

## 審査の結果の要旨

氏名 真砂 佳史

本論文は、「クリプトスポリジウムの定量手法の開発と水道水摂取による感染リスクの評価」と題し、8章より構成され、水系感染性の病原微生物であるクリプトスポリジウムを対象とし、その検出法の開発、水道水源中における挙動の把握、水道水起因のリスクの評価、水質管理の方法に関する研究である。

第1章は序論である。

第2章には、水中のクリプトスポリジウムに関する既存の研究をまとめ、本研究の位置づけを示している。

第3章「Quenching Primer/Probe PCR 法による水中のクリプトスポリジウムの定量手法の開発」では、水中のクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) を検出・定量する新しい手法の開発について説明している。既存の手法では、遺伝子型の判定と定量を同時に行えないため、試料中の遺伝子型の相違を健康リスク評価に反映させることができなかった。本研究では、後段に種・遺伝子型の判定を行うことを前提とした、Quenching Primer/Probe を用いたリアルタイム PCR 法 (QP-PCR 法) を用いることで、非常に低濃度で存在するクリプトスポリジウムの分子生物学的定量手法の開発に成功している。クリプトスポリジウムに対する QPrimer PCR 法と QProbe PCR 法の優劣の比較を行い、QProbe PCR 法の方が、定量性の高さ、および検出限界の低さの面で優れていることを明らかにしている。

第4章「クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別手法の開発および比較」では、クリプトスポリジウムの DNA を、種・遺伝子型ごとに類別、あるいは判別する手法の開発を行っている。3種の制限酵素 (*Ssp* I, *Vsp* I, *Sty* I) を用いた Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP)法を試みた結果、ヒトに感染するとされている6つの種 (*C. parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis*、*C. canis*、*C. felis*、*C. muris*) のみを対象とした場合は、その6種全てを識別できることを明らかにしている。すなわち、ヒトへの感染を調べる疫学調査に有効な手法であることを示している。

さらに、新しい種・遺伝子型の判別手法として Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)法を用いた判別手法の適用を試み、9種類 (*C. parvum*、*C. hominis*、*C. canis*、*C. meleagridis*、*C. felis*、*C. sp. strain 938*、*C. andersoni*、*C. serpentis*、*C. saurophilum*) の種・遺伝子型全てを類別することが可能であることを明らかにしている。既存のクローニング法と、Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)法についても、文献調査により比較した上で、DGGE 法により DNA を類別し、後段のシーケンシング法でそれらを判別することにより、試料中に含まれているクリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判定する方法が最も

優れていると結論づけている。

第5章「河川水中のクリプトスポリジウム濃度変動の評価」では、数時間おきに24時間自動的に最大100[L]の河川水を採取する装置を開発し、第3章、第4章で開発した測定手法を用いて、水道水源中のクリプトスポリジウム濃度を1年にわたり測定している。その結果、クリプトスポリジウムは、水道水源である関東平野の利根川、小山川の双方から検出され、試料陽性率はそれぞれ34%（94試料中32試料）、67%（18試料中12試料）であったこと、また、検出した濃度の実測最大値は、それぞれ95、58 [oocysts/100L]であったとしている。同時に12種類の種・遺伝子型を検出している。すなわち、河川水中のクリプトスポリジウムの濃度と種・遺伝子型の両者を同時に測定できる新しい手法であることを明らかにしている。検出された種・遺伝子型の季節変動から、*C. parvum* が初夏～夏季に集中して検出され、秋季には、ウシに特異的な *C. andersoni* が多く検出されたことを示し、利根川河川水の汚染原因は、ウシであると推定している。また、降雨により引き起こされた高濁度時の河川水からは、クリプトスポリジウムが高頻度で検出されることを明らかにしている。

第6章「水道水中のクリプトスポリジウムによる感染リスクの評価」では、第5章で得られたデータを基にして、水道水摂取によるクリプトスポリジウム症の感染リスクをモンテカルロ法により評価している。その結果、全ての種・遺伝子型のクリプトスポリジウムが等しくヒトに対する感染力を持つと仮定したシナリオでは、年間感染確率の95%値が約 $10^{4.1}$  [infection/year]、*C. parvum* のみを対象としたシナリオでは、年間感染確率の95%値は約 $10^{4.8}$  [infection/year]、ヒトに感染可能なクリプトスポリジウムの種・遺伝子型のみを対象としたシナリオでも、ほぼ同じ値約 $10^{4.8}$  [infection/year]が得られたとしている。以上のシナリオの比較より、種・遺伝子型を考慮してリスク評価を行うべきこと、また全ての種・遺伝子型を判別せずに検出する顕微鏡観察による検出手法では、感染リスクを過大に見積るおそれがあることを指摘している。

第7章「浄水場におけるリスク管理手法の提案」では、第6章で開発したリスク評価モデルを用いて、検査を行う頻度により、保障される安全性が大きく異なることを明らかにした上で、浄水場において、感染リスクが許容範囲内にあることを保障するために必要な水質監視手法の提案を行っている。

第8章は研究成果と今後の展望をとりまとめて示している。

このように本論文は水中のクリプトスポリジウムの検出法の開発ならびに水道水源と水道水摂取のリスク評価に新しい知見を加えた研究成果であり、都市環境工学の学術分野の進展に大いに貢献するものである。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。