

域はいずれも同様な抗体価の分布を示し、抗体価の分布や平均値が河川の汚染状況や畜産業の形態・規模による地域差を反映しているとは考えられなかった。ちなみに、米国ジョージア州での水系集団感染時における IgG 抗体価の推移を見ると、感染地域の住民血清は非感染地域に比べて少なくとも 2.5 倍（中央値比較）高くなったと報告されている（Prist1999）。ごく最近淡路島の高校生にクリプトスポリジウムの手袋感染事例が発生しているが、偶然にも本研究の抗体価調査に淡路島が選ばれていた。今後、淡路島において継続的に調査協力が得られるならば、集団感染にともなう地域の抗体価の変化（反映）について詳細な情報を得ることができるもの期待している。

クリプトスポリジウム感染後の抗体価の変動に関する他の報告によれば、ボランティアを用いた感染実験では、およそ 1 ヶ月後には抗体価上昇が認められ、少なくとも 2 ヶ月程度は抗体陽性が続くことが示されている（Moss1998）。水系感染事例に関連した報告では、1996 年の米国内で起こったいくつかの事例において、抗体価は感染後 3 ヶ月をピークに減少して行き、その半減期は約 12 週間と計算されている（Prist2001）。1993 年のミルウォーキー集団感染事例において児童を対象とした調査を行ったところ、クリプトスポリジウム 27kDa 抗原に対しては 1 ヶ月をピークに、2 ヶ月後には半減するが、17kDa 抗原に対しては 1 ヶ月以後 2 ヶ月まで高抗体価を維持したと報告されている（McDonald, 2001）。同じく 1992 年のオレゴン州での集団感染後 2 年間にわたる血清調査では、15/17kDa 抗原に対して 2 年半の間高い抗体価が続いたことが報告されている。この理由として、事例後の浄水場の施設の改善が不十分であったため、その後も住民の暴露が続いたためではないかと説明されている（Frost1998）。しかしながら、これまでの ELISA 法による抗体価調査では、一般健常人において 15.4%（ドイツ; Petry, 1998）から 33.2%（カナダ; Renton et al., 1999）甚だしい例では 62%から 83%（イタリア; Frost et al., 2001）が陽性反応を示す結果となっており、今回の著者等の結果と著しく異なっている。

ちなみに、当該調査結果では各地の 20 才から 29 才における体陽性率は母数の少ない 2 地域を除き、0.4 ~ 2.2%と低く、欧米における調査との間に大きな開きがあった。ところで、欧米で行われた調査では 15KDa, 17Kda あるいは 27KDa の精製抗原が用いられ、当該研究では脱囊直後のスポロゾイトの粗抗原が用いられている。一般に、粗抗原を用いた反応系において非特異反応がしやすい傾向にあるが、今回の結果は全く逆であった。

今回の 20 才から 59 才の健常者を対象とした抗体調査では、全国で抗体陽性と判断された血清が 9 件認められ、そのうちの 5 件が埼玉県に集中していた。各県における抗体陽性者は人口 100 人あたり 0.4 人から 0.8 人であったのに対し、埼玉県では 2.2 人と他県と比べ人口比で 2.8 ~ 5.5 倍高い値を示した。埼玉県の血清が採取された時期は越生町のクリプトスポリジウム集団感染以降であり、この結果が集団感染を反映したものである可能性も指摘できる。この点の真偽を明らかにすることは本抗体検査方法の信頼性を高める上で、きわめて重要であると考えられる。

## E. 結 論

わが国におけるクリプトスポリジウム抗体価保有率はおおむね低いレベルにあると考えられた。さらに他地域について調査を進めデータを蓄積することで、集団感染時、あるいはそれ以前の潜在的な集団感染を的確に把握することが可能なシステムを構築することが必要である。感染事例の多い米国では水道水源の違い、あるいは水処理法の違いと血清抗体価に関する調査研究が始まっており（Frost ら 2000, 2001）、クリプトスポリジウムの感染リスク要因の解明が試みられている。国内においても、水道の質の違いの比較、例えば全国に多数利用されている簡易水道と大規模な一般水道、またそれと関連した塩素添加のみとろ過処理による違いという視点から、血清調査を行うことも今後の研究課題として考慮すべきではないかと思われる。

## 参考文献

- Frost, F. J., Calderon, R. L., Muller, T. B., Curry, M., Rodman, J. S., Moss, D.M., and dCruz., A.A. (1998), A two-year follow-up survey of antibody to *Cryptosporidium* in Jackson County, Oregon following an outbreak of waterborne disease. *Epidemiol. Infect.*, **121**, 213-217.
- Frost, F. J., Fea, E., Gilli, G., Biorci, F., Muller, T. M., Craun, G. F., Calderon, R.L.(2000), Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in southern Europe. *Eur. J. Epidemiol.*, **16**(4), 385-390.
- Frost, F. J., Muller, T., Craun, G. F., Calderon, R. L., and Roefer, P. A. (2001), Paired city *Cryptosporidium* serosurvey in the southwest USA. *Epidemiol. Infect.*, **123**, 301-307.
- McDonald, A. C., Kenzie, W. R.-Mac., Addiss, D. G., Gradus, M. S., Linke, G., Zembrowski, E., Hurd, M. R., Arrowood, M. J., P Lammie, J. P., and Priest, J. W. (2001), *Cryptosporidium parvum*-Specific Antibody Responses among Children Residing in Milwaukee during the 1993 Waterborne Outbreak. *J. Infectious Diseases*, **183**, 1373-1379.
- Moss, D. M., Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., DuPont, H. L., Arrowood, M. J., Hightower, A. W., and Lammie, P. J. (1998), The Antibody Response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* Antigens following Experimental Infection in Humans. *J. Infectious Diseases*, **178**, 827-833.
- Petry, F. (1998), Epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* antibodies [corrected] in sera of persons from Germany. *Infection*, **26**(1), 7-10.
- Priest, J. W., Kwon, J. P., Moss, D. M., Roberts, J. M., Arrowood, M. J., Dworkin, M. S., Juranek, D. D., and Lammie, P. J. (1999), Detection by Enzyme Immunoassay of Serum Immunoglobulin G Antibodies That Recognize Specific *Cryptosporidium parvum* Antigens. *J. Clin. Microbiol.*, **37**(5), 1385-1392.
- Priest, J. W., Li, A., Khan, M., Arrowood, M.J., Lammie, P. J., Ong, C. S., Roberts, J. M., and I. - Renton, J. (2001), Enzyme Immunoassay Detection of antigen-Specific Immunoglobulin G Antibodies in Longitudinal Serum Samples from Patients with Cryptosporidiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**(2), 415-423.
- I.-Renton, J., Blatherwick, J., Bowie, W. R., Fyfe, M., Khan, M., Li, A., King, A., McLean, M., Medd, L., Moorehead, W., Ong, C.S., and Robertson, W. (1999), Epidemic and aEndemic Serprevalence of Antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in Residents of Three Communities with Different Drinking Water Supplies. *Am. J. Trop. Med.*, **60**(4), 578-583.

## F. 研究発表

### 論文発表

1. 八木田等。(2002) クリプトスポリジウムの抗体測定法の開発。(in preparation).
2. 八木田等。(2002) クリプトスポリジウムの血清疫学に関する研究。(in preparation).
3. K. Yagita, S. Izumiyama, H. Tachibana, G. Masuda, M. Iseki, K. Furuya, Y. Kameoka, T. Kuroki, T. Itagaki and T. Endo. (2001) Molecular

- characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.*, **87**, 950-955.
4. K. Ono, H. Tsuji, S. K. Rai, A. Yamamoto, K. Masuda, T. Endo, H. Hotta, T. Kawamura and S. Uga. (2001) Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(9), 3832-3836.
  5. S. Izumiyama, I. Furukawa, T. Kuroki, S. Yamai, H. Sugiyama, K. Yagita and T. Endo. (2001) Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infections in Weaned Piglets and Fattening Porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **54**, 23-26.
  6. 増田剛太、今村顕史、味澤 篤、根岸昌功、八木田健司、遠藤卓郎、井関基弘。(2001)下痢症患者からのクリプトスポリジウムの検出：駒込病院での成績。*Clinical Parasitology*, **12**(1), 89-91.
  7. 泉山信司、古川一郎、黒木俊郎、八木田健司、遠藤卓郎。(2001)相模川および酒匂川流域におけるクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストの汚染調査。*環境技術*, **30**(6), 63-67.
  8. 泉山信司、八木田健司、佐野 茂、遠藤卓郎 (2001) 水道におけるクリプトスポリジウム等原虫類検査のための連続ローター開発。*環境技術*, **30**(3), 66-71.
  9. 泉山信司、中井 裕、板垣 匡、小野敏夫、大塚孝康、黒木俊郎、八木田健司、遠藤卓郎 (2001) 家畜およびと畜場搬入動物等のクリプトスポリジウム汚染実態調査。*動物の原虫病*, **16**(1), 18-23.
- 口頭発表
1. 八木田健司、泉山信司、相楽裕子、坂本光男、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2002) *C.parvum* 遺伝子型 1 および遺伝子型 2 によるヒト重複感染例 第 76 回日本感染症学会 (東京都 文京区、4 月 11-12 日)
  2. 辻 英高、押部智宏、小野一男、近平雅嗣、増田邦義、山本昇五、八木田健司、遠藤卓郎 (2002) 簡易水道から検出された爬虫類由来のクリプトスポリジウム 第 76 回日本感染症学会 (東京都 文京区、4 月 11-12 日)
  3. 坂本光男、相楽裕子、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2002) 当院における腸管寄生虫症の検討 第 76 回日本感染症学会 (東京都 文京区、4 月 11-12 日)
  4. 八木田健司、泉山信司、増田剛太、井関基弘、遠藤卓郎 (2002) ヒト分離クリプトスポリジウムの分子疫学 第 71 回日本寄生虫学会大会 (神奈川県 伊勢原市、3 月 29-30 日)
  5. 八木田健司、泉山信司、亀岡洋祐、橘 裕司、増田剛太、井関基弘、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2001) クリプトスポリジウムの遺伝子型別 日本原生動物学会第 34 回大会 (兵庫県 神戸市、11 月 16-18 日)
  6. 八木田健司、亀岡洋祐、橘 裕司、増田剛太、井関基弘、黒木俊郎、遠藤卓郎 (2001) クリプトスポリジウムの遺伝子型別 第 61 回日本寄生虫学会東日本大会 (千葉県 千葉市、10 月 20 日)
  7. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司 (2001) 水試料中の病原微生物検出に係る分子生物学的手法の利用と限界－原虫類検査法を中心として－ 日本水環境学会 (福岡県 北九州市、9 月 10-11 日)
  8. 八木田健司、泉山信司、橘 裕司、遠藤卓郎 (2001) クリプトスポリジウムの Genotyping 第 1 回環境技術研究協会

年次大会（大阪府 大東市、6月8日）

大量の水を対象とした原虫濃縮回収装置の開発

分担研究者 平田 強  
研究協力者 森田重光

## 分担研究：大量の水を対象とした原虫濃縮回収装置の開発

分担研究者 平田 強 麻布大学環境保健学部 教授  
研究協力者 森田 重光 麻布大学環境保健学部 講師

### 研究要旨

大孔径中空糸精密ろ過膜はろ過に伴う損失水頭の発現が極めて少ないため、水道水であれば  $m^3$  規模を比較的容易にろ過できると考えられる。そこで、90%cut-off 孔径が  $2.0\mu m$  と  $3.6\mu m$  の 2 種類の大孔径中空糸精密ろ過膜を用いて添加回収試験を行ない、*C. parvum* 捕集特性と回収方法について検討した。その結果、*C. parvum* の濃縮には 90%cut-off 孔径が  $2.0\mu m$  の大孔径中空糸精密ろ過膜が適していることが明らかとなった。また、滅菌水道水および U.S.EPA Method 1623 記載の誘出液を用いた手動振とう法による回収率は 40%にとどまり、膜面に捕集した *C. parvum* オーシストの回収方法について検討が必要であることが示唆された。

### A 研究目的

環境水中のクリプトスポリジウム等の原虫濃度は一般に低い、感染力および塩素耐性が著しく強いことを考えると、感染症防止のためには低濃度レベルの汚染を評価する必要がある。暫定対策指針に記載されているクリプトスポリジウム等の濃縮方法のなかで最も広く用いられているメンブランフィルター法は安定した回収率が得られる汎用性が高い方法であるが、試料水の濁度が高いとフィルターの枚数が多くなり、作業が煩雑になるほか、フィルターの溶解に用いるアセトンが捕集した原虫を不活化する可能性もある。

最近開発された大孔径中空糸精密ろ過膜は、従来の限外ろ過膜や精密ろ過膜とくらべ孔径が数  $\mu m$  と大きく、大孔径側にシャープな孔径分布を有するため除濁効果は期待できないが、ろ過に伴う損失水頭の発現が極めて少ないため水道水であれば  $m^3$  規模の試料を比較的容易にろ過できると考えられる。そこで本研究では、この新しい中空糸精密ろ過膜を用いた環境水（水道水を含む）中のクリプトスポリジウムの濃縮方法について検討した。

### B 方法

#### 1 大孔径膜

90%cut-off 孔径が  $2.0\mu m$  の中空糸精密ろ過膜と  $3.6\mu m$  の中空糸精密ろ過膜（いずれもクラレ社製）を用いた。膜面積はともに  $0.1m^2$  である。なお、中空糸を製造する過程で生成される微細な粒子を除去するため、ろ過試験を行なう前に水道水で約 30 分間逆洗した。

#### 2 ろ過方法および剥離回収方法

脱塩素した水道水 100 L のうちの 50 L をろ過した後、濃度が 330~360 oocysts/L となるように *C. parvum* オーシストを添加した水道水 4 L をろ過し、続いて残りの 50 L をろ過した（計 104 L）。ろ過方式は外圧式とし、ろ速は 24 m/d (1.67 L/min) に維持した。ろ過水は 5 分間分ずつ採取した。

膜面に捕集したオーシストは、ハウジングに滅菌水道水 50 mL を添加し、手動で 3 分間振とうして剥離させた。この操作を 3 回繰り返した後、U.S.EPA Method1623 記載の誘出液 (Laureth-12 1.0g, Tris (pH7.4) 10mL, EDTA (pH8.0) 2mL, Antiform A 150  $\mu$ L, 精製水 1L) を 50 mL 添加して手動で 3 分間振とうして誘出させた。

### 3 オーシストの計数

ろ過水および誘出液をそれぞれセルロースアセテート膜フィルター (直径 25 mm, 孔径 0.8  $\mu$ m) で全量ろ過し、蛍光抗体染色剤 (Hydrofluor Combo Kit, Strategic Diagnostics Inc.) で染色した。染色したオーシストは落射蛍光顕微鏡 (Olympus BX-60) で観察し、計数した。

## C 結果

### 1 *C. parvum* オーシストの捕集

オーシスト添加後のろ過水中への漏出数、漏出率および除去率を表 1 に示す。90%cut-off 孔径が 2.0  $\mu$ m の中空糸精密ろ過膜ではオーシスト添加 10 分後 (約 17 L ろ過後) から極わずかながらオーシストが漏出し始めた。しかし、その個数は 5 分間分 (8.35 L) のろ過水中に 2~3 個であり、50 L ろ過による除去率は 99%以上であった。一方、90%cut-off 孔径が 3.6  $\mu$ m の中空糸精密ろ過膜ではオーシスト添加直後から漏出し、50 L ろ過による除去率は約 80%にとどまった。

表 1 ろ過水中へのオーシスト漏出率と除去率

膜タイプ	添加オーシスト数 (個)	上段：ろ過水中オーシスト数 (個) / 下段：漏出率 (%)						除去率 (%)	
		0-5min	5-10min	10-15min	15-20min	20-25min	25-30min		計
2.0 $\mu$ m	1322	0	0	2	2	3	3	10	99.2
		0	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.8	
3.6 $\mu$ m	1455	4	12	76	88	72	43	295	79.7
		0	0.8	5.2	6.1	5.0	4.0	20.3	

### 2 *C. parvum* オーシストの剥離回収

各誘出液中のオーシスト数および回収率を表 2 に示す。滅菌水道水を加えて手動振とうする方法では、両ろ過膜とも、回収率は操作 3 回分の合計で約 25%であった。滅菌水道水による 3 回の回収操作後に界面活性剤を含む EPA 誘出液を加えて振とうしたときの回収率は 12~14%にとどまった。したがって、滅菌水道水による 3 回の回収と EPA 誘出液による 1 回の回収操作の総回収率は約 40%になる。

表 2 各誘出操作のオーシスト回収率

膜タイプ	添加オーシスト数 (個)	上段：回収オーシスト数 (個) / 下段：回収率 (%)				総回収率 (%)
		水道水-1	水道水-2	水道水-3	EPA誘出液	
2.0 $\mu$ m	1312	212	112	12	181	39.4
		16.2	8.5	0.9	13.8	
3.6 $\mu$ m	1160	244	44	8	139	37.5
		21.0	3.8	0.7	12.0	

## D 考察

90%cut-off 孔径が 2.0  $\mu$ m の中空糸精密ろ過膜を用いた場合、ろ過水 50 L あたりのオーシスト漏出率は約 0.8%にすぎず、実質上ほとんどすべてのオーシストを捕集できた。しかし、90%cut-off 孔径

が  $3.6\mu\text{m}$  の中空糸精密ろ過膜ではオーシストの 60%程度が漏出した。したがって、 $2.0$  の大孔径膜はオーシストの捕集に利用可能であるが、孔径  $3.6\mu\text{m}$  の大孔径膜は不適と判断された。

膜面に捕集したオーシストの滅菌水道水および EPA 誘出液による回収率は約 40%にとどまった。酢酸セルロース製の限外ろ過膜（分画分子量 150,000 Dalton, ダイセンメンブレンシステムズ社製）を用いた添加回収試験 ( $1.4 \times 10^4$  oocysts/ $\text{m}^3$ ) では、精製水による 1 回の手動振とう操作で 98%を超えるオーシストが回収されている。大孔径精密ろ過膜からのオーシストの回収率は限外ろ過膜よりも明らかに低く、中空糸の内側から水を圧送する逆洗や圧縮空気による空洗等、手動振とう法以外の剥離回収方法について今後検討が必要である。

### 参考文献

- Hirata, T. and Hashimoto, A. (1998) Experimental assessment of the efficacy of microfiltration and ultrafiltration for *Cryptosporidium* removal, *Water Science and Technology*, 38(12), 103-107
- 厚生省生活衛生局水道環境部長通知 (1998) 水道水におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針
- U.S.EPA (2001) Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, EPA-821-R-01-025

環境水中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの  
濃度変動とその感染リスクに関する基礎的検討

分担研究者 大垣真一郎  
研究協力者 片山浩之

# 平成 13 年度 厚生科学研究

## 分担研究報告書

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る  
健康リスク評価及び管理に関する研究

### 環境水中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度変動と その感染リスクに関する基礎的検討

分担研究者 大垣 眞一郎 東京大学大学院工学系研究科 教授  
研究協力者 片山 浩之 東京大学大学院工学系研究科 講師

#### 概要

本研究では、大容量の環境試料から *Cryptosporidium* および *Giardia* を同時に検出する手法の開発を行った。その結果、精製手法については、PSIMS 法を用いることにより試料中の濁質量に関係なく安定した回収率 (*Cryptosporidium* : 64%、*Giardia* : 69%) が得られることが示された。しかし、MF カートリッジフィルターによる濾過および遠心分離による濃縮過程では、既存の手法と比較して、十分な回収率が得られないことがわかった。この点に関しては、更なる改良が必要であると考えられる。

本手法を用いて多摩川河川水からの検出を試みたところ、*Giardia* は全てのサンプルから検出され、その濃度は  $2.3 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^2$  [cysts/100L] であることがわかった。*Cryptosporidium* は 3 試料中 1 試料から検出され、その濃度は 23 [oocysts/100L] であった。変動を定量的に評価するには、もう少し検出限界を下げるような手法上の改良が必要であると考えられる。また、同時に測定した水質指標 (濁度、大腸菌群、糞便性大腸菌群) との相関は見られなかった。

#### 1. 研究の背景

##### 1.1. *Cryptosporidium* 感染症の発生について

水道水中の *Cryptosporidium* による大規模な感染症発生については、米国 Wisconsin 州 Milwaukee で 40 万人以上が感染した事例 (CDC, 1996) など、海外でいくつかの事例が報告されている。また CDC (Center for disease control and prevention, U.S.A.) は、1991 年から 1998 年の間に、*Cryptosporidium* によるアウトブレイクが 10 件発生し、408,254 人が発症したと報告している (CDC, 1993, 1996, 1998, 2000)。このような状況を踏まえ、WHO は、1995 年 12 月から、*Cryptosporidium* を含む病原性微生物にかかわる飲料水水質ガイドラインの検討を開始した。

1996 年 6 月には、わが国で最大の *Cryptosporidium* 感染症集団発生が埼玉県越生町で発生した (埼玉県衛生部, 1997)。これを受けて厚生省は、同年「水道における *Cryptosporidium* 暫定対策指針 (厚生省, 1996)」を策定し (1998 年改正)、水道水源が *Cryptosporidium* によって汚染されるおそれがある浄水場に対して、浄水の濁度を 0.1 度以下に維持するよう運転管理の徹底を求めた。また 1999 年 4 月施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医

療に関する法律（感染症新法）（1999）」では、*Cryptosporidium* 症や *Giardia* 症が四類感染症に指定され、感染症が発生した場合の医師による届出等の対応が行われるようになった。それ以降は、両感染症共に散発事例しか報告されていない（*Cryptosporidium* 症 19 例、*Giardia* 症 275 例）。

### 1.2. 環境水中の *Cryptosporidium* とその発生源について

厚生労働省(1997)は、1997年に国内の94水源277地域に対して *Cryptosporidium* および *Giardia* の存在量調査を行った。その結果、*Cryptosporidium* の地点陽性率は2.9%、*Giardia* の地点陽性率は8.7%となった。

Hashimotoら(1998)が相模川の13地点に対し調査を行ったところ、全ての地点から *Cryptosporidium* および *Giardia* が検出され、国内の河川において高い確率でこれらの病原性微生物が存在する可能性を示した。また Onoら(2001)は、兵庫県内の18の河川に対して調査を行い、県内の河川の多く(72%)が *Cryptosporidium* により汚染されていると報告した。

これらの結果を比較すると、1997年の厚生省の調査では、サンプル量が10Lと小さく、また検出に用いる手法もそれほど回収率が高いものではなかったため検出できなかった可能性もあり、水道水源である環境水中に、*Cryptosporidium* および *Giardia* は高い確率で存在していると推測できる。

環境水中の *Cryptosporidium* の発生源についてはすでいくつかの研究がなされており、下水道の雨天時越流水(Gibson III et al., 1998)や、畜産排水(Hashimoto et al., 1999)などがあげられている。

### 1.3. アウトブレイクの発生原因について

過去に発生したアウトブレイクの原因について調査したところ、大きく分けて以下の2つが挙げられることがわかってきている。

- ・自然由来の水源濃度の上昇  
大雨、雪解けなどによる、牛や人間の糞便などを含む排水の河川への流入
- ・給排水システムの構造上および運転上の問題  
浄水場での事故や逆洗水の再利用、下水処理場と浄水の取水口の位置関係など

Roseら(2000)は、1971年から1994年までの水系感染症の発生と激しい降雨との関係について調査し、アウトブレイクの20~40%は激しい降雨と関連があると報告した。また Currieroら(2001)は、アメリカにおける水系感染症の集団発生と気象条件の関係について調査した、水系感染症の発生と大雨などの気象条件には密接な関係があると報告した。また Ohgakiら(2001)は、河川水中の *Cryptosporidium* 濃度は降雨により指数関数的に上昇し、20[mm/day]の降雨により約1LOG上昇するとしている。

## 2. 研究の概要

報告された *Cryptosporidium* 症および *Giardia* 症感染者の人数を見ると、平常時のリスクは

十分許容できるリスクレベルの範囲内にあるといえる。したがって、浄水場における処理工程の見直しなど、定常的なリスクを制御するための新たな対策は不要である可能性が高い。

現在の対策は、主に局地的に発生した大規模なアウトブレイクに対処するにとられているものであり、そのようなアウトブレイクに対処するには、現在行われているような一日一回程度のモニタリングでは不十分である。

アウトブレイクが発生する要因については、人為的、自然発生的なものが共に存在するが、いずれにせよ時間レベルの変動により発生していることは明らかである。特に自然的要因に起因するアウトブレイクを制御するためには、そのような要因が発生する条件について検討がなされるべきであるが、現在のところ疫学調査による研究しかなされておらず、実測により評価を行った例はまだない。

そこで本研究では、環境水中の *Cryptosporidium* および *Giardia* の濃度の時間的な変動を評価し、自然的要因によるアウトブレイク発生のきっかけとなる突発的な濃度の上昇が起こる環境条件についての調査を行うことを大きな目的とする。

環境水中の濃度変動を評価するには、より大容量の試料に対して検出を試みる必要がある。しかし、現在開発されている手法は、10~20L の試料に対して検出を行うための手法であり、より大容量の試料に対して適用できるかどうかは不明である。そこで本研究では、大容量の環境試料から *Cryptosporidium* および *Giardia* を検出する手法の開発を行った。

### 3. *Cryptosporidium*、*Giardia* の検出手法の開発

#### 3.1. 概要

環境水からの *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの検出手法は、大きく分けて試料からの濁質の回収・濃縮・精製・計数の4つのステップからなる。これまでに水からの検出手法に関しては多くの研究がなされているが、それらは主に最大 20L 程度の水道水、または環境水からの検出手法である。本研究で目指す数百 L 規模の環境水からの検出に際しては、それら従来の手法と以下の点で異なっている。

- ・試料が大容量であるため、濃縮に用いる手法に制限がある
- ・濃縮後の試料に含まれる濁質量が多く、精製の妨げになる

そこで本研究では、以下の点に関して改良を行った。まず濃縮手法に関しては、より膜面積の大きな膜を用いて試料を濾過することにした。次に試料中の濁質からの精製手法に関しては、既存の手法に改良を加え、濁質の影響を受けにくい精製手法の開発を行った。

今回のようにいくつかのプロセスからなる検出手法の開発においては、そのプロセス毎の回収率を評価することが重要である。そこで本研究では、濁質の回収・濃縮・精製のそれぞれの過程における回収率を評価するために、検出プロセスのさまざまな段階で *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストを添加し、実験を行った。そのプロセスの概要を図1に示す。

#### 3.2. 河川水からの濁質の回収手法

2001年9月~2002年1月に多摩川下流域(河口より25km, 淡水域)の河川水を採取し、

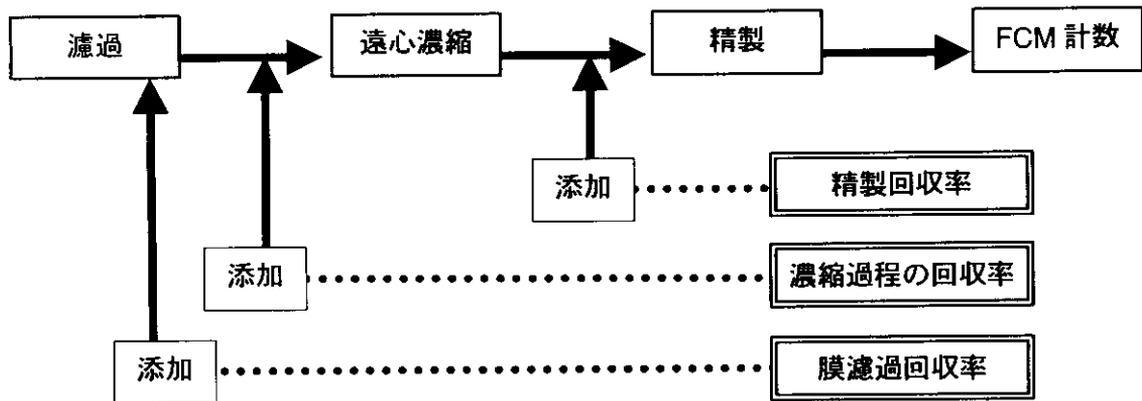


図1 回収率評価実験の概要図

試料として用いた。河川水の水質を表1に示す。濃縮にはMFカートリッジフィルター（セルロース繊維製、孔径1 $\mu$ mまたは3 $\mu$ m、有効濾過面積4000cm<sup>2</sup>、ADVANTEC）を用い、濾過後の膜モジュールを持ち帰って以下の試験に供した。

表1 多摩川河川水の水質

実験	濁度 [NTU]	大腸菌群 [CFU/mL]	糞便性大腸菌群 [CFU/100mL]
C.精製	1.0-3.2	1.6x10 <sup>1</sup> - 6.5x10 <sup>2</sup>	3.4x10 <sup>2</sup> -2.6x10 <sup>4</sup>
G.精製	2.9-4.4	5.5x10 <sup>1</sup> - 6.5x10 <sup>2</sup>	6.8x10 <sup>2</sup> -2.6x10 <sup>4</sup>
膜回収率	4.4	5.5x10 <sup>1</sup>	6.8x10 <sup>2</sup>

### 3.3. 精製手法の改良

1995年に策定されたICRでは、シヨ糖浮遊法を用いて *Cryptosporidium* オーストを精製することとしている。しかしこの手法は、特に濁質を含んだ試料からの回収率が低く、あまり優れた手法とはいえない。またEPAが1999年に策定したMethod1622(EPA, 1999a)およびMethod1623(EPA, 1999b)では、免疫磁気ビーズ法を用いることとしている。この手法は一般に60~80%の回収率が得られると報告されており、現在広く用いられている。しかし、この回収率は試料水中の濁質の影響を受け、濁質量の増加に伴い回収率が低下するといという報告もある(McCuin et al., 2001, Bukhari et al., 1998)。今回扱う試料はさらに大量の濁質を含むため、回収率の低下が懸念される。八木ら(2001)は、免疫磁気ビーズ法の前に高比重のシヨ糖溶液による密度勾配遠心を行うことで、濁質を含む試料からの *Cryptosporidium* の回収率が向上したと報告した。

本節では、これら既存の精製手法の比較を行い、本研究での検出に適用できるかどうかについての評価を行った。加えて、SIMS法において前処理に用いられている高比重のシヨ糖溶液を、Percoll-シヨ糖溶液に変更した手法(PSIMS法)についても同様の評価を行った。

### 3.3.1. 実験に用いた試料および実験手法

孔径 3 $\mu$ m の膜モジュールに 100 倍濃度 PET 溶液を適量添加し、よく振り混ぜてから濁質を回収した。さらに遠心分離を行い、河川水 100L 分の濁質を 10mL に濃縮したものをサンプルとした（以下懸濁系）。次に濃縮液にオーシストまたはシストをそれぞれ約  $10^5$ [(oo)cysts]添加し、各精製手法（PS 法、IMS 法、SIMS 法、PSIMS 法）を用いて精製した。同様の操作を超純水にオーシストまたはシストを添加した系についても行い（以下純系）、濁質の有無による回収率の変化について調べた。

一般に顕微鏡観察による計数は、測定誤差が大きく、また判別にはかなりの技術を必要とし、また試験者への身体的負荷が大きい。一方フローサイトメトリーを用いた計数では、測定そのものによる誤差が小さく、また常に同一の条件で判別を行うことができる。そこで本研究では、オーシストおよびシストの計数にフローサイトメトリーを利用することとした。

### 3.3.2 精製回収率評価

#### 3.3.2.1. *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium* の精製回収率評価実験の結果を図 2 に示す。

純系での実験結果では、PS 法、IMS 法、SIMS 法、PSIMS 法の平均回収率はそれぞれ 38%、63%、62%、60%となり、PS 法と免疫磁気ビーズを用いる 3 つの手法との間に大きな差が見られた。また、免疫磁気ビーズを用いる 3 つの手法の回収率は、既存の研究で得られた回収率とほぼ一致した。そこで、濁質を含む系では、PS 法を除いた 3 つの手法についてのみ実験を行った。

懸濁系では、IMS 法、SIMS 法、PSIMS 法の平均回収率はそれぞれ 24%、63%、64%となった。IMS 法では純系と比較して回収率が大きく低下したのに対し、SIMS 法、PSIMS 法ではほとんど差が見られなかった。

#### 3.3.2.2. *Giardia*

*Giardia* の精製回収率評価実験の結果を図 3 に示す。

純系では、IMS 法、SIMS 法、PSIMS 法の平均回収率はそれぞれ 97%、22%、79%となり、SIMS 法における前処理により、大幅に回収率が低下することが明らかとなった。ショ糖溶液による密度勾配遠心の際、シストの大部分が沈渣と共に除去されてしまっていることが原因と考えられる。PSIMS 法では、このような前処理における回収率の大幅な低下は見られなかった。

懸濁系では、それぞれの平均精製回収率は順に 68%、14%、69%となった。平均値の傾向は、純系における結果と同じであり、濁質による極端な回収率の低下は見られなかった。また、IMS 法では、1 回の実験でのばらつきは非常に小さかったが、1 月 4 日～1 月 5 日のデータ（原水の濁度：1.43）と 1 月 10 日～1 月 11 日のデータ（原水の濁度：2.90）で回収率が大きく異なっている。このことから、IMS 法での精製回収率は、添加した試料の水質(主に濁質の量)により、回収率が大きく変動することが示唆された。

### 3.3.3. 回収率の比較

以上で得られた回収率を比較するため、回収率の平均値に対する t-検定を行った。有意水準は5%とした。その結果、以下のことが明らかとなった。

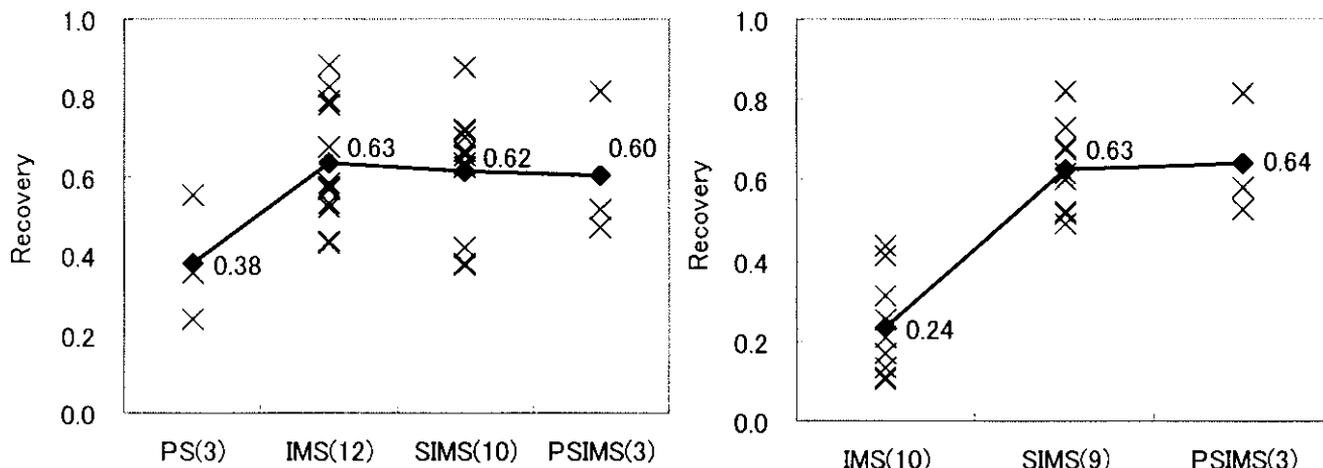


図2 *Cryptosporidium* 精製回収率の比較  
(左：純系、右：懸濁系、カッコ内の数値はサンプル数)

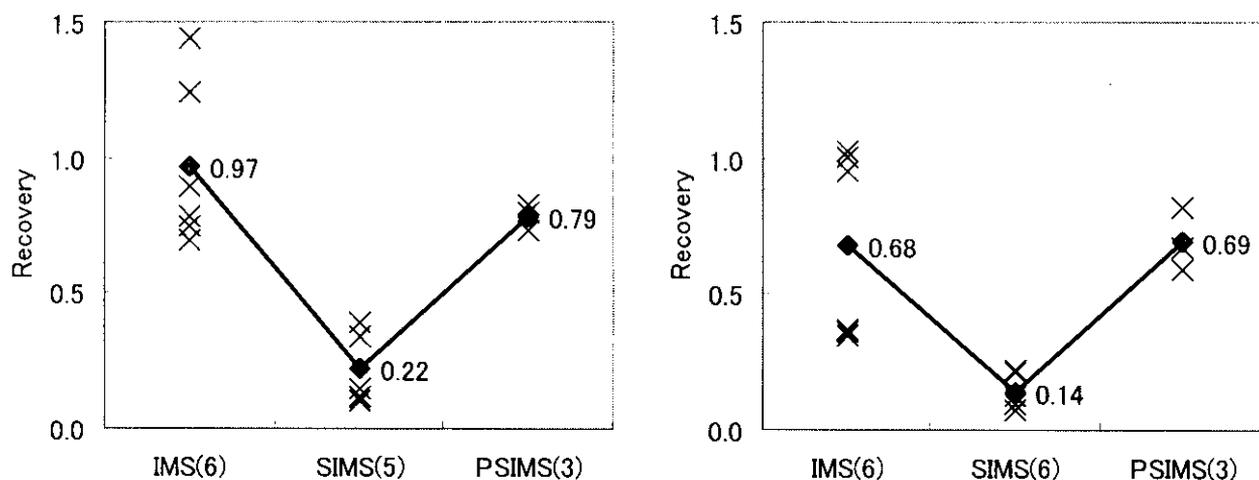


図3 *Giardia* 精製回収率の比較  
(左：純系、右：懸濁系、カッコ内の数値はサンプル数)

### *Cryptosporidium* の回収率について

- ・ 純系において PS 法は残りの 3 法と比較して有意差は出なかったものの回収率は低かった (順に  $P=0.09, 0.11, 0.19$ )。IMS 法、SIMS 法、PSIMS 法の間には差が見られなかった。
- ・ 懸濁系において IMS 法は、SIMS 法および PSIMS 法と比較して平均値が有意に低かった。
- ・ IMS 法は純系と懸濁系で有意な平均値の低下が見られたのに対し、SIMS 法、PSIMS 法では差は見られなかった。

### Giardia の回収率について

- ・純系懸濁系共に、SIMS 法は IMS 法および PSIMS 法と比較して有意に回収率が低かった。
- ・3つの手法全て、懸濁物質が入ることにより回収率は低下したが有意差は見られなかった。

以上より、PSIMS 法を用いることで、試料中の濁質量に関係なく、高い回収率で *Cryptosporidium* オーストおよび *Giardia* シストを回収できることが判明した。また、この手法は、試料中の懸濁物質のほとんどを除去できるため、フローサイトメトリーで計数するための精製手法として非常に適しているといえる。

### 3.4. 濾過・濃縮過程、およびプロセス全体での *Cryptosporidium* 回収率評価

#### 3.3.1. 評価手法

あらかじめ河川水を濾過しておいた膜モジュール（孔径 1 $\mu$ m, *Cryptosporidium*: 69.0L, *Giardia*: 74.9L, 以下濾過後膜）に、*Cryptosporidium* オーストまたは *Giardia* シストをそれぞれ約 10<sup>5</sup>[(oo)cysts]添加した河川水 2L を通し、さらに水道水を 5L 濾過した。次にモジュール内に PET 溶液を適量加えてよく振とうし、残渣を回収した後、遠心分離によりさらに濃縮を行った。精製は PSIMS 法を用いた。同様の操作を、河川水を通していない膜（以下新膜）に対しても行い、濁質の影響を調べた。

次に、濃縮過程での回収率を評価するため、1L の試料に *Cryptosporidium* オーストまたは *Giardia* シストをそれぞれ約 10<sup>5</sup>[(oo)cysts]添加し、遠心濃縮後 PSIMS 法で精製して、FCM で計数した。

濾過過程での回収率は、上に述べた二つの手法の回収率の比をとることで評価した。また濃縮過程での回収率は、3.3.で算出した精製回収率との比で評価した。

#### 3.4.2. 濾過・濃縮過程の回収率評価結果

濾過過程での *Cryptosporidium* の回収率は、濾過後膜で 14.0%、新膜で 18.3%となった。EPA の Method 1623 で用いられている Envirochek（孔径 1 $\mu$ m, 濾過面積 1300cm<sup>2</sup>）の回収率は最大で約 70%といわれており、これと比較すると低い値となった。しかし、Envirochek は 20L の環境水からの回収に用いられているのに対し、本研究で用いた膜は最大 300L の河川水を濾過することができ、検出能力の点ではよりすぐれた手法であるといえる。

遠心分離による濃縮過程での *Cryptosporidium* の回収率は、26.7%~41.9%となった。この過程では 200mL 遠沈管での遠心を 2 回、50mL 遠沈管での遠心を 1 回行うため、遠心濃縮 1 回あたりの回収率を算出すると 64%~75%となる。

#### 3.4.3. プロセス全体の回収率評価結果

プロセス全体の回収率は、*Cryptosporidium* で 3.9%、*Giardia* で 2.7%となった。この結果より得られる *Cryptosporidium* の検出限界は、

$$\frac{100}{0.039} = 25.6 \text{ [oocysts/sample]}$$

であり、*Giardia* の検出限界は、

$$\frac{100}{0.027} = 37.0 \text{ [cysts/sample]}$$

となった。試料の量による回収率の低下はないものと仮定すると、今回の手法での検出限界の下限は、多摩川河川水の濾過において最大濾過可能量が 327.1[L]であったことから、

$$\text{Cryptosporidium} : \frac{1}{327.1 \times 0.039} \times 100 = 7.8 \text{ [oocysts/100L]}$$

$$\text{Giardia} : \frac{1}{327.1 \times 0.027} \times 100 = 11 \text{ [cysts/100L]}$$

と算出できる。この値は、Envirochek を用いた手法の *Cryptosporidium* 検出限界

$$\frac{1}{20 \times 0.2} \times 100 = 25 \text{ [oocysts/100L]}$$

と比較して低い値となっており、本手法の有用性が示されたといえる。

#### 4. 環境水からの検出

これまでに述べた手法を用いて、多摩川河川水からの *Cryptosporidium* および *Giardia* の検出を行った。また水質指標として、濁度、大腸菌群、糞便性大腸菌群の測定も行った。表 2 にモニタリングの結果および水質指標の測定結果を示す。

全てのサンプルから *Giardia* シストが検出され、その濃度は 6.2~15.9[cysts/100L] (回収率を加味すると  $2.3 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^2$  [cysts/100L])であった。また *Cryptosporidium* オーシストは、1つのサンプルから検出され、その濃度は 0.9[oocysts/100L] (同様に  $2.3 \times 10^2$  [oocysts/100L])であった。

表 2 多摩川でのモニタリング結果

実験日	天候 (前日)	天候 (当日)	濁度[NTU]	水量 [L]	TC [CFU/mL]	FC [CFU/100mL]
1211	-	晴	1.1	290.1	N.A.	N.A.
1218	-	晴	1.0	327.1	$1.6 \times 10^1$	$3.4 \times 10^2$
0129	晴	晴	4.4	69.0	$5.5 \times 10^1$	$6.8 \times 10^2$

精製手法	カウント		濃度 [(oo)cysts/100L]		回収率を加味 [(oo)cysts/100L]	
	Crypto	<i>Giardia</i>	Crypto	<i>Giardia</i>	Crypto	<i>Giardia</i>
SIMS	N.D.	18	<0.34	6.2	<8.7	$2.3 \times 10^2$
SIMS	3*	52	0.9	15.9	23	$5.8 \times 10^2$
PSIMS	N.D.	8	<1.45	11.6	<37	$4.3 \times 10^2$

※：200倍での蛍光観察のみで判定した。微分干渉像は、緩衝液の塩が析出していて確認できなかった。

N.A. : Data not Available, N.D. : Not Detected

大腸菌群、糞便性大腸菌群の濃度と *Cryptosporidium* および *Giardia* の濃度を比較すると、

*Cryptosporidium* が検出された方の試料のほうが指標の濃度が低いという結果になった。この結果は、これらの 2 つの指標が、*Cryptosporidium* および *Giardia* の指標とはなりづらいという既存の知見と一致する。

## 5. まとめ

本研究では、環境水中の *Cryptosporidium* および *Giardia* の濃度変動を評価するための、環境水中からの検出手法について検討を行った。

精製手法については、PSIMS 法を用いることにより試料中の濁質量に関係なく安定した回収率が得られることが示された。しかし、本研究で用いた MF カートリッジフィルターによる濾過、および遠心分離による濃縮過程では、既存の手法と比較して、検出限界という観点からはほぼ同等の能力を持っているといえるが、回収率を比較すると十分な結果が得られないことがわかった。この点に関しては、更なる改良が必要であると考えられる。考えられる改良法としては、濾過後の膜を逆洗し、連続遠心分離を行って濃縮する手法や、濾過膜の前にプレフィルターを設置することで、さらに大量の試料を濾過できるようにする、などが挙げられる。

本手法を用いて多摩川河川水からの検出を試みたところ、*Giardia* は全てのサンプルから検出され、その濃度は  $2.3 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^2$  [cysts/100L] であることがわかった。*Cryptosporidium* は 3 試料中 1 試料から検出され、その濃度は 23 [oocysts/100L] であった。変動を定量的に評価するには、もう少し検出限界を下げるような手法上の改良が必要であると考えられる。また、同時に測定した水質指標（濁度、大腸菌群、糞便性大腸菌群）との相関は見られなかった。

## 参考文献

- Bukhari, Z. and Smith, H.V. (1998), Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 64, Iss 11, pp 4495-4499
- CDC (1993), *Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1991-1992*, Nov. 19, 1993 / Vol.42 / No.SS-5
- CDC (1996), *Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1993-1994*, Apr. 12, 1996 / Vol.45 / No.SS-1
- CDC (1998), *Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1995-1996*, Dec. 11, 1998 / Vol.47 / No.SS-5
- CDC (2000), *Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1997-1998*, May 26, 2000 / Vol.49 / No.SS-4
- Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B. and Lele, S. (2001), The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994, *American Journal of Public Health*, Vol 91, Iss 8, pp 1194-1199
- Gibson III, C.J., Stadterman, K.L., States, S. and Sykora, J. (1998), Combined sewer overflows: a source of *Cryptosporidium* and *Giardia*?, *Water Science and Technology*, Vol. 38, No. 12, pp. 67-72
- Hashimoto, A. and Hirata, T. (1999), Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Sagami river, Japan, Conference preprint of Asian Waterqual '99: 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference, Vol.2, pp.956-961
- McCuin, R.M., Bukhari, Z., Sobrinho, J. and Clancy, J.L. (2001), Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation, *Journal of Microbiological Methods*, Vol 45, Iss 2, pp 69-76
- Ohgaki S., Y. Masago, H. Katayama, T. Hirata, A. Hashimoto and M.Z.B. Alam (2001) Quantitative Risk Assessment of *Cryptosporidium* in a Watershed, *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology* edited by Matsuo et.al.,pp 91-99
- Ono, K., Tsuji, H., Rai, S.K., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T. and Uga, S. (2001), Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 67, Iss 9, pp 3832-3836
- Rose, J.B., Daeschner, S., Easterling, D.R., Curriero, F.C., Lele, S. and Patz, J.A. (2000), Climate and waterborne disease outbreaks, *Journal American Water Works Association*, Vol 92, Iss 9, pp 77-87
- U.S. EPA (1999a), Method 1622: *Cryptosporidium* water by Filtration / IMS / IFA
- U.S. EPA (1999b), Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration / IMS / IFA
- 厚生労働省 (1997), クリプトスポリジウム等の水道水源における動態に関する研究報告書, 厚生科学研究
- 厚生労働省 (1996, 1998), 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針
- 八木 正一, 中西 正治, 小田 琢也, 山本 稔, 井上 亘 (2001), クリプトスポリジウム試験分離精製操作法の比較検討, 第 52 回全国水道研究発表会梗概集, pp.628 - 629.
- 埼玉県衛生部 (1997), 「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