

## F. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

(該当なし)

### 2. 実用新案登録

(該当なし)

### 3. その他

(該当なし)

## G. 謝辞

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

表 A

### <微生物分科会>

荒井 活人	東京都水道局
安藤 正典	山梨大学工学部
遠藤 卓郎	国立感染症研究所
大河内 由美子	麻布大学生命・環境科学部 環境科学科
大谷 喜一郎	元神奈川県内広域水道企業団
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
岸田 直裕	国立保健医療科学院
酒井 紳	神奈川県内広域水道企業団
高藤 俊	浜松市上下水道部
高田 陽	神奈川県畜産技術センター
田部井 由紀子	東京都健康安全研究センター
橋本 温	県立広島大学生命環境学部 環境科学科
松島 有希子 (旧姓川口)	桐生市水道局水質センター
水野 聰	新潟市水道局
渡邊 洋大	神奈川県企業庁

### <化学物質・農薬分科会>

相澤 貴子	(公財)水道技術研究センター
井上 剛	福岡県南広域水道企業団
江崎 智昭	神戸市水道局
鎌田 素之	関東学院大学理工学部
河村 裕之	神奈川県内広域水道企業団
桐山 秀樹	奈良県水道局
小坂 浩司	国立保健医療科学院
佐藤 学	神奈川県衛生研究所
高橋 英司	新潟市水道局
川上 夏紀	茨城県企業局
西野 真之	八戸圏域水道企業団
三浦 晃一	仙台市水道局
三枝 慎一郎	広島市水道局
渡部 祐介	千葉県水道局

### <消毒副生成物分科会>

内橋 孝行	大阪広域水道企業団
伊佐 智明	沖縄県企業局
中村 美早紀	茨城県企業局
小林 利男	東京都水道局
菱田 祐太	国立保健医療科学院
城山 二郎	奈良県水道局
田中 康夫	阪神水道企業団
中井 喬彦	横浜市水道局
北本 靖子	大阪市水道局
服部 晋也	大阪市水道局
船岡 英彰	京都市上下水道局
木村 直広	北千葉広域水道企業団
吉川 雄介	川崎市上下水道局
篠田 豊	東京都水道局
清宮 佳幸	千葉県水道局

### <リスク評価管理分科会>

鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター
西村 哲治	帝京平成大学薬学部
小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所
平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所
山田 隆志	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
川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所
高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所
小林 克己	国立医薬品食品衛生研究所

長谷川 隆一	国立医薬品食品衛生研究所
松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所
山口 治子	国立医薬品食品衛生研究所
五十嵐 智女	国立医薬品食品衛生研究所
小熊 久美子	東京大学大学院先端科学技術研究センター
金見 拓	東京都水道局
及川 富士雄	北千葉広域水道企業団
中町 眞美	阪神水道企業団
高橋 和彦	東京都水道局
塩見 祐二	大阪市水道局
森田 久男	埼玉県企業局
北澤 弘美	公益社団法人日本水道協会
町田 高広	公益社団法人日本水道協会

<水質分析法分科会>

安達 史恵	大阪府立公衆衛生研究所
阿部 晃文	川崎市上下水道局

柏木 勉	川崎市上下水道局
五十嵐 良明	国立医薬品食品衛生研究所
久保田 領志	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
大窪 かおり	佐賀県衛生薬業センター
木下 輝昭	東京都健康安全研究センター
渡邊 喜美代	東京都健康安全研究センター
小田 智子	東京都健康安全研究センター
小杉 有希	東京都健康安全研究センター
井上 亘	兵庫県立健康生活科学研究所
谷畑 智也	兵庫県立健康生活科学研究所
宮脇 崇	福岡県保健環境研究所
境 泰史	(公財)北九州生活科学センター
高木 総吉	大阪府立公衆衛生研究所
吉田 仁	大阪府立公衆衛生研究所

平成 27 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	高田 陽	(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数の測定が開始され、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、従属栄養細菌数の測定を固体表面試料に応用した。滅菌綿棒を使用して測定方法したところ、配管中に多数検出される場所を見出した。滞留、あるいは遅い流速が問題となり、バイオフィーム等が生じたと考えられた。協力が得られた特定建築物と病院の水道蛇口から、十分に捨て水をしていない開けた直後の初流水を検査し、*Legionella* 属菌が培養により検出された。分離された *Legionella* 属菌は *L. pneumophila* SG1 他であった。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。開栓直後の水を捨てること、定期的な捨て水を行い滞留させないこと、残留塩素濃度の維持、といった対策が推奨されると考えられた。

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、水道原水にウイルス（アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルス、トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV））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。PMMoVと各種ウイルスは同程度の除去が得られ、PMMoVはウイルスの指標として有効と期待された。各ウイルスは、凝集沈澱・砂ろ過処理により、1～2-Log程度の除去が得られた。実浄水場の凝集・沈澱、急速砂ろ過におけるPMMoVの除去効率を実測し、4.3-Logの除去率が得られた。

クリプトスポリジウム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法の比較を継続した。2法の定性的な一致率は、クリプトスポリジウムが78%、ジアルジアが81%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、汚染源の推定に活用できると考えられた。検鏡の簡易化を目的に、観察フィルター上のクリプトスポリジウム計数にMPN法の応用を試みたところ、実施可能であった。多数のクリプトスポリジウムを計数する際に、有用と考えられた。水道におけるクリプトスポリジウムのリスク管理には、種類ごとの感染確率、水道原水中の濃度と種類、浄水処理による除去率といった数値が必要となるが、これらの情報は非常に限られている。そこで本研究では過去の大規模集団感染における患者発生数に着目し、水道水中の病原体濃度が1桁減少すれば、患者発生は1桁減少するという前提で、クリプトスポリジウム症の大規模集団感染を防ぐのに必要なバリアの程度を計算した。過去の集団感染では数千人から数十万人、すなわち4-Log弱から6-Log弱が発生しており、これが10日間かけて蓄積したと想定した場合、この患者数を0人に抑えるには3-Logないし5-Log程度のバリア導入が推奨との単純計算ができた。国外では、2011年にスウェーデンで推定20,000人が発症する、水道が原因と推測される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。

#### 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。

水道水では、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。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

菌数についての研究はほとんどないが、海外において100 cm<sup>2</sup>あたり1.1×10<sup>5</sup>～5.75×10<sup>6</sup> CFUであったとの報告がある<sup>1)</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100 cm<sup>2</sup>あたり3.9×10<sup>5</sup>～2.4×10<sup>6</sup> CFU<sup>3)</sup>、洗浄後は6×10<sup>0</sup>～1.9×10<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。

配管内面の一定面積から拭きとって培養する操作に、市販の拭き取り用器材が有効であった。適切に残留塩素が管理された末端給水栓の配管内でも、わずかとはいえ細菌が付着して存在し、バイオフィルムの形成されるおそれのあることが、これまでの調査で判明している<sup>2)</sup>。また近年、地震等の災害時の迂回経路や需要増大時の水

圧水量の均等化を目的に、配水区域のブロック化が行われている<sup>3)</sup>。すなわち、適当な広さの配水区域に、複数の本管が接続されたり、隣接ブロックと接続されているなど、その区域に 2、3 箇所から水が流入出し、水圧の変動や非常時への備えがなされている。ところがこうしたブロック内では水が滞留し、残留塩素濃度が低下したり赤水が発生するなど、実際の管理は容易ではないらしい。滞留ではないが、流速が遅ければ配管内で水道水中に含まれる夾雑物が沈降し、蓄積する恐れがある。例えば 0.4 m/s(少なくとも 0.2 m/s)の流速が 1 日 1 回あれば、配管はセルフクリーニングされると考えられており、配管を衛生的に維持するためにはそのような配慮が求められている<sup>4,5)</sup>。

*Legionella* 属菌は、平成 27 年度の患者届出数が年間 1,600 弱例と多く、対策が求められている。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、ビル建築物や病院等の、蛇口における *Legionella* 属菌の汚染状況の調査を企図した。

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、国内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<sup>6, 7, 8, 9)</sup>。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)と、その他のウイルスの除去率を比較した<sup>10)</sup>。

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 2011 年にもスウェーデンにおいて 20,000 人の集団感染が報告

され、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<sup>11, 12)</sup>。集団感染を防ぐのに必要な、浄水場における対策の程度について考察した。

クリプトスポリジウム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継続した。

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。これまで検討した最適なる過方法により、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適切な分散が得られている。この方法を用いて繰り返しプレパラートを作成し、MPN 値と実計測値が同等であることを実験的に確認し、利用可能となることを目指した。

## B. 研究方法

### B1-1 水道配管内の拭き取り従属栄養細菌数

水道工事で得られた配管に対して従属栄養細菌数の調査を行った。採取は工事の際に発生した使用済み水道配管の内表面に、滅菌した水道水をかけてバイオフィーム以外の細菌や土を洗い流したのち、拭き取り検査キット(BD ラスパークチェック)を使用して内壁 2~12 cm<sup>2</sup>をふき取ることで、キット付属のリン酸緩衝生理食塩水 10 ml に回収した。7 日後と 14 日後の従属栄養細菌のコロニー数(colony forming unit、以下 CFU)を定法に従い R2A 培地を用いて混釈法で測定した<sup>13)</sup>。赤茶けた汚れに対して、フェロシアン化カリウム水溶液を用いた鉄の定性反応を行った<sup>14)</sup>。配管の使用年数は市の給水台帳等より求めた。工事の都合上、配管内の水がサンプリングできなかつた際は、近隣の公園や神社の給水栓の水温と残留塩素を測定し参考値とし

た。

#### B1-2 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。ビル建築物、および3医療機関において、試料を採取した。試料は水試料およびスワブ試料とし、水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水した。開栓直後の、蛇口付近に滞留している水を採取した。他に、温度、pH、遊離残留塩素濃度等を測定した。スワブ試料は、滅菌綿棒で蛇口内を拭って採取し、リン酸緩衝液(pH 7.0)の50倍希釈液(以下、希釈緩衝液)1 ml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>15)</sup>。すなわち、水試料はメンブランフィルターでろ過濃縮し、希釈緩衝液に再浮遊した。浮遊液は、熱処理、あるいは酸処理後に適宜希釈し、GVPC $\alpha$  寒天平板培地、WYO $\alpha$  寒天平板培地等に塗抹し、36~37℃で7日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落をBCYE $\alpha$  寒天平板培地(Oxoid)に転培し、性状により鑑別を行った。16S rRNA 遺伝子、Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)のPCR法、あるいはLAMP法(Loopamp レジオネラ検出試薬キットE、栄研化学)により、遺伝子検査を行った。必要により、型別用血清および自発蛍光の有無、16S rRNA 遺伝子の塩基配列により、種の鑑別を行った。

#### B2-1 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有効性

水道事業体の協力を得て入手した水道原水を用いて、回分式凝集沈澱-砂ろ過処理における、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルス、トウガラシ微斑ウイルスの処理性を評価した。精製したアデノウイル

ス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスを $10^{2-3}$  PFU/mLになるように、また、トウガラシ微斑ウイルスを $10^3$  lesions/mLになるように同時添加した水道原水A~H(8箇所の原水、pH: 7.0-7.7、濁度: 0.4-4.6 NTU、DOC: 0.6-3.7 mg/L、UV260: 0.01-0.09 cm<sup>-1</sup>)を実験原水とし、角型ビーカーに2 L添加した。ここに、凝集剤として従来から広く用いられているポリ塩化アルミニウム(塩基度が50%)を各浄水処理場における使用濃度になるように添加し、直ちに(予備試験の結果を用いて)HClあるいはNaOHにてpHを7に調整した。これをG値200 s<sup>-1</sup>(197 rpm)にて1分間急速攪拌、G値20 s<sup>-1</sup>(42 rpm)にて10分間緩速攪拌した後、60分間静置した。原水及び静置後の上澄水を採取した。上澄水を120 m/dのろ速にて、珪砂(有効径: 0.6 mm、均等係数: 1.3以下)を充填した砂ろ過カラム(ろ層厚さ: 10 or 20 cm)に10分間、あるいは15分間通水し、凝集沈澱-砂ろ過処理後の試料を採取した。ウイルス濃度はリアルタイムPCR法にて定量した。トウガラシ微斑ウイルスについてはタバコ葉(*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc*)への感染評価も実施した。

#### B2-2 国内浄水場におけるウイルス除去の実測

環境中で最も高濃度と言われるトウガラシ微斑ウイルスおよびヒト腸管系ウイルスをPCR法により測定した。2014年の5、6、9、11月および2015年1月に、国内の3箇所の浄水場(浄水場1、浄水場2、浄水場3)の協力を得て、昨年度に比べて12試料を追加した(合計43試料)。測定対象のウイルスを増やし(アイチウイルス、ノロウイルス、PMMoV、アデノウイルス40型、41型、JCポリオーマウイルス)、最終的なデータとして取りまとめた。すなわち、QIAamp viral RNA mini kit(Qiagen)等により核酸を抽出した後、PCRを行った。必要によりPCR阻害を回避する希釈等の操作を行った。除去処理した場合、核酸抽出液の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。

### B3-1 相模川水系における遺伝子検出法を用いた原虫調査

試料として相模川水系の河川表流水を用いた。相模川本川は、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。相模川本川に流入する支川のうち鳩川、中津川、小鮎川、貫抜川、玉川、永池川で採水した。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。検鏡は定法に従い、試料水を親水性 PTFE フィルター(孔径 5  $\mu\text{m}$  直径 90 mm)でろ過濃縮した後、免疫磁性体粒子法により原虫類を分離し、蛍光抗体染色法で観察および計数を行った。一部の試料を除き、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、残りの半量を遺伝子検出法に供した。

免疫磁性体粒子法で分離した原虫類は、磁性体粒子から塩酸解離後、中和処理と TE buffer で遠心洗浄した。核酸抽出、逆転写、定量 PCR は、Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit 及び Cycleave RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を使用した。クリプトスポリジウム1個あたり 18,000 コピー、ジアルジア1シストあたり 1,600 コピーとして個数を算出し、検水量相当に換算した。遺伝子増幅産物の塩基配列決定を行い、Blast 検索により近縁の登録配列を調べた。

### B3-2 格子入り観察フィルター上での MPN 法を用いたクリプトスポリジウム定量

ホルマリン固定した *Cryptosporidium parvum* genotype 2 のオーシスト 1 ml に、蛍光標識-抗クリプトスポリジウム抗体 100  $\mu\text{l}$ (ARK Fluor Ab C/G, アークリソース)を加え、一昼夜冷蔵庫内(4  $^{\circ}\text{C}$ )で染色し、 $10^1$  個/ml オーダーに PBS で希釈した。PBS には分散性を高めるために、Tween 80 を 0.1 % の濃度で添加した。

メンブランフィルターは、3 mm 角の格子と直径 20 mm の疎水円の付いた、孔径 0.45  $\mu\text{m}$ 、直径 25 mm のセルロースニトレートメンブランフィルター(13106-25-N、ザルトリウス)を用いた。フィルターホルダーの焼結ガラス製の吸引部およびファンネルは、メンブランフィルターの疎水円(直径 20 mm)より大きい直径 22 mm に加工したものをを用いた。昨年度の検討で、メンブランフィルター上での等分散性の確認されたろ過方法、すなわち 10 分間の静置と、吸引圧力をほとんどかけずにゆっくりろ過する方法に従ってろ過し、プレパラートを作成した。クリプトスポリジウムの計数には、落射蛍光顕微鏡の B 励起 200 倍で行った。フィルター上のオーシスト数と、オーシストの計数された区画数(陽性区画数)を同時に数えた。区画は、3 mm 角の完全区画と、辺縁の不定形の区画を区別した。不完全区画は、すべてをまとめて 1 区画とする場合と、中央を境に左右の 2 区画とする場合の 2 通りで MPN 値を算出した。MPN 値の計算には、USEPA の MPN プログラム(Most probable number calculator, US EPA)を用いた。MNP 値と計数値の比較には t 検定を用いた。

### B3-3 クリプトスポリジウム症の大規模集団感染を防ぐのに必要なバリア

過去の集団感染における患者発生数を、報告資料から求めた<sup>16, 17, 18)</sup>。飲料水中の病原体の濃度が 1 桁減少すれば、患者発生数は 1 桁減少するという前提で、大規模集団感染を防ぐのに必要なバリアの程度を単純計算した。

## C. 研究結果および考察

### C1-1 水道配管内の拭き取り従属栄養細菌数

サンプリングを行った配管の一部写真を図 1 に、従属栄養細菌数を表 1 に示す。配水管および給水管のいずれも培養 7 日後の結果での検出数は 5 個未満であった。培養 14 日後の結果では菌数が増加し、塩素消毒による損傷菌の検出が想像された。14 日後のサンプル No.2 において 2,000 CFU/cm<sup>2</sup> と検出数が高かった。

No.2 は水の停滞が発生しやすいような配水管の末端であった(図 2 工事箇所)。No.2 の配管は、周辺の 4 件の住宅のための、50 mm の配水管の約 50 m であった。検体を採取したのは配管の最末端の鉄キャップの部分である(図 1A、B)。最後の個人宅への給水管は、鉄キャップ設置部位の 50 cm ほど手前にあり、それ以降の 50 cm の部分は水が滞留する状態であった。このような滞留をさせないための、何らかの工夫が必要と考えられた。

一方、No.2 と異なり、配管内部に明らかに赤茶けた色の汚れが付着していたが(図 1D、F)、従属栄養細菌数は培養 14 日後であっても 10 CFU/cm<sup>2</sup> 未満と意外に少なかった。汚れに対して、鉄の定性反応試験を行ったところ、陽性であったことから、汚れは鉄さび由来の可能性が高かった。水の滞留が発生していなければ、配管内部に鉄由来の汚れが付着しても、従属栄養細菌数の増加が許されないと考えられた。このことから、配管を衛生的に維持するには、滞留させないことが必要と考えられた。

上記とは別に、赤水苦情に伴う布設替え工事があり、3 地点で 2 回ずつ培養を行う機会を得た(表 2)。特に試料 3、4 において 10<sup>4</sup>ないし 10<sup>5</sup> CFU/cm<sup>2</sup> と高い従属栄養細菌数であった。使用年数は 3 地点で最も浅く、年数に関連性が無かった。試料 3、4 の地点は、障害物を回避するために配管が上に立ち上がる場所で、内部からゴミも回収された(図 4)。ゴミの成分は鉄とアルミニウムが主だったことから、配水系由来の鉄錆と、浄水処理から僅かに漏れた凝集剤が混ざったものと考えられた。

シミュレーションにより各地点の流速を求めたところ、年平均で最大 13 cm/s、最小 1 cm/s と遅い様子であった。この配管は、ブロック化により 2 方向から水が供給されて水が押し合っており、滞留しやすい場所であった。セルフクリーニングに必要な 1 日瞬間最大の 40 cm/s とは数字の意味が異なるので比較はできないが、ゴミが蓄積している以上は、セルフクリーニングができていないと考えられた。流速を高める対策、例えば配管

径の縮小やブロック化の解消を行い、現状を把握するために流速計を使用するなどが考えられるかもしれない。定期的な捨て水も、当面の対策になるかもしれない。もし赤錆等の苦情があれば、近辺の管網の流速を確認し、洗管などを積極的に行うことが考えられた。塩素濃度は最低限維持されているので、大腸菌、一般細菌で検出できる問題ではない。残念ながら、事前に付近の従属栄養細菌数を測定していないので、どのような菌数であったかは不明である。従属栄養細菌数がどこまで高まっていたのか、このような事例の蓄積が必要と考えられた。

#### C1-2 蛇口等水環境のレジオネラ属菌の検出

新築の特定建築物と、3 医療機関の協力を得て、蛇口付近に滞留している水を採取し、レジオネラ属菌の検査を行った。

特定建築物の配管は複雑で、滞留が懸念された(図 5)。入居前における、蛇口を開いた直後の初流水では、大腸菌は 12 か所全てで検出されなかったものの、一般細菌数はおよそ 100,000 CFU/mL、従属栄養細菌数は 210,000 CFU/mL と高かった(図 6、7)。(ちなみに直接の比較はできないが、十分放流した後に測定される一般細菌数は 100 CFU/ml、従属栄養細菌数は 2,000 CFU/ml が基準である。)調査対象の特定建築物は、建物完成後から入居前までの 2~3 ヶ月ほどの間(10 月竣工、調査は入居前日の 1 月 7 日)に、水の滞留による微生物汚染が生じてしまったと考えられた。入居後は菌数が漸減し、夏季に一時的に増加(水温上昇によると考えられた)したものの、減少傾向にあった。入居後の水道使用に伴って、水の停滞が解消されたことが理由と考えられた。

レジオネラ属菌は、入居前から汚染が認められた。当初は少なかったものの、夏に向かって漸増し、その後も高いまま維持された(表 3)。漸増は水温の上昇とバイオフィーム中のレジオネラ属菌の割合の増加、秋から冬にかけての高止まりは給湯系の混合使用やバイオフィームが除去されないことが理由と考えられた。一般細菌数及



び従属栄養細菌数のような経時的な減少はみられず、サンプリングタイミングの影響が若干の上下変動はあるものの、一旦汚染が定着すれば、除去されること無く汚染が継続したと考えられた。レジオネラ属菌の菌種は、*Legionella anisa*、*L. sp.*及び*L. nautarum*であった。

以上の結果から、入居前後のバイオフィルムの定着を防ぐための、水抜きあるいは滞留させない定期的な放水、バイオフィルムの定着後は洗浄したり定期的に放水したり、滞留しても塩素濃度を高く維持できるように受水槽や貯水槽の時点で追加塩素したり水位を下げ滞留時間を減らしたり、といった対策の必要が考えられた。

3 医療機関の蛇口より、高頻度にレジオネラ属菌が培養で検出された(表4)。医療機関Dでは浴室の湯口水、蛇口水、シャワー水、病室・ナースステーション・給湯室・共用場所・談話室・中央監視室の洗面台の蛇口水、貯水槽の蛇口水を15検体採取した。*L. pneumophila* SG1及びSG5、*L. feeleii*、*Legionella sp.*が、各種蛇口から採取した水試料15検体中の10検体(67%)、及びスワブ検体13検体中の1検体(8%)から培養で検出された(表4)。なお詳細は示さないが、水試料9検体(60%)からレジオネラDNAが検出され、スワブ検体13検体からDNAは検出されなかった。温度は平均28.4℃、範囲は18.0~38.7℃、pHは平均7.8、範囲は7.7~7.8、遊離残留塩素濃度は平均0.05mg/L、範囲は0.01~0.11mg/L、ATPは幾何平均3.8RLU、範囲は0~32RLU、従属栄養細菌数は幾何平均170CFU/ml、範囲は1.0~9,250CFU/mlであった。

医療機関Eでは浴室の湯口水、蛇口水、シャワー水、病室・ナースステーション・共用場所・談話室の洗面台の蛇口水、受水槽の蛇口水を16検体採取した。*L. pneumophila* SG1及び*L. feeleii*が各種蛇口から採取した水試料16検体中の6検体(38%)、及び共用場所の洗面台の蛇口のスワブ検体14検体中の2検体(14%)から培養で検出された(表4)。なお詳細は示さないが、水試料は受水槽水2検体のうちの1検体

を除く15検体(94%)、スワブ1検体(7%)からレジオネラDNAが検出された。温度は平均29.6℃、範囲は18.1~33.8℃、pHは平均7.5、範囲は7.4~7.6、遊離残留塩素濃度は平均0.09mg/L、範囲は0.01~0.54mg/L、ATPは幾何平均4.8RLU、範囲は2~11RLU、従属栄養細菌数は幾何平均1,095CFU/ml、範囲は6.0~49,500CFU/mlであった。

医療機関Fでは浴室の湯口水、蛇口水、シャワー水、病室・ナースステーション・共用場所・談話室の洗面台の蛇口水、受水槽の蛇口水を15検体採取した。*Legionella sp.*が談話室及び病室の蛇口から採取した水試料15検体中の4検体(27%)から培養で検出された(表4)。なお詳細は示さないが、水試料1検体(7%)からレジオネラDNAが検出されたが、スワブ検体からは検出されなかった。温度は平均30.4℃、範囲は19.8~42.4℃、pHは平均7.4、範囲は7.3~7.6、残留塩素濃度は平均0.23mg/L、範囲は0.14~0.56mg/L、ATPは幾何平均1.8RLU、範囲は0~8RLU、従属栄養細菌数は幾何平均64.7CFU/ml、範囲は検出限界以下~3,005CFU/mlであった。

医療機関により差はあるが、蛇口の初流水が高率にレジオネラ属菌、特に*L. pneumophila*に汚染されている実態が明らかとなった。中でかろうじて医療機関Fが、他の2医療機関と比較して汚染率が低かった。この医療機関の遊離残留塩素濃度の平均は0.23mg/L、範囲は0.14~0.56mg/Lであったが、レジオネラ属菌が検出されたのは遊離残留塩素濃度が0.2mg/L未満の水試料であった。これに対して他の2医療機関の遊離残留塩素濃度は平均0.09mg/L(0.01~0.54mg/L)及び0.05mg/L(0.01~0.11mg/L)と低かった。医療機関Dでは高置水槽において追加の塩素消毒が行われており、医療機関EとFでは行われていなかった。この結果から、給水系における遊離残留塩素濃度がレジオネラ属菌の汚染と関連していることが示唆された。いずれの病院にも大きな受水槽、高置水槽があり、2、3日分の水が貯水されており、他

の病院と同様に、災害への備えがなされていた<sup>19)</sup>。つまり常時、水が滞留している環境にあり、塩素が消失しても仕方のない状況にあった。病院等の大きな受水槽、高置水槽を保有する施設においては、仮に浄水場側で塩素濃度を高めたとしても塩素が不足かもしれない。水道の給配水は、3日間もの滞留は考慮されていないのではないか。この様な施設の蛇口の衛生状態を維持するには、浄水場側で3日間の滞留を考慮した塩素消毒にするか、施設側で受水槽あるいは高置水槽に塩素を添加するか、いずれにしても蛇口初流水の遊離残留塩素濃度を0.2 mg/L以上となるように努めることが必要と考えられた。

ちなみに水試料に比べて、スワブ検体からの培養並びにDNAの陽性率が低かったが、採取できる量が異なるので単純比較はできないが、綿棒の届く口の辺りでレジオネラ属菌が増えたのではなく、綿棒の届かない奥側で増えている可能性が考えられた。

#### C2-1 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有効性

凝集沈殿処理(静置後)並びに砂ろ過処理後における、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスと、トウガラシ微斑ウイルスの除去率の相関を図8に示す。凝集沈殿処理後のアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率は、それぞれ0.4-1.2 log、0.8-1.7 log、0.6-1.2 log、0.5-1.1 logとなった。凝集沈殿-砂ろ過処理後は、静置後に比べて除去率が向上し、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率は、それぞれ1.4-2.4 log、0.9-2.7 log、0.8-2.4 log、0.8-2.0 logとなった。この時のトウガラシ微斑ウイルスの除去率は、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスのいずれのウイルスの間にも相関関係が認められた。トウガラシ微斑ウイルスの除去率は、水系感染症ウイルスの除去率と同程度であった。

結果には示さないが、砂ろ過処理においては、砂ろ過カラムを2本連結した場合、すなわち、ろ層厚さ20 cmの場合の除去率も評価したが、ろ層厚さの違いによる除去率の差異は見られず、また、除去率の経時的な変化も見られなかった。

以上の結果から、トウガラシ微斑ウイルスは、水系感染症ウイルスの凝集沈殿-砂ろ過処理性を評価する上で有効な代替指標と成り得る可能性が示唆された。すなわち、トウガラシ微斑ウイルスは、水道原水を含む水環境中に水系感染症ウイルスよりも大幅に高い濃度で存在していることから<sup>20, 21, 22)</sup>、処理水の大量濃縮が不要で、他のウイルスに比べて指標として有利である。

なお、既往の研究において、PACI-50sを用いた凝集沈殿処理における大腸菌ファージMS2の除去率は、感染性のPFU法と遺伝子コピー数のPCR法の評価に差が見られ、その原因がPACIの不活化効果によると報告されている。ここでは詳細は記さないが、本研究で*Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc*を用いた感染性評価手法とPCR法を比較した結果、同程度の除去率が得られた。すなわち、トウガラシ微斑ウイルスは、MS2とは異なり、PACIにより不活化されず、指標として有効と考えられた。

#### C2-2 国内浄水場におけるウイルス除去の実測

原水中のウイルス濃度および各種試料における陽性率を表5に示す。原水試料中の濃度範囲は、先行研究同様、本調査においてもPMMoVが $10^{4.52 \pm 0.49}$  copies/Lと桁違いに高濃度で存在することが示された。処理過程や最終浄水を含む各種試料中の陽性率も、PMMoVが最も高かった。凝集・沈殿および急速砂ろ過による処理(処理工程D)のウイルス除去率を評価し、処理工程D全体におけるPMMoVの除去効率が4.3-Log以上であった。昨年度の処理工程B全体における5.2-Logより若干低い、凝集剤添加なしの急速砂ろ過(処理工程C)や緩速ろ過(処理工程A)の1~2-Logより遥かに高かった。

#### C3-1 相模川水系における遺伝子検出法を用

## いた原虫調査

過去の結果を含め、検鏡法および遺伝子検出法の結果を表 6 に、クリプトスポリジウムについて遺伝子検出法で陽性となった試料の塩基配列を解読した結果を表 7 に示した。今回の調査におけるクリプトスポリジウムの試験で、両法が一致したのは全体の 78 % (両方陰性 47 %、両方陽性 31 %) であった。両法が一致しなかったのは 22 % であり、全て遺伝子検出法のみ陽性であった。両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約 3 個相当以下と低かったことが原因の 1 つとして考えられた。後述の塩基配列決定からはクリプトスポリジウムの配列が得られており、遺伝子検出法のみ陽性でも問題なかった。陽性となった試料の定量において、定量結果におよそ乖離はなかった。蟹淵排水路において例外的に大きく乖離し、特に 2014.12.17 の試料では、検鏡法で 188 個検出されたのに対して、遺伝子検出法では 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、PCR 阻害はなかった。しかし過去の調査においても、畜舎施設の夾雑物の多い試料では遺伝子検出法の検出数が減少することが報告されていた<sup>23)</sup>。そのような試料では、さらなる核酸の精製、環境中あるいは排水処理過程における核酸の分解の可能性を検討する必要が考えられた。以上の結果から、遺伝子検出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。

ジョルジアの試験で両法の定性結果が一致したのは 81 % であったが、これらは両法とも陰性であった。両法の定性結果が一致しなかったのは 19 % であり、全て検鏡法のみ陽性であった。今回、陽性となったのは 7 試料と少なく、蟹淵排水路の試料を除くと、検出個数は 1~4 個であった。両法の定性結果の不一致は、試料中のシストが少なかったのが原因の 1 つと考えられた。蟹淵排水路の結果は、クリプトスポリジウムでも乖離が見られたので、クリプトスポリジウムと同様の注意が必要と考えられた。

遺伝子検出法で得られた遺伝子増幅産物の塩基配列の解読の結果、全ての試料からクリプトスポリジウムの配列が得られ、遺伝子検出法の特異性に問題はなかった。今回の調査では遺伝子検出法で 19 試料が陽性となり、ブタ由来の *C. suis* (AF115377)、ウシ由来の *C. andersoni* (AF093496) もしくはネズミ由来の *C. muris* (AB089284)、ヘビ(ヤマカガシ)由来の *C. sp.* (AB222185)、カモ(カナダガン)由来の *C. sp.* (AY324639)、上海の下水由来の *C. sp.* (FJ205700) の塩基配列が得られた。その中でも *C. suis* の遺伝子型は 14 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<sup>24)</sup>。

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、各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、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* が検出された報告があり<sup>25)</sup>、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。

## C3-2 格子入り観察フィルター上での MPN 法を用いたクリプトスポリジウム定量

少数オーシスト ( $10^1$  個/ml オーダー) を含む試料 1 ml を、格子入りフィルター上に分散した状態になるようにろ過し、100 枚のプレパラートを作成した (図 9、10)。それぞれのプレパラートを顕微鏡観察し、現行の方法で 1 つ 1 つオーシスト数を計測した値と、陽性区画数から MPN 値を求めた場合のオーシスト数の比較した (表 8)。

オーシスト数を 1 つ 1 つ計数した実測値は、平均  $5.43 \pm 2.76$  個/ml (1~15 個/ml) であったのに対して、陽性区画数から求めた MPN 値では、 $6.08 \pm 3.74$  個/ml (1.01~22.6 個/ml、不完全区画の分割をしない場合)、あるいは  $5.95 \pm 3.83$  個

画の分割をしない場合)、あるいは  $5.95 \pm 3.83$  個/ml(1.01~20.8 個/ml、不完全区画を 2 区画に分割して計算した場合)であった。いずれの場合においても MPN 値は実計測値よりも若干大きい値となるものの、実計測値と MPN 値に有意差はなく( $p < 0.01$ )、値は同等であった。

昨年度の検討で最適なる過条件を求め、本年度の研究で実測値と MPN 値の同等性を実証した。以上の通り、格子入り観察フィルター上でのクリプトスポリジウムの計数法として、MPN 法の実用性を確認した。これを応用すれば、数十個といった多数のクリプトスポリジウムが観察フィルター上にある場合に、二重に数えたり数え漏らしたりという問題から逃れることが可能になる。そのように多数のクリプトスポリジウムがある場合、1 つ 1 つを確認したり、正確さに注意して時間を使うより、複数の試料を繰り返し検査し、クリプトスポリジウムの増減の変動を追跡することに時間を使うほうが有意義と考えられる。

### C3-3 クリプトスポリジウム症の大規模集団感染を防ぐのに必要なバリア

国内の越生町の事例<sup>16)</sup>、欧州最大の事例<sup>17)</sup>、過去最大の米国の事例<sup>18)</sup>、における発症者数を 0 人にするのに必要な病原体除去の性能を単純に計算した(表 9)。患者は 1 日に発生したのではなく、数日間続いて発生しているので、仮に 10 日間の患者発生が蓄積した結果とした場合も想定し、単純に患者数を 10 で割った(対数表記から 1 引いた)除去性能も求めた。結果として 3.0 ないし 4.6 となり、患者発生を 1 人未満に抑えるには、3 ないし 5-Log 程度の、クリプトスポリジウムの除去が必要だったと考えられた。つまりそのまま、国内の浄水場におけるクリプトスポリジウム対策として、3 ないし 5-Log 程度の除去性能が推奨と考えられた。現在国内では、凝集沈殿ろ過の濁度管理の徹底と河川の流域管理等を含め、3-Log が達成され、患者が発生しない程度に抑えが効いていると想像される。ところが、越生町では凝集剤を使わなかった、ミルウォーキーでは凝集剤の切り替えに失敗して凝集不良し

たというような、何か瑕疵がいずれどこかで生じるかもしれない。また、スウェーデンでは瑕疵の情報がなく、現状の凝集沈殿ろ過のシングルバリアに依存するのも正直心もとない。現在、クリプトスポリジウム対策には、緩速ろ過、急速ろ過に加えて、膜処理、紫外線処理が使用可能であり、これらの対策を重ねたマルチプルバリアであれば、万一瑕疵が生じても他のバリアが機能し、大規模な集団感染に至らずに済むと期待される。

なお、以上の結果に関わらず、Dose-Response の感染確率、水道原水の河川水中のクリプトスポリジウム濃度と種類、浄水処理による除去率といった検討は必要と考えられる。

## D. 結論

### D1-1 水道配管内の拭き取り従属栄養細菌数

水の滞留部分、赤錆の苦情があった配管において、配管内面から高い従属栄養細菌数が検出された。配管の末端であったり、ブロック化により流速が遅くゴミが蓄積することが問題と考えられた。滞留が発生しない、配管を健全に維持するための設計や工事方法の工夫が必要と考えられた。

### D1-2 蛇口等水環境のレジオネラ属菌の検出

これまで注意が払われていなかった、蛇口の初流水を狙ってレジオネラを検査した。新築の特定建築物において、入居前の時点で既に水道水の滞留によると考えられる微生物汚染が発生していた。入居後は一般細菌数等の減少がみられたものの、レジオネラ属菌は継続して検出され、除去困難なバイオフィルムの定着が想像された。医療機関の蛇口からもレジオネラ属菌が検出された。検出率は機関により若干異なり、遊離残留塩素濃度との関連が示唆された。病院等の慢性的な大容量貯水の滞留には追加塩素を行うこと、施設にかかわらず遊離残留塩素 0.2 mg/L 以上が検出されるまで捨て水する等の、注意喚起が必要と考えられた。

### D2-1 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有

従来から広く用いられる塩基度 50 %の PACl (PACl-50s)を用いた凝集沈澱-砂ろ過処理におけるアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率は、PCR 法にて評価した場合、それぞれ 1.4-2.4 log、0.9-2.7 log、0.8-2.4 log、0.8-2.0 log であった。トウガラシ微斑ウイルスの除去率と各ウイルスの除去率の間には高い相関関係が認められたことより、トウガラシ微斑ウイルスが、水系感染症ウイルスの凝集沈澱-砂ろ過処理性を評価する上で有効な代替指標と成り得る可能性が示唆された。

#### 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、4.3-Log の除去率が得られた。

#### D3-1 相模川水系における遺伝子検出法を用いた原虫調査

検鏡法と遺伝子検出法の定性的な一致率は、クリプトスポリジウムは 78 %、ジアルジアは 81 %と概ね良好であった。遺伝子増幅産物の塩基配列は、相模川ではブタ由来の *C. suis* が多く検出された。*C. suis*は小鮎川、中津川において高頻度で検出されたことから、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の解読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。

#### D3-2 格子入り観察フィルター上での MPN 法を用いたクリプトスポリジウム定量

格子入り観察フィルター上でクリプトスポリジウムを均一に分散させ、クリプトスポリジウムの MPN 法による計数が可能となった。多数のクリプトスポリジウムが検出される場合に有用と考えられた。

#### D3-3 クリプトスポリジウム症の大規模集団感染を防ぐのに必要なバリア

過去の大規模集団感染における患者発生数に着目した。過去の集団感染では数千人から数十万人、すなわち 3-Log から 6-Log 弱が発生しており、10 日間かけて蓄積したと想定した場合、この患者数を 0 人に抑えるには合計で 3-Log ないし 5-Log 程度となるマルチプルバリアの導入が推奨との単純計算ができた。

#### E. 参考文献

1. 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
2. 泉山信司、秋葉道宏、松島拓、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 26 年度分担研究報告書
3. 水道技術研究センター、配水区域のブロック化とは？  
<http://www.jwrc-net.or.jp/qa/12-38.pdf>、2016 年 4 月 2 日現在
4. J. H. G. Vreeburg, E. J. M. Blokker, P. Horst, J. C. van Dijk, Velocity-based self-cleaning residential drinking water distribution systems, *Water Science & Technology Water Supply* 2009, 9(6):635-641
5. Buchberger, S., Blokker, M., and Vreeburg, J. (2009) Sizes for Self-Cleaning Pipes in Municipal Water Supply Systems. *Water Distribution Systems Analysis 2008*: pp. 1-10.
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. Guzman-Herrador B, Carlander A, Ethelberg S, Freiesleben de Blasio B, Kuusi M, Lund V, Löfdahl M, MacDonald E, Nichols G, Schönning C, Sudre B, Trönnberg L, Vold L, Semenza JC, Nygård K. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. *Euro Surveill.* 2015;20(24):pii=21160.
  12. Rehn M, Wallensten A, Widerström M, Lilja M, Grunewald M, Stenmark S, Kark M, Lindh J. Post-infection symptoms following two large waterborne outbreaks of *Cryptosporidium hominis* in Northern Sweden, 2010-2011. *BMC Public Health.* 2015 Jun 4;15:529.
  13. 日本水道協会:上水試験方法(微生物編)、pp.47～51、2011
  14. 榎富賢二郎、真鍋純一、松永兼充、穴井元昭他、「異物検査事例集-食品中の異物を中心として」(サイエンティスト社)
  15. 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
  16. 埼玉県衛生部、「クリプトスポリジウムによる集団下痢症」-越生町集団下痢症発生事件-報告書(平成9年3月)
  17. 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.
  18. 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.
  19. 小菅瑠香、小林健一、秋葉道宏、山田俊郎、鶴田秀貴、關本李子、小窪和博、災害拠点病院における水確保の実態に関する研究、第6回保健医療科学研究会、平成24年12月、埼玉県和光市
  20. Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J. and Breitbart, M. (2009) Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 75(22), 7261-7267.
  21. Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K. and Wilhelm, M. (2011) Evaluation of

- pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research* 45(3), 1358-1368.
22. Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M. and Akiba, M. (2013) Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 79(23), 7413-7418.
  23. 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
  24. 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.*, (55), pp.703-707. 2006
  25. 勝山ら、第57回全国水道研究発表会講演集、pp.656-657. 2006

#### F. 研究発表 誌上発表

1. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Marubayashi, T. (2016). Effect of coagulant basicity on virus removal from water by polyferric chloride. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, in press.
2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K. (2016). Characterization of recombinant norovirus virus-like particles and evaluation of their applicability to the investigation of norovirus removal performance in membrane filtration processes. *Water Science and Technology: Water Supply*, in press.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Marubayashi, T. (2016). Effect of aluminum hydrolyte species on human enterovirus removal from water during the coagulation process. *Chemical Engineering Journal* 284(1): 786-793.
4. 泉山信司、遠藤卓郎、水道における人への危害が問題となる病原微生物とその対策、水環境学会誌、2016, 39(2), 54-58

#### 口頭発表

1. 村井一真、白崎伸隆、松下拓、松井佳彦 (2016). 消毒耐性ウイルスの膜ろ過処理性評価および代替指標候補ウイルスとの処理性比較. 第50回日本水環境学会年会, 徳島, 2016/3/16-18.
2. 山下玲菜、白崎伸隆、松下拓、松井佳彦 (2016). トウガラシ微斑ウイルスは水系感染症ウイルスの浄水処理性指標となるのか?:凝集沈澱・砂ろ過における処理性比較. 第50回日本水環境学会年会, 徳島, 2016/3/16-18.
3. 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
4. 中野勲、鈴木允執、吉田圭吾、泉山信司、遠藤卓郎、橋本温 (2016) 水道原水を対象としたクリプトスポリジウム計数へのMPN法の導入、日本水環境学会第50回年会、徳島
5. 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等耐塩素性微生物による集団感染の発生動向、日本水道協会水道研究発表会、2015年10月、さいた

- ま市
6. 泉山信司、飲料水の危機事案に対する関係機関の連携、病原微生物への対応、第29回公衆衛生情報研究協議会シンポジウム、2016年1月、埼玉県和光市
  7. Ryuichi Kato, Hiroyuki Katayama, Hiroaki Furumai, Removal Efficiency of Viruses by Re-addition of Coagulant in Bench-Scale Rapid Sand Filtration System, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2015), September 13th-19th 2015 - Lisbon, Portugal
  8. Asami, T., Torrey, J. R., Katayama, H., Hashimoto, A., Haramoto, E., Furumai, H., Evaluation of removal efficiency of pepper mild mottle virus during full scale drinking water treatment processes. Poster session presented at: 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology; 2015 Sept 13-19; Lisbon, Portugal.
  9. Torrey, J. R., Asami, T., Hashimoto, A., Katayama, H., Furumai, H., Comparison of Enteric Virus and Indicator Virus Removal efficiency in a Full Scale Drinking Water Treatment Plant. Poster session presented at: 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology; 2015 Nov 22-24; Fukuoka, Japan.
  10. Torrey, J. R., Asami, T., Hashimoto, A., Katayama, H., Furumai, H., Monitoring Indigenous Pepper Mild Mottle Virus to Estimate Viral Removal in Drinking Water Treatment. Poster session presented at: 日本水環境学会 水中の健康関連微生物シンポジウム、2015年12月、東京
  11. 片山浩之、浄水処理工程中のウイルス除去効率の評価、日本水環境学会 水中の健康関連微生物シンポジウム、2015年12月、東京
  12. Hiroyuki KATAYAMA, Tatsuya ASAMI, Ryuichi KATO, Chettiyappan VISVANATHAN and Hiroaki FURUMAI, Evaluation of virus removal efficiency at water treatment plants in Bangkok and in Japan, Special Workshop on Health-Related Environmental Virology, Barcelona, May 2015
  13. Torrey, Jason; Asami, Tatsuya; Katayama, Hiroyuki; Furumai, Hiroaki and Hashimoto, Atsush, Evaluating Virus Removal Efficiency in Drinking Water Treatment Plants with Indigenous Pepper Mild Mottle Virus, 第50回日本水環境学会年会, 徳島, 2016/3/16-18.
- 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



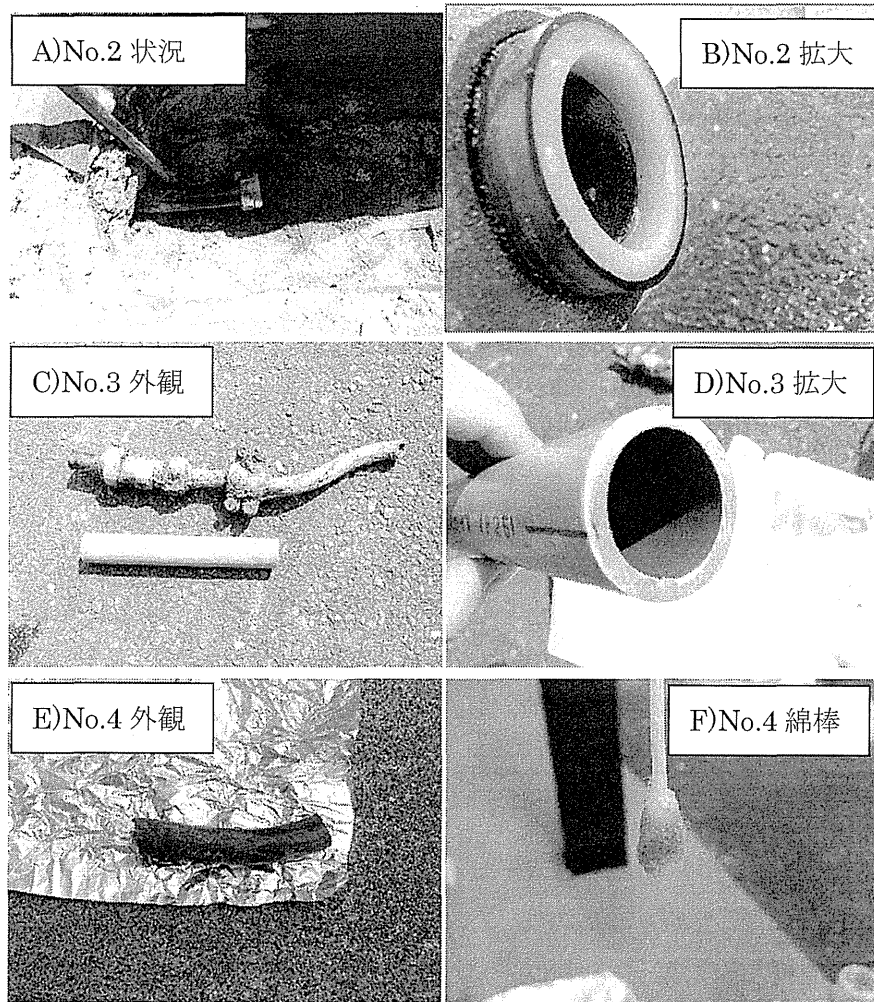


図1 従属栄養細菌数を測定した配管等の一部写真

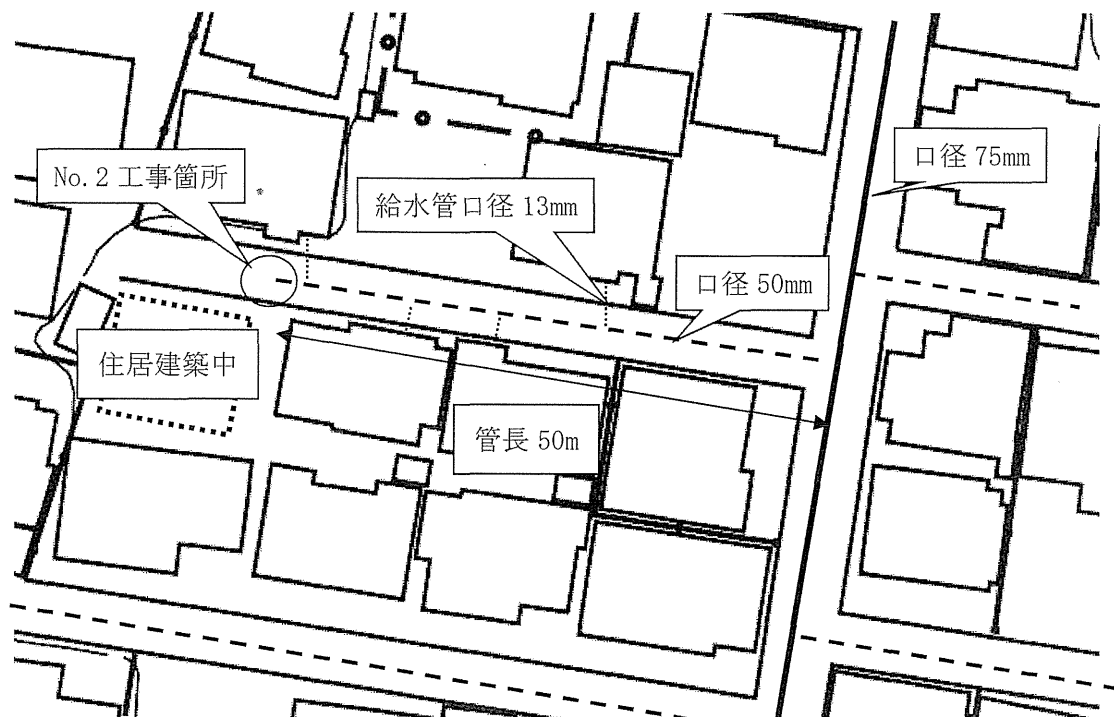


図2 No.2の配管状況図

表 1 配管内拭き取りの従属栄養細菌数

サンプル No.	採水日	工事内容	気温	水温	残留塩素	使用年数	管種	材質	口径	ふき取り面積	従属栄養細菌数(測定数)				従属栄養細菌数 (cfu/cm <sup>2</sup> )	
											7日後		14日後		7日後	14日後
1	7/22	漏水配管修繕工事	31.0	26.5	0.47	>30	給水管	鉛	13mm	6.1	0	0	1	7	0	0
1	7/22	漏水配管修繕工事	31.0	26.5	0.47	10	給水管	PE 二層管	13mm	6.1	1	2	5	10	<1	1
2	8/6	配管伸長設置工事	37.5	-	0.17	15	配水管	PE	50mm	2	0	0	4300	4200	0	2125
2	8/6	配管伸長設置工事	37.5	-	0.17	15	配水管	PE(汚れていた部分)	50mm	2	0	0	2500	3500	0	1500
2	8/6	配管伸長設置工事	37.5	-	0.17	15	配水管	鉄キャップ	50mm	3.1	0	0	4500	3600	0	1306
3	8/21	漏水配管修繕工事	36.0	25.6	0.40	39	給水管	鉛	13mm	6.1	0	3	1	4	<1	<1
3	8/21	漏水配管修繕工事	36.0	25.6	0.40	<30	給水管	PE 二層管	13mm	6.1	0	3	0	3	<1	<1
3	8/21	漏水配管修繕工事	36.0	25.6	0.40	>39	配水管	VP	25mm	11.8	0	0	0	0	0	0
4	10/15	漏水配管修繕工事	26.0	23.0	0.39	32	給水管	鉛	13mm	6.1	0	0	0	0	0	0
4	10/15	漏水配管修繕工事	26.0	23.0	0.39	32	給水管	鉛	13mm	6.1	0	0	0	1	0	<
5	11/27	漏水配管修繕工事	13.0	17.5	0.34	38	給水管	鉛	13mm	6.1	13	9	18	18	2	3

サンプル No. 1, 3, 4, 5 の水温と残留塩素は近隣の公園や神社より採水して測定を行った。

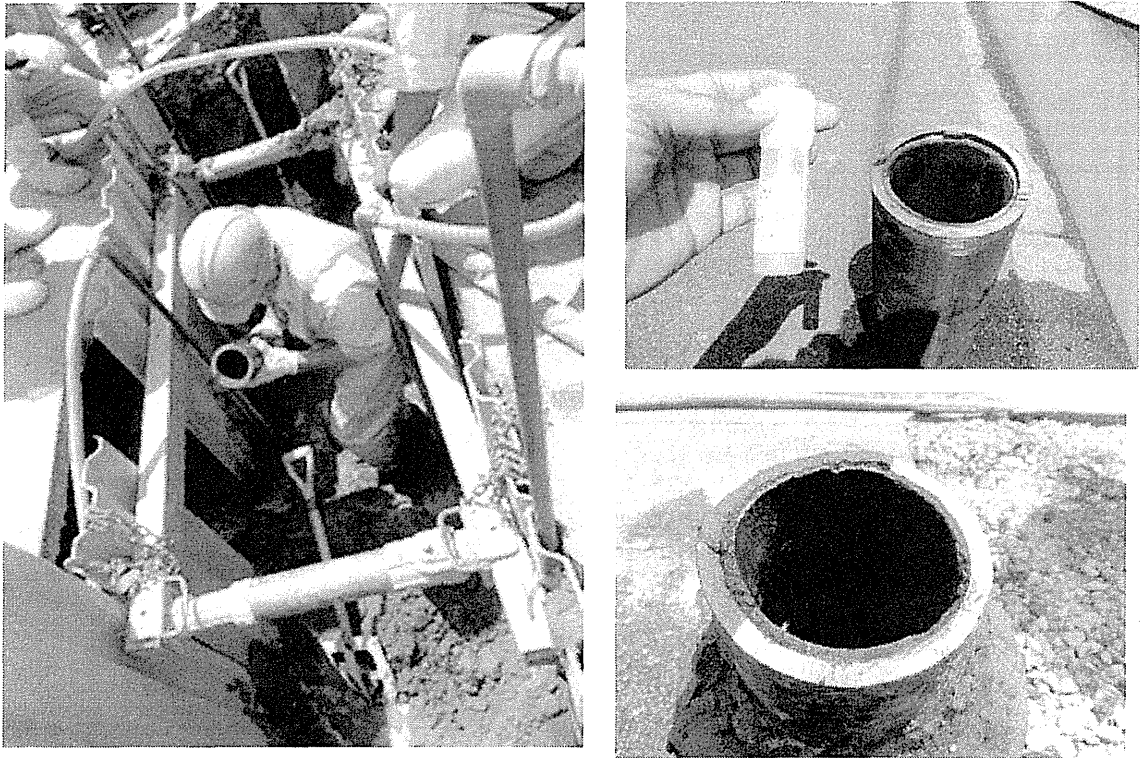


図3 布設替え工事と採取(表2の試料1、2に対応)

A: 工事現場の様子

B: 切り落とした配水本管

C: 拭き取り後、茶色の表面が若干、落ちた様子

表2 布設替え工事の配管内面の従属栄養細菌数

試料番号、管種	従属栄養細菌数				使用年数
	培養7日後		14日後		
	懸濁液 (cfu/mL)	同単位面積当たり (cfu/cm <sup>2</sup> )	懸濁液 (cfu/mL)	同単位面積当たり (cfu/cm <sup>2</sup> )	
①モルタルライニング鑄鉄管	24	60	32	80	35年(S55竣工)
②モルタルライニング鑄鉄管	36	90	178	440	35年(S55竣工)
③モルタルライニング鑄鉄管	52,000	130,000	56,000	140,000	26年(S64竣工)
④エポキシ紛体ライニング鑄鉄管(異形管)	23,000	57,000	23,000	58,000	26年(S64竣工)
⑤モルタルライニング鑄鉄管	430	1,100	590	1,500	49年(S41竣工)
⑥モルタルライニング鑄鉄管	520	1,300	600	1,500	49年(S41竣工)

配管径は全て100mmであった。採取場所は全て側面側で行った。

参考として、採取日は1、2が平成27年5月22日、3、4が28日、5、6が6月5日だった。

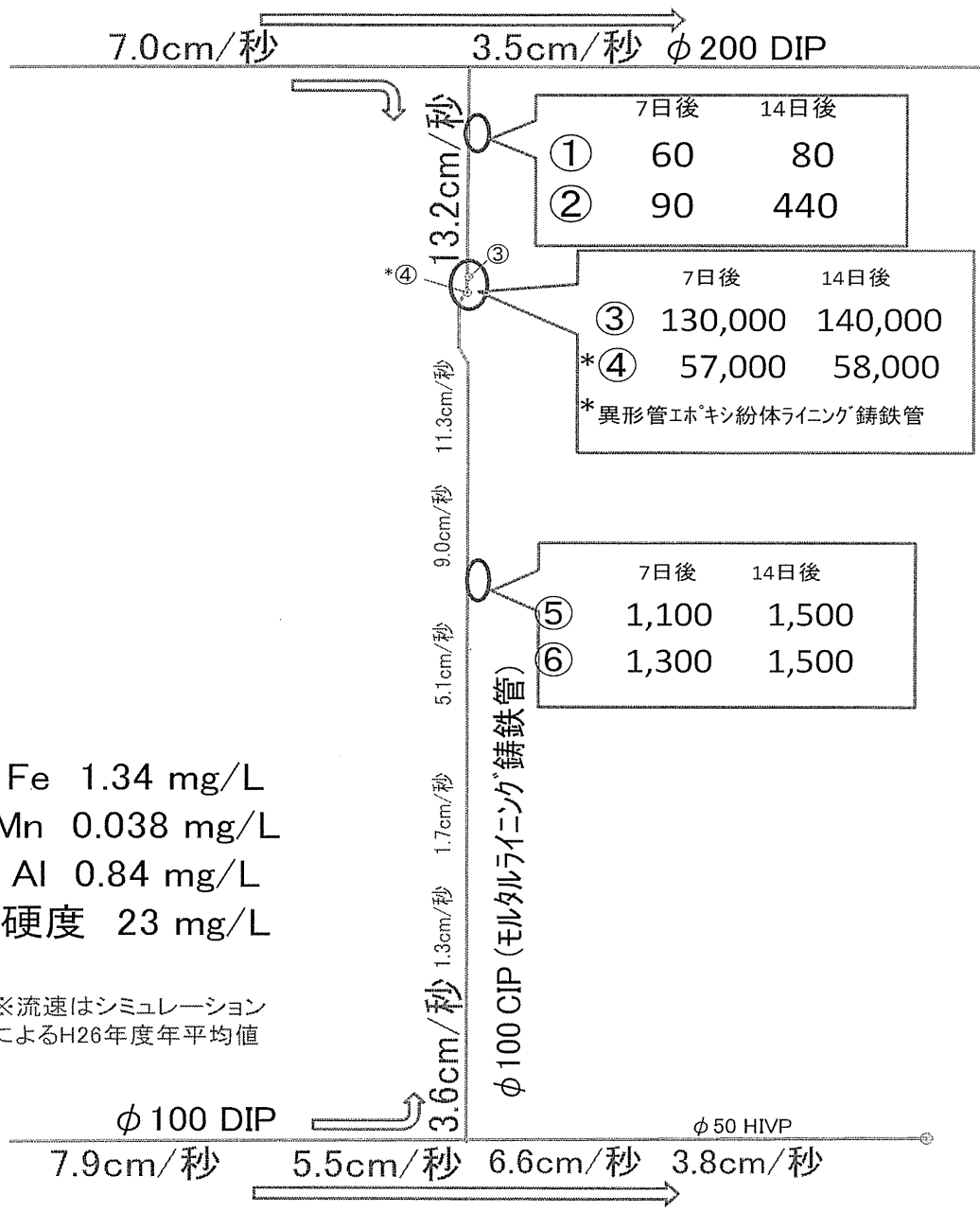


図4 採取試料の位置関係の模式図

縦方向の線が問題の配水管で、布設替え工事を行った。丸1から6の後の数値は従属栄養細菌数を表し、表1より再掲した。試料3、4の箇所が左に曲がっているのは、迂回のために配管が上方方向に立ち上がっていることを意味しており、左を通った意味ではない。図の上と下に、左右に伸びる配水管がある。上の配水管は右に続いているが、下の配水管は、右下で行き止まりになっている。左の写真は、3、4の配管内から採取されたゴミで、元素分析の結果を下に記入した。配管にそって、シミュレーションにより求めた年平均の流速、管径、管の種類等を記入した。