

## 2. 実験方法

### 2.1 球状ハイドロキシアパタイト粉体を用いた汙過フィルター

可溶性粉体として当初の実験に粒径 $10\mu\text{m}$ 程度 (重量分布の平均粒径 $19\mu\text{m}$ 、個数分布の平均粒径 $6\mu\text{m}$ 、顕微鏡下で $6\sim 15\mu\text{m}$ 程度の分布、孔径 $8\mu\text{m}$ の支持体で保持可能で孔径 $16\mu\text{m}$ 支持体では漏れる、アパミクロン AP-20C、積水化成工業(株)、試供品)、 $20\mu\text{m}$ 及び $40\mu\text{m}$  (平均粒径 $20\pm 2\mu\text{m}$ 及び $40\pm 4\mu\text{m}$ 、CHTセラミックハイドロキシアパタイト TypeII、Bio-Rad Laboratories, Inc.、¥79,000/100g) のハイドロキシアパタイト粉体、研究後半に入手できた粒径 $30\mu\text{m}$  (平均粒径 $33\mu\text{m}$ で $20\sim 50\mu\text{m}$ に90%の分布、FSC用アパタイト、アドバンテック東洋(株)、¥3,900/50g) のハイドロキシアパタイト粉体を

用いた (図-1)。予備実験では $47\text{mm}$  フィルター用の直径 $11\text{cm}$ 、高さ $18\text{cm}$ の上部が開放のプラスチック製減圧汙過容器 (500mL ファンネル装備の $47\text{mm}$  ポリサルホンホルダー、KP-47W、アドバンテック東洋(株))、あるいは $47\text{mm}$  フィルター用の直径約 $70\text{mm}$ 、高さ $29\text{cm}$ の筒状のステンレス製加圧汙過容器 (47mm タンク式ステンレスホルダー (100mL)、XX40 047 00、Millipore corp.) を使用した (図-2、3)。それらのホルダーベースに支持体として孔径 $8\mu\text{m}$ あるいは $16\mu\text{m}$ のナイロンメッシュ (東京スクリーン(株)) を敷いた。これに十分量の精製水に攪拌・懸濁したハイドロキシアパタイト粒子を注入し、ごく緩やかな速度で下行通水し、均質なケーキ層形成に努めた。その際、ケーキ層の上の容器内に、十分量の水層が保たれるよう留意した。

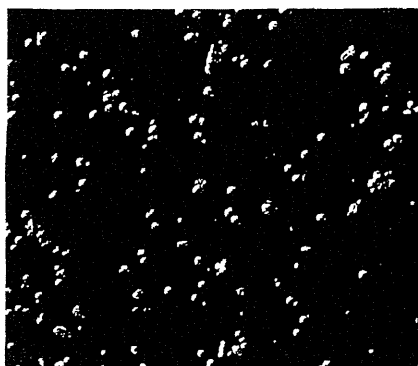
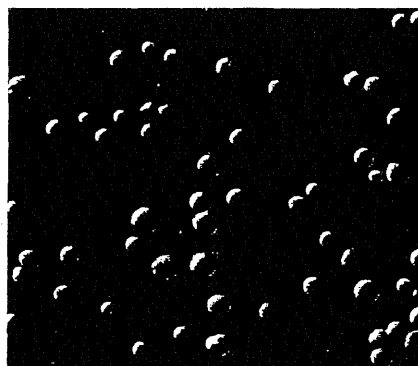
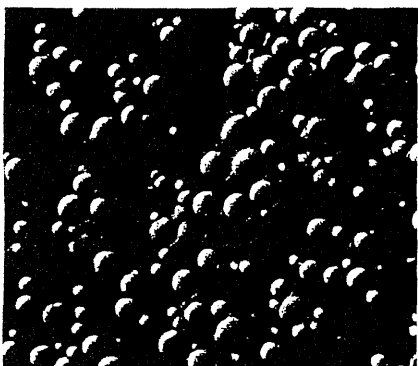
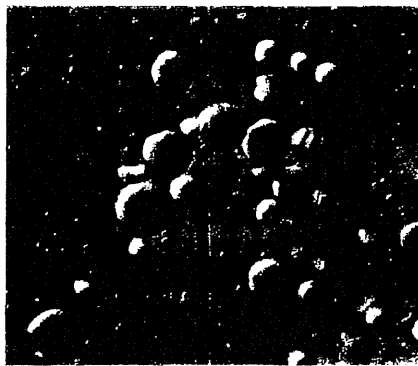
A)  $10\mu\text{m}$ B)  $20\mu\text{m}$ C)  $30\mu\text{m}$ D)  $40\mu\text{m}$ 

図-1 ハイドロキシアパタイト粒子の顕微鏡写真  
微分干渉顕微鏡で観察した。各写真は同じ縮尺でスケールバーは $50\mu\text{m}$ 。

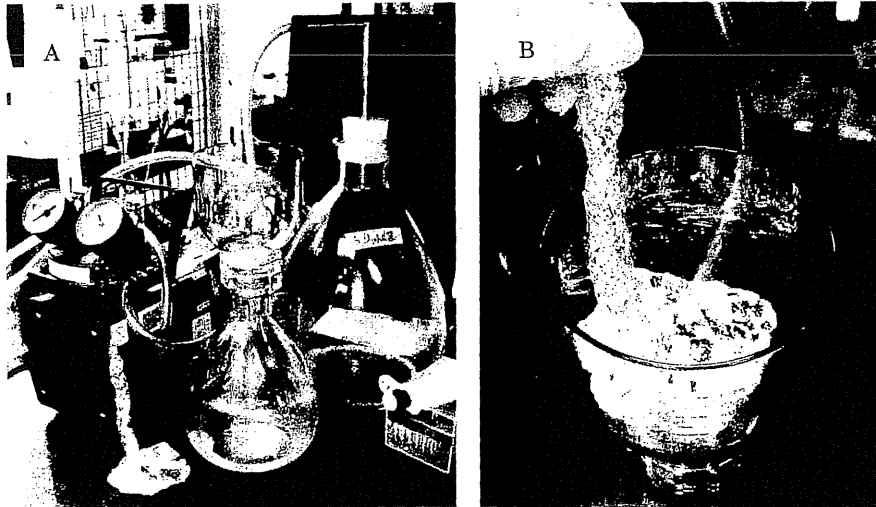


図-2 減圧濾過装置

A) ポリサルホンホルダーを吸引ガラス瓶に取り付け、5Lの吸引トラップ瓶を経て吸引ポンプ等に接続した。B) ケーキ濾過層が乱れないように、アルミホイルで作成した遮蔽板を使って、水の勢いを減じながら連続的に試料水を追加した。

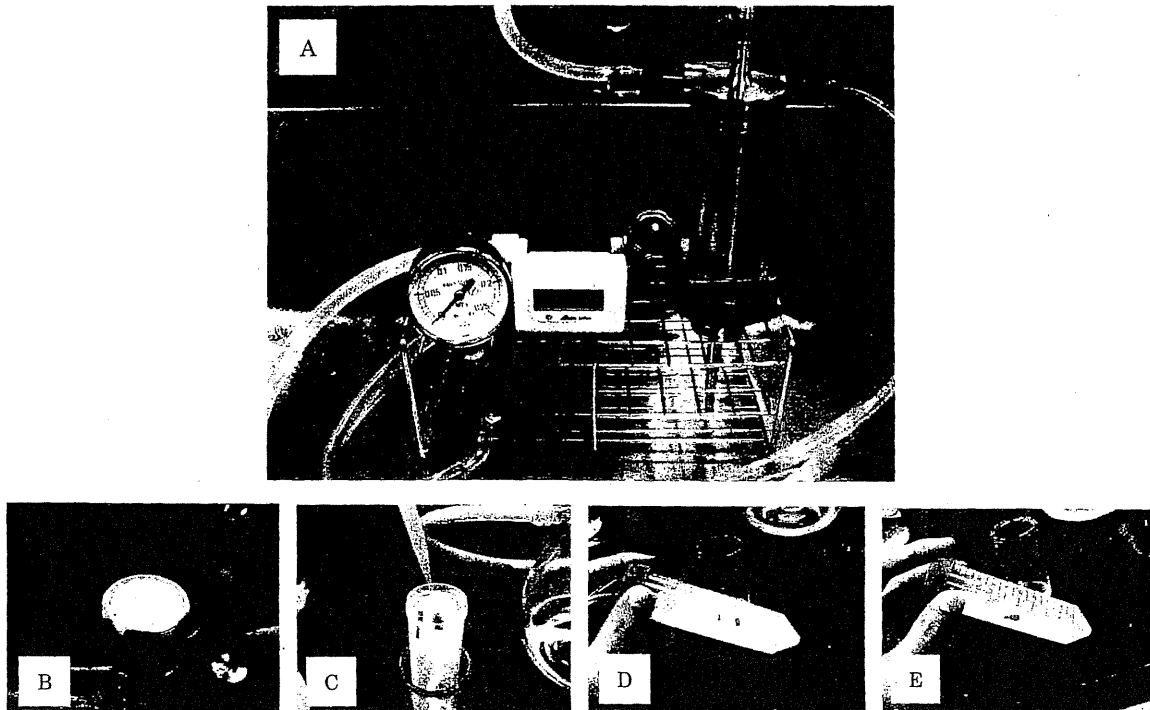


図-3 加圧濾過装置

A) 水道の蛇口に積算流量計、圧力計、金属製フィルター容器の順に接続した。B) 濾過濃縮物の回収例。水を抜き、濾過容器を開封した直後。C) ハイドロキシアパタイトをサポートフィルターごと50mL遠心管に移し、界面活性剤添加精製水でハイドロキシアパタイトを洗い落とした。D) フィルターを除き、塩酸を加え、攪拌直前の様子。E) 攪拌し、塩酸で粉体がすみやかに溶解した。

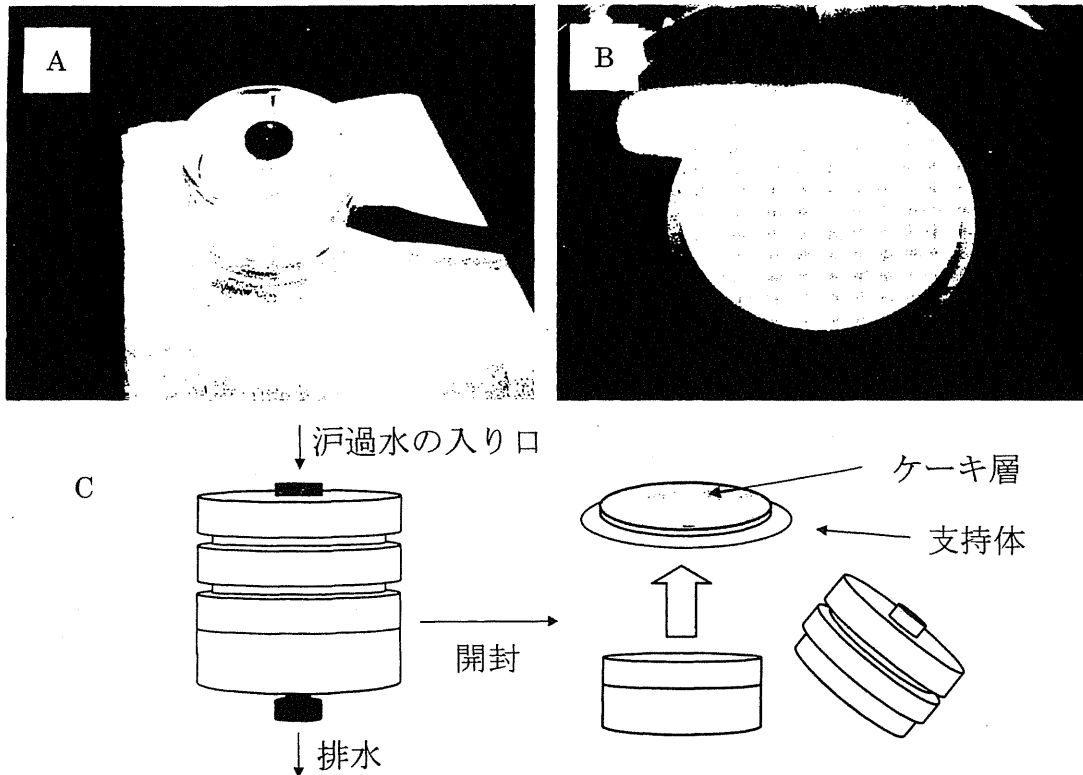


図-4 使い捨てプラスチック容器での汙過

A) 汙過後のプラスチック容器、B) シャーレに取り出した汙過濃縮物、C) プラスチック容器の模式図

本実験には内径34mmの3層構造の使い捨て円筒プラスチック容器（3ピースタイプ37mmモニター、アドバンテック東洋㈱）を用い、その最下部にケーキ層の支持体としてコーテッドタイプフィルター（ $3\mu\text{m}$ の粒子を99.9%保持、Y100A035A、アドバンテック東洋㈱）をセットし、その上に上述の要領でハイドロキシアパタイトのケーキ層を形成させた（図-4）。予備実験の結果から粉体量として $1\sim 1.5\text{kg}/\text{m}^2$ （直径34mmに $1\sim 1.5\text{g}$ 、ケーキ層の厚さは $1\sim 2\text{mm}$ 程度、トータルコストとして約500円/1回分）で良い捕捉率が得られる条件を検討した。

## 2.2 汙過操作

ハイドロキシアパタイトの粒径とケーキ層の厚さ（ハイドロキシアパタイトの使用量）の検討には吸引汙過を使用した。また汙過の捕捉率の確認試験では多量（ $\geq 100\text{L}$ ）の試料水の汙過を行うため加圧汙過を用いた。

吸引汙過では前述のポリサルホン製フィルターホルダーを用い、トラップピンと圧力調整付きポンプ（吸引加圧両用ポンプ、XX55 100 00、Millipore corp.）あるいはチュービングポンプ（東京理化学器械㈱）を接続した（図-2）。汙速は $10\text{m}/\text{h}$ （ $0.2\text{L}/\text{分}$ ）程度に調整した。粗い粉体ではチュービングポンプの排気・排水による低い圧力でも汙過が可能で、細かな $10\mu\text{m}$ の粉体では吸引ポンプによるより高い汙圧を必要とした。粒径毎に捕捉率を求めた際の粉体使用量は、 $1.0\text{kg}/\text{m}^2$ （内径40mm程度に $1.3\text{g}$ の粉体を使用）で一定とした。粉体使用量毎に捕捉率を求めた際には $20\mu\text{m}$ の粉体を使用し、 $0.25\sim 1.0\text{kg}/\text{m}^2$ で用量を変化させた（内径40mm程度に対して $0.3\sim 1.3\text{g}$ の粉体量に相当）。ビーカーに用意した精製水1Lに粉体を懸濁し、フィルターホルダーに通水してケーキ層を形成し、引き続き性能評価用蛍光ビーズを懸濁した1Lを汙過、次いで精製水1Lを汙過し

た。界面活性剤（濃度0.01%のTween80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Sigma)）を適宜使用した。汙過に際しては水流によるケーキ層（汙過面）の乱れを避けるため、フィルターホルダーの導水部分に遮蔽板を設置して汙過面全面で均一に通水するよう工夫した。なお、フィルターホルダーのファネル内に数百 mL の水量が維持されていれば遮蔽板を用いなくても水の層により水の勢いが吸収されて安定した汙過操作が行えた。

加圧汙過では、前述のステンレス製フィルターホルダーあるいはプラスチック製37mm モニターを用いた。蛇口（東京都新宿区、国立感染症研究所内）に、積算流量計（OF05ZZQ、愛知時計電機株）、ブルドン管式圧力計（三田計器社）、そして汙過器の順にチューブを用いて接続した（図-3、4）。蛇口を徐々に開閉して汙圧を30～50kPa 程度、汙速を30～40m/h 程度（ステンレス製フィルターホルダーで0.6L/分程度、プラスチック製37mm モニターで0.4L/分程度）に調整した。粉体はステンレス製フィルターホルダーに20 $\mu$ m を1.0kg/m<sup>2</sup>、プラスチック製37mm モニターに30 $\mu$ m を1.0ないし1.5kg/m<sup>2</sup>の条件で使用した。100mL 程の精製水に懸濁したハイドロキシアパタイト粒子を下行通水してケーキ層形成後、水道水の汙過を開始した。数分経過後、水道蛇口付近のチューブに設置した三方コネクターを介して汙過を中断せずに、クリプトスポリジウムオーシストあるいは蛍光ビーズをプラスチックシリンジを用いて静かに流路に注入し、その後100L 程の水道水を汙過した。

### 2.3 捕捉性能評価

捕捉性能評価にはオーシストの代替品として3 $\mu$ m の緑色蛍光を発する蛍光ビーズ（以下、代替蛍光ビーズ：粒径：2.762 $\pm$ 0.057 $\mu$ m、Fluoresbrite calibration grade YG、Polyscience）を10<sup>8</sup>個、あるいはホルマリン固定した精製クリプトスポリジウムオーシスト10<sup>8</sup>個を用いた。クリプトスポリジウムは感染マウスの糞便よりショ糖浮遊法と塩化セシウム浮遊法により精製した<sup>9)</sup>。

ハイドロキシアパタイト粉体の溶解には1M 塩酸（和光純薬）を用いた。管壁へのオーシストあるいは代替蛍光ビーズの付着を防ぐために試料

水には Tween80 を適宜使用した。支持体上のケーキ層を全て50mL の遠心管に移し、次いでハイドロキシアパタイト1g に対して20mL の1M 塩酸を用いて完全に溶解した。ハイドロキシアパタイトが溶け残った場合は若干量の塩酸を追加した。代替蛍光ビーズの計数にはフローサイトメーター（PAS 型、Partec）を用い、溶解後の試料200 $\mu$ L 中の蛍光ビーズを求め、同じ容量にストックから懸濁した蛍光ビーズを分母として捕捉率を算出した。添加時の誤差が生じることから、十分に攪拌するなどの注意を要した。同一試料の3回前後行ったフローサイトメーターによる測定での標準偏差は2～5%程度、同一試料の2回行った顕微鏡下の計数で標準偏差は7%程度であった。オーシストの回収実験では、ハイドロキシアパタイト全量を溶解後にその内の1割分を直径25mm の PTFE フィルターで汙過し、定法に従って蛍光抗体染色を行い蛍光顕微鏡で計数した。

### 2.4 ハイドロキシアパタイト粉体中のオーシスト保存性評価

感染マウスの糞便より精製した未固定の *Cryptosporidium parvum* オーシストを使用した。水道水2mL と粒径30 $\mu$ m のハイドロキシアパタイト粉体1.5g とオーシスト（10<sup>8</sup>～10<sup>6</sup>個）を50mL 遠心管中で混合し、密栓して4 $^{\circ}$ C で2週間ほど保管した。そこから一定量（20～40 $\mu$ L）の試料を取り出して、700 $\mu$ L の1M 塩酸で溶解し、その後0.1% Tween80水溶液を加えて1.5mL に調整した。次いで、顕微鏡観察用の PTFE フィルター（直径25mm）で所定量（20～40 $\mu$ L）を汙過し、洗浄後、定法により蛍光抗体染色を行い、約100個のオーシストを蛍光顕微鏡下で計数し、染色性の変化の有無を観察した。あるいは、一定量500 $\mu$ L の試料を取り出し、4.5mL の0.1% Tween80水溶液と5mL の1M 塩酸を加えてハイドロキシアパタイトを溶解後に遠心分離した。沈さをガラスのスライド上に封入し、微分干渉顕微鏡下で、形態変化の有無を観察した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 捕捉される粒子粒径の理論値計算

当該研究ではクリプトスポリジウムオーシスト等の効率的な濃縮・保存方法の開発に向け、球状

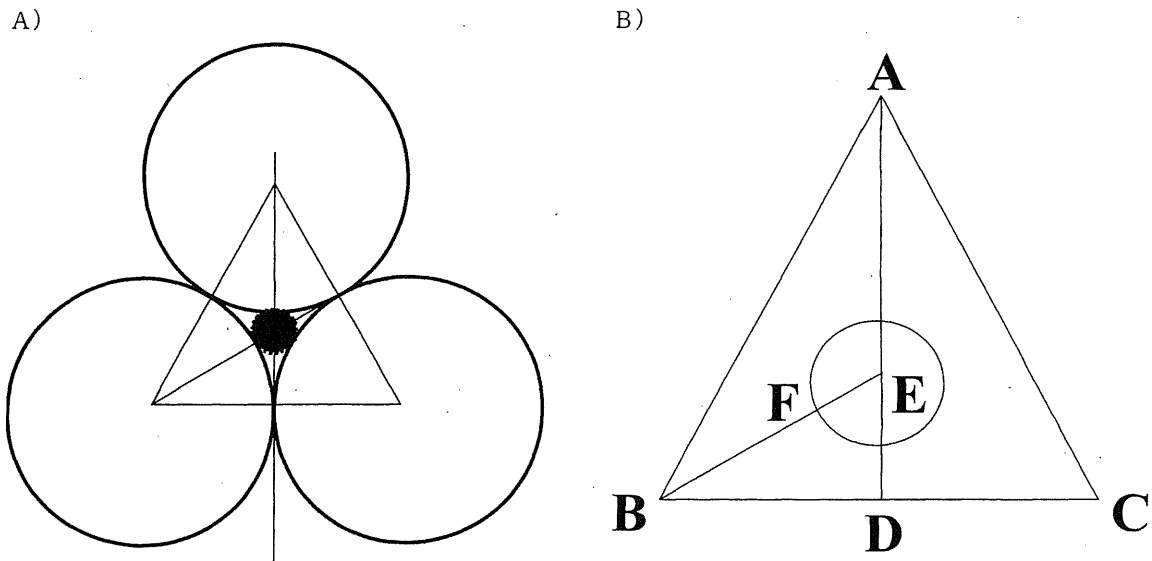


図-5 粉体沝過法のケーキ沝過層に使用する粒径の計算

A) 3つの球の配置が最も密になる状態とその間隙を通過する最大の粒子(中央)の模式図、B) 計算のために設定した三角形の拡大図

のハイドロキシアパタイト粒子を積層して生じたケーキ層をフィルターとした新たな沝過フィルター(粉体沝過フィルター)の有効性について検討した。ここで、積層した粒子がつくるフィルターの孔径、すなわち捕捉可能な粒径を求めた。計算上は球が最密に充填された状態を想定して、そこに形成される空間の大きさを求めた。すなわち、ケーキ層の形成する沝過孔径は平面図上で3つの円の間隙に接する小さい円の直径として計算される(図-5A)。図中の大きな円すなわちハイドロキシアパタイトの半径を $r$ としたとき、3つの円の中心を結ぶ正三角形ABCは、1辺の長さが $2r$ となる(図-5B)。頂点A(=円の中心A)から正三角形ABCを2分割する直線を引き、辺BCとの交点をDとする。同様に、2分割の直線を頂点Bと頂点Cから引くと、三角形の各内角の二等分線は1点E(=内心)で交わる。3つの大きな円が同じ大きさであるとするれば、三角形ABCは正三角形となり、直線AE、BE、CEの長さは等しく、一方、3つの大きな円と小さな円は等距離にあり、点Eは大きな3つの円に外接する円の中心でもある。小さな円と直線BEの交点をFとする。三角形BDEは、30度、60度、90度

の角度を持つ直角三角形であり、辺の長さは、 $DE:BE:BD = 1:2:\sqrt{3}$ の関係にある。ここでBDとBFは大きな円の半径であることから、三角形BDEの各辺の長さは、 $DE = r/\sqrt{3}$ 、 $BE = 2r/\sqrt{3}$ 、 $BD = r$ と計算される。小さな円の半径は直線EFの長さであり、 $EF = BE - BF = 2r/\sqrt{3} - r = (2/\sqrt{3} - 1)r$ と計算される。数値に直すと約 $0.15r$ であり、すなわち補足粒径の理論値は、積層する粒子のおよそ15%の径と計算される。直径 $5\mu\text{m}$ のオーシストを捕捉するには、 $5\mu\text{m}$ を $0.15$ で除して得られる直径 $33\mu\text{m}$ の粉体が対応すると計算される。

### 3.2 粒径毎の実際の粒子捕捉率

夾雑物のない条件下で積層する粒子の粒径を変化させて、実際のクリプトスポリジウムオーシストの捕捉率を検討した。

この実験では当初に入手利用できたハイドロキシアパタイト3種を使用し、模擬粒子として直径 $3\mu\text{m}$ の代替蛍光ビーズの捕捉性能を求めた。その結果、直径 $10\mu\text{m}$ 及び $20\mu\text{m}$ では高い捕捉率が得られた。直径 $40\mu\text{m}$ のハイドロキシアパタイトを用いた場合、若干捕捉率が低下する傾向が見られたが、いずれの粒径の粒子を用いても概ね9

割あるいはそれ以上の代替蛍光ビーズの捕捉が確認された (表-1)。

表-1 粉体粒径と3 $\mu\text{m}$ 蛍光ビーズ捕捉率

粉体粒径 ( $\mu\text{m}$ )	3回の実験の捕捉率 (%)			平均捕捉率 (%)
	1	2	3	
40	72	95	97	88
20	105	114	109	109
10	90	101	99	97

概ね9割以上の捕捉が確認はされたものの、40 $\mu\text{m}$ で若干の捕捉率が低下する傾向が見られた。夾雑物の少ない水道水には、理論上の30 $\mu\text{m}$ 強以下の粒径のハイドロキシアパタイトを使用するのが適していると考え、ハイドロキシアパタイトの使用量と捕捉率の関係の検討では20 $\mu\text{m}$ 、後述の使い捨て容器での汙過実験には粒径30 $\mu\text{m}$ のハイドロキシアパタイトを使用した。

### 3.3 ハイドロキシアパタイト粉体使用量と捕捉率

本汙過方法では使用する粉体の量によって汙速や汙過圧力などが変わり、ひいてはフィルターの捕捉性能に影響する。しかし、安易に粉体量を増やせば回収工程における塩酸量が増えるなどの不都合が生じる恐れがあり、量は必要最小限に抑えることが望ましい。そこで、粒径20 $\mu\text{m}$ のハイドロキシアパタイトを用いて、粉体の使用量 (すなわちケーキの層厚) を変化させて、捕捉率への影響を検討した (表-2)。その結果、粉体量を0.25 $\text{kg}/\text{m}^2$ とした場合、形成されるケーキ層は薄く、捕捉率が平均64%に低下した。粉体量を0.5から1.0 $\text{kg}/\text{m}^2$ の間とした場合ではケーキ層の完全さが確保され、この範囲では概ね9割あるいはそれ以上の捕捉率が得られた。当該結果からは粉体量が1.0 $\text{kg}/\text{m}^2$ が適していると考えられた。なお、汙過後の処理を考慮すると粉体量はなるべく少ないことが望まれることから、汙過を安定させるなどの方法で可能な限り粉体の低減化に向けて検討する予定である。

### 3.4 大容量の汙過後の捕捉率

当該研究では浄水の数L~数百Lの汙過への応用を想定しており、大容量の汙過に際しても一旦

表-2 粉体使用量と捕捉率

粉体使用量 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	2回の実験の捕捉率 (%)		平均捕捉率 (%)
	1	2	
0.25	61	68	64
0.5	83	93	88
1.0	104	104	104

表-3 大容量の汙過後の捕捉率

実験番号	汙過水量 (L)	処理時間 (h)	汙圧 (kPa)	捕捉率 (%)
1	120	3.4	40~50	97
2	110	4.3	30~40	80
3	160	4.2	40	80
平均				86

捕捉した目的粒子を保持し続けなければならない。そこで、10<sup>6</sup>個の代替蛍光ビーズを捕捉させたケーキ汙過フィルターで多量の水道水 ( $\geq 100\text{L}$ ) を汙過し、その間のオーシスト等の漏失の有無を検討した。その結果、ケーキ層からは9割程度の代替蛍光ビーズが回収され、多量の汙過による捕捉物の漏失は最小限に抑えられていた (表-3)。

### 3.5 ハイドロキシアパタイト粉体と混合したオーシストの保存性確認

ハイドロキシアパタイト粉体と混合したオーシストを用意し、2週間にわたり定期的にその一部を取り出して所定の回収・顕微鏡標本作製工程を経てオーシストを計数し、染色性ならびに微細構造の変化の有無を検討した。その結果、2週間の冷蔵保存期間中にオーシスト数は減少せず (図-6)、また、蛍光抗体染色性、あるいは微細構造に変化が起きないことが確認された。

### 3.6 使い捨て容器での粉体汙過

汙過装置の簡素化、ひいては方法の普及を目指して、内径34mm程度の使い捨て三層プラスチック容器を用いて粉体汙過を試みた。計算上でも実験上でも30 $\mu\text{m}$ 強の粒径が最も適していたこと、研究後半に入手可能となったことから、粒径30 $\mu\text{m}$ のハイドロキシアパタイトを使用した。この時の粉体量は1あるいは1.5g (1あるいは1.5 $\text{kg}/\text{m}^2$ に

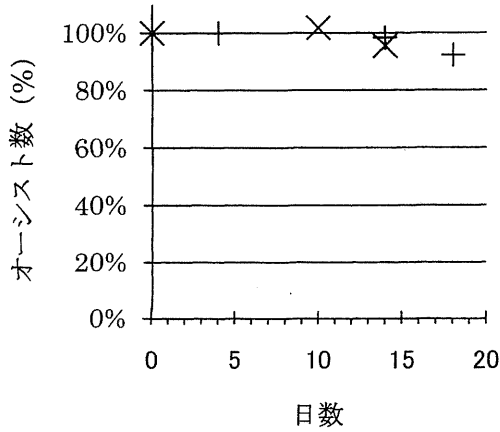


図-6 水道水に懸濁した粉体中のオオシスト保存性  
+ : 1回目、x : 2回目

相当) を用い、ケーキ層は目視で1~2mm程度となり、安定した汙過が可能に見えた。ろ加圧は50kPaとしたが、汙速が早すぎるとケーキ層の中央が割れて窪むことを経験し、低い圧力で一定とした。

方法に記したように、汙過の初期に10<sup>5</sup>個の蛍光ビーズあるいは10<sup>3</sup>個の固定クリプトスポリジウムオオシストを添加し、その後に水道水を100L以上汙過した。使用した汙過フィルターは内径34mmとこれまでにクリプトスポリジウムの濃縮法で使用されていたメンブレンフィルターに比べて小さいが、上記の汙過条件において100L以上の水道水を余裕をもって汙過できることが確認された。汙過の初期に添加した代替蛍光ビーズあるいはオオシストは、その後に100L以上の汙

過によっても9割以上が回収されており、多量の汙過による漏失は最小限に抑えられていることが示された(表-4)。

なお、プラスチック容器に1gあるいは1.5gのハイドロキシアパタイトを使用したが、実際の手技として50mLの遠心管に濃縮物を含むケーキ汙過層を移すには界面活性剤添加精製水20mLが適量であること、25mLの1M塩酸でハイドロキシアパタイト1.5gまで溶解できること、などを考慮し、1.5gの粉体量を上限とした。

4. まとめ

酸溶解性の球状のハイドロキシアパタイト粉体を積層してなるケーキ層をフィルターとした粉体汙過法を開発した。クリプトスポリジウムオオシスト5μmを捕捉するには30μmの粒子が適すると計算され、実験的に10μmから40μmの粒径を持つ粒子で形成した汙過フィルターで捕捉可能であることを確認した。ハイドロキシアパタイトの粉体量の検討では使用量に従った捕捉率が得られ、1kg/m<sup>2</sup>が適していると考えられた。汙過装置の簡素化、ひいては方法の普及を目指して内径34mm程度の使い捨ての三層プラスチック容器を用いたケーキ汙過フィルターを作製し、100L以上の水道水の汙過が可能なこと、また、9割以上の捕捉性能を確認した。当該ケーキ汙過方法は単に多量の浄水の汙過が可能ばかりではなく、保存が容易であること、さらにオオシストなど捕捉粒子の回収に際してケーキ層を形成するハイドロキシアパタイトを塩酸で溶解除去できる利点がある。

表-4 使い捨て容器での粉体汙過

実験番号	粉体使用量 (kg/m <sup>2</sup> )	評価粒子	汙過水量 (L)	汙過時間 (h)	汙圧 (kPa)	捕捉率 (%)
1	1.5	3μm 蛍光粒子	144	6	50~80	97
2	1.5	3μm 蛍光粒子	113	5	50~60	107
3	1.5	オオシスト	105	4.5	50~60	101
4	1.5	オオシスト	112	5	50~60	102
5	1	3μm 蛍光粒子	117	4.5	40~70	104
6	1	3μm 蛍光粒子	110	4.5	40~70	98
7	1	オオシスト	104	6.5	25~40	93
8	1	オオシスト	129	7.8	20~40	92

## 5. 謝辞

積水化成品工業株式会社よりハイドロキシアパタイト粉体の試供品と粒度分布の資料をご提供いただいた。本研究は平成18年度の厚生労働省科学研究費補助金「地域健康危機管理研究事業 最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究」(主任研究者: 眞柄泰基、H16-健康-066)、平成19~21年度の厚生労働省科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業 飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(研究代表者: 松井佳彦、H19-健危-一般-012)の補助を受けて実施した。本研究成果の一部は、第59回全国水道研究発表会(平成20年)において発表した。

## 参 考 文 献

- 1) Warren, CA, and Guerrant RL. Clinical disease and pathology, pp.235-253. In Fayer R and Xiao L (ed.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. (2008)
- 2) 泉山信司、遠藤卓郎、わが国で発生した *Cryptosporidium* 集団感染に関する考察、日本臨床寄生虫学会雑誌、Vol.16, No.1, pp.58-60 (2005)
- 3) Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. Vol.331, No.3, pp.161-167 (1994)
- 4) Stein PL. The Great Sydney Water Crisis of 1998, *Water, Air, & Soil Pollution*, Vol.123, No.1-4, pp.419-436 (2000)
- 5) McClellan PQC. Sydney Water Inquiry Fifth Report; Final Report Vol.2, p.160 (1998) ([http://www.dpc.nsw.gov.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0016/15361/Fifth\\_Report\\_-\\_Final\\_Report\\_Volume\\_2\\_-\\_December\\_1998.pdf](http://www.dpc.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0016/15361/Fifth_Report_-_Final_Report_Volume_2_-_December_1998.pdf), 2011年11月8日確認)
- 6) 八木欣平、高野敬志、山野公明、伊東拓也、澤田幸治、古屋宏二、2002年、北海道クリプトスポリジウム症集団発生事例報告、病原微生物検出情報、Vol.26, No.7 (No.305), pp.171-172, 2005
- 7) 水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について、厚生労働省健康局水道課長、健水発第0330005号(平成19年3月30日)
- 8) Peng X, Murphy T, Holden NM. Evaluation of the effect of temperature on the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. *Appl Environ Microbiol*. Vol.74, No.23, pp.7101-7107 (2008)
- 9) Arrowood MJ, Donaldson K. Improved Purification Methods for Calf-Derived *Cryptosporidium parvum* Oocysts Using Discontinuous Sucrose and Cesium Chloride Gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43 : 89S. (1996)

(平成23年11月9日受付)



<報告>

水道クリプトスポリジウム試験法の検査体制維持・向上に係る技術研修の役割

黒木俊郎<sup>1)</sup>, 泉山信司<sup>2)</sup>, 八木田健司<sup>2)</sup>, 遠藤卓郎<sup>2)</sup>, 岸田直裕<sup>3)</sup>, 島崎大<sup>3)</sup>, 秋葉道宏<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 神奈川県衛生研究所企画情報部

<sup>2)</sup> 国立感染症研究所寄生動物部

<sup>3)</sup> 国立保健医療科学院

**Role of technical training course at National Institute of Public Health in maintaining and improving detection system for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water samples in Japan**

Toshiro KUROKI<sup>1)</sup>, Shinji IZUMIYAMA<sup>2)</sup>, Kenji YAGITA<sup>2)</sup>, Takuro ENDO<sup>2)</sup>,  
Naohiro KISHIDA<sup>3)</sup>, Dai SIMAZAKI<sup>3)</sup>, Michihiro AKIBA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

<sup>2)</sup> National Institute of Infectious Diseases

<sup>3)</sup> National Institute of Public Health

抄録

国立保健医療科学院の短期研修「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」は、水試料からのクリプトスポリジウム及びジアルジア試験法の習得を目的に平成10年度に国立公衆衛生院（当時）において開講され、平成23年度で14回目を迎えた。この研修は、水道におけるクリプトスポリジウム等汚染に対応するための技術的知識、能力ならびに検査技術を習得して、地方において中心的役割を担う人材を養成することを目的としている。研修は講義と実習からなり、実習は実技習得に重点を置き、水試料の濃縮・精製方法、染色方法、微分干渉装置付蛍光顕微鏡による観察方法から構成されている。最近では、研修の中にクリプトスポリジウム等の検査に導入されることとなった遺伝子検出法を取り入れている。

キーワード：クリプトスポリジウム，人材育成，公衆衛生専門職，コンピテンシー

**Abstract**

The technical training course of the detection methods for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples at The National Institute of Public Health started in 1999 and the 14<sup>th</sup> in the series was held in 2012. The aim of the course is to acquire technique knowledge, proficiency and competencies for performing the detection methods of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking and source water and to train personnel with major roles in the local area. The course consists of lectures and practical training. Practical training is designed to focus on acquiring laboratory skills for detecting *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples, including concentration of water samples, separation of the target microbes by means of sucrose gradient separation and immunomagnetic separation, immunostaining and differential interference optic (DIC microscopic)

連絡先：秋葉道宏

〒351-0012 埼玉県和光市南2-3-6

2-3-6, Minami, Wako-shi, Saitama, 351-0197, Japan.

Tel: 048-458-6271

Fax: 048-458-6272

E-mail: akiba@niph.go.jp

[平成24年10月18日受理]

observation. Recently, gene detection technique of *Cryptosporidium* and *Giardia* are included in the laboratory training.

**keywords:** *Cryptosporidium*, human resources development, public health professionals, competency  
(accepted for publication, 18th October 2012)

## I. はじめに

クリプトスポリジウムはコクシジウムに属する原虫の1種で、消化管の上皮細胞に寄生し、ヒトの下痢症の原因となる。感染型であるオーシストはオーシスト壁に覆われ、環境や消毒薬に抵抗性を示す。環境中にはオーシストが存在する。この原虫によるヒトの感染症は欧米では1976年に最初に報告され [1, 2], 1980年代には水系感染による集団下痢症が注目された。耐塩素性であるクリプトスポリジウムは、塩素消毒により微生物学的安全性が確保されてきた水道水にとって、大きな脅威となっている。多くの水系感染事例が世界中で報告されており、特に1993年には米国ミルウォーキー市において、水道水を介して推計40万人が感染した史上最大の集団下痢症事例が発生した [3]。

わが国においては、1986年に高知県で最初の症例が報告され [4], その後散発事例が発生した。1994年（平成6年）に神奈川県平塚市の雑居ビルで簡易専用水道を介した集団下痢症が発生し [5], 1996年（平成8年）には埼玉県越生町の町営水道が汚染され、町民の約9,000人が下痢症を発症する大規模な集団発生があった [6]。これらの水道関連事例の発生を受けて、厚生省（当時）は平成8年10月に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針（以下、暫定対策指針という）」 [7] を策定するとともに、水道水源の汚染状況を把握するために「水道に関するクリプトスポリジウムオーシストの検出のための暫定的な試験方法」 [8] を提示した。この試験法は平成10年6月に一部改正され、さらに平成19年3月には「暫定対策指針」が「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針（以下、対策指針という）」 [9] に変更されて、「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法」 [10] の別添として「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（以下、検査方法という）」が公表された。

検査方法では、クリプトスポリジウム同様にジアルジアについても試験方法が示されている。ジアルジアは動物性鞭毛虫の1種であり、ヒトに寄生するジアルジアはランブル鞭毛虫とも呼ばれている。感染型であるシストはシスト壁に覆われ、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）と同様に環境や消毒薬に抵抗性を示す。ヒトが感染すると無症状の場合もあるが、軟便から水様便を呈する下痢症の原因となることもある。

平成8年の暫定対策指針により試験法が示されたことを受けて、試験法および顕微鏡観察技能の習得に関する技術研修に対する要望が非常に高まったことから、「水試料か

らのクリプトスポリジウム試験法実習」が国立公衆衛生院（当時）において平成10年度から開講された。受講対象者は地方衛生研究所、保健所および水道事業体などの職員としている。本研修は、単に受講生が必要な知識と技術を習得するにとどまらず、本研修の受講生が地方におけるクリプトスポリジウム・ジアルジア対策の推進に重要な役割を担うことが期待されている [11]。さらに、本研修への参加について、多くの機関から強い要望が出されている。

本稿では、国立保健医療科学院において実施されている短期研修、水道クリプトスポリジウム・ジアルジア試験法に係わる技術研修を概説し、さらに、今後の課題について述べる。

## II. 研修の意義, 目的

「水試料からのクリプトスポリジウム試験法実習」では、その目的を①耐塩素性微生物に関する知識を習得する、②飲料水における耐塩素性微生物の問題を理解する、③試験方法を理解し、操作法を習得する、④技術者に求められる基本的能力と専門能力を向上させる、としている（表1）。試験方法の基本的操作法を習得することは重要であるが、研修の受講対象者を3年以上の微生物実務経験者としてい

表1 研修の目的

項目	概要
耐塩素性微生物に関する知識の習得	クリプトスポリジウムの生物学の特徴を習得する ジアルジアの生物学の特徴を習得する
飲料水における耐塩素性微生物の問題に対する理解	飲料水の安全性確保と耐塩素性微生物の問題を理解する 試験法実施の意義と自らの役割を理解する 過去の汚染事例を学習する 対応法を理解する
試験方法に対する理解と操作法の習得	飲料水の安全性確保上の問題点を見出し、解決する 試験方法の工程を理解する 試験方法の操作を理解し、習得する 操作上の留意点を理解する 顕微鏡操作及び写真撮影技術を習得する
技術者に求められる基本的能力と専門能力の向上	試験法を適切・確実に実施し、オーシストやシストを正しく判定する 各ステップにおける操作法を適切に選択し、効率的に実施する 試験法の問題点を見出し、解決する

るため、試験方法における実践的な高度知識・技術の習得にも力点を置いている。

水試料からのクリプトスポリジウム等の試験法は、検査手順の統一性よりも検査実績（回収率）を重視した方法であり、先述の「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法」[10]においても、「回収率に一層の改善が得られることが明らかな場合は、必要に応じて適宜、部分的な変更や改良を加えても差し支えない。」と記載されている。このため、水試料の性状等により使用する試験法の内容の変更や操作方法の検討等を行い、それぞれの水試料に適した操作方法を見出し、回収率を向上させるとともに、顕微鏡観察によりオーシストやシストの判定を行わなければならない。そのためには、クリプトスポリジウム等の生物学的な知識や試験方法全般に関する知識と技術が求められる。それぞれの施設において試験実施者を育成するためには、OJT (On-the-Job Training, 職場内での訓練) を活用することが重要である。しかし、人事異動や職員数の減少あるいは試験方法の実施に経験と高度な技術を要するといった様々な理由により、OJTだけでは不十分となる状況が生じている。そのため、Off-JT(Off the Job Training, 職場外での訓練) の重要性がますます増大している。

国立保健医療科学院では保健衛生等に関するOff-JTを提供する機関として位置づけられている。Off-JTの利点は、それぞれの施設でのニーズに即した、OJTでは得られない技術や知識・能力あるいは高度な技術や最新の情報および知識を短時間で得られること、Off-JTの場において講師や受講生と情報交換を行えることなどが挙げられる。本研修では、水試料からのクリプトスポリジウム等の試験法の担当者に求められる実践的な知識と操作手技が習得できるように研修内容を編成している。

近年、職務遂行に必要な能力を明確に規定し、評価するためにコンピテンシーの概念が導入されている。本研修においては、水試料からのクリプトスポリジウム等試験法に関する知識と技術の習得に重点を置いているが、専門職として求められる能力を身につけることにも配慮している。求められる能力としては、「新任時期における地域保健従事者の現任教育に関する検討会報告書（平成16年3月）」[12]において示された基本的能力と専門能力を参考に設定している（表2）。具体的には、水道水の微生物学的安全性確保における耐塩素性微生物問題の重要性やクリプトスポリジウム等の汚染の把握のための試験法の意義といった、責任感、積極性、情報収集・調査研究能力及び健康危機管理

表2 試験担当者に求められる能力

能力		到達目標	
基本的能力	責任感	組織目標認知能力	職場の使命や試験業務の重要性を正しく理解している。
		完遂能力	試験業務に誠意を持って取り組み気概を持って遂行することができる。
	協調性	役割認識能力	試験業務における自らの役割を理解し、関係者と協力して遂行する。
		相互理解能力	同僚、上司、関係者と意思疎通を図り、連携して試験業務を遂行する。
	積極性	問題把握能力	試験業務の目的を理解し、問題意識を持って遂行する。
		問題解決能力	試験業務における課題・問題点を抽出し、解決しようと前向きに取り組む。
		自己開発能力	自己啓発に努め、積極的に知識・技術の習得・向上に努める。
	効率性	コスト認識能力	コスト意識を持ちながら試験業務を遂行する。
		手段選択能力	試験業務の手順や効率性を考えて遂行する。
		業務遂行能力	試験業務を決められた手順で遂行できる。
	理解力	事実認識能力	試験業務に関する情報を検証し、事実を正確に理解できる。
		分類能力	試験業務に関する事実・情報を分類し、整理することができる。
		情報収集能力	適切な方法を用いて情報を正確に収集することができる。
	判断力	分析能力	得られた情報を正確に分析し、総合的に捉える。
		権限認識能力	試験業務に関する事実や情報を上司に報告、相談する。
倫理観	判断処理能力	試験業務に関する判断を自ら行い、適切に対処できる。	
	規範認識能力	試験業務に対する使命感を持ち、住民の信頼に応える。	
専門能力	各職種共通の専門能力	企画・立案能力	水道水の耐塩素性微生物に関する課題に対応した企画・立案ができる。
		情報収集・調査研究能力	専門職として知識・技術を身につけ、業務に必要な情報を収集し、業務に役立てる。
		事業運営能力	試験業務に関する事業を円滑に運営することができる。
		事業対象者支援能力	事業の対象者を適切に支援することができる。
		健康危機管理能力	健康危機管理が必要な状況を理解し、発生時に迅速・適切に対処できる。
		連携・調整・社会資源開発能力	必要に応じて人的資源、社会的資源を適切に活用し、問題を解決できる。
事業評価能力	事業の評価に主体的に参画することができる。		

能力等の、試験実施者に求められる能力に関連した内容を講義と実習に盛り込んでいる。

我が国における水道水のクリプトスポリジウム汚染を監視・制御するためには、専門的知識を有し、確定検査を実施可能な試験者が各地域において複数名ずつ存在することが理想であるが、人事異動等の影響で確保が困難な状況にある。本研修には、このような課題を解決するための2つの役割が存在する。1つは、受講生がそれぞれの地域でのクリプトスポリジウム等の対策に実践的に取り組むことができるようになること、および検査体制の中核として活躍することである。さらに、研修で得られた知識や習得した技術は職場内あるいは地域の関連部署・機関へ伝達することで、その地域のクリプトスポリジウム等への対応ならびに検査体制が確立・強化されていくことである。もう1つは、本研修は地方におけるクリプトスポリジウム等の対応体制の支援に重要な役割を担っている。受講生が職場において異動することにより、知識や技術が十分に伝達されないことも実際に起きている。そのため、同一の職場から複

数回にわたり職員が受講生として参加していることも事実である。このような場合には、新たに知識や技術を習得した受講生が継続的に対応に当たることを可能にしている。

### Ⅲ. 研修受講生の概要

本研修には、毎年度16~23人(平均21.5人)が受講し、平成10年から平成22年度までの13年間で279人に達した。水道事業者からの受講生が最も多く126人(45.2%)で、地方衛生研究所がこれに次いで114人(40.9%)となっている(表3)。受講生は北海道から沖縄まで1県を除く46都道府県から集まり、所属数は131機関となった。その内訳は46地方衛生研究所(35道府県, 11市区), 16保健所(6道府県, 10市), 52水道事業者, 16検査機関, その他1機関であった(表4)。各機関からの参加は原則1人としているが、受講生を複数年度にわたり参加させている機関もあり、最高は9人で、1機関からの参加受講生数は平均2.13人となっている。

表3 「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」の年度別受講者数

	年 度														合計 (%)
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
受講者数															
所 属															
地方衛生研究所	12	13	5	11	8	4	8	9	5	8	12	9	10	8	122 (40.3)
保健所	2	3	1	0	3	1	3	2	3	1	1	1	0	3	24 (7.9)
国立機関	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (0.3)
水道事業者	5	7	10	10	10	11	9	9	11	12	9	13	10	13	139 (45.9)
検査機関	1	0	3	2	2	0	3	1	3	2	0	0	0	0	17 (5.6)
地 域															
北海道・東北	2	3	4	3	5	4	5	3	3	3	5	5	4	4	53 (17.5)
関東	4	6	4	7	7	2	3	4	6	7	3	4	7	2	66 (21.8)
中部	3	2	3	3	4	3	6	4	2	2	4	3	2	6	47 (15.5)
近畿	3	4	2	1	2	1	3	1	2	2	1	3	1	1	27 (8.9)
中国・四国	4	5	3	5	4	2	3	5	3	3	4	3	1	4	49 (16.2)
九州・沖縄	4	3	3	4	1	4	3	4	7	6	5	5	5	7	61 (20.1)
合計	20	23	19	23	23	16	23	21	23	23	22	23	20	24	303 (100)

表4 「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」の受講者の地域別所属数

	衛生研究所	保健所	水道事業者	検査機関	その他*
北海道・東北	7	3	10	2	0
関東	12	0	10	2	1
中部	8	2	8	5	0
近畿	4	4	7	0	0
中国	5	5	6	2	0
四国	3	1	5	2	0
九州・沖縄	9	1	9	2	0
合計	48	16	55	16	1

\*: 国立機関

#### IV. 試験法の概要

水道原水や水道水中のオーシスト及びシストの有無ならびに個数を監視することは、水道水を汚染したこれらの原虫の感染リスクを推定し、あるいは水道原水中の汚染状況を把握して、水道水の微生物学的安全性を確保することが目的である。もしも汚染があれば適切な処置を施し、未然に感染を防がなければならない。

水試料のクリプトスポリジウム等の試験法は、採水、濃縮、精製、染色および顕微鏡観察と計数の各段階から構成されている(表5)[10]。水試料からのクリプトスポリジウム等の試験法は欧米でも実施され、米国のMethod 1622および1623や英国のthe Water Supply(Water Quality)(Amendment) Regulations 1999がある[13-15]。これらの試験法もわが国の試験法と同様の段階を踏んでオーシストおよびシストを検出する。しかし、各段階で使用される器材などはそれぞれ国により異なり、経済的理由や試験法に対する考え方などの違いが反映されている。

わが国あるいは米国や英国などにおいて、水試料からのクリプトスポリジウム等の検査は採用すべき試験法が定められている。しかし、試料の性状が多様多様で、具体的には砂や粘土質様濁質あるいは植物プランクトンなどの生物が多い、あるいは各種排水が流入しているといった状況があり、オーシストやシストの回収率の向上や正確な判別のために試験法に記載された限られた範囲ではあるがそれぞれの試料の性状に見合った手法・操作や試薬・器具・器材などを変更しなければならないことがある。そこで、実績主義の立場が取られている[16]。すなわち、試験実施者は対象とする試料に合わせて試験法の内容を組み立て、それを実施することが推奨されている。

水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法

において、回収率を向上させ、汚染状況のより正確な数値を得るためには、試験法の内容を覚え、技術を習得するだけでは不十分である。試験実施者は、それぞれの試薬・機器や操作などの意義、原理、長所、短所を正しく理解し、さらに応用に関する知識や技術が備わっていることが望ましい。実際にこの試験法は、試料中のオーシストおよびシスト数が非常に少ないために大量の水を対象とし、労力と時間を要する。さらに夾雑物の中から少数の微粒子であるオーシストおよびシストを検出・確定するための高度な技術と能力が要求される[17-19]。そのため、試料や試験過程の様々な要因が回収率やオーシストやシストの判別・計数に影響する。報告されている回収率に非常に幅があるのはそうした実情を反映している[17-19]。

#### V. 研修

##### 1. 研修の概要

研修は講義と実習で構成している。講義の内容は「原虫汚染への行政対応」、「水道システムと水の安全性」、「原虫汚染の実態」、「浄水処理における対応とモニタリング」、「原虫の生物学的特性と水系感染」、「試験法の解説」と、原虫の生物学的特性から飲料水の微生物学的安全性の確保及び行政対応までの広い範囲に渡っている。こうした講義において、耐塩素性原虫の公衆衛生上の問題、試験法実施の使命及び意義、試験結果に基づく行政対応の重要性、汚染や健康危機管理事項発生時の行政及び浄水場等での対応、耐塩素性原虫に関する世界的状況、耐塩素性原虫及び試験法等に関する情報収集の重要性等について学習する。これにより、試験実施者に求められる基本的能力(責任感、積極性、理解力及び判断力)及び専門能力(情報収集・調査研究能力及び健康危機管理能力)に対する理解を深めることが期待される。また、近年では「遺伝子検査法の導入に

表5 水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法の概要

ステップ	手法
1. 採水	
2. 濃縮	1) セルロースフィルター-アセトン溶解法 2) 親水性PTFEフィルター法 3) ポリカーボネート製メンブレンフィルター法 4) カートリッジフィルター法
3. オーシスト・シストの分離・精製	1) 密度勾配遠沈法(浮遊法) 2) 免疫磁性体粒子法(磁気ビーズ法)
4. 蛍光抗体染色	1) 直接蛍光抗体染色法 (1) メンブレンフィルター法 (2) 試験管内染色法 2) 間接蛍光抗体染色法
5. 顕微鏡観察	1) 蛍光顕微鏡による観察 (1) B励起光 (2) G励起光 (3) UV励起光 2) 微分干渉顕微鏡による観察

「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」より抜粋

向けて」を組み込み、今後導入される遺伝子検査の概要と最新情報が学習できるようにしている。

本研修の実習では、受講者が水試料の濃縮、精製、染色までの一連の操作を確実に習得できるように、実習期間中に3回実施できるようにカリキュラムを組んでいる(表6)。こうした操作法の選択は、試験法の効率的実施、試験法上の問題の抽出と解決、また、同じ操作を繰り返すことでより確実に技術を習得することを目指している。さらに、試験法における各段階では操作法に選択肢があるため、一連の操作を複数回実習する中で受講生が操作法を選択し、異なる方法を実施できるように考慮している。これにより、受講生が自発的に各種操作法を体験できるように促し、各自の職場において採用している操作法が適正であるか否かを確認することも、普段採用していない操作法を実習することができるようにしている。

水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法では、試料からのオーシストとシストの回収率を向上させ、さらに顕微鏡観察により正しく判別・計数して、汚染状況を可能な限り正確に把握することが重要である。そのためには、各段階における試薬と機器、それらの操作に関する詳細な説明を加え、留意すべきポイントを把握できるようにし、受講生がそれぞれの職場に戻ってから、試験法の対象とする試料水に合わせた試験法を実施できるように実習の内容を配慮している。研修中のデモンストレーションにおいてこうしたポイントを段階ごとに紹介するとともに、受講生が操作の実習中にポイントを確認しながら進められるように、それぞれの段階で説明を加えている(図1)。

実習は受講生を4グループに分けて行っている。カリ

表6 研修の内容

- |                             |
|-----------------------------|
| 1. 開講式、オリエンテーション            |
| 2. 講義                       |
| 3. 河川水からの検出のデモンストレーションおよび演習 |
| 4. 顕微鏡操作法実習                 |
| 5. 添加回収実験                   |
| 6. 河川水からの検出                 |
| 7. 作製標本の評価                  |
| 8. 遺伝子検査法のデモンストレーションおよび演習   |

キュラムに従って、与えられた課題に対して各受講生が個々に試験操作を実習することを基本としているが、グループ毎に受講生間で意思疎通を図って調整しながら課題の完遂とそれに伴う各自の責任を認識し、実習結果の情報交換などを行うように配慮している。濃縮法と精製法は複数の操作法が選択できるようにし、受講生個々の自主性が発揮されるようにしている。

研修期間の後半では、この数年にわたり全受講生を対象に口頭試験を試行している。これは受講生の試験法への理解度と技術的到達度を確認することが目的で、随時必要なアドバイスをを行っている。

## 2. 濃縮法

水試料中のオーシスト数あるいはシスト数は非常に少ないため、大量の水試料をフィルターにより濃縮しなければならない。「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」では、採水量を原水では10L、水道水では20Lを標準とするとしている。水試料の濃縮法として、「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」に準じて受講生がアセトン溶解法と親水性PTFEメンブランフィルター法のいずれかを選択して実習できるようにしている。

濃縮の段階ではオーシストやシストが多量の夾雑物と共に存在しており、夾雑物の影響による回収率の低下を防がなければならない[20]。また、遠心による濃縮や洗浄を行うため遠心操作を繰り返すが、遠心操作によるオーシストやシストのロスが生じることが判明している[17]。そこで研修では、夾雑物の扱いや界面活性剤の効果[21]、遠心操作の回数を可能な範囲で減らすこと、遠心機のブレーキのかけ方、上清の除去の仕方、沈渣の処理方法などを説明している。

## 3. 精製法

「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」では、密度勾配遠心法(Percol-シヨ糖浮遊法)と免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)が示されている。試料の性状(濁度、夾雑物の量や質・種類)、技術的要因あるいは経済的理由などにより選定する方法が決まる。表

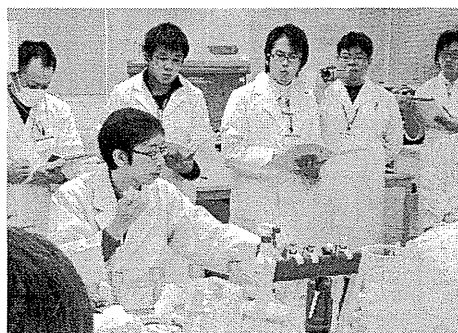


図1(a) デモンストレーションの様子

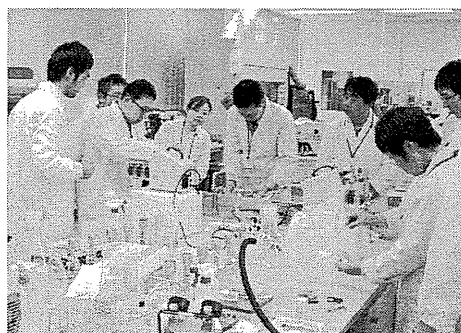


図1(b) 実習の様子

流水を試料とする場合は夾雑物が多いために、精製が不可欠である。本研修では、Percol-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法をいずれもデモンストレーションで受講生に示している。実際の実習においては、受講生が2法を選択して実施できるようにしている。

免疫磁気ビーズ法は特異性が高く、概して浮遊法よりも回収率が高いとされている [22, 23]。浮遊法に比較して作製した標本中の夾雑物が少なく、観察が容易に行えるという利点もある。また、操作も比較的簡単であるため、検査担当者による実施が容易である。しかし、試料中の夾雑物の量や質・種類、その他の条件によっては抗原抗体反応やビーズ・(オー)シスト複合体の回収を阻害し、特に鉄様微粒子が存在したり、適切なpHから外れたりすると回収率が低下することが報告されている [22, 24, 25]。高濁度の試料では浮遊法の回収率が良いとの報告もある [23, 26]。研修ではこうした事項を含め、免疫磁気ビーズ法とPercol-シヨ糖浮遊法の操作方法および回収率を低下させないためのポイントなどを紹介している。

さらに、夾雑物が非常に多い高濁質試料を想定して、実習ではPercol-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法を組み合わせた精製法も実施している。この方法は、両法の欠点を補い、利点を補完しており、回収率を向上させることができる [27]。こうした実習を通じて、実際の試験において応用されることが期待される。

#### 4. 染色法

オーシストやシストを特異的に染色するために抗原抗体反応に基づいた染色法（蛍光免疫染色法）が推奨されている。そこで、抗原抗体反応に関する基礎的知識に関する講義を行い、操作法を実習する。オーシストやシストのロスを防ぎ [28]、内部構造の観察を可能にするために、染色はメンブランフィルター上で実施することを推奨しており、フィルターの種類はセルロースアセテートフィルターと親水性PTFEメンブランフィルターを採用している。セルロースアセテートフィルターでは染色後に脱水操作が必要であり、この操作にある程度の訓練を要するとともにやや煩雑であることから、最近では操作が容易なPTFEフィル

ター上での染色を中心にした実習を行っている。

フィルター上で染色を行う場合には、フィルターに試料を載せ過ぎない、乾燥させない、染色液の洗浄を十分に行うなどといった点に留意するように実習する。こうした留意点は顕微鏡観察を確実にに行い、延いては正しく判定することにつながることから、染色操作上の重要なポイントとなる。

#### 5. 顕微鏡観察法

水試料からのクリプトスポリジウム等試験法は、図2に示すとおり、水試料中のオーシストとシストを顕微鏡による観察に基づいて判別した上で計数するため、顕微鏡観察は最も重要な部分を占めている。このオーシストあるいはシストを正しく判別できるかどうかは検査担当者の能力に依存している [29]。米国の公定法（Method 1622および1623）では、免疫磁気ビーズ法で精製されたオーシストとシストをスライドガラスに乾燥固着させ、特異蛍光抗体とDAPIによる核の染色により確定するとしている。これに対して、日本の試験法では染色をメンブランフィルター上で行い、特異蛍光抗体とDAPIによる染色に加えて微分干渉装置による内部構造の観察により確定することが求められている。そのため、形態観察を確実に行う必要があり、検査担当者の高い能力が要求される。

顕微鏡は微生物の検査や研究を行う施設に設備されている一般的な装置であるが、その操作方法を熟知している技術者や研究者は極めて少ないといっても過言ではない。ところが、水試料からのクリプトスポリジウム等試験法に用いる「微分干渉装置付蛍光顕微鏡」は、非常に特殊で操作法を熟知して観察することが求められる。

微分干渉装置は、無染色で細胞などの微細構造を観察するのに適している。しかし、適切な観察像を得るためには光学素子の調整が不可欠であるため、その習得に多くの時間を要し、研修では重点的に実習している。V. 4. で述べたように、染色・観察に用いるPTFEフィルターでは特有の縞模様が観察される。さらに、オーシストやシストがメンブランフィルター上にあるために標本が厚くなり、観察像が悪影響を受けて微分干渉装置付顕微鏡本来の観察像

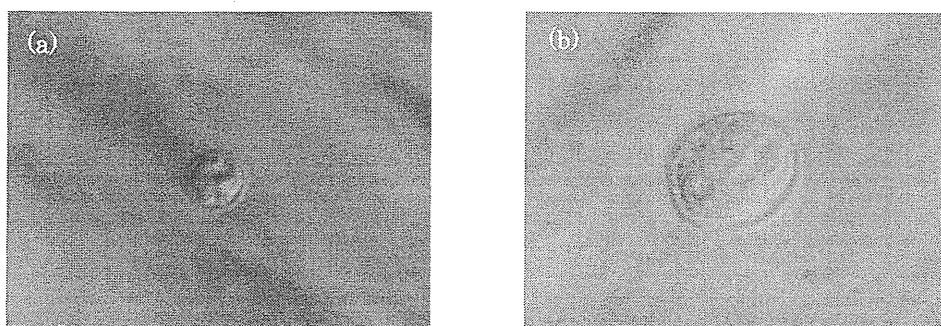


図2 実習において受講生が撮影したオーシストおよびシストの写真の1例。  
 (a) 水試料から捕捉されたメンブランフィルター上のクリプトスポリジウムオーシスト（微分干渉像）  
 (b) 同じアルジアシスト

とやや異なるものとなる。そのため、夾雑物やフィルターの妨害を受けてもなお、適切な操作により観察することでオーシストやシストを正しく判別することが求められる。

本研修では、受講生2～3人に1台の顕微鏡を準備し、実習時間内にできる限り長い時間を顕微鏡観察に費やすことができるように努めてきている。顕微鏡の構造から始まり、蛍光顕微鏡の励起光の選択、対物レンズの選択、ケーラー照明法、被写界深度、標本の観察時の視野とステージの移動などを説明する。さらに、受講生の標本の観察実習中には講師がマンツーマンで操作法を説明するとともに、受講生の操作法への理解度を確認する。

平成14年からはデジタルカメラが装備された顕微鏡を使用するようになった。写真撮影が格段に容易になり、写真撮影技術の実習が追加された。受講生には、観察したオーシストとシストを撮影し、写真を提出することを必修の課題としている。実習の最終日には、講師が写真を1枚ずつ講評する。これにより受講生の顕微鏡操作、観察、写真撮影を含む総合的な顕微鏡観察技術の習得達成度の確認が可能となった。すなわち、オーシストやシストの特徴を捉えた写真を撮影するためには、それぞれの特徴を理解していると同時に、顕微鏡の操作とデジタルカメラによる撮影技術を習得していなければならない。提出された写真によりそれらを評価することができ、受講生自身も写真の客観的評価により技術の習得度を認識できるようになった。提出された原虫の写真はCDあるいはDVDに記録し、研修最終日に受講生全員に配付している。

写真撮影技術は観察記録を残す上で必須である。水試料

からオーシストあるいはシストを疑う粒子が検出された場合に、専門家に電子メールで写真を送付すれば、意見を迅速に得ることも可能となる。水道水などからクリプトスポリジウム等が検出された場合に、できるだけ短時間に確定して、対応策を講じなければならない。写真による確定判断に際しては、オーシストやシストの特徴が的確に写真に記録されていなければならない。こうした観点からも、写真撮影技術の習得は重要である。

## 6. 精度管理

水試料からのオーシストとシストの回収率は様々な要因の影響を受ける。回収率の確認作業は、採用している試験法の信頼性を把握するために重要である[16]。さらに、前述したように試験法は実績を重視するため、事前に評価することを条件に、各段階で使用する試薬や器材、操作方法を置き換えることが認められている。「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」には精度管理法として「精度管理のためのオーシスト添加実験」が記載されており、本研修では、実際に添加回収実験を行うことで精度管理に関する手法を身につけるようにしている。

## VI. 受講生の技術習得度の評価

水試料からのクリプトスポリジウム等の検出のための試験法を実施するに当たり必要とされる知識及び操作手技を設定し(表7)、研修期間中に各研修受講生に対して口頭試問により習得度の評価を行っている。各項目は4点評価

表7 口頭試問の対象と期待されるレベル

対象項目	期待される主なレベル
プロセス手順の理解	試験法の特徴を述べることができる。
	試験法の手順を述べることができる。
	試験法全般における留意点を述べることができる。
	試験法全般における回収率を上げるための留意点を述べることができる。
濃縮・精製法の理解	濃縮・精製法の種類と特徴を述べることができる。
	各濃縮・精製法の手順を述べることができる。
	濃縮・精製法の操作上の留意点を述べることができる。
	濃縮・精製法における回収率を上げるための留意点を述べることができる。
染色技術・標本の作成	染色技術・標本作製法の種類と特徴を述べることができる。
	染色技術・標本作製法の操作上の留意点を述べることができる。
	染色技術・標本作製法における回収率を上げるための留意点を述べることができる。
蛍光・微分干渉像観察のセッティング	蛍光顕微鏡・微分干渉装置の特徴を述べることができる。
	蛍光顕微鏡・微分干渉装置の操作上の留意点を述べることができる。
	蛍光顕微鏡・微分干渉装置の応用的操作を述べることができる。
ケーラー照明	ケーラー照明の特徴を述べることができる。
	ケーラー照明の操作上の留意点を述べることができる。
	ケーラー照明の応用的操作を述べることができる。
クリプトスポリジウム・ジアルジアの写真撮影	(オー)シストの形態的特徴を述べることができる。
	(オー)シストの鑑別点を述べることができる。
	(オー)シストの写真撮影上の留意点を述べることができる。



とし、全項目の平均点を算出している。

口頭試問とは別に、前述のように、全受講生は顕微鏡観察したオーシスト及びシストを写真撮影し、提出することになっており、提出された写真は研修最終日にスライドプロジェクターで投影し、全受講生の前で講師が講評を行う。受講生は自分が提出した写真に加え、他の受講生の多くの写真の評価を視聴することで、形態観察の仕方とそれに必要な顕微鏡の操作、写真撮影の技法などを復習することができる。一方、講師は個々の受講生が習得すべき知識や技術の習得度を、提出された写真を介して確認することができる。

## Ⅶ. 受講生からの研修に対する評価

本研修では、研修修了時に受講生を対象に研修内容に対するアンケート調査を実施しているが、本研修は受講生から全体的に高い評価を得ている。平成23年度の研修では、満足度に関して「とても良かった」、「概ね良かった」、「どちらかという良かった」、「良くなかった」という項目のうち、「とても良かった」と回答した受講生が約70%、「概ね良かった」と回答した受講生が約30%であり、同様のアンケート調査を実施している他の研修と比較しても高い満足度が得られている。また、個別意見としても「最先端の情報、最高峰の指導の下、基本から研修を受けられたのがよかった」、「演習で（顕微鏡の）微分干渉像の写真の撮り方を覚えられたことは収穫だった。また、一連の操作手順を再度確認できて、研修に参加した甲斐があった」、「実践的で即役立つ内容になっており、他県、他施設の状況も理解することができた。」等の肯定的な意見が多く出ており、日常業務に役立つ実践的な研修が行われていることが確認できる。

## Ⅷ. 今後の課題

水道水の微生物学的安全性の確保のために、水道事業にもHACCPの概念が導入され、ハザードとしての原水の汚染状況を正確に把握することが大前提となっている。そのため、クリプトスポリジウム等の試験法による検査の需要が一層高まっており、それに応えられる検査技術の普及と定着が求められている。新たに遺伝子検査法が提案されているが、水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法は、今後も顕微鏡観察による方法が基本であることに変わりはない。この試験法の各段階である「濃縮・精製技術」、「染色技術」、「技術を要する顕微鏡操作」および「顕微鏡を用いた観察手法」を多くの受講生が習得し、彼らがそれぞれの地域においてさらに技術を伝達・普及させていくことが本研修の使命である。こうした検査体制を維持・向上させるために、本研修が果たすべき役割は大きい。前述したように水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法は実績主義を重視する試験法であるため、対象とする試料に適した試薬、機器・器材を組み合わせ、

微分干渉装置付蛍光顕微鏡で観察して判別・計数しなければならない。こうした試験法の選択の決定や試験の工程中の問題点の解決、あるいは顕微鏡観察による判定などに対して、研修後も支援することができれば、本研修がこれまで以上に重要な役割を果たすことになると思われる。

水道水を介したクリプトスポリジウム症あるいはジアルジア症の発生は、健康危機管理上の重大な問題である。本研修は、水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法に関する知識と技術の習得を主な目的としながら、受講生が地域においてクリプトスポリジウム・ジアルジア対策に取り組みながら、検査体制の中核として活躍できるようにすることも、その役割として担っている。中核となるためには、受講生は単に試験法に関する知識や操作技術を習得するにとどまらず、地域保健行政に関連した幅広い能力が求められる。したがって、今後は試験担当者に求められるコンピテンシーの理解と向上を目的として、基本的能力及び専門能力に関連した幅広い内容を講義ならびに実習に加えることを検討しなければならない。

水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジアの遺伝子検出法は、試験法として今後本格的に導入され、日常的に実施される検査として普及・定着する可能性がある。本研修では、これまでのところデモンストレーションにより操作を紹介し、また短時間の実習が行われているのみであるが、今後は顕微鏡観察操作と同様に、本格的な実習を行い、受講生の技術向上に努める必要があるだろう。

## 引用文献

- [1] Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 1976;70:592-8.
- [2] Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 1976;70:11560.
- [3] MacKenzie WR, Schell WL, Blair KA, Addiss DG, Peterson DE, Hoxie NJ, Kazmierczak JJ, Davis JP. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis*. 1995;21:57-62.
- [4] 鈴木了司, 岡村宣典, 倉繁隆信, 倉繁迫, 浜田義, 是沢俊輔, 雑賀光一. ネフローゼ症候群の一患者のクリプトスポリジウム症. *日本熱帯医学会雑誌*. 1986;14:13-21.
- [5] 黒木俊郎, 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志朗, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣勲, 井関基弘. 神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症. *感染症学雑誌*. 1996;70:132-40.
- [6] 埼玉県衛生部. クリプトスポリジウムによる集団下痢

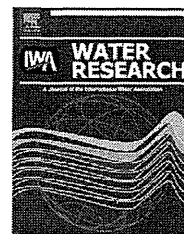
- 症—越生町集団下痢症発生事件—報告書。1997。
- [7] 厚生労働省生活衛生局水道環境部長通知。水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」。(平成8年10月4日付 衛水第248号)。
- [8] 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知。水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法。(平成10年6月19日付 衛水第49号)。
- [9] 厚生労働省健康局水道課長通知。水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について。(平成19年3月30日付 健水発第0330005号)。
- [10] 厚生労働省健康局水道課長通知。水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について。(平成19年3月30日付 健水発第0330006号)。
- [11] 厚生労働省健康局水道課水道水質管理室。水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集の送付について。(平成14年2月15日付)。
- [12] 新任時期における地域保健従事者の現任教育に関する検討会報告書(平成16年3月)
- [13] U.S. Environmental Protection Agency. 1998. USEPA method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/IFA. EPA 821-R-98-010. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 1998.
- [14] U.S. Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/IFA. EPA 821-R-99-006. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 1999.
- [15] United Kingdom Drinking Water Inspectorate. Water supply (water quality) (amendment) regulations 1999, SI no.1524. U.K. Drinking Water Inspectorate, London, England. 1999.
- [16] Francy DS, Simmons OD 3rd, Ware MW, Granger EJ, Sobsey MD, Schaefer FW 3rd. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:4118-28.
- [17] LeChevallier MW, Norton WD, Siegel JE, Abbaszadegan M. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:690-7.
- [18] Bukhari, Z., R. M. McCuin, C. R. Fricker, and J. L. Clancy. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:4495-9.
- [19] LeChevallier MW, Di Giovanni GD, Clancy JL, Bukhari Z, Bukhari S, Rosen JS, Sobrinho J, Frey MM. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:971-9.
- [20] Feng YY, Ong SL, Hu JY, Song LF, Tan XL, Ng WJ. Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:1898-903.
- [21] Musial CE, Arrowood MJ, Sterling CR, Gerba CP. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:687-92.
- [22] Kuhn, R. C., C. M. Rock, and K. H. Oshima. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68:206-2070.
- [23] McCuin RM, Clancy JL. Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:267-74.
- [24] Yakub GP, Stadterman-Knauer KL. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl Environ Microbiol.* 2000;6:3628-31.
- [25] 平田強, 橋本温, 遠藤卓郎. *Giardia/Cryptosporidium* ビーズの実用性. 厚生科学研究費補助金 先端的厚生科学研究分野 新興・再興感染症研究事業「水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究」(主任研究者: 国包章一) 平成10年度分担研究報告書。1999. p.49-54.
- [26] Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, LeChevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:3427-32.
- [27] Michael Royer, Lihua Xiao, Altaf Lal. Animal Source Identification Using A *Cryptosporidium* DNA Characterization Technique. EPA, CDC. 2002.
- [28] Warnecke M, Weir C, Vesey G. Evaluation of an internal positive control for *Cryptosporidium* and *Giardia* testing in water samples. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37:244-8.
- [29] Smith HV, Campbell BM, Paton CA, Nichols RA. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:5198-201.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)



## Selecting analytical target pesticides in monitoring: Sensitivity analysis and scoring

Koji Tani<sup>a</sup>, Yoshihiko Matsui<sup>b,\*</sup>, Kensuke Iwao<sup>a</sup>, Motoyuki Kamata<sup>c</sup>, Taku Matsushita<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Graduate School of Engineering, Hokkaido University, N13W8, Sapporo 060-8628, Japan

<sup>b</sup> Faculty of Engineering, Hokkaido University, N13W8, Sapporo 060-8628, Japan

<sup>c</sup> College of Engineering, Kanto Gakuin University, Mutsuurahigashi 1-50-1, Kanazawa-ku, Yokohama 236-8501, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 April 2011

Received in revised form

2 September 2011

Accepted 13 November 2011

Available online 25 November 2011

#### Keywords:

Pesticide runoff

Index

Ranking

Risk assessment

### ABSTRACT

Measuring river water concentrations of all pesticides applied in a catchment area is a daunting task. This study aims to develop new score tables for selecting analytical target pesticides. Sensitivity analyses were conducted using a diffuse pollution hydrologic model to quantitatively evaluate the influence of pesticide properties (e.g.,  $\log K_{OC}$ , degradability [half-life]) on concentrations of rice-farming pesticides in river water. Using the results of the analyses, score tables were systematically designed for the pesticide properties such that the sum of the scores for a particular pesticide, designated as the contamination index, was proportional to the expected/predicted concentration of that pesticide in river water. The contamination indexes for pesticides applied in three river basins were calculated and compared with the corresponding observed pesticide concentrations. Correlations between contamination indexes and observed concentrations were fairly good. Pesticides were ranked according to the quotients obtained by dividing the pesticide concentrations predicted from the contamination indexes by the corresponding drinking-water quality guideline values, and pesticide candidates to be monitored were successfully selected on the basis of a threshold quotient.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pesticides have markedly enhanced agricultural productivity and crop yields (e.g. Bolognesi, 2003). However, pesticide releases from agricultural fields and the resulting contamination of surface water threaten human health, as well as the local ecosystem in many regions, because surface water is a primary source of drinking water (Gilliom et al., 1999; Capri and Karpouzas, 2007; Hildebrandt et al., 2008; Vryzas et al., 2009; Wittmer et al., 2010). Governments regulate pesticide concentrations in drinking water. For example, the European Union Drinking Water Directive specifies a maximum acceptable

concentration of 0.1  $\mu\text{g/L}$  for individual pesticides and a maximum total acceptable concentration of 0.5  $\mu\text{g/L}$  for all pesticides and their metabolites, degradation products, and reaction products (Drinking Water Directive, 1998). The analytical target pesticides are not defined by the Directive, but those pesticides which are likely to be present in a given supply need to be monitored by the monitoring authority. In order to select the analytical target pesticides, therefore, a risk assessment is required which takes into account the pesticide usage and the local circumstances, but this process is not defined in the Directive. Japanese drinking water quality guideline (JDWQG) specifies that *DI* value should not exceed 1; *DI* is the

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 11 706 7280.

E-mail address: [matsui@eng.hokudai.ac.jp](mailto:matsui@eng.hokudai.ac.jp) (Y. Matsui).

0043-1354/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2011.11.036

sum of the  $DV_i/GV_i$  quotients for monitored pesticides [MHLWJ (Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan), 2003a]:

$$DI = \sum_i \frac{DV_i}{GV_i} \quad (1)$$

where  $DV_i$  is the observed concentration of pesticide  $i$  and  $GV_i$  is the reference concentration of pesticide  $i$  and is determined in JDWQG by MHLWJ (2003a) based on the acceptable daily intake of the pesticide. A hundred and two pesticides are listed in Pesticide Group 1 of JDWQG on the basis of the quantities sold and the availability of quantification methods, and the monitoring authority can further select the analytical target pesticides depending on its local circumstances. The selection process is, however, not defined.

Chemical scoring and ranking methods are developed as a screening tool for risk assessment of chemicals (Swanson et al., 1997; Finizio et al., 2001; Gramatica and Guardo, 2002; Juraske et al., 2007). A score table that ranks pesticides has been proposed for the selection of analytical target pesticides for JDWQG (Kamata et al., 2007). In this score table (hereafter referred as the old score table), a pesticide is scored between 1 and 5 for each of the following properties: quantity sold, octanol–water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ ), degradability, and acceptable daily intake (ADI), as shown in Table 1S in the supplementary information. Ideally, the sum of the first three scores (Scores A–C in Table 1S, which are related to pesticide runoff from rice paddies), should be well correlated with the concentrations of a particular pesticide in river water, but the old score table has not been validated. Generally, the results of chemical ranking approach have rarely been validated against measured concentrations, while the approach is applied for screening pesticides in surface water (Altenburger et al., 1993; Papa et al., 2004). In addition, the old score table does not include any criteria for selecting which pesticides should be monitored. For example, even if a list of pesticides was sorted and prioritized by means of the old score table, the table does not specify an absolute threshold value above which a pesticide should be selected for monitoring. Consequently, the old score table is hardly accepted as a screening tool by monitoring authorities.

In the current study our aim was to develop and test new score tables for (1) selecting pesticides with the potential to contaminate river water and (2) facilitating the development of a program for monitoring water quality. Rice-farming pesticides were investigated in this study as unlike upland field pesticides, they enter river water at high rates due to the large amount of fresh natural water required during the cropping season (Matsui et al., 2002). Therefore, pesticides applied to rice-paddy fields have a greater potential to contaminate river water, some of which is the source of drinking water.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Diffuse pollution hydrologic model

Although many models and their applications have been reported, few are designed to predict runoff of rice-farming pesticides from rice-paddy fields (Inao and Kitamura, 1999;

Miao et al., 2003; Nakano et al., 2004; Inao et al., 2008). Moreover, very few studies have attempted to develop a diffuse pollution hydrologic model applicable to basin-scale catchments (Matsui et al., 2002). In this study, we applied a diffuse pollution hydrologic model, which is capable of predicting the rice-farming pesticide concentrations in river water (Matsui et al., 2006a, b, Matsui et al., 2007), for conducting sensitivity analysis and then developing score tables. Sensitivity analysis capability of the model is also verified using the data of pesticide runoff dependency on  $K_{ow}$  (Tani et al., 2010). To apply the model to the river basins, we divided each catchment area into a grid of 1-km<sup>2</sup> cells and then subdivided each grid cell into at least 12 compartments: a rice-paddy compartment et al. (Matsui et al., 2006a). It is assumed that applied pesticides reach the paddy fields (the loss due to the drift of pesticide, the effect of application mode, the effect of spray formulation, and the effect of adjuvants were not accounted). A set of differential mass-balance equations was defined to describe the dynamics of the pesticide and water in each compartment. The equations are solved as a system of ordinary differential equations by Gear's stiff method (backward differentiation formulas) from the IMSL MATH/LIBRARY (Visual Fortran Versions 6.6, Compaq). The Chikugo River (33.18°N, 130.28°E, length: 143 km, basin area: 2860 km<sup>2</sup>) and Sagami River basins (35.25°N, 139.22°E, length 109 km, basin area 1680 km<sup>2</sup>) were selected as the model river basins.

### 2.2. Pesticides

Pesticide concentrations observed in 2004–2008 in the Mabechi River (40.47°N, 141.42°E, length 142 km, basin area 2050 km<sup>2</sup>) and in 2004–2007 in the Chikugo and Sagami Rivers were used for evaluating the score tables. Pesticide concentration data were obtained from the local water supply authorities (see Acknowledgments), who measured pesticide concentrations almost weekly according to the JDWQG standard methods (MHLWJ, 2003b). Pesticide property data were obtained by PCKOCWIN (organic carbon partitioning coefficient estimation program), KOWWIN (octanol-water partitioning coefficient estimation program) and BIOWIN (biodegradation factor estimation program) modules in the EPI (Estimation Program Interface) Suite (Aronson et al., 2006; US Environmental Protection Agency, 2007) Tomlin, 2006; Kamrin, 1997), and Ministry of the Environment of Japan (2010). The quantities of pesticides sold in the basins were estimated from pesticide sale data books (Japan Plant Protection Association, 2005–2008) after allocation of the pesticide sales to the river basins on the basis of land-use data (Matsui et al., 2006a; Kamata et al., 2008).

### 2.3. Sensitivity analyses for constructing the new score tables

#### 2.3.1. Score for quantity of pesticide sold

Pesticides applied in fields reach the river after having been diluted. Therefore, the basic potential for the pesticide concentration in river water should be proportional to the quantity of pesticide sold divided by the river flow rate. In the current study, the score for the quantity of pesticide sold, defined as Score X, is given by