

Table 1 Concentrations of protozoa and surrogate indicators in Sagami river and its tributaries

Sampling points		Presumptive	Confirmed	Presumptive	Confirmed	Turbidity	<i>E.coli</i>	coliforms	<i>C.perfringens</i> spores*	Aerobic spores
		<i>Crypto.</i>	<i>Crypto.</i>	<i>Giardia</i>	<i>Giardia</i>					
		(oocysts·100l ⁻¹)		(cysts·100l ⁻¹)		(unit)	(MPN·100ml ⁻¹)		(cfu·100ml ⁻¹)	
Katura B.	GM	4	3	28	28	9	330	9,200	110	6,500
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Range	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Sagami L.	GM	7	3	8	5	3	6	231	2	98
	SD	86	8	20	5	1	290	24,382	8	1,909
	Range	3~218	1~22	4~60	2~13	1~6	7~790	1,700~68,000	4~23	900~5,900
	n	4/6	4/6	6/6	3/6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6
Miyayama	GM	15	9	21	4	3	469	25,355	25	5,610
	SD	47	18	20	5	2	771	32,572	34	3,122
	Range	2~170	1~67	4~80	1~18	1~9	68~3,300	3,300~130,000	2~130	2,300~13,000
	n	18/18	15/18	18/18	14/18	18/18	18/18	18/18	18/18	18/18
Showa B	GM	3	2	6	2	3	93	7,313	6	2,583
	SD	3	3	10	1	2	218	7,658	22	2,097
	Range	1~8	1~8	1~29	1~3	2~8	20~610	3,300~24,000	2~58	1,400~7,200
	n	5/5	3/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Kaneda	GM	5	7	11	20	2	193	4,043	13	4,209
	SD	8	-	202	64	4	5,166	35,038	85	8,107
	Range	2~24	-	2~510	3~130	1~12	23~13,000	40~93,000	6~220	1,900~23,000
	n	5/5	1/5	5/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Katahara B	GM	4,859	2,111	1,059	542	8	29,009	134,110	857	2,936
	SD	6,128	2,977	24,610	6,410	9	145,435	543,268	5,309	1,701
	Range	360~21,000	190~11,000	10~80,000	14~20,000	3~30	2,000~ 1,300,000	9,300~ 1,700,000	30~4,700	940~6,500
	n	9/9	9/9	9/9	8/9	9/9	8/9	8/9	8/9	9/9
Motocho	GM	39	23	79	9	5	1,048	46,611	60	4,988
	SD	61	35	38	12	3	1,283	57,452	71	3,500
	Range	10~180	6~100	32~140	2~36	2~9	170~4,000	4,900~170,000	21~220	2,700~12,000
	n	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Higashicho	GM	40	20	27	8	2	1,108	31,008	33	4,929
	SD	80	51	18	7	2	1,842	19,884	24	4,875
	Range	15~210	9~130	9~51	2~19	1~7	490~4,900	7,900~68,000	15~85	1,500~14,000
	n	4/5	4/5	4/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Hanbara	GM	7	-	3	1	1	34	3,658	1	464
	SD	-	-	3	-	0	38	24,251	4	341
	Range	-	-	1~7	-	1~1	8~130	330~79,000	0 2~12	200~1,100
	n	1/9	0/9	2/9	1/9	3/9	8/9	9/9	9/9	9/9
Saido B	GM	9	6	24	11	2	941	58,564	33	9,745
	SD	13	7	73	16	2	1,496	77,893	38	101,361
	Range	2~43	2~23	4~250	2~44	1~6	45~4,900	4,900~240,000	7~110	2,900~ 330,000
	n	7/9	5/9	9/9	8/9	5/9	9/9	9/9	9/9	9/9
Ayutsu B.	GM	101	33	21	2	2	217	29,639	44	3,624
	SD	1,061	206	87	0	3	630	29,028	36	332
	Range	12~2,500	3~500	9~210	2~2	1~8	20~1,700	7,900~79,000	18~110	4,100~3,100
	n	4/5	4/5	4/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Total	GM	34	24	30	12	3	537	22,256	26	3,514
	SD	3,712	1,786	9,642	2,783	5	157,706	253,533	2,021	36,829
	Range	1~21,000	1~11,000	1~80,000	1~20,000	1~30	7~ 1,300,000	330~1,700,000	0 2~4,700	200~330,000
	n	63/77	51/77	68/77	51/77	65/77	74/77	76/77	76/77	77/77

GM : Geometric mean
SD : Standard deviation
n Number of tested samples

* Presumptive *C.perfringens* spores
- : Blank

3.2 原虫濃度と各指標項目濃度の回帰分析

原虫濃度を目的変数、指標項目濃度を説明変数とする単回帰式、重回帰式および自由度2重調整寄与率を Table 2 に示した。

Table 2 Regression line among protozoa and indicators

Criterion variable	No of explanation variable	$r^{/2}$	(Partial) regression coefficient for					b	P<0.05	P<0.01
			<i>C.perfringens</i> * (a_1)	Aerobic spore (a_2)	<i>E.coli</i> (a_3)	Coliforms (a_4)	Turbidity (a_5)			
Presumptive <i>Crypto.</i> (n=57)	1	0.544	1.03	-	-	-	-	-3.23	+	+
	1	0.425	-	-	0.72	-	-	-2.70	-	+
	1	0.140	-	-	-	-	1.26	0.87	-	+
	1	0.087	-	-	-	0.53	-	-2.41	-	+
	1	0.037	-	-0.90	-	-	-	7.48	+	-
	2	0.732	1.16	-1.51	-	-	-	6.20	+	+
	3	0.759	0.80	-1.65	0.36	-	-	6.70	+	+
	4	0.753	0.81	-1.72	0.30	0.11	-	6.59	+	+
5	0.744	0.82	-1.71	0.30	0.11	-0.03	6.54	+	+	
Confirmed <i>Crypto.</i> (n=48)	1	0.501	0.95	-	-	-	-	-3.20	+	+
	1	0.449	-	-	0.69	-	-	-2.75	+	+
	1	0.099	-	-	-	-	1.09	0.72	+	+
	1	0.099	-	-	-	0.61	-	-3.22	+	+
	1	0.032	-	-0.83	-	-	-	6.88	-	-
	2	0.677	1.08	-1.36	-	-	-	5.26	-	+
	3	0.730	0.59	-1.52	0.45	-	-	5.94	-	+
	4	0.718	0.59	-1.51	0.46	-0.02	-	5.98	-	+
5	0.706	0.60	-1.50	0.46	-0.02	-0.03	5.93	-	+	
Presumptive <i>Giardia</i> (n=58)	1	0.708	1.00	-	-	-	-	-3.07	+	+
	1	0.674	-	-	0.76	-	-	-2.94	+	+
	1	0.267	-	-	-	-	1.40	0.78	+	+
	1	0.263	-	-	-	0.69	-	-3.62	+	+
	1	-0.009	-	0.46	-	-	-	-1.51	-	-
	2	0.752	0.60	-	0.37	-	-	-3.43	+	+
	3	0.749	0.60	-0.21	0.40	-	-	-2.12	+	+
	4	0.740	0.60	-0.22	0.39	0.01	-	-2.13	+	+
5	0.731	0.59	-0.22	0.39	0.01	0.01	-2.11	+	+	
Confirmed <i>Giardia</i> (n=42)	1	0.671	1.02	-	-	-	-	-3.76	+	+
	1	0.657	-	-	0.84	-	-	-4.01	+	+
	1	0.318	-	-	-	0.92	-	-5.88	+	+
	1	0.206	-	-	-	-	1.28	0.37	+	+
	1	-0.046	-	-0.17	-	-	-	2.26	-	-
	2	0.697	0.58	-	0.42	-	-	-4.20	+	+
	3	0.702	0.56	-0.43	0.44	-	-	-1.37	+	+
	4	0.694	0.56	-0.54	0.37	0.18	-	-1.56	+	+
5	0.681	0.61	-0.48	0.38	0.15	-0.17	-2.00	+	+	

$r^{/2}$: Proportion doubly adjusted for the degrees of freedom

*.Presumptive *C.perfringens* spores

+ significant

- Rejected

b: Constant

3.2.1 目的変数：クリプトスポリジウム

単回帰分析でクリプトスポリジウムオーシスト濃度との間に最も高い相関が認められたのは推定ウエルシュ菌芽胞であった(目的変数:推定クリプトスポリジウム, $r^{/2}=0.544$, $p<0.01$, 目的変数:確定クリプトスポリジウム, $r^{/2}=0.501$, $p<0.01$)。このとき、回帰係数はほぼ1(推定 $a_1=1.03$, 確定 $a_1=0.95$)であり、推定ウエルシュ菌芽胞の濃度変化はクリプトスポリジウムオーシストの濃度変化によく一致していた。推定ウエルシュ菌芽胞よりは劣るものの、大腸菌でも相関が認められた(目的変数:推定クリプトスポリジウム, $r^{/2}=0.425$, $p<0.01$, 目的変数:確定クリプトスポリジウム, $r^{/2}=0.449$, $p<0.01$)。一方、好気性芽胞,

大腸菌群および濁度では自由度 2 重調整寄与率が低く、原虫濃度との間に相関は認められなかった。

重回帰分析で説明変数を 2 変数とした場合、推定、確定クリプトスポリジウム共に、説明変数の最適な組合せとして推定ウェルシュ菌芽胞と好気性芽胞が選択された(目的変数:推定クリプトスポリジウム, $r^2=0.732$, $p<0.01$, 目的変数:確定クリプトスポリジウム, $r^2=0.677$, $p<0.01$)。また、3 変数とした場合では推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および大腸菌が選択された(目的変数:推定クリプトスポリジウム, $r^2=0.759$, $p<0.01$, 目的変数:確定クリプトスポリジウム, $r^2=0.730$, $p<0.01$)。この 3 変数を用いたときにすべての組合せの中で最も高い自由度 2 重調整寄与率となり、説明変数を 4 以上としても自由度 2 重調整寄与率の増加はみられなかった。

3.2.2 目的変数：ジアルジア

クリプトスポリジウムの場合と同様、単回帰分析でジアルジアシスト濃度との間に最も高い相関が認められたのは推定ウェルシュ菌芽胞 であり(目的変数:推定ジアルジア, $r^2=0.708$, $p<0.01$, 目的変数:確定ジアルジア, $r^2=0.671$, $p<0.01$)、回帰係数もほぼ 1 であった(推定 $a_1=1.00$, 確定 $a_1=1.02$)。また、大腸菌でも相関が認められた(目的変数:推定ジアルジア, $r^2=0.674$, $p<0.01$, 目的変数:確定ジアルジア, $r^2=0.657$, $p<0.01$)。

重回帰分析では、クリプトスポリジウムの場合と異なり、推定、確定ジアルジア共に説明変数を 2 変数とした場合では推定ウェルシュ菌芽胞と大腸菌が最適な組合せとして選択された(目的変数:推定ジアルジア, $r^2=0.752$, $p<0.01$, 目的変数:確定ジアルジア, $r^2=0.697$, $p<0.01$)。推定ジアルジアシスト濃度ではこの 2 変数を用いたときに最適な組合せとなり、説明変数を 3 以上としても自由度 2 重調整寄与率の増加はなかった。確定ジアルジアではさらに好気性芽胞を加えて推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌および好気性芽胞の 3 変数とした場合に最適な組合せとなった($r^2=0.702$, $p<0.01$)。

4. 考察

本研究では 9 ヶ月間にわたり、相模川水系の原虫汚染状況調査を行った。下水や畜舎排水の流入が少なく、低濃度(低頻度)の汚染が観察された中津川半原から、畜舎排水の流入があつて常在的に高濃度の汚染が確認された小鮎川片原橋付近まで、汚染状況に幅はあるものの、試験水量 100l の調査ではほとんどの地点でクリプトスポリジウムオーシストまたはジアルジアシストが検出されており、広範かつ常在的な汚染が確認された。特に小鮎川片原橋付近では養豚排水処理施設からの放流水が大きな汚染源となっており、水環境の原虫汚染源として、畜産排水の重要性が示された。

原虫濃度と指標項目濃度との回帰分析により、単一の原虫汚染指標としては推定ウェルシュ菌芽胞が、複数の指標を用いて原虫汚染レベルを推測するには推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および大腸菌の 3 項目の組合せが最も適しており、原虫汚染を考慮した代替指標として推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および大腸菌を用いることの有効性が実証された。特に推定ウェルシュ菌芽胞は単回帰分析で両原虫濃度と高い相関が認められたばかりでなく、回帰係数が 1 近傍の値を示して両原虫の濃度変化ともよく一致していることから、環境水の原虫汚染レベルを推測するための最も有効な代替指標であるといえよう。また、下水処理工程でのジアルジアシストの濃度変化とよく一致していることも報告されており³⁾、下水、河川水などの広範な水環境で原虫汚染の代替指標となりうる事が強く示唆される。

クリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストは糞便由来の、各種環境ストレスに抵抗性を持つ、環境中では増殖しない生物性の粒子と考えることができる。このような原虫の特徴から、本研究で調査した指標項目が回帰分析または重回帰分析で説明変数として選択されたあるいは選択されなかった理由は以下のように推察される。

推定ウェルシュ菌芽胞はこれらの原虫の特徴をすべて有するため、最も有効な指標となった。

好気性芽胞はそのほとんどが枯草菌(*B.subtilis*)であり¹³⁾、糞便汚染との関係は低いため、単回帰分析では両原虫濃度と相関が認められなかった。しかし、芽胞であるため、各種環境ストレスに抵抗性をもち、生物性粒子の挙動を示すことから推定、確定クリプトスポリジウムオーシストおよび確定ジアルジアで最適な説明変数の組合せの1変数として選択された。しかしながらジアルジアシストはクリプトスポリジウムオーシストより環境水中での耐性が低いことと、枯草菌は大きさが $0.7\sim 0.8\times 2\sim 3\mu m$ とジアルジアシストの1/5程度であり、環境水中での挙動がサイズの大きいジアルジアシストとは異なることから、クリプトスポリジウムオーシストと異なり、ジアルジアシストの2変数の重回帰分析では選択されなかった。

一方、大腸菌は好気性芽胞とは反対に糞便汚染の特定性の強い指標ではあるものの、芽胞を形成しないために環境水中での死滅が速く、クリプトスポリジウムオーシストの2変数の重回帰分析ではより耐性の高い好気性芽胞が選択された。

大腸菌群および濁度は単回帰分析で原虫濃度との間に有意な相関は認められず、さらに重回帰分析で説明変数として取り入れても自由度2重調整奇与率は上昇しなかった。これは大腸菌群は大腸菌と比較して糞便汚染の指標性が低いためであり、また、濁度は無生物性の粒子の影響が大きく、原虫などの生物性の粒子とは異なる挙動を示すためであると考えられる。

原虫試験は煩雑であり、指標細菌濃度から原虫汚染のレベルを迅速かつ簡便に予測することは水系の原虫汚染対策に有効な手段である。本研究では推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌および好気性芽胞濃度は原虫汚染レベルを予測するための有効な指標であることが示された。しかしながら、指標細菌濃度から予測される原虫汚染レベルはクリプトスポリジウム症やジアルジア症集団発生時の状況を反映するものではなく、あくまで水域の原虫汚染の多寡を評価するためのものである。また、水から検出された原虫の感染性の評価は今後の検討課題であり、本研究で得られた知見には感染性に関する情報は加味されていない。従って、指標細菌濃度から予測された原虫汚染レベルを解釈する際にはこれらの情報が含まれていないことを考慮する必要がある。

5. まとめ

相模川水系のクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト濃度を調査した。また、大腸菌、大腸菌群、推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および濁度を同時に調査し、原虫汚染の代替指標としての有効性を回帰分析で評価した。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 相模川水系 11 地点の調査で推定クリプトスポリジウムオーシストはすべての地点で、確定クリプトスポリジウムオーシストは 10 地点で、また、ジアルジアシストは確定、推定共にすべての地点で検出された。それぞれの濃度の幾何平均値は推定クリプトスポリジウムオーシスト $34\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$ ($1\sim 21,000\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$)、確定クリプトスポリジウムオーシスト $24\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$ ($1\sim 11,000\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$)、推定ジアルジアシスト $30\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$ ($1\sim 80,000\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$)、確定ジアルジアシスト $12\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$ ($1\sim 20,000\text{個}\cdot 100\text{L}^{-1}$)であった。
- 2) 原虫濃度と各指標項目濃度との間の単回帰分析ではクリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシスト共に推定ウェルシュ菌芽胞との間に最も高い相関が認められた。
- 3) 推定および確定クリプトスポリジウムオーシストを目的変数とする重回帰分析では推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および大腸菌の組合せが、推定ジアルジアシストを目的変数とする重回帰分析では推定ウェルシュ菌芽胞と大腸菌、確定ジアルジアシストでは推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌および好気性芽胞が最適な組合せとして選択された。

- 4) 原虫汚染レベルを推測する代替指標として単一の指標では推定ウェルシュ菌芽胞が、複数の指標を用いる場合には推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および大腸菌が有効であった。特に推定ウェルシュ菌芽胞は原虫濃度の変化ともよく一致し、最も有効な代替指標であることが強く示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたって、平成9年度文部省科学研究費補助金 課題番号 09650606 および平成9年度私学振興財団大学院重点特別経費－研究科共同経費による補助を受けたことを付記する。

参 考 文 献

- 1) 橋本温, 平田強 (1998) 相模川水系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レベル, 水環境学会誌, **21**, 119-122.
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境水道整備課報道発表資料「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」平成9年8月19日付
- 3) 平田強, 橋本温 (1997) 水中のクリプトスポリジウムの存在量, 環境技術, **26**, 15-20.
- 4) Medema, G.J., Bahar, M. and Schets, F.M. (1997) Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, fecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms, *Water Science and Technology*, **35**(11-12), 249-252.
- 5) 橋本温, 平田強, 土佐光司, 眞柄泰基, 大垣眞一郎 (1997) 下水中の *Giardia* シストおよび *Cryptosporidium* オーシスト濃度と下水処理における除去性, 水環境学会誌, **20**, 404-410
- 6) Jakubowski, W., Boutros, S., Faber, W., Fayer, R., Ghiorse, W., LeChevallier, M., Rose, J., Schaub, S., Singh, A. and Stewart, M. (1996) Environmental methods for *Cryptosporidium*. *Journal of American Water Works Association*, **88**, 107-121.
- 7) Payment, P. and Franco, E. (1993) *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 2418-2424.
- 8) Hirata, T., Kawamura, K., Sonoki, S., Hirata, K., Kaneko, M. and Taguchi, K. (1993) Removal efficiencies of microorganism in wastewater treatment processes, *Water Science and Technology*, **28**(7), 55-61.
- 9) Hirata, T., Kawamura, K., Yano, K., Kaneko, M., Moniwa, T., Tosa, K. and Taguchi, K. (1991) *Clostridium perfringens*, as an indicator microorganism for the evaluation of the effect of wastewater and sludge treatment systems, *Water Science and Technology*, **24**(2), 367-372.
- 10) LeChevallier, M. W. and Norton, W.D. (1992) Examining relationship between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. *Journal of American Water Works Association*, **84**(12), 54-60
- 11) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針 別添 3 平成 8 年 10 月 4 日付
- 12) 厚生省生活衛生局水道環境部監修 (1993) 上水試験方法, pp492-494, pp516-517 日本水道協会.
- 13) (社)日本水道協会 (1993) 上水試験方法解説編, p578 日本水道協会.
- 14) Hass, C.N., Crockett, C.S., Rose, J.B., Gerba, C.P. and Fazil, A.M. (1996) Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *Journal of American Water Works Association*, **88**(9), 131-163

分担研究報告書 7

Giardia/Cryptosporidium ビーズの実用性の検討

分担研究者 平田 強、遠藤卓郎

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

Giardia/Cryptosporidium ビーズの実用性の検討

麻布大学環境保健学部 平田 強
麻布大学大学院 橋本 温
国立感染症研究所寄生動物部 遠藤卓郎

研究要旨

Cryptosporidium beads との混合キットの有効性について、シスト・オーシストを添加した純水と環境水の双方から新たに開発された *Giardia* 用 beads の *Giardia* シストとの結合能力を検討し、その実用性を明らかにした。また、*Giardia* と *Cryptosporidium* 分離能力について検討し、*Giardia* については従来法（メンブレンフィルター—ショ糖浮遊法）に比べて遜色ない結果が得られることを明らかにした。しかし、*Cryptosporidium* については、混合キットで選択分離したとき、従来法よりも回収率がやや低下する傾向が認められ、混合キットを用いた IMS 法では、濃縮物と IMS の比率を調整するなどの工夫が必要である可能性が示唆された。

I *Giardia* Beads の *Giardia* シスト結合能力の評価

1 目的

Giardia beads, *Cryptosporidium* beads の *Giardia* シストに対する選択結合性を評価する。

2 方法

Giardia WB 株（国立感染症研究所）のシスト 3.5×10^3 個を精製水 10mL に懸濁させ、*Giardia* および *Cryptosporidium* 分離用ビーズ（DYNAL anti-*Giardia* and *Cryptosporidium*）の *Giardia* beads, *Cryptosporidium* beads, *Giardia* beads と *Cryptosporidium* beads の混合物をそれぞれ個別に添加して反応させ、上清に残存する *Giardia* シストを計数し、beads の *Giardia* シストとの結合性を評価した。

3 結果及び考察

結果を Table 1 に示す。

Table 1 *Giardia* beads の結合性試験結果

Beads	上清中の <i>Giardia</i> シスト数	結合率
<i>Giardia</i> beads 単独	2.5×10^3 個	29%
<i>Cryptosporidium</i> beads 単独	3.5×10^3 個	0%
両 beads の混合物	2.6×10^3 個	26%

Giardia beads 単独の場合、シストと結合は生じたものの、液中のシストの 29% としか結合しなかった。*Cryptosporidium* beads とは当然のことながら全く結合しなかった。*Giardia* beads と *Cryptosporidium* beads の混合物の場合も、*Giardia* beads 単独の場合とほぼ同じ 26% のシストとしか結合しなかった。*Giardia* beads と結合したシストが 29% と低かったのは、添加したシストの抗原性が当該 beads の抗体とマッチングしていなかったことが考えられる。

このような不可解な問題が発生したので、次の II の評価を行った。

II Giardia シストの抗原性の評価

1 目的

Iで行った *Giardia* beads の *Giardia* との結合能力が異常に低い結果となったが、その原因は、供試 *Giardia* シストの可能性が考えられた。そこで、ヒト下痢症由来の *Giardia* 4株を入手、これに *Giardia muris* を加えた計5株を用いて *Giardia* beads の *Giardia* との結合能力の再評価を行った。

2 方法

(1) 供試 *Giardia* シスト

実験にはヒト由来 *Giardia* sp. 4株および *Giardia muris* 1株の計5株を用いた (Table 2)。なお、Iの評価で、抗原性に問題のあった株はWB株である。

(2) 蛍光抗体染色試薬

蛍光抗体染色には Hydrofluor Combo(SDI 社製)および Giardi-aGlo(Waterborne 社製)を用いた。

Table 2 供試 *Giardia* 株

由来	株	分離精製方法
ヒト	人由来株1(国立感染症研究所)	糞便から分離精製
	人由来株2(神奈川県衛生研究所)	糞便から分離精製後5%ホルマリンで保存2年
	R307(DYNAL社)	5%ホルマリン保存
	WB(国立感染症研究所)	ヌードマウス糞便から精製
?	<i>G.muris</i> (国立感染症研究所)	ヌードマウス糞便から精製

(3) 操作

Table 2 の各シストの希釈懸濁液をマイクロチューブ(1.5mL)に入れ、染色抗体が染色キットに記載されている稀釈倍率になるように抗体を加えてタッチミキサーで攪拌した後、室温で25分反応させた。染色後、PBSを加え、遠心分離して上清を吸引除去した(Hydrofluor Comboについては1次、2次抗体の二回同様の操作を行った)。染色後、1%DABCO水溶液10 μ Lを滴下したスライドグラス上に、適量の試料をのせ、カバーガラスをかけてネイルエナメルで封入した。

これを微分干渉顕微鏡(200倍)してシストを検索し、各シストについてB励起で観察した。蛍光強度を目視観察して、強染色シストと弱染色シストに分別して計数した。

3 結果及び考察

計数結果をTable 1, 2に示した。WB株を除く他のヒト由来株はHydrofluor Combo, Giardi-aGloのいずれによってもすべて強染色された。*Giardia muris*も両抗体染色試薬ですべて強染色された。このように、不良染色を示すのはWB株のみであって、しかも不良染色は両抗体染色試薬に共通であった。

これらの結果から、WB株のみが *Giardia* spp.の中で特殊な抗原性を有する株であるため染色不良を示したのであって、他の株ではHydrofluor Combo, Giardi-aGloのいずれの抗体試薬も良好に染色でき、両抗体試薬は同等で、かつ、環境試料への適用性もほぼ充分と判断された。

Table 1 Hydrofluor Comboによる *Giardia* 5株の染色性

	微分干渉計数値(個)	強染色シスト(個)	弱染色シスト(個)
人由来株1	43	43(100%)	0
人由来株2	100	100(100%)	0
R307	128	128(100%)	0
WB	46	26(57%)	20(43%)
<i>G.muris</i>	112	104(4%)	0

Table 2 Giardi-aGlo による *Giardia* 5 株の染色性

	微分干渉計数値(個)	強染色シスト(個)	弱染色シスト(個)
人由来株1	87	87(100%)	0
人由来株2	103	103(100%)	0
R307	105	105(100%)	0
WB	102	24(24%)	79(77%)
G.muris	136	126(93%)	10(7%)

Ⅲ 精製水へのシスト・オーシスト添加系での回収能力の評価

1 目的

Dynal 社の開発した IMS 法用 *Giardia/Cryptosporidium* 染色キットの検出能力を評価する。

2 材料と方法

(1) 供試 *Giardia* シストおよび *Cryptosporidium* オーシスト

ヒト由来の *Giardia* sp.株および *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用いた。

G.sp. (R307 株, DYNAL 社, 5%ホルマリンにより固定済み)

C.parvum (HNJ-1 株, 大阪市立大, 未固定)

(2) 方法

10³/10mL の *Giardia* シスト, *Cryptosporidium* オーシスト懸濁液をそれぞれ個別に調製し, 精製水 10mL に一定量の懸濁液を添加して, *Giardia* シスト単独, *Cryptosporidium* オーシスト単独, シスト・オーシスト混合の懸濁液を調製し, 5 種類の試料とした。添加数は 10mL 当たり, シスト 190 個, オーシスト 270 個であった。

5 種類の試料について, DYNAL anti-*Giardia* and *Cryptosporidium* を用いて IMS 法により *Giardia* シストと *Cryptosporidium* オーシストを同時分離し, 分離液の全量 (10mL) をメンブレンフィルターを用いてろ過し, フィルター上で間接蛍光抗体染色を行い, 顕微鏡観察により計数した。

3 結果および考察

シスト及びオーシストの添加数及び回収結果を Table 3 に示す。

今回の R307 株を用いた実験では *Giardia*, *Cryptosporidium* 単独および両者混合系で, *Giardia* では 63-96%(平均 80%), *Cryptosporidium* では 71-96%(84%)と高い回収率が確認された。

Table 3 のデータを詳細にみると, *Giardia* では, 単独系(G-1,2:73%)よりも *Giardia* と *Cryptosporidium* の混合系(GC-1,2:87%)で, *Cryptosporidium* では混合系(GC-1,2:79%)よりも単独系(C:96%)で若干高い回収率が得られているが, 実験数が少ないため, 再現性のある現象なのかどうか, 判断できなかった。しかし, この差は, 実用上, 問題とならないレベルと考えられる。

Table 3 シストおよびオーシストの添加回収試験結果

実験系	添加数 (個/試料)		回収数 (%)	
	<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>	<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>
G-1	190	0	120 (63%)	
G-2	190	0	154 (82%)	
C	0	135	130 (96%)	
GC-1	190	135	145 (77%)	116 (86%)
GC-2	190	135	163 (96%)	96 (71%)

IV 環境水濃縮物へのシスト・オーシスト添加系での回収能力の評価

1 目的

精製水への添加系でほぼ良好な回収結果が得られたので、環境水への濃縮物に *Giardia* シストを添加し、環境水中の懸濁物質からの *Giardia* 用ビーズの分離能力を評価する。あわせて、回収率および操作性についてシヨ糖浮遊法との比較評価を行う。

2 材料と方法

(1) 供試 *Giardia* シストおよび *Cryptosporidium* オーシスト

IIIの(1)に同じ。

(2) 環境水濃縮物の調製

相模川宮山付近河川水 200L を、メンブレンフィルター-アセトン溶解法および中空糸膜法(小型モジュール)で濃縮した。

(3) 方法

メンブレンフィルター-アセトン溶解法と中空糸膜モジュール法で濃縮した河川水 200L 相当の濃縮物をそれぞれ 100L 相当分ずつに 2 分し、一方にシスト懸濁液 3mL とオーシスト懸濁液 3mL を加え、よく攪拌したのち、2 等分した。他方は無添加のままとした。これらの濃縮物から 40L 相当の濃縮物を分取し、それをさらに 2 等分し、一方を IMS 法で、他方をシヨ糖浮遊法で選択分離した。

選択分離した試料の全量をフィルター上で間接蛍光抗体染色し、顕微鏡で観察し、計数した。

3 結果

IMS 法およびシヨ糖浮遊法で選択分離した試料中の *Giardia* シストおよび *Cryptosporidium* オーシストの計数値、回収率および添加系の添加数を Table 4 に示した。また、それぞれの系のアセトン溶解-シヨ糖浮遊法(従来法)に対する回収シストおよびオーシスト数の比率を Table 5 に示した。

Table 4 濃縮方法の異なる濃縮物からのアセトン溶解法と IMS 法のシスト・オーシスト回収結果

			計数値(個)		添加量		回収率(%)*	
			クリプト	ジアルジア	クリプト	ジアルジア	クリプト	ジアルジア
アセトン溶解法濃縮物	無添加	シヨ糖	100	10	—	—	—	—
		IMS	38	20	—	—	—	—
中空糸濃縮物	無添加	シヨ糖	74	14	—	—	—	—
		IMS	111	11	—	—	—	—
アセトン溶解法濃縮物	添加	シヨ糖	489	320	680	560	57.2	55.4
		IMS	237	361	680	560	29.3	60.9
中空糸濃縮物	添加	シヨ糖	575	211	680	560	73.7	35.2
		IMS	316	417	680	560	30.1	72.5

* 回収率はそれぞれの濃縮+選択分離法での無添加でのシストまたはオーシスト数を計数値から引いた値を用いて算出した。

Table 5 アセトン溶解-シヨ糖浮遊法計数値に対する各方法の計数値の比

			対アセトンシヨ糖比	
			クリプト	ジアルジア
アセトン溶解法濃縮物	無添加	シヨ糖浮遊法	1.00	1.00
		IMS	0.38	2.00
中空糸膜モジュール法濃縮物	無添加	シヨ糖浮遊法	0.74	1.40
		IMS	1.11	1.10
アセトン溶解法濃縮物	添加	シヨ糖浮遊法	1.00	1.00
		IMS	0.48	1.13
中空糸膜モジュール法濃縮物	添加	シヨ糖浮遊法	1.18	0.66
		IMS	0.65	1.30

Giardia シストは、無添加系でも添加系でも、アセトン溶解法濃縮物、中空糸膜モジュール法濃縮物のいずれからも、シヨ糖浮遊法よりも IMS 法で高い計数值あるいは高い回収率を示す傾向が明らかであることから (Table 4, 5), *Giardia* beads は環境水濃縮物から良好に *Giardia* シストを回収できると考えられる。

一方, *Cryptosporidium* では様子が異なり, シヨ糖浮遊法に比べて回収率が低い傾向が認められた (両者とも 30%; Table 4), 従来法との比較でも中空糸+IMS の系を除いて, IMS 法での回収は従来法より低い結果となっている (Table 5)。このことは, beads を用いる IMS 法では, *Giardia* beads と *Cryptosporidium* beads を混合した場合, *Giardia* の回収率には影響しないが, *Cryptosporidium* の回収率を若干低下させる場合があることを示しており, 高い定量性を要求される場合は, beads 添加量を増やす, IMS 操作時の濃縮物量を少なくする, といった操作上の注意が必要なのかもしれない。

分担研究報告書 8

中空糸膜モジュールを用いた
新しい原虫濃縮方法の検討

分担研究者 平田 強、金子光美

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

中空糸膜モジュールを用いた新しい原虫濃縮方法の検討

麻布大学環境保健学部	平田 強
摂南大学工学部	金子 光美
麻布大学大学院	橋本 温

研究要旨

中空糸膜モジュールを使用する新たな原虫濃縮方法の開発を試みた。中空糸膜には、水道用膜ろ過装置として実用化されている酢酸セルロース製、分画分子量 150,000Dalton のUF膜を選定した。実用性に係る種々の観点から検討し、外圧方式でろ過し、特殊な誘出液を使用することなく、単なる手動振盪による水洗浄で中空糸膜付着物を容易に剥離回収できることが明らかになった。この方法による濃縮物と従来法（メンブレンフィルターアセトン溶解法）による濃縮物について、シヨ糖浮遊法とIMS法で選別分離し、回収率を比較検討した。その結果、従来法と同等か、それ以上の回収率が得られることが明らかになった。この方法の導入により、受託機関への検体送付を水試料によらずろ過済モジュールで行えるほか、アセトン使用を避けることができる。しかし欠点として、従来法に比べて濃縮物量が多くなる傾向が認められた。

1 目的

環境水の原虫濃度は一般に低いですが、感染力が著しく強いことを考えると、水道における感染症防止のためには極めて低濃度レベルの汚染を定量的に評価する必要がある。しかしながら、現行のメンブレンフィルター法、カートリッジフィルター法、遠心沈殿法のいずれも、超低濃度汚染の定量的評価には必ずしも十分な方法となっていない。

暫定対策指針に記載されているクリプトスポリジウム等の濃縮回収方法のなかではメンブレンフィルターアセトン溶解法が最も多用されている。この方法は煩雑ではあるものの、正しく操作すれば比較的安定した回収率が得られるほか、広範な水質に適用できるなど、汎用性に優れた方法であるが、次のような問題点が指摘されている。

- ①試料水の濁度が高いと多量の水試料のろ過には多数のフィルターを必要とすること
- ②フィルターからの分離操作にアセトンを用いる必要があり、労働衛生上は必ずしも好ましくないこと
- ③アセトンによってシストやオーシストが不活化あるいは殺滅され、検出されたオーシストの生育活性等を測定する必要性が生じたときの障害になるおそれがあること

そこで本研究では、これらの問題点を解決できる濃縮回収方法を開発するために、

- (1) 多量の水試料（できれば水道水で1m³レベル）をろ過できること、
- (2) ろ過済みフィルターが容易に搬送できるものであること
- (3) ろ過、回収操作が比較的簡便であること、
- (4) 回収率がメンブレンフィルターアセトン溶解法よりも高いか、少なくとも同等であること、

(5) 後段の選択濃縮、染色等の操作に悪影響を及ぼさないこと
 の5点を満たすことを目標に据え、中空糸限外ろ過モジュール膜を用いた新たなクリプトスポリジウムオーシスト濃縮方法について検討した。なお、本研究の推進に当たっては、ダイセル化学株式会社及びダイセンメンブレンシステムズ株式会社両社の多大な協力を得た。

2 検討内容、方法及び結果

2-1 膜材質の選定

膜は既存の膜利用技術に使用されている中空糸膜から選定することとし、吸着性の低い材質である酢酸セルロース製のものとした。具体的には、ダイセンメンブレンシステムズ社製の酢酸セルロース製中空糸UF膜とした。選定した中空糸膜の仕様は次のとおりである。

膜材質：酢酸セルロース

分画分子量：150,000Dalton

2-2 通水方向の検討

麻布大学3号館の水道水100Lにオーシスト約600個を添加したものを原水とした。原水100Lを、ローラーポンプ加圧方式で膜モジュールに内圧方式と外圧方式で通水した。モジュール内の中空糸膜の膜面積は、外表面換算で0.17 m²、内表面換算0.14m²である。通水後、USEPA Method 1622 記載の誘出液 (Laureth-12 1.0g, Tris(pH7.4) 10mL, EDTA(pH8.0) 2mL, Antiform A 150μL, 精製水 1L) を用いて誘出した。その結果、内圧方式では膜に付着したオーシストを単なる振騰によって剥離させるのは困難で、回収率は30%程度にすぎなかった。一方、外圧型ではオーシストの剥離が極めて容易で、単なる手動振騰でほぼ100%回収することができた。この結果に基づき、通水方向は、中空糸の外側から中空糸内部へ向けてろ過する外圧方式を採用した。

2-3 ろ過可能水量の検討

中空糸膜モジュールに麻布大学3号館水道水をローラーチューブポンプで連続供給し、流量の低下状況を観察した。その結果、ろ過流量が初期流量の1/3に低下するまでの積算ろ過水量は約30m³/m²であった。また、膜面積0.1m²モジュールによるろ過性能調査では、近畿地方の水道水を初期流量0.25L/minを維持したまま40Lろ過することが可能で、代表的な汚濁河川である大和川河川水(濁度約10度)では10Lろ過可能であった(10Lろ過時の流量は0.2L/min, 平均ろ過圧力235kPa(最大使用圧力284kPa))。これらの結果から、暫定対策指針で指定されている水道水40L及び河川水おおむね20Lをろ過可能な膜面積は0.1m²と推定した。

暫定対策指針は行政対応上のものであるが、浄水場等におけるクリプトスポリジウムの挙動や除去性を検討するには、水道水1m³レベルのろ過が可能なモジュールが望ましい。それらについては別途、膜面積を適宜増加させることにより対応可能である。

2-4 膜からの剥離回収に関する検討

本膜モジュールに採用した中空糸膜はアセトンで溶解することができる。したがって、従来法のメンブレンフィルターアセトン溶解法のディスクフィルターの代わりに組み込むことも可能であるが、アセトンはシストやオーシストの生育活性に影響するおそれが高いことから、アセトンを使用しない回収方法を検討した。

2-4-1 従来法との比較(1)ーオーシスト分離の難しい環境水による比較

(1) 方法

排水の流入があり、従来法(メンブレンフィルターアセトン溶解法)ではオーシスト分離が比較

的難しい水(相模川厚木市元町付近河川水)を対象とし、従来法と中空糸膜モジュール法のオーシスト回収能力を比較した。中空糸膜モジュールは KPO2(外圧型, 内径 0.6mm, 外形 0.9mm, 膜面積 0.14m²)を使用した。ろ過水量は従来法で 50.4L, 中空糸膜モジュール法で 16.4L とした。

誘出は method 1622 誘出液を用いた振盪法(シェーカー使用)で、誘出液量は 80mL, 振盪は 5min × 2回とした。誘出操作 1 回目の誘出液と 2 回目の誘出液をそれぞれ個別に試験した。

選択分離は従来法についてはシヨ糖浮遊法, 中空糸膜モジュール法については濃縮回収液を 2 等分し、一方をシヨ糖浮遊法, 他方を IMS 法で行った。なお、誘出 2 回目の誘出液については、IMS 法のみで選択分離した。

(2) 結果

結果を Table 1 に示した。計測されたクリプトスポリジウムの推定オーシスト濃度は、中空糸膜モジュール法で濃縮したあとシヨ糖浮遊法で分離した場合 134 個/100L であり、従来法で測定した濃度 149 個/100L とほぼ同じであった。確定値では中空糸膜モジュール法 98 個/100L, 従来法 62 個/100L となり、中空糸膜モジュール法の方が高い値であった。ジアルジアでは、推定値で中空糸膜モジュール法 537 個/100L に対して従来法 331 個/100L, 確定値で中空糸膜モジュール法 146 個/100L, 従来法 133 個/100L で、いずれも中空糸膜モジュール法が良好な成績を示した(従来法の成績に対する比を Table 2 に示した)。

このように、中空糸膜モジュール法は、従来法と比較して、少なくとも同等か、むしろ良好といえる回収成績を示す傾向が認められた。

Table 1 河川水より分離されたオーシスト数

	中空糸+シヨ糖	中空糸+IMS	従来法
推定 <i>Cryptosporidium</i> oocysts	11 個/8.2L	2 個/8.2L	75 個/50.4L
確定 <i>Cryptosporidium</i> oocysts	5 個/8.2L	0 個/8.2L	31 個/50.4L
推定 <i>Giardia</i> cysts	44 個/8.2L	—	167 個/50.4L
確定 <i>Giardia</i> cysts	12 個/8.2L	—	67 個/50.4L

Table 2 従来法と中空糸膜モジュール法の比較評価(Table 1 より)

	中空糸+シヨ糖	中空糸+IMS	従来法
推定 <i>Cryptosporidium</i> oocysts	0.90	0.16	1.00
確定 <i>Cryptosporidium</i> oocysts	1.00	0	1.00
推定 <i>Giardia</i> cysts	1.62	—	1.00
確定 <i>Giardia</i> cysts	1.10	—	1.00

2 回目の誘出液からはオーシスト検出されなかった。

(3) 結論

中空糸膜モジュール法で調査した場合、従来法でオーシスト分離が比較的難しいと思われる試料で、従来法と同等かそれ以上の能力で *Cryptosporidium* オーシストまたは *Giardia* シストを分離することが可能であった。また、誘出操作 2 回目の誘出液からオーシストはほとんど検出されず、膜からの剥離は実質上、1 回の誘出操作で十分と判断される成績が得られた。

2-4-2 従来法との比較(2) - オーシスト添加環境水による比較

(1) 方法

試料水として、水道水源である相模川寒川町宮山地点の河川水を用い、オーシスト無添加系と添加

系の両系で、従来法と中空系膜モジュール法との比較を行った。ろ過、誘出等の操作方法は基本的に2-4-1と同様の方法で行った。なお、ろ過水量は、オーシスト無添加系では、中空系膜モジュール法49L、従来法40L、オーシスト添加系では、中空系膜モジュール法53.6L、従来法45.4Lであった。

選択分離も2-4-1と同様、従来法についてはシヨ糖浮遊法で、中空系膜モジュール法は濃縮物を2等分してシヨ糖浮遊法およびIMS法で選択分離した。また、誘出2回目の誘出液については全量IMS法で選択分離した。

(2) 結果

無添加系で検出されたオーシスト数をTable 3に、添加系のオーシスト添加量と回収オーシスト数をTable 4に示した。無添加系では中空系膜モジュール-シヨ糖浮遊法と従来法でほぼ同じ値が得られた。中空系膜モジュール-IMS法と従来法-IMS法では、中空系膜モジュール-IMS法がより良好な成績を示した。添加系では、シヨ糖浮遊法、IMS法のいずれの場合も、中空系膜モジュール法と従来法で有意な差はみられなかった。

Table 3 無添加系におけるオーシスト、シストの回収結果

濃縮選択分離法(試験水量)	オーシスト数/50L	シスト数/50L
中空系+シヨ糖(24.5L)	39	33
中空系+IMS(24.5L)	45	—
従来法(アセトン+シヨ糖)(20L)	38	35
従来法(アセトン+IMS)(20L)	33	—

Table 4 添加系におけるオーシスト、シストの回収結果

濃縮選択分離法(試験水量)	添加オーシスト数/50L	回収オーシスト数/50L
中空系+シヨ糖(24.5L)	250	138
中空系+IMS(24.5L)	250	206
従来法(アセトン+シヨ糖)(20L)	250	145
従来法(アセトン+IMS)(20L)	250	178

添加系のオーシスト数から無添加系のオーシスト数(試料水由来のオーシスト数)を除いた値からオーシスト回収率を推算した。結果をTable 5に示した。選択分離をシヨ糖浮遊法で行った系と比較すると、添加したオーシストの回収率の推定値は、中空系膜モジュール法-シヨ糖浮遊法 a では59%、従来法 c では53%であり、有意差はないものの、中空系膜モジュール法でやや高い値となった。IMS法で選択分離した場合も、従来法(d; 65%)に比べて中空系膜モジュール法(b; 88%)で高い値が得られた。このように、中空系膜モジュールの使用による回収率の低下はなく、選択分離方法としてシヨ糖浮遊法、IMS法のいずれを用いても、従来法と同等か、むしろ若干良好な成績が得られる傾向が認められた。

中空系膜モジュールからの2回目の誘出操作では、オーシスト添加系、無添加系のいずれもオーシストはほとんど回収されなかった(添加系、無添加系のいずれも、回収数はオーシスト0個、シスト1個)。このことから、特に高度に汚濁した水源でなければ、回収可能なオーシストのほとんどが、1回の誘出操作で回収されるものと考えられる。

Table 5 オーシストの推定回収率

実験系	オーシスト回収率(%)
a 中空系+シヨ糖	59
b 中空系+IMS	88
c 従来法(アセトン+シヨ糖)	53
d 従来法(アセトン+IMS)	65

(3) 結論

中空系膜モジュール法は、河川水でも従来法と同等か、それ以上のオーシスト回収率が得られた。また、中空系膜からのオーシストの剥離回収は1回の誘出操作で十分達成できることが強く示唆された。

2-4-3 膜モジュールのろ過能力と回収方法の予備的検討

(1) 方法

中空系膜モジュール (FAO3 ; 中空系内径 0.5mm, 外形 0.6mm, 膜面積 2.3 m²) を用いて浄水場ろ過水を、FBO2(原水用, 膜面積 0.14 m²)を用いて浄水場原水をろ過した。ろ過後、それぞれ3とおりの方法で誘出操作を行ったのち中空系膜を目視観察し、付着物の剥離状況を評価した。なお、両モジュールとも、使用後、洗浄剤で丁寧に洗浄し、繰り返し使用した(試料: 浄水 4 試料, 原水 2 試料)。

誘出方法は次のとおりである。

FAO3 からの誘出: 1. 精製水 200ml を加え手動振盪×3 回

2. method1622 誘出液 200ml を加え手動振盪

3. 精製水 200ml を加え手動振盪

FBO2 からの誘出: 1. 精製水 100ml を加え手動振盪×3 回

2. method1622 誘出液 100ml を加え手動振盪

3. 精製水 100ml を加え手動振盪

(2) 結果

浄水場ろ過水は FAO3 (膜面積 2.3m²) で 2m³ 以上、浄水場原水は FBO2 (膜面積 0.14m²) で 50L 以上ろ過可能なことが推測された(ろ過実績からの推定)。この結果から、ろ過水 100L, 水道原水 20L をろ過できる膜面積はおおむね 0.1m² と考えられた。また、誘出操作については、精製水による手動振盪のみで膜周囲の堆積物は外観上、完全に剥離されていたことから、特殊な誘出液を使用しなくても、精製水のみで誘出できる可能性が示唆された。

これらの結果に基づき、2-4-4の剥離回収方法の検討を行った。

2-4-4 水道水および河川水濃縮物の剥離回収方法(誘出液と誘出回数)に関する検討

(1) 水道水濃縮物からの剥離回収

オーシスト 1.41×10^4 個を添加した水道水 1 m³ を全量ろ過し、精製水のみで4回誘出操作を行った(1回当たり精製水 100mL で手動振盪による方法)。5回目は、Method 1622 誘出液を用いて誘出した。各回の誘出液についてオーシストを定量し、回収率を算出した。結果を Table 6 に示す。

精製水による1回目の誘出操作により98%を超えるオーシストが回収された。水道水のような有機濁質の少ない水の場合は、中空系膜からの分離に、特殊な誘出液を用いることなく、精製水による振盪のみで中空系膜から十分に剥離回収できる可能性が示唆された。

Table 6 誘出回数別回収オーシスト数と回収率

誘出回数	回収数(個)	回収率(%)
1回目	1.39×10 ⁴	98.6
2回目	223	1.6
3回目	4	0.03
4回目	3	0.02
5回目	0	0

(2) 河川水濃縮物からの剥離回収

実際の河川水を用いて、(1)と同様の試験を行った。当該河川水はこれまでの調査で常時クリプトスポリジウムオーシストが存在する地点であることから、オーシスト無添加系とオーシスト添加系の2系で評価した。

1)無添加系

無添加系では、添加系と同一の河川水 50.5L を濃縮し、誘出操作全回分の誘出液を合わせ、その全量を定量した。得られたオーシスト数は 150 個で、当該河川水のクリプトスポリジウムオーシスト濃度は 297 個/100L となった。

2)添加系

添加系での誘出回数ごとの回収オーシスト数を Table 7 に示した。なお、回収率の算出に当たって、添加オーシスト数に無添加河川水中のオーシスト数を加えた値を添加河川水中のオーシスト数とし、この値に対する比率から算出した。

- ・ 添加オーシスト数 : 6,900 個を添加
- ・ ろ過水量 : 107.7L
- ・ 河川水中のオーシスト濃度 : 150 個/50.5L

水道水の場合は誘出操作 1 回で十分に回収できたが、河川水の場合は 1 回目で 66.7%、2 回目で 21%が回収され、1 回の誘出操作のみでは不十分であった。しかし、誘出操作 2 回までの積算回収率は 87.7%となったことから、精製水のみで誘出する場合は、2 回の誘出操作が必要と判断された。

Table 7 誘出回数別回収オーシスト数と回収率

誘出回数	回収数 (%)	積算%	回収%*1	積算%*1	相対回収率
1回目	4,800 (66.7)	66.7	66.1	66.1	75.3
2回目	1,480 (21.0)	87.7	20.4	86.5	99.0
3回目	34 (0.47)	88.1	0.47	87.0	99.4
4回目	23 (0.32)	88.5	0.32	87.2	99.9
5回目	6 (0.08)	88.6	0.008	87.3	100
Total	6,343 (88.6)	88.6	87.3	87.3	100

*1: 河川水由来オーシストの回収率と添加オーシストの回収率が同じ値であるとしたときの回収率
河川水を用いた系では 1 回の誘出で回収率 98.9%を達成したが、河川水の場合は 2 回の誘出操作が必要。

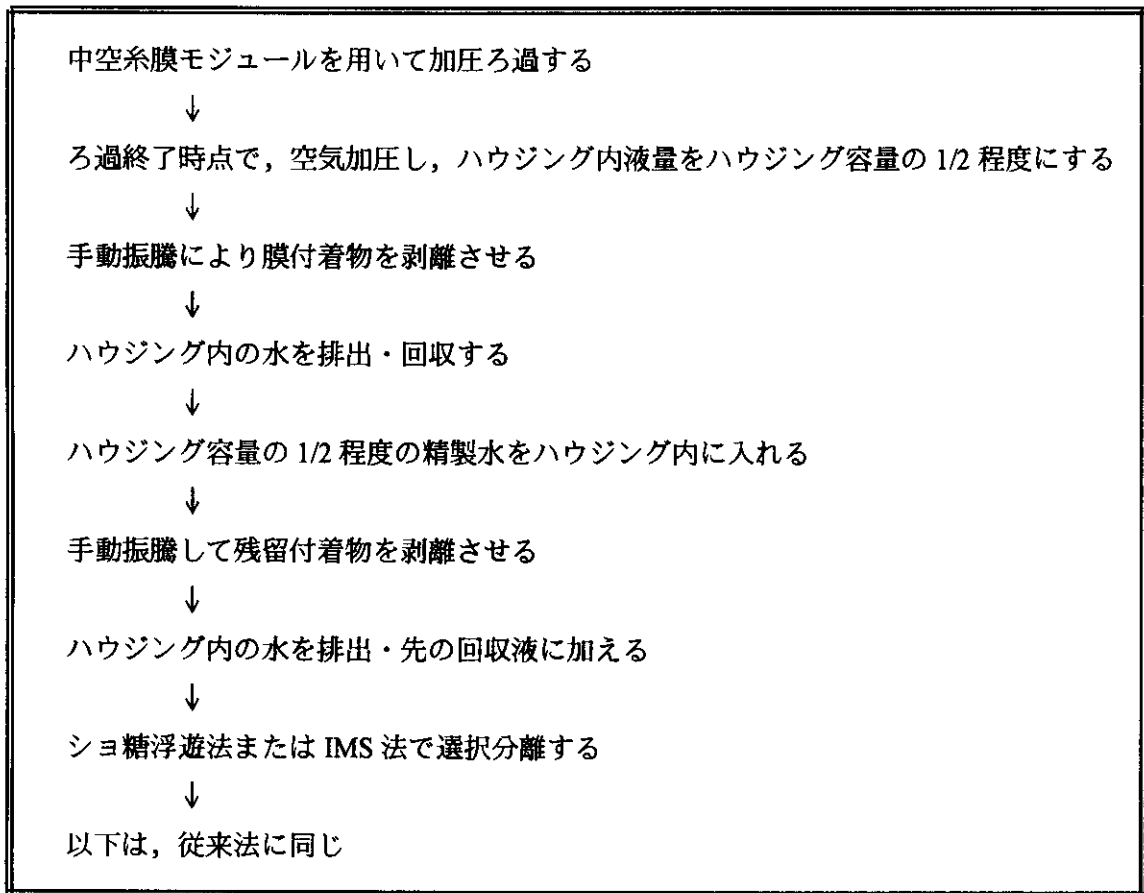
3 膜モジュールの設計

水中のクリプトスポリジウム濃縮方法として、中空糸膜モジュールを用いて濃縮する方法について検討した。その結果、以下の知見が得られた。

- (1) 中空糸膜の材質は酢酸セルロース製のものが利用できる。この中空糸膜は既に水処理用に実用化されているものであり、大量に生産されている。このため開発・製作に要する費用を圧縮できる。しかも、モジュール内に充填する中空糸膜面積を調整することにより単一のモジュールで大量の試料水のろ過が可能となり、浄水処理過程におけるクリプトスポリジウムの挙動や超低濃度のクリプトスポリジウムを検出できる可能性が高く、原虫汚染問題に対する取り組みに大きく貢献できる。加えて、試料をろ過したモジュールを受託検査機関に送付する方法を導入することにより、クリプトスポリジウム検査受託検査機関の濃縮操作を省略できるメリットも想定される。
- (2) 中空糸膜からの誘出には、精製水をハウジング内に入れて手動振盪する簡単な方法が適用可能であり、誘出回数は2回で充分と考えられる。このことは、従来法の試験操作段階で余儀なくされているオーシストの不活化を大幅に低減することが可能となり、将来の発展に貢献できる可能性が高い。
- (3) 中空糸膜モジュールを用いた濃縮回収方法は、従来法であるメンブレンフィルター-アセトン溶解法とほぼ同等か、それ以上の回収率が期待できる。
- (4) 問題点としては、中空糸膜モジュール法では従来法に比べて微細な粒子を捕捉するので沈渣が大きくなることが挙げられる。このため、後段の選択分離操作段階における工夫が必要となる場合も想定される。

これらの知見に基づき、まずは暫定指針に対応できる膜モジュール（原水 20L 程度、浄水 40L）を設計することとし、基本設計の詰めを一応終了、試作品を作成した。現在、試作品を用いた実証試験の段階に入っている。

なお、この方法は、クリプトスポリジウム試験方法に記載してあるカートリッジフィルター法の一つとして位置付けられ、提案する新しい方法の捕集・剥離回収操作は次のとおりである。



ハウジングはよく洗浄したのち、再使用する。

膜モジュールもよく洗浄すれば、繰り返し再使用可能である。