

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5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	浅田安廣	京都大学大学院工学研究科
	泉山信司	国立感染症研究所寄生動物部
	島崎 大	国立保健医療科学院生活環境研究部
	増田貴則	国立保健医療科学院生活環境研究部
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
	瀧野博之	阪神水道企業団
	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	県立広島大学生物資源科学部
	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
	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、浄水でのレジオネラ属菌の遺伝子量を把握した結果、レジオネラ属菌遺伝子の検出率は浄水試料が低く、浄水処理によるレジオネラ属菌の遺伝子量の低減効果が示された。続いて従属栄養細菌数(HPC)との相関関係の評価した結果、浄水試料の中でレジオネラ属菌の遺伝子が検出した試料を用いた場合に、HPC とレジオネラ属菌の遺伝子量に弱い正の相関が確認でき、レジオネラ汚染を把握する上で、処理システム内での細菌汚染状況を把握することが重要であることが示された。続いて従属栄養細菌汚染状況が異なる水道水試料に対して、レジオネラの再増殖に関連する自由生活性アメーバ(FLA)の再増殖を評価した結果、HPC が低濃度であってもシストが栄養体に変化すること、また初期の HPC 濃度が高い試料ほど FLA 再増殖までのラグが短くなったことを確認した。また、FLA の十分な増殖が起こった試料では、先行して HPC が 10^3 CFU/mL 以上に上昇する傾向が確認された。最後に、フラッシング洗浄による給水管内のレジオネラ汚染の軽減効果について評価した。その結果、高流量条件で放水を行った場合、低流量条件での放水よりも給水栓でのレジオネラ濃度を長期間にわたって低濃度に抑制できることが明らかとなった。その一方で、高流量条件でも 1~2 週間後にはレジオネラが一定レベルまで再増殖したことから、放水（フラッシング洗浄）のみでは対策の持続性に限界があることも示唆された。

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 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。疑い粒子を別の原理である遺伝子検出で確認して補えば、検査の信頼性の向上が期待できる。平成 19 年の通知において遺伝子検出が導入されてから時間が経過しており、最近の検査結果を振り返って、顕微鏡検査と遺伝子検査が一致することを確認した。

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

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、水道システムの微生物汚染問題、特に細菌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。なお、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ている。

具体的には、まず全国 21 浄水場でのレジオネラ属菌遺伝子量の実態について調査した。

続いて、従属栄養細菌汚染状況が異なる水道水試料に対して、レジオネラの再増殖に関連する自由生活性アメーバ(FLA)の再増殖を評価した。

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、フラッシング洗浄による給水管内のレジオネラ汚染の軽減効果について評価した。

2. 耐塩素性病原微生物の顕微鏡検出と遺伝子検出の一致の確認

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⁾。一時的な高濃度の汚染を捉えられるよう、検査水量を 1L に減らして代わりに検査頻度を増やしたり、多少なりと高感度で排出源の推定に有用と期待される PCR 法の活用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、すでに遺伝子検査も可能となっている⁷⁾。遺伝子検査は、増幅の有無や塩基配列といった質の違う情報が得られて、顕微鏡検査を補ったり置き換えたりが期待できる。実際に、水道原水として使われる河川水において、壊れたクリプトスポリジウムが 100 ないし 1,000 個/10L と多く検出され、遺伝子検査が参考になる事例もあった⁹⁾。

高濃度な汚染事例で顕微鏡検査を遺伝子検査で補えたが、遺伝子検査の信頼性の情報は提案当初のものに限られていたかもしれない。平成 19 年の通知において遺伝子検出が導入されてから時間が経過しており、最近の検査結果を振り返って、顕微鏡検査と遺伝子検査が一致することを確認した¹⁰⁻¹³⁾。

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. 浄水場でのレジオネラ属菌遺伝子量の実態把握

全国 21 浄水場を対象とし、各浄水場の原水、ろ過水、浄水について従属栄養細菌数(HPC)を測定した。原水については、滅菌済 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 1mL 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。HPC は、R2A 寒天培地を用いて 20±1°C、7 日間培養した。

レジオネラ属菌の遺伝子量調査では、まず各浄水場の原水を 100 mL、ろ過水、浄水を 1 L、滅菌済みメンブレンフィルター (孔径: 0.22 μm) でろ過し、DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN)を用いて、DNA 抽出を行った。得られた DNA 抽出液は、CycleavePCR™ Legionella (16S rRNA) Detection Kit (Takara)を用いて、CFX96 Touch Deep Well リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD)により、各試料の遺伝子量を測定した。遺伝子量については、Cq 値 40 を定量値算出に用いる下限値とし、Cq 値 40 以下の試料について算出した。

1. 2. 従属栄養細菌汚染状況が異なる水道水試料における自由生活性アメーバの再増殖評価

水道水由来 FLA の分離を行うために、全塩素が消失した給水栓水 500 mL を採取し、孔径 3.0 μm の滅菌済みメンブレンフィルターで 1 mL にろ過濃縮した。熱不活化した大腸菌液を塗布した無栄

養寒天培地を用いてこの濃縮液を 30 °C で培養し、形成されたプラーク周縁部の位相差顕微鏡観察を行った。FLA 増殖部の寒天を切り出して継代培養を行った後に、PYG 液体培地に懸濁して濃度を調整し、96well マイクロプレートに 1 cell/well となるよう分注して単離を試みた。単離後の FLA から核酸を抽出し、Ami6F1 と Ami9R のプライマー対を用いて FLA の 18S rRNA 領域(600-700 bp)を増幅した後に、シーケンス解析 (タカラバイオ) を依頼した¹⁴⁾。

続いて FLA 植種液を調製した。1/100 量の熱不活化大腸菌液を添加した PYG 液体培地を用いてこの FLA 株を培養した後に、PAS バッファーを用いて FLA 細胞の洗浄と濃度調整を行い、栄養体細胞の植種液とした。一方、この植種液を 30°C で 2 日間静置することでシスト化を誘導した試料を、シスト化細胞の植種液として使用した。2 日間で約 95% の細胞がシスト化することは別途確認済みである。各植種液中の細胞濃度は血球計算盤を用いて算出した。

次に HPC 濃度の異なる水道水試料を調製した。まず給水栓から直接採取した水道水試料の全塩素を中和した後に、①採水直後に孔径 0.2 μm の滅菌済みメンブレンフィルターで除菌した後に 4 °C で冷蔵保存した試料と、②1 週間 20 °C で静置して HPC を再増殖させた後に、孔径 3.0 μm の滅菌済みメンブレンフィルターで FLA を除去した試料をそれぞれ調製し、①と②の混合比率を変化させることで、HPC 濃度が 0~2.4×10⁵ CFU/mL の水道水試料を調製した。HPC は R2A 平板培地を用いて、20°C で 7 日間培養した。

最後に、調製した水道水試料を用いて FLA 再増殖試験を行った。まず、調製した HPC 濃度の異なる各水道水試料 6 mL ずつを 6 well プレート 3 well に分注した。各 well に 1 cell/well となるように 1) 栄養体細胞植種液または 2) シスト細胞植種液を添加し、軽く混合後、30°C で 7 日間培養した。この間、主に 0、1、2、4、5、7 日目に倒立位相差顕微鏡 (キーエンス) を用いた×200 倍の検鏡と写真撮影により、各 well 内の FLA 栄養体細胞とシストをそれぞれ計数した。一方、試料中の HPC 濃度の変化は、主に 0、3、5、7 日目に上述の培養法により測定した。

1. 3. フラッシング洗浄による給水管内のレジオネラ汚染の軽減効果に関する検討

京都大学構内の 5-6 箇所の給水栓を調査対象とした。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。まず、各給水栓での初期状態を合わせるために予備洗浄 (流量 3 L/分で遊離残留塩素濃度が 0.1 mg/L 以上検出されるまで放水) を行った。その後 2 週間の滞留期間を設けた後、低流量条件での放水を行った。低流量条件では流量 3~6 L/分で、排出水の遊離残留塩素が 0.1 mg/L 以上検出されるまで放水した。この時、給水栓によって水の入れ替わりに要する時間が異なったため、放水時間は 4~42 分間とばらついた。放水終了後 30 分、2、4、7 日後に蛇口をゆっくりと開栓して初流水 1 L 超を採水し、これをその時点での滞留水とした。続いて、同様の予備洗浄を行った後に高流量条件での放水も行った。高流量条件では、各蛇口で可能な最大流量 (流量 8~25L/分) で 60~90 分間放水した。放水終了後 30 分、2、4、7、14 日後に滞留水を採取した。調査は 2023 年の 7~9 月に実施した。

採水試料について、レジオネラ属菌、FLA、HPC 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、上水試験方法¹⁵⁾に従って 5 分間の酸処理を行った後、GVPC 培地 (バイオメリュー・ジャパン) を用いて 36°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°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。HPC は検水を濃縮せずに R2A 平板培地を用いて 20 °C、7 日間の培養後、コロニーを計数した。また、検水 500 mL を別途ろ過濃縮後、DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) を用いてプロトコル通りに DNA を抽出した。この DNA 抽出液に対して、全細菌 (16S rRNA 遺伝子¹⁶⁾、レジオネラ属菌¹⁷⁾、レジオネラの宿主アメーバとして知られる *Vermamoeba vermiformis*¹⁸⁾ の遺伝子濃度を qPCR 法で定量した。qPCR での定量下限値はいずれも 2.3 log copies/L であった。

2. 耐塩素性病原微生物の顕微鏡検出と遺伝子検出の一致の確認

河川水や排水等の試料からクリプトスポリジ

ウム等の検査を行い、顕微鏡検査と遺伝子検査の結果を比較した¹⁰⁻¹²⁾。クリプトスポリジウムとジアルジアの検査は、定法に従って行われた⁷⁾。すなわち 10L 程の試料水は、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, Thermo Fisher Scientific) 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、精製試料を蛍光抗体で免疫染色、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粒子を探して、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 PCR が遺伝子増幅に使用された。PCR 産物あるいは Nested-PCR 産物から、両鎖を DNA シーケンサーで読み取りし、アセンブルと修正を経て、塩基配列が決定された (ユーロフィンジェノミクス、シグマアルドリッチジャパン)。混合試料が疑われる PCR 産物には、ゲノムシーケンサー (MiSeq, Illumina) が用いられた。すなわち、読み取りされた 2×300bp の数万のペアリードから、FASTX-Toolkit でトリム、FLASH でマージされ、Qiime2 により代表配列とその数が出力された (生物技研)¹³⁾。0.1%以上などの頻度で検出された配列から出現割合が算出された。以上の配列から DNA アライメントと、NJ 法による系統樹の作成を経て、クリプトスポリジウム等の種別・遺伝子型別が行われた。

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. 浄水場でのレジオネラ属菌遺伝子量の実態把握

全国 21 浄水場試料でのレジオネラ属菌の遺伝子検出率は、原水で 100%(84 試料/84 試料)、ろ過水で 82.1%(69 試料/84 試料)、浄水で 56.0%(47 試料/84 試料)であった。また、検出した試料での

レジオネラ属菌の遺伝子量の幾何平均は、原水で 1.2×10^6 copies/L、ろ過水で 1.7×10^3 copies/L、浄水で 2.5×10^3 copies/L となった。qPCR による遺伝子量の評価のため、生菌、死菌の判断はできないが、検出率を考慮すると、浄水処理を経ることで原水と比較して浄水中のレジオネラ属菌の遺伝子量が大きく低下していることが確認できた。

続いて、HPC とレジオネラ属菌遺伝子検出の関係性について検討した (図 1)。原水、ろ過水試料においては、HPC とレジオネラ属菌遺伝子量との関係性はない傾向が確認されたが、浄水試料については、浄水の検出試料のみを用いた場合に、HPC とレジオネラ属菌遺伝子量と弱い正の相関 (相関係数 $R=0.41$) が確認された。

浄水の検出試料では、ろ過水の検出試料と同等あるいは微増した遺伝子量が多く確認されている。Buse ら(2019)は、遊離している *Legionella pneumophila* と管材に形成させたバイオフィーム内に生息する *Legionella pneumophila* を用いて、塩素処理、クロラミン処理による不活化効果の違いについて、CT 値 (残留塩素濃度 (mg/L) × 時間 (min)) を用いて評価している。そして結果として、3log 不活化させるに必要な塩素処理の CT 値は、遊離している *Legionella pneumophila* で 0.11 (mg・min)/L、PVC (ポリ塩化ビニル) に形成させたバイオフィーム内に生息する *Legionella pneumophila* で 36.11 (mg・min)/L¹⁹⁾ となり、バイオフィームにより *Legionella pneumophila* が保護されることで塩素処理による不活化効果が低下したと考えられる。この点を考慮すると、本調査での浄水試料で検出したケースは、バイオフィームなどによりレジオネラ属菌が保護されている状態で存在しており、塩素処理によるレジオネラ属菌遺伝子への影響が限定的であった可能性が考えられる。そのため、バイオフィームなどの細菌汚染状況を把握する指標は、レジオネラ汚染を推測する上で重要である可能性が考えられた。

1. 2. 従属栄養細菌汚染状況が異なる水道水試料における自由生活性アメーバの再増殖評価

給水栓水から単離した FLA は、形態および動きの観察、ならびにシーケンス解析結果から *Vermamoeba vermiformis* と同定された。この FLA 種の遺伝子は、既往研究においても給水系統で最も高頻度で検出されたと報告されている²⁰⁾。以下、この FLA を使用して、再増殖試験を実施した。

再増殖試験に用いる水道水試料は、7 段階の混合比率で調製した。各試料の HPC 濃度は、< 1、

39、 3.6×10^2 、 3.1×10^3 、 7.2×10^3 、 3.4×10^4 、 2.4×10^5 CFU/mL であった。この7試料を用いて、FLAの栄養体細胞またはシスト細胞を植種し、再増殖を経時的に調べた。結果を図2および図3に示す。

栄養体細胞を植種した場合(図2)は、初期 HPC が <1 CFU/mL の試料では、7日間の培養期間中に FLA の再増殖は確認されなかった。初期 HPC が 39 CFU/mL の試料では、4日目以降に再増殖が起こった。一方、初期 HPC が 3.6×10^2 CFU/mL 以上の各試料では、2日目には FLA の再増殖が確認されており、特に 3.4×10^4 CFU/mL 以上では最初の2日間で5倍以上に増殖した。また、初期 HPC が 3.6×10^2 CFU/mL の試料では、3日目までに HPC が 1.7×10^4 CFU/mL へと急激に上昇しており、その後追従して FLA の増殖が起こったと考えられる。

次にシスト細胞に植種した場合(図3)は、シスト細胞が 1 cell/well となるよう植種したが、実際には約 20 cells/well のシストが確認された。シスト数が多くなると房状に塊を形成する場合が多いため、血球計算盤を用いて濃度を算出する際にシスト塊が十分に分散されておらず、シスト濃度の過小評価につながったと考えられる。初期 HPC <1 CFU/mL の試料では HPC 濃度には変化が見られなかったが、2日目以降に栄養体細胞の出現が確認された。初期 HPC が 39 CFU/mL の試料でも4日目以降に植種したシストの多くが栄養体細胞へと変化した。初期 HPC が 3.6×10^2 および 3.1×10^3 CFU/mL の試料では、2日目に栄養体細胞が出現し、その後7日目まで増殖が続いた。初期 HPC 3.6×10^2 CFU/mL の試料では、3日目には HPC が 2.1×10^3 CFU/mL に増加していた。初期 HPC が 7.2×10^3 CFU/mL 以上では、2日目までに栄養体を確認され、7日目には 40~85 cells へと増殖量も大きかった。

以上より、試料中の HPC 濃度が高くなるほど栄養体細胞の出現まで、あるいは増殖開始までのラグが短くなる傾向が確認された。これらの結果を元に、水道水試料の HPC 汚染の進行状況が FLA 再増殖に及ぼす影響を調べた。2日前に測定された HPC と FLA 細胞数(栄養体)の関係を図4に示す。初期濃度 1 cell/well で栄養体を植種した場合、FLA 再増殖が進んだ試料(≥ 5 cells/well)では、2日前の HPC はすべて 10^3 CFU/mL 以上に分布した。シスト細胞を植種した場合にも植種量(約 20 cell/well)よりも多くの FLA が検出された試料で再増殖が起こったと判断すると、いずれも

2日前の HPC はすべて 10^3 CFU/mL 以上に分布した。

1. 3. フラッシング洗浄による給水管内のレジオネラ汚染の軽減効果に関する検討

表1に低流量/高流量条件で放水した後の給水栓における遊離残留塩素濃度と HPC の変化を示す。遊離残留塩素はいずれの条件でも開栓(放水)直後に復活しものの、低流量条件のもとでは2日後には完全に消失していた。一方、高流量条件では最大7日後まで遊離残留塩素が検出される給水栓があり、低流量条件よりも塩素が残留しやすい傾向にあった。従属栄養細菌は遊離残留塩素の減衰に応じて増加し、最終的(7、14日経過後)には $4 \log$ CFU/mL 程度まで再増殖した。また、高流量条件においては再増殖がやや遅くなる傾向が見られた。

放水後、所定の時間滞留させた給水栓水に対して、培養法でレジオネラと FLA 濃度を測定した結果をそれぞれ図5A、図5Bに示す。いずれの給水栓でも放水前には $4 \log$ CFU/L 前後と高濃度のレジオネラによって汚染されていた。一定時間放水すると、いずれの放水条件でも放水直後にはレジオネラが概ね不検出となった。2日後以降のレジオネラ濃度の変化は放水流量によって顕著に異なった。低流量条件では2日経過時点ですぐに $3 \log$ CFU/L 程度まで上昇した一方で、高流量条件では4日間の滞留期間で $2 \log$ CFU/L 前後と比較的低レベルを維持しており、再増殖が遅れる様子が見られた。FLA についても同様に放水流量によって顕著な違いが見られ、低流量条件では放水2日後の時点で放水前のレベル($1.5 \log$ PFU/L 前後)まで増加したものの、高流量条件では放水後7日間ほぼ不検出となった。

表2に高流量条件で放水した際の全細菌、レジオネラ属菌、*V. vermiformis* の遺伝子濃度の測定結果をまとめる。いずれの微生物も放水直後には大きく濃度が減少したものの、その後の滞留によって再増殖していく様子が見られた。特に、レジオネラ遺伝子は放水後の4日間は放水前に比べて $2 \log$ 以上低く、14日後も $1 \log$ 低い濃度であった。一方、*V. vermiformis* 遺伝子は2日後には放水前と同程度のレベル ($1 \log$ 以内の差異)まで増加していた。すなわち、*V. vermiformis* はレジオネラに比して濃度の回復が早い様子が見られた。

本調査では、水が長期滞留する給水栓を対象として、放水流量がレジオネラ汚染の軽減効果に及ぼす影響を検討した。まず、いずれの流量条件で

も放水直後にはレジオネラを含む全ての微生物濃度が大きく低減した(図5、表2)。これは、滞留水の排出に加えて、給水管内部を遊離残留塩素の含む水で置換することによって一時的に消毒効果が復活した結果、微生物濃度の減少につながったものと考えられる。次に、放水後の滞留期間においてはいずれの放水条件でも遊離残留塩素濃度の低下が進み(表1)、それに伴って従属栄養細菌やレジオネラ、FLAの再増殖が確認された(図5、表2)。放水条件によって比較すると、高流量で放水することで滞留時の遊離残留塩素の減衰は緩やかとなり(表1)、レジオネラやFLAの再増殖が低流量条件に比べて鈍化する様子が見られた(図5)。これは、高流量の水流によって給水管内面に生じるせん断力が大きくなり、生物膜の剥離が促進されたことが一因であると考えられる。一方で、高流量条件をもってしても7~14日後には3 log CFU/L以上までレジオネラ濃度が回復する給水栓も多かった。

最後に、高流量条件での放水後の再増殖過程に注目すると、レジオネラの宿主アメーバである*V. vermiformis*はレジオネラに比して濃度の回復が早く(表2)、レジオネラに先行して増殖している可能性が示唆された。さらに今回、FLAの陽性試料では陰性試料よりも培養法でのレジオネラ濃度が統計的に有意に高かったことから、FLAがレジオネラの再増殖過程に重要な役割を果たし、レジオネラ再増殖の可能性を示唆する指標として有用となりえることが改めて指摘できる。

2. 耐塩素性病原微生物の顕微鏡検出と遺伝子検出の一致の確認

関東地方で汚染に苦慮している河川水や排水等の委託試料を検査した結果では、検査の原理が異なるので完全な1:1対応はしなくても、顕微鏡と遺伝子(RT-PCR法)の陽性陰性の結果は7~8割程度が一致($0.82=(71+24)/116$ 、 $0.66=(19+57)/116$)した(表3)。顕微鏡法の確定結果を基準に2×2分割表を作成し、クリプトスポリジウムRT-PCR法の感度は0.86、特異度は0.73であった。ジアルジアでは感度0.66、特異度0.66であった。Nested-PCRによりPCR産物が安定して得られて、塩基配列から種別・型別を行えた。塩基配列の内容は、*Cryptosporidium suis*、*C. muris*(又は*C. andersoni*)、*Giardia lamblia* Assemblage A(又はF)、B、E、G、*Giardia* sp.であった。

東北地方で山間部で畜産による影響がないに

もかかわらず、野生動物等の影響を受けてジアルジア検出に苦慮した水道原水では、顕微鏡と遺伝子のジアルジア検出が7割($0.71=(23+32)/77$)の一致であった(表4)。2×2分割表を作成して、ジアルジアは感度0.74、特異度0.70であった。塩基配列は*G. microti*であった。

下水疫学を目的に関東地方で都市部の下水処理場の処理水(放流口近傍の河川水)を検査した結果は、試料数は少ないものの、顕微鏡と遺伝子の検出が8~9割($0.83=(6+14)/24$ 、 $0.88=(19+2)/24$)一致した(表5)。クリプトスポリジウムは感度0.75、特異度0.88、ジアルジアは感度0.90、特異度0.67であった。Nested-PCRの産物から塩基配列決定を行い、*C. parvum*、*C. meleagridis*、*C. canis*、*C. suis*、*G. lamblia* Assemblage A(又はF)、B、Dの配列が得られた。

下流の河川水を水道原水としてクリプトスポリジウムの種類が複数含まれる試料の場合、従来のPCR-SeqやPCR-RFLP法では解決できない場合があった。ゲノムシーケンサーでの読み取りにより、混合試料であっても塩基配列の読み取り、種別・型別を行えた(図6)。経験的にはPCR-RFLPは10%の混合頻度が検出の下限で、ゲノムシーケンサーの読み取りは数%の頻度を検出できていた(図6)。

以上の通り、最近の検査における顕微鏡検査と遺伝子検査を比較し、クリプトスポリジウム・ジアルジアのいずれの検出においても7割程度の一致であった。遺伝子検査法の使用不可あるいは不一致の心配があったのかもしれないが、高濃度な汚染の顕微鏡検出を遺伝子検出で補った事例で示された通り⁹⁾、利用に問題ないと考えられた。複数の配列が混合している場合であっても、ゲノムシーケンサーにより読み取りが可能で、混合割合も求められた。

E. 結論

・全国21浄水場の原水、ろ過水、浄水でのレジオネラ属菌の遺伝子量を把握するとともに、HPCとの相関関係を評価した。その結果、レジオネラ属菌遺伝子の検出率より、浄水処理によるレジオネラ属菌の遺伝子量の低減効果が示された。浄水試料でレジオネラ属菌の遺伝子が検出した試料を用いた場合に、HPCとレジオネラ属菌の遺伝子量に弱い正の相関が確認でき、レジオネラ汚染を把握する上で、HPC等により、処理システム内での細菌汚染状況を把握することが重要であること

が示された。

・水道水試料から分離した *V. vermiformis* の栄養体細胞またはシストを異なる HPC 濃度の水道水試料に接種し、HPC と FLA の再増殖を経時的に調べた。その結果、HPC が低濃度であってもシストが栄養体に変化すること、また初期の HPC 濃度が高い試料ほど FLA 再増殖までのラグが短くなったことを確認した。一方、FLA の十分な増殖が起こった試料では、先行して HPC が 10^3 CFU/mL 以上に上昇する傾向が確認された。

・水道水が長期滞留した給水栓において異なる流量条件で放水を行い、その後の滞留期間におけるレジオネラの再増殖過程を比較した。高流量条件（8～25L/分で60～90分間）で放水を行った場合、低流量条件（3～6L/分で概ね数分間）での放水よりも給水栓でのレジオネラ濃度を長期間にわたって低濃度に抑制できることが明らかとなった。その一方で、高流量条件でも1～2週間後にはレジオネラが一定レベルまで再増殖したことから、放水（フラッシング洗浄）のみでは対策の持続性に限界があることも示唆された。

・水道クリプトスポリジウム等の検査における、顕微鏡検査と遺伝子検査の結果を比較して、7割程度の一致であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 瀧野博之, 浅田安廣, 増田貴則: 実態調査に基づく従属栄養細菌数と一般細菌数の関係性評価. 令和5年度日本水道協会全国会議, 東京, 2023/10/18-20.
- 2) 泉山信司, 小澤克行: 河川水クリプトスポリジウム等の検査における顕微鏡検査と遺伝子検査の比較. 第82回日本寄生虫学会東日本支部大会, 第56回日本原生生物学会大会および第74回日本衛生動物学会東日本支部大会との合同大会 (PPEZ-2023), 東京, 2023/10/20-22.
- 3) 泉山信司, 北沢和, 藤瀬大輝, 井上亘: クリプトスポリジウム・ジアルジアの下水疫学. 第23回環境技術学会年次大会, 草津, 2023/10/28.
- 4) 永田莞織, 青井裕亮, 中西智宏, 伊藤禎彦: 建

物給水システムにおけるレジオネラ対策からみた給水管の洗浄効果に関する研究. 第60回環境工学研究フォーラム, 山口, 2023/11/29-12/1.

- 5) 北沢和, 藤瀬大輝, 井上亘, 泉山信司: 都市河川におけるクリプトスポリジウム, ジアルジアの調査手法確立と実態調査. 第58回日本水環境学会年会, 福岡, 2024/3/6-8.
- 6) 風間真, 泉山信司, 浦山俊一, 高木善弘, 布浦拓郎, 七戸新太郎: ランブル鞭毛虫から検出された5種類のRNAウイルス. 第92回日本寄生虫学会大会, 金沢, 2023/3/29-31.

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).
- 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 number), 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, *Clin. Parasitol.*, 16, 53-57, 2005.
- 9) 増田貴則, 島崎大, 浅田安廣, 泉山信司, 大河内由美子, 中西智宏, 鎌田智子, 北沢和, 古川紗耶香, 安原雄作, 橋本温, 黒木俊郎, 井上亘, 武藤千恵子, 梅津萌子, 瀧野博之, 小久保敦啓, 小澤克行:微生物(細菌・寄生虫)に関する研究, 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(研究代表者、松井佳彦)」令和 4 年度分担研究報告書.
- 10) 泉山信司, 小澤克行:河川水クリプトスポリジウム等の検査における顕微鏡検査と遺伝子検査の比較, 第 82 回日本寄生虫学会東日本支部大会, 第 56 回日本原生生物学会大会および第 74 回日本衛生動物学会東日本支部大会との合同大会 (PPEZ-2023), 2023 年 10 月, 東京都.
- 11) 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, 日本水道協会水道研究発表会, 2022 年 10 月, 名古屋市.
- 12) 泉山信司, 北沢和, 藤瀬大輝, 井上亘, クリプトスポリジウム・ジアルジアの下水疫学, 第 23 回環境技術学会年次大会, 2023 年 10 月, 滋賀県.
- 13) 鎌田智子, 栗田志広, 入倉真紀:次世代シーケンシング(NGS)を用いた河川水のクリプトスポリジウム汚染実態調査, 日本水道協会全国会議(第 103 回総会・水道研究発表会), 2023 年 10 月, 東京都.
- 14) Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G: Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2428-2438, 2006.
- 15) 日本水道協会:上水試験方法 IV. 微生物編 2020 年版, 2020.
- 16) Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden A: Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700, 1993.
- 17) Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, Limberger RJ., Musser KA.: Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 125-132, 2008.
- 18) Kuiper MW, Valster RM, Wullings BA, Boonstra H, Smidt H, van der Kooij D: Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(9), 5750-5756, 2006.
- 19) Buse HY, Morris BJ, Struwing IT, Szabo JG: Chlorine and monochloramine disinfection of *Legionella pneumophila* colonizing copper and polyvinyl chloride drinking water biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(7), e02956-18, 2019.
- 20) Nisar MA, Ross KE, Brown MH, Bentham R, Hinds J, Whiley H: Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems, *Water Res.*, 226, 119238, 2022.

J. 謝辞

全国の水道事業体から水道原水、ろ過水、浄水のご提供をいただきました。記して謝意を表します。

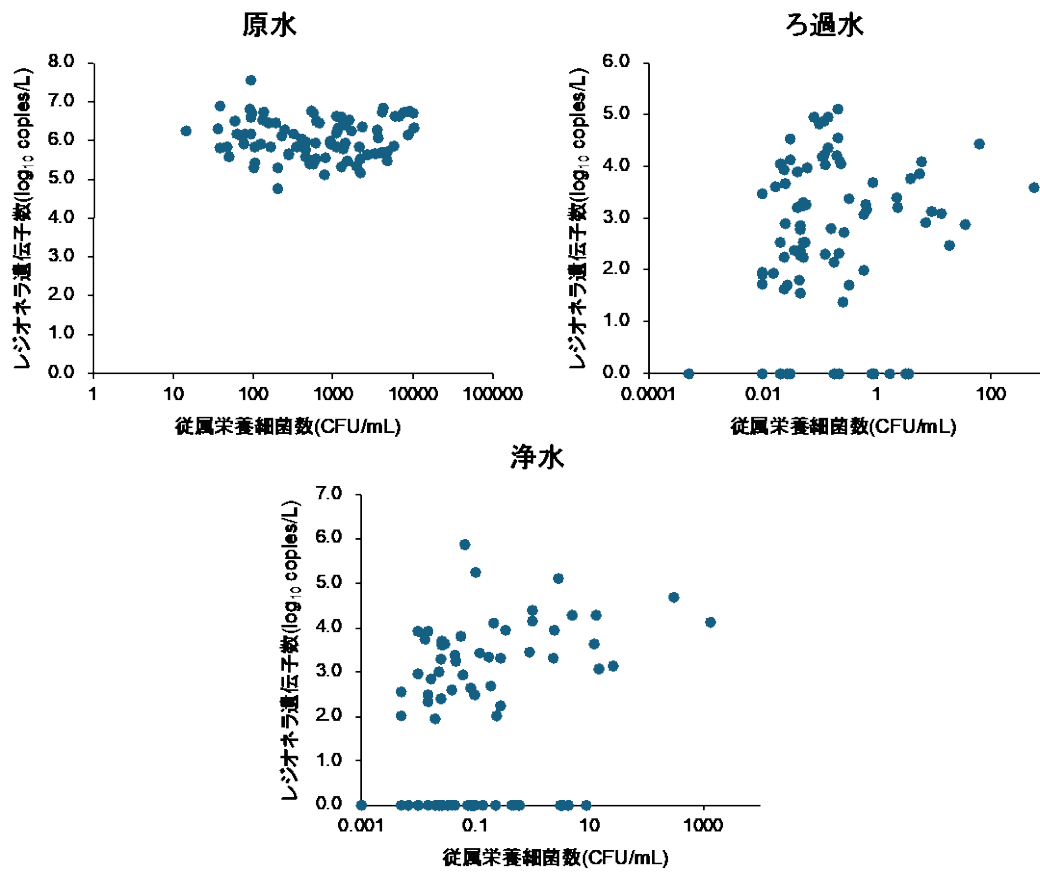


図 1 原水、ろ過水、浄水試料での従属栄養細菌数とレジオネラ属菌遺伝子量の関係

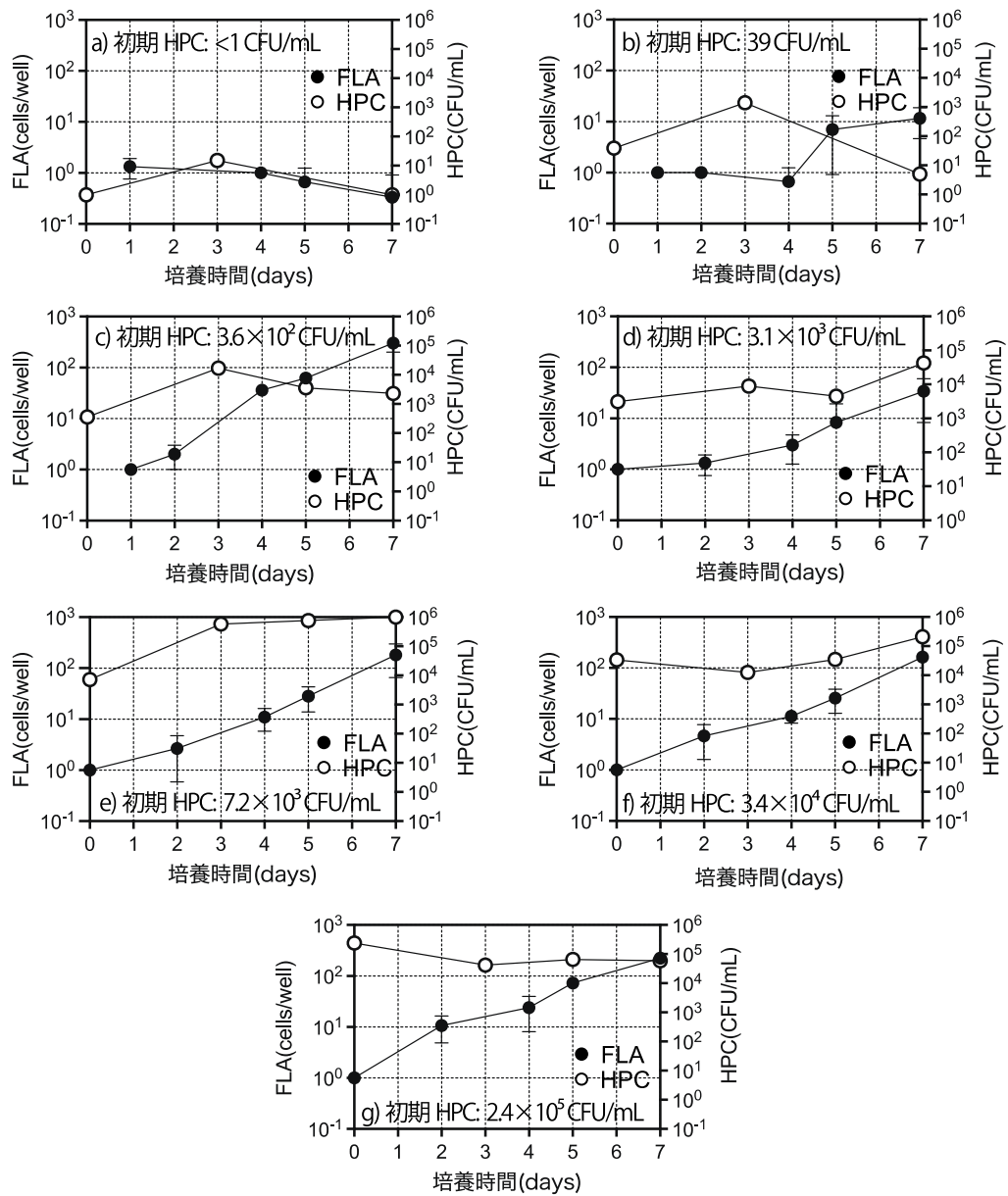


図2 異なる HPC 汚染状況の水道水試料における FLA の再増殖(栄養体細胞を植種した場合)
(n=3、エラーバーは標準偏差)

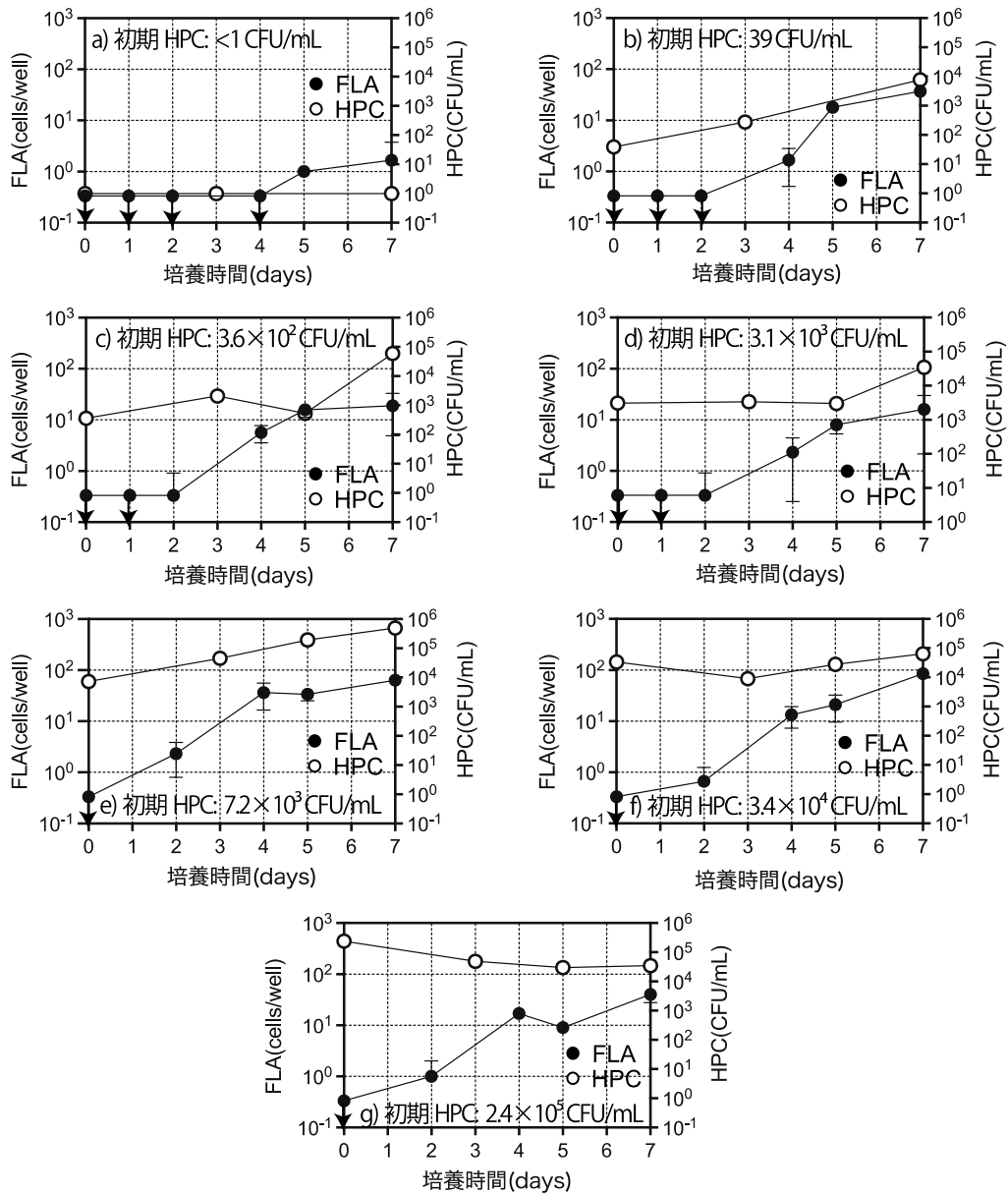


図3 異なる HPC 汚染状況の水道水試料における FLA の再増殖(シスト細胞を植種した場合)
(n=3、エラーバーは標準偏差、下向き矢印は不検出を意味する)

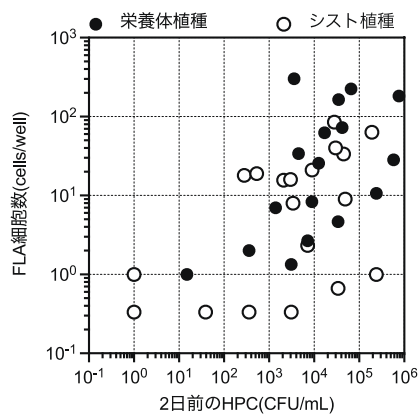


図4 2日前のHPCとFLA増殖量の関係

表1:遊離残留塩素濃度と従属栄養細菌の測定結果(平均値、カッコ内は最小～最大)

測定 タイミング	遊離残留塩素濃度 (mg/L)		従属栄養細菌数 (log CFU/mL)	
	低流量	高流量	低流量	高流量
開栓直前	ND	ND	4.6 (3.8～5.3)	4.3 (4.2～4.4)
開栓直後	0.28 (0.1～0.77)	0.79 (0.67～1.0)	1.6 (1.4～1.8)	ND
2日後	ND	0.18 (ND～0.71)	3.3 (2.8～4.0)	1.7 (1.3～2.4)
4日後	ND	0.11 (ND～0.38)	3.9 (2.7～4.7)	2.9 (2.7～3.2)
7日後	ND	0.05 (ND～0.18)	4.1 (3.3～4.6)	3.5 (1.0～4.3)
14日後	NA	ND	NA	4.4 (4.1～4.7)

ND: 不検出、NA: 分析せず

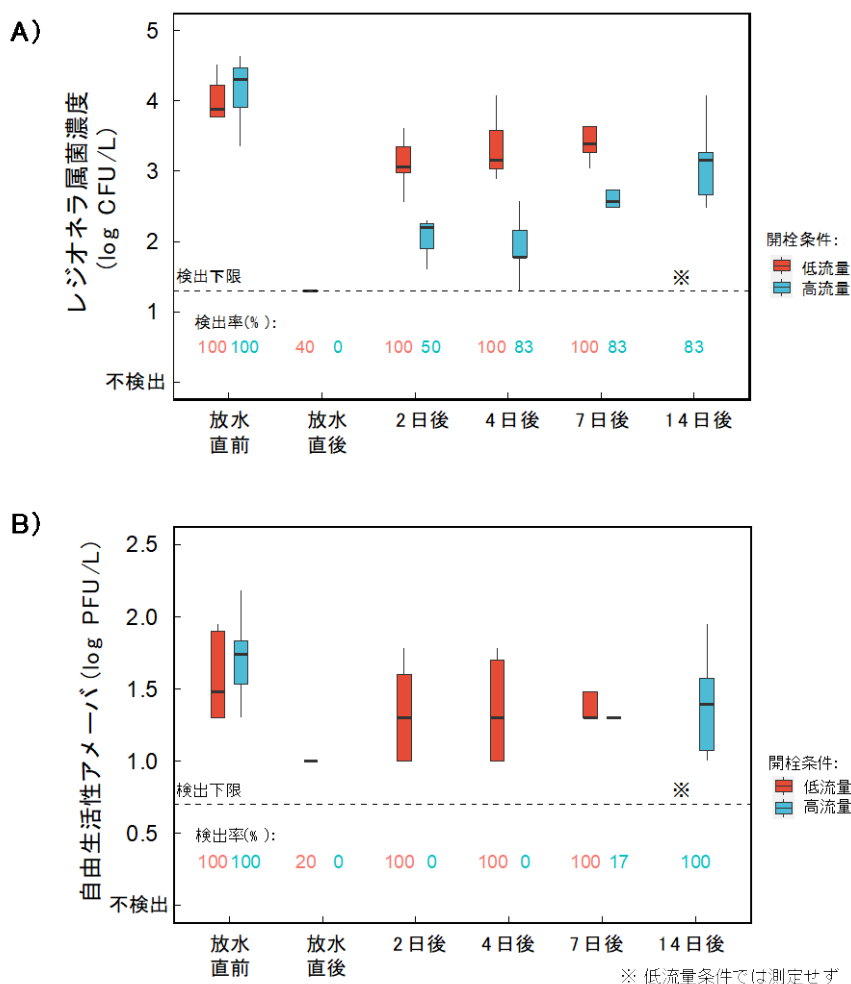


図5 低流量/高流量条件での放水後のレジオネラ(A)と自由生活性アメーバ(B)の濃度変化 (検出下限未満のデータは0 log CFU or PFU/Lとして表示。箱ひげ図は検出データのみで描画。)

表2 高流量条件での放水後の全細菌、*V. vermiformis*、レジオネラ属菌の遺伝子濃度の変化

測定対象	項目	放水前	放水後				
			30分	2日	4日	7日	14日
全細菌(16S rDNA)	平均濃度*(log copies/L)	8.3	5.2	6	6.5	7.8	8.5
	検出率 (%)	100	0	83	100	100	100
<i>V. vermiformis</i>	平均濃度*(log copies/L)	4.5	ND	3.9	3.7	4.1	4.7
	検出率 (%)	100	67	83	100	83	100
レジオネラ	平均濃度*(log copies/L)	5.8	2.7	3.6	3.5	4.6	4.8

*幾何平均値

表 3 関東地方の委託受託検査試料における顕微鏡検査と遺伝子検査の一致状況

A)クリプトスポリジウム

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
遺伝子検査	陽性	71	9	80
	陰性	12	24	36
計		83	33	116

B)ジアルジア

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
遺伝子検査	陽性	19	30	49
	陰性	10	57	67
計		29	87	116

表 4 東北地方の山間部からジアルジア検出での一致状況

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
遺伝子検査	陽性	23	14	37
	陰性	8	32	40
計		31	46	77

表 5 関東地方の下水疫学での一致状況

A)クリプトスポリジウム

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
遺伝子検査	陽性	6	2	8
	陰性	2	14	16
計		8	16	24

B)ジアルジア

		顕微鏡検査		計
		陽性	陰性	
遺伝子検査	陽性	19	1	20
	陰性	2	2	4
計		21	3	24

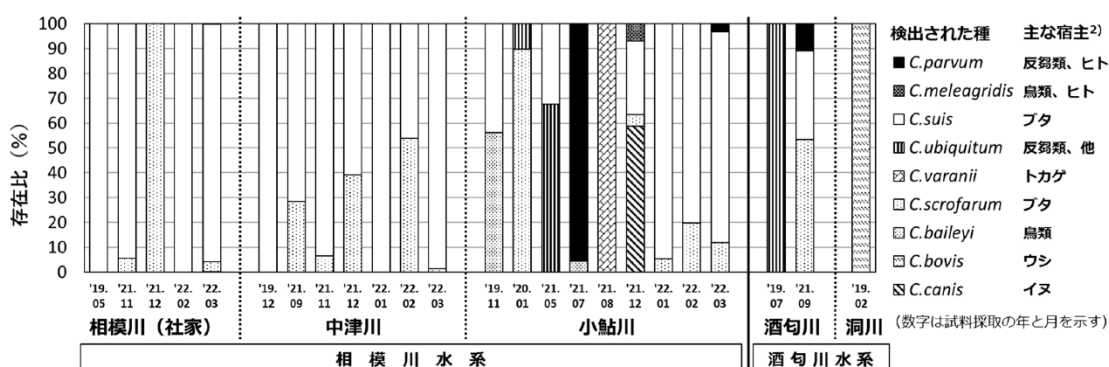


図 6 クリプトスポリジウム PCR 産物のゲノムシーケンサーによる読み取り、種別と割合の例