下水中の *Giardia* シストおよび *Cryptosporidium* オーシスト濃度と下水処理における除去性

橋本 温* 平田 強** 土佐 光司**
眞柄 泰基*** 大垣 眞一郎****

Occurrence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Sewage and Their Reduction in Treatment Process

Atsushi HASHIMOTO*, Tsuyoshi HIRATA**, Koji TOSA**,
Yasumoto MAGARA*** and Shinichiro OHGAKI****

* Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University, 1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229 Japan

** Department of Environmental Health, College of Environmental Health, Azabu University, ditto

*** Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108 Japan

**** Department of Urban Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113 Japan

Abstract

In order to investigate the occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw sewage and the removal in sewage treatment processes, we conducted a field survey at 9 sewage treatment plants. The results can be summarized as follows: 1) In all plants, *Giardia* cysts were detected in raw sewage and effluent of primary sedimentation. Cyst densities in raw sewage ranged from 130 to 5,500 cysts·l⁻¹ (geometric mean 1,350 cysts·l⁻¹). Cyst densities in effluent of primary sedimentation ranged from 150 to 5,200 cysts·l⁻¹ (geometric mean 800 cysts·l⁻¹). 2) *Cryptosporidium* oocysts were detected from only one raw sewage sample with the density of 28 oocysts·l⁻¹. 3) Indicator bacteria counts tested, *C. perfringens* spores, coliforms and *E. coli*, were statistically correlated with *Giardia* cyst densities and the most significant relationship was observed between *C. perfringens* spore counts and *Giardia* cyst densities. 4) No correlation was observed between *Giardia* cysts removal and indicator bacteria removal. However, significant relationship was observed between average removal of *C. perfringens* spores and *Giardia* cysts. These results indicated that *C. perfringens* spores can be useful indicator for the evaluation of protozoan densities and removal. 5) Turbidity appeared to be the most appropriate indicator for *Giardia* cysts removal in activated sludge treatment process.

Key words : *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, turbidity, protozoan pollution

1. はじめに

近代の上下水道の普及は水系感染症の制御に大きな成功を収めた。そのため、わが国では水系感染症の流行は過去の出来事と思われがちである。ところが近年、細菌に代表されるような従来型の感染症と異なり、原虫やウイルスなどによる水系感染症が報告されるようになってきた。このうち本研究で取り上げる *Giardia lamblia* および *Cryptosporidium parvum* はヒトなどのほ乳類に広い宿主域を持つ腸管寄生性の原虫で、激しい下痢を伴った消化器系の疾病を引き起こす。特に AIDS 患者などの免疫不全患者が *C. parvum* に感染した場合には、効果的な化学療法剤がないため死に至るケースもまれではない。また、これらの原虫は最小感染量が小さいこと、塩素消毒に著しい耐性があり、浄水処理レベルの塩素濃度ではほとんど不活化されないことなど、通常の病原細菌とは大きく

異なる特徴があり、水質衛生上重要な原虫である¹⁻³⁾。米国ではこれらの原虫による水系感染の集団発生が相次いで報告されており、1993年と1994年の2年間だけでも、凝集沈殿、濾過、塩素消毒された水道水を感染源とする *Cryptosporidium* 集団感染が3件、*Giardia* 集団感染が1件発生している¹⁾。また、わが国でも、1994年に神奈川県平塚市で下水に汚染された受水槽を感染源とした *Cryptosporidium* 集団感染が発生⁴⁾、1996年には埼玉県越生町でわが国初の水道水による *Cryptosporidium* 集団感染が発生した。

これらの原虫のわが国における感染状況調査や疫学調査は少なく、環境水における分布などの基礎的な情報も全くない。そこで本研究では、原虫の主要な汚染源の一つであると考えられる下水の *Giardia* シストおよび

* 麻布大学大学院環境保健学研究科環境保健科学専攻 〒229 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

** 麻布大学環境保健学部環境保健学科 同上

*** 国立公衆衛生院水道工学部 〒108 東京都港区白金台4-6-1

**** 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 〒113 東京都文京区本郷7-3-1

Cryptosporidium オーシストの濃度を実態調査した。

2. 方法

2.1 試料

都市下水を標準活性汚泥法で処理している下水処理場 9 カ所の流入下水 22 試料, 最初沈殿池流出水 23 試料, 放流水 23 試料(塩素消毒なし 13 試料, 塩素消毒あり 10 試料)を用いた。試料はポリ瓶(1l)に採取し, クーラーバッグで保冷しながら研究室に持ち帰った。持ち帰った試料はその一部を指標細菌試験に用い, 残りの試料は遠心分離機で遠心(1,050×g, 10min)して沈渣を集め, これに沈渣と等量の 10%中性緩衝ホルマリン溶液を加え固定し, 冷蔵保存した。

2.2 原虫試験

2.2.1 ショ糖浮遊遠心法⁵⁾

ホルマリン固定した試料の一部(沈渣として 1ml を超えない程度)をスピッツ型ポリプロピレン遠心管(50ml)にとり, PBS(0.1%Tween80 含)に再懸濁して 20ml としたのち, 試料層の下にシリンジと内径 2mm のシリコンチューブを用いて percoll-ショ糖溶液(比重 1.10)をゆっくり注入した。試料層とショ糖層の界面を乱さないように注意しながら遠心(1,050×g, 10min)したのち, 界面上部の試料層の全層をバスターピペットで別の遠心管に移した。これに PBS を加えて 50ml とし, 遠心(1,050×g, 10min)して上清を捨てた。ショ糖を除くためにこの操作を 3 回繰り返し, 最後に PBS で 50ml にして蛍光抗体染色用試料とした。

2.2.2 間接蛍光抗体法

あらかじめ撥水ペンで直径 1cm 程度の小円を描き, PBS に浸したセルロースアセテート製メンブランフィルター(孔径 0.2 μm, 直径 25mm, ADVANTEC TOYO 製)をフィルターホルダーにセットし, 撥水ペンで仕切った小円内で 1%BSA 溶液 1ml および試料の適量(200 μl~1ml)を汙過した。汙過後, フィルターをピンセットでスライドガラス上に置き, 汙過面に *Giardia* spp. と *Cryptosporidium* spp. を同時に染色できる検査キット, HYDROFLUOR COMBO KIT(ENSYS INC. 製)の一次抗体をのせ, 遮光して室温で 25 分反応させた。反応後, フィルターを再びフィルターホルダーにセットし, PBS を汙過して一次抗体を洗い流したのち, 一次抗体の場合と同様の操作で FITC により標識された二次抗体を反応させ, その後 PBS で洗浄した。スライドガラス上に DABCO-グリセロール封入剤(約 500 μl)をのせ, その上に抗体染色したフィルターをのせ, 加温してフィルターを透明化したのち, カバーガラスをかけ, 落射蛍光顕微鏡(B 励起, 10×20 の倍率)でフィルター全面を観察した。

FITC に特徴的に染色されて青リンゴ色の蛍光を発する 4~6 μm の類円形のものを *Cryptosporidium* オーシスト, 10~13 μm の楕円形のものを *Giardia* シストと推定し計数した。シストあるいはオーシストの計数値と試料の濃縮率および汙過量から試料中のシストまたはオーシスト濃度を算出した。

本法はフィルター上に捕捉された粒子を顕微鏡観察して定量する方法であるため, 検出限界は基本的に懸濁物質に依存する。このため, 試料によって検出限界値が異なり, 本研究での検出限界値は流入下水で 15~83 個・l⁻¹, 最初沈殿池流出水では 15~50 個・l⁻¹, 放流水では 1~8 個・l⁻¹ の範囲であった。

2.3 指標細菌試験

2.3.1 大腸菌, 大腸菌群⁶⁾

特定酵素基質培地を用いた 10 倍希釈 MPN 3 本法または 5 本法により大腸菌および大腸菌群試験を行った。

2.3.2 ウェルシュ菌芽胞⁶⁾

約 15ml の試料を滅菌した試験管にとり, 恒温槽を用いて 75°C, 10min 加熱したのち, 氷水で冷却した。冷却後, ハンドフールド改良寒天培地を用いた三重層法またはメンブランフィルター法でウェルシュ菌芽胞を測定した。

2.4 濁度⁶⁾

分光光度計を用いて波長 660nm の吸光度を測定し, 濁度を求めた。

2.5 除去指数の算出

Giardia シスト, 指標細菌および濁度の除去性を次式(1)式で示される除去指数 $R(\log_{10} \text{ removal})$ で評価した。

$$R = -\log_{10} (C_{out} / C_{in}) \quad (1)$$

ここで R : 除去指数, C_{in} : 処理プロセス流入水中の濃度, C_{out} : 処理プロセス流出水中の濃度である。

3. 結果

3.1 原虫濃度

3.1.1 *Giardia* シスト

下水および処理水中の *Giardia* シスト, 指標細菌および濁度の値を Table 1 に示した。*Giardia* シストは調査したすべての処理場の流入下水および最初沈殿池流出水から検出された。それぞれの試料の *Giardia* シスト濃度は, 流入下水で 130~5,500 個・l⁻¹(幾何平均 1,350 個・l⁻¹), 最初沈殿池流出水で 150~5,200 個・l⁻¹(幾何平均 800 個・l⁻¹)であり, 流入下水と最初沈殿池流出水に有意な差はなかった。放流水では塩素消毒をせずに放流している 13 試料のうち 9 試料から検出され, その濃度は 13~75 個・l⁻¹ であった。残りの 3 試料からは検出されなかった(検出限界は 5~6 個・l⁻¹)。また, 塩素消毒した放流水 10 試料では 9 試料から検出され, その濃度は 8~36 個・l⁻¹(幾何平均 13 個・l⁻¹) であった。流入下水中の *Giardia* シストは, 米国⁷⁾で 683~3,750 個・l⁻¹, カナダ⁸⁾では 26~3,022 個・l⁻¹(平均 1078 個・l⁻¹)と報告されているが, 今回の調査では, 下水中の *Giardia* シスト濃度はわが国もほぼ同様のレベルにあった。

3.1.2 *Cryptosporidium* オーシスト

Cryptosporidium オーシストは, *Giardia* シストと異なり, 試験した 9 カ所のうち 1 カ所の処理場(No.2)の流入下水 1 試料から 28 個・l⁻¹ 検出されただけで, 他の試料からは検出されなかった(検出限界は, 流入下水で 15~83 個・l⁻¹, 最初沈殿池流出水では 15~50 個・l⁻¹, 放流水では 0.9~8 個・l⁻¹)。そこで, 処理場 No.1 の 3 回目および No.2~8 の 2 回目の調査では流入下水および最初沈殿池流出水(それぞれ 9 試料)について検出限界を 16 個・l⁻¹ として調査したが, いずれからも検出されなかった。*Cryptosporidium* オーシストは, 米国 12 カ所の処理場の流入下水で 840~13,700 個・l⁻¹(平均 5,300 個・l⁻¹)⁹⁾などの報告があり, *Giardia* シストとほぼ同じオーダーで検出されている。わが国の都市下水の *Cryptosporidium* オーシスト濃度については 10¹ 個・l⁻¹ 程度か, それ以下と考えられ, 米国の例より 1~2 オーダーは少ないことが示唆された。

3.2 *Giardia* シストと指標細菌および濁度の関係

3.2.1 濃度

流入下水, 最初沈殿池水および最終沈殿池流出水(塩素

Table 1 Occurrence of *Giardia* cysts and indicator bacteria in raw and treated sewage

Site No.	Raw sewage					Effluent of primary sedimentation				
	Density of				Turbidity (unit)	Density of				Turbidity (unit)
	<i>Giardia</i> cysts (N/L)	<i>C.perfringens</i> spores (cfu/ml)	coliforms (MPN/ml)	<i>E.coli</i> (MPN/ml)		<i>Giardia</i> cysts (N/L)	<i>C.perfringens</i> spores (cfu/ml)	coliforms (MPN/ml)	<i>E.coli</i> (MPN/ml)	
1	2,800	N. T.	N. T.	N. T.	98	830	N. T.	N. T.	N. T.	96
	4,000	N. T.	N. T.	N. T.	120	3,000	N. T.	N. T.	N. T.	120
	1,800	670	3,300,000	330,000	140	1,800	520	790,000	240,000	110
2	4,500	N. T.	N. T.	N. T.	140	3,000	N. T.	N. T.	N. T.	140
	2,300	400	1,300,000	130,000	96	500	200	490,000	170,000	67
3	400	420	N. T.	N. T.	130	1,000	230	N. T.	N. T.	130
	770	N. T.	2,400,000	330,000	110	880	N. T.	810,000	N. T.	83
4	400	N. T.	N. T.	N. T.	180	400	N. T.	N. T.	N. T.	85
	640	1,300	2,400,000	78,000	220	800	560	230,000	78,000	82
5	1,600	600	930,000	750,000	260	1,400	550	2,400,000	930,000	150
	2,300	1,500	240,000	130,000	120	5,200	820	790,000	220,000	110
6	1,800	950	11,000,000	1,500,000	300	310	500	4,600,000	380,000	96
	5,500	1,700	490,000	170,000	190	4,000	1,800	330,000	31,000	130
7	130	20	930,000	230,000	180	150	20	1,500,000	36,000	74
	N. T.	3,200	1,700,000	340,000	1,000	420	230	490,000	170,000	160
	1,500	550	790,000	240,000	120	740	460	490,000	40,000	60
8	1,200	30	29,000,000	930,000	260	250	40	430,000	400,000	160
	2,800	880	1,700,000	170,000	190	2,000	220	1,100,000	170,000	150
	3,900	1,200	310,000	240,000	160	780	560	33,000	7,800	53
9	830	780	7,900,000	400,000	110	490	460	3,300,000	160,000	120
	960	N. T.	N. T.	N. T.	110	510	N. T.	N. T.	N. T.	110
	670	150	33,000	6,800	95	280	110	49,000	4,000	62
	950	360	350,000	130,000	60	280	240	350,000	130,000	73
GM	1,353	508	1,261,339	220,552	154	801	289	567,682	98,831	100
SD	1,442	754	6,904,239	364,713	183	1,307	400	1,210,763	221,885	32
n	22	17	17	17	23	23	17	17	16	23

Site No.	Effluent of secondary sedimentation					After chlorination				
	Density of				Turbidity (unit)	Density of				Turbidity (unit)
	<i>Giardia</i> cysts (N/L)	<i>C.perfringens</i> spores (cfu/ml)	coliforms (MPN/ml)	<i>E.coli</i> (MPN/ml)		<i>Giardia</i> cysts (N/L)	<i>C.perfringens</i> spores (cfu/ml)	coliforms (MPN/ml)	<i>E.coli</i> (MPN/ml)	
1	14	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	-	-	-	-	-
	40	N. T.	N. T.	N. T.	3	25	N. T.	N. T.	N. T.	<1
	<3	2.2	1,700	790	<1	-	-	-	-	-
2	190	N. T.	N. T.	N. T.	9	8	N. T.	N. T.	N. T.	<1
	25	6.8	4,900	79	<1	-	-	-	-	-
3	<5	7.7	N. T.	N. T.	6	-	-	-	-	-
	16	N. T.	780	>100	2	-	-	-	-	-
4	<5	N. T.	N. T.	N. T.	3	-	-	-	-	-
	63	1.1	1,800	200	2	-	-	-	-	-
5	25	9.0	1,500	150	6	25	19.0	N. T.	N. T.	5
	13	11.0	3,300	780	1	-	-	-	-	-
6	13	5.0	930	460	3	8	4.0	93	2.4	4
	<3	15.0	790	230	1	6	12.0	490	3.3	1
7	<6	0.4	240	43	2	-	-	-	-	-
	75	8.5	2,400	170	23	-	-	-	-	-
	13	9.4	13,000	1,700	3	-	-	-	-	-
8	16	0.4	2,400	240	7	-	-	-	-	-
	18	6.9	2,400	270	4	-	-	-	-	-
	5	8.6	3,100	170	3	<2	0.5	N. T.	N. T.	<1
9	71	29.0	N. T.	4,600	12	36	15.0	200	2	2
	30	N. T.	N. T.	N. T.	12	16	N. T.	N. T.	N. T.	12
	8	9.5	790	79	4	8	10.3	3.3	0.078	4
	34	76.0	5,400	1,300	12	9	1.9	N. T.	N. T.	12
GM	24	6.0	1,880	316	4	13	5.4	74.1	1.05	4
SD	42	17.2	2,980	1,106	5	10	6.5	183.1	1.18	4
n	18	17	16	16	20	9	7	4	4	7

N.T.:Not tested. -;Discharged without chlorination

Fig. 1 Relationship between densities of *E. coli* or coliforms and *Giardia* cysts Fig. 2 Relationship between densities of *C. perfringens* spores and *Giardia* cysts Fig. 3 Relationship between turbidity and *Giardia* cyst densities

消毒なし)より得られたデータについて *Giardia* シスト濃度と指標細菌濃度および濁度の関係を Fig.1~3 に示した。*Giardia* シスト濃度は大腸菌群、大腸菌、ウェルシュ菌芽胞および濁度のいずれとも相関が認められたことから回帰式を求めた。結果は次式(2)~(5)のとおりである。

$$C_G = 0.2214 C_{Co}^{0.4299} \quad (r^2 = 0.6963) \quad (2)$$

$$C_G = 0.0264 C_{Ec}^{0.4998} \quad (r^2 = 0.6969) \quad (3)$$

$$C_G = 0.0127 C_{Cp}^{0.8594} \quad (r^2 = 0.7875) \quad (4)$$

$$C_G = 4.592 T^{1.111} \quad (r^2 = 0.7856) \quad (5)$$

ここで C_G : *Giardia* シスト(個・ l^{-1}), C_{Co} : 大腸菌群(MPN・ l^{-1}), C_{Ec} : 大腸菌(MPN・ l^{-1}), C_{Cp} : ウェルシュ菌芽胞(cfū・ l^{-1}), T : 濁度(度)である。

三種の指標細菌の中で、*Giardia* シストと最もよい相関を示したのはウェルシュ菌芽胞で、寄与率は0.7875であった。また、べき指数も0.8594と1に近く、ウェルシュ菌芽胞と *Giardia* シストの濃度変化はよく一致していた((4)式)。一方、大腸菌群と大腸菌でもウェルシュ菌芽胞より若干低いものの *Giardia* シストとの間に相関が認められた(寄与率0.6963と0.6969)。しかし、べき指数は、それぞれ0.4299と0.4998であり、ウェルシュ菌芽胞の場合よりも明らかに小さかった((2)~(3)式)。濁度もウェルシュ菌芽胞と高い相関が認められ、寄与率は0.7856であった。また、べき指数は1.111と1近傍の値であった((5)式)。このように、ウェルシュ菌芽胞と同様に濁度と *Giardia* シストの濃度変化もよく一致していた。

3. 2. 2 除去指数

Giardia シストと指標細菌および濁度の除去性を比較するため、最初沈殿池流出水の濃度をベースに(1)式で活性汚泥法(曝気槽+最終沈殿池)による除去指数を算出し、*Giardia* シストと各指標細菌の除去指数の関係を Fig.4~6 に示した。回帰式は次式(6)~(9)で表された。

$$R_G = -0.0257 R_{Co} + 1.566 \quad (r^2 = 0.0011) \quad (6)$$

$$R_G = 0.1843 R_{Ec} + 1.970 \quad (r^2 = 0.0062) \quad (7)$$

$$R_G = 0.6132 R_{Cp} + 0.623 \quad (r^2 = 0.2233) \quad (8)$$

$$R_G = 1.3615 R_T + 0.305 \quad (r^2 = 0.6132) \quad (9)$$

ここで R_G : *Giardia* シストの除去指数, R_{Co} : 大腸菌群の除去指数, R_{Ec} : 大腸菌の除去指数, R_{Cp} : ウェルシュ菌芽胞の除去指数, R_T : 濁度の除去指数である。

Giardia シストと指標細菌の除去指数の間には有意な相関は見られなかった(寄与率は大腸菌群0.0011, 大腸菌0.0062, ウェルシュ菌芽胞0.2233)。また、回帰式の傾きも小さく、*Giardia* シストの除去指数と指標細菌の除去指数の間には類似性は認められなかった((6)~(8)式)。一方、濁度と *Giardia* の除去指数の関係は(9)式であらわれ、両者の間に有意な相関が認められた(寄与率0.6132)。また、傾きは1.36と1に近い値となり、濁度と *Giardia* シストの除去指数の間には高い類似性が認められた。

3. 2. 3 平均除去指数

Giardia シスト、指標細菌および濁度の下水処理における平均的な除去性について比較するため、最初沈殿池流

Fig. 4 Relationship between $\log_{10}$ removal of *E. coli* or coliforms and *Giardia* cysts

Fig. 5 Relationship between $\log_{10}$ removal of *C. perfringens* spores and *Giardia* cysts

Fig. 6 Relationship between $\log_{10}$ removal of turbidity and *Giardia* cysts

出水の濃度をベースに(1)式で算出したすべての処理場の除去指数の平均値(平均除去指数)を算出し、Table 2に示した。

活性汚泥法(曝気槽+最終沈殿池)におけるウェルシュ菌芽胞の平均除去指数は *Giardia* シストとほぼ同じであり、わずか $0.12\log_{10}$ 大きいだけであったが、大腸菌群および大腸菌の平均除去指数は *Giardia* シストの平均除去指数より約 $1\log_{10}$ も大きかった。この傾向は塩素消毒後でさらに顕著になり、ウェルシュ菌芽胞の平均除去指数は *Giardia* シストとほとんど差はみられず、わずか $0.08\log_{10}$ の差に過ぎないのに対して、大腸菌群は $2.15\log_{10}$ 、大腸菌は $2.86\log_{10}$ も大きい値を示した。このように、*Giardia* シストとウェルシュ菌芽胞の除去指数には相関は認められなかったが、平均除去指数でみる限りは、両者の除去性はよく一致していた。しかしながら、*Giardia* シストと大腸菌群および大腸菌の除去性には大きな差異が見られた。濁度では、活性汚泥法(曝気槽+最終沈殿池)による平均除去指数が $1.51\log_{10}$ であり、*Giardia* シストと全く同値であった。また、塩素消毒後では *Giardia* シストより $0.46\log_{10}$ 小さく、 $1.37\log_{10}$ であった。濁度の除去もウェルシュ菌芽胞と同様に *Giardia* シストとよく一致していた。

Casson ら¹⁰⁾はカリフォルニアで活性汚泥法で処理を行っている処理場で、本研究と同じショ糖浮遊遠心法を用いて *Giardia* シスト濃度調査を行っている。そのデータから下水処理プロセスにおける *Giardia* シストの除去指数を求めると、最初沈殿は $0 \sim 0.5\log_{10}$ 、活性汚泥法(曝気槽+最終沈殿池)では $2.29 \pm 0.35\log_{10}$ となる。本研究では活性汚泥法による平均除去指数は $1.51 \pm 0.48\log_{10}$ 、塩素消毒を含めても $1.83 \pm 0.52\log_{10}$ であり、活性汚泥法による除去性に関してはカリフォルニアでの結果よりも平均でおおよそ $0.8\log_{10}$ 低い結果となった。

4. 考察

Cryptosporidium および *Giardia* は宿主特異性が低く、多種の動物に寄生するため、検出されたシストやオーシストに家畜やネズミ由来のものが含まれていることも考えられ、そのすべてがヒト由来とは限らない。しかしながら地域内のヒトを含む動物全体の感染率という観点でみれば、調査した都市下水から *Giardia* シストは常時検出されたものの *Cryptosporidium* オーシストはほとんど検出されなかったことから考えて、わが国での *Giardia* 感染率は米国と同様のレベルにあるが、*Cryptosporidium* 感染率は著しく低い(少なくとも1~2オーダー)ことが推察される。本研究では生育活性については測定していないが、*Giardia* シストの塩素抵抗性は非常に高く大腸菌の2,350倍であるといわれている²⁾ことや、英国で調査した42%の下水処理水から生育活性のある *Giardia* シストが検出されていること¹¹⁾から、公衆衛生的な見地からは、検出されたシストやオーシストの大部分が感染力を持っていると考えておく必要がある。本研究で放流水23試料中18試料で *Giardia* シストが検出され(陽性率78%)、その濃度は最大75個・ l^{-1} (幾何平均17個・ l^{-1})であった。放流先の利水状況にもよるが、これらの放流水が水道水源に放流された場合には汚染源となることは明らかであり、このことを念頭に置いて対応を検討する必要がある。

原虫検査は操作に熟練を要し、機材、試薬等が高価である上に回収率が不安定であることなど多くの難点があることから、可能であれば、操作が簡便で定量性の優れた

Table 2 Average $\log_{10}$ removal of *Giardia* cysts and indicator bacteria in conventional activated sludge treatment plants

	Average $\log_{10}$ removal			
	From primary effluents to secondary effluents	n	After chlorination	n
<i>Giardia</i> cyst	1.51 $\pm$ 0.48	18	1.83 $\pm$ 0.52	9
<i>C.perfringens</i> spore	1.63 $\pm$ 0.50	17	1.91 $\pm$ 0.61	7
coliforms	2.42 $\pm$ 0.70	17	3.98 $\pm$ 0.69	4
<i>E.coli</i>	2.49 $\pm$ 0.67	16	4.69 $\pm$ 0.45	4
Turbidity	1.51 $\pm$ 0.48	22	1.37 $\pm$ 0.41	7

ている細菌指標などの導入が望ましい。細菌に代表される従来型の腸管系病原微生物の汚染や除去の指標として、糞便汚染の指標である大腸菌群および大腸菌は効果的に機能しているが、大腸菌群および大腸菌の除去指数と *Giardia* シストの除去指数との間に相関は認められず、平均除去指数でみても塩素消毒前で約 $1\log_{10}$ 、塩素消毒後では約 $2\sim 3\log_{10}$ も大きい値となった。このことは大腸菌群や大腸菌を用いて原虫の除去を評価すると過大評価につながることになり、大腸菌群や大腸菌は十分な指標とはならないことを示唆している。

原虫による汚染やその除去の代替細菌指標としてウェルシュ菌やその芽胞が挙げられている。これはウェルシュ菌が腸管常在菌であることに加えて、下水を含む水環境における増殖性がないこと、生残性が高いこと、消毒剤耐性が高いことによる¹²⁻¹⁴⁾。本研究においてもウェルシュ菌芽胞と *Giardia* シストとの間に濃度に関して高い相関が認められ、回帰式のべき指数も 1 近傍の値となっていることから、ウェルシュ菌芽胞が原虫汚染指標として有効であることが示唆された。しかしながら、除去指数に関しては大腸菌群や大腸菌よりも高い相関はあったものの、代替指標となりうることを強く示唆するほどの関係は認められなかった。

その原因の一つとして、原虫試験方法の問題が挙げられる。水の原虫試験には汙過濃縮-ショ糖浮遊-間接蛍光抗体法が一般的に用いられているが、この方法は濁度などの試料の水質にその回収率が大きく影響され、たとえば本研究と濃縮方法は異なるものの、カートリッジフィルターを用いた濃縮法で *Cryptosporidium* オーシストを検出する場合に、回収率は汙過の段階で $88\sim 99\%$ 、フィルターからの誘出の段階で $16\sim 78\%$ 、ショ糖浮遊遠心法で $66\sim 77\%$ 、抗体染色の過程を含むすべての工程を通して $9\sim 59\%$ と不安定でかつ低い値をとる¹⁵⁾。これは濃縮やショ糖浮遊法の過程に繰り返し用いられる遠心分離が大きな原因の一つと考えられる。濃縮のための遠心分離の回収率については *Cryptosporidium* で $45.6(1,500\times g)\sim 78.0\%(5,000\times g)$ 、*Giardia* で $70.9(1,500\times g)\sim 88.9\%(5,000\times g)$ であり、上清とともにオーシストやシストが除去されてしまうこと¹⁶⁾や、ショ糖浮遊遠心での *Giardia* シストの回収率が $6\sim 13\%$ であること¹⁷⁾が報告されている。本研究で用いた試料では流入下水や最初沈殿池流出水と放流水では濁度に $1\sim 2$ オーダーの大きな差異があった。また試験操作の過程で計 6 回の遠心分離を行っているため、これらが回収率を変動させ、その結果、除去指数の不一致をもたらした可能性も否定できない。ウェルシュ菌芽胞は前述したように保存性の高い糞便汚染指標細菌であり、試験も簡便であるため、その原虫に対する指標性についてはさらなる検討を行う必要がある。

一方、濃度と除去指数のいずれの点においても *Giardia*

シストと高い相関が認められたのは濁度であった(Fig.3 および 6)。LeChevallier ら¹⁸⁾は凝集沈殿、砂汙過などの浄水処理における *Giardia* シストの除去性は濁質の除去性と類似しており、*Giardia* シストが $1.0\log_{10}$ 除去されるときに濁質は $0.66\log_{10}$ 除去されることから濁度が原虫のよい指標となると報告している。本研究でも *Giardia* シスト濃度と濁度の間に有意な相関が認められ(5)式、濁度の除去は *Giardia* シストの除去とほぼ一致した(Table 2 および(9)式)。このように下水処理においても濁度は *Giardia* シスト除去のよい指標となることが明らかになった。濁度は極めて簡単に高精度の分析が可能であるので、原虫汚染防止の観点から水処理プロセスの制御に濁度を指標として利用すべきであろう。しかしながら広範な環境水を対象としたとき、糞便汚染の程度と濁度とは必ずしも相関しないと考えられるので、原虫汚染の評価レベルを高めるには保存性のある糞便汚染指標を併用した評価方法を確立していく必要がある。

5. まとめ

都市下水を標準活性汚泥法で処理している 9 カ所の下水処理場で原虫濃度および下水処理プロセスにおける除去性について調査した。その結果、以下の知見が得られた。

1) すべての下水処理場から *Giardia* シストが検出され、その値は流入下水で $130\sim 5,500$ 個・ l^{-1} (幾何平均 $1,350$ 個・ l^{-1})、最初沈殿池流出水で $150\sim 5,200$ 個・ l^{-1} (平均 800 個・ l^{-1})であった。放流水では最大 75 個・ l^{-1} のシストが検出された。

2) *Cryptosporidium* オーシストは 1 カ所の処理場の流入下水の 1 試料からのみ 28 個・ l^{-1} の濃度で検出されたが、それ以外の試料からは検出されなかった。

3) ウェルシュ菌芽胞、大腸菌群および大腸菌の濃度はいずれも *Giardia* シスト濃度との間に相関が認められた。そのうちウェルシュ菌芽胞は、最もよい相関を示した。

4) *Giardia* シストの除去指数と指標細菌の除去指数との間には大腸菌群、大腸菌およびウェルシュ菌芽胞の三種とも相関は認められなかった。しかしながら全データによる平均除去指数ではウェルシュ菌芽胞と *Giardia* シストはほぼ一致しており、その生物学的特性から原虫除去指標としての可能性が示された。一方、大腸菌群、大腸菌の平均除去指数は *Giardia* シスト平均除去指数と比べて活性汚泥法(曝気槽+最終沈殿池)で $1\log_{10}$ 、塩素消毒後では約 $2\sim 3\log_{10}$ の開きが生じ、原虫の除去指標としては妥当性に欠けた。

5) 濁度は *Giardia* シストとの間に濃度、除去指数のいずれでも高い相関が見られ、下水処理における原虫の除去指標として有効であることが示された。

謝辞

本研究を行うにあたり、原虫試験方法について大阪市立大学医学部医動物学教室助教授井関基弘博士から懇切なご指導をいただきました。心からお礼を申し上げます。

また、調査にご協力いただいた麻布大学環境保健学部小方直人君、田村司郎君に謝意を表します。

(原稿受付 1996年12月11日)

(原稿受理 1997年3月21日)

参考文献

- 1) 井関基弘 (1996) 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—, 日本水処理生物学会誌, 32, 67-78.
- 2) 平田強, 橋本温, 保坂三継 (1995) クリプトスポリジウム汚染と水道, 水道協会雑誌, 64(12), 2-10.
- 3) (社)水環境学会「水中の健康関連微生物」研究委員会 (1995) 水中の健康関連微生物シンポジウム講演集, (社)水環境学会「水中の健康関連微生物」研究委員会, 152-173.
- 4) 黒木俊郎, 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志朗, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣勲, 井関基弘 (1996) 神奈川県内で発生した水系感染 *Cryptosporidium* 感染症, 感染症学雑誌, 70, 132-139.
- 5) U.S.EPA (1995) ICR protozoan method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water (Draft), U.S.EPA.
- 6) 厚生省生活衛生局水道環境部 監修 (1993) 上水試験方法, pp492-494, pp516-517, 日本水道協会.
- 7) Jakubowski, W., Skora, J.L., Sorber, C.A., Casson, L.W. and Gavaghan, P.D. (1991) Determining Giardiasis prevalence by examination of sewage. *Water Science and Technology*, 24(2), 173-178.
- 8) Roach, P.D., Olson, M.E., Whitley, G. and Wallis, P.M., (1993) Water born *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Yukon, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 67-73.
- 9) Rose, J.B., Cifirino, A., Madore, M.S., Gerba, C.P., Sterling, C.R. and Arrowood, M.J. (1986) Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments. *Water Science and Technology*, 18(10), 233-239.
- 10) Casson, L.W., Sorber, C.A., Sykora, J.L., Gavaghan, P.D., Shapiro, M.A. and Jakubowski, W. (1990) *Giardia* in wastewater - effect of treatment. *Research Journal of Water Pollution Control Federation*, 62, 670-675.
- 11) Gilmour, R.A., Smith, H.V., Smith, P.G., Morris, P.G. and Girdwood, R.W.A (1991) The occurrence and viability of *Giardia* spp. in UK waters. *Water Science and Technology*, 24(2), 179-182.
- 12) Hirata, T., Kawamura, K., Yano, K., Kaneko, M., Moniwa, T., Tosa, K. and Taguchi, K. (1993) Removal efficiencies of microorganisms in wastewater treatment processes. *Water Science and Technology*, 28(7), 55-61.
- 13) Hirata, T., Kawamura, K., Sonoki, S., Hirata, K., Kaneko, M. and Taguchi, K. (1991) *Clostridium perfringens*, as an indicator microorganism for the evaluation of the effect of wastewater and sludge treatment systems. *Water Science and Technology*, 24(2), 367-372.
- 14) 金子光美 編著 (1996) 水質衛生学, pp.478-481, 技報堂出版.
- 15) 金子光美 監訳 (1992) 飲料水の微生物学, p.291, 技報堂出版.
- 16) Shepherd, K.M. and Wyn-Jones, A.P. (1996) An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1317-1322.
- 17) Bielec, L., Boisvert, T.C. and Jackson, S.G. (1996) Modified procedure for recovery of *Giardia* cysts from diverse water sources. *Letters in applied microbiology*, 22, 21-25.
- 18) LeChevallier, M. W. and Norton, W. D. (1992) Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. *Journal of American Water Works Association*, 84(12), 54-60.