

平成 21 年度厚生労働科学研究 (健康安全・
危機管理対策総合研究事業)
飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究
(微生物分科会)

研究代表者 松井佳彦 (北海道大学大学院工
学研究科)

研究分担者 泉山信司 (国立感染症研究所寄
生動物部)、遠藤卓郎 (国立感染症研究所細菌
第一部)、秋葉 道宏 (国立保健医療科学院水
道工学部)、松下 拓 (北海道大学大学院工学
研究科)

研究協力者 岸田直裕 (国立保健医療科学院
水道工学部)、片山浩之 (東京大学大学院工学
研究科)、森田重光 (麻布大学生命・環境科学
部)、浅見吉之、大谷喜一郎、勝山志乃 (神奈
川県内広域水道企業団)、猪又明子 (東京都健
康安全研究センター環境保健部)、黒木俊郎、
稲田貴嗣 (神奈川県衛生研究所)、溝口智子
(財)岐阜県公衆衛生検査センター生物臨床
検査課)、百田隆祥 (栄研化学 (株) 生物化学
研究所)、碓井圭名子 (タカラバイオ (株) 製
品開発センター)、大内一敏 (東洋濾紙 (株)
技術センター)

研究要旨

水道水の微生物学的な安全性は凝集沈殿ろ過と塩素消毒により担保されてきた。クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の混入による大規模な水系集団感染の経験を契機として、塩素消毒に大きく依存する微生物対策を改めて見直すことが求められている。

一般細菌に置き換わる指標としての従属栄養細菌測定が開始され、全国の測定値が徐々に明らかになりつつある。一般細菌に比べて高感度な試験が可能となったことで、不検出ではない、有意な測定値が得られている。

ウイルスではノロウイルス、インフルエンザウイルスの処理性を検証し、水道の安全性を確認した。

耐塩素性病原微生物対策として、試料水の濃縮方法、クリプトスポリジウムならびにジアルジアの迅速遺伝子検査法を開発した。rRNA の逆転写によってクリプトスポリジウムの高感度検出が可能となり、実用化に向けての道が開けた。一方、クリプトスポリジウム等検査が定期的に行われているが、検出状況を公表している 197 水道事業者中、24 事業者 (13%) において原水からの検出を確認した。畜産排水処理施設に着目し、病原性原虫の流出傾向を調査したところ、処理施設への流入水中のクリプトスポリジウム濃度は 24,000~960,000 oocysts/L、ジアルジア濃度は 3,900~810,000 cysts/L であり、検出率・濃度とも高かった。排水処理による両原虫の除去は平均で 2-3 log 程度であったが、処理に不良が生じると原虫の除去性能が著しく低下した。

A. 研究目的

微生物分科会では水道の微生物汚染に係る諸問題、すなわち従属栄養細菌、腸管系ウイルス、そして耐塩素性病原微生物を包括的に検討し、水道の微生物学的な安全性確保と向上を目指している。

平成 20 年 4 月より従属栄養細菌数の測定は水質管理目標設定項目に追加された。従属栄養細菌を一般細菌に代わる指標として活用するには、現状を明らかにし、活用方法の整理と実践が必要と考える。

腸管系ウイルスでは現行の浄水処理によって十分に不活化されることを示すことが、安全・安心につながる。ヒトノロウイルスは、未だ効率的な細胞培養系が確立されていないため、培養可能な病原性ウイルス (マウスノロウイルス) との比較から現行の処理による除去性能 (log removal) を求めた。トリインフルエンザウイルスは腸管で増殖して鳥間での水を介した糞口感染が指摘されることから、水道におけるインフルエンザウイルスの処理性について確認を行った。

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策ではモニタリングシステムの拡充に向けた濃縮方法と検出方法の開発検討を進めている。平成 19 年 4 月に適用となった指針で浄水を毎日 20 リットル以上採水して 14 日間の保存が推奨されているが、試料水そのものの保存には場所を要することから、水試料の濃縮とその保存方法について提案した。ここでは連続的に採水することで水質変化に対応したり、濃縮物として保存することで保存を容易にした。さらに浄水だけでなく原水試料の濃縮方法についても新たに検討を始めた。

現行の指針におけるクリプトスポリジウム等検査法は顕微鏡を主体とする検査法であるが、顕微鏡検査に比べて複数の試料を一括して処理が可能となる遺伝子検査法に期待が寄せられている。クリプトスポリジウム等に関しては排出源対策が重要であることから、相模川下流域及び社家取水口で検出されたクリプトスポリジウムの型別判定を行い、併せて、畜産施設からのオーシストの排出状況を調査した。

B. 研究方法

B1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

従属栄養細菌検査について、神奈川県内広域水道企業団の水源である酒匂川の河川水を用いて実施した。また、全国各地における従属栄養細菌の検出状況については各地の水道事業者がインターネット上で公表している水質検査結果を集計した。低濃度の残留塩素が存在する状況での従属栄養細菌増殖（リグロース）の可能性については、実験的に低濃度の残留塩素を保持した環境を作り、滞留水（保存水）における従属栄養細菌の挙動を追跡した。

B2 腸管系ウイルスに関する研究

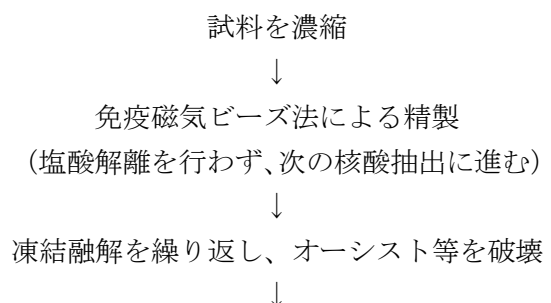
ヒトノロウイルスは細胞培養形が確立されていないことから、PCR によるマウスノロウイルスの評価系を応用して塩素に対する耐性

の評価を行なった。また、凝集・沈殿・ろ過による除去は、ヒトノロウイルスの外殻タンパク粒子（rNV-VLPs：バキュロウイルス-昆虫細胞で発現させたもの）を用いた添加実験により評価した。あわせて、大腸菌ファージ Q β ならびに MS2 を用いて除去を求め、外殻タンパク粒子で得られた結果との比較した。インフルエンザウイルスはヒトインフルエンザ（H1N1 季節性）ならびにトリインフルエンザ（H5N3）を使用した。

B3 耐塩素性病原性微生物の研究

浄水試料の濃縮・保存を可能とする新規ろ過方法として、酸溶解性の粒状ヒドロキシアパタイトを用いたケーキろ過フィルターを開発し、性能評価を行った。試料水として国立感染症研究所内の水道蛇口水、神奈川県内広域水道企業団綾瀬浄水場計器室の浄水を使用した。ろ過水中に既知濃度の 3 μ m 蛍光ビーズ、あるいはホルマリン固定オーシストを添加し、回収率を評価した。実地検証例として神奈川県内の 2 つの水道事業者、A 市；河川表流水を原水 15500m³/日浄水場、B 市：深井戸を水源とする浄水場の協力を得た。A 市では 20L、60L、及び B 市では 24 時間の連続濃縮を行った。一方、原水濃縮法としての応用には相模川河川水を用いて、ろ過水量等を確認した。原水適用装置モデルは、浄水用 37mm サンプリングユニットではなく、90mm 径のフィルターホルダーにろ紙と粉体を使用した。

オーシストからの核酸抽出は以下の手順で行った。



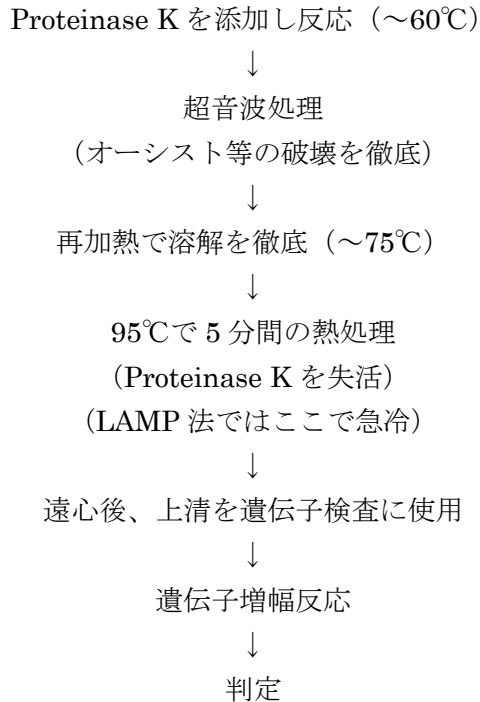


図 遺伝子抽出手順を中心とした遺伝子検査法の流れ

RT-LAMP 法の感度試験では、核酸抽出液 (600 個/5 μL) を 10 倍毎の連続希釈濃度で 0.00006 個/5 μL まで調整し、各濃度段階について 2 連の RT-LAMP 反応を行った。

検鏡法と RT-LAMP 法による環境水からのクリプトスポリジウム検出を比較した。環境水 20L を定法に従いフィルター濃縮した。濃縮液を 2 等分し、それぞれ免疫磁気ビーズによる精製を行った。一方を定法に従い検鏡法で、他方を核酸抽出に使用した。濃縮液の沈渣量が多い場合には、沈渣を 2～3 等分し、それぞれを免疫磁気ビーズで精製した。全ての環境水試料は磁気ビーズ精製後 -20℃ で冷凍保存し、後日まとめて核酸抽出を行った。核酸抽出液 20 μL より 5 μL を RT-LAMP に使用した。RT-LAMP により陽性となった増幅産物は電気泳動を行い、バンドパターンの異同により増幅産物がクリプトスポリジウム等であることを確認した。併せて、定量 PCR の反応系の構築を行なった。

全国のクリプトスポリジウム等検出状況は、

インターネット上で公表している 197 水道事業体の測定値を集計し、その解析を試みた。相模川水系のクリプトスポリジウムの遺伝子型別では、サンプルを中空糸膜+遠心分離法で濃縮し、DNA を精製した後、PCR 法で解析対象遺伝子 (18SrDNA, hsp70) を増幅し、既知のクリプトスポリジウム遺伝子配列情報に基づいて、クリプトスポリジウムの種及び株を同定した。養豚施設の汚染実態調査では、養豚舎内に排泄された糞便と母豚の直腸便を FEA 法により検査し。また、試料の一部から磁気ビーズ法によりクリプトスポリジウム等を精製し、18S rDNA 遺伝子の配列に基づく型別を実施した。畜産施設の排水処理評価では、畜産流入排水は 2L、畜産排水処理水は 10 L からクリプトスポリジウム等の検出を試みた。なお、調査対象施設では畜舎排水は活性汚泥法で処理がなされていた。施設への流入排水は遠心濃縮、排水は中空糸限外ろ過膜で加圧ろ過濃縮した。超音波処理後にショ糖密度勾配遠心法で精製したオーシストをセルロースフィルター上で蛍光抗体染色し、定法に従い顕微鏡で計数した。

C. 研究結果および考察

C1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

酒匂川の河川水を取水する飯泉取水管理事務所平成 17 年 8 月より平成 20 年 12 月まで 1 回/月の頻度で行った 41 回の試験結果より、同時に測定した他の項目と比較したところ、

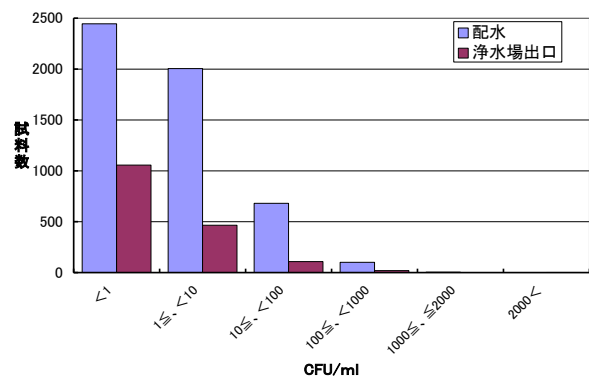


図 インターネット上で公開された従属栄養細菌の検出状況 (試料総数 6888)