

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4～5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、浄水について、一般細菌数と従属栄養細菌数(HPC)の調査を行った。ろ過水、浄水では一般細菌数と HPC との間に相関関係が弱いことから、HPC 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。次に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。さらに HPC との相関関係を評価した結果、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、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。次に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 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。また、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。疑い粒子が見つかったも、クリプトスポリジウム等と判定せず、見逃される傾向にあるかもしれない。ある冬季の河川水において、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ので、クリプトスポリジウムとの判断は躊躇された。平成 19 年に導入された遺伝子検出を試みたところ、RT-PCR 法と RT-LAMP 法のいずれも陽性であった。RT-PCR 産物から Nested-PCR を経て、ブタで報告のある *Cryptosporidium suis* の配列が得られた。遺伝子検査法があまり活用されていなかったのは、実例や信頼性の情報に乏しいことが理由と思われたことから、最近に行われた検査の顕微鏡と遺伝子が 7 割程度に一致していたことを確認した。試料に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可能で、混合割合も求められた。判断に苦慮することがあれば、異なる検査で補うことが、検査の信頼性の向上につながると考えられた。

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

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、実態調査ならびに室内実験による検討を行った。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。

まず、浄水処理システムでの細菌類の挙動把握について、全国 21 浄水場を対象とし、水質基準項目である一般細菌数と水質管理目標設定項目である従属栄養細菌数(HPC)、レジオネラ属菌の遺伝子量の実態を調査し、関係性について評価した。

次に、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、再増殖試験方法の検討を行った。

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、滞留時間の影響、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高濃度検出とその信頼性の検討

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、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。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。この高濃度な検出が今後の検査の参考になることを期待して、経緯を報告する次第である。

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、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るが、本報告にある通り判断の難しいことが時々生じる⁷⁾。平成 19 年に導入された遺伝子検査も可能となっているが、実績が少ないこと、信頼性の情報が提案当初に限られていたことが理由などとして、あまり活用されていなかったかもしれない。先の高濃度検出と遺伝子検査法の信頼性確保に、最近の検査結果について検討を加えることとした。遺伝子検査は検出の原理が異なり、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、顕微鏡検査を補うことが期待される。

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. 浄水処理システムでの細菌類の挙動把握

全国 21 浄水場を対象とし、各浄水場の原水、ろ過水、浄水について一般細菌数、HPC、レジオネラ属菌の遺伝子量の調査を行った。

一般細菌数、HPC については、平板培養法で測定を行った。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 μ m) 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 $^{\circ}$ C で 24 時間培養し、HPC は、R2A 寒天培地を用いて 20 \pm 1 $^{\circ}$ C、7 日間、14 日間培養した。

レジオネラ属菌の遺伝子量調査では、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 μ m) 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. 水道水試料における微生物再増殖試験方法の検討

ここでは、(1)レジオネラ再増殖評価試験のための植種液調製方法と(2)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(FLA)の再増殖評価の検討を行った。

(1)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 μ m 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 4000 CFU/mL となるように懸濁し、低栄養状態で馴致するため 20 $^{\circ}$ 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。

(2) 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(FLA)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 μ m の滅菌済みメンブレンフィルターで 1 mL をろ過濃縮した。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 $^{\circ}$ 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⁹⁾。

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 $^{\circ}$ 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 μ m の滅菌済みメンブレンフィルターで除菌した後に 4 $^{\circ}$ C で冷蔵保存した試料と、②1 週間 20 $^{\circ}$ C で静置して HPC を再増殖させた後に、孔径 3.0 μ m 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 $0\sim 2.4\times 10^5$ 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 $\times 200$ 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. 給水管内での細菌汚染に関する実態調査

ここでは、(1) 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と(2) 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の検討を行った。

(1) 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の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、遊離残留塩素濃度が0.2 mg/L 以上検出されるまで継続した。初流水約1L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°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、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、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°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ブランク数を計数した。HPCは検水を濃縮せずにR2A平板

培地を用いて20°C、7日間の培養後にコロニーを計数した。

また、初流水は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) 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の検討

1.3.(1)と同様の選定基準で、京都大学構内の5-6箇所の給水栓を調査対象とした。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8~25 L/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1.3.(1)と同じ培養法で測定した。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¹⁰⁾、レジオネラ属菌¹¹⁾、レジオネラの宿主アメーバとして知られる *Vermamoeba vermiformis*¹²⁾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高濃度検出とその信頼性の検討

クリプトスポリジウム検査は、もっぱら10Lの採水試料から検査が開始されている。令和2年から3年の冬季に高濃度な汚染が問題となった試料は、水道原水として使用されている河川水に由来し、ここでは採水地点や固有名詞等の詳細を明らかにしない。これに前後して、関連する河川水や畜産排水試料、山間部でジアルジア汚染が問題となった試料、都市部で下水疫学を目的とした河川試料、下流の河川水で複数のクリプトスポリジウム等が混合している試料を顕微鏡検査と遺伝子検査の比較検討の対象とした。

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、クリプトスポリジウムのオーシスト壁等を抗クリプトスポリジウム・抗ジアルジア蛍光抗体で免疫染色、核を DAPI 染色し、観察用フィルター上に封入された。蛍光微分干涉顕微鏡を用いて、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とジアルジアシストを探して、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、微分干涉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逆転写リアルタイム PCR (Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit、同 *Giardia* 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) 等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 $2 \times 300\text{bp}$ の数万のペアリードから、トリムとマージ処理後に、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、系統樹の作成を経て、クリプトスポリジウムとジアルジアの種別・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. 浄水処理システムでの細菌類の挙動把握

全国 21 浄水場の原水、ろ過水、浄水での一般細菌数と HPC 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。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 HPC を算出した結果、430 CFU/mL [95%信頼区間: 266 CFU/mL, 693 CFU/mL] となり、現行の目標値 (暫定) の 2000 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 HPC の関係性を評価した (図 2)。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、HPC 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、HPC 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。

続いてレジオネラ属菌遺伝子の検出率は、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。

最後に 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結果 (図 3)、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間に相関性がないことが確認された。一方、浄水試料については、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。浄水試料でレジオネラ属菌遺伝子検出したケースは、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の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. 水道水試料における微生物再増殖試験方法の検討

(1)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

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 2000 CFU/mL となるよう添加した。

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、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画分(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ーが検出された。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。

(2)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(FLA)の再増殖評価

新たに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¹⁴⁾。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。

栄養体細胞を植種した場合は、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、その後追隨して 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 日目までに栄養体細胞が確認され、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. 給水管内での細菌汚染に関する実態調査

(1) 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

全検体の遊離残留塩素濃度とレジオネラ濃度・HPC 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遊離残留塩素濃度が 0.1 mg/L 以上まで回復すると、HPC は水質管理目標設定項目で設定される目標値 2000 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¹⁵⁾ことが一因と考えられる。

図 6 に各滞留条件のもと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、FLAの餌としての役割を果たすことが指摘されている細菌群の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) 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の検討

まず、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の変化を調査した。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。HPC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。

続いて、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7A、図7B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。

最後に、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では、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。

2. 耐塩素性病原微生物の高濃度検出とその信頼性の検討

ある冬季の河川水から、顕微鏡観察でアップルグリーンに光る粒子が多数認められた(図8)。大きさはクリプトスポリジウムの5 μ m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9A)、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9B)、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り、警戒せざるをえなかった。

横つながりで相談が行われて、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10)。幸い、ヒトからの分離報告がほとんどない種であった¹⁶⁾。

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くないこと、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。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。上流にブタやウシの畜産農家が存在し、気温低下に伴う排水処理効率の低下が原因と想像された。検査機関としては、匿名であっても情報の共有が困難であったが、検査の技術的な側面に限定することで、試料匿名のまま相談が成立した。

クリプトスポリジウム等の遺伝子検査は平成19年に導入され可能となっていたが、実績が少ないこと、信頼性の情報が提案当初に限られていたかもしれない。上述の*C. suis* 検出の信頼性の確認、並びに遺伝子検査法の向上を意図して、最近の検査における顕微鏡と遺伝子の一致状況について以下の通り検討した。

高濃度な検出があった河川水を含め、関連する河川水や排水等を検査した結果では、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1)。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。

東北地方の山間部で、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の場合、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2)。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3)。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8)。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11)。

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たところ、検査の原理が異なるので完全な1:1対応はしなくても、クリプトスポリジウム・ジアルジアのいずれの検出とも7割程度が一致した。遺伝子検査法の使用に心配があったかもしれないが、特段の問題はないと考え

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、浄水での一般細菌数とHPC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HPCは430 CFU/mLと目標値の2000 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。

・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。

・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。

・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。

・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。結果を無視することなく、相談と確認に進んだのが良かったと言えた。最近の検査における顕微鏡と遺伝子の結果を比較したところ、7割程度の一致が得られた。1 個/10L の難しい検査であり判断に苦慮することがあれば、異なる検査で補うことが、検査の信頼性向上につながると考えられた。

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一河川水と野ネズミの *Giardia microti* 検出一. 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.
- 5) 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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) Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., and Greub, G.: Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2428-2438, 2006.
 - 10) Muyzer, G. et al.: 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.
 - 11) Nazarian, E.J. et al.: Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 125-132, 2008.
 - 12) Kuiper, M.W. et al.: 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.
 - 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) Nisar, M. A., Ross, K. E., Brown, M. H., Bentham, R., Hinds, J., and Whiley, H.: Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems. *Water Res.* 226, 119238, 2022.
 - 15) 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.
 - 16) Ryan U, Fayer R, Xiao L: *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs, *Parasitology*, 141(13), 1667-1685, 2014.

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。

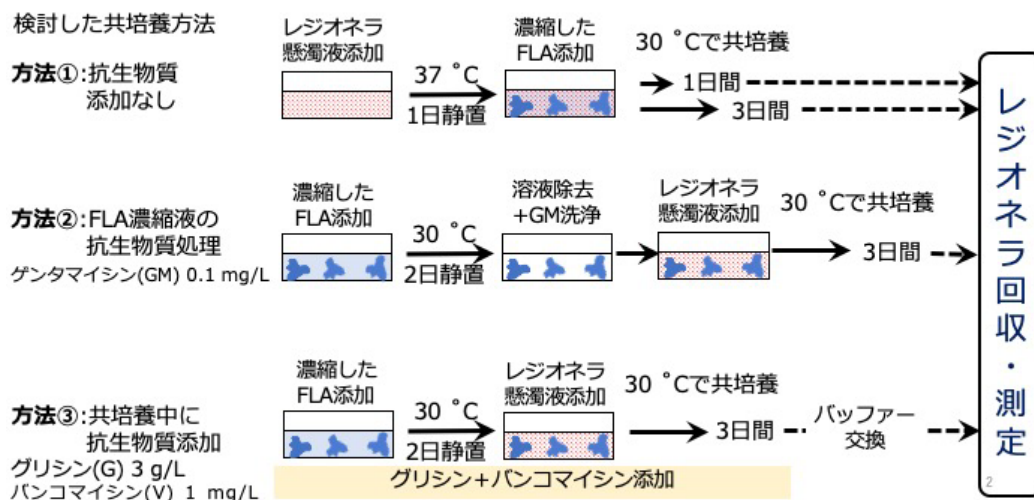


図1 検討したFLA/レジオネラ属菌共培養方法

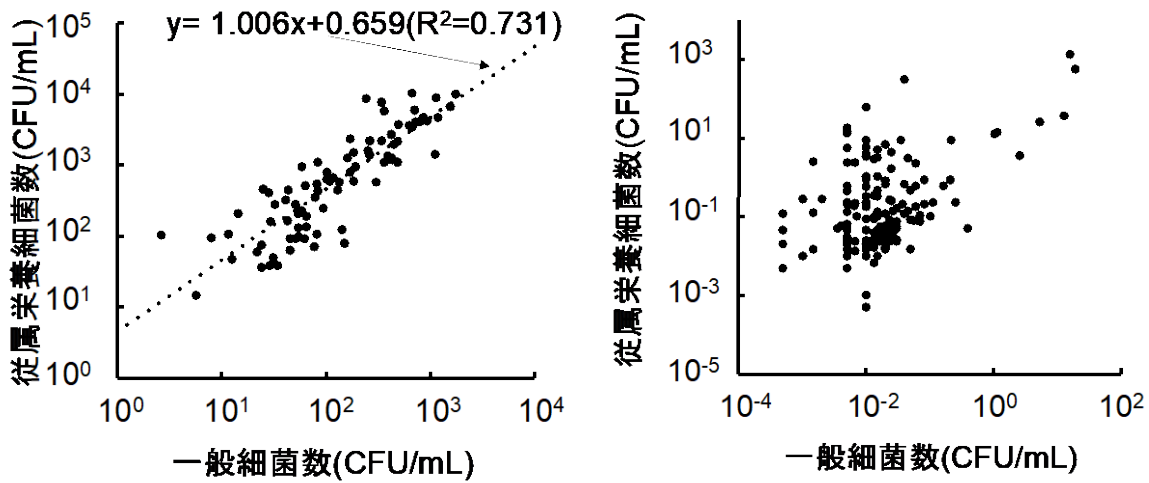


図2 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価(左:原水 84 データ、右:浄水・ろ過水 168 データ)

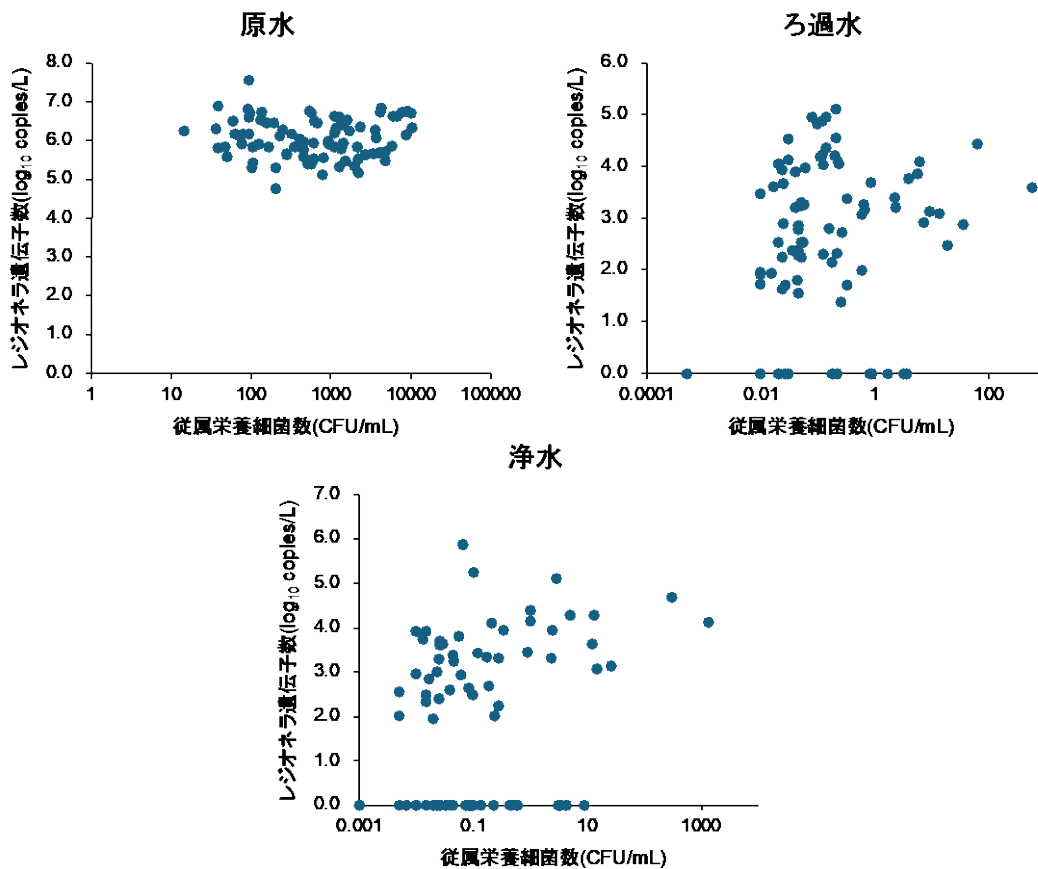


図3 原水、ろ過水、浄水試料での従属栄養細菌数とレジオネラ属菌遺伝子量の関係

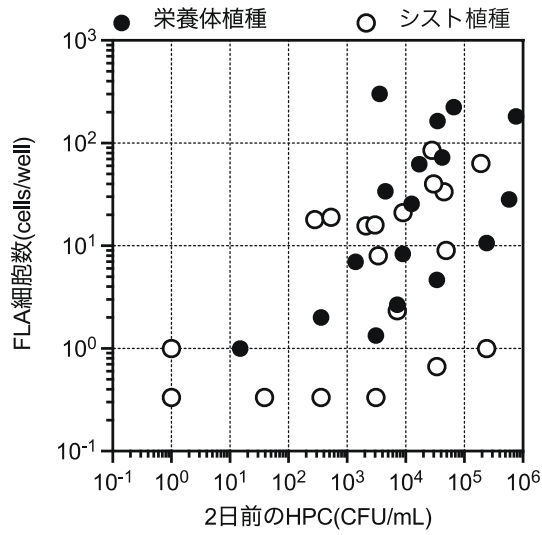


図4 2日前のHPCとFLA増殖量の関係

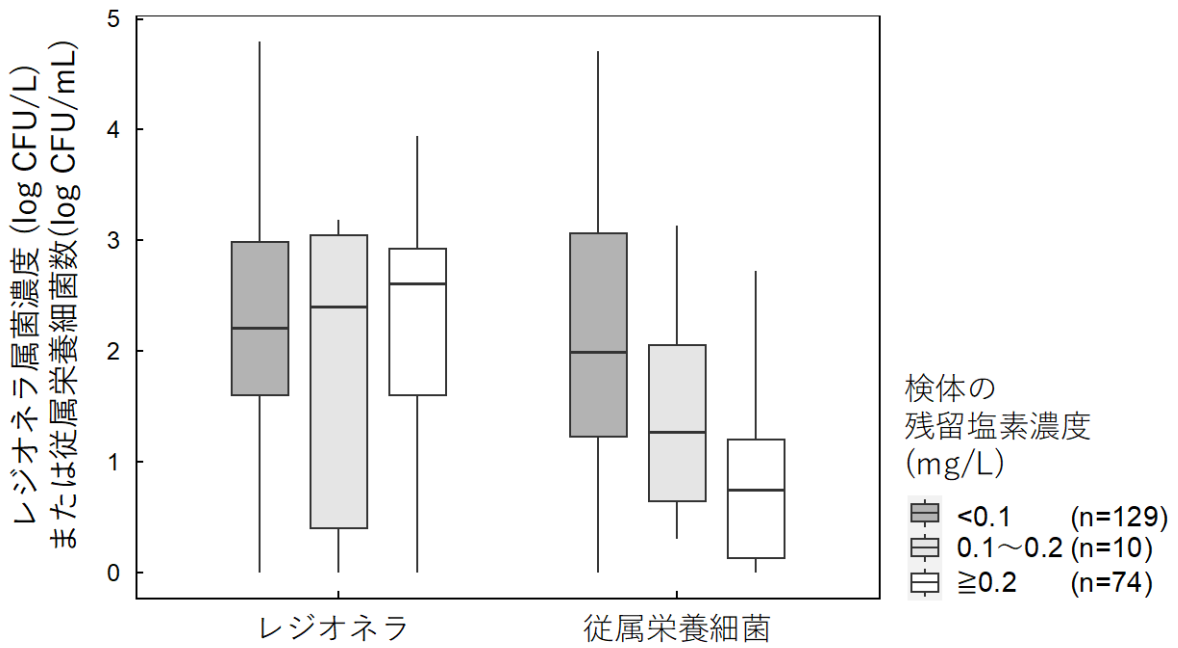


図5 残留塩素濃度とレジオネラ濃度・従属栄養細菌数の関係

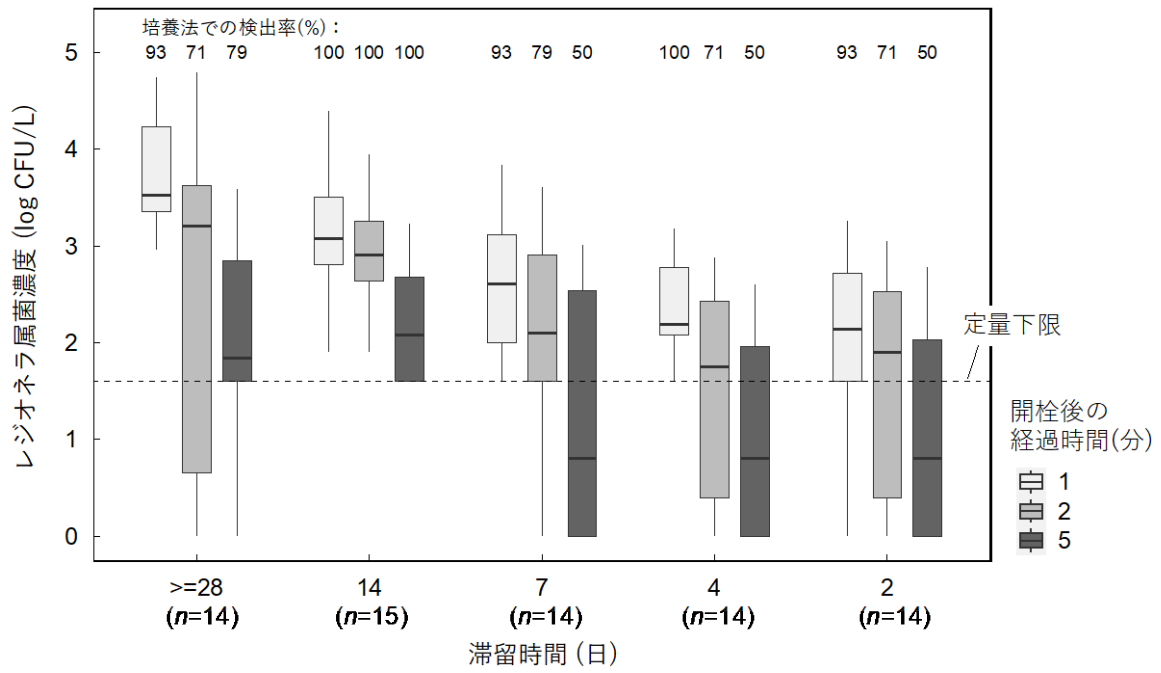


図6 異なる滞留時間のもとでの給水栓水中レジオネラ濃度
 (定量下限は 40 CFU/L、定量下限未満のデータは 1 CFU/L として表示)

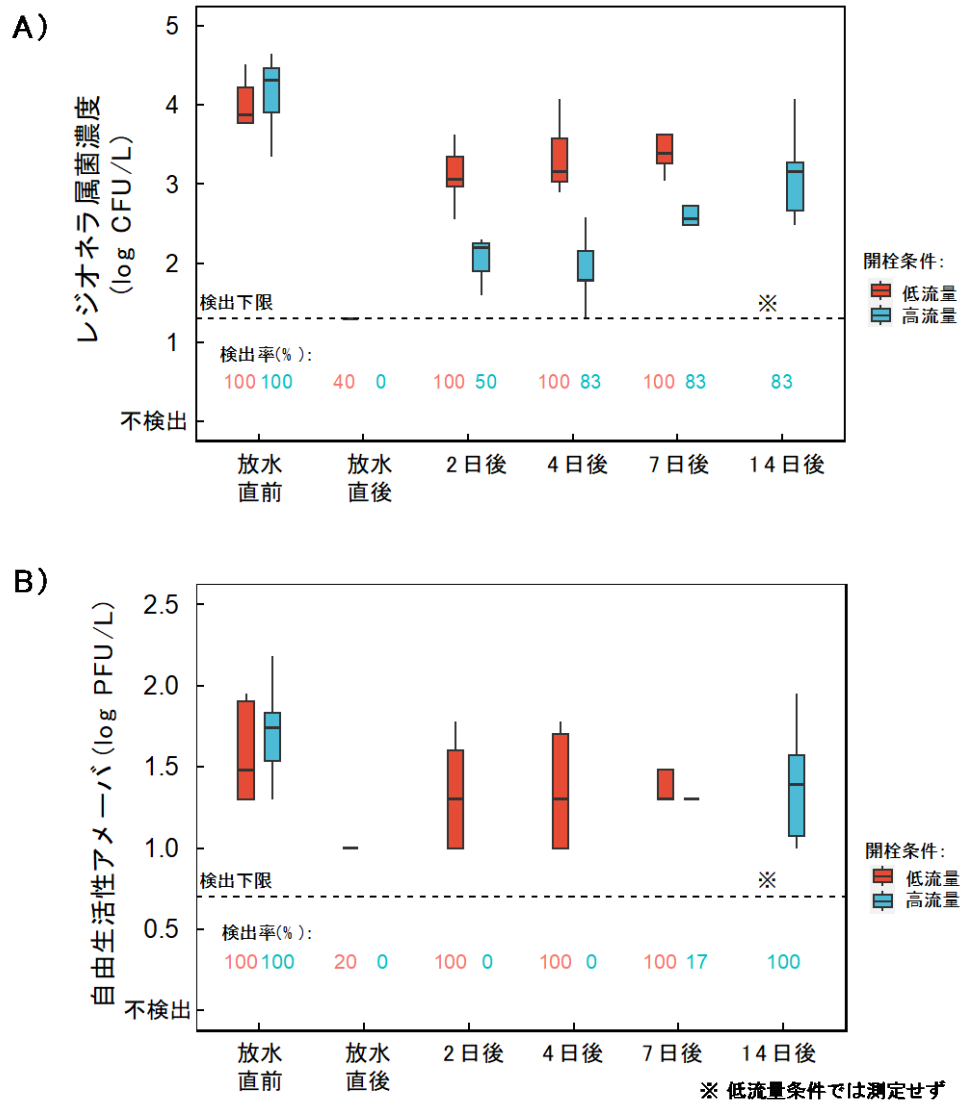


図7 低流量/高流量条件での放水後のレジオネラ(A)と自由生活性アメーバ(B)の濃度変化
(検出下限未満のデータは0 log CFU or PFU/Lとして表示。箱ひげ図は検出データのみで描画。)

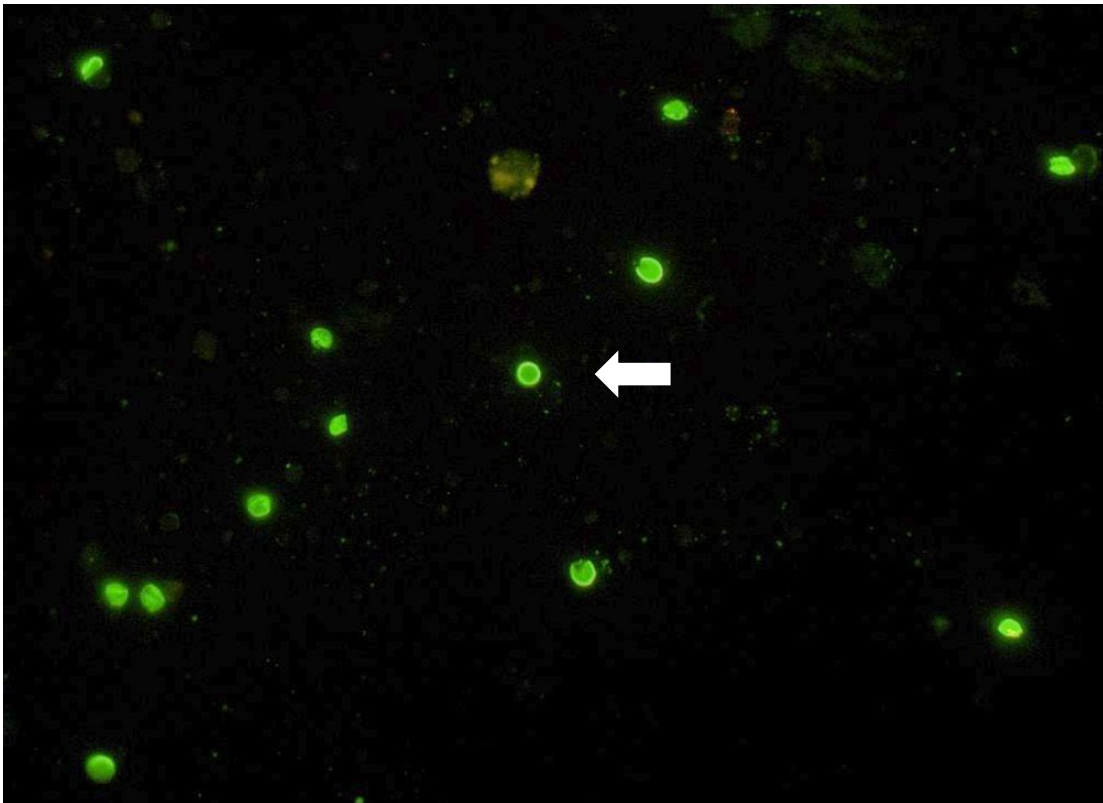


図 8 蛍光顕微鏡像

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

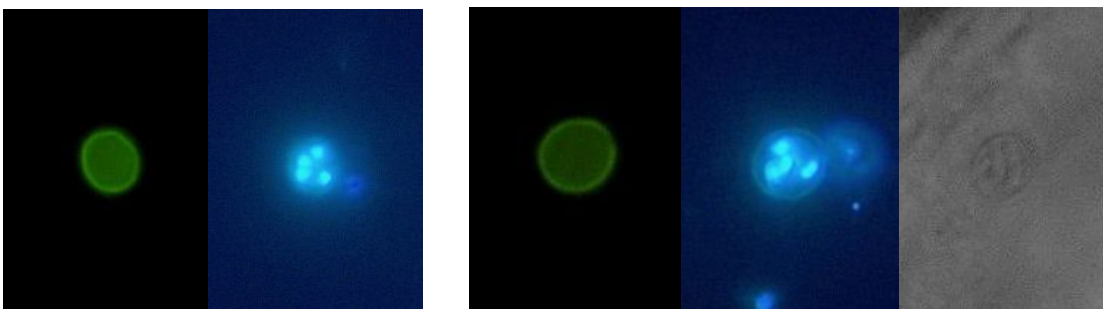
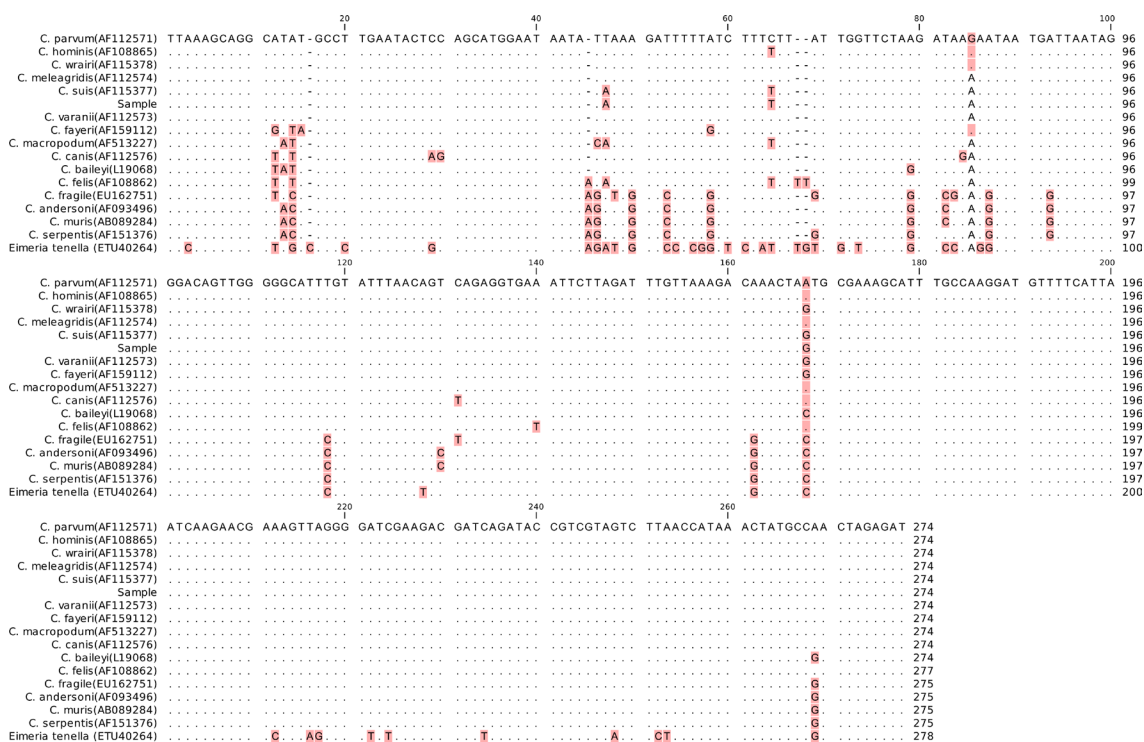


図 9 詳細な顕微鏡像の例

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

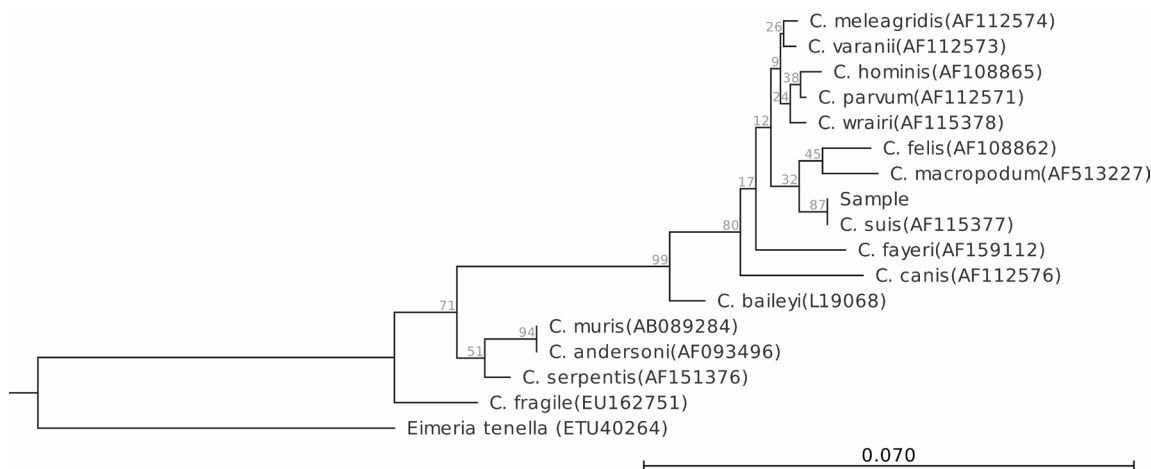


図 10 *Cryptosporidium suis* の塩基配列の検出

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。

表 1 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 2 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 3 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

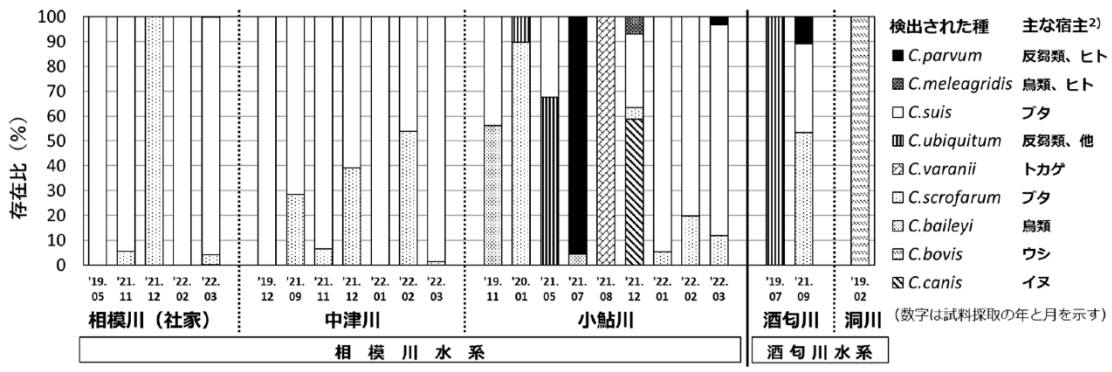


図 11 クリプトスポリジウム PCR 産物のゲノムシーケンサーによる読み取り、種別と割合の例