

<水質分析法分科会>

五十嵐 良明	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
久保田 領志	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
小杉 有希	東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部
木下 輝昭	東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部
矢野 美穂	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部
阿部 晃文	川崎市上下水道局 水管理 センター 水道水質課
境 泰史	公財) 北九州生活科学センター
大窪 かおり	佐賀県衛生薬業センター

平成 25 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）

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

研究代表者 松井 佳彦（北海道大学大学院工学研究院）

### 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 ー微生物分科会ー

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研究科）
研究協力者	酒井 紳	（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	田部井 由紀子	（東京都健康安全研究センター）
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	黒木 俊郎	（神奈川県衛生研究所）
研究協力者	田邊 眞	（神奈川県農業技術センター畜産技術所）
研究協力者	安藤 正典	（山梨大学工学部）
研究協力者	橋本 温	（県立広島大学生命環境学部）
研究協力者	大河内 由美子	（麻布大学 生命環境科学部）

#### 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。

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。付着性の従属栄養細菌を測定する方法を安定させるため、拭き取り法の検討を行った。拭きとり面積を一定とし、市販のふきとり検査キットの綿棒を使用することが好ましく、超音波処理よりも試験管ミキサーで 1 分間攪拌することが綿棒からの回収方法として適していた。レジオネラ属菌の汚染実態調査を開始し、水道に関連した汚染を培養法とPCR法で検出した。家庭内環境では使っていない蛇口や風呂水から培養陽性であった。クリプトスポリジウム等の濃縮を目的とした粉体ろ過法を、細菌にも応用した。粉体の使用でろ過水量が倍増し、粉体は培養を阻害せず、回収率はフィルター単独の半分程度からほぼ 10 割に向上した。大腸菌のコリラート培地法と嫌気性芽胞菌のハンドフォード改良寒天培地法に適用が可能であった。

全国 11 箇所の原水を用いて、試験管内でポリオウイルスと MS2 ファージの PAC による凝集沈殿ろ過によるウイルス除去を実測した結果、ポリオウイルスは凝集処理で 1-Log 程度、孔径 0.45  $\mu$  m の膜ろ過後で計 3-Log 程度の除去が得られた。MS2 ファージはポリオウイルスと挙動が異なり、指標にならないことが判明した。すなわち、凝集処理で 3-Log 程度、膜ろ過後で 6-Log 程度となり、高塩基度 PAC の使用でさらに除去率が向上した。

デジタル PCR は低濃度の遺伝子定量を可能とする近年の新しい技術で、これをクリプトスポリジウムに適用した。1 オーシスト当たりの 18S rRNA のコピー数は 20 と予想されていたが、デジタル PCR の測定で 28 コピーとほぼ対応した。発現している rRNA は 21,900 コピーであった。これまでクリプトスポリジウム遺伝子検出法の定量用に整備された検量線の結果とほぼ対応しており、検量線の信頼性が支持された。クリプトスポリジウム等の濃縮を目的とした粉体ろ過法では、クロスコンタミネーションを防ぐ目的で吸引ろ過法を検討している。より簡便にろ過を行う目的で、ガラス製ファネルを用いること、低温の原水の発泡を防ぐ脱気操作としての攪拌と加温、ファネルをゴム板で封じて吸引圧で試料水を導入することを新たに工夫した。クリプトスポリジウム等検査法の基準化を考えるに際して、煮沸勧告や給水停止の社会的な混乱の回避が必須である。紫外線照射等の追加の対策を導入することで、水道利用者にとっての安全性向上、水道事業と行政にとっての混乱解消、検出後対応手順の整理により検査者にとっての心理的負担の軽減と検査法にとっての正しい陽性陰性判定が可能となることが考察された。すなわち、クリプトスポリジウム検査は水安全計画における最終製品産物の確認の方法として位置づけられることが妥当と考えられた。

#### 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。

水道水を含む多くの水は、同化性有機炭素 (AOC, Assimilable organic carbon) を含み、細菌の増殖が可能である<sup>1,2)</sup>。水道水では、特に消毒の塩素が消失すると従属栄養細菌が増殖するが、このことにあまり注意が払われてこなかった。従属栄養細菌の多くは病原性のない雑菌として扱われるが、一部には日和見感染の病原体が存在し、免疫不全等の健康弱者にとっては注意すべき対象となる。加えて、雑菌を捕食増殖する自由生活性アメーバが存在し、さらに、自由生活性アメーバに感染し増殖するレジオネラ属菌 (*Legionella*) は、ヒトに重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こすことが知られている。このように、水環境には目には見えなくても生態系のピラミッドが存在し、微生物の増加により水道水の衛生状態が悪化する恐れがある。この問

題は浄水場で水道水の十分な消毒が行われても防げず、末端側で生じてしまうことから、途中配管、貯水槽、末端給水栓等の衛生的な管理が必要である。配管の内壁に付着した従属栄養細菌数についての研究はほとんどないが、海外において 100cm<sup>2</sup> あたり 1.1 $\times$ 10<sup>5</sup> ~ 5.75 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU であったとの報告がある<sup>2)</sup>。配管とは全く条件が異なるが、壁面が木の板である浴槽について、洗浄前の浴槽壁面を拭き取った結果、従属栄養細菌数は 100cm<sup>2</sup> あたり 3.9 $\times$ 10<sup>5</sup> ~ 2.4 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU<sup>3)</sup>、洗浄後は 6 $\times$ 10<sup>0</sup> ~ 1.9 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU で、このような施設では、レジオネラ属菌に悩まされている。

平成 20 年度より水質管理目標設定項目に従属栄養細菌が追加された。従属栄養細菌は配水・給水系統における清浄度の指標として活用されることが期待されている。従属栄養細菌の測定には、試料水を R2A 寒天培地や PGY 培地で培養する詳細な方法が上水試験方法に記載されている<sup>1)</sup>。一方、配管や給水栓等の表面に付着したバイオフィームに関心を持たれるもの、

その測定については上水試験方法に記載はない。固形表面を測定するには拭き取り法やスタンプ法が食品分野等で用いられており、これに準じて行うことが考えられる<sup>4,5)</sup>。当該研究では一定面積から市販の拭き取り用器材で安定して試料を採取すること、採取した綿棒から効率よく細菌を遊離懸濁、分散させてから培養を行う、という一連の検討を行うこととした。検討後に、この方法を実際の配管試料に応用した。

*Legionella* 属菌は、患者の届出が年間1,000例と多く、国内外の *Legionella* 感染症は入浴施設、冷却塔などが主要な感染源であることが知られているが、国内事例の半数は原因不明とされる。そこで、身の回りの水環境として、一般家庭の *Legionella* 属菌の汚染状況を明らかにすることを企図した。

ウイルスによる水系感染症を制御していくためには、浄水工程におけるウイルスの処理性を詳細に把握した上で効果的かつ効率的な処理を施すことが重要となる。しかしながら、現在、我が国の浄水場で広く行われている凝集沈澱処理においては、ヒト水系感染症ウイルスの処理性に関する知見はほとんどない。そこで本研究では、凝集沈澱処理を実施している全国の浄水場の協力を得て、送付いただいた原水を用いた回分式凝集処理実験により、ウイルスの処理性を詳細に評価することを目的とした。ヒト水系感染症ウイルスの処理性を代替しうる水質指標の模索を同時に試みた<sup>6,7,8)</sup>。

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しての粉体ろ過法と、検出方法として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。

遺伝子定量に広く採用されているリアルタイムPCR法は、一般に標準試料を用いた検量線が不可欠だが<sup>9,10,11)</sup>、標準試料の取り扱い、濃度調整が容易でなく、汚染(コンタミネーション)も懸念される。そこで本研究では、絶対定量法として注目されているデジタルPCR法に着目した。この方法では標準試料の検量線を用いることなく、目的試料中の遺伝子断片の定量が可能である。反応液を数百の反応セルに分けてから反応を行い、PCRの増幅が得られた区画数から、MPN法のように統計処理を行うことで、試料中の絶対数を算出する方法である。1オーシスト内の遺伝子断片の定量に、デジタルPCR法の適用を試みた。

クリプトスポリジウム濃縮法の一つである粉体ろ過法の方式は、装置の汚染問題を対策した吸引ろ過方式が開発された。先の検討で、吸引ろ過方式は加圧ろ過方式と同様の性能があり河川水に使用可能と示されたが、いくつか改善すべき問題が見つかり、検討を行った。具体的には、フィルターホルダーの形式、そのフタ、そして低温試料で生じる気泡について検討した。市販されているフィルターホルダーの形式にはステンレススクリーンと焼結ガラス製の2つがあり、ステンレススクリーンではケーキ層が一定にならない恐れがあった。10℃以下の低温な試料水を粉体ろ過する場合、ろ過中に試料水中の溶存気体が減圧とともに気泡となって析出し、均一であるべきケーキ層を破壊するといった問題が発生していた。粉体ろ過を吸引ろ過で行う際に用いるフィルターホルダーのふたは、特別注文が必要であったことから、代用品について探索した。

原虫の濃縮法として開発された粉体ろ過法を、細菌測定の濃縮法に応用を試みた。検査の容易化、大容量試料への適用性などを目指した。大腸菌をモデル微生物として、濃縮および回収方法の開発および性能の評価を行った。

クリプトスポリジウム等の耐塩素性微生物による集団感染は、世界的には未だに報告が続いており、何らかの対策が必要と考えられる。日本でも平成24年の2月末から3月にかけて、浄水に

においてジアルジアシストが検出され、煮沸勧告が出された事例があった。給水地域では混乱が生じ、10万人単位で影響が及んだ模様であったが、幸い、感染報告はなかった。何故このようなことが生じるのか、このような事態を回避する方法はあるのか、水道利用者、水道事業者と行政、そして耐塩素性病原微生物の検査にとっての最善を探ることを目的として、現状の整理を試みた。

## B. 研究方法

### B1-1 従属栄養細菌の拭きとり試験

従属栄養細菌の拭きとり試験法の検討では、元宿浄水場2系ろ過池内壁付着物を用いて予備検討を行った。拭き取り面積は100cm<sup>2</sup>とし、拭き取る箇所に滅菌済みイオン交換水約200mLをかけ、バイオフィーム以外の細菌を洗い流した後、市販の拭き取り検査キット(図1)の綿棒で拭き取り、検査キットに含まれるリン酸緩衝生理食塩水10mLに回収した。界面活性剤は細菌分野で分散効果が得られることが経験的に知られていることから、リン酸緩衝生理食塩水に1%の界面活性剤Tween80(和光純薬)を20μL添加した。回収した検査キットを1分間懸濁した後、綿棒を新しい検査キットに移して再び1分間懸濁した。この操作を繰り返し合計5回の懸濁を行い、5つの懸濁液を調製した。懸濁は試験管ミキサー(Thermolyne Maxi Mix II、3,000rpm)、あるいは超音波(東京超音波技研IUC-7321N、900W)とし、菌の回収を比較した。拭き取り面積10cm<sup>2</sup>に相当する懸濁液1mLより、定法に従いR2A寒天培地を用いて20°Cで7日間培養し、従属栄養細菌数を測定した。配管実試料では、給水管取出し工事によりくり抜かれた配管(塩化ビニール管、図2)より測定を行った。配管内表面に滅菌済みイオン交換水約200mLをかけ、検査キットの綿棒で内表面全体を拭き取り回収した。操作は、給水管取出し工事現場で行ったが、屋外のため無菌操作ができず、比較対照として空気中の従属栄養細菌数を確認した。すなわち、同地点で同時間(約20秒)検査キットの綿棒を空气中にさらした対照を測定した。

培養操作は試験室で無菌的に行った。培養に用いた懸濁液1mLは拭き取り面積の1/10に相当する。

### B1-2 家庭環境中のレジオネラ属菌の検出

*Legionella* 属菌の培養検出は、「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究(研究代表者:倉文明)」と共同して行い、成果の一部を引用した。研究方法の詳細は以下のとおりである。

調査に協力が得られた5軒の家庭において、平成25年7月26日から10月8日の期間に調査材料を採取した。試料は水試料およびスワブ試料とし、水試料は25%チオ硫酸ナトリウム2.0mlを添加した滅菌容器に原則として1,000mlを採取した。水道水は放水直後に採取した。温度は採取時に、pHは実験室に搬送してから測定した。遊離残留塩素濃度は採取時にDPD法により測定した。スワブ試料は、滅菌綿棒で採取部位を拭って採取し、リン酸緩衝液(pH7.0)の50倍希釈液(以下、希釈緩衝液)1mlが入った滅菌管に入れた。各試料は冷蔵にて実験室に搬送・保存した。培養は定法にて行った<sup>5)</sup>。すなわち、水試料は直径47mm、孔径0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5mlの希釈緩衝液に再浮遊した。スワブ試料は4mlの希釈緩衝液で浮遊した。試料の浮遊液は50°C、20分の加熱処理を行った後、pH2.2緩衝液で4分間酸処理した。処理後に希釈緩衝液で10倍希釈し、原液と10倍および100倍希釈液の各100μlをGVPCα寒天平板培地(Oxoid)およびWYOα寒天平板培地(栄研化学)に塗抹し、36°Cで7日間培養した。*Legionella*属菌を疑う集落をBCYEα寒天平板培地(Oxoid)に転培し、性状により鑑別を行った。調査検体から分離された*Legionella*属菌は、16S rRNA遺伝子およびLmip(*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)のプライマーを用いたPCRにより、*Legionella*属菌と*L. pneumophila*であることを検査した。さらに、型別用血清(デンカ生

研)および自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。通常の鑑別法で鑑別できない株は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列により種を決定した。

アメーバによる *Legionella* 属菌の増菌培養では、水試料およびスワブ試料の再浮遊試料の加熱処理後の浮遊液 1.5ml を、*Acanthamoeba castellanii* を浮遊させた希釈緩衝液に接種し、25°C で 3~5 日間培養した。培養後、培養液を pH2.2 緩衝液で 4 分間酸処理し、100 $\mu$ l ずつを GVPC $\alpha$  寒天平板培地 (Oxoid) および WYO $\alpha$  寒天平板培地 (栄研化学) に塗抹し、36°C で 7 日間培養した。菌を疑う集落を、性状による鑑別と、LAMP 法検出を試みた。

LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子 (16S rRNA 遺伝子) の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) により行った。水試料およびスワブ試料を希釈緩衝液に浮遊させた試料、およびアメーバ増菌培養液を対象にして、キット添付の説明書に従って核酸抽出と反応を行った。従属栄養細菌は R2A 寒天培地 (BD) で混釈培養法により 25°C で 7 日間培養した。

### B1-3 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

粉体ろ過による細菌測定の見直しは、以下のとおり行った。粉体として粒径 20 $\mu$ m (アパミクロン AP-20C、積水化成工業 (株))、粒径 30 $\mu$ m (平均粒径 33 $\mu$ m、FSC 用アパタイト、アドバンテック東洋 (株)) の球状ハイドロキシアパタイトを用いた。ろ過装置および支持フィルターとして、プラスチック製減圧ろ過容器 (500mL ファンネル装備の 47mm ポリサルホンホルダー、KP-47W、アドバンテック東洋 (株)) を使用した。ろ過容器を吸引ガラス瓶に取り付け、乾式の吸引ポンプに接続し、吸引ろ過を行った。粉体の支持体として、PTFE メンブランフィルター (オムニポアフィルター、孔径 0.45 $\mu$ m または 1.0 $\mu$ m、直径 47mm、メルク (株)) を用いた。支持フィルターをセットしたフィルターホルダーに 100mL 程度の精製水を加えたのち、粉体を添加し、ろ過を行った。高濁度試料水は、農業用の溜め池より採取した底泥を用いて調製した (186NTU)。高濁度

試料水を 60kPa で吸引ろ過し、ろ液流出速度 70 滴/min 未満を終点としてろ過可能水量を測定した。支持フィルターはセルロース混合エステルフィルターと PTFE フィルター (ともに孔径 1.0 $\mu$ m) を使用し、粒径 30 $\mu$ m の粉体の添加量を 0.5、1、2g と変え、ろ過可能水量を測定した。また、同様の条件で、フィルター孔径 0.45 $\mu$ m、粉体粒径 20 $\mu$ m においてもろ過可能水量の測定を行い、最適なフィルター孔径と粉体粒径を決定した。粉体の大腸菌の発育への影響を評価するため、粉体を添加した培地 (コリラート培地および XM-G 寒天培地) および非添加のコントロールでリン酸緩衝液中に一定量に調整した *Escherichia coli* (ATCC 11775 株、NBRC 102203) を添加して定量し、両者を比較した。大腸菌濃縮の添加回収実験は、支持体として孔径 1.0 $\mu$ m の PTFE フィルターを使用し、粒径 20 $\mu$ m の粉体 0.5g を加え、一定量の大腸菌懸濁液 1mL を添加した。大腸菌を含む濃縮物の回収は、界面活性剤 (0.1%TWEEN 80) を用い、共洗い法あるいはフィルターごと回収する方法の 2 つの方法を比較した。共洗い法は、フィルター上の粉体層およびろ過容器内をリン酸緩衝液で共洗いし、粉体および洗浄液を回収した。フィルターごと回収する方法は、支持体のフィルターごと粉体層を滅菌ピンセットで回収した。大腸菌は定法に従い、XM-G 寒天培地 (混釈法) を用いて定量した。粉体を添加しない通常のろ過法を用いた場合も同様に行った。実環境試料での大腸菌および嫌気性芽胞菌測定では、広島県庄原市の戸郷川および国兼川で採水を行った。嫌気性芽胞菌はハンドフォード改良培地法 3 重層法またはメンブランフィルター法で定量した。

### B2 腸管系ウイルスに関する研究

本研究では、全国の浄水場の協力を得て、水道原水 11 を取り寄せた。これにウイルスを添加して人工原水とし、ジャーテストにて凝集沈澱処理実験を行った。原水 300 mL 中に、ウイルス濃度をポリオウイルスが 10<sup>3</sup> PFU/mL、MS2 が 10<sup>6</sup> PFU/mL とするよう添加した。予備実験として、

凝集剤注入後の pH が 7.0 となる 0.1 mol/L の HCl、もしくは 0.1 mol/L の NaOH の添加量を把握した後、本実験では、予備実験で得られた所定量の 0.1 mol/L の HCl、もしくは 0.1 mol/L の NaOH を添加した。凝集剤として塩基度が 50% のポリ塩化アルミニウム(従来 PACl, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 10.0%, SO<sub>4</sub>: 2.7%, 比重: 1.21)、塩基度が 70% のポリ塩化アルミニウム(高塩基度 PACl, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 10.2%, SO<sub>4</sub>: 2.0%, 比重: 1.19)を 1.1~5.4 mg-Al/L(河川水採水日に実際の浄水処理場で使用された凝集剤添加濃度)になるように添加し、G 値 200 s<sup>-1</sup>(95 rpm)で急速攪拌を 1 分間、G 値 20 s<sup>-1</sup>(20 rpm)で緩速攪拌を 10 分間行った後、静置を 60 分間行った。静置後、上澄み水を採取し、実験原水とともにポリオウイルスおよび MS2 の定量に加え、各種水質項目の測定を行った。なお、ポリオウイルスおよび MS2 の定量は PFU 法によった。膜ろ過には孔径 0.45μm の PTFE フィルターを用いた。

### B3-1 デジタル PCR 法を用いたクリプトスポリジウムの定量

標準試料として、感染マウスの糞便より精製した *Cryptosporidium parvum* オーシスト(H8 株)を用いた。なお、標準試料の精製は採取日を変えて 2 回実施しており、株は同一だが、精製と濃度測定が独立している。それぞれの試料を Std.1、Std.2 とし、それらの誤差を含めた検討を行った。オーシストの濃度測定には使い捨ての血球計算盤を使用した。核酸抽出は遺伝子検出法で標準的に行っている以下の方法で行った<sup>11)</sup>。試料を -80℃ のドライバスと 37℃ 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 溶解液を添加し、60℃ 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℃ で 10 分間の追加反応を行った。この核酸抽出液を 95℃ で 5 分間加熱し、Proteinase K を失活させた後、水中で急冷した。一部の核酸抽出液については、逆転写反応(Takara, PrimeScript RT Master Mix)によって cDNA を合成した。核酸抽出試料の濃度は、

PCR 法が 1 反応あたり 1 oocyst となるように、RT-PCR に使用する cDNA 溶液については 1 反応あたり 0.025 oocysts 相当となるように TE バッファーを用いて希釈を行い、その後、デジタル PCR に供した。冷凍保存していた 1.1×10<sup>4</sup>oocysts/50μL、7.0×10<sup>4</sup>oocysts/50μL の高濃度の試料から抽出を行い、段階希釈を経て最終的な濃度を調製した。デジタル PCR には、BioMark Real-time System、12.765 Digital Array (Fluidigm Corporation)を用いた。すなわち、反応溶液が 765 の微小セルに自動分注され、PCR 反応後にそれぞれのセルについて陰性・陽性の判断をし、陽性反応数からポアソン分布に基づき計算することで、元の反応液中の遺伝子数を定量した。一連の分注、PCR、陽性区画の計数、定量値算出は、装置により自動的に行われた。PCR の反応系に、既往文献に記載された 18S rRNA 遺伝子を標的としたプライマー・TaqMan プローブを用いた<sup>9)</sup>。各試料について 2 回の測定を行った。

### B3-2 吸引式粉体ろ過法の検討

フィルターホルダーの形式の検討では、市販のステンレススクリーンと焼結ガラス製の 2 つを用いて粉体ろ過法を行い、その後のろ過ケーキの状態を比較した。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(図 12a)。ろ過後のケーキを観察した。

低水温試料水の前処理方法の検討では、ろ過前の試料水中の溶存気体量の低減化を目的に、「スターラーで激しく攪拌する方法」と「水浴で加温後、室温まで冷却する方法」で検討した。「スターラーで激しく攪拌する方法」は、試料水をろ過前に 2L ごとに分けてスターラーで 10min 激しく攪拌したのち、10L ポリタンクに移し変えた。「水浴で温めた後、室温になるまで冷ます方法」

は水道水約 10L(水温 7.5℃)を 45℃の水浴で 30min 温めたのち、一晚放置して室温まで冷却した。粉体は浄水 200ml に懸濁させたのち脱気して使用した。

吸引方式用のフィルターホルダー用のふたの検討には、特別注文のふたと、代替として汎用品として販売されている安価なゴム板のふたを試した。ふたは厚さ 5mm のゴム板(クロロプレンゴム)を接着剤にて張り合わせ厚さ 10mm にして用いた。ゴム板の中央部にはチューブが通るように穴を貫通させた。チューブは 8×5mm を用いた(図 12b)。ろ過時にはホルダーの縁にシリコングリスを塗った後、おもりをゴム板の上に乗せて安定させた。

### B3-3 水道水におけるクリプトスポリジウム汚染の検出と対策について、考え方の整理

論文、書籍、厚生労働科学研究費補助金による報告、インターネット公開の資料等を参照した。いずれも出典を明記した上で引用し、必要により抜粋、あるいは若干の修正を加えた。

## C. 研究結果および考察

### C1-1 従属栄養細菌の拭きとり試験

試料を拭きとったスワブを試験管ミキサーで懸濁した場合と超音波で懸濁した場合の比較では、試験管ミキサーの方が懸濁 1 回目から 2 回目への菌数の減少が大きく、懸濁 1 回目で多くの菌を回収できることが分かった(図 3)。界面活性剤有無の比較では、試験管ミキサーにおいても超音波においても菌数、懸濁液の色ともに大きな差はなく、界面活性剤の存在は培養に影響しなかった。以上のことから配管等の拭き取り測定は、リン酸緩衝生理食塩水に界面活性剤を添加して、懸濁方法を試験管ミキサーとし、1 分間攪拌することとした。

配管実試料より拭きとり検査を行った(表 1)。配管 1、3 には 36~52CFU/cm<sup>2</sup> の従属栄養細菌が存在し、配管 2 にはほとんど存在しなかった。この数値は、浄水場ろ過池内壁(10<sup>0</sup>~10<sup>2</sup>CFU/cm<sup>2</sup>)と比較して同程度であった。また、

海外で報告されている数値(1.1×10<sup>-1</sup>~5.75×10<sup>4</sup>CFU/cm<sup>2</sup>)と比較した場合<sup>2)</sup>、中間程度に位置した。参考として、国内の洗浄前の浴槽壁面(3.9×10<sup>3</sup>~2.4×10<sup>4</sup>CFU/cm<sup>2</sup>)と比較すると<sup>3)</sup>、桁違いに清浄であった。空気中においても従属栄養細菌の存在を確認したが、若干数であるため、採取操作時の空気中からの汚染は少ないと考えられた。

今回採取を行った地区における末端給水栓水の残留塩素濃度は年間平均 0.3mg/L であり、残留塩素濃度が適切に管理されていても、バイオフィームがわずかに形成されることを改めて確認した。わずかとはいえ細菌が存在するため、塩素の消失により速やかに細菌が増殖する恐れが考えられ、配管等の管理の重要性が改めて認識された。

### C1-2 家庭環境中のレジオネラ属菌の検出

家庭内の水環境における *Legionella* 属菌の培養検出結果を表 2 および表 3 に示した。*Legionella* 属菌が寒天平板培地の培養法で分離されたのは、水試料 25 検体中 1 検体(4%、洗面台蛇口水 1 検体(*Legionella* sp. L-29、370 CFU/ml))であった。スワブ試料 31 検体では検出されなかった。水試料では、アメーバ増菌培養後に *Legionella* 属菌が分離された試料はなかった。スワブ試料ではアメーバ増菌培養後に 2 検体(7%、風呂の蛇口 1 検体(*Legionella* sp.)および洗面台の蛇口 1 検体(*Legionella* sp. L-29))から *Legionella* 属菌が分離された。重篤な肺炎の集団感染で問題となる *L. pneumophila* は検出されなかったが、*Legionella* 属菌の存在は *L. pneumophila* による汚染の指標とされている<sup>12)</sup>。従って、一般の家庭内に *Legionella* 属菌による汚染が発生する環境があり、注意を要すると考えられた。

LAMP 法により *Legionella* 属菌の遺伝子が検出されたのは、水試料 25 検体中 4 検体(16%)、スワブ試料 31 検体中 2 検体(7%)であった。アメーバ増菌培養後に LAMP 法が陽性となったのは、水試料ではなかったが、スワブ試料



では4検体(13%)であった。これら6検体のうち、4検体はアメーバ増菌培養前はLAMP法は陰性であったが、理由として試料中の *Legionella* 属菌がLAMP法の最低検出感度以下(60CFU/反応)が考えられた。

*Legionella* 属菌が検出された洗面台の蛇口は、3カ月以上使用していないため、蛇口あるいは配管中に生物膜が形成され、*Legionella* 属菌が増殖したことが推測された。流水を30分間継続するとLAMP法は陰性となり、水流と水道水中の遊離残留塩素により除菌されたと推測された。しかし、1週間後の再検査でLAMP法陽性となった。一度生じた生物膜の対処は難しいことが示唆された。

水試料25検体中18検体の従属栄養細菌数を測定し、その幾何平均は176CFU/ml、範囲は1~46,000CFU/mlであった。レジオネラ培養陽性1検体の従属栄養細菌数は、46,000CFU/mlであった。LAMP法陽性の3検体の従属栄養細菌数はそれぞれ6,300、21,550および46,000CFU/mlであった。検体中の従属栄養細菌数が高いことは、生物膜の存在と、*Legionella* 属菌の増殖が可能な環境が示唆された。ちなみに、レジオネラ属菌の検出は、営業浴場施設の管理、患者発生時の疫学調査、研究目的等の検査は行われているが、時間や費用を要することから、家庭内の検査には、生態系の底辺である従属栄養細菌の測定が適していると考えられた。

### C1-3 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

高濁度モデル水を用いて、粉体ろ過法のろ過可能水量を測定した(図4)。コントロール(粉体無添加)のろ過可能水量は、フィルター孔径1.0 $\mu$ mでは624mL、孔径0.45 $\mu$ mでは344mLとなり、孔径1.0 $\mu$ mが孔径0.45 $\mu$ mより約1.8倍多く、フィルター孔径によってろ過可能水量に差が生じた。一方、粒径20 $\mu$ mの粉体を添加した条件では、フィルター孔径1.0 $\mu$ mでは1,082mL、孔径0.45 $\mu$ mでは1,052mLであり、ろ過可能水量が増加した。粉体ろ過では、フィルター孔径

の差はほぼなかった。結果には示さないが、粒径30 $\mu$ m、1.0gと1.5gの粉体使用量も検討したが、粒径20 $\mu$ mの0.5gと同様の結果であった。粉体は、大腸菌の発育に影響しなかった(XM-G寒天培地(1シャーレ20mLにつき)とコリラート培地(1試験管1mLにつき)にそれぞれ0.05g添加の場合)。

回収方法も共洗いとフィルターごとの回収のいずれも可能であった。通常の膜ろ過より、界面活性剤を使用したとしても、粉体ろ過法の回収の方が良かった(図5)。最終的に、孔径1.0 $\mu$ mのPTFEフィルター、粒径20 $\mu$ mの粉体を0.5g添加する条件を最適な粉体ろ過条件として提案した。

河川水を対象として、粉体ろ過による濃縮後にコリラートMPN法により定量を行った大腸菌数と、公定法であるコリラートMPN法により定量を行った大腸菌数の関係を図6に示した。両者の相関係数は $R^2=0.9425$ と高い相関が認められ、粉体ろ過法と公定法で同等の大腸菌数を得られることが確認された。なお、この試験には界面活性剤を使用しなかったが、確認で行った界面活性剤の添加結果は、非添加と同等の値が得られた。

大腸菌と同様に、嫌気性芽胞菌についても河川水を対象に、粉体ろ過による濃縮を行った後に混釈法と公定法であるメンブランフィルター法を比較した(図7)。粉体ろ過法とメンブランフィルター法により定量した嫌気性芽胞菌の濃度は相関が認められ( $R^2=0.8457$ )、粉体ろ過による濃縮法の有効性が確認された。なお、界面活性剤添加では、公定法による測定値よりも高い値(高回収)となる傾向にあった。

### C2 腸管系ウイルスに関する研究

図8に凝集沈澱処理におけるポリオウイルスの処理性を示す。塩基度50%の従来PAClを用いた場合、原水Iを用いた場合に0.5log程度、原水Kを用いた場合に2.5log程度の除去であったが、それ以外の原水ではポリオウイルスの除去率には大きな差はなく、概ね1log程度の除

去率であった。また、塩基度 70%の高塩基度 PACI を用いてもポリオウイルスの処理性はほとんど向上しなかった。

凝集沈澱後に孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の膜でろ過を行うと、従来 PACI を用いた場合の除去率が 3~4 log へと増加した(図 9)。ポリオウイルスは直径 0.02~0.03  $\mu\text{m}$  程度であるから孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の膜では除去できず、実際に凝集剤を添加しないコントロール試験ではポリオウイルスは除去されなかった。従って、膜ろ過後に除去率が増加したのは、本研究で行った凝集沈澱処理では沈降しない小さなフロックが存在し、その中にポリオウイルスが捕捉されていたためであると考えられた。

一方、大腸菌ファージ MS2 は従来 PACI を用いた凝集沈澱処理では、結果には示さないが、3~6 log の除去率であった。ポリオウイルスとは異なり、MS2 の除去には高塩基度 PACI が有効であり、従来 PACI と比べて 3 log 程度除去率が増加した。

以上の結果を比較すると、凝集沈澱処理におけるポリオウイルスの除去率は、MS2 の除去率に比べて 2~5 log 程度小さいことが判明した(図 10)。MS2 はヒト水系感染症ウイルスであるポリオウイルスや A 型肝炎ウイルスとサイズが同程度であるため、ヒト水系感染症ウイルスのモデルウイルスとして実験に用いられ、多くの先行研究にて浄水処理性などの評価に用いられてきた<sup>6, 7, 8)</sup>。しかしながら、本研究で示されたように、MS2 とヒト水系感染症ウイルスであるポリオウイルスの除去性は大きく異なり、常に MS2 の除去率がポリオウイルスの除去率を上回った。すなわち、凝集沈澱処理におけるヒト水系感染症ウイルス(少なくともポリオウイルス)のモデルウイルスとして大腸菌ファージ MS2 を使うことは適切ではないことが示された。

### C3-1 デジタル PCR 法を用いたクリプトスポリジウムの定量

図 11 に示すとおり、自動分注された微小セルは、PCR 反応後に陰性・陽性をはっきりと区別

することができ、陽性セルの数から、表 4 に示すとおり、クリプトスポリジウム由来の核酸を定量することが可能であった。

(逆転写反応に供しなかった)DNA 試料の場合、4 回の測定の平均で 1 オーシストあたり、 $28 \pm 4$  コピーという値が得られた。一般に血球計算盤による濃度測定は誤差が大きい恐れが懸念されるが、Std.1 と 2 の精製と濃度測定が異なる試料でも、ほぼ同様の結果が得られた。クリプトスポリジウムの 18S rRNA をコードする遺伝子の場合、理論上 1 オーシストあたり 20 コピー(=ゲノム上 5 コピー×オーシスト内 4 スポロゾイト)有していると報告されており<sup>10)</sup>、理論上の値と近い定量値が得られてことから、デジタル PCR 法を用いてクリプトスポリジウム由来の遺伝子を比較的正確に測定できたと考えられた。加えて、18S rRNA を対象としたプライマー・TaqMan プローブを用いた本 PCR は、デジタル PCR に利用可能と言えた。この反応系を利用して、次に RT-PCR による rRNA の定量を試みた。

(逆転写反応後の)cDNA 試料の場合、4 回の測定の平均で 1 オーシストあたり  $21,900 \pm 7,080$  コピーという値が得られた。リアルタイム PCR 法を用いて定量された実測値(18,000~26,000 コピー)<sup>11)</sup>とは近い値で、こちらも対応が得られた。本 RT-PCR は、デジタル PCR に利用可能と言えた。

### C3-2 吸引式粉体ろ過法の検討

フィルターホルダーの形式を検討した。ステンレススクリーンのろ過ケーキの場合、中央部は凹凸なく平坦なろ過ケーキが形成された。一方で外周部付近のステンレススクリーンの穴が空いていない部分では粉体の堆積が浅くなったり、フィルターが露出している部分があった(図 13a, b)。焼結ガラス製のものは中央部から外周まで平坦なろ過ケーキが形成され、ステンレススクリーンのろ過されたものに見られた粉体の偏りはなかった(図 13c, d)。粉体ろ過法は、濃縮した粒子を粉体ごと回収し、支持体の揉み出し洗いはしないので、裸出した支持体部分に濃縮されると回

収困難(回収率の低下)の恐れがある。陰圧で粉体ろ過を行うには、焼結ガラス製ホルダーの使用が適していると考えられた。

一般に水に溶存する気体の量は、水温が低いほど増加する。実際に、水温がおよそ 10℃以下の水に対して陰圧で粉体ろ過法を行った場合、試料水に溶存していた空気が気泡となって析出し粉体層に穿孔が発生するといった現象が発生していた(図 14a, b)。試料水をスターラーで激しく攪拌してからろ過を開始した場合、細かな気泡が発生したものの気泡の析出状況に改善が見られ、ろ過ケーキも均一な厚みの良好なものが得られた。試料水を加温して脱気処理を行った場合も、ろ過中に気泡は見られなかった。定量的な検討はしていないが、スターラーで激しく攪拌するよりも確実に脱気されている様子であった。ろ過ケーキも均一な厚みの良好なものが得られた(図 14c, d)。いずれの方法にしても、発泡に対策することが重要と考えられた。

粉体ろ過の吸引ろ過に用いるフィルターホルダーのふたは、これまで高価な特注品を使用していた。汎用の安価なゴム板でも吸引ろ過法が実施できるか実験した結果、ゴム板でもろ過可能なことが確認できた。なお、特注のふたよりも気密性が低かったためか、タンクからホルダーまでの流速は自然流下程度であり遅く時間がかかり、流速は 7 割程度に留まった。今回使用したゴム板はクロロプレンゴム製のものであり比較的硬いものであったため、やわらかい素材のゴム板を用いると密着し気密性が高まり、ろ過速度が改善する可能性が考えられた。

### C3-3 水道水におけるクリプトスポリジウム汚染の検出と対策について、考え方の整理

浄水からクリプトスポリジウム等が検出された事例が、平成 8 年度から 24 年度の間に 26 件があった(表 5)(厚生労働省水道課調べ、<http://www.env.go.jp/council/09water/y090-34/ref02.pdf>より)。内 2 例は、越生町と雑居ビルでの集団感染事例で、患者が発生したから水道が疑われて、原因調査の結果として検出

された事例である。残りの 24 件は、患者の発生とは関係なく検査が行われ、偶然に浄水から検出された。幸い患者発生の報告はなかったが、煮沸勧告や給水停止等の対応がなされて、利用者に負担が生じた。

水道法第四条には以下の通り定められている。

水道により供給される水は、次の各号に掲げる要件を備えるものでなければならない。

一 病原生物に汚染され、又は病原生物に汚染されたことを疑わせるような生物若しくは物質を含むものでないこと。

二 (以下略)

この法律を厳密に適用しようとすると、クリプトスポリジウムの混入は一切許されず、検出されれば給水を停止しなければならない。この原則は今日においても守るべきもので、事故を起こさないという法律の強い意志が現れている。安全性の高い水道は日本の財産であり、それを低下させるような判断はされない。一方、現実問題として、クリプトスポリジウム等の混入をどのようにして対処するのかを考えなければならない。

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物による水系感染は、世界的には常に集団感染が報告され続けてきた(表 6)<sup>13)</sup>。近年においてもクリプトスポリジウムで胃腸症状の申告が 1 万人を超える、推定 2 万 7 千人の集団感染が 2010 年に発生している<sup>14)</sup>。この集団感染はヨーロッパで最大、米国 Milwaukee の事例に次ぐ世界第二位の規模であった<sup>15)</sup>。表には列挙しなかったが、水道水以外では、水泳プール、修景水(噴水等)ではさらに多数の集団感染事例が報告されている<sup>13)</sup>。すなわち、クリプトスポリジウム等に対しては、塩素に依存した対策では防ぎきれない実態が露見している。

河川水等の水道原水は、家畜等の糞便汚染がしばしば問題とされていた。しかし、畜産排水は既に対策済みとされていた。農林水産省まとめの、家畜排せつ物法の施行状況によると、国

内の畜産農家は10万戸あり、規模が大きいなど、法律の管理対象とされる農家は半数の5万戸あり、その99.98%は既に管理基準に適合とのことであった(図15)。一方、当研究班が全国30箇所の原水を取り寄せてクリプトスポリジウムとジアルジアを検査した結果、半数以上より検出されており、家畜由来かどうかはともかくとして、汚染は明らかであった(表7)<sup>11, 16)</sup>。

幸い、日本の水道は、世界的に最高水準にあると国内外に信じられている。今後ともこの評価を裏切らない対応が求められる。日本では、誤接続、盗水、陰圧が生じることは極めてまれと思われる。すなわち、浄水場の水質≒末端の水質、高品質を目指すことが可能である。水道水は、飲料水だけでなく、消防、衛生(風呂、トイレ、下水処理)、医療、農工業等々とあらゆる方面で用いられている。すなわち、現代社会において水道は、もはや止めることの出来ないシステムになっている。したがって、耐塩素性病原微生物の対策を目的とした処理の追加は、過剰な設備投資ではなく、保険、あるいは投資と考えるべきであると考え。仮に、横浜市の小雀浄水場においてクリプトスポリジウムによる汚染が生じて断水した場合、1日の被害は32億円、復旧までに要する時間を1週間と仮定した場合は7倍の224億円が被害額と試算されている<sup>17)</sup>。この間の都市生活はマヒ状態となる。

水道の歴史において、近代水道が開始される以前の水道は病気を運ぶことを理由に嫌われていた時代があったようである。水道の発展の経緯は成書に詳しいので抜粋して列挙する(図16)<sup>18, 19, 20)</sup>。かつて、ろ過なし、消毒なしの水道が原因で、コレラが流行する時代があった。1848年に始まったロンドンのコレラの大流行においては、3万人が罹患して1万人以上が死亡した。John Snowが疫学調査で水道が原因であることを突き止め、1854年の再流行では水道を止めることで流行を収束させた。1892年、ドイツのハンブルグとアルトナの隣接する両市は、エルベ川から取水していた。ろ過をしていなかったハンブルグでコレラが流行し、緩速ろ過をしていたアルトナ

では流行がなかったことから、ろ過が病原体の除去に有効であることが示された。その後、一時期ろ過が過信されたが、徐々に消毒の必要性が認識されていった。Jersey Cityは公衆衛生の観点からの強い要請に基づいてBoontonからの水道水を塩素処理する権利を有する、という判決が裁判所で1910年に出され、その後に塩素消毒が米国に急速に広まっていった。

クリプトスポリジウムは、サイズが5 $\mu\text{m}$ と小さいことから凝集沈殿ろ過による除去は完全ではなく、塩素耐性があり、水道を介して伝播する恐れがある。水道を介した集団感染が、1980年代から工業先進国を中心に報告されるようになっていく。もっともよく知られているのが1993年に米国Milwaukeeで発生した大規模事例で<sup>15)</sup>、40万人が罹患したとされる。その3年後の1996年、日本においても越生町で水道を介した大規模集団感染が発生し<sup>21)</sup>、水道における耐塩素性病原微生物の対策が急務となった。現在の水道は、耐塩素性病原微生物をどのように対策をするのかが問われている、と云ってよい。対策の具体的な方法としては、紫外線照射と膜処理が「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」に既に記載されている。

クリプトスポリジウム等による汚染対策は、平常時と異常時は切り分けて考えるべきと思われる。例えば、凝集剤の変更で問題が生じたMilwaukeeの事例がある<sup>15)</sup>。沈殿池中に設置された傾斜板をメンテナンスするために外したところ、集団感染に至ったNorth Battlefordの事例がある<sup>22)</sup>。越生町の場合は、下水排水が取水口の上流にあったこと、濁水で汚染が希釈されていなかったこと、取水口の工事を行ったこと、降雨があったこと、気温上昇により飲水量が増加したであろうこと、凝集沈殿処理なし塩素消毒のみの処理であったこと、下水、浄水、利用者間でクリプトスポリジウムの汚染が循環したこと、があった<sup>21, 23)</sup>。水道水を介した事故は、原水に病原微生物が存在する状況にあって、浄水処理に瑕疵が生じた際に発生するものであることを再確認しておく<sup>23)</sup>。このような状況は、平時のリスク管

理とは明らかに異なる、想定外の事態である。このような想定外の状況に陥ったとしても、水道の安全性を何とか維持したいとすれば、マルチプルバリアの導入が効果的と考えられる。万が一、一段目の処理に失敗しても、二段目の処理が問題を緩和してくれる。上述の集団感染の3事例とも、実は前兆現象として僅かな患者が発生し続けていた。もしマルチプルバリアのコンセプトが反映されていれば、これらの感染者と事故が防げたのではなかろうか。

現在、HACCP の考え方を取り入れた WSPs (水安全計画) に基づき、高度な品質管理を行うことが進められている。つまり、対策前の施設では、危害を検知し、対策を行う。対策済みの施設では、大腸菌検査と同様、安全性をアピールするための基礎データになる。つまり、まず対策があって、対策を講じた上で、品質管理のための試験を行う、というのが水道における検査のあり方ではないだろうか。換言すると、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物は、施設基準によって凝集沈殿ろ過の濁度の徹底や処理の追加を行い、未然に汚染を防ぐことである。

浄水での病原体検出は、給水停止、あるいは煮沸勧告をする事態に陥る。検査者にとってはたいへんに重い検査で、そのような負担を生じさせないためには必要な対策を導入することと、検出後対応手順の整理により、検査者にとっての心理的負担の軽減と検査法にとっての正しい陽性陰性判定を可能とすると考えられた。

## D. 結論

### D1-1 従属栄養細菌の拭きとり試験

バイオフィルムの従属栄養細菌を安定して拭き取り測定するため、測定方法を検討した。市販の拭きとり試験用滅菌綿棒を用い、リン酸緩衝生理食塩水に界面活性剤を添加して1分間攪拌する方法が適していた。この方法により3つの配管実試料を測定し、2つの配管で従属栄養細菌の存在を確認した。末端給水栓水での残留塩素濃度が適切に管理されていても、バイオフィルムがわずかに形成されることを改めて確認した。

### D1-2 家庭環境中のレジオネラ属菌の検出

5軒の家庭の給水・給湯水および蛇口から水試料とスワブ試料の計56検体を採取し、*Legionella* 属菌の検査を行った。3検体(5%)が培養陽性、10検体(18%)が遺伝子陽性であった。検出されたのは、台所、浴室および洗面台の給水・給湯水と蛇口であった。これらの検体は従属栄養細菌数も多く、*Legionella* 属菌の増殖が可能な環境であることが推測された。今回の調査では *L. pneumophila* は検出されなかったが、家庭内の水環境に *Legionella* 属菌の汚染があり、当該菌が発生しておかしくないことが明らかとなった。末端の給水栓と水の使用方法について、注意喚起が必要と考えられた。

### D1-3 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

粉体ろ過法の細菌試験への応用について検討した結果、新しい、大容量の濃縮が可能な、細菌の簡便な濃縮法としての有効性が示された。すなわち、粉体の添加により、高濁度水においても2倍以上にろ過可能水量が増加し、ろ速も向上した。ハイドロキシアパタイト粉体は、培地中に存在しても、大腸菌の発育に影響はなく、濃縮後に粉体と菌体を分離する必要はなかった。河川水の試料において粉体ろ過法による濃縮を大腸菌(コリラート MPN 法)および嫌気性芽胞菌(ハンドフォード改良寒天培地法)に適用したところ、コントロールの公定法と同等かそれ以上の定量値が得られた。

## D2 腸管系ウイルスに関する研究

全国11箇所の原水を用いて、試験管内でポリオウイルスとMS2ファージのPACによる凝集沈殿ろ過によるウイルス除去を実測した結果、ポリオウイルスは凝集処理で1-Log程度、0.45 $\mu$ m膜ろ過後で計3-Log程度の除去が得られた。MS2ファージはポリオウイルスと挙動が異なり、指標にならないことが判明した。すなわち、凝集処理で3-Log程度、膜ろ過後で6-Log程度となり、高塩基度PACの使用でさらに除去率が向上

した。

### D3-1 デジタル PCR 法を用いたクリプトスポリジウムの定量

デジタル PCR 法を用いて、検量線を作ること無く、感染動物の糞便から精製されたクリプトスポリジウム由来の DNA、RNA を定量可能であった。1 オーシスト当たりの 18S rRNA のコピー数は 20 と予想されていたが、デジタル PCR の測定で 28 コピーとほぼ対応した。発現している rRNA は 21,900 コピーであった。これまでクリプトスポリジウム遺伝子検出法の定量用に整備された検量線の結果とほぼ対応しており、検量線の信頼性が支持された。

### D3-2 吸引式粉体ろ過法の検討

フィルターホルダーの形式の違いにより、ろ過ケーキに差が見られた。焼結ガラス製のものとは流路の偏りもなく、均一の厚みのろ過ケーキを得られた。陰圧で粉体ろ過を行うには、ステンレスではなく、焼結ガラス製ホルダーの使用が適していると考えられた。低水温試料水に粉体ろ過法を適用する場合は、ろ過前の脱気処理が不可欠であった。脱気処理を何もせずに行った場合、ろ過の最中に成長した気泡により正常な濃縮が行えない恐れがあった。低温の原水の発泡を防ぐ脱気操作としての攪拌と加温が対策となった。吸引方式用のフィルターホルダー用のふたは、特注品でなくても、フィルターホルダー内へ試料水を導入可能であり、より低コストな粉体ろ過法の実施が可能であった。

### D3-3 水道水におけるクリプトスポリジウム汚染の検出と対策について、考え方の整理

水道の微生物汚染対策の歴史的な経緯を鑑みて、現在行われている凝集沈殿ろ過と塩素消毒に加えて、紫外線照射、あるいは膜ろ過といった処理を追加することにより耐塩素性病原微生物を対策することが、今後の方向と考えられた。HACCP に基づく WSPs の推進も含めることで、水道利用者にとっての安全性向上、水道事業と

行政にとっての混乱解消、検出後対応手順の整理により検査者にとっての心理的負担の軽減と検査法にとっての正しい陽性陰性判定を可能にすると考えられた。

### E. 参考文献

- 1) 日本水道協会: 上水試験方法(微生物編)、pp.47~51、2011
- 2) 金子光美監訳: 飲料水の微生物学より、水道水中の従属栄養細菌のモニタリング、pp.441~465、1992、技報堂出版
- 3) 遠藤卓郎他: 厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究(主任研究者: 井上博雄)」より、平成 18 年度分担研究報告書「紫外線殺菌装置の有効性評価」、pp.87~97、2006
- 4) 日本薬学会: 衛生試験法・注解、pp.55~59、2010、金原出版
- 5) レジオネラ症防止指針作成委員会: レジオネラ症防止指針(第 3 版)、pp.28~36、2009、(財)ビル管理教育センター
- 6) Jacangelo, J. G., Adham, S. S. and Laïné, J. M. (1995) Mechanism of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and MS2 virus removal by MF and UF, *Journal of the American Water Works Association*, 87(9), 107-121.
- 7) Sobsey, M. D., Battigelli, D. A., Shin, G. A. and Newland, S. S. (1998) RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater, *Water Science and Technology*, 38(12), 91-94.
- 8) Fiksdal, L. and Leiknes, T. O. (2006) The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water, *Journal of Membrane Science*, 279(1-2), 364-371.
- 9) Miller W. A., Gardner I. A., Atwill E. R., Leutenegger C. M., Miller M. A.,

- Hedrick R. P., Melli A. C., Barnes N. M. and Conrad P. A. Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). J. Microbiol. Meth. 2006; 65:367-79.
- 10) 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 2004; 304: 441-5.
- 11) 松井佳彦、泉山信司、秋葉道宏、松下拓、片山浩之他、「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－」、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)(研究代表者、松井佳彦)より平成 23 年度分担研究報告書
- 12) van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Arnault L, Bloc D, Laudat P, Hartemann P, Quentin R.: *Legionella anisa*, a possible indicator of water contamination by *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 44 (1):56-9, 2006.
- 13) Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res. 2011 Dec 15;45(20):6603-14.
- 14) Widerström M, Schönning C, Lilja M, Lebbad M, Ljung T, Allestam G, Ferm M, Björkholm B, Hansen A, Hiltula J, Långmark J, Löfdahl M, Omberg M, Reuterwall C, Samuelsson E, Widgren K, Wallensten A, Lindh J. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. Emerg Infect Dis. 2014 Apr;20(4):581-9. doi: 10.3201/eid2004.121415.
- 15) Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JB. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med. 1994 Jul 21;331(3):161-7.
- 16) 松井佳彦、泉山信司、秋葉道宏、松下拓、片山浩之他、「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－」、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)(研究代表者、松井佳彦)より平成 24 年度分担研究報告書
- 17) 厚生科学研究費補助金「水道における化学物質の毒性、挙動及び低減化に関する研究(主任研究者:眞柄泰基)」H12 年度総括研究報告書より、「クリプトスポリジウムによる断水の被害額算定(小泉清)」pp.527-529
- 18) 金子光美(編著):水道の病原微生物対策より、序章、pp.2~3、2006、丸善
- 19) 金子光美監訳:飲料水の微生物学より、微生物と飲料水ろ過、pp.109~110、1992、技報堂出版
- 20) 金子光美編著:水質衛生学より、塩素消毒の歴史、pp.283~286、1996、技報堂出版
- 21) Yamamoto N, Urabe K, Takaoka M, Nakazawa K, Gotoh A, Haga M, Fuchigami H, Kimata I, Iseki M. Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. Kansenshogaku Zasshi. 2000 Jun;74(6):518-26.
- 22) Stirling R, Aramini J, Ellis A, Lim G,

Meyers R, Fleury M, Werker D. Waterborne cryptosporidiosis outbreak, North Battleford, Saskatchewan, Spring 2001. Can Commun Dis Rep. 2001 Nov 15;27(22):185-92.[Article in English, French]

- 23) 遠藤卓郎、泉山信司「クリプトスポリジウム集団感染の前兆現象」、厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)「クリプトスポリジウム等による水系感染症に係わる健康リスク評価及び管理に関する研究(クリプトスポリジウム等感染リスクの評価手法の確立に関する研究)(主任研究者:国包章一)」より平成17年度分担研究報告書

coagulation-ceramic microfiltration process with high-basicity polyaluminum coagulation pretreatment, Water Science and Technology: Water Supply, accepted.

5. 岸田直裕、原本英司、今野祥顕、泉山信司、浅見真理、秋葉道宏. 水中のクリプトスポリジウム・ジアルジア検査における遺伝子検査法の実用性に関する検討. 土木学会論文集 G(環境)2013; 69(7):III\_631-637.
6. 泉山信司、黒木俊郎、水系感染する病原微生物(クリプトスポリジウムおよびレジオネラ)への対策、水環境学会誌、36(5)、161-164、2013

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Matsushita, T., Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K., Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon, Separation and Purification Technology, 107, 79-84, 2013.
2. Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y. and Matsui, Y., Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and precoagulation-microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR, Water Research, 47, 5819-5827, 2013.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Marubayashi, T. and Sato, S., Improved virus removal by high-basicity polyaluminum coagulants compared to commercially available aluminum-based coagulants, Water Research, 48, 375-386, 2014.
4. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Kimura, M. and Ohno, K., Virus removal by an in-line

##### 学会発表

1. 丸林拓也, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 全国の水道原水を用いた水系感染症ウイルスの凝集処理性評価及びウイルス処理性指標の模索, 第48回日本水環境学会年会, 2013
2. Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y., Tatsuki, Y. and Oshiba, A., Evaluating norovirus removal during drinking water treatment by using recombinant norovirus virus-like particles, 2nd International Doctoral Symposium with Partner Universities, Sapporo, Japan, 24-26 October 2013.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Tatsuki, Y., Estimating norovirus removal performance in an in-line coagulation-ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus VLPs and immuno-PCR method, IWA Membrane Technology Conference (IWA-MTC 2013), Toronto, Canada, 25-29 August 2013.
4. Kishida N, Noda N, Haramoto E, Kawaharazaki M, Akiba M, Sekiguchi



- Y. Quantitative detection of human enteric adenoviruses in river water by microfluidic digital PCR; The 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology; 2013 Sep; Florianopolis; Brazil.
5. 岸田直裕、原本英司、今野祥顕、泉山信司、浅見真理、秋葉道宏. 水中のクリプトスポリジウム・ジアルジア検査における遺伝子検査法の実用性に関する検討. 第 50 回環境工学研究フォーラム; 2013 年 11 月; 札幌.
  6. 泉山信司、岸田直裕、岸田小百合、秋葉道宏、八木田健司、クリプトスポリジウムとジアルジア計数を目的とした定量逆転写 PCR の検量線作成、第 82 回日本寄生虫学会、2013 年 3 月、東京都
  7. 久野草太郎、田中繁樹、及川智、東京都区部給水栓における従属栄養細菌の検出状況、日本水道協会関東地方支部水質研究発表会、2013 年 11 月、東京都
  8. 泉山信司、水野聰、川口有希子、及川智、従属栄養細菌による飲料水兼用耐震性貯水槽の管理、環境技術学会、2013 年 9 月、岐阜県
  9. 泉山信司、水道水におけるクリプトスポリジウム汚染の検出と対策について、考え方の整理、第 83 回日本寄生虫学会、2014 年 3 月、愛媛県
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
特許第 5476558 (平 26.2.21) 「水試料中の原虫のろ過回収方法および水道水又は水道原水の水質の管理方法」
  2. 実用新案登録
  3. その他  
なし

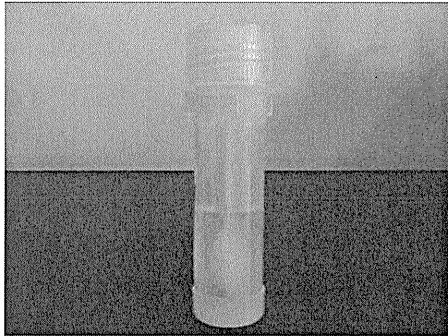


図1 拭き取り検査キット



図2 くり抜いた配管(配管 No.1)

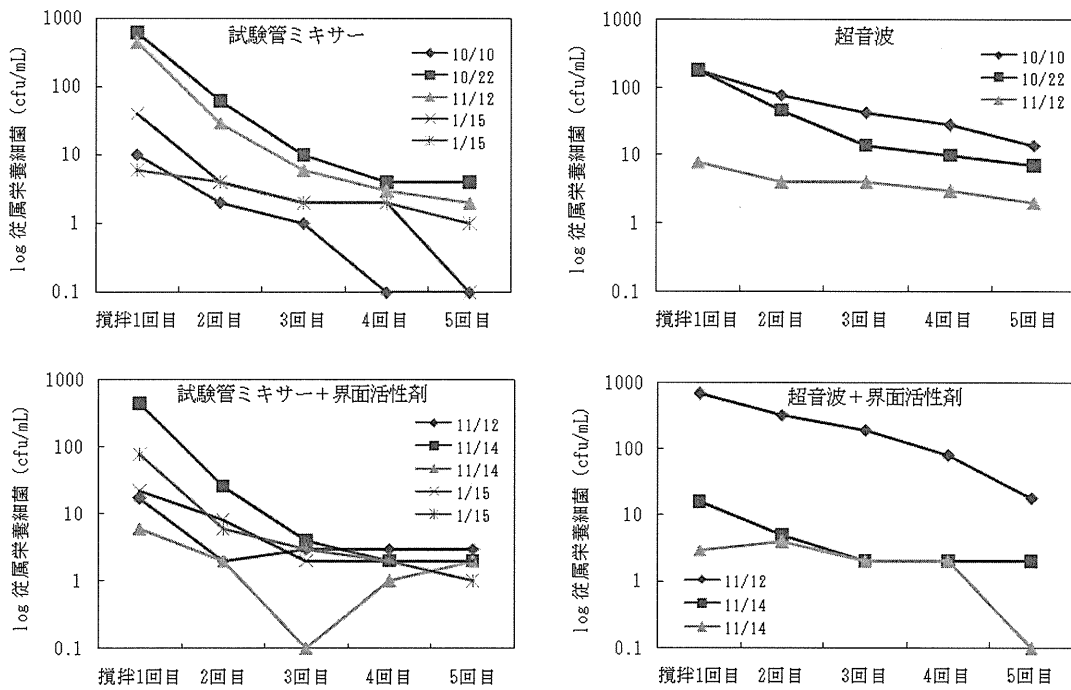


図3 懸濁液中の従属栄養細菌数 (cfu/mL)  
(数値0は0.1としてプロットした。)

表1 配管実試料測定結果

配管 No.	採取日	使用年数 (年)	拭き取り面積 (cm <sup>2</sup> )	従属栄養細菌		
				配管懸濁液 (cfu/mL)	配管単位面積あたり (cfu/cm <sup>2</sup> )	空气中懸濁液 (cfu/mL)
1	12/10	12	3.1	16	52	—
2	1/10	43	4.9	1	2	3
3	1/21	18	2.8	10	36	5

表 2 家庭で採取した水試料の性状と *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	温度 (°C)		pH		塩素濃度 (ppm)		HPC (CFU/ml)		培養 陽性	菌数 (CFU/ml)	LAMP 陽性	アメーバ増菌後	
			平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均 <sup>a</sup>	範囲				培養陽性	LAMP 陽性
台所 蛇口水	4	6	29.3	23.5-42.0	7.6	7.2-7.8	0.63	0.5-0.8	189	0-932	0		1	0	0
風呂 蛇口水	4	5	29.8	24.5-42.0	7.5	7.2-7.8	0.47	0-0.8	145	1-484	0		0	0	0
風呂 給湯水	4	7	34.4	26.5-39.0	7.5	7.1-7.8	0.20	0-0.8	5,726	13-32,800	0		1	0	0
洗面台 蛇口水	3	4	26.0	25.5-26.5	7.4	7.2-7.8	0.47	0-0.8	16,897	6-46,000	1 <sup>b</sup>	370	2	0	0
庭 蛇口水	1	2	24.8	24.8	7.4	7.4	0.6	0.6	0	0	0		0	0	0
公園 蛇口水	—	1	26.5	26.5	7.3	7.3	0	0	—	—	0		0	0	0
合計		25									1		4	0	0

a: 幾何平均、 b: *Legionella* sp. L-29 検出

表 3 家庭の水道関連設備で採取されたスワブ検体等における *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	培養 陽性	LAMP 陽性	アメーバ増菌後		
					培養陽性	LAMP 陽性	
スワブ							
台所	蛇口	4	5	0	0	0	0
風呂	蛇口	4	6	0	0	1 <sup>a</sup>	2
風呂	給湯口	4	4	0	2	0	0
風呂	シャワーヘッド	3	4	0	0	0	0
洗面台	蛇口	2	3	0	0	1 <sup>b</sup>	1
トイレ	蛇口	3	4	0	0	0	1
洗濯機	蛇口	1	1	0	0	0	0
庭	蛇口	2	3	0	0	0	0
公園	蛇口	—	1	0	0	0	0
合計			31	0	2	2	4

a: *Legionella* sp. 検出

b: *Legionella* sp. L-29 検出

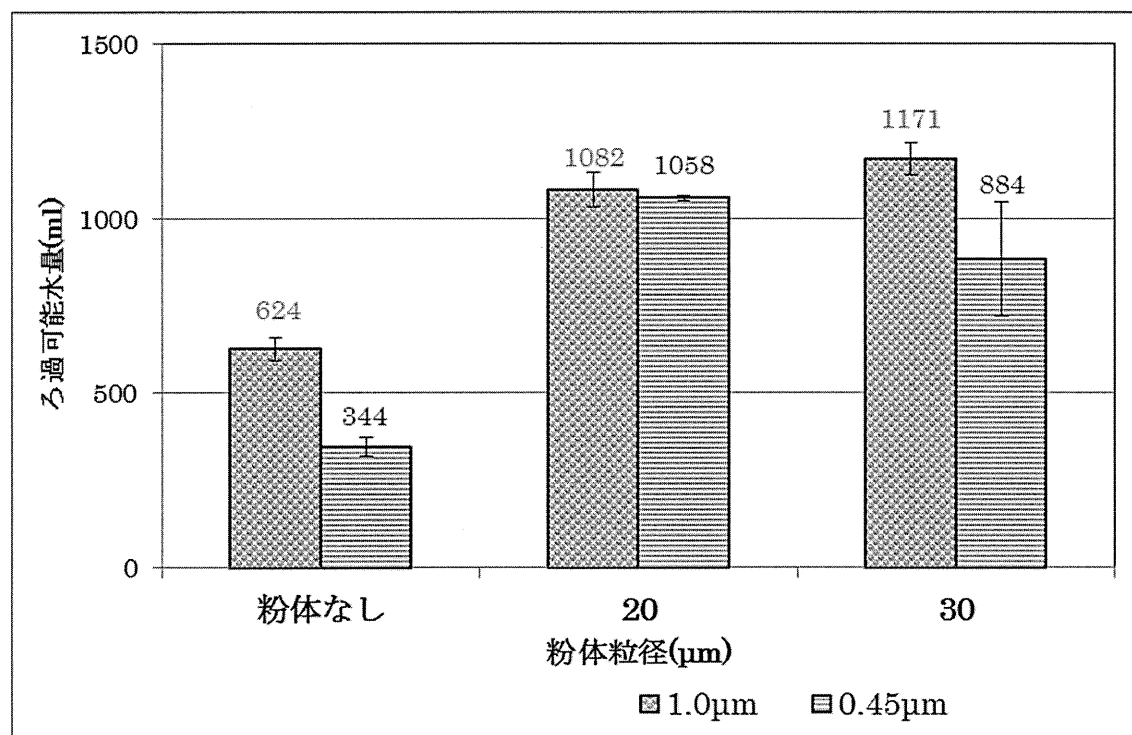


図 4 フィルター孔径と粉体粒径の大きさによるろ過可能水量