

杉本直樹, 西村哲治: 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, 2011.11.

Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Ono, A., Hasegawa,
R., Hirose, A., Imai, T., Ogawa, K., Ema, M. and
Nishikawa, A., Two-generation reproductive toxicity
study of aluminium sulfate administered via drinking
water to rats. Society of Toxicology 50th Annual
Meeting [Washington, D.C., USA], 2011.

Hirose, A., Fujii, S., Furukawa, M., Nishimura, T.,
Hirata-Koizumi, M., Yamamoto, M., Usami, M.,
Ono, A. and Umemura, T., A combined repeated
dose and reproductive/developmental toxicity
screening study of perfluorooctadecanoic acid in rats.
The 31th International Symposium on Halogenated
Persistent Organic Pollutants (August 2011, Brussels,
Belgium), 2011.

平田睦子, 藤井咲子, 小野敦, 広瀬明彦, 今井俊
夫, 小川久美子, 江馬眞, 西川秋佳. 硫酸アルミ
ニウムの飲水投与による二世世代繁殖毒性試験.
第51回日本先天異常学会学術集会, 東京, 2011.7.

Niizuma, S., Matsui, Y., Matsushita, T. and Ohno, K.,
Evaluating allocation factors of drinking-water
quality standard based on the risk and exposure
assessment, The 4th IWA-ASPIRE Conference,
Tokyo, Japan, 2-6 October 2011.

Dawei Quan, Ryosuke Okashita, Teruo Muto, Yasuo
Yanagibashi, Shinya Echigo, Sadahiko Itoh, Yumiko
Ohkouchi, Hideto Jinno: Alternative Approach to
Estimate the Allocations to Drinking-water of THMs
and HAAs, Micropol & Ecohazard, University of
New South Wales, Sydney, Australia, July 11-13,
2011,

新妻瞬, 松井佳彦, 松下拓, 大野浩一, 有害金属
摂取量に対する飲料水の影響と水質基準におけ
る寄与率の考え方, 第62回全国水道研究発表会,
大阪, 2011/5/18-20, 646-647, 2011.

Kimura, M., Matsui, Y., Matsushita, T., Shirasaki, N.
and Ishikawa, T. B., Reducing ceramic membrane
fouling and residual aluminum by pre-coagulation
with high-basicity polyaluminum chloride. The 4th
IWA-ASPIRE Conference, Tokyo, Japan, 2-6
October 2011

Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsushita, T. and Matsui,
Y., Virus removal by adsorption on super-powdered
activated carbon. The 4th IWA-ASPIRE Conference,
Tokyo, Japan, 2-6 October 2011

Niizuma, S., Matsui, Y., Matsushita, T. and Ohno, K.,
Evaluating allocation factors of drinking-water
quality standard based on the risk and exposure
assessment. The 4th IWA-ASPIRE Conference,

Tokyo, Japan, 2-6 October 2011

Kobayashi Y, Itoh M, Ymamada T, Akiba M and
Matsui Y. Experimental evaluations of water
treatment system as adaptations to a sharp increase
in raw-water turbidity caused by climate change,
using a pilot-scale plant. The 4th IWA-ASPIRE
conference and exhibition., Tokyo, Oct. 2011.

木村正興, 石川太了, 白崎伸隆, 松井佳彦, 松下
拓, ポリ塩化アルミニウムの塩基度がセラ膜ろ
過性能に及ぼす影響. 第45回日本水環境学会年
会, 札幌, 2011/3/18-20.

木村正興, 石川太了, 白崎伸隆, 松井佳彦, 松下
拓, 大野浩一, 凝集剤PAClの高塩基度化による
残留アルミニウムの低減化. 第47回環境工学研
究フォーラム, 高知, 2010/11/9-10.

石川太了, 木村正興, 松井佳彦, 松下拓, 大野浩
一, 高塩基度PAClを用いた凝集処理後の残留ア
ルミニウム濃度とその温度影響. 第61回全国水
道研究発表会, 新潟, 2010/5/19-21.

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回全国水道研究發
表会, 2010

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.

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.

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.

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.

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澱
-MF膜ろ過処理性評価, 第65回土木学会年次学
術講演会, 2010.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 凝集沈
澱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.

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.

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.

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, 京都市, 平成22年9月10日.

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, 福岡, 2010年3月15-17日.

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.

Tani K., Matsui Y., Kamata M., Iwao K., Ohno K. and Matsushita T.: Runoff sensitivity analysis to prioritize pesticides for monitoring. 14th IWA international specialist conference on diffuse pollution: diffuse pollution and eutrophication. 2010.

Tani K., Matsui Y., Kamata M., Iwao K., Ohno K. and Matsushita T.: Determining and verifying property-based pesticide scores for priority setting based on sensitivity analysis with runoff model. Water and Environment Technology Conference 2010. 2010.

直井啓, 鎌田素之: 水環境におけるネオニコチノイド系農薬の存在実態と浄水処理性の評価. 第47回環境工学研究フォーラム. 2010.

田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 杉本直樹, 西村哲治: 水試料中の農薬の定量値における不確かさ. 第47回全国衛生化学技術協議会年会. 2010.

岩尾憲祐, 谷幸二, 松井佳彦, 鎌田素之, 大野浩一, 松下拓: モデルシミュレーションを用いた感度解析に基づく農薬スコア表. 第61回全国水道研究発表会講演集. 466-467, 2010.

鎌田素之, 相澤貴子, 松井佳彦, 第一群農薬の検出実態と今後の監視農薬. 第61回全国水道研究発表会講演集. 468-469, 2010.

Quan, D., Yanagibashi, Y. Okashita, R., Jinno, H., Echigo, S., Itoh, S., and Ohkouchi, Y.: Estimation on

the Allocation-to-drinking- water of trihalomethanes, The 19th Joint KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, Kyoto, Japan, 129-139, 2010.

福井克人, 萱沼康夫, 小坂浩司, 浅見真理, 秋葉道宏: モデル化合物のオゾン処理によるNDMAの生成特性, 第61回全国水道研究発表会講演集, 新潟, 2010, 492-493.

Itoh, S., BGordon, B.A., Callan, P., and Bartram, J.: Regulations and perspectives on estimating total toxicity - Importance of estimating the total toxicity, PACIFICHEM 2010; 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, ENVR 203, Honolulu, Hawaii, 2010.

Echigo, S., Itoh, S., Tanida, S., and Miyagawa, Y.: Speciation of iodine in the Lake Biwa- Yodo River basin as the precursors of disinfection byproducts, PACIFICHEM 2010; 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, ENVR 205, Honolulu, Hawaii, 2010.

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-誘導体化-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).

Nishimura, T., Suzuki, T.: Concentration of per-fluorinated compounds in river water in Tokyo, PFAA Days III, 2010.6.

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.

Nishimura, T., Suzuki, T. : Concentration of perfluorinated compounds in river water in Japan. Dioxin2010, 2010.9.

西村哲治: 水道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.

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.

古林祐正, 伊藤雅喜, 山田俊郎, 南方則之, 堀野秀一, 佐藤研一郎. パイロットプラントにおける濁度急変による浄水処理への影響に関する実験的検討. 第61回全国水道研究発表会; 2010.5.19-21; 新潟. 同講演集. 262-263, 2010.

Kimura, M., Matsui, Y., Matsushita, T., Ohno, K.,

Hasegawa, H. and Ishikawa, T., Novel polyaluminum coagulant to minimize dissolved residual aluminum concentration after coagulation and separation, Water and Environment Technology Conference 2010, Yokohama, Japan, 25–26 June 2010.

松井佳彦, 飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究, 厚生労働科学研究費成果発表シンポジウム, 国立保健医療科学院, 東京, 2010年10月.

F. 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>

安藤 正典	武蔵野大学
稲田 貴嗣	神奈川県衛生研究所
猪又 明子	東京都健康安全研究センター
岩本 智江	東京都水道局
遠藤 卓郎	国立感染症研究所
及川 智	東京都水道局
大谷 喜一郎	神奈川県内広域水道企業団
大西 卓宏	㈱環境科学研究所
勝山 志乃	神奈川県内広域水道企業団
金見 拓	東京都水道局
上村 弘	宮城県仙南・仙塩広域水道事務所
川口 有希子	桐生市水道局
岸田 小百合	タカラバイオ(株)
岸田 直裕	国立保健医療科学院
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
佐々木 美江	宮城県仙南・仙塩広域水道事務所
Jatuwat Sangsanont	東京大学
荘司 浩史	茨城県企業局
高橋 正	新潟市水道局
高藤 俊	浜松市上下水道部
竹内 潤子	愛媛県立衛生環境研究所
武田 万里子	大阪市水道局
田邊 眞	神奈川県農業技術センター
角田 徳子	東京都水道局
百田 隆祥	栄研化学(株)生物化学研究所
船坂 鎌三	㈱環境科学研究所
古川 一郎	神奈川県衛生研究所
松田 信行	㈱環境科学研究所
水野 聡	新潟市水道局

その他9回

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

溝口 智子	㈱岐阜県公衆衛生検査センター
三輪 雅幸	大阪市水道局
村崎 愛	大阪市水道局
矢澤 秀行	桐生市水道局
山下 憲司	神奈川県内広域水道企業団
山本 純子	タカラバイオ(株)
渡邊洋大	神奈川県企業庁

<無機物質分科会>

愛甲 俊郎	沖縄県企業局
石橋 健二	福岡県南広域水道企業団
市川 豊	(社)日本水道協会
上杉 佳寛	(社)日本水道協会
大野 浩一	国立保健医療科学院
木島 健治	千葉県水道局
小林 利男	東京都水道局
坂本 薫	千葉県水道局
白崎 伸隆	北海道大学
荘司 浩史	茨城県企業局
林 広宣	大阪市水道局
比嘉 元紀	沖縄県企業局
平林 達也	大阪市水道局
森 健次	名古屋市上下水道局
森實 圭二	大阪市水道局

<一般有機物分科会>

安藤 正典	武蔵野大学
阿部 晃文	川崎市上下水道局
阿部 進	東京都水道局
今村 康夫	大阪市水道局
宇田川富男	(社)日本水道協会
川元 達彦	兵庫県立健康生活科学研究所
工藤 幸生	(社)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

<消毒副生成物分科会>

稲波 文雄	京都市上下水道局
越後 信哉	京都大学
小笠原 和雄	大阪広域水道企業団
金井 正和	川崎市上下水道局
鎌田 泰和	奈良県水道局
河村 裕之	(社)日本水道協会
北本 靖子	大阪市水道局
小坂 浩司	国立保健医療科学院
佐藤 賢	茨城県企業局
勢川 利治	京都市上下水道局
高橋 和彦	東京都水道局
田中 康夫	阪神水道企業団
中嶋 淳	茨城県企業局
野本 雅彦	北千葉広域水道企業団
保坂 幸尚	東京都水道局
細田 耕	京都市上下水道局
厩橋 哲也	阪神水道企業団
三輪 雅幸	大阪市水道局
與古田 亨	沖縄県企業局
吉岡 浩二	奈良県水道局

<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
加登 優樹	広島市水道局
鎌田 素之	関東学院大学
菊池 満	奈良県水道局
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
佐藤 和男	神奈川県内広域水道企業団
杉田 育生	広島市水道局
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

<水道水寄与率分科会>

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

<リスク評価分科会>

小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所
加藤 日奈	国立医薬品食品衛生研究所
鎌田 栄一	国立医薬品食品衛生研究所
川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所
鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター
高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所
長谷川 隆一	(独)製品評価技術基盤機構
松本 真理子	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

平成 22～24 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 山下 憲司、勝山 志乃、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、岩本 智江、角田 徳子、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 佐々木美江、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、矢澤 秀行（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、高橋 正（新潟市水道局）
研究協力者 武田万里子、三輪 雅幸、村崎 愛（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 猪又 明子（東京都健康安全研究センター）
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、稲田 貴嗣、黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）
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 山本 純子、岸田小百合（タカラバイオ（株））
研究協力者 松田 信行、船坂 鎌三、大西 卓宏（株式会社環境科学研究所）
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 Jatuwat Sangsanont（東京大学大学院工学研究科）
研究協力者 安藤 正典（武蔵野大学）
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。

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。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装置を導入することで、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配管内バイオフィルムを調査した結果、10 個/cm² の実例が得られた。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であった。平成 21 年度の全国の測定値を検討すると、測定地点の大部分で検出数はわずかであった。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、検出される菌叢と数が異なっていた。現行の 7 日間培養を 14 日間になると、特に浄水の従属栄養細菌数が増加した。

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 0.1μm 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 Qβ 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。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、接触時間 0.5 秒の消毒を評価可能となった。大腸菌と Qβ フェージの塩素消毒、並びにポリオウイルスのオゾン処理の効果を検証し、短時間で高い不活化が得られることが改めて確認された。また、RNase 処理 RT-PCR 法により、塩素消毒後の大腸菌フェージ Qβ の生残数が比較的良好に定量可能であった。

耐塩素性病原微生物の研究では、試料水の新規濃縮方法としての粉体ろ過法、並びに新規検出方法としての遺伝子検出法の実用性を検証し、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。浄水目的に開発された粉体ろ過法であったが、原水への応用も可能であった。原水のろ過水量は 2~63L と濁度によって変動し、原水濁度が 10 度未満なら現行検査水量の 10L を 90mm フィルター 1 回でろ過可能と考えられた。浄水のろ過水量は使い捨て 35mm フィルター 24 時間で 200~500L となり、濃縮物の一部だけで現行検査水量の 20L に足り、緊急時の 120L の濃縮にも対応できる水量であった。捕捉性能は概ね 100%近い性能が得られた。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結果、従来の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 近くと実用性十分であった。

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。いずれの機関においても使用可能の結果が得られた。すなわち、RT-LAMP 法、qRT-PCR 法のいずれにおいても、遺伝子検出法は高感度であった。添加回収実験では添加試料から陽性、未添加試料から陰性と、予定の結果が得られた。河川試料からのクリプトスポリジウム等検出は、顕微鏡法と遺伝子法は概ね結果が一致した。一部に結果の不一致が見られたが、異なる遺伝子増幅法間では結果が一致し、遺伝子増幅産物からクリプトスポリジウム等の配列が得られ、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。増幅産物の配列決定から、ヒトに感染する可能性のある遺伝子型の存在が改めて確認された。qRT-PCR 法では汚染の量的把握が可能であったが、クリプトスポリジウム等の入手は容易ではないことから、陽性対照として用意した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 コピー相当であった。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 コピー相当であった。

クリプトスポリジウム等検査法の改善のため、アセトン溶解法あるいは 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たが、いずれの方法でも検査は実施可能であった。国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良好に染色できた。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。新しい蛍光標識試薬は、従来の FITC と異なり、励起光の連続照射による蛍光の退色が少なかった。いずれの蛍光抗体試薬も、検査への活用が期待された。

畜産排水を調査した結果、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、母ブタから離乳したばかりの育成豚舎が最も多かった。糞尿分離を徹底し排水への混入を低減させるか、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。

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。

A1 東日本大震災と水道の微生物学的安全性

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。

A2 従属栄養細菌測定の実用に関する研究

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。この指標の整理と活用が求められている。

A3 腸管系ウイルスに関する研究

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除去・不活化を示すことが、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²⁾。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。具体的には浄水処理中の凝集沈殿処理と消毒による除去・不活化が十分になされていることの確認が重要と考えられる。近年、膜ろ過処理は、従来の凝集沈殿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行うこととした。一方消毒では、低いCt値での消毒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10秒程度、試料採取、消毒剤中和を合わせると15秒の接触時間が限界であり、それより短い接触時間の試料を採取することができなかった。この検討に向けて、短い接触時間の試料を採取可能な消毒装置を開発することとした。

A4 耐塩素性病原性微生物の研究

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、試料水の濃縮方法と検出方法の開発を進めてきた。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。また、高感度な遺伝子検査法への期待が高まった。それらの要望に応えるべく、これまでに粉体ろ過濃縮法と迅速遺伝子検出法が開発され、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た。当該研究では水道事業者、地方衛生研究所、民間検査機関らの協力を得て、検証と検討の積み重ねを行うこととした。

qRT-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、顕微鏡法と同様に個数を求めて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。しかし、いずれも容易では無いことから、人工的な遺伝子断片を用いた検量線を作成、使用することとした。異なる施設間で検査結果を比較することも考慮すれば、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た。検査における定量の負担を減らす目的で、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、検量線を作成することとした。

その他、クリプトスポリジウム等検査法の改善を目指した。濃縮方法(セルロースエステルフィルター、PTFEフィルター)と精製方法(免疫磁気ビーズ法)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。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、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。標識に使われる FITC の蛍光色素は退色することが問題であることから、退色の遅い蛍光標識の検討を合わせて行うこととした。

秋期から春期にかけて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、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。

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、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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）において、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、 $\phi 50\text{mm}$ （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 80.07cm^2 ）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 40cm^2 ）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 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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個/ 4cm^2 となる。

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た。

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。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。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、設置状況との対応を確認した。培養日数と菌数の関係を検討した。

B3 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（ABO42808、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、感染カイコより 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 Q β (以下 Q β 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ブ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、Q β 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、Q β 及び MS2 を河川水に同時添加し、MF 膜ろ過、UF 膜ろ過、凝集-MF 膜ろ過の、大きく分けて 3 通りのろ過処理を実施した。ろ過前およびろ過後の各ウイルス濃度を定量 (VLPs は immuno-PCR 法、Q β 、MS2 は RT-PCR 法あるいはブラック法を使用) し、除去率を求めた。

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、当該研究ではごく短い接触時間で消毒する装置 (プラグフロー装置) の開発を目指した。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。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。装置が適切に機能することを検証するために、大腸菌と大腸菌ファージ Q β の消毒試験を実施した。Q β 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 MicrospinTM S-300)を用いたゲル濾過により精製したものを用いた。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。これとは別に 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を検討した。この RNase RT-PCR を適用し、指標ウイルスとして大腸菌ファージ Q β を使い、塩素消毒後のウイルス測定法として評価した。

B4 耐塩素性病原性微生物の研究

B4-1 粉体ろ過法の検証と改良

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) 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 μ 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 μ 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。

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。蛍光ビーズ希釈液はファンネルに直接添加し、その後、浄水を全量ろ過した。

B4-2 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検証、実績の積み重ねと改良

当初 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。その後 1 機関 (神奈川県企業庁水道水質センター) において、導入に向けた検討を行った。

遺伝子検出法には、RT-LAMP 法あるいは LAMP 法 (栄研化学)、qRT-PCR 法 (サイク

リングプローブ法 (タカラバイオ)、TaqMan プローブ法、Universal Qprobe 法) を用いた。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。顕微鏡法検査は定法に従い行った。

クリプトスポリジウムオーシストとジアリジアシストは、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。

添加回収実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。オーシストとシストからの核酸抽出は、凍結融解と Proteinase K による酵素処理の方法で行った。

検量線の作成には、核酸試料の 10 倍希釈系列を作製し、qRT-PCR を行った。PCR 反応チューブあたりのオーシスト、シスト数と、蛍光強度が基準値を超えたところの C_p 値 (C_t 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 10^5 コピー/ μ L の陽性対照を使用した。

qRT-PCR 産物、あるいは一部試料の Nested-PCR 法から塩基配列を決定し、Blast 検索により相同配列を検索した。

B4-3 クリプトスポリジウム等検査法の改善

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の検討は、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 μ m (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。

国産蛍光抗体試薬は、以下の方法で検討した。まず、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)または外国産試薬(Aqua-Glo、Waterborne)を使用した。

退色の遅い蛍光標識試薬の検討には、新しい色素の代表として Dylight 標識抗体(アーク・リソース)、従来の FITC 標識の代表として EasyStain (BTF) を用い、定法に従って染色を行った。封入操作には、EasyStain 添付の封入剤、Fluoprep (蛍光試料用水性封入剤、ピオメリュー)、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。各染色標本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。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。

B4-4 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。豚舎の汚水枘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⁴⁾)を一定量添加し、回収率を求めた。

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、今なお特効薬はなく、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⁵⁾。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⁶⁾、避難所でインフルエンザ集団感染の報告⁷⁾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⁸⁾。

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⁹⁾、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^{10) 11)}。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 従属栄養細菌測定の実用に関する研究

表2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。水源及び配水系統図を図 2 に、平成 24 年 1 月以降の従属栄養細菌測定結果を表 3 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った。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。

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 4)。採取場所については図 2 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 には付着物があつたが、配管 2、4 には付着物はなかつた。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つた。停滞箇所に注意を要することを事例として確認した。

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 40cfu/4cm² (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。こうしたバイオフィルムの拡大を防ぐには、残留塩素消毒の徹底が重要と思われた。

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、多くの水道事業者で試験結果が公開されている。平成 23 年 3 月現在で約 190 事業者、約 1970 の採水地点より、H21 年度の結果を集計することができた。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 未満であつた(図 3)。また、各地点の最高値の平均値は 23cfu/mL と低かつた。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つたのではないかと推測された。以上の通り、測定地点の大部分で検出数はわずかであつた。

浄水処理過程の管理を企図して、処理方法が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、工程を経るに従つて検出数が減少し、浄水では概ね従属栄養細菌は検出されなかつた。高度浄水処理では、オゾン処理工程までは処理に伴つ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 4)。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検出されなくなったが、BAC 池の従属栄養細菌を減少させるには、上行流式活性炭処理といった方法が考えられるかもしれない。

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 5)。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。

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を検討した結果、検出率は概ね 40~80% の範囲で、検出時の平均検出数はほぼ 10 個/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 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。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、10 個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 5)。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 10 個以上検出数)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い地点として特定した。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 6)。

なお、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 6A~C)、これは原水(図 6D)とは異なる傾向にあった。原水の検出数は、7 日目から 14 日目の増殖率は高くなく、増殖速度の遅い細菌の優占、塩素消毒の損傷による増殖の遅延などが推測された。このことを検出率で検討してみると、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 7)。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¹²⁾。方法の統一あるいは過去との整合性の観点からは 20°C 7 日間の培養条件が好ましいが、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は 20°C 14 日が好ましい。培養条件を決めるのは容易ではなく、将来の課題と考えられた。

以上の通り、高い検出地点の把握と問題の解消を貯水槽や末端給水栓で行うことで、従属栄養細菌は活用し得ることが示された。従来、従属栄養細菌は配管中での再増殖を検知するのに有用と期待されていたが、検討した範囲で、大きな配管や古い配管であっても問題はなかった。これは国内の配水系が適切に管理されていることを示す結果と考えられた。すなわち、海外の水道と異なり、断水と汚水の吸引や滞留と塩素濃度の低下といった問題がほぼない、高品質な日本の水道を反映した結果と考えられた。従属栄養細菌が多く検出されるような管理の不足している末端給水栓を積極的に見出すことが、日本全体の水質向上につながると期待された。

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 7)。すなわち、従来の ELISA 法(10^9 VLPs/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 8)。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 μ M-Al 以上の PACI 添加で、ノロウイルスを 4-Log 以上除去した(図 9)。結果には示していないが、分画分子量 1kDa の UF 膜と同程度の除去性能であった。一方、鉄系凝集剤を使用した凝集-MF 膜ろ過では、40 μ M-Fe の FeCl₃ 添加で 3-Log 程度が除去された(図 10)。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 μ 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 9)。これは鉄系凝集剤を使用した場合でも再現した(図 10)。Q β も MS2 もノロウイルスの指標としては不足があり、一方で野生ノロウイルスの培養法は未だ確立されておらず、従って 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。

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)を開発し、最終的に構成した消毒装置のスキームを図 11 に示した。この装置が有効に機能していることを検証するために、大腸菌を塩素消毒した結果、初期遊離塩素濃度 0.5mg/L の場合には 2.5 秒間で約 4-Log の不活化が直線的に測定された(図 12)。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。さらに大腸菌ファージ Q β で塩素消毒を実施すると、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(図 13)。最後に、オゾンによるポリオウイルス不活化実験を行った(図 14)。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が不活化された。まず 0.7 秒後に 3-Log 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。なお、PCR 法による測定ではブラック法と異なり、0.5-Log 程度の不活化しか観察されていないが、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た。

なお、PCR 法による測定でもブラック法と同等の結果が得られるように、Cryonase Cold-active Nuclease を用いた RNase RT-PCR 法を構築した。この処理により塩素消毒後の不完全なウイルス RNA を分解した結果、ブラック法と RNase RT-PCR 法の結果は初期濃度によって違いが見られたが、高い初期濃度(2mg/L)でブラック法の感染価に近い不活化曲線が得られた。

従来、ウイルス処理は消毒が基本と漠然と考えられていたかもしれないが、以上の通り、低い Ct 値であってもウイルスとファージは消毒されていた。加えて、PAC 凝集-MF ろ過処理でもノロウイルス VLPs で 4-Log 以上の除去率が得られており、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。

C3 耐塩素性病原微生物の研究

C3-1 粉体ろ過法の検証と改良

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、支持体の浮き上がりが一時間問題となったが、メインフィルターの支持

体をろ紙から不織布に変更して強度を上げたこと、製造時の締め付け圧力不備の改善により、問題は解消された(写真 6A)。また、原水への応用も期待され、以下の検証の過程で 90mm の直径であれば原水 10L のろ過可能であることが示され(写真 6B)、原水と浄水とともに、良好なる過濃縮物が得られるようになった(写真 6C、D)。ろ過を簡便に実施するためのろ過補助装置も使用可能になった(写真 7A)。

5 機関の協力を得て粉体ろ過法の検証を開始し、その結果は水道微生物問題検討会の資料として活用され、当該研究班の報告書に成果としてまとめた。原水のろ過水量は濁度により影響を受けたが、2~63L が 1 時間にろ過可能であった(表 8)。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、30 度を越える濁度では 3 回、70 度で 4 回に分けてのろ過が目安となった(図 15)。低濁度では 1 時間に最大 63L に達し、試験複数回分の水量を濃縮できた。浄水のろ過水量は 24 時間で 200~500L に達し、浄水検査の標準 20L には濃縮試料の一部を使用するだけで分量であった。試験法では、応急対応のための検査に水道水 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るが、粉体ろ過法はこの 120L のろ過にも対応できるものと判断された。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。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、活用が期待された。

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 70~最大 117%)であ

った(表 8)。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 8)。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。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。

粉体ろ過法の利便性を向上させるべく、さらに改良を行った。すなわち、加圧ろ過方式で残る僅かな汚染を回避するため、吸引ろ過方式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、アスピレーターの陰圧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 7B)、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。この方法で行った捕捉性能は、平均 93.6%(計 4 回のろ過の実施)と良好であった(表 9)。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ことから、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。

C4-2 クリプトスポリジウム等遺伝子検出法の検証、実績の積み重ねと改良

当初、10 機関の協力を得て遺伝子検出法の検証を開始し、その結果は水道微生物問題検討会の資料として活用され、当該研究班の報告書に成果としてまとめた。さらに 1 機関において遺伝子検出法の導入を目的に検討が行われ、現時点で 11 機関において遺伝子検出法が実施可能であった（表 10）。

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。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っていないが、いずれかの遺伝子検出法が実施可能であった（表 10）。否定的な結果はなく、ほぼ全てが肯定的であった。以下、代表例の結果を示す。

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 11 の結果は、UV 照射不活化の添加回収試験用の標品を用い、顕微鏡下で (オー) シスト数を確認してから感度試験がなされており、反応チューブあたりで 0.006 個相当の (オー) シストが検出された。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 16）。

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 12）、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 17）。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。

その他の結果も含め、最終的に遺伝子検出法はクリプトスポリジウム等の検出方法の一つとして使用可能であることが示された。

遺伝子法はまだ実績が少ないことから、検出の積み重ねを行った。全国 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クリプトスポリジウムが 50% (= 15/30)、ジアルジアが 30% (= 9/30) であった（表 13）。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。qRT-PCR 法と LAMP 法の定性的な検出結果はほぼ一致し、陽性試料からクリプトスポリジウムあるいはジアルジア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 (SSU rRNA 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¹³⁾。

遺伝子法は顕微鏡法に近い 43% (= 13/30)、27% (= 8/30) の頻度でクリプトスポリジウムとジアルジアを検出できたが、定性的な検出結果は必ずしも一致しなかった（表 14、15）。その理由として、試料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 16）。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 に分したこの試験では、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 16)。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クリプトスポリジウム 10 試料、ジアルジア 9 試料については、2 試料を除き 5 (oo) 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。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とも言えた。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 17)。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、クリプトスポリジウム 7 試料、ジアルジア 3 試料で遺伝子増幅と塩基配列の解読に成功し(表 18、19)、それぞれ 3 試料の遺伝子型がヒトへの感染が報告されていた

14) 15)。

検査における定量の負担を減らす目的で、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 に示した。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。

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。

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