

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

水系感染微生物による水環境汚染の把握と
微生物起源解析の活用に関する研究
(5-1603)

平成28年度～平成30年度

Development and Application of Novel Microbial Source Tracking Tools
for Waterborne Infectious Disease Control

〈研究代表機関〉
東京大学

〈研究分担機関〉
京都大学
東北大学
山梨大学

〈研究協力機関〉
なし

2019年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価 （東京大学）	11
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価 （京都大学）	22
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-3 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究 （東北大学）	38
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	

4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-4 ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究
(山梨大学) 55

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

III. 英文Abstract 73

I. 成果の概要

課題名 5-1603 水系感染微生物による水環境汚染の把握と微生物起源解析の活用に関する研究

課題代表者名 片山 浩之（東京大学大学院 工学系研究科 都市工学専攻 准教授）

研究実施期間 平成28～30年度

累計予算額 112,941千円

（うち平成28年度：38,285千円、平成29年度：38,285千円、平成30年度：36,371千円）

本研究のキーワード 微生物起源解析、糞便汚染、大腸菌、ファージ、腸管系ウイルス、バクテロイデス、雨天時排水、ノロウイルス、血液型決定抗原陽性大腸菌、医薬品

研究体制

- (1) 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価(東京大学)
- (2) 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価(京都大学)
- (3) 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究(東北大学)
- (4) ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究(山梨大学)

研究協力機関

なし

1. はじめに(研究背景等)

水環境における衛生学的水質基準として、我が国においては大腸菌群が長らく用いられてきた。その間、先進諸外国においては、大腸菌群を大腸菌に変更するだけにとどまらず、大腸菌ファージを用いた規制や、リスク評価を取り入れた基準など、様々な先進的な科学的知見を取り入れた基準が導入されているが、我が国ではいまだに大腸菌群などの細菌指標のみの規制に終始している。大腸菌などの細菌指標は、クリプトスポリジウムやウイルスなどの環境ストレスに耐性の高い病原微生物よりも死滅しやすいため、指標性に問題があることが指摘されている。また、逆に大腸菌は様々な温血動物から排出されたり、環境中での増殖の可能性が指摘されたりしていることから、地域の努力にも関わらず環境基準の超過が減少しない原因となっているとも指摘されている。近年は、クリプトスポリジウムのみならず、病原ウイルスについても環境試料からの測定データが得られるようになってきており、指標の実効性について環境調査データにより評価が可能となってきている。また、申請者らがH27年度まで行っている環境省の研究においても、ノロウイルスに代表される腸管系ウイルスの海域での拡散挙動は大腸菌と異なる傾向を示すこと、琵琶湖南湖のウイルス濃度は、広く頻繁に検出され、大腸菌などの指標細菌濃度と無関係に検出されることなどが分かってきている。また、指標と病原微生物の濃度相関のみに依拠するのではなく、汚染源のはっきりしているものを指標とすることで汚染源解析する(そして病原微生物のリスク評価に用いる)手法が発達してきているが、我が国における環境試料についてはデータの蓄積が足りないのが現状である。

2. 研究開発目的

(1) 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価

東京湾沿岸域において、降雨イベント前後の腸管系ウイルス、バクテリオファージの存在状況の関係性について明らかにするとともに、トウガラシ微斑ウイルスのウイルス指標としての有効性、遺伝子型別FRNAファージの汚染源解析指標としての有効性を検討する。また、河川環境中における大腸菌の増殖可能性について解析する。さら

に、我が国に広く分布するバクテロイデスファージに対して感受性の広い宿主株を探索する。

(2) 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価

琵琶湖南湖において微生物を長期間モニタリングする。また、ファージや大腸菌の遺伝子解析による微生物起源解析や、医薬品マーカーや3次元蛍光などの汚染源解析の手法を適用して、その有効性を評価する。微生物濃度変動と雨天時の下水処理場の排水との相関についても解析を試みる。

(3) 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究

環境水サンプル中から血液型決定抗原陽性大腸菌を単離し、血液型決定抗原分泌関連遺伝子を同定する。この血液型決定抗原分泌関連遺伝子のノロウイルス指標としての活用可能性を評価する。

(4) ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究

山梨県内を研究フィールドとし、バクテロイデス、ウイルスおよびミトコンドリアDNAを微生物遺伝子マーカーとして用いることの有効性を糞便汚染源試料を用いて評価し、河川水中の糞便汚染源の推定を試みると共に、琵琶湖南湖の湖水への適用も試みる。さらに、新たな微生物遺伝子マーカー候補としてF特異DNA大腸菌ファージ(F-DNAファージ)と体表面吸着大腸菌ファージ(体表面ファージ)に着目し、その有効性を評価する。

3. 研究開発の方法

(1) 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価

大型降雨イベント時に東京湾沿岸でサンプリングを行い、腸管系ウイルスおよびバクテリオファージの分布を調査した。また、底泥や濾過食生二枚貝の中腸腺に蓄積したウイルスを東京湾、多摩川において回収し、より長期的な腸管系ウイルス等の糞便汚染の蓄積状況を調べた。また、河川水に含まれる基質について、大腸菌の資化性能解析し、環境水中での増殖可能性を調査した。さらに、全国19地域の下水处理施設から流入水試料を採取し、バクテロイデス株の分離を行うと共に、ファージ感受性試験を行い、感受性幅の広い株を探索した。

(2) 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価

琵琶湖南湖、南湖に放流する下水処理場放流水の水中の病原微生物、指標微生物の存在実態を調査した。F RNAファージの遺伝子型解析、ヒト由来医薬品等の測定を通じて汚染源の解析を進めることで、その有効性評価のためのデータを蓄積した。また、琵琶湖南湖で単離した大腸菌について、全ゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーを用いて解読することで、その起源を推定した。また、琵琶湖南湖でのノロウイルス濃度の変動と周辺の合流式下水道における雨天時の排水の相関を調べた。

(3) 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究

大腸菌検出用培地による培養前環境水サンプル及び培養後の菌体について、蛍光標識付き抗血液型決定抗原抗体により標識し、フローサイトメトリーにより血液型決定抗原陽性大腸菌の単離を試みた。同時に、ノロウイルス吸着性糖鎖である血液型決定抗原を細胞外に保持する大腸菌K-12 BW25113を親株とする変異体（計3985株）について、血液型決定抗原発現レベル及びノロウイルス粒子吸着性を評価した。

(4) ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究

糞便汚染源試料として、下水流入水と2次処理水、合併浄化槽排水、ウシ糞便、ブタ糞便および豚舎排水を採取したほか、過去の研究で採取した試料も適宜使用した。水試料として、糞便汚染の影響をほとんど受けていないと想定される山梨県瑞牆山の源流域の3地点（9試料）、甲府盆地内を流下する荒川の5地点と富士川の1地点（54試料）、甲府盆地全域の21地点（63試料）において河川水、琵琶湖南湖の11地点で湖水（44試料）を採取した。

指標微生物として、大腸菌群と大腸菌を培養法によって測定した。バクテロイデスは、7種類の定量PCR系（ヒト：3種類、反芻動物：2種類、ブタ：2種類）を用いて測定した。ミトコンドリアDNAの測定には、ヒト、ウシおよびブタに特異的な3種類の定量PCR系を使用した。ウイルスは、5種類のヒトウイルスおよびヒト特異的マーカーとなり得ることが示唆されている2種類の植物ウイルス、3種類のウシウイルスおよび2種類のブタウイルスを対象とした定量PCR系を用いて測定した。

F-DNAファージと体表面ファージは、ブラック法によって培養した後、ブラックを単離し、それぞれに

特異的な定量PCR系と定性PCRに供し、ダイレクトシーケンシングによって遺伝子群を同定した。

4. 結果及び考察

(1) 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価

東京湾沿岸域において降雨後の腸管系ウイルスおよびバクテリオファージ汚染の実態調査を実施した結果、測定した全ての微生物で、降雨後には晴天時と比べて有意な濃度の上昇が見られたが、各指標微生物はそれぞれ異なる挙動を示した。GI型FRNAファージは他の微生物と比較して、濃度の上昇が限定的であった一方で、GIII型FNRAファージは晴天時にはほとんど検出されず、降雨後のCSO発生時に高い濃度で検出されており、濃度変化が非常に大きかった。このことから、GIII型FRNAファージは、他の微生物と比較しても、降雨直後のCSOによる汚染への特異性が高いと言える。

また、調査領域を東京湾口まで広げ、湾口～湾中央部における人為的PMMoV汚染の調査を実施するとともに、その生残性を室内実験で観察したところ、生残実験においては、大腸菌やノロウイルスに比べて高い残存傾向を示した。PMMoVは環境中ウイルス汚染の新規指標として期待されているが、環境調査における高濃度なPMMoVの特徴と合わせて、本研究で得られた残存性に関わる挙動は、病原性ウイルスとの比較において重要な知見である。

全国19地域の下水处理施設から採取した試料からは、228株のバクテロイデス株を分離した。この中に、分離地と異なる流入水試料に高いファージ感受性を示したものが29株見られた。日本では地域ごとに住む人々の食生活なども異なると考えられるが、住民糞便由来の腸内細菌とファージは地域間で感染し得るものであり、バクテロイデスファージの測定が新たな汚染指標となりうる。

また、河川水を培養液とした大腸菌の増殖実験では、環境水中での増殖ポテンシャルと他細菌との有機物競合を明らかにした。

(2) 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価

大腸菌、大腸菌群の検出結果

琵琶湖南湖、または下水処理場の流入水試料および放流水試料における大腸菌および大腸菌群の検出濃度を比較した。下水処理場の流入水試料および放流水試料では、大腸菌・大腸菌群濃度比が1:10程度となった。この結果は、糞便に強く汚染された水中では、大腸菌・大腸菌群濃度比が1:10程度となる過去の報告と一致する。これに対して、琵琶湖南湖の水試料では、ほとんどの試料で大腸菌群濃度が大腸菌濃度の100倍以上となった。南湖での濃度比の結果は、南湖での採水試料から検出された大腸菌群のほとんどは糞便ではなく土壌等に由来するものであることを示唆している。このことから、少なくとも琵琶湖南湖においては、大腸菌群は糞便汚染を評価する指標として有効ではないことが明らかとなった。

FRNA ファージの遺伝子型別の検出結果

放流水中のFファージを遺伝子型別にRT-qPCRで定量した。流入水と同様に、放流水中からもGII、GI、GIII-Fファージの順で頻繁に検出された。GII-Fファージは主に人糞便由来であること、放流水中でも高頻度、比較的高濃度に検出されることから、琵琶湖南湖における病原ウイルス汚染の指標の候補となりうると期待される。

琵琶湖南湖におけるGII-Fファージは2014年7月～2016年12月までの調査で27% (n=366のうち99)の試料で検出されていた。琵琶湖南湖水サンプルのうちで27%は、下水処理場からの処理水の汚染を受けていることが考えられた。また、琵琶湖南湖からはGIII-Fファージも検出された(3%、n=366のうち12)。サブテーマ(1)の研究結果が示すように、GIII-FPHは、雨天時に下水が未処理のまま水域へ放流されるようなフレッシュな汚染を示す指標になりえる。琵琶湖南湖でも、雨天時下水排水に起因するような汚染イベントが発生していたことが示唆される。

ノロウイルスの検出結果、雨天時下水処理場での排水との相関

琵琶湖南湖においてはGII-NoVは2014年に90試料中71試料で陽性となり、高頻度かつ高濃度で検出さ

れた。しかし、2015年は144試料中17試料で陽性と極端に陽性率が低下し、検出濃度も $10^1 \sim 10^2$ copies/L程度と検出下限値付近の低濃度であった。そして、2016年4月から再び陽性率、検出濃度ともに上昇し、2016年の132試料中88試料で陽性となった。このように、GII-NoVの検出傾向は年によって大きく異なっていた。興味深いことに、2014年、2016年、および2017年においては胃腸炎患者数が増える冬季の前の9月、10月において琵琶湖水でのノロウイルス濃度が放流水試料と同等もしくはそれ以上の高濃度で検出されていた。通常の下水処理場の放流水以外にも南湖へ負荷源があることが示唆される。例えば、雨天時の下水処理場からの排水が考えられた。そこで、琵琶湖南湖におけるノロウイルス濃度とその簡易処理水量の関係を比較した。つまり、簡易処理放流が発生したと思われる時期に琵琶湖南湖でウイルス濃度が上昇していないかを解析した。その結果、簡易処理量と琵琶湖南湖におけるGII-NoV濃度との間に強い正の相関が見られた。これらの結果から、初沈と塩素消毒だけでは十分に流入下水中のGII-NoVを除去・不活化できないため、雨天時に簡易処理放流が発生することが一つの要因となって琵琶湖南湖でウイルス濃度が上昇することが示唆された。

医薬品類を用いた南湖採水地点での下水処理水混入率の推定

難分解性医薬品であるCrotamitonとSulpirideの下水処理水中濃度と湖水中濃度を比較することで、湖水試料中の下水処理水混入率を計算した。その結果、下水処理場近傍において下水処理水混入率が高い結果となっており、Crotamitonが琵琶湖南湖においても下水混入のマーカーとして機能することが示唆された。

大腸菌の全ゲノム解析による系統分類、起源推定

2017年3月、7月、10月、12月に採水した琵琶湖水および周辺の3下水処理場の放流水から大腸菌を培養単離し、それぞれの大腸菌株の全ゲノム塩基配列を解読した系統分類の結果、琵琶湖水由来の大腸菌も下水放流水由来の大腸菌もB1系統が最多であった。しかし、琵琶湖水由来の大腸菌(44株中30株、68%)の方が、下水放流水由来の大腸菌(50株中22株、44%)よりも高い割合であった。過去の研究から、環境中から検出される大腸菌は系統B1が最も多いとの報告があり、本研究の琵琶湖水由来の大腸菌の系統分類は一致する結果となった。また、放流水は系統Aが50株中に8株(16%)あったが、琵琶湖水はゼロであった。由来既知の糞便株の系統分類の結果でヒト糞便由来株の多くが系統Aに分類されている結果を合わせて考察すると、琵琶湖南湖水由来の大腸菌は、やはり、下水由来(ヒト糞便由来)の大腸菌と系統が異なることが推測された。

宿主特異的マーカー遺伝子の保持の有無に基づく起源推定の結果から、琵琶湖南湖水由来の大腸菌は44株のうち、15株(33%)がトリ由来であると同定され、他にはウシ由来も7株(16%)あった。ヒト由来とブタ由来はそれぞれ1株のみ(2.2%)と非常に少なかった。琵琶湖南湖水の大腸菌については系統分類の結果もマーカー遺伝子の結果も、大腸菌の起源はトリの寄与がもっとも高いことを示唆している。下水処理放流水由来の大腸菌は、また琵琶湖水試料とは異なり、51株のうち14株(27%)がヒト由来で最多であった。

(3) 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究

水環境中に血液型決定抗原陽性大腸菌が存在していることが証明された。さらに、糖代謝に関わる複数の遺伝子が血液型決定抗原の発現に寄与していることが示された他、血液型決定抗原の構成成分であるガラクトースの代謝に関わるgalU遺伝子の欠損株が、ノロウイルス粒子結合性を喪失することが判明した。河川水中のgalU遺伝子量をノロウイルス濃度と比較したところ、一定の相関が確認され、ノロウイルス汚染指標としての有効性が示唆される結果を得た。

(4) ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究

糞便汚染源試料を用いて微生物遺伝子マーカーを測定し、感度(陽性試料を正しく陽性と判定できた割合)、特異度(陰性試料を正しく陰性と判定できた割合)および正確度(陽性・陰性試料を正しく判別できた割合)に基づいて評価した結果、バクテロイデス検出系においては、ヒト特異的な系としてBacHum、反芻動物特異的な系としてBacR、ブタ特異的な系としてPig2Bac系が適していると判断された。ミトコンドリアDNA検出系として測定したウシおよびブタ特異的な2種類の系は、いずれも水試料への適

用が可能であると判断した。測定したウイルス遺伝子マーカーのうち、CrAssphage、ヒトアデノウイルス、ウシノロウイルスおよびブタテスコウイルスの4種類の検出系を使用することが適していると判断された。

瑞牆山河川水からは、ブタバクテロイデスは検出されず、ヒトバクテロイデスは9試料中1試料が陽性となったのみであったが、反芻動物バクテロイデスは9試料すべてから検出され、河川源流域においてシカやイノシシ等の反芻動物による河川水中への糞便汚染が生じていることが示唆された。甲府盆地内の荒川の5地点においては、反芻動物に加えてヒトバクテロイデスも大部分の試料から検出された。

甲府盆地全域の21地点で採取した河川水を用いた調査の結果、ヒトバクテロイデスは、上流に人家が存在しない地点（塔岩川）においてのみ測定したすべての試料が非検出となったが、21地点中19地点ではすべての試料から検出された。ウシバクテロイデスに比べて反芻動物バクテロイデスは多くの試料から検出されていたことから、ウシ以外の反芻動物による糞便汚染の影響があることが示唆された。塔岩川から反芻動物バクテロイデスが検出された結果は、瑞牆山での結果と一致する傾向であり、河川上流域においてシカやイノシシ等による糞便汚染の影響は大きいと推察された。ブタバクテロイデスとブタミトコンドリアDNAは比較的類似した検出傾向を示していた。特に、笛吹川の支川である鎌田川に位置する地点（鎌田川流末）と、鎌田川の流入直後の地点（三郡東橋）において、ブタバクテロイデスとブタミトコンドリアDNAの両方が高濃度で検出され、この流域に点在する豚舎からの排水による影響を受けていることが示唆された。CrAssphageは塔岩川を除くすべての地点から検出され、そのうち12地点ではヒトアデノウイルスも検出されていたことから、ヒト糞便汚染源を受けている地点であると推定された。ブタテスコウイルスは、ブタバクテロイデスおよびブタミトコンドリアDNAと同様に、鎌田川を中心とした地域から検出された。また、琵琶湖南湖の湖水に対する調査の結果、ヒトバクテロイデスとCrAssphageが多くの試料から検出され、ヒト糞便汚染を受けていることを示すと共に、他の流域へも本研究の手法を適用可能であることが示唆された。

ヒト糞便汚染源試料から単離したF-DNAファージのブラックは主にfd群とWT群に分類され、ブタ糞便汚染源試料由来のブラックとは異なる遺伝子群に分類された。同様に、体表面ファージの場合においても、マイクロウイルス科のPhiX174マイクロウイルス属を対象とした塩基配列解析により、ヒト糞便汚染源試料とブタ糞便汚染源試料から単離したブラックを異なる遺伝子群に分類することができた。これらの結果は、F-DNAファージと体表面ファージが新たな微生物遺伝子マーカーとなり得ることを示唆するものであった。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- 1) 全国19ヶ所の下水処理場から、バクテロイデス候補228株を分離した。この中から、分離源と異なる流入水試料に含まれるファージに対して高い感受性を示すものが29株が得られた。日本では地域ごとに住む人々の食生活なども異なると考えられるが、住民糞便由来の腸内細菌とファージは地域間で感染し得るものであり、バクテロイデスファージの測定が新たな汚染指標となりうることを示した。
- 2) 琵琶湖において、指標微生物および病原ウイルスを長期間にわたって継続してモニタリングしている。H26～27年度の環境省総合推進費での調査も含めれば4年半にわたりモニタリングしていることになる。これほど長期間にわたって指標微生物とウイルスの濃度変動の関係の調査は世界的にも稀である。
- 3) 琵琶湖南湖で単離された大腸菌の全ゲノム情報を解析することで、その起源を推定できる可能性を示すことに成功した。大腸菌全ゲノム解析の環境サンプルへの適用例としては、世界的にもほとんど例がなく、貴重なデータである。その結果、大腸菌については琵琶湖南湖では下水処理場以外にトリやウシの負荷が大きいことが示された。
- 4) 微生物だけでなく医薬品についても併せてデータを取得したことも世界的にみても貴重な研究である。これまで、環境中での保存性の高い一部の医薬品は下水汚染のマーカーとして使用されており、琵琶湖南湖においても活用が可能であることが示された。

- 5) 全国的に合流式下水道対策が推進されているが、現在のところその水質対象はBODとSSである。本研究では、放流先の湖水の他に、主な人為活動に由来する下水、下水処理水、雨天時の下水処理場からの簡易処理水を含む放流水、合流式下水道対策の放流水のデータを集め、わが国で両者の関係を初めて比較した貴重な研究である。その結果、特にノロウイルスに関しては、湖水の季節変動パターンは、下水や下水処理水の季節変動パターンを反映せず、雨天による簡易放流の発生と関連することが初めて、統計的に示唆された。このことは、ノロウイルスの発生源、排出源、排水先の閉鎖性水域の緻密な観測から得られた成果である。
- 6) HBGA陽性細菌の水環境中における存在実態は不明であったが、本研究により下水及び河川水中に存在することが確認されたことから、HBGA陽性細菌がノロウイルスの環境中動態に影響を与えうることが示された。
- 7) 山梨県内で最適化した微生物遺伝子マーカーを河川水に適用することにより、豚舎の下流地点からブタ特異的な微生物遺伝子マーカーが検出されることや、河川上流域の清流において反芻動物特異的遺伝子マーカーが高頻度で検出され、シカやイノシシ等の野生動物の糞便による影響の大きさが示唆されること等の成果を得た。また、琵琶湖南湖で採取した湖水に対しても調査を行うことにより、本研究の手法が他の流域に対しても有効となり得ることが示された。
- 8) 新たな微生物遺伝子マーカーとして、F-DNAファージや体表面ファージを遺伝子群レベルで検出することの有効性を示した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

国土交通省の下水道技術ビジョンの平成27年度改定、またその後の微生物学的安全性の議論にあたって、合流式下水道越流や分流式不明水の侵入時での雨天時病原微生物問題への取り組む技術開発重要性が取り上げられているが、本研究成果である東京湾、琵琶湖など放流先地先や下水処理場での指標細菌やウイルスなどの実態調査データが反映されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

現在検討が継続されている大腸菌群数から大腸菌への変更の根拠に、琵琶湖南湖で環境省環境総合推進費でこれまで集積してきた大腸菌群数と大腸菌数に相関関係がみられていないことが根拠として反映される見込みである。また大腸菌へ指標変更したとしても人の活動が少ない河川で基準値が満足できない場合の原因追及に、本研究で開発してきているソーストラッキング技術が使われると見込まれる。また環境基準が大腸菌に変更される場合に、環境基準を達成するために必要な下水道での処理水水質目標を、流域ごとに流域別下水道整備計画で検討することが想定される。その場合にも本研究で開発しているソーストラッキング技術が使われると見込まれる。

下水道分野では、現状進められている合流式下水道対策が、主にBODやSSを分流式並みの負荷量に削減することを目標としているが、放流先水域が閉鎖的で、水利用が重要な場合には、この対策だけでは、病原微生物、特にウイルス対策が不十分であることをこの研究は示している。このため、雨天時処理方法の技術開発へのインセンティブを与えると期待される。また合流式下水道対策が完了した場合にも、分流式污水管に雨天時の侵入水が流入していることが本研究から示唆された。このことは、合流式下水道だけでなく、分流式下水道での雨天時の水質対策が重要であることを示している。今後、分流式下水道での雨天時侵入水対策と雨天時処理技術の開発が加速すると思われる。

PMMoV濃度と大腸菌濃度の経時的な傾向を比較すると、PMMoVの残留期間は大腸菌よりも長い。これは、降雨後のウイルス汚染が細菌汚染よりも長く持続することを示唆している。我が国においては、水浴場の微生物学的な水質基準は糞便性大腸菌群数により規制されているが、本研究の結果はこうした基準だけではウイルス由来の感染リスク管理には不十分であることを示していると考えられる。また、新しい衛生指標として期待される大腸菌は、環境中で増殖するとすれば、汚染の過大評価に直結する環境政策上重要な問題である。本研究の結果は、大腸菌が河川環境中で増殖する強い可能性を示すものであり、指標微生物としての大腸菌に対する評価・判断資料を提供するものである。さらに、環境基準としての大腸菌数の中で、血液型決定抗原分泌大腸菌の量をgalU存在量により予測することにより、大腸菌数の計測だけでは予測が困難であったノロウイルスによる水環境汚染を検

知ることが可能である可能性が本研究により示唆された。

大腸菌群数から大腸菌数へと水質環境基準における衛生指標が変更された後にも、河川上流域の清流において大腸菌数が基準超過となる事例等が生じることが想定される。そのような際に、直ちに基準超過(不適合)とするのではなく、超過を引き起こしている原因を解明し、超過を回避するための対策を採ることが可能であるかを検討することのできる仕組みがあることが望ましい。本研究で開発した宿主特異的微生物遺伝子マーカーを用いた微生物起源解析を活用することで、大腸菌群や大腸菌を測定するのみでは得ることのできない、水環境中の糞便汚染源に関する知見を得ることができ、適切な汚染負荷低減対策を採ることを可能にし得るものである。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

< 査読付き論文 >

- 1) Vu Duc Canh, Hideki Osawa, Kentaro Inoue, Ikuro Kasuga Satoshi Takizawa, Hiroaki Furumai and Hiroyuki Katayama (2019) Ferrihydrite treatment to mitigate inhibition of RT-qPCR virus detection from large-volume environmental water samples, *Journal of Virological Methods*, 263: 60-67.
- 2) 朴耿洙, 朴仁久, 山下尚之, 田中宏明(2017)被災下水処理場の暫定処理後の塩素消毒による指標微生物の不活化と生態毒性, *下水道協会誌* 54 93-100.
- 3) 三浦尚之, 渡部徹, 藤井健吉, 金谷祐里, 田中宏明, 村上道夫(2018) 水中の健康関連微生物リスク研究の歴史の変遷と最先端 *日本リスク研究学会誌*, 27(2)、1-11
- 4) 朴耿洙, 朴仁久, 山下尚之, 田中宏明(2018)被災下水処理場の暫定処理を想定したオゾン消毒による指標微生物の不活化と生態毒性, *下水道協会誌*, 55, 667, 66-74
- 5) 松葉祐亮, 田中景介, 西田佳記, 圓佛伊智朗, 山下尚之, 田中宏明. 環境システム計測制御学会 学会誌 EICA (vol 23, issue 2/3, 47-51) (2018) 雨天時の下水処理場における指標微生物の制御に関する基礎検討
- 6) 山口武志, 山下尚之, 田中宏明 (2018) EEM-PARAFACによる河川水中の溶存態有機物の動態へ及ぼす雨天時都市下水の影響検討, *土木学会論文集G (環境)*、74 (7) 、III_275-III_284.
- 7) M.Amarasiri, M. Kitajima, A. Miyamura, R. Santos, S. N. Monteiro, T. Miura, S. Kazama, S. Okabe and D. Sano (2018) Reverse transcription-quantitative PCR assays for genotype-specific detection of human noroviruses in clinical and environmental samples, *Int J Hyg Environ Health*, 221(3):578-585.
- 8) Eiji Haramoto, Rui Osada (2018) Assessment and application of host-specific *Bacteroidales* genetic markers for microbial source tracking of river water in Japan, *PLOS ONE*, 13(11): e0207727.

< その他誌上発表 (査読なし) >

- 1) 田中宏明(2018)「Swimmable」な水環境管理目標の改定と課題、*環境衛生工学研究* 32(2) 【招待論文】
- 2) 山口武志, 山下尚之, 田中宏明(2018) EEM-PARAFACを用いた雨天時の桂川における下水処理放流水混入の簡易指標に関する検討、*環境衛生工学研究*, 32(3)、25-27 【優秀ポスター賞受賞号】

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) Vu Duc Canh, Hideki Osawa, Satoshi Takizawa, Hiroaki Furumai, Kentaro Inoue and Hiroyuki Katayama: 5th Food and Environmental Virology conference, Kusatsu, 2016 “Application of Ferrihydrite (Fh) to Remove the Inhibition of Humic Acid in Molecular-Based Detection Methods.”
- 2) Y. Ishii, F. Kurisu, I. Kasuga and H. Furumai: IWA Microbial Ecology and Water Engineering Conference, Copenhagen, Denmark, 2016 “Growth Potential of Escherichia coli in Urban River Waters and Screening of Its Growth Substrate.”
- 3) Vu Duc Canh, Takashi Hijikata, Hiroaki Furumai and Hiroyuki Katayama: International Symposium on Sustainable Urban Environment, Assam, 2017 “Application of ferrihydrite to improve RT-qPCR virus

detection in Tokyo coastal water after rainfall event.”

- 4) 石井淑大、栗栖太、春日郁朗、古米弘明:第51回日本水環境学会年会(2017)「都市河川水中における大腸菌と他細菌による増殖基質の競合」
- 5) 井上健太郎、片山浩之、古米弘明:第52回日本水環境学会年会(2018)「新規ウイルス汚染指標PMMoVの沿岸海域環境における残存性について」
- 6) Takashi Hijikata, Hiroyuki Katayama and Hiroaki Furumai: The 11th IWA-WWCE, Tokyo, 2018
“Occurrence of Enteric Viruses and Microbial Indicators in Tokyo Coastal Area After a CSO Event.”
- 7) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明、第53回下水道研究発表会、名古屋(2016)、被災下水処理場での粒子付着ウイルスに対する紫外線及びオゾン消毒
- 8) 田中宏明(2017)水環境・河川環境を取り巻く最近の話題 一琵琶湖南湖は泳げるかー、琵琶湖河川ゼミナールアクア琵琶、2017年8月30日、滋賀県大津市 アクア琵琶【招待講演】
- 9) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第51回日本水環境学会年会、熊本(2017) EEM-PARAFACを用いた琵琶湖水中の下水道施設由来成分の指標性に関する検討
- 10) 田中景介、山下尚之、田中宏明、第20回日本水環境学会シンポジウム、和歌山(2017)雨天時下水処理場における指標微生物及びウイルスの流入実態
- 11) 井原賢、田村太一、五味良太、林東範、劉思瑶、馬綴宇、山下尚之、田中宏明、第20回日本水環境学会シンポジウム、和歌山 (2017) 琵琶湖南湖から検出される大腸菌の全ゲノム解析
- 12) 田中宏明、水系感染リスクの水質管理への利用、日本リスク研究学会第30回年次大会、Oct.27-29, 2017、彦根市滋賀大学【招待講演】
- 13) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第54回環境工学研究フォーラム、岐阜(2017) 3次元蛍光分析法の活用による琵琶湖南湖水中の下水処理場由来成分の指標性に関する検討
- 14) 田中景介、松葉祐亮、西田佳記、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)指標微生物を対象とした一部合流式区域を有する分流式下水処理場における雨天時調査
- 15) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)EEM-PARAFACを用いた琵琶湖流出河川における台風時の下水処理放流水汚染の簡易指標に関する検討
- 16) 劉思瑶、井原賢、田村太一、馬綴宇、林東範、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)全ゲノム解析による、琵琶湖南湖で検出される大腸菌の起源推定
- 17) 田中景介、松葉祐亮、西田佳記、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)指標微生物を対象とした一部合流式区域を有する分流式下水処理場における雨天時調査
- 18) Hiroaki Tanaka(2018)More Challenges of Water Quality Management Attributed to Sewage Works in Japan, The 2nd The National Conference on Water Treatment and Water Reuse of China,2018年4月21日、Hilton Qingdao Golden Beach, Qingdao China【招待講演】
- 19) Hiroaki Tanaka(2018) Discussion on Recent Challenges of Water Quality Management & Relevant Sewerage System, Public Works Research Institute, Special Semina,2018年4月23日、土木研究所、つくば【招待講演】
- 20) 田中宏明(2018)衛生学的視点からの水環境と水再利用の新たな目標設定の動向、第31回環境工学連合講演会レギュラトリーサイエンスと環境工学、2018年5月22日 東京、日本学術会議【招待講演】
- 21) 田中宏明(2018)より安全、安心な琵琶湖の水質を 目指して、国立研究開発法人 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター第15回琵琶湖分室セミナー、2018年7月11日、滋賀県大津市琵琶湖環境科学センター【招待講演】.
- 22) 田中宏明(2018)衛生学的水質目標設定の動きと 下水道への波及、第24回下水道新技術研究発表会、2018年7月13日、大阪市大阪科学技術センター【招待講演】
- 23) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第55回下水道研究発表会、北九州市(2018)蛍光分析を活用した処理場での雨天時下水中の溶存有機成分の挙動特性に関する検討
- 24) 奥野義規、井原賢、田村太一、林東範、山下尚之、田中宏明、第40回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム、京都(2018)、琵琶湖南湖流域における下水中ノロウイルスの遺伝子型解析

- 25) 山口武志、林東範、井原賢、田中宏明、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根(2018)、河川の衛生学的安全性へ及ぼす雨天時下水の影響
- 26) 于再治、白坂勇也、田村太一、林東範、山口武志、井原賢、田中宏明、山下尚之、端昭彦、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根(2018)、琵琶湖南湖におけるウイルスの長期モニタリング
- 27) 馬継宇、井原賢、劉思瑶、田村太一、奥野義規、林東範、山下尚之、田中宏明、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根(2018)、Analysis of antibiotic-resistant Escherichia coli in Lake Biwa and wastewater treatment plants effluent
- 28) Masaru IHARA, Siyao LIU, Taichi TAMURA, Chihyu MA, Dongbum IM, Naoyuki YAMASHITA, Hiroaki TANAKA, 第17回世界湖沼会議、茨城(2018)、Investigation of the source of E.coli in the southern part of Lake Biwa
- 29) 奥野義規、井原賢、田村太一、林東範、山下尚之、田中宏明、第53回日本水環境学会年会、甲府(2019)、琵琶湖南湖流域における下水中ノロウイルスの遺伝子型解析
- 30) 西田光希、松葉祐亮、田中景介、田中宏明、西田佳記、第53回日本水環境学会年会、甲府(2019)、合流式下水処理場における雨天時の衛生微生物調査
- 31) 田中宏明(2019)琵琶湖・淀川流域でのバイオリスク低減、水環境創造機構 講演会、大阪市、国民會館 武藤記念ホール 2019/5/15【招待講演】
- 32) 田中宏明(2019)気候変動対応のための排水インフラの技術開発、京都大学インダストリアルデイ2019①(産学マッチング交流会)～気候変動に関するレジリエンスの強化～、キャンパスプラザ京都、2019/5/24【招待講演】
- 33) 小島友祐、モハン・アマラシリ、佐野大輔、平成29年度土木学会東北支部技術研究発表会、郡山(2018)腸内細菌の組織血液型決定抗原様物質分泌関連遺伝子に関する研究
- 34) P. Yang, M. Kitajima, S. Okabe and D. Sano, 第52回日本水環境学会年会、札幌(2018) Identification of bacterial genes responsible for producing norovirus-binding glycoconjugates.
- 35) M. Amarasiri, P. Yang, M. Kitajima, S. Okabe and D. Sano, ISFEV2018, アリゾナ (2018) Bacterial genes responsible for producing norovirus-binding glycoconjugates.
- 36) 森山一葉、長田留衣、山田貴大、原本英司、坂本康(2017)F特異DNA大腸菌ファージの遺伝子型検出による水環境中の糞便汚染源解析、第51回日本水環境学会年会、熊本大学
- 37) 堂山貴広、望月大蔵、原本英司(2017)下水および河川水中におけるF特異大腸菌ファージの遺伝子群別解析、第20回日本水環境学会シンポジウム、和歌山大学
- 38) 中谷航己、山田貴大、Bikash Malla, 原本英司(2018)宿主特異的ウイルス遺伝子マーカーを用いた甲府盆地河川水中の糞便汚染源の解析、第45回土木学会関東支部技術研究発表会、山梨大学
- 39) 古川琴美、長田留衣、Bikash Malla, 原本英司、坂本康(2018)バクテロイデスを指標とした甲府盆地河川水中の糞便汚染源解析、第45回土木学会関東支部技術研究発表会、山梨大学
- 40) 堂山貴広、原本英司(2018)F特異RNA大腸菌ファージ野生株の遺伝子群別の塩素消毒耐性、第52回日本水環境学会年会、北海道大学
- 41) 望月大蔵、原本英司(2018)河川水中の糞便汚染指標としての体表面吸着大腸菌ファージの遺伝子群別検出の有効性、第52回日本水環境学会年会、北海道大学
- 42) 原本英司(2018)宿主特異的微生物遺伝子マーカーを用いた水環境中の糞便汚染源解析、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根大学
- 43) 堂山貴広、原本英司(2018)F特異RNA大腸菌ファージの遺伝子型別の塩素消毒耐性、第55回環境工学研究フォーラム、京都大学
- 44) 堂山貴広、原本英司(2019)塩素消毒処理による大腸菌ファージ野生株の遺伝子型別の不活化効果、第53回日本水環境学会年会、山梨大学
- 45) 牧瀬晃基、Bikash Malla, 原本英司、坂本康(2019)河川水中の糞便汚染指標としてのCrAssphageの有効性の検討、第53回日本水環境学会年会、山梨大学
- 46) 伊藤聖晃、望月大蔵、原本英司(2019)環境水中における体表面吸着大腸菌ファージの糞便汚染指標として

の有効性評価, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学

- 47) 古賀皓晟, 堂山貴広, 原本英司, 坂本康(2019)河川水中におけるF特異DNA大腸菌ファージの存在実態および糞便汚染源指標としての有効性の検討, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学
- 48) 山本一輝, Bikash Malla, 原本英司, 坂本康(2019)ミトコンドリアDNAおよびバクテロイデス遺伝子マーカーを用いた河川水中の糞便汚染源解析, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学

7. 研究者略歴

研究代表者

片山 浩之

東京大学工学部卒業、東京大学大学院工学系研究科修了、博士(工学)、現在、東京大学大学院工学系研究科准教授

研究分担者

1) 田中 宏明

京都大学工学部卒業、京都大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、独立行政法人土木研究所水質チーム上席研究員、現在、京都大学大学院工学研究科教授

2) 佐野 大輔

東北大学工学部卒業、東北大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、北海道大学大学院工学研究科准教授、現在、東北大学大学院工学研究科准教授

3) 原本 英司

東京大学工学部卒業、東京大学大学院工学系研究科修了、博士(工学)、現在、山梨大学大学院総合研究部准教授

II. 成果の詳細

II-1 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価

東京大学

工学系研究科 都市工学専攻

片山 浩之

栗栖 太

端 昭彦（平成29-30年度）

井上 健太郎

先端科学技術研究センター

小熊 久美子

平成28～30年度累計予算額：38,641千円

（うち平成28年度：12,485千円、平成29年度：12,385千円、平成30年度：13,771千円）

[要旨]

腸管系ウイルスは感染したヒトの消化器系器官中で複製された後、高濃度で糞便と共に排泄されるため、下水中にはウイルスが高濃度で含まれている。通常は、沈殿、生物処理、消毒等の処理を経て排出されるものの、大雨時には合流式下水道雨天時越流水（combined sewer overflow, CSO）が生じ、CSOは未処理の下水を環境水中に放出するため、発生時には不定期に受水域の微生物汚染が深刻化する。また一方で、受水域の汚染状況は年間を通じて一定ではなく、大きな変動が予想され、定期的に採水調査することだけでは、年間の汚染状況を把握することは困難である。それ故、リスク管理の観点について、降雨後環境中に排出されたウイルスの濃度、およびウイルスの遺伝子型に着目した汚染状況の把握が重要であると言える。また、我が国では微生物学的水浴場水質判定基準は、糞便性大腸菌群により定められているが、しばしば指標細菌の存在状況と腸管系ウイルス等の病原性ウイルスの存在状況との間には必ずしも相関が見られないことや、指標細菌自体の増殖可能性について指摘されている。それ故、環境中における腸管系ウイルスの挙動、新しい衛生指標として期待される大腸菌の増殖に関わる挙動、さらに、バクテリオファージ等を用いた新規指標の確立等が重要な事項であると考えられる。

本サブテーマでは、下記3点の課題を扱うことで、水環境中のウイルスと指標微生物の動態把握を試みた。①東京湾沿岸域における腸管系ウイルスおよびバクテリオファージのモニタリング、②幅広いファージ感受性をもつバクテロイデス株の選定、③河川水中における大腸菌の増殖と他細菌による増殖基質競合の検討。

本研究の成果として、GIII型FRNAファージは他の微生物と比較して、降雨直後のCSOによる汚染への特異性が高いこと、PMMoVは生残実験において大腸菌やノロウイルスに比べて高い残存傾向を示すことが明らかとなった。また、全国19地域の下水処理施設からバクテロイデス株を分離し、地域相互間の感染実験により、バクテロイデスファージの測定が新たな汚染指標となりうることを示した。さらに、河川水を培養液とした大腸菌の増殖実験により、環境水中での増殖ポテンシャルと他細菌との有機物競合を明らかにした。

[キーワード]

腸管系ウイルス、FRNAファージ、バクテロイデスファージ、大腸菌増殖、合流式下水道雨天時越流水（CSO）

1. はじめに

腸管系ウイルスは感染したヒトの消化器系器官中で複製された後、高濃度で糞便と共に排泄されるため、下水中にはウイルスが高濃度で含まれている。東京都市圏から排出される下水は通常、沈殿、生物処理、消毒等の処理を経て排出されるものの、大雨時には合流式下水道雨天時越流水（combined sewer

overflow, CSO) が生じてしまう。CSOは未処理の下水を環境水中に放出するため、CSO発生時には不定期に受水域のウイルス汚染が深刻化する。この傾向は東京湾沿岸域や東京23区域の都市河川において確認されている。このようなことから、CSO発生時においてはウイルスの感染リスクが増加すると考えられ、実際にデンマークのコペンハーゲンでCSO発生時に開催されたトライアスロン大会における下痢症のアウトブレイク事例が報告されている。

一方で、東京湾の汚染状況は年間を通じて一定ではなく、大きな変動が予想され、定期的に採水調査することだけでは、年間の汚染状況を把握することは困難である。また、主にRNAでゲノムが構成される腸管系ウイルスは進化速度が速く、粒子表面のタンパクが変化すると、過去にヒトが獲得した免疫は役に立たず、少しのウイルス粒子だけで感染が成立してしまう。

そのため、リスク管理の観点について、降雨後環境中に排出されたウイルスの濃度、およびウイルスの遺伝子型に着目した汚染状況の把握が重要であると言える。

今後、2020年東京オリンピックではお台場においてトライアスロン競技、中央防波堤ではボート競技などが予定されている。過去にコペンハーゲンで生じたアウトブレイクのような事態が国際大会で繰り返されることはあってはならず、そのため、東京湾沿岸域のウイルス汚染状況把握は急務の問題であると言える。

また、我が国では微生物学的水浴場水質判定基準は、糞便性大腸菌群により定められているが、しばしば指標細菌の存在状況と腸管系ウイルス等の病原性ウイルスの存在状況との間には必ずしも相関が見られないことや、指標細菌自体の増殖可能性について指摘されている。それ故、新しい衛生指標として期待される大腸菌の環境中での増殖に関わる挙動は、状況を把握すべき重要な事項である。

細菌指標に代わる新規ウイルス指標として、本研究では、糞便由来でありかつ水環境中に高濃度で存在するアイチウイルスやトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)、およびF特異大腸菌ファージ (FPH) に着目した。FPHは所有する核酸によって、FDNAファージとFRNAファージに大別される。特に、FRNAファージは糞便中に多く存在し、ノロウイルスやエンテロウイルスなどの、多くの腸管系ウイルスと同じ特徴 (エンベロープを持たない直径30nmほどの正二十面体構造で、一本鎖 (+) RNAを遺伝子として持つ) を有するため、ウイルス汚染の指標として期待されている。また、FPHは検出に当たって、簡単に感染力を考慮することができる (ブラック法) という点も、指標として優れている。

近年の先行研究によると、FRNAファージは4つの遺伝子型 (GIからGIV) に分類され、それぞれで異なる物性・排出源を持つ。GII、GIII型は主にヒト糞便から検出される一方で、GI、GIV型はブタ、ウシ、トリなどの動物糞便から主に検出される。ただし、GIV型はほとんど環境中からは検出されないことが分かっている。また、熱や酸・アルカリ、塩分に対して、GI型は耐性が高く、GIII、GIV型は耐性が低いことや、下水処理で、GI型が減衰しにくく、GIII、GIV型が減衰しやすいことが報告されている。このように、FRNAファージの中でも遺伝子型毎に特徴が異なるが、GIII型は、下水中に多く存在する一方で、環境中で不活化しやすく下水処理で減衰しやすいことが知られている。そのため、感染力を持つGIII型は、下水処理や塩素・環境ストレスの影響を受けていない、排出されてから間もない未処理の下水による汚染を示すものであり、CSO由来のウイルス汚染指標として有力だと考えられる。

2. 研究開発目的

沿岸海域の汚染は、親水活動を介して人々に健康リスクをもたらす。中でも病原微生物の水系感染は曝露一回あたりのリスクが大きく、下痢症等による健康影響を直ちに引き起こす。そのため、感染リスクを適切に評価し、管理する必要がある。腸管系ウイルスによる沿岸海域の汚染が世界的に広く報告されており、またその感染力の強さゆえに、細菌や原虫のみならず腸管系ウイルスによる感染リスクも考慮する必要がある。また、新しい遺伝子型をもつ腸管系ウイルスに対しては過去の流行によって得られた免疫が十分に機能しないため、感染リスクを適切に評価し、管理する必要がある。

以上のことから、本サブテーマでは下記の3点の課題を扱うことで、水環境中のウイルスと指標微生物の動態把握を試みた。

① 東京湾沿岸域における降雨後の腸管系ウイルスおよびバクテリオファージ汚染の実態調査

- ② 幅広いファージ感受性をもつバクテロイデス株の選定
- ③ 河川水中における大腸菌の増殖と他細菌による増殖基質競合の検討

3. 研究開発方法

① 東京湾沿岸域における降雨後の腸管系ウイルスおよびバクテリオファージ汚染の実態調査

(1) FRNAファージの有効性評価

2016年から2018年の3年間に、降雨後の表層水試料を採取した。また、降雨後の試料との比較のため、2017年と2018年には降雨から4日以上経過した際の表層試料を晴天試料として採取した（表(1)-1）。潮位の影響を考慮して、採水は基本的に干潮付近の時間帯に行なった。

調査では、お台場、芝浦、目黒、隅田の4地点で採水を行なった（図(1)-1）。お台場は実際に2020年オリンピックの競技場所として使用される場であることから、その他の3地点は、お台場への主要な汚染の流入源であり、お台場の汚染を考えるうえで、重要なポイントであることから対象とした。

表(1)-1 採水調査日程

年	試料タイプ	日程
2016	wet/dry	10/18, 20, 22, 25 (Day 1, 3, 5, 8)
	wet	11/22 (Day 1)
2017	wet	10/20 (Day 1)
	wet/dry	10/30, 11/1, 3, 6 (Day 1, 3 and Day 1, 4)
	dry	11/17 (Day 4)
2018	wet	6/12, 14, 16 (Day 1, 3 and Day 1)
	wet/dry	7/30, 8/1, 3 (Day 1, 3, 5)

括弧内のDayは降雨からの経過日数を示している。

試料タイプwetは雨天時試料、dryは晴天時試料を示している。



図(1)-1 試料採取地点

STP：下水処理場、P：ポンプ所

- ・ 寒天培地を用いた大腸菌およびF特異ファージの測定

大腸菌は、クロモカルト寒天培地による単層培養法によって測定した。37℃で一晩培養した後、青い色を呈色したコロニーを大腸菌としてカウントした。FPHは、*Salmonella* Typhimurium WG49株を宿主として、トリプトン・グルコース培地を用いた単層培養ブラック法により測定した。

37°Cで一晩培養したのち、発現したブラックをFPHとしてカウントした。

・ ICC-PCRによる感染力を持つFRNAファージの遺伝子型別の測定

Hata et al. 2016の手法¹⁾を一部改変した手法で、測定を行なった。まず、宿主としてWG49株を用い、試料中のFRNAファージを一晩培養し、培養液2 μLからFRNAファージのRNAを抽出した。この試料からQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いたone step RT-qPCRによって、FRNAファージを遺伝子型別に検出し、定性結果に基づいたMPN法により、それぞれの遺伝子型の定量濃度を得た。晴天時と雨天時の濃度セットの間に有意な差があるかを確認するために、ノンパラメトリック検定であるMann-Whitney's U-testを行なった。得られたP値が0.05を下回った場合は有意な差があるとした。

(2) 二枚貝および底泥に蓄積するウイルスの調査

東京湾の4測点（多摩川河口、鮫洲ポンプ場、中央防波堤、葛西臨海公園沖）より採取した水試料、底泥試料、二枚貝試料について、PMMoV遺伝子のコピー数をリアルタイムPCR (StepOnePlus, Applied Biosystems) を用いて定量した。解析には、2015年5月から継続採取している試料を併せて用いた。

水試料中のウイルス粒子は陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法^{2), 3)}で濃縮した。二枚貝（カキ）試料は-20°Cで冷凍保存した後、解剖して中腸腺を摘出し、1個体当たり10 mLのMilliQ水で懸濁させた上清からウイルス核酸を抽出した。底泥試料は、ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン社) を用いて核酸抽出した。

(3) 東京湾におけるPMMoVの分布調査と生残実験

これまでの研究により沿岸域で高濃度に存在することが明らかとなったPMMoVに着目し、東京湾内の分布調査（羽田周辺～富津岬～浦賀水道）を行った。試料は、2017年7月5日、11月2日、2018年3月2日に、図(1)-2に示す測点より表層水を採取した。

また、CSO発生時（2017年7月5日）の羽田空港周辺試料を用いて、ウイルスと大腸菌の生残試験を実施した。採取した表層水20Lを室温・暗所に静置し、経時的に1Lずつ採取し、濃度変化を調査した。



図(1)-2 東京湾調査の実施測点

② 幅広いファージ感受性をもつバクテロイデス株の選定

全国19ヶ所の下水処理場から流入水を採取し、調整を加えたGAMブイヨン（ニッスイ）で嫌気培養した。GAM培地は嫌気性細菌全般を増殖させるため、バクテロイデス属細菌以外を阻害する目的で、コリスチン、ネオマイシン、ブリリアントグリーン、ヘミンを微量添加した。集積培養の後、バクテロイデ

ス寒天培地でコロニー形成を確認、滅菌楊枝で分離し、各処理場から12株ずつ、合計228株保存した。ここで分離培養されたバクテロイデス株について、M市処理場の流入水を用いてブラック形成試験を実施した。

また、処理場から研究室へ試料を持ち戻す際の集積によって流入水中のバクテロイデス比率が変動する影響を確認するため、一部の処理場流入水試料と集積後試料における細菌群集構造（16S rRNA遺伝子）を次世代シーケンサMiSeq（イルミナ）で解析した。

③ 河川水中における大腸菌の増殖と他細菌による増殖基質競合の検討

多摩川丸子橋付近より採水した河川水を培養液とし、①孔径 $0.2\mu\text{m}$ ろ過+低温殺菌（微生物がほぼいない）、②孔径 $0.8\mu\text{m}$ ろ過（捕食者がいない）、③無機塩培地（接種大腸菌の増殖量を評価する対照系）、④無処理水、の4条件に大腸菌を接種し増殖実験を行った。さらに、培養液から有機物を固相抽出し、超高分解能質量分析計で水中の溶存有機物を比較した。

4. 結果及び考察

① 東京湾沿岸域における降雨後の腸管系ウイルスおよびバクテリオファージ汚染の実態調査

(1) FRNAファージの有効性評価

FRNAファージの遺伝子型に対するICC-PCRは、淡水試料を用いて開発された手法であり、海水試料に適用した例は見られない。そこで、海水試料に対するFRNAファージのICC-PCRの有効性を確認するために、FPHのブラック法の結果とICC-PCRによる遺伝子型別定量濃度の合計を比較した。

その結果、ICC-PCRによる定量濃度は、ブラック法の結果と高い相関を示した（ $r = 0.83$, $p < 0.01$ ）。また、ICC-PCRとブラック法の定量値の違いを見ると、ほとんどの場合で $1\log$ の範囲に収まった（56/62, 90%）。この結果から、ICC-PCRによって海水試料中の感染力をもつFRNAファージを遺伝子型別に定量することができたと考えられる。

また、降雨翌日の試料を雨天時試料、降雨から4日以上が経過した試料を晴天時試料として、それぞれの微生物濃度を比較したところ、全ての微生物でMann-Whitney's U-testのP値は0.05を下回り、雨天時と晴天時の濃度に有意な差があると認められた。しかし、大腸菌やアイチウイルスと比べると、FPHは晴天時と雨天時の平均的な濃度の差が小さい傾向が見られた。これは、FPHの中でもGI型FRNAファージの生残性が高く、晴天時でも高い濃度で検出されていることが影響していると考えられる。また、大腸菌やFPHおよびGI、GII型FRNAファージは晴天時の試料からも検出された一方、GIII型FRNAファージは晴天時の試料では、ほとんど不検出となった。これは、GIII型FRNAファージは環境中で不活化しやすく、下水処理で減衰していて処理水にほとんど含まれていないためと考えられる。なお、GIII型FRNAファージは、降雨直後には多くの試料で検出されており、CS0発生時には濃度が上昇していると言える。このことから、GIII型FRNAファージは、晴天時は検出されないものの、降雨後には検出されるため、他の指標微生物と比較しても、降雨直後のCS0による汚染への特異性が高いと言える。したがって、CS0に由来するウイルス汚染の指標として利用できる可能性があると考えられる。

(2) 二枚貝および底泥に蓄積するウイルスの調査

東京湾のモニタリングについて、リアルタイムPCRによる定量の結果を表(1)-2に示す。PMMoVは、それぞれの海水試料中には 10^5 から 10^7 copies/Lの範囲で存在しており、直前3日間の総雨量による変動は確認されなかった。本研究のサンプリングは、二枚貝採取を目的として大潮の時期に行っているため、明確なCS0の発生が確認できなかったためであると考えられる。

カキの中腸腺に含まれるウイルス量は、試料によって検出濃度が大きく異なっていたが、これはカキの大きさや環境中の付着場所など、個体差が大きいことや、カキの脂肪分等による阻害によって検出が安定しない可能性が考えられる。また、底泥試料からPMMoVは検出されなかったが、これは底泥中

に阻害物質が多量に含まれるためと考えられる。

表(1)-2 東京湾における海水、底泥、二枚貝試料中のPMMoV濃度

	2015年		2016年			Unit	
	5/20	8/30	11/26	2/27	6/22		
	直前3日総雨量	8.5	3.5	29.5	0.5		11.5
	水深/試料					mm	
多摩川河口	0 m	6.28	5.89	5.26	5.59	5.81	log copies/L
	カキ	3.70	N.D.	2.99	N.D.	4.91	log copies/個体
鮫洲ポンプ場	0 m	5.20	5.72	6.41	5.34	6.43	log copies/L
	底泥	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	log copies/g
中央防波堤	0 m	5.76	5.96	5.36	5.86	6.43	log copies/L
葛西臨海公園	0 m	6.82	6.62	6.93	6.46	5.84	log copies/L

(3) 東京湾におけるPMMoVの分布調査と生残実験

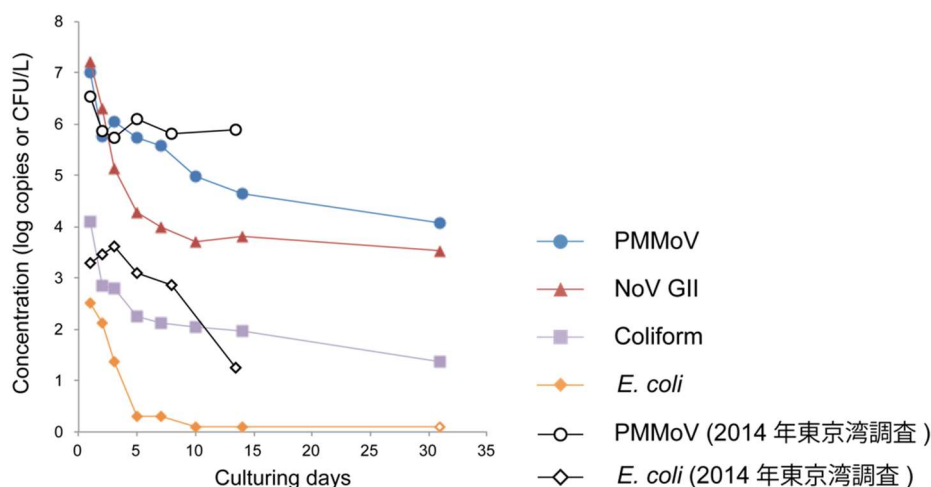
東京湾におけるPMMoVの濃度測定結果、多摩川河口域の羽田空港周辺（測点A）、および富津岬の第二海堡周辺（測点C）ではPMMoV濃度が測定できたものの、湾中央部（測点B）および湾口（測点D）においては不検出となった（表(1)-3）。PMMoVの存在は、人為的な排水源からの距離を反映しているものと考えられる。

表(1)-3 東京湾におけるPMMoV濃度

測点	2017年	2018年	
	7月5日	11月2日	3月2日
海ほたる	2.99×10^3	-	-
A	6.18×10^5	4.56×10^3	9.92×10^3
B	-	*	*
C	-	4.59×10^3	4.47×10^3
D	-	*	*

単位：copies/L, -：サンプル採取なし, *：検出限界（ 1.26×10^2 copies/L）以下

次に、羽田空港周辺の表層水を用いた微生物生残実験の結果を、2014年に実施した東京湾調査における環境中における濃度変化と共に図(1)-3に示す。



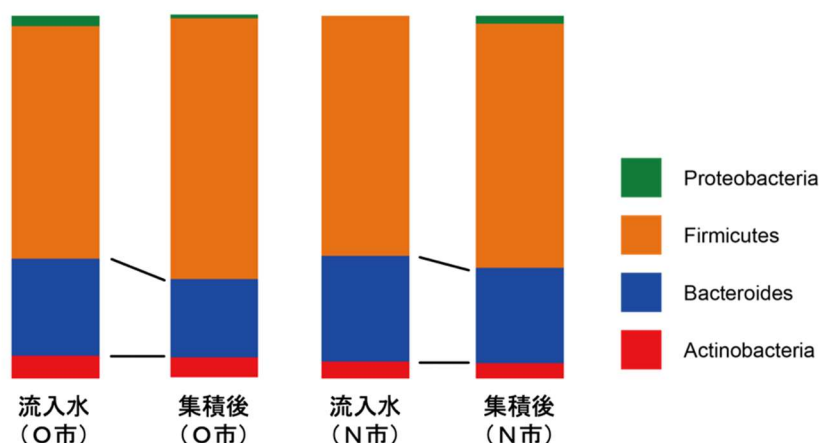
図(1)-3 生残実験および環境中における微生物の濃度変化

生残実験において、ノロウイルスGII、大腸菌、大腸菌群は1週間経過時まで急激に低下している一

方で、PMMoVは初期の減少がやや緩やかな傾向を示した。2014年に実施した環境調査の結果では、降雨後も上流から大腸菌・ウイルスの供給が続くものと考えられるが、PMMoVは大腸菌の挙動と比較しても初期の高濃度を維持する傾向にある。本研究の結果と総合してみると、PMMoVは高い生残傾向にあるものと考えられる。

② 幅広いファージ感受性をもつバクテロイデス株の選定

本研究では、全国19ヶ所の処理場より各12株、合計228株のバクテロイデス株を単離した。その際、研究室へ試料を持ち戻すまでの時間に試料中のバクテロイデス比率がどのように変化するかをモニタリングするため、流入水と集積後の試料で16S rRNA遺伝子の比率を解析した。下記図(1)-4に、O市とN市の試料における濃度変化を示す。



図(1)-4 試料採取時の流入水と集積培養後の微生物群集構造

解析の結果、Phylumレベルの解析においては、試料中の細菌構造は大きな変動が見られないことがわかった。バクテロイデスの存在比率が大きく減少していることはないため、実験室へ持ち戻った試料からも、十分にバクテロイデス株が培養できるものであったと考えられる。

得られたバクテロイデス株について、分離された時期・場所が異なるM市の流入水を用いて、プラック形成数を調べ、ファージ感受性試験を実施した。各処理場の12株について、それぞれのプラック形成数を下記の表(1)-4に示す。

表(1)-4 分離株を宿主とした感受性試験のブラック形成数

処理場	株A	株B	株C	株D	株E	株F	株G	株H	株I	株J	株K	株L
北海道	-	3	2	-	6	5	11	2	-	-	5	18
青森県	-	-	-	-	2	8	3	1	13	2	-	2
秋田県	4	2	2	6	-	-	1	2	-	-	1	-
宮城県	-	-	-	-	9	2	4	2	5	-	1	10
新潟県	12	-	18	-	7	8	7	2	-	1	9	13
長野県	-	7	3	5	1	-	3	5	7	2	1	2
栃木県	5	2	-	-	10	4	-	4	2	5	7	1
富山県	-	-	-	-	4	5	-	1	11	3	-	-
山梨県	-	10	-	11	6	6	8	-	13	7	1	7
神奈川県	-	4	5	-	3	-	11	2	-	-	10	-
和歌山県	-	-	8	1	-	-	3	3	10	-	6	-
愛知県	10	9	-	-	-	3	-	3	1	8	-	2
鳥取県	-	-	22	-	7	-	6	-	10	14	13	13
岡山県	-	-	-	-	-	10	-	4	-	6	4	-
広島県	2	2	3	2	5	9	9	8	-	14	-	2
香川県	6	7	-	7	9	-	-	15	-	7	7	-
福岡県	-	-	-	-	-	7	6	-	1	-	10	1
鹿児島県	-	2	15	-	-	14	5	-	13	1	5	13
沖縄県	5	-	-	-	9	1	-	14	-	-	-	4

単位：x 10¹ PFU/mL

-: 検出限界（10 PFU/mL）以下

ファージ感受性試験の結果、1.0 x 10² PFU/mL以上の感受性を示した株が29株確認され、どの処理場由来の分離株にもブラックが形成されない株も存在した。本試験は、宿主株を分離した処理場と異なる地域の流入水を用いて実施しているが、検出・不検出の頻度は地域によって一様ではないことから、異なる地域由来の流入水試料で試験をすると、今回とは異なる結果となる可能性も示唆された。

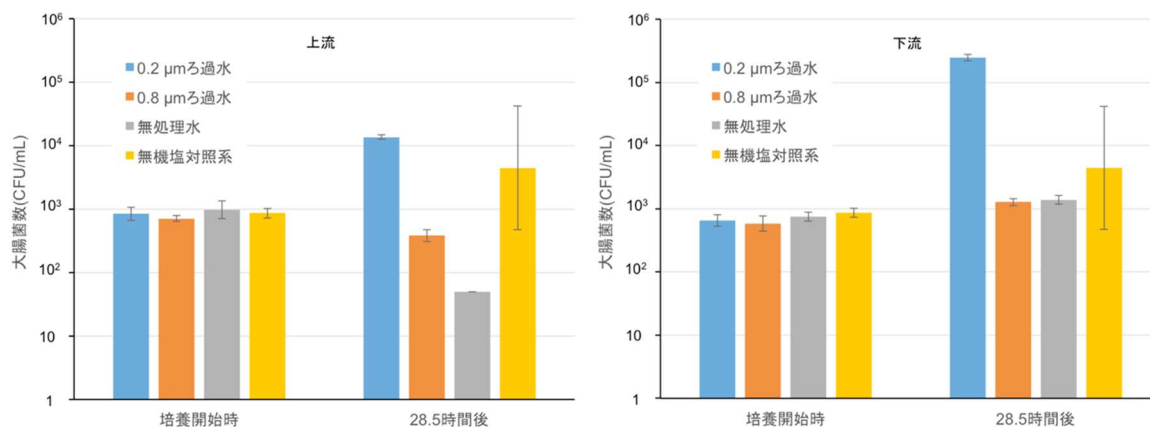
海外で実用されているバクテロイデス株の検出実績は1 x 10² - 5 x 10³ PFU/mLであることから、今回得られた228株のうち、1.0 x 10² PFU/mL以上の感受性を示した29株が、日本全地域のファージを検出する高感度宿主株の候補となる。今後、複数地域の流入水試料を用いた感受性試験で選抜することによって、幅広く高感度なファージ感受性宿主株を獲得することができると考えられる。

③ 河川水中における大腸菌の増殖と他細菌による増殖基質競合の検討

多摩川河川水を用いた大腸菌培養実験の菌数変化を図(1)-5に示す。

孔径0.2 μmろ過水の増殖量と無機塩対照系の比較は、大腸菌が採水地点における有機物を用いて増加できる増殖ポテンシャルを示していると考えられる。孔径0.2 μmろ過水と孔径0.8 μmろ過水の増殖量の比較は、試料水中の他細菌との基質競合による増殖阻害を示していると考えられる。また、孔径0.8 μmろ過水と無処理水との差は、大型微生物の捕食による増殖阻害と考えられる。放流水の上流および下流のどちらにおいても、大腸菌は環境水中で増殖するポテンシャルを示し、他生物の存在によって増殖阻害を受けていることが示された。放流水下流において大型微生物の影響が見られなかったのは、大型微生物が細菌よりも下水処理水の塩素消毒による不活化の影響を強く受けているためと考えられる。

培養後の有機物比較では、解析した質量分析計の全ピーク1122のうち、孔径0.2 μmろ過水の培養液では、56のピークで減少が確認され、大腸菌による消費が確認された。さらに、孔径0.8 μmろ過水の培養液で減少したピークのうち、53のピークは孔径0.2 μmろ過水培養液で減少したピークと共通していた。このことは、大腸菌が増殖に用いる基質を他細菌も競合して消費していることを示すと考えられる。



図(1)-5 培養実験における大腸菌数の変化（放流水上流および下流の試料）

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本サブテーマでは、東京湾沿岸域において、降雨後の腸管系ウイルスおよびバクテリオファージ汚染の実態調査を実施した。測定した全ての微生物で、降雨後には晴天時と比べて有意な濃度の上昇が見られたが、各指標微生物はそれぞれ異なる挙動を示した。例えば、GI型FNRAファージは他の微生物と比較して、濃度の上昇が限定的であった。一方で、GIII型FNRAファージは晴天時にはほとんど検出されず、降雨後のCSO発生時に高い濃度で検出されており、濃度変化が非常に大きかった。このことから、GIII型FNRAファージは、他の微生物と比較しても、降雨直後のCSOによる汚染への特異性が高いと言える。

また、調査領域を東京湾口まで広げ、湾口～湾中央部における人為的PMMoV汚染の調査を実施するとともに、その生残性を室内実験で観察したところ、生残実験においては、大腸菌やノロウイルスに比べて高い残存傾向を示した。PMMoVは環境中ウイルス汚染の新規指標として期待されているが、環境調査における高濃度なPMMoVの特徴と合わせて、本研究で得られた残存性に関わる挙動は、病原性ウイルスとの比較において重要な知見である。

全国19地域の下水処理施設から採取した試料からは、228株のバクテロイデス株を分離した。この中に、分離地と異なる流入水試料に高いファージ感受性を示したものが29株見られた。日本では地域ごとに住む人々の食生活なども異なると考えられるが、住民糞便由来の腸内細菌とファージは地域間で感染し得るものであり、バクテロイデスファージの測定が新たな汚染指標となりうることを示した。

また、本サブテーマでは河川水を培養液とした大腸菌の増殖実験を実施し、環境水中での増殖ポテンシャルと他細菌との有機物競合を明らかにした。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

PMMoV濃度と大腸菌濃度の経時的な傾向を比較すると、PMMoVの残留期間は大腸菌よりも長い。これは、降雨後のウイルス汚染が細菌汚染よりも長く持続することを示唆している。我が国においては、水浴場の微生物学的な水質基準は糞便性大腸菌群数により規制されているが、本研究の結果はこうした基準だけではウイルス由来の感染リスク管理には不十分であることを示していると考えられる。

また、新しい衛生指標として期待される大腸菌は、環境中で増殖するとすれば、汚染の過大評価に直結する環境政策上重要な問題である。本研究の結果は、大腸菌が河川環境中で増殖する強い可能性を示

すものであり、指標微生物としての大腸菌に対する評価・判断資料を提供するものである。

本研究は、現在衛生学的水質基準として使用されている大腸菌群に対して、複数の代替指標を提案することができる。第一に、安価で簡便な培養法を用いた手法として、嫌気性細菌バクテロイデスに感染するファージ数をブラック法で測定するための宿主株候補を獲得した。第二に、培養法と分子生物学的手法を組み合わせた、ICC-PCRによる感染力を持つFRNAファージの遺伝子型別測定法を開発した。

6. 国際共同研究等の状況

- 1) バルセロナ大学のProf. Joan Jofreから、バクテロイデス株の分離について助言と菌株の提供を受け、研究を進めている。Prof. Joan Jofreは、バクテロイデスファージの定量手法に最も早くから着手している、当該研究の世界的第一人者である。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Vu Duc Canh, Hideki Osawa, Kentaro Inoue, Ikuro Kasuga, Satoshi Takizawa, Hiroaki Furumai and Hiroyuki Katayama (2019) Ferrihydrite treatment to mitigate inhibition of RT-qPCR virus detection from large-volume environmental water samples, *Journal of Virological Methods*, 263: 60-67.

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) Vu Duc Canh, Hideki Osawa, Satoshi Takizawa, Hiroaki Furumai, Kentaro Inoue and Hiroyuki Katayama: 5th Food and Environmental Virology conference, Kusatsu, 2016 “Application of Ferrihydrite (Fh) to Remove the Inhibition of Humic Acid in Molecular-Based Detection Methods.”
- 2) Y. Ishii, F. Kurisu, I. Kasuga and H. Furumai : IWA Microbial Ecology and Water Engineering Conference, Copenhagen, Denmark, 2016 “Growth Potential of Escherichia coli in Urban River Waters and Screening of Its Growth Substrate.”
- 3) Vu Duc Canh, Takashi Hijikata, Hiroaki Furumai and Hiroyuki Katayama: International Symposium on Sustainable Urban Environment, Assam, 2017 “Application of ferrihydrite to improve RT-qPCR virus detection in Tokyo coastal water after rainfall event.”
- 4) 石井淑大、栗栖太、春日郁朗、古米弘明：第51回日本水環境学会年会（2017）「都市河川水中における大腸菌と他細菌による増殖基質の競合」
- 5) 井上健太郎、片山浩之、古米弘明：第52回日本水環境学会年会（2018）「新規ウイルス汚染指標 PMMoVの沿岸海域環境における残存性について」
- 6) Takashi Hijikata, Hiroyuki Katayama and Hiroaki Furumai: The 11th IWA-WWCE, Tokyo, 2018 “Occurrence of Enteric Viruses and Microbial Indicators in Tokyo Coastal Area After a CSO Event.”

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 一般公開シンポジウム「水環境の微生物学的安全性に関する研究の動向」（主催：水中の健康関連微生物研究委員会、2017年5月31日、東京大学福武ホール、観客約100名）にて、Weir博士（オハイオ州立大学）、Blanch博士（バルセロナ大学）を招聘し研究動向を探るとともに、研究成果紹介を実施

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Akihiko Hata, Seiya Hanamoto, Yuya Shirasaka, Naoyuki Yamashita and Hiroaki Tanaka: Appl. Environ. Microbiol., Volume 82, 4252-4244 (2002), Quantitative Distribution of Infectious F-Specific RNA Phage Genotypes in Surface Waters.
- 2) Hiroyuki Katayama, Akihiro Shimasaki and Shinichiro Ohgaki: Appl. Environ. Microbiol., Volume 68, 1033-1039 (2002), Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater.
- 3) Akihiko Hata, Hiroyuki Katayama, Masaaki Kitajima and Hiroaki Furumai: Appl. Environ. Microbiol., Volume 81, 4932-4939 (2015), Wastewater Analysis Indicates that Genetically Diverse Astroviruses, Including Strains Belonging to Novel Clades MLB and VA, Are Circulating within Japanese Populations.

II-2 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価

京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター

田中宏明

井原賢

山下尚之（平成28、29年度のみ）

端昭彦（平成28年度のみ）

林東範

李善太（平成28年度のみ）

朴峻遠（平成28年10月まで）

平成28～30年度累計予算額：35,601千円

（うち平成28年度：11,501千円、平成29年度：11,500千円、平成30年度：12,600千円）

【要旨】

琵琶湖南湖において微生物を長期間モニタリングした。また、ファージや大腸菌の遺伝子解析による微生物起源解析や、医薬品マーカーや3次元蛍光などの汚染源解析の手法を適用して、その有効性を評価した。大腸菌の全ゲノム解析の結果からは、大腸菌については琵琶湖南湖では下水処理場以外にトリやウシの負荷が大きいことが示された。大腸菌の全ゲノム解析は環境水中の大腸菌の負荷源を推定する上で有効である可能性が示された。また、医薬品マーカーの測定からは、琵琶湖南湖でも地点によっては下水混入率が高くなることが示された。これらの結果から、琵琶湖南湖では、下水処理場からの放流水の混入は確かにあるが、微生物については下水よりもトリやウシからの負荷が大きいことが示唆された。

【キーワード】

琵琶湖、ノロウイルス、大腸菌、医薬品、起源解析、下水、雨天時排水

1. はじめに

京大グループは、H27年度までの環境省推進費の研究においても琵琶湖南湖で微生物調査を実施してきており、琵琶湖南湖においてもノロウイルスなどのヒト病原ウイルスが検出されることを明らかにしてきた。琵琶湖南湖におけるヒト病原ウイルスの負荷源としては当然、下水処理場の放流水が疑われるが、琵琶湖南湖でのノロウイルス濃度の変動と下水処理場放流水のノロウイルス濃度の変動には相関がみられないことも明らかとなっていた。琵琶湖南湖におけるヒト病原ウイルスの負荷源について、詳細に検討をする必要がある。通常の下水処理場の放流水以外のヒト病原ウイルスの負荷源としては、合流式下水道における雨天時の処理が十分でない排水（合流吐口からの放流や遮集された雨天時下水の下水処理場での簡易処理放流や雨天時処理放流）などが考えられる。簡易処理放流とは、設計を超える降雨時に下水処理場から沈殿処理と塩素消毒だけした十分な雨天時汚水を放流することを指す。しかし合流式下水道の対応は、現在の設定目標では主にBODやSSの処理場での除去に焦点が当てられており、生物処理量を上回る雨天時処理法は、高速ろ過などの雨天時処理法に限定されている。一方、水環境における下水の混入を調べる方法として、下水処理場から排出されていることが明らかである医薬品や特定有機物をマーカーとして使う方法等が発達してきており、琵琶湖南湖でもその活用が期待できる。

水環境における衛生学的水質基準として、我が国においては大腸菌群が長らく用いられてきたが、大腸菌群はヒト糞便由来の物だけでなく、土壌細菌など環境由来もあることからその指標性の根拠が薄い。大腸菌への変更が検討されている。しかしながら、大腸菌も、ヒトだけでなく様々な温血動物から排出されていることから、必ずしも水環境中のヒト糞便汚染の指標になっていない可能性が考えられる。近年、大腸菌の遺伝子解析によってその起源（宿主）を推定する方法が発達してきており、環境水への適用が期待されるが、情報が十分ないのが現状である。

2. 研究開発目的

様々な微生物起源推定の方法を適用し、琵琶湖南湖におけるウイルスと細菌の起源を推定する。

3. 研究開発方法

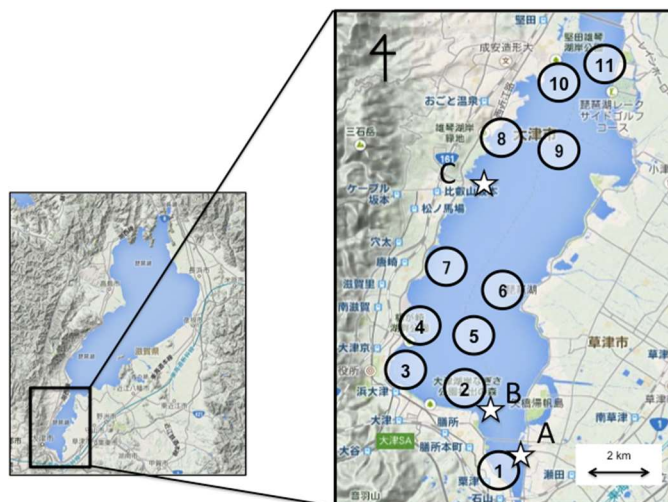
様々な微生物起源推定の方法を適用して、琵琶湖南湖における病原微生物の起源を推定した。そのために、琵琶湖南湖および下水処理場の放流水を毎月採水し、病原微生物、指標微生物の濃度を測定した。また、それぞれのサンプルについて、①RNAフェージの遺伝子型解析、②3次元蛍光測定による下水由来の溶存有機物の分析、③ヒト由来医薬品の測定、を通じて、琵琶湖南湖における微生物汚染に対する下水処理場放流水の影響を解析した。また、④琵琶湖南湖で単離した大腸菌について全ゲノムの塩基配列を次世代シーケンサー(NGS)を用いて解読し、その起源(宿主)を推定した。さらに、琵琶湖南湖でのノロウイルス濃度の変動に対する合流式下水道における雨天時の排水の影響を調べるために、⑤琵琶湖南湖でのノロウイルス濃度変動と雨天時の簡易処理水の発生タイミングの相関を調べた。以下に方法を説明する。

1) 試料の収集

2016年4月から2019年3月にかけて、月に1度の頻度で琵琶湖南湖の11地点で湖水試料を収集した(図(2)-1)。ポンプを用いて表層水を収集し、1地点につき約6 Lを滅菌済み容器(マイティーパック、1.8 L、マルエム)にて捕集した。これら試料は指標微生物分析、ウイルス分析、ノロウイルスの遺伝子型解析に供した。

2016年4月から2019年3月にかけて、月に1度の頻度で南湖沿岸に位置する3か所の下水処理場で流入水試料及び放流水試料を収集した。流入水試料は約500 mLを滅菌済み遠沈管(250 mL、Corning)にて捕集した。また、放流水試料(約4 L)は塩素消費のためチオ硫酸ナトリウム(終濃度: 15 mg/L)を添加した滅菌済み容器にて捕集した。これら試料は指標微生物分析、ウイルス分析、及び大腸菌の全ゲノム解析に供した。

収集した試料は保冷したまま研究室へ輸送し、採取から4時間以内に指標微生物検出及びウイルス濃縮操作に供した。



図(2)-1. 調査対象地点。丸囲みの数字は湖水採水地点
図中星印(A-C)は下水処理場を示す。

2) 指標微生物の分析

大腸菌、大腸菌群はXMG寒天培地(ニッスイ)を用いた平板培養法により定量した。試料1 mLもしくは5 mLをシャーレに添加し、寒天培地と混釈し、培地を固化させた後37°Cで一晩培養した。また、特に低濃度と考えられる試料については50~1000 mLを平板膜に通水した後、膜上に寒天培地を撒き、培養した。

Fファージは宿主として *Salmonella typhimulium* WG49を用いたブラック形成法(Mooijman *et al.*, 2002)により定量した。WG49適量と試料5 mLをシャーレ上で混釈し、培地を固化させた後37°Cで一晩培養した。また、特に濃度が低いと考えられる試料については、1試料あたりに10枚のシャーレを用いることで、50 mLからの検出とした。

3) ウイルス濃縮操作

試料中のウイルスはKatayama *et al.* (2002)の手法により濃縮した。濃縮水量は琵琶湖表層水について最大2 L、流入水及び放流水についてそれぞれ0.1 L、2 Lとした。

4) 定量RT-PCRによるウイルスRNAの検出

二次濃縮液を用い、定量RT-PCR (以下RT-qPCR)によるRNA定量を試みた。まず、二次濃縮液140 μ Lより、QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen)によるRNA抽出操作に供し、RNA抽出液60 μ Lを得た。RNA抽出液 2.5 μ Lをによる逆転写反応(Reverse transcription: RT)に供し、cDNA 5 μ Lを得た。得られたcDNA 5 μ Lから、qPCRによる各種ウイルス遺伝子の検出を試みた。測定対象はGI-及びGII-ノロウイルス (NoV、Kageyama *et al.*, 2003)、トウガラシ微斑ウイルス (pepper mild mottle virus: PMMoV、Rosario *et al.*, 2009)、GI-GIV FRNAファージ (FPH、Wolf *et al.*, 2008) とし、プライマー、TaqManプローブは既往文献記載のものを使用した。

5) EEM-PARAFACを用いた琵琶湖南湖水中の下水処理場放流水由来成分の指標性に関する検討

Fluorescence excitation emission matrices-parallel factor analysis (EEM-PARAFAC)を用いた溶存有機成分の主成分分析を、琵琶湖南湖水試料および近隣の下水処理場放流水試料等に適用し、下水処理場放流先水域の環境中の下水処理場放流水由来成分の指標性を調べた。2016年4月から11月にかけて、琵琶湖南湖11地点で表層水を収集した。採水地点は図(2)-1に示した通りである。さらに2016年4月から11月にかけて、近隣の下水処理場3箇所(図(2)-1、A-C)で最終沈殿池越流水および放流水を収集した。収集した試料(約50 mL)はろ過後、Aqualog(Horiba)での3次元蛍光測定により多波長励起-蛍光マトリックス(Excitation-Emission Matrix、以下EEM)を作成した。得られたEEMの蛍光強度値は、超純水のラマン散乱スペクトル強度を用いて標準化した。励起波長240~800 nm、蛍光波長244.13~826.63 nmの範囲で、琵琶湖南湖水 (n=143)、最終沈殿池越流水および放流水 (n=69)の各EEMの蛍光強度データを対象に、PARAFAC解析を行った。PARAFAC解析で分離された琵琶湖南湖水の主成分と最終沈殿池越流水および放流水の主成分を比べ、類似する成分間で琵琶湖南湖水・放流水の各スコア値(その試料が該当成分をどの程度含んでいるかを蛍光強度値で示したPARAFAC解析の出力データ)の相関を比較した。

琵琶湖南湖で見いだした下水処理場放流水由来成分が他の水系でも下水処理場放流水混入の指標として適用できるかどうかを検討した。具体的には、雨天時に下水処理場で簡易処理放流が発生したタイミングで、下水処理放流水の放流先である桂川下流域で1時間毎に16~24時間連続して採水し(2018年2月および3月に実施)、DOC測定とともにEEM-PARAFACにより対象水中の溶存有機態主成分を推定した。その結果から、河川水中の溶存態有機物の動態へ及ぼす雨天時の都市排水の影響と溶存態有機主成分の簡易指標性を検討した。なお、PARAFAC解析に供した試料数は放流水 (n=88) 及び河川水 (n=79) であった。

6) 水試料中の医薬品類分析方法

下水由来の医薬品類は下水混入のマーカーとして利用できる(Nakada *et al.*, 2008)。琵琶湖南湖においても医薬品マーカーが下水混入のマーカーとして機能するかを検討した。環境水試料をガラス瓶に満水になるまで採水した後、ガラス繊維ろ紙によりろ過し、ろ液を溶存態試料として回収した。溶存態試料はOasis HLB (Waters) カートリッジにより固相抽出を行った。液体クロマトグラフ-タンデム質量計: LC-MS/MS {UPLC (AQUITY, Waters)、MS/MS (Quattro micro API, Waters)} により測定を行っ

た。定量は代替サロゲート法（成宮ら、2010）により行い、試料中の医薬品類濃度を算出した。

7) 大腸菌の全ゲノム解析

2017年3月、7月、10月、12月に採水した琵琶湖水から大腸菌を単離した。また、周辺の3下水処理場で同時期に放流水を採水して大腸菌を単離した。大腸菌はXMG寒天培地(ニッスイ)を用いた平板培養法により培養した。採水月毎に、琵琶湖水由来と放流水由来それぞれ12株の大腸菌からゲノムDNAを抽出し、ライブラリーを作成した（Gomi et al., 2014）。次世代シーケンサーMiSeq（Illumina）を用いて大腸菌全ゲノムの塩基配列を解読した。得られたリードから以下の3つの解析を行った。1) k-mer系統樹に基づいたPhylogroup（系統）の分類、2)五味らの報告したヒト、トリ、ブタ、ウシ由来大腸菌の宿主特異的マーカー遺伝子（Gomi et al., 2014）の保有状況に基づいた宿主の推定。解析は市販のソフトCLC Genomics WorkbenchおよびMicrobial Genomics Module（CLC bio）、またはCenter for Genomic Epidemiologyのウェブサイト（<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>）を利用した。

4. 結果及び考察

1) 下水処理場における指標微生物およびウイルスの存在状況

指標微生物およびウイルスのデータは、H28年度～H30年度に本プロジェクトで取得したデータだけでなく、H26～H27年度に実施された環境省総合推進費で取得したデータも、比較のため併せて示し結果を考察する。

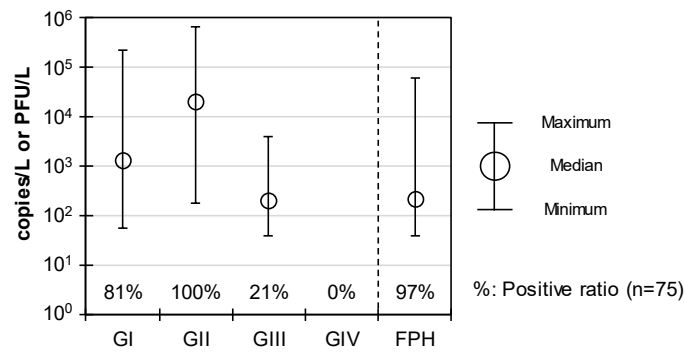
a) 大腸菌、大腸菌群の検出結果

琵琶湖南湖、または下水処理場の流入水試料および放流水試料における大腸菌および大腸菌群の検出濃度を比較した。下水処理場の流入水試料および放流水試料では、大腸菌・大腸菌群濃度比が1:10程度となった。この結果は、糞便に強く汚染された水中では、大腸菌・大腸菌群濃度比が1:10程度となる過去の報告と一致する（Costán-Longares et al., 2008）。これに対して、琵琶湖南湖の水試料では、ほとんどの試料で大腸菌群濃度が大腸菌濃度の100倍以上となった。南湖での濃度比の結果は、南湖での採水試料から検出された大腸菌群のほとんどは糞便ではなく土壌等に由来するものであることを示唆している。このことから、少なくとも琵琶湖南湖においては、大腸菌群は糞便汚染を評価する指標として有効ではないことが明らかとなった。

b) FRNA フェージの遺伝子型別の検出結果

放流水中のRT-qPCRによるFフェージ検出結果を遺伝子型別に、ブラック法によるFフェージの濃度測定結果とともに図(2)-2に示す。最大値、中央値、不検出であった試料を除いた最小値を示した。流入水と同様に、放流水中からもGII、GI、GIII-Fフェージの順で頻繁に検出されたが、GIV-Fフェージはすべての試料において検出されなかった。また、ブラック法で検出された感染力を持ったFフェージの濃度は 10^2 - 10^3 PFU/L程度と低い値であった。GII-Fフェージは主に人糞便由来であること、放流水中でも高頻度、比較的高濃度に検出されることから、琵琶湖南湖における病原ウイルス汚染の指標の候補となりうると期待される。

琵琶湖南湖におけるGII-Fフェージは2014年7月～2016年12月までの調査で27%（n=366のうち99）の試料で検出されていた。琵琶湖南湖水サンプルのうちで27%は、下水処理場からの処理水の汚染を受けていることが考えられた。また、琵琶湖南湖からはGIII-Fフェージも検出された。具体的には、2014年7月～2016年12月までの調査で3%（n=366のうち12）の試料で検出されていた。サブテーマ(1)の研究結果が示すように、GIII-FPHは、雨天時に下水が未処理のまま水域へ放流されるようなフレッシュな汚染を示す指標になりえる。琵琶湖南湖でも、雨天時下水排水に起因するような汚染イベントが発生していたことが示唆される。



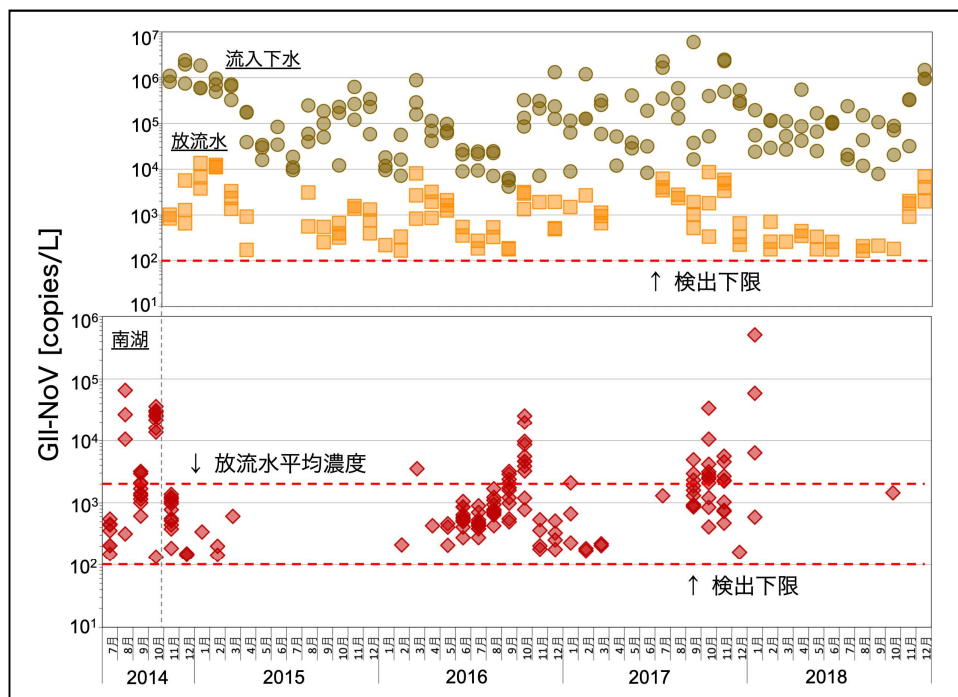
図(2)-2. RT-qPCRおよびプラック法による放流水中のFファージ濃度測定結果
GI～GIVはRT-qPCRによる測定結果，FPHはプラック法によるFファージの測定結果を示す。

2) 琵琶湖南湖における指標微生物およびウイルスの存在状況

a) ノロウイルスの検出結果、雨天時下水処理場での排水との相関

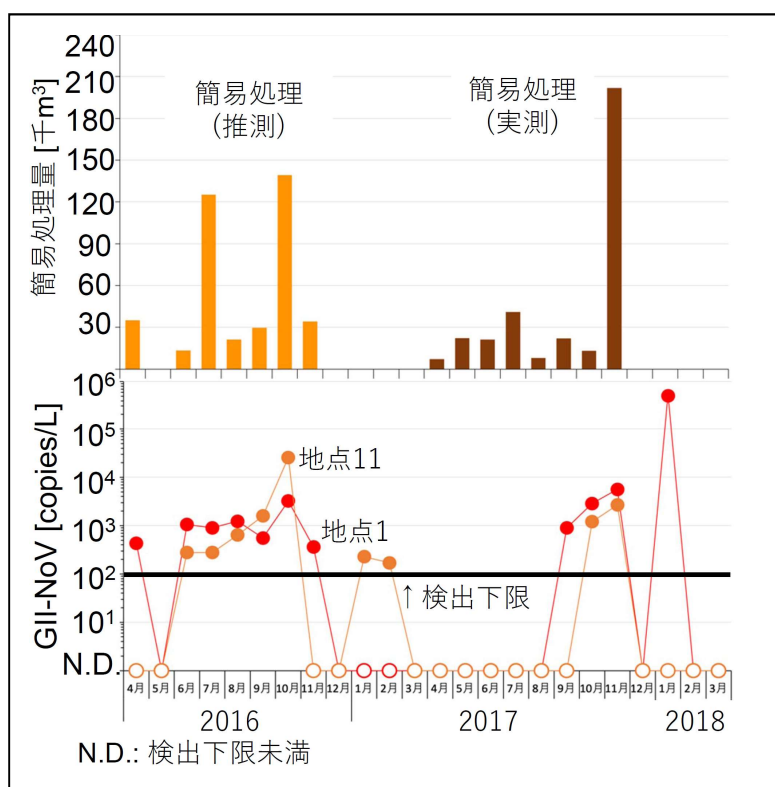
湖水試料および下水試料から検出されたGII-NoVの濃度変動を図(2)-3に示す。湖水試料、下水試料ともに陽性を示した試料のみプロットしている。流入水試料では冬季に濃度が上昇し夏季に低下する傾向が観察され、一般的な冬季流行性を反映していることが示唆されたが、放流水試料では流入水試料と比較して濃度の変動幅が小さく、年中通して $10^2 \sim 10^3$ copies/L程度で存在していることが示された。南湖で夏季においてもGII-NoVが検出された理由の一つと考えられる。

南湖においてはGII-NoVは2014年に90試料中71試料で陽性となり、高頻度かつ高濃度で検出された。しかし、2015年は144試料中17試料で陽性と極端に陽性率が低下し、検出濃度も $10^1 \sim 10^2$ copies/L程度と検出下限値付近の低濃度であった。そして、2016年4月から再び陽性率、検出濃度ともに上昇し、2016年の132試料中88試料で陽性となった。このように、GII-NoVの検出傾向は年によって大きく異なっていた。興味深いことに、2014年、2016年、および2017年においては胃腸炎患者数が増える冬季の前の9月、10月において琵琶湖水でのノロウイルス濃度が放流水試料と同等もしくはそれ以上の高濃度で検出されていた。通常の下水処理場の放流水以外にも南湖へ負荷源があることが示唆される。例えば、雨天時の下水処理場からの排水が考えられた。



図(2)-3. 琵琶湖南湖および下水処理場における各採水月のGII-NoV濃度測定結果
上：下水処理場流入水および放流水，下：琵琶湖南湖水

雨天時の下水処理場からの排水が琵琶湖南湖におけるノロウイルス濃度の変動に与える影響を解析した。具体的には、琵琶湖南湖周辺の3下水処理場の一つにおいて、合流式下水道を抱える処理区がある。合流式改善事業は完了しているが、雨天時に分流式污水管への侵入水が増えるため、雨天時に簡易処理放流（設計を超える降雨時に下水処理場から沈殿処理と塩素消毒した十分な雨天時下水を放流する）が発生していることが分かった。そこで、琵琶湖南湖におけるノロウイルス濃度とその簡易処理水量の関係を比較した。つまり、簡易処理放流が発生したと思われる時期に琵琶湖南湖でウイルス濃度が上昇していないかを解析した。簡易処理放流量と南湖におけるGII-NoV濃度の推移を図(2)-4に示した。簡易処理放流量は、当該の下水処理場から提供いただいた日報に記載の実測値を用いた。一部データが入手できなかった期間については他の情報に基づいて簡易処理放流量を推測した。結果を見ると、簡易処理量が多い2016年7月、2016年10月及び2017年11月付近で、琵琶湖南湖地点1及び地点11のGII-NoV濃度が上昇していたことが分かった。さらに、ノンパラメトリック検定であるスピアマン順位相関を用いて簡易処理放流量と南湖におけるGII-NoV濃度の相関を解析した。スピアマン順位相関係数 ρ は、2変量が直線関係かどうかを問わず、どの程度単調増加もしくは単調減少なのかを示す。有意水準は5%とした。その結果、図(2)-1の地点1において簡易処理量とGII-NoV濃度との間に強い正の相関が見られた($\rho = 0.51$)。また、地点11においても有意な正の相関が見られた($\rho = 0.42$)。これらの結果から、初沈と塩素消毒だけでは十分に流入下水中のGII-NoVを除去・不活化できないため、雨天時に簡易処理放流が発生することが一つの要因となって琵琶湖南湖でウイルス濃度が上昇することが示唆された。



図(2)-4. 簡易処理放流量と琵琶湖南湖におけるノロウイルス濃度(地点1、11)の比較

b) PMMoV の検出結果

2018年の流入下水からの検出頻度が30サンプル中30サンプルで、1月～10月常に検出された。濃度は $2.5 \times 10^7 \sim 6.4 \times 10^8$ copies/Lであり、過去のデータと同様に月ごとの変動はなく一定濃度であった。GII-NoVと比較してPMMoV濃度の変動は小さいが、その理由はPMMoVが植物に感染するウイルスでありヒト体内では増殖しないためと考えられる。GII-NoVはヒト病原ウイルスであり感染すればヒト体内で増殖する。そのため、冬季にノロウイルス感染症が流行すると下水中のGII-NoV濃度も上昇する。しかし、PMMoVにはそのようなヒトでの感染の流行は考えられない。そのため、GII-NoVと異なりPMMoV濃度

の変動が小さかったと考えられる。

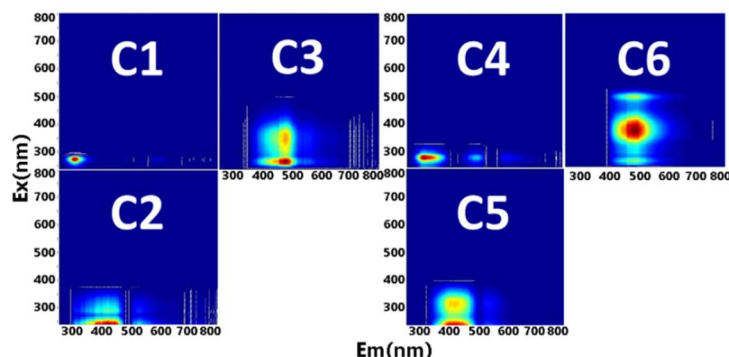
2018年の放流水からの検出頻度は流入下水と同じで、1月～10月常に検出された。2014年11月～2017年12月のデータと同様に高頻度であった。濃度は $1.8 \times 10^5 \sim 9.9 \times 10^6$ copies/Lであり、過去のデータと同様に季節変動がなかった。

2018年の南湖からの検出頻度は110サンプル中100サンプルで、1月～10月常に検出された。濃度は $1.6 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^5$ copies/Lであった。また、5月～8月にかけて濃度が2-logほど減少していた。2014年7月～2017年12月のデータと比較して、2018年の検出頻度は過去のデータと同様に高頻度であった。PMMoVの検出頻度が高い原因として、下水処理場からのPMMoVの負荷量が高いほかにも、PMMoVの生残性が高いことが考えられる。我々の実験では、実験環境下で太陽光へ曝露し、qPCRにより濃度の減衰を調べた結果、PMMoVはGII-NoVに比べて減衰速度が遅い結果が得られている(白坂、2017)。そのため、PMMoVはGII-NoVよりも環境中で生残しやすく、検出されやすいと考えられる。PMMoVの濃度については、過去のデータと同様に春から夏にかけて濃度が減少していた。同じ時期に放流水の濃度が減少していないため、下水処理場からの負荷は減少していないと考えられる。また、PMMoV濃度が減少する時期がちょうど梅雨の時期と重なっていることから、降水量が増加することで南湖の水量も増加し、PMMoVが希釈されて検出濃度が下がった可能性がある。

3) EEM-PARAFACを用いた琵琶湖南湖水中の下水処理場放流水由来成分の指標性に関する検討

EEM-PARAFACにより得られた琵琶湖南湖水と最終沈殿池越流水および放流水の主成分のスペクトルを図(2)-5に示す。H28年度に取得したデータ(2016年4月～11月)だけでなく、以前の環境省総合推進費で取得したデータ(2015年11月～2016年3月)も比較のため併せて示す。本検討で得られたEEMスペクトルからは、琵琶湖南湖水で3つ(C1・C2・C3)、最終沈殿池越流水及び放流水で3つ(C4・C5・C6)の主成分が分離された。C1はトリプトファン様成分(Yamashita *et al.*, 2008)、C2及びC3はフミン様成分であること(Stedmon and Markager, 2005)、一方のC4はトリプトファン様成分、C5及びC6はフミン様成分であること(Gentry-Shields *et al.*, 2013)が報告されている。

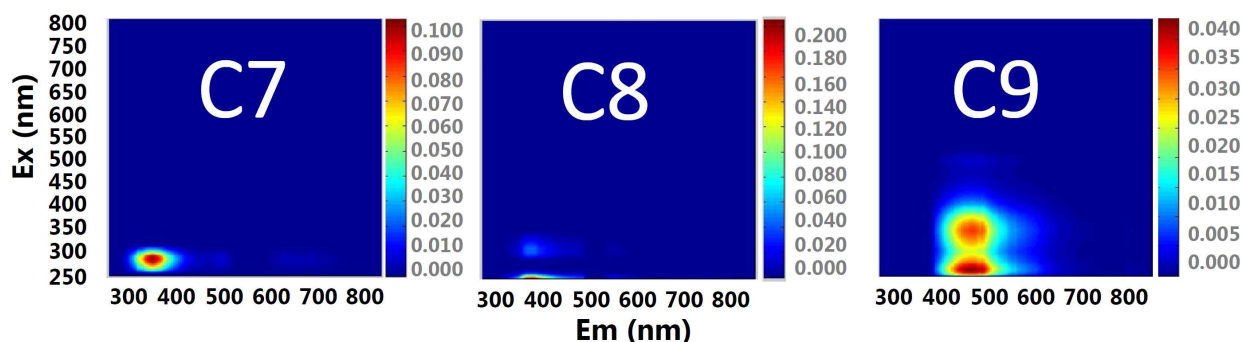
琵琶湖南湖水の主成分(C1・C2・C3)と最終沈殿池越流水及び放流水の主成分(C4・C5・C6)の間で類似している成分の組み合わせをC1vsC4、C2vsC5、C3vsC6と仮定し、下水処理場Cの放流水のスコア値と放流口近傍の地点8での琵琶湖南湖水のスコア値との相関を解析した。C1vsC4の R^2 値が他に比べ高い結果となった($R^2 > 0.5$)。これはC4の環境中での保存性が他より高いためと考えられる。これに対しC5については放流水に多く含まれるが、一方で紫外線による分解性が高いことも報告されている(Stedmon and Markager, 2005)。以上により、琵琶湖南湖水の3つの主成分(C1・C2・C3)が放流水汚染指標となる可能性のあること、その中でもC1が有力な候補であることが示唆された。



図(2)-5. EEM-PARAFACにより得られた琵琶湖南湖流域の各水試料の主成分のスペクトル
左側C1・C2・C3: 琵琶湖南湖水、右側C4・C5・C6: 最終沈殿池越流水および放流水。

また、EEM-PARAFACにより得られた雨天時の桂川下流域の主成分のスペクトルを図(2)-6に示す。桂川下流域からはC7、C8、およびC9の3つの主成分が分離された。C7は琵琶湖南湖の試料から分離された

ピークC1と励起光、蛍光の分布が類似しており、同様に、C8はC2と、C9はC3とそれぞれ類似していた。このように、河川においても、雨天時に下水処理場において簡易処理放流が発生した場合に、琵琶湖南湖で見出された主成分C1、C2、およびC3が放流水汚染指標となる可能性が確認できた。



図(2)-6. EEM-PARAFACにより得られた桂川下流域の各水試料の主成分のスペクトル

4) 医薬品類を用いた南湖採水地点での下水処理水混入率の推定

CrotamitonやSulpirideなどの難分解性医薬品は下水処理場に流入したのち、下水処理を経てもほとんど分解されないまま南湖へと放流される。さらに、南湖へ放流後も、太陽光による光分解や微生物による生分解をほとんど受けないと考えられる。そのため、湖水中での濃度減少は、主に湖水による希釈や移流・拡散によって起こると考えられる。したがって、下水処理水中濃度と湖水中濃度を比較することで、湖水試料中の下水処理水混入率を計算することができる。琵琶湖南湖水や下水処理場放流水で測定したCrotamiton濃度データを用いて、各採水地点の下水処理水混入率を以下の式により計算した。

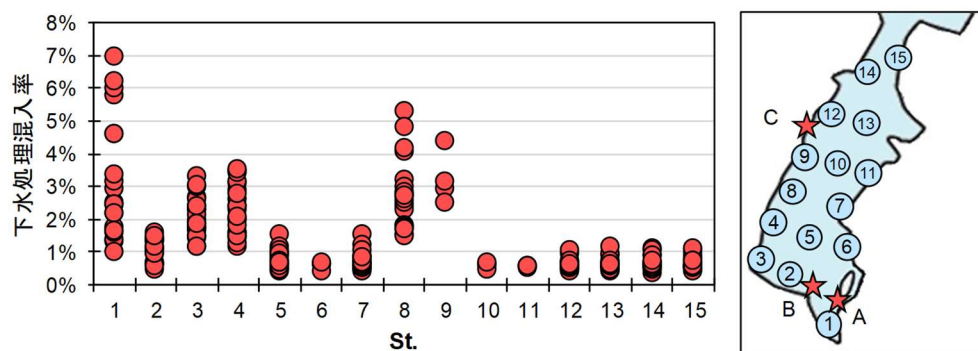
$$\text{下水処理水混入率 (\%)} = \frac{C_{\text{Lake}}}{\sum(C_{\text{eff}} \times Q_{\text{eff}}) / \sum Q_{\text{eff}}} \times 100$$

ここで、 C_{Lake} : 湖水試料中のCrotamiton濃度 [ng/L]

C_{eff} : 各下水処理場の放流水試料中のCrotamiton濃度 [ng/L]

Q_{eff} : 各下水処理場の処理水量 [m³/day] を示す。

2014年12月から2016年12月に採水した放流水試料および湖水試料から算出した各採水地点における下水処理混入率を図(2)-7に示す。下水処理場近傍である地点1、8、および9において下水処理水混入率が高い結果となっており、Crotamitonが琵琶湖南湖においても下水混入のマーカとして機能することが示唆された。また、南湖西岸(地点3、4)も比較的高い値であった。これに対して南湖東岸およびC処理場以北の地点は比較的低い混入率が低く、ほとんど1%を下回る結果となった。これらの結果から、C処理場の放流水は南湖へ排出された後、西岸に沿って南に流下することが示唆された。また、B処理場すぐ北に位置する地点2で混入率が低く、すぐ南に位置する地点1では混入率が高いことから、B処理場の放流水も南へ流下することが示唆された。このように、医薬品マーカーは琵琶湖南湖においても下水処理水の混入率を推定する上で有力な方法である。



図(2)-7. 各採水地点における下水処理水混入率

5) 大腸菌の全ゲノム解析

a) 系統樹の作成、phylogroupによる大腸菌の分類

2017年3月、7月、10月、12月に採水した琵琶湖水および周辺の3下水処理場の放流水から大腸菌を培養単離し、それぞれの大腸菌株の全ゲノム塩基配列を解読した。それぞれの株から得られたコンティグの長さの合計は500万塩基程度えられており、大腸菌のゲノムの全長をシーケンスできていると考えられた。それぞれの株から作成されたコンティグについて、琵琶湖水、放流水、糞便由来の大腸菌と従来から系統分類の代表として用いられている大腸菌reference株の全ゲノム情報を合わせてk-mer系統樹を作成した。例として、2017年7月のサンプルの結果について詳しく説明する。放流水由来の大腸菌は系統Aが最も多く12株中5株(42%)だった。これに対して琵琶湖水由来の大腸菌は系統Aはゼロで、系統B1が最多で12株中7株(58%)だった。ヒト糞便由来の株は9株中4株(44%)が系統Aに分類されている。放流水由来と類似した系統である。トリ糞便由来の株は5株中4株(80%)がB1に分類された。琵琶湖水と類似した系統である。

放流水由来の大腸菌はヒトマーカを保有している株が最も多く4株、ついで3株がトリマーカを保有していた。これに対して琵琶湖水由来の大腸菌はヒトマーカを保有する株はゼロで、トリマーカを保有する株が5株であった。ウシマーカを保有する大腸菌が1株見られた。

2017年3月、7月、10月、12月の全4回の調査での系統分類の結果を合わせて考察する。全体の結果から見ると、琵琶湖水由来の大腸菌も下水放流水由来の大腸菌もB1系統が最多であった。しかし、琵琶湖水由来の大腸菌(44株中30株、68%)の方が、下水放流水由来の大腸菌(50株中22株、44%)よりも高い割合であった(表(2)-1)。過去の研究から、環境中から検出される大腸菌は系統B1が最も多いとの報告(Walk et al., 2007)があり、本研究の琵琶湖水由来の大腸菌の系統分類は一致する結果となった。また、放流水は系統Aが50株中に8株(16%)あったが、琵琶湖水はゼロであった。由来既知の糞便株の系統分類の結果でヒト糞便由来株の多くが系統Aに分類されている結果を合わせて考察すると、琵琶湖南湖水由来の大腸菌は、やはり、下水由来(ヒト糞便由来)の大腸菌と系統が異なることが推測された。

琵琶湖水由来の大腸菌は系統Dが系統B1に次いで多く、16%を占めていた。C系統、F系統は琵琶湖水にも放流水にも占めていた割合は2%以下であった。

表(2)-1 琵琶湖水および放流水由来の大腸菌の各系統の割合

phylogroup	割合(%)	
	琵琶湖水 (n=44)	放流水 (n=50)
B1	68	44
C	2	0
A	0	16
E	5	8
D	16	8
B2	7	22
F	2	2

b)大腸菌の起源推定

先行研究においてヒト、トリ、ウシ、またはブタ由来の大腸菌株から選定された13種の遺伝子マーカー(Gomi et al., 2014)を用いて、琵琶湖水と下水処理場の放流水から単離された大腸菌の起源を推定した。2017年3月、2017年7月、2017年10月、2017年12月に採取した琵琶湖南湖試料から単離された大腸菌、および下水処理場放流水試料から単離された大腸菌、それぞれの遺伝子マーカーの保有パターンを調べた。結果を表(2)-2にまとめた。起源特定の際は、ある特定の起源(ヒト、ウシ、ブタ、トリ)に特異的なマーカーのみを1つ以上保有していた大腸菌株については、その起源由来であると判断した。

琵琶湖南湖水由来の大腸菌は44株のうち、15株(33%)がトリ由来であると同定され、他にはウシ由来も7株(16%)あった。ヒト由来とブタ由来はそれぞれ1株のみ(2.2%)と非常に少なかった。過去の研究から、トリ糞便由来の大腸菌は系統B1に最も多く割り当てられ(49%)、次いで系統Dに20%が割り当てられたと報告されている(Gordon et al., 2003)。この先行研究の結果は、琵琶湖水由来の大腸菌が系統B1、および系統Dに多く割り当てられ(表(2)-1)、マーカー遺伝子の保有状況からもトリが最も多かった結果と合致する。つまり、琵琶湖南湖水の大腸菌については系統分類の結果もマーカー遺伝子の結果も、大腸菌の起源はトリの寄与がもっとも高いことを示唆している。一方、20株(44%)の大腸菌株は遺伝子マーカーを保有していなかった。

下水処理放流水由来の大腸菌は、また琵琶湖水試料とは異なり、51株のうち14株(27%)がヒト由来で最多であった。下水がヒト糞便を含む排水がメインであることを考えると、ヒト由来が最多となった結果は当然と理解できる。一方で、過去のブラジルでの研究からは、ヒト糞便由来の大腸菌は系統Aに最も多く割り当てられ(38%)、次いで系統Dに26%が割り当てられたと報告されている(Carlos et al., 2010)。この先行研究の結果は、放流水由来の大腸菌が系統B1に最も多く割り当てられた本研究の結果(表(2)-1)と一致しない。系統分類でB1が最多となった理由は現時点ではわからないが、日本とブラジルという地理的な違い、ヒト集団の違いが保持する大腸菌の系統の違いを生んでいる可能性は考えられる。今後の課題である。

また、下水放流水由来の大腸菌は琵琶湖水試料と比べてトリ由来が14%と低い割合であった。ウシ由来3.9%、ブタ由来2.0%であった。放流水試料にも22株(43%)の大腸菌株が遺伝子マーカーを保有せず起源の同定ができなかった。

表(2)-2 琵琶湖水および放流水由来の大腸菌の宿主特異的マーカーの検出割合

宿主特異的遺伝子マーカー	割合(%)	
	琵琶湖水 (n=44)	放流水 (n=50)
ヒト	2.2	27
ヒト or トリ	2.2	3.9
ヒト or トリ or ブタ	2.2	3.9
ブタ	2.2	2.0
ウシ	16	3.9
トリ	33	14
ブタ or トリ	0	2.0
マーカー未検出	44	43

琵琶湖水も放流水も、43～44%の大腸菌株は遺伝子マーカーを保有していなかった。その原因としては以下の3つの可能性が考えられる。

- 1) 今回用いた宿主マーカー遺伝子はその動物起源の大腸菌を100%検出できるわけではない。
- 2) ヒト、ブタ、ウシ、トリ以外の宿主からの大腸菌の負荷がある。
- 3) 特定の宿主の腸管内に生息する大腸菌だけでなく、複数種の宿主の腸管内で生息できる大腸菌が存在する可能性。

起源推定のまとめ

琵琶湖南湖試料から単離された大腸菌44株、下水処理場放流水試料から単離された大腸菌50株について、ヒトマーカー、ウシマーカー、ブタマーカー、トリマーカーのマーカー遺伝子を用いて起源解析を行った。その結果、放流下水と流入下水はヒト由来が最も多く、琵琶湖南湖の大腸菌はヒトではなくトリ由来が最も多く、次いでウシ由来の大腸菌も多かった。

大腸菌の水環境中の糞便汚染指標としての有効性と意義

琵琶湖南湖から検出される大腸菌は、下水放流水から検出される大腸菌とは、ゲノム塩基配列に基づく分類でも起源推定の結果からも、異なっていることが示唆された。下水由来の大腸菌はヒト糞便由来が多い結果となっていたのに対して、琵琶湖南湖水由来の大腸菌はトリやウシ由来が多い結果となった。この結果は、琵琶湖南湖においてはヒト糞便汚染よりもトリやウシ糞便汚染の方が負荷が大きいことを示唆している、とも考えられる。今回の結果が他の水系にも当てはまるとの確証はないので、対象とする水系ごとに本研究で実践したような調査を実施する必要があると考える。大腸菌の全ゲノム解析という方法論は、いずれの水系であっても適用可能である。

本研究の結果は、ヒト糞便(下水)汚染以外の汚染源の寄与が大きい水環境では、微生物汚染を軽減するためには下水処理場だけでは効果に限界があることも示唆している。下水以外の汚染源、例えば畜産排水や水鳥の糞便などを抑制しなければ水環境での微生物汚染を軽減できないことが示唆される。

医薬品マーカーの測定からは、琵琶湖南湖でも地点によっては下水放流水の混入が確かにあることが示された(図(2)-7)。しかし、微生物については、琵琶湖南湖においては下水よりもトリやウシからの負荷が大きいことが示唆された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 琵琶湖において、指標微生物および病原ウイルスを長期間にわたって継続してモニタリングしている。H26～27年度の環境省総合推進費での調査も含めれば4年半にわたりモニタリングしていることにな

る。これほど長期間にわたって指標微生物とウイルスの濃度変動の関係の調査は世界的にも稀である。

2) 琵琶湖南湖で単離された大腸菌の全ゲノム情報を解析することで、その起源を推定できる可能性を示すことに成功した。大腸菌全ゲノム解析の環境サンプルへの適用例としては、世界的にもほとんど例がなく、貴重なデータである。その結果、大腸菌については琵琶湖南湖では下水処理場以外にトリやウシの負荷が大きいことが示された。

3) 微生物だけでなく医薬品についても併せてデータを取得したことも世界的にも貴重な研究である。これまで、環境中での保存性の高い一部の医薬品は下水汚染のマーカーとして使用されており、琵琶湖南湖においても活用が可能であることが示された。

4) 水試料を3次元蛍光分析することによって下水汚染のマーカーとして活用できる可能性が示された。

5) 全国的に合流式下水道対策が推進されているが、現在のところその水質対象はBODとSSである。本研究では、放流先の湖水の他に、主な人為活動に由来する下水、下水処理水、雨天時の下水処理場からの簡易処理水を含む放流水、合流式下水道対策の放流水のデータを集め、わが国でこれらの関係を初めて比較した貴重な研究である。その結果、特にノロウイルスに関しては、湖水の季節変動パターンは、下水や下水処理水の季節変動パターンを反映せず、雨天による簡易放流の発生と関連することが初めて、統計的に示唆された。このことは、ノロウイルスの発生源、排出源、排水先の閉鎖性水域の緻密な観測から得られた成果である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

国土交通省の下水道技術ビジョンの平成27年度改定、またその後の微生物学的安全性の議論にあたって、合流式下水道越流や分流式不明水の侵入時での雨天時病原微生物問題への取り組む技術開発重要性が取り上げられているが、本研究成果である東京湾、琵琶湖など放流先地先や下水処理場での指標細菌やウイルスなどの実態調査データが反映されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

現在検討が継続されている大腸菌群数から大腸菌への変更する理由に、環境省環境総合推進費で集積してきた琵琶湖南湖での大腸菌群数と大腸菌水に相関関係がみられていないことが根拠として反映している。また大腸菌へ指標変更したとしても、人の活動が少ない河川で基準値が満足できない場合の原因追及に、本研究で開発してきているソーストラッキング技術が使われると見込まれる。また環境基準が大腸菌に変更される場合に、環境基準を達成するために必要な下水道での処理水水質目標を、流域ごとに流域別下水道整備計画で検討することが想定される。その場合にも本研究で開発しているソーストラッキング技術が使われると見込まれる。

現在、日本においては衛生学的水質基準が大腸菌群から大腸菌への変更の検討が進んでいる。本研究の結果は、大腸菌の水環境中の糞便汚染指標としての有効性と意義について情報を与えた。つまり大腸菌は必ずしも人糞便由来ではなく、家畜や水鳥などに由来とする大腸菌もかなり多いことが示唆された。

本研究で用いた大腸菌の全ゲノム配列解読は、起源解析方法として有効であることが示された。起源推定の結果がどれくらい確かであるのか、他の水系でもこの方法が有効なのか等、今後データをさらに蓄積することで、行政にも活用できる方法として確立できる可能性がある。

本研究の結果は、ヒト糞便(下水)汚染以外の汚染源の寄与が大きい水環境では、微生物汚染を軽減するためには下水処理場だけでは効果に限界があることも示唆している。下水以外の汚染源、例えば畜産排水や水鳥の糞便などを抑制しなければ水環境での微生物汚染を軽減できないことが示唆される。

下水道分野では、現状進められている合流式下水道対策が、主にBODやSSを分流式並みの負荷量に削減することを目標としているが、放流先水域が閉鎖的で、水利用が重要な場合には、この対策だけでは、病原微生物、特にウイルス対策が不十分であることをこの研究は示している。このため、雨天時処理方法の技術開発へのインセンティブを与えると期待される。また合流式下水道対策が完了した場合に

も、分流式污水管に雨天時の侵入水が流入していることが本研究から示唆された。このことは、合流式下水道だけでなく、分流式下水道での雨天時の水質対策が重要であることを示している。今後、分流式下水道での雨天時侵入水対策と雨天時処理技術の開発が加速すると思われる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明(2017)被災下水処理場の暫定処理後の塩素消毒による指標微生物の不活化と生態毒性、下水道協会誌 54 93-100.
- 2) 三浦尚之、渡部徹、藤井健吉、金谷祐里、田中宏明、村上道夫(2018) 水中の健康関連微生物リスク研究の歴史的変遷と最先端日本リスク研究学会誌、27(2)、1-11
- 3) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明(2018)被災下水処理場の暫定処理を想定したオゾン消毒による指標微生物の不活化と生態毒性、下水道協会誌、55、667、66-74
- 4) 松葉祐亮、田中景介、西田佳記、圓佛伊智朗、山下尚之、田中宏明. 環境システム計測制御学会 学会誌 EICA (vol 23, issue 2/3, 47-51) (2018) 雨天時の下水処理場における指標微生物の制御に関する基礎検討
- 5) 山口武志、山下尚之、田中宏明(2018)EEM-PARAFACによる河川水中の溶存態有機物の動態へ及ぼす雨天時都市下水の影響検討、土木学会論文集G(環境)、74(7)、III_275-III_284.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 田中宏明(2018)「Swimmable」な水環境管理目標の改定と課題、環境衛生工学研究 32(2) 【招待論文】
- 2) 山口武志、山下尚之、田中宏明(2018) EEM-PARAFACを用いた雨天時の桂川における下水処理放流水混入の簡易指標に関する検討、環境衛生工学研究、32(3)、25-27 【優秀ポスター賞受賞号】

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明、第53回下水道研究発表会、名古屋(2016)、被災下水処理場での粒子付着ウイルスに対する紫外線及びオゾン消毒
- 2) 田中宏明(2017)水環境・河川環境を取り巻く最近の話題 一琵琶湖南湖は泳げるかー、琵琶湖河川ゼミナールアクア琵琶、2017年8月30日、滋賀県大津市、アクア琵琶【招待講演】
- 3) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第51回日本水環境学会年会、熊本(2017) EEM-PARAFACを用いた琵琶湖水中の下水道施設由来成分の指標性に関する検討
- 4) 田中景介、山下尚之、田中宏明、第20回日本水環境学会シンポジウム、和歌山(2017)雨天時下水処理場における指標微生物及びウイルスの流入実態
- 5) 井原賢、田村太一、五味良太、林東範、劉思瑶、馬綴宇、山下尚之、田中宏明、第20回日本水環境学会シンポジウム、和歌山(2017)、琵琶湖南湖から検出される大腸菌の全ゲノム解析
- 6) 田中宏明、水系感染リスクの水質管理への利用、日本リスク研究学会第30回年次大会、Oct.27-29, 2017、彦根市滋賀大学【招待講演】
- 7) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第54回環境工学研究フォーラム、岐阜(2017) 3次元蛍光分析法の活用による琵琶湖南湖水中の下水処理場由来成分の指標性に関する検討
- 8) 田中景介、松葉祐亮、西田佳記、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)指標微生物を対象とした一部合流式区域を有する分流式下水処理場における雨天時調査

- 9) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)EEM-PARAFACを用いた琵琶湖流出河川における台風時の下水処理放流水汚染の簡易指標に関する検討
- 10) 劉思瑶、井原賢、田村太一、馬緻宇、林東範、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)全ゲノム解析による、琵琶湖南湖で検出される大腸菌の起源推定
- 11) 田中景介、松葉祐亮、西田佳記、山下尚之、田中宏明、第52回日本水環境学会年会、札幌(2018)指標微生物を対象とした一部合流式区域を有する分流式下水処理場における雨天時調査
- 12) Hiroaki Tanaka(2018)More Challenges of Water Quality Management Attributed to Sewage Works in Japan, The 2nd The National Conference on Water Treatment and Water Reuse of China,2018年4月21日、Hilton Qingdao Golden Beach, Qingdao China【招待講演】
- 13) Hiroaki Tanaka(2018) Discussion on Recent Challenges of Water Quality Management & Relevant Sewerage System, Public Works Research Institute, Special Semina,2018年4月23日、土木研究所、つくば【招待講演】
- 14) 田中宏明(2018)衛生学的視点からの水環境と水再利用の新たな目標設定の動向、第31回環境工学連合講演会レギュラトリーサイエンスと環境工学、2018年5月22日 東京、日本学術会議【招待講演】
- 15) 田中宏明(2018)より安全、安心な琵琶湖の水質を 目指して、国立研究開発法人 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター第15回琵琶湖分室セミナー、2018年7月11日、滋賀県大津市琵琶湖環境科学センター【招待講演】.
- 16) 田中宏明(2018)衛生学的水質目標設定の動きと 下水道への波及、第24回下水道新技術研究発表会、2018年7月13日、大阪市大阪科学技術センター【招待講演】
- 17) 山口武志、山下尚之、田中宏明、第55回下水道研究発表会、北九州市(2018)蛍光分析を活用した処理場での雨天時下水中の溶存有機成分の挙動特性に関する検討
- 18) 奥野義規、井原賢、田村太一、林東範、山下尚之、田中宏明、第40回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム、京都(2018)、琵琶湖南湖流域における下水中ノロウイルスの遺伝子型解析
- 19) 山口武志、林東範、井原賢、田中宏明、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根(2018)、河川の衛生学的安全性へ及ぼす雨天時下水の影響
- 20) 于再治、白坂勇也、田村太一、林東範、山口武志、井原賢、田中宏明、山下尚之、端昭彦、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根(2018)、琵琶湖南湖におけるウイルスの長期モニタリング
- 21) 馬緻宇、井原賢、劉思瑶、田村太一、奥野義規、林東範、山下尚之、田中宏明、第21回日本水環境学会シンポジウム、島根(2018)、Analysis of antibiotic-resistant Escherichia coli in Lake Biwa and wastewater treatment plants effluent
- 22) Masaru IHARA, Siyao LIU, Taichi TAMURA, Chihyu MA, Dongbum IM, Naoyuki YAMASHITA, Hiroaki TANAKA, 第17回世界湖沼会議、茨城(2018)、Investigation of the source of E.coli in the southern part of Lake Biwa
- 23) 奥野義規、井原賢、田村太一、林東範、山下尚之、田中宏明、第53回日本水環境学会年会、甲府(2019)、琵琶湖南湖流域における下水中ノロウイルスの遺伝子型解析
- 24) 西田光希、松葉祐亮、田中景介、田中宏明、西田佳記、第53回日本水環境学会年会、甲府(2019)、合流式下水処理場における雨天時の衛生微生物調査
- 25) 田中宏明(2019)琵琶湖・淀川流域でのバイオリスク低減、水環境創造機構 講演会、大阪市、国民會館 武藤記念ホール 2019/5/15【招待講演】
- 26) 田中宏明(2019)気候変動対応のための排水インフラの技術開発、京都大学インダストリアルデイ2019①(産学マッチング交流会)～気候変動に関するレジリエンスの強化～、キャンパスプラザ京都、2019/5/24【招待講演】

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 田中宏明、日本水環境学会 水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム Recent progress in microbial safety in water environment～水環境の微生物学的安全性に関する研究の動向～、東京 (2017) 琵琶湖南湖でレクリエーションはどの程度可能か？
- 2) 田中宏明、水環境・河川環境を取り巻く最近の話題 一琵琶湖南湖は泳げるか一、琵琶湖河川ゼミナールアクア琵琶、2017/8/30、アクア琵琶【招待講演】
- 3) 井原賢、水環境中の微量汚染化学物質と病原微生物について、K-CONNEXファーストコンタクト、KRPアイデア・シェアリング・コミュニティ第6回、2017/11/22、京都リサーチパーク【招待講演】
- 4) 田中宏明、井原賢、奥野義規、田村太一、山下尚之、琵琶湖における病原微生物存在実態の調査、滋賀県衛生科学センターでのアウトリーチ、2018/1/29、滋賀県衛生科学センター

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Mooijman, K. A., M. Bahar, M. Muniesa, and A. H. Havelaar. 2002. Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *Journal of Virological Methods*. 103 (2): 129-136.
- 2) Katayama, H., A. Shimasaki, and S. Ohgaki. 2002. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (3): 1033-1039.
- 3) Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (4): 1548-1557.
- 4) Rosario, K., E. M. Symonds, C. Sinigalliano, J. Stewart, and M. Breitbart. 2009. Pepper Mild Mottle Virus as an Indicator of Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (22): 7261-7267.
- 5) Wolf, S., J. Hewitt, M. Rivera-Aban, and G. E. Greening. 2008. Detection and Characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Method*. 149 (1): 123-128.
- 6) 白坂勇也. 2017.琵琶湖南湖におけるウイルス汚染の実態把握及びウイルス汚染指標の検討, 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻, 修士論文.
- 7) 成宮正倫, 中田典秀, 小西千絵, 宝輪勲, 田中宏明. 2010. 代替サロゲートを用いた環境試料中医薬品類の分析. 第19回環境化学討論会講演要旨集. 534-535.
- 8) Gomi, R., et al., Fecal source tracking in water by next-generation sequencing technologies using host-specific *Escherichia coli* genetic markers. *Environmental science & technology*, 2014 (48), 9616-9623.
- 9) Walk, S.T., et al., Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches, *Environmental Microbiology*, 2007 (9), 2274-2288.
- 10) Gordon, D.M., et al., The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects, *Microbiology*, 2003 (149), 3575-3586.
- 11) Carlos, A., et al., *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination, *BMC Microbiology*, 2010 (10), 161.

- 12) Yamashita, Y., R. Jaffé, N. Maie, and E. Tanoue. 2008. Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC). *Limnology and Oceanography*. 53 (5): 1900-1908.
- 13) Stedmon, C. A., and S. Markager. 2005. Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnology and Oceanography*. 50 (2): 686-697.
- 14) Gentry-Shields, J., A. Wang, R. M. Cory, and J. R. Stewart. 2013. Determination of specific types and relative levels of QPCR inhibitors in environmental water samples using excitation-emission matrix spectroscopy and PARAFAC. *Water Research*. 47 (10): 3467-3476.

II-3 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究

東北大学大学院環境科学研究科 佐野大輔

平成28～30年度累計予算額：20,326千円

(うち平成28年度：8,126千円、平成29年度：8,200千円、平成30年度：4,000千円)

[要旨]

本研究では、ノロウイルス吸着性糖鎖である血液型決定抗原を細胞外物質として分泌する大腸菌に着目し、この血液型決定抗原陽性大腸菌がノロウイルスを捕捉して水環境中に存在しているとの仮説に基づき、大腸菌の中でも血液型決定抗原陽性大腸菌が水環境のノロウイルス汚染指標として使用可能であるかを検討した。その結果、水環境中から複数の血液型決定抗原陽性大腸菌を単離することに成功した。また遺伝子欠損株を用いた実験により、糖代謝に関わる遺伝子が大腸菌の血液型決定抗原分泌関連遺伝子として同定され、この遺伝子を血液型決定抗原陽性大腸菌の追跡マーカーとして使用することが可能となった。

[キーワード]

ノロウイルス、血液型決定抗原陽性大腸菌

1. はじめに

毎年冬季になると感染性胃腸炎の被害が多発し社会的問題となっている。厚生労働省によると、2005年から2013年までの感染性胃腸炎の定点報告数は毎年80万件以上に上る¹⁾。このうち、非細菌性胃腸炎の主要な病原体としてはヒトノロウイルス (HuNoV) が挙げられる。HuNoV感染症は症状が比較的軽症であるが、免疫力の弱い乳幼児や高齢者では重篤化するケースもあり、特に高齢者では嘔吐物の誤嚥による肺炎や喉に詰まらせることによる窒息等により死者が発生することもある²⁾。免疫力の強い若年層であっても発症中は激しい嘔吐や下痢症等が続き社会活動が困難となるなど、社会に与える影響は少なくない。Hoffmannらによれば全米におけるHuNoV感染症に由来する経済損失は年間20億ドルと試算されておりその影響の大きさを物語っている³⁾。

我々の生活に大きな打撃を与える感染症であるにも関わらず、HuNoV感染症には現在有効な対策が打ち出せていない。HuNoVでは効果的なワクチンを作り出すことが現状困難であるほか、多様な遺伝子型集団を構築しているために特定の遺伝子型の株に感染した直後に異なる遺伝子型の株に感染するケースも一部では報告されているなど⁴⁻⁶⁾、免疫による制御も効果的とはいえない。目下、HuNoV感染症に対してはHuNoVに感染しないように予防することが重要となる。感染経路が多岐にわたり⁷⁻⁸⁾、且つその生態が十分に解明されていないHuNoVでは、HuNoVが環境中でどのように存在し、どのようにヒトに暴露され感染を拡大するかを解明した上で効果的な予防・制御手法を見極める必要がある。

本研究では、HuNoVに吸着性を示す糖鎖を菌体外に有する大腸菌 (HuNoV吸着性大腸菌) が存在し、ヒト体外に排出されたHuNoVはHuNoV吸着性大腸菌と共存状態にあり、HuNoVの生態に影響を及ぼすとの仮説を立てた。この仮説の検証の過程で組織血液型決定抗原を介してHuNoVを吸着することができる腸内細菌の存在を証明した。しかしながら、HuNoV吸着性糖鎖を分泌する細菌の環境水中における存在実態は明らかにされていない状況であった。

2. 研究開発目的

本研究では、環境水中よりHuNoV吸着性糖鎖である血液型決定抗原を保有する大腸菌株の単離を試みた。また遺伝学的手法に基づき環境水中HuNoV吸着性大腸菌の存在量を定量するために、血液型決定抗原の分泌に関与する遺伝子の特定を試みた。

3. 研究開発方法

3-1 環境水中からの血液型決定抗原分泌細菌株の取得

水試料として山梨県甲府市を流れる富士川水系の荒川沿い及び富士川沿いを採水源とする河川水試料及び、富士川沿いに立地する甲府市浄化センターへの流入下水及び二次処理後水を用いた。（採水日：2016年8月17日、9月6日、10月20日）各水試料の採水地を図(3)-1に示す。



地域	地点
甲府市浄化センター	流入水
	2次処理水
甲府盆地	A下福沢橋
	B漆戸橋
	C金石橋
	D富士見橋
	E荒川橋
	F富士橋

図(3)-1 水試料採取地点

水試料100mLを滅菌済みの三角フラスコにいれ、大腸菌用特定酵素基質培地であるコリラート（WP020I; Idexx）の粉末を添加し、37°C条件下で一晩振とう培養した。翌日、培養液のOD値を測定し、菌体量が 10^6 から 10^7 cellsとなるように培養液を1.5mLチューブに分注した。1.5mLチューブに15%BSA-PBSを50 μ L添加し、30分間、850rpmで振とう培養した。30分間経過後、各チューブに対して菌体量 10^6 に対してFITC標識抗血液型決定抗原抗体（SC-69951FITC, SC-69952 FITC; Santa Cruz Biotechnology）を1 μ Lの割合となるように5%BSA-PBS+0.05%Tween20溶液で終量50 μ Lに調整した抗体希釈液を添加し30分間、850rpmで振とう培養した。30分経過後に6000gで5分間の遠心を行い、上清を回収した。遠心により形成したペレットを50 μ Lの5%BSA-PBS+0.05%Tween20溶液で再懸濁した後に6000 \times gで5分間の遠心を行い、菌試料を洗浄した。再度形成したペレットを50 μ Lの5%BSA-PBS+0.05%Tween20溶液で再懸濁し、終濃度が106 cells/mLとなるようにPBSで希釈し、北海道大学創生研究機構のオープンファシリティが所有する卓上セルソータシステムに供した。検出の際には抗体を添

加していない非染色系(NC系)を別途調整し、細胞集団の蛍光強度をFCMデータ上で比較した。FCMデータで検出された細菌集団のうち、蛍光強度が強く示された集団を滅菌済み超純水にコリラート粉末を添加し調整した培地にソーティングし、本研究室の実験室に持ち帰り37°C条件下で一晩振とう培養した。ここまでの一連の操作を1サイクルとし、FCMデータ上で細胞集団の顕著な変動が観察されるまでサイクルを繰り返した(採水日8月17日の水試料を用いた実験系ではサイクル化を行わなかった)。細胞集団の変動が観察された段階でソーティング対象を200 μ L/wellのコリラート溶液が添加された96well白色プレート(136101; Thermo Fisher Scientific)へと変更し、wellの乾燥を避けるためにパラフィルムでwellを囲い、37°C条件下で一晩培養した。翌日各well中の培養液の色が透明から黄色に変化していることを確認し、暗室下でUVハンディランプ(アズワン)を用いて365nmの波長の紫外線を照射した。紫外線照射下で青色の化学発光が検出されたwellから大腸菌用の特定酵素基質寒天培地クロモカルトコリフォーム(110426; EMD Millipore)上に植菌し、単離操作を行った後に37°C条件下で一晩培養した。翌日クロモカルトコリフォーム寒天培地上で紫色のコロニーの有無を観察し、血液型決定抗原分泌大腸菌候補株とした。

3-2 血液型決定抗原分泌大腸菌候補株の血液型活性試験

血液型活性試験にはABOスフィア(KTS502C; 鎌倉テクノサイエンス)を用いた。血液型決定抗原分泌大腸菌候補株をR2A培地を用いて37°C条件下で一晩培養した。翌日、菌培養液のOD値を測定した。ABOスフィア付属の試料希釈液を用いて、菌体量が 10^8 cells/mLとなるように調整した。付属のプレートへ菌溶液を40 μ Lずつwellに入れ抗A抗体結合ビーズ溶液、抗B抗体結合ビーズ溶液、抗H抗体結合ビーズ溶液をそれぞれに40 μ Lずつ加え、菌液添加後に直ちに手でよく振とうし菌溶液と抗体結合ビーズを良く混合した。プレートミキサーを用いて室温下でプレートを30分間混合した。30分経過後に各菌ごとにwell内での凝集塊の有無を観察し、凝集塊の形成度合いに応じて血液型活性の程度を評価した。

3-3 16S rRNA遺伝子配列解析による血液型決定抗原分泌大腸菌の確認

クロモカルト寒天培地上の単離株コロニーの一部を100 μ Lの0.05MのNaOH溶液中に溶かし、サーマルサイクラーを用いて95°Cで15分間加熱した。加熱終了後に1000rpmで5分間遠心し、上清10 μ Lを回収し100倍に希釈した。100倍に希釈した抽出DNA試料と試薬を下記の表(3)-1の組成に従い混合し、表(3)-2の条件に従いPCR反応を行った。PCRプライマーとして27fと1492rプライマーを用いた。得られたPCR産物はFastGene Gel/PCR Extraction Kit (FG-91302; 日本ジェネティクス)を用いて精製した。精製したPCR産物が30-120ngとなるように調整し、27f、530f、907r、1492rの各プライマーと混合してPCRを行い、16S rRNA配列解析を行った。

表(3)-1 PCR試薬の組成とプライマー配列

組成	体積	名称	配列
10x Extaq buffer	4 μ L	27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
dNTP	3.2 μ L	530f	GTGCCAGCMGCCGCGG
f primer	0.2 μ L	907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
r primer	0.2 μ L	1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
Ex taq	0.2 μ L		
sample	2 μ L		
MilliQ	30.2 μ L		
Total volume	40 μ L		

表(3)-2 PCR反応条件

サイクル回数	温度	時間
1回	95°C	2min
	95°C	1min
30回	55°C	1min
	72°C	1min
1回	72°C	5min
	4°C	∞

3-4 遺伝子欠損株を用いた網羅的な解析に基づく血液型決定抗原分泌関連遺伝子の同定

E. coli K-12 BW25113株の遺伝子欠損株ライブラリであるKeio Collection株を用いて、血液型活性の低下をもたらす遺伝子欠損を同定することを試みた。各遺伝子欠損株をLB培地を用いて37°C条件下で一晩培養した。培養後、OD = 0.2となるようにABOスフィア付属の抗体希釈Bufferで希釈し、付属のプレートへ菌溶液を40 μ Lずつ各wellに入れた。抗A抗体結合ビーズ溶液、抗B抗体結合ビーズ溶液、抗H抗体結合ビーズ溶液をそれぞれに40 μ Lずつ加え、菌液添加後に直ちに手でよく振とうし菌溶液と抗体結合ビーズを良く混合した。プレートミキサーを用いて室温下でプレートを30分間混合した。30分経過後に各菌ごとにwell内での凝集塊の有無を観察し、凝集塊の形成度合いに応じて血液型活性の程度を評価した。

3-5 ELISA法による*E. coli* K-12 BW25113株及び遺伝子欠損株のNoVLP吸着能力評価

E. coli K-12 BW25113及び遺伝子欠損株を25mLのLB培地で、37°C条件下で24時間培養した。培養液を4000 \times gで5分間遠心し上清を回収した。ペレットを15mLの0.9%NaCl溶液で再懸濁し、凍結乾燥器にかけ乾燥させた。凍結乾燥した試料を500 μ LのMilliQで再懸濁した後に、試料に含有される総タンパク量をLowly法により定量した。Lowly法の手法は第4章4.3.5項に記載した。

定量した全菌体試料100 μ g及びに500mM DTTを10 μ L添加し、サーマルサイクラーにより70°Cで10分間加熱した。加熱した試料をELISAプレート上に100 μ g/wellとなるように加え、一晩4°C条件下で静置した。翌日試料溶液を捨て、試料を固層化したwellを350mLのPBSで2回洗浄し、キムタオルを用いてプレートに付着している水滴を良く切った。各wellに対して0.1%(w/v)に調整したクリスタルバイオレット溶液を210 μ L/wellで分注し、15-30分静置した。クリスタルバイオレット溶液を捨て各wellを350mLのPBSで2回洗浄し、キムタオルを用いてプレートに付着している水滴を良く切った。15-30分静置後、各wellにエタノールとアセトンの体積比が8:2の混合溶液を220 μ L/well ずつ加え、プレートリーダーでCV570を測定し、菌体のELSAプレート上の固層化量を評価した。

菌体のELSAプレート上固層化が確認された菌株に対しては、同様の手法で菌体を固層化した。試料溶液を捨て、350mLの5%BSA-PBSで各wellを満たし、1時間ブロッキングした。5%BSA-PBSを捨て、350mLのPBSで2回洗浄し、キムタオルを用いてプレートに付着している水滴を良く切った。その後、5% BSA -PBS+0.05% Tween20溶液で200倍希釈したNoVLP溶液を50 μ L/wellで加え、プレートミキサーで攪拌しながら常温下で1時間反応させた。NoVLP溶液を捨て350mLのPBSで2回洗浄し、キムタオルを用いてプレートに付着している水滴を良く切った。その後同様の希釈液で300倍希釈した抗NoVLP血清溶液を50 μ L/wellで加え、プレートミキサーで攪拌しながら常温下で1時間反応させた。抗NoVLP血清溶液を捨て350mLのPBSで2回洗浄し、キムタオルを用いてプレートに付着している水滴を良く切った。

その後同様の希釈液で2000倍希釈したHRP標識抗体希釈液を50 μ L/wellで加え、プレートミキサーで攪拌しながら常温下で1時間反応させた。抗体溶液を捨て350mLのPBSで4回洗浄し、キムタオルを用いてプレートに付着している水滴を良く切った。滅菌超純水100mlにクエン酸0.52 g, Na₂HPO₄ 0.71 g, OPD 1錠, および過酸化水素水30 μ lを溶解させたOPD溶液を100 μ L加え30分間静置した。その後50 μ Lの2M H₂SO₄を加え、反応を停止させた後に、波長490nmの光を1秒間照射した際の吸光度を、プレートリーダーを用いて測定した。

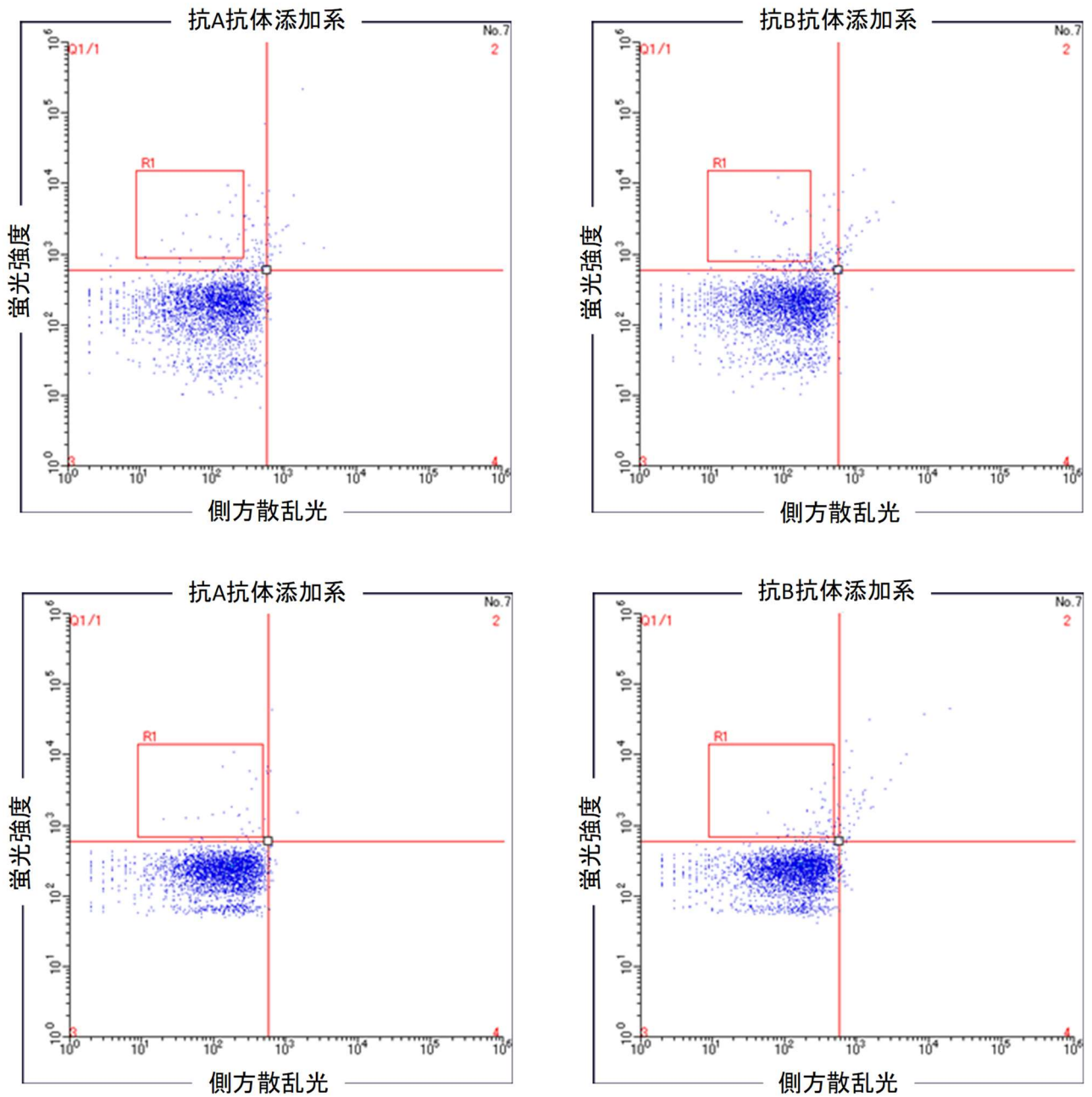
また*E.coli* K-12 BW25113及び遺伝子欠損株の菌体外多糖類量をフェノール硫酸法定量した。*E.coli* K-12 BW25113及び遺伝子欠損株を25mLのLB培地で、37°C条件下で24時間培養した。2ポジションチューブに、抽出した菌体外多糖類ならびに検量線用の500、100、50、10、5、1、0g/Lのグルコース溶液をそれぞれ500 μ Lずつ加えた。各溶液に0.5%(v/v)フェノール溶液を500 μ Lずつ加え、よく混合した。各混合液に濃硫酸 (~98%) を1.5mL加え、即座によく混合した。各試料溶液が冷えた段階で96wellプレートへそれぞれ200 μ L加え、波長490nmの光を1秒間照射した際の吸光度を、プレートリーダーを用いて測定した。

4. 結果及び考察

4-1 環境水中からの血液型決定抗原分泌大腸菌株の取得

採水日2016年8月17日の水試料を用いて検証したFCMの結果を図(3)-2に示した。尚FCMの結果の図中に示された十字線は、別途抗体を添加していない非染色系 (NC) をセルソータに供し細胞集団の95%以上が左下の領域に含有されるように設定している。8月17日の河川水試料及び流入下水試料由来の細菌では抗A抗体、抗B抗体を問わず、蛍光標識抗体により染色された陽性細胞の割合 (領域Q1/1) は極めて低い値であった (表(3)-3)。流入下水試料中からは血液型決定抗原を分泌する細菌は容易に見出されることが先行研究において報告されており、本検証とは相反する結果となった。この理由としては、先行研究では免疫学的手法による集積培養を行っていることから、下水試料に含有される血液型決定抗原分泌細菌株の存在量を正確には反映できていないこと、また集積培養に用いたR2A培地の成分が影響していること、及び本研究で用いた抗体あるいは標識された蛍光色素が劣化していることが原因と考察された。先行研究で用いたR2A培地は有機基質成分を制限することで高濃度基質培地では検出が難しい従属栄養細菌を検出することを可能としている。更に添加されているピルビン酸ナトリウムの作用により、損傷を受けた菌体も検出することが可能となっている。一方、本研究で用いたコリラートは大腸菌群用の特定酵素基質培地であり、大腸菌あるいは大腸菌群の検出精度を向上させるために、炭素源を制限している。両培地成分の違いが培養可能な細菌種に差を生んでおり且つ集積培養により菌層が変動していること、また抗体の劣化による陽性細胞数の過小評価が原因となっていると考えられた。

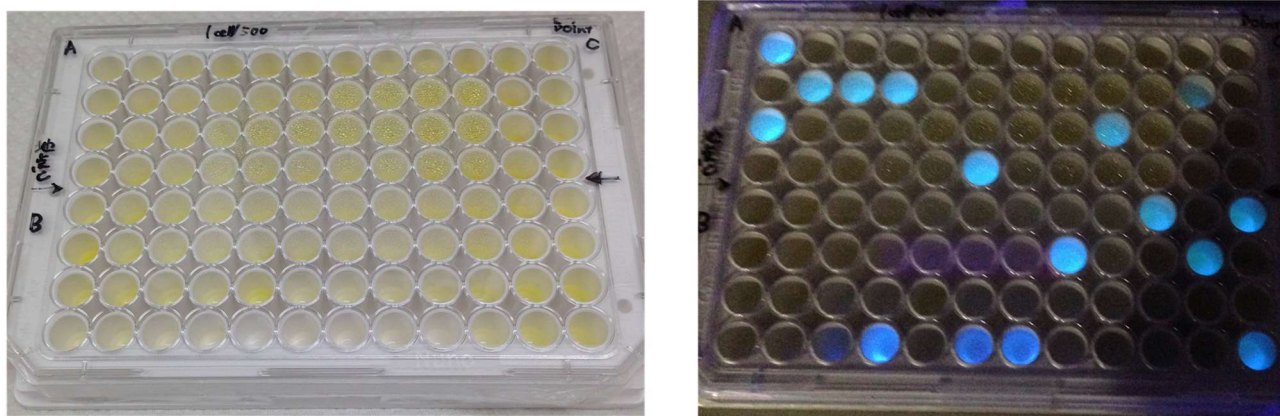
各試料より96wellプレートへ2cells/wellの割合でソートし、37°C条件下で一晩培養後 (図(3)-3) に単離操作を行った結果を表(3)-4に示した。紫外線照射により発光したウェルより植菌し、クロモカルト寒天培地上得られた紫色コロニーは河川水試料由来で52株、下水試料由来で44株であった。



図(3)-2 8月17日の水試料由来細菌のFCMデータ 上:河川水(A地点) 下:流入下水

表(3)-3 採水地点別の陽性細胞の割合(Q1/1)

	採水地点							
	A	B	C	D	E	F	流入下水	二次処理後水
抗A抗体	2.32%	1.56%	1.92%	0.86%	1.00%	1.38%	0.44%	0.68%
抗B抗体	2.64%	1.72%	1.88%	0.90%	1.14%	0.98%	0.78%	1.50%

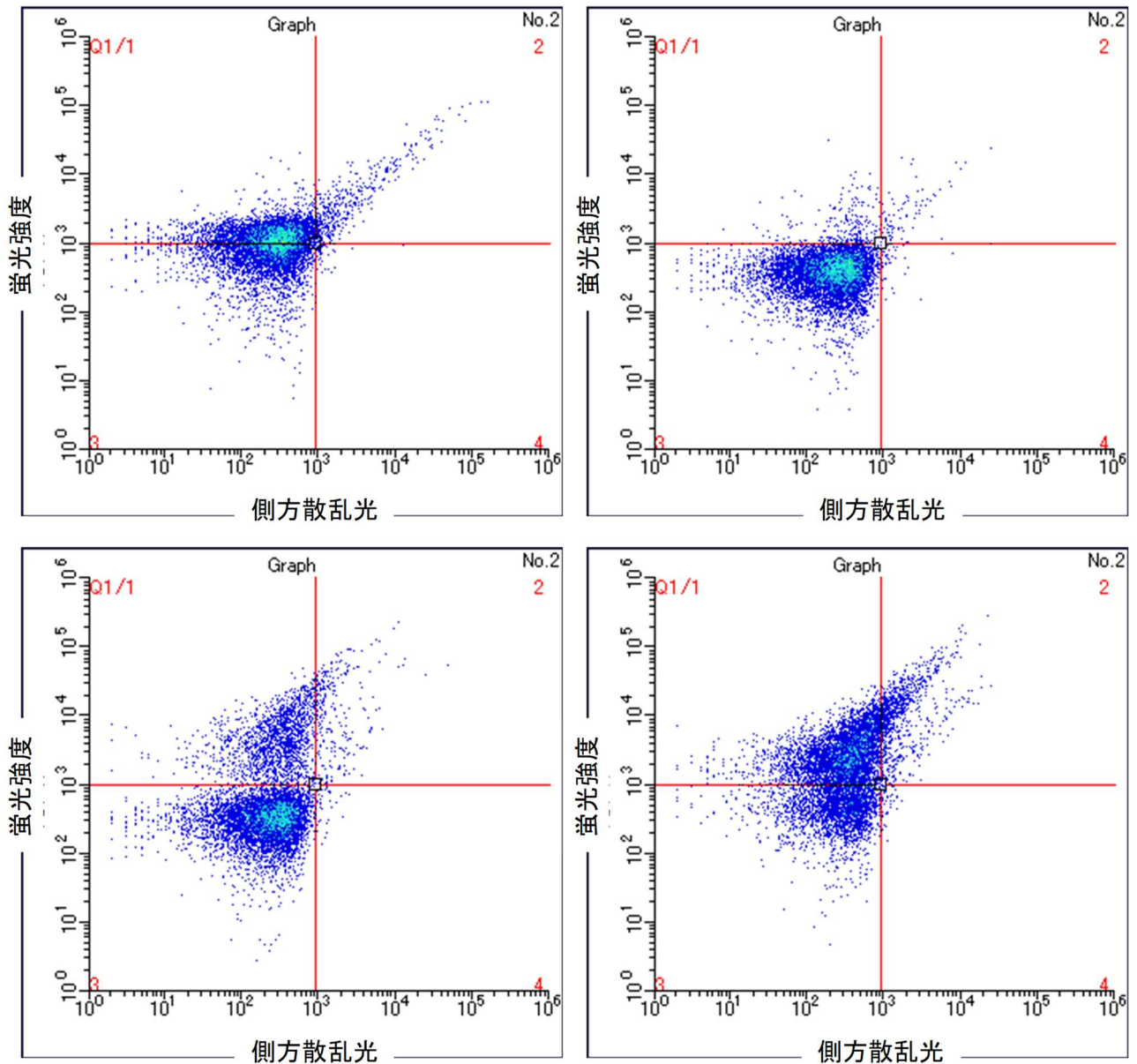


図(3)-3 96wellプレート上での血液型決定抗原分泌細菌のコリラートによる培養結果

表(3)-4 2016年8月17日水試料の単離試験結果

採水地	発光ウェル数	紫色コロニー
A	11	7
B	30	7
C	16	3
D	40	12
E	33	23
F	11	0
流入下水	51	22
二次処理後水	55	22

以上の結果をふまえ、9月6日及び10月20日の系では、セルソータのサイクル化を試み、陽性細胞数の増加を試みた（9月6日の水試料はサイクル条件の検討に用いたため単離にまで至らなかった）。10月20日の水試料を用いて検証したFCMの結果を図(3)-4及び表(3)-5に示した。各試料の1サイクル目の検証では新規に購入した抗体を用いたほか、洗浄操作を行わなかったために、抗体による特異的な染色のみならず、抗体が非特異的に細菌へと吸着したことにより、陽性細胞数が多く検出されたと推測された。よって2回目のサイクル以降は1回の洗浄操作を加えて検証を行った。図(3)-4で示したように、流入下水試料由来の細菌を抗A抗体を用いて染色した系では3サイクル目で顕著な集団の変動が観察されており、蛍光標識抗体により染色された集団の多くが検出される領域Q1/1における割合が5.92%から39.88%へと増加した。また4サイクル目では更なる細胞集団の割合の増加が観察されたほか、非染色系サンプル（NC系）が95%以上含有される領域Q1/3の割合が52.22%から35.70%まで減少した。一方で流入下水試料由来の細菌を抗B抗体を用いて染色した系では2サイクル目から3サイクル目で集団の割合の減少が観察されたものの、4サイクル目に顕著な細胞集団の変動が観察された。また抗A抗体で染色した系と同様にQ1/3に含有される細胞集団の割合が、79.97%から62.07%まで減少した。以上の結果より下水試料由来の細菌を抗血液型決定抗原抗体で染色した系ではサイクル回数の増加に伴い、血液型決定抗原を菌体外に保有する細菌の試料中の全細菌に占める割合が増加したと推測された。



図(3)-4 2016年10月20日流入下水試料由来、抗A抗体標識細菌のFCMデータ
 左上) 1サイクル目 右上) 2サイクル目
 左下) 3サイクル目 右下) 4サイクル目

表(3)-5 各試料のサイクルによる陽性細胞の割合(Q1/1)

サイクル	1	2	3	4
流入下水抗A抗体	51.03%	5.92%	39.88%	56.53%
流入下水抗B抗体	84.05%	17.39%	12.69%	32.37%
河川水抗A抗体	50.69%	4.17%	4.26%	4.41%
河川水抗B抗体	92.10%	6.12%	0.58%	8.12%

河川水試料由来の細菌をセルソータに供して得られたFCMデータでは、抗A抗体を用いて染色した系では細胞集団の顕著な変動が観察されず、抗B抗体を用いて染色した系では多少の変動は観察されたものの顕著な差は観察されなかった。以上の結果より河川水試料由来の細菌を用いた系ではサイクル回数を増加させても、血液型決定抗原を菌体外に保有する細菌を十分量獲得することは難しいという結果となった。この理由としては河川水中に占める血液型決定抗原分泌細菌の存在量が少なく、また細菌の増殖速度が一律ではないために効果的に集積培養がかからなかったことが原因として考えられた。

流入下水試料及び河川水試料由来の細菌双方の4サイクル目で、領域Q1/1に含有される細菌集団をコリラート入りの96wellプレートへとソーティングを行った。流入下水試料を用いた系では100cells/wellでソーティングを行い、河川水試料では陽性細胞数が少ないことから、それぞれ48wellに対して20cells/wellの割合でソーティングを行った。ソーティング後の96wellプレートを一晩培養し、波長365nmの紫外線を照射した結果を表(3)-6に示した。化学発光が検出されたwellからクロモカルト寒天培地上へと植菌を行い、単離操作後に37°C条件下で一晩培養した。得られた紫色コロニーを血液型決定抗原分泌大腸菌候補株とした。

以上、8月17日、9月6日及び10月20日に採水した河川水、下水試料双方を用いて、上記の操作により獲得した単離株は総計139株であり、内訳としては河川水試料由来株が55株、下水試料由来株が84株であった。

表(3)-6 2016年10月20日の水試料単離試験結果

水試料	発光ウェル数	紫色コロニー
流入下水 抗A	96/96	19
流入下水 抗B	49/96	21
河川水 抗A	48/48	1
河川水 抗B	48/48	2

4-2 血液型決定抗原分泌大腸菌候補株の血液型活性試験

2016年8月17日および10月20の水試料から単離した紫色コロニーを形成する細菌の血液型活性試験の結果を表(3)-7及び表(3)-8に示した。8月17日の水試料から単離した細菌でHBGA活性を示した株は河川水試料では0株、下水試料では7株であった。一方10月20日の水試料から単離した細菌では河川水試料2株、下水試料15株が血液型活性を示した。本研究で単離した細菌のうち血液型活性を示した株の多くが下水試料由来であった。この結果は5.4.1と同様の傾向を示しており、血液型決定抗原分泌細菌はその多くが人為活動由来である可能性が示唆された。再現性が観察された全24株に対しては、A、B及びHのすべての血液型活性を評価した。その結果を図(3)-5に示した。一度再現性が観察されたいたBE4株であったが血液型活性の全プロファイル試験ではH型抗原活性は観察されたもののB型抗原活性は観察されなかった。また河川水から単離されたRAB2でも同様の結果となった。そこでこの2株は血液型低活性株候補として菌体量の希釈系を用意してHBGA活性を検証した。その結果を図(3)-6に示した。単離株BE4では 3×10^8 cells/mLまでの濃度でA及びB型抗原活性は観察されなかった。一方で単離株RAB2では 2×10^8 cells/mLの濃度でB型抗原活性が、 3×10^8 cells/mLでは弱いながらもA型抗原活性が観察された。これらの観察結果より単離株BE4は血液型低活性株である可能性が示唆された。

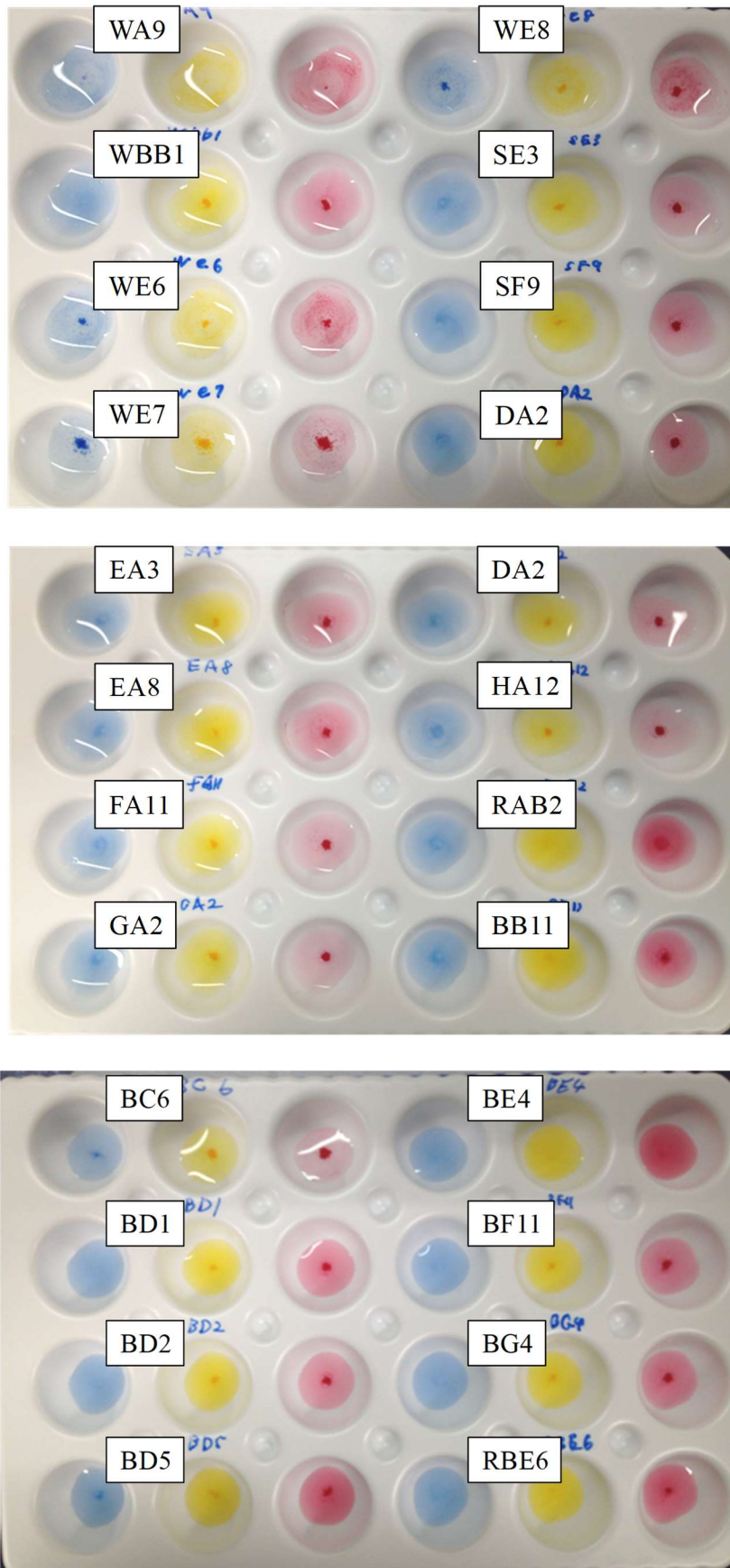
表(3)-7 8月17日採水の水試料より単離した細菌の血液型活性試験結果

	A	B	H	再現性		A	B	H	再現性		A	B	H	再現性	
AA11	-	nt	nt								SD9	-	nt	nt	
AA4	-	nt	nt		EB4	-	nt	nt			SE1	++	nt	nt	
AB8	-	nt	nt		EB5	-	nt	nt			SE3	+++	nt	nt	○
AC9	-	nt	nt		EC2	-	nt	nt			SF1	-	nt	nt	
AF2	nt	-	nt		EC3	-	nt	nt			SF12	-	nt	nt	
AG6	nt	-	nt		EC7	nt	-	nt			SF7	++	nt	nt	
AH11	nt	-	nt		ED3	-	nt	nt			SF9	+++	nt	nt	○
BA5	-	nt	nt		ED6	+	nt	nt			SG10	-	nt	nt	
BB11	-	nt	nt		EE11	nt	-	nt			SG1	++	nt	nt	
BD5	-	nt	nt		EE3	nt	+	nt			SH7	-	nt	nt	
BE6	nt	+	nt		EE5	nt	+	nt			WA4	-	nt	nt	
BE9	nt	+	nt		EE7	nt	-	nt			WA7	-	nt	nt	
BH8	nt	+	nt		EG10	nt	-	nt			WA8	-	nt	nt	
CB11	-	nt	nt		EG11	nt	+	nt			WA9	++	nt	nt	○
CB2	+	nt	nt		EG5	nt	-	nt			WB2	-	nt	nt	
CB3	-	nt	nt		EG6	nt	-	nt			WB4	-	nt	nt	
DA12	-	nt	nt		EG7	nt	-	nt			WBB1	nt	++	nt	
DA2	-	nt	nt		EG9	nt	-	nt			WBC1	nt	-	nt	○
DA5	-	nt	nt		EH12	nt	-	nt			WC3	-	nt	nt	
DA6	+	nt	nt		EH2	nt	-	nt			WC4	-	nt	nt	
DB4	-	nt	nt		EH3	nt	-	nt			WC8	-	nt	nt	
DC2	-	nt	nt		EH5	nt	+	nt			WD2	nt	+	nt	
DC6	-	nt	nt		EH6	nt	-	nt			WD5	-	nt	nt	
DD9	+	nt	nt		SA3	-	nt	nt			WD9	-	nt	nt	
DE2	nt	+	nt		SA4	-	nt	nt			WE10	nt	++	nt	
Df7	nt	-	nt		SA9	-	nt	nt			WE11	nt	+++	nt	
DC12	nt	-	nt		SB10	-	nt	nt			WE6	nt	+++	nt	
DG12	nt	+	nt		SB11	-	nt	nt			WE7	nt	+++	nt	○
DH10	nt	-	nt		SB2	-	nt	nt			WE8	nt	+++	nt	○
DH12	nt	-	nt		SB4	+++	nt	nt			WF3	nt	-	nt	○
EA3	-	nt	nt		SB9	+	nt	nt			WG11	nt	-	nt	
EA6	-	nt	nt		SC1	-	nt	nt			WG12	nt	-	nt	
EA7	+	nt	nt		SC2	-	nt	nt			WG4	nt	-	nt	
EB1	-	nt	nt		SC4	-	nt	nt			WH1	nt	++	nt	
EB11	-	nt	nt		SD1	+	nt	nt			WH6	nt	-	nt	
EB2	-	nt	nt		SD8	+	nt	nt							

表(3)-8 10月20日採水の水試料より単離した細菌の血液型活性試験結果

	A	B	H	再現性		A	B	H	再現性		A	B	H	再現性
AH7	-	nt	nt		BD2	nt	+	nt	○	DA2	+	nt	nt	○
BA1	nt	-	nt		BD5	nt	+	nt	○	EA3	+	nt	nt	○
BA12	-	nt	nt		BE4	nt	+	nt	○	EA8	+	nt	nt	○
BA3	nt	-	nt		BE5	nt	-	nt		FA11	+	nt	nt	○
BA5	nt	-	nt		BE8	nt	-	nt		FA2	-	nt	nt	
BB10	nt	-	nt		BF11	nt	+	nt	○	GA11	-	nt	nt	
BB11	nt	+	nt	○	BG11	nt	-	nt		GA2	+	nt	nt	○
BB4	nt	-	nt		BG4	nt	+	nt	○	HA12	+	nt	nt	○
BB7	nt	-	nt		BH12	nt	-	nt		HA2	+	nt	nt	○
BC6	nt	+	nt	○	BH5	nt	-	nt		RAB2	+	nt	nt	○
BC8	nt	-	nt		CA1	-	nt	nt		RBE6	nt	+	nt	○
BD1	nt	+	nt	○	DA1	-	nt	nt		RBF11	nt	-	nt	

+:活性あり、-:活性なし nt:未検証



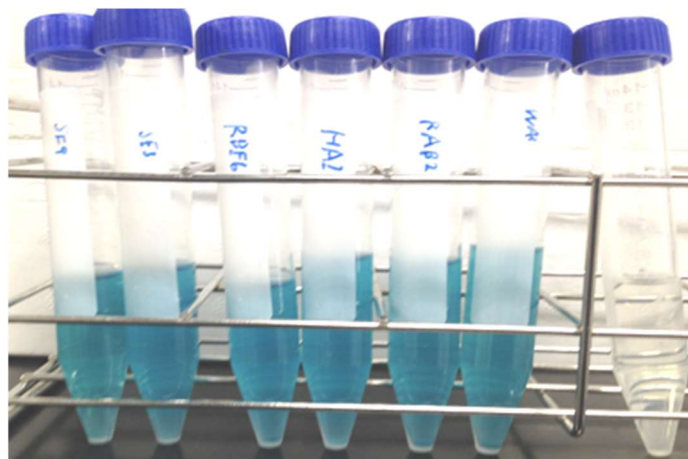
図(3)-5 ABOスフィアで再現性が観察された株の全プロファイル結果



図(3)-6 血液型活性陰性候補株の希釈系での検証結果

4-3 16S rRNA遺伝子配列解析による血液型決定抗原分泌大腸菌の確認

16S rRNA遺伝子配列解析によるシーケンシング結果と相同な配列をBLASTを用いて検索した。その結果今回シーケンシングした24株のうち18株は大腸菌と相同性100%、1株は*Serratia*属（相同性99%）に属し、残りの5株は*Shigella*属及び*Eshcherichia*属と相同性99%となった。この結果に関しては、平成24年6月改定の赤痢菌検査・診断マニュアルによれば、*Shigella*属は*Enterobacteriaceae*科の独立した属として認知されているが*Eshcherichia*属との16S rRNA遺伝子配列の相同性は平均で85%以上となっており、16S rRNA遺伝子の配列のみでは同属に分類されるとされている。またこれまでに臨床検体から分離された*Shigella*属の中には*Eshcherichia*属と相同性が99%であり、16S rRNA遺伝子配列の比較のみでは分類が困難な株も存在することが報告されている。よって赤痢菌の診断には、生理学的特性の比較が必須であるとされている。一般的に用いられる赤痢菌と大腸菌の判別にはラクトース分解性が知られており、赤痢菌はラクトース分解性を示さないことが報告されている。ラクトースとはガラクトースとグルコースがβ-1,4-グリコシド結合した二糖類である。大腸菌におけるラクトース分解を触媒する酵素としてはラクターゼが知られており、ラクターゼはβ-ガラクトシターゼ群の一つとして知られている。今回単離したすべての細菌はクロモカルト寒天培地上で紫色のシングルコロニーから得られた株であり、β-ガラクトシターゼ活性を保有するものと推測された。また、色調の判定に際してβ-グルクロニダーゼ活性の影響を受けない特定酵素基質培地ECブルー（05591；日水製薬）を用いてこの5株を37度条件下で一晩培養した。その結果を図(3)-7に示した。ECブルーに含有される5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシドはβ-ガラクトシターゼにより、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリン及び5,5-ジブロム-4,4-ジクロロインディゴに分解される。この際無色の5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシドから青色の5,5-ジブロム-4,4-ジクロロインディゴが分離されるために、β-ガラクトシターゼを保有する細菌を培養すると青色を呈する。今回の観察では双方への相同性を示した5株すべてで青色への変化が観察され、β-ガラクトシターゼの活性が示された。この結果よりこれらの株はすべて*Eshcherichia*属に属する細菌であると推測された。



図(3)-7 ECブルーによる培養結果 左5本：双方へ相同性を示した株
右から2本目：大腸菌と相同性100%、最右端：菌なし

16S rRNA遺伝子配列解析の結果ならびに血液型活性試験の結果をまとめたものを表(3)-9に示した。本手法を基に環境水試料から血液型決定抗原分泌大腸菌が系計22株単離された。

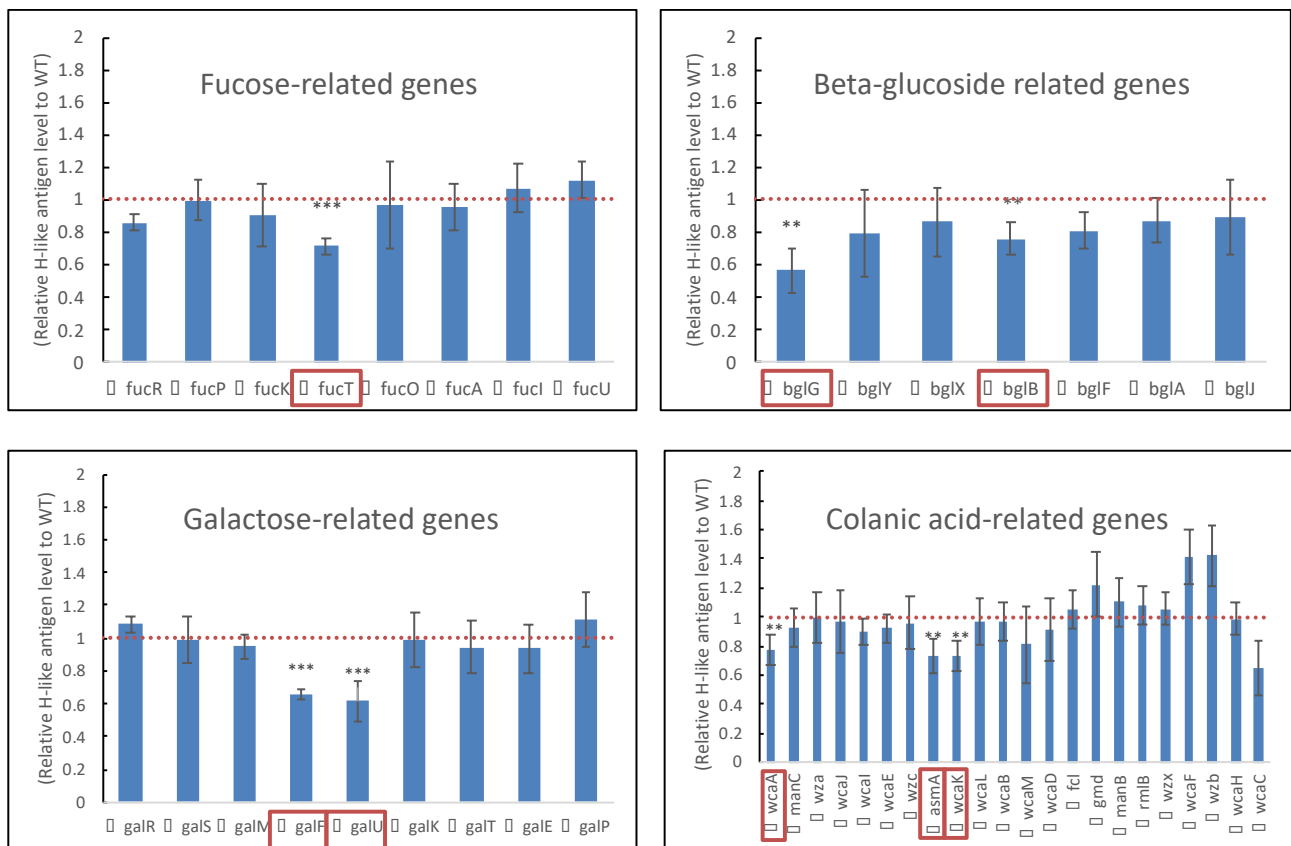
表(3)-9 単離株の16S rRNA遺伝子配列解析及び血液型活性試験結果

株名	類似株	類似度	A	B	H
WA9	<i>Escherichia coli</i> SLK172	99%	+	+	+
WBB1	<i>Escherichia coli</i> strain 2016C-3936C1	100%	-	++	+++
WE6	<i>Escherichia coli</i> strain 2016C-3936C1	100%	++	++	++
WE7	<i>Escherichia coli</i> strain 2016C-3936C1	100%	+++	+++	+++
WE8	<i>Escherichia coli</i> strain 2016C-3936C1	100%	++	++	++
SE3	<i>Escherichia coli</i> strain CCFM8336	100%	-	++	++
SF9	<i>Escherichia coli</i> SLK172	100%	-	++	++
DA2	<i>Escherichia coli</i> strain M9	100%	-	++	++
EA3	<i>Escherichia coli</i> strain D1	100%	-	++	++
EA8	<i>Escherichia coli</i> strain 06-00048	100%	-	+	++
FA11	<i>Escherichia coli</i> strain RCB456	100%	-	++	++
GA2	<i>Escherichia coli</i> strain 2016C-3936C1	100%	-	++	++
HA2	<i>Escherichia coli</i> SLK172	99%	-	++	++
HA12	<i>Escherichia coli</i> strain RCB456	100%	-	++	++
BB11	<i>Escherichia coli</i> strain S56	100%	-	-	++
BC6	<i>Serratia</i> sp. TSS	100%	+	+++	+++
BD1	<i>Escherichia coli</i> strain S56	100%	-	++	+++
BD2	<i>Escherichia coli</i> strain VTM4R8	99%	-	++	+++
BD5	<i>Escherichia coli</i> SLK172	100%	++	++	++
BE4	<i>Escherichia coli</i> SLK172	100%	-	-	-
BF11	<i>Escherichia coli</i> strain M1	100%	-	++	+++
BG4	<i>Escherichia coli</i> strain CRMY4	100%	-	++	+++
RAB2	<i>Escherichia coli</i> strain GZEC-2	99%	-	-	+
RBE6	<i>Escherichia coli</i> strain GZEC-2	99%	-	+	++

+:活性あり、-:活性なし

4-4 遺伝子欠損株を用いた網羅的な解析に基づく血液型決定抗原分泌関連遺伝子の同定

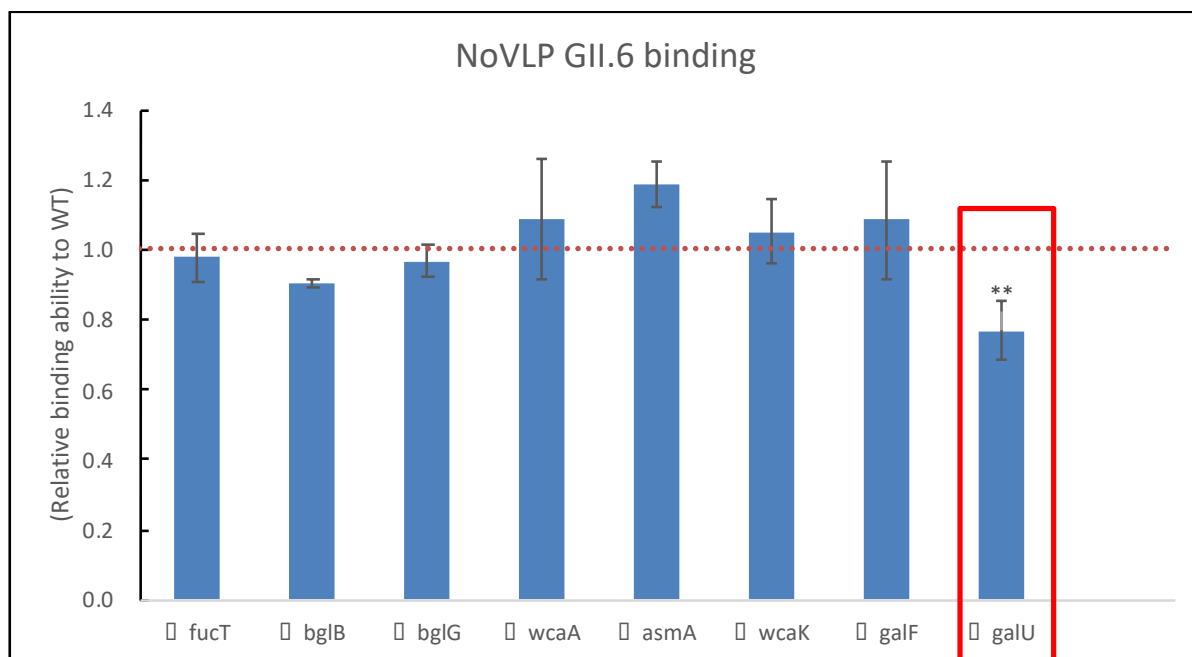
E. coli K-12 BW25113株の遺伝子欠損株ライブラリであるKeio Collection株を用いて、血液型活性の低下をもたらす遺伝子欠損を同定することを試みた。特に糖代謝関連遺伝子の欠損株に着目し、全部で46株について血液型活性を評価した。その結果を図(3)-8に示す。試験を行なった46株のうち8株について、有意な血液型活性の低下が見られた。この結果は、これらの遺伝子が血液型決定抗原の分泌に関わっていることを示唆する結果である。そこで、これらの欠損株についてNoVLP吸着能を評価した。



図(3)-8 遺伝子欠損株の血液型活性評価

4-5 ELISA法による*E. coli* K-12 BW25113遺伝子欠損株のNoVLP吸着能力評価

前節で得られた血液型活性が低下した遺伝子欠損株に関し、NoV GII.6のVLPを用いてノロウイルス粒子吸着能力をELISA法により評価した。その結果を図(3)-9に示す。結果的に、1株のみ ($\Delta galU$ 株) が有意にNoVLP吸着能力を低下させていた。*galU*は大腸菌のガラクトース代謝を担う酵素であり、この遺伝子を欠損することにより細胞壁にガラクトースを組み込むことができなくなることが知られている。ガラクトースは血液型決定抗原の構成単糖として使用されていることから、*galU*遺伝子を欠損することにより、血液型決定抗原分泌量が低下し、その結果、ノロウイルス粒子結合能力が低下したものと考えられた。この*galU*遺伝子は、水環境中の血液型決定抗原分泌大腸菌の追跡用遺伝子マーカーとして使用可能と考えられる。



図(3)-9 *E.coli* K-12 BW25113遺伝子欠損株のNoVLP吸着能力評価

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究により、ノロウイルス吸着性を有する血液型決定抗原分泌大腸菌が水環境中に存在することが示された。この血液型決定抗原分泌大腸菌は、水環境中でノロウイルスを捕捉した状態で存在可能であり、ノロウイルスによる汚染指標として活用可能である。大腸菌の血液型決定抗原分泌に関わる遺伝子としてgalUが同定され、水環境中における血液型決定抗原分泌大腸菌追跡用遺伝子マーカーとしての利用が期待される。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境基準としての大腸菌数の中で、血液型決定抗原分泌大腸菌の量をgalU存在量により予測することにより、大腸菌数の計測だけでは予測が困難であったノロウイルスによる水環境汚染を検知することが可能である可能性が本研究により示唆された。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

1) M.Amarasiri, M. Kitajima, A. Miyamura, R. Santos, S. N. Monteiro, T. Miura, S. Kazama, S. Okabe and D. Sano: Int J Hyg Environ Health, 221(3):578-585 (2018) Reverse transcription-quantitative PCR assays for

genotype-specific detection of human noroviruses in clinical and environmental samples.

＜査読付論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 小島友祐、モハン・アマラシリ、佐野大輔、平成29年度土木学会東北支部技術研究発表会、郡山（2018）腸内細菌の組織血液型決定抗原様物質分泌関連遺伝子に関する研究
- 2) P. Yang, M. Kitajima, S. Okabe and D. Sano, 第52回日本水環境学会年会、札幌（2018）Identification of bacterial genes responsible for producing norovirus-binding glycoconjugates.
- 3) M. Amarasiri, P. Yang, M. Kitajima, S. Okabe and D. Sano, ISFEV2018, アリゾナ（2018）Bacterial genes responsible for producing norovirus-binding glycoconjugates.

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 佐野大輔、日本水環境学会 水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム Recent progress in microbial safety in water environment～水環境の微生物学的安全性に関する研究の動向～、東京（2017）血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 厚生労働省 ノロウイルスに関するQ&A
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html
- 2) Tarak K. Trivedi, Rishi Desai, Aron J. Hall, Manish Patel, Umesh D. Parashar, and Benjamin A. Lopman: Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A systematic literature review. *American Journal of Infection Control*, 41(7), 654-657, 2013
- 3) Hoffmann, Sandra, Michael B. Batz, and J. Glenn Morris Jr.: Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1292-1302, 2012.
- 4) 谷口力男、波多野義純、本館睦美、田中敦子、星旦二：乳児施設におけるノロウイルス集団感染事例の記述疫学的統計，日本食品微生物学会誌，25(1)，17-31，2008.
- 5) Suzanne M. Matsui and Harry B. Greenberg: Immunity to Calicivirus Infection, *Journal of infectious diseases*, 181(2), 331-335, 2000.
- 6) R. W. Ryder, N. Singh, W. C. Reeves, A. Z. Kapikian, H. B. Greenberg and R. B. Sack: Evidence of

Immunity Induced by Naturally Acquired Rotavirus and Norwalk Virus Infection on Two Remote Panamanian Islands, *Journal of infectious diseases*, 151(1), 99-105, 1985.

- 7) Ben Lopman, Paul Gastañaduy, Geun Woo Park, Aron J Hall, Umesh D Parashar, and Jan Vinjé: Environmental transmission of norovirus gastroenteritis, *Current Opinion in Virology*, 2(1), 96-102, 2012.
- 8) Jonathan A. Otter, Saber Yezli, and Gary L. French: The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens, *Infection journal and hospital epidemiology*, 32(7), 687-699, 2011.
- 9) Brandi L. Cantarel, Pedro M. Coutinho, Corinne Rancurel, Thomas Bernard, Vincent Lombard, and Bernard Henrissat: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics, *Nucleic acids research*, 37(1), 233-238, 2009.

II-4 ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究

山梨大学大学院総合研究部

原本 英司

平成28～30年度累計予算額：18,373千円

(うち平成28年度：6,173千円、平成29年度：6,200千円、平成30年度：6,000千円)

[要旨]

水環境中への主要な糞便汚染源であると想定される宿主（ヒト、反芻動物（ウシ）およびブタ）に対し、様々な糞便汚染源試料（下水流入水および処理水、合併浄化槽排水、豚舎排水、ウシ糞便等）における微生物遺伝子マーカー（バクテロイデス、ミトコンドリアDNA、ウイルス）の測定を通じ、山梨県内において利用可能な微生物遺伝子マーカーを決定した。それらの微生物遺伝子マーカーを山梨県内で採取した河川水に適用することにより、豚舎の下流地点からブタ特異的な微生物遺伝子マーカーが検出されることや、河川上流域の清流において反芻動物特異的な遺伝子マーカーが高頻度で検出され、シカやイノシシ等の野生動物の糞便による影響の大きさが示唆されること等の成果を得た。また、琵琶湖南湖で採取した湖水に対しても調査を行うことにより、本研究の手法が他の流域に対しても有効となり得ることを示した。さらに、新たな微生物遺伝子マーカーとして、F特異DNA大腸菌ファージや体表面吸着大腸菌ファージを遺伝子群レベルで検出することの有効性を示した。

[キーワード]

微生物起源解析、ウイルス、バクテロイデス、大腸菌ファージ、糞便汚染

1. はじめに

現在、環境省において水質環境基準における衛生指標を大腸菌群数から大腸菌数へと変更することが検討されている。これは、大腸菌群には糞便由来を主とする大腸菌以外の細菌も含まれることから、人為汚染のない河川源流域でも大腸菌群数が多く検出される場合があり、糞便汚染を正確に反映できていないことが懸念されているためである。大腸菌群数から大腸菌数に切り替えることで、糞便汚染の程度をより正確に評価することが可能となることが期待される。一方で、河川源流域にはシカやイノシシ等の野生動物が多く生息しているため、大腸菌の排出起源として、人為的なものに加えて野生動物によるものも看過することはできない。加えて、大腸菌は土壌で生残・増殖し、河川水中に供給されている可能性もある。河川水中から検出される大腸菌をはじめとする微生物の排出起源を同定することにより、適切な排出負荷低減対策を講じることが可能となる。また、自然由来の大腸菌に起因して基準値を超過している場合には基準超過を容認することを可能にする等、流域の実状に応じた対応へとつなげることもできると期待される。

水環境中の糞便汚染源を解析するための手法として、宿主特異的に排出される微生物をマーカーとして検出することに基づく微生物起源解析（Microbial Source Tracking, MST）がある。宿主特異的な微生物遺伝子マーカーとして、糞便中に豊富に存在することから、バクテロイデスが広く用いられており、それぞれの宿主に対応した定性PCR系および定量PCR系が多く開発されている。しかしながら、これらのPCR系の課題として、ある特定の地域で開発された検出系を他の地域へ適用した際に、宿主特異性が得られないということが挙げられる。微生物遺伝子マーカー検出系の使用に際しては、水試料への適用に先立ち、対象地域の糞便汚染源となり得る試料を用いてその有効性を検証し、最適なものを選定することが求められる。

2. 研究開発目的

本研究では、山梨県内を研究フィールドとし、バクテロイデス、ウイルスおよびミトコンドリアDNAを微生物遺伝子マーカーとして用いることの有効性を糞便汚染源試料を用いて評価し、河川水中の糞便汚

染源の推定を試みると共に、琵琶湖南湖の湖水への適用も試みた。さらに、新たな微生物遺伝子マーカー候補としてF特異DNA大腸菌ファージ(F-DNAファージ)と体表面吸着大腸菌ファージ(体表面ファージ)に着目し、その有効性を検討した。

3. 研究開発方法

1) 試料の採取

本研究で使用した糞便汚染源試料および水試料を表(4)-1に示す。ヒト糞便汚染源試料として、下水処理場において下水流入水と2次処理水(各15試料)、合併浄化槽からの排水(3試料)を採取した。ウシ糞便汚染源試料として、ウシ飼育施設においてウシ糞便(15試料)を採取した。ブタ糞便汚染源試料として、ブタ飼育施設においてブタ糞便(1試料)と豚舎排水(3試料)を採取したほか、過去の研究において採取し、凍結保存していた試料(26試料)を適宜使用した。

水試料として、糞便汚染の影響をほとんど受けていないと想定される地点として、山梨県瑞牆山の源流域の3地点において河川水(9試料)を採取した。また、甲府盆地内を流下する荒川の5地点と合流先の富士川の1地点(計6地点)において河川水(54試料)を採取した。さらに、図(4)-1に示すように、甲府盆地全域を対象とした採水調査を実施し、環境基準点を中心とした21地点において河川水(63試料)を採取した。他流域の水試料として、琵琶湖南湖の11地点で4ヶ月間にわたって毎月1回採取した湖水(44試料)を用いた。

表(4)-1 本研究で使用した糞便汚染源試料および水試料

地点	試料	採取期間	試料数
下水処理場	流入水	2016.08-12,	1試料×15回 = 15試料
	2次処理水	2017.11-2018.01, 2018.11-2019.01	1試料×15回 = 15試料
合併浄化槽	放流水	2016.12, 2018.01	1試料×3回 = 3試料
ウシ飼育施設	ウシ糞便	2016.10-12	3試料×5回 = 15試料
ブタ飼育施設①	ブタ糞便	2017.12	1試料×1回 = 1試料
	豚舎排水	2017.12, 2018.12	1試料×3回 = 3試料
ブタ飼育施設②	河川水(上流)	2014.06-10	1試料×9回 = 9試料
	河川水(下流)	2014.02-10	1試料×9回 = 17試料
瑞牆山	河川水(塩川)	2016.09-10	3試料×3回 = 9試料
甲府盆地	河川水(荒川)	2016.08-12	6試料×9回 = 54試料
	河川水(盆地全域)	2017.10-2018.01, 2018.11-12	21試料×3回 = 63試料
琵琶湖南湖	湖水	2018.11-2019.02	11試料×4回 = 44試料

Millipore) により1mL程度に濃縮した。糞便試料は、PBS (-) に懸濁した。この試料から200 μ Lを分取し、QIAamp DNA mini kitを用いたDNA抽出に供した。また、140 μ Lを分取し、QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した後、High capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた逆転写反応によってcDNA溶液を得た。

ヒト特異的なウイルス遺伝子マーカーの候補として、DNAウイルスであるヒトアデノウイルス (Heim et al. 2003)、JCポリオーマウイルスおよびBKポリオーマウイルス (Pal et al. 2006)、RNAウイルスであるノロウイルスGI (Kageyama et al. 2003)、アイチウイルス (Kitajima et al. 2013) を測定した。また、ヒト特異的なマーカーとなり得る可能性が示唆されている植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルス (Haramoto et al. 2013、Zhang et al. 2006) とタバコモザイクウイルス (Balique et al. 2013)、さらに、新規のバクテロイデスファージであるCrAssphage (Stachler et al. 2017) を測定した。動物特異的なウイルス遺伝子マーカーの候補として、DNAウイルスである2種類のウシポリオーマウイルスの定量PCR系 (Hundesha et al. 2010、Wong and Xagorarakis 2011) とブタアデノウイルス (Hundesha et al. 2009)、RNAウイルスであるウシノロウイルス (Wolf et al. 2010) とブタテスコウイルス (Jimenez-Clavero et al. 2003) を測定した。定量PCRにはThermal Cycler Dice Real Time System TP800を使用し、40サイクル以内に蛍光強度の増幅曲線が閾値を超えた場合に陽性と判断した。

6) F-DNAファージの測定

F-DNAファージを選択的に検出可能とするため、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49を宿主に用いたブラック法でのF特異大腸菌ファージ (Fファージ) の培養の際にRNaseを添加し、F特異RNA大腸菌ファージ (F-RNAファージ) の増殖の抑制を試みた。RNaseの添加濃度として、0、1、5および10 μ g/mLの4段階を設定し、M13ファージ (F-DNAファージ) およびMS2ファージ (F-RNAファージ) の濃度低減率とRNase添加濃度との関係性を評価した。

糞便汚染源試料および水試料から単離したFファージのブラックからDNAを加熱抽出し、F-DNAファージに特異的な定量PCR (Haramoto et al. 2009、Vinjé et al. 2004) に供した。30サイクル以内に蛍光強度の増幅曲線が閾値を超えたブラックをF-DNAファージ陽性であると判断した。陽性ブラックに対し、定量PCR系と同一のプライマーを用いた定性PCRに供し、アガロースゲル電気泳動によって確認できたバンド (PCR産物) を回収した。QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) を用いてゲルからPCR産物を精製し、ダイレクトシーケンシングによってF-DNAファージの塩基配列を決定し、系統樹を作成した。

7) 体表面ファージの測定

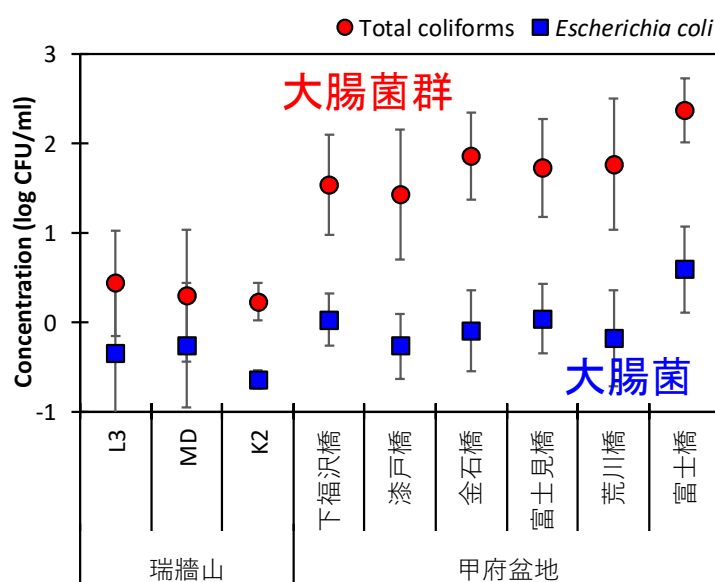
体表面ファージは、*Escherichia coli* WG5を宿主に用いたブラック法によって測定した。体表面ファージには、マイクロウイルス科、ポドウイルス科、マイオウイルス科、サイフォウイルス科、アッカーマンウイルス科の5種類の科が含まれるが、そのうちマイクロウイルス科に属する3種類の属 (PhiX174マイクロウイルス属、Alpha3マイクロウイルス属およびG4マイクロウイルス属) に特異的な定量PCR系 (Lee 2009) を用い、単離した体表面ファージのブラックがマイクロウイルス科であるかどうかを判定した。マイクロウイルス科と判定された場合には、本研究で設計したPhiX174マイクロウイルス属に特異的なプライマーを用いた定性PCR (増幅塩基長：404bp) に供した後、アガロースゲル電気泳動によるバンドの切り出しとQIAquick gel extraction kitを用いたPCR産物の精製を行い、ダイレクトシーケンシングによって体表面ファージの塩基配列を決定し、系統樹を作成した。いずれのPCRにおいても、ブラック単離液からのDNA抽出は加熱処理によって行った。また、F-DNAファージと体表面ファージのいずれにおいても、PCRの最初の加熱反応 (酵素活性ステップ) で十分な量のDNAが抽出されることが確認されたため、一部のブラック単離液に対してはDNA加熱抽出 (95°C、5分間) を省略し、単離液を直接PCRに供した。

4. 結果及び考察

1) 大腸菌群および大腸菌の測定結果

大腸菌群と大腸菌は、測定したすべてのヒト糞便汚染源試料から検出され、大腸菌の濃度は、下水流

入水が5 log colony-forming units (CFU)/mL程度、2次処理水と合併浄化槽排水が2 log CFU/mL程度であった。これらの細菌はすべてのウシとブタの糞便、豚舎排水からも検出されたが、ウシ糞便においては採取日と試料間による濃度差が大きく、3 log程度の変動が見られた。これは、採取した糞便の状態（新鮮さ）によるものと推察された。図(4)-2に示すように、大腸菌群と大腸菌は、上流に人為汚染源のない瑞牆山河川水からも常時検出されており、その検出濃度は、大腸菌群が1.91~2.84 log most probable number (MPN)/100mL、大腸菌が0.80~2.21 log MPN/100mLであり、現行の環境基準ではB類型に相当する大腸菌群濃度であった。



図(4)-2 瑞牆山および甲府盆地河川水（荒川、富士川）中の腸菌群および大腸菌の濃度

2) バクテロイデスの測定結果

糞便汚染源試料からのバクテロイデス遺伝子マーカーの検出結果を表(4)-2に示す。下水流入水および2次処理水、合併浄化槽排水の92% (23/25) において、3種類の系いずれを用いてもヒトバクテロイデスが検出され、2試料のみ2種類の系で陽性となった。一方、BacCow系を除いて、反芻動物およびブタバクテロイデスの陽性率は低い値であった。ウシ糞便からは、反芻動物バクテロイデスに加えて、ヒトおよびブタバクテロイデスも検出される傾向にあり、特にHF183-TaqMan系では15試料すべてが陽性反応を示した。ブタ糞便に対しては、ブタバクテロイデス検出系のみならず、3種類のヒトバクテロイデス検出系のいずれも陽性反応を示した。豚舎排水に対しても同様の傾向が認められた。ブタ飼育施設からの排水が流入する河川の上流と下流地点における結果を比較したところ、Pig2Bac系において陽性率 (100%) と濃度 (4.5~7.8 log copies/L) 共に大幅な上昇が見られ、ブタ糞便汚染の影響であると推定された。

この結果を基に、感度（陽性試料を正しく陽性と判定できた割合）、特異度（陰性試料を正しく陰性と判定できた割合）および正確度（陽性・陰性試料を正しく判別できた割合）を算出した結果を表(4)-3に示す。ヒトバクテロイデス検出系では、HF183-TaqMan系 (58%) に比べて、*gyrB*系 (79%) とBacHum系 (81%) の値が高く、ヒト特異的な検出系として適していることが分かった。正確度は同程度ではあったものの、検出濃度が*gyrB*系よりも高かったことを考慮し、BacHum系が最適であると判断した。また、反芻動物バクテロイデスに対してはBacCow系 (63%) よりもBacR系 (95%)、ブタバクテロイデスにはPF163-SYBR系 (67%) よりもPig2Bac系 (77%) が適していることが分かった。すなわち、BacHum系、BacR系およびPig2Bac系の3種類の検出系を用いることにより、ヒト、反芻動物ならびにブタに由来する糞便汚染源解析が可能となった。

瑞牆山および甲府盆地河川水（荒川、富士川）からのバクテロイデスの検出結果を表(4)-4に示す。瑞牆山河川水からは、ブタバクテロイデスは検出されず、ヒトバクテロイデスは9試料中1試料が陽性とな

ったのみであったが、反芻動物バクテロイデスは9試料すべてから3~4 log copies/L程度の濃度で検出された。この結果は、河川源流域においてシカやイノシシ等の反芻動物による河川水中への糞便汚染が生じていることが示唆された。甲府盆地内の荒川の5地点においては、反芻動物に加えてヒトバクテロイデスも大部分の試料から検出された。荒川が合流した富士川の富士橋においては、9試料中8試料からブタバクテロイデスが検出されており、これは後述の通り、荒川以外の河川において豚舎排水の影響を強く受けている河川があることに起因していると推察された。

甲府盆地全域の21地点で採取した河川水からのヒトバクテロイデスの検出結果を図(4)-3に示す。ヒトバクテロイデスは、上流に人家が存在しない塔岩川 (No. 21) においてのみ測定したすべての試料が非検出となったが、21地点中19地点ではすべての試料から検出された。上流域に位置し、人口密度が低い亀甲橋 (No. 9) や桜橋 (No. 17) ではヒトバクテロイデスの濃度は低い値を示す傾向にあった。

表(4)-2 糞便汚染源試料からのバクテロイデスの検出結果

試料	ヒト			反芻動物		ブタ	
	<i>gyrB</i>	BacHum	HF183-TaqMan	BacR	BacCow	Pig2Bac	PF163-SYBR
流入水	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	1/10 (10%)	10/10 (100%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)
2次処理水	11/12 (92%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0/12 (0%)	2/12 (17%)	1/12 (8%)	0/12 (0%)
合併浄化槽放流水	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
ウシ糞便	4/15 (27%)	5/15 (27%)	15/15 (100%)	14/15 (93%)	15/15 (100%)	12/15 (80%)	14/15 (93%)
ブタ糞便	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
豚舎排水	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)
河川水(ブタ飼育施設上流)	8/9 (89%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	3/9 (33%)	7/9 (78%)	2/9 (22%)	6/9 (67%)
河川水(ブタ飼育施設下流)	17/17 (100%)	17/17 (100%)	17/17 (100%)	11/17 (65%)	17/17 (100%)	17/17 (100%)	15/17 (88%)

表(4)-3 バクテロイデス検出系の感度、特異度および正確度

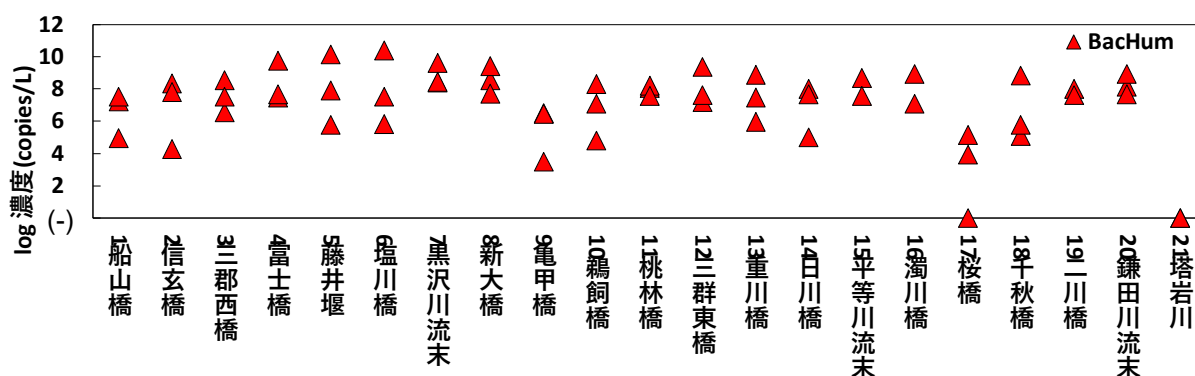
指標	ヒト			反芻動物		ブタ	
	<i>gyrB</i>	BacHum	HF183-TaqMan	BacR	BacCow	Pig2Bac	PF163-SYBR
感度	23/25 (92%)	25/25 (100%)	25/25 (100%)	14/15 (93%)	15/15 (100%)	20/20 (100%)	16/20 (80%)
特異度	11/18 (61%)	10/18 (56%)	0/18 (0%)	27/28 (96%)	12/28 (40%)	26/40 (65%)	24/40 (60%)
正確度	34/43 (79%)	35/43 (81%)	25/43 (58%)	41/43 (95%)	27/43 (63%)	46/60 (77%)	40/60 (67%)

※ 70%以上の数値を赤字で表記

表(4)-4 瑞牆山および甲府盆地河川水（荒川，富士川）からのバクテロイデスの検出結果

地域	採水地点	ヒト		反芻動物		ブタ		大腸菌	
		陽性率	濃度	陽性率	濃度	陽性率	濃度	陽性率	濃度
瑞牆山	上流	0/3 (0%)	Not detected	3/3 (100%)	2.7-3.6	0/3 (0%)	Not detected	1/3 (33%)	3.7
	中流	1/3 (33%)	4.9	3/3 (100%)	2.9-3.7	0/3 (0%)	Not detected	0/3 (0%)	Not detected
	下流	0/3 (0%)	Not detected	3/3 (100%)	3.6-4.1	0/3 (0%)	Not detected	1/3 (33%)	3.3
甲府盆地	下福沢橋	9/9 (100%)	4.9-6.8	9/9 (100%)	1.0-3.8	3/9 (33%)	0.3-8.0	4/9 (44%)	0.3-3.6
	漆戸橋	7/9 (78%)	5.1-5.8	8/9 (89%)	1.0-4.1	3/9 (33%)	0.3-2.4	4/9 (44%)	0.3-3.7
	金石橋	9/9 (100%)	5.2-6.0	9/9 (100%)	1.1-4.4	2/9 (22%)	0.1-3.2	3/9 (33%)	0.1-3.8
	富士見橋	7/9 (78%)	3.3-6.4	8/9 (89%)	1.7-4.2	1/9 (11%)	0.1	4/9 (44%)	0.1-3.7
	荒川橋	8/9 (89%)	5.1-5.8	9/9 (100%)	1.4-7.0	1/9 (11%)	0.1	4/9 (44%)	0.1-3.8
	富士橋	9/9 (100%)	6.2-7.6	9/9 (100%)	2.8-5.1	8/9 (89%)	3.4-4.7	9/9 (100%)	3.4-4.8

※ 70%以上の数値を赤字で表記，濃度：log copies/L



図(4)-3 甲府盆地全域の河川水中におけるヒトバクテロイデスの濃度

3) ミトコンドリアDNAの測定結果

ウシおよびブタミトコンドリアDNA検出系の感度、特異度および正確度を表(4)-5に示す。いずれの手法も感度は100%であったが、特異度はウシミトコンドリアDNA検出系が67%、ブタミトコンドリアDNA検出系が70%となり、対象宿主以外の糞便汚染源試料に対しても陽性反応を示す場合があった。ウシミトコンドリアDNA検出系の正確度は77%であり、最適な反芻動物バクテロイデス検出系と判断されたBacR (95%) よりも低い値であったが、BacCow系 (63%) より高い値であった。ブタミトコンドリアDNAの正確度は73%であり、ブタバクテロイデス検出系 (Pig2Bac系：77%、PF163-SYBR系：67%) と同程度の値であった。この結果より、ウシおよびブタミトコンドリアDNA検出系のいずれも河川水試料への適用が可能であると判断した。

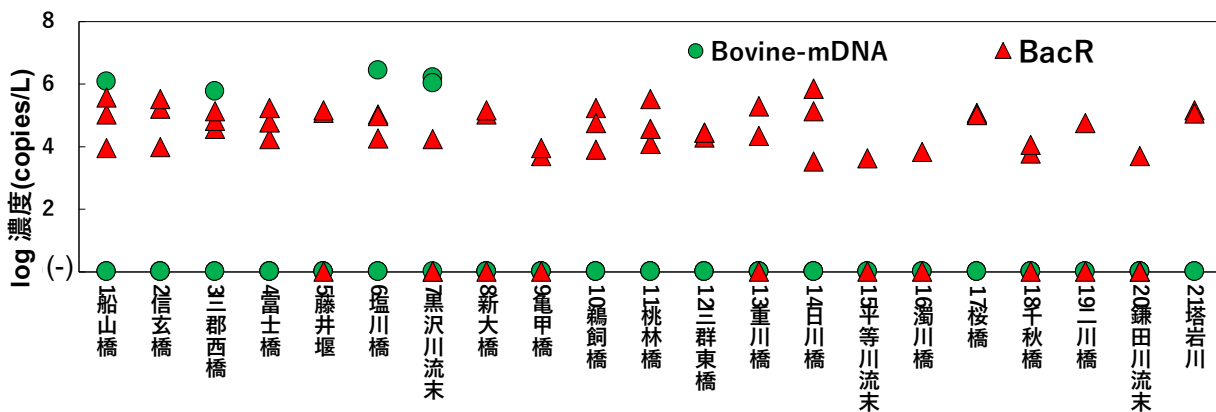
甲府盆地全域で採取した河川水からの動物由来のミトコンドリアDNAとバクテロイデスの検出結果を図(4)-4および図(4)-5に示す。ウシバクテロイデスに比べて反芻動物バクテロイデスは多くの試料から検出されていたことから、ウシ以外の反芻動物による糞便汚染の影響があることが示唆された。塔岩川 (No. 21) から反芻動物バクテロイデスが検出された結果は、瑞牆山での結果と一致する傾向であり、河川上流域においてシカやイノシシ等による糞便汚染の影響は大きいと推察された。

ブタバクテロイデスとブタミトコンドリアDNAは比較的類似した検出傾向を示していた。特に、甲府盆地を北東から流下する笛吹川の支川である鎌田川に位置する鎌田川流末 (No. 20) と、鎌田川の流入直後の地点である三郡東橋 (No. 12) において、ブタバクテロイデスとブタミトコンドリアDNAの両方が高濃度で検出されていた。鎌田川流末地点の上流域には豚舎が複数存在しており、これらの豚舎からの排水による影響を強く受けていることが示唆された。鎌田川以外の笛吹川流域の河川からも比較的高頻度・高濃度で検出されており、その影響によって、釜無川と笛吹川が合わさった下流の地点である富士橋 (No. 4) においても高濃度で検出されたと推察される。

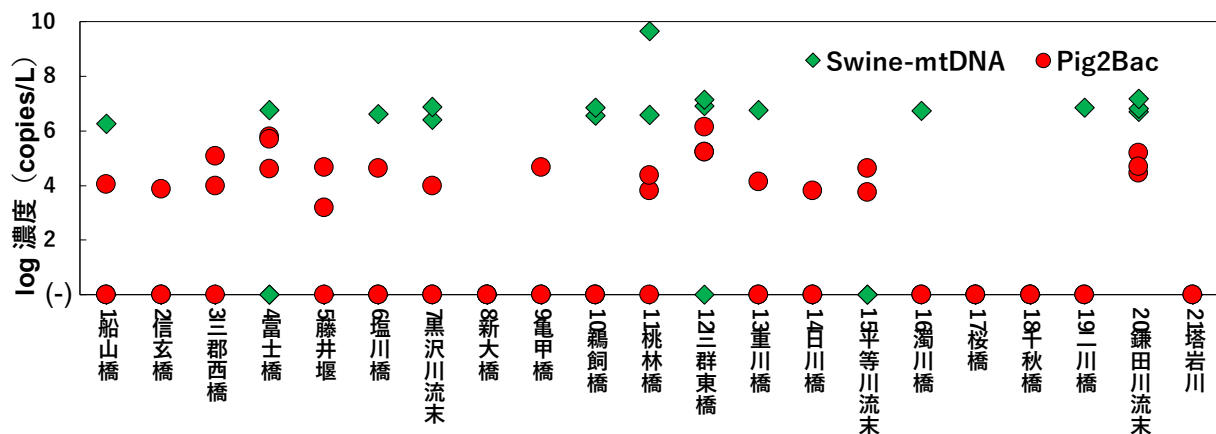
表(4)-5 ウシおよびブタミトコンドリアDNA検出系の感度、特異度および正確度

指標	ウシ	ブタ
	Bovine-mtDNA	Swine-mtDNA
感度	15/15 (100%)	4/4 (100%)
特異度	22/33 (67%)	31/44 (70%)
正確度	37/48 (77%)	35/48 (73%)

※ 70%以上の数値を赤字で表記



図(4)-4 甲府盆地全域の河川水中における反芻動物バクテロイデスおよびウシミトコンドリアDNAの濃度



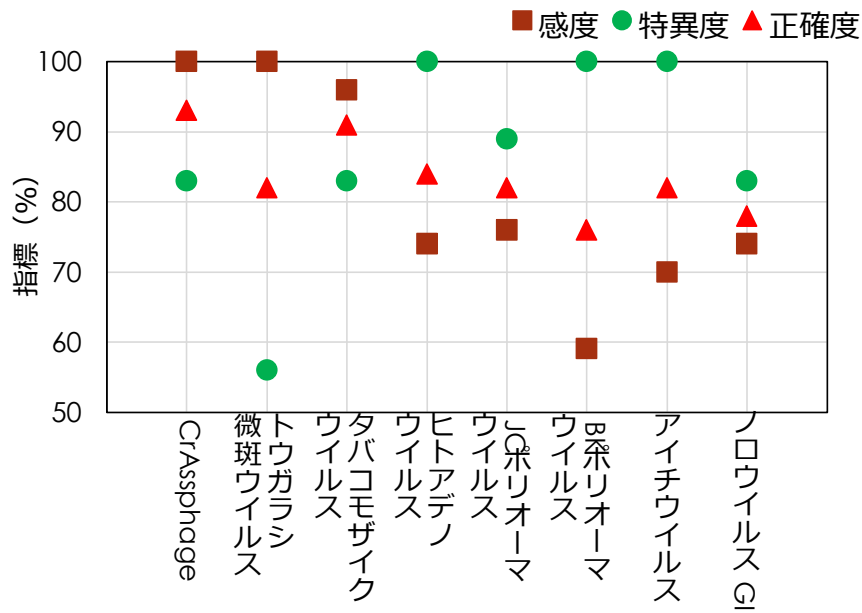
図(4)-5 甲府盆地全域の河川水中におけるブタバクテロイデスおよびブタミトコンドリアDNAの濃度

4) ウイルスの測定結果

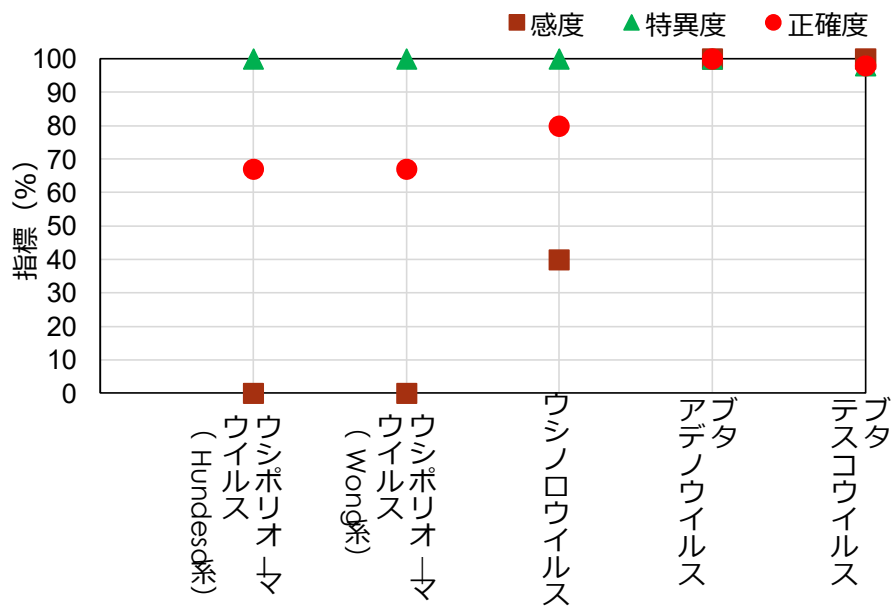
糞便汚染源試料から5種類のヒトウイルスと2種類の植物ウイルス、CrAssphageを検出し、ヒト特異的ウイルス遺伝子マーカーとしての感度、特異度および正確度を算出した結果を図(4)-6に示す。感度は、植物ウイルスとCrAssphageは100%あるいはそれに近い高い値を示したが、5種類のヒトウイルスはいずれも80%未満の値であった。これは、ヒトウイルスは感染者からのみ排出されるため、感染者が存在しない、あるいは少ないためにヒト糞便汚染源試料から検出されなかったと考えられた。一方で、ヒト糞便汚染源試料からの陽性率が低かったことと関連し、動物糞便汚染源試料からのヒトウイルスの陽性率も低く、特異度が80%を示し、特に、ヒトアデノウイルスとBKポリオーマイルス、アイチウイルスは100%であった。トウガラシ微斑ウイルスは特異度が低く、CrAssphageとタバコモザイクウイルスとは異なり、ヒト特異的遺伝子マーカーとしては適さないと判断された。CrAssphageとタバコモザイクウイルスは特異度は同等であったが、感度が100%であったCrAssphageの方がヒト特異的遺伝子マーカーとして適していると考えられた。これらの結果に基づき、ヒト特異的ウイルス遺伝子マーカーとして、CrAssphageとヒトアデノウイルスを用いることとした。

ウシおよびブタ特異的ウイルス遺伝子マーカー検出系の感度、特異度および正確度を図(4)-7に示す。3種類のウシ特異的遺伝子マーカー検出系はいずれも感度が低く、特に、2種類のウシポリオーマイルス検出系の感度は0%であった。これは、各ウシ糞便試料は、同じ飼育区画内の3~5スポットで採取した糞便を混合して得たものであり、その中に感染個体から排出された糞便が含まれていない場合にはウイルスは検出されないためであると考えられた。このことは、多くの個体から排出される糞便を含む豚舎排水を対象として検討したブタ特異的遺伝子マーカーの感度が100%であったことから支持される。ウシ特異的遺伝子マーカーの正確度は70~80%程度であったが、これはウシ以外の糞便汚染源試料からもウイルスが検出されなかったためであり、感度が0%であったことから、ウシポリオーマイルスを使用することは適切ではないと判断した。一方で、ウシノロウイルスは、感度は低いものの、適用可能であると判断した。ブタアデノウイルスとブタテスコウイルスは、感度、特異度、正確度いずれも98~100%と高かったが、豚舎排水中の濃度はブタアデノウイルス (7.2~7.4 log copies/L) よりもブタテスコウイルス (8.4~9.4 log copies/L) の方が高かったため、ブタテスコウイルスの方がより適していると判断した。

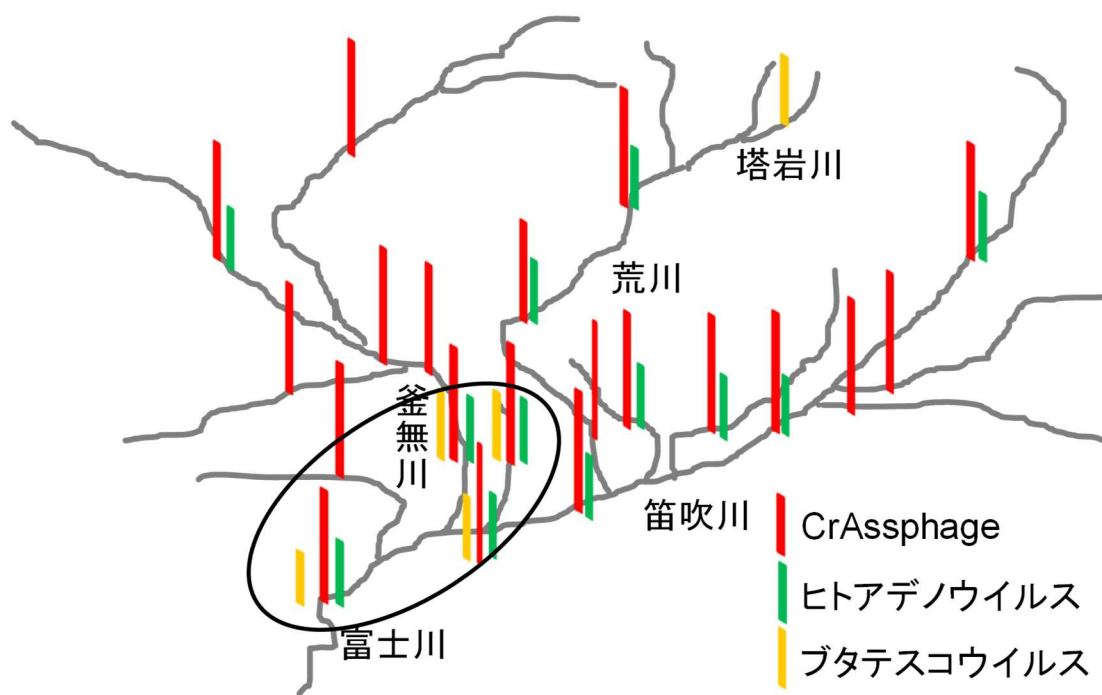
糞便汚染源試料を用いた検討で適用可能であると判断したCrAssphage、ヒトアデノウイルス、ウシノロウイルスおよびブタテスコウイルスの検出を甲府盆地全域の河川水試料から試みた。図(4)-8に示すように、CrAssphageは塔岩川 (No. 21) を除くすべての地点から検出された。このうち12地点ではヒトアデノウイルスが検出されていたことから、ヒト糞便汚染源を受けている地点であると推定された。ブタテスコウイルスは、図中で枠で囲った三郡西橋 (No. 3)、富士橋 (No. 4)、三郡東橋 (No. 12) および鎌田川流末 (No. 20) において検出されており、鎌田川を中心に検出される傾向にあったブタバクテロイデスやブタミトコンドリアDNAと同様のものではあった。ただし、ブタテスコウイルスは塔岩川で採取した1試料からも検出されており、上流には豚舎は存在しないことと、ブタバクテロイデスとブタミトコンドリアDNAは検出されていないことから、非特異的な配列と反応していた可能性もある。なお、ウシノロウイルスはいずれの試料からも検出されなかった。



図(4)-6 ヒト特異的ウイルス遺伝子マーカー検出系の感度、特異度および正確度



図(4)-7 動物特異的ウイルス遺伝子マーカー検出系の感度、特異度および正確度

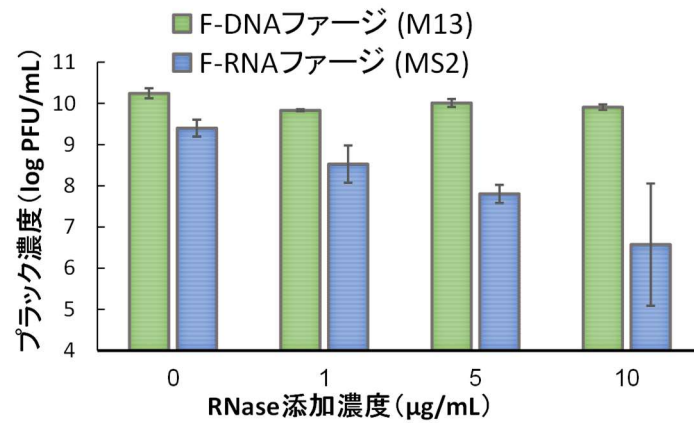


図(4)-8 甲府盆地全域の河川水からのCrAssphage、ヒトアデノウイルスおよびブタテスコウイルスの検出結果

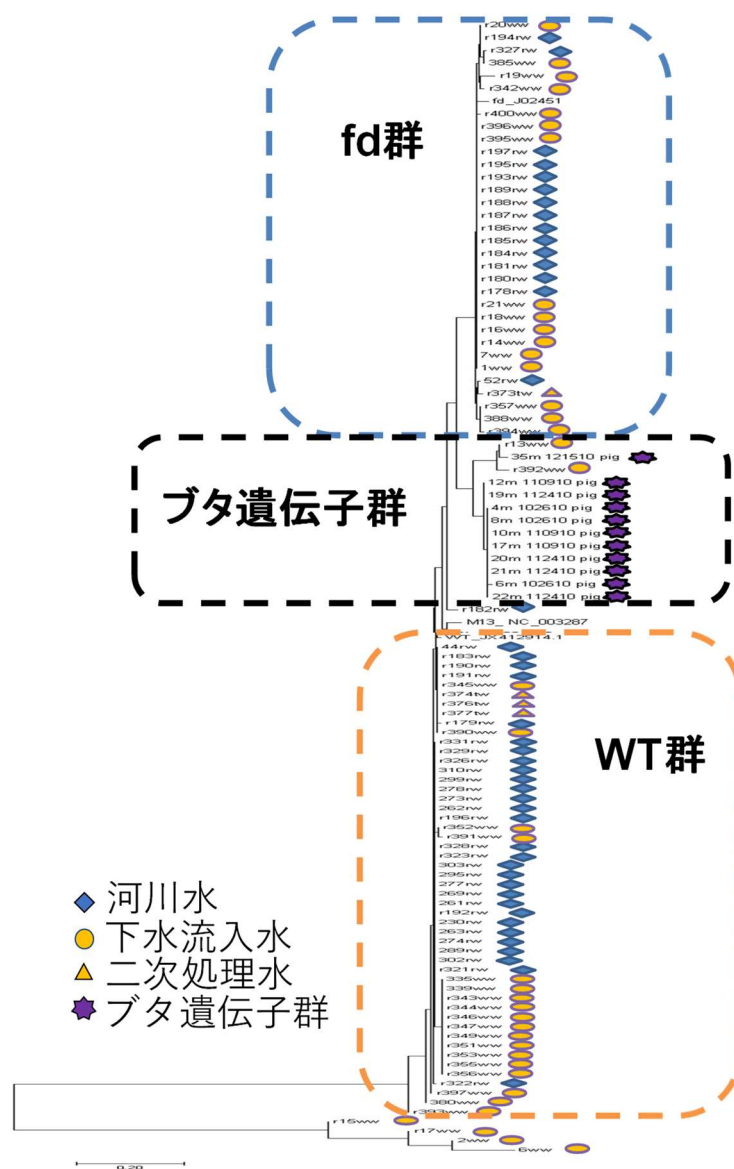
5) F-DNAファージの測定結果

図(4)-9に示すように、RNaseの添加濃度を上げるにつれてF-RNAファージであるMS2ファージの濃度に低下が見られ、添加濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ の際に $2.8 \pm 1.7 \log$ ($n = 6$)の濃度低減率が得られた。一方、F-DNAファージであるM13ファージの濃度低減率は $0.3 \pm 0.1 \log$ ($n = 6$)と低く、 $10 \mu\text{g/mL}$ のRNase添加濃度でF-DNAファージを十分選択的に検出可能であることが分かった。このRNase添加処理を用いない場合、下水流入水から単離したFファージのプラックに占めるF-DNAファージの割合は17.7% (47/265)であったのに対し、RNase添加処理を導入することでその割合は99.5% (190/191)に上昇し、効率的なF-DNAファージ単離株の収集が可能となった。

糞便汚染源および水試料から単離したFファージのプラックをF-DNAファージの定量PCRと定性PCRに供し、F-DNAファージと判定された96株に対してダイレクトシーケンシングを行った結果、89株の塩基配列を決定することに成功した。図(4)-10に示すように、ヒト糞便汚染源試料から単離したプラックの大部分はfd群またはWT群に分類され、いずれにも分類されないものもあった。一方、ブタ糞便汚染源試料から単離されたプラックは単一の遺伝子群に分類された。河川水試料から単離したプラックはfd群またはWT群に分類されたことから、これらのファージの由来はヒト糞便である可能性が示唆された。ただし、F-DNAファージのプラックの単離に成功したのはヒトとブタ糞便汚染源試料からのみであったため、F-DNAファージを用いた糞便汚染源解析の有効性は今後さらに検討する必要がある。



図(4)-9 RNase添加によるF-DNAファージおよびF-RNAファージの濃度変化



図(4)-10 F-DNAファージの系統樹

6) 体表面ファージの測定結果

表(4)-6に示すように、体表面ファージは、ブラック法によって測定した糞便汚染源試料すべてから検出され、河川水からも95%の陽性率を示した。また、表(4)-7に示すように、単離したブラックをマイ

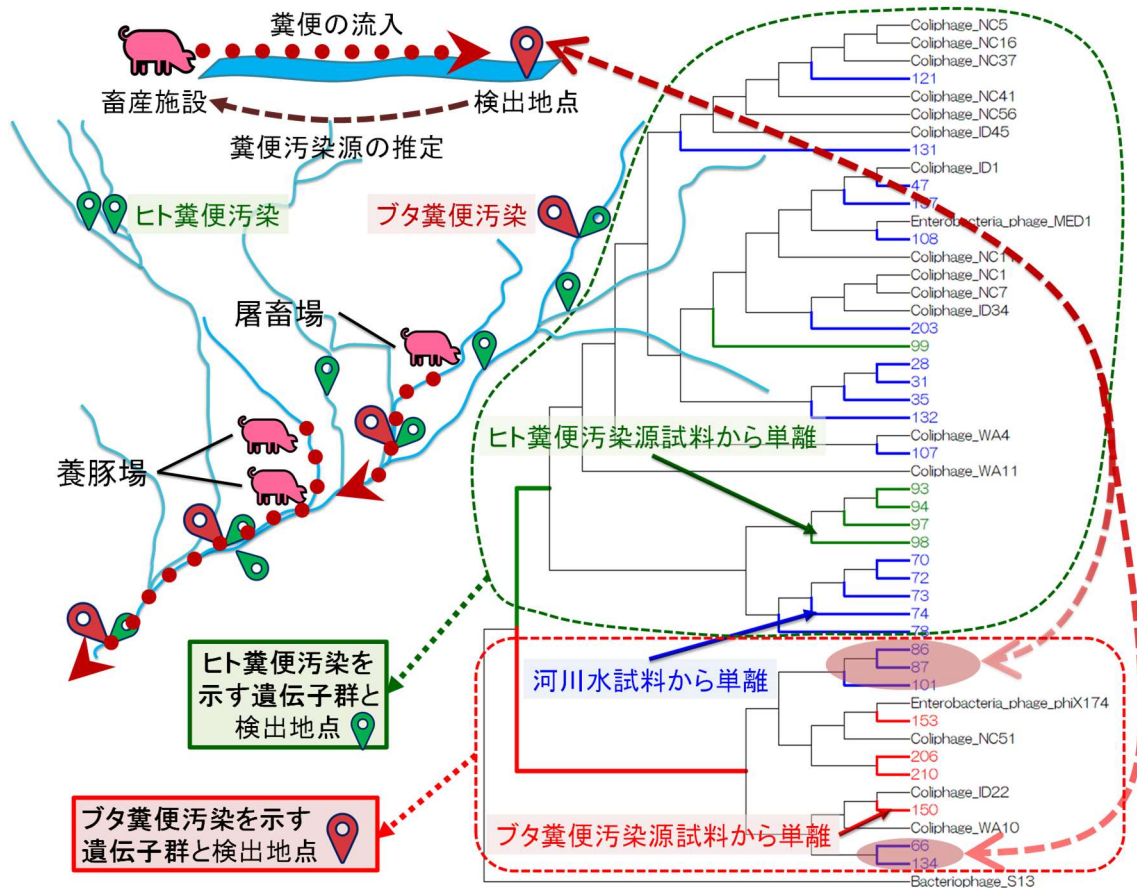
クロウイルス科に特異的な定量PCRに供した結果、下水流入水、下水処理水および豚舎排水から単離したプラックのそれぞれ36%、63%、87%がマイクロウイルス科であることが分かった。このことから、体表面ファージあるいはマイクロウイルス科の検出に基づくのみでは、糞便汚染源解析は行えないことが明らかとなった。そこで、PhiX174マイクロウイルス属を増幅可能な定性PCR系を新たに設計し、マイクロウイルス科と判定されたプラックを塩基配列解析に供した。その結果、図(4)-11に示すように、ヒト糞便汚染源試料とブタ糞便汚染源試料から単離したプラックは異なるクラスターに分類され、PhiX174マイクロウイルス属の遺伝子群を決定することで、糞便汚染源の判別が可能となることが示唆された。河川水試料は、
ブタ

表(4)-6 糞便汚染源試料および河川水試料からの体表面ファージの検出結果

試料	陽性試料数/測定試料数(陽性率)	陽性試料中の濃度(PFU/mL)
下水流入水	5/5 (100%)	3800~17000
下水処理水	5/5 (100%)	0.7~30
豚舎排水	3/3 (100%)	510~4900
河川水	60/63 (95%)	0.1~135

表(4)-7 単離した体表面ファージプラックからのマイクロウイルス科の検出結果

試料	陽性プラック数/単離プラック数(陽性率)
下水流入水	20/55 (36%)
下水処理水	25/40 (63%)
豚舎排水	34/39 (87%)
河川水	176/450 (39%)



図(4)-11 PhiX174マイクロウイルス属の塩基配列解析結果

6) 琵琶湖南湖の湖水からの微生物遺伝子マーカーの検出結果

山梨県内で最適化した微生物遺伝子マーカーの他地域への適用可能性を検証するため、琵琶湖南湖で採取した湖水試料からのヒトバクテロイデスの検出を試みたところ、ヒトバクテロイデスは44試料中22試料（50%）から検出され、ヒト糞便汚染の存在が示唆された。CrAssphageは44試料中7試料（16%）から検出され、そのうち6試料はヒトバクテロイデスに対しても陽性反応を示し、ヒト糞便汚染を受けている可能性をより強く支持するものであった。一方、ブタおよび反芻動物バクテロイデスは44試料いずれからも検出されず、これらによる糞便汚染が存在しない、または、検出限界以下の濃度で遺伝子マーカーが存在していたと推察された。

本研究で新たに提案を試みたF-DNAファージの糞便汚染源指標としての有効性を評価するため、Fファージをブラック法で測定したところ、11%（5/44）の試料から0.05～0.25 PFU/mLの濃度で検出された。しかしながら、単離したブラックをF-DNAファージに特異的な定量PCRに供したものの、いずれのブラックも陽性反応を示さず、F-RNAファージであると推定された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

水環境中への主要な糞便汚染源であると想定される宿主（ヒト、反芻動物（ウシ）およびブタ）に対し、様々な糞便汚染源試料（下水流入水および処理水、合併浄化槽排水、豚舎排水、ウシ糞便等）における微生物遺伝子マーカー（バクテロイデス、ミトコンドリアDNA、ウイルス）の測定を通じ、山梨県内において利用可能な微生物遺伝子マーカーを決定することに成功した。最適と判断された微生物遺伝子マーカーを山梨県内で採取した河川水に適用することにより、豚舎の下流地点からブタ特異的な微生物遺伝子マーカーが検出される等、流域の土地利用状況に対応した測定結果が得られ、本研究の手法が有効であることが示された。特に、上流に人為汚染源がない河川上流域の清流において、反芻動物バ

クテロイデスを中心とした反芻動物特異的遺伝子マーカーが高頻度で検出されたことは、シカやイノシシ等の野生動物がこれらの清流における糞便汚染に大きな影響を与えていることを示唆するものであり、水環境中の糞便汚染を評価する上で、ヒトのみならず動物由来の汚染も看過できないことが示された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

大腸菌群数から大腸菌数へと水質環境基準における衛生指標が変更された後にも、河川上流域の清流において大腸菌数が基準超過となる事例等が生じることが想定される。そのような際に、直ちに基準超過（不適合）とするのではなく、超過を引き起こしている原因を解明し、超過を回避するための対策を採ることが可能であるかを検討することのできる仕組みがあることが望ましい。本研究で開発した宿主特異的微生物遺伝子マーカーを用いた微生物起源解析を活用することで、大腸菌群や大腸菌を測定するのみでは得ることのできない、水環境中の糞便汚染源に関する知見を得ることができ、適切な汚染負荷低減対策を採ることを可能にし得るものである。

6. 国際共同研究等の状況

特に特筆すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Eiji Haramoto, Rui Osada (2018) Assessment and application of host-specific *Bacteroidales* genetic markers for microbial source tracking of river water in Japan, PLOS ONE, 13(11):e0207727.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に特筆すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に特筆すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 森山一葉，長田留衣，山田貴大，原本英司，坂本康（2017）F特異DNA大腸菌ファージの遺伝子型検出による水環境中の糞便汚染源解析，第51回日本水環境学会年会，熊本大学
- 2) 堂山貴広，望月大蔵，原本英司（2017）下水および河川水中におけるF特異大腸菌ファージの遺伝子群別解析，第20回日本水環境学会シンポジウム，和歌山大学
- 3) 中谷航己，山田貴大，Bikash Malla，原本英司（2018）宿主特異的ウイルス遺伝子マーカーを用いた甲府盆地河川水中の糞便汚染源の解析，第45回土木学会関東支部技術研究発表会，山梨大学
- 4) 古川琴美，長田留衣，Bikash Malla，原本英司，坂本康（2018）バクテロイデスを指標とした甲府盆地河川水中の糞便汚染源解析，第45回土木学会関東支部技術研究発表会，山梨大学
- 5) 堂山貴広，原本英司（2018）F特異RNA大腸菌ファージ野生株の遺伝子群別の塩素消毒耐性，第52回日本水環境学会年会，北海道大学

- 6) 望月大蔵, 原本英司 (2018) 河川水中の糞便汚染指標としての体表面吸着大腸菌ファージの遺伝子群別検出の有効性, 第52回日本水環境学会年会, 北海道大学
- 7) 原本英司 (2018) 宿主特異的微生物遺伝子マーカーを用いた水環境中の糞便汚染源解析, 第21回日本水環境学会シンポジウム, 島根大学
- 8) 堂山貴広, 原本英司 (2018) F特異RNA大腸菌ファージの遺伝子型別の塩素消毒耐性, 第55回環境工学研究フォーラム, 京都大学
- 9) 堂山貴広, 原本英司 (2019) 塩素消毒処理による大腸菌ファージ野生株の遺伝子型別の不活化効果, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学
- 10) 牧瀬晃基, Bikash Malla, 原本英司, 坂本康 (2019) 河川水中の糞便汚染指標としてのCrAssphageの有効性の検討, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学
- 11) 伊藤聖晃, 望月大蔵, 原本英司 (2019) 環境水中における体表面吸着大腸菌ファージの糞便汚染指標としての有効性評価, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学
- 12) 古賀皓晟, 堂山貴広, 原本英司, 坂本康 (2019) 河川水中におけるF特異DNA大腸菌ファージの存在実態および糞便汚染源指標としての有効性の検討, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学
- 13) 山本一輝, Bikash Malla, 原本英司, 坂本康 (2019) ミトコンドリアDNAおよびバクテロイデス遺伝子マーカーを用いた河川水中の糞便汚染源解析, 第53回日本水環境学会年会, 山梨大学

(3) 出願特許

特に特筆すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 原本英司 (2017) 微生物遺伝子マーカーを活用した河川水中の糞便汚染源解析, 日本水環境学会水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム「Recent progress in microbial safety in water environment～水環境の微生物学的安全性に関する研究の動向～」, 東京大学

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に特筆すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 堂山貴広: 第53回日本水環境学会年会 年会優秀発表賞 (クリタ賞), 2019年3月8日

8. 引用文献

- 1) Balique, F., Colson, P., Barry, A. O., Nappez, C., Ferretti, A., Al Moussawi, K., Ngounga, T., Lepidi, H., Ghigo, E., Mege, J. L., Lecoq, H., and Raoult, D. (2013) Tobacco mosaic virus in the lungs of mice following intra-tracheal inoculation. PLoS ONE 8, e54993.
- 2) Bernhard, A. E., and Field, K. G. (2000) A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 66, 4571–4574.
- 3) Bernhard, A. E., and Field, K. G. (2000) Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. Appl Environ Microbiol 66, 1587–1594.
- 4) Dick, L. K., Bernhard, A. E., Brodeur, T. J., Santo Domingo, J. W., Simpson, J. M., Walters, S. P., and Field, K. G. (2005) Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. Appl Environ Microbiol 71, 3184–3191.
- 5) Haramoto, E., Katayama, H., Asami, M., and Akiba, M. (2012) Development of a novel method for simultaneous concentration of viruses and protozoa from a single water sample. J Virol Methods 182, 62–69.

- 6) Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., and Kunikane, S. (2009) Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. *Water Res* 43, 3759-3764.
- 7) Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., and Akiba, M. (2013) Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl Environ Microbiol* 79, 7413-7418.
- 8) Haugland, R. A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L., and Shanks, O. C. (2010) Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR. *Syst Appl Microbiol* 33, 348-357.
- 9) Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., and Pring-Akerblom, P. (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 70, 228-239.
- 10) Hundesa, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodriguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., and Girones, R. (2010) Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol Methods* 163, 385-389.
- 11) Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodriguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Suñen, E., and Girones, R. (2009) Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods* 158, 130-135.
- 12) Jimenez-Clavero, M. A., Fernandez, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., Roblas, N., and Ley, V. (2003) Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl Environ Microbiol* 69, 6311-6315.
- 13) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., and Katayama, K. (2003) Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41, 1548-1557.
- 14) Kildare, B. J., Leutenegger, C. M., McSwain, B. S., Bambic, D. G., Rajal, V. B., and Wuertz, S. (2007) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. *Water Res* 41, 3701-3715.
- 15) Kitajima, M., Hata, A., Yamashita, T., Haramoto, E., Minagawa, H., and Katayama, H. (2013) Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of Aichi viruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 79, 3952-3958.
- 16) Lee, H. S. (2009) Somatic coliphage families as potential indicators of enteric viruses in water and methods for their detection. PhD. University of North Carolina, Chapel Hill.
- 17) Lee, C. S., and J. Lee. (2010) Evaluation of new gyrB-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination. *J Microbiol Methods* 82, 311-318.
- 18) Malla, B., Ghaju Shrestha, R., Tandukar, S., Bhandari, D., Inoue, D., Sei, K., Tanaka, Y., Sherchand, J. B., and Haramoto, E. (2018) Validation of host-specific *Bacteroidales* quantitative PCR assays and their application to microbial source tracking of drinking water sources in the Kathmandu Valley, Nepal. *J Appl Microbiol* 125, 609-619.
- 19) Mieszkin, S., Furet, J. P., Corthier, G., and Gourmelon, M. (2009) Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 75, 3045-3054.
- 20) Pal, A., L. Sirota, T. Maudru, K. Peden, and A. M. Lewis Jr. 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods* 135, 32-42.
- 21) Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L., and Farnleitner, A. H. (2006) Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl Environ Microbiol* 72, 5610-5614.

- 22) Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., and Siciliano, S. D. (2005) Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ Microbiol* 7, 249–259.
- 23) Stachler, E., Kelty, C., Sivaganesan, M., Li, X., Bibby, K., and Shanks, O. C. (2017) Quantitative CrAssphage PCR assays for human fecal pollution measurement. *Environ Sci Technol* 51, 9146–9154.
- 24) Vinjé, J., Oudejans, S. J. G., Stewart, J. R., Sobsey, M. D., and Long, S. C. (2004) Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 70, 5996–6004.
- 25) Wolf, S., Hewitt, J., and Greening, G. E. (2010) Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 76, 1388–1394.
- 26) Wong, K., and Xagorarakis, I. (2011) Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1521–1526.
- 27) Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Rum, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, F., and Ruan, Y. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 4, e3.
- 28) 原本英司, 片山浩之, 浅見真理, 秋葉道宏, 国包章一 (2010) 河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発. *水道協会雑誌* 79, 2-11.

Ⅲ. 英文Abstract

Development and Application of Novel Microbial Source Tracking Tools for Waterborne Infectious Disease Control

Principal Investigator: Hiroyuki KATAYAMA
 Institution: The University of Tokyo
 7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo, 113-8656, JAPAN
 Tel: +81-3-5841-6271
 E-mail: katayama@env.t.u-tokyo.ac.jp
 Cooperated by: Kyoto University
 Tohoku University
 University of Yamanashi

[Abstract]

Key Words: Microbial source tracking, Fecal contamination, *E. coli*, Phage, Enteric virus, Bacteroides, Norovirus, Bacterial histo-blood group antigens

In Japan, total coliforms have long been used as an indicator on fecal pollution in water quality standards in the water environment. Meanwhile, some developed countries have adopted various advanced scientific findings such as criteria for quantitative microbial risk assessment and regulations using bacteriophages to represent the enteric viruses. Bacterial indicators including *Escherichia coli* are more likely to die off under environmental stresses as compared to pathogenic microorganisms such as cryptosporidium and viruses. Therefore, it is pointed out that *E. coli* has a limitation of representativeness of the fecal microorganisms in waters. On the other hand, *E. coli* is excreted from various warm-blooded animals, and possible growth in the environment can also cause the frequency to exceed the environmental standard.

In recent years, occurrence data of not only *Cryptosporidium* but also pathogenic viruses in environmental samples have become available, which enabled to evaluate the effectiveness of the index using environmental survey data. In addition, not only correlation analysis between the index and pathogenic microbes, microbial and chemical source tracking methods were developed to clearly identify the contamination source and host animals of fecal pollution.

In this study, environmental data were accumulated from the environmental survey study. Pepper mild mottle virus was found to be prevalent in Tokyo bay, which was found too persistent as an indicator of human enteric viruses. About 50% of *E. coli* isolates from the Lake Biwa had same genetic markers with the isolates from birds, which may reflect fecal pollution from birds in the Lake Biwa. Studies conducted in river basins in Yamanashi Prefecture demonstrated the usefulness of locally validated microbial genetic markers to fecal contamination analysis of river water, along with identification of possible novel fecal contamination indicators, such as FDNA and somatic phages. Norovirus-binding gene of *E. coli* was identified from the study using a gene knockout collection.