

氏名	いずみ やま しん じ 泉 山 信 司
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	論工博第3585号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	水道水に出現する病原性原虫の検出法の開発研究

論文調査委員 (主査) 教授 寺島 泰 教授 住友 恒 教授 森澤 眞輔

論文内容の要旨

本論文は、*Cryptosporidium*、*Giardia*等の原虫類による水道水汚染の防除を目的とし、汚染実態の把握、原虫類検査法の改良、ならびに塩素消毒による防除の効果について検討したもので、5章から構成されている。

第1章は序論であり、海外やわが国で生じた *Cryptosporidium* 等の原虫類による水道水の汚染と感染の事例に基づき、対策の重要性及び本研究の目的を述べている。

第2章では、比較的大規模な畜産施設のある神奈川県内の2つの流域を対象に汚染調査を、また家畜と愛玩動物について感染実態調査を行うとともに、汚染・感染の分子疫学的調査方法について検討している。その結果、当該流域における *Cryptosporidium* および *Giardia* による恒常的な汚染の実態、畜産や住宅など流域の土地利用によって異なる実態などが示されている。一方、(オー)シストの排出源である家畜(ウシ、ブタ)の感染実態について、なかでも調査したウシの20%に感染が認められ、特に1ヶ月未満の子ウシにおいては53.8%の高率の感染が明らかにされている。また、愛玩動物でもイヌの0.8%、ネコの5.4%に感染が認められ、感染源の広範化と対策の重要性が指摘されている。

さらに、上記調査およびわが国で発生した *Cryptosporidium* 症患者から得られた分離株の遺伝子解析を行ない(PCR-RFLP法)、ウシ由来株では Genotype 2 を、またヒト分離株では Genotype 2 とヒトに特有と考えられている Genotype 1、ならびに新たな Genotype 3 の3遺伝型を検出している。なお Genotype 3 は人から初めて検出されたもので、18S-rRNA 遺伝子の塩基配列の比較によりトリについて報告されている *C. meleagridis* と一致する。これらにより原虫感染の分野においても分子疫学的手法の導入が可能かつ有効であることが明らかとなった。

第3章は原虫類による汚染の検査方法について検討したものである。まず原虫類の濃縮に必要な連続遠心濃縮装置に着目し、操作の簡略化および濃縮効率の向上を図るべく連続遠心用ローターの改良と小型化を試みている。その結果、改良連続ローターにより *Cryptosporidium* の回収率80%という良好な結果を得ている。次いで、検出に際し、蛍光抗体染色法により特異的に嚢子を染色・可視化するために用いられる抗体について、*Cryptosporidium* に対する単クローン抗体の作成に成功し、その国産化を実現している。抗体産生クローンの評価に際してはフローサイトメーターを用いて染色特性評価を行い、染色特性の良好な2クローンを選別するとともに、この単クローン抗体を用いて原虫類6属11種、藻類5属5種に対する交差反応性を検討し、*C. parvum* と同属の *C. muris* および *C. baileyi* に対して交差反応性を示すものの他の原虫類等には非特異反応を示さないことを確認している。また、異なった蛍光色素で標識した2種の単クローン抗体を用いた二重染色により、顕微鏡観察およびフローサイトメーターのいずれの解析においても、*Cryptosporidium* と他の非特異反応粒子との識別をより容易にしている。

第4章では、*Giardia* 嚢子に対する塩素消毒の効果を検討している。ここでは脱嚢率を指標として嚢子の生物活性評価を行い、フローサイトメーターによる計数化システムを構築している。脱嚢阻止率は塩素濃度とその接触時間の積である ct 値とよく相関し、水温10~15°C、塩素濃度0.5~1.0mg/Lの条件において、Ct値50程度の処理により *Giardia* 嚢子の脱嚢活性を210g程度阻害することをあきらかにしている。

第5章は結論であり、本研究の成果を取りまとめている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、*Cryptosporidium* や *Giardia* など病原性原虫類による水道の汚染と影響の防除を目的とし、水道水源における汚染の様態、検査法の改良・開発ならびに塩素処理の有効性について研究したものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. 神奈川県 の 2 流域 について汚染実態を調査し、いずれの流域も *Cryptosporidium* 及び *Giardia* で恒常的に汚染されていること、畜産排水が重要な汚染源であることなどを明らかにした。
2. 汚染経路の解析調査には PCR-RFLP 法による分子疫学的手法が有効であることを示した。また本解析手法により、従来トリ型のといわれていた種 (*C. meleagidis*) が、わが国でも健常者の下痢症の原因となっていることを示した。
3. 原虫の濃縮法の改良を目的として連続遠心ローターを開発し、これが検査の効率向上に有効であることを実証した。
4. 水道水から *Cryptosporidium* を検出する工程に用いられる特異蛍光抗体について、特異性の向上と国産化とを目的として開発研究を行ない、フローサイトメーターを用いた選別により、他の原虫類には交差反応を示さない、良好な染色特性を持つ複数のクローンを得ることに成功した。
5. 異なった蛍光色素で標識された複数の単クローン抗体を用いる多重染色法を検討し、著しい特異性の向上を実現した。
6. フローサイトメーターによる計数システムにより、*Giardia* 嚢子に対する塩素消毒の効果を検討し、原水における汚染の程度が低いという前提のもとでは、現行の塩素処理の範囲で *Giardia* 汚染の制御が可能であることを示した。

以上要するに本論文は、*Cryptosporidium* や *Giardia* など原虫類の各種の検査法を改良・開発するとともに、塩素消毒の有効性を評価し、これらによる水道の汚染や感染の検知と制御の基礎を与えたものであって、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成13年2月9日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。