

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道水及び原水における化学物質等の実態を踏まえた水質管理の向上に資する研究」
令和4年度分担研究報告書

微生物（細菌・寄生虫）に関する研究

研究分担者	増田貴則	国立保健医療科学院生活環境研究部
	島崎 大	国立保健医療科学院生活環境研究部
	浅田安廣	国立保健医療科学院生活環境研究部
	泉山信司	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	大河内由美子	麻布大学生命環境科学部
	中西智宏	京都大学大学院工学研究科
	鎌田智子	神奈川県内広域水道企業団浄水部
	北沢 和	川崎市上下水道局
	古川紗耶香	青森市企業局水道部
	安原雄作	九十九里地域水道企業団浄水課
	橋本 温	県立広島大学生命環境学部
	黒木俊郎	岡山理科大学獣医学科
	井上 亘	神戸大学大学院農学研究科
	武藤千恵子	東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
	梅津萌子	東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
	瀧野博之	国立保健医療科学院生活環境研究部
	小久保敦啓	(株)江東微生物研究所
	小澤克行	(一財)千葉県薬剤師会検査センター

研究要旨

水道システムの細菌汚染問題、特にレジオネラ汚染とその指標性の検討として取り上げられた従属栄養細菌に関する調査を行った。まず、全国21浄水場の原水、ろ過水、浄水について、一般細菌数と従属栄養細菌数の調査を行った。ろ過水、浄水では一般細菌数と従属栄養細菌数との間に相関関係が弱いことから、従属栄養細菌数による細菌類再増殖の影響を受けていると考えられ、水質管理目標値設定には細菌類再増殖を考慮した上で検証する必要があることが示された。続いて、レジオネラ属菌の安定した再増殖試験を実施できるように、自由生活性アメーバ（FLA）とレジオネラ属菌を共培養による再増殖試験に用いる植種液調製方法を検討したが、抗生物質添加によるFLA細胞内へのレジオネラの取り込みの改善は見られなかった。最後にレジオネラ汚染された実際の給水システムにおいて、滞留時間がレジオネラ再増殖やその関連微生物（FLAや細菌群集）に与える影響を評価した結果、一度汚染された給水システムでのレジオネラ属菌制御の困難さを示した一方で、給水栓での滞留条件によってはレジオネラ属菌の宿主FLAや細菌群集組成が変化し、レジオネラ属菌再増殖に影響を及ぼしている可能性も示された。

水道におけるクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の検査は、水道原水10L中のわずかに1つを顕微鏡で検出する容易ではない検査が行われていることから、疑われる粒子が見つかっていてもクリプトスポリジウム等との判定が行われない偽陰性の可能性も否定できない。ある河川水において、冬季に蛍光抗体で染色された粒子が多数認められた。その粒子は完全な状態ではなく壊れたものが多かったため、クリプトスポリジウムとの判断は保留された。逆転写RT-PCRからNested-PCRを経て、プタで報告のある*Cryptosporidium suis*の配列が得られた。疑われる粒子の最終判断については他機関への相談や検査の有効性が確認された。

A. 研究目的

水道水の微生物学的安全性の持続的な確保を目指すため、水道水源ならびに水道システムでの微生物汚染問題、特に細菌、寄生虫による汚染に着目し、関連する文献調査ならびに実態調査を行った。以下に研究課題ごとの具体的な研究の目的・概要を示す。

1. レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性に関する検討

本研究では細菌汚染として従属栄養細菌、そして再増殖可能な病原細菌としてレジオネラ属菌に着目し、水質管理目標設定項目である従属栄養細菌数の暫定目標値 (2,000 CFU/mL) の再検討に向けて、水道システムでの従属栄養細菌数に関するデータ蓄積、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌自体の指標性評価、制御方法に関する検討を行った。

具体的には従属栄養細菌数ならびに水道水質基準項目である一般細菌数について、全国 21 浄水場での実態を調査した。

続いて、室内実験でレジオネラ属菌の安定した再増殖試験を実施できるように、自由生活性アメーバ(Free-living amoeba; FLA)とレジオネラ属菌を共培養による再増殖試験に用いる植種液調製方法を検討した。

最後にレジオネラ属菌に汚染された実際の給水システムにおいて、滞留時間がレジオネラ再増殖やその関連微生物 (FLA や細菌群集) に与える影響を評価した。

2. 耐塩素性病原微生物の高濃度検出事例

非血性の水様下痢を呈するクリプトスポリジウム症とジアルジア症は、糞便中に排出されたオーシストとシストの経口摂取により糞口感染する。いずれも塩素消毒に抵抗性があることから、水道水を介した感染が生じて問題となる。国内では、クリプトスポリジウムによる集団感染が町水道と貯水槽水道、ジアルジアは貯水槽水道において発生している^{1,2)}。海外でもクリプトスポリジウムやジアルジアの水系集団感染が様々に報告され、場所によらず、あらゆる地域で問題になり得る³⁻⁶⁾。これら耐塩素性病原微生物は、低濃度でも患者が発生し数値基準になじまないことから水質基準には設定されていないが、水質管理の一環として水道原水の検査が定期的に行われている⁷⁾。

水道クリプトスポリジウム等検査法の検出下限は 1 個/10L と低濃度な一方で、糞便からは 10⁷/g といった高濃度な排出がある⁸⁾。本報告にあるような高濃度な汚染の瞬間を捉えるのがリスクの低減に有効だとしても、実際の検査は負担が大きくなり年に数回の低頻度しかない⁷⁾。検査の負担を低減するには、検査水量を 1L に減らして、代わりに検査頻度を増やすといった提案が、将来の検討課題として考えられる。

クリプトスポリジウムの検出方法は顕微鏡検査を基本として、遺伝子検査も可能となっている⁷⁾。単に蛍光抗体でアップルグリーンに染色された粒子をクリプトスポリジウムと判断するのは偽陽性になるので、DAPI 染色像や微分干渉像を含めて総合的に観察する必要があり、判断の難しいことが時々生じる。追加の採水と検査を実施することで、結果の再現性を得ることはできるが、クリプトスポリジウムの真偽の判定に至らない可能性もある。これを補うには、同一標本を熟練者が観察することで、不慣れによる判断の難しさを避けることができ(クロスチェック)⁹⁾、さらに別の原理である遺伝子検査を行えば、増幅の有無や塩基配列といった質の違う情報が得られ、顕微鏡検査を補える可能性がある。

水道原水として使われるある河川水において、クリプトスポリジウムが検出されたが、その粒子は完全な状態ではなく壊れたものが多かったこと、数が 100 ないし 1,000 個/10L とあまりに多かったことから、当初はクリプトスポリジウムとの判断が保留された。他機関への相談が行われて、遺伝子検査を追加することにより、クリプトスポリジウム検出の最終判断に至ることができた。本事例が今後の検査の参考となることを期待して、経緯を報告する。

なお、ヒトに感染するクリプトスポリジウムの種類は、*Cryptosporidium hominis* (ヒト型、あるいは *C. parvum* Genotype I)、*C. parvum* (ウシ型、あるいは *C. parvum* Genotype II) が多いことがよく知られている¹⁰⁾。免疫機能の低下した場合等に、*C. suis* (ブタ型) 等の、稀なクリプトスポリジウムのヒト感染があることも知られている¹⁰⁾。ブタも *C. parvum* 等の他の種類に感染することはあり、*C. hominis* の実験感染モデルとして用いられたりもする¹¹⁾。

B. 研究方法

1. レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性に関する検討

1.1. 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価

全国 21 浄水場を対象とし、各浄水場の原水、ろ過水、浄水について一般細菌数と従属栄養細菌数の調査を 2 回(2022 年 10 月、2023 年 1 月)行った。原水については、滅菌 PBS により段階希釈を行い、平板培養法で培養した。ろ過水、浄水については試料 1 mL を培養するとともに、100 mL (必要に応じて 1 L) を滅菌済みメンブレンフィルター (孔径: 0.22 μm) でろ過し、そのろ紙をあらかじめ準備した平板寒天培地上に置き、培養を行った。一般細菌数は、標準寒天培地を用いて 36 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養し、従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いて 20 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、7 日間、14 日間培養した。昨年度検証した結果も含め、従属栄養細菌数と一般細菌数の関係性を評価した。

1.2. レジオネラ再増殖評価試験のための植種液調製方法の検討

麻布大学キャンパス内の使用頻度の低い給水栓水、または河川水を原水とする高度浄水処理施設の生物活性炭 (BAC) 処理水を 8 L 採取し、孔径 3 μm の滅菌済みメンブレンフィルターを用いて試料中の FLA をろ過捕集し、約 25 mL の PAS バッファーに再懸濁して FLA 濃縮液を調製した。一方、過去に給水栓より単離した *L. feeleii* 血清群 1 を滅菌水に約 4,000 CFU/mL となるように懸濁し、低栄養状態で馴致するため 20 $^{\circ}\text{C}$ で 4~5 日間保存した。これらを用いて、FLA とレジオネラ属菌の共培養を以下の 3 通りの方法 (図 1) で検討した。

①抗生物質添加なし

②FLA 濃縮液の抗生物質処理 (0.1 mg/L ゲンタマイシン添加)

③共培養中に抗生物質添加 (グリシン 3 g/L、バンコマイシン 1 mg/L 添加)

①~③共に、共培養後に十分なピペッティングにより底面に付着したアメーバを剥離した上で培養液を回収し、0.2 M 塩酸-塩化カリウム溶液 (pH 2.2) を用いて酸処理後、GVPC 培地を用いてレジオネラ属菌を定量した。①抗生物質添加なしの系のみ、FLA 細胞内に取り込まれたレジオネラ属菌の定量を以下の方法で実施した。6 ウェル底面に付着した FLA 細胞に 0.1 mg/L ゲンタマイシン

を含む PAS バッファーを加えて 1 時間静置し、FLA 細胞外のレジオネラを不活化した後、さらに PAS バッファーを用いて 3 回洗浄し、新しい PAS バッファー 4 mL に再懸濁した。その後、同様に酸処理を行った後、GVPC 培地を用いてレジオネラ属菌の定量を行った。

1.3. 給水管内の水の滞留時間がレジオネラ再増殖と関連微生物群集に及ぼす影響評価

本調査では、京都大学構内実験室の給水システムを調査対象とした。7 箇所の給水栓において、一定期間の滞留と放水を繰り返しながら滞留水を採取した。対象給水栓は、1) 滞留時間を自在にコントロールできること、2) 予備調査で一定レベルのレジオネラ汚染が確認されていること、3) 給水栓同士が離れており、ある給水栓での放水が他の給水栓付近の水の滞留状況に影響しないこと、を基準として選定した。滞留時間は 28 日以上、14 日、7 日、4 日、2 日の条件で放水を 2~6 回繰り返し、最後の 2 回分の放水時に水試料を採取した。毎回の放水流量は 2.0~2.5 L/min とし、残留塩素濃度が 0.2 mg/L 以上検出されるまで継続した。初流水約 1 L と放水開始後 1、2、5 分後に約 500 mL を採取した。採水は 2022 年の夏~冬にかけて行い、水温は 15~28 $^{\circ}\text{C}$ の範囲であった。

放水開始後 1、2、5 分の水試料については、レジオネラ属菌、FLA、従属栄養細菌数をいずれも培養法で測定した。検水 500 mL を孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターで吸引ろ過後、滅菌超純水 5 mL に再懸濁した。得られた濃縮液 3 mL はレジオネラの測定に用い、5 分間の酸処理を行った後、GVPC 培地 (ビオメリュー・ジャパン) を用いて 36 $^{\circ}\text{C}$ で 7 日間培養し、システイン要求性試験と PCR 確定試験を行った。残りの濃縮液 2 mL は FLA の測定に用い、熱不活化大腸菌を塗布した無栄養寒天培地に 1 mL ずつ塗布培養 (30 $^{\circ}\text{C}$ 、7 日間) し、位相差顕微鏡で出現したプラーク数を計数した。従属栄養細菌数は検水を濃縮せずに R2A 平板培地を用いて 20 $^{\circ}\text{C}$ 、7 日間の培養後にコロニーを計数した。

また、初流水は以下の手順で Miseq (イルミナ社) を用いた 16S rDNA アンプリコンシーケンス解析に供し、滞留時間に応じた細菌群集組成の変化を調査した。

2. 耐塩素性病原微生物の高濃度検出事例

本事例のクリプトスポリジウム検査は、水道事業体から水質検査機関に委託され、届けられた 10 L の採水試料から検査が開始された。水道原水として使用された令和 2 年から 3 年の冬季の河川水試料が本報告の検査対象で、汚染源対応に目処がつくまでは、採水地点や固有名詞等の詳細は明らかにされなかった。

検査は定法に従って行われた⁷⁾。すなわち 10 L の試料水は、PTFE フィルターあるいはセルロースエステルフィルターを用いて、ろ過濃縮された。剥離懸濁液あるいはフィルターのアセトン溶解液から、遠心分離により再濃縮され、水に再懸濁された。ここから免疫磁気ビーズ法 (Dynabeads GC-Combo, Dynal) により、クリプトスポリジウム等が精製された。酸処理により、磁気ビーズからクリプトスポリジウム等が解離回収された。精製試料は必要により分割され、顕微鏡と遺伝子の検査に使用された。

顕微鏡法では、精製試料のオーシスト壁を抗クリプトスポリジウム蛍光抗体 (EasyStain、BioPoint) で免疫染色、核を DAPI 染色し、観察用フィルターを用いて封入された。蛍光微分干渉顕微鏡を用いて、B 励起の蛍光像からアップルグリーンに光るクリプトスポリジウムオーシストを探して、U 励起で 4 つの核を観察し、G 励起で植物性の自家蛍光がないことを確認し、微分干渉観察により 4 つのスプロゾイト等の内部構造が確認された。遺伝子検査法では、精製試料より凍結融解と Proteinase K 処理により核酸が抽出された。18S rRNA の一部領域を標的とする逆転写リアルタイム PCR (Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit、タカラバイオ) と逆転写 LAMP (Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット、栄研化学) が遺伝子増幅に使用された。希釈後の逆転写 PCR 産物を鋳型とした Nested-PCR の増幅産物から、塩基配列が決定された (ユーロフィンジェノミクス)。配列のアセンブル、アライメント作成、NJ 法による系統樹の作成に、CLC Genomics Workbench (Qiagen) を使用した。

C. 結果及び D. 考察

1. レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性に関する検討

1. 1. 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価

全国 21 浄水場の原水、ろ過水、浄水での一般細菌数と従属栄養細菌数の測定結果 (調査回数: 4 回、計 252 データ) に基づき、相関関係について評価した (図 2)。決定係数は 0.827 と相関性が高い傾向を示した。また得られた回帰式に基づき、一般細菌数 100 CFU/mL に相当する従属栄養細菌数を算出した結果、430 CFU/mL [95%信頼区間: 266 CFU/mL、693 CFU/mL] となり、現行の基準値 (暫定) の 2,000 CFU/mL を下回る結果となった。

次に原水試料、浄水・ろ過水試料の 2 グループに分けて、一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性を評価した (図 3)。原水試料では、決定係数は 0.731 と相関性が高い傾向を示した一方で、浄水、ろ過水においては決定係数が 0.221 と相関関係が弱い結果となった。これは一般細菌数が 1 CFU/mL を下回る試料において、従属栄養細菌数の範囲のバラツキが大きいことが影響している。以上より、従属栄養細菌数の目標値を設定する際には、細菌類の再増殖を考慮した上で、汚染指標としての目標値を設定する必要があると考えられる。

1. 2. レジオネラ再増殖評価試験のための植種液調製方法の検討

抗生物質添加なしの場合 (方法①) の共培養後のレジオネラ濃度を比較した結果を図 4 に示す。本実験では大学内の水道水を 8L 濃縮して FLA 濃縮液を調製し、植種直後のレジオネラ属菌数が共培養液中で 2,000 CFU/mL となるよう添加した。FLA が存在しない PAS バッファーを用いた対照系では、レジオネラ属菌数が共培養後に約 10^3 CFU/mL 以下に減少した。一方、FLA 共存系で 3 日間共培養した培養液全成分 (細胞内 + 細胞外) 中のレジオネラ属菌数についても、対照系と比較するとわずかに多いものの、明確な増殖は確認されなかった。また、FLA 細胞内へのレジオネラ属菌の取り込みもほとんど起こらなかった。FLA との共培養時の顕微鏡観察では、夾雑細菌が共培養液中に多数存在していた。そのため FLA と共に濃縮された夾雑細菌により FLA によるレジオネラ取り込みが阻害されている可能性がある。

FLA 濃縮液中の共雑細菌抑制を目的として抗生物質処理を行った場合 (方法②) では、FLA 非共存系のみ約 10 CFU/mL でレジオネラ様コロニ

一が検出された。BAC 処理水から FLA を濃縮・回収する際に、ろ紙上に灰色調の堆積物が確認されており、この共濃縮された堆積物が物理的にレジオネラ属菌と FLA の接触を阻害した可能性が考えられる。

①②の結果を踏まえて、共培養中に抗生物質（グリシン・バンコマイシン）を添加し、夾雑細菌抑制を試みた（方法③）。しかし、GVPC 培地上に発育したコロニー数は増加したものの、レジオネラ属特異的な PCR により確認したところ、いずれもレジオネラ属菌ではなかった。

以上、3 通りの共培養方法を検討したが、添加したレジオネラ属菌が共培養後にも一定濃度で検出されたのは方法①（抗生物質添加なしで共培養）の場合のみであった。

1. 3. 給水管内の水の滞留時間がレジオネラ再増殖と関連微生物群集に及ぼす影響評価

全検体の残留塩素濃度とレジオネラ濃度・従属栄養細菌数の関係を比較したものを図 5 に示す。滞留水の放水によって残留塩素濃度が 0.1 mg/L 以上まで回復すると、従属栄養細菌数は水質管理目標設定項目で設定される暫定目標値 2,000 CFU/mL を概ね下回っており、直ちに不活化されていた。一方、レジオネラにはそのような大きな減少は見られず、残留塩素 0.36 mg/L でも 3.9 log CFU/L の濃度で検出されるケースも確認された。給水管内でレジオネラは生物膜や宿主 FLA に寄生していると考えられ、それらによって消毒ストレスから保護された¹²⁾ことが一因と考えられる。

図 6 に各滞留条件のもとでのレジオネラ濃度と検出率を示す。いずれの滞留条件でも、放水の継続にしたがってレジオネラ濃度は減少傾向にあった。給水栓における水の滞留期間を 28 日以上から 14 日、7 日と短縮するにしたがってレジオネラ濃度は概ね減少したことから、給水栓の定期開栓がレジオネラ汚染に対して一定の抑制効果を持つことがわかった。その一方で、7 日から 4 日、2 日と短縮してもさらなる濃度低下は見られず、依然として高いレジオネラ検出率（開栓 1 分後で 90%以上）であった。これより、給水システムが一度でもレジオネラによって汚染されれば、高頻度な捨て水のみではレジオネラを根絶することは難しいことが同時に示された。ただし、今回の滞留期間 7、4、2 日の条件の継続時間はそれぞれ 35、24、12 日と給水管内の生物叢が成熟するには

短いと考えられる点には注意が必要である。

一方、細菌群集構造の解析結果により、滞留期間の短縮に応じて *Bacteroidia* 綱や *Gammaproteobacteria* 綱の割合が減少することが確認された。既報¹³⁾によれば *Gammaproteobacteria* 綱の *Piscinibacter* 属や *Methyloversatilis* 属といった細菌群が FLA の餌としての役割を果たすことが指摘されている。本調査でもこれらの属が検出され、滞留時間が短くなるにつれて存在割合が減少することが確認された。これより、高頻度の開栓によって塩素を含んだ水道水を流すことで、FLA の餌となる細菌群が排出・不活化された結果、FLA 検出率が減少した可能性が考えられる。以上をまとめると、給水栓における水の滞留時間が短くなるにつれて、細菌群集の多様性の減少と FLA 再増殖の抑制が確認され、それが最終的にレジオネラの再増殖にも影響を及ぼしている可能性が示された。

2. 耐塩素性病原微生物の高濃度検出事例

顕微鏡観察の結果として、アップルグリーンに光る粒子が多数認められた（図 7）。大きさはクリプトスポリジウムの 5 μm 前後であった。しかし、壊れたオーシスト壁と思われる粒子が多数あり、きれいな球形をしているものの割合が少なく、クリプトスポリジウムとの判断は保留された。壊れたものなら 1,000 個/10L 程が存在した。壊れていないものは紛れていてよくわからないが、探せば数個は見つかる状況であった。DAPI 染色像は 4 つの核（図 8A）、微分干渉像はスポロゾイトと思われる写真も撮影されて（図 8B）、クリプトスポリジウムの特徴と矛盾しなかった。検査途中で壊れたのか、採水前後に壊れたのか、河川水中で壊れたのか、排出元で壊れたのか、壊れていないものがいつ届くようになるのかわからない状態であったため、他検査機関へ相談が行われ、遺伝子検査に進んだ。

結果は、RT-PCR と RT-LAMP のいずれも反応陽性であった。確実な読み取りのために Nested-PCR を行い、産物の塩基配列を決定したところ、*Cryptosporidium suis* と配列が一致した（GenBank Acc No. MN715857 他と 100%、285bp/285bp、図 9）。幸い、ヒトからの分離報告がほとんどない種であった¹⁰⁾。ただし、リアルタイムなクリプトスポリジウム検査や浄水処理の調整ができないこ

と、糞便汚染があることに変わらないこと、水道水を畜産業でも利用すること、次にヒト感染する種類が感染排出されてくる可能性もありえないこと、この遺伝子検査は割合の多い配列が読めても少ないものの有無は不明であること、等々があり、クリプトスポリジウムの種によらず、検出には注意が払われた。

後から判明したこととして、同じ流域から別の事業者が採水して別の機関が検査しており、そちらでは 100 ないし 200 個/10L の判断であった (図 10)。採水地点と日時が異なるものの、クリプトスポリジウムの高濃度な汚染が検出されていた。幸い、保健所に不明下痢症が多数届けられていることはなかった。過去数年前から検出時点までの推移を見ると、同じ冬季に汚染が検出される傾向にあった (図 10)。冬季に汚染が増加するのは他の流域でも認められており、原因としては気温低下に伴う排水処理効率の低下が想像されていた。上流にブタやウシの畜産農家が存在した。

検査機関の間では匿名であってもその情報共有は困難であったが、匿名試料に関する検査技術の側面に限定することで相談が成立した。水道クリプトスポリジウム検査にはクロスチェック制度があり、顕微鏡検査において判断に迷いがある場合においては相談する道が用意されており、顕微鏡に限らず時々相談が行われている⁹⁾。民間検査機関は全国給水衛生検査協会においては、セカンドオピニオン制度の名称で、協力体制が構築されている¹⁴⁾。本件においては同じ水系における情報共有は、検査を委託した水道事業者の間で行われ、さらに飲料水健康危機管理実施要領に基づいて、水道事業者から厚生労働省水道課へ報告がなされた¹⁵⁾。当該水道事業者の課題としては汚染への対処が残された。

E. 結論

・全国 21 浄水場の原水、ろ過水、浄水での一般細菌数と従属栄養細菌数の測定結果に基づき、相関性を評価した結果、一般細菌数 100 CFU/mL に相当する従属栄養細菌数は 430 CFU/mL と暫定目標値の 2,000 CFU/mL を大幅に下回る結果となった。浄水、ろ過水データのみで相関関係性を評価したところ、相関性は弱く、従属栄養細菌の再増殖による影響であると考えられた。

・再増殖試験におけるレジオネラの安定的な再増

殖を目的として、給配水管内のレジオネラ存在形態を模擬するため、抗生物質処理を加えた FLA/レジオネラの共培養方法を検討した。しかし、抗生物質添加なしの試験系も含めいずれの方法でも FLA 細胞内へのレジオネラの取り込みはほとんど起こらなかった。

・レジオネラ汚染された給水システムにおいて、給水栓における滞留時間を 28 日以上から 14 日、7 日と短縮することで培養可能なレジオネラ濃度の抑制効果が見られた一方で、7 日以内の条件ではその効果が頭打ちとなったことから、一度汚染された給水システムでは蛇口の定期的な開栓のみでレジオネラを制御することは難しいことがわかった。また、滞留条件によって宿主 FLA や細菌群集組成が変化し、レジオネラ再増殖に影響を及ぼしている可能性も示された。

・水道原水として使われる河川水から、クリプトスポリジウム 1,000 個/10L 程の高濃度な汚染が検出された。顕微鏡検査では検出が保留されたところを、遺伝子検査で補われて、*Cryptosporidium suis* の配列が得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 谷口直生, 三浦尚之, 浅田安廣, 上野薫, 谷口なつ海, 増田貴則: 水道統計を用いたわが国における従属栄養細菌の測定状況解析. 水道協会雑誌, 92(2), 2-13, 2023.
- 2) 泉山信司: 水の塩素消毒一病原微生物の塩素消毒にまつわる誤解への回答例. 環境技術, 51(2), 43-48, 2022.
- 3) 泉山信司: クリプトスポリジウムなどによる食中毒、臨床検査. 66, 91-97, 2022.

2. 学会発表

- 1) 瀧野博之, 浅田安廣, 増田貴則: 粒状活性炭上に生息するカビ臭原因物質分解細菌の探索. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 2) 青井裕亮, 永田莞織, 中西智宏, 伊藤禎彦: 給水末端における間欠的な塩素接触条件がレジオネラ再増殖に及ぼす影響. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.

- 3) 泉山信司, 小久保敦啓, 小澤克行: 水道原水からの高濃度なクリプトスポリジウムの検出事例. 環境技術学会, 京都, 2022/10/22.
- 4) 古川紗耶香, 赤坂遼平, 山崎朗子, 泉山信司: 青森市におけるジアルジア汚染源調査ー河川水と野ネズミの *Giardia microti* 検出ー. 令和4年度日本水道協会全国会議(水道研究発表会), 名古屋, 2022/10/19-21.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし
- I. 参考文献
- 1) 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), 1997.
- 2) 岸田一則, 石田篤史: 本邦初のジアルジア集団感染事例について. 平成23年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会, 茨城県土浦市.
- 3) 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.*, 20(4), 581-589, 2014.
- 4) Nygård K., Schimmer B., Søbstad Ø., Walde A., Tveit I., Langeland N., Hausken T., Aavitsland P.: A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area, *BMC Public Health*, 6, 141 (article ID), 2006.
- 5) Karanis P., Kourenti C., Smith H.: Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt, *J. Water Health*, 5(1), 1-38, 2007.
- 6) Baldursson S., Karanis P.: Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010, *Water Res.*, 45(20), 6603-6614, 2011.
- 7) 厚生労働省医薬・生活衛生局水道課長:「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」の一部改正について(薬生水発 0529 第1号, 令和元年5月29日).
- 8) 山本徳栄, 砂押克彦, 山口正則, 森田久男, 森永安司, 川名孝雄, 高木正明, 鳥海宏, 所正治, 井関基弘: クリプトスポリジウム症患者におけるオーシスト排出数の推移と排出期間. 日本臨床寄生虫学会誌, 16, 53-57, 2005.
- 9) 厚生労働省健康局水道課長: 飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領について(健水発第 0330007 号, 平成19年3月30日).
- 10) Ryan U., Fayer R., Xiao L.: *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs, *Parasitology*, 141(13), 1667-1685, 2014.
- 11) Widmer G., Köster P. C., Carmena D.: *Cryptosporidium hominis* infections in non-human animal species: revisiting the concept of host specificity, *Int. J. Parasitol.*, 50(4), 253-262, 2020.
- 12) Donlan R. M., Forster T., Murga R., Brown E., Lucas C., Carpenter J., Fields B.: *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants, *Biofouling*, 21(1), 1-7, 2005.
- 13) van der Kooij D., Veenendaal H. R., Italiaander R., van der Mark Ed. J., Dignum M.: Primary colonizing *Betaproteobacteriales* play a key role in the growth of *Legionella pneumophila* in biofilms on surfaces exposed to drinking water treated by slow sand filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(24), e01732-18, 2018.
- 14) 一般社団法人全国給水衛生検査協会: クリプトスポリジウム検査に関するセカンドオピニオン体制

の整備について、<http://www.kyueikyo.jp/second.html> (令和5年3月7日時点)。

- 15) 厚生労働省健康局水道課長、健康危機管理の適正な実施並びに水道施設への被害情報及び水質事故等に関する情報の提供について(健水発1025第1号,平成25年10月25日)

J. 謝辞

全国の水道事業者から水道原水、ろ過水、浄水のご提供をいただきました。また、独立行政法人水資源機構の坂本樹紀氏と関係者より、クリプトスポリジウム検査結果の情報提供を受けました。記して謝意を表します。

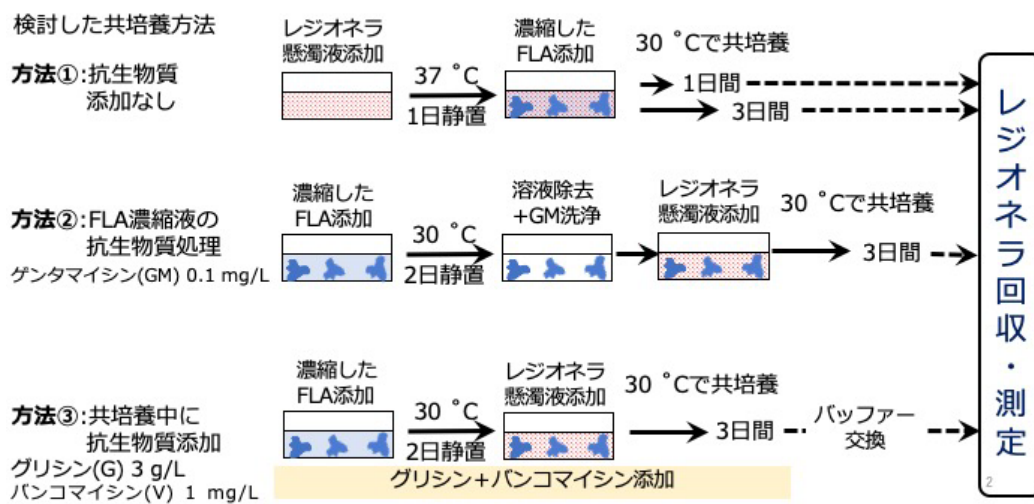


図1 検討したFLA/レジオネラ属菌共培養方法

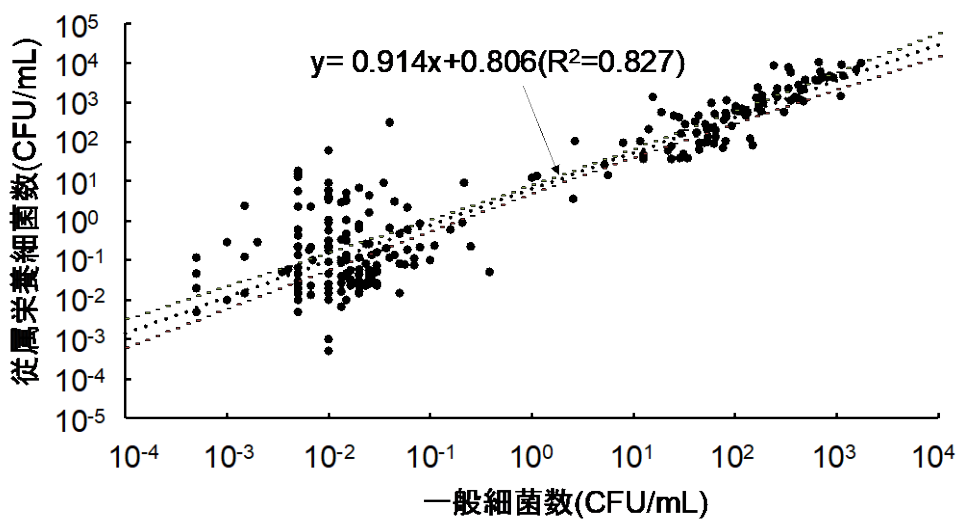


図2 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価

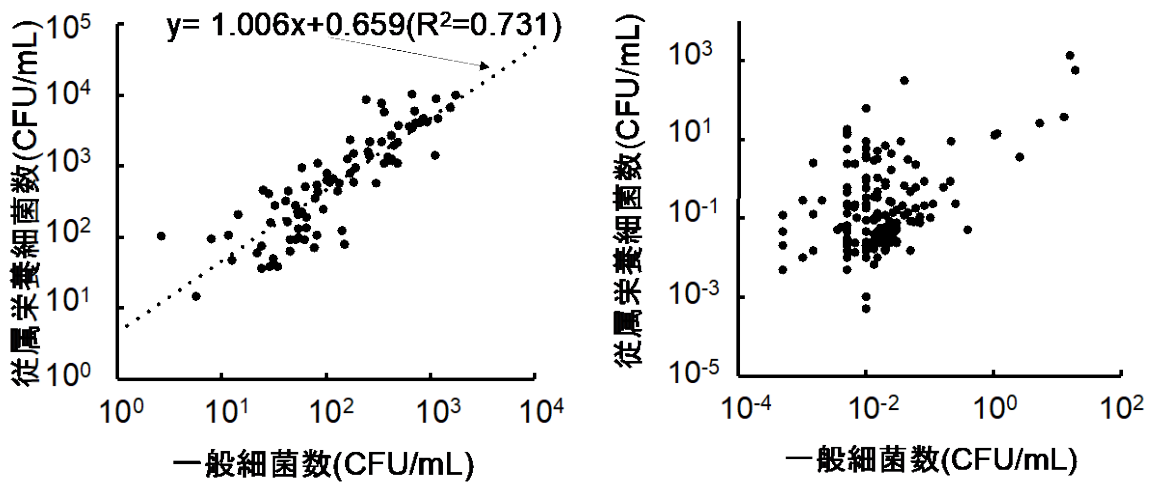


図3 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価(左:原水 84 データ、右:浄水・ろ過水 168 データ)

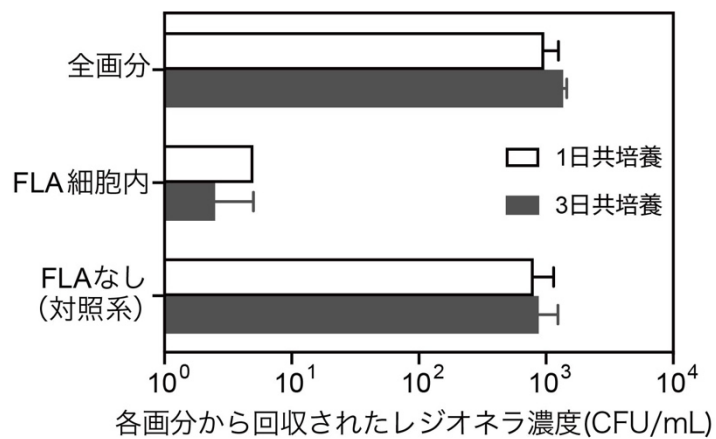


図4 ①抗生物質添加なし条件における共培養結果(の比較)
各画分から回収されたレジオネラ濃度を共培養液 1 mL 当たりに換算して比較した。

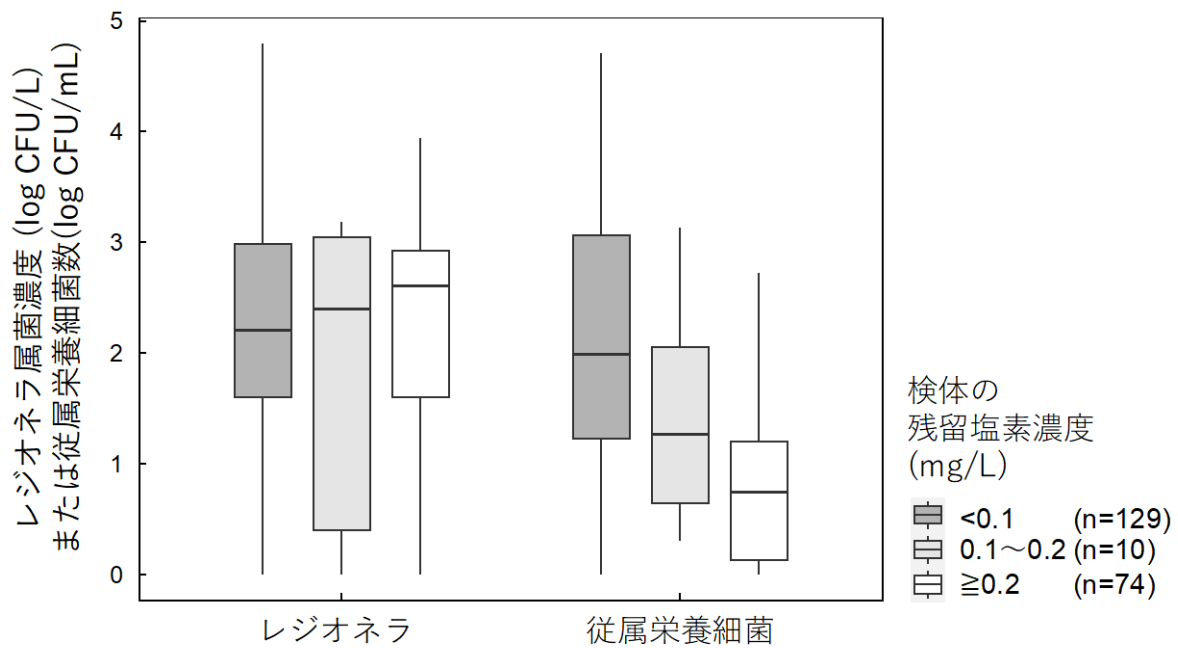


図5 残留塩素濃度とレジオネラ濃度・従属栄養細菌数の関係

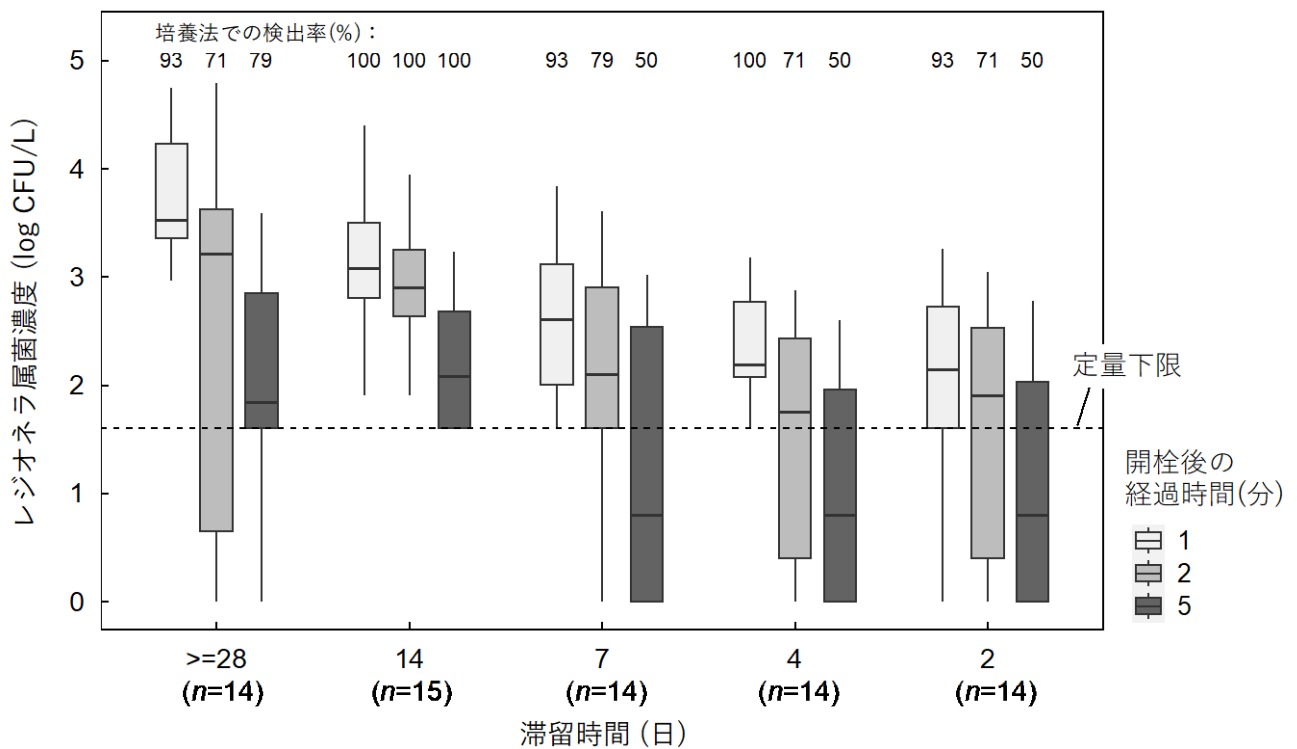


図6 異なる滞留時間のもとでの給水栓水中レジオネラ濃度
(定量下限は 40 CFU/L、定量下限未満のデータは 1 CFU/L として表示)

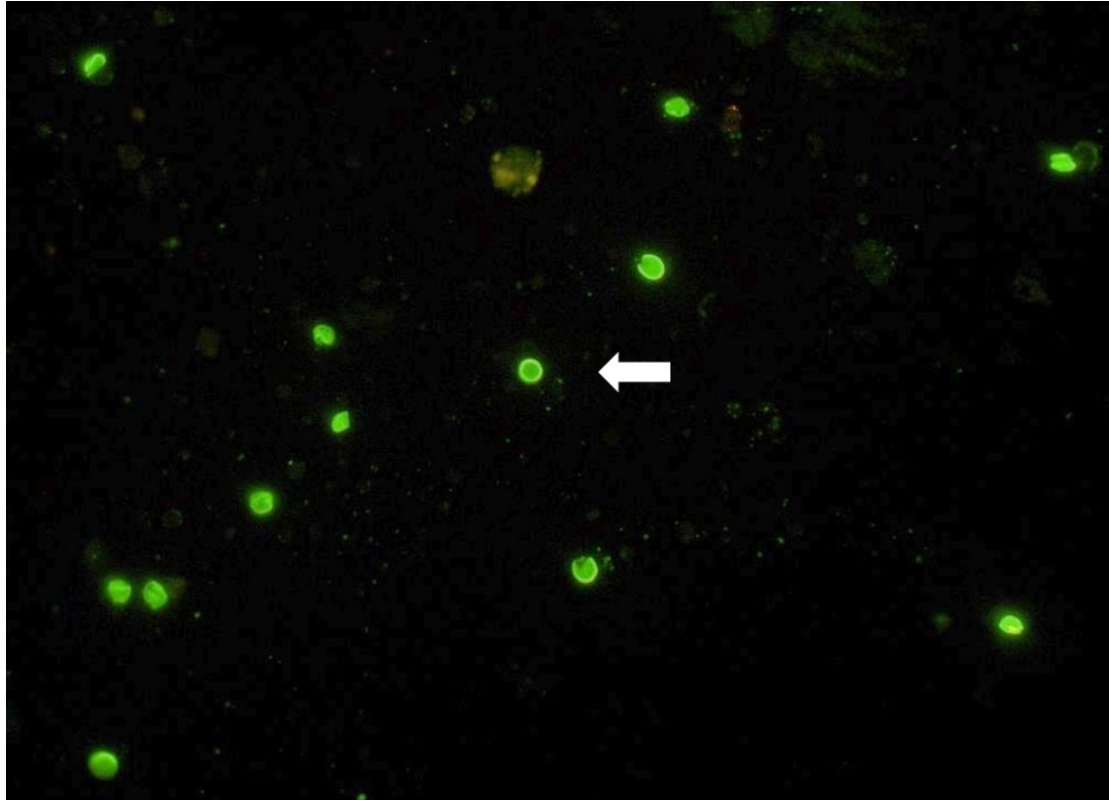
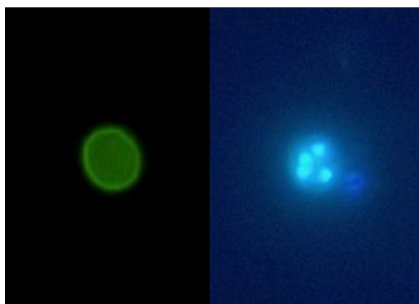


図 7 蛍光顕微鏡像:球形を保ったクリプトスポリジウム(中央白矢印)、壊れたクリプトスポリジウム(周辺)と思われる、アップルグリーンの蛍光色に特異的に染色された粒子が多数観察された。全視野に 1 つを探す検査であったところを、1 視野の中に染色された粒子が多数ある時点で異様であり、この中から正常な形態を保った粒子を計数するのは困難であった。

A) DAPI 染色像の例



B) 微分干渉像の例

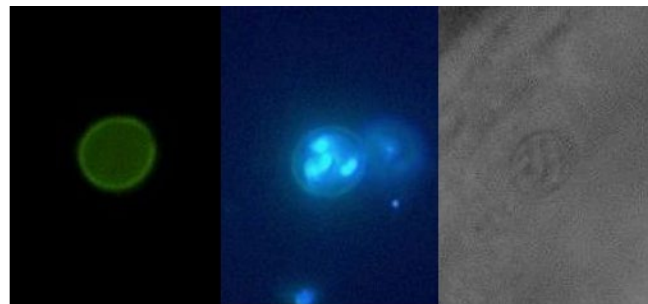
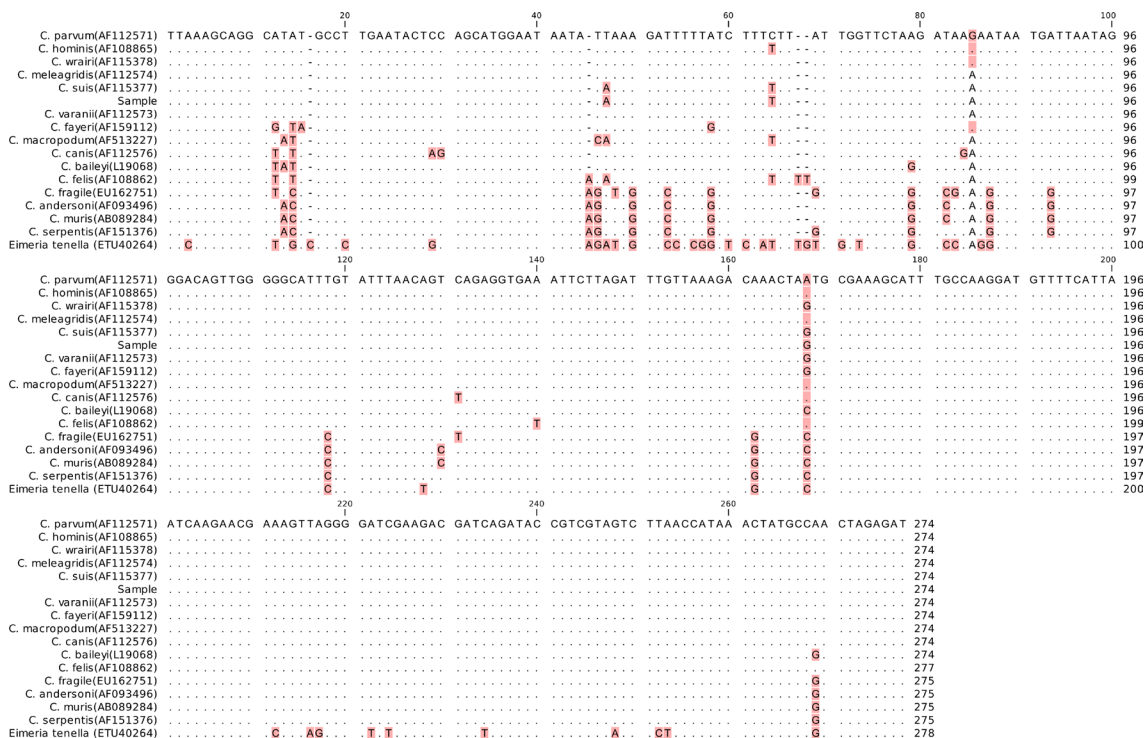


図 8 詳細な顕微鏡像の例:A: FITC 染色像(左)、DAPI 染色像(右)の例では、4 つの核が観察された。B: FITC 染色像(左)、DAPI 染色像(中央)、微分干渉像(右)の例では、DAPI で染色された 4 つの核に加えて、微分干渉像はスポロゾイトと矛盾しない構造物が観察された。

A) 取得した塩基配列と基準配列のアライメント



B) 系統樹

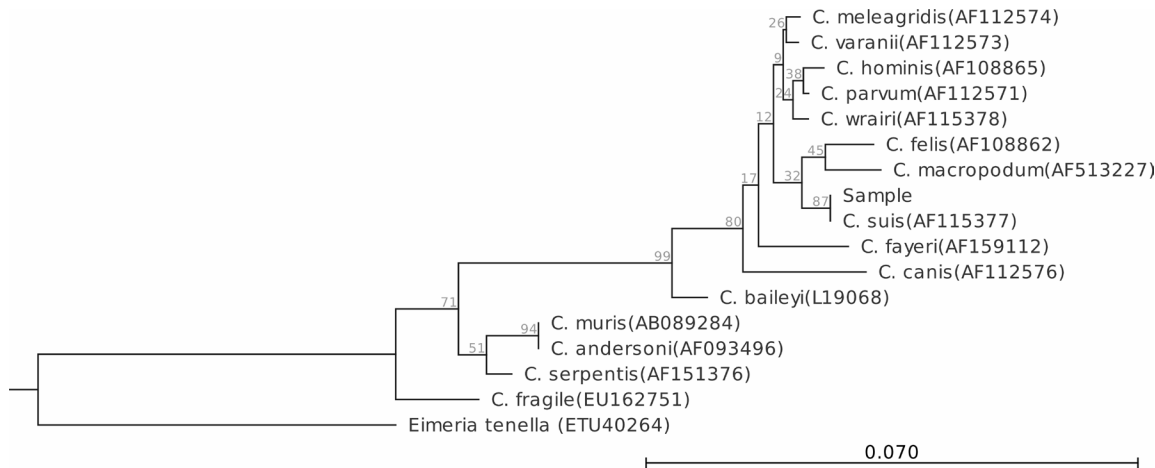


図 9 *Cryptosporidium suis* の塩基配列の検出:PCR 産物の塩基配列を決定し(図中の Sample)、基準配列との A)アライメント(同一塩基を・、Gap をー、異なる塩基を表示)と B)系統樹を作成した。

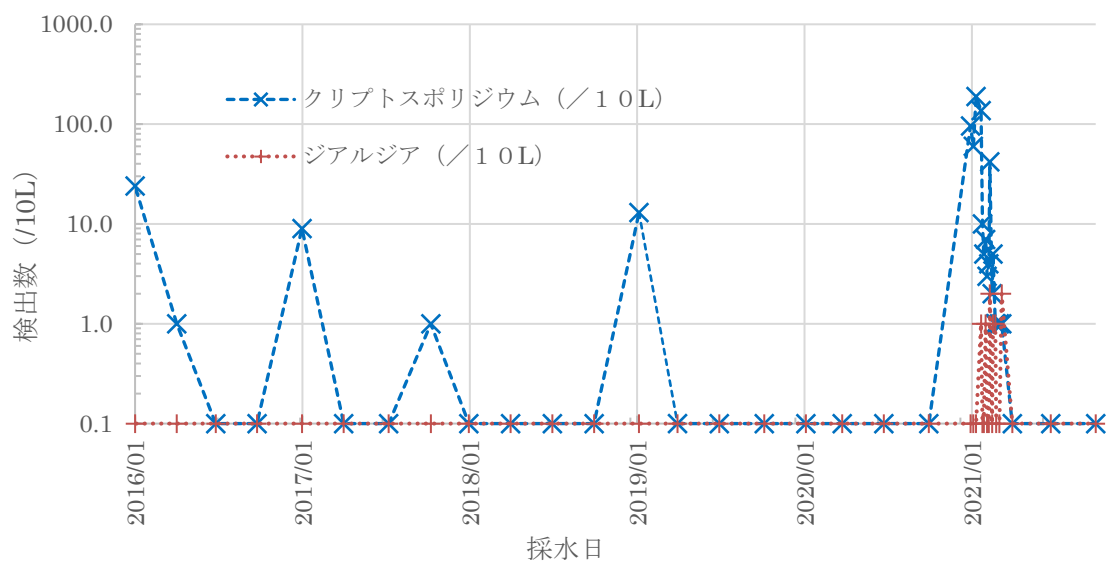


図 10 クリプトスポリジウム検出数の推移:3ヶ月に1回の頻度で検査が行われて、1月前後の冬季に多く検出される傾向が続いていた。2021年の1月は多数の検出があったために、集中して複数回の検査が行われた。数値の季節変動を追いやすい様に、プロットを点線をつないでいる。桁違いの検出数が見やすいように対数軸にして、不検出(<1 /10L)を0.1で表現している。

