

多摩川原橋付近の河川水では PFCAs の合計濃度は 19.7~90.8ng/L、PFCSs が 41.5~996.5ng/L と上流域に比べ高かった。また、PFCAs の場合は上流域では検出される PFCAs の種類は少なく、PFOA および PFNA が主であったが、中流域では PFOA よりも炭素鎖長の短い PFCAs も検出された。これに対して、PFCSs の場合は上流域から中流域で殆ど変わらず、PFOS、PFHxS が主であった。高幡橋では比較的高濃度の PFCs が検出されたが、その後の継続調査(8~12月)で多摩川原橋付近の河川水と同程度であったことから、一過性の汚染によるものと考えられた。

多摩川水系における年間変動を調べるために 2008 年 1 月から 12 月にかけて調査を実施した。羽村堰では PFCAs が 0.7~5.1ng/L、PFCSs が 0.2~30.4ng/L で、年間を通じて濃度変動は小さかった。2008 年 4 月には一時的に PFOS が比較的高濃度(29.2ng/L)で検出された。中流域では PFCAs が 14.4~59.9ng/L と上流域に比べ濃度は高かったが、濃度変動は小さかった。一方、PFCSs は 17.3~167.7ng/L で、上流域に比べ濃度は高く、濃度変動は PFCAs に比べて大きかった。各 PFCs の存在比は上流域の羽村堰では PFCAs が PFOA(48.9%)>PFNA(38.4%)>PFDA、PFUdA、PFHpA、PFPeA、PFHxA(1.9~3.8%)>PFDoA、PFTrDA、PFTeDA(0.6~1.4%)で、PFCSs が PFOS(81.5%)>PFHxS(14.2%)>PFBS(3.8%)>PFHpS、PFDS(<0.6%)であった。また、中流域の多摩川原橋では PFCAs が PFNA(41.9%)>PFOA(31.5%)>PFHxA(13.7%)>PFHpA(6.1%)>PFDA、PFUdA(3%)>PFPeA、PFDoA、PFTrDA、PFTeDA(<1%)で、PFCSs の場合は PFOS(79.7%)>PFHxS(16.2%)>PFBS(3%)>PFHpS、PFDS(<1%)であった。

利根川水系中川の三郷付近では、PFCAs および PFCSs とともに季節による明確な差違はみられなかった。PFCAs の合計最高濃度は 40.9ng/L(3月)、合計最低濃度は 14.5ng/L(8月)、PFCSs の合計最高濃度は 50.9ng/L(7月)、合計最低濃度は 10.5ng/L(8月)であった。各 PFCAs の存在比は、PFNA(37.4%)>PFOA(33.9%)>PFHxA(14.1%)>PFHpA、PFUdA、PFDA(3.9~4.9%)>PFDoA、PFTrDA、PFTeDA(<1%)であった。PFCSs では、PFOS(72.8%)>PFBS(15.2%)>PFHxS(11.2%)>PFHpS、PFDS(<1%)であった。

3. かび臭対策に対するアンケートの調査結果

1) 回答率および解析対象浄水場

調査対象とした 67 事業体中、59 事業体から回答が得られ、その回収率は、88.1%であった。各事業体には、その事業体が所有する代表的な浄水場について回答を求めたが、複数の浄水場について回答した事業体もあったため、合計 67 の浄水場となった。アンケートの解析にあたっては、北海道から九州・沖縄まで全国の回答が得られた 67 浄水場を対象とした。また、配水量が 1,000m³/d 以下の小規模な浄水場から 1,000,000m³/d 以上の大規模な浄水場までが調査対象となっている。

2) かび臭被害の発生状況

かび臭被害が発生した浄水場は、34 浄水場(50.7%)であった。また、地域毎に被害の発生割合が異なることがわかった。気温の高い地域でやや被害の割合が高いものの、北海道で 50%以上の発生割合を示すなど、必ずしも気温の低い地方で被害が少ないわけではないことがわかった。

かび臭被害を受けた浄水場の主要な水源の種類は、河川が 23 浄水場(67.6%)と最も多く、次いでダム直接 7 浄水場(20.6%)、

湖沼4浄水場(11.8%)の順であり、表流水が100%を占めた。かび臭の発生原因は、水源の種類毎に異なっているが、いずれの水源も藍藻類(シアノバクテリア)が高い割合を占めた。一方、河川を主要な水源としている浄水場では発生原因不明の割合が27%を占めており、原因を特定出来ないケースも多いことがわかった。

3) かび臭対策

(1) かび臭原因物質の基準化の認知

現行の水質基準より、2-MIB及びジェオスミンが基準化されたことについては、回答のあった67浄水場中、全ての回答者が知っていた。平成19年3月31日に経過措置(両物質0.00002mg/L)が解除され、平成19年4月1日より、両物質が0.00001mg/Lになったことについては、1浄水場の回答者が知らなかったと回答している。

(2) かび臭対策の実施有無

かび臭対策については、かび臭被害が発生したと回答した34浄水場全てで「実施している」との回答を得た。また、かび臭被害が発生していない33浄水場においても、14浄水場(42.4%)は「実施している」と回答しており、予防対策を行っている浄水場も多いことが明らかとなった。なお、「その他」と回答した5浄水場に関しても、その回答内容から「実施している」と判断した。

(3) かび臭対策の内容

かび臭対策の内容については、水源対策20浄水場(19.4%)、高度浄水処理の導入45浄水場(43.7%)、浄水処理プロセスの運転条件の変更38浄水場(36.9%)で、高度浄水処理の導入が最も多かった。水源対策については、揚水筒7浄水場(35%)と最も多く、次いで選択取水7浄水場(35%)、硫酸銅散布4浄水場(20%)、散気管1浄水場(5%)の順であった。高度浄水処理の導入につい

ては、粉末活性炭処理が24浄水場(53.3%)と半数以上を占め、次いで粒状活性炭処理9浄水場(20%)、オゾン処理6浄水場(13.3%)、生物処理3浄水場(6.7%)の順であった。浄水処理プロセスの運転条件の変更については、粉末活性炭の注入率の増加15浄水場(39.5%)が最も多く、次いで塩素注入点の変更(前塩素から中塩素)14浄水場(36.8%)、凝集剤の注入率の増加7浄水場(18.4%)、二段凝集処理(濾過前にも凝集剤を注入)1浄水場(2.6%)の順であった。

(4) かび臭の管理指標

かび臭の管理指標については、「設けている」26浄水場(38.8%)、「設けていない」41浄水場(61.2%)であった。モニタリングは、浄水(濾過水)8浄水場、原水6浄水場、浄水出口水3浄水場であった。指標項目は、かび臭原因物質を直接測定している浄水場が多く、その濃度は、原水では2-MIB、ジェオスミン濃度0.000003~0.00001mg/L、浄水では、2-MIB、ジェオスミン濃度0~0.000005mg/Lであった。また、2-MIB濃度をジェオスミンより低い値に設定している浄水場も多かった。なお、大規模の浄水場の方が管理指標を設けている割合が大きいと予想されたが、本アンケート調査においてはそのような傾向は得られなかった。

(5) かび臭被害への対応状況

地域によってカビ臭被害の発生傾向およびその対応状況が異なっており、琵琶湖系浄水場では毎年常に40日以上カビ臭被害への対応を行っていたことから、カビ臭被害に対して脆弱な水源が存在していることがわかった。また、相模湖系浄水場では平成17、18年度に年間100日以上カビ臭被害への対応を行っており、カビ臭被害が急激に増加している地域も存在することがわかった。

4. 千苜貯水池におけるかび臭物質の推移と対策

平成 20 年度、千苜貯水池におけるかび臭物質の推移を調査し、同時に対策を行った。

貯水池内では6月より藍藻類の *Anabaena crassa* が増殖し、7月 14 日に合流において 590 巻/mL 検出された。このときジェオスミンの値は 550ng/L であった。これらの生物は移流などにより堰堤前でも観測されているが、表層に集積しやすいことから、6月 17 日に取水口を 20 尺から 36 尺に変更した結果、原水のジェオスミンの値を 4ng/L 以下と低く保つことができた。

8月、表層での *Anabaena crassa* の衰退に伴い、ジェオスミンの値は減少していたが、水温躍層 (7~14m) での貧酸素水塊形成によりアンモニア態窒素やマンガンの値が高くなるなど水質が悪化したことから、段階的に活性炭槽稼働数を増やし対応した。

9月、取水口の 36 尺で腐敗臭や硫化水素臭を呈するなどより水質が悪化し、また、取水口の 20 尺において 2-MIB の値が最大 19ng/L 検出された。このため、20、28、36 尺の 3ヶ所より取水するとともに、活性炭処理を継続した。

なお、2-MIB については、6月より堰堤前で徐々に増加していたが、合流や郡界では低く、また *Phormidium tenue* がごくわずか確認されたがその増殖はなく、かび臭の原因となる生物を特定することはできなかった。また、この時期は *Microcystis aeruginosa* が優占し、アオコを形成した。

10月、貯水池表層におけるかび臭濃度が低下したことから、取水口を 20 尺に変更したが、依然として貧酸素水塊が形成されていたことから、活性炭処理を継続した。

11月、気温の低下に伴う貧酸素水塊の縮小により徐々に水質が改善されたことから、段階的に活性炭槽稼働数を減らした。

12月、堰堤前 20m 以深で Geosmin の値が検出されていたこと、気温低下に伴い貯水池水の全層循環が近いと考えられることから、活性炭槽稼働数を 2 槽に増やし対応した。なお、20m 以深におけるかび臭の原因となる生物を特定することはできなかった。

5. 塩素消費速度と残留溶存有機物質との関係

塩素処理 3 日後の残留塩素濃度が 0.2~0.4mg/L になった結果のみを解析に使用した。

残留塩素は最初の数時間は急速に減少し、その後、緩やかに減少していた。そのため、以下の解析の中では 3 日間の塩素濃度の減少以外に、0~1 日までを急速反応部分、1日~3 日までを緩速反応部分として分けた減少塩素濃度について検討することとした。2/3 に採水した水源池水において、残留濁度は 2mg-AI/L までに急激に低下したが、有機物質濃度の指標である DOC や UV254 は、12mg-AI/L にかけて添加量と共に緩やかに低下した。溶存有機物質量と 3 日間の減少塩素濃度に相関は見られなかった。しかし、この 3 日間の減少塩素濃度は、初期の急激な塩素濃度の減少とその後の緩やかな減少に区分できた。

塩素処理前の有機物質濃度 (DOC および UV254) と、それぞれ 1 日間および 1 日後から 3 日までの塩素濃度の減少の関係にも、明確な相関関係は見られなかったが、UV254 と 1~3 日の塩素濃度の減少にはある程度の相関が見られるようであった。しかしながら、1~3 日の塩素濃度の減少は、初期の急激な塩素濃度の減少に比べて 1/10 程度であり、塩素処理前の有機物質濃度と相関するという事は理論的には考えにくい。

2/3 採水の水源池水に対する各凝集剤添加量の凝集処理水の塩素処理前の UV254 と 1~3 日の塩素消費量の間には、凝集処理後

サンプル、特に添加量が多い5つのサンプルのみを見ると、高い相関があるようにも見えるが、その相関線上に原水の値は乗らず、すべてのサンプルが直線的な相関関係にあるとはいえない。1日後の有機物質量と1~3日の減少塩素濃度の関係で、UV254の増加に伴い減少塩素濃度も増加している傾向が見られたが、幅広いUV254で同様の減少塩素濃度が得られており、相関があるとはいえなかった。1日後3日までのUV254の減少量と減少塩素濃度の関係は、1点を除いて良好で直線的な相関関係が見られた。

D. 考察

1. 水道水源におけるPFCsの存在実態調査

本調査で水道原水等の河川水中にPFOAやPFOSだけでなく、その他の炭素鎖長の違うPFCsもそれらと同レベルで検出される場合があることが明らかとなった。しかし、PFOSよりも炭素鎖の長い分子種の存在濃度は低く、最近のPFOSの使用動態を反映して環境中で分解された分子種が検出されている可能性が示唆された。また、環境水中にPFOAよりも炭素鎖の長いPFNAやPFDAが有意に検出されたことは、これらの物質の生物蓄積性等明らかになっていないことが多いため、環境中の動態に注意を払う必要があると思われる。PFHxAは多摩川水系の中流域および利根川水系から2008年5月以降、比較的に高濃度に検出された。近年、PFOAの代替品としてPFHxAが製造されるようになったこと、PFCAs製品の不純物、フルオロテロマーアルコールの代謝産物等が原因として考えられ、今後注意する必要がある。

2. PFCsの負荷源の推定

多摩川水系の各採水地点における河川水中のPFCs濃度と河川水量から各採水地点におけるPFCsの1日あたりの存在量を求めた。なお、河川水量およびPFCs濃度の日内

変動はないものと仮定した。上流域のPFCAsおよびPFCSsの量は1g/day以下であった。一方、中流域では、PFCAsが80g/day、PFCSsが90g/dayと存在量が増加した。

羽村堰-日野橋間ではPFCs存在量が著しく増加した。この区間では秋川と平井川の2河川が流れ込んでいるが、これら河川水中のPFCsの存在量は1g/day未満であったことから、この区間におけるPFCs存在量の増加は下水処理場A,Bからの負荷によると推察された。また、日野橋-関戸橋間では浅川が本流に流れ込んでいる。日野橋でのPFCsの存在量と浅川(採水地点:高幡橋)でのPFCs存在量を合算しても関戸橋でのPFCsの存在量にはならなかった。この日野橋-関戸橋間では2下水処理場C,Dからの処理水が流入している。さらに、関戸橋-多摩川原橋間では大栗川と2下水処理場E,Fの処理水が本流に流れ込んでいる。大栗川での調査は実施していないが、水量が少ないことから、その負荷量は少ないと考えられる。これらの推論から、多摩川のPFCsは下水処理場法流水が負荷源になっていることが考えられた。

3. かび臭対策に対するアンケートの調査結果

かび臭被害が発生した浄水場は、34浄水場(50.7%)であった。平成7年度に日本水道協会が行った生物障害に関するアンケート調査では、異臭味障害が発生した事業者の割合が20.9%であったことから、調査対象数等は異なるものの、臭気に関する被害を報告する浄水場の割合が高まっていることがわかった。平成15年にかび臭物質(ジェオスミン、2-MIB)が水道水質基準に追加されたことを受けて、各水道事業者において、かび臭に対する関心が高まっている様子がうかがえた。

また、気温の高い地域でやや被害の割合

が高いものの、必ずしも気温の低い地方で被害が少なくないことは、水源の富栄養化の進行状況等他の要因も大きく関与していると推測される。

4. 塩素消費速度と残留溶存有機物質との関係

溶存有機物質と3日間の減少塩素濃度に相関は見られなかった。減少塩素濃度は、初期の急激な塩素濃度の減少とその後の緩やかな減少に区分でき、初期の急激な残留塩素濃度の減少は通常処理場内で起こると考えられ、その後の緩やかな残留塩素濃度の減少が配管中の減少を示すものと考えられた。

同じ原水の「凝集処理水」というほぼ同様の性状のサンプル内で相関を取ると、有機物質の性質が均一化されており、有機物質濃度でも減少塩素濃度との間に良い相関が取れるが、凝集の有無といった大きく有機物質の構成が異なると考えられるサンプル間で比較すると、単に有機物質濃度の指標だけでは、塩素減少濃度（消費速度）を予想することは困難であると考えられた。

1日後の有機物質と1～3日の減少塩素濃度の関係の関係で、UV254の増加に伴い減少塩素濃度も増加している傾向が見られたが、相関があるとはいえなかったことから、溶存有機物質の種類が異なることによる塩素との反応性の違いが原因で、DOCやUV254のような有機物質の指標で残留塩素濃度の減少を予測するには限界があることが示唆され、溶存有機物質の構造や官能基、分子量といった溶存有機物質の性質を示す指標の導入が必要であると考えられた。1日後3日までのUV254の減少量と減少塩素濃度の関係は、1点を除いて良好で直線的な相関関係が見られ、UV254で検出される二重結合が主に塩素消費に関与しており、塩素との反応で二重結合が消滅することが

示唆された。しかし、一方で塩素と反応している二重結合は有機物質が持つ二重結合の一部であることも明らかである。以上のことから、溶存有機物質の骨格中には、塩素と反応する二重結合以外にも塩素と反応しにくいUV254で検出される部位が存在し、有機物質によって量が異なるため、UV254では残留塩素濃度の減少を予測できないと考えられた。

E. 結論

TOCは平成15年の基準化によって明らかに低減し、平成19年度ではほぼ一致した数値を示していた。この結果は、浄水の水質が有機物量として均質であることを示唆しており、TOC基準化が達成されたことが明確となった。

PFCAs（炭素数5、6、7、8、9、10、11、12、13および14）とPFCSs（炭素数4、6、7、8および10）を対象とし、安定同位体標識体を内標準物質として用いたSPE-LC/MS/MS法により、2008年1月から12月にかけて水道水源である多摩川水系および利根川水系を対象に実態調査を行った。多摩川水系の上流域ではPFCsの合計濃度は低く、最高値はPFCAsが5.1 ng/L、PFCSsが30.4 ng/Lであった。一方、中流域では濃度が増加し、最高値はPFCAsが59.9 ng/L、PFCSsが167.7 ng/Lであった。利根川水系中川ではPFCsの合計濃度の最高値はPFCAsが40.9 ng/L、PFCSsが50.9 ng/Lであった。各PFCsの存在比は両水系ともに、PFCAsではPFNA、PFOA > PFHxAで、PFCSsではPFOS > PFHxS、PFBSであった。多摩川水系において下水処理場の下水処理水が流入している地点でPFCsの濃度は著しく上昇することが明らかとなり、下水処理場が主な汚染源であることが示唆された。PFCsは浄水処理場における処理性が

低いことから、今後、下水処理場の下水処理水が流入している河川水を水道水源としている水道事業者では原水中の PFCs を測定する必要があることが示唆された。

全国 67 事業者を対象にかび臭対策に対するアンケート調査を実施し、全国におけるかび臭被害の対策・管理指標等が明らかとなり、今後のかび臭物質に関する水質基準を改定する上で、貴重な知見が得られた。

千苺貯水池を対象にカビ臭物質の推移について調査した結果、季節によってカビ臭物質濃度のみでなく、原因となる障害生物種が大きく異なることが明らかとなった。一方、一部のケースでは原因微生物を特定することが困難であることもわかった。カビ臭対策としては取水口の変更で対応出来るケースもあるが、対応できない場合は、現状では活性炭処理に頼らざるを得ないと考えられる。

残留塩素の減少には初期の急激な残留塩素と後の緩やかな減少の間の変曲点があり、変曲点の前後共に、単に有機物質量ではなく有機物質の性質により残留塩素の減少速度が異なった。塩素処理前の DOC や UV254 では残留塩素濃度の減少を予測できず、溶存有機物質の骨格中には、塩素と反応する二重結合以外にも塩素と反応しにくい UV254 で検出される部位が存在し、有機物質によって量が異なることが原因と考えられた。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 秋葉道宏、かび臭対策の最新動向 水道におけるかび臭対策の最新動向. 用水と廃水、50(10)、pp. 821-824、2008.

2. 学会発表

1) 鈴木俊也、宇佐美美穂子、保坂三継、西村哲治、矢口久美子、環境水中の有機フッ素化合物の分析法. 第 17 回環境科学討論会、2008. 6.

2) 鈴木俊也、宇佐美美穂子、西村哲治、矢口久美子、小縣昭夫、水環境中の有機フッ素化合物—多摩川水系における存在実態—. 第 45 回全国衛生化学技術協議会年会、2008. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究
微生物分科会報告書

研究代表者	松井 佳彦	北海道大学大学院工学研究科
研究分担者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
	松下 拓	北海道大学大学院工学研究科
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	片山 浩之	東京大学大学院工学系研究科
	北島 正章	東京大学大学院工学系研究科
	浅見 吉之	神奈川県内広域水道企業団
	大谷 喜一郎	神奈川県内広域水道企業団
	猪又 明子	東京都健康安全研究センター
	百田 隆祥	栄研化学(株)生物化学研究所

概要:

従属栄養細菌数関連:東京都健康安全研究センターと神奈川県内広域水道企業団のデータをまとめると、原水では、表流水で30~720,000cfu/ml、浅井戸、深井戸、湧水では2~330cfu/mlの範囲であった。浄水については、多くの地点で10cfu/mlであったが、ろ過処理のない塩素消毒のみの浄水で高くなる傾向が認められた。また、インターネット上で公開されているデータでは浄水場出口、給水栓などの浄水系試料の最高値は5900cfu/mlであった。水質管理目標項目の目標値(2000cfu/ml)を超えた報告は1例のみであった。水道水中の従属栄養細菌のデータ収集(作業中)0.05~0.2mg/L程度の低残留塩素を維持して水を保存した場合、暗所に20°Cで10日間ほどの保存では遊離残留塩素が0.05mg/L程度であっても従属栄養細菌のリグロースは観察されなかった。

耐塩索性病原微生物関連:クリプトスポリジウムの迅速検出法として、遺伝子検査法(LAMP法)の開発の一環として、検査のプロトコルの作成と感度評価を行なった。最適な核酸抽出法の検討を行い、RNA/DNA抽出法として磁気ビーズ法から核酸抽出後にアルカリ熱抽出を提案した。

河川水濃縮物にオーシストを添加し、磁気ビーズ法で回収後に核酸抽出、LAMPを実施した。最終のDNA抽出液は25 μ Lとし、このうちの5 μ Lを用いたLAMP反応では確実にクリプトスポリジウムを検出することが再確認された。ところで、クリプトスポリジウムの検査指針では1個のオーシストを検出することが求められていることから、常に濃縮検体(その抽出DNA)の全量を1反応に用いなければならず、実用性に欠けることが指摘される。上記のことを受け、RNA検出(RT-LAMP法)に切り替えるべく検討がなされた。その結果、オーシスト0.006個まで検出可能であることが確認され、

RT-LAMP 法にすることで実用性が確保されることが示された。

ウイルス関連：ノロウイルスの VLP (Virus-like Particle: ノロウイルスゲノムの構造蛋白質領域をバキュロウイルスに組み込み、カイコで発現させて獲られたウイルス粒子に酷似した粒子) を作成し、標品が直径 35-39nm の粒子状であることを確認した。これを大腸菌ファージ Qb, MS2 を共存させ、浄水処理性の比較を行うことで浄水処理性 (凝集沈澱砂ろ過) の評価系を構築した。

ノロウイルスに類縁のマウスノロウイルスを用いてウイルスの塩素耐性を評価した。その結果、3mg/L・min の遊離塩素消毒により 4log 以上の不活化が達成されることを明らかにした。一方、塩素消毒におけるノロウイルス GII とマウスノロウイルスの遺伝子残存率が同程度であったことから、ノロウイルス GII も 3mg/L・min の遊離塩素消毒により 4log 以上不活化することが期待された。実務的には、0.1mg/L・min の遊離塩素濃度を保った配水システムにおいては 30 分間の接触で 4log 以上のノロウイルス不活化が期待できるものと評価された。

A. 研究目的

従来、水道水の微生物学的な安全性は浄水処理に加え遊離残留塩素管理により保証されてきた。しかしながら、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の混入による大規模な水系集団感染を経験したことにより、新たな局面を迎えている。また、近年では腸管系ウイルスによる上水汚染の懸念、あるいは系内でのバイオフィーム対策の指標として従属栄養細菌数測定の活用が期待されている。昨年に引き続き、当該分科会ではこれらの諸問題に対処すべく研究を進めた。

平成 20 年度より水質管理目標設定項目に加えられた従属栄養細菌について各地の届け出情報をもとにトレンドの把握に努めた。

耐塩素性病原微生物対策としては汚染状況のモニタリングシステムの構築に向けて、多量の浄水からのクリプトスポリジウムオーシスト検出の試み塩素耐性病原微生物検出に向けた迅速遺伝子検査法の改良、あわせて汚染実態調査が行われた。

ウイルス汚染のモニタリングに関しては、新たな指標の検索・検証実験、ならびにマウス

ノロウイルスを代替指標とした塩素感受性試験が行なわれた。

B. 研究方法

1. 従属栄養細菌数に係る研究

平成 20 年度より水質管理目標設定項目に加えられた従属栄養細菌の検出事例の収集、河川水における従属栄養細菌数と一般細菌の特性の検討 (特に他の水質項目との関係)、低濃度残留塩素存在下で従属栄養細菌のリグロースのおきる条件の検証を行った。

2. 耐塩素性病原微生物に係る研究

2.1 ケーキろ過装置の性能評価

クリプトスポリジウム等に対する対策の一環として水道水試料の保存が勧奨されたことから、多量の浄水をろ過・保存が可能なケーキろ過装置の性能評価を行なった。本装置の最大の利点は多量の浄水をろ過できることに加え、ケーキろ材を溶解除去することで濃縮検体から迅速にオーシスト等を分離することが可能な点である。しかしながら、ろ層に使用するハイドロキシアパタイトの純度によっては不溶性の不純物が鏡検の障害になることから、精製ハイドロキシアパタイトの使用による改良を試みた。

また、免疫磁気ビーズ分離法との併用を検討した。

2.2 相模川水系において分離されるクリプトスポリジウム の遺伝子解析

平成 20 年 2 月 27 日、及び平成 21 年 2 月 9 日、12 日、16 日に相模川水系社家取水口、中津川定点、小鮎川定点等においてクリプトスポリジウムの検出と得られたオーシストの遺伝子解析を実施した。

2.3 遺伝子検査法の検討

迅速な検査法として、クリプトスポリジウムを対象とした LAMP 法及び RT-LAMP 法を開発してきた。本年度はこれらの実用性を評価するために、添加回収実験及び感度試験を行った後、種々の環境水を用いてクリプトスポリジウムを検査し、検鏡法による結果と比較、検討した。具体的には、河川水濃縮物にクリプトスポリジウムオーシストを添加し、磁気ビーズ法により回収、磁気ビーズオーシスト複合体から直接に核酸抽出を行い、LAMP 反応を行う反応手順を作成した。クリ

プトスポリジウムにおいては遺伝子検査の標的 DNA コピー数が少なく、実効性を伴った試験方法として現場での利用に至らないという課題があった。これを解決する方法として、多量のコピー数が期待できる RNA を標的とした RT-LAMP 反応に置き換えることで対応すべく検討した。

腸管系ウイルスの指標の開発に関する研究

ノロウイルスは水系汚染の可能性のあるウイルスの中で疫学的に最も重要な一つである。ノロウイルスに関しては今日まで細胞培養系が確立されておらず、塩素等の消毒効果判定が不可能な状況にある。現在、最も有力なノロウイルス代替指標とされているマウスノロウイルスを用いてノロウイルスの塩素消毒耐性について調べることを目的とする。

また、昨年に引き続き、バッチ式凝集－沈澱－砂ろ過処理によるノロウイルス VLP (virus like particle) 処理性 (処理工程における挙動) を実験的に検討し、大腸菌ファージ等の処理性と比較した。

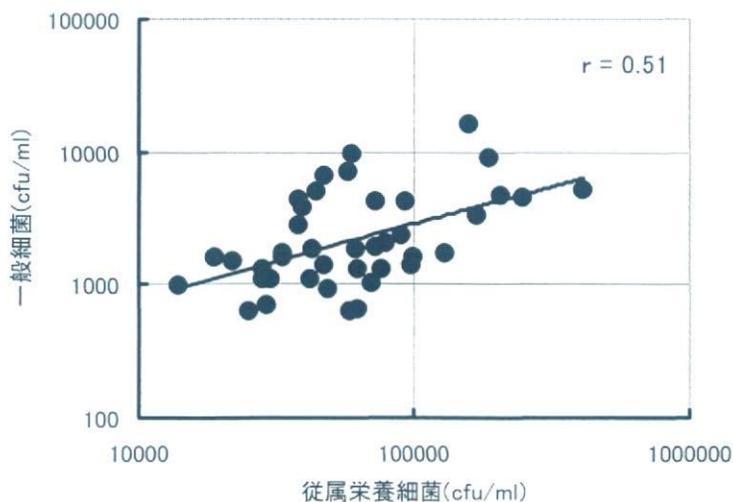


図 1.酒匂川下流部における従属栄養細菌と一般細菌の関係

表 1. 東京都健康安全研究センター、神奈川県内広域水道企業団が行った従属栄養細菌試験結果

	従属栄養細菌				従属栄養細菌		
	範囲	幾何平均	幾何平均		範囲	幾何平均	幾何平均
原水	表流水	30	30	4100	急速ろ過	0	0
		130	130			0	0
		300	300			0.0~1.0	0.1
		310	310			0.0~2.0	0.0
		640	640			0.0~3.0	0.1
		2000	2000			0.0~6.0	0.1
		3300	3300			4.5	4.5
		8100	8100		0	0	
		8600~220000	28000		0.4	0.5	0.5
		5900~120000	30000			1.5	1.5
	10000~420000	47000	膜ろ過	14	14		
	14000~410000	60000		100	100		
	18000~340000	61000	塩素処理のみ	0.5	0.5		
	9700~720000	190000		1.5	1.5		
	浅井戸	2		2	2	2	
6.5		6.5		2.5	2.5		
7		7		5.5	5.5		
7		7		9	9		
31		31		37	37		
35		35	45	45			
72		72	110	110			
330	330	240	240				
深井戸	9.5	9.5	9.5	9.5			
湧水	39	39	39	39			

C. 研究成果および考察

1. 従属栄養細菌に係る研究

平成 20 年 4 月より従属栄養細菌が水質管理目標設定項目として加えられた。目標値は 2000cfu/ml である。東京都健康安全研究センターと神奈川県内広域水道企業団のデータをまとめると、原水では、表流水で 30~720,000cfu/ml、浅井戸、深井戸、湧水では 2~330cfu/ml の範囲であった(表 1)。浄水については、多くの地点で 10 cfu/ml であったが、ろ過処理のない塩素消毒のみの浄水で高くなる傾向が認められた。一方、原因不明であるが膜ろ過を行った浄水でも従属栄養細菌が多い例がみられた。

H20 年 4 月以降、多くの水道事業体で試験が行われており一部の結果はインターネット上で見ることができる(表 2)。浄水場出口、給水栓などの浄水系試料の最高値は 5900cfu/ml であった。水質管理目標項目の目標値(2000cfu/ml)を超えた報告は 1 例

のみであった。この超過例は河川の伏流水を水源とし、膜ろ過後に塩素消毒をしている施設であった。ちなみに、この水の一般細菌は 0 cfu/ml、大腸菌は不検出、TOC=0.9mg/L、濁度=0.2 度、残留塩素=0.34 mg/L であった。

従属栄養細菌の存在量及び検出傾向を一般細菌数と比較すると、表流水における従属栄養細菌の存在量は一般細菌と相関関係が認められ、菌数は従属栄養細菌の方がより多く、酒匂川(神奈川県西部)の河川水では一般細菌の約 30 倍であった(n=40)(図 1)。

水温の影響: 一般細菌、および従属栄養細菌ともに水温との間には有意の相関が認められた。相関係数(r)は従属栄養細菌のほうが低く、従属栄養細菌は一般細菌に比べて水温の影響を受けないことが示された(図 2 左)。

濁度の影響: 一般細菌、および従属栄養

細菌はともに濁度と有意の相関が認められた。相関係数は一般細菌のほうが高値となっており、一般細菌において濁度の影響がより強く表れることを示していた(図2中)。なお、今回の調査期間中の濁度変動が少なかったことから、さらに検討が必要と考える。

DOCの影響:一般細菌、従属栄養細菌共にDOC(溶存有機態炭素)と有意の相関が認められた。相関係数は一般細菌との関連において高値を示し、DOCの影響は一般細菌に対してより強いことが示された(図2右)。

表2.ネット上で公開されている従属栄養細菌情報(2009年2月現在)

事業体名	原水系		浄水系	
	最低	最高	最低	最高
北海道				
桂沢水道企業団	310	4,200	0	0
北見市上水道	31,000	44,000	0	16
札幌市水道局			0	5
白老町上下水道課			1	8
東北				
いわき市水道局			0	5
奥州市水道部	480	480		
白河市水道事業所			1	290
多賀城市上水道部	40	80	0	3
登米市水道事業所			1	46
浪江町上下水道課	7	880		
宮城県大崎広域水道事務所			0	0
関東				
朝霞市水道部			0	3
我孫子市水道局			8	8
市原市水道部	21,000	130,000	0	98
伊奈町水道課			7	200
岩舟町水道課			120	1000
桶川北本水道企業団			0	17
小山市水道施設課	11	22	5	6
香取市水道工務課	20	95,000		
近畿				
神奈川企業庁			0	110
神奈川県内広域水道企業団				38
鴨川市水道局	2	190,000	0	110
北千葉水道企業団			0	0
君津広域水道企業団	22,000	62,000	<1	270
越谷・松伏水道企業団			0	0
埼玉県営水道	7,600	136,000	0	16
栄町(長門川水道企業団)			0	23
常総市水道課			0	290
葛蒲町水道課			12	12
館林市水道課			0	0
千葉県水道局	9,000	470,000	0	55
千葉市水道局			3	73
東京都水道局	4	340,000	0	160
那須塩原市水道事業			0	120
沼田市上下水道課			0	0
日立市企業局			0	93
ひたちなか市水道事業所	77,000	77,000	0	30
藤岡市浄水課	3,900	3,900	53	53
藤岡町上下水道課			0	0
南房総広域水道企業団	330	12,000	0	73
三芳水道企業団	0	16,000	0	1200
武蔵野市水道部			1	1
真岡市水道部水道課			3	9
八潮市水道部			1	13
横浜市水道局	4,800	180,000	<1	15
和光市施設課			0	29
中部				
海部南部水道企業団			検出されず	検出されず
愛知県中部水道企業団	0	478	0	7
石川県営水道			0	0
一宮市上下水道部			1	1
伊東市上下水道部	4	9,700		
磐田市水道課			0	61
上田市上下水道局	15	62	0	3
岡崎市水道局			0	1
岐阜県営水道	0	2,400	0	3
瀬戸市浄水場管理事務所			0	2
武豊町上下水道課			0	1
長野県営水道	9	54,000	0	310
新潟市水道局	50,000	110,000	0	3
福井県企業局	883	7,900	0	3
三島市水道部			4	8
南魚沼市水道課			12	40
南知多町水道課			0	0
美浜町水道課			0	0
中国・四国				
明石市水道部			0	0
伊丹市水道局			0	16
大阪市水道局			0	39
小野市水道部			<10	<10
尾鷲市水道部			<30	<30
桜井市水道局	1	17,000	<1	<1
葛城市水道局	≥3000	≥3000	0	0
甲賀市上下水道部			0	5900
城陽市上下水道部			0	0
高槻市水道部	6	3,700	0	62
豊中市上下水道部	5,200	25,000	0	98
西播磨水道企業団	9	340	0	840
彦根市水道部			0	310
兵庫県企業庁	92	60,000	0	26
福知山市ガス水道部			0	1000
三木市水道工務課			0	150
守山市上下水道事業所			0	0
養父市生活環境部			0	900
和歌山市水道局			0	355
宇和島市水道局			0	0
岡山県南部水道企業団			0	0
香川県水道局			0	5
倉敷市水道局			0	9
山陽小野田市水道局			0	58
周南市水道局	2,600	5,900	0	2
高松市水道局			0	584
多度津町水道課			不検出	11
備南水道企業団			0	0
福山市水道局			<1	519
防府市水道局	0	81	0	0
美作市上水道課			0	6
大分市水道局			0	430
大木町環境課			3	480
沖繩県企業局			0	0
北九州市水道局			0	2
宮崎県高鍋町水道課			2	38
那覇市上下水道局			0	2
一ツ瀬川営農飲雑用水広域水道企業団			1	1
福岡県南広域水道企業団			0	1200
別府市水道局			0	45
水俣市水道局	6,300	36,600		
都城市水道局			2	900
宗像地区事務組合	850	18,000	0	93
与論町水道課	42	42		
全国	0	470,000	0	5,900

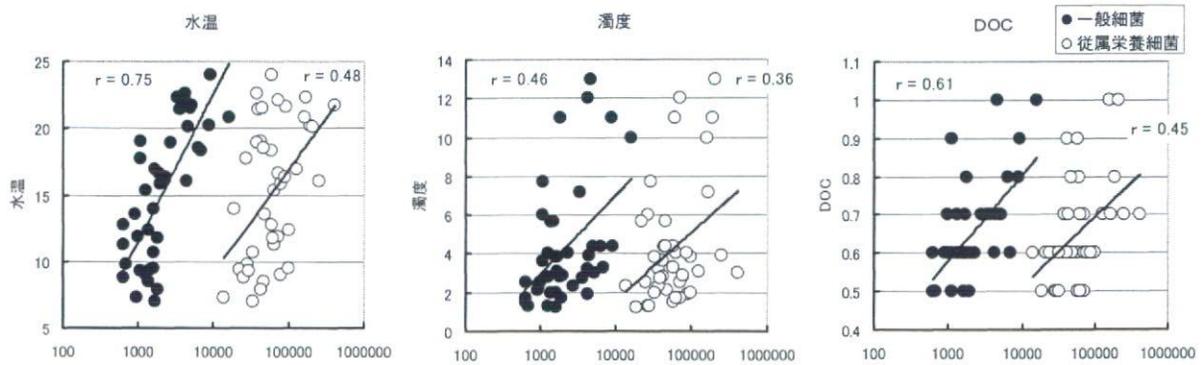


図 2.酒匂川下流部における従属栄養細菌、一般細菌と水温、濁度、DOC の関係

2. 低濃度残留塩素存在下での従属栄養細菌のリグロース模擬試験

H20年4月から新たに水質管理目標設定項目となった従属栄養細菌は、本来的な水中細菌数を表現し、配水系等での生物膜やスライムの形成など水道施設の清浄度の劣化を端的に表現する指標として優れているといわれている。このため塩素が消失するなど条件が揃えばリグロースが起こる可能性が疑われる。予備実験として、10日間程度の保存では遊離残留塩素0.0mg/Lの試験区でも従属栄養細菌のリグロースは観察されなかった。従属栄養細菌のリグロースが観察されたのはクロスネクションを想定して河川水(原水)を添加した試料で、遊離残留塩素0.0mg/Lと遊離残留塩素0.05mg/Lの試料のみであった。河川水(原水)添加の試料でも遊離残留塩素が0.1mg/L存在すれば従属栄養細菌のリグロースは認められなかった。ただし、今回試験に用いた水はpHが7.05と比較的低く、消毒効果の低下が予想される高pH値の場合にどうなるのかについては今後検討していきたい。ちなみに、従来の細菌指標である一般細菌や大腸菌は、一旦塩素により不活化させてしまえば、塩素が消失してもリグロースが起きるケースは少なく、リグロースはあまり問題とはならなかった。

3. 耐塩素性病原微生物に係る研究

3.1 ケーキろ過装置の性能評価

平成 19 年度から、神奈川県内広域水道企業団綾瀬浄水場の浄水を試料としてケーキろ過粉体ろ過層形成)濃縮法を用いて原虫試料の濃縮、検鏡による原虫試験を検討してきた。この濃縮法で綾瀬浄水は20L濃縮に約40分、一晚(16時間程度)継続すると350L程度濃縮できることが判明している(平成 19 年度報告)。しかしながら、鏡検に際してろ過助剤のハイドロキシアパタイト由来の不純物が時に障害になることが示唆された。そこで、性能の向上に向けて精製度の高いハイドロキシアパタイトの使用、あるいは免疫磁気ビーズ分離法との組み合わせについて検討した。2社の精製度の高いハイドロキシアパタイトを用い、塩酸による溶解液をメンブランフィルター(PTFE 膜、孔径:1 μ m)でろ過し、顕微鏡観察を行った。精製ハイドロキシアパタイトはいずれの製品にもフィルター上にろ過物として蓄積するような不純物が含まれていないことが確認された(図 3-a-c)。

既既存のアパタイトでは、約 200 分程度で100Lの浄水を濃縮することができた。一方、粒径 40 μ m(精製アパタイト)を用いた場合には100Lの濃縮に約120分と、ろ過速度の向上が見られた。一方、粒径 20 μ mを用いた場合には100Lの濃縮に約240分と、ほぼ期待通りの結果が得られた(図4)。

ついで、2種類の精製アパタイトを用い、100L程度浄水を濃縮したものにクリプトスポリジウムを添加して鏡鏡法で実施した。鏡鏡法による原虫試験の回収率は10%程度と低い値に留まった。その原因として、100L程度濃縮された浄水試料では浄水由来の濁質が多く、これが回収率の悪さに反映されたも

のと考えられた。この問題を解消すべく、免疫磁気分離処理を加えた方法を検討した。すなわち、中和処理としてはEDTAと水酸化ナトリウムを加えた。中和処理後、免疫磁気ビーズにより、クリプトスポリジウムを精製・分離したところ回収率は約60%~90%と上昇した。



図 3-a A社製(20µm)



図 3-b B社製(40µm)

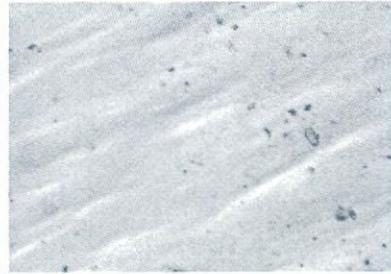


図 3-c 既存

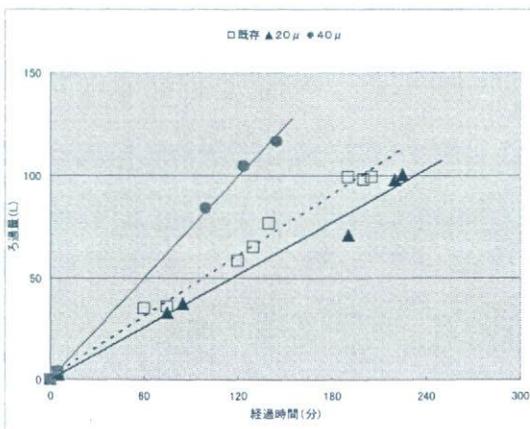


図 4 経過時間とろ過量の関係



試料の中和手順

表 3 中和処理と免疫磁気分離法を加えた試験法での回収率

浄水濃縮量(L)	クリプトスポリジウム回収率(%)
104	80
99	59
100	73
100	75
101	91

相模川流域で分離されるクリプトスポリジウムの遺伝子解析： これまでの調査から、社家取水口で検出されたクリプトスポリジウム数は例年冬期に濃度が上昇する傾向が見られている。当該研究においては平成20年2月27日に社家取水口、中津川定点、小鮎川定点の3ヶ所、平成21年2月9日、12日及び16日に社家取水口で採水し、得られたクリプトスポリジウムの遺伝子解析を実施した。得られた結果は前回までの調査と同様で、中津川と小鮎川からはブタ型のクリプトスポリジウムが検出された。冬期に社家取水口で高濃度に検出されるクリプトスポリジウムの主

たる原因は、右岸の中津川と小鮎川からのブタ型であろうと推定されるが、平成20年2月27日調査ではこれまでと同様にブタ型、ウシ型、及びヒト型の3型が確認された。社家取水口ではヒト型やウシ型が検出されることから、関係する浄水場においてはろ過水の濁度管理に万全を期さなければならない。ちなみに、ブタ型のクリプトスポリジウムは、ヒトへの感染リスクが低いと考えられている。

なお、平成20年2月27日の原虫試験（検鏡法）では、3ヶ所の調査地点からクリプトスポリジウムとジアルジアが検出された。

表4 相模川下流域クリプトスポリジウム遺伝子型調査

採取日	平成20年2月27日			平成21年2月9日	平成21年2月12日	平成21年2月16日
採水地点	社家吸水井	小鮎川第二鮎津橋	中津川鮎津橋	社家吸水井	社家吸水井	社家吸水井
採取量(L)	210	140	150	300	330	1000
クリプトスポリジウム 検鏡法測定結果	8/10L	18個/10L	2個/10L	1個/10L	未実施	0個/10L
ジアルジア 検鏡法測定結果	2個/10L	10個/10L	5個/10L	0個/10L	未実施	0個/10L
遺伝子解析結果	ブタ・ウシ・ヒト	ブタ	ブタ	検出	不検出	検出

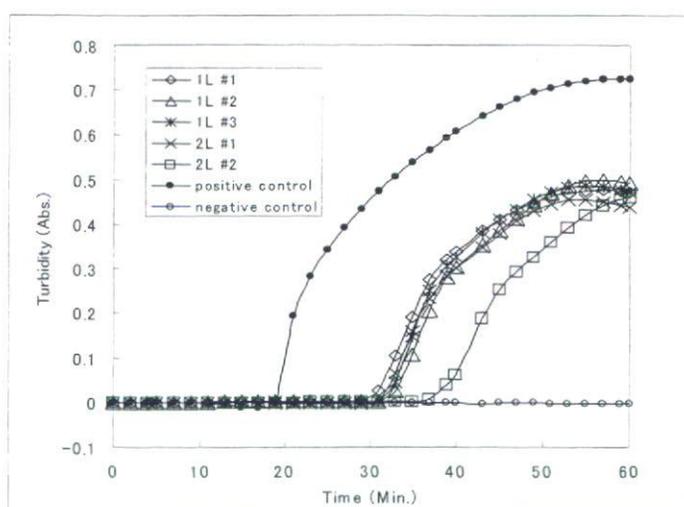


図5 LAMPによるクリプトスポリジウム遺伝子の検出

3.2 遺伝子検査法の検討

核酸抽出方法の検討： 表流水の1,000

倍濃縮液に適量のクリプトスポリジウムオーシストを添加した試料（113個

/mL) を用意し、ここから一連のオーシストの分離・精製工程をたどり核酸を抽出し、最終的に LAMP 法による検出を試みた。具体的には試料液に適量の免疫磁気ビーズを加え、磁気ビーズに捕捉されたオーシストをビーズから乖離することなく、凍結・融解を 5 回繰り返す、これに 20 μ L の溶解液 (TE : 20mM、NaCl : 0.1%、TrironX-100 : 2mM、DTT : 0.2 μ g/mL、Proteinase K : 6mAnson-U/mL) を添加して 60 $^{\circ}$ C で 30 分間の処理を行なった。さらに超音波処理 (2 分間)、次いで 75 $^{\circ}$ C 10 分間の追加反応した後に、Proteinase K の不活化のため 95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後に、約 25 μ L の上清 (抽出液) を得た。この抽出液 5 μ L を用いて複数回の LAMP 反応を行なった結果、30~40 分後に濁度上昇が認められ、全ての反応系で陽性反応が確認された (図 5)。この反応系では DNA 抽出上清 25 μ L 中に計算上 11 個のオーシストに相当する DNA が含まれることから、LAMP 検査に供した 5 μ L 中には 2.2 個分に相当する DNA が含まれていたことになる。過去の検討によりクリプトスポリジウム LAMP 法の検出限界は鋳型 DNA 6 コピー¹⁾ とされていることから、本結果は順当な結果と判断された。一方、クリプトスポリジウムの 1 オーシスト当たりの標的遺伝子数は 20 コピー程度とされており、当該プロトコルでは DNA 抽出液 (25 μ L) のうち、1/5 量が用いられることから、試料水中にオーシストが 1 個のみ含まれるような状況では反応チューブに鋳型 DNA がわずか 4 コピー程度含まれることになり、確実に陽性反応を得ることが難しいものと考えられる。とから、本結果は順当な結果と判断された。一方、クリプトスポリジウムの 1 オーシスト当た

りの標的遺伝子数は 20 コピー程度とされており、当該プロトコルでは DNA 抽出液 (25 μ L) のうち、1/5 量が用いられることから、試料水中にオーシストが 1 個のみ含まれるような状況では反応チューブに鋳型 DNA がわずか 4 コピー程度含まれることになり、確実に陽性反応を得ることが難しいものと考えられる。従って、この問題の解消には反応系の液量を増やすか、反応感度向上を計ることが必須となる。反応系の液量を増やす方法は酵素などを多量に使用することから経済的に負荷が大きすぎるものと判断される。また、現行の核酸抽出液の濃縮率はほぼ限界に近く、これ以上に濃縮率を高めるとむしろ反応が不安定になることあ危惧される。すなわち、前 2 手段は現実性に欠け、RT-LAMP 法の導入が唯一の選択肢と判断される。

RT-LAMP 法の感度試験：表流水の 1,000 倍濃縮液に別途オーシストを添加し、上述の方法で得られた抽出液を RNA 抽出液とし、この液の 10 倍希釈系列を調製した (最終濃度 0.00006 個 / 5 μ L)。各濃度について RT-LAMP を行ったところ、反応チューブあたりの理論的オーシスト濃度が 0.06 個相当以上のとき、2 回の反応の Tt 値 (陽性反応が出現するまでに要する時間) はほぼ一致するが、さらに希釈倍数をあげて反応チューブあたりの鋳型 DNA が 0.006 個相当のとき、2 回の反応系の Tt 値は不安定となって 1 分程度の差 (31.7 分及び 32.8 分) が生じた。さらに、0.00006 個相当では反応の確実性が保証されなかった。これらの結果から、再現性のある検出感度は Tt 値がほぼ一致する 0.006 個 / チューブと判断された。

ところで、免疫磁気ビーズに捕捉されたオーシストから核酸を抽出した場合、核酸の一部が磁気ビーズに吸着されることが判明した

(図7)。免疫磁気ビーズに吸着された DNA はビーズをアルカリ熱抽出することで上清に回収されることを確認した(図 8(旧5))。そこで、RNA も同様に磁気ビーズに吸着される

ものか検討した。その結果、磁気ビーズへの吸着はわずかで、ほぼ無視できる範囲と判断された(図 9(旧4))。

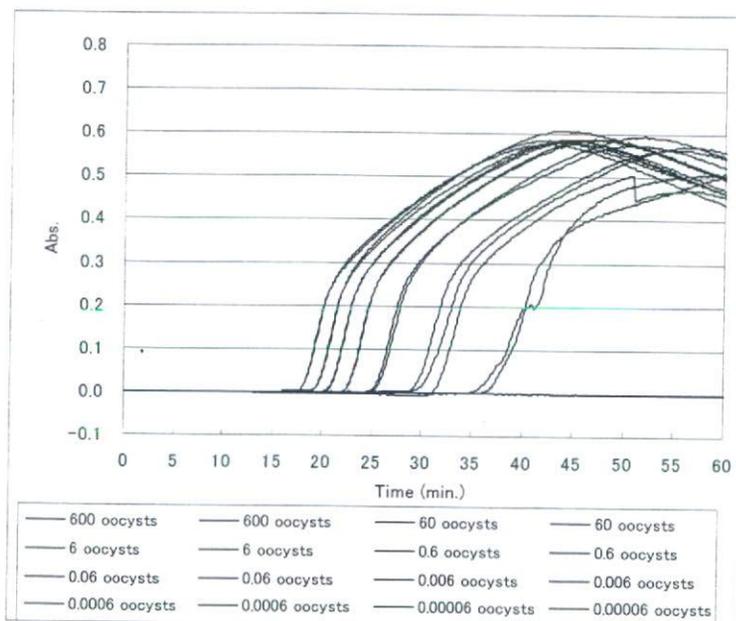


図 6 RT-LAMP の検出感度

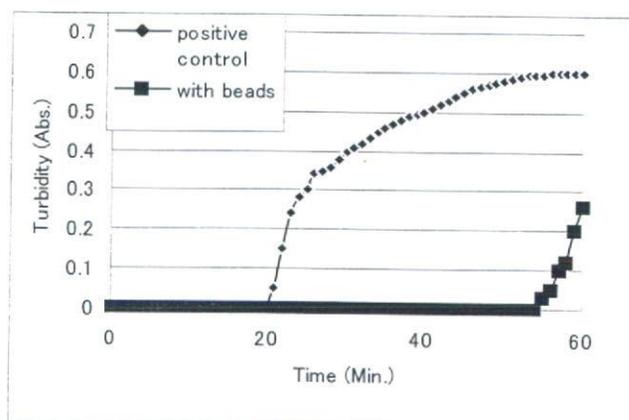


図 7 磁気ビーズによる DNA の吸着

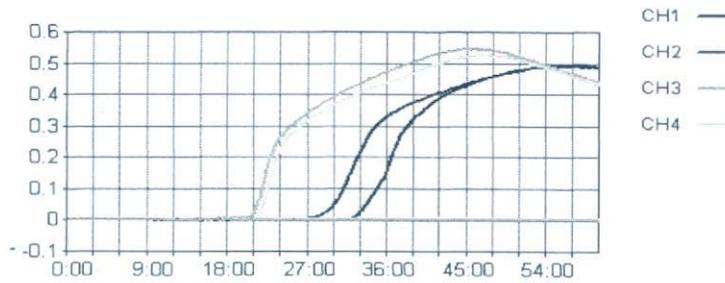


図8 アルカリ熱抽出による LAMP 反応の改善
CH1,2:ビーズ吸着後、CH3,4:アルカリ熱抽出回収後

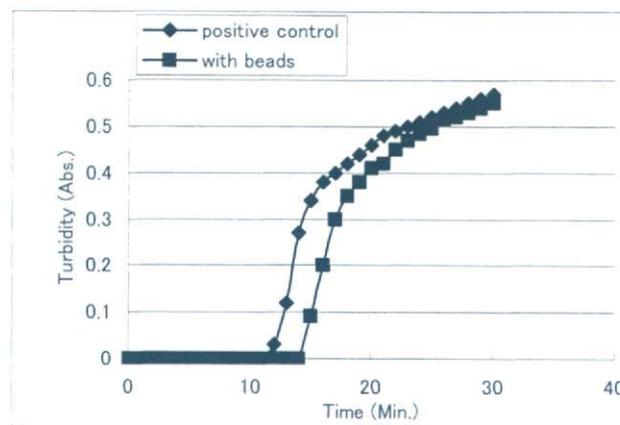


図9 磁気ビーズによる RNA 吸着

環境水からのクリプトスポリジウム検出：
平成 20 年 10 月から 12 月に採取した東京都及び宮城県内の環境水 31 検体 (No.1~31)を鏡検法、LAMP 法、RT-LAMP 法によりクリプトスポリジウム検査を行なった。環境水 20L(ただし神奈川県内の表流水は 10L、養豚場排水は 10mL)を添加回収試験と同様の方法で濃縮した。濃縮液を 2 分し、半量を鏡検に供し、残りの半量を核酸 (DNA/RNA) 抽出に使用した。全ての環境水試料は磁気ビーズ精製後に -20℃で冷凍保存し、後日まとめて核酸抽出を行った。その結果、鏡検によって 2 検体からクリプトスポリジウムが検出され、それらの 2 検体は RT-LAMP 法で陽性となった。また、鏡検によって陰性と判定された 29 試料のうち、5

試料が RT-LAMP 法で陽性となった。また、通常の LAMP 法では、鏡検で陽性と判定された 2 検体はいずれも反応陰性となった。鏡検で不検出とされた 29 試料のうち 2 試料が陽性反応を示した。そのほか、陽性判定には至らなかったものの測定終了直後(反応時間 50 分過ぎ)に濁度上昇の見られた検体が 2 検体あった。平成 20 年 1 月から 2 月に採取した神奈川県内の環境水 5 検体 (No.32~36)についても同様に検査を行った(養豚場排水 2 試料、表流水 3 試料)。これらの 5 試料全てから鏡検によりクリプトスポリジウムが確認された。このうち RT-LAMP 法では 2 検体が陽性となった。LAMP 法では全て陰性と判定されたが、測定終了直後(反応時間 50 分過ぎ)に濁度上昇の見られ

た検体が 2 検体あった。

RT-LAMP で陽性となった反応生成物がクリプトスポリジウム遺伝子であることの確認のため、RT-LAMP 増幅産物について電気泳動解析を行った(図 10)。その結果、レーン 3 から 16 のバンドパターンは全てレーン 2 と一致したことから、RT-LAMP での陽性反応はクリプトスポリジウムに由来した真の反応であることが確認された。なお、環境試料では顕微鏡観察で陽性となった 5 試料のうち 3 試料で RT-LAMP 陰性となったがこの理由については目下検討中である。これらは養豚場排水 (No.32、33)、あるいは養豚場排水

が流入する河川水 (No.34~36) で、養豚場排水に含まれるアンモニア等によりオーシストが不活化された可能性が推測される。

一方、LAMP 法で陽性となった 2 検体及び濁度上昇の見られた 3 検体の反応生成物の電気泳動解析の結果はいずれも非特異反応であることが判明した(図 11)。

これらの結果から、免疫磁気ビーズによるクリプトスポリジウムオーシストの分離・精製と組み合わせた RT-LAMP 法により、検鏡法よりも高感度にクリプトスポリジウムを検出することが可能となり、モニタリングへの適用が可能であると考えられた。

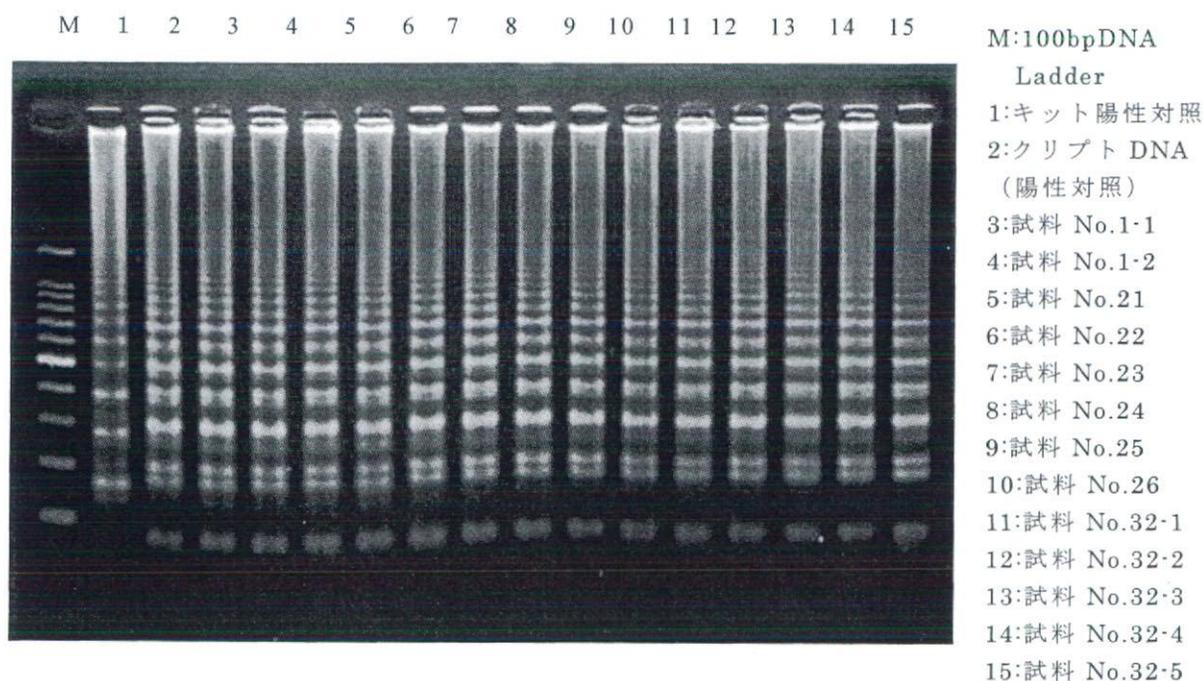


図 10 RT-LAMP 産物の解析

レーン 1 は検査キットに付属の陽性対照で、本物のクリプトスポリジウムの DNA による増幅反応 (レーン 2) とは異なるパターンを示すように設計されている。したがって陽性となった検体のバンドパターンをレーン 1、およびレーン 2 と比較することで、実際にクリプトスポリジウムが検体に存在したのかを判別することができる。レーン 3 から 16 のバンドパターンは全てレーン 2 と一致したことから、いずれもクリプトスポリジウムに由来した反応であることが確認される。

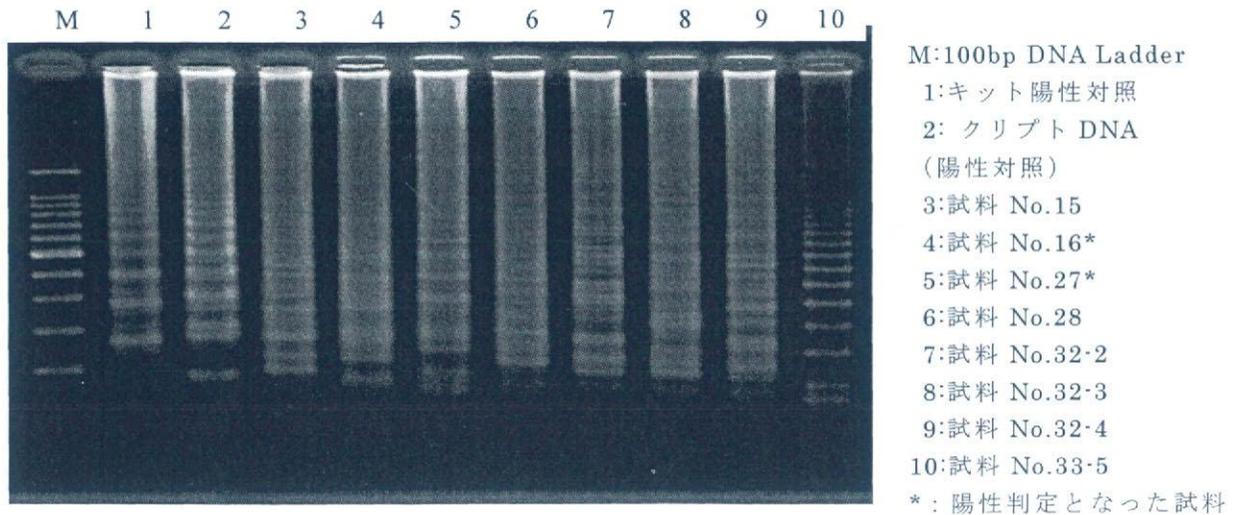


図 11 磁気ビーズからアルカリ抽出した鋳型による LAMP 産物の解析

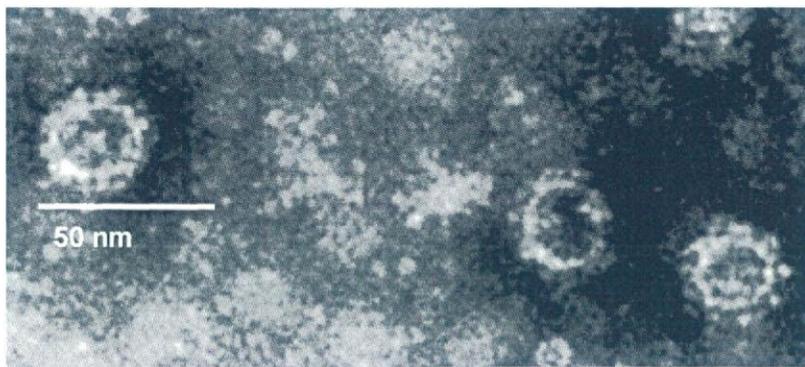


図 12 NV-VLPs の TEM 画像

4. 腸管系ウイルスの指標の開発に関する研究

4.1. 浄水処理工程におけるヒトノロウイルスの除去性

培養不能なヒトノロウイルスの構造や抗原性を調べるため、その外套タンパク(Virus like particles, VLPs)を遺伝子組換え生物を用いて発現させる手法が確立された (Jiang et al., 1992, J. Virology, 66)。この手法により安定したヒトノロウイルス外套タンパク(NV-VLPs)の供給が可能となり、それを用いてヒトノロウイルスの酵素免疫測定法(ELISA 法)が開発された(Kamata et al., 2005, J. Medical Virology, 76)。現在では

検出キットが市販されており、発現された NV-VLPs は、構造的にも抗原的にも野生のヒトノロウイルスと全く等しい。そこで本研究では、NV-VLPs を用いてヒトノロウイルスのベンチスケール水処理実験を行った。NV-VLPs は野生ヒトノロウイルスと全く同じ構造かつ大きさであり、完全な粒子形状が保証されるため、PCR 法のみでは把握しきれなかったヒトノロウイルス粒子の処理性を論じることが可能となる。

培養不能なヒトノロウイルスの構造や抗原性を調べるため、その外套タンパク(VLPs)を遺伝子組換え生物を用いて発現させる手法が確立された。以来、この手法により安定したヒ

トノウイルス外套タンパク(NV-VLPs)の供給が可能となり、そ、現在では検出キットが市販されるようになった。発現されたNV-VLPsは、構造的にも抗原的にも野生のヒトノウイルスと全く等しい。そこで本研究では、NV-VLPsを用いてヒトノウイルスのベンチスケール水処理実験を行うことを目的とする。NV-VLPsは野生ヒトノウイルスと全く同じ構造かつ大きさであり、完全な粒子形状が

保証されるため、ヒトノウイルス粒子の処理性を論じることが可能となる。

河川水を用いてNV-VLPsを $10^{6.5}$ - 10^{11} NV-VLPs/mLになるように希釈調整し、測定キットに付属のプロトコルに従いELISA法により定量した。本方法では濃度範囲 $10^{8.0}$ - $10^{10.5}$ NV-VLPs/mLにおいて、吸光度が濃度依存的に増加するとともに、良好な直線性が確認された。

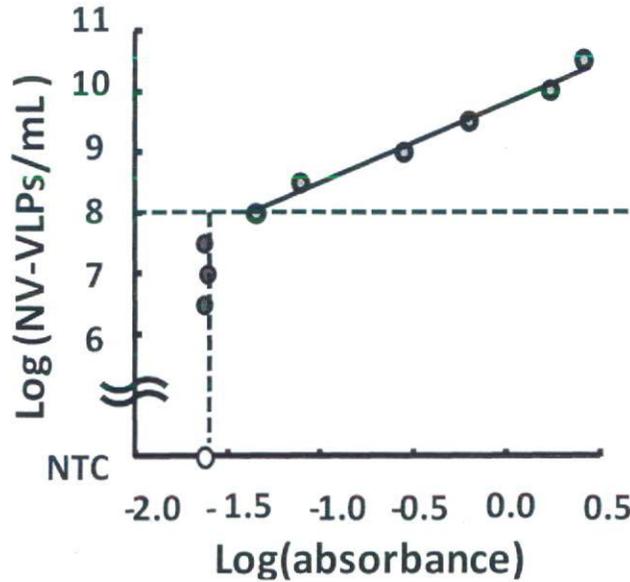


図 13 ELISA 法による NV-VLPs の検量線

本研究では $10^{8.0}$ NV-VLPs/mL未満のNV-VLPs濃度では、NV-VLPsを含まないネガティブコントロール(NTC)とほぼ同程度の吸光度を示すことが分かった。即ち、本プロトコルでの定量限界は $10^{8.0}$

NV-VLPs/mLであり、浄水処理実験でのサンプル吸光度がこの値を下回った場合は、「 $10^{8.0}$ NV-VLPs/mL未満」と評価した。また、 $10^{10.5}$ NV-VLPs/mLを超える濃度が期待される場合は、実験に用いる河川水により適宜希釈を行った後に定量を行った。

ショ糖密度勾配遠心法により、本研究で発現させたNV-VLPsの比重を測定したところ、

比重は 1.16 g/cm^3 であることがわかった。NV-VLPsは内部にRNAを含まない中空であるため、野生ノロウイルスの比重 $1.3\sim 1.4 \text{ g/cm}^3$ (Greenberg et al., 1981, J. Virology, 37)よりいくぶん小さい値を示した。

Zetasizer Nano ZS 532nm (Malvern Instruments)を使用し、NV-VLPs、および大腸菌ファージQ β とMS2の電気泳動移動度測定を行なった。NV-VLPsは $-0.14 (\mu\text{m/s})/(V/\text{cm})$ で、大腸菌ファージQ β とMS2はそれぞれ $-0.85 (\mu\text{m/s})/(V/\text{cm})$ 、 $-0.84 (\mu\text{m/s})/(V/\text{cm})$ であった。即ち、