

平成 30 年度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）

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）
研究分担者	片山 浩之	（東京大学大学院工学研究科）
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	今井 美江	（東京都水道局）
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	植木 健一	（新潟市水道局）
研究協力者	浅野 峰子	（横浜市水道局）
研究協力者	中嶋 直樹	（神奈川県衛生研究所）
研究協力者	黒木 俊郎	（岡山理科大学獣医学科）
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	春日 郁朗	（東京大学大学院工学研究科）
研究協力者	白崎 伸隆	（北海道大学大学院工学研究院）
研究協力者	三浦 尚之	（国立保健医療科学院）
研究協力者	浅田 安廣	（国立保健医療科学院）
研究協力者	島崎 大	（国立保健医療科学院）
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

貯水槽水道の給水栓を対象として、塩素の残留状況が異なる給水栓から初流水を採取し、レジオネラ属による汚染状況と残留塩素濃度を調査した。レジオネラ属は遊離残留塩素が 0.1 mg/L を越えて残留している給水栓からはすべて不検出であった。以前の対象施設は蛇口のレジオネラ汚染に苦慮していたが、自己水源の井戸水への切り替えに伴って追加の遊離塩素消毒が徹底され、汚染は大きく改善した。

ウイルス指標として期待されるトウガラシ微斑ウイルスは、実際の浄水処理における挙動に関心が寄せられている。急速ろ過の凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している国内浄水場 A において、トウガラシ微斑ウイルスの処理性を通年で評価した。PCR 法にて評価した凝集沈澱-砂ろ過処理によるトウガラシ微斑ウイルスの除去率は、1.3~2.0-Log であり、除去率の季節的な変動は小さかった。除去率は凝集沈澱-砂ろ過処理の室内実験と同程度であり、再現

性が得られた。トウガラシ微斑ウイルスが凝集沈澱-砂ろ過処理により 1.6-Log 除去される浄水場 A においては、各種水系感染症ウイルスも 1.6-Log 程度除去されるものと推察された。浄水場における凝集沈澱-砂ろ過処理によるウイルスの除去率は 2-Log 未満であり、ウイルス対策は後段の塩素処理に大きく依存していることが改めて確認された。

クリプトスポリジウムは塩素消毒に抵抗性があることから、水道を介した散発的な感染が懸念される。1 個のクリプトスポリジウムで感染する確率は、かつて 165 個で 50% (1 個で 0.4% 程度) と計算されていた。ところが感染しやすい種と株が存在し、今では USEPA で 1 個が 10% 程度の感染確率、WHO が 20% と計算の前提が更新され、桁違いに感染確率が大きいことが想定されている。10⁻⁶ DALYs (障害調整生存年数) の目標維持には、従来の 2-Log 除去ではなく、3-Log 以上の徹底が必要であった。微生物許容感染リスク 10⁻⁴/年の目標には、4-Log 以上が必要であった。対策としては、2 ないし 3-Log の除去率が期待される凝集沈澱ろ過の急速ろ過によるシングルバリアだけでなく、マルチプルバリアとして紫外線処理や膜処理に、当面の対策として二段凝集の導入、集水域の管理にモニタリングや排水処理の徹底など、水質の維持向上が将来の方向と考えられた。

A. 研究目的

微生物分科会では水道の微生物汚染に係る問題として細菌、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 貯水槽水道の蛇口のレジオネラ汚染

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、さらにヒトに重篤な肺炎やポンティアック熱を引き起こすレジオネラ属菌 (*Legionella*) が増殖することから、問題となる。この汚染は塩素消毒が無くなると生じてしまい、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¹⁾。以前から蛇口のレジオネラ属菌汚染に苦慮していた貯水槽水道の給水栓を対象として、塩素の残留状況が異なる初流水を採取し、レジオネラ属菌と残留塩素濃度の調査を企図した。

A2 凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性評価

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²⁾。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³⁻⁶⁾。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^{7,8)}、処理水中のウイルス濃度は非常に低く、数百~数千 L の処理水を濃縮した場合であっても不検出/定量下限以下となることが少なくない。そのため、浄水場におけるウイルスの処理性を、水系感染症ウイルスを直接定量することにより正確に把握することは事実上困難な現状にある。

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⁹⁾、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¹⁰⁻¹²⁾、そのほとんどがヒト糞便由来とされていることから^{10・11)}、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殿-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¹³⁾。ウイルス指標として活用するにあたって、実際の浄水処理におけるトウガラシ微斑ウイルスの挙動に関心が持たれる。そこで本研究では、国内浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性を通年で評価し、季節変動の有無を確認することとした。

また、感染価を有するウイルスを選択的に検出する Viability PCR 法が開発されてきているが、水道におけるウイルス測定法としての適用可能性を評価するため、水道水を対象とした Viability PCR 法を試みた。

A3 散発的なクリプトスポリジウム感染を防止するための対策

非血性の水様下痢を呈するクリプトスポリジウム症は、糞口感染し、塩素消毒に抵抗性があることから、水道を介して大規模な集団感染が発生した。一方、大きな集団感染だけでなく、低濃度の汚染から散発的な感染が生じてしまうことも問題になる。10L 中に 0.08 個のクリプトスポリジウム濃度の水道水を給水人口 6 万人に対して供給し、218 人の患者発生が英国で報告されている¹⁴⁾。

1 個のクリプトスポリジウム(オーシスト)で感染する確率は、かつて 165 個で 50% (1 個で 0.4% 程度)と計算されていた^{15, 16)}。ところが感染しやすい種と株が存在し、今では USEPA(米国環境保護庁)で 1 個が 10%程度(4 から 16%)の感染確率^{17, 18)}、WHO(世界保健機関)が 20%と計算の前提が更新され^{19, 20)}、桁違いに感染確率が大きいと想定されている。現在の国内におけるクリプトスポリジウム対策を目的とした浄水処理は、前提が桁違いに変化した結果、除去率も桁違いに必要な状態に陥っている。そこで本

研究では新しい感染確率を前提として、水道を介した感染症抑止の目標である 10^{-6} DALYs(障害調整生存年数、disability-adjusted life year(s))、あるいは微生物許容感染リスク 10^{-4} /年(年間、1 万人に 1 人)を達成するのに必要な除去率を改めて算出した。平成 15 年の厚生科学審議会では 1 個で 0.4%の感染確率と 1 個/10L の原水汚染を仮定し、凝集沈殿ろ過による 2-Log の除去率で、概ね 10^{-6} DALYs の目標を達成できると想定されていた²¹⁾。3-Log の除去率なら、微生物許容感染リスク 10^{-4} /年も概ね達成できていた。国内で多く行われているポリ塩化アルミニウム(PAC)を用いた凝集沈殿ろ過(急速ろ過)は、2 ないし 3-Log のクリプトスポリジウム除去が得られるとされる。そして平成 19 年の水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針に従い、ろ過池出口の濁度を 0.1 度以下とすることで、除去率の維持が徹底されている²²⁾。

B. 研究方法

B1 貯水槽水道の蛇口のレジオネラ汚染

給水栓のレジオネラ汚染と残留塩素濃度の関係を明らかにすることを目的として、大学構内の給水栓 20 カ所から初流水約 4 L の採水を 12 回行った。今年度は遊離塩素が微量(~ 0.2 mg/L)に残留している給水栓を対象として重点的に調査を実施した。残留塩素濃度は HACH 社残留塩素測定用試薬を用いて、開栓直後、採水中、採水後の各濃度を測定した。レジオネラ測定は、試料 1 L を Isopore メンブレンフィルター(孔径 0.2 μm , メルクミリポア社製)でろ過した後、酸処理を行い 10 mL に濃縮し、GVPN 培地を用いて 37 °C で 7~10 日間培養した。生育したレジオネラ様コロニーは斜光法による実体顕微鏡観察、L(+)-システイン要求性試験を行った後に、LEG228-LEG858 プライマー対を用いてレジオネラ確定試験を行った²³⁾。自由生活性アメーバは、試料 1 L を孔径 8 μm のメンブレンフィルター(ザルトリウス社製)を用いてろ過捕集した。20 mL の PSA バッファーに再懸濁した後、さらに 1,000 \times g, 5 分間の遠心分離により得た 1

mL の濃縮液を、熱不活化大腸菌を塗布した無栄養寒天培地を用いて 30 °C で培養した。

2017(H29)年度末に大学内の複数の建物において、水道事業者からの受水から、ほとんどを自家水源の井水でまかなう水供給システムへの切り替えがあった。処理フローは、原水(地下水) 前塩素処理(鉄・マンガン対策と消毒) 砂ろ過処理 軟水化(イオン交換処理) UF 膜処理(孔径 0.005 μm) 次亜塩素酸ナトリウム注入であった。

B2 凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性評価

実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性を評価するため、浄水場 A の原水、あるいは浄水処理工程水 80 ~ 1,500 L におけるトウガラシ微斑ウイルスの濃度を定量した。昨年度報告した 2017 年 10 月、11 月、12 月の採水に引き続き、今年は 2018 年 5 月、7 月、11 月に採水を実施した。

大容量試料水に適用可能なウイルス濃縮法として、当該研究で開発したナノセラム陽電荷膜を用いたウイルス濃縮法を使用した。すなわち、浄水場 A 内において原水 80 ~ 250 L、沈澱水 100 ~ 550 L、チオ硫酸ナトリウムのインライン添加により残留塩素を中和した砂ろ過水 100 ~ 1,000 L、あるいは浄水 100 ~ 1,500 L を、ポンプを用いて 3 ~ 7 L/min の初期流速にてナノセラム陽電荷膜(膜孔径: 2 μm)に通水した。

膜に吸着したウイルスを脱着させるウイルス溶出液として pH 9.5 の 1.5% (w/w) ビーフエキス溶液(0.05 M グリシン含有)350 mL を添加し、1 分間浸漬させた。未使用のビーフエキス溶液 150 mL を膜に通水することにより、ビーフエキス溶液と共に、ウイルスを回収した。浸漬時間を増しながらこの溶出操作を 3 回繰り返す、合計 2 L のビーフエキス溶液にウイルスを濃縮した(一次濃縮)。ウイルス溶液の pH を HCl にて 3.5 に調整した

後、30 分間攪拌することにより、溶液中のビーフエキスを凝集した。これを 2,500 × g にて 15 分間遠心分離することにより、上澄水と凝集フロックを分離した。

上澄水については、タンジェンタルフロー UF 膜(分画分子量: 300 kDa)を用いて 20 mL まで濃縮し、更にメンブレンフィルター(膜孔径: 0.45 μm)にてろ過した(二次濃縮[上澄み])。一方、凝集フロックについては、pH 9 の 0.15 M リン酸バッファーを添加し、160 rpm にて 10 分間振とうすることにより、凝集フロックを溶解した。これを 4,000 × g にて 10 分間遠心回収した後、pH を HCl にて 7.0 に調整することにより 20 mL まで精製・濃縮し、更にメンブレンフィルター(膜孔径: 0.45 μm)にてろ過した(二次濃縮[フロック])。

以上の二次濃縮[上澄み]及び二次濃縮[フロック]より、リアルタイム定量 PCR 法を用いて、トウガラシ微斑ウイルス濃度を定量した。QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いた逆転写により cDNA を合成した。合成した cDNA を TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems) Distilled water、トウガラシ微斑ウイルスに特異的なプライマー(最終濃度: 400 nM、タカラバイオ)及びプローブ(最終濃度: 250 nM Applied Biosystems) と混合した後、リアルタイム定量 PCR 装置 (Applied Biosystems 7,300, Applied Biosystems) に供することにより、トウガラシ微斑ウイルス濃度を定量した。トウガラシ微斑ウイルスの Log 除去率 (Log[C₀/C]; C₀: 原水のトウガラシ微斑ウイルス濃度, C: 処理後のトウガラシ微斑ウイルス濃度) を算出した。

Viability PCR 法の評価方法として、高温不活化したウイルスおよび塩素消毒したウイルスを対象に、ブラック法との乖離がより少ない方法が優れていることとして評価した。また、浄水試料へ

の適用性評価としては、浄水場において原水及び緩速ろ過水、凝集沈殿砂ろ過・オゾン生物活性炭処理・休息砂ろ過水、凝集沈殿砂ろ過水の処理水を濃縮したもの(20L-560L)に、アイチウイルス(AiV)をモデルウイルスとして添加したものをを用いた。ethidium monoazide (EMA)、propidium monoazide (PMA) および cis-dichlorodiammineplatinum (CDDP)を用いた前処理によりカプシドで保護されていないウイルスゲノムを不活化し、その後定量的PCR法により測定した。また、前処理の効果を高めるため、界面活性剤SDを添加した処理についても有効性を実験的に比較した。

B3 散発的なクリプトスポリジウム感染を防止するための対策

感染確率は前述の通り、従来が165個で50%(1個で0.4%程度、すなわち感染確率P、摂取数N、パラメータ $k=238.6$ のとき、 $P=1-\exp(-N/k)$ で感染確率が計算され、 $N=1$ の時は $P=1-\exp(-1/238.6)=0.0042$)とされていた^{15, 16, 21})。USEPAでは新しく4から16%とされることから、中間で10%を代表とした^{17, 18})。WHOは20%とした^{19, 20})。飲水量は、従来の非加熱飲水量は1Lとされたが²¹)、実際はずっと少ないとされ、200mLでの計算を加えた²⁴)。クリプトスポリジウム症のDALYは、従来は0.00103、現在は0.0015とした¹⁹⁻²¹)。原水のクリプトスポリジウム汚染については、当時の状況から大きく変化せず、1個/10Lの前提をそのままとした。検出数の多い河川ではブタ型が多かった一方で¹)、家庭排水を多く含む下水からクリプトスポリジウム等の検出が指摘されていた²⁵)。クリプトスポリジウムは5類感染症の全数届出疾患だが、未だに特效薬がなく、一般病院での検査もされていない²⁶)。感染確率の計算には、Excel(Microsoft)を使用した。

C. 研究結果および考察

C1 貯水槽水道の蛇口のレジオネラ汚染

遊離残留塩素濃度とレジオネラ濃度の関係を、

井水切り替え前の結果と、井水切り替え後の2018(H30)年度の結果を合わせて、図1に示した。2018(H30)年度の採水試料の遊離残留塩素濃度は、不検出~0.65 mg/Lに分布していたが、遊離残留塩素が0.04 mg/Lに低下していた2試料からのみレジオネラ属菌が検出され、その濃度は70および 4.7×10^3 CFU/Lであった。井水切り替え前は多くの給水栓で遊離塩素濃度の低下とレジオネラ属菌の検出があったが、井水切り替え後は残留塩素の消費が進んだ給水栓のみからレジオネラが検出され、多くの給水栓では不検出となった(図1)。適切に管理された給水栓水の残留塩素濃度が0.7 mg/L前後に達し、切替前の0.5 mg/L前後より向上があり、塩素消毒の徹底がレジオネラ減少の理由と考えられた。なお、レジオネラが検出された給水栓からは自由生活性アメーバも少ないながらも継続して検出されていた(~10 PFU/L)。

C2 凝集沈殿-砂ろ過処理を実施している実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性評価

浄水場Aにおいて、トウガラシ微斑ウイルスの処理性を評価した(図2)。PCR法にて評価した原水におけるトウガラシ微斑ウイルス濃度は $10^{0.7} \sim 1.6$ copies/mLとなり、定量可能な程度に高い濃度で存在した。また、季節的な濃度変動も小さかった。

凝集沈殿処理水及び砂ろ過処理水におけるトウガラシ微斑ウイルス濃度はそれぞれ $10^{-0.7} \sim 0.7$ copies/mL、 $10^{-0.9} \sim -0.1$ copies/mLとなり、原水に比べて濃度の低減が確認された(図2)。従って、凝集沈殿-砂ろ過処理はウイルスの除去に有効であることが示された。除去率は、 $1.3 \sim 2.0$ -Log(平均1.6-Log)であり、除去率の季節的な変動は小さかった(図2)。

細かく見ると、凝集沈殿単独で平均1.2-Logの除去率であった(図3)。凝集沈殿と砂ろ過の間に、統計的な有意差が認められ($P < 0.05$)後段の砂ろ過処理も、ウイルス除去に寄与していることが示された(砂ろ過単独で

平均 0.4-Log)

塩素処理後の浄水におけるトウガラシ微斑ウイルス濃度は $10^{-1.4} \sim 0.3$ copies/mL となり、砂ろ過後に比べて濃度が低減した場合もあった。しかしながら、凝集沈澱-砂ろ過の除去率と塩素処理の除去率（低減率）の間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。本研究でトウガラシ微斑ウイルスの定量に用いた PCR 法は、消毒効果の過小評価に繋がる懸念があり、除去率（低減率）の解釈には注意が必要であった。

以上の通り、浄水場 A において得られた除去率は、これまで実施した凝集沈澱-砂ろ過処理の室内実験の除去率（水質の異なる全国 8カ所の水道原水を用いた場合に得られた除去率；範囲: 0.3 ~ 2.5-Log , 平均: 1.5-Log)¹³⁾と同程度であった。すなわち、実浄水場におけるウイルスの除去率は、室内実験により再現可能と示唆された。加えて、各種水系感染症ウイルスも同程度除去されるものと推察された。一方で、浄水場における物理的処理（凝集沈澱-砂ろ過処理）によるウイルスの除去率は 2-Log 未満であり、ウイルス対策は後段の塩素処理に大きく依存していることが改めて確認された。

Viability PCR については、SD を用いたほうが高温不活化したウイルスの誤陽性が少なくなることが分かった。また、EMA, PMA および CDDP では、CDDP が最も誤陽性が少なくなるという結果が得られた。塩素消毒に対しても同様の結果が得られた。このことから、SD を併用した CDDP が Viability PCR の前処理として最も優れていることが分かった。

浄水場における試料からの阻害については、PCR に対する阻害のほうが SD-CDDP 前処理に対する阻害よりも大きく、浄水試料においては SD-CDDP 処理は問題なく行えることが分かった。

C3 散発的なクリプトスポリジウム感染を防止するための対策

クリプトスポリジウムの感染確率が 0.4% から

10 ないし 20% に高まった分、浄水場における除去率を、+1.4 ないし +1.7-Log 高めたら良いと単純計算できた (= $\text{Log}_{10}(10 / 0.4)$ 、あるいは = $\text{Log}_{10}(20 / 0.4)$)。それだけでは理解しづらい、理解が得られにくいので、もう少し具体的な数値を当てて以下の通り計算をした。

従来に想定されていた、水道を介したクリプトスポリジウム感染確率を表 1 に再掲した(厚生科学審議会資料、平成 15 年)。当時は 2-Log 除去で、目標の 10^{-6} DALYs が概ね達成される計算であった(表 1)。3-Log 除去率の感染確率は 1.5×10^{-4} となり、微生物許容感染リスク 10^{-4} /年の目標にも概ね届く計算であった(表 1)。非加熱飲水量や曝露量は仮定に過ぎず、Log 除去率に厳密な数字を求める意味はあまりないが、 10^{-6} DALYs ならびに微生物許容感染リスク 10^{-4} /年から逆算すると、2.2 ないし 3.2-Log が必要との計算であった(表 1、右 2 列)。2 ないし 3-Log の除去率が想定される凝集沈澱ろ過以外にも、汚染のモニタリングや集水域の管理といった対策もあって、実質 2.2 ないし 3.2-Log に達することが期待されたであろう。

新しい感染確率として 10% を仮定して先述と同様に計算した場合、3-Log の除去が徹底されれば 3.8×10^{-6} DALYs となり、(その他の対策を含め 3.6-Log に達すれば)何とか目標が達成できることとなった(表 2A)。ただ微生物許容感染リスク 10^{-4} /年は守れず、これを達成するには逆算で 4.6-Log の除去が必要であった。感染確率に 20% を仮定した場合、目標の 10^{-6} DALYs と微生物許容感染リスク 10^{-4} /年を守るには、それぞれ逆算で 3.9-Log、4.9-Log が必要であった(表 2B)。感染確率の 10% と 20% の違いは少なく、求められる Log 除去率は 0.3-Log 程の増加に留まった。すなわち、感染確率 0.4% から桁違いであったが、10% と 20% の間は大差なかった。

近年は非加熱の水道水の飲用が減っていることから 1L ではなく 200mL を仮定し、併せてクリプトスポリジウム感染の健康影響度を更新してみた(従来 0.00103 から 0.0015 DALYs とし

た)。ちなみに単純計算で浄水処理に必要な処理能力は、飲水量の低下で 0.7-Log 下がり (=Log10(0.2 / 1))、健康影響度が上がることで 0.16-Log 上がる (=Log10(0.0015 / 0.00103))。

具体的には、感染確率が 10% の場合は、3-Log の除去が徹底されれば 1.1×10^{-6} DALYs となり、目標は概ね達成できる計算であった(表 3A)。ただし微生物許容感染リスク 10^{-4} /年は守れず、これを達成するには逆算で 3.9-Log の除去が必要であった。感染確率が 20% の場合、3-Log の除去が徹底されれば 2.2×10^{-6} DALYs となり、(その他の対策を含め 3.3-Log で)目標が達成できる計算であった(表 3A)。微生物許容感染リスク 10^{-4} /年を達成するには、逆算で 4.2-Log の除去が必要であった。

以上の計算により、 10^{-6} DALYs の維持には、従来の 2-Log 除去ではなく、3-Log 以上の徹底が必要であった。微生物許容感染リスク 10^{-4} /年を目標とする場合は、4-Log 以上の除去率が必要であった。総合すると、必要な除去率は 3 ないし 5-Log の範囲にあると計算された。凝集沈殿ろ過による急速ろ過はクリプトスポリジウムを 2 ないし 3-Log の除去が可能とされるが、現状は処理能力の不足が懸念された。加えてシングルバリアでは心もとないので、マルチプルバリアとして紫外線処理や膜処理、当面の対策として二段凝集などが追加の処理として考えられた。本研究で求めた 3 ないし 5-Log の除去率は、患者数から計算した、大規模集団感染を未然に防ぐのに必要な 3 ないし 5-Log とも対応する結果であった²⁷⁾。

D. 結論

D1 貯水槽水道の蛇口のレジオネラ汚染

蛇口のレジオネラ汚染に苦慮していた貯水槽水道の給水栓を対象として、塩素の残留状況が異なる給水栓から初流水を採取し、レジオネラ属と自由生活性アメーバを測定した。レジオネラ属は遊離残留塩素が 0.1 mg/L を越えて残留している給水栓からはすべて不検出となり、井水切り替えに伴う塩素消毒の徹底により、レジオネ

ラ汚染は大きく改善していた。

D2 凝集沈殿-砂ろ過処理を実施している実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性評価

浄水場 A における凝集沈殿-砂ろ過処理によるトウガラシ微斑ウイルスの除去率は、1.3~2.0-Log であり、季節変動は小さかった。室内実験と同程度の除去率であり、実浄水場におけるウイルスの除去率を、室内実験により再現できると示唆された。トウガラシ微斑ウイルスが凝集沈殿-砂ろ過処理により 1.6-Log 除去される浄水場 A においては、各種の水系感染症ウイルスも 1.6-Log 程度除去されると推察された。浄水場における物理的処理(凝集沈殿-砂ろ過処理)によるウイルスの除去率は 2-Log 未満であり、ウイルス対策は後段の塩素処理に大きく依存していることが改めて確認された。

浄水試料を対象として、0.1%SD を併用した CDDP 前処理により、選択的に感染価を有するウイルスを検出する PCR 法が可能であることが分かった。

D3 散発的なクリプトスポリジウム感染を防止するための対策

感染確率を従来の 0.4% ではなく 10 ないし 20% に増加、かつ非加熱飲水量を従来の 1L から 200mL へ減少を仮定した。 10^{-6} DALYs の目標維持には、従来の 2-Log 除去ではなく、3-Log 以上の徹底が必要であった。微生物許容感染リスク 10^{-4} /年の目標には、4-Log 以上が必要であった。総合すると 3 ないし 5-Log の除去率が必要と考えられた。対策としては、2 ないし 3-Log の除去率が期待される凝集沈殿ろ過の急速ろ過によるシングルバリアだけでなく、マルチプルバリアとして紫外線処理や膜処理に、当面の対策として二段凝集の導入、集水域の管理にモニタリングや排水処理の徹底など、水質の維持向上が将来の方向と考えられた。

E. 参考文献

1. 泉山信司、秋葉道宏、松下拓他、「水道水質の評価及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28年度分担研究報告書
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Yamashita, R. (2018). Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a

- surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation-rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Research* 120: 460–469.
14. Mason BW, Chalmers RM, Carnicer-Pont D, Casemore DP. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in North-West Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. *J Water Health*. 2010 Jun;8(2):299-310.
 15. DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med*. 1995 Mar 30;332(13):855-9.
 16. Haas CN, Crockett CS, Rose JB, Gerba CP, Fazil AM. Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *Journal of American Water Works Association* 88(9):131-136,1996.
 17. USEPA. Economic Analysis for the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule. EPA-821-R-06-001 より、Appendix N Infectivity Dose-Response Analysis, December 2005.
 18. USEPA. National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule; Final Rule. Vol.71, No.3, p.662, January 5, 2006.
 19. WHO, Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water より、5. Effect assessment: dose-response relation, pp. 57-67, 2009. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70117>
 20. WHO, Guidelines for drinking-water quality, fourth edition, ISBN 978 92 4 154815 1, 2011, p. 132.
 21. 厚生科学審議会答申「水質基準の見直し等について」より参考資料4(クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策関係部分) .クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策、平成 15 年 4 月 28 日 (<https://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/08/dl/s0804-4b4.pdf>、2018 年 11 月 26 日時点)
 22. 厚生労働省健康局水道課長、水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について (通知)、健水発第 0330005 号(平成 19 年 3 月 30 日)
 23. Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., and Yoshida, S. (1997) Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2489–2494.
 24. 大瀧雅寛、非加熱水量アンケート調査の結果報告、生活工学研究、2002, 4(2), 222-227.
 25. 井上亘、菅野淳一、下水処理場等の排水からのクリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出、病原微生物検出情報月報 (IASR) Vol. 39 p.27-28, 2018
 26. 感染研感染症疫学センター、<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、病原微生物検出情報月報 (IASR) Vol.35 No.8. p.185-186, 2014
 27. 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 27 年度分担研究報告書
- F. 研究発表
誌上発表
1. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Yamashita, R. (2018). Evaluation

- of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation-rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Research* **120**: 460–469.
2. Miura T, Gima A, Akiba M. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food Environ Virol.* 11(1):9-19, 2019.
 3. Tsuchioka H, Izumiyama S, Endo T, Wada T, Harada H, Hashimoto A. Hydroxyapatite powder cake filtration reduces false positives associated with halophilic bacteria when evaluating *Escherichia coli* in seawater using Colilert-18. *J Microbiol Methods.* 2019 Feb 22;159:69-74.
 4. Canh, V.D., Kasuga, I., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Viability RT-qPCR Combined with Sodium Deoxycholate Pre-treatment for Selective Quantification of Infectious Viruses in Drinking Water Samples. *Food Environ. Virol.* 11, 40–51.
 5. 大屋日登美, 鈴木美雪, 政岡智佳, 中嶋直樹, 古川一郎, 前川純子, 倉文明, 泉山信司, 黒木俊郎, 医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態, 感染症誌 92: 678 ~ 685, 2018
- 口頭発表
1. 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2019). PMAxx-Enhancer-PCR 法による水道原水中の感染性ウイルスの選択的定量. 第 53 回日本水環境学会年会, 甲府, 2019/3/7–9.
 2. 松村拓哉, 高力聡史, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2019). トウガラシ微斑ウイルスを挙動指標とした膜ろ過浄水施設におけるウイルスの処理性評価. 第 53 回日本水環境学会年会, 甲府, 2019/3/7–9.
 3. 三浦尚之, 鈴木知美, 儀間ありさ, 越後信哉, 秋葉道宏. 病原ウイルスの表流水中存在形態を考慮した汚染指標に関する検討, 第 53 回日本水環境学会年会講演集, 254, 2019.
 4. 三浦尚之, 儀間ありさ, 荒川直子, 篠原成子, 松村諭, 越後信哉, 原本英司, 秋葉道宏. 地下水における病原ウイルス汚染実態調査に向けた検討, 平成 30 年度水道研究発表会講演集, 770-771, 2018.
 5. 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2018). 培養困難なウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入ウイルス様粒子の創製. 第 26 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2018/11/8–9.
 6. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2018). 浄水処理におけるウイルスの処理性評価と処理技術の高度・高効率化. 外力支援型バイオアッセイ技術コンソーシアム 第 1 回技術セミナー・技術交流会, 東京, 2018/6/8. 招待講演
 7. 山下玲菜, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2018). 実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価: ナノセラム陽電荷膜とタンジェントアルフローUF 膜を併用した大容量濃縮法の適用. 第 52 回日本水環境学会年会, 札幌, 2018/3/15–17.
 8. 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2018). 培養困難な水系感染症ウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入型ウイルス様粒子の創製. 第 52 回日本水環境学会年会, 札幌, 2018/3/15–17.
 9. 岩本和也, 目黒健, 堀場世樹, 宮崎誠生, 泉山信司, 橋本温, 二種の抗クリプトスポリジウムモノクローナル抗体によるオーシスト二重染色の試み, 日本水環境学

- 会年会、2018年3月、北海道札幌市
10. 中野勲、山口裕太郎、泉山信司、橋本温、レジオネラ菌のろ過濃縮に用いるメンブレンフィルターおよびろ過法の評価、日本水環境学会年会、2018年3月、北海道札幌市
 11. 大河内由美子、泉山信司、前川純子、貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況、日本防菌防黴学会、2018年11月、東京都
 12. 浅野峰子、泉山信司、クリプトスポリジウム対策を目的とした浄水場濁度管理への粒子計の活用、日本水道協会平成30年度全国会議（水道研究発表会）、2018年10月、福岡県
 13. 古川紗耶香、山本貢平、赤坂遼平、泉山信司、河川水からのジアルジア（*Giardia microti*）の検出、日本水道協会水道研究発表会、2018年10月、福岡県
 14. 泉山信司、汚染される理由と事例、講演会・シンポジウム「医療機関の給湯・給水系に潜むレジオネラ感染リスク - 実態と予防策 - 」、2018年10月、東京都
 15. 泉山信司、水道における病原性微生物への対策、市民公開講座「安全な水道水をめざして - 水質基準に関する研究の最前線」、2018年5月、東京都
 16. 泉山信司、浅野峰子、クリプトスポリジウム対策を目的とした浄水場濁度管理への粒子計の活用、平成30年3月、東京
- 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