

平成 28～30 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）
研究分担者	春日 郁朗	（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	江原 和宏	（東京都水道局）
研究協力者	今井 美江	（東京都水道局）
研究協力者	中嶋 健二	（浜崎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	（桐田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	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	田部井 由紀子	（東京都健康安全研究センター）
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	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

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。汚染指標となる従属栄養細菌数の応用として、配水池の壁面と蛇口の初流水等を測定した。配水池内部の拭き取りでは、水面下の水道水が触れている部分は菌数が少なく、水面より上の触れていない部分の方が多数であり、残留塩素の有効性を改めて認識した。捨て水をしていない開栓直後の初流水は、残留塩素が消失して従属栄養細菌数が多数検出されるが、医療機関と大学の蛇口がレジオネラ属菌で汚染されている実態が明らかとなった。追加塩素消毒を行い、汚染は改善した。消毒効果を低下させない適切な清掃や、塩素濃度の向上に管理の徹底といった、注意喚起が改めて必要と考えられた。

塩素消毒のみに依存しないため、凝集沈澱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である。指標ウイルスを提案するため、全国の水道事業者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、凝集沈澱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の再現性が確認されたことから、ウイルス指標として有効と考えられた。低いウイルス濃度に対応可能な、ナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法を構築し、100～5,000 Lからの大容量の試料水に対応可能となった。浄水場Aの凝集沈澱-砂ろ過処理によりトウガラシ微斑ウイルスは1.6-Log減少し、室内実験と同程度と再現性が得られた。通年の評価でも1.3～2.0-Logと、季節的な変動は小さかった。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。塩素消毒では、トウガラシ微斑ウイルスが見かけ上0.2-Log（PCR法評価）減少し、実質、水系感染症ウイルスの4.7-Log以上の不活化（例えばPFU法評価）に相当した。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、ウイルス対策は塩素消毒に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。現在のクリプトスポリジウム対策は、2ないし3-Logの除去（99～99.9%の除去）が可能とされる、濁度0.1度以下を維持するろ過（急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等）が求められている。結果として障害調整生存年数 $10^{-6}$  DALYsあるいは微生物許容感染リスク $10^{-4}$ /年の目標が達成され、感染リスクは無視できる程度しかないと考えられてきた。ところが感染しやすい種と株が存在し、かつて感染確率は1個で0.4%程度の想定だったが、今ではUSEPAで1個が10%程度の感染確率、WHOが20%と計算の前提が桁違いに変化していた。リスクを再計算した結果、障害調整生存年数 $10^{-6}$  DALYsの目標維持には、従来の2-Log除去ではなく、3-Log以上の除去が必要であった。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、2～3-Log除去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。実際問題として、相模川ではクリプトス

ポリジウム汚染が継続して検出されていた。塩基配列はブタ由来の遺伝子型が多く検出され、幸いヒトに直ちに影響する恐れは低かったが、いつかヒトに感染する型に変化することが恐れられた。畜産排水の汚染を低減する方法として、アンモニアの存在下でアルカリ性にする簡便な処理方法を提案した。濁度 0.1 度の対策に否定的な意見が聞かれることがあり、現状を確認した。水道水質データベースによれば、浄水場出口の濁度で 0.1 度の超過がわずかに認められたが、9 割以上は目標を達成できており、問題のある系統を丁寧に対応すべきと考えられた。高感度粒子計を用いたリアルタイムな処理工程の把握と、後 PAC を用いたいわゆる二段凝集を用いる浄水場を検討したところ、清明な浄水の供給が達成されていた。二段凝集と高感度粒子計の活用は、他の浄水場にも提案できる方法と考えられた。

## 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 配水池と蛇口の細菌汚染への対応

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。自由生活性アメーバには角膜炎で問題となる *Acanthamoeba* や致命的な脳炎で問題となる *Naegleria fowleri* があり、汚染は極力抑えることが求められる。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<sup>1-2)</sup>。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。

個々の病原体を測定するには種類が多くて限度があり、従属栄養細菌数は汚染の程度を簡易に評価する指標となる。その応用として、本研究では配水池壁面の従属栄養細菌数を測定した。工事関係者の協力を得て、配水池の清掃に立ち会うことができた。当該の配水池はいずれも簡易水道の管理下にあったが、近年に上水道に統

合されたものであった。中山間地域に設置されて数十年が経過し、今回が初めての清掃とのことであった。

国内では、2018 年(平成 30 年)のレジオネラ患者の届出数が 2,000 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、対策を検討している。海外では、水道水質の低下によりレジオネラ集団感染が報告されている<sup>3)</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>4)</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り、指針等の修正や注意喚起が必要と考えられた<sup>5)</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。しかし現状の配管は、洗浄が考慮されていないかもしれない<sup>6)</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、放水や洗浄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。以前から蛇口のレジオネラ属菌汚染に苦慮していた大学の貯水槽水道では、井水への切替えに伴う追加塩素消毒により、遊離塩素濃度とレジオネラ汚染が改善した例を見た。

#### A2 凝集沈澱ろ過によるウイルスの除去性

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>7)</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>8-11)</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>12,13)</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<sup>14)</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>15-17)</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>15,16)</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<sup>18)</sup>。

そこで、本研究では、大容量の試料水から

トウガラシ微斑ウイルスを効果的に濃縮・回収可能なウイルス濃縮法を構築し、これを水道原水及び浄水処理水に適用することにより、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ことを目的とした。具体的には、ナノセラム陽電荷膜とタンジェントルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法を構築し、大容量の試料水からのトウガラシ微斑ウイルスの濃縮・回収への有効性を評価した。浄水場の協力を得て、実際の原水及び処理工程水中のトウガラシ微斑ウイルスを測定し、実浄水場の凝集沈澱ろ過によるウイルスの除去性を推察した。

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、水道を介して集団感染が生じて問題となる。国内では越生町での集団感染が発生したが、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、対策が必要であることに未だ変わりがない<sup>19,20)</sup>。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<sup>21)</sup>。

現在のクリプトスポリジウム対策は、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度以下とするろ過（急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等）が求められている<sup>22)</sup>。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、凝集沈澱ろ過による2-Log(99%)の除去率で、概ね10<sup>-6</sup>DALYsの目

標を達成できると想定されていた<sup>23)</sup>。3-Log (99.9%)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。結果として目標が達成され、感染リスクは無視できる程度しかないと考えられてきた。

ところが感染しやすい種と株が存在し、計算の前提が狂った。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<sup>24, 25)</sup>。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<sup>26, 27)</sup>、WHO(世界保健機関)が20%と計算の前提が更新され<sup>28, 29)</sup>、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障害調整生存年数 $10^{-6}$ DALYs、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。

1個/10Lの原水汚染を仮定したが、国内の汚染実態にはあまり注意が払われていなかったかもしれない。そこで原虫類の検出事例の多い相模川に着目し、汚染実態と対策について検討した。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>30, 31)</sup>。糞尿を含む豚舎から排出される畜産汚水の上澄を貯留すると、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ることとした。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>32)</sup>。

現在のクリプトスポリジウム対策である濁度0.1度に、否定的な意見が聞かれることがある。0.1度を達成できない、難しい、といったことが理由にあるのかもしれない。現状の濁度の確認と、対策として二段凝集と高感度粒子計の活用について、検討した。

## B. 研究方法

### B1 配水池と蛇口の細菌汚染への対応

配水池は中山間地に位置する小規模なもので(図1D)以下の仕様であった。

- ・設置年度...昭和48年
- ・容量...48t
- ・流入水...県水道用水供給事業からの受水および深井戸による自己水源
- ・次亜添加装置...無
- ・配水ポンプ...水中型
- ・清掃の有無...記録なし
- ・調査日の残留塩素...0.18 mg/L

配水池の内壁面およそ2cm四方を、市販の拭き取り検査キット(BDラスパーチェックふき取り検査用スワブ)にて拭き取りした。拭き取り検査キットに含まれるりん酸緩衝生理食塩水10mLに、滅菌済み1% Tween 80を20 $\mu$ L添加し、一分ほどよく懸濁した後の1mLを培養した。必要により試料を希釈した。

レジオネラに関しては、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、水道事業体の塩素濃度の調整、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。蛇口水、受水槽水等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。温度は採取時に、pH は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(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、各種理化学項目を定法により測定した。*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 *Lmip* (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene)のプライマーを用いた PCR により *Legionella* 属菌と *L. pneumophila* であることを決定した<sup>33, 34)</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。

上述の医療機関とは別に行った、大学構内の蛇口におけるレジオネラ測定は、初流水約 4 L を採水して定法に従い検査した。2017(H29)年度末に大学内の複数の建物において、水道事業体からの受水から、ほとんどを自己水源の井水でまかなう水供給システムへ切り替えがあり、影響が大きかった。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  $\mu$ m) 次亜塩素酸ナトリウム注入であった。切り替え後は、遊離塩素が微量( $\sim$ 0.2 mg/L)に残留している給水栓を重点的に調査した。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 メンブランフィルター(孔径 0.2  $\mu$ m, 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、GVPC 培地を用いて 37  $^{\circ}$ C で 7 $\sim$ 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<sup>35)</sup>。

## B2 凝集沈澱ろ過によるウイルスの除去性

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、

大腸菌ファージ MS2 を使用した。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*、大腸菌を用いて培養し、ウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法により定量した。

トウガラシ微斑ウイルスを  $10^3$  lesions/mL、他の精製したウイルスを  $10^{2-3}$  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  $\text{cm}^{-1}$ ) を実験原水とし、角型ピーカーに 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,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ : 10.1%,  $\text{SO}_4$ : 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  $200 \text{ s}^{-1}$  (197 rpm) にて 1 分間急速攪拌、G 値  $20 \text{ s}^{-1}$  (42 rpm) にて 10 分間緩速攪拌した後、60 分間静置した。静置後の上澄水を、凝集沈澱直後の試料としてウイルス濃度を測定した。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 分後のろ過水を、凝集沈澱-砂ろ過処理後の試料としてウイルス濃度を測定した。

大容量試料水に適用可能なウイルス濃縮法として、ナノセラム陽電荷膜を用いたウイルス濃縮法を検討した。まず、ウイルスの添加回収試験を行った (トウガラシ微斑ウイルスを  $10^{7-10}$  copies/mL になるように添加)。試料水には、浄水処理工程水 40 L (浄水場 A における原水, 沈澱水, 砂ろ過水, 浄水) あるいは

水道水 100~5,000 L を用いた。残留塩素は、チオ硫酸ナトリウムの添加により中和した。4~7 L/min の初期流束にて専用ハウジングに収容されたナノセラム陽電荷膜 (膜孔径: 2  $\mu\text{m}$ ) を用いて、試料水をろ過した。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 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 回繰り返し、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、水系感染症ウイルスとタンパク質を凝集した。これを  $2,500 \times g$  にて 15 分間遠心分離することにより、トウガラシ微斑ウイルスを含む上澄水と水系感染症ウイルスを含む凝集フロックを分離した。上澄水は、タンジェントフロー UF 膜 (分画分子量: 300 kDa) を用いて 20 mL まで濃縮した (二次濃縮 [上澄み])。一方、凝集フロックは、pH 9 の 0.15 M リン酸バッファーを添加し、160 rpm 10 分間の振とうにより再溶解した。次いで、 $4,000 \times g$  10 分間の遠心分離で回収した上清の pH を HCl にて 7.0 に調整することで、トウガラシ微斑ウイルスの画分を 20 mL まで精製・濃縮した (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] をメンブレンフィルター (膜孔径: 0.45  $\mu\text{m}$ ) にてろ過した後に、核酸を抽出した。PCR 阻害の評価を目的に、二次濃縮後の試料に人工的にマウスノロウイルス及び MS2 を添加し、滅菌蒸留水に添加した場合と比較した。

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いてウイルス試料から DNA, あるいは RNA を抽出し、RNA については 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。抽出した DNA、あるいは合成した cDNA、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems)、Distilled water、各種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）を混合し、リアルタイム定量 PCR 装置（Applied Biosystems 7,300, Applied Biosystems）を用いてウイルス濃度を定量した。ウイルスの Log 除去率は、 $\text{Log}[C_0/C]$ （ $C_0$ : 処理前のウイルス濃度,  $C$ : 処理後のウイルス濃度）として算出した。

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におけるトウガラシ微斑ウイルスの濃度を定量した。ウイルス濃縮には当該研究で開発した、ナノセラム陽電荷膜を用いた方法を使用した。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 の初期流束にてナノセラム陽電荷膜（膜孔径: 2  $\mu\text{m}$ ）に通水した。2017 年 10 月、11 月、12 月、2018 年 5 月、7 月、11 月に採水した。

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<sup>23-25</sup>。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<sup>26, 27</sup>。WHO は 20% とした<sup>28, 29</sup>。飲水量は、従来の非加熱飲水量は 1L とされたが<sup>23</sup>、実際はずっと少ないとされ、200mL での計算を加えた<sup>37</sup>。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<sup>23, 28, 29</sup>。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。背景としては、相模川水系ではブタ型が多かった一方で<sup>37</sup>、関西方面では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<sup>38</sup>。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<sup>39</sup>。感染確率の計算には、Excel (Microsoft) を使用した。

相模川水系におけるクリプトスポリジウム調査は、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・ジアルジア専用シーケン



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。畜産汚水(神奈川県畜産技術センター協力)に洗浄操作を加えることで、条件の均一化を図った。その後、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、 $700 \pm 400$  mg/L 程度との報告を参考にした<sup>40)</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 日後には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。

水道水の濁度の分布は、日本水道協会の水道水質データベースを参照した(<http://www.jwwa.or.jp/mizu/list.html>)。各浄水場の系統ごとに集計された PDF から、濁度を抜粋して再掲した。結果の重複を避けるため、水道用水供給事業ではない、上水道事業の結果を参照した。分布の母集団が、濁度 0.1 度を守るレベル 4 施設の割合が高くなるように、原水の種別を表流水とダム湖沼に絞り、地下水他は含めなかった。配水途中の汚れによる影響を除外するため、ここでは浄水場出口の分布を確認し、給水栓水の測定値は参照しなかった。

## C. 研究結果および考察

### C1 配水池と蛇口の細菌汚染への対応

設置されてから数十年が経過する配水池の内壁面が茶色の膜で覆われて、層状になっていた(図 1A、B)。清掃の方法に関して、ただ単に中の水を入れ替えたり、沈殿物を除去するだけではなく、可能な限り内壁面の膜を除去する方が望ましいと言えた。水位面での程度検出に差が生じるか、拭き取りによる従属栄養細菌数の測定を試みた。上部の内壁面

は膜が存在せず、拭き取りをしても見た目は綿棒そのものの状態であった。水面下の膜部分の方が、検出数が多いと予測していたが、結果はまったくの逆で、綿棒の着色のなかった上部(図 1C の 、 、 )の方が顕著に多かった。茶色の着色があった(膜が綿棒に付着した)方が検出が少なく(図 1C の 2、3、6、8、9) これは残留塩素の有効性によるものと考えられた。内壁面の東西南北で拭き取りを実施し、他の内壁面についても同様の傾向が見られた。 と の違いは、水に触れているか否かの差である。たとえ膜が存在し、汚れているように見えていても、残留塩素が有効な範囲では細菌に対する相当の抑止が作用し、一方の水面境界より上部は塩素の効果が及ばず、湿気は確保され、細菌にとって生育しやすい環境であったと考えられた。細菌を抑えるには、十分な塩素濃度とし、配水池を満水に近い水位とし、そして水位を安易に変動させるべきではないと示唆された。検出数の多かった境界より上部(上図の 、 、 )から検出された従属栄養細菌数は、数日で 1,000 CFU/cm<sup>2</sup> を超えたため、百倍希釈、千倍希釈にて追加検査を実施した。結果、いずれの希釈倍率においても二週間後に 1,000 を超えて、 $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> を超過した(図では都合により >1,000 と表記している)。指針やガイドラインでは、具体的な清掃の手段や方法、清掃間隔を示していたが、これらは目標であり、必要性について言及しているに留まった。また、実施率は全配水池容量に対する割合であるため、小規模配水池ほど優先順位が低くなってしまふことが懸念された。

蛇口のレジオネラ汚染を見出した 3 医療機関と、比較対象の 1 研究機関の給水系・給湯系の状況を表 1 に示した。3 医療機関の給水系からレジオネラ属菌が検出された一方で、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(表 2)。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。医療機関 C は自己水源を持ち、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。3 医療機関の受水槽の容量は 180~290m<sup>3</sup> あった。医療機関 A は残塩の不足が問題であったことから、受水槽への次亜塩素酸ナトリウムの添加を 2016 年 12 月 14 日に開始した。受水槽での遊離残留塩素濃度は、添加前が 0.1 ないし 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 2)。以前は蛇口でかるうじて 0.1mg/L と不足気味であったが、追加塩素消毒の開始後は 5 水試料の遊離残留塩素濃度は 0.1~0.4mg/L(平均 0.25mg/L)と、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。レジオネラ検査は、塩素濃度が安定して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。表では塩素添加直前が不検出もあって必ずしも因果関係が明確ではないが、検出頻度が低減し、状態は改善する方向と言えた。意図して使用頻度の少ない蛇口を検査すると、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、捨て水や洗浄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。

蛇口のレジオネラ汚染を見出した大学では、自己水源の井水に切り替えに伴う塩素消毒により、大きな改善を見た。遊離残留塩素濃度とレジオネラ濃度の関係を、井水切り替え前後の結果を合わせて図 3 に示した。井水切り替え後の試料は、遊離残留塩素濃度が不検出~0.65 mg/L に分布し、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こと、対照的であった。井水切り替えに伴う塩素消毒の徹底が、レジオネラ減少に効果的と考えられた。

#### C2 凝集沈澱ろ過によるウイルスの除去性

凝集沈澱-砂ろ過処理におけるウイルスの除去率を図 4 に示した。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、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同程度であり、高い相関があることを確認した。すなわちトウガラシ微斑ウイルスは、他のウイルスと同程度に除去され、水系感染症ウイルスの処理性を評価する上で有効なウイルス指標であった。トウガラシ微斑ウイルスは、水環境中に他の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>15-17)</sup>、大容量の濃縮を実施しない場合であっても検出/定量できる可能性が高く、他のウイルスに比べて指標として有利と考えられた。

大容量の試料水からウイルスを濃縮するため、ナノセラム陽電荷膜を用いたウイルス濃縮法を検討した。当初はビーフエキスの凝集フロックをウイルス濃度の定量対象としたが、トウガラシ微斑ウイルス(及び MS2)は、水系感染症ウイルスやマウスノロウイルスと異なり、上澄みに残留することが判明した(図 5)。トウガラシ微斑ウイルスの定量には凝集

後の上澄みを対象とし、タンジェンタルフロ－UF 膜を用いて更に濃縮する手法を構築した。

トウガラシ微斑ウイルスを添加した試料水から、回収率を評価した(図6)。浄水処理工程水 40 L、並びに脱塩素水道水 100 L を濃縮した場合は、93%以上と高い回収率が得られた。試料水間の回収率に大きな差異も見られなかった。水道水 1,000 L 及び 5,000 L を濃縮した場合は、容量の増加に伴って回収率が低下したものの、50%以上の回収率を維持した。本研究で構築したウイルス濃縮法は、大容量の試料水からトウガラシ微斑ウイルスの濃縮が可能であり、応用が期待された。二次濃縮[フロック]の試料でPCR阻害が生じたが、トウガラシ微斑ウイルスが濃縮される二次濃縮[上澄み]にPCR阻害が生じなかったことも有利と考えられた(図7)。

浄水場 A において本濃縮法を適用し、原水、沈澱水、ろ過水、塩素処理後のトウガラシ微斑ウイルスを測定した(図8)。季節的な濃度変動は小さく、除去率は 1.3 ~ 2.0-Log (平均 1.6-Log) であった。細かく見ると、凝集沈澱単独で平均 1.2-Log の除去率であった(図9)。凝集沈澱と砂ろ過の間に、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)。一方、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 ( $P > 0.05$ )。

浄水場 A において得られた除去率は、前述の凝集沈澱-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)と同程度であった(図4)。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。

塩素処理によるトウガラシ微斑ウイルスの減少率は 0.2-Log (PCR 法評価) であった。この時の浄水場 A における塩素処理の CT 値(塩素濃度と接触時間の積)は約 20 mg-Cl<sub>2</sub> · min/L であった。塩素処理の室内実験において、トウガラシ微斑ウイルスの濃度が 0.2-Log 減少(PCR 法評価)するのに必要な CT 値の 25 mg-Cl<sub>2</sub> · min/L<sup>41)</sup>と概ね一致した。CT 値 25 の塩素消毒は、比較的高い塩素耐性を有するコクサッキーウイルスで、4.7-Log 以上の不活化(PFU 法評価)に相当することが分かっている<sup>41)</sup>。以上を総合すると、水系感染症ウイルスは、浄水場 A の凝集沈澱-砂ろ過処理により物理的に 1.6-Log 除去され、消毒により 4.7-Log 以上が不活化され、合計で 6.3-Log 以上の処理性があつたと推察された。

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(= Log<sub>10</sub>(10 / 0.4)、あるいは = Log<sub>10</sub>(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 4 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 4)。3-Log 除去率の感染確率は  $1.5 \times 10^{-4}$  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 4)。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殿ろ過以外にも、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  $3.8 \times 10^{-6}$  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 5)。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。表には示さないが、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。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%からは桁違いであったが、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 0.0015DALYs 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))。感染確率が 10%の場合は、3-Log の除去が徹底されれば  $1.1 \times 10^{-6}$  DALYs となり、目標は概ね

達成できる計算であった(表 6)。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。表には示さないが、感染確率が 20%の場合、3-Log の除去が徹底されれば  $2.2 \times 10^{-6}$  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。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の追加、当面の対策として後述の二段凝集や排出源の対策などが考えられた。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<sup>37)</sup>。

1 個/10L の原水汚染を仮定したが、国内の汚染実態にはあまり注意が払われていなかったかもしれない。国内ではクリプト検出の報告が少なく、汚染が少ないと思われているのかもしれないが、相模川水系では断続的にクリプトが検出され、PCR 法と検鏡法の結果に相関性もあり(図 10、相関係数(r)は 0.62)、真に汚染されていると考えられた。陽性 18 検体の塩基配列は、社家は 83% (10/12 検体)、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* が検出された。支流の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ず、

環境中に排出される場合がある<sup>30,31)</sup>。いつかヒトに感染する型に変化することが恐れられるところであった。

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、アルカリと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(図 11)。豚舎から排出される畜産汚水の上澄を貯留すると、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おり、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>32)</sup>。アルカリ性かつアンモニウムイオン存在下で、rRNA 量及びクリプト数は激減した(図 12、条件 6)。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>32)</sup>。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。なお、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、オーシスト壁が最後まで残った。畜産の現場において石灰を畜舎に使用することがあり、排水は高 pH になり、臭気に配慮しつつ貯留できれば、クリプトスポリジウム等を簡易に対策できると期待された。

濁度 0.1 度の対策に否定的な意見が聞かれることがあり、浄水場における濁度の分布を確認した(表 7、図 13)。ろ過池出口の濁度の統計はないので、浄水場出口の濁度で代用した。平均値の分布で 0.1 度を超えたのはわずか 1 系統(各浄水場系統ごとの集計結果)であり、99.8%(=610/611 系統)は 0.1 度以下で管理されていた。最高値の分布では、24 系統(3.9%、24/611)に超過があり、大部分の 96.1%(587/611)は 0.1 度以下であった。この 24 系統が、濁度 0.1 度の維持に苦慮している施設と考えられた。この 24 系統の困難さを理由に、0.1 度の管理を止めようとするのは、日本の水道水質にとって損失と考えられた。クリプトスポリジウム問題が生じてから

は、水道水は相当に綺麗になったと聞く(私信、神奈川県内広域水道企業団)。配水系の配管の汚れにならないように、浄水場では可能な限り、濁質を除くことが望ましい。凝集沈殿ろ過を適切に管理し、凝集剤の再凝集が生じさせないことも求められる。水道事業にとって埋設された長大な水道配管は財産であり、浄水処理に係る費用は多くなく、管路の財産を毀損しないための管理と努力は重要と考えられた。濁度 0.1 度を守ることで、国内では 1996 年以来、大きな集団感染を起こしていない実績がある。

病原体の検査には相当の時間と費用と熟練を要し、結果が出た時には、すでに水道水は配水、消費されている。濁度の目標は、今なお大事な管理指標であることに変わりがない。浄水処理工程をリアルタイムに監視、管理するには、濁度や粒子数の測定が適していると考えられた。パイロットプラント及び実プラントでの、凝集剤に硫酸バンドを用いた処理実験によると、浄水中のクリプトスポリジウムの存在量と最も相関が高かった指標は、粒子計による 4~7 $\mu\text{m}$  の粒子の濃度であり、濁度はこれに次ぐ相関があると報告されている<sup>42)</sup>。

濁度と粒子数による運転管理はすでに多くの浄水場で行われているが、あまり注意が払われておらず、活用方法を共有する意義がある。一例として横浜市小雀浄水場の場合、透過散乱型濁度計を導入し、ろ過水濁度が制御値を守っているかだけでなく、前方散乱/光遮断微粒子カウント方式の粒子計でリアルタイムに粒子数の動きを監視している。ろ過水濁度は概ね 0.03 以下、通常は 0.00 であり、処理の悪化をより早期に見つける方法として、粒子計が活用されている。粒子数が増加傾向になると、ろ過濁度上昇時の対応と同様に、処理としては前 PAC 増量(通常の凝集沈殿処理におけるポリ塩化アルミニウムの増量)後 PAC 注入(いわゆる二段凝集)と砂ろ過、原因によっては前塩素消毒の強化等々を行う

(図14) 粒子数が10個/mLを超えた場合、凝集沈殿後の処理水にPACを添加(後PAC)し、10個未満となるように制御する(表8)。しかし、そのまま後PACを継続するとろ過池への負荷が懸念されるため、迅速に適正注入率を求め、前PACを増量して沈殿処理を強化する。そして後PACの添加を停止し、ろ過池への負荷を避ける。後PACを停止できない状況となると、ろ過水を検鏡するなど、原因を調査する。多くの場合、原水中に生物が多くなっており、前塩素強化や、前PACを増量し、後PACを停止できるか検討する。凝集沈殿前のpHを若干下げて、凝集効率を高めることもある。平成29年4月の時点で2 $\mu$ m以上の粒子数はろ過水(1池)で3個/mL程度を表示し、濁度0.00度の良好な処理を維持できている。

結果が出るのが早ければ早いほど浄水処理へ直ちに反映できるので、浄水場としては大変助かっている。クリプトスポリジウム指針でも浄水処理の強化はうたわれているので、どこの事業体も同様な対応をしていると思われるが、今まで情報が共有されたことがなかった。粒子数の測定と二段凝集は、膜ろ過や紫外線処理が導入されるまでのつなぎとして提案できると考えられた。

#### D. 結論

##### D1 配水池と蛇口の細菌汚染への対応

汚染指標となる従属栄養細菌数の応用として、配水池の壁面と蛇口の初流水等を測定した。配水池内部の拭き取りでは、水面下の水道水が触れている部分は少なく、水面より上の触れていない部分の方が多数であり、残留塩素の有効性を改めて認識した。医療機関と大学の蛇口がレジオネラ属菌で汚染されている実態が明らかとなったが、追加塩素消毒を行い、汚染は改善した。消毒効果を低下させない適切な清掃や、塩素濃度の向上に管理の徹底といった、注意喚起が改めて必要と考えられた。

##### D2 凝集沈殿ろ過によるウイルスの除去性

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。各種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の再現性が確認され、ウイルス指標として有効と考えられた。低いウイルス濃度に対応可能な、ナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法を構築し、100~5,000Lからの大容量の試料水に対応可能となった。浄水場Aにおいて、トウガラシ微斑ウイルスは、凝集沈殿-砂ろ過処理により1.6-Log減少し、室内実験と同程度であり、再現性が得られた。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。塩素消毒では、トウガラシ微斑ウイルスが見かけ上0.2-Log(PCR法評価)減少し、実質、水系感染症ウイルスの4.7-Log以上の不活化(例えばPFU法評価)に相当した。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、ウイルス対策は塩素消毒に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<sup>-6</sup>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<sup>-4</sup>/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。実際問題として、相模川ではクリプトスポリジウム汚染が継続して検出されていた。塩基配列はブタ由来の遺伝子型が多く検出され、いつかヒトに感染する型に変化することが恐れられた。畜産排水の汚染を低減する方法として、アンモニアの存在下でアルカリ性にする簡便な処理方法を提案した。二段凝集と高感度粒子計を用いた、濁度管理の徹底を提案した。

#### E. 参考文献

1. 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
2. Cope JR, Ratard RC, Hill VR, Sokol T, Causey JJ, Yoder JS, Mirani G, Mull B, Mukerjee KA, Narayanan J, Doucet M, Qvarnstrom Y, Poole CN, Akingbola OA, Ritter JM, Xiong Z, da Silva AJ, Roellig D, Van Dyke RB, Stern H, Xiao L, Beach MJ. The first association of a primary amebic meningoencephalitis death with culturable *Naegleria fowleri* in tap water from a US treated public drinking water system. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15;60(8):e36-42.
3. Zahran S, McElmurry SP, Kilgore PE, Mushinski D, Press J, Love NG, Sadler RC, Swanson MS. Assessment of the Legionnaires' disease outbreak in Flint, Michigan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 20;115(8):E1730-E1739.
4. 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.
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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)
  20. 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. doi: 10.3201/eid2004.121415.
  21. 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.
  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. 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)
  24. 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.
  25. 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.
26. 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.
  27. 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.
  28. 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>
  29. WHO, Guidelines for drinking-water quality, fourth edition, ISBN 978 92 4 154815 1, 2011, p. 132.
  30. 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)
  31. 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)
  32. 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)
  33. 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.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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
  38. 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
  39. 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
  40. 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)
  41. 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講演集: 622.
  42. Nieminski E.C.Nieminski, Ongerth J.E.(1995) ; Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration,

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. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. Kuroki T, Watanabe Y, Teranishi H, Izumiyama S, Amemura-Maekawa J, Kura F. Legionella prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. *Epidemiol Infect.* 2017 May;145(7):1398-1408.
11. 橋本温、土岡宏彰、泉山信司、中野勲、遠藤卓郎、最確数法を用いた簡便なクリプトスポリジウム計数法の開発、環境技術、46 巻 (2017) 11 号 p. 601-608
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
13. Asami, T., Katayama, H., Torrey, J. R., Visvanathan, C. and Furumai, H., 2016. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation-sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. *Water Res.* 101, 84–94.
  14. 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.
  15. Canh, V.D., Kasuga, I., Furumai, H., Katayama, H., 2018. Impact of various humic acids on EMA-RT-qPCR to selectively detect intact viruses in drinking water. *J. Water Environ. Technol.* 16, 83–93.
  16. Kato, R., Asami, T., Utagawa, E., Furumai, H., Katayama, H., 2018. Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan. *Water Res.* 132, 61–70.
- 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. 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.
  4. 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
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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処理性の比較. 第 25 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2017/11/9–10.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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)
11. 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.
  12. 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)
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 泉山信司, 従属栄養細菌数の活用・途中配管や末端蛇口の汚染実態, 東京大学水環境制御研究センター (RECWET) ワークショップ「水道給配水系における細菌管理の課題と最新の動向」, 平成 29 年 11 月, 東京
  24. 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
  25. 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
  26. 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
27. 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
28. 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
29. 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