オゾン処理水・販売再生水等のクリプトスポリジウム試験

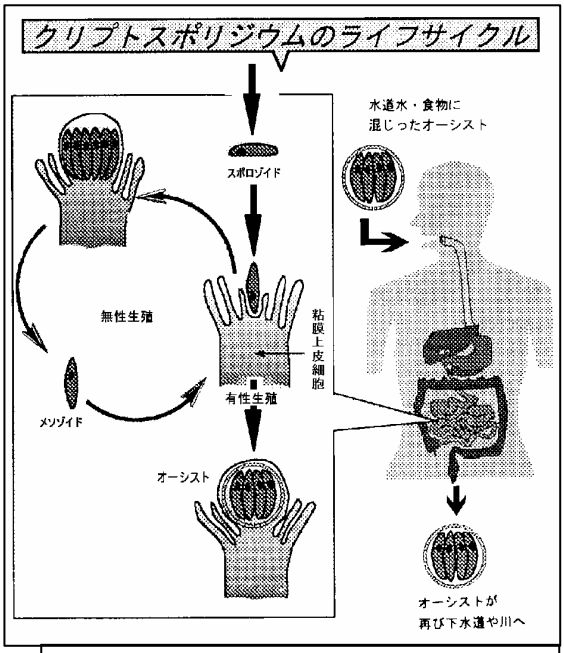
水再生水質課　○竹村　伸一　村岡　麻衣子、井上　智（現所属:資源循環局資源開発室）

1　はじめに

1996年6月、埼玉県越生町で水道水を介したクリプトスポリジウム症の集団感染が発生し、8,000人以上にも及ぶ大規模な集団下痢・腹痛等の被害を引き起こした。この大規模な感染を引き起こした原因の一つに、水道取水源の上流に排水処理施設が位置していたことが、指摘されている。

建設省（現国土交通省）は、クリプトスポリジウムの全国調査を実施するとともに、「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会」を発足させ、その最終報告（2000 年 3 月）で、「再利用に関して下水道部局は事業実施主体であるので、適宜クリプトスポリジウムの濃度を測定し、実態を把握しておくことが望ましい。」と提言した。

これに基づいて、水再生水質課では、下水道におけるクリプトスポリジウムの実態を把握する目的で、2001 年～2004 年まで、水再生センターと汚泥資源化センター及び再生水利用施設を対象に、委託調査を行った[1)]。その間、分析体制・分析技術の整備を行い、2004年度から、本課で測定を開始したので、その結果を報告する。

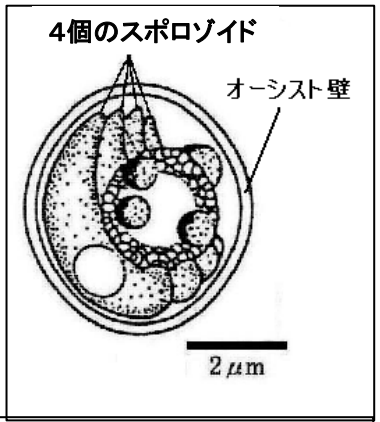


図－1　クリプトスポリジウムの生活史

下水道事業団　クリプトスポリジウム概説より

2　クリプトスポリジウムとは

クリプトスポリジウム（*Cryptosporidium parvum*）は、経口感染によってヒトの小腸等に寄生して増殖し、4～22 日の潜伏期間の後、クリプトスポリジウム症という水様性下痢と腹痛を引き起こす、原生動物である。感染したクリプトスポリジウムは増殖し（図－1）、丈夫な殻に包まれたオーシストを形成し、これが体外に排出される。オーシストは 5.0×4.5μm 程度の楕円形の形状をしていて、その中にバナナ状のスポロゾイドが 4 個内包されている（図－2）。



図－2　クリプトスポリジウムオーシスト

下水道事業団クリプトスポリジウム概説一部改変

クリプトスポリジウム症には有効な治療薬がまだなく、健常者では免疫力により 2 週間程度で自然治癒するが、AIDS等の免疫不全患者では、重篤になり生命に危険が及ぶこともある。アメリカでは、1993年3月にウィスコンシン州ミルウォーキーで、大規模な水系感染によるクリプトスポリジウム症の集団感染が発生し、感染者は約 40 万人にも達した。

3　下水処理におけるクリプトスポリジウムの問題点

クリプトスポリジウムが下水処理で問題になるのは、オーシストに強い薬剤抵抗性があり、塩素混和池における次亜塩素酸ナトリウムの消毒では、全く効果がないためである。オーシストは環境中では増殖しないが、水中では長期間生存し、水温 15℃で 40～160 日、5℃で 100 日生存するとの報告がある。オーシストの不活化には、オゾン消毒や紫外線消毒が有効である。

4　下水処理水のクリプトスポリジウム対策に関する暫定指針（案）

国土交通省では、「処理水、再生水の衛生学的水質プロジェクト」で、2002 年 11 月に、下水処理水のクリプトスポリジウム対策に関する暫定指針（案）（以下、暫定指針（案）と省略）を提案している。この暫定指針（案）の中で、「下水

処理水の放流先下流（ただし、海域は除く）において、水道水源としての利用や水浴等により直接下水処理水が暴露されるような水利用が行われている、もしくは下水処理水の再利用（再生水）が行われ親水用水、修景用水、水洗用水や散水用水により人へ直接再生水が暴露する場合において適用する」としている。横浜市は、適用範囲の前者には当たらないが、後者には入江川せせらぎや江川せせらぎ等が当たる。

また、暫定指針（案）の中では、放流水、再生水中のクリプトスポリジウム濃度基準も提言している。横浜市が関係する親水用水、修景用水、水洗用水や散水用水の基準は表－1の通りである。

表－1 再生水中のクリプトスポリジウム濃度基準(暫定指針案)

利用対象	監視強化基準値 L1 Cryptosporidium 濃度（個/L）	監視強化基準値 L2 Cryptosporidium 濃度（個/L）	基準上限値 L1、L2はこの値を超過して設定してはならない	測定対象
親水用水	0.39	0.49	2.4	再生水
修景用水	0.39	0.49	23.1	再生水
散水用水	0.39	0.49	40.0	再生水

下水処理水のクリプトスポリジウム対策に関する暫定指針（案）（別紙－1）一部改変

5 試料と測定方法

5－1 測定試料

測定試料は、微生物学的リスクを考慮して、ヒトと接触する可能性が高いせせらぎ等の供給源であるオゾン処理水（神奈川・港北・都筑水再生センター）、販売再生水（販売量が少ない栄第二・西部水再生センターと販売再生水設備点検中の都筑水再生センターではろ過水）、放流先（いたち川）でヒトと接触する可能性が高い栄第一水再生センターの流入下水と二次処理水の、合計 25 検体（回収率測定試験を含めると 29 検体）（表－2）を行った。採水は、流入下水と二次処理水は自動採水器による 24 時間混合採水、その他は午前中のスポット採水である。

表－2 2004年度測定試料

試料の種類		採水場所	試料数	検水量(L)
流入下水		栄第一	4	0.1
二次処理水		栄第一	4	10
再生水	オゾン処理水	神奈川	2	10
		港北	2	
		都筑	2	
	販売再生水	北部第一	1	10
		北部第二	1	
		神奈川	1	
		港北	1	
		中部	1	
		金沢	1	
		南部	1	
		栄第一	1	
ろ過水		都筑	1	5
		栄第二	1	10
		西部	1	
回収率測定	流入下水	栄第一	1	0.1
	二次処理水	栄第一	1	10
	オゾン処理水	神奈川	1	10
	販売再生水	中部	1	10

5－2 測定方法

クリプトスポリジウムオーシストの測定方法の概略を図－3に示す。測定は、「クリプトスポリジウム－解説と試験方法－」（日本水道協会）（以下、水道協会法と省略）に従った。測定フローは、オーシストのろ過濃縮、夾雑物からのオーシストの分離・精製、オーシストの蛍光染色、顕微鏡観察による計数という操作からなる。

図－3 測定方法の概略フロー図

日本下水道協会からも、「下水試験方法（追補暫定版）－内分泌攪乱化学物質及びクリプトスポリジウム編－2002 年度版－」として測定方法を詳述しているが、「本測定法は、改良及び検討すべき点もあると考えられることから、本手法と同等あるいはそれ以上の回収率や精度が得られる方法があれば、その方法でおこなうことは差し支えない」としている。このため、本課の測定では、1)有機溶媒等の廃液が生じない、2)器具・試薬が汎用品である、3)測定時間が短縮できる、の理由により、図－3 に示した水道協会法を用いた。また、回収率測定試験に用いる添加オーシストは、Waterborne 社製の *Cryptosporidium parvum* oocysts（ホルマリン固定済）を用い、測定方法は水道協会法に準じて行った。

5－3 判定基準

クリプトスポリジウムの顕微鏡観察による判定基準は、「クリプトスポリジウム－解説と試験方法－」（日本水道協会）では、「FITC 標識蛍光抗体染色で緑色の特異蛍光を発する類円形の粒子で、その大きさが 4.2～5.4 μm に範囲に

入るもの」で、さらに「ⅰ）微分干渉像でスポロゾイドが確認されること、ⅱ）DAPI 染色の結果、オーシスト内部のスポロゾイドの核が 2～4 個明瞭に観察されること、ⅲ）G励起下で内部がはっきりと赤色を呈しないこと」としている。

今回の測定では、試料が下水処理水であるため夾雑物が上水に比べて多く、微分干渉像でスポロゾイドを確認することが、非常に困難であった。このため、今回の判定基準は、上記のⅰ）の条件を除いたものを陽性とした。

6 測定結果

6－1 オゾン処理水・販売再生水等の結果

測定結果を表－3 に示す。栄第一水再生センターの流入下水（4 回/年）と二次処理水（4 回/年）はともに、不検出であった。これは、2001 年度の委託調査結果と同様の結果であった [1)]。

オゾン処理水（2 回/年）では、神奈川水再生センターの 1 回目測定で 0.1 個/L 検出された以外は、全て不検出であった。過去の委託調査で、オゾン処理水の陽性率は神奈川水再生センター（17%、n=8）、都筑水再生センター（0%、n=8）、港北水再生センター(31%、n=16）となっている [1)]。しかし、前述した暫定指針（案）の 0.39 個/L を上回っているのは、2000 年度の港北水再生センターの 0.8 個/L のみであった [1)]。

販売再生水とろ過水（1 回/年）は、北部第一水再生センターで 0.1 個/L、南部水再生センターで 0.1 個/L、中部水再生センターで 0.2 個/L、栄第二水再生センター（ろ過水）で 0.8 個/L、西部水再生センター（ろ過水）で 0.8 個/L となっている。栄第二・西部水再生センターに関しては、現在再試験中である。販売再生水としては、前述した暫定指針（案）の 0.39 個/L をいずれも下回っている。

表－3 クリプトスポリジウム測定結果（平成17年3月末時点）

水再生センター	試料	検水量(L)	濃度
北部第一	販売再生水	10	1個/10L
北部第二	販売再生水	10	不検出
神奈川	オゾン処理水(1回目)	10	1個/10L
	オゾン処理水(2回目)	10	不検出
	販売再生水	10	不検出
中部	販売再生水	10	2個/10L
南部	販売再生水	10	1個/10L
金沢	販売再生水	10	不検出
港北	オゾン処理水(1回目)	10	不検出
	オゾン処理水(2回目)	10	不検出
	販売再生水	10	不検出
都筑	オゾン処理水(1回目)	10	不検出
	オゾン処理水(2回目)	10	不検出
	砂ろ過水	5	不検出
栄第一	流入下水(1回目)	0.1	不検出
	流入下水(2回目)	0.1	不検出
	流入下水(3回目)	0.1	不検出
	流入下水(4回目)	0.1	不検出
	二次処理水(1回目)	10	不検出
	二次処理水(2回目)	10	不検出
	二次処理水(3回目)	10	不検出
	二次処理水(4回目)	10	不検出
	販売再生水	10	不検出
栄第二	砂ろ過水	10	8個/10L
西部	砂ろ過水	10	8個/10L

*栄第二・西部水再生センターは、再試験中

6－2 オーシスト回収率

それぞれの試料（流入下水・二次処理水・オゾン処理水・販売再生水）について、オーシストの回収率を把握するため、添加回収実験を行った。そのうち、販売再生水の結果を表－4 に示す。販売再生水では、オーシストを始めから加えた場合の回収率は 44%で、分離・精製段階からと染色段階からの回収率は、それぞれ 89%、87%となっているため、ろ過段階での損失が考えられる。

表－4 販売再生水の回収率測定試験

	添加時期	回収率(%)
添加Ⅰ	始めから	44
添加Ⅱ	分離・精製から	89
添加Ⅲ	染色から	87

7 今後の課題

流入下水では、酢酸エチルでの洗浄を行うと回収率の向上が期待されるとの報告がある [2)]。過去の委託試験でも、流入下水の回収率は、17～46%と低い値となっている [1)]ので、この方法を含め、回収率の向上を検討する。

また、免疫磁気ビーズ試薬で、Dynabeads GC-Combo kit を用いることにより、クリプトスウポリジウムとジアルジアの同時検出を検討し、ジアルジアの実態についても調査・検討する。

参考文献

日本下水道事業団：クリプトスポリジウム概説 テキスト 9C504(1997)

日本下水道協会：下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会最終報告(2000)

日本下水道協会：下水試験方法（追補暫定版）－内分泌攪乱化学物質及びクリプトスポリジウム編－2002 年度版－(2002)

1)井上智、村岡麻衣子、竹村伸一：下水道におけるクリプトスポリジウム実態調査、水質管理課課内発表会講演集(2004)、25-29

2)橋本温：下水からの原虫試験方法、私信 E メール（未発表）、2004