

土木研究所資料

下水処理場等におけるクリプトスポリジウム の検出方法の検討及び実態調査

平成10年1月

建設省土木研究所
下水道部三次処理研究室

Copyright © (1998) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Director General of P.W.R.I.

この報告書は、土木研究所長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、土木研究所長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

注：本資料（土木研究所資料 第3533号）中に掲載した顕微鏡写真は、写真印画紙をオフセット印刷している。このため一部の写真において、蛍光像の輪郭・色合い等が忠実に再現されにくくなっている。また、微分干渉像については輪郭等が不明瞭となっている場合がある。

下水処理場等におけるクリプトスポリジウム の検出方法の検討及び実態調査

三次処理研究室 研究員 諏訪 守
室 長 鈴木 穰

要旨：

現在、原虫等による水系感染症がクローズアップされてきているようであり、我が国でも神奈川県平塚市及び埼玉県越生町において病原性原虫類の一種であるクリプトスポリジウムによる集団感染事例が発生し、感染者は数千人にも及んだ。このため、本報告においては、下水処理水（再生水）を親水・修景利用している全国の下水処理場を対象に流入下水及び下水処理水（再生水）についてクリプトスポリジウムの実態調査を実施し、我が国におけるオーシストの存在状況の把握を行った。さらには、関東地方の主要河川におけるクリプトスポリジウムの実態調査を併せて実施した。

キーワード： 原虫、クリプトスポリジウム、下水、下水処理水、河川水



下水処理場等におけるクリプトスポリジウムの検出方法の検討及び実態調査

目 次

第1章	はじめに	1
第2章	クリプトスポリジウムとは	2
第3章	クリプトスポリジウムによる集団感染事例	5
第4章	下水中等からオーシストを検出するための検討	7
4.1	検討目的	7
4.2	検討方法及び結果	7
4.3	まとめ	18
第5章	下水処理場におけるクリプトスポリジウムの実態調査	20
5.1	調査目的	20
5.2	調査方法	20
5.3	調査結果	20
5.4	まとめ	23
第6章	関東地方の主要河川におけるクリプトスポリジウムの実態調査	26
6.1	調査目的	26
6.2	調査方法	26
6.3	調査結果及びまとめ	26
第7章	その他の調査結果及び検討	34
7.1	クリプトスポリジウムのオーシストの大きさについて	34
7.2	免疫磁気ビーズ法による下水、河川水中からのオーシストの回収について	35
第8章	結 論	39
	参考文献	41
	謝 辞	42

資料編（発表論文、測定方法、クリプトスポリジウムに関する新聞記事）

第1章 はじめに

近年、生活様式の高度化に伴い、水需要の増大や異常気象による渇水問題がクローズアップされてきている。このような背景から下水処理水の水資源としての有効利用が注目されており、我が国で発生する下水処理水の約1%にあたる1億 m^3 （平成5年度）が工業用水、親水・修景用水等として現在再利用されている¹⁾。下水処理水は都市域における安定した供給源でもあるため、これからの需要の増大が予想される。また、下水道普及の進展に伴い、上水取水源の上流に下水処理場が建設される事例が増加しており、流域内において下水処理水が再び上水として利用されるようになってきている。

現在、下水処理水を環境水中に排出する際には、消毒などによって大腸菌群数を3,000個/ m l 以下に削減することが定められている。しかし、現行指標が定められた頃と比較すると病原微生物に関する知見が一段と拡大した現在、下水処理水の直接再利用が行われるようになり、また下水処理水が再び上水として利用されるようになった状況なども考慮して、その妥当性について他の病原微生物等を含めて改めて検討すべきであると考えられる。

水中の病原微生物の検出技術の向上に伴って、アメリカなどでの水系感染症の発病要因は1960年代には皆無であったウイルス、原虫等が近年大きなウエイトを占めるようになってきている²⁾。特に腸管系ウイルスや、原虫等のシストやオーシストによる水系感染症が近年クローズアップされてきているようであり、神奈川県平塚市及び埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウムによる集団感染などは記憶に新しい^{3) 4)}。平成8年6月から7月にかけて埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウムによる集団感染事例は、越生町の浄水場にクリプトスポリジウムが混入、浄水過程で除去しきれなかったクリプトスポリジウムを含む水道水が各家庭に給水され、8,000人以上にもおよぶ感染者が発生した。

以上のことから本報告においては、下水処理水（再生水）を親水・修景利用している全国の下水処理場を対象に流入下水及び下水処理水（再生水）についてクリプトスポリジウムの実態調査を実施し、我が国におけるオーシストの存在状況の把握を行った。さらには、関東地方の主要河川におけるクリプトスポリジウムの実態調査を併せて実施した。

第2章 クリプトスポリジウムとは

原虫 (*Cryptosporidium*) は孢子虫綱のアイメリア亜目に属する原生動物の一種で近縁性のものに戦争イソスポーラ、トキソプラズマがある。クリプトスポリジウムは1907年ネズミから始めて検出されている。その後1971年には、ウシのクリプトスポリジウム症が発見されクリプトスポリジウムが動物の病原体であることが確認されている。さらに、1976年には免疫不全症候群の人間への感染が確認されて以来、1983年には58例の感染が報告されており、そのほとんどがエイズ患者であったとされる。免疫力の低いエイズ患者等への感染は重篤な症例となる。クリプトスポリジウムという原虫に感染・発病すると、クリプトスポリジウム症になり激しい下痢と腹痛を起こす。前述のとおり免疫力の低いAIDS患者等の日和見感染症として注目されているが、健康な人が感染しても1~2週間に及ぶ激しい下痢を起こし、入院加療を要する場合もあるとされる。通常、人に感染するのは *C.parvum* という種であるが、人以外にもウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ネズミ等にも寄生する。*C.baileyi* はニワトリに寄生性のものとされるがAIDS患者にも感染した例、また、ウシやネズミから分離された *C.muris* などはAIDS患者等の免疫力の低い人には感染する可能性があるとされている。現在、魚、両生類、鳥類、ほ乳類など179種類の異なった宿主が報告されており、自然界に広く分布している。

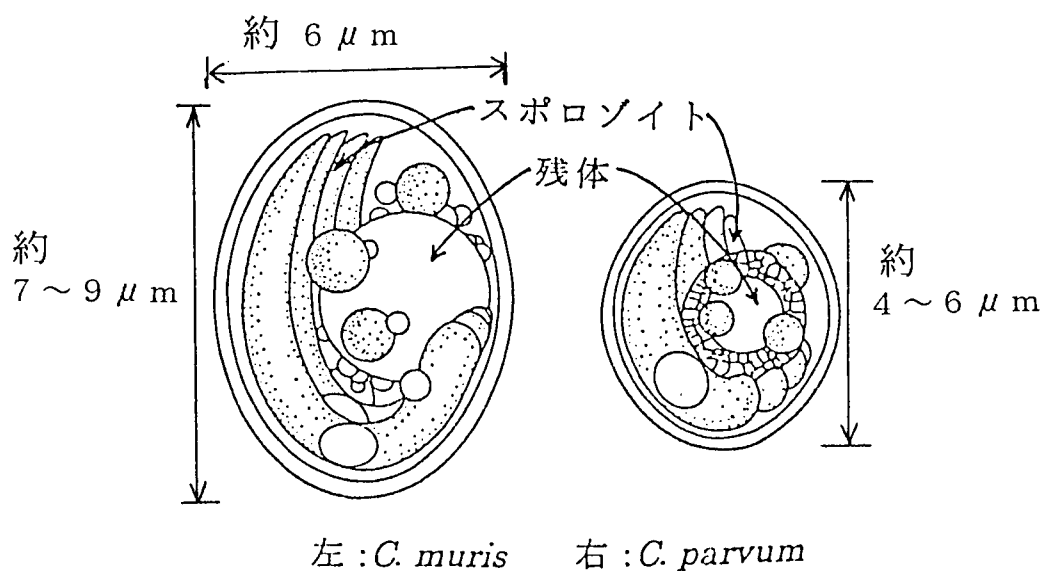
尚、これらクリプトスポリジウムのオーシストの大きさは *C.parvum* で直径約4.5~5.5 μm の類円形、*C.baileyi* で平均直径約4.5~6.2 μm 、*C.muris* は約7~9 $\times$ 6 μm の楕円形であるとされる。クリプトスポリジウムのオーシストの模式図を図-1に示す。4個のバナナ状のスποロゾイト、残体等より構成されており、これら内部構造物がオーシスト壁により保護されている。写真-1は、当研究室において、平成8年6月26日に採水を行った越生町浄水場取水口付近の河川水からクリプトスポリジウムのオーシストを検出したものである。

以下に、検出方法ごとのオーシストの写真を示す。写真-2は蔗糖浮遊法により検鏡したオーシストである。蔗糖浮遊法によりオーシストを集積したものは白く輝き、オーシスト中に顆粒の存在が見られる。写真-3は、蔗糖浮遊法によって集積したオーシストを抗酸染色したものである。抗酸染色したものはオーシスト壁が染まるのではなく内部のスποロゾイトや残体が明るい赤色からピンク色に染まる。細菌や酵母などは青く染色されてしまうとされる。写真-4は、オーシストを間接蛍光抗体法により蛍光染色させたものである。青リンゴ色の蛍光を発するのが特徴である。写真-5は、間接蛍光抗体法により検鏡したオーシストを微分干渉装置により内部構造を観察したものである。オーシスト内部にはスποロゾイトや残体と推定される内部構造物の存在が確認される。また、これら内部構造物を被っているオーシスト壁が明確に写っている。

オーシストは、オーシスト壁に保護されることにより、消毒などに対して強い耐性を示すとされる。例えば表-1には、遊離塩素に対する抵抗性を比較するため、大腸菌の抵抗性を1とした場合の各種病原体の抵抗性を示した。ポリオウイルスは45、ジアルジアは2,350、クリプトスポリジウムは240,000であり、クリプトスポリジウムは通常の塩素消毒においては不活化されにくい。また、クリプトスポリジウムの大きさは約5 μm と小さく、通常の浄水処理過程では完全に除去されないことから、浄水

原水がクリプトスポリジウムに汚染された場合には大規模な集団感染を引き起こす可能性が大となる。さらには、現段階においてクリプトスポリジウム症に対する有効な薬剤がなく、確立された治療法もない大きな問題もあるとされる。

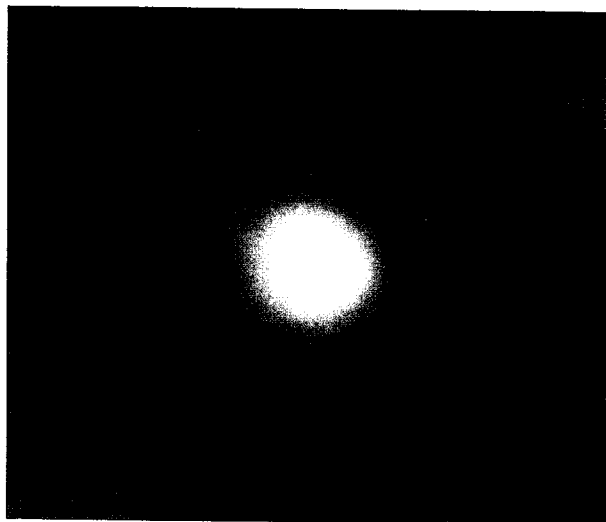
写真－６は、内部構造物の存在が確認されないオーシストであり、オーシスト壁のみ写っており抜け殻状態となっている。このようなオーシストは内部構造物がないことから生育活性（感染能力）を有しないと考えられる^{5) 6) 7) 8)}。



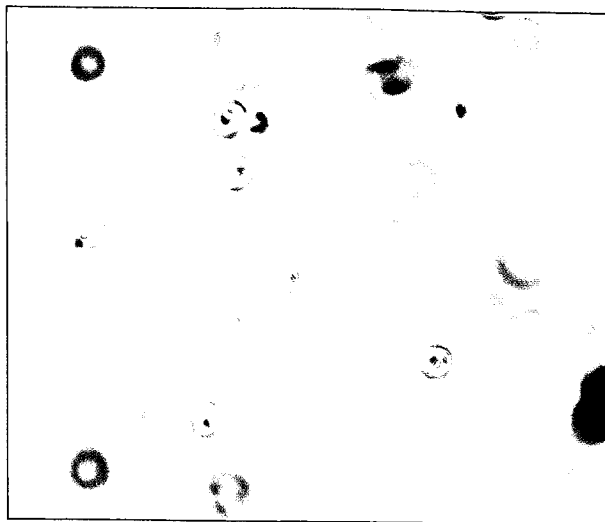
図－１ オーシストの模式図

表－１ 遊離塩素に対する抵抗性

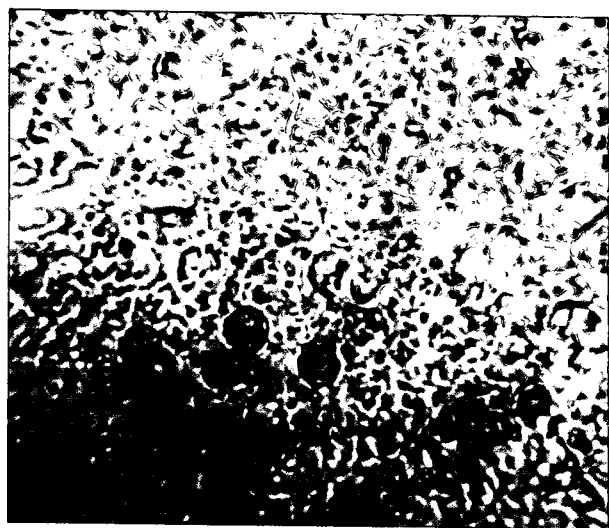
微生物	相対的な抵抗性
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Polio virus 1</i>	45
<i>Giardia lamblia</i>	2, 350
<i>Cryptosporidium parvum</i>	240, 000



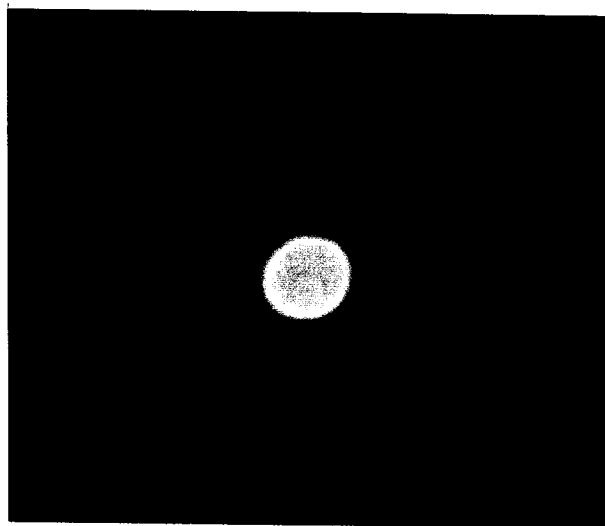
写真一 1



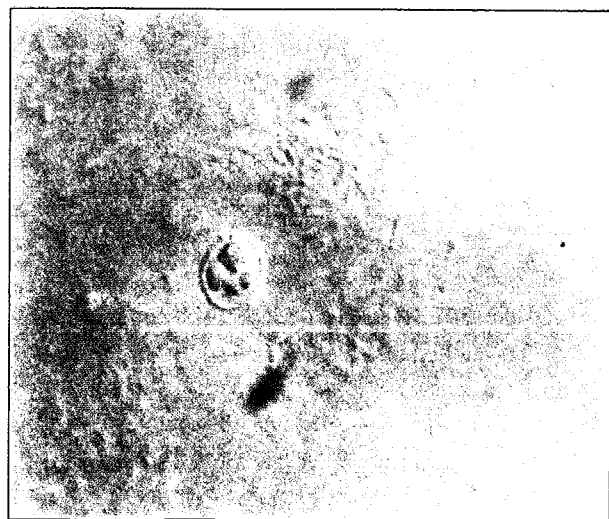
写真一 2



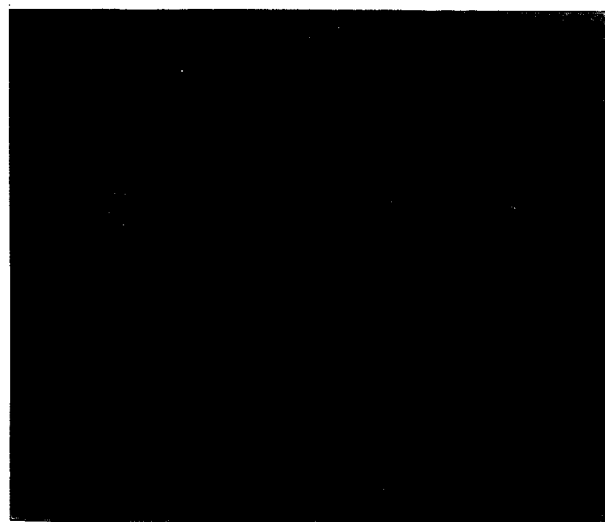
写真一 3



写真一 4



写真一 5



写真一 6

第3章 クリプトスポリジウムによる集団感染事例

米国での1991年～1994年における飲料水による集団感染事例を表－2に、リクリエーションでの不慮の水摂取による集団感染事例を表－3に示す^{8) 9)}。さらに、日本における集団感染事例を表－4に示す。1993年3月に発生したウイスコンシン州ミルウオーキーでの集団感染では、感染者数が40万人以上にも及びエイズ患者にも感染したことから、約400人が死亡したとされる。このように、水道水源が何らかの理由によりクリプトスポリジウムに汚染されることによって大規模な集団感染事例が生じることになる。同様に、我が国においても神奈川県や埼玉県で大規模な集団感染事例が生じている。

表－2 米国での飲料水による集団感染事例

年 月	州	感染者数 (人)	水 源	原 因
91/08	ペンシルベニア	551	井戸	処理不十分
92/02	オレゴン	3,000	湧水	処理不十分
92/05	オレゴン		河川	処理不十分
93/03	ウイスコンシン	403,000	湖	処理不十分
93/04	ワシントン	7	井戸	表流水混入
93/08	ミネソタ	27	湖	不明
93/12	ネヴァダ	103	湖	不明
94/08	ワシントン	134	井戸	灌漑用水混入

表－3 リクリエーションでの不慮の水摂取による集団感染事例

年 月	州	感染者数 (人)	感染源
92/06	オレゴン	500	プール
92/08	アイダホ	26	ウォータースライド
93/04	ウイスコンシン	51	プール
93/08	ウイスコンシン	5	プール
93/08	ウイスコンシン	54	プール
93/08	ウイスコンシン	64	プール
94/07	ミズーリ	101	プール
94/07	ニュウジャージー	418	公園の池

表－４ 日本での飲料水による集団感染事例

年 月	都道府県	感染者数（人）	原 因
94/08	神奈川県平塚市	461	水道受水槽の汚染
96/06	埼玉県越生町	約8,800	水道水源の汚染

特に、平成８年６月に発生した埼玉県越生町でのクリプトスポリジウムの集団感染事例では、同町の水道水源である越辺川伏流水がクリプトスポリジウムに汚染されたことによって、同町人口の半数以上である8,000人以上が感染した。このため、越生町では汚染された町営水道から県営水道（別の水源）に切り替える措置を講じ、感染拡大の防止を計った。７月下旬には、集団感染も終息したとされるが、二次感染を防止する目的から、夏季における同町内の小中学校のプール授業を全て取りやめた。

尚、越辺川伏流水の汚染源については不明確であるものの、上流に位置する農村集落排水処理施設の処理水が上水源水として取水されることにより、オーシストが循環し、被害が拡大したとされている¹⁰⁾。

一方、クリプトスポリジウム等による集団感染が多く発生している米国での生下水等のオーシスト数の調査例を表－５に示す¹¹⁾。生下水中の平均濃度は、4.1～1732個/ℓ、下水処理水中では、4～489個/ℓ、下水処理水放流先の表流水で0.12～18個/ℓであった。また、標準活性汚泥法によるクリプトスポリジウムの除去に関して、滞留時間６時間の活性汚泥実験装置において、流入下水にオーシストを添加してオーシストの除去を検討した例がある。その結果、最初沈殿池で83.6%、最終沈殿池で90.7%、全体で98.6%の除去率が得られた¹²⁾。このようなことから、下水処理水の再利用において、ウイルスと原虫に関して、米国のアリゾナ州では、その基準値を設定している。不特定の人が暴露される非制限的(*unrestricted*)な利用については、40ℓ中に１腸管系ウイルス、*Giardia* や *Cryptosporidium* については40ℓ中に１シストあるいは１オーシスト以下としている¹³⁾。

表－５ 米国でのオーシスト数の調査例

試 料	濃度（個/ℓ）
生 下 水	4.1 ～1,732
二次処理水	4 ～ 489
表 流 水	0.12～ 18

第4章 下水中等からオーシストを検出するための検討

4.1 検討目的

I C R (*Information Collection Rule*) で提案されているオーシスト集積法¹⁴⁾では、浄水原水及び浄水を対象に1 μ mのポリプロピレン製カートリッジフィルターで140~1,400 ℓ をろ過し、そのフィルターを溶出液で洗浄、遠心分離を行い沈査を回収、その沈査と原虫を分離し検出を行うものである。この方法では回収率が5~20%程度と低いと言われている⁸⁾。一方、上記方法によって流入下水や下水処理水及び汚濁河川等を対象とした場合、1 μ mのフィルターではすぐ目詰まりを起こし適用しにくいと考えられる。このため当初、オーシストを集積させる方法としては、遠心分離を行いその沈査を回収しオーシストの検出を試みた。この方法によってもオーシストを検出できたが、特に清浄な二次処理水や河川水等の回収率が低いことから新たな集積法を検討しなければならないと考えられた。

このため、回収率の向上を目的として、J.E.Aldom ら¹⁵⁾の方法を参考に下水中等からのオーシストの検出を試みたものである。

4.2 検討方法及び結果

本検討では、下水及び下水処理水等を対象とするとともに、なるべく多くのサンプルを濃縮する目的からフィルターの公称孔径を3 μ mとした。濃縮方法は、平膜メンブランフィルター(セルロース混合エステル、公称孔径3 μ m)で試料のろ過を行いオーシストを捕捉させ、フィルターをアセトンに浸し良く溶かすとともにオーシストをアセトンで固定した。アセトン、エタノール、溶出液で各々遠心処理(1,050 G・10分間)を行った後、その集積液をフィルターに通し間接蛍光処理した後、落射専用蛍光顕微鏡にてオーシストを観察・定量した。間接蛍光処理には、HYDRO-FLUOR-Comboキット, ENSYS INC.を用いた。また、平膜メンブランフィルター(公称孔径3 μ m)のオーシスト捕捉性能を確認するために、オーシストを添加した放流水(A下水処理場の放流水にクリプトスポリジウム株を添加したもの、オーシスト濃度約5,600個/ ℓ) 1 ℓ をろ過、そのろ液についてオーシストの存在を調査した。その結果、オーシストの存在が確認されなかったことから、公称孔径が3 μ mのフィルターによってもオーシストは充分捕捉されているものと考えられた。

上記濃縮法による、A下水処理場の放流水を用いた回収率試験結果では、平均の回収率が約34%であった。しかし、精製水にクリプトスポリジウム株を添加した予備実験においては、上記濃縮法によって約86%の回収率を得た。実際の放流水等を用いたオーシスト濃縮法では、アセトンでフィルターを溶解した時SS分の残留が認められた。約86%の回収率を得た予備実験においては全て溶解しており、SS分の残留が認められなかった。回収率が低下(約86%→約34%)する原因の1つにSS分にオーシストが取り込まれている可能性や、フィルター(蛍光処理用)に通す際SS等に隠れていることが予想される。また、サンプル中にSS分が存在していると、オーシストを濃縮するためのサンプル量が減少するとともに、アセトンで溶解した時に集積液中にSS分が残留することによりフィルター(蛍光処理用)に通すオーシスト集積液が少量となるため、検出限界値が低くなる問題も生じる。

1) SS分の影響を取り除く検討

このため、サンプルのSS分の影響を取り除くため、以下の3方法について比較検討を行った。

(1)サンプルを22 μ mのふるいに通し夾雑物を取り除き、3 μ mのメンブランフィルターでオーシストを捕捉・定量。(2)サンプルを遠心分離し上澄液については3 μ mのメンブランフィルターでオーシストを捕捉・定量、回収した沈査についてはパーコール蔗糖浮遊液によって夾雑物とオーシストを分離・定量。(3)比較対照として直接サンプルを3 μ mのメンブランフィルターでろ過しオーシストを捕捉・定量。サンプルとしては、A下水処理場の二次処理水にクリプトスポリジウム株を添加したものを使用した。

1-1) 検討結果

検討結果を図-2に示す。サンプルを22 μ mのふるい処理又は遠心分離(上澄み+沈査)したものについては、比較対照よりも回収率が向上している。これは、SS分の影響(SSへの取り込みあるいは蛍光処理時の妨害等)が低減していることによるものと考えられた。尚、遠心分離を行うためには二次処理水等を対象とした場合、大容量の遠心分離装置が必要になると考えられる。さらに、回収した沈査及び上澄液からのオーシスト集積、蛍光処理し検鏡しなければならないため、オーシストを検出するため集積操作や検鏡時間が増えることになる。

2) 22 μ mのふるい処理の影響

さらに、22 μ mのふるい処理がクリプトスポリジウムの検出に及ぼす影響を検討するために、A下水処理場の流入下水の沈査及び放流水を利用し、直接3 μ mのメンブランフィルターでオーシストを捕捉・定量を行ったものと、前処理として22 μ mのふるい処理を行ったサンプルについて検出量の比較を行った。比較検討方法は、あらかじめ作成しておいたA下水処理場の流入下水の沈査(ホルマリン固定)0.5mlを下水高度処理水500mlに添加したものと放流水を対象とし、ふるい処理の有無による検出量の差異を把握する方式とした。尚、いずれのサンプルとも、クリプトスポリジウムは添加していない。

2-1) 検討結果

採水日の異なる2種類の流入下水の沈査及び放流水について検討を行った。検討結果を図-3に示す。全てのサンプルとも22 μ mのふるい処理を行うことによって、明らかに検出量が増加している。これは、22 μ m以上の夾雑物を除去することによって蛍光処理を行う際、SS分の影響が低減したものと考えられる。また、ふるい処理を行うことによって、蛍光処理する際にフィルターに通水できるオーシストの集積液量を増加させられる。

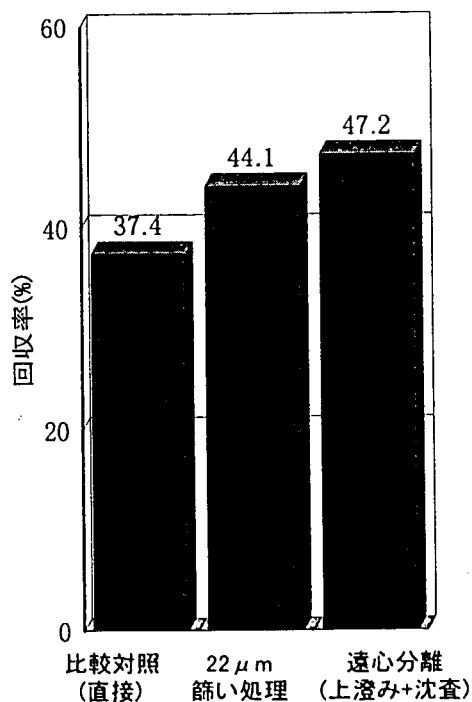


図-2 オーシスト検出のための前処理方法の検討

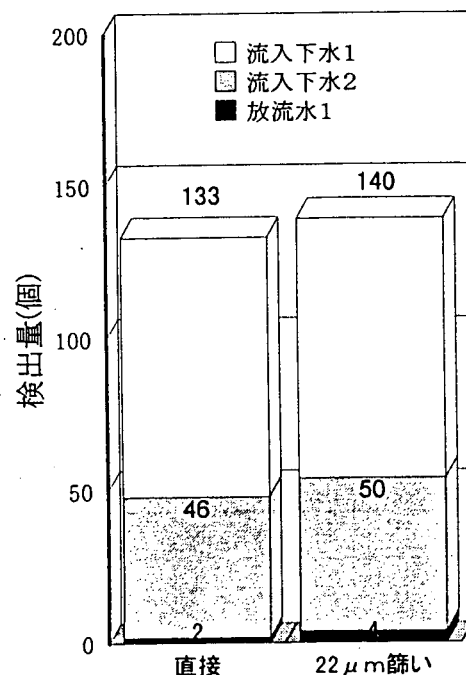


図-3 22 μmの篩い処理がオーシスト検出量に及ぼす影響

3) 密度勾配遠心処理による懸濁物（フロック）とオーシストの分離

オーシスト検出のため下水二次処理水等を22 μmのふるいに通し、メンブランフィルターでろ過、アセトンに浸し良く溶かすとともにオーシストを固定、アセトン、エタノール、溶出液各々で遠心処理を行った後、その集積液をフィルターに通し蛍光処理を行うが、その集積液中に懸濁物の生成が認められる場合がある。生成した懸濁物とオーシストを分離することができれば蛍光処理できる集積液量を増加できることから、検出限界値を高められると考えられる。このため、密度勾配遠心処理によって懸濁物とオーシストを分離を試みた。検討方法は、A下水処理場放流水にクリプトスポリジウム株を添加、上記手法によりオーシスト集積液を作成する方法とした。その集積液中のオーシストを定量したものを比較対照とし、集積液中の懸濁物をパーコール蔗糖浮遊液を用い、密度勾配遠心処理により懸濁物とオーシストの分離を試み、その分離液中のオーシストを定量することによって回収率の比較を行った。

3-1) 検討結果

検討結果を図-4に示す。オーシスト集積液を直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量したものは、約66%と高い回収率が得られているが、生成した懸濁物を密度勾配遠心処理した分離液については、オーシストの回収率が約44%に低下している。この回収率の低下の原因としては、遠心処理操作

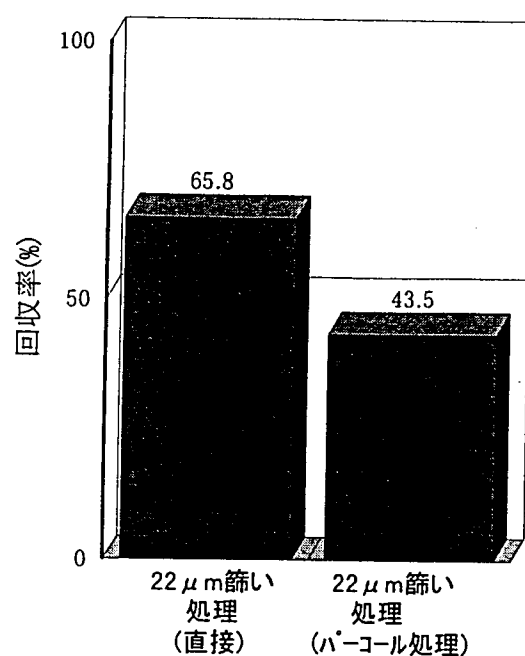


図-4 密度勾配遠心処理による生成フロックとオーシストの分離

が2回多くなることや、生成した懸濁物とともに遠心処理時に一部の懸濁物と一緒に沈降してしまうことによるものと考えられる。また、大部分の懸濁物は界面上に集積してしまうことから、オーシストと懸濁物の分離も良好に行えなかった。よって、オーシスト集積液を作成し懸濁物が生成されたとしても、密度勾配遠心処理による懸濁物とオーシストの分離は考慮せず、オーシスト集積液を直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量すれば高い回収率が得られるものと考えられた。

4) フィルターへのSS負荷量が回収率に及ぼす影響

22 μm のふるいによって夾雑物の除去を行い、フィルター上にオーシストを捕捉させアセトンによりフィルターを溶解、オーシストを固定させアセトン、エタノール、溶出液で各々遠心分離を行いオーシスト集積液を作成するが、上記に述べたようにその際、懸濁物（フロック）が生成される場合がある。22 μm 以下のSS負荷量などによって、その生成懸濁物量が左右されるとともに、懸濁物生成量の違いによってオーシストの回収率が変化するのではないかと推定される。このため、フィルターへのSS負荷量を変化させ懸濁物生成量の違いがオーシストの回収率に及ぼす影響を検討した。

検討方法は、A下水処理場の放流水及びBプラントの二次処理水にクリプトスポリジウム株を添加した後、22 μm のふるいによって夾雑物の除去を行い、フィルターへのSS負荷量を変化させ回収率の把握を行う方法とした。SS負荷量については、22 μm 以下のSS負荷量として約0~1mgの範囲とし、この時のフィルターへの通水量としては1~6ℓであった。また、フィルターへの通水量の多少に

かわらず、オーシストの添加個数はどのケースともほぼ同一とした。

4-1) 検討結果

検討結果を図-5に示す。尚、今回の検討において生成された懸濁物（フロック）の量はSS負荷量が約0mgの時ではほぼ0、0.3~1mgの時で約0.1~0.3mℓであった。SS負荷量が約0mgの場合には、オーシストの回収率は約67%となっている。SS負荷量が約0.3~1.0mgに変化した場合においてもその回収率は約60~76%となっており、生成される懸濁物が多くなってもオーシスト回収率に及ぼす大きな影響は現れていない。以上の結果から、生成された懸濁物へのオーシストの取り込み量は少ないものと考えられた。しかし、集積液中の生成される懸濁物量が多くなることにより、蛍光処理を行う際のフィルターへの捕捉水量が減少することから、検出限界値が低くなる可能性がある。

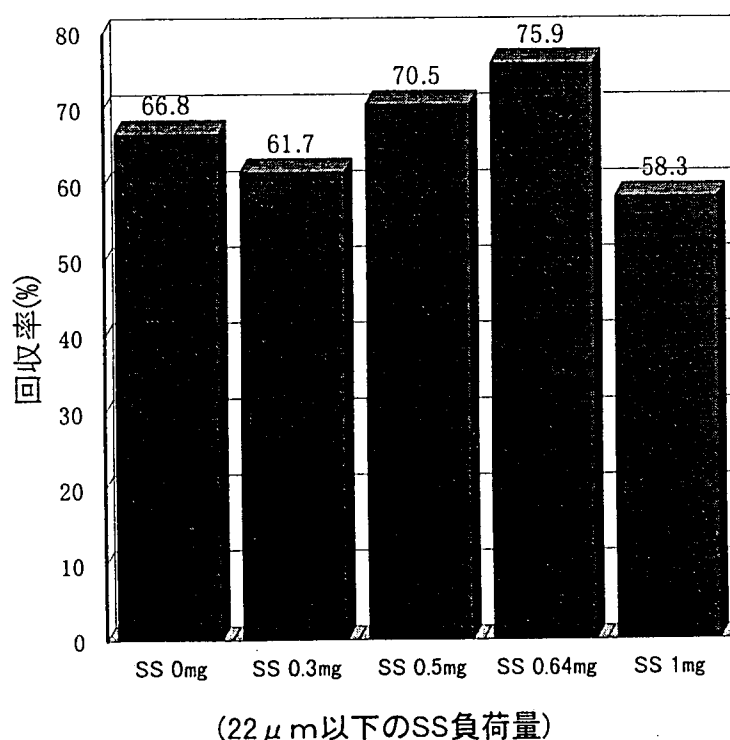


図-5 フィルターへのSS負荷量がオーシスト回収率に及ぼす影響

5) 検出限界値向上のための検討

上記4)の下水処理水を用いた検討結果から、オーシスト集積液中の懸濁物（フロック）生成量が多くなっても回収率に及ぼす影響は少ないものと考えられた。これは、生成された懸濁物へのオーシストの取り込み量が少量であるものと推定される。しかし、集積液中の生成される懸濁物量が多くな

ることにより、蛍光処理を行う際のフィルターへの通水量が減少することから、検出限界値が低くなる可能性が伺えた。このため、本検討においては、生成懸濁物とオーシストを分離させることによって蛍光処理を行う際のフィルターへの通水量を増加させることを目的に、オーシスト集積液を22～210 μm のふるいによって処理し回収率に及ぼす影響と通水量を把握した。ひいては検出限界値の向上に資するものである。

検討方法は、試料を22 μm のふるいで処理を行った後メンブランフィルターでろ過、オーシストを補足させフィルターをアセトンで溶解するとともにオーシストを固定、アセトン、エタノール、溶出液で各々遠心処理を行い集積液を作成した。集積液中のオーシストを測定したものを比較対照として、集積液を各々のふるいによって処理したものについてオーシスト数を測定し回収率及び通水量の把握を行った。試料には、B下水処理場の流入下水及び下水処理水（砂ろ過水）にクリプトスポリジウム株を添加したものをを用いた。

5-1) 検討結果

下水処理水を用いた検討結果を図-6に示す。オーシスト集積液を直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量したものは約52%の回収率が得られているが、集積液を22 μm のふるいで処理したものについては、回収率が約46%に低下している。しかし、蛍光処理を行う際にフィルターに通水できる集積液量としては、22 μm のふるいで処理をすることによって約2倍以上増加できる。一方、ふるいの粒径が44 μm 以上となると通水量はあまり増加させられない。

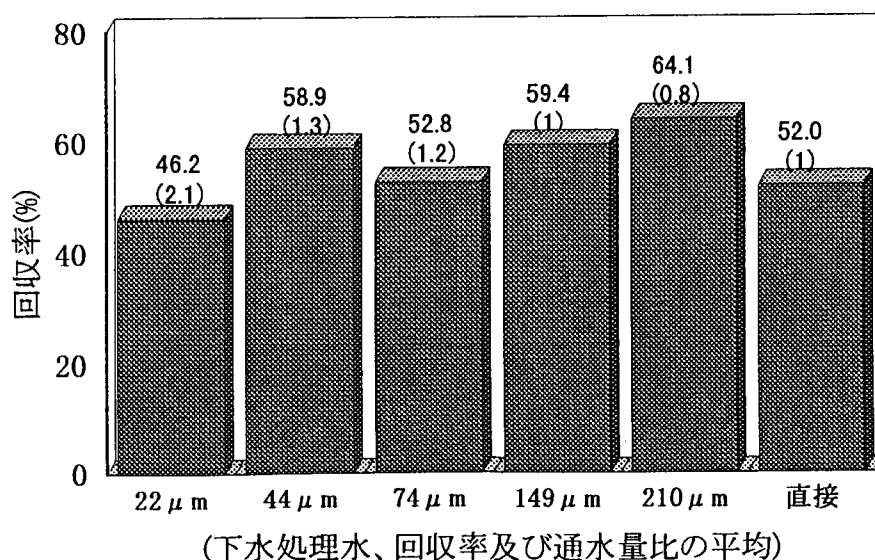


図-6 ふるいの粒径が回収率に及ぼす影響

ここで、下水処理水中のオーシストを1個/ℓと仮定し、蛍光染色に用いるフィルター枚数を同一として、フィルターへの通水量と回収率の関係から、ふるい処理の実施有無によるオーシストの検出効率を下記に示した式により比較し、比較結果を図-7に示す。

$$\text{検出量(個/ℓ)} = 1 \text{ 個/ℓ} \times (K/S) \times R$$

K : 蛍光処理する検水量(mℓ)

S : オーシスト集積液(5mℓ)

R : 回収率

集積液を直接蛍光処理した場合、K=1.0、S=5、R=0.52を代入すると、

検出量=0.10個/ℓとなる。

一方、集積液をふるい処理した場合、K=2.1、S=5、R=0.46を代入すると、

検出量=0.19個/ℓとなる。

よって、22μmのふるいで処理をすることにより、検出量は約2倍向上するとともに検出限界値も向上する。

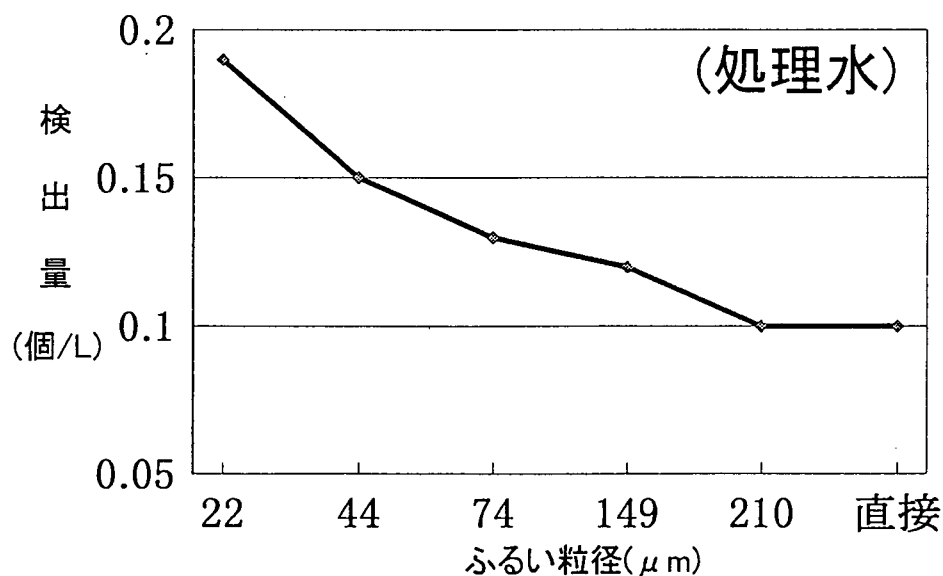
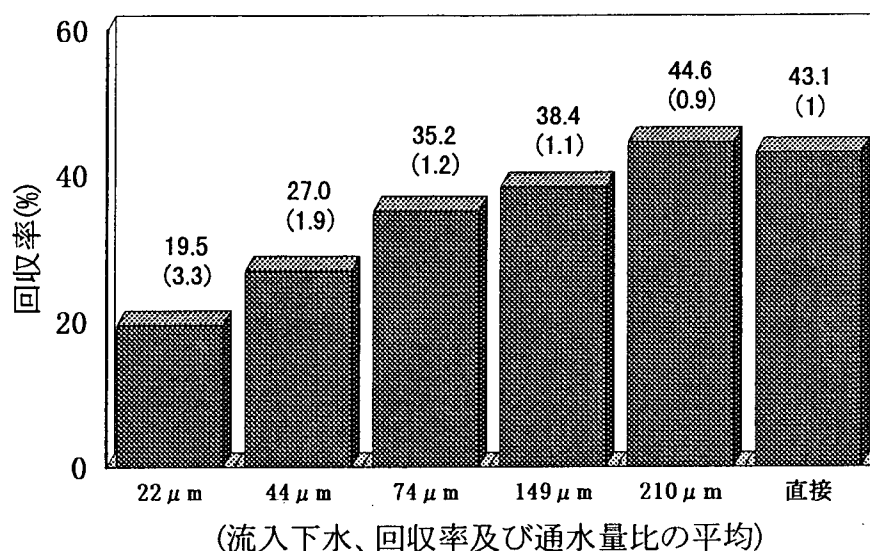


図-7 オーシストの検出効率

次に、流入下水を用いた検討結果を図－8に示す。オーシスト集積液を直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量したものは約43%の回収率が得られているが、集積液を22 μ mのふるいで処理したものについては、回収率が約20%に低下している。しかし、蛍光処理を行う際にフィルターに通水できる集積液量としては、22 μ mのふるいで処理をすることによって約3倍以上増加できる。一方、ふるいの粒径が74 μ m以上となると通水量はあまり増加させられない。



図－8 ふるいの粒径が回収率に及ぼす影響

ここで、流入下水中のオーシストを10個/ℓと仮定し、蛍光染色に用いるフィルター枚数を同一として、フィルターへの通水量と回収率の関係から、ふるい処理の実施有無によるオーシストの検出効率を下記に示した式により比較し、比較結果を図－9に示す。

$$\text{検出量(個/ℓ)} = 10\text{個/ℓ} \times (K/S) \times R$$

K : 蛍光処理する検水量(mℓ)

S : オーシスト集積液(5mℓ)

R : 回収率

集積液を直接蛍光処理した場合、K=1.0、S=5、R=0.43を代入すると、

検出量=0.86個/ℓとなる。

一方、集積液をふるい処理した場合、K=3.3、S=5、R=0.20を代入すると、

検出量=1.32個/ℓとなる。よって、22 μ mのふるいで処理をすることにより、検出量は約1.5倍向上するとともに検出限界値も向上する。また、ふるい処理を行うことにより蛍光染色用フィルターへの懸濁物の影響が少なくなり、オーシストを検出するための検鏡時間を大幅に短縮できる。

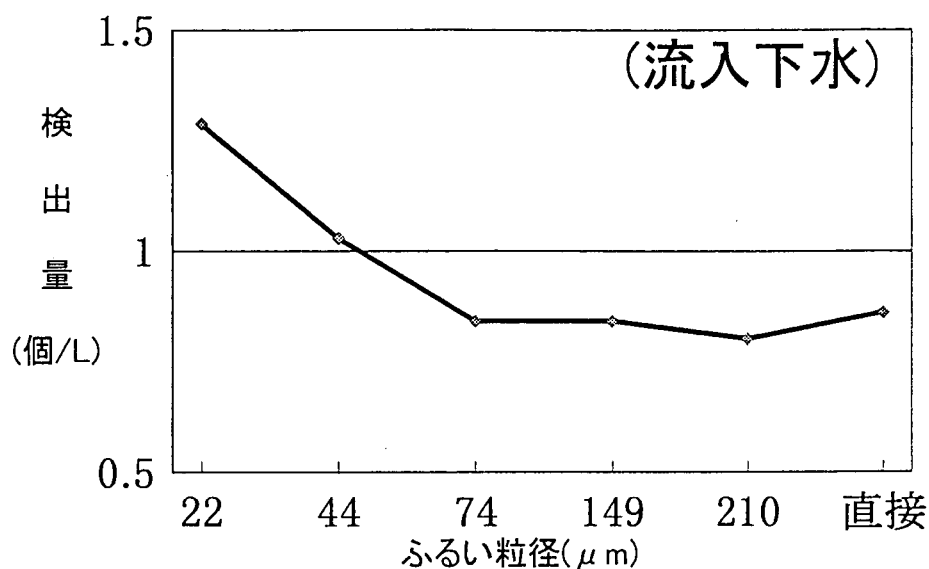


図-9 オーシストの検出効率

6) オーシストの添加量が回収率に及ぼす影響

クリプトスポリジウムのオーシストを濃縮・定量する場合、かならずしも水中に存在しているオーシスト全量を捕捉しているとは限らないことが予想されるため回収率試験を実施している。しかし、オーシストの添加量の多少によって、回収率に及ぼす影響が不明なことから、オーシストの添加量を変化させた時の回収率に及ぼす影響を検討した。検討方法は、B下水処理場の流入下水150mℓ、高度処理水約4～10ℓにオーシストを約100個～約2,000個の範囲で添加し、回収率の把握を行った。この時の高度処理水中のオーシスト濃度は、約30～500個/ℓである。

6-1) 検討結果

検討結果を図-10、11に示す。尚、グラフ上に記してある横軸の数値は添加個数、カッコ内の数値は濃度を示している。オーシストの添加個数及び濃度の多少にかかわらず、オーシストの回収率は流入下水の場合約24～32%、処理水の場合約52～65%となっており、全てのケースでほぼ一定の回収率が得られている。よって、今回の検討においてオーシストの添加個数が約100個～2,000個の範囲であれば回収率に及ぼす影響は現れないと考えられた。

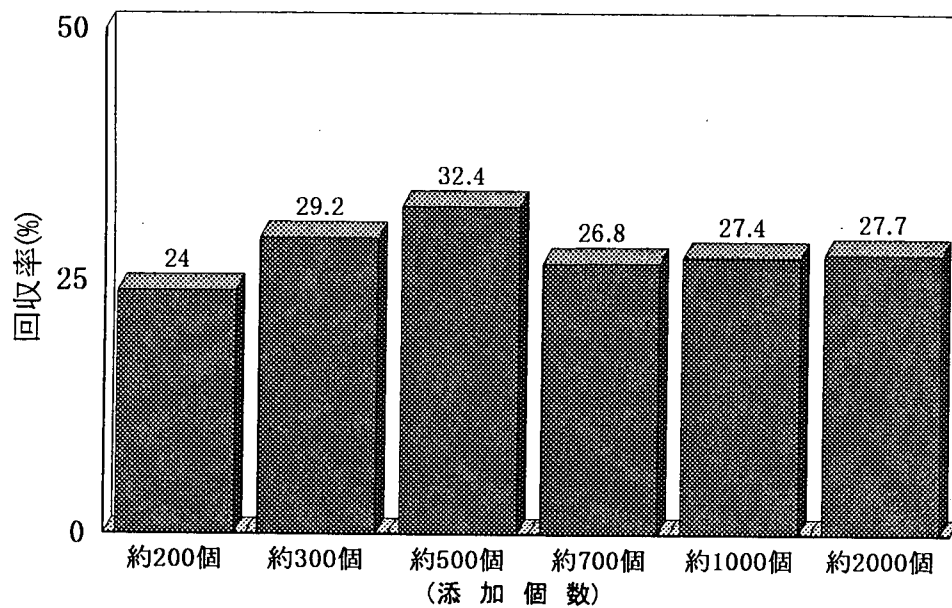


図-10 オーシストの添加個数が回収率に及ぼす影響
(流入下水)

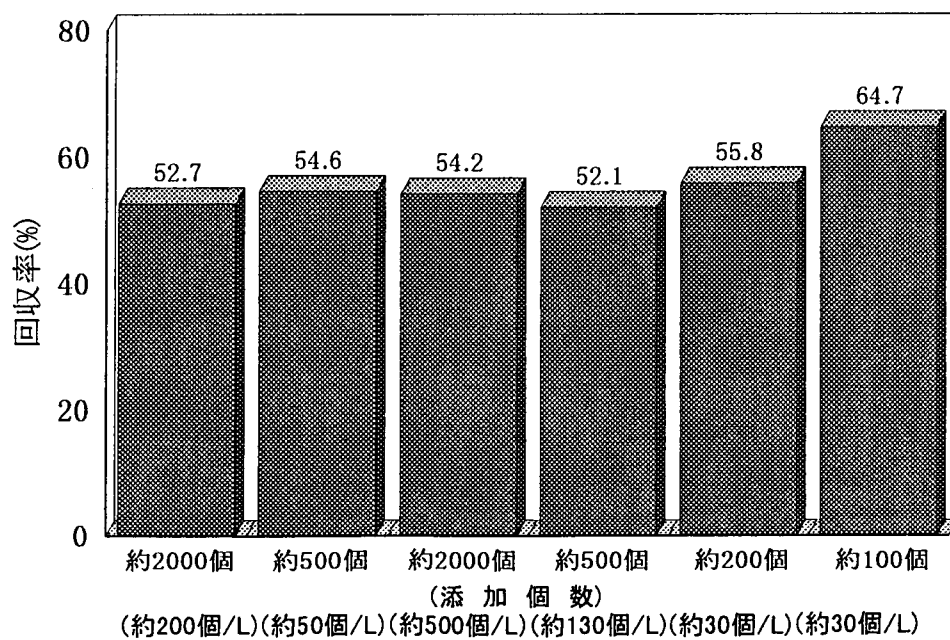


図-11 オーシストの添加個数が回収率に及ぼす影響
(処理水)

7) 1人の感染者が存在した場合の流入下水中のオーシスト濃度の推定

クリプトスポリジウムに感染し発症した人が排出するオーシストは、下痢のピーク時において1日に約10億個とされる⁹⁾。クリプトスポリジウムのオーシストが人等のふん便中に含まれて排出されることから、下水道を通じ下水処理場に流入してくることが予想される。このため、下水道処理区域内にクリプトスポリジウム感染者が1人存在した場合の流入下水中のオーシスト濃度の推定を行った。推定結果を表-6に示す。流入水量が5,000m³/日規模の下水処理場の場合には、流入下水中の平均オーシスト濃度は約200個/ℓ、100,000m³/日規模の場合には約10個/ℓとなる。比較的小規模な処理場の場合には、平均オーシスト濃度が高いことから検出しやすいと考えられるが、水量の多い大規模な処理場では希釈割合が大きいことから、平均オーシスト濃度が低くなるため、分析水量を多くしなければならないと考えられる。また、活性汚泥処理によるオーシスト除去効果を90%として仮定し処理水中のオーシスト濃度を求めると、5,000m³/日規模の下水処理場の場合には、平均オーシスト濃度は約20個/ℓ、100,000m³/日規模の場合には約1個/ℓとなる。よって、処理水についても大規模な下水処理場であれば、分析水量の増加を計らなければならないと考えられる。

表-6 オーシスト濃度の推定結果
(処理区域内に感染者が1人存在と仮定)

流入下水量 (m ³ /日)	流入下水 平均オーシスト濃度	流入下水を測定し 回収率20%と仮定	処理水* 平均オーシスト濃度		処理水を測定し 回収率50%と仮定	
5,000	200個/ℓ	40個/ℓ	20個/ℓ	2個/ℓ	10個/ℓ	1個/ℓ
10,000	100個/ℓ	20個/ℓ	10個/ℓ	1個/ℓ	5個/ℓ	0.5個/ℓ
50,000	20個/ℓ	4個/ℓ	2個/ℓ	0.2個/ℓ	1個/ℓ	0.1個/ℓ
100,000	10個/ℓ	2個/ℓ	1個/ℓ	0.1個/ℓ	0.5個/ℓ	0.05個/ℓ
500,000	2個/ℓ	0.4個/ℓ	0.2個/ℓ	0.02個/ℓ	0.1個/ℓ	0.01個/ℓ

* 活性汚泥処理によるオーシスト除去効果を90% (左値)、99% (右値) として仮定。

4. 3 まとめ

平成8年6月から7月にかけて埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウムによる集団感染事例は、越生町の水道水源である越辺川伏流水にクリプトスポリジウムが混入、浄水過程で除去しきれなかったクリプトスポリジウムを含む水道水が各家庭に給水され、8千人以上にもおよぶ感染者が発生した。

クリプトスポリジウムによる大規模な感染症が発生した場合、感染者のふん便とともに多量のオーシストが排出される。このような多量のオーシストがふん便とともに排出されることからそれらが下水道を通じ下水処理場に流入してくることが予想される。このため、本報告においては、下水中よりオーシストを検出するための濃縮及び回収法について種々の検討を実施した。以下、それらの検討結果について示す。

① 平膜メンブランフィルターを用いたオーシスト濃縮法は、下水二次処理水等からオーシストを回収する上で比較的高い回収率が得られるものと考えられた。

② 22 μ mのふるいによりサンプル中の夾雑物を除去することによって、オーシストの回収率を若干向上させることができると考えられた。また、ふるい処理を行うことによって、濃縮水量を増加でき検出限界値を向上させられる。

③ さらに、検出限界値向上を目的として、オーシスト集積液中の懸濁物（フロック）とオーシストの分離をパーコール蔗糖液を用いた密度勾配遠心処理によって検討した。オーシスト集積液を密度勾配遠心処理しても下水処理水の場合、懸濁物とオーシストを良好に分離できなかった。また、直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量したものは、約66%と高い回収率が得られたが、生成した懸濁物を密度勾配遠心処理した集積液については、オーシストの回収率が約44%に低下した。

④ オーシスト集積液中の懸濁物（フロック）生成量が多くなっても、オーシストの回収率に及ぼす大きな影響は現れなかった。このため、集積液中に生成された懸濁物へのオーシストの取り込み量は少ないものと考えられた。

⑤ 検出限界値向上を目的に、22~210 μ mのふるいによりオーシスト集積液中のオーシストと懸濁物（フロック）の分離を検討した。下水処理水を用いた結果から、オーシスト集積液を直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量したものは、平均で約52%の回収率が得られたが、集積液を22 μ mのふるいで処理したものについては、若干回収率が低下して平均で約46%の回収率であった。しかし、蛍光処理を行う際にフィルターに通水できる集積液量としては、22 μ mのふるい処理を行うことによって2倍量以上増加させられることから検出限界値を高めることができる。また、蛍光染色に用いるフィルター枚数を同一とし、オーシストの検出効率をフィルターへの通水量と回収率の関係から求めると、22

μm のふるい処理を行うことによって約2倍向上する。

流入下水の場合には、オーシスト集積液を直接フィルターに通し蛍光処理を行い定量したものは、平均で約43%の回収率が得られたが、集積液を22 μm のふるいで処理したものについては、平均の回収率が約20%に低下した。しかし、蛍光処理を行う際にフィルターに通水できる集積液量としては、ふるい処理を行うことによって3倍量以上増加できることから、下水処理水の場合と同様に検出限界値を高めることができる。また、蛍光染色に用いるフィルター枚数を同一とし、オーシストの検出効率をフィルターへの通水量と回収率の関係から求めると、22 μm のふるい処理を行うことによって約1.5倍向上するとともに、蛍光染色するフィルターへの懸濁物の影響が少なくなり、オーシストを検出するための検鏡時間を大幅に短縮することができた。

⑥ 流入下水、処理水を用いた回収率試験において、オーシストの添加個数及び濃度を変化させオーシストの回収率に及ぼす影響を検討したが、添加個数の多少にかかわらず、検討を行った各々のケースでほぼ一定の回収率が得られた。

第5章 下水処理場におけるクリプトスポリジウムの実態調査

5.1 調査目的

先にも述べたとおり、我が国においても神奈川県平塚市や埼玉県越生町でクリプトスポリジウムによる大規模な感染症が発生しており、水中（水道水源、流入下水及び処理水中）でのオーシスト存在有無の確認が急務であると考えられる。とりわけ、クリプトスポリジウムのオーシストが人等のふん便中の含まれて排出されることから、下水道を通じ下水処理場に流入し活性汚泥処理や砂ろ過等で除去しきれなかったオーシストが環境水中に排出されることが考えられる。このようなことから、下水処理水を親水・修景利用している処理場において早急に実態調査を行う必要があると考えられる。このため、本調査は下水処理水を再生水として親水・修景利用している処理場を対象に、クリプトスポリジウムのオーシストの存在の有無を把握することを目的に行うものである。

5.2 調査方法

本調査は、19都道府県67ヶ所の下水処理場の流入下水及び再生水（下水処理水を親水・修景利用しているもの）についてオーシストの検出・定量を行った。総検体数は、流入下水73検体、再生水74検体の147検体である。再生水の処理方式は処理場毎に異なり、二次処理レベルから砂ろ過あるいは膜ろ過等に及んでいる。試料の採取は平成8年9月初旬から10月中旬（一部の処理場においては、12月初旬）の間に順次行いオーシストの検出を試みた。オーシストの検出・定量方法は、下記に示した図-12の方法により実施した。尚、間接蛍光処理には、HYDRO-FLUOR-Comboキット, ENSYS INC. を用いた。

5.3 調査結果

調査結果を表-7に示す。流入下水では73検体中7検体の試料からオーシストが検出された。検出割合としては約9.6%であり、検出個数としては約8～50個/ℓの範囲であった。この時の検出限界値の範囲としては約3～33個/ℓであった。一方、再生水においては74検体中9検体の試料からオーシストが検出された。検出割合としては約12.2%であり、検出個数としては約0.05～1.6個/ℓの範囲であった。この時の検出限界値の範囲としては約0.04～0.5個/ℓであった。流入下水、再生水のいずれかの試料において、オーシストが検出された処理場は、調査の対象とした67箇所の処理場中13箇所であり検出割合としては約19%であった。この内、流入下水と再生水からともにオーシストが検出された処理場は2箇所であった。

さらに、下水及び処理水中から検出されたオーシストの検鏡写真の一部を写真-7に示した。

尚、オーシストの平均回収率は室内実験等の回収率試験結果から流入下水で約14%、下水処理水（再生水）等で約46%である。

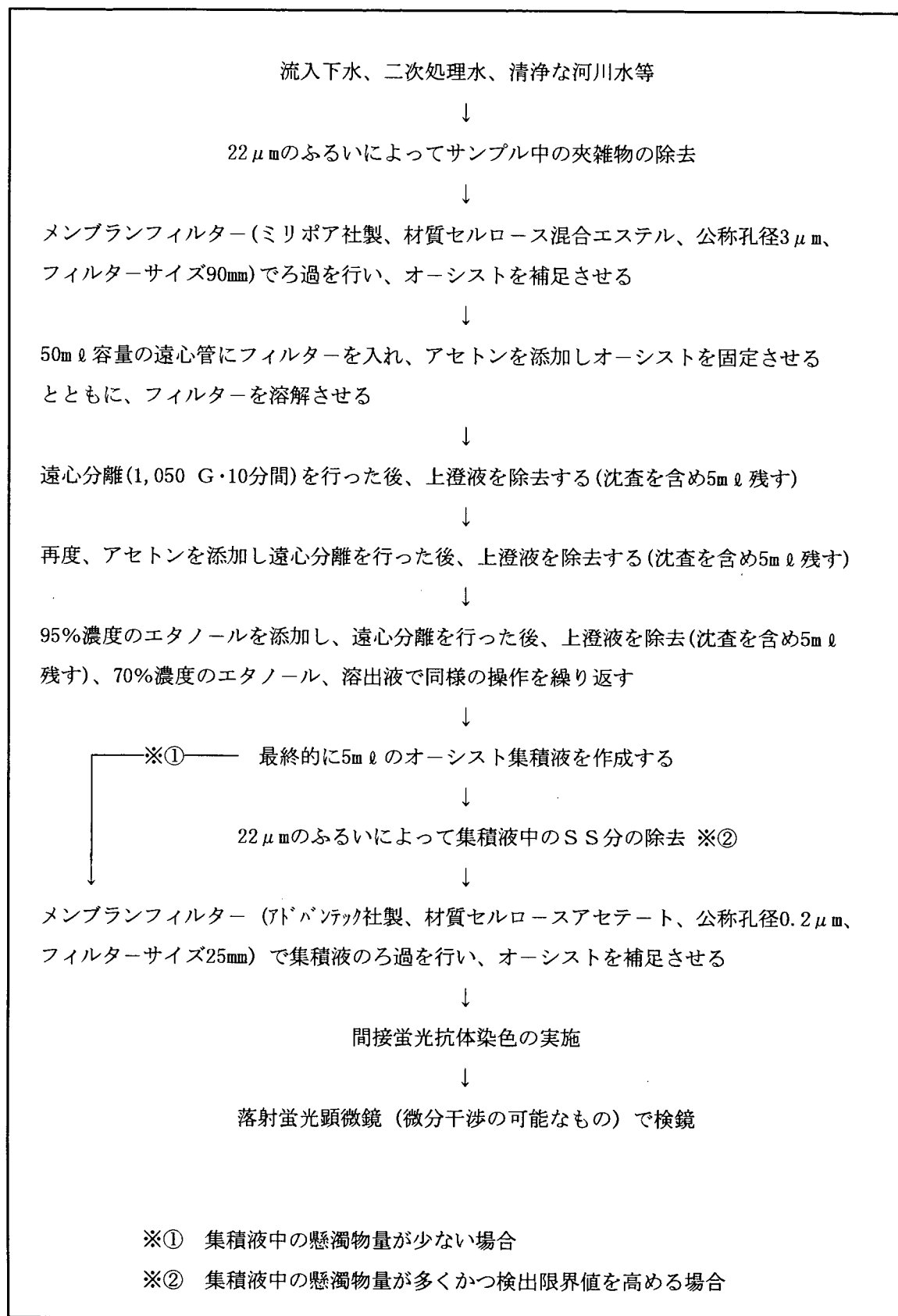


図-12 オーシストの定量方法

表-7 クリプトスポリジウム全国調査結果総括表

	流入下水	再生水
・調査都道府県数	19	19
・総検体数（処理場数）	73検体(67)	74検体(67)
・検出割合（陽性率）	9.6%（7/73）	12.2%（9/74）
・平均回収率（%）	約14	約46
・検出個数範囲（個/ℓ）	8～50	0.05～1.6
・検出限界値範囲（個/ℓ）	3～33以下	0.04～0.5

※ 再生水の処理工程は、表中の備考欄に示したとおり二次処理レベルから砂ろ過あるいは膜処理等に及んでいる。

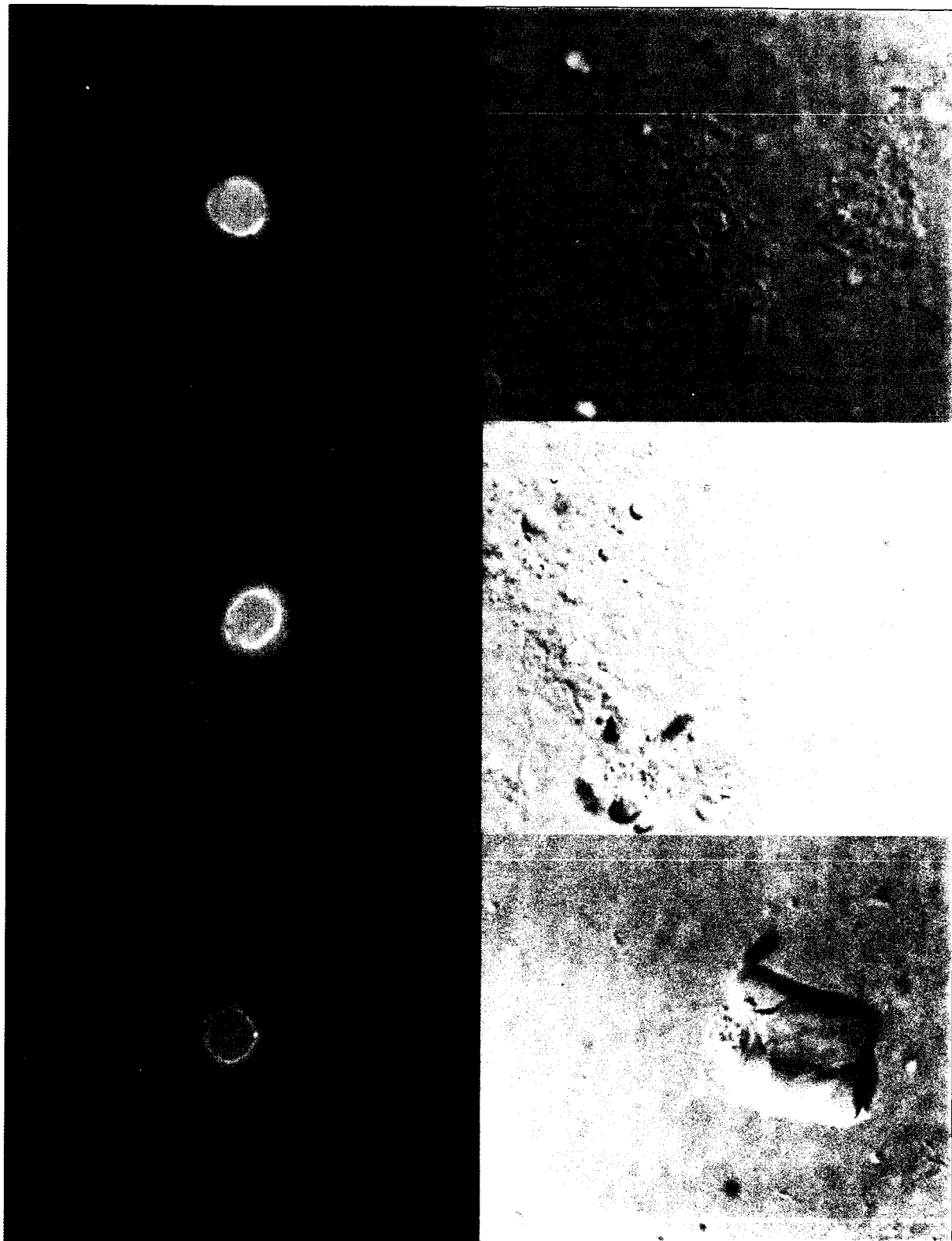
5.4 まとめ

本調査は、下水処理水を再生水として親水・修景利用している下水処理場を主に、全国67ヶ所の下水処理場の流入下水及び再生水合わせて147検体についてオーシストの検出・定量を行った。以下、調査結果の概要を以下に示す。

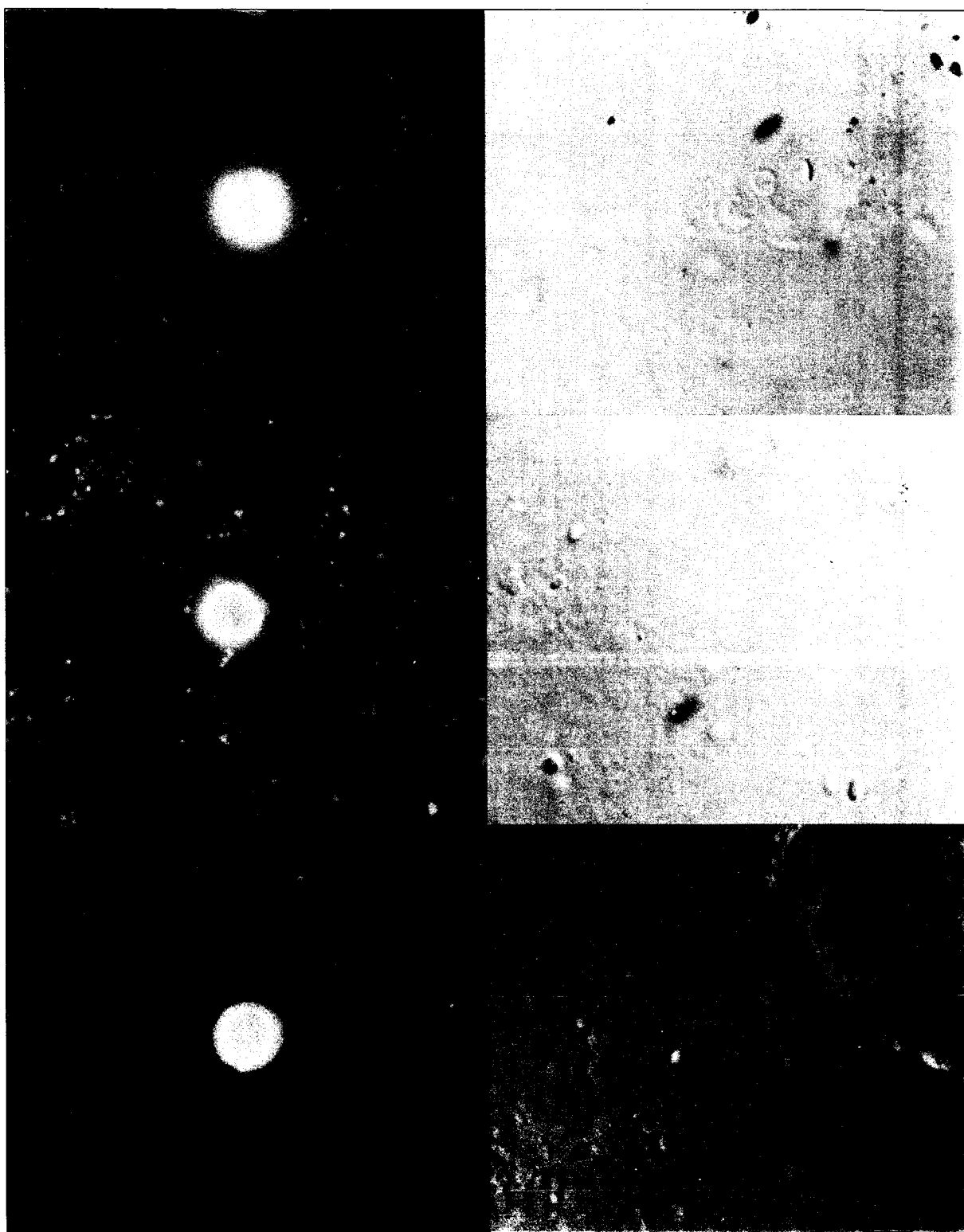
①流入下水、再生水のいずれかの試料において、オーシストが検出された処理場は、調査対象とした67箇所の処理場中13箇所であった。

②今回の調査におけるオーシストの検出濃度は流入下水で約8～50個/ℓ、再生水で約0.05～1.6個/ℓであった。

以上の調査結果をクリプトスポリジウム症が多く発生している米国で行った調査例¹¹⁾と比較すると、検出濃度及び検出割合とも低い段階にあると考えられた。



写真－7-1 流入下水中から検出されたオーシストの検鏡写真
(右側：微分干渉像、左側：蛍光像)



写真－7-2 処理水中から検出されたオーシストの検鏡写真
(右側：微分干渉像、左側：蛍光像)

第6章 関東地方の主要河川におけるクリプトスポリジウムの実態調査

6.1 調査目的

埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウムによる大規模な感染症は、越生町の上水源である越辺川伏流水がクリプトスポリジウムに汚染され、浄水過程で除去しきれなかったクリプトスポリジウムを含む水道水が各家庭に給水され、8千人以上にもおよぶ感染者が発生した。このため、本調査は水道水源として供される河川水等でのオーシスト存在有無の確認を目的に実施するものである。

尚、関東地方の主要河川における本調査は、関東地方建設局の依頼により実施したものである。

6.2 調査方法

本調査は関東圏内の主要河川、とりわけ大規模な取水を実施している河川において実施した。採水箇所の概略位置を図-13に示す。採水箇所は越生町浄水場付近の越辺川河川水をはじめ荒川水系秋ヶ瀬堰、利根川水系利根大堰、佐原大橋、江戸川水系新葛飾橋、多摩川水系羽村堰の6箇所である。調査期間は、平成8年6月下旬より現在（平成9年12月）まで実施している。

オーシストの測定方法は、基本的には下水及び処理水で用いた方法と同一であるが、懸濁物の多い試料（秋ヶ瀬堰、利根大堰、佐原大橋、新葛飾橋）については、オーシストの濃縮方法を若干変更した。懸濁物が多い場合には濃縮水量が減少してしまうことから、遠心分離を行い沈査と上澄液を別々に回収し、オーシストの検出を試みた（平成9年6月の試料より沈査のみの分析）。すなわち、河川水の懸濁物（沈査）は、流入下水及び下水処理水の懸濁物（沈査）と性状が異なるため、パーコール蔗糖液での密度勾配遠心処理による懸濁物（沈査）とオーシストの分離状況が良好であると考えられたためである。参考までに密度勾配遠心処理後の状況を図-14に記するとともに、オーシストの測定方法を図-15に示した。

また、平成9年6月の底泥調査は、表泥を乱さないよう静かに採泥を行い、採泥量と等量の10%中性ホルマリン溶液を添加しオーシストを固定した。この底泥2mℓ分を用いて、パーコール蔗糖液による密度勾配遠心処理を行い、オーシストを分離した。

6.3 調査結果及びまとめ

調査結果を表-8～10に示す。平成8年6月に採水を行った越生町浄水場付近の河川水から3.2個/ℓのオーシストが検出された（この時の回収率は約2.4%と低いことから、以後オーシストの濃縮法を上記手法に変更した）。この採水時には、すでに越生町において集団感染が発生していた時期である。その後、7月以降の越生町浄水場付近の河川水からはオーシストが検出されていない。しかし、平成9年1, 2, 9月の秋ヶ瀬堰試料、12月の新葛飾橋試料から0.05～0.06個/ℓのオーシストが検出されているが、その他3ヶ所の採水地点の河川水からはオーシストは検出されなかった。平成9年6月に行った底泥調査においてもオーシストは検出されなかった。各調査、採水（採泥）地点毎に検出限界値等が異なるが、本調査では83検体の河川水（底泥含む）についてオーシストの検出を試みたが、その内5



図-13 採水箇所の概略位置

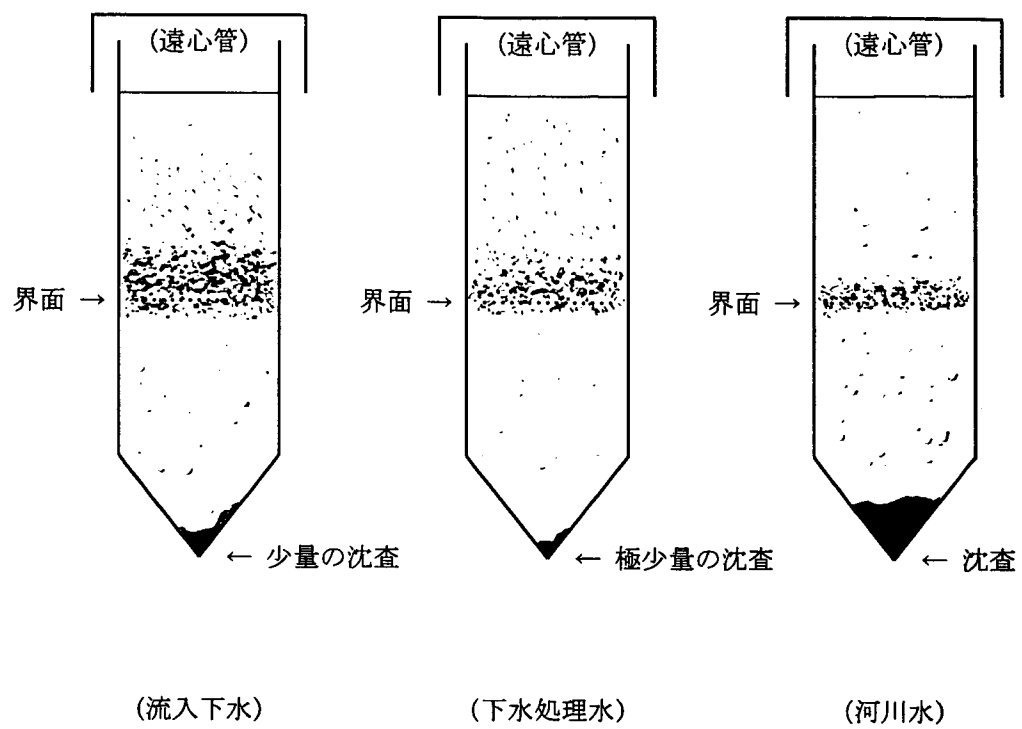


図-14 パーコール蔗糖液による密度勾配遠心処理後の状況

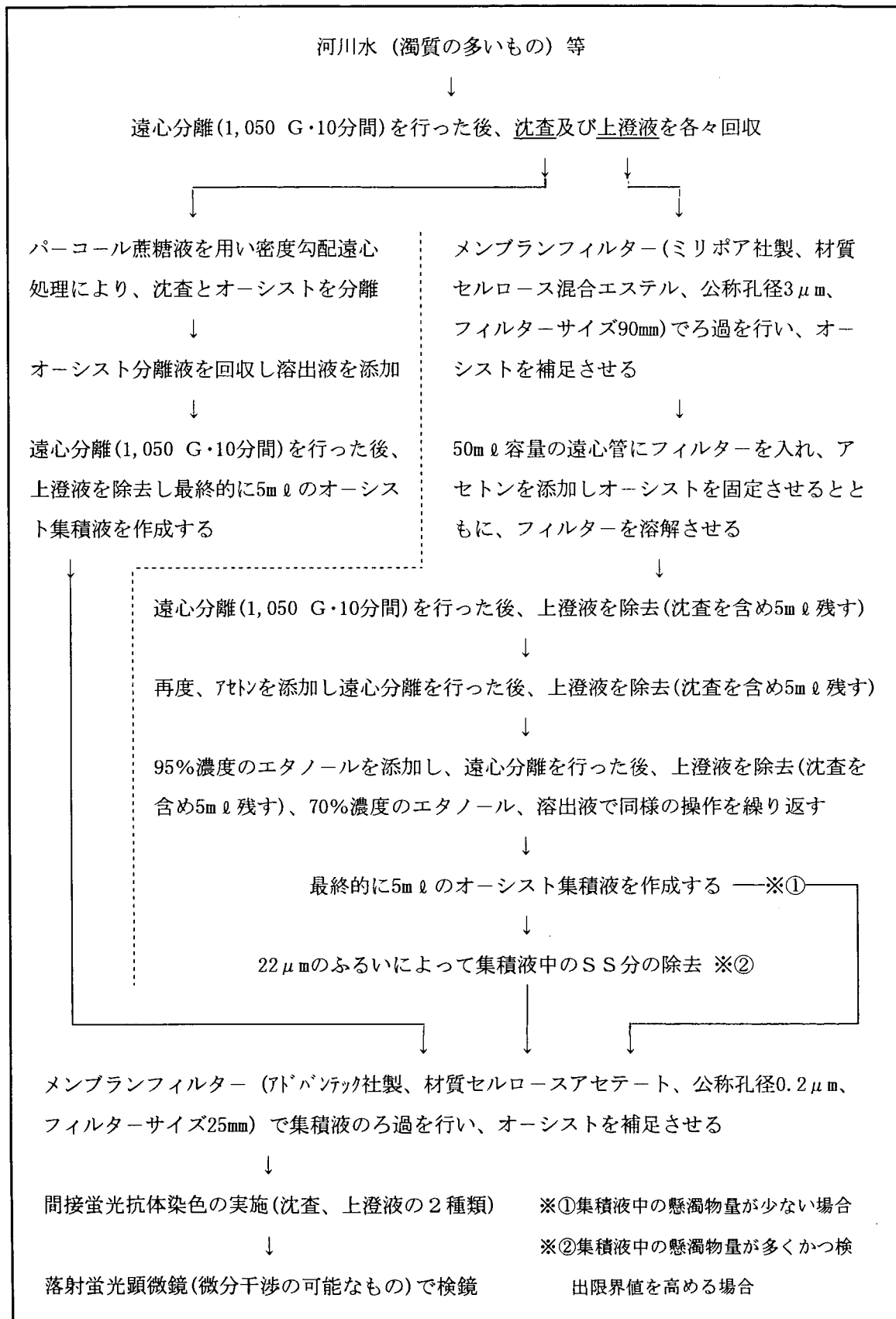


図-15 オーシストの定量方法

検体の試料から検出されたのみであり、陽性（検出）割合としては約6%であった。一方、米国での河川表流水におけるオーシストの調査例¹¹⁾では、最大で18個/ℓという報告もあり今回検出された(越生浄水場付近河川水除く)オーシスト濃度は、それよりも2オーダー以上低いものとなっている。

以上の調査結果から、越辺川を含む関東圏内6河川におけるオーシストの存在状況が明らかとなった。現段階においては陽性（検出）割合、検出濃度(越生浄水場付近河川水除く)とも低いものと考えられる。しかし、越生町での集団感染事例に鑑みると、今後も継続して河川水中におけるオーシストの実態調査を行う必要があるものと考えられた。尚、今回の調査におけるオーシストの平均回収率は、越生浄水場付近の河川水を用いて約44%、秋ヶ瀬堰の試料を用いて約22%であった。また、今回の調査において検出されたオーシストの検鏡写真を写真－8に示した。

表－8 実態調査結果表

	越辺川**	秋ヶ瀬堰	利根大堰	羽村堰	新葛飾橋	水郷大橋
採 水 日	H8. 6. 26*	H8. 6. 26*				
検出個数(個/ℓ)	3. 2	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/ℓ)	—	—				
採 水 日	H8. 7. 18	H8. 7. 18				
検出個数(個/ℓ)	不検出	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/ℓ)	1. 8	3. 6				
採 水 日	H8. 7. 30	H8. 7. 30				
検出個数(個/ℓ)	不検出	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/ℓ)	1. 6	1. 3～2. 4				
採 水 日	H8. 8. 6	H8. 8. 6	H8. 8. 6	H8. 8. 6	H8. 8. 6	H8. 8. 6
検出個数(個/ℓ)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/ℓ)	2. 2	1. 1～2. 5	0. 7～2. 8	2. 2	4. 4～5. 0	4. 4～6. 7
採 水 日	H8. 8. 20	H8. 8. 20				
検出個数(個/ℓ)	不検出	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/ℓ)	0. 2～0. 4	1. 5～6. 0				
採 水 日	H8. 9. 17	H8. 9. 17	H8. 9. 3	H8. 9. 3	H8. 9. 3	H8. 9. 3
検出個数(個/ℓ)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/ℓ)	2. 7	0. 6～1. 1	0. 6～0. 7	0. 6	1. 2～1. 9	0. 6～3. 0
採 水 日	H8. 10. 22	H8. 10. 22	H8. 10. 8	H8. 10. 22	H8. 10. 8	H8. 10. 8
検出個数(個/ℓ)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/ℓ)	0. 1	0. 07～0. 1	0. 44	0. 09	0. 25～0. 44	1. 5

表－9 実態調査結果表

	越辺川**	秋ヶ瀬堰	利根大堰	羽村堰	新葛飾橋	水郷大橋
採水日	H8.11.19	H8.11.19	H8.11.5	H8.11.5	H8.11.5	H8.11.5
検出個数(個/l)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/l)	0.05	0.07	0.1	0.05	0.14～0.15	0.3
採水日	H8.12.10	H8.12.10	H8.12.3	H8.12.3	H8.12.3	H8.12.3
検出個数(個/l)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/l)	0.05	0.08	0.15	0.05	0.15	0.11～0.22
採水日	H9.1.21	H9.1.21	H9.1.7	H9.1.7	H9.1.7	H9.1.7
検出個数(個/l)	不検出	0.06	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/l)	0.04	0.06	0.08	0.04	0.11	0.22
採水日	H9.2.18	H9.2.18	H9.2.4	H9.2.12	H9.2.4	H9.2.4
検出個数(個/l)	不検出	0.05	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/l)	0.04	0.05	0.25	0.15	0.08	0.23
採水日	H9.3.11	H9.3.11	H9.2.27 鮎 管橋 不検出	—	—	—
検出個数(個/l)	不検出	不検出	0.05	—	—	—
検出限界値(個/l)	0.05	0.05	0.05	—	—	—
採水日	H9.4.22	H9.4.22	—	—	—	—
検出個数(個/l)	不検出	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/l)	0.05	0.05	—	—	—	—
採水日	H9.6.25	H9.6.25	H9.6.3	H9.6.3	H9.6.3	H9.6.3
検出個数(個/l)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/l)	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	0.13
採泥日(泥)	H9.6.25	H9.6.25	H9.6.3	H9.6.3	H9.6.3	H9.6.3
検出個数(個/ml)	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/ml)	0.50	0.77	0.50	0.50	0.50	0.50
採水日	H9.8.19	H9.8.19	—	—	—	—
検出個数(個/l)	不検出	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/l)	0.08	0.05	—	—	—	—
採水日	H9.9.16	H9.9.16	H9.9.2	H9.9.2	H9.9.2	H9.9.2
検出個数(個/l)	不検出	0.05	不検出	不検出	不検出	不検出
検出限界値(個/l)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07	0.05

表-10 実態調査結果表

	越辺川**	秋ヶ瀬堰	利根大堰	羽村堰	新葛飾橋	水郷大橋
採 水 日	H9. 10. 21	H9. 10. 21				
検出個数(個/l)	不検出	不検出	—	—	—	—
検出限界値(個/l)	0. 05	0. 05				
採 水 日	H9. 12. 9	H9. 12. 9	H9. 12. 2	H9. 12. 2	H9. 12. 2	H9. 12. 2
検出個数(個/l)	不検出	不検出	不検出	不検出	0. 06	不検出
検出限界値(個/l)	0. 05	0. 05	0. 05	0. 05	0. 06	0. 07
回収率試験結果 (%)	4 4	2 2	—	—	—	—
検出限界値範囲	0. 04～2. 7	0. 05～6. 0	0. 05～2. 8	0. 04～2. 2	0. 06～5. 0	0. 05～6. 7

* H8, 6/26の試料については試料の濃縮法が若干異なる。

** 越辺川は越生浄水場取水口付近の河川水である。

同一欄に2種類の検出限界値が記してあるのは、沈査と上澄液の分析水量が異なるためである。

回収率： H9, 2/18 越生浄水場取水口付近越辺川河川水試料使用 約42%

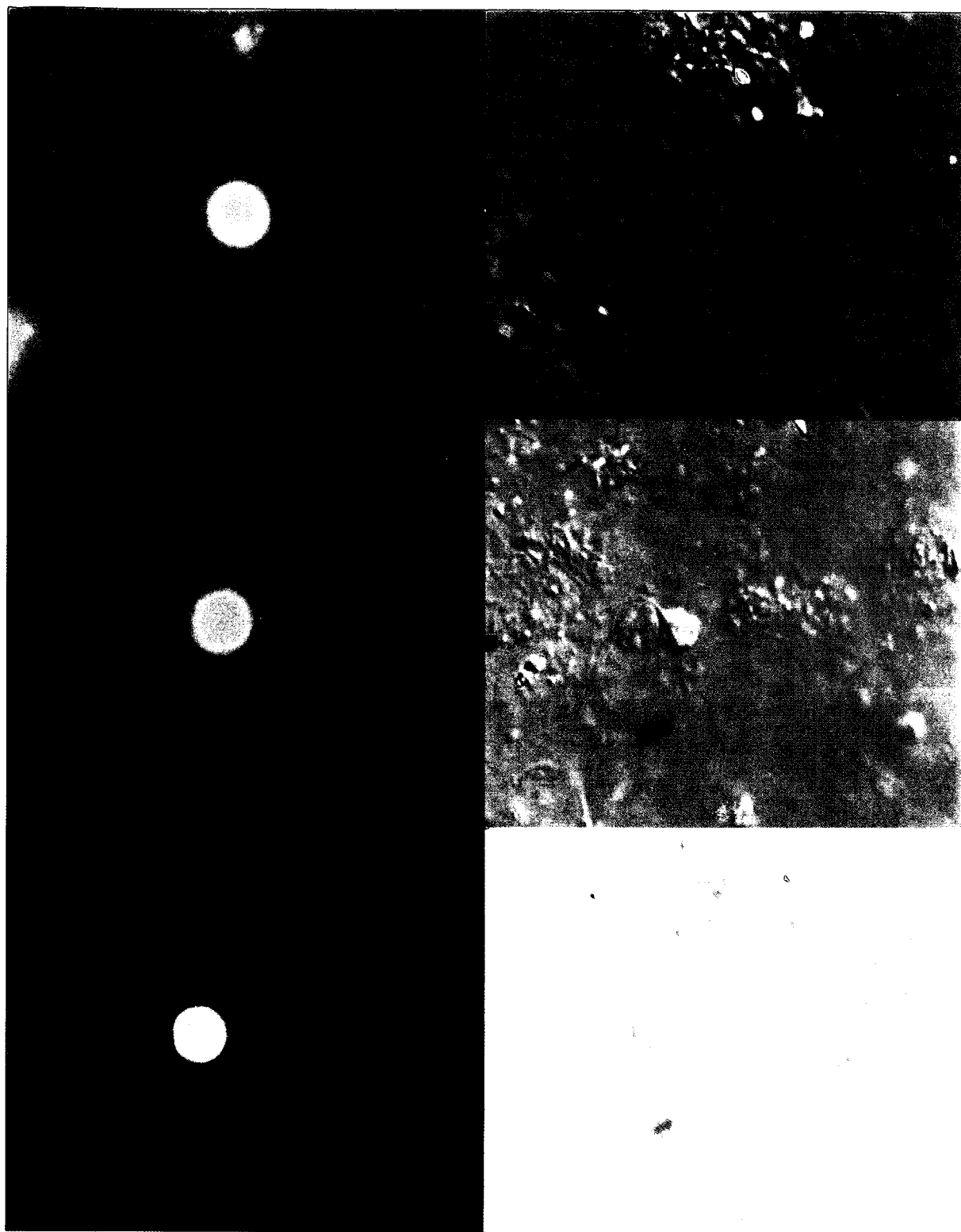
H9, 10/21 越生浄水場取水口付近越辺川河川水試料使用 約47%

(羽村堰試料は浄水場付近河川水試料と濃縮法が同じ)

H9, 3/11 秋ヶ瀬堰試料 使用 約26%

H9, 10/21 秋ヶ瀬堰試料 使用 約18%

(利根大堰、新葛飾橋、水郷大橋試料は、秋ヶ瀬堰試料と濃縮法が同じ)



写真－８ 河川水中から検出されたオーシストの検鏡写真
(上段:越辺川, H8, 6, 26、中段:秋ヶ瀬堰, H9, 9, 16、下段:新葛飾橋, H9, 12, 2)
(右側:微分干渉像、左側:蛍光像)

7.1 クリプトスポリジウムのオーシストの大きさについて

オーシスト (*Cryptosporidium parvum*) であるか否かの判定基準の1つに大きさの測定があり、その大きさは約4～6 μm といわれている。そこで、HYDRO-FLUOR-Comboキットに含まれている陽性コントロール中のオーシスト及び下水中から検出されたオーシストの大きさについて測定を行い、その分布及び観察状況について整理した。測定個数は、陽性コントロールで約350個、下水試料で約200個の計550個である。尚、オーシストの大きさ測定は、微分干渉観察で行った。

測定結果を図-16に示す。円形観察されたオーシストの中で、直径が約4.5 μm のものは全体の約30%以上であった。また、円形観察されたオーシストは、全体の約50%以上を占めている。オーシストの形態は類円形とされていることから、蛍光染色用フィルターへのオーシスト捕捉状況によるが、約半数が円形観察されたことになる。円形観察されたオーシストの大きさは、直径が約5 μm のものが最大であり、直径が約5.5 μm 以上のものは存在しなかった。

一方、類円形観察されたオーシストの中では、短径約4.5 μm ×長径約5 μm のものが、全体の約20～26%を占めている。長径が約5.5 μm の存在も認められたが、測定したオーシスト全体の0.7%程度と極少数であった。また、長径が6 μm 以上のものは存在しなかった。

よって、直径あるいは短・長径が約4～5 μm の範囲内で測定されたオーシストは、99%以上を占めることが明らかとなった。

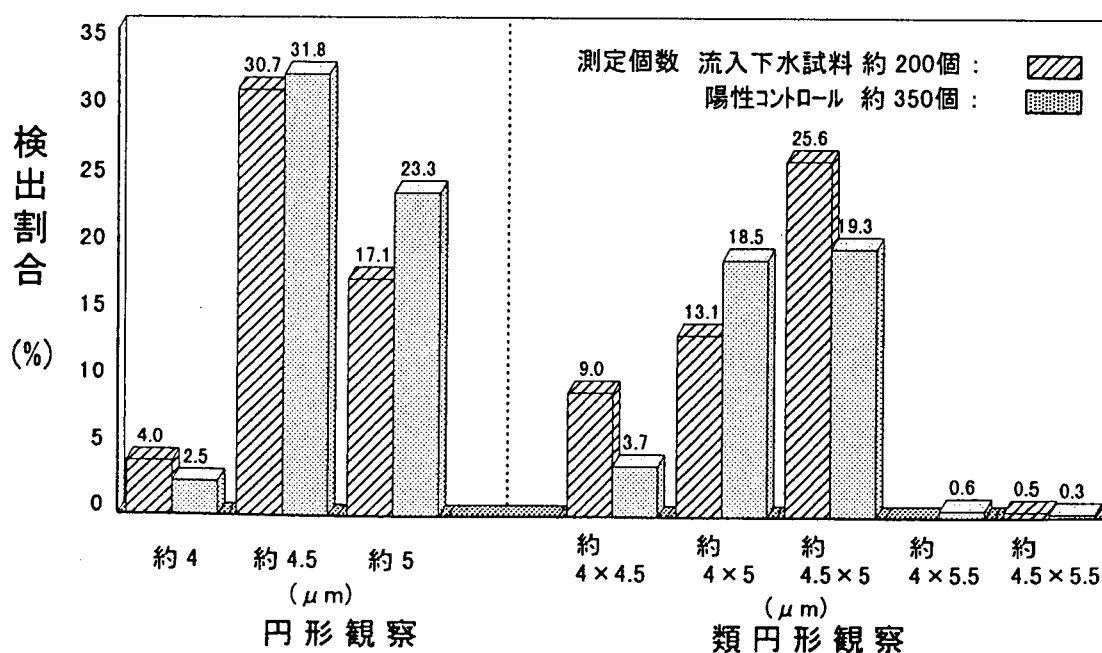


図-16 オーシストの大きさ(微分干渉観察時)

7. 2 免疫磁気ビーズ法による下水、河川水中からのオーシストの回収について

1) 検討目的

下水処理水をフィルターで濃縮しオーシストを回収した場合、その回収率は約50%程度（ふるい処理を実施）と比較的高く、分析水量もある程度多くできた。しかし、流入下水の場合では、夾雑物が多いことから分析水量を多くできない（蛍光染色用フィルターの枚数が多くなる）上に、回収率も約20～30%程度（ふるい処理を実施）と低下してしまう課題が生じた。このため、分析水量と回収率のさらなる向上を目的として、免疫磁気ビーズ法による下水、河川水中からのオーシストの回収について検討を実施した。

2) 検討方法

流入下水と処理水については、B下水処理場のものを使用、河川水については秋ヶ瀬堰及び越辺川の河川水を使用し、適宜オーシストを添加し検討を行った。各々の試料をフィルター（直径47mm、ポリカーボネート製、孔径 $2.0\mu\text{m}$ あるいは $3.0\mu\text{m}$ ）によってろ過濃縮した。懸濁物の多い試料については、ろ過水量を多くするために孔径が $3.0\mu\text{m}$ のフィルターを使用した。ろ過後水に0.8%程度のオーシストの漏れを生じた（ $2.0\mu\text{m}$ のフィルターの場合には、漏れを生じていない）。ろ過濃縮したフィルターは、溶出液に浸し超音波処理した後、溶出液からフィルターを取り出し $1,050\times G$ で遠心分離を行い、濃縮試料を作成した。この濃縮試料に免疫磁気ビーズキットの磁気ビーズを $100\mu\text{L}$ 添加した後、磁気ビーズキットの処方に従って処理を行い、オーシスト集積液を作成した。この集積液を間接蛍光染色用のフィルターに通水しオーシストを捕捉させ、間接蛍光染色処理した後オーシストを計数した。間接蛍光染色処理には、HYDRO - FLUOR-Comboキット, ENSYS INC. を用いた。

3) 検討結果

3-1) 超音波処理時間の違いによるオーシストの検出個数比

フィルターによって試料をろ過濃縮した場合、フィルターからオーシストを分離させる方法の1つとして、超音波処理が考えられる。そこで、超音波処理によってフィルターからオーシストを分離する際の最適処理時間について検討を行った。検討には、B下水処理場の流入下水及び越辺川の河川水を使用した。超音波洗浄器の出力は120W（周波数38kHz）、処理時間は0～10分間の6段階とした。図-17に検討結果を示す。超音波処理時間が0分の時の検出個数を基準に、各処理時間のオーシスト検出個数比を表したものである。超音波処理時間を長くすることにより、検出個数は徐々に増加傾向を示しており、流入下水、河川水とも5分間の超音波処理時間において最大値を示した。よって、超音波洗浄器の出力が120W程度であれば、約5分間の超音波処理時間が適当であると考えられた。しかし、オーシストの性状（ホルマリン固定か否か等）により、超音波強度や時間を考慮しなければ、オーシスト壁が破壊される可能性があるものと考えられる。

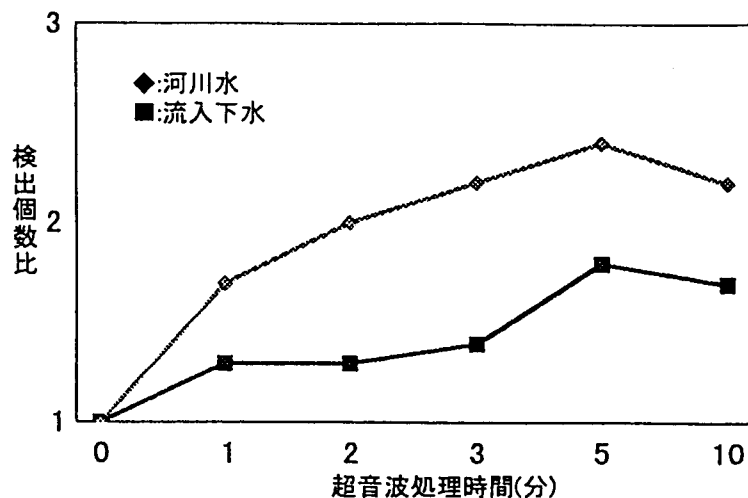


図-17 超音波処理時間の違いによる
オーシストの検出個数比

3-2) 下水、河川水中からのオーシストの回収率

免疫磁気ビーズ法による下水中からのオーシストの回収率試験結果を図-18に示す。フィルターによる流入下水の濃縮水量を約10~200mℓとし回収率の把握を行った。濃縮水量が少量の場合には、オーシストの回収率は約20~30%程度であるのに対し、濃縮水量を約150mℓ以上とした場合には、回収率が10%以下と低下している。よって、流入下水については濃縮水量の多少により、オーシストの回収率が影響されることが明らかとなった。図-19は処理水中からの回収結果である。二次処理水については、濃縮水量を0.5~10ℓ、三次処理水(砂ろ過)では1~20ℓとした。二次処理水、三次処理水とも濃縮水量の多少による回収率への影響は少ないようである。二次処理水中からの回収率は約10~20%であり、平均回収率は約16%であった。また、三次処理水での回収率は、約10~25%であり、平均回収率は約18%であった。よって、処理水に関しても、免疫磁気ビーズ法によるオーシストの回収率は低いものであった。

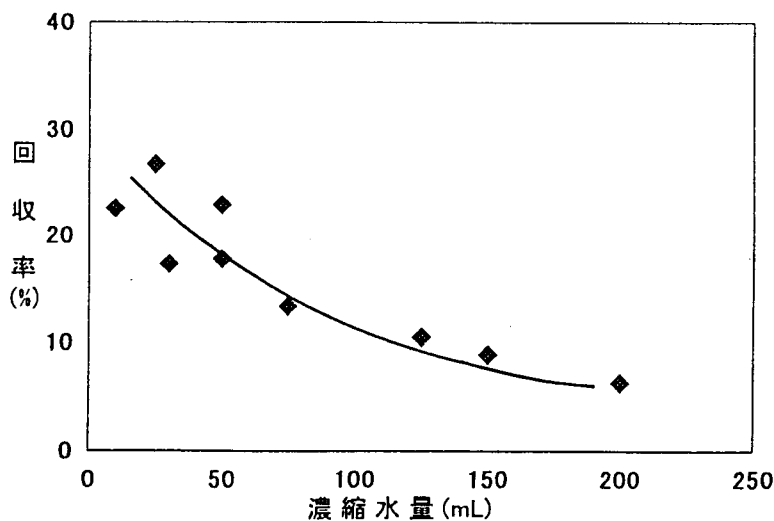


図-18 下水中からの回収率

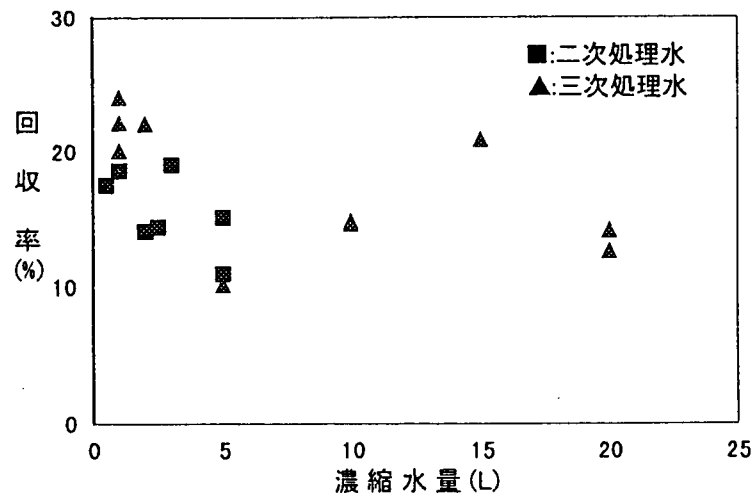


図-19 処理水中からの回収率

一方、河川水中からの回収結果について図-20に示す。懸濁物の少ない越辺川試料については濃縮水量を1～20ℓ、比較的懸濁物の多い秋ヶ瀬堰試料については濃縮水量を1～5ℓとした。越辺川試料でのオーシスト回収率は約40～60%程度であり、平均回収率は約47%であった。また、秋ヶ瀬堰試料では約30～40%程度であり、平均回収率は約37%であった。試料中の懸濁物が多くなることにより、若干回収率が低下するようであるが、下水処理水と同様に、濃縮水量の多少による回収率への影響は少ないようである。しかし、河川水中からのオーシストの回収率は、下水処理水中からの回収率の約2～3倍高いものとなっている。

以上の結果から、免疫磁気ビーズ法によるオーシストの回収率は、濃縮試料の性状の違いにより大きな影響を受けることが明らかとなった。

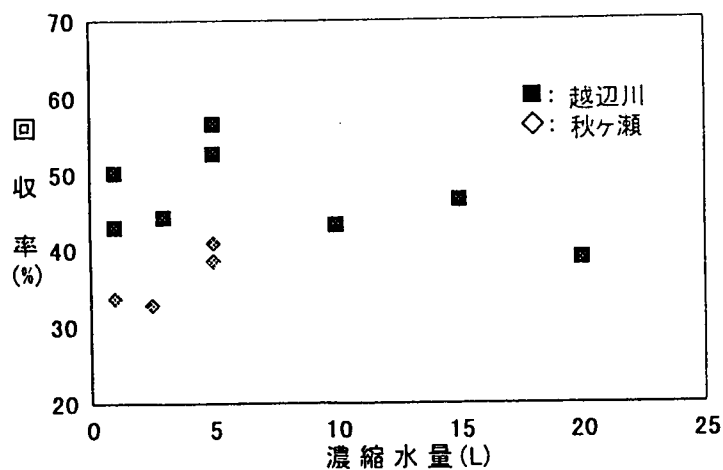


図-20 河川水中からの回収率

3-3) 回収率向上のための予備的検討

上記の検討結果から、免疫磁気ビーズ法による下水試料中からのオーシストの回収率は、低いことが明らかとなった。このため、下水試料中からのオーシストの回収率向上を目的として、ビーズ添加量を増加させた場合のオーシストの回収率に及ぼす影響を予備的に検討した。検討試料には三次処理水を使用、ビーズの添加量は所定の添加量を基準に2～10倍量の5段階とした。

検討結果を表-11に示す。ビーズの添加量を3倍量としても、オーシストの平均回収率はあまり向上せず24%程度であるが、添加量を5倍量以上とすることによってオーシストの平均回収率は、若干向上して約36%程度である。よって、ビーズの添加量を5～10倍量増加させても、添加量に見合った大幅なオーシストの回収率の向上は、見込めないものと考えられた。

表-11 ビーズ添加量と回収率の関係

ビーズ添加量	1倍量	2倍量	3倍量	5倍量	10倍量
回収率 (%)	21.6	23.8	24.0	36.6	35.3

検討試料：三次処理水

4) まとめ

本検討は、免疫磁気ビーズ法による下水、河川水中からのオーシストの回収について、分析水量と回収率のさらなる向上を目的として実施したものである。

その結果、流入下水の濃縮水量が少量の場合には、オーシストの回収率は約20～30%程度であるのに対し、約150mℓ以上とした場合にはオーシストの回収率は10%以下に低下することから、濃縮水量の多少によりオーシストの回収率は影響を受けることが明らかとなった。下水処理水に関しては、濃縮水量の多少による回収率への影響は少ないようであった。しかし、オーシストの回収率は、三次処理水、三次処理水(砂ろ過)ともに約20%程度と低いものであった。また、回収率の向上を目的として、ビーズ添加量を増やし三次処理水を用いて検討を行ったが、添加量に見合った大幅なオーシストの回収率の向上は、見込めないものと考えられた。

河川水に関しては、試料中の懸濁物が多くなることにより若干回収率が低下するようであるが、下水処理水と同様に、濃縮水量の多少による回収率への影響は少ないようであった。また、オーシストの平均回収率は約40～50%程度であり、比較的高い回収率が得られるものと考えられた。

以上の結果から、免疫磁気ビーズ法によるオーシストの回収率は、濃縮試料の性状の違いにより大きな影響を受けることが明らかとなった。よって、流入下水や処理水を対象とした免疫磁気ビーズ法の適用は、現段階においてオーシストの回収率が低いことから、課題が残されるものと考えられた。しかしながら、河川水への適用に関しては、従来の濃縮法と比較して同等かそれ以上の回収率が得られ、かつ、蛍光染色用フィルターの使用枚数を1/10量程度(20ℓ濃縮)に減らせることができるため、検鏡時間を大幅に短縮できるものと考えられた。

第8章 結 論

平成8年6月～7月にかけて埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウムによる集団感染事例は、越生町の水道水源である越辺川伏流水にクリプトスポリジウムが混入、浄水過程で除去しきれなかったクリプトスポリジウムを含む水道水が各家庭に給水され、8千人以上にもおよぶ感染者が発生した。クリプトスポリジウムによる大規模な感染症が発生した場合、感染者のふん便とともに多量のオーシストが排出される。このような多量のオーシストがふん便とともに排出されることから、それらが下水道を通じ下水処理場に流入してくることが予想される。

このため、本報告においては、下水中等よりオーシストを検出するための濃縮及び回収方法について種々の検討を実施した。さらに、越生町での集団感染事例に鑑み、下水処理水を再生水として利用している全国の下水処理場を対象に流入下水、再生水についてオーシストの存在有無の把握を行うのとともに、関東圏内における河川水についてもオーシストの実態調査を実施した。

本実態調査・検討を総括すると次のようになる。

1) 下水処理水を再生水として利用している全国67ヶ所の下水処理場を対象としたクリプトスポリジウム実態調査結果から、流入下水73検体中7検体からオーシストが検出された。再生水においては、74検体中9検体からオーシストが検出された。検出濃度範囲は、流入下水で約8～50個/ℓ、再生水で約0.05～1.6個/ℓであった。

2) 越辺川を含む関東圏内の6河川についてオーシストの実態調査を行ったが、越辺川、秋ヶ瀬堰、新葛飾橋以外の河川水からはオーシストが検出されなかった。83検体の河川水（底泥含む）の内5検体の試料から検出されたのみであり、陽性（検出）割合としては約6%であった。検出濃度範囲は、約0.05～0.06個/ℓであった（H8, 6, 26越辺川試料除く）。

3) メンブランフィルターを用いたオーシスト濃縮法は、下水二次処理水、清浄な河川水等からオーシストを回収する上で比較的高い回収率が得られるものと考えられた。

4) オーシスト集積液中の懸濁物（フロック）とオーシストをふるいによって分離すれば、蛍光染色を行うためのフィルターへの通水量が増加でき、検出限界値を向上させられるのとともにオーシストの検出効率も高まるものと考えられた。

5) 免疫磁気ビーズ法によるオーシストの回収率は、濃縮試料の性状等の違いにより大きな影響を受けることが明らかとなった。

全国67ヶ所の下水処理場におけるクリプトスポリジウムの実態調査から、我が国におけるおおまかなオーシストの存在状況を把握することができた。流入下水、再生水とも検出割合としては約10%程度、検出濃度としては流入下水で約8～50個/ℓ、再生水で約0.05～1.6個/ℓとなっており、米国で行った調査例¹¹⁾の水中濃度と比較した場合、流入下水、再生水（処理水）で2オーダー低い値である。

また、越辺川を含む関東圏内6河川の実態調査では、越辺川、秋ヶ瀬堰、新葛飾橋以外の河川水からはオーシストが検出されなかった。しかし、今後とも、放流水中および河川水中のオーシスト濃度について注意を払う必要がある。

さらに、クリプトスポリジウムによる集団感染が発生した場合には、感染者から多量のオーシストが排出されるため、下水道を通じて下水処理場へ流入してくることが考えられる。現在の一般的な活性汚泥法では、オーシストは80～99%程度除去^{16) 17)}され、水域への負荷が大きく削減されるが、除去されなかった一部のオーシストが放流先の河川等へ排出される可能性がある。このため、集団感染発生時には、発生地域の流入下水を処理している下水処理場等で、オーシストを極力排出しないための除去手法（負荷削減のための緊急的追加処理対策の実施）あるいは下流地域での水利用制限の広報等の対策が必要になるものと考えられる。

【参考文献】

- 1) 建設省下水道部監修、日本の下水道、平成8年
- 2) (社)水環境学会、水中の健康関連微生物シンポジウム講演集, 1995
- 3) 例えば、神奈川新聞 (1994, 9, 7)
- 4) 例えば、埼玉新聞 (1996, 6, 26)
- 5) 図説人体寄生虫学、改訂第4版、南山堂
- 6) NEW 寄生虫病学、南江堂
- 7) *Walter Jakubowski, "Giardia and Cryptosporidium" Fifth Japan / US Workshop on Sewage Treatment Technology, 1995*
- 8) *Moore A.C., Herwaldt B.L., Craun G.F., Calderon R.L., Highsmith A.K., and Juraneck D.D., Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992, J. Am. Water Works Assoc. 86, 2:87-99, 1994*
- 9) 井関 基弘、水系感染クリプトスポリジウム症の集団発生「その実状と対策」, 1996
- 10) 埼玉県衛生部、「クリプトスポリジウムによる集団下痢症報告書」, 1997
- 11) *Rose, J.B. (University Of Arizona, USA), Occurrence and significance of Cryptosporidium on water, Journal American Water Works Association, Vol. 80, No. 2, pp. 83-89, 1988*
- 12) *Stadterman, K.L. (Allegheny County Sanitary Authority, USA), Sninsky, A.M., Sykora, J.L., Jakubowski, W., Removal and inactivation of Cryptosporidium oocysts by activated sludge treatment and anaerobic digestion, Water Science & Technology, Vol. 31, No. 5-6, pp. 97-104, 1995*
- 13) (社)水環境学会、水中の健康関連微生物シンポジウム講演集, 1995
- 14) *Federal Register Vol. 59, No. 28, 1994*
- 15) *J.E. Aldom and A.H. Chagla, "Recovery of Cryptosporidium oocyst from water by a membrane filter dissolution method" Letters in Applied Microbiology, Vol. 20, pp. 186-187, 1995*
- 16) *de Maturana, I.V.-M., Arez-Mazas, M.E., Duran-Oreiro, D., Lorenzo-Lorenzo, M.J., Efficacy of activated sludge in removing Cryptosporidium parvum oocyst from sewage, Applied & Environmental Microbiology, Vol. 58, No. 11, pp. 3514-3516, 1992*
- 17) *Stadterman, K.L., Sninsky, A.M., Sykora, J.L., Jakubowski, W., Removal and inactivation of Cryptosporidium oocyst by activated sludge treatment and anaerobic digestion, Water Science & Technology, Vol. 31, No. 5-6, pp. 97-104, 1995*
- 18) 諏訪 守、鈴木 穰、「下水中からのクリプトスポリジウムの濃縮方法について」、第31回日本水環境学会年会講演集, 1997

謝 辞

本調査・検討を進めるにあたって、大阪市立大学医学部 井関 基弘先生、木俣 勲先生には多大なご指導、ご協力を得ました。また、全国の下水处理場における実態調査では、各自治体、処理場関係各位に試料の採取及び送付に関して、それぞれ多くのご協力を得ました。ここに記して感謝いたします。

尚、水質研究室 田中 宏明室長には、実態調査等に関して、多くの指導を得た。また、汚泥研究室 北村 友一研究員には、多くの協力を得た。

• 資 料 編

- ・ 発表論文

下水中からのクリプトスポリジウムの濃縮方法について

建設省土木研究所 ○諏訪 守、鈴木 穣

Evaluation of Recovery Method of Cryptosporidium Oocysts from Wastewater, Mamoru SUWA, Yutaka SUZUKI
(Public Works Research Institute)

1. はじめに

我が国でも神奈川県平塚市や埼玉県越生町でクリプトスポリジウムによる集団感染事例が報告されており、水中におけるクリプトスポリジウムのオシストの存在有無の確認が急務であると考えられる。とりわけ、オシストが人等のふん便中に含まれて排出されることから、下水処理場に流入してくることが予想される。このため本報告では、下水及び処理水中からオシストを簡易かつ効率よく回収することを目的として濃縮方法等の検討を行った。

2. 検討方法

検討には、オシストを添加したA下水処理場の流入下水及び砂ろ過水を用い、J. E. Aldomら¹⁾の方法を参考に、下水中からオシストを濃縮した場合の回収率の把握を行った。オシストの検出は、キット(HYDROFLUOR-Combo, ENSYS INC.)を用いて間接蛍光抗体染色し落射蛍光専用顕微鏡により計数した。

3. 検討結果及び考察

検討結果を図-1に示す。オシストの平均回収率は流入下水で約43%、砂ろ過水で約52%となっており、比較的高い回収率が得られた。しかし、オシスト集積液中に懸濁物等の生成が認められたことから、蛍光染色を行うためのフィルターへの通水量が減少し、検出限界値が低くなる可能性がある。このため、検出限界値の向上を目的に、オシスト集積液をふるい処理し回収率に及ぼす影響や通水量の把握を行った。

ふるい処理の影響を図-2、3に示す。流入下水の場合、44 μ mのふるいで通水量を約2倍、22 μ mのふるいで約3倍以上増加させられたが、回収率が各々約30~20%に低下している。処理水の場合には、22 μ mのふるいで通水量を約2倍以上増加させられたが、回収率が約46%に低下している。流入下水と比較すると処理水では、ふるい処理の影響が少ないものとなっている。一方、ふるいの粒径が74 μ m以上になると通水量をあまり増加させられない。

ここで、流入下水のオシスト濃度を10個/ℓ、処理水のオシスト数を1個/ℓと仮定、蛍光染色に用いるフィルター枚数を同一とし、フィルターへの通水量と回収率の関係からふるい処理の実施有無によるオシストの検出効率を(1)式により比較した。 $K = C \cdot (F/S) \cdot R$ —(1)

ここに、K:検出濃度(個/ℓ)、C:オシスト濃度(個/ℓ)、F:通水量(mℓ)、S:集積液量(mℓ)、R:回収率

比較結果を表-1に示す。ふるい処理を行うこと

により検出濃度は約1.5~2倍になるとともに検出限界値も向上する。また、ふるい処理を行うことにより蛍光染色するフィルターへの懸濁物の影響が少なくなり、オシストを検出するための検鏡時間を大幅に短縮することができる。

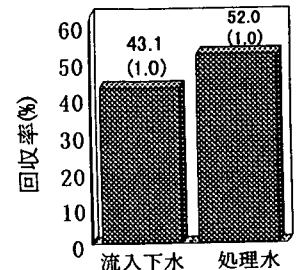


図-1 オシストの回収率

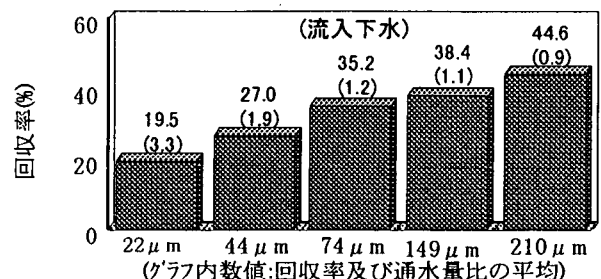


図-2 ふるいの粒径が回収率に及ぼす影響

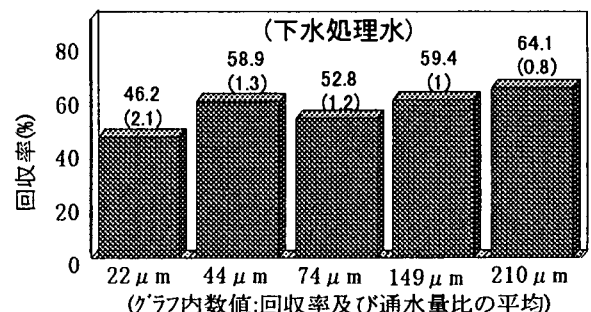


図-3 ふるいの粒径が回収率に及ぼす影響

表-1 検出効率

	C	F	S	R	K
流入下水ふるい無	10	1	5	0.43	0.86
流入下水 22 μm	10	3.3	5	0.20	1.32
処理水 ふるい無	1	1	5	0.52	0.10
処理水 22 μm	1	2.1	5	0.46	0.19

4. おわりに

本検討において、大阪市立大学医学部 井関 基弘先生、木俣 勲先生には多くのご指導、ご協力を得ました。ここに記して感謝いたします。

(参考文献) 1) J. E. Aldom and A. H. Chagla, "Recovery of Cryptosporidium oocyst from water by a membrane filter dissolution method" Letters in Applied Microbiology, Vol. 20, pp. 186~187(1995)

・クリプトスポリジウム

測定方法

クリプトスポリジウム測定方法

クリプトスポリジウムのオーシストは、試料をろ過濃縮あるいは遠心分離濃縮(Percoll蔗糖浮遊法による前処理)し、間接蛍光抗体染色を行って落射蛍光顕微鏡による蛍光観察及び微分干渉観察という手順で計数した。

(1) 試 薬

- ・精製水：ミリ-Qを使用。
- ・95%のエタノール：95%のエタノールをそのまま使用。
- ・70%のエタノール：95%のエタノールを精製水で希釈。
- ・アセトン：アセトンを原液(95%以上で可)のまま使用。
- ・10%リン酸緩衝ホルマリン溶液：リン酸一水素ナトリウム(Na_2HPO_4)0.762 g、リン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)0.019 g、ホルマリン100m lに精製水を加え、全量を1 lとした。
- ・リン酸緩衝貯蔵原液：塩化ナトリウム(NaCl)80 g、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)2 g、リン酸一水素ナトリウム($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)29 g、塩化カリウム(KCl)2 gに精製水を加え、全量を1 lとした。
- ・リン酸緩衝生理食塩水(PBS)：リン酸緩衝貯蔵原液を10倍に希釈し、0.1Nの塩酸又は水酸化ナトリウムを用いてpHを7.4に調整。使用時に孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下のフィルターでろ過した。
- ・Percoll蔗糖液(比重1.10)：比重1.13のPercoll 45m lと精製水45m l及び10m lの2.5Mの蔗糖液を混合。孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下のフィルターでろ過。液体比重計で比重をチェック。比重は1.09～1.10の範囲内にした(1.09以下の場合には使用しない)。4℃で保存。1週間以内に使用。使用の際、室温にしておく。
- ・2.5Mの蔗糖液：温めた精製水40m lに85.58 gの蔗糖を溶かし、これに精製水を加え100m lにメスアップ。
- ・1%トリスル硫酸ナトリウム貯蔵液：トリスル硫酸ナトリウム1 gを精製水に溶かし、100m lにメスアップ。
- ・1% Tween 80貯蔵液：99m lの精製水に1.0m lのTween 80を添加。
- ・溶出液：1%トリスル硫酸ナトリウム貯蔵液100m l、1%のTween 80 100m l、Sigma Antifoam A(消泡剤)0.1m l、10倍のPBS100m lを500m lの精製水に溶かし、pHを7.4に調整後、1 lにメスアップ。使用時に孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下のフィルターでろ過し1週間以内に使用した。
- ・2% DABCOグリセロール封入液(DABCO Glycerol Mounting Medium2%)：あらかじめ95m lのグリセロールを温めておく。これに2 gのDABCOを入れ、溶けるまでマグネツクスターラー等で攪拌する(注意：吸湿性で引火しやすい。皮膚や目に触れないように、吸い込まないように)。最終的にグリセロールを加え100m lとした。作成してから6ヶ月経過したものは使用しない。室温保存。
- ・1%牛の血清アルブミン(BSA)：1 gの牛血清の結晶を1倍のPBS 85m lに入れ、マグネツクスター

ラーで攪拌した。牛血清を溶かしたあと、PBSで100mℓにメスアップ。0.22μmのメンブレンフィルターでろ過滅菌し、滅菌した容器に保存。作成してから速やかに使用。4℃で保存。

- ・エタノール・グリセロール混合液(脱水液)：エタノール(99.5%)の適量とグリセロール5mℓ、精製水の適量を混合して全量100mℓとして、所定のエタノール濃度(10、20、40、80、95%)の脱水液を調製し、孔径0.45μm以下のフィルターでろ過した。
- ・間接蛍光抗体染色キット：HYDROFLUOR-Combo, ENSYS INC.を使用した。凍結させないように2～8℃で冷蔵保存。このキットは、一次抗体キット原液(PAR:Primary Antibody Reagent)、二次抗体キット原液(LR:Labeling Reagent)、ヤギ血清原液(NGS:Normal Goat Serum)、クリフトスホリジウム・オシストとジアルジアのシストの陽性試料(PAC:Positive Antigen Control Reagent、ホルマリン固定)より構成されている。

(2) 器 具

- ・ろ過器：熱処理可能なもの(試料濃縮用、フィルター径90mm)
- ・ろ過器：マニホールド等(多検体用)、フィルターホルダー等(熱処理可能なもの、蛍光抗体染色用、フィルター径25mm)
- ・遠心分離器：1,050×Gで多本掛け水平式(ブレーキ解除の行えるもの)
- ・恒温器：40℃前後に設定可能なもの
- ・落射蛍光顕微鏡：オリンパスBX60、微分干渉装置付きで倍率400倍(油浸観察)及び1000倍(油浸観察)まで可能、マイクロメーターを備えたもの
- ・液体比重計：測定範囲が1.06～1.12
- ・先の細くなったピンセット
- ・先のとがっていないフィルター用ピンセット
- ・ピペッター(試薬及び試料分注用)
- ・ふるい(目開き22μm、ステンレス製)

(3) 消耗品

- ・顕微鏡スライドガラス：52mm×76mm
- ・カバーガラス：30mm×30mm
- ・フィルター：ミリポア社製、直径90mm、材質セルロース混合エステル、孔径3.0μm(試料濃縮用)
- ・フィルター：アドバンテック社製、直径25mm、材質セルロースアセート、孔径0.2μm(蛍光抗体染色用)
- ・支持フィルター：ミリポア社製、直径25mm、材質セルロース混合エステル、孔径0.3μm
- ・尖底遠心管：ポリプロピレン製で容量が50mℓ(キャップ付きのもの)
- ・ネイルエナメル等：ネイルエナメル等透明な固定液あるいは透明なセロテープ

(4) 試験操作

① 試料の濃縮(オシスト集積液の作成)

1) 試料のろ過濃縮

セルロース混合エステルディスクフィルター(直径90mm、孔径 $3.0\mu\text{m}$)で試料^{注1}をろ過した。ろ過水量は概ね流入下水の場合数100mℓ、処理水の場合には数ℓ～数10ℓを目安とした。また、流入下水等の夾雑物の多い試料については、ふるいにより夾雑物の除去^{注2}を行った。ろ過水量を多くしたい場合には、濃縮用フィルターを数枚用いる。ろ過した後フィルターを丸めて50mℓ尖底遠心管(遠心管1本にフィルター1枚)に入れ、アセトンを加えて遠心管のキャップを閉めてフィルターを溶解してから、 $1,050\times G$ で10分間、遠心分離した。尚、遠心分離を行う際にはフレイキを使用しない。上澄液のアセトンを吸引除去して下層の5mℓを残し再度、アセトン45mℓ加えて再懸濁させ、遠心分離を繰り返す。上澄液のアセトンを吸引除去して下層の5mℓを残し、95%濃度のエタノール、70%濃度のエタノール、溶出液で同様な操作を繰り返し、最終的に5mℓのオシストの集積液を作成した。尚、直ちに間接蛍光抗体染色を行えない場合には、70%濃度エタノールの遠心分離操作までとし、遠心分離後、上澄液45mℓを取り除き再懸濁させた後、4℃で保存した。

流入下水等の試料でオシスト集積液中の懸濁物質が多い場合には、間接蛍光抗体染色を行う際、フィルターへの通水量が少量となることから、ふるいを用いて集積液中の懸濁物の除去を行った。この場合、オシストの回収率は若干低下^{注3}するが、蛍光染色用フィルターへの通水量が多くなることから、オシストの検出効率が向上するものと考えられた^{注4}。

2) 試料の遠心分離濃縮

上記1)のろ過濃縮以外に、遠心分離を行って試料の濃縮を行った^{注5}。対象試料としては、主に懸濁物の多い河川水である。まず、試料を $1,050\times G$ で10分間、遠心分離を行い沈査を回収し、沈査と等量の10%リン酸緩衝ホルマリン溶液を加えオシストを固定した。この固定液2mℓ(2mℓを越えない)を50mℓ尖底遠心管にとり、20mℓになるよう溶出液を添加しミキサーでよく攪拌した。この固定液と溶出液の混合液の下層に比重を1.10に調整(調整毎にかならず比重をチェック)したPercoll蔗糖液30mℓを界面を乱さないよう丁寧に加え $1,050\times G$ で10分間、遠心分離(密度勾配遠心処理による沈査とオシストの分離)を行った。尚、遠心分離を行う際には界面を乱さないよう徐々に回転数を上昇させるとともに、停止の際にもフレイキを使用しない。遠心分離後、遠心管の中間付近に界面層が生成されるので、上層の懸濁層20mℓと中間の界面層5mℓを50mℓ尖底遠心管に採取、溶出液を加えて50mℓとし再度遠心分離を行った。遠心分離後、上層の上澄液45mℓを取り除き5mℓのオシスト集積液を作成した。

注1：試料採取後は保冷して持ち帰り、冷暗所(又は冷蔵)に保存して速やかに処理する(24時間以内)。放流水等で残留塩素がある場合には、チオ硫酸ナトリウム液等を用い中和した。

注2：試料中の夾雑物を除去することにより、試料濃縮用フィルターの枚数を少なくすることができる。

注3：ふるいの目開きに幅によって、オシストの回収率や蛍光染色用フィルターへの集積液通水量が増減する。

注4：流入下水等の試料でオシスト集積液中の懸濁物質が多い場合には、間接蛍光抗体染色を行う際、染色用フィルターへの通水量が少量となり分析水量を多くできない。また、染色用フィルターへの通水量を多くすると、懸濁物の影響によりオシストの回収率が低下する可能性がある。

注5：懸濁物の少ない河川水、下水処理水や砂ろ過水等の高度処理水については、遠心分離を行っても沈査が生成されないことから、この方法は適さない。しかし、懸濁物の多い河川水等の試料ではろ過水量が多くできないことから、遠心分離濃縮の方が適している場合がある。

② 間接蛍光抗体染色

1) メンブレンフィルターの準備

必要な枚数^{注1}のフィルター(蛍光抗体染色用)及び支持フィルターを別々に1倍のリン酸緩衝液(PBS)で満たされているペトリ皿等に浸した。先の鈍なフィルターばさみを使って、1枚ずつ緩衝液の表面にフィルターを水平におとす。フィルターが湿ってきたら、フィルターばさみでフィルターを押さえて沈ませた。使用する前に少なくとも1分以上フィルターを浸した。

2) 間接蛍光抗体染色の実施

ろ過器にフィルターを設置した後、BSA液2mℓでフィルターを洗浄した。上記①の1)あるいは2)で作成したオシスト集積液を、フィルターで適量^{注2}ろ過し、BSA液2mℓでフィルター上の試料を湿润後、ゆっくりと吸引した。同様に、陽性試料(PAC液)を希釈調製したものと陰性試料についても行った。NGS液0.5mℓをフィルターに載せ、数分間放置後、吸引してからPAR液0.5mℓをフィルターに載せて一次染色した(室温で25分間)^{注3}。PBS液2mℓで5回吸引洗浄してから、LR液0.5mℓをフィルターに載せて二次染色した(室温、25分間で遮光)^{注3}。次に、PBS液2mℓで5回吸引洗浄してから、10%脱水液1mℓを加えてゆっくりと吸引し、20%、40%、80%、95%と脱水液の濃度を徐々に高めて、同様の操作を繰り返した。

スライドガラス上に、40℃前後で保温しておいたDABCO液数滴を滴下し、フィルター捕捉面が上になるようにDABCO液上にフィルターをのせ、40℃前後で20～30分間湿润保温処理した(フィルターが白く乾燥しないよう注意)。フィルターが半透明になったことを確認した後、DABCO液2～3滴、適量をフィルター上面に滴下し、カバーガラスをかけて封入し、その周囲を透明なセロテープで封じ、プレパラートを作製した。尚、DABCO液の滴下には気泡が入らないように注意。直ちに検鏡が行えない場合には、蛍光、微分干渉観察するまで、乾燥しないよう、遮光して4℃で保存した(5～7日以内に検鏡)。

注1：試料の性状や濃縮水量、蛍光染色用フィルターに通水する水量によって異なるが、フィルターの枚数は数枚から数十枚必要。

注2：オシスト集積液中に懸濁物が多く存在する場合、染色用フィルターへの通水量を多くすると、懸濁物の影響によりオシストの回収率が低下する可能性がある。また、オシストを検鏡（微分干渉時）する際に内部構造の観察がしづらくなる。

注3：染色操作においてフィルター上の染色液がなくならないように注意。

〈参考文献〉

- 1) J.E.Aldom and A.H.Chabla, "Recovery of *Cryptosporidium* oocyst from water by a membrane filter dissolution method" *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 20, pp. 186~187 (1995)
- 2) *Federal Register* 59, 28 Thursday February 10 (1994)
- 3) 諏訪 守ら「下水中からのクリプトスポリジウム濃縮方法について」、第31回日本水環境学会年会講演集(1997)

- ・ クリプトスポリジウムに関する
新聞記事



追加処理の検討を

下水協の
検討委
クリプト対策で中間報告



金子 謙南大教授

下水道におけるクリプトスポリジウムへの対応策を検討している日本下水道協会の「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会」(委員長 金子光美・摂南大学教授)は二十八日までに、集団感染発生時の凝集剤添加などの追加的処理や再利用のための処理水の供給停止などを検討を進めていた。

下水道におけるクリプトスポリジウムの検出状況は、昨年九月から十月にかけて下水処理水を再利用している全国六十七カ所で実施した濃度測定の結果、全体の二割程度で検出され、濃度範囲は流入下水

で八・五〇個／ℓ、処理水で〇・〇五～一・六個／ℓとなつていて、この結果について中間報告では、米国等で報告されている数値よりかなり低く、直接飲用に供されるものでないため、検出されたことを直ちに問題視すべきではないと強調。クリプトスポリジウムの除去法については、海外の研究事例で濃度活性汚泥法で八〇～九〇％程度除去されることから、下水処理によってクリプトスポリジウムの水域への負荷は大きく削減されると指摘。さらに低下させる手法として追加的に凝集

剤添加や砂ろ過法などが考えられるとしている。
下水道管理上の対応方策について中間報告では、平常時と集団感染発生時を区別し、集団感染発生時には、放流先の水利用状況に応じた緊急的な追加処理の検討や、処理水の再利用を行っている場合には処理水の供給停止、利用制限、追加処理等の措置も検討すべきとしている。
同検討委では今後、環境基準設定等の動きも勘案しながら、ガイドライン策定や除去法の技術的検討を進めるほか、シアルジアなどクリプトスポリジウム以外の病原性微生物についても対象を広げ対応策を検討していく方針である。

日本下水道新聞

平成9年8月4日

(1997年)

発行所

日本水道新聞社

本社：〒160 東京都新宿区西新宿6-6-2
TEL: 03(3340)4731 FAX: 03(3340)5388
支社：〒102 東京都千代田区九段南4-8-9
TEL: 03(530)4611 FAX: 03(530)4612
支社：〒530 大阪市北区東瓦町3-22
TEL: 06(365)5033 FAX: 06(365)5641
支社：〒460 名古屋市中区丸ノ内2-6-7
TEL: 052(231)6392 FAX: 052(231)2680

ガイドラインの策定など

下水道のクリプト対策で中間報告

建設省下水道部は七月二十八日「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会」の中間報告をまとめた。昨年夏に埼玉県越生町で水道水が原因のクリプトスポリジウム感染症が発生したことから、日本下水道協会内に検討委員会（委員長：金子光美・摂南大学教授）を設置し、下水道における対応について検討している。中間報告では、①環境基準等の設定状況を勘案し、同中間報告を踏まえたガイドラインの策定を検討する。②クリプトスポリジウムに関するリスクアセスメントのあり方の検討を深めるとともに、クリプトスポリジウムの除去方法等の検討を推進する。③クリプトスポリジウム以外の病原性微生物の対応策を検討する——としている。

クリプトスポリジウムは、人間やほ乳動物に寄生する耐塩素性の病原性原虫で、人間が感染すると、下痢や腹痛などの症状を起す。

昨年九月から十月にかけて全国六十七カ所の下水処理場で下水中のクリプトスポリジウムの濃度測定を行った結果、全体の二割で検出され、濃度は流入下水で八〜五十個／リ、処理水で〇・〇五〜一・六個／リであった。この結果は米国等で報告されている数値よりかなり低く、処理水は直接飲用されないため、直ちに問題視すべきでないとしている。

その他の中間報告の指摘事項は次の通り。

海外での研究事例によると、クリプトスポリジウムは、標準活性汚泥法によって八〇〜九九％程度除去されることがから、下水処理によって、クリプトスポリジウムの水質への負荷は大きく削減される。クリプトスポリジウムの濃度をさらに低下させる手法としては、追加的に流入下水や活性汚泥混合液に凝集剤を添加する方法および砂ろ過を行う方法等が考えられる。しかし、クリプトスポリジウムの除去方法等については、汚泥中クリプトスポリジウムの不活化も含めて、今後さらに実験的検討を行う必要がある。

クリプトスポリジウムへの下水道管理上の対応方法については、平常時と集団感染発生時を区別して、以下のような考え方に基くことが適当であり、今後さらに検討を深めるべきである。

①平常時においては、放流先である公共用水域における環境基準設定状況等を踏まえつつ、処理目標水質については、水の利用形態を考慮したリスクアセスメントの手法を適用することについて検討することが適当である。また、関係部局との連絡体制を整備することが必要である。さらに、感染者に対して、下水道への排出について指導を行うことについても検討する必要がある。

②集団感染発生時には、高い濃度のクリプトスポリジウムが下水処理場に流入するたため、放流先の水利利用状況等に応じた緊急的な追加処理を行うことを検討するとともに、発生する汚泥の処理についても注意する必要がある。また、関係部局が相互に情報を交換し、全体的に緊急的な対応をとることにより、水域の感染リスクを低減させる必要がある。

③処理水の再利用を行うている場合には、下水道部局と利用者の間で連絡体制を整備するとともに、クリプトスポリジウム濃度によっては、処理水の供給停止、利用制限、追加処理等の措置をとることについても検討すべきである。

水道産業新聞

水道産業新聞社

大 阪：〒530 大阪市北区堂山町1-5
電話(06)312-3871-3
FAX番号(06)312-3874
東 京：〒108 東京都港区芝浦2-15-16
電話(03)3454-7101-5
FAX番号(03)3454-3443
名古屋：〒451 名古屋市中区名駅2-4-3
電話(052)551-3532
FAX番号(052)562-4761



営業本部
名古屋市中川区湊池町13番1号
電話(052)3662155 6664

パイプ・バルブ・マンホール

水道、下水道
水の総合専門紙

日本専門新聞協会加盟

クリプトの検査法確立へ

厚生省 監視と制御で研究班

厚生省は、クリプトスポリジウム原虫等の検査方法の開発や改良を行うため、「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班」を発足させる。現在用いられている膜ろ過「アセトン」法にかわる、迅速で高い回収率をもった検査方法の開発を進めるほか、水道水の常時監視を可能とするため、クリプトスポリジウム等の代替指標を開発することとなっている。クリプト等の感染性微生物に宣戦布告をしている厚生省が、包囲網を狭めるため、着々と布石を打っているといえる。

迅速、高回収率めざす



国包章一氏

現在クリプトスポリジウム
の検査は「水道におけるクリ

プトスポリジウム暫定対策指針」に基づき、膜ろ過「アセトン」法が用いられている。しかしこの検査法は、回収率が二〇～五〇％と低いうえ、顕微鏡での最終的な確認も極めて難しいなど、プロセス全体に多大な熟練を要するといわれている。検査方法に誤りが

あり、浄水からクリプトスポリジウムが検出されたとして混乱を生じた例もあった。クリプトスポリジウムやシアルジア等の原虫による水系汚染が世界的な問題となっておりにもかかわらず、水道水における迅速で的確な検査方法は未だに確立されていない

という現状だ。こうしたことから厚生省では、迅速で簡便、かつ正確な検査方法の開発を促進するため、国立公衆衛生院の国包章一・水道工学部長を主任研究者とする研究班を組織し、感染性原虫の検査方法の開発・改良に取り組むことにしたものの、研究班は、クリプトスポリジウムなど病原性微生物の専門家十名の学識者で構成

されている。研究班では本年度から三年程度を目途に、①現在用いられている膜ろ過「アセトン」法にかわるオシストの迅速で高い回収率を有する分離・濃縮法の開発の蛍光抗体法にかわる検査方法の開発を進める。さらに、水道水の常時監視を可能とするため、クリプトスポリジウム等の代替指標を開発し、常時監視体制の

構築を目指す。オシストの高い回収率を可能とする方法としては、ビーズ法等も検討される見込みだ。また、常時監視のための代替指標では、粒径カウンターの採用などが候補としてあがっている。

研究班の初会合は、九月十九日(金)午後一時より、国立公衆衛生院で開かれる。

クリプト監視と制御に関する研究班

主任研究者「国包章一・国立公衆衛生院水道工学部長
委員「荒木國典・国立公衆衛生院衛生微生物学部長
井関基弘・大阪市立大学医学部助教授「遠藤卓郎・国立感染症研究所寄生病原体動物学部長「金子光美・摂南大学工学部教授「黒木俊郎・神奈川県衛生研究所細菌病理部臨床血清科主任研究員「西尾治・国立公衆衛生院衛生微生物学部ウィルス室長「平田由・麻生大学環境保健学部長「眞柄泰基・北海道大学工学部研究科教授「山崎省二・国立公衆衛生院衛生獣医学部長