

今回は FOSA のみが特定の井戸で定常的に検出された。上述のとおり、地下水の PFCs は Z 川の影響だと考えられるが、FOSA については、河川水では一回しか検出されていない。したがって、河川水中の FOSA の前駆物質から涵養中に FOSA が生成し、地下水で検出した可能性が考えられた。また、FOSA は PFOS 前駆物質であるため、更に分解して PFOS が生成していると考えられた。そこで、地下水における PFOS と FOSA の関係を判定した結果、PFOS と FOSA には負の相関関係があることが確認された。河川水中の前駆物質から FOSA が生成し、まだ PFOS まで反応していない地下水では FOSA が高濃度で PFOS が低濃度となり、PFOS まで反応した地下水では FOSA が低濃度で PFOS が高濃度となっている可能性が考えられた。ただし、FOSA は PFOS の濃度を説明できるほど高濃度ではないため、他の前駆物質の存在が考えられたが、N-MetFOSAA、N-EtFOSAA、N-MeFOSE、N-EtFOSE の四つの物質は検出されなかった。これらは定量下限値が高いために検出されなかったか、これら以外の前駆物質が存在していた可能性が考えられた。

E. 結論

B 地域の水源である地下水と、影響のある河川及び流域の下水処理場放流水における PFCs について調査した結果、地下水で PFCs が検出され、河川や下水処理場放流水でも検出された。河川は下水処理場放流水の影響を受け、地下水はその河川の影響を受けていると考えられた。地下水では PFOS 前駆物質の FOSA が検出され、涵養中に PFOS の生成が考えられた。

C 地域の河川水における PFCs の主成分は PFOA と PFNA であり、そのほとんどを占めている PFOA の値が大きく変動していた。さらに、炭素鎖が 8 以上の PFCs は活性炭の

交換頻度を上げることにより若干除去されていたことから、活性炭処理による物理吸着が効果的と考えられた。

また、ごく微量ではあるが雨水からも検出されたことから、数 ng/L 程度とあまり汚染を受けていない水源における汚染起源の特定は困難であるが、PFCs による汚染を受けている水源については、存在比等の実態調査を行うことにより、その汚染起源を特定できる可能性があることがわかった。

固相抽出-誘導体化 GC-MS 法を用いて水道原水・浄水、給水栓水中 EDTA の存在実態を評価した。その結果、EDTA は水道原水では ND (<0.1) \sim 22.1 μ g/L、浄水では ND (<0.1) \sim 13.8 μ g/L、給水栓水は ND (<0.1) \sim 13.0 μ g/L の範囲で検出され、最大値は地点 D の水道原水で 22.1 μ g/L であった。EDTA の目標値 (500 μ g/L) と比較すると、すべての水道原水は目標値の 1/10 未満であり、水道浄水、給水栓水については目標値の 1/30 未満であった。また、採水地点間で差があるものの、特に水道原水中から高濃度で EDTA が検出された地点において、全国 6 カ所の水道事業体の導入により水道浄水・給水栓水中で濃度の低減が認められており、一定の除去効果が得られると考えられた。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 小林憲弘, 杉本直樹, 西村哲治 (2011) : SPE-GC/MS 法による水道原水・浄水・給水栓水中 EDTA の存在実態, 第 48 回全国衛生化学技術協議会, 長

野，11月，講演要旨集，206-207.

2. 実用新案登録
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

1. 特許取得

なし。

なし。

平成 23 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

水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究　－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）
研究分担者	松下 拓	（北海道大学大学院工学研究院）
研究分担者	片山 浩之	（東京大学大学院工学系研究科）
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	角田 徳子	（東京都水道局）
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	川口有希子	（桐生市水道局水質センター）
研究協力者	渡邊 洋大	（神奈川県企業庁水道水質センター）
研究協力者	水野 聰	（新潟市水道局）
研究協力者	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生活環境研究部）
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	岸田小百合	（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	古川 一郎	（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	村崎 愛	（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	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。

東日本大震災の対応を通じて、水道水の微生物学的安全性について検討した。宮城県では取水・導水・浄水施設に大きな被害はなく浄水処理は可能な状態にあったが、送水管の漏水 10 箇所を復旧し送水に至るまでには最大 21 日間を要した。水源の上流にある下水処理施設の被害が少なく通常の処理が行われ、水道水の微生物学的な安全性に直接の影響が出なかった。下水処理施設が壊滅的被害を受けた沿岸部ではその付近に浄水場の取水がなかった。次の災害が同じ程度に済むとは限らず、注意を要すると考えられた。水道水の供給再開が急がれ、理化学試験による

迅速な判定が行われた。微生物検査はリアルタイムな検査結果が得られず、被害状況が不明な災害状況下においては、外部からの支援による微生物検査の実施が望ましいと考えられた。原水に汚染が生じた場合をあらかじめ想定し、小規模な浄水場では紫外線や膜処理等の導入、対策済み浄水場では塩素消毒やろ過の徹底と濁度の監視、災害時の水質低下の恐れの一一般利用者向け周知、迅速な再開のための判断基準の整理が重要と考えられた。

一般細菌に比べて高感度な従属栄養細菌の測定が開始され、その指標の有効活用が求められている。測定地点の多くは目標値未満で経年変化も少なく、配水系統は清浄に保たれていたと言えた。一部に変動や高い測定値の存在を見出し、ろ過なし塩素消毒のみの浄水処理、硝酸態窒素との関連などが示唆された。これらを追求することで、水質の向上、配水系の改善が期待された。現行の浄水の7日間培養を2倍の14日間培養にすることで従属栄養細菌数は経時的に増加し、感度と作業性迅速性の兼ね合いが問題となった。

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。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(プラグフロー装置)を開発し、大腸菌ファージ Q β の塩素消毒とポリオウイルスのオゾン処理を行ってその効果を検証した。新しく開発した装置により接触時間 0.7 秒の消毒が観察可能となり、従来に比べてより精度の良い不活化曲線が得られた。ウイルス粒子検出系として immuno-PCR 法を改良し、従来の ELISA 法より 1,000 倍の高感度が得られた。今後の検証試験への活用が期待された。

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、粉体を支持するメンブレンフィルターが水の充填操作でめくれて捕捉性能が低下する問題が指摘されていたが、改善されたユニットでは問題は発生せず所定の捕捉性能、回収率が得られた。粉体ろ過に使用する流路の汚染が問題となり、界面活性剤を用いた洗浄で流路の汚れを効果的に洗浄できることを確認した一方、細かな汚れは残留し完全には除去できないことを実験的に明らかにした。従って、同じ試料のろ過には問題は少ないかもしれないが、試料間のクロスコンタミネーションが特に問題となる試料では何らかの対策を要すると考えられた。粉体ろ過濃縮後の遠心沈殿で生じる固いペレットを懸濁するには、100%PETの使用、50mL遠心管の使用、チューブを叩いて沈殿物を浮かせること、より強いミキサーで攪拌することが、懸濁方法としては最善と考えられた。国産蛍光抗体試薬を検討した結果、原水に添加したクリプトスポリジウムとジアルジアを問題なく染色可能で、活用が期待された。

遺伝子検出法では検量線の作成、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。クリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシストの入手は容易ではないことから、人工合成の陽性対照の遺伝子断片より検量線を作成した。クリプトスポリジウム 1 オーシストに含まれる 18S rRNA 量は、TaqMan 法で 26,000 コピー、サイクリングプローブ法で 18,000 コピーに相当した。ジアルジア 1 シストあたりでは、サイクリングプローブ法で 1,600 コピーに相当した。河川試料からのクリプトスポリジウム等検出は、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。顕微鏡陽性、遺伝子検出法陰性となる理由として確率論的な問題が大きいことを考察した。当該研究の成果の一部は委員会資料として活用され、粉体ろ過法と遺伝子検出法がクリプトスポリジウム等検査法の通知に追加された。

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23年3月11日14時46分に三陸沖を震源としたマグニチュード9.0、最大震度7を記録する東北地方太平洋沖地震が発生し、水道施設にも甚大な被害が生じた¹⁾。宮城県仙南・仙塩広域水道では、取水・導水・浄水施設に大きな被害はなく浄水処理は可能な状態にあったが、送水施設では漏水10箇所を復旧し送水に至るまでには最大21日間を要した。更に、送水を開始した6日後に震度6強の余震が発生し、新たに2箇所の送水管で漏水したため一部の区間で最大4日間の送水停止となった。この経験から浄水場における震災対応と微生物からみた水道水の安全性について考察した。

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、活用の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、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。流域の都市化が進行し、下水処理水が流入する河川においては、下水処理によっても除去されなかったウイルスが混入した環境水を水道水源として浄水処理が行われる可能性は十分に考えられる。浄水処理過程におけるウイルス除去が不十分な場合、実際に供給される水道水中にも

ウイルスが生残する可能性が考えられ、実際に海外の水道水中からの腸管系ウイルスの検出も報告されている²⁾。従って、浄水処理過程におけるウイルスの処理性を評価することは、安全かつ信頼性の高い飲料水の上水の安定供給を行う上で重要な課題の一つである。低いCt値でのウイルスの消毒処理を正確に評価するには、低濃度において、短時間の接触時間を制御する実験系の構築が課題であった。昨年度に開発した、ごく短い接触時間で消毒する装置(プラグフロー装置)が正しく機能することを検証した。これに加えて、ウイルス粒子検出系として、感度の低いELISA法の代替として開発したimmuno-PCRを改良し、さらなる高感度を目指した。

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しての粉体ろ過法と検出方法の遺伝子検出法の開発検討を進めてきた。現行試験法へのこれら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、検証を行なっている。

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粉体ろ過濃縮法では、昨年度の試験ではろ過開始時に浄水ろ過ユニット内のフィルターが浮き上がり、正常なケーキ層が形成されない致命的な問題が指摘されていた。加えて、粉体ろ過装置の洗浄の難しさと、それに伴うコンタミ汚染の問題、ろ過濃縮物のペレットが硬く懸濁に時間がかかる問題も指摘されており、これらの改善について検討した。クリプトスポリジウム等の顕微鏡検査に代わる方法として遺伝子検出法に期待が寄せられている。リアルタイムPCRは、検量線から遺伝子断片のコピー数を求めることが可能なことから、顕微鏡法と同様に定量を行うことが想定される。ところが、いずれの病原体も試験管培養で検査目的に合致するオーシスト等を作ることではできず、その都度購入したり、各施設において実験動物の感染維持が必要となる。オーシスト等はBSL2

の安全対策がなされた施設で取り扱われる(国立感染症研究所病原体等安全管理規程)。特にクリプトスポリジウム属パルバム(遺伝子型がⅠ型、Ⅱ型のもの)は、感染症法に基づく四種病原体として適正な管理が求められる(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律、平成18年12月8日一部改正、平成19年6月1日施行)。実際にはクリプトスポリジウム等試験のためだけにこのような設備を整備するのは困難であることから、試験管内で合成された遺伝子断片による、代替の検量線の使用が適していると考えられる。本来は核酸抽出効率や核酸精製回収率といった変動の要因を考慮して、本物のオーシスト等を使用すべきであるが、現在使用している核酸抽出方法ではカラム精製などを行わず、核酸の損失はほぼ無視出来るプロトコルで行われている。また、環境中のオーシスト等は、新鮮なものとの活性が異なる恐れも考えられる。一般論としてRNAは分解を受けやすく、特に高感度にRNAを検査する遺伝子検出法では、影響が生じる可能性がある。異なる施設間で検査結果を比較することも考慮すれば、これらのような理由で検量線が変化するよりは、絶対的な遺伝子断片のコピー数を基準とした換算が有効とも考えられる。以上のことから、当該研究では人工的な遺伝子断片を用いた検量線を作成した。

遺伝子検出法はまだ実績が少ないことから、河川等試料からのクリプトスポリジウム等検出の検討を積み重ねている。逆転写反応を行わない定量PCR法(qPCR法)についても事業所排水を用いて、検討を加えた。高感度な遺伝子検出法は、サンプルの一部分で試験が可能であることから追試や別の反応系による確認試験を行ったり、塩基配列決定により増幅の正しさを確認したり遺伝子型を明らかにできる利点がある。わずか1個のオーシストを検出する場合、確率的な問題は避けられないと考えられたことから、その影響について考察した。

クリプトスポリジウム検査に使用される蛍光抗体染色試薬は外国産だったが、最近になり国内

産の蛍光抗体染色試薬が別の研究班の産学官連携で開発され、その試薬が市販用に整備された³⁾。国内産試薬が使用可能になることは、クリプトスポリジウム等検査が海外の試薬にのみ依存してきた状況から脱することでもあり、安全保障の観点からも好ましいと考えられる。この蛍光抗体試薬を用いて浜松市の原水に添加したクリプトスポリジウムとジアルジアを染色し、性能を確認した。蛍光抗体染色では退色をできる限り抑えて観察することが重要であり、退色防止剤についても検討した。グリセロールを含まないDABCO/PBSは退色防止の性能が低く、一方PTFEメンブレンフィルターはグリセロールで不透明化することが問題だった。

当該研究の成果の一部は厚生労働省健康局水道課の水道における微生物問題検討会の会議資料として活用され、粉体ろ過法と遺伝子検出法がクリプトスポリジウム等検査法に追加された(「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」(健水発0302第2~4号厚生労働省健康局水道課長通知、平成24年3月2日))。

B. 研究方法

B1 東日本大震災と水道の微生物学的安全性

地震や被害の詳細については各種の公式資料、インターネット資料を確認した。宮城県の水道事業の状況は自動計器や人による記録、関係者からの聞き取り調査によった。

B2 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±1℃で7日間培養を行った。場合によりこれを2枚以上行い、算術平均値を結果に使用した。試料は、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。

東京都水道局の主要浄水場11か所において、月1回の頻度で原水、浄水の試験を実施した。工程水については3カ月に一度行った。給水栓水は、区部の配水系統毎の給水栓水質監視の

代表地点として設置されている45か所の自動水質計器設置地点を対象とし、月1回の頻度で実施した。浄水処理後、浄水が給水栓に到達する時間は、概ね12ないし48時間である。

桐生市水道局では、末端給水栓水の水質検査を月1回実施している。平成19、20年度の2年間、従属栄養細菌を検査項目に加えて実施した結果を集計した。末端で従属栄養細菌数が高めに検出された採水地点に関連する試料の追加測定を平成23年度に実施した。

B3 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、当該研究では昨年度に開発した、ごく短い接触時間で消毒する装置(プラグフロー装置)を活用した。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、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。装置が適切に機能することを検証するために、大腸菌ファージQBの消毒試験を実施した。QBは*E. coli* K12 F+を用いたブラック法により測定した。従来は不活化プロファイルが測定できなかったオゾンによるウイルスの不活化について、ポリオウイルスを用いて実験した。ポリオウイルスはBGM細胞を用いて培養し、Sephacryl (illustra Microspin™ S-300)を用いたゲル濾過により精製したものをを用いた。ウイルスの生残性はブラック法で評価し、参考としてPCR法により核酸の残存を確認した。

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、昨年度に開発したimmuno-PCR系を改良した。使用するプレートの変更、一次抗体の作成のし直し、洗浄条件の変更、PCR条件の検討などを行った。

B4 耐塩素性病原性微生物の研究

B4-1 粉体ろ過法の検証

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(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(いずれもAdvantec)を使用した。

原水での評価は、神奈川県企業庁寒川浄水場の原水である相模川の表流水を使用した。初期粉体量を1g、追加粉体量を2g、計3gの粉体を使用し、初期ろ過圧30kPa、フィルター径90mmの支持体を使用してろ過濃縮した。浄水でのろ過水量評価は、神奈川県企業庁水道水質センター内の給水栓を使用した。浄水は、通常の凝集沈殿ろ過と塩素処理がなされており、濁度は0.1度未満であった。0.5gの粉体が充填された37mmろ過ユニットを使用し、追加粉体1gの計1.5gの粉体使用量の条件で、圧力50kPa程度で加圧ろ過し、流速と積算ろ過量を経過観察した。

粉体ろ過法単体の捕捉性能を評価するのに、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(3 μ m、Polyscience)とホルマリン固定クリプトスポリジウムオーシストを使用した。ろ過開始から間もなく、蛍光ビーズあるいは固定オーシストを添加した検水をろ過し、原水の場合は10L、浄水の場合は100Lをろ過した。同時に45mLの界面活性剤入りPBSが入った50mL遠沈管に、同じ量の蛍光ビーズあるいは固定オーシストを添加し、添加量の分母を求めた。濃縮物を50mL遠沈管に回収し、塩酸を用いて粉体を溶解した。溶解液の一部に含まれる個数を検鏡にて測定することで、添加量と比較し捕捉性能を評価した。検鏡は溶解液を観察用PTFEフィルターでろ過し、洗浄、オーシストの場合は蛍光抗体で染色し、封入後に微分干渉蛍光顕微鏡で計数した。磁気ビーズ精製を行う通常の回収操作では、磁気ビーズ法の前に遠心濃縮、遠心洗浄を行った。免疫磁気ビーズ精製と顕微鏡観察は定法通りに行った。

ろ過の補助装置の汚染とクロスコンタミネーションが懸念されたことから、洗浄方法を確認した。ろ過にはクリプトスポリジウムサンプリングシステムと37mm フィルターカートリッジを用いた。まず、ろ過の流路を汚染するため、高濃度の3 μ mの蛍光ビーズを含む浄水10L(2.6 \times 10⁵個/10L)をろ過濃縮した。得られたろ過濃縮物より溶解液の一部100 μ lに含まれる蛍光ビーズの個数を、クリプトスポリジウム検査法に準じて観察用のPTFE フィルター上で計数した(①蛍光ビーズ検体)。サンプリングシステムのマニュアル記載方法、すなわち0.3%Tween80 10Lで通水洗浄したのち、浄水100Lをろ過濃縮した。濃縮物溶解液の一部3mlに含まれる蛍光ビーズの個数を計数し、洗浄効果を確認した(②洗浄後検体)。次いでシステムを浄水999Lで通水洗浄したのち、浄水100Lをろ過濃縮した。濃縮物溶解液の一部3mlに含まれる蛍光ビーズの個数を計数した(③999L 洗浄後検体)。システムの粉体攪拌槽をスポンジと洗剤で洗浄したのち、再度、浄水100Lをろ過濃縮した。濃縮物溶解液の一部3mlに含まれる蛍光ビーズの個数を計数した(④スポンジ洗浄後検体)。

原水をろ過した粉体ろ過濃縮物を塩酸に溶解させ遠心沈殿で生成するペレットは硬く、懸濁させるのに時間がかかっていた。大原浄水場原水(濁度3~8度)10~19Lを粉体ろ過法でろ過濃縮した濃縮物を検討に使用した。ペレットを簡単に素早く懸濁させるための条件検討に、0.1%または1%Tween80、100%PET 溶液(ピロリン酸ナトリウム 10 水塩 20g、EDTA3Na 30g、Tween80 10gを超純水1Lに溶解させたもの)、50mlと15ml チューブ、Vortex Genie2 (Scientific Industries)とAutomatic Lab Mixer(iuchi)の2種類のミキサーを使用した。

B4-2 国内産蛍光抗体試薬の染色試験

γ 線滅菌されたクリプトスポリジウムとジアルジアを大原浄水場原水(濁度24度)約4Lに添加し、粉体ろ過法でろ過濃縮した。得られたろ過濃縮物より、塩酸溶解、遠心濃縮、遠心洗浄、免

疫磁気ビーズ精製を行い、精製試料を得た。精製試料を定法に従い、観察用PTFEフィルター上で蛍光抗体染色した。蛍光抗体試薬に国産試薬(ARK Flour、アーク・リソース(株))または外国産試薬(Aqua-Glo、Waterborne)を使用した。蛍光顕微鏡でB励起にて倍率200倍で染色当日および7日後に観察した。

B4-3 退色防止剤の検討

0.5M carbonate-bicarbonate buffer (pH9.0)にグリセロールを添加して0、10、15%の3段階のグリセロール濃度に調製した。DABCOを溶解し退色防止剤とし、従来のDABCO/PBSと市販の退色防止剤と、退色防止の効果を比較した。定法に従い蛍光抗体染色したジアルジアを観察、撮影した。

B4-4 クリプトスポリジウム、ジアルジア遺伝子検出法における検量線の作成

クリプトスポリジウムオーシスト(*Cryptosporidium parvum* H8株)⁴⁾とジアルジアシスト(*Giardia lamblia* WB株)は、それぞれ感染マウスあるいは感染スナネズミの糞便から、シヨ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、その後は冷凍状態(-20 $^{\circ}$ C)で待機した。

オーシストとシストからの核酸抽出は、従来通りに、凍結融解とProteinase Kによる酵素処理の方法で行った。すなわち、試料を-80 $^{\circ}$ Cのドライバスと37 $^{\circ}$ Cのヒートブロックを用いて5回の凍結融解を行った。次にProteinase Kを含む溶解液を添加し、60 $^{\circ}$ Cで30分間溶解反応を行った。その後2分間の超音波処理を行い、さらに75 $^{\circ}$ Cで10分間の追加反応を行った。この核酸抽出液を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱してProteinase Kを失活させた後、水中で急冷した。

得られた核酸抽出液より10倍希釈系列を作製し、逆転写(以下、RT)反応をPrimeScript RT reagent (タカラバイオ)を用いて行った。後述のTaqManプローブの系には、逆転写プライマー、サイクリングプローブ法には、Random 6

mers プライマーと Oligo dT プライマーを使用した。サーマルサイクラーを用いて 37°C、15 分間の逆転写反応を実施した後、85°C 5 秒間の加熱で酵素を失活させ、得られた逆転写産物をリアルタイム PCR の鋳型とした。

リアルタイム PCR は、TaqMan プローブ法⁵⁾あるいはサイクリングプローブ法(CycleavePCR *Cryptosporidium* Detection Kit、Assemblage E に対応した改良版の CycleavePCR *Giardia* Detection Kit、タカラバイオ)を用いた。遺伝子増幅・蛍光値測定には LightCycler (Roche) あるいは Thermal Cycler Dice Real Time System II(タカラバイオ)を用いた。PCR 反応チューブあたりのオーシスト、シストの個数と、蛍光強度が基準値を超えたところの Cp 値(Ct 値)で片対数グラフにプロットすることで検量線を作成した。

TaqMan 法の陽性対照に、濃度既知の合成遺伝子(Accession No.: AF161856、配列長さ: 192 mer)を用意した。サイクリングプローブ法には、キットに添付されている 10⁵ コピー/μL の陽性対照を使用した。

B4-5 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検討

RT-LAMP 法あるいは LAMP 法、qRT-PCR 法(TaqMan プローブ法、サイクリングプローブ法)、PCR 法(TaqMan プローブ法)を実施した。顕微鏡法検査は定法に従い、遺伝子検出法の結果と比較した。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・陰性の定性的判定と検量線より定量を行い、顕微鏡法の結果と比較した。

国立保健医療科学院では国内 30 箇所の浄水場の協力を得て水道原水を検査した。神奈川県衛生研究所では神奈川県内の河川水検査を実施した。神奈川県内広域水道企業団では相模川水系の社家取水及び酒匂川水系の飯泉取水の他、相模川支流の中津川、小鮎川とその流

域、及び神奈川県内の畜産施設の排水処理施設の流入水(原水)と放流水(処理水)を試験した。東京都健康安全研究センターと東京都水道局はそれぞれ水道水、湧水、表流水の 20 試料と 18 試料について共同して検査した。(RT-)LAMP を東京都健康安全研究センターで行い、同じ核酸抽出試料より qRT-PCR を東京都水道局水質センターで実施した。試料の収集・濃縮・精製と検鏡法はそれぞれの施設で行い、核酸抽出試料を 2 施設間で共有した。大阪市水道局では事業所排水(下水処理場放流水)を用い、定量逆転写 PCR 法(qRT-PCR 法)に加えて定量 PCR 法(qPCR 法)を実施した。

C. 研究結果および考察

C1 東日本大震災と水道の微生物学的安全性

被災当時、宮城県では仙南・仙塩広域水道、大崎広域水道、石巻広域水道の 3 事業により 11 市 11 町 1 村に給水していた。研究協力者が所属した仙南・仙塩広域水道は七ヶ宿ダムを水源として、県南部および仙台市から塩釜市、松島町までの海岸部の 7 市 10 町、給水人口約 156 万人に 1 日最大 235,370m³ の水道用水を低区系・高区系の 2 系統で送水していた(図 1)。ダムで取水した水は約 12km を経て南部山浄水場の着水井へ直接流入し、前塩素・後塩素処理と急速ろ過方式で浄水処理を行い、浄水池から自然流下で受水市町の配水池に送水していた。宮城県仙南・仙塩広域水道事務所ではダム取水から浄水処理、各受水市町の受水点まで管理し、受水点から配水池、配水池から各家庭の給水栓までの管理は受水市町が行っていた。

この地震で七ヶ宿ダムでは震度 6 弱、浄水場の地震計では 120Gal(震度 5 強相当)を記録したが、取水・導水施設への影響はなかった。浄水施設の施設点検で、傾斜板の落下(数千枚中の 2~3 枚)、傾斜板シャフトの破損(比較的大きな被害)、弁室、配管など数十箇所コンクリートの剥離や亀裂、水漏れなどが確認されたが、浄水処理は可能な状態であった。

配水系の漏水が多く、高区系では 7 箇所、低

区系では3箇所では復旧工事が施工された(図1)。すべての工事が終わる30日までの19日間、作業は休むことなく続けられた。

充水・洗管作業は低区系と高区系に分かれ、各系で同時に進められた。水質検査項目は水温、色度、濁度、残留塩素濃度、pHで、色度5度以下、濁度2度以下、pH5.8から8.6の水質基準が満たされ、残留塩素濃度が0.1mg/L以上認められたとき“飲用に適した水質”と判断した。これは通常の漏水復旧時の基準である。検査は、送水管の口径や長さから洗管終了時間を予測し、受水点の給水栓から採水して実施した。

低区系では3月15日から4月1日、高区系では3月21日から4月1日に検査を実施した(表1)。33受水点のうち2受水点は色度の判定基準を満たしていなかったが、配水池の洗浄ため送水を開始してほしいと要望があったので、各家庭への送水は水質検査で判定基準を満たしてから行うことを条件に送水を開始した。

水道は必要性(県民の要望)と安全性(水質検査の実施)との間で判断しなければならない状況に置かれていた。仙南・仙塩広域水道でも震災直後は水道水の必要性を重視し水質検査を実施せずに送水する話もあった。しかし、震災前の水道水の蓄積があった配水池の、水質悪化を避けたい受水市町もあり、検査して送水の運びとなった。前述の通り、配水池の洗浄を目的に、判断基準を満たさない受水市町向け送水があった。災害時は水道水の安全性よりも必要性に傾く恐れも考えられ、もちろん消防や衛生の必要性もあり一概に水質を優先して断水を継続すれば良いということではないかもしれないが、蛇口水は安全との約束であり、送水再開の判断基準と水質検査の重要性を浸透させることが大切と思われた。

仙南・仙塩広域水道での震災後の微生物検査は、4月13日に原水および浄水、末端受水点3箇所を実施した。原水では一般細菌数8個/mL、大腸菌は検出されず、浄水と末端受水点3箇所からは一般細菌数も大腸菌も検出されなかった。更に、5月9日には原水のクリプトスポリ

ジウム等検査を実施し、クリプトスポリジウム、ジアルジアは検出されなかった。震災後の微生物検査の結果は例年と変化がなく、震災による影響はなかった。

今回の震災では水源の汚染がなく、通常の浄水処理および管理が可能であったため、いずれの施設においても安全な水道水を供給することができたと考えられた。送水系の漏水復旧には通常の理化学試験のみで対応し、微生物検査は復旧の現場では使用されなかった。このことから、リアルタイムな検査結果が得られない微生物検査は、平時における水道水の安全性を保障する高度の品質管理(水質)が目的と考えられた。微生物検査を被災地で行うことは容易ではなく、より安全性の高い水道水を供給するためには外部からの支援によって検査を行う必要性が指摘される。

塩素消毒のみでは耐塩素性病原微生物の対策にならず、微生物学的な安全性が担保されないことは既に知られているところであり、状況によってはクリプトスポリジウム等の検査を急ぎ行う必要性が生じることが考えられる。特にクリプトスポリジウム症に感染すると、健常者は自然治癒が期待できるが、今なお特效薬はなく、未だに免疫不全状態の患者、乳幼児、高齢者らにとってリスクとなる。大規模災害になるほど検査の必要性の判断は容易ではなくなるが、外部の支援による検査を行うことで被災地の負担を増やすことなく、危険性を早い時期から知り得ると期待された。

災害時の水道水における感染症のリスクについて、既に文献的に4通りが考えられていた⁶⁾。

すなわち、

- (1) 水源も浄水場も正常な場合→通常と変わらない
- (2) 浄水場は正常、水源が汚れた場合→250～500人に1人発病の可能性がある。浄化率アップ(7～8-log除去)で10⁻⁴/回以下のリスク
- (3) 浄水場の機能が低下した場合→(a) 水源が正常なら3000人に1人が発病の可能性がある。(b) 水源が汚染されたら3～5人に1人が発病の

可能性がある。

(4) 水管網が損傷した場合→25～500人に1人が発病

今回は(4)、あるいは限りなく(1)に近い状況にあった。送水は、一旦は完全に断水した後、安全を確認しながら順次再開されたので、汚染を受けた水道水が使用される可能性がほぼなかった。今回の結果に安堵するのではなく、災害時は水質低下にも考慮しなければならないことを、一般に周知する必要性も考えられた。

大崎広域水道(県北部)では、復旧時の検査は理化学検査(水温、色度、濁度、pH、残留塩素濃度)で対応した(大崎広域水道、私信)。取水は河川から行い、取水から導水・浄水施設に大きな被害はなかったので水を供給することが可能であった。通常とは異なる塩素消費の可能性を考慮して、残留塩素の濃度を通常より高く保持することで、安全な水の供給に努めた。浄水場はろ過施設を有していた。

仙台市水道局(仙台市内)では、取水しているダム上流に下水処理場はなく、水質の悪化もみられなかった(仙台市水道局、私信)。県外より応援に駆けつけた給水車は、仙台市内の浄水場の浄水を安全な水として運搬し、給水に用いることができた。仙台市水道局の管理下にありダム以外から取水している小規模の浄水場では、膜ろ過が導入されていて、もしクリプトスポリジウム等が原水に混入した場合でも膜処理により除去できた。上流側の下水施設に被害がなかった。なお、管理下ではない小規模の井戸で、工業排水の流入が生じたとの情報があり、全ての水が安全とは限らなかったと聞く。

震災後の県内の感染症は、避難途中の負傷や津波などによる破傷風7例、津波の泥や水によるレジオネラ症2例の報告⁷⁾、避難所でインフルエンザ集団感染の報告⁸⁾があった。また、震災1週間は創傷、2週目以降は感染症が増え31日までの疾患は呼吸器感染症が67%を占めたとされている⁹⁾。

感染性胃腸炎などの集団発生は宮城県内では認められず¹⁰⁾、福島県では封じ込めに成功し

た事例が報告されていた。インフルエンザやノロウイルスなどの感染性・伝播性の高いウイルス感染症がみられたが、医療従事者、公衆衛生担当者、被災者自身、ボランティアらの尽力があり、ハイチ地震のコレラのような水系感染症の大流行には至らなかった。ハイチの場合は、マンホール等に溢れている汚水が混入しているだろう水を使わざるを得ない厳しい環境下にあった¹¹⁾¹²⁾。もし汚水が混入していても、手元で塩素剤を用いて塩素消毒を行えば、コレラは防げたのかもしれない。そのような劣悪な環境に追い込まれないための、迅速な給水や支援が求められており、東日本大震災では給水車による給水やペットボトルの供給によってそのような劣悪な環境は防がれたと言えた。

C2 従属栄養細菌の指標性に関する研究

東京都水道局の主要浄水場11か所と45か所の自動水質計器設置地点を対象とし、従属栄養細菌数を測定した(図2)。各浄水場原水の従属栄養細菌数は3年間ほぼ同レベルで、原水及び工程水の検出数は培養2～3日で急激に増加し、7日以降は増加割合が減少する傾向があった(図3)。地下水及び伏流水が $10^0 \sim 10^3$ cfu/mL、多摩川水系上流域、相模川水系が $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL、荒川、江戸川流域が $10^4 \sim 10^6$ cfu/mLであった。

通常処理及び高度処理の浄水では、従属栄養細菌の検出数は10個/ml未満であったが、20年度に東村山浄水場、21年度に小作浄水場において各一回ずつ10個/mlを超える値が検出数されている。(表2)。浄水の検出状況は、3年間を通してほぼ同様となっており、浄水処理が安定していると考えられた。境浄水場では、他の浄水場よりやや高い値が検出しているが、緩速ろ過処理の生物処理に由来すると考えられた。砧と砧下浄水場では膜処理が行われているが、サンプリング管の影響と想像された。

給水栓水の検出数は、培養7日から14日の間で急激に増加し(図4)、これは原水とは異なる傾向にあった。浄水場原水の検出値において

は、7日目から14日目の増殖率は高くないことから、増殖速度の遅い細菌の優占、細菌の塩素消毒のダメージによる増殖の遅延などが考えられる。23区の45地点の7日目の陽性率は40～60%程度だったのが、14日目には陽性率90%以上となった(表3)。7日目から14日目の変化については、過去の調査研究においても同様の結果が得られていた¹³⁾。方法の統一あるいはこれまで得られているデータとの整合の観点からは、試験方法としては20℃7日間の培養条件が好ましいと考えられた。一方、できるだけ増殖が定常状態になった検出数を把握するとした場合、現時点の条件の変更を最小限とするのであれば、20℃14日が好ましい。実務的な試験期間を考慮し、菌叢が異なることが確認できれば、25℃7日も考えられた。

自動水質計器が設置されている採水地点直近の配水管路の経年数と、従属栄養細菌の検出数について比較した(図5)。必ずしも、管路が古ければ従属栄養細菌の検出数も高いというわけではなかったが、7日培養の結果で、わずかに従属栄養細菌の分布が経年変化で高い方に広がる感触もあった。以上の通り、浄水と給水栓水では検出数が低く、適切に管理されれば、長期にわたり維持することは可能と言えた。

桐生市水道局では平成19年度、20年度ともに、採水地点9～11において検出数が高く季節変動もうかがわせた(図6、図7)。検出数の多い理由として、給水栓蛇口の汚染、「凝集沈澱＋急速ろ過」を行っていないこと(原水が地下水であること)、配管の状態などが考えられた。採水地点9の原水である第8水源は、平成18年から硝酸態窒素が不定期に上昇する傾向が見られ、継続的に監視を行っていた。平成19、20年度の従属栄養細菌数と、硝酸態窒素との相関を見たところ、硝酸態窒素が増加すると従属栄養細菌も同様に増加する傾向があった(図8)。汚染が付加されると微生物が増殖する栄養となるため、採水地点9の従属栄養細菌数の増加は原水の汚染に起因し、配水の間増殖したことが示唆された。この場合は配水系の管理というよ

り、原水の管理に注意が必要と考えられた。

平成23年度に採水地点9～11で実施した結果では、冬季に測定したため全般的に測定値は低い傾向にあったが、採水地点11は161cfu/mlと高い値に対して、第10配水場は2cfu/mlと少なく、再増殖等が懸念された(図9)。今後、第5配水場と不二山配水場の検査をおこなって、詳細を明らかにしたい。なお、第10配水場から不二山配水場への直接のルートと第5配水場を経由するルートのどちらも同時に使用しており、一方のみに切り替えることはなく、死水は存在しない。流量については変動はあるが、これは地下水系に限らず表流水系の配水についても同じと言えたことから、流量の問題でもないと思現時点では考えられた。

C3 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(プラグフロー装置)を昨年度に開発した。これが有効に機能していることを検証するために、大腸菌フェージQ β の塩素消毒の結果を示す(図10)。バッチ実験の結果と開発した装置の不活化速度は同じであり、非常に短い(0.7秒)接触時間における不活化を測定することに成功した。

次いで、オゾンによるポリオウイルス不活化実験を行った(図11)。0.1ないし0.2mg/Lの低いオゾン濃度で、2～4-log以上のポリオウイルスの不活化された。まず0.7秒後に3Log近い不活化が生じて、3秒後にはポリオウイルスは検出限界以下となった。従来の方法では不活化を定量的に測定できないが、今回用いた装置により不活化曲線を得ることが可能となったことがわかる。また、PCR法による測定では、ブラック法と異なり、0.5Log程度の不活化しか観察されていない。これは、ウイルスの不活化が生じても遺伝子の断片は残存しているためと考えられる。

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)検出のELISA法の代替となる

immuno-PCR 検出系を昨年度に構築したが、検出感度が同程度にとどまっていた。今年度はこれを改良することで高感度化を目指した。図 12 に immuno-PCR 法のフローを示したが、多数の検討を行った。すなわち、一次抗体を固相化するプレートの変更、使用する一次抗体二次抗体の変更、抗原抗体反応の条件、PCR 条件等。最終的に得られた immuno-PCR 法による VLPs の検量線と従来の ELISA 法を図 13 に示した。従来の ELISA 法では 10^9 particles/mL 以上の濃度にて VLPs を定量可能に対し、immuno-PCR 法では $10^5 \sim 10^6$ particles/mL 程度まで VLPs を定量可能であった。immuno-PCR では $10^9 \sim 10^{11}$ particles/mL の範囲において、リアルタイム PCR の Ct 値に VLPs 濃度に対する大きな濃度依存性が確認された。さらに、 10^9 particles/mL 以下の濃度範囲でも、傾きが小さくなるものの、 $10^5 \sim 10^6$ particles/mL 程度まで濃度依存性が確認された。途中で折れ曲がっているところなど検討の余地はあるかもしれないが、再現性良くこのような線が引けた。以上より、改良した immuno-PCR 法は ELISA 法での定量下限値の $1/1,000 \sim 1/10,000$ 程度まで VLPs が定量できるようになった。今後、この定量法を用い、ノロウイルスの浄水処理性の評価を行う予定である。

C4 耐塩素性病原微生物の研究

C4-1 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は、昨年度の検証でろ過水量、捕捉性能、回収率を検討し、使用可能な結果が得られていた。しかしながら、ろ過の開始時に、空気を抜くための下から上への通水の操作があり、そこで支持体が浮き上がり、その後ろ過を開始しても粉体のろ過層が適切に形成されずに捕捉性能が低下するという、ろ過にとって致命的な問題が指摘されていた。この問題の改善は製造に際し、メインフィルターの支持体を濾紙から不織布に変更し強度を上昇させたこと、製造時の締め付け圧力の不備を解消させることにより行われ

た(図 14)。神奈川県企業庁と浜松市でこのカートリッジを使用して浄水をろ過し、支持フィルターが再び浮き上がることはなかった。また、24 時間に $220 \sim 340$ L のろ過濃縮が可能で(図 15)、浄水検査の標準である 20L に十分量が濃縮されることが改めて確認された。昨年度の試験でフィルターが浮き上がった場合、固定オーシストの捕捉性能は $71 \sim 82\%$ に低下したが、今回は問題なく、捕捉性能は $87 \sim 114\%$ に改善回復した(表 4)。ケーキ層を安定して形成することの重要性が改めて指摘された。この捕捉性能評価では塩酸溶解後の試料を直ちに観察用フィルターにろ過して染色観察を行った。精製なしでも、アップルグリーンに光るオーシストを計数することが可能で、短時間での試験が応急対応に適していると考えられた。免疫磁気ビーズ精製後の回収率は、原水において $54 \sim 81\%$ が得られ、他の濃縮方法と比べて遜色ない結果であることが改めて確認された(表 5)。

ろ過の際に残留した配管等の汚染が、次のろ過のクロスコンタミネーションを引き起こし問題となる。当該研究でろ過補助装置として使用しているクリプトスポリジウムサンプリングシステムの、洗浄と汚染の残留について検討を行った。まず、高濃度の蛍光ビーズをろ過濃縮することで配管を汚染した(表 6、①蛍光ビーズ検体)。マニュアル記載の方法に従って 0.3% Tween80 で配管洗浄した後で、やや小さい直径 $2.4\mu\text{m}$ の粒子 3 個が検出された(②洗浄後検体)。洗浄後に検出された粒子は小さく、評価粒子は除けたと言えなくも無いが、汚れが残っているという意味で無視できなかつた。小さな蛍光ビーズを汚れとした場合、洗浄除去の効果は 99.97% (3.6-log) と計算された。仮にクリプトスポリジウム 1 個がろ過装置に入ってきた場合、装置を洗浄すれば 99.97% の汚れが洗浄で除かれて、 0.0003 個が次の濃縮物を汚染する恐れがあると計算された。

②洗浄後検体で汚れが検出されたことから、さらにその状態から装置を浄水 999L で洗浄した。少し小さな約 $3\mu\text{m}$ の粒子 2 個が検出された

(③999L 洗浄後検体)。単なる通水では除けなかった。粉体攪拌槽を取り外してスポンジと洗剤で丁寧な手洗い洗浄をした場合、1.7 μm の粒子1個が検出された(④スポンジ洗浄後検体)。手の入る部分として粉体攪拌槽を洗浄したが、配管等の交換はできず、汚れが攪拌槽以外の場所に残っていたと考えられた。洗浄を重ねるにつれ検出される蛍光ビーズの粒子が小さくなっていく現象も観察された一方で、元の評価した大きさの粒子は一度も認められなかった。

以上の結果から、ろ過に使用する装置の汚染は、あまり問題ではないと実験的に言えたのかもしれないが、それでも手の届かない部分がある場合に完全除去は困難なことも実験的に確かめられた。同じ試料を繰り返してろ過する場合には問題は少ないかもしれないが、特に試料間のクロスコンタミネーションが問題となる場合は、分解洗浄できる装置やディスポーザブルな部品の使用、吸引ろ過などの汚れを最小限に抑える工夫が望ましいと考えられた。

浜松市は天竜川より原水を取水しており、ダムから来る細かな粘土質の粒子が問題となる。粉体ろ過法で濃縮物を得ると、細かな粒子が集まって粘土様の状態となり、これを再懸濁することに困難が生じた。この問題は粉体ろ過法に限ったことではないが、粉体ろ過法では強く問題を感じるようになり、再懸濁の方法を検討した。再懸濁を容易にすることを目的に0.1%と1%Tween80の効果を比較したところ、1%の方が0.1%よりも早く懸濁した。次に、1%Tween80と100%PET溶液でペレットの懸濁の早さを比較した結果、100%PETの方が早く懸濁した。100%PETに含まれているピロリン酸ナトリウムの粘土分散作用によると考えられた。次に、50mlと15mlチューブでペレットの懸濁の早さを比較した結果、50mlチューブは15mlチューブよりも早く懸濁できることがわかった。15mLチューブの場合でも、チューブの先をテーブルに数度強く打ちつけてペレットがチューブ底部より剥がしてそれからボルテックスすれば、ペレットをより早く懸濁できた。2種類のミキサーを使い、ペレット

の懸濁の早さを比較した結果、回転半径が大きく勢いの良いミキサーでより早く懸濁できた。

C4-2 国内産蛍光抗体試薬の染色試験

大原浄水場原水に添加回収したクリプトスポリジウムとジアルジアを定法に従い、観察用PTFEフィルター上で蛍光抗体染色し、国産の蛍光抗体試薬と外国産の試薬による染色像を比較した。染色当日ではいずれの抗体でもクリプトスポリジウムとジアルジは明るく発色した(図16)。従来、外国産の蛍光抗体染色試薬はジアルジアが暗かったが、国産ではそれと異なり、ジアルジアがクリプトスポリジウムと同じくらい明るく発色して観察が容易だった。原水由来の夾雑物が存在しても、発色の明るさは損なわれることなく、同程度に感じられた。7日後の観察では、いずれも若干の退色が見られるものの、問題なく観察することができた。試験した範囲で、クリプトスポリジウム等検査の障害になるような、想定外の粒子が染色されることは無かった。

C4-3 退色防止剤の検討

種々の退色防止剤で封入したジアルジアの、B励起光照射直後と15~60秒経過後の蛍光像を図17に示した。高pHの緩衝液を使用することで、FITCの蛍光強度が強く明るくなった。グリセロールの濃度が高まるに従い、退色が防がれた。PTFEメンブレンフィルターの透明度に影響しない濃度(10~15%)のグリセロールを加えることで、従来のDABCO/PBSに比べて、退色防止効果の高い封入が可能となった。

C4-4 クリプトスポリジウム、ジアルジア遺伝子検出法における検量線の作成

濃度既知の合成遺伝子を使ってRT反応のないリアルタイムPCRを行い、検量線を作成した。一方、オーシスト抽出試料に対してはRT反応後にリアルタイムPCRを行い、オーシスト内の18S rRNAから逆転写反応で得られるcDNAのコピー数を定量した。

TaqManプローブ法におけるクリプトスポリジ

ウムの検量線を図 18 に示す。オーシスト由来の cDNA、合成遺伝子ともに、Ct 値の変動は少なく、直線性の高い検量線が描けた。オーシスト 1 個を得られた式 ($y = -1.585\ln(x) + 20.869$) に代入すると Ct20.87 となり、合成遺伝子の式 ($y = -1.543\ln(x) + 36.56$) に Ct20.87 を代入すると鑄型量として 26,000 コピーと計算された。なお、式の傾きがおよそ揃っているため、オーシストと合成遺伝子とにかかわらず増幅効率も近く、合成遺伝子による検量線の代用は可能と考えられた。

サイクリングプローブ法では、精製した日が異なるオーシストの冷凍サンプルを 8 サンプル使用したが、変動が少なく、増幅効率も陽性対照の増幅効率とほぼ同じであった。RT-PCR 後の 1 オーシストは、陽性対照 18,000 コピー相当となった (図 19)。すなわち、オーシスト 1 個を式 ($y = -1.435\ln(x) + 24.605$) に代入すると Ct24.61 となり、合成遺伝子の式 ($y = -1.433\ln(x) + 38.67$) に Ct24.61 を代入すると 18,000 コピーと計算された。

TaqMan 法はサイクリングプローブ法の 18,000 コピーより 1.4 倍ほどコピー数が多い 26,000 コピーと出たが、定量値が大きく変動しやすい生物関係の結果にしては 2 倍の範囲内に収まっており、概ね同じ結果と言えた。差が生じる理由としては RT の効率、あるいは qPCR の効率による変動等が考えられ、qRT-PCR の反応系毎に検量線の確認を行えば良いと考えられた。いずれにしても 1 オーシストあたりの rDNA コピー数¹⁴⁾ 20 コピーに比べれば 3 桁多く、逆転写反応で rRNA を cDNA に変換し、高感度化が可能であることを改めて確認した。

サイクリングプローブ法ではジアルジアの検量線も作成した。冷凍 8 サンプルを用い、増幅効率は陽性対照の増幅効率とほぼ同じであったが、冷凍サンプル間でシストの個数と Ct 値の相関にバラツキがあった。感染動物から排出されるシストの品質が一定ではないことを顕微鏡下で観察していたことから、シストの活性によって変動が生じたと考えられた。8 サンプル中、個数と Ct 値

の関係が他のサンプルと明らかに異なる 3 サンプルを除き、陽性対照の検量線と同等の傾きで相関係数が良い 5 サンプルの結果を用いて算出した。その結果、RT-PCR 後の 1 シストは、陽性対照 1,600 コピー相当となった。すなわち、シスト 1 個をシストの式 ($y = -1.424\ln(x) + 29.262$) に代入すると Ct29.26 となり、合成遺伝子の式 ($y = -1.367\ln(x) + 39.363$) に Ct29.26 を代入すると 1,600 コピーと計算された (図 20)。この値は、先に報告した 1 シストあたり 18S rDNA の 1,008 コピーに比べて¹⁵⁾、値が近くて感度向上の効果が少なく、rRNA を鑄型にしているというより rDNA を鑄型にしているのに近いと言える程度であった。一見、クリプトスポリジウムに比べてケタ違いの結果に見えるが、オーシストは 4 つのスポロゾイト(細胞)が含まれることがジアルジアと異なる。1 スポロゾイト(細胞)あたりでは 5,000 コピー程度と計算され、ジアルジア 1 シスト(細胞)あたりとは、桁違いでは無く数倍の範囲におさまった。

C4-5 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検討

遺伝子検出法はまだ実績が少ないことから、河川等試料水からのクリプトスポリジウム等検出を積み重ねている。

国立保健医療科学院では 30 箇所の浄水場の協力を得て水道原水を検査した結果、顕微鏡観察による検出率は 50% (= 15/30) であった (表 7)。1 地点で 440 oocysts/10L という極めて高濃度の汚染が確認され、短期的に高濃度の糞便汚染が発生したと考えられた。リアルタイム PCR 法と LAMP 法の定性的な検出結果は完全に一致し、全ての陽性試料からクリプトスポリジウムの塩基配列が得られ、遺伝子検査法の特異性に問題はなかった。検出濃度は一部の試料で 0.04 oocysts 相当/10L など極端に低く、環境中で損傷し、標準試料に比べて核酸 (RNA 分子の数) が少ないクリプトスポリジウムオーシストが検出されたと推測された。この現象は、過去の調査においても確認されている¹⁶⁾。

遺伝子検出法は顕微鏡観察法と同程度の43% (= 13/30)の頻度でクリプトスポリジウムを検出できたが、顕微鏡観察と遺伝子検査法の定性的な検出結果は必ずしも一致しなかった(表8)。その理由として、試料中のオーシスト濃度が低い場合は偶然片方の検査試料にしかオーシストが入らない可能性が考えられた(表9)。試料中に複数存在する分子を検出する化学物質の検査と異なり(どんなに低濃度でも多数の分子が存在し、分子1個を検査することはない)、クリプトスポリジウム検査はたった1個前後の粒子の存在を確認することが求められる。濃度としての挙動よりも粒子としての挙動に注意を要する検査法となっていることが改めて強調された。10Lを5Lに分けた今回の試験では、もし10Lに1個しかなければ、顕微鏡法か遺伝子検出法か、どのようにしても一方の検査でしか陽性の結果は得られない(表9)。同様に、2個なら50%、3個なら25%の確率で不一致と確率論的に計算される。

検出結果が方法間で一致しなかった10試料(全体の33%)については、1試料を除き500cysts/5L以下の濃度であり、確率論的なばらつきは避けられないと考えられたが、低濃度であっても顕微鏡法と遺伝子検出法の検出頻度は同程度であった。検査数が少ないので確定的なことは言えないが、遺伝子検出法の感度や精度に大きな問題はないと示唆された。

この確率の問題を解消するには、複数回のサンプリングが有効と考えられた。仮に1個のオーシストしか含まれていない試料を2分割して一方を試験した場合でも、3回実施すれば9割近い確率で、確実に陽性の結果が得られる(表10)。もちろん、1個/10Lより低濃度な場合には、そのような単純な結果にはならず、数回に1回陽性になるといった状況も想像される。ちなみに、解決方法に検査水量の増加を想定した場合、100Lに10個の場合は安定かもしれないが、100Lに1個の場合はやはり、ばらつきから逃れられない。クリプトスポリジウム検査の意義を鑑みれば、低い汚染を正確に定量することが求めら

れるのではなく、未対策の施設において汚染の有無を確実に定性的に判定すること、あるいは対策済み施設において一時的な高濃度の汚染を定量的に検出することを目的に、頻回に検査を行うことが重要と考えられた。

遺伝子型判別用 Nested PCR およびシーケンス解析を実施した結果、表11に示すとおり、7サンプルで遺伝子増幅と塩基配列の解読に成功し、3試料の遺伝子型がヒトへの感染が報告されていた¹⁷⁾。

神奈川県衛生研究所で実施された神奈川県内の河川水検査では、顕微鏡検査でオーシスト数が10Lあたり3個および6個であった河川水において、サイクリングプローブ法 qRT-PCR で0.4個相当、0.3個相当が検出された(表12)。濃度は低くても汚染を的確に捉えており、検査目的は達成したと考えられた。遺伝子検出法は、多数の試料を一度に反応することが可能なことが利点と期待された。

神奈川県内広域水道企業団では、クリプトスポリジウムの検鏡法とLAMP法の河川水試料における一致率は63.2%と平成22年度の結果とほぼ同等であった(表13)。ただし、検鏡法でクリプトスポリジウム数が5個以上検出(6事例)された試料における3法の一致率は100%であったのに対して、検鏡法の結果が10L中5個以下検出(13事例)では3法一致率が低かった(一致率30.8%)。不一致の理由は前述のとおり、低濃度サンプルで生じるばらつきと考えられた。遺伝子試験2法間では、一致率が94.7%(19試料中18試料)と高かった。

平成23年度の調査におけるジアルジアの3方法の一致率は、36.8%と平成22年度と同様低かった(表14)。クリプトスポリジウム同様に、遺伝子増幅の特異性等よりも、検鏡法での検出数が1~2個/10Lと少なかったことが低い一致率の原因と考えられた。当初、遺伝子試験2法間の一致率が78.9%(19試料中15試料)とクリプトスポリジウムの結果と比較して少し低い程度であったが、再試験で不一致試料が一致(反応陽性)に転じた。試料中のジアルジア量が検出限界付

近(高い Tt 値、Ct 値)で結果が安定しないことが理由と考えられ、複数回の反応は不安定の回避に有効と考えられた。

畜産施設のクリプトスポリジウムでは 6 試料中 5 試料で 3 法(一致率 83.3%)の結果が一致した(表 15)。一致しなかった試料(35 個/mL)は、排水処理原水試料で、検鏡法では検出されたが、両遺伝子方法では当初は陰性であった。阻害物質の影響と推測され、結果には示さないが、試料に標準試料核酸も添加した反応で阻害を確認した。この時の対照試験と別の追試で、陽性反応が得られた(表 15 の*1~*3)。結果に偏りが生じており、核酸の抽出と分散の不完全も理由として考えられた。この検討結果からも、複数回の反応は不安定を回避するのに有効と考えられた。ジアルジアは、全ての試料で 3 法とも不検出で一致した(表 15)。

RT-PCR 法で得た増幅産物の塩基配列を決定したところ、クリプトスポリジウムからは *Cryptosporidium parvum* の塩基配列が得られ、ブタ由来の配列(DQ898160)にほぼ一致した(表 13)。ジアルジアは、全ての試料で *Giardia intestinalis* の配列が得られた(表 14)。4/4 社家右岸及び 4/4 中津川再試験は有蹄類特有の Assemblage E が、それ以外は、ヒトやその他の動物が感染する Assemblage A であった。

東京都健康安全研究センターでは、LAMP 法の特異性と手技の簡略化の兼ね合いを見る目的で、免疫磁気ビーズ法の塩酸解離を行った場合と、行わずに結合状態から核酸抽出した場合の 2 通りを行った(表 16)。

クリプトスポリジウム検鏡法では、No.16 のみ 1 オーシスト検出された。16 は再反応でも結果が揃わなかったが、LAMP 法の Tt 値が高く、鋳型量が極めて少ないことが理由と考えられた。結果には示さないが、RT-LAMP 陽性産物をアガロースゲル電気泳動で解析した結果、全てクリプトスポリジウムに由来する反応であった。RT-LAMP に用いる核酸抽出液量は、5 μ L よりも 2 μ L の方が陽性率が高く、偽陽性もないこと

から、2 μ L が適していると考えられた。qRT-PCR で陽性となった 4 検体について、PCR 及び塩基配列解析を行った結果、No.5、12、15 が *C. suis* (Accession No. JF710259.1)、No.14 が *C. parvum* genotype2 (Accession No. HQ651731.1) の配列だった。

ジアルジア検鏡法では、No.12 のみ 1 シスト検出された。qRT-PCR は 2 回目の反応で陽性となったが、この場合も LAMP 法の Tt 値が高く、鋳型量が極めて少ないと考えられた。RT-LAMP 陽性産物をアガロースゲル電気泳動で解析した結果、ジアルジアに由来するパターンを示さず偽陽性があった。酸解離を行わなかったサンプルからは偽陽性は見られなかった。昨年度の検討においても、同様の傾向だったことから、今後はジアルジアの LAMP 法には酸解離せずに核酸抽出を行うべきと考えられた。塩酸解離後の試料は 0.1M の NaCl が含まれる計算で、遺伝子増幅では一般に反応液中の塩が多いと正確性は低下することが知られており、塩の持ち込みが問題と想像された。RT-PCR では、RT 反応液の 2 割しか PCR に持ち込まれず希釈されることから、塩濃度は問題にならなかったと考えられた。また、ジアルジアは RT-LAMP でなく LAMP による検出が適していると考えられた。昨年度の検討においても RT-LAMP は偽陽性の傾向にあった。ジアルジアは標的遺伝子のコピー数が多く、実試料で感度が足りていることから、現状では RT のない LAMP で十分と考えられた。

東京都水道局の試料分では、検鏡でのクリプトスポリジウム陽性は半数の 9 試料で、この 9 試料は遺伝子検出法の qRT-PCR と RT-LAMP 法のいずれも陽性の結果が得られた(表 17)。残り半数の顕微鏡陰性では、そのほとんどで遺伝子検出法が陽性となり、形態観察されない壊れたクリプトスポリジウムの検出と考えられた。一方、ジアルジアの顕微鏡陽性については遺伝子検出法との一致が少なく、当該試料中のジアルジアは核酸が分解された恐れが考えられた。東京都の 2 施設間で核酸抽出試料を共有し、異な

る遺伝子検出法を試し、ほぼ揃った結果が得られた。

大阪市水道局では、事業所排水を対象に試験した。検鏡ではクリプトスポリジウムは検出されなかったが、qRT-PCR 法では事業所排水 B でクリプトスポリジウムが検出され、qRT-PCR 法の検出感度が高いことが理由と考えられた(表 18)。いずれの事業所排水においてもジアルジアが検出され、定性結果に差異はなかったが、定量結果は検鏡法に比べて qRT-PCR 法では低く、qPCR では高く検出された(表 19)。以上のことから、遺伝子検査法については定量性が課題として挙げられた。9月1日および9月6日の事業所排水の qRT-PCR 法によって増幅された産物の配列はクリプトスポリジウムおよびジアルジアで、確認した範囲で反応特異性に問題はなかった。

クリプトスポリジウム検査は、顕微鏡検査も含め、どの方法で検出するとしてもバラつきが大きい傾向と考えられた。今回使用した排水処理を経たクリプトスポリジウムやジアルジアは正常な状態を維持しているとは限らず、ますます誤差を生じさせると考えられた。いずれの試験法でも同じ結果が得られると期待して試験を行えば、陽性・陰性の定性判定や定量に混乱が生じる恐れがあり、その性質を理解した上で使用する必要が指摘された。検査法の原理が違えば結果が違うのは当然で、一方、原理の違う検査法を組み合わせれば、併用により客観性や測定精度を高めることができると考えられた。

D. 結論

D1 東日本大震災と水道の微生物学的安全性

水源の上流にある下水処理施設の被害が少なく、通常の処理が行われ、浄水処理も可能だったことから水道水の微生物学的な安全性に直接の影響が出なかった。沿岸部ではその付近に浄水場の取水がなく、マンホールからの溢水にも対応がなされた。影響が生じなかったのは幸いであって、次の災害が同じ程度に済む保証はなく、注意を要すると考えられた。水道水の供給

再開は急がれることは明らかであり、理化学試験による迅速な判定が求められた。被害状況が不明な大規模災害においては、微生物検査はリアルタイムな検査結果が得られないが、外部からの支援による微生物検査の実施が望ましいと考えられた。原水に汚染が生じた場合をあらかじめ想定し、小規模な浄水場では紫外線や膜処理などの高度処理を導入しておくこと、あるいは対策済み浄水場では塩素消毒やろ過の徹底と濁度の監視が重要と考えられた。水質検査では対応できない状況も考えられ、災害時の水質低下の恐れへの周知や、迅速な再開のための判断基準の整理も重要と考えられた。

D2 従属栄養細菌の指標性に関する研究

従属栄養細菌が検出されても目標値より低く、全般的に良好に管理されていると言えた。配水管敷設経過年数と検出数の関係については、明確な相関は見られなかったが、年数の長い管で、特異的に検出数の高い地点も見られたことから、何らかの条件がそろった管において年数が影響する可能性も考えられた。塩素消毒のみで配水された採水地点は、ろ過処理された場合に比べて、従属栄養細菌数が多い傾向があった。従属栄養細菌数と硝酸態窒素との関連が示唆された。配水場から採水地点の間に菌数増加した地点を見出した。今後、途中配管の詳細を明らかにすることで、管理の向上が期待された。

D3 腸管系ウイルスに関する研究

従来は15秒以上の消毒剤の接触時間しか観察できなかったが、新しく開発したプラグフロー装置により、接触時間0.7秒の消毒を観察が可能となった。オゾンによるポリオウイルスの不活化曲線が精度良く得られた。この装置のウイルス不活化試験への活用が期待された。immuno-PCR法の改良により、ELISA法での定量下限値の1/1,000~1/10,000程度までVLPsが定量可能となった。ノロウイルスの浄水処理性の評価への活用が期待された。

D4 耐塩素性病原微生物の研究

D4-1 粉体ろ過法の検証

神奈川県の水浄水と水道原水に対して粉体ろ過を実施し、捕捉性能、回収率ともに良好な結果が得られた。ろ過ユニット内でフィルターが浮く問題が生じたが、改善され、捕捉性能も上昇した。ケーキ層を安定して形成することが捕捉性能の維持に重要であることが改めて指摘された。浄水においても、十分なる過水量が得られ、捕捉性能に問題はなかった。利便性が高く、応急対応の大容量の水浄水を処理可能となることに期待が持たれた。粉体ろ過の流路の洗浄は、0.3%Tween80を用いた方法で効果的に洗浄できることが確認できた。一方で、細かな汚れは残留し完全には除去できないことも明らかとなった。同じ試料を繰り返してろ過する場合には問題は少ないかもしれないが、特に試料間のクロスコンタミネーションが問題となる場合は、分解洗浄できる装置やディスポーザブルな部品の使用、吸引ろ過などの汚れを最小限に抑える工夫が望ましいと考えられた。粉体ろ過濃縮後の遠心沈殿で生成する固いペレットの問題では、100%PETの使用、50mL 遠心管の使用、チューブを叩いて沈殿物を浮かせること、より強いミキサーで攪拌することが、懸濁方法としては最善と考えられた。

D4-2 国内産蛍光抗体試薬の染色試験

国内産蛍光抗体試薬を用いて、クリプトスポリジウムとジアルジアを問題なく染色できた。原水より添加回収したクリプトスポリジウム等でも問題なかった。適用数が少ないが、水道事業体などで通常行われる原水を対象としたクリプトスポリジウム検査に活用されると期待された。外国産試薬よりジアルジアが明るく染色され、観察が容易であった。試験した範囲で、クリプトスポリジウム等検査の障害になるような、想定外の粒子が染色されることは無かった。

D4-3 退色防止剤の検討

封入剤の緩衝液を PBS (pH7.4) から高 pH

の 0.5M carbonate-bicarbonate buffer (pH9.0) に変えることで、蛍光強度が増大した。また、PTFE メンブレンフィルターの透明度に影響しない濃度 (10~15%) のグリセロールを加えることで、従来の DABCO/PBS に比べて退色防止の効果が高まった。

D4-4 クリプトスポリジウム、ジアルジア遺伝子検出法における検量線の作成

リアルタイム PCR 法におけるクリプトスポリジウムとジアルジアの定量を目的に、陽性対照の遺伝子断片より検量線を作成した。クリプトスポリジウム 1 オーシストあたりの 18S rRNA 量は、TaqMan 法で 26,000 コピー、サイクリングプローブ法で 18,000 コピーに相当すると計算された。ジアルジア 1 シストあたりでは、サイクリングプローブ法で 1,600 コピーに相当すると計算された。

D4-5 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検討

遺伝子検査法は、顕微鏡観察と同程度の検出率であった。方法間に結果の不一致が見られたが、低濃度のクリプトスポリジウム検出は確率的な問題を含むことを計算で示し、頻回の試験がその解消に有効と考えられた。遺伝子検出法間の結果がほぼ一致し、塩基配列はクリプトスポリジウム、ジアルジアの配列が得られ、遺伝子検出法の特異性に問題はなかった。遺伝子型は多様で、ブタ由来やヒトへ感染する可能性のある型が確認された。様々な河川水、畜産排水、事業所排水からクリプトスポリジウム、ジアルジアが検出された。ジアルジア検出には、RT-LAMP よりも LAMP が適しており、また、酸解離処理を行わずに核酸抽出することが推奨された。2 施設間で核酸抽出試料を共有し、異なる遺伝子検出法を試し、ほぼ揃った結果が得られた。クリプトスポリジウム検査は、顕微鏡検査と遺伝子検出法といずれの試験法でも同じ結果が得られると期待して試験を行えば、陽性・陰性の定性判定や定量に混乱が生じる恐れがあり、それぞれ試験の性質を理解した上で使用する必要が指摘さ

れた。検鏡不検出・遺伝子陽性で遺伝子検出法が高感度であったり、検鏡陽性・遺伝子不検出で核酸の分解が生じていたり、顕微鏡の形態が壊れていたり遺伝子検出法の反応阻害が生じたりすることも考えられた。検査法の原理が違えば結果が違うのは当然で、一方、原理の違う検査法を組み合わせれば、併用により客観性や測定精度を高めることができると考えられた。遺伝子検出法は同時多数の検体処理が期待された。

E. 参考資料

- 1) 気象庁,http://www.seisvol.kishou.go.jp/eq/gaikyo/monthly201103/20110311_to_hoku_1.pdf (平成 24 年 3 月 5 日確認)
- 2) Lee, S. H. and Kim, S. J., (2002) Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban area in Korea, *Water Research*, **36**(1), 248-56.
- 3) 厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「顧みられない病気に関する研究(研究代表者:野崎智義)」より平成 22 年度分担研究報告書「抗リアルジアルモノクロナル抗体の性能評価と ELISA 法への応用(研究分担者:八木田健司)」
- 4) Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T. and Endo, T.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan, *Parasitol. Res.*, **87**, 950-955 (2001)
- 5) 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、2010、181-189
- 6) 金子光美：震災時における水の安全対策に関する研究 (2002 年 3 月), 科学研究費補助金研究成果報告
- 7) 渥美亨, 後藤郁男, 佐藤由紀, 沖村容子: 震災後の宮城県における感染症発生状況とリスク評価, 病原微生物検出情報, **32**, S4(2011)
- 8) 押谷仁, 神垣太郎, 岡本道子, 当広謙太郎, 大谷可菜子, 貫和奈央, 鈴木陽: 東日本大震災後の仙台市およびその周辺でのインフルエンザのモニタリング, 病原微生物検出情報, **32**, S6(2011)
- 9) 國島広之, 具芳明, 山田充啓, 猪股真也, 石橋令臣, 金森肇, 遠藤史郎, 青柳哲史, 八田益充, 徳田浩一, 北川美穂, 賀来満夫, 新井和明, 矢野寿一, 平瀧洋一: 病原微生物検出情報, **32**, S5(2011)
- 10) 宮城県保健環境センター: 宮城県感染症発生動向調査情報, Vol.10-23 (2011)
- 11) TIME,http://www.time.com/time/photogallery/0,29307,1954087_2025626,00.html(平成 24 年 3 月 19 日時点)
- 12) TIME,http://www.time.com/time/photogallery/0,29307,1954087_2025846,00.html(平成 24 年 3 月 19 日)
- 13) 保坂ら (2001) 水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討 東京衛研年報 **52** p245-249
- 14) Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G. A., Xu, P., Bankier, A. T., Dear, P. H., Konfortov, B. A., Spriggs, H. F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L. and Kapur, V.: Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*, *Science*, **304**, 441-445 (2004)
- 15) 平成 21 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「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究(研究代