

令和3年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究

研究代表者 松井 佳彦（北海道大学大学院工学研究院）

### 微生物(寄生虫等)に関する研究

#### 耐塩素性病原微生物の顕微鏡検査における精度管理の例

研究分担者	泉山 信司	(国立感染症研究所寄生動物部)
研究協力者	鎌田 智子	(神奈川県内広域水道企業団浄水部)
研究参加者	大杉 由利子	(神奈川県企業庁企業局)
研究参加者	宮本 雅史	(横浜市水道局)
研究協力者	藤瀬 大輝	(川崎市上下水道局)
研究参加者	古口 健太郎	(川崎市上下水道局)
研究参加者	森山 富美	(横須賀市上下水道局)
研究協力者	古川 紗耶香	(青森市企業局水道部)
研究協力者	安原 雄作	(九十九里地域水道企業団浄水課)
研究協力者	橋本 温	(県立広島大学生命環境学部)
研究協力者	黒木 俊郎	(岡山理科大学獣医学科)
研究協力者	井上 亘	(神戸大学大学院農学研究科)
研究協力者	中嶋 直樹	(神奈川県衛生研究所)

#### 研究要旨

水道におけるクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の検査は、水道原水 10L 中のわずか 1 つを顕微鏡で検出する容易ではない検査が行われている。手順が複雑かつ熟練を要する試験操作を伴い、検査結果は原水水質、検査手法、検査者の技量等により変動する恐れがある。しかし、他の試験検査と異なり、外部精度管理が導入されておらず、日頃から試験精度を把握している検査機関は少ないと推察される。本研究は、耐塩素性病原微生物の検査における精度管理を例示し、精度管理の環境が向上することを目的とした。河川表流水を水源とする某水道事業体では、検査技能の維持や精度の把握を目的とした訓練が年 1 回実施されており、その内容は参考になると言えた。陽性コントロールは、安価に頻回に使えるよう、Alexa594 標識した固定試料を用意した。試験精度を高めるため、陽性コントロールの取り扱い方法を統一した。施設間の比較には、同じ河川水試料を試験試料として統一して使用した。陽性コントロールを計数した結果、変動係数は概ね 20%以内であった。5 水道事業体の間で添加回収試験を行い、いずれも回収率は 50%以上、変動係数も 20%以内と良好であった。5 事業体は同一水系で取水しており、信頼性良く原水水質を共同監視できる体制が整っていると述べた。

## A. 研究目的

非血性の水様下痢を呈するクリプトスポリジウム症とジアルジア症は、糞便中に排出されたオーシストとシストの経口摂取により糞口感染する。いずれも塩素消毒に抵抗性があることから、水道水を介した感染が生じて問題となる。国内では、クリプトスポリジウムによる集団感染が町水道と貯水槽水道、ジアルジアは貯水槽水道において発生している<sup>1,2)</sup>。海外でもクリプトスポリジウムやジアルジアの水系集団感染が報告され、これら耐塩素性病原微生物の対策は、水道水における課題の一つとなっている<sup>3-6)</sup>。

対策には国内でよく使われている急速ろ過以外に、緩速ろ過、膜処理、紫外線処理と、これらの組み合わせが用いられることがある<sup>7)</sup>。ろ過の性能が低下したり、ろ過池で濃縮された汚染が水道水に入らないような、ろ過池の管理も必要とする。病原体の検査はリアルタイムな結果を得ることができないので、濁度計でろ過池をリアルタイムに監視したり、丁寧なろ過の開始と終了、洗浄の徹底といった対策が行われている。原水水質の監視が定期的に行われている。

水道のクリプトスポリジウム等検査法は、遺伝子検査も可能だが、今なお顕微鏡検査を基本としている<sup>7)</sup>。単に蛍光抗体で緑色に染色された粒子を、クリプトスポリジウムやジアルジアとして計数するだけでは済まず、その前に複雑な濃縮、精製の操作を経る必要がある。手順が複雑かつ熟練を要する試験操作を伴い、検査結果は原水水質、検査手法、検査者の技量等により変動する恐れが高い。しかし、クリプトスポリジウム等検査は、他の試験検査と異なり、外部精度管理が導入されておらず、日頃から試験精度を把握している検査機関は少ないと推察される。検査に係る指針「別添3 水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法」には、「付録1 精度管理のためのオーシスト添加実験」の項目があり、自主的な内部精度管理の実施が任さ

れている<sup>7)</sup>。施設間で行われたものとして10年以上前の記録になるが、利根川・荒川水系の水道事業者により精度管理の実施例が報告されていた<sup>8)</sup>。この中で当初のクリプトスポリジウム平均回収率は38%(8~80%)だったものが、翌年には平均63%(43~78%)と向上しており、このような取り組みを広く行うことが有用と考えられる。

そのような取り組みが直近に行われた例として、河川表流水を水源とする某水道事業者(以下、E水道事業者)における技能訓練について報告する。E水道事業者では検査技能の維持や精度の把握を目的とした訓練が年1回実施されていた。この訓練の延長として、同一水系で取水している5事業者間での添加回収試験を行い、検査結果を比較や共有できるものか、検討した。

## B. 研究方法

回収率算出用の陽性コントロールは、Alexa594標識のホルマリン固定クリプトスポリジウムオーシストを使用した<sup>9)</sup>。オーシストは*Cryptosporidium parvum*感染マウスの糞便より、シヨ糖浮遊法と塩化セシウム浮遊法で精製した。0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液の100 $\mu$ Lに浮遊した $10^5 \sim 10^6$ 個のクリプトスポリジウムを、Alexa594 (Alexa Fluor 594 carboxylic acid, succinimidyl ester, Invitrogen)と混合し、室温で1時間反応させることで標識した。過剰な色素を精製水との遠心洗浄で除去し、0.0005% Tween80を加えた10%ホルマリンで固定した後、冷蔵保管した。これを0.0005% Tween80溶液で約150個/200 $\mu$ Lとなるよう希釈したものを以下、陽性コントロールとした。

陽性コントロールは使用前に1分間ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、同時に複数回分取する際も、その都度攪拌を行った。陽性コントロールの操作はその都度、使用したピペットの吸入/吐出を繰り返し、チップを共洗いしてから必

要量を分取した。

添加回収試験における添加数を正確に求めるため、陽性コントロールを 2 回ないし 5 回、計数し、平均値を求めた。後述の添加試料の用意と同時に、1.5mL チューブに約 150 個/200  $\mu$ L を分取し、蛍光染色試薬 (EasyStain CG、BioPoint、以下、染色試薬) を添加し染色した (4°C、1 晩)。孔径 1  $\mu$ m、直径 25mm の親水性 PTFE メンブレンフィルター (H100A025A、ADVANTEC) を、染色・観察用フィルターとして使用した。このフィルターを減圧濾過ユニット (STU-11-SS、ADVANTEC) にセットし、染色済の陽性コントロールを吸引ろ過した。染色に用いたチューブには、洗浄と回収のため PBS を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌して、洗浄液を繰り返し吸引ろ過した。チューブの洗浄操作を計 5 回行い、減圧濾過ユニットのファンネル内を PBS で洗浄した後、染色・観察用フィルターを水系封入剤 (EasyStain CG 付属品) を用いてプレパラートに封入した。乾燥を防ぐために、ネイルエナメルでカバーガラスの四辺をシールした。蛍光微分干渉顕微鏡 (BX63, オリンパス) の倍率 200 倍 (対物レンズ 20 $\times$ ) を使用して、B 励起光下で緑色蛍光を発するオーシスト様粒子を陽性コントロールとして計数した。ばらつきを評価するため、標準偏差は、Microsoft Excel 2016 上で stdev 関数を使用して求めた。変動係数は、標準偏差を平均値で除して求めた。後述の添加回収試験では、下記の式により試験者ごとの回収率を算出した。

回収率 (%) = (添加回収試験における検出数 / 陽性コントロール平均値)  $\times$  100

t 検定は Microsoft Excel 2016 を使用して、「t-検定: 等分散を仮定した 2 標本による検定」を実施した。

E 水道事業体におけるクリプトスポリジウム検

査の訓練には、日常的な検査をしていないが年 1 回の訓練はしている職員 8 名「訓練対象者」と、現役の検査担当者 6 名「試験補助者」が参加し、必要により試験補助者は訓練対象者に試験操作方法を助言した。

河川水 (2021 年 10 月 21 日採水、濁度 2.5 度、あるいは 2021 年 11 月 18 日採水、濁度 1.3 度) を複数のポリ容器に 10L ずつ採水し、陽性コントロールを 200  $\mu$ L (クリプトスポリジウム約 150 個含む) ずつ添加することで、添加回収試験を行った。訓練は連続した 2 日に分けて行い、調製した試料水は室温 (約 20°C) で保管し、翌日の試験にも使用した。

クリプトスポリジウムの濃縮精製は、常法の PTFE メンブレンフィルター濃縮、免疫磁気ビーズ精製で行った<sup>10)</sup>。すなわち、試料水 10L を直径 90mm、孔径 5  $\mu$ m の親水性 PTFE フィルター (オムニポアメンブレンフィルター、メルク) でろ過濃縮した。フィルター補足物を PET 液 (精製水 1L 中、ピロリン酸ナトリウム 0.2g、エチレンジアミン四酢酸 3 ナトリウム 0.3g、0.1g Tween80 の水溶液) に懸濁し、遠心濃縮 (1,100G  $\times$  10 分) した。沈渣から免疫磁気ビーズ法 (DynaBeads GC-Combo, VERITAS) によりクリプトスポリジウムを精製した。精製後のクリプトスポリジウムは 1.5mL マイクロチューブに回収し、チューブ内で蛍光抗体染色した (37°C 30 分、または 4°C 1 晩)。ろ過濃縮から染色までは、同日内に実施した。検鏡を直ちに実施しない場合は冷蔵し、2 週間以内に検鏡した。

検鏡は、前述の陽性コントロールの計数と同様に行った。蛍光微分干渉顕微鏡の倍率 200 倍及び 400 倍を使用して、B 励起光下で FITC の緑色蛍光を発し、かつ G 励起光で Alexa594 の赤色蛍光を発するオーシスト様粒子を陽性コントロールとして計数した。赤色蛍光のないクリプトスポリジウム様粒子は、微分干渉像あるいは DAPI 染色像を観察し、河川水由来のクリプトス

ポリジウムとして計数した。

5 水道事業体間(A~E)の精度管理では、約 100~200 個/100  $\mu$  L となるよう陽性コントロールを作成し、10mL ずつ分注したものを各事業体に配付した。河川水(2021 年 12 月 14 日採水、濁度 1.9 度)を各事業体が持参したポリ容器に採水し、試料水とした。採水した試料水は冷暗所に保管し、1週間以内に試験した。試料水 10L に陽性コントロール 100  $\mu$  L を加え、各事業体の方法で試験した(図 1)。免疫磁気ビーズ(Dynabeads GC-Combo, VERITAS)は、同一ロットを使用した。事業体 B~E は、同日に陽性コントロールの計数と添加回収試験を行った。事業体 A は日を変えて試験を行った際、同日に計数した陽性コントロールの平均値を用いて、回収率を計算した。

## C. 結果及び考察

### C1. E 水道事業体の訓練~添加回収試験

試験補助者が代表して行った陽性コントロールの計数は、平均値が 120~130 個、変動係数が概ね 10%であった(表 1)。

訓練として行った添加回収試験の結果は、試験補助者、訓練対象者ともに回収率の平均値が 50%以上と良好であった(表 2)。試験補助者 4 名は、検査の担当年数が 1~4 年(平均 3 年)、回収率が 45%~61%(平均 53%)で、例数は少ないが経験年数と回収率の間に関連はなかった。経験年数が短くとも、日常的にクリプトスポリジウム検査を実施している職員については、一定の試験精度が保たれていると考えられた。一方、訓練対象者の回収率は 28%~87%(平均 56%)と、回収率のばらつきが大きかったものの、平均値は試験補助者 4 名の 53%と遜色なかった。変動係数は試験補助者、訓練対象者、全体がそれぞれ、12%、39%、32%で、訓練対象者では、日常的な検査から離れることで個人の技量の差が結果に大きく影響すると考えられた。全体とし

ては、年 1 回の訓練の成果として、技能が維持されていると言えた。

過去 10 年間の同訓練における回収率の推移は、若干の変動はあるものの、訓練参加者全体が 40~60%と概ね良好であった(図 2)。どちらかと言えば、訓練対象者の回収率は、試験補助者の回収率よりもやや低く、当然のこととして日常的に検査を実施している職員の方が回収率が高い傾向にあった。なお、同じ地点の河川水を用いて訓練してきたが、それでも年によって回収率の変動やばらつきは避けられないと考えられた。

毎年 1 名程度のこととして、回収率が 0%になることがあり、実際、参考までに併記した前回訓練時の 1 名が 0%であった(表 2)。わずかなミスで容易に失敗する試験であることを表していると考えられた。訓練と精度管理の必要性を、改めて指摘される内容であった。

### C2. 5 水道事業体の添加回収試験

陽性コントロールの平均値は、5 事業体全体で 157 個(変動係数 15%)であった(表 3)。130~170 個と若干幅があったものの、全体と各事業体の間に有意差はなかった( $p>0.05$ ,  $t$  検定)。変動係数はいずれも 20%以内と、有機物の一般的な精度管理において良好と判断される  $\pm 20\%$  の範囲内に収まっていた。

統一された同時採水の河川水試料ではあったが、試験時に確認した濁度は、1.4 から 2.3 と 1 度近い差が生じ、平均濁度 1.9、変動係数 21%であった(表 4)。

全試験者における回収率は、50%~99%の範囲にあり、平均回収率 78%、標準偏差 14、変動係数 18%であった(表 3、図 3)。回収率の変動は濁度の変動と遜色なく、難しい検査としては、良く揃っていると言えた。回収率は最大 2 倍の開きがあったものの、全ての試験者が概ね 50%以上の回収率を得ており、回収率の平均( $N=15$ )

78%は良好であった。

事業体別の平均回収率は 63%~95%で(図4)、事業体間に有意差はなかった( $p>0.05$ , t 検定)。

なお、添加回収試験に用いた統一試料の河川水から、元の河川水試料に由来するクリプトスポリジウムが 1~14 個検出された(表 3)。こちらは当初の目的外だったが、計数値が大きく変動しており、採水の偶然による変動が生じやすいこと、顕微鏡下の目視による判断の難しさが反映されたと考えられた。複数の検査者で判断したり(クロスチェック)、別の原理の検査(遺伝子検査等)で補うといった工夫が対策として考えられた。

成書には、「回収率が 30%以下の場合や、ばらつきが大きい場合には、試験操作ごとのチェックを行い、精度の向上を図る」と記載されている<sup>10)</sup>。本研究における添加回収試験の結果は、この成書の基準を達成していた。まず、全ての試験者が概ね回収率 50%以上であった。全試験者の変動係数 18%については、添加した陽性コントロールの変動係数が 15%、濁度の変動係数 21%を考慮すれば、ばらつきは大きくないと言えた。一方、回収率の範囲は最大と最小で 2 倍の開きがあり、常に回収率にこの程度の差が生じる可能性に留意する必要があると考えられた。

#### D. 結論

訓練の結果、検査技術の維持を確認できた。しかし、クリプトスポリジウム検査は煩雑な作業を要し、変動することがあり、定期的な訓練の必要性を改めて認識した。陽性コントロールと河川水試料を統一し、5 事業体間の添加回収試験を行い、回収率は概ね 50%以上と良好であった。試験者や事業体間で特段の問題はなく、検査結果の共有と比較が可能と考えられた。

#### E. 参考文献

1. 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(平成9年3月)

2. 岸田一則、石田篤史、本邦初のジアルジア集団感染事例について、平成23年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、茨城県土浦市
3. Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J, Långmark J, Löfdahl M, Omberg M, Reuterwall C, Samuelsson E, Widgren K, Wallensten A, Lindh J. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. *Emerg Infect Dis.* Vol.20, No.4, pp.581-589 (2014)
4. Nygård K, Schimmer B, Søbstad Ø, Walde A, Tveit I, Langeland N, Hausken T, Aavitsland P. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health.* 2006 May 25;6:141.
5. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007 Mar;5(1):1-38.
6. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 2011 Dec 15;45(20):6603-14.
7. 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課長. 「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」の一部改正について, 薬生水発 0529 第1号(令和元年5月29日)
8. 宮島裕子、藤田貴之、秋元克己、高橋真紀、熊谷美紀、寺澤英昭、島野猶一、阿部敏弘、野中貴子、野田功、利根川・荒川水系における原虫類共同調査、用水と廃水 50(8),

676-682, 2008

9. 稲田康志、木俣勲、塩出貞光、石本知子、井関基弘、プロテインラベリング法で蛍光標識したクリプトスポリジウムオーシストのオーシスト検出検査及び除去試験への適用、水道協会雑誌 73(6), 14-21, 2004
10. 日本水道協会(2003)親水性 PTFE ろ過ーボルテックス剥離法、クリプトスポリジウムー解説と試験方法ーより、日本水道協会、東京

#### F.研究発表

##### 誌上発表

1. 井上亘、萩田堅一、藤瀬大輝、橋本温、泉山信司、小規模下水処理場放流水の塩素抵抗性原虫調査、水道協会雑誌、90(11), 23-27, 2021
2. 橋本温、柳下真由子、小林謙介、泉山信司、水道水質関連調査データを用いた水源のクリプトスポリジウム等検出状況とその定量的微生物リスク評価、水道協会雑誌, 90(4), 1-9, 2021

##### 口頭発表

1. 泉山信司、古川紗耶香、油川一紀、山本貢平、今健亘、赤坂遼平、山崎朗子、東北地方のある浄水場上流山間部における、げっ歯類の *Giardia* 流行調査、日本寄生虫学会東日本大会、2021年10月、栃木県(オンライン)
2. 井上亘、泉山信司、*Cryptosporidium* のオーシスト壁の透過性に関する研究、日本水

処理生物学会、2021年10月、神奈川県(オンライン)

3. 泉山信司、消化管寄生性原虫のクリプトスポリジウム・ジアルジアへの対応、日本水処理生物学会、2021年10月、神奈川県(オンライン)
4. 泉山信司、古川紗耶香、油川一紀、山本貢平、今健亘、赤坂遼平、山崎朗子、山間部のげっ歯類が汚染源と推定される、腸管寄生性原虫による水道原水の汚染検出と対策の事例、日本防菌防黴学会、2021年9月、大阪市(オンライン)
5. 井上亘、クリプトスポリジウム研究のための水質検査計画のデータの地図化およびデータベース化、兵庫自治学会研究発表大会 2021年9月、神戸市(オンライン)
6. 泉山信司、古川紗耶香、油川一紀、今健亘、赤坂遼平、山崎朗子、「耐塩素性病原微生物の顕微鏡検査を遺伝子検査で補い、浄水場の対策に反映された例」、環境技術学会、2021年6月、オンライン
7. 泉山信司、「環境水(河川、畜舎排水、下水放流水)中のクリプトスポリジウム、ジアルジア調査についての研究意義と将来展望」より、国内の検出状況等について」、水道微生物問題研究会、令和3年4月、神奈川県(オンライン)

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得、2. 実用新案登録、3. その他なし



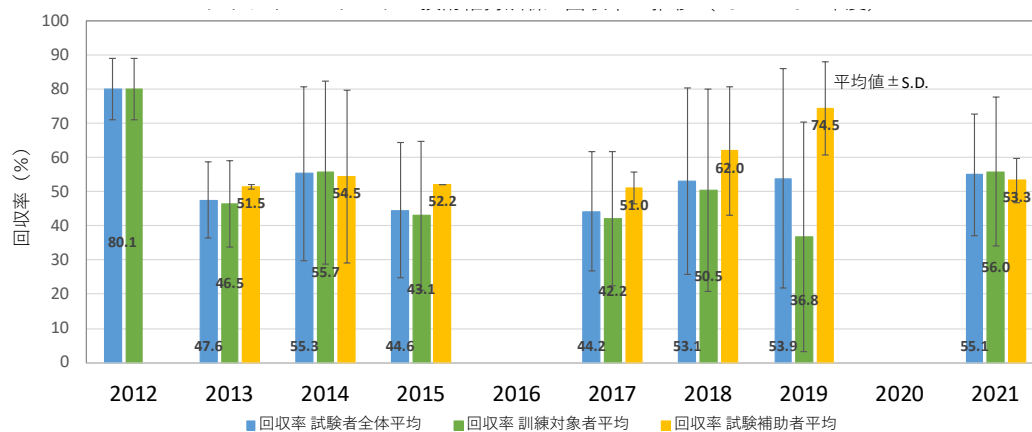
図1 試験操作フロー (5水道事業体分)

表1 陽性コントロール計数結果

添加確認実施日	1本目	2本目	3本目	4本目	5本目	平均値	標準偏差	変動係数 (%)
2021年10月21日	111	118	136	126	128	124	9.602	7.76
2021年11月18日	125	130	111	137	149	130	14.100	10.81

表2 クリプトスポリジウム技術維持訓練、各試験者の回収率

検査日	陽性コントロール添加数	試験者	ブランク年数	試験補助者の 在職年数	検出数(個)	回収率 (%)	前回収率(%)	対 試験補助者 平均回収率(%)
11月18日	130	A	4年	-	45	34.6	62.7	64.8
	130	B	8年	-	47	36.2	82.4	67.7
	130	C	17年	-	79	60.8	42.2	113.7
	130	D	7年	-	94	72.3	59.4	135.3
11月19日	130	E	13年	-	68	52.3	26.6	97.9
	130	F	1年	-	36	27.7	84.3	51.8
	130	G	2年	-	100	76.9	72.5	144.0
	130	H	5年	-	113	86.9	28.3	162.7
10月21日	124	I	試験補助者	3	70	56.5	62.3	-
	124	J	試験補助者	4	75	60.5	60.8	-
	124	K	試験補助者	1	64	51.6	0.0	-
	124	L	試験補助者	4	56	45.2	92.5	-



訓練参加者数

※2016年度及び2020年度は訓練を実施せず

年度	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
訓練対象者	6	7	9	5	-	10	10	6	-	7
試験補助者	0	2	4	1	-	3	3	5	-	5

図2 クリプトスポリジウム技術維持訓練 回収率の推移 (2012~2021年)



表 3 5 水道事業体の添加回収試験（試験者別一覧）

実施事業体・試験者	A-1	A-2	A'-1	A'-2	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2	C-3	D-1	D-2	E-1	E-2	E-3	全試験者平均
平均コントロール添加数 個	157.0	157.0	131.0	131.0	169.2	169.2	169.2	169.6	169.2	169.6	135.6	135.6	162.2	162.2	162.2	156.7
コントロール計数値 個	147	136	107	95	124	135	84	167	167	148	78	94	124	110	136	123.5
コントロール回収率 %	93.6	86.6	81.7	72.5	73.3	79.8	49.6	98.5	98.7	87.3	57.5	69.3	76.4	67.8	83.8	78.4
クリプト（試料由来） 個/10L	1	3	5	5	6	6	1	9	8	12	3	2	14	9	10	-
ジアルジア（試料由来） 個/10L	0	5	0	0	0	0	0	1	7	0	0	0	3	0	0	-

表 4 5 水道事業体の添加回収試験に用いた統一河川水試料の濁度分布

実施事業体	A	A'	B	C	D	E	平均
採水日	12/14						-
試験日	12/20	12/21	12/15	12/16	12/16	12/14	-
濁度（試験実施時）	1.4	1.6	1.6	2.3	2.0	2.3	1.9

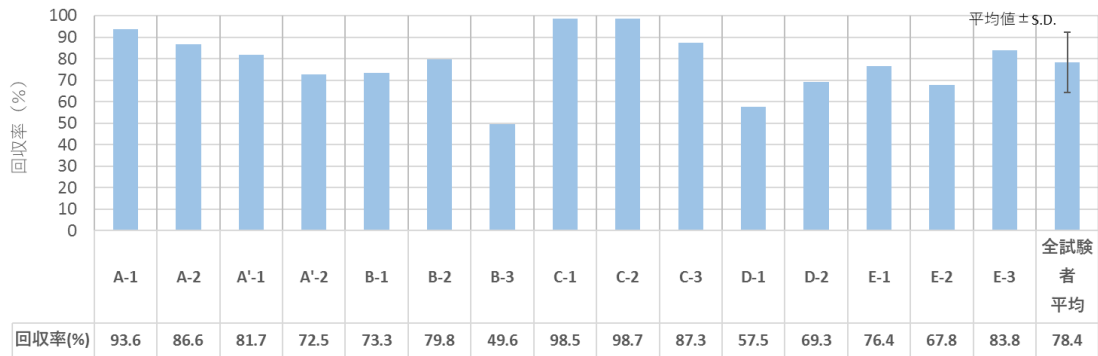


図3 5 水道事業者の添加回収試験（試験者別一覧、表3再掲）

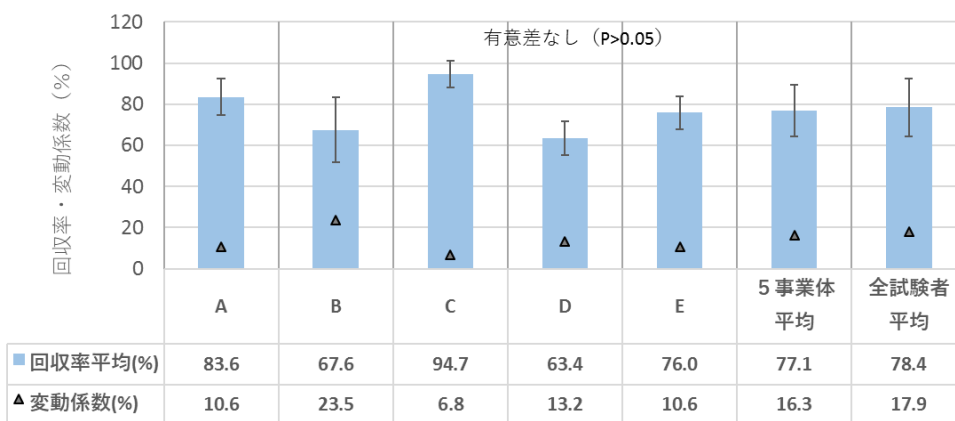


図4 5 水道事業者の添加回収試験（事業者別平均と変動係数）