Table 9 Frequency and concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw and filtered water

Country	Mean	Range	positive/sample	Location	References
Cryptosporidium					
Raw water					
U.S. and Canada	270/100L(GM)	7-48400/100L	74/85 (87%)	river	LeChevallier *et al.*, 1991
U.S.	43/100L(GM)	2-4400/100L	57/111 (51%)	river	Rose *et al.*, 1991
U.S.	14/L(GM)				
Japan	2/10L(GM)	2-4/10L	8/272(8%)	river and lake	National Survey, 1996
Japan	3/10L(GM)	1-26/10L	7/17(41%)	river	Kanagawa Prefecture, 1998
Filtered water					
U.S.	0.04/100L(GM)		2/17(12%)	-	Rose *et al.*, 1991
U.S.	3.3/100L		35/262(13%)	-	LeChevallier and Norton, 1995
Japan	1.2/1000L(GM)	0.5-8/1000L	9/26(35%)	-	Present
Giardia					
Raw water					
U.S. and Canada	277/100L(GM)	44-6600/100L	69/85 (81%)	river	LeChevallier et al., 1991
U.S.	43/100L(GM)	2-140/100L	14/111 (13%)	river	Rose et al., 1991
	3/100L(GM)	3-30/100L	14/111 (13%)	lake	
Filtered water					
U.S.	0/100L		0/17(0%)	-	Rose *et al.*, 1991
U.S.	2.6/100L		12/262(4.6%)	-	LeChevallier and Norton, 1995
Japan	0.8/1000L(GM)	0.5-2/1000L	3/26(12%)	-	Present

Table 10 The parametre concentration for satisfying the acceptable annual infection risk (10^{-4}) of protozoa in assuming the removal of 3 $\log_{10}$ by drinking water treatment

	Cryptosporidium oocysts	PI oocysts	*Giardia* cysts	PI cysts
Cl.perfringens spores (cfu・100ml^{-1})	8	5	3	2
E.coli (MPN・100ml^{-1})	50	30	20	7

分担研究報告書１０

浄水場における原水の原虫類出現状況と浄水処理による除去

分担研究者　平田　強

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

浄水場における原水の原虫類出現状況と浄水処理による除去

分担研究者　平田　強　麻布大学環境保健学部　教授
研究協力者　橋本　温　麻布大学大学院環境保健学研究科

要　旨

原虫汚染レベルの高い河川水を原水とするA浄水場において，大量試料水の濃縮が可能な中空糸UF膜を用いて，1998年7月から1999年9月までの約1年間にわたり月1回の頻度で計13回，原水(着水井) 50 *l* および浄水(凝集沈澱ろ過水) 1,000～2,000 *l* を濃縮してクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染状況を調査した。調査した原水13試料のすべてからクリプトスポリジウムオーシストが検出され，陽性試料の幾何平均濃度は400個/1,000*l* (範囲160～1,500個/1,000*l*)，全試料の累積出現頻度50%値は幾何平均値と同様約400個/1,000*l*，90%値は約900個/1,000*l* であった。ジアルジアシストは13試料のうち1試料を除く12試料から検出され，陽性試料の幾何平均濃度は170個/1,000*l* (範囲42～590個/1,000*l*)，全13試料の累積出現頻度50%値は150個/1,000*l*，90%値は400個/1,000*l* であった。また，浄水からも両原虫が検出され，試験した26試料中の陽性試料はクリプトスポリジウムオーシストが9試料，ジアルジアシストが3試料であった。陽性試料のクリプトスポリジウムオーシストの幾何平均濃度は1.1個/1,000*l*(範囲0.5～8.0個/1,000*l*)，全26試料の累積出現頻度50%値は0.25個/1,000*l*，90%値は2.0個/1,000*l* と推定された。一方，陽性3試料のジアルジアシスト幾何平均濃度は0.8個/1,000*l*(範囲0.5～2.0個/1,000*l*)，全26試料の累積出現頻度50%，90%値はそれぞれ約0.04個/1,000*l*，0.5個/1,000*l* と推定された。

同一採水日の原水と浄水の濃度から算出した凝集沈殿＋急速砂ろ過における除去は両原虫ともおおむね2～3 $\log_{10}$ の範囲にあり，クリプトスポリジウムオーシストの平均除去は2.54 $\log_{10}$ (範囲:2.00～3.18 $\log_{10}$，n=9)，ジアルジアでは平均2.53 $\log_{10}$ (範囲:1.74～3.06 $\log_{10}$，n=3)であった。一方，原水及び浄水の累積出現頻度50%値を用いると，クリプトスポリジウム3.2 $\log_{10}$，ジアルジア3.6 $\log_{10}$，90%値を用いるとクリプトスポリジウム2.7 $\log_{10}$，ジアルジア2.9 $\log_{10}$ の除去となった。

また，浄水から検出された原虫がすべてヒト感染性を有していると仮定し，塩素消毒による不活化を考慮して本浄水場の水道水を直接飲用した場合の原虫の年間感染リスクを試算したところ，1日2*l* 飲用，原虫試験の回収率を50%とした場合，クリプトスポリジウムは $10^{-2.2}$，ジアルジアは $10^{-3.1}$，1日飲用水量を0.2 *l*，原虫回収率を50%と仮定した場合，クリプトスポリジウム $10^{-2.9}$，ジアルジア $10^{-3.8}$ となった。このリスクレベルは，U.S.EPAの提唱する飲料水の許容年間感染リスク 10^{-4} を超えるものであった。

1. はじめに

我が国の水道普及率は1998年に96%となり[1]，飲料水を介したコレラ，腸チフス，赤痢等の細菌感染症の流行はほとんど認められなくなっている。しかしながら，1996年に埼玉県越生町で飲料水を介してクリプトスポリジウム感染症が発生した例にみられるように[2]，塩素消毒に著しい耐性を有する原虫による集団感染症が発生している。米国では1980年代以降，ジアルジア感染症が頻繁に発生しており，クリプトスポリジウム感染症も同様に発生している[3]。なかでも1993年にはミルウォーキーで約40万人の感染者を出した飲料水を介したクリプトスポリジウムによる大規模集団感染症が発生

した[2]。

原水のクリプトスポリジウムおよびジアルジアによる汚染実態調査は米国で積極的に行われており，河川水および湖水の 65～97%からクリプトスポリジウムが検出されている[4]。我が国では埼玉県越生町での集団発生を契機に厚生省から「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」[5] が通知され，水環境の汚染実態調査が行われるようになった。厚生省が 1996 年から 1997 年にかけて行った全国調査では，水道水源 94 水域 277 地点のうち，クリプトスポリジウムは 6 水域の 8 地点，ジアルジアは 16 水域の 24 地点で検出された[6]。神奈川県が 1997 年に水道水源 15 地点で行った調査でもクリプトスポリジウムは 6 地点，ジアルジアは 10 地点から検出された[7]。また，相模川水系では，調査を行った 11 地点全てからクリプトスポリジウムおよびジアルジアが検出されている[8]。このように我が国の水道水源環境は，米国と同様，相当広範囲にわたって両原虫により汚染されているものと考えられる。一方，浄水については，米国では数 100～数 1,000*l* 規模の調査でクリプトスポリジウムが試料中の 27%から検出された[9] との報告がある。しかしながら，我が国では，福井県でジアルジアシストが検出された事例[10] を除くと，凝集沈殿ろ過した浄水から検出されたという報告はない[7][11]。しかし，わが国の浄水の調査は通常，水量 20*l* で行われており，より大量の試料水について試験すれば検出される可能性がある。

そこで，本研究では，水道の原虫汚染状況と浄水処理における除去性を把握するため，原虫汚染レベルの比較的高い河川を水源とし急速砂ろ過法で浄水処理を行っている水道を選び，大量試料の濃縮装置として新たに開発した中空糸 UF 膜を用いて，原水 50*l*，浄水 1,000～2,000*l* 規模の原虫汚染調査を実施した。

2　調査方法

2.1　調査対象とした浄水場

比較的高度の原虫汚染レベルにある河川表流水を原水とし，再生バンド併用による凝集沈澱，急速砂ろ過(150m/day)，塩素消毒のシステムからなる浄水処理方法を採用しているA浄水場を対象とした。試料水は，着水井１カ所，１系ろ過池流出水１カ所，２系ろ過池流出水１カ所の計３カ所から採取した(図 1)。なお本浄水場は「水道水のクリプトスポリジウム暫定対策指針(厚生省 1998)」に基づいて浄水施設が適正に運転管理されており，ろ過水の濁度は常時 0.1 度未満を達成していた。

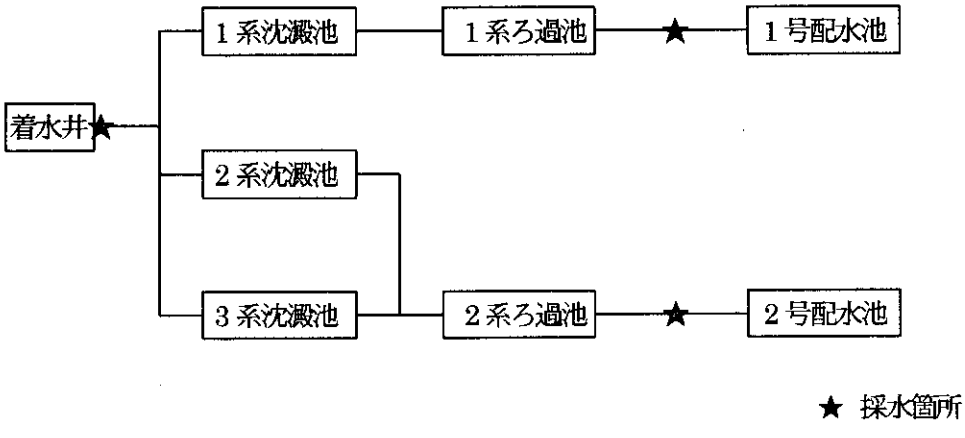


図 1　原水および浄水の採水箇所

2.2 **調査頻度**

1998年7月から1999年9月までの期間，月1回の頻度で計13回の調査を行った。

2.3 **原虫試験**

試料の採水および濃縮；大量の試料の濃縮に適した[12]酢酸セルロース製外圧型中空糸UF膜モジュール(中空糸内径0.8mm, 外径1.3mm, 分画分子量150,000, ダイセンメンブレンシステムズ(株)製)を用いて現場で採水・濃縮した。すなわち，原水は小型中空糸UF膜モジュール(膜有効面積0.3 ㎡)で図に示した着水井からローラーポンプで加圧して50*l*ろ過した。また，浄水は2系統あるろ過池からそれぞれの配水池へ送水される途中のサンプラー管に大型中空糸UF膜モジュール(膜有効面積1.4 ㎡)を接続して1,000～2,000*l*ろ過した。ろ過後，膜モジュールを実験室に搬送し，試験に供した。

中空糸UF膜モジュールからの誘出；　原水をろ過した小型モジュールではMilliQ水100m*l*，浄水をろ過した大型モジュールでは200m*l*を加え，手で良く振盪し，その洗液をそれぞれ遠心管に集めた。この操作を3回繰り返した後，U.S.EPA method 1622記載のカプセルフィルター用誘出液[13]を小型モジュールでは50m*l*，大型モジュールでは100m*l*を加え，再び手で良く振盪し，その洗液を先の遠心管にそれぞれ集めた。最後に，小型モジュールではMilliQ水50m*l*を，大型モジュールでは100m*l*を加え，U.S.EPA method 1622カプセルフィルター用誘出液の場合と同様の操作を行い，すべての洗液を同じく先の遠心管に集めた。洗液のすべてを遠心(1,050×g, 20分)し，上清を除去した。

ショ糖浮遊法；誘出液を，遠心分離後の沈渣量で0.5m*l*以下に相当する量を遠心管に分取し，PBS(T+)（界面活性剤加リン酸緩衝生理食塩水，Tween80添加，Sigma Antiform A添加）を加えて20m*l*にして，タッチミキサーで良く攪拌した。攪拌後，Percollショ糖溶液(比重1.10)をシリンジとシリコンチューブを用いて下層から界面を乱さないように注入し，遠心(1,050×g, 10分)した。上清を別の遠心管に回収し，PBS(T-)(界面活性剤加リン酸緩衝生理食塩水，Tween80無添加，Sigma Antiform A無添加）で50m*l*にしたのち再び遠心(1,050×g, 10分)し，上清を除去した。

間接蛍光抗体法；セルロースアセテート製メンブランフィルター(孔径0.8μm, 直径25mm, ADVANTEC製)をPBS(T-)に浸してからフィルターホルダーに載せ，1%BSA(牛血清アルブミン)と0.1%NGS(正常ヤギ血清)をそれぞれ1m*l*ずつ滴下し，吸引ろ過した。その後選択分離を行った試料をゆっくりとろ過し，次いでPBS(T-)，1%BSA，0.1%NGSをそれぞれ1m*l*ずつろ過し，フィルターを洗浄した。洗浄後，フィルターをスライドガラスに載せ1次抗体(HYDOROFLUOR COMBO, EnSys社製)を70μ*l*滴下し，湿度の保たれた暗所で25分反応させた。反応後，フィルターをフィルターホルダーに戻し，PBS(T-)，1%BSA，0.1%NGSをそれぞれ1m*l*ずつろ過し，フィルターを洗浄した。1次抗体と同様の操作で2次抗体を反応させ，DAPI 5,000倍希釈液を70μ*l*滴下し1分間反応させた。反応後，フィルターをフィルターホルダーに戻し，1次抗体と同様にフィルターを洗浄した後，90%エタノール/グリセリン溶液を1m*l*滴下しフィルターを脱水した。脱水後，2%DABCO/グリセリン封入剤を1滴載せたスライドガラスにフィルターを載せ，さらに2%DABCO/グリセリン封入剤を1滴載せ，カバーガラスをかぶせてプレパラートを作成した。

計数；　作成したプレパラートを落射蛍光顕微鏡で観察し，以下に示した判定基準で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を判定し，計数した。

1) **クリプトスポリジウムオーシスト**

推定試験；1,000倍の蛍光像で以下の(1)～(4)すべての特徴が確認されたものをクリプトスポリジウム蛍光抗体陽性粒子とした。

(1) FITCによる青リンゴ色の蛍光が観察されること。

(2) 直径が 4～6μm であること。

(3) 輪郭が強く染色された楕円形(あるいはひしゃげた紙風船様)であること。

(4) 内部に赤，オレンジなどの蛍光像が観察されないこと。

確定試験；1,000 倍の蛍光像またはノマルスキー微分干渉で次の(1)，(2)のいずれかが確認され，かつ(3)が確認されるものを確定クリプトスポリジウムオーシストとした。

(1) スポロゾイトが確認されること。

(2) 縫合線が確認されること。

(3) クリプトスポリジウムオーシストとは明らかに異なる構造が観察されないこと。

2) ジアルジアシスト

推定試験；1,000 倍の蛍光像で以下の(1)～(3)すべての特徴が確認されるものをジアルジア蛍光抗体陽性粒子とした。

(1) FITC による青リンゴ色の蛍光が観察されること。

(2) 長径 9～15μm であること。

(3) 輪郭が強く染色される楕円形で，その染色像がジアルジアに特徴的であること。

確定試験；1,000 倍の染色像または微分干渉像で次の(1)と(2)の両方の特徴が観察されるものを確定ジアルジアシストとした。

(1) 核，軸糸，中央小体のいずれかが確認されること。

(2) ジアルジアシストと明らかに異なる構造が確認されないこと。

2.4 濁度および粒子数の測定

いずれも微粒子カウント式高感度濁度計(富士電機(株)製)を用いて測定した。

3 結果および考察

3.1 原水および浄水の原虫濃度

原水および浄水のクリプトスポリジウム濃度の経月変化を図 2 に，ジアルジア濃度の経月変化を図 3 に示す。また，陽性試料から算出したクリプトスポリジウムの幾何平均値を表 1 に，ジアルジアの幾何平均値を表 2 に示す。

表 1 原水におけ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の陽性率と幾何平均濃度

	クリプトスポリジウム		ジアルジア	
	蛍光抗体陽性粒子	オーシスト	蛍光抗体陽性粒子	シスト
陽性試料数／試験試料数	13/13	13/13	13/13	12/13
陽性率(%)	100	100	100	92
幾何平均(個/1,000l)	890	400	650	170
濃度範囲(個/1,000l)	480-2,300	160-1,500	200-2,000	42-590

1 年間にわたる調査で，クリプトスポリジウムは調査した原水 13 試料のすべて(陽性率 100%)から検出され，陽性試料の蛍光抗体陽性粒子濃度の幾何平均値は 890 個/1,000*l* (範囲 480～2,300 個/1,000*l*)，オーシストは 400 個/1,000*l* (範囲 160～1,500 個/1,000*l*)であった。ジアルジアも原水中に存在し，ジアルジア蛍光抗体陽性粒子は調査した 13 試料すべて(陽性率 100%)から，シストは 1 試料を除いた 12

試料(陽性率 92%)から検出された。陽性試料のジアルジア蛍光抗体陽性粒子濃度の幾何平均値は 650 個/1,000*l* (範囲 200～2,000 個/1,000*l*)，シストは 170 個/1,000*l* (範囲 42～590 個/1,000*l*)であった。

表 2　浄水におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの陽性率と幾何平均濃度

	クリプトスポリジウム		ジアルジア	
	蛍光抗体陽性粒子	オーシスト	蛍光抗体陽性粒子	シスト
陽性試料数／試験試料数	11/26	9/26	6/26	3/26
陽性率(%)	42	35	23	12
幾何平均(個/1,000l)	1.5	1.1	1.3	0.8
濃度範囲(個/1,000l)	0.5-8.0	0.5-8.0	0.5-4.0	0.5-2.0

一方，浄水では，26 試料のうち，クリプトスポリジウム蛍光抗体陽性粒子が 11 試料(陽性率 42%)から，オーシストが 9 試料(陽性率 35%)から検出された。陽性試料における濃度の幾何平均値は，クリプトスポリジウム蛍光抗体陽性粒子が 1.5 個/1,000*l*(範囲 0.5～8.0 個/1,000*l*)，オーシストが 1.1 個/1,000*l*(範囲 0.5～8.0 個/1,000*l*)であった。ジアルジアはクリプトスポリジウムよりも陽性率が低く，26 試料のうちジアルジア蛍光抗体陽性粒子は 6 試料(陽性率 23%)から，シストは 3 試料(陽性率 12%)から検出された。濃度はクリプトスポリジウムと同レベルであり，陽性試料のジアルジア蛍光抗体陽性粒子濃度の幾何平均値は 1.3 個/1,000*l* (範囲 0.5～4.0 個/1,000*l*)，シストは 0.8 個/1,000*l* (範囲 0.5～2.0 個/1,000*l*)であった。

我が国ではこれまで，急速ろ過法あるいは緩速ろ過法で処理した浄水からクリプトスポリジウムオーシストが検出されたとの報告はなかったが[7) 11)]，今回の調査ではじめて，凝集沈澱ろ過の浄水処理が適正な管理の下で行われていて浄水の濁度が常時 0.1 度未満を達成している浄水からクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストが検出された。

米国では，急速ろ過法で処理された浄水から両原虫が検出されており，濃度の幾何平均値は，クリプトスポリジウムオーシスト 3.3 個/100*l* (範囲 0.29～57 個/1,000*l*，検出率 13.4%)，ジアルジアシスト 2.6 個/100*l* (範囲 0.98～9.0 個/1,000*l*，検出率 4.6%)と報告されている[4)]。今回の調査で検出された濃度は，クリプトスポリジウムオーシスト，ジアルジアシストともに米国での浄水の濃度よりやや低い値であった。

3.2　原虫濃度の累積出現頻度

クリプトスポリジウム濃度の累積出現頻度分布を図 4-1 に，ジアルジア濃度の累積出現頻度分布を図 4-2 に示す。原水では，図中のプロットはほぼ直線上に並んでおり，クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子，クリプトスポリジウムオーシスト，ジアルジア蛍光抗体陽性粒子，ジアルジアシストのいずれも，濃度の出現頻度分布はほぼ対数正規分布となっており，累積出現頻度の 50%，90%値はそれぞれクリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子で約 800，1,500 個/1,000*l*，クリプトスポリジウムオーシストで 400，900 個/1,000*l*，ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子で約 700，1,500 個/1,000*l*，ジアルジアシストで 150，400 個/1,000*l* と推定された。

浄水では，陽性試料が少ないため累積出現頻度の全体的な分布形状は明らかにできなかったが，原水と同様，対数正規分布と仮定し，クリプトスポリジウムの累積出現頻度 50%，90%値はそれぞれ蛍光抗体粒子で 0.4，3 個/1,000*l*，オーシストで 0.25，2.0 個/1,000*l* と推定された。また，ジアルジアで

は陽性データが蛍光抗体粒子で6個，シストではわずか3個しか得られなかったので推定精度は著しく悪くなるが，あえて累積出現頻度50%，90%値を求めると，ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子ではそれぞれ0.2，1.5個/1,000*l*，シストではそれぞれ0.04，0.5個/1,000*l*と推定された。

3.3 浄水処理による原虫の除去性

クリプトスポリジウムあるいはジアルジアが原水とろ過水の両方から検出された調査日毎のデータから浄水処理(凝集沈澱＋砂ろ過)による原虫除去を計算した。結果を表3にまとめた。

表3 原水及び浄水が原虫陽性の調査日毎のデータから算出した原虫除去(log_{10})レベル

	平均±標準偏差	範　囲	データ組数
クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子	2.77±0.25	2.24 - 3.06	11
クリプトスポリジウムオーシスト	2.54±0.35	2.00 - 3.18	9
ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子	2.95±0.40	2.48 - 3.55	7
ジアルジアシスト	2.53±0.57	1.74 - 3.06	3

除去の平均値はいずれも2.5～3 log_{10}の範囲にあり，浄水処理による除去はクリプトスポリジウムオーシスト2.54 log_{10}，ジアルジアシスト2.53 log_{10}と，両原虫の除去はほぼ一致していた。これらの結果から，両原虫は平均的に2.5 log_{10}除去されるものと判断された。

表4 原虫濃度累積出現頻度から算出した推定濃度と浄水処理による除去レベル

	クリプトスポリジウム				ジアルジア			
累積出現頻度	50 %		90 %		50 %		90 %	
	蛍光抗体陽性粒子	オーシスト	蛍光抗体陽性粒子	オーシスト	蛍光抗体陽性粒子	シスト	蛍光抗体陽性粒子	シスト
原水濃度(/1000*l*)	800	400	1,500	900	700	150	1,500	400
浄水濃度(/1000*l*)	0.4	0.25	3.0	2.0	0.2	0.04	1.5	0.5
除去(log_{10})	3.3	3.2	2.7	2.7	3.5	3.6	3.0	2.9

また，濃度累積出現頻度分布から外挿及び推定により算出した累積出現頻度 50%及び 90%値とそれらの値から計算した原虫除去レベルを表4に示す。浄水処理(凝集沈殿＋急速砂ろ過)による両原虫の除去は，原水及びろ過水の原虫濃度累積出現頻度50%値から計算すると，クリプトスポリジウムでは蛍光抗体陽性粒子が3.3 log_{10}，オーシストが3.2 log_{10}，ジアルジアでは蛍光抗体陽性粒子が3.5 log_{10}，オーシストが3.6 log_{10}と求められた。一方，累積出現頻度90%値からは，クリプトスポリジウムでは蛍光抗体陽性粒子，オーシストともに2.7 log_{10}，ジアルジアでは蛍光抗体陽性粒子が3.0 log_{10}，ジアルジアシストが2.9 log_{10}であった。このように，累積出現頻度分布から求めた50%値及び90%値に基づいた除去レベルの計算値は，表3に示した原水及び浄水の原虫陽性データから算出した原虫除去レベルに比べてやや高値を示す傾向があった。

凝集沈殿および砂ろ過の実験プラントを用いた調査で，クリプトスポリジウムオーシストが 2.98 log_{10}，ジアルジアシストが3.40 log_{10}，米国の実動の浄水場では両原虫ともに2～2.5 log_{10}除去されたとの報告がある[4) 15)]。今回我々の得た結果は，これらの原虫除去レベルの報告値とほぼ同等レベルにある。これらの結果から，凝集沈澱＋砂ろ過方式で浄水濁度を常時0.1度以下に管理したとき，クリプ

トスポリジウムオーシスト，ジアルジアシストとも，平均でおおむね 2.5$\log_{10}$ の原虫除去が期待できると考えられる。

3.4 原虫濃度と濁度および粒子数の相関

原水における原虫濃度と濁度および粒子数との関係を図 5 に，浄水における関係を図 6 に示す。これらの結果から求めたクリプトスポリジウム濃度と濁度および粒子数間の単相関係数を表 5 に，ジアルジア濃度と濁度および粒子数間の単相関係数を表 6 に示す。

表 5　クリプトスポリジウム濃度と濁度および粒子数の単相関係数

	原水				浄水			
	蛍光抗体陽性粒子		オーシスト		蛍光抗体陽性粒子		オーシスト	
	n	r^2	n	r^2	n	r^2	n	r^2
濁度	11	0.09	11	0.11	10	0.04	9	0.06
粒子								
0.5-1 μm	11	0.09	11	0.11	10	0.07	9	0.08
1-3 μm	11	0.13	11	0.15	10	0.04	9	0.05
3-7 μm	11	0.07	11	0.09	6	0.01	5	0.02
>7 μm	10	0.00	10	0.00	7	0.05	6	0.00
> 0.5 μm	11	0.10	11	0.11	10	0.06	9	0.08

表 6　ジアルジア濃度と濁度および粒子数の単相関係数

	原水				浄水			
	蛍光抗体陽性粒子		シスト		蛍光抗体陽性粒子		シスト	
	n	r^2	n	r^2	n	r^2	n	r^2
濁度	11	0.04	10	0.08	4	0.02	2	-
粒子								
0.5-1 μm	11	0.06	10	0.00	4	0.01	2	-
1-3 μm	11	0.06	10	0.01	4	0.00	2	-
3-7 μm	11	0.14	10	0.01	3	0.16	2	-
>7 μm	10	0.01	9	0.70	3	0.07	2	-
> 0.5 μm	11	0.06	10	0.00	4	0.01	2	-

クリプトスポリジウムオーシスト濃度と濁度および粒子数との単相関分析では，原水，浄水とも寄与率が 0.00～0.15 と低く，いかなる組合せでも有意な相関は認められなかった(表 5)。ジアルジアシスト濃度と濁度および粒子数との単相関分析では，原水のジアルジア蛍光抗体陽性粒子濃度と>7 μm 粒子数との間にのみ寄与率 0.7 と比較的高い相関が認められたが，それ以外の組合せでは寄与率が 0.00～0.16 と低く，相関は認められなかった(表 6)。このように，原虫濃度と濁度あるいは粒子数との間に有意な関係は見出せなかった。

3.5 原虫除去と濁度除去あるいは粒子除去との相関

原虫除去と濁度除去，粒子除去の関係を図7に，単相関係数を表7に示す。

表7 原虫除去と濁度及び粒子除去間の単回帰分析結果

	原水				浄水			
	蛍光抗体陽性粒子		シスト		蛍光抗体陽性粒子		シスト	
	n	r^2	n	r^2	n	r^2	n	r^2
濁度	10	0.01	9	0.07	4	0.97	2	-
粒子								
0.5-1μm	10	0.02	9	0.06	4	0.96	2	-
1-3μm	10	0.00	9	0.01	4	0.92	2	-
3-7μm	6	0.07	5	0.18	2	-	2	-
>7μm	7	0.06	6	0.17	3	0.80	2	-
>0.5μm	10	0.02	9	0.06	4	0.97	2	-

クリプトスポリジウム除去と濁度除去および粒子除去との間の寄与率はいずれも著しく低く(0～0.18)，相関関係は認められなかった。ジアルジア除去では，濁度除去および粒子の除去率との間に寄与率で0.80～0.97の強い相関関係が認められており，濁度除去や粒子除去が原虫除去の代替評価指標となる可能性を示唆していると考えられるが，データ数がわずか3～4組しかないため信頼性に欠け，現時点では参考にとどめざるを得ない。

急速砂ろ過法における粒子数除去と原虫除去の関係については，4～7μm径の粒子数とクリプトスポリジウム濃度との間に高い相関が認められ，原虫の除去性の指標として有用であると報告されている[15]。今回我々の行った調査でも，クリプトスポリジウムでは有意な相関が認められなかったものの，ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子の除去と濁度除去および粒子除去の間に強い相関関係を示唆する結果が得られた。今後，情報を蓄積して詳細解析を試みる価値があると考えられる。

3.6 原虫感染リスク

本浄水場の浄水を飲用した場合の原虫の年間感染リスクを，浄水の原虫濃度の累積出現頻度90%値に基づき試算した。感染の用量反応モデルには指数モデル(1)式，年間リスクの計算には(2)式を用いた。

$$P = 1 - \exp(\gamma C) \quad \cdots (1)$$

$$\text{年間のリスク} = 1 - (1 - P)^{365} \quad \cdots (2)$$

ここで，P：1日当たりの感染リスク，C：1日当たりの原虫摂取量(個)

γ：用量反応パラメータ(クリプトスポリジウム 1/238.601[16]，ジアルジア 0.0199[17])

計算に当たっては，

(1) 検出された原虫のすべてが生きていて，ヒト感染性を有する。

(2) 塩素消毒(残留塩素1.0mg/l，最低限確保されている滞留時間1時間，CT値60mg･min/l)でクリプトスポリジウムはまったく不活化されず，ジアルジアは1log程度不活化される[18]。

との仮定を設けた。

これにさらに，次の2つの追加条件を設定して，年間感染リスクを試算した。

(a) 非加熱水道水の飲水量：2.0 l，原虫試験の回収率100%。

(b) 非加熱水道水の飲水量：0.2 *l*，原虫試験の回収率 50%。

表 8　クリプトスポリジウムおよびジアルジアによる年間感染リスクの試算結果

	クリプトスポリジウム		ジアルジア	
水道水中の検出濃度	2 個/1,000*l*		0.5 個/1,000*l*	
塩素消毒による不活化	0 $\log_{10}$		1.0 $\log_{10}$	
追加条件	(a)	(b)	(a)	(b)
原虫試験の回収率	100%	50%	100%	50%
非加熱飲用水量	2 *l*	0.2 *l*	2 *l*	0.2 *l*
感染リスク計算値	$10^{-2.2}$/年	$10^{-2.9}$/年	$10^{-3.1}$/年	$10^{-3.8}$/年

試算結果を表 8 に示す。

U.S.EPA は，社会的背景を考慮した水道水によるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの許容年間感染リスクとして 10^{-4} を提唱している[19]。この値をもとに今回のリスク試算結果を考えると，追加条件(b)ではジアルジアのみが 10^{-4} をほぼ満たしているが，それ以外はいずれも許容年間感染リスク 10^{-4} を満たしていない。

また，本研究で得られた結果に基づき，浄水処理による原虫の除去率を 3 log と仮定すると，許容年間感染リスク 10^{-4} に相当する原水の最大許容濃度は，クリプトスポリジウムでは 32 個/1,000*l*，ジアルジアシストでは 6.8 個/1,000*l* と計算される。これらの計算値は本浄水場原水 13 試料すべてが最大許容濃度の 5～100 倍の範囲にあることを示しており，10^{-4} レベルを達成するには 2 $\log_{10}$ の除去が可能な付加的処理が必要ということになる。

これらのリスク計算は，非加熱飲用水量や原虫の生死，ヒト感染性等の生物要因を不確実な仮定の上に立って試算したものである。したがって，現実と大きく乖離している危険性を内含している。より適正なリスク評価を行うために，水道水の飲料水量，検出された原虫の生死やヒト感染性が評価できる試験方法等の開発が望まれる。

4　まとめ

本研究では，相模川を原水とする浄水場を対象にクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染状況の調査を行い，原水および浄水の原虫濃度，急速砂ろ過による原虫の除去性を評価した。その結果，以下のような知見が得られた。

1) 本浄水場における原水では，クリプトスポリジウムオーシストは調査した 13 試料すべてから，ジアルジアシストは 1 試料を除いた 12 試料から検出され，常時汚染されていることが明らかになった。原水の原虫濃度の幾何平均値は，クリプトスポリジウムオーシストでは 400 個/1,000*l*，ジアルジアシストでは 170 個/1,000*l* であった。
2) 一方，浄水では 26 試料のうち，クリプトスポリジウムオーシストは 9 試料から，ジアルジアシストは 3 試料から検出された。その濃度の幾何平均値は，クリプトスポリジウムオーシストでは 1.1 個/1,000*l*，ジアルジアシストでは 0.8 個/1,000*l* であった。
3) 急速砂ろ過による両原虫の除去率は，累積出現頻度 50%値で計算するとクリプトスポリジウムオーシスト 3.2 log，ジアルジアシスト 3.6，累積出現頻度 90%値ではクリプトスポリジウムオーシスト 2.7 log，ジアルジアシスト 2.9 log であった。
4) 本浄水場からの水道水を飲用した時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

の年間感染リスクは，検出された原虫がすべて生きていてヒト感染性を有するものとすると，U.S.EPA の提唱する許容年間感染リスク 10^{-4} を満足できないレベルにあるとの試算結果となった。

参考文献

1) 厚生省水道整備課 (1998)：水道普及率(平成 10 年 3 月 31 日付)

2) 保坂三継 (1998)：水系原虫感染症－原因物質と流行発生－，用水と廃水 40, 11 - 24.

3) Cryptosporidium Capsule (1998)：FS Publishing, New York.

4) LeChevallier M W and Norton W D (1995)：*Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water, *Journal of American Water Works Association* **87,** 54-68

5) 厚生省生活衛生局水道環境部 (1998)：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 年度 6 月 19 日改正）

6) (財)水道技術研究センター(1997)：クリプトスポリジウム等の水道水源における動態に関する研究報告書

7) 神奈川県衛生部(1998)：報道発表資料-クリプトスポリジウム水道水源および浄水の汚染実態調査の結果について，平成 10 年度 9 月 11 日付.

8) 橋本温，河井健作，西崎綾，松本かおり，平田強 (1999)：相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染とその汚染指標の検討，水環境学会誌 **22,** 282-287

9) LeChevallier M W, Norton W D and Lee R G (1991)：Occurrence of *Giardia* and *Cryptospridium* spp. in surface water supplies, *Applied and Environmental Microbiology* **57,** 2610-2616

10) 金子光美 (1999)：水道のクリプトスポリジウム対策，金子光美著, 86-88, ぎょうせい出版，東京

11) 東京都衛生局，水道局，報道記者発表 (1998)：平成 10 年度クリプトスポリジウムの水質検査結果について（平成 11 年度 5 月 25 日付）

12) 宮本千歳，横井望美 (2000)：中空糸ＵＦ膜法による水中のクリプトスポリジウムオーシストの濃縮法の検討，麻布大学環境保健学部環境保健学科水環境学研究室卒業論文

13) U.S.EPA (1998)：Method 1622: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, U.S.EPA

14) Hashimoto A and Hirata T (1999)：Occurrence of *Cryptosporidium* oocycts and *Giardia* cysts in Sagami river, Japan, ASIAN WATERQUAL '99 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference, Conference Preprint **2,** 956-961

15) Nieminski E C and Ongerth J E (1995)：Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration, *Journal of American Water Works Association* **87,** 96-98

16) 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,** 131-136

17) Rose J B and Gerba C P (1991)：Use of risk assessment for development of microbial standards, *Water Science and Technology* **24,** 29-34

18) 金子光美監訳 (1992)：水系ジアルジア感染症，飲料水の微生物学，259-269，技報堂出版，東京

19) U.S.EPA (1996)：The Surface Water Treatment Rule

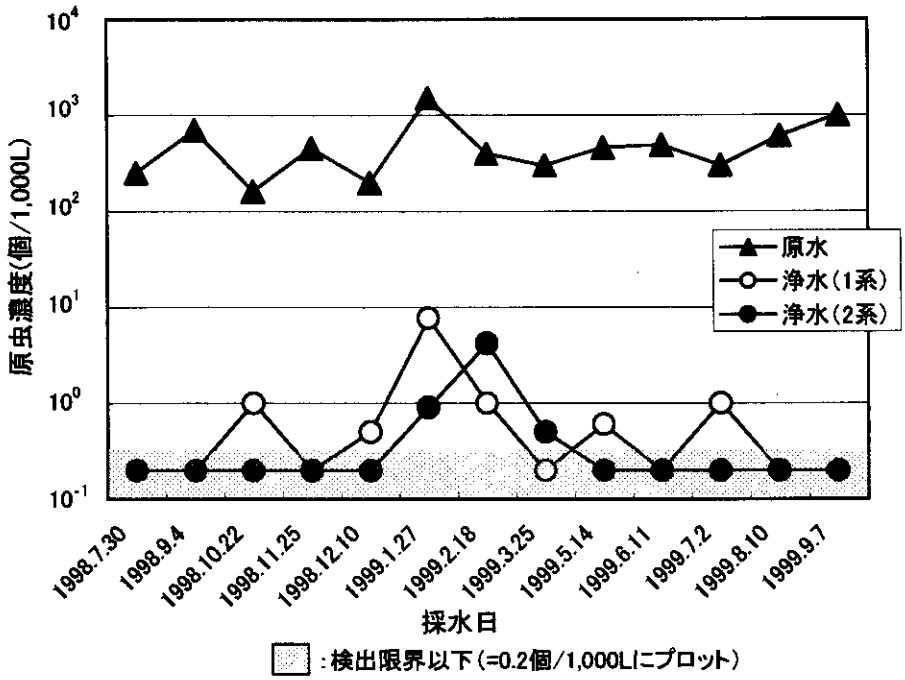


図2 クリポトスポリジウムオーシスト濃度の経月変化

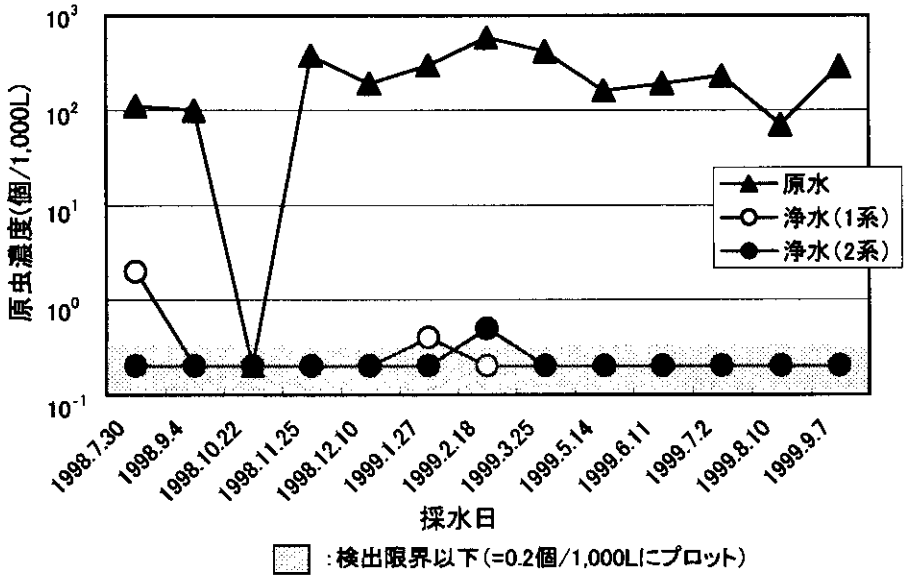
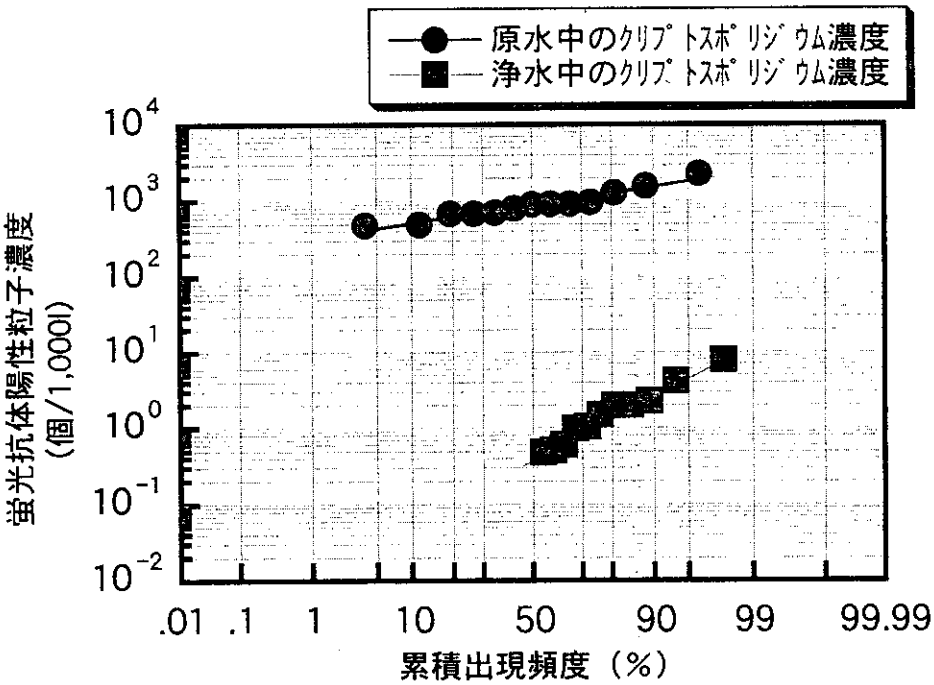
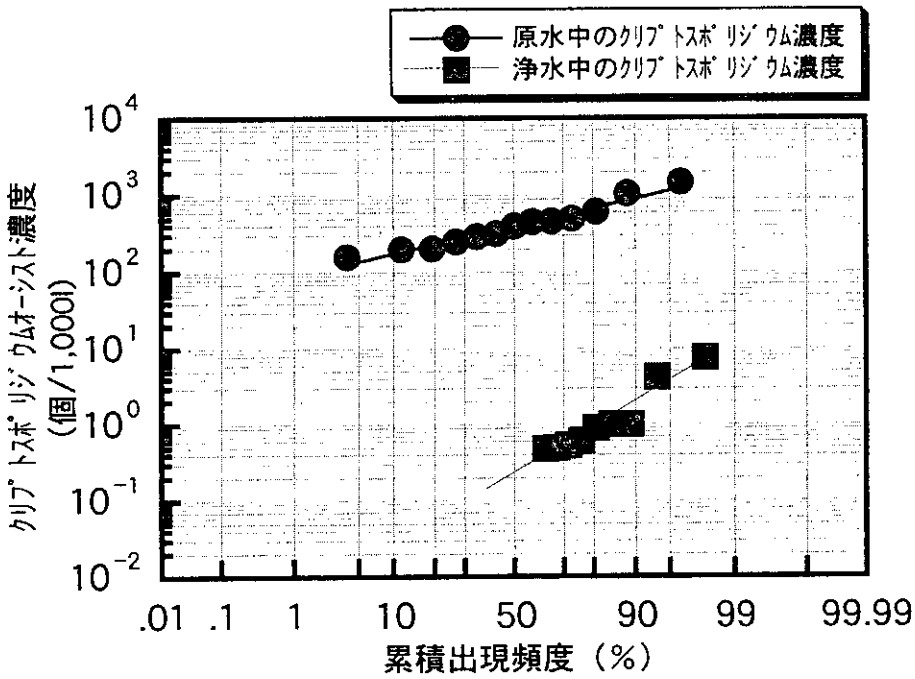


図3 ジアルジアシスト濃度の経月変化

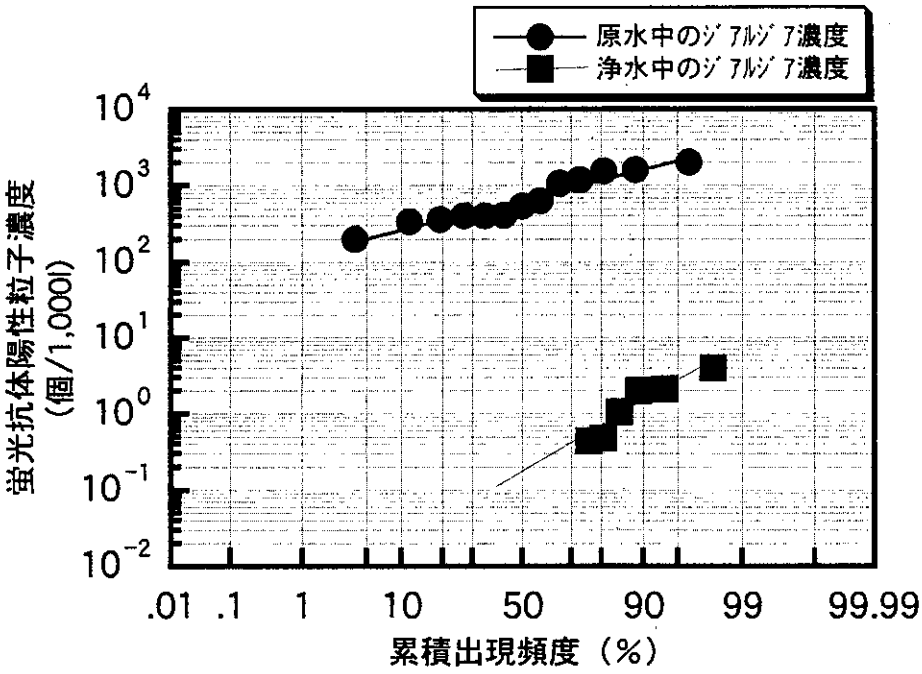


（1） 原水および浄水中のクリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子濃度の累積出現頻度

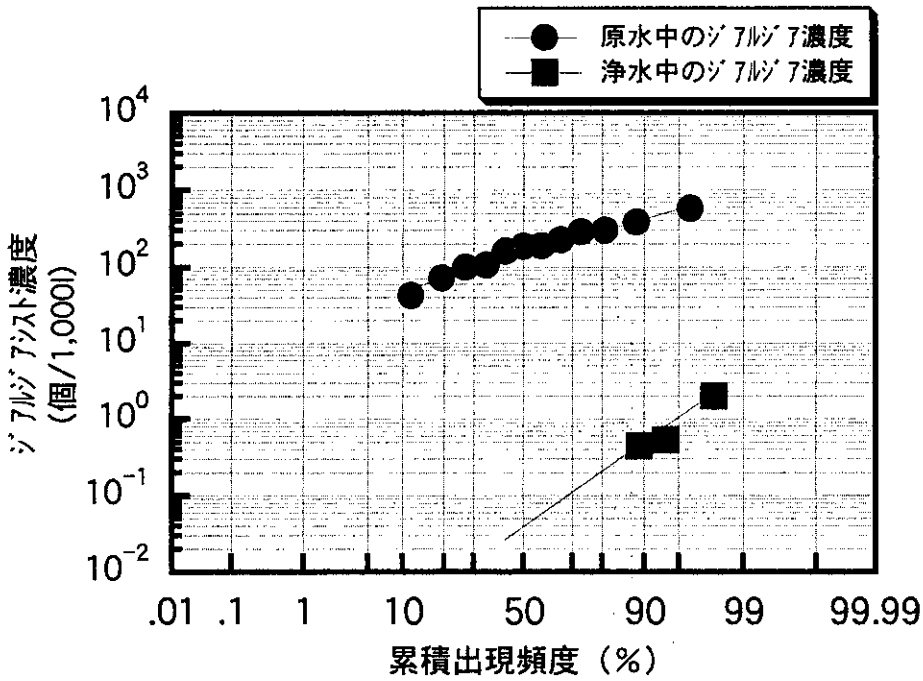


（2） 原水および浄水中のクリプトスポリジウムオーシスト濃度の累積出現頻度

図4-1 原水および浄水の原虫濃度の累積出現頻度

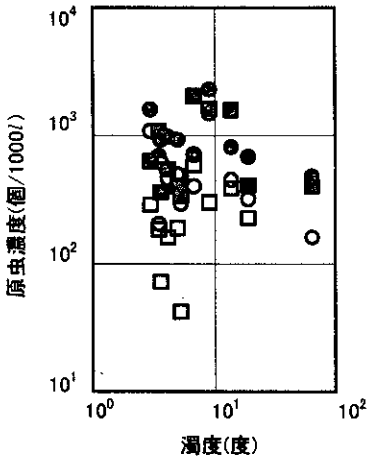


（3） 原水および浄水中のジアルジア様蛍光抗体陽性粒子濃度の累積出現頻度

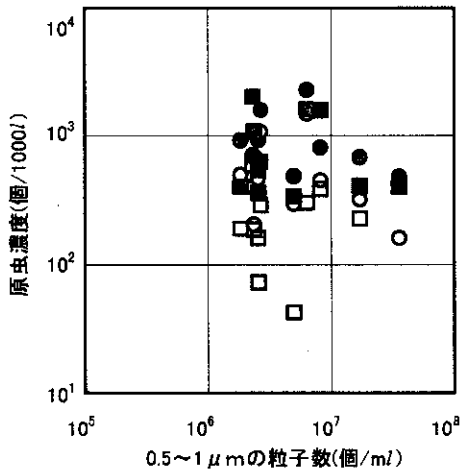


（4） 原水および浄水中のジアルジアシスト濃度の累積出現頻度

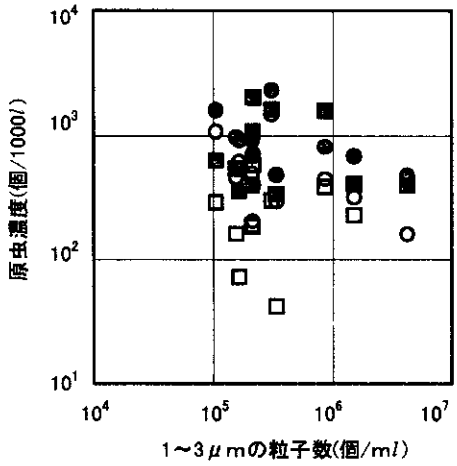
図4-2 原水および浄水の原虫濃度の累積出現頻度



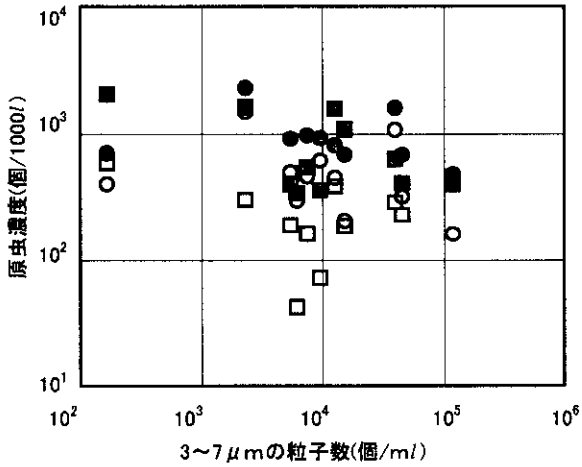
(1) 原虫濃度 vs 濁度(原水)



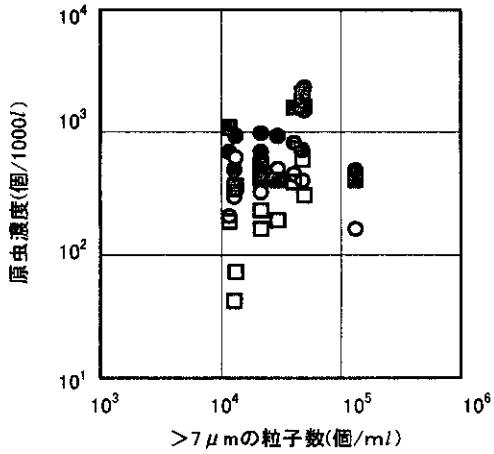
(2) 原虫濃度 vs 0.5～1μm粒子数(原水)



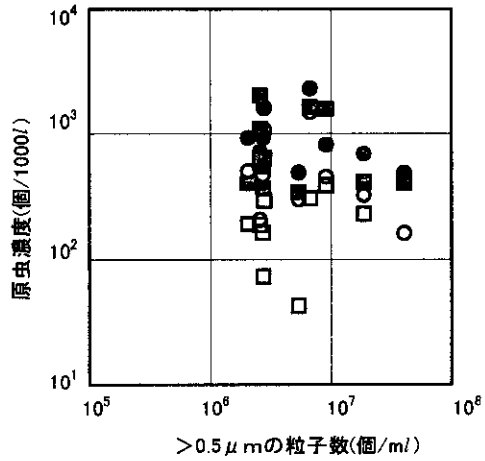
(3) 原虫濃度 vs 1～3μm粒子数(原水)



(4) 原虫濃度 vs 3～7μm粒子数(原水)



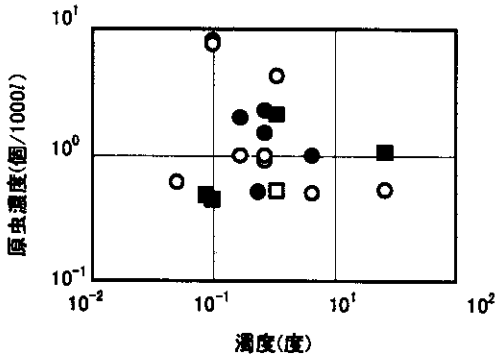
(5) 原虫濃度 vs >7μm粒子数(原水)



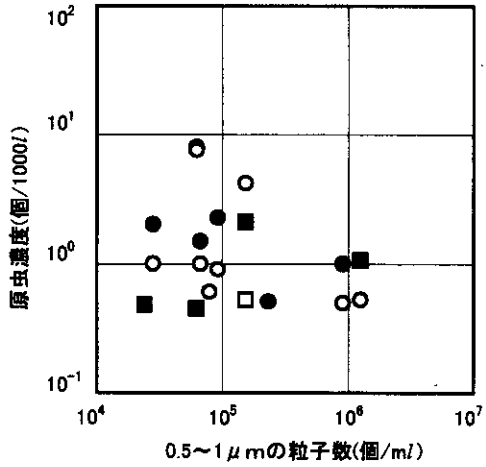
(6) 原虫濃度 vs >0.5μm粒子数(原水)

● クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子
○ クリプトスポリジウムオーシスト
■ ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子
□ ジアルジアシスト

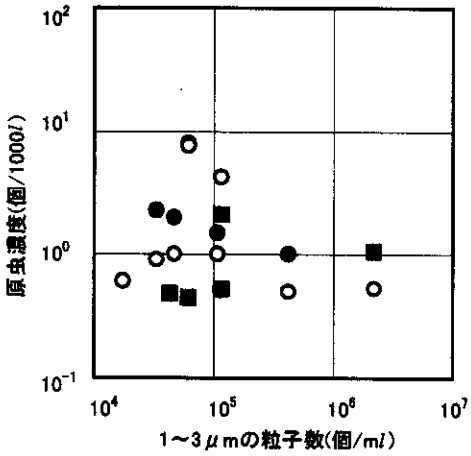
図5 原水の原虫濃度と濁度および粒子数との関係



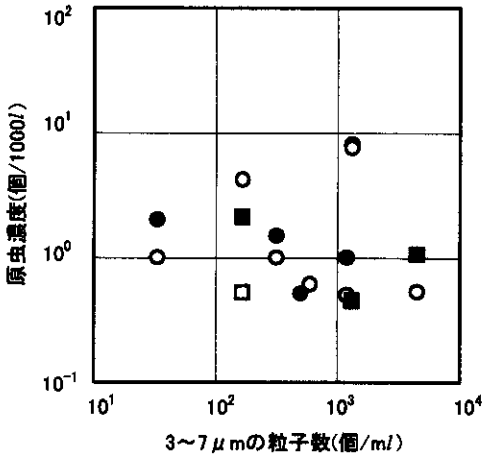
(1) 原虫濃度 vs 濁度(浄水)



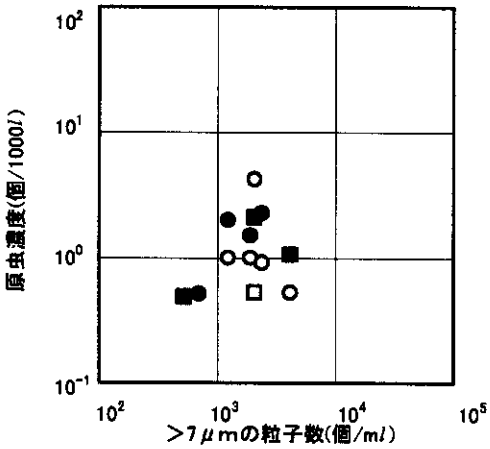
(2) 原虫濃度 vs 0.5～1μm粒子数(浄水)



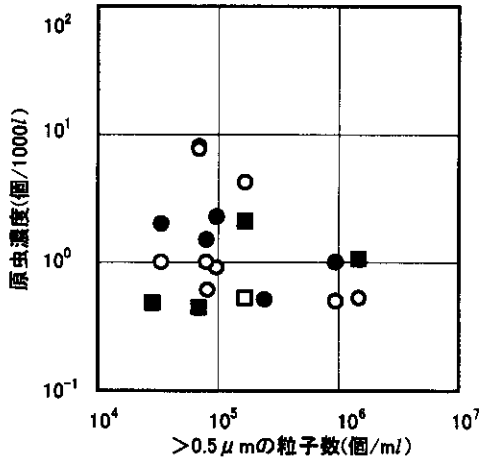
(3) 原虫濃度 vs 1～3μm粒子数(浄水)



(4) 原虫濃度 vs 3～7μm粒子数(浄水)



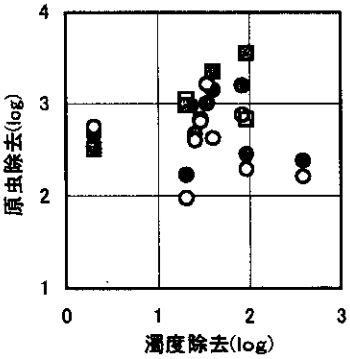
(5) 原虫濃度 vs >7μm粒子数(浄水)



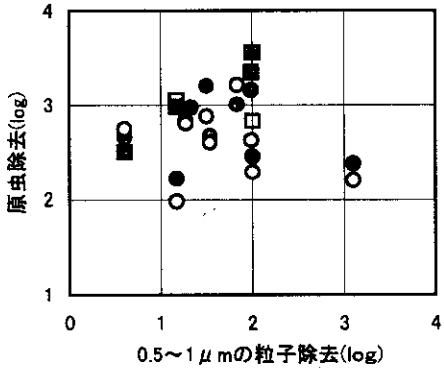
(6) 原虫濃度 vs >0.5μm粒子数(浄水)

● クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子
○ クリプトスポリジウムオーシスト
■ ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子
□ ジアルジアシスト

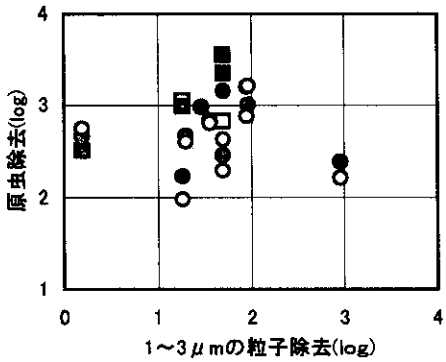
図6 浄水の原虫濃度と濁度および粒子数との関係



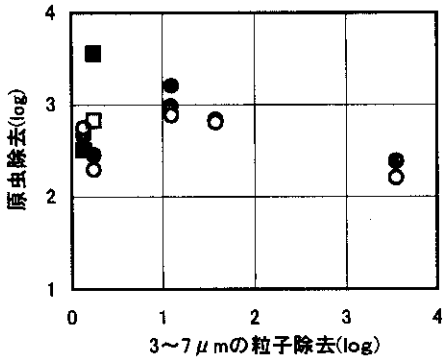
(1) 原虫除去 vs 濁度除去



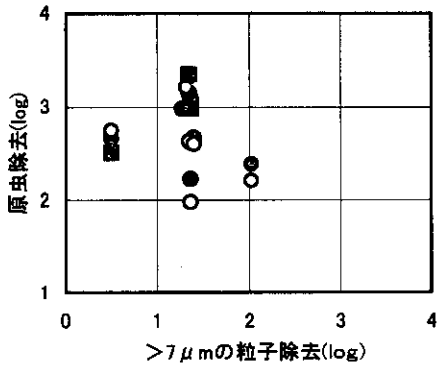
(2) 原虫除去 vs 0.5～1μm粒子除去



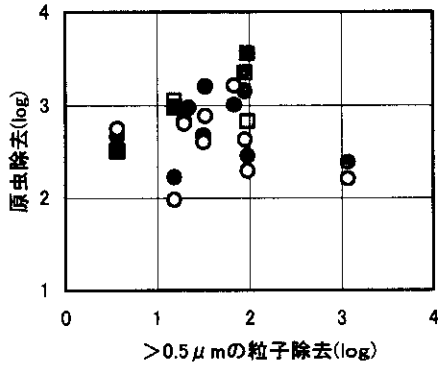
(3) 原虫除去 vs 1～3μm粒子除去



(4) 原虫除去 vs 3～7μm粒子除去



(5) 原虫除去 vs >7μm粒子除去



(6) 原虫除去 vs >0.5μm粒子除去

● クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子
○ クリプトスポリジウムオーシスト
■ ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子
□ ジアルジアシスト

図7 浄水処理による原虫除去と濁度および粒子除去との関係

分担研究報告書１１

相模川河川水および養豚場放流排水中の *Cryptosporidium parvum*オーシストの遺伝子型の解析

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

相模川河川水および養豚場放流排水中の *Cryptosporidium parvum* オーシストの遺伝子型の解析

分担研究者　平田　強　麻布大学環境保健学部　教授

分担研究者　遠藤卓郎　国立感染症研究所寄生動物部　室長

研究協力者　橋本　温　麻布大学大学院環境保健学研究科

要　旨

環境から単離した *Cryptosporidium parvum* 様オーシスト全 86 個 (相模川河川水分離 25 個，養豚排水処理水分離 51 個)について個別に Cry44 と Cry373 からなるプライマーを用いた 1st PCR を行い，25 個の増幅に成功した。同じプライマーによる 2nd PCR で再増幅できたのは，そのうち 21 個であった。21 個の 2nd PCR 増幅産物のうち，*Rsa* I による消化による切断断片のパターンに基づいて遺伝子型の分類ができたのは 20 個で，いずれも 1 型 (ウシタイプ)に分類され，2 型 (ヒトタイプ)に分類されたものはなかった。

1　はじめに

わが国では水環境の原虫汚染に関する情報が少なく，定量的な情報としては神奈川県の水道水源の汚染状況調査 (神奈川県衛生部, 1996, 1997)と厚生省の行った全国 257 ヶ所の水道水源についての全国調査 (厚生省, 1997)の 2 件のみであった。そこで神奈川県の主要な水源の一つである相模川水系を選び，その 11 地点について 13 ヶ月間にわたる原虫汚染実態調査を行うこととし，1997 年 6 月に開始し，1998 年 6 月に終了した。その結果，相模川は原虫により比較的高度に汚染されていることが明らかになっている。(平成 9 年度厚生科学研究補助金-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報告書，および，平成 10 年度厚生科学研究補助金-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報告書)。

高度の汚染が観察された原虫 2 種類のうち，クリプトスポリジウムについては，ヒトに感染性を有するとされる *Cryptosporidium parvum* の遺伝子型に少なくとも 1 型（ウシタイプ），2 型（ヒトタイプ）の 2 タイプがあることが報告されている(Ortega *et al.*, 1991 ; Carraway *et al.*, 1997 ; Spano *et al.*, 1997 ; Gibbons *et al.*, 1998)。現段階では，遺伝子型の差がヒト感染性に関係するという報告はないが，汚染源の推定など疫学情報として利用できる可能性が考えられる。

そこで本研究では，PCR－RFLP 法により *C.parvum* をウシなどから分離される 1 型（ウシタイプ）とヒトから分離される 2 型（ヒトタイプ）に分類する Carraway *et al.*, (1997)の方法を参考に，相模川の河川水から分離したクリプトスポリジウムおよび相模川水系の主要汚染源と考えられた養豚場放流排水から分離したクリプトスポリジウムの遺伝子型を調べた。

2　材料と方法

1) 供試クリプトスポリジウムオーシスト株

1 型（ウシタイプ）のコントロールとして大阪市立大学医学部医動物学教室より分与され，麻布大学生物科学総合研究所感染動物エリアにて SCID マウス(日本クレア)で継代している *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用いた。本株は経口投与し感染後 2 週間目より SCID マウスの糞便を回収し，ショ