

小規模水供給施設における衛生問題と微生物的安全確保法

研究分担者 伊藤禎彦 京都大学大学院工学研究科教授
研究分担者 中西智宏 京都大学大学院工学研究科助教
研究協力者 曾 潔 京都大学大学院工学研究科博士後期課程

研究要旨：

小規模水供給施設を調査対象とし、原水の微生物リスクを推定したうえで、必要な浄水処理レベルについて考察を行った。さらに、限定的な情報の下で、微生物的な安全性を確保するためのアプローチ方法を提示した。さらに、より精緻なリスク評価を可能とするために、次世代シーケンサーを用いた病原細菌の一斉検出法を整備し、対象地域の原水に適用した。その結果、対象地域では土壌・水環境中の常在菌が主な病原細菌であることを示した。検出された病原種を対象としたリスク評価を行い、浄水処理に要求される除去・不活化能について考察した。

A. 研究目的

本研究課題のひとつは、小規模水供給システムにおける衛生的な水の持続的供給を目的とした技術的検討を行うことである。飲料水供給施設等の小規模水供給施設においては、浄水処理や消毒が不十分である場合も少なくない^{1,2)}。特に、地元管理されている施設では、塩素消毒の必要性が認識されていない場合や、意図的に忌避される場合がある。

微生物的安全性の面では、たとえ塩素消毒が行われていなくても、利用者は、もちろん清浄な水を使用できていると考えているし、通常、感染症の流行などが起きるわけでもない。このような状況下において、都会に出た人が帰省した際、しばらく滞在していると、同行した子供（孫にあたる）がおなかをこわすことがあるという。溪流水や沢水を手ですくって飲んだ場合、“おなかをこわす本体”とはいったい何か、興味あるところである。しかし、そのような水道原水について病原微生物に関する検査が行われることは皆無と言ってよい。ここでは、限定的な情報の下で、微生物的な安全性をいかに確保すればよいか、その具体的アプローチ方法を定量的微生物リスク評価手法によって検討した。

上記の「限定的な情報」とは一般細菌などの指標微生物に関する水質項目を指すが、これをリスク評価の出発点とする場合、リスクを過大評価してしまう問題がある。一方、原水中の病原微生物を次世代シーケンサーによって網羅的に検出・同定できれば、対象微生物を限定できるためより精緻なリスク評価が可能となると期待される。令和3年度は最新のロングリード型次世代シーケンサーによって病原細菌を一斉検出し、検出結果を定量的微生物リスク評価(QMRA)手法に利用することで必要な浄水処理レベル（病原細菌の除去・不活化能）を推定した。令和4年度は分析手法を改善し検出精度を向上させることに取り組んだ。

B. 方 法

1. 滋賀県長浜市寺院への訪問調査

滋賀県長浜市内の^{だいきちじ}大吉寺（長浜市野瀬町）の水供給施設への訪問調査を行った。以前膜ろ過施設を設置していた企業（株式会社清水合金製作所）立会いのもと、ご住職からヒアリングすることができた。また、株式会社清水合金製作所からも、これまでの経緯等についてヒアリングを行った。原水、および寺院への供給水を採水し水質測定を行った。原水は溪流である。

2. 京都帝釋天^{たいしゃくてん}水供給施設の調査

京都帝釋天（京都府南丹市）の寺務所になっている福寿寺のご住職から、水利用状況についてヒアリングすることができた。南丹市との関わりの有無についてもヒアリングした。

3. 京都市内における原水調査

京都市西京区において、トロッコ保津峡駅（嵯峨野観光鉄道株式会社）の駅舎と売店に水供給している施設があり、これを調査対象とした。保津川を挟んで、北側の施設と南側の施設の2か所があり、前者は売店へ、後者は駅舎へ水供給しているものである。定期的に採水を行い、水質測定を行った。

4. 病原細菌群の網羅的検出

上記のトロッコ保津峡駅の北側施設と南側施設で採取した水試料に対して、病原細菌の網羅的検出を行った。試料を孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過濃縮後、PowerSoil kit (Qiagen 社) でろ紙から核酸を抽出した。その後、LongAmp Hot Start Taq DNA Polymerase (New England BioLab) と 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024; Oxford Nanopore Technologies 社, 以下 ONT 社) を用いて、真正細菌由来の 16S rDNA 全長を PCR 増幅した。反応液組成やその他の反応条件は原則 Barcoding kit 付属のプロトコルに従ったが、アニーリング温度と伸長時間については別途適切な条件を検討し、アニーリング温度 50 度、伸長時間 2 分を採用した。増幅産物をビーズ精製し、全サンプルを混合したものを Flow Cell R9.4.1(ONT 社) にロードし、MinION Mk1B(ONT 社) で配列データを取得した。ONT 社の配布する解析ソフト Guppy ver. 5.0.16 でベースコールした後、バーコード配列に応じて検体ごとに配列データを仕分け、プライマー配列を除去した。その後、NanoCLUST³⁾ という解析ソフトを用いて主たる細菌種由来の代表配列を推定した。得られた代表配列を NCBI の Refseq データベースに対して BLAST 検索し、配列類似性が最上位にヒットした細菌種の分類群情報を取得し、種レベルまでの微生物名を割り当てた。最後に、NanoCLUST によって同定された全細菌種の中から病原種のみを抽出した。具体的には、既報^{4,5)}や日本細菌学会による病原細菌リスト、BacDive データベース⁶⁾を参考に全 1409 種からなる病原種リストを作成し、同定結果を照合することで病原種を抽出した。

なお、上記の手法では検出結果の信頼性が低かったため、最終年度には手法の改良を行った。具体的には、Unique Molecular Identifier (UMI) 法⁷⁾によって次世代シーケンサーの解読エラーを補正し、より信頼度の高い 16S rDNA 全長配列から病原種の検出を行った（詳細は令和 4 年度分担研究報告書⁸⁾を参照）。

5. QMRA 手法による細菌の要求除去・不活化能の推定

対象地域の供給水の微生物リスクを必要十分に低減するために求められる浄水処理レベルを推定した。その手順の概要を図 1 に示す。まず、対象地域の供給水をそのまま生活用水として用いた場合の感染リスクを推定した。上記のシーケンス分析で得られた各病原種の相対存在割合と別途測定データを用いて、水源での病原細菌の生菌数を推定した。次に、この水を非加熱飲用あるいはシャワー利

用する場合を想定して各病原細菌への曝露評価を行い、用量-反応関係を用いて感染確率を推定した。なお、曝露評価や感染確率の推定に必要な情報は多くの病原種で存在しないため、表1のように感染経路と発生源に応じて病原種をグループ分けして、曝露モデルや用量-反応関係が既知の細菌種で代用してリスク評価を行った。最後に、WHOの提案する許容可能な年間感染確率である $10^{-4}/(\text{人} \cdot \text{年})$ を超えないための生菌の閾値濃度を病原種ごとに算出し、原水中の生菌数の推定値と比較することで必要除去・不活化能を推定した。

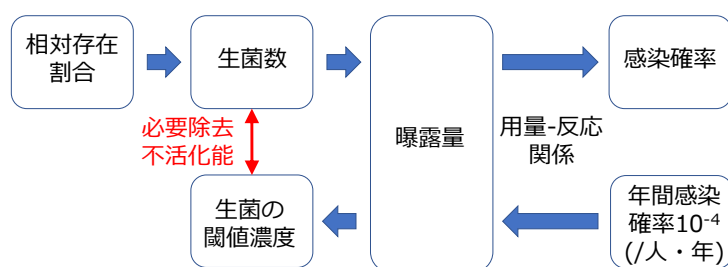


図1 浄水処理に求められる細菌の除去・不活化能の推定手順

表1 各病原種の曝露評価・感染確率の推定にあたって想定した事項

細菌種の感染経路	由来	曝露評価	用量-反応関係で 想定した細菌種
エアロゾル感染	-	シャワー時のエアロゾル 吸入による曝露	<i>Legionella pneumophila</i>
経口感染 他 (不明なもの含む)	糞便 その他	非加熱飲水による経口感染 (飲水量：327mL/day)	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

(倫理面への配慮)

本調査研究の内容は、京都大学大学院工学研究科工学研究倫理委員会における審査非該当であることを確認した上で、個人情報の保護及び調査に関係する対象者を含む安全性に配慮して実施した。ヒアリング調査における具体的な配慮事項は以下のとおりである。1)ヒアリングでは個人情報に関する設問を含まない、2)得られた情報は本研究実施以外の目的には使用しない、3)得られたデータに含まれる情報は適切に管理し、第三者には開示しない。また、同情報は研究担当者のみが扱い、研究終了後に適切に廃棄する。

C. 結 果

1. 滋賀県長浜市寺院への訪問調査

(1) 経緯

以前は砂ろ過施設が設置されていた(写真資料あり)。これに対し、観光地でもあることから、旧浅井町から対策の必要性を指摘され、2005年に、膜ろ過装置を設置した(写真資料あり)。クリプトスポリジウム対策の意味もあったとみられる。導入されたのは、株式会社清水合金製作所のアクアレスキュー類似装置(初期モデル、MF、50 m³/日)。旧浅井町が発注したもの(2006年市町村合併により

長浜市に移管)。2013 年、長浜市は、地元自治会に管理を移管した。その後も、長浜市は水質検査を行っていたようである。

導入したシステムは、原水流量の減少により、ポンプが作動しなくなるなどのトラブルがしばしば発生した。給水栓からしばらく水を流していると、水量が減少することがしばしばあった。断水もよく起きるので困っていた。ただし、これらは膜ろ過装置に原因があるのではなく、取水設備が不良だったことに原因があるとみられる。

このため 3～4 年前に膜ろ過装置は撤去し、現有設備に変更した。これは長浜市が業者に設計を依頼し、長浜市が設置したものと思われる。

(2) 水供給施設の現況

原水は渓流水。雪解け水の割合が高く、水温は低い。水面に、目開き数 mm のスクリーンが設置されている。この下部に集水管＝導水管があるものとみられる。原水槽（桝）に導入。これは沈砂池の役割あり。設置後 3～4 年が経過し、砂が堆積している。流入管および流出管がほぼ埋まっている状態。数年に一度程度の頻度で除去・清掃を行う必要があるとみられる。槽内に目開き数 mm のストレーナを備えた集水管（流出管）あり。流出管は、渓流岸の石の下に埋設され、渓流水面に沿って下流へと延伸されている。取水施設の写真は本報告書別報⁹⁾に掲載した。

下流には防火水槽兼原水槽があり、原水はここに流入。直前にドレンがあり、ここで捨水および採水が可能。防火水槽からの流出管は、槽下部に設置されているので、防火水槽は沈砂池にはなっていない。ポンプアップして寺内に供給。塩素は注入されていない。

ポンプ室内には、以前砂ろ過装置があったが、その後、膜ろ過装置に置き換えられた。

下流位置に以前から防火水槽とポンプ施設があったため、これらを活用したものとみられる。ただし、寺内に供給するためには、下流側からポンプアップする必要がある状況となっている。

大吉寺のみの水供給施設であり、他に供給を受けている住宅等はない。

(3) 施設管理の状況

メンテナンスは特に行っていない。費用も不要。ただし、原水槽には砂が堆積しているので、数年に一度程度の頻度で除去・清掃を行う必要があるとみられる。

現在、市の関与があるわけではなく、補助等も特にあるわけではない。

(4) 管理体制、利用状況

定期的な水質検査を行っているわけではない。自費で 8000 円を負担し、検査してもらったことがある。市が発行する広報で水質検査の希望を募っていたので、これに申し込んだもの。保健所に依頼。11 項目検査とみられる。大腸菌も不検出であって、特に問題はなかった。

降雨時には濁ることがある。浴槽に水を張ったとき濁りがあることがわかる。水を抜いた後に、底に懸濁物質が残っていることもある。飲用しているが、おなかをこわすなどの問題は全くない。上流域に住居など、汚染源はない。周辺で、シカが死んでいたこともあるが、問題とは思っていない。

(5) 水質測定結果

2021 年 5 月 19 日採水試料について、原水 40 項目の検査を厚生労働大臣登録検査機関に依頼した（既報）。その他の独自水質測定結果は次節に示す。原水濁度は高くないが、浄水メカニズムがないため、濁度は低減していない。細菌の測定結果をみても、低減しているとはいえない。

一方、防火水槽内の滞留時間が長いとみられるので、コンクリートのアルカリ分が溶出し、高 pH、高硬度になる可能性がある。しかし、今回測定した範囲では特にそのような傾向は認められなかった。

（６）その他

長浜市内には 10 の寺院があるが、他寺院には水道が普及しており、独自施設をもつのは大吉寺だけである。水道普及地域から大吉寺までは距離があり、配水管を敷設することはできないため、寺独自の施設となっている。

長浜市市民生活部環境保全課生活衛生係へのヒアリングを実施した。専用水道の使用開始時に手続きを行うほかは、未普及地域に対する施策や改善方策等をもっているわけではない。長浜市としての課題や県・国に対する要望事項も特にない。なお、当該地域の上水道事業、簡易水道事業は長浜水道企業団が行っている。ヒアリングしたが、未普及地域については関与していない。

2. 京都帝釋天水供給施設の調査

（１）水供給施設の概要

水源は、奥の院礼拝所（すぐ上手に天降石あり）近くにあり。湧き水であるが、原水としては表流水とみなされる。原水受水槽（榊）で受けた後、境内に供給されている。古くから利用されてきている水である。

（２）水利用の状況

飲み水としても利用されている。茶所^{ちやしよ}において、参拝者にふるまわれる。水を汲みに来る人もいる。ほかには、トイレの手洗い。手水舎^{ちょうずや}2 か所（寺院石段下と、奥の院礼拝所への石段手前）あり。防火用水としての役割もある。

（３）施設管理の状況

管理は地元の方が行っている。湧き水なので水量変化が少なく（なく）、これまでに枯れたことはない。

（４）水質管理の状況

南丹市との関わりはなく、水質検査も行われていない。

（５）その他

奥の院礼拝所への石段手前の蛇口から採水。2021 年 4 月 16 日採水試料について、原水 40 項目の検査を厚生労働大臣登録検査機関に依頼（既報）。

社団法人 船井青年会議所社会開発委員会は、1992 年、京都府北部地域において 6 か所の水を調査し、資料「船井六水」^{ふないりくすい} 10) としてとりまとめている。6 か所の水は、神社や鍾乳洞における湧き水、および、寺院、地蔵、滝においてみられる水である。水質試験機関に依頼し、13 項目にわたる水質検査が実施されている（平成 4 年 7 月採水）。さらに、“味くらべ”が行われ、その指標は「甘さ」、「辛さ」、「マイルドさ」、「ドライさ」、「総合比較」の 5 項目である。

3. 原水調査の結果

（１）大吉寺施設の原水試験結果

2021 年 3 月～2022 年 7 月に行った原水試験の結果を表 1 に示す(n=6)。

表 1 大吉寺施設の原水試験結果(2021 年 3 月～2022 年 12 月、n=6)

	採水日	pH	電気伝導度 μS/cm	濁度 度	一般細菌 CFU/mL	従属栄養細菌 CFU/mL	大腸菌群 MPN/100mL	大腸菌 MPN/100mL	嫌気性芽胞菌 CFU/L
原水	2021/03/09	7.62	60.5	0.68	5.6	653	≥240	1.5	12.0
	2021/05/19	7.78	63.5	1.02	8.2	100	≥240	2.3	14.0

給水栓水	2021/08/30	7.77	66.6	1.49	13.3	560	≧240	24	1.3
	2021/12/08	7.69	68.5	1.74	11.0	453	46	4.3	18.0
	2022/07/11	7.95	75.2	1.21	12.0	128	≧240	24	44.7
	2022/12/08	7.96	72.7	1.14	2.3	497	≧240	9.3	84.7
	2021/03/09	7.68	59.8	0.49	2.1	963	24	0.9	4.0
	2021/05/19	7.83	66.9	0.44	1.7	32	110	0.9	2.0
	2021/08/30	7.75	63.6	0.52	4.0	443	110	4.3	15.3
	2021/12/08	7.61	73.9	0.29	4.3	657	110	2.3	2.0
	2022/07/11	7.94	76.2	0.36	3.0	104	≧240	4.3	8.7
	2022/12/08	8.00	75.8	0.69	1.3	96.3	110	4.3	33.3

(2) 京都帝釋天施設の原水試験結果

2021 年 3 月～2023 年 2 月に行った原水試験の結果を表 2 に示す(n=29)。

表 2 京都帝釋天施設の原水試験結果(2021 年 3 月～2023 年 2 月、n=29)

	pH	電気伝導度 μS/cm	濁度 度	一般細菌 CFU/mL	従属栄養細菌 CFU/mL	大腸菌群 MPN/100mL	大腸菌 MPN/100mL	嫌気性芽胞菌 CFU/L
平均値 (算術／幾何)	7.84	57.6	10.5	29.6	304	-	9.1	21.2
最大値	7.99	99.8	21.4	167	887	≧2400	110	102
最小値	7.49	37.0	1.6	1.3	72.0	4.3	0.4	2.7
中央値	7.89	56.0	9.9	28.0	360	-	15.0	22.3

(3) トロッコ保津峡駅施設の原水試験結果

北側施設について、2020 年 11 月～2023 年 2 月に行った原水試験の結果を表 3 に示す(n=33)。また、南側施設について、2020 年 11 月～2023 年 2 月に行った原水試験の結果を表 4 に示す(n=30)。

南側施設の方が、濁度、一般細菌、従属栄養細菌の値は小さいが、電気伝導度は大きい。

表 3 トロッコ保津峡駅北側施設の原水試験結果(2020 年 11 月～2023 年 2 月、n=33)

	pH	電気伝導度 μS/cm	濁度 度	一般細菌 CFU/mL	従属栄養細菌 CFU/mL	大腸菌群 MPN/100mL	大腸菌 MPN/100mL	嫌気性芽胞菌 CFU/L
平均値 (算術／幾何)	7.75	63.7	4.90	29.6	245	-	8.2	11.8
最大値	7.97	90.5	10.6	300	1210	≧2400	1100	76.0
最小値	6.66	25.2	0.14	5.3	11.0	29.0	0.4	1.3
中央値	7.89	59.5	5.03	30.0	360	-	9.3	12.7

表 4 トロッコ保津峡駅南側施設の原水試験結果(2020 年 11 月～2023 年 2 月、n=30)

	pH	電気伝導度 μS/cm	濁度 度	一般細菌 CFU/mL	従属栄養細菌 CFU/mL	大腸菌群 MPN/100mL	大腸菌 MPN/100mL	嫌気性芽胞菌 CFU/L
平均値 (算術／幾何)	7.68	91.7	1.08	9.9	125	-	8.9	12.6
最大値	7.97	122	3.94	65.7	653	≧2400	240	120
最小値	6.46	60.6	0.21	0.3	7.7	4.3	0.4	0.7
中央値	7.80	90.9	0.81	12.0	165	-	9.3	17.0

4. 病原細菌群の網羅的検出

図2に次世代シーケンサーを用いて病原細菌を一斉検出した結果を、図3に改良した手法によって得られた一斉検出結果を示す。図2には偽陽性のものが含まれる可能性が高いものの、これらの図から *Aeromonas* 属や *Mycobacterium* 属、*Legionella* 属、*Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属といった水環境や土壌中の常在菌が頻繁に検出されていることがわかる。これらの多くは免疫の低い人々に感染性を示す日和見感染菌として一般的なものである。他にも *Klebsiella* 属や *Clostridium* 属など動物の糞便由来の細菌として有名なものも散発的に検出されたものの、上記のような環境常在菌よりは検出されにくい傾向にあった。

5. QMRA 手法による細菌の要求除去・不活化能の推定

トロッコ保津峡駅の北側、南側施設の原水の微生物的安全性を確保するために必要な除去不活化

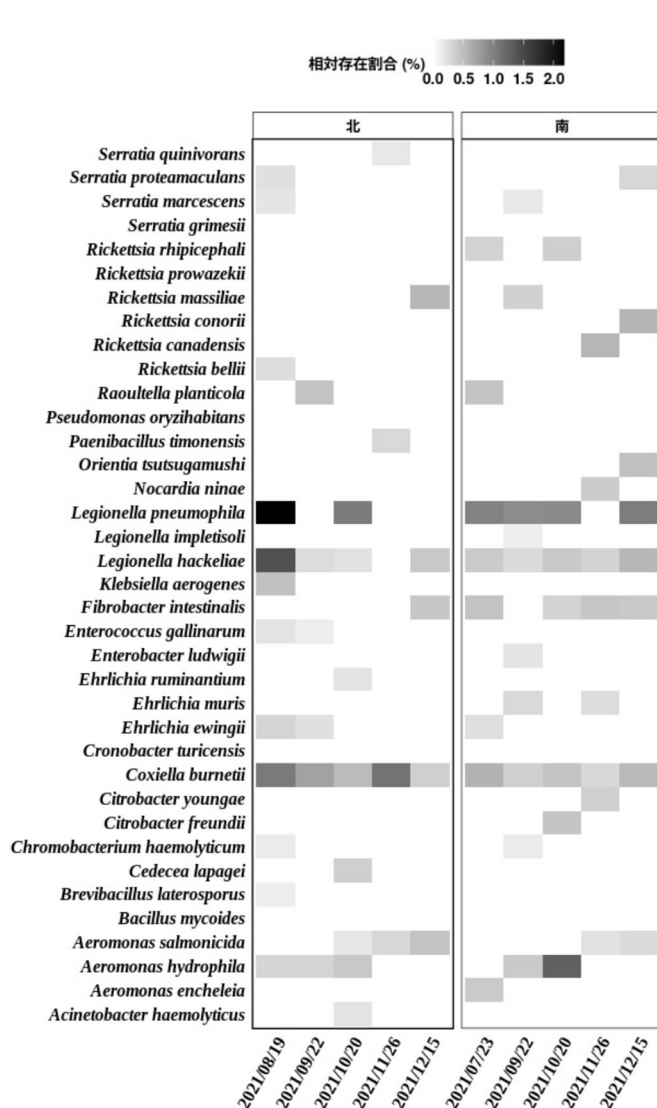


図2 トロッコ保津峡駅における病原細菌種の一斉検出結果（左：北側施設、右：南側施設）

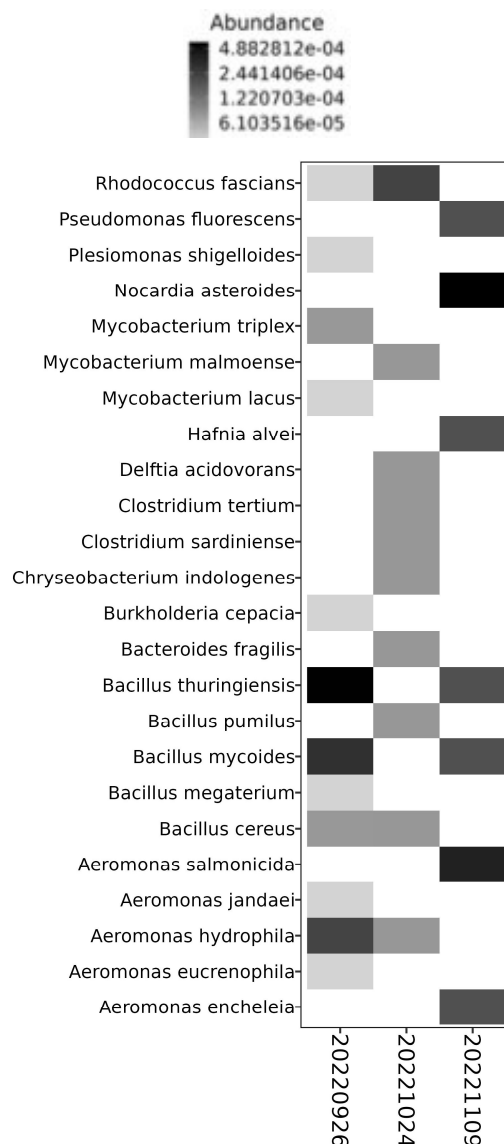


図3 トロッコ保津峡駅（北側施設）における病原細菌種の一斉検出結果（図中の Abundance は全細菌に占める相対割合を横軸は採水日を示す）

log 数の推算結果を図 4、図 5 に示す。なお、これは図 2 の検出結果に基づいて推算したものである。感染経路がエアロゾル吸入の病原種に対しては概ね 1～2 log 程度の除去・不活化 log 数となったのに対して、経口感染を仮定した病原種の要求処理能は 5～7 log 程度と高く推算された。経口感染の細菌を十分に除去・不活化できればエアロゾル感染の細菌リスクも制御できるため、対象地域における必要除去・不活化能としては 5～7 log 程度であることが推察された。なお、感染経路による要求処理能の違いが出た理由として、エアロゾル吸入を介した曝露量が飲水による曝露よりも大幅に小さいことが考えられる。

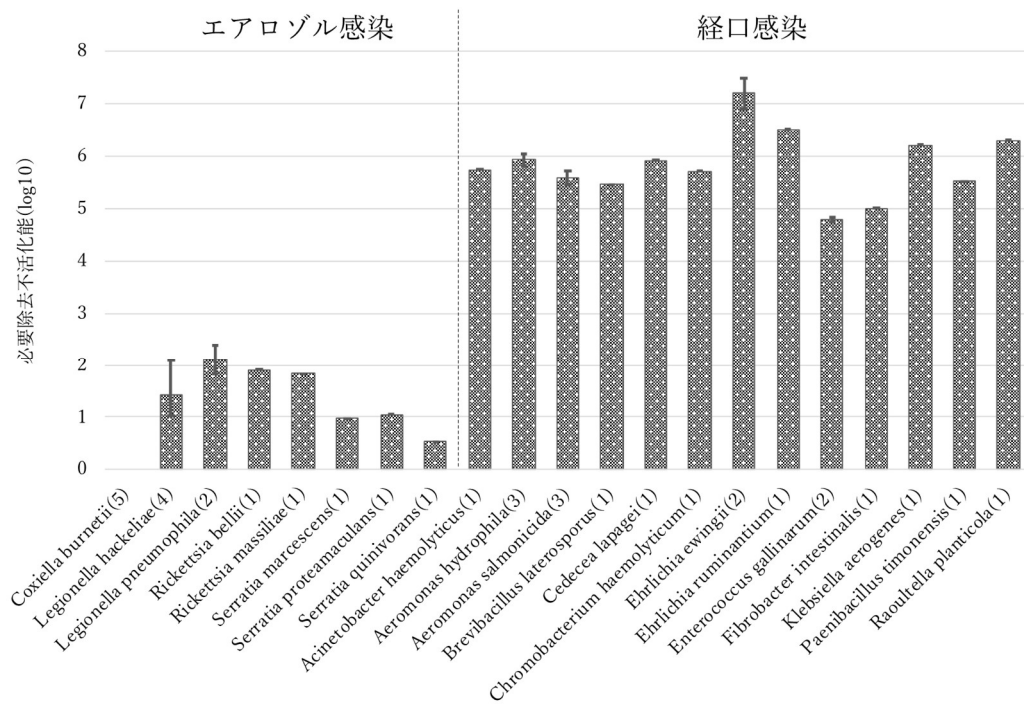


図 4 浄水処理に求められる除去・不活化 log 数
(北側施設、横軸のカッコ内は検出された試料数を示す)

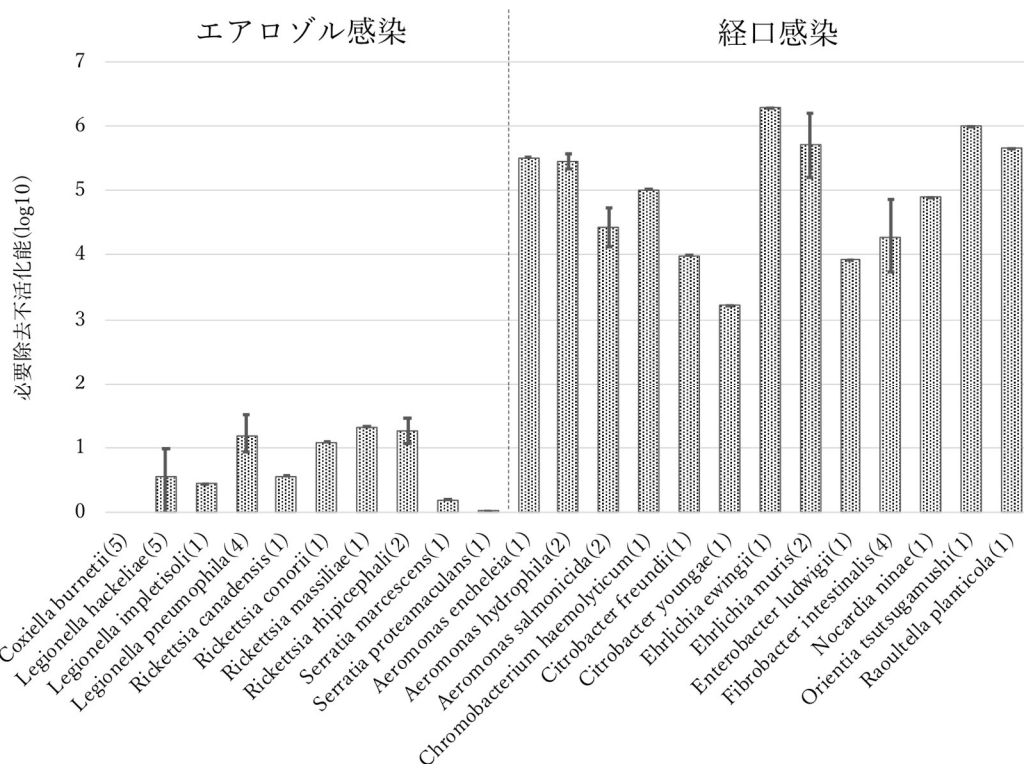


図5 浄水処理に求められる除去・不活化 log 数
(南側施設、横軸のカッコ内は検出された試料数を示す)

D. 考 察

小規模水道においては、まずは微生物的な安全確保が優先される¹¹⁾。ここでは、定量的微生物リスク管理 (Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA) 手法によって、原水の微生物リスクを定量したうえで、必要な浄水処理レベルについて考察する。

1. 微生物的安全確保へ向けたアプローチ方法¹²⁾

ここでは、地元管理されている水供給施設を含めた小規模水道施設を扱っている。そのような施設の場合、特定の病原微生物、すなわちカンピロバクター、ロタウイルス、クリプトスポリジウム、ジアルジアなどの原水中の濃度が把握されているのは皆無であろう。また、浄水処理や消毒が不十分である場合も少なくない。そのような施設において、微生物的な安全性を確保しようとする場合、どのようなアプローチ方法をとればよいのだろうか。図6は、そのための枠組みを示したものである。

飲用井戸等衛生対策要領は、給水開始前に、消毒副生成物 11 種類を除く 40 項目の検査を求めている。これより、一般細菌と大腸菌については検査結果が存在するはずである。万一、存在しなければ、これら 2 項目の検査を行うものとする。すなわち、図6では、原水について、一般細菌と大腸菌の検査結果が存在することを前提とする。

原水において一般細菌のみが検出 (大腸菌は不検出) され、利用できる情報がこれしかない場合、既存の文献情報を参照しつつ日和見菌等の病原性細菌濃度を推定する。また、適用すべき用量-反応モデルも不明なので、適当と考えられる日和見菌の感染確率モデルを使用する。なお、最大感染確率モデルや逆に低確率モデルを使用することも考えられる。これより算出される、浄水処理において必要な除去・不活化能は大きな値となり、実際のリスクよりも極めて安全側の評価をすることになるだろう。

これに対して、原水に対する追加調査を実施できる場合を考える。網羅的検出 (一斉検出) 試験や

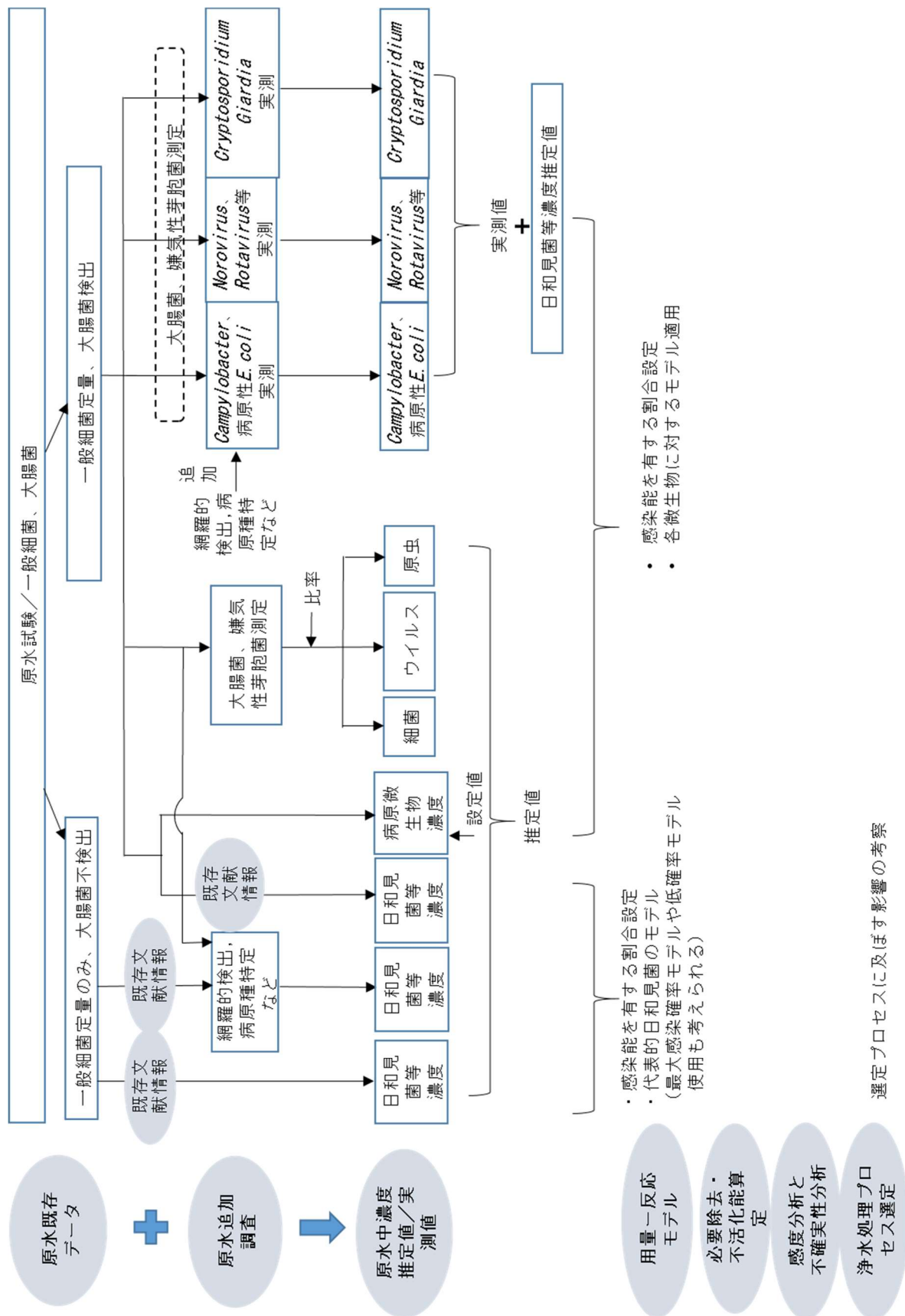


図 6 微生物的安全確保へ向けたアプローチ方法

病原種を特定する試験などを実施できる場合には、対象微生物を限定できる。また種によっては、特定の用量－反応モデルを使用できる場合がある。これによって、安全側に過ぎる評価が緩和され、必要な除去・不活化能も小さな値ですむことになるだろう。

次に、大腸菌が検出された場合を考える。追加調査を行わない場合、大腸菌「検出」という定性結果のみであるので、病原性微生物の濃度としては安全側の値に設定することになる。これは、対象となる病原微生物の原水中濃度に関するデータがない、または不足している場合にも、類似した原水に関する文献値から設定する方法としてしばしば採用される方法である。例えば、カンピロバクター：1/10 L, クリプトスポリジウム：1/m³ など。

これに対して、追加調査を行える場合を考える。まず、大腸菌や嫌気性芽胞菌といった指標細菌の濃度を測定できた場合には、これに既存文献に基づいた比率を乗じることによって、細菌、ウイルス、原虫の濃度を設定する。さらに、もっとも望ましい追加調査とは、各病原微生物の濃度を実測できることである。こうして推定または実測した病原微生物の濃度に基づいて、必要な除去・不活化能の導出を進める。

重要な点は、原水に対する既存データのみでは、安全側の評価とせざるを得ず、必要な除去・不活化能も大きくなるのに対して、追加調査を詳しく行えば行うほど、制御すべきリスクを限定することができるので、必要除去・不活化能の大きさも適切に設定できるということである。

2. 一般細菌数を用いた必要除去・不活化能の試算^{12,13,14,15)}

測定数が多い京都帝釈天施設およびトロッコ保津峡駅施設の測定結果に基づいて試算する。今回の原水試験の結果は表3、表4、表5に示す通りであるが、ここではまず、一般細菌のみ検出され大腸菌が検出さなかった場合を考える。

表6は、文献に見られる比率等を取りまとめたものである。25文献をレビューしたが、それらは、浄水処理の有無、消毒の有無等を含む各種の報告である。このうち、原水が表流水（河川、貯水池、湖沼）である場合のデータを抽出した。表のNは、報告数を意味する。なお、ここでは、HPCについて一般細菌と従属栄養細菌を区別していない。

表6 文献に見られる比率等のまとめ

	HPC/全細菌	HPC/全生菌	全生菌/全細菌
表流水における値 (各ケースについての中央値を算出。その後、全体の中央値を算出。)	N=12 9.82E-06 ~ 3.10E-01 Median=7.47E-04	N=8 3.31E-04 ~ 7.75E-01 Median=1.81E-03	N=8 3.08E-01 ~ 9.55E-01 Median=0.506

表6を参照して設定した比率等は以下の通り。一般細菌/全細菌=0.075%、一般細菌/全生菌=0.18%、病原性生菌/全病原性細菌=50.6%。また、全細菌の約3%は病原性細菌とした。以上より、病原性生菌数の算定式は以下の通り。

$$\text{病原性生菌数} = \text{一般細菌数} \div 0.075\% \times 3\% \times 50.6\%$$

病原性生菌はすべて日和見菌等であるとみなす。用量-反応モデルとしては、日和見菌のうち指数モデルの γ が最小である *Staphylococcus aureus* のモデル($\gamma=7.64\text{E-}08$)を適用した。

必要除去・不活化能の試算結果を表7に示す。測定した一般細菌数をもとに、病原細菌による感染確率 10^{-4} /人/年以下を満たすのに必要な除去・不活化 log 数を算定したものである。

表7 一般細菌数に基づく必要除去・不活化能の試算

	トロッコ保津峡駅 北側施設	トロッコ保津峡駅 南側施設	京都帝釈天施設
日和見菌等推定濃度(cells/mL)	5.99E+02	2.00E+02	5.99E+02

必要除去・不活化 log 数	4.7	4.3	4.7
----------------	-----	-----	-----

3. 大腸菌数を用いた必要除去・不活化能の試算

つぎに、一般細菌に加えて大腸菌が検出された場合を想定する。大腸菌については、水質検査機関による検査結果の報告は、「不検出」または「検出」の定性的結果のみである。したがって、検査結果が「検出」であった場合、濃度は独自に測定する必要がある。

各試料水の大腸菌濃度測定値に基づいて、各種病原微生物に対する必要除去・不活化能を試算した結果を表8に示す。まず、大腸菌測定値に対して比率を乗じ各種病原微生物濃度を設定した。その後、感染確率 10^{-4} /人/年以下を満たすのに必要な除去・不活化 log 数を算定したものである。

「WHO 定量的微生物リスク評価ガイドブック」¹²⁾に記載されている大腸菌：E. coli O157:H7、大腸菌：ロタウイルス、大腸菌：クリプトスポリジウム、大腸菌：カンピロバクターの比率はそれぞれ 1:0.08、1:5.00E-06、1:1.00E-06、1:0.66 である。用量—反応モデルについては、E. coli O157:H7 は $\gamma=0.0093$ 、ロタウイルスは $\gamma=0.59$ を適用した。

このような、細菌、ウイルス、原虫を対象としてリスク評価を行った場合、カンピロバクターに対する必要除去・不活化能がもっとも大きい結果となる場合が多い。表8の結果も同様であることがわかる。また、本例のように大腸菌や嫌気性芽胞菌が検出された場合、クリプトスポリジウムに対する除去・不活化能として、例えば 3 log 程度以上の処理能が必要とされてしまう場合が多いが、表8では 1.3~1.4 log でよいと見積られている。このように、簡単な QMRA を行うだけで、過剰処理を回避し、必要十分な浄水処理プロセスを提示することができる。

表8 大腸菌濃度測定値に基づく各種病原微生物に対する必要除去・不活化能の試算

病原微生物	条件／パラメータ	トロッコ北側施設 log 数	トロッコ南側施設 log 数	京都帝釈天施設 log 数
病原大腸菌 E. coli O157:H7	大腸菌×0.08 ; $\gamma=0.0093$	4.9 (6.56E-03)	4.9 (7.12E-03)	4.9 (7.28E-03)
カンピロバクター	大腸菌×0.66; $\gamma=0.686$	7.6 (5.41E-02)	7.7 (5.87E-02)	7.7 (6.01E-02)
ロタウイルス	大腸菌×5.00E-06 ; $\gamma=0.59$	2.5 (4.10E-07)	2.5 (4.45E-07)	2.5 (4.55E-07)
クリプトスポリジウム	大腸菌×1.00E-06 ; $\gamma=0.2$	1.3 (8.20E-08)	1.3 (8.90E-08)	1.3 (9.10E-08)

カッコ内は原水中推定濃度(cells/mL)

4. 不確実性分析

表7で、*Staphylococcus aureus* の用量-反応モデル($\gamma=7.64E-08$)を適用した場合をベースケースとして不確実性分析を行った。トロッコ保津峡駅北側施設を対象とした場合の結果を表9に示す。

表6に示した文献情報を精査し、極端な報告値を除外すると、一般細菌／全細菌：0.00681%~1.75%、一般細菌／全生菌：0.0595%~5.93%、全生菌／全細菌：32%~65.5%の範囲とみなせる。これらを参考として、一般細菌／全細菌の割合、病原性細菌／全細菌の割合、病原性生菌／病原性細菌の割合の上限値および下限値を表9のように設定した。また、日和見菌等生菌／全生菌、病原性細菌／全細菌、日和見菌等／病原性生菌の割合の最小値は、とりあえず、それぞれ 0.01%、0.01%、0.1%と仮定する。これより、日和見菌等／病原性生菌の割合の下限値として 0.1%を設定した。感染能を有する割合は

10%~100%に設定することが多いことから、下限値を 10%とした。用量—反応モデルは *Staphylococcus aureus* のモデル ($r=7.64E-08$) に対して、*Legionella* のモデル($r=5.99E-02$)を適用した。非加熱飲料水消費量 327 mL は大阪市で得られた値であるが、WHO 飲料水水質ガイドラインに記載されている 1 L を設定した。

ベースケースにおける 4.8 log に対して必要除去・不活化能の差が 1 log を超える項目を朱書している。これらはリスク評価において不確実性が高い項目であるといえることができる。このように、不確実性分析を行うことによって、今後重点的に調査を行ったり知見の集積を行うべき項目を抽出することができる。

今後は、調査データを集積しつつ、ここで述べた枠組みを構築していくこととする。

表 9 不確実性分析の結果(トロッコ保津峡駅北側施設対象)

必要除去・不活化能に対する不確実性項目		必要除去・不活化 log 数
ベースケース		
一般細菌数: 29.6 CFU/ml ; 一般細菌／全細菌の割合=0.075% ; 病原性細菌／全細菌の割合=3% ; 病原性生菌／病原性細菌の割合=50.6% ; 日和見菌等／病原性生菌の割合=100% ; 感染能を有する割合=100% ; 非加熱飲料水消費量=327 ml; <i>Staphylococcus aureus</i> 用量反応モデルを借用 $\gamma=7.64E-08$		4.7
一般細菌／全細菌の割合	0.001%	6.6
	10%	2.6
病原性細菌／全細菌の割合	0.01%	2.3
	10%	5.3
病原性生菌／病原性細菌の割合	10%	4.0
	80%	4.9
日和見菌等／病原性生菌の割合	0.1%	1.7
感染能を有する割合	10%	3.7
非加熱飲料水消費量	1 L	5.2
用量-反応モデル	<i>Legionella</i> : $\gamma=5.99E-02$	10.6

*赤字：必要除去・不活化 log 数の差が 1 を超える項目

5. 病原細菌群の網羅的検出とそれに基づいたリスク評価

上記考察 2～4 の内容は、原水中の微生物濃度として一般細菌や大腸菌のみが利用できる場合のリスク評価結果である。一方、本研究では次世代シーケンサーによる病原細菌の網羅的検出結果も用いてリスク評価を行い、必要除去・不活化 log 数を推定した。トロッコ保津峡駅施設の原水からは、*Mycobacterium* や *Aeromonas*、*Bacillus* 属といった環境常在菌が頻繁に検出され、都市部の大河川で問題となるような糞便由来の病原細菌は散発的な検出にとどまった。今回対象としたような山間部の地表水に糞便汚染が発生することは稀であることは想像にも難しくなく、水道原水としては清浄な水質であると推察される。一方で、これらの日和見感染菌が存在していることも事実であるため、高齢者など免疫の弱い人々が水利用の主体となる場合には、適切な浄水操作が必要となるであろう。トロッコ保津峡駅施設で検出された 22 属 37 種の病原種（図 2）のうち、感染経路をエアロゾル吸入とした病原種については概ね 1～2 log 程度、経口感染を仮定した病原種に対しては 5～7 log 程度という要求処理能が推定された。特に後者の値は表 9 や表 10 の算定値よりも大きいことが多く、一斉検出によって評価対象の微生物を限定したとしても、必ずしも必要な除去・不活化能が小さくなることはなかった。遺伝子解析によって検出される細菌の生死状態を踏まえた評価とすることや、水系感染を引き起

こす病原種に絞った評価とすること、曝露シナリオや用量-反応関係が不明な病原種に対する適切な評価法の立案が今後の課題である。

E. まとめ

(1) 小規模水供給施設における定量的微生物リスク評価と安全確保へ向けたアプローチ方法

滋賀県長浜市寺院、京都府南丹市寺院、および京都市西京区における水供給施設を調査対象とした。原水の微生物リスクを推定したうえで、必要な浄水処理レベルについて考察を行った。

また、限定的な情報の下で、微生物的な安全性を確保するためのアプローチ方法を提示した。

(2) 小規模水供給施設における原水中の病原細菌群の網羅的検出

上記の小規模水供給施設の原水を対象に、NGS を用いて種レベルまでの分類解像度を持たせた細菌の一斉検出に取り組んだ。その結果、対象地域では土壌・水環境中の常在菌が主な病原細菌であることを示した。検出された全ての病原種を対象としたリスク評価を行い、浄水処理に要求される除去・不活化能について考察した。

謝辞：トロッコ保津峡駅施設（京都市西京区）における調査にご協力いただいている嵯峨野観光鉄道株式会社、採水調査を受け入れていただいている京都帝釈天（京都府南丹市）、および大吉寺（滋賀県長浜市）に謝意を表す。

F. 研究発表

1. 学会発表

原彩斗、曾潔、中西智宏、伊藤禎彦：小規模水供給施設における病原細菌のスクリーニング調査を踏まえた定量的微生物リスク評価，環境衛生工学研究，Vol.36, No.3, pp.21-23, 2022.7

Jie Zheng, Ayato Hara, Takuya Kubo, Tomohiro Nakanishi, Sadahiko Itoh : Potential of Nanopore Sequencing of Full-length 16S rRNA for Identification of Pathogenic Bacteria in Small-scale Water Supply Systems, Water and Environment Technology Conference, WET2022-online PROGRAM and ABSTRACT, p.57, 2022.7

伊藤禎彦，曾潔，中西智宏：小規模水道供給システムの実態と微生物学的安全確保法，2022 年度第 35 回日本リスク学会年次大会講演論文集，p.90, 2022.11.

曾潔，原彩斗，久保拓也，中西智宏，伊藤禎彦：病原細菌種の網羅的検出に基づいた小規模水供給施設における定量的微生物リスク評価，第 56 回日本水環境学会年会講演集，p.119, 2022.3.

中西智宏，曾潔，久保拓也，原彩斗，伊藤禎彦：水道原水中の病原細菌種の一斉検出を目的とした DNA メタバーコーディング手法の確立，第 56 回日本水環境学会年会講演集，p.122, 2022.3.

2. 総説・解説

伊藤禎彦，中西智宏，曾潔：小規模な水供給でどう安全な水を確保するか，特集：人口減少社会における持続可能な水供給システムとまちづくり，保健医療科学，Vol.71, No. 3, pp.225-233, 2022.8

3. 講演

伊藤禎彦：地元管理されている小規模水道の実態と課題，島根大学生物資源科学部，2022.10.25

伊藤禎彦：小規模水供給施設における衛生問題と微生物的安全確保，令和 4 年度市町村等水道担当者連絡会（第 21 回），公益財団法人島根県環境保健公社主催，ホテル白鳥，2022.10.26

伊藤禎彦：小規模水供給施設の実態と微生物的安全確保，シンポジウム「小規模水供給システム研究

の進展」，東京大学 HASEKO-KUMA HALL，2023.2.22.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【参考文献】

- 1) 伊藤禎彦，堀さやか：住民との連携による水供給システムの維持管理手法とそれらの知見共有方策に関する検討、平成 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）小規模水供給システムの安定性及び安全性確保に関する統合的研究（H29-健危-一般-004）総括研究報告書，pp.82-89, 2019.3.
- 2) 伊藤禎彦，堀さやか：地元管理されている小規模水道の実態と課題、平成 31 年度（令和元年度）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）小規模水供給システムの安定性及び安全性確保に関する統合的研究（H29-健危-一般-004）分担研究報告書，pp.108-141, 2020.3
- 3) Rodríguez-Pérez, H., Ciuffreda, L. and Flores, C : NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data, *Bioinformatics*, Vol. 37, No. 11, pp. 1600– 1601, 2021.
- 4) Fang, T., Cui, Q., Huang, Y., Dong, P., Wang, H., Liu, W.-T. and Ye, Q. : Distribution comparison and risk assessment of free-floating and particle-attached bacterial pathogens in urban recreational water: Implications for water quality management, *Science of the Total Environment*, Vol. 613, pp. 428–438, 2018.
- 5) Taylor, L. H., Latham, S. M. and Woolhouse, M. E. : Risk factors for human disease emergence, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, Vol. 356, No. 1411, pp. 983–989, 2001.
- 6) Reimer, L. C., Vetcinova, A., Carbasse, J. S., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C., and Overmann, J.: Bac Dive in 2019: Bacterial phenotypic data for high-throughput biodiversity analysis, *Nucleic acids research*, 47(D1), D631-D636, 2019.
- 7) Karst, S.M., Ziels, R.M., Kirkegaard, R.H., Sørensen, E.A., McDonald, D., Zhu, Q., Knight, R., Albertsen, M., 2021. High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nat. Methods* 18, 165–169.
- 8) 伊藤禎彦、中西智宏、曾潔：小規模水供給施設における衛生問題と微生物的安全確保法、令和 4 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）小規模水供給システムの持続可能な維持管理に関する統合的研究（20LA1005）分担研究報告書、2023.3.
- 9) 伊藤禎彦、中西智宏：表流水取水装置および管内環境制御からみた浄水処理方法、令和 3 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）小規模水供給システムの持続可能な維持管理に関する統合的研究（20LA1005）分担研究報告書、2021.12.

- 10) 社団法人 船井青年会議所社会開発委員会：船井六水、12 p, 1992.
- 11) 岸田直裕，松本悠，山田俊郎，浅見真理，秋葉道宏；我が国における過去 30 年間の飲料水を介した健康危機事例の解析（1983～2012 年）、保健医療科学,64(2),70-80,2015.
- 12) 国立保健医療科学院；定量的微生物リスク評価-水安全管理への適用-,235p., 2020.
- 13) QMRA wiki, <http://qmrawiki.org/>.
- 14) World Health Organization; Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition Incorporating the First Addendum, 2017.
- 15) 伊藤禎彦，曾潔，武藤陽平：小規模水供給施設における衛生問題と微生物的安全確保法，令和 2 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）小規模水供給システムの持続可能な維持管理に関する統合的研究（20LA1005）分担研究報告書, 2022.3.