

2/11 (18.2)、キンイロスパイニーマウスでは 0/13、0/13、アレチネズミでは 0/8、0/8、デブスナネズミでは 2/9 (22.2%)、0/9、アメリカモモンガでは 5/10 (50.0%)、0/10、デグーでは 0/9、9/9 (100%)、ピグミージェルボアでは 0/20、0/20、シマリスでは 0/10、0/10、バナナリスでは 2/10 (20.0%)、0/10、フサオジャービルでは 2/10 (20.0%)、0/10、フトオアレチネズミでは 0/10、0/10、ミミナガハリネズミでは 1/10 (10.0%)、0/10、オオエジプトアレチネズミでは 4/10 (40.0%)、0/10、リチャードソンジリスでは 0/10、6/10 (60.0%)、コロンビアジリスでは 1 (10.0%)、0/10、ダウリアハタリスでは 0/10、0/10、エゾリス 3/10 (30.0%)、1/10 (10.0%)、タイリクモモンガでは 0/10、0/10、ゼブラマウスでは 0/11、0/11 であった (表 3)。

D. 考察

平成 17 年度の調査では、環境中に存在する *Cryptosporidium* の種あるいは遺伝子型と宿主に関する情報の収集を目的として、野生哺乳類、鳥類および爬虫類における *Cryptosporidium* の保有状況、および海外からペットとして輸入されるげっ歯類における *Cryptosporidium* と *Giardia* の保有を調査した。

鳥類の 179 検体からは *Cryptosporidium* が検出されなかった。カナダガンが *Cryptosporidium* を保有していることが報告されているが¹⁾、昨年と今年の調査ではいわゆる水鳥類からは *Cryptosporidium* は検出されなかった。したがって、こうした鳥類では *Cryptosporidium* の保有は稀であることが推測された。今後とも、水鳥における *Cryptosporidium* 保有の状況を追跡する必要があるように思われる。

平成 13 年に兵庫県において発生した簡易水道の *Cryptosporidium* 汚染事例から分離された *Cryptosporidium* の遺伝子型

は *Cryptosporidium* sp. 938 と一致していた。昨年度および今年度の調査では、同じ遺伝子型を有する *Cryptosporidium* がヤマカガシから検出された。さらに特に中国地方に生息するヤマカガシにおいて高率に保有していることが明らかになったことから、兵庫県山崎町の事例はヤマカガシが汚染源であったことが強く推測された。

種により保有率は異なるが、げっ歯類では高率に *Cryptosporidium* および *Giardia* を保有していることが今年度の調査においても確認された。アメリカモモンガ、オオエジプトアレチネズミ、エゾリス、バナナリス、フサオジャービルでの保有率が高かった。これらのげっ歯類はペットとして日本に輸入され、一般の家庭で飼育されることになる。こうしたげっ歯類が感染源あるいは汚染源となって *Cryptosporidium* を伝播したり、汚染事例の原因となることが懸念される。

E. 文献

1. Zhou L, Kassa H, Tischler ML, Xiao L.: Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). Appl Environ Microbiol. 2004 ;70:4211-5.

F. 健康危機管理情報 なし

G. 研究発表 誌上発表 なし

学会発表

1. 黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、三宅芳枝、遠藤卓郎：野鳥におけるクリプトスポリジウム¹⁾の保有 獣医疫学会第 17 回学術集会 2006 年 3 月 つくば

表1-1 鳥類における *Cryptosporidium* の保有状況

目	科	種	検体数
アマツバメ	アマツバメ	ヒメアマツバメ	1
ガンカモ	ガンカモ	アヒル	1
		カルガモ	3
		キンクロハジロ	3
		スズガモ	3
		オカヨシガモ	2
		オシドリ	1
		サカツラガン	1
		ヒドリガモ	3
キジ	キジ	コジュケイ	1
		キンケイ	1
コウノトリ	サギ	アオサギ	2
		アマサギ	1
		ゴイサギ	4
		ダイサギ	1
		チュウサギ	2
スズメ	アトリ	カワラヒワ	2
	カラス	オナガ	2
		ハシブトガラス	2
		ハシボソガラス	2
		種不明カラス	1
	シジュウカラ	シジュウカラ	2
	セキレイ	ハクセキレイ	1
	ツバメ	ツバメ	11
	ハタオリドリ	スズメ	10
	ヒタキ	メボソムシクイ	2
	ヒタキ	オオルリ	1
		キビタキ	2
		イソヒヨドリ	1
	ヒタキ	アカハラ	1
	ヒヨドリ	ヒヨドリ	4
	ムクドリ	ムクドリ	10
	メジロ	メジロ	5
	ホオジロ	クロジ	1

表1-2 鳥類における *Cryptosporidium* の保有状況

目	科	種	検体数
チドリ	カモメ	アジサシ	1
		コアジサシ	3
		オオセグロカモメ	1
		セグロカモメ	3
		ユリカモメ	4
		シギ	アカエリヒレアシシギ
ツル	クイナ	イソシギ	1
		オオバン	1
ハト	ハト	バン	1
		アオバト	2
		キジバト	15
フクロウ	フクロウ	ドバト	29
		オオコノハズク	2
ブッポウソウ	カワセミ	フクロウ	2
		カワセミ	1
ペリカン	ウ	ヤマセミ	1
		カワウ	4
ホトトギス	ホトトギス	ツツドリ	1
ミズナギドリ	アホウドリ	コアホウドリ	2
		オオミズナギドリ	1
		ハシボソミズナギドリ	1
ワシタカ	ハヤブサ	チョウゲンボウ	3
		ハヤブサ	1
	ワシタカ	オオタカ	1
		サシバ	2
		ツミ	2
		ハイタカ	3
	合計		179

表2 ヘビ類における *Cryptosporidium* の保有状況

地域	ヤマカガシ		シマヘビ ^o		アオダ ^o イシヨウ	
	no.	+	no.	+	no.	
関東	22	1 (4.5%)	3	0	3	0
信越・北陸	-		4	0	-	
近畿	3	0	9	0	-	
中国	39	11 (28.2%)	17	0	1	0
九州	1	1 (100%)	-		-	
合計	65	13 (20.0%)	33	0	4	0

表3 輸入げっ歯類における *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有状況

種名	調査頭数	検出頭数 (%)	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
カイロトゲマウス	11	1 (9.1%)	2 (18.2%)
キンイロスパイニーマウス	13	0	0
アレチネズミ	8	0	0
デブスナネズミ	9	2 (22.2%)	0
アメリカモモンガ	10	5 (50.0%)	0
デグー	9	0	9 (100%)
ピグミージェルボア	20	0	0
シマリス	10	0	0
ババナリス	10	2 (20.0%)	0
フサオジャービル	10	2 (20.0%)	0
フトオアレチネズミ	10	0	0
ミミナガハリネズミ	10	1 (10.0%)	0
オオエジプトアレチネズミ	10	4 (40.0%)	0
リチャードソンジリス	10	0	6 (60.0%)
コロンビアジリス	10	1 (10.0%)	0
ダウリアハタリス	10	0	0
エゾリス	10	3 (30.0%)	1 (10.0%)
タイリクモモンガ	10	0	0
ゼブラマウス	11	0	0

分担研究報告書 3

相模川水系におけるクリプトスポリジウムオーシストの出現状況

分担研究者 平田 強、金子光美

研究協力者 森田重光

相模川水系における *Cryptosporidium* オーストの出現状況

分担研究者 平田 強 麻布大学環境保健学部 教授
金子光美 立命館大学理工学部 教授
研究協力者 森田重光 麻布大学環境保健学部 講師

概要

神奈川県的主要な水道水源の一つである相模川水系では相模川本川および支流の 5 地点を調査した。すべての河川から少なくとも一回は *Cryptosporidium* が検出された。支流は、本川より濃度が高い傾向があり、養豚排水の影響による可能性が示唆された。本川へ流入する雨水用吐口 7 地点についても調査した。3 地点から *Cryptosporidium* が検出されたが、いずれも支流に比べ濃度が低く、流量もはるかに少ないことから、*Cryptosporidium* 汚染への寄与は非常に低いと判断された。

河川水から検出された *Cryptosporidium* の生死を判定するため、DAPI 染色法で染色した。DAPI 陽性率は低く、DIC 像で内部構造が確認できないオーストの比率は 55~100%と高かった。これらの結果から、河川環境では、長時間の滞留、太陽光の照射、その他の物理的ストレスなどにより、生残しているオーストの比率が相当程度低下していると推察された。

A. 研究目的

下水や河川水から *Cryptosporidium* が検出されている。人への感染リスクや水の微生物的安全性を評価するには、それらの出現特性と、種あるいは型別の出現濃度分布が重要であるが、その情報は非常に少ない。そこで 3 年間にわたって *Cryptosporidium* オーストの下水および河川水中に存在量と、個々のオーストの遺伝子タイピングを目的として、汚染実態調査を行ってきた。

本年度は、相模川水系について、水道取水池のある相模川本川および支流の中津川、小鮎川、玉川、貫抜川、永池川に加え、雨水用吐口のうち本川へ流入する 7 地点を対象に、オーストの存在量調査を行った。

B. 研究方法

B-1 調査対象河川

1) 本川、支流および吐口の採水

神奈川県的主要な水道水源である相模川の *Cryptosporidium* の汚染源について把握するため、流域の状況を調査した。すなわち、重要な汚染源と考えられる養豚場、養鶏場などの家畜飼育施設の分布および降雨時の未処理放流の影響を考え、下水道の整備状況について情報を各市町村、神奈川県および河川管理者より（厚木、海老名、相模原、座間市役所、愛川町の各役場）、養豚場や養鶏場の分布等は Web サイト等より情報を入手した（神奈川県企画部統計課, 2004, かながわ畜産ひろばホームページ, <http://kanagawa.lin.go.jp/index.htm>）。これらの情報を踏まえて現地調査を行った後、*Cryptosporidium* 調査を行うための採水地点として、相模川の支流 5 地点（中津川、小鮎川、玉川、貫抜川、永池川の本川流入直前地点）、および吐口の代表的な地点として 7 地点を選定した。また相模川本川は水道水取水地点の直上流地点で採水した。それぞれの採水地点を図 1 に示す。

本年度の調査は 2005 年 5 月~11 月の間に 9 回に行い、各試験水量は、約 4~30 L とした。

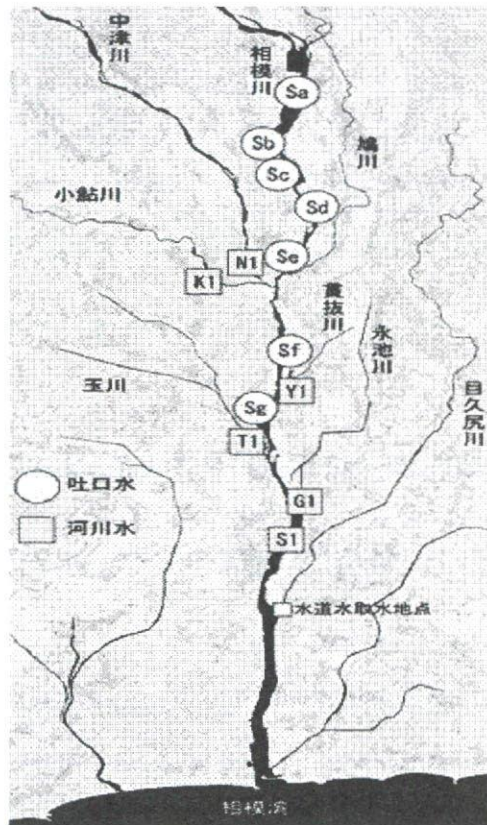


図1 相模川水系採水地点

2) 流量の測定

各河川および吐口の右岸側から 1m 間隔に垂直測定線を定め、垂直測定線ごとに水深および流速を測定した。流速は、流速計 (KENEK, LTD) を用いて水深に応じて 1~3 点法 (土木学会水理公式集改訂委員会, 1971) を用い、40 秒~1 分間測定し平均値を求めた。求められた垂直測定線上の平均流速より垂直測定線で区分された断面ごとの平均流量を (1) 式で算出し、その総和 (2) 式) を流量とした。

$$q_n = v \times h \times w \dots \dots \dots (1)$$

ここで、 q_n : 各区分における平均流量 (cm^3/s), v : 平均流速 (cm/s), h : 水深 (cm), w : 各区分の幅 (cm)

$$Q = \Sigma(q_1 + q_2 + \dots + q_n) \dots \dots (2)$$

ここで、 Q : 全断面流量 (cm^3/s)

B-2 *Cryptosporidium* 試験方法

1) 試料の濃縮

河川水試料の全量を、酢酸セルロース製外圧型中空糸 UF 膜モジュール (DAICEN MEMBRANE-STSTEMS, LTD) にローラーポンプで加圧通水して濾過した。濾過後、モジュール内に EPA Method1623 に準拠してカプセル誘出液を約 50mL 加え、十分に振とうし、その洗浄液を遠沈管 (200mL) に回収する操作を 3 回繰り返した。回収した洗浄液を遠心分離 ($1,500 \times g$, 15 分) し、上清を吸引除去して沈渣を回収した。

2) ショ糖密度勾配遠心法による選択濃縮

濃縮した河川水は、遠沈管 (50mL) に 20mL ずつ分注し、シリンジとシリコンチューブを用いて下層に Percoll ショ糖 ($d=1.10$) を注入して全量 50mL とし、遠心分離 ($1,500 \times g$, 15 分) した。遠心分離の後、界面およびその上部水層をシリコンコーティングしたパスツールピペットを用い

て新しい遠沈管 (50mL) に分取し、PBS (T+) で全量を 50mL とした後、遠心分離 (1,050×g, 15 分) した。遠心分離後、上清を吸引除去した。

3) 免疫磁気ビーズ法による *Cryptosporidium* オーシストの選択分離

試料を、それぞれ 3~12 本の IMS 用チューブに 10mL ずつ分取し、*Cryptosporidium* 用免疫磁気ビーズとビーズ用 buffer (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* kit, DYNAL BIOTEC, LTD) を加え、ローターで 1 時間回転しながら反応させた後、ビーズを磁石で回収した。回収したビーズに 0.1M 塩酸を加えてビーズからオーシストを分離し、最後に 1M 水酸化ナトリウムで中和した。

4) 染色

(1) 蛍光抗体染色法

免疫磁気ビーズ法で処理した試料に *Cryptosporidium* 用蛍光抗体 (Easy Stain™ C&G FITC, BTF, LTD) を 100 μ L 添加して 4 °C の暗所で 2 日間染色した。

(2) DAPI 染色法

DAPI (4',6 ジアミン-2 フェニルインドール塩酸塩) 0.2mg を 1mL メタノールに溶解させて DAPI 保存液を調製し、それをさらに PBS で 5000 倍に希釈した溶液を 10 μ L 添加した。

5) オーシストの計数と単離

倒立型落射蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE300, Nikon, LTD) のステージの上に置いたプラスチックシャーレ (ϕ 56mm) に撥水ペンで ϕ 20mm の円を描いた。その円内にマイクロピペットで Milli Q 水 100 μ L をのせ、さらに水滴内に染色した試料 10~30 μ L をゆっくり加えた。さらに 10% Triton X-100 溶液 0.5 μ L を加え、5~10 分間静置してオーシストが沈降した後に、B 励起光を照射して 200 倍の倍率で観察し、球形で直径 5 μ m 前後の青リンゴ色の蛍光を発する粒子を探した。検出した粒子は、ノマルスキー微分干渉像で内部構造を観察し、*Cryptosporidium* オーシストであることを確認した。一部の試料は DAPI 染色を行い、U 励起光でオーシスト内のスポロゾイトの核が 1~4 個青色に染まるのを確認した。

また、遺伝子型解析を行うサンプルを採取するために、観察したオーシストを、ガラスキャピラリー (ガラス製毛細管 (Calibrated Pipettes 10 μ L, Drummond Scientific Company) をガスバーナーで加熱し、引き伸ばしたもの) を用いて単離した。単離したオーシストは、保存のため 1 個ずつ PCR 緩衝液 (10×*Taq* Buffer (TaKaRa, LTD) 2.5 μ L, 滅菌 Milli Q 水 15.5 μ L) の入った PCR チューブ (0.2 mL) に吹き出した。

C. 結果

1) 本川および支流の *Cryptosporidium* 汚染レベル

河川水 10 L 当りの *Cryptosporidium* 濃度を表 2 に示す。また、採水当日の天候を表 3 に示す。表 2 より 2005 年の 5, 6, 7, 9, 11 月に採水を行った本川および支流の全てから *Cryptosporidium* が検出された。

本川 (相模川 S1) と支流における月別の *Cryptosporidium* 濃度の変化を図 3 に示す。中津川、小鮎川は 11 月に濃度が高く、本川に比べそれぞれ 8 倍、20 倍の濃度の *Cryptosporidium* が検出された。玉川においては 5 月に濃度が高く、本川に比べ 15 倍の濃度の *Cryptosporidium* が検出された。

表2 河川の *Cryptosporidium* 濃度

	2005.5		2005.6		2005.7		2005.9		2005.11	
	濃度 (個/10 L)	採水量 (L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)
中津川N1	2(2)	10.0					1.7(5)	30.0	8.3(25)	30.0
小鮎川K1							4(12)	30.0	19.7(59)	30.0
玉川T1	14.6(14)	9.6	2.4(5)	21.1			<0.6(0)	15.0	3.7(11)	30.0
貫抜川Y1	1(1)	10.0					<0.3(0)	30.0	<0.3(0)	30.0
永池川G1	3(3)	10.0	0.7(2)	13.8	1.3(2)	15.0	<0.3(0)	30.0	1(3)	30.0
相模川S1	1.4(16)	114.7							1(3)	30.0

() 内は実際の個数

空欄は採水を行っていない

表3 本年度の採水地点における天候

	採水地点	前々日	前日	採水日
5月9日	S1	曇り	晴れ	晴れ
5月13日	Sa, Sb, Sc, Se, Sg, T1, N1	晴れ	晴れ	曇り
5月23日	Sd, Sf, Y1, G1	晴れ	雨	晴れ
6月27日	T1, Sg, G1	晴れ	晴れ	曇り
7月1日	G1	曇り	晴れ	雨
9月26日	Sc, Sg, Se, Y1, N1, K1	曇り	晴れ	曇り
9月30日	T1, G1	曇り	晴れ	晴れ
11月7日	Sc, Se, Sg, Y1, G1	雨	大雨	晴れ
11月14日	S1, K1, N1, T1	晴れ	晴れ	曇り

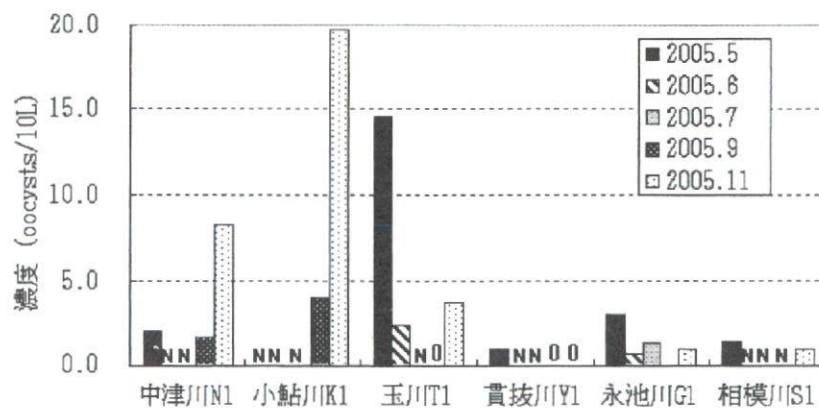


図3 河川の *Cryptosporidium* 濃度

N : Not tested. 0 : Not detected

1997, 2004, 2005 年度の河川水 100 L 当りのオーシスト濃度を図4に, 支流周辺における流域状況を表4に示す。図4より, 相模川本川の濃度と比べて, 中津川は平均5.4倍, 小鮎川は12倍, 玉川4倍と, 本川よりも濃度が高かった。他の調査でも, 流入河川等の小規模な水環境では汚染源からの影響が大きく, 本川よりも1オーダー程度高い値が出現する可能性があるとして報告されており(保坂, 2003), 本調査でも同じ傾向が認められた。

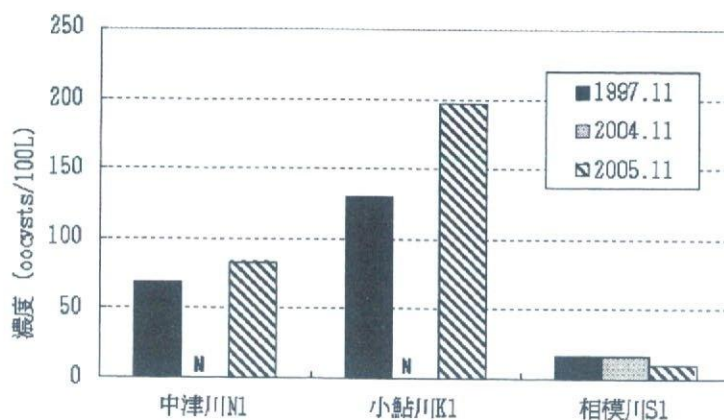


図4 河川のCryptosporidium濃度

N : Not tested.

表4 支流周辺における流域状況

河川名 (観測地点)	陽性率	流量実測値 m ³ /s (天候)	流量 報告値 m ³ /s	採水地 点の川 幅	採水地 点のお よそ の水深	採水地点の河川状況	河川域周辺の状況 (住所)
中津川 (第一点津橋)	3/3	N	*7.05 (平均) *25.25 (最大)	35 m程	N	・流れは比較的緩やか。 ・周辺は住宅街。 ・河川敷は砂利。 ・上流に宮ヶ瀬ダムがあり、様々な要因によって放流し定期的にも放流する。	上流に1箇所の養豚場 (厚木市三田1939)
小鮎川 (第二点津橋)	2/2	N	*2.49 (平均) *8.45 (最大)	15 m程	N	・流速は非常に早い。 ・周辺は住宅街。 ・川には様々なゴミがある。	上流に1箇所の養豚場 (厚木市上荻野5503)
玉川 (相川水位 観測所)	3/4	6/27 1.42 (曇り) 9/30 0.76 (晴れ)	*1.49 (平均) *3.30 (最大)	11 m程	33 cm	・流れは比較的緩やか。 ・両岸は草で覆われている。 ・底は砂地。 ・採水した水は茶色に濁っている。	上流に3箇所の養豚場 (厚木市飯山2136、 厚木市愛名871、厚 木市小野2136) 上流に1箇所の養豚場 (厚木市飯山3575)
貫抜川	1/3	N	ND	11 m程	55 cm程	・必ず油が浮いている。 ・流れがあるときは水質は良好だが、流れが無い時は黄土色に濁っている。 ・川底はヘドロがある。 ・海老名駅を含む河川より北部地域の農業用水が流れている。 ・周辺は住宅街。 ・泡が消えない。	
永池川 (本川合流前)	4/5	7/1 2.06 (雨) 9/30 0.08 (晴れ)	*0.62 (平均) *2.47 (最大)	12 m程	58 cm	・雨以外の日の流れは水量はあっても流れはほとんどない。 ・水質は常に黄土色に濁っている。 ・周辺は住宅街。	上流に2箇所の養豚場 (海老名市中野1904、 海老名市中野408)
相模川本川 (寒川取水堰)	2/2	N	*25.23 (平均) *42.59 (最大)				

N = Not Tested

ND = No Data

* 神奈川県環境農政部，平成14年度 神奈川県公共用水域及び水質測定結果より

** 国土交通省関東整備局京浜河川事務所，平成16年時刻流量年表，日流量年表より

2) 吐口の調査結果

採水地点の流域状況を表5に示す。また，相模川本川に流入する吐口 Sa~Sg における

Cryptosporidium 濃度を表 6 に示す。相模川に流入する吐口の数が多いため、1 回目の調査でオーシストが検出された吐口のみ、2 回目以降も採水することとした。

表 5 吐口周辺における流域状況

	陽性率	流量(晴天時、雨天時等)とおおまかな比較 ※10段階比較	吐口の幅	採水地点のおおよその水深	採水地点の河川状況	吐口周辺の状況
Sa	0/1	比較段階 1	1 m程	5 cm未満	・周辺に田んぼがあり、農業用水が流れている。 ・流れはほぼない。 ・透明度は高い。 ・川底は茶色の砂地。	・田んぼがある。
Sb	0/1	比較段階 8	3 m程	20 cm程	・周辺に田んぼがあり、水は茶色に濁っている。 ・流れは非常に速い。 ・農業用水が主な水源である。	・田んぼがある。
Sc	3/3	比較段階 1	6 m程	10 cm未満	・水はやや黄色を呈している。 ・水量が少なく色々なゴミが流れている。 ・吐口周辺は開発途中で工事が行われえいる。 ・吐口の底は藻で覆われている。・周囲は河川敷で砂利。 ・吐口を含め、汚い。枝などの流れ着いたものが沢山見うけられた。	・開発途中で工事現場がある。
Sd	0/1	比較段階 10	4 m程	50 cm程 ※前日の天気が雨。	・高い位置にある吐口から河川敷に流れ落ちる。・川底には藻などは生えていない。 ・水質はほぼ透明だがやや黄土色に見える。・ペットボトルなどの大きなゴミが多い。	・閑散としていて住宅とビルが点在している。
Se	2/3	比較段階 4	3 m程	20 cm程	・透明度は高い。 ・底は砂地で流れは緩やか。 ・水質はほぼ透明。 ・周辺は工場地帯である。 ・やぶ蚊が非常に多い。 ・鯉がいた。	・工場地帯があり大きな建物がいくつもあり建築関係の会社が多い。
Sf	0/1	比較段階 2	6 m程	10 cm程	・水質はやや黄土色を呈している。 ・吐口から水が河川敷に流れ落ちている。水量が少ない。	・周辺は閑散としていて住宅と大きなビルが点在する。
Sg	2/3	6/27 0.17m ³ /s (曇り) 9/30 0.01m ³ /s (晴れ) 比較段階 5	6 m程	10 cm	・吐口の底は藻に覆われている。 ・水は比較的きれいだがゴミが浮いている。 ・泡がなかなか消えない。 ・家庭用排水が流れていると思われる。 ・吐口を含め汚い。	・周辺は住宅街である。・大きな会社のビルもある。

表 6 吐口の *Cryptosporidium* 濃度

	2005.5		2005.6		2005.7		2005.9		2005.11	
	濃度 (個/10 L)	採水量 (L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)	濃度 (個/10 L)	採水量(L)
Sa	<2.5(0)	4.0								
Sb	<2.5(0)	4.0								
Sc	2.5(1)	4.0					0.6(2)	30.0	0.3(1)	30.0
Sd	<10(0)	10.0								
Se	2.3(2)	8.7					<0.3(0)	30.0	2.7(8)	30.0
Sf	<2.5(0)	4.0								
Sg			<0.3(0)	29.0			1.3(4)	30.0	0.3(1)	30.0

() 内は実際の検出個数

空欄は採水を行っていない

吐口 Sa は、厚木市内を集水域としており、吐口水の透明度は高かった。周辺には水田が広がっており、主に農業用水/排水が流れていると考えられる。調査は 1 回のみであるが、試料水 4 L からオーシストは検出されなかった。

吐口 Sb は、厚木市内を集水域としている。流量は 7 地点中 2 番目に多く、水は茶色に濁っていた。周辺には水田があり、農業用水/排水が流入していた。調査は 1 回のみであるが、試料水 4 L からオーシストは検出されなかった。

吐口 Sc は、厚木市内を集水域としている。流量は非常に少なく、周辺には工事現場があった。調査は 3 回行い、4~30 L 採水した。すべての試料からオーシストが検出され、濃度は 0.3~2.5 oocysts/10 L であった。

吐口 Sd は、海老名市内を集水域としている。前日が雨ということもあり、流量は 7 地点の中で最も多かった。周辺は、閑散としていて住宅やビルが点在した地域である。調査は 1 回のみであるが、試料水 10 L からオーシストは検出されなかった。

吐口 Se は、厚木市内を集水域としている。流れは穏やかで流量は多くなかった。周辺は工場地帯で大きな建物が多かった。調査は 3 回行い 8.7~30 L 採水した。3 試料中 2 試料から検出され、濃度はそれぞれ、2.3 oocysts/10 L、2.7 oocysts/10 L であった。

吐口 Sf は、海老名市内を集水域としている。水量は少なく、周辺は閑散としていて住宅とビルが点在した地域である。調査は 1 回のみであるが、試料水 4 L からオーシストは検出されなかった。

吐口 Sg は、厚木市内を集水域としている。流速の測定を 2 回行った。平均流量は 0.09 m³/s で吐口の中では多くはなかった。また、泡が浮いていて家庭用排水が流れているように思われる。周辺は住宅街であるが、大きなビルもある。調査は 3 回行い、各回とも 30 L 採水した。3 試料中 2 試料からオーシストが検出され、濃度はそれぞれ、0.3 oocysts/10L、1.3 oocysts/10L であった。

吐口水から検出された *Cryptosporidium* 濃度を図 5 に示す。調査した相模川に流入する雨水用吐口 7 地点のうち、Sc、Se、Sg の 3 地点から *Cryptosporidium* が検出された。いずれも相模川の支流に比べ流量がおよそ 0.01~0.2 m³/s と極めて少なく、かつ、低濃度であるため、本川への汚染の影響は少ないと考えられる。

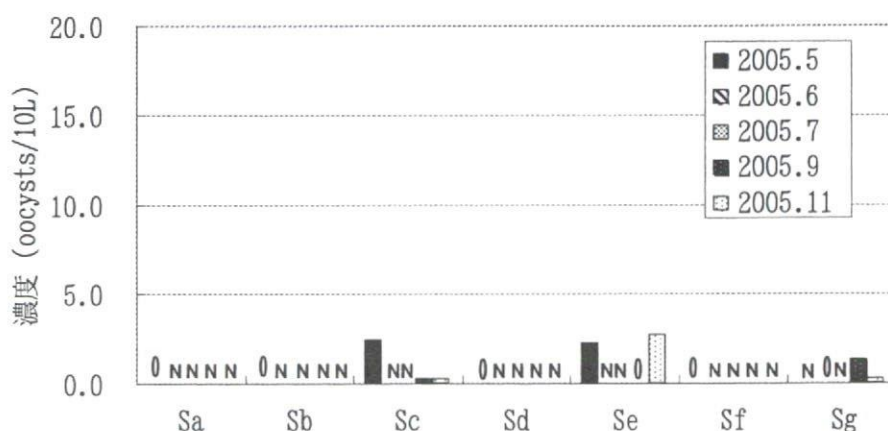


図5 吐口の *Cryptosporidium* 濃度

N : Not tested. 0 : Not detected

C-3 検出された *Cryptosporidium* の DAPI 陽性率

河川水から検出された *Cryptosporidium* の生死を判定するため、11月に採取した河川水(4地点)の試料を DAPI 染色法で染色した。なお、内部構造の有無に関係なく、球形で直径 $5\mu\text{m}$ 前後の青リンゴ色の蛍光を発する粒子すべてを *Cryptosporidium* として DAPI 染色の陽性率を算出した。結果を表7に示す。4地点で採取した河川水の DAPI 陽性率は0~33%であり、別に行った下水のデータ(67%(3個中2個)および75%(8個中6個))に比べると、下水試料では陽性率が高く、河川水試料では陽性率が低い結果となった。また、DIC像で内部構造が確認できないオーシストが、下水試料では33%(3個中1個)、25%(8個中2個)であるのに対し、今回の河川水試料では、中津川で100%(3個中3個)、本川で100%(4個中4個)、玉川で58%(12個中7個)、小鮎川で55%(31個中17個)と高い割合で観察された。

表7 下水及び河川水から検出された *Cryptosporidium* の DAPI 染色性並びに内部構造の有無

地点 (検査水量)	DAPI		DAPI positive rate (%)	DAPI(-)のうち		DIC negative(-) rate (%)
	(+)	(-)		DIC(+)	DIC(-)	
中津川(30L)	0	3	0	0	3	100
玉川(30L)	4	8	33	1	7	58
小鮎川(30L)	6	25	19	8	17	55
相模川本川(30L)	0	4	0	0	4	100
参考：下水 10月(1L)	2	1	67	0	1	33
参考：下水 11月(1L)	6	2	75	0	2	25

D. 考察

相模川については、これまでの調査で、本川では年間を通して *Cryptosporidium* オーシストが検出されている(西岡ら, 1999)。また、個々のオーシストの遺伝子解析によれば、2003年度の相模川本川で得られたオーシストのうち遺伝子解析に成功したオーシストの70%がヒト由来のオーシストであったのに対し、2004年度の調査では *Cryptosporidium* オーシストはすべて豚由来であった。このように相模川本川のオーシストの主要な遺伝子型はヒト由来型と豚由来型であり、本川への汚染源は複数あると推定される。その主要な汚染源のひとつは、2003年度の調査によると小鮎川

上流の養豚排水から検出された *Cryptosporidium* オーシストの 90% が豚由来であったことから (杉本, 2004), 養豚排水が豚由来型の主要な排出源となっている可能性がある。しかし, ヒト型の主要な排出源については, 現在までの調査ではなお明らかになっていない。

相模川本川への *Cryptosporidium* 汚染源として, 都市排水用吐口排水の負荷を明らかにするために, 吐口排水について *Cryptosporidium* 調査を行ったが, いずれの吐口も, オーシスト負荷量は実質上無視できるほど小さいことがわかった。また, 中津川との合流前の本川では過去の調査で *Cryptosporidium* がほとんど存在しないことが確認されている。そこで *Cryptosporidium* の流入源が今回調査した 4 支流 (中津川, 小鮎川, 玉川) のみであると仮定して, 各支流の流量とオーシスト濃度の積から相模川本川へのオーシスト負荷の寄与の割合を求めると, 中津川が 52%, 小鮎川が 44%, 玉川が 4.1%, 永池川が 0.50% となり, 中津川, 小鮎川の占める割合が大きいことがわかる。また, 相模川に流入する中津川, 小鮎川, および玉川が流れる厚木市と, 貫抜川, 永池川の流れる海老名市の周辺の流域状況 (表 4) と, 養豚場や養鶏場の分布を比較した。その結果, 厚木市には養豚場の数や豚の飼育頭数が多いことから, 豚由来の *Cryptosporidium* オーシストが他の地域に比べ, 多量に流出している可能性がある。このことは, 2003 年度の調査で小鮎川上流にある養豚排水中の *Cryptosporidium* 濃度が 4000 oocysts/L と高濃度であった (杉本, 2004) ことから裏付けられる。したがって今後は, 中津川と小鮎川の 2 支流に絞った詳細調査が必要である。

2003 年度の調査では, 養豚排水中の *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型は動物由来のみであったにもかかわらず, 相模川本川から検出されたオーシストの遺伝子型はヒト由来が 70% 以上と, ヒト由来の排水の混入による汚染が示唆された。しかし今年度の研究では, 遺伝子型の調査を行っておらず, 吐口から検出された *Cryptosporidium* が畜産排水由来ではなく下水由来であると断定することはできなかった。したがって, 今後, 吐口から検出された *Cryptosporidium* の遺伝子型の解析を行う必要がある。

オーシストの生死に関する試験的調査では, 個数が少なく定量的なデータを得ることは出来なかったものの, DAPI 染色ならびに DIC 観察結果によれば, 河川水中のオーシストは, 下水中のオーシストに比べて, 明らかに損傷を受けていた。河川中の *Cryptosporidium* は採水地点までの滞留時間内に日照, 水温など物理的ストレスを受けてオーシストが徐々に損傷を受けている可能性が考えられ, DAPI 陽性率が低くなる要因であると推測される。また, 採水地点が, より下流に位置する相模川で採取されたオーシストの DAPI 陽性率は小鮎川および玉川のそれに比べて低いことから, 流下時間が長くなる大河川においてはより環境ストレスが大きくなるものと推測された。

E. まとめ

本研究では相模川水系の *Cryptosporidium* オーシスト濃度を調査した。相模川本川, 本川に流れ込む支流 3 地点, および雨水用吐口 7 地点を調査対象とし, 流域状況や前年度までの調査結果を含め, 考察した。その結果, 以下のことが明らかになった。

1. 支流に比べ, 吐口は *Cryptosporidium* 濃度が低く, 流量も少ないことから, 相模川本川の *Cryptosporidium* 汚染への寄与は小さい。
2. 中津川, 小鮎川流域には他の支流に比べ畜産業が多く, 河川水の *Cryptosporidium* 濃度も高いことから, 家畜由来の *Cryptosporidium* 汚染が考えられる。
4. 河川水では損傷したオーシストの比率が下水中のオーシストに比べて高いのは, 環境ストレスの影響と考えられる。

参考文献

- 愛川町役場 (1991) 相模原流域関連愛川公共下水道事業下水道計画一般図 (雨水)
- 厚木市役所 (2002) 厚木市公共下水道計画図 (雨水)
- 土木学会編 (1971) 水理公式集, 168-169.
- 海老名市役所 (2004) 海老名市公共下水道一般図 (雨水)
- Hashimoto A., Kunikane S. and Hirata T. (2002) Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Wat. Res.*, 36, 519-526.
- 保坂三継 (2003) わが国の水環境における原虫汚染の実態, 第6回日本水環境学会シンポジウム講演集, 57-58.
- 神奈川県環境農政部 (2003) 平成14年度 神奈川県公共用水域及び水質測定結果
- 神奈川県企画部統計課 (2004) 県勢要覧, 104-105.
- かながわ畜産ひろばホームページ <http://kanagawa.lin.go.jp/index.htm>
- Kelley M. B., Warriar P. K., Brokaw J. K., Barrett K. L. and Komisar S. J. (1995) A study of two U.S. army installation drinking water sources and treatment systems for the removal of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Proc. AWWA WQTC*, 2197-2230.
- 国土交通省関東整備局京浜河川事務所 (2005) 平成16年時刻流量年表, 日流量年表
- 国立感染症研究所ホームページ <http://idsc.nih.go.jp/iasr/26/305/dj3052.html>
- 日本水道協会 (2000) 水道の原虫対策に関する研究 平成12年度報告書, 61-67.
- Nieminski E. C. and Ongerth J. E. (1995) Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration. *J. AWWA*, Sep., 96-106.
- 相模原市役所 (2004) 相模原市公共下水道箇所図 (雨水)
- 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
塩原広之, セミナー生産技術 養豚経営－生き残るための手がかり(2)－ <http://cali.lin.go.jp/cali/manage/127/s-semina/127ss1.htm>
- 諏訪守, 鈴木穰 (1998) 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, 土木研究所資料3533号
- 杉本ひとみ (2004) 下水および河川水から単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型の解析, 麻布大学院修士論文
- 手塚祐介 (2005) 下水および河川水に存在する *Cryptosporidium* の遺伝子型の調査, 麻布大学卒業論文
- (財) 水道技術研究センター (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, 12-13, 26-29, 60-63.
- Yoder J. S., Blackburn B. G., Craun G. F., Hill V., Levy D. A., Chen N., Lee S. H., Calderon R. L. and Beach M. J. (2004) Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks Associated with Recreational Water－United States, 2001-2002. *CDC.*, Oct 22, 53, 1-21.
- 座間市役所下水道整備課 (2004) 座間市公共下水道計画一般平面図 (雨水)

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

特になし。

H 知的財産権出願・登録状況

特になし。

分担研究報告書 4

利根川水系におけるクリプトスポリジウムと
ジアルジア汚染実態の調査

主任研究者 国包章一

分担研究者 秋葉道宏、片山浩之、真柄泰基

研究協力者 李 華芳

利根川水系におけるクリプトスポリジウム、ジアルジア汚染実態の調査

主任研究者：国包 章一 国立保健医療科学院 水道工学部
分担研究者：秋葉 道宏 国立保健医療科学院 水道工学部
分担研究者：片山 浩之 東京大学院 工学系研究科
分担研究者：眞柄 泰基 北海道大学創成科学研究機構
研究協力者：李 華芳 国立保健医療科学院 水道工学部

概要

水道水源河川水中のクリプトスポリジウム、ジアルジア汚染レベルの上昇の要因を明らかにするため、利根川とその上流に位置する支流の小山川の表流水を採取し、クリプトスポリジウム及びジアルジアの個数を測定し、濃度変動を明らかにした。支流の小山川のクリプトスポリジウム及びジアルジアの汚染レベルは、本川の利根川に比べ高い傾向を示し、クリプトスポリジウムでは2オーダー高い月もあった。クリプトスポリジウムが高濃度で検出された季節には、ヒトへの感染性を示す *Cryptosporidium parvum bovine genotype* の存在が明らかになった。小山川流域は、河川水中のオーシスト及びシストの濃度変動は、家畜飼育施設排水、生活排水処理水の点源負荷による影響が大きいことが示唆された。

A. 研究目的

水道水を介したクリプトスポリジウム感染症の集団発生は、国内外を問わず、世界各地で問題となっている。世界保健機関（WHO）では、クリプトスポリジウムを含む病原微生物による感染症は水道水に関係する最も普遍的で広範囲にみられる健康リスクであるととらえ、ヒトや動物が排泄する糞便が主たる汚染源であるとしている。クリプトスポリジウムによる水道水の感染リスクの評価を行う場合、原水の汚染レベルの変動が重要な因子であり、汚染レベルの上昇は降雨による放牧等の家畜飼育施設での家畜や野生動物の糞便の洗い流しや家畜飼育施設排水、生活排水処理水の点源負荷が大きな要因と考えられている。

そこで本研究では、水道水源河川水中のクリプトスポリジウム、ジアルジア汚染レベルの上昇の要因を明らかにするため、利根川とその上流に位置する支流の小山川の表流水を採取し、クリプトスポリジウム及びジアルジアの個数を測定し、濃度変動を明らかにした。

B. 研究方法

B-1 調査地点と流域状況

調査地点は、利根川・荒川水系の利根大堰地点（流域面積 6,018 km²、流域人口 190 万人）と小山川下流地点（流域面積 133.3km²、流域人口 68,870 人）を選定した。利根大堰地点は埼玉県北部に位置し、4km 下流には埼玉県A浄水場の取水点がある。小山川は、利根川の支流で、利根大堰地点の上流約 15kmに位置する。小山川の採水地点へ流入する流域は、図

1に示すように本庄市、岡部町、上里町、神川町、美里町、児玉町を含んでおり、その土地利用は、水田 3074ha、畑 4074ha、山林 3719ha、市街地 1281ha である。近年、本庄市を中心とした「本庄市地方拠点都市地域」に指定されており、今後人口増加や産業の発展が見込まれている。流域内には、クリプトスポリジウム及びジアルジアの汚染源として考えられる生活排水処理施設、家畜飼育施設が点在している。生活排水の処理人口、家畜飼育施設の家畜頭数を表1及び2に示した。流域内の総人口は約 15.6 万人であり、下水道、農業集落排水、合併処理人口を合計した衛生処理人口は 7.4 万人（衛生処理率 46.6%）である。また、流域内には、牛の飼育戸数 210 戸、豚の飼育戸数 30 戸が点在しており、家畜頭数は、乳用牛約 5,800 頭、肉用牛約 13,000 頭、豚約 18,000 万頭であり、埼玉県内で最も家畜の密度が大きい地域である。

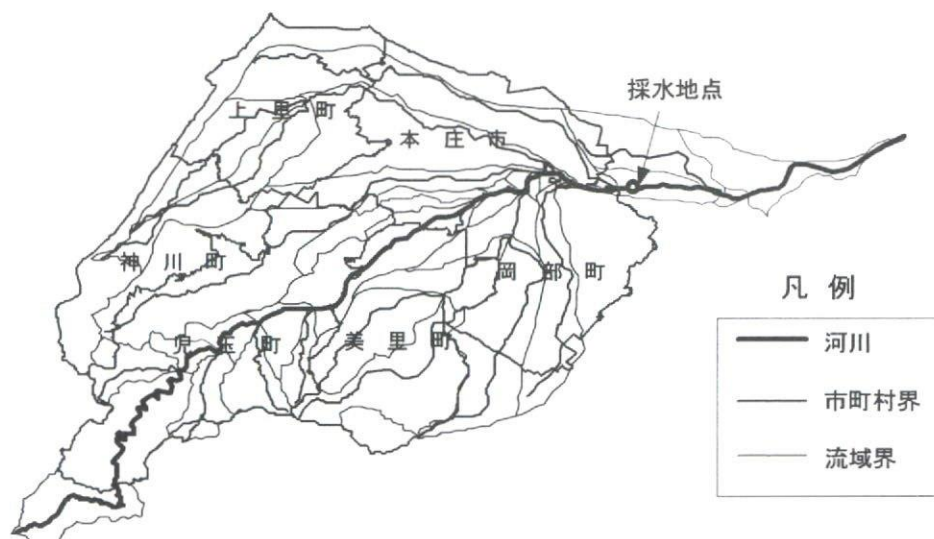


図1 小山川の流域・市町村界と採水地点

表1 流域の人口、衛生処理人口 (単位：人)

市町村	総人口	下水道	農業集落排水	合併処理浄化槽	衛生処理人口	衛生処理率 (%)
本庄市	59,234	37,323	1,137	3,584	42,044	68.8
美里町	12,193		2,718		2,718	22.3
児玉町	21,756			3,262	3,262	15
神川町	13,667			5,645	5,645	41.3
上里町	30,271			13,607	13,607	45
岡部町	18,642	1,977	228	4,132	6,337	35.4
合計	155,763	39,300	4,083	30,230	73,613	46.6

出典) 下水道人口は下水道統計平成 15 年度版、総人口、農業集落排水、浄化槽は浄化槽年鑑、平成 15 年版

表2 流域の家畜頭数（平成14年度末現在）

	乳用牛		肉用牛		豚	
	飼育戸数	頭数	飼育戸数	頭数	飼育戸数	頭数
本庄市	10	360	0	50	0	2,340
美里町	20	480	10	500	10	4,370
児玉町	30	1,250	30	1,980	0	2,680
神川町	30	1,420	10	1,310	10	3,160
上里町	10	810	10	1,310	10	3,940
岡部町	20	1,530	30	7,780	0	x
合計	120	5,850	90	12,930	30	16,490

出典) 農業統計、平成16年度版

B-2 採水方法

利根大堰地点では、現地に自動試料採取装置を設置し、経時的に水試料および濁質の採取を行った。自動試料採取装置へはポンプを用いて送水し、MF膜モジュール（三菱レイヨン、10cm円筒、高さ25cm程度）で100L程度ろ過した後、濁質成分を回収（クリプトスポリジウムオーシスト定量）した。また同時に1L程度の河川水を採取（水質分析用）した。採水頻度は、1～2ヶ月に1回（1回当たり3時間毎計8回採水）である。一方、小山川下流地点では、現地においてMF膜モジュールにローラーポンプで加圧通水して40～60L程度ろ過した後、濁質成分を回収した。また同時に1L程度の河川水を採取した。採水頻度は、1～2ヶ月に1回（1回当たり2～3時間毎計4回採水）である。

B-3 クリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストの定量

現地において濃縮した濁質成分を、遠心分離し、上清を吸引除去して沈渣を回収した。回収した試料は、高密度Pwcoll-ショ糖密度勾配遠心法、免疫磁気ビーズ法（Dynabeads GC-Combo, DYNAL）により濃縮・精製を行い、蛍光抗体（Easy Stain™ BTF DECISIVE MICROBIOLOGY）を用いて染色し、倒立顕微鏡（ECLIPSE TE2000-U、Nikon）を用いて蛍光染色FITCと微分干渉像で観察した。微分干渉像で内部構造の存在が確認され、ほぼ球形で直径5μm前後の緑色の蛍光を発しているオーシスト、楕円形で5～8μm×8～12μm程度の緑色に発光しているシストを探索した。その結果、陽性だと判断できたオーシスト（シスト）をガラスキャピラリー（Calibrated Pipets 10μL、Drummond Scientific Company）により単離・計測した。

単離したオーシストについては、18SrRNA遺伝子配列の決定を行い、同定した（平田、2006）。オーシストからのDNA抽出は、凍結融解法（-80℃で30minと56℃で30minを5回）を用い、18SiF-1と18SiRプライマーを用いて、18SrRNA遺伝子内の約260bpを対象にPCRで増幅をした（Morgan et al. 1997）。増幅DNAをテンプレートとし、ダイレクトシーケンスを日立ハイテクサイエンスシステムズ（株）で塩基配列を決定し、得られた塩基配列を

BLAST (Nucleotide-nucleotide BLAST, National Center for Biotechnology Information, U.S.A)により既知の塩基配列と比較し、相同性の高い種または遺伝子型を同定した。

B-4 指標水質項目の分析

指標水質項目として、大腸菌群 (Total coliform, TC)、糞便性大腸菌群 (Fecal coliform, FC)、大腸菌 (*E.coli*)、嫌気性芽胞菌 (ウェルシュ菌芽胞、Anaerobic spores、Spores of *Clostridium perfringens*, As)、硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$)、濁度を測定した。これらの項目の分析は、全て上水試験法(2,000年)に準じて行った。

C. 結果及び考察

C-1 河川水中のオーシスト及びシスト濃度と遺伝子解析

利根大堰地点のオーシスト及びシスト、水質項目の濃度を表3に示した。オーシスト及びシストは、それぞれ58試料中の48試料(陽性率82%)、76試料中の76試料(陽性率100%)から検出された。シストは、全試料から検出された。オーシストの月別の平均濃度(算術)を高い順で見ると、2005年1月30(oocysts/100L)、2004年12月23(oocysts/100L)、2005年11月18(oocysts/100L)と冬季に高い濃度で検出された。月別で最大濃度を示した1月で、日内の濃度変動を見ると、最小10~最大48(oocysts/100L)であった。シストの月別の平均濃度を高い順で見ると、2005年1月58(cysts/100L)、同年6月40(cysts/100L)、同年2月38(cysts/100L)であり、季節変動は小さく、オーシストと比較するとほとんどの月で高い濃度で検出された。月別で最大濃度を示した1月で、日内の濃度変動を見ると、最小32~最大89(cysts/100L)であった。

一方、小山川下流地点では、表4に示すようにオーシスト及びシストともにそれぞれ58試料中全ての試料で検出された。オーシストの月別の平均濃度を高い順で見ると、2005年9月807(oocysts/100L)、同年11月617(oocysts/100L)、2004年1月70(oocysts/100L)であり、本川に比べ2オーダー高い月もあった。月別で最大濃度を示した9月で、日内の濃度変動を見ると、最小2~最大3214(oocysts/100L)であり、非常に大きな変動を示した。シストの月別の平均濃度を高い順で見ると、2005年11月2031(cysts/100L)、同年7月356(cysts/100L)、同年6月271(cysts/100L)であり、オーシストと同様に本川に比べ高濃度のシストが検出された。

利根川で2、6、9、11月に検出されたオーシストを単離し、種・遺伝子型を解析した。その結果を図2に示した。単離したオーシストの種・遺伝子型は、*Cryptosporidium parvum* bovine genotype (ヒトへの感染性あり)、*C. meleagridis* (同あり)、*C. muris* (同あり)、*C. parvum* pig genotype I (同なし)、*C. parvum* pig genotype II (同なし)、*C. baileyi* (同なし)、*C. andersoni* (同なし)であり、ヒトへ感染を示す種・遺伝子型の存在が明らかになった。各月でオーシストの種・遺伝子型の相対比はことなり、オーシストが高濃度で検出された2、11月で、ヒトへの感染性を示す*C. parvum* bovine genotypeが検出された。

C-2 河川水中のオーシスト及びシスト濃度と水質項目、降雨との関係