

Figure 1 | Effect of coagulant type on removal of infectious Q β by the in-line coagulation–ceramic MF process as evaluated by the PFU method. Source water was river water 1. Coagulant dosage was 1.08 (a) or 2.16 (b) mg-Al/L. Values are filtration time-averaged removals, and the error bars indicate standard deviations. The absence of a bar indicates that the Q β concentrations were below the quantification limit in the treated water.

(approximately 25 nm) was smaller than the nominal pore size of the ceramic MF membrane (0.1 μ m), no removal of infectious Q β was observed in the absence of coagulation pretreatment (data not shown). In contrast, in-line coagulation pretreatment dramatically enhanced the removal ratios ($\log[C_0/C_f]$) of infectious Q β compared with ceramic MF alone at around pH 6.8 of treated water. Greater than 6-log removals were achieved by a combination of in-line coagulation pretreatment and ceramic MF filtration, regardless of the type of coagulant, because during the coagulation pretreatment, Q β was effectively incorporated into the aluminum flocs, which were larger than the nominal pore size of the ceramic MF membrane, and the flocs with incorporated Q β were removed by ceramic MF filtration.

The infectious Q β removal performances of AlCl₃, alum, and PACI-1.5 were markedly decreased when the pH of the treated water shifted from 6.8 to 7.8. Even when the coagulant dosage was increased from 1.08 to 2.16 mg-Al/L, <1-log removals were observed for those coagulants (Figure 1(b)). In contrast, PACI-2.2 continued to remove viruses with high efficiency (>6-log removal of infectious Q β) even under weakly alkaline pH conditions (Figure 1(a)). This result indicates that the type of coagulant affects virus removal performance in the in-line coagulation–ceramic MF process, especially under weakly alkaline pH conditions, and that a high-basicity PACI (e.g. PACI-2.2) can remove viruses more effectively than the other commercially

available aluminum-based coagulants used in the present study.

Effect of PACI basicity on bacteriophage removal

As described above, PACI-2.2 removed infectious Q β more efficiently than did other aluminum-based coagulants, including PACI-1.5, especially under weakly alkaline pH conditions. To precisely quantify the effect of PACI basicity on virus removal, we compared the removal of Q β by in-line coagulation pretreatment with four PACIs with different basicities followed by ceramic MF filtration within the pH range 6.8–7.8 (Figure 2, source water was river water 2). More than 8-log removals of infectious Q β , assessed by the PFU method, were attained by the in-line coagulation–ceramic MF process with all the PACIs when the pH of the treated water was about 6.8, regardless of their basicity (Figure 2(a)). In contrast, the removal efficiencies of infectious Q β depended on the basicity of the PACIs when the pH of the treated water was about 7.8. The in-line coagulation–ceramic MF process with PACI-1.5 and PACI-1.8 achieved approximately a 1-log removal of infectious Q β , but approximately 6-log and >8-log removals were achieved with PACI-2.2 and PACI-2.5, respectively. A similar trend was observed for removal ratios of total Q β , assessed by the RT-PCR method. Although high removal efficiencies of total Q β , at least

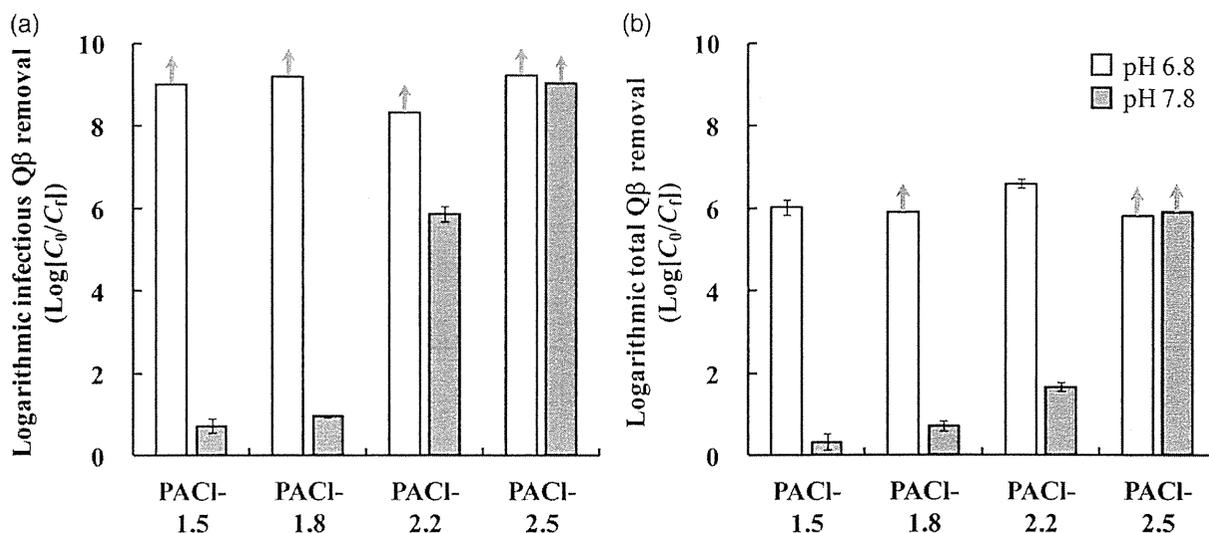


Figure 2 | Effect of PACl basicity on infectious Q β removal as evaluated by the PFU method (a) and on total Q β removal as evaluated by the RT-PCR method (b) by the in-line coagulation–ceramic MF process. Source water was river water 2. Coagulant dosage was 1.08 mg-Al/L. Values are filtration time-averaged removals, and the error bars indicate standard deviations. The absence of a bar indicates that the Q β concentrations were below the quantification limit in the treated water.

6-log removals, were achieved for all PACls at around pH 6.8, marked differences in removal ratios were observed among the four PACls when the pH of the treated water was about 7.8 (Figure 2(b)). These results suggest that the basicity of PACls affects virus removal performance in the in-line coagulation–ceramic MF process, especially under weakly alkaline conditions.

As shown Figure 2, the in-line coagulation–ceramic MF process with PACl-2.5 effectively removed viruses compared to the performance of the other PACls used in the present study. In addition, this process removed DOC and UV260-absorbing NOM more efficiently and resulted in a lower residual aluminum concentration than did the processes with PACl-1.5, PACl-1.8, and PACl-2.2, especially under weakly alkaline conditions (whereas approximately 20–30% and 40–50% removals for DOC and UV260-absorbing NOM, respectively, and 0.08–0.15 mg-Al/L residual aluminum concentrations were observed for PACl-1.5, PACl-1.8, and PACl-2.2 at a pH of about 7.8, approximately 50% and 70% removals for DOC and UV260-absorbing NOM, respectively, and <0.01 mg-Al/L residual aluminum concentrations were attained for PACl-2.5). Accordingly, the combination of coagulation pretreatment with high-basicity PACl and ceramic MF is effective in treating drinking water, including virus removal, over a broader pH range

compared to commercially available aluminum-based coagulants.

The Q β removal ratios determined by the PFU and RT-PCR methods differed markedly, depending on the coagulation conditions. The infectious Q β removal ratios (Figure 2(a)) were larger than the total Q β removal ratios (Figure 2(b)). Because our previous study demonstrated that Q β loses its infectivity after being mixed with aluminum hydrolyte species during coagulation with PACl-1.5 (Matsushita *et al.* 2011), the virucidal activity of the PACls contributed to the removal efficiency of infectious Q β during the in-line coagulation–ceramic MF process.

Characterization of coagulants

To elucidate why PACl-2.5, which has a higher basicity, was more effective in removing viruses, we used ESI-TOF-MS to analyze the aluminum hydrolyte speciation in PACl-2.5. In the ESI-TOF-MS spectra of all the coagulants (Figure 3), we found the most intensive peak at m/z 97, which is assigned to the monomeric aluminum species $[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ (Urabe *et al.* 2007). In addition, fragment ions of tridecameric species – i.e. Al_{13} species such as $[(\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12})]^{7+}$ with peaks at m/z 303 $[\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{28}(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$ and 454 $[\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{29}]^{2+}$ (Stewart *et al.* 2009) – were observed for

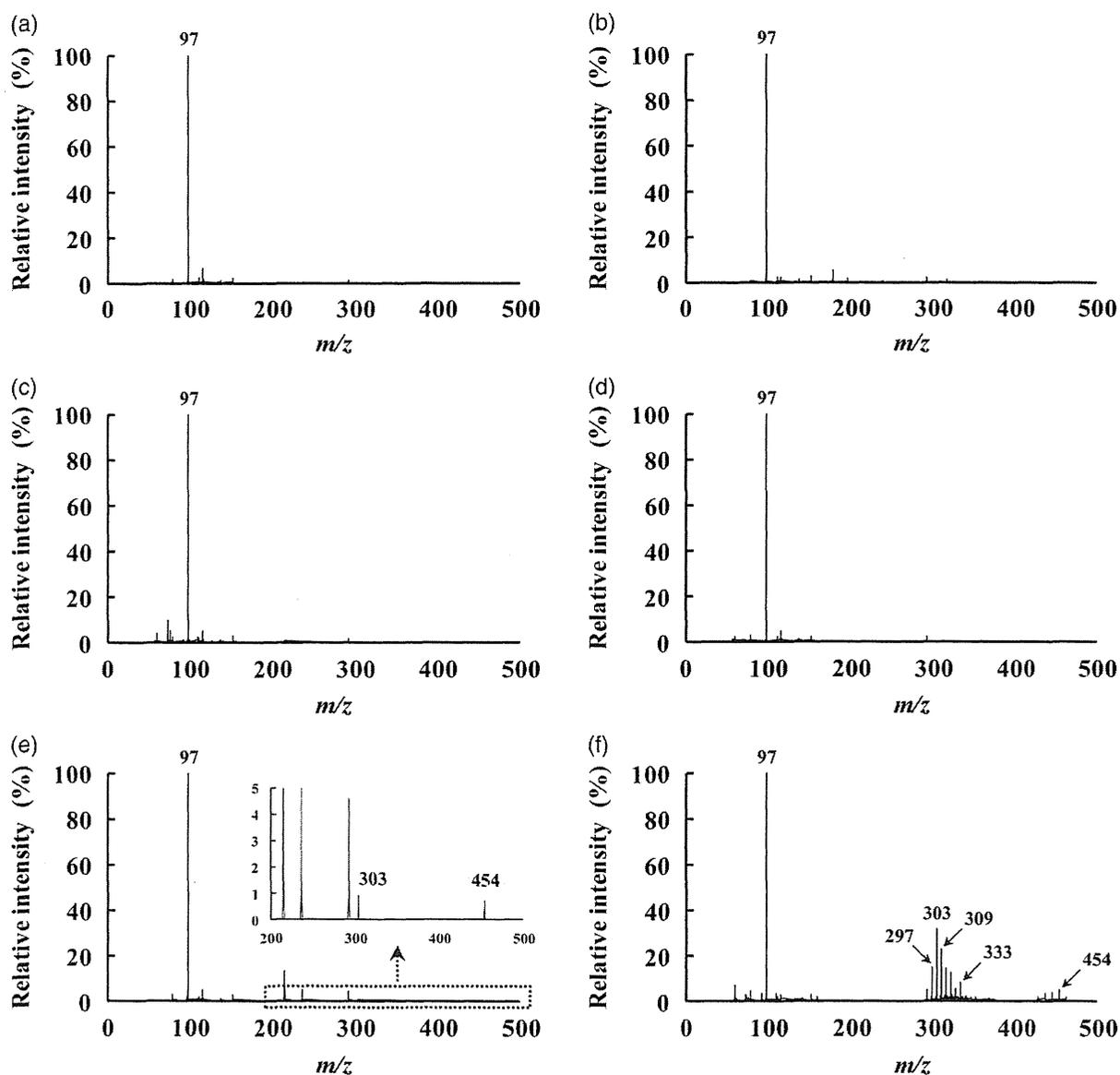


Figure 3 | ESI-TOF-MS spectra of coagulants: AlCl_3 (a), alum (b), PACl-1.5 (c), PACl-1.8 (d), PACl-2.2 (e), and PACl-2.5 (f).

PACl-2.2 (the relative intensities of these two peaks were 0.7–0.9%) and PACl-2.5. In contrast, no peak for Al_{13} species was confirmed in the spectra of AlCl_3 , alum, PACl-1.5, and PACl-1.8. Moreover, other strong peaks of Al_{13} species at m/z 297 [$\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{28}]^{3+}$, 309, 315, 321, 327, and 333 [$\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{28}(\text{H}_2\text{O})_{2-6}]^{3+}$ (Stewart *et al.* 2009) were observed in the spectrum of PACl-2.5. These results suggest that high-basicity PACls such as PACl-2.2 and PACl-2.5

contain Al_{13} species, but these species are not present in AlCl_3 , alum, PACl-1.5, and PACl-1.8.

Some researchers have demonstrated that the content of Al_{13} species in a coagulant is approximately equal to that of Al_b species categorized by the Ferron method (Chen *et al.* 2006). In the present study, whereas strong peaks related to Al_{13} species were observed for PACl-2.5, the content of Al_b in PACl-2.5 was very similar to those in other

aluminum-based coagulants used in the present study (Table 2). In contrast, the content of Al_c varied as a function of the coagulant type and was highest in PACl-2.5 (Table 2). Because the Al_{30} species $[(Al_{30}O_4(OH)_{56}(H_2O)_{24})]^{18+}$ does not react with Ferron reagents within 120 min, it is categorized as Al_c by the Ferron method (Chen *et al.* 2007). In addition, the Al_{30} species is known to consist of two Al_{13} species connected by four monomeric aluminum species (Chen *et al.* 2007), the implication being that the peaks of monomeric aluminum species and fragment ions of Al_{13} species will also be observed when the Al_{30} species in a coagulant is decomposed by fragmentation in the ESI-TOF-MS analysis. Actually, these peaks were clearly confirmed in the ESI-TOF-MS spectrum of PACl-2.5, as shown in Figure 3. Therefore, PACl-2.5 possibly contained not only Al_{13} species but also Al_{30} species.

The positive colloid charges of the coagulants were also determined by using a colloid titration technique (Figure 4). The colloid charge densities of the $AlCl_3$ and alum were very small and almost constant, regardless of the aluminum concentration. In contrast, the colloid charge densities of the PACls increased with increasing concentrations of aluminum. In addition, the colloid charge density of PACl-2.5 was the highest among the aluminum-based coagulants used in the present study. Because Al_{13} species and Al_{30} species are known to be effective coagulants because of their strong charge neutralization capability and high structural stability (Chen *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2008), the presence of Al_{13}

species, Al_{30} species, or both in PACl-2.5 is possibly associated with the large amount of positive colloid charge. In addition, the absence of sulfate in PACl-2.5 probably also contributed to its high colloid charge density compared with that of other sulfated PACls such as PACl-1.5, PACl-1.8, and PACl-2.2, because the presence of sulfate during the coagulation process reduces the charge neutralization capability of coagulants (Wang *et al.* 2002). These characteristics of PACl-2.5 account for its high capability to neutralize the negative charges on viruses during coagulation pretreatment. Actually, the in-line coagulation–ceramic MF process with PACl-2.5 could effectively remove viruses not only under neutral pH conditions but also under weakly alkaline conditions, as described above.

We have shown through this study that coagulation pretreatment with PACl-2.5 followed by ceramic MF has a variety of advantages, including effective removal of viruses, DOC, and UV260-absorbing NOM, and the process results in very low residual aluminum concentrations compared with other aluminum-based coagulants, even under weakly alkaline conditions. To elucidate whether the in-line coagulation–ceramic MF process with high-basicity PACl is actually useful for drinking water treatment, further investigations using a wide variety of water sources are needed, because the concentration of viruses in the treated water may be affected by the characteristics of the source water.

CONCLUSIONS

1. The basicity of PACls affects the virus removal performance of the in-line coagulation–ceramic MF process. The high-basicity PACls, PACl-2.2 and PACl-2.5, could effectively remove viruses not only under neutral pH conditions but also under weakly alkaline conditions.
2. Among the various aluminum-based coagulants used in the present study, PACl-2.5, which has a high Al_c content (including Al_{13} species and possibly Al_{30} species) and a high colloid charge density, removed viruses more efficiently (>8-log for infectious viruses; >6-log for total viruses) than the other aluminum-based coagulants in the pH range 6.8 to 7.8.
3. The in-line coagulation–ceramic MF process with PACl-2.5 removed not only viruses but also DOC and

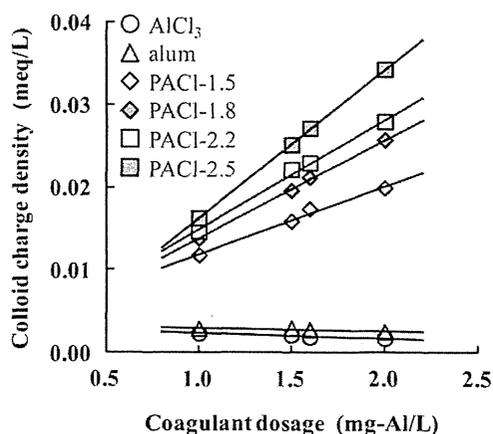


Figure 4 | Colloid charge densities of the coagulants as evaluated by the colloid titration technique.

UV260-absorbing NOM more efficiently and resulted in a lower residual aluminum concentration than did commercially available PACls, especially under weakly alkaline conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists A (no. 25709044, 2013), a Grant-in-Aid for Scientific Research S (no. 24226012, 2012) and B (no. 24360211, 2012) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), a Grant-in-Aid (2013) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and the Kurita Water and Environment Foundation (no. 23050, 2011).

REFERENCES

- Adams, M. H. 1959 *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York, NY, USA, pp. 450–454.
- Chen, Z., Fan, B., Peng, X., Zhang, Z., Fan, J. & Luan, Z. 2006 Evaluation of Al₃₀ polynuclear species in polyaluminum solutions as coagulant for water treatment. *Chemosphere* **64** (6), 912–918.
- Chen, Z., Luan, Z., Fan, J., Zhang, Z., Peng, X. & Fan, B. 2007 Effect of thermal treatment on the formation and transformation of Keggin Al₁₅ and Al₃₀ species in hydrolytic polymeric aluminum solutions. *Colloid Surf. A* **292** (2–3), 110–118.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (ed.) 2005 *Virus Taxonomy: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 741–750.
- Hu, C. Z., Liu, H. J., Qu, J. H., Wang, D. S. & Ru, J. 2006 Coagulation behavior of aluminum salts in eutrophic water: Significance of Al₁₅ species and pH control. *Environ. Sci. Technol.* **40** (1), 325–331.
- Huang, H., Schwab, K. & Jacangelo, J. G. 2009 Pretreatment for low pressure membranes in water treatment: a review. *Environ. Sci. Technol.* **43** (9), 3011–3019.
- Kimura, M., Matsui, Y., Kondo, K., Ishikawa, T., Matsushita, T. & Shirasaki, N. 2013 Minimizing residual aluminum concentration in treated water by tailoring properties of polyaluminum coagulants. *Water Res.* **47** (6), 2075–2084.
- Lee, J. D., Lee, S. H., Jo, M. H., Park, P. K., Lee, C. H. & Kwak, J. W. 2000 Effect of coagulation conditions on membrane filtration characteristics in coagulation-microfiltration process for water treatment. *Environ. Sci. Technol.* **34** (17), 3780–3788.
- Matsukawa, S., Itoho, S., Habuthu, S. & Aizawa, T. 2006 An approach to residual aluminium control at Nisiya purification plant, Water Works Bureau, Yokohama. *Water Sci. Technol. Water Supply* **6** (4), 67–74.
- Matsushita, T., Matsui, Y., Shirasaki, N. & Kato, Y. 2005 Effect of membrane pore size, coagulation time, and coagulant dose on virus removal by a coagulation-ceramic microfiltration hybrid system. *Desalination* **178** (1–3), 21–26.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y. & Ohno, K. 2011 Virus inactivation during coagulation with aluminum coagulants. *Chemosphere* **85** (4), 571–576.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. & Ohno, K. 2009 Comparison of removal performance of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophage Q β and MS2, in a coagulation–ceramic microfiltration system. *J. Membrane Sci.* **326** (2), 564–571.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A. & Ohno, K. 2010 Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Res.* **44** (5), 1307–1316.
- Stewart, T. A., Trudell, D. E., Alam, T. M., Ohlin, C. A., Lawler, C., Casey, W. H., Jett, S. & Nyman, M. 2009 Enhanced water purification: a single atom makes a difference. *Environ. Sci. Technol.* **43** (14), 5416–5422.
- Tanneru, C. T., Rimer, J. D. & Chellam, S. 2013 Sweep flocculation and adsorption of viruses on aluminum flocs during electrochemical treatment prior to surface water microfiltration. *Environ. Sci. Technol.* **47** (9), 4612–4618.
- Urabe, T., Tanaka, M., Kumakura, S. & Tsugoshi, T. 2007 Study on chemical speciation in aluminum chloride solution by ESI-Q-MS. *J. Mass. Spectrom.* **42** (5), 591–597.
- Wang, D., Tang, H. & Gregory, J. 2002 Relative importance of charge neutralization and precipitation on coagulation of kaolin with PACl: effect of sulfate ion. *Environ. Sci. Technol.* **36** (8), 1815–1820.
- Wang, D., Sun, W., Xu, Y., Tang, H. & Gregory, J. 2004 Speciation stability of inorganic polymer flocculant–PACl. *Colloid Surf. A* **243** (1–3), 1–10.
- Yan, M. Q., Wang, D. S., Qu, J. H., Ni, J. R. & Chow, C. W. K. 2008 Enhanced coagulation for high alkalinity and micro-polluted water: the third way through coagulant optimization. *Water Res.* **42** (8–9), 2278–2286.
- Zhang, P., Wu, Z., Zhang, G., Zeng, G., Zhang, H., Li, J., Song, X. & Dong, J. 2008 Coagulation characteristics of polyaluminum chlorides PAC-Al₃₀ on humic acid removal from water. *Sep. Purif. Technol.* **63** (3), 642–647.
- Zhu, B., Clifford, D. A. & Chellam, S. 2005 Virus removal by iron coagulation-microfiltration. *Water Res.* **39** (20), 5153–5161.

Quantitative detection of human enteric adenoviruses in river water by microfluidic digital polymerase chain reaction

Naohiro Kishida, Naohiro Noda, Eiji Haramoto, Mamoru Kawaharasaki, Michihiro Akiba and Yuji Sekiguchi

ABSTRACT

We describe an assay for simple and accurate quantification of human enteric adenoviruses (EAdVs) in water samples using a recently developed quantification method named microfluidic digital polymerase chain reaction (dPCR). The assay is based on automatic distribution of reaction mixture into a large number of nanolitre-volume reaction chambers and absolute copy number quantification from the number of chambers containing amplification products on the basis of Poisson statistics. This assay allows absolute quantification of target genes without the use of standard DNA. Concentrations of EAdVs in Japanese river water samples were successfully quantified by the developed dPCR assay. The EAdVs were detected in seven of the 10 samples (1 L each), and the concentration ranged from 420 to 2,700 copies/L. The quantified values closely resemble those by most probable number (MPN)-PCR and real-time PCR when standard DNA was validated by dPCR whereas they varied substantially when the standard was not validated. Accuracy and sensitivity of the dPCR was higher than those of real-time PCR and MPN-PCR. To our knowledge, this is the first study that has successfully quantified enteric viruses in river water using dPCR. This method will contribute to better understanding of existence of viruses in water.

Key words | absolute quantification, digital PCR, gastroenteritis, real-time PCR, waterborne infectious diseases

Naohiro Kishida (corresponding author)
Michihiro Akiba
Area on Water Management,
Department of Environmental Health,
National Institute of Public Health,
2-3-6 Minami,
Wako, Saitama 351-0197,
Japan
E-mail: kishida@niph.go.jp

Naohiro Noda
Mamoru Kawaharasaki
Yuji Sekiguchi
Biomedical Research Institute,
National Institute of Advanced Industrial Science
and Technology (AIST),
Central 6, Higashi 1-1-1,
Tsukuba, Ibaraki 305-8566,
Japan

Eiji Haramoto
Interdisciplinary Graduate School of Medicine and
Engineering,
University of Yamanashi,
4-3-11 Takeda, Kofu,
Yamanashi 400-8511,
Japan

INTRODUCTION

The accurate quantification of pathogenic microorganisms in water is crucial for estimating and controlling health risk of waterborne infectious diseases. Real-time polymerase chain reaction (PCR) is widely used for quantifying microorganisms in water (Rajal *et al.* 2007; Wyn-Jones *et al.* 2011; Kishida *et al.* 2012a). However, the quantified value by real-time PCR is unstable if the copy number of target genes in the reaction mixture is small, because the effect of annealing error at the beginning of the PCR cycle (PCR drift) on the amplification efficiency is high (Wagner *et al.* 1994). Although it is possible to increase copy number by concentrating microorganisms in water by filtering or centrifugation, excess concentration increases inhibitory substances for PCR, such as humic acids, fulvic acids and polysaccharides, which are typically co-extracted with target DNA from natural water samples (Hata *et al.* 2011).

Due to the inhibitory effect, the concentration of microorganisms in water is often underestimated (Hamza *et al.* 2009; Hata *et al.* 2011). If copy number is small, and inhibitory effect is high, estimated quantified value can be less than one copy. This phenomenon sometimes occurred in our previous experiments (data not shown). In addition, accurate preparation of copy number of standard DNA is generally difficult, which increases quantification error.

In this study, we focused our attention on a recently reported novel molecular method for the quantification of nucleic acid sequences named microfluidic digital PCR (dPCR) (Dube *et al.* 2008; Spurgeon *et al.* 2008) as an improved method for the quantification of microorganisms in water. The microfluidic dPCR is a new technology that allows absolute quantification of target genes without the use of standard DNA. As shown in Figure 1, the reaction

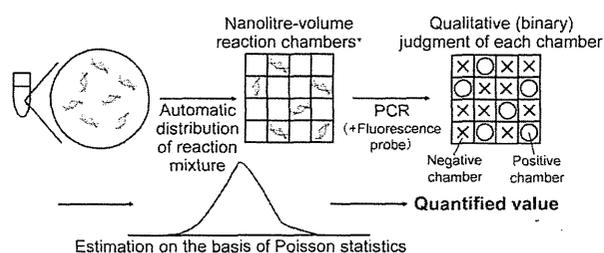


Figure 1 | Schematic presentation of microfluidic dPCR for estimating the target DNA without the use of standard DNA. (*The number of reaction chambers is much larger in an actual device.)

mixture for PCR is automatically distributed and partitioned into a large number of nanolitre-volume reaction chambers. After conducting PCR in the chambers, the amount of target DNA is estimated from the number of chambers containing amplification products on the basis of Poisson statistics, which can predict how input DNA is distributed into all small chambers (Dube *et al.* 2008). This method provides binary output because the PCR reaction in each nanolitre-volume chamber is either positive or negative, and the quantified copy number is independent of the PCR amplification efficiency (Hoshino & Inagaki 2012). Therefore, this method can accurately and simply quantify microorganisms even if inhibitory substances exist in the reaction mixture (Hoshino & Inagaki 2012). However, this method has rarely been applied to quantification of pathogenic microorganisms in water.

In the present study, we developed a microfluidic dPCR assay for accurate quantification of human enteric adenoviruses (EAdVs) as representative microorganisms, and applied the assay to the detection in water samples collected from a Japanese river. To investigate validity of the microfluidic dPCR, conventional real-time PCR assay and most probable number (MPN)-PCR assay were also performed, and the quantification data for the three techniques were compared.

MATERIALS AND METHODS

Collection of river water samples, virus concentration and DNA extraction

In total, 10 river water samples were collected from one sampling site in the Tone River in Japan, from October 2011 to March 2012. The Tone River has a total length of 322 km and a catchment area of 16,840 km², with approximately 800 tributaries. The sampling site was located on

the right bank at the Tone Diversion Weir, where the surface water is utilized for the production of drinking water for the Tokyo Metropolitan Area. Over 2 million people live in the upper river basin of the sampling site, and there are many wastewater treatment plants and private septic tanks in the area. Enteric AdVs have been frequently detected at this sampling site in a previous study by us (Kishida *et al.* 2012b).

One litre of sampled river water was concentrated to approximately 0.6 mL using electronegative and ultrafiltration membranes as described previously (Haramoto *et al.* 2005). For detection of EAdVs, 200 µL of the concentrated sample was subjected to DNA extraction using a QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) to obtain 200 µL of the resulting DNA.

Quantification of EAdVs by dPCR, real-time PCR and MPN-PCR

The primer pairs and the TaqMan probe used for dPCR, real-time PCR and MPN-PCR were designed to amplify adenovirus stereotypes 40 and 41 (Ko *et al.* 2005). The dPCR was performed using the BioMark Real-time System and 12.765 Digital Array, which consisted of 12 panels containing 765 reaction chambers each (Fluidigm Corporation, San Francisco, USA). Aliquots of 1.15 µL of extracted DNA solution were mixed with 3.45 µL of reaction buffer containing 2.3 µL of TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan), 900 nM of each primer, and 250 nM of TaqMan probe. The reaction mixtures were incubated at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. After amplification, Digital PCR Analysis Software (Fluidigm Corporation) was used to count the number of positive chambers. Finally, the software statistically estimated the absolute copy number of target DNA in panels using Poisson statistics. The theory and equations used in this study have been described elsewhere (Dube *et al.* 2008; Bhat *et al.* 2009). Briefly, the copy number of template DNA (M) is given by

$$M = -C \times \ln\left(1 - \frac{H}{C}\right)$$

where C is the number of all chambers in a panel (=765) and H is the number of positive chambers (Hoshino & Inagaki 2012). Because the molecules in the reaction mix are distributed in small chambers, dPCR quantifies the number of molecules instead of the copy number of genes estimated by real-time PCR. For example, a genome fragment

possessing three copies of the target gene in a reaction chamber should be quantified as one by digital PCR, whereas real-time PCR quantifies it as three (Hoshino & Inagaki 2012).

Real-time PCR and MPN-PCR were performed using LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). For real-time PCR, aliquots of 1.15 μL of extracted DNA solution were mixed with 18.85 μL of reaction buffer containing 10 μL of 2 \times LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics), 400 nM of each primer, and 200 nM of TaqMan probe. The reaction mixtures were incubated at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min followed by 50 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 s and 55 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s. When fluorescence intensity is over the threshold value within 45 cycles, the sample was considered to be positive. Tenfold serial dilutions of chemically synthesized oligo-DNAs of adenovirus serotype 40 (Accession No.: X16583; position: 614-723) were used to make a standard curve. The concentration of the standard was calculated from the optical density measurement. Validation of concentration of standard DNA was also performed using dPCR. Namely, standard DNA with the concentration of 500 copies/reaction calculated from the optical density measurement was quantified using dPCR.

For MPN-PCR, DNA sample was manually diluted as described previously (Katayama *et al.* 2008). The reaction mixture composition and incubation condition of MPN-PCR were the same of those of real-time PCR except for template volume. To compare detection sensitivity of each PCR, the total volume of template DNA solution before dilution for MPN-PCR was set as 1.15 μL . Each PCR test was performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of concentration of standard DNA using dPCR

Figure 2 shows binary results of each reaction chamber of dPCR. Positive and negative chambers were clearly divided. Therefore, the number of positive chambers was successfully counted, and copy number was quantified on the basis of Poisson statistics. The quantified values for standard DNA tested in triplicate resemble each other (78 ± 10 copies/reaction). However, these values were much less than the input copy number (500 copies/reaction). This result indicates that the copy number of standard DNA prepared by the optical density measurement and dilution was not accurate.

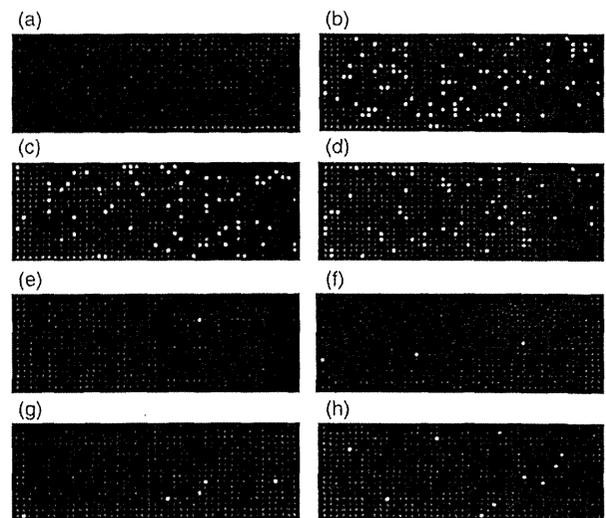


Figure 2 | Images of the digital PCR array after 45 cycles of PCR. Each panel contains 765 chambers, and white chambers are positive. (a) Negative control, (b)–(d) standard DNA ($n = 3$), (e)–(h) river water samples (examples).

Quantification of EAdV concentration in river water sample using dPCR

The EAdVs were successfully detected from river water samples using dPCR. As shown in Table 1, EAdVs were detected in seven of the 10 samples (70%). In this study, the water sampling was conducted only in the winter season when detection frequency of EAdVs is high. In fact, the detection efficiency is higher compared to a previous study conducted year-round which covered all seasons at the same sampling site (Kishida *et al.* 2012b).

Table 1 | Concentration of EAdVs in river water samples from the Tone River in Japan determined by microfluidic dPCR

Sample no.	Concentration (copies/L)			Mean	Standard deviation
	1	2	3		
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	420	420	420	420	0
5	1,000	1,500	1,500	1,300	290
6	460	920	1,400	920	460
7	1,300	2,500	4,000	2,700	1,500
8	440	880	1,800	1,000	670
9	440	1,300	1,300	1,000	510
10	1,600	1,600	2,000	1,700	230

Although the reason why detection efficiency is high in the winter season is not clear, a seasonal variation in the number of infected patients may be one of the reasons. According to limited clinical data reported to the National Institute of Infectious Diseases, Japan, the number of confirmed EAdVs (patients/surveillance site) was larger in the winter season in 2011/2012 compared with other seasons (National Institute of Infectious Diseases 2014). Hence, it is suggested that EAdVs were shed from humans and discharged into the water environment via wastewater treatment plants in this season, which may cause an increase in the concentration of EAdVs in river water. Another reason may be a seasonal variation in rainfall. Near the sampling site, the amount of rainfall was small in the winter season in 2011/2012 (Japan Meteorological Agency 2014), which decreases the water level of the river and the dilution effect by rainfall, and may cause an increase in the concentration of EAdVs in river water. Meanwhile, the first three samples (No. 1–3 in Table 1) were negative for EAdVs. This may be because the amount of rainfall near the sampling period was different. The amount of rainfall in the early winter season that the first three samples were obtained was larger than that in the late winter season when the other samples were obtained (Japan Meteorological Agency 2014). Dilution

effect by rainfall would be higher in the early winter season, which decreased the concentration of EAdVs in river water.

Although river water samples were concentrated using electronegative and ultrafiltration membranes, the quantified copy number of each reaction was less than 10, as shown in Figure 2, because the EAdV concentration in river water sample is normally lower compared to those in sewage samples (Haramoto *et al.* 2007). Nevertheless, relatively stable quantified values were obtained. The mean concentration of each sample tested in triplicate ranged from 420 to 2,700 copies/L. This contaminant level is similar to that of the previous study conducted at another Japanese river (Haramoto *et al.* 2007).

Comparison of quantified data among dPCR, real-time PCR and MPN-PCR

Table 2 shows quantified data of EAdVs by dPCR, real-time PCR and MPN-PCR. Standard deviations of positive samples quantified by dPCR are lower than those by real-time PCR. This indicates that stable quantification data can be obtained using dPCR even when the target copy number in the reaction mixture is small. This is because dPCR provides binary output since the PCR reaction in

Table 2 | Concentration of EAdVs in river water samples using three different PCR methods (unit: copies/reaction; $n = 3$)

Sample no.	dPCR		MPN-PCR		Real-time PCR			
	Mean	S.D. ^c	Mean	S.D. ^c	Adjustment ^a		Non-adjustment ^b	
					Mean	S.D. ^c	Mean	S.D. ^c
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1.0	0	1.9	1.6	0	0	0	0
5	2.7	0.58	4.0	3.4	3.7	3.0	23	19
6	2.0	1.0	0	0	1.2	0.42	7.7	2.7
7	6.3	3.5	6.2	2.7	3.7	3.9	24	25
8	2.3	1.5	4.7	2.7	2.2	2.0	14	13
9	2.3	1.2	2.1	1.8	1.5	0.66	9.7	4.2
10	4.3	0.58	3.7	0.94	1.7	1.2	11	7.6
Mean ^d	3.0	1.4	3.8	2.2	2.3	1.9	15	12
Detection frequency	70%		60%		60%		60%	

^aQuantified values when the concentration of standard DNA was adjusted (validated) by dPCR.

^bQuantified values when the concentration of standard DNA was not adjusted (validated) by dPCR.

^cStandard deviation.

^dMean values of the positive samples.

each nanolitre-volume chamber is either positive or negative, and the quantified copy number is independent of the PCR amplification efficiency. In addition, the standard deviations quantified by dPCR are lower than those by MPN-PCR. This is because the handling error does not exist in the dPCR measurement. The reaction mixture is automatically distributed and partitioned into a large number of nanolitre-volume reaction chambers in dPCR whereas it is manually diluted and distributed in MPN-PCR.

The detection frequency of dPCR is a little higher than those of real-time PCR and MPN-PCR. This can be expected because amplification efficiency of dPCR is higher. Since the reaction chamber is very small, heat transfer of reaction mixture during PCR cycles would be efficiently completed. In a further study, the detection sensitivity could be thoroughly investigated by applying dPCR to quantification of microorganisms in a larger number of water samples.

The mean values of positive samples determined by real-time PCR are similar to those determined by dPCR and MPN-PCR when the standard DNA was adjusted (validated) by dPCR. However, they varied substantially when the standard was not adjusted as shown in Table 2. This strongly indicates that the standard DNA concentration calculated from the optical density measurement is not accurate. Generally, accurate preparation of standard DNA for real-time PCR is difficult and troublesome. Although the reaction time of dPCR and real-time PCR is almost the same, handling time considerably decreases in dPCR because accurate data can be obtained without the use of standard DNA.

CONCLUSIONS

Concentrations of EAdVs in Japanese river water samples were quantified by dPCR and other current detection techniques. The accuracy and sensitivity of the dPCR were higher than those of current detection techniques. Therefore, the dPCR can be applicable to quantify pathogenic microorganisms in aquatic environments in the cases where accuracy and sensitivity are more important than analytical costs. Accurate analytical data are strongly required when the data are used for regulation. In addition, dPCR measuring may be suitable for quantitative microbial risk assessment because accurate and sensitive data are required to increase the precision of the assessment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by a Health Labour Sciences Research Grant (H25-Kenki-Ippan-007) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. We thank Ms Satowa Yoshiike for helping to use dPCR.

REFERENCES

- Bhat, S., Herrmann, J., Armishaw, P., Corbisier, P. & Emslie, K. R. 2009 Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394** (2), 457–467.
- Dube, S., Qin, J. & Ramakrishnan, R. 2008 Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One* **3**, art. e2876.
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Uberla, K. & Wilhelm, M. 2009 Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research* **43** (10), 2657–2668.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. & Ohgaki, S. 2005 Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (5), 2403–2411.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. & Ohgaki, S. 2007 Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology* **103** (6), 2153–2159.
- Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C. & Furumai, H. 2011 Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (13), 4336–4343.
- Hoshino, T. & Inagaki, F. 2012 Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Systematic and Applied Microbiology* **35** (6), 390–395.
- Japan Meteorological Agency 2014 Previous meteorological data retrieval website. <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php> (in Japanese) (accessed 26 April 2014).
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H. & Ohgaki, S. 2008 One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* **42** (6–7), 1441–1448.
- Kishida, N., Miyata, R., Furuta, A., Izumiyama, S., Tsuneda, S., Sekiguchi, Y., Noda, N. & Akiba, M. 2012a Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR). *Water Research* **46** (1), 187–194.
- Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M. & Akiba, M. 2012b One-year weekly survey of noroviruses and enteric

- adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. *Water Research* **46** (9), 2905–2910.
- Ko, G., Jothikumar, N., Hill, V. R. & Sobsey, M. D. 2005 Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **127** (2), 148–153.
- National Institute of Infectious Diseases 2014 Infectious disease agents surveillance report website. <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html> (in Japanese) (accessed 26 April 2014).
- Rajal, V. B., McSwain, B. S., Thompson, D. E., Leutenegger, C. M., Kildare, B. J. & Wuertz, S. 2007 Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research* **41** (7), 1411–1422.
- Spurgeon, S. L., Jones, R. C. & Ramakrishnan, R. 2008 High throughput gene expression measurement with real-time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One* **3**, art. e1662.
- Wagner, A., Blackstone, N., Cartwright, P., Dick, M., Misof, B., Snow, P., Wagner, G. P., Bartels, J., Murtha, M. & Pendleton, J. 1994 Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Systematic Biology* **43** (2), 250–261.
- Wyn-Jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman, A. M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M. S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szwedzik, R. & Wyer, M. 2011 Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research* **45** (3), 1025–1038.

First received 21 January 2014; accepted in revised form 27 May 2014. Available online 10 June 2014

病原微生物検出情報 月報

Infectious Agents Surveillance Report (IASR)

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>

水道におけるクリプトスポリジウム等検出状況と対応事例：厚労省水道課3, クリプトスポリジウム農場実習感染事例：青森県4, ウシ型クリプトスポリジウム症集団感染事例：北海道5, クリプトスポリジウム症潜伏期間6, ジアルジア集団感染事例：千葉県7, 日本のHAART時代におけるHIV感染合併ジアルジア症・クリプトスポリジウム症8, ジアルジア症と胆嚢炎様症状10, 原虫による水系感染：世界の集団発生事例10, スウェーデンの公共水道で発生した*Cryptosporidium hominis*の大規模集団感染11, 米国で2013年に発生したサイクロスポラ症アウトブレイク12, クリプトスポリジウム・ジアルジア検査法13, 乳児無菌性腸膜炎疑い患者等からのヒトパレコウイルス3型検出：石川県16, 海外帰国患者からのカルバペネム耐性肺炎桿菌・多剤耐性アシネトバクター・VRE同時検出事例16, 2014年予防接種に関する戦略的諮問委員会ミーティング17

Vol.35 No. 8 (No.414)

2014年8月発行

国立感染症研究所
厚生労働省健康局
結核感染症課

事務局 感染研感染症疫学センター
〒162-8640 新宿区戸山1-23-1
Tel 03 (5285) 1111

(禁、無断転載)

本誌に掲載された統計資料は、1)「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づく感染症発生動向調査によって報告された、患者発生および病原体検出に関するデータ、2) 感染症に関する前記以外のデータに由来する。データは次の諸機関の協力により提供された：保健所、地方衛生研究所、厚生労働省食品安全部、検疫所。

<特集> クリプトスポリジウム症およびジアルジア症 2014年7月現在

クリプトスポリジウム症およびジアルジア症は、消化管寄生性原虫感染による疾患で、非血性的水様下痢等の症状を示し、糞便中に排出されるオーストヤシストを経口摂取することで伝播する(糞口感染)。感染症法においては全数把握の5類感染症で、医師には診断後7日以内の届出が義務付けられている(届出基準は<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-04.html>, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-08.html>)。届出には検査診断(従来の鏡検による病原体検出に加え、2011年からは抗原検出あるいは遺伝子検出が追加された)が必要である(本号13ページ)。また、クリプトスポリジウムは特定病原体の四種病原体としての管理を要する。

クリプトスポリジウム症

クリプトスポリジウム症は、孢子虫類に属する*Cryptosporidium*の感染に起因する。人には主に*C. hominis*(従来の*C. parvum* genotype Iあるいはヒト型)が、哺乳類には主に*C. parvum*(従来の*C. parvum* genotype IIあるいはウシ型)が感染するが、稀な*C. meleagridis*(トリ型)が集団感染事例から検出されたこともある(IASR 29: 22-23, 2008)。糞便中に排出されるオースト(直径5μmの球形)(本号14ページ図1)は、塩素等の消毒薬に抵抗性である。水道、水泳プール、噴水

等の水を介した水系集団感染は大規模になりやすく、厚生労働省では「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」(健水発第0330005号, 平成19年3月30日; <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/dl/ks-0330005.pdf>)を定め、水道施設の整備[水のろ過(急速ろ過, 緩速ろ過, 膜ろ過等), 紫外線照射], 原水(河川水など)の検査, 浄水処理の運転管理(ろ過池出口の水の濁度0.1度以下の徹底), 水源対策を講じることとされている(本号3ページ)。水や食品を介した感染経路以外にも、患者や動物との接触感染があり、性感染症, 人獣共通感染症, 日和見感染症としても報告されている。潜伏期間は6日(4~8日)で(本号6ページ), 水様下痢等の症状が10日間程度持続するが、効果的な治療薬はなく、健常者では脱水を防ぐ対症療法が基本である。免疫不全状態では、慢性、難治性、消耗性的下痢を引き起こし、免疫機能を回復させる治療が施されなければ時に致死的となる。日本では1996年の埼玉県越生町の水道水を介した

表1. クリプトスポリジウム症・ジアルジア症報告数, 1999年4月~2014年7月

診断年	クリプトスポリジウム症 報告数	ジアルジア症 報告数
1999(4~12月)	4	42
2000	3	98
2001	11	137
2002	109	113
2003	8	103
2004	92	94
2005	12	86
2006	18	86
2007	6	53
2008	10	73
2009	17	70
2010	16	77
2011	8	65
2012	6	72
2013	19	82
2014(1~7月)	80	37

(感染症発生動向調査: 2014年7月30日現在報告数)

図1. クリプトスポリジウム症患者の性別年齢分布, 2006年1月~2013年12月

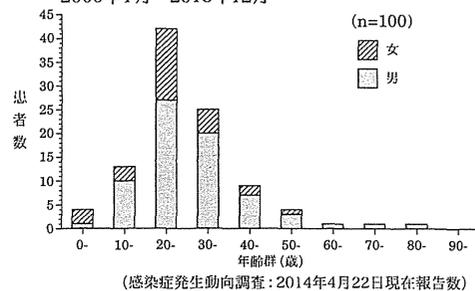
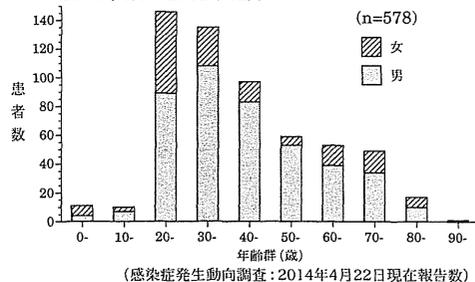


図2. ジアルジア症患者の性別年齢分布, 2006年1月~2013年12月



(特集つづき)

表2. クリプトスポリジウム症感染要因, 2006~2013年

感染経路・要因	報告数 (n=100)
ウシとの接触	32
海外渡航	27
性的接触(すべて男性間)	11
食品	4
その他*	2
不明(うち7例基礎疾患・免疫不全あり)	24

*肥料(有用微生物)の飲用、動物糞便扱い
(感染症発生動向調査: 2014年4月22日現在報告数)

集団感染がもっとも大規模な事例として知られており、地域住民の約7割の8,800人が発症した(IASR 17: 217-218, 1996; 埼玉県衛生部報告書, 平成9年3月)。次いで雑居ビル(汚染された貯水槽)の蛇口水(IASR 15: 248-249, 1994)や水泳プールでの集団感染事例(IASR 26: 167-168, 168-169, 169-170&170-171, 2005), 牧場実習での感染事例(IASR 30: 319-321, 2009)等の報告がある。

感染症発生動向調査: クリプトスポリジウム症の患者届出は, 前回特集(IASR 26: 165-166, 2005)以降, 2006~2013年まで年10例程度であった(前ページ表1)。2014年6月には多数の小学生と同行者が体験学習で集団感染した事例が発生しており, 原因の調査中である。

2006~2013年に診断された患者の感染要因は, ウシとの接触, 海外渡航関連(直近の渡航歴があり, 海外での飲食物摂取が疑われる場合), 男性間性的接触, 食品由来であった(表2)。ウシとの接触では, 学生の農場実習において子ウシとの接触が原因と示唆された事例(本号4ページ), 自然体験学習(本号5ページ)などの集団感染が報告されていた。食品由来事例としては, 2006年にウシの生肉(ユッケあるいは生レバー)に関連の集団感染があった(IASR 28: 88-89, 2007)。

海外感染例の渡航先は, 開発途上国が主であった。その中には, ジアルジアや赤痢アメーバなど他の病原体との重複感染も報告されていた(IASR 28: 298-299, 2007)。男性間の性的接触例では, HIVとの重複感染も報告されていた(本号8ページ)。2006~2013年に診断されたクリプトスポリジウム症患者は20代に多く, 男性が多かった(前ページ図1)。

国内では2006年以降, 大規模な水系集団感染はなかった。しかし海外では, 飲料水, プール, 噴水等による水系集団感染が2004~2010年の間に120件が報告され(本号10ページ), 特に2010年には欧州で最大規模の水系集団感染が報告されている(本号11ページ)。

ジアルジア症

ジアルジア症は, 鞭毛虫類に属する消化管寄生性原虫 *Giardia* の感染による。ヒトに感染する *G. lamblia* (あるいは *G. duodenalis*, *G. intestinalis*, 別名ランブル鞭毛虫) は, 8つの遺伝子型(Assemblage A~H)に分類され, ヒトからはA, Bが検出される。ジアルジアのシスト(短径5~8×長径8~12 μ mのラグビー

表3. ジアルジア症感染要因, 2006~2013年

感染経路・要因	報告数 (n=578)
海外渡航*	250
性的接触*	71
(うち男性間性的接触)	42)
下水や糞便等への曝露	6
集団感染(ビルの貯水槽)	4
不明	251

*要因の重複4例を含む
(感染症発生動向調査: 2014年4月22日現在報告数)

ボール型) (本号15ページ図2) は, 塩素消毒に抵抗性があるが, クリプトスポリジウムに比べて弱く, サイズが大きいことからろ過等で除去されやすく, ジアルジア対策としてクリプトスポリジウム対策が有効である(前述の対策指針参照)。治療にはメトロニダゾール(公知申請により2012年からジアルジア症への健康保険適用がなされた)が使われる。

感染症発生動向調査: ジアルジア症の届出は, 2006~2013年の間に578例あった(前ページ表1)。2010年には近年の本邦で初めてジアルジアによる集団感染が報告された(本号7ページ)。感染要因は, 海外渡航関連, 性的接触, 下水や糞便等への曝露であった(表3)。海外感染例の渡航先は, 開発途上国が主であった。性的接触は, 男性間が多かった(71例のうち42例)。ジアルジア症の届出は, クリプトスポリジウム症と同様に20代に多く, 男性が多かった(前ページ図2)。他の病原体との重複感染は26例(578例中の4.5%)報告されており, 赤痢アメーバ, クリプトスポリジウム, チフス菌, パラチフス菌, 赤痢菌などであった。HIVとの重複感染も報告されていた(本号8ページ)。ジアルジア症が疑われる場合, 他の病原体との重複感染を疑って検査することが重要と考えられた。

症状の多くは下痢であるが, 腹部不快感などのみで下痢, 軟便, 粘液便等の症状の報告のなかった例が98例(578例中の17%), 無症状が13例(578例中の2.2%)あり, 無症状病原体保有者(シストキャリア)の存在が指摘される。感染症法におけるジアルジア症の届出基準には無症状病原体保有者は含まれていないが, 感染源としての注意が必要である。精査目的と思われる内視鏡検査が行われていた63例(578例中の11%)において, 十二指腸液, 胆汁, 膵液等からのジアルジア検出が報告されていた。胆嚢炎様症状を呈する患者において, ジアルジアが稀に検出されることに注意を要すると考えられた(本号10ページ)。

クリプトスポリジウム, ジアルジア等の原虫類による感染症は, 世界的には多くの患者が発生している。消化管寄生性原虫には, 他にサイクロスポラ(本号12ページおよび15ページ図3), イソスポラ, 赤痢アメーバ等もあり, 水源や動物などの感染源対策, 手洗い, 加熱などの感染予防対策はクリプトスポリジウム, ジアルジア対策と共通である。原因不明の下痢症に対しては, クリプトスポリジウム症やジアルジア症も鑑別診断に挙げての, 糞便の検査が重要である。

＜特集関連情報＞

水道におけるクリプトスポリジウム等検出状況と対応の事例（給水停止等の対応を行ったもの）

2014(平成26)年2月末現在
厚生労働省健康局水道課

年度	件数	都道府県	種別	浄水処理	長期的対応	備考
1996(平成8)	1	埼玉県	上水道	急速ろ過処理	膜ろ過施設設置	浄水からクリプトスポリジウムを検出 住民14,000人のうち8,800人が感染
1997(平成9)	2	鳥取県	簡易水道	塩素処理のみ	上水道事業に併合	原水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
		兵庫県	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
1998(平成10)	2	福井県	簡易水道	急速ろ過処理	浄水処理管理強化	原水及び浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
		兵庫県	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
1999(平成11)	1	山形県	上水道	塩素処理のみ	広域用水供給事業から受水	原水からクリプトスポリジウム及びジアルジアを検出 感染症患者なし
2000(平成12)	3	青森県	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
		沖縄県	小規模水道	簡易ろ過及び塩素処理	上水道事業に併合	浄水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
		岩手県	簡易水道	塩素処理のみ	水源変更、急速ろ過施設設置	浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2001(平成13)	5	愛媛県	上水道	塩素処理のみ	当該水源は使用中止	浄水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
		岩手県	簡易水道	緩速ろ過処理	浄水処理管理強化	原水及び浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
		兵庫県	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
		鹿児島県	上水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置予定	原水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
		愛媛県	上水道	急速ろ過、活性炭処理	ろ材入替、浄水処理管理強化を予定	浄水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
2002(平成14)	1	山形県	簡易水道	塩素処理のみ	応急対策として膜処理装置設置、長期的には上水道事業と統合予定	原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2003(平成15)	2	大分県	上水道	塩素処理のみ	当該水源は使用中止	原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
		山形県	小規模水道	塩素処理のみ	応急対策として膜ろ過施設設置、長期的には水源変更	浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2004(平成16)	1	兵庫県	上水道	急速ろ過処理	安全確認迄の間飲用制限、浄水処理管理強化を実施	原水及び浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2005(平成17)	0	該当なし				
2006(平成18)	1	大阪府	簡易水道	急速ろ過	濁度計を設置し常時濁度管理を徹底	原水及び浄水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
2007(平成19)	2	富山県	簡易水道	塩素処理のみ	上水道事業に併合	原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
		富山県	簡易水道	急速ろ過(濁度管理不可)	紫外線処理施設設置予定	原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2008(平成20)	1	山形県	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2009(平成21)	0	該当なし				
2010(平成22)	2	富山県	専用水道	塩素処理のみ	紫外線処理施設の設置あるいは隣接簡易水道への切り替え	原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
		千葉県	小規模貯水槽水道	—	貯水槽を更新	給水栓水からクリプトスポリジウム及びジアルジアを検出。小規模貯水槽水道の利用者43人のうち28人が体調不良。4人がジアルジアに感染
2011(平成23)	1	長野県	簡易水道	急速ろ過		原水及び浄水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
2012(平成24)	1	群馬県	用水供給	急速ろ過		浄水からジアルジアを検出 感染症患者なし
2013(平成25)	2	北海道	飲料水供給施設	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水及び浄水からクリプトスポリジウムを検出 感染症患者なし
		東京都	専用水道	除鉄・除マンガン処理		原水からジアルジアを検出 感染症患者なし
計	28					

※ 原水からクリプトスポリジウム等が検出された場合で「対策指針」に基づく対策が講じられていない施設の事例を含む。

<特集関連情報>

クリプトスポリジウム農場実習感染事例, 2010年
— 青森県

2010年9月6日, 青森県上北地域県民局地域健康福祉部保健総室(上十三保健所)にA大学学校医から, 「A大学の学生4人に下痢症状があり受診している。昨年のクリプトスポリジウム症患者と症状が似ている」との電話連絡があった。同大学では2009年にも子ウシとの接触が原因とされる発症者13名の感染症事例があった(IASR 30: 319-321, 2009)。調査および原因究明の結果, 学生の実習における子ウシとの接触が原因と推定される感染症事例であったため, その概要について報告する。

発生概要

A大学B研究室の初発患者学生は, 8月23~27日まで診療実習のため数日間, 下痢症状のあるウシと接触していた。また, C研究室の3名の学生は8月27日~9月5日に下痢を呈していた子ウシの世話などを行っていた。B研究室の初発患者は, C研究室の学生が世話を

していた子ウシやC研究室の発症者3名との接触はなかった。8月29日の初発患者の後, 9月3日, 9月4日, 9月5日とC研究室の3名が下痢, 腹痛を訴えたため, 9月6日A大学学校医からの連絡となった(表1, 2)。

原因究明

同年9月7日, 環境保健センターに発症者4名の便が搬入された。クリプトスポリジウムオーシストの検出は国立感染症研究所の「病原体検査マニュアル」に従い, 直接蛍光抗体法によって顕微鏡下にオーシストの陽性を確認した。次に便からDNAを抽出し, CRY-44, CRY-373のプライマーを用いたクリプトスポリジウムポリスレオニン遺伝子を標的としたPCR法により検出を行った後, 制限酵素Rsa Iを用いたRFLP法(restriction fragment length polymorphism)を行っ

表2. 発生概要

室名	在籍数	発症者計
B研究室	17	1
C研究室	24	3
合計	41	4

表1. 患者発生状況

	研究室	B研究室学生 男(23歳)	C研究室学生 男(24歳)	C研究室学生 女(22歳)	C研究室学生 男(24歳)	
8月23日						
8月24日	子ウシ搬入					
8月25日		診療サービス 巡回診療実習				
8月26日						
8月27日				子ウシ世話		
8月28日				子ウシ世話		
8月29日			頭痛・腹痛・倦怠感	子ウシ世話	子ウシ世話	
8月30日		頭痛・腹痛・倦怠感・ 下痢			子ウシ世話	
8月31日		〇〇病院受診点滴	子ウシ世話	下痢, 嘔吐		
9月1日				子ウシ世話		
9月2日		〇〇病院入院				
9月3日	学 会			夜から下痢・腹痛	子ウシ世話	
9月4日				受診	下痢・腹痛	子ウシ世話
9月5日			下痢・腹痛	下痢	受診 子ウシ世話	子ウシ世話, 夜から 腹痛・水の様な便
9月6日			学校医である病院受診			
9月7日		下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛	下痢・腹痛	
9月8日	患者便のクリプト陽性を確認	軟便2回, 腹痛なし	下痢15回・腹痛	下痢10回・腹痛	下痢1回・腹痛軽度	
9月9日	(ウン便のクリプト顕微鏡法陰性を確認)	普通便1回, 腹痛なし	下痢15回, 腹痛なし	下痢5回・食後腹痛	下痢7回・腹痛・37.6℃	
9月10日		普通便 登校	下痢10回, 腹痛なし	下痢3回, 腹痛なし	下痢15回・吐き気・嘔吐・38.6℃ 夜間39℃まで上昇	
9月11日		症状なし	下痢5回, 腹痛なし	下痢5回, 腹痛なし	病院受診, 腹痛, 点滴・内服, 下痢30回・38.0℃	
9月12日		症状なし	普通便	下痢1回・軟便1回	下痢5回, 熱上昇なし	
9月13日	患者便, ウシ便のPCR法陽性, RFLP法一致を確認 保健所が動物由来感染症対策の改善指導	症状なし	普通便 登校	普通便 登校	下痢1回	
9月14日		症状なし	症状なし	症状なし	軟便1回	
9月15日		症状なし	症状なし	症状なし	普通便 登校	
~10月29日	症状消失 2週間後	症状なし	症状なし	症状なし	症状なし	

＜特集関連情報＞

北海道帯広市におけるウシ型のクリプトスポリジウム症集団感染事例

2013年7月、北海道帯広市の中学校において、同市内の牧場で実施された自然体験学習に参加した生徒を中心に、消化器症状を伴う不調を訴えて集団欠席するという事例が発生した。全体に軽症であったものの、欠席者の中には下痢を呈する者も多くいた。有症者の便を検査した結果、ウシ型のクリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum* のオーシストが検出されたことから、自然体験学習の実施施設における動物由来のクリプトスポリジウム症集団感染が示唆された。

2013年7月10日、「7月1日に帯広市内の牧場で実施された自然体験学習に参加した生徒（2年生）に消化器症状を呈する多数の欠席者が出ている」との情報がもたらされ、教育委員会と保健所が合同で聞き取り調査を実施した。その結果を踏まえて翌11日に有症者76名を分析したところ、主症状として明らかな下痢を呈していた者が31名（40.8%）いた。その他の症状として、吐き気・嘔吐36名（47.4%）、腹痛48名（63.2%）、発熱29名（38.2%）、頭痛49名（64.5%）などが認められた。なお、1年生と3年生にも有症者が見受けられたが、少数、散発的で、重大な感染拡大には至っていない模様であった。念のため、校舎内洗面施設等の消毒と手洗いの徹底を指示するとともに、2年生を中心に採便してウイルスおよび細菌学的検査に加えクリプトスポリジウム検査の実施を決定した。一方、当該牧場では自然体験学習実施日以前の6月下旬に、飼育されている子ウシのクリプトスポリジウムおよびロタウイルスの陽性を確認していたとの情報を得たため、改めて保健所が子ウシ1頭の便を採取した。7月12日、有症者76名のうち12名の便を採取し、検査を開始した。

保健所で実施したウイルスおよび細菌学的検査各5名分の結果から、ノロウイルスおよびロタウイルスによる感染性胃腸炎、病原性大腸菌など15種による細菌性食中毒が否定された。一方、北海道立衛生研究所では、ホルマリンおよび酢酸エチルで処理した後にショ糖遠心浮遊法によって、有症者12名中8名および子ウシ1頭の便から特徴的な淡紅色を示す直径約5ミクロンのクリプトスポリジウムオーシストを検出した。また、型を特定するために、Polythreonine 遺伝子 (poly-T) と *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) 遺伝子についてPCR-RFLPを行い、増幅および制限酵素 *Rsa* I による切断パターンからウシ型のクリプトスポリジウム *C. parvum* と確定した。なお、オーシスト陽性の生徒と子ウシ由来の遺伝子すべてにおいて同様の結果を得た。さらに、PCR産物についてダイレクトシーケンスによる塩基配列の比較を試みたところ、生徒と子ウシの poly-T および COWP 領域は完全

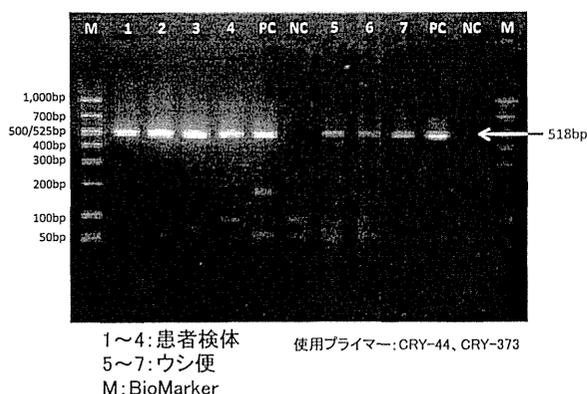


図1. CRY-44、CRY-373によるPCR産物の電気泳動像

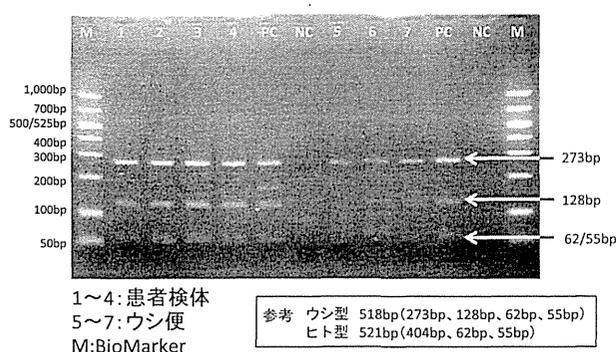


図2. 制限酵素 (*Rsa* I) による切断RFLP電気泳動パターン

た。患者便4検体はいずれも、PCRが陽性、PCR産物のRFLPパターンはウシ型であった。同日、環境保健センターは、子ウシと患者便について遺伝子学的比較を行うため、子ウシ便の提供を依頼した。PCR法および *Rsa* I を用いたRFLP法では、患者便4検体、子ウシ便3検体すべて同じ結果が得られた（図1、2）。

対応

前年の保健所による指導（手洗い場等の環境整備、タオル等の共用はせずペーパータオル等に変更、作業着等の洗濯は熱湯消毒後行うこと）が徹底されていなかったため、保健所は大学側に対し、書面および口頭で改善指導を行うとともに、症状消失後2週間の健康観察を依頼した。C研究室では、学生24人が子ウシの世話をしていたが、発症者が4名と、前年より少なかったことは、昨年の事例経験から受診した学校医が本感染症を早期に疑ったこと、保健所が発症者4名に対し、結果が判明するまで自宅待機を勧めるなど、迅速かつ適切な対応を行ったことが要因と考えられる。しかし、感染症の専門知識を有しても感染が防ぎきれないことがあるため、感染力の強い病原体には細心の注意を払うことが重要と考えられた。

青森県環境保健センター微生物部

武沼浩子 福田 理 大野譲治 工藤真哉
上北地域県民局地域健康福祉部保健総室
(上十三保健所)

姥名勇登 瀬川香代子 宮川隆美

表. 北海道で発生したクリプトスポリジウム症の報告数 (1999~2013年)

年	全国 総数 ^{*1)}	北海道における発生数		
		合計	事例 No.	内 訳 (発生数)
1999	4	1	1	(1) 詳細不明
2000	3	0		
2001	11	0		
2002	109	104	2	(61) ヒト型の集団発生 ^{*2)}
			3	(34) ヒト型の集団発生
			4	(1) 詳細不明
			5	(8) ウシ型の集団発生 ^{*3)}
2003	8	0		
2004	92	2	6	(1) 詳細不明
			7	(1) 詳細不明
2005	12	7	8	(1) 詳細不明
			9	(1) 詳細不明
			10	(1) 詳細不明
			11	(1) 詳細不明
			12	(3) ウシ型の集団発生
2006	18	3	13	(1) 詳細不明
			14	(1) ウシとの接触を確認
			15	(1) 詳細不明
2007	6	0		
2008	10	0		
2009	17	2	16	(1) 酪農従事者
			17	(1) ウシとの接触を確認
2010	16	3	18	(1) ウシとの接触を確認
			19	(1) ウシとの接触を確認
			20	(1) 酪農従事者
2011	8	1	21	(1) 酪農従事者
2012	6	0		
2013	19	10	22	(1) 酪農系大学生
			23	(8) ウシ型の集団発生(本事例)
			24	(1) ウシとの接触を確認
Total	339	133		
		39.2 %		

*1) 国立感染症研究所 感染症発生動向調査参照
 *2) この事例は兵庫県からの報告
 *3) この事例は千葉県からの報告

に一致した。以上の結果より、生徒と子ウシが感染したクリプトスポリジウムは同じ株と推定された。当該牧場で実施された自然体験学習の際に、ウシ型のクリプトスポリジウムによる集団感染が発生したと結論づけられた。

表に示すように、北海道におけるクリプトスポリジウム症は、1999~2013年の期間中、24事例133名の報告がなされている(2事例は修学旅行生が北海道で感染したもので、兵庫県と千葉県からの報告である)。この期間における全国の報告総数339名に対して39.2%を占めている。2002年のMorgan-Ryanらの報告以降、通常、ヒトがクリプトスポリジウム症を発症する場合、その病原体はヒト型の *C. hominis* が最も多く、次にウシ型の *C. parvum*、そして稀にトリに由来する *C. meleagridis* の順であるとされている^{1,2)}。しかし、北海道の場合、1999年以降にヒト型と確認された事例は2002年の2事例のみで、その他はウシ型が3事例(2002, 2005, 2013年)、型の特定はされていないがウシとの接触が確認されている事例が9事例、詳細不明

が10事例となっており、ウシ由来の感染と考えられる割合が多く、全体の半数を占めている。

北海道は酪農王国であり、業務として酪農に携わる人が多いだけでなく、学生の酪農実習、一般住民を対象とする観光・体験プログラムも多い。このように環境的にウシと触れ合う機会が多いにもかかわらず、“ウシのクリプトスポリジウム”については、感染症法や家畜伝染病予防法による届出・監視の対象ではなく、動物愛護管理法においても畜産農家は登録の対象外であるため規制の及ばない状況にある。従って、ウシを飼育する施設においてはウシ型のクリプトスポリジウムの感染の危険性が存在することを認識する必要がある。5類感染症として規定されている本症を予防するため、住民意識の向上とともにウシを飼育する施設側の対策を充実させることが重要と考えられる。

参考文献

- 1) Morgan-Ryan, *et al.*, J Eukaryot Microbiol 49: 433-440, 2002
- 2) 所 正治, 井関基弘, 治療 86: 2704-2708, 2004
 北海道立衛生研究所
 山野公明 入江隆夫 孝口裕一 伊東拓也
 浦口宏二 八木欣平 岡野素彦
 北海道保健福祉部健康安全局地域保健課
 井上有美 澤田康文(現北海道栗山町役場)
 北海道帯広保健所
 児玉晋治(現北海道早来食肉衛生検査所)
 狩野利夫(現函館新都市病院)
 相田一郎(現北海道岩見沢保健所兼北海道滝川保健所)

<特集関連情報>

クリプトスポリジウム症の潜伏期間

クリプトスポリジウム症の潜伏期間は、国内の集団感染事例(1994年神奈川県平塚市と1996年埼玉県越生町, 2002年北海道は推定曝露日を0とした)からの計算で、6日(4~8日)と計算される(図)。つまり、原

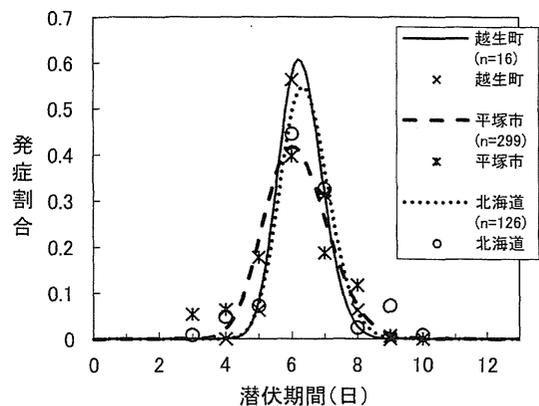


図. 国内クリプトスポリジウム集団感染の潜伏期間

因となった飲食物を摂取した日を0日として、6日後に発症した。流行曲線の作成は、曝露日の推定に有用である。潜伏期間が長いことから、原因となった飲食物が残らず、残っていても食品からの検出は容易ではなく、人の記憶も残りにくく、原因究明は困難となることが多い。喫食調査等の地道な疫学調査が重要である。

参考文献

泉山信司, 遠藤卓郎, Clinical Parasitology 16 (1): 58-60, 2005

国立感染症研究所寄生動物部 泉山信司

<特集関連情報>

ジアルジアによる集団感染事例について

ジアルジア症は、消化管寄生虫の一種であるジアルジア (*Giardia lamblia*; 別名ランブル鞭毛虫) による原虫感染症である。糞便中に排出された原虫嚢子により食物や水が汚染されることによって経口感染を起こす。その潜伏期間は、3~25日とされ、水様性下痢や腹痛を主症状とするが、健康な者の場合は無症状のことも多い。また、感染症法上の5類感染症に分類され、医師の診断後7日以内の届出が必要な、全数把握疾患である。千葉県での発生状況は、2007年2例、2008年3例、2009年1例、2010年6例(本事例の4例を含む)、2011年1例、2012年1例、2013年4例であった。わが国ではこれまで集団感染事例は報告されていないが、千葉県で飲料水が原因と考えられるジアルジアの集団感染事例を経験したので報告する。

経過

2010(平成22)年11月8日、千葉県内の事業所より、管轄する保健所に「原因不明の下痢症状を訴える職員が、11月に入り増えている」という連絡があった。保健所が調査した結果、職員および給食従事者43名のうち39名の体調不良者を確認した。保健所の検査で、11月10日に厨房蛇口より採水した飲料水から残留塩素は

表1. 職種別発症状況

人数	症状	
	有	無
職員	37	3
給食従事者	2	1

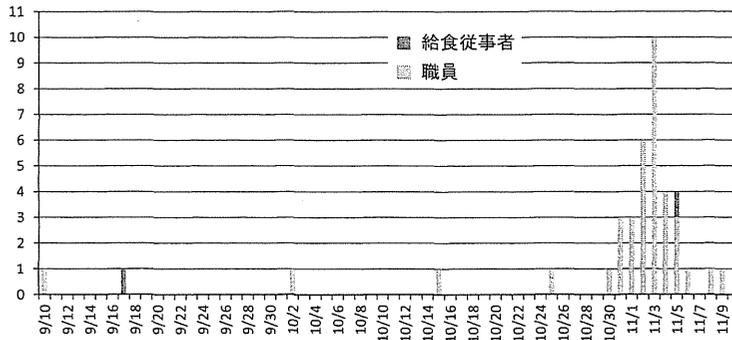


図1. 職種別発症日

表2. 症状

症状	合計	発症者		発症率 (%)
		男	女	
下痢	38	9	29	97.4
腹痛	23	3	20	59.0
発熱	19	2	17	48.7
吐気	9	0	9	23.1
頭痛	7	0	7	17.9
嘔吐	5	0	5	12.8
胃痛	4	0	4	10.3
倦怠感	3	0	3	7.7
悪寒	3	0	3	7.7
脱力感	2	1	1	5.1

表3. 職種別検便検査結果

	原虫		細菌	ウイルス
	ジアルジア	クリプトスポリジウム		
職員発症者	検体数 6	6	16	2
	陽性者数 3	0	0	0
給食従事者	検体数 3	3	3	3
	陽性者数 1	0	0	0

検出されず、大腸菌が検出された。衛生研究所で患者等9名の検便検査の結果、4名からジアルジアが検出され、11月15日に施設の厨房蛇口の飲料水からもジアルジア、クリプトスポリジウムが検出されたことから、飲料水を原因としたものと推定された。

1. 調査・検査対象および検査方法

1) 聞き取り調査および検便検査: 事業所職員40名および給食従事者3名のすべてについて聞き取り調査を実施した。職員の有症状者16名と給食従事者3名について食中毒菌検査を、職員の有症状者2名と給食従事者3名についてノロウイルス検査を実施した。さらに9名について、原虫(クリプトスポリジウムおよびジアルジア)検査を実施した。

2) 施設状況調査および水質検査: 施設の状況および管理状況について聞き取り調査をするとともに、公営上水道を水源とする地下式受水槽入口、高架水槽ドレン、厨房蛇口から採水を行い、水質検査(11項目試験)および原虫の検査(メンブレンフィルター加圧ろ過-アセトン溶解法、免疫磁性体粒子法および蛍光抗体染色-顕微鏡検査法)を実施した。

2. 調査・検査結果

1) 聞き取り調査および検便検査結果: 有症状者は43名中39名(90.7%)で、職種別では、事業所職員40名中37名、給食従事者3名中2名であった(表1)。

有症状者数は、11月1日頃から急激に増加しており、10月31日～11月7日までの間では、一峰性を示すように見えるが、発症時期は9月10日～11月9日とばらついていた(前ページ図1)。

主な症状は、下痢38名(97.4%)、腹痛23名(59.0%)、発熱19名(48.7%)、吐気9名(23.1%)であった(前ページ表2)。また、医療機関を受診し抗菌薬の投薬を受けた後も症状が回復しない者が多数存在した。

なお、ペットの飼育状況、海外渡航歴等について確認したが、いずれも感染源となるものは見出せなかった。

事業所職員の有症状者16名と給食従事者3名の検便検査では、食中毒菌およびノロウイルスはいずれも陰性であった。さらに検体残余のあった9名について原虫検査を実施し、職員の有症状者6名中3名、給食従事者3名中1名からジアルジアの栄養体およびシストが確認された(前ページ表3)。

2) 施設状況調査および水質検査結果: 事業所が入居するビルは、水道法等の適用外施設であった。保健所探知後、11月10日の施設調査時に厨房蛇口からの採水では、残留塩素は検出されず、大腸菌が検出された。また、使用を中止し、清掃を実施するために受水槽等の水を落とした11月15日に、地下受水槽入口、高架水槽ドレン、厨房蛇口から採水を行ったところ、厨房蛇口から、ジアルジア(18個/20l)、クリプトスポリジウム(149個/20l)が、高架水槽ドレンからは、クリプトスポリジウム(234個/20l)が検出された。地下受水槽入口から採水した上水からは、ジアルジア、クリプトスポリジウムは不検出であった。なお、厨房蛇口から大腸菌群、大腸菌が、高架水槽ドレンから大腸菌群が検出されたが、地下受水槽入口からはいずれも検出されなかった。残留塩素は、地下受水槽入口では検出されていたが、施設内の厨房蛇口では検出されなかった。

事業者は改善策として、地下受水槽の給水を停止し、新しい給水施設(受水槽、水道管)を設置した。その後、地下受水槽への給水を停止したにもかかわらず、3～6月の3カ月強で地下受水槽内の水位の上昇と汚濁が確認され、地下受水槽の内部には、接続先を確認できない複数の配管と、過去に使用していた配管周りのコンクリートに腐食が認められた。

考察・まとめ

1) 本事例は、有症状職員6名中3名、給食従事者3名中1名からジアルジアが確認され、施設の厨房蛇口の飲料水からもジアルジアが検出されたことから、飲料水を原因としたジアルジアによる集団発生と推定された。

2) 便からの検出はジアルジアのみであるが、水質検査からクリプトスポリジウムが検出されたことや、ジアルジアにはあまりみられない発熱が有症状者の半

数近くにみられたことから、他の病原体の関与も否定できなかった。

3) 飲料水汚染の原因について究明には至っていないが、古い地下式受水槽が汚染された可能性が高いと考えられた。水道法や本県のように独自に条例を制定していても、保健所等の立入調査を受けない施設は多数存在する。本事例のような発生を防止するために、千葉県では水道事業者あてに、水道施設の適正な維持管理の徹底について指導する通知文を発出した。このことは原虫による水系感染症の感染防止対策における注意喚起の契機として重要と思われた。

千葉県衛生研究所

篠崎邦子 岸田一則 富田隆弘¹⁾ 遠藤幸男²⁾
小林八重子 石井俊靖

¹⁾現健康福祉部疾病対策課

²⁾現健康福祉部健康福祉政策課

<特集関連情報>

日本のHAART時代におけるHIV感染合併ジアルジア症・クリプトスポリジウム症

HIV感染者における腸管寄生性原虫症の位置づけ
ジアルジア症とクリプトスポリジウム症は、糞口感染により伝播する腸管寄生性原虫症(以下原虫症と略)であり、赤痢アメーバ症と並んで国内での診断頻度の高い原虫症である。水や食べ物が糞便により汚染されている発展途上国では、季節を問わず流行がみられる。また、クリプトスポリジウム症に関していえば、日本でも、飲料水やプール水からのアウトブレイクがたびたび報告されている^{1,2)}。これらの感染様式は、地域は違えど、シスト・オーシストに汚染された環境を介して感染が伝播する点で類似している。一方、近年HIV感染者などで問題となっているのが、性感染症としての流行である。原虫症の代表である赤痢アメーバの報告では、男性同性愛者(men who have sex with men; MSMと略)や性風俗で勤務する人々(commercial sex worker; CSWと略)に症例が急増していることが報告されている³⁾。上記原虫症の流行は、環境を介さず、ヒト-ヒトで感染が成立する特徴があり、肛門と口唇が直接接触するような性行為(oral-anal sexual contact)がリスクとされている⁴⁾。性感染としてHIV感染者が増加する日本では、HIV感染者が原虫症に罹患するリスクが高く、HIV診療を行う上で原虫症は重要な下痢の原因疾患である。これらの感染症を疑う際に重要な問診は、oral-anal sexual contactがなかったかを聞くことである。また、クリプトスポリジウム下痢症はHIV感染者で重症化することからAIDS指標疾患の1つであり、1996年以前の強力な抗HIV療法(highly active anti-retroviral therapy; HAARTと略)が導入される前はHIV感染者の主要な死因の1

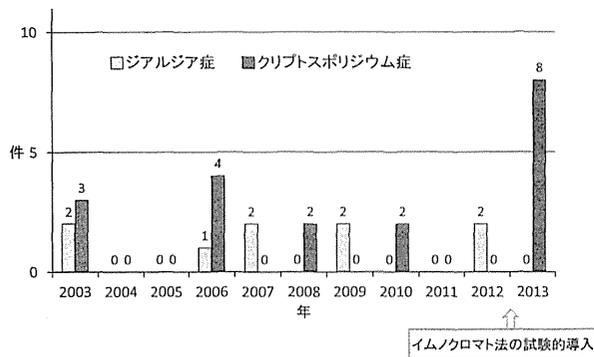


図. 年別HIV感染合併ジアルジア症、クリプトスポリジウム症年別発症件数 (国立国際医療研究センター病院エイズ治療研究開発センター単施設データ)

つとなっていた⁵⁾。HAART導入後は、HIV感染者におけるクリプトスポリジウム症の予後は劇的に改善していることが知られているが、日本におけるHAART時代のジアルジア症とクリプトスポリジウム症の実態は明らかになっていない。

HAART時代のジアルジア症、クリプトスポリジウム症

当院での経験と診断上の問題点：図に、過去10年間の当科(エイズ治療研究開発センター)におけるジアルジア症、クリプトスポリジウム症確定診断症例数を載せた。日本人HIV感染者かつ国内での感染が疑われた症例だけを提示している。全例が同性間性的接触のある男性であった。当施設では、同じ原虫感染症である赤痢アメーバ症は年間10例以上(多い年では年間25例)経験しているのと比較すると、どちらの原虫も診断数は非常に少ない。2012年以前は、いずれの原虫症も年間5例以下であり、診断された季節もバラバラで、性感染症による感染でのアウトブレイクは今までに経験していない。当院では、試験的に2013年から、イムノクロマト法(IC法と略)による検査を検鏡検査と平行して行ってみたところ、ジアルジア症の診断件数の増加はなかったが、クリプトスポリジウム症は年間8件と急増していた。短期間(月単位)に症例数が集積するようなアウトブレイクを経験した訳ではなかったことから、IC法導入により診断感度が高まったことが診断件数増加を引き起こしたと考えているが、今後3年程度IC法を継続して症例数の推移を見ていく予定である。また、IC法導入前にクリプトスポリジウム症と診断された症例を解析してみたところ、11件のうち約半数の5件は、(原虫検査には不向きな)明視野光学顕微鏡による検鏡検査で原虫が同定されず、それでも臨床的にクリプトスポリジウム症が強く疑われたために、国立感染症研究所寄生動物部においてIC法や蛍光抗体を用いた高感度な特殊顕微鏡検査を実施した結果、クリプトスポリジウムが同定された症例であった。つまり、多くの症例が明視野光学顕微鏡検査では偽陰性であったことが判明した。HIV感染者に限った話ではないが、明視野検鏡の診断感度が十分でないことが、

クリプトスポリジウム症の頻度を過小評価させる要因となっており、臨床現場での診療をも非常に困難にしている。

臨床像：ジアルジア症は、10年間で9症例を経験しているが、7症例は診断時にHAART未導入の症例であり、HAART中にジアルジア症と診断された症例は2例のみであった。また、HAART未導入の症例の中には1日に10回を超える比較的ひどい下痢をきたす症例が散見されるものの、クリプトスポリジウム症と比して軽症例が多く、数カ月に及ぶ慢性下痢症の経過をたどる症例が多い。特にHAART中にジアルジア症と診断された2症例は、いずれも下痢というよりは腹部不快感に対して便検査が行われていた。当院での経験からは、HAART時代のジアルジア症は、抗HIV薬の副作用による下痢と類似した臨床像を呈し、少なくとも临床上大きな問題となるようなケースは稀であることが推察される。また、HAARTの有無にかかわらず、全例でメトロニダゾールが著効しており、臨床的にメトロニダゾール耐性が疑われる症例はなかった。

一方で、クリプトスポリジウム症は、激しい水様下痢をきたす。診断症例のうち、HAART中の症例が6割を占め、免疫状態が比較的安定している症例であっても3分の2の症例が1日20回以上または1時間に1回以上の激しい下痢を認めている。便失禁をしてしまう例もあり、脱水で入院加療を要する症例も散見される。クリプトスポリジウム症に伴う激しい下痢症は、全例が外来で治療されているジアルジア症とは対照的であった。クリプトスポリジウム症に対する確立された抗原虫薬はない。当院での経験でも、抗HIV療法を継続または導入し対症療法を行うことで、ほぼ全例が2週間以内に症状の改善を得ることができ、死亡症例は経験していない。3例に熱帯病治療薬研究班⁶⁾から取り寄せたNitazoxanideが投与されているが、投与開始前に症状は軽快傾向であった。

結語

HAART時代において、ジアルジア症は慢性下痢症・腹部不快感の鑑別となる一方で、クリプトスポリジウム症は激しい水様下痢を起こしうる点で注意すべき疾患となる。また、原虫類のシスト・オーシストはアルコールや塩素消毒に耐性であることから、感染管理を考える上で診断意義の極めて高い疾患である。HIV感染者で、「便失禁するほどの下痢症」を診たときには、クリプトスポリジウム症は絶対に鑑別しなければならず、繰り返し検査を行っても診断が付かない場合には、専門機関への問い合わせを行うべきと考える。

参考文献

- 1) 山本徳栄, 他, 感染症学雑誌 74: 518-526, 2000
- 2) 高木正明, 他, 感染症学雑誌 82: 14-19, 2008
- 3) IASR 28: 103-104, 2007
- 4) Hung CC, et al., Am J Trop Med Hyg 84: 65-69,