

平成 28 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）

水道水質の評価及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

微生物に関する研究 - 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 | 松下 拓    | （北海道大学大学院工学研究院）       |
| 研究分担者 | 秋葉 道宏   | （国立保健医療科学院）           |
| 研究協力者 | 栗田 志広   | （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 | 江原 和宏   | （東京都水道局）              |
| 研究協力者 | 中嶋 健二   | （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 | 庭山 秀一   | （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 | 黒木 俊郎   | （神奈川県衛生研究所）           |
| 研究協力者 | 玉井 拙夫   | （神奈川県立足柄上病院）          |
| 研究協力者 | 安藤 正典   | （元山梨大学工学部）            |
| 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）         |
| 研究協力者 | 片山 浩之   | （東京大学大学院工学研究科）        |
| 研究協力者 | 春日 郁朗   | （東京大学大学院工学研究科）        |
| 研究協力者 | 遠藤 卓郎   | （国立感染症研究所細菌第一部）       |

研究要旨

医療機関を対象とした調査において、捨て水をしていない開栓直後の初流水よりレジオネラが培養により検出され、汚染実態を改めて確認した。塩素消毒の消失に伴う蛇口における従属栄養細菌数の増加とレジオネラ属菌による汚染が懸念され、捨て水や追加塩素等の対策が必要と考えられた。塩素消毒のみに依存しないため、凝集沈殿ろ過によるウイルスの除去性に関心が寄せられていた。全てのウイルスを水道で検査するのは現実的ではなく、ウイルス指標があれば有用と期待される。指標ウイルスを提案するため、全国の水道事業体の協力を得て水道原水を収集し、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）を添加して人工原水とし、凝集沈殿ろ過による除去率を評価した。トウガラシ微斑ウイルスの除去率は各種ウイルスと同程度であることが再現し、ウイルス指標として有効と考えられた。また、凝集 - MF 膜処理においても、各種ウイルスの指標としてのトウガラシ微斑ウイルスの有効性が示された。クリプトスポリジウムの河川汚染実態や対策の必要性を明らかにする目的で、相模川をモデルにク

リプトスポリジウム汚染の実態を調査している。RT-PCR と塩基配列決定により、ブタ由来の遺伝子型が多く検出され、相模川水系におけるクリプトスポリジウム汚染の実態を改めて確認した。養豚排水の対策が汚染の低減に必要と考えられ、低減方法を検討した。

## A. 研究目的

微生物分科会では水道の微生物汚染に係る問題として、従属栄養細菌、腸管系ウイルス、そして耐塩素性病原微生物を検討し、水道の微生物学的な安全性向上を目指している。

### A1 蛇口のレジオネラ属菌汚染対応

水道水は、塩素消毒が消失すると雑菌が増殖するが、このことにあまり注意が払われてこなかった。この雑菌を捕食増殖する自由生活性アメーバが存在し、さらにレジオネラ属菌 (*Legionella*) が自由生活性アメーバに感染し増殖することから、問題となる。レジオネラは、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。この汚染は浄水場で水道水を十分に消毒しても防げず、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。水道水が給湯に用いられて塩素消毒が消失し、給湯にレジオネラ汚染が生じることも多く、水道水の使い方には注意を要する。

国内では、平成 28 年のレジオネラ患者の届出数が 1,600 例と多く、年々増加しており、対策が求められている。主要な感染源は入浴施設、冷却塔などが国内外で知られているが、分子疫学の結果からは、国内事例の半数が原因不明とされる。直接の因果関係は不明であるが、当該研究において水道蛇口におけるレジオネラ汚染を見出したので、従属栄養細菌数の応用の延長として、実態と対策について検討している。海外では、水道水質の低下によりレジオネラ症患者の増加が報告された例がある<sup>1)</sup>。

病院は感受性の高い重篤な患者が入院しており、院内感染の防止が必須である<sup>2)</sup>。病院は災害に備えて 2, 3 日分の貯水量があり、塩素消毒が消失しやすい悪条件も重なっていることも判明し、指針等の修正や注意喚起が必要と考え

られた<sup>3)</sup>。通常、汚染があれば、洗浄を行って汚れを除き、安全をより確かにするための消毒を加える。しかし現場の医療機関の配管は洗浄等が考慮されていないのかもしれない<sup>4)</sup>。

汚染された蛇口の塩素濃度が 0.1mg/L 前後と少なく、放水しても消毒効果は期待できなかったことから、塩素消毒の追加を検討した。まずは最低限の塩素消毒を維持してバイオフィルムの発生や悪化を抑制することが、放水等の対策より先と考えられた。以前の結果より、追加塩素消毒を行っている医療機関はレジオネラ汚染の程度が低く、遊離塩素消毒が重要と強く示唆されていた。

### A2 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有効性

ウイルスによる水系感染症の制御に資するため、浄水工程におけるウイルス除去率を検討している。米国環境保護局 (USEPA) は、汚染物質の候補 (Contaminant Candidate List 4: CCL4) として、アデノウイルス、エンテロウイルス (ポリオウイルス, コクサッキーウイルス, エコーウイルスを含む), A 型肝炎ウイルス, カリシウイルス (ノロウイルス, サポウイルスを含む) の 4 種のウイルスを挙げている<sup>5)</sup>。しかし培養・定量の難しさ等の理由から、これらの水系感染症ウイルスの特に凝集やろ過といった物理的な処理性に関する知見は少ないのが現状である<sup>6, 7, 8, 9)</sup>。実浄水場における水系感染症ウイルスの処理性を評価した事例が見られるものの<sup>10, 11)</sup>、処理水中のウイルス濃度は非常に低く、数百~数千 L の処理水を濃縮する必要があることから、多くの時間と手間を要する。

このような状況の中、植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルスが着目されている。

同ウイルスは、ヒトの糞便中に最も多量に存在する RNA ウイルスで<sup>12)</sup>、水道原水を含む水環境中において、他の水系感染症ウイルスよりも大幅に高い濃度で存在し<sup>13-15)</sup>、そのほとんどがヒト糞便由来とされていることから<sup>13, 14)</sup>、水道のウイルス指標として期待されている。これまでに水系感染症ウイルスとトウガラシ微斑ウイルスの凝集沈澱-砂ろ過処理における除去率は、同程度との結果が得られている。この時に使用したろ過砂は新しい砂であったことから、実際の砂ろ過池で使用されている熟成砂での再現試験を企図した。また、凝集 - MF 膜処理における指標性についても実験を行い、検討した。

### A3 相模川水系におけるクリプトスポリジウムの汚染実態と対策の検討

欧州最大規模のクリプトスポリジウム水系集団感染が近年に報告されるなど、水道のクリプトスポリジウム対策が必要であることに変わりがない一方で、国内の汚染実態にはあまり注意が払われていない恐れがある。そこで原虫類の検出事例の多い相模川をモデルとして、汚染実態を明らかにすること、対策することを目的とした。

過去、相模川水系ではブタ由来の遺伝子型が多く検出されている。神奈川県内の養豚施設排水は活性汚泥法等で浄化処理されているが、クリプトスポリジウムに関しては除去しきれないため、環境中に排出される場合がある<sup>16, 17)</sup>。何らかの簡易な排出源での低減化対策があれば、浄水場の負担が軽減する。糞尿を含む豚舎から排出される汚水の上澄(以下、畜産汚水)を貯留すると、クリプトスポリジウムが減少する事例が経験的に観察されていた。これを明らかにして低減化対策として用いることができないか、クリプトスポリジウムが減少する貯留条件を探った。畜産汚水には多量のアンモニアが存在し、クリプトスポリジウムはアンモニアによって不活性化されるとの報告があったことから、アンモニアと pH に着目した<sup>18)</sup>。

## B. 研究方法

### B1 水道蛇口のレジオネラ汚染対応

水道の本研究班と、レジオネラの解析が行えるレジオネラ研究班の、2つの研究班の協力により行った。具体的には「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究(研究代表者:前川純子)」と共同して行い、成果の一部を引用した。一般の蛇口の汚染に関する注意喚起、水道事業者の塩素濃度の調整、ビル建築物内や病院や老健施設の受水槽と蛇口の管理の徹底と言った、広範囲への波及が予想され、協力が効果的と考えている。

調査の対象は、神奈川県内の3医療機関とし、比較対象として1研究機関を加えた。調査の試料は水試料とした。洗面台の蛇口水、受水槽水を水試料として採取した。レジオネラ属菌及び従属栄養細菌数の水試料は、25%チオ硫酸ナトリウム1mlを添加した滅菌容器に500mlを採取した。シャワーや蛇口からの水は、意図して開栓直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pHを実験室に搬入時にガラス電極法で測定した。遊離残留塩素濃度はDPD法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101型(柴田科学)を用いて実験室に搬入時に測定した。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

水質とレジオネラ汚染の関連性を解析するために、水試料を対象に、以下の理化学項目を定法により測定した。

- ・全有機炭素(TOC):湿式酸化法
- ・アンモニア態窒素:グルタミン酸脱水素酵素法
- ・塩化物イオン:アミラーゼ酵素法
- ・カルシウムイオン:フレイム原子吸光法(JISK 0101-15.2.2)
- ・マグネシウムイオン:フレイム原子吸光法(JISK 0101-15.3.2)
- ・鉄:フレイム原子吸光法(JISK0101-60.2)
- ・マンガン:フレイム原子吸光法(JISK0101-58.2)
- ・亜鉛:フレイム原子吸光法(JISK0101-52.1)

- ・銅:フレイム原子吸光法(JISK0101-51.2)
- ・ニッケル:ICP 発光分光分析法(JISK0101-54.3)

*Legionella* 属菌の分離は以下の方法で行った。すなわち、試料は直径 47mm、孔径 0.2 $\mu$ 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 50 倍希釈 PBS で再浮遊した。試料の浮遊液は 0.5ml を 50 $\square$ 、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5ml に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理の試料及び処理後の浮遊液を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100 $\mu$ l を MWY 寒天平板培地(Oxoid)及び GVPC 寒天平板培地(日水製薬)に塗抹し、36 $\square$ 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。

*Legionella* 属菌遺伝子の LAMP 法検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E(栄研化学)を用いた。メンブランフィルターでろ過濃縮後、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した試料に対して、キット添付の説明書に従って実施した。

調査試料から分離された *Legionella* 属菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene)および *Lmp* (*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* であることを決定した<sup>19, 20</sup>。さらに、型別用血清(デンカ生研)を用いて型別した。

従属栄養細菌数は、定法に従い R2A 寒天培地(BD)に接種し、混釈培養法により 25 $\square$ で 7 日間培養で求めた。培養後、集落数を計数した。

医療機関におけるレジオネラ汚染対策として、受水槽に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、レジオネラ汚染への効果を検証した。対象医療機関に次亜塩素酸ナトリウム添加装置を設置した。遊離塩素濃度のセンサーが高価であること、センサーの校正が煩雑であり医療機関での管理に向かないことから、フィードバック制御は行わず、単純な一定速度の添加とした。添加量は水道水使用量から計算し、遊離残留塩素濃度が

+0.5mg/L を添加の目標とした。

## B2 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有効性

CCL4 に挙げられている水系感染症ウイルスとして、培養可能なアデノウイルス 40 型 Dugan 株、コクサッキーウイルス B5 型 Faulkner 株、A 型肝炎ウイルス IB 型 HM175/18f 株を使用した。また、ヒトノロウイルスの代替として広く用いられているマウスノロウイルス I 型 CW1 株に加え、トウガラシ微斑ウイルス pepIwate-Hachiman1 株を使用した。

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、トウガラシ微斑ウイルスは、それぞれ A549 細胞、BGM 細胞、FRhK-4 細胞、RAW264.7 細胞、*Nicotiana benthamiana* を用いて培養し、リアルタイム定量 PCR 法にて濃度を定量した。

トウガラシ微斑ウイルスを 10<sup>3</sup> lesions/mL になるように、他の精製したウイルスを 10<sup>2-3</sup> PFU/mL になるように、水道原水に同時に添加した。水道原水 A~H(凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している全国 8 箇所の浄水処理場原水、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 を用意した。ここに、凝集剤として従来から広く用いられている塩基度が 50% のポリ塩化アルミニウム (PACI-50s, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 10.1%, SO<sub>4</sub>: 2.9%, 比重: 1.2) を 1.08~2.70 mg-Al/L (水道原水採水時の各浄水処理場における凝集剤添加濃度) 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。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、静置を 60 分間実施した。原水及び静置後の上澄水のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した。

上澄水を 120 m/d のろ速にて新砂(材質: 珪砂, 実測有効径: 0.8 mm, 実測均等係数: 1.32)

あるいは熟成砂(更生作業から6年経過の砂, 材質: 珪砂, 実測有効径: 0.7 mm, 実測均等係数: 1.37)を充填した砂ろ過カラム(ろ層厚さ: 10 cm)に10分間通水した。通水5分後及び10分後のろ過水のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量した。

一方, 孔径0.1 µmのMF膜(PVDF)を用いた凝集-MF膜処理実験も行い, トウガラシ微斑ウイルス, 大腸菌ファージ, 水系感染症ウイルスの処理性を比較した。

### B3 相模川水系におけるクリプトスポリジウムの汚染実態と対策の検討

これまでの相模川水系における調査結果を確認する意味で, 昨年度とは別の事業者で実施された結果を検討した。社家, 中津川および小鮎川の試料に関して, 検鏡法と平行してPCR法を実施した。平成22年度から平成27年度の結果より, クリプトスポリジウムのPCR法と検鏡法の定量性を比較した(n=101)。平成26年度から平成28年度の陽性試料より, クリプトスポリジウムの塩基配列を決定した。顕微鏡法, 遺伝子検査法は定法に従い, 免疫磁気ビーズ試薬, 蛍光抗体染色試薬(EasyStain), クリプトスポリジウム遺伝子検査試薬(Cycleave RT-PCR Cryptosporidium detection kit)を用いた。rRNAコピー数は, クリプト個数に換算して比較した。塩基配列決定はクリプトスポリジウム・ジアリジア専用シーケンス解析(タカラバイオ)で行った。

アンモニアを用いたクリプトオーシストの不活化試験は以下の通りに行った。まず, 畜産汚水(神奈川県畜産技術センター協力)は溶存物質や細菌類などの初期条件が採取のたびに異なっており, 結果が左右されることに悩まされたことから, 洗浄等の操作を畜産汚水に加えることで, 条件の均一化を図った。その後, 畜産汚水はリン酸緩衝生理食塩水(以下, PBS), またはアンモニウムイオン溶液(1000 mg/L, アンモニア態窒素標準液, 東亜ディーケーケー株式会社)で希釈し, HCl又はNaOHでpHを調整した。

アンモニア濃度は, 700 ± 400 mg/L程度との報告を参考にした<sup>21)</sup>。それぞれの条件におけるpH値は中性7.0, 酸性5.0, アルカリ性10.0とし, 7日後にほぼ変化のないことを確認した。各試料を7日間保管し, 検鏡によってクリプト数, PCR法によってrRNAを定量した。検鏡では, 核を保持しているクリプト数とは別に, 核の有無を問わず典型的な染色像を示す粒子をオーシスト様粒子として計数した。

## C. 研究結果および考察

### C1 水道蛇口のレジオネラ汚染対応

3医療機関と1研究機関の給水系・給湯系の状況を表1に示した。医療機関Aで使用している水道水の原水は井水で, その他の機関で使用している水道水の原水は表流水であった。医療機関Cでは井水をRO処理して, 水道水と混合して利用していた。医療機関A及び研究機関Dは独自の追加塩素消毒がなかった。医療機関B及びCは独自に塩素添加装置を設置し, 給水系の残留塩素濃度を0.5及び0.8mg/Lに設定していた。3医療機関の受水槽の容量は180~290m<sup>3</sup>あった。給湯方式は医療機関A及びBは集中方式を採用し, 医療機関Cと研究機関Dは複数の建物があり, 局所方式と集中方式の両方を採用していた。

各機関の給水系の理化学項目の測定平均値を表2に示した。医療機関Aでは, 後述のように次亜塩素酸ナトリウムの給水系への添加実験を行ったが, 理化学項目の測定は添加実験開始前に実施した。昨年度に報告したとおり, 3医療機関の給水系からレジオネラ属菌が検出されている。一方で研究機関からはレジオネラ属菌は検出されず, 受水槽の大きさや蛇口の使用頻度がレジオネラ汚染の有無あるいはその頻度の差となって現れるのかもしれない。関連すると考えられる理化学項目は, 本研究の範囲では塩素濃度以外にはなかった。

2016年12月14日から, 医療機関Aの受水槽への次亜塩素酸ナトリウムの添加を開始した。受水槽での遊離残留塩素濃度は, 添加前が0.2

程度、添加後が 0.7mg/L 程度で推移し、予定通りであった(図 1)。

次亜塩素酸ナトリウム添加の効果を判定するためのレジオネラ検査は、安定した濃度が継続したと考えられる、開始から 2 か月後の 2017 年 2 月 21 日に実施した(表 3)。

過去にレジオネラが検出されたことのある 5B 内科の 2 箇所の蛇口は塩素濃度が向上し、レジオネラは検出されなかった。塩素添加直前に検出されず因果関係が明確ではないが、検出頻度が低いことは好ましい状況と言えた。

意図して使用頻度の少ない蛇口を検査すると、レジオネラ属菌が検出され続けた。使用していない病室(3A 小児科 306 病室水道蛇口)からは、高い濃度でレジオネラが検出され続けており、蛇口の廃止が必要と考えられた。

使用頻度の低い手術室準備室水道蛇口、手術室洗浄水道蛇口(右側奥)は、塩素濃度があるにも関わらず生菌が検出され、汚染の程度が高いと想像された。消毒の強化を行ったが、洗浄はしていないので、汚れの残存は承知している。塩素濃度が改善したので、捨て水を行うことで汚染は低減する方向と期待された。LAMP 法の結果が一部不一致となったが、主に *Legionella pneumophila* を検出するキットなので、菌種の違いが理由と考えられた。

追加塩素消毒の開始後、5 水試料の遊離残留塩素濃度は 0.1 ~ 0.4mg/L(平均 0.25mg/L)であった。以前は 0.1mg/L 前後しかなかったが、初流水であっても塩素濃度がある程度維持され、改善が得られた。塩素濃度が維持されれば汚れの付着が防がれるので、十分に水を流したり、配管を洗浄したりと具体的な対策をする準備が整った。

当該医療機関の給湯系は集中方式を採用しており、60 °C で供給されていた。混合栓の蛇口(4 か所)では、給水系と給湯系から別々に水試料を採取し、給湯系の遊離残留塩素濃度は 0.05 ~ 0.1mg/L(平均 0.09mg/L)であった。給湯系の遊離塩素濃度も高まるように、水質管理目標設定項目の目標値である 1mg/L の濃度まで、

受水槽への追加塩素量を増やすことが考えられた。腐食が問題となるステンレス配管はなかった(表 1)。

C2 トウガラシ微斑ウイルスの指標としての有効性

凝集沈澱-砂ろ過処理におけるウイルスの除去率を図 2 に示した。図の縦軸は  $\text{Log}[C_0/C_f]$  ( $C_0$ : 原水のウイルス濃度,  $C_f$ : 砂ろ過水のウイルス濃度)にて表記した。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の除去率は、それぞれ 1.3-2.4 log, 0.8-2.5 log, 1.1-2.4 log, 0.8-2.4 log となり、昨年度報告した除去率(それぞれ 1.4-2.4 log, 0.9-2.7 log, 0.8-2.4 log, 0.8-2.0 log)と同程度であったことから、実験の再現性が確認された。なお、原水 G において除去率が低下したが、 $E_{260}$  が  $0.093\text{cm}^{-1}$  と一番高い割に、凝集剤が他と同程度の 2.7 mg-Al/L と多くないことが理由だったかもしれない。

砂ろ過に使用する砂の熟成の有無がウイルスの処理性に与える影響を評価するため、熟成砂を用いた回分式凝集沈澱-砂ろ過実験を実施し、新砂での除去率と比較した(図 3)。新砂と熟成砂を用いた場合の除去率は、同程度であった。使用した範囲で、砂ろ過に使用する砂の熟成の有無は、ウイルスの処理性に影響しなかった。

凝集沈澱処理及び新砂の砂ろ過処理における各種ウイルスの除去率をプロットした(図 4)。熟成砂と新砂との差がなかったので、ここでは熟成砂の結果を省略している。トウガラシ微斑ウイルスの除去率と各種ウイルスの除去率は、高い相関があることを再確認した。すなわち、トウガラシ微斑ウイルスの除去率は、他のウイルスと同程度であった。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澱-砂ろ過処理性を評価する上で有効なウイルス指標として期待できる結果であった。

また、凝集 - MF 膜処理でも、トウガラシ微斑

ウイルスは、水系感染症ウイルスと同程度あるいはいくぶん小さい除去率であった。大腸菌ファージ MS2 も水系感染症ウイルスと同程度あるいはいくぶん小さい除去率が得られたが、大腸菌ファージφX174は、水系感染症ウイルスより大幅に小さい除去率となり、水系感染性ウイルス指標として用いることが難しいのではないかと判断された。

以上より、トウガラシ微斑ウイルスは、凝集沈殿-砂ろ過処理および凝集-MF膜処理における水系感染症ウイルスの指標として有効であることが示された。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>13, 14, 15)</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と考えられた。

### C3 相模川水系におけるクリプトスポリジウムの汚染実態と対策の検討

PCR法と検鏡法を比較した結果(図5)、相関係数(r)は0.62と、相関性を認めた。検鏡法とPCR法では原理に違いがあるため、両手法で測定値が完全に一致することはありえないが、クリプトの検出傾向を知る上では、十分な定量性があると考えられた。なお、PCR法と検鏡法で測定値に大きな差があった事例(検鏡法:251個/10L、PCR法:32個/10L)が存在したが、試料中にPCR阻害物質が存在した可能性やクリプトスポリジウムが壊れていたなどが考えられた。

陽性18検体の塩基配列は、社家は83%(10/12)、小鮎川は100%(3/3)、中津川は100%(3/3)の割合でブタ由来の*Cryptosporidium suis*が検出され、従来と同様にブタ由来が多い結果であった。小鮎川および中津川流域に養豚施設が存在し、相模川水系における主なクリプト排出源は養豚施設である可能性を改めて確認した。

養豚施設ではクリプトスポリジウムが強い病原性を発揮しないため、病気としての関心はあまり持たれていない。排水処理での除去を期待し、

養豚施設での導入が容易と思われる、アンモニアを用いたクリプトスポリジウムの不活化を検討した。畜産汚水は溶存物質や細菌類などの初期条件が採取のたびに異なってしまうことから、検討の結果、最終的に図6に示す溶存物質・細菌除去の操作を畜産汚水に加えることで、条件の均一化を図った。アンモニア処理の結果、rRNA量及びクリプト数は、アルカリ性かつアンモニウムイオン存在下(条件6)で激減した(図7)。アンモニウムイオンはアルカリ性になると遊離アンモニアが生成され、遊離アンモニアは生物にとって毒性が高いために、クリプトが死滅したと考えられる<sup>18)</sup>。一方、オーシスト様粒子はどの条件においても顕著な減少はなく、強固なオーシスト壁が最後まで残ったと考えられた。rRNA量や核の存在はその個体の生存性の指標となりえるものであり、いずれも失われたことから、クリプトスポリジウムは死滅したと考えられた。

## D. 結論

### D1 水道蛇口のレジオネラ汚染対応

検討対象を医療機関とし、蛇口のレジオネラ汚染を改めて確認した。追加塩素消毒を行い、蛇口の塩素濃度を改善することができた。使わない蛇口は廃止、汚れの酷い箇所は洗浄や捨て水を行い、塩素濃度を維持し続けることで、安全性が向上すると考えられた。

### D2 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-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をPCR法にて評価した結果、それぞれ1.3-2.4 log, 0.8-2.5 log, 1.1-2.4 log, 0.8-2.4 logとなった。これらの除去率は、昨年度報告した除去率と同程度であったことから、実験の再現性が確認された。トウガラシ微斑ウイルスの除去率と水系感染症ウイルスの除去率の間には高い相関関係が認められることを再確認した。砂ろ過に使用する砂の熟成の有無は、除去率にほとんど影響しなかった。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澱-砂ろ過処理性を評価する上で有効なウイルス指標と期待された。また、凝集 - MF 膜処理においても水系感染症ウイルスと同程度あるいはいくぶん小さい除去率が得られたことから、トウガラシ微斑ウイルスが、凝集 - 膜ろ過処理における水系感染症ウイルスの指標として有効であることが示された。

#### D3 相模川水系における遺伝子検出法を用いたクリプトスポリジウムの実態調査

相模川水系におけるクリプトスポリジウム汚染の実態を改めて確認した。顕微鏡法と遺伝子検査法のクリプトスポリジウム数はおよそ相関した。遺伝子増幅産物の塩基配列は、ブタ由来の *Cryptosporidium suis* が多く検出され、養豚場の畜産排水が問題と考えられた。汚染低減の対策案として、アンモニアによるクリプトスポリジウム不活化方法を検討した。

#### E. 参考文献

1. Flint water advisory task force. Final report. March 2016. ([https://www.michigan.gov/documents/snyder/FWATF\\_FINAL\\_REPOR\\_T\\_21March2016\\_517805\\_7.pdf](https://www.michigan.gov/documents/snyder/FWATF_FINAL_REPOR_T_21March2016_517805_7.pdf), 2017 年 4 月 5 日時点)
2. 小出 道夫、藤田 次郎、レジオネラによる院内感染と感染防止対策. 日本環境感染学会誌 2009; 24. 1: 1-8.
3. 厚生労働省医政局、災害時における医療体制の充実強化について(医政発 0321 第 2 号)平成 24 年 3 月 21 日
4. 日本医療福祉設備協会、病院設備設計ガイドライン(衛生設備編)HEAS-03-2011
5. U.S. Environmental Protection Agency. (2016) Drinking Water Contaminant Candidate List 4, EPA-HQ-OW-2012-0217, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
6. Jacangelo, J. G., Adham, S. S. and Laine, 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. Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F. and Girones, R. (2006) Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environmental Science and Technology* **40**(23), 7416-7422.
11. Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calqua, B., Huguet, J.M., Matia, L. and Girones, R. (2009) Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Research* **43**(7), 2011-2019.
12. Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F. and Ruan, Y.J. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *Plos Biology* **4**(1), 108-118.
13. 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.
14. 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.
  15. 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.
  16. 諏訪 守、鈴木 穰: 活性汚泥処理によるクリプトスポリジウムの除去実験, 第 34 回日本水環境学会年会講演集, p64(2000)
  17. 秋葉道宏 他: 畜産排水処理施設におけるクリプトスポリジウムの排出と除去性の調査、公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と制御に関する研究、環境省環境保全研究、p4.18-4.22(2010)
  18. Michael B.Jenkins, Dwight D. Bowman, William C. Ghirese: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.64, No2, p.784-788 (1998)
  19. 山本啓之: PCR 法による *Legionella* 属細菌の検出・同定. *日本臨床*, 50 特別号: 394-399, 1992.
  20. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, and Atlas RM : Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cellular Probes*, 4: 175-187, 1990.
  21. 川村 英輔、田邊 眞、鈴木 一好: リン結晶化法を用いた豚舎汚水からのリン回収の可能性, *日豚会誌*, 48(1), pp.1-9(2011)
  - Murai, K. (2017). Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Research* **115**: 29–39.
  2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K. and Aochi, A. (2017). Elimination of representative contaminant candidate list viruses, coxsackievirus, echovirus, hepatitis A virus, and norovirus, from water by coagulation processes. *Journal of Hazardous Materials* **326**: 110–119.
  3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T. and Murai, K. (2016). Investigation of enteric adenovirus and poliovirus removal by coagulation processes and suitability of bacteriophages MS2 and φX174 as surrogates for those viruses. *Science of the Total Environment* **563-564**: 29–39.
  4. 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* **65**(4), 322–329.
  5. 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* **16**(3), 737–745.
  6. 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

#### F. 研究発表

##### 誌上発表

1. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and

##### 口頭発表

1. 黒木俊郎、泉山信司、大屋日登美、鈴木美雪、前川純子、倉文明、医療機関の給水系

- におけるレジオネラ属菌汚染調査、日本水道協会水道研究発表会、2016年11月、京都市
2. 泉山信司、倉文明、大屋日登美、黒木俊郎、病院の蛇口におけるレジオネラ汚染の検出、環境技術学会、2016年9月、姫路市
  3. 高力聡史、白崎伸隆、松下拓、松井佳彦 (2017). トウガラシ微斑ウイルスと水系感染症ウイルスの塩素消毒耐性の比較：感染性評価手法とPMA-PCR法の併用による評価。第51回日本水環境学会年会、熊本、2017/3/15-17.
  4. 白崎伸隆、村井一真、松下拓、松井佳彦 (2016). 膜ろ過処理による水系感染症ウイルスの除去。第19回日本水環境学会シンポジウム、秋田、2016/9/13-15.
  5. 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
  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. 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.
  8. Vu Duc Canh, Hiroyuki Katayama, and Hiroaki Furumai (2016) Behavior of humic acid recovery during the Mg<sup>2+</sup> concentration method for drinking water samples, the 12th International Symposium on Southeast Asian Water Environment, pp.397-402. (28-30 November, Hanoi, Vietnam)
  9. Vu Duc Canh, Hiroyuki Katayama, and Hiroaki Furumai (2017) Applicability of EMA-qPCR method to detect damaged virus in drinking water under presence of organic compounds, 第51回日本水環境学会年会 (3/15-17, 熊本)
  10. 渡邊洋大、泉山信司、岩谷梓、齊藤巧介、成澤千秋、上村郁子、関山真樹、北村壽朗、相模川水系における遺伝子検出法を用いた原虫調査、日本水道協会水道研究発表会、2016年11月、京都市
  11. 泉山信司、松下拓、秋葉道宏、片山浩之、水道の微生物学的な安全性向上に向けた取り組み、日本水道協会水道研究発表会、2016年11月、京都市
- 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