

PFCs が比較的高濃度に検出される井戸付近には、基地や研究所等の施設が存在するが、今回の調査では汚染源の特定はできなかった。また、人口の少ない地域では地下水から PFCs は検出されないか、検出されて 10ng/L 未満と低い結果であった。

比較的高濃度に PFCs が検出される地下水付近の地下水からも PFCs が検出されていることから、これらの水質をヘキサダイアグラムで比較したところ、非常に良く類似しており、汚染源が同じである可能性が示唆された。

#### 1. 4 多摩地域地下水中の PFCs のクラスター分析

地下水中の各 PFCs の検出濃度を用いてクラスター分析を行った。PFOS および PFHxS はその他の PFCs との結合距離が非常に大きく、また、両者の結合距離は小さいことから、多摩地域の地下水では、これら 2 物質が卓越した存在であることがわかった。また、PFOA と PFHxA も同じ階層に分類され、関係が強いことが示唆された。また、PFBS もその他の PFCs に比べ特徴的であることがわかった。

#### 2. 地下水の調査結果

浄水場が水源としている地下水では、調査した 7 か所の全ての井戸で有機フッ素化合物が検出され、PFHxS, PFOS, PFOA, PFNA が比較的高濃度で検出された。いずれの井戸でも 0.001 $\mu$ g/L 以上で検出された。PFOS が最高 0.023 $\mu$ g/L と高濃度であった。

#### 3. 固相抽出-誘導体化 GC-MS 法を用いた給水栓水におけるエチレンジアミン四酢酸の存在実態調査

都内 28 か所の給水栓で採水した試料水のすべてから EDTA が検出された。検出濃度範囲は 0.461 から 11.2 $\mu$ g/L で、平均濃度は 2.17 $\pm$ 1.93 $\mu$ g/L であった。最大濃度で検出された 1 地点以外の 27 地点においては、目標値である 0.5 mg/L の 1/100 以下の 4 $\mu$ g/L 未満であり、比較的低濃度であった。平成 21 年度未規制物質等の水道における存在実態調査（厚生労働省）の報告によると、浄水中の検出濃度範囲は 1.0~28 $\mu$ g/L であり、本調査と同程度の検出濃度範囲であった。

#### 4. ヘッドスペース GC-MS 法を用いた給水栓水における塩化ビニルモノマーの存在実態調査

都内 30 か所の給水栓で採水した試料水のすべてから塩化ビニルモノマーが検出された。検出濃度範囲は 0.06 から 0.50 $\mu$ g/L で、平均検出濃度は 0.12 $\pm$ 0.08 $\mu$ g/L であった。最大濃度で検出された地点以外の 28 地点においては、目標値である 2 $\mu$ g/L の 1/10 程度以下であった。

#### D. 結論

東京都多摩地域の飲用としている地下水 347 か所を対象として、有機フッ素化合物 (PFCs) の存在実態調査を実施した。検出下限値 1ng/L 以上の検出率は PFOA (64%) > PFOS (57%) > PFHxS (53%) > PFNA (46%) > PFHpA, PFPeA, PFBS (39-41%) > PFHxA (36%) > その他 (0-13%) の順で、深井戸 (深さ 30-300m) よりも浅井戸 (深さ 0-30m 未満) の方が、検出頻度および濃度の中央値で高い傾向がみられた。クラスター分析により、PFOS および PFHxS が卓越した存在であり、その他、PFBS、PFOA、PFHxA も特徴的な存在であることがわかった。

固相抽出-誘導体化 GC-MS 法を用いて、給水栓水中 EDTA の濃度を調査した結果、すべての給水栓水中から検出され、検出濃度範囲は 0.461 から 11.2 $\mu$ g/L で、平均濃度は 2.17 $\pm$ 1.93 $\mu$ g/L であった。最大濃度で検出された 1 地点以外の 27 地点においては、目標値である 0.5 mg/L の 1/100 以下の 4 $\mu$ g/L 未満であった。このことから、給水栓水においても EDTA は低濃度ではあるが存在していることが明らかとなった。

高感度測定が可能な S-trap ヘッドスペース GC/MS 法を用いて、給水栓水を対象に塩化ビニルモノマーの濃度を調査した結果、すべての給水栓水中から検出され、平均濃度は 0.12 $\pm$ 0.08 $\mu$ g/L で、最大濃度は 0.50 $\mu$ g/L であったが、採水地点の約 90% は目標値 2 $\mu$ g/L の 1/10 以下であった。

#### E. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Nishimura, T.: Determination

- of EDTA in Water Samples by SPE-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. J. Water Environ. Technol., 8(4), 347-353 (2010).
2. 西村哲治：2090年の水道法に基づく水質基準改正について，ファルマシア，46(3)，276-279 (2010)
- 2) 解説・総説
- 西村哲治：水道法に基づく水質基準改正についての解説，食品衛生学雑誌 50，374-375，2010.
- 3) 学会発表
1. 久保田領志，田原麻衣子，清水久美子，杉本直樹，西村哲治：固相抽出-誘導體化-GC/MS法によるEDTAの測定法の検討，第61回全国水道研究発表会(2010.5)
  2. Nishimura, T., Suzuki, T.: Concentration of per-fluorinated compounds in river water in Tokyo, PFAA Days III (2010.6)
  3. Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Nishimura, T.: Determination of EDTA in water samples by SPE-gas chromatography/mass spectrometry, Water and Environment Technology Conference, International Forum for Scientists and Engineers. (2010.6)
  4. Nishimura, T., Suzuki, T. : Concentration of perfluorinated compounds in river water in Japan. Dioxin2010 (2010.9)
  5. 西村哲治：水道水に影響を与える未規制化学物質及びその対策，相模川・酒匂川水質協議会創立40周年記念講演会 (2010.11)
  6. Nishimura, T., Suzuki, T.\*, Hirose, A. : Risk Assessment in Intake from Drinking Water of Per-fluorinated Compounds, 2010 Annual Meeting of Society for Risk Analysis (2010.12)
  7. 高木総吉，鈴木俊也，西村哲治，川元達彦，小林浩，猪又明子，森田久男，永瀬久光，中室克彦：環境試験法、水質試験法、有機フッ素化合物，日本薬学会第131年会 (2011.3)
- F. 健康危機情報  
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む。)
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

平成 22 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
分担研究報告書

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－

研究代表者 松井 佳彦（北海道大学大学院工学研究院）  
研究分担者 泉山 信司（国立感染症研究所寄生動物部）  
研究分担者 秋葉 道宏（国立保健医療科学院水道工学部）  
研究分担者 松下 拓（北海道大学大学院工学研究科）  
研究分担者 片山 浩之（東京大学大学院工学研究科）  
研究協力者 山下 憲司（神奈川県内広域水道企業団）  
研究協力者 勝山 志乃（神奈川県内広域水道企業団）  
研究協力者 大谷喜一郎（神奈川県内広域水道企業団）  
研究協力者 金見 拓（東京都水道局）  
研究協力者 岩本 智江（東京都水道局）  
研究協力者 角田 徳子（東京都水道局）  
研究協力者 Jatuwat Sangsanont（東京大学大学院工学研究科）  
研究協力者 高藤 俊（浜松市上下水道部浄水課水質管理グループ）  
研究協力者 佐々木美江（宮城県仙南・仙塩広域水道事務所）  
研究協力者 上村 弘（宮城県仙南・仙塩広域水道事務所）  
研究協力者 川口有希子（桐生市水道局水質センター）  
研究協力者 矢澤 秀行（桐生市水道局水質センター）  
研究協力者 水野 聰（新潟市水道局）  
研究協力者 高橋 正（新潟市水道局）  
研究協力者 猪又 明子（東京都健康安全研究センター）  
研究協力者 百田 隆祥（栄研化学（株）生物化学研究所）  
研究協力者 岸田 直裕（国立保健医療科学院水道工学部）  
研究協力者 遠藤 卓郎（国立感染症研究所細菌第一部）  
研究協力者 山本 純子（タカラバイオ(株)製品開発センター）  
研究協力者 溝口 智子（(財)岐阜県公衆衛生検査センター）  
研究協力者 松田 信行（株式会社環境科学研究所）  
研究協力者 船坂 鎌三（株式会社環境科学研究所）  
研究協力者 竹内潤子（愛媛県立衛生環境研究所）  
研究協力者 古川 一郎（神奈川県衛生研究所）  
研究協力者 稲田 貴嗣（神奈川県衛生研究所）  
研究協力者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）  
研究協力者 武田万里子（大阪市水道局）  
研究協力者 三輪 雅幸（大阪市水道局）  
研究協力者 荘司 浩史（茨城県企業局水質管理センター）  
研究協力者 安藤 正典（武蔵野大学）

## 研究要旨

水道水の微生物学的な安全性は凝集沈殿ろ過と塩素消毒により担保されてきた。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の経験を契機として、新たな見地からの微生物研究が求められている。

一般細菌に比べて高感度な従属栄養細菌測定が開始され、その指標性の検討が求められている。全国 2 年分の測定値の比較で、測定地点の多くは安定した測定値が得られていたが、一部に変動や高い測定値が存在し、その理由としては給水栓の汚染が影響しているのではないかと推測された。高度浄水処理過程における従属栄養細菌数は、オゾン処理までに減少したものが、生物活性炭処理により増加し、後段の消毒、砂ろ過で減少した。浄水と給水栓水では、検出される菌の比率が異なっていた。

ウイルス汚染への対応として浄水処理の有効性の検証が続けられている。低い Ct 値での塩素消毒を正確に評価するため、ごく短い接触時間での消毒効果を検証するための処理装置を開発した。本年度は大腸菌を用いた性能試験で接触時間 0.5 秒の消毒を確実に評価することができた。ウイルス粒子検出系として、従来の ELISA 法の代替となる Immuno-PCR 法を開発し、ELISA 法と同等の感度を得た。

耐塩素性病原微生物関連の研究では、試料水の新規濃縮方法としての粉体ろ過法、並びに遺伝子検出法の実用性を検証し、現行試験法への追加を目指した。粉体ろ過法では積算ろ過水量、捕捉性能、並びに回収率を評価した。いずれの担当協力機関においても使用可能であることを示す結果が得られた。すなわち、浄水目的に開発された粉体ろ過法であったが、浄水用の 37mm ユニットに比べて大きな 90mm のろ過ホルダーを使用し、原水への応用も可能であった。原水のろ過水量は 3~63L と濁度によって変動し、原水濁度が 10 度を超える場合は、2 回に分けて濾過を行うことで、現行検査法の 10L をろ過可能と考えられた。浄水のろ過水量は 24 時間で 200~500L となり、濃縮物の一部だけで現行の検査水量 20L が可能で、緊急時の 120L の濃縮に対応できる水量であった。ろ過法単体としての捕捉性能は概ね 100% 近くと理論値に近い性能が得られた。

遺伝子検出法の感度試験、添加回収試験、並びに河川水試料からの顕微鏡法と遺伝子検出法の比較試験を実施した。いずれの担当協力機関においても使用可能であることを示す結果が得られた。すなわち、RT-LAMP 法、qRT-PCR 法のいずれにおいても、遺伝子検出法が高感度であることが改めて確認された。添加回収実験で添加試料から陽性、未添加試料から陰性と理論どおりの結果が得られた。反応阻害物の混入が心配され、鋳型量を抑えること、あるいは阻害を低減する試薬の使用により阻害は回避されることが示された。河川試料からのクリプトスポリジウム等の検出については、顕微鏡陽性試料では遺伝子検出法で概ね陽性が得られ、遺伝子の増幅産物からはクリプトスポリジウム等の塩基配列が確認された。また、qRT-PCR 法では汚染の量的把握が可能であった。これらの結果から遺伝子検査法の実用化は可能と判断された。

### A. 研究目的

微生物分科会では水道の微生物汚染に係る諸問題、すなわち従属栄養細菌、腸管系ウイルス、そして耐塩素性病原微生物を包括的に

検討し、水道の微生物学的な安全性確保と向上を目指している。

平成 20 年 4 月より従属栄養細菌数の測定は水質管理目標設定項目に追加された。厚生

労働省では従属栄養細菌に関し「配水区域ごとの定期的な測定により、異常な増加が生じていないかを確認し、水質管理上の指標として、浄水処理過程や消毒過程での細菌の挙動の評価、配水系における塩素の消失や水の滞留の状況の評価に活用し、情報の蓄積に努めるべきである。」としている。暫定目標値の2,000cfu/mlを超過する地点は限られたが、多くの測定値は不検出ではない有意の値が得られるようになり、この指標の現状を明らかにし、活用方法の整理と実践が求められている。

ウイルスの安全性に関しては知見が少なく、塩素消毒等の現行の浄水処理によって十分に不活化・除去されることを示すことが、安全・安心につながる。具体的には浄水中の低濃度の塩素においてもウイルスの不活化が十分になされていることが重要なポイントと考えられるが、低い Ct 値での塩素消毒を正確に評価するには、低濃度の遊離塩素濃度において、短時間の接触時間を制御する実験系の構築が課題となる。従来の消毒実験はバッチ式の反応装置を用いており、消毒剤と微生物の混合に少なくとも 10 秒程度を要し、試料採取、消毒剤中和を合わせると 15 秒以上の接触時間が限界であり、それ以下の接触時間の試料を採取することができなかった。そのため、短い接触時間の試料を採取可能な消毒装置を開発した。これに加えて、ウイルス粒子検出系として、感度の低い ELISA 法の代替となる高感度な検出法を検討した。

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策では、モニタリングシステムの拡充に向けた試料水の濃縮方法と検出方法の開発検討を進めてきた。その中で、高感度な遺伝子検査法への期待が高かった。また、クリプトスポリジウムの 6 日の潜伏期間を鑑み、過去にさかのぼっての試験を可能とする試料保存の重要性が指摘されているが、それを簡易に実施する方法が求められていた。その要望に応えるべく粉体ろ過濃縮法と迅速遺伝子検

出法は開発され、現行試験法への追加を厚生労働省水道課の微生物問題検討会において提案し、実用性の検証が求められている。当該研究では水道事業体、地方衛生研究所、民間検査機関らの協力を得て、検証を行うこととした。

## B. 研究方法

### B1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

従属栄養細菌は、検水 1 試料あたり 1mL、培地は R2A 寒天培地を用い、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 7 日間培養を行った。試料は、採水前にガスバーナーで火炎滅菌し、数分の排水後、チオ硫酸ナトリウム入りの滅菌採水瓶へ採水したものをを用いた。

処理方法の異なる浄水場の各工程水について、月 1 回の頻度で（一部の浄水場は 3 か月に 1 回）実施し、浄水処理過程での消長を追跡した。自動水質計器設置地点の給水栓を対象に、末端給水栓における従属栄養細菌数を測定した。配水過程での検出数の変動を調査するため、単一の浄水場の配水割合が高い配水系統より、流達時間が長い給水栓 1 箇所と、その中間に位置する給水栓 2 箇所を選択し採水した。検水は 100mL を孔径  $45\mu\text{m}$  の滅菌メンブランフィルターでろ過した後、R2A 寒天平板培地に密着させて培養した。浄水及び給水栓水で検出される従属栄養細菌の細菌相を明らかにするために、従属栄養細菌の同定は 16S rDNA 塩基配列に基づき行った。

全国各地における従属栄養細菌の検出状況については各地の水道事業体がインターネット上で公表している水質検査結果を集計し、昨年度の集計結果と対比させた。給水栓水における採水時の課題を指摘するため、細菌、残留塩素、滞留時間、放流量の関係を浄水場内の給水栓において実施した。

### B2 腸管系ウイルスに関する研究

従来の消毒実験はバッチ式の反応装置を用いて 15 秒以上の接触時間が限界であったが、

本研究では図1に示すような連続式押し出し流れ反応装置を開発した。この装置では、反応時間は混合ポイント～試料採取ポイントまでの試料の滞留時間が消毒剤と微生物の接触時間となり、採取ポイントでは中和剤（チオ硫酸ナトリウム）により消毒が停止される。接触時間は、混合ポイント～試料採取ポイントまでの距離（L）、あるいは流速を調整することで、自由に設定することが可能となる。pH 指示薬としてフェノールレッドを用いて視覚的に混合状態を確認し、混合地点以降のpH 変化を確認した。装置性能の確認に大腸菌の消毒試験を実施した。

ノロウイルス外套タンパク粒子（VLPs）に対する ELISA 法検出系の代替として、immuno-PCR 系を開発した。VLPs をマウスに経口投与し得られた抗体を使用し、プラスミド上で作成した EcoRI 制限酵素切断部位を持つタグ配列を抗体に結合した。VLPs と反応した抗体より EcoRI 酵素でタグを切断し、遊離したタグを鋳型として SYBR Premix DimerEraser (TaKaRa RR091A) を使用してリアルタイム定量 PCR 法を実施した。タグの検出に 5' Biotin-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA, TAT TAC CGC CTT TGA GTG AG のプライマーを使用し、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems 製) を用いて、95°C1 分、95°C 10 秒、55°C1 分、72°C62 秒の 50 サイクルで反応させた。

### B3 耐塩素性病原性微生物の研究

#### B3-1 粉体ろ過法の検証

5 機関（浜松市上下水道部、宮城県仙南・仙塩広域水道事務所、桐生市水道局、神奈川県企業庁水道水質センター、新潟市水道局（順不同））の協力を得て、粉体ろ過法の実用性を検証した。粉体ろ過法は、酸溶解性の粒状ハイドロキシアパタイトを用いたケーキろ過フィルターで、積算流量、ろ過単独の模擬粒子の捕捉性能、免疫磁気ビーズ法でのクリプト

スポリジウム精製操作を含む回収率を中心に評価した。捕捉性能の評価に、クリプトスポリジウムオーシストの模擬粒子としての蛍光ビーズ（ $2.76 \pm 0.06 \mu\text{m}$ 、Fluoresbrite calibration grade YG、Polyscience）またはホルマリン固定クリプトスポリジウム、回収率の評価に固定クリプトスポリジウムを使用した。原水ならびに浄水は、各協力事業体における原水並びに浄水を使用した。粉体ろ過のケーキろ過層の形成には、ハイドロキシアパタイト粉体、浄水用のプラスチック製ろ過ユニット（37YS3HAAN、直径 37mm）あるいは原水用ろ過ホルダー（直径 90mm）と粉体支持体（ $3 \mu\text{m}$  の粒子を 99% 捕捉するフィルター）（いずれも Advantec）を使用した。ろ過補助装置は、流速計、積算流量計、圧力計、レギュレーター、追加粉体用タンクとスターラーと加圧ポンプからなるクリプトスポリジウムサンプリングシステム（FSC-037-090、Advantec）を使用した。濃縮物を回収するため、50mL 遠心管内において 1N 塩酸 25ml、0.1% Tween80 5ml、精製水 15mL を用いて粉体を溶解し、性能評価にはそのまま溶解液の一部を検鏡測定、回収率は遠心濃縮と遠心洗浄後に定法に従い免疫磁気ビーズ法等を実施した後に検鏡測定した。蛍光ビーズ、クリプトスポリジウムの計数に、蛍光微分干渉顕微鏡を使用した。

#### B3-2 遺伝子検出法の検証

10 機関（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、財団法人岐阜県公衆衛生検査センター、株式会社環境科学研究所、国立保健医療科学院、愛媛県立衛生環境研究所、神奈川県衛生研究所、東京都水道局、大阪市水道局、茨城県企業局水質管理センター）の協力を得て、遺伝子検出法の実用性を検証した。遺伝子検出法の検証では、RT-LAMP 法あるいは LAMP 法、qRT-PCR 法（サイクリングプローブ法、TaqMan プローブ法、Universal Qprobe 法）を実施した。

比較の顕微鏡法検査を定法に従い行った。クリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストは、感染動物の糞便からショ糖浮遊と塩化セシウム浮遊法により精製した。血球計算盤で濃度を求め、核酸抽出まで冷凍状態で待機、あるいはUV照射により不活化して添加回収試験に使用した。添加回収試験に使用する河川水試料等は、各協力機関において個々に用意した。クリプトスポリジウム等の精製は免疫磁気ビーズ法により行った。核酸抽出は、凍結融解と Proteinase K 処理により行った。遺伝子増幅反応は、製品等の方法に従った。陽性・陰性の定性的判定、検量線より定量を行い、顕微鏡法の結果と比較した。阻害物質阻止剤（試作品、栄研化学）を RT-LAMP 反応に使用した。

遺伝子検出法は水道事業体において必ずしも普及していない試験法であり、導入しづらいのではないかと心配された。導入への困難さを確認するため、遺伝子検査の経験の有無が qRT-PCR 法検量線に与える影響を確認した。水道事業体並びに地方衛生研究所等クリプトスポリジウム検査担当者の協力を得て、同一のクリプトスポリジウム凍結試料、試薬、機器を使用し、検量線の作成を qRT-PCR 法（TaqMan プローブ法）にて実施した。

### B3-3 濃縮精製法の組み合わせの問題

クリプトスポリジウム等検査法は濃縮方法と精製方法の組み合わせによっては回収率が得られないことが心配されていることから、不安を払拭するために検査法の組み合わせ毎に回収率を確認した。すなわち、アセトン溶解法と免疫磁気ビーズ法、あるいは PTFE フィルター法と免疫磁気ビーズ法の 2 つの組み合わせで回収率を求めた。アセトン溶解法にはセルロースエステルフィルター（Advantec）、PTFE フィルターには孔径 5 μm（Advantec ならびに Millipore）を使用した。濃縮操作と精製操作は定法に従い、回収率は顕微鏡下で計数したオーシスト数から

求めた。

## C. 研究結果および考察

### C1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

従属栄養細菌が水質管理目標設定項目となった平成 20 年 4 月以降、多くの水道事業体で試験結果が公開されている。昨年の H20 年度分に続き H21 年度の結果を集計し、平成 23 年 3 月現在で約 190 事業体から約 1970 の採水地点を集計することができた。昨年調査を行った平成 20 年度と同様、浄水場出口、給水栓水などの浄水系試料では 98% の地点が目標値の 10% である 200cfu/mL 未満であった（図 1）。また、各地点の最高値の平均値は 23cfu/mL と低かった。最高値は 1,800cfu/mL と目標値の 2,000cfu/mL を超過せず、この地点の翌月の再検査結果は 22cfu/mL と大きく下回り、測定時の採水に何らかの問題があったのではないかと推測された。同一地点で H20 年度と H21 年度の平均値（961 地点）を比較すると（図 2）、100cfu/ml を超過した 53 地点（4%）で測定値の分布が散発的で変動が大きく、100cfu/ml 超過の内訳は平成 20 年度で 33 地点、平成 21 年度で 26 地点、両方の年度で超過は 6 地点あった。一方、908 地点（96%）の多くは 0cfu/ml から 100cfu/ml の範囲に直線的に分布し、2 年間の測定値の変化は少ないと考えられた。すなわち、測定地点の大多数は安定した測定値が得られていたが、一部に変動や高い測定値が存在し、その理由としては給水栓の汚染が影響しているのではないかと推測された。

水質管理上の指標として、浄水処理過程の評価に活用すべく、処理方法の異なる主要浄水場の各工程水について、従属栄養細菌数を測定した。急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過及び塩素消毒のみの浄水施設では、工程を経るに従って検出数が減少し、浄水では概ね従属栄養細菌は検出されなかったが、高度浄水処理では、オゾン処理工程までは処理に伴って検

出数が減少したが、BAC 処理水で数十～数万個/mL 程度の従属栄養細菌が年間を通じて検出された (図 3)。検出された従属栄養細菌は BAC 池から漏えいしたもので、BAC 池では生物浄化が行われていると推測された。その後の消毒処理でほとんど従属栄養細菌が検出されなくなった。

浄水及び給水栓水における従属栄養細菌を同定した結果、検出された細菌相が異なり、浄水場と細菌相に特定の傾向は見られなかった (図 4)。末端での菌数が多く、残留塩素の消費されやすい給水管や末端給水栓等での再増殖と考えられた。

## C2 腸管系ウイルスに関する研究

低い Ct 値においてもウイルスの不活化がなされることを確認するため、短い接触時間の試料を採取可能な消毒処理装置を開発した (図 5)。塩素による大腸菌の消毒実験の結果、初期遊離塩素濃度 0.5mg/L の場合には 2.5 秒間で約 4Log の不活化が直線的に測定された (図 6)。この装置により従来は 15 秒以上を要した接触時間を 0.5 秒まで短縮できた。来年度は本装置を用いてウイルスの消毒実験を行う予定である。

浄水処理過程におけるウイルスの処理性を評価する目的で、ノロウイルス外套タンパク粒子 (VLPs) を使用した実験を行っているが、検出系の ELISA 法の代替となる immuno-PCR 検出系を構築した。外套タンパク粒子は内部に RNA や DNA を持たないため、検出用の抗体にタグ配列を結合し、PCR による高感度検出を目指した。抗原抗体反応を行うプレートの形状の影響排除、反応プログラムの至適化、制限酵素 EcoRI によるタグ配列の分離回収、プライマー濃度等組成の至適化を行った結果、 $10^{10}$ ～ $10^{12}$  VLPs/mL で濃度依存性が観察された (図 7)。この範囲内で VLPs の immuno-PCR による定量が可能となり、ELISA 法と同等の感度に達した。使用する抗体等の最適化を進めることで、さら

に感度向上が期待された。

## C3 耐塩素性病原微生物の研究

### C3-1 粉体ろ過法の検証

酸溶解性ハイドロキシアパタイト粒子を用いた粉体ろ過法の検証では、ろ過水量、捕捉性能、回収率を検討した。原水のろ過水量は濁度により影響を受けたが、3～63L が 1 時間にろ過可能であった (表 1)。高濁度の際は、1 度のろ過で検査に使用する 10L に届かず、10度を越える場合は2回の濃縮に分けることが目安となった (図 8A, B)。低濁度では 1 時間に最大 37L に達し、試験複数回分の水量を濃縮できた (図 8C)。浄水のろ過水量は 24 時間で 200～500L に達し、浄水検査の標準である 20L には濃縮試料の一部を使用するだけで十分量であった (図 9)。24 時間の連続したろ過濃縮は、水質の変動にも対応できると考えられた。試験法では、応急対応のための検査にあつては、水道水 40L を採水場所毎に 3 試料採取し、その全量を濃縮すると規定されているが、粉体ろ過法ではこの 120L のろ過にも対応できるものと判断された。粉体ろ過法の 2 週間の試料保存があれば、いつでも過去に遡って迅速に検査を開始することが可能であり、24 時間のろ過濃縮時間も問題とはならないと考えられた。

粉体ろ過法の捕捉と維持の性能を評価した。固定クリプトスポリジウムあるいは蛍光付き粒子をろ過水中に投入し、濃縮物を塩酸溶解後、直ちに顕微鏡下で計数した。ケーキ層の上に残った粒子として回収された割合は、原水と浄水の場合、オーシストと蛍光ビーズを使用した場合のいずれの組み合わせにおいても概ね 7～10 割 (最小 67～最大 117%) であった (表 1)。粉体ろ過法が性能を発揮するには、積層した粉体が厚さを持ったケーキ層を形成して漏れがなく、ろ過途中にケーキ層が壊れずに濃縮物を維持できることが必要であり、粉体ろ過法は濃縮方法としてこれら捕捉と維持の性能を有していたことが確認された。

固定クリプトスポリジウムを使用した回収率の評価では、20～80%程度の回収率が得られた(表1)。この回収率は、従来のアセトン溶解法やPTFEフィルター濃縮法との比較で概ね同程度と考えられた。クリプトスポリジウム等試験法は、濃縮、精製、顕微鏡観察の工程からなり、濃縮方法はその後の精製や顕微鏡観察との相性は重要な問題で、特に濃縮方法と精製方法の組み合わせに注意が必要ではないかとされてきた。粉体ろ過法は他の濃縮法にはない操作として、粉体を塩酸溶解し、カルシウムと酸を除去する操作が必要であるが、そうした操作は回収率に影響しないことが確認された。

以上の結果から、粉体ろ過法はクリプトスポリジウム等のろ過濃縮方法の一つとして使用可能であることが示された。当初、浄水濃縮保存法として開発された粉体ろ過法であるが、原水の濃縮方法として採用可能であることが示された。浄水を37mmの小さなろ過フィルターで濃縮、冷蔵保存することは、従前の10Lのポリタンクによる保存方法よりも扱いは容易と言えた。

### C3-2 遺伝子検出法の検証

遺伝子検出法の検証では、RT-LAMP法あるいはqRT-PCRの感度試験、添加回収試験を行い、それから河川等試料中のクリプトスポリジウム等検出を顕微鏡法と比較した(表2)。遺伝子検出法の検証では、設備等の制約もあり各機関で一律の操作とならず、多角的な検討が加えられた。これまでに得られた代表例を中心に結果を示す。

遺伝子検出法の感度試験では、冷凍標品を用いた核酸抽出と反応を行って検証機関の環境整備を行った。反応チューブあたり1個未満のクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストがRT-LAMP法、qRT-PCR法(サイクリングプローブ法)で検出され、いずれの機関においても高感度であることが改めて確認された。表3の結果は、UV照射に

より不活化された添加回収試験用の標品を用いたもので、顕微鏡下でオーシスト数を確認した。qRT-PCR法(サイクリングプローブ法)の検量線では、再現性が確認された(図10)。

添加回収試験では、顕微鏡法とqRT-PCR法(サイクリングプローブ法)の検出数に相関が得られ、遺伝子検出法での定量が可能であることが示された(図11)。RT-LAMP法による定性的な判定は正常に機能した(表4)。なお、添加回収試験では、原水への添加、濃縮物への添加、精製後の添加と3箇所で行われた(図12)。これは遺伝子検出法の成績が、濃縮、精製操作の影響を受けずに、遺伝子検出の操作に注視した評価が行えるように配慮した操作となっている。結果としては、いずれの添加試験からも回収された。

河川等試料中からのクリプトスポリジウム等の検出試験は、顕微鏡法と遺伝子検出法(RT-LAMP法、RT-PCR法(サイクリングプローブ法))の検出結果が概ね一致した(表5)。なお、確認のために行われたRT-PCR法のPCR産物の塩基配列決定からは、それぞれクリプトスポリジウムおよびジアルジアの特異配列が確認された。なお、遺伝子検出法では反応阻害物質の混入が問題となるが、抽出核酸試料の使用量を減少させることで反応阻害物質の影響が排除され、その結果として陽性率の向上がはかられた(表5)。

別の機関で実施した河川水試料からのクリプトスポリジウムの検出では、顕微鏡法による検出結果と遺伝子検出法による結果は概ね一致した(表6)。また、RT-LAMP法とqRT-PCR法では遺伝子の増幅方法が異なるが、これら2方法の検査結果はほぼ一致した(表7)。これらのPCR産物からはクリプトスポリジウムの配列を確認した。ジアルジアの検出はDNA-LAMP法により行い、クリプトスポリジウムと同様、顕微鏡法と遺伝子検出法の結果は概ね一致した(表7)。また2種類の遺伝子検出法の結果もほぼ一致しており、PCR産物からはジアルジアの配列を確認し

た。なお、一部の試料では阻害物質阻止剤（試作品、栄研化学）の添加によって、一部結果の陽転と Tt 値の短縮が起きており、増幅反応の促進が見られた（表 6、7、図 13）。

荒川の河川水からは、10月に数百のクリプトスポリジウムが顕微鏡法で検出され、qRT-PCR法でも遜色ない定量値が得られ、多量の汚染が的確に捉えられていた（表 8）。

利根川の河川水からは、複数試料よりクリプトスポリジウムが検出され（表 9）、顕微鏡法で蛍光抗体染色された粒子数と qRT-PCR法（TaqMan法、Universal QProbe法）に相関が得られた（図 14）。この結果では顕微鏡法のクリプトスポリジウム数に比べて遺伝子検出法で定量された値が高い傾向にあったが、遺伝子検出法が顕微鏡法より高感度であることは、汚染を判定する目的において遺伝子検出法の利点となると考えられた。

遺伝子検出法は水道事業体において実施されていない試験法であり、導入しづらいのではないかと心配された。導入への困難さを確認するため、遺伝子検査の経験の有無が qRT-PCR法検量線に与える影響を確認した。水道事業体並びに地方衛生研究所等クリプトスポリジウム検査担当者の協力を得て、遺伝子検出法（qRT-PCR法）の検量線を作成した。遺伝子経験者の検量線はほとんどばらつきがなかったのに対して（図 15a）、未経験者はばらつきが見られたが（図 15b）、未経験者の半数以上は経験者と同等の検量線を引くことができた（図 15c）。また、未経験者 9名中、8名は陽性陰性の反応結果は正しく得られた。この操作を行う前に 2 時間半程度の実演と解説を行っており、その程度で定性試験が十分に可能、多少の訓練で定量試験も可能との感触が得られた。

### C3-3 濃縮精製法の組み合わせの問題

クリプトスポリジウム等検査法における濃縮方法と精製法の組み合わせにより、回収率が得られないとの不安が持たれていたこと

から、検証実験の添加回収試験に際して回収率を確認した。すなわち、アセトン溶解法と免疫磁気ビーズ法との組み合わせ、および PTFE フィルターと免疫磁気ビーズ法との組み合わせの 2 通りの処理工程を採用したが、いずれも良好な結果が得られた（表 4）。一部からは前者の組み合わせでは良好な回収率が得られないとの懸念が示されていたが、前者の組み合わせによる回収率は 49~85%、平均 66%、±17%の標準偏差、後者の組み合わせによる回収率は 50~126%、平均 83±20%と、方法の違いはほとんど無視できるものであった。

## D. 結論

### D1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

全国 2 年分の測定値の比較では、測定地点の多くは安定した測定値が得られていたが、一部に変動や高い測定値が存在し、その理由としては給水栓の汚染が影響しているのではないかと推測された。高度浄水処理過程における従属栄養細菌数は、オゾン処理までに減少したものが、生物活性炭処理により増加し、後段の消毒、砂ろ過で減少した。浄水と給水栓水では、検出される菌の比率が異なっていた。

### D2 腸管系ウイルスに関する研究

低い Ct 値での塩素消毒を正確に評価するため、短い接触時間の試料を採取可能な消毒装置を開発した。大腸菌による性能試験で、接触時間 0.5 秒の消毒が可能と示された。ウイルス粒子検出系として、従来の ELISA 法の代替となる Immuno-PCR 法を開発し、ELISA 法と同等の感度を得た。

### D3 耐塩素性病原微生物の研究

#### D3-1 粉体ろ過法の検証

耐塩素性病原微生物では、試料水の新規濃縮方法としての粉体ろ過法、並びに顕微鏡法に代わる遺伝子検出法の実用性を検証し、現

行試験法への追加を目指した。

粉体ろ過法では積算ろ過水量、捕捉性能、並びに回収率を評価した。いずれの協力機関においても使用可能であることを示す結果が得られた。原水のろ過水量は 3~63L と濁度によって変動し、原水濁度が 10 度を超える場合は、2 回に分けて濾過を行うことで、現行検査法の 10L をろ過可能と考えられた。浄水のろ過水量は 24 時間で 200~500L となり、濃縮物の一部だけで現行の検査水量 20L が可能であった。ろ過法単体としての捕捉性能は概ね 100% 近くと理論値に近い性能であった。回収率は 20~80%、概ね 60% 程度と、他の濃縮法と遜色なかった。粉体ろ過法の浄水試料保存、ルーチン検査への利用が期待された。

#### D3-2 遺伝子検出法の検証

遺伝子検出法の感度試験、添加回収試験、並びに河川水試料からの顕微鏡法と遺伝子検出法の比較試験を実施した。いずれの協力機関においても使用可能であることを示す結果が得られた。すなわち、RT-LAMP 法、qRT-PCR 法のいずれにおいても、遺伝子検出法が高感度であることが改めて確認された。添加回収実験で添加試料から陽性、未添加試料から陰性が得られた。反応阻害が指摘されたが、鋳型量を抑えること、あるいは阻害を低減する試薬の使用により阻害が回避された。河川試料からのクリプトスポリジウム等の検出については、顕微鏡陽性試料では概ね遺伝子検出法陽性が得られ、遺伝子増幅産物からはクリプトスポリジウム等の塩基配列が確認された。また、qRT-PCR 法では汚染の量的把握が可能であった。遺伝子検出法は未経験者であっても多少の実習後に試験可能であった。これらの結果からクリプトスポリジウム検査の検出方法の一つとして、遺伝子検出法の実用化は可能と判断された。

#### D3-3 濃縮精製法の組み合わせの問題

アセトン溶解法と免疫磁気ビーズ法との組み合わせ、および PTFE フィルターと免疫磁気ビーズ法との組み合わせの 2 通りの処理工

程を検討し、いずれも方法でもクリプトスポリジウム検査は実施可能であった。

#### E. 謝辞

この研究の実施にご協力いただいた神奈川県企業庁水道水質センターの渡邊洋大氏、齊藤巧介氏、北村壽朗氏、他センターの皆様方に感謝する。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A. and Ohno, K., Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Research*, 44(5), 1307-1316, 2010.
2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Oshiba, A. and Ohno, K., Evaluation of norovirus removal performance in a coagulation-ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus virus-like particles, *Water Science and Technology*, 61(8), 2027-2034, 2010.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. and Ohno, K., Feasibility of in-line coagulation as a pretreatment for ceramic microfiltration to remove viruses, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 59(8), 501-511, 2010.
4. 岸田直裕, 古川一郎, 黒木俊郎, 猪又明子, 泉山信司, 森田重光, 秋葉道宏, リアルタイム RT-PCR 法を用いた河川試料水中のクリプトスポリジウムの高感度定量, *日本水処理生物学会誌*, 46, 181-189, 2010.
5. 猪又明子, 百田隆祥, 泉山信司, 勝山志

乃, 岸田直裕, 秋葉道宏, 遠藤卓郎、環境水中のクリプトスポリジウム検出を目的とした RT-LAMP 改善法の実用性評価、日本水処理生物学会誌 Vol.47 No.1 2011 pp.9-18.

学会発表

1. 岩本智江, 田中繁樹, 田中真紀子, 高橋輝行, 浄水処理過程および配水過程における従属栄養細菌の挙動, 日本水道協会 第 61 回全国水道研究発表会, 2010
2. Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsushita, T. and Matsui, Y., Virus removal by adsorption on super-powdered activated carbon, Proceedings of the 4th IWA-ASPIRE Conference, Tokyo, Japan, 2-6 October 2011.
3. Matsushita, T., Shirasaki, N., Ohshiba, A., Matsui, Y. and Ohno, K., Evaluating norovirus removal during drinking water treatment by using recombinant NV-VLPs, Proceedings of IWA World Water Congress, Montreal, Canada, 19-24 September 2010.
4. 佐藤翔太, 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 高塩基度ポリ塩化アルミニウムが示すウイルスの高い除去性, 第 62 回全国水道研究発表会, 2011.
5. 鈴木英明, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 安藤直哉, 超微粉化活性炭を用いたウイルスの吸着除去, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011.
6. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, アルミニウム系凝集剤によるウイルスの不活化, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011.
7. 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 凝集剤中のアルミニウム形態がウイルスの凝集沈殿処理に与える影響, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011.
8. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, MALDI-TOF-MS を用いたアルミニウム系凝集剤によるウイルス不活化機構の検討, 第 47 回環境工学研究フォーラム, 2010.
9. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 水処理分野における質量分析の重要性, 第 2 回日本質量分析学会北海道談話会・研究会, 2010.
10. 白崎伸隆, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, VLPs を用いたヒトノロウイルスの凝集沈殿-MF 膜ろ過処理性評価, 第 65 回土木学会年次学術講演会, 2010.
11. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 凝集沈殿処理によるウイルスの除去と不活化, 第 61 回全国水道研究発表会, 2010.
12. 鈴木英明, 安藤直哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 微粉化活性炭によるウイルス吸着除去, 第 61 回全国水道研究発表会, 2010.
13. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 小泓 誠, インライン凝集-MF 膜ろ過処理によるウイルスの効果的除去, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010.
14. S. Izumiyama, A. Inomata, N. Kishida, S. Katsuyama, T. Momoda, K. Usui, M. Akiba, K. Yagita, T. Endo, Development of nucleic acid amplification assays for highly sensitive detection of Cryptosporidium in water samples, Proceedings of Intestinal and Free-Living Protozoan Parasites Meeting, The 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, p.8, January 12, 2011, Tokyo Japan.
15. 泉山信司, 溝口智子, 百田隆祥, 遠藤卓郎, クリプトスポリジウム検査の添加回収実験による濃縮精製法の比較と迅速遺伝子検出法の検討, 第 10 回環境技術学会研究発表会、平成 22 年 9 月 10 日、京

都市

16. 百田隆祥, 太田嘉則, 神田秀俊, 猪又明子, 泉山信司, 遠藤卓郎, RT-LAMP 法を用いたクリプトスポリジウムの高感度迅速検出, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010 年 3 月 15-17 日, 福岡
17. 岸田直裕, 今野祥顕, 秋葉道宏, 猪又明子, 泉山信司, 水道クリプトスポリジウ

ム検査への遺伝子検査法導入に関する研究, 第 4 回保健医療科学研究会, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
なし

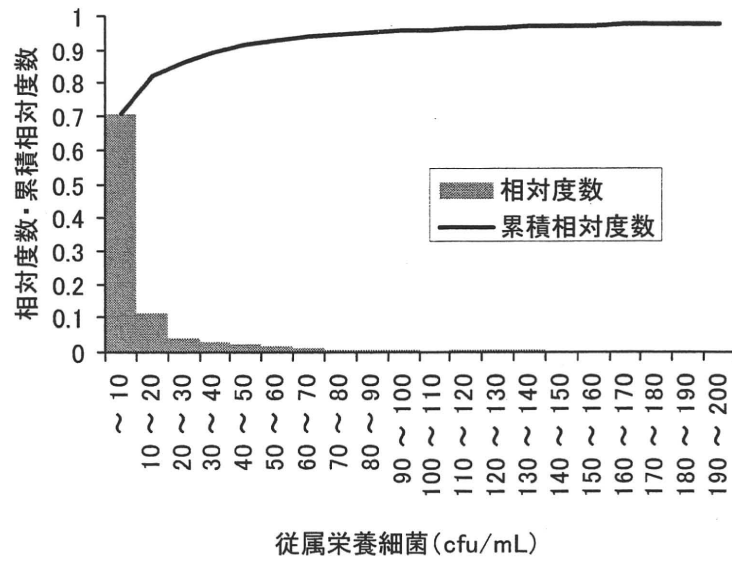


図1 平成21年度従属栄養細菌最高値の頻度分布

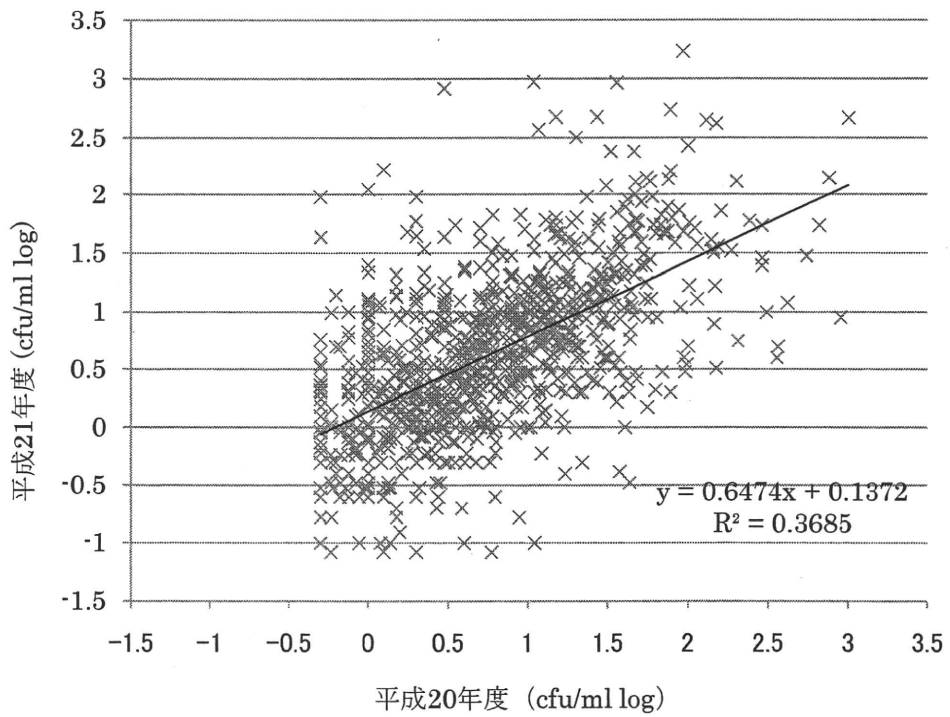


図2 従属栄養細菌数（平均値）、同一地点の平成20年度対平成21年度（n=961）

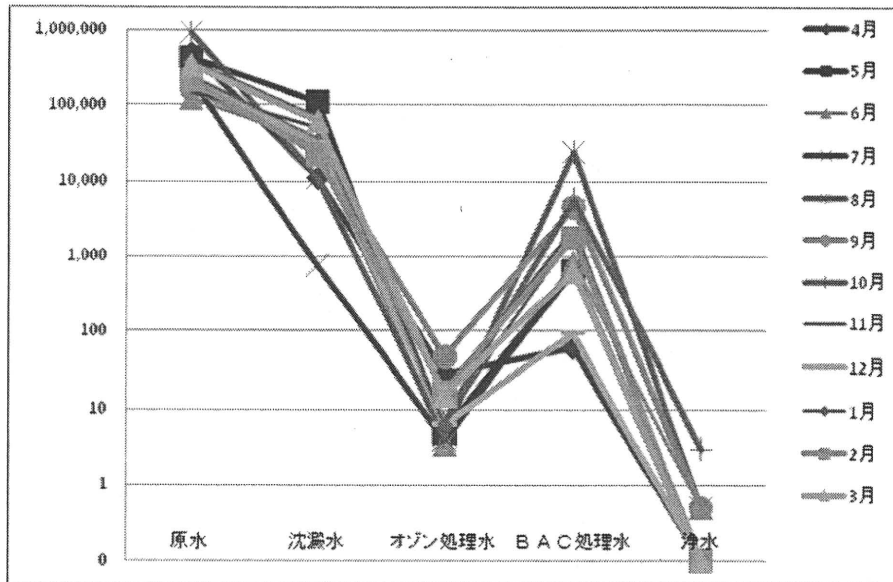


図 3 オゾン処理後の BAC 処理による従属栄養細菌数の増加

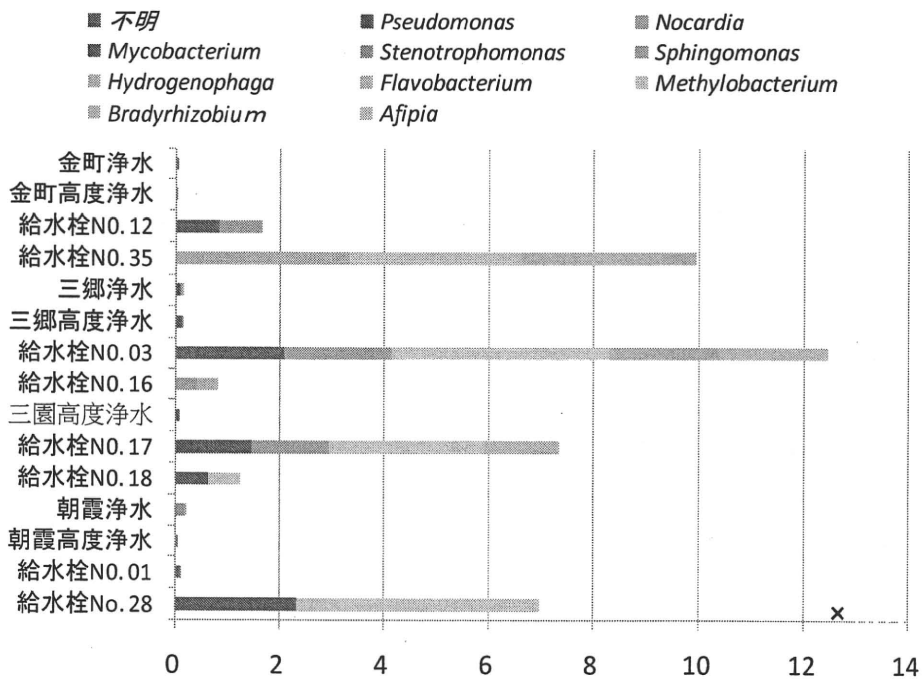


図 4 従属栄養細菌の菌叢変化 (平成 20 年 5 月サンプリング)

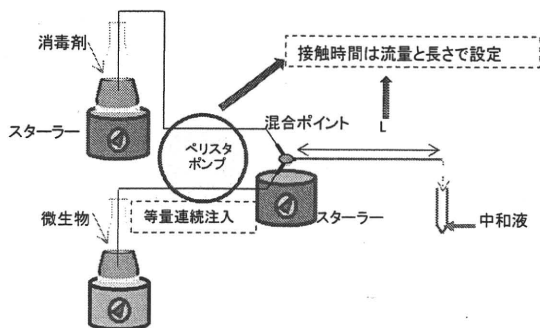


図 5 短い接触時間の試料を採取可能な消毒装置

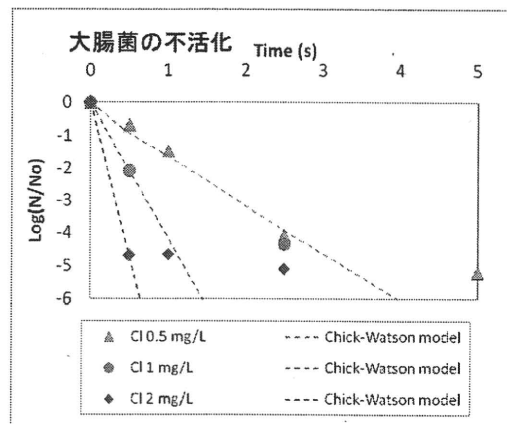


図 6 短い接触時間の試料を採取可能な消毒装置を使用した大腸菌不活化実験

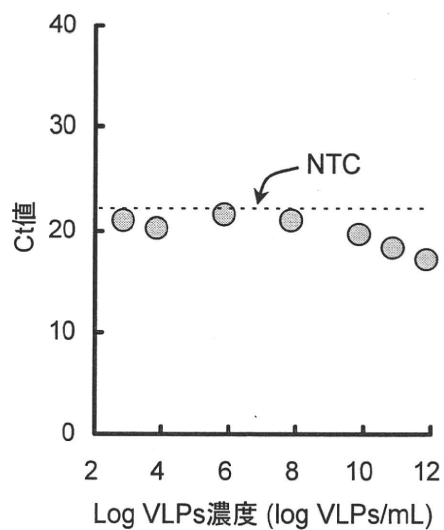


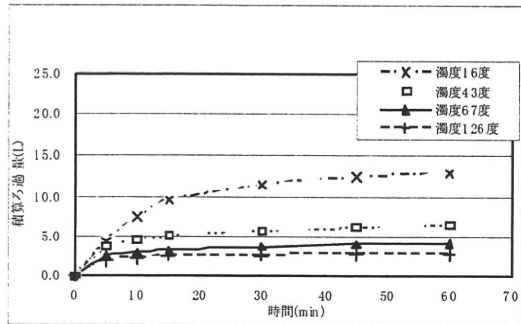
図 7 ノロウイルス外套タンパク粒子 (VLPs) を標的とした immuno-PCR の開発

表 1 粉体ろ過法のろ過水量、捕捉性能、並びに回収率

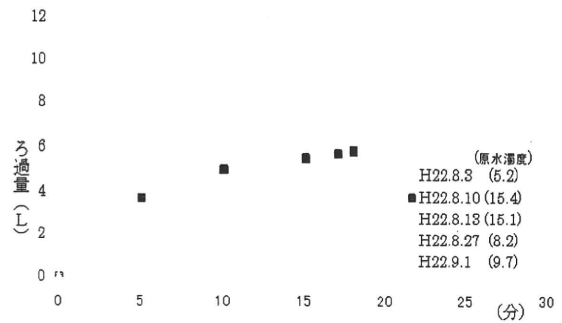
実施機関	原水				浄水			
	ろ過水量	捕捉性能		回収率	ろ過水量	捕捉性能		回収率
		蛍光ビーズ	オーシスト			蛍光ビーズ	オーシスト	
浜松市上下水道部	3～13L/1h	96～ 103%	109～ 117%	61～ 65%	340～ 510L/24h	97～ 111%	100～ 109%	45～ 82%
宮城県仙南・仙塩広域水道事務所	31～37L/1h	83～ 105%	—*	23～ 57%	370～ 460L/24h	80～ 99%	82～ 100%	—
桐生市水道局	5～63L/1h	81～ 90%	—	67～ 83%	280～ 550L/24～ 48h	87～ 101%	103～ 111%	—
神奈川県企業庁水道水質センター	—	—	—	—	220～ 340L/24h	99～ 110%	67～ 78%	—
新潟市水道局水質課	6～ 10L/30min	70～ 92%	—	—	420～ 480L/24h	81～ 100%	—	21～ 53%

\*— : no data.

A)浜松市原水



B)新潟市原水



C)宮城県仙南仙塩原水

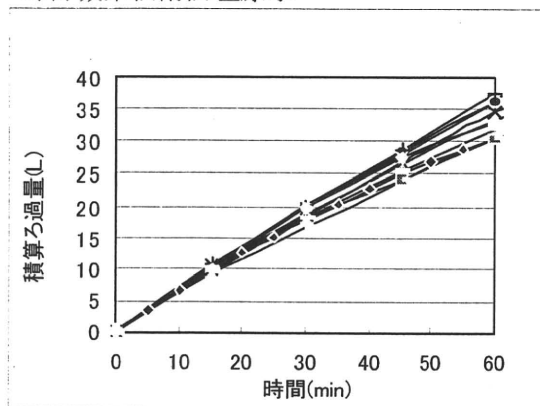
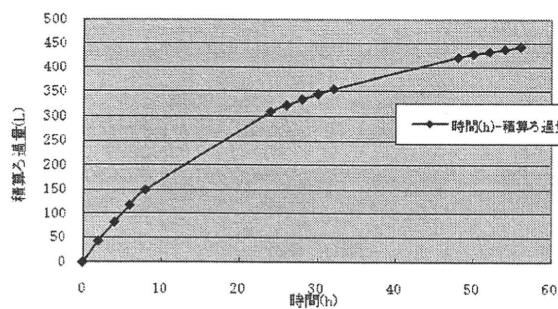


図 8 原水積算ろ過水量

A)桐生市浄水



B)神奈川県浄水

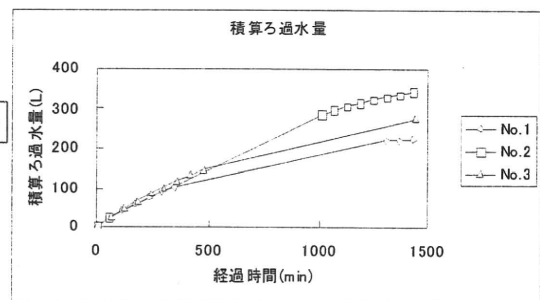


図 9 浄水積算ろ過水量

表2 クリプトスポリジウム遺伝子検出法、検証結果一覧

協力機関	LAMP 法		RT-PCR 法	
	クリプトスポリジウム	ジアルジア	クリプトスポリジウム	ジアルジア
東京都健康安全研究センター	3*	3	3, 4	3, 4
神奈川県内広域水道企業団	1, 3	1, 3	3, 4	3, 4
財団法人岐阜県公衆衛生検査センター	2	—	—	—
株式会社環境科学研究所	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2
国立保健医療科学院	1, 2, 3	1	1, 2, 3	1
愛媛県立衛生環境研究所	—	—	1, 2	1, 2
神奈川県衛生研究所	—	—	1, 2	—
東京都水道局	—	—	1, 2, 3, 4	1, 3
大阪市水道局	—	—	1, 2	1, 2
茨城県企業局水質管理センター	1, 2	—	—	—

\*注

1：感度試験を実施して、高感度な検出が可能であるか確認した

2：添加回収実験を行ない、所定の検出が可能であるか確認した

3：河川等実試料より検出を行い、顕微鏡法と比較した

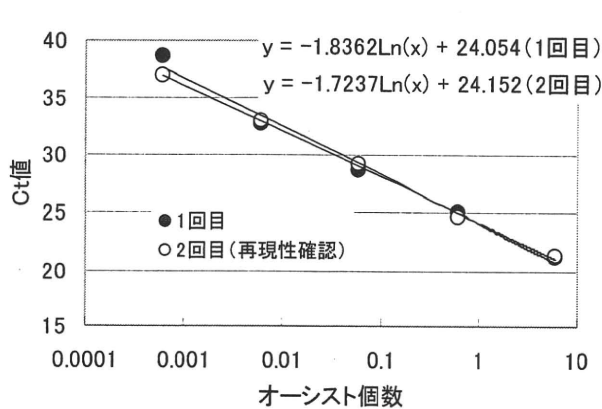
4：RT-PCR 産物の塩基配列を決定した

—：未実施

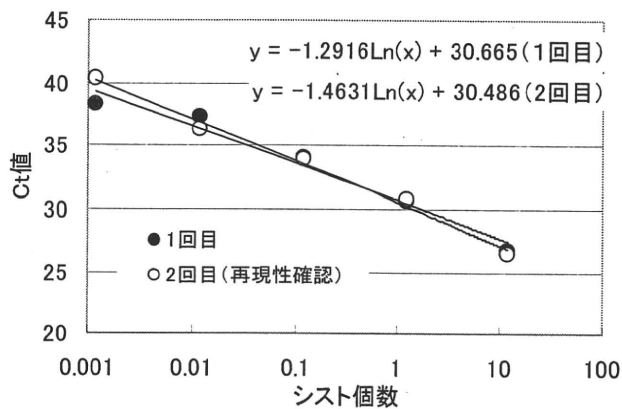
表3 遺伝子検出法の感度試験 (UV 照射オーシスト使用)

クリプト又はジアルジア (個/反応チューブ)	RT-LAMP		qRT-PCR	
	クリプト	ジアルジア	クリプト	ジアルジア
6	+	+	+	+
0.6	+	+	+	+
0.06	+	+	+	+
0.006	+	+	+	+
0.0006	-	-	-	-

\*Giardia は DNA-LAMP



A) オーシスト検量



B) シスト検量線

図10 qRT-PCR 感度試験

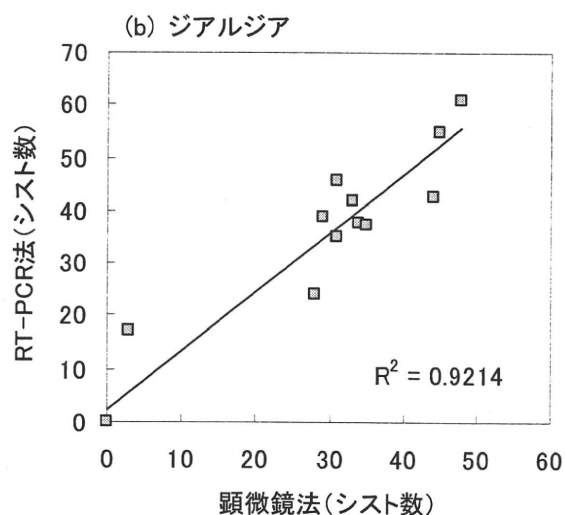
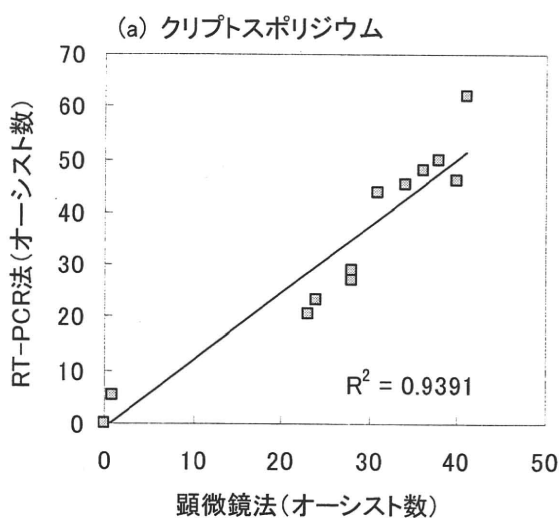


図11 添加回収試験における顕微鏡法とqRT-PCR法定量値の比較