

令和元年～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

水道原水におけるクリプトスポリジウム等検査法の向上に係る研究

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	井上 亘	(神戸大学大学院農学研究科)
研究協力者	古川 紗耶香	(青森市企業局水道部)
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	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	中嶋 直樹	(神奈川県衛生研究所)

研究要旨

クリプトスポリジウムやジアルジア等の耐塩素性病原微生物は、塩素消毒に抵抗性があり、ろ過除去等の対策が不十分であれば、水道水を介した感染事故が生じて問題となる恐れがある。クリプトスポリジウム等は様々な動物に感染し地域に関わらず流行するもので、実際に影響を受けたと思われる水道原水からの検出報告が日本全国に分布することを確認した。以前は汚染がないと考えられてきた山間部に由来する河川水であっても、ジアルジアの遺伝子が検出され、上流の野生動物が由来と考えられた。この検出は顕微鏡検査の形態観察が容易ではなく、遺伝子検査によって補われた例であった。顕微鏡検査の安定に向け、訓練と施設間の精度管理を例示した。10Lにわずか1個を検出しなければならない困難さについては、より濃度が高い下水放流水を検査することが有用と考えられた。

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>。

対策の必要性や程度を考える上で、汚染実態の把握は基本である。クリプトスポリジウムとジアルジアは世界のどこにでもいる、ユビキタスな病原体であることが知られている<sup>7)</sup>。海外の河川の様子は、クリプトスポリジウムが不検出～ $0.05 \sim 8.4 \times 10^4$  個/10L<sup>8)</sup>、あるいは予測モデルとして $10^{-5} \sim 10^3$ /10Lの範囲にあり<sup>9)</sup>、ヒト由来の高濃度な汚染が人口の集中した地域で指摘されている。ジアルジアは、不検出～ $0.01 \sim 3.2 \times 10^4$ /10Lの範囲で報告されている<sup>10)</sup>。下水処理場が整備された日本国内でこれほどの高濃度に達するとは考えにくい。患者クラスターの発生や合流式下水道からの放流など、一時的な河川への汚染負荷は生じるかもしれない<sup>11)</sup>。現行の河川水の検査は10Lにわずか1個を検出する難しいものだが、下水の高濃度な試料を狙って検査するならば、検査感度の向上や流行の検知が期待できるかもしれない。

その河川水中の10Lに1個を検出する検査法は、今なお顕微鏡検査を基本としているが、遺伝子検査も使用可能となっている<sup>12)</sup>。単に蛍光抗体で染色されたオーシストやシストが顕微鏡下に検出されるだけでなく、その種類や遺伝子型、塩基配列と言った情報が増えるほど、検査の精度・確度の向上や、排出源の情報が得られる。ある河川水の検査において、ジアルジアの大きさだが、内部構造が*Giardia lamblia*とは異なって見える粒子が検出された。従来の顕微鏡検査の鑑別基準で判断すれば、ジアルジアではないことになってしまうが、遺伝子検査により確認を行い、ジアルジア属の遺伝子の配列が得られた。顕微鏡検査を遺伝子検査で補うことのできた例であった。

この様に、クリプトスポリジウム等の顕微鏡検査は、蛍光抗体で緑色に染色されたわずか1つの粒子を検出する難しいものとなっている。複雑

な濃縮や精製に熟練を要する操作を要し、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<sup>12)</sup>。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。施設間で行われた精度管理が10年以上前に報告されており、今なお、このような取り組みを行うことが有用と考えられる<sup>13)</sup>。

以上を受けて、本研究では水道におけるクリプトスポリジウム対策の向上を目指して、次の課題を検討した。すなわち、原水におけるクリプトスポリジウム等の汚染実態の把握、顕微鏡検査を遺伝子検査で補うこと、顕微鏡検査の精度管理を行うこと、下水の検査による検査感度の向上について、検討した。

## B. 研究方法

### B1. 全国の水道原水におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアの検出状況

クリプトスポリジウムとジアルジアの検出報告は、「水道水及び水道用薬品等に関する調査等一式業務報告書」より、「4. クリプトスポリジウム等の検出状況の整理」を参照した<sup>14, 15)</sup>。検出地点の住所や施設名は、Webのジオコーディングサービスを利用して、緯度経度に変換した<sup>16-19)</sup>。地図上でプロットが重ならない様に、および特定の地点が強調されない様に、緯度経度に $-0.25$ から $+0.25$ の範囲で乱数( $+RAND()/2-0.25$ )を加えた。これは緯度と経度のいずれも、大雑把に50kmのずれに相当する。地理院地図のWebサービスを利用して、地図上におよその報告地点をプロットした<sup>20)</sup>。

### B2. 山間部由来の河川水原水における、野生動物由来のジアルジア検出

着水井もしくはその上流域の河川より10Lを採水し、検査指針<sup>12)</sup>に準拠して(オー)シストを精

製した。すなわち、PTFE フィルター法で濃縮し、免疫磁気ビーズ法 (Dynabeads GC-Combo) でクリプトスポリジウムとジアルジアを精製した。同じサンプルから検鏡と遺伝子検査の両方を行う場合は、精製を終えた段階でサンプルを等分した。検鏡法に蛍光抗体染色液 (アーク・リソース製 ARK Fluor Ab C/G) を使用した。遺伝子検査法に、クリプトスポリジウムの SSU rDNA を標的とする RT-PCR (CY230、タカラバイオ)、ジアルジアの SSU rDNA を標的とする RT-PCR (CY231、タカラバイオ)、*G. muris* の SSU rDNA を標的とする RT-PCR、 $\beta$  ジアルジン遺伝子を標的とするリアルタイム PCR とジアルジア属を広く検出できる SSU rDNA を標的としたコンベンショナル PCR を使用した<sup>21, 22)</sup>。

日本においては *G. microti* の検出報告例が見あたらず、海外での既知の宿主 (マスカラット、野ネズミ類) から、日本の宿主を予想した<sup>23-26)</sup>。日本に生息する野ネズミ類のうち、その上流域に生息が予想される、近縁の野ネズミ類 (アカネズミ、ヒメネズミ、ハタネズミ、ヤチネズミ) 4 種をターゲットとして、シャーマントラップによる捕獲を行った。捕獲調査は 2018 年の 6 月 (3 日間)、8 月 (2 日間)、10 月 (2 日間) の全 3 回行った。この捕獲調査は関係法規を順守し、関係省庁に所定の手続きをしてから行った。

捕獲地点は、浄水場の集水区となっている上流域で、河川から *G. microti* が検出されたことのある 3 地点 (地点 A、B、C) と、検出されたことのない 1 地点 (D) を選択した。捕獲した野ネズミ類は、現場で写真撮影、体長・尾長・耳長などを測定、糞便の回収を行った後に、放逐した。ネズミの種類は、記録した形態と、一部は SSU rDNA の一部配列から判別した。糞便サンプルから精製操作後に等分し、検鏡検査と遺伝子検査を行った。野ネズミ類の捕獲と検鏡検査の一部は、エヌエス環境株式会社に委託した。捕獲第 1 日目もしくは 2 日目に各地点の河川の採水と検査を

行った。

### B3. クリプトスポリジウム顕微鏡検査の精度管理

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>27)</sup>。オーシストは *Cryptosporidium parvum* 感染マウスの糞便より精製した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。オーシストから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、約 150 個/200  $\mu$  L に希釈したものを、陽性コントロールとした。陽性コントロールは冷蔵保管し、使用前に 1 分間以上、良く攪拌した。

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 2~5 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。蛍光微分干渉顕微鏡の倍率 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。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。

水道事業体 E における検査の訓練に、年 1 回訓練の「訓練対象者」と、現役の検査担当者の「試験補助者」が参加した。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 ず

つ添加することで、添加回収試験を行った。

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と免疫磁気ビーズ精製で行った<sup>28)</sup>。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〜)。検鏡は、前述の陽性コントロールの計数と同様に行った。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、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、統一した試料水を使用した。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、常法の PTFE メンブレンフィルター濃縮と免疫磁気ビーズ精製を基本として、各事業体でわずかに異なる操作方法で試験した。

#### B4. 下水放流水のクリプトスポリジウム等検査

下水道事業体の協力を得て、畜舎や動物施設の影響の少ないことを条件に、様々な排水試料を収集した<sup>16)</sup>。試料採取の頻度は月 1 回程度とし、2018 年 5 月から 2019 年 2 月に計 76 検体、2019 年 6 月から 11 月に計 61 検体を得た。最終処理水 10 L を、ポリ容器(ウォータータンク、アイリスオーヤマ)に採取した。濃縮精製は、半分の 5 L より、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>28)</sup>。精製試料(約 220  $\mu$ L)の半分を、免疫蛍光染色し(EasyStain CG)、ビニールフレーム<sup>29)</sup>で顕微鏡標本を作成し、微分干渉蛍光顕微鏡を用いて

オーシストとシストを計数した。

#### C. 結果及び考察

##### C1. 全国の水道原水におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアの検出状況

水道原水におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの報告数は<sup>14, 15)</sup>、年 50 件程度、11 年間に計 1,018 件の報告の大部分は、汚染を受けやすい地表水、表流水、伏流水、浅井戸を水源としていた(表 1)。

クリプトスポリジウムの検出は 11 年間に 618 件あり、地図にプロットすると、北は北海道、南は沖縄まで、全国的に報告されていた(図 1A)。ジアルジアは、11 年間に 573 件の報告があった。クリプトスポリジウムと同様に、全国的な分布を示した(図 1B)。

元々、クリプトスポリジウム症とジアルジア症はユビキタスにどこでも認められる病気であり、南国や開発途上国に限って分布すると言ったような地域特異性は無い<sup>7)</sup>。仮に現在が清浄であっても、容易に病原体が持ち込まれる恐れが考えられる。場所によらず、流行や汚染に注意を要すると考えられた。

いずれも検出の多くは関東地方に集中したが、その河川が畜産排水に汚染されやすいこと、検査頻度が高いこと、などが理由と考えられた<sup>30)</sup>。検査能力やそもそもの検査の有無、汚染の強い河川水を避けられるといった水事情の違いも影響するかもしれない。水道原水に使われない河川の汚染実態は、この地図には反映されないことになり、地下水等の水の豊かな地域は検出報告が少ないかもしれない。年単位の集中や増減といった傾向は認められなかった。

##### C2. 山間部由来の河川水原水における、野生動物由来のジアルジア検出

河川水の水道原水からクリプトスポリジウム等の顕微鏡検査を行い、ジアルジアサイズのシスト

らしきものは観察されるが、核の配置が従来とは異なり、ジアルジアとは言い難いシスト様粒子の存在する状況が続いた(図 2)。遺伝子検査を導入すると、ジアルジアの RT-PCR が陽性、塩基配列は近縁の配列 (AF006676) を基準として、99.6% (=224/225bp) の一致、系統樹解析の結果から *G. microti* (図 3) と推定された。遺伝子検査を行った 28 ヶ月計 33 サンプルのうち、20 サンプルでジアルジア遺伝子の増幅が確認された。一部抜粋して 2018 年 8 月から 2019 年 7 月分の検査結果を表 2 に示した。他にも河川上流域の複数地点からも遺伝子増幅産物を得た。シーケンスに成功した着水井 14 サンプルと上流域 24 サンプルは、全て上記の *G. microti* と同じ配列であった。

集水区となっている上流の河川水と、宿主と予想されるげっ歯類の汚染実態を 4 地点 (A から D) で調査した(図 4)。野ネズミ類は 83 匹(再捕獲個体は含まない)捕獲され、うち 47 匹分の糞を精製して原虫検査を行った。検鏡検査でジアルジアと断定できるシストが見られた 3 検体と、同程度の大きさのシスト壁らしき蛍光のみが見られた 14 検体、計 17 検体のうち、*G. microti* 遺伝子の読み取りに成功したのは 4 検体であった(表 3)。ネズミから検出した *G. microti* と捕獲地点周辺河川や着水井で検出した *G. microti* の塩基配列は、混合塩基を一致とみなせば、全期間、全地点でほぼ同じ(99~100%)であった。

ジアルジアが検出される野ネズミの種類は、以下の通りであった。海外ではマスカラットの他、野ネズミ類では *Apodemus* 属(アカヒメネズミに近縁)・*Microtus* 属(ハタネズミに近縁)・*Myodes* 属(ヤチネズミに近縁)からの *G. microti* の検出報告があるが、国内では見当たらず、少なくともハタ/ヤチネズミが日本における *G. microti* の宿主の一部であると判明した<sup>22)</sup>。例数は少ないが、*G. microti* は高率に感染しており、ハタネズミが 100%(=陽性 2/2 個体)、ヤチネズミが 67%(=

2/3)の検出率であった。アカネズミ(0/24)とヒメネズミ(0/18)に *G. microti* の検出はなかった。*G. muris* の検出はアカネズミに限られた(13% = 3/24)。同じげっ歯類でも棲み分けや流行状況の相違が想像された。

以上のとおり、検鏡法の定期検査では原虫を確定できなかったところを、遺伝子検査で補うことができた。

### C3. クリプトスポリジウム顕微鏡検査の精度管理

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 4)。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。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 4)。わずかなミスで容易に失敗する試験であり、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。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。

5 水道事業者の添加回収試験で施設間の成績を確認した。陽性コントロールの平均値は、5 事業者全体で 157 個(変動係数 15%)であった(表 5)。130~170 個と若干幅があったものの、全体と各事業者の間に有意差はなかった( $p>0.05$ , t 検定)。

なお、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。

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 5)。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、事業体間に有意差はなかった( $p>0.05$ , t 検定)。

これまでクリプトスポリジウム等検査の精度に注意が払われていなかったことから、今後はこのような精度管理が行われることを期待した。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 5)。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)で補うといった工夫が対策として考えられた。

#### C4. 下水放流水のクリプトスポリジウム等検査

下水放流水の検査結果を表 6、7 に示した。クリプトスポリジウムは 2%(=陽性 3/全試料 137)の頻度で陽性となった(D1、E1)。

ジアルジアは 25%(=32/127)の陽性率であった。全 22 処理場のうち、16 の処理場の排水から検出され、継続的な傾向にあった。ジアルジア症の場合、旅行者下痢症などが多いこと、不顕性感染が多いこと、慢性化するなどして、シストを排出する期間がクリプトスポリジウムに比べて長いことなどが原因かもしれない。

下水の検査で陽性となった地区では、この期間に、感染症発生動向調査(NESID)へのクリプ

トスポリジウム症とジアルジア症の届出はなかった<sup>31)</sup>。すべての下痢症を検査するのは現実的ではなく、すべての患者発生を把握できないのは致し方ない面がある。病院や患者の負担なく、その地域の感染を推定できる方法として、下水の検査は有用と考えられた。従来の河川水の検査は 1 個/10L の検出限界で行われてきたが、下水放流水は 1 個/L で行っても汚染の恐れを判断する目的には十分と考えられた。排出源により近く、より高濃度な検査が有利といえた。

#### D. 結論

日本全国の水道原水から年 50 件ほどの汚染が報告され、11 年間にクリプトスポリジウムは 618 件、ジアルジアは 573 件あった。関東地方に検出が多かったものの、全国的な分布を示し、場所によらず汚染に注意を要すると考えられた。

水道原水の定期検査で、特異蛍光抗体で染色されるジアルジア大の粒子が観察されたが、核の配置が従来の鑑別基準から外れていたため、ジアルジアとは判断されていなかった。遺伝子検査で RT-PCR が陽性となり、げっ歯類の *Giardia microti* の塩基配列が得られた。取水地点より上流を調査し、河川水と野生のネズミの糞便から同じ塩基配列が検出された。顕微鏡検査が遺伝子検査によって補われ、耐塩素性病原微生物の排出源が想定外に明らかとなった。

クリプトスポリジウム検査の訓練を行い、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、回収率が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。これまでクリプトスポリジウム検査の精度管理には注意が払われておらず、訓練と施設間の精度管理を例示することで今後の改善を期待した。

下水道事業体の協力を得て、計 22 箇所から 137 試料を検査した。下水放流水 3 試料からクリプトスポリジウムが検出された。ジアルジアは、32 試料と検出が多かった。対象地域内ではこの期間にクリプトスポリジウム症とジアルジア症の届出がなかった。従来の河川水の検査は 1 個/10L の検出限界で行われてきたが、下水放流水は 1 個/L で行っても汚染の恐れを判断する目的には十分と考えられた。下水の検査による感度の向上は有用と考えられた。

#### 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. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* 2006 May;22(5):203-8.
8. Betancourt, W. 2019. *Cryptosporidium* spp. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org> (R. Fayer and W. Jakubowski, (eds) Part 3 *Protists*) <http://www.waterpathogens.org/book/cryptosporidium> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
9. Vermeulen LC, van Hengel M, Kroeze C, Medema G, Spanier JE, van Vliet MTH, Hofstra N. *Cryptosporidium* concentrations in rivers worldwide. *Water Res.* 2019 Feb 1;149:202-214.
10. Boarato-David, E., Guimarães, S., and Cacciò, S. 2017. *Giardia duodenalis*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org>
11. 井上亘, 菅野淳一. 下水処理場等の排水からのクリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出. 病原微生物検出情報月報 (IASR). Vol.39, No.2, pp.27-28 (2018)
12. 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)
13. 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
  14. 環境管理センター、「4. クリプトスポリジウム等の検出状況の整理」、平成 25 年度水道水及び水道用薬品等に関する調査業務報告書より、pp.135-149.
  15. 三菱ケミカルリサーチ、「4. クリプトスポリジウム等の検出状況の整理」、平成 30 年度水道水及び水道用薬品等に関する調査等一式業務報告書より、pp.195-207.
  16. 井上亘、上村育代、川元達彦、吉田昌史、浄水処理困難物質等のリスク管理のための水道水源にある施設のデータベース化と地図化に関する研究、兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告 8 号: 50-53. 2017.
  17. 谷謙二、Yahoo!マップ API を使ったジオコーディングと地図化 (<http://ktgis.net/gcode/index.php>, 2020 年 3 月 4 日時点)
  18. Aoba、Geocoding.jp、(<https://www.geocoding.jp/>, 2020 年 3 月 4 日時点)
  19. tree、住所と緯度経度を相互変換、(<https://1-dot-tree-maps-152415.appspot.com/geocoding/>, 2020 年 3 月 4 日時点)
  20. 国土地理院、地理院地図(電子国土 Web)、(<http://geolib.gsi.go.jp/node/2555>、2020 年 3 月 4 日時点)
  21. 武田万里子、新谷保徳、林広宣、三輪雅幸、リアルタイム PCR 法を用いた *Giardia* の測定方法の確立と環境水への適用、第 54 回日本水道協会関西地方支部研究発表会、2010 年
  22. Helmy YA, Spierling NG, Schmidt S, Rosenfeld UM, Reil D, Imholt C, Jacob J, Ulrich RG, Aebischer T, Klotz C. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. Parasites Vectors. 2018 Mar 27;11(1):213.
  23. Feely DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. J Protozool. 1988 Feb;35(1):52-4.
  24. Boeck, WC. Mitosis in *Giardia microti*. University of California Publications in Zoology, 1917, 18: 1.
  25. Feely DE, Chase DG, Hardin EL, Erlandsen SL. Ultrastructural evidence for the presence of bacteria, viral-like particles, and mycoplasma-like organisms associated with *Giardia* spp. J Protozool. 1988 Feb; 35(1):151-8.
  26. van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol. 1998 Apr;84(2):294-300.
  27. 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
  28. 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、132-133、日本水道協会、東京
  29. 井上 亘、小田琢也、簡易なクリプトスポリジウムのオーシストの計数方法、寄生虫学研究:材料と方法(宇賀昭二、丸山治彦編) 2012 年版, 三恵社, 名古屋, ISBN978-4-88361-998-6: 85-86, 2012.



30. 泉山信司, 秋葉道宏, 松下拓他. 微生物に関する研究, pp.17-32. 水道水質の評価及び管理に関する総合研究(研究代表者: 松井佳彦)平成 28 年度総括・分担研究報告書. 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)(2016)
31. 兵庫県感染症情報センター, (<http://www.hyogo-iphes.jp/kansen/infectdis.htm>, 2020 年 3 月 4 日時点)

## 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
3. 泉山信司, 最近の感染確率に基づく、水道水からクリプトスポリジウムを除去・不活化する目標の再計算、水道協会雑誌、89(8), 2-7, 2020
4. 橋本温, 中本佳奈, 鈴木裕之, 土岡宏彰, 泉山信司, ハイドロキシアパタイト粉体ろ過法の効率と大腸菌試験への適用性, 環境技術, 2020, 49(2), 31-37
5. Tsuchioka H, Izumiyama S, Endo T, Wada T, Harada H, Hashimoto A. Hydroxyapatite powder cake filtration reduces false positives associated with halophilic bacteria when evaluating *Escherichia coli* in seawater using Colilert-18. J Microbiol Methods. 2019 Feb 22;159:69-74.

### 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)
8. Motomu Inoue, Shinji Izumiyama,

- Toshinobu Suzaki. Semi-permeability assay of *Cryptosporidium* oocyst wall using saturated sodium chloride solution. Joint online meeting of the Japan Society of Protistology and Korean Society of Protistologists. November 2020, Kobe, Japan.
9. 泉山信司、井上亘、橋本温、国内の水道原水におけるクリプトスポリジウムの検出状況、環境技術学会、2020年6月、京都市(オンライン)
  10. 井上亘、荻田堅一、鈴木雅和、野村素行、四方浩人、水道水の感染リスク把握のための小規模下水処理場排水の塩素抵抗性原虫調査、水道研究発表会、2019年11月、函館市
  11. 泉山信司、水道水を介してクリプトスポリジウムに感染するリスクの計算、環境技術学会、2019年6月、京都市
  12. 泉山信司、クリプトスポリジウム症、平成30年度希少感染症診断技術研修会、平成31年2月、東京都
  13. 泉山信司、耐塩素性病原生物について、水道水質検査セミナー、平成31年2月、青森市
  14. 今健亘、油川一紀、洗砂機導入の検討経過について、第22回水道技術事例発表会、2019年8月、福島県
  15. 赤坂遼平、油川一紀、古川紗耶香、山崎朗子、横内川水源涵養保安林区域生態動向調査、日本水道協会水道研究発表会、2019年11月、北海道
- 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

表 1 クリプトスポリジウムあるいはジアルジアの検出が報告された水道原水の水源種別と報告数

水源種別*1	検出報告数		
	クリプト	ジアルジア	いずれか*3
地表水	496	459	805
表流水	95	91	167
伏流水	11	6	17
地表水、伏流水*2	1	1	1
不圧地下水(浅井戸)	6	4	10
被圧地下水(深井戸)	4	4	7
その他	3	5	6
未記入	2	3	5
計	618	573	1018

\*1 報告の記載通りに分類したが、地表水には表流水が多数含まれていると思われた。\*2 報告の記載通りで、地表水と伏流水を混合していると思われた。\*3 クリプトスポリジウムとジアルジアを同時に検出した報告が複数あり、クリプトスポリジウムとジアルジア検出数の合計にはなっていない。

A) クリプトスポリジウム検出地点(平成 20～30 年、618 地点)

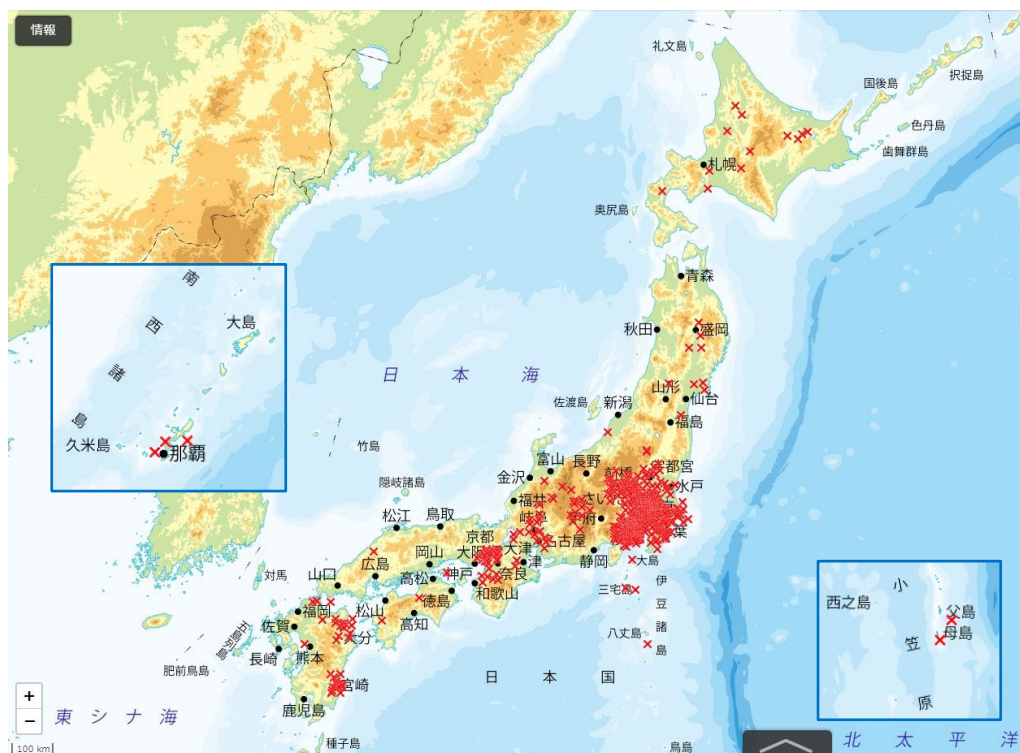


図 1 水道原水のクリプトスポリジウム、ジアルジア検査より報告地点(続く)

B) ジアルジア検出地点(平成 20~30 年、573 地点)

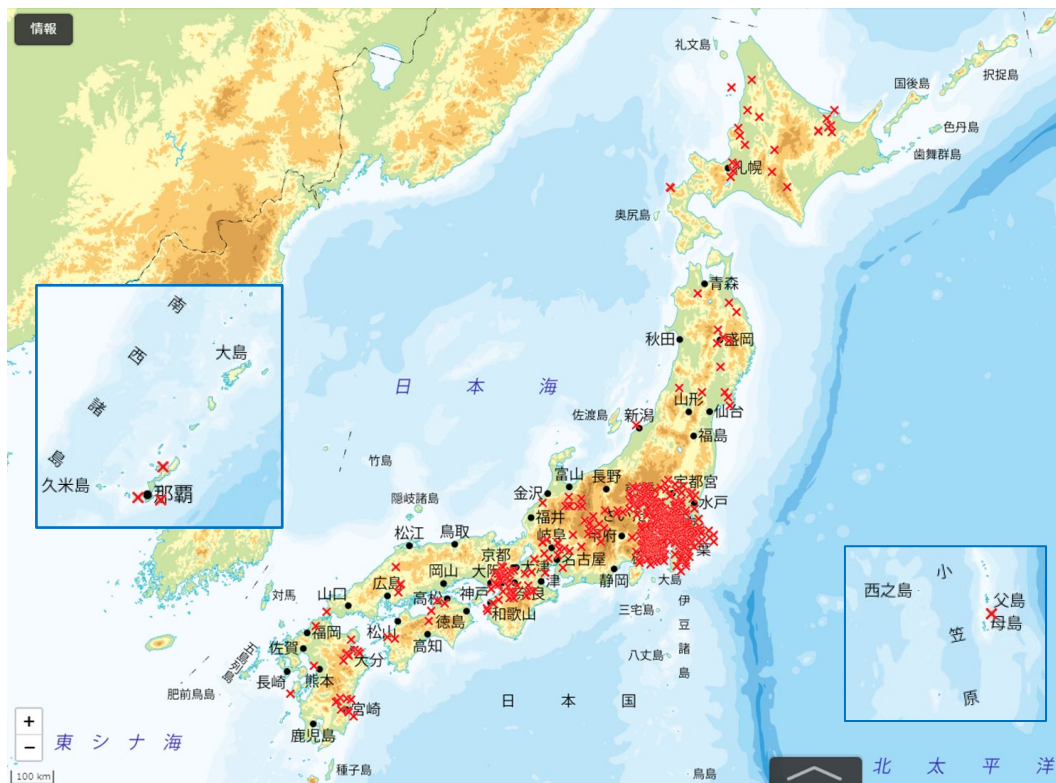
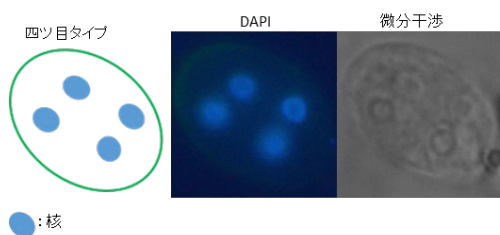


図 1 水道原水のクリプトスポリジウム、ジアルジア検査より報告地点(続き)

X印 1 つが検出報告 1 件に対応し、緯度経度に 50km 相当の誤差を加えて重ならないようにしている

A) 核の配置が四つ目タイプ



B) 従来の鑑別基準の核の配置

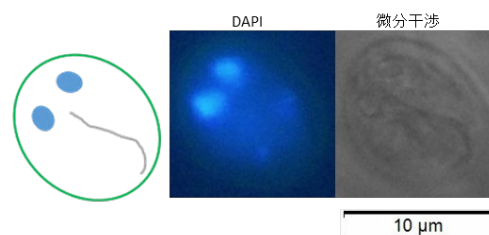


図 2 浄水場着水井から検出したシスト様粒子(A)とジアルジアシスト(B)の模式図、DAPI 染色像、微分干渉像

A) 実験感染や単一のシストを取り出して確認できたわけではないが、もっぱら図の通りにシスト内に核が分散して存在する試料から、*Giardia microti* の配列が検出された。B) *Giardia* の 2 ないし 4 つの核の配置は、ラグビーボール状のシストの中で、片側に寄っていると考えられていた。

図3 ジアルジア rRNA 系統樹

*Giardia microti* と *G. muris* (A03 系統と B10 系統の 2 種類) の配列が取得された。配列は浄水場の着水井、上流河川水試料、ネズミ糞便の間で共通だった。

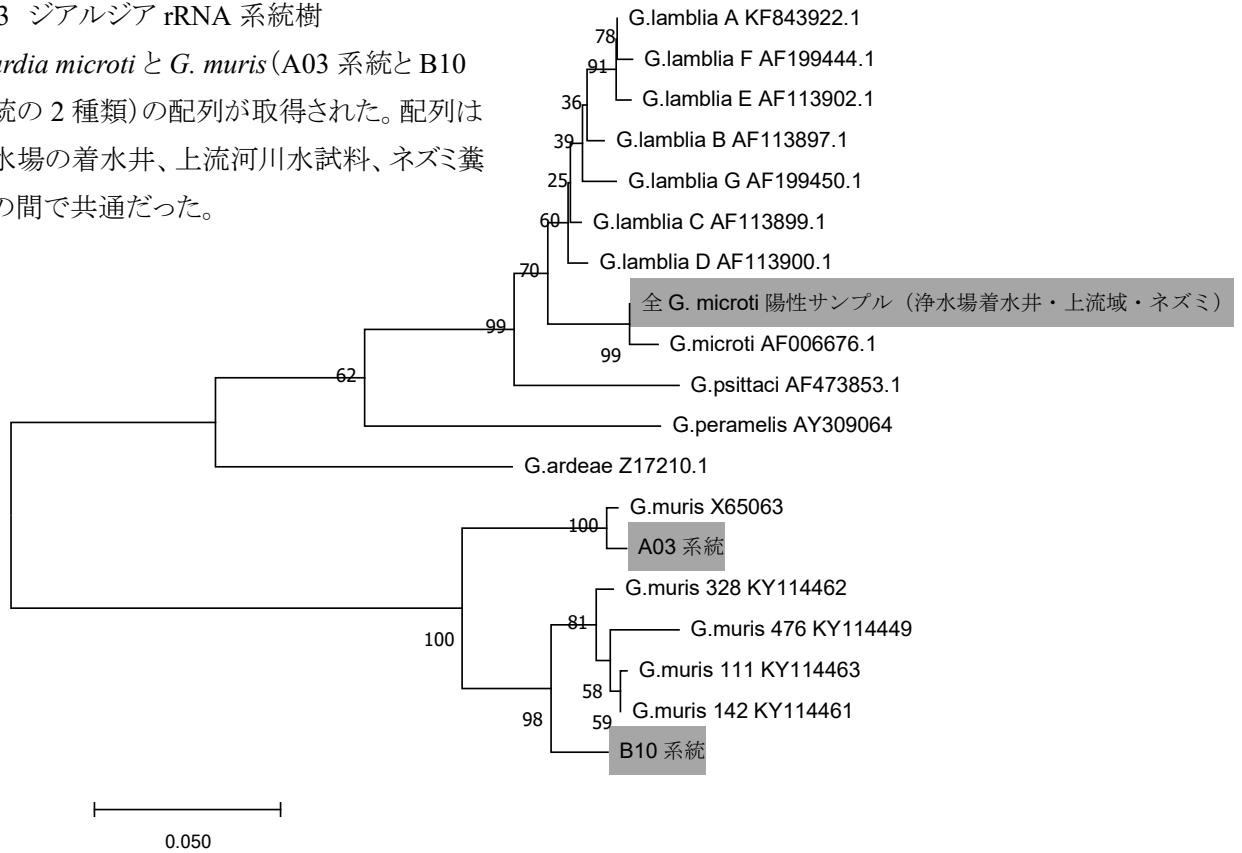


表2 着水井からの検出結果 (2018/08~2019/07)

採水日	ジアルジア			
	増幅	シーケンス	検鏡検査	
			DAPI	微分干渉
2018/08/07	±*1	×	-	-
2018/09/12	-	/	-	-
2018/10/4	+	<i>G. microti</i>	+	+
2018/11/12	+	<i>G. microti</i>	+	+
2018/12/10*2	+	<i>G. microti</i>	+	-
2019/01/21	+	<i>G. microti</i>	-	-
2019/02/12	-	/	-	-
2019/03/18	-	/	-	-
2019/04/22	+	<i>G. microti</i>	-	-
2019/05/20	+	<i>G. microti</i>	-	-
2019/6/24	±	×	+	+
2019/7/22	-	/	+	+

\*1、+ : 増幅もしくは観察あり、± : 微増幅、- : 増幅もしくは観察なし、× : RT-PCR 微増幅のため、シーケンスできなかったもの。\*2、2018/12/10 の試料において新規 *G. muris* RT-PCR を試行し、RT-PCR が陽性、*G. muris* (A3 系統) の配列が得られた。

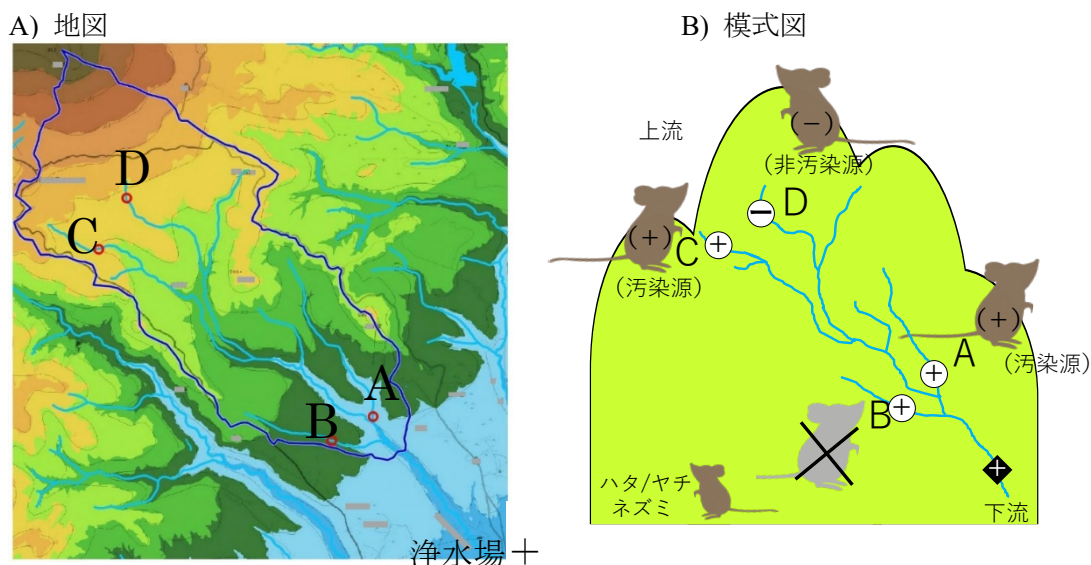


図4 ネズミ調査地点の位置関係と *Giardia microti* 検出結果の模式図

A) 赤○の A(標高 102m)から D(標高 550m)が、ネズミの捕獲・糞便検査と、河川水の検査を行った地点。青枠線は水源保護区域を表す。右下に浄水場+がある。B)模式地図、河川を意味する線上で、+は河川水中のジアルジア検出を表す。ネズミ上の+は糞便中のジアルジア検出を表す。B 地点のネズミの色が薄くXは、ネズミが捕獲されていないことを表す。

表3 シストもしくはシスト壁が観察されたネズミと遺伝子検査結果一覧(17匹分抜粋)

個体番号	回	地点	ネズミ推定種	検鏡結果	CY231 RT-PCR	βジアルジンリアルタイム	新規 <i>G. muris</i> RT-PCR
002	第1回	A	ハタ	シスト壁のみ	<i>G. microti</i>	±*	
011	第1回	A	ハタ	シストと断定	<i>G. microti</i>	±	
015	第1回	A	アカ	シスト壁のみ	—	—	
017	第1回	B	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
020	第1回	C	アカ	シスト壁のみ	—	—	
021	第1回	D	アカ	シスト壁のみ	—	—	
034	第1回	A	アカ	シストと断定	—	+	<i>G. muris</i> (B10 系統)
048	第2回	A	アカ	シスト壁のみ	—	+	<i>G. muris</i> (B10 系統)
049	第2回	A	アカ	シスト壁のみ	—	—	
050	第2回	A	アカ	シスト壁のみ	—	+	<i>G. muris</i> (B10 系統)
054	第2回	C	ヤチ	シスト壁のみ	<i>G. microti</i>	—	
059	第2回	C	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
067	第2回	D	ヤチ	シスト壁のみ	—	—	
075	第2回	A	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
107	第3回	B	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	
108	第3回	C	ヤチ	シストと断定	<i>G. microti</i>	—	
110	第3回	C	ヒメ	シスト壁のみ	—	—	

\* +:増幅、±:微増幅、-:増幅なし

表 4 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	-

表 5 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 6 下水放流水からのクリプトスポリジウムとジアルジアの検出結果(2018年度)

処理場名	クリプトスポリジウム(個/L、検鏡)												ジアルジア(個/L、検鏡)												陽性率
	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	陽性率	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	陽性率			
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	0	0	0.5	13	6	0	243	0	30	0	50%			
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	1.2	4.8	0	1.6	0	1.2	0	40%			
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	10%			
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	40	0	0	0	0	0	16	0	3.2	0	30%			
C1	-*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	-	0	0	0	0	0	0	0	5.2	0	11%			
C2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	-	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	11%			
D1	-	0	0.4	0	0	0	0	0	0.4	0	22%	-	1.2	0	0	0	9.2	0	0	3.2	0	33%			
D2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	-	0	0	0	0	0	0	0	39	0	11%			

\*:未実施

表7 下水放流水からのクリプトスポリジウムとジアルジアの検出結果 (2019年度)

処理場名	クリプトスポリジウム(個/L、検鏡)						ジアルジア(個/L、検鏡)					
	6月	7月	9月	10月	11月	陽性率	6月	7月	9月	10月	11月	陽性率
E1	4.8	0	0	0	0	20%	0	0	0	0	0	0%
E2	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	0	0%
F1	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	0	0%
G1	0	-*	0	-	-	0%	0	-	0	-	-	0%
H1	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	0	0%
I1	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	0.4	20%
I2	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	55.2	20%
J1	0	-	-	0	-	0%	0	-	-	0	-	0%
J2	0	-	-	0	-	0%	0	-	-	0	-	0%
K1	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	6.8	20%
K2	0	0	0	0	0	0%	0	0.8	0	0	0	20%
L1	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	41.6	0	20%
L2	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	4.8	0	20%
M1	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	13.6	2.8	40%

\*:未実施