

表 1 平成 19 年度のヘビ調査の結果

地域	陽性数/ 検体数		
	ヤマカガシ	シマヘビ	マムシ
東北	11/20 (55.0%)	－	0/7
信越			
北陸	4/ 4 (100%)	0/6	－
九州	0/17 (0%)	0/1	－
合計	16/41 (25.6%)	0/7	0/7

表 2 日本の野外に生息するヘビにおける *Cryptosporidium* sp. の保有  
(平成 14～19 年度の結果)

地域	陽性数/ 検体数				
	ヤマカガシ	シマヘビ	アガノイソグサ	マムシ	ジムグリ
北海道	－	0/1	－	－	0/5
東北	11/27 (40.7%)	0/8	0/2	0/7	－
関東	6/43 (14.0%)	0/20	0/25	0/1	－
信越					
北陸	4/4 (100%)	0/10	－	0/5	－
東海	0/ 2	0/7	0/5	－	－
近畿	1/10 (10.0%)	0/79	0/6	－	－
中国	31/101 (35.2%)	0/46	0/8	0/1	－
四国	3/14 (21.4%)	0/5	－	0/1	0/1
九州	1/22 (4.5%)	0/2	0/1	－	－
合計	57/223 (25.6%)	0/178	0/47	0/15	0/6

表3 *Cryptosporidium* 用 TaqMan PCR システムの特徴

TaqMan プローブ		標的遺伝子
PCR プライマー	塩基配列	
FG-pro	FAM / CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC / TAMRA	452bp DNA
FG-F	CGCTTCTCTAGCCTTTCATGA	
FG-R	CTTCACGTGTGTTTGCCAAT	
KAR	FAM / ACCGACTTGCCCTCC / TAMRA	18S rRNA
18SiF	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG	
18SiR	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC	
COWP P702	HEX / TGCCATACATTGTTGCTGACAAATTGAAT / BHQ-1	COWP
F	CAAATTGATACCGTTTGTCTTCTG	
R	GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT	
CPHSP2P2	FAM / TGTTGCTCCATTATCACTCGGTTTGA / TAMRA	<i>hsp70</i>
CPHSPT2F	TCCTCTGCCGTACAGGATCTCTTA	
CPHSPT2R	TGCTGCTCTTACCAGTACTCTTATCA	
EUK3	FAM / AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC / BHQ1	18S rRNA
18SiF	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG	
18SiR	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC	
Crypt-276p	FAM / CATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGG / TAMRA	18S rRNA
Crypt-193f	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCA	
Crypt-374r	CTCCCTCTCCGGAATCGAA	

下水処理によるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの除去に関する研究

分担研究者 麻布大学環境保健学部 森田 重光

研究要旨

2007 年 4 月から 12 月の間、下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シスト濃度を定量した。下水中の *Cryptosporidium* オーシストの濃度レベルは 5.00～1380 oocysts/L, *Giardia* シストの濃度レベルは 447～1170 cysts/L であった。6 月と 11 月の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は他の月と比べ有意に高く、集水域で小規模なアウトブレイクが発生した可能性が示唆された。放流水中の *Cryptosporidium* オーシストの濃度レベルは 0.08～2.13 oocysts/L, *Giardia* シストの濃度レベルは 2.00～6.70 cysts/L であり、両原虫の除去率は *Cryptosporidium* オーシストが 96.1～99.9%, *Giardia* シストが 99.2～99.8% であった。

ColorSeed を回収率トレーサとして添加した定量実験の結果から、*Giardia* シストの回収率が 8% 以下と低いことが明らかとなったため、ショ糖浮遊法による精製条件の最適化を図った。*Cryptosporidium* の比重は 1.06～1.08 であることからショ糖浮遊法で用いられるショ糖液の比重は 1.15～1.20 であることが多い。しかし、ショ糖の比重を変化させた回収実験の結果から、*Giardia* シストをショ糖浮遊法で精製して定量するためには、ショ糖液の比重を 1.30 とする必要があることが明らかとなった。

A. 研究目的

*Cryptosporidium* や *Giardia* をはじめとする原虫類は世界中に分布しており、主として水環境から検出される。先進国でも水を介した集団感染を引き起こしており、微生物衛生上の深刻な課題となっている。

そこで本研究では、都下の下水処理場で流入下水および放流水を採取し、*Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度レベルを明らかにするとともに、流入下水中の濃度と放流水中の濃度から下水処理による両原虫の除去率を算出した。

これまでに報告されている *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度レベルに関する研究では、試料をショ糖浮遊法や免疫磁気ビーズ法などの何らかの精製工程を経てから抗体染色法で染色し、顕微鏡観察して計数する方法が用いられている（U.S.EPA, 1995, U.S.EPA, 1999）。しかし、これらの精製工程では夾雑物が除去されるが *Cryptosporidium* オーシストや *Giardia* シストも損失する。したがって、試料中の濃度レベルを定量的に評価するためには損失分を補正する必要があるが、これまで回収率で補正したデータはほとんど報告されていない。

そこで本研究では、*Cryptosporidium* オーシストの回収率で補正する定量方法について検討した。

B. 研究方法

B-1 調査試料

2007 年 4 月から都内の下水処理場において月 1 回の頻度で流入下水および放流水を採取した。この下水処理場では標準活性汚泥法を用いて処理している。採取量は流入下水 2.0 L, 放流水 40 L とした。

1) 流入下水

流入下水は 2 L ポリタンクに採取し麻布大学へ搬送した。採取した流入下水は 4℃のインキュベータ内で保存し、採取後 1 週間以内に精製した。

2) 放流水

放流水は 20 L ポリタンク 2 本に採取した。採取した放流水には直ちにチオ硫酸ナトリウム溶液を添加し残留塩素を中和した。放流水は麻布大学へ搬送後直ちに濃縮し、濃縮物を 4℃のインキュベータ内で保存した。濃縮物は 1 週間以内に精製した。

B-2 回収率算出用トレーサの添加

精製工程におけるオーシストの損失を補正するために用いるトレーサとして ColorSeed (BTF Pty.) を用いた。ColorSeed は *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストを Texas Red で染色したものである。

B-3 *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃縮・精製

1) 濃縮

流入下水を入れたポリタンクにミキサーを挿入し試料を十分に混合した後に、うち 400 mL をポリプロピレン製遠沈管（以下遠沈管）8 本に 50 mL ずつ分注し、ここにトレーサを 100～200 (oo)cysts 添加してボルテックスミキサーで撹拌した。その後、遠心分離（1,500×g, 15 分間, 4℃）し、上清 25 mL をアスピレーターで吸引除去した。

放流水は試料全量を酢酸セルロース製外圧型中空糸限外ろ過膜モジュール（DAICEN MEMBRANE-STSTEMS, LTD）へ加圧ポンプを用いて通水しろ過した。ろ過後、モジュール内の液量が 100 mL 程度になるまで空気を圧送し、残った溶液を用いて膜表面に捕捉された物質を洗浄した。そして、その洗浄液を 2 本の遠沈管に分注した後、モジュール内へカプセル誘出液を約 100 mL 注入して振盪洗浄し、その洗浄液を 2 本の遠沈管に分注した。さらにモジュール内に精製水を約 100 mL ずつ 2 回に分けて注入し、その洗浄液を 2 本の遠沈管に分注した。これらの操作で得られた計 8 本の遠沈管を遠心分離し、沈渣を 2 本の遠沈管にまとめた。そして再び遠心分離し、上清を吸引除去して 1 本の遠沈管に沈渣をまとめ、トレーサとして ColorSeed を 100～200 (oo)cysts 添加した。

## 2) 超音波処理

試料中に存在する *Cryptosporidium* オーシストや *Giardia* シストは夾雑物に吸着あるいは抱合されている可能性があるため、流入下水および放流水を出力 300 W の超音波洗浄機（ULTRASONIC GENERATOR, SHARP）に 3 分間かけて、夾雑物からオーシストおよびシストを遊離させた。

## 3) ショ糖密度勾配遠心法

超音波処理した試料を直ちにボルテックスミキサーで撹拌した後、内径 2 mm のシリコンチューブを先端につけたシリンジを用いて各遠沈管の底へショ糖溶液（比重 1.20～1.30）を全量が 50 mL となるまで慎重に注入し界面を形成させた。これらの遠沈管を遠心分離した後、液面から界面下 7.5 mL までの溶液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に分取した。これに PBS（+）を加えて全量を 50 mL とした後、遠心分離して上清を吸引除去する操作を繰り返し、ショ糖を除去した。

## B-4 蛍光抗体染色

全てのフィルタに PBS で 3 倍希釈した *Cryptosporidium*, *Giardia* 用直接染色抗体試薬（Easy Stain<sup>TM</sup> C&G FITC,BTF Pty）を 80 μL 滴下し、暗所、室温、湿潤条件下で 45 分間反応させた。反応後、2 mL の洗浄液（Easy Stain<sup>TM</sup> Fixing

Buffer）で洗浄し、30%および 90%エタノール・グリセリン溶液をそれぞれ 500 μL ずつ吸引してフィルタを脱水した。脱水後、フィルタを 2% DABCO（1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane）グリセリン封入剤を滴下したスライドガラスにのせ、カバーガラスをかけてプレパラートとした。

## B-5 オーシスト、シストおよびトレーサの定量

### 1) オーシスト、シストの定量

ノマルスキー微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡（BX-60, OLYMPUS）を用いてプレパラートにした試料を観察した。まず、B 励起光下 200 倍で観察し、アップルグリーン色の蛍光を発する 4～6 μm あるいは 8～12 μm の類円形または楕円形の蛍光粒子を検索した。該当した蛍光粒子は 400 倍および 1,000 倍の微分干渉像で *Cryptosporidium* オーシストあるいは *Giardia* シストであるか否かを判定した。

### 2) トレーサの定量

*Cryptosporidium* オーシスト、*Giardia* シストの定量後に ColorSeed を定量した。すなわち、プレパラートにしたフィルタの全面を G 励起光下 200 倍で検鏡し、強い赤色の蛍光を発する 4～6 μm あるいは 8～12 μm の粒子の個数を計数した。

## C. 結果と考察

### C-1 流入下水中の *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度

流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度を図 1-a に示す。本研究で調査した 2007 年 4 月から 12 月の流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 5.00～1380 oocysts/L であった。このうち、6 月（1380 oocysts/L）と 11 月（188 oocysts/L）の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は他の月と比べ有意に高く、集水域で小規模なアウトブレイクが発生した可能性が示唆された。11 月の下水濃縮物中の *Cryptosporidium* オーシストの優占種をダイレクトシーケンシングで調べたところ、ヒトのみに感染する *Cryptosporidium hominis* であることが明らかとなった。この結果はヒト集団でアウトブレイクが発生したことを裏付けるものであると考えられる。

流入下水中の *Giardia* シスト濃度を図 2-a に示す。本研究で調査した流入下水中の *Giardia* シスト濃度は 448～1170 cysts/L であり、*Cryptosporidium* オーシスト濃度の調査で観測されたようなピークはみられず、また、全体的に *Cryptosporidium* オーシスト濃度よりも数倍から数十倍高かった。

### C-2 放流水中の *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度

放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度を図 1-b に *Giardia* シスト濃度を図 2-b に示す。*Cryptosporidium* オーシスト濃度は 0.08~2.13 oocysts/L, *Giardia* シスト濃度は 2.00~6.70 cysts/L であった。

### C-3 除去率

流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト, *Giardia* シストの濃度から下水処理による除去率を求めた (図 3)。その結果, *Cryptosporidium* オーシストの除去率は 96.1~99.9% (1.40~2.83 log<sub>10</sub> 除去), *Giardia* シストの除去率は 99.8~99.2% (2.11~2.66 log<sub>10</sub> 除去) となった。

以上の結果から, 下水とともに処理場に流入した *Cryptosporidium* オーシスト, *Giardia* シストは, 処理工程 (標準活性汚泥法) でいずれも高い効率で除去されることが明らかとなった。

### C-4 回収率

2007 年 6 月から 12 月の流入下水試料を分析したときの ColorSeed-*Cryptosporidium* オーシストの回収率は 50~71% であったが, ColorSeed-*Giardia* シストの回収率は全て 8% 以下であった。このように *Giardia* シストの回収率が低くなる理由としては, 精製工程に不備がある, あるいは, トレーサが *Giardia* シストと同じ挙動をとらず, 見かけ上回収率が低下することが考えられる。

そこで, まず, 下水試料に ColorSeed を添加し, ショ糖浮遊法のショ糖液の比重を 1.20, 1.25, 1.30 と変化させたときの ColorSeed の回収率を求めた。また, 実試料中の両原虫と ColorSeed の両原虫が精製工程中で同じ挙動を示すか否かを調べるため, 下水中の *Cryptosporidium* および *Giardia* を精製せずに直接フィルタでろ過して定量し, 精製した後の両原虫の定量値との比から実試料中の両原虫の回収率を算出した。

比重 1.20~1.30 のショ糖液で精製したときの下水中に存在していた *Giardia* シストおよび ColorSeed-*Giardia* シストの回収率を表 1 に示す。下水中に存在していた *Giardia* シストも ColorSeed-*Giardia* シストもショ糖の比重が高くなるにつれて回収率は向上し,  $d=1.30$  のときの回収率は下水中に存在していた *Giardia* シストが 53%, 添加した ColorSeed-*Giardia* シストが 51~56% となった。*Giardia* シストと ColorSeed-*Giardia* シストの回収率は比重が変わってもほぼ同じ値となったことから, ショ糖浮遊法の工程内では両者は同じ挙動をとるものと考えられた。なお, ショ糖浮遊法のショ糖液の比重を高くすると狭雑物の分離能が低くなる。しかし, ショ糖浮遊法で精製

した後の試料中の濁質の量は, ショ糖の比重が 1.20 の場合よりも比重 1.30 の場合の方が多少多かったものの, 顕微鏡観察が困難になるレベルではなかった。以上の結果から, *Giardia* シストをショ糖浮遊法で精製する場合はショ糖液の比重を 1.30 とする必要があることが明らかとなった。

### D. 結論

本研究では, 流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト, *Giardia* シストの濃度を調査した結果, 以下の知見が得られた。

- ① 流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 5.00~1380 oocysts/L, *Giardia* シスト濃度は 448~1170 cysts/L となり, 放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度は 0.08~2.13 oocysts/L, *Giardia* シスト濃度は 2.00~6.70 cysts/L となった。
- ② 流入下水および放流水中濃度から下水処理による両原虫の除去率を算出したところ, *Cryptosporidium* オーシストでは 96.1~99.9%, *Giardia* シストでは 99.2~99.8% であった。
- ③ *Giardia* シストをショ糖浮遊法で精製して定量する場合は, ショ糖液の比重を 1.30 とする必要がある。

### E. 参考文献

- U. S. EPA, ICR protozoan method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure, EPA/814-B-95-003 (1995)
- U. S. EPA, Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration-IMS/FA, EPA-821-R-99-006 (1999)

### F. 健康危機管理情報

なし

### G. 研究発表

1. 誌上発表
- Morita, S., Ishii, T., Akiba, M., Yagita, K., Kuroki, T., Katayama, H., Haramoto, E. and Hirata, T., Quantifying the removal of pathogenic protozoa during activated sludge processing, *Proceedings of International Water Association ASPIRE Conference and Exhibition*, 114/8pp. (2007)
- Morita, S., Nakashima, T., Urakami, I., Iwasaki, T. and Hirata, T., Inactivation of *Cryptosporidium* by a combination of UV irradiation and chlorination, *Proceedings of International Water Association ASPIRE Conference and Exhibition*, 21/8pp. (2007)

## 2. 学会発表

Morita, S., Ishii, T., Akiba, M., Yagita, K., Kuroki, T., Katayama, H., Haramoto, E. and Hirata, T., Quantifying the removal of pathogenic protozoa during activated sludge processing, International Water Association ASPIRE Conference and Exhibition, Parth (2007)

Morita, S., Nakashima, T., Urakami, I., Iwasaki, T. and Hirata, T., Inactivation of *Cryptosporidium*

by a combination of UV irradiation and chlorination, International Water Association ASPIRE Conference and Exhibition, Parth (2007)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

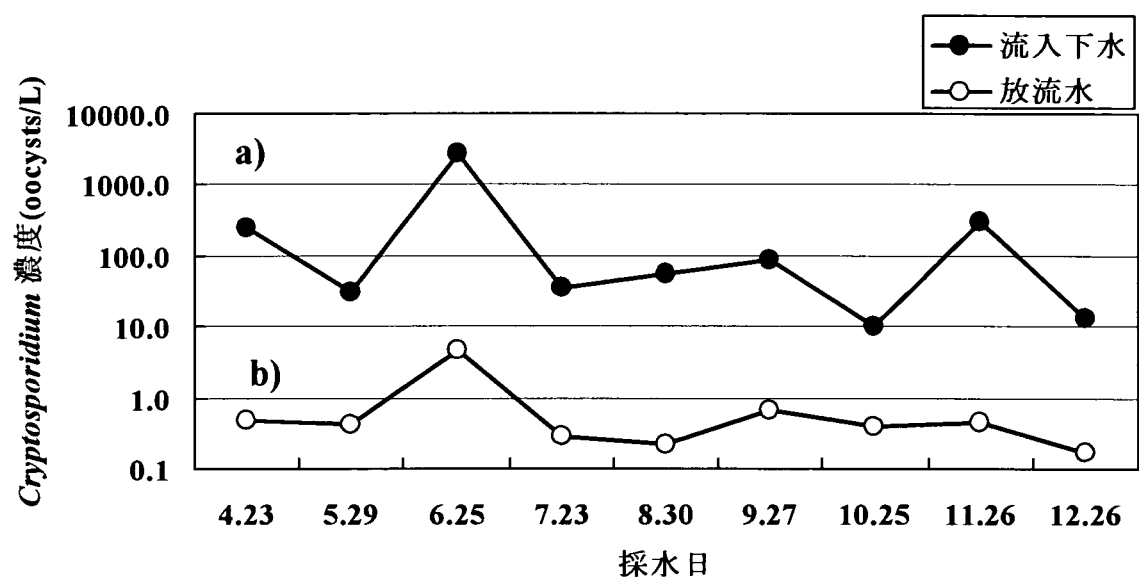


図1 流入下水および放流水中の *Cryptosporidium* 濃度  
a)流入下水, b)放流水

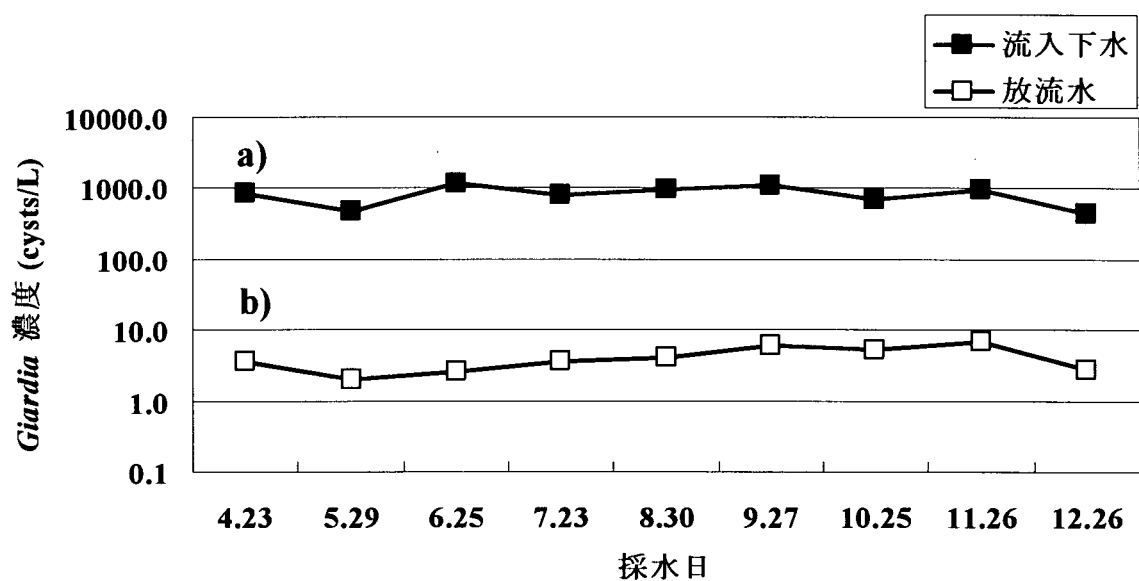


図2 流入下水中および放流水中の *Giardia* 濃度  
a)流入下水, b)放流水

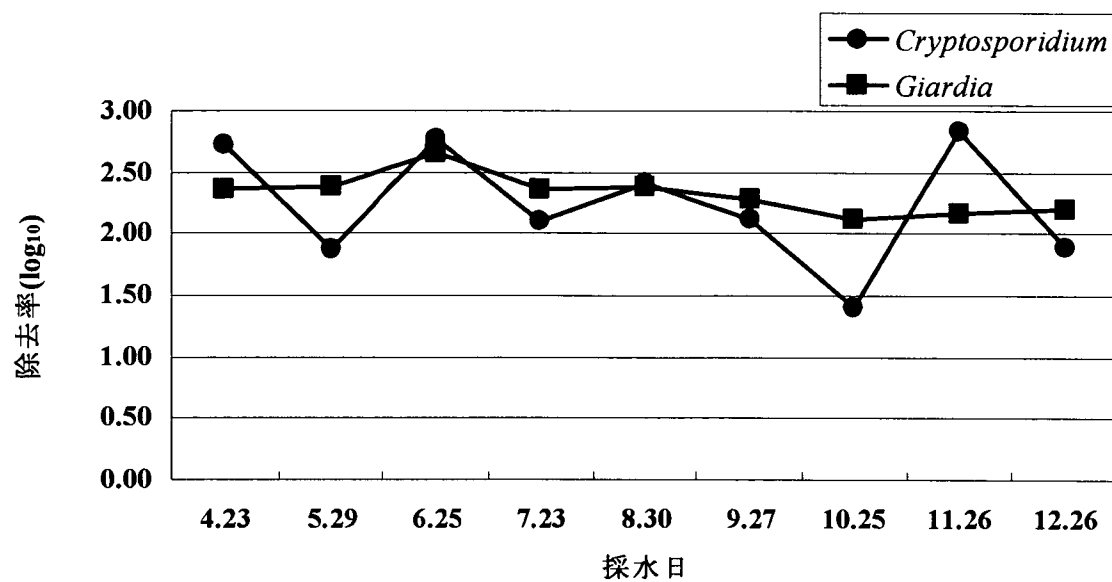


図3 *Cryptosporidium* および *Giardia* の除去率

表1 下水中 *Giardia* およびトレーサー *Giardia* の回収率

シヨ糖液比重	回収率(%)	
	下水中 <i>Giardia</i>	ColorSeed <i>Giardia</i>
1.20	10	1-8
1.25	25	27
1.30	53	51-56



## 畜舎排水処理施設におけるクリプトスポリジウムの除去性の検討

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：森田 重光 麻布大学環境保健学部  
研究協力者：原本 英司 国立保健医療科学院水道工学部  
研究協力者：與那城雄司 国立保健医療科学院水道工学部

### 研究要旨

牛舎汚水を処理する実施設において、流入水及び処理水を採取し、オーシストの濃度を把握するとともに、その除去性について検討した。その結果、牛舎汚水処理施設の流入オーシスト濃度は、1500 oocysts/L ～2000 oocysts/L であり、その除去率は、1.03Log～1.30Log であった。

### A. 研究目的

クリプトスポリジウムはヒトや哺乳動物（ウシ、ブタ、イヌ、ネコ等）の消化管内で増殖し、感染症をもたらす。これらの感染した動物の糞便に混じってクリプトスポリジウムオーシスト（以下オーシストという）が環境中に排出される。これまでの世界における水道水を介した集団感染事例の検証から、オーシストの原水汚染と不十分な浄水処理が重なることで事故につながっている。原水中のオーシストの存在量は、水源となる表流水等の取水施設の上流域に、生活排水処理施設又は畜舎排水処理施設等の排出源の有無で大きく左右される。従って、排出源である両排水処理施設の除去性や排水中の存在量の把握が重要となる。畜舎については、平成 11 年、家畜排せつ物の適正な管理に向けて、家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律（家畜排せつ物法）が施行され、一定規模以上の家畜を飼養する畜産農家や事業所において、畜舎排水の処理施設が普及している。しかし、畜舎排水処理施設におけるオーシストの除去に関する定量的な知見は乏しく、クリプトスポリジウムの感染リスクなどを評価する際に支障をきたしている。

そこで本研究では、牛舎汚水を処理する実施設において、流入水及び処理水を採取し、オーシストの濃度を把握するとともに、その除去性について検討した。

### B. 研究方法

#### B-1 畜舎排水処理施設

畜舎排水処理施設は、神奈川県内牛舎汚水処理施設を対象とした。この処理施設の処理フローを図 1 に示した。処理方式としては、回分式活性汚泥法を採用している。肉用牛、乳用牛あわせて 70～80 頭分を飼育しており、その汚水とミルクパーラー排水約 6.2m<sup>3</sup>/日进行处理している。表 1 に処理施設の設計緒元を示した。

#### B-2 試料の採取

調査は、平成 19 年 8 月、12 月の 2 回実施した。試料は、図 1 に示すとおり牛舎汚水処理施設において、流入水及び処理水をそれぞれ 2L 採取した。

#### B-3 オーシストの定量

採取した試料 2L を十分に混合した後、100mL をショ糖浮遊法及び酢酸エチル抽出法でマトリクスを除去した。その試料をフィルタでろ過し、直接免疫抗体法及び DAPI 法で染色して顕微鏡観察を行った。直接免疫抗体法で染色された直径 4～6μm の粒子について微分干渉像及び DAPI 染色像を観察し、オーシストであるか否かを判定した。

#### B-4 水質項目の測定

12月の調査では、流入水、処理水について、水温、pH、BOD、SS、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌の測定を行った。分析方法は、上水試験方法(2001年)に準じて行った。

## C. 結果及び考察

### C-1 SS, BOD の除去

牛舎汚水処理施設では、肉用牛、乳用牛あわせて 70～80 頭分の汚水とミルクングパーラー排水を 1 日あたり約 6.2m<sup>3</sup> を処理している。表 2 に各水質項目の除去率を示した。SS 及び BOD 濃度は、流入水がそれぞれ 280.0 mg/L, 734.0mg/L, 処理水がそれぞれ 5.0mg/L, 3.0mg/L であった。その除去率は SS 99.0%, BOD 99.3%であり、非常に高い値を示した。なお、当該自治体が制定した水質汚濁防止法に係る畜舎の排出基準は SS 200mg/L, BOD 160mg/L である。

### C-2 オーシストの濃度及びその除去

ウシ、ブタ等の畜舎はオーシストの主要な排出源である。特にウシはヒトへの感染性を有する *Cryptosporidium parvum* の宿主である。本研究では、牛舎汚水処理施設を対象として、その除去性について調査を実施した。その結果を表 3 に示した。8 月、12 月の流入水のオーシスト濃度はそれぞれ 2000 oocysts/L, 1500 oocysts/L であった。処理水では 8 月 100 oocysts/L 以下、12 月 140 oocysts/L の濃度で検出された。その除去率は、8 月 1.30Log 以上、12 月 1.03Log であった。今回の調査では SS, BOD の除去が良好であり適切に処理が行われていたと考ええると、牛舎汚水処理施設のオーシスト除去は 1Log 程度除去されることがわかった。下水処理プロセス（活性汚泥処理法）によるオーシスト除去は約 2Log であると報告されている。畜舎排水処理施設におけるオーシスト除去性は、下水処理プロセスと比較して、低くなることがわかった。

畜舎排水処理施設におけるクリプトスポリジウムの指標菌の除去率は、大腸菌群 3.70Log, 大腸菌 4.08Log, 嫌気性芽胞菌

1.27Log であり、嫌気性芽胞菌がオーシストと最も近似した除去率を示した。今回は、夏と冬の 2 回の調査結果であり、今後データの蓄積を必要とされる。

## D. 結論

本研究では、牛舎汚水処理施設の実施設において、流入水及び処理水を採取し、オーシストの濃度を把握するとともに、その除去性について検討した。その結果、以下の知見が得られた。

- 1) 牛舎汚水処理施設の流入オーシスト濃度は、1500 oocysts/L ～2000 oocysts/L であり、その除去率は、1.03Log ～1.30Log であった。
- 2) クリプトスポリジウムの指標菌の除去率は、大腸菌群 3.70Log, 大腸菌 4.08Log, 嫌気性芽胞菌 1.27Log であり、オーシストと最も近似した除去率を示したのは、嫌気性芽胞菌であった。

## E. 参考文献

社団法人日本下水道協会. 下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会 最終報告,平成 12 年 3 月,2000.

## F. 健康危機管理情報

なし

## G. 研究発表

なし

## H. 学会発表

なし

## I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

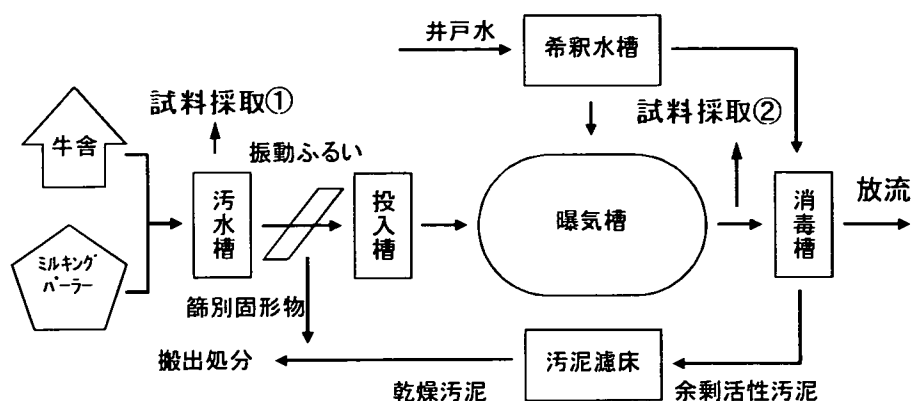


図1 牛舎汚水処理施設の処理フロー

表1 設計緒元

処理方式	回分式活性汚泥法
滞留時間	約 24 時間
曝気槽	1 時間おきの間欠曝気
処理対象	搾乳牛換算 70 頭分の尿汚水とミルクパーラー排水
処理対象汚水量	$70 \text{ 頭} \times 60 \text{ l} + 2 \text{ m}^3 = 6.2 \text{ m}^3$
処理対象 BOD	25.5kg/日、4,113ppm
処理対象 SS	25.7kg/日、4,116ppm
曝気槽 BOD 負荷	$0.3 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{日}$
放流水の水質	BOD 56ppm、SS 59ppm

表2 各水質項目の除去率

水質項目	流入水	処理水	除去率
水温(℃)	15.4	15.3	—
pH	7.15	7.85	—
SS(mg/L)	280.0	3.0	99.0 (%)
BOD(mg/L)	734.0	5.0	99.3 (%)
大腸菌群 (CFU/mL)	280,000	56	3.70 (Log)
大腸菌 (CFU/mL)	42,000	3.5	4.08 (Log)
嫌気性芽胞菌 (CFU/mL)	120	6.5	1.27 (Log)

表3 オーシストの除去率

調査日	流入水 (oocysts/L)	処理水 (oocysts/L)	除去率 (Log)
070809	2000	<100	1.30
071203	1500	140	1.03

## 利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染の実態調査

分担研究者：秋葉 道宏 国立保健医療科学院水道工学部  
協力研究者：原本 英司 国立保健医療科学院水道工学部  
協力研究者：與那城雄司 国立保健医療科学院水道工学部  
協力研究者：橋本 温 阿南工業高等専門学校

### 研究要旨

水道水源河川におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源である利根川並びにその支川の小山川等の 9 地点を選定し、表流水に含まれるクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度分布とその遺伝子型を明らかにした。オーシスト、シスト濃度は、それぞれ 0.5～788 oocysts/10L, 0.5～37 cysts/10L であった。オーシストの遺伝子型は、*Cryptosporidium pig* genotype I (AF115377) が 49 試料、*C. andersoni* (AB089285) が 5 試料、*C. pig* genotype II (EF012375) が 1 試料、*C. pig* genotype II (EU331243) が 1 試料、*C. meleagridis* (AF112574) が 1 試料であり、同定された 57 試料中 50 試料 (88%) がヒトへの感染報告が存在する遺伝子型 (*C. pig* genotype I 及び *C. meleagridis*) であった。

### A. 研究目的

水道水を介したクリプトスポリジウム症の集団発生は、国内外を問わず、世界各地で問題となっている。我が国においては、1996 年の埼玉県越生町での集団発生事例を受け、主要な水道水源におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染の実態調査が行われている。特に、汚濁した流入河川では、本川に比べてクリプトスポリジウムオーシスト（以下オーシストという）及びジアルジアシスト（以下シストという）の濃度が高いことが報告されており、支川でのオーシスト及びシストによる汚染実態を把握することは非常に重要であると考えられる。また、水道水源に存在するクリプトスポリジウムの遺伝子型に関しては、いまだ知見が乏しく、水道水のクリプトスポリジウム汚染による健康リスクの評価を行う際に支障をきたしている。

そこで本研究では、水道水源河川におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源である利根川及びその支川的小山川等において 9 地点を選定し、クリプトスポリジウム及

びジアルジアによる汚染実態の把握とクリプトスポリジウムの遺伝子型の解析を試みた。

### B. 研究方法

#### B-1 調査地点と流域状況

調査地点は、利根川中流域に位置する利根大堰を中心に 4 地点、利根川の支川である小山川において 2 地点、小山川からさらに枝分かれした A 川において 3 地点を選定した（図 1）。利根大堰は上水、工業用水、農業用水の大規模取水（導水）地点となっている。利根川の流域の土地利用は、山地等約 69%、水田や畑等の農地約 25%、宅地等の市街地約 6%となっており、流域内の総人口は 1,214 万人である。小山川の流域には、クリプトスポリジウム及びジアルジアの排出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。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 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。A 川は、小山川へ合流する支川のひとつである。流域内の家畜頭数は、乳用牛約 1,900 頭、肉用牛約 2,700 頭、豚約 5,100 頭であり、小山川の流域内で最も家畜が集中している地域である。

## B-2 試料の採取

調査は、平成 19 年 6 月から平成 20 年 2 月にかけて計 6 回実施した。6 月及び 8 月の調査（以下前期調査という）では、河川水を 40L 採水した。一方、10 月以降の調査（以下後期調査という）では、河川水を 10L 採水した。

## B-3 回収率算定用トレーサーの添加

水試料中に存在するオーシスト及びシストを検出する試験は、オーシスト及びシストの濃縮、精製、染色、顕微鏡観察の諸工程からなる。その一連の工程におけるオーシスト及びシストの回収率を算定するため、河川水の採水容器に代替トレーサー（Color Seed C&G, BTF）を添加した。

## B-4 試料の濃縮及び精製

オーシスト及びシストの濃縮及び精製は、「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法」に準じて行った。前期調査では、河川水と底泥試料をそれぞれアセトン溶解性のメンブレンフィルター（直径 293mm、孔径 1.2 $\mu$ m、Millipore）を用いて全量加圧ろ過したのち、メンブレンフィルターをアセトンにより完全溶解して除去し、オーシスト及びシストを含む沈渣を遠心分離により回収した（メンブレンフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法）。一方、後期調査では、河川水を親水性 PTFE メンブレンフィルター（直径 142mm、孔径 1.0 $\mu$ m, Advantec）を用いて全量加圧ろ過したのち、メンブレンフィルターを攪拌子と試験管ミキサーにより強く攪拌して、オーシスト及びシストを含む捕捉物を洗い出して回収した（親水性 PTFE メンブレンフィルター法）。

## B-5 オーシスト及びシストの検出

はじめに、精製した試料を 2 等分したのち、半量の試料に含まれるオーシスト及び

シストを染色して定量した。また、残りの半量に含まれるオーシストを染色して単離に供した。

### 1) オーシスト及びシストの定量

精製した試料を撥水ペン（Dako）により直径約 1cm の円を描いた親水性 PTFE メンブレンフィルター（直径 25mm、孔径 1.0 $\mu$ m, Advantec）を用いて吸引ろ過した。メンブレンフィルター上で DAPI 染色液

（4',6-diamidino-2-phenylindole, 0.4 $\mu$ g/mL）と蛍光抗体染色液（Easy Stain, BTF）による染色を行ったのち、スライドガラス上にメンブレンフィルターを載せ、カバーガラスをかけてプレパラートを作製した。作製したプレパラートを微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡（IX71, OLYMPUS）により観察した。オーシストについては、類円形で、その長径が 5 $\mu$ m 前後の緑色の蛍光を発する粒子を探索した。シストについては、卵円形で、その長径が 8～18 $\mu$ m、短径 5～8 $\mu$ m の緑色の蛍光を発する粒子を探索した。その結果、陽性と判定されたオーシスト及びシストを計数した。

### 2) オーシストの単離

精製した試料に蛍光抗体染色液（Easy Stain, BTF）を添加し、4℃で 2 日間以上染色したのち、遠心分離（3,000 x g, 10 分間）により 100 $\mu$ L 程度に濃縮した。濃縮した試料を GLASS BASE DISH（ディッシュ直径 35mm、カバーガラス直径 12mm, IWAKI）に滴下し、微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡（ECLIPSE TE2000-U, Nikon）により観察した。オーシストの定量的場合と同様に、緑色の蛍光を発する粒子を探索し、陽性と判定されたオーシストをガラスキャピラリー（Calibrated Micropipets 10 $\mu$ L, drummond scientific company）により単離した。

## B-6 代替トレーサーの定量

代替トレーサーが含まれる精製物は、オーシスト及びシストの定量的場合と同様に、プレパラートを作製し、顕微鏡下（IX71, OLYMPUS）でオーシスト及びシストの形態と類似した粒子を探索し、B 励起光下で緑色、かつ、G 励起光下で赤色の蛍光を発する粒子をトレーサーと判断して計数した。

## B-7 DNA 抽出

単離したオーシストを滅菌超純水 18μLが入ったPCR用マイクロチューブに吐き出し、そのマイクロチューブを-80℃と室温での凍結融解処理を3回繰り返し、10% Triton X100 5μLを加えて、サーマルサイクラーで99℃、15分間の加熱処理を行った。

#### B-8 Nested PCR

DNAを抽出したオーシストを18S rRNA領域を対象としたNested PCRに供した。First PCRでは、5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'および5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'の2種類のプライマーを用いて約1325bpを増幅させ、Second PCRでは、5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'と5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'を用いて約830bpを増幅させた(Xiao *et al.*, 1999 及び Xiao *et al.*, 2000)。PCR酵素にはKOD-Plus-(TOYOBO)を使用し、PCR反応液の組成およびPCR条件は標準プロトコルにしたがった。Nested PCR後の試料は、2%アガロースゲルを用いた電気泳動に供したのち、エチジウムブロマイドで染色し、目的の長さのPCR産物が生成されているかを確認した。

#### B-9 ダイレクトシーケンシング

電気泳動によって陽性と判定された試料は、QIAquick PCR purification kit(Qiagen)を用いてPCR産物を精製したのち、ダイレクトシーケンシングによって塩基配列を解読した。得られた塩基配列情報をClustal Wを用いてアラインメントしたのち、近隣結合法(neighbor-joining analysis)によって系統樹を作成し、クリプトスポリジウムの遺伝子型を決定した。

#### B-10 河川水の分析

河川水の水質指標項目として、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌、濁度を測定した。これらの項目の分析は、上水試験方法(2001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の濃度

河川水中のオーシスト及びシストの検出

結果を示した(表1)。オーシストは、39試料中31試料(79%)から検出され、最大で788 oocysts/10Lの濃度を示した。シストは、39試料中28試料(71%)から検出され、最大濃度は37 cysts/10Lであった。河川別の陽性率は、オーシストの場合、利根川で72%(13/18)、小山川で75%(9/12)、A川で100%(9/9)であり、シストの場合、利根川で78%(14/18)、小山川で50%(6/12)、A川で89%(8/9)であった。また、月別の陽性率は、オーシストが50~100%、シストが0~100%の範囲内で変動し、ともに8月に最も低い陽性率を示した。

河川別のオーシストとシストの最大濃度は、利根川ではそれぞれ20 oocysts/10L及び32 cysts/10Lであったのに対し、小山川では96 oocysts/10L及び24 cysts/10L、A川では788 oocysts/10L及び37 cysts/10Lとなり、オーシストについては、本川に比べて支川へ遡るほど高濃度で検出される傾向が見られた。これは、本川に比べて支川の方が人為的負荷の影響を大きく受けるためであると推察される。小山川において、いろは橋(上流)よりも高橋(下流)でのオーシストの陽性率と濃度が高い値を示したことから、この2地点の間にオーシストの混入地点が存在していることが示唆された。このことは、両地点の間で小山川に合流するA川で極めて高いオーシスト濃度が得られていることから支持される。さらに、10月中旬のA川では、上流から中流、下流にかけてオーシスト及びシスト濃度の上昇が顕著であったことから、A川を流下する過程でオーシスト及びシストが混入したと考えられた。河川水中のオーシスト及びシスト濃度の上昇の要因のひとつに、降雨が挙げられている。その理由として、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によるとされている。A川流域に位置する寄居雨量観測所のデータによると、10月中旬の降水量は、採取日の前々日0mm/day、前日1mm/day、当日0mm/dayであり、目立った降雨は観測されていない。このことから、10月中旬のA川におけるオーシスト及びシスト濃度が上昇した要因としては、降雨による洗い流しの影響より生活排水処理施設や家畜飼育施設からの排出が示唆された。しかしながら、12月のA川では、オー

シスト濃度は、10月中旬に比べて極端に低い濃度であったことから、汚染は定常的ではないと考えられた。

平成19年4月より適用された「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」(厚生労働省、2007年)の中で、水道原水のクリプトスポリジウム汚染の可能性の有無を判定するための指標として、大腸菌、嫌気性芽胞菌を挙げている。河川水中のオーシスト、シストの検出の有無で比較すると、オーシスト及びシストが検出された場合、大腸菌、嫌気性芽胞菌の幾何平均濃度は、両菌ともに $10^3$  CFU/100mL程度であったのに対し、オーシスト及びシストが検出されなかった場合、それぞれ $10^2$  CFU/100mL程度、 $10^2 \sim 10^1$  CFU/100mL程度であり、その濃度に差がみられた。このことから、オーシスト及びシストの微生物指標となっていることが検証された(表2及び表3)。なお、幾何平均濃度を求めるにあたり、大腸菌、嫌気性芽胞菌が不検出の場合は、定量下限の1/10値を代入して算定した。

## C-2 単離したオーシストのNested PCRおよびダイレクトシーケンスの結果

河川水中から単離したオーシストのNested PCRおよびダイレクトシーケンスの結果を表4に示す。単離した422試料をNested PCRに供した結果、57試料(14%)が陽性となった。そのすべてをダイレクトシーケンスに供した結果、57試料すべて(100%)で塩基配列の解読に成功した。単離から塩基配列の解読までの最終的な成功率は14%(57/422)であり、河川水から単離したオーシストの遺伝子型を解析した秋葉らの結果(67%, 2007)や平田らの報告(46%, 2004及び16%, 2005)と比較すると、低い結果であった。河川水中のオーシストは、培養株や下水に含まれるオーシストに比べて、環境中での影響(日照、水温、その他物理的なストレス)によりオーシストが損傷を受けていると考えられており、その成功率も低くなる傾向がみられる。今回の場合は、特にPCRの陽性率(14%)が低かった。その要因として、オーシストを単離した際に含まれる夾雑物やDNA抽出の過程で割れたオーシストの殻自体が、PCRによる遺伝子の増幅を阻害しているこ

とが挙げられる。

## C-3 河川水中のオーシストの種や遺伝子型

河川水中から単離したオーシストの塩基配列と2008年2月現在でGenBankに登録されている主要な配列約40を用い、Xiaoらが提言している遺伝子型名を付した系統樹を作製した結果を図2に示す。また、この系統樹に基づき、河川水中から単離したオーシスト57試料の遺伝子型を同定した結果を表5に示す。同定された遺伝子型の内訳は、*Cryptosporidium pig* genotype I (AF115377)が49試料と最も多く、*C. andersoni* (AB089285)が5試料、*C. pig* genotype II (EF012375)が1試料、*C. pig* genotype II (EU331243)が1試料、*C. meleagridis* (AF112574)が1試料であった。河川別の内訳は、利根川では*C. andersoni* (AB089285)が1試料、小山川では*C. pig* genotype I (AF115377)が3試料、*C. andersoni* (AB089285)が3試料、*C. pig* genotype II (EF012375)が1試料、*C. pig* genotype II (EU331243)が1試料、A川では*C. pig* genotype I (AF115377)が46試料、*C. andersoni* (AB089285)が1試料、*C. meleagridis* (AF112574)が1試料であった。

同定されたオーシストの遺伝子型のうち、ヒトへの感染が報告されているのは、*C. pig* genotype I (AF115377)および*C. meleagridis* (AF112574)であり、57試料中50試料(88%)がヒトへの感染報告が存在する種や遺伝子型であった。

また、昨年度の結果(秋葉ら、2007)と比較すると、昨年度は河川水中から単離したオーシストは全て*C. parvum* bovine genotype (55試料)であったのに対し、今年度は*C. parvum* bovine genotypeは全く検出されず、その他の遺伝子型(57試料)であった。小山川の高橋地点では、昨年度は*C. parvum* bovine genotypeのみ(11試料)が検出されたのに対し、今年度検出された遺伝子型は、*C. pig* genotype I (3試料)、*C. andersoni* (3試料)、*C. pig* genotype II (2試料)であり、年により異なる傾向が見られた。

## C-4 異なる濃縮法による回収試験

河川水を試料として、濃縮法別にそれぞれ 5 試料について、代替トレーサーを添加し、濃縮から精製までの一連の工程の回収試験を行った（表 6）。メンブレンフィルター加圧ろ過—アセトン溶解法では、オーシスト、シストのトレーサーの平均回収率は、河川水が 40L の場合、それぞれ 7.5%（5～10%）、11.5%（5～18%）であり、河川水が 10L の場合、それぞれ 5.7%（4～7%）、3.7%（2～5%）であった。一方、親水性 PTFE メンブレンフィルター法では、オーシスト、シストのトレーサーの平均回収率は、河川水が 10L の場合、それぞれ 50.6%（32～59%）、40.8%（26～53%）であり、アセトン溶解法と比べて高い回収率が得られた。アセトン溶解法の場合、オーシストが濁質とともにコロイドに埋もれてしまう可能性が指摘されており、操作に熟練が必要な濃縮法であると考えられた。

#### D. 結論

本研究では、水道水源河川におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアの分子生物学的情報に関するデータベースの構築を行うため、首都圏住民の水道水源である利根川並びにその支川の小山川等の 9 地点を選定し、表流水に含まれるクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度分布とそこに存在するクリプトスポリジウムの遺伝子型を明らかにした。その結果を要約すると、以下のとおりである。

- 1) 調査は 6 月から 2 月にかけて 6 回実施したところ、河川水中のオーシストは、79%（31/39）の試料から検出され、最大で 788 oocysts/10L の濃度を示した。一方、河川水中のシストは、71%（28/39）の試料から検出され、最大濃度は 37 cysts/10L であった。
- 2) 河川別のオーシストの最大濃度は、利根川では 20 oocysts/10L であったのに対し、小山川では 96 oocysts/10L、A 川では 788 oocysts/10L となり、本川に比べて支川へ遡るほど高濃度で検出される傾向が見られた。さらに小山川においては、いろは橋（上流）よりも高橋（下流）でのオーシスト及びシストの濃度が 1 オーダ程度高い値を示したことから、この 2 地点の間にオーシスト

及びシストの混入地点が存在していることが示唆された。

- 3) 単離したオーシスト 422 試料のうち、57 試料（14%）が同定され、その内訳は、*Cryptosporidium pig* genotype I (AF115377) が 49 試料、*C. andersoni* (AB089285) が 5 試料、*C. pig* genotype II (EF012375) が 1 試料、*C. pig* genotype II (EU331243) が 1 試料、*C. meleagridis* (AF112574) が 1 試料であった。同定されたオーシストの遺伝子型のうち、ヒトへの感染が報告されているのは、*C. pig* genotype I (AF115377) および *C. meleagridis* (AF112574) であり、57 試料中 50 試料（88%）がヒトへの感染報告が存在する遺伝子型であった。また、昨年度は河川水中から単離したオーシストは全て *C. parvum* bovine genotype（55 試料）であったのに対し、今年度検出された遺伝子型は *C. pig* genotype I（49 試料）、*C. andersoni*（5 試料）、*C. pig* genotype II（2 試料）、*C. meleagridis*（1 試料）であり、遺伝子型の分布に異なる傾向が見られた。
- 4) 異なる濃縮法による回収試験を行ったところ、オーシスト、シストのトレーサーの回収率は、メンブレンフィルター加圧ろ過—アセトン溶解法の場合、4～10%、2～18%であり、親水性 PTFE メンブレンフィルター法の場合、32～59%、26～53%となり、親水性 PTFE メンブレンフィルター法の方が高い回収率を示した。

#### E. 参考文献

- Lihua Xiao, Lillian Escalante, Chunfu Yang, Irshad Sulaiman, Anannias A. Escalante, Richard J. Montali, Ronald Fayer, and Altaf A. Lal. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus, Applied and Environmental Microbiology, April 1999, p. 1578-1583, Vol. 65, No. 4
- Lihua Xiao, Kerri Alderisio, Josef Limor, Michael Royer, and Altaf A. Lal. Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool, Applied and Environmental Microbiology, December



2000, p. 5492-5498, Vol. 66, No. 12

秋葉道宏, 片山浩之, 西澤博. 利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染の実態調査, 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業, 平成 18 年度総括・分担研究報告書, 306-319, 2007.

平田強, 金子光美, 森田重光, 橋本温. 単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型解析手法の実用化と水環境試料への適用, 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業, 平成 15 年度総括・分担研究報告書, 43-56, 2004.

平田強, 金子光美, 森田重光, 橋本温. 単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型解析手法の実用化と水環境試料への適用, 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業, 平成 16 年度総括・分担研究報告書, 73-83, 2005.

Gregory D. Sturbaum, Carrie Reed, Paul J. Hoover, B. Helen Jost, Marilyn M. Marshall, and Charles R. Sterling. Species-Specific,

Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Detection of Single *Cryptosporidium parvum* Oocysts, Appl Environ Microbiol. 2001 June; 67(6): 2665-2668.

#### F. 健康危機管理情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 学会発表

西澤博, 金志勲, 秋葉道宏, 浅見真理, 国包章一. 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の実態調査. 第 58 回全国水道研究発表会; 2007 年 5 月; 釧路. 第 58 回全国水道研究発表会講演集. p.610-611.

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

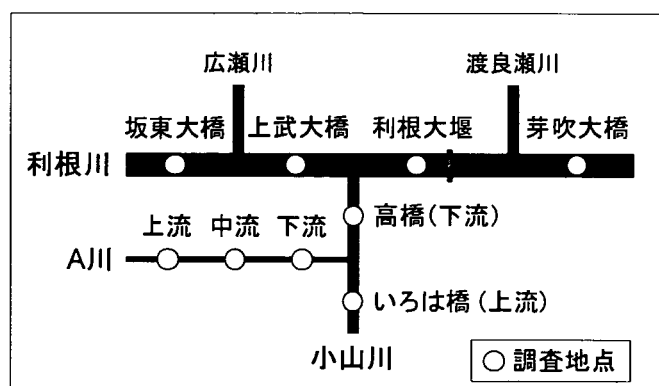


図1 利根川水系における調査地点

表1 河川水中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度

調査地点	各採取日の濃度 (oocysts/10L)						各採取日の濃度 (cysts/10L)					
	2007					2008	2007					2008
	6/28 <sup>a</sup>	8/28 <sup>a</sup>	10/17	10/29	12/17	2/25	6/28 <sup>a</sup>	8/28 <sup>a</sup>	10/17	10/29	12/17	2/25
<b>利根川</b>												
坂東大橋	3.0	0.5	-	2	不検出	不検出	0.5	不検出	-	2	6	10
上武大橋	3.5	不検出	-	2	6	6	1.0	不検出	-	8	12	2
利根大堰	6.0	不検出	-	8	20	18	5.0	不検出	-	2	26	32
芽吹大橋	1.0	不検出	-	2	-	-	0.5	不検出	-	10	-	-
<b>小山川</b>												
いろは橋	不検出	0.5	1	2	不検出	不検出	0.5	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
高橋	10.0	5.0	96	12	68	48	3.5	不検出	1	6	20	24
<b>A川</b>												
上流	-	-	15	-	6	2	-	-	2	-	8	不検出
中流	-	-	788	-	8	200	-	-	13	-	2	28
下流	-	-	675	-	2	106	-	-	37	-	32	16

<sup>a</sup> 調査水量が40Lのため、10L中の濃度へ換算

表2 河川水中の大腸菌群及び大腸菌の濃度

調査地点	各採取日の大腸菌群の濃度 (CFU/100mL)						各採取日の大腸菌の濃度 (CFU/100mL)					
	2007					2008	2007					2008
	6/28	8/28	10/17	10/29	12/17	2/25	6/28	8/28	10/17	10/29	12/17	2/25
<b>利根川</b>												
坂東大橋	20000	15000	-	28000	5900	670	110	450	-	330	280	27
上武大橋	51000	5200	-	62000	12000	2800	180	270	-	360	720	190
利根大堰	42000	3800	-	240000	34000	480000	53	不検出	-	1700	190	170
芽吹大橋	21000	12000	-	150000	-	-	40	13	-	570	-	-
<b>小山川</b>												
いろは橋	28000	21000	9500	17000	970	330	33	340	50	120	13	7
高橋	94000	59000	140000	210000	39000	46000	620	570	19000	1500	1400	1200
<b>A川</b>												
上流	-	-	61000	-	17000	35000	-	-	300	-	410	620
中流	-	-	130000	-	47000	41000	-	-	2300	-	2200	7800
下流	-	-	420000	-	19000	230000	-	-	46000	-	440	2600

表-3 河川水中の嫌気性芽胞菌濃度及び濁度

調査地点	各採取日の嫌気性芽胞菌の濃度 (CFU/100mL)						各採取日の濁度 (度)					
	2007					2008	2007					2008
	6/28	8/28	10/17	10/29	12/17	2/25	6/28	8/28	10/17	10/29	12/17	2/25
利根川												
板東大橋	68	66	-	88	60	140	4.4	4.2	-	8.0	3.5	3.6
上武大橋	100	68	-	84	150	180	7.8	4.9	-	26.4	3.0	3.5
利根大堰	150	140	-	68	84	250	6.4	9.5	-	25.6	7.4	22.8
芽吹大橋	110	110	-	310	-	-	5.6	6.7	-	23.5	-	-
小山川												
いろは橋	不検出	不検出	4	12	不検出	不検出	0.6	1.2	0.6	9.4	0.3	1.1
高橋	160	490	84	120	140	330	6.2	3.5	2.8	4.0	4.2	4.8
A川												
上流	-	-	84	-	72	52	-	-	0.8	-	0.6	2.1
中流	-	-	186	-	270	3100	-	-	4.6	-	6.4	74.9
下流	-	-	460	-	610	2300	-	-	4.1	-	3.1	46.9

表 4 単離したオーシストの Nested PCR およびダイレクトシーケンスの結果

試料	報告者	単離した オーシスト数	Nested PCR 陽性数	シーケンス 成功数	最終結果
河川水	本調査	422	57/422 (14%)	57/57 (100%)	57/422 (14%)
	秋葉ら, 2007	33	-	-	22/33 (67%)
	平田ら, 2004	39	32/39 (82%)	18/22 (82%)	18/39 (46%)
	平田ら, 2005	32	16/32 (50%)	5/16 (31%)	5/32 (16%)
下水	平田ら, 2004	107	85/107 (79%)	74/81 (91%)	74/107 (69%)
	平田ら, 2005	118	63/118 (53%)	47/63 (75%)	47/118 (40%)
培養株	Sturbaum <i>et al.</i> , 2001	50	19/50 (38%)	-	-
	平田ら, 2004	30	30/30 (100%)	3/3 (100%)	-

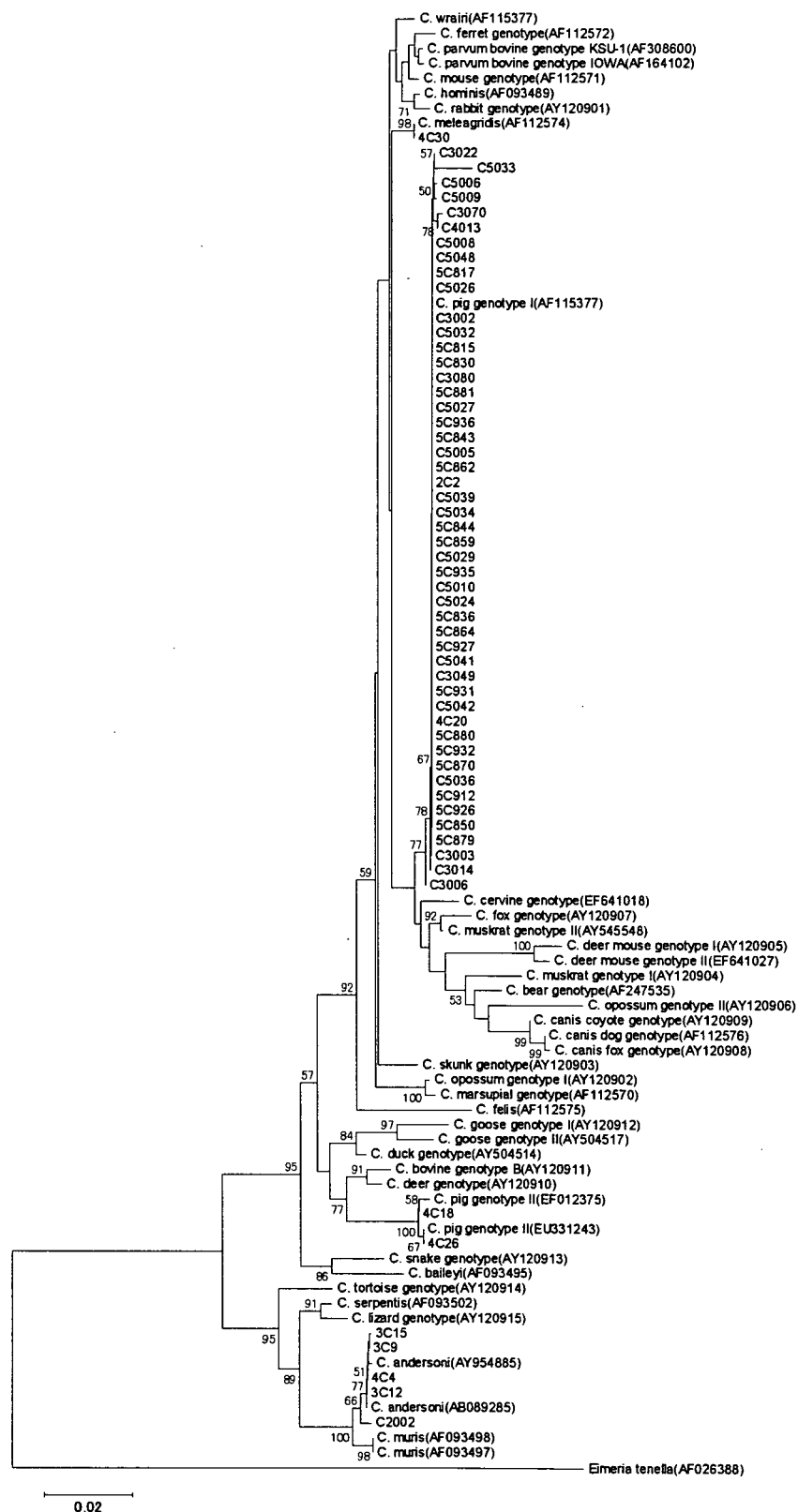


図2 近隣結合法(neighbor-joining analysis)によるクリプトスポリジウム属原虫の系統樹  
(Values on branches are percent bootstrapping using 1,000 replicates.)