

Environment Research and Technology Development Fund

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-2006 水環境における新興・再興微生物リスク管理に向けた微生物起源解析の活用に関する研究  
(JPMEERF20205006)

令和2年度～令和4年度

英文課題名

Development and Application of Microbial Source Tracking Tools for Emerging and Re-emerging Infectious Risk Management in Water Environment

〈研究代表機関〉  
東京大学

〈研究分担機関〉  
東北大学  
群馬大学  
京都大学  
高知大学  
山梨大学  
東京農業大学

令和5年5月

## 目次

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| I. 成果の概要                                                   | 1  |
| 1. はじめに（研究背景等）                                             | 2  |
| 2. 研究開発目的                                                  | 2  |
| 3. 研究目標                                                    | 3  |
| 4. 研究開発内容                                                  | 3  |
| 5. 研究成果                                                    | 4  |
| 5-1. 成果の概要                                                 | 4  |
| 5-2. 環境政策等への貢献                                             | 5  |
| 5-3. 研究目標の達成状況                                             | 6  |
| 6. 研究成果の発表状況                                               | 8  |
| 6-1. 査読付き論文                                                | 8  |
| 6-2. 知的財産権                                                 | 9  |
| 6-3. その他発表件数                                               | 10 |
| 7. 国際共同研究等の状況                                              | 10 |
| 8. 研究者略歴                                                   | 10 |
| II. 成果の詳細                                                  | 11 |
| II-1 大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案<br>（東京大学、東北大学、群馬大学） | 11 |
| 要旨                                                         | 11 |
| 1. 研究開発目的                                                  | 11 |
| 2. 研究目標                                                    | 11 |
| 3. 研究開発内容                                                  | 11 |
| 4. 結果及び考察                                                  | 15 |
| 5. 研究目標の達成状況                                               | 21 |
| 6. 引用文献                                                    | 21 |
| II-2 新たな大腸菌の起源解析方法の提案<br>（高知大学、京都大学）                       | 22 |
| 要旨                                                         | 22 |
| 1. 研究開発目的                                                  | 22 |
| 2. 研究目標                                                    | 22 |
| 3. 研究開発内容                                                  | 22 |
| 4. 結果及び考察                                                  | 24 |
| 5. 研究目標の達成状況                                               | 29 |
| 6. 引用文献                                                    | 29 |
| II-3 清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析<br>（山梨大学、東京農業大学）              | 30 |
| 要旨                                                         | 30 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| 1. 研究開発目的         | 30 |
| 2. 研究目標           | 31 |
| 3. 研究開発内容         | 31 |
| 4. 結果及び考察         | 33 |
| 5. 研究目標の達成状況      | 39 |
| 6. 引用文献           | 40 |
| III. 研究成果の発表状況の詳細 | 41 |
| IV. 英文Abstract    | 45 |

## I. 成果の概要

課題名 5-2006 水環境における新興・再興微生物リスク管理に向けた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 教授)

重点課題 主：【重点課題⑮】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副：【重点課題⑯】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (5-3) 大腸菌等に関する起源解析手法の開発及びその活用に関する研究

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

研究経費

100,800千円（合計額）

（各年度の内訳：令和2年度：36,000千円、令和3年度32,400千円、令和4年度：32,400千円）

研究体制

（サブテーマ1）大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案  
(東京大学)

サブテマリーダー 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 片山 浩之

（サブテーマ2）新たな大腸菌の起源解析手法の提案（京都大学、高知大学（令和3年10月～））

サブテマリーダー 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター(令和3年10月より高知大学農林海洋科学部) 井原 賢

（サブテーマ3）清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析（山梨大学）

サブテマリーダー 山梨大学大学院総合研究部附属国際流域環境研究センター 原本 英司

研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 水質環境基準、衛生指標、大腸菌、微生物起源解析、リスク管理

### 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、我が国では大腸菌群が用いられてきたが、糞便汚染を明確に捉えていない状況が見られることから、令和4年4月に大腸菌数への見直しが行われた。ただし、その変更により基準超過地点が著しく減少するかは不透明である。申請者らのこれまでの研究において、大腸菌の遺伝子解析により、琵琶湖から検出される大腸菌の排出源（大半はヒト由来ではない）が分かっている（H28～30推進費）。水質環境基準を大腸菌へ変更するにあたり、人為活動由来と野生生物由来の大腸菌を判別する方法を開発することは非常に重要である。また、諸外国においては、リスクの視点を取り入れて水環境中の病原ウイルスのリスクを管理する考え方が導入されてきており、我が国でもウイルスのリスク管理を導入すべきと考えられる。大腸菌は水環境中でウイルスよりも死滅しや

すく、拡散挙動もノロウイルス等の腸管系ウイルスと異なる傾向を示すことが分かってきている（H28～30推進費）。このように、大腸菌はウイルスの指標としては限界があることが示唆されている。

## 2. 研究開発目的

本研究では、以下の2点を目的とする。

### (1) 環境基準に適用可能な大腸菌の汚染起源解析手法の開発

### (2) 病原ウイルスの新たなリスク管理手法の提案

目的 (2) 「病原ウイルスの新たなリスク管理手法の提案」に対してサブテーマ1、目的 (1) 「環境基準に適用可能な大腸菌の汚染起源解析手法の開発」に対してサブテーマ2および3を実施する。

## 1. 大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案

病原ウイルスのリスク管理手法を提案するための前提となる、水域における腸管系ウイルスの消長を実測する。東京湾において晴天時だけでなく雨天時の下水越流水発生後に大腸菌およびファージ等の指標微生物と腸管系ウイルスの消長を実測する。また、水環境中の微生物は不検出となることが多いが、そのようなデータを統計的にどう取り扱うべきか検討を行う。

## 2. 新たな大腸菌の起源解析方法の提案

現在、公共のデータベースには世界各地から膨大な数の由来が既知の大腸菌の全ゲノム配列データが登録されている。これらの配列を取得し、スーパーコンピュータを使い、ヒト、トリ、ウシ、ブタおよびそれ以外の動物を宿主とする大腸菌の遺伝子マーカーを提案する。琵琶湖で実態調査を行い、大腸菌の全ゲノム配列を次世代シーケンサーで解読し、提案する遺伝子マーカーの検証を行う。さらに、同じ水試料に対して、環境DNAの分析による生物種の同定も行うことで、大腸菌の宿主と疑われた動物の糞便が本当にその水を汚染していたのかを検証する。

## 3. 清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析

人為汚染源のない清流河川における大腸菌等の微生物の汚染実態について、野生動物が集うヌタ場が供給源となっている可能性に着目して調査を行う。大腸菌やバクテロイデス、大腸菌ファージ等の宿主特異的な微生物遺伝子マーカー検出系を適用することで、清流河川における糞便汚染源を明らかにする。また、自治体レベルで適用可能な手法として、大腸菌を培養して遺伝子マーカーを測定することによる糞便汚染源判別法を開発する。

## 3. 研究目標

|                |                                                                                                                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 全体目標           | 本研究の最終目標は、「環境基準に適用可能な大腸菌の汚染起源解析手法を開発するとともに、大腸菌だけでは管理できないウイルスについて、将来のリスク管理の導入に向けて管理手法を提案する。                                                            |
| サブテーマ1         | 大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案                                                                                                                     |
| サブテーマリーダー/所属機関 | 片山浩之／東京大学                                                                                                                                             |
| 目標             | ウイルスのリスク管理手法の提案に必要な水域での腸管ウイルスや指標候補微生物の存在実態や消長のパターンを明らかにし、測定手法や測定頻度、データの統計的取扱い方法を提案する。それらの成果を用いて、水中ウイルス濃度の推定の精度の向上を試み、当日の水浴等による感染リスクの推定を可能とすることを目的とする。 |

|                    |                                                                                |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| サブテーマ2             | 新たな大腸菌の起源解析方法の提案                                                               |
| サブテーマリーダー<br>/所属機関 | 井原賢／京都大学・高知大学                                                                  |
| 目標                 | 水環境から単離された大腸菌株のゲノム配列情報の取得と、公共のゲノムデータベースの情報を活用して新たなマーカーを探索し、大腸菌の新たな起源解析方法を提案する。 |

|                    |                                                                                                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| サブテーマ3             | 清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析                                                                                    |
| サブテーマリーダー<br>/所属機関 | 原本英司／山梨大学                                                                                                  |
| 目標                 | 大腸菌やバクテロイデス、大腸菌ファージ等の宿主特異的な遺伝子マーカーを利用した微生物起源解析手法の適用可能性を評価すると共に、微生物リスク管理の観点から、環境基準を超過する地点における水質管理の在り方を提案する。 |

#### 4. 研究開発内容

##### サブテーマ（1）大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案

ウイルスのリスク管理手法の提案に必要な水域として東京湾を対象とし、腸管ウイルスや指標の存在実態を明らかにした。また、データの統計的取扱いにより微生物濃度をよりよく推定する方法の提案を目的とした。大腸菌の迅速測定法の評価、F特異RNAファージの膜吸着培養RT-PCRによる遺伝型別検出法の開発、統計学に基づく病原微生物濃度推定法の開発を行った。

##### サブテーマ（2）新たな大腸菌の起源解析方法の提案

水環境での大腸菌実態調査に基づく負荷源の探索と大腸菌ゲノム配列に基づく起源の推定、下水（ヒト）由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発を目的とした。負荷源の探索については、琵琶湖南湖および琵琶湖周辺の下水処理場、河川での大腸菌と薬剤耐性菌の調査を実施し存在実態を把握した。下水（ヒト）由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発については、公共データベースから大腸菌ゲノム配列を入手し、ゲノムワイド関連解析を実施して、下水由来大腸菌のマーカー遺伝子を開発した。そして、下水由来の大腸菌と様々な動物糞便由来の大腸菌の下水由来大腸菌マーカー遺伝子の保有状況を調べた。

##### サブテーマ（3）清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析

河川上流域の清流等のAA類型の地点において大腸菌数の基準超過地点が生じた場合、大腸菌の起源を同定し、汚染負荷低減策を講じるような試みが求められる。人為汚染源のない清流河川における大腸菌等の微生物の汚染実態について、シカやイノシシ等の野生動物が泥浴びや飲水のために集まるヌタ場が供給源となっている可能性に着目して調査を行った。

#### 5. 研究成果

##### 5-1. 成果の概要

##### サブテーマ（1）大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案

病原ウイルスのリスク管理手法を提案するための前提となる、水域における腸管系ウイルスの消長を評価するため、Trap法の評価および大腸菌迅速測定法の評価を行った。Trap法は脱着速度が速いため、定量性が不十分であると判断された。大腸菌迅速測定により、雨天時越流水後の海域において大腸菌を検出できることが分かった。

東京湾において晴天時だけでなく雨天時の下水越流水発生後に大腸菌およびファージ等の指標微生物

物と腸管系ウイルスの消長を実測し、塩素消毒をされた簡易処理水が卓越する水域において、大腸菌が不検出でも感染性を有するファージが検出されたことから、ウイルスによる感染リスクがある可能性が示された。

他の微生物の濃度などから水中微生物どうしの濃度の関係性を推測するために、非検出の濃度を予測する方法論として、2種類のアプローチを採用した。一つは、ある微生物濃度が閾値以上か未満かの2値予測するアプローチで、もう一つは、濃度自体を補完するアプローチである。2値予測および濃度補間の両方のアプローチのために新たな機械学習アルゴリズムをそれぞれ開発した。実際の水質データセットを用いて性能評価実験を実施したところ、どちらのアルゴリズムも従来法より顕著に予測性能が向上することが分かった。

## サブテーマ (2) 新たな大腸菌の起源解析方法の提案

サブテーマ2では、水環境での大腸菌実態調査に基づく負荷源の探索と大腸菌ゲノム配列に基づく起源の推定、下水(ヒト)由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発を目的とした。負荷源の探索については、琵琶湖南湖および琵琶湖周辺の下水処理場、河川での大腸菌と薬剤耐性菌の調査を実施し存在実態を把握した。その結果、琵琶湖へ流入する24河川において、特に畜産が盛んな東近江方面、甲賀方面を流域に持つ河川ではテトラサイクリン耐性大腸菌数が多く確認され、畜産が盛んでない琵琶湖北部や東部を流域に持つほとんどの河川でテトラサイクリン耐性大腸菌は検出されないことが分かった。流域の畜産活動と河川中の薬剤耐性菌は関連している可能性が示唆された。また、河川や下水処理場の放流水では雨天時に大腸菌数が上昇することを明らかにした。点源負荷(小規模下水処理施設)、面源負荷(堆肥利用の畑地)が考えられた。

また、本サブテーマでは、微生物起源解析 (Microbial Source Tracking、MST) に使用可能な、下水由来大腸菌に特異的な新規遺伝子マーカーを探索した。まず、下水由来大腸菌のゲノム配列と、動物糞便由来大腸菌のゲノム配列をゲノムワイド関連解析 (Pan-GWAS) により比較することで、下水関連遺伝子マーカー候補(下水由来大腸菌に有意に多く検出される遺伝子)を144個特定した。その後、特定した遺伝子マーカー候補を対象として、感度・特異度に基づき遺伝子マーカーの絞り込みを行い、最終的にW\_nqrCとW\_clsA\_2という2つの下水由来大腸菌特異的遺伝子マーカーを特定した。本研究では、これら2つの遺伝子マーカーを検出するためのPCRプライマーも設計した。なお、これらの遺伝子マーカーを組み合わせ用いた場合の感度は約25%、特異度は約99%であることもわかった。これらの遺伝子マーカーは、コロニーを対象としたPCR (コロニーPCR) でも検出可能であることから、日常の水質検査で検出された大腸菌が下水由来かそうでないかを判別するために有用であると考えられる。

## サブテーマ (3) 清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析

シカやイノシシ等の野生動物が泥浴びのために集まる「ヌタ場」を対象に、大腸菌やMSTマーカー等の汚染実態を調査した。2020年8月～2022年12月の期間中、ヌタ場の土壌を91試料、土壌表層水を3試料、河川水を3地点から計18試料、湧水を8試料、シカ糞便を39試料、クマ糞便を1試料、計160試料を採取し、培養法とリアルタイムPCR法を用いた大腸菌の測定に加え、複数のウイルス、バクテロイデスおよびミトコンドリアDNAを対象としたMSTマーカー、細菌16S rRNAや環境DNAを測定することで、自動撮影カメラによる野生動物の活動状況を含めて、ヌタ場における微生物の汚染実態の全体像を明らかにした。

ヌタ場土壌試料からの大腸菌の検出率は53% (48/91) であり、夏季から初秋 (8～10月) には77% (36/47) の試料から検出され、他の季節 (27%、12/44) よりも高頻度であったことから、ヌタ場での野生動物による糞便汚染レベルは季節変動を示すことが分かった。ヌタ場土壌試料からのMSTマーカーの検出方法として、1%懸濁液よりも無希釈の試料を用いることが有効であることを明らかとし、その手法を用いることで、広く糞便汚染を示す指標であるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) に加え、ヒトバクテロイデスやクラスファージ、反芻動物バクテロイデス、ブタバクテロイデス、ブタミトコンドリアDNA等を検出することに成功した。MSTマーカーは大腸菌が検出されない試料からも検出されており、大腸菌とは挙動が

異なるものと考えられた。ヒト由来とされるMSTマーカーや環境DNAがヌタ場土壌試料から検出されたものの、自動撮影カメラの撮影状況等を踏まえ、ヒトとサル等の野生動物を判別できていないと推察された。

また、従来よりも短時間で大腸菌を測定可能な迅速培養法の開発に取り組み、コリラート-18粉末試薬を添加した試料100mLを6～8時間程度培養した後、リアルタイムPCR法で大腸菌マーカーを検出する手順を構築した。この手法を発展させ、サブテーマ（2）が開発した2種類の下水由来大腸菌マーカーを組み入れることで起源解析を可能にすることを検討したものの、培養操作で大腸菌と共に増殖する大腸菌群の中にも下水由来大腸菌マーカーを有するものが存在することが確認されたため、現時点では起源解析までを行うことは困難であると判断された。今後、大腸菌のみに特異的なマーカーを開発することで、下水のみならず、動物由来の大腸菌を対象とした迅速・高感度な起源解析法の構築につながることを期待される。

## 5-2. 環境政策等への貢献

### <行政等が既に活用した成果>

「水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件」（令和3年10月環境省告示第62号）及び「地下水の水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件」（令和3年10月環境省告示第63号）が公布された。

関連して、環境省の生活環境項目環境基準専門委員会が開催されており、その中で本研究が大きく取り上げられている。特に、自然環境保全の観点については、重要な情報として以下の議論があった。すなわち、AA類型の地点の多くは、従来の大腸菌群数では基準値を超過していたが、大腸菌数に切り替わることで超過率が低下することが期待される。一方で、大腸菌数に切り替わった後でも基準超過する地点が生じる可能性も否めず、大腸菌の起源を同定し、場合によっては自然環境保全がなされていると認めることもあり得るなどである。

また、環境省の生活環境項目環境基準等に係る意見交換会において、大腸菌が人為汚染であるかどうかの判断が重要事項として取り上げられている。本研究成果である大腸菌やMSTマーカー等の活用について知見を紹介し、可能な方策を示した。また、下水由来大腸菌に特異的な新規遺伝子マーカーの活用については、日常的なモニタリングにおいて得られる大腸菌コロニーをそのまま使えることから、有用な可能性を示しており、今後も引き続き議論されることとなっている。

### <行政等が活用することが見込まれる成果>

- 1) **起源特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発**：下水から単離した大腸菌の全ゲノム配列と、公共データベースに登録されているヒト以外の動物（牛、豚、鳥、げっ歯類等）糞便由来の大腸菌のゲノム配列を比較することで、下水（ヒト）由来の大腸菌に特異的な遺伝子マーカーを特定した。さらに、PCRでの測定系を開発し、様々な水試料から単離した大腸菌に適用することでその有用性を示した。今後、環境水の人為汚染を特定する際に有用なツールとなることが期待される。
- 2) **河川源流域の微生物・糞便汚染に及ぼす「ヌタ場」の影響**：上流に人為汚染源が存在しない河川源流域において定常的に大腸菌が検出される原因の一つとして、シカやイノシシ等の野生動物が泥浴びのために集まる「ヌタ場」が寄与している可能性がある。本研究により、ヌタ場の土壌では周辺土壌とは異なる微生物叢が形成されており、野生動物の活動期には土壌からの大腸菌の検出率が向上すると共に、動物由来の微生物遺伝子マーカーも多く検出されることが明らかとなった。これらの成果は、河川源流域における微生物・糞便汚染を評価する上でのヌタ場の重要性を示すものである。



- 3) **大腸菌の迅速培養法の開発**：測定に1日を要する従来の培養法よりも短時間（6～8時間程度）で大腸菌の測定結果を得ることができる培養リアルタイムPCR法を開発した。本研究で開発した下水由来大腸菌マーカーは大腸菌以外の大腸菌群も有しているものであったため、迅速培養法と組み合わせて使用することはできなかったものの、今後の研究で下水由来あるいはその他の汚染源由来の大腸菌のみに特異的なマーカーを開発することができれば、本手法に組み入れることで大腸菌の起源解析が可能となることが期待される。それにより、上流に人為汚染源が存在しないAA類型等の水域において基準値を超過するレベルで大腸菌が検出される場合に、現行の培養法では得ることのできない、大腸菌の起源に関する情報を提供することを可能とする。本手法は、自治体レベルでも十分導入可能になることが期待される。
- 4) **大腸菌では判定できないウイルスリスクの検知**：感染性を有するF特異大腸菌ファージの遺伝子型別定量法を開発した（膜吸着培養PCR法）。これにより、大腸菌による水浴リスクの監視に加え、より正確なリスクの把握が可能となった。
- 5) 統計学的に水中微生物同士の濃度の関係性を推測する手法を開発した。実際の水質データセットを用いて性能評価実験を実施したところ、どちらのアルゴリズムも従来法より顕著に予測性能が向上しており、水系感染リスクの判断の妥当性が向上することが期待される。

### 5-3. 研究目標の達成状況

| 全体目標                                                                                       | 目標の達成状況                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 本研究の最終目標は、「環境基準に適用可能な大腸菌の汚染起源解析手法を開発するとともに、大腸菌だけでは管理できないウイルスについて、将来のリスク管理の導入に向けて管理手法を提案する。 | <p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>感染性を有するファージを遺伝子型別に定量する方法をはじめ、ウイルスの感染リスクの管理に向けた評価法を確立できた。微生物遺伝子マーカー等の存在実態を明らかにし、大腸菌の測定のみでは得ることのできない情報を提供可能な微生物起源解析手法の有効性を示すことができた。当初予定より多くの大腸菌ゲノム配列をデータベースから取得し、当初の想定を前倒しして、下水（ヒト）由来大腸菌の遺伝子マーカーを2種類特定し、その有用性は従来のものより優れていることを示した。</p> |

| サブテーマ1目標                                                                                                                                                | 目標の達成状況                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ウイルスのリスク管理手法の提案に必要となる水域での腸管ウイルスや指標候補微生物の存在実態や消長のパターンを明らかにし、測定手法や測定頻度、データの統計的取扱い方法を提案する。それらの成果を用いて、水中ウイルス濃度の推定の精度の向上を試み、当日の水浴等による感染リスクの推定を可能とすることを目的とする。 | <p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>東京湾において、大腸菌のみではウイルスの感染リスクを正しく評価できていないことを示し、膜吸着培養PCR法により感染性を有するファージを遺伝子型別に定量できることを示した。また、統計学的に微生物の濃度推定する方法を開発した。これらにより、水中ウイルス濃度の推定の精度の向上が達成され、新たなリスク管理方法の基礎となる知見が得られた。以上より、研究目標が達成されたといえる。</p> |

| サブテーマ2 目標                                                                      | 目標の達成状況                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 水環境から単離された大腸菌株のゲノム配列情報の取得と、公共のゲノムデータベースの情報を活用して新たなマーカーを探索し、大腸菌の新たな起源解析方法を提案する。 | <p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>大腸菌、大腸菌群の実態調査は、当初の予定よりも高頻度、また、雨天時の調査も追加した。雨天時には河川中の大腸菌、薬剤耐性大腸菌が増加すること、さらに下水処理場からの処理不十分な排水の影響が大きいことを明らかにした。</p> <p>当初予定より多くの大腸菌ゲノム配列をデータベースから取得し、当初の想定を前倒して、下水（ヒト）由来大腸菌の遺伝子マーカーを2種類特定できた。下水由来、動物由来の大腸菌を多数単離し、下水由来大腸菌の遺伝子マーカーの有効性を確認できた。</p> <p>設定した目標「水環境での大腸菌実態調査に基づく負荷源の探索」と「下水由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発」を計画以上の成果を得て達成できた。</p> |

| サブテーマ3 目標                                                                                                  | 目標の達成状況                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 大腸菌やバクテロイデス、大腸菌ファージ等の宿主特異的な遺伝子マーカーを利用した微生物起源解析手法の適用可能性を評価すると共に、微生物リスク管理の観点から、環境基準を超過する地点における水質管理の在り方を提案する。 | <p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>3年間の研究期間中に山梨県小菅村のヌタ場を中心に当初予定以上となる160試料を採取し、これらの試料中における様々な微生物遺伝子マーカー等の存在実態を明らかにし、大腸菌の測定のみでは得ることのできない情報を提供可能な微生物起源解析手法の有効性を示すことができた。</p> <p>従来よりも短時間で大腸菌を測定可能な迅速培養法を開発し、サブテーマ2とも連携することで、下水由来大腸菌の判定への適用可能性を検討し、環境基準を超過する地点での水質管理に応用可能な知見を得た。</p> |

## 6. 研究成果の発表状況

### 6-1. 査読付き論文

#### <件数>

12件

#### <主な査読付き論文>

- 1) Inoue, K., Asami, T., Shibata, T., Furumai, H., Katayama, H.: Science of the Total Environment, 727, 138502. (2020) Spatial and temporal profiles of enteric viruses in

- the coastal waters of Tokyo Bay during and after a series of rainfall events (IF: 10.7)
- 2) 杉江由規、井原賢、馬綴宇、田中宏明：Environ. Sanit. Eng. Res., 35 (1), 29-35 (2021) 琵琶湖南東部の河川における大腸菌とその薬剤耐性の存在実態 (IF: なし)
  - 3) Akihiko Hata, Yuya Shirasaka, Masaru Ihara, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: Science of the Total Environment, 780, 146607 (2021). Spatial and temporal distributions of enteric viruses and indicators in a lake receiving municipal wastewater treatment plant discharge (IF: 10.7)
  - 4) 杉江由規、井原賢、馬綴宇、田中宏明：土木学会論文集G(環境)、76 (7)、III\_431-III\_440 (2020) 琵琶湖南東部の河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態と降雨の影響 (IF: なし)
  - 5) 山口武志、井原賢、山下尚之、林東範、田村太一、牧野樹生、田中宏明：土木学会論文集G(環境)、77(7)、III\_11-III\_20 (2021) 雨天時の桂川の衛生 微生物指標に与える合流式下水道の下水処理場の影響に関する実態調査 (IF: なし)
  - 6) Chih-Yu Ma, Masaru Ihara, Siyao Liu, Yoshinori Sugie, Hiroaki Tanaka: Environmental Advances, 8, 100185 (2022) Tracking the source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the aquatic environment in Shiga, Japan, through whole-genome sequencing (IF: 3.4)
  - 7) Ryota Gomi, Yasufumi Matsumura, Michio Tanaka, Masaru Ihara, Yoshinori Sugie, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 77, 1237-1246 (2022) Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in *Enterobacterales* isolated from surface waters in Japan (IF: 5.8)
  - 8) Chih-Yu Ma, Yoshinori Sugie, Zaizhi Yu, Yoshiki Okuno, Hiroaki Tanaka, Masaru Ihara: Chemosphere, 301, 134382 (2022) Occurrence of *E. coli* and antibiotic-resistant *E. coli* in the southern watershed of Lake Biwa, including in wastewater treatment plant effluent and inflow rivers (IF: 8.9)
  - 9) Ryota Gomi, Masaki Yamamoto, Michio Tanaka, Yasufumi Matsumura: Current Research in Microbial Sciences, 3, 100144 (2022) Chromosomal integration of bla CTX-M genes in diverse *Escherichia coli* isolates recovered from river water in Japan (IF: 8.1)
  - 10) Ryota Gomi, Eiji Haramoto, Hiroyuki Wada, Yoshinori Sugie, Chih-Yu Ma, Sunayana Raya, Bikash Malla, Fumitake Nishimura, Hiroaki Tanaka, Masaru Ihara: Science of the Total Environment, 864, 160952 (2023) Development of two microbial source tracking markers for detection of wastewater-associated *Escherichia coli* isolates (IF: 10.7)

## 6-2. 知的財産権

- 1) 原本英司、五味良太、井原賢「大腸菌由来の核酸増幅用プライマーキット及び大腸菌の存在を判定する方法」、特願2022-128358、令和4年8月10日出願

## 6-3. その他発表件数

|                  |     |
|------------------|-----|
| 査読付き論文に準ずる成果発表   | 0件  |
| その他誌上発表（査読なし）    | 0件  |
| 口頭発表（学会等）        | 21件 |
| 「国民との科学・技術対話」の実施 | 11件 |
| マスコミ等への公表・報道等    | 0件  |

|                |    |
|----------------|----|
| 本研究費の研究成果による受賞 | 4件 |
| その他の成果発表       | 0件 |

## 7. 国際共同研究等の状況

- 1) JSPS 二国間交流事業 「降雨影響下の沿岸域におけるウイルス感染リスク指標としてのFRNAファージの有効性」、2020年4月～2022年3月（予定）、ニュージーランド・Cawthron Instituteとの共同研究を実施中。コロナ禍の影響を受け、1年の延長を模索中。人為影響の多い東京湾と、畜産系の影響を多く受けるニュージーランドにおいて降雨後の水質変化の違いについて研究を実施した。

## 8. 研究者略歴

研究代表者

片山 浩之

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都市工学専攻教授

研究分担者

- 1) 佐野 大輔

東北大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、東北大学大学院工学研究科土木工学専攻教授

- 2) 加藤 毅

東北大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、群馬大学情報学部教授

- 3) 小熊 久美子

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都市工学専攻准教授

- 4) 春日 郁朗

東京大学大学院工学系研究科修了、博士（工学）、現在、東京大学先端科学技術研究センター准教授

- 5) 橋本 崇史

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附属水環境工学研究センター准教授

- 6) 井原 賢

総合研究大学院大学生命科学研究科修了、博士（理学）、現在、高知大学農林海洋科学部准教授

- 7) 西村 文武(令和3年4月1日～)

京都大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター准教授

- 8) 五味 良太

京都大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻助教

- 9) 朴キョンス

京都大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター博士研究員

- 10) 原本 英司

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附属国際流域環境研究センター教授

## 11) 八重樫 咲子

東北大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、山梨大学大学院総合研究部工学域土木環境工学系准教授

## 12) 瀬川 高弘

東京工業大学大学院生命理工学研究科修了、博士（理学）、現在、山梨大学総合分析実験センター講師

## 13) 松林 尚志

東京工業大学大学院生命理工学研究科修了、博士（理学）、現在、東京農業大学農学部生物資源開発学科教授

## Ⅱ．成果の詳細

### Ⅱ－１ 大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案

東京大学

大学院工学系研究科都市工学専攻 片山 浩之

東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 佐野 大輔

群馬大学情報学部 加藤 毅

東京大学

大学院工学系研究科都市工学専攻 小熊 久美子

先端科学技術研究センター 春日 郁朗

大学院工学系研究科附属水環境工学研究センター 橋本 崇史

#### 〔要旨〕

病原ウイルスのリスク管理手法を提案するための前提となる、水域における腸管系ウイルスの消長を評価するため、Trap法の評価および大腸菌迅速測定法の評価を行った。Trap法は脱着速度が速いため、定量性が不十分であると判断された。大腸菌迅速測定により、雨天時越流水後の海域において大腸菌を検出できることが分かった。

東京湾において晴天時だけでなく雨天時の下水越流水発生後に大腸菌およびファージ等の指標微生物と腸管系ウイルスの消長を実測し、塩素消毒をされた簡易処理水が卓越する水域において、大腸菌が不検出でも感染性を有するファージが検出されたことから、ウイルスによる感染リスクがある可能性が示された。

他の微生物の濃度等から水中微生物どうしの濃度の関係性を推測するために、非検出の濃度を予測する方法論として、2種類のアプローチを採用した。一つは、ある微生物濃度が閾値以上か未満かの2値予測するアプローチで、もう一つは、濃度自体を補完するアプローチである。2値予測および濃度補間の両方のアプローチのために新たな機械学習アルゴリズムをそれぞれ開発した。実際の水質データセットを用いて性能評価実験を実施したところ、どちらのアルゴリズムも従来法より顕著に予測性能が向上することが分かった。

#### 1. 研究開発目的

##### 大腸菌および腸管系ウイルスの濃度変動を考慮したリスク管理手法の提案

病原ウイルスのリスク管理手法を提案するための前提となる、水域における腸管系ウイルスの消長を実測する。東京湾において晴天時だけでなく雨天時の下水越流水発生後に大腸菌およびファージ等の指標微生物と腸管系ウイルスの消長を実測する。また、水環境中の微生物は不検出となることが多いが、そのようなデータを統計的にどう取り扱うべきか検討を行う。

#### 2. 研究目標

ウイルスのリスク管理手法の提案に必要となる水域での腸管ウイルスや指標候補微生物の存在実態や消長のパターンを明らかにし、測定手法や測定頻度、データの統計的取扱い方法を提案する。それらの成果を用いて、水中ウイルス濃度の推定の精度の向上を試み、当日の水浴等による感染リスクの推定を可能とすることを目的とする。

#### 3. 研究開発内容

##### 1) Trap法の定量性評価

親水空間としての東京湾が重要視されている。しかし、雨天時越流水（CS0）により水環境の基準を超えることが多々あり、安全な親水空間とはされておらず、遊泳が禁止されている。十分な衛生状況の

整っていない開発途上国において下水の混入により飲料水や環境水が汚染され、感染症が広まっていく事例もあるが、先進国においても同様の感染事例が見られている。環境中におけるウイルスの挙動解明はいまだ発展途上の研究分野である。

従来この感染症リスクは糞便性大腸菌群や大腸菌などの細菌指標を用いて管理されてきたが、実際に感染症を引き起こす病原体は細菌にとどまらずウイルス・原虫なども含む。細菌指標が必ずしもこれらの病原体の挙動を示すとは限らないと示されている中、ウイルスによる感染症リスク管理のためにウイルス指標が必要となっている。そこで着目されている指標候補の一つがF特異大腸菌RNAファージ (FRNAPH) である。

FRNAPHはF絨毛を持つ細菌 (*E. coli* K12 F+ A/λ など) に感染するバクテリオファージである。直径20～30nmの正二十面体構造をしており、エンベロープを持たない一本鎖RNAウイルスとして様々な腸管系ウイルスと形が似ていること、そして培養によって生死の判別が可能であることから水中のウイルスの指標として期待されている。遺伝型がGI-GIVの4種類があり、そのうちGIIとGIIIはヒト由来だと考えられている。

現在これらの病原微生物リスク管理にはGrab法を用いた採水が実施されている。しかし、ある代表時点の濃度しか定量できないという弱点がある。そこでTrap法を併用することで長時間にわたる微生物の濃度把握が可能になると考えられる。しかし、Trap法は通水した水量が把握できないことや吸着機構が不明であることから定量性は低いとされており、定量性の評価は今まで研究されてきていない。

この研究ではTrap法の定量性を探求する。ウイルスや素材ごとの吸着機構や特性などを踏まえて定量的な測定手法を開発する。その後には実際の水環境に適用し、従来のGrab法との比較を通じてCS0による水系感染症リスクの把握・管理について検討する。

今回の研究で求められる吸着材の条件としては以下の4つがあげられる。

①ウイルスの吸着が発生し、それを評価できる、②吸着速度が速い、③脱着速度が遅い、④想定される環境濃度において吸着飽和に至らない

特に③の脱着速度に関する条件については、脱着速度が遅いほど時間がたってもピークを保持し続けると考えられ、長時間にわたる微生物濃度の推定に重要な要素のひとつであると考えられる。

FRNAPHの吸着材への吸着特性を調べるため、以下の実験を行なった。1時間MS2添加人工海水に浸した吸着材を滅菌済み人工海水に移し (t=0とする)、濃度変動を観測した。槽内の無菌状態を保持するため、t = 60, 180, 240 [h] に新たな滅菌済み人工海水に取り換えた。

## 2) 大腸菌の迅速測定

大腸菌汚染は、雨天時の合流式下水道越流水 (CS0) の重要な指標である。CS0時の大腸菌は、大腸菌特有のβ-D-グルクロニダーゼ (GLUC) 活性に基づき、ColiMinder (VNM、オーストリア) を用いてモニタリングした。GLUCは、Chromocult Coliform Agar (Merck, Japan) 等の従来の培養法でも使用されている酵素である。ColiMinderは、コロニー形成に24時間かかる培養法に比べ、最大12サンプルを自動測定でき、1サンプルあたり洗浄工程を含めて30分しかかからないため、迅速かつハイスループットにデータを得ることができる。

大腸菌濃度 (Chromocult Coliform Agarで測定) が既知の下水道サンプル1本を100mM PBSで10倍に希釈し、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^2$  CFU/mLの範囲で標準曲線を作成した。大腸菌濃度 (CFU/mL) とGLUCレベル (Modified Fishman Unit (MFU)/100mL) の間の式を以下のように構築した。 ( $r^2 = 0.9999$ ) :

$$\text{GLUC活性 (MFU/100mL)} = 0.0054 \times \text{大腸菌 (CFU/100mL)} - 1.1228$$

サンプルは、2021年11月9日と11日の降雨時に東京湾岸で採取した。サンプリング地点は、神田川河口、墨田川河口、日の出栈橋、芝浦、目黒川河口、東京湾トンネル、お台場、レインボーブリッジ、晴海大橋である (図1.1)。大腸菌は、ChromoCult Agarを用いたプレートカウントと、ColiMinderの2つの方法で測定した。



図1.1 東京湾周辺サンプリングサイト

### 3) F特異RNAファージの膜吸着培養RT-PCRによる遺伝型別検出

FRNAPH は4つの遺伝型を持つRNAウイルスであり、それぞれ特性が異なるため、ウイルス汚染指標として利用するには、遺伝子型別に定量を行う必要がある。しかし、従来qPCR法では活性の有無が判別できず、従来のブラック法では遺伝型の判別が困難であった。そこで、活性のあるFRNAPHを遺伝子型別に検出するために開発されたものが培養RT-PCRであった。ただし、こちらは淡水試料に対して適用された手法であり、海水試料に対する適用例は少ないのが現状である。

培養RT-PCRを海水に適用した際には1Lや100mLの大容量試料においてFRNAPHを不活化させてしまい、培養できない事例が多くあった。そこで、本研究では、膜吸着培養RT-PCRと称した培養RT-PCRの変法を開発し、この手法を海水に対し最適化することで、実際の海水試料に適用することを目的とした。具体的には、まず人工海水を用いて作業効率の向上や適切なプローブの組み合わせの検討を行い、そこで得られた知見をもとに実際の海水に本手法を適用した。また、海水中でのその他のウイルス濃度と活性のあるFRNAPHの遺伝子型の濃度を比較することで水系感染症のリスク管理についても考察した。

海水試料を対象とすることから、陰電荷膜を用い、陽イオンや凝集剤を試料に添加することなく通水させることで膜上にFRNAPHを吸着させた。その後、膜を試験管に入れ、ホストを添加し一晩震盪培養を行った。ホストを培養直前に添加することで不活化することを防ぎ、震盪培養を行うことでFRNAPHが膜から効率よく脱着することを狙いとした。MPN法を適用することで定量値を得た。濃度の決定にはUSEPAのMPN calculatorを用いた。

東京湾試料に対して膜吸着培養RT-PCRと、作業の効率化の検討を行った。サンプリング日時および採水地点は以下の通りである。

2022年12月13日に東京で1日3.5mm程度の弱い降雨があった。また、2022年12月22日の未明から午前にかけて東京で20mm程度の降雨がありCS0が発生した。そこで降雨後1日(12月14日)と降雨時(12月22日)の午前11時ごろにサンプリングを行い、ウイルス濃度を測定した。採水地点は芝浦、目黒川河口、隅田川河口、レインボーブリッジの4地点で、それぞれの地点にて表層水を採取した。

### 4) 統計学に基づく病原微生物濃度推定法の開発

水環境における新興・再興微生物リスク管理のためには、可能な限り正確に水中微生物同士の濃度の



関係性を把握する必要がある。病原微生物には、サルモネラ菌、赤痢菌、大腸菌0157:H7等の細菌や、ノロウイルス、ロタウイルス等の腸管系ウイルスが含まれる。これらの病原微生物は、海水、河川、湖沼、地下水等の環境水を汚染し、度々水系感染症を引き起こしている。水中微生物同士の濃度の関係性を把握する必要性は、病原微生物の濃度の測定はいまだ簡便化されていないことから生じている。大腸菌に関して迅速に測定する機器の精度の評価が行われているが、その測定技術はすべての水中微生物に応用できるわけではない。本研究では、水環境におけるリスク管理として、他の微生物の濃度等から水中微生物同士の濃度の関係性を推測する方法論の開発を試みた。本研究の目標は、他の微生物の濃度等から水中微生物同士の濃度の関係性を推測するために、非検出の濃度を予測する方法論を開発することであった。

その方法論として、2種類のアプローチを採用した。一つは、ある微生物濃度が閾値以上か未満かの2値予測するアプローチで、もう一つは、濃度自体を補完するアプローチである。

## 2値予測するアプローチ

2値予測の方法としては、線形予測器が典型的な方法となる。線形予測器に高い汎化能力を持たせるには、十分な個数の訓練用例題が必要となる。しかし、応用によっては、十分な訓練用例題が得られない場合がしばしばあり、本研究で取り組むタスクも少ない例題数から推定することになる。訓練用例題の個数の不足による訓練精度の低下を抑制するアプローチとしては、事前知識の活用が有用である。幸い、本研究で取り組むタスクでは、多くの説明変数が目的変数と正の相関になるか、負の相関になるか、あらかじめ分かっている。正の相関があるとわかっている場合、対応する回帰係数も正になるのが理想的である。負の相関があるとわかっている場合、対応する回帰係数は負になるべきである。しかし、訓練用例題が十分ではなく、相関が弱い場合は、対応する回帰係数は、既知の相関の符号と逆の符号に学習されてしまうことがしばしばおこり、その結果、その回帰係数が正しい予測を妨げてしまう。

本研究では、一部の説明変数と目的変数との真の相関の符号があらかじめわかっているときに、そのドメイン知識をサポートベクトルマシンの学習に組み込むことができる、新しい学習アルゴリズムを開発した。サポートベクトルマシン学習とは、ソフトヒンジ損失に基づく正則化経験リスクを最小にする回帰係数を見つけることである。従来のサポートベクトルマシン学習のアルゴリズムとしては、ペガサス法がよく知られている。ペガサス法は主問題を勾配降下法で解く方法である。このアルゴリズムは、最適値に劣線形収束することが示されている。すなわち、正則化経験リスクの値とその最小値との差が $\epsilon$ 以下になるまでに必要な反復数は $\epsilon$ の逆数のオーダーであることが理論的に保証されている。また、各反復の計算量は、訓練用例題数と説明変数の次元数の積にオーダーでおさまる。よって、ペガサス法は、理論的にも実用的にも使用しやすい最適化アルゴリズムとなっていた。

本研究では、正則化経験リスクを符号制約の下で最小化するアルゴリズムを開発した。正則化経験リスクを符号制約の下で最小化するためには、ペガサス法をベースにするアプローチを考えることができる。それは、従来のペガサス法の各反復において、実行可能領域への射影を行うステップを挿入したのになっている。これは、最適化分野でいう射影勾配法的一种になる。射影ステップの計算量も説明変数の次元数のオーダーとなるので、結局各反復の計算量は訓練用例題数と説明変数の次元数の積にオーダーを維持する。さらに、射影ステップを挿入しても、最適値に劣線形収束することを証明することができる。しかし、このアプローチは従来のペガサス法と同じ短所を抱えている。それは、反復中に得られる解が十分最適解に近くなったか判断できないことである。正則化経験リスクの正確な最小値は最後まで分からないので、最小値との差も測定することは困難となる。

本研究では、最適値への劣線形収束が保証されており、かつ、反復中に得られる解が十分最適解に近く達したことが保証される停止条件を利用できる新しい学習アルゴリズムを開発した。本研究で開発した最適化アルゴリズムは、サポートベクトルマシン学習の主問題を符号制約の下で直接解くのではなく、双対問題を解く方法である。双対問題を解くために、フランクウルフ法を採用し、その枠組みの下で開発した。これによって、新たに開発した最適化アルゴリズムでも、フランクウルフ法で保証される劣線形収束の性質を継承する。また、フランクウルフ法は、ステップサイズのような最適化のために調整が

必要なパラメータを持たないことから、情報科学的知識がなくても簡単に使用できるアルゴリズムとなるため、水質工学への応用に適している。

反復数を低く抑える理論保証があったとしても、各反復の計算が重ければ実用的なアルゴリズムにならない。フランクウルフ法の各反復は、方向探索ステップと線探索ステップの2ステップからなる。本稿におけるもっとも大きな発見は次の2点からなる：

(a) 符号制約の下でサポートベクトルマシン学習問題の双対問題を解くフランクウルフ法において、方向探索ステップの計算量は、訓練用例題数と説明変量の次元数の積にオーダーに抑えられる。

(b) 線探索ステップの計算量も訓練用例題数と説明変量の次元数の積にオーダーに抑えられる。

よって、フランクウルフ法の各反復は例題数と説明変量の次元数の積にオーダーで計算可能であることが理論的に保証される。つまり、本研究で開発した最適化アルゴリズムは、ペガサス法に基づく射影勾配法と等しいオーダーの計算量と反復数で最適解に収束させることができる。加えて、明確な停止条件を持つアルゴリズムになっているため、停止条件が不明確という射影勾配法の短所も克服された。

#### 濃度を補完するアプローチ

非検出の水中微生物濃度を直接予測する方法として、トビットモデルを考えることができる。トビットモデルは、従属変量と説明変量からなる打ち切りデータを解析するための線形回帰法の拡張として知られている。トビットモデルにおいて打ち切りが許されるのは従属変量のみであり、トビットモデルのフィッティングには、すべての説明変量の値が与えられる必要があった。しかし、病原体濃度の関係性を解析するためには、微生物学的水質データに複数の打ち切り変量が含まれることが多い。これらのデータを補完するためには、打ち切られた病原体濃度の変量ごとに従属変量を変え、トビットモデルを繰り返し適用する方法が考えられる。しかし、このアプローチを使うには、説明変量に用いられる病原体濃度が、たとえ打ち切られたとしても、何らかの値で埋めてから適用しなければならない。このアプローチは折衷的であり、複数の打ち切られた病原体濃度の推定には最適とはいえない。したがって、より洗練されたアプローチを確立する必要がある。

本研究では、従来のトビットモデルを拡張し、従属変量を多重化することによって、複数の打ち切り変量を同時扱えるようにした。この拡張モデルを複数ターゲットトビットモデルと呼ぶ。本研究では、トビットモデルの対数尤度関数の一部の項がカルバックライブラ距離の最小値で表されることを発見し、この発見を活用して、等価で拡張可能な尤度関数に再定式化した。本研究で開発したトビットモデルの拡張は、複数の対数尤度関数を重ね合わせるによって実現した。再定式化された目的関数の最大化にブロック座標上昇法を用いた場合、各ステップは閉じた形式で表すことができ、それゆえに、数値的安定性が保証されたアルゴリズムとなった。この性質は、トビットモデルは様々な拡張がなされてきたがそれらの方法とは対照的である。これまでの多変量化を試みたトビットモデルの拡張はいずれも多重積分が必要であった。本研究で開発した複数ターゲットトビットモデルは、数値積分が必要なく、シンプルな更新則であるゆえに、メンテナンスが容易である。また、モデルフィッティングに必要な調整すべきパラメータが一切ない。このような性質は、ブラックボックスとしてアルゴリズムを適用せざるを得ない場合においても、安定して運用できるため、水質工学における好ましい有用性を保持することになる。

## 4. 結果及び考察

### 1) Trap法の定量性評価

結果は以下図1.2に示す。最初の60分で急激に吸着量が減り、無菌状態に移してから8時間後にはほとんど不検出となってしまった。ピーク発生から8時間以内に吸着材を取り出さなければピークがあったことは類推不可能である。これは、Trap法の長所であるはずの採水時点の時間依存性の低さとは合わなくなってしまう、現状の手法では環境適用に適さない。

今回の実験は、自然環境中よりも激しい濃度変動を意図的に生じさせた。実環境に近い緩やかな減少条件であれば異なる傾向がみられる可能性がある。しかし、このような急変化にもほぼ即時的に濃度変

動の影響を受けてきたため、より緩やかな濃度変化ではなおさら周囲の濃度と平衡を保ちながら減少することが予想される。

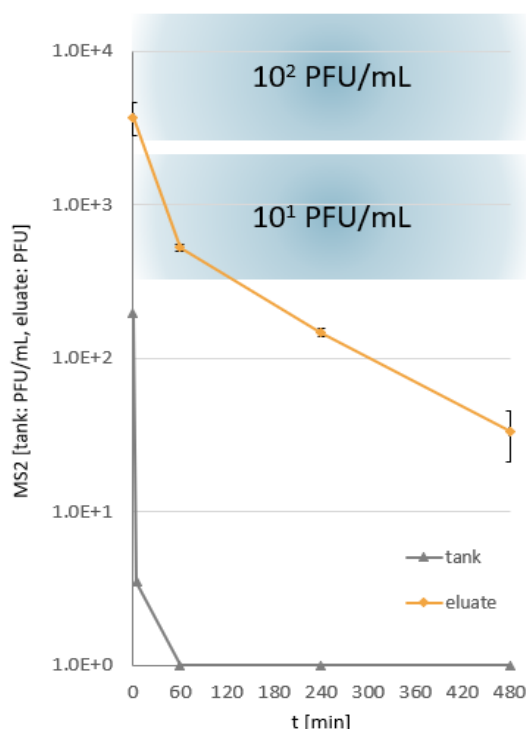


図 1.2 MS2 吸着量 (PFU) と MS2 濃度 (PFU/mL) の経時変化

今回開発した手法は実環境への適用において適している部分と今後工夫が必要な部分があると判明した。上記に述べた4条件のうち、脱着速度が速いことが明らかになった。60分以内に吸着量が激減し、8時間後にはほぼ検出されなくなってしまう。

脱着速度への対応法としては吸着材の形状・密度を変えることが考えられる。また、吸着量は吸着材の質量に比例するため、実環境中に投入する吸着材を現在実験で使っているものよりも大きくすれば、飽和吸着量が増加し、より高い濃度まで観測できると考えられる。

このように、Trap法を展開しても従来のGrab法サンプル以上の情報は得られない。Trap法としての情報の価値を生み出すためには、脱着時間が遅くなるような工夫が必要である。今回は吸着材の質量も大きさも小さく、密度も低いため溶液が通水しやすい状況となっている。質量や密度を変えることで中の溶液を出づらくすることや、表面処理を行い誘出まで脱着しづらくする等の方策が検討される。

## 2) 大腸菌の迅速測定

各サンプルにおけるGLUCのレベルを図1.3に示す。大腸菌濃度が最も高かったのは、雨の日（2021年11月9日）の神田と目黒であった。11月11日には、神田と目黒で濃度が低下し、晴海、レインボーブリッジ、お台場、東京トンネルで濃度が上昇し、大腸菌が水流に沿って河川から湾岸部へ分布していることがわかった。

培養法とColiMinderで得られた大腸菌濃度を図1.4で比較した。ほとんどのサンプルで、2つの方法は一貫した結果を示した。しかし、2021年11月9日の芝浦と日の出からのサンプルでは、ColiMinderよりも低い培養結果が観察された。培養結果とGLUCに基づく結果の差は、これら2つのサンプルの大腸菌が生存しているが培養できない可能性を示唆しており、下水が雨水と一緒に排出される前に消毒が行われた可能性がある。したがって、ColiMinderは迅速な結果を提供するだけでなく、培養法と組み合わせることで、大腸菌の生存状態を示唆できる可能性がある。

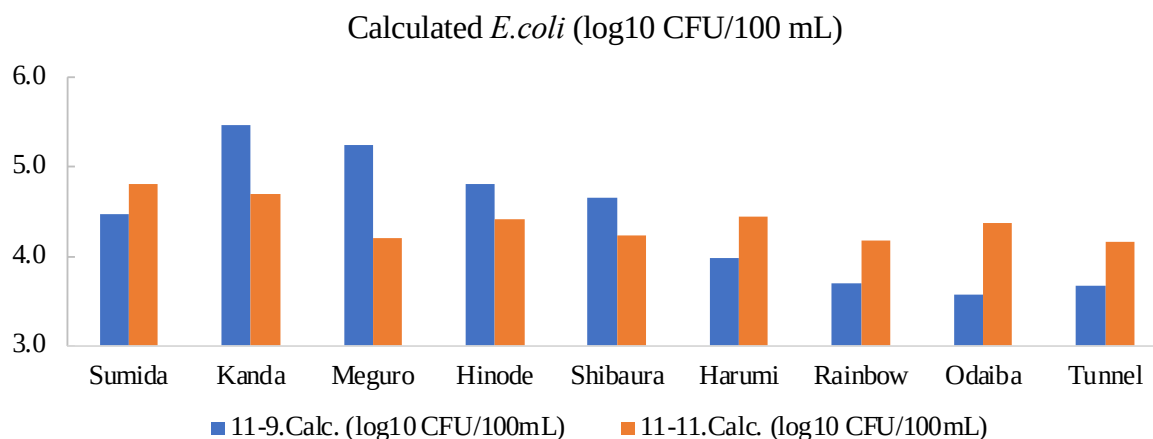


図1.3 ColiMinderで得られたGLUCの結果から算出した大腸菌濃度

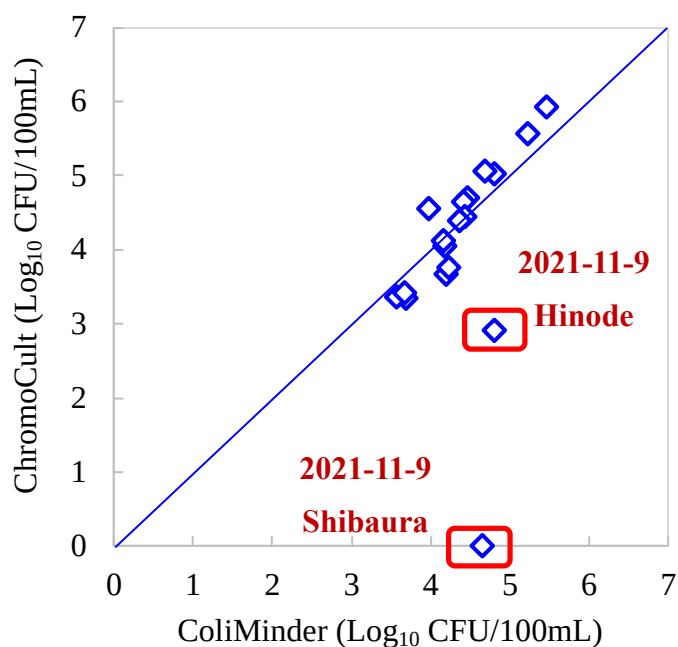


図1.4 培養大腸菌濃度 (CFU/100 mL) とColiMinderで得られたGLUC活性から算出した濃度との相関

### 3) F特異RNAファージの膜吸着培養RT-PCRによる遺伝型別検出

表1.1および1.2に結果を示す。FRNAPHが検出されたほとんどの試料で低い希釈段階(1Lや100mL)における陽性本数が多くなっており、適切にMPN法が適用できていると言える。この点はこの膜吸着培養RT-PCRで大きく改善された。

これは、膜を浸した培養液を震盪培養することで膜に吸着したFRNAPHがきちんと脱着し、ホストに感染できていることが理由として考えられる他、従来の培養RT-PCRは膜に通水する前の試料にホストを添加するのに対し、本実験の膜吸着培養RT-PCRは試料を膜に通水し、その膜を培養液に浸した後にホストを添加しているためホストが不活化せず、多くのホストに感染することができたこと、サンプルに凝集剤を加えていないことなどが原因として考えられる。

表1.1 12/14 膜吸着培養RT-PCR結果

| 採水地点  | Volume | GI       |           | GII      |           | GIII     |           |
|-------|--------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
|       |        | Positive | MPN/100mL | Positive | MPN/100mL | Positive | MPN/100mL |
| 芝浦    | 1mL    | 1        | 46.0      | 1        | 46.0      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
| 目黒川   | 1mL    | 2        | 0.61      | 2        | 2.67      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 2        |           | 1        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 2        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 2        |           | 3        |           | 0        |           |
| 隅田川   | 1mL    | 1        | 0.75      | 1        | 2.04      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 1        |           | 1        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 2        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
| レインボー | 1mL    | 0        | 3.16      | 0        | 0.28      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 0        |           | 0        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 2        |           | 0        |           |

表1.2 12/22 膜吸着培養RT-PCR結果

| 採水地点  | Volume | GI       |           | GII      |           | GIII     |           |
|-------|--------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
|       |        | Positive | MPN/100mL | Positive | MPN/100mL | Positive | MPN/100mL |
| 芝浦    | 1mL    | 0        | 9.27      | 0        | 0.44      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 2        |           | 2        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 2        |           | 0        |           |
| 目黒川   | 1mL    | 1        | 46.0      | 1        | 0.61      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 2        |           | 0        |           |
| 隅田川   | 1mL    | 1        | 46.0      | 1        | 46.0      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 3        |           | 0        |           |
| レインボー | 1mL    | 0        | 2.10      | 0        | 2.10      | 0        | 0         |
|       | 10mL   | 2        |           | 2        |           | 0        |           |
|       | 100mL  | 2        |           | 2        |           | 0        |           |
|       | 1L     | 3        |           | 3        |           | 0        |           |

また、東京湾の試料に対して水系感染ウイルスや指標微生物である大腸菌等の濃度を測定した。その結果を表1.3に示す。なお、ウイルスは通常のPCRで測定しているため、感染性のあるもののみを検出しているFRNAPHと単純に比較できないことに注意する。

結果としては芝浦、目黒川河口、隅田川河口、レインボーブリッジの全ての地点で腸関係ウイルスや指標ウイルス、大腸菌の存在が確認できた。特に、PMMoVは環境水中に非常に高濃度で安定して存在しており、Inoue et al. (2020)と同様の結果となった。

表1.3 水系感染ウイルスや指標微生物の濃度

| 採水地点 | Target       | 単位       | 12/14(弱雨後1日)       | 12/22(雨天時)         | 採水地点  | Target       | 単位       | 12/14(弱雨後1日)       | 12/22(雨天時)         |
|------|--------------|----------|--------------------|--------------------|-------|--------------|----------|--------------------|--------------------|
| 芝浦   | NoV G I      | copies/L | 0                  | 0                  | 隅田川   | NoV G I      | copies/L | $1.8 \times 10$    | $1.9 \times 10$    |
|      | NoV G II     | copies/L | $8.18 \times 10^3$ | $4.78 \times 10^3$ |       | NoV G II     | copies/L | $9.82 \times 10^3$ | $2.11 \times 10^4$ |
|      | Aichi V      | copies/L | $3.47 \times 10^2$ | $3.05 \times 10^2$ |       | Aichi V      | copies/L | $3.31 \times 10^2$ | $2.64 \times 10^2$ |
|      | PMMoV        | copies/L | $9.06 \times 10^8$ | $3.46 \times 10^8$ |       | PMMoV        | copies/L | $2.53 \times 10^8$ | $3.29 \times 10^8$ |
|      | FRNAPH G I   | MPN/L    | $4.60 \times 10^2$ | $9.27 \times 10$   |       | FRNAPH G I   | MPN/L    | 7.45               | $4.60 \times 10^2$ |
|      | FRNAPH G II  | MPN/L    | $4.60 \times 10^2$ | <b>4.37</b>        |       | FRNAPH G II  | MPN/L    | $2.04 \times 10$   | $4.60 \times 10^2$ |
|      | FRNAPH G III | MPN/L    | 0                  | 0                  |       | FRNAPH G III | MPN/L    | 0                  | 0                  |
|      | 大腸菌数         | CFU/L    | -                  | <b>0</b>           |       | 大腸菌数         | CFU/L    | -                  | $1.05 \times 10^4$ |
|      | 大腸菌群数        | CFU/L    | -                  | $5.00 \times 10^3$ |       | 大腸菌群数        | CFU/L    | -                  | $2.10 \times 10^4$ |
| 目黒川  | NoV G I      | copies/L | $2.30 \times 10$   | $1.60 \times 10$   | レインボー | NoV G I      | copies/L | 0                  | 0                  |
|      | NoV G II     | copies/L | $1.58 \times 10^4$ | $1.47 \times 10^4$ |       | NoV G II     | copies/L | $3.11 \times 10^3$ | $5.09 \times 10^3$ |
|      | Aichi V      | copies/L | $3.56 \times 10^2$ | $4.14 \times 10^2$ |       | Aichi V      | copies/L | $1.54 \times 10^2$ | $3.32 \times 10^2$ |
|      | PMMoV        | copies/L | $8.61 \times 10^8$ | $8.61 \times 10^8$ |       | PMMoV        | copies/L | $2.11 \times 10^8$ | $2.59 \times 10^8$ |
|      | FRNAPH G I   | MPN/L    | 6.06               | $4.60 \times 10^2$ |       | FRNAPH G I   | MPN/L    | $3.16 \times 10$   | $2.10 \times 10$   |
|      | FRNAPH G II  | MPN/L    | $2.67 \times 10$   | 6.01               |       | FRNAPH G II  | MPN/L    | 2.84               | $2.10 \times 10$   |
|      | FRNAPH G III | MPN/L    | 0                  | 0                  |       | FRNAPH G III | MPN/L    | 0                  | 0                  |
|      | 大腸菌数         | CFU/L    | -                  | $8.50 \times 10^3$ |       | 大腸菌数         | CFU/L    | -                  | $1.00 \times 10^3$ |
|      | 大腸菌群数        | CFU/L    | -                  | $2.90 \times 10^4$ |       | 大腸菌群数        | CFU/L    | -                  | $3.00 \times 10^3$ |

大腸菌はNoV G I やNoV G II と比較的強い相関を示しており、指標として優れているように見える。しかし、12月22日の芝浦のサンプルにおいては、大腸菌が検出されなかった。これは、大腸菌の塩素耐性が低く簡易処理の塩素によって不活化されていることが原因であると考えられる。

一方で、活性のあるFRNAPH G I , G II は検出されたほか、病原ウイルスであるNoV G II も検出された。

このように、大腸菌は塩素で不活化されやすいため、芝浦など塩素による簡易処理水が流れている地点では病原性ウイルスが存在するにもかかわらず、大腸菌が不活化されていて検出されないという可能性がある。今回の結果から、そのような大腸菌の指標性の弱さを、活性のあるFRNAPH G I , G II を検出することで補完できる可能性が示唆された。

#### 4) 統計学に基づく病原微生物濃度推定法の開発

##### 2値予測の結果

本研究で開発した符号制約学習の効果を確かめるため、実際の水質データを用いて数値実験を行った。水質データは、分担者佐野が2012年1月から2013年4月までの期間でサンプリングによって得たものである。サンプリングは、札幌市内の豊平川、厚別川、野幌川、望月寒川の4地点で1か月に2回の頻度で行われた。サンプリングによって大腸菌濃度、水温、pH、EC、DO、SS、BOD、TN、TP、流量を得た。それらの水質データの測定は、American Public Health Association が定めた Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater、21st edition に基づいている。このサンプリングによって177レコードからなるデータセットを得た。この大腸菌の濃度をそのほかの病原体微生物の濃度に見立てて数値実験を行った。最適化アルゴリズムの停止条件には0.001を用いた。96レコードのうち、無作為に選んだデータを訓練用とし選択し、残りを評価用とした。このように排他的に選んだ訓練用サブセットと評価用サブセットの組み合わせを50個生成し、それぞれで予測正解率とPRBEPを算出した。どちらの比較指標も1に近いほど予測性能が高いこと示している。予測正解率はサポートベクトルマシンから得られる予測スコアが0より大きかった場合を陽性、0以下だった場合を陰性として予測して、分子を真陽性と真陰性の和、分母を評価用例題数として求められるもので、最もわかりやすい評価指標ではあるが、正例と負例のバランスが悪いときなどは特に、必ずしも予測性能を評価できていない等の批判もある。PRBEPは Precision Recall Break Even Point の略であり、予測正解率の欠点を補うことができる性能指標である。予測スコアの閾値を動かして得られる Precision-Recall 曲線において、PrecisionとRecallが等しくなる点を特定することによって算出できる。

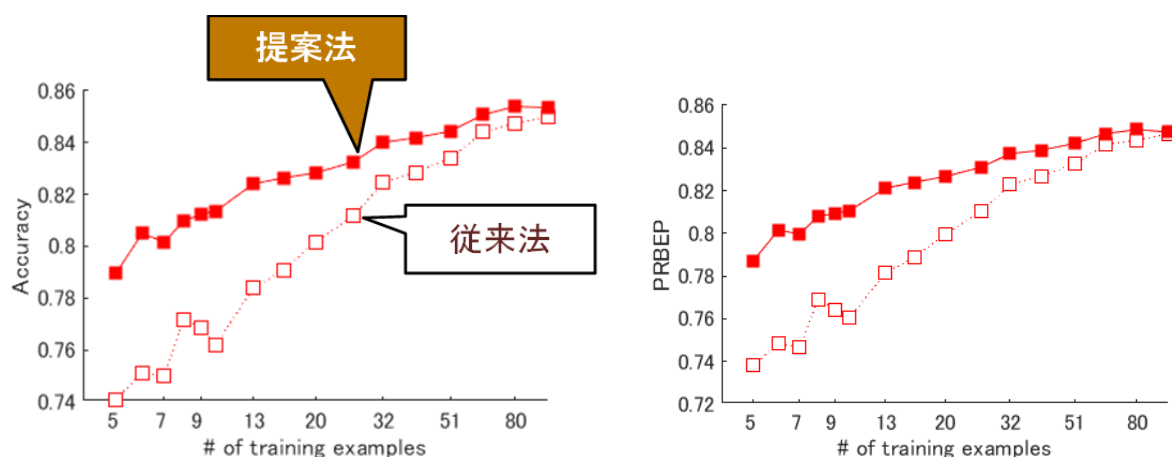


図1.5 2値予測における従来法と提案法の性能比較(左パネル：正解率による比較、右パネル：PRBEPによる比較)

図1.5に、訓練用例題数を変えたときの正解率とPRBEPの平均をプロットした。提案法が符号制約の下で学習したサポートベクトルマシン、従来法が従来のサポートベクトルマシンを表す。いずれの訓練用例題数の場合も、予測正解率・PRBEPともに、符号制約による性能向上が観察された。訓練用例題数が小さいときに符号制約による性能向上が特に大きかった。訓練用例題数が大きくなると性能の差は縮まっていくが、一貫して予測性能が向上することがわかった。水質工学分野においては、測定に費用と労力がかかるため、データ数を大きくできないことが多々ある。本研究で開発した機械学習アルゴリズムを用いれば、訓練用例題が少ないことにより予測性能が悪化する影響を緩和することができることが分かった。

#### 濃度補間の結果

従来のトビットモデルは、単一の病原微生物濃度しか補完できなかったのに対し、本研究で開発した複数ターゲットトビットモデルは複数の病原微生物濃度を同時に補完することができる。複数濃度同時補間の効果を確認するため、数値実験を行った。実験には、4個の水質データセットIndian、NY Top、NY Bottom、Sapporoを用いた。Indianはインドの河川から採取された1,591個の標本が含まれている。水質変量は、糞便性大腸菌群濃度、大腸菌群濃度、DO、BOD、pH、Cond、Nitroである。NY TopおよびNY Bottomは、ニューヨーク港とその近郊の河川から採取されたものである。また、NY TopおよびNY Bottomの測定値は、それぞれ、表層水、底層水からのものである。これら2個のデータセットには、それぞれ534個、523個の標本が含まれている。両方のデータセットにおいて、水質変量は、糞便性大腸菌群濃度、大腸菌群濃度、BOD、WMDO、pH、Cond、水温である。最後のデータセットSapporoは2値予測で用いたものと同じである。これら4個のデータセットの水質測定値はすべて指標として用いられているもので、打ち切られることはほとんどない。これらを実際に病原体濃度としてシミュレーションするために、Indian、NY Top、NY Bottomの最初の4変量、Sapporoは最初の5変量について、人工的に陰性率を設定した。標本サイズは100とした。無作為に選んだ各標本について、陰性率があらかじめ設定した値と一致するように、定量限界値を導入した。この手順を50回繰り返し、得られた50回の補完結果から、推定誤差を算出した。

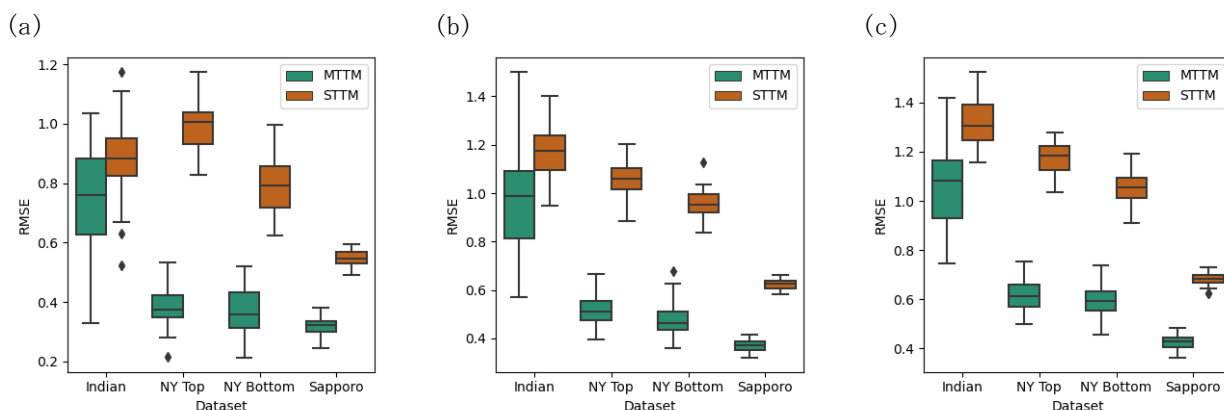


図1.6 濃度補間における従来法と提案法の性能比較 ((a) 陰性率10%の場合、(b) 陰性率20%の場合、(c) 陰性率30%の場合、MTTMは複数ターゲットトビットモデル、STTMは従来のトビットモデルを表す)

図1.6は、複数ターゲットトビットモデル、および従来のトビットモデルで得られた50個の平均二乗誤差の平方根(RMSE)の箱ひげ図である。パネル(a)、(b)、(c)は、陰性率をそれぞれ、10%、20%、30%と設定した場合をプロットしたものである。いずれの場合においても、複数ターゲットトビットモデルは従来のトビットモデルと比較して、RMSEの値が大幅に小さくなっている。このことは、複数の病原体濃度を別々に補完するよりも同時に補完する方が高精度であることを示唆している。

## 5. 研究目標の達成状況

大腸菌のみではウイルスの感染リスクを正しく評価できていないことを示し、膜吸着培養PCR法により感染性を有するファージを遺伝子型別に定量できることを示した。また、統計学的に微生物の濃度推定する方法を開発した。これらにより、水中ウイルス濃度の推定の精度の向上が達成され、あらたなリスク管理方法の基礎となる知見が得られた。以上より、研究目標が達成されたといえる。

## 6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。



## Ⅱ－２ 新たな大腸菌の起源解析方法の提案

高知大学

農林海洋科学部農林資源環境科学科 井原 賢

京都大学

大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 西村 文武

大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 朴 キョンス

大学院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(令和2年度)

大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 馬 緻宇(令和2年度)

大学院工学研究科都市環境工学専攻 五味 良太

### 【要旨】

サブテーマ2では、水環境での大腸菌実態調査に基づく負荷源の探索と大腸菌ゲノム配列に基づく起源の推定、下水(ヒト)由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発を目的とした。負荷源の探索については、琵琶湖南湖および琵琶湖周辺の下水処理場、河川での大腸菌と薬剤耐性菌の調査を実施し存在実態を把握した。その結果、琵琶湖へ流入する24河川において、特に畜産が盛んな東近江方面、甲賀方面を流域に持つ河川ではテトラサイクリン耐性大腸菌数が多く確認され、畜産が盛んでない琵琶湖北部や東部を流域に持つほとんどの河川でテトラサイクリン耐性大腸菌は検出されないことが分かった。流域の畜産活動と河川中の薬剤耐性菌は関連している可能性が示唆された。また、河川や下水処理場の放流水では雨天時に大腸菌数が上昇することを明らかにした。点源負荷(小規模下水処理施設)、面源負荷(堆肥利用の畑地)が考えられた。

また、本サブテーマでは、微生物起源解析(Microbial Source Tracking、MST)に使用可能な、下水由来大腸菌に特異的な新規遺伝子マーカーを探索した。まず、下水由来大腸菌のゲノム配列と、動物糞便由来大腸菌のゲノム配列をゲノムワイド関連解析(Pan-GWAS)により比較することで、下水関連遺伝子マーカー候補(下水由来大腸菌に有意に多く検出される遺伝子)を144個特定した。その後、特定した遺伝子マーカー候補を対象として、感度・特異度に基づき遺伝子マーカーの絞り込みを行い、最終的にW\_nqrCとW\_clsA\_2という2つの下水由来大腸菌特異的遺伝子マーカーを特定した。本研究では、これら2つの遺伝子マーカーを検出するためのPCRプライマーも設計した。なお、これらの遺伝子マーカーを組み合わせ用いた場合の感度は約25%、特異度は約99%であることもわかった。これらの遺伝子マーカーは、コロニーを対象としたPCR(コロニーPCR)でも検出可能であることから、日常の水質検査で検出された大腸菌が下水由来かそうでないかを判別するために有用であると考えられる。

### 1. 研究開発目的

環境基準に適用可能な大腸菌の汚染起源解析手法を開発することを目的とする。

### 2. 研究目標

水環境から単離された大腸菌株のゲノム配列情報の取得と、公共のゲノムデータベースの情報を活用して新たなマーカーを探索し、大腸菌の新たな起源解析方法を提案する。

### 3. 研究開発内容

サブテーマ2では、水環境での大腸菌実態調査に基づく負荷源の探索と大腸菌ゲノム配列に基づく起源の推定、下水(ヒト)由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発を目的とした。負荷源の探索については、琵琶湖南湖および琵琶湖周辺の下水処理場、河川での大腸菌と薬剤耐性菌の調査を実施し存在実態を把握した。その結果、河川や下水処理場の放流水では雨天時に大腸菌数が上昇することを明らかにした。また、下水(ヒト)由来特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発については、公共データベースから大腸菌ゲノム配列を入手し、ゲノムワイド関連解析を実施して、下水由来大腸菌のマーカー遺伝子を

開発した。そして、下水由来の大腸菌と様々な動物糞便由来の大腸菌の下水由来大腸菌マーカー遺伝子の保有状況を調べた。その結果、開発したマーカー遺伝子は動物由来大腸菌に比べて下水由来大腸菌で有意に多く検出されることが分かった。

### 1) 琵琶湖周辺河川での大腸菌/薬剤耐性大腸菌の調査

琵琶湖定期調査では、2020年7月から2021年11月にかけて、琵琶湖南湖で採水した。採水地点は南から粟津沖中央、浜大津沖中央、三保ヶ崎沖、柳ヶ崎沖、柳ヶ崎沖中央、唐崎沖、大宮川沖、雄琴沖、雄琴沖中央、堅田沖、木ノ浜沖である。期間中、計12回の採水を行った。

琵琶湖へ流入する河川中の大腸菌、薬剤耐性大腸菌の実態を調査した。2020年11月から2021年10月にかけて、琵琶湖に流入する22の河川と唯一の琵琶湖からの流出河川である瀬田川で採水した。調査対象の河川は瀬田川、雄琴川、真野川、和邇川、鴨川、安曇川、知内川、石田川、天野川、大川、大浦川、余呉川、姉川、芹川、犬上川、宇曽川、愛知川、日野川、野洲川、葉山川、草津川、十禅寺川、狼川である。十禅寺川においては計1回、それ以外の地点では計5回の採水を行った。

大腸菌および薬剤耐性大腸菌の測定方法を以下に記す。50～500mLの河川水を直径47mm、孔径0.45μmのMF-ミリポア（Merck Millipore）を用いて吸引ろ過した。ろ過後のメンブレンフィルターをシャーレに設置しXM-G寒天培地を用いて培養を行った。薬剤耐性大腸菌の培地にはそれぞれ薬剤を添加したものをを用いた。アンピシリンの場合は最終濃度が32μg/mL、テトラサイクリンの場合は最終濃度が16μg/mLになるように薬剤を培地に添加した。これらの濃度は大腸菌の各薬剤に対する耐性の有無を判別するためにアメリカの Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が提唱するブレイクポイントを採用した。37℃で24時間培養し、青色のコロニーを大腸菌と判定し、コロニーを計数した。一つの試料に対してプレート2枚で大腸菌を計数し、その平均値から検水量に応じて大腸菌数 (CFU/100mL) を算出した。

### 2) 日野川、野洲川における大腸菌/薬剤耐性大腸菌の調査、晴天時と雨天時の比較

野洲川および日野川において、河川中の大腸菌数に対する降雨の影響を、複数回調査した。2019年10月～2022年3月の間に、雨天時と晴天時に各7回ずつ採水を実施した。採水地点は北杣川、横田橋、野洲川橋（以上、野洲川地その支流）、および御代参橋、宮橋、増田橋、野寺橋（以上、日野川とその支流）である。全ての採水地点で、平常時に計13回、増水時に計9回の採水を行った。野洲川と日野川の流域には、農業集落排水処理施設などの汚水処理施設が多く存在する。これらの施設からの処理水は湖岸地域を除いて、野洲川や日野川およびその支流に放流されていると考えられる。1)と同様の方法で大腸菌、薬剤耐性大腸菌を測定した。

### 3) 降雨時の河川における大腸菌/薬剤耐性大腸菌の時系列変動

降雨時の大腸菌および薬剤耐性大腸菌の河川における時間変動を明らかにするために2020年4月12日～17日、9月6日～10日、9月25日～30日、2021年5月27～31日、9月17～22日の計5回、野洲川の野洲川橋において、連続採水調査を実施した。いずれの連続採水も降雨前から採水を実施し、増水後も水位の減少に応じて数日間にわたって採水を継続した。1)に記載の方法に従って大腸菌、薬剤耐性大腸菌を測定した。

### 4) 下水由来大腸菌の遺伝子マーカーの開発

微生物起源解析 (Microbial Source Tracking, MST) に使用可能な、下水由来大腸菌に特異的な新規遺伝子マーカーを探索した。まず、塩基配列の公共データベース (GenBank) から、様々な国から登録された完全長の大腸菌ゲノム配列を1278株分取得した。これらのゲノム配列の中から、登録情報を参照することで、ヒト・霊長類以外の動物糞便 (ブタ、鳥類、げっ歯類、ウシ、イヌ等) に由来する大腸菌ゲノムを抽出した (n=82)。これら82株分の動物糞便由来ゲノムと、我々が滋賀県の下水処理場から単離して塩基配列を決定した50株分の大腸菌ゲノムを、バイオインフォマティクスソフトウェアを用いて解析することで、これら計132のゲノム中に検出される全ての遺伝子を特定した。その後、これらの遺伝子の中から、下水由来大腸菌ゲノムに有意に多く検出される遺伝子 (= 下水 (ヒト) 由来の大腸菌に特異的な遺伝子マーカーの候補) を、ゲノムワイド関連解析 (Pan-GWAS) という手法を用いる

ことで、特定した。具体的には、Pan-GWAS解析の結果、Benjamini-Hochberg補正p値が0.05未満かつ特異度が95%以上である遺伝子を、下水由来大腸菌特異的遺伝子マーカー候補と定めた(特異度については後述)。

上記方法で特定された遺伝子マーカー候補について、大腸菌ドラフトゲノム(完全長のゲノム配列と異なり、次世代シーケンサーで取得した配列データに近い状態のゲノム配列)を用い、特異度(図2.1)の高さに着目して遺伝子マーカー候補の絞り込みを行った。以下、詳細を説明する。大腸菌ドラフトゲノムは、完全長ゲノムを取得した際と同様に、GenBankから取得した(n=20237)。この中から、登録情報を参照して、①ヒト・霊長類以外の動物糞便に由来する大腸菌ゲノム(n=3318)および②下水に由来する大腸菌ゲノム(n=335)を抽出した。①に対する特異度が99%以上の遺伝子(①において、当該遺伝子マーカーの検出数が33株/3318株以下と同義)を、最終的な遺伝子マーカー候補とした。これらの最終的な遺伝子マーカー候補の中から、②に対する感度が高く、保有パターンが異なる遺伝子を選択し、遺伝子マーカーとした。なお、特異度を99%以上に設定した理由は、下水(ヒト)由来の偽陽性を少なくするためである。

上記で特定した遺伝子マーカーW\_nqrCとW\_clsA\_2について、Primer 3というソフトウェアを用いてPCRプライマーを設計した。そして、これら設計したPCRプライマーを用いて、追加の大腸菌株、大腸菌ゲノムを対象として感度や特異度の検証を行った(注:ここで用いた大腸菌株や大腸菌ゲノムは検証用であり、上記遺伝子マーカーの開発で用いた大腸菌株や大腸菌ゲノムとは異なるセットである)。特異度の検証については、起源既知の動物から単離した大腸菌合計207株(イヌ由来大腸菌24株、ネコ由来大腸菌24株、ウシ由来大腸菌39株、ニワトリ由来大腸菌30株、シカ由来大腸菌30株、ブタ由来大腸菌30株、水鳥由来大腸菌30株)を用い、実際にPCRを行い、W\_nqrCとW\_clsA\_2を検出した。また、感度の検証については、下水から単離した大腸菌合計127株を用い、こちらも実際にPCRを行うことでマーカーを検出した。本研究ではさらに、起源既知の動物由来大腸菌ゲノムを824株分、下水由来大腸菌ゲノムを91株分GenBankからダウンロードし、パソコンの中でPCRを行うこと(= in silico PCR)これらマーカーを検出した。これら実際のPCRとin silico PCRの結果を統合し(つまり下水由来大腸菌218株、動物由来大腸菌1031株に対する(in silico) PCRの結果を統合し)、感度と特異度を算出した。

本研究では、さらに河川水などの環境水から単離した大腸菌株80株についても実際にPCRを行いこれらのマーカーを検出し、さらにGenBankからダウンロードした環境水由来大腸菌株303株についてもin silico PCRを行うことでこれらのマーカーを検出した。以上の流れを図2.2に示した。

また、本研究では、下水から直接抽出したDNA中に含まれるW\_nqrCとW\_clsA\_2の濃度についても定量をして、培養を介さない手法でこれらマーカーが検出できるかを検証した。この実験では、滋賀県の下水処理場から採取した初沈越流水3サンプル、処理水3サンプルを対象としてDNA抽出・DNA精製・PCR阻害物除去を行い、W\_nqrCとW\_clsA\_2のリアルタイムPCRによる検出を行った。

また、本研究では、下水から直接抽出したDNA中に含まれるW\_nqrCとW\_clsA\_2の濃度についても定量をして、培養を介さない手法でこれらマーカーが検出できるかを検証した。この実験では、滋賀県の下水処理場から採取した初沈越流水3サンプル、処理水3サンプルを対象としてDNA抽出・DNA精製・PCR阻害物除去を行い、W\_nqrCとW\_clsA\_2のリアルタイムPCRによる検出を行った。

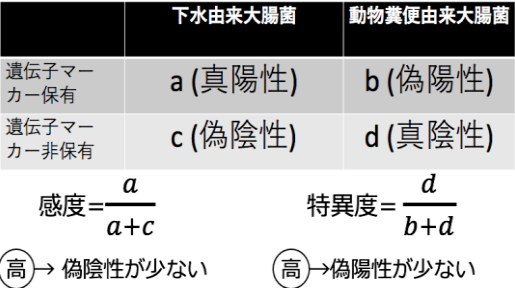


図2.1 感度と特異度の定義

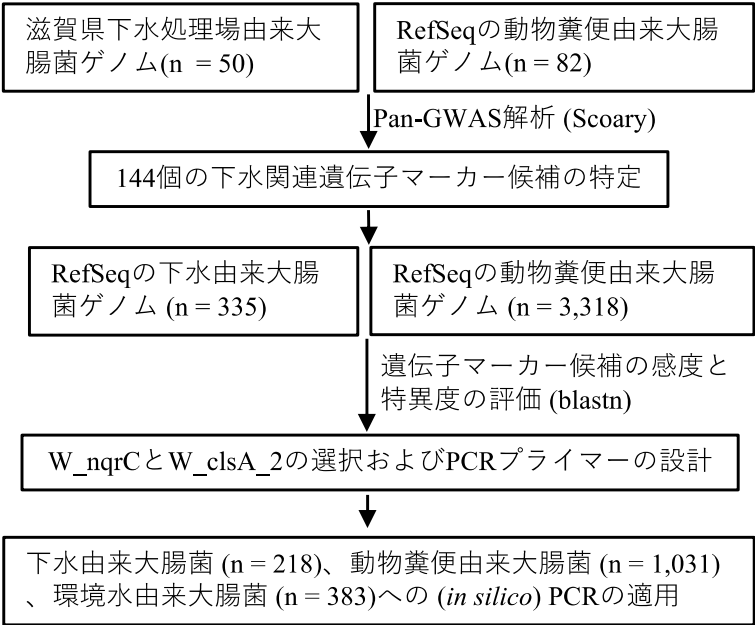


図2.2 下水特異的大腸菌遺伝子マーカーの開発の流れ

4. 結果及び考察

## 1) 琵琶湖周辺河川での大腸菌/薬剤耐性大腸菌の調査

琵琶湖流入24河川における存在実態調査の結果を図2.3に示す。大腸菌はどの河川でも数十～週百CFU/100mLで検出された。家畜に多いテトラサイクリン耐性大腸菌の分布には、河川によって偏りが大きいことが分かった。負荷源の違いが示唆される。滋賀県では特に畜産が盛んな東近江方面、甲賀方面を流域に持つ河川ではテトラサイクリン耐性大腸菌数が多く確認され、畜産が盛んでない琵琶湖北部や東部を流域に持つほとんどの河川でテトラサイクリン耐性大腸菌は検出されなかった。流域の畜産活動と河川中の薬剤耐性菌は関連している可能性が示唆される。これは、既存の研究結果でも指摘されている。一方で、大津・琵琶湖南部方面でも多くのテトラサイクリン耐性大腸菌が検出されており、家畜以外にもテトラサイクリン耐性大腸菌の負荷源が示唆される。

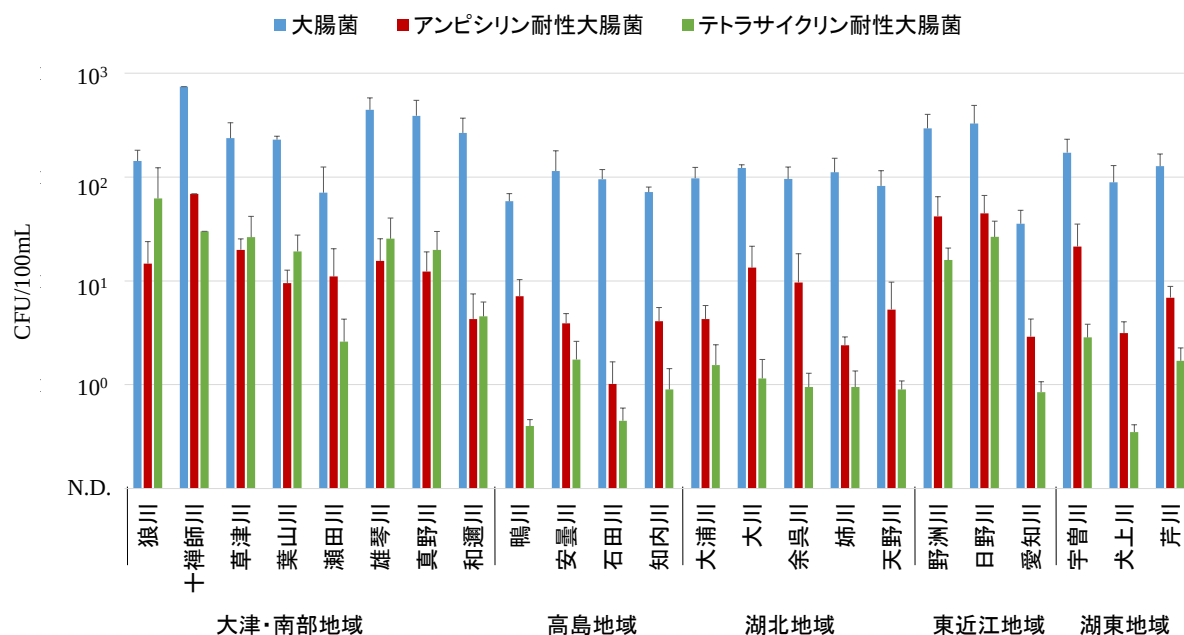


図2.3 河川中の大腸菌数に対する降雨の影響

## 2) 日野川、野洲川における大腸菌/薬剤耐性大腸菌の調査、晴天時と雨天時の比較

2019年11月2日、11月20日、12月23日、12月31日、2020年3月17日、4月2日、4月8日、6月9日、6月14日、7月20日、7月23日、7月30日、8月5日、8月27日、9月16日、10月5日、12月16日、12月16日、2021年2月16日、4月4日、6月10日、8月11日、9月9日の調査における、大腸菌数と薬剤耐性大腸菌数の分布を図2.4に示す。各採水地点における増水時と平水時に分けて採水日毎の菌数をプロットしている。

全ての採水地点において、大腸菌数は平水時よりも増水時に有意に多かった(図2.4a)、 $p < 0.05$ 。平水時は中央値で16～58 CFU/100mLの範囲であり、増水時は98～581 CFU/100mLであった。アンピシリン耐性大腸菌も全ての採水地点で菌数が平水時よりも増水時に有意に多かった(図2-4b)、 $p < 0.05$ 。平水時は中央値で0.8～13.5 CFU/100mLの範囲であり、増水時は中央値で20～74 CFU/100mLであった。テトラサイクリン耐性大腸菌は、日野川の御代参橋を除くすべての採水地点で菌数が平水時よりも増水時に有意に多かった(図2.4c)、 $p < 0.05$ 。平水時はほとんど検出されず中央値で1CFU/100mL程度であった。増水時は中央値で5～45.5CFU/100mlであった。以上の結果から、降雨時には野洲川と日野川で大腸菌および薬剤耐性大腸菌数が上昇することが明らかとなった。

また、河川水から単離した大腸菌株からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を実施した。本研究で開発した下水由来大腸菌の遺伝子マーカーの保有状況を調べ、開発した下水由来大腸菌の遺伝子マーカーの有効性を評価した(後述)。

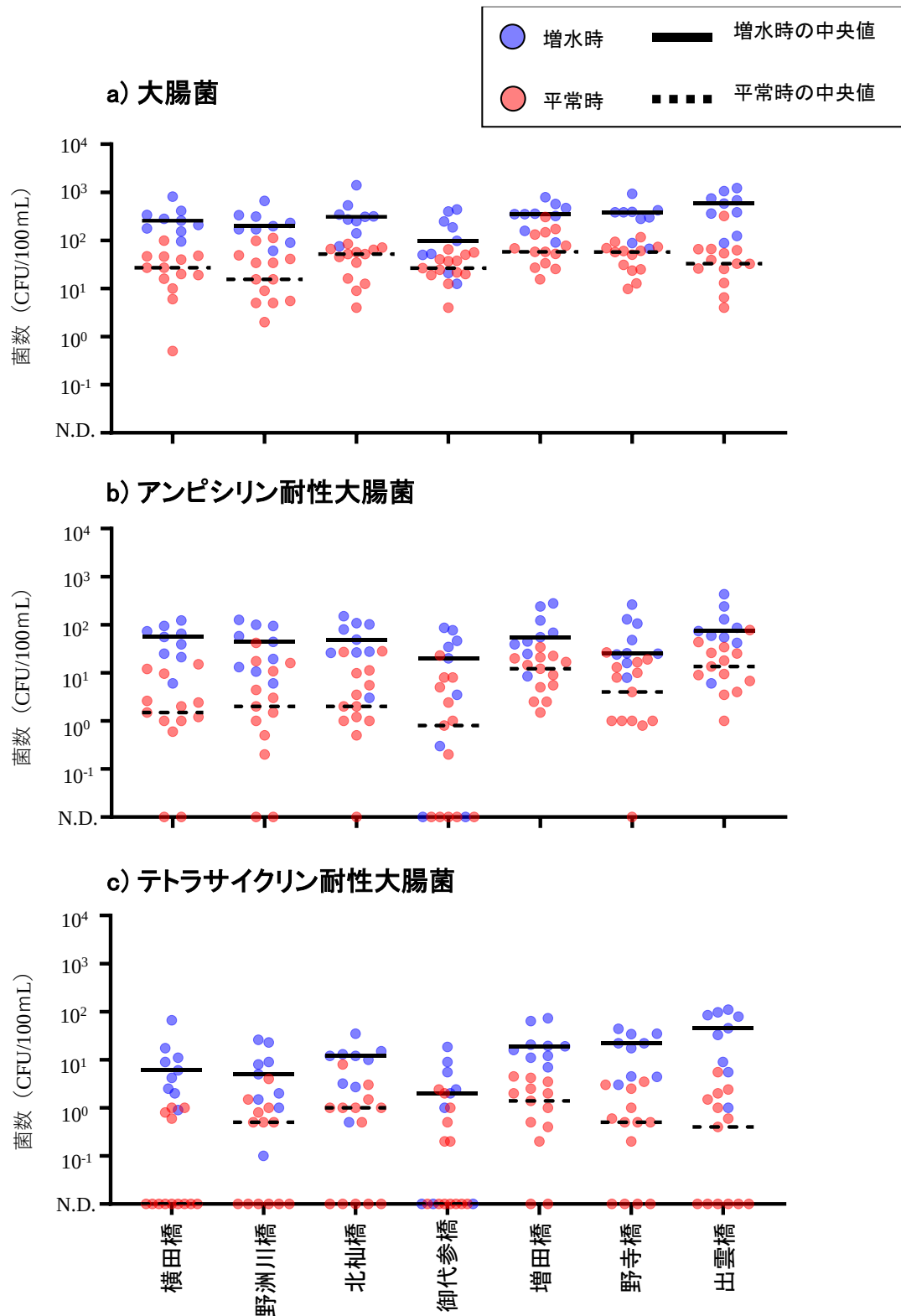


図2.4 野洲川、及び日野川における薬剤耐性大腸菌の存在実態調査結果

N. D. : 検出下限値 (0.1~0.5 CFU/100mL) 未満

### 3) 降雨時の河川における大腸菌/薬剤耐性大腸菌の時系列変動

2020年4月12日～17日の降雨における、大腸菌および薬剤耐性大腸菌の時間変動を図2.5に示す。大腸菌および薬剤耐性大腸菌は流量の増加に伴い菌数が10～100倍程度に増加し、流量のピーク後には菌数の減少



がみられた。大腸菌は流量のピーク後も数日間にわたり高い菌数を維持した。アンピシリン耐性大腸菌、テトラサイクリン耐性大腸菌も、大腸菌数に比べると1桁～2桁ほど低い。流量のピーク後も数日間に渡り検出された。降雨によって上昇した大腸菌や薬剤耐性大腸菌は少なくとも数日間はその影響が持続することが示された。他の4回の調査においても、同様の結果が得られている。

降雨時に河川水中の大腸菌や薬剤耐性大腸菌が増加する原因は、小規模下水処理施設での雨天時簡易処理の発生、面源(堆肥が施肥された畑地など)からの流出、河川の低質のまきあげに伴う大腸菌の巻き上げなどが可能性として考えられる。

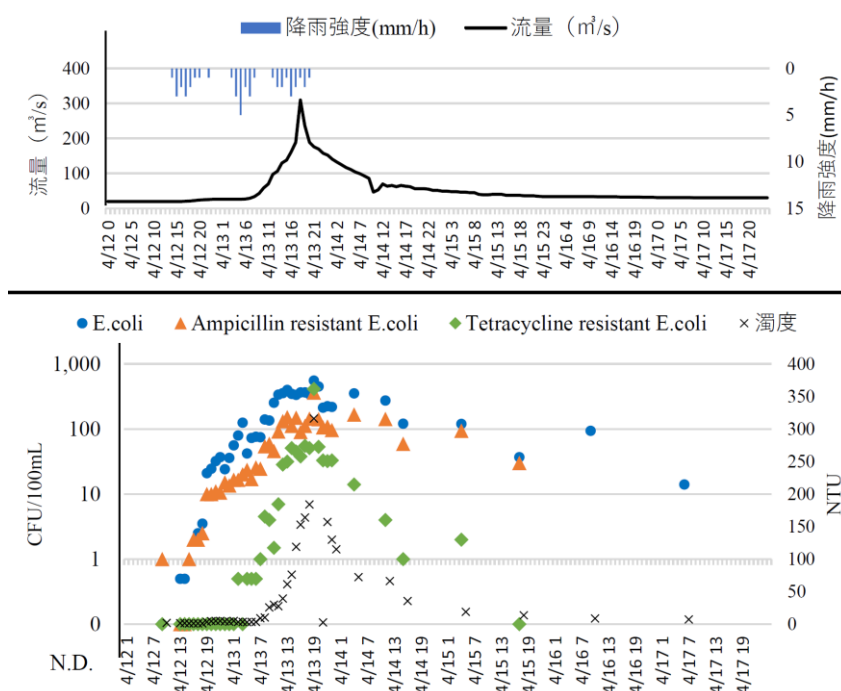


図2.5 雨天時の野洲川における大腸菌数の時間変動

#### 4) 下水由来大腸菌の遺伝子マーカーの開発

動物糞便由来大腸菌完全長ゲノム (n=82) と、下水処理場由来大腸菌ゲノム (n=50) をバイオインフォマティクスにより解析した結果、合計25343の遺伝子が検出された。また、ゲノムワイド関連解析によって、それらの遺伝子の中の144個の遺伝子が、下水由来大腸菌ゲノムに有意に多く検出されることがわかった (=遺伝子マーカー候補) (図2.6)。また、これらの遺伝子マーカー候補を対象とし、ドラフトゲノムを用いて特異度99%以上という条件で絞り込みを行うことで、16種類の最終的な遺伝子マーカー候補を同定した。これらの16種類の遺伝子マーカー候補の中から、下水由来大腸菌に対する感度が高く、保有パターンが異なる遺伝子を2種類選択し、下水由来大腸菌の遺伝子マーカー (W\_clsA\_2およびW\_nqrC) とした。

これらの遺伝子マーカーの感度は、単独で用いた場合約9～16%ほど、特異度が99%以上であることが確認された(表2.1)。また、2つの遺伝子マーカーのどちらかを保有する大腸菌を遺伝子マーカー陽性とした場合、感度は $9.25\% + 16.4\% = 25.65\%$ となり、マーカーを併用することで感度が向上することがわかった。2つのマーカーを併用した場合でも、特異度は約99%と、高いままであることがわかった。さらに、W\_clsA\_2とW\_nqrCは、日本だけでなく北アメリカ、ヨーロッパ、アフリカの下水由来大腸菌からも検出され、国内はもちろん国外での運用も期待できることがわかった。本研究では、既存の下水特異的大腸菌遺伝子マーカー (H8及びH12) の性能評価も行なった。その結果、既存のマーカーH8とH12を組み合わせで用いた場合の感度は97.8%、特異度は24.2%となり、これらH8やH12といった既存のマーカーは、下水特異的遺伝子マーカーとして機能しうるものの、今回開発したマーカーW\_nqrCやW\_clsA\_2よりは感度や特異度が低いことがわかった。

本研究では、W\_nqrCとW\_clsA\_2を対象としてPCRプライマーを設計した(表2.2)。これらのプライマーを用い、新たな、つまり遺伝子マーカーの開発で用いていない大腸菌株や大腸菌ゲノムを用いて、(in silico) PCRで遺伝子マーカーを検出することで、感度と特異度を検証した。その結果、(in silico) PCRによる感度と特異度は、2つの遺伝子マーカーを併用した場合にそれぞれ27.1%と97.8%になり、上記結果と同様に、高いパフォーマンスを示すことがわかった。

図2.6 遺伝子マーカー候補の感度と特異度

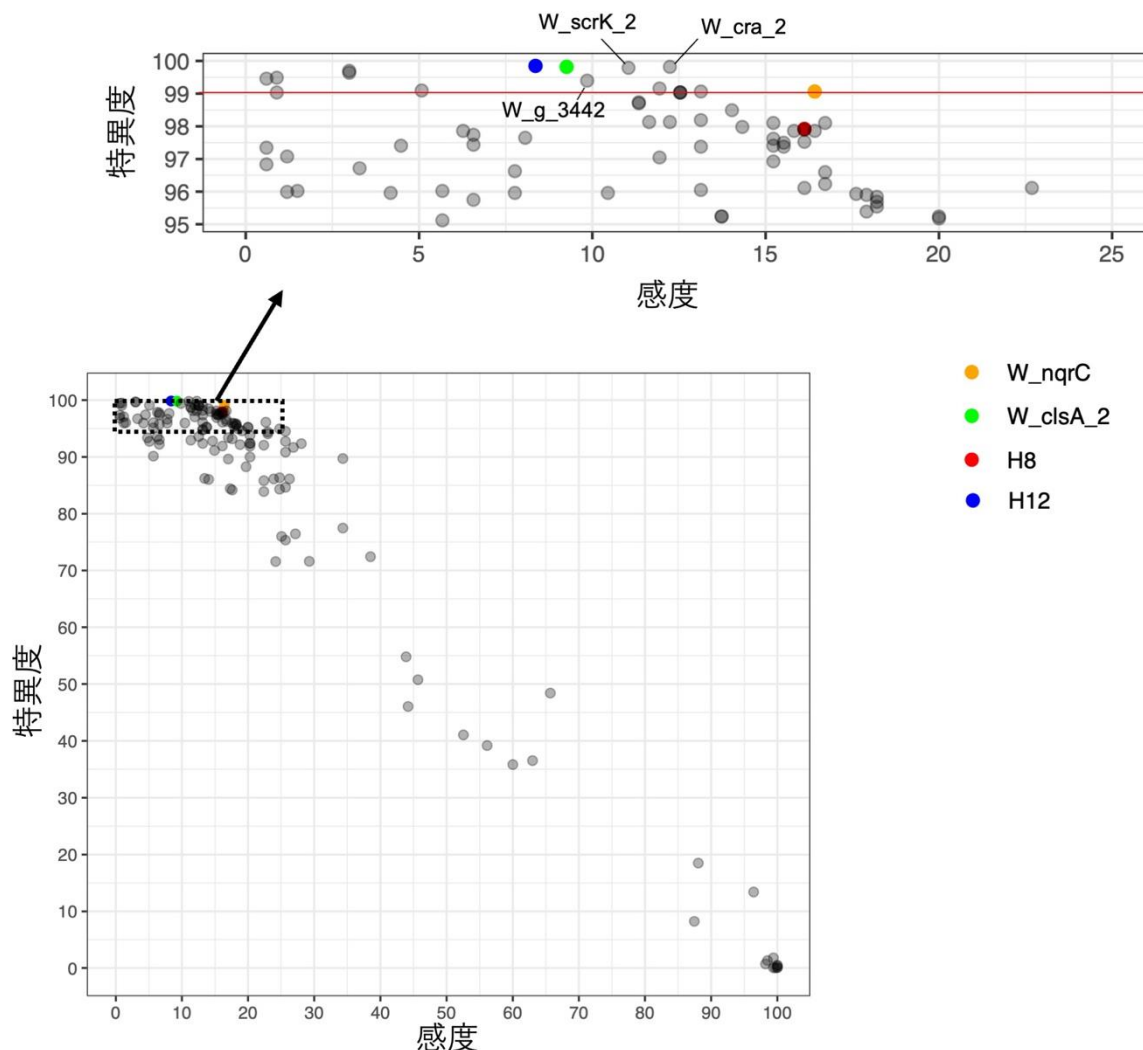


図2-6 遺伝子マーカー候補の感度と特異度

さらに、環境水中の大腸菌からこれらの遺伝子マーカーを (in silico) PCRによって検出した結果、383株中36株からも、これらの遺伝子マーカーが検出された。このことから、環境水中の大腸菌もこれらの遺伝子マーカーを保有する場合があります、これらのマーカーは環境水由来大腸菌の微生物起源解析に用いることが可能であることが示唆された。

本研究では、下水から直接抽出したDNAを対象として、培養を介さない手法 (リアルタイムPCR) でも、これらの遺伝子マーカーの濃度を定量した。その結果、全てのサンプルからマーカーを検出することに成功した (感度100%)。また、検出されたW\_nqrCの濃度については、初沈越流水で7.13-7.24  $\log_{10}$  gene copies (GC)/L、処理水で4.43-4.76  $\log_{10}$  GC/Lであった。W\_clsA\_2の濃度については、初沈越流水で8.39-8.54  $\log_{10}$  GC/L、処理水で6.12-6.18  $\log_{10}$  GC/Lであった (表2.3)。これらの濃度は、既存のヒト下水特異的なマーカーであるバクテロイデスHF183やcrAssphageと比較するとやや低い値であり、下水から起源解析マーカーを直接検出する場合はHF183やcrAssphageといった既存のマーカーを標的とする方が良いことがわかった。また、大腸菌1細胞あたりに1コピー存在することが知られているuidA遺伝子の濃度と比較しても、W\_nqrCはほぼ同じ濃度でW\_clsA\_2はuidAより高い濃度となっていることから、開発した遺伝子マーカーは大腸菌以外の菌種も保有する場合があることが示唆された。

しかし一方で、W\_nqrCとW\_clsA\_2は培養により単離した大腸菌については、上述のように高い特異度を示すため、培養を介す場合には有用であることが示唆された。特に、2022年4月からは、水質汚濁に係る環境基準が大腸菌群数から大腸菌数へと変更されたため、大腸菌コロニーを対象として適用できる本

研究で開発した遺伝子マーカーは有用であると考え（注：これら環境基準は培養により生じたコロニーを数えることで計測される）。また、本研究で開発した遺伝子マーカーは、環境水を培養してできたコロニーを直接用いてPCRにより検出することが可能であることがわかっており、本手法（コロニーPCR）は簡便であることから、今後環境水から検出された大腸菌コロニーの起源を同定する際に有用であると考え。

表2.1 下水由来大腸菌の遺伝子マーカー候補の感度と特異度

| 遺伝子マーカー | GenBank動物糞便<br>由来大腸菌<br>(n=3318) | GenBank下水<br>由来大腸菌<br>(n=335) | 感度    | 特異度   | オッズ比 |
|---------|----------------------------------|-------------------------------|-------|-------|------|
| W_cls_2 | 6                                | 31                            | 9.25% | 99.8% | 56.3 |
| W_nqrC  | 31                               | 55                            | 16.4% | 99.1% | 20.8 |

表2.2 W\_nqrCとW\_clsA\_2を検出するためのPCRプライマー配列

| 遺伝子マーカー  | プライマー配列                                           | 増副産物長 (bp) |
|----------|---------------------------------------------------|------------|
| W_nqrC   | F: CATGCGTTTCTTGCTCTGGG<br>R: GTTGGCGTCTTCCACCTAG | 105        |
| W_clsA_2 | F: ACCGATGATTGGTGCATAC<br>R: GCTCAAAGCGCCCATGAAG  | 165        |

表2.3 W\_nqrCとW\_clsA\_2の下水中濃度

| サンプル   | log <sub>10</sub> gene copies (GC)/L |          |      |      |             |
|--------|--------------------------------------|----------|------|------|-------------|
|        | W_nqrC                               | W_clsA_2 | H8   | H12  | <i>uidA</i> |
| 初沈越流水1 | 7.16                                 | 8.43     | 6.39 | 6.41 | 7.21        |
| 初沈越流水2 | 7.24                                 | 8.39     | 6.26 | 6.03 | 7.32        |
| 初沈越流水3 | 7.13                                 | 8.54     | 6.47 | 6.32 | 7.21        |
| 処理水1   | 4.60                                 | 6.18     | 4.01 | 3.93 | 4.57        |
| 処理水2   | 4.43                                 | 6.12     | 4.17 | 4.15 | 4.50        |
| 処理水3   | 4.76                                 | 6.15     | 4.01 | 4.16 | 4.80        |

## 5. 研究目標の達成状況

水環境から単離された大腸菌株のゲノム配列情報の取得と、公共のゲノムデータベースの情報を活用して新たなマーカーを探索し、大腸菌の新たな起源解析方法を提案することができた。

大腸菌、大腸菌群の実態調査は、当初の予定よりも高頻度、また、雨天時の調査も追加した。雨天時には河川中の大腸菌、薬剤耐性大腸菌が増加すること、さらに下水処理場からの処理不十分な排水の影響が大きいことを明らかにした。当初予定より多くの大腸菌ゲノム配列をデータベースから取得し、当初の想定を前倒しして、下水（ヒト）由来大腸菌の遺伝子マーカーを2種類特定できた。下水由来、動物由来の大腸菌を多数単離し、下水由来大腸菌の遺伝子マーカーの有効性を確認できた。

以上より、設定した目標を計画以上の成果を得て達成できた。

## 6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。



## Ⅱ-3 清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析

山梨大学

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 大学院総合研究部附属国際流域環境研究センター | 原本 英司  |
| 大学院総合研究部工学域土木環境工学系     | 八重樫 咲子 |
| 総合分析実験センター             | 瀬川 高弘  |
| 東京農業大学農学部生物資源開発学科      | 松林 尚志  |

### 【要旨】

本研究では、シカやイノシシ等の野生動物が泥浴びのために集まる「ヌタ場」を対象に、大腸菌やMSTマーカー等の汚染実態を調査した。2020年8月～2022年12月の期間中、ヌタ場の土壌を91試料、土壌表層水を3試料、河川水を3地点から計18試料、湧水を8試料、シカ糞便を39試料、クマ糞便を1試料、計160試料を採取し、培養法とリアルタイムPCR法を用いた大腸菌の測定に加え、複数のウイルス、バクテロイデスおよびミトコンドリアDNAを対象としたMSTマーカー、細菌16S rRNAや環境DNAを測定することで、自動撮影カメラによる野生動物の活動状況を含めて、ヌタ場における微生物の汚染実態の全体像を明らかにした。

ヌタ場土壌試料からの大腸菌の検出率は53% (48/91) であり、夏季から初秋 (8～10月) には77% (36/47) の試料から大腸菌が検出され、他の季節 (27%、12/44) よりも高頻度であったことから、ヌタ場での野生動物による糞便汚染レベルは季節変動を示すことが分かった。ヌタ場土壌試料からのMSTマーカーの検出方法として、1%懸濁液よりも無希釈の試料を用いることが有効であることを明らかとし、その手法を用いることで、広く糞便汚染を示す指標であるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) に加え、ヒトバクテロイデスやクラスファージ、反芻動物バクテロイデス、ブタバクテロイデス、ブタミトコンドリアDNA等を検出することに成功した。MSTマーカーは大腸菌が検出されない場合も検出されており、大腸菌とは挙動が異なるものと考えられた。ヒト由来とされるMSTマーカーや環境DNAがヌタ場土壌試料から検出されたものの、自動撮影カメラの撮影状況等を踏まえ、ヒトとサル等の野生動物を判別できていない可能性が示唆された。

従来よりも短時間で大腸菌を測定可能な迅速培養法の開発に取り組み、コリラート-18粉末試薬を添加した試料100mLを6～8時間程度培養した後、リアルタイムPCR法で大腸菌マーカーを検出する手順を構築した。この手法を発展させ、サブテーマ (2) が開発した2種類の下水由来大腸菌マーカーを組み入れることで起源解析を可能にすることを検討したものの、培養操作で大腸菌と共に増殖する大腸菌群の中にも下水由来大腸菌マーカーを有するものが存在することが確認されたため、現時点では起源解析までを行うことは困難であると判断された。今後、大腸菌のみに特異的なマーカーを開発することで、下水のみならず、動物由来の大腸菌を対象とした迅速・高感度な起源解析法の構築につながることを期待される。

### 1. 研究開発目的

水質環境基準における衛生微生物指標の見直しが以前より検討されてきおり、非糞便由来の細菌が多く含まれる大腸菌群数の問題点を踏まえ、大腸菌群数から大腸菌数への変更が検討されている (2022年4月より実際に変更された)。大腸菌を指標として用いることで、従来よりも糞便汚染レベルを正確に判定できるようになることが期待される。河川上流域の清流等のAA類型の地点の多くは、従来の大腸菌群数では基準値を超過していたが、大腸菌数に切り替わることで超過率が低下することが期待される。一方で、大腸菌数に切り替わった後でも基準超過する地点が生じる可能性も否めず、大腸菌の起源を同定し、汚染負荷低減策を講じるような試みが求められる。

そこで、本研究では、人為汚染源のない清流河川における大腸菌等の微生物の汚染実態について、シ

カやイノシシ等の野生動物が泥浴びや飲水のために集まるヌタ場が供給源となっている可能性に着目して調査を行う。大腸菌やバクテロイデス、大腸菌ファージ等の宿主特異的なMSTマーカー検出系を適用することで、清流河川における糞便汚染源を明らかにする。また、自治体レベルで適用可能な手法として、大腸菌を培養して遺伝子マーカーを測定することによる糞便汚染源判別法の開発に取り組む。

## 2. 研究目標

大腸菌やバクテロイデス、大腸菌ファージ等の宿主特異的な遺伝子マーカーを利用した微生物起源解析手法の適用可能性を評価すると共に、微生物リスク管理の観点から、環境基準を超過する地点における水質管理の在り方を提案する。

## 3. 研究開発内容

### 1) ヌタ場を利用する野生動物の調査

野生動物によるヌタ場の利用状況を明らかにすることを目的として、4ヶ所のヌタ場に自動撮影カメラを設置して観測を実施した。また、自動撮影カメラによる観測結果と比較することを目的とし、哺乳類の環境DNAの検出を試みた。

### 2) ヌタ場における微生物の汚染実態調査

シカやイノシシ等の野生動物が泥浴びのために集まる「ヌタ場」を対象に、大腸菌やMSTマーカー等の汚染実態を調査した。表3.1に示すように、2020年8月～2022年12月の期間中、山梨県小菅村のヌタ場5地点（かり場奥、かり場、もろくぼ、たなくら、山沢入りのヌタ）において土壌を91試料（かり場奥31試料、かり場24試料、もろくぼ2試料、たなくら22試料、山沢入りのヌタ12試料）、降雨時に見られた土壌表層水を3試料、下流域に位置する小菅川の河川水を3地点から計18試料、湧水を8試料、シカ糞便を39試料、クマ（ツキノワグマ）糞便を1試料、計160試料を採取した。また、比較のためにヌタ場の周辺土壌も採取した。

ヌタ場土壌試料と動物糞便試料は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS（－））を用いて1%懸濁液に調整した。試料を適宜希釈し、指標微生物として、クロモアガーECC寒天培地（関東化学）およびコリラート-18（IDEXX Laboratories）を用いた培養法によって大腸菌群と大腸菌を測定した。

ヌタ場土壌・動物糞便試料の1%懸濁液を遠心し、上清をウイルス濃縮液、沈渣をPBS（－）で再懸濁して細菌濃縮液として回収した。河川水および湧水試料は、孔径0.45  $\mu$ mの混合セルロース膜（直径47mm、Merck）を用いた陰電荷膜破碎型濃縮法と遠心式フィルターユニットを用いたUF膜濃縮法により濃縮した。ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific）による逆転写反応に供した。ウイルスDNA、細菌DNAおよびミトコンドリアDNAはQIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて抽出した。また、ヌタ場土壌・動物糞便試料については、1%懸濁液からのMSTマーカーの検出率が十分高くはなかったことから、無希釈の試料を用い、DNeasy PowerSoil Kit（QIAGEN）を用いたDNA抽出またはAllPrep PowerViral DNA/RNA Kit（QIAGEN）を用いたDNA・RNA抽出に供した。

リアルタイムPCR装置にはThermal Cycler Dice Real Time System III（タカラバイオ）を用い、糞便汚染指標としてトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）、ヒト特異的マーカーとしてヒトバクテロイデス（*gyrB*）とクラスファージ（CrAssphage）、反芻動物特異的マーカーとして反芻動物バクテロイデス（BacR）、ブタ特異的マーカーとしてブタバクテロイデス（Pig2Bac）、ブタミトコンドリアDNA（Swine-mtDNA）およびブタアデノウイルス（Porcine adenovirus）を定量した。

また、試料からFastDNA SPIN Kit for Soil（MP Biomedicals）を用いてDNAを抽出し、細菌16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をPCR増幅した後、MiSeq（イルミナ）による配列解読に供した。Qiime2 pipelineを用いた配列解析を実施し、SILVA 132をデータベースとして系統分類解析を行った。さらに、細菌DNA抽出液に対し、*CytB*、COIおよび12S rRNAを対象としたPCRを実施し、MiSeqを用いた次世代シーケンス解析に供し、データベースの真核生物の配列と100bp以上かつ97%以上一致した配列を抽出した。

表3.1 スタ場地域で採取した試料

| 試料             | 地点/種類        | 2020年度<br>(2020年8月<br>～12月) | 2021年度<br>(2021年4月<br>～2022年3月) | 2022年度<br>(2022年4月<br>～12月) | 計   |    |
|----------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----|----|
| ヌタ場<br>(土壌)    | かり場奥         | 11                          | 14                              | 6                           | 31  | 91 |
|                | かり場          | 11                          | 8                               | 5                           | 24  |    |
|                | もろくぼ         | 0                           | 2                               | 0                           | 2   |    |
|                | たなくら         | 8                           | 10                              | 4                           | 22  |    |
|                | 山沢入りのヌタ      | 5                           | 4                               | 3                           | 12  |    |
| ヌタ場<br>(土壌表層水) | かり場奥<br>もろくぼ | 0                           | 3                               | 0                           | 3   |    |
| 河川水            | 小菅川(下流)      | 4                           | 1                               | 0                           | 5   | 18 |
|                | 小菅川(上流)      | 0                           | 7                               | 5                           | 12  |    |
|                | 小菅川(上流・雄滝)   | 0                           | 1                               | 0                           | 1   |    |
| 湧水             | -            | 0                           | 8                               | 0                           | 8   |    |
| 野生動物<br>糞便     | シカ糞便         | 1                           | 24                              | 14                          | 39  |    |
|                | クマ糞便         | 1                           | 0                               | 0                           | 1   |    |
| 計              |              | 41                          | 82                              | 37                          | 160 |    |

### 3) MSTマーカーとしての大腸菌ファージの有効性評価

体表面ファージの測定には、山梨県甲府盆地内で採取した下水処理場の流入水（18試料）と2次処理水（18試料）、放流水（15試料）、豚舎排水（2試料）および河川水（4地点、38試料）を用いた。体表面ファージは*Escherichia coli* W65を宿主に用いたブラック法によって測定し、シャーレ上に形成したブラックを単離した。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、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法に供し、ダイレクトシーケンシングによる塩基配列解析を行った。

### 4) 大腸菌の培養MST法の開発

上流に人為汚染源が存在しないAA類型に指定されるような水域において大腸菌が環境基準値を超過した場合、大腸菌の起源が動物由来あるいは自然由来であるのかを解明することが重要となる。水試料に対して大腸菌遺伝子マーカーをPCRにより直接検出する場合、特にAA類型のような水域においては検出限界値以下の濃度で大腸菌が存在するために検出できず、起源の推定が困難になることが想定される。そこで、検出感度を向上させるための培養法とMSTマーカー検出法を組み合わせた新たな手法（培養MST法）を開発し、迅速かつ高感度での大腸菌の起源推定を可能とすることを試みた。大腸菌K12を滅菌超純水や河川水（100mL）に添加したものを実験原水として用い、コリラート-18の粉末培地を添加して37℃で培養し、経時的に採水し、寒天培地法およびリアルタイムPCR法（大腸菌が共通して有する*ybbW*遺伝子を増幅対象）により大腸菌の濃度を測定した。

また、サブテーマ（2）で開発した2種類の下水由来大腸菌マーカー（W\_nqrC、W\_clsA\_2）を対象としたリアルタイムPCR法を本培養法と組み合わせることで下水由来の大腸菌を判別可能とするために必要な検討として、培養法で増殖する大腸菌以外の大腸菌群がこれらのマーカーを保有しているかどうかを調べた。クロモアガーECC寒天培地法で形成したコロニー（青色：大腸菌、赤色：大腸菌群以外の大腸菌）、コリラート-18法のトレイのウェル水（黄色かつ青色（紫外線照射下）：大腸菌（大腸菌群も含み得る）、黄色のみ：大腸菌以外の大腸菌群）に対し、大腸菌特異的なリアルタイムPCR法（*ybbW*）を実施し、大腸

菌あるいは大腸菌以外の大腸菌群であることを確認した。2種類の下水由来大腸菌マーカーに対するリアルタイムPCR法を別個に行うよりも、マルチプレックス反応により同時に検出することができれば効率的である。そこで、標準試料とマーカー陽性大腸菌を用い、マルチプレックスリアルタイムPCR法による検出が可能かどうかを検討した。

#### 4. 結果及び考察

##### 1) スタ場を利用する野生動物の調査

4ヶ所のスタ場に設置した自動撮影カメラで合計1349カメラ日の撮影データを解析することができ、ニホンジカやニホンイノシシをはじめとする中大型哺乳類10種が確認された。撮影頻度は、上位種から、ニホンジカ、ニホンイノシシ、ホンダタヌキ、ニホンテン、ニホンザル、ツキノワグマ、ニホンアナグマ、ハクビシン、アカギツネ、ニホンカモシカの順であった。

大型哺乳類であるシカとイノシシで全体の6割以上、中型食肉類であるタヌキとテンも全体の2割以上を占め、これら4種で全体の8割以上を占めていた（図3.1）。月別の撮影頻度を比較したところ、シカとイノシシには秋に明瞭なピークが確認されたが、タヌキとテンには明瞭なピークは認められなかった。また、これら4種のスタ場での行動内容を調べたところ、全種に共通して飲水行動が確認された。一方、スタ浴び行動はシカとイノシシのみ、採食行動はタヌキとアナグマのみで確認された。オスジカのスタ浴び行動は、自身の排泄物や精液を泥と混ぜ合わせて体に塗る繁殖期のマーキング行動であり、それによってシカが持つ微生物がスタ場へと排出されることが予想され、この時期のスタ場周辺での微生物量の増加に寄与しているものと推察された。

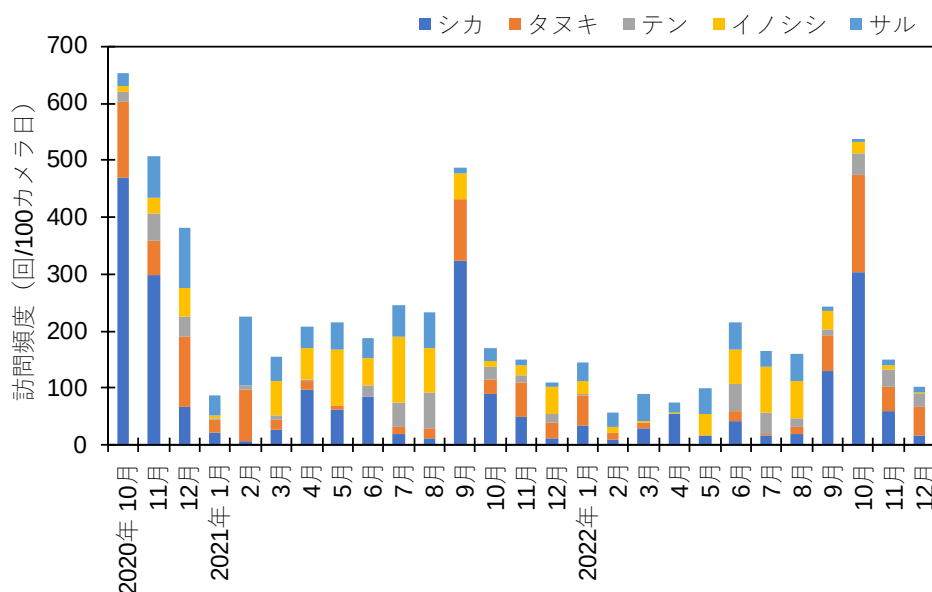


図3.1 自動撮影カメラによる野生動物の月別の撮影頻度

##### 2) スタ場における微生物の汚染実態調査

表3.2に示すように、スタ場土壌試料からの大腸菌の検出率は53% (48/91) であり、検出濃度には10～48,000 colony-forming units (CFU)/gと大きな変動が見られた。夏季から初秋 (8～10月) には77% (36/47) の土壌試料から大腸菌が検出され、他の季節 (27%、12/44) よりも高頻度であった (図3.2)。これは、後述する自動撮影カメラによる野生動物の活動状況と一致するものであり、スタ場での野生動物による糞便汚染レベルは季節変動を示すことが確認された。また、大腸菌は、スタ場土壌表層水の33% (1/3)、河川水の28% (5/18) から検出された。動物糞便からは高濃度 (シカ：平均 $1.6 \times 10^6$  CFU/g, クマ： $8.4 \times 10^5$  CFU/g) で検出され、いずれも新鮮な野生動物糞便試料として利用できることが確認された。

表3.2 スタ場試料からの大腸菌の検出結果

| 試料             | 地点/種類        | 陽性試料数/測定<br>試料数(陽性率) | 検出濃度<br>(log CFU/g or mL) |
|----------------|--------------|----------------------|---------------------------|
| スタ場<br>(土壌)    | かり場奥         | 18/31(58%)           | 2.4 ± 0.9                 |
|                | かり場          | 12/24(50%)           | 2.0 ± 0.4                 |
|                | もろくぼ         | 2/2(100%)            | 3.6 ± 1.5                 |
|                | たなくら         | 11/22(50%)           | 2.3 ± 0.9                 |
|                | 山沢入りのスタ      | 5/12(42%)            | 2.4 ± 1.1                 |
|                | 計            | <b>48/91(53%)</b>    | 2.3 ± 0.9                 |
| スタ場<br>(土壌表層水) | かり場奥<br>もろくぼ | 1/3(33%)             | 2.5                       |
| 河川水            | 小菅川(下流)      | 0/5(0%)              | ND                        |
|                | 小菅川(上流)      | 5/13(39%)            | -0.9 ± 0.1                |
| 湧水             | -            | 1/8(13%)             | -1.0                      |
| 野生動物<br>糞便     | シカ糞便         | 39/39(100%)          | 6.2 ± 1.6                 |
|                | クマ糞便         | 1/1(100%)            | 5.9                       |

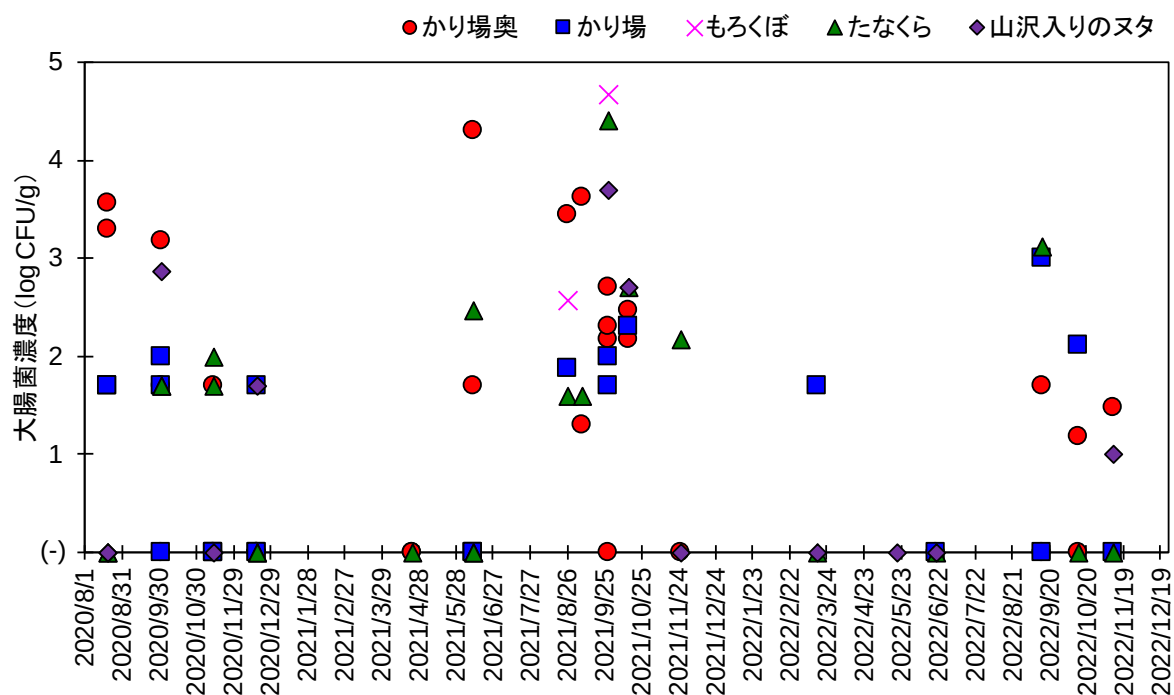


図3.2 スタ場土壌試料中の大腸菌濃度の季節変動

スタ場土壌・野生動物糞便試料(1%懸濁液)および小菅川河川水からのMSTマーカの検出結果を表3.3に示す。河川水4試料のうち、PMMoVが1試料(25%)、クラスファージが2試料(50%)、反芻動物バクテロイデスが3試料(75%)から検出された。一方、小菅川と比較してスタ場土壌試料と野生動物糞便試料からの陽性率は低い値となり、PMMoVのみが陽性率11%で検出され、ヒトバクテロイデスと反芻動物バクテロイデスは検出されなかった。この要因として、1%懸濁液を用いたため、試料中のMSTマーカが検出下限以下にまで希釈されてしまっていたことが考えられた。そこで、大腸菌濃度を考慮して選抜したスタ場泥12試料(2020年度に採取)に対し、試料の希釈を行わずに再測定を実施したところ、ヒトバクテロイデスが25%、反芻動物バクテロイデスが58%、ブタバクテロイデスが25%、ブタミトコンドリアDNAが67%から検出された(表3.4)。反芻動物とブタ特異的なMSTマーカが高頻度で検出されており、シカやイノシシによる糞便汚染の影響を受けている可能性が示唆された。ヒトバクテロイデスも検出されているものの、付近ではヒトの活動は観測されていないことから、本マーカではヒトとサルを判別できて

いない可能性も示唆された。

無希釈のヌタ場土壌を用いた測定を2020～2022年度に採取した56試料に適した結果を表3.5に示す。MSTマーカーに加えて大腸菌マーカーも測定しており、各マーカーを2ウェルずつ測定しているため、表では各ウェルのリアルタイムPCRの結果別に整理している。PMMoVはすべての試料から検出され、他のMSTマーカーの陽性率は25～57%であった。表中で太字で示している箇所のように、大腸菌マーカーが2ウェルいずれからとも検出されていない試料からともMSTマーカーが検出される場合があった。

表3.3 ヌタ場試料（1%懸濁液）および河川水からのMSTマーカーの検出結果

| 宿主   | MSTマーカー                        | MSTマーカー検出結果 |           |
|------|--------------------------------|-------------|-----------|
|      |                                | ヌタ場・糞便      | 河川水       |
| 糞便汚染 | トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)            | 11% (4/37)  | 25% (1/4) |
| ヒト   | ヒトバクテロイデス ( <i>gyrB</i> )      | 0% (0/37)   | 0% (0/4)  |
|      | クラスファージ (CrAssphage)           |             | 50% (2/4) |
| 反芻動物 | 反芻動物バクテロイデス (BacR)             | 0% (0/37)   | 75% (3/4) |
| ブタ   | ブタバクテロイデス (Pig2Bac)            |             | 0% (0/4)  |
|      | ブタミトコンドリアDNA (Swine-mtDNA)     |             | 0% (0/4)  |
|      | ブタアデノウイルス (Porcine adenovirus) |             | 0% (0/4)  |

表3.4 ヌタ場土壌試料（無希釈）からのMSTマーカーの検出結果

| 宿主   | MSTマーカー      | 陽性試料数/測定試料数(陽性率) |            |            |                   | 濃度<br>(log<br>copies/g) |
|------|--------------|------------------|------------|------------|-------------------|-------------------------|
|      |              | かり場奥             | たなくら       | 山沢入り<br>ヌタ | 計                 |                         |
| ヒト   | ヒトバクテロイデス    | 0/5 (0%)         | 2/3 (67%)  | 1/4 (25%)  | <b>3/12 (25%)</b> | 2.6～3.8                 |
|      | クラスファージ      | 0/5 (0%)         | 0/3 (0%)   | 0/3 (0%)   | <b>0/12 (0%)</b>  | N.D.                    |
| 反芻動物 | 反芻動物バクテロイデス  | 2/5 (40%)        | 2/3 (67%)  | 3/4 (75%)  | <b>7/12 (58%)</b> | 4.1～4.4                 |
| ブタ   | ブタバクテロイデス    | 1/5 (20%)        | 1/3 (33%)  | 1/4 (25%)  | <b>3/12 (25%)</b> | 2.6～3.6                 |
|      | ブタミトコンドリアDNA | 3/5 (60%)        | 3/3 (100%) | 2/4 (50%)  | <b>8/12 (67%)</b> | 3.1～5.5                 |
|      | ブタアデノウイルス    | 0/5 (0%)         | 0/3 (0%)   | 0/4 (0%)   | <b>0/12 (0%)</b>  | N.D.                    |

表3.5 ヌタ場土壌試料からのMSTマーカーと大腸菌マーカーの測定結果

| 大腸菌 ( <i>sfmD</i> ) |                 | MSTマーカー                    |                                  |                         |                           |                                   |
|---------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| リアルタイム<br>PCR結果     | リアルタイム<br>PCR結果 | 糞便汚染全般                     | ヒト                               |                         | 反芻動物                      | ブタ                                |
|                     |                 | トウガラシ<br>微斑ウイルス<br>(PMMoV) | ヒトバクテ<br>ロイデス<br>( <i>gyrB</i> ) | クラスファージ<br>(CrAssphage) | 反芻動物<br>バクテロイデス<br>(BacR) | ブタミトコン<br>ドリアDNA<br>(Swine-mtDNA) |
| ++                  | ++              | 21                         | 4                                | 0                       | 4                         | 8                                 |
|                     | +-              | 2                          | 7                                | 8                       | 4                         | 4                                 |
|                     | --              | 0                          | 12                               | 15                      | 15                        | 11                                |
| +-                  | ++              | 15                         | 1                                | 2                       | 3                         | 5                                 |
|                     | +-              | 3                          | 3                                | 1                       | 5                         | 6                                 |
|                     | --              | 0                          | 14                               | 15                      | 10                        | 7                                 |
| --                  | ++              | <b>14</b>                  | <b>2</b>                         | <b>0</b>                | <b>2</b>                  | <b>8</b>                          |
|                     | +-              | <b>1</b>                   | <b>1</b>                         | <b>3</b>                | <b>0</b>                  | <b>1</b>                          |
|                     | --              | 0                          | 12                               | 12                      | 13                        | 6                                 |
| 測定試料数(計)            |                 | 56                         | 56                               | 56                      | 56                        | 56                                |
| 陽性試料数(陽性率)          |                 | 56 (100%)                  | 18 (32%)                         | 14 (25%)                | 18 (32%)                  | 32 (57%)                          |

図3.3に示すように、細菌16S rRNAの網羅的解析により、ヌタ場試料間において細菌叢に大きな差異があることが明らかとなった。ヌタ場泥試料は、周辺土壌とも細菌叢が異なっており、特徴的な微生物汚染が生じていると考えられた。

環境DNA解析において使用した3種類のPCR系のうち、COIでは細菌や菌類、昆虫類に由来するDNAが得られ、12S rRNAはPCR増幅が十分ではなく、増幅された試料からは細菌と魚類由来のDNAが得られた。このことから、*CytB*のみを対象とした解析を実施した。図3.4に例を示すように、試料の種類および調査日によって検出された生物種に大きな差が見られた。2020年8月のヌタ場泥試料から得られた配列の大部分は、ヤマアカガエル、アズマヒキガエル、ニホンヒキガエル等の両生類由来のものであった。また、2020年10月と11月に採取した小菅川の試料からは、ニジマスやマイワシ等の魚類由来の配列が優占して検出され、哺乳類由来の配列はほとんど得られなかった。

2020年10月と11月に採取したヌタ場泥試料からは哺乳類由来の配列が優占して検出されたものの、取得できた配列数が限定されていたことに起因し、同定された種数は5種(OTU数:13種)であった(表3.6)。イノシシ由来の配列が10試料中5試料と多く検出され、ニホンジカ由来の配列は1試料から得られたのみであったが、当該試料ではニホンジカ由来配列が優占しており、局所的な汚染が生じていることが示唆された。なお、ヒト由来の配列も多く検出され、1試料からはオランウータン由来の配列も検出されたが、自動撮影カメラの結果も考慮すると、これらの配列の一定程度の割合はサルに由来している可能性が高いと考えられる。

表3.7に示すように、小菅川河川水13試料から各種のMSTマーカーが検出され、クラスファージ(6試料)、反芻動物バクテロイデス(3試料)、PMMoV(2試料)、ヒトバクテロイデスおよびブタミトコンドリアDNA(各1試料)の順であった。培養法で大腸菌が検出された試料の80%(4/5)、検出されなかった試料の75%(6/8)、リアルタイムPCR法で大腸菌マーカーが検出された試料の100%(7/7)、検出されなかった試料の50%(3/6)からいずれかのMSTマーカーが検出された。これらの結果より、ヌタ場の下流に位置する清流河川にもMSTマーカーは存在しており、特に培養法による大腸菌の存否とは傾向が一致せず、大腸菌の指標性の限界が示された。

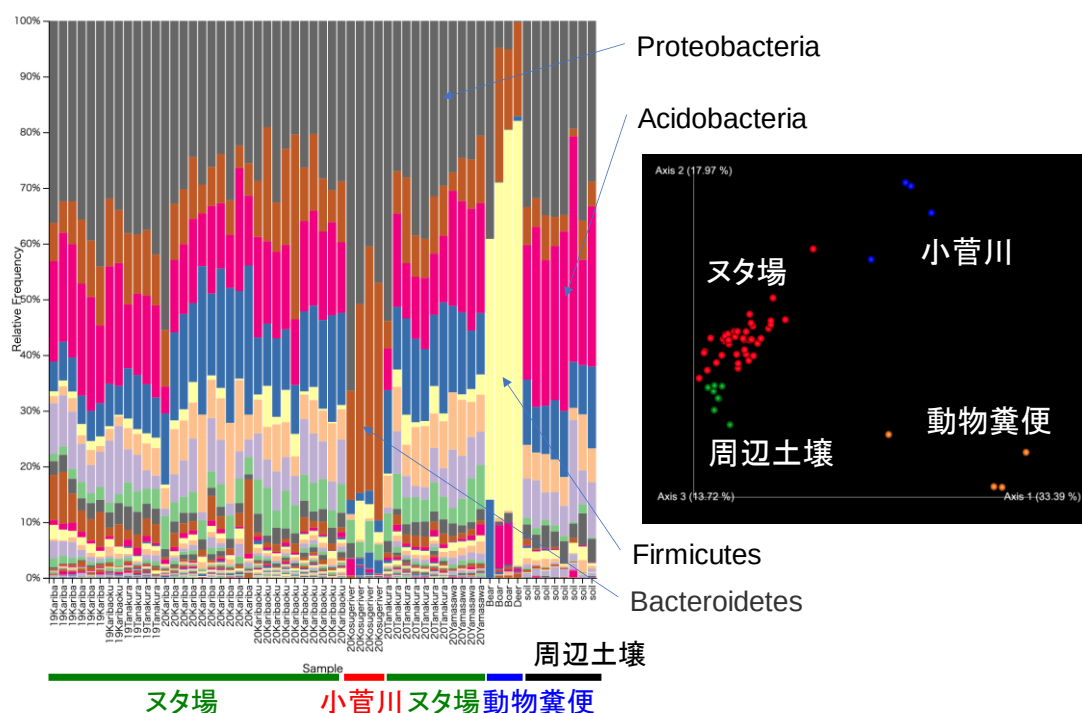


図3.3 ヌタ場試料からの細菌16S rRNAの検出結果



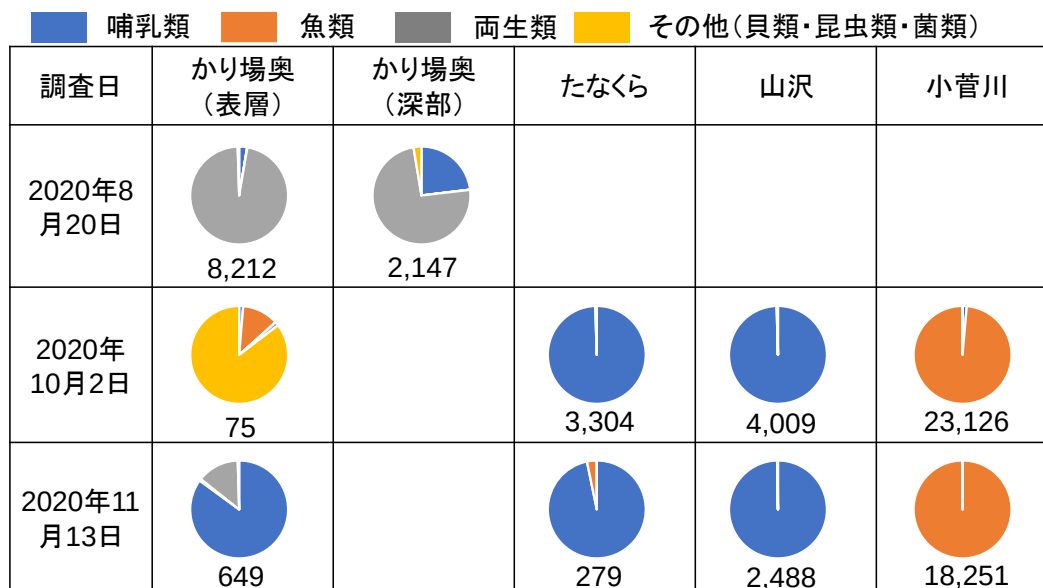


図3.4 スタ場泥・河川水試料からの環境DNAの検出結果(図中の数値は取得配列数)

表3.6 スタ場土壌・河川水試料からの哺乳類由来配列の検出結果

| 種名<br>(OUT数)       | 2020年8月20日   |              | 2020年10月2日 |       |       |     | 2020年11月13日 |      |       |     |
|--------------------|--------------|--------------|------------|-------|-------|-----|-------------|------|-------|-----|
|                    | かり場奥<br>(表層) | かり場奥<br>(深部) | かり場奥       | たなくら  | 山沢入り  | 小菅川 | かり場奥        | たなくら | 山沢入り  | 小菅川 |
| アジアアナグマ<br>(2)     | 0            | 120          | 0          | 1     | 0     | 0   | 0           | 0    | 0     | 0   |
| イノシシ(2)            | 1            | 0            | 0          | 2,757 | 1     | 0   | 0           | 269  | 0     | 1   |
| ニホンジカ(1)           | 0            | 0            | 0          | 0     | 3,984 | 0   | 0           | 0    | 0     | 0   |
| ヒト(7)              | 213          | 375          | 1          | 529   | 5     | 318 | 552         | 1    | 2,481 | 0   |
| スマトラオラン<br>ウータン(1) | 0            | 0            | 0          | 0     | 1     | 0   | 0           | 0    | 0     | 0   |

表3.7 河川水からのMSTマーカの検出結果

| 宿主         | 大腸菌・MSTマーカー               | 陽性試料数/測定<br>試料数(陽性率) |
|------------|---------------------------|----------------------|
| 糞便汚染<br>全般 | 大腸菌(培養法)                  | 5/13(38%)            |
|            | 大腸菌(qPCR法, <i>sfmD</i> )  | 7/13(54%)            |
|            | トウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)        | 2/13(15%)            |
| ヒト         | ヒトバクテロイデス( <i>gyrB</i> )  | 1/13(8%)             |
|            | クラスファージ(CrAssphage)       | 6/13(46%)            |
| 反芻動物       | 反芻動物バクテロイデス(BacR)         | 3/13(23%)            |
| ブタ         | ブタバクテロイデス(Pig2Bac)        | 0/13(0%)             |
|            | ブタミトコンドリアDNA(Swine-mtDNA) | 1/13(8%)             |

### 3) MSTマーカーとしての大腸菌ファージの有効性評価

体表面ファージは、下水流入水(18試料、1500~26500 PFU/mL)、2次処理水(18試料、12~70 PFU/mL)、放流水(15試料、0.3~1.5 PFU/mL)および豚舎排水(2試料、3,600~29,000 PFU/mL)のすべてから検出され、河川水試料の89%(34/38)からも0.1~60 PFU/mLの濃度で検出された。また、単離したブラックをマイクロウイルス科に特異的なリアルタイムPCR法、さらに、陽性となったブラックに対してPhiX174



マイクロウイルス属に特異的な定性PCR法を供した結果、いずれの種類の試料からもこれらのファージは検出された（図3-5）。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、PhiX174マイクロウイルス属の検出に基づくのみでは糞便汚染源解析は行うことは困難であることが示唆された。

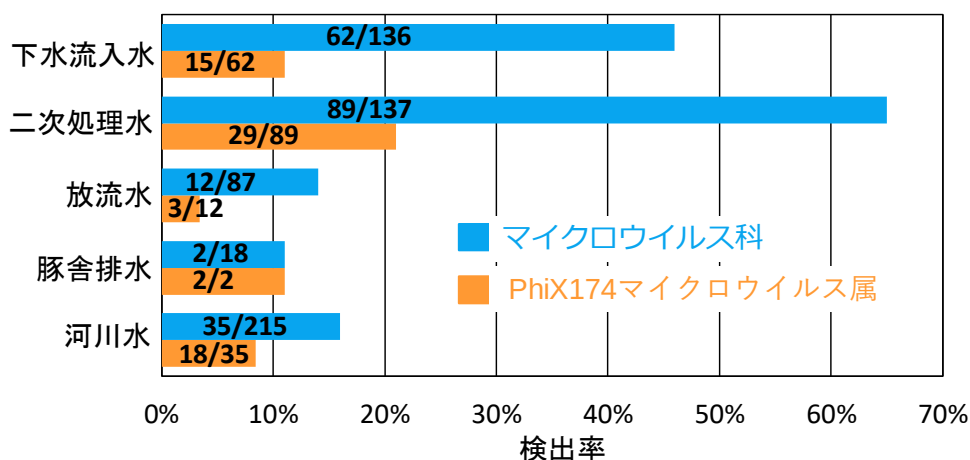


図3.5 糞便汚染源および河川水試料から単離したブラックを用いた体表面ファージ（マイクロウイルス科およびPhiX174マイクロウイルス属）の検出結果

#### 4) 大腸菌の培養MST法の開発

大腸菌K12を添加した実験原水を用いた実験では、滅菌超純水と河川水（ろ過滅菌あり・なしの2種類）のいずれを用いた場合でも、また、初期濃度を変化させた場合においても大腸菌の増殖速度に差は見られず、6時間で3 log（1,000倍）、8時間で4 log程度（10,000倍）程度の増殖が見られた（図3.6）。このことより、6時間程度の培養操作を行うことで、大腸菌が高濃度に増殖した試料を得ることができ、いずれの水試料においても8時間後には $10^6 \sim 10^8$  copies/mLの濃度で大腸菌遺伝子を検出することができた。最短で4時間でリアルタイムPCR法で検出可能な濃度を得ることができた。また、モバイルリアルタイムPCR装置であるPicoGene PCR1100（日本板硝子）を用いた場合にも同様の結果が得られ、迅速かつ簡便な大腸菌の測定が可能となった。

この培養法と下水由来大腸菌マーカーのリアルタイムPCR法を組み合わせるため、まず、2種類のマーカーを同時検出可能であるかどうかを検討した。図3.7に示すように、シングルプレックスリアルタイムPCR法でW\_nqrCは約91℃、W\_clsA\_2は約83℃のT<sub>m</sub>値を示し、マルチプレックスリアルタイムPCR法を実施した場合にも同等のT<sub>m</sub>値を示した。このことから、2種類のマーカーをマルチプレックスリアルタイムPCR法で検出可能であると判断した。

下水から得られたコロニーおよびウェル水にマルチプレックスリアルタイムPCR法を適用したところ、表3.8に示すように、大腸菌よりは低いものの、大腸菌群も高い割合で2種類のマーカーを有していることが明らかとなった。このことから、現時点で大腸菌の迅速・高感度検出は可能であるものの、下水由来の大腸菌の起源解析を組み入れることは困難であると判断した。今後、下水由来のみならず、シカやイノシシ等の起源別の大腸菌のみに特異的なMSTマーカーを新たに設計することができれば、迅速かつ高感度な大腸菌の起源解析法の構築につながるものと期待される。

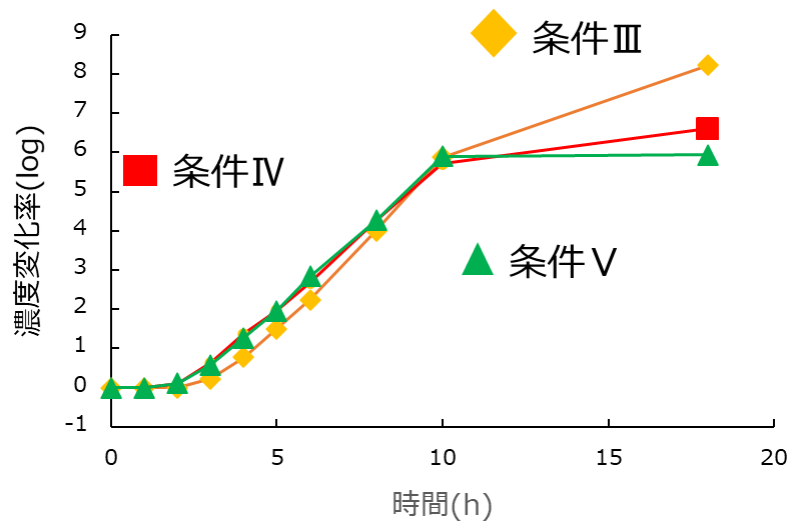


図3.6 コリラート-18を用いた迅速培養法による大腸菌濃度の経時変化（条件Ⅲ：河川水、条件Ⅳ：河川水（ろ過）（初期濃度：低）、条件Ⅴ：河川水（ろ過）（初期濃度：高））

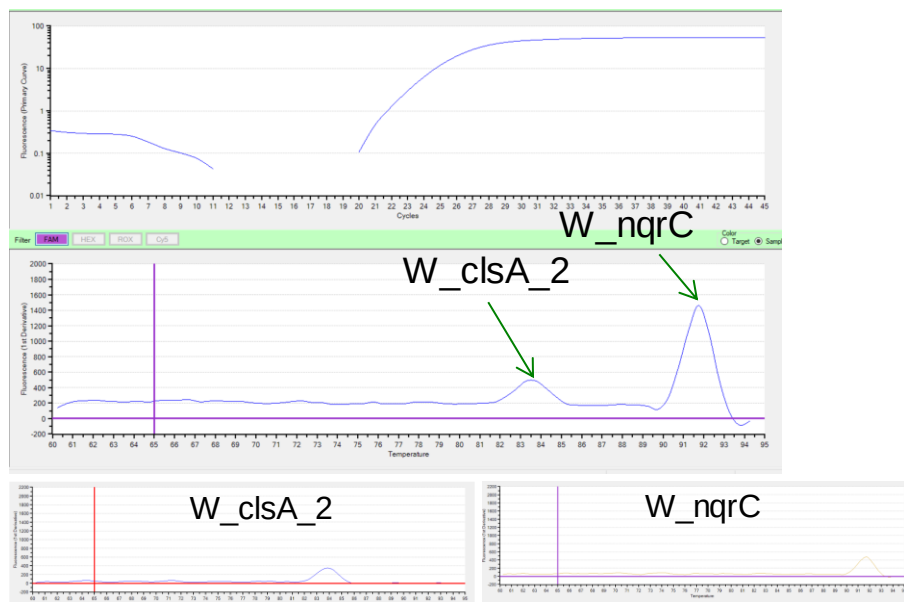


図3.7 マルチプレックスリアルタイムPCR法による2種類の下水由来大腸菌マーカーの同時検出の検討

表3.8 培養した大腸菌および大腸菌群からの下水由来大腸菌マーカーの検出結果

| マーカー     | クロモアガーECCコロニー  |                | コリラート-18ウェル    |                |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|          | 大腸菌            | 大腸菌群           | 大腸菌            | 大腸菌群           |
| W_nqrC   | 10/43<br>(23%) | 2/48<br>(4%)   | 52/75<br>(69%) | 25/59<br>(42%) |
| W_clsA_2 | 15/43<br>(35%) | 11/48<br>(23%) | 17/75<br>(23%) | 11/59<br>(19%) |
| 計        | 24/43<br>(56%) | 13/48<br>(27%) | 64/75<br>(85%) | 30/59<br>(51%) |

## 5. 研究目標の達成状況

3年間の研究期間中に山梨県小菅村のヌタ場を中心に当初予定以上となる160試料を採取し、これらの

試料中における大腸菌や様々なMSTマーカ等の存在実態を明らかにし、野生動物の活動状況に付加可能な情報を提供することで、微生物起源解析手法の有効性を示すことができた。

従来よりも短時間で大腸菌を測定可能な迅速培養法を開発し、サブテーマ2とも連携することで、下水由来大腸菌の判定への適用可能性を検討し、環境基準を超過する地点での水質管理に応用可能な知見を得た。

これらの成果により、当初の目標を達成できたと判断した。

## 6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

### Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

#### (1) 誌上発表

#### <査読付き論文>

##### 【サブテーマ1】

- 1) Inoue, K., Asami, T., Shibata, T., Furumai, H., Katayama, H.: Science of the Total Environment, 727, 138502. (2020) Spatial and temporal profiles of enteric viruses in the coastal waters of Tokyo Bay during and after a series of rainfall events (IF: 10.7)

##### 【サブテーマ2】

- 1) 杉江由規、井原賢、馬綴字、田中宏明: Environ. Sanit. Eng. Res., 35 (1), 29-35 (2021) 琵琶湖南東部の河川における大腸菌とその薬剤耐性の存在実態 (IF: なし)
- 2) Akihiko Hata, Yuya Shirasaka, Masaru Ihara, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: Science of the Total Environment, 780, 146607 (2021). Spatial and temporal distributions of enteric viruses and indicators in a lake receiving municipal wastewater treatment plant discharge (IF: 10.7)
- 3) 杉江由規、井原賢、馬綴字、田中宏明: 土木学会論文集G(環境)、76 (7)、III\_431-III\_440 (2020) 琵琶湖南東部の河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態と降雨の影響 (IF: なし)
- 4) 西田光希、張浩然、井原賢、田中宏明: 土木学会論文集G(環境)、76 (7)、III\_441-III\_448 (2020) 下水処理場から水域へ放流される年間微生物負荷量の推定 (IF: なし)
- 5) 山口武志、井原賢、山下尚之、林東範、田村太一、牧野樹生、田中宏明: 土木学会論文集G(環境)、77(7)、III\_11-III\_20 (2021) 雨天時の桂川の衛生 微生物指標に与える合流式下水道の下水処理場の影響に関する実態調査 (IF: なし)
- 6) Chih-Yu Ma, Masaru Ihara, Siyao Liu, Yoshinori Sugie, Hiroaki Tanaka: Environmental Advances, 8, 100185 (2022) Tracking the source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the aquatic environment in Shiga, Japan, through whole-genome sequencing (IF: 3.4)
- 7) Ryota Gomi, Yasufumi Matsumura, Michio Tanaka, Masaru Ihara, Yoshinori Sugie, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 77, 1237-1246 (2022) Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in *Enterobacterales* isolated from surface waters in Japan (IF: 5.8)
- 8) Chih-Yu Ma, Yoshinori Sugie, Zaizhi Yu, Yoshiki Okuno, Hiroaki Tanaka, Masaru Ihara: Chemosphere, 301, 134382 (2022) Occurrence of *E. coli* and antibiotic-resistant *E. coli* in the southern watershed of Lake Biwa, including in wastewater treatment plant effluent and inflow rivers (IF: 8.9)
- 9) Ryota Gomi, Masaki Yamamoto, Michio Tanaka, Yasufumi Matsumura: Current Research in Microbial Sciences, 3, 100144 (2022) Chromosomal integration of bla CTX-M genes in diverse *Escherichia coli* isolates recovered from river water in Japan (IF: 8.1)
- 10) 杉江由規、馬綴字、湯鈺、趙博、五味良太、西村文武、田中宏明、井原賢: 土木学会論文集G(環境)、78 (7)、III\_317-III\_326 (2022) 琵琶湖および流域河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態とその起源 (IF: なし)
- 11) Ryota Gomi, Eiji Haramoto, Hiroyuki Wada, Yoshinori Sugie, Chih-Yu Ma, Sunayana Raya, Bikash Malla, Fumitake Nishimura, Hiroaki Tanaka, Masaru Ihara: Science of the Total Environment, 864, 160952 (2023) Development of two microbial source tracking markers for detection of wastewater-associated *Escherichia coli* isolates (IF: 10.7)

## <査読付き論文に準ずる成果発表>

特に記載事項はない。

## <その他誌上発表（査読なし）>

特に記載事項はない。

### （２）口頭発表（学会等）

#### 【サブテーマ１】

- 1) 中浦英瑠、片山浩之：第55回日本水環境学会年会（2021）多試料分析に向けた陰電荷膜二段階ウイルス濃縮法の開発
- 2) 片山浩之：第58回環境工学研究フォーラム（2021）微生物測定は手間だが役に立つ
- 3) Miaomiao Liu, Hiroyuki Katayama: IWA World Water Congress & Exhibition 2022 (2022)  
Using viability quantitative PCR to evaluate the health risk of virus pollution derived from combined sewer overflow
- 4) Ryo Kishino, Takashi Hashimoto, Hiroyuki Katayama: IWA Aspire Conference & Exhibition 2023 (2023, accepted) Quantification of Infectious F-specific RNA Phage in Seawater by Membrane Adsorption Direct Cell Culture RT-PCR (MADCC-RT-PCR)

#### 【サブテーマ２】

- 1) 于再治、西田光希、張浩然、杉江由規、張浩、朴耿洙、趙博、井原賢、田中宏明：第23回日本水環境学会シンポジウム（2020）下水処理場における簡易処理発生時の病原ウイルス濃度変動の解明
- 2) 杉江由規、井原賢、馬緻宇、田中宏明：第57回環境工学フォーラム（2020）琵琶湖南東部の河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態と降雨の影響
- 3) 杉江由規、井原賢、馬緻宇、田中宏明：第42回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム（2020）琵琶湖南東部の河川における大腸菌とその薬剤耐性の存在実態
- 4) 西田光希、張浩然、井原賢、田中宏明：第57回環境工学フォーラム（2020）下水処理場から水域へ放流される年間微生物負荷量の推定
- 5) 杉江由規、馬緻宇、湯鈺、趙博、五味良太、西村文武、田中宏明、井原賢：第56回日本水環境学会年会（2022）琵琶湖、及び周辺河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態と起源推定
- 6) 井原賢、杉江由規、于再治、西田光希、馬緻宇、趙博、和田浩幸、朴耿洙、湯鈺、五味良太、西村文武、田中宏明：第25回日本水環境学会シンポジウム（2022）雨天時の下水処理場および河川における微生物濃度の変動
- 7) 杉江由規、馬緻宇、湯鈺、趙博、五味良太、西村文武、田中宏明、井原賢：第59回環境工学研究フォーラム（2022）琵琶湖および流域河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態とその起源
- 8) 五味良太、原本英司、和田浩幸、杉江由規、馬緻宇、Sunayana RAYA、Bikash MALLA、西村文武、田中宏明、井原賢：第57回日本水環境学会年会（2023）下水由来大腸菌を検出するための遺伝子マーカーの開発
- 9) Zaizhi YU, Mitsuki NISHIDA, Haoran ZHANG, Yoshinori SUGIE, Hao ZHANG, Kyoungsoo PARK, Bo ZHAO, Masaru IHARA, Hiroaki TANAKA. 第58回下水道研究発表会（2021）Viral removal by wastewater treatment during wet weather when primary effluent discharges occur.

#### 【サブテーマ３】

- 1) 原本英司：第66回日本水環境学会セミナー「水環境における病原性ウイルスモニタリング技術の動向」（2021）環境水中における病原微生物の汚染実態と微生物指標の活用

- 2) 伊藤聖晃、原本英司：第55回日本水環境学会年会（2021）環境水中の微生物遺伝子マーカーとしての体表面吸着大腸菌ファージの有効性評価
- 3) Eiji Haramoto: Virtual Conferences: ERS International Scientific Week (2021) Health-related water microbiology: wastewater-based epidemiology and microbial source tracking
- 4) Nana Frempong Manso, Bikash Malla, Eiji Haramoto: 4th International Forum on Asian Water Environment Technology (2021) Selection and application of bacteriophages as a microbial genetic marker in environmental water: the case of somatic coliphages
- 5) 原本英司、八束響、Sunayana Raya、Bikash Malla、濱端一苑、吉田響太、瀬川高弘、八重樫咲子、松林尚志：第25回日本水環境学会シンポジウム（2022）ヌタ場における微生物の存在実態調査
- 6) Nana Frempong Manso, Bikash Malla, and Eiji Haramoto: Water and Environment Technology Conference Online 2022 (2022) Fate of somatic coliphages as a microbial genetic marker in environmental water
- 7) 宗形亮、原本英司、金子栄廣、八重樫咲子：第50回土木学会関東支部技術研究発表会（2023）シカの糞を対象としたDNAメタバーコーディングによる食性解析
- 8) 佐々木優人、原本英司、金子栄廣、八重樫咲子：第50回土木学会関東支部技術研究発表会（2023）Nested PCR法を利用した環境DNAメタバーコーディングの検討

### （3）「国民との科学・技術対話」の実施

#### 【サブテーマ1】

- 1) 第36回水を語る会（主催：水を語る会、2020年10月31日、オンライン、参加者約60名）にて講演
- 2) 市民講座「SDGs時代の環境・みどり・防災」（主催：認定NPO法人かわさき市民アカデミー、2021年5月27日、川崎市生涯学習プラザ・オンライン併催、参加者約60名）にて講演
- 3) 技術士会近畿本部上下水道部会（2021年9月2日）にて下水疫学調査によるウイルス測定とその活用方法の将来展望について講演
- 4) 灘校土曜講座（2021年10月9日）にてウイルス感染リスク管理と水に関わる社会基盤について講演
- 5) 東京大学オープンキャンパス「都市工学」を開く（2022年8月4日、オンライン）にて講義
- 6) 東京大学キャンパス訪問対応（2022年11月19日、埼玉県立浦和第一女子高等学校1・2学年希望者60名）にて研究内容の紹介

#### 【サブテーマ2】

- 1) 京都大学図書館での研究紹介の展示「Website 桂の庭」（2021年1月18日～、web閲覧者、および図書館利用者が見学、現在も公開中）にて琵琶湖周辺河川での大腸菌調査の紹介 (<https://seeds.t.kyoto-u.ac.jp/seeds/ihara/>)
- 2) 国土交通省・土木学会（環境工学委員会下水道の持続可能性向上に寄与する先端融合技術に関する調査小委員会シンポジウム「医療・防災分野と下水道が連携した未来のサニテーションに向けて」（2023年1月24日、オンライン、参加者約200名）にて講演

#### 【サブテーマ3】

- 1) 山梨大学工学部オープンキャンパス（2020年8月9日、参加者約50名（高校生）、オンライン）にて水環境中の糞便汚染源解析に関する研究の紹介
- 2) やまなしジュニアドクター育成自然塾（2023年2月12日、参加者10名（小学生）、対面）にてシカ糞便内容物の分析に関する研究の紹介

- 3) IHRP2022 全国高校生異分野融合型研究プログラム（2022 年 6 月 11 日、参加者 10 名（高校生）、オンライン）にて環境 DNA 分析に関する研究の紹介

#### （４）マスコミ等への公表・報道等

特に記載事項はない。

#### （５）本研究費の研究成果による受賞

##### 【サブテーマ２】

- 1) 杉江由規、井原賢、馬綴宇、田中宏明：第42回京都大学環境衛生工学会シンポジウム、研究奨励賞 受賞
- 2) 杉江由規、井原賢、馬綴宇、田中宏明：第57回環境工学研究フォーラム、論文奨励賞 受賞
- 3) 杉江由規、馬綴宇、湯鈺、趙博、五味良太、西村文武、田中宏明、井原賢：第56回日本水環境学会年会、クリタ賞 受賞
- 4) 第58回下水道研究発表会口頭発表セッション 最優秀賞、公益財団法人日本下水道協会、2021年8月2日、Zaizhi YU, Mitsuki NISHIDA, Haoran ZHANG, Yoshinori SUGIE, Hao ZHANG, Kyoungsoo PARK, Bo ZHAO, Masaru IHARA, Hiroaki TANAKA.

#### （６）その他の成果発表

特に記載事項はない。

#### IV. 英文Abstract

### Development and Application of Microbial Source Tracking Tools for Emerging and Re-emerging Infectious Risk Management in Water Environment

Principal Investigator: Hiroyuki KATAYAMA

Institution: the University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo city, Tokyo, JAPAN

Tel: 81-3-5841-6271

E-mail: katayama@env.t.u-tokyo.ac.jp

Cooperated by: Tohoku University, Gunma University, Kochi University, Kyoto University, University of Yamanashi, Tokyo University of Agriculture

[Abstract]

Key Words: Water quality standards, hygiene indicators, *Escherichia coli*, microbial source tracking, risk management.

Actual measurements were taken of the fluctuations in indicator microorganisms such as *Escherichia coli* and phages, as well as enteric viruses, not only during clear weather but also after sewage overflow events during rainy weather in Tokyo Bay. In water areas predominantly treated with simple chlorination, infectious phages were detected in the absence of *Escherichia coli*, indicating a potential risk of infection by viruses. This suggests the possibility of infection risk from viruses even when the water has been treated with simple chlorination.

Novel genetic markers specific to wastewater-associated *Escherichia coli* were explored for microbial source tracking (MST). Ultimately, two wastewater-associated *Escherichia coli* genetic markers, namely W\_nqrC and W\_clsA\_2, were identified. PCR primers were also designed for the detection of these two genetic markers. It was found that when these genetic markers were used in combination, the sensitivity was approximately 25%, and the specificity was approximately 99%. These genetic markers can also be detected using colony PCR, making them useful for determining whether the detected *Escherichia coli* in routine water quality testing is of wastewater origin or not.

The contamination status of *Escherichia coli* and MST markers, such as in deer and wild boar gathering areas known as wallows are investigated. In addition to measuring *Escherichia coli* using culture methods and real-time PCR, MST markers targeting multiple viruses, *Bacteroidales*, and mitochondrial DNA, as well as measuring bacterial 16S rRNA and environmental DNA, were employed to reveal the overall picture of microbial contamination in the wallows, including the activity patterns of wildlife captured by automated cameras. The MST markers were detected even when *Escherichia coli* was not detected, indicating different behavior compared to *Escherichia coli*.