

分担研究報告書 8

河川水中のクリプトスポリジウムの時間的変動の実測

分担研究者 大垣眞一郎  
研究協力者 片山浩之

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスク評価及び管理に関する研究

河川水中のクリプトスポリジウムの時間的変動の実測

分担研究者 東京大学大学院工学系研究科 教授 大垣 眞一郎  
研究協力者 東京大学大学院新領域創成科学研究科 講師 片山 浩之

A. 研究目的

1) クリプトスポリジウム感染症の集団発生について

水道水中のクリプトスポリジウムによる大規模な感染症発生については、米国 Wisconsin 州 Milwaukee で 40 万人以上が感染した事例など、海外でいくつかの事例が報告されている。また CDC (Center for disease control and prevention, U.S.A.) は、1991 年から 1998 年の間に、クリプトスポリジウムによるアウトブレイクが 10 件発生し、408,254 人が発症したと報告している (CDC, 1993, 1996, 1998, 2000)。このような状況を踏まえ、WHO は、1995 年 12 月からクリプトスポリジウムを含む病原性微生物にかかわる飲料水水質ガイドラインの検討を開始した。

1996 年 6 月には、わが国で最大のクリプトスポリジウム感染症集団発生が埼玉県越生町で発生した (埼玉県衛生部, 1997)。これを受けて厚生省は同年「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針 (厚生省, 1996)」を策定し (1998 年改正)、水道水源がクリプトスポリジウムによって汚染されるおそれがある浄水場に対して、浄水の濁度を 0.1 度以下に維持するよう運転管理の徹底を求めた。また 1999 年 4 月施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症新法) (1999)」では、クリプトスポリジウム症やジアルジア症が四類感染症に指定され、感染症が発生した場合の医師による届出等の対応が行われるようになった。

2) 環境水中のクリプトスポリジウムとその発生源について

厚生労働省(1997)は、1997 年に国内の 94 水源 277 地域に対してクリプトスポリジウムおよびジアルジアの存在量調査を行った。その結果、クリプトスポリジウムの地点陽性率は 2.9%、ジアルジアの地点陽性率は 8.7%となった。ただし当時の検出手法は、厚生省により定められた暫定的な手法であり、回収率が低いことが既に明らかとなっている (LeChevallier et al., 2000, Stanfield et al., 2000)。その後測定手法の改良が図られ、国内河川においてクリプトスポリジウムおよびジアルジアが検出された例がいくつか報告されている (表 1)。これらの結果から、国内河川水中には広範囲にわたりクリプトスポリジウムおよびジアルジアが存在すると推測できる。

環境水中のクリプトスポリジウムの発生源についてはすでにいくつかの研究がなされており、下水道の雨天時越流水 (Gibson III et al., 1998) や、下水処理水 (橋本ら, 1998)、畜産排水 (Hashimoto et al., 1999) などがあげられている。

表 1 国内河川におけるモニタリング結果 (地点陽性率)

対象河川	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	参考文献
国内河川	2.9%(8/277)	8.7%(24/277)	厚生労働省, 1997
相模川	100%(13/13)	100%(13/13)	Hashimoto et al., 1999
大分県内主要2河川	67%(7/11)	33%(4/11)	吉用ら, 2000
兵庫県内の18河川	72%(13/18)	測定せず	Ono et al., 2001
多摩川	50%(4/8)	75%(6/8)	保坂ら, 2002

### 3) アウトブレイクの発生原因について

過去に発生したアウトブレイクの原因には、大きく分けて以下の2つが挙げられる。

- ・ 自然由来の水源濃度の上昇

大雨、雪解けなどによる、牛や人間の糞便などを含む排水の河川への流入

- ・ 給排水システムの構造上および運転上の問題

浄水場での事故や逆洗水の再利用、下水処理場と浄水の取水口の位置関係など

Rose ら(2000)は、1971 年から 1994 年までの水系感染症の発生と激しい降雨との関係について調査し、アウトブレイクの 20~40%は激しい降雨と関連があると報告した。また Curriero ら(2001)は、アメリカにおける水系感染症の集団発生と気象条件の関係についてシミュレーションを行い、水系感染症の発生と大雨などの気象条件には密接な関係があると報告した。

### 4) 研究の目的

現在とられているクリプトスポリジウム対策は、主に過去に発生した大規模なアウトブレイクに対処することに起因している。アウトブレイクが発生する要因については人為的、自然発生的なものが共に存在するが、いずれにせよ時間レベルの濃度変動により発生していると考えられる。特に自然的要因に起因するアウトブレイクを制御するためには、そのような要因が発生する条件について検討がなされるべきであるが、現在のところ疫学調査やシミュレーションによる研究が多く、実測により評価を行った例はまだ少ない(Kistemann et al., 2002)。

そこで本研究では、水道水の安全性の評価に大きく影響すると考えられる水源中の病原性原虫濃度の変動についての評価手法を確立することを目的とした。

## B. 研究方法

2002 年 5 月から 6 月にかけて、多摩川下流域において連続サンプリングによるクリプトスポリジウムおよびジアルジアのモニタリングを行った。

サンプリング装置は調布取水堰（東京都大田区田園調布、多摩川下流域）に設置し、現地にて河川水の濾過を行った。サンプルは自動的に 2 時間間隔で 8 つ採取し、採取終了後速やかに膜モジュールを持ち帰った後、以下に示す手法でクリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出を行った。サンプリング装置には携帯電話が接続しており、遠隔操作によりサンプリングを開始することができる。本来は降雨等の環境条件の変化と同時にサンプリングを開始することを目的としていたが、今回のサンプリングに関しては時間の制約により不可能であった。また濾過と同時に 1L の河川水を採取し、水質指標の測定を行った。

セルロース繊維製プリーツカートリッジフィルター（有効濾過面積 4000cm<sup>2</sup>、孔径 1μm）を用いて河川水をろ過し、捕捉された濁質を PS-IMS 法（八木ら(2001)の手法の変法）により精製した。クリプトスポリジウムおよびジアルジアを FITC 抗体により染色し、蛍光・微分干渉顕微鏡により計数した。大腸菌群数(TC)および糞便性大腸菌群数(FC)をデソキシコレート寒天培地を用いる重層寒天方により測定した。濁度を濁度計（Hach 社製）により測定した。

## C. 研究結果

各サンプリング日ごとの測定結果を時系列表示したものを図 1 に示す。

クリプトスポリジウムは全 29 サンプル中 8 サンプルからのみ検出され（サンプル陽性率 28%）、ジ

アルジアは全てのサンプルから検出された。また、検出されたサンプルの濃度を比較すると、クリプトスポリジウム濃度はジアルジア濃度と比較しておよそ 1LOG 低い結果となった。

時間に伴う変動を見ると、ジアルジア、TC、FC とともに 1 サンプル期間内での変動はおよそ 1LOG 以下であった（6 月 19 日の後半のサンプルを除く）。測定値全体の幅が 3LOG 以上あることと比較すると小さいといえる。濁度の変動も同様に小さかった（2[NTU]程度）。

6 月 19 日のサンプル後半（6 月 17 日午前 1 時以降）に、全ての水質指標が急激に上昇していることが観察された。

次にジアルジア濃度と各水質指標との関係を図 2 に示す。図を見て明らかなように、全ての指標において相関は認められなかった。これは既存の知見に一致する。

#### D. 考察

6 月 19 日のサンプル後半になんらかの状況の変化が起こったと考えられる。降雨による変動の可能性が考えられるが、気象庁によればこの日に雨は降っていないということがわかっており、河川流量も変動していないため、このような変動が起きた要因は不明である。また、ジアルジアの濃度が他の水質指標よりも 1 サンプル分（約 2 時間）早く上昇しているが、これに関しても原因等は不明である。以上より、定常時は原虫濃度および各種水質指標に大きな変動は見られないにも関わらず、あるタイミングで極端に濃度が変動しうることが確認できた。またこの変動は、これまで指標性がないとされてきた一般的な水質指標（濁度、大腸菌群数、糞便性大腸菌群数）でも見られたことから、水中の原虫濃度の相対的な指標としての有用性が示唆された。

#### E. 結論

多摩川の河川水を 2 時間間隔で採取してクリプトスポリジウムおよびジアルジアを測定し、時間単位で大きく変動していたことを確認することが出来た。また、これらの病原原虫類はほかの水質指標と常時は相関が見られないものの、突発的な濃度上昇においてはすべての水質指標の値が上昇していた。これらの知見は、これまで行われてきた散発的なサンプリングでは得られないものであり、今後のリスク管理を考える上で貴重なデータであると考えられる。

#### 参考文献

- CDC (1993). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1991-1992. Nov. 19, 1993 / Vol.42 / No.SS-5
- CDC (1996). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1993-1994. Apr. 12, 1996 / Vol.45 / No.SS-1
- CDC (1998). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1995-1996. Dec. 11, 1998 / Vol.47 / No.SS-5
- CDC (2000). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1997-1998. May 26, 2000 / Vol.49 / No.SS-4
- Curriero, F.C., Patz, J.A., Rose, J.B. and Lele, S. (2001). The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994, American Journal of Public Health, **91**, 8, pp 1194-1199
- Gibson III, C.J., Stadterman, K.L., States, S. and Sykora, J. (1998). Combined sewer overflows: a source of *Cryptosporidium* and *Giardia*? Water Science and Technology, Vol. 38, No. 12, pp. 67-72
- Hashimoto, A. and Hirata, T. (1999). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Sagami river, Japan, Conference preprint of Asian Waterqual '99: 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference, Vol.2, pp.956-961
- Kistemann, T., Claßen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V. and Exner, M. (2002). Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. Applied and Environmental Microbiology, **68**, 5, 2188-2197.

- LeChevallier, M.W., Abbaszadegan, M. and Di Giovanni, G.D. (2000). Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples using an integrated cell culture-PCR (CC-PCR) system., *Water Air and Soil Pollution*, **123**, 1-4, 53-65
- Ono, K., Tsuji, H., Rai, S.K., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T. and Uga, S. (2001). Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 9, 3832-3836
- Stanfield, G., Carrington, E., Albinet, F., Compagnon, B., Dumoutier, N., Hamsch, B., Lorthioy, A., Medema, G., Pezoldt, H., de Roubin, M.R., de Lohman, A. and Whitmore, T. (2000). An optimised and standardised test to determine the presence of the protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water, *Water Science and Technology*, **41**, 7, 103-110
- Rose, J.B., Daeschner, S., Easterling, D.R., Curriero, F.C., Lele, S. and Patz, J.A. (2000). Climate and waterborne disease outbreaks, *Journal American Water Works Association*, Vol 92, Iss 9, pp 77-87
- 厚生労働省 (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, 厚生科学研究
- 厚生労働省 (1996, 1998), 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針
- 埼玉県衛生部 (1997), 「クリプトスポリジウムによる集団下痢症」ー越生町集団下痢症発生事件ー報告書
- 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よる除去性, *水環境学会誌*, **20**, 6, 404-410
- 八木 正一, 中西 正治, 小田 琢也, 山本 稔, 井上 亘 (2001), クリプトスポリジウム試験分離精製操作法の比較検討, 第 52 回全国水道研究発表会梗概集, pp.628 - 629.
- 感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律, 1999.4.1 施行

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

- Masago Y., H. Katayama, A. Hashimoto, T. Hirata and S. Ohgaki (2002) Assessment of risk of infection due to *Cryptosporidium parvum* in drinking water *Water Science and Technology*, Vol 46, No11-12, 319-324
- 真砂佳史、片山浩之、大垣眞一郎 (2002) 大容量の河川水からの *Cryptosporidium* 及び *Giardia* の濃縮・精製手法の検討 第 53 回全国水道研究発表会講演集、pp632-633

H. 知的財産権出願・登録状況 なし

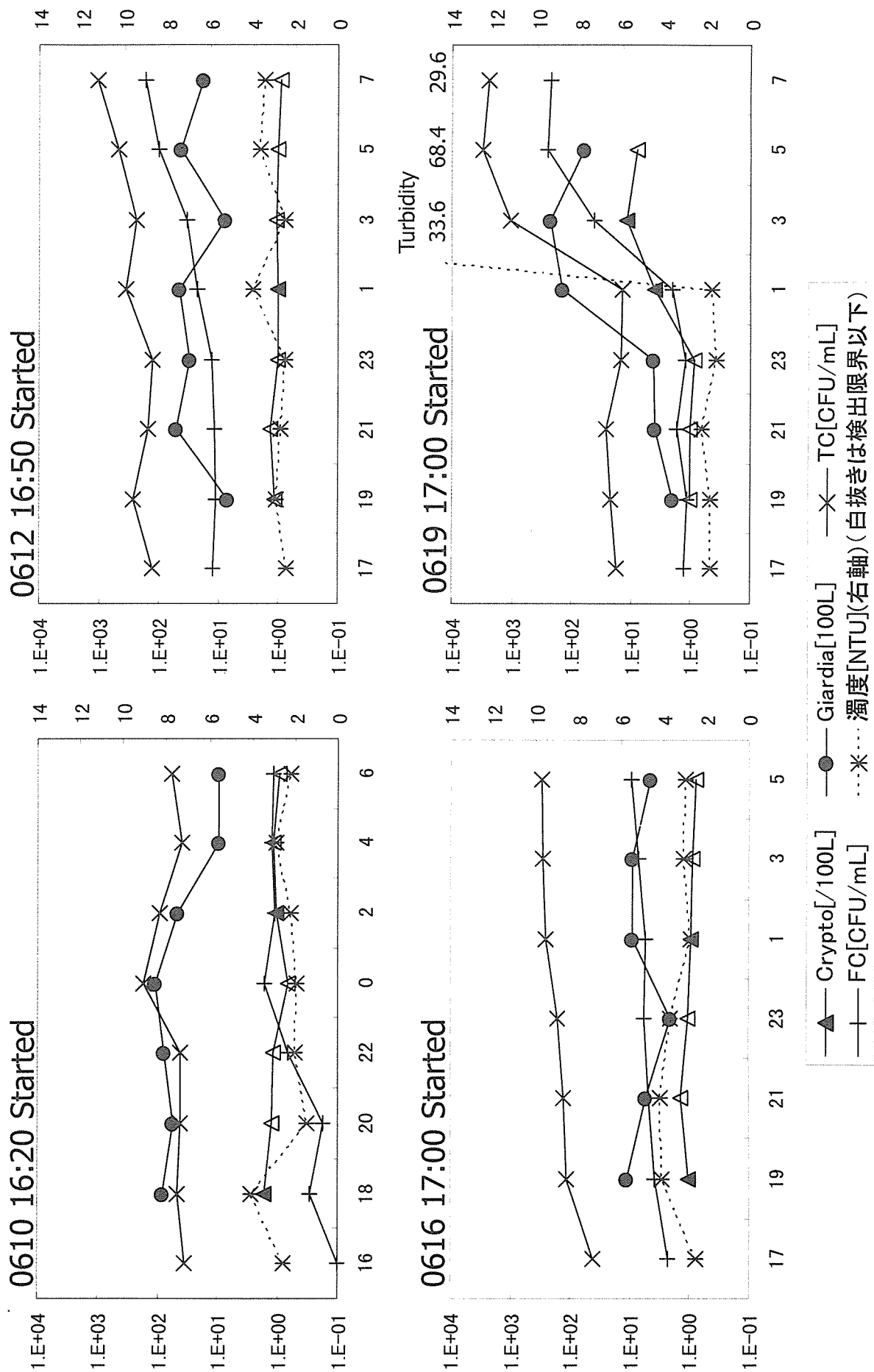


図1 多摩川でのモニタリング結果

サンプリング日

- + 519
- × 610
- △ 612
- 616
- \* 619

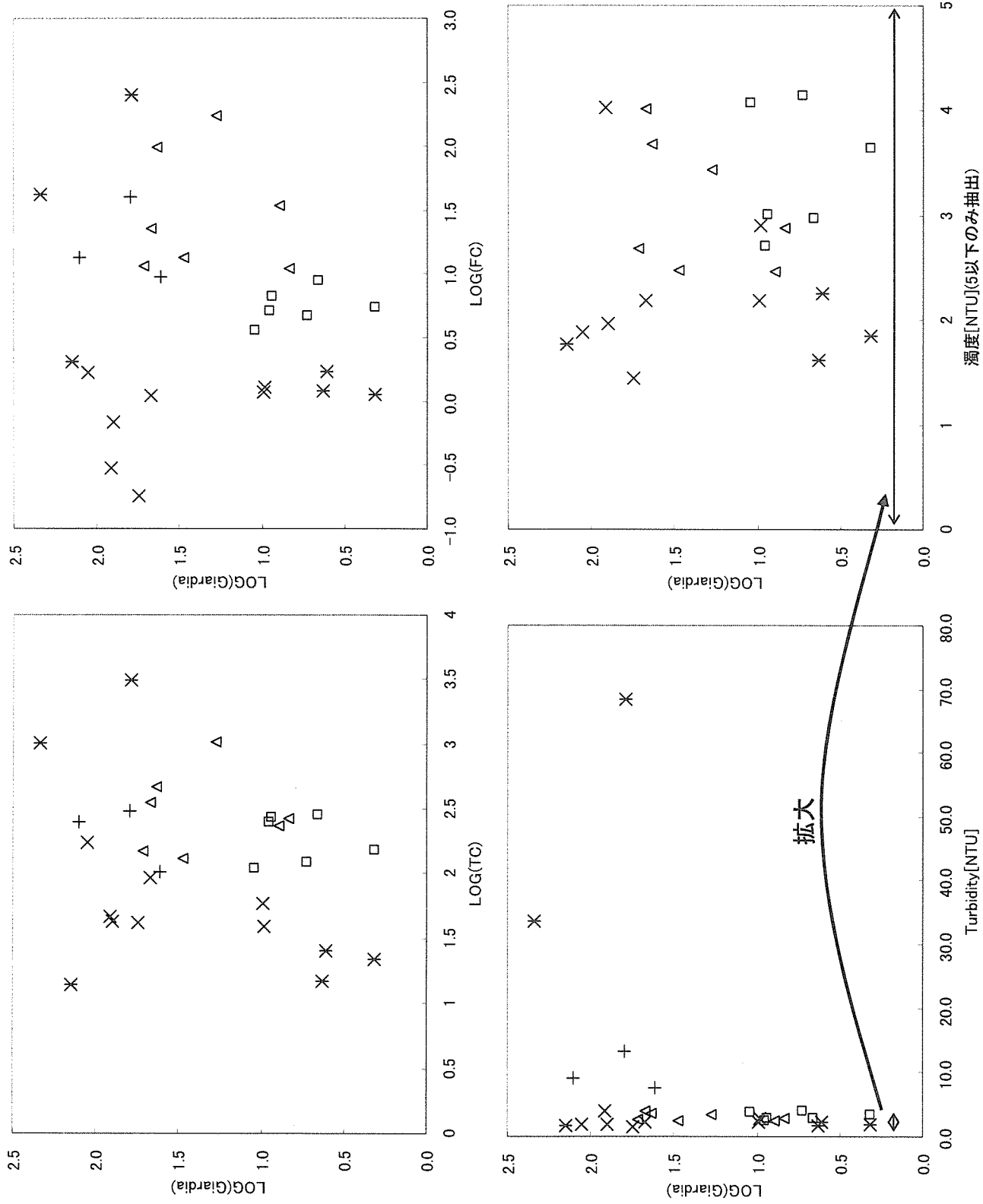


図2 ジアルジア濃度と各種指標の関係

浄水場の原水およびろ過水における  
原虫の出現濃度分布と除去に関する実態調査

分担研究者 平田 強  
研究協力者 森田重光



平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係る健康リスク評価及び管理に関する研究  
浄水場の原水およびろ過水における原虫の出現濃度分布と除去に関する実態調査

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 森田 重光 麻布大学環境保健学部 講師

## 要旨

本研究では、暫定対策指針に基づいて適正な濁度管理を実施している浄水場で、原水とろ過水の原虫汚染レベルの把握と浄水処理による除去特性の評価を目的とし、平成 14 年度は 9 回分の採取試料の原虫試験を行った。試験水量は原水 20～50L、ろ過水 1,500～2,500L である。得られたデータを過去の全データと統合して原水 30 試料、ろ過水 59 試料からなるデータベースとし、原水およびろ過水の原虫濃度と浄水処理による除去率の累積出現分布等の解析を試みた。

原水では、クリプトスポリジウムの陽性率は 100%、濃度範囲は 110～1,900 個/1,000 L で、出現濃度はほぼ対数正規分布し、累積出現確率 50%値は 450 個/1,000 L、95%値は 1,600 個/1,000 L であった。しかし、累積出現確率の高い領域（90%以上）になると対数正規分布則からやや外れる傾向がうかがわれた。ジアルジアの陽性率は 93%（28/30）、濃度範囲は 0.3～720 個/1,000 L、累積出現分布は対数正規確率紙上で緩やかな山形の曲線となった。ジアルジア濃度の累積出現確率 50%値は 160 個/1,000 L で、95%値は 590 個/1,000 L であった。ろ過水では、クリプトスポリジウムは 60 試料のうち 28 試料から検出された（陽性率 47%、濃度範囲 0.3～11 個/1,000L）。累積濃度出現分布は、原水の場合と同様、おおむね対数正規分布的であったが、分布の傾きが大きいという特徴が認められた。累積出現確率 50%値は約 0.3 個/1,000L、95%値は 7 個/1,000L であった。ジアルジアは調査した 60 試料のうち 7 試料（陽性率 12%）から検出されたが、濃度はいずれも約 0.5 個/1,000 L 以下で、累積出現確率 50%値は読みとれなかった。95%値は 0.5 個/1,000 L であった。

原水、ろ過水のいずれも陽性であった調査日のデータから算出した除去率の累積出現確率 50%値は、推定クリプトスポリジウムで  $2.81 \log_{10}$ 、推定ジアルジアでは  $3.05 \log_{10}$ 、95%値は、推定クリプトスポリジウムで  $3.18 \log_{10}$ 、推定ジアルジアで  $3.55 \log_{10}$  であった。

これらの研究成果から、原水のクリプトスポリジウム濃度はジアルジア濃度よりも高いか、同等レベルにあること、急速砂ろ過法によるクリプトスポリジウムの除去成績はジアルジアと同等かそれ以下であること、したがって、クリプトスポリジウムをターゲットにして適切な水質管理を行えば、同時にジアルジアに対する適切な水質管理が達成できること、などを明らかにすることができた。

## A 目的

表流水を水源とする水道の浄水処理システムは、通常、微細な懸濁粒子等を物理的に除去するろ過プロセスと、病原微生物を不活化する消毒プロセスから構成される。我が国で消毒に用いられている塩素は、現在世界的に水系感染症の原因となっている原虫類に対しては効果が極めて小さく、とりわけクリプトスポリジウムに対してはほとんど無効であることは既に周知の事実である（たとえば、志村ほか(2001)）。それゆえ、水道水の原虫類に対する安全性は、浄水処理におけるろ過などによる物理的除去の成否に大きく依存することになる。実稼動している浄水場の急速砂ろ過シス

テムのクリプトスポリジウム平均除去率は、米国・カナダから  $2.38 \log_{10}$  (LeChevallier *et al.*, 1991)、我が国からは  $2.47 \log_{10}$  と報告されており (Hashimoto *et al.*, 2002)、 $2 \sim 3 \log_{10}$  の除去が期待できると考えられるが、原水中の濃度が高い場合には  $2 \sim 3 \log_{10}$  の除去で十分に安全な水道水となるかどうか、保証はない。また、橋本らは、実際のろ過水 26 試料のうち 9 試料からクリプトスポリジウムを検出しており (Hashimoto *et al.*, 2002)、原水中の原虫の一部がろ過池から漏出することが明らかになっているが、定量的な評価データは限られている。そこで本研究では、急速砂ろ過法で浄水処理している浄水場で、原水とろ過水のクリプトスポリジウムとジアルジアの汚染状況調査を行い、得られたデータを 1998 年 7 月から 2001 年 11 月までの過去のデータと統合して、出現濃度や除去特性等を解析した。

## B 調査方法

### 1 調査対象浄水場

相模川を水源とする、ある浄水場を対象とした。この浄水場では、原水から高濃度にクリプトスポリジウムならびにジアルジアが検出されていることから、クリプトスポリジウム暫定対策指針(厚生省生活衛生局水道環境部、1998)に従ってろ過水濁度を常時 0.1 度未満とする濁度管理を行っている。全調査日のろ過水濁度は通常 0.02 度以下、最大値は 0.03 度であり、急速砂ろ過システムが適正に運転管理されていることが伺われる。

### 2 原虫試験

#### 2.1 試料の採取および濃縮

本年度は 2001 年 12 月から 2002 年 11 月まで月 1 回の頻度で計 9 回採取した原水 9 試料、ろ過水 18 試料について原虫試験を行った。

試料の採取・濃縮方法は次のとおりである。

大量の試料の濃縮に適した酢酸セルロース製外圧中空系 UF 膜モジュール(中空系内径 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)を用いて採水した。原水は小型中空系 UF 膜モジュール(膜面積  $0.3 \text{ m}^2$ )で着水井からローラーポンプで加圧しながら 50L ろ過し、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リング管に大型中空系 UF 膜モジュール(膜面積  $1.4 \text{ m}^2$ )を接続して 2,000~3,000L ろ過した。また、大腸菌、大腸菌群試験用試料として、原水および浄水をそれぞれ滅菌したメディウム瓶に 500mL (2002 年 10 月 29 日以降は 1,500mL) 採水した。

#### 2.2 中空系 UF 膜モジュールからの誘出

試料をろ過した中空系 UF 膜モジュールを研究室へ持ち帰り、クリプトスポリジウムおよびジアルジアを誘出した。誘出方法は次のとおりである。

原水をろ過した小型中空系 UF 膜モジュールには超純水を 100mL、ろ過水をろ過した大型中空系 UF 膜モジュールには 200mL をそれぞれ加えて手でよく振ったのち、その洗液を遠沈管(200mL)に集めた。その後、U.S.EPA Method 1622<sup>18)</sup>に記載されたカプセルフィルター用の誘出液を、小型中空系 UF 膜モジュールには 50mL、大型中空系 UF 膜モジュールには 100mL

加え、再び手でよく振り、その洗液を前述の遠沈管にそれぞれ集めた。最後に、小型中空系 UF 膜モジュールには超純水を 50mL、大型中空系 UF 膜モジュールには 100mL を加え、U.S.EPA Method1622 カプセルフィルター用誘出液を用いた場合と同様の操作を行い、全ての洗液を遠沈管に集めて遠心分離（1,050×g, 15 分）し、上清を除去した。

### 2.3 ショ糖浮遊法による選択分離

遠心沈渣量として 0.5mL 以下を遠沈管（50mL）に分取し、PBS（T+）（150mmol 界面活性剤加リン酸緩衝生理食塩水、Tween80 添加、Sigma Antifoam A 添加）を加えて 20mL とし、タッチミキサーで良く攪拌した後、比重 1.09~1.10 の Percoll ショ糖溶液を、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、遠心分離（1,050×g, 15 分）した。界面と上清を別の遠心管に回収し、PBS（T+）で 47.5mL にしたのち再び遠心分離（1,050×g, 15 分）し、上清を除去した。更に PBS（T-）（リン酸緩衝生理食塩水、Tween80 および Sigma Antifoam A 無添加）で 47.5mL にしたのち遠心分離（1,050×g, 15 分）し、上清を除去した。

### 2.4 染色法

染色は、染色性の違いを調べるために、原水については試料を半分ずつに分け、間接蛍光抗体染色法と直接蛍光抗体染色法の二通りの方法で行なった。浄水については間接蛍光抗体染色法のみとした。

#### 2.4.1 間接蛍光抗体染色法

撥水ペンで円を描いたセルロースアセテート製メンブランフィルター（孔径 3.0μm, 直径 25mm, ADVANTEC 製）を PBS（T-）に浸してから多試料ろ過器にセットし、PBS（T-）、1%BSA（ウシ血清アルブミン）、0.1%NGS（正常ヤギ血清）をそれぞれ 1mL 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 1mL ずつろ過し、フィルターを洗浄した。洗浄後、1 次抗体（HYDROFLUOR COMBO, Strategic Diagnostics 社製）を 100μL 滴下し、湿度の保たれた暗所で 25 分反応させた後、PBS（T-）、1%BSA、0.1%NGS をそれぞれ 1mL ずつ用いてろ過洗浄した。1 次抗体と同様の操作で 2 次抗体を 25 分間反応させた。なお、DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）染色では、5,000 倍希釈液を 2 次抗体添加 20 分後に滴下し、5 分間反応させた。反応後、1 次抗体と同様にフィルターを洗浄した後、30%エタノール/グリセリン溶液、90%エタノール/グリセリン溶液をそれぞれ 1mL 滴下して脱水した。脱水後、2%DABCO/グリセリン封入剤を 1 滴のせたスライドガラスにフィルターをのせ、更に 2%DABCO/グリセリン封入剤を 1 滴のせ、カバーガラスをかぶせてプレパラートを作製した。

#### 2.4.2 直接蛍光抗体染色法

セルロースアセテート製メンブランフィルター（孔径 3.0μm, 25mm, ADVANTEC 製）を PBS（T-）に浸してから、多試料ろ過器にセットし、選択分離を行った試料をゆっくりとろ過し、超純水 1mL で洗浄した後に、抗体（Easy Stain, Biotechnology Frontiers 社製）を 100μL 滴下し、室温で 10 分間反応させた。DAPI 染色は 5,000 倍希釈液を抗体添加 10 分後に滴下し 5 分間反応させた。反応後、ゆっくり吸引し、洗浄用緩衝液 100μL を滴下したのち、室温に 1 分

間放置し、ろ過した。ろ過後、2%DABCO/グリセリン封入剤を1滴のせたスライドガラスにフィルターをのせ、更に2%DABCO/グリセリン封入剤を1滴のせ、カバーガラスをかぶせてプレパラートとした。

## 2.5 計数

作製したプレパラートをノルマルスキー微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡（BX60, オリンパス光学工業製）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およびジアルジアを判定し、計数した。

### 1) クリプトスポリジウム

推定試験；1,000倍の蛍光像で以下の(1)～(4)の全てがあてはまるものを推定クリプトスポリジウムと判定した。

- (1) FITCによる青リンゴ色蛍光が観察されること
- (2) 直径が4～6 $\mu\text{m}$ であること
- (3) 輪郭が強く染色された類円形（あるいはひしゃげた紙風船様）であること
- (4) 内部に赤もしくは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倍の蛍光像で以下の(1)～(5)の全てがあてはまるものを確定クリプトスポリジウムと判定した。

- (1) ノルマルスキー微分干渉像でスポロゾイトが確認されること
- (2) ノルマルスキー微分干渉像で縫合線が確認されること
- (3) DAPI像で核が観察されること
- (4) G励起像で赤く光らないことが確認されること
- (5) クリプトスポリジウムとは明らかに異なる構造が確認されないこと

### 2) ジアルジア

推定試験；1,000倍の蛍光像で以下(1)～(3)の全てを満たすものを推定ジアルジアとした。

- (1) FITCによる青リンゴ色蛍光が観察されること
- (2) 直径が9～15 $\mu\text{m}$ であること
- (3) 輪郭が強く染色された類円形で、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倍の蛍光像で以下(1)～(3)の全てを満たすものを確定ジアルジアとした。

- (1) DAPI像で核が観察されること
- (2) ノルマルスキー微分干渉像で軸系、中央小体のいずれかが確認されること
- (3) ジアルジアと明らかに異なる構造が確認されないこと

## 3 水質項目

### 3.1 大腸菌、大腸菌群試験

特定酵素基質培地（MMO-MUG培地）を用いて、10倍希釈、5、6段階MPN5本法で定量した。培養条件は、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $24\pm 2\text{ hr}$ とした<sup>19)</sup>。

### 3.2 濁度および粒子数の測定

微粒子カウント式高感度濁度計（富士電機）を用いて、濁度、粒径別粒子数を測定した。原水の

濁度は、浄水場が積分球式濁度計で測定した値を用いた。

## C 結果および考察

### 1 データの統合

今年度分のデータ（2001年12月～2002年11月採取分）と、過去のデータ（1998年7月～2001年11月）の原水中のクリプトスポリジウムおよびジアルジアの累積出現確率分布を比較したところ、両データ群間に有意な差は認められなかった。ろ過水でも、クリプトスポリジウム、ジアルジアともに、累積出現確率50%値および95%値、出現濃度分布等に有意な差が認められなかった。そこで、今年度分のデータ（2001年12月～2002年11月採取分）と過去のデータ（1998年7月～2001年11月）をすべて統合し、原水、ろ過水それぞれ同一の母集団からのデータベースであるとみなして整理・解析した。不検出も含めて、確定データ数は、原水ではクリプトスポリジウム、ジアルジアともそれぞれ30試料、ろ過水では、1試料でジアルジアの検査ミスがあり、最終的なろ過水の試料数は、クリプトスポリジウムで60試料、ジアルジアで59試料である。

### 2 原虫濃度

#### 2.1 陽性率と濃度範囲

原水では、クリプトスポリジウムは30試料のすべてから検出された（陽性率100%）。濃度範囲は110～1,900個/1,000Lであった。ジアルジアは、30試料のうち28試料から検出され（陽性率93%）、陽性試料の濃度範囲は20～720個/1,000Lであった。ろ過水では、クリプトスポリジウムは60試料のうち28試料から検出され（陽性率47%）、濃度範囲は0.3～11個/1,000Lであったが、ジアルジアは59試料中わずか7試料からしか検出されず（陽性率12%）、濃度範囲も0.3～0.53個/1,000Lと、クリプトスポリジウムに比べて低い値であった。

なお、わが国におけるクリプトスポリジウムの濃度について、水道原水取水点を含む東京都の多摩川上流で0～10個/1,000L<sup>20)</sup>、東京都の利根川水系江戸川で100個/1,000L、宮城県の吉田川で200個/1,000L、山形県の大泉第1～3水源地で68個/1,000L、神奈川県相模川の300個/1,000L<sup>21)</sup>、ジアルジアでは、多摩川上流で110～190個/1,000L<sup>20)</sup>、宮城県の鳴瀬川で100個/1,000Lで、山形県の大泉第1～3水源地で34個/1,000L、岩手県の第1水源で100個/1,000L<sup>21)</sup>と報告されている。これらの報告値に比べると、今回われわれが得た累積出現確率50%値（クリプトスポリジウム450個/1,000L、ジアルジア160個/1,000L）は若干高い傾向があるが、オーダーはほぼ同じレベルにあると見てよいと考えられる。

#### 2.2 累積出現分布

原水およびろ過水のクリプトスポリジウムの累積出現確率分布を図1に、ジアルジアの累積出現確率を図2に示す。また、出現濃度分布図から求めたクリプトスポリジウムおよびジアルジアの陽性率と、累積出現確率50%値、95%値を表1、2にまとめた。

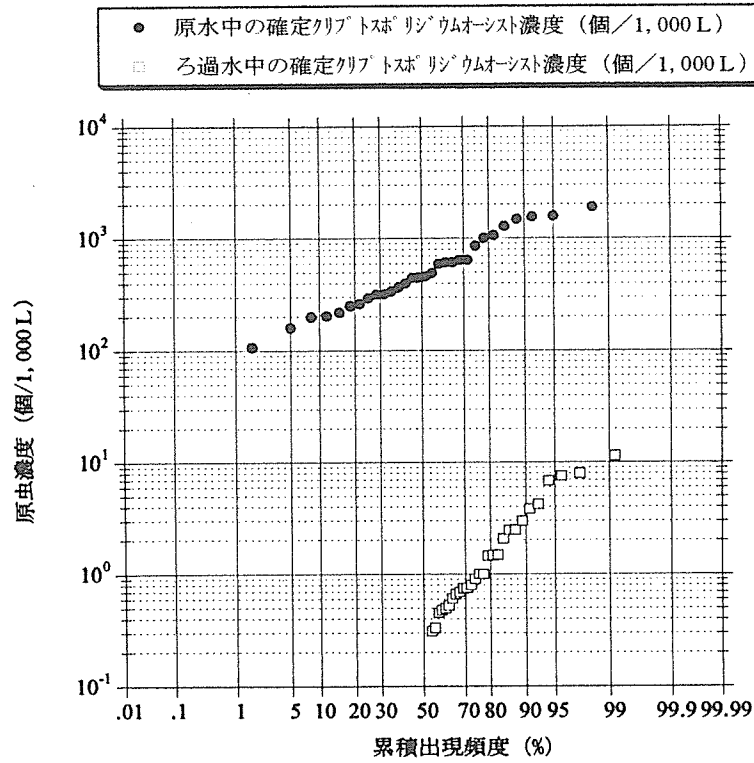


図1 原水およびろ過水におけるクリプトスポリジウム濃度累積出現分布

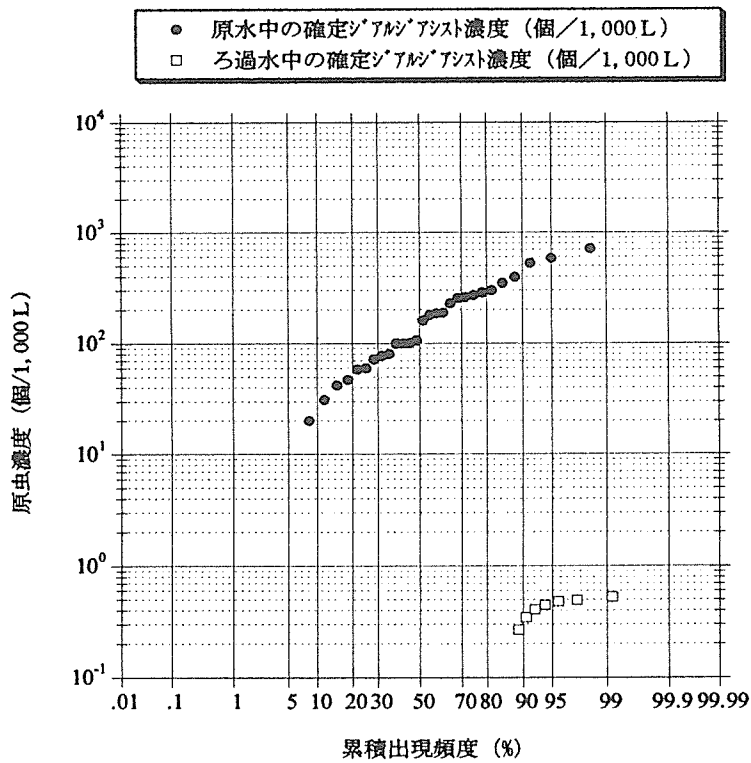


図2 原水およびろ過水におけるジアルジア濃度の累積出現分布

表1 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出現濃度

	クリプトスポリジウム	ジアルジア
累積出現確率 50%値 (個/1,000L)	450	160
累積出現確率 95%値 (個/1,000L)	1,600	590
陽性データの出現濃度範囲 (個/1,000L)	110~1,900	20~720
陽性率 (%)	100	93
陽性試料数/試験試料数	30/30	28/30

表2 ろ過水におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの出現濃度

	クリプトスポリジウム	ジアルジア
累積出現確率 50%値 (個/1,000L)	0.3	-
累積出現確率 95%値 (個/1,000L)	7	0.5
陽性データの出現濃度範囲 (個/1,000L)	0.3~11	0.5~2
陽性率 (%)	47	12
陽性試料数/試験試料数	28/60	7/59

### 2.1.1 原水

原水におけるクリプトスポリジウムの累積出現確率 50%値は 450 個/1,000 L、95%値は 1,600 個/1,000 L、ジアルジアの累積出現確率 50%値は 160 個/1,000 L、95%値は 590 個/1,000 Lであった(表1、2)。分布形状を詳細に見ると、クリプトスポリジウムでは、出現確率のきわめて低い領域(原水では累積出現確率 90%、ろ過水では 95%を超える領域)で対数正規分布からやや外れ、濃度の上昇が鈍くなる傾向が認められる(図1)。これを外挿すると、原水における累積 99.9%値のクリプトスポリジウム濃度は 2,000 個/1,000 L 程度のレベルと考えられる。

一方、原水のジアルジア濃度は対数正規確率図上でわずかながら上に凸(山形)のなだらかな曲線の形状となり、クリプトスポリジウムの場合よりもさらに対数正規分布則から外れる傾向が認められた(図2)。また、クリプトスポリジウムと同様、ジアルジアでも高濃度領域で濃度上昇が鈍くなり、累積 99.9%値は 1,000 個/1,000 L 程度のレベルになると考えられる。

このように、クリプトスポリジウムとジアルジアの出現濃度分布はいずれも対数正規分布的ではあるが、細部では異なることが明らかになった。

図3には、クリプトスポリジウム濃度とジアルジア濃度の関係を示した。クリプトスポリジウム濃度が増加するとジアルジア濃度も増加する傾向が認められるものの、両者に有意な相関関係は認められず、それぞれお互いにかなり独立した変動を示すようである。しかしながら、ジアルジア濃度がクリプトスポリジウム濃度を越えたのは 30 回中わずか 2 回しかなく、30 回中 28 回(93%)でクリプトスポリジウム濃度はジアルジア濃度よりも高いことから、ジアルジアの濃度がクリプトスポリジウムを凌ぐことはまれであると考えられる。また、ジアルジアの遊離塩素に対する消毒耐性はクリプトスポリジウムほど顕著ではなく、水道における塩素消毒でもある程度の不活化が期待できることから、現行の水道システムにおいては、クリプトスポリジウムによる汚染レベルの把握と、その出現濃度に対する適切な対策の実施が最重要課題であるといえよう。

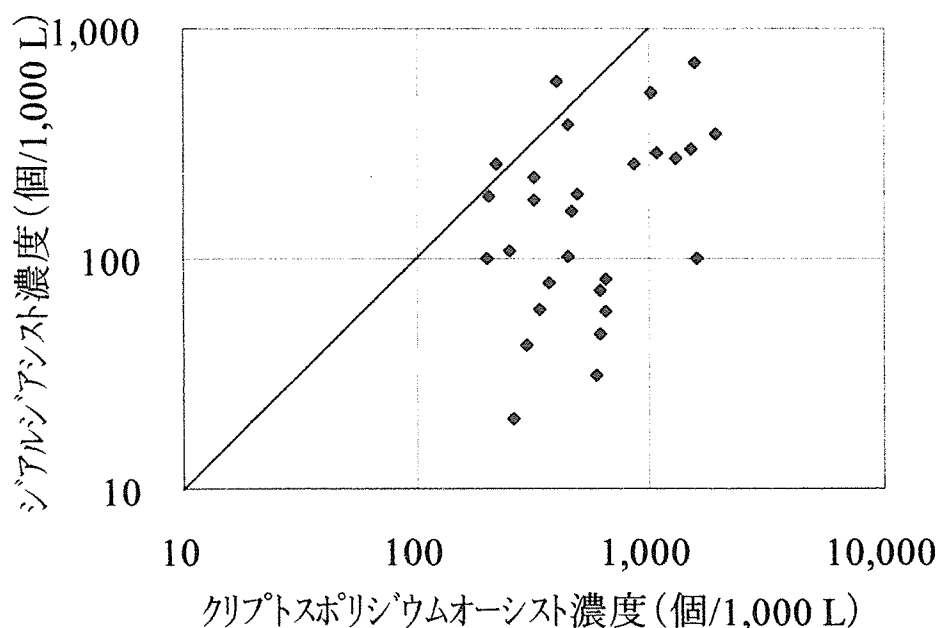


図3 原水におけるクリプトスポリジウムとジアルジアの濃度の関係

### 2.1.2 ろ過水

クリプトスポリジウムは、ろ過水試料の約半数で検出されず、累積出現確率が 50%以下では定量値が得られなかったが、累積出現確率 50%~95%の範囲でおおむね対数正規分布則に従うことが観察された。累積出現確率 50%値は 0.3 個/1,000 L、95%値は 7 個/1,000 L であった（表 2）。原水と同様、ろ過水でも高濃度域（累積確率 95%超）で濃度の上昇が鈍くなる傾向が認められ（図 2）、99.9%値は 20 個/1,000L（0.5 個/20L）かそれ以下と推測される。

ジアルジアでは、2,000L もの大量のろ過水試料について検査したにもかかわらず、陽性率はわずか 12%しかなく、累積出現確率 90%~99%の非常に狭い範囲のデータしか得られなかった。しかも計数値が小さく、定量性の著しく乏しいデータしか得られなかった。このため、信頼性のある出現濃度分布は得られなかった。なお、累積出現確率 99%値はわずか 0.5 個/1,000L と極めて低濃度であった。

このように、今回調査した浄水場のろ過水の原虫濃度は、累積出現確率が 99%と極めて高いときであっても、クリプトスポリジウムで 10 個/1,000L（0.2 個/20L）、ジアルジアで 0.5 個/1,000L（0.01 個/20L）に過ぎず、クリプトスポリジウム暫定対策指針に記載されているろ過水 20L の検査では検出される可能性がほとんどない極めて低い濃度であった。このことは、暫定対策指針から見て、この浄水場では、一連の浄水処理が、原水のクリプトスポリジウムやジアルジア汚染に照らして適正に運転管理されていると判断できよう。

### 2.1.3 リスクの概算

ろ過水から検出されたクリプトスポリジウムの濃度分布を対数正規分布とみなして、クリプトスポリジウム濃度の幾何平均値（個/1,000L）の自然対数値として  $\mu = -0.81$ 、標準偏差  $\sigma = 1.37$  とし、妥当性が必ずしも十分には検証されていないものの、さまざまな研究でリスクの推定に一般に用いられる下記の仮定の下で、モンテカルロシミュレーション法により年間感染リスクを概算した。



その結果、感染リスクは、 $10^{-267}$ /年と算出された。

仮定1 検出されたクリプトスポリジウムはすべて生きていて、個々のクリプトスポリジウムの感染確率は次式(1)で表される。

$$P(N) = 1 - \exp(-N/k) \quad (1)$$

N: クリプトスポリジウムオーシストの経口摂取個数、k: パラメータ (= 238.604)

仮定2 ヒトのクリプトスポリジウムに対する感受性に個体差はない。

仮定3 水摂取水量は年間を通じて1L/(人・日)の一定値である。

仮定4 給水集団人口は無限に大きく、クリプトスポリジウムの年間リスクは、日リスクの365日分の総和であらわされる。

現行の試験方法で検出されるクリプトスポリジウム等の計測値をそのまま、仮定1の用量反応モデルに適用するにはいくつかの問題点がある。その一つは、現行の試験方法は顕微鏡による形態観察が基本であり、生死が不明であることである。すなわち、形態上の異常が認められなければ、生死に関係なく、すべて生きているものとみなさざるを得ない。その結果、過大評価につながるおそれ非常に高い。二つめは、型別が判断できないことである。クリプトスポリジウム等には同じ種に分類されていても、いくつかのtypeがあることが知られており、typeによって感染力が大きく異なる。(1)式はある特定のtypeの株で得られた人感染実験データに基づくものであり、それ自体の信頼性は低くないと考えられるが、異なるtypeの株に同じパラメータが適用できるかどうかは疑問である((1)式のパラメータの算出に用いられた感染データのID50は132個とされているが、他の株では9個程度とちょっと小さいとの報告や、132よりもずっと大きいとする報告もある)。三つめは、水摂取量である。上記のリスク計算では、わが国で行われた生水の飲水量の調査に基づいて、累積飲水量97.5%値に相当する1L/(人・日)を採用している。それ自体は、水道水として供給する水の質として見た場合は妥当と判断できるが、その値を基に計算したリスクの値は、水道使用者の実際の飲水量分布を考慮した取り扱い(たとえば飲水量の幾何平均値を用いるなど)をしないと、リスクを過大に評価することになる。

このように、上記4つの仮定に基づいたクリプトスポリジウムの年リスクの試算値は $10^{-267}$ /年となったが、たとえば、検出されたクリプトスポリジウムのうちヒト感染性を有するものの存在比率を0.1、飲水量を200mLとすると、供給されている水道水の感染リスクはおおむね $10^{-4}$ /年レベルになり、USEPAの許容感染リスク $10^{-4}$ /年相当の値となる。この修正試算結果に基づけば、本浄水場では、汚染レベルが1オーダー上昇するような水源環境の変化、ヒト感染力が著しく高いtypeのクリプトスポリジウムによる汚染、あるいは浄水処理の運転管理上のミスが発生等がなければ、水道水がクリプトスポリジウム感染の主要な源となるおそれは低いと考えられる。

いずれにしても、現行の試験方法では信頼性のあるリスク計算を行うのに十分な質が確保できないという大きな欠点がある。分子生物学的手法の導入など、感染性や生死を評価できる試験方法の開発・導入が望まれる。

### 3 原虫の除去率

過去の調査ならびに今回の一連の調査で用いた原虫試験方法は2段階からなり、第1段階では、当該原虫に特異的な免疫蛍光抗体によって染色され、かつ大きさが当該原虫の標準サイズ近傍であることを確認する。そして第2段階で、微分干渉で内部構造を観察して、当該原虫に特異的な構造が観察されたときに確定値としているが、この第2段階の顕微鏡観察で、時として、挟雑する粒子による妨害が生じ、判定ができないことがある。このため、特定の性状を持った粒子の数としてみた場合、挟雑粒子による顕微鏡観察の妨害もほとんどないことから、第2段階の粒子計数値よりも第1段階の蛍光粒子数の計数値のほうが数値データとしての信頼性が高く、数値も大きい。そこで、本研究では、クリプトスポリジウムやジアルジアの除去率は、クリプトスポリジウム、ジアルジアともに、推定値データと確定値ベースの両方のデータから計算した。なお、計算に当たっては、原水、浄水のいずれからも定量値が得られているデータ組のみを使用した。

推定試験結果から算出した両原虫の除去率の累積出現確率分布を図4、5に、累積出現確率別の除去率を表3に示す。

表3 急速砂ろ過法におけるクリプトスポリジウムとジアルジアの除去率

累積出現確率	クリプトスポリジウム		ジアルジア	
	推定	確定	推定	確定
5%	1.94	1.70	2.25	不明
50%	2.81	2.71	3.05	2.83
95%	3.48	3.28	3.55	3.17

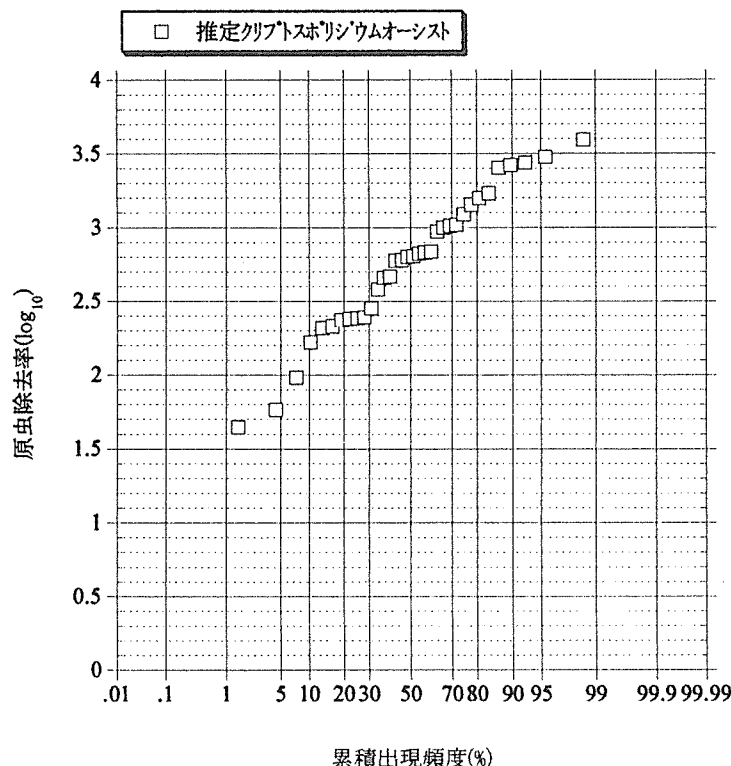


図4 原水とろ過水の推定クリプトスポリジウム濃度から計算した除去率

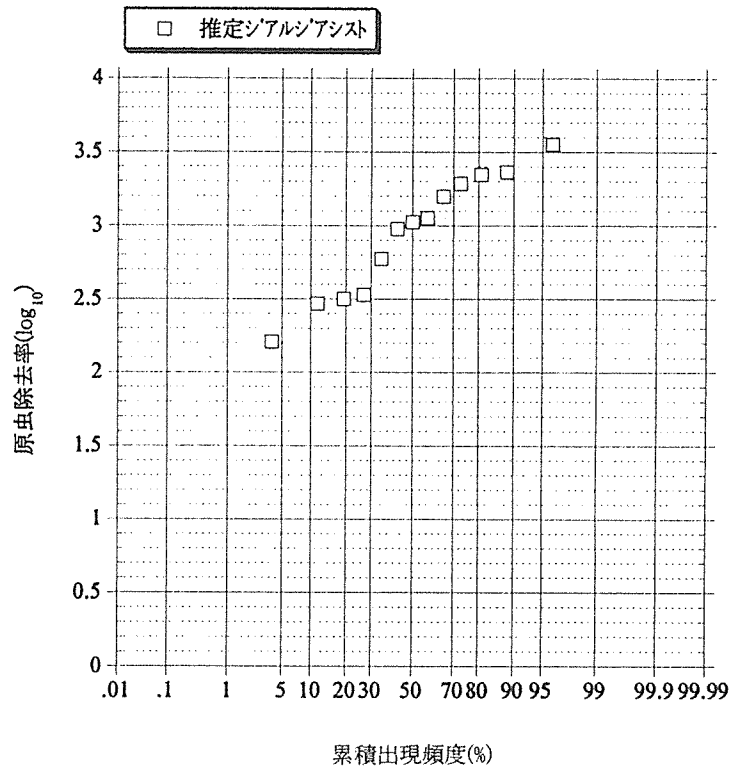


図5 原水とろ過水の推定ジアルジア濃度から計算した除去率

浄水処理の原虫除去率は、推定クリプトスポリジウムで 1.65～3.59  $\log_{10}$ 、確定クリプトスポリジウムで 1.44～3.67  $\log_{10}$  の範囲にあった。一方、推定ジアルジアの除去率は 2.21～3.55  $\log_{10}$ 、確定ジアルジア除去率は 1.73～3.17  $\log_{10}$  の範囲にあった。

クリプトスポリジウム、ジアルジアとも、推定値ベースで算出した除去率と確定値ベースで算出した除去率とが若干異なり、推定値ベースで算出した除去率のほうが、わずかながら高率になる傾向が認められた。前述したように、特定の性状を有する粒子の計数値の信頼性は確定試験（微分干渉像の観察）よりも推定試験（蛍光抗体粒子）のほうが高いので、推定濃度から得られた除去率の値が、より真値に近いと考えることができる。したがって、表3から、クリプトスポリジウムの平均除去率は 2.81  $\log_{10}$ 、ジアルジアで 3.05  $\log_{10}$  と判断してよいと言えよう。この結果は、北米の浄水場で得られた結果（クリプトスポリジウムで約 2.4 $\log_{10}$ 、ジアルジアで約 2.6 $\log_{10}$  (LeChevallier et al., 1991) よりもやや高い値となっており、当該浄水場で浄水処理が適正に管理されていることを示すものと考えられる。

図6は、クリプトスポリジウムとジアルジアのいずれでも除去率の定量値が得られた調査日の除去率データをプロットしたものである。相関関係は明瞭ではないが、クリプトスポリジウムの除去率が高いときはジアルジアの除去も高い傾向が認められ、クリプトスポリジウムよりも高い除去率を示すものが 12 組のデータ中 8 組（75%）にも及び、そのうち除去率の差が 1  $\log_{10}$  を超えるものが 5 組もあった。一方、逆のケース（ジアルジアよりもクリプトスポリジウムの除去率が高い）は 4 組に過ぎず、しかもその差は大きいものでもわずか 0.3  $\log_{10}$  しかなかった。このことは、急

速砂ろ過システムにおけるジアルジアとクリプトスポリジウムの除去に明瞭な相関はないものの、ほとんど常に、クリプトスポリジウムよりもジアルジアが除去されやすいことを示している。

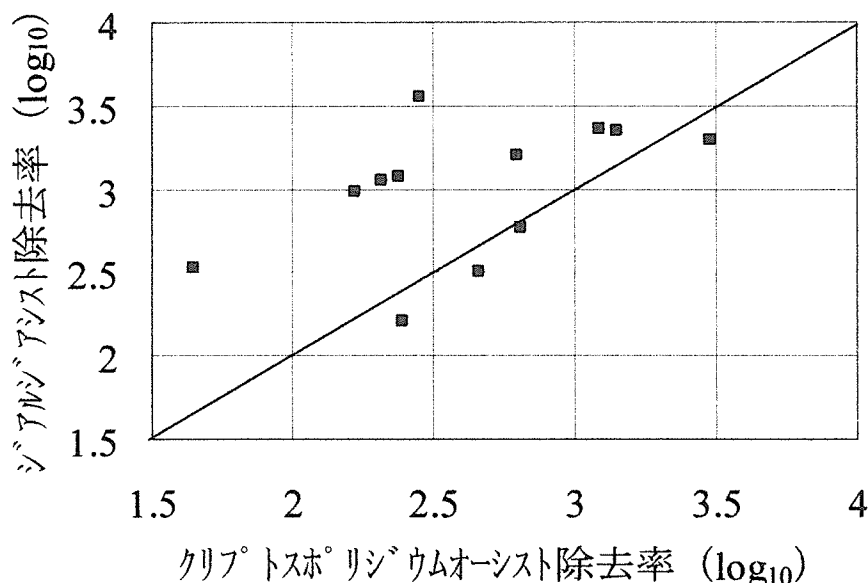


図6 浄水処理による推定クリプトスポリジウムと推定ジアルジアの除去率の関係

2.1.1 で示したように、本浄水場原水では、ジアルジア濃度よりもクリプトスポリジウム濃度のほうが高かった。ジアルジアの除去率は、ほとんど常にクリプトスポリジウムの除去率を上回っていた。ろ過水のジアルジア濃度はクリプトスポリジウムの1/10か、それ以下であった。そのうえ、ジアルジアにはクリプトスポリジウムほどの高い塩素抵抗性はない。したがって、本浄水場では、現状の原水汚染の性状やレベルが大きく変化しないかぎり、クリプトスポリジウムを主要ターゲットにして浄水工程の適正な管理を実施すれば、ジアルジア問題も同時に解決されるといえよう。

なお、水温が低いと、凝集沈殿砂ろ過プロセスの濁質除去機能が低下してろ過水中の原虫濃度が高くなることが示唆されている (Hashimoto *et al.*, 2001)。冬季など、低水温時には浄水施設の慎重な運転管理が必要である。

#### 4 原虫と水質項目間の関係

##### 4.1 原虫濃度と濁度および粒子数

クリプトスポリジウム濃度と濁度および粒子数の関係を調べたが、クリプトスポリジウム濃度には、原水、ろ過水ともに、濁度および各粒径別粒子数のいずれとも相関は認められなかった。ジアルジア濃度でも、原水では濁度および各粒径別粒子数のいずれとも相関は認められず、ろ過水ではデータ数不足のために評価できなかった。

##### 4.2 原虫濃度と大腸菌および大腸菌群

暫定対策指針では、水道原水の原虫汚染のおそれの判断を、糞便汚染指標である大腸菌および嫌気性芽胞菌の検査によって判断することとしている。今回調査対象とした水系では、嫌気性芽胞が有効性であることが既に報告されているが (橋本ほか, 1999)、大腸菌あるいは大腸菌群の有効性については必ずしも十分な検証がなされていない。そこで、原水における原虫濃度と大腸菌数およ