

## 60. 公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と規制影響分析に関する研究

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 厚生労働省<br>国立保健医療科学院水道工学部        | 国包 章一 |
| 国立感染症研究所 寄生動物部                 | 遠藤 卓郎 |
| 国土交通省<br>独立行政法人 土木研究所水環境研究グループ | 鈴木 穰  |

### 公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と規制影響分析に関する研究委員会

|     |                                     |        |
|-----|-------------------------------------|--------|
| 委員長 | 厚生労働省国立保健医療科学院水道工学部                 | 国包 章一  |
| 委員  | 国立保健医療科学院 水道工学部                     | 秋葉 道宏  |
|     |                                     | 浅見 真理  |
|     | 国立感染症研究所 寄生動物部                      | 遠藤 卓郎  |
|     |                                     | 八木田 健司 |
|     | 独立行政法人 土木研究所<br>水環境研究グループ 水質チーム     | 鈴木 穰   |
|     |                                     | 小森 行也  |
|     | 独立行政法人 土木研究所<br>材料地盤研究グループ リサイクルチーム | 尾崎 正明  |
|     |                                     | 諏訪 守   |
|     | 北海道大学大学院工学研究科<br>環境創生工学専攻水質変換工学講座   | 岡部 聡   |
|     | 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻                 | 片山 浩之  |
|     | 埼玉県企業局大久保浄水場                        | 本多 正義  |
|     | 水質管理センター                            | 森田 久男  |
|     | 埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当                    | 山本 徳栄  |
|     | 水・食品担当                              | 荒井 勉   |
|     | 東京都水道局水質センター検査課                     | 北田 真吾  |
|     | 北海道立衛生研究所 健康科学部                     | 泉 敏彦   |

研究期間 平成 17 年度～19 年度

## 60. Evaluation of health risk from human-animal sources in water resources and regulation impact analysis (RIA)

(FY 2005-2007)

Shoichi KUNIKANE, Michihiro AKIBA, Mari ASAMI  
Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health,  
Ministry of Health, Labour and Welfare.

Takuro ENDO, Kenji YAGITA  
Division of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Ministry of Health, Labour and Welfare.

Yutaka SUZUKI, Koya KOMORI, Norihide NAKADA  
Water Quality Research Team, Water Environment Research Group, Public Works Research Institute,  
Ministry of Land, Infrastructure and Transportation

Masaaki OZAKI, Mamoru SUWA, Akiko SUYAMA  
Recycling Research Team, Material and Geotechnical Engineering Research Group, Public Works Research  
Institute, Ministry of Land, Infrastructure and Transportation

Satoshi OKABE  
Environmental Innovation Engineering, University of Hokkaido

Hiroyuki KATAYAMA  
Department of Urban Engineering, the University of Tokyo

Masayoshi HONDA, Hisao MORITA  
Saitama Prefectural Okubo Water Treatment Plant and Prefectural Water Quality Management Center

Norishige YAMAMOTO, Tsutomu ARAI  
Saitama Institute of Public Health

Shingo KITADA  
Water Quality Management Center, Tokyo Metropolitan Water Works

Toshihiko IZUMI  
Hokkaido Prefectural Institute for Health Sciences

For characterization of human-animal contamination of water source, a field survey was conducted in a model watershed along the Tone River. *Cryptosporidium*, *Giardia*, *E.coli*, anaerobic spores (AS), viruses and sterols were analyzed for 3 points in arms of the river along with basic water quality indicators. As a result, *Cryptosporidium parvum* bovine genotype and *Giardia lamblia* assemblage B and AI were found in water from the Tone river. All of these protozoa identified were pathogenic to human. In addition, composition of sterols showed similarity with composition of human and pig discharges.

*Norovirus* GI, *Norovirus* G2, *Enterovirus* and *Adenovirus* were detected in the Tone river and a branch of the river. Especially in winter, *Norovirus* G2, *Enterovirus* and *Adenovirus* were detected more than 3,000 PDU/L in total in a branch of the river.

In order to identify and trace pathogens originating from human and livestock waste, the pathogens and organic wastewater contaminants (OWCs) were monitored in a watershed with several districts which differed in service ratio of sewerage system. Caffeine (representing dissolved wastewater constituents) and fecal sterols (representing particulate bound wastewater constituents) were analyzed for 24 hours in every 4 hours. The results of OWCs analysis showed specific composition of OWCs according to the status of the sewage treatment methods in the districts, such as sewage system, on-site treatment facilities or night soil collection system.

In addition, to clarify the relationship between the microorganism's marker and the chemical markers, *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Norovirus* were measured. Especially, the mean load of fecal sterols during a day was correlated to the load of *Norovirus*. It was considered that the concentration of the pathogens in environmental water and wastewater would be greatly different according to the infection prevails period, non-infection prevail period, and the difference of the load source in the watershed.

A method of detecting *Cryptosporidium* in benthic soil was developed. A field survey along Tone river proved the existence of *Cryptosporidium* in benthic soils especially in some specific tributaries.

Fate of *E. coli*, fecal coliform and human type *Bacteroides-Prevotella* marker in environmental water was observed. The *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA marker decayed in several days in environmental water, while *E. coli* and fecal coliform occasionally increased in that.

It has already been well documented that the freshwater benthic clam, *Hyriopsis schlegeli*, accumulates effectively *Cryptosporidium parvum* oocysts through its feeding process, known as the biological filter, and shed the concentrated oocysts into the feces. The present study deals with the applicability of *H. schlegeli* to remove the oocysts from the finished water of the sewage treatment plant. The biological and chemical qualities of water in the final precipitation pond were well acceptable for cultivation of *H. schlegeli*. The filtration rate of this clam (b.w. 500 g) was about 10 L/hr. The fecal mass of the clam, in which the oocysts were concentrated, though it is mucus, is heavy enough to be precipitable to the bottom of the pond against the upward flow of the sewage water. As the calculated volume of the treated water running in the sewage pond (4.3m x 19.9m x 18.6m) was around 8L/0.01m<sup>2</sup>/hr, the number of clams required to remove oocysts per 0.01m<sup>2</sup> was to be 1. Practically, 48 clams/0.48m<sup>2</sup> in each 2-story cage being set along the trough will remove around 50% of the oocysts from the finished water. The long-term trial is being underway to evaluate the efficacy of the removal of the oocyst from the finished water by putting in practice proper number of *H. schlegeli*, as an environment-friendly biological filter, in a middle-sized sewage treatment plant in Hokkaido.

To evaluate regulation impact (RIA) of countermeasures for protecting cryptosporidiosis health risk from human-animal sources, we hereby calculate the life cycle cost of membrane filtration and UV irradiation in case of introducing them to existing small drinking water treatment plants, based on the life cycle costs for 30 years. Estimation of annual expense per capita for a plant sized from 50,000 m<sup>3</sup>/day to 100 m<sup>3</sup>/day, varies from \$19.4 to \$55.6 for membrane filtration and, much lower, \$0.75 to \$12.5 for UV irradiation system. Both systems are estimated to decrease enough health risk calculated by Disabled Adjusted Life Years (DALYs).

## 1. はじめに

我が国では、下水道および合併浄化槽等の普及が進みつつあるが、依然として水源河川において人や家畜に起因する大腸菌群数等の公共用水域汚染は高いレベルにある。地域や季節などによる変動はあるが、クリプトスポリジウムやノロウイルスなどの病原微生物の検出例なども報告されている。衛生学的な安全を確保するため浄水処理では可能な限り高度処理の導入などが進められているが、一方で排水施設の処理条件向上や取水位置の調整など、その他の方策との連携が求められている。

本研究は、人畜由来汚染指標により、水道水源等の公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの特性を把握し、それらによるリスクを削減するための規制や技術上の方策の効果を最大とするための施策を提案することを目的としている。

なお、本研究は国立保健医療科学院、国立感染症研究所、独立行政法人土木研究所の3機関共同で、また、北海道大学大学院工学研究科、東京大学大学院工学研究科、埼玉県衛生研究所、東京都水道局、埼玉県企業局の協力を得て実施している。

## 2. 研究目的

本研究においては、大腸菌、原虫、ウイルス等微生物、排泄物由来化学物質等からマーカーとなる項目の抽出を行うとともに、国内の水源等を対象に汚染指標項目の実態調査により汚染状況を把握し、代表性、特異性、安定性、操作性等を考慮し、水道水源を中心とする公共用水域の人畜由来汚染指標グループを確立するための調査を行うこととした。当該指標のパターンにより水源の汚染プロファイルを作成する。また、地理的な施設情報等の活用により、水源の人畜由来汚染源の負荷を推測すると共に、下水処理水、畜産排水、未処理水等の寄与率を推定する。

一方で、代表的な感染微生物を例として、汚染による健康影響リスクを推定し、通常処理、高度処理、膜処理、自然界における消長等の消毒除去効果等リスク削減効果について解析を行う。

以上の結果等から、人畜由来汚染に関する各種施策、規制等について、その影響の評価分析を行い、最も有効な施策に

関する提言を行う。

平成19年度においては、実態調査、指標菌等の挙動に関する検討及び規制影響分析に関する検討等を行った。得られた知見および成果は以下の通りである。

## 3. 利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染と下水処理水及び河川水中のステロイド類に関する実態調査

(国立保健医療科学院水道工学部：国包章一，秋葉道宏，浅見真理，眞壁朝宏，西澤博，原本英司，與那城雄司，北京大学：胡建英，常紅)

### 3.1. 研究目的

水道水を介したクリプトスポリジウム感染症の集団感染は、国内外を問わずに世界各国で発生している。また、ジアルジア感染症の集団感染は、国内においての事例は無いが、世界各国では多数発生しており、米国においてはクリプトスポリジウムよりもジアルジアで多く発生している。越生町での集団発生の事例があるが、水道水中にクリプトスポリジウム等による汚染が引き起こされると、その影響は広域かつ深刻になる可能性が非常に高くなる。その為、水道水におけるヒトへの感染リスクを評価・低減するために浄水処理による除去率や水源での汚染実態調査が行われてきている。しかし、まだ多くのリスク要因が明確には解明されていない。また、水道水源に存在するクリプトスポリジウムの遺伝子型に関しては、いまだ知見が乏しく、水道水の原虫汚染による感染リスクの評価を行う際に支障をきたしている。

本研究では、首都圏住民の水道水源である利根川水系の河川水と底泥を対象に、原虫による汚染実態の把握と検出されたクリプトスポリジウムオーシスト（オーシスト）の遺伝子型の解析を試みた。加えて、原虫汚染の微生物指標として、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌、F特異大腸菌ファージ（Fファージ）を選び、その指標性について検討を行った。また、人畜由来汚染の化学指標として、エストロジェン、アンドロジェン、プロジェストジェン、グルココルチコイド等のステロイド類について調査を行った。対象となったホルモン類は、天然及び人工物質から環境中に存在する可能性のある物質を選択した。

### 3.2 研究方法

#### 3.2.1 調査地点と流域状況

調査地点は、上水、工業用水、農業用水の大規模取水（導水）地点である利根大堰を中心に利根川中流域で4地点（A：坂東大橋、B：上武大橋、C：利根大堰、D：芽吹大橋）、その支川である小山川で2地点（E：いろは橋、F：高橋）を選定した（図3.1）。利根川は首都圏を擁した関東平野を流域として抱え、流域内人口は日本総人口の約1割にあたる1,214万人に達している。小山川は利根川の支川のひとつであり、その流域には原虫の排出源として考えられる生活排水処理施設や家畜飼育施設が点在しており、埼玉県内でも家畜の密度が高い地域となっている。

#### 3.2.2 試料の採取

調査は、平成19年6月、8月、10月、12月及び平成20年2月に計5回実施した。河川水は表流水を40L（6月及び8月調査）または10L（10月以降調査）採取した（計28試料）。なお、D地点での河川水の採取は、6月、8月、10月の3回のみとした。

底泥は円筒状（直径5cm×高さ10cm）のコアサンプラーを用いて同一地点で3ヶ所採泥を行い、底泥の表層10cmを均一に混合した。その後、6月及び8月の調査では、混合した底泥のうち1g-wetを滅菌水1Lに懸濁（往復振とう機使用、160rpm、10分間）させて試料とし、10月以降の調査では、混合した底泥のうち1g-wetを界面活性剤添加ピロリン酸ナトリウム希釈液15mLに攪拌し（試験管ミキサー使用、3,300rpm）、遠心分離後（1,100xg、10分間）の沈渣を試料とした（計13試料）。なお、底泥の採取は、B地点、C地点、F地点の3地点を対象とした。

#### 3.2.3 原虫の濃縮・精製および検出

試料の濃縮及び精製は、「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法」に準じて行った。6月及び8月の調査では、河川水、底泥ともにメンブレンフィルター加圧ろ過-アセトン溶解法によって濃縮した。10月以降の調査では、河川水のみを親水性PTFEメンブレンフィルター法によって濃縮した。その後、すべての試料を免疫磁気ビーズ法によって精製し、直接蛍光抗体法により染色したのち、試料を2等分し、半量をスライドガラスに封入して倒立顕微鏡で定量し、半量をガラスキャピラリーによる単離に供した。

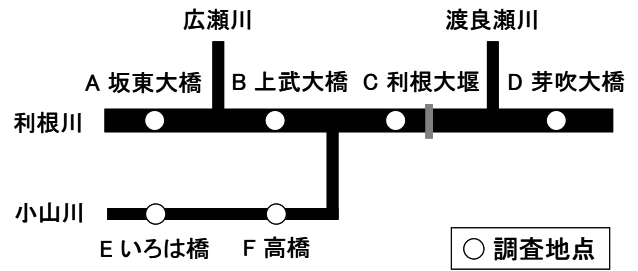


図3.1 利根川水系における調査地点

#### 3.2.4 オーシストの遺伝子型の解析

単離したオーシストは、凍結融解によってDNAを抽出し、Nested PCRとアガロースゲル電気泳動で目的のPCR産物を確認した後、ダイレクトシーケンシングによって塩基配列を解読した。得られた塩基配列情報をClustal Wを用いてアライメントしたのち、近隣結合法(neighbor-joining analysis)によって系統樹を作成し、オーシストの遺伝子型を決定した。

#### 3.2.5 微生物指標の測定

河川水中の原虫汚染の微生物指標として、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌、Fファージを測定した。大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌の分析は、上水試験方法(2001年)に準じて行い、Fファージは、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49を宿主に用いたブラック法によって定量した。

#### 3.2.6 化学指標の測定

人畜由来汚染の化学指標として、以下の項目をLC/MS/MSによって測定した。

- 1) Estrogens 17 $\alpha$ -estradiol (E2-a) と 17 $\beta$ -estradiol (E2-b) の比率がヒト由来と動物由来の指標となる可能性
- 2) Androgens 人畜由来の汚染指標
- 3) Progestogens 人畜由来の汚染指標
- 4) Glucocorticoids 未処理水か処理水かの判断指標となる可能性

### 3.3 結果及び考察

#### 3.3.1 河川水中のオーシスト及びシストの濃度

河川水中のオーシスト及びシストの検出結果を示した（図3.2）。また、地点別の河川水中のオーシスト及びシストの平均濃度を示した（図3.3）。オーシストは、28試料中20試料（71%）から検出され、最大で68 oocysts/10Lの濃度を示し

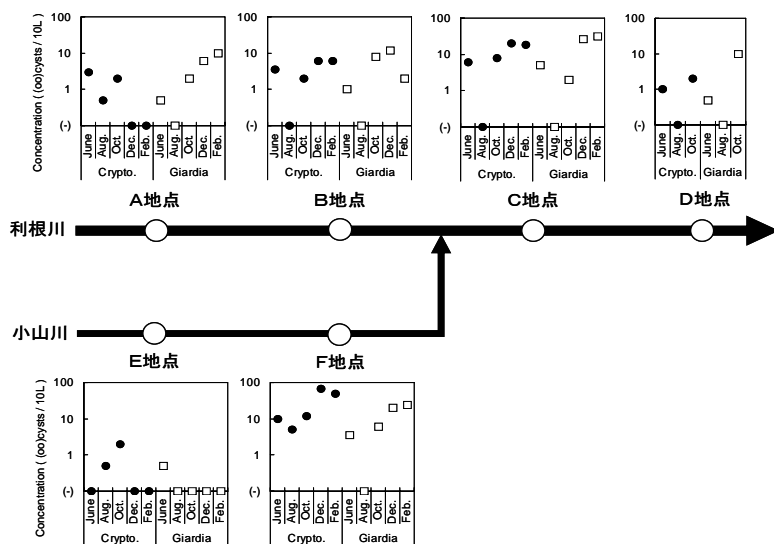


図 3.2 各地点における河川水中のオーシスト及びシスト濃度

(6月及び8月の調査ではメンブレンフィルター加圧ろ過-アセトン溶解法、10月以降の調査では親水性 PTFE メンブレンフィルター法による濃縮を行った)

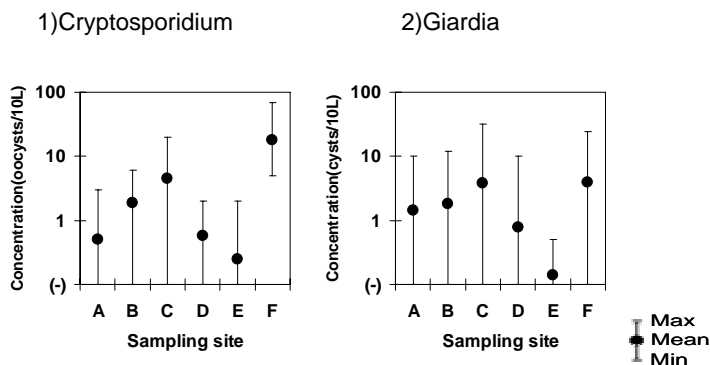


図 3.3 地点別の河川水中のオーシスト及びシストの平均濃度

た。シストは、28 試料中 19 試料 (67%) から検出され、最大濃度は 32 cysts/10L であった。地点別の陽性率は、オーシストが 40～

100%、シストが 20～80%の範囲内にあり、オーシスト、シストともにE地点で最小、F地点で最大の陽性率を示す傾向が見られた。また、月別の陽性率は、オーシストが 50～100%、シストが 0～100%の範囲で変動し、オーシスト、シストともに8月に最も低い陽性率を示した。

地点別の幾何平均濃度では、F地点においてオーシスト濃度が最大 (23.9 oocysts/10L) となった。また、E地点からF地点にかけて、オーシスト及びシストの濃度が顕著に上昇していたことから、この両地点間に糞便汚染が存在していると考えられた。なお、幾何平均濃度を求めるにあたり、オー

シスト及びシストが不検出の場合は、定量下限の1/10値を代入して算定した。

### 3.3.2 底泥中のオーシスト及びシストの濃度

底泥中のオーシスト及びシストの検出結果を示した (表 3.1)。オーシストは、13 試料中 4 試料 (30%) から検出され、最大で 22 oocysts/g-dry の濃度を示した。シストは、13 試料中 5 試料 (38%) から検出され、最大濃度は 15 cysts/g-dry であった。地点別の陽性率は、オーシストが 20～60%、シストが 20～67%の範囲内にあり、オーシスト、シストともにF地

点で最大の陽性率を示し、河川水中の陽性率と同様の傾向が見られた。また、月別の陽性率は、オーシストが 0～66%、シストが 0～100%の範囲で変動し、オーシスト、シストともに12月に最も高い陽性率を示した。その要因として、12月は採取日までの数日間、調査地点の周辺において降雨がなかったことが挙げられる。底泥中のオーシストは、降雨に伴う河川流量の変化によって、河川水中

に再懸濁されると報告されているが<sup>1)</sup>、12月の場合は反対に、降雨がなかったことによって、河川流量の目立った変化がなく、原虫が底泥中に蓄積されていたものと推察される。利根大堰の近傍の古戸観測地点のデータ<sup>2)</sup>によると、12月における日別の平均流量は、採取日の前々日 118m<sup>3</sup>/sec、前日 112m<sup>3</sup>/sec、当日 112m<sup>3</sup>/sec とほぼ変動がなかった。

河川別にみた底泥中のオーシストとシストの幾何平均濃度は、利根川ではそれぞれ 0.2 oocysts/g-dry 及び 0.3 cysts/g-dry であったのに対し、小山川では 2.0 oocysts/g-dry 及び 2.7 cysts/g-dry となり、オーシスト及びシストともに、本川に比べて支川の濃度が高い傾向が見られた。これは河川水中のオーシスト濃度の傾向と一致していた。

### 3.3.3 単離したオーシストの遺伝子型の解析結果

単離した 129 試料を Nested PCR に供した結果、10 試料 (8%) が陽性となった。そのすべてをダイレクトシーケンスに供した結果、10 試料すべて (100%) で塩基配列の解読に成功した。解読した塩基配列と 2008 年 2 月現在で GenBank に登録されている主要な配列約 40 を用いて系統樹を作成した結果、同定された遺伝子型の内訳は、*Cryptosporidium pig* genotype I (AF115377) が 4 試料、*C. andersoni* (AB089285) が 4 試料、*C. pig* genotype II (EF012375) が 1 試料、*C. pig* genotype II (EU331243) が 1 試料であった (図 3.4)。*C. pig* genotype I は免疫不全患者における感染が報告されているが<sup>3)</sup>、ヒトへの感染は稀な遺伝子型として分類されている<sup>4)</sup>。一方、*C. andersoni* 及び *C. pig* genotype II は、現在のところ、ヒトへの感染報告は見当たらない。

このことより、検出されたオーシストはヒト由来の可能性が低いと推察された。これらの遺伝子型の代表的な宿主は、*C. pig* genotype I 及び *C. pig* genotype II がブタであり、*C. andersoni* がウシであることから、家畜由来の糞便汚染が示唆された。また、昨年著者らの遺伝子解析の結果は、すべて *C. parvum* bovine genotype であったのに対し、今年はその他の遺伝子型であり、調査の時期によって調査の時期によって遺伝子型の分布に違いがあることが明らかとなった。

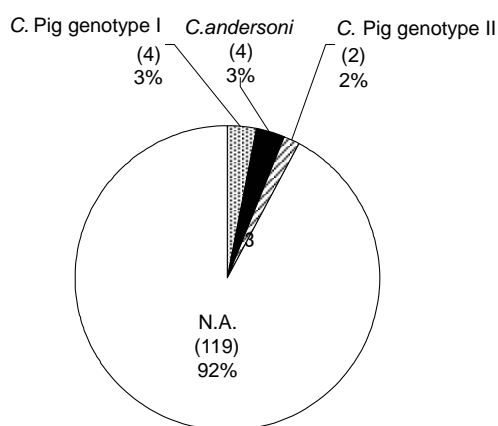


図 3.4 同定されたオーシストの遺伝子型の内訳

表 3.1 底泥中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの濃度

測定した含水率 (%) より湿潤重量 (g-wet) から乾燥重量 (g-dry) へ換算

| 調査地点 | 各採取日の濃度 (oocysts/g-dry <sup>a</sup> ) |      |       |       |      | 各採取日の濃度 (cysts/g-dry <sup>a</sup> ) |      |       |       |      |
|------|---------------------------------------|------|-------|-------|------|-------------------------------------|------|-------|-------|------|
|      | 2007                                  |      | 2008  |       |      | 2007                                |      | 2008  |       |      |
|      | 6/28                                  | 8/28 | 10/29 | 12/17 | 2/25 | 6/28                                | 8/28 | 10/29 | 12/17 | 2/25 |
| 利根川  |                                       |      |       |       |      |                                     |      |       |       |      |
| 上武大橋 | 不検出                                   | 不検出  | 不検出   | 3     | 不検出  | 不検出                                 | 不検出  | 3     | 3     | 不検出  |
| 利根大堰 | 3                                     | 不検出  | 不検出   | 不検出   | 不検出  | 不検出                                 | 不検出  | 不検出   | 3     | 不検出  |
| 小山川  |                                       |      |       |       |      |                                     |      |       |       |      |
| 高橋   | -                                     | -    | 不検出   | 22    | 4    | -                                   | -    | 不検出   | 13    | 15   |

### 3.3.4 微生物指標の測定結果

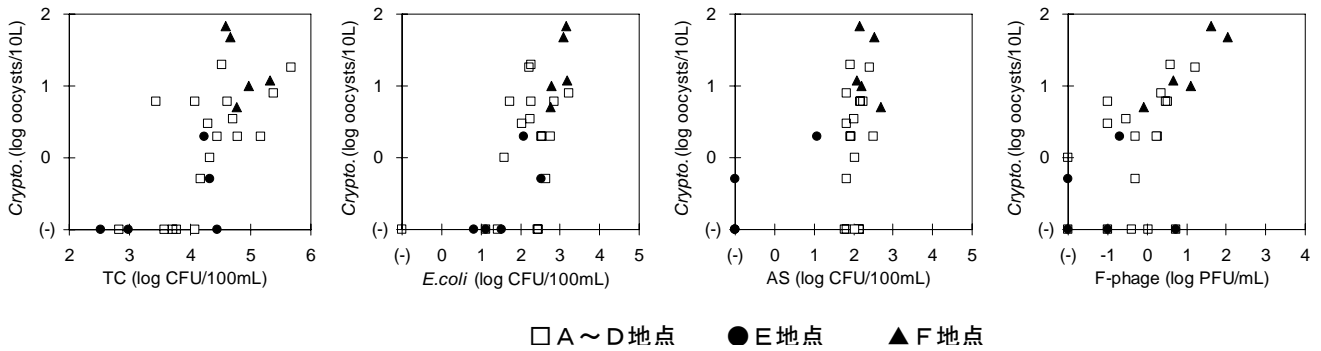
大腸菌群は、28 試料すべて (100%) から検出され、その濃度範囲は 330~480,000 CFU/100mL であった。大腸菌は、28 試料中 27 試料 (96%) から検出され、その濃度範囲は 7.0~1,700 CFU/100mL であった。嫌気性芽胞菌は、28 試料中 24 試料 (86%) から検出され、その濃度範囲は 12~490 CFU/100mL であった。F フェージは、28 試料中 24 試料 (86%) から検出され、最大濃度は 110 PFU/mL であった。オーシスト及びシスト濃度と同様に、すべての指標項目について、調査地点別の幾何平均濃度は、F 地点で最大となった。

### 3.3.5 オーシスト及びシスト濃度と微生物指標濃度の相関

河川水中のオーシスト及びシスト濃度と各微生物指標濃度との相関を検討した。なお、オーシスト、シスト及び各微生物指標の濃度は、測定値の対数を用い、不検出の場合は、定量下限の 1/10 値を代入して検討を行った。相関の有無は、算出した相関係数 (表 3.2) と散布図の分布状況から判断した (図 3.5 及び図 3.6)。

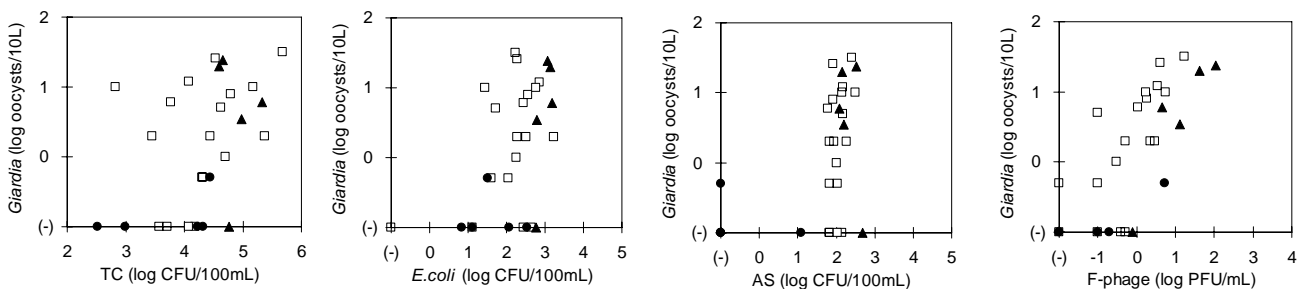
河川水中のオーシスト濃度は、大腸菌群 ( $r=0.686$ ,  $n=28$ )、大腸菌 ( $r=0.653$ ,  $n=28$ )、F フェージ ( $r=0.595$ ,  $n=28$ ) について、正の相関を示した。一方、河川水中のシスト濃度は、F フェージ ( $r=0.752$ ,  $n=28$ ) との相関が見られた。しかしながら、他の微生物指標よりも相関が高いとされている嫌気性芽胞菌については、オーシスト、シストともに相関は認められなかった。その要因として、嫌気性芽胞菌の濃度は、A~D 地点及び F 地点では、オーシストの濃度に関わらず、常に  $10^2$  CFU/100mL 前後の濃度で検出されていることが挙げられる。

それに対して F フェージの場合は、A~D 地点及び F 地点においてもオーシスト及びシスト濃度に対応する分布が確認



- 1) 大腸菌群                      2) 大腸菌                      3) 嫌気性芽胞菌                      4) F フェージ

図 3.5 地点別のオーシスト濃度と各微生物指標濃度の関係



- 1) 大腸菌群                      2) 大腸菌                      3) 嫌気性芽胞菌                      4) F フェージ

図 3.6 地点別のシスト濃度と各微生物指標濃度の関係

表 3.2 河川水中のオーシスト及びシスト濃度と各微生物指標濃度との相関係数

| 原 虫   | 大腸菌群       | 大腸菌        | 嫌気性芽胞菌     | Fフェージ      |
|-------|------------|------------|------------|------------|
| オーシスト | 0.686 (28) | 0.653 (28) | 0.521 (28) | 0.595 (28) |
| シスト   | 0.438 (28) | 0.476 (28) | 0.494 (28) | 0.752 (28) |

されたことから、本調査地点においては、嫌気性芽胞菌よりもFフェージが、オーシスト及びシストの代替指標として有効となりうることが示唆された。

また、調査月別のオーシスト濃度及びシストと各微生物指標濃度の相関について検討した。大腸菌群については、調査月に関わらず同様の傾向がみられたが、大腸菌、嫌気性芽胞菌については、8月とその他の月の傾向の違いが顕著に現れ、Fフェージについては、調査月ごとに異なる傾向を示した(図 3.7、図 3.8)。河川水中のオーシスト及びシスト濃度は、冬

季に高い値を示すことが多く報告されている。その理由として、冬季には河川流量が減少すること、発生源となる生活排水処理施設での除去率が低下すること、河川水の水温の低下に伴い自己減衰率が低下すること等が挙げられる。その他、流域内における原虫症の感染率も関係すると考えられる。今回の結果では、原虫症の感染率が高い場合は、指標微生物の濃度に対して、オーシストの割合が高くなると推測されたが、試料採水月による違いはある程度見られたものの全ての指標に共通の傾向は認められなかった。それは、特に8月ではオーシストの検出数が少なかったこと、嫌気性芽胞、Fフェージは時期により起源が異なることに起因する可能性もあると考えられた。



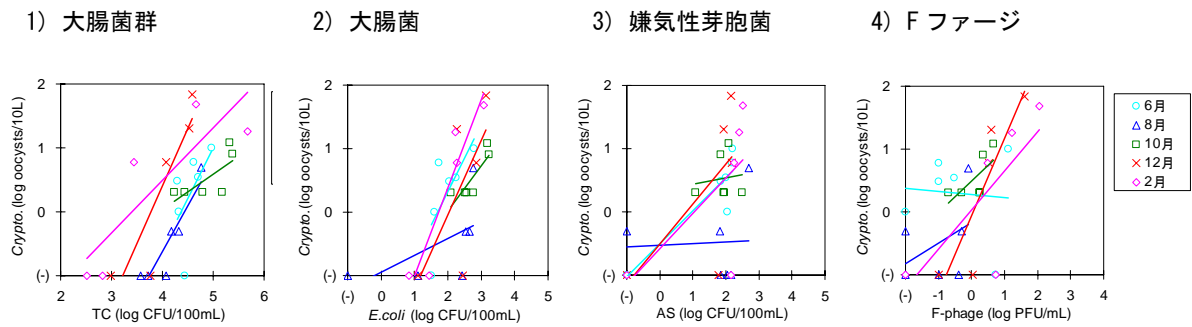


図 3.7 調査月別のクリプトスポリジウムオーシスト濃度と各微生物指標濃度の関係

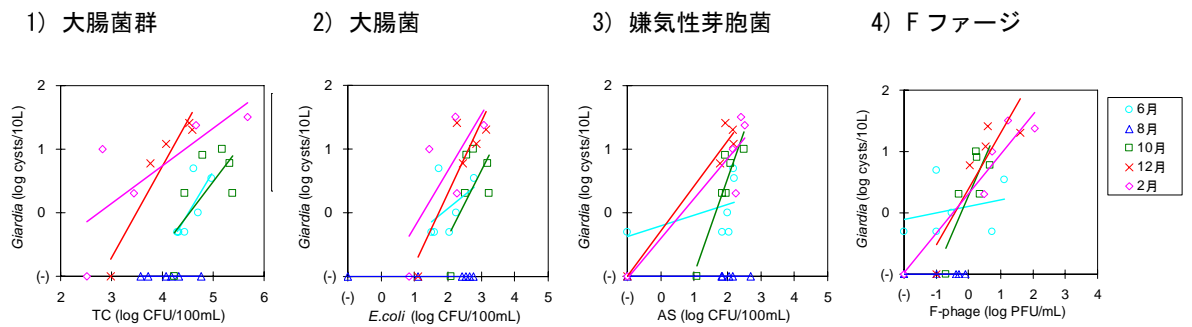


図 3.8 調査月別のジアルジアシスト濃度と各微生物指標濃度の関係図

### 3.3.4 人畜由来汚染の代替指標の検討

河川水中のオーシスト及びシストの検出の有無で比較すると、平成19年9月と平成20年2月で検出、12月不検出の高橋地点では、平成19年9月と平成20年2月に嫌気性芽胞菌が高い濃度を示しており、オーシスト及びシストの良い微生物指標となっていた。

底泥中のオーシスト及びシストの検出の有無で比較すると、3回の調査でともに検出された利根大堰地点では、嫌気性芽胞菌の濃度も $10^3 \sim 10^4$ で推移していた。この一因として、利根大堰地点では堰が設置されているため、他の地点と比べ、オーシスト及びシストが沈降・堆積しやすいことによると考えられる。また、3回の調査で一貫して底泥の粒度分布が変化していない点や大腸菌に比べ高濃度であること、環境中での指標菌の消長を考えると、嫌気性芽胞菌が底泥中のオーシスト及びシストの微生物指標となり得ることがわかった。

アンモニア性窒素は、特に9月から2月にかけて濃度が高くなる傾向が顕著であった。TOCと濁度は9月に濃度が高い傾向であった。これらの化学指標は原虫類の排出源として考えられる生活排水関連処理施設や家畜飼育施設等からの不十分な処理下水の流入により高くなると予想されるため、論理的にも見てもある程度の裏付けが可能であるが、利根川のような大きな河川では多くの推定される汚染源があることから、今後は汚染源となる施設からの排水の詳細な調査が必要である。

### 3.3.5 ステロール類による検討

表3.3に各ステロール濃度と割合の結果を示した。環境水における微生物指標は、糞便汚染の存在を明らかにできるが、汚染源がヒト由来か動物由来かを識別することはできない。そこでコレステロール、エピコプロスタノール、コプロスタノール、コレスタノールが糞便に検出される主要なステロール

ル類であることから、その構成比などから汚染源の特定を試みた。コプロスタノールは、ヒト由来の糞便中のステロイドの60%を占めており、コプロスタノール/コレスタノール比が0.4以上の場合は、糞便汚染を示すとされている<sup>12)</sup>。2月のいろは橋地点を除いて全ての地点で、その比が0.4を超えており、糞便による汚染であることが推測された。この結果の裏付けとして、嫌気性芽胞菌や大腸菌も2月のいろは橋地点では低い値を示していた。次に下水及び汚染水等が河川へ流入することでヒト由来の糞便汚染が生じている場合、コプロスタノール/コレステロール比が0.5より大きくなるとの報告<sup>13)</sup>がある。今回の調査ではその比は全て0.5以下であり、ヒト由来の糞便汚染等が生じているとは考えにくい結果となった。しかし、ヒト由来のコプロスタノールと動物で優先的なエピコプロスタノールの比は、オーシスト及びシストが高濃度で検出された2月の高橋地点と利根大堰地点で16.6と16.7と高い値を示したことから、ヒト由来の汚染が増加したことが示唆される。

今回検出、特定されたオーシストとシストは全て人獣共通の感染型であり、さらにステロール類の結果ではヒト由来の汚染が顕著であったことから、発生源としてはヒト由来の糞便汚染によるものと推定された。

### 3.3.6 ステロイド類の濃度

環境水における人畜由来指標のステロイド類についても検討を行った。

#### 1) エストロジェン

日本の下水処理場の流入水、流出水の結果では、いずれもE2-bの濃度が高く、E2-aの濃度は低かった。一方、家畜施設の近傍の環境水では、E2-aの比率の高い箇所があった。中国における調査結果では、家畜処理水中ではE2-aの比率が高い傾向であり、関連性がある可能性がある。(表3.4、図3.9)

#### 2) アンドロジェン

アンドロジェンについては、以下のアンドロステンジオン等6種が検出された。(表3.5)

#### 3) プロジェストジェン

以下のプロジェストジェン6種が検出された。中でもプロ

表 3.4 ステロール類の比

|                          | いろは橋 |     |     | 高橋  |      |      | 利根大堰 |      |      |
|--------------------------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
|                          | 9月   | 12月 | 2月  | 9月  | 12月  | 2月   | 9月   | 12月  | 2月   |
| コプロスタノール/<br>コレスタノール比    | 0.7  | 0.7 | 0.2 | 0.9 | 5.3  | 3.6  | 0.6  | 3.6  | 2.5  |
| コプロスタノール/<br>コレステロール比    | 0.1  | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.4  | 0.4  | 0.1  | 0.4  | 0.3  |
| コプロスタノール/<br>エピコプロスタノール比 | -    | -   | -   | 2.2 | 10.4 | 16.6 | 2.4  | 13.8 | 16.7 |

-: エピコプロスタノール定量下限以下

ジェステロン濃度が一番高かった。(表3.6)

#### 4) グルココルチコイド

下水処理場流入水、流出水の調査で、グルココルチコイド類6種が検出された。コルチゾール、コルチゾン等の濃度が比較的高かった。

グルココルチコイド類の比率

$$C=C(\text{cortisol}+\text{cortisone})/C(\text{prednisolone})$$

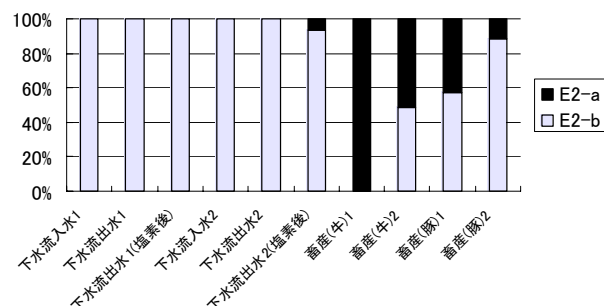
は、処理の前後で減少することが中国の下水処理場の調査で明らかにされているが、今回の調査では、比率Cの減少は少なかった。これは、今回調査対象とした下水処理場の処理方法が標準活性汚泥法であったため、中国での調査対象となった下水処理場と異なっていたことに起因する可能性がある。

(図3.10)

表 3.4 下水及び河川水中のエストロジェン濃度 (ng/L)

| ng/L       | E2-b | E2-a | E1   | E3 |
|------------|------|------|------|----|
| 下水流入水1     | 6.1  |      | 46   | 31 |
| 下水流出水1     | 2.3  |      | 104  |    |
| 下水流出水1(塩素) | 1.6  |      | 88   |    |
| 下水流入水2     | 12   |      | 46   | 35 |
| 下水流出水2     | 4.2  |      | 135  |    |
| 下水流出水2(塩素) | 1.1  | 0.08 | 42   |    |
| 畜産(牛)1     |      | 0.06 | 0.51 |    |
| 畜産(牛)2     | 0.16 | 0.17 | 0.47 |    |
| 畜産(豚)1     | 0.33 | 0.25 | 1.1  |    |
| 畜産(豚)2     | 0.23 | 0.03 | 0.19 |    |

図 3.9 下水処理水及び河川水中のエストロジェン濃度比



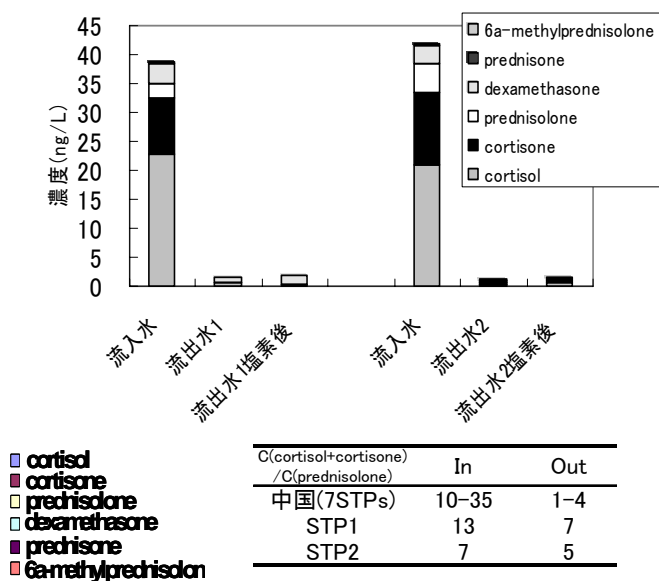


図 3.10 下水処理水及び河川水中のエストロジェン濃度比

表 3.5 下水処理水及び河川水中のアンドロジェン濃度

|              |                               | (ng/L)     |                 |              |              |                 |   |
|--------------|-------------------------------|------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|---|
| ng/L         | 19-nor-4-Androstene-3,17-diol | Nandrolone | androstenedione | Testosterone | Androsterone | Epiandrosterone | 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-progesteren-3- |
| 下水流入水1       |                               | 5          | 69              | 7.9          | 1441         | 1261            | 2.2   |
| 下水流出水1       |                               | 2          | 1.9             |              |              |                 | 0.83  |
| 下水流出水1 (塩素後) |                               | 1.6        | 5.3             |              |              |                 | 1   |
| 下水流入水2       |                               | 4.8        | 164             | 15           | 1102         | 626             | 1.7   |
| 下水流出水2       |                               | 4.4        | 2.2             |              |              |                 | 1.3   |
| 下水流出水2 (塩素後) |                               | 5          | 5.1             |              |              |                 | 1.4   |
| 畜産(牛)1       |                               |            | 0.32            |              |              | 1.6             |   |
| 畜産(牛)2       | 0.25                          |            | 0.45            |              |              | 1.3             |   |
| 畜産(豚)1       | 0.18                          |            | 0.46            |              |              | 2.6             |   |
| 畜産(豚)2       |                               |            | 0.28            |              |              | 4.7             | 0.15  |

表 3.6 下水処理水及び河川水中のプロジェステロジェン濃度

|              |                                  | (ng/L)                           |  |                   |              |                             |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|--|-------------------|--------------|-----------------------------|
| ng/L         | 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone | 21 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone | 6 $\alpha$ -methyl-Hydroxyprogesterone | Megestrol acetate | Progesterone | Medroxyprogesterone acetate |
| 下水流入水1       |                                  | 2.07                             |  |                   | 3.09         | 2.42                        |
| 下水流出水1       | 0.13                             | 0.16                             | 1.94                                   | 0.48              | 0.13         | 0.28                        |
| 下水流出水1 (塩素後) |                                  | 0.25                             | 1.56                                   | 0.35              | 0.31         | 0.42                        |
| 下水流入水2       | 0.6                              | 2.1                              |  |                   | 10.48        | 0.21                        |
| 下水流出水2       |                                  |                                  | 0.27                                   | 0.15              | 0.11         | 0.04                        |
| 下水流出水2 (塩素後) |                                  | 0.25                             | 0.24                                   |                   | 0.37         | 0.03                        |
| 畜産(牛)1       |                                  |                                  |  |                   | 0.06         |                             |
| 畜産(牛)2       |                                  |                                  |  |                   | 0.06         |                             |
| 畜産(豚)1       |                                  |                                  |  |                   | 0.09         |                             |
| 畜産(豚)2       | 0.29                             |                                  |  |                   | 0.06         |                             |

### 3.4 まとめ

本研究では、首都圏の水道水源である利根川水系の河川水を対象に、クリプトスポリジウム及びジアルジアによる汚染実態の把握とオーシストの遺伝子型の解析を試みた。また、原虫汚染の微生物指標並びに人畜由来汚染の化学指標に関する検討を行ったところ、以下の知見が得られた。

- 河川水中のオーシストは、71% (20/28) から検出され、最大で 68 oocysts/10L の濃度を示した。シストは、67% (19/28) から検出され、最大濃度は 32 cysts/10L であった。地点別の幾何平均濃度では、F 地点においてオーシスト濃度が最大 (23.9 oocysts/10L) となり、E 地点から F 地点にかけて、オーシスト及びシストの濃度が顕著に上昇していたことから、この両地点間に糞便汚染が存在していると考えられた。
- 底泥中のオーシストは、30% (4/13) から検出され、最大で 22 oocysts/ g-dry の濃度を示した。シストは、38% (5/13) から検出され、最大濃度は 15 cysts/ g-dry であった。
- 同定された遺伝子型の内訳は、*C. pig* genotype I が 4 試料、*C. andersoni* が 4 試料、*C. pig* genotype II が 2 試料であった。*C. pig* genotype I はヒトへの感染が稀な遺伝子型であること、*C. andersoni* 及び *C. pig* genotype II はヒトへの感染報告が見当たらないことから、検出されたオーシストはヒト由来の可能性が低く、ブタやウシ等の家畜由来の糞便汚染が示唆された。また、昨年はずべて *C. parvum* bovine genotype であったという結果に対して、今年はその他の遺伝子型であり、調査の時期によって遺伝子型の分布に違いがあることが明らかとなった。
- 微生物指標の陽性率は、大腸菌群が 100% (28/28)、大腸菌が 96% (27/28)、嫌気性芽胞菌が 86% (24/28)、F ファージが 86% (24/28) であった。オーシスト及びシスト濃度と同様に、すべての指標項目について、F 地点での濃度が最大であった。
- 河川水中のオーシスト濃度は、大腸菌群 ( $r=0.723$ ,  $n=25$ )、大腸菌 ( $r=0.678$ ,  $n=25$ )、F ファージ ( $r=0.605$ ,  $n=25$ ) について、正の相関を示した。しかし、他の微生物指標

よりも相関が高いとされている嫌気性芽胞菌については、相関は認められなかった。一方、河川水中のシスト濃度は、いずれの微生物指標に対しても相関を示さなかった。

- 6) 河川水中のオーシスト濃度は、大腸菌群 ( $r=0.686$ ,  $n=28$ ), 大腸菌 ( $r=0.653$ ,  $n=28$ ), Fファージ ( $r=0.595$ ,  $n=28$ ) について、河川水中のシスト濃度は、Fファージ ( $r=0.752$ ,  $n=28$ ) について、正の相関を示した。本調査地点においては、相関が高いとされている嫌気性芽胞菌よりもFファージが、オーシスト及びシストの代替指標として有効となりうることが示唆された。

今回の調査では、人畜由来汚染の指標となりうるステロイド類について調査を行ったところ、下水流入水、放流水、河川水からのべ22種が検出された。今回の調査は、地点数も限定的であるが、いずれのステロイドも人畜由来汚染の存在を示すものであり、特にエストラジオール類の比率、グルココルチコイド類の比率については、汚染源の可能性と処理の程度を示す指標となりうる可能性があった。

#### 4. 埼玉県北部の小山川流域等における原虫類調査

(埼玉県衛生研究所 水・食品担当 荒井勉, 臨床微生物担当 山本徳栄)

##### 4.1 はじめに

平成18年度までは埼玉県北部を流れる小山川およびそれに流入する河川について、原虫類汚染の実態調査を実施してきた。平成19年度は、他機関の調査において原虫類汚染が報告されている広瀬川および石田川を調査地点に加えた。また、原虫類の外、理化学項目および指標菌等を検査項目に加え、調査を実施した。

##### 4.2 調査方法

###### 4.2.1 調査地点及び調査時期

調査地点は利根川右岸に流入する小山川に架かる泉沢橋、砂田橋および小山川橋、小山川の支川である女堀川に架かる八幡橋、利根川左岸に流入する広瀬川に架かる中島橋、同じく石田川に架かる古戸橋とした(図4.1)。

調査は平成20年1月および2月に行った。

###### 4.2.2 調査項目

調査項目は原虫類(クリプトスポリジウムおよびジアルジア)

ア)、pH値、濁度、有機物(全有機炭素(TOC)の量)、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、塩化物イオン、大腸菌および嫌気性芽胞菌とした。

検査方法は、原虫類については(社)日本水道協会が提案する方法(平成15年2月)により実施した。理化学試験等については水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年厚生労働省告示第261号)および浄水試験方法((社)日本水道協会)に準じて行った。

##### 4.3 調査結果

(表4.1、4.2)に河川水中のオーシスト、シスト等の測定結果を示した。小山川に流入する河川の女堀川においては、2回の調査でクリプトスポリジウムは検出されなかったが、ジアルジアが2~4個/10L検出された。

一方、小山川における1月の調査では、クリプトスポリジウムはいずれの調査地点においても出されなかったが、2月の調査では泉沢橋および砂田橋地点において、それぞれ30個/10L、7個/10L検出された。小山川橋地点においては検出されなかった。ジアルジアは最大で2個/10Lのレベルであった。

広瀬川においては1月の調査でクリプトスポリジウムおよびジアルジアが1個/10L検出されたが、2月の調査ではいずれも不検出であった。

石田川においては、1月の調査では原虫類は不検出であったが、2月の調査ではクリプトスポリジウムが3個/10L、ジアルジアが9個/10L検出された。

大腸菌は2回の調査で $10^1 \sim 10^3$ MPN/100mLのオーダーで検出されたが、2月の調査時の方が総じて低レベルであった。嫌気性芽胞菌は2回の調査で、いずれの地点においても $10^2$ CFU/100mLのオーダーで検出されたが、2月の調査時の方が低い傾向にあった。

原虫類の指標菌とされる上記2種の細菌試験について、今回の調査結果では、原虫類との相関は明確ではなかった。

##### 4.4 まとめ

原虫類対策の一環として、小山川流域等において、原虫類実態調査を実施し、その結果以下の点が明らかになった。

- 1) 小山川に流入する女堀川において、2回の調査でクリプトスポリジウムは検出されなかったが、ジアルジアは検出され、その数は2~4個/10Lであった。
- 2) 小山川における1月の調査では、クリプトスポリジウム

は検出されなかったが、2月の調査では0~30個/10L検出された。また、調査地点の上流部では高いレベルで検出され、下流部では検出されなかったことから、発生源から間欠的に汚染される可能性が示唆された。

ジアルジアについては、検出されても最大で2個/10Lのレベルであった。

- 3) 今回の調査では、広瀬川における原虫類の汚染レベルは低かった。
- 4) 今回の調査では、原虫類の検出レベルと、指標菌とされる細菌試験の検査結果に明確な関係はなかった。

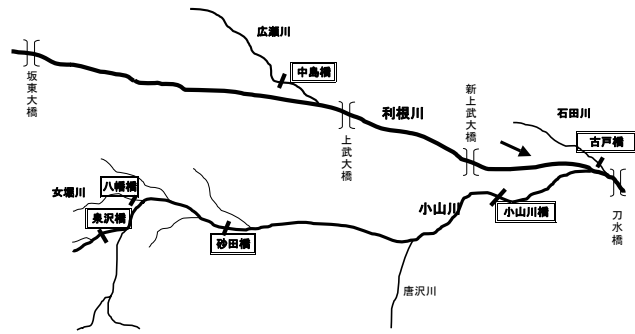


図 4.1 原虫類等調査地点

表 4.1 原虫類等調査結果 (採水日：平成 20 年 1 月 29 日)

| 採水場所 | 採水時刻 | 水温<br>(°C) | pH値  | 濁度<br>(度) | TOC<br>(mg/L) | NH4-N<br>(mg/L) | NO3-N<br>(mg/L) | NO2-N<br>(mg/L) | Cl-<br>(mg/L) | 大腸菌<br>(MPN/100mL) | 嫌気性芽胞菌<br>(CFU/100mL) | クリプト<br>(個/10L) | ジアルジア<br>(個/10L) |
|------|------|------------|------|-----------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|--------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| 広瀬川  | 中島橋  | 11:20      | 6.5  | 7.2       | 5.4           | 2.2             | 0.8             | 3.8             | 0.1           | 31.6               | 780                   | 410             | 1                |
| 石田川  | 古戸橋  | 13:20      | 8.0  | 7.2       | 2.7           | 2.3             | 1.0             | 3.4             | 1.3           | 89.8               | 1000                  | 240             | 0                |
| 小山川  | 泉沢橋  | 10:10      | 6.5  | 7.4       | 9.0           | 2.4             | 0.8             | 2.3             | 0.1           | 25.9               | 1400                  | 540             | 0                |
|      | 砂田橋  | 10:50      | 6.5  | 7.4       | 3.7           | 2.7             | 1.4             | 3.6             | 0.5           | 34.9               | 1500                  | 270             | 0                |
|      | 小山川橋 | 12:40      | 7.5  | 7.4       | 5.3           | 3.4             | 3.5             | 1.5             | 3.0           | 56.9               | 1800                  | 530             | 0                |
| 女堀川  | 八幡橋  | 10:35      | 12.0 | 7.4       | 4.2           | 5.3             | 7.8             | 2.9             | 0.6           | 62.0               | 2200                  | 960             | 0                |

表 4.2 原虫類等調査結果 (採水日：平成 20 年 2 月 19 日)

| 採水場所 | 採水時刻 | 水温<br>(°C) | pH値  | 濁度<br>(度) | TOC<br>(mg/L) | NH4-N<br>(mg/L) | NO3-N<br>(mg/L) | NO2-N<br>(mg/L) | Cl-<br>(mg/L) | 大腸菌<br>(MPN/100mL) | 嫌気性芽胞菌<br>(CFU/100mL) | クリプト<br>(個/10L) | ジアルジア<br>(個/10L) |
|------|------|------------|------|-----------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|--------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| 広瀬川  | 中島橋  | 11:15      | 6.5  | 7.2       | 6.4           | 3.3             | 0.8             | 3.9             | 0.1           | 31.0               | 450                   | 400             | 0                |
| 石田川  | 古戸橋  | 13:10      | 10.0 | 7.4       | 3.2           | 3.1             | 0.8             | 4.0             | 0.1           | 95.0               | 170                   | 560             | 3                |
| 小山川  | 泉沢橋  | 10:15      | 6.0  | 7.4       | 4.7           | 2.5             | 0.6             | 2.5             | 0.1           | 33.5               | 1400                  | 360             | 30               |
|      | 砂田橋  | 10:50      | 6.5  | 7.4       | 3.0           | 3.2             | 1.7             | 4.4             | 0.2           | 43.2               | 690                   | 140             | 7                |
|      | 小山川橋 | 12:45      | 9.0  | 7.4       | 4.7           | 4.5             | 2.8             | 3.9             | 0.3           | 50.8               | 63                    | 360             | 0                |
| 女堀川  | 八幡橋  | 10:35      | 13.0 | 7.4       | 3.8           | 5.8             | 5.8             | 3.5             | 0.9           | 77.2               | 390                   | 580             | 0                |

## 5. 下水処理場等における人畜由来汚染の削減効果に関する評価

(独立行政法人土木研究所水環境研究グループ 水質チーム 鈴木穰、小森行也、中田典秀、材料地盤研究グループ リサイクルチーム 尾崎正明、諏訪守、陶山明子)

### 5.1 公共用水域への下水処理水の流入による生物マーカー、化学物質マーカーの変化

#### 5.1.1 調査方法

公共用水域において下水処理水の流入による生物マーカー、化学物質マーカーの変化と相互関係を把握するため、1河川を対象に下水処理水の流入前後で実態調査を行った。また、調査対象流域における各マーカーの特性との関係を把握するため、河川流域内にある下水処理場で流入下水、放流水を対象に各マーカーの除去特性についても調査を行った。調査は北関東を流れる OH 川とその流域内にある H 下水処理場を対象とした(図 5.1 参照)。下水処理水放流先の OH 川の上流では、ウシ、ブタなどの畜産が行われており、河川流域には畜産系の負荷が存在する。H 下水処理場の下水処理方式は活性汚泥処理法であり、処理水量は約 11,000m<sup>3</sup>/日、消毒方式は次亜塩素酸ナトリウムによる塩素消毒法である。調査は平成 17 年 11 月、18 年 2 月の 2 回、晴天時(平水位時)に 4 時間毎の 24 時間採水を行った。採水試料は流入下水、放流水(一部二次処理水試料を含む)に加え、放流先河川の放流口上流河川水、放流水の混合された下流河川水である。

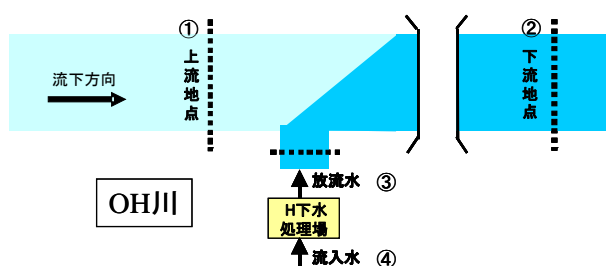


図 5.1 調査地点の概要

### 5.1.2 調査対象とした生物マーカー、化学物質マーカーとその測定法

#### 1) 生物マーカー

本研究で対象とした生物マーカーは、大腸菌、病原微生物のクリプトスポリジウム、ジアルジア、ノロウイルス (G1、2 型) である。各々の病原微生物の測定法を以下に示す。

大腸菌はクロモカルト培地による平板培養法 (37°C) とした。

原虫類のクリプトスポリジウム、ジアルジアは試料をポリカーボネート製メンブランフィルターによるろ過濃縮後(一部の流入下水試料は遠心濃縮)、超音波処理でフィルターからオーシスト(シスト)を剥離させ免疫磁気ビーズ法で回収し、蛍光抗体染色による顕微鏡観察とした。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズ GC・コンボキット、蛍光抗体染色にはハイドロフローコンボキット、ENSYS INC.、18、19 年度分はイーグーステインを用いた。濃縮に用いた試料量は流入下水 200mL、その他の試料は 20L とした。

ノロウイルスの濃縮法は、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法によるもので、試料中に PEG # # 6000 (終濃度 8%) および NaCl (終濃度 0.4M) を添加・攪拌し完全に溶解させた。4°C で 1 夜静置の後、10,000×G、30 分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣を RNase-free 水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。濃縮液中のウイルスは、リアルタイム PCR 法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN 社)を用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN 社)でウイルス RNA を精製した。上記で抽出したウイルス RNA 試料 1 μg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社)を用い全量 20μl の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 2μL をリアルタイム PCR に供した。ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」に準じた。<sup>1)</sup>リアルタイム PCR は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN 社)を用い、リアルタイム PCR 装置は LightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。

#### 2) 化学物質マーカー

本研究で対象とした化学物質マーカーは 10 種のステロール類およびカフェインである。各化学物質マーカーの測定法を以下に示す。

ステロール類の測定は、Isobe et al.<sup>2)</sup> に若干の改良を加え行った。具体的な方法を以下に示す。採取試料 600mL を直ちにガラス繊維フィルター (GF/B、孔径 1.0 $\mu$ m、Whatman 社製) でろ過した。この時のろ液を溶存態試料、フィルター上の残渣を懸濁態試料とした。ろ液に Cholesterol-d10 および Caffeine-d4 を含むサロゲート溶液を添加し、あらかじめそれぞれ 10mL のメタノールおよび水でコンディショニングした固相抽出カートリッジ (Oasis HLB、Waters 社製) を用いて固相抽出を行った。試料通水後、適量の水でカートリッジを通水洗浄した後、アルミホイルに包み氷冷保存した。ろ過に用いたフィルターも、アルミホイルに包み氷冷保存した。以上の操作を現場にて行い、以降の抽出操作を実験室にて行った。

試料を通水したカートリッジを、遠心分離 (3,000rpm、15min)、窒素通気 (15min) で脱水し、15mL のメタノールでカートリッジに保持した成分を溶出させた。溶出液をさらにロータリーエバポレーターで濃縮し、シリカゲルを充填したカートリッジ (Sep-Pac Si、Waters 社製) で精製した。シリカゲルカートリッジはあらかじめ 10mL のヘキサンで洗浄し、そこへ少量のヘキサン/ジクロロメタン溶液 (75:25、v/v) に転溶した溶存態試料濃縮液を加え、全量で 5mL のヘキサン/ジクロロメタン溶液 (75:25、v/v)、次いで 5mL のジクロロメタン、10mL のアセトン/ジクロロメタン溶液 (25:75、v/v) を流し、第 1~3 画分を得た。この第 3 画分を窒素パーズによりさらに濃縮し、1mL のアセトンで定溶した後、2 分割した (それぞれステロール画分、カフェイン画分とする)。

試料をろ過したフィルターは、凍結乾燥した後、メタノールを入れたビーカーに移し、Cholesterol-d10 および Caffeine-d4 を含むサロゲート溶液を添加した後、超音波抽出した。その後、抽出液を移し替え、さらにジクロロメタン、30%アセトン/ジクロロメタン溶液で超音波抽出した (各 15min)。全ての抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーター、窒素パーズにより濃縮し、前述のシリカゲルカートリッジによる分画操作に供した。

ステロール画分は、さらに窒素パーズにより濃縮し、2mL

容量のスクリーバイアルに移し、各 50 $\mu$ L のピリジン、無水酢酸を加え、室温にて誘導体化した (20 時間)。誘導体化後、100 $\mu$ L の塩酸 (4N) と 300 $\mu$ m のヘキサンを加え液-液抽出 (3 回) し、抽出液を無水硫酸ナトリウムを充填したカラムに通し脱水した。脱水液をさらに窒素パーズにより濃縮・乾固し、重水素化多環芳香族炭化水素 (D-PAH) を含む 50 $\mu$ g/L イソオクタン溶液で定溶し、GC-MS 分析に供した。

カフェイン画分は、さらに窒素パーズにより濃縮・乾固し、50 $\mu$ g/L の D-PAH イソオクタン溶液で定溶し、同じく GC-MS 分析に供した。

ステロール類の GC-MS 分析における GC-MS の条件、モニターイオン、定量方法は Isobe et al.<sup>2)</sup> に従った。カフェインの GC-MS 分析は、Buerge et al.<sup>3)</sup> に従った。

### 5.1.3 調査結果と考察

#### 1) 流量観測および現場観測結果

17 年度の調査における流量観測結果を図 5.2 に示す。いずれの調査においても、上流地点と下流地点における流量の時間変動、調査を行った処理場の放流量の時間変動はともに小さく、下流地点における流量に対する占める下水処理放流水の割合は 5~23%程度 (平均 13%) であった。なお、2005 年 11 月に行った調査においては、下流地点の流量が上流地点の流量を下回る時もあり、流量を正確にとらえられていない可能性が唆された。上流地点河川水および下水処理水の水温は、2005 年 11 月の調査時にはそれぞれ 14 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、2006 年 2 月にはそれぞれ 6.9 $^{\circ}$ C、19 $^{\circ}$ C であった。

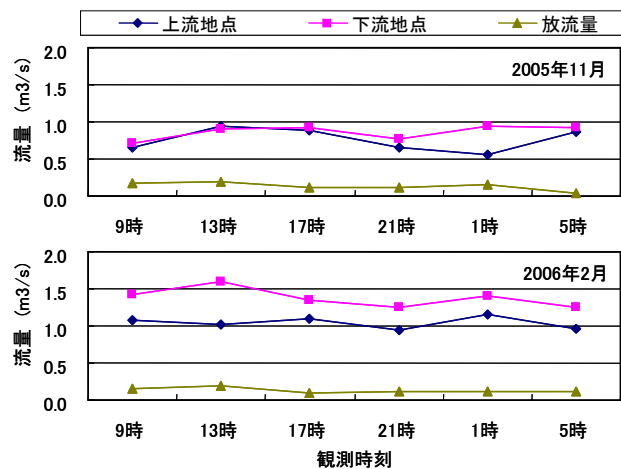


図 5.2 OH 川隣接下水処理場放流量および下水処理水流入地点上下流の流量

## 2) 生物マーカー

生物マーカーの調査結果を表 5.1 に示す。大腸菌は各調査月の各試料で 1 検体、その他の病原微生物については各試料で 6 検体（4 時間毎の 24 時間採水）の採水分析を行った。全ての試料で大腸菌は検出されているが、活性汚泥処理法、塩素消毒法により下水処理場でその多くは除去・不活化されており、放流水の大腸菌の濃度は放流先河川水と比較して低い。クリプトスポリジウムは 11 月、2 月、ノロウイルス G1 型は 11 月の全ての試料で不検出であり汚染のレベルは低かった。ジアルジアは 11 月の流入下水で N. D.  $\sim 5.5 \times 10^1$  cysts/L の濃度で検出される場合もあるが、活性汚泥処理法により除去が行われ放流水の検出濃度範囲は N. D.  $\sim 1.0 \times 10^1$  cysts/L と低下している。また、流入下水のノロウイルス G2 型の検出濃度範囲は N. D.  $\sim 7.4 \times 10^1$  copies/L であり、ジアルジアと比較すると活性汚泥処理法による除去率は低いと考えられたが、放流水の検出濃度範囲は N. D.  $\sim 2.4 \times 10^1$  copies/L と放流先河川水の濃度と同レベルであった。ジアルジア、ノロウイルスとともに放流先河川水への下水処理水の負荷は低レベルであると考えられた。

2 月の流入下水ではジアルジアの検出濃度範囲は  $7.5 \times 10^1 \sim 3.4 \times 10^3$  cysts/L であり、調査時期が異なることで検出濃度に大きな違いがあると考えられるが、海外旅行後の下痢患者や人間ドックでの検便で多く検出される原虫であり、無症状であることも少なくないとされる<sup>4)</sup>。しかし、活性汚泥処理法での除去率は平均で 4log 程度であり放流水の検出濃度範囲は N. D.  $\sim 1.5 \times 10^{-1}$  cysts/L と大幅に低下していた。

流入下水のノロウイルスは、 $2.3 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^6$  copies/L の範囲で検出されており、下水・河川水とも非流行期（11 月調査）の汚染は低レベルであったが、冬季（2 月調査）の感染流行期には高濃度のノロウイルスが流入していた。活性汚泥処理法により除去が行われ放流水のノロウイルス濃度は大幅に低下しているが、非流行期（11 月調査）の放流水濃度と比較すると 1~2 オーダー高い。

また、放流先河川の上流試料においても冬季（2 月調査）の感染流行期では 11 月調査と比較して 1~2 オーダーの検出濃度の上昇が見られた。ノロウイルス G1、G2 はヒトのみに感染し排出されることから、実態は不明であるものの上流の

河川水にも合併浄化槽などからのヒト由来の負荷があるものと推定された。このため、下水・河川水から検出されたノロウイルスは、分子系統解析により遺伝子型判別を行い、流域内における存在状況の相互関係を評価する必要があると考えられた。11 月に比較して 2 月では、流入下水のジアルジア、ノロウイルスの濃度上昇が見られたが、ともに下水処理場で除去されることにより放流水のジアルジア、ノロウイルスは、放流先河川水の検出濃度と同レベルとなるため、放流先河川水への下水処理水の負荷は低レベルであると考えられた。

我が国の下水処理場や関東圏内の河川水におけるクリプトスポリジウムの調査例<sup>5)</sup>では、平常時において検出濃度・割合は海外との調査例と比較して低いとの報告もあり、本調査ではこれを裏付ける結果となった。しかし、集団感染症発生時には、感染者から多量のクリプトスポリジウムのオーシストが排出されることから、流入下水中の濃度は高まると考えられる。また、流域に家畜負荷の存在する河川では、降雨時の汚濁負荷上昇時においてオーシストやシストの検出濃度・割合が平常時と比較して上昇、同様に畜産排水由来の負荷により、オーシストやシストの検出率が高くなるという報告<sup>6) 7)</sup>がある。このため、降雨時等の汚濁負荷上昇時において他の病原微生物を含めた調査が必要であると考えられる。また、ノロウイルスに関しては、調査時期が異なることで下水・河川水試料の検出濃度や活性汚泥処理法による除去率に各々違いが見られるとともに、他の調査報告例に示された除去率<sup>8)</sup>と乖離していた。

化学物質マーカーの分析結果を表 5.2、表 5.3、表 5.4、表 5.5 に示す。



表 5.1 生物マーカーの調査結果 (17年度)

|           |     | ジアルジア<br>(Cysts/L)   |                      | ノロウイルス G1<br>(Copies/L) |                   | ノロウイルス G2<br>(Copies/L) |                   | 大腸菌<br>(Cfu/mL)   |                      |
|-----------|-----|----------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
|           |     | 11月                  | 2月                   | 11月                     | 2月                | 11月                     | 2月                | 11月               | 2月                   |
| 上流<br>河川水 | 9時  | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | $9.7 \times 10^1$ | N.D.                    | $9.5 \times 10^0$ | —                 | —                    |
|           | 13時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 17時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | $1.1 \times 10^3$ | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 21時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | $6.5 \times 10^1$ | N.D.                    | $5.7 \times 10^2$ | $2.6 \times 10^1$ | $2.2 \times 10^1$    |
|           | 1時  | $5.0 \times 10^{-2}$ | N.D.                 | N.D.                    | $6.6 \times 10^1$ | $2.4 \times 10^1$       | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 5時  | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | $1.1 \times 10^2$ | —                 | —                    |
| 下流<br>河川水 | 9時  | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 13時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | $1.6 \times 10^1$       | $2.1 \times 10^0$ | —                 | —                    |
|           | 17時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 21時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | $9.7 \times 10^1$ | $3.2 \times 10^1$       | $1.9 \times 10^1$ | $3.5 \times 10^1$ | $1.3 \times 10^1$    |
|           | 1時  | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 5時  | N.D.                 | $5.0 \times 10^{-2}$ | N.D.                    | $1.1 \times 10^3$ | N.D.                    | $1.4 \times 10^3$ | —                 | —                    |
| 放流水       | 9時  | N.D.                 | $5.0 \times 10^{-2}$ | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 13時 | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                    | $1.1 \times 10^3$ | N.D.                    | $7.7 \times 10^2$ | —                 | —                    |
|           | 17時 | $5.0 \times 10^{-2}$ | N.D.                 | N.D.                    | N.D.              | $2.4 \times 10^1$       | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 21時 | $1.0 \times 10^{-1}$ | N.D.                 | N.D.                    | $2.1 \times 10^2$ | $3.7 \times 10^0$       | $1.9 \times 10^2$ | $5.0 \times 10^0$ | $4.0 \times 10^{-1}$ |
|           | 1時  | $5.0 \times 10^{-2}$ | $1.5 \times 10^{-1}$ | N.D.                    | N.D.              | N.D.                    | N.D.              | —                 | —                    |
|           | 5時  | N.D.                 | $5.0 \times 10^{-2}$ | N.D.                    | $3.1 \times 10^1$ | $1.9 \times 10^1$       | $2.3 \times 10^1$ | —                 | —                    |
| 二次処理水     | 21時 | —                    | —                    | —                       | —                 | —                       | —                 | $7.0 \times 10^2$ | $4.0 \times 10^2$    |
| 流入下水      | 9時  | $5.5 \times 10^1$    | $3.4 \times 10^3$    | N.D.                    | $2.5 \times 10^4$ | N.D.                    | $2.3 \times 10^5$ | $1.7 \times 10^5$ | $5.2 \times 10^4$    |
|           | 13時 | $5.0 \times 10^1$    | $1.9 \times 10^3$    | N.D.                    | $1.7 \times 10^5$ | N.D.                    | $7.5 \times 10^5$ | —                 | —                    |
|           | 17時 | $1.0 \times 10^1$    | $5.4 \times 10^2$    | N.D.                    | $8.9 \times 10^5$ | $7.4 \times 10^1$       | $2.7 \times 10^6$ | —                 | —                    |
|           | 21時 | $1.0 \times 10^1$    | $8.9 \times 10^2$    | N.D.                    | $1.2 \times 10^6$ | $5.4 \times 10^1$       | $2.1 \times 10^6$ | —                 | —                    |
|           | 1時  | N.D.                 | $1.4 \times 10^2$    | N.D.                    | $7.3 \times 10^4$ | N.D.                    | $1.3 \times 10^6$ | —                 | —                    |
|           | 5時  | N.D.                 | $7.5 \times 10^1$    | N.D.                    | $3.8 \times 10^5$ | N.D.                    | $1.3 \times 10^6$ | —                 | —                    |

※ クリプトスポリジウム：11月、2月の合計48試料について測定を行ったが全て不検出(N.D.)。  
 検出限界値：測定に供した試料中に1個のオーシスト(シスト)が存在した場合の濃度。流入下水  $5.0 \times 10^0$  個/L、処理水・河川水は  $5.0 \times 10^{-2}$  個/Lである。

表 5.2 上流地点におけるカフェインおよびステロール類の濃度変化 (µg/L)

| Sampling date<br>Sampling time | Nov. 9, 2005 |       |       |       | Nov. 10, 2005 |      | Feb. 8, 2006 |       |       |       | Feb. 9, 2006 |       |
|--------------------------------|--------------|-------|-------|-------|---------------|------|--------------|-------|-------|-------|--------------|-------|
|                                | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00          | 5:00 | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00         | 5:00  |
| Caffeine                       | 0.75         | 0.60  | 5.61  | 1.58  | 4.37          | 1.89 | 1.15         | 1.20  | 1.32  | 3.77  | 2.69         | 1.86  |
| Coprostanone                   | 0.21         | 0.23  | 0.22  | 0.16  | 0.05          | 0.11 | 0.20         | 0.13  | 0.16  | 0.06  | 0.07         | 0.05  |
| Coprostanol                    | 0.58         | 0.46  | 0.50  | 0.40  | 0.40          | 0.27 | 4.01         | 1.49  | 1.32  | 1.27  | 1.01         | 1.47  |
| Epicoprostanol                 | 0.08         | 0.09  | 0.13  | 0.07  | 0.09          | 0.07 | 0.44         | 0.17  | 0.17  | 0.15  | 0.14         | 0.14  |
| Cholesterol                    | 3.15         | 2.13  | 2.11  | 1.96  | 2.72          | 1.34 | 10.01        | 7.89  | 7.44  | 8.98  | 9.12         | 11.28 |
| Cholestanol                    | 0.31         | 0.32  | 0.30  | 0.21  | 0.22          | 0.16 | 0.68         | 0.48  | 0.51  | 0.51  | 0.42         | 0.50  |
| Campesterol                    | 0.58         | 0.26  | 0.27  | 0.22  | 0.27          | 0.17 | 1.23         | 0.69  | 0.67  | 0.75  | 0.64         | 0.76  |
| Stigmasterol                   | 0.53         | 0.32  | 0.33  | 0.22  | 0.43          | 0.21 | 1.15         | 0.75  | 0.71  | 0.74  | 0.66         | 0.71  |
| Sitosterol                     | 2.69         | 0.90  | 0.92  | 0.63  | 1.81          | 0.65 | 4.04         | 2.09  | 2.00  | 2.17  | 2.26         | 2.20  |
| Fucosterol                     | 0.11         | 0.07  | 0.08  | 0.08  | 0.07          | 0.06 | 0.26         | 0.19  | 0.20  | 0.22  | 0.18         | 0.20  |
| Stigmastanol                   | 0.24         | 0.06  | 0.19  | 0.11  | 0.13          | 0.10 | 1.10         | 0.32  | 0.38  | 0.32  | 0.30         | 0.27  |
| Total sterol                   | 8.47         | 4.84  | 5.05  | 4.05  | 6.18          | 3.13 | 23.12        | 14.20 | 13.57 | 15.18 | 14.81        | 17.59 |
| b/baCOP                        | 0.65         | 0.59  | 0.63  | 0.66  | 0.64          | 0.62 | 0.86         | 0.76  | 0.72  | 0.71  | 0.71         | 0.75  |
| e/baCOP                        | 0.09         | 0.12  | 0.16  | 0.12  | 0.14          | 0.17 | 0.09         | 0.09  | 0.09  | 0.09  | 0.10         | 0.07  |

表 5.3 下流地点におけるカフェインおよびステロール類の濃度変化 (µg/L)

| Sampling date<br>Sampling time | Nov. 9, 2005 |       |       |       | Nov. 10, 2005 |      | Feb. 8, 2006 |       |       |       | Feb. 9, 2006 |       |
|--------------------------------|--------------|-------|-------|-------|---------------|------|--------------|-------|-------|-------|--------------|-------|
|                                | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00          | 5:00 | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00         | 5:00  |
| Caffeine                       | 0.48         | 0.69  | 0.60  | 2.02  | 3.07          | 0.04 | 0.92         | 0.89  | 1.22  | 3.78  | 2.95         | 1.51  |
| Coprostanone                   | 0.10         | 0.12  | 0.28  | 0.19  | 0.19          | 0.20 | 0.13         | 0.12  | 0.11  | 0.10  | 0.09         | 0.08  |
| Coprostanol                    | 0.49         | 0.49  | 0.73  | 0.52  | 0.47          | 0.57 | 3.08         | 1.29  | 1.14  | 1.18  | 0.88         | 1.23  |
| Epicoprostanol                 | 0.03         | 0.08  | 0.17  | 0.10  | 0.08          | 0.03 | 0.37         | 0.15  | 0.13  | 0.13  | 0.11         | 0.10  |
| Cholesterol                    | 2.36         | 2.36  | 3.53  | 1.97  | 2.89          | 2.30 | 9.73         | 8.64  | 7.33  | 9.34  | 8.40         | 8.90  |
| Cholestanol                    | 0.30         | 0.28  | 0.41  | 0.26  | 0.24          | 0.27 | 0.54         | 0.40  | 0.38  | 0.40  | 0.33         | 0.40  |
| Campesterol                    | 0.31         | 0.25  | 0.37  | 0.23  | 0.24          | 0.25 | 0.94         | 0.60  | 0.52  | 0.57  | 0.52         | 0.57  |
| Stigmasterol                   | 0.36         | 0.35  | 0.42  | 0.27  | 0.34          | 0.31 | 0.79         | 0.56  | 0.49  | 0.55  | 0.49         | 0.53  |
| Sitosterol                     | 1.19         | 1.07  | 1.15  | 0.66  | 1.16          | 0.93 | 2.79         | 1.64  | 1.42  | 1.62  | 1.76         | 1.61  |
| Fucosterol                     | 0.09         | 0.08  | 0.08  | 0.08  | 0.10          | 0.07 | 0.22         | 0.16  | 0.16  | 0.19  | 0.15         | 0.17  |
| Stigmastanol                   | 0.18         | 0.14  | 0.24  | 0.20  | 0.13          | 0.07 | 0.74         | 0.26  | 0.25  | 0.24  | 0.22         | 0.20  |
| Total sterol                   | 5.40         | 5.22  | 7.39  | 4.47  | 5.84          | 5.01 | 19.35        | 13.82 | 11.92 | 14.32 | 12.95        | 13.79 |
| b/baCOP                        | 0.62         | 0.64  | 0.64  | 0.67  | 0.66          | 0.68 | 0.85         | 0.76  | 0.75  | 0.74  | 0.73         | 0.76  |
| e/baCOP                        | 0.04         | 0.11  | 0.15  | 0.12  | 0.11          | 0.04 | 0.10         | 0.09  | 0.08  | 0.08  | 0.09         | 0.06  |

表 5.4 下水処理放流水中のカフェインおよびステロール類の濃度変化 (µg/L)

| Sampling date<br>Sampling time | Nov. 9, 2005 |       |       |       | Nov. 10, 2005 |       | Feb. 8, 2006 |       |       |       | Feb. 9, 2006 |      |
|--------------------------------|--------------|-------|-------|-------|---------------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------------|------|
|                                | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00          | 5:00  | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00         | 5:00 |
| Caffeine                       | 0.04         | 0.05  | 0.04  | 0.02  | 0.05          | 1.63  | 0.19         | 0.16  | 0.71  | 0.66  | 0.34         | 0.25 |
| Coprostanone                   | 0.24         | 0.22  | 0.31  | 0.22  | 0.21          | 0.19  | 0.25         | 0.10  | 0.05  | 0.05  | 0.11         | 0.04 |
| Coprostanol                    | 0.90         | 0.79  | 1.32  | 1.14  | 1.21          | 1.01  | 1.81         | 1.64  | 1.52  | 1.34  | 2.47         | 0.99 |
| Epicoprostanol                 | 0.13         | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.08          | 0.08  | 0.30         | 0.07  | 0.07  | 0.06  | 0.10         | 0.05 |
| Cholesterol                    | 4.67         | 4.93  | 6.16  | 6.78  | 9.31          | 4.63  | 7.07         | 9.48  | 9.26  | 6.11  | 9.44         | 5.63 |
| Cholestanol                    | 0.48         | 0.38  | 0.56  | 0.47  | 0.52          | 0.48  | 0.50         | 0.59  | 0.52  | 0.44  | 0.59         | 0.39 |
| Campesterol                    | 0.37         | 0.35  | 0.51  | 0.41  | 0.43          | 0.37  | 0.65         | 0.65  | 0.66  | 0.52  | 0.81         | 0.48 |
| Stigmasterol                   | 0.58         | 0.64  | 0.56  | 0.55  | 0.71          | 0.67  | 0.74         | 0.78  | 0.77  | 0.65  | 0.81         | 0.53 |
| Sitosterol                     | 1.51         | 2.01  | 1.30  | 1.60  | 1.98          | 2.35  | 1.97         | 1.73  | 1.81  | 1.50  | 2.01         | 1.22 |
| Fucosterol                     | 0.08         | 0.08  | 0.09  | 0.08  | 0.09          | 0.08  | 0.10         | 0.26  | 0.11  | 0.22  | 0.13         | 0.08 |
| Stigmastanol                   | 0.21         | 0.20  | 0.11  | 0.18  | 0.19          | 0.18  | 0.33         | 0.17  | 0.18  | 0.18  | 0.20         | 0.10 |
| Total sterol                   | 9.15         | 9.62  | 10.95 | 11.46 | 14.73         | 10.05 | 13.71        | 15.47 | 14.95 | 11.06 | 16.69        | 9.51 |
| b/baCOP                        | 0.65         | 0.68  | 0.70  | 0.71  | 0.70          | 0.68  | 0.78         | 0.74  | 0.74  | 0.75  | 0.81         | 0.72 |
| e/baCOP                        | 0.09         | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.05          | 0.05  | 0.13         | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.03         | 0.03 |

表 5.5 流入下水中のカフェインおよびステロール類の濃度変化 (µg/L)

| Sampling date<br>Sampling time | Nov. 9, 2005 |       |       |       | Nov. 10, 2005 |       | Feb. 8, 2006 |       |       |       | Feb. 9, 2006 |       |
|--------------------------------|--------------|-------|-------|-------|---------------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------------|-------|
|                                | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00          | 5:00  | 9:00         | 13:00 | 17:00 | 21:00 | 1:00         | 5:00  |
| Caffeine                       | 34.3         | 27.6  | 40.4  | 43.4  | 30.1          | 16.6  | 12.1         | 11.0  | 15.5  | 15.7  | 8.5          | 6.2   |
| Coprostanone                   | 13.0         | 7.8   | 6.4   | 6.3   | 4.5           | n.d.  | 7.9          | 6.3   | 3.8   | 3.0   | 3.9          | 7.1   |
| Coprostanol                    | 139.5        | 97.4  | 102.3 | 75.5  | 47.1          | 73.5  | 420.4        | 303.2 | 252.6 | 211.4 | 116.0        | 161.0 |
| Epicoprostanol                 | 0.9          | 0.4   | 0.6   | 0.5   | 0.3           | 0.4   | 0.6          | 0.6   | 0.8   | 0.7   | 0.0          | 0.5   |
| Cholesterol                    | 274.0        | 192.6 | 205.1 | 153.6 | 113.8         | 146.9 | 698.6        | 448.9 | 431.8 | 331.4 | 225.9        | 279.9 |
| Cholestanol                    | 4.8          | 3.5   | 4.0   | 3.0   | 2.4           | 3.4   | 14.1         | 9.4   | 9.2   | 7.7   | 5.4          | 7.4   |
| Campesterol                    | 21.6         | 15.7  | 18.9  | 13.7  | 9.1           | 13.1  | 77.4         | 48.9  | 49.8  | 38.7  | 24.9         | 34.8  |
| Stigmasterol                   | 7.7          | 6.2   | 8.0   | 5.5   | 4.1           | 9.7   | 30.6         | 21.5  | 23.3  | 15.9  | 10.7         | 25.1  |
| Sitosterol                     | 57.8         | 41.6  | 56.5  | 35.5  | 24.2          | 33.0  | 148.8        | 91.2  | 87.9  | 73.5  | 83.0         | 60.5  |
| Fucosterol                     | 2.6          | 1.7   | 2.2   | 1.4   | 1.1           | 3.0   | 5.3          | 3.6   | 3.8   | 2.4   | 1.9          | 3.9   |
| Stigmastanol                   | 6.1          | 3.9   | 4.6   | 3.6   | 2.4           | 4.3   | 9.5          | 6.4   | 6.7   | 5.2   | 3.5          | 4.4   |
| Total sterol                   | 528          | 371   | 409   | 298   | 209           | 287   | 1,413        | 940   | 870   | 690   | 475          | 584   |
| b/baCOP                        | 0.97         | 0.97  | 0.96  | 0.96  | 0.95          | 0.96  | 0.97         | 0.97  | 0.96  | 0.96  | 0.96         | 0.96  |
| e/baCOP                        | 0.01         | 0.00  | 0.01  | 0.01  | 0.01          | 0.00  | 0.00         | 0.00  | 0.00  | 0.00  | 0.00         | 0.00  |

河川水中のカフェイン濃度は、上流地点で 0.60~5.61 $\mu\text{g/L}$ 、下流地点で 0.04~3.78 $\mu\text{g/L}$  であり、2005 年 11 月、2006 年 2 月の調査時ともに大きな濃度差は確認されなかった。下水処理放流水中の濃度は、0.02~1.63 $\mu\text{g/L}$  であり、2005 年 11 月調査時の 1 データを除くと、2006 年 2 月調査時の下水処理放流水中濃度の方が高かった。流入下水中のカフェイン濃度は、6.2~43.4 $\mu\text{g/L}$  であり、若干 2005 年 11 月調査時の方が他方に比べ高かった。河川水中の総ステロール類濃度は、上流地点で 3.13~23.1 $\mu\text{g/L}$ 、下流地点で 4.47~19.3 $\mu\text{g/L}$  であった。下水処理放流水、流入下水中の総ステロール類濃度は、それぞれ 9.15~16.7 $\mu\text{g/L}$ 、209~1410 $\mu\text{g/L}$  であった。総ステロール類濃度は、概ね 2006 年 2 月調査時の方が他方に比べ高かった。

調査時に得られた流量データ、下水処理場から提供された放流量データより、各成分の負荷量を算出した (図 5.3)。調査河川における総ステロール類の負荷量は、2005 年 11 月に比べ 2006 年 2 月の調査時に高く、同じく下水処理場への流入負荷および流出負荷量も同様の傾向であった。しかし、い

れの調査時においても、下水処理場からの流出負荷量は、処理水の受入れ河川に対する負荷量は低いことが示唆された。調査河川上流地点におけるカフェインの負荷量は、2005 年 11 月は 6.67g/h、2006 年 2 月は 7.43g/h とほぼ同程度であった。下水処理場からの流出負荷量は、2005 年 11 月は 0.07g/h、2006 年 2 月は 0.17g/h であり、ステロール類同様に、下水処理水の受入れ河川に対する流出負荷は小さいと見積もられた。ここで、2006 年 2 月において、上流地点および下流地点における総ステロール類、カフェインの負荷量の経時変化は類似している。一方、2005 年 11 月 9 日の 9 時、13 時、17 時の試料については、上流と下流の負荷量の変動の関係が乖離している。このことより、下水処理水が流入した後の河川下流地点における採水が、同時刻では適切に行われていなかったか、もしくは流量が正確に観測できていなかった可能性がある。

各成分の負荷量から、下水処理場における除去率を算出した (表 5.6)。

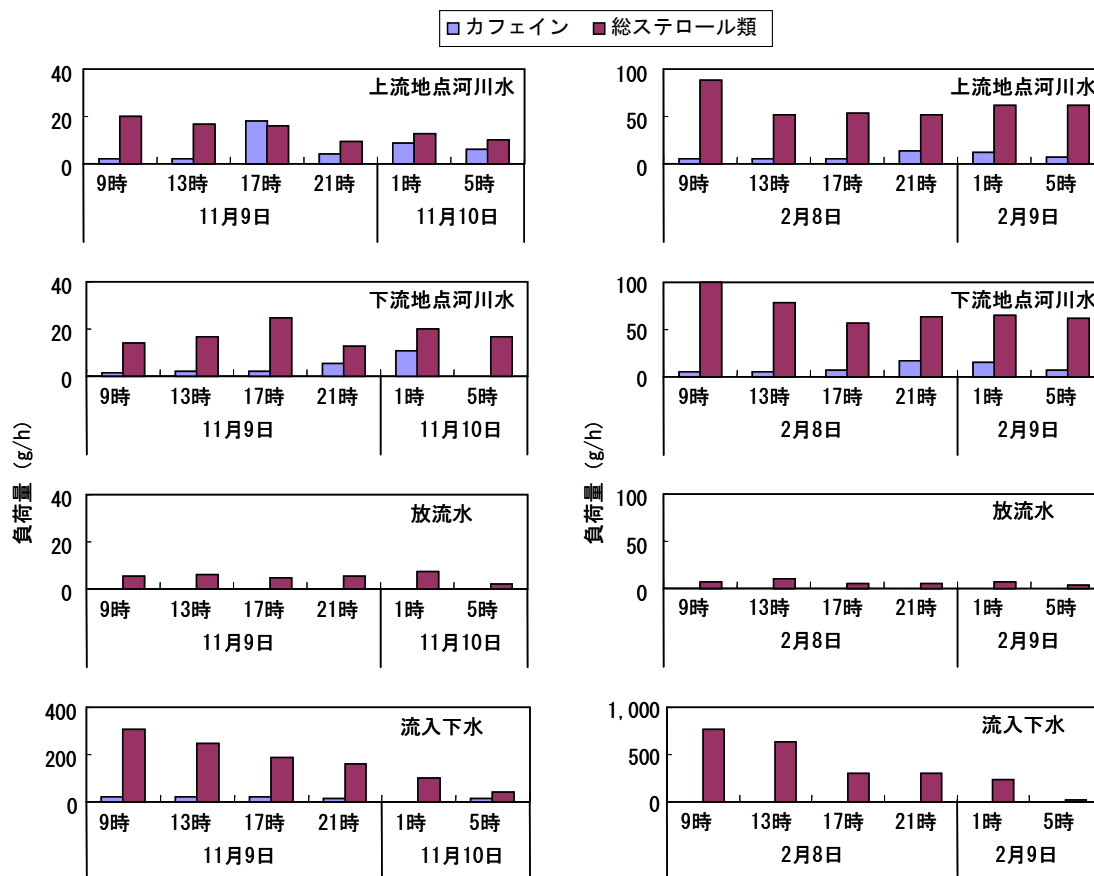


図 5.3 OH 川におけるカフェインと総ステロール類負荷量の経時変化  
(左：2005 年 11 月調査、右：2006 年 2 月調査)

表 5.6 OH 川隣接下水処理場における  
各化学物質マーカーの除去率 (%)

| 調査年月日          | ステロール類      | カフェイン       |
|----------------|-------------|-------------|
| 2005年11月10-11日 | 92.6 ~ 98.2 | 87.4 ~ 100  |
| 2006年2月8-9日    | 82.4 ~ 99.0 | 57.3 ~ 98.6 |

ステロール類の除去率は 82.4%~99%、カフェインの除去率は 57.3%~100%であった。また、いずれの調査時においても、朝方(5時)水量が低下する時間帯の除去率を除くと、どちらの成分も 95%以上の除去率となった。

上流地点で検出される化学物質の起源を推定するために、ステロール類の分析結果について考察を進める。はじめに、各調査地点において検出されるステロール類組成の時間変動は小さかった。また、各ステロールの組成、粒子(懸濁相)への分配は、河川水、下水処理水で同様の傾向であった(表 5.7、図 5.4)。ステロール類を用いた糞便汚染の指標として、いくつかのステロールの濃度比を用いた手法が提案されている<sup>9)</sup>。そのうち、水域における生活排水の負荷を示す指標： $b/baCOP$  [coprostanol/(coprostanol+cholestanol)]、水域における畜産排水の負荷を示す指標： $e/baCOP$  [epicoprostanol/(coprostanol+cholestanol)]を用いた。未処理の流入下水では、前者は 0.97 と高く、後者は 0.01 以下と低い(表 5.7)。下水処理によりその比は変化しているが、それらの値は上流地点での値とほぼ等しかった。このことより、上流地点におけるこれらの物質の起源は、処理を受けた家庭排水の寄与が大きいことが示唆された。

表 5.7 ステロール類分析結果の解析

| 地点            | 溶存/懸濁比        | b/baCOP   | e/baCOP   |
|---------------|---------------|-----------|-----------|
| 上流地点<br>(D地点) | 30~80%が懸濁相に存在 | 0.59~0.86 | 0.06~0.17 |
| 下流地点<br>(E地点) | 30~80%が懸濁相に存在 | 0.62~0.81 | 0.04~0.15 |
| 下水処理水         | 30~80%が懸濁相に存在 | 0.65~0.81 | 0.02~0.12 |
| 流入下水          | 80%以上が懸濁相に存在  | 0.97      | 0.01以下    |

b/baCOP: 水域における生活排水の負荷を示す指標  
e/baCOP: 水域における畜産排水の負荷を示す指標

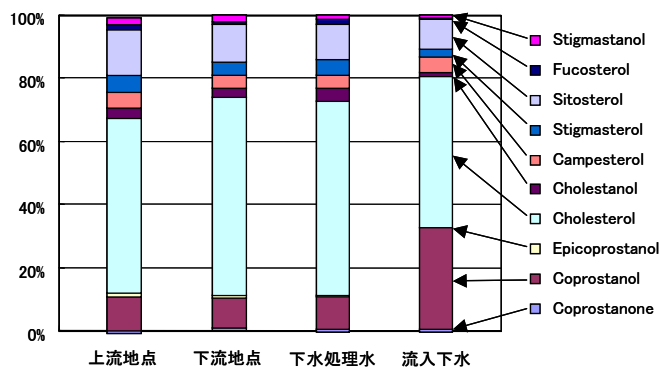


図 5.4 各試料のステロール組成の比較 (2006年2月調査における13時採水試料)

## 5.2 下水道整備状況が異なる流域における化学物質マーカー、生物マーカーの変化

### 5.2.1 調査地点及び調査方法

18-19 年度調査は、千葉県手賀沼に流入する大津川流域の下水道整備状況が異なる支川 3 地点において実施した。調査流域の概略を図 5.5 に示した。大津川上流部は下水道普及率が低く(ほぼ 0%)中流部で 30%、下流部で 95%程度である。平成 14 年度の流域情報を基に整理した流域内の生活排水整備状況に

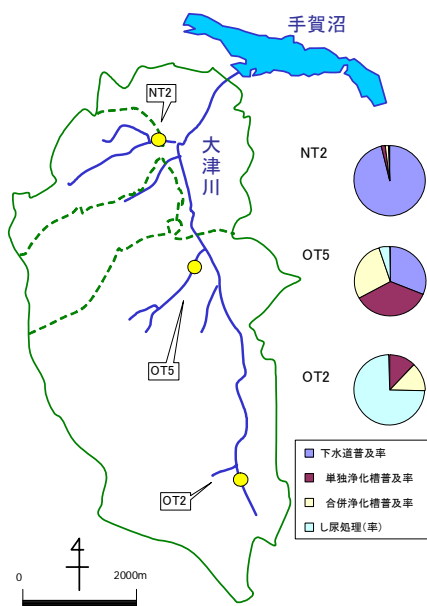


図 5.5 調査地点

によれば、上流部調査地点 OT2 の集水面積は 437ha、人口 37,345 人でありトイレ排水・生活排水等は、くみ取り、単独浄化槽、合併浄化槽による処理がほとんどであり、下水道普及率は 0%である。中流部調査地点 OT5 は集水面積 592ha、人口 35,026 人で下水道普及率 31%である。残りの 69%はくみ取り、単独浄化槽、合併浄化槽により処理されている。下流部調査地点 NT2 は集水面積 212ha、人口 11,841 人で下水道普及率が 96%である。

2006 年 12 月 5-6 日に 18 年度調査、2008 年 1 月 22-23 日に 19 年度調査を、前述の 3 地点において河川水を 6 時間間隔で通日(24 時間)採水を実施した。同時に流量観測と現場測定(水温、pH、EC、DO、残留塩素等)を実施した。

### 5.2.2 測定方法

化学物質マーカー、生物マーカーの測定方法は平成 17 年

度と同じ方法とした。

本研究で対象とした化学物質マーカーは 10 種のステロール類およびカフェインである。ステロール類およびカフェインの測定は、それぞれ Isobe et al. <sup>2)</sup>、Buerge et al. <sup>3)</sup> に若干の改良を加え行った。

また、生物マーカーは大腸菌、病原微生物のクリプトスポリジウム、ジアルジア、ノロウイルス (G1 型、G2 型) とした。

### 5.2.3 調査結果と考察

#### 1) 18 年度の調査結果

試料を採取した 3 流域の排水整備状況を図 5.6 に、各種排水人口を図 5.7 に、流量の経時変化を図 5.8 に示した。図 5.7 における各種排水人口の内容は以下の通りである。未処理生活雑排水人口はし尿処理および単独浄化槽人口を、処理済み生活雑排水人口は合併浄化槽人口を、処理済みトイレ排水人口は単独および合併浄化槽人口の和を示す。これらの整理の結果、OT⑤からの汚濁負荷が高いと予想された。

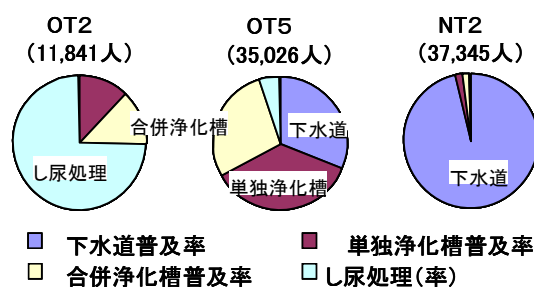


図 5.6 調査地点のトイレ排水・生活排水  
処理人口内訳

※ ( ) 内の数値は、集水域内人口

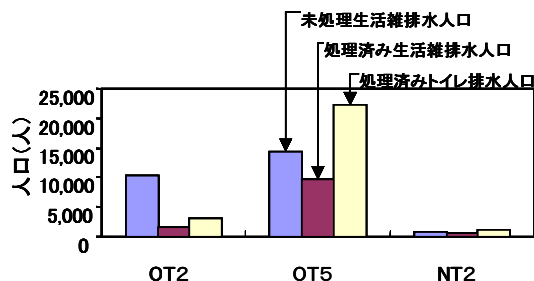


図 5.7 調査地点における各種排水排出人口

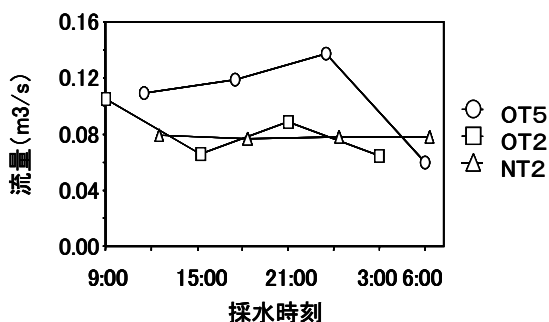


図 5.8 調査地点における流量の経時変化

表 5.8 に本調査における化学物質マーカーの分析結果を示す。得られたステロール組成を、過年度までに行った女堀川での調査結果と比較した (図 5.9)。その結果、女堀川における調査のうち、流入下水におけるステロール組成を除くと、いずれの排水試料についても明瞭な差異は観察されなかった。ステロール類の相対組成比を用いて比較を行ったが、ステロール組成同様に明瞭な差異は観察されなかった。この結果から、女堀川の下処理水流入地点より上流で採取された河川水は、主に生活雑排水の汚濁負荷を受けているものと推

察される。

得られた結果と流量データより、各成分の負荷量の経時変化を算出した (図 5.10)。ステロール類とカフェインの負荷量はほぼ同様の経時変化を示した。OT2、NT2 では、カフェインの負荷量に比べステロール類の負荷量が大きいのに対し、OT5 ではカフェインの負荷量がいずれの採水時間においてもステロール類の負荷量に比べ大きくなった。

図 5.11 には、各調査地点における BOD、カフェイン、ステロール類の日平均負荷量を示した。OT2 ではステロール類の負荷量が相対的に大きく、OT5 ではステロール類の負荷量が相対的に小さかった。各地点のステロール類の日平均負荷量の関係は、ノロウイルス (G2 型) の日平均負荷量の関係と類似しており、今回の調査がウイルス発生の流行期に実施しているため、ステロール類の負荷量が指標として有効であると考えられる。しかし、ノロウイルス (G2 型) とステロール類の負荷量の経時変化においては、両者に類似の変動は確認されなかった。

表 5.8 調査地点における化学物質マーカーの分析結果 (ng/l)

| 地点名<br>採取日<br>採取時間 | OT2    |        |        |        | OT5    |        |        |        | NT2    |        |        |        |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                    | Dec. 5 |        |        | Dec. 6 | Dec. 5 |        | Dec. 6 |        | Dec. 5 |        | Dec. 6 |        |
|                    | 9:00   | 15:00  | 21:00  | 3:00   | 12:00  | 18:00  | 0:00   | 6:00   | 12:00  | 18:00  | 0:00   | 6:00   |
| 化合物名               | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) | (ng/L) |
| Caffeine           | 11,993 | 7,808  | 13,137 | 6,472  | 5,031  | 4,290  | 3,803  | 3,973  | 1,046  | 1,120  | 1,241  | 255    |
| Coprostanone       | 768    | 230    | 303    | 287    | 95     | 67     | 72     | 69     | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   |
| Coprostanol        | 5,064  | 1,276  | 1,688  | 1,601  | 285    | 206    | 198    | 169    | 318    | 242    | 200    | 126    |
| Epicoprostanol     | 193    | 83     | 107    | 113    | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   |
| Cholesterol        | 35,699 | 8,810  | 12,112 | 10,782 | 2,031  | 1,480  | 1,865  | 1,050  | 3,570  | 1,950  | 1,944  | 1,004  |
| Cholestanol        | 1,342  | 377    | 469    | 467    | 163    | 119    | 123    | 117    | 146    | 113    | 104    | n.d.   |
| Campesterol        | 3,400  | 685    | 939    | 848    | 187    | 168    | 149    | 113    | 239    | 204    | 127    | 109    |
| Stigmasterol       | 1,715  | 404    | 601    | 526    | 169    | 150    | 106    | 99     | 152    | 177    | 102    | 81     |
| Sitosterol         | 7,953  | 1,653  | 2,350  | 2,020  | 513    | 408    | 326    | 268    | 684    | 481    | 302    | 228    |
| Fucosterol         | 316    | 116    | 155    | 148    | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   |
| Stigmastanol       | 350    | 124    | 155    | 153    | 94     | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   | n.d.   |
| Total sterol       | 56,800 | 13,756 | 18,880 | 16,946 | 3,537  | 2,598  | 2,841  | 1,885  | 5,109  | 3,166  | 2,779  | 1,548  |

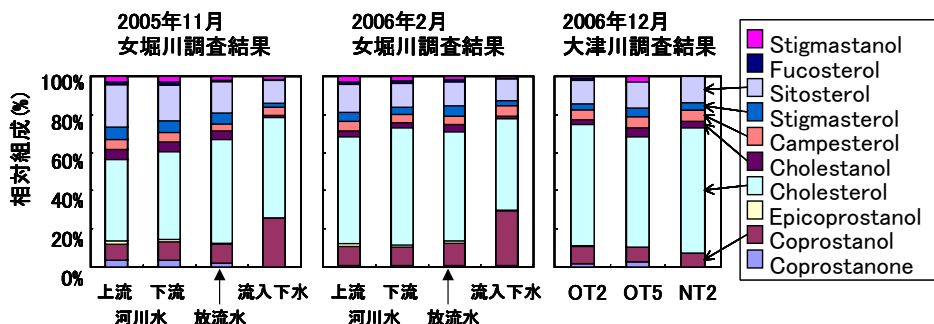


図 5.9 女堀川および本調査 (大津川) における各種排水のステロール組成の比較

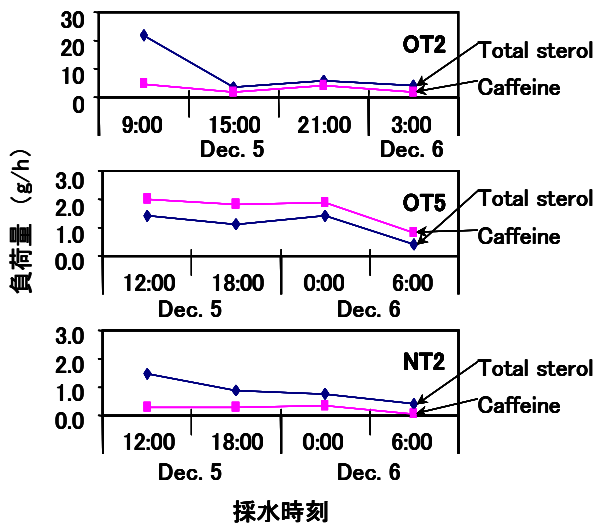


図 5.10 調査地点における各化学物質マーカー  
負荷量の経時変化

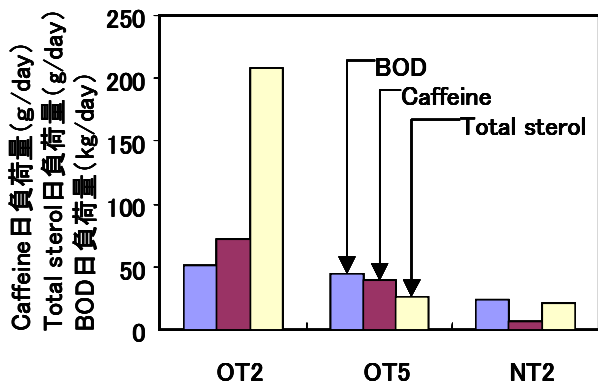


図 5.11 調査地点における BOD と各化学物質  
マーカーの日平均負荷量

調査実施前においては、流域 OT5 の排水からウイルス、ステロール類が高濃度で検出されると予想したが、両者の負荷は OT2 が最大となった。また、OT5 のカフェインの負荷が、他の地点と異なりステロール類よりも大きくなった。

生物マーカーの調査結果を表 5.9、図 5.12 に示した。全ての試料で大腸菌の検出レベルは  $10^0 \sim 10^2$  cfu/mL であり、ふん便汚染の可能性が示された。クリプトスポリジウム、ジアルジアに関しては 12 検体中 1～2 検体からの検出、検出濃度は各々 0.05 oocysts・cysts/L であり、平常時における汚染レベルは低い。17 年度に実施した畜産系負荷の存在する河川やその流域内にある下水処理場放流水の調査でも同様な結果であった。

表 5.9 生物マーカーの検出結果 (18 年度)

(1) ノロウイルス (コピー/L)

| 試料名 | 時間         | Norovirus G1型 | Norovirus G2型 |
|-----|------------|---------------|---------------|
| OT2 | 12/5 9:00  | 7.2E+04       | 3.7E+05       |
|     | 12/5 15:00 | 3.5E+04       | 5.3E+05       |
|     | 12/5 21:00 | 1.3E+04       | 4.0E+04       |
|     | 12/6 3:00  | 5.6E+04       | 4.4E+05       |
| OT5 | 12/5 11:30 | N. D.         | 2.9E+04       |
|     | 12/5 17:30 | N. D.         | 3.2E+03       |
|     | 12/5 23:30 | N. D.         | 4.0E+04       |
|     | 12/6 5:30  | N. D.         | 1.6E+04       |
| NT2 | 12/5 12:30 | N. D.         | 2.0E+04       |
|     | 12/5 18:20 | N. D.         | 3.6E+03       |
|     | 12/6 0:20  | N. D.         | 1.0E+04       |
|     | 12/6 6:20  | N. D.         | 5.0E+03       |

(2) クリプトスポリジウム・ジアルジア (個/L)

| 試料名 | 時間         | クリプトスポリジウム | ジアルジア   |
|-----|------------|------------|---------|
| OT2 | 12/5 9:00  | N. D.      | 5.0E-02 |
|     | 12/5 15:00 | N. D.      | N. D.   |
|     | 12/5 21:00 | N. D.      | N. D.   |
|     | 12/6 3:00  | N. D.      | N. D.   |
| OT5 | 12/5 11:30 | N. D.      | 5.0E-02 |
|     | 12/5 17:30 | N. D.      | N. D.   |
|     | 12/5 23:30 | N. D.      | N. D.   |
|     | 12/6 5:30  | N. D.      | N. D.   |
| NT2 | 12/5 12:30 | 5.0E-02    | N. D.   |
|     | 12/5 18:20 | N. D.      | N. D.   |
|     | 12/6 0:20  | N. D.      | N. D.   |
|     | 12/6 6:20  | N. D.      | N. D.   |

(3) 大腸菌 (cfu/mL)

| 試料名 | 時間         | 大腸菌     |
|-----|------------|---------|
| OT2 | 12/5 9:00  | 3.5E+01 |
|     | 12/5 15:00 | 2.0E+01 |
|     | 12/5 21:00 | 2.5E+01 |
|     | 12/6 3:00  | 3.0E+01 |
| OT5 | 12/5 11:30 | 1.5E+01 |
|     | 12/5 17:30 | 3.5E+00 |
|     | 12/5 23:30 | 2.0E+00 |
|     | 12/6 5:30  | 4.0E+00 |
| NT2 | 12/5 12:30 | 1.9E+02 |
|     | 12/5 18:20 | 5.0E+01 |
|     | 12/6 0:20  | 1.0E+02 |
|     | 12/6 6:20  | 9.0E+00 |

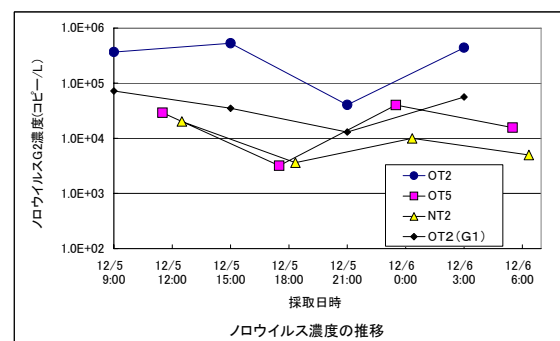


図 5.12 ノロウイルス濃度の推移

流行期におけるノロウイルスの検出濃度は、地点 OT2 で 1 Lあたり  $10^4 \sim 10^5$  濃度、OT5、NT2 で  $10^3 \sim 10^4$  濃度であり、比較的高濃度であった。流域における流行状況などが異なるため単純には比較はできないが、17 年度に実施した畜産系負荷の存在する河川の検出濃度とは大きな違いが見られた。これは、ヒト由来の負荷割合の大きさが違うことに起因するものと考えられた。各地点のウイルス検出濃度と測定流量からウイルスの負荷量 (図 5.13) を算出すると、OT2 が  $2.3E+12/day$  (G1: $3.22E+11/day$ )、OT5 が  $2.2E+11/day$ 、NT2 が  $6.7E+10/day$  であった。処理済みトイレ排水人口 (単独・合併浄化層人口) は OT5 が最も多いが、ウイルス負荷量は OT2 が最も高いため、各々の負荷量の関係は乖離した傾向が見られた。

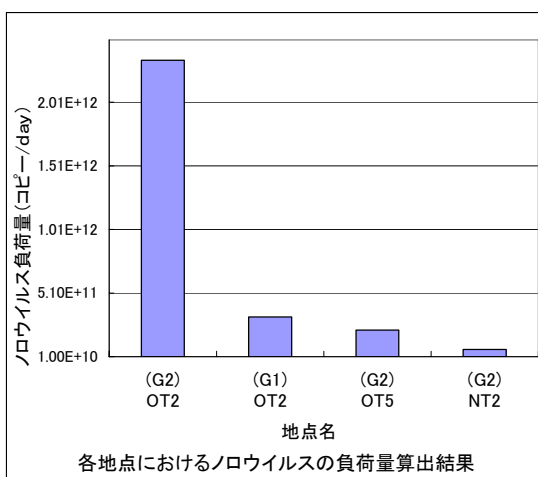


図 5.13 各地点におけるノロウイルスの負荷量算出結果

## 2) 19 年度の調査結果

19 年度の調査は、2008 年 1 月 22-23 日に、大津川流域の 3 小河川にて河川水を 6 時間おきに 24 時間採水した。同時に行った流量観測の結果を図 5.14 に示した。図 5.14 の流量経時変化より OT2 及び OT5 は流量に時間変動があり、NT2 の流量はほぼ一定の値を示していることが分かる。OT2 及び OT5 は下水道整備率が低いため、生活排水は単独浄化槽又は合併浄化槽により処理された後、各調査流域に排出されている。これに対し NT2 はほぼ 100% 下水道が普及していることから、生活排水は下水道に排出されており、観測された流量は湧水等が主体の基底流量と考えられる。

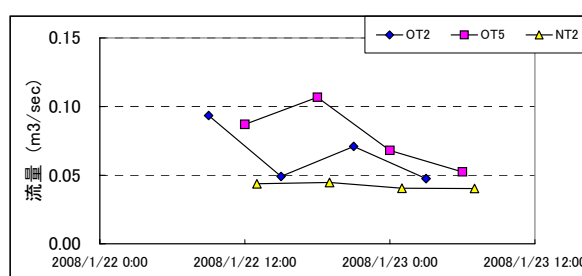


図 5.14 大津川の各調査地点における流量の経時変化

## (2) 化学物質マーカーの検出状況 :

表 5.10、表 5.11 に本調査における化学物質マーカーの分析結果を示す。溶存態試料ではコレステロールが分析したステロール類のなかで最も高い濃度 ( $800 \sim 11,000 ng/L$ ) で検出された。

表 5.10 大津川調査結果 (溶存態試料) Surrogate 補正有り 単位 : ng/L

| 試料名<br>化合物名 | LOD | LOQ | TB<br>超純水 | NT-②    | NT-②    | NT-②    | NT-②    | OT-⑤    | OT-⑤    | OT-⑤    | OT-⑤    | OT-②    | OT-②    | OT-②    | OT-②    |
|-------------|-----|-----|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|             |     |     |           | (12:00) | (18:00) | (00:00) | (06:00) | (12:00) | (18:00) | (00:00) | (06:00) | (09:00) | (15:00) | (21:00) | (03:00) |
| コプロスタノン     | 13  | 44  | 206       | N.D.    | Tr(18)  | Tr(14)  | N.D.    | N.D.    | N.D.    | N.D.    | Tr(16)  | N.D.    | Tr(18)  | N.D.    | Tr(15)  |
| コプロスタノール    | 7   | 22  | 176       | 72      | 109     | 119     | 86      | 81      | 97      | 61      | 56      | 475     | 83      | 1161    | 809     |
| エピコプロスタノール  | 6   | 21  | 147       | Tr(9)   | Tr(13)  | Tr(14)  | Tr(11)  | Tr(15)  | Tr(16)  | Tr(14)  | Tr(14)  | 39.0    | 41.0    | 55.0    | 27.0    |
| コレステロール     | 8   | 26  | 3273      | 1138    | 1546    | 1810    | 1055    | 1268    | 1342    | 927     | 797     | 10797   | 7606    | 10126   | 7679    |
| コレスタノール     | 8   | 26  | 619       | 58.0    | 80      | 82      | 70      | 93      | 100     | 76      | 76      | 350     | 365     | 322     | 291     |
| カンベステロール    | 10  | 33  | 294       | 65      | 80      | 82      | 66      | 76      | 100     | 68      | 67      | 892     | 643     | 1246    | 642     |
| スチグマステロール   | 16  | 52  | 412       | 58.0    | 91      | 87      | 76      | 76      | 113     | 92      | 81      | 600     | 495     | 668     | 442     |
| シトステロール     | 14  | 48  | 619       | 147     | 200     | 185     | 158     | 167     | 227     | 164     | 140     | 2119    | 1480    | 2728    | 1521    |
| フコステロール     | 9   | 31  | 737       | 58.0    | 78      | 68      | 58.0    | 68      | 93      | 68      | 76      | 149     | 161     | 134     | 127     |
| スチグマスタノール   | 7   | 24  | 619       | 41.0    | 57.0    | 51.0    | 46.0    | 55.0    | 73      | 54.0    | 64      | 124     | 148     | 132     | 115     |



表 5.11 大津川調査結果 (懸濁態試料) Surrogate 補正有り 単位 : ng/L

| 試料名<br>化合物名 | LOD LOQ |    | TB     | NT-②    | NT-②    | NT-②    | NT-②    | OT-⑤    | OT-⑤    | OT-⑤    | OT-⑤    | OT-②    | OT-②    | OT-②    | OT-②    |
|-------------|---------|----|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|             |         |    | 超純水    | (12:00) | (18:00) | (00:00) | (06:00) | (12:00) | (18:00) | (00:00) | (06:00) | (09:00) | (15:00) | (21:00) | (03:00) |
| コプロスタノン     | 13      | 44 | N.D.   | N.D.    | N.D.    | Tr(20)  | N.D.    | Tr(14)  | Tr(32)  | Tr(31)  | N.D.    | N.D.    | 76      | N.D.    | 102     |
| コプロスタノール    | 7       | 22 | N.D.   | 236     | 392     | 534     | 173     | 372     | 600     | 610     | 341     | 2614    | 2658    | 2011    | 2322    |
| エピコプロスタノール  | 6       | 21 | N.D.   | N.D.    | N.D.    | N.D.    | N.D.    | Tr(13)  | 22.0    | Tr(18)  | Tr(15)  | 89      | 113     | 129     | 88      |
| コレステロール     | 8       | 26 | 139    | 2081    | 3377    | 3489    | 1040    | 3811    | 4999    | 4119    | 2406    | 25922   | 14417   | 20243   | 14386   |
| コレスタノール     | 8       | 26 | Tr(17) | 55.0    | 76      | 81      | 43.0    | 155     | 211     | 177     | 115     | 776     | 404     | 601     | 451     |
| カンペステロール    | 10      | 33 | N.D.   | 89      | 143     | 221     | 79      | 314     | 640     | 529     | 298     | 2586    | 1472    | 2692    | 1396    |
| スチグマステロール   | 16      | 52 | N.D.   | 64      | 105     | 135     | 72      | 196     | 405     | 391     | 193     | 1473    | 1010    | 1330    | 847     |
| シトステロール     | 14      | 48 | Tr(18) | 296     | 477     | 645     | 248     | 847     | 1577    | 1331    | 729     | 5428    | 3130    | 5416    | 2870    |
| フコステロール     | 9       | 31 | Tr(22) | Tr(30)  | Tr(29)  | 35.0    | Tr(27)  | 40.0    | 63      | 55.0    | 37.0    | 169     | 103     | 132     | 100     |
| スチグマスタノール   | 7       | 24 | Tr(16) | Tr(20)  | Tr(22)  | 26.0    | Tr(16)  | 34.0    | 56.0    | 50.0    | 32.0    | 187     | 112     | 171     | 118     |

次にシトステロール (140~2,700ng/L)、カンペステロール (65~1,250ng/L)、コプロスタノール (56~1,160ng/L)、スチグマステロール (58~670ng/L)、コレスタノール (58~370ng/L)、フコステロール (58~160ng/L)、スチグマスタノール (41~150ng/L) の濃度で検出された。また、エピコプロスタノール (Tr(9ng/L)~55ng/L)、コプロスタノン (ND~Tr(18ng/L)) は、他のステロール類に比べ低濃度であった。

懸濁態試料は溶存態試料同様の結果であり、コレステロールの検出濃度が最も高く、次にシトステロール、カンペステロール、コプロスタノール、スチグマステロール、コレスタノール、スチグマスタノール、フコステロールの順であった。

また、各調査地点のステロール相対組成を図 5.15、図 5.16 に示す。各地点におけるステロール相対組成に大きな違いはみられない。

更に、本年度得られたステロール相対組成と過年度までに行った女堀川・大津川での調査結果 (図 5.9) と比較した。ステロール類の相対組成比を用いて比較を行ったが、明瞭な差異は観察されなかった。

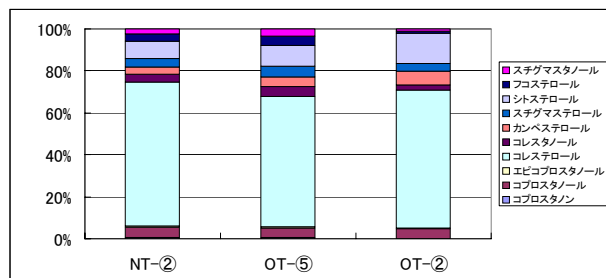


図 5.15 各調査地点におけるステロール組成 (溶存態試料) Surrogate 補正有り

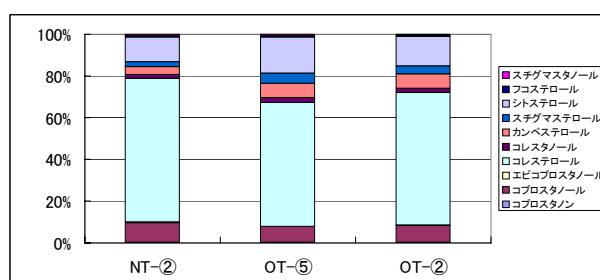


図 5.16 各調査地点におけるステロール組成 (懸濁態試料) Surrogate 補正有り

19 年度の生物マーカーの調査結果を表 5.12 に示す。全ての試料で大腸菌の検出濃度レベルは  $10^0 \sim 10^2$  cfu/mL であり、ふん便汚染の可能性が示唆された。残留塩素濃度が  $0 \sim 0.05$  mg/L の範囲で検出された地点 OT5 では、大腸菌の検出レベルは  $10^0 \sim 10^1$  cfu/mL であるのに対し、地点 NT2 では  $0$  mg/L、OT2 では  $0 \sim 0.03$  mg/L であったため、大腸菌の検出レベルは  $10^1 \sim 10^2$  cfu/mL となり、OT5 と比較して大腸菌の検出濃度は若干高い傾向が見られた。

クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出 (定量限界値  $0.05$  オ・スト/L)、ジアルジアは 12 検体中 2 検体から検出され検出濃度は  $0.05$  スト/L (定量限界値  $0.05$  スト/L) であった。17 年度に実施した畜産系負荷の存在する河川やその流域内にある下水処理場放流水の調査でも同様な結果であった。また、18 年度に実施した本河川での調査結果と検出レベルは同様であり、これらの原虫類に関しては平常時においては汚染レベルが低いものと考えられた。一方、クリプトスポリジウム症集団発生の異常時には、その処理区域内の下水処理場

において極めて高濃度のオーシストの流入が確認されており、放流先水域での感染リスクを低減させるために、下水処理場で緊急対策の実施の必要性を論じた報告がある<sup>10)</sup>。緊急対策手法として、凝集剤添加活性汚泥法や凝集剤添加砂ろ過法、流入下水の凝集沈殿法について評価した事例があり、各々の除去率は 5log、2.6log、1~3log との報告がある<sup>11)</sup>。クリプトスポリジウムの集団感染発生時には、これらの手法を組み合わせることで下水処理場において高い除去率が得られ、放流先水域での感染リスクを低減させることが出来ると考えられる。

ノロウイルスに関しては、非流行期と流行期に調査を行うことで検出濃度の違いを把握した。非流行期の調査では、18年度流行期の調査で比較的高濃度で検出された地点 OT2 を対象とし、7月に採水を行いノロウイルスを定量分析したが、G1型、G2型ともに定量限界値(3.8×10<sup>3</sup>コピー/L)以下であった。同一河川を対象とした18年度の流行期での最大検出濃度は地点 OT2 でG1型が10<sup>4</sup>コピー/L、G2型が10<sup>5</sup>コピー/L濃度レベル、19年度の流行期ではG1型、G2型ともに10<sup>5</sup>コピー/L濃度レベルであり、流行期であるか否かの違いにより最大検出濃度は2オーダー以上異なることが明らかとなった。19年度の流行期における地点 OT2 では、全ての試料においてノロウイルスの検出濃度は10<sup>5</sup>コピー/L濃度レベルであり、2ヶ年にわたり調査を行ったが流行期においては恒常的にノロウイルスに汚染されているものと考えられた。その他の地点 OT5、NT2 の試料では定量限界値(1.6×10<sup>3</sup>~3.0×10<sup>4</sup>コピー/L)以下であった。流域における流行状況などが異なるため単純には比較はできないが、17年度の流行期に実施した畜産系負荷の存在する河川

の検出濃度は不検出~10<sup>3</sup>コピー/L濃度レベルであり、ヒト由来の負荷割合の大きさが違うことによっても検出濃度は異なると考えられた。また、下水処理場において、感染流行期でのノロウイルスの流入実態や除去率に関して調査を行った事例があり、感染流行期の流入下水中のノロウイルス濃度はG1、G2型ともに10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>コピー/Lで推移した。活性汚泥処理法による除去率は1~2log程度であるが、PACの添加濃度を10mg-AL/Lとした凝集剤添加活性汚泥法による除去率の上積み効果は最大で2.5log程度であった。同様にPACの添加濃度を3mg-AL/Lとすることで砂ろ過法の除去率を最大で1.8log程度向上させられるとの報告がある<sup>12)</sup>。放流先の形態によっては、下水処理水中のノロウイルスを極力低濃度化する必要があると考えられるが、現在のところ目標とすべきウイルス濃度の設定は困難である。今後リスク評価に関わる研究の進展に伴い下水処理場において、さらなる除去率の向上が求められる可能性も否定できないが、上記手法の活用によっては下水処理場において放流水中のノロウイルス濃度をコントロールできる。また、消毒によるノロウイルスの不活化効果を評価できない課題も現状ではあるが、消毒強化による不活化効果も下水処理場では見込める可能性がある。

感染症発生時の異常時や感染流行期であるか否か、流域における負荷源の違いで環境水、それに影響を及ぼす下水処理水のクリプトスポリジウム、ノロウイルスの検出濃度は大きく異なることが考えられた。このため、公共用水域の衛生的安全性を担保する上で、モニタリングの継続実施や濃度変動に対応したリスク管理手法の構築についての評価は特に重要であるものと考えられた。

表 5.12 生物マーカーの検出結果 (19年度)

| ノロウイルス (コピー/L) |            |               |               | クリプトスポリジウム、ジアルジア (個/L) 大腸菌 (cfu/mL) |            |            |            |            |            |         |
|----------------|------------|---------------|---------------|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| 試料名            | 日時         | Norovirus G1型 | Norovirus G2型 | 試料名                                 | 日時         | クリプトスポリジウム | ジアルジア      | 試料名        | 日時         | 大腸菌     |
| OT2            | 7/10 9:00  | N. D.         | N. D.         | OT2                                 | 1/22 9:00  | N. D.      | 5.0E-02    | OT2        | 1/22 9:00  | 8.0E+01 |
|                | 検出限界値:     | 3.8E+03       | 3.8E+03       |                                     | 1/22 15:00 | N. D.      | N. D.      |            | 1/22 15:00 | 7.0E+01 |
| OT2            | 1/22 9:00  | 3.1E+05       | 3.1E+05       |                                     | 1/22 21:00 | N. D.      | 5.0E-02    | 1/22 21:00 | 8.0E+01    |         |
|                | 1/22 15:00 | 2.3E+05       | 1.3E+05       | 1/23 3:00                           | N. D.      | N. D.      | 1/23 3:00  | 5.0E+01    |            |         |
|                | 1/22 21:00 | 4.2E+05       | 3.3E+05       | OT5                                 | 1/22 12:00 | N. D.      | N. D.      | OT5        | 1/22 12:00 | 9.0E+00 |
|                | 1/23 3:00  | 1.0E+05       | 1.6E+05       |                                     | 1/22 18:00 | N. D.      | N. D.      |            | 1/22 18:00 | 1.0E+01 |
| OT5            | 1/22 12:00 | N. D.         | N. D.         | 1/23 0:00                           | N. D.      | N. D.      | 1/23 0:00  | 1.0E+01    |            |         |
|                | 1/22 18:00 | N. D.         | N. D.         | 1/23 6:00                           | N. D.      | N. D.      | 1/23 6:00  | 3.0E+00    |            |         |
|                | 1/23 0:00  | N. D.         | N. D.         | NT2                                 | 1/22 13:10 | N. D.      | N. D.      | NT2        | 1/22 13:10 | 2.0E+01 |
| 1/23 6:00      | N. D.      | N. D.         | 1/22 19:00    |                                     | N. D.      | N. D.      | 1/22 19:00 |            | 8.0E+01    |         |
| NT2            | 1/22 13:10 | N. D.         | N. D.         |                                     | 1/23 1:00  | N. D.      | N. D.      | 1/23 1:00  | 1.8E+02    |         |
|                | 1/22 19:00 | N. D.         | N. D.         |                                     | 1/23 6:40  | N. D.      | N. D.      | 1/23 6:40  | 4.0E+01    |         |
|                | 1/23 1:00  | N. D.         | N. D.         |                                     |            |            |            |            |            |         |
|                | 1/23 6:40  | N. D.         | N. D.         |                                     |            |            |            |            |            |         |

### 5.3 生物マーカーと化学物質マーカーの関係

平成 17 年度に調査した流入下水、下水処理放流水および平成 18 年度に調査した下水道整備状況の異なる小河川のデータをを用いノロウイルス G1、G2 型と化学物質マーカーの関係を整理し図 5.17、図 5.18 に示した。作図に用いたデータはノロウイルス流行期の平成 18 年 2 月と 12 月のデータとした。また、化学物質マーカーは、未処理排水による人為汚染のマーカーとして提案されているカフェイン<sup>3)</sup>とステロール類については総ステロールとした。

ノロウイルス G1、G2 型とも両対数グラフ上でカフェインと総ステロールの間に弱い相関が見られる。べき乗回帰により求めた相関係数は G1 型ではカフェインが 0.86、総ステロールが 0.73 であり G2 型ではカフェインが 0.80、総ステロールが 0.67 であった。最大の G1、G2 型濃度は、化学物質マーカーのカフェインあるいは総ステロールである程度推測できると考えられる。

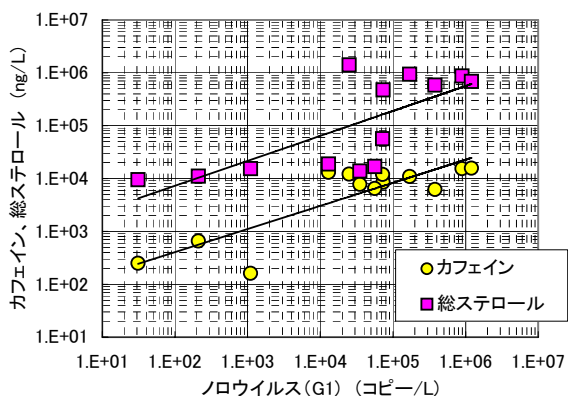


図 5.17 ノロウイルス (G1) と化学物質マーカーの関係

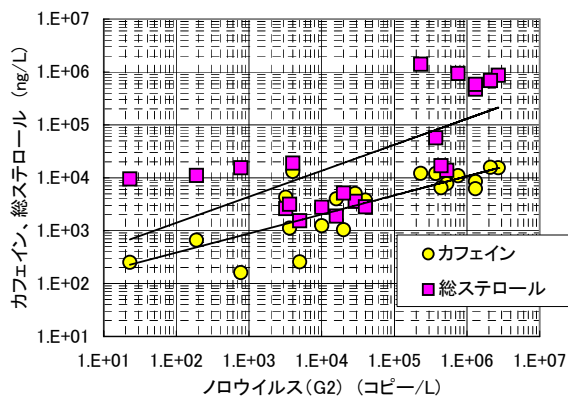


図 5.18 ノロウイルス (G2) と化学物質マーカーの関係

### 5.4 まとめ

本研究では、まず公共用水域への下水処理水の流入による生物マーカー、化学物質マーカーの変化と相互関係を把握するため、1 河川を対象に下水処理水の流入前後で実態調査を行った。また、調査対象流域における各マーカーの特性との関係を把握するため、河川流域内にある下水処理場で流入下水、放流水を対象に各マーカーの除去特性について調査した。次いで、下水道整備率が異なる 3 つの小河川において実態調査を行い、化学物質マーカー、生物マーカーの変化と相互関係を把握した。以上の研究から得られた結果を以下に示す。

- 1) 平常時における下水・河川水試料のクリプトスポリジウムの検出濃度・割合は低かった。
- 2) ジアルジアは流入下水で高濃度に検出される場合もあるが、活性汚泥処理法による除去率は高く、放流水のシスト濃度は放流先河川水と同程度となるため、公共用水域へ及ぼす負荷は低レベルであると考えられた。
- 3) ノロウイルスは非流行期と流行期あるいは流域における負荷源が異なることで検出濃度に大きな違いがあり、下水・河川水試料とも非流行期の汚染のレベルは低かった。
- 4) すべての試料からステロール類およびカフェインが検出された。
- 5) 調査対象河川に占める下水処理水の割合は低く、また、ステロール類やカフェインの負荷も低いことが明らかとなった。
- 6) 調査を行った下水処理場におけるステロール類やカフェインの除去率は概ね 95%以上であった。
- 7) 下水処理水の流入前後で生物マーカーの実態調査を行ったところ、平常時における下水・河川水試料のクリプトスポリジウムの検出濃度・割合は低かったが、ジアルジアは流入下水で高濃度に検出される場合もあった。活性汚泥処理法によるジアルジアの除去率は高く、放流水のシスト濃度は放流先河川水と同程度となるため、公共用水域へ及ぼす負荷は低レベルであると考えられた。また、下水処理場におけるステロール類やカフェインの除去率は概ね 95%以上であり、河川水に占める下水処理水中のこれら化学物質マーカーの負荷も低いことが明らかとなった。
- 8) 下水道整備率が異なる各地点のステロール類の日平均負

荷量の関係は、ノロウイルス（G2 型）の日平均負荷量の関係と類似しており、今回の調査がウイルス発生の流行期に実施しているため、ステロール類の負荷量が指標として有効であることが示唆された。

9) 流行期におけるノロウイルス(G1、G2 型)と化学物質マーカーの関係を整理したところ、カフェインまたは総ステロールとの間に弱い相関が認められた。このため、これら化学物質マーカー濃度を測定することにより、ノロウイルスの最大汚染状況を推測できることが分かった。

## 6. 河川底泥中のクリプトスポリジウム調査

(東京都水道局水質センター検査課 北田真吾)

### 6.1 はじめに

平成 17 年 1 月、利根川本流で多数の原虫類が検出され、利根川の広域にわたる汚染が危惧された。このため、当局は、利根川・荒川水系の水道事業者と協同で、水源流域における原虫類の実態調査を実施し、原虫類負荷の高い河川を特定した。しかし、その後、数度にわたって追跡調査したが、同一河川であっても原虫類検出数の変動が大きかった。さらに、たまたま河川の底泥（以下、「底泥」という。）を巻き上げて、濁質が多い試料があり、これを検査した結果、多くの原虫類が検出されることを確認した。これを受け、当局では、河川における原虫類の汚染実態の把握を行うとともに、汚染源の特定に資するため、底泥中の原虫類に関する実態調査を実施している。

本報告では、平成 18～19 年度の実態調査の結果についてまとめる。

### 6.2 調査方法

#### 6.2.1 調査地点及び調査月日

平成 18 年度は、過去の実態調査において、原虫類を多く検出した水系の中から広瀬川水系を選定した。

#### 6.2.2 試料の採取方法

##### a 河川水

調査地点の表層水を採取した。

##### b 河川底質

底質の採取は、図 6.1 に示す装置を用い、直径 23.5cm の範囲内にある底泥の表面を河川水とともに採取した。

### 6.2.3 測定方法

試料水量は、河川水が 10L、底質が 5L である。試料水に C100-PBS を 100mg/L となるように加えて 5 分攪拌し、5 分静置後、上澄水を回収した。これを免疫磁気ビーズ法—直接蛍光抗体染色法で精製・染色して検鏡した。本方法による回収率は、クリプトスポリジウムで約 50%、ジアルジアで約 20% である。

### 6.3 調査結果

結果を表 6.1 に示す。4 月の調査では、全ての調査地点でクリプトスポリジウムを検出し、特に底泥中に多量に存在していることが確認された。7 月から 9 月には、河川水、底泥

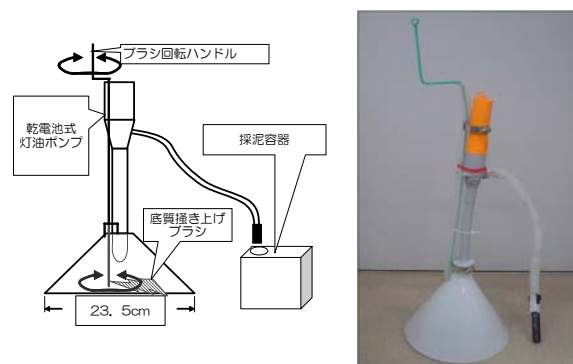


図 6.1 底泥採取装置

ともにほとんど検出されなかったが、10 月以降、再び検出されるようになり、12 月以降は全ての調査地点で検出されている。2 月には検出数が減少する傾向が認められている。

以上の結果から、

- ① 原虫類は、夏季にはほとんど検出されず、秋季から春季に増加する。
- ② 原虫類は、河川底に堆積していることが多く、河川水の検査だけでは原虫類汚染のリスクを見逃す危険性がある。

ことが明らかになった。

夏季に原虫類がほとんど検出されなかったひとつの原因として、河川流量の増加による影響が考えられる。広瀬川水系における河川流量の実測値はないが、7 月から 9 月および 2 月の調査日における河川流量は、他の期間に比べて多かったことを確認している。また、図 6.3 に示すとおり、伊勢崎地点で 24 時間の積算雨量が 20mm 以上あった日は 20 日を超えており、特に 7 月中旬、10 月上旬、12 月下旬に多量の降

表 6.1a 広瀬川水系における原虫類検出結果（平成 18 年度）

|         |     |                        | 4/17                   | 7/31 | 8/28 | 9/25 | 10/30 | 12/5  | 12/18  | 1/29   | 2/26   |       |
|---------|-----|------------------------|------------------------|------|------|------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| スクロリジウム | 葦川  | 城東橋 水 (個/10L)          | 18                     | 0    | 0    | 0    | 17    | 1,500 | 1,200  | 280    | 3      |       |
|         |     | 底泥 (個/m <sup>2</sup> ) | 2,400                  | 120  | 0    | 0    | 3,400 | 8,800 | 34,000 | 4,300  | 580    |       |
|         | 蛍光橋 | 水 (個/10L)              | 3                      | 3    | 0    | 2    | 29    | 40    | 180    | 63     | 18     |       |
|         |     | 底泥 (個/m <sup>2</sup> ) | 3,600                  | 0    | 0    | 0    | 460   | 1,300 | 2,200  | 14,000 | 1,900  |       |
|         | 広瀬川 | 中島橋                    | 水 (個/10L)              | 46   | 0    | 1    | 2     | 5     | 20     | 64     | 28     | 46    |
|         |     |                        | 底泥 (個/m <sup>2</sup> ) | 120  | 58   | 0    | 0     | 0     | 750    | 1,900  | 17,000 | 1,600 |

表 6.1b 広瀬川・小山川水系における原虫類検出結果（平成 19 年度）

|     |      |                        | 5/28 | 6/26 | 8/27 | 9/26 | 10/30 | 11/19 | 12/17 | 1/22 | 2/18 | 3/17 |
|-----|------|------------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|------|------|
| 広瀬川 | 中島橋  | 河川水(個/10L)             | 10   | 6    | 0    | 0    | 11    | 0     | 0     | 9    | 5    | 9    |
|     |      | 底泥 (個/m <sup>2</sup> ) | 170  | -    | 0    | 0    | 0     | 0     | 46    | 46   | 810  | 320  |
|     |      | (個/dry-g)              | 2    | -    | 0    | 0    | 0     | 0     | 2     | 2    | 6    | 3    |
| 小山川 | 小山川橋 | 河川水(個/10L)             | -    | -    | -    | -    | 14    | 18    | 0     | 13   | 4    | 30   |
|     |      | 底泥 (個/m <sup>2</sup> ) | -    | -    | -    | -    | 0     | 92    | 180   | 180  | 510  | 23   |
|     |      | (個/dry-g)              | -    | -    | -    | -    | 0     | 6     | 5     | 5    | 6    | 2    |
| 福川  | 葛和田橋 | 河川水(個/10L)             | -    | -    | -    | -    | 0     | 0     | 0     | 3    | 0    | 0    |
|     |      | 底泥 (個/m <sup>2</sup> ) | -    | -    | -    | -    | 0     | 23    | 0     | 0    | 46   | 0    |
|     |      | (個/dry-g)              | -    | -    | -    | -    | 0     | 0     | 0     | 0    | 1    | 0    |

雨がかったことが分かる。このことから、河川流量の増加によって底泥中の原虫類が下流へ流されていた可能性があると考えられる。

このほかの要因には、①負荷量自体の減少、②紫外線量の増加や水温上昇による死滅、③他の生物による捕食等が挙げられる。これらについては、今後、検証していく必要があると考えられた。

### 6.3 平成 19 年度の実態調査

#### 6.3.1 調査地点

平成 19 年度は、17 年度の実態調査において、原虫類を多く検出した水系の中から広瀬川水系及び小山川水系を選定した。小山川、福川は牛の飼育頭数が多い流域であり、その本川合流点近くを調査地点とした。また、広瀬川中島橋は昨年度からの継続調査地点としている。試料の採取、測定は前項と同様に行った。

#### 6.3.2 調査結果

調査は、昨年度の結果をふまえ春季から夏季にかけて小山川、福川の底泥の採取が可能な調査地点の選定を行い、秋季（10 月）から本調査を開始した。本調査および広瀬川中島橋のクリプトスポリジウム検出結果を（表 6.2）に示す。

19 年度の夏季は、18 年度と同様にほとんどクリプトスポリジウムを検出せず、秋季以降は、18 年度と異なり検出数が少ないまま推移した。また、河川水のみ、あるいは底泥のみからの検出例も多く、18 年度とは異なる傾向を示した。秋季にクリプトスポリジウムが検出されなかった原因として、底泥中のクリプトスポリジウムが降雨により掃流されたことが考え

られる。しかし 10 月下旬以降ほとんど降雨はない。このことから、負荷量自体の減少等が原因と考えられるが、詳細は不明である。

なお、ジアルジアについては、クリプトスポリジウムと同様の傾向であった。

### 6.4 まとめ

原虫類対策の一環として、利根川支流広瀬川水系において、実態調査を実施した。その結果、以下の点が明らかになった。

- 1) 原虫類は、夏季にはほとんど検出されず、秋季から春季に増加する。
- 2) 原虫類は河川底に堆積していることが多いことから、底泥中の原虫類調査は、負荷源の特定に有効である。また、河川水の検査だけでは原虫類汚染のリスクを見逃す危険性がある。
- 3) 秋季から春季、特に冬季、降雨等により河川水量が増加すると河川底の原虫類が流されて下流域での原虫類汚染のリスクが高まる。これにより、水道原水から原虫類が検出されるなど、浄水処理に悪影響を及ぼすことが危惧された。
- 4) 平成 19 年度は春季から秋季にかけてはほとんど検出されなかった。
- 5) 平成 19 年度は 18 年度とは異なり秋季以降も検出数は少ないまま推移した。河川水のみ、または底泥のみからの検出例が多かった。

## 7. 利根川水系におけるウイルスの実態調査

(東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 片山浩之・原本英司)

### 7.1 はじめに

腸管系ウイルスは、感染者に下痢をはじめとした症状を引き起こし、糞便と共にヒトの体外に高濃度で排出される。下水や河川水、海水などの水系に混入したウイルスが増殖することはないものの、環境中で長期間の感染価を保持が可能である。米国環境保護庁は、浄水処理工程で水道原水中のウイルスを 4 log (99.99%) 除去あるいは不活化し、飲料水の摂取によるウイルスの年間感染リスクを  $10^{-4}$  以下に抑制することを推奨している (U.S. EPA, 2001)。しかしながら、ノロウイルスやサポウイルスなどのここ数年で検出技術が確立されるようになったウイルスについては、水環境中での存在状況に関する知見が限られており、感染リスクの算出を困難にしている。

水環境中におけるウイルスの代替指標として、水処理工程と水環境中における挙動の類似性から F 特異大腸菌ファージ (F ファージ) が有望視されている (IAWPRC, 1991)。F ファージは、保有する核酸の種類によって F-RNA ファージと F-DNA ファージに大別され、F-RNA ファージはさらに 4 種類の群 (I~IV 群) に分類されている。II 群と III 群は主にヒトから検出され、I 群と IV 群は主にヒト以外の動物から検出されるため、ヒトと動物の糞便汚染を区別する上で F-RNA ファージの群別判定は有力な手法となることが期待される (Gourmelon *et al.*, 2007)。

本研究では、水道水源である利根川水系を対象に複数種のウイルスの存在実態調査を実施した。指標微生物として、大腸菌群と大腸菌に加えて F ファージを測定し、その群別判定によってヒトと動物の糞便汚染の寄与率の把握を試みた。また、ウイルスと指標微生物との相関性を検証した。

### 7.2 調査方法

#### 7.2.1 試料の採取

平成 19 年度は、6 月、8 月、10 月、12 月および 2 月に計 5 回、利根川中流域の 4 地点 (A: 坂東大橋, B: 上武大橋, C: 利根大堰, D: 芽吹大橋) および支流の小山川の 2 地点 (E: いろは橋, F: 高橋) において河川水 (計 23 試料) を採取した。なお、D 地点での採取は、6 月、8 月、10 月の 3 回のみ

とした。(図 7.1-図 3.1 に同じため省略)

#### 7.2.2 ウイルスの濃縮

ウイルスの検出手順を図 7.2 に示す。河川水 2L に 2.5M  $MgCl_2$  20mL を添加して十分に混合させた後、HA 膜 (混合セルロース膜, 口径 90mm, 孔径 0.45 $\mu m$ , Millipore) で全量をろ過し、 $Mg^{2+}$  を架橋としてウイルスを HA 膜に吸着させた。0.5mM  $H_2SO_4$  (pH 3) 200mL をろ過する酸洗浄操作を行った後、1mM NaOH (pH 11) 10mL をろ過してウイルスを HA 膜から誘出した。ろ液を回収する遠沈管にはあらかじめ 100mM  $H_2SO_4$  (pH 1) 50 $\mu L$  と 100X TE buffer 100 $\mu L$  を入れておき、ウイルスの回収と同時に pH を中和した (Katayama *et al.*, 2002)。

得られた濃縮液の容量をさらに減らすため、遠心式フィルターユニットである Centriprep YM-50 (Millipore) に濃縮液の全量を入れ、2,500rpm で 10 分間遠心した。UF 膜を透過した溶液を捨てた後、さらに 2,500rpm で 5 分間遠心し、UF 膜を透過しなかった溶液 (約 700 $\mu L$ ) を回収した。

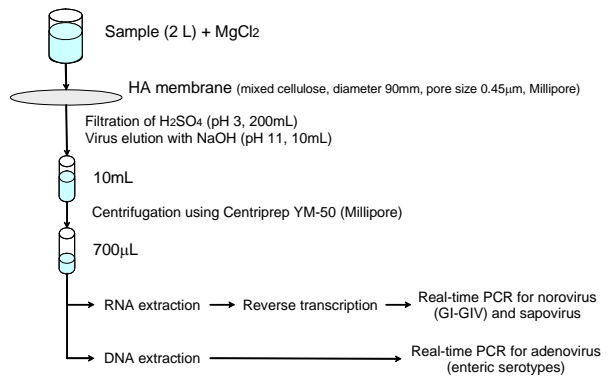


図 7.2 ウイルスの検出手順

#### 7.2.3 RNA ウイルスの検出

RNA ウイルスとして、冬季の急性胃腸炎の病因であるノロウイルスとサポウイルスを測定した。ノロウイルスは、既知の 5 種類の遺伝子群のうちの 4 種類 (GI~GIV) を測定対象とした。GI, GII, GIV はヒトに感染し、GIII はウシに感染することが知られている。サポウイルスは、ヒトに感染する遺伝子群を測定対象とした。

濃縮液から 140 $\mu L$  を分取し、QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出液 60 $\mu L$  を得た後、High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) を用いた逆転写反応によって cDNA を生成し、LightCycler 2.0 (Roche) を用いたリアルタイム PCR によってノロウイルス (Kageyama *et al.*, 2003; Trujillo *et al.*, 2006; Wolf *et*

al., 2007) およびサポウイルス (田所ら, 2005) を定量した。

### 7.2.4 DNA ウイルスの検出

DNA ウイルスとして、腸管系アデノウイルスを測定した。腸管系アデノウイルスとは、A~F 群に分類されるヒトアデノウイルスの中で胃腸炎に関与する F 群に属する 2 種類の血清型 (40, 41 型) のことであり、水環境中に広く存在していることが知られている。

濃縮液から 200 $\mu$ L を分取し、QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出液 200 $\mu$ L を得た後、リアルタイム PCR によって腸管系アデノウイルスを定量した (Ko et al., 2005)。

### 7.2.5 指標微生物の測定

指標微生物として、MMO-MUG 培地を用いた ONPG 法によって大腸菌群、ONPG-MUG 法を用いて大腸菌を定量した。また、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 を宿主に用いたブラック法によって F フェージを定量した。シャーレ上に形成した F フェージのブラックを無作為に単離し、リン酸緩衝食塩液 500 $\mu$ L に溶解させた。溶解液から 140 $\mu$ L を分取し、QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) を用いた RNA 抽出および SuperScript II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (Invitrogen) を用いた逆転写反応に供した後、F-RNA フェージの各群に特異的なリアルタイム PCR (Ogorzaly et al., 2004) を用いて単離したブラックの群を決定した。

## 7.3 調査結果

### 7.3.1 ウイルスの測定結果

河川水からのウイルスおよび指標微生物の測定結果を (表 7.2) に示す。また、採水地点別の平均濃度を図 7.3 に示す。28 試料中 25 試料 (89%) から検査したウイルスのいずれか 1 種類以上が検出された。ノロウイルスは、28 試料中 19 試料 (28%) が 1 種類以上の遺伝子群に対して陽性となった。ヒトに感染するノロウイルスの主要な遺伝子群である GI と GII は、それぞれ 28 試料中 16 試料 (57%) から検出された。また、新規の遺伝子群である GIV が 28 試料中 2 試料 (7%) から検出された。一方、ウシ由来の遺伝子群である GIII はいずれの試料からも検出されなかった。

サポウイルスと腸管系アデノウイルスは、それぞれ 28 試料中 20 試料 (71%) から検出され、ノロウイルスよりも高い濃度推移を示した。

採水地点別では、いずれのウイルスも F 地点における平均濃度が最も高かった。これらのヒトに感染するウイルスの濃度が E 地点と F 地点の間で上昇していたことから、両地点間に強いヒトの糞便汚染源が存在していると考えられた。両地点間に位置する下水処理場の放流水が主要な汚染源である可能性がある。

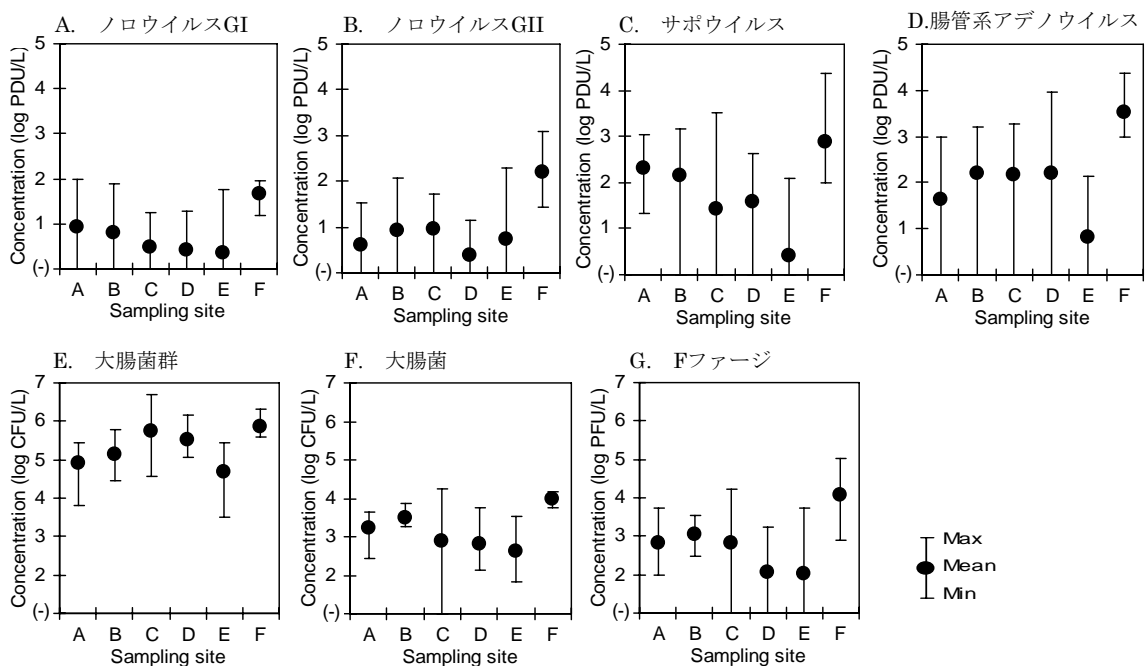


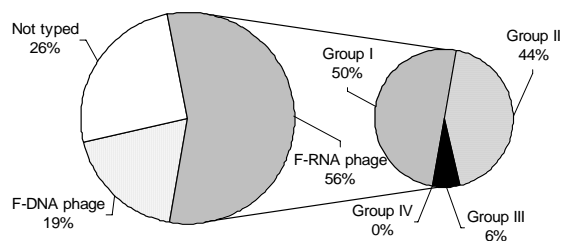
図 7.3 採水地点別のウイルスおよび F フェージの平均濃度

表 7.2 河川水からのウイルス及び指標微生物の測定結果

| 調査月 | 採水地点 | ノロウイルス | ノロウイルス | ノロウイルス | ノロウイルス | サポウイルス | 腸管系アデノウイルス | 大腸菌群      | 大腸菌    | Fファージ  |
|-----|------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|-----------|--------|--------|
|     |      | GI     | GII    | GIII   | GIV    |        |            |           |        |        |
|     |      | PDU/L  | PDU/L  | PDU/L  | PDU/L  | PDU/L  | PDU/L      | CFU/L     | CFU/L  | PFU/L  |
| 6月  | A    | 20     | —      | —      | —      | 280    | 330        | 210,000   | 1,100  | 100    |
|     | B    | 8.3    | 4.2    | —      | —      | 510    | 1,200      | 510,000   | 1,800  | 300    |
|     | C    | 18     | 29     | —      | —      | 17     | 600        | 420,000   | 530    | 100    |
|     | D    | 19     | —      | —      | —      | 420    | 480        | 210,000   | 400    | —      |
|     | E    | —      | —      | —      | —      | 120    | —          | 280,000   | 330    | 5,400  |
|     | F    | 30     | 88     | —      | —      | 290    | 2,400      | 940,000   | 6,200  | 13,000 |
| 8月  | A    | 100    | —      | —      | —      | 21     | —          | 150,000   | 4,500  | 500    |
|     | B    | —      | —      | —      | —      | 100    | 1,600      | 52,000    | 2,700  | 400    |
|     | C    | —      | —      | —      | —      | —      | 1,800      | 38,000    | —      | —      |
|     | D    | —      | 14     | —      | —      | 120    | 8,900      | 120,000   | 130    | 100    |
|     | E    | —      | —      | —      | —      | —      | 140        | 210,000   | 3,400  | —      |
|     | F    | 89     | 28     | —      | —      | 98     | 2,200      | 590,000   | 5,700  | 800    |
| 10月 | A    | —      | —      | —      | —      | 290    | —          | 280,000   | 3,300  | 500    |
|     | B    | —      | —      | —      | —      | —      | —          | 620,000   | 3,600  | 1,800  |
|     | C    | —      | —      | —      | —      | 250    | 55         | 2,400,000 | 17,000 | 2,300  |
|     | D    | —      | —      | —      | —      | —      | —          | 1,500,000 | 5,700  | 1,700  |
|     | E    | —      | —      | —      | —      | —      | —          | 170,000   | 1,200  | 200    |
|     | F    | 15     | 50     | —      | —      | 310    | 1,000      | 2,100,000 | 15,000 | 4,600  |
| 12月 | A    | —      | 34     | —      | —      | 200    | 970        | 59,000    | 2,800  | 1,100  |
|     | B    | 15     | 120    | —      | —      | 1,500  | 110        | 120,000   | 7,200  | 3,400  |
|     | C    | 6.2    | 54     | —      | —      | 3,200  | 1,300      | 340,000   | 1,900  | 4,000  |
|     | E    | —      | 23     | —      | —      | —      | 88         | 9,700     | 130    | 100    |
|     | F    | 77     | 1,200  | —      | 45,000 | 23,000 | 23,000     | 390,000   | 14,000 | 41,000 |
| 2月  | A    | 22     | 28     | —      | —      | 1,100  | 530        | 6,700     | 270    | 5,500  |
|     | B    | 80     | 98     | —      | —      | 900    | 460        | 28,000    | 1,900  | 3,000  |
|     | C    | 2.3    | 42     | —      | —      | —      | —          | 4,800,000 | 1,700  | 17,000 |
|     | E    | 57     | 200    | —      | —      | —      | —          | 3,300     | 67     | —      |



A. 全試料



B. 試料別

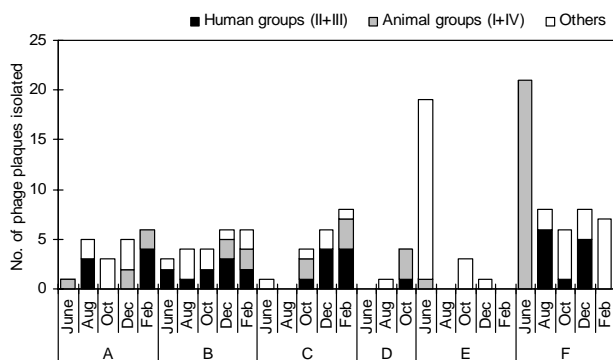


図 7.4 河川水から単離した F フェージのプラックの分類

7.3.2 指標微生物の測定結果

大腸菌群はすべての試料から検出され、3,300~4,800,000 CFU/L の濃度を示した。大腸菌は 28 試料中 27 試料 (96%) から検出され、67~17,000 CFU/L の濃度を示した。F フェージは 28 試料中 24 試料 (86%) から検出され、最大濃度は 110,000 PFU/L であった。ウイルスと同様、採水地点別の指標微生物の平均濃度は F 地点において最大となった。

単離した F フェージのプラック 140 試料をリアルタイム PCR に供した結果、F-RNA フェージは 78 試料 (56%) から検出された。その内訳は、I 群が 39 試料、II 群が 34 試料、III 群が 5 試料であり、IV 群は検出されなかった (図 7.3)。

すなわち、ヒト由来とされる II 群と III 群が 39 試料、ヒト以外の動物由来とされる I 群と IV 群が 39 試料となった。F フェージが高濃度で検出された F 地点では、6 月には動物由

来の F-RNA フェージ (I 群) のみが検出されたが、その他の月には動物由来の群は検出されず、ヒト由来の F-RNA フェージ (II, III 群) が検出された。このことより、ヒトに比べ、動物による糞便汚染の寄与率には大きな変動が存在することが示唆された。なお、F-RNA フェージの 4 種類の群のいずれにも分類されなかった 62 試料のうち、26 試料は F-DNA フェージに特異的な PCR (Vinjé *et al.*, 2004) で陽性となり、F-DNA フェージであることが分かった。

7.3.3 ウイルスと指標微生物との相関

ウイルスと指標微生物の両方が陽性を示した試料に対し、試料中のウイルス濃度と指標微生物濃度との相関性を検討した結果を表 7.2 に示す。F フェージについては、単離したプラックの内訳に基づき、試料中のヒトおよび動物由来の F-RNA フェージの濃度を算出した。相関性の有無は、相関係数の値とプロットの分布から判断した。

大腸菌群および大腸菌は、いずれのウイルスに対しても相関を示さなかった。F フェージは、ノロウイルス GII ( $r = 0.783$ ) とサポウイルス ( $r = 0.669$ ) に対して正の相関を示した。この正の相関は、ヒト由来の F-RNA フェージに対しても認められたが、動物由来の F-RNA フェージとは相関を示さなかった。検出対象としたノロウイルス GII とサポウイルスはヒトから排出されていることから、ヒト由来の F-RNA フェージと強い相関を示したと考えられる。一方、ノロウイルス GI と腸管系アデノウイルスは F フェージと相関を示さなかった。ウイルスの種類によっては F フェージが代替指標となり得ることが示唆されたことから、ウイルスと F フェージの相関性の検証を中心とした実態調査の継続が必要である。

表 7.3 ウイルスと指標微生物との相関

| ウイルス       | 大腸菌群   | 大腸菌   | Fフェージ        | F-RNAフェージ    |        |
|------------|--------|-------|--------------|--------------|--------|
|            |        |       |              | ヒト由来群        | 動物由来群  |
| ノロウイルスGI   | -0.41  | 0.169 | 0.09         | -0.179       | -0.271 |
|            | -16    | -16   | -14          | -10          | -6     |
| ノロウイルスGII  | -0.009 | 0.412 | <b>0.783</b> | <b>0.758</b> | 0.129  |
|            | -16    | -16   | -15          | -9           | -6     |
| サポウイルス     | -0.062 | 0.293 | <b>0.669</b> | <b>0.848</b> | 0.306  |
|            | -20    | -20   | -19          | -11          | -8     |
| 腸管系アデノウイルス | 0.15   | 0.114 | 0.319        | 0.36         | 0.362  |
|            | -20    | -19   | -17          | -10          | -7     |

括弧内は試料数

## 7.4. 結論

本研究では、利根川水系を対象としたウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、腸管系アデノウイルス）とFファージの存在実態調査を行い、以下の知見を得た。

- 1) 河川水 2L を濃縮してリアルタイム PCR に供した結果、89% (25/28) の試料から検査したウイルスのいずれか 1 種類以上が検出された。ノロウイルスの陽性率は、ヒトに感染する主要な遺伝子群である GI と GII が各 57% (16/28), ウシに感染する遺伝子群である GIII が 0% (0/23), 新規の遺伝子群である GIV が 7% (2/28) であった。サポウイルスと腸管系アデノウイルスは、それぞれ 71% (20/28) の試料から検出された。
- 2) 採水地点別では、いずれのウイルスも F 地点における平均濃度が最も高かった。これらのヒトに感染するウイルスの濃度が E 地点と F 地点の間で上昇していたことから、両地点間にヒトの糞便汚染源が存在していると考えられた。
- 3) 指標微生物の陽性率は、大腸菌群が 100% (23/23), 大腸菌が 96% (27/28), F ファージが 86% (24/28) であった。ウイルスと同様、採水地点別の指標微生物の平均濃度は F 地点において最大となった。
- 4) 単離した F ファージのブラック 140 試料のうち、F-RNA ファージは 78 試料 (56%) から検出された。その内訳は、ヒト由来の群 (II, III 群) が 39 試料、ヒト以外の動物由来の群 (I, IV 群) が 39 試料であった。F ファージが高濃度で検出された F 地点では、6 月には動物由来の F-RNA ファージのみが検出されたが、その他の月にはヒト由来の F-RNA ファージが検出され、動物による糞便汚染の寄与率には大きな変動が存在することが示唆された。

ウイルスと指標微生物の両方が陽性を示した試料において、F ファージは、ノロウイルス GII ( $r = 0.783$ ) とサポウイルス ( $r = 0.669$ ) に対して正の相関を示した。この正の相関は、ヒト由来の F-RNA ファージに対しても認められたが、動物由来の F-RNA ファージとは相関を示さなかった。一方、ノロウイルス GI と腸管系アデノウイルスは F ファージと相関を示さず、いずれのウイルスも大腸菌群および大腸菌とは相関を示さなかった。ウイルスの種類によっては F ファージが

代替指標となり得ることが示唆された。

## 8. 新たな糞便汚染指標としての *Bacteroides-Prevotella* 属遺伝子マーカーの環境水中での挙動および病原性微生物との関係

(北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 岡部聡)

### 8.1 はじめに

河川における人および家畜糞便による汚染の把握は、流域の衛生管理を行う上で重要な課題である。しかし、現行の糞便汚染指標（大腸菌群、糞便性大腸菌群）は、非糞便由来細菌の存在や、環境水中における当該細菌の増殖による糞便汚染の過大評価などの問題がある。このような背景から、近年、新たな糞便汚染指標として注目されているのが *Bacteroides-Prevotella* 属（腸内嫌気性細菌）の 16S rRNA 遺伝子マーカーである。我々はこれまでに、ヒト、ウシおよびヒト由来株に特異的な 16S rRNA 遺伝子マーカーを同定し、それらを real-time PCR 法を用いて定量することにより人畜由来の糞便汚染の識別と汚染度の定量を同時に行う手法を確立した<sup>1)</sup>。しかし、実環境中における遺伝子マーカー定量値の妥当性については十分な検討がなされていない。そこで本年度は、当遺伝子マーカーの環境水中での挙動および病原性微生物との関連について検討を行った。

### 8.2 実験方法

はじめに、阻害物質を高濃度に含む試料に対する real-time PCR 法の検出限界を求めめるため、ヒト、ウシおよびブタ糞便をろ過河川水に混入させ濃縮した試料 (0.5g/mL) の DNA 抽出液の希釈系列を作成し、*Bacteroides-Prevotella* 属特異的プライマー (BacPre1) と宿主動物 (ヒト、ウシ、ブタ) 特異的プライマー (Human-Bac1, Cow-Bac2, Pig-Bac2)<sup>1)</sup> を用い、標的遺伝子のコピー数をそれぞれ定量した。同様にして作成した試料 (5  $\mu$ g/L) を一定の温度条件下 (4, 10, 20, 30°C) で好氣的に培養し、定期的に試料中の 4 つの宿主特異的遺伝子マーカー (Bac-Pre, Human, Cow, Pig) を同方法で定量した。同時に、試料中の大腸菌群数および糞便性大腸菌数をメンブレンフィルター法により測定した。

一方、*Bacteroides-Prevotella* 遺伝子マーカーと病原性微生物と

の関係は、下水処理場から採取した生下水、最初沈殿地汚泥および一次処理水と河川水を試料とし、河川水は 3L のファイター濃縮を行った後に DNA を抽出した。病原性微生物の検出には、腸管出血性大腸菌：0-157 遺伝子、ペロ毒素 1 型および 2 型生菌、毒素原性大腸菌：LT 遺伝子、STh 遺伝子、サルモネラ菌 invA 遺伝子、ウェルシュ菌毒素遺伝子、黄色ブドウ球菌毒素 TSST-1 遺伝子、コレラ毒素 ctx 遺伝子に特異的なプライマー (Takara, Japan) を用いて病原性遺伝子を PCR 増幅した後、電気泳動を行い陽性・陰性を判定した。

### 8.3 実験結果と考察

試料に対する real-time PCR 法の検出限界は Bac-Pre1 および Human-Bac1 については  $10^2$  copies/reaction、Cow-Bac2 および Pig-Bac2 では  $10-10^2$  copies/reaction であった。いずれも、標準物質 (*B. fragilis* DNA または plasmid DNA) を用いて作成された検量線の検出限界 ( $4.0 \times 10^1$  copies/reaction および 6.2 copies/reaction) より 1 桁ずつ感度が低下した。*Bacteroides-Prevotella* 属のオペロン数を 6 と仮定すると、検出限界は  $1-17$  cells/reaction と推定され、本手法が環境試料に対しても十分な測定感度を有し、夾雑物による影響は少ないことが確認された。

好気条件下で培養した結果、いずれの遺伝子マーカー (Bac-Pre, Human, Cow, Pig) も培養温度 4°C の場合を除き、培養開始からほぼ一定のコピー数を保った後 7~10 日目に 1 から 2 Log 減少した。4°C では、25 日目まで大きな変動は見られなかった (図 8.1)。

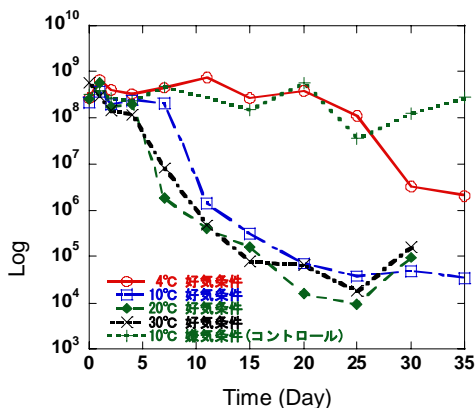


図8.1 *Bacteroides-Prevotella* 遺伝子マーカー検出量の経日変化

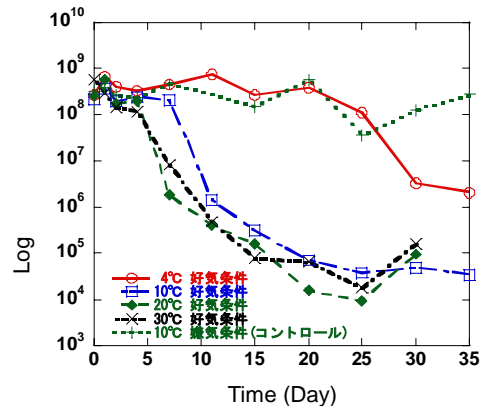


図8.2 大腸菌群の経日変化

一方、大腸菌群数および糞便性大腸菌群数は、4°Cを除く全ての温度条件下で培養開始直後大幅に増加した後緩やかに減少したが、35 日を経過しても初期菌数を下回らなかった (図 8.2)。4°Cにおける大腸菌群と糞便性大腸菌群数の挙動は異なっており、大腸菌群数が緩やかに増加した後 10 日目から減少したのに対し、糞便性大腸菌群では増殖が認められず 20 日目から減少していった。また、河川・下水処理場の試料からペロ毒素 2 型生菌、STh 遺伝子、黄色ブドウ球菌毒素 TSST-1 遺伝子およびコレラ毒素 ctx 遺伝子はほとんど検出されないか、全く検出されなかった。その他の病原性遺伝子については、ウェルシュ菌毒素遺伝子を除き、試料中の Bac-Pre 遺伝子マーカーのコピー数が多いほどその検出頻度が高くなる傾向が見られた (表 8.1. 相関係数左から順に  $R = 0.89, 0.93, 0.88, 0.88$ )。ウェルシュ菌毒素遺伝子は、Bac-Pre 遺伝子マーカーのコピー数に関わらず比較的高い検出頻度で全ての試料から検出され、明確な関連性は見られなかった。

### 8.4 まとめ

本研究により、大腸菌群および糞便性大腸菌群数は環境中で増加する可能性が示唆されたのに対し、絶対嫌気性細菌である *Bacteroides-Prevotella* 属の 16S rRNA 遺伝子マーカーは、数日間環境水中に残留した後、すみやかに減衰するこ

とが示唆された。すなわち、河川から本手法により検出される遺伝子マーカーは現行の指標に比べ糞便汚染の現状をより正確に反映していると考えられた。また、宿主動物の異なる遺伝子マーカーによる減衰速度の差異も見られなかったことから、河川における主要な糞便汚染源の特定も可能であることが確認された。さらに、一部の病原性細菌遺伝子と Bac-Pre 遺伝子マーカーとの間に相関がみられたことから、病原微生物による水系汚染のリスク評価を行うことも期待できる。

表 8.1. 下水処理場および河川試料中の *Bacteroides-Prevotella* 遺伝子マーカー検出量と病原性遺伝子の検出頻度

| Bac-Pre 遺伝子マーカー<br>Log(copies/100 mL) | サンプル数 | 陽性サンプル数 (%) |          |                |               |
|---------------------------------------|-------|-------------|----------|----------------|---------------|
|                                       |       | 0-157 遺伝子   | ペロ毒素1型生菌 | サルモネラ菌 invA遺伝子 | 毒素原性大腸菌 LT遺伝子 |
| $10^2-10^3$                           | 2     | 0 (0)       | 0 (0)    | 0 (0)          | 0 (0)         |
| $10^3-10^4$                           | 2     | 0 (0)       | 0 (0)    | 1 (50)         | 1 (50)        |
| $10^4-10^5$                           | 6     | 2 (33)      | 0 (0)    | 1 (17)         | 0 (0)         |
| $10^5-10^6$                           | 5     | 2 (40)      | 1 (20)   | 3 (60)         | 3 (60)        |
| $10^6-10^7$                           | 3     | 3 (100)     | 2 (67)   | 3 (100)        | 2 (67)        |
| $10^7-10^8$                           | 7     | 7 (100)     | 3 (43)   | 7 (100)        | 7 (100)       |
| $10^8-10^9$                           | 7     | 5 (71)      | 6 (86)   | 7 (100)        | 7 (100)       |
| $10^9-10^{10}$                        | 2     | 2 (100)     | 2 (100)  | 2 (100)        | 2 (100)       |

## 9. 環境水中のクリプトスポリジウム・オーシスト汚染の低減化に関する研究

(北海道立衛生研究所 健康科学部飲料水衛生科 泉 敏彦、伊藤 八十男、国立感染症研究所 寄生動物部原生動物室 八木田健司、遠藤卓郎)

### 9.1 環境水中のクリプトスポリジウム・オーシスト汚染の低減化に関する研究

我々は、二枚貝の水濾過能力に着目して、これまでに汽水性底性二枚貝のヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) が、河川水中に混入したクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*、以下、“クリプト”と略す) のオーシスト捕捉手段として有用であることを明らかにした<sup>1, 2)</sup>。本研究は、水生生物を利用した水中のオーシスト低減化のための生物水浄化システムの実用化を目指している。そこで、ヤマトシジミよりも大型で水濾過能力が高いことが予想される淡水性底性二枚貝のイケチョウガイ (*Hyriopsis schlegelii*) に着目した。イケチョウガイはイシガイ科の貝で、淡水性二枚貝としては世界最大種の一つである。原産地は滋賀県の琵琶湖及び淀川水系であるが、淡水真珠の母貝として日本各地に移植されている。本種は雌雄異体で、母貝の鰓内で受精卵より発育した幼生 (グロキジウム幼生) は、出水管から放出されると一定期間 (約 2 週間)、周囲に生息する魚類の体表面、鰓、鰭等に付着してその体液を吸収して寄生生活を送った後、底性生活に移り、二枚貝として成長する<sup>3)</sup>。また、本種はコイ科淡水魚のタナゴ類の産卵母貝としても知られている<sup>4)</sup>。このように、イケチョウガイは、特殊な生態系を持つため、移植した施設内での無定型な増殖が起きないように管理できること、長寿であること、及び、種苗生産技術が確立していること、等の理由から本研究で検討することとした。今回、イケチョウガイを利用した生物水浄化システムの実用化の可能性について検討する目的で、原虫類が混入する可能性が高い、実際のフィールド (下水処理場) において、当該システムを利用したクリプトのオーシストの低減化に関し、その実用化に向けて各種試行を実施した。

平成 18 年度までの検討の結果、**1)** イケチョウガイは、クリプトのオーシストを、餌と共に消化管内に摂取し、3~4 日以内に、消化することなく、そのまま糞中に排泄すること。**2)** イケチョウガイに摂取されたオーシストは、消化管

以外の組織には分布しないこと。**3)** イケチョウガイは、貝表面への沈殿物の沈積防止措置をすれば、下水処理場の最終沈殿池で棲息可能であること。**4)** 体重 500 g のイケチョウガイは、冬季の最終沈殿池の水温 (約 15°C) においても、約 10 L/hr の最大水濾過能力を有すること。**5)** 最終沈殿池の水上昇率は 0.8 m/hr (8 L/0.01m<sup>2</sup>/hr) であるため、体重 500 g のイケチョウガイを 1 個/0.01m<sup>2</sup> の密度で設置すれば、上昇水量分の水 (8 L/hr) が濾過可能であること。**6)** イケチョウガイの糞は、緩やかな上昇水流 (<0.03 cm/sec) のある最終沈殿池においても、確実に水底に沈降すること。等の基礎的データが得られた。

そこで、平成 19 年度は、実際のフィールド (下水処理場の最終沈殿池) にイケチョウガイを設置し、その際のイケチョウガイによるオーシスト低減化効果について、実証実験を行った。

### 9.2 実験室内におけるイケチョウガイの飼育

実験に使用したイケチョウガイは、柳瀬パール有限会社より購入した。



図 9.1 淡水性底性二枚貝のイケチョウガイ (*Hyriopsis schlegelii*)

#### 1) 飼育水槽

水槽は、保温用の発泡スチロール製外槽 (10 L、30×40×25 cm) とイケチョウガイ飼育用の樹脂製内槽 (8 L、23×23×23 cm) からなる二重槽構造とした。なお、外槽の内壁全体に遮光用の黒色ビニールシートを展開した。まず、外槽をマグネチックスターラー上に設置し、これに水道水を適量満たし、槽の内部に外槽水攪拌用攪拌子とクーラー (RZ-90、REI-SEA) の冷却用パイプと水温センサーを設置した。イケチョウガイは、多段式のステンレス製飼育ラックに貝同士が重ならないように水平に収納した。この飼育ラックを、あらかじめ一定温度 (15°C)

に調整した飼育水（24時間汲み置きした水道水）を満たし棒状のエアストーン（2基）と内漕水攪拌用攪拌子を設置した内漕内に収納した。次に、この内漕を外漕内に浮かべ、漕上部に飛沫防止用の樹脂製カバーを被せ、更にもその上に遮光（半遮光）用のビニール製カバーを置き、内漕全体を一定温度（15℃）に保温した。（図9.2）

## 2) 窒素酸化バクテリア

イケチョウガイの排泄物由来のアンモニア及び亜硝酸イオンを酸化し、無害化する目的で、窒素酸化バクテリア（パワーバクター、SUDO）を飼育水の交換の度に約0.3 mL/Lの割合で内漕水に添加した。

## 3) 飼料

イケチョウガイの飼料として、藍藻類のスピルリナ（*Arthrospira platensis*）を原料としたアサリ用粉末飼料（BV-01、大日本インキ化学工業(株)）を用いた。給餌に当たっては、貝重量の約0.1%相当の粉末飼料を少量の水に懸濁し、飼育水交換の約30分後より3～4時間おきに1日3回（合計で貝重量の約0.3%）、内漕水に添加した。

## 4) 飼育水の交換

飼育装置に内漕水用の濾過フィルターが未装備のため、1日1回、午前中に飼育水を全量交換した。交換用の飼育水は、水道水をあらかじめ室温と冷蔵室（4℃）にそれぞれ保管しておき、交換時に水温15℃となるように混合してから使用した。

## 9.3 貝によるオーシストの体内保持能力と排出経路

貝を以下の条件で6週間順化飼育した後、オーシストを1回暴露後にオーシストの排出状況と体内分布を1日ごとに7日間、経時的に観察した。なお、クリプトのオーシストは、国立感染症研究所 寄生動物部原生動物室より分与されたものを使用した。

### 1) オーシストの排出状況を観察する際の貝の飼育条件

- 1) 水量：8L（飼育水槽サイズ：23×23×23 cm）
- 2) 使用した貝の大きさと個数：イケチョウガイ（体重：50～70 g、21個）
- 3) 水温：15℃
- 4) 飼料：アサリ用粉末飼料 BV-01（大日本インキ、30 mg/L）
- 5) オーシストの暴露量： $9.48 \times 10^4$ 個/貝（ $2.49 \times 10^5$ 個/L）

L)

オーシスト暴露後、24時間ごとに7日間、飼育水と水槽底部に沈殿した糞中のオーシストの定性と定量を、所定の方法に基づき行った。

### 2) オーシストの体内分布を観察する際の貝の飼育条件

上記1)と同一の飼育条件下で、体重50～70 gの貝3個を1群として、計21個飼育した。オーシスト暴露後、24時間ごとに7日間、貝を3個ずつ解剖し、消化管内容物、鰓及び外套膜を取り出し、ポリトロンで粉碎後、所定の方法により、オーシストの定性と定量を行った。



図9.2 イケチョウガイ飼育用の水温調節装置付き水槽

## 9.4 貝の水濾過速度

以下の条件の下、粉末飼料を飼育水槽に懸濁後、水槽内の水の濁度を、飼料添加直後より15分間隔で経時的に測定し、単位時間当たりの濁度の減少率から貝の水濾過速度を算出した。

なお、下水処理場（札幌市建設局下水道施設部 創成川水処理センター）の最終沈殿池水における水濾過速度の測定の際には、基本的に上記条件と類似の飼育条件（飼育水：最終沈殿池の水、添加飼料：なし）で測定した。なお、得られた成績は、体重500 gの大きさの貝に外挿して提示した。即ち、水濾過速度は、鰓の面積に概ね比例（体重の2/3乗に比例）する。従って体重500 gの大きさの貝に体重200 gの貝のデータを外挿するために、値を $(500/200)^{2/3} \approx 1.85$ 倍して表示した。

- 1) 水量：5L（5Lのガラス製ビーカー使用）
- 2) 使用した貝の大きさと個数：イケチョウガイ（体重：200 g、2個）
- 3) 水温：15、20、25℃
- 4) 飼料：アサリ用粉末飼料 BV-01（大日本インキ）を、9～336 mg/Lの間の密度で7段階に変化させて供給した。
- 5) オーシストの暴露量： $7 \times 10^5$ 個/L

## 6) 濁度計 : Water Analyzer-2000 (日本電飾工業)



図9.3 水濾過速度測定用ビーカーと貝保持用のラック

### 9.5 イケチョウガイの糞の沈降速度測定

緩やかな上向水流がある下水処理場の最終沈殿池において、イケチョウガイの糞が確実に水底に沈降することを確認する目的で実施した。まず、現地で広井式流速計(離合社)を使用して垂直上方向の流速を測定した。室内実験においては、底面に水道の蛇口より誘引したホースの先端を固定した中型デシケーター(Φ:25 cm、h:25 cm)を用意し、ホース先端部の上面にはデシケーターに付属の目皿を被せた。更に、目皿の上に樹脂製ネット(Φ:1 mm)を被せて、給水時に目皿の上面全体に緩やかな上向き水流が起きるような状況を作った。そこに飼育槽から回収したイケチョウガイの糞を水面に落とし、その沈降状況を観察した。

### 9.6 下水処理場水についての検討項目

札幌市創成川水処理センターの協力を得て、以下の項目について検討した。

#### 1) 魚類を利用した水質判定

イケチョウガイの設置場所の下水処理場の最終沈殿池の水質が、イケチョウガイの棲息可能な水質であるかを確認する目的で、イケチョウガイと同一の環境に棲息する魚種を最終沈殿池の水で2週間飼育(水交換頻度:1回/日)し、その間の生態行動の変化の有無について観察した。

魚種は、全国に普遍的に棲息するコイ科のギンブナ(*Carassius gibelio langsdorfi*)とイケチョウガイを産卵母貝としうるコイ科のタナゴ類の一種である、ヤリタナゴ(*Tanakia lanceolata*)を候補として選択した。ギンブナについては、適当な大きさの魚体の確保が困難であったため、同属種のキンギョ(ワキン、*Carassius auratus*)を代用した。

#### 2) 水質測定項目

イケチョウガイの生育や活動に悪影響を及ぼす可能性がある因子を把握する目的で、平成18年8月から、翌年7月まで、下水処理場の最終沈殿池から毎月1回の頻度で

水を採取し、水温、pH、電気伝導度(EC)、溶存酸素濃度、亜硝酸態窒素濃度、アンモニア態窒素濃度、総リン濃度、リン酸態リン濃度、総硬度、Ca、Mg、Al、Ba、Cd、Cr、Cu、Fe、Mn、Pb及びZn濃度を測定した。また、採取時の外気温も同時に測定した。

### 3) イケチョウガイの設置場所の選定

下水処理場の最終沈殿池内の部位や深度等の要因が、イケチョウガイの生育に及ぼす影響を把握する目的で、飼育用ネットに収納したイケチョウガイを池の様々な場所に深度を変えて設置し、生育状況を毎月1回(約4週間おき)の頻度で4ヶ月間観察した。

### 9.7 最終沈殿池におけるイケチョウガイによるオーシスト低減化効果について

最終沈殿池の片側のトラフに沿って専用ラックに収納したイケチョウガイを設置し、その際のトラフ内に流入する水の貝による濾過状況を、以下の項目を指標として経時的に観察した。対照群としては、貝を収納していないラックを同様に同じ最終沈殿池の反対側のトラフに沿って設置し、このトラフ内の水を対照用として使用した。

#### 1) 濁度

毎月1回の頻度でトラフ内の水を採取し、濁度を測定した。

#### 2) 水中微生物の存在密度

上記の濁度測定と同時期に採取したトラフの水に、水中微生物固定用のルゴール液を試料水1Lに付き5mL添加し、沈殿濃縮(20~30 mL)後に鏡検して微生物の定性及び定量を行った。

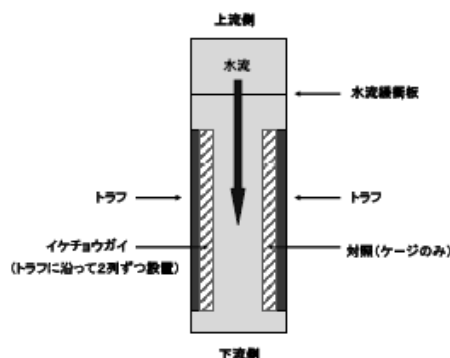


図9.4 最終沈殿池とイケチョウガイの設置状況  
(上面図)

最終沈殿池 ; L:34.5 m×W:4.3 m×D:3.0 m

トラフ ; L:19.0 m×W:0.5 m×D:0.2 m

## 9.8 結果及び考察

以下に、平成 18 年度までに得た成績の概略と、今回（平成 19 年度）、実際のフィールド（下水処理場の最終沈殿池）にイケチョウガイを設置した際のオーシストの低減化効果に関する実証実験の成績について記す。

### 9.8.1 オーシストの体内保持能力と排出経路

オーシスト暴露後にはオーシストは消化管内以外には殆ど検出されなかった。糞及び消化管内容物中のオーシスト量の経時変化を図 9.5 に示す。糞及び消化管中のオーシストは共にほぼ同様のパターンで減少し、暴露後 3～4 日間で暴露量の 85%以上が糞中に検出された。このことから、オーシストは消化管内に長期間保持されることなく、そのまま糞中に排泄されることが明らかとなった。

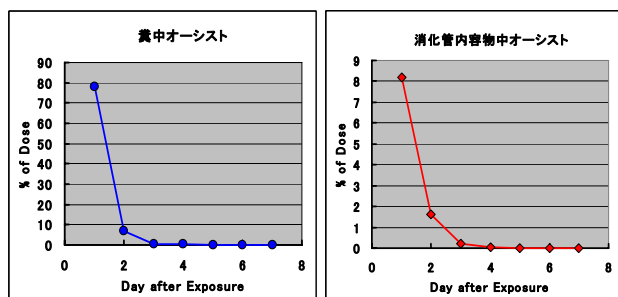


図 9.5 オーシスト暴露後のイケチョウガイの、糞及び消化管内容物中のオーシスト残存率の経時変化

### 9.8.2 イケチョウガイの水濾過速度

図 9.6 にイケチョウガイの摂食活動に伴う、濁度及び水中のオーシスト密度の経時変化を示す。濁度、すなわち水中の餌の密度の減少と、オーシスト密度の減少がほぼ同じパターンを示し、また、データは未記載であるが、餌を与えない条件下では、オーシストの減少は殆ど観察されなかったことから、イケチョウガイは餌と共にオーシストを摂取していることが明らかとなった。また、この時の濁度の減少率から、イケチョウガイの水濾過速度は、飼料密度が 14～28 mg/L の時に、10 L/hr（約 200 L/day、15℃）～16 L/hr（約 300 L/day、20℃）と、最大値を示すことが把握できた（図 9.7）。

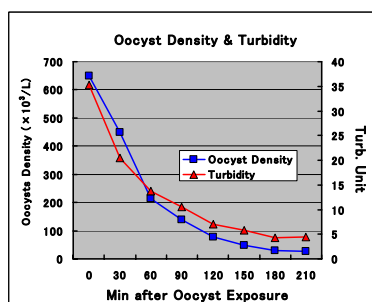


図 9.6 イケチョウガイの摂食活動に伴う濁度及びオーシスト密度の経時変化（水温：15℃、餌料密度：28 mg/L）

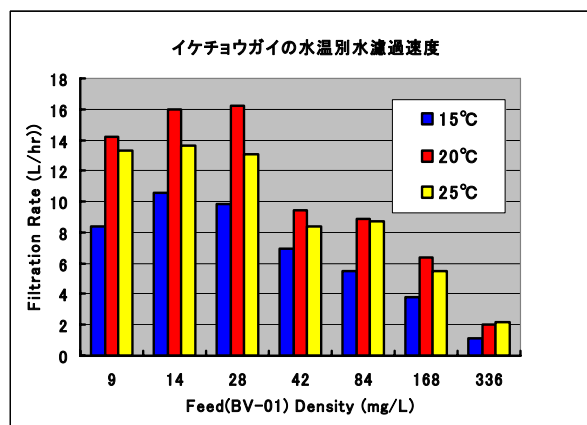


図 9.7 水温別、餌料密度別イケチョウガイ水濾過速度

なお、最終沈殿池の水を用いて行った水濾過速度測定実験においても、イケチョウガイは概ね 10 L/hr（約 200 L/day、15℃）～14 L/hr（約 270 L/day、20℃）の水濾過速度を示すことが明らかとなった。

### 9.8.3 イケチョウガイの糞の沈降速度測定

最終沈殿池で流速計を使用して垂直方向の流速を測定したところ、測定不能であった。これは、垂直方向の流速が流速計の最低測定可能流速（3 cm/sec）以下であったためと考えられた。実際、最終沈殿池における、処理水の流入量（約 1,600 m<sup>3</sup>）から計算しても、垂直上方向の流速は 0.02～0.03 cm/sec であると推測された。そこで、実験室内で現地状況を再現する際の垂直上方向の流速を、実際の速度の約 100 倍の 3 cm/sec として、糞の沈降速度を測定したところ、この条件下においても、イケチョウガイの糞は、デシケーター内のどの部分に落としても確実に沈降することが確認され、また、その沈降速度は 1.0～2.0 cm/sec であった。



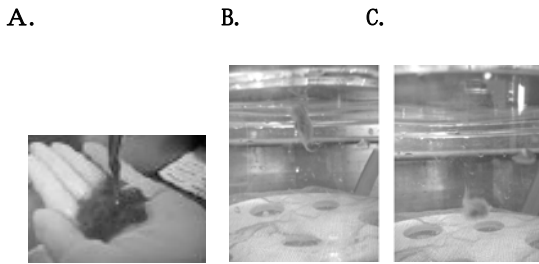


図 9.8 イケチヨウガイの糞の沈降速度測定

A : 粘性の高い糞

B～C : 垂直方向の上昇水流 (3 cm/sec) のある中、沈降する糞

#### 9.8.4 魚類を利用した水質検査

ヤリタナゴ及びキンギョ共に下水処理場の最終沈殿池の水 (平成 18 年 8 月採取、用損酸素濃度 : 1.5 mg/L) を用い、2 週間の飼育観察を行ったが、その行動に全く異常は認められなかった。

#### 9.8.5 水質測定項目

最終沈殿池の水の溶存酸素濃度は、水質検査を行った 12 ヶ月間における変動幅が大きく、これまでの最低値は 2007 年 8 月の 1.5 mg/L であり、最高値は同年 9 月の 7.7 mg/L であった。全体的には 3.5 mg/L 付近の値が観測されることが多かった。なお、飼育槽 (水温 : 15°C) における溶存酸素濃度は、9.0 mg/L であった。

鰓呼吸をする水生生物にとって毒性の高いアンモニアについて、アンモニア性窒素は、2007 年 8 月に 1.45 mg/L (飼育槽 : 0.02 mg/L) と一時的に高い値を示したが、その後は 0.02～0.25 mg/L の範囲の変動値であった。また同じく水生生物にとって有毒な亜硝酸について、亜硝酸性窒素は、2007 年 8 月に一時的に 2.30 mg/L (飼育槽 : 0.05 mg/L) と高い値を示したが、その後は 0.50 mg/L 以下の変動値であった。共に最終沈殿池の方が飼育槽水よりも高くなる傾向が観察された。

総リンは、観察期間中 0.50 mg/L 前後の高い値を示した (飼育槽 : 0.10 mg/L) が、2007 年 11～12 月には 0.20～0.35 mg/L と、値が低下した。また、リン酸態リンは、観察期間中 0.40 mg/L 前後の値を示した (飼育槽 : 0.02 mg/L) が、2007 年 11～12 月にはその値は 0.02～0.25 mg/L となった。なお、最終沈殿池のリンは大部分がリン酸態リンとして存在した。

水温は、2007 年 8 月の 24°C が最高であったが、最高外気

温が氷点下 (-2.1°C) であった 2008 年 1 月においても、14°C を維持していた。

また、重金属類等については、最終沈殿池と飼育槽との間に特に大きな差は認められなかった。

最終沈殿池におけるこれらの水質試験項目に関しては、少なくとも今回の測定値の範囲内であれば、上記 4 の“魚類を利用した水質検査結果”と併せて、イケチヨウガイの最終沈殿池における長期的生存に関して、阻害要因とはならないと考えられた。

#### 9.8.6 イケチヨウガイの設置場所の選定

イケチヨウガイを最終沈殿池の流入口付近に設置した場合、その設置深度にかかわらず 1 ヶ月後の貝の死亡率は高く (約 50%)、いずれも多量の沈殿物に覆われていた。一方、より下流域になるに従って死亡率は低下する傾向が認められた。最下流部では、殆ど死亡例は見られなかった。また、同一箇所においては、設置深度が浅い方が死亡率は低かった。貝の死亡原因としては、沈殿物の付着による呼吸困難、溶存酸素濃度の低下、餌となる微生物の存在密度等が考えられた。これらの結果から、イケチヨウガイを設置する場所としては、最終沈殿池の下流域の浅い場所が適当であるが、沈殿物の付着防御が可能であれば、上流域にも設置できるものと考えられた。

#### 9.8.7 最終沈殿池におけるイケチヨウガイによるオーシスト低減化効果について

図 9.10 に最終沈殿池の側面図を示す。活性汚泥処理が終了した水は、画面左側より最終沈殿池に導入され、濁質成分が沈殿物として沈降する。上澄み水は、トラフを経て高度処理施設で塩素処理後、放流される。一方、最終沈殿池内に堆積した沈殿物は自動的に収集され、熱処理される。

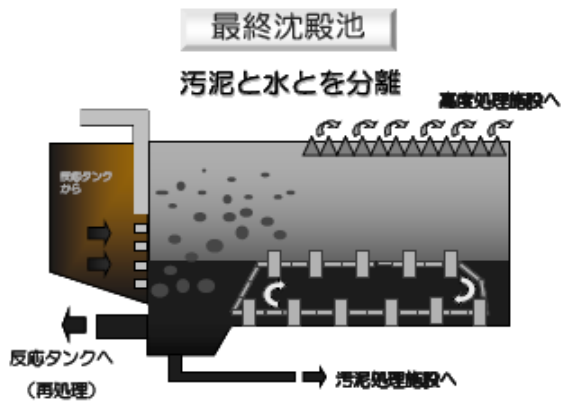
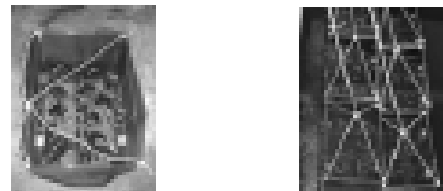


図 9.10 最終沈殿池の構造 (側面図)

最終沈殿池における、1区画1日当たりの流入量は、約1,600 m<sup>3</sup>であり、この水量がトラフに流入する。1時間当たりの水の上昇は、約80 cmとなり、この上昇水量を、10 cm平方の区画で表示すると、1時間当たりの上昇水量は、約約8 Lとなる。本実験において、イケチョウガイ (体重: 500 g) の水濾過能力は10 L/hr (約200 L/day、15℃) ~16 L/hr (約300 L/day、20℃) であることから、10 cm平方の区画に体重500 gの貝を1個設置すれば、理論上は毎時上昇する水量を設置した貝が濾過しようとされる。

そこで、トラフ1基当たり、トラフに沿って水面の約40%を覆うようにイケチョウガイを上記の密度 (1個/0.01 m<sup>2</sup>) で敷設することとした。これにより、トラフ1基に流入する水の、約50%が貝に濾過されると考えられる。(図9.11略)

なお、イケチョウガイは、専用ネット (60 cm×40 cm) 1枚に付き、体重500 gの貝を12個装着した物を2枚 (貝24個) 用意し、これを20 cmの間隔を開けて上下2段にして専用ラック (60 cm×40 cm×60 cm) に装着する予定であったが、実際に入手できた貝が、体重100 g程度の大きさであった。体重500 gの貝の水濾過能力は、体重100 gの貝約3個分に相当するため、専用ラック1基当たり、72個の貝を設置した。専用ラックは、沈殿物を防除するために、側面に樹脂製ネット (Φ: 1 mm) を二枚重ねにして取り付けた。貝を装着したラックは全部で10基 (貝の総数: 720個) 用意し、これをトラフに沿って水深10~30 cmの所に5基ずつ2列に配置した。なお、同じ池の反対側のトラフには、対照群として、貝を装着していないラックを同様に2列に設置した (図9.4、図9.11)。



専用ラックに収納したイケチョウガイ トラフ側面への設置状況

図 9.11 最終沈殿池へのイケチョウガイの設置

### 1) 濁度

図9.12にイケチョウガイの設置の有無による、トラフ中の水の濁度変化を示す。貝の存在により、濁度が20~30%減少することが明らかとなった。

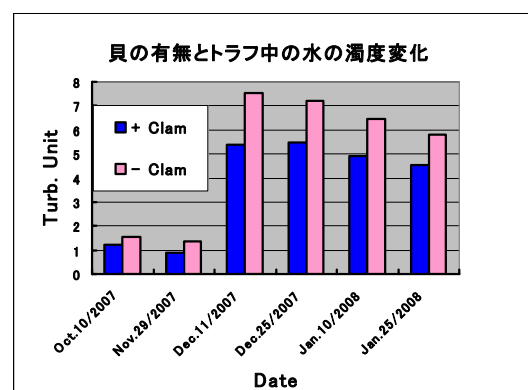


図 9.12 貝の存在の有無によるトラフ中の水の濁度差

+Clam : イケチョウガイあり  
-Clam : イケチョウガイなし

### 2) 水中微生物の存在密度

図9.13に上記図9.12と同様に、トラフ内の水中に存在する微生物について比較を行った結果を示す。いずれの微生物もイケチョウガイの消化管内からも検出されており、餌として摂取されているものと考えられる。いずれも概ね40~60%程度対照群よりも存在密度が低くなっている傾向が認められた。二枚貝は一般に、濾過摂食法の一つである繊毛粘液摂食法によって水中の餌となる微生物やデトリタスを捕捉する。その際、餌の表面構造等の因子によって、貝の鰓表面を覆う粘液に付着する量的状況が異なってくると考えられている。本実験において、イケチョウガイの有無によって、微生物の種類によってはその存在密度にバラツキが認められたが、これは、このような二枚貝の摂食様式に起因する現象と考えられた。

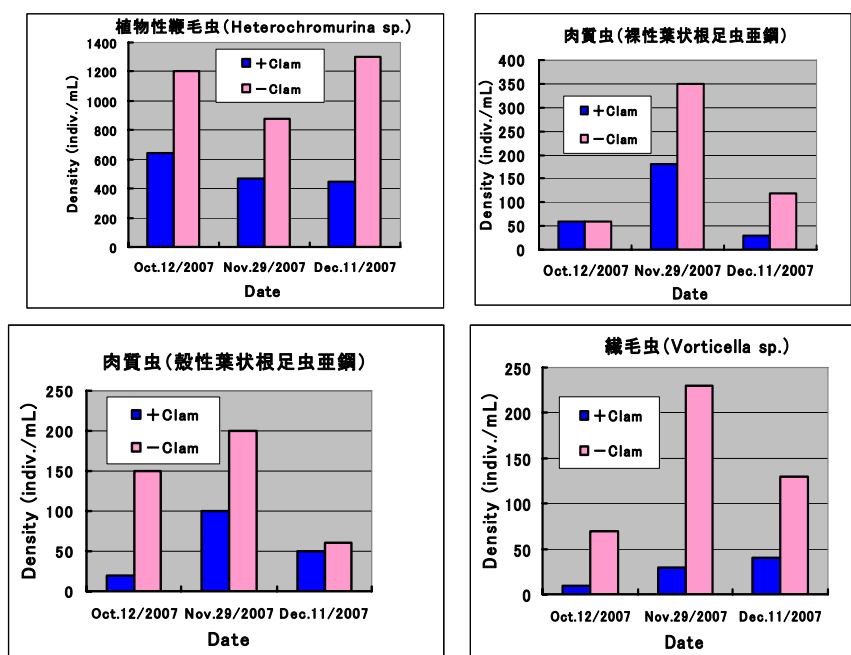


図 9.13 貝の存在の有無と、トラフ中の水に存在する微生物の存在密度  
+Clam: イケチョウガイあり、-Clam: イケチョウガイなし

## 9.9 まとめ

- 1) 淡水性底性二枚貝のイケチョウガイは、15~25℃の水温範囲で高い水濾過能力を発揮すると共に、水中のクリプトスポリジウムのオーシストを餌と共に消化管内に摂取し、粘性の高い高比重の糞中に排泄する能力があることを実験室内レベルで明らかにした。
- 2) イケチョウガイが有する上記性質を利用して、イケチョウガイによる公共用水中のオーシストの量的低減化モデルを構築することを目的に、下水処理場の最終沈殿池におけるイケチョウガイの微生物除去能力を調べた。実地試験にあたっては最も現実的な方法として沈殿池のトラフに沿って貝飼育槽を設置し、またオーシスト除去効果を推定する水質学的データとして、オーシストと同様に浮遊性粒子として存在する濁質および微生物に関して、貝設置によるトラフ内の水の濁度および微生物密度の変動を調べた。
- 3) 水温と貝のろ過能力に関する実験室データおよび沈殿池の周年水温変動に関する予備調査データより、貝のろ過能力が最低限発揮される水温 15℃前後の期間において、1日のトラフ1基あたり流入水量のおよそ 50%が貝によりろ過されるというモデル実験を行った。その結果、水温 15℃前後となる 10~1月の低水温期において、イケチョウガイ設置により

トラフ内の水の濁度が 20~30%程度減少すること、また餌となる水中の微生物類の密度に関しては、優占的に存在する種類に限定された結果ではあるが、その種類により差はあるものの 40~60%の減少が認められた。

- 4) 以上の知見より、限定された条件で行われたモデル実験ではあるが、イケチョウガイの生存条件を満たしうる公共用水域において、貝のろ過能力を利用した水浄化システムによりオーシストの量的低減化の可能性が示された。これを基準として、さらに効率向上を図ることは可能であると考えられる。本モデルは従来にない生物機能を利用した環境調和型の浄化システムのひとつであり、小~中規模の下水処理場において最もその有効性が発揮されるものと期待される。近年、市民参加型の環境浄化運動が盛んになっているが、本システムは貝の飼育・管理を下水処理事業者に委託するような形で水資源の保全・再利用に市民参加を促す機会を与えることも期待される。

## 10. 水源上流の下水処理場からの原虫の流出事例について

(埼玉県水質管理センター 森田久男)

### 10.1 荒川上流流域の下水道普及状況

荒川上流流域は、埼玉県及び東京都の水源に位置するが、構成市町である深谷市及び寄居町には、行政人口で約 18 万人以上が居住している。この地域の公共下水道普及率は 43.1%であり、このうち、荒川上流流域下水道の普及率は 7.9%である(表 10.1)。この流域下水道の下水処理場において、クリプトスポリジウムが検出された事例について、経過の整理と考察を行う。

表 10.1 荒川上流流域の公共下水道整備状況  
(平成 18 年度末現在)

| 都市名       | 行政面積<br>(ha) | 行政人口<br>(人) A | 処理面積<br>(ha) | 処理人口<br>(人) B | 普及率(%)<br>B/A |
|-----------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
|           |              |               |              |               |               |
| 深谷        | 13,758       | 145,433       | 1,397.70     | 71,968        | 49.5          |
| (流域下水道)   |              |               | 224.3        | 7,559         | 5.2           |
| (単独公共下水道) |              |               | 1,173.4      | 64,409        | 44.3          |
| 寄居        | 6,417        | 37,328        | 212.8        | 6,827         | 18.3          |
| 計         | 20,175       | 182,761       | 1,610.5      | 78,795        | 43.1          |
| (流域下水道計)  |              |               | 437.1        | 78,795        | 7.9           |

### 10.2 下水処理水のクリプトスポリジウム対策について

国土交通省では、平成 15 年 6 月 26 日付け国土交通省都市・地域整備局下水道部流域管理官付流域下水道計画調整官事務連絡で、「下水処理水のクリプトスポリジウム検査と管理計画の策定を求めている。埼玉県では、「埼玉県流域下水道下水処理水の水系リスク管理計画」(平成 17 年 3 月 18 日県土整備部長決裁)を定め、流入下水及び放流水のクリプトスポリジウム濃度を毎月 1 回測定すること、表 10.2 に示す濃度基準により対応を行うことを定めている。

表 10.2 濃度基準値

|             |         |
|-------------|---------|
| 監視強化基準値 L 1 | 2.8 個/L |
| 緊急対応基準値 L 2 | 4.1 個/L |
| 基準上限値       | 6.6 個/L |

#### (1) 監視強化基準値 L 1 以上が検出された場合

- ① 関係機関への連絡・情報交換
- ② すみやかに放流水を採取して再測定を実施
- ③ 再測定後の測定を次のとおり実施
  - ア ②の採取日の翌日に放流水を採取し測定
  - イ 監視強化基準値以上を検出した検体の採取日から 1 週間以内に 1 回測定

ウ イの採取日以降、1 週間以内に 1 回測定

- ④ 測定結果が 3 回連続して監視強化基準値未満となった場合、監視強化を解除
- ⑤ ④以降、月 1 回の通常測定の実施

#### (2) 緊急対応基準値 L 2 以上(基準上限値以上の場合を含む)が検出された場合

- ① 関係機関への連絡・情報交換及び公衆への情報提供
- ② 凝集剤の添加等による除去の実施
- ③ 再測定(毎日)の実施
- ④ 再測定の結果、2 回連続して緊急対応基準値未満となった場合、公衆への情報提供(緊急対応解除情報)及び監視の実施

### 10.3 下水処理水中からの原虫検出事例

荒川上流水循環センター(終末処理場)において平成 19 年 4 月 17 日 9:50 採水された水中に、クリプトスポリジウム流入水 310 個/L、放流水 7.9 個/L が検出されたため、緊急対応として、関係機関への情報提供が行われ、新聞等にも掲載された。

埼玉県衛生研究所の DNA 検査により、流入水中のクリプトスポリジウムは、*Cryptosporidium parvum* gonotype2 であり、ヒトと動物(ウシ、ブタ、マウス等)の両方に感染すると判別された。

表 10.3 荒川上流水循環センターでの H17,H18 クリプト濃度

| 単位         | 定量<br>下限 | H17 |    |   |   |   |   |    |    |    |   | H18 |   |   |     |
|------------|----------|-----|----|---|---|---|---|----|----|----|---|-----|---|---|-----|
|            |          | 4   | 5  | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2   | 3 |   |     |
| 流入水<br>個/L | 10       | <   | 10 | < | < | < | < | <  | <  | <  | < | <   | < | < | 20  |
| 放流水<br>個/L | 0.1      | <   | <  | < | < | < | < | <  | <  | <  | < | <   | < | < | 0.1 |

| 単位         | 定量<br>下限 | H18 |   |   |   |     |   |     |    |    |   | H19 |   |   |   |
|------------|----------|-----|---|---|---|-----|---|-----|----|----|---|-----|---|---|---|
|            |          | 4   | 5 | 6 | 7 | 8   | 9 | 10  | 11 | 12 | 1 | 2   | 3 |   |   |
| 流入水<br>個/L | 10       | <   | < | < | < | 70  | < | <   | <  | <  | < | <   | < | < | < |
| 放流水<br>個/L | 0.1      | <   | < | < | < | 0.2 | < | 0.3 | <  | <  | < | <   | < | < | < |

表 10.4 市野川水循環センターでの H17,H18 クリプト濃度

| 単位         | 定量<br>下限 | H17 |     |   |   |   |   |    |    |     |   | H19 |   |   |   |
|------------|----------|-----|-----|---|---|---|---|----|----|-----|---|-----|---|---|---|
|            |          | 4   | 5   | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12  | 1 | 2   | 3 |   |   |
| 流入水<br>個/L | 10       | <   | 10  | < | < | < | < | 10 | <  | <   | < | <   | < | < | < |
| 放流水<br>個/L | 0.1      | <   | 0.1 | < | < | < | < | <  | <  | 0.1 | < | <   | < | < | < |

| 単位         | 定量<br>下限 | H18 |     |   |     |     |   |     |    |     |   | H19 |   |   |   |
|------------|----------|-----|-----|---|-----|-----|---|-----|----|-----|---|-----|---|---|---|
|            |          | 4   | 5   | 6 | 7   | 8   | 9 | 10  | 11 | 12  | 1 | 2   | 3 |   |   |
| 流入水<br>個/L | 10       | 10  | 20  | < | <   | <   | < | <   | <  | <   | < | <   | < | < | < |
| 放流水<br>個/L | 0.1      | <   | 0.4 | < | 2.2 | 0.2 | < | 0.1 | <  | 1.2 | < | 0.7 | < | < | < |

荒川上流水循環センターの放流量は約 3,000 t / 日 (0.035t/s)、当時の荒川流量 33.2t/s (約 1000 倍 (大芦橋 約 8.2t/s、武蔵水路 25t/s) であり、荒川でのクリプトスポリジウムは、

$$8 \text{ 個/L} \div 1000 \times 10 = 0.08 \text{ 個/10L}$$

となると計算された。

図 10.1 に、当該事例について調査された流入水と放流水中の原虫の濃度変動について示す。4月中旬に流入水における濃度が 200 個/L に達する場合があります、放流水においても濃度が高かったため凝集剤 (PAC) 注入が行われ、濃度が数日間かけて濃度が減少している様子が現れている。

クリプトスポリジウムは 1 リットルあたり 8 個程度で放流されているとして計算すると、河川水の 13 リットル中にクリプトスポリジウム 1 個程度となる。

河川水を検査したデータからクリプトスポリジウムは通常河川に出現する微生物であることが判っており、この程度であれば通常と変わらないレベルである。上述のとおり、通常の状態であるので、従来どおりの濁度管理による浄水処理の徹底を実施していれば問題ないと考えられた。

今回の場合、クリプトスポリジウムへの対策としては、川遊びや釣りなどを行う際、川の水を直接飲まない、魚は十分洗浄し加熱して食べる、食事の前には手を洗うなどの通常の衛生対策を守れば問題ないものと考えられた。

今回検出された濃度は、水源に対してはあまり影響が無く、通常の河川水とほぼ同等であり特別な対応は要しなかった。従って、流域の特性を考慮して通報基準値を見直すことも必要である可能性があるが、一方、過去の年報でも、濃度は今回より低いながら流入水、放流水からクリプトが検出さ

れており、通常からの情報交換も重要であると考えられた。

## 11. クリプトスポリジウム等対策のための小規模水道における紫外線照射施設及び膜施設の導入に関する規制影響分析

(国立保健医療科学院水道工学部 浅見真理、国包章一)

### 11.1 はじめに

平成 17 年 3 月末現在の厚生労働省調査では、表流水、伏流水、浅井戸又は深井戸を水源とする浄水施設 (全量浄水受水以外の施設) 20,064 施設のうち、水道原水のクリプトスポリジウム等による汚染のおそれがある施設 (予防対策の必要な施設) は 5,480 施設 (約 27%) である。このうち 3,076 施設では、既にろ過施設設置等の予防対策について実施済みであるが、残る 2,404 施設については、ろ過施設設置等について検討中である。このような施設には簡易水道等の小規模な水道事業者によるものが全体の約 78% (1,869 施設) と依然多い。これらの施設では、当面の措置として暫定対策指針に基づき水道原水の濁度を監視し、濁水等により原水の濁度レベルが通常よりも高くなった場合には、取水停止等を行っている。

厚生労働省の水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針においては、人畜由来汚染の指標菌の検出事例がある場合にはろ過施設を設置することが求められてきたが、敷地や財政面でろ過施設の設置は困難な場合が多い。しかし、クリプトスポリジウム等の検出事例 17 件のうち 12 件 (71%) が塩素消毒のみでろ過施設を設置していない施設であり、喫緊の対策が急務である。

そこで本研究では、クリプトスポリジウム等対策のために紫外線照射及び膜ろ過施設等を導入する際の規制影響について解析を行った。

### 11.2 対象となる水道の要件

本稿で述べるレベル 3 の水道とは、レベル 4 (クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高いと判断される) には該当しない、伏流水、浅井戸等を水源とする施設であっても、原水から指標菌が検出されたことがある場合、当該原水は糞便により汚染されていると考えられることから、クリプトスポリジウム等による汚染のおそれがあると判断される水道

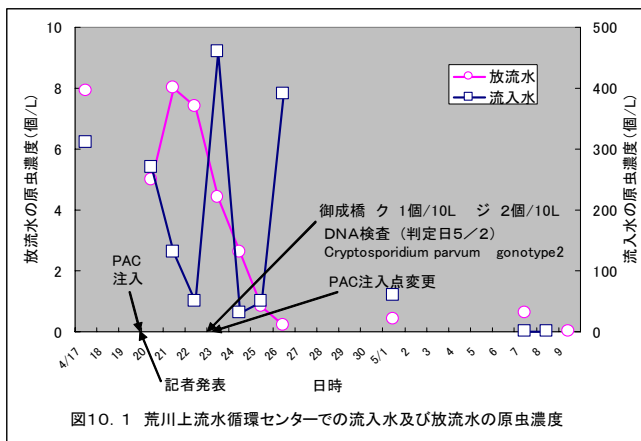


図 10.1 荒川上流水循環センターでの流入水及び放流水の原虫濃度

である。(図 11.1)

レベル3の水道は、いずれかの施設を整備することとされている。

クリプト対策指針におけるレベル3の水道の要件 (抜粋)

- (a) ろ過池出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備 (急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等)。  
 (b) クリプトスポリジウム等を不活化することができる紫外線処理設備。具体的には以下の要件を満たすもの。  
 ① 紫外線照射槽を通過する水量の 95%以上に対して、紫外線 (253.7nm 付近) の照射量を常時 10mJ/cm<sup>2</sup> 以上確保できること。  
 ② 処理対象とする水が以下の水質を満たすものであること。  
 ・濁度 2 度以下であること  
 ・色度 5 度以下であること  
 ・紫外線 (253.7nm 付近) の透過率が 75%を超えること (紫外線吸光度が 0.125 abs./10mm 未満)  
 ③ 十分に紫外線が照射されていることを常時確認可能な紫外線強度計を備えていること。  
 ④ 原水の濁度の常時測定が可能な濁度計を備えていること (過去の水質検査結果等から水道の原水の濁度が 2 度に達しないことが明らかである場合を除く。)

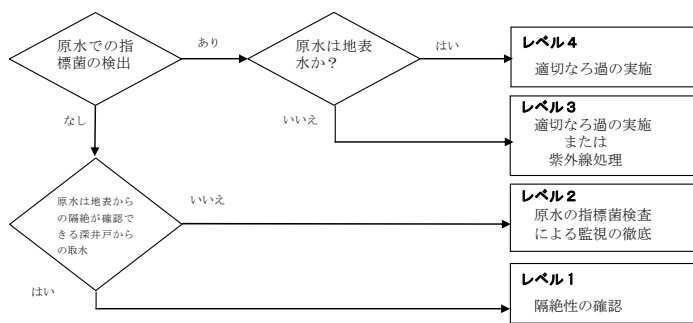


図 11.1 クリプトスポリジウム暫定対策指針における対策の分類

### 11.3 ライフサイクルコストの算出とリスク比較

クリプト対策レベル3のカテゴリーに属する原水について、各種処理方法を導入する場合のライフサイクルコストを水道技術研究センターの導入ガイドライン等の数値を用いて計算したところ、30年比較、60年比較ともコストが最も低いのは紫外線照射であった。また、30年比較、60年比較とも処理能力が大きくなるほど浄水方式別におけるコストの格差が大きくなっていることが分かった。

伏流水において検出されたオーシスト濃度 (0.2 個/L) を用いて健康影響度を求めた結果、無処理 (6.0 × 10<sup>-4</sup> DALYs) では年間健康影響度許容値 (1.4 × 10<sup>-6</sup> DALYs) 以上のリスクである。

クリプトスポリジウム等の対応として、緩速ろ過、凝集沈殿急速ろ過、膜ろ過、紫外線照射等の上水処理を行えばクリプトスポリジウムに関する健康影響度は 1.2 × 10<sup>-6</sup> ~ 6.0 × 10<sup>-11</sup> DALYs となり、年間健康影響度許容値を下回るリスク水準となった。

原虫対策として膜処理や紫外線照射設備を導入した場合における人口あたりコスト (30年ライフサイクルコストによる) を求めた結果、200人規模の施設では、紫外線施設導入の場合月額 125 円なのに対し、膜処理施設では 556 円に相当したため、紫外線照射施設では、膜処理施設に比べ大幅に安価であることが示された (図 11.2)。

紫外線照射はその不活化効果を維持するため、原水の水質に対して適用制限がある。水質に応じた紫外線照射設備等の適用性について解析を行う必要がある。

## 12. まとめ

- 1) 水源となる流域における微生物存在調査において、原虫クリプトスポリジウム、ジアルジアが検出された。河川水中のクリプトスポリジウムオーシストは、71% (20/28) から検出され、最大で 68 oocysts/10L の濃度を示した。ジアルジアシストは、67% (19/28) から検出され、最大濃度は 32 cysts/10L であった。畜産地域を流域に持つ地点において原虫濃度が顕著に上昇していた。
- 2) 利根川水系を対象としたウイルス (ノロウイルス、サポウイルス、腸管系アデノウイルス) と F フェージの存在実態調査では、河川水 2L を濃縮してリアルタイム PCR に供した結果、89% (25/28) の試料から検査したウイルスのいずれか 1 種類以上が検出された。ノロウイルスの陽性率は、ヒトに感染する主要な遺伝子群である GI と GII が各 57% (16/28)、ウシに感染する遺伝子群である GIII が 0% (0/23)、新規の遺伝子群である GIV が 7% (2/28) であった。サポウイルスと腸管系アデノウイルスは、それぞれ 71% (20/28) の試料から検出された。地点によっては冬期に合計 3,000PDU/L を超える高い値を示した。
- 3) 人畜由来汚染の指標の一つとして、F-フェージについて検討を行ったところ、単離した F フェージのブラック 140 試料のうち、F-RNA フェージは 78 試料 (56%) から検出された。その内訳は、ヒト由来の群 (II, III 群) が 39 試

料、ヒト以外の動物由来の群 (I、IV 群) が 39 試料であった。F フェージが高濃度で検出された F 地点では、6 月には動物由来の F-RNA フェージのみが検出されたが、その他の月にはヒト由来の F-RNA フェージが検出され、糞便汚染の寄与率には大きな変動が存在するが、原虫濃度とフェージは相関を示すことが示唆された。

- 4) 淡水性底性二枚貝のイケチョウガイは、15~25 度の水温範囲で高い水濾過能力を発揮すると共に、水中のクリプトスポリジウムのオーシストを餌と共に消化管内に摂取し、粘性の高い高比重の糞中に排泄する能力があることを実験室内レベルで明らかにした。
- 5) クリプトスポリジウムのオーシストの低減化の一手段として、イケチョウガイを下水処理場の最終沈殿池に設置する方法を試行したところ、水温 15 度前後となる 10~1 月の低水温期においても、イケチョウガイ設置によりトラフ内の水の濁度が 20~30%程度減少すること、また餌となる水中の微生物類の密度に関しては、優占的に存在する種類に限定された結果ではあるが、その種類により差はあるものの 40~60%の減少が認められた。比較的低コストで、かつ環境への影響も少ないシステムとなりうるということが示唆された。
- 6) 糞便性汚染指標の中で、大腸菌群および糞便性大腸菌群数は環境中で増加する可能性が示唆された。対して、絶対嫌気性細菌である *Bacteroides-Prevotella* 属の 16S rRNA 遺伝子マーカーは、数日間環境水中に残留した後、すみやかに減衰するため、河川から本手法により検出される遺伝子マーカーは現行の指標に比べ糞便汚染の現状をより正確に反映していると考えられた。
- 7) 下水処理水の流入前後で生物マーカー、化学物質マーカーの変化と相互関係の実態調査を行ったところ、平常時における下水・河川水試料のクリプトスポリジウムの検出濃度・割合は低かったが、ジアルジアは流入下水で高濃度に検出される場合もあった。活性汚泥処理法による除去率は高く、放流水のシスト濃度は放流先河川水と同程度となるため、公共用水域へ及ぼす負荷は低レベルであると考えられた。
- 8) ノロウイルスは非流行期と流行期あるいは流域における負荷源が異なることで検出濃度に大きな違いがあり、下

水・河川水試料とも非流行期の汚染のレベルは低かった。

- 9) 下水道整備率が異なる 3 地点の流行期におけるノロウイルス (G1、G2 型) と化学物質マーカーの日平均負荷量の関係を整理したところ、カフェインまたは総ステロールとの間に弱い相関が認められた。このため、これら化学物質マーカー濃度を測定することにより、ノロウイルスの最大汚染状況を推測できることが分かった。
- 10) 原虫対策として膜処理または紫外線処理を導入する場合の費用を給水人口別に計算したところ、小規模施設では、紫外線照射は、膜処理に比べ大幅に安価であることが示された。また、クリプトスポリジウム等の対応として、緩速ろ過、凝集沈殿急速ろ過、膜ろ過、紫外線照射等の浄水処理を行えばクリプトスポリジウムに関する健康影響度は  $1.2 \times 10^{-6} \sim 6.0 \times 10^{-11}$  DALYs (障害調整生存年数) となり、年間健康影響度許容値を下回るリスク水準となることが計算上示された。

## 参考文献

### 第 3 章 参考文献

- 1) 大村達夫, 渡部徹, 真砂佳史. 河川および内湾底泥中のクリプトスポリジウム存在量調査, 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業, 平成 17 年度総括・分担研究報告書, 55-60, 2006.
- 2) 関東農政局利根川水系土地改良調査管理事務所, 水源情報提供システム. (<http://tonecho.st.wakwak.ne.jp/login.asp>)
- 3) Xiao, L. H., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Vivar, A., Lal, A. A. and Gilman, R. H.: Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *Journal of Infectious Diseases*, 185 (12): 1846-1848, 2002.
- 4) Lihua Xiao, Ronald Fayer, Una Ryan, and Steve J. Upton. *Cryptosporidium Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health*, *Clin Microbiol Rev.* 17(1): 72-97, 2004.

### 第 5 章 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2003)、ノロ

ウイルスの検出法について.

ス除去効率向上手法の検討, 未定稿

- 2) Kei O. Isobe, Tarao Mitsunori, Mohamad P. Zakaria, Nguyen H. Chiem, Le Y. Minh, Hideshige Takada: Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environ. Sci. and Tech.*, 36, 4497-4507 (2002) .
  - 3) Ignaz J. Buerge, Thomas Poiger, Markus D. Müller, Hans-Rudolf Buser: Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science and Technology*, 37, 691-700 (2003).
  - 4) 上村清、井関基弘、平井和光、木村英作著、寄生虫学テキスト、文光堂.
  - 5) M. Suwa and Y. Suzuki (2001) Occurrence of *Cryptosporidium* in Japan and countermeasures in wastewater treatment plant, *Wat. Sci. and Tech.* 43(12), 183-186.
  - 6) 諏訪守、鈴木穰(1999)「汚濁負荷上昇時の河川における原虫類調査」、第2回日本水環境学会シンポジウム講演集.
  - 7) 北澤弘美、国包章一、眞柄泰基(1999)「水道水源におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア実態調査結果の解析」、水道協会雑誌、68(4).
  - 8) 原本英司、片山浩之 他(2005)「下水処理場におけるノロウイルスの季節変動の調査」,第53回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集,311.
  - 9) Laurel J. Standley, Louis A. Kaplan and Darrell Smith: Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources. *Environmental Science and Technology*, 34, 3124-3130 (2000).
  - 10) 諏訪守、鈴木穰、尾崎正明 (2007) クリプトスポリジウム集団感染発生地域の下水処理場におけるオーシストの実態, 下水道協会誌論文集, 44(538), 151-160.
  - 11) 諏訪守、鈴木穰 (2002) 下水処理のクリプトスポリジウム除去効果およびその向上方策, 下水道協会誌論文集, 39(474), 135-144.
  - 12) 尾崎正明、諏訪守 (2008) 下水処理過程でのノロウイルス除去効率向上手法の検討, 未定稿
- ## 第7章 参考文献
- 1) 片山浩之、嶋崎明寛、大垣眞一郎. 2002. 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発. *水環境学会誌*. 25:469-475.
  - 2) 感染症情報センター. 2006. <http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>
  - 3) Gourmelon, M., M. P. Caprais, R. Ségura, C. Le Menec, S. Lozach, J. Y. Piriou, and A. Rincé. 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4857-4866.
  - 4) IAWPRC study group on Health Related Water Microbiology. 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25:529-545.
  - 5) Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41:1548-1557.
  - 6) Katayama, H., A. Shimasaki, and S. Ohgaki. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1033-1039.
  - 7) Ko, G., N. Jothikumar, V. R. Hill, and M. D. Sobsey. 2005. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 127:148-153.
  - 8) Ogorzaly, L., and C. Gantzer. 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *J. Virol. Methods.* 138:131-139.
  - 9) Trujillo, A. A., K. A. McCaustland, D. P. Zheng, L.



- A. Hadley, G. Vaughn, S. M. Adams, T. Ando, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 2006. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 44:1405-1412.
- 10) U. S. Environmental Protection Agency. 2001. National primary drinking water standards. EPA816-F-01-007. Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- 11) Vinjé, J., S. J. G. Oudejans, J. R. Stewart, M. D. Sobsey, and S. C. Long. 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5996-6004.
- 12) Wolf, S., W. M. Williamson, J. Hewitt, M. Rivera-Aban, S. Lin, A. Ball, P. Scholes, and G. E. Greening. 2007. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5464-5470.
- 13) 田所健一, 本堂朋子, 影山努, 篠原美千代, 土井りえ, 山口敏和. 2005. リアルタイム PCR によるサポウィルス検出法の開発. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会抄録集. p. 235.
- Contam Toxicol*, 51, 559-566 (2006)
- 3) 紀平 肇、松田 征也、内山 りゅう：日本産淡水貝類図鑑 ①琵琶湖・淀川産の淡水魚類 (2003)、株式会社ピーシーズ
- 4) 赤井 裕、秋山 信彦、鈴木 伸洋、増田 修：タナゴのすべて (2004)、株式会社マリン企画

#### 関連する研究発表

- 1) Olga Savichtcheva and Satoshi Okabe, Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspective, *Water Research*, 40, 2463-2476 (2006)
- 2) T. Izumi, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama : Detection System of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator in River Water. *Arch Environ Contam Toxicol*, 51, 559-566 (2006)
- 3) Asami, M., Kunikane, S., Regulatory Impact Analysis (RIA) - introduction of membrane filtration or UV irradiation into small water supply system against potential cryptosporidium contamination, Efficient Operation and Management, Specialist Group Meeting of International Water Association, Jeju, Korea, 2007
- 4) 眞壁朝宏、浅見真理、秋葉道宏、国包章一、森田久男、公共用水域における人畜由来汚染のステロール指標に関する研究、第 58 回全国水道研究発表会講演要旨集 (2006. 5)
- 5) 西澤博、金志勲、秋葉道宏、浅見真理、国包章一、利根川水系におけるクリプトスポリジウムとジアルジア汚染の実態調査、全国水道研究発表会講演集 610-611 (2007. 5)
- 6) 中田典秀、小森行也、鈴木穰 下水道整備状況の異なる流域における生理活性物質の動態、第 16 回環境化学討論会講演要旨集 82-83 (2007. 6)
- 7) 浅見真理、秋葉道宏、原本英司、與那城雄司、国包章一、流域における病原微生物の状況と水道原水への影響、保健医療科学研究会 (2008. 2)

#### 第 8 章 参考文献

- 1) 岡山ら (2005) 日本水環境学会年会講演集、p210

#### 第 9 章 参考文献

- 1) T. Izumi, Y. Itoh, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama : Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator for *Cryptosporidium parvum* Oocysts in River Water., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72(1), 29-37 (2004)
- 2) T. Izumi, K. Yagita, T. Endo, T. Ohyama : Detection System of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator in River Water. *Arch Environ*

- 8) 與那城雄司、原本英司、秋葉道宏、浅見真理、国包章一、利根川水系におけるクリプトスポリジウム及びギアルジアの検出と遺伝子型の解析, 第59回全国水道研究発表会 (2008)
- 9) Haramoto E, Kitajima, Katayama H, Asami M, Akiba M, Ohgaki S, Kunikane S, Detection and genotyping of F-specific RNA bacteriophages as indicators of noroviruses in river water in Japan, 108th General Meeting of American Society for Microbiology (2008)
- 10) 原本英司、與那城雄司、秋葉道宏、橋本温、森田重光、浅見真理、国包章一、利根川流域の小河川におけるクリプトスポリジウムおよびギアルジアの汚染実態の解明、土木学会環境工学フォーラム論文集、印刷中 (2008)