

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 津嶋 良典

本研究では、わが国有数の酪農地帯である北海道の河川湖沼の *Cryptosporidium parvum* による汚染状況を把握し、主な汚染源と推定される牛糞便から本原虫を分離・同定し、従来より高感度の検出法を検討するとともに、遺伝子解析により種を同定し、分離オオシストの Viability と Infectivity を評価し、飼育牛と本原虫水系感染症との因果関係も考察した。本論文の内容は、以下の3章より構成されている。

第1章 北海道における環境水中からの *C. parvum* オオシストの検出

まず初めに、北海道における河川水中からの *C. parvum* オオシストの検出に取り組んだ。北海道の飼育牛の疫学調査報告と既に報告されている各検出法の検討から、従来よりも検出感度の高い方法を用いて、*C. parvum* オオシストによる環境水汚染状況の正確な把握を試みた。即ち、大容量の環境水サンプルを処理できるカートリッジフィルターを用いたフィルトレーション法、及び我々が改良法を考案した硫酸鉄水溶液を用いたフロキュレーション法の2法である。上記の2法により採取された環境水サンプルを、蔗糖不連続密度勾配分離法にて分離濃縮し、キニヨン染色法と蛍光抗体法により *C. parvum* オオシストを同定した。その結果、調査した河川の60% (6/10)、採取したサンプルの50% (14/28) が *C. parvum* 陽性であった。また、フィルトレーション法による検出オオシスト濃度は、最大値を諸外国と比較しても非常に低い濃度 (Max 0.8 oocysts/L) であった。

第2章 硫酸鉄フロキュレーション法を用いた北海道における河川水中 *C. parvum* オオシスト数の季節変動の検討

次に、硫酸鉄フロキュレーション法を用いた北海道における河川水中 *C. parvum* オオシスト数の季節変動の検討に取り組んだ。これまでの報告では、人のクリプトスポリジウム症の発生には明確では無いが季節性が見られたとの報告もあり、農業活性や農作業のサイクルとの関係も推定されたので、北海道の河川を対象に、河川水中に存在する *C. parvum* オオシストの季節変動を調べる目的で、オオシストの検出を行った。1999年8月から2001年10月までの間、3河川について硫酸鉄フロキュレーション法による分離と蛍光抗体法及び核染色法による同定を実施した。その結果、8月をピークとする季節性が観察され、降雨量、一ヶ月未満の子牛頭数、農業形態の関与が示唆された。

第3章 SCID マウスを用いた北海道における河川水中 *C. parvum* オオシストの生死判定と感染性の検討

最後に、SCID マウスを用いた北海道における河川水中 *C. parvum* オオシストの Viability と Infectivity の検討に取り組んだ。近年、Viability の検討では簡便さから DAPI/PI 法などの核染色を用いた方法が検討されているが、環境水中には夾雑物も多く存在し、特異蛍光と非特異蛍光の区別は容易ではなく、感染性の有無は不明であった。そこで SCID マウスを用

いて、北海道の河川水中より検出した *C. parvum* オオシストの Viability と Infectivity を検討した。キュノカートリッジフィルターを用いたフィルトレーション法、蛍光抗体法及び核染色法 (DAPI 染色) により 2001 年 9 月及び 10 月に北海道の河川水中から 2×10^4 個の *C. parvum* オオシストを採取した。検出したオオシストを 6 匹の SCID マウス (1×10^3 個/1 匹) に経口投与したところ感染が成立し、マウス糞便中にオオシストを検出した。このオオシストを Hokkaido River Water - 1 (HRW-1) とし、次に、継代維持した HRW-1 の Infectivity を調べる目的で人由来株の *C. parvum* genotype 2 HNJ-1 及び牛由来株の *C. parvum* genotype 2 TK-1 と比較した。SCID マウスにオオシスト 1×10^4 個/1 匹を経口接種後、2 日毎に糞便を回収し、オオシストを蔗糖浮遊遠心分離法にて粗精製し、蛍光抗体法にて検出して、1 g 糞便中のオオシスト数 (OPG) を経時的に記録した。その結果、3 群の平均 OPG の動態に顕著な差は見られなかった。次に HRW-1 の遺伝子型を Small Subunit Ribosomal RNA 遺伝子を用いた PCR 制限酵素断片長多型法にて調べた結果、*C. parvum* genotype 2 であった。

本研究において、本邦においても、大規模な集団感染が起こる可能性が示唆された。2002 年において、2 つの *C. parvum* の集団感染事例が報告されたことを考えると水道水を介した水系感染症としてのクリプトスポリジウム症対策は本邦においても、世界各国の例にも、緊急課題である。本原虫の正確かつ高感度な検出系を確立し、集団感染の予防に貢献し集団感染発生時には迅速な対応が可能なシステムの構築をめざし本原虫による水系感染症対策を押し進める必要がある。本研究は学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) 論文として価値あるものと認めた。