

環境研究総合推進費 (環境問題対応型研究)

5-2006



東北大学



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 研究代表者: 片山 浩之

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 教授

(公社)日本水環境学会 水中の健康関連微生物研究委員会 委員長

JPMEERF20205006

重点課題

■主: 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: 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

令和2年度-4年度

研究目的および研究体制

- 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こと



日本水環境学会

水中の健康関連微生物
研究委員会

◎ 委員長 ○ 顧問
● 幹事 * 委員

サブテーマ① 東京大学・東北大学・群馬大学グループ
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

◎ 片山浩之，* 小熊久美子，* 春日郁朗，橋本崇史

● 佐野大輔，* 加藤毅

* 東京湾の大腸菌、腸管系ウイルス等の時間変動モニタリング
* リスク管理に向けた不検出データの活用法の提案



サブテーマ② 高知大学・京都大学グループ
新たな大腸菌の起源解析方法の提案

* 井原賢，* 西村文武，* 五味良太，

* ゲノム配列を用いた大腸菌起源解析法の提案
* 琵琶湖水系における大腸菌の起源解析



サブテーマ③ 山梨大学・東京農業大学グループ
清流河川における微生物の汚染実態と
その起源解析

● 原本英司，八重樫咲子，瀬川高弘，松林尚志

* 清流河川とヌタ場における微生物の汚染実態調査
* 迅速・高感度な糞便汚染源判定手法の開発



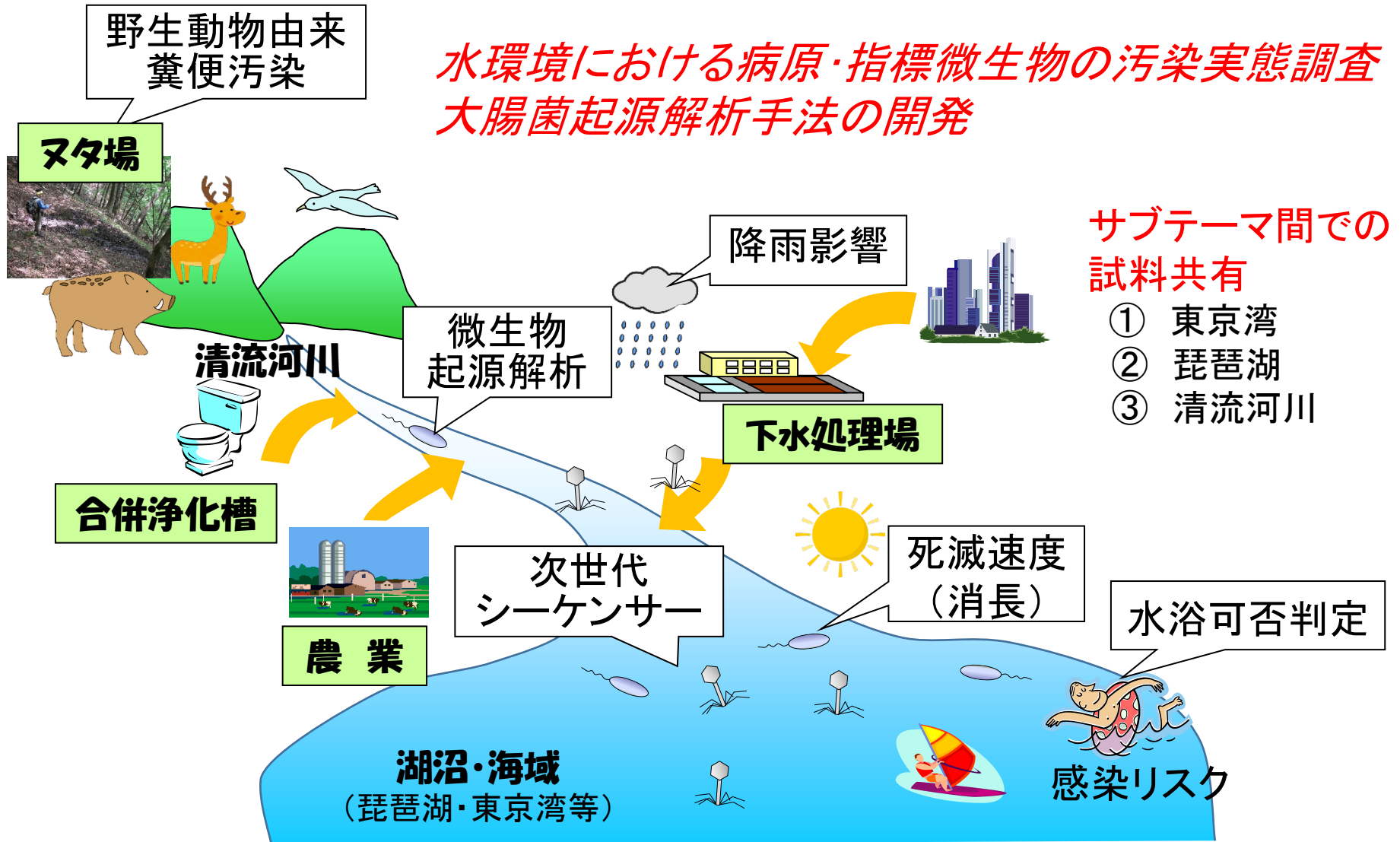
学術分野の進展

- **分子生物学**を用いた調査法(PCR等)の進展
 - メタゲノム解析による新しい指標の発見
 - **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

研究目的

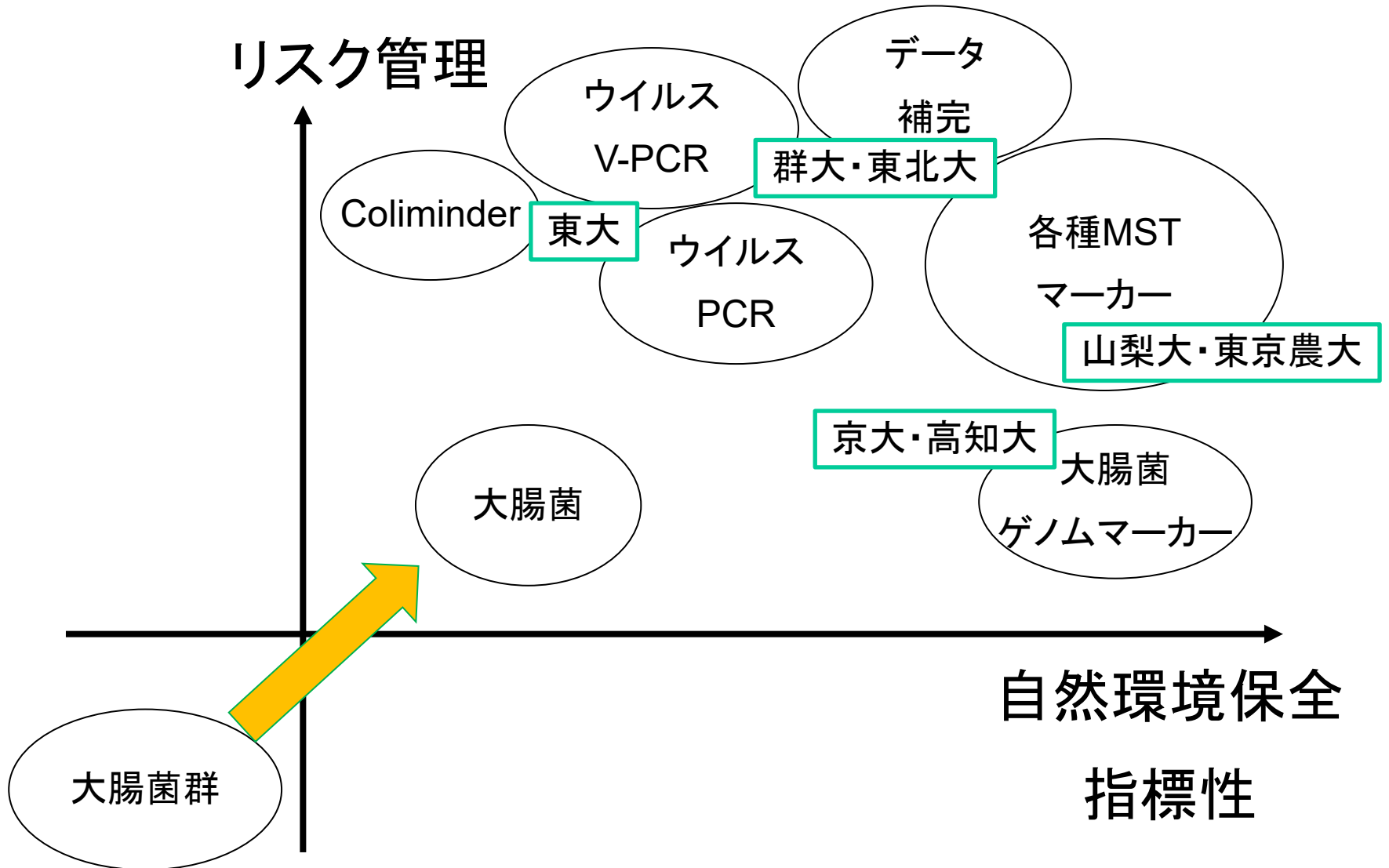
- 大腸菌群→大腸菌へBetterな選択(令和4年4月)
 - ただし、限界も
1. 起源の特性: ヒト糞便汚染指標としての限界
⇔ 自然環境保全(環境基準AA)
大腸菌の起源解析手法の開発が必要
(サブテーマ2、3)
 2. 挙動の特性: 病原細菌より高い生残性
⇔ リスク管理(水浴基準)
大腸菌を補足する新たなウイルス指標の開発が必要
(サブテーマ1)

本研究の概念図



大腸菌の指標性評価と新規指標の提案

成果の概念図





東北大学



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

水浴リスク管理の新たな枠組みの必要性

1) 水浴場における水浴の可否は、大腸菌群から大腸菌に変更(令和4年)

- 水浴場開場前の5・6月の測定、非常に限られた回数の測定
- 水質変動を反映せず、水質の良いときの試料が採取されやすい。
- 現行基準では場所の判定として機能

2) 東京湾において水浴できるか

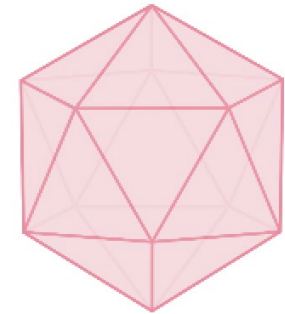
- 東京五輪において水浴させた(トライアスロンなど)。
- 都民の親水活動を可能とすることが考えられる。
- 従来の方法では不可。

3) 病原微生物濃度は大きく変動する

- 東京湾では雨天時に合流式下水道越流水の影響を受ける。
- ウイルスは大腸菌とは異なる挙動を示す。
- ウイルスの感染リスクを評価する必要がある。

F特異RNA 大腸菌ファージ(FRNAPH)

- ・直径20～30nmの非エンベロープ型一本鎖RNAウイルス
- ・レビウイルス科に属しF纖毛を持つ細菌を宿主とする
- ・**腸管系ウイルスと構造(正二十面体)、サイズが類似**
→病原ウイルスの指標



ノロウイルスなどと同様の
正二十面体構造を持つ

遺伝型	排出源	処理場流入	処理耐性
		下水中の割合	
GI(MS2)	動物	小	高 高
GII(GA)	ヒト	大	
GIII(Qβ)	ヒト	大	低 低
GIV(SP)	動物	極小	

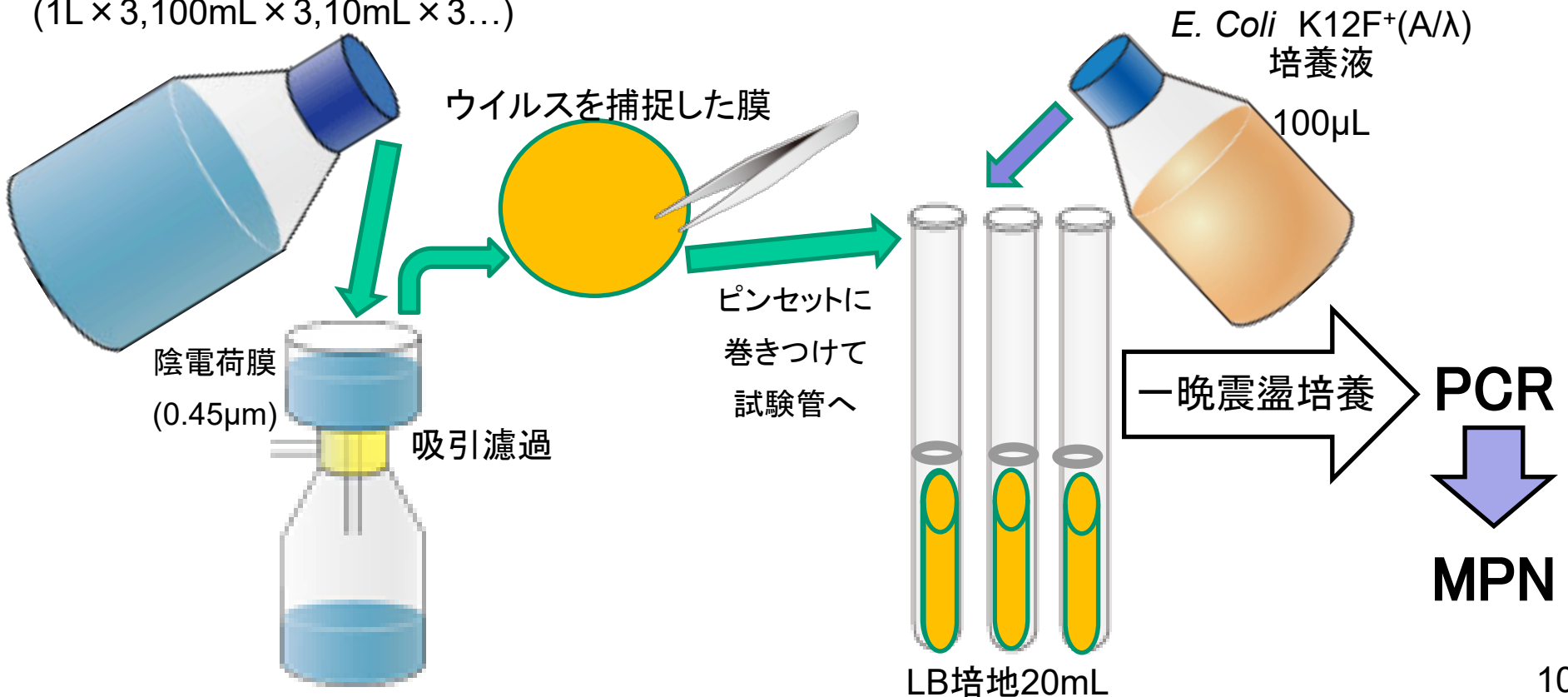
4つの遺伝型に分かれ、挙動や排出源が異なる

➡ 遺伝子型別に定量することで各々の特性に着目可能

膜吸着培養RT-PCR

- ・培養を挟むことで**活性のあるFRNAPH**のみ、定量性を**MPN法**で担保
- ・PCRにより**遺伝子型別**検出が可能
- ・大量の試料を測定できるため、**検出感度**が向上

(1L × 3, 100mL × 3, 10mL × 3...)



東京湾試料への適用-サンプリング

サンプリング日時



図1. サンプリング地点

・2022年12月14日(弱降雨後1日)

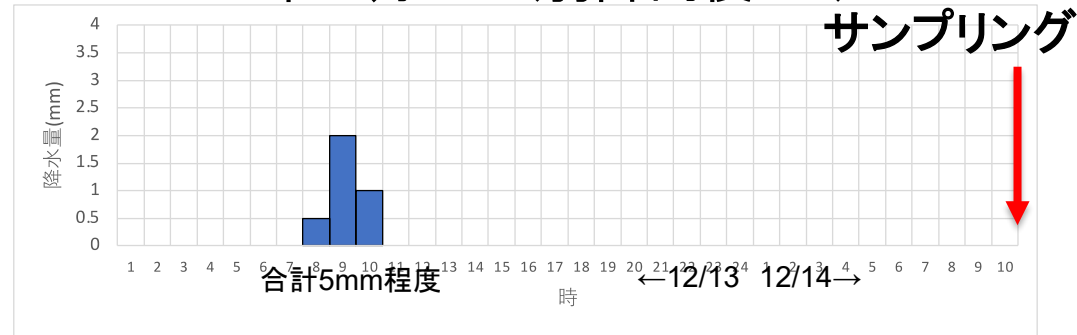


図2 12/13-12-14の降雨量(mm)(観測地点:東京)

・2022年12月22日(降雨時)

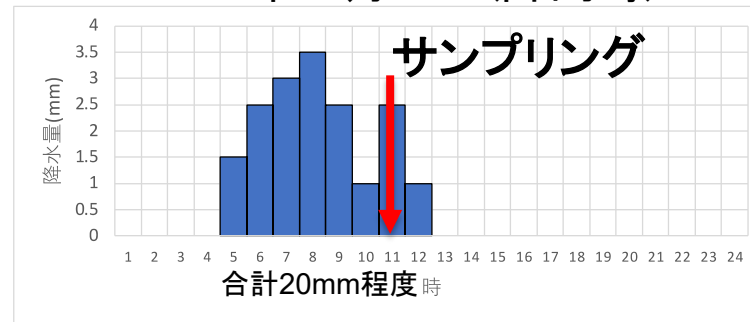


図3 12/22の降雨量(mm)(観測地点:東京)

採水地点(表層水)

- ①芝浦 ②目黒川河口 ③隅田川河口
④レインボーブリッジ

東京湾試料への適用-ウイルス濃度結果

雨天時の芝浦の微生物濃度

採水地点	Target	単位	12/22(雨天時)
芝浦	NoV G I	copies/L	0
	NoV G II	copies/L	4.78×10^3
	Aichi V	copies/L	3.05×10^2
	PMMoV	copies/L	3.46×10^8
	FRNAPH G I	MPN/L	9.27×10
	FRNAPH G II	MPN/L	4.37
	FRNAPH G III	MPN/L	0
	大腸菌数	CFU/L	0
	大腸菌群数	CFU/L	5.00×10^3

12/22芝浦

(雨天時簡易処理水の影響大)

大腸菌は**不活化**



大腸菌の塩素耐性の低さを

FRNAPH GIIで補完できる可能性

感染性のあるFRNAPH GII検出

水中病原微生物濃度の補完

- 従来モデル

y_1	y_2	x_1
≤ 4.0	6.5	6.9
≤ 4.0	3.0	3.2
≤ 4.0	5.5	9.5
5.0	7.0	0.3
10.2	3.8	4.4
10.7	9.0	3.8

補完

y_1	y_2	x_1
1.6	6.5	6.9
1.3	3.0	3.2
3.7	5.5	9.5
5.0	7.0	0.3
10.2	3.8	4.4
10.7	9.0	3.8

打ち切りは1列のみ

- 提案モデル

y_1	y_2	x_1
≤ 4.0	6.5	6.9
≤ 4.0	≤ 4.0	3.2
≤ 4.0	5.5	9.5
5.0	7.0	0.3
10.2	≤ 4.0	4.4
10.7	9.0	3.8

補完

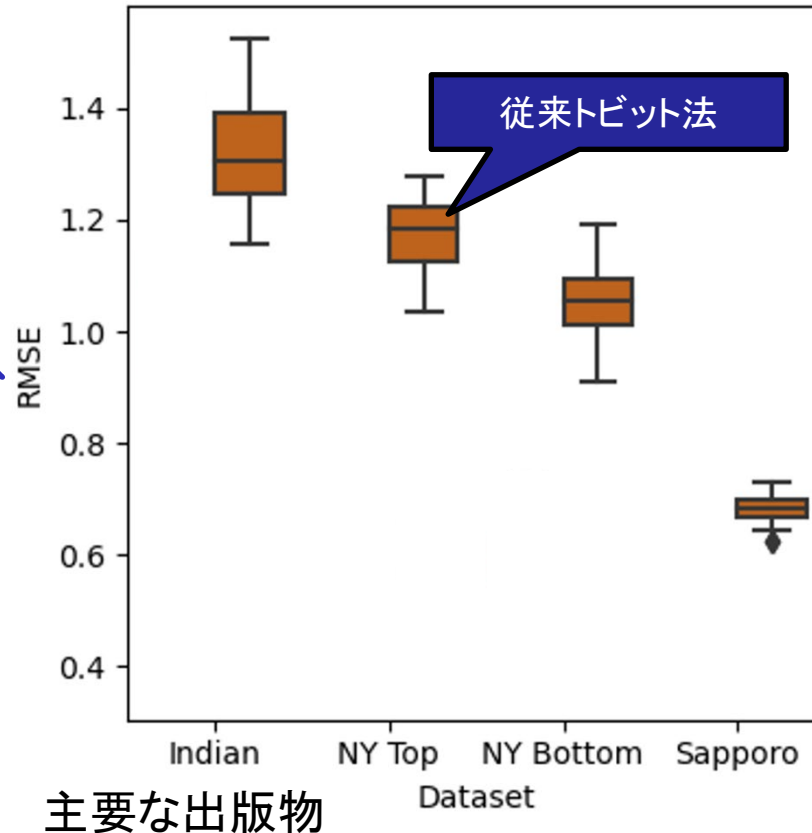
y_1	y_2	x_1
1.6	6.5	6.9
1.3	3.0	3.2
3.7	5.5	9.5
5.0	7.0	0.3
10.2	3.8	4.4
10.7	9.0	3.8

打ち切りは複数列でもよい

補完の実験結果

- 標本サイズ : 100個
- 試行回数 : 50回

誤差
小さいほどよい



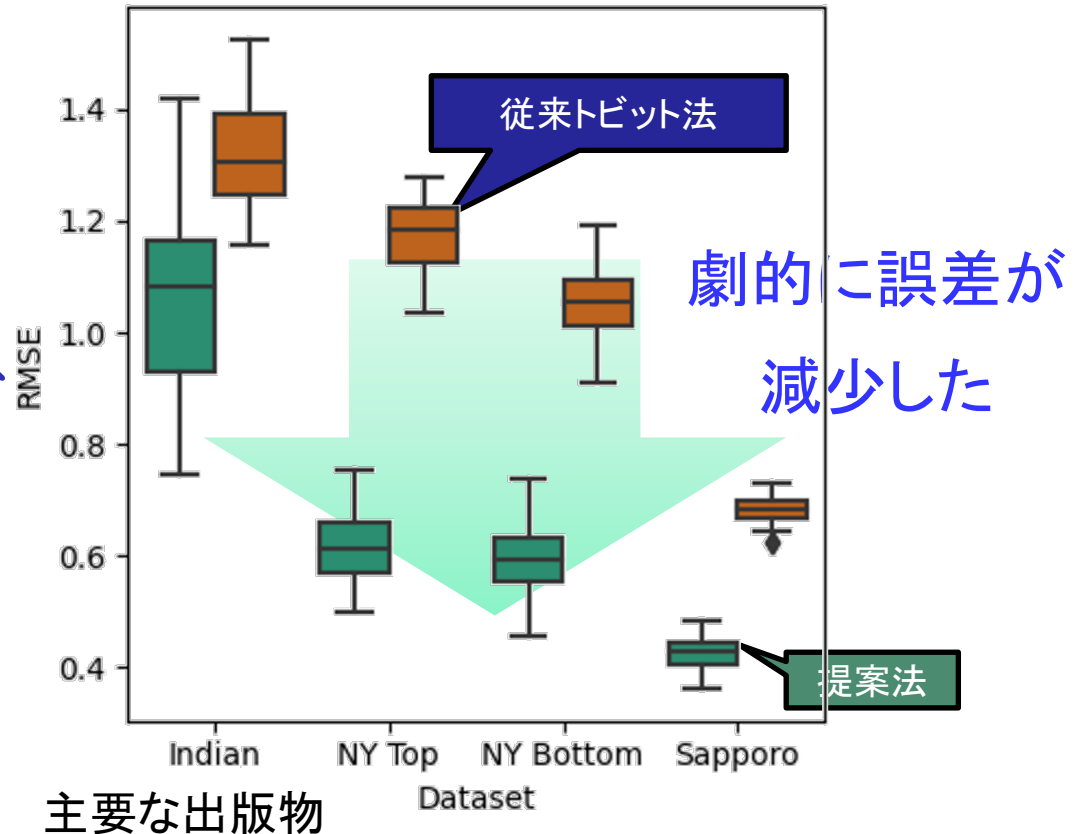
- HongYuan Cao and Tsuyoshi Kato, Asymmetric Tobit analysis for correlation estimation from censored data, IEICE Transactions on Information & Systems, Vol.E104-D,No.10,pp.1632--1639,Oct. 2021.DOI: 10.1587/transinf.2021EDP7022
- Yuya Takda, Daisuke Sano, Syun-suke Kadoya, Tsuyoshi Kato, Multi-Target Tobit Models for Completing Water Quality Data, IPSJ Transactions on Mathematical Modeling and its Applications (TOM), minor revision.

補完の実験結果

- 標本サイズ : 100個
- 試行回数 : 50回

誤差
小さいほどよい

➤ 同時に補完した方が
高精度に推定できる



- HongYuan Cao and Tsuyoshi Kato, Asymmetric Tobit analysis for correlation estimation from censored data, IEICE Transactions on Information & Systems, Vol.E104-D, No.10, pp.1632--1639, Oct. 2021. DOI: 10.1587/transinf.2021EDP7022
- Yuya Takda, Daisuke Sano, Syun-suke Kadoya, Tsuyoshi Kato, Multi-Target Tobit Models for Completing Water Quality Data, IPSJ Transactions on Mathematical Modeling and its Applications (TOM), minor revision.

サブテーマ1 成果まとめ

1. 膜吸着培養PCR法により**感染性のあるFRNAファージ**の遺伝型別高感度測定が可能となった。

雨天時越流水の簡易処理の影響が大きい受水域において**大腸菌が不検出**であるにもかかわらず**感染性のあるファージが検出**された。塩素消毒に対する感受性の違いが反映されていると考えられる。ウイルスリスク管理に有用であることが示された。

2. 酵素による迅速測定法Coliminderは雨天時越流水の影響が大きい海水試料から大腸菌を検出することができた。
3. 試料採取現場における時間短縮を目指したウイルス濃縮法を開発し、これまでよりも短時間で多数の試料の採取が可能となった。
4. カプシド完全性試験を組み合わせたPCR法によるウイルス測定法を開発し、その有効性を評価した。
5. 水中微生物濃度の補完方法を新たに提案し、誤差を少なく推定することが可能となった。

サブテーマ1 研究目的の達成状況

目標どおりの成果をあげた。

- 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た。
- 感染性を有するファージの遺伝子型別定量法の開発に成功した。
- 大腸菌の迅速測定法により、雨天時合流式下水道越流水の影響を把握できることを示した。
- 統計学的に微生物の濃度推定する方法を向上させた。

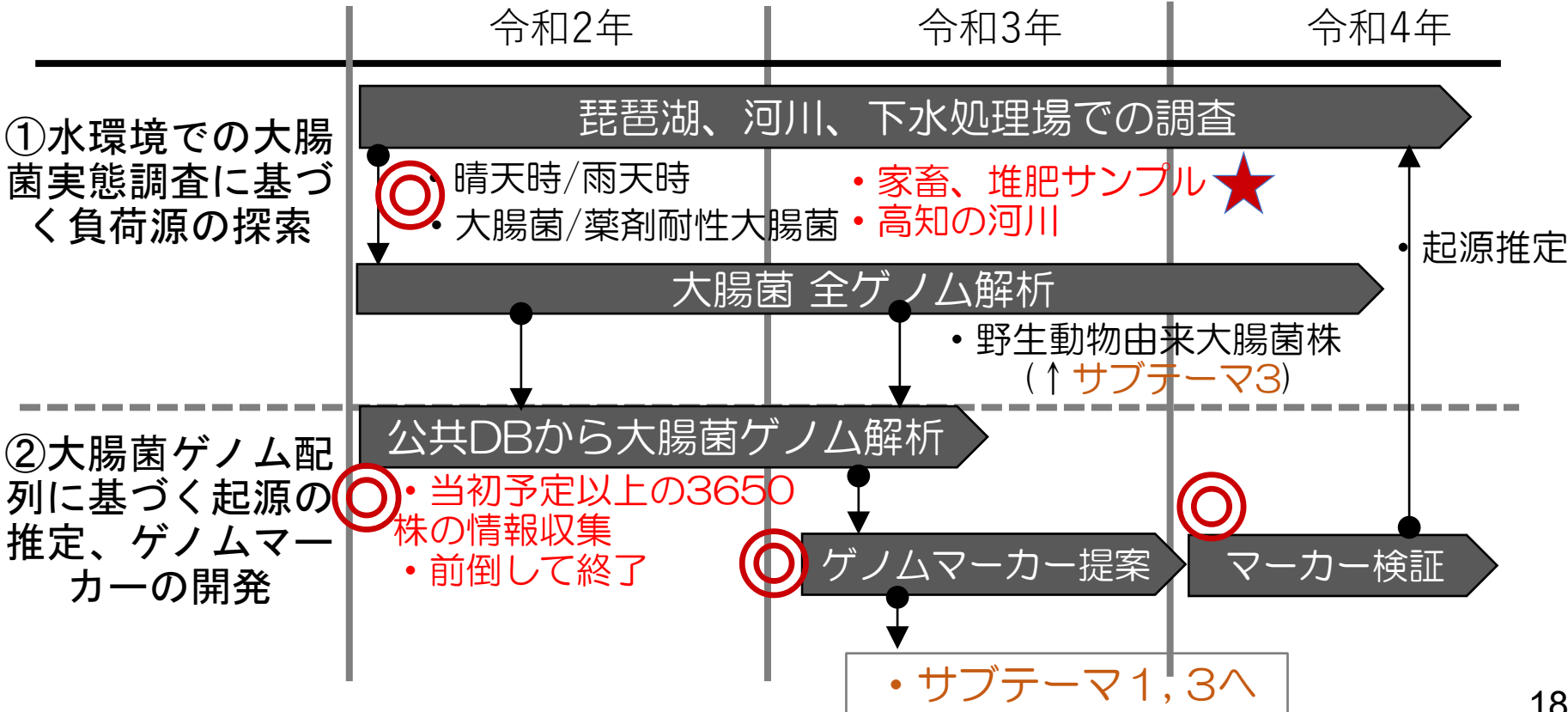
これらにより、水中ウイルス濃度の推定の精度の向上が達成され、あらたなリスク管理方法の基礎となる知見が得られた。以上より、研究目標が達成されたといえる。

サブテーマ2 (京大,高知大G): 新たな大腸菌の起源解析方法の提案

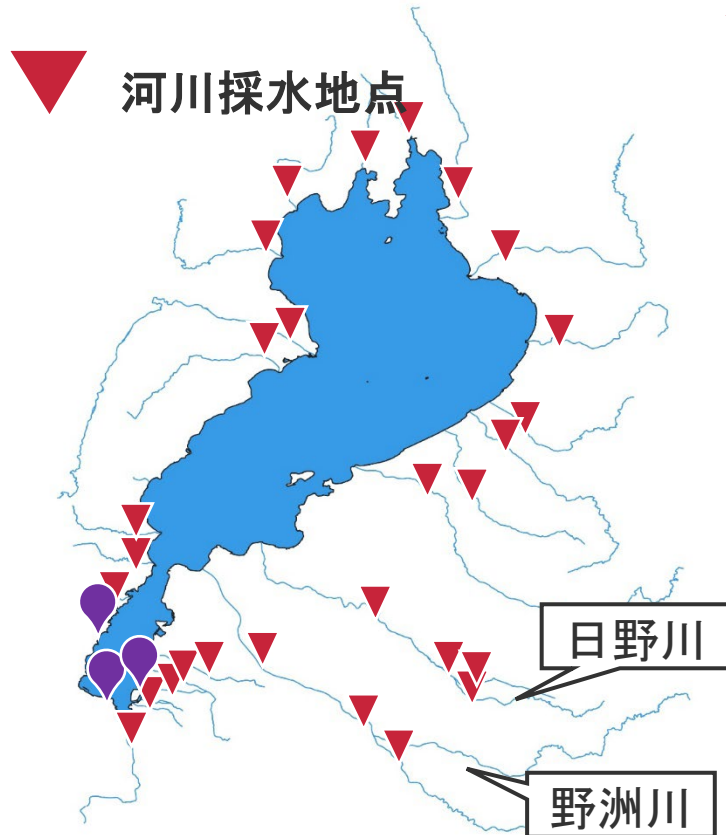
目標

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

計画と進捗  想定通りあるいは前倒して進捗  新たに追加した項目



大腸菌/薬剤耐性大腸菌の調査概要



3下水処理場
処理人口
80万人分
35万m³/日放流

河川調査 晴天時、雨天時

2019年
10月23日,
11月14日, 15日, 20日,
12月15日, 23日, 31日

2020年
3月17日,
4月2日, 8日,
6月9日, 14日,
7月20日, 23日, 30日
8月5日, 27日
11月3日

2021年
5月、7月、9月、10月

2022年
3月

下水処理場調査 晴天時、雨天時

24～48時間連続調査

2019年
10月11日、22日、24日

2020年
3月4～5日
7月3～5日
9月15～16日
10月9～11日

2021年
3月15日

家畜糞便の採取

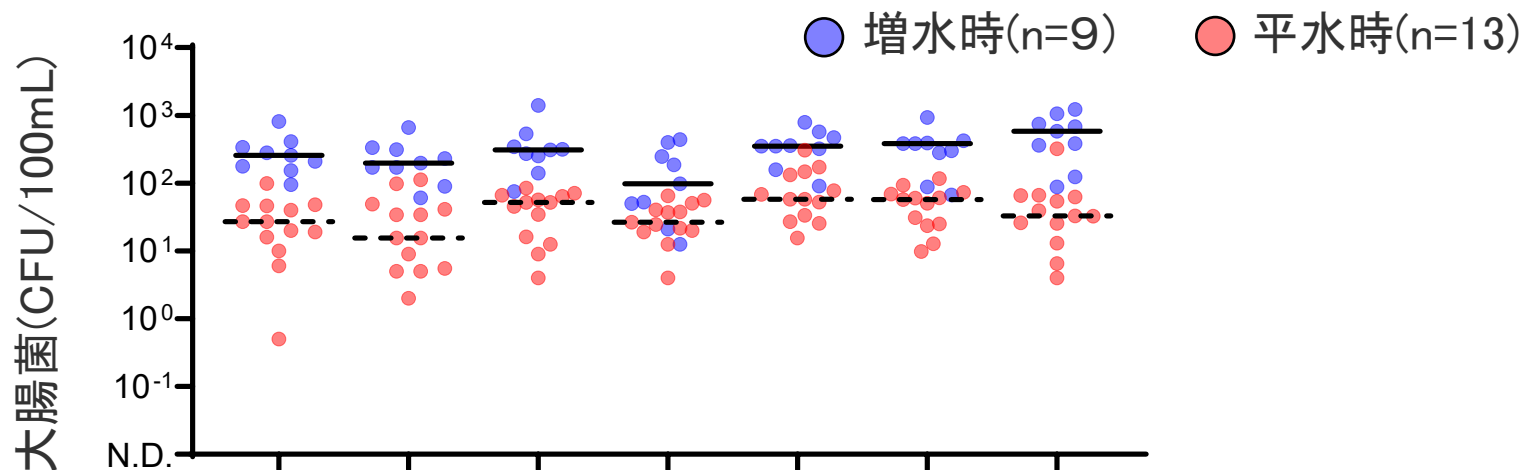
トリ、牛 2021年
6月3日



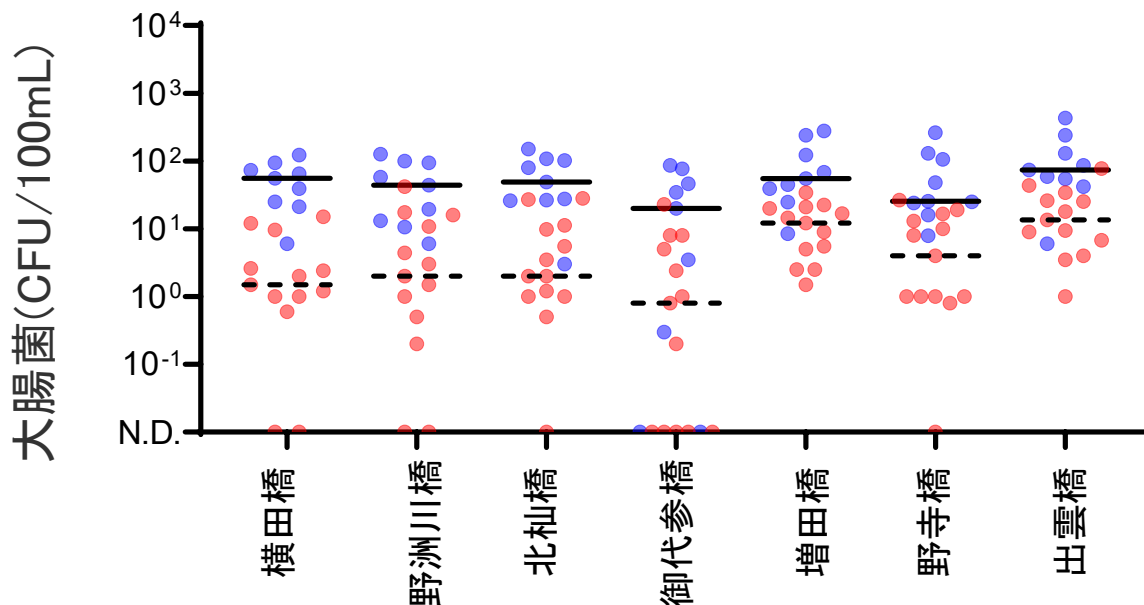
- ✓ 大腸菌、薬剤耐性大腸菌の培養、菌数測定
⇒流量と菌数から負荷量の推定
- ✓ 大腸菌株の単離と全ゲノム解析
⇒宿主特異的な遺伝子マーカー探索、検証

畜産の盛んな日野川と野洲川 平水時と増水時の大腸菌数調査

大腸菌

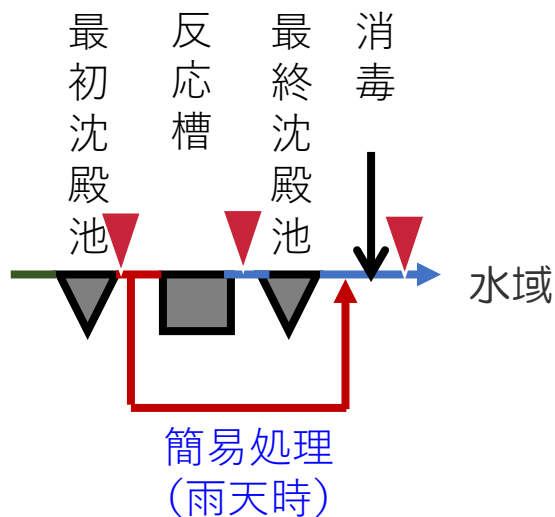


アンピシリン
耐性大腸菌



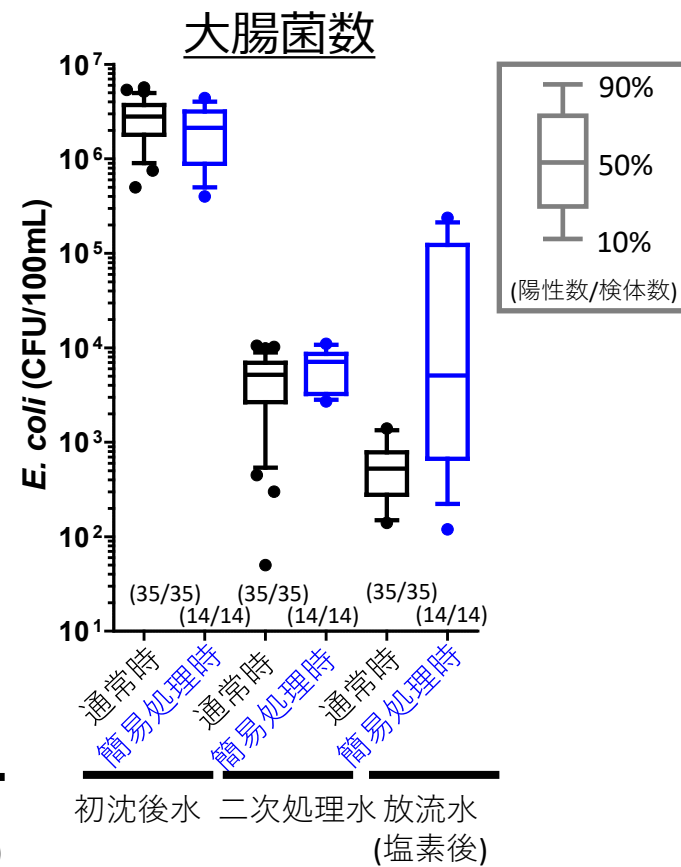
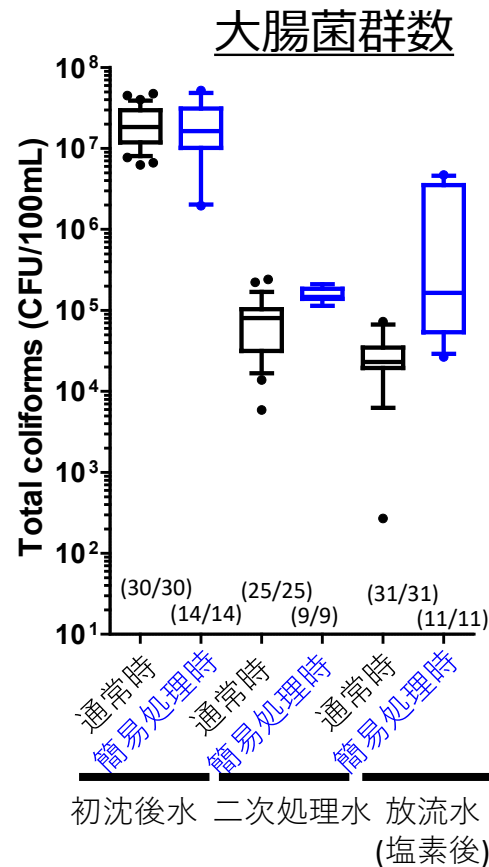
- ✓ 降雨によって大腸菌、薬剤耐性大腸菌数が増加する
- ✓ 点源負荷(小規模下水処理施設)、面源負荷(堆肥利用の畑地)が考えられる

雨天時の下水処理場からの大腸菌排出の調査



■ 通常運転、簡易処理運転時に24～48時間の連続採水

■ 2019年から、これまでに8回の調査を実施



- ✓ 分流式下水道にもかかわらず、雨天時に簡易処理が発生する。
- ✓ 簡易処理では、放流水中の菌数が数十倍に上昇する。
- ✓ 放流先の琵琶湖へのインパクトも大きい。

大腸菌を用いた微生物汚染源解析

令和4年4月から水環境の衛生微生物指標が大腸菌へ変更



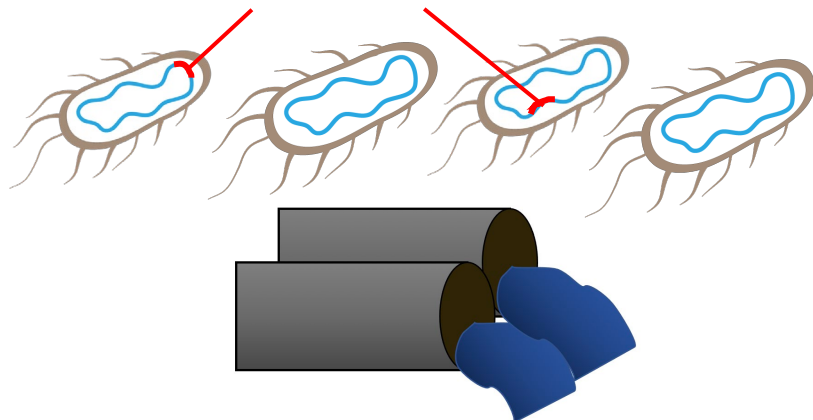
大腸菌を対象としたMSTマーカーがあれば、日常の水質検査で検出した大腸菌をついでに解析することで汚染の原因を知ることができる。

※大腸菌のMSTマーカーは2014年に発表されたH8、H12というヒト特異的大腸菌MSTマーカーがあるのみであり、感度や特異度の向上が見込まれる。

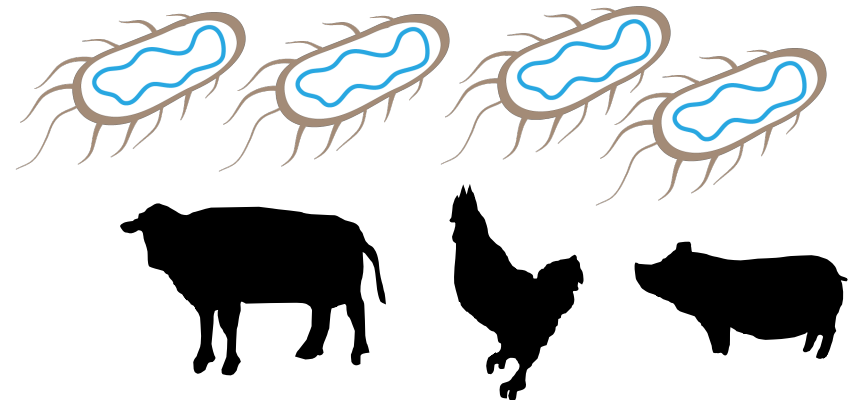
下水特異的な大腸菌MSTマーカ－の開発

下水由来の大腸菌ゲノムと、ヒト以外の動物に由来する大腸菌株のゲノムとを比較し、下水由来大腸菌に特異的なDNA配列(=MSTマーカ－)を開発する。

ヒト (下水) 特異的遺伝子マ－カ－



下水由来大腸菌ゲノム



動物由来大腸菌ゲノム

開発したMSTマーカ-の下水由来大腸菌への感度・特異度の検証 -*in vitro* PCRと*in silico* PCRの結果-

- ✓ 下水由来、および動物由来の大腸菌を多数単離し、開発したMSTマーカ-の性能を評価した。
- ✓ 新たに開発したMSTマーカ-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わかった。

新しいマーカ- 従来のマーカ-

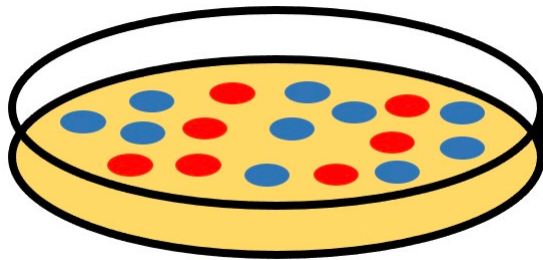
		W_nqrCもしくは W_clsA_2を保有	H8もしくは H12を保有
<i>in vitro</i> PCR	下水由来大腸菌 (n = 127)	30 (23.6%)	18 (14.2%)
	動物由来大腸菌 (n = 207)	7 (3.4%)	2 (1.0%)
<i>in silico</i> PCR	下水由来大腸菌 (n = 91)	29 (31.9%)	25 (27.5%)
	動物由来大腸菌 (n = 824)	16 (1.9%)	27 (3.3%)

開発したMSTマーカ-の環境サンプルへのPCR例①

下水が主要な大腸菌汚染源と考えられる河川



大腸菌の単離



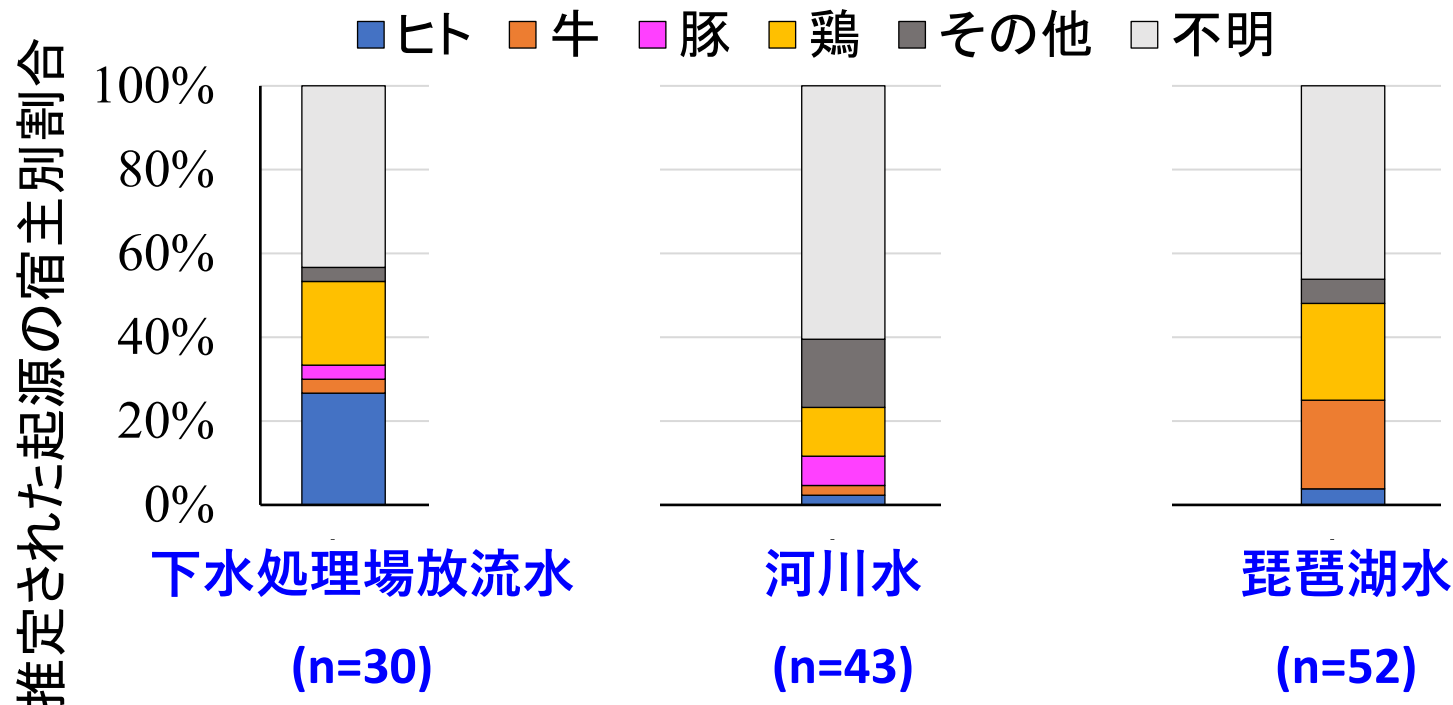
● 大腸菌

● その他の細菌

大腸菌	W_nqrC	W_clsA_2	起源
コロニー1	-	-	不明
コロニー2	-	+	下水
コロニー3	-	-	不明
コロニー4	+	-	下水
コロニー5	-	-	不明
コロニー6	-	-	不明
コロニー7	-	-	不明
コロニー8	+	-	下水
コロニー9	-	-	不明
コロニー10	-	-	不明
		・	
		・	
		・	
コロニー80	-	-	下水

14株/80株から、
開発した下水特異
的MSTマーカ-
が検出された。
→下水が主要な汚
染源という事実と
矛盾しない。

開発したMSTマーカースの環境サンプルへのPCRの適用例②



- ✓ 下水処理場放流水由来の大腸菌はヒトマーカースの保有割合が高い。
 - ✓ 河川水ではヒトよりも豚、鶏マーカースの保有割合が高い。
 - ✓ 琵琶湖水では牛と鶏マーカースの保有割合が高い。
- 河川や琵琶湖ではヒトよりも家畜による負荷が大きいことが示唆される。
鶏マーカースについては、水鳥由来の大腸菌の可能性も考えられる。

サブテーマ2 研究目的の達成状況

目標を上回る成果をあげた。

- 大腸菌、大腸菌群の実態調査は、当初の予定よりも高頻度で行い、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。
- 当初の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。

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。

サブテーマ（3）（山梨大学，東京農業大学） 清流河川における微生物の汚染実態とその起源解析

- ① 清流河川およびヌタ場における微生物の汚染実態の調査
 - 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」がリザーバー（供給源）となっている可能性に着目して調査を実施する
- ② 水環境中の糞便汚染源解析に適用可能なMSTマーカ－検出系の開発
 - 大腸菌やバクテロイデス，ウイルス，大腸菌ファージ等の宿主特異的なMSTマーカ－検出系を適用することで，水環境中における糞便汚染源を明らかにする
 - 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MSTマーカ－を測定することによる糞便汚染源判別法（培養MST法）を開発する



採取試料

- 採取期間:2020年8月～2022年12月
- 採取試料数:160

試料	地点/種類	2020年度 (2020年8月 ～12月)	2021年度 (2021年4月 ～2022年3月)	2022年度 (2022年4月 ～12月)	計	
ヌタ場 (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 (土壌表層水)	かり場奥 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 糞便	シカ糞便	1	24	14	39	
	クマ糞便	1	0	0	1	
計		41	82	37	160	

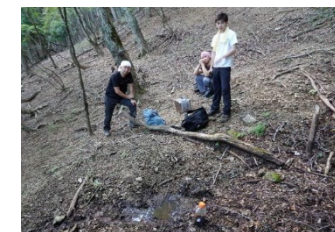
かり場



山沢入りのヌタ



たなくら



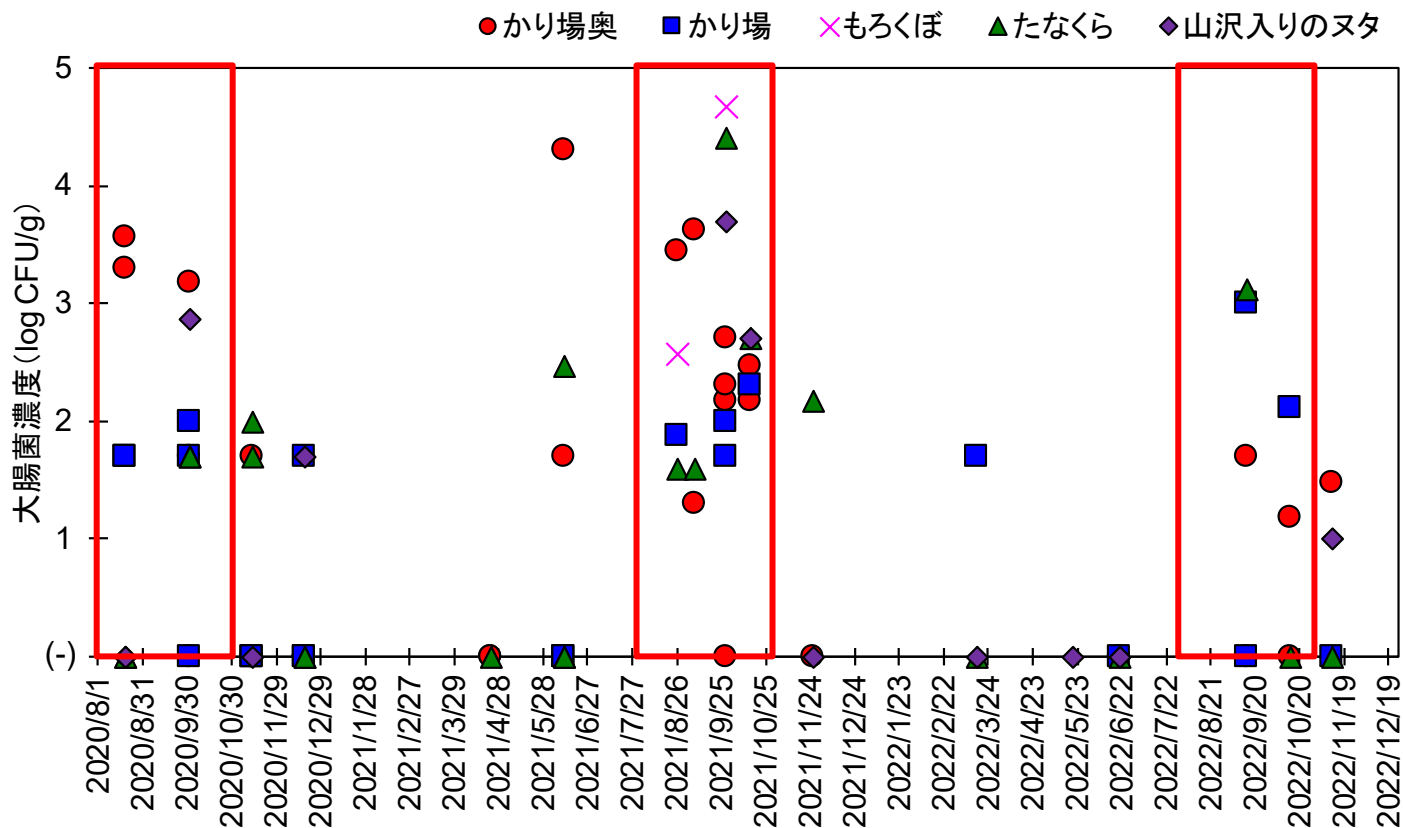
大腸菌の測定結果

- 採取期間: 2020年8月～2022年12月(160試料)
- 測定法: クロモアガーECC寒天培地法(関東化学)

試料	地点/種類	陽性試料数/測定 試料数(陽性率)	検出濃度 (log CFU/g or mL)
又々場 (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
	山沢入りの又々	5/12(42%)	2.4 ± 1.1
	計	48/91(53%)	2.3 ± 0.9
又々場 (土壌表層水)	かり場奥 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 糞便	シカ糞便	39/39(100%)	6.2 ± 1.6
	クマ糞便	1/1(100%)	5.9

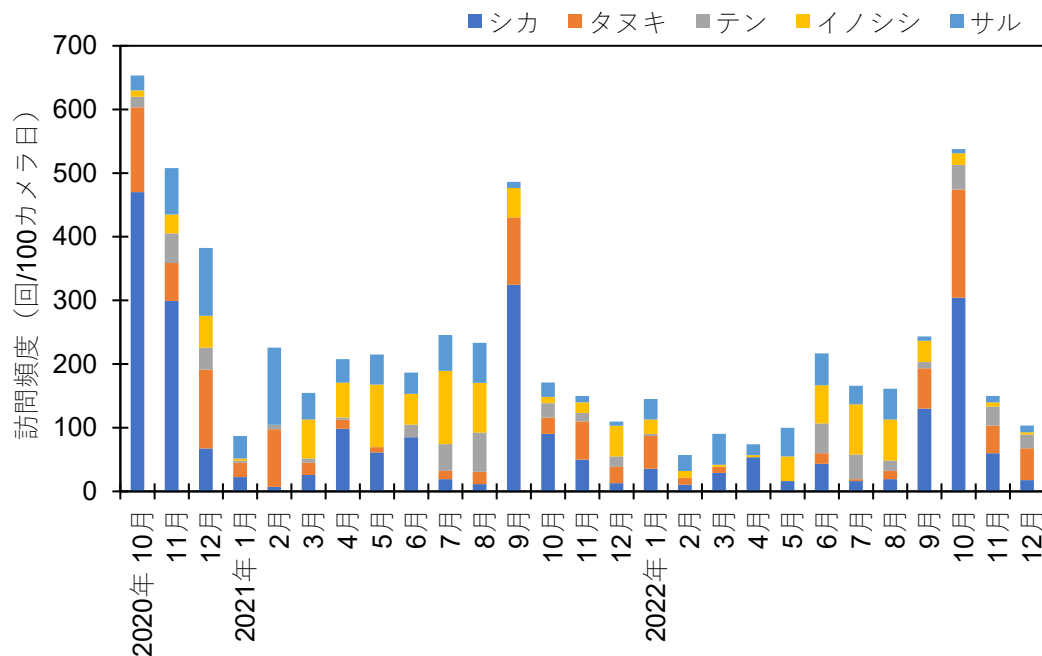
又々場土壤からの大腸菌の測定結果

- 測定法: クロモアガーECC寒天培地法(関東化学)
- 大腸菌の陽性率: 53% (48/91)
- **夏季～初秋(8～10月)の陽性率は77%(36/47)となり, 他の季節(27%(12/44))よりも高頻度で大腸菌が検出された**



自動撮影カメラによる野生動物の観測結果

- 4ヶ所のヌタ場で、中大型哺乳類10種の訪問を記録(シカとイノシシで60%以上)
- 撮影頻度順:ニホンジカ, ニホンイノシシ, ホンドタヌキ, 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
- 主要4種(シカ, イノシシ, タヌキ, テン)の行動特性
 - シカとイノシシには秋に明瞭な活動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
 - 4種に共通して飲水行動が見られたが, ヌ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



ニホンジカの行動別撮影頻度



MSTマーカーと大腸菌マーカーの測定結果

- ヌタ場土壌: 56試料 (2020年度: 12試料, 2021年度23試料, 2022年度: 21試料)

大腸菌 (<i>sfmD</i>)		MSTマーカー				
リアルタイムPCR結果	リアルタイムPCR結果	糞便汚染全般	ヒト		反芻動物	ブタ
		トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)	ヒトバクテロイデス (<i>gyrB</i>)	クラスファージ (CrAssphage)	反芻動物バクテロイデス (BacR)	ブタミトコンドリアDNA (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
--	++	14	2	0	2	8
	+-	1	1	3	0	1
	--	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%)

- 大腸菌が検出されていない試料からもMSTマーカーが検出された(赤太字箇所)
- トウガラシ微斑ウイルス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

河川水からのMSTマーカの検出結果

- 小菅川河川水13試料から各種のMSTマーカが検出され、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), qPCR法で大腸菌マーカ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マーカが検出された
- スタ場の下流に位置する清流河川にもMSTマーカは存在しており, 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

宿主	大腸菌・MSTマーカ	陽性試料数/測定試料数(陽性率)
糞便汚染全般	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%)

サブテーマ3 研究目的の達成状況

目標どおりの成果をあげた。

- 3年間の研究期間中に山梨県小菅村の**又々場**を中心に当初予定以上となる**160試料**を採取し、分析した。
- 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。
- 従来よりも短時間で大腸菌を測定可能な**迅速培養法**を開発した。
- 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。

以上より、目標を達成できたといえる。

環境政策等への貢献

1) 起源特異的な大腸菌の遺伝子マーカーの開発

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。様々な水試料から単離した大腸菌の**人為汚染を特定**する際に有用なツールとなる。

2) 糞便汚染の起源解析手法の有用性の確認

シカやイノシシ等が泥浴びのために集まる「ヌタ場」から動物由来の**微生物遺伝子マーカー**も多く検出された。起源解析手法のツールボックスから、我が国で実用的な手法が確立した。また、**糞便汚染**起源として**ヌタ場の寄与**が考えられる。

3) 海水浴場等におけるウイルス感染リスク評価

FRNAファージの遺伝子型別測定を開発した。大腸菌の迅速測定法の有用性が示された。統計学的な微生物濃度推定の精度を向上させることに成功した。以上より、**ウイルスの感染リスク**の評価方法が向上した。

研究成果の発表状況

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.
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.
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.
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), III431-440 (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.
5. 西田光希、張浩然、井原賢、田中宏明: 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, 土木学会論文集G(環境) 76 (7), III441-448 (2020)
6. 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、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, 土木学会環境工学研究論文集, 77(7), III11-III20 (2021)
7. Chih-Yu Ma, Masaru Ihara, Siyao Liu, Yoshinori Sugie, Hiroaki Tanaka. Tracking the source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the aquatic environment in Shiga, Japan, through whole-genome sequencing. Environmental Advances, Volume 8, 100185 (2022).
8. Ryota Gomi, Yasufumi Matsumura, Michio Tanaka, Masaru Ihara, Yoshinori Sugie, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto. Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in Enterobacterales isolated from surface waters in Japan. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 77, 1237-1246 (2022).
9. Chih-Yu Ma, Yoshinori Sugie, Zaizhi Yu, Yoshiki Okuno, Hiroaki Tanaka, Masaru Ihara. 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. Chemosphere, 301, 134382 (2022)
10. Ryota Gomi, Masaki Yamamoto, Michio Tanaka, Yasufumi Matsumura. Chromosomal integration of *bla*_{CTX-M} genes in diverse *Escherichia coli* isolates recovered from river water in Japan. Current Research in Microbial Sciences, Volume 3, 100144 (2022).
11. 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、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, 土木学会論文集G(環境), 78 (7), III317-326 (2022)
12. Ryota Gomi, Eiji Haramoto, Hiroyuki Wada, Yoshinori Sugie, Chih-Yu Ma, Sunayana Raya, Bikash Malla, Fumitake Nishimura, Hiroaki Tanaka, Masaru Ihara. Development of two microbial source tracking markers for detection of wastewater-associated *Escherichia coli* isolates. Science of the Total Environment, Volume 864, 160952 (2023)

研究成果の発表状況

口頭発表（学会等）	21件
「国民との科学・技術対話」の実施	11件
本研究費の研究成果による受賞	4件

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