

**【5-1603】水系感染微生物による水環境汚染の把握と微生物起源解析の活用に関する研究 (2016~2018 112,941 千円)**

**研究代表者 片山 浩之 (東京大学)**

## 1. 研究実施体制

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

## 2. 研究開発目的

- (1) 水環境における大腸菌の挙動解明および新規ウイルス指標の有効性評価

東京湾沿岸域において、降雨イベント前後の腸管系ウイルス、バクテリオファージの存在状況の関係性について明らかにするとともに、トウガラシ微斑ウイルスのウイルス指標としての有効性、遺伝子型別 FRNA ファージの汚染源解析指標としての有効性を検討する。また、河川環境中における大腸菌の増殖可能性について解析する。さらに、我が国に広く分布するバクテロイデスファージに対して感受性の広い宿主株を探索する。

- (2) 琵琶湖における病原微生物汚染起源解析の有効性評価

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

- (3) 血液型決定抗原陽性大腸菌のノロウイルス指標性に関する研究

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

- (4) ヒト糞便汚染評価に適した微生物基準の導入に関する研究

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

### 3. 本研究により得られた主な成果

#### (1) 科学的意義

- 1) 全国19ヶ所の下水処理場から、バクテロイデス候補228株を分離した。この中から、分離源と異なる流入水試料に含まれるファージに対して高い感受性を示すものが29株が得られた。日本では地域ごとに住む人々の食生活なども異なると考えられるが、住民糞便由来の腸内細菌とファージは地域間で感染し得るものであり、バクテロイデスファージの測定が新たな汚染指標となりうることを示した。
- 2) 琵琶湖において、指標微生物および病原ウイルスを長期間にわたって継続してモニタリングしている。H26~27年度の環境省総合推進費での調査も含めれば4年半にわたりモニタリングしていることになる。これほど長期間にわたって指標微生物とウイルスの濃度変動の関係の調査は世界的にも稀である。
- 3) 琵琶湖南湖で単離された大腸菌の全ゲノム情報を解析することで、その起源を推定できる可能性を示すことに成功した。大腸菌全ゲノム解析の環境サンプルへの適用例としては、世界的にもほとんど例がなく、貴重なデータである。その結果、大腸菌については琵琶湖南湖では下水処理場以外にトリやウシの負荷が大きいことが示された。
- 4) 微生物だけでなく医薬品についても併せてデータを取得したことも世界的にみても貴重な研究である。これまで、環境中での保存性の高い一部の医薬品は下水汚染のマーカーとして使用されており、琵琶湖南湖においても活用が可能であることが示された。
- 5) 全国的に合流式下水道対策が推進されているが、現在のところその水質対象はBODとSSである。本研究では、放流先の湖水の他に、主な人為活動に由来する下水、下水処理水、雨天時の下水処理場からの簡易処理水を含む放流水、合流式下水道対策の放流水のデータを集め、わが国で両者の関係を初めて比較した貴重な研究である。その結果、特にノロウイルスに関しては、湖水の季節変動パターンは、下水や下水処理水の季節変動パターンを反映せず、雨天による簡易放流の発生と関連することが初めて、統計的に示唆された。このことは、ノロウイルスの発生源、排出源、排水先の閉鎖性水域の緻密な観測から得られた成果である。
- 6) HBGA陽性細菌の水環境中における存在実態は不明であったが、本研究により下水及び河川水中に存在することが確認されたことから、HBGA陽性細菌がノロウイルスの環境中動態に影響を与えうることを示された。
- 7) 山梨県内で最適化した微生物遺伝子マーカーを河川水に適用することにより、豚舎の下流地点からブタ特異的な微生物遺伝子マーカーが検出されることや、河川上流域の清流において反芻動物特異的遺伝子マーカーが高頻度で検出され、シカやイノシシ等の野生動物の糞便による影響の大きさが示唆されること等の成果を得た。また、琵琶湖南湖で採取した湖水に対しても調査を行うことにより、本研究の手法が他の流域に対しても有効となり得ることが示された。
- 8) 新たな微生物遺伝子マーカーとして、F-DNAファージや体表面ファージを遺伝子群

レベルで検出することの有効性を示した。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

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

### <行政が活用することが見込まれる成果>

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

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

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

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

#### **4. 委員の指摘及び提言概要**

環境基準の指標の変更の妥当性、測定法の開発、大腸菌の起源の分析など、有用な成果が得られているので、実用化に向けて研究をさらに進めて欲しい。

ただし、現在の基準項目となっている大腸菌群数に対し、検討結果から見えてきた感染性微生物の指標のあるべき姿、方向性についての提案が望まれる。さらに、研究成果をどのように統合化して、行政ニーズに対応する提言にまとめるかを考えて欲しい。

#### **5. 評点**

総合評点：A