

Prasad et al., 1994), the molecular weight of an rNV-VLP is calculated to be approximately 10,000 kDa. The molecular weight of each rNV-VLP was therefore 1000–10,000 times the MWCOs of these two UF membranes. Accordingly, we expected high retention on these UF membranes. However, in terms of their pore geometry, UF membranes generally consist of an interconnected three-dimensional network of channels of non-uniform size and shape (Jeon et al., 2008). Thus, each UF membrane is characterized by a pore size distribution, and the nominal MWCO guarantees only a 90% rejection rate (i.e., a 1-log reduction) of compounds with that molecular weight. The UF membranes with MWCOs of 10 and 100 kDa probably had a wide pore-size distribution range over their MWCOs, with the result that a reduction of only 1.5 log was observed for the rNV-VLPs. In contrast, the rNV-VLPs were effectively removed (4-log removal) by the UF membrane with a MWCO of 1 kDa. The pore size distribution of this UF membrane likely included a region of smaller pore sizes than the distributions of the UF membranes with MWCOs of 10 and 100 kDa. As a result, the 1 kDa UF membrane could effectively retain the rNV-VLP particles.

The removal ratios of the bacteriophages by the UF membranes tended to be similar to those of the rNV-VLPs: the removal ratios by UF membranes with MWCOs of 10 and 100 kDa were almost the same (1.8–2.7 log), and those by the UF membrane with a MWCO of 1 kDa were much larger (5.5–6.2 log) than those by the UF membranes with MWCOs of 10 and 100 kDa. The removal ratios of the bacteriophages were always greater than those of the rNV-VLPs, even though the bacteriophage diameters were smaller than the rNV-VLP diameter. Important factors affecting rejection of viruses by membranes include electrostatic and hydrophobic interactions in addition to the ratio of the membrane pore diameter to the virus diameter (Madaeni et al., 1995; Langlet et al., 2009). Virus particles electrostatically adsorb to filter media when the filter media and the virus particles have unlike charges. When they have like charges, the virus particles are repulsed by the filter media, and then they are able to pass through the media (Dowd et al., 1998). The UF membranes used in the present study were negatively charged (Kwon et al., 2008), and both the rNV-VLPs and the bacteriophages were also negatively charged at pH 6.8 (Shirasaki et al., 2010). Thus, it is unlikely that electrostatic adsorption caused retention of the virus particles. Instead, hydrophobic interaction may have contributed to the virus retention; hydrophobic viruses tend to be more difficult for hydrophilic membranes to remove than hydrophilic viruses (Langlet et al., 2009). Q β is more hydrophobic than MS2 (Langlet et al., 2008; Matsushita et al., 2013), and the UF membranes used in the present study were hydrophilic. Accordingly, Q β was most likely removed by the UF membranes to a lesser extent than MS2 because of its greater hydrophobicity. The rNV-VLPs may be more hydrophobic than either bacteriophage.

3.3. Removal of rNV-VLPs by the hybrid pre-coagulation–MF process

Fig. 5 shows the removal ratios of rNV-VLPs by in-line coagulation followed by a ceramic MF. When the ceramic MF was used without pre-coagulation (0 $\mu\text{mol/L}$ of coagulant), no rNV-

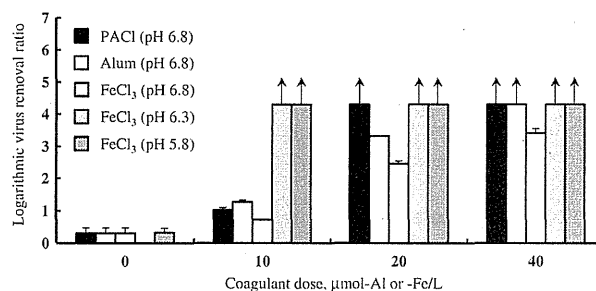


Fig. 5 – rNV-VLP removal by in-line coagulation followed by a ceramic microfiltration membrane having 0.1 μm diameter pores. The columns and error bars represent averages and standard deviations, respectively, of three runs. The arrows indicate virus concentrations below the quantification limit.

VLP removal was observed (<0.3 log), as with the organic MF membranes. When the pre-coagulation process was used with 10 $\mu\text{mol-Al/L}$ of PACl coagulant prior to the MF process (black column), the removal was slightly improved, up to approximately 1.0 log. When the PACl dose was increased to ≥ 20 $\mu\text{mol-Al/L}$, the removal was dramatically improved, up to ≥ 4.3 log. The virus removal observed in the present study was most likely caused by sweep coagulation, because charge neutralization with aluminum salts generally occurs at low aluminum concentrations, usually on the order of a few micromoles per liter at a pH around neutral (Gregory, 2006). Positively charged sweep aluminum flocs (amorphous aluminum hydroxide, $\text{Al}(\text{OH})_3$) (Davis and Leckie, 1978) were efficiently formed with a PACl dose of ≥ 20 $\mu\text{mol-Al/L}$, and rNV-VLPs were effectively incorporated into the sweep flocs. Because the size of the sweep flocs with incorporated rNV-VLPs was greater than the membrane pore size, the rNV-VLPs were effectively rejected by the membrane along with the sweep flocs. Additionally, rNV-VLPs that did not become enmeshed in the sweep flocs during the pre-coagulation step were probably adsorbed to the sweep flocs that were retained as precipitate on the MF membrane surface when the rNV-VLPs encountered the precipitate. According to Shirasaki et al. (2010), coagulation–rapid sand filtration fails to remove rNV-VLPs with a PACl dose of ≤ 20 $\mu\text{mol-Al/L}$; rather, a PACl dose of ≥ 40 $\mu\text{mol-Al/L}$ is required for a reduction of approximately 3 logs. The ceramic MF process was superior to the rapid sand filtration process for solid/liquid separation after coagulation in terms of the coagulant dose required and the removal ratio of the rNV-VLPs. Moreover, the rNV-VLP removal performance of pre-coagulation with PACl doses of ≥ 20 $\mu\text{mol-Al/L}$ followed by the ceramic MF process was higher than the performance of direct UF by the membrane with a MWCO of 1 kDa.

When the experiments were conducted with alum coagulant (white columns), rNV-VLPs were efficiently removed by the hybrid system, but the removal ratios were slightly smaller than those obtained with PACl as the coagulant. During the coagulation process, many aluminum species are generated by hydrolysis of aluminum coagulants. Among

them, the polycationic species Al_{13} ($[AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$) is believed to be the most active species responsible for coagulation (Bottero et al., 1982; Parthasarathy and Buffle, 1985). Virus removal by PACl may have been enhanced compared to that by alum, because PACl contains more preformed Al_{13} than alum (Van Benschoten and Edzwald, 1990; Gregory, 2006).

When the experiments were conducted with ferric chloride coagulant at pH 6.8 (light gray columns), the rNV-VLP removal ratios were smaller than those with the aluminum coagulants. However, when the coagulation pH was lowered to 6.3 or 5.8, rNV-VLP removal was dramatically improved. The reported optimal pH range of the coagulation–sedimentation process with ferric chloride for DOC removal is less than 6.0 (Abbaszadegan et al., 2007). In the same manner, the removal of rNV-VLPs was improved when the pH was reduced from neutral to acidic. At pH 6.3 and 5.8, removal ratios ≥ 4.3 logs were observed even with $10 \mu\text{mol-Fe/L}$ of coagulant. These removal ratios were greater than those with PACl or alum. Chang et al. (1958) also reported greater removal of Coxsackie viruses and a bacteriophage with ferric chloride than with alum by a coagulation–sedimentation process at pH 6.2.

Similar to the rNV-VLPs, the bacteriophages were effectively removed by the MF membrane after pre-coagulation with PACl (Fig. 6), but the removal ratios of the bacteriophages were greater than those of the rNV-VLPs. Different from direct filtration, with a pre-coagulation–MF system, hydrophobic interaction between the virus particles and the membrane is probably not an important factor in determining virus removal ratios. Instead, interaction between the virus

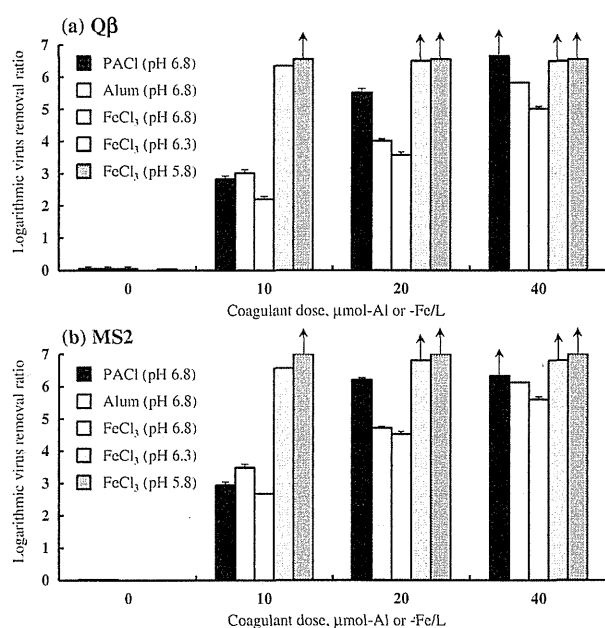


Fig. 6 – Bacteriophage removal by in-line coagulation followed by a ceramic microfiltration membrane having $0.1 \mu\text{m}$ diameter pores. The columns and error bars represent averages and standard deviations, respectively, of three runs. Arrows indicate virus concentrations below the quantification limit. (a) Q β , (b) MS2.

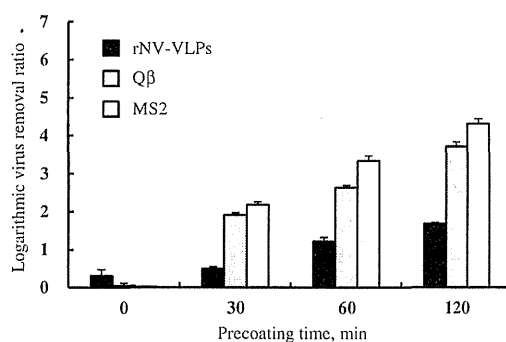


Fig. 7 – Virus removal by a ceramic MF membrane pre-coated with PACl ($20 \mu\text{mol-Al/L}$). No coagulant was used during the virus removal experiments. The columns and error bars represent averages and standard deviations, respectively, of three runs.

particles and the hydrolyzing aluminum species likely played an important role. Shirasaki et al. (2010) reported that the removal ratios of rNV-VLPs by a coagulation–sedimentation process were smaller than those of the bacteriophages Q β and MS2 because of differences in affinity with the hydrolyzing aluminum species, possibly originating from differences in the hydrophobicity of the viruses. The same phenomenon probably occurred during the pre-coagulation process employed in the present study and thus can explain the differences in the rNV-VLP and bacteriophage removal ratios by the hybrid pre-coagulation–MF process. Additionally, the extent of electrostatic adsorption of the virus particles onto positively charged aluminum flocs retained on the membrane surface as precipitates also probably affected the removal performance. The rNV-VLPs are less negative than the bacteriophages (Shirasaki et al., 2010). Accordingly, the extent of electrostatic adsorption of rNV-VLPs to the aluminum precipitates was likely smaller compared with that of the bacteriophages, because the magnitude of the electrostatic attractive force between two unlike charges is proportional to the scalar product of the magnitudes of the charges. This difference probably also contributed to the differences in the virus removal performance between rNV-VLPs and the bacteriophages observed in the present study. Even without pre-coagulation, the ceramic MF membrane pre-coated with aluminum flocs (Fig. 7) was able to remove viruses, and this result clearly implies that the virus particles were adsorbed onto the retained aluminum precipitates. Overall, in terms of the contribution to the virus removal, the affinity of the virus particles for the hydrolyzing aluminum species and the aluminum precipitates most likely had a greater impact than hydrophobic interactions between the virus particles and the membrane. As a result, the removal ratios of the bacteriophages were always greater than those of the rNV-VLPs. Because of their greater removal ratios, neither Q β nor MS2 can act as a conservative surrogate of NV in a hybrid pre-coagulation–MF system. Even taking into account the high removal ratios of the bacteriophages in a direct UF or pre-coagulation–MF hybrid system, the estimated removal of NV was 1–2 logs smaller than those of the bacteriophages.

4. Conclusions

1. An iPCR assay for rNV-VLPs was successfully developed. The assay could measure rNV-VLP concentrations of $\geq 10^5$ VLPs/mL. With the iPCR assay, the detection limit of rNV-VLPs was improved at least 1000-fold compared with that obtained with the ELISA method.
2. By using the iPCR assay and rNV-VLPs, we were able to successfully evaluate NV removal performance by direct MF/UF and hybrid pre-coagulation–MF processes.
3. The removal ratios of the bacteriophages Q β and MS2 by direct MF/UF filtration and by the hybrid coagulation–MF process were always greater by 1–2 logs than the rNV-VLP removal ratios. Accordingly, neither Q β nor MS2 can be used as a conservative surrogate of NV in these processes.
4. Direct filtration with a UF membrane having a MWCO of 1 kDa effectively removed rNV-VLPs (removal ratio approximately 4 logs), whereas direct filtration with MF membranes having nominal pore size of 0.1 μm could not remove the rNV-VLPs.
5. The performance of the hybrid pre-coagulation–MF ($\phi = 0.1 \mu\text{m}$) process with a sufficient coagulant dose ($\geq 10 \mu\text{mol-Fe/L}$ for ferric chloride, $\geq 20 \mu\text{mol-Al/L}$ for PACl, and $\geq 40 \mu\text{mol-Al/L}$ for alum) in rNV-VLP removal (≥ 4.3 logs) was greater than the performance of direct filtration with a UF membrane having a MWCO of 1 kDa.

Acknowledgments

This research was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (2012), a Grant-in-Aid for Scientific Research (S) (2013), a Grant-in-Aid for the Encouragement of Young Scientists (2013), and a Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (2012) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, by a Grant-in-Aid (2012) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and by the Kurita Water and Environment Foundation (2011).

REFERENCES

- Abbaszadegan, M., Mayer, B.K., Ryu, H., Nwachuku, N., 2007. Efficacy of removal of CCL viruses under enhanced coagulation conditions. *Environmental Science and Technology* 41 (3), 971–977.
- Adler, M., Schulz, S., Fischer, R., Niemeyer, C.M., 2005. Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR (“Imperacer”) method with end-point and real-time detection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (4), 1289–1294.
- Adler, M., Wacker, R., Niemeyer, C.M., 2008. Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *Analyst* 133 (6), 702–718.
- Aw, T.G., Gin, K.Y.-H., Ean Oon, L.L., Chen, E.X., Woo, C.H., 2009. Prevalence and genotypes of human noroviruses in tropical urban surface waters and clinical samples in Singapore. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (15), 4984–4992.
- Black, R.E., Cousens, S., Johnson, H.L., Lawn, J.E., Rudan, I., Bassani, D.G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C.F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L., Mathers, G., 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet* 375 (9730), 1969–1987.
- Bottero, J.Y., Tchoubar, D., Cases, J.M., Fiessinger, F., 1982. Investigation of the hydrolysis of aqueous solutions of aluminum chloride. 2. Nature and structure by small-angle X-ray scattering. *The Journal of Physical Chemistry* 86 (18), 3667–3673.
- Bradley, I., Straub, A., Maraccini, P., Markazi, S., Nguyen, T.H., 2011. Iron oxide amended biosand filters for virus removal. *Water Research* 45 (15), 4501–4510.
- Chang, S.L., Stevenson, R.E., Bryant, A.R., Woodward, R.L., Kabler, P.W., 1958. Removal of coxsackie and bacterial viruses in water by flocculation. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 48 (1), 51–61.
- Constantine, N.T., Edelman, D.C., Barletta, J.M., 2004. Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *American Journal of Clinical Pathology* 122 (1), 20–27.
- Davis, J.A., Leckie, J.O., 1978. Surface ionization and complexation at the oxide/water interface II. Surface properties of amorphous iron oxyhydroxide and adsorption of metal ions. *Journal of Colloid and Interface Science* 67 (1), 90–107.
- de Bruin, E., Duizer, E., Vennema, H., Koopmans, M.P., 2006. Diagnosis of norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 137 (2), 259–264.
- Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S., Corapcioglu, M.Y., 1998. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), 405–410.
- Gregory, J. (Ed.), 2006. *Particles in Water. Properties and Processes*. CDC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Herath, G., Yamamoto, K., Urase, T., 1999. Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. *Water Science and Technology* 40 (4–5), 331–338.
- Hutson, A.M., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology* 12 (6), 279–287.
- Jeon, J.-D., Kim, S.J., Kwak, S.-Y., 2008. ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) cryoporometry as a tool to determine the pore size distribution of ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 309 (1–2), 233–238.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology* 66 (11), 6527–6532.
- Kwon, B., Molek, J., Zydney, A.L., 2008. Ultrafiltration of PEGylated proteins: fouling and concentration polarization effects. *Journal of Membrane Science* 319 (1–2), 206–213.
- Lénès, D., Deboosere, N., Ménard-Szczebara, F., Jossent, J., Alexandre, V., Machinal, C., Vialette, M., 2010. Assessment of the removal and inactivation of influenza viruses H5N1 and H1N1 by drinking water treatment. *Water Research* 44 (8), 2473–2486.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F., Gantzer, C., 2008. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. *Water Research* 42 (10–11), 2769–2777.
- Langlet, J., Ogorzaly, L., Schrotter, J.-C., Machinal, C., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Gantzer, C., 2009. Efficiency of MS2 phage and Q β phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method. *Journal of Membrane Science* 326 (1), 111–116.
- Madaeni, S.S., Fane, A.G., Grohmann, G.S., 1995. Virus removal from water and wastewater using membranes. *Journal of Membrane Science* 102 (0), 65–75.

- Maia, M., Takahashi, H., Adler, K., Garlick, R.K., Wands, J.R., 1995. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen. *Journal of Virological Methods* 52 (3), 273–286.
- Matsushita, T., Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsui, Y., Ohno, K., 2013. Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon. *Separation and Purification Technology* 107, 79–84.
- McKie, A., Samuel, D., Cohen, B., Saunders, N.A., 2002. A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *Journal of Immunological Methods* 270 (1), 135–141.
- Miura, T., Masago, Y., Chan, Y.-M., Imai, T., Omura, T., 2009. Detection of bacteria and enteric viruses from river and estuarine sediment. *Journal of Water and Environment Technology* 7 (4), 307–316.
- Mweene, A.S., Ito, T., Okazaki, K., Ono, E., Shimizu, Y., Kida, H., 1996. Development of immuno-PCR for diagnosis of bovine herpesvirus 1 infection. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (3), 748–750.
- Parthasarathy, N., Buffle, J., 1985. Study of polymeric aluminium(III) hydroxide solutions for application in waste water treatment. Properties of the polymer and optimal conditions of preparation. *Water Research* 19 (1), 25–36.
- Patel, M.M., Hall, A.J., Vinje, J., Parashar, U.D., 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology* 44 (1), 1–8.
- Pontius, F.W. (Ed.), 1990. *Water Quality and Treatment: a Handbook of Community Water Supplies*. American Water Works Association, McGraw-Hill, New York.
- Prasad, B.V., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M.K., 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of Virology* 68 (8), 5117–5125.
- Richards, A.F., Lopman, B., Gunn, A., Curry, A., Ellis, D., Cotterill, H., Ratcliffe, S., Jenkins, M., Appleton, H., Gallimore, C.I., Gray, J.J., Brown, D.W.G., 2003. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of Clinical Virology* 26 (1), 109–115.
- Sano, T., Smith, C., Cantor, C., 1992. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258 (5079), 120–122.
- Shi, C., Wei, J., Jin, Y., Kniel, K.E., Chiu, P.C., 2012. Removal of viruses and bacteriophages from drinking water using zero-valent iron. *Separation and Purification Technology* 84 (0), 72–78.
- 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. *Journal of Membrane Science* 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 Research* 44 (5), 1307–1316.
- Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T., 2000. Complete nucleotide sequence of the chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Virology* 278 (2), 490–500.
- Tian, P., Mandrell, R., 2006. Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *Journal of Applied Microbiology* 100 (3), 564–574.
- Urase, T., Yamamoto, K., Ohgaki, S., 1996. Effect of pore structure of membranes and module configuration on virus retention. *Journal of Membrane Science* 115 (1), 21–29.
- Van Benschoten, J.E., Edzwald, J.K., 1990. Chemical aspects of coagulation using aluminum salts—I. Hydrolytic reactions of alum and polyaluminum chloride. *Water Research* 24 (12), 1519–1526.
- Westrell, T., Teunis, P., van den Berg, H., Lodder, W., Ketelaars, H., Stenström, T.A., de Roda Husman, A.M., 2006. Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Research* 40 (14), 2613–2620.
- Yang, Z., Wu, X., Li, T., Li, M., Zhong, Y., Liu, Y., Deng, Z., Di, B., Huang, C., Liang, H., Wang, M., 2011. Epidemiological survey and analysis on an outbreak of gastroenteritis due to water contamination. *Biomedical and Environmental Sciences* 24 (3), 275–283.

水中のクリプトスポリジウム・ジアルジア検査 における遺伝子検査法の実用性に関する検討

岸田 直裕^{1*}・原本 英司²・今野 祥顕¹・泉山 信司³
浅見 真理¹・秋葉 道宏⁴

¹国立保健医療科学院 生活環境研究部 水管理研究分野 (〒351-0197 埼玉県和光市南2-3-6)

²山梨大学大学院 医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

³国立感染症研究所 寄生動物部 (〒162-8640 新宿区戸山1-23-1)

⁴国立保健医療科学院 (〒351-0197 埼玉県和光市南2-3-6)

* E-mail: kishida@niph.go.jp

水中のクリプトスポリジウム・ジアルジア検査における遺伝子検査法の実用性を検討するため、国内30箇所の浄水場から水道原水を採取し、顕微鏡観察法および遺伝子検査法を用いてこれらの原虫を検査し、検出結果を比較した。遺伝子検査法としてRT-qPCR法を用いた場合、顕微鏡観察法と同程度の検出率で原虫が検出されたが、一部の試料ではクリプトスポリジウムの検出濃度が顕微鏡観察法に比べ極端に低くなることもあった。また、遺伝子検査法により、水道原水中に存在する原虫の種・遺伝子型が多様であることが明らかとなり、その多くがヒトに感染する可能性のあるものであった。さらに、遺伝子検査法によって検出された種・遺伝子型によっては、水源における汚染源の推測も可能であることがわかった。

Key Words : *Cryptosporidium, drinking-water, Giardia, molecular analysis, public health*

1. はじめに

クリプトスポリジウムやジアルジア等の耐塩素性原虫は、感染者に下痢等の症状を引き起こし、糞便中に高濃度で排出されるため、下水処理場・浄化槽等を介して水環境中に放出される。このことから、河川等の水道水源がこれらの微生物に汚染されるおそれがある。

1993年に米国Milwaukee市で発生した水道を介したクリプトスポリジウムの集団感染事例では、推定感染者40万人以上、確定患者5千人以上が発生したと報告されている^{1,3)}。我が国においても1996年に埼玉県越生町の町民の約7割が感染したとされる大規模なクリプトスポリジウムの集団感染事例が発生している⁴⁾。近年では、2007年にアイルランドのGalway市にて182人、2010年にスウェーデンのÖstersund市にて11,200人の推定患者の発生が報告されている^{5,6)}。このような原虫による水道水由来の健康影響リスクを定量的に推定し、管理するためには、水中の原虫濃度を正確に測定する必要がある。

現在、クリプトスポリジウムの検査で主流となっているのは顕微鏡観察法であるが、本手法は技術の習得に多

大な時間を要している。また、陽性/陰性の判定において個人差が生じるおそれも考えられることから、迅速に検出可能で分析者の負担が少なく、かつ再現性の高い検出法の導入が強く求められている。このような特徴を満たす検査法として近年注目を集めているのが遺伝子検査法である。遺伝子検査法を用いて水中の原虫の検査が可能であることが報告されているが、その適用サンプルは、国内では一部の地域の水道原水や環境水に限られており^{7,9)}、より広範囲の試料について、遺伝子検査法の適用性を検証する必要がある。また遺伝子検査法では、検出有無のみでなく、宿主特異性や発生源の推定に繋がる種・遺伝子型も明らかとすることが可能であるが、水中の原虫の種・遺伝子型についても、これまでは調査範囲が限定されていた¹⁰⁾。

そこで本研究では、国内30箇所の浄水場から水道原水を採取し、顕微鏡観察法および遺伝子検査法を用いてクリプトスポリジウム・ジアルジアを検査し、検出結果について比較検討した。さらに、国内の水道原水に存在する原虫の種・遺伝子型の分布・ヒトへの感染性の有無を調査した。

2. 実験方法

(1) 調査地点および採取試料

2010年12月に国内30地点の浄水場の協力を得て、水道原水10Lを採取した。調査地点は、国内の主要な水系の中から地域間に偏りが生じないように、クリプトスポリジウム等による汚染のおそれの判断基準¹¹⁾がレベル4に該当する原水の地点を選定した。選定浄水場は比較的大規模であり、全30浄水場の総配水量は日本全国の浄水場の総配水量の約10%に相当する^{12, 13)}。採取した試料は冷蔵して実験室に輸送し、到着後速やかに分析に供した。

(2) 試料の濃縮・精製方法

「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」¹⁴⁾に記されている濃縮法のうち、親水性PTFEメンブレンフィルター法によって、河川水10Lを約10mLまで濃縮した。その後、Dynabeads GC-Combo (Life Technologies) を用いた免疫磁気ビーズ法による精製・濃縮を行い、約110 μ Lまで濃縮した。濃縮・精製試料の半量(約55 μ L)を顕微鏡検査に供し、残りの半量を遺伝子検査に供した。なお、顕微鏡観察と遺伝子検査法の両方に使用できる内部標準を調製することが困難であるため、本研究では、濃縮前の試料に内部標準の添加は行わなかった。

(3) 顕微鏡観察

撥水ペンで直径約15mmの円を描いた親水性PTFEメンブレンフィルター(直径25mm, 孔径1.0 μ m, Advantec)で濃縮・精製試料を吸引ろ過し、EasyStain (BTF) を用いた直接蛍光抗体染色法とDAPI染色法に供してプレパラートを作製した。微分干渉像観察機能付きの蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて円内を全視野観察し、クリプトスポリジウム(直径4~6 μ mの類円形)とジアルジア(長径8~14 μ m, 短径5~8 μ mの卵円形)を公定法¹⁴⁾に準じて計数した。なお、公定法では、核ヤスプロゾイト(クリプトスポリジウム)、軸糸(ジアルジア)等が確認できたものを陽性と判断するが、本研究では蛍光観察でオーシスト・シスト壁のみが観察できたものも陽性として計数している。

(4) 遺伝子検査

a) 核酸抽出方法

-80 $^{\circ}$ Cのドライバスと37 $^{\circ}$ Cのヒートブロックを用いて濃縮・精製試料の凍結融解を5回行った。次に溶解液を等量(55 μ L)添加し(反応チューブ内溶解液終濃度: 10mM Tris-HCl (tris-hydroxymethyl-aminomethane, pH7.6), 1mM

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 20mM NaCl, 0.1% (w/v) TritonX-100, 2mM DTT (dithiothreitol), 1.5mM Anson-U/mL Proteinase K), 60 $^{\circ}$ Cで30分間溶解反応を行った。その後、2分間の超音波処理と75 $^{\circ}$ Cで10分間の加熱処理を行った。この核酸抽出液を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、Proteinase Kを失活させた後、水中で急冷した。

b) 逆転写反応

クリプトスポリジウムオーシスト1個あたりの18S rRNAをコードするDNA数は限られている一方、rRNA分子自体は多量に存在するため、逆転写反応を実施し、rRNA分子を相補的DNA (cDNA) に変換することで、定量PCR (qPCR) 法の検出感度が著しく向上することが筆者らの過去の検討で明らかとなっている⁹⁾。このため、本研究では、qPCRを実施する前に逆転写反応を行った(RT-qPCR)。核酸抽出液をPrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いた逆転写反応(37 $^{\circ}$ C 15分→85 $^{\circ}$ C 5秒)に供し、cDNA溶液を合成した。

c) qPCR法(定量試験)

顕微鏡による計測数と比較するため、遺伝子定量法として、Cycleave PCR *Cryptosporidium/Giardia* Detection Kit (Takara Bio) を用いたqPCR法を実施した。本キットではクリプトスポリジウム・ジアルジアの18S rRNA領域を増幅ターゲットとしている。キットの中には内部標準遺伝子も含まれているが、本研究ではPCR阻害の有無を定性的に確認するために使用し、定量値の補正は行っていない。キット付属の説明書に従い、テンプレートにはcDNA溶液2 μ Lを用いた。遺伝子増幅・蛍光値測定にはLightCycler 480 System II (Roche Applied Science) を用い、反応条件はキット付属の説明書どおりとした。検量線作成のための標準試料として、感染マウスの糞便より精製した*C. parvum*オーシスト(H8株)および感染スナネズミの糞便より精製した*G. intestinalis*シスト(WB株)を水道原水試料と同じ方法で調製したcDNA溶液を用いた。

d) LAMP法(特異性確認用定性試験)

qPCR法の特異性を確認するため、Loopamp クリプトスポリジウム/ジアルジア検出試薬キット(栄研化学)を用いたLAMP法も実施した。本キットでは、qPCR法と同様にクリプトスポリジウム・ジアルジアの18S rRNA領域を増幅ターゲットとしているが、増幅配列(プライマーのアニーリング位置)が異なっている。キット付属の説明書に従い、テンプレートには核酸抽出液5 μ Lを用いた。クリプトスポリジウムの場合は、逆転写反応の追加による感度上昇が認められているため⁷⁾、反応溶液に1.5UのReverse Transcriptase (Roche Applied Science) を添加した(One-step RT-LAMP)。遺伝子増幅・濁度の連続測定には、Loopampリアルタイム濁度測定装置(Realoop-30,

モリテックス)を用い、反応条件はキット付属の説明書どおりとした。

e) (Semi-) nested PCR法 (種・遺伝子型判別試験)

水道原水中のクリプトスポリジウムおよびジアルジアのヒトへの感染性を推定するため、種・遺伝子型を判別可能な(Semi-)nested PCR法^{15,17)}を実施した。クリプトスポリジウムの場合は18S rRNA遺伝子を対象としたNested PCR法、ジアルジアの場合はglutamate dehydrogenase (*gdh*) 遺伝子を対象としたSeminested PCR法である。本試験方法では、ヒトクリプトスポリジウム症の主要な原因である*C. hominis*、*C. parvum*をはじめとする多数の種・遺伝子型を検出することが可能である。クリプトスポリジウム・ジアルジアの遺伝子型判別用の(Semi-)nested PCR法では、これまでに逆転写反応の追加による感度向上に関する検討が行われていなかったため、テンプレートには核酸抽出液とcDNA溶液の両方を使用した。PCR酵素にはPremix Ex Taq Hot Start Version (Takara Bio)を使用し、各プライマーの濃度は0.3μMとした。PCR反応液45μLに核酸抽出液またはcDNA溶液5μLを添加し、1st PCRに供した。PCR反応液48μLに1st PCR終了後の溶液(増幅産物)2μLを添加し、2nd PCRに供した。反応温度条件は、1st、2nd PCRともに、クリプトスポリジウムの場合は、94°C2分→(94°C30秒→55°C30秒→72°C1分)×35サイクル→72°C7分とし、ジアルジアの場合は、94°C2分→(94°C30秒→56°C30秒→72°C1分)×35サイクル→72°C7分とした。

(Semi-)nested PCR法後の試料は、2%アガロースゲルを用いた電気泳動に供した後、エチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーター(UVP)で目的の長さのPCR産物の生成有無を確認した。PCR産物の生成が確認された場合は、ゲルからPCR産物を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)でPCR産物を精製した後、ABI 3730x DNA Analyzer (Applied Biosystems)を用い

たダイレクトシーケンシングによって塩基配列を決定した。得られた塩基配列から両端のプライマー部位を除いた領域に対し、GenBankの登録株も含め、近隣結合法を用いて系統樹を作成し、クリプトスポリジウム・ジアルジアの種・遺伝子型を決定した。

3. 実験結果および考察

(1) 顕微鏡観察による原虫の検出結果

原虫は国内広範囲の水道原水から検出された。表-1に示すとおり、顕微鏡観察による検出率はクリプトスポリジウムで50% (15/30)、ジアルジアで30% (9/30)であり、過去の国内の全国規模の調査結果と比較すると、やや高い値であった。この理由の一つとしては調査時期の違いが挙げられる。国内の水道原水においては、原虫の検出率は冬期に高くなる傾向が得られているが¹⁸⁾、本調査では冬期にのみ試料を採取しているため、他の調査結果より高い検出率が得られたと推測された。

検出濃度は概ね1 (oo)cyst/L以下であったが、クリプトスポリジウムでは、1地点で44 oocysts/Lという極めて高濃度の汚染が確認された。異なる時期に筆者らが実施した実態調査においては、本調査地点において高濃度の汚染は確認されていないことから¹⁸⁾、水源流域に短期的に高濃度の糞便汚染が発生したと推測される。このような高濃度の原虫汚染は、表-1に示すとおり、既往の調査でも確認されている。

(2) 顕微鏡観察法と遺伝子検査法の検査結果の比較

表-2に示すとおり、RT-qPCR法を用いた場合も、顕微鏡観察法と同程度の検出率で原虫が検出されることが明らかとなった。一方、RT-qPCR法による原虫の検出濃度

表-1 顕微鏡観察法による原虫の検出率・濃度の比較

期間	調査地点	種類	試験水量	クリプトスポリジウム		ジアルジア		文献
				検出率	検出濃度 (oocysts/L)	検出率	検出濃度 (cysts/L)	
2010年度	国内30地点	水道原水	5L*	50% (15/30)	0.2~44	30% (9/30)	0.2~1	本研究
2010年度	国内30地点	水道原水	1.4~2L	27% (32/120)	0.5~17	20% (24/120)	0.5~2	岸田ら, 2013 ¹⁸⁾
2008~2009年度	国内16地点	水道原水	1~2L	41% (26/64)	0.5~30	36% (23/64)	0.5~3.8	Haramoto et al., 2012 ¹⁹⁾
1997年	国内94水源域	水源	5~10L	6% (6/94)	0.1~0.4	17% (16/94)	0.1~2.3	厚生省, 1997 ²⁰⁾
1985~1988年	米国内17州	水源	400L	51% (93/181)	≤290	15% (28/181)	≤6.3	Rose et al., 1991 ²¹⁾

*総試験水量は10Lだが、顕微鏡検査には濃縮・精製後の半量の試料を用いているので、5Lと記載。

は、顕微鏡観察法による濃度とは異なる値を示した。クリプトスポリジウムの場合、顕微鏡観察法に比べ、遺伝子検査法では全体的に検出濃度が低く、一部の試料で0.04 oocyst相当/10Lなどの極端に低濃度で検出された。これは、環境中で損傷し、標準試料に比べて核酸（RNA分子数）が少ないクリプトスポリジウムオーシストが検出されたことが主な原因であると推測された。オーシスト内部のRNA分子は比較的不安定であり、実験室環境下で低温（5℃）にて保存された場合にも、10日間で分子数が約60%減少することが報告されており²⁾、実環境中では更なるRNA分子の減少が発生していると予想される。また、極端に低濃度で検出された試料においても内部標準遺伝子は問題なく増幅されていたことから、PCR阻害が発生している可能性は低いと考えられる。ただし、本研究で使用している内部標準はqPCR時のDNAであり、核酸抽出や逆転写反応時の阻害の有無は評価することができていないため、これらの影響を今後調査していく必要がある。

これらのことから、顕微鏡観察法でクリプトスポリジウムを検査していた機関において遺伝子検査法を新しく導入する場合、従来の検査結果と異なる定量値が得られる可能性が高く、過去の検査結果と比較する際には注意が必要と考えられた。ジアルジアの場合は、1シスト内に存在するDNA数に比べRNA分子数がそれほど多くないため、環境中で損傷し、標準試料に比べてRNA分子数が少ない試料においても、逆転写時にクリプトスポリジウムほどコピー数に差が生じなかったと推測された。

一方、表-3に顕微鏡観察法とRT-qPCR法の陽性・陰性試料数を示すが、両手法で定性的な検出結果が一致したのは、クリプトスポリジウムで30試料中20試料（67%）、ジアルジアで30試料中21試料（70%）であり、必ずしも両手法の検出結果は一致しなかった。本研究では、10Lの水道原水を濃縮・精製した後、試料を2つに分割して顕微鏡観察法と遺伝子検査法に供しているため、元の試料中の原虫濃度が低い場合は、片方の検査試料にしか原虫が入らない可能性があり、この確率の問題が両手法の定性的試験結果に差が生じた主要因と考えられた。実際に、検出結果が手法間で一致しなかった19試料中18試料（95%）については、5(oocysts)/5L以下の低濃度であった。微生物粒子は化学物質と異なり、水中で必ずしも均等に分散しているとは限らないことから、このような低濃度試料において、定性的な検出結果に差が生じるのは避けられないと考えられる。これまでの検査実績の少ない遺伝子検査法において特異性に問題がある可能性も考えられたが、増幅配列の異なるqPCR法とLAMP法で定性的な検出結果が異なったのは60試料中1試料（2%）のみ

であり、少なくともqPCR法のプライマー・プローブ配列には問題はなかった。

(3) 種・遺伝子型の分布

種・遺伝子型判別用(Semi-)nested PCR法およびシーケンス解析を実施した結果、クリプトスポリジウムで7試料（23%）、ジアルジアで3試料（10%）の増幅と塩基配列の解読に成功した。検出率がqPCR法と比べて低くなっているが、これはクリプトスポリジウムの場合、PCRの標的配列の塩基長がqPCR法と比べて数倍長く、増幅効率が低いためであると考えられる。ジアルジアの場合はこのことに加えて、標的領域がrRNA遺伝子ではなく*gch*遺伝子であったことから、ジアルジアシストが有する核酸のコピー数がqPCR法と比べて少ないためであると推測された。

クリプトスポリジウムの場合、表4に示すとおり、逆転写反応を追加することで検出率が上昇したが、ジアルジアの場合は、標的領域がrRNA遺伝子ではなく、逆転写によってcDNA数の増加が見込めないことから、検出感度は上昇しなかった。

表5に示すとおり、国内の水道原水中に存在する原虫の種・遺伝子型は多様であることが明らかとなった。クリプトスポリジウムに関しては、上流域に下水処理場が存在する浄水場原水においても、ヒトクリプトスポリジウム症の主要な原因とされている*C. hominis*、*C. parvum*は

表-2 顕微鏡観察法とRT-qPCR法による原虫の検出結果の比較

原虫	顕微鏡観察法		RT-qPCR法	
	検出率	検出濃度 (oo)cysts/10L	検出率	検出濃度 (oo)cysts/10L
クリプトスポリジウム	50%(15/30) 47%(14/30)*	2~440 2~100*	43% (13/30)	0.04~12
ジアルジア	30%(9/30) 27%(8/30)*	2~10 2~6*	27% (8/30)	0.55~27

*核マシホロゾイト等の内部構造まで観察できたもの。

表-3 顕微鏡観察法とRT-qPCR法による原虫の陽性・陰性試料数の比較

原虫	RT-qPCR法	顕微鏡観察法	
		陽性	陰性
クリプトスポリジウム	陽性	9	4
	陰性	6	11
ジアルジア	陽性	4	5
	陰性	4	17

表-4 (Semi)-nested PCR法における逆転写反応の有無による原虫の検出率の比較

原虫	検出率		逆転写反応有無 における検出試 料の一致数
	逆転写反応 あり	逆転写反応 なし	
クリプトス ポリジウム	23% (7/30)	7% (2/30)	2
ジアルジア	3% (1/30)	7% (2/30)	0

表-5 検出された原虫の種・遺伝子型

種または遺伝子型 (Accession No.)	ヒトへの感染報告
クリプトスポリジウム	
<i>C. suis</i> (AB694726)	あり (稀)
<i>C. sp. pig genotype II</i> (AB694732)	あり (稀)
<i>C. andersoni</i> (AB694731)	なし
<i>C. felis</i> (AB694730)	あり (稀)
<i>C. ubiquitum</i> (AB694728)	あり (稀)
<i>C. sp. muskrat genotype II</i> (AB694727)	なし
<i>C. sp. avian genotype III</i> (AB694729)	なし
ジアルジア	
<i>G. intestinalis</i> genotype AI (AB694736)	あり
<i>G. intestinalis</i> genotype AII (AB694735)	あり
<i>G. intestinalis</i> genotype BIV (AB694737)	あり

検出されなかったが、検出された7種類中4種類がヒトへの感染報告があるものであった^{23,24)}。ジアルジアに関しては3種類すべての種・遺伝子型がヒトへの感染報告があり²⁵⁾、ヒトへ感染する可能性のある原虫が国内の水道水源に存在していることが確認された。顕微鏡観察のみではこのような感染性に関する情報を得ることは困難であり、水系感染リスクを正しく把握する上でも遺伝子検査法の有用性は高いといえる。

原虫の種・遺伝子型の情報から、水源における原虫の汚染源の推測が可能となった。*C. suis*, *C. sp. pig genotype II*の宿主は主にブタであり、*C. andersoni*の場合はウシであることから²³⁾、これらの種・遺伝子型が検出された浄水場の水源では、家畜由来のクリプトスポリジウム汚染が発生していたと考えられた。これらの種・遺伝子型は、国内では利根川水系の流域から高頻度で検出されている¹⁰⁾。また、スコットランドで実施された大規模な水道原水のクリプトスポリジウム汚染実態調査においても*C. andersoni*は最も検出率が高い種であった²⁴⁾。*C. felis*の主な宿主はネコであり、ネコ由来の汚染が疑われるが、ヒトへも稀に感染することが報告されており²³⁾、どちらか

が汚染源であると推測された。*C. ubiquitum*の宿主範囲は広く、ヒツジ、シカ、ヤギ、ヒト等多数の動物に感染すると報告されていることから、汚染源を推測することは困難である。*C. ubiquitum*は先述のスコットランドの実態調査でも比較的高頻度で検出されており、他の地域の水源・環境水等からの検出例も多い^{24, 26-28)}。*C. sp. muskrat genotype II*の主な宿主はマスカラットであり、国内においても生息が確認されている野生外来動物であるが、その生息数は限られていることから、別の宿主が存在している可能性が示唆された。先述のスコットランドの実態調査においても、頻度は低いものの検出されている遺伝子型である²⁹⁾。*C. sp. avian genotype III*の宿主は、モモイロインコ、オカメインコ等のインコ科の鳥であると報告されているが^{29,31)}、ペットや野生のインコの糞便が水道原水まで辿りつく可能性は他の動物と比較して低いと考えられるため、*C. sp. muskrat genotype II*同様、他の宿主の存在が疑われた。全体的にみると、ヒトが宿主であると報告されていない種・遺伝子型も検出されており、この結果は、国内の水道原水がヒト以外の動物の糞便にも汚染されていることを示しているともいえる。

ジアルジアについては、*G. intestinalis* genotype AI, AII, BIVが同定されたが、このうちAIIとBIVはヒトに特異的に感染すると報告されており²⁵⁾、下水処理場や浄化槽等からのジアルジア汚染が発生していたと推測された。AIはヒトや様々な動物に感染する人獣共通感染型であり²⁴⁾、宿主が多いことから汚染源を推測することは困難であった。

このように、検出された種・遺伝子型によっては、水源における汚染源を推測することが可能であり、このことは顕微鏡観察法に対する遺伝子検査法の利点の一つである。一方、宿主範囲が広い種・遺伝子型の場合は、汚染源を推測することが困難であり、別の汚染源追跡手法と組み合わせる等の工夫が必要であろう。

4. まとめ

国内30箇所の浄水場から水道原水を採取し、顕微鏡観察法および遺伝子検査法を用いてクリプトスポリジウム・ジアルジアを検査し、その結果を比較検討した。本研究で得られた主な知見は以下のとおりである。

- (1) 国内広範囲の水道原水から原虫が検出された。クリプトスポリジウム・ジアルジアの検出率は、顕微鏡観察法で50%, 30%, 遺伝子検査法 (RT-qPCR法) で43%, 27%であり、遺伝子検査法を用いても顕微

鏡観察法と同程度の検出率で原虫が検出されることが明らかとなった。

- (2) 顕微鏡観察法による原虫の検出濃度は概ね1 (oo)cyst/L以下であったが、1地点で44 oocysts/Lという極めて高濃度のクリプトスポリジウム汚染が確認された。また、遺伝子検査法としてRT-qPCR法を用いた場合、特にクリプトスポリジウムで極端に低い濃度で検出されることがあり、顕微鏡観察法と定量結果を比較する際には注意が必要である。
- (3) 種・遺伝子型判別用(Semi-)nested PCR法およびシーケンス解析を実施した結果、国内の水道原水中に存在する原虫の種・遺伝子型は多様であることが明らかとなった。検出された種・遺伝子型の多くがヒトへの感染報告があるものであり、ヒトへ感染する可能性のある原虫が国内の水道水源に存在していることが確認された。また、検出された種・遺伝子型によっては水源における汚染源を推測可能であった。

謝辞：試料の採取にご協力いただいた水道事業者関係者に深く感謝する。また本研究は、環境省地球環境保全等試験研究費「公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と制御に関する研究」および厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究」の一環で行われたものである。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) Cicirello H.G., Kehl K.S., Addiss D.G., Chusid M.J., Glass R.I., Davis J.P. and Havens P.L.: Cryptosporidiosis in children during a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin: clinical, laboratory and epidemiologic findings, *Epidemiology and Infection*, Vol. 119, No. 1, pp. 53-60, 1997.
- 2) Corso P.S., Kramer M.H., Blair K.A., Addiss D.G., Davis J.P. and Haddix A.C.: Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 9, No. 4, pp. 426-431, 2003.
- 3) MacKenzie W.R., Schell W.L., Blair K.A., Addiss D.G., Peterson D.E., Hoxie N.J., Kazmierczak J.J. and Davis J.P.: Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission, *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 21, No. 1, pp. 57-62, 1995.
- 4) 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.
- 5) Pelly H., Cornican M., O'Donovan D., Chalmers R., Hanahoe B., Cloughley R., McKeown P. and Corbett-Feeney G.: A large outbreak of cryptosporidiosis in western Ireland linked to public water supply: a preliminary report, *Eurosurveillance*, Vol. 12, No. 18, pii=3187, 2007.
- 6) Water Quality Research Australia: *Cryptosporidium* outbreak in Sweden, *Public Health Newsletter of Water Quality Research Australia*, No. 60, pp. 1-2, 2010.
- 7) Inomata A., Kishida N., Momoda T., Akiba M., Izumiyama S., Yagita K. and Endo T.: Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples, *Water Science and Technology*, Vol. 60, No. 8, pp. 2167-2172, 2009.
- 8) 武田万里子, 林広宣, 三輪雅幸: リアルタイム PCR 法による *Cryptosporidium*・*Giardia* の測定と環境水検査への適用性の検討, 用水と廃水, Vol. 54, No. 6, pp. 451-461, 2012.
- 9) Kishida N., Miyata R., Furuta A., Izumiyama S., Tsuneda S., Sekiguchi Y., Noda N. and Akiba M.: 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*, Vol. 46, No. 1, pp. 187-194, 2012.
- 10) 原本英司, 與那城雄司, 秋葉道宏, 橋本温, 森田重光, 浅見真理, 国包章一: 利根川流域の小河川におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染実態の解明, 環境工学研究論文集, Vol. 45, pp. 371-377, 2008.
- 11) 厚生労働省: 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 (健水発第 0330005 号通知), 2007.
- 12) 水道産業新聞社: 全国浄水場ガイド 2008, 2008.
- 13) 日本水道協会: 平成 21 年度水道統計施設・業務編, 2011.
- 14) 厚生労働省: 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 (健水発第 0330006 号), 2007.
- 15) Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R. and Lal A.A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 4, pp. 1578-1583, 1999.
- 16) Xiao L., Alderisio K., Limor J., Royer M. and Lal A.A.: Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 12, pp. 5492-5498, 2000.
- 17) Read C.M., Monis P.T. and Thompson R.C.: Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP, *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 4, No. 2, pp. 125-130, 2004.
- 18) 岸田直裕, 今野祥顕, 原本英司, 浅見真理, 秋葉道宏: 我が国における水道原水中の水系感染性ウイルスおよび原虫の存在実態と指標微生物の有効性, 水道協会雑誌 (印刷中).
- 19) Haramoto E., Kitajima M., Kishida N., Katayama H., Asami M. and Akiba M.: Occurrences of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms, *Food and*

- Environmental Virology*, Vol. 4, No. 3, pp. 93-101, 2012.
- 20) 厚生省水道環境部水道整備課：水道水源におけるクリプトスポリジウム等の検出状況について（報道発表資料，平成9年8月19日付），1997.
- 21) Rose J.B., Gerba C.P. and Jakubowski W.: Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*, *Environmental Science and Technology*, Vol. 25, No. 8, pp. 1393-1400, 1991.
- 22) 八木田健司，泉山信司，村上裕子：公用水域における病原微生物の生存性に関する研究，環境保全研究成果集，Vol. 2009, pp. 46:17-26 (CD-ROM), 2009.
- 23) Fayer R. and Xiao L.: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, pp. 1-42, IWA Publishing, 2007.
- 24) Nichols R.A., Connelly L., Sullivan C.B. and Smith H.V.: Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 17, pp. 5977-5986, 2010.
- 25) Thompson R.C.: The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis, *Veterinary Parasitology*, Vol. 126, No. 1-2, pp. 15-35, 2004.
- 26) Jiang J., Alderisio K.A. and Xiao L.: Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 8, pp. 4446-4454, 2005.
- 27) Ruecker N.J., Braithwaite S.L., Topp E., Edge T., Lapen D.R., Wilkes G., Robertson W., Medeiros D., Sensen C.W. and Neumann N.F.: Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 12, pp. 3945-3957, 2007.
- 28) Jellison K.L., Lynch A.E. and Ziemann J.M.: Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed, *Environmental Science and Technology*, Vol. 43, No. 12, pp. 4267-4272, 2009.
- 29) Makino I., Abe N. and Reavill D.R.: *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*), *Avian Diseases*, Vol. 54, No. 3, pp. 1102-1107, 2010.
- 30) Ng J., Pavlasek I. and Ryan U.M.: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 12, pp. 7548-7553, 2006.
- 31) Ryan U.: *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians, *Experimental Parasitology*, Vol. 124, No. 1, pp. 113-120, 2010.

(2013. 5. 24 受付)

Practicability of Molecular Analysis for Testing *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water

Naohiro KISHIDA¹, Eiji HARAMOTO², Yoshiaki KONNO¹, Shinji IZUMIYAMA³,
Mari ASAMI¹ and Michihiro AKIBA⁴

¹Area on Water Management, Dept. of Environmental Health, National Institute of Public Health

²Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

³Dept. of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

⁴National Institute of Public Health

To investigate practicability of molecular analysis for testing *Cryptosporidium* and *Giardia* in water, these protozoans in raw water obtained from 30 Japanese drinking-water treatment plants were tested by conventional microscopic observation and molecular analysis, and the results were compared. Detection sensitivity of two methods resembles each other if RT-qPCR is used as a molecular analysis method. On the other hand, the quantified concentrations of *Cryptosporidium* detected in a few raw waters by RT-qPCR were much lower than those by microscopic observation. Molecular analysis revealed that species and/or genotypes of protozoans in raw water are ecologically diverse, and most species and/or genotypes are potentially infectious for humans. Furthermore, it was found that contamination sources of protozoans in water sources can be predicted depending on detected species and/or genotypes by molecular analysis.

水系感染する病原微生物 (クリプトスポリジウムおよびレジオネラ) への対策*

泉山 信司 黒木 俊郎

1. はじめに

クリプトスポリジウムは腸管寄生性の原虫で、糞口感染して水様性下痢症を引き起こす。強い塩素耐性を有すること、大きさが5 μmと小さく除去されにくいことから、水道水を介して集団感染に至ることがある。一方のレジオネラ属菌はグラム陰性の細菌で、水環境中のバイオフィームで原生生物に感染して増殖し、飛沫感染してヒトに重篤な肺炎を引き起こす。しばしば浴槽水、冷却塔水が原因で集団感染となることから問題とされている。いずれの病原体にしても対応は容易ではなく、検査法や対策は発展の余地がある。

2. クリプトスポリジウム

2.1 クリプトスポリジウムとは

原虫(真核単細胞生物)の1種であるクリプトスポリジウムは、腸管上皮細胞に寄生し、非血性の下痢症を引き起こす¹⁾。塩素消毒への抵抗性により、水道を介した集団感染の危険があることから、とくに水系感染症として問題にされている。1993年の米国ミルウォーキーの水道水を介した水系集団感染では、感染者は40万人におよんだとされる²⁾。日本では1996年に埼玉県越生町の水道水を介した集団感染で、地域住民の6割強の8,800人が発症したとされる³⁾。噴水や水泳プールの親水施設等を介した水系感染もあり、2004年に長野県で発生した事例では、プールの利用者など288人が症状を訴え

た⁴⁾。食品を介した事例もあり、灌漑や農作物の洗浄に汚染のない安全な水を使用したり、加熱調理を徹底することが必要である。患者、乳幼児の汚物処理や、患者や動物との触れ合いといった直接接触感染があり、性感染症の1つともされる。

水道を介した水系感染は社会的、経済的な影響が大きく、国内でも水道におけるクリプトスポリジウム検査法が整備されている(平成19年3月30日付け健水発第0330006号厚生労働省健康局水道課長通知、平成24年3月2日一部改正)。感染症法による届出が整備され、クリプトスポリジウムは5類感染症の全数把握疾患である。原虫類の感染事例は、海外では多数の報告がある一方、国内では積極的な検査がされず、届出は年間10数例と少ない⁵⁾。下痢症に対する検査体制の整備が必要と考えられる。

クリプトスポリジウムに感染すると、糞便中に感染型のオーシストが多数排出される。1オーシストの摂取で4~16%の感染確率と計算され⁶⁾、わずかな糞便汚染、すなわち少ない数で感染が成立する。前述のとおり、消毒に抵抗性があり、オーシストが小さく除去が困難である。潜伏期間は、国内のクリプトスポリジウム集団感染で6日(4~8日)と長く⁷⁾、原因となった飲食物が残らず原因究明は困難となることが多い。症状は通常1~2週間で改善するが、その後も60日間と長期にオーシストが便に排出されることがあり、下痢から回復した後も汚染源として注意を要する⁸⁾。本症の特効薬は未だ知られておらず、健常者においては脱水に対する対症療法が基本である⁹⁾。クリプトスポリジウム属の遺伝子解析の結果から、国内では、*C. hominis*(ヒト型)、*C. parvum*(ウシ型)、*C. meleagridis*(トリ型)の順に感染事例が多い¹⁰⁾。排水処理の徹底により河川水環境の安全性向上や浄水処理への負荷低減が求められる。

2.2 検査法

2.2.1 遺伝子検出法

環境水ならびに下痢症の検査は、当初より顕微鏡による形態学的検査が行われていたが、最近になって遺伝子検出法が実用化され¹¹⁾、平成24年4月から前述の水道における検査法に追加された。水道クリプトスポリジウム検査は河川水10L中にわずか一つのオーシストをも検出する難しい検査であるが、遺伝子法が実施可能になった要点としては大きく分けて以下の5点が挙げられる。すなわち、1.免疫磁気ビーズ法で阻害物質を徹底除去、2.固いオーシストから核酸を効率よく抽出、3. DNAではなくコピー数の多いrRNAを標的として高感度を達成、4. それにより1反応の使用量が少量で済み、再反応、異なる遺伝子法の相互検証で信頼性を確認、5. 検証に複数機関の協力が得られた、ことである。



Shinji Izumiya

平成9年 埼玉大学大学院理工学研究科修士課程修了
同年 株式会社池田理化企画学術課社員
13年 国立感染症研究所寄生動物部第一室研究員
17年 同研究所寄生動物部主任研究官博士(工学)



Toshiro Kuroki

昭和55年 東京農工大学農学部卒業
57年 カリフォルニア大学デイビス校疫学予防医学科大学院修了
58年 東京農工大学農学研究科修了
同年 神奈川県衛生研究所細菌病理部技師
平成5年 同研究所細菌病理部主任研究員
21年 同研究所微生物部専門研究員
23年 同研究所企画情報部長獣医学博士

* Countermeasures against Waterborne Infections Caused by *Cryptosporidium* and *Legionella*

遺伝子法が実施可能になったことで、これまでのオーシスト数ではなく、標的遺伝子のコピー数と塩基配列といった質的に異なる情報が得られるようになった。これにより、これまで曖昧だった病原体の汚染源あるいは排出源とその責任を検討したり、感度が足りていればmRNAを標的として活性を評価したり、多数の試料を並行して検査したり、抽出試料の冷凍待機と輸送、高頻度検査による汚染の推移把握を可能にすると考えられる。顕微鏡法と遺伝子法は検査の原理が異なるので結果が必ずしも1:1対応しないかもしれないが、現状では顕微鏡法を遺伝子法が補完すると期待される。

2.2.2 粉体ろ過法

クリプトスポリジウム症は潜伏期間が長く、過去にさかのぼる原因調査は必ずしも容易ではない。米国ミルウォーキーにおける集団感染では、配水地区で保存されていた水からクリプトスポリジウムの検出がなされた²⁾。オーストラリアでは、シドニーでのクリプトスポリジウムによる水道汚染問題¹²⁾が生じたことを契機に、試料水の保存が提案された¹³⁾。ちなみに食品の分野では、大量調理施設等において検査の保管が推奨され(大量調理施設衛生管理マニュアル, 平成9年3月24日付け衛食第85号別添, 平成25年2月1日改正), 自治体の条例により義務付けられている。飲料水の安全をより確かなものにするため、日本の水道でも浄水あるいは浄水濃縮試料の保存が推奨された(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, 健水発第0330005号)。

試料水の簡便な濃縮保管方法として、ハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキろ過の方法(粉体ろ過法)が開発された¹⁴⁾。この方法では、平面的なメンブレンフィルターとは異なり、立体的に積層されたろ過層(1~2 mmの厚さ)で濃縮を行う(図1)。この方法はろ過水量の増加、標準的な冷蔵庫でコンパクトに濃縮物の保存、非常時に濃縮済み試料から素早く試験を開始、ろ過層の溶解除去に塩酸を使用して従来の有機溶剤の使用を回避する利点がある。ろ過濃縮後は粉体を酸で溶解し、遠心濃縮でろ過濃縮物を取り出すことができる。直径35 mmのろ過層1つで多量(≥100 L)の水道水の濃縮、原水への応用では直径90 mmのろ過層1つで濁度

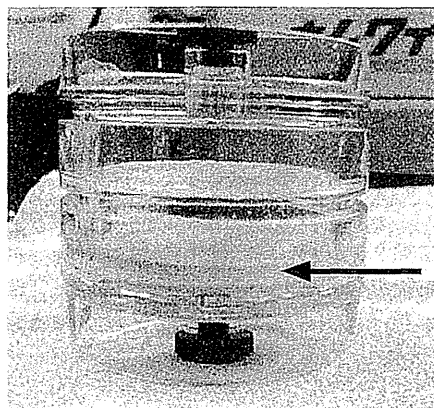


図1 粉体ろ過法のケーキろ過層
使い捨てプラスチック容器内にハイドロキシアパタイトを積層して形成された直径35 mm, 厚さ1~2 mm程のろ過層(矢印)。

10度未満の河川水試料10 Lの濃縮が目安である。試料水を自動的に濃縮する装置もすでに開発されている。原水試験では免疫磁気ビーズ法による精製操作を行う。浄水の場合は溶解物の一部使用で従来の20 L分の試験に足り、夾雑物を避けるために複数枚の観察用フィルターに分けて染色観察することで、回収率の問題を回避しつつ最短の試験が可能である。万が一水道水の汚染が疑われても、過去に配水された試料にさかのぼって繰り返し検査が可能となった。

2.3 対策

UVや膜処理等の高度処理により、クリプトスポリジウムの不活化・除去が可能である¹⁵⁾。国内では小規模の浄水処理施設を中心に導入が進められている。とくに小規模な施設は、ろ過施設がなかったり、塩素管理が不十分で細菌・ウイルス感染の発生事例もあることから、これらの対策は有効と考えられる。大規模な施設ではろ過施設を有しておりクリプトスポリジウムは除去されるが、一時的な高濃度汚染に対する不安があったり、ろ過処理の失敗などから事故につながるため、水安全計画(水道版HACCP)に則り、原水の状況把握とろ過処理の適切な実施によって安全な飲料水の供給に努めることとなる。

3. レジオネラ

3.1 レジオネラ属菌とは

レジオネラ属には50以上の菌種があり、その中で*Legionella pneumophila*による感染の報告が9割程度と多いが、他の菌種の症例も報告される¹⁶⁾。症状は大きく分けて、インフルエンザ様のボンティアック熱と、重篤なレジオネラ肺炎がある。レジオネラ症は米国フィラデルフィアで生じた肺炎の集団発生として1976年にはじめて認知された¹⁷⁾。ホテルの冷却塔が感染源と推定され、肺炎患者221名が発生し、そのうちの29名が死亡した。国内では2002年の宮崎県の温泉施設で発生した推定感染者数295名、うち7名が死亡した事例が最大の集団感染で、循環式浴槽が感染源であった¹⁸⁾。レジオネラ症は感染症法の4類の全数届出疾患に指定され、近年では年間900件の届出があり、そのうち50件前後の死亡がある(図2)。国内の感染源として問題となるのは主に浴槽水で、バイオフィーム中で自由生活性アメーバ

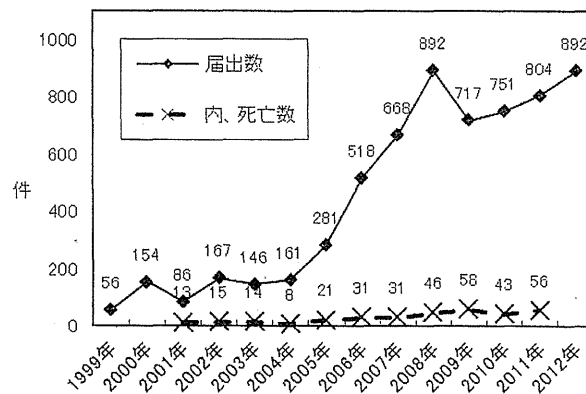


図2 レジオネラ症届出数の年次推移
レジ情報(高橋幸雄氏によるメーリングリスト)より許可を得て転載。一部に未確定と欠損あり、追加届があると遡及して修正されることがある。

等の原生物に感染したレジオネラが増殖し、エアロゾルとなって肺に吸入されたり、誤嚥や溺水することで感染する。旅館業、公衆浴場の水質基準では検出されないこととされる（公衆浴場における水質基準等に関する指針、平成12年12月15日生衛第1811号厚生省生活衛生局長通知、平成15年2月14日一部改正）。他に冷却塔水、超音波式加湿器、修景水、給湯水等がエアロゾルの発生源として問題となり、腐葉土の吸引による感染報告事例もある。ヒト-ヒト感染はない。

3.2 検査法

2000年の新感染症法の施行以来、年々報告数が増加した理由としては、この間に尿中抗原検査（尿中抗原検査の保険収載は2003年4月1日、日本呼吸器学会成人市中肺炎診療ガイドラインでは2005年10月に中等度以上の肺炎で尿中抗原検査）、ならびに喀痰からの遺伝子検査法（核酸同定検査の保険収載は2011年10月1日）が普及し、肺炎の原因が究明されるようになったことがある。従来のレジオネラ属菌の培養には、活性炭の入った特殊な寒天平板培地（BCYE_a, WYO_a, GVPC等）が用いられて1週間程度の培養時間を要し、検査は容易ではなかった。これまでに臨床検体の迅速検査法が先行し、以下に紹介する環境試料の検査法は開発・導入されつつある。

浴槽水の最も迅速な検査として、その場で計測可能なATP測定が提案された¹⁹⁾。これはルシフェラーゼ発光でATPを高感度に測定するもので、自由生活性アメーバの餌となる雑菌の増殖をATP量で検出し、汚染の指標として利用する。

次にレジオネラに特異性の高い迅速検査として、やはり遺伝子検査法に期待が寄せられている。消毒等によって死滅した菌のDNAも検出されることから、現状ではこの性質を理解した上で、営業停止処分された施設の再開に活用されている²⁰⁾。すなわち、死菌DNAが遺伝子増幅で検出されなければ、生菌は培養検出されない。液体培養法（Liquid Culture）と逆転写PCR法を組み合わせた高感度なLC-RT-PCR法や、EMA処理（Ethidium MonoAzide）により死菌を抑えて生菌の選択的検出を行うEMA-PCR法と、これらの応用によるLC-EMA-PCR法の開発も進められており、いずれも応用が期待される^{21, 22)}。

浴槽水消毒の効果判定を目的として、フローサイトメトリーを応用した迅速評価法が提案された²³⁾。この方法では雑菌の死滅による蛍光粒子の消失を、消毒効果の指標としている。浴槽水の種類や泉質に関わらず、消毒効果を分単位で判定して消毒の調整にフィードバックすることが可能となる。

確度よく早期にコロニーを検出する方法として、斜光法が提案されている²⁴⁾。寒天平板培地の培養3日目から7日目間に、実体顕微鏡下で新たな集落の発育を注意深く観察していると、レジオネラのコロニーにはカットグラス様の模様が観察され、他の雑菌と区別することができる（図3）。レジオネラ属菌の感染源調査等の分子疫学的解析にはパルスフィールドゲル電気泳動や塩基配列決定が行われ、菌株確保のための培養は必須である。

3.3 対策

本稿では浴槽水の消毒に関する進展に集中して記載する。

循環式浴槽は、管理を怠れば入浴者の汚れが目の届かないろ過器に蓄積され、レジオネラ属菌の培養器となる。湯を落とさずに1週間にわたって少量の温泉を追加し続けるみなし掛け流し式では、浴槽でバイオフィームとレジオネラが発生する。浴槽施設でレジオネラ症集団感染が繰り返されたことを受けて、浴槽水の塩素消毒が緊急避難的に導入され（レジオネラ症を予防するための必要な措置に関する技術上の指針、厚生労働省告示第264号平成15年7月25日）、高濃度塩素で徹底洗浄するなどの対応が提案された²⁵⁾。しかし、井水や温泉水の遊離残留塩素消毒は簡単ではなく、アンモニア態窒素によって塩素消費が過大となったり、高pHの条件下で消毒効果が低下したり、薬湯成分と塩素が反応する等、入浴施設を管理しきれない場合が生じていた²⁶⁾。臭気が敬遠されて塩素消毒が徹底されない恐れもあり、代替消毒法が求められていた。

こうした状況下、モノクロラミン消毒が着目された²⁷⁾。アルカリ性pHかつアンモニア過剰の条件下でアンモニアと次亜塩素酸を反応させると、結合塩素の1種であるモノクロラミン（NH₂Cl）が生成され（NH₃ + HClO → NH₂Cl + H₂O）、消毒効果が得られる。モノクロラミンは不安定なことから、現場で生成する操作を要する。アンモニアの不足やpHが酸性側になると、ジクロラミン、トリクロラミンが生成して臭気を発するので注意を要する。

米国の水道ではモノクロラミン消毒が、バイオフィーム対策および消毒副生成物対策として、2005年時点で3割の施設に導入の実績があり²⁸⁾、また、給湯系のレジオネラ対策には遊離塩素に比べてモノクロラミンがより有効であるとの報告がある²⁹⁾。日本の水道でも結合残留塩素による消毒は0.4 mg・L⁻¹以上、著しく汚染の恐れがある場合1.5 mg・L⁻¹以上と規定され（水道法第22条に基づく水道法施行規則第17条第1項第3号）、この結合残留塩素はモノクロラミンと想定される。

モデル浴槽でモノクロラミン消毒が検討された結果、同じ浴槽水を2週間にわたって循環使用してもレジオネラ属菌とアメーバは検出されず、従属栄養細菌数も低く抑えられていた²⁷⁾。塩素臭の主因と言われるトリクロラミンは検出されず、入浴者から塩素臭がほとんどないと感想も得られた。現在までに複数の営業入浴施設にお

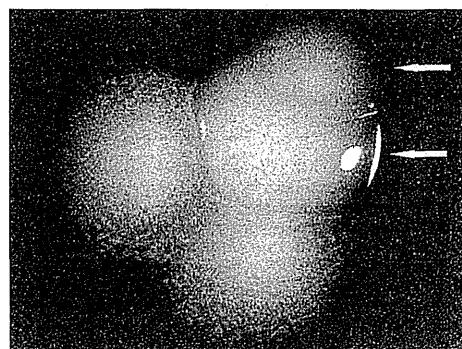


図3 斜光法によるレジオネラ属菌の実体顕微鏡観察像²⁴⁾。カットグラス様の模様が入ったレジオネラ属菌のコロニー（左と下の2つ）、他の菌のコロニー（右上の2つ、矢印）が観察される（森本氏、環境感染誌より許可を得て転載）。

いてモノクロロミンの有効性が実証されつつあり、活用が期待されている。静岡県では平成25年4月から浴槽水の消毒方法として、モノクロロミンを追加した新たな条例が施行される予定とのことである（(仮称) 静岡県公衆浴場法施行条例）。

4. おわりに

クリプトスポリジウムとレジオネラのいずれにしても、水環境の適切な管理が求められており、一朝一夕に解決されるような状況にはないと思われる。経済的な制約だけでなく、多方面の利害関係が絡む問題でもある。感染症の発生を抑えて管理していくためには、ユーザーサイドを含むあらゆる関係者の理解と協力が必要であり、研究や課題を解説しながら、この場を借りて協力をお願いする次第である。

参考文献

- 1) Fayer, R. (2008) General Biology, in "Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. 2nd ed." (Ed. Fayer, R. and Xiao, L.), pp.1-42. Boca Raton, FL, CRC.
- 2) Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B. and Davis, J. P. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, 331 (3), 161-167.
- 3) 埼玉県衛生部 (1997)「クリプトスポリジウムによる集団下痢症」-越生町集団下痢症発生事件-報告書 (平成9年3月), pp.102-106. 埼玉県, 埼玉.
- 4) 高木正明, 島海宏, 遠藤卓郎, 山本徳栄, 黒木俊郎 (2008) プール水を介したクリプトスポリジウム症集団発生事例, 感染症学雑誌, 82 (1), 14-19.
- 5) 八木田健司, 泉山信司 (2008) 国内外におけるクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症の発生動向の現状と比較, 第68回日本寄生虫学会東日本支部大会, 2008年10月4日浜松市
- 6) USEPA (2006) National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule: Final Rule, 71 FR 654, pp.662.
- 7) 泉山信司, 遠藤卓郎 (2005) わが国で発生した *Cryptosporidium* 集団感染に関する考察, *Clinical Parasitology*, 16 (1), 58-60.
- 8) 山本徳栄, 森田久男, 森永安司, 川名孝雄, 砂押克彦, 山口正則, 丹野瑛喜子 (2005) クリプトスポリジウム症患者における臨床症状とオーシスト排出の推移, 病原微生物検出情報 (IASR), 26, 170-171.
- 9) 水野泰孝 (2010) クリプトスポリジウム症, 「寄生虫薬物治療の手引き改訂第7版」(輸入熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬を用いた最適な治療法による医療対応の確立に関する研究班), pp.15-16, ヒューマンサイエンス振興財団政策創薬総合研究事業, 東京.
- 10) Yagita, K., Izumiya, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T. and Endo, T. (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan, *Parasitol Res*, 87 (11), 950-955.
- 11) Inomata, A., Kishida, N., Momoda, T., Akiba, M., Izumiya, S., Yagita, K. and Endo, T. (2009) Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. *Water Science and Technology*, 60 (8), 2167-2172.
- 12) Stein, P. L. (2000) The Great Sydney Water Crisis of 1998. *Water, Air, & Soil Pollution*, 123, 419-436.
- 13) McClellan, P. Q. C. (1998) Sydney Water Inquiry Fifth Report; Final Report Volume 2, p.160. http://www.dpc.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0016/15361/05_Fifth_Report_-_Final_Report_Volume_2_-_December_1998.pdf (2013年3月8日時点).
- 14) 泉山信司, 遠藤卓郎 (2012) 粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発, 水道協会雑誌, 81 (9), 14-22.
- 15) Clancy, J. L. and Hargy, T. M. (2008) Waterborne: Drinking Water, in "Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. 2nd ed." (Ed. Fayer, R. and Xiao, L.), pp.305-333, Boca Raton, FL, CRC.
- 16) Diederer, B. M. (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J Infect*, 56 (1), 1-12.
- 17) Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C. and Brachman, P. S. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*, 297 (22), 1189-1197.
- 18) 河野喜美子, 岡田美香, 倉文明, 前川純子, 渡辺治雄 (2007) 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例, 感染症学雑誌, 81, 173-182.
- 19) 倉文明 (2010) 平成19～21年度総合研究報告書, 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業).
- 20) 浅野陽子 (2007) 核酸増幅法を用いた公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導について, 生活と環境, (1), 89-91.
- 21) 烏谷竜哉, 磯部純子, 中島洋, 泉山信司, 浅野由紀子, 矢崎知子 (2011) 平成22年度分担研究報告書: 液体培養 (Liquid Culture) 定量RT-PCR法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討, 「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 (研究代表者, 倉文明)」, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理総合研究事業).
- 22) Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Kura, F. and Watanabe, H. (2009) Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR, *Appl Environ Microbiol*, 75 (1), 147-153.
- 23) Taguri, T., Oda, Y., Sugiyama, K., Nishikawa, T., Endo, T., Izumiya, S., Yamazaki, M. and Kura, F. (2011) A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of *Legionella* in bath water, *J Microbiol Methods*, 86 (1), 25-32.
- 24) 森本洋 (2010) 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性, 日本環境感染学会誌, 25 (1), 8-14.
- 25) 杉山寛治 (2008) 循環式浴槽の衛生管理-フィルター・リフレッシュ法の有用性, 温泉工学会誌, 30 (2-3), 98-104.
- 26) 村上光一, 長野英俊, 野田多美枝, 濱崎光宏, 堀川和美, 石黒靖尚, 乙藤武志, 迎田 恵之, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎 (2008) 浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アเมอร์バの関連, およびレジオネラ属菌を塩素消毒により制御する場合の問題点, 防菌防微, 36 (11), 749-756.
- 27) 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣邦雄, 遠藤卓郎 (2010) モノクロロミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策, 保健医療科学, 59 (2), 109-115.
- 28) Seidel, C. J., McGuire, M. J., Summers, R. S. and Via, S. Have utilities switched to chloramines?, *J Am Water Works Assoc*, 97, 87-97.
- 29) Flannery, B., Gelling, L. B., Vugia, D. J., Weintraub, J. M., Salerno, J. J., Conroy, M. J., Stevens, V. A., Rose, C. E., Moore, M. R., Fields, B. S. and Besser, R. E. (2006) Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine, *Emerg Infect Dis*, 12 (4), 588-596.

水道統計を基にした水道事業者等における 農薬類の測定計画の解析

小坂 浩司^{1*}・浅見 真理¹・佐々木 万紀子¹・松井 佳彦²・秋葉 道宏³

¹国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究分野 (〒351-0197 埼玉県和光市南2-3-6)

²北海道大学大学院工学研究院 (〒060-8628 北海道札幌市北区北3条西8)

³国立保健医療科学院 (〒351-0197 埼玉県和光市南2-3-6)

* E-mail: kosaka@niph.go.jp

水道統計を基にして、国内1554全水道事業等(以下、水道事業)を対象に農薬類の測定実態を解析した。農薬類の年間測定回数が多い水道事業ほど測定農薬類数が多い傾向や、測定が年1回であっても、農薬類が検出される傾向が高い春期～夏期に測定を行っているなど適切な水質管理の側面が見受けられた。一方、約50%の水道事業は農薬類測定を行っておらず、測定していた割合は、規模が大きい水道事業の方が高かった。農薬類測定を行っている水道事業の多くは年間測定回数が4回以下で、特に1回の水道事業が最も多かった。水質管理目標設定項目でリストされている第1候補群全102種を測定していた水道事業の割合は、原水、浄水でそれぞれ34%、38%で、それ以外では測定する農薬類の選定を行っていた。

Key Words : monitoring, pesticide, water supply, water utility

1. はじめに

農薬類は、水田など水環境に直接影響がある開放系で使用され、水源に流入することがあるため、水道において最も関心が高い化学物質群の一つである。世界保健機関(WHO)は26農薬類に飲料水水質ガイドライン値¹⁾を、米国環境保護庁(USEPA)は21農薬類に最大許容濃度を設定²⁾している。日本の場合、1992年度の水道水質基準改正³⁾で、4農薬類が水質基準項目に、15農薬類が監視項目に指定された。その後、2003年度の水道水質基準改正⁴⁾で、第1候補群と呼ばれる101農薬類が1項目として水質管理目標設定項目に指定された。なお、本研究では、農薬取締法⁵⁾における登録農薬(一部失効農薬を含む)、およびその分解生成物、農薬以外で衛生害虫駆除等に使用される薬剤の総称を農薬類とする。

2003年度の水道水質基準改正での農薬類に対する考え方⁶⁾は、各農薬類について検出値と目標値の比を求め、その和(検出指標値)が1を超えないこととするというものである。この改正で、水道水質基準は逐次改正方式⁷⁾となり、水質管理目標設定項目の第1候補群に含まれる農薬類数は、2007年度のフィプロニルの追加により102

種に⁷⁾、2012年度の農薬類の分類の見直しにより120種に改正された⁸⁾。2012年度の見直しでは、名称が第1候補群から対象農薬リスト掲載農薬類に変更された。また、目標値も、複数の対象農薬類について見直しが行われてきた⁹⁻¹²⁾。

水道事業者(簡易水道事業者、上水道事業者)および水道用水供給事業者は、水質管理目標設定項目の対象農薬類、あるいはそれ以外の農薬類について、水質検査および水源や原水等での水質試験を行い、その結果をホームページや水質年報等で公表している。このうち、簡易水道事業者を除く上水道事業者および水道用水供給事業者(以下、水道事業者等)の場合、これら農薬類の水質試験・水質検査結果(以下、測定結果)の中で、水質管理目標設定項目の対象農薬類は、(公社)日本水道協会による水道統計(水質編)で、浄水場ごとにそれぞれ整理されている。水道統計(水質編)¹³⁾では、各浄水場における各農薬類の最高値や平均値の分布も示しているため、全国での検出状況の情報を得ることができる。

ところで、農薬類は水質基準項目ではないため、測定実施の判断は水道事業者等に任せられており、年間測定回数も規定されていない。また、農薬類は対象とする病

害虫に応じ散布される地域が異なるため¹⁴⁾、測定を行う農薬類は、各水道事業者等がその地域の状況を勘案して適切に選定するものとされている⁴⁾。農薬類は、時期によって検出されやすさが異なることも報告されている¹⁵⁾。これらは、化学物質の検出状況を評価する場合、対象試料の測定計画の状況も踏まえる必要があるが、特に農薬類についてはその必要性が大きいことを意味している。

現在、水道事業者等は、水質検査の項目、測定回数、地点等を示した水質検査計画を毎年度策定し、公表することとなっている¹⁶⁾。このため、測定計画に関する情報の多くは水質検査計画から入手できるが、全国の水道での状況は明らかとなっていない。水道統計（水質編）では、各浄水場での年間測定回数は記載されているが、測定日は示されていない。また、各農薬類の測定浄水場数は示されているが、各水道事業者等（あるいは各浄水場）で測定農薬類数ほどの程度であったのか、水質管理目標設定項目の対象農薬類のうち、どの農薬類が測定対象に選定されていたのか等の情報は整理されていない。今後の農薬類の測定のあり方を考える場合、農薬類の全国的な検出状況の把握は重要であるが、一方、測定計画の全国的な状況の把握も重要であると考えられる。

本研究では、全国の水道事業者等での農薬類の測定計画（測定を行っていた水道事業者等数、測定農薬類数、年間測定回数等）の実態を明らかにすることを目的に、水道統計（水質編）¹³⁾を基にした解析を行った。このとき、水道事業者等の規模や地域による差異についても検討した。農薬類は春期～夏期に検出される傾向が高いことが報告されているため¹⁵⁾、農薬類測定月も調査した。

2. 調査方法

(1) 調査対象

水道事業者等での農薬類の測定計画は、2009年度を調査対象に、水道統計（水質編）¹³⁾を基に解析を行った（以下、水質管理目標設定項目の対象農薬類を2009年度の名称である第1候補群の農薬類と呼ぶ）。調査対象となる農薬類数は102種であった。水道事業者等は複数の水道事業等（上水道事業および水道用水供給事業、以下、水道事業）を有している場合がある。水道統計では、水道事業者等ではなく水道事業を単位として集計しているため、本研究でも水道事業を単位とした。

水道統計（水質編）¹³⁾では、各水道事業の測定結果を浄水場ごとに公表している。本研究では、水道統計（水質編）に記載されていた6058全浄水場と上水道事業に統合中の幾つかの簡易水道事業の浄水場を対象に、各浄水場の測定結果を整理し、水道事業ごとの結果とした（次

の(2)を参照）。これは、農薬類は水質基準項目ではないため、測定は義務とはなっておらず、複数の浄水場を有している水道事業では、全浄水場で測定を行っている場合がある一方、水系が類似している浄水場のうちの1浄水場を測定対象にしたり、最も検出されるおそれが高い浄水場を測定対象にしたり等、農薬類の測定にあたり、浄水場の選定を行っていた場合があると考えられたためである。すなわち、浄水場ではなく水道事業を対象とした方が、水道事業者等の測定計画を評価する上でより適切であると考えたことによる。

水道統計（水質編）¹³⁾では、測定試料として、原水、浄水場出口水、給水栓水、浄水（給水栓水等）に分類している。本研究では、原水と浄水（給水栓水等）（以下、浄水）を対象とした。

(2) 年間測定回数、測定農薬類数

複数の浄水場を有する水道事業で、第1候補群の各農薬類の年間測定回数が浄水場によって異なっていた場合、各浄水場での年間測定回数の最大値を、水道事業におけるその農薬類の年間測定回数とした。水道事業における農薬類の年間測定回数は、各農薬類の年間測定回数の最大値とした。水道事業における測定農薬類数は、年1回以上いずれかの浄水場で測定を行っていた農薬類数とした。上水道事業に事業統合中の簡易水道事業の場合、関連情報（浄水量、取水量、地下水量）は、一部2008、2010年度のデータを用いた。

水道統計（水質編）¹³⁾では、水道統計（施設業務編）¹⁷⁾と異なる集計方法で記入されるなど不整合が認められる場合があった。そこで、次の①～⑩に該当する場合、必要に応じて水道統計（施設業務編）¹⁷⁾や全国簡易水道統計¹⁹⁾の確認、水道事業者等のホームページに掲載されていた水質検査計画や水質検査結果の確認、水道事業者等への電話による聞き取りやアンケート調査を行い、データを修正した後に解析に用いた。なお、これら調査を全対象水道事業について行っては行っていないので、水道統計（水質編）全ての修正必要箇所が修正されているとは限らないことを付記しておく。

- ①調査対象水道事業の確定にあたり、水道統計（施設業務編）¹⁷⁾と（水質編）¹³⁾で比較を行ったが、このとき一方のみに記載されていた場合
- ②著者らの知る限りでは農薬類測定を行っていたと考えられるが、その結果が記載されていなかった場合
- ③農薬類測定を行っていなかった水道事業の幾つかに、その理由を調査した場合
- ④農薬類測定を行っていた水道事業の幾つかに、測定月等の調査をした場合
- ⑤原水と浄水での農薬類の年間測定回数が異なっていた

場合

⑥原水と浄水での測定農薬類数が異なっていた場合

データの修正等にあたり、本研究での定義付けが必要と考えられた場合もあった。その定義付けを示す。

⑦調査対象水道事業に含めるかどうかの判断

- ・簡易水道事業が上水道事業と事業統合中であった場合、簡易水道事業として水質検査を行っていたため水道事業に含めた（ただし、農薬類の測定の有無によらず）。
- ・計画段階の水道事業で、2009年度は給水未開始であった場合、水道事業に含めなかった。
- ・取水から浄水場への原水供給までが水道事業の範囲の場合、水質検査は水道事業の対象外であったため、水道事業には含めなかった。
- ・上水道事業と水道用水供給事業を行っている水道事業者等が、その両方に記載されていた場合、一方の水道事業に統一した。

⑧複数の水源の水を原水としたり、複数の系統を有する浄水場での農薬類の年間測定回数

- ・複数の水源の水が混合された後の水ではなく、ある水源の水についてのみ測定を行っていた場合、混合された後の水と同様に原水の測定とした。
- ・同時期に複数の水源の水それぞれについて測定し、その数を測定回数としていた場合、その時期の原水の測定回数は1回に修正した。
- ・同時期に複数の系統の浄水それぞれについて測定し、その数を測定回数としていた場合、その時期の浄水の測定回数は1回に修正した。

⑨農薬類測定は行っていたが、水道統計（水質編）に反映されていなかった場合、水道事業者等の水質検査計画（それに類する計画）に基づくものであったときには、測定を行っていたとした。ただし、水道統計（水質編）では、水質検査計画に基づいた測定結果のみを集計していたかは不明である。

⑩水道事業者等の水道事業が、水道統計（施設業務編）¹⁷⁾と（水質編）¹³⁾の両方で複数の水道事業に分類されていた場合、複数の水道事業を有していると判断した。一方、水道統計（施設業務編）¹⁷⁾と（水質編）¹³⁾での分類が異なっていた場合、確認調査により、複数の水道事業を一つにとりまとめていた場合、測定結果を水道事業ごとに整理し、一つの水道事業を複数の水道事業に分けて記載していたと判断した場合、測定結果を一つの水道事業にとりまとめた。全対象水道事業は1554となった。

(3) 農薬類測定月

農薬類測定月は、水道統計（水質編）には記載されていない。水道事業を、原水（浄水）での農薬類の年間測

定回数が1, 2~9, 10回以上のグループに分類し、それぞれのグループから23, 13, 19水道事業を任意に選んで、①~③のいずれかの方法により、農薬類測定月を調査した。①の場合、2009年度の情報を優先したが、他年度の情報しか入手できなかったときには、その情報を用いた。

- ①水道事業者等のホームページに掲載されている水質検査計画、水質検査結果、水質年報等
- ②電話による聞き取り調査
- ③アンケート調査

(4) 水道事業の規模や地域による分類

規模による水道事業の分類は、水道事業認可者（大臣認可/知事認可）あるいは給水人口により行った。ただし、2009年度から道州制特区²⁰⁾により大臣認可の水道事業がなくなった北海道については、2008年度時点での認可者により分類した。知事認可の上水道事業や簡易水道事業が大臣認可の上水道事業と事業統合中の場合、事業統合前の認可状態に統一した形でデータを修正した。なお、水道事業等の認可の手引き²¹⁾では、大臣認可の水道事業は給水人口が5万人を超えた上水道事業および1日最大給水量が25000m³を超えた水道用水供給事業と定義され（一部、対象外の場合あり。水道用水供給事業の給水量は浄水量を意味する）、知事認可の水道事業より規模が大きい。給水人口により水道事業を分類する場合、上水道事業のみを対象とした。

地域によって水道事業を分類する場合、農薬類の分類見直しの基礎資料における分類を参考に²²⁾、全国を北海道、東北、関東、北陸、東海、近畿、中国、四国、九州、沖縄の10ブロックに分類した。

(5) その他の調査

(2)、(3)の電話による聞き取り調査やアンケート調査に併せて、農薬類の測定計画に関連した以下の事項を調査した。ただし、これらは聞き取り調査やアンケート調査に常に付随したわけではない。

- ①測定を行った農薬類の選定理由
- ②原水、浄水のいずれかで農薬類の年間測定回数が多かった場合（一方のみで測定を行っていた場合）の理由

3. 結果および考察

(1) 農薬類の測定実施状況と年間測定回数

1554の全対象水道事業のうち、原水、浄水で農薬類測定を行っていた水道事業数の関係を図-1に示す。原水、浄水で測定を行っていた水道事業数はそれぞれ644

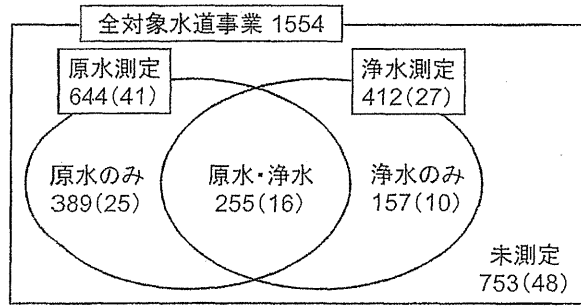


図-1 農業薬類測定を行っていた水道事業数 [括弧内の数値は割合 (%)]

(41%) , 412 (27%) で、原水で測定を行っていた水道事業数の方が多かった。両方で農業薬類測定を行っていた水道事業数は255で、その割合は16%であった。原水、浄水のいずれかで農業薬類測定を行っていた水道事業数は801で、約50%の753では未測定であった。

図-2 (a), (b)に、それぞれ原水、浄水での農業薬類の年間測定回数の分布を示す。原水、浄水のいずれも農業薬類の年間測定回数は1~38回の範囲であり、最も多かった水道事業は奈良県水道用水供給事業であった。続いて年間測定回数が多かった水道事業は、久留米市水道事業(原水、浄水:32)、神奈川県内広域水道企業団水道用水供給事業(原水:22)、福岡地区水道企業団水道用水供給事業(原水、浄水:18)であった(括弧内は対象試料とその年間測定回数)。

年間測定回数が1回の水道事業数は、原水では366(57%)、浄水では217(53%)であり、農業薬類を測定している水道事業の約50%は年間測定回数が最小の1回の測定であった。続いて、年間測定回数が2,4回の水道事業の数が多く、農業薬類測定を行っていた水道事業のうち4回以下であった割合は、原水では91%、浄水では81%であった。逆に、原水での年間測定回数が10回以上の水道事業の数(割合)は20(6%)、浄水でのそれは15(5%)で、僅かであった。

水道水質基準項目は、項目ごとに年間の測定回数が規定されており、基本的項目(一般細菌、大腸菌、全有機炭素、塩化物イオン、pH値、濁度等9項目)を除くと3ヶ月に1回以上、すなわち年4回以上となっている¹⁹⁾。したがって、農業薬類の測定を行っていた水道事業の多くは、水道水質基準項目より測定回数を少なくしていたと言える。農業薬類の検出されやすさは、時期によって異なることから¹⁹⁾、測定回数が少ない場合、特に、検出されやすい時期の把握とその時期での測定が求められる。一方、年10回以上測定している水道事業の場合、水道水質基準項目と同じ測定回数、あるいはそれよりも多い測定回数のところもあった¹⁹⁾。これらの水道事業では、農業薬類が検出されるおそれが高く、水道水質基準項目と同様また

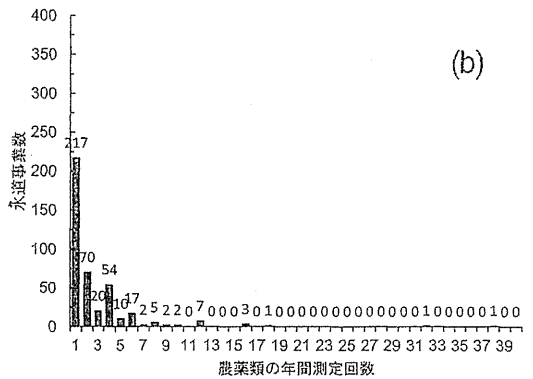
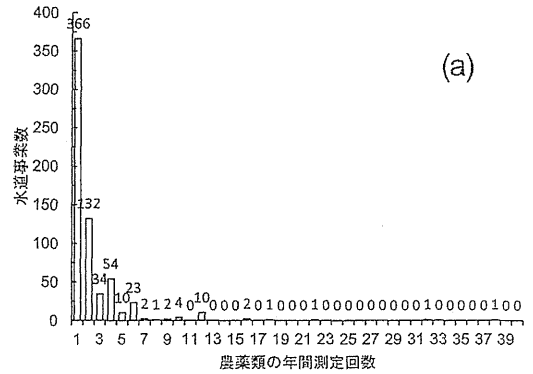


図-2 (a) 原水、(b) 浄水での農業薬類の年間測定回数に対する水道事業数の分布

表-1 原水、浄水の方が農業薬類の年間測定回数が多かった理由

測定回数が多かった試料	回答例
共通	・ 県の水質管理計画に基づいているため
原水	・ 原水の方が検出される可能性が高いため ・ 原水で調査しているが検出されなかったため、浄水では調査していない ・ 浄水では、農業薬類の形態が変化する場合もあるため ・ 農業薬類散布情報等を活用しており、取水側での監視を充実させているため
浄水	・ 最終的な安全性の観点から ・ 水質検査の基本は浄水であるため

はそれ以上に注視すべき項目として農業薬類を位置付けていると考えられた。加えて、測定回数が多いとそれだけ費用がかかるため、測定回数と規模には関連性があると考えられ、次の(2)で解析を行うこととした。

原水と浄水間で農業薬類の年間測定回数が異なっていたり、原水と浄水のどちらかのみで測定を行っていた水道事業について、その理由を調査し、表-1に結果をまとめた。原水での年間測定回数が多かった水道事業からは、原水の方が検出される可能性が高いためとの回答があった。これは、監視としての農業薬類測定をより重視していたためと考えられた。一方、浄水での年間測定回数が多

かった水道事業からは、安全性の確認のためとの回答があった。これは、水道水の水質保証としての農薬類測定をより重視していたためと考えられた。

(2) 水道事業の規模から見た農薬類の測定実施状況と年間測定回数

水道事業を水道事業認可者により分類し、農薬類測定の実況について評価した(表-2)。大臣認可、知事認可の水道事業のうち農薬類測定を行っていた割合は、原水

表-2 農薬類測定を行っていた水道事業数(水道事業認可者による比較)

分類	大臣認可	知事認可
対象水道事業数	504	1050
原水測定	349 (69)	295 (28)
浄水測定	265 (53)	147 (14)
両方で測定	200 (40)	55 (5)
少なくとも一方で測定	414 (82)	387 (37)
未測定	90 (18)	663 (63)

*括弧内の数値は割合(%)

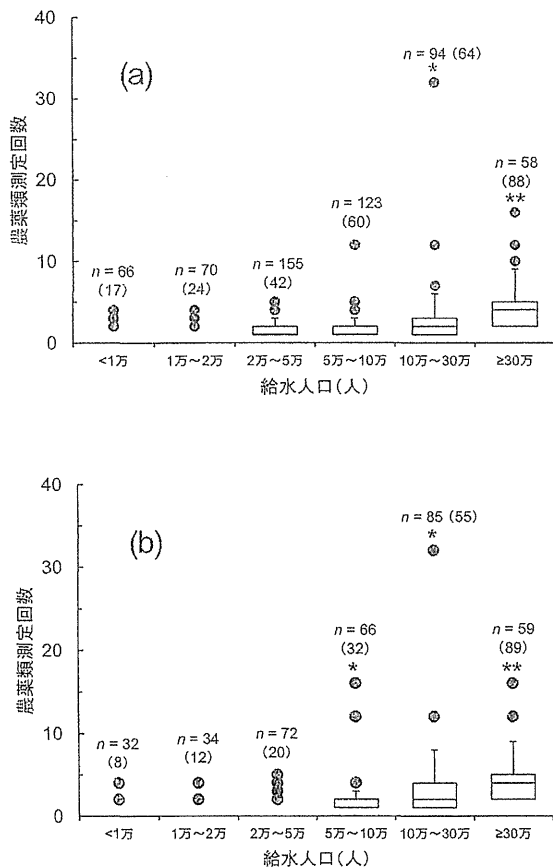


図-3 (a) 原水、(b) 浄水での上水道事業の給水人口と農薬類の年間測定回数の関係 [nは農薬類測定を行っていた水道事業数、括弧内の数値は割合(%)、*、**はそれぞれ一つ下位の分類と $p < 0.05$, 0.01 で有意差あり]

ではそれぞれ 69%、28%であった。浄水ではそれぞれ 53%、14%であった。原水、浄水の少なくとも一方で農薬類測定を行っていた水道事業の割合は、大臣認可と知事認可のそれぞれで 82%、37%で、その差は約 2 倍であった。規模が小さい知事認可の水道事業の方が、農薬類測定を行っていた水道事業数の割合は小さいことの原因として、事業規模が小さいため財政面も含め農薬類を測定する余裕がなかったこと、農薬類による汚染のおそれが少ない水を原水としていた場合が多かったこと等があげられるが、これについては次の(3)でさらに議論する。

次に、規模の効果をより詳細に見るため、給水人口によって水道事業を 1 万人未満、1 万人以上 2 万人未満、2 万人以上 5 万人未満、5 万人以上 10 万人未満、10 万人以上 30 万人未満、30 万人以上の 6 つに分類した。水道用水供給事業を除く、上水道事業のみを対象とした。

給水人口規模別で分類された各水道事業区分における、原水、浄水での農薬類の年間測定回数の分布を図-3 (a)、(b)に示す。合わせて、図中に、農薬類測定を行っていた水道事業数の割合を水道事業区分ごとに示した。この割合は、原水、浄水でそれぞれ 17~88%、8~89%の範囲であったが、給水人口が大きくなるのにしたがって増加した。表-2 では、規模が大きい大臣認可の水道事業の方が農薬類測定を行っていた結果が示されたが、図-3の結果から、上水道事業の規模と農薬類の年間測定回数の傾向がよりはっきりと示された。

ノンパラメトリックな方法であるマン・ホイットニーの U 検定で、図-3 (a)、(b)に示す隣り合う 2 つの区分間での農薬類の年間測定回数の平均順位の違いを検定した。原水、浄水のいずれも、5 万人以上 10 万人未満と 10 万人以上 30 万人未満の間、10 万人以上 30 万人未満と 30 万人以上の間で $p < 0.01$ あるいは 0.05 で有意差が認められた。加えて、浄水では 2 万人以上 5 万人未満と 5 万人以上 10 万人未満の間でも $p < 0.05$ で有意差が認められた。

ところで、給水人口が大きい上水道事業でも、農薬類測定を行っていなかった場合もあった。例えば、給水人口が 25 万人以上の場合、原水の農薬を測定してない水道事業数は 13、浄水では 9 であった。原水に関する 13 の内、1 上水道事業は給水人口が 100 万人以上であった。

(3) 水源と受水率から見た農薬類の測定実施状況

農薬を測定しないことの原因として水源を仮定し解析を行った。浄水量と給水量の比(浄水量/給水量)

(%)と取水量に占める地下水量の割合(地下水量/取水量)(%)をそれぞれ求めた。浄水量/給水量は、その値が小さい方が水道用水供給事業などからの受水の割合が高いことを意味しており、供給側で農薬類測定を行っていれば、測定を省略した場合もあったと推測したたり