

環境研究総合推進費
H28-30環境問題対応型研究課題
課題番号:5-1603



東北大学



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

研究課題代表者: 片山浩之

日本水環境学会水中健康微生物研究委員会
東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

研究実施期間: 2016年6月～2019年3月

累積予算額: 112,941千円

研究体制

研究代表者：片山浩之○



日本水環境学会 水中の健康関連微生物研究会
委員長◎、副委員長○、幹事長●、*委員

東京大学グループ サブテーマ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



片山浩之○, 栗栖太, 小熊久美子,
端昭彦、井上健太郎

【連携研究者】 古米弘明（東京大学）

- * 東京湾の腸管系ウイルス・指標微生物のモニタリング
- * 大腸菌増殖特性の評価

京都大学グループ サブテーマ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



田中宏明◎, 山下尚之*, 井原賢*, 林東範

- * 琵琶湖における病原微生物のモニタリング
- * Fファージ遺伝子型解析、医薬品解析、
次世代シーケンサーに解析による汚染起源方法の有効性評価

東北大学グループ サブテーマ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



佐野大輔●

- * ノロウイルス吸着性大腸菌がノロウイルスの挙動に与える影響の調査

山梨大学グループ サブテーマ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



原本英司*

- * 山梨清流での腸管系ウイルス・指標微生物のモニタリング
- * 宿主特異性の高いウイルスやファージを用いた
新たな指標「ヒト糞便汚染度」の整理

学術分野の進展

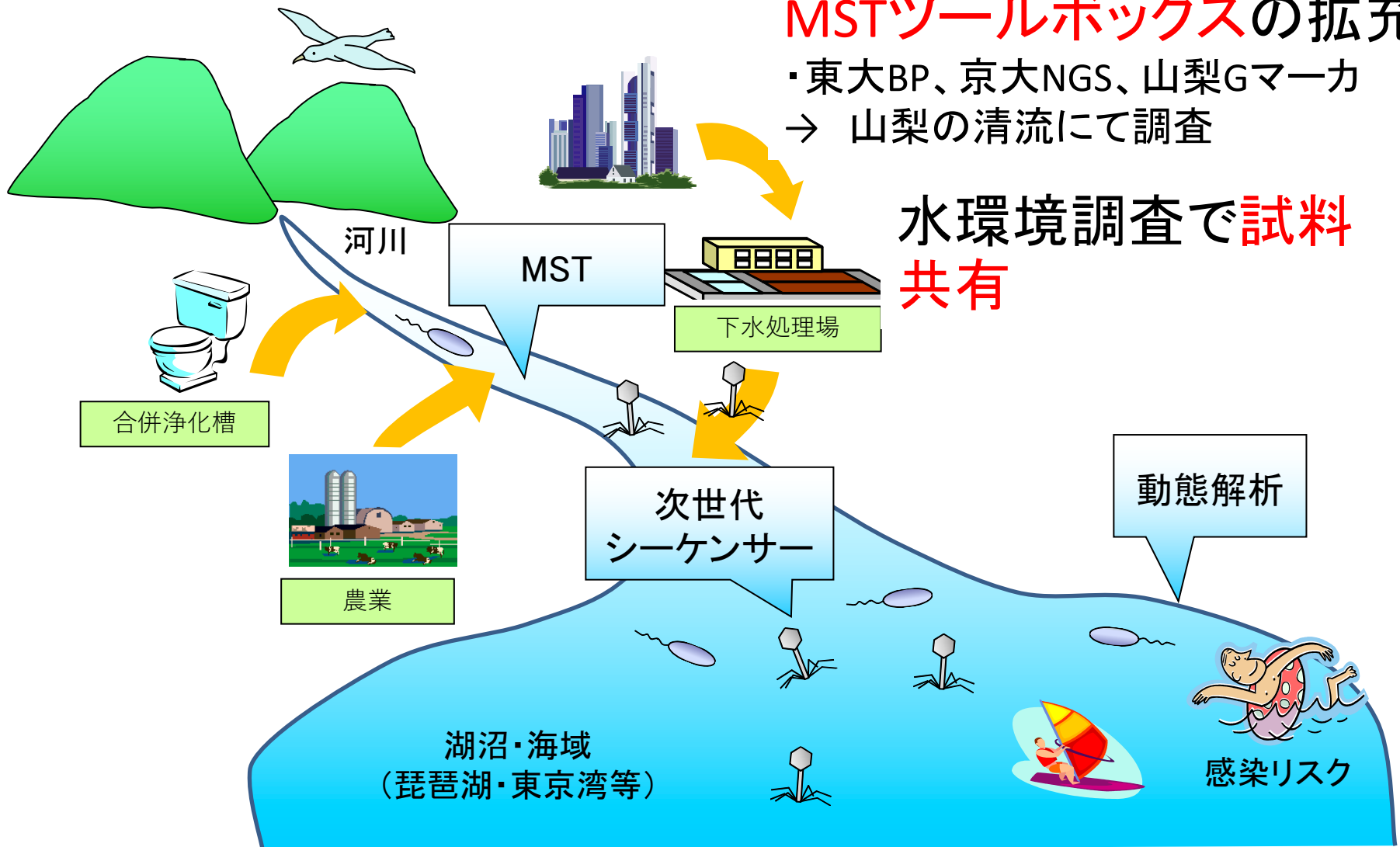
- **分子生物学**を用いた調査法(PCR等)の進展
 - **微生物起源解析**(MST)の発達
 - クリプトスポリジウム以降、**定量的微生物リスク評価**(QMRA)が発達
 - オランダではQMRAによる水道水質基準
 - USEPAやWHO等では、水中の病原微生物濃度に基づき、**QMRA**で水質ガイドライン設定を進めるべく準備中
- ⇔ 日本の行政では、大腸菌群・大腸菌の議論にとどまっている

河川・湖沼・沿岸域の病原・指標微生物調査

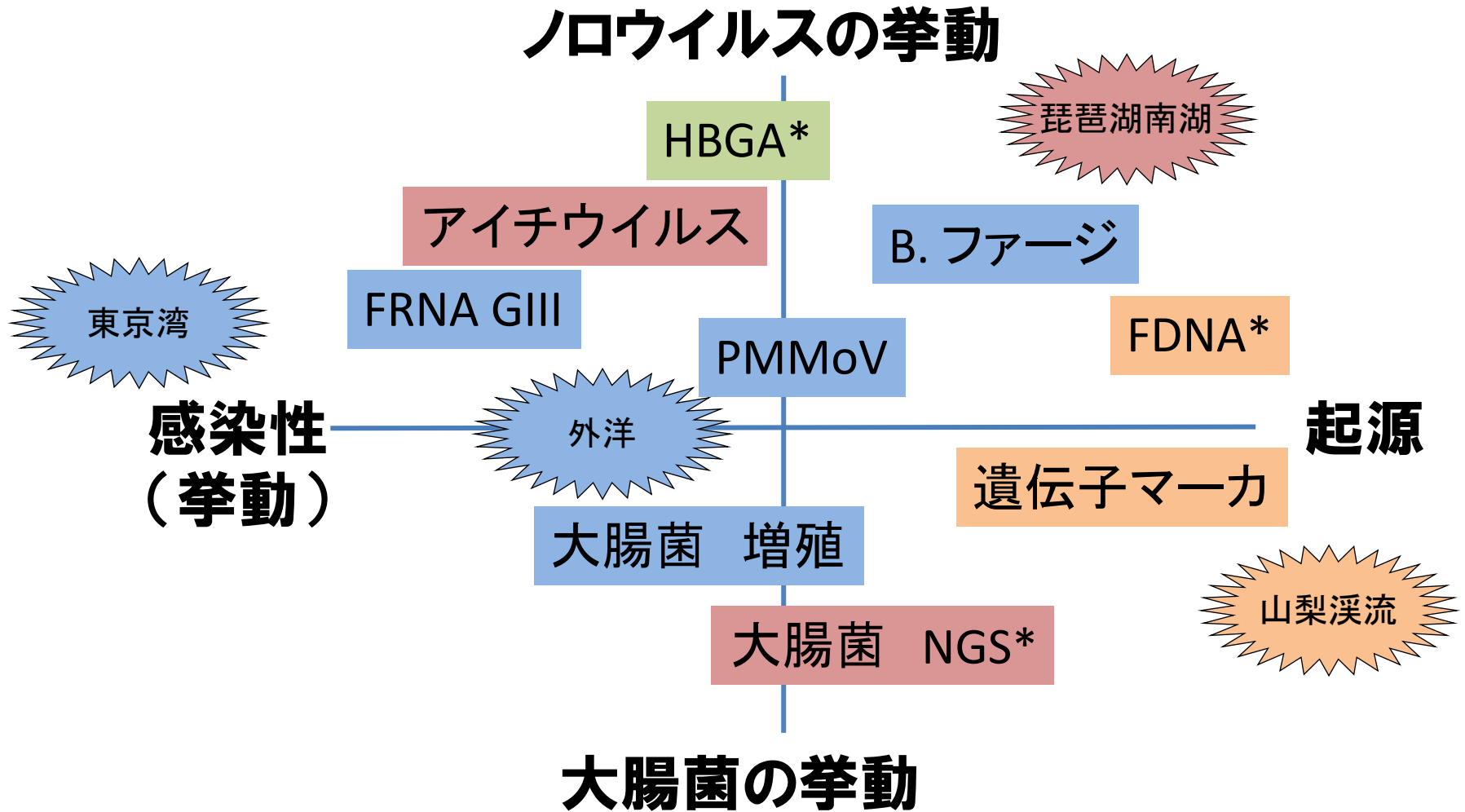
MSTツールボックスの拡充

・東大BP、京大NGS、山梨Gマーカ
→ 山梨の清流にて調査

水環境調査で**試料共有**



指標の位置づけ



①東京大

②京都大

③東北大

④山梨大

* : 世界で初めての試み

大腸菌の指標性

- 大腸菌群→大腸菌へBetterな選択
- ただし、限界も

1. 起源の特性: ヒト糞便の指標

⇔自然環境保全(環境基準AA)

MSTを用いた起源解析

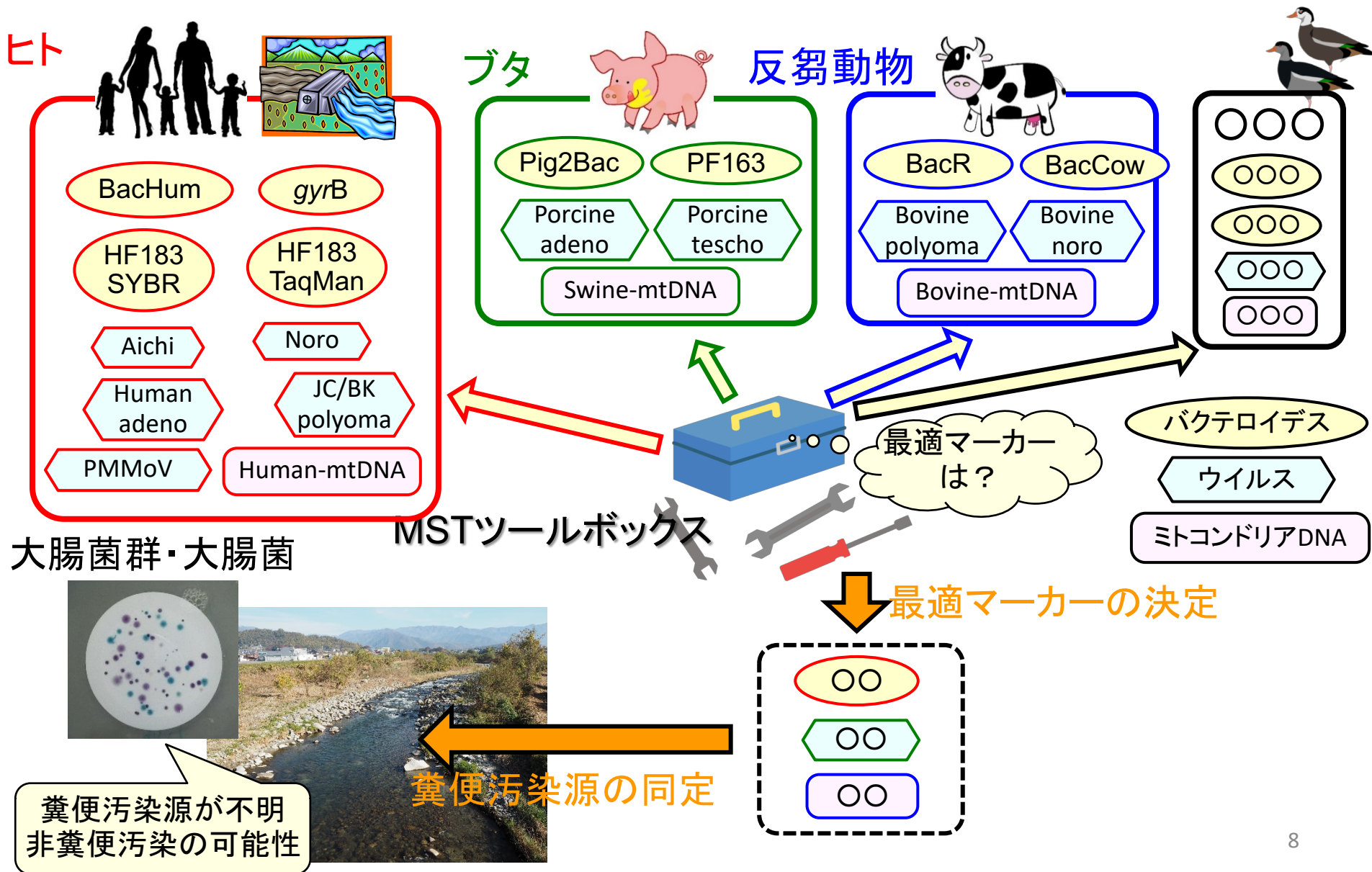
2. 挙動の特性: 病原細菌より高い生残性

⇔リスク管理(水浴基準)

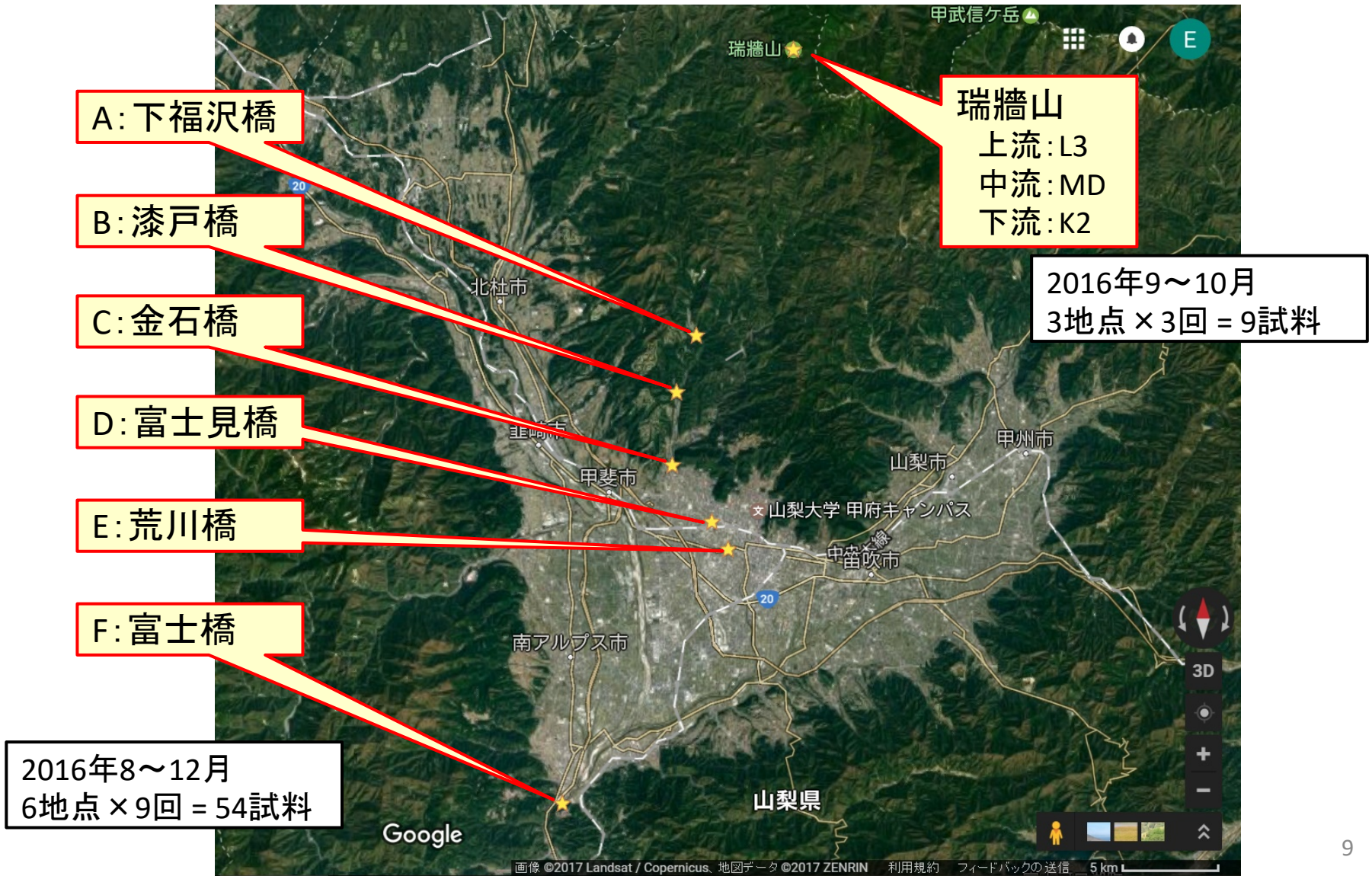
MSTを用いたウイルスの挙動解析

MSTを用いた起源解析

MSTツールボックスの活用方法

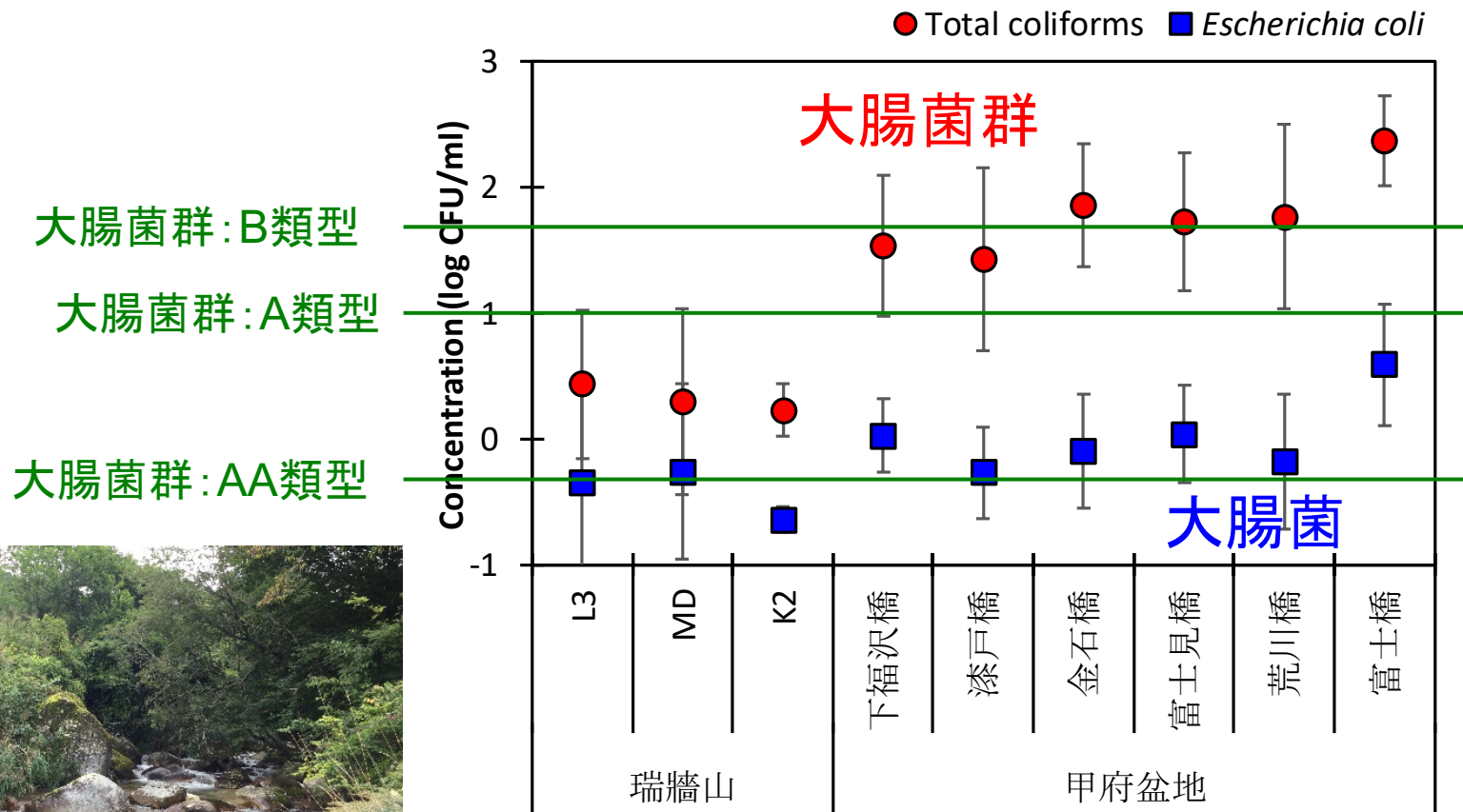


河川水の採取地点(瑞牆山, 荒川)



大腸菌群, 大腸菌の濃度(瑞牆山, 荒川)

- 河川源流域の瑞牆山の3地点においても, 大腸菌は常時検出された



バクテロイデスを用いたMST

- 様々な糞便汚染源試料に対し, **ヒト(3種類)**, **反芻動物(2種類)**および**ブタ(2種類)**に特異的なバクテロイデスのqPCRを実施した

試料	ヒト			反芻動物		ブタ	
	<i>gyrB</i>	BacHum	HF183- TagMan	BacR	BacCow	Pig2Bac	PF163- SYBR
流入水 ヒト	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%)

糞便汚染源試料に対するバクテロイデス qPCR系の適用結果

感度: 陽性試料を陽性と判定できた割合

特異度: 陰性試料を陰性と判定できた割合

正確度: 全試料に対し, 陽性・陰性を正しく判定できた割合

指標	ヒト			反芻動物		ブタ	
	<i>gyrB</i>	BacHum	HF183-TaqMan	BacR	BacCow	Pig2Bac	PF163-SYBR
感度 Sensitivity	23/25 (92%)	25/25 (100%)	25/25 (100%)	14/15 (93%)	15/15 (100%)	20/20 (100%)	16/20 (80%)
特異度 Specificity	11/18 (61%)	10/18 (56%)	0/18 (0%)	27/28 (96%)	12/28 (40%)	26/40 (65%)	24/40 (60%)
正確度 Accuracy	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

- 感度, 特異度, 正確度の3指標による評価の結果, 宿主特異的なqPCR系として, ヒトにはBacHum, 反芻動物にはBacR, ブタにはPig2Bacの使用が適していると判断した

河川水(瑞牆山, 荒川)からのバクテロイデスの検出結果

野生のシカ由来の汚染?

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

上流

下流

※ 70%以上の数値を赤字で表記, 濃度: log copies/L

- 琵琶湖南湖での大腸菌の起源推定:大腸菌の遺伝子解析の結果

- ✓ 放流水はヒト由来が最多
- ✓ 琵琶湖水はトリ由来が最多、次いでウシ由来
ヒト由来は非常に少ない

⇒下水以外にも畜産や水鳥など、琵琶湖南湖への大腸菌の負荷がある

環境政策への貢献

起源解析 まとめ

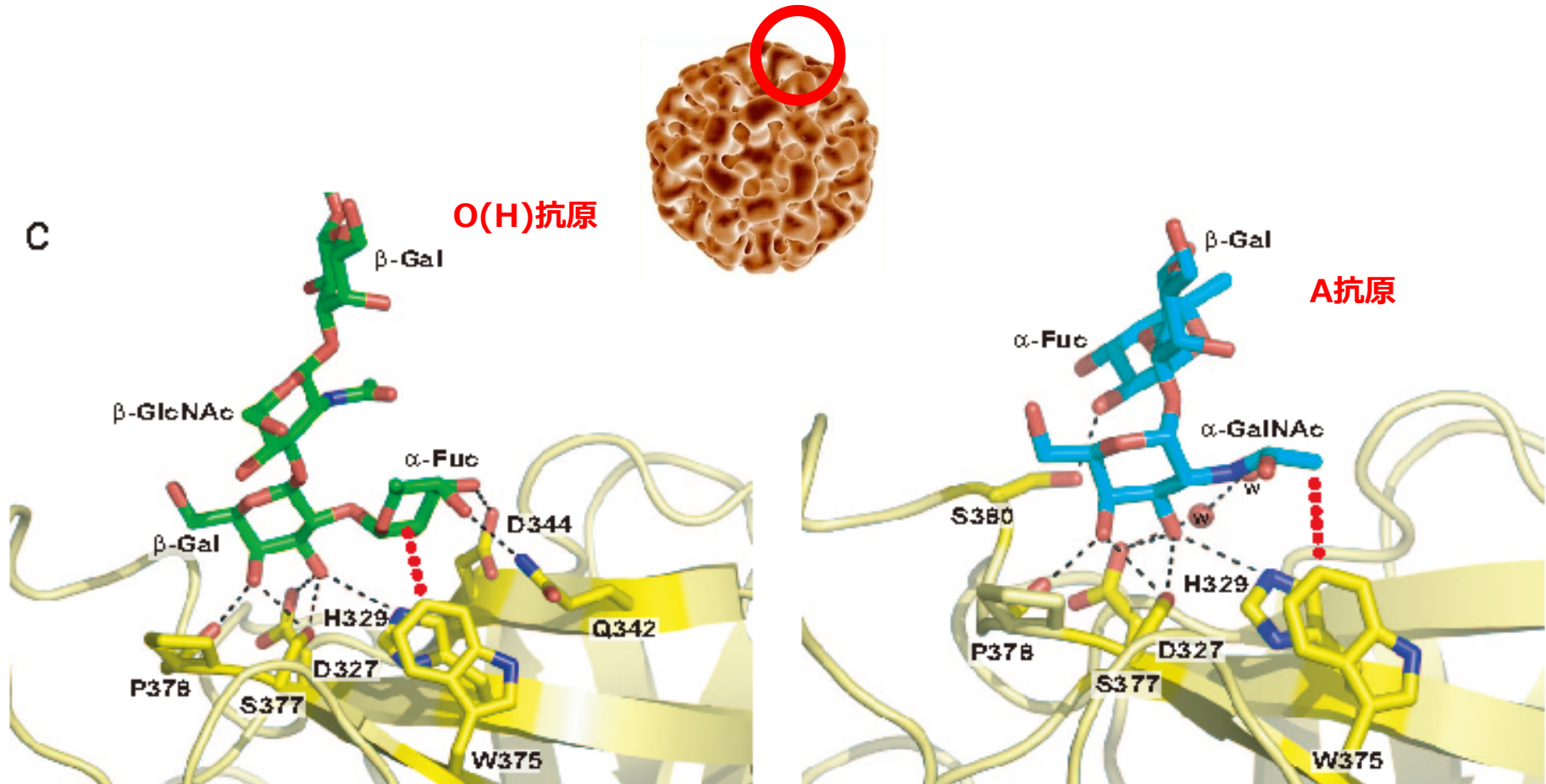
- 大腸菌や糞便汚染の宿主動物を推定することが可能(例えばヒトバクテロイデスBacHum)
- ヒトや家畜動物からの大腸菌を自然由来と区別

→ 大腸菌基準超過時に、自然由来の大腸菌によるのであれば、それを示すことは可能である。

その場合、環境基準を超えていないものとみなす管理方法も考えられる。

MSTを用いたウイルスの挙動解析

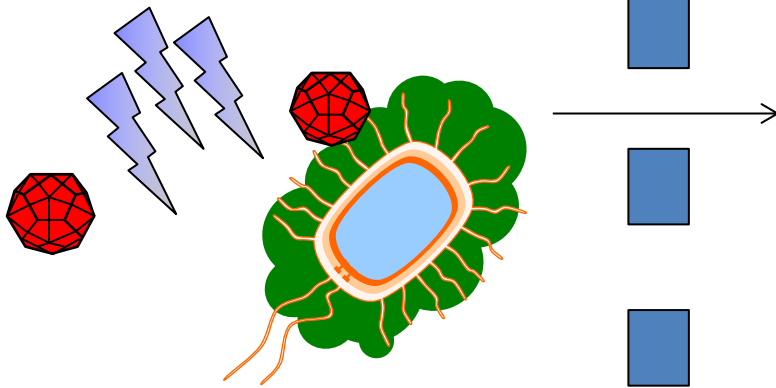
HBGA-ノロウイルス粒子間相互作用



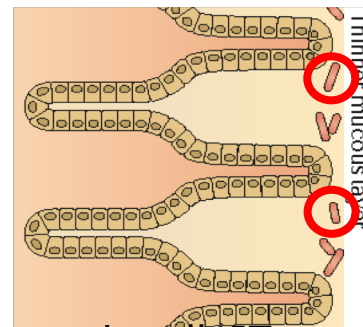
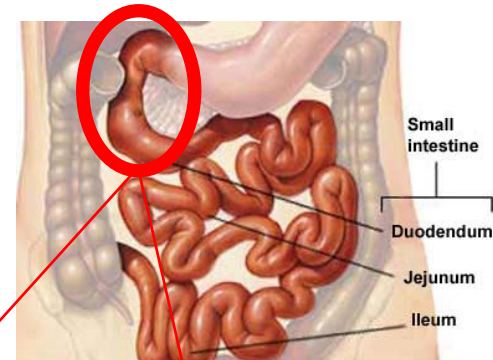
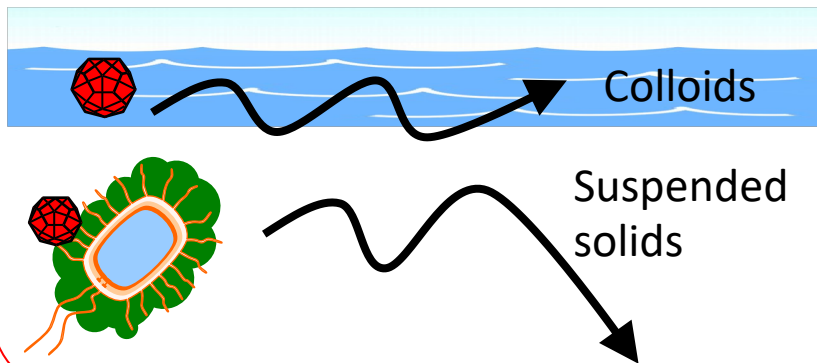
Choi et al., 2008, PNAS, 105(27), 9175-9180.

血液型決定抗原 (HBGA) 陽性大腸菌 = ノロウイルス吸着性大腸菌の存在意義

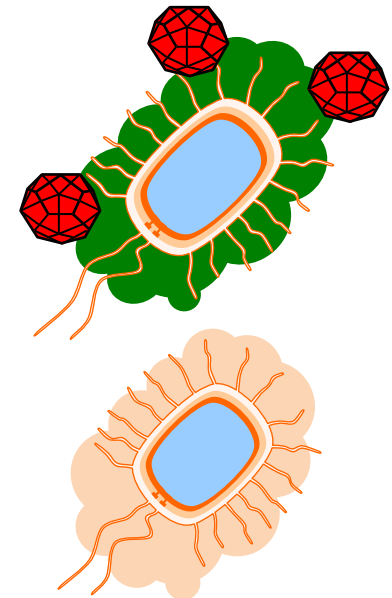
消毒剤感受性・膜処理性



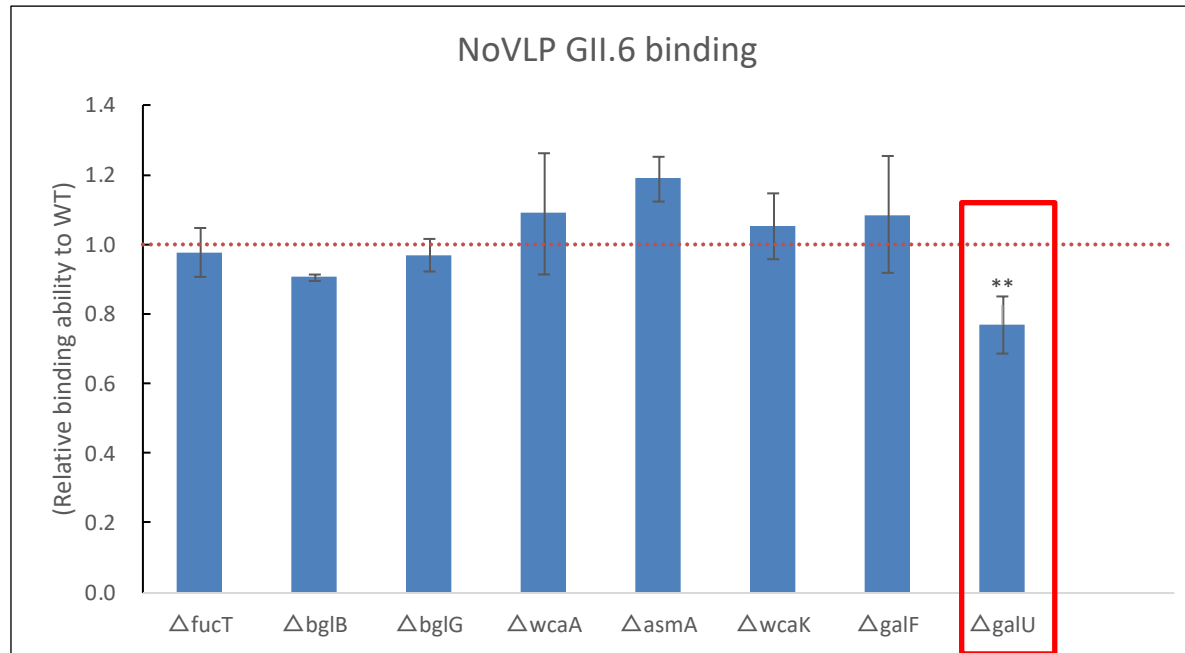
環境中動態



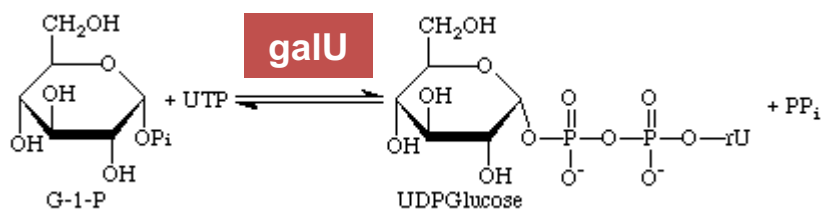
十二指腸
上皮細胞



ノロウイルス粒子結合試験



galU (UTP glucose-1-phosphate uridylyltransferase)



- 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と細胞壁にガラクトースを組み込むことができなくなる(Sundararajan *et al.*, 1962).

サブテーマ(1) 東京大学

採水地点・測定項目



サンプリング地点

STP:下水処理場 P:ポンプ所

腸管系ウイルスと指標微生物の存在状況

2016年度

①1日後

②1,3,5,8日後

2017年度

①1日後

②1,3,1,4日後 (間に降雨)

③4日後(晴天試料として)

2018年度

①1,3,1日後(間に降雨)

②1,3,5日後

降雨後1日目の試料を雨天時試料 (n=24)

降雨後4日以上経過した試料を晴天時試料 (n=20) とした.

測定微生物と測定方法

	測定項目	測定方法
指標微生物	大腸菌	コロニー計数
	FPH	ブラック法
	GI~GIII-FRNAPH	ICC-PCR
腸管系ウイルス	AiV	RT-qPCR

調査期間: 2014年8月から2015年11月まで月に1度.

調査地点: 琵琶湖南湖の6地点 (2015年4月より4地点)



① プラック法によるFPH定量

(感染力を考慮, 遺伝子群の判別不可)

1. 50 mLをシャーレに分取し, プラック形成

② MPN-ICC-RT-PCRによるFRNAPH定量

(感染力を考慮, 遺伝子群別定量)

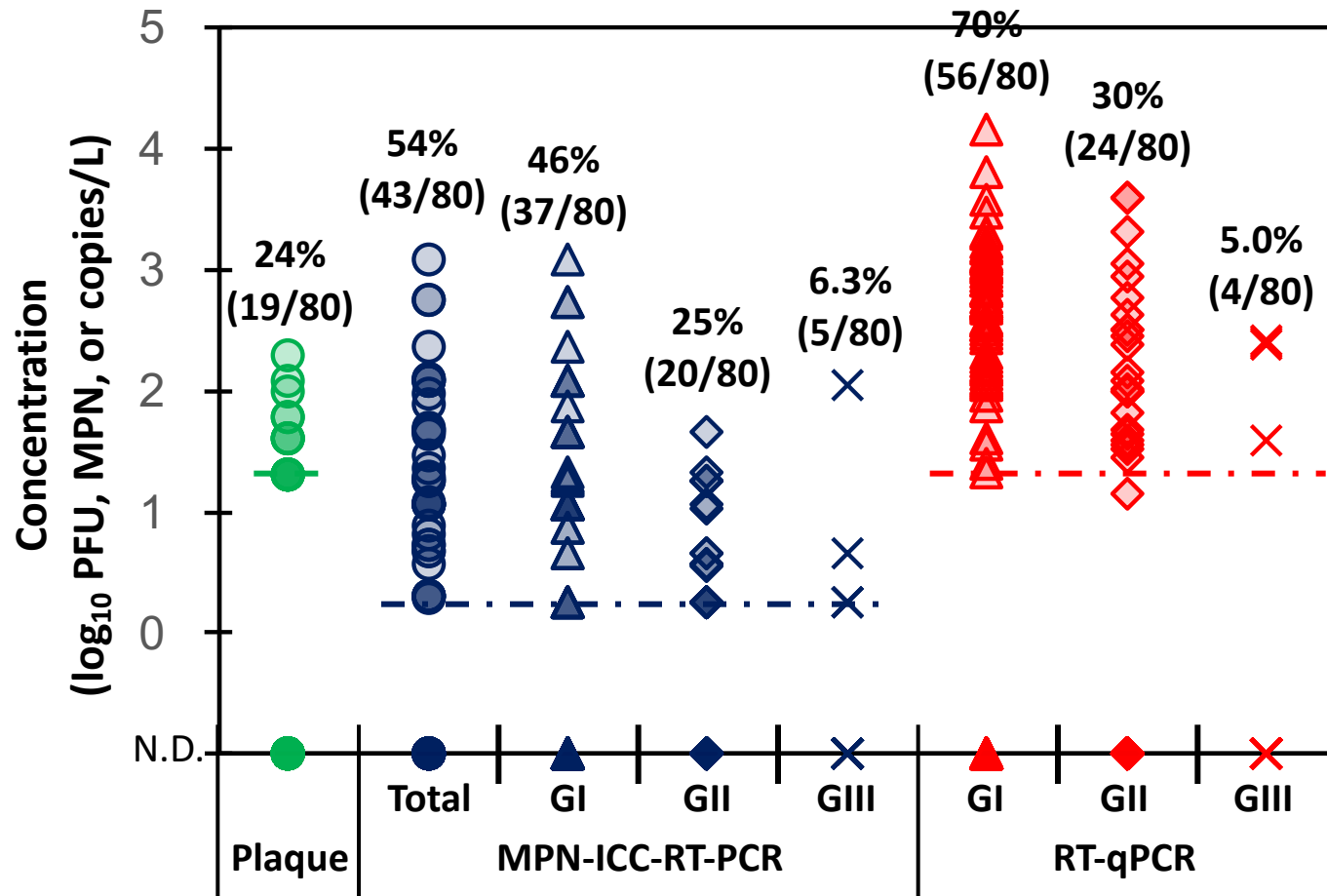
1. 0.2 – 200 mLの10倍段階, 3連で液体培養
2. 培養液にRT-qPCR適用, MPNにより定量

③ RT-qPCRによるFRNAPH定量

(感染力を無視, 遺伝子群別定量)

1. 試料2 Lを0.7 mLまで減容 (陰電荷MF膜 → UF膜)
2. RNA抽出ののちRT-qPCRで定量

各手法での検出結果



- 陽性率, 濃度ともに GI > GII > GIII > GIV (不検出)
- RT-qPCRは他の2手法よりも高濃度となる傾向. →感染力のないファージが検出されている.

環境政策への貢献

挙動解析 まとめ

- FRNAファージは、遺伝型別に耐性が異なる。
- 遺伝型別に感染性のあるファージの検出が可能である。

→感染性のあるGIII型が存在する場合は、きわめてリスクが高いと言えそうである。（東京湾の雨天時）

→感染性のあるGII型が存在する場合は、感染性のあるウイルスが存在していそうである。

国民との科学・技術対話

【一般公開シンポジウム】

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
「水環境の微生物学的安全性
に関する研究の動向」

2017年5月31日(水)

於: 東京大学 福武ホール

一般参加者: 75名

* 研究代表者・分担者による発表 4題

* 招へい外国人研究者によるQMRA
及びMSTに関する講演 2題



【国際学会シンポジウム】

5th Conference of International Society for Food
and Environmental Virology (ISFEV2016)

2016年9月13-16日 於: 草津

参加者: 150名

* 研究代表者、分担者がChairとSecretaryを務める



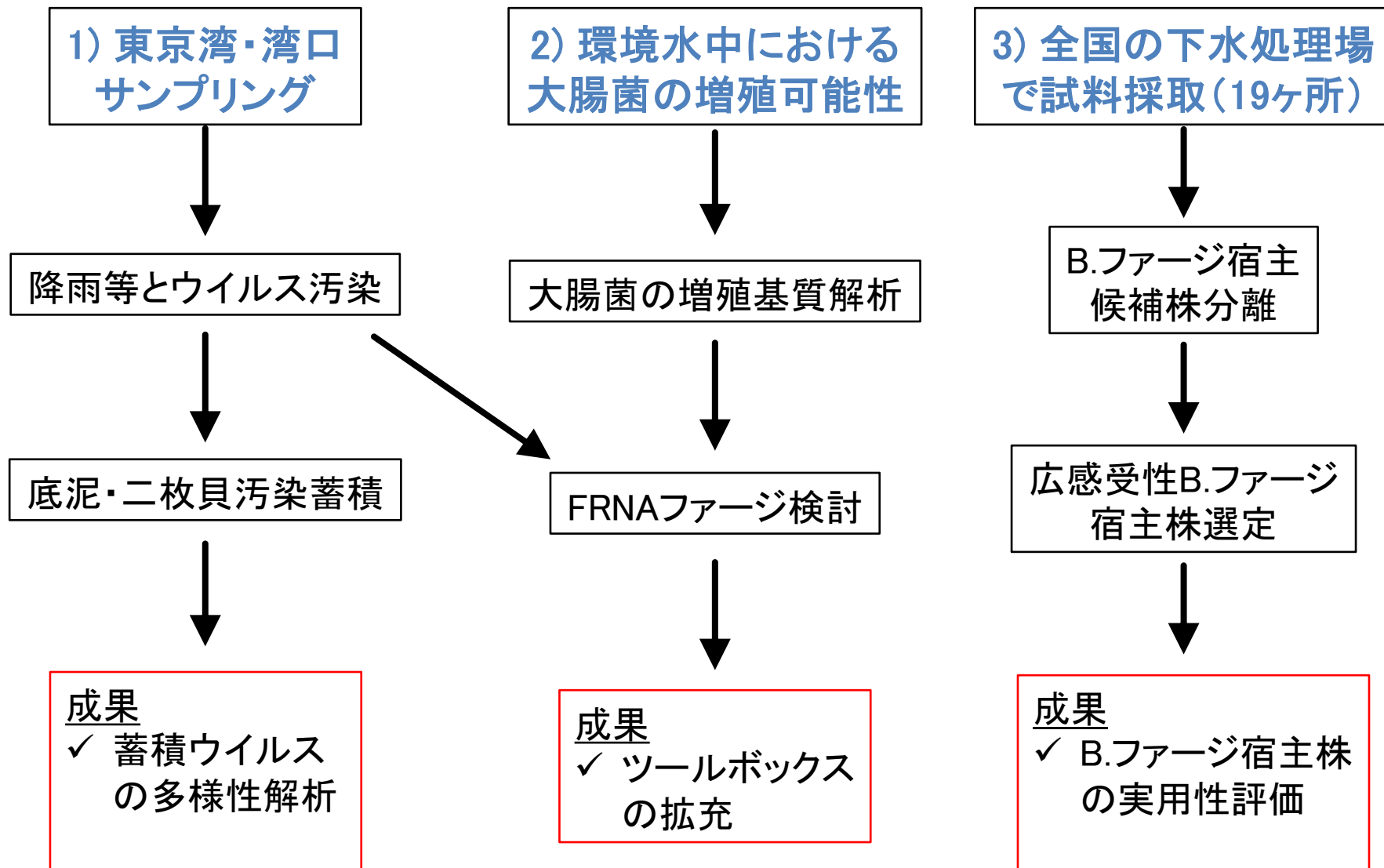
【水環境学会シンポジウム】

水中の健康関連微生物研究委員会

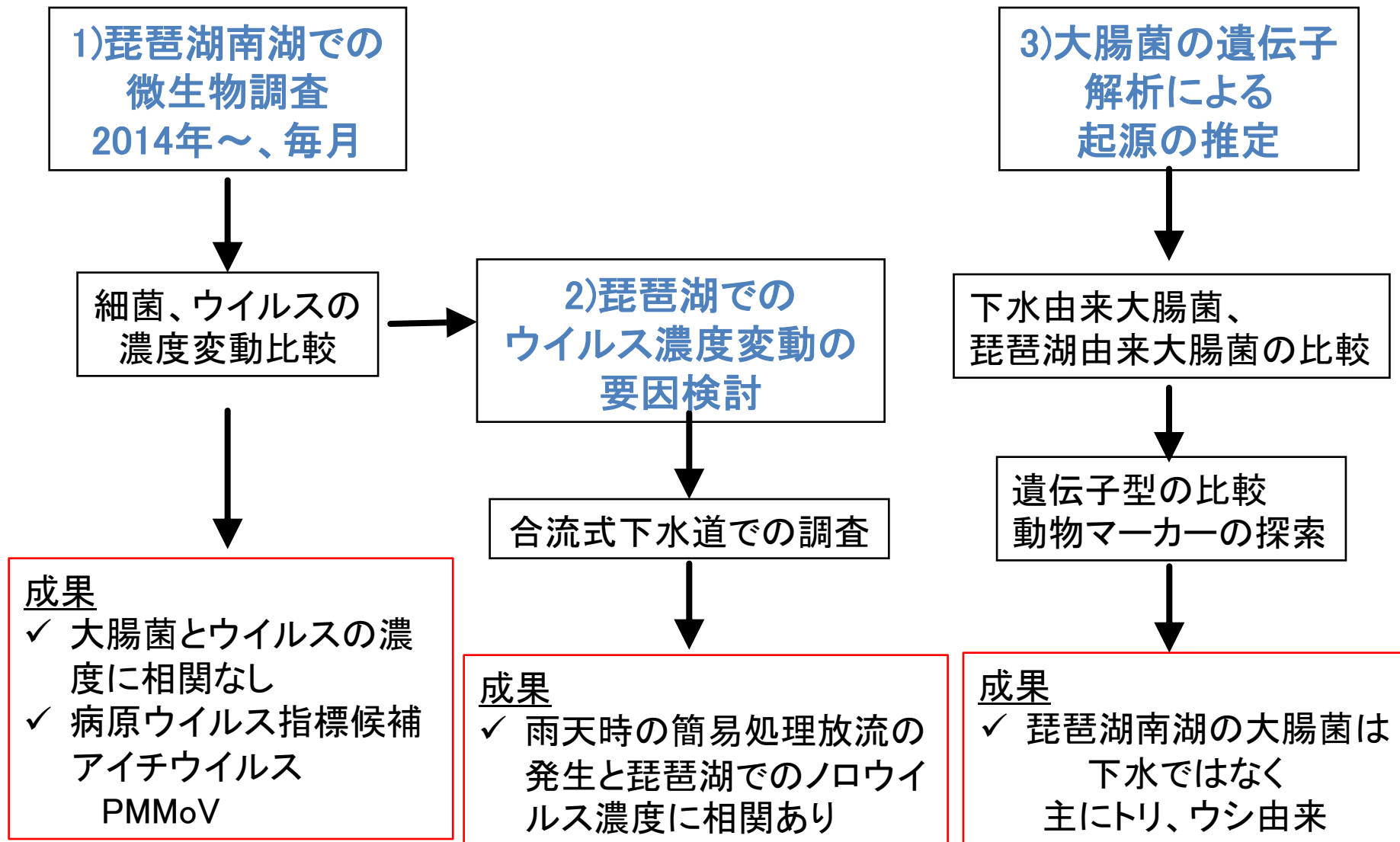
「ツールボックスアプローチ
による衛生学的水質評価」

2018年9月4日(水) 於: 島根大学

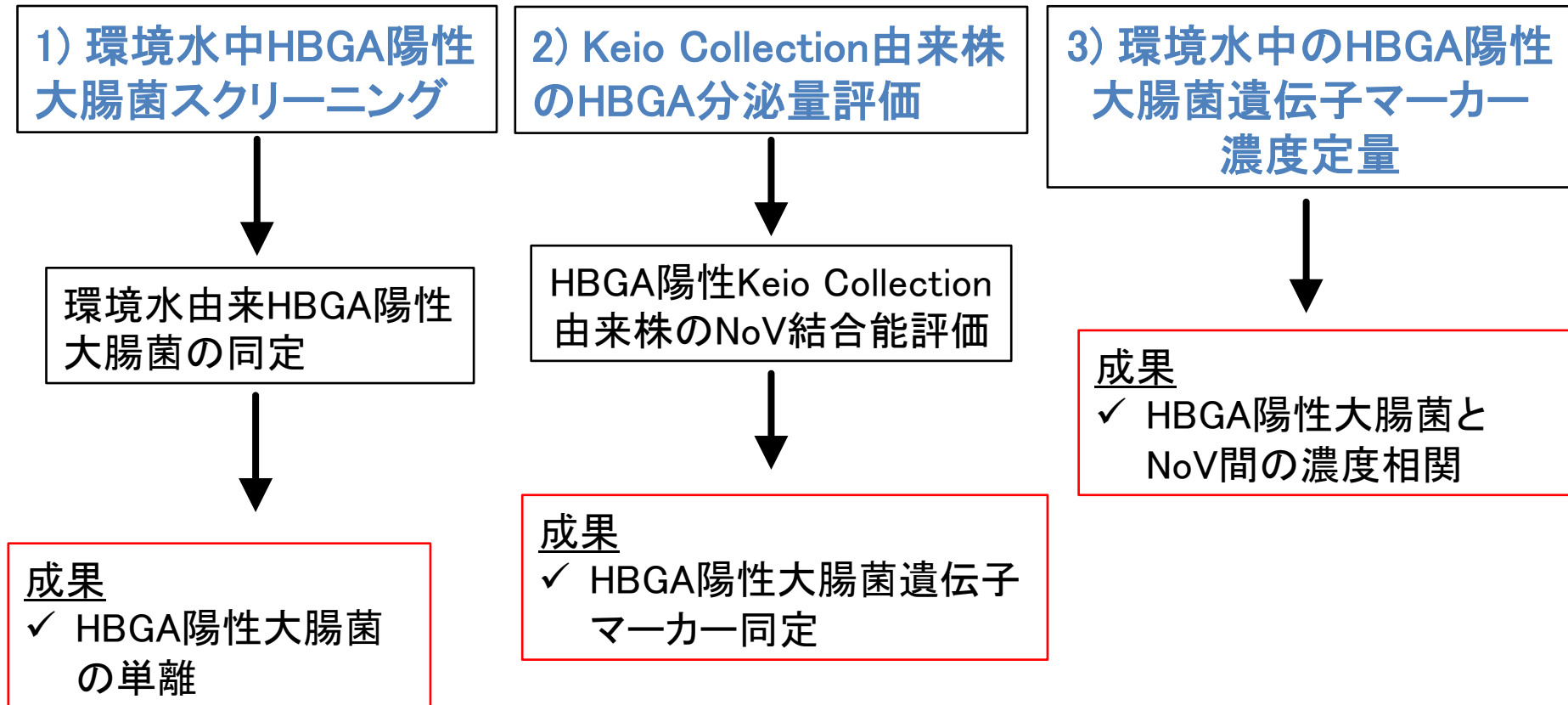
(1) 東京大学グループの成果



(2) 京都大学グループの成果



(3) 東北大学グループの成果



HBGA: ノロウイルス吸着性糖鎖

(4) 山梨大学グループの成果

1)流域ごとに適した MSTマーカ－の確立

糞便汚染源試料中のMST
マーカ－の検出
(感度・特異度・正確度による
評価)

成果

- ✓ 甲府盆地に適したMSTマ
ーカ－の確立
- ✓ 河川水の糞便汚染実態
の可視化に成功(土地利
用状況とマーカ－検出結
果の一致)
- ✓ 清流における反芻動物
由来の糞便汚染の影響
を示唆

2)他流域への最適 MSTマーカ－ 検出系の適用

琵琶湖南湖での調査
(京大グループと共同)

成果

- ✓ ヒト特異的MSTマーカ
ーの検出に成功
- ✓ 他の流域に対する本
アプローチの有効性
を示唆

3)新たなMSTマーカ－ 候補の検討

F特異DNA大腸菌ファージ
(F-DNAファージ)
体表面吸着大腸菌ファージ

宿主特異的な遺伝子群
の探索

成果

- ✓ ヒト・ブタ糞便汚染を
判別できる可能性