

平成 25～27 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	及川 智	（東京都水道局）
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 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	（神奈川県畜産技術センター）
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。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。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配管内面に応用し、滅菌綿棒を使用して測定したところ、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。協力が得られた家庭、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、レ

ジオネラ属菌が培養により検出された。分離された菌は *Legionella pneumophila* SG1 他であった。蛇口等の水環境がレジオネラ属菌により汚染されることを確認した。滞留させないこと、遊離残留塩素濃度を維持すること、開栓直後の水を捨てること、といった対策が推奨されると考えられた。

凝集沈殿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、並びに河川水中で最も高濃度な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。従来から広く用いられる塩基度50%のPACl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であり、急速ろ過を模した孔径0.45 μmの膜ろ過の追加で概ね計3-Log程度の除去が得られた。凝集沈殿-砂ろ過処理の場合は、1~2-Log程度の除去が得られた。PMMoVは各ウイルスと同様の挙動を示した。国内の実浄水場において、凝集沈殿と急速ろ過等におけるウイルス濃度を実測したところ、PMMoVが4.3~5.2-Log除去されていた。PMMoVは、ウイルス指標として有効と期待された。

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た。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を行うこと、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。この粉体ろ過法を、細菌にも応用したところ、粉体の使用でろ過水量が倍増でき、粉体は培養を阻害せず、回収率の向上も見られることが示された。大腸菌のコリラート培地法とX-MG培地の混釈培養法、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。クリプトスポリジウム検鏡の簡易化を目的に、観察フィルター上の計数にMPN法の応用を試みたところ、実施可能であった。多数を計数する際に、有用と考えられた。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。その結果、1オーシスト当たり20と予想されていた18S rRNA遺伝子のコピー数に、デジタルPCRの測定である28コピーがほぼ対応した。rRNAから逆転写で得られたcDNAは、21,900コピーであった。このことはリアルタイムPCRの定量用に整備された検量線と対応し、検量線の信頼性が支持された。水道原水試料中のクリプトスポリジウムにデジタルPCRを適用することにより、標準試料を用いることなく、リアルタイムPCR法と同様の定量値が得られた。

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法を比較した。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。

国内で2010年にジアルジア症の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。国外では、2010年にスウェーデンで推定27,000人、2011年に推定20,000人が発症する、水道を介した、あるいは水道の関連が疑わ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。2010

年に問題となった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。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されると考えられた。

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、検査者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考えられた。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。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、大規模集団感染の防止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、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。

#### 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。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。この問題に関連して、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<sup>1)</sup>。加えて、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。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>2,3)</sup>。当該研究では市販の拭き取り用器材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用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。

適切に残留塩素が管理された配管内でも、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>4)</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>5)</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>6,7)</sup>。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 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>8)</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>9)</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。

レジオネラ症は、感染症法に基づく平成 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。主要な感染源は入浴施設、冷却塔などが知られているが、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、ビル建築物や病院等の、蛇口におけるレジオネラ属菌の汚染調査を企図した。

ウイルスによる水系感染症を制御していくためには、塩素消毒のみに依存すること無く、浄水工程におけるウイルスの処理性(除去率)を的確に把握しておくことも意味がある。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>10, 11, 12, 13)</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、ウイルス処理性の評価を目的とした。ウイルス指標の候補として、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(Pepper mild mottle virus、

PMMoV)を検討した<sup>14)</sup>。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検討した。

2010 年にスウェーデンで推定 27,000 人、2011 年に推定 20,000 人が発症する、水道を介した、あるいは水道の関連が疑われるクリプトスポリジウムによる大規模集団感染が報告されている<sup>15, 16, 17)</sup>。27,000 人は欧州最大、過去 2 番めに大きく、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。

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策では、モニタリングシステムの拡充に向けた試料水の濃縮方法としての粉体ろ過法と検出方法の遺伝子検出法の開発検討を進めてきた。研究班の成果を元に、試験法へのこれらの追加を提案した結果、通知に追加されて試験に使用可能となった(平成 19 年 3 月 30 日付け健水発第 0330006 号厚生労働省健康局水道課長通知、平成 24 年 3 月 2 日一部改正)。従って、今後は普及と実用性をより高めるための改良が求められる。

クリプトスポリジウム濃縮法の一つである粉体ろ過法の方式は、当初は加圧ろ過での利用を想定していたが、装置による試料間の汚染を最小限に抑えるべく吸引ろ過方式が必要となった。ただし、いくつか改善すべき問題が見つかり、特に低温試料で生じる気泡について検討した。

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。このクリプトスポリジウム濃縮法として開発された粉体ろ過法を、細菌測定の濃縮法として応用を試みた。

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 法の適用を試みた。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。まず、最適な

る過方法により、前提となる検鏡用メンブラ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るようにする。そして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。

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>18, 19, 20)</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。クリプトスポリジウム検査に、デジタル PCR 法の適用を試みた。

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。

平成 24 年の 2 月末から 3 月にかけて、浄水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。給水地域では混濁が生じ、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。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。

## B. 研究方法

### B1-1 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℃、7 日後と 14 日後のコロニー数を測定した<sup>1)</sup>。サンプリングに際しては、捨て水を最低 5 分、約 100 L、多い地点では 1 時間、約 10,000 L 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。

### B1-2 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>1)</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>2)</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った際は、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。

### B1-3 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。協力が得られた家庭、ビル建築物、および医療機関において、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いて採取し、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>3)</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、あるいは酸処理した後に適宜希釈し、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。

アメーバによる *Legionella* 属菌の増菌培養では、加熱処理後の浮遊液 1.5 ml 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 pH 2.2 緩衝液で4分間酸処理し、100  $\mu$ l ずつを GVPC $\alpha$  寒天平板培地および WYO $\alpha$  寒天平板培地に塗抹し、36 で7日間培養した。菌を疑う集落より、性状による鑑別と、LAMP 法検出を行った。

#### B1-4 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(500 mL ファンネル装備の 47 mm 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、吸引ポンプに接続し、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  $\mu$ m、直径 47 mm、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  $\mu$ m または 1.0  $\mu$ m、直径 47 mm、メルク(株))を敷いた。ろ過は、まず支持フィルターをセットしたフィルターホルダー上に 100 mL 程度の精製水を加えたのち、粉体を添加し、それから試料のろ過を開始した。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(186 NTU)。高濁度試料水を 60 kPa で吸引ろ過し、ろ液流出速度 70 滴/min 未満を终点としてろ過可能水量を測定した。

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 0.5 g を加え、一定量の大腸菌懸濁液 1 mL 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を行った。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。

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 50 mL 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、50 ml 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 50 ml 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。

#### B2-1 凝集沈殿-PTFE フィルター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 (pH: 6.3-8.1, 濁度: 1-27 NTU, DOC: 0.4-3.9 mg/L, UV260: 0.01-0.08 cm<sup>-1</sup>) を取り寄せた。角型ピーカーに用意した 300 mL 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、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 10.0%、SO<sub>4</sub>: 2.7%、比重: 1.21) を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、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。G 値 200 s<sup>-1</sup> で急速攪拌を 1 分間、G 値 20 s<sup>-1</sup> 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 0.45µm の PTFE フィルターを用いた。ウイルスの定量は、PFU 法(plaque forming unit)にて行った。

#### B2-2 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、回分式凝集沈殿-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、並びに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<sup>2-3</sup> PFU/mL になるように、また、トウガラシ微斑ウイルスを 10<sup>3</sup> lesions/mL になるように同時添加した。8 箇所の水道原水(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、角型ピーカーの 2 L にウイルスを添加した。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> にて 1 分間急速攪拌、G 値 20 s<sup>-1</sup> 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み水を採取した。上澄み水を 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、凝集沈殿-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。

#### B2-3 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、並びにアイチウイルス、ノロウイルス、PMMoV、アデノウイルス、JC ポリオーマウイルスを、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、合計 43 試料を採取した。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) 等により核酸を抽出した後、PCR を行った<sup>14)</sup>。必要により PCR 阻害を回避する希釈等の操作を行い、最も高い測定結果を

真の濃度とみなした。

### B3-1 クリプトスポリジウムの吸引式粉体ろ過法

フィルターホルダーは、焼結ガラス製を用いた。10 L ポリタンクに溜めた大原浄水場浄水約 10 L をフィルター径 90 mm、粉体量 3 g、ろ過圧 27 kPa の条件でろ過を開始した。装置は[ポリタンク]—[90 mm フィルターホルダー]—[マニホール]—[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 50 cm ほど高い位置に設置した。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 2 L ごとに分けてスターラーで 10 min 激しく攪拌したのち、10 L 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 10 L (水温 7.5 ) を 45 の水浴で 30 min 温めたのち、一晩放置して室温まで冷却した。粉体は浄水 200 ml 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(厚さ 5 mm 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 10 mm)を用いた。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 8×5 mm を用いた。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。

### B3-2 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 µl (ARK Fluor Ab C/G, アークリソース)を加え、一昼夜冷蔵庫内(4 )で染色し、10<sup>1</sup> 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 µm、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。メンブランフィルター上での等分散性の確認されたる過方法、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。MPN 値と実計測値の比較には、t 検定を用いた。

### B3-3 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>20)</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。18S rRNA から、逆転写反応(Takara、PrimeScript RT Master Mix)によって cDNA を合成した。

PCR 法による 18S rDNA 遺伝子の定量では、1 反応あたり 1 oocyst となるように、核酸抽出試料の量を調整した。18S rRNA から逆転写で作成した cDNA の定量には、1 反応あたり 0.025 oocysts 相当となるようにした。冷凍保存していた  $1.1 \times 10^4$  oocysts/50  $\mu$ L、 $7.0 \times 10^4$  oocysts/50  $\mu$ L 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>18)</sup>。各試料について 2 回の測定を行った。

全国 10 箇所の浄水場の協力を得て、水道原水 5 L 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前述の方法で行った。逆転写反応によって cDNA を合成し、デジタル PCR 法およびリアルタイム PCR 法により濃度を測定した。比較のリアルタイム PCR には LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics) を用いた。PCR の反応系は、デジタル PCR、リアルタイム PCR とともに、前述の反応系を用い、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、後述のデジタル PCR 法を用いて測定した換算係数(22,000 コピー/オーシスト)を用いた。

#### B3-4 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  $\mu$ 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、中和処理と遠心洗浄を行った。核酸抽出、逆転写、定量 PCR には、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。

#### B3-5 高度浄水処理(オゾン処理)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 2.0 mg/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<sup>22)</sup>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<sup>23)</sup>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 manual " <sup>24)</sup> 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)

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

$C^*$ : 特性 C 値濃度(mg/L)

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

$C^*$  滞留槽では  $C^* = C_{\text{出口}}$

HDT: 水理的滞留時間(min)

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

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。

B3-6 国内外の発生動向、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、大規模集団感染を防ぐのに必要なバリア

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、必要により抜粋等を行った。

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。過去の集団感染における患者発生

数は、報告資料から求めた <sup>17, 25, 26)</sup>。

## C. 研究結果および考察

### C1-1 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 m<sup>3</sup>から90 m<sup>3</sup>の放水を行っており、総量は1シーズン(13週)でおよそ800~1,200 m<sup>3</sup>であった。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。結果には含まれていないが、改修に成功した同型の貯水槽の経験があったことから、滞留しやすい構造上の問題と考えられた。

施設 H3は1日の入れ替わり回数が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と考えられた。

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。

以上の通り、滞留の恐れを見出し解消させることで、従属栄養細菌数は有効活用されると期待された。なお全体として、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、損

傷菌の存在が示唆された。現行の検査方法では 7 日に加えて 14 日も検査することが望ましいとされるが、14 日は必須になると考えられた。

#### C1-2 水道配管内の拭き取り従属栄養細菌数

表 2 に配管実試料の測定結果を示した。合計 16 試料から従属栄養細菌が 0~1,083 CFU/cm<sup>2</sup> 検出された。この 10<sup>3</sup> CFU/cm<sup>2</sup> の数値は、平成 25 年度に測定した浄水場ろ過池内壁 (10<sup>0</sup>~10<sup>2</sup> CFU/cm<sup>2</sup>) より多く、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>)<sup>8)</sup> の、中間より多い方と考えられた。

最も多く検出された配管 15 は、配管 14、配管 16 と同じ末端区域に位置した (図 1)。また、配管 15 と配管 16 は距離も近く、どちらも昭和 43 年敷設の比較的古い配管であるが、配管 15 のみ高い結果となった。その要因として、配管 15 の敷設状況が影響している可能性が考えられた。配管 15 はループ状に形成された配水管への分岐点手前にあたり、道路の形状に合わせてカーブしている場所であり、わずかとはいえ汚れの付着しやすい面 (カーブの内側の面) が生じた。流速は 0.1~0.5 m/s (日最大配水量発生時) と想定されたが、セルフクリーニングに必要な 0.4 m/s (あるいは 0.2 m/s) を下回る想定が範囲に含まれていた<sup>6, 7)</sup>。もし水需要が低ければ、汚れが付着しやすい状態と考えられ、実際茶褐色と黒褐色の沈着が見られた。なお配管 14 は、配管 15 同様に流速が遅いのに菌数が少ないのは、使用年数が浅いことが理由かもしれない。配管 14 から 16 の地区における末端給水栓水の残留塩素濃度は年間平均 0.3 mg/L であり、残留塩素濃度管理は適切に行われている。一方、塩素濃度の管理が適切であっても配管内には付着した細菌が存在し、流速の遅い場所などにバイオフィルムが形成される恐れがあることを確認した。

次に、給配水管の末端で滞留している問題を見出した。サンプリングを行った配管の一部写真

を図 2 に、従属栄養細菌数を表 3 に示す。培養 7 日後の結果での検出数は 2 CFU/cm<sup>2</sup> 未満であったが、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ている配水管の末端であった (図 3 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 2A、B)。最後の個人宅への給水管の分岐は、鉄キャップ設置部位の 50 cm ほど手前にあり、分岐以降の 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 3 CFU/cm<sup>2</sup> 以下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。

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 (図 4、表 4)。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 5)。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た。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として、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った。従属栄養細菌数がどこまで高まっていたのか、この様な事例の蓄積と、問題解消が必要と考えられた。

### C1-3 蛇口等水環境のレジオネラ属菌の検出

複数家庭の協力を得て、開栓直後の滞留していた蛇口水を採取し、レジオネラ属菌の分離ならびに遺伝子の検出を試みた(表 5)。培養により水試料68検体中2検体(3%)から生菌が分離された。重篤な肺炎の集団感染で知られる *Legionella pneumophila* SG1 が、一般家庭の浴槽の給湯水から検出され、注意する必要があると考えられた。LAMP 法により遺伝子が検出されたのは、12 検体(18%)であった。

新築の特定建築物では、配管は複雑で、滞留が懸念された(図 6)。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(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。結果には示さな

いが、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 6)。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ー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、バイオフィー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て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 7)。医療機関Dでは *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%)から培養で検出された(表 7)。遊離残留塩素濃度は平均0.05 mg/L、範囲は0.01~0.11 mg/L、従属栄養細菌数は幾何平均170 CFU/ml、範囲は1.0~9,250 CFU/mlであった。

医療機関Eでは *L. pneumophila* SG1 及び *L. feeleii* が水試料16検体中の6検体(38%)から培養で検出された(表 7)。遊離残留塩素濃度は平均0.09 mg/L、範囲は0.01~0.54 mg/L、従属栄養細菌数は幾何平均1,095 CFU/ml、範囲は6.0~49,500 CFU/mlであった。

医療機関Fでは *Legionella sp.*が水試料15検体中の4検体(27%)から培養で検出された

(表 7)。残留塩素濃度は平均 0.23 mg/L、範囲は 0.14 ~ 0.56 mg/L、従属栄養細菌数は幾何平均 64.7 CFU/ml、範囲は検出限界以下 ~ 3,005 CFU/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。その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範囲は 0.14 ~ 0.56 mg/L であったが、レジオネラ属菌が検出されたのは 0.2 mg/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 0.09 mg/L (0.01 ~ 0.54 mg/L) 及び 0.05 mg/L (0.01 ~ 0.11 mg/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>27)</sup>。つまり常時、水が滞留している環境にあり、塩素消毒が消失しても仕方のない状況にあった。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と。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。

以上の通り、従属栄養細菌数とレジオネラ属菌の結果から、滞留させないこと、遊離残留塩素濃度を維持すること、開栓直後の水を捨てること、といった対策が推奨と考えられた。

#### C1-4 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 7)。最初に粉体を使用していないコントロールのろ過可能水量は、フィ

ルター孔径 1.0  $\mu\text{m}$  では 624 mL、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  では 344 mL で、当然のこととして目の細かい方が詰まりやすく、ろ過水量に差が生じた。一方、粒径 20  $\mu\text{m}$  の粉体を添加した条件では、1,082 mL あるいは 1,058 mL と、粉体の使用によりろ過可能な水量が倍増した。粉体ろ過では、支持フィルターの孔径による差はなかった。結果には示さないが、粒径 30  $\mu\text{m}$  の 1.0 g と 1.5 g の粉体使用量も検討したが、粒径 20  $\mu\text{m}$  の 0.5 g と同様の結果であった。また、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 20 mL)とコリラート培地(1 試験管 1 mL)にそれぞれ 0.05 g 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。界面活性剤を使用したとしても、定法の膜ろ過より、粉体ろ過法の回収率が良かった。最終的に、孔径 1.0  $\mu\text{m}$  の PTFE フィルターに粒径 20  $\mu\text{m}$  の 0.5 g を添加する条件を、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 8 に示した。両者の相関係数は  $R^2 = 0.94$  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が得られた。

X-MG 培地において、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数を比較した(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。

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の試料を、粉体ろ過法と従来法で比較した(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った。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、大容量の液体試料のままでは加熱処理が困難である。本法では、濃縮後の粉体とフィルターを試験管に回

収し、リン酸緩衝液で浸してから加熱する方法とし、有効に機能した。

以上の通り、クリプトスポリジウムを目的とした粉体のろ過法は、細菌への応用も可能であった。大容量の細菌検査が従来より容易になった。

#### C2-1 凝集沈殿-PTFE フィルターろ過によるアデノウイルス、ポリオウイルスの除去性

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 11 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、凝集沈殿のみでは、ウイルスの除去は期待できなかった。

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を図 12 に示す。いずれの水道原水を用いた場合においても、凝集沈殿静置後に比べて除去率が大きく向上し、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。凝集沈殿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殿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 年までの凝集沈殿-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、 $3.0 \pm 1.4$  Log の除去率が期待できることを報告している<sup>13)</sup>。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異なるかもしれないが、本研

究で得られた凝集沈殿-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 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 13 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。なお、先の 0.45 µm のメンブレンフィルターでのろ過の結果に比べて若干除去率が低い、メンブレンフィルターと砂ろ過のろ過性能の差、PFU 法では無く PCR による評価であること、が理由と考えられた。

なお、既往の研究において、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 PAC1 の不活化効果によると報告されている。本研究での *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc* を用いた感染性評価手法(図 14、15)と PCR 法を比較した結果は、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、PAC1 により不活化されなかった。

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。

### C2-3 国内浄水場におけるウイルス除去の実測

各浄水場の処理フローおよび試料採取地点を図 16 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。浄水場 3 (処理系統 D) では鉄系凝集剤および PAC による凝集・沈殿および急速砂ろ過が行われている。

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 8 に示す。原水試料中の濃度範囲は、先行研究同様<sup>28, 29, 30)</sup>、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 が最も高い 83% であった。他の低濃度なウイルスに比べて有利であり、今後の活用が期待された。

原水中および各処理工程後におけるトウガラシ微斑ウイルスの定量結果を図 17 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 18)。凝集・沈殿および急速砂ろ過による処理 (処理工程 B および D) のトウガラシ微斑ウイルス除去率は高く、4.3 ~ 5.2-Log であった。凝集剤添加なしの急速砂ろ過 (処理工程 C) は 0.73-Log (平均値) と高くなく、凝集・沈殿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。

以上の通り、トウガラシ微斑ウイルスは、浄水処理におけるウイルス指標として使用可能であっ

た。

### C3-1 クリプトスポリジウムの吸引式粉体ろ過法

試料間のクロスコンタミネーションを回避するため、出来る限り接触面を低減することが可能な吸引式の粉体ろ過法を検討した (図 19A、B)。フィルターホルダーは、ステンレススクリーンのろ過ケーキの場合は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ことから、中央部から外周まで平坦なるろ過ケーキが形成される焼結ガラス製を使用した。

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、水温がおおよそ 10 以下の水に対して陰圧で粉体ろ過を行った場合、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 19C、D)。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 (図 19E、F)。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。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、高価な特注品に加えて、汎用の安価なゴム板でも実施可能であった (図 19B)。以上の通り、クリプトスポリジウムの濃縮方法に、吸引式粉体ろ過法の提案が可能となった。

### 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 20、21)。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を比較した (表 9)。

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/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( $p < 0.01$ , t 検定)、値は同等であった。

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 デジタル PCR 法を用いたクリプトスポリジウムの定量

クリプトスポリジウムオーシストに含まれる 18S rDNA 遺伝子は、4 回の測定で平均で 1 オーシストあたり、 $28 \pm 4$  コピーであった(表 10)。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>19)</sup>、理論上の値に近い定量値が得られた。加えて、18S rDNA 遺伝子を標的としたプライマー・TaqMan プロブを用いた本 PCR は、デジタル PCR でも利用可能であった。この反応系を利用して、次に rRNA の定量を試みた。

rRNA から逆転写反応後の cDNA は、4 回の測定で平均で 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(表 10)。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>20)</sup>と対応が得られた。

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 反応の障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、デジタル PCR 法とリアルタイム PCR 法は同様の定量値が得られた(図 22)。サンプル毎の誤差も小さかった。

以上の通り、デジタル PCR とリアルタイム PCR は同じ濃度(コピー数)が得られ、リアルタイム PCR の信頼性が支持された。いずれの方法によってもクリプトスポリジウムの定量が可能であった。

### C3-4 相模川水系における遺伝子検出法を用いた原虫調査

検鏡法および遺伝子検出法の結果を表 11 に示した。クリプトスポリジウムの結果が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。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。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 障害がはなかった。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>31)</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。

ジア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(表 11)。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(表 12)。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>32)</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>33)</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。

### C3-5 高度浄水処理(オゾン処理)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<sup>24)</sup>。滞留槽出口の溶存オゾン濃度目標値を0.09 mg/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 $0.07 \cdot \text{Log}(15\%)$ 、ジアルジアの対数減少値は $1.0 \cdot \text{Log}(90\%)$ と計算された(表 13)。オゾン注入率の目標値を2 mg/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 $0.56 \cdot \text{Log}(73\%)$ 、ジアルジアの対数減少値は $3.7 \cdot \text{Log}(99.98\%)$ と計算された(表 14)。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0.7 mg/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 $0.15 \cdot \text{Log}(29\%)$ 、ジアルジアの対数減少値は $1.6 \cdot \text{Log}(98\%)$ と計算された(表 15)。これらの結果から、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。ジアルジアに対しては、冬季でもオゾン注入を強化すれば、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 16、17)。この際のクリプトスポリジウムの対数減少値は $0.03 \sim 0.13 \cdot \text{Log}(6.7 \sim 26\%)$ 、ジアルジアの対数減少値は $0.54 \sim 1.3 \cdot \text{Log}(71 \sim 95\%)$ 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。2010年に問題となったスウェーデンの浄水場では、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。従来は、

オゾン処理はクリプトスポリジウムに対して効果があると考えられていたが、臭素酸のことからオゾンを多く使うことができず、現実には効果がないと認識を改めなければならなかった。

### C3-6 国内外の発生動向、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、大規模集団感染を防ぐのに必要なバリア

国内では 2010 年に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が報告されていた<sup>34)</sup>。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<sup>35)</sup>。

海外では、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い<sup>17)</sup>。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、同様に対策の導入を推奨すべきと考えられた。スウェーデンでは、翌 2011 年にも水道の関連が疑われる 20,000 人のクリプトスポリジウム集団感染が報告されており、分かっているにもかかわらず防ぎきれない現実を、目の当たりにさせられる。

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 18)<sup>36)</sup>。これには前述の 2010 年のスウェーデンの事例が 1 万人規模とし

て記載されている。また、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>36)</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 23)。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 19)<sup>20, 31)</sup>。であれば、浄水場において対策をせざるを得ない。(もちろん、浄水場にかかる負担を減らすために、流域管理を行うことも重要である。)

国内で浄水等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 26 件があった(表 20)(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、越生町のクリプトスポリジウムと雑居ビルのジアルジア集団感染事例で、患者が発生して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った。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と思われる。幸い患者発生はなかったが、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、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、過去の水系感染への反省を踏まえたもので、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。

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 末端の水質なので、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>37)</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24)<sup>38, 39, 40)</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 μm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>26)</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>25)</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。導入例として例えば、膜処理として国内最大規模の横浜市川井浄水場、通知前から率先導入された八戸圏域水道企業団蟹沢浄水場における紫外線処理装置がある。

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>26)</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>41)</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、湯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、利用者の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>42, 43)</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>43)</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。そこに上述の問題が発生し、大規模な集団感染へと発展した。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。

このマルチプルバリアにどの程度の性能が必要であるか、難解なリスク論を避けて、単純計算を試みた。国内の越生町の事例<sup>25)</sup>、欧州最大の事例<sup>17)</sup>、過去最大の米国の事例<sup>26)</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21)。次に患者は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)除去性能を求めた。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。

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、未然に汚染と感染事故を防ぐことが先にある。対策前の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るのも変な話である。大体、検査は時々にしが行われないので、現在の汚染状況はよくわからない。繰り返しになるが、まずは必要な対策を導入することが先で、その後に検査による正しい陽性陰性判定が可能となると考えられた。

#### D. 結論

##### D1-1 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た。従属栄養細菌数の利用は有効であった。

##### D1-2 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。

##### D1-3 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、身の回りの水環境、蛇口の初流水を狙ってレジオネラを検査した。家庭蛇口等にレジオネラ汚染があった。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。

#### D1-4 粉体ろ過法の細菌濃縮への応用

クリプトスポリジウムのろ過濃縮を目的とした粉体ろ過法は、実環境水における大腸菌、嫌気性芽胞菌への応用が可能であった。大容量からの細菌試験に活用が期待される。

#### D2-1 凝集沈殿-PTFE フィルター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 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有効性

同じく PACl を用いた凝集沈殿-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殿-砂ろ過処理性を評価する上で有効な指標となる可能性が示唆された。

#### D2-3 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を測定対象とすることにより、実浄水場のウイルスの除去効率を実測することができた。凝集・沈殿、急速砂ろ過では 4.3~5.2-Log の除去率が得られた。トウガラシ微斑ウイルスは、ウイルス指標として有効と期待された。

#### D3-1 クリプトスポリジウムの吸引式粉体ろ過法

試料間のコンタミネーションを抑えるための、吸引ろ過の粉体ろ過法によるクリプトスポリジウムの濃縮が可能となった。低温の原水ではろ過の最中に粉体濾過層に気泡が生じて正常な濃縮が行えない恐れがあり、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、特注品に加えて、汎用品でも使用可能で、より低コストな実施も可能であった。

#### 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 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、クリプトスポリジウムの DNA、RNA を定量可能であった。1 オースト当たりの 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。18S 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とほぼ対応しており、検量線の信頼性が支持された。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ストを定量することも可能

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。

#### D3-4 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、相模川の原因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。

#### D3-5 高度浄水処理(オゾン処理)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、国内浄水場の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低いと計算された。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上記計算から、オゾン処理には依存できないと考えられた。

#### D3-6 国内外の発生動向、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、大規模集団感染を防ぐのに必要なバリア

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。2010 年と 2011 年に欧州最大規模の、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集団感染が生じており、未だに注意を要することになりはなかった。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。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。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、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。対策することにより、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、検査法にとっての正しい陽性陰性判定が可能と考えられた。

#### 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. 日本薬学会：衛生試験法・注解、pp.55～59、2010、金原出版
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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
  9. 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
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  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. 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.
  19. 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.
20. 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
  21. 榊富賢二郎、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)
  22. 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.
  23. 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.
  24. U.S. Environmental Protection Agency (2010) Long term 2 enhanced surface water treatment rule toolbox guidance manual, pp.214-237.
  25. 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)
  26. 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.
  27. 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
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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
  32. 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
  33. 勝山ら、第 57 回全国水道研究発表会講演集, pp.656-657. 2006
  34. 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
  35. 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



36. 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.
37. 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
38. 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
39. 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
40. 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
41. 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]
42. 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.
43. 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

## F. 研究発表

### 誌上発表

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. 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.
4. 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
5. 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.
6. 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.
7. 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.
  8. 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
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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. 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, Kawaharasaki 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
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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
  15. 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
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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.

23. 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.
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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  
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