

泉山信司, 佐々木美江, 東日本大震災における水道水の微生物学的安全性, 第 12 回 環境技術学会 年次大会, 2012 年, 滋賀県草津市

勝山志乃, 泉山信司, 百田隆祥, 岸田小百合, 河川表流水における原虫類の遺伝子検査法と検鏡による従来法の比較, 日本水処理生物学会第 49 回大会, 平成 24 年, 東京都

渡邊 洋大, 齊藤 巧介, 上村 郁子, 北村 壽朗, 神奈川県企業庁における粉体ろ過法の検討, 第 63 回全国水道研究発表会, 2012 年, 島根県松江市.

Kimura, M., Matsui, Y., Takahashi, T., Oshiba, A., Machida, K., Shirasaki, N. and Matsushita, T., Precoagulation by basicity-optimized polyaluminum chloride effectively reduces membrane fouling. IWA Particle Separation Conference, Berlin, Germany, 18–20 June 2012.

Kimura, M., Matsui, Y., Oshiba, A., Ishikawa, T. B., Machida, K., kondo, K., Shirasaki, N. and Matsushita, T., Basicity-optimized polyaluminum chloride to minimize dissolved residual aluminum concentration. IWA Particle Separation Conference, Berlin, Germany, 18–20 June 2012.

高橋知也, 木村正興, 中川翠, 松井佳彦, 白崎伸隆, 松下拓, ポリ塩化アルミニウムの塩基度が膜ろ過性能に及ぼす影響. 第 47 回日本水環境学会 年会, 大阪, 2013/3/11-13.

中川翠, 木村正興, 高橋知也, 松井佳彦, 松下拓, 白崎伸隆, ポリ塩化アルミニウムの塩基度が膜ろ過水質に及ぼす影響. 第 47 回日本水環境学会 年会, 大阪, 2013/3/11-13.

近藤健太, 大芝淳, 木村正興, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, ポリ塩化アルミニウムの塩基度と高分子組成が残留アルミニウム濃度に与える影響. 第 63 回全国水道研究発表会, 松江, 2012/5/16-18.

阿部晃文: 多摩川流域におけるタミフルの実態調査, 平成 24 年度日本水道協会関東地方支部水質研究発表会 (2012.11).

Akifumi A. : Monitoring of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Phosphorous Fire Retardants in the Tama River Basin in Japan. The 9th International Symposium on Water Supply Technology (2012.11).

加々爪郁子, 細田耕: 花火大会に起因する過塩素酸の影響調査, 第 63 回全国水道研究発表会講演

集, 2012, 520-521.

小橋川直哉, 田中康夫, 江島英文, 小坂浩司, 浅見真理, 秋葉道宏: 二段階塩素処理によるトリクロロミン生成の抑制効果, 第 63 回全国水道研究発表会講演集, 2012, 276-277.

八木健太, 柳川茂, 佐藤和男: LC/MS 導入による酒匂川農薬監視体制の強化. 平成 24 年度日本水道協会関東地方支部水質研究発表会. 2012.

小林憲弘: 水道水中の農薬類の試験法開発とその妥当性評価. 環境科学会 2012 年会シンポジウム. 2012.

鎌田素之. 水道水源における農薬の検出実態. 環境科学会 2012 年会シンポジウム. 2012.

浅見真理, 小坂浩司. 水道統計に見る農薬測定の実態と浄水処理性. 環境科学会 2012 年会シンポジウム. 2012.

松井佳彦, 岩尾憲祐, 松下拓, 白崎伸隆, 鎌田素之. 水道原水からの検出可能性に基づく農薬類の水質基準分類見直し. 環境科学会 2012 年会. 2012.

小林憲弘, 塚本多矩, 田原麻衣子, 久保田領志, 杉本直樹, 五十嵐良明: 水道における水質管理目標設定項目の候補農薬の LC/MS/MS 一斉分析法の開発. 第 21 回環境化学討論会. 2012.

小林憲弘, 久保田領志, 杉本直樹, 五十嵐良明: 水道水質試験法に関するアンケート調査. 第 63 回全国水道研究発表会講演集. 2012, 600-601.

川寄悦子, 梶田香奈, 中田俊芳, 須戸幹, 鎌田素之: ネオニコチノイド系農薬の水道水質検査法の開発とその適用. 第 46 回日本水環境学会 年会講演集, 501, 2012.

大野浩一, 浅見真理, 松井佳彦, 水質汚染事故時の給水停止に対する住民のパーセプションについて, 第 47 回日本水環境学会 年会講演集, 409, 大阪, 2013/3/11-13.

大野浩一, 浅見真理, 松井佳彦, 給水停止対策に対する住民のパーセプション—アンケート結果より, 日本リスク研究学会第 25 回年次大会講演論文集, 155-158, 彦根市, 2012/11/9-11.

木戸淳基, 新妻瞬, 松井佳彦, 権大維, 伊藤禎彦, 大野浩一, 松下拓, クロロホルム摂取量に対する飲料水の影響と水質基準における割当率, 第 63 回全国水道研究発表会講演要旨集, 538-539, 松江, 2012/5/16-18, 2012

Hirose, A., Takahashi, M., Kato, H., Doi, Y., Hagiwara, A., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Kubota, R. and Nishimura, T. (2012) Repeated dose toxicity of fullerene C60 by gavage for a month in rats. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012.7) (Sendai, Japan).

Hirose, A., Ono, A., Hirata-Koizumi, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Furukawa, M., Kamata, E. and Nishimura, T. (2012) Repeated dose 28-day oral toxicity studies of single- and multi-walled carbon nanotubes in rats. The 48th EUROTOX2012 (2012.6)(Sweden, Stockholm).

Ono, A., Ikeya, M., Suzuki, T., Nishimura, T., Kawamura, T., Takahashi, M., Matsumoto, M., Kato, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A. (2012) A combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening study of perfluoroundecanoic acid in rats. The 52nd SOT Annual meeting (2013.3) (San Antonio, TX, USA).

平田睦子, 藤井咲子, 古川正敏, 川村智子, 高橋

美加, 松本真理子, 加藤日奈, 小野敦, 広瀬明彦. (2012) パーフルオロドデカン酸の反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 第39回日本毒理学学会学術年会 (2012.7) (仙台).

F. 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
(該当なし)
3. その他
(該当なし)

G. 謝辞

本研究課題の遂行に際しては、表 A に示す研究協力者及びその所属組織より協力を頂いた。ここに記して謝す。

表 A

<微生物分科会>

勝山 志乃	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
及川 智	東京都水道局
高藤 俊	浜松市上下水道部
川口 有希子	桐生市水道局
渡邊 洋大	神奈川県企業庁
水野 聰	新潟市水道局
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
岸田 直裕	国立保健医療科学院
遠藤 卓郎	国立感染症研究所
岸田 小百合	タカラバイオ(株)ドラゴンジェノミクスセンター
大西 卓宏	(株)環境科学研究所
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
安藤 正典	武蔵野大学

<無機物質分科会>

大野 浩一	国立保健医療科学院
坂本 薫	千葉県水道局
荘司 浩史	茨城県企業局

小林 利男	東京都水道局
森 健次	名古屋市上下水道局
森實 圭二	大阪市水道局
石橋 健二	福岡県南広域水道企業団
比嘉 元紀	沖縄県企業局
上杉 佳寛	社)日本水道協会

<一般有機物分科会>

阿部 進	東京都水道局
阿部 晃文	川崎市上下水道局
今村 康夫	大阪市水道局
川元 達彦	兵庫県立健康生活科学研究所
工藤 幸生	日本水道協会
久保田 領志	国立医薬品食品衛生研究所
小杉 有希	東京都健康安全研究センター
鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター
當山 裕一	大阪市水道局
中町 眞美	阪神水道企業団
灘 重樹	神戸市水道局
服部 晋也	大阪市水道局
原 郁夫	大阪市水道局
深瀬 勝己	大阪市水道局

丸岡 強	仙台市水道局
松井 克肇	大阪市水道局
矢野 美穂	兵庫県立健康生活科学研究所

加登 優樹	広島市水道局
鎌田 素之	関東学院大学
桐山 秀樹	奈良県水道局
小坂 浩司	国立保健医療科学院
小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所
田原麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所
西野 真之	八戸圏域水道企業団
三浦 晃一	仙台市水道局
柳川 茂	神奈川県内広域水道企業団
渡辺 正秀	新潟市水道局

<消毒副生成物分科会>

田中 康夫	阪神水道企業団
鎌田 泰和	奈良県水道局
北本 靖子	大阪市水道局
野本 雅彦	北千葉広域水道企業団
佐藤 賢	茨城県企業局
高橋 和彦	東京都水道局
小笠原 和雄	大阪広域水道企業団
與古田 亨	沖縄県企業局
細田 耕	京都市上下水道局
金井 正和	川崎市上下水道局
小坂 浩司	国立保健医療科学院
越後 信哉	京都大学

<寄与率分科会>

国包 章一	静岡県立大学
柳橋泰生	福岡女子大学
大野 浩一	国立保健医療科学院

<リスク評価分科会>

鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター
西村 哲治	国立医薬品食品衛生研究所
江馬 眞	(独)産業技術総合研究所
小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所
高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所
松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所

<農薬分科会>

相澤 貴子	(公財)水道技術研究センター
在原 潤	千葉県水道局
泉田 翔	茨城県企業局
井上 剛	福岡県南広域水道企業団

平成 24 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	及川 智（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	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)ドラゴンジェノミクスセンター）
研究協力者	大西 卓宏（(株)環境科学研究所）
研究協力者	黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）
研究協力者	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と対応が求められている。

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。災害時対応用貯水槽（飲料水兼用耐震性貯水槽）において、目標値の 2,000cfu/mL 未満ではあるが、数百 cfu/mL と高い従属栄養細菌数が検出され、残留塩素の低下が認められた。下層に低温な水の滞留が生じており、捨て水や攪拌を促す板を導入することで、問題が解消された。従属栄養細菌の検出も 10cfu/mL 未満に低下し、従属栄養細菌の活用例となった。平成 19、20 年に従属栄養細菌の検出数の多かった末端給水栓を平成 24 年に精査した結果、直前の別の給水栓では不検出となり、問題の給水栓付近での増殖と考えられた。塩化ビニールパイプのくり抜きによる配管内バイオフィルムを調査した結果、10cfu/cm² が検出され、配管内バイオフィルムの貴重な実例が得られた。このバイオフィルムは多くないと思われたが、配管 1m（1,600cm²）当たり 16,000cfu 相当の従属栄養細菌が存在する計算となる。その他の測定地点の多くは、検出数はわずかで、浄水配水は清浄に保たれていた。

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。ノロウイルスの膜ろ過における処理性を、遺伝子組換えで作成したノロウイルス VLPs (Virus-like particles) と immuno-PCR による検出法を組み合わせることで評価した。単独ではウイルスを除去できない孔径 0.1 μm の MF 膜であっても、前処理として凝集処理を導入することでノロウイルス(並びに大腸菌フェージ Q β と MS2)も除去され、凝集-MF 膜処理におけるノロウイルスの除去率は 4-Log 以上が得られた。また、RNase 処理 RT-PCR 法により、塩素消毒後の大腸菌フェージ Q β の生残数を比較的良好に定量することが可能であることを明らかにした。

耐塩素性病原微生物の新規濃縮方法の粉体ろ過法において、ろ過濃縮装置に残る汚染を回避する目的で、吸引ろ過方式を検討した。吸引ろ過方式であれば、使用する器具の洗浄が可能であったり、ディスプレイ部品の使用ができるという点で、これまで行なってきた加圧ろ過方式より優れている。検討の結果、加圧ろ過方式と同等の 94% の捕捉率が得られ、ろ過水量も濁度 10 度で 10L 近くと十分な実用性が得られた。遺伝子検出法では、これまでの検証とは別に、導入を目的とした検討が新たな事業体で行われ、qRT-PCR 法の感度に問題はなかった。河川表流水を試料とした添加回収実験でも、遺伝子検出法は検鏡法と同じく検出し、回収率も良好であった。実試料試験では、クリプトスポリジウムで検鏡法とほぼ同一の結果が得られた。水道事業体の協力を得て 30 箇所の水道原水よりジアルジア試験を行った結果、遺伝子検査法と顕微鏡観察は同程度の検出率であった。一部に結果の不一致が見られたが、異なる遺伝子増幅法では結果が一致し、遺伝子増幅産物からジアルジアの配列が得られ、遺伝子検出法に問題はなかった。低濃度のジアルジア検出は、昨年検討したクリプトスポリジウムの時と同様に確率的な問題を含み、頻回の試験がその解消に有効と考えられた。ヒトへ感染する可能性のあるジアルジアの遺伝子型の存在が改めて確認された。

適切に管理されたブタの畜舎排水処理でも年間を通して一定量のオーシストが排出されていたことが、発生源調査の進展から明らかとなった。月齢別に飼育している豚舎の直接排水におけるオーシストの排出状況を調査した結果、ほとんどが 3 ヶ月齢以下の母ブタから離乳したばかりの畜舎(育成豚舎)が最も多かった。このオーシストを低減化することが今後の課題と考えられた。

クリプトスポリジウム検査に使われる蛍光抗体色素の FITC は退色する性質があるが、近年は退色しづらい新規の蛍光色素が開発され、こうした新しい色素をクリプトスポリジウム検査に有用と考えて検討を行った。Dylight 標識の蛍光抗体試薬による染色では、励起光の連続照射による蛍光の退色が少なく、加えて 7 日間の冷蔵保存を行っても蛍光強度は維持されていた。今後の顕微鏡試験への応用が期待された。

A. 研究目的

微生物分科会では水道の微生物汚染に係る問題として、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検討し、水道の微生物学的な安全性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。国内で暫定目標値の 2,000cfu/ml を超過する地点は限られたが、一般細菌数測定で多くが不検出になるのと異なり、高感度な測定によって有意な値が得られるようになった。この指標の活用が求められている。

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る不活化・除去を示すことが、安全・安心につながる。下水処理水が流入する河川水を、水道水源として使用す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不活化除去が不十分な場合、実際に海外の水道水中から腸管系ウイルスが検出されている¹⁾。従って、浄水処理を徹底することに加えて、処理過程におけるウイルスの処理性を評価することは、飲料水供給にとって意味がある。近年、膜ろ過処理は、従来の凝集沈澱砂ろ過処理より省スペース化及び安定した高度な処理性が期待され、膜の品質向上とコスト低下により低圧の精密ろ過膜(MF膜)や限外ろ過膜(UF膜)が浄水処理に広く普及してきている。この膜ろ過の処理性の評価を、当該研究で開発したimmuno-PCRを応用して行うこととした。

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。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た結果、これらの試験法は通知に追加され、試験に使用可能となった(平成19年3月30日付け健水発第0330006号厚生労働省健康局水道課長通知、平成24年3月2日一部改正)。従って、今後は普及と実用性をより高めるための改良が求められる。

クリプトスポリジウムの粉体ろ過濃縮法では、昨年度の試験で汚染の残留が避けては通れないことが実験的に示され、改善方法として洗浄が可能な吸引ろ過に着目した。吸引ろ過であれば、ろ過前に設置される装置はガラス製ファネル等で済み、汚染を最小限に抑えることができる。

クリプトスポリジウム遺伝子検出法の導入と、実績の蓄積を目的に、遺伝子検査法と顕微鏡法の比較を継続した。

秋期から春期にかけて相模川でクリプトスポリジウムが河川水中から多く検出される傾向にあり、相模川・酒匂川水質協議会等の過去の調査か

ら、汚染源の一つとして畜産施設が疑われている。畜産施設の協力を得て、豚舎排水処理施設の流入汚水とその処理水中のクリプトスポリジウム調査を実施し、排出される豚舎の特定を目指した。

クリプトスポリジウム検査はこれまで蛍光抗体染色を行なってオーシスト等を顕微鏡下に検索してきたが、この蛍光抗体が検出に重要で、蛍光強度は検出を左右する恐れがある。ところが標識に使われるFITCの蛍光色素は退色する性質があり、検査、写真撮影、クロスチェックの操作の間に退色して、見返した時の同定の信頼性が失われたり、同じ粒子を探すことができなくなる等の問題が生じる。遺伝子検査法の導入が進むとしても、顕微鏡検査は操作段階毎の回収率の追跡ができたり、短時間に検査結果を得られたりするので、蛍光抗体染色の重要性に変わりはない。FITCと異なる色素としては、DyLight、Alexa、Cy等の色素が販売されており、退色が遅く安定性がある、pHによる影響が少ない、同じ励起波長、蛍光波長で観察が可能で装置の変更が不要、といった利点がある。こうした新しい色素をクリプトスポリジウム検査に導入することは有用であり、比較検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

B1 従属栄養細菌測定の実用に関する研究

従属栄養細菌は定法に従い、培養に試料水1mL、培地にR2A寒天培地を用い、20±1℃で7日間ないし14日間の培養を行った。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。

飲料水兼用耐震性貯水槽(以下緊急貯水槽とする)の検討では、設置当初から定期的に水質検査を行い緊急貯水槽内の残留塩素濃度の把握などを行ってきたが、従属栄養細菌が管理目標設定項目に追加された平成20年から検査に従属栄養細菌を追加し、滞留の有無などの確認を行った。大気開放式緊急貯水槽につ

いては施設内に設置された蛇口、圧力式緊急貯水槽については消火栓用給水管を開放し、水道水の残留塩素を確認の後、滅菌瓶にて採水した。

配管内バイオフィルムの従属栄養細菌測定は、φ50mm(実測内径 5.1cm)、長さ 5.0cm の配管を使用した。採取操作での汚染を洗浄するため、内表面(面積 80.07cm²)の付着物に滅菌水をかけて洗浄した。その後、付着物の 1/2(面積約 40cm²)を滅菌済み薬さじで掻き採り、希釈水 10mL に加え、十分に攪拌したものを試料とした。試料 1mL をシャーレに分取し、R2A 寒天培地を用いて 20±1°C で 7 日間培養した(付着物 1)。残り 1/2 の付着物についても同様に操作し、測定した(付着物 2)。コロニーカウント値の単位は cfu/4cm² となる。硝酸態窒素測定の前試料は従属栄養細菌同様、十分な残留塩素濃度が確認された後、ポリエチレン瓶に採水し、イオンクロマトグラフにより測定した。

平成 19 年度から 24 年度まで継続して検査を行っている都内給水栓 45 箇所を対象として、6 年間の各年度の検出率、検出時平均検出数、10 個以上検出率及び最大値を算出した。各地点の順位付けを行い比較した。

B2 腸管系ウイルスに関する研究

全遺伝子情報が解読されて ELISA 検出感度が高いノロウイルス(Accession number: AB042808, Chiba407/1987/JP)のゲノム情報を用いて VLPs(ウイルス様粒子)を作製した。ORF2 の 5'末端から ORF3 を含むゲノム末端までを使用して遺伝子組み替えバキュロウイルスを構築した。そのバキュロウイルスをカイコに感染させて VLPs を発現させ、カイコより VLPs を精製した。

immuno-PCR 法の固定化一次抗体は VLPs をマウスに経口投与し得られた IgM 抗体、二次抗体に VLPs をウサギに経口投与し得られた IgG 抗体を使用した。Immuno-PCR は以下の方法で実施した。すなわち、一次抗体を固相化したプレート上で、抗原・抗体反応により試料

VLPs を一次抗体に結合させた。PBST で洗浄後、ビオチン標識二次抗体を VLPs に結合させた。PBST で洗浄後、アビジン溶液を添加してビオチンと結合させた。PBST で洗浄後、ビオチン化 DNA タグ(480bp)溶液を添加し、アビジンとビオチンを結合させた。PBST で洗浄し、制限酵素(*Eco* RI)処理で DNA タグを遊離させた。遊離 DNA タグを SYBR Green を用いたリアルタイム PCR で定量することで、VLPs の濃度を定量した。

本研究では VLPs と同時に 2 種類の大腸菌ファージ Qβ(以下 Qβ と表記)と MS2(以下 MS2 と表記)を使用した。宿主大腸菌を用いたプラック形成法とリアルタイム定量 RT-PCR 法の 2 種類の方法を用いて、Qβ 及び MS2 の濃度を求めた。札幌市豊平川河川水(以下、河川水と表記)を水道原水として使用した。VLPs、Qβ 及び MS2 を札幌市豊平川河川水に同時添加した実験原水を、MF、UF 膜を使用したろ過処理実験と凝集-MF 膜処理実験の大きく分けて 3 通りを実施した。実験原水及びろ過水の各ウイルス濃度を定量(VLPs は immuno-PCR 法、Qβ、MS2 は RT-PCR 法あるいはプラック法を使用)し、除去率を求めた。

Cryonase™ Cold-active Nuclease を用いた RNase 処理により不完全なウイルス粒子に由来する RNA を分解し、感染価のあるウイルスの遺伝子のみを選択的に検出する手法として、RNase RT-PCR を適用し、指標ウイルスとして大腸菌ファージ Qβ を用い、塩素消毒後のウイルス測定法として評価した。

B3 耐塩素性病原性微生物の研究

B3-1 吸引式粉体ろ過法の検討

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、これまでの加圧ろ過ではなく、機材を交換洗浄できる吸引ろ過を検討した。10L ポリタンクに溜めた大原浄水場浄水約 10L をフィルター径 90mm、粉体量 3g、ろ過圧 27kPa の条件でろ過を開始した。装置は【ポリタンク】—【90mm フィルターホルダー】—【マニ

ホールド】—【循環式アスピレーター】の順に組み立て、試料水の入ったポリタンクはファンネルより50cmほど高い位置に設置した。ろ過前に粉体は浄水200mlに懸濁させたのち5分間脱気するか、またはそのまま使用した。蛍光ビーズ希釈液(2.6×10^5 個/100 μ L)100 μ lをファンネルに直接添加した。その後、浄水10Lを全量ろ過した。ろ過後、粉体1.5g当たり50ml試験管1本(合計2本)に回収して粉体を全て溶解(塩酸35ml、100%PET 10ml)させ、溶解液500 μ lずつ計4回、合計2mlをクリプトスポリジウム検査法に従い蛍光顕微鏡にて蛍光ビーズの数を計数し回収量とした。これと同時に蛍光ビーズの添加数を計数した。捕捉性能評価は回収量を添加量で割って100を乗じた%値とした。ろ過量試験は大原浄水場原水20Lをろ過して行った。ろ過の流出水が少なくなったところで、ろ過を停止し、ろ過前とろ過後のポリタンクの重量を測ってろ過量を求めた(1kg=1L)。

B3-2 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)、Nested-PCR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。

添加回収試験は、検鏡法においてクリプトスポリジウム及びジアルジアが0個/10Lであった平成24年9月24日、平成24年12月17日に採水した神奈川県内の河川表流水(それぞれ濁度4.1度、2.0度)10Lを用いて行った。標準試料として、クリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストのUV不活化試料を使用した。試料水10Lに、上記のオーシスト・シストを添加し、濃縮はカートリッジフィルター法を用い、以降の

精製、顕微鏡観察は定法に従い行った。実試料試験は、平成24年5月～11月までの期間で採水した神奈川県内の河川水や湧水を試料として実施した。試料水は20L採水し、それぞれ顕微鏡検査とqRT-PCRに10L用いた。

神奈川県内広域水道企業団では相模川水系の社家取水、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汚水の原虫試験を継続して実施した。検鏡法は定法に従い、試料水を孔径5 μ mの親水性PTFEフィルターでろ過濃縮した後、免疫磁気分離、直接蛍光抗体染色法で行った。精製操作の磁気ビーズでの洗浄及び回収操作の効率を上げるため、磁気分離に使用する磁石を製造元標準の磁石ではなく、磁力が強いネオジム磁石を使用した。この磁石は磁気分離の際に、磁石をクリップに付けた状態の試験管を回転装置にかけることで、手を使わずに磁気分離が可能となる。LAMP法陽性になった試料に関してはアガロースゲル電気泳動を行い、原虫類の遺伝子増幅を確認した。RT-PCR法では、人工的に作成した陽性対照の遺伝子断片より作成した検量線を用いた。今回は、クリプトスポリジウム1オーシスト当たり18,000コピー、ジアルジア1シスト当たり1,600コピーとして算出された検量線¹⁾を使用した。RT-PCR法増幅産物は直接塩基配列決定を行い、Blast検索により配列内容の確認を行い、最も近縁の登録配列の番号を記録した。

国立保健医療科学院では2010年12月に30箇所の浄水場の協力を得て、水道原水10Lよりジアルジア試験を実施した。定法に従い、親水性PTFEメンブレンフィルター法によって河川水10Lを約10mLまで濃縮した後、免疫磁気ビーズ法による精製・濃縮操作を行い約110 μ Lまで濃縮した。濃縮試料の半量(約55 μ L)を顕微鏡検査に供し、残りの半量を遺伝子検査法(定性的検査用LAMP法、遺伝子定量用リアルタイムRT-PCR法および遺伝子型判別用RT-seminested PCR法)に供した。遺伝子型判別用のRT-seminested PCR法は、核酸抽出

液から逆転写反応によって cDNA を合成した後、既報²⁾に準じて Seminedsted PCR を行った。増幅産物の塩基配列はダイレクトシーケンシング法により決定した。

B3-3 畜産排水クリプトスポリジウム調査

K 畜産施設では、子ブタから親ブタまで常時 700 頭程度を飼育し、分娩豚舎には母ブタと離乳前の子ブタ(1 ヶ月齢位まで)、育成豚舎には離乳子ブタ(1~3 ヶ月齢位まで)、肥育豚舎には 3 ヶ月齢以降のブタ、成豚舎には出産前の母ブタを飼育している。ブタは、床の一部をスノコ状にし、排泄物を床下に落とす豚舎で飼育されている。床下に落ちた排泄物は、糞と尿に分離され(固液分離)、糞は堆肥化処理されている。一方、各豚舎からの尿及び畜舎を洗浄した汚水等は、集めた後、振動ふるいで大きな固形物を除去したのち、汚水調整槽を経て井戸水で 2~3 倍程度に希釈し、曝気槽(オキシレーションディッチ法:滞留時間 2~3 日)を用いた排水処理施設で処理されている。豚舎の汚水枡等から採取した直接汚水(①分娩豚舎・②育成豚舎 No.1・③育成豚舎 No.2・④肥育豚舎・⑤成豚舎)と、排水処理施設に流入する⑥流入原水(振動ふるいで固形物を除いた後の汚水)と、オキシレーションディッチ法処理後沈殿物を除いた排水処理施設処理水(⑦越流水)を 2012 年 6 月 25 日、7 月 26 日、10 月 18 日及び 11 月 19 日の 4 回採取し、クリプトスポリジウム検査を実施した。豚舎直接排水及び⑥流入原水は、試料によっては食べ残し等の固形物が多かったため、試料の濃縮操作は行わず、前処理として超音波処理(300W で 3 分間)を行い、1 分 30 秒間静置後、上澄水から一定量(1 または 0.5mL)採取し、10mL 程度になるよう PET 溶液で希釈した後、免疫磁気ビーズで精製した。試料によっては免疫磁気ビーズ処理前に酢酸エチルを用いた脱脂処理を行った。越流水の試験については、試料量 100mL を親水性 PTFE 膜でろ過濃縮を行った後、免疫磁気ビーズ法で精製した。試験の都度、内部標準(Alexa Fluor594 で染色したオ

ーシスト³⁾)を一定量添加し、回収率を求めた。

B3-4 安定性の高い色素で標識された蛍光抗体の検討

本研究では 2 種類の直接染色抗体試薬、Dylight(アーク・リソース社製)と EasyStain (BTF 社製)を用い、定法に従って染色を行った。前者は新しい色素、後者は古い FITC 標識の代表として使用した。封入操作には、EasyStain 添付の封入剤、Fluoprep(蛍光試料用水性封入剤)、PBS(pH 7.4)の 3 種類を用いた。クリプトスポリジウムとジアルジアは、EasyStain に添付の対照用試料を用いた。作成直後の試料と湿潤箱で冷蔵保存した試料について試験した。退色の比較では、各試料のクリプトスポリジウムとジアルジアのそれぞれ 3 個体ずつをランダムに選び、B 励起光を 120 秒間連続照射し、15 秒間隔で FITC 蛍光像を同じ条件下で撮影した。撮影後、画像処理ソフト(imageJ, National Institutes of Health, USA)を用いて、シストおよびオーシスト部分の蛍光強度のピーク値を記録した。保存日数の比較では、1~7 日間冷蔵保存した試料について試験した。各試料のクリプトスポリジウムとジアルジアのそれぞれ 5 個体ずつをランダムに選び、FITC 像の写真撮影を行った。

C. 研究結果および考察

C1 従属栄養細菌測定の実用に関する研究

表 1 に平成 20 年 9 月から平成 24 年 9 月までの、緊急貯水槽の従属栄養細菌の検出状況、材質及び備考欄に施した対策等を示した。すべての検査において一般細菌、大腸菌は不検出であるが、一部の施設では従属栄養細菌が数百のオーダーで検出された。これらの施設では、残留塩素が 0.2mg/L 程度に低下しており、貯水槽内部での滞留発生が疑われた。この結果を受けて、滞留発生防止策として貯水槽底部からの定期的または常時放水を実施するなどの対策をとった。加えて、貯水槽内面の劣化に伴う生物・微生物の繁殖防止のため、内面防水塗装の更

新も進めた。最終的には対策が奏功し、平成 24 年 9 月の従属栄養細菌数は全施設で 1 桁程度となり、緊急貯水槽の衛生状態は改善された。従属栄養細菌は、一般細菌では検出できない緊急貯水槽内の滞留を検出し得た。今後も、緊急貯水槽内の衛生管理に従属栄養細菌の検査を活用して行きたいと考えている。

配管バイオフィルムの検討では平成 19 年度、20 年度ともに、採水地点 9～11 において検出数が 39～56cfu/mL と他の 10 未満に比べて高く、季節変動も疑い精査した。平成 24 年 1 月より実施した水源及び配水系の従属栄養細菌測定結果を表 2、配水系統図を図 1 に示す。5 つの水源において従属栄養細菌を測定した結果、第 2、9、10 水源は低い値で安定していた一方、第 6、8 水源は変動が見られた。特に第 8 水源は変動が大きく、平均値は 5 つの水源の中で最も高い値となった。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ため、継続的に監視を行っている水源である。第 8 水源周辺には農地があり、過去に畜産廃棄物の農地還元が行われていたことから、畜産廃棄物の影響が疑われているが、原因の特定には至っていない。第 9 配水場では、水源の従属栄養細菌数が少なかったため、塩素による効果は確認できなかった。一方、第 8 配水場では、第 6 水源で平均 54cfu/mL、第 8 水源で平均 142cfu/mL 検出されていた従属栄養細菌が塩素により平均 8cfu/mL まで減少した。水源の従属栄養細菌数が多くても、塩素消毒で従属栄養細菌をある程度低減できていた。

採水地点 11 は他地点より高く検出される傾向が見られたが、給水栓 A、給水栓 B は低値あるいは不検出であったことから、給水栓 B と採水地点 11 の間の配管内バイオフィルム等による汚染の可能性が高いと考えられた。

採取した配管の内表面について付着状況を確認した(表 3、採取場所については図 1 に示した)。配管 1～4 は給水管取出し工事によりくり抜かれた配管、配管 5 は配管の更新に伴い採取した配管である(写真 1～5)。配管 1、3、5 には付

着物があったが、配管 2、4 には付着物はなかった。例数は少ないが、古い配管ほど付着物がある傾向が見られた。配管 5 については比較的水が停滞している可能性がある小学校プールへの配管であったため、採取した配管の中で付着物が最も多かった。停滞箇所には注意を要することを実例として確認した。

付着物のバイオフィルムを確認するために配管 5 の付着物について従属栄養細菌を測定した結果、平均 40 個/4cm²(10 個/cm²)が検出され、配管内バイオフィルムの貴重な実例が得られた。このバイオフィルムは多くないと思われたが、配管 1m(1,600cm²)当たり 16,000cfu 相当の従属栄養細菌が存在する計算となる。こうしたバイオフィルムを防ぐには、残留塩素消毒の徹底が重要と思われた。

平成 19 年度から平成 24 年度までの都内給水栓における従属栄養細菌数の検討では、検出率は概ね 40～80%の範囲で、検出時の平均検出数はほぼ 10cfu/mL 以下であった。集計したデータ数は合計で 2,176 であった。目標値の 2,000cfu/mL を超過する結果はなく、全て清浄であったが、測定値が他に比べて高い地点は散見された。

各検査回から算出した 10cfu/mL 以上検出率と最大値を指標として扱い、比較した。10cfu/mL 以上検出率については 20%以下であり、検出数は多くなかった(図 2)。最大値は検査回ごとに大きく変動しているが、概ね 100cfu/mL 以下であった(図 2)。ここで、各地点を順位付けるために、給水栓における従属栄養細菌の検出率、検出時平均検出数、10cfu/mL 以上検出率を検出指標として算出し、これら指標から 6 年間の平均値をもとに順位付けを行い、さらに順位の合計値で給水栓をランク付けした(表 4)。なお、この比較についてはデータ数確保のため、平成 23 年度以降の新設を除く 45 地点で比較した。総合順位が高い地点は、検出指標(検出率、検出時平均検出数及び 10cfu/mL 以上検出数)のすべてが高い結果であり、従属栄養細菌が多数検出される傾向にあ

った。特に、1位から3位までの地点は、4位以降の地点と比較して順位合計点が低く、特異的に従属栄養細菌が検出されやすかった。一方、総合順位が低い地点は検出指標のすべてが低かった。なお、グループ間の比較で、検出指標の値の幅は大きく違ったが、浄水場の系統などによる明確な傾向はなかった。強いて上位、中位、下位のグループに分けて比較すると、配水小管経過年数と流達時間については、経過年数が少なく、流達時間が短いと総合順位が大きい(従属栄養細菌の検出率や検出数が少ない)傾向がみられたが、相関係数を計算すると明確な相関は得られなかった(表5)。

以上から、従属栄養細菌の検出傾向は、給水栓の個別の状況によると考えられた。特異的に従属栄養細菌が高頻度で検出される給水栓は、生物膜の形成などが想像された。

C2 腸管系ウイルスに関する研究

ノロウイルス VLPs の高感度検出のため、immuno-PCR 検出系を開発、改良した結果、 $10^{5.7}$ VLPs/mL 以上の濃度で VLPs の定量が可能となった(図3)。すなわち、従来の ELISA 法(10^9 particles/mL 以上)に比べて1000倍程度の高感度な検出が可能となった。これにより、用いる VLPs の量の制約が少なくなること、より高い除去率の評価が可能となる利点が期待された。

豊平川河川水へのノロウイルス VLPs の添加と膜ろ過試験を行い、開発した系を用いて VLPs を検出した。各種メンブレンフィルターでの予備検討を行い、最終的に構築した膜ろ過実験系で凝集・MF 膜処理を行った(図4)。比較のために、大腸菌ファージ Q β 、MS2 を同時に使用した。

PAC による凝集・MF 膜ろ過では、 $20 \mu\text{M}$ -Al 以上の PACl 添加で、ノロウイルスを 4-Log 以上除去した(図5)。結果には示さないが、分画分子量 1kDa の UF 膜と同程度の除去性能と言えた。一方、鉄系凝集剤を使用した凝集・MF 膜ろ過では、 $40 \mu\text{M}$ -Fe の FeCl₃ 添加で 3-Log 程

度が除去された(図6)。同じ凝集剤濃度では除去率が低下したが、凝集剤を多く使用することで除去率の向上が認められた。なお、結果には示さないが、凝集剤を用いない $0.1 \mu\text{m}$ の MF ろ過ではノロウイルス VLPs はほとんど除去できなかった。

同時に添加した大腸菌ファージの除去率と比較すると、ノロウイルス VLPs は大腸菌ファージよりも除去しづらい傾向が認められた(図7)。これは鉄系凝集剤を使用した場合でも確かめられた(図8)。Q β も MS2 もノロウイルスの指標としては不足があり、野生ノロウイルスの培養法は未だ確立されておらず、VLPs をウイルス除去の指標として活用しつつ、ファージは参考に留めて使うと考えられた。

従来、ウイルス処理は塩素消毒が基本と考えられてきたが、PAC 凝集・MF ろ過処理でも 4-Log 以上の除去率が得られることから、塩素消毒との相乗効果による除去不活化が期待できた。すなわち、ウイルスであってもマルチプルバリアの発想で安全性向上に期待することが可能と言えた。

RNase 処理 RT-PCR 法により、塩素消毒後の Q β の測定値が低下した。この傾向は初期濃度によって違いが見られ、高い初期濃度(2mg/L)の方が低い初期濃度(0.1mg/L)よりも感染価に近い不活化曲線を示す傾向が見られた。

C3 耐塩索性病原微生物の研究

C3-1 吸引式粉体ろ過法の検討

加圧ろ過で残る僅かな汚染を回避するため、吸引ろ過による粉体ろ過法を検討した。予備検討では、フィルターホルダーをゴム製のフタで覆い、アスピレーターで試料水をマニホールド内に導入したところ、ろ過層に多数の凹凸が生じ、捕捉性能評価は 58.6%と低かった。ポリタンクをフィルターホルダーより高い位置に設置して浄水をろ過した場合(写真6)、ろ過ケーキは表面に凹凸や層を貫くような孔もなく、滑らかに平坦で、良好であった。同じ方法で行った捕捉性能評価の結果も平均 93.6%(計4回のろ過の

実施)と良好であった(表 6)。マニホールド内を高い陰圧にしなければ、粉体ろ過法の吸引ろ過方式は成立することが判明した。なお、粉体の脱気の有無は、回収率に影響を与えなかった。原水をろ過した場合、濁度 12 度では約 8L 程度に留まったが、濁度 10 度未満では 10L 以上ろ過することができた(表 7)。加圧ろ過の時と同じく、10 度未満で 10L のろ過が目安となった。ろ過水量が変化しなかったことから、捕捉性能の変化はないものと考えられた。

C3-2 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検討

遺伝子検出法の導入を目的に、添加回収試験、実試料試験を行った。検討に先立ち、検量線を作成した結果、クリプトスポリジウムは 0.00044 オーシスト相当/反応チューブ以上、ジアルジアは 0.0017 シスト相当/反応チューブ以上で陽性反応が得られた。10L の試料水にクリプトスポリジウム遺伝子(18S rRNA)が 0.11 個相当、ジアルジア遺伝子(18S rRNA)が 0.43 個相当存在すると、計算上は陽性反応が得られることが確認され、遺伝子検出法は 10L 試料水中の 1(オー)シストの存在を検出可能と言えた。添加回収試験を実施した結果、qRT-PCR の回収率は約 80%程度であり、検鏡法の回収率より良好な結果が得られた(表 8)。実試料試験では、クリプトスポリジウムの検鏡法と遺伝子検出法の結果は概ね一致した(表 9)。なお、D(表流水)の試料では、検鏡法では不検出であったが、遺伝子検出法ではごく微量(0.083 個相当/10L)の陽性を示し、結果が一致しなかった。この試料からは、オーシストの可能性はあるが形態が崩れ、検鏡法では判別できなかった粒子が観察されていた。これらの粒子が実は環境中で損傷したオーシストであり、標準試料に比べて核酸が少ないオーシストが qRT-PCR で検出されたと推測された。

神奈川県企業団の相模川流域試料からは、クリプトスポリジウムの 11 試料全てで、検鏡法、LAMP 法及び qRT-PCR 法の結果が一致した

(表 10)。例数は少ないが、検鏡法で検出数が 5 個以下であった試料の結果でも、3 法とも一致した。これは試料中のオーシスト、シスト数が 1 つではない複数であったこと、濁質洗浄を徹底する等の精製処置を確実に行って偽陰性を防いだことが大きく影響したと考えられた。ジアルジアでも 3 法の一致率は 82%と高い一致率であった(表 11)。結果には示さないが、LAMP 及び RT-LAMP 法で陽性結果となった増幅産物のアガロースゲル電気泳動では、目的とする原虫類遺伝子の増幅パターンが確認された。qRT-PCR 法で得られ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クリプトスポリジウム、ジアルジアからはジアルジアの配列が得られ、いずれの配列も DDBJ/EMBL/GenBank 登録配列と 99 ないし 100%の一致率が得られた。クリプトスポリジウムはブタ由来の *Cryptosporidium parvum* の配列が得られた。ジアルジアは *Giardia intestinalis* の人獣共通の Assemblage A と、(配列からは区別できない)Assemblage A 又はネコ由来の F の配列が得られ、ヒトに感染する可能性のある型が河川から検出された。なお、検鏡法と qRT-PCR 法で得られた定量値を比較すると、qRT-PCR 法の値は検鏡法より低い値となることが多かったが、原因として試料中の原虫類の遺伝子自体が劣化していた、試料中の遺伝子試験阻害物質の影響等が考えられた。

全国の浄水場 30 箇所の協力を得て行ったジアルジア検査では、複数の水道原水からジアルジアが検出され、顕微鏡観察と qRT-PCR による検出率は 30%程であった(表 12)。顕微鏡の検出濃度は全て 10 cysts/10L 以下であった(表 13)。qRT-PCR 法と LAMP 法の定性的な検出結果は 29/30 検体で一致したことから、遺伝子検査法の特異性には問題はないと推測された。一方、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 14)。本研究では、10L の河川水を濃縮・精製した後、試料を 2 つに分離して顕微鏡観察と qRT-PCR 法に供しているため、元の試料中のシスト濃度

が低い場合は、シストが均一に分散していると仮定したとしても、偶然片方の検査試料にしかシストが入らない可能性があり、この確率の問題が 2 手法の定性的結果に差が生じた主な要因と考えられた。この問題は昨年度のクリプトスポリジウムでの検討で考察した内容と同様である。検出結果が方法間で一致しなかった 9 試料(全体の 30%)については、全て 5 cysts/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。実際、低濃度であってもシスト検出は顕微鏡法と遺伝子検出法は同程度の陽性率であった。さらに、qRT-PCR 法で検出された全ての試料でジアルジアの塩基配列が得られたことから、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。従って、ジアルジア検査の意義を鑑みれば、低い汚染の濃度を正確に測定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。なお、遺伝子型判別用 *Seminested PCR* から配列決定した結果、検出された全ての遺伝子型がヒトへの感染が報告されており⁴⁾、ヒトへ感染する可能性のあるジアルジアが水道原水に存在していることが確認された(表 15)。

C3-3 畜産排水クリプトスポリジウム調査

月齢別に飼育されている豚舎の直接排水を豚舎別に調査した結果、オーシストが検出されたのは⑤成豚舎以外の、直接排水の①分娩豚舎、②・③の育成豚舎及び④肥育豚舎の 4 ヶ所、排水処理の⑥流入原水と⑦越流水、合計 6 ヶ所であった(図 9)。特に離乳直後の子ブタを飼育している育成豚舎からの排出量が桁違いに多かった(10⁷ オーシスト/10L 相当)。一方、3 ヶ月齢以降のブタを飼育している肥育豚舎や母ブタのみを飼育している成豚舎からは、ほとんどオーシストは検出されなかった。すなわち 3 ヶ月齢までの子ブタを飼育している豚舎から排出するオーシストの量を制御できれば、豚舎全体からの排

出量を低減させることができる可能性が示唆された。本施設では育成豚舎は畜舎の配置で最も上流に位置しており、排水処理を追加したり、分けたりする方法があるかもしれない(図 10)。なお、⑥流入原水と⑦越流水のオーシスト濃度から求めた排水処理施設内でのオーシスト除去率は 2-Log 程度、最大 4.8-Log であり、オーシストは排水処理施設で適切に処理できていた。一方で⑦越流水のオーシスト濃度は、0~10² 個/10L で、完全には除かれていなかった。

C3-4 安定性の高い色素で標識された蛍光抗体の検討

作成直後の試料において、連続して励起光を照射することによる蛍光の退色を追跡した(図 11A, B)。FITC 標識の例(EasyStain)では、励起光照射直後の蛍光強度は、クリプトスポリジウムで 126~241、ジアルジアで 64~129 であったが、照射時間と共に退色が進み、照射 120 秒後の両者の蛍光強度は 50 以下まで低下した。一方、新しい蛍光標識の例(Dylight)では、クリプトスポリジウムとジアルジアの蛍光強度は、照射直後の 177~231 から徐々に低下したものの、照射 120 秒後の蛍光強度は 100 以上であり、退色は少なかった。保存日数と蛍光強度の関係を検討すると、FITC 標識では作成直後の蛍光強度(141~210)は高かったが、保存 1 日後に大きく低下し、以降の蛍光強度(30~94)は低いまま推移した(図 12A, B)。新しい蛍光標識では、作成直後の高い蛍光強度(160~216)が、作成 7 日後(147~198)までほとんど低下しなかった。旧来の FITC 標識と異なり、新しい蛍光標識は退色しづらく、検査に有用と言えた。

D. 結論

D1 従属栄養細菌の活用に関する研究

飲料水兼用耐震性貯水槽において従属栄養細菌を活用した結果、滞留の恐れを検知し、対策を行うことで緊急貯水槽の衛生状態を向上させることができた。

従属栄養細菌数が多く検出された採水地点

11 を精査した結果、その給水栓付近での増殖と判明した。滞留のある配管 5 より、 $10\text{cfu}/\text{cm}^2$ とわずかとはいえ、バイオフィルムの存在を培養で確認した。バイオフィルム防止に、残留塩素消毒の徹底が重要と考えられた。

給水栓の順位付けを行った結果、検出指標による総合順位が高い地点は、検出指標のすべてが高い結果であり、問題のある給水栓と捉えた。総合順位が上位、中位、下位のグループについて設置状況を検討したが、総合順位と設置状況の指標と間に明確な相関はなく、従属栄養細菌の検出は、給水栓の個別の状況によると考えられた。

D2 腸管系ウイルスに関する研究

ノロウイルス VLPs を定量する immuno-PCR 法の構築に成功し、 $10^{5.7}$ VLPs/mL 程度から検出可能となった。単独ではウイルスを除去できない MF 膜であっても、前処理として凝集処理を導入することで、ノロウイルス VLPs (とファージ) を 4-Log 以上除去できた。

D3 耐塩素性病原微生物の研究

D3-1 吸引式粉体ろ過法の検討

粉体ろ過法の吸引ろ過方式は、加圧ろ過方式と同等の捕捉性能評価であり、ろ過水量も濁度 10 度で 10L 近くとますますであった。従来の加圧ろ過方式は分解洗浄が容易ではなかったが、吸引ろ過方式は単純で使用する器具の洗浄が可能であったり、ディスポーザブルな部品の使用ができるという点で加圧ろ過方式より優れていた。

D3-2 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検討

導入を目的に qRT-PCR 法を検討した結果、クリプトスポリジウム、ジアルジア共に試料中に 1 個相当の遺伝子が存在していれば検出可能であり、感度は十分であると考えられた。神奈川県内の河川表流水を試料とした添加回収実験では、遺伝子検出法は検鏡法と同じく検出し、回

収率も良好であった。実試料試験では、クリプトスポリジウムは検鏡法とほぼ同一の結果が得られ、有効な方法であると考えられた。

神奈川県企業団の相模川水系において、検鏡法と LAMP 法及び qRT-PCR 法 3 方法の原虫類試験結果を比較したところ、クリプトスポリジウム及びジアルジアともに、80% 以上の一致率が得られた。遺伝子法同士の一貫率は高く、qRT-PCR 法からはクリプトスポリジウムとジアルジアの配列が得られており、遺伝子法の特異性に問題はなかった。遺伝子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はブタ由来の遺伝子型が、ジアルジアはヒトが感染する可能性がある遺伝子型が検出された。

全国 30 箇所の水道原水のジアルジア試験では、遺伝子法と顕微鏡法は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、異なる遺伝子法間で結果が一致し、遺伝子増幅産物からジアルジアの配列が得られた。低濃度のジアルジア検出は確率論的な問題を含み、頻回の試験がその解消に有効と考えられた。ヒトに感染する可能性のあるジアルジアの遺伝子型が確認された。

D3-3 畜産排水クリプトスポリジウム調査

オーシストを排泄するブタは、ほとんどが 3 ヶ月齢以下の子ブタであった。排出量は季節にかかわらず、母ブタから離乳したばかりの畜舎(育成豚舎)が最も多かった。従って、3 ヶ月齢以下の子ブタから排泄される糞便中のオーシストを低減化することができれば、豚舎全体から排出されるオーシスト量を大幅に低減できる可能性が示唆された。糞尿分離を徹底し排水への混入を低減させるか、3 ヶ月齢までの豚のオーシスト含有廃水を別系統で処理するなどの検討も必要と考えられた。越流水から濃度は高くないが、一定レベルのオーシストが常時検出された。排水処理施設のオーシスト除去率は 2.1~4.8-Log と変動が見られたが、おおむね良好な処理状況であった。

D3-4 安定性の高い色素で標識された蛍光抗体の検討

従来の FITC 標識の蛍光抗体染色では、染色試料は励起光を連続照射すると退色が進んだ。染色後の試料を冷蔵保存すると 1 日後には蛍光強度が大きく減少し、作成後直ちに観察することが推奨と言えた。一方、新しい蛍光標識では、励起光の連続照射による蛍光の退色が少なかった。7 日間の冷蔵保存を行っても、ほとんど退色しなかった。このような退色の少ない蛍光色素は検査に有用で、活用が期待された。

E. 参考文献

- 1) 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.
- 2) Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004 Jun;**4**(2): 125-30.
- 3) 秋葉他: 畜産排水処理施設におけるクリプトスポリジウムの排出と除去性の調査, 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制御に関する研究, 環境省環境保全研究, p.4-18~4-22, 平成 22 年
- 4) Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009 Feb;**25**(2):93-100.

F. 研究発表

論文発表

1. Matsushita, T., Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K. (2013) Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon,

Separation and Purification Technology, **107**, 79–84.

2. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳 (2012) ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, *土木学会論文集 G (環境)*, **68**(7), III_41–50.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T. and Ohno, K. (2012) Difference in behaviors of F-specific DNA and RNA bacteriophages during coagulation-rapid sand filtration and coagulation-microfiltration processes, *Water Science and Technology: Water Supply*, **12**(5), 666–673.
4. Kishida N, Miyata R, Furuta A, Izumiyama S, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Noda N, Akiba M. Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR). *Water Res.* 2012 Jan 1;**46**(1):187-94.
5. Izumi T, Yagita K, Izumiyama S, Endo T, Itoh Y. Depletion of *Cryptosporidium parvum* oocysts from contaminated sewage by using freshwater benthic pearl clams (*Hyriopsis schlegeli*). *Appl Environ Microbiol.* 2012 Oct; **78**(20): 7420-8.
6. 泉山信司, 遠藤卓郎, 粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発, *水道協会雑誌*, 2012, **81**(9), 14-22.
7. 黒木俊郎, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎, 岸田直裕, 島崎大, 秋葉道宏, *水道クリプトスポリジウム試験法の検査体制維持・向上に係る技術研修の役割*, 保健医療科学, 2012, Vol.61 No.5, p.454–463

学会発表

1. Shirasaki, N., Matsushita, T. and

- Matsui, Y. (2012) Virus removal by a coagulation-microfiltration process, Proceedings of the 4th IWA Asia-Pacific Young Water Professionals Conference 2012, Tokyo, Japan.
2. 丸林拓也, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2013) アルミニウム系及び鉄系凝集剤の塩基度がウイルスの処理性に与える影響, 第 47 回日本水環境学会年会, 大阪.
 3. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳 (2012) ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, 第 49 回環境工学研究フォーラム.
 4. 白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦 (2012) ウイルス様粒子と新規イムノ PCR 法を併用したヒトノロウイルスの膜ろ過処理性評価, 第 67 回土木学会年次学術講演会, 名古屋
 5. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Sato, S., Effective removal of virus by high-basicity polyaluminum coagulation treatment, Proceedings of Particle Separation Conference, Berlin, Germany, 18–20 June 2012.
 6. Shirasaki, N., Matsushita, T., Tatsuki, Y. and Matsui, Y., A new approach to estimate norovirus removal performance in a membrane filtration process by using virus-like particles and immuno-PCR method, Proceedings of AWWA/AMTA 2012 Membrane Technology Conference & Exposition, Glendale, AZ, USA, 27 February–1 March 2012.
 7. 白崎伸隆, 大芝淳, 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処理性に与える影響, 第 63 回全国水道研究発表会, 2012.
 8. 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 第 46 回日本水環境学会年会, ウイルス除去に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, 2012.
 9. 田附雄一, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 遺伝子組み換えにより発現したウイルス外套タンパク粒子と新規 immuno-PCR 法を用いたヒトノロウイルスの膜ろ過性の評価, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012.
 10. 岸田直裕, 今野祥顕, 浅見真理, 秋葉道宏, 原本英司, 泉山信司, 水道水源における原虫汚染の全国実態調査, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012.
 11. 岸田直裕, 吉本泰士, 佐藤逸人, 泉山信司, 秋葉道宏, 遠藤卓郎, クリプトスポリジウム検査における遺伝子検査法の作業性に関する検討, 第 63 回全国水道研究発表会, 2012 年, 島根県松江市
 12. 泉山信司, 八木田健司, 森田重光, 宮崎誠生, 蛍光抗体染色用抗クリプトスポリジウムモノクローナル抗体の開発, 第 81 回日本寄生虫学会大会, 2012 年
 13. 泉山信司, 佐々木美江, 東日本大震災における水道水の微生物学的安全性, 第 12 回 環境技術学会年次大会, 2012 年, 滋賀県草津市
 14. 勝山志乃, 泉山信司, 百田隆祥, 岸田小百合, 河川表流水における原虫類の遺伝子検査法と検鏡による従来法の比較, 日本水処理生物学会第 49 回大会, 平成 24 年, 東京都
 15. 渡邊 洋大, 齊藤 巧介, 上村 郁子, 北村 壽朗, 神奈川県企業庁における粉体ろ過法の検討, 第 63 回全国水道研究発表会, 2012 年, 島根県松江市
 16. Abeynayaka A., Katayama H. Manami, I. and Furumai, H. Low temperature enzymatic degradation of bacteriophage Q β RNA and partially chlorinated bacteriophage Q β . (Accepted). WET2013. 15th-16th June 2013. Tokyo
- 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

表 1 飲料水用耐震性貯水槽における従属栄養細菌の推移

従属栄養細菌:CFU/mL, 水質管理目標設定項目(目標値 2000CFU/mL)

施設名	H20.9	H21.9	H22.9	H23.9	H24.9	容積(m ³)	竣工年	材質	備考	
大気開放式	A	0	1	0	0	100	S58(1983)	コンクリート内面防水塗装		
	B	37	4	12	-	100	S59(1984)	コンクリート内面防水塗装	H23.12 貯水槽内面防水塗装実施	
	C	2	0	2	1	100	S59(1984)	コンクリート内面防水塗装		
	D	0	0	1	2	100	S59(1984)	コンクリート内面防水塗装		
	E	2	0	0	1	100	S60(1985)	コンクリート内面防水塗装		
	F	730	5	3	2	100	S60(1985)	コンクリート内面防水塗装	H25.2 貯水槽内面防水塗装実施	
	G	18	22	16	43	100	S62(1987)	コンクリート内面防水塗装	H22.12 貯水槽内面防水塗装実施	
	H	4	-	6	2	100	H8(1996)	コンクリート内面防水塗装		
圧力式	I	40	20	22	710	8	H9(1997)	鋼製内面エポキシ樹脂塗装	定期的に放水実施	
	J	360	4	170	17	4	H10(1998)	鋼製内面エポキシ樹脂塗装	定期的に放水実施	
	*K	0	1	2	4	0	H15(2003)	鋼製内面エポキシ樹脂塗装	*H18.8 滞留対策済み(流入水を低部に吹き付ける方法)	
	*L	0	2	0	9	4	H10(1998)	鋼製内面ステンレス鋼	*H19.7 滞留対策済み(流入水を低部に吹き付ける方法)	
	M	8	9	43	10	1	60	H8(1996)	モルタルライニング 鑄鉄管	H20~夏期に貯水槽低部から捨水実施(5~40L/分) H22は5L/分
	N	100	270	1	54	2	60	H14(2002)	鋼製内面エポキシ樹脂塗装	H22~夏期に貯水槽低部から捨水実施(10L/分) H23は5L/分

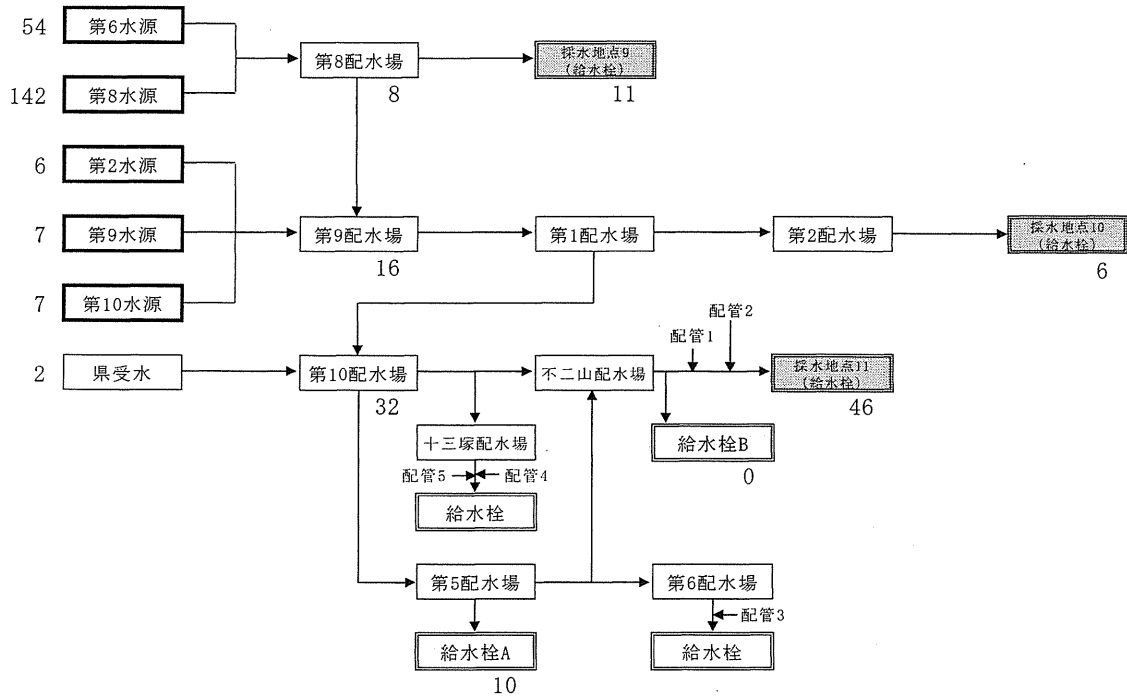


図 1. 配水系統図

図中の数値は平均従属栄養細菌数(個/mL)。第8配水場から第9配水場への配水量は1割程度、第1配水場から第10配水場への配水量は5割程度、第10配水場から不二山配水場への配水量は3割程度。なお、本配水系統の配管割合は塩化ビニール管84%、鑄鉄管13%、鋼管3%。配管1~5の矢印は写真1~5のくりぬき箇所に対応。

表 2. 水源及び配水系各地点の従属栄養細菌（個/mL）

	平成23年度								平成24年度									
	1/27	2/7	3/13	3/23	4/17	5/15	6/12	7/10	8/7	8/20	9/11	10/4	10/10	11/13	12/4	1/8	2/8	2/13
第6水源	—	—	110	—	—	—	68	—	—	—	22	—	—	—	14	—	—	—
第8水源	142	—	170	—	—	—	216	—	—	—	28	272	—	—	24	—	—	—
第2水源	—	—	7	—	—	—	6	—	—	—	3	—	—	—	6	—	—	—
第9水源	—	—	20	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	—	4	—	—	—
第10水源	—	—	10	—	—	—	2	—	—	—	11	—	—	—	5	—	—	—
県受水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—
第8配水場	18	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—
第9配水場	—	—	—	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
第10配水場	—	—	—	2	—	—	—	—	—	94	—	25	—	—	—	—	6	—
採水地点9	—	6	2	—	2	10	12	6	16	—	31	—	26	12	4	13	12	3
採水地点10	—	0	2	—	4	4	4	9	3	—	18	—	6	10	5	2	12	3
採水地点11	—	226	161	—	64	12	22	78	25	20	29	26	20	10	10	16	6	7
給水栓A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	18	—	—	—	—	—	—
給水栓B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	—	—	—	—	—

表 3. 配管内表面調査（管材質は全て塩化ビニール管）

配管 No.	採取日	敷設年	付着状況	従属栄養細菌（個/4cm ² ）
1	H24.11.6	S63	付着物あり（写真 1）	—
2	H24.11.8	H6	付着物なし（写真 2）	—
3	H24.12.7	H1	付着物あり（写真 3）	—
4	H24.12.7	H4	付着物なし（写真 4）	—
5	H25.1.11	S45	付着物あり（写真 5）	40

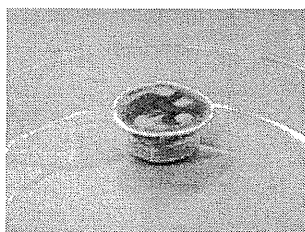


写真 1（配管 1）



写真 2（配管 2）

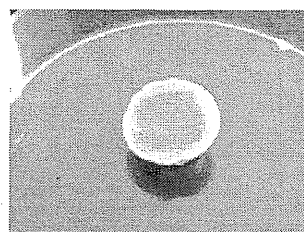


写真 3（配管 3）

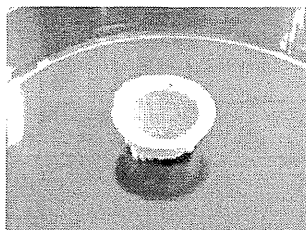


写真 4（配管 4）

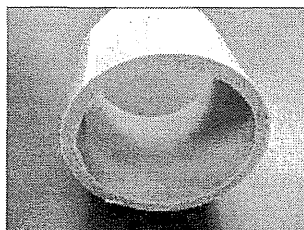


写真 5（配管 5）

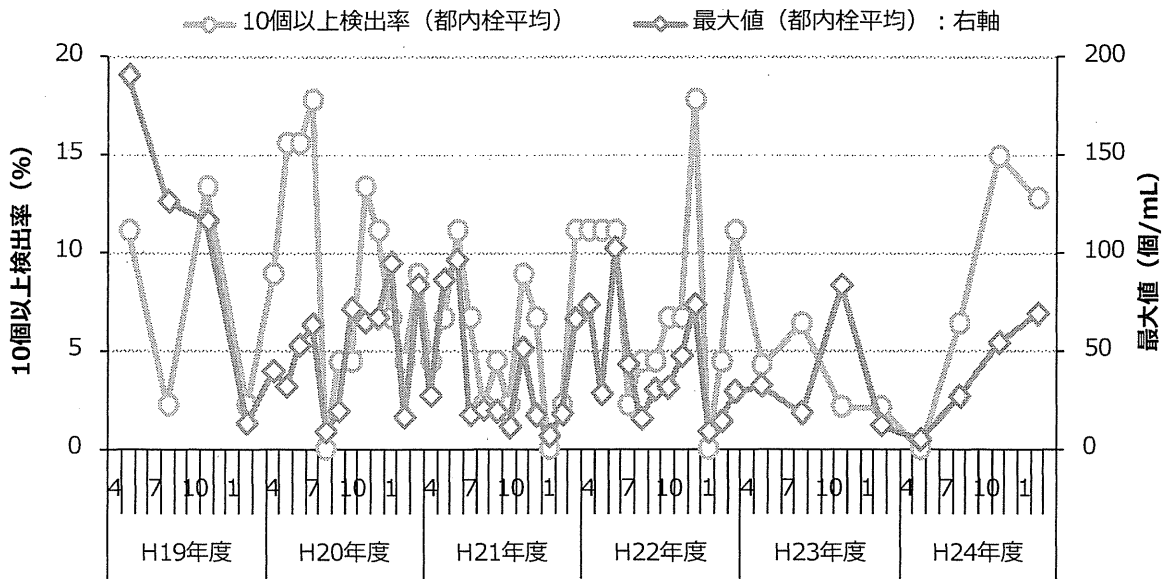


図 2 平成 19～24 年度までの都内給水栓従属栄養細菌 10 個以上検出率及び最大値

表 4 都内給水栓における従属栄養細菌の順位付け結果(抜粋)

総合 順位	地点 番号	検出率		検出時平均 検出数		10 個以上 検出率		順位 合計値	備考
		順位	平均値 (%)	順位	平均値 (個/mL)	順位	平均値 (%)		
1	10	2	86.1	2	21.3	1	33.3	5	・朝霞系
2	38	1	88.9	4	13.3	2	31.9	7	・三郷系
3	28	11	73.6	1	28.1	3	29.2	15	・朝霞系(最末端)
4	17	6	79.2	14	4.4	5	15.3	25	・三郷系
	33	5	81.9	13	4.4	7	13.9	25	・金町・三郷系
	36	14	66.7	7	7.8	4	20.8	25	・朝霞系
23	34	22	56.9	18	3.4	19	5.6	59	・金町・三郷系
	42	9	73.6	22	3.1	28	1.4	59	・朝霞系
45	1	44	9.7	45	0.8	33	0.0	122	・朝霞系(水質センタ 一敷地内)

表 5 総合順位グループ別と設置状況の比較

	配水小管経過年数 (平成 21 年度時点)	給水管経過年数 (平成 21 年度時点)	流達時間
上位 (1～3 位)	33.0 年	15.7 年	30.3 時間
中位 (20～25 位)	25.2 年	13.0 年	27.8 時間
下位 (40～45 位)	19.3 年	16.2 年	23.7 時間
全地点との相関係数	-0.286	0.158	-0.025