

図-4 藻類細胞のゼータ電位 *N.palea*

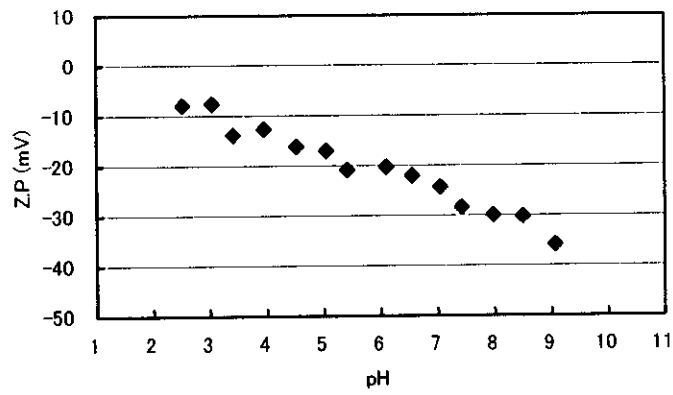


図-5 クリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位

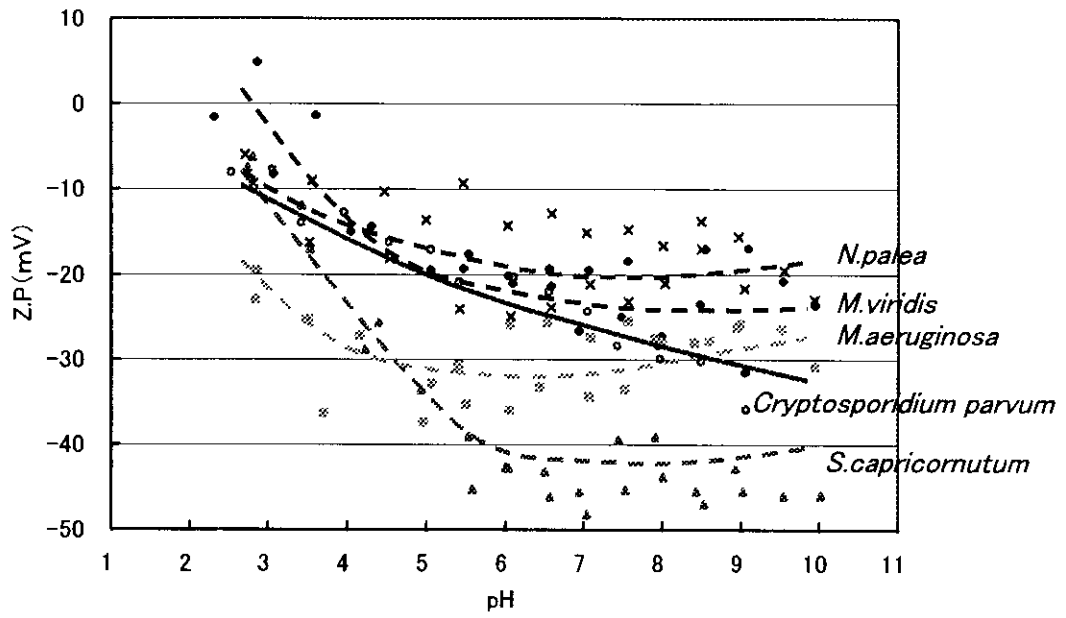
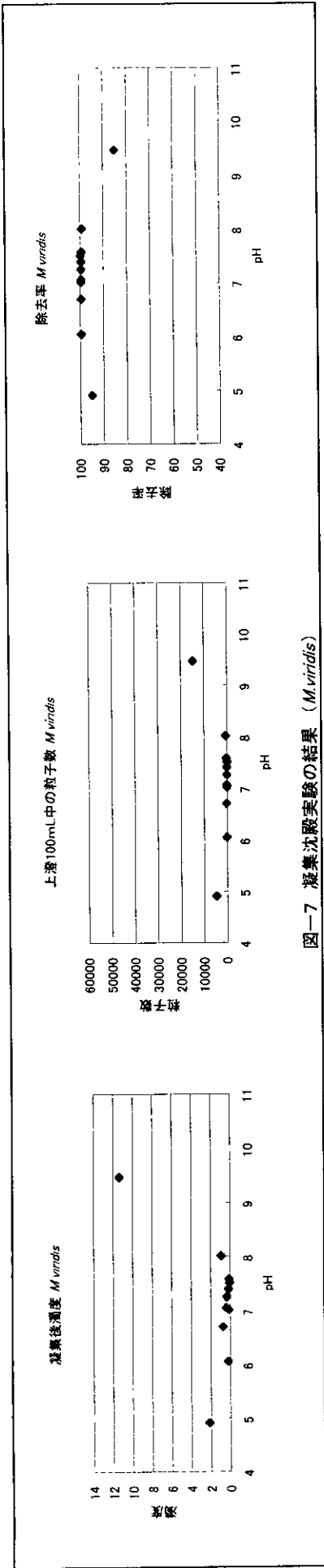
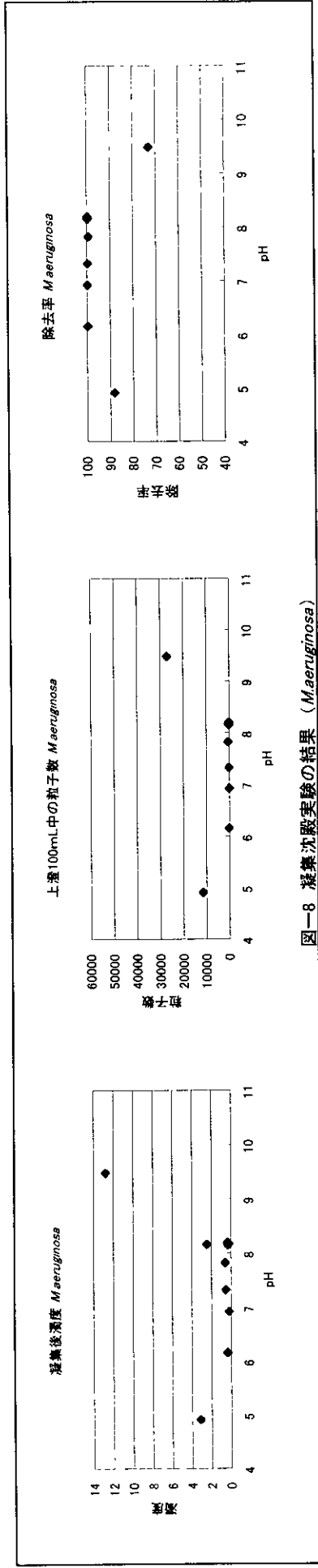


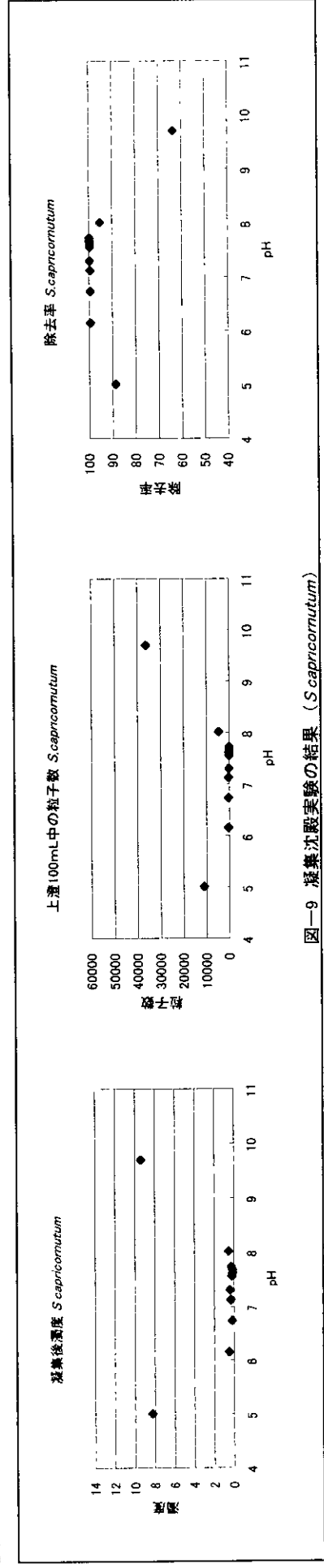
図-6 藻類細胞とクリプトスポリジウムオーシストのゼータ電位



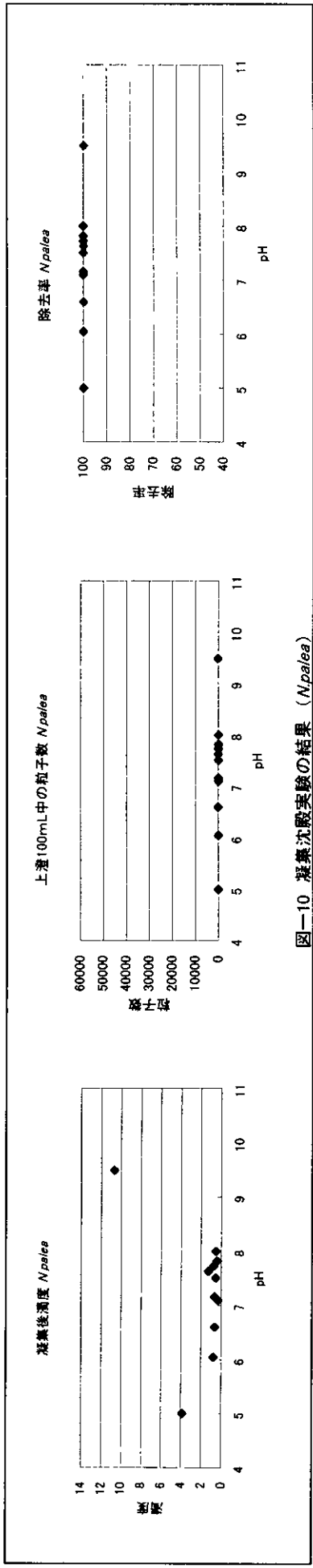
図一7 凝集沈殿実験の結果 (*M. viridis*)



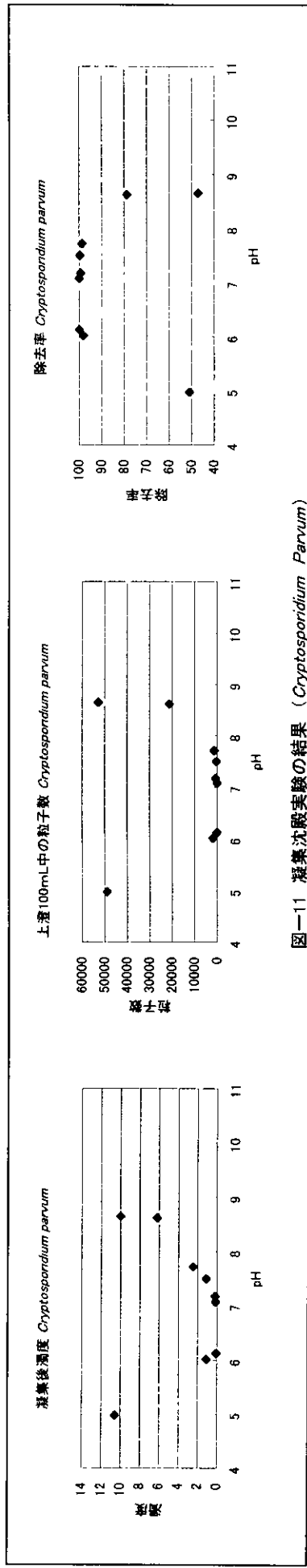
図一8 凝集沈殿実験の結果 (*Maeruginosa*)



図一9 凝集沈殿実験の結果 (*S. capricornutum*)



図一10 凝集沈殿実験の結果 (*N. palea*)



図一11 凝集沈殿実験の結果 (*Cryptosporidium Parvum*)

表-1 藻類の除去率

	上澄100mL当たり			上澄100mL当たり			
	凝集後pH	の粒子数(個)	除去率(%)	凝集後pH	の粒子数(個)	除去率(%)	
<i>M. viridis</i>	4.91	4860	95.14	<i>S. capricornutum</i>	5.01	11160	88.84
	6.05	280	99.72		6.15	480	99.52
	6.70	360	99.64		6.73	400	99.60
	7.02	200	99.80		7.12	400	99.60
	7.06	280	99.72		7.30	240	99.76
	7.26	280	99.72		7.55	240	99.76
	7.40	280	99.72		7.61	200	99.80
	7.51	160	99.84		7.67	160	99.84
	7.58	400	99.60		7.72	160	99.84
	8.01	640	99.36		8.01	4680	95.32
9.47	14760	85.24	9.70	36360	63.64		
<i>M. aeruginosa</i>	4.91	11700	88.30	<i>N. palea</i>	5.00	60	99.94
	6.15	200	99.80		6.05	40	99.96
	6.92	160	99.84		6.60	120	99.88
	7.32	200	99.80		7.10	0	100.00
	7.82	600	99.40		7.16	0	100.00
	8.15	240	99.76		7.51	0	100.00
	8.16	440	99.56		7.63	120	99.88
	8.17	40	99.96		7.73	40	99.96
	8.18	240	99.76		7.82	0	100.00
	8.20	200	99.80		8.00	0	100.00

表-2 クリプトスポリジウムの除去率

	上澄100mL当たり		
	凝集後pH	の粒子数(個)	除去率(%)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	4.98	48960	51.04
	6.02	1800	98.20
	6.13	60	99.94
	7.08	0	100.00
	7.18	680	99.32
	7.50	360	99.64
	7.72	1320	98.68
	8.62	21240	78.76
	8.65	52920	47.08

分担研究報告書 2

浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム
除去指標としての藻類除去率

分担研究者 眞柄泰基

分担研究報告書

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び 類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標としての藻類除去率

分担研究者	眞柄 泰基	北海道大学大学院工学研究科	教授
主任研究者	国包 章一	国立公衆衛生院水道工学部	部長
研究協力者	北澤 弘美	国立公衆衛生院水道工学部	室長

研究要旨 浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標として、水道原水に含まれる各種藻類に着目し、浄水処理過程におけるその除去性をクリプトスポリジウムオーシストと比較した。その結果、藻類の除去率とクリプトスポリジウムオーシストの除去率は同程度の数値を示し、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標としての藻類除去率の適用可能性が明らかになった。

A. 研究目的

クリプトスポリジウムは、現行の塩素消毒ではほとんど不活化されないことから、浄水処理過程における物理的除去が求められており、厚生省の「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」（平成10年6月改正）では徹底した濁度管理が要求されている。水中のクリプトスポリジウムを短時間で簡便に検査することはむずかしいが、本研究では、クリプトスポリジウムに近い大きさ的比重をもつ粒子として、水道原水に含まれる藻類に着目し、浄水処理過程におけるその除去性に関して検討を行った。これは、藻類をクリプトスポリジウム除去の代替指標として使用できれば、濁度管理に加え、従来からの生物試験で二重に安全性をチェックできるからである。

B. 研究方法

3水道事業者、8浄水場における過去5～6年間の原水、沈殿水、ろ過水（又は浄水）の生物試験結果^{1), 2), 3)}をもとに、凝集沈殿、砂ろ過による藻類除去率を算出した。これらの数値と既存の研究で報告されているクリプトスポリジウムの除去率とを比較することにより、藻類除去率が浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標として使えるかどうかを検討した。

検討対象としたのは、次の浄水場の生物試験結果である。

北九州市水道局	穴生浄水場	}
	本城浄水場	

阪神水道企業団	畑浄水場	}	平成4年4月～平成9年3月
	井出浦浄水場		
	甲山浄水場		
	猪名川浄水場		
	尼崎浄水場		
神奈川県企業庁水道局	寒川浄水場		平成4年4月～平成10年3月

C. 研究結果及び考察

1. 藻類除去率の特徴

表-1は、主な藻類の凝集沈殿による除去率及び凝集沈殿+砂ろ過による除去率をまとめたもので、種類別にデータ数(n)、除去率の平均値、除去率の標準偏差(s)を示してある。水源における藻類出現状況によって、データ数の多少がある。除去率は標準偏差からわかるように、同一種でもバラツキが大きい、これは浄水処理条件が異なるためと考えられる。除去率に季節的な変動は認められなかった（除去率の経月変化を表した図の例を図-1、図-2に、また、水温と除去率との関係を表した図の例を図-3、図-4に示す）。また、藍藻、緑藻、珪藻の別で比較すると、藍藻類の除去率が最も低く、緑藻、珪藻の順で高くなった。種類別の除去率の平均値は、原水-沈殿水が $0.5 \sim 2(\log_{10})$ 、原水-ろ過水が $1 \sim 4(\log_{10})$ であった。表-1の原水-沈殿水除去率(\log_{10})と原水-ろ過水除去率(\log_{10})との関係を図示すると図-5のようになり、両者には相関が認められた。このことから、種類によっては除去性に特徴があるものの全体的な傾向としては、凝集沈殿で除去しにくいものは砂ろ過を経ても除去されにくいといえる。

2. クリプトスポリジウムの除去率

凝集沈殿+砂ろ過によるクリプトスポリジウムの除去に関してはいくつかの研究がある。表-2は、パイロット実験や実規模実験の結果を参考文献4)、5)に基づいて整理したものである。これによると、凝集沈殿+砂ろ過によるクリプトスポリジウムの除去率は $1.67 \sim 3.40(\log_{10})$ 、平均値で $2.50(\log_{10})$ である。また、参考文献6)によると、凝集沈殿による除去率は $1.0 \sim 1.5(\log_{10})$ であり、急速ろ過による除去率は $1.5 \sim 2.5(\log_{10})$ 、凝集沈殿+砂ろ過による除去率は $2.5 \sim 3.0(\log_{10})$ である。

3. 指標性の検討

図-6は藻類除去率の図に、文献4)、5)、6)に基づくクリプトスポリジウム除去率の範囲を加えたものである。この図からわかるように、藻類の除去率とクリプトスポリジウムの除去率は重なっており、藻類除去率をクリプトスポリジウム除去の代替指標として用いることの妥当性が示唆される。藻類を代替指標として用いる場合には、浄水処理過程においてクリプトスポリジウムと同様な挙動を示す藻類を選択するのが好ましい。したがって、

図-6の破線の範囲にある *Anabaena*、*Microcystis*、*Phormidium*、*Cymbella*、*Gomphonema*、*Navicula*、*Nitzschia*、*Synedra ulna*、*Ankistrodesmus*、*Chlamydomonas*、*Coelastrum*、*Scenedesmus* や全藍藻類、全緑藻類、総生物数に着目すれば、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウムの除去を間接的にモニタリングできるものと考えられる。

D. 結論

本研究により、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウム除去指標としての藻類除去率の適用可能性が明らかになった。特定の藻類種に着目するとクリプトスポリジウムがどの程度の割合で除去できているかを推定することができると考えられるが、藻類を指標として採用するに当たっては、次の点に注意する必要がある。

①藻類除去率のデータにはバラツキがあるので、複数の藻類種を用いるべきである。

②水源や季節によって出現する藻類種が異なるので、指標とする種を適宜使い分ける必要がある。

また、本研究で用いたデータのみでは、藻類の種類数が少ないので、今後はさらにデータを蓄積するとともに、凝集剤の注入率等の運転条件や原水中の藻類数と除去率の関係についても検討を加え、指標性の向上を図る必要があると考える。

E. 参考文献

- 1) 北九州市水道局：水質試験年次報告書，平成4年度（第28集）～平成8年度（第32集）。
- 2) 阪神水道企業団：水質試験所調査試験年次報告書，平成4年度（通第41号）～平成8年度（通第45号）。
- 3) 神奈川県企業庁水道局：県営水道の水質，平成4年度～平成9年度。
- 4) E.C.Nieminski and J.E.Ongerth ,Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration, Jour.AWWA 87(9):96-106,1995.
- 5) *Cryptosporidium* in Water Supplies, Second Report of the Group of Experts, October 1995, London: HMSO.
- 6) K.J.Ives, *Cryptosporidium* – The new threat in the water, Special seminar on international trends in water environment management, Tokyo, Japan, April 23, 1996, Japan Society on Water Environment, 41-48

表-1 主な藻類の除去率(Log)の整理結果

藻 類 種		原水-沈でん水			原水-ろ過水		
		n	平均	s	n	平均	s
全藍藻類		197	1.21	0.58	160	2.44	0.93
アナバエナ	<i>Anabaena</i>	39	1.08	0.62	39	2.23	1.13
クロオコックス	<i>Chroococcus</i>	10	0.54	0.52	6	1.04	0.52
メリスモペディア	<i>Merismopedia</i>	4	2.02	0.73	6	3.08	0.85
マイクロシステイス	<i>Microcystis</i>	55	1.29	0.78	60	2.51	1.10
オシラトリア	<i>Oscillatoria</i>	88	0.94	0.59	42	2.15	0.74
フォルミディウム	<i>Phormidium</i>	72	1.20	0.62	57	2.41	0.97
全珪藻類		384	1.55	0.41	289	3.23	0.53
アクナンテス	<i>Achnanthes</i>	181	0.80	0.49	165	1.77	0.69
アステリオネラ	<i>Asterionella</i>	181	1.60	0.64	57	3.09	1.13
コココネイス	<i>Cocconeis</i>	77	1.54	0.50	3	3.52	0.24
キクロテラ&ステファノディスクス	<i>Cyclotella & Stephanodiscus</i>	543	1.69	0.47	335	3.65	0.80
キンベラ	<i>Cymbella</i>	219	1.33	0.57	65	2.96	0.79
フラギラリア	<i>Fragilaria</i>	206	1.49	0.54	40	3.82	0.59
ゴムフォネマ	<i>Gomphonema</i>	209	1.39	0.58	84	3.22	0.92
メロシラ	<i>Melosira</i>	556	1.29	0.50	84	3.44	1.10
ナビクラ	<i>Navicula</i>	471	1.27	0.51	313	3.16	0.79
ニツチア	<i>Nitzschia</i>	625	1.28	0.47	439	3.03	0.76
シネトラ ウルナ	<i>Synedra ulna</i>	132	1.22	0.54	52	2.71	0.72
シネトラ アクス	<i>Synedra acus</i>	305	0.98	0.44	98	2.47	0.73
全緑藻類		442	1.39	0.52	380	2.73	0.98
アクチナストルム	<i>Actinastrum</i>	13	1.54	0.64	3	1.92	1.24
アンキストロデスムス	<i>Ankistrodesmus</i>	225	1.05	0.58	154	2.48	0.75
クラミトモナス	<i>Chlamydomonas</i>	177	1.11	0.50	136	2.11	0.64
コエストラム	<i>Coelastrum</i>	64	1.29	0.65	39	2.02	1.01
ディクティオスフェリウム	<i>Dictyosphaerium</i>	21	0.96	0.33	19	1.33	0.52
オオキシステイス	<i>Oocystis</i>	116	0.95	0.38	91	1.85	0.58
ペディアストラム	<i>Pediastrum</i>	60	1.41	0.52	4	4.07	0.51
セネデスムス	<i>Scenedesmus</i>	319	1.45	0.60	260	2.64	0.90
シュレテリア	<i>Schroederia</i>	66	1.52	0.53	20	3.49	0.66
スフェロキシステイス	<i>Sphaerocystis</i>	22	1.02	0.59	16	1.67	0.66
総生物数		475	1.49	0.40	479	3.24	0.70

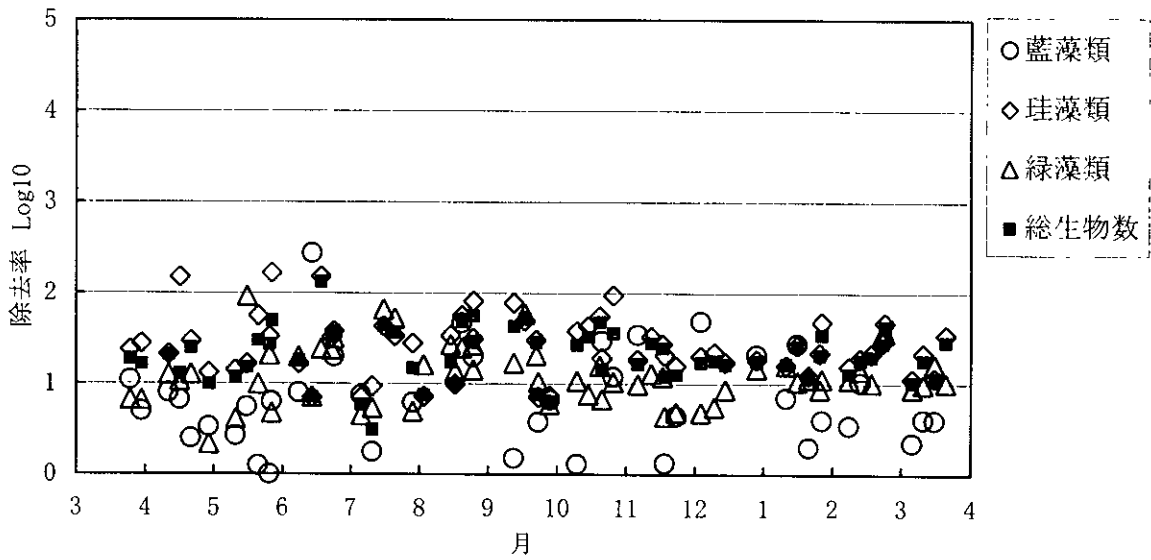


図-1 穴生浄水場 原水-沈でん水 除去率

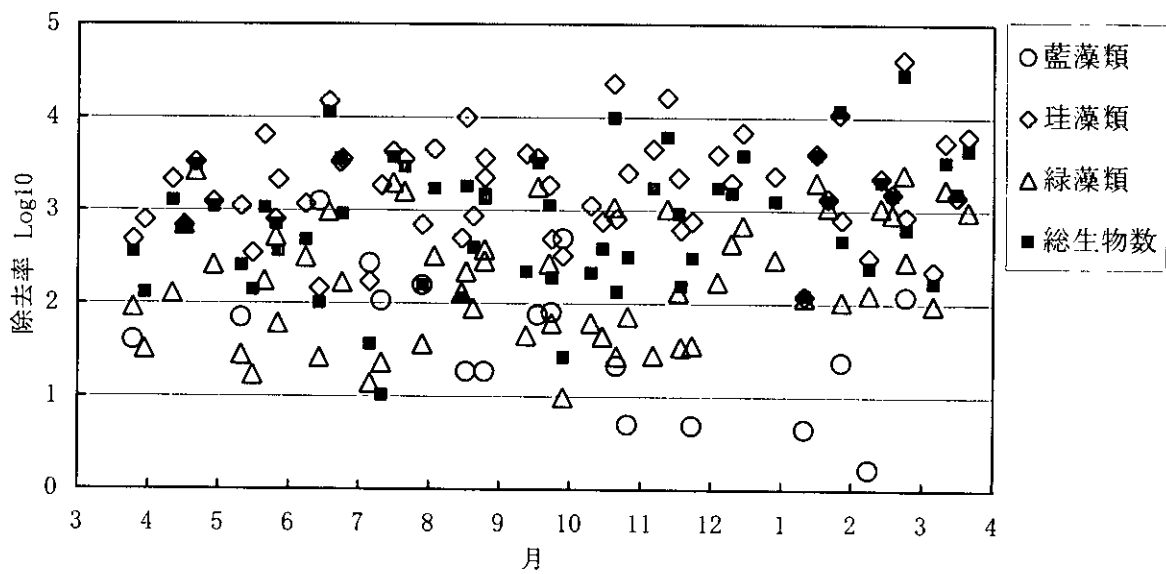


図-2 穴生浄水場 原水-ろ過水 除去率

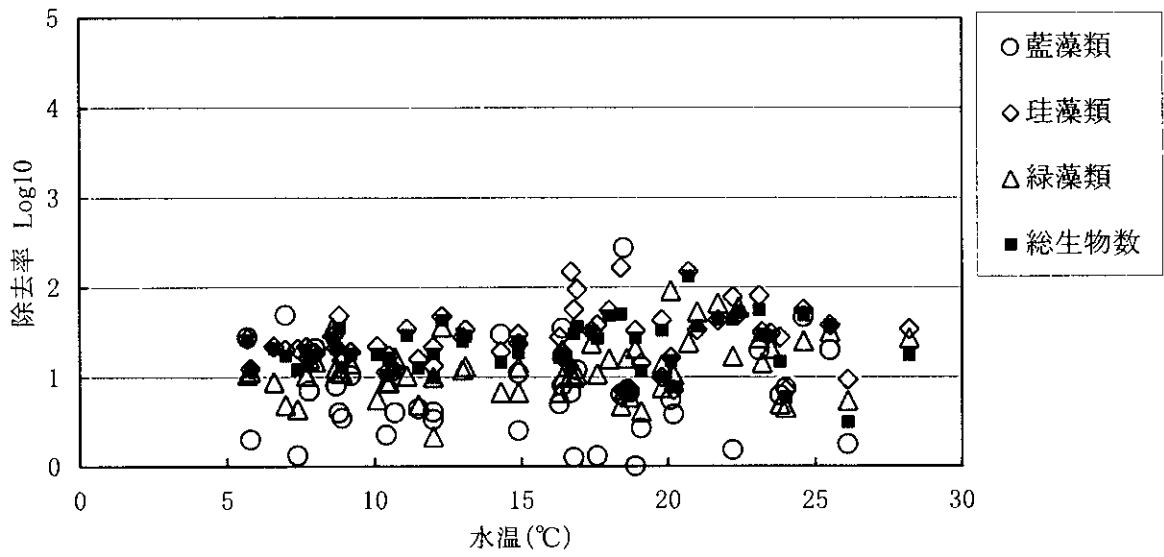


図-3 穴生浄水場 原水-沈でん水除去率と水温の関係

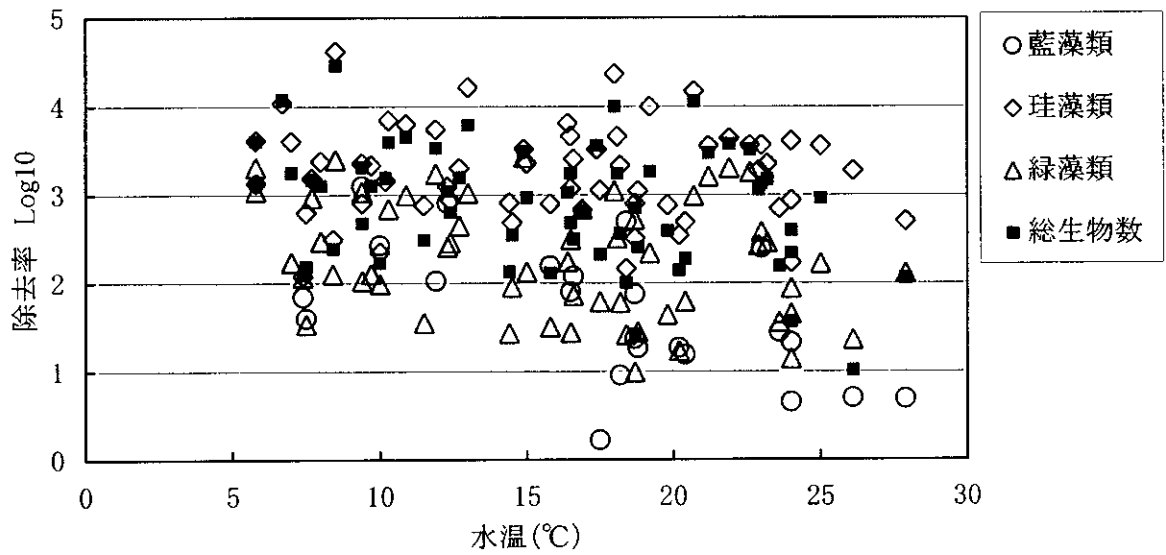


図-4 穴生浄水場 原水-ろ過水除去率と水温の関係

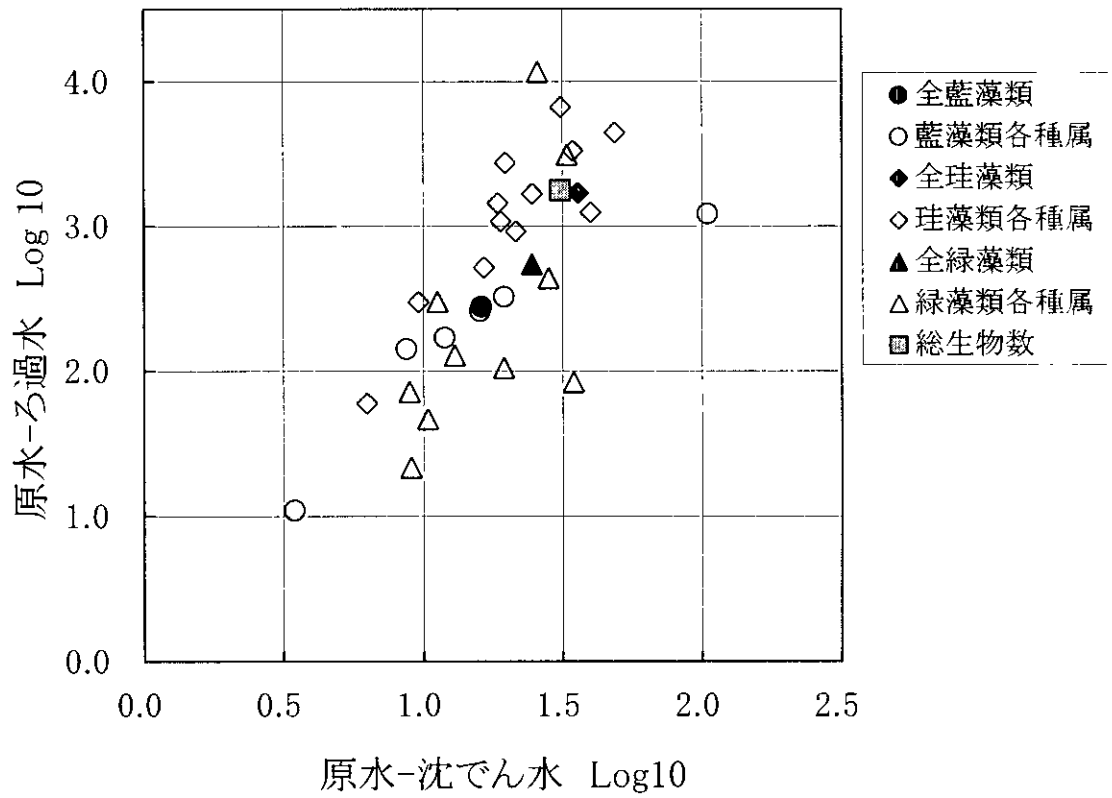


図-5 浄水処理過程における藻類除去率

表—2 クリプトスポリジウム原水—ろ過水除去率

		Percent	log	
ジョーダンバレー パイロットプラント 参考文献 1)	実験 1	99.65%	2.46	
	実験 2	98.66%	1.87	
	実験 3	99.87%	2.89	
	実験 4	99.95%	3.30	
	実験 6	99.88%	2.92	
	実験 7	99.45%	2.26	
	実験 9	99.69%	2.51	
	実験 10	99.96%	3.40	
	ハンティントン 実規模施設 参考文献 1)	実験 1	99.60%	2.40
		実験 2	99.05%	2.02
実験 3		97.87%	1.67	
合衆国の 実規模施設における 実験結果 参考文献 2)	A	99.90%	3.00	
	B	99.00%	2.00	
	C	99.70%	2.52	
	D	99.50%	2.30	
	E	99.70%	2.52	
平均			2.50	

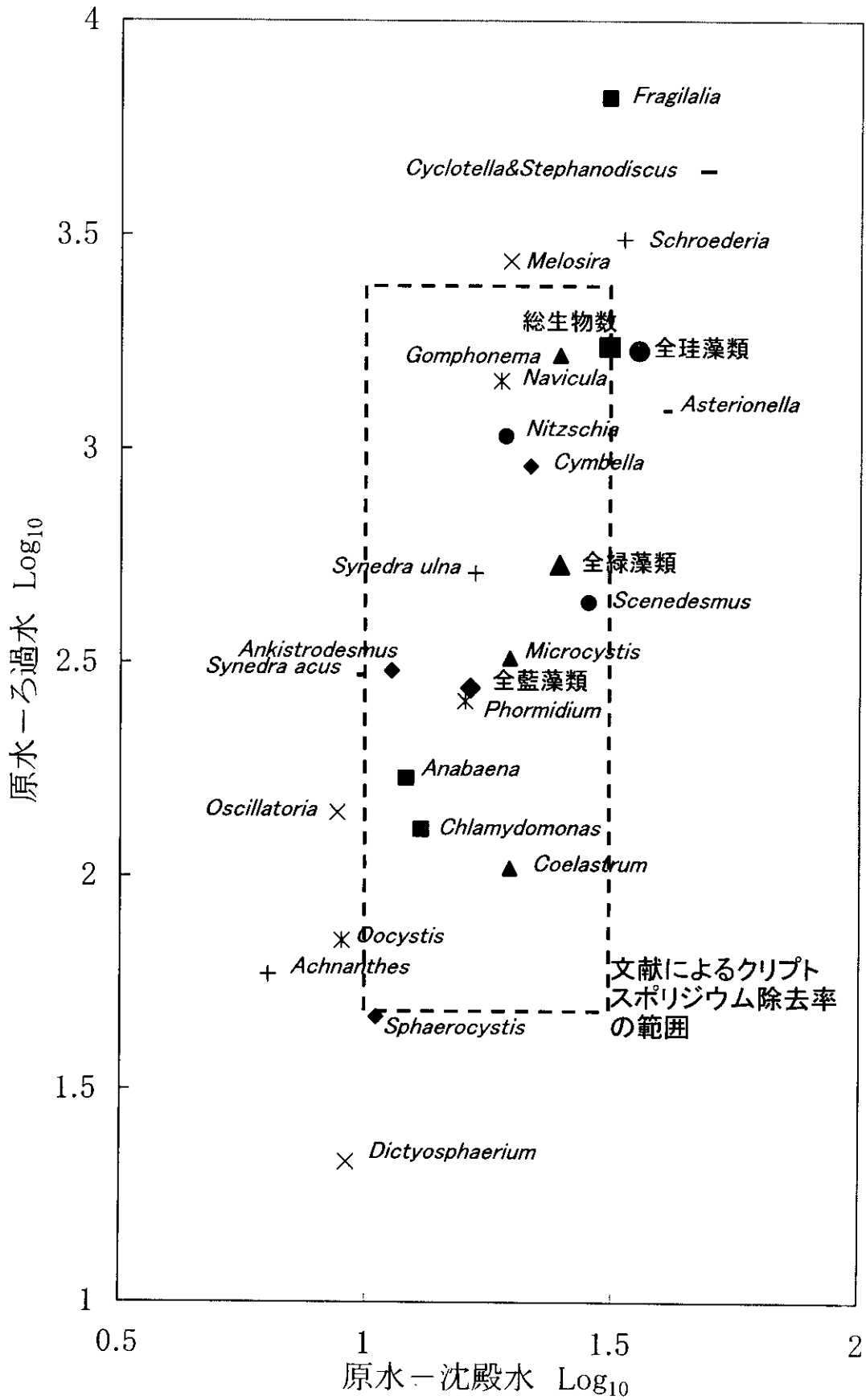


図-6 代替指標としての藻類除去率

分担研究報告書 3

原虫検出法の検討

分担研究者 荒木国興

分担研究報告書

研究課題： 水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

分担研究： 原虫検出法の検討

分担研究者： 荒木 国興 国立公衆衛生院衛生微生物学部 部長

研究協力者： 山浦 常 東京女子医科大学中央検査部感染症対策科 講師
戸塚 恭一 東京女子医科大学中央検査部感染症対策科 教授
伊藤健一郎 国立公衆衛生院衛生微生物学部 細菌室長

研究要旨

都内に棲息しているクマネズミ、ドブネズミの糞便からクリプトスポリジウムの検出を試み、*Cryptosporidium parvum* のオーシストをコーチゾン投与の SD ラット体内で増殖させた。また、渡航者や消化器内科を受診した患者の下痢便及び軟便から *C.parvum* のオーシストと *Giardia* のシストの検出を試み、検出した原虫の保存方法と染色性について検討した。その結果、スライドガラスに塗布した糞便をメタノールで固定してから冷蔵庫で 10 ヶ月間保管したが、10%ホルマリン液で保存した糞便と同様に抗酸染色法、蛍光染色法による検査で支障がなく、2 種原虫の positive control として使用できることが分かった。

1 はじめに

わが国の水源水域から検出されたクリプトスポリジウムのオーシストは、大きさ及び形態学的特徴から *C.parvum* のものと判定されたが、感染源は特定されていない。人及び仔牛の下痢便中の *C.parvum* は人に感染するが、豚、羊、猫、ネズミ、野生動物などの *C.parvum* が人に感染するか否かについては不明である。これらの動物の *C.parvum* の人への感染性について検討することは極めて重要だが、困難なため、動物モデルでの感染性を比較するか PCR 法による遺伝子解析で検討しなければならない。以上の観点から種々の動物の便を検査して *C.parvum* のオーシストを集め、遺伝子配列を調べておけば感染源となる動物種を推定する上で大いに役立つ。

Giardia のシストも河川水から検出されているが、クリプトスポリジウムと同様に感染源は特定されていない。種々の動物に寄生する *Giardia* と人由来の *Giardia* との比較検討も今後の課題となるが、海外から旅行者が持ち込む *Giardia* や下痢便や軟便中の *Giardia* を入手して保管しておく必要がある。

感染症新法の施行に伴い寄生虫性の下痢症の検査も行われるようになるので、赤痢アメーバ及びこれらの原虫の検査法について指導するとともに、*C.parvum* のオーシスト、*Giardia* の栄養型及びシストを positive control として供与することも大切である。

2 方法

(1) アルカリペプトン液の影響

成田空港検疫所で渡航者の下痢便を検査する時、糞便をアルカリペプトン液に入れ 6 時間 37℃で保存してから細菌の検査をしているので、検査後の検体から原虫を検出するためには原虫に対するアルカリペプトン液と便内の細菌の影響についても調べておく必要がある。同時に細菌検査後の検体を一定数確保するには 1 週間～10 日間が必要となる。そこで低温での保存期間についても検討した。細菌を入れないアルカリペプトン液と大腸菌を入れたアルカリペプトン液を調整し、*C.parvum* のオーシストと *Giardia* の栄養型を含む少量の糞便を入れ、37℃で 6 時間、6℃で 1 週間保存してから 2,500 rpm で 5 分間遠心沈殿し、沈査から原虫の検出を試みた。

(2) 渡航者の下痢便の検査

成田空港検疫所で保管しておいた 60 検体を 2,500 rpm で 5 分間遠心沈殿し、上清のアルカリペプトン液をトランスファーピペットで吸い取り、蒸留水を加えてから再び遠心沈殿し、沈査から原虫の検出を試みた。スライドグラスにヤギ血清を 3μl 塗布し、血清が乾いたのを確認してから 10μl の糞便液を円を描くように塗布した。風乾後にメタノールで 3 分間固定してから抗酸染色法及び *Cryptosporidium/Giardia* の FITC 標識モノクローナル抗体使用の直接蛍光抗体染色法で原虫の検出を試みた。

(3) 消化器内科受診者の糞便検査

東京女子医科大学の消化器内科を受診した患者の下痢便及び軟便について蔗糖浮遊法（比重 1.266 の蔗糖液使用）で *C.parvum* のオーシストの検出を試みた。同時にヨード・ヨードカリ液で *Giardia* の栄養型あるいはシストの検出を試みた。

(4) ネズミの糞便検査

アペックス産業の協力を得て都内のビルに棲息しているクマネズミとドブネズミを捕獲し、蔗糖浮遊法で糞便内の *C.parvum* のオーシストの検出を試みた。

(5) *C.parvum* の感染実験

6 匹のクマネズミから検出された *C.parvum* のオーシスト (2.0×10^4 個) をコーゾンを投与した SD ラット (♀, 5W) に感染させた。SD ラットは 1 群 5 匹づつとし、感染後 14 日まで糞便 1 グラム中のオーシスト数 (OPG) を蔗糖浮遊法で調べた。

(6) 原虫の保存と染色性の検討

愛知県食肉衛生検査所から供与された仔牛、豚、綿羊、猫、クマネズミ由来の *C.parvum* のオーシストの大部分は遺伝子解析に用いられたが、一部はスライドガラスに塗布し、メタノールで固定してから positive control として 5℃ で保管した。同様に東京大学医科学研究所感染症免疫内科から供与された *Giardia* の栄養型及びシスト、東京女子医科大学から供与された *C.parvum* のオーシスト及び *Giardia* のシストは 10%ホルマリンで固定して保存したが、一部はスライドガラスに塗布し、3ヶ月、6ヶ月、10ヶ月後に *Cryptosporidium*/*Giardia* の FITC 標識モノクローナル抗体使用の直接蛍光抗体染色試薬で原虫の検出を試みた。

3 研究結果および考察

(1) 人の糞便についての検査結果

大腸菌を含むにアルカリペプトン液に原虫の存在を確認した糞便を入れ、37℃ 6時間、6℃ で 1週間保管してから抗酸染色による *C.parvum* のオーシストの検出を試みたが、赤く染まったオーシストが確認された。次にギムザ液及びヨード・ヨードカリ液を用いて *Giardia* の栄養型の染色を試みたが特徴のある栄養型が確認された。さらに FITC 標識モノクローナル抗体使用の直接蛍光抗体染色試薬で検査したが、アップルグリーンに染色した原虫が確認され、アルカリペプトン液、大腸菌による影響は見られなかった。なお、アルカリペプトン液で処理しないジアルジア症患者の糞便を乾燥しないようにして 1ヶ月間冷蔵庫に保管してから検査したが、栄養型及びシストの染色性に問題はなかった。したがって、他機関に原虫の検査をするための糞便の供与を依頼するときは低温で保管しておいてもらうことが望ましい。

成田空港検疫所における渡航者の下痢便について抗酸染色法で検査したが *C.parvum* のオーシストは検出できなかった。また、Waterborn 社製 FITC 標識モノクローナル抗体使用の直接蛍光抗体染色試薬 WBA100FL で原虫の検出を試みたが、*C.parvum* のオーシスト及び *Giardia* の栄養型及びシストは検出されなかった。成田空港検疫所では採便棒で糞便を採取しているので便量が少ないこと、渡航者の滞在期間が短かったことなどが考えられるので、次年度はこの点について考慮する必要があるだろう。

東京女子医科大学の消化器内科を受診した患者 48 名の下痢便及び軟便を簡易蔗糖浮遊法で検査したが、*C.parvum* のオーシストは検出されなかった。しかし、4 名の患者の軟便から *Giardia* のシストが検出された。東南アジアに 2週間以上滞在すると *Giardia* に感染する機会も多くなると言われているので、できるだけ発展途上国に 10日以上滞在した患者の下痢便あるいは軟便について検査したい。なお、メトロニダゾール投与で治療効果が

認められないジアルジア症患者も出てきたので、*Giardia* については薬剤耐性のあるものとそうでないものについて遺伝子解析を行う必要があると思われた。

(2) 動物由来の *C.parvum* の検査結果

都内のビルに棲息しているクマネズミ及びドブネズミの糞便を蔗糖浮遊法で検査した結果、クマネズミ 38 匹中の 7 匹、ドブネズミ 4 匹中の 1 匹から *C.parvum* のオーシストが検出された。これらのうち、クマネズミ由来の *C.parvum* のオーシストをコーチゾン投与のラットに感染させた結果、表 1 に示したように感染後 4 日目から 2.3×10^4 個のオーシストが検出され、感染 14 日目では $2.6 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ 個のオーシストが検出された。一部は遺伝子解析用に供与したが、残りは *C.parvum* の positive control として保管した。都内のビルに棲息しているクマネズミやドブネズミに *C.parvum* が感染していたことから、国内のネズミには高率に *C.parvum* が感染している可能性があり、重要な感染源になることが示唆された。今後は他県のクマネズミやドブネズミについても調査することが望ましい。

表 1 クマネズミ由来の *C. parvum* オーシストのラットへの感染実験

使用した クマネズミ No	投与後の OPG			
	4 日	7 日	10 日	14 日
20	3.1×10^6	4.3×10^6	2.5×10^6	2.0×10^6
23	4.7×10^6	2.9×10^6	2.3×10^6	2.2×10^6
24	3.5×10^6	6.1×10^6	4.3×10^6	2.5×10^6
30	6.9×10^4	2.3×10^4	7.1×10^5	4.0×10^5
32	2.3×10^4	2.9×10^4	2.6×10^5	4.1×10^5
34	4.3×10^4	2.9×10^4	4.1×10^5	2.6×10^5

(3) 原虫の供与

愛知県食肉衛生検査所で蔗糖浮遊法により牛、綿羊、豚、猫、ネズミなどの便から検出された *C.parvum* のオーシストを供与してもらい、遺伝子解析に使用した残りの便をスライドグラス上に塗布し、メタノールで固定してから冷蔵庫に保管した。また、東大学医科学研究所の感染免疫内科からジアルジア症患者の糞便を供与してもらい、便内の栄養型、シストを確認してから *C.parvum* のオーシストと同様にスライドグラス上に塗布し、メタノールで固定してから冷蔵庫に保管した。*C.parvum* のオーシストに関しては、約 10 ヶ月間は抗酸染色法及び Waterborn 社製の WBA100FL による蛍光染色法の positive control として支障のないことが分かった。*Giardia* のシストもホルマリン固定標本と同じように約 10 ヶ月間は positive control として使用できることが分