

表 2 Nested PCR および PCR-DGGE 法の PCR 条件

Sequences of Primers			
18SiF	AG TGA CAA GAA ATA ACA ATA CAG G		
	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG -		
18SiF - GC	GGG GCA CGG GGG GAG TGA CAA GAA ATA -		
	ACA ATA CAG G		
18SiR	CCT GCT TTA AGC ACT CTA ATT TTC		
Polymerase		PCR mix	
Taq Gold	Polymerase	2.5	U
PCR cycles		10 × PCR buffer	5 μL
No. of cycles	30 cycles	dNTP	200 nM each
Hot start	94°C, 5 min.	Mg ²⁺	2 mM
Denaturing	94°C, 30 sec.	Forward primer	500 nM
Annealing	60°C, 30 sec.	Reverse primer	500 nM
Extension	72°C, 30 sec.	Total volume	50 μL
Final extension	72°C, 5 min.		

精製した DNA を、GC クランプを含まないプライマーを用いた PCR (表 2) により再増幅した。得られた PCR 産物を Montage PCR μ 96 プレート (Millipore) で精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いたシーケンシング反応を行った。反応後の液を Montage SEQ プレート (Millipore) で精製してシーケンシング (ABI 3100 (Applied Biosystems)) に供した。

C-3 測定した水質項目

化学指標として、全有機炭素 (TOC)、溶存有機態炭素 (DOC)、硝酸態窒素 (NO₃-N)、亜硝酸態窒素 (NO₂-N)、アンモニア態窒素 (NH₄-N)、リン酸態リン (PO₄-P)、紫外線 (波長 260nm) 吸光度 (E260) を測定した。微生物指標として、大腸菌群 (TC)、糞便性大腸菌群 (FC)、大腸菌 (*E. coli*) およびウェルシュ菌芽胞 (AS) を測定した。

濁度は、利根大堰で 1 時間おきに測定されたデータを、国土交通省の水文・水質データベース (<http://www1.river.go.jp/>) から取得した。また別に、実際に測定を行った試料の濁度も測定し、国土交通省のデータと比較して、採取した試料が利根川の水質を代表しうるものとなっていることを確認した。

降水量は、利根大堰では測定していないため、気象庁のアメダスのデータを「電子閲覧室」ウェブサイト (<http://www.data.kishou.go.jp/>) から取得した。利根大堰の降水量として、すぐ上流に位置する藤岡 (群馬県藤岡市) の測定値を用いた。また、上流域の降水量として、水上 (群馬県水上町) と万場 (群馬県神流町) の測定値を用いた。

C-4 測定項目の濃度変動の評価

水質変動は、その時間周期によってその要因や特徴が異なる。今回の現地調査では、主に次の二つの濃度変動について調査を行った。

季節変動：現地調査期間（12ヶ月間）全体を通じた濃度変動

時間変動：1回の試料採取で得られた8試料（およそ24時間分）の中での濃度変動

前者については、各試料採取で得られた8試料をひとまとめにして、各月の結果を比較することで評価した。後者については、8試料の測定値の分散や変化の様子を評価した。この場合、試料採取日がどのような特徴を持っているかにより、測定日を分類しておくことが必要である。本調査では、主に降雨による濃度変動を評価することを目的としているため、測定日前後の降雨の有無により、測定日を以下のように分類した。

降雨時：5月18～19日（降雨後）、6月21～22日（降雨初期）

晴天時：その他

C-5 水質項目の指標性の検定

測定試料を、クリプトスポリジウム検出の有無で分け（以下検出群、非検出群と呼ぶ）、それぞれの群における、各項目の測定値の平均値の差を以下の手順で評価した。微生物指標については、測定値の対数を用いて評価を行った。

全ての群に対して1サンプルのKolmogorov-Smirnov検定を行い、各群の測定値が正規分布に従うかどうかを検定した。次に、検出群・非検出群の双方において正規分布から外れているとはいえなかった測定項目に対しては、パラメトリックな手法（F検定、t検定）により、母平均に差が見られるかどうかを検定した。どちらか一方でも正規分布から外れていた測定項目に対しては、ノンパラメトリックな手法（Mann-WhitneyのU検定）で分布の差を検定した。

C-6 複数の水質項目の同時利用によるクリプトスポリジウムの有無の判定

複数の指標を同時に用いることで、クリプトスポリジウムの有無を判定できるかを、判別分析により調査した。計算にはSPSS Ver. 11.0（SPSS）を用いた。判別係数はマハラノビスの汎距離を用いて算出し、ステップワイズ法により変数の選択を行った。ステップワイズ法における変数の取捨の判定には、F値の有意確率を用いた（選択時 $p=0.05$ 、削除時 $p=0.10$ ）。分析に際し、微生物指標については、測定値の常用対数を用いた。

D. 結果

D-1 当該期間の濁度および降水量

この12ヶ月間の総降水量は1,105[mm]で、平年値（1,099[mm]）とほぼ同じであった。しかし、2004年10月に402[mm]の雨が集中して降り、他の月（特に夏季）は例年を下回るという特徴が見られた。10月に多量の雨をもたらしたのは、10月9日に台風22号（Ma-on）、10月21日に台風23号（Tokage）がこの地域に接近したことによる、それぞれ142[mm]、109[mm]の激しい降雨である。また、10月3日から5日にかけて、台風によるものではないが、3日間で合計115[mm]の激しい降雨が観測された。

濁度の1日平均値が100[度]を越えたのは合計7日間であった。先に述べた10月の台風22号（10月8日、9日）、23号（10月20日）および10月初旬の大雨（10月5日）に加え、5月20日には台風2号（Nida）、

9月5日には台風18号(Songda)の影響を受けて、濁度が激しく上昇した。12月16日にも同様の濁度上昇が観測されたが、これに関しては、その原因はわからなかった。

D-2 利根川水系における現地調査結果

図3に、利根大堰でのモニタリングで得られた測定結果(一部)を示す。

Nested PCR法によるクリプトスポリジウム検出の結果、利根大堰の94試料中33試料(陽性率35%)、小山川の18試料中12試料(同67%)からクリプトスポリジウムが検出された。検出された全ての試料をDGGE-Sequencingに供した結果、利根大堰、小山川合わせて、12種類の種・遺伝子型(*C. parvum* IOWA(AF164102)、*C. parvum* KSU-1(AF308600)、*C. hominis*(AY204231)、*C. andersoni*(AB089285)、*C. felis*(AF159113)、*C. baileyi*(L19068)、*C. sp.* 944(AY382170)、*C. sp.* 938(AY120913)、*C. sp.* PG1-26(AY204231)、*C. sp.* PG1-26の近縁種、*C. sp.* 6876(AY504514)の近縁種、*C. sp.* 1665(AY120915)の近縁種)が検出された。両河川ともに、最も頻繁に見られたのは*C. andersoni*(利根大堰17試料、小山川7試料)であった。利根大堰では、以下*C. parvum* IOWA isolate(13試料)、*C. baileyi*(9試料)の順となった。一方、小山川では、*C. sp.* strain 938(4試料)、*C. parvum* IOWA isolate(3試料)の順となり、利根大堰で頻繁に見られた*C. baileyi*は検出されなかった。ヒトに特異的に感染する*C. hominis*は、小山川の1試料からのみ検出された。両河川から検出された種・遺伝子型は、検出頻度の低い種・遺伝子型に多少違いが見られたものの、それほど差は見られなかった。

ヒトへの感染が報告されている種・遺伝子型の中では、*C. parvum* IOWA株(AF164102)、*C. parvum* KSU-1株(AF308600)、*C. hominis*(AY204231)、*C. felis*(AF159113)の3種・4遺伝子型が検出された。クリプトスポリジウムが検出された試料の中で、これらの種・遺伝子型を含んでいたのは、利根大堰の試料で16%(94試料中15試料)、小山川の試料では22%(18試料中4試料)であった。

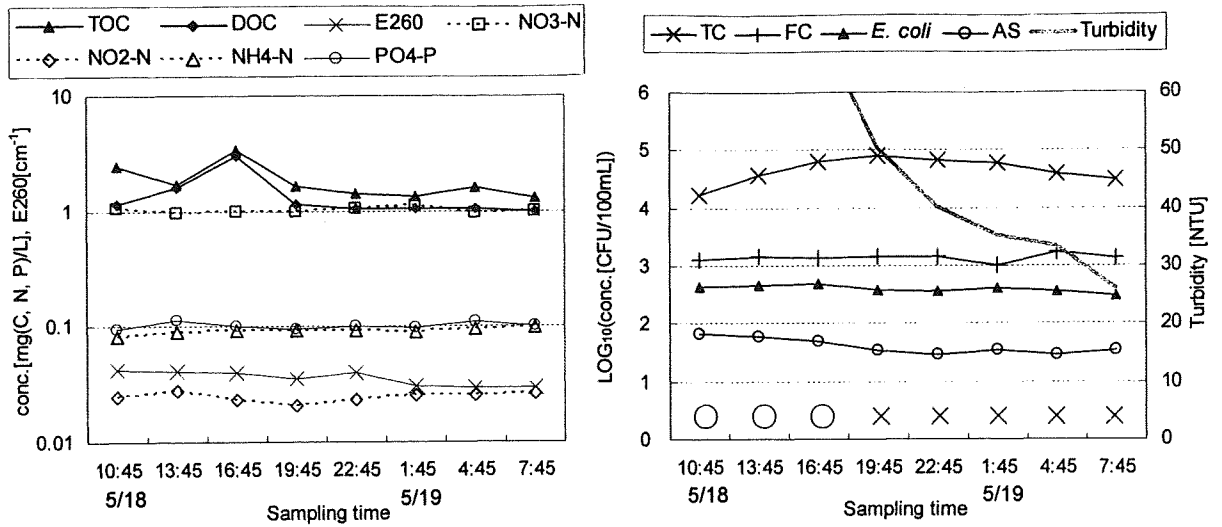
D-3 測定値の季節変動

(1) クリプトスポリジウムの定量結果

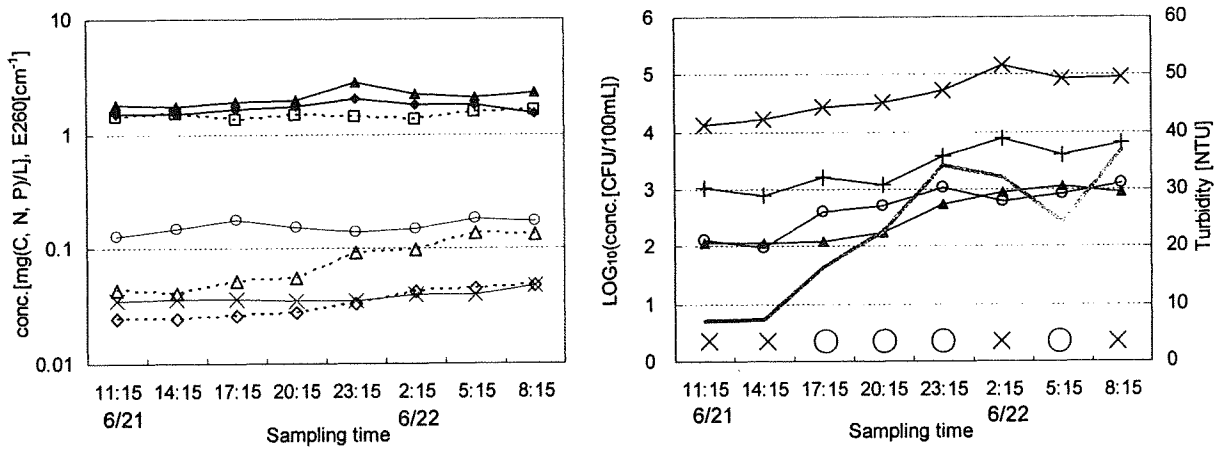
月毎のクリプトスポリジウムの検出頻度(図4)を見ると、12月~8月の試料では多くても8試料中2試料から検出される程度であったのに対し、9月~11月には、検出率がそれぞれ8試料中5試料、8試料中8試料、8試料中7試料と非常に高かった。また1試料中の検出数も、他の月では全ての試料が定量下限以下であったのに対し、10月の7試料、11月の5試料で定量下限(2.5[oocysts/sample])以上の定量値がみられた。今回用いた手法は、検出だけであれば1[oocyst/PCR tube]からでも可能であることを考えると、12月~8月はおおよそ1[oocysts/100L]以下であったのに対し、10月、11月は 10^1 [oocysts/100L]オーダーであり、他の月と比較して十~数十倍程度濃度が高かったといえる。一ヶ月の中の1日だけの値を用いて議論しているため、必ずしも今回の定量結果がそれぞれの月を代表しているとはいえないが、9~11月の3回連続して濃度が高い傾向が見られたことから、クリプトスポリジウムは、秋に高濃度で存在する可能性が高いといえる。

(2) 検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型

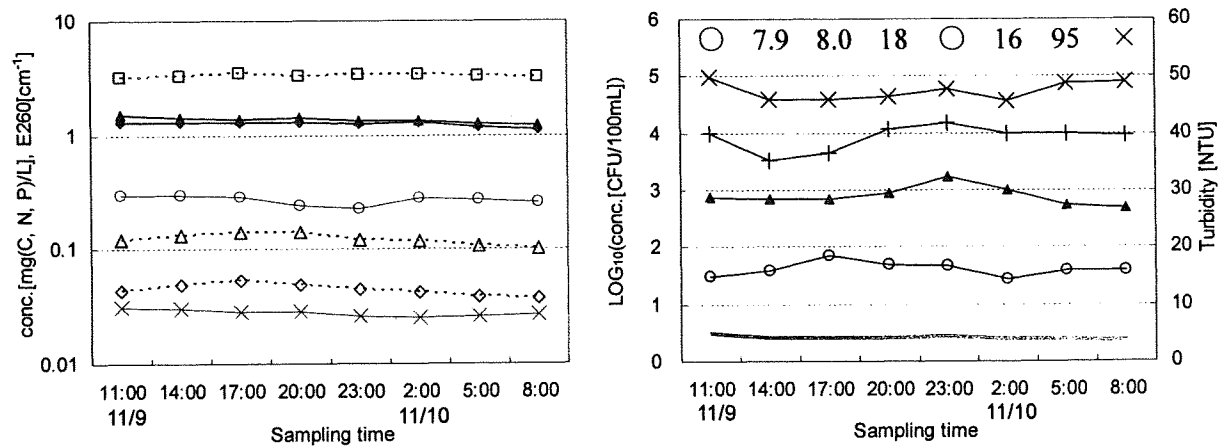
表3は、それぞれの試料採取で得られた8試料のうち、どの種・遺伝子型がいくつの試料に含まれていたかを調べたものである。



(a) 5月18~19日



(b) 6月21~22日



(c) 11月9~10日

図3 利根大堰試料の測定結果

(左：化学指標、右：微生物指標、濁度、クリプトスポリジウム)

クリプトスポリジウムの測定結果

×：非検出、○：検出（定量下限以下）、数値：定量値 [oocysts/100L]（定量下限以上）

表3 試料採取ごとの検出数 (1回あたりの測定試料数：利根川 (上段) 8 試料)、小山川 (下段) 4 試料

	12/25	01/13	03/09	04/12	05/18	06/21	07/13	08/02	08/25	09/15	10/26	11/09
<i>C. andersoni</i> (AB089285)	17				1					1	8	7
<i>C. parvum</i> IOWA (AF164102)	13			1	3	4	2		1	2		
<i>C. baileyi</i> (L19068)	9										3	6
<i>C. parvum</i> KSU-1 (AF308600)	7			2	3	2						
<i>C. sp.</i> 938 (AY120913)	4			1	1			1				
<i>C. sp.</i> PG1-26 (AY204231) 近縁種	3										3	
<i>C. sp.</i> 1665 (AY120915) 近縁種	1											1
<i>C. sp.</i> 6876 (AY504514) 近縁種	2											2
<i>C. felis</i> (AF159113)	1							1				
<i>C. sp.</i> PG1-26 (AY204231)	0											
<i>C. sp.</i> 944 (AY382170)	0											
<i>C. hominis</i> (AY204231)	0											
総検出数 (8 試料中)	33	0	0	0	0	4	2	1	1	5	8	7
<i>C. andersoni</i> (AB089285)	7								1	2	4	
<i>C. parvum</i> IOWA (AF164102)	3						1			1	1	
<i>C. baileyi</i> (L19068)	0											
<i>C. parvum</i> KSU-1 (AF308600)	1						1					
<i>C. sp.</i> 938 (AY120913)	4							2		1	1	
<i>C. sp.</i> PG1-26 (AY204231) 近縁種	0											
<i>C. sp.</i> 1665 (AY120915) 近縁種	1											1
<i>C. sp.</i> 6876 (AY504514) 近縁種	0											
<i>C. felis</i> (AF159113)	0											
<i>C. sp.</i> PG1-26 (AY204231)	1									1		
<i>C. sp.</i> 944 (AY382170)	1						1					
<i>C. hominis</i> (AY204231)	1							1				
総検出数 (4 試料中)	12	0	0	1	2	1	2	1	1	4	4	

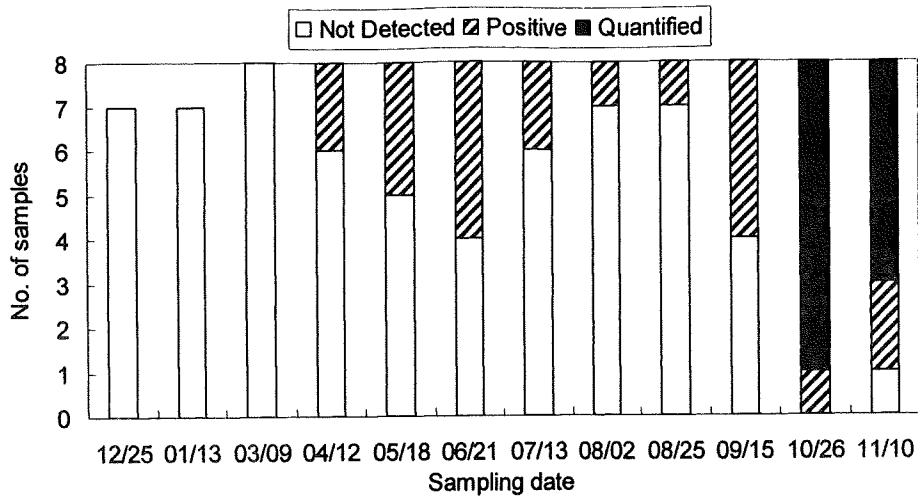


図4 各試料採取日のクリプトスポリジウムの検出状況

(Not Detected : 陰性、Positive : 陽性 (定量下限以下)、Quantified : 陽性 (定量範囲内))

ウシに特異的に感染する *C. andersoni* は、全検出数 17 のうち 15 試料が 10 月と 11 月に集中していた。また、鳥類に特異的に感染する *C. baileyi* も、検出された 9 試料がいずれも 10 月 (3 試料)、11 月 (6 試料) であった。以上から、これらの種は、これらの月に特異的に出現した種であるといえる。一方、一般に水中のクリプトスポリジウムの多くを占めると考えられてきた *C. parvum* は、*C. parvum* IOWA isolate が 4 月から 9 月にかけて、また *C. parvum* KSU-1 isolate は 4 月～6 月の試料から検出されたが、他の季節には全く検出されなかった。

10 月および 11 月の試料において、これまで報告されているどの種にもあてはまらない遺伝子配列が 3 種類見られた。いずれの配列も、既存の遺伝子配列から 6～8 塩基異なっていた。今回増幅した領域における、*C. parvum* と *C. hominis* の塩基配列の違いが 7 塩基であることを考えると、これらは、新しい種である可能性がある。

(3) 化学指標

窒素の各項目 (硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アンモニア態窒素) は、秋～冬季に濃度が高くなる傾向が見られた。この傾向は、特に亜硝酸態窒素で顕著であった。TOC は、調査初期 (2003 年 12 月、2004 年 1 月) にのみ高い濃度を示し、あとの試料では低かった。リン酸態リンはこのような傾向を見せなかった。

(4) 微生物指標

大腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌の 3 項目は、春季 (3 月、4 月) に濃度が低く、秋～冬季 (12 月～1 月、10 月～11 月) に高いという傾向が見られた。クリプトスポリジウムおよびジアルジアが高頻度で検出された 5 月、6 月、10 月、11 月に高い濃度となっており、病原微生物のよい指標となっている可能性がある。また、クリプトスポリジウムが検出されなかった 12 月の結果を見ると、大腸菌群および糞便性大腸菌群は高濃度になっていたのに対し、大腸菌は低濃度のままであったことから、大腸菌は、クリプトスポリジウムの指標として、他の微生物指標より優れている可能性がある。

嫌気性芽胞は、年間を通して $10^1\sim 10^2$ [CFU/100mL]のオーダーで安定しており、季節変動は見られなかった。

D-4 測定値の時間変動

(1) 晴天時の時間変動

・炭素系項目（全有機炭素、溶存有機炭素、紫外吸光度）

12月と3月の測定値を除いて、TOCのCV値が20%以下であり、あまり日内変動は見られなかった。DOCおよびE260はほとんど変動しなかった（CV値10%以下）。比較的日内変動が大きかった12月と3月のTOCについても、3月のDOCのCV値が8.2%と非常に低かったことを考えると、いくつかの試料において、濁質の混入によりTOCの測定値が大きくなってしまったためと考えられる。

・窒素系項目（硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アンモニア態窒素）、リン酸態リン

12月のアンモニア態窒素の測定値で大きな日内変動が見られた以外は、ほとんどの項目でCV値は20%以下であった。12月のアンモニア態窒素の測定値は、値自体も他と比較して高かった。硝酸態窒素の変動と比較して、残りの3項目の変動が大きかったが、これは、測定値自体が小さく、測定誤差が大きく影響したものと考えられる。

・微生物指標

化学指標と比較して大きな変動が見られたが、それでも2~3倍の範囲内に収まっていた。1月の測定値で多少増加傾向が見られた他は、値は安定していた。

(2) 降雨初期（6月21~22日）の濃度変動（図3（b））

・降水量、濁度

この日は、試料採取中に、降雨が観測された。藤岡でも、16時から19時までの3時間に、6[mm]の降雨を記録した。上流部でも、ほぼ同じ時間帯に、水上で24[mm]、万場で27[mm]の降雨をそれぞれ観測した。この降雨により、利根大堰では17時ごろから濁度が上昇し、試料採取開始時（6月21日午前11時45分）には10[NTU]以下であったのが、試料採取後期（6月22日深夜~朝）には30[NTU]前後まで上昇した。

・各種水質指標

化学指標では亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素がそれぞれ約2倍、3倍に増加した。微生物指標は、それぞれ数倍~10倍程度増加した。それぞれ濁度の上昇と同じタイミングで発生した。

・病原微生物

濁度が上昇し始めた時に、それまでの2試料では非検出であったクリプトスポリジウムが検出され始め、後半6試料中4試料で陽性となった（表5-8）。しかし定量可能な濃度域までは増加しなかったため、どの程度の濃度変化があったかはわからなかった。ジアルジアは、最初の2試料しか得ることができず、共に非検出であった。

(3) 降雨後 (5月18~19日) の濃度変動 (図3 (a))

・降水量、濁度

試料採取の2日前に、流域全体で降雨が観測され、それにより濁度の上昇が起きていた。藤岡では、5月16日に12[mm]の降雨が観測され、また上流部の水上で16[mm]、万場で12[mm]の降雨が観測された。また、水上では、翌17日にも21[mm]の降雨を記録した。この降雨により濁度が上昇した(利根大堰のデータは欠測)あと、下降し始めたときに採取されたのがこの日の試料である。

・各種水質指標

濁度が50[NTU]を超えていた前半4試料において、炭素系項目(TOC、DOC、E260)の値が高く、またばらつきも大きかった。しかし、降雨初期に濁度上昇と共に上昇した亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素は、低い値で安定していた。また、微生物指標は、降雨初期ほどの激しい変動はなかったものの、嫌気性芽胞の値がこの期間中に約半分になった。大腸菌群は、期間前半で増加したのち減少するという、他とは違った変化を見せた。

・病原微生物

病原微生物の測定結果を見ると、クリプトスポリジウムは高濁時の3試料から検出され、残りの5試料は非検出であった。これは、降雨初期に得られた結果と一致した。ジアルジアは、濁度が低下した後半3試料からのみ検出され、高濁時の試料からは検出されなかった。

この時期に検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型(表3)は、この季節に通常見られるもの(*C. parvum* IOWA 株およびKSU-1株)と変わらなかった。これは、洪水時には、通常見られない野生株が多く見られたという既存の研究例(Xiao *et al.*, 2001)とは異なる結果であった。

D-5 水質項目の指標性評価

8つの水質指標($\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、TOC、DOC、 $\log(\text{TC})$ 、 $\log(\text{FC})$ 、 $\log(E. coli)$)で、各群の平均値に有意な差が見られた。しかし、TOCについては、非検出群の方が検出群よりも平均が高く、指標として意味のある差ではなかったため、以下の考察からは除外した。

濁度については、降雨時にはクリプトスポリジウムと同じ挙動を示したにもかかわらず、有意な差が見られなかった。これは、濁度の低い晴天時にも、クリプトスポリジウムが検出されている(特に9~11月)のと、降雨後のデータ(5月、図3(a))において、濁度の降下と共にクリプトスポリジウムが検出されなくなったものの、その時点での濁度はまだ30[NTU]であり、晴天時と比較するとかなり高い値であったことが要因と考えられる。

化学指標では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、TOC、DOCで有意差が見られた。処理が不十分な下水(あるいは浄化槽)処理水や畜舎排水は、クリプトスポリジウムと共にこれらの項目の濃度も高いと予想されるため、理論的に見てもある程度の裏付けが可能である。

微生物指標では、大腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌で有意差が見られた。これらは全て糞便汚染の指標であり、クリプトスポリジウムがヒト、あるいは家畜の糞便をその起源とすることを考えても納得できる結果であった。しかし、これまでの知見で、他の微生物指標よりも相関が高いとされていた嫌気性芽胞では、有意な差が見られなかった。これは、嫌気性芽胞の測定値が、クリプトスポリジ

ウムの検出・非検出に関わらずほとんどばらつきがなく、検出手法（50mL法）の下限付近で安定していたため、指標そのものの定量性が低かったことが原因として考えられる。

D-6 複数の水質項目の利用によるクリプトスポリジウムの有無の推定

判別分析の結果、有効な変数として、硝酸態窒素、濁度の2つが選ばれた。硝酸態窒素は、前節の解析において、検出群と非検出群との間に平均値の差が見られた指標であったが、濁度は有意差が見られない指標であった。図5に、これら2種類の指標とクリプトスポリジウムの検出／非検出の関係、並びに判別分析により得られた境界線を示す。硝酸態窒素濃度または濁度が高い時（図5の境界線の右側）に、クリプトスポリジウムが高頻度で検出されていることがわかる。

前節で行った濃度変動の評価結果を併せて考えると、硝酸態窒素は、主に10月や11月のような、糞便汚染が激しい時のクリプトスポリジウム濃度上昇を反映するために選択されたと考えられる。一方、濁度は、5月や6月に見られたような、降雨初期や降雨後の試料におけるクリプトスポリジウム濃度変動を反映するために選択されたと考えられる。

この分析では、微生物指標は選択されなかった。これらの指標自身の変動しやすいものであり、他の値を指標するには不向きであることと、今回選択された硝酸態窒素と濁度が持つ変動要因を併せ持つような変動を示すと考えられるため、それぞれの要因を独立に示している指標と比較して選択されづらかったことが理由として考えられる。

E. まとめ

様々な要因で引き起こされるクリプトスポリジウム濃度の変動を、その変動の時間スケールを考慮に入れた手法で定量的に評価し、その要因を明らかにするため、利根川にて現地調査を行った。

1時間単位で採水間隔を制御でき、自動的にクリプトスポリジウム測定用の試料を8試料採取する装

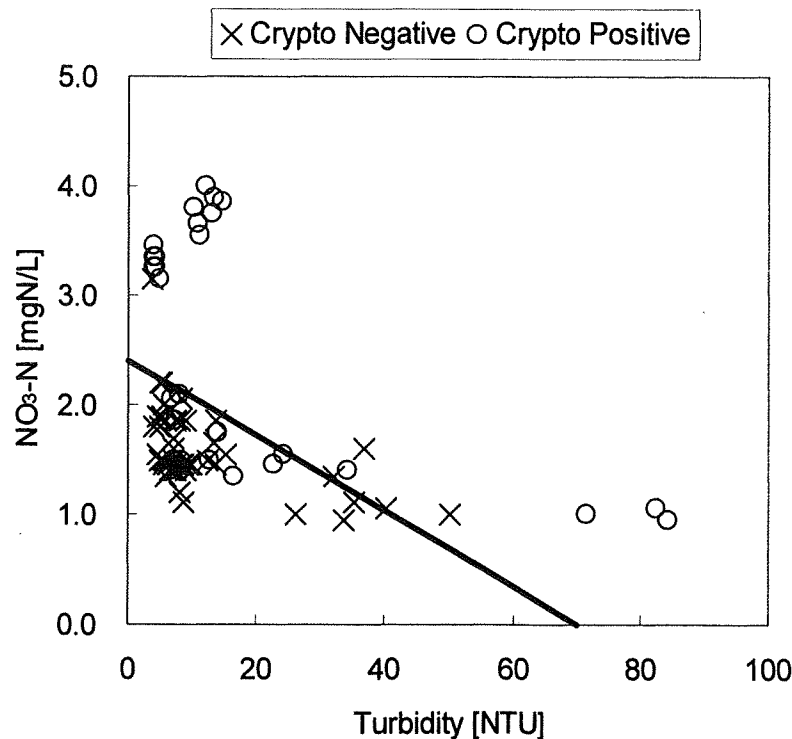


図5 判別分析の結果

置を開発した。その装置を用いて試料を採取し、利根川およびその支流である小山川の両河川水中のクリプトスポリジウム濃度を測定した。

クリプトスポリジウムは、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35% (94 試料中 33 試料)、67% (18 試料中 12 試料) であった。検出濃度の最大値はそれぞれ 95 [oocysts/100L]、58 [oocysts/100L] であった。また、利根川、小山川を合わせて、12 種類の種・遺伝子型 (*C. parvum* IOWA、*C. parvum* KSU-1、*C. hominis*、*C. andersoni*、*C. felis*、*C. baileyi*、*C. sp.* 938、*C. sp.* 944、*C. sp.* PG1-26、*C. sp.* PG1-26 の近縁種、*C. sp.* 6876 の近縁種、*C. sp.* 1665 の近縁種) が検出された。このことから、QProbe PCR 法による水中のクリプトスポリジウム検出手法は、実河川を対象とした測定に十分適用可能であり、これまでに開発された手法では不可能であった、試料水中のクリプトスポリジウムの量と種・遺伝子型の両方を同時に得ることができる。

利根大堰で検出されたクリプトスポリジウムの季節変動を見ると、2004年9～11月の濃度が、他の時期の濃度と比較して約十～数十倍であり、この時期の利根川河川水が高濃度のクリプトスポリジウムにより汚染されている可能性があることが示した。しかし、検出された種・遺伝子型を見ると、2004年10月～11月に検出されたクリプトスポリジウムは、全てヒトに対する感染例が報告されていない種 (*C. andersoni*、*C. baileyi*、*C. sp.* PG1-26 の近縁種、*C. sp.* 6876 の近縁種、*C. sp.* 1665 の近縁種) であった。したがって、この2ヶ月間の高い濃度は、ヒトへのリスクを評価するときには除外されなければならない。

また、ヒトへの感染力がある種に注目すると、両河川を併せて3種、4遺伝子型 (*C. parvum* IOWA、*C. parvum* KSU-1、*C. hominis*、*C. felis*) が検出された。その中でも、*C. hominis* と *C. felis* は、それぞれ1試料ずつから検出されただけであり、*C. parvum* の2種類の遺伝子型が突出して多く検出された。利根大堰において、これらの種・遺伝子型が検出された季節を見ると、全て4月～9月に集中していた。*C. parvum* と *C. andersoni* が検出され、国内におけるヒトのクリプトスポリジウム症の要因として多数を占める *C. hominis* (Yagita *et al.*, 2001) がほとんど検出されなかったことから、この地域のクリプトスポリジウムの汚染源はウシである可能性が高いといえる。

クリプトスポリジウム濃度の時間変動について調査した結果、定量値が多く得られた2004年10月および11月の測定結果を見ると、水中のクリプトスポリジウム濃度は、試料採取の時間間隔である3時間の間に、最大で10倍程度のばらつきが持つことがわかった。この変動幅は、同じ日に採取したジアルジアと同程度であり、微生物指標の変動幅よりも大きかった。このことから、水中の病原微生物は、微生物指標と比較して、より大きな変動を持っていることが示された。このことが、これまでのところ有効な指標微生物が見られない要因の1つであると考えられる。

降雨によって引き起こされる時間レベルの濃度変動に着目すると、雨天時に採取した2回 (5月、6月) のデータを見ると、降雨に伴い濁度が上昇しているときに、クリプトスポリジウムが検出される傾向が見て取れた。この結果は、これまで疫学調査等で得られていた知見の証左となると思われる。

<参考文献>

- Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B., Lele, S. (2001). The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *American Journal of Public Health*, 91(8):1194-1199.
- Kistemann, T., Claßen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V., Exner, M. (2002). Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5):2188-2197.

- Masago, Y., Katayama, H., Hashimoto, A., Hirata, T., Ohgaki, S. (2002). Assessment of risk of infection due to *Cryptosporidium parvum* in drinking water. *Water Science and Technology*, 46(11-12):319-324.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A. and Thompson, R.C.A. (1997). Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *Journal of Parasitology*, 83(5):825-830.
- Rose, J.B., Daeschner, S., Easterling, D.R., Curriero, F.C., Lele, S., Patz, J.A. (2000). Climate and waterborne disease outbreaks. *Journal American Water Works Association*, 92(9):77-87.
- USEPA (1999a). USEPA Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/IFA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC EPA 821-R-98-010.
- USEPA (1999b). USEPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/IFA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA 821-R-99-006.

真砂 佳史, 片山 浩之, 大垣 眞一郎 (2002), 大容量の河川水からの *Cryptosporidium* および *Giardia* の濃縮・精製手法の検討, 第 53 回全国水道研究発表会梗概集, 632-633.

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, 628-629.

F. 研究発表

F-1 論文発表

Y. Masago, K. Oguma, H. Katayama, T. Hirata and S. Ohgaki (2004); *Cryptosporidium* monitoring system at a water treatment plant based on waterborne risk assessment, *Water Science and Technology*, Vol. 51, Iss. 1, pp. 293-299.

真砂 佳史, 小熊 久美子, 片山 浩之, 大垣 眞一郎 (2004); 消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による水中のクリプトスポリジウムの定量および種別判定手法の開発, 環境工学研究論文集, Vol. 41, pp. 311-319.

F-2 口頭発表

真砂 佳史, 小熊 久美子, 片山 浩之, 大垣 眞一郎、環境水中の病原性微生物の濃度変動測定手法の開発、平成 16 年度土木学会全国大会第 59 回年次学術講演会、愛知、2004 年 9 月

真砂 佳史, 小熊 久美子, 片山 浩之, 大垣 眞一郎、消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による水中のクリプトスポリジウムの定量および種別判定手法の開発、第 41 回環境工学研究フォーラム、宮崎、2004 年 11 月

F-3 ポスター発表

Y. Masago, K. Oguma, H. Katayama and S. Ohgaki; Temporal Concentration Variability of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Tama River, Japan, 2nd Asia Conference on Ultraviolet Technologies for Environmental Applications, October 2004.

分担研究報告書 7

流域の地理情報にもとづいた水道水源（河川）における

病原微生物濃度の予測

分担研究者 大村達夫

研究協力者 渡部 徹

流域の地理情報にもとづいた水道水源（河川）における病原微生物濃度の予測

分担研究者：大村達夫（東北大学大学院工学研究科土木工学専攻）
協力研究者：渡部 徹（東北大学大学院工学研究科土木工学専攻）

研究要旨

本研究では、河川流域における水利用システムにおける病原微生物（クリプトスポリジウム）感染リスクを評価するために、流域の地理情報（人口、年齢構成、土地利用、上下水道施設の配置等）から、病原微生物の発生と挙動を予測するためのモデルを開発することを目的とする。本年度は、阿武隈川流域を対象流域として、土地利用にもとづいた流出解析モデルの構築を行った。解析は3次メッシュを基準とし、メッシュ間での水の流出方向は、隣接する上下左右の4メッシュの中で標高の勾配が最も大きくなる方向を選び、その方向にのみ流出が発生することとした。土地利用のメッシュデータについては、5種類（水田、畑地、山地、都市、水域）に分類し解析を行った。流出量の計算においては、平面方向にはメッシュ型、鉛直方向には二層型を用いたメッシュ型二層流出モデルを適用した。表層については粗度係数と傾斜を考慮した Kinematic wave model、第二層については線形滞留モデルをそれぞれ採用した。病原微生物負荷源として、阿武隈川中流域に位置する下水処理場を取り上げ、下水処理水放流点から約40km下流に位置する福島市において流量とクリプトスポリジウム濃度をそれぞれ評価した。2001年の降水量データを用いて流出解析を行った結果、福島市における河川流量の実測値を（冬季を除き）再現することができた。また、福島市における阿武隈川のクリプトスポリジウム濃度については、流量に応じて変化が見られるが、平均で0.01個/Lと算出された。

A. 研究目的

本研究では、流域の水循環利用システムにおける病原微生物（クリプトスポリジウム）の発生や挙動の予測を通じて、水道水起因の感染リスクを評価するためのモデルを構築することを目的としている。昨年度は、水中の病原微生物との接触機会が増加することが予想される、渇水時の下水処理水再利用を対象に、感染リスク評価モデルを開発した。しかしながら、水道水源（河川）における病原微生物の存在量が不明であったため、信頼性の高いリスク評価結果を得ることができなかった。

そこで、平成16年度からは、水道水源における病原微生物の存在量を明らかにするため、流域の地理情報（人口、年齢構成、土地利用、上下水道施設の配置等）にもとづいて、病原微生物の発生と挙動を予測するためのモデルを開発することを目指す。本年度はその手始めとして、土地利用にもとづいた流出解析モデルの構築を主に行った。

B. モデル化の方法

B-1. メッシュデータの処理

本研究では、阿武隈川流域を対象流域として設定し、国土交通省が提供している国土数値情報から、標高・傾斜度メッシュ（G04-56M_07）と土地利用メッシュ（L03-09M-07）を利用した。標高・傾斜度メッシュは、3次メッシュ（2万5千分の1の地形図の1/10細分区画、約1km×1km）の1/4細分区画まで整備されているのに対し、土地利用メッシュは、3次メッシュの1/10細分区画で整備されている。メッシュサイズが小さすぎる場合は、莫大な計算時間や、記憶容量の不足が考えられ、逆に、メッシュサイズが大きすぎる場合は、流出計算において、誤差の増大や、細部の出力を把握できない場合がある。したがって、本対象流域がおおよそ5,400km²と広いことと解析目的を考慮して、本研究では、3次メッシュ（総メッシュ数6,000）で解析を行った。

メッシュ間での水の流出方向は、標高・傾斜度メッシュから得られる標高データをもとに、隣接する上下左右の4メッシュの中で、標高の勾配が最も大きくなる方向を選び、その方向にのみ流出が発生することとした。

土地利用のメッシュデータについては、11種類に分類される土地利用を同一流出特性のものどうしをまとめ、以下

の5種類に再分類¹⁾し解析を行った。

- 分類1 (水田) 田
- 分類2 (畑地) その他の農用地
- 分類3 (山地) 森林・荒地・ゴルフ場
- 分類4 (都市) 建物用地, 幹線交通要地・その他の用地
- 分類5 (水域) 河川地及び湖沼・海浜・海水域

後述するように, 上記の5分類ではそれぞれ粗度が異なり, 土地利用は流出解析における主要な因子とみなせる。

B-2. 降水

降水データは, 雨量年表 (国土交通省河川局, 2001年) から得た雨量観測地点における日降水量[mm]を用いた。各メッシュにおける降水量は, そのメッシュから最も近い3つの雨量観測地点における降水量から, それぞれの観測地点までの距離を基準とした重み付き平均値として計算した。

B-3. 流出水量

平面方向にはメッシュ型, 鉛直方向には二層型を用いて流域特性を3次的に表現するメッシュ型二層流出モデルを適用する。表層については Kinematic wave model を採用し, 粗度係数と傾斜を考慮した次式により, 流出量を計算した。

$$\frac{\partial h}{\partial t} + \frac{\partial q}{\partial x} = r(x,t) \quad \dots (1)$$

$$q = \alpha h^m \quad \dots (2)$$

ここに, h : 水深, q : 単位幅あたりの流量[L²T⁻¹], r : 単位幅あたりの横流入量[L³T⁻¹], t : 時間[T], x : 斜面における流下方向距離[L], α, m : それぞれ流れの抵抗に関する定数で, 以下のように示される。

$$\alpha = \frac{\sqrt{\sin\theta}}{n}, \quad m = \frac{5}{3} \quad \dots (3)$$

なお, θ : 斜面または河道勾配[-], n : 粗度係数[L^{-1/3}T]である。粗度係数は土地被覆状態に基づいて修正した。すなわち, 土地利用ごとに設定した各係数に面積率を乗じることにより算定した。

$$n_i = \frac{\sum n_k A_k}{A} \quad \dots (4)$$

なお, n_i : メッシュ i の粗度係数[L^{-1/3}T], n_k : 土地利用 k の粗度係数[L^{-1/3}T] (表1), A_k : 土地利用 k の面積[L²], A : メッシュの面積[L²]である。

表1. 土地利用別の粗度係数

土地利用	粗度係数[m ^{-1/3} s]	
山地	0.6	→分類3
水田	0.25	→分類1
農地	0.4	→分類2
都市	0.2	→分類4
用水路	0.2	
下水道	0.05	
河道	0.01	→分類5

第二層については, 以下の式で定義される線形貯留モデルを適用した。

$$\frac{dS}{dt} = I - O \quad \dots (5)$$

$$O = k \cdot S \quad \dots (6)$$

ここに, S : 貯留量[L³], I : 流入強度[L³T⁻¹], O : 流出強度[L³T⁻¹], k : 透水係数[T⁻¹]である。 I, O, k はそれぞれ, 次式

のように算出した。

$$I = P_{in} + Q_I \quad \dots (7)$$

$$O = P_{out} + Q_O \quad \dots (8)$$

$$k = k_1 + k_2 \quad \dots (9)$$

ただし、 P_{in} : 上層からの浸透強度[L³T⁻¹], Q_I : 上流メッシュからの流入強度[L³T⁻¹], Q_O : 下流メッシュへの流出強度[L³T⁻¹], とする。なお、 k_1 , k_2 は次式より算定する。

$$k_1 = \frac{k_H \cos \theta}{B \cdot \varepsilon} \quad \dots (10)$$

$$k_2 = \frac{k_V}{\varepsilon} \quad \dots (11)$$

なお、 k_H : 水平透水係数[LT⁻¹] (=0.014cm/s), k_V : 鉛直透水係数[LT⁻¹] (=0.1cm/s), B : メッシュ幅[L], ε : 有効間隙率[-]である。

B-4. 病原微生物負荷源と評価地点

病原微生物負荷源として、阿武隈川中流域に位置する下水処理場を取り上げる。この処理場の放流量は、日量で45,000m³であり、ここから常に1個/Lの濃度でクリプトスポリジウムが排出されていることとする²⁾。感染者からのオーシスト排出量を10⁹個/日と見積もると、この放流水濃度の仮定は、処理人口15.2万人の中におおよそ5名の感染者がいるケースに相当する(下水処理によるオーシスト除去効率を99%とする²⁾)。河川水中でクリプトスポリジウムは長期間生存することが知られているため、その不活化は無視する。流量および病原微生物濃度の評価地点は、下水処理水放流点から約40km下流に位置する福島市とした。この地点では、水道水源として河川水を取水している。

C. 結果と考察

C-1. 流出解析の精度

標高・傾斜度メッシュより得られる平均標高データから求めた阿武隈川流域の落水線を図1に示す。次に、2001年の降水量データを用いて流出解析を行った結果を図2に示す。福島市における河川流量の計算値を、国土交通省による実測値と比較すると、冬季を除きよく一致していることが分かる。冬季には実測値に現れないピークが計算値で出現しており、この不一致は今回の計算には降雪が考慮されていないために生じたものと考えられる。降雪と融雪の効果を加味することで、本研究で用いたメッシュ型二層流出モデルから、さらに高い精度で流量予測結果が得られることが期待される。

C-2. 病原微生物濃度の予測

図3に、福島市における阿武隈川のクリプトスポリジウム濃度を示した。河川流量に応じて変化が見られるが、平均濃度は0.01個/Lであった。下水処理水の濃度に比較して1/100に希釈されていることが分かる。この地点における河川水の大腸菌群数として、330-22,000MPN/100mL(平均4300MPN/100mL)と報告されている。平均値を基準にすると、河川水中でクリプトスポリジウムは、大腸菌群数の約1/5,000,000も低い濃度で存在していたこととなる。

D. 結論

メッシュ型二層流出モデルを用いた流出解析により、降水量データをもとに、高い精度で河川流量を再現することができた。また、下水処理場からの病原微生物負荷を考慮することで、水道水源の汚染状況を予測することも可能となった。今後は、さらに予測精度を向上させるためのモデル改良を行うとともに、水道水起因の感染リスク評価も可

能とするモデルに発展させる予定である。このモデルを利用することで、以下のような成果も期待できる。

- (1)集中豪雨による突発的な流量増加時に、下水道から高い濃度の微生物が放流される、いわゆる CSO や SSO 問題に対応したリスク評価。
- (2)下水処理場のような点源ではなく、畑地、農地等の面源（下水汚泥の緑農地還元を想定）からの病原微生物の発生を考慮したリスク評価。

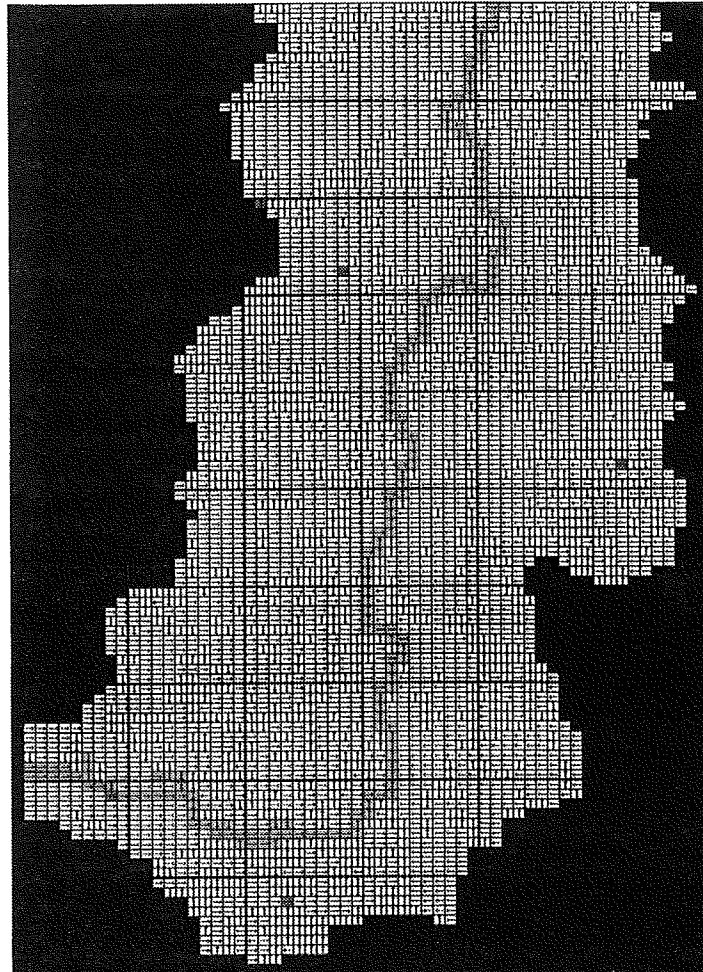


図1. 阿武隈川流域の落水線（グレーの部分に阿武隈川を示す）

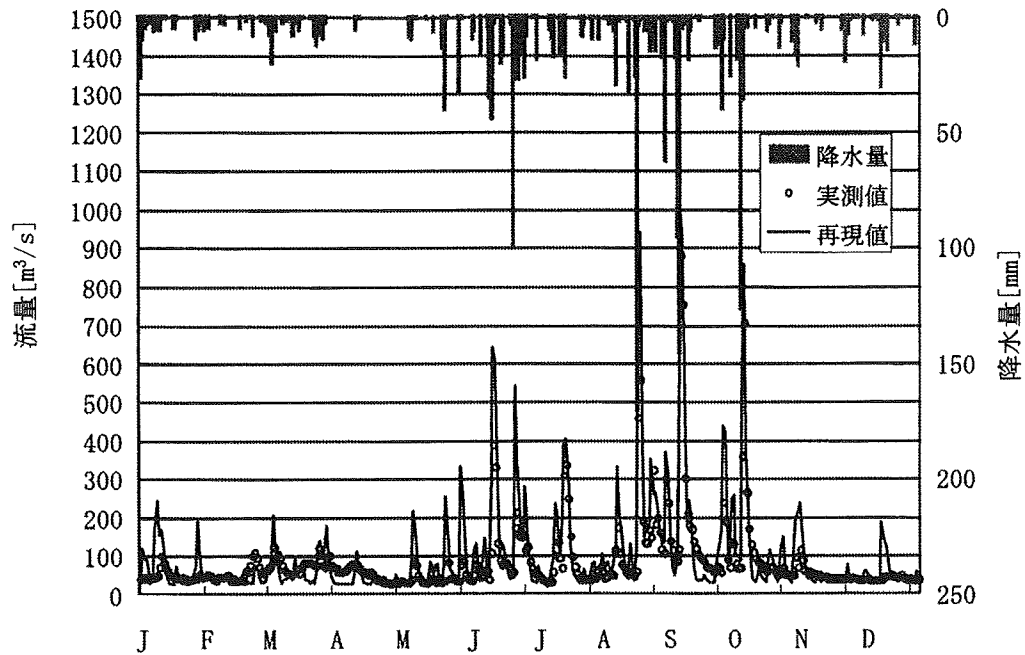


図2. 福島市における降水量と阿武隈川の流量

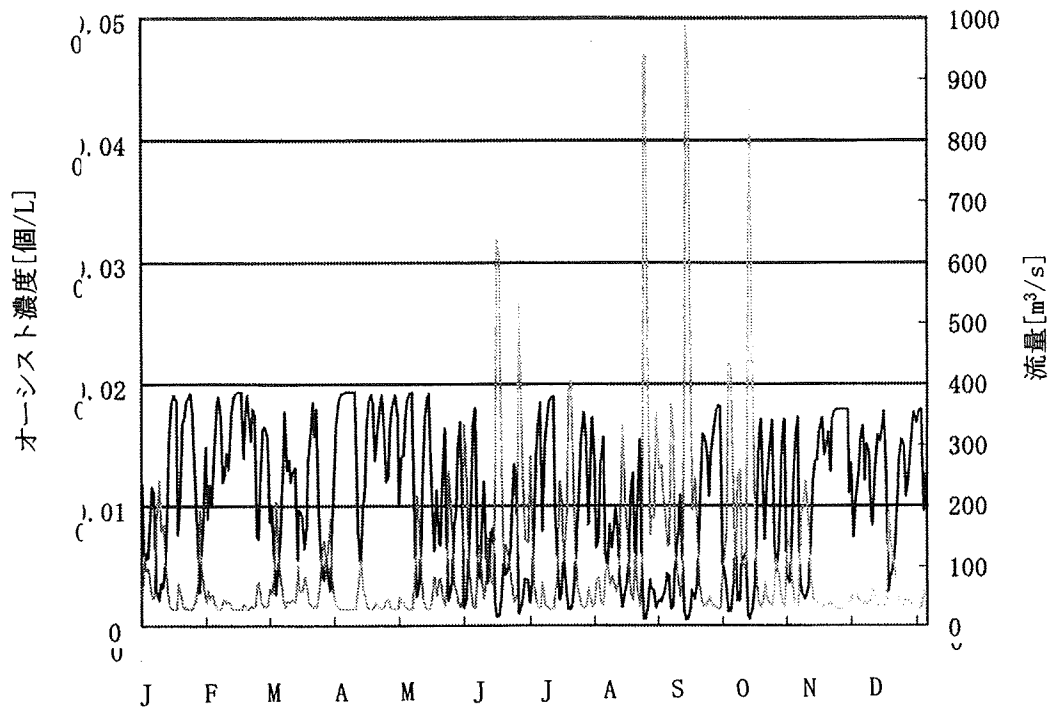


図3. 福島市における阿武隈川のクリプトスポリジウム濃度

参考文献

- 1) 小尻利治：シミュレーションモデルでの流域環境評価手順の開発，京都大学防災研究所年報，第41号，1998
- 2) 土木研究所：下水処理場等におけるクリプトスポリジウムの検出方法の検討及び実態調査，平成10年1月

E. 研究発表

1. 論文発表

T. Watanabe, K. Hashimoto, Y. Abe and T. Omura: Evaluation of Health Risks in the Wastewater Reclamation in the Abukuma Watershed, Japan, Proceedings of 8th IWA International Conference on Diffuse/Nonpoint Pollution (CD-ROM), 801-808, 2004

2. 学会発表

渡部徹, 橋本剛志, 阿部欽章, 大村達夫: DALY を指標とした下水処理水再利用による健康リスク評価, 第 59 回土木学会年次学術講演会講演概要集 (CD-ROM), 37-38, 2004

三浦尚之, 阿部欽章, 渡部徹: GIS を用いた阿武隈川流域における水中病原微生物の挙動評価モデルの開発, 平成 16 年度土木学会東北支部技術研究発表会講演概要, 908-909, 2005

阿部欽章, 渡部徹, 大村達夫: 日光による不活化に着目した河川中の病原ウイルスの挙動に関する研究, 平成 16 年度土木学会東北支部技術研究発表会講演概要, 910-911, 2005

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, and Baba E : Identification of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Vet Parasitol* 129: 165:168, 2005.
- Abe N, Read C, Thompson RCA, and Iseki M: Zoonotic genotype of *Giardia intestinalis* detected in a ferret. *J Parasitol* 91: 179-182(2005)
- Abe N, Iseki M: Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol Res* 92:523-6(2004)
- Matsubayashi M, Abe N, Takami K, Kimata I, Iseki M, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, and Baba E: First record of *Cryptosporidium* infection in raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). *Vet Parasitol* 120:271-5(2004)
- 稲田康志、木俣勲、塩田貞光、石本和子、井関基弘：プロテインラベリング法で蛍光標識したクリプトスポリジウムオーシストのオーシスト検出検査および除去試験への適用。水道協会雑誌、73 (6) : 14-31(2004)
- T. Endo and Y. Morishima.: Major helminth zoonoses in water, in *Waterborne Zoonoses* (ed. WHO), pp.291-304, 2004 (IWA Publishing).
- T. Izumi, Y. Itoh, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama.: Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator for *Cryptosporidium parvum* Oocysts in River Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72:29-37, 2004.
- 遠藤卓郎、泉山信司：病原微生物対策への理解に向けて Safe Drinking-Water for the Control of Microbial Hazards. *用水と廃水* 46(7), 43-49, 2004.
- 遠藤卓郎、黒木俊郎、泉山信司. <話題の感染症>ジアルジア症 モダンメディア 50(4), 73-77, 2004.
- 遠藤卓郎、八木田健司. 第5章 総論および原虫類、食品衛生指針 微生物編2004、518-534, 2004.
- Y. Masago, K. Oguma, H. Katayama, T. Hirata and S. Ohgaki: *Cryptosporidium* monitoring system at a water treatment plant based on waterborne risk assessment, *Water Science and Technology*, 51, Iss. 1, 293-299(2004)
- 真砂 佳史, 小熊 久美子, 片山 浩之, 大垣 眞一郎; 消光型蛍光プローブを用いたリアルタイムPCR法による水中のクリプトスポリジウムの定量および種別判定手法の開発。環境工学研究論文集、41、311-319(2004)

2. 著書・総説

- 井関基弘、所正治：クリプトスポリジウム症。木村哲、喜田宏（編）「人獣共通感染症」医薬ジャーナル社、大阪、321-439(2004)