : 複合酸化剤溶液の *Cryptosporidium parvum* オーシスト感染性に対する不活化効果、感染症学雑誌、77(2)、pp.75~82.
- 9)感染症研究所 感染症情報センター (2005) : サーベイランス、<http://idsc.nih.gov/idwr/ydata/report-Ja.html>
- 10)Graczyk, T.K., Fayer, R., Lewis, E.J., Trout, J.M., Farley, C.A:

Cryptosporidium oocysts in bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res., 1999;85:518-521.

11) Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., Costas, E.: Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Appl. Environ. Microbiol., 2000;66:1866-1870.

12) Freire-Santos, F., Oteiza-Lopez, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A., Ares-Mazas, E., Alvarez-Suarez, E., Garcia-Martin, O.: Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. J. Parasitol., 2000;86:853-854.

13) Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Xiao, L., Lai, A., Jenkins, M.C., Graczyk, T.K.: Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res., 2002;88:998-1003.

14) Gomez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martinez-Urtaza, J., Garcia-Martin, O., Ares-Mazas, M.E.: Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. Int. J. Food Microbiol., 2003;87:97-105.

15) Graczyk, T.K., Marcogliese, D.J., De Lafontaine, Y., Da Silva, A.J., Mhangami-Ruwende, B., Pieniazek, N.J.: *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. Parasitol. Res., 2001;87:231-234.

16) Graczyk, T.K., Conn, D.B., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.N.S., DaSilva, A.J.: Human waterborne parasite in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. Parasitol. Res., 2004;93: 385-391.

17) Lowery, C.J., Nugent, P., Moore, J.E., Millar, B.C., Xiru, X., Dooley, J.S.: PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern

Ireland. *Epidemiol. Infect.*, 2001;127: 545-553.

18)Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Santin, M., Zhou, L., Lal, A.A., Xiao, L: Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.*, 2003;89: 141-145.

19)Fayer, R., Lewis, E.J., Trout, J.M., Graczyk, T.K., Jenkins, M.C., Higgins, J., Xiao, L., Lal, A.A: *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerging Infect. Dis.*, 1999;5: 706-710.

20)Fayer, R., Dubey, J.P., Lindsay, D.S: Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trend Parasitol.*, 2004;20: 531-536.

21)Chalmers, R.M., Sturdee, A.P., Mellors, P., Nicholson, V., Lawlor, F., Kenny, F., Timpson, P: *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997;25:380-384.

22)Gomez-Couse, H., Freire-Santos, F., Amar, C.F.L., Grant, K.A., Williamson, K., Ares-Mazas, M.E., McLauchlin, J: Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004;91:279-288.

23)Graczyk, T.K., Fayer, R., Cranfield, M.R., Conn, D.B: Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998;64:427-430.

24)Graczyk, T.K., Conn, D.B., Marcogliese, D.J., Graczyk, H., Lafontaine, Y. de: Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol. Res.*, 2003;89:107-112.

25)東京都環境局環境評価部（広域監視課）：平成12年度水生生物調査結果報告書 2002;p.276-307.

- 26)Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl. Environ. Microbiol., 1999;65:3386-3391.
- 27)Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A., Thompson, R.C.A: Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. J. Parasitol., 1997;83:825-830.
- 28)Abe, N., Kimata, I., Iseki, M: Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and a dog in Japan. J. Vet. Med. Sci., 2002;64:165-168.
- 29)Sasahara, T., Maruyama, H., Aoki, M., Kikuno, R., Sekiguchi, T., Satoh, Y., Kitasato, H., Takayama, Y., Inoue, M: Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. J. Infect. Chemother., 2003;9:278-281.
- 30)Campbell, M.S., Wright, A.C: Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. Appl. Environ. Microbiol., 2003;69:7137-7144.
- 31)Murphree, R.L., Tamplin, M.L: Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Appl. Environ. Microbiol., 1995;61:3656-3660.
- 32)Romalde, J.L., Ribao, C., Luz Vilarino, M., Barja, J.L: Comparison of different primer sets for the RT-PCR detection of hepatitis A virus and astrovirus in mussel tissues. Water Sci. Technol., 2004;50:131-136.
- 33)Izumi, T., Itoh, Y., Yagita, K., Endo, T., Ohyama, T: Brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator for *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004;72:29-37.
- 34)橋本 温、杉本ひとみ、森田重光、平田 強 (2004): Nested PCR-ダイレクトシーケンス法による相模川の *Cryptosporidium* の遺伝子型判別、第 55 回全国水道研究発表会、pp.584~585.

- 35)Olson, M.E., O'Handeley, R.M., Ralston B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A: Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trend. Parasitol.*, 2004;20:185-191.
- 36)Sreter, T., Egyed, Z., Szell Z., Kovacs, G., Nikolausz, M., Marialigeti, K., Varga, I: Morphologic, host specificity, and genetic characterization of a European *Cryptosporidium andersoni* isolate. *J. Parasitol.*, 2000;86:1244-1249.
- 37)Enemark, H.L., Ahrens, P., Lowery, C.J., Thamsborg, S.M., Enemark, J.M., Bille-Hansen, V., Lind, P: *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. *Vet. Parasitol.*, 2002;107:37-49.
- 38)Hajdusek, O., Ditrich, O., Slapeta, J: Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 2004;122:183-192.
- 39)Daniel, R.G., Staak, D., Robinson, G., Thomas, A.L., Hadfield, S.J., Elwin, K., Chalmers, R.M: Detection of *Cryptosporidium andersoni* in a dairy cow with diarrhoea in the UK. *Vet. Rec.*, 2005;156:423.
- 40)Moriarty, E.M., McEvoy, J.M., Lowery, C.J., Thompson, H.P., Finn, M., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A., Duffy, G: Prevalence and characterisation of *Cryptosporidium* species in cattle faeces and on beef carcasses at slaughter. *Vet. Rec.*, 2005;156:165-168.
- 41)Olson, M.E., Ralston, B.J., O'Handley R., Guselle, N.J., Appelbee, A.J (2003): What is the clinical and zoonotic significance of Cryptosporidiosis in domestic animal and wildlife. In: Thompson, R.C.A., Armson, A., Ryan, U.M., ed. *Cryptosporidium* from molecules to disease. Elsevier Inc, Pennsylvania, USA, pp.51-68.
- 42)Matsubayashi, M., Kimata, I., Abe, N., Tani, H., Sasa, K: The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. *Parasitol. Res.*, 2004;93:504-506.

43)Olson, M.E., O'Handeley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C.A: Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattele. Trend Parasitol., 2004;20:185-191.

44)Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin. Microbiol. Rev., 2004;17:72-97.

45)Satoh, M., Hikosaka, K., Sasaki, T., Suyama, Y., Yanai, T., Ohta, M., Nakai, Y: Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. Appl. Environ. Microbiol., 2003;69:691-692.

46)Koyama, Y., Satoh, M., Maekawa, K., Hikosaka, K., Nakai, Y: Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. Vet. Parasitol., 2005;130:323-326.

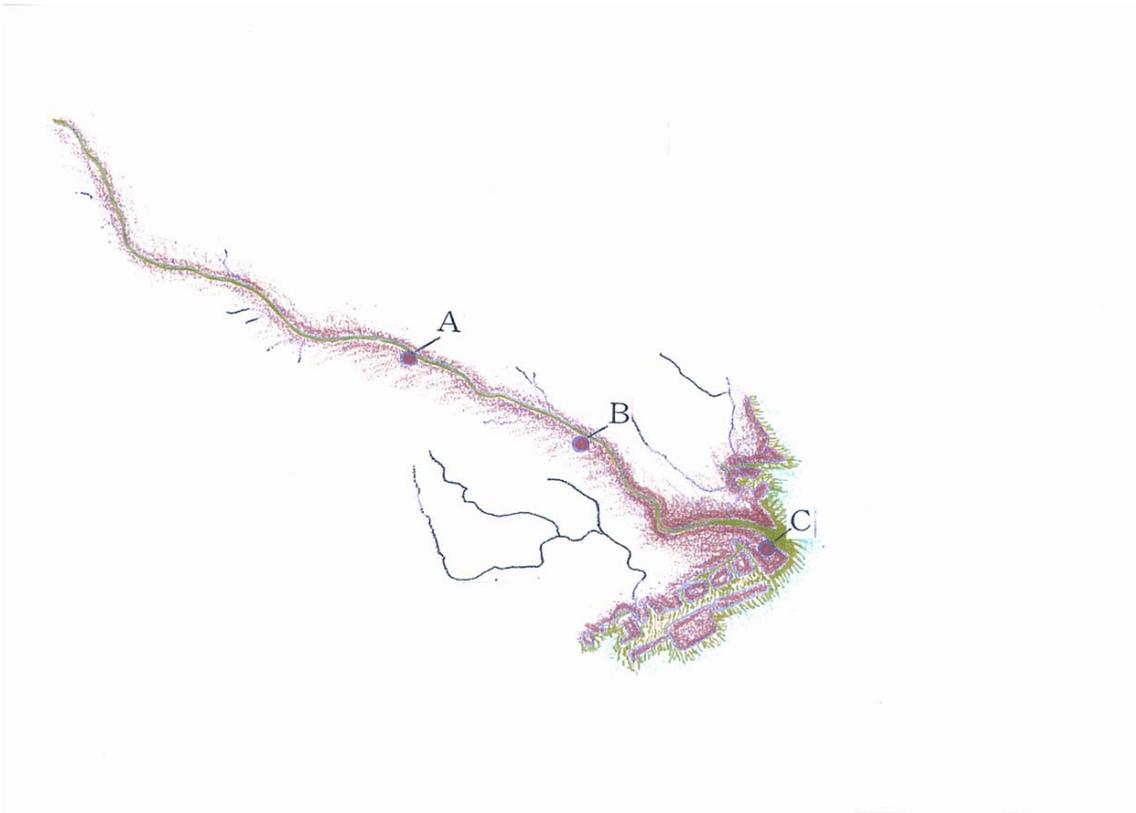
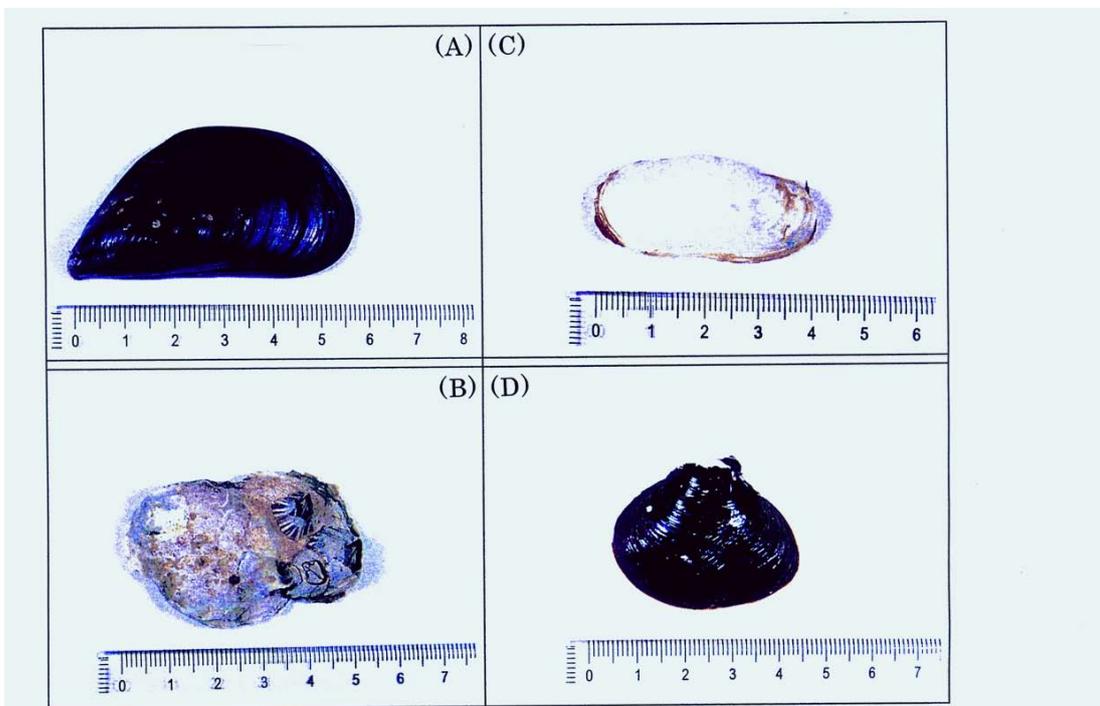


Fig. 1
 多摩川の調査地点を示す。A 地点は多摩川原橋より 200m 下流、
 B 地点は田園調布堰上、C 地点は大師橋より 1 km 下流



調査対象とした 4 種類の二枚貝を示す。(A)ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*)、(B)イワガキ(*Crassostrea nippona*)、
 (C)コオキナガイ (*Laternula boschasina*)、(D)ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*)

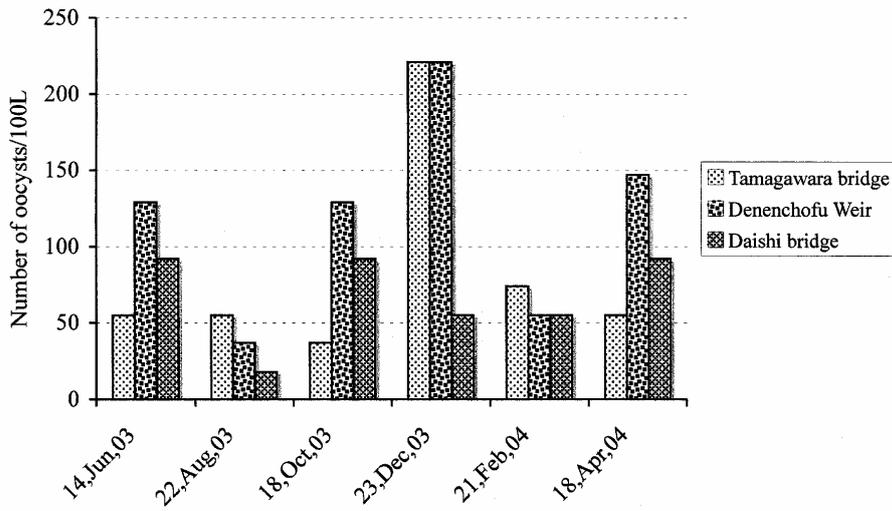


Fig. 3

多摩川本流の下流域の A 地点、B 地点そして C 地点において 2003 年 6 月から 2004 年 5 月にかけて隔月に河川水を採取し、オーシストの数を計数した。オーシスト数は河川水 100 ℓ 当たりで示す。

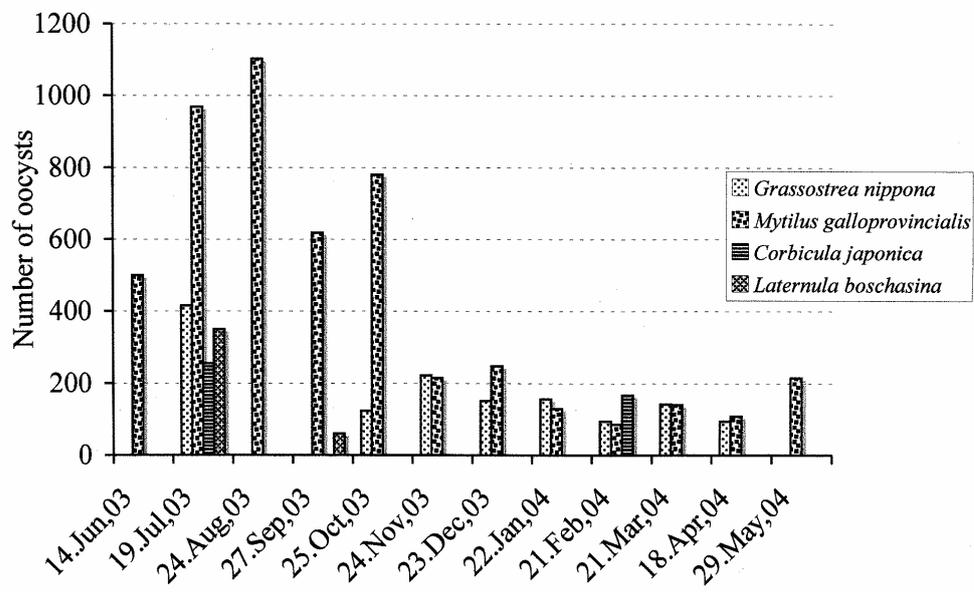


Fig. 4

多摩川河口において年 6 月から 2004 年 5 月にかけて毎月貝類を採取し、オーシストの数を計数した。各貝から検出されたオーシストの数はムラサキガイとイワガキでは 100g、コオキナガイでは 2g、そしてヤマトシジミでは 20g 当たりで示す。

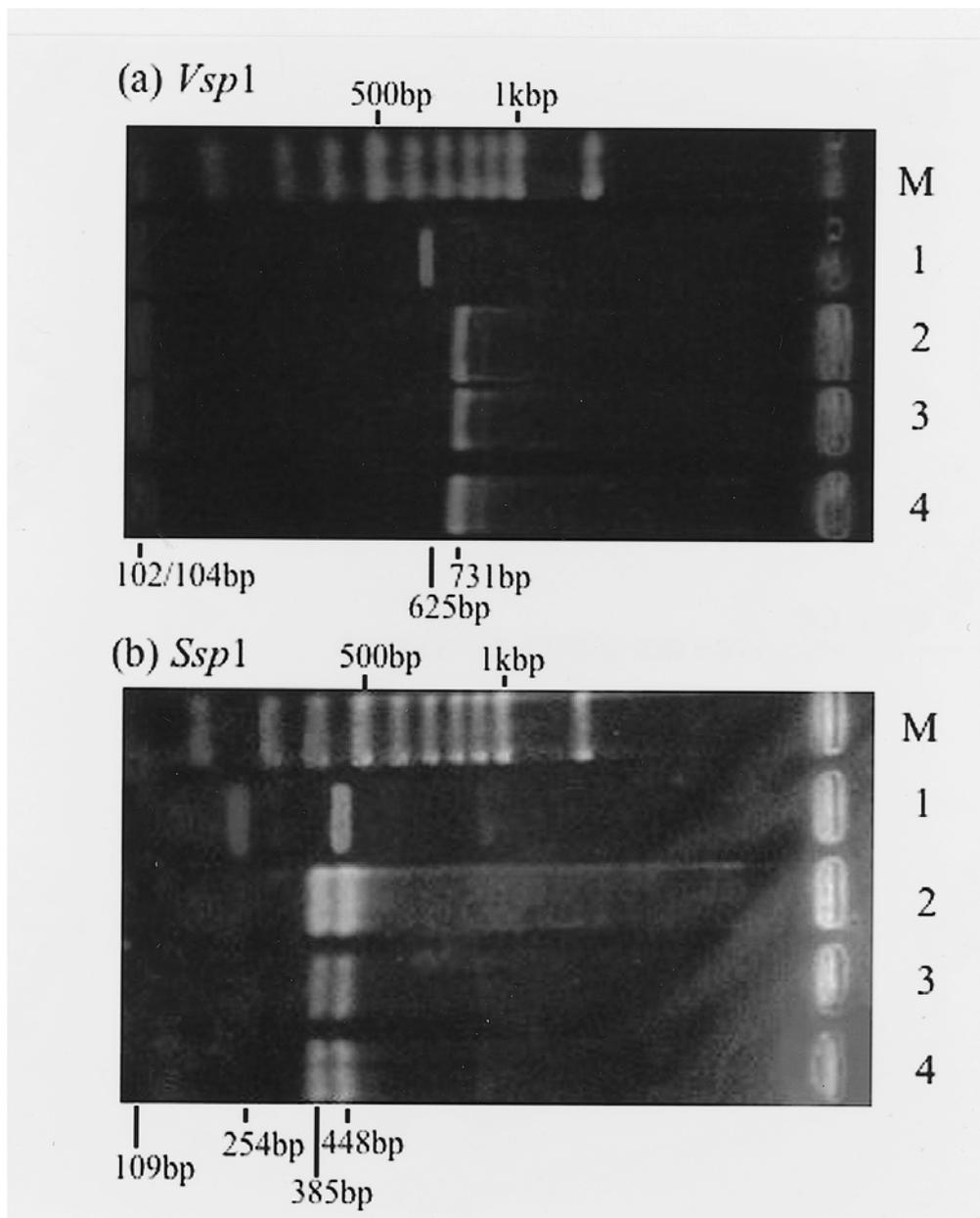


Fig. 5

河川水および貝類から回収されたオーシストの Nested-PCR 産物は制限酵素、*SspI*(a)および *VspI*(b)で消化後、アガロースゲル電気泳動を行った。

M：分子量マーカー(1 kbp ladder)、1： *C. parvum* HNJ-1 株、2：河川水、3：ムラサキイガイ、4：イワガキ

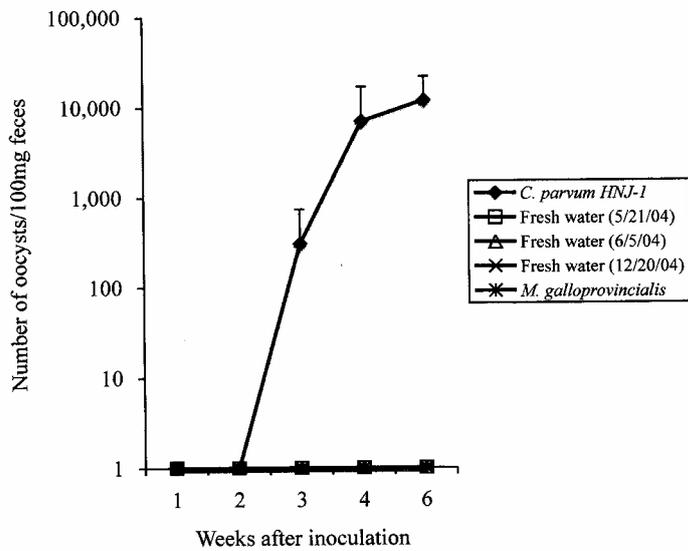


Fig. 6

河川水およびムラサキイガイから回収されたオーシストの 10 個を SCID マウスに経口接種し、経時的に糞便中に排泄されるオーシストの数を計数した。陽性対照として *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストを投与した。オーシスト数は糞便 100mg 当たりで示す。

Table 1 遺伝子解析に使用したプライマーの塩基配列

| 名称 | 塩基配列 |
|------------|----------------------------------|
| 1. RFLP-F1 | 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' |
| RFLP-R1 | 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3' |
| 2. RFLP-F2 | 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' |
| RFLP-R2 | 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' |
| 3. 18SiF | 5'-AGTGACAAGAAATAACAATACAGG-3' |
| 18SiR | 5'-CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC-3' |

Table 3 各検体間の PCR およびダイレクトシーケンスの比較

| 検体 | PCR 陽性数 | シーケンス成功数 | 相同性を示した種および遺伝子型 |
|------------------------|-----------|-----------|---|
| 多摩川 | 5/5(100%) | 3/5(60%) | <i>C. parvum</i> human type <i>C. parvum</i> cattle type <i>C. muris</i> <i>C. andersoni</i> |
| ムラサキイガイ | 5/5(100%) | 2/5(40%) | <i>C. parvum</i> cattle type <i>C. muris</i> <i>C. andersoni</i> |
| イワガキ | 4/4(100%) | 2/4(50%) | <i>C. parvum</i> cattle type <i>C. muris</i> <i>C. andersoni</i> |
| <i>C. parvum</i> HNJ-1 | 2/2(100%) | 2/2(100%) | <i>C. parvum</i> cattle type |

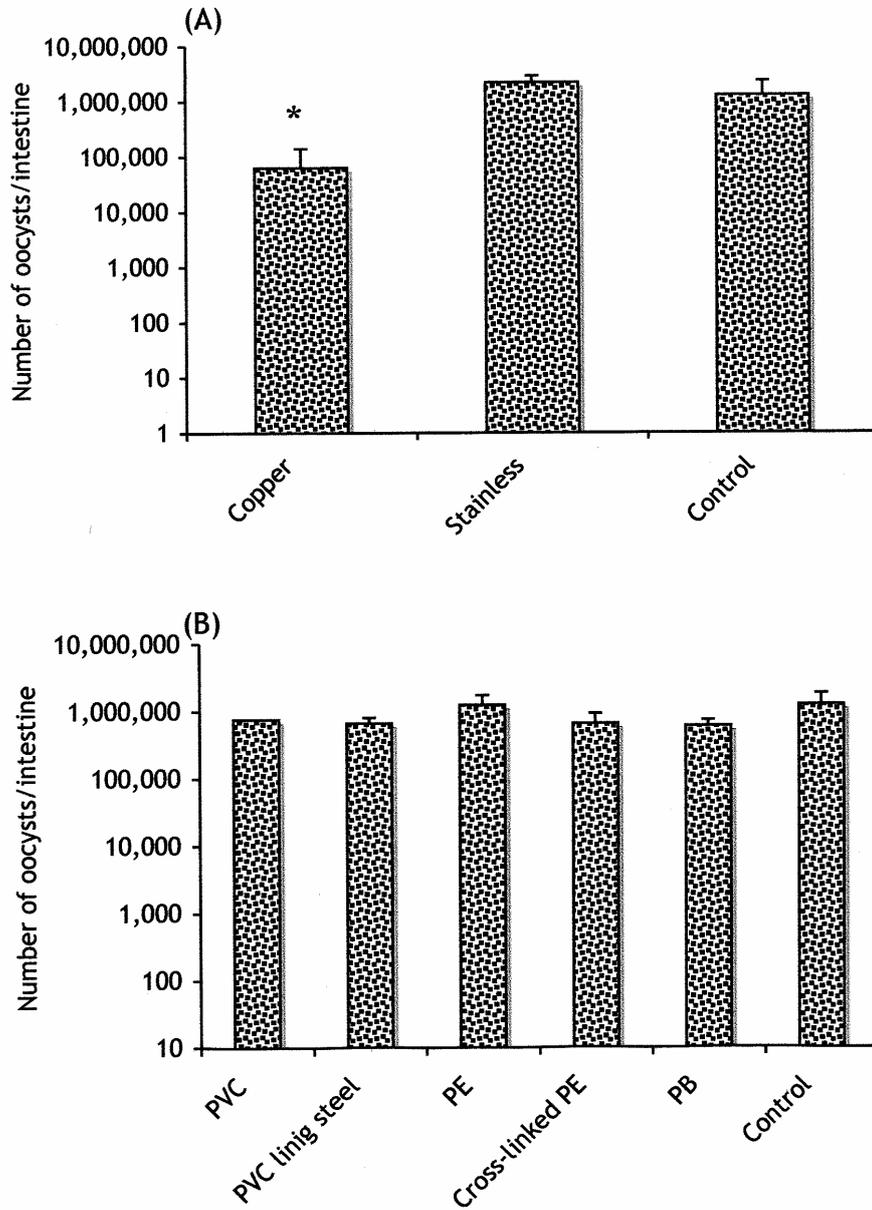


Fig. 7

材質の異なる配管に24時間充填した *C. parvum* HNJ-1株のオーシストを回収し、その 10^4 個を乳飲みマウスに経口接種した。陽性対照(control)としてガラス製試験管に充填したオーシストを投与した。7日後に腸管当たりのオーシスト数を計数した。実験群は銅管(Copper)、ステンレス管(Stainless)、硬質塩ビ管(PVC)、塩ビライニング鋼管(PVC-lining steel)、ポリエチレン管(PE)、架橋ポリエチレン管(Cross-linked PE)及びポリブテン管(PB)である。

* : control 群に比べ $P < 0.01$ で有意

「^{た ま がわすいけい}多摩川水系の^{かいるい}貝類からみた^{おせんじったい}クリプトスポリジウム^{かんせんぼうしたいさく}汚染実態と感染防止対策に

かん ちょう さ じっけんけんきゅう
関する調査・実験研究」

(研究助成・学術研究 VOL. 34-N0. 252)

著 者 ^{ささはら たけし} 笹原 武志

発行日 2006年3月31日

発行者 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141