

平成 26 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 - 微生物分科会 -

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	（元神奈川県内広域水道企業団）
研究協力者	荒井 活人	（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	松島 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 聡	（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	（神奈川県畜産技術センター）
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索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。配管の汚染状況を把握するため、従属栄養細菌測定を固体表面試料に応用した。昨年度検討した測定方法により配管実試料を測定し、10 試料から従属栄養細菌数が 0～52 CFU/cm² とわずかに検出された。耐震性貯水槽を調査したところ、水質の基準値を超過していないが、従属栄養細菌数の増加によりわずかとはいえ滞留またはその恐れを複数の耐震性貯水槽において認めた。協力を得られた家庭の水道蛇口から *Legionella* 属菌は水試料 33 検体中 2 検体(6.1%)において菌が分離された。分離された *Legionella* 属菌は *L. pneumophila* SG1 および *L. anisa* であった。LAMP 法では水試料 33 検体中 12 検体 (36%) およびスワブ試料 35 検体中 6 検体 (17%) からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。ビル建築物内

では、培養法の 25 件全てで検出されなかったものの、遺伝子検査では LAMP 法で 4 件、リアルタイム PCR 法で 13 件が検出された。蛇口等の水環境が *Legionella* 属菌により汚染されることを改めて確認した。

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、原水（環境水）にアデノウイルス、ポリオウイルスを添加して人工原水とし、これを用いて回分式凝集処理実験を行うことで、処理性（除去率）を評価した。従来から広く用いられる塩基度 50%の PACl を用いた凝集沈澱処理におけるアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率は、PFU 法にて評価した場合、それぞれ 0.1～1.4 log、0.5～2.4 log であった。急速ろ過を模した孔径 0.45 μ m の膜ろ過の追加で概ね計 3-Log 程度の除去が得られた。国内の実浄水場において、凝集沈澱と急速ろ過等におけるウイルスの除去効率を実測し、トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）が 5.2-Log 除去されていた。エボラウイルスはエンベロープのあるウイルスであるので比較的消毒剤等に感受性が高く、水道水中ではエボラウイルスを不活化できていると考えられた。

高度浄水処理施設が導入されている浄水場において、溶存オゾン濃度からクリプトスポリジウム等に対する不活化効果を推計した。不活化効果は 1-Log に満たず、クリプトスポリジウムの不活化効果はあまり期待できないと考えられた。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であることから、絶対定量が可能なデジタル PCR の適用を試みた。標準試料を用いることなく、水道原水試料中のクリプトスポリジウムオーシストを定量することが可能であり、既存のリアルタイム PCR 法と同様の定量値が得られた。遺伝子検出法の適用実績はまだ少なく、さらなる知見の積み重ねと応用が求められていることから、相模川河川水を試料として検鏡法と qRT-PCR 法の比較を行った。2 法の定性的な一致率は、73%と概ね対応が得られた。遺伝子増幅産物の塩基配列を決定したところ、ブタ由来の *C. suis* が多く検出された。原虫の濃縮法として開発された粉体ろ過法を、指標細菌等の新しい濃縮法として提案するため、従来法との比較を行った。大腸菌では、X-MG 培地を用いた混釈培養法で、ろ過容器内を共洗いし界面活性剤 Tween80 を 0.5%添加したリン酸緩衝水で遊出することで従来法と同等の回収が得られた。嫌気性芽胞菌でも対応が得られた。メンブレンフィルター上のクリプトスポリジウムの係数を簡便化するため、MPN 法を適用することを想定し、最も基本的な前提となる「検鏡用メンブレンフィルター上でのオーシスト等の分散性」について、模擬粒子のクリプトレーサーを用いて最適ろ過方法について検討を行った。国内のクリプトスポリジウム流行状況を把握するため、感染症発生動向調査の 2006～2013 年を集計した。届出数は年 10 例程度で、幸いに水道が原因と推定される事例はなかった。国外では、2010 年にスウェーデンで推定 27,000 人が発症する水道を介したクリプトスポリジウムによる大規模集団感染が生じており、未だに注意を要することに変わりはない。この事故の後に紫外線消毒が導入され、国内でも同様に対策することが推奨と考えられた。問題の浄水場では前オゾン処理が導入されていたが、この集団感染の経験と国内浄水場の計算から、オゾン処理には依存できないと考えられた。ジアルジア症は年平均 72 例であった。2010 年に初めて集団感染が報告された。これは千葉県内の小規模貯水槽水道における、蛇口を介した集団感染であった。ビル建築物の貯水槽の管理を徹底することが必要と考えられた。

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^{1, 2)}。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ト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 100cm² あたり $1.1 \times 10^5 \sim 5.75 \times 10^6$ CFU であったとの報告がある²⁾。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 100cm² あたり $3.9 \times 10^5 \sim 2.4 \times 10^6$ CFU³⁾、洗浄後は $6 \times 10^0 \sim 1.9 \times 10^2$ 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数が追加された。従属栄養細菌数は配水・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。従属栄養細菌数の測定には、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¹⁾。一方、配管や給水栓等の表

面に付着したバイオフィルムに関心が持たれるものの、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^{4, 5)}。当該研究では昨年度に、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一連の操作を検討した。今年度はこの方法を実際の配管試料に応用した。

地震等の災害時に飲料水や生活水を確保するための施設として耐震性貯水槽が広く利用されてきている。これまでの調査によると、圧力式耐震性貯水槽において夏季に貯水槽内の水と、流入水で水温差があると、貯水槽内底部で滞留が発生し、残留塩素が低下し、従属栄養細菌数が高く検出されてしまうことがわかっている。今回、4 水道事業体の協力を得て、12 か所の貯水槽について従属栄養細菌数の検査を行い、夏季において耐震性貯水槽内で水質劣化が生じていないか実態調査を行った。

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。昨年度に引き続き、家庭やビル建築物の蛇口等における *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、すなわち除去率を的確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多くない^{6, 7, 8, 9)}。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。国内の浄水場の協力を得て、環境中で最も濃度が高く検出されるトウガラシ微斑ウイルス

(以下、PMMoV)の、除去率の実測を試みた¹⁰⁾。アフリカでの流行で問題となっているエボラウイルスの塩素消毒についても考察した。

水道を介したクリプトスポリジウム等の集団感染は、未だに生じており、例えば 2010 年にはスウェーデンにおいて欧州最大、過去 2 番めに大きな集団感染が生じており、水道におけるクリプトスポリジウム対策は未だに重要である¹¹⁾。一般にクリプトスポリジウムはオゾン等の酸化処理に弱いとされるが、問題の浄水場で前オゾン処理を行っていたにも関わらず集団感染が生じており、有効ではなかった恐れがある。国内のオゾン処理におけるクリプトスポリジウムの不活化の程度について推計を試みた。

クリプトスポリジウムの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。

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^{12, 13, 14)}、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。昨年度は標準試料を用いて 1 オースト内の遺伝子断片の定量を実施し、適用可能であった。今年度は水道原水中のオーストの定量を試みた。

遺伝子検出法の適用実績はまだ少なく、さら

なる知見の積み重ねと応用が求められている。そこで原虫類の検出事例の多い相模川河川水について、検鏡法と遺伝子検出法の比較を行った。qRT-PCR 法陽性試料の遺伝子増幅産物を用いて塩基配列を決定することにより遺伝子型の同定を行い、調査流域の汚染状況を調べた。

クリプトスポリジウムの濃縮法として開発された粉体ろ過法を、細菌濃縮への応用を試みている。検査の容易化、大容量試料への適用性などが可能であった。昨年度の研究で、コリラート MPN 法による大腸菌の濃縮定量および嫌気性芽胞菌の定量について、その実用性が示された。一方、X-MG 培地による混釈培養法では、低濃度域で公定法より低い回収率となることが示されていた。今年度の研究では、この低濃度での X-MG 培地・粉体ろ過法の大腸菌回収率の向上と広い濃度範囲での大腸菌および嫌気性芽胞菌の粉体ろ過法による濃縮定量の実証実験を行うこととした。

メンブレンフィルター上のクリプトスポリジウムの計数を簡便化するため、MPN 法の適用を企図した。顕微鏡観察試料を作成する際に格子入りメンブレンフィルターを用い、クリプトスポリジウム様の粒子の陽性区画数を計測して、面積当たりの濃縮物のろ過量(=原水相当量)と陽性区画数から MPN 値を求めるものである。本法では、蛍光抗体染色および免疫磁気ビーズ法の特異性を前提として、クリプトスポリジウムの確認を簡便化しようとしている。すなわち、陽性区画数を計数するだけの試験操作を期待している。その際に最も基本的な前提となる「検鏡用メンブレンフィルター上でのオースト等の分散性」について、模擬粒子のクリプトレーサーを用いて最適なろ過方法について検討を行うこととした。

感染症法においてはクリプトスポリジウム症とジアルジア症のいずれも 5 類全数把握疾患で、医師に届出の義務があり、国内の流行状況を把握するための基礎資料となる。水道におけるクリプトスポリジウム対策を考える上で、国内の流行状況を把握するため、届出の 2006 ~ 2013 年を集計したので報告する。

B. 研究方法

B1-1 従属栄養細菌の拭きとり試験

試料は、桐生市の給水管取り出し工事に伴い採取した配水管の穿孔片(以下穿孔片という、図1)、給水管布設替工事に伴い採取した給水管の一部(以下給水管という、図2)とした。どちらも塩化ビニール管である。採取した試料は、内表面に滅菌済みイオン交換水約500mLをかけ、バイオフィルム以外の細菌を洗い流した。その後、穿孔片の場合は、内表面全体を検査キットで拭き取り、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。給水管の場合は、内表面の一部(約2cm四方)を3箇所、それぞれ別の新しい検査キットで拭き取り、同様に回収した。拭き取り操作は、試料の乾燥を避けながら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、上記拭き取り操作と同地点で、同時間(約20秒)検査キットの綿棒を空気中にさらし、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。培養操作は試験室で無菌的に行った。リン酸緩衝生理食塩水に1%の界面活性剤Tween80を20 μ L添加し、1分間試験管ミキサーで攪拌した後、懸濁液1mLをR2A寒天培地を用いて20 $^{\circ}$ Cで7日間培養し、従属栄養細菌数の測定を行った。なお、懸濁液1mLは拭き取り面積の1/10に相当する。

B1-2 耐震性貯水槽における従属栄養細菌数

4都市で設置している圧力式耐震性貯水槽の11地点および大気開放式耐震性貯水槽の1地点について、従属栄養細菌数、一般細菌、残留塩素、pH値、水温の調査を行った。従属栄養細菌数はR2A培地を用いて、20 $^{\circ}$ C、7日後と14日後のコロニー数を測定した。サンプリングに際しては、捨て水を最低5分、約100L、多い地点では1時間、約10,000L行った。また、入れ替わり回数の算出は管路シミュレーションソフトなどを使用し、年間配水量の平均、または、7月から9月までの間の配水量の平均から概算値を求め

た。

B1-3 蛇口等水環境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10軒の家庭、およびビル建築物(A)(東京都内に所在する地下2階・地上7階からなる本館(延床面積17,940 m^2)及び地下2階・地上6階からなる別館(延床面積10,022 m^2))において、平成26年7月7日から平成26年11月3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、他を採取した。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⁵⁾。すなわち、水試料は直径47mm、孔径0.2 μ m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 $^{\circ}$ 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100 μ lをGVPC α 寒天平板培地およびWYO α 寒天平板培地に塗抹し、36 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。*Legionella*属菌を疑う集落をBCYE α 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 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 μ l ずつを GVPC α 寒天平板培地(Oxoid)および WYO α 寒天平板培地(栄研化学)に塗抹し、36 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。

Legionella 属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E(栄研化学)、Cycleave PCR Legionella (16SrRNA) Detection Kit(タカラバイオ)を用いて行った。なお、リアルタイム PCR のキットはレジオネラ属菌を広く捉えられるように設計されたもので、一方の LAMP 法は *L. pneumophila* の検出を目的に開発されたものであることが、レジオネラの研究班において先に報告されている。LAMP 法添付の説明書に従ったアルカリ熱抽出、あるいは QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン)を用いて核酸抽出した。従属栄養細菌は R2A 寒天培地で混釈培養法により 20 ないし 25 で 7 日間培養した。

B2-1 凝集沈殿ろ過によるアデノウイルス、ポリオウイルスの除去性

アデノウイルス 40 型 Dugan 株及びポリオウイルス 1 型 LSc/2ab 株を実験に使用した。全国の浄水場の協力を得て、水道原水 13 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殿処理実験を行った。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、Al₂O₃: 10.0%、SO₄: 2.7%、比重: 1.21)を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⁻¹(94 rpm)で急速攪拌を 1 分間、G 値 20 s⁻¹(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、実験原水とともにウイルスの定量を行った。急速ろ過を模した膜ろ過には、孔径 0.45 μ m の PTFE フィルターを用いた。

B2-2 国内浄水場におけるウイルス除去の実測

本調査の測定対象のウイルスは、環境中でも最も高濃度と言われるトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)を PCR 法により測定した。2014 年の 5、6、9、11 月に、国内の 2 箇所の浄水場(浄水場 1、浄水場 2)の協力を得て、合計 32 試料を採取した。各浄水場の処理フローおよび試料採取地点を図 5 に示す。これらの浄水場では、「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」に基づき、ろ過処理工程後の濁度を 0.1 度以下に抑えられるよう濁度監視による運転管理が実施されている。浄水場 1 は 2 つの処理系統(A、B)を有し、処理系統 A は緩速砂ろ過、処理系統 B では PAC による凝集・沈殿および急速砂ろ過が行われている。浄水場 2(処理系統 C)では凝集剤を添加せずに上向流式の急速砂ろ過処理を行い、その後緩速砂ろ過処理を行っている。それぞれ多量の水試料を採取し、陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法による濃縮と、UF 膜を用いた二次濃縮を行った。QIAamp viral RNA mini kit(Qiagen)により核酸を抽出した後、RT-PCR を行った¹⁰⁾。必要により PCR 障害を回避する希釈等の操作を行った。除去処理した場合、RNA 抽出液の 10 倍希釈した場合、処理なしのうち、最も高い測定結果を真の濃度とみなした。いずれの処理系統に関しても、ウイルス除去効率の評価の妥当性を考慮し、試料の採取は各処理系統について処理フローの順に、かつ同日中に行った。

B2-3 エボラウイルスの塩素消毒

エボラウイルスの情報は、公開されている各種資料を参照した。

B3-1 高度浄水処理におけるクリプトスポリジウム等の不活化率の推算

上下迂流向流3段接触方式のオゾン接触槽を有するX浄水場において、水温の低下から不活化効果が低くなる冬季にオゾン注入率を2.0mg/Lまで増し、その前後で各オゾン接触槽及び滞留槽の出口における溶存オゾン濃度をインジゴカルミン法¹⁵⁾で測定した。併せて、オゾン接触槽1段目の流入水、オゾン接触槽3段目出口及び生物活性炭処理水の臭素酸イオン濃度をイオンクロマトグラフ法¹⁶⁾で測定した。さらに、2010年4月にEPA(米国環境保護庁)が公表した" Long term 2 enhanced surface water treatment rule toolbox guidance manul "¹⁷⁾に示された以下の計算式を用い、溶存オゾン濃度等の測定結果から不活化効果を表す対数減少値(常用対数で表された残存率の正負の符号を逆にした値。)を計算した。

$$-\log(I/I_0) = \log(1 + 2.303 \times k_{10} \times C^* \times \text{HDT})$$

...式 1

ただし:

$-\log(I/I_0)$: 対数減少値

k_{10} : 対数減少値の係数(L/mg・min)

$$k_{10} = 0.0397 \times (1.09757)^{\text{水温}}$$

C^* : 特性C値濃度(mg/L)

$$\text{接触槽では } C^* = C_{\text{出口}} \div 2$$

$$\text{滞留槽では } C^* = C_{\text{出口}}$$

HDT: 水理学的滞留時間(min)

$$\text{HDT} = \text{槽容量} \div \text{流入水量}$$

なお、EPA マニュアルでは、トレーサー実験を行って10%流出時間(T_{10})を計算していない場合は、反応槽各段が完全混合槽であるとしてCSTR法で対数減少値の計算を行うこととしているため、これに従って対数減少値を計算した。また、クリプトスポリジウムに関して最初の接触槽に不活化率を設定しないこと、第2槽以降であっても流入水に残留オゾンが検出されない槽には不活化率を設定しないことを勧告しているため、これに従っている。

B3-2 デジタルPCRによる水道原水中のクリプトスポリジウムの定量

全国10箇所の浄水場の協力を得て、水道原水5Lを採取した。常法に従い、親水性PTFEメンブレンフィルター法によって濃縮を行った。免疫磁気ビーズ法による精製を実施した後、核酸抽出に供した。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。すなわち、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、氷中で急冷した。さらに、逆転写反応(Takara、PrimeScript RT Master Mix)によってcDNAを合成した。合成されたcDNAはデジタルPCR法およびリアルタイムPCR法に供した。

デジタルPCRには、BioMark Real-time System、12.765 Digital Array (Fluidigm Corporation)を用いた。本システムでは、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する。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る。一方、比較のリアルタイムPCRにはLightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics)を用いた。PCRの反応系には、デジタルPCR、リアルタイムPCRともに、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¹²⁾。各試料について2回の測定を行った。コピー数(RNA分子数)からオーシスト数への換算には、デジタルPCR法を用いて測定した換算係数(=約22,000コピー/オーシスト)¹⁸⁾を用いた。

B3-3 相模川河川水を用いたqRT-PCR法と検鏡法によるクリプトスポリジウム測定と比較

試料として神奈川県相模川水系の河川表流水を用いた。相模川本川に流入する支川のうち鳩川、貫抜川、永池川、中津川、小鮎川、玉川で採水した。また、相模川本川は、調査を行う各支川合流前の座架依橋と支川合流後の寒川取水堰で採水した。畜舎排水の影響が大きい試料を得るため、中津川に流入する排水路(蟹淵排水路)の畜産施設排水口の下流約1 kmの地点で採水した。検鏡法は定法に従い、試料水を孔径5 μm の親水性 PTFE フィルター (JMWP09025 Millipore) でろ過濃縮した後、免疫磁性体粒子法 (Dynabeads Invitrogen) により分離し、蛍光抗体染色法 (Easy Stain BTF) で観察および計数を行った。一部の試料を除いて免疫磁性体粒子法により分離した後の試料の半量を検鏡法に供し、残りの半量を qRT-PCR 法に供した。免疫磁性体粒子法で分離した原虫類は、磁性体粒子からの塩酸解離、中和処理を行い、TE buffer で洗浄濃縮した。核酸抽出と qRT-PCR は、Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit を使用した。定量 PCR に必要な検量線を作成するために、コピー数が既知のキット付属の陽性コントロールを使用した。濃度は、検水量相当に換算した。陽性と判断された試料の増幅産物について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を調べた。増幅産物の配列決定はタカラバイオにて実施した。

B3-4 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

ハイドロキシアパタイト粉体として粒径20 μm (重量分布の平均粒径19 μm 、アパミクロン AP-20C、積水化成品工業(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3Lの吸引ガラス瓶に取り付け、乾式の吸引ポンプ(真空度調節可能なコンパクトドライアスピレーター、DAS-01、アズワン

(株))に接続し、吸引ろ過を行った。ホルダーベースに粉体の支持体として、セルロース混合エステルタイプメンブランフィルター(セルロース混合エステルフィルター、孔径1.0 μm 、直径47mm、東京濾紙(株))、あるいは PTFE メンブランを親水化処理したオムニポアメンブランフィルター (PTFE フィルター、孔径0.45 μm または1.0 μm 、直径47mm、メルク(株))を敷いた。支持体のフィルターをセットしたフィルターホルダー上に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。広島県庄原市の戸郷川および国兼川で採水した河川水および、庄原市下水処理場の流入水および放流水(塩素消毒前)を試料として用いた。採水した試料は、採水後直ちに実験に供した。試料をろ過したのち、滅菌したピンセットでフィルターごと粉体層を50mL遠沈管に移した。リン酸緩衝液を用いて、十分にろ過容器内を共洗いし、洗浄液も全て遠沈管に回収した。また、界面活性剤添加系では、0.5%TWEEN 80 を添加したリン酸緩衝液を用いてろ過容器を洗い流し、50ml遠心管に回収した。嫌気性芽胞菌については、フィルターを中型ガラス試験管に回収し、ウォーターバスで75、20分間加熱を行ったのち、全量を50ml遠心管に移した。フィルター、粉体および濃縮物を含む試料はタッチミキサーで十分に懸濁させ、大腸菌はXM-G寒天培地(混釈法)を用いて、嫌気性芽胞菌はハンドフォード改良寒天培地法で定量した。粉体ろ過法と比較するため、従来のメンブランフィルター法および混釈培養法で定量を行った。

B3-5 フィルター上のクリプトスポリジウム分散性

クリプトスポリジウムの代替粒子として、クリプトレーサー(水道技術研究センター)を用いた。クリプトレーサーは比重1.19、直径は5 μm で、オーシストと同様の形態を持った粒子である。顕微鏡観察用の格子付メンブランフィルターとして、ザルトリウス製、直径25mm、直径20mmの疎水円付のものを用いた。フィルターは蛍光観察下で識別可能な3mm角の格子が印刷されてお

り、裁断の状況によって 3mm 角の完全な区画(完全区画)が顕鏡面に 20-26 個存在する(図 11)。ろ過装置としてろ過部が焼結ガラス製またはステンレスメッシュ製のフィルターホルダー(ADVANTEC 25mm)と付属のファンネル(直径 17.5mm、高さ 10cm)を用いた。クリプトレーサーをおおよそ 10^3 個/ml 程度となるよう PBS に懸濁したものをを用いた。フィルターホルダーおよびファンネルにセットしたフィルターに試料 1ml を注入し、水流ポンプで吸引ろ過した。ろ過操作は以下の条件について検討を行った。

・フィルターホルダーの材質(焼結ガラスおよびステンレス)

・ろ過の前に粒子の沈降を図る 10 分の静置操作(有無)

・ろ過の速度(急速にろ過および吸引圧力をほとんどかけずにゆっくりとろ過)

・PBS に Tween80 を 0.1% 添加(有無)

ろ過後、フィルターを封入剤(ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Life Tech.)1 滴を滴下したスライドガラスに載せ、カバーガラスをかけて封入した。落射蛍光顕微鏡、B 励起、200 倍の観察でフィルターの全面を観察し、それぞれの区画に分布するクリプトレーサーの数を計数し、中央部、周辺部および辺縁部の各区画内のトレーサー数を比較した。

B3-6 クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の発生動向

平成 11 年 4 月 1 日から施行された感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)に基づき、感染症法に規定された疾患の患者が、全国でどのくらい発生したのか調査集計されている(感染症発生動向調査)。このデータベースに登録されたクリプトスポリジウム症並びにジアルジア症の登録内容を集計、精査した。なお、届出基準と届出票は、以下のホームページ上に掲載されている。

(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-04.html>, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/>)

([kekaku-kansenshou11/01-05-08.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-08.html))。

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

表 1 に配管実試料の測定結果を示した。昨年度に 3 試料、今年度に 7 試料を測定し、合計 10 試料から、従属栄養細菌数が $0 \sim 52$ CFU/cm² とわずかに検出された。この数値は、昨年度測定した元宿浄水場ろ過池内壁($10^0 \sim 10^2$ CFU/cm²)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($1.1 \times 10^{-1} \sim 5.75 \times 10^4$ CFU/cm²)と比較した場合²⁾、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と比較すると桁違いに清浄であった。配管の従属栄養細菌数と使用年数との関係については、現時点で相関は見られなかった。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、残留塩素濃度管理は適切に行われている。塩素消毒が適切であれば、菌数が増加することはないと考えられた。一方、管理が適切であっても配管内には付着した細菌がわずかとはいえ存在し、バイオフィルムが形成される恐れがあることも確認した。

C1-2 耐震性貯水槽における従属栄養細菌数

耐震性貯水槽の水質検査結果を表 1 に示す。施設 N1、N2とも、7 月から 9 月末の間、調査時の捨て水のほかに毎週 1 回の頻度で、60 m³ から 90 m³ の放水を行っており、総量は 1 シーズン(13 週)でおよそ 800 ~ 1200 m³ である。施設 N1、N2とも構造が他に比べ単純であり、入れ替わり回数が 3 回/日以上あるにもかかわらず、低水温の滞留水が大量に発生し、対策として毎年夏季に捨水を行っている。それにもかかわらずわずかとはいえ従属栄養細菌数が他よりも高かった。

施設 H1、H2、H3とも 1 日の入れ替わり回数 2.4 回と多くはないが、滞留は発生していなかった。施設 NA1 は地上設置大気開放式で、従属栄養細菌数が多かったが、サンプリング管の汚れによるもので、滞留によるものではないと考え

られた。施設NA2は入れ替わり回数 25 回/日と大きく、良好な結果であった。

施設NA3では、並列に3槽設置されていることから、1槽ごとの入れ替わり回数は0.63回/日と少なく、従属栄養細菌数の増加および槽内がモルタルライニングである影響によるpH値上昇が認められ、滞留が懸念された。貯水槽の配管を、並列から直列に変更することで水質改善の可能性がある。

施設K1、K2、K3では、入れ替わり回数が3回/日以上であり、滞留はなかった。

施設K4では、入れ替わり回数が1.4回/日と少なく、施設NA3と同様の理由で滞留が懸念される。

全体として、滞留が懸念されるいずれの耐震性貯水槽も、14日間培養後の従属栄養細菌数が大幅に増加する傾向が見られた。損傷菌の存在が示唆された。なおいずれの検体においても、一般細菌数と従属栄養細菌数との関連性は認められなかった。

C1-3 蛇口等水環境のレジオネラ属菌の検出

10軒の家庭の協力を得て68検体(蛇口水試料33検体、スワブ試料35検体)を採取し、*Legionella*属菌の分離ならびにLAMP法による遺伝子の検出を試みた(表3、4)。培養により水試料33検体中2検体(6.1%)から*Legionella*属菌が分離された。浴槽の給湯水の検体では水試料から直接*L. pneumophila* SG1が分離された。台所の蛇口水の検体では、アメーバ増菌培養後に*L. anisa*が分離された。スワブ試料35検体では*Legionella*属菌は分離されなかった。今年度の調査では、重篤な肺炎の集団感染が発生した*L. pneumophila* SG1が一般の家庭内で検出され、注意する必要があると考えられた。

LAMP法により*Legionella*属菌の遺伝子が検出されたのは、水試料33検体中12検体(36%)およびスワブ試料35検体中6検体(17%)であった。

ビル建築物(A)の水道末端2か所から採水し

た水道水における従属栄養細菌数、レジオネラ属菌の検査結果を表1に示した。7月～9月の調査期間における本館の初流水では4,800、2,400及び2,000 CFU/mL、別館の初流水では4,500及び5,500 CFU/mLと管理目標設定項目の目標値2,000 CFU/mLを超える従属栄養細菌数が検出されたが、放流1分後には本館で51、16及び14 CFU/mL、別館で240及び110 CFU/mLと大幅に減少した。従属栄養細菌数は、放流2分後以降も放流時間の経過と共に更に減少しており、放流15分後には本館で0.5、0及び1.5 CFU/mL、別館で18及び8.5 CFU/mLと低い値であった(表1)。初流水でのみ2,000 CFU/mLを超えたが、これら初流水の残留塩素濃度が0～0.1 mg/Lと低く、給水栓内の停滞とレジオネラの増殖可能な環境の存在が推察された。

水試料及びスワブ試料について、レジオネラ属菌の培養検査を行ったが、レジオネラ属菌は検出されなかった。LAMP法でレジオネラ属菌遺伝子が検出と判定されたのは、本館では9月の放流後2分のみ、別館では8月放流後1分及び2分で、9月は放流後2分であった。リアルタイムPCR法でレジオネラ属菌遺伝子が検出されたのは、本館では7月、8月が初流水のみで、9月が初流水及び放流後15分で検出され、別館では8月、9月共に初流水から放流後15分までの全てで検出された(表1)。培養法では検出できなかったものの、LAMP法及びリアルタイムPCR法による遺伝子検査では検出され、培養法では確認できない菌種のレジオネラ属菌の存在、あるいは死菌の存在と推察された。なお、LAMP法及びリアルタイムPCR法による遺伝子検査の結果に不一致が見られたが、検出されたレジオネラ属菌の遺伝子量が微量であったにことに加えて、2つの方法の検出感度の違いによることも考えられた。

C2-1 凝集沈殿ろ過によるアデノウイルス、ポリオウイルスの除去性

PACl-50sを用いた凝集沈殿処理(静置後)に

おけるアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率を図 3 に示す。PFU 法にて評価したアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率は、それぞれ 0.1 ~ 1.4 Log、0.5 ~ 2.4 Log となった。なお、いずれの水道原水を用いた場合であっても、濁度の除去率は 76 ~ 99%であったのに対し、アデノウイルスの除去率については、0.1 Log 程度に留まる水道原水も見られた。従って、PACl-50s を用いた凝集沈澱処理により、アデノウイルス及びポリオウイルスを除去することは可能であるものの、それぞれの除去率は、水道原水の水質によって大きく異なることが確認された。アデノウイルスの除去率は、ポリオウイルスの除去率に比べて低い傾向であった。

凝集沈澱後に急速ろ過を模した膜ろ過処理を追加したアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率を図 4 に示す。いずれの水道原水を用いた場合においても、凝集沈澱静置後(図 3)に比べて除去率が向上し、PFU 法にて評価したアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率は、それぞれ 1.9 ~ 3.7 Log、2.4 ~ 3.9 Log となった。アデノウイルス及びポリオウイルスの粒径は、本研究で使用したメンブレンフィルターの膜孔径よりも小さいため、これらのウイルスが水中において凝集塊を形成せずに単分散している場合は、0.45 μm のメンブレンフィルターでは除去することができない。凝集沈澱処理によってアデノウイルス及びポリオウイルスを含むマイクロフロックが、後段の膜ろ過処理によって効果的に抑止されたために凝集沈澱処理に比べて除去率が向上したと推察された。なお、Hijnen らは、1975 年から 2003 年までの凝集沈澱-粒状層ろ過処理(砂ろ過処理含む)におけるウイルスの処理性評価に関する研究を Review しており、 3.0 ± 1.4 Log の除去率が期待できることを報告している⁹⁾。0.45 μm のメンブレンフィルターと砂を含む粒状層では分離機構が厳密には異なるかもしれないが、本研究で得られた凝集沈澱-膜ろ過処理におけるウイルスの除去率は、既往の研究と同程度となった。

C2-2 国内浄水場におけるウイルス除去の実測
検出阻害軽減化処理後のトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)陽性率は全試料について 88 % (28/32)、原水試料について 100 % (12/12) であった。原水試料中の濃度範囲は $10^{2.1} \sim 10^{5.9}$ copies/L と、先行研究同様、本調査においても PMMoV が多いことが示された。原水中および各処理工程後における PMMoV の定量結果を原水中濁度と共に図 6 に示す。除去効率の算出には処理工程前試料および処理工程後試料の両者から濃度が定量された場合のデータのみを用いた(図 7)。凝集・沈澱および急速ろ過による処理(処理工程 B)のウイルス除去率が最も高く、処理工程 B 全体における PMMoV の除去効率が 5.2-Log であったのに対し、凝集剤添加なしの急速ろ過((処理工程 C)の PMMoV 除去効率は 0.73-Log (平均値)と高くなかった。凝集・沈澱工程が急速ろ過の除去効率向上に貢献していると示唆された。緩速ろ過(処理工程 A)によるウイルス除去効率も高くなかった。

C2-3 エボラウイルスの塩素消毒

エボラウイルスは感染症法の 1 類感染症に指定されており、取扱いについて厳しく定められており、BSL4 の施設においてのみ実験が可能である。不純物が少ない水中における塩素消毒の有効性については、実験データが存在しない。感染経路としては直接接触とされ、エアロゾルに関する記述もあるが、水系感染は警戒を要する感染経路とはみなされていない。細胞培養後に緩衝液で 10 倍希釈し、4 および室温での生残性を見た実験では、26 日間で 2-Log の低下(4)、4-Log の低下(室温)、その後は 46 日目に至るも大きくは減らなかった¹⁹⁾。このことから、必ずしも不安定とは言えないが、培地成分などの有機物等が少ない水道水のような条件におけるウイルスの生残性については更なる実験が必要である。

WHO のエボラ予防ガイドンス(WHO, 2014)では、吐物等の処理に塩素系の消毒剤を勧めている。また、衣服の洗濯等においても塩素を

加えることを勧奨している。エボラウイルスはエンベロープのあるウイルスであるので比較的消毒剤等に感受性が高く、エンベロープのないウイルス(norovirus, rotavirus, adenovirus, poliovirus など)に対して効果のある消毒剤は、すべてエボラウイルスに対しても有効であると考えられている(CDC, <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/environmental-infection-control-in-hospitals.html>)。清澄な水中における 1mg/L 程度の塩素消毒は、腸管系ウイルスに対して有効であり、10min・mg/L 程度で 3-Log 以上の不活化が期待できる(CDC, <http://www.cdc.gov/safewater/effectiveness-on-pathogens.html>)ので、水道水中では十分にゆとりをもってエボラウイルスを不活化できていると考えられる。

C3-1 高度浄水処理におけるクリプトスポリジウム等の不活化率の推算

EPA マニュアルに従い浄水場オゾン接触槽及び滞留槽における通常運転時の対数減少値を計算した¹⁷⁾。滞留槽出口の溶存オゾン濃度目標値を 0.09mg/L で制御した通常時は、オゾンによるクリプトスポリジウムの対数減少値は 0.07-Log(15%)、ジアルジアの対数減少値は 1.0-Log(90%)と計算された(表 6)。オゾン注入率の目標値を 2mg/L で制御したオゾン注入強化時は、オゾンによるクリプトスポリジウムの対数減少値は 0.56-Log(73%)、ジアルジアの対数減少値は 3.7-Log(99.98%)と計算された(表 7)。過去に X 浄水場の原水水質が悪化したためオゾン注入率を 0.7mg/L に強化した際のクリプトスポリジウムの対数減少値は 0.15-Log(29%)、ジアルジアの対数減少値は 1.6-Log(98%)と計算された(表 8)。これらの結果から、通常のオゾン接触槽及び滞留槽ではクリプトスポリジウムに対してあまり不活化効果がないと考えられた。なお、冬季でもオゾン注入を強化すれば、ジアルジアに対してはある程度の不活化効果が期待できる結果であった。

X 浄水場と同様に上下迂流向流 3 段接触方式のオゾン接触槽を有し、さらに前段ろ過池も有する Y 浄水場のオゾン接触槽及び滞留槽における対数減少値を計算した(表 9、10)。この際のクリプトスポリジウムの対数減少値は 0.03 ~ 0.13-Log(6.7 ~ 26%)、ジアルジアの対数減少値は 0.54 ~ 1.3-Log(71 ~ 95%)と計算され、X 浄水場と同程度であった。いずれの浄水場においても臭素酸は基準内であったが、その兼ね合いからオゾン濃度の大幅な増は考えられていない。

以上の結果から、水温が高い夏季であっても、クリプトスポリジウムに対するオゾンの不活化効果はあまり大きくはないと推算された。

C3-2 デジタル PCR による水道原水中のクリプトスポリジウムの定量

デジタル PCR 法によって水道原水試料中のオーシストの定量を試みた結果、標準試料の場合と比べ、PCR 反応の阻害の影響が蛍光曲線の立ち上がりが遅い傾向にあった。このため、PCR のサイクル数を 50 サイクルと通常より長く設定し、影響を緩和して定量を実施した。その結果、図 8 に示す通り、デジタル PCR 法を用いて既存のリアルタイム PCR 法は同様の定量値が得られた。サンプル毎の誤差も小さかった。言い換えると、定量 PCR で得られる定量値(コピー数)は、デジタル PCR によって同じコピー数が得られており、いずれの方法によっても、クリプトスポリジウムの定量は可能と考えられた。

C3-3 相模川河川水を用いた qRT-PCR 法と検鏡法によるクリプトスポリジウム測定と比較

検鏡法および qRT-PCR 法の試験で、2 法が一致したのは全体の 73%(両方陰性 56%、両方陽性 17%)であった。2 法が一致しなかったのは 27%であり、全て qRT-PCR 法のみ陽性であった。増幅産物は全てクリプトスポリジウムの配列であった。この結果から、qRT-PCR 法は検鏡法と比較しても同等かもしくはそれ以上の感度を有すると考えられた。2 法の結果が一致しなかった

理由として、試料中のオーシスト濃度が低かったことが原因の1つとして考えられた。不一致であった試料はqRT-PCR法での検出個数が約3個相当以下と低濃度であった。加えてこれらの試料には環境中で損傷を受け、形態的に検鏡法では判別することが不可能なオーシストが含まれていた可能性も考えられた。

両方陽性になった試料では、一部を除いて、定量結果に大きな乖離はなかった。大きく乖離したのは蟹淵排水路においてで、検鏡法では188個検出されたのに対して、qRT-PCR法では3.6個相当しか検出されなかった。この試料における内部標準遺伝子の増幅曲線のCt値は、陰性対象試料とほぼ同等の値を示したことから、PCR阻害が発生している可能性は低く、環境中における核酸の分解が考えられた。

qRT-PCR法で得られた増幅産物の直接塩基配列決定の結果、全ての試料からクリプトスポリジウムの配列が得られ(表1)、qRT-PCR法の特異性に問題はなかった。今回の調査ではqRT-PCR法で13試料が陽性となり、ブタから分離されている *Cryptosporidium suis* (AF115377)、ウシから分離されている *C. andersoni* (AF093496)もしくはネズミから分離されている *C. muris* (AB089284)、ヘビ(ヤマカガシ)から分離されている *Cryptosporidium* sp. (AB222185)、カモ(カナダガン)から分離されている *Cryptosporidium* sp. (AY324639)、上海の下水から分離されている *Cryptosporidium* sp. (FJ205700)の塩基配列が得られた。その中でも *C. suis* の配列は8試料と最も多く確認された。今回検出された *C. andersoni*、*C. muris* および *C. suis* はヒトからの検出事例は稀である²⁰⁾。

今回の調査では支川合流前の座架依橋からクリプトスポリジウムは検出されなかったが、支川からは多く検出され、支川合流後の寒川取水堰からも検出された。さらに検出頻度の高い小鮎川と中津川からは *C. suis* が多く検出されており、下流の寒川取水堰でも *C. suis* が確認された。過去の調査においても、小鮎川、中津川からはブタ型の *C. parvum* が検出されたという報告があ

り⁵⁾、これらの支川、さらにはその支川に排水している畜舎が相模川の大きな汚染源の1つではないかと推察された。

C3-4 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

粉体ろ過-X-MG 培地法と従来法との比較をするため、X-MG 培地-粉体ろ過-混釈法とメンブランフィルター法で河川水、下水流入水および放流水の大腸菌を濃縮、計数した(図9)。回収用のリン酸緩衝溶液に Tween 80 を0.5%添加する方法が適しており、粉体ろ過法は従来法と同等かそれ以上の回収が認められた。昨年度の結論である、コリラートMPN法で大容量の試験を可能にすることに加えて、粉体ろ過法はメンブランフィルター法と比較して操作が容易な混釈法を大容量の検査に適用可能にすることが明らかになった。

大腸菌と同様に、嫌気性芽胞菌についても河川水、下水流入水および放流水を試料に、粉体ろ過法とコントロールの従来法で計測した(図10)。嫌気性芽胞菌は、どの濃度域においても従来法と同等かそれ以上の菌数となり、幅広い濃度範囲で適用が可能であることが示された($r^2=0.9958$)。特に、嫌気性芽胞菌の試験では、試料の加熱操作(75℃, 20分)が必要であるが、大容量の試料では加熱処理が困難である。本法では、濃縮し、回収した粉体を含むフィルターを試験管に回収し、リン酸緩衝液で浸して加熱する方法とした。このように、嫌気性芽胞菌の試験のための大容量の試料の加熱法としても粉体ろ過による濃縮法は有効な手段であると考えられた。

C3-5 フィルター上のクリプトスポリジウム分散性

フィルター上のクリプトスポリジウムを計数する際にMPNを導入することを企図し、最適なる過条件を検討するため、フィルターホルダー、ろ過前の静置、界面活性剤の有無が異なる条件で、フィルター上の中央部および周辺部の区画内でのクリプトレーサーの分散性を評価した(表12)。ろ過部にステンレスメッシュを装着したフィルター

ホルダーを使用し、Tween 80 添加 PBS を用い、試料水をファンネルに注入し 10 分間静置後にろ過を行うこととした条件で周辺部と中央部のトレーサー数の比がほぼ 1 となり、分散性が確保された。なお、すべての条件で吸引はほとんど吸引圧力をかけない、すなわち「ゆっくり」した条件でろ過を行った。ちなみに、ろ過速度は結果に影響し、急速なるろ過条件ではクリプトレーサーは中央部に集まる傾向がみられ、分散性は確保されなかった。

最適な条件(界面活性剤添加、10 分静置)で、クリプトレーサーをろ過し、すべての完全区画を計数した。10 回の試行を行い、すべての完全区画および中央 4 区画、辺縁部および中間部に区切った完全区画の径数値を求めた(表 13)。それぞれの区画区分間の計数値に有意差は認められず($\alpha = 0.05$)、本ろ過条件下でクリプトレーサーの分散性が確認された。

C3-6 クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の発生動向

クリプトスポリジウム症、ならびにジアルジア症の届出数をグラフに示した(図 12)。クリプトスポリジウム症の届出数は、年 10 例程度であった。2002 年、2004 年、2014 年にピークがあるが、集団感染によるものであった。それぞれ、北海道の原因不明による 2 回の集団感染、長野県の水泳プールを介した集団感染、長野県の牧場体験学習における集団感染が反映されていた²¹⁾、²²⁾。2006 年から 2013 年の間に報告された 100 件における感染要因は大きく分けて、ウシとの接触、海外渡航関連、男性間性的接触、食品摂取であった(表 14)。幸いに水道が原因と推定される事例はなかったが、潜伏期間が 6 日と長く原因不明になることが多いので、原因不明の部分を減らせるように、届出基準と届出表の表記を工夫するなどして潜伏期間や感染経路など情報提供が必要であると考えられた。農場実習、自然体験学習における、ウシ接触の集団感染が示唆される届出が複数認められた。食品由来は、2006 年にウシの生肉に関連の集団感染があっ

た。海外の渡航先は、ほぼ開発途上国であった。

国外では、2010 年にスウェーデンで推定 27,000 人が発症する水道を介した大規模なクリプトスポリジウムの集団感染が生じており、米国 Milwaukee に次ぐ世界第二位、欧州最大規模と、未だに注意を要することに変わりはなかった¹¹⁾。問題の浄水場では前オゾン処理、凝集沈殿・急速ろ過、結合塩素消毒と、国内と同様の浄水処理がなされており、処理の不足が懸念された。この事故の後に紫外線消毒が導入されており、国内で大規模集団感染を未然に防ぐために、同様に紫外線消毒等の対策の導入を推奨すべきと考えられた。国内では水道水からクリプトスポリジウムあるいはジアルジアが検出されて、煮沸勧告や給水停止となることが 2006 年から 2013 年の間に 10 件(内 1 件は後述のジアルジア集団感染)あり、このような混乱を避けるためにも、対策が取られていることが望ましいと考えられた。

ジアルジア症は年平均 72 例で、2001 年をピークになだらかに推移していた(図 9)。2006 年以降に変化を生じさせるような大きな事件はなかったが、2010 年に国内で初めてジアルジアの集団感染が報告された²¹⁾。2012 年から治療薬のメトロニダゾールの健康保険適用がなされたが、現時点で報告数の増加はみられていない。感染要因は大きく分けて、海外渡航、男性間性的接触、下水や糞便等への曝露であった(表 2)。海外の渡航先は、開発途上国が主であった。届出の多くは下痢症であったが、腹部不快感のみで下痢症ではない例が 17%(98)、無症状が 2.2%(13)あり、感染源として注意を要すると考えられた。11%(63)において内視鏡検査が行われ、十二指腸液、胆汁、膵液からジアルジア検出されていた。腹部症状があっても寄生虫検査が行われることは少なく、内視鏡の病理検査に至って感染が判明することがあり、届出数は実態より少ない恐れが高く注意を要すると考えられた。

2010 年のジアルジア集団感染は、千葉県内の小規模貯水槽水道における、蛇口を介した水

系集団感染として報告され、概要は以下のとおりであった。有症状者は聞き取り調査した 43 名中の 39 名(91%)であった。蛇口水から残留塩素が検出されず、地下受水槽、蛇口水からジアルジアとクリプトスポリジウムが検出された。便検査した 9 名中の 4 名からジアルジアが検出され、ジアルジア集団感染と確認された。地下受水槽に給水している市水道水からは不検出であった。この集団感染は、1994 年の平塚市におけるクリプトスポリジウム集団感染とよく似たもので、ビル建築物の貯水槽の管理を徹底する必要が指摘される²³⁾。

D. 結論

D1-1 従属栄養細菌の拭きとり試験

昨年度検討した測定方法により配管実試料を測定し、10 試料について従属栄養細菌数は 0 ~ 52CFU/cm²とわずかに検出された。拭き取り回数については 1 回で十分と考えられた。配管実試料から検出された従属栄養細菌数はわずかであったが、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るため、配管等の管理の重要性を再認識した。

D1-2 耐震性貯水槽における従属栄養細菌数

従属栄養細菌数の増加により、水質の基準値を超過していないが、わずかとはいえ滞留またはその恐れを複数の耐震性貯水槽において認められた。従属栄養細菌数の利用は有効であった。

D1-3 蛇口等水環境のレジオネラ属菌の検出

10 軒の家庭の蛇口等を調査した結果、*Legionella* 属菌は水試料 33 検体中 2 検体(6.1%)から分離された。浴室の給湯水から *L. pneumophila* SG1 が、台所の蛇口から *L. anisa* が分離された。LAMP 法では水試料 33 検体中 12 検体(36.4%)およびスワブ試料 35 検体中 6 検体(17%)からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。ビル建築物内の蛇口では、レジオネラ属菌は、培養法では検出されなかったものの、LAMP 法及びリアルタイム PCR 法による

遺伝子検査では検出された。蛇口水におけるレジオネラ属菌の汚染の可能性が確認され、蛇口をひねる際の放流を注意喚起する必要性が考えられた。

D2-1 凝集沈殿ろ過によるアデノウイルス、ポリオウイルスの除去性

従来から広く用いられる塩基度 50%の PACl (PACl-50s)を用いた凝集沈殿処理におけるアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率は、PFU 法にて評価した場合、それぞれ 0.1 ~ 1.4 Log、0.5 ~ 2.4 Log であった。凝集沈殿後に急速ろ過を模した膜ろ過処理を追加したアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率は、それぞれ 1.9 ~ 3.7 Log、2.4 ~ 3.9 Log となった。

D2-2 国内浄水場におけるウイルス除去の実測

水環境中に高濃度で存在するトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)を測定対象とすることにより、実浄水場の凝集・沈殿、急速砂ろ過におけるウイルスの除去効率を実測することに成功し、5.2-Log の除去率が得られた。

D2-3 エボラウイルスの塩素消毒

不純物が少ない水中における塩素消毒の有効性については、実験データが存在しなかった。エボラウイルスはエンベロープのあるウイルスであるので比較的消毒剤等に感受性が高く、エンベロープのないウイルスに対して効果のある消毒剤は、すべてエボラウイルスに対しても有効であると考えられており、水道水中ではエボラウイルスを不活化できていると考えられた。クリプトスポリジウム問題以降に塩素消毒に依存することはできなくなったが、ウイルス細菌の対策としては塩素消毒は有効と考えられた。

D3-1 高度浄水処理におけるクリプトスポリジウム等の不活化率の推算

EPA マニュアルに従い計算した対数減少値から、通常のオゾン注入ではオゾン接触槽及び滞留槽でのクリプトスポリジウムの不活化

効果はあまり大きくはないと考えられた。高度浄水処理施設を導入したとしても、クリプトスポリジウム等への対策として、定期的な原水の検査やろ過水濁度の管理などが依然として重要であると考えられた。

D3-2 デジタル PCR による水道原水中のクリプトスポリジウムの定量

デジタルPCR法を用いて、標準試料を用いること無く、水道原水試料中のクリプトスポリジウムオーシストを定量することが可能であった。既存のリアルタイム PCR 法と同様の定量値が得られ、いずれの方法でも定量が可能と考えられた。

D3-3 相模川河川水を用いた qRT-PCR 法と検鏡法によるクリプトスポリジウム測定の比較

相模川河川水を試料として遺伝子検出法の応用を進めた。検鏡法と qRT-PCR 法の比較では 73%の結果が一致して問題なく、遺伝子検出法がより高感度であった。qRT-PCR 法で得られた遺伝子増幅産物の塩基配列を決定したところ、相模川ではブタ由来の *C. suis* が多く検出され、相模川の原虫汚染はこれらの支川の影響が大きいと推察された。遺伝子増幅産物の塩基配列決定によるクリプトスポリジウムの種の同定は、調査流域の汚染原因の推定に有用と考えられた。

D3-4 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

粉体ろ過法の大腸菌、嫌気性芽胞菌への応用を実環境水で実証した。大腸菌では、X-MG 培地を用いた混釈培養法で、界面活性剤 Tween80 を 0.5%添加したリン酸緩衝水で遊出することで従来法と同等の回収が得られた。嫌気性芽胞菌でも従来法と対応が得られ、嫌気性芽胞菌の大容量試料の加熱法として粉体ろ過による濃縮法は有効であった。

D3-5 フィルター上のクリプトスポリジウム分散性

検鏡用メンブランフィルター上でのオーシストの分散性について、クリプトトレーサーを用いて検討を行った。界面活性剤有、10 分静置、ほとん

ど吸引圧力をかけずにゆっくりとろ過、ステンレス製フィルターホルダー使用の条件で、クリプトトレーサーが均一に分散し、MPN 法の適用を可能とする最適なるろ過方法を確立できた。

D3-6 クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の発生動向

クリプトスポリジウム症とジアルジア症の流行状況を把握するため、届出の 2006～2013 年を集計した。幸いに水道が原因と思われる事例はなかったが、2010 年にスウェーデンで水道を介したクリプトスポリジウムによる大規模集団感染が生じており、未だに注意を要することに変わりなかった。この事故の後に紫外線消毒が導入され、国内でも同様の対策導入を推奨すべきと考えられた。問題の浄水場では前オゾン処理が導入されていたが、この集団感染の経験と国内浄水場の計算から、オゾン処理には依存できないと考えられた。小規模貯水槽水道における、蛇口を介したジアルジアの水系集団感染が報告され、ビル建築物の貯水槽の管理を徹底することが必要と考えられた。

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

- Lainé, 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) Hijnen, W.A.M. and Medema, G.J. (2010) Elimination of micro-organisms by drinking water treatment processes: a review, 8-9, IWA Publishing, London, UK.
- 10) Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F, Ruan Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 2006 Jan;4(1):e3.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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
- 15) 日本水道協会(2011)上水試験方法 2011 年版 . 理化学編. pp.230-235. 32 残留オゾン. 日本水道協会, 東京.
- 16) 日本水道協会(2011)上水試験方法 2011 年版 . 金属類編. pp.110-112. 14 臭素酸. 日本水道協会, 東京.
- 17) U.S. Environmental Protection Agency (2010) Long term 2 enhanced surface water treatment rule toolbox guidance manual, pp.214-237.
- 18) 厚生科学研究費補助金 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.平成 25 年度研究報告書より、分担研究報告書「微生物分科会」
- 19) T.J. Piercy, S.J. Smither, J.A. Steward, L. Eastaugh and M.S. Lever, 2010, The survival of filoviruses in liquids, on solid substrates and in a dynamic aerosol, *Journal of Applied*

Microbiology 109, 1531–1539.

- 20) Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Diaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2,414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol.* 2006;55:703–7.
- 21) 感染研感染症疫学センター、病原微生物検出情報月報 (IASR) より、〈特集〉クリプトスポリジウム症およびジアルジア症 2014 年 7 月現在、Vol.35 No.8、2014
- 22) 東京都健康安全研究センター、東京都微生物検査情報、Vol.34 No.12、2013
- 23) 感染研感染症疫学センター、病原微生物検出情報月報 (IASR) より、〈特集〉クリプトスポリジウム症 2005 年 6 月現在、Vol.26 No.7、2005

F. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Kimura, M. and Ohno, K. (2014) Virus removal by an in-line coagulation-ceramic microfiltration process with high-basicity polyaluminum coagulation pretreatment, *Water Science and Technology: Water Supply*, **14**(3), 429–437.
3. Kishida N, Noda N, Haramoto E, Kawaharasaki M, Akiba M, Sekiguchi Y. Quantitative detection of human enteric adenoviruses in river water by microfluidic digital polymerase chain

reaction. *Water Sci Technol* 2014;70(3):555-60.

4. 感染研感染症疫学センター、病原微生物検出情報月報 (IASR) より、〈特集〉クリプトスポリジウム症およびジアルジア症 2014 年 7 月現在、Vol.35 No.8、2014

学会発表

1. Marubayashi, T., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Oshiba, A. (2014) Development of novel high-basicity polyaluminum chloride for effective virus removal, IWA World Water Congress, Lisbon, Portugal, 21–26 September 2014.
2. 白崎伸隆, 丸林拓也, 村井一真, 松下拓, 松井佳彦 (2014) Contaminant Candidate List に掲載された水系感染症ウイルスの凝集処理性評価, 第 51 回環境工学研究フォーラム, 山梨, 2014/12/20–22.
3. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2014) ウイルスによる水系感染症の制御に向けた浄水処理技術の高度・高効率化, 第 22 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2014/11/21.
4. 村井一真, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2014) 腸管アデノウイルスの凝集処理性, 第 64 回全国水道研究発表会, 名古屋, 2014/10/23–25.
5. 土岡, 泉山, 原田, 和田, 橋本 (2014) 指標細菌等の濃縮・回収法としての粉体ろ過法の適用性, 日本水道協会平成 26 年度全国会議(水道研究発表会), 名古屋
6. 泉山信司, 木下一美, 村上裕子, 八木田健司, クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内発生動向, 第 84 回日本寄生虫学会, 2015 年 3 月, 東京都

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

