

エンテロトキシン遺伝子保有ウェルシュ菌の
水系から食系への循環とその制御に関する研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

令和3年9月
(2021年)

鈴木裕之

内容

第1章 序論.....	4
1-1 水を取り巻く感染症の問題.....	4
1-2 様々な指標としてのウェルシュ菌.....	5
1.3 ウェルシュ菌食中毒の問題.....	6
1.4 ウェルシュ菌の水-食の問題.....	7
1-5 本研究の構成.....	8
第2章 <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌に関するこれまでの知見と課題.....	11
2-1 ウェルシュ菌の産生毒素とこれまで研究動向の概説.....	11
2-2 ウェルシュ菌食中毒の実態とその汚染源.....	12
2-3 指標としてのウェルシュ菌.....	15
2.3.1 糞便汚染指標細菌としてのウェルシュ菌.....	15
2.3.2 水源のクリプトスポリジウム汚染の恐れ判断指標.....	15
2.3.3 MST 指標.....	15
2.3.4 水処理、消毒の効果の指標.....	16
2.4 ウェルシュ菌に関するこれからの課題.....	16
第3章 ウェルシュ菌食中毒原因食材としてのじゃがいもの重要性.....	18
3.1 緒言.....	18
3.2 材料と方法.....	20
3.2.1 試料.....	20
3.2.2 ウェルシュ菌の分離・培養.....	20
3.2.3 菌株の分離と増菌培養.....	20
3.2.4 マルチプレックス PCR・アガロースゲル電気泳動.....	21
3.2.5 16S rRNA 遺伝子解析.....	23
3.3 結果.....	24
3.3.1 市販じゃがいものウェルシュ菌検出状況.....	24
3.3.2 既報食中毒原因株との相同性解析.....	27
3.3.3 付着土壌量とウェルシュ菌および <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌量の関係.....	27
3.4 考察.....	31
3.5 結論.....	33
第4章 <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌汚染源としての下水放流水とその環境負荷.....	34
4.1 緒言.....	34
4.2 材料と方法.....	37
4.2.1 採水地点.....	37
4.2.2 糞便汚染指標の計測.....	38

4.2.3 汚濁負荷量の算出とウェルシュ菌汚濁に関する原単位	39
4.3 結果	40
4.3.1 ヒトおよび家畜の点源汚染からの流入が FIB 濃度に及ぼす影響	40
4.3.2 ヒト面源汚染からの流入が FIB 濃度に及ぼす影響	40
4.3.3 点源汚染および面源汚染のあるエリアにおける <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌の 分布	41
4.4 考察	44
4.4.1 食中毒原因菌としての <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌	44
4.4.2 MST 指標としての <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌	44
4.5 結論	47
第 5 章 下水放流水中ウェルシュ菌芽胞制御を目的とした塩素代替消毒剤：過酢酸の効果	48
5.1 緒言	48
5.2 材料と方法	51
5.2.1 供試試料水	51
5.2.2 供試過酢酸、塩素剤およびその濃度測定法	51
5.2.3 供試細菌の定量方法	51
5.2.4 供試ウイルスの定量方法	51
5.2.5 CT 値と生残率の算出	52
5.2.6 過酢酸および塩素剤の試料水との接触	53
5.3 結果	54
5.3.1 過酢酸および遊離残留塩素による精製水中の大腸菌の不活化	54
5.3.2 過酢酸および遊離塩素による下水放流水中の PMMoV の不活化	57
5.4 考察	59
5.5 結論	62
第 6 章 総括	63
6.1 ウェルシュ菌食中毒原因食材としてのじゃがいもの意義	63
6.2 <i>cpe</i> 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚染源としてのヒト下水放流水とその環境負荷	63
6.3 下水放流水中ウェルシュ菌芽胞制御のための塩素代替消毒剤としての過酢酸の評価	64
参考文献	65
謝辞	76

第1章 序論

1-1 水を取り巻く感染症の問題

中世ヨーロッパにおいて人口の3分の1が死亡したと言われるペスト等、感染症は古くから人類を脅かす大きな問題であった。公衆衛生上の安全性が確保されているように見える現代の先進国でも、2003年に突如SARS（重症急性呼吸器症候群：severe acute respiratory syndrome）を引き起こした新型コロナウイルス：SARS Cov-1、2005年に猛威を振るった高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1型）、東京オリンピックを目前に控えた現在なお猛威を振るう新型コロナウイルス：SARS Cov-2等の新興・再興感染症による脅威は後を絶たず、医療や予防医学がどれほど発達しても人類は感染症と向き合い続けなければならない。種々ある感染症の中でも、生物にとって生活生存に必要不可欠な物質である水を介して感染を広げる水系感染は、生命に対する本質的な脅威であり人類にとっての大きな問題である。

1893年にドイツではReinckeが、同年米国でもMillsが、砂ろ過された水道水の供給は、その地域での水系感染症の減少のみならず一般死亡率の減少効果ももたらすことを明らかにした。この歴史的出来事は現在でもMills-Reinckeの現象として近代水道の水質衛生学的意義として、その推進・普及のための思想的背景となっている[1]。これらの思想を背景に、現代社会では資源である水を安全に利用・循環し、環境に還元するシステム、すなわち水道-下水道等の水利用システムを構築した。一方で、先進国のように水利用システムが整備されている場合においても、特に安全な飲料水を造り供給するシステムである水道は、そのシステムの瑕疵や不備によって、病原微生物を伝播させるシステムにもなりうる恐れがあるため、水道の水質管理とその監視は公衆衛生上きわめて重要な問題である。

水道原水、リクリエーション水、海水を含め、広く水環境中には水系感染症を引き起こす病原微生物として様々な細菌、ウイルス、原虫が存在している[2]。中でもヒトの腸管に感染し、感染症を引き起こす病原微生物（腸管系病原微生物）は感染者や感染動物に下痢をはじめとした症状を引き起こし、増殖した病原微生物が糞便とともに感染者の体外に高濃度で排出される[3]。近代上下水道はこれらの腸管系病原微生物の糞便-水-経口の循環を断ち、流行の阻止を主な目的として発達しており、特に塩素による消毒の徹底により、コレラや赤痢のような病原細菌による水系感染症は大幅に減少した[1]。しかしながら、1976年米国での初報を皮切りに、細菌の制御には効果的であった塩素に耐性を有する耐塩素性病原微生物（原虫）である *Cryptosporidium* による水道を介したアウトブレイクが欧米で散発し[4]、1996年には本邦においても9000人を超える感染者が報告された[5]。こうした原虫類に加えて、これまでに150種類以上のウイルスが水源環境を汚染する可能性のある下水流入水や放流水中から分離されている[6]。これらのウイルスは一般に細菌と比較して塩素消毒に耐性があることが知られているため[1]、ノロウイルスを含む腸管系ウイルスの制御が水質衛生上

の新たな課題とされている。このように、水系感染症の糞便-水-経口の循環をコントロールするために構築された水利用システムの中で、新たな水系感染症の問題として、原虫である *Cryptosporidium* や *Giardia*[7]、その他のウイルスなどの耐塩素性病原微生物の問題が顕在化してきた。

これらの原虫、ウイルスに加えて、細菌のうちウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は芽胞を形成するため、一般的な細菌と比較して塩素消毒に高い耐性を有する。本論文の中心的な研究対象であるウェルシュ菌は、芽胞形成による環境中での高い生残性や塩素消毒への耐性から、消毒耐性の高い原虫類の代替指標として、また水処理における物理的除去性の評価等に古くから利用を検討する試みがなされてきた[8]。あるいは水道原水となる河川におけるヒト腸管系ウイルス指標として適しているとする先行研究も存在する[9]。また本菌は、第2章で詳解するように、主要な食中毒の起因となる病原微生物であり、食品衛生上検討すべき意義も極めて大きいものである。

上記に示した通り、水利用システムが整備された先進国においても、水中には塩素に耐性を持つ病原微生物が、原虫やウイルスに加え、細菌類も含め種々存在している。ヒトの健康に危険をもたらす耐塩素性病原微生物の制御は公衆衛生の観点から極めて重要であり、その制御方法として、これらの耐塩素性病原微生物の汚染源の特定や、水環境中での挙動の調査、塩素を代替、補完する消毒剤の評価等が必要であると考えられる。

1-2 様々な指標としてのウェルシュ菌

本論文では、水処理工程や水質汚染の指標細菌であり、かつ病原微生物であるウェルシュ菌を中心的な対象として、その水質衛生学および食品衛生学上の意義や対策について論じる。

ウェルシュ菌は水の糞便汚染指標を含めた様々な指標としておよび食中毒の起因となる病原微生物としての2つの側面を有している。このうち糞便汚染指標に関する先行研究では、古くは温血動物腸管に常在し、糞便あるいは下水処理施設を介して水環境中に放出されることから、大腸菌[10] (*Escherichia coli*)が代表例として扱われてきた。ウェルシュ菌も大腸菌同様腸管常在菌であるためヒト糞便での出現率は100%であり、糞便とともに環境中に排出される[11]。また芽胞形成菌であるため一部が芽胞として存在し、それらが高い環境生残性と消毒耐性を示す点、環境での増殖の可能性は極めて少ないこと[12]などから、ウェルシュ菌を水の糞便汚染指標細菌として利用する試みは古くからなされていた[9][13]。加えてウェルシュ菌は水処理施設におけるウイルスや原虫シスト、オーシストの除去及び不活化指標として有効であるとの研究もあり[9]、我が国では水道水源の原虫汚染のおそれの判断指標(厚生労働省 2007)として用いられてきた。このように、病原微生物であると同時に、腸管の常在菌であり、糞便汚染や塩素等の消毒効果の指標細菌として、また水処理工程におけるウイルスや原虫の除去性能の指標として用いられてきたウェルシュ菌であるが、近年新たな指標としての意義も提言されている。

近年の研究では、大腸菌や腸球菌などの従来型の糞便汚染指標細菌（FIBs: Fecal indicator bacteria）は水中の病原微生物濃度との相関が低い点[14]、FIBs の代表例である大腸菌について、腸管から排出されたのちに土壌や砂等の環境中でも増殖しさらに増殖先環境に定着する[15]こと等が報告されており、ヒト糞便汚染の指標細菌としての評価を疑問視する報告[16]や、従来型の FIBs では糞便由来の水環境汚染の検出に不十分であるとの指摘がある[17]。こうした状況の中、ウェルシュ菌及びその芽胞に対し糞便汚染指標細菌としての活用に付加して、新たな概念の指標としての有効性や機能性が指摘されている。すなわち、ウェルシュ菌はヒトおよび非草食動物糞便中に遍在していること[13]、その生残性の高さから時間的、空間的に広い範囲で汚染源の探索が可能となる点[18]などから、糞便汚染指標としてのみならず、微生物学的汚染源探索（MST: Microbial source tracking）指標としての有効性が検討されている[13][19]。

MST とは昨今提唱されている糞便汚染の起源を推定する手法の 1 つであり、微生物学的手法、分子生物学的手法、化学的手法等さまざまな提案がなされている[20]。ヒトおよび動物糞便はそれぞれに固有あるいは共通する種々の病原微生物を含んでいる[21]ことから、こうした病原微生物による水系感染の制御には、糞便汚染指標細菌を用いた単純な糞便汚染状況の把握に加えて、MST 指標を用いて汚染源を把握し、その対策を講ずることが有効であることは論を待たない。ウェルシュ菌は人や多くの動物種の腸管に存在し、その糞便から検出されることが明らかになっており[19]、2 章で詳述するように各種の毒素を産生し、その毒素をコードする遺伝子を保有するものもある。このうち、食中毒とも関連する毒素であるエンテロトキシン（*cpe*: *Clostridium perfringens* enterotoxin）をコードする遺伝子を保有するウェルシュ菌、すなわちエンテロトキシン遺伝子保有ウェルシュ菌（*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌）は、家畜等の動物糞便由来の試料からは検出されず、ヒト由来の下水流入水や放流水からのみ検出されると報告されており[19]、効果的なヒト MST 指標として活用できる可能性についても指摘されている。この *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は下水流入水及び放流水中におよそ 30%という高率で検出されるとの報告もあり[19]、下水流入水や糞便汚染の影響を受けた水環境中の堆積物が *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のリザーバーとなっているとの指摘もある[22]。実際ヒト下水処理施設放流水から *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が 10^{10} cfu/m³/day のオーダーで環境中に放出されている点を報告が報告されており、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト糞便汚染の MST 指標として有望である点に加え、食中毒起因病原微生物がヒト糞便を経由して大量に環境へと放出されている危険を指摘する研究も存在する[23]。

1.3 ウェルシュ菌食中毒の問題

このように、ヒト由来の糞便と関係の強い下水流入水、放流水とその汚染を受ける環境から高い頻度で検出される *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌であるが、一方、もう一つの側面として、食中毒の被害者から単離されたウェルシュ菌における *cpe* 毒素検出率は 100%である[24]

ことから、本毒素がウェルシュ菌食中毒の原因であり、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はその食中毒の起因菌であると考えられている。ウェルシュ菌食中毒原因食品はカレーやシチュー、仕出し弁当等の大量調理かつ複合調理食品であることが多く[25]、どの食材が汚染されていたのか確定することが困難であった。これまでなされた調査では野菜や果物[26]、豆類[27]、市販カレールー[28]、海水魚[29]等多岐にわたる食材から検出されており、特にウェルシュ菌が動物腸管常在菌であり、検出率も高かったため食肉や肉製品が原因食材と目されてきた経緯がある[30][31]。

長らく食肉類が原因食品とする考えが支配的であったが、近年の遺伝子検査をベースにした研究では、前述のヒト下水試料や家畜由来糞便試料の調査結果[19]と同様に市販食肉類からウェルシュ菌は検出されるものの、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は検出されず[32]、その原因食材は未解明のままである。

1.4 ウェルシュ菌の水-食の問題

ヒト由来の排水によって汚染された水環境と食品を結ぶルートやその可能性については、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水放流水から河川を通じ海域に至り、アサリを汚染しているとの報告もなされている[33]。他には自然環境中、特に土壌からの検体の7%に *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出されたとの報告[34]など、一部その関与を示唆する様な報告がなされているものの、確証的にヒト由来排水と食品の関係について評価した研究はまだなされていない。

ヒト糞便に偏在する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が下水放流水中に多量に存在し、土壌からも検出され、海域まで至っている事実から考えるに、食中毒原因食材を汚染するルートの可能性として下水放流水を汚染源とした一連の流れがあるのではないかと推察が成立するがこの点についてはより深く研究してゆく必要がある。

上記で概説した通り、塩素耐性病原微生物であるウェルシュ菌、中でも食中毒原因菌として知られる *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が下水処理施設放流水から大量に放出されており、放流先河川を通じて土壌や海域を汚染し、農作物や海産物を汚染している可能性否定できない状況がある。

下水道の終末処理施設や浄化槽などの排水・し尿処理設備は、第一義的には糞便-経口感染する感染症の汚染ルートを絶つという意義がある。この意義に基づいて、流域下水道や浄化槽などの整備、設置がなされており、これらの普及は細菌性水系感染症の制御に一定の大きな役割を果たした[3]。これらのシステムで最終的に環境へ放流される水の安全性の評価は、従来から用いられている大腸菌を主体とした微生物指標であり(金子 2003)、病原微生物の数を制御し、環境汚染の負荷低減に大きな役割を果たしているものは次亜塩素酸ナトリウムなどを用いた塩素消毒[3]である。

一方で、本章で述べたウェルシュ菌などの塩素耐性を有する病原微生物は、ヒトの糞便から下水放流水などを介して環境を汚染している。加えて、下水放流水が食中毒の原因食品の

汚染源となっている可能性も否定できず、塩素消毒のみでは制御することのできない問題である。さらには、塩素消毒は消毒用塩素の残留性が問題となり、下水処理水等の放流先である河川や海洋環境に生息する藻類などの水生生物への影響[35]や塩素と環境中に豊富に存在するフミン質など各種の有機物との反応によって生成されるトリハロメタン類をはじめとした消毒副生成物の問題[2]もある。このように塩素を主たる消毒剤とした現在の下水消毒システムはウェルシュ菌のような耐塩素性病原微生物の制御の脆弱性に加えて、放流先の環境への負荷の問題にも視点を置く必要がある。

塩素の持つこのような問題点への取り組みとして、イタリアをはじめとする諸外国では下水消毒に対し塩素代替消毒剤を模索する動きがあり[36][37]、中でも医療、食品衛生分野における知見の蓄積がある点[38]、環境への負荷が極めて軽微である点[39]、酸化剤として機能を有する点に加え、代謝系の阻害やタンパク質分解酵素作用の阻害等、塩素とは異なる不活化機序を有する点[40]などから過酢酸に関する研究が注目されている[37]。

ここまで述べたように、従来から FIBs としての活用が検討されてきたウェルシュ菌に対し、糞便汚染の有無のみでなく汚染源の特定やその対策までを可能にしうる MST 指標としての検討は公衆衛生学上大きな意義があると考えられる。一方で食中毒起因菌である *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水処理施設から放流先河川を通じ、土壌や海域を汚染している実態は由々しき事態と言える。さらに *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が土壌を介して農産物を、海域を介して海産物を汚染している可能性も否定はできず、大規模食中毒を引き起こすウェルシュ菌の食材汚染ルートを解明する意義は極めて高い。同時に、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌汚染源となりうるヒト下水処理施設には感染の連鎖を確実に断ち切る役割が求められているが、芽胞形成により高い塩素耐性を獲得するウェルシュ菌の制御は、現行の塩素を中心とした下水処理方式では容易ではない。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌制御に向けこれまでなされてきた研究では、FIBs や MST 指標としての評価や環境への負荷、食中毒の実態についての調査、塩素代替消毒剤の検討等 1 つ 1 つの論点に対する詳細な検討はなされているものの、食品やその原材料の管理のみならず、水域やその汚染源となるヒト由来排水など、本菌の循環を考慮した広範かつ統合的な考察は確立されていない。

1-5 本研究の構成

1.1 節では、水利用システムが整備された先進国での新たな問題として、耐塩素病原性微生物について触れた。近代上下水道は塩素消毒の徹底により、コレラや赤痢のような病原細菌による水系感染症を大幅に減少させてきたが、近年では原虫やウイルス、一部の細菌等塩素耐性病原微生物による感染等が報告され、塩素に依存した水処理への警鐘に向き合うことが水質衛生学上の今後の重要課題の 1 つと言える。また、1.2 節ではウェルシュ菌について、糞便汚染や原虫の処理工程、あるいは MST 指標としてなど、種々の指標性をもつ重要性について触れた。1.3 節では耐塩素性病原微生物の中でも、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌について食中毒原因菌として制御が重要であることに加え、その食品汚染ルートの解明の

必要性について触れた。大規模食中毒を引き起こす *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の制御には汚染食材の特定が効果的であるが、食中毒原因食品がカレーやシチュー等の大量かつ複合調理食品であることが多く、構成食材も多岐にわたるため原因食材の特定が困難という実態が存した。従来は原因食材として食肉が疑われてきたが、近年では遺伝子解析技術の発展により、ウェルシュ菌の中でも食中毒を引き起こす *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は市販食肉からはほぼ検出されないとする報告も複数なされている。一方で *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のヒト糞便偏在と、ヒト排水由来のルートを通じた土壌や海域の汚染が指摘されている。ここにおいて、新たな原因食材の調査がウェルシュ菌食中毒防止に向けた大きな課題となる。

さらに、1.4 節に *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の指標としての重要性、特にヒト糞便汚染探索指標としての重要性と環境汚濁の問題について触れ、下水処理水放流前の効果的な消毒法の必要性について概説した。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水放流水中に多量の存在するため、放流先河川を通じて土壌や海域を汚染している可能性も否めず、感染症制御の観点からその挙動の把握は公衆衛生学上取り組むべき重要課題である。一方で *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト糞便に偏在している特徴を奇貨として、ヒト MST 指標として有効活用できればヒト糞便中病原微生物による河川や海域汚染の予防手段として大いなる意義がある。加えて本菌を含めた塩素耐性病原微生物の存在が指摘されている昨今、消毒用塩素による生じる放流先環境への負荷や消毒副生成物の存在も踏まえ、塩素代替あるいは補完する新たな消毒剤の検討が必要と考えられる。

これらの点を統合して、本論文では第 2 章にて *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌に関するこれまでの知見と課題を述べた。続いて食中毒原因ウェルシュ菌の新たな原因食材を推定するべく、第 3 章においてヒト下水放流水から河川を通じて土壌に至る経路を推定し、土壌が付着する可能性が非常に高い根菜類、特に入手が容易なじゃがいもを調査対象として、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚染状況調査を行った。また *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌汚染源としての下水放流水の意義や汚染状況の調査、同時に本菌のヒト MST 指標としての有効性を評価するべく、第 4 章において実稼働下水処理施設放流水及び下水道未接続の人口密集河川において *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の挙動についてケーススタディを行った。そして塩素耐性を持つ *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の放流先環境への放出を制御するべく、第 5 章において塩素を代替、補完する消毒剤として過酢酸による本菌の不活化を評価した。

以上より本論文では、ヒト由来排水に偏在する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が食品まで伝播する経路を推定すると同時に、環境汚染源と目される下水処理施設放流水の放流後の実態を調査し、また汚染を未然に防ぐべく塩素に代替する消毒剤の検討を行った。すなわち *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌による感染リスクの低減を目的とし、本菌の水系から食系への循環と把握し、その制御に関する研究を行うこととした。

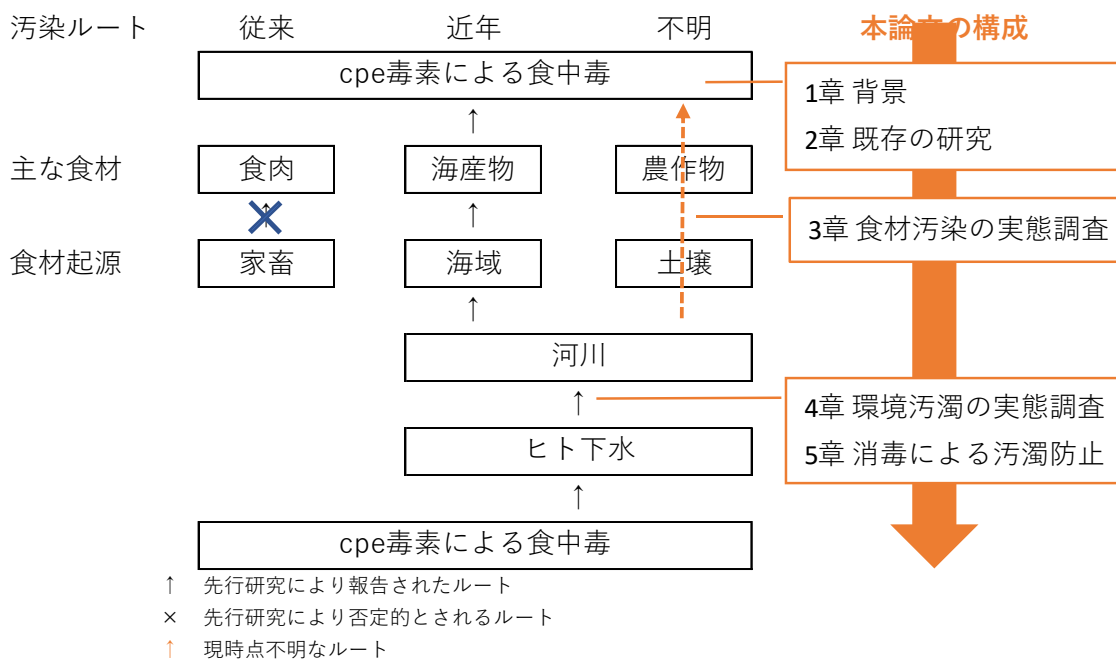


図 1-1 エンテロトキシン遺伝子保有ウェルシュ菌の循環イメージと本論文の構成

第2章 *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌に関するこれまでの知見と課題

2-1 ウェルシュ菌の産生毒素とこれまで研究動向の概説

本論文では Firmicutes 門 Clostridium 属の偏性嫌気性・芽胞形成菌である *Clostridium perfringens*: ウェルシュ菌を研究の対象としている。ウェルシュ菌は産生する主要毒素 (α 、 β 、 ϵ 、 ι) により大きく A 型から E 型まで分類される[41]。近年では新たに、 α 毒素と腸管毒素である *Clostridium perfringens* enterotoxin (*cpe*) を産生するものを F 型、また α 毒素と NetB 毒素を有するものを G 型と分類する動きもある[42]。 α 毒素は A 型菌の主要毒素としてガス壊疽を、 β 毒素は C 型菌による壊疽性腸炎を、 ϵ 毒素は動物に対する神経毒性、*cpe* 毒素はいわゆる腸管毒素としての病原性を持つ[41]。

これらのウェルシュ菌が感染し、その産生する毒素によって発生する様々な疾患や障害のうち、最も事例報告が多いものはエンテロトキシン (*cpe*) 産生株による大規模食中毒である[43]。*cpe* 産生菌による食中毒については、発生源ごとの遺伝子多様性に関する疫学調査[24]、毒素の検出及び定量方法の評価[44]、ウェルシュ菌型ごとの *cpe* 遺伝子座に関する調査[43]等多くの研究がなされ、食品衛生上制御すべき重要性は古くから示されている。

一方で、近年遺伝子解析技術の発展によって、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の河川や土壌を含めた自然環境中での分布、家畜や市販食肉における汚染状況等様々な観点からの調査研究がなされている。すなわち、ウェルシュ菌がヒトおよび動物腸管常在菌である[45]ため、本菌を水質の糞便汚染指標細菌としての利用を検討する研究[46]、ウェルシュ菌の中でも *cpe* 遺伝子保有株が動物糞便には極めてまれにしか存在しない一方でヒト糞便に偏在している[47]ことから、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌をヒト糞便汚染の指標細菌、もしくはヒト糞便汚染の汚染源探索 (MST: Microbial source tracking) 指標として利用を検討する研究[19]、あるいは下水放流水が毒素産生能を持つ *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境汚染源の一端であるとして、放流先河川を通じた水系環境の汚染源となりうるとの警鐘を鳴らす報告[23]がある。

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌は食中毒あるいは高齢者福祉施設等において、ベッドの柵やトイレ床等を介し食品を媒介しない下痢症を引き起こす[42]。また、ウェルシュ菌毒素検出に関する広範囲な調査報告では、食中毒被害者から単離されたウェルシュ菌の *cpe* 遺伝子検出率は 100%であり[24]、本毒素がウェルシュ菌食中毒の原因である可能性は極めて高いと考えられている。

ウェルシュ菌による食中毒は多量の生菌 (10^8 cfu/100g) を喫食することで起こり、下痢症発症の原因は *cpe* 毒素であるが、食物中であらかじめ産出された毒素によるものではなく、本菌栄養型細胞の摂取が前提になることから、本症は感染型食中毒に分類される[45]。食品又は糞便から単離されたウェルシュ菌のうち、*cpe* を産生するものは約 5%との報告[44]があり、腸管内で *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が増殖し芽胞を形成する際に産生される *cpe* の作

用により下痢症等を発症する[25]。また *cpe* を産生するウェルシュ菌は多くが A 型に分類されるが、C 型や D 型も一般的である[43]。A 型ウェルシュ菌由来の *cpe* 遺伝子の全塩基配列はすでに報告されており (Genbank accession no.M98037)、ヒトの食中毒に関与する *cpe* 遺伝子の大部分は染色体上またはプラスミド上に存在する[48]とされる。

このように、ウェルシュ菌は各種の毒素産生能を有し、特に *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は我が国及び諸外国において古くから食中毒の原因菌として認識されており、加えて遺伝子技術の発展に伴い、その分布や動態についても調査が進みつつある。

2-2 ウェルシュ菌食中毒の実態とその汚染源

前項で述べたように、ウェルシュ菌は産生する種々の毒素によりさまざまな疾病を引き起こし、また多種の毒素や酵素を菌体外に産生し、これらの毒素により病害作用を引き起こす[49]公衆衛生上の制御すべき問題を有している。このうち、*cpe* 遺伝子を有し、*cpe* を産生するウェルシュ菌は食中毒の起因菌として健康被害が顕著であるためその詳細な調査研究は重要であり、本論文では、この *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境中での挙動から食品汚染経路の推定までを試みた。

ウェルシュ菌食中毒は我が国でも定常的に発生し、毎年年間 20-30 例ほど報告されている。表 2-1 及び図 2-1 に厚生労働省統計に基づく日本における過去 5 年間 (2016-2020 年) の細菌性食中毒事件数を示す。我が国ではウイルス性、寄生虫、化学物質等も含め年間およそ 1000 件の食中毒事件が発生し、細菌性食中毒のうち最も事件数が多いカンピロバクターが占める割合は 2020 年を除き 70%以上に達している。ウェルシュ菌食中毒は 22-31 件で、占める割合は 5.7%から 8.4%に過ぎず、件数の順位はカンピロバクター、黄色ブドウ球菌に次ぐ 2-3 位で推移している。次に表 2-2 および図 2-2 に日本における過去 5 年間の食中毒患者数を示す。細菌性食中毒のうち、最も患者数が多いのはカンピロバクターで、占める割合は最大で 43.7% (2016 年) に達する一方、ウェルシュ菌は最大で 40% (2018 年) に達する。患者数では常に 1-2 位に位置し、細菌性食中毒患者数における本菌の影響の大きさが明らかとなっている。また表 2-3 および図 2-3 に細菌性食中毒 1 件当たり患者数を示す。細菌性食中毒による 1 件当たりの患者数は過去 5 年間の算術平均値では 18.4 人/件、カンピロバクターでは 7.0 人/件であるところ、ウェルシュ菌の場合は 54.4 人/件と非常に多いことが示されている。米国でも主要な食中毒原因菌として知られ、CDC の疫学統計によると 2009-2015 年においてウェルシュ菌食中毒の発生件数は 198 件、患者数は 7834 人で、細菌性食中毒被害患者数ではサルモネラ菌に次ぐ第 2 位に位置している[50]。このようにウェルシュ菌による食中毒は発生件数に対する患者数が多く、大規模な集団事例が多いとされている[25]。

上記に示したように *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が患者数の多い比較的大規模な集団食中毒を引き起こす背景として、大量に調理される複合食品を原因食として発生することが指摘されている。すなわち、本菌は広範囲の温度域 (12-50 °C、至適温度 43-45 °C) で増殖する[51]ため、食品中にウェルシュ菌芽胞が残存した場合は短時間での再加熱では死滅せず、

逆に発芽が促進される場合がある。また嫌気性菌であるため真空パック内で増殖しやすく[52]、セントラルキッチンにおける食材の大量一括調理-真空パック-クックチル方式（加熱調理後 90 分以内に中心温度 3°C以下まで急速冷却をして、0~3°Cで衛生的に保管しておき、食事を提供するタイミングで再加熱する調理法）が多用される病院や高齢者施設での給食サービスでの報告もなされている[53][53]。加えて、加熱調理により食品中心部が微嫌気状態となることから、大量調理のカレーやシチュー類がウェルシュ菌食中毒の原因食品となりやすい点が指摘されている[49]。他には大型の寸胴鍋（内径 60 cm、深さ 55 cm）で調理後再加熱したパスタクリームによる患者数 412 名という大型食中毒の報告[54]もある。

さらにこの大量調理による複合的な食品が原因となることは、ウェルシュ菌食中毒の大きな特徴の 1 つとして、原因食品の特定の困難さにつながっている。ウェルシュ菌は芽胞を形成して土壌などの自然環境に常在するため、農産物・畜水産物など食材に広く分布しており[25]、肉や野菜、調味料等多種類の食材から構成される複合調理食品ではどの食材が汚染されていたのか究明するのは容易ではない。たとえば市販のカレールー自体からもウェルシュ菌が検出されているが、カレールーが多くのスパイスや肉エキス、果汁、ペースト状調味料等から生成されていることから汚染食材の確定はなされていない[28]。

ウェルシュ菌は動物腸管に常在することから、主要な原因食材としての食肉類の意義が古くから指摘されてきた[55]が、近年の遺伝子解析の結果では、市販食肉からウェルシュ菌は検出されるものの、食中毒原因毒素をコードする遺伝子である *cpe* を保有する菌株はほぼ検出されていないとする調査[32]もあり、原因食材としての可能性は確定的ではない。食肉の他に本菌が検出されている食材は香辛料や青果物[26]、豆類や野菜類[27]、水産物[33]等多岐にわたり、その汚染源の特定や重要管理食材については明確化されずにいる。このように、細菌性食中毒の患者数上位 2 位内である本菌についての実態調査は食品衛生上の極めて大きな課題である。

近年、ヒトの排水を中心とした水環境において、ウェルシュ菌の分布とその毒素遺伝子の保有状況に関する調査が行われている[19][47]。これらの調査において、食中毒に関連する可能性のある *cpe* 遺伝子を有するウェルシュ菌の環境中での動態の一端が示されるようになってきた。ヒト由来の下水流入水および放流水中ウェルシュ菌の陽性率は 100%であり、さらに *cpe* 遺伝子保有率も 30%程度と高いことが報告[19]されており、ヒト下水放流水が重要な汚染源である可能性がうかがえる。加えて、ヒト下水放流水から *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が 10^{10} cfu/m³/day と少なくない量が環境中へ放出されているとの報告とともに、下水から河川を経由し、土壌を汚染している可能性について考察がなされている[23]。あるいは近年の研究では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が環境中、特に土壌試料検体の 7%から検出されているとの報告もある[34]。こうした報告から、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト糞便-下水放流水を通じて河川へ放出され、河川水を利用した灌漑用水や土壌への堆積により、農作物を汚染している可能性は否定できない。すなわち、*cpe* 遺伝子を保有し、食中毒の原因となりうるウェルシュ菌の大きなリザーバーとして、ヒトはとても重要な存在となりうる

ことが示唆されている。

表2-1 過去5年間の日本における原因細菌別食中毒発生事件数

	2016	2017	2018	2019	2020
その他細菌	110	102	116	77	68
ウェルシュ菌	31	27	32	22	23
カンピロバクター	339	320	319	286	182
件数順位	3	3	2	3	3

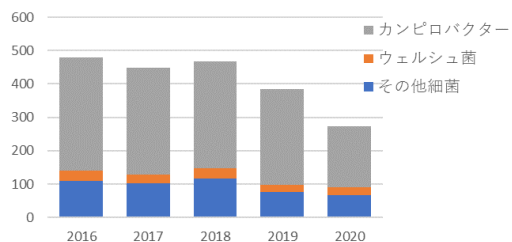


図2-1 過去5年間の原因細菌別発生件数

表2-2 過去5年間の日本における食中毒患者数

	2016	2017	2018	2019	2020
その他細菌	2800	3086	2319	1636	7443
ウェルシュ菌	1411	1220	2319	1166	1288
カンピロバクター	3272	2315	1995	1937	901
患者数順位	2	2	1	2	2

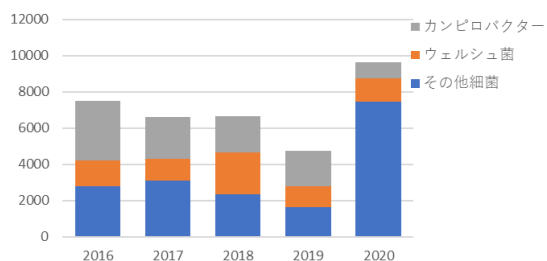


図2-2 過去5年間の細菌性食中毒患者数

表2-3 細菌性食中毒1件当たり患者数

	2016	2017	2018	2019	2020
細菌	15.59	14.75	14.20	12.31	35.28
ウェルシュ菌	45.52	45.19	72.47	53.00	56.00
カンピロバクター	9.65	7.23	6.25	6.77	4.95

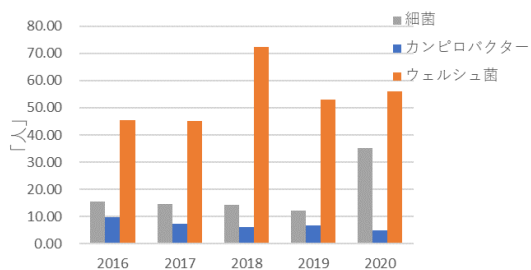


図2-3 細菌性食中毒1件当たり患者数

2.3 指標としてのウェルシュ菌

2.3.1 糞便汚染指標細菌としてのウェルシュ菌

ウェルシュ菌はヒトおよび動物腸管常在菌であるため[45]、健康なヒトおよび動物糞便からも検出される[56]。加えて、ウェルシュ菌の細菌学的特徴として芽胞形成能がある。この耐久性の高い特殊な細胞構造によって自然界に分布するウェルシュ菌は環境中に長期間生残することができる[57]との報告がある。

ヒト下水流入・放流水および牛、豚等の家畜や野鳥等野生動物糞便中のウェルシュ菌検出率は 100%との報告がある[19]。また下水処理施設の放流前消毒剤としても広く導入されている塩素剤に対して強い耐性を持つことから、下水放流水中には依然としてウェルシュ菌が多数生残しており、調査した 3 処理施設いずれにおいても塩素処理された放流水中にもいずれも生残しており、その濃度は 10^1 cfu/mL との報告がある[19]。

芽胞形成による環境生残性の高さに加え、ヒトや動物の腸管常在細菌である点から、以前よりウェルシュ菌を大腸菌や腸球菌のような従来型の糞便汚染指標細菌（FIBs：fecal indicator bacteria）に代わる指標として評価する研究がある[18][46]。

2.3.2 水源のクリプトスポリジウム汚染の恐れ判断指標

ウェルシュ菌は環境生残性および消毒剤耐性の高さの類似性から、同様の特性を持つ病原原虫である *Cryptosporidium* や *Giardia* の指標細菌として検討されてきた[58]。また *Cryptosporidium* や *Giardia* による汚染との相関の高さから、飲料水処理工程での急速砂ろ過法における *Cryptosporidium* や *Giardia* の除去指標として[9]、あるいは下水処理施設で用いられる活性汚泥法での両原虫の除去指標として[19]、ウェルシュ菌が検討されてきた。さらにはウェルシュ菌が飲料水処理工程における原虫類およびヒト腸管系ウイルスの除去指標となるとの研究もなされている[9]。

2.3.3 MST 指標

ヒト糞便には多くの病原微生物が含まれており[21]、水道原水やレクリエーション水が汚染されている実態がある[21][59]。このため水質衛生の観点から、従来から FIBs を用いて水の糞便汚染の推定が行われてきた。しかし代表的な FIBs である大腸菌は土壤中で再増殖する点[10]、レクリエーション水の調査において腸球菌は腸管系病原微生物との相関が低かった点[60]、海域において大腸菌や腸球菌は気温や降雨の影響によって腸管系ウイルスとの相関が失われる点[61]等有効性に疑義を唱える指摘がなされ[17]、近年は従来型 FIBs では水の病原微生物汚染を十分に検出できていないのではないかとこの疑問も呈されている。

さらに、従来型 FIBs は汚染源から場所的・時間的に近い「今・ここ」における糞便汚染を推定できる可能性はあるが、上記に触れた再増殖の問題や気候変動により汚染発生から距離的・時間的に隔たりがある場合は十分に機能しない可能性が考えられる。一方で公衆衛生上より重要かつ効果的なのは、汚染源を的確に検出し、事案ごとに有効な対策を取ること

であろう。この考え方に従って、近年では微生物を用いた MST と呼ばれる手法が注目されている[62]。中でもウェルシュ菌は芽胞形成による生残性の高さから、汚染源から時間的・距離的な隔たりがあっても有効な指標性を示す利点を持ち[18]、ヒト腸管系ウイルスや原虫シスト、オーシストとの相関も高い[9]点などから MST 手法に活用できる指標 (MST 指標) として有望視されており、さらに *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はそのヒト糞便偏在性からヒトの MST 指標として適しているとの指摘もある[19][22]。

さらに *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は家畜試料からは 438 検体中 1 件しか検出されなかった一方、ヒト糞便由来試料では 309 検体中 109 件と高い陽性率で検出されている[19]。この結果はヒトが *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の重要なリザーバーであるとする先行研究[47]とも一致している。また近年ヒト下水処理施設放流水中の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が河川を通じて海域へ至り、環境及び海産物を汚染し食中毒の原因となっているとの報告もなされている[33]。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌による感染症の制御には、重要な汚染源の 1 つと目される下水放流水を注視する必要があると考えられるが、ウェルシュ菌に関する先行研究はなされているものの、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌に着目した研究はまだ多くはなされていない。

2.3.4 水処理、消毒の効果の指標

ウェルシュ菌の大きな特徴の 1 つとして、芽胞形成による消毒剤耐性が知られている。例として、下水消毒剤として最も広く導入されている塩素剤に対し、大腸菌群及び腸球菌は 1 mg/L で 15 分間接触させれば 3 log 以上の不活化が達成できる一方、ウェルシュ菌芽胞は 700 mg/L で 15 分接触させても全く影響を受けないか 0.1 log 程度の不活化しか達成できなかったとする報告がある[46]。下水放流水中にウェルシュ菌が 10^5 cfu/ml と高濃度に存在することは報告されており[23]、いまだ十分な対策がなされているとは言えない状況である。とはいえ、放流水中残留塩素が河川に生息する水生生物に悪影響を及ぼすことは古くから指摘されており[35]、また消毒用に添加された塩素が水中の有機物と合成しトリハロメタン類 (THMs) をはじめとした消毒副生成物を生成する点も指摘されており[63]、消毒効果を上昇させる目的で現状よりも塩素濃度を高く設定するのは得策ではないと考えられる。

近年放流先環境に生息する生態系への影響を考慮し、また消毒副生成物を生じない等の長所から、欧米にて過酢酸を下水処理場の消毒剤として活用する動きがある[64][65]。現在の塩素に強く依存した下水消毒法に対して、環境負荷のより少ない持続可能的な、また耐塩素性病原微生物対策として、塩素代替あるいは塩素の短所を補う補完的な消毒剤の検討が重要である。

2.4 ウェルシュ菌に関するこれからの課題

このように近年明らかになってきている *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境での動態や分布[19]、古くから本菌の食中毒の原因と推定されている食肉に関するその原因として否定

的な研究[32]に加えて、現状でも多数の食中毒事例が発生し続け、その原因食材の不明瞭さを鑑みると、本菌食中毒は、従来から考えられてきた家畜腸管-食肉というシンプルな汚染源では説明できないと考えられる。一方で食中毒原因菌としての側面に加えて、水環境中における糞便汚染指標として、あるいは原虫類の指標として、またヒト糞便汚染探索指標としての有用性も検討すべき重要な側面である。

このため本論文では、この食中毒に起因するウェルシュ菌の動態を広く探り、ヒト—水系などの環境—食を含む未解明なウェルシュ菌の循環について検討を行う。第3章ではウェルシュ菌食中毒原因として想定される食材のうち、土壌との親和性が高いことから根菜類、特に入手が容易であるじゃがいもに着目し、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の市販じゃがいもからの検出状況について調査を行った。第4章では下水放流水中 *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境汚染の実態調査を行うと同時に、ウェルシュ菌が生成する芽胞の環境生残性の高さと *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のヒト糞便偏在性を活用したヒト糞便汚染探索指標(MST指標)としての有効性について議論を行った。第5章では下水放流水中 *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌に対し、塩素を代替あるいは補完する目的で、過酢酸による不活化評価を行った。また PMMoV (Pepper Mild mottle virus) は下水処理システムで様々な腸管ウイルス系ウイルスより高い生残性を示したとの報告[66][67]があることから、下水放流水中に存在するウイルスに対する過酢酸の不活化効果とその評価手法について検討を行った。

第3章 ウェルシュ菌食中毒原因食材としてのじゃがいもの重要性

3.1 緒言

ウェルシュ菌は産生する4つの主要毒素 (α 、 β 、 ι 、 ϵ) に応じて A から E 型菌に分類される[41]。またこれらの毒素とは別に、食中毒は *cpe*(*Clostridium perfringens* enterotoxin) 遺伝子を有する株から産生される腸管毒素によって引き起こされる。*cpe* 毒素は抗原的に均一なもので、化学的には分子量約 35,000、アミノ酸残基 300 余りの単純タンパク質であり、pH4.0 以下では不安定、60 °C10 分間で破壊される[68]。本毒素は pH4.0 以下では短時間で破壊されるため胃内を通過できないと考えられるため、ウェルシュ菌食中毒は、食品中で増殖した *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を喫食することで引き起こされる。

国内におけるウェルシュ菌食中毒の発生件数は過去5年(2016-2020年)で年間20-30件程度と決して多くはないが、事案の特徴の1つに、1件当たりの患者数が多いことが挙げられる[69]。日本での1件当たり患者数は同期間で45-72人と同じ細菌性食中毒のカンピロバクターの患者数6-10人と比較しても相当に多く、この傾向は米国でも同様である[70]。

ひとたびアウトブレイクが発生すると大型化する食中毒原因菌であるため、その制御は食品衛生上重要な課題である。対策としては何よりも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌に汚染された食材を調理に用いないことが肝要であるが、ウェルシュ菌が持つ特徴である偏性嫌気性・芽胞形成性[56]により原因食材の特定が困難なケースが多い。たとえば加熱調理により食品中心部が微嫌気状態になることから、大量調理のカレーやシチュー類がウェルシュ菌食中毒の原因食となりやすい点が指摘されている[49]。また芽胞形成により加温に対する強い抵抗性を獲得し100°C前後の加熱では生残する[71]ため、大量調理後に再加熱する際は注意が必要である。また嫌気状態を好むため真空パック内で増殖しやすく[52]、セントラルキッチンにおいて大量調理後、各調理地点で盛り付けるような弁当類も事例として多く挙げられている[25]。上記のカレーやシチュー、仕出し弁当といった食品に共通するのは、いずれも複合調理食品として多種多様な食材が混在されている点であり、このことが原因食材の特定を困難にしている。

ウェルシュ菌はヒトおよび動物の腸管常在菌であるため、本菌による食中毒の原因食材として古くは食肉が推定されてきた[30]。しかし近年の遺伝子解析技術の発達により、牛、豚、鶏肉等市販食肉からはウェルシュ菌は高頻度に検出されるものの、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はほぼ検出されないとの報告がなされており[32][72]、食肉由来とする経路を疑問視する向きもある。加えて *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は食中毒患者からはもちろんのこと、健康なヒト糞便中からも検出され、調理従事者80人にのち5人(6%)が陽性であったとの報告もある[47]ため、健康な食品従事者の手指を介して汚染が持ち込まれる可能性も否定できない。他にも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト糞便に偏在し、家畜や野生動物糞便からはほぼ検出されないとの報告[19]、芽胞による耐塩素性から不活化に至らず、下水処理施

設放流水から 10^{10} cfu/m³/day と少なくない量が環境中に放出されているとする調査報告[23]、また下水処理施設放流水中の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が放流先河川を通じて海域に至り、アサリを汚染しているとの報告[33]もなされている。あるいはその経路は不明なもの *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が土壌中から検出されている [34][34]。その他にも下水流入の影響が強い河口にて底生性カニ類から *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出され、下水放流口に近いエリア程その濃度が高かったとの報告もある[73]。

このように *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が食中毒を引き起こしており、現時点確定的な原因食材は提案されていない一方、ヒト糞便および下水処理施設放流水に多量に存在し、放流先河川を経由して海域を汚染している実態がある。またヒト糞便に偏在する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が土壌中から検出されるという事実がある。ここから推察するに、ヒト下水放流水が汚染源となり、汚染経路の一端として河川を経由した後土壌へと至り根菜類を汚染する、あるいは灌漑用水として農業利用された結果農作物を汚染している可能性も否定できない。一方、下水から検出される *cpe* 遺伝子と、ウェルシュ菌食中毒事例から検出された *cpe* 遺伝子の相同性を解析した報告はまだ十分になされておらず、今後は下水から河川、土壌、農作物、食中毒由来株へと一貫した調査も重要になるとと思われる。

そこで本章では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の新たな食材汚染ルートの一端として、汚染された土壌から食材に至る可能性を考慮し、土壌との親和性が高い根菜類に着目した。中でも入手が容易であり、原因食品として多く例示されるカレーやシチュー等の複合調理職人の食材として用いられる頻度が高いじゃがいもを対象として調査を行った。また市販じゃがいもの *cpe* 毒素の有無に加えて、検出時の遺伝子相同性解析を行うことで、ウェルシュ菌食中毒との関連の有無を調査検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 試料

2019年3月から2020年7月にかけて北海道から九州にて採取された市販じゃがいも計30試料を用いた。それぞれの試料の産地は、北海道5試料、青森3試料、茨城2試料、埼玉1試料、千葉4試料、静岡1試料、広島4試料、佐賀1試料、長崎4試料、宮崎1試料、熊本3試料、鹿児島1試料であり、主要な産地である北海道および九州地方の試料および広島県産の試料を中心に用いた。

3.2.2 ウェルシュ菌の分離・培養

3.2.2.1 付着土壌の分離

土が付着した状態のじゃがいも1個を試料とし、初めにその乾燥重量を測定した後、試料と界面活性剤 Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate (Tween80) 0.1%含リン酸緩衝液 100 mL を UV で滅菌済みのチャック付きポリ袋に入れ、手もみで洗浄した。洗浄後、じゃがいもを袋から取り出し、この洗浄液を 50 mL 遠沈管 2 本に分注した。その後 1 度再び 50 mL の界面活性剤 (Tween80) 0.1%含リン酸緩衝液 50 mL をポリ袋に加え、袋内の付着液を共洗いしてその洗液も 50 mL 遠沈管に分注した。洗浄後の試料(ジャガイモ 1 個)の乾燥重量を測定し、洗浄前の重量との差を求め、外表に付着していた土壌の質量を求めた。

3.2.2.2 加熱処理・吸引ろ過

回収した洗液の入った遠沈管を恒温水槽に浸し、75℃20分間加熱処理した後、氷水中に浸して急冷した。加熱後の洗液を複数枚の直径 47 mm、孔径 0.45 μm のセルロース混合エステルタイプメンブレンフィルター（東洋濾紙株式会社）に吸引ろ過を行った。

3.2.2.3 培養

シャーレにハンドフォード改良寒天培地（関東化学株式会社）を約 5 mL 注ぎ固化し、固化後の培地表面に洗液をろ過したメンブレンフィルターを乗せた。メンブレンフィルターの上にハンドフォード改良寒天培地を約 10 mL 注ぎ 2 層目を形成させ、固化した 2 層目の上に約 5 mL のハンドフォード改良寒天培地を注いで三重層を形成した。この 3 層の培地を嫌気ジャーにアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学株式会社）とともに倒置して入れ、45℃24±2 時間嫌気培養した。培養後、培地上に形成された黑色コロニーを嫌気性芽胞菌(推定ウェルシュ菌)として計数し定量した。

3.2.3 菌株の分離と増菌培養

ハンドフォード改良寒天培地に形成された黑色コロニーを 1 試料あたり 10 株以上を無作為に、10 株以下のものについては全株を選び、白金耳で無菌的に釣菌してコロンビア 5%ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に植種した。植種後、嫌気ジ

ヤーに入れ、36°C24±2時間嫌気培養して増菌した。培養後、得られたコロニーを一白金耳程度釣菌し、TE(Tris/Tris-HCl 10 mM EDTA 1mM)緩衝液 (ナカライテスク株式会社) 1 mL の入ったスクリーキャップに分取し、遺伝子検査まで-30 °Cで凍結保存した。

3.2.4 マルチプレックス PCR・アガロースゲル電気泳動

TE 緩衝液 1mL 中で冷凍保存した試料を Template とし、この Template 溶液 2.5 µl を 50 µl PCR チューブに分取したのち、10% Triton X 0.5 µl および超純水 20 µl を加え 95 °C 5 分間サーマルサイクラーで加熱溶菌した。溶菌後、ウェルシュ菌の保有する 6 つの毒素遺伝子 (*cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iap*, *cpe*) を標的としたプライマーを加え、表 3.2.1 および表 3.2.2 に示した組成と条件でマルチプレックス PCR を行った。マルチプレックス PCR を行った。使用したプライマーの塩基配列を示す[74]。

PCR ののち、増幅産物を電気泳動を行い、各株の 6 つの毒素遺伝子の保有について評価した。また、同様に一部の株(*cpe* 遺伝子の保有が確認された株)については、表 3.2.3 および 3.2.4 に示した条件で 16S rRNA の V3、V4 領域の PCR も行い、増幅産物を得た。

表 3.2.1 マルチプレックス PCR 反応条件

2×Quick Taq HS DyeMix	12.5µL
β2 primer (F,R)	各 1.0µL (計 2.0µL)
other preimer (5種×F, R)	各 0.5µL (計 5.0µL)
DDW	0.5µL
10% Triton X	0.5µL
Template DNA	2.5µL
DDW	20.µL
Total	25µL

95°C	15分	} 40サイクル
94°C	30秒	
53°C	1分30秒	
72°C	1分30秒	
72°C	10分	

表 3.2.2 プライマー塩基配列

Toxin gene	Primer	Sequence (5'-3')	product
<i>cpa</i> (α -toxin)	CPAIphaF	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324bp
	CPAIphaR	CCTCTGATACTTCGTGTAAG	
<i>cpb</i> (β -toxin)	CPBeteF3	GCGAATATGCTGAATCATCTA	195bp
	CPBetaR3	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	
<i>cpb2</i> (β 2-toxin)	CPBeta2totalF2	AAATATGATCCTAACCAAM ^a AA	548bp
	CPBeta2totalFR	CCAAATACTY ^b TAATYGATGC	
<i>etx</i> (ϵ -toxin)	CPEpsilonF	TGGGAACCTCGATACAAGCA	376bp
	CPEpsilonR2	AACTGCACTATAATTTCTTTTCC	
<i>iap</i> (ι -toxin)	CPlotaF2	AATGGGTCCTTTAAATAATC	272bp
	CPlotaR	TTAGCAAATGCACTCATATT	
<i>cpe</i> (enterotoxin)	CPEnterofF	TTCAGTTGGATTTACTTCTG	485bp
	CPEnterorR	TGCCAGTAGCTGTAATTGT	

表 3.2.3 PCR の反応条件

10% TritonX	0.5 μ L
Template DNA	2.5 μ L
DDW	2.0 μ L
Ex-Taq	1.0 μ L
primerF, R	各2.5 μ L (計5.0 μ L)
dNTPS	5.0 μ L
10 \times buffer	5.0 μ L
DDW	29 μ L
Total	50 μ L

16S rRNA		<i>cpe</i>	
94 $^{\circ}$ C	2分	95 $^{\circ}$ C	2分
94 $^{\circ}$ C	30秒	94 $^{\circ}$ C	30秒
55 $^{\circ}$ C	30秒	53 $^{\circ}$ C	1分30秒
72 $^{\circ}$ C	30秒	72 $^{\circ}$ C	1分30秒
72 $^{\circ}$ C	5分	72 $^{\circ}$ C	10分

} 40サイクル

表 3.2.4 プライマー塩基配列

	Primer	Sequence(5'-3')
<i>cpe</i> (enterotoxin)	CPEnterofF	TTCAGTTGGATTTACTTCTG
	CPEnterorR	TGCCAGTAGCTGTAATTGT
16S rRNA	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

3.2.5 16S rRNA 遺伝子解析

PCR にて *cpe* 遺伝子の保有が認められた株については、その増幅産物のシーケンス解析を行った。シーケンスはタカラバイオ(株)に委託し、得られた各株の *cpe* および 16S rRNA V3、V4 領域の塩基配列データを得た。

塩基配列データは遺伝子解析アプリケーションソフトウェアである MEGA-X (Molecule Evolutionary Genetics Analysis: <https://www.megasoftware.net/home>) を用いて NCBI(National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベース上にある各種のウェルシュ菌の遺伝子情報と併せてマルチプルアライメントを行い、分子系統樹を作成した。

3.3 結果

3.3.1 市販じゃがいものウェルシュ菌検出状況

北海道から九州までの全 12 道府県（北海道 5、青森 3、茨城 2、埼玉、千葉 4、静岡、広島 4、佐賀、長崎 4、宮崎、熊本 3、鹿児島）産の市販じゃがいもを 2019 年 3 月-2020 年 7 月の期間収集し、それぞれの試料から分離されたウェルシュ菌株の *cpe* を含む 6 つの毒素遺伝子 (*cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iap*, *cpe*) の保有状況を調査した。

じゃがいも 30 試料から得られた計 4136 株の嫌気性芽胞菌(推定ウェルシュ菌)からランダムに選んだ 613 株について保有毒素遺伝子の確認を行った。ウェルシュ菌はすべての菌型で α 毒素 (*cpa*) を産生するため、*cpa* 遺伝子保有嫌気性芽胞菌をウェルシュ菌と判定した(櫻井ら 2002)。各試料からのウェルシュ菌分離率及び毒素遺伝子保有率を表 3.3.1 に示した。

マルチプレックス PCR の結果、分離した 613 株のうち 288 株から *cpa* 遺伝子が検出され、じゃがいもから分離されたハンドフォード改良寒天培地上で黒色コロニーを形成する嫌気性芽胞菌のうち 47%がウェルシュ菌と同定された。またウェルシュ菌と同定された 288 株のうち、64 株(22%)から、ウェルシュ菌食中毒の原因であるウェルシュ菌エンテロトキシンをコードする遺伝子である *cpe* 遺伝子が検出され、これらは *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌と同定された。*cpa*、*cpe* 以外の毒素遺伝子の保有状況は、*cpb* は 288 株中 17 株(5.9%)、*cpb2* は 288 株中 14 株(4.9%)、*iap* は 288 株中 1 株(0.3%)から検出され、*etx* 遺伝子保有株は検出されなかった。ジャガイモからのウェルシュ菌および *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の検出状況について、図 3.3.1 に整理した。調査した 30 試料のうち、93%に当たる 28 試料から嫌気性芽胞菌(推定ウェルシュ菌)が、86%の 26 試料からウェルシュ菌が検出され、市販の多くのジャガイモがウェルシュ菌による汚染と糞便との接触の可能性が示唆された。加えて、33%、10 試料からは *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出され、食中毒との関係性が示唆された。この 10 試料から分離されたウェルシュ菌のうち、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の割合は 8-100%と幅広く、試料によってはじゃがいも付着土壌から分離されたウェルシュ菌のうちすべての株が *cpe* 遺伝子を保有していた。

表 3.3.1 各試料からのウェルシュ菌分離率および毒素遺伝子保有率

日付	産地	総嫌気性芽胞菌数	<i>cpa</i> 分離率		<i>cpe</i> 保有率		<i>cpb</i> 保有率		<i>cpb2</i> 保有率	
20190313	鹿児島	95	100%	40/40	45%	18/40	35%	14/30		
20190709	広島	72	75%	30/40	20%	6/30			10%	3/30
	長崎	25	-	-	-	-				
	熊本	44	35%	7/20	-	-				
20190819	北海道	0	-	-	-	-				
	青森	7	100%	7/7	-	-				
	茨城	1	100%	1/1	-	-				
20190828	北海道	359	54%	30/56	40%	12/30				
	千葉	35	32%	8/25	13%	1/8	13%	1/8		
	静岡	1	100%	1/1	-	-				
20190912	北海道	4	75%	3/4	-	-				
	青森	2	50%	1/2	100%	1/1				
	長崎	1	100%	1/1	-	-				
20190929	北海道	121	23%	9/40	33%	3/9				
	千葉	14	63%	5/8	80%	4/5				
	埼玉	1109	26%	13/50	8%	1/13				
20200622	宮崎	108	80%	24/30	-	-	4%	1/24		
	熊本	8	13%	1/8	-	-			100%	1/1
	長崎	1	-	-	-	-				
20200629	北海道	8	25%	2/8	-	-				
	広島	766	49%	44/90	39%	17/44			20%	9/44
	熊本	19	11%	2/19	100%	2/2				
	長崎	3	33%	1/3	-	-				
20200714	千葉	1	-	-	-	-				
	広島	22	5%	1/22	-	-				
	佐賀	253	13%	9/67	-	-	11%	1/9		
20200727	青森	16	21%	3/14	-	-				
	茨城	1022	87%	34/39	-	-				
	千葉	19	73%	11/15	-	-			9%	1/11
	広島	0	-	-	-	-				
合計30ヶ所		4136	47%	288/613	22%	64/288	5.9%	17/288	4.9%	14/288

嫌気性芽胞菌
(推定ウェルシュ菌)
28/30 試料 (93%)
確定ウェルシュ菌
(*cpa* 保有)
26/30 試料 (86%)
cpe 遺伝子
保有ウェルシュ菌
10/30 試料 (33%)

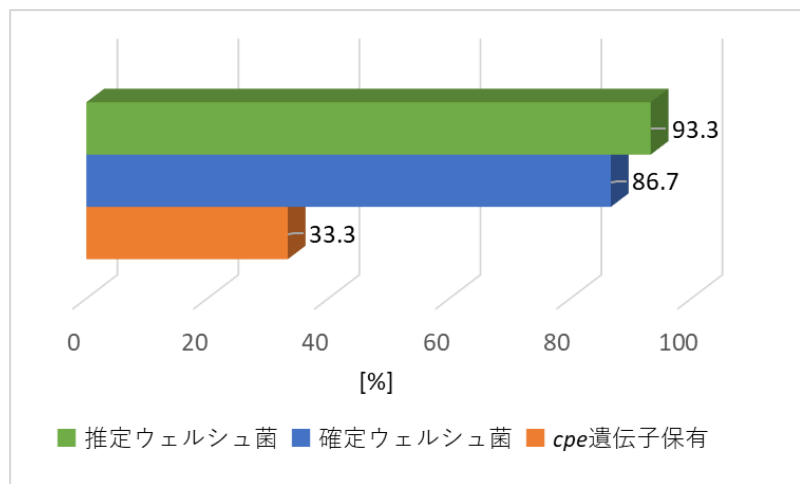


図 3.3.1 市販じゃがいもにおけるウェルシュ菌検出割合

3.3.2 既報食中毒原因株との相同性解析

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌と同定された 64 株に対して 16S rRNA の V3、V4 領域と *cpe* 遺伝子を対象にシーケンス解析を実施した結果正確な塩基配列が得られた株は 16S rRNA は 56 株 (400 bp 前後)、*cpe* 遺伝子は 49 株 (430 bp 前後) であった。*cpe* 遺伝子の正確な塩基配列が得られた 49 株と *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の標準株である NCTN 8239 (GenBank:U11257.1) の塩基配列を比較したところ、じゃがいもから分離された *cpe* 遺伝子の塩基配列と標準株には大きな変異が認められず、多くが一塩基多型であった。また正確な塩基配列が得られた 16S rRNA の V 3、V 4 領域と食中毒由来株 (GenBank:DQ196139.1) のマルチプルアライメントの結果、じゃがいも由来の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の 16S rRNA の V 3、V 4 領域の塩基配列には大きな変異が認められた。

図 3.3.4 にマルチプルアライメントの結果を基に作成した *cpe* 遺伝子系統樹を示す。正確な塩基配列が得られた 49 株中 47 株 (95.9%) には大きな差異は認められず、NCBI データベースに登録されたヒト糞便分離株の *cpe* 遺伝子と塩基配列と大まかに一致した。またじゃがいもから検出された *cpe* と *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌標準株である NCTC8239 の持つ *cpe* 遺伝子の相同性は高かった。図 3.3.5 に 16S rRNA のマルチプルアライメントの結果を基にした系統樹を示す。解析の結果じゃがいもから分離された *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の 16S rRNA の V3、V4 領域の塩基配列 (56 株) は 3 つのグループに大別出来た。3 グループの産地一覧について表 3.3.2 に示した。

3.3.3 付着土壌量とウェルシュ菌および *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌量の関係

じゃがいも 30 試料について、付着土壌量とウェルシュ菌及び *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌数の関連について調査を行った。各じゃがいもから検出されたウェルシュ菌及び *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の総数を付着土壌重量で除し、付着土壌の量[g]単位当たりの濃度を算出した。じゃがいも 1 試料ごとの付着土壌量は 0.028-0.925 g であり、算術平均は 0.124 g であった。ウェルシュ菌及び *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌数はどちらも付着土壌量との相関は低く、土壌の量が増えればウェルシュ菌あるいは *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の量も増える、という関係は成立しなかった。また各試料からの土壌 1 g あたりのウェルシュ菌および *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の菌数は、前者が 11-6649 cfu/g、後者が 8-1425 cfu/g となり、試料によって濃度のばらつきが観察された。

図 3.3.4 ジャガイモから分離された *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の *cpe* 遺伝子系統樹

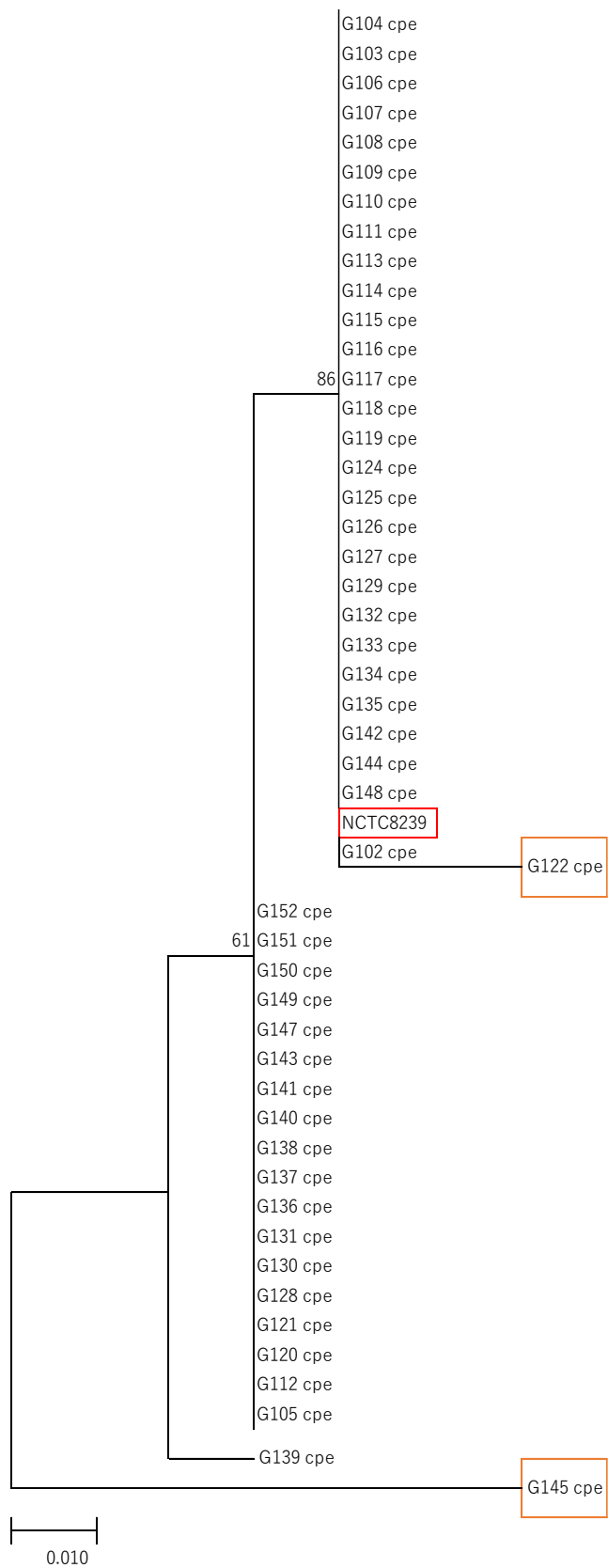


図 3.3.5 ジャガイモから分離された *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の 16S rRNA 系統樹

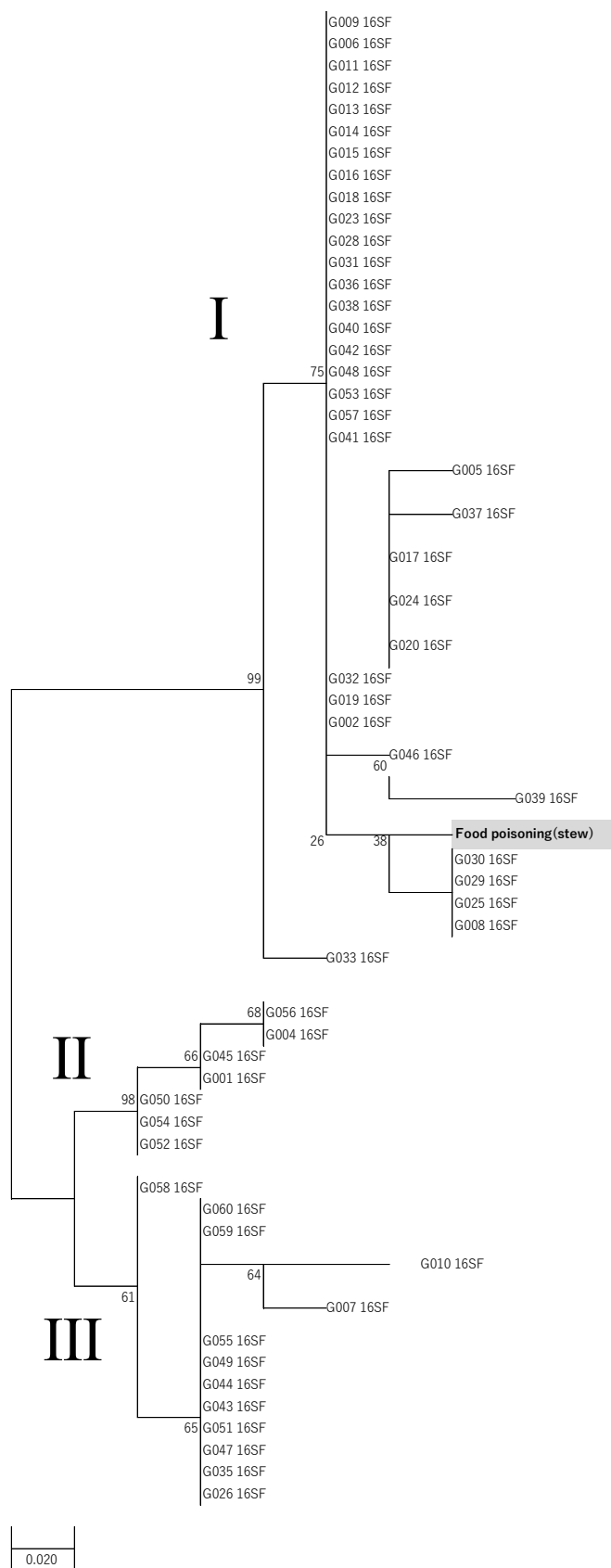


表 3.3.2 16S rRNA 塩基配列で分類したじゃがいもの産地一覧

I			II			III		
G024	19.10.29	北海道	G001	20.6.29	広島	G026	19.8.28	北海道
G028			G004			G035		
G029			G045		鹿児島	G007		広島
G030			G050			G010		
G031			G052			G043	19.3.13	鹿児島
G032			G054			G044		
G033			G056			G047		
G036						G051		
G025	19.9.12	青森				G055		
G020	19.10.29	千葉				G058		
G023						G059		
G002		広島				G060		
G002						G049		
G006								
G008								
G009								
G011								
G012								
G013								
G014								
G015								
G016								
G017								
G037	19.7.9							
G038								
G039								
G040								
G041								
G042								
G018	20.6.29	熊本						
G019								
G046		鹿児島						
G048								
G053								
G057								

3.4 考察

調査したじゃがいも 30 試料のうち 86%にあたる 26 試料からウェルシュ菌が検出され、またじゃがいもから検出された嫌気性芽胞菌のうち 47% (288/613 株) がウェルシュ菌であり、そのうち 22% (64/288 株) が食中毒起因となる *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌であった。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が土壌から検出されるとする報告[34]、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は野生動物や家畜糞便からは検出されず、ヒト糞便中に偏在するとする報告[19]、ヒト下水放流水中に多量に存在するとする報告[23]から、本章で供試したじゃがいもあるいは土壌がヒト糞便汚染の影響を受けた可能性が高いと考えられた。今回の研究では評価を行っていないが、もしじゃがいもあるいは土壌が糞便汚染を受けている場合は、ウェルシュ菌のほかにも腸管系病原微生物による汚染を受けている可能性も考えられる。

ウェルシュ菌は動物腸管常在菌であるため、古くは食中毒原因食材として食肉類が疑われてきた[30]。しかし、遺伝子検査技術の発展とともにウェルシュ菌の中でも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を対象とした詳細な調査が行われるようになると、市販食肉からウェルシュ菌は多く検出されるものの、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はほぼ検出されない状況が判明してきた[32]。そもそも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は食材から検出されるウェルシュ菌の 0-5%程であるとの報告[76]もあり、*cpe* 遺伝子保有率は決して高くはない。市販鶏肉の詳細な調査でも、200 検体中 154 検体 (77%) からウェルシュ菌が検出されたものの、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はわずかに 1 検体に過ぎなかったとの報告[77]がある。こうした先行報告と比べ本研究で得られたじゃがいもからの *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の検出率 (22%) は高く、じゃがいもがウェルシュ菌食中毒原因食材となりうる点が示唆された。本研究はじゃがいもから *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出された初の事例であり、今後は洗浄方法や調理方法との関連を踏まえつつ、許容される汚染量の検討が課題となると考えられる。

またマルチプルアライメントの結果を基に作成した系統樹によるとじゃがいもから検出された *cpe* 毒素遺伝子は過去に報告された食中毒由来株との相同性が示され、この点からもじゃがいもがウェルシュ菌食中毒原因食材となる蓋然性が高いことが示唆された。

ウェルシュ菌食中毒原因食材として例示されるカレーやシチュー類にじゃがいもはしばしば使用されるため、複合調理食品におけるウェルシュ菌食中毒原因食材として従来よりも重点的に管理する必要も考えられる。すなわち、調理施設における調理工程では、大腸菌や一般細菌汚染の伝播を防ぐため、食肉を扱ったまな板を生で食べる野菜類にそのまま扱うのは禁忌であり、スポンジを用いて洗浄してもなお菌数は増える可能性があることから、同じまな板は使い回してはならないとされる[78]。また病原性大腸菌 o-157 対策を念頭に置いた食肉処理業向け HACCP では、畜種ごと、肉の種類ごたまな板、ナイフ、手袋等使用した器具は交換するものとされている[79]。これまでウェルシュ菌食中毒の原因食材は食肉類だと目されており、じゃがいも等根菜類を注視すべきとした研究はまだなされていなかった。特にじゃがいもは野菜類の一部として扱われ、サラダ等に用いる生食用野菜と同じ調理器具を用いて管理されてきた可能性が高い。すなわちじゃがいもは食肉類の管理ほどは重

要視されておらず、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌対策を念頭に置いた衛生管理もなされてこなかったため、ウェルシュ菌食中毒の原因食材として十分な対策がなされないまま調理に用いられ、場合によっては調理器具等を介して他の食材を汚染していた可能性も否定できない。古くから食肉類は病原性大腸菌対策として重点的な管理がなされてきた[80]が、同じく複合調理食品に用いられる食材の一環として、今後はじゃがいもも現状以上の衛生管理が求められる必要があるのではないだろうか。そしてそもそも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌によるじゃがいもの汚染を防ぐべきと考えられる。

ウェルシュ菌食中毒原因食品はカレーやシチューと言った複合調理食品のため、用いられる食材も多岐にわたり原因食材の特定は容易ではない。一方で第 4 章で述べるように、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト由来排水に偏在しており、浄化槽放流水や下水処理施設放流水から十分な処理がなされないまま高負荷に河川へと放流されている実態がある。

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌がどのような経路を通じて食品を汚染しているのか確定的な報告はなく、また現時点ヒト下水放流水が河川から土壌を通じて直接根菜類を汚染しているとする結果は得られていないものの、少なくともじゃがいもがウェルシュ菌食中毒の原因食材の一つであり、食品衛生上取り扱いに注意を要する点は間違いない。

じゃがいもから分離された *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の 16S rRNA の V3、V4 領域の塩基配列は、大きく 3 つのグループに大別された。このうち I 型のグループは既報の食中毒由来株と同一性が高かった。I 型にはすべての産地のじゃがいも分離株が含まれていることから、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌によるじゃがいもの汚染に地域性はないものと示唆された。また本調査では正確な収穫時期まではデータを得られていないが、南北に長い我が国において、一般にじゃがいもは地域ごとに作付けから収穫のタイミングが異なるため、汚染には季節による影響も少ないのではないかと推察される。

これまでも海産物[33]や香辛料や野菜、果物[26]をウェルシュ菌食中毒原因食材と推定する報告はなされているものの、じゃがいもを *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚染源と特定した観点での調査はなされていない。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は土壌からも検出されている[34]が、じゃがいもは原因食材として注視されてこなかった盲点から付着土壌の洗浄や調理加工時の加熱工程などにウェルシュ菌を念頭に置いた処理はなされていなかった可能性が高い。

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水放流水から河川を通じて海域に至るまでの経路を論じた研究[33]もあり、河川を通じて土壌に至る経路、あるいは灌漑用水を通じて農作物を汚染する経路等も考えられる。また下水による汚染影響の強い河口において、生息するカニおよび底泥から *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出されており、下水放流口に近いエリアほど高頻度に検出されたとする報告もある[73]。そこで次章ではヒト下水放流水から水環境を経由して農作物汚染にいたる可能性について考証を試みたい。

3.5 結論

本章では食中毒原因食材の1つとしてのじゃがいもの意義について論じた。市販じゃがいもは多くがウェルシュ菌に汚染されており、また3割以上が食中毒原因菌である *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌であった。また *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の 16S rRNA の V3、V4 領域を調査したところ、先行研究により報告されている食中毒原因株との相同性が確認された。

土壌を介してじゃがいもが汚染されている実態の報告はこれまでになく、従来は食肉が疑われていたウェルシュ菌食中毒において、原因食材としてのじゃがいもがもつ重要性があきらかとなった。一方土壌がいかに汚染されているかのルート解明が充分になされていない。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のヒト下水放流水の汚染状況を踏まえ、今後の課題としてウェルシュ菌が下水から食材へいたるルートの解明とその環境中での循環および制御に関する研究が重要と考えられる。

第4章 *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌汚染源としての下水放流水とその環境負荷

4.1 緒言

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト糞便中に存在する点、芽胞を形成するため下水処理施設で行われる塩素消毒に対し高い耐性を示す点[58]、ヒト由来の下水放流水から環境に放流されていること[23]から、下水処理施設の放流水が *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の放流先の河川をはじめとした水環境の汚染源として機能している蓋然性が高いと考えられる。加えて、下水放流水を介して環境中に放出された結果、海域へ至る過程において水産物や耕作土壌等を通じて農作物を汚染している可能性も高い。そこで本章では、はじめに *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の水域での分布および下水放流水の汚染源としての意義の検討を行った。

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌が引き起こす食中毒は世界各国で発生しており、米国ではサルモネラに次ぐ細菌性食中毒であり年間推定患者数は 100 万人[81]、EU 圏では本菌に関連した食中毒患者数は約 500 万人と推定されている[82]。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌による食中毒は本邦でも発生件数に対する患者数が多い食中毒細菌として認識されており、直近3年間（2016-2018年）でも年間患者数（1220-2319人）及び1件当たり患者数（45-72人）は常に1-2番目に位置している[69]。当該食中毒の原因食品としてはカレー、シチュー等粘度が高く嫌気状態が形成されやすい煮込み料理およびパーティー・旅館での複合調理食品によるものが多く、特に食肉、魚介類及び野菜類を使用した煮物や大量調理食品で多く見られるものの、原因となる食材やその汚染ルートはいまだに不明な点が多い[32]。ウェルシュ菌食中毒の原因食材の特定が困難であることに加え、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がどこから由来し、どのタイミングで原因食材を汚染しているのかについても不明な点が多い[26][53]。一方で、第3章に論じたとおり、本論文では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がじゃがいもを汚染している実態を明らかにした。また先行する研究では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水放流水から河川を通じて海域に至り、アサリを汚染しているとの報告[33]がなされている。加えてウェルシュ菌はヒトを含めた温血動物の腸管の常在菌であるため糞便中から多数検出されるものの、食中毒の原因となる *cpe* をコードする *cpe* 遺伝子を保有するウェルシュ菌はヒト糞便に偏在し、食肉となる家畜である牛豚、家禽由来の糞便試料からは検出されないとする報告がある[19]。

これらの背景をもとに、下水放流水や浄化槽などのヒトに起因する糞便汚染あるいは養豚場排水が流入する動物に由来する糞便汚染が明らかなる3つの河川において、その流入前後の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の分布、負荷量を評価して、その汚染源としての意義について考察した。

さらには、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のヒト由来糞便汚染における遍在性[19]を根拠とした、水域におけるヒト由来糞便汚染を評価するための指標：MST (Microbial source tracking) 指標としての本菌の有効性についても評価を行った。

糞便汚染指標は、公衆衛生学上解決すべき種々の細菌、ウイルス、原虫類の水系の汚染を適正に評価し、発展途上国に住む子供たちを含め、毎年三百万人を超える人々が命を落としている[83]水系感染症の制御のための重要なツールである。

これらの水系感染症の病原微生物の多くは、糞便-経口感染することから[21]、水の糞便汚染を適切に評価する事はそのリスク回避には極めて有効性が高いものである。そのため水質の衛生管理を行うにあたり糞便汚染の検出は重要課題であり、古くから大腸菌や腸球菌のような腸内常在細菌が糞便汚染指標（FIBs：Fecal indicator bacteria）として用いられてきた[84]。

しかしながら、近年の研究では、現在最も広く用いられている糞便汚染指標である大腸菌は、動物の腸管から放出された先の環境中でも長期間生残し、環境中で再増殖する点[10]やウイルスや原虫とは環境中の消長や挙動が異なる点などが指摘[17]されており、糞便汚染の正確な検出という目的には充分に対応できていないという問題がある。また FIBs では網羅的な糞便汚染の推定は可能としても、これらの細菌は多くの異なる動物の消化管に存在するため、汚染源まで識別するのは困難であると考えられる[85]。一方で公共用水域における衛生的な水の確保のためには、汚染源やそれに起因する病原微生物に対して適切な対策を構築するのが何よりも重要と考えられる。

近年糞便汚染の起源を微生物学的、遺伝子学的、化学的手法を用いて追跡する方法が提案されており、中でも指標微生物を用いた特定方法：MST が様々な提案されている[20][86]。たとえば細菌を用いた手法として糞便性大腸菌/糞便性連鎖球菌レシオが提案されたが、本手法は糞便性連鎖球菌の生存率の変動や検出方法によるばらつきが指摘されている[87]。*Enterococcus faecalis* と *E. faecium* はヒト糞便に多く検出されるため、腸球菌はヒト糞便汚染指標細菌として広く用いられているが、環境中でかなりの量が再増殖してしまうとの指摘がなされている[88]。あるいは *Bifidobacterium* spp. はヒト糞便中に多量に存在する一方、動物腸管からはほぼ検出されないため[89]、MST 指標として期待がなされたが、環境中で短期間に大幅に減少してしまう点が指摘されている[90]。近年では宿主特異的な遺伝子から汚染源を特定する手法も提案されており、中でも *Bacteroides* の 16S rRNA 遺伝子断片 HF183 の使用が有望視されている[91][92]。しかし、本マーカーの定量は降雨や日射量、水質に影響を受ける点[93]や、ノンポイント汚染が濃厚な場面で有意な数値上昇が見られなかった点などが指摘されている[94]。

このような状況の元、ウェルシュ菌を用いた MST 手法が提案されてきている。その根拠としてまず、比較的簡単な方法で精度よく定量できる点に加え、ヒトおよび動物糞便から検出されるため、水環境中における糞便汚染の検出に適しているとされる点がある[95]。また、非草食性野生動物およびヒト糞便汚染と本菌の相関が示唆されている点がある[13]。さらに、ヒト腸管系ウイルスや原虫との相関がみられる点[9]、生残性の高さから、汚染源が離れている場合でも糞便汚染の検出に適した指標と目されている点も挙げられる[18]。また先行する研究では、ウシ・ブタ・トリなどの家畜糞便中にウェルシュ菌は広く存在するものの、食

中毒を引き起こす *cpe* 遺伝子保有株はほぼ検出されない一方、ヒト糞便由来の下水流入水・処理水では高い検出率（約 30%）であることが明らかになっている[19]。このように、ヒト下水流入水や都市河川流域中の淡水浮遊物が *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のリザーバーである点[22]、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌とヒト糞便との高い関連性やソースにおけるヒト糞便汚染指標としての有効性[19]については指摘されているものの、河川等の実環境における *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の MST 指標としての実証性や有効性を評価した研究はない。

これらの背景を踏まえ、*cpe* 保有ウェルシュ菌の MST 指標としての有効性を、実際にヒトおよび家畜由来の糞便汚染が流入する河川での調査によって検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 採水地点

4.2.1.1 西城川水系の採水地点と流域特性

ヒト糞便点源汚染のモデル河川として広島県庄原市西城川水系にて調査を行った（図 4.2.1）。調査エリアは全長およそ 500m の範囲で、採水は西城川の下水放流水流入前（SP1）、下水放流水（SP2）、市街地を流下し浄化槽によるヒト由来の糞便排水の流入がある戸郷川（SP3）、下水放流水及び戸郷川の流入後の地点（SP4）の 4 地点とし、全地点で糞便汚染指標細菌濃度および *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の分布調査を行った。当エリアの下水処理場は処理人口約 8700 人、オキシデーショondiッチ（OD）法で処理したのち、消毒用塩素を添加して西城川へと放流している。戸郷川では各家庭に設置された浄化槽を用いて、合計およそ 300 人のし尿と生活雑排水が活性汚泥処理を施されたのち、消毒用塩素を添加され河川へ放流されている。

4.2.1.2 相模川水系の採水地点と流域特性

ヒト糞便面源汚染および動物糞便点源汚染のモデル河川として神奈川県相模川水系にて調査を行った（図 4.2.2）。相模川は神奈川県相模湾で海域と接続する流域面積 1680 km²、幹川流路延長 113km の河川である。下流部に接続する永池川流域は市街化され人口が集中しており、家畜糞便の流入は確認されていない。自治体が公表する統計要覧を用い流域の非水洗化率から算出した下水道非接続人口は 1705 人である[96]。流域住民は浄化槽による処理ののち家庭雑排水を河川に放流しているため、この河川流域をヒト糞便汚染の面源汚染モデルとし採水を行った（SP5-6）。上流に位置する小鮎川は非水洗化人口は最大 17 人と少ない一方、流域に養豚場を有するため、ブタ由来糞便排水による点源汚染のある河川として調査を行った（SP7-8）。流域人口は自治体ホームページを、ブタ飼育頭数や排水量は神奈川県の特特定業事業者名簿を参照した[96]。

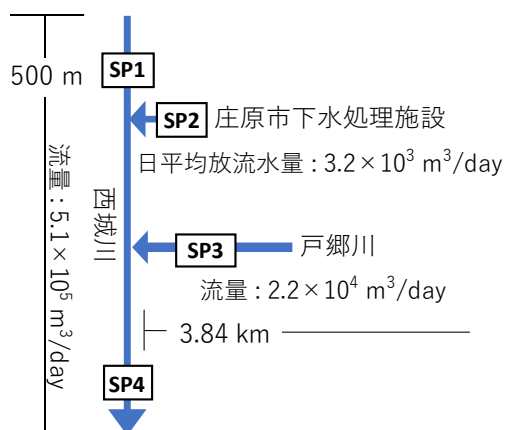


図 4.2.1 西城川水系

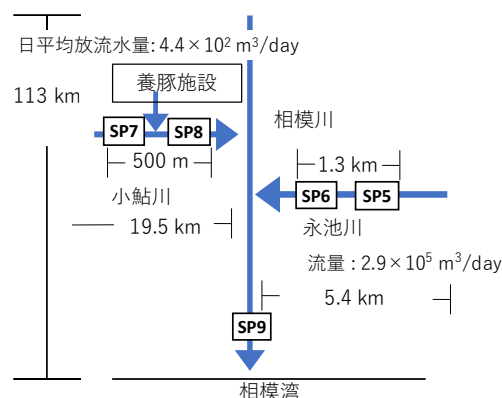


図 4.2.2 相模川水系

4.2.2 糞便汚染指標の計測

4.2.2.1 試料の採取と保存

西城川水系では2016年11月から2018年4月にかけて計10回、相模川水系では2016年5月～2018年7月にかけて計6回、河川水は各地点の表層水を採取し、洗浄済みのポリエチレン容器に保存した。採取した試料は速やかに実験室へ持ち帰り、24時間以内に細菌数を検査した。

4.2.2.2 大腸菌、大腸菌群、腸球菌

大腸菌の計数は特定酵素基質法である Colilert-24 (IDEXX, USA) を用いた。試料水100ml に試薬を加えて混合した後、QT トレイ (Quanti-Tray/2000, IDEXX) に入れて密封し、36℃で24時間培養した。培養後、大腸菌群はQT トレイで陽性反応を示したウェルを計数し、大腸菌数は付属取扱説明書に従い、黄色を呈し、かつUV365 nm の照射時に青白く発光したウェルを大腸菌陽性と判定した。陽性と判定されたウェル数から大腸菌数を最確法 (MPN 100 ml⁻¹) にて算出した。腸球菌数は試薬に Enterolert (IDEXX, USA) を用い、QT トレイに密閉した後41℃で24時間培養した。培養後暗所でUV365 nm 照射時に蛍光を示したウェルを計数し、MPN を算出した。

4.2.2.3 嫌気性芽胞菌 (ウェルシュ菌)

嫌気性芽胞菌はハンドフォード培地 (栄研化学株式会社) を用いた三重層法にてコロニー数を計数した。

4.2.2.4 ウェルシュ菌毒素遺伝子の検査

各試料から検出された嫌気性芽胞菌のうち *cpe* をコードする遺伝子保有ウェルシュ菌芽胞を同定するため遺伝子検査を行った。遺伝子検索には6種類のウェルシュ菌毒素遺伝子 (*cpa*, *cpb*, *cpb2*, *etx*, *iap*, *cpe*) を対象とし、マルチプレックスPCRを行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅産物の確認を行った。マルチプレックスPCRに用いた6種類のウェルシュ菌毒素遺伝子をコードするプライマーの塩基配列を表4.2.1[74]に示す。

表 4.2.1 嫌気性芽胞菌のマルチプレックス PCR に用いたプライマーの塩基配列

Toxin gene	Primers	Sequence (5'-3')	Product
(α-toxin)	CPAlphaF	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324 bp
	CPAlphaR	CCTCTGATACATCGTGTAAG	
cpb (β-toxin)	CPBetaF3	GCGAATATGCTGAATCATCTA	195 bp
	CPBetaR3	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	
cpb2 (β2-toxin)	CPBeta2totalF	AAATATGATCCTAACCAAM ^a AA	548 bp
	CPBeta2totalR	CCAAATACTY ^b TAATYGATGC	
etx (ε-toxin)	CPEpsilonF	TGGGAACCTCGATACAAGCA	376 bp
	CPEpsilonR	AACTGCACTATAATTCCTTTTCC	
iap (ι-toxin)	CPiotaF	AATGGTCCTTTAAATAATCC	272 bp
	CPiotaR	TTAGCAAATGCACTCATATT	
(entrototoxin)	CPEnteroF	TTCAGTTGGATTACTTCTG	485 bp
	CPEnteroR	TGTCCAGTAGCTGTAATTGT	

4.2.3 汚濁負荷量の算出とウェルシュ菌汚濁に関する原単位

培養により得られたウェルシュ菌は PCR にかき、*cpe* 陽性率を定量した。*cpe* 陽性ウェルシュ菌濃度に日毎河川流量を乗じ、以下の式 (1) で各河川の汚濁負荷量 (cfu/m³/day) を算出した。流量の算出に当たり、西城川は河川管理事務所より提供を受けた河川水位および流量を用い、下水放流水は市役所下水道課に確認し、戸郷川は流速と流入面積を実測した。

$$\text{細菌汚濁負荷量 [cfu/day]} = \text{細菌濃度 [cfu/m}^3\text{]} \times \text{流量 [m}^3\text{/day]} \dots (1)$$

大腸菌、腸球菌についても同様に算出した。またウェルシュ菌は汚濁負荷量を流域人口若しくは処理人口で除し、*cpe* 陽性ウェルシュ菌の排出原単位 (cfu/人/day) を以下の式 (2) で求めた。

$$\text{細菌汚濁に関する原単位 [cfu/人/day]} = \frac{\text{細菌汚濁負荷量 } \left[\frac{\text{cfu}}{\text{day}} \right]}{\text{処理人口または河川流域の非水洗化人口 [人]}} \dots (2)$$

本値を算出するにあたり、下水道処理施設の処理人口および河川流域の非水洗化人口の調査を行った。各人口データは行政府が発表している統計データを用いた。

4.3 結果

4.3.1 ヒトおよび家畜の点源汚染からの流入が FIB 濃度に及ぼす影響

ヒト由来糞便が流入する点源汚染が存在する河川である西城川において、採水地点 SP1～SP4 (図 4.2.1) と対応する各採水地点での細菌濃度を表 4.3.1 に示す。この採水エリアは下水処理施設 (OD 法) (SP2) からの放流と戸郷川流域 (SP3) の浄化槽放流水によるヒト糞便点源汚染を受けている。ヒト糞便汚染の影響を受ける前の地点 (SP1) における腸球菌、大腸菌の濃度は低く、それぞれ 0.65 MPN/mL、0.52 MPN/mL であった。ウェルシュ菌及び *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌濃度はそれぞれ 0.27 cfu/mL、0.0037 cfu/mL であった。SP2 と SP3 の流入を受けた後、SP4 における FIBs 及びウェルシュ菌濃度は上昇した：腸球菌 0.81 MPN/mL、大腸菌 1.37 MPN/mL、ウェルシュ菌 0.54 cfu/mL、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌 0.1 cfu/mL であった。SP1 と SP4 を比較すると t 検定における p 値はウェルシュ菌、大腸菌、腸球菌でそれぞれ 0.08、0.03、0.78 であった。すなわち大腸菌濃度は有意に上昇し、ウェルシュ菌濃度も上昇傾向が見られたものの有意な上昇は観察されなかった。

SP4 における FIBs とウェルシュ菌の汚濁負荷量理論値と SP2 と SP3 の汚濁負荷量実測値合計はほぼ一致した。腸球菌実測値 5.7×10^{11} MPN/m³/day に対し理論値は 5.1×10^{11} MPN/m³/day、大腸菌実測値 7.5×10^{11} MPN/m³/day に対し理論値は 5.5×10^{11} MPN/m³/day、ウェルシュ菌実測値 3.2×10^{11} cfu/m³/day に対し理論値は 3.3×10^{11} cfu/m³/day であった。

相模川水系小鮎川の SP7 と SP8 は山間部に位置し住民人口は少ない一方大規模養豚場からの排水の影響を受けている。このため養豚排水流入により大腸菌濃度は 1.39 から 2.03 MPN/mL へ、ウェルシュ菌濃度は 0.1 から 1.45 cfu/mL へと上昇した。

4.3.2 ヒト面源汚染からの流入が FIB 濃度に及ぼす影響

相模川での採水地点 SP5～SP9 (図 4.2.2) と対応する各採水地点における細菌濃度を表 4.3.2 に示す。国土交通省が公表する河川関連総合情報によると (unpublished data)、本河川流域の土地利用は、山地等が約 73%、水田や畑地等の農地が約 7%、河川・湖畔が約 3%、宅地等の市街地が約 12% となっており、下流部の厚木市等の市街化された地域に人口が集中している。相模川での各採水地点では、西城川上流 (SP1) と比べいずれの細菌濃度も高い傾向にあった。これは山間部を流れる清澄な西城川と、市街地を流れ流域人口が多い相模川との流域特性の違いによるものと推察された。小鮎川では養豚排水の流入前地点 SP7 と流入後地点 SP8 では大腸菌、ウェルシュ菌に濃度上昇が観察された (表 4.3.1)。浄化槽排水が多く流入し、ヒト糞便汚染の面源汚染源と目される永池川では、SP5、SP6 おいて、腸球菌 (MPN/m³/day) は 12.23 と 6.85、大腸菌 (MPN/m³/day) は 7.24 と 12.2、嫌気性芽胞菌 (cfu/m³/day) は 1.87 と 1.99 であり、いずれもヒト糞便点源汚染の影響を受けた西城川下流 (SP4) よりも高く、ヒト糞便により高度に汚染されていると推察された。

4.3.3 点源汚染および面源汚染のあるエリアにおける *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の分布

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌は上流地点 SP1 と比べヒト糞便点源汚染流入後の地点 SP4 では濃度で1オーダー、汚濁負荷量では約2倍高かった(表4.3.1)。数値の上昇はFIB sの上昇と同様の理由が考えられた。なお *cpe* 遺伝子保有率はSP2では30.2%、SP3では20.4%と、ヒト糞便汚染のある箇所では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌陽性率が高く、陽性株がヒト糞便に偏在するとする先行研究[19][19]と合致した。また *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚濁負荷量 (cfu/m³/day) はSP1では 2.3×10^{10} であったのに対しSP4では 4.3×10^{10} へと上昇していた。さらにSP1、SP2、SP3の合計値を理論値としてSP4と比較する 5.0×10^{10} に対して実測値は 4.3×10^{10} であり、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌も糞便汚染指標細菌同様収支が一致した。この結果より、ヒト下水放流水の流入があると本菌の濃度及び汚濁負荷量が上昇することが示された。庄原市下水処理施設 (SP2) における計算上の汚濁原単位はウェルシュ菌で 1.1×10^7 cfu/人/day、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌で 2.5×10^6 cfu/人/dayであった。

ヒト糞便汚染の面源汚染源として疑われる永池川 SP5 および SP6 では、ウェルシュ菌濃度は西城川上流 (SP1) と比べ1オーダー高く、*cpe* 遺伝子保有率はそれぞれ27.6%、26.4%であり、下水放流水 (SP2) の30.2%と同等の高い値を示した。これはFIB sの濃度上昇の理由と同様、ヒト糞便汚染の流入による結果と示唆された。永池川における *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚濁負荷量は $1.4\text{--}1.5 \times 10^{11}$ cfu/mL であり、ヒト点源汚染ソースである庄原市のSP2の値 2.5×10^{10} cfu/mL よりも1オーダー高い結果だった。永池川における計算上の汚濁原単位はウェルシュ菌で 3.4×10^8 cfu/人/day、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌で 8.2×10^7 cfu/人/dayであった。永池川流域に設置されている浄化槽はオンサイト型の簡易処理設備であり、下水処理施設とは処理能力が異なる。このため、流入後河川の汚濁負荷量が庄原市のSP2を上回ってしまった可能性が高い。

小鮎川では養豚排水の流入による大腸菌とウェルシュ菌の濃度上昇は観察されたが、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌濃度はSP7-8で0.003~0.06 cfu/mlであり(表4.3.2)、永池川と比較して1-2オーダー低かった。この理由として、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト糞便中に偏在している点、永池川は流域人口が61912人に対し下水未接続人口が1705人であるのに対し、小鮎川は712人に対し最大17人である(図4.2.2)から、小鮎川がヒト糞便による汚染を受けていないためと考えられた。

表4.3.1 西城川流域の指標細菌濃度及び汚濁負荷量(点源汚染流入河川)

Sampling point	糞便汚染源の種類	平均濃度 (MPN or cfu/ml)					平均汚濁負荷量 (MPN or cfu/m ³ /day)				
		EC (n=10)	ENT (n=8)	CP (n=10)	calculated cpe (+) CP	cpe (+) rate (%)	EC	ENT	CP	cpe (+) CP	
SP1※1)	西城川 点源汚染流入前	0.52	0.65	0.27	0.03	13.3(92/691)	4.1×10 ¹¹	4.0×10 ¹¹	2.3×10 ¹¹	2.3×10 ¹⁰	
SP2※2)	点源汚染源：下水放流水	11.2	0.8	31.4	7.93	30.2(129/427)	3.6×10 ¹⁰	2.5×10 ⁹	9.9×10 ¹⁰	2.5×10 ¹⁰	
SP3※2)	点源汚染源：戸郷川(下水未接続による 浄化槽放流水の影響を受ける河川)	4.44	3.25	0.26	0.05	20.4(70/343)	1.0×10 ¹¹	1.1×10 ¹¹	9.3×10 ⁹	1.7×10 ⁹	
Estimate SP4 load(total load of SP1 to 3)	-	-	-	-	-	-	5.5×10 ¹¹	5.1×10 ¹¹	3.3×10 ¹¹	5.0×10 ¹⁰	
SP4	SP2、SP3による汚染合流地点	1.37	0.81	0.54	0.1	21.5(95/442)	7.5×10 ¹¹	5.7×10 ¹¹	3.2×10 ¹¹	4.3×10 ¹⁰	

EC : *E. coli*, ENT : enterococci, CP : *C. perfringens*, (+) : 陽性

※1 西城川流量 5.1×10⁵ m³/day

※2 下水道普及率 96.3%, 下水処理人口 8.7×10³ [96]

庄原下水処理場放流水量 3.1×10³ m³/day [96].

※3 戸郷川流量 2.2×10⁴ m³/day [実測値]

浄化槽処理人口 3.3×10² [96]

表4.3.2 相模川流域の指標細菌濃度及び汚濁負荷量(ヒト面源汚染及び家畜点源汚染流入河川)

Sampling point	糞便汚染源の種類	平均濃度 (MPN or cfu /ml)				cpe (+) rate (%)	平均汚濁負荷量 (MPN or cfu /m ³ /day)			
		EC (n=2-3)	ENT (n=3)	CP (n=4-6)	calculated cpe (+) CP		EC	ENT	CP	cpe (+) CP
SP5※1)	面源汚染:永池川(浄化槽放流水の影響を受けた河川)	7.24	12.23	1.87	0.52	27.6(58/210)	2.1×10 ¹²	3.5×10 ¹²	5.4×10 ¹¹	1.5×10 ¹¹
SP6		12.2	6.85	1.99	0.48	26.4(66/250)	3.5×10 ¹²	2.0×10 ¹²	5.8×10 ¹¹	1.4×10 ¹¹
SP7※2)	小鮎川(養豚排水流入前)	1.39	4.48	0.1	0.003	3.6(6/166)				
SP8※3)	小鮎川(養豚排水流入後)	2.03	4	1.45	0.06	3.9(11/279)				
SP9	相模川(合流地点)	1.24	4.49	1.41	0.1	5(13/258)				

EC : *E. coli*, ENT : enterococci, CP : *C. perfringens*, (+) : 陽性

※1 流域人口 62,000人 下水普及率 97.2% [96]

永池川流量 2.9×10⁵ m³/day [実測値]

※2 流域人口 712人 下水普及率 97.6% [96]

※3 養豚数 4,900. [96]

4.4 考察

4.4.1 食中毒原因菌としての *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌

ウェルシュ菌を原因とする食中毒事件は欧米、本邦とも非常に多く、被害者数においては常に細菌性食中毒の上位に位置している[81][82]。原因食品としては一般に肉類が推定されているが、確証的な報告はいまだなされていない。ここにおいて、本研究で示した通り、食中毒原因菌となる *cpe* 遺伝子を有するウェルシュ菌は活性汚泥などの処理と塩素消毒を行った放流水から 2.3×10^{10} cfu/m³/day、浄化槽による処理を行った後の家庭排水が流入する永池川では 1.4×10^{11} cfu/m³/day と高負荷な濃度で検出され、環境中に放出されている。食中毒を引き起こす *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌感染ルートはいまだ非解明ではあるが、本章で述べた調査結果よりヒト下水処理施設放流水が放流先河川を汚染していることは確実であろう。また先行する研究では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水処理施設放流水から河川を通じて海域に至りアサリを汚染している実態が検証[33]されており、他にも市街地や郊外の土壌いずれからも検出されるとの報告[34]もある。加えて3章では土壌との親和性が高い根菜類であるじゃがいもを調査したところ従来食品汚染源として指摘されてきた食肉類を大きく上回る汚染率で *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出された。これらの点を統合すると下水処理施設や浄化槽から排出されるヒト下水排水が放流先河川に対する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚染源として機能し、結果河川を通じて地下土壌や耕作土壌の汚染、あるいは河川水が灌漑用水として用いられた結果農作物を汚染する経路が容易に想定しうる。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はこのように海産物や農作物の汚染を通じてヒト食中毒を引き起こし、ヒト腸管内で増殖し、いずれまたヒト下水処理施設へ至るという一連の循環も否定はできない。この仮定に立った場合、食中毒発生予防のため、また病原性細菌である *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境中での循環を絶つためには、ヒト糞便排水処理施設における現状よりも強化された確実な制御が必要となるであろう。

4.4.2 MST 指標としての *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌

公共用水域における衛生的な水の確保のためには、種々のソースから発した糞便汚染を検出する従来型の FIBs による評価からより踏み込み、MST などを評価できる指標の必要性が生じている[20][86][99]。様々な微生物が MST 指標として提案されており、ウイルスではヒトアデノウイルスやヒトポリオマウイルスは絶対的な種特異性を示すためヒト MST 指標として有望視されている[100]。またトウガラシ紫斑病ウイルス (PMMoV: Pepper mild mottle virus) はその濃度がヒト糞便汚染との相関が高く、有望な指標であると示されている[101]。しかし、ウイルスを MST 指標として導入するにあたり、低濃度に存在するウイルスの濃縮方法、遺伝子検出を行うための高感度な検出機器、RT-qPCR での検量線の作成が必要等技術的な課題はまだ多い[101][102][103][104][101]。一方細菌であれば培養法によって生きた細菌の数が確認でき、定量作業がウイルスと比べ比較的容易であるメリットがある。こうした背景のもと、培養が容易な点、環境中での生残性が高い点、原虫・ウイルスの指標に

もなりうる点[9][18]から、本研究では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌を点源汚染、面源汚染のある実河川における MST 指標として提案し、その実証を行った。

本研究では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は点源汚染での評価で MST 指標として定量的にヒト糞便汚染をとらえられることが確認された。これは、従来の FIBs が単に糞便汚染の流入の前後で増加しただけなのに対して、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト糞便の流入によって陽性率が增加するばかりか、その収支も一致していたことから推察できる。また *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト排水流入地点では濃度及び汚濁負荷量ともに上昇が観察されたが、養豚排水の流入ではまったく増加しなかった点から、ヒト特異的な MST 指標として有用である。

ヒト糞便の面源による高度な汚染が推察される河川でも、従来の FIBs は上昇し、また *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の陽性率は点源汚染ソースのモデルである下水処理場放流水と同等であった。これはヒト糞便中に *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が偏在とする先行研究とも一致しており[19]、面源からのヒト糞便汚染を受けた場合も本菌がヒト MST ツールとして有効である点が示唆された。

先行する研究において挙げられたヒト糞便に偏在する点[19]、他の糞便汚染指標細菌より生残性が高く腸管系ウイルスとの高い相関がみられる点[22]、に加え、上記に示すようにヒト糞便汚染を定量的に検出しかつヒト糞便に対する種特異性持つ点などから *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト MST 指標として有効である。今後のデータ蓄積により、本菌サンプリング濃度と流量からヒト糞便汚染の強度を半定量的に確認したり、汚染の強度から関与する人の数が推定できる可能性がある。

また MST 指標導入への追い風として、ウェルシュ菌は培養が容易であり、*cpe* 陽性率は基本的な PCR 操作で評価できるためウイルスを指標とする場合よりも参入障壁が低い。また芽胞を形成するため環境中での保存性が高く、長期間での糞便汚染を評価する指標ともなりうる。あるいは塩素消毒耐性を有するため本邦では水道におけるクリプトスポリジウム等原虫対策の指標として用いられている点などから、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト MST のみならず、様々な機能を持った指標として活躍が期待される。

問題点としては、庄原市下水放流水と永池川の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌汚濁原単位を比較すると、前者では 2.5×10^6 cfu/人/day、後者では 8.2×10^7 cfu/人/day であり、原単位に 1 log の開きが生じてしまっている。この理由として下水処理と浄化槽という処理形態の違いが原因と考えられる。すなわち定量的な評価法にするためには、流域状況や流入する汚染の処理形態等を考慮する必要があると考えられる。またウェルシュ菌培養後の *cpe* 遺伝子検出は煩雑な作業を伴うため、作業者の手技に依存せず、ワンステップで済むようなリアルタイム PCR を用いた半定量的な検出法の確立も今後の課題となろう。

塩素による下水放流水の消毒は世界的に広く採用されており、殺菌スペクトルの広さや抜群の費用対効果からこれからも消毒技術として優先的な地位を占めると思われる。一方近年処理水中の残留塩素やトリハロメタン等の副生成物による放流先水生生物への影響

[105]や塩素臭等様々な問題も提起されている。加えて本研究で示されたように *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が放流先環境へ放出されている実態がある。今後たとえば芽胞への一定の効果も確認され、塩素とは異なる作用機序が期待できる過酢酸のような塩素代替あるいは補完的消毒剤の検討が必要な時期に来ているのではないだろうか。

4.5 結論

本章では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌のヒト下水処理施設から環境への放出と MST 指標としての重要性について論じた。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト下水処理施設放流水からは 2.5×10^{10} cfu/m³/day が放流され、浄化槽からの流入を受ける面源汚染存在河川でも 10^{10} cfu/m³/day の汚濁負荷量が検出されており、ヒト下水由来排水が環境中の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚濁源として重要な位置を占めている点が判明した。また放流先河川から海域へ至る経路に加えて、土壌や灌漑用水を通じて農作物を汚染しうる蓋然性も否定できず、ヒト下水放流水が食中毒原因菌である *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の循環に大きな位置を占めている点が示唆された。

水系からの糞便汚染検出は飲料水やレクリエーション水を介した水系感染症の予防において最重要課題である。検出されたウェルシュ菌における *cpe* 遺伝子保有率はヒト糞便点源汚染の流入により 13.3%から 21.5%へと上昇し、ヒト糞便面源汚染源のある河川では 26.4-27.6%と高い数値を示した。一方で養豚排水からの流入を受ける小鮎川では FIBs 及びウェルシュ菌の濃度上昇は観察されたが、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の陽性率は 3.6%から 3.9%への推移に過ぎず変動は生じなかった。この結果から *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト MST 指標として有効であると考えられた。

第 5 章 下水放流水中ウェルシュ菌芽胞制御を目的とした塩素代替消毒剤：過

酢酸の効果

5.1 緒言

幅広い抗菌スペクトルや蓄積された知見、使いやすさや比較的成本が低いなどの利点から、現在下水放流水の消毒剤として塩素および塩素系消毒剤が最も一般的である[106]。しかしながら放流水中の残留塩素が河川に生息する水生生物に悪影響を及ぼすことは古くから指摘されており[35]、特に付着藻類の生育を阻害し藻類バイオマスを低下させることが報告されている[107]。また、消毒用に添加された塩素が、水中の有機物と合成し Trihalomethanes (THMs) を始めとした消毒副生成物 Disinfection by-products (DBPs) を生成する点が指摘されている[63]。こうした DBPs は遺伝毒性やエピジェネティック効果[108]、発がん性[109]、突然変異原性、遺伝変性等のデメリットが多数報告されている[110][111][112][113]。塩素系消毒剤による下水放流水中に存在する病原微生物の除去は最優先課題ではあるものの、上水と比べ有機物を豊富に含む放流水において[110]、放流後の水環境への負荷や放流水の再利用を検討する際、DBPs の問題は看過できない。

飲料水中に含まれる病原微生物によって引き起こされる下痢症はしばしば先進国及び発展途上国にてアウトブレイクを引き起こし、経済的に恵まれない地域では多くの死者をもたらしている[114]。また下水処理施設において塩素処理された放流水にもなお多くの病原微生物が存在し、これらの塩素耐性の病原微生物が下痢症を引き起こすことが知られている[115]。これらの塩素耐性病原微生物のうち、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) とジアルジア (*Giardia* spp.) 等の原虫は、下水処理施設からの放流水中などに存在しており[115]、化学的消毒剤に対する耐性が知られ[116]、特に塩素に著しい耐性を有することから[117]、放流先の表流水を汚染し、それを原水とした水道を介してしばしば大規模な感染を引き起こし[118]、また、細菌ではウェルシュ菌は芽胞を形成することで高い耐塩素性を獲得することで知られている[119]。本菌は温血動物の腸管に偏在するが、特に食中毒原因菌として知られる *cpe* 遺伝子保有株はヒト糞便から高頻度に検出されるとの報告がある[19]。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌による食中毒は世界中で多発しており、米国では年間 100 万人が罹患し、サルモネラ菌による食中毒と同等の患者数となっており[81]その対策は重要である。

同様に下痢症を引き起こす腸管系ウイルスはヒト糞便中に大量に存在し、低用量で感染が成立し、環境中に長く生残し、水処理プロセスに対し耐性を持つ[120][121][122]ため、その対策は必須である。なかでもノロウイルスは世界中で引き起こされている急性非細菌性胃腸炎の主な原因であり[123]、感染者の糞便中に排泄される結果下水中に含まれている[124]。ノロウイルスを含め、ウイルスは塩素消毒による影響を受けにくく、排水処理後も生

残するため、下水処理施設における除去/不活化は放流先環境への微生物学的安全上急務となっている[125]。

このように塩素の放流先への影響の問題と塩素耐性の病原微生物の制御の観点から、いくつかの地域で下水消毒に対し塩素に代替する消毒剤を模索する動きがある[36][126]。これらのうち、化学的な代替消毒剤として代表的なものとして二酸化塩素やオゾンがあるが、これらの酸化作用の強い物質は塩素と同様に DBPs の生成が報告されている[63]。また、物理的処理として代表的であり、我が国でも下水や浄水の消毒法として用いられている紫外線による消毒法は、導入へのコスト面の問題がある[127]と同時に、微生物によっては紫外線照射後に可視光が照射されることによって、紫外線によって生じた遺伝子の欠損が一連の光回復酵素群によって修正される光回復能を有するという問題もある[128]。さらには、限外ろ過膜や精密ろ過膜を用いた膜ろ過を下水処理に導入する試みもあるが、導入コストや設備上導入の困難さ[129]が依然大きい。このように、下水放流水の微生物学的な安全性を確保し、導入の容易な塩素消毒の代替あるいは補完消毒法としてはまだ検討の段階のものが多い。

近年下水放流水中の THMs 濃度に対する環境基準値を厳しく設定しているイタリアでは、塩素に代替する新たな消毒剤に関するいくつかの研究が報告されている[126][130][131]。中でも過酢酸は医療、食品衛生分野における消毒剤として実績がある点[38]、分解性が極めて高く、分解生成物は水、酸素、過酸化水素であるため運用上毒性の高い物質は生成されない点[39]、芽胞やウイルスにも効果があるとの報告があり[38][132]、微生物に対したんぱく質変性を引き起こす[40]、あるいは代謝系酵素の働きを阻害する効果があるため[133]塩素とは異なる不活化機序を持つ点、従来型の次亜塩素酸添加設備を流用でき導入が容易な点[134]等から、下水放流水に対する代替的/補完的消毒剤として期待されている。

本章では、環境負荷を抑え、塩素耐性病原微生物に対しても効果が期待できる消毒剤として、芽胞の消毒効果、食品へも適用される安全性などの観点から過酢酸に着目し、検討を行った。消毒の供試微生物として、塩素消毒に耐性を有し[119]、第4章で述べた通り、塩素消毒後の下水放流水中に 10^5 cfu/mL オーダーで存在して、放流後河川等の水環境に 10^{10} - 10^{11} cfu/m³/day での汚濁を起こしているウェルシュ菌[23]を対象とした。ウェルシュ菌はヒト由来の排水に多量に存在し[19]、下水放流水が水環境の汚染源となっており[23]、なかでも食中毒を引き起こす *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト下水中に大量に存在しており[19][23]、下水放流水を通じて海域へ至り、二枚貝を汚染している可能性があること[33]が報告されている。*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌による食中毒ルート的一端として、すでに明らかにされたように下水放流先河川から海域へと至り海産物を汚染している実態[33]に加え、灌漑用水や土壌を経て農作物を汚染している可能性は排除できない[33]。このため放流先環境への汚濁負荷低減を目的とし、下水処理施設において、塩素代替、あるいは補完する消毒剤として、ウェルシュ菌に対する過酢酸の有用性を評価した。

加えて、塩素耐性を有するウイルスの過酢酸による不活化について検討するために、トウガラシ紫斑病ウイルス(PMMoV: Pepper mild mottle virus)をモデルとして評価を行った。PMMoVは *Virgaviridae* 科 *Tobamovirus* 属に属する桿状、ノンエンベロープの1本鎖プラス鎖RNAウイルス[135]で、喫食に由来してヒト糞便中に排出されるため生活排水から高頻度に検出される[136]ウイルスである。本ウイルスゲノムは極めて安定性が高く、全世界的に消費される食材である pepper 類およびそれを喫食したヒトの糞便に遍在する[137][137]ことから、ヒト糞便指標としても用いられている。また、PMMoVは下水処理システムで様々な腸管系ウイルスより高い生残性を示した報告[66][67]があることから、下水放流水中に存在する PMMoV を供試ウイルスとし、過酢酸による不活化について検討した。

5.2 材料と方法

5.2.1 供試試料水

下水放流水は庄原市浄化センター（OD 法、avg. of daily effluent flow: $3.2 \times 10^3 \text{ m}^3/\text{day}$ ）の最終沈殿池放流水（塩素添加前）を 10 L 採取し供した。

5.2.2 供試過酢酸、塩素剤およびその濃度測定法

塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液（富士フィルム和光特級）を、過酢酸は Perasan®MP2-J（関東化学株式会社）を適宜希釈した。濃度測定は残留塩素測定は DPD 法を用いた吸光光度計 MP-100（Lovibond 社）を、過酢酸は電流滴定法を用いた PA-300（平沼産業）を用いた。

5.2.3 供試細菌の定量方法

ウェルシュ菌、大腸菌は下水放流水中に存在する野生株を用い、また不活化曲線の検討用に大腸菌標準株（NBRC3301）を用いた。栄養型の不活化をするため、試料水はウォーターバス 75°C20 分間加温し、その後直ちに氷冷した。ウェルシュ菌芽胞はハンドフォード培地三重層にて定量した(Eiken Chemical Co.,Ltd., Tokyo, Japan). 大腸菌は xm-g 培地にて平板培養法で定量した。

5.2.4 供試ウイルスの定量方法

下水放流水中に存在する PMMoV の定量にはリアルタイム PCR を用いつつ感染性の有無を評価できるよう、propidium monoazide(PMA)処理を用いて PMA-qPCR を行った。

5.2.4.1 intact PMMoV 識別のための PMA 処理

分取した試料の一部を PMA dye Product Information（コスモバイオ）と参照し、以下の手順で PMA 処理を行った。1.5 mL マイクロチューブに試料を 140 μL 入れ、終濃度 50 μM となるように 20 mM PMA dye（コスモバイオ）を適当量添加した。中のサンプルが漏れないように 1.5 mL チューブにパラフィルムを巻き付け、サンプルをアルミホイルで覆ったトレイに置き、新党培養器上で室温 5 分間インキュベートした。その後、氷上にアルミホイルを敷いてサンプルを置き、ハロゲンライト（CHP500、キャスターライティングジャパン、100V、415W ハロゲン球）を用いて約 20 cm 真上から 15 分間サンプルに光を照射した。光照射後、全量を用いて RNA 抽出を行った。

5.2.4.2 RNA 抽出

QIAmp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて試料水 140 μL から RNA を抽出した。手順は QIAamp Viral RNA Mini プロトコルを参照した。得られた抽出 RNA は直ちに逆転写反応に用いた。

5.2.4.3 逆転写反応

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて、付属プロトコルに従い逆転写反応を行った。

5.2.4.4 qPCR

表 5.2.1 に従い 10×Primer probe solution を調製した。プライマーおよびプローブは、原本ら[138]が設計したものを使用した (表 5.2.2)。qPCR 溶液を 1.5 mL チューブ内で調製し 96 ウェルシートの各ウェルに 18 μL ずつ分注した。続いて、あらかじめ 1×10^5 copies/2 μL に調製しておいた検量線用プラスミドを $10^0 \sim 10^5$ copies/反応の各段階に希釈調整した。調製後、検量線用プラスミドまたは逆転写済みのサンプルを qPCR 反応溶液 18 μL が入っているウェルに 2 μL ずつ添加した (検量線: n=3, サンプル: n=3)。ウェル内に全溶液を入れた後、ウェルにシートを張り、遠心を行い気泡を除去した。その後、PIKO REAL 96 Real-Time PCR System (Thermo SCIENTIFIC)を用いて反応を行い、終了後 PikoReal Software 2.2 を用いて結果を解析した。

5.2.5 CT 値と生残率の算出

CT 値については時間と濃度が互いに变化するため、式 (1) にて求めた。

$$CT = T(C_0 + C)/2 \quad \dots (1)$$

CT:CT 値 (mg · min/L)、 C_0 :理論濃度、 C :反応後濃度(mg/L)、 T :接触時間 (min)

qPCR で得られた反応前後のコピー数を用いて生残率を式 (2) にて求め、不活化効果を検討した。

$$I = -\log_{10} \frac{N}{N_0} \quad \dots (2)$$

I:不活化 log 数、 N :不活化後のコピー数 (/mL)、 N_0 :不活化前のコピー数 (/mL)

表 5.2.1 10×Primer probe 溶液組成

	濃度	終濃度	μL
PMMoV-FP1	100μM	4μM	4
PMMoV-RP1	100μM	4μM	4
PMMoV-Probe1	10.5μM	2μM	19
DDW	-	-	79
total			100

表 5.2.2 qPCR に用いたプライマーおよびプローブ

Primer	塩基配列 (5'~3')
PMMoV-FP1	GAG TGG TTT GAC CTT AAC GTT GA
PMMoV-RP1	TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT
Taq Man Probe	塩基配列 (5'~3')
PMMoV-Probe 1	FAM-CTT ACC GAA GCA AAT G-MGB

5.2.6 過酢酸および塩素剤の試料水との接触

下水放流水は 3 L 三角フラスコへ分取し、遊離残留塩素、過酢酸とも理論値 10 ppm となるよう添加した。室温にて緩やかにスターラー攪拌し、最大接触時間 120 min にいたるまで適時サンプリング及び濃度測定を行った。分取したサンプルはチオ硫酸ナトリウムを添加し反応を停止させた。

精製水系は大腸菌標準株を $10^7\sim 10^8$ cfu/mL まで増菌した懸濁液を調製し、これを精製水 100 ml を注入したビーカーへ添加した。酸化剤接触濃度は遊離残留塩素は理論値 1.0 ppm、過酢酸は理論値 2.5-5.0 ppm とし、最大 10 min 接触に至るまで、適時サンプリング及び濃度測定を行った。分取したサンプルはチオ硫酸ナトリウムを添加し反応を停止させた。

5.3 結果

5.3.1 過酢酸および遊離残留塩素による精製水中の大腸菌の不活化

精製水中に懸濁させた大腸菌(NBRC3301)の過酢酸および遊離塩素による log 不活化率を図 5.3.1 に示した。過酢酸による不活化実験は実験開始時の濃度を 1.0 mg/L(run 1)、2.5 mg/L(run 2-1,3,4)および 5 mg/L(run 4)として実験を行い、各接触時間ごとに残留過酢酸濃度を測定して CT 値を求めた。精製水中の大腸菌の過酢酸による不活化は、いずれの初期過酢酸濃度においても同様に進行し、CT 値 10 mg・min/L まで不活化の進行しない遅滞期が生じ、CT 値 10 mg・min/L を超えると急速に不活化が進行し、CT 値 13.44 mg・min/L で-4.83 log、20.48 で-8 log 不活化率が得られた。一方、コントロールとして計測した遊離塩素による不活化は初期濃度 0.1 mg/L で接触開始直後に-4 log の不活化が得られた。過酢酸は遊離塩素と比較して大腸菌の不活化がゆっくりと進行し、遊離塩素と同等の不活化には十分な接触時間を必要とすることが示された。

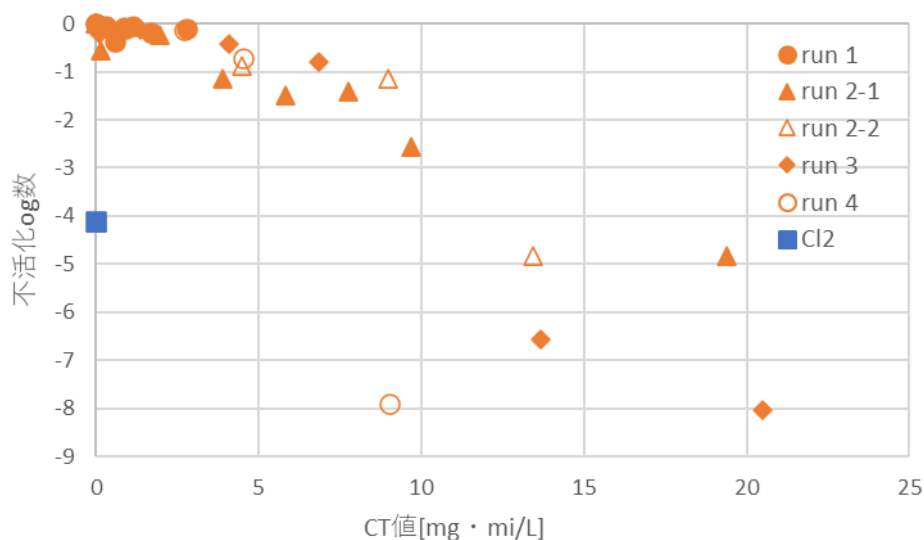


図 5.3.1 塩素および過酢酸による精製水中大腸菌の不活化

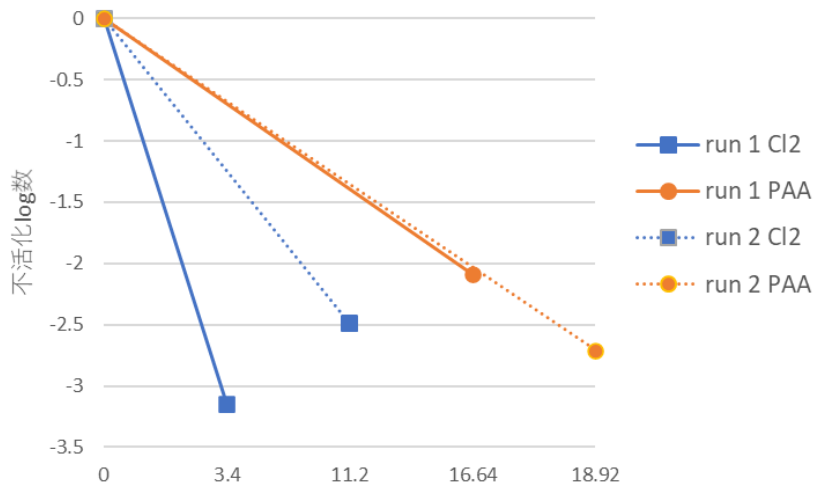


図 5.3.2 塩素および過酢酸による下水放流水中大腸菌の不活化

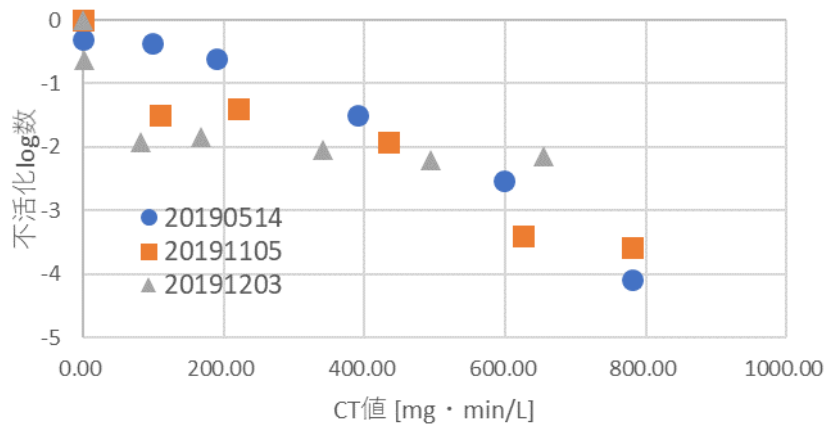


図 5.3.3 塩素による下水放流水中ウェルシュ菌の不活化

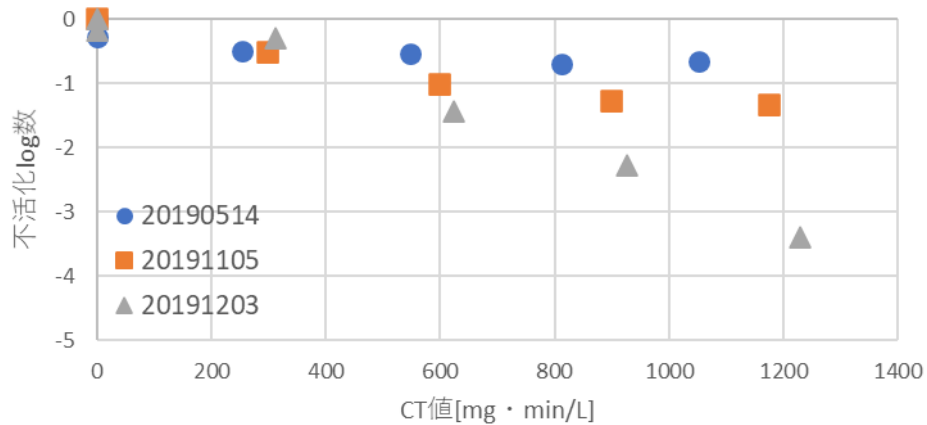


図 5.3.4 過酢酸による下水放流水中ウェルシュ菌の不活化

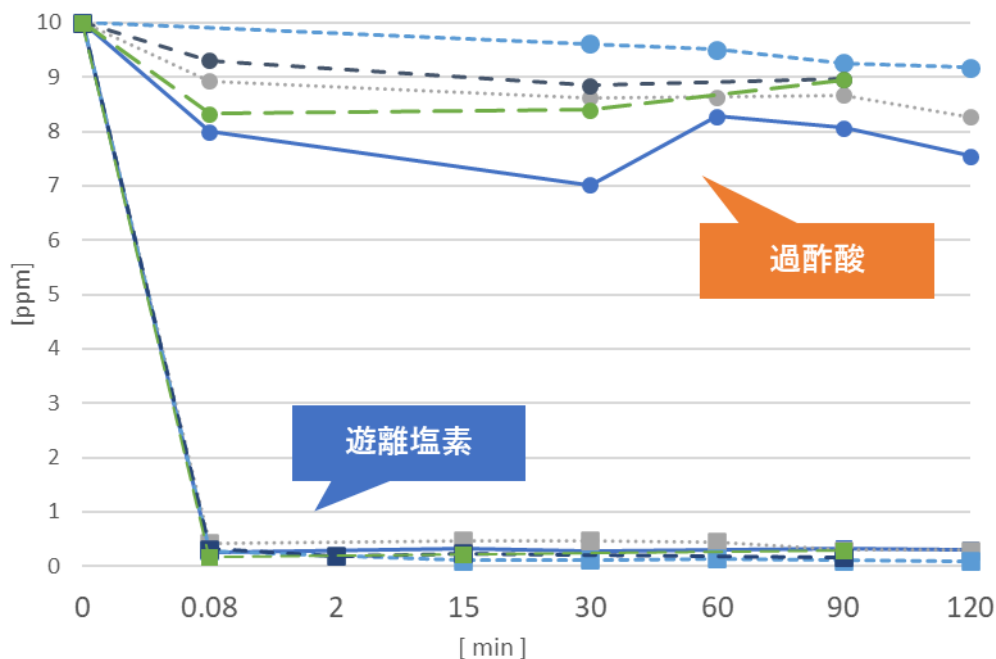


図 5.3.5 塩素および過酢酸の濃度経時変化

下水放流水中に過酢酸または塩素を添加したときの大腸菌およびウェルシュ菌(どちらも下水放流水中に存在する野生株)の不活化について、大腸菌を図 5.3.2 に、ウェルシュ菌を図 5.3.3 および図 5.3.4 に、その時の過酢酸および遊離塩素の残留濃度の変化を図 5.3.5 に示した (n=5、下水試料は都度性状が異なるため標準偏差は求めていない)。

下水放流水中(COD 17.23 mg/L, n=4, SD.1.79)に過酢酸および遊離塩素を初期注入量 10 mg/L となるように添加したときの濃度変化(図 5.3.5)では、過酢酸は添加直後に最大で 20% 程度の減少がみとめられるものの、120 分経過後でもほぼ添加量の 80-90%の過酢酸が残留し、共存する有機物等による消費が起きていないことが示された。一方、一般に下水放流水の消毒に用いられる塩素は、10 mg/L の濃度で添加しても直後に消費され、遊離残留塩素は 120 分後に 0.09-0.3 mg/L までに消費された。

このときの大腸菌の不活化(図 5.3.2)は、大腸菌は CT 値 3.4 mg・min/L で 3log に不活化率が得られた同一の試料で過酢酸は 2 log 不活化の CT 値は 16.64 mg・min/L(run1)、同様に 2.5log 不活化に遊離塩素では CT 値 11.2 mg・min/L が必要であったのに対して過酢酸では 18.92 mg・min/L であり、精製水中での不活化実験の結果と異なり、下水放流水中では、遊離塩素の大腸菌の不活化効率が著しく低下しているのに対して、過酢酸では遊離塩素と比較してその不活化効果の小さかった。過酢酸は有機物共存下でもその濃度を維持することができ、大腸菌の不活化効果の減衰も小さいことが示された。

また、過酢酸と遊離塩素の下水放流水中のウェルシュ菌芽胞の不活化について評価した(図 5.3.3、図 5.3.4)。3 回の実験を行い、遊離塩素によるウェルシュ菌の不活化はリニアに進

行し、CT 値 800 付近で最大で 4 log の不活化率が観察された。

一方、過酢酸についても同一試料を用いて 3 回の実験を行ったが、不活化効果は実験ごとに異なり、CT 値 1000 以上で 1~3 log と結果に差が生じた。

大腸菌と比較して、ウェルシュ菌は遊離塩素、過酢酸どちらに対しても耐性を有し、十分な不活化には高い接触時間を要することが示された。

5.3.2 過酢酸および遊離塩素による下水放流水中の PMMoV の不活化

過酢酸および遊離塩素の下水放流水中のウイルスの不活化効果とその評価法について検討するため、PMMoV(下水放流水中の野生株)の不活化効果を評価した(図 5.3.6、図 5.3.7)。

初期濃度 10 mg/L となるように下水放流水中に遊離塩素または過酢酸を添加し、経時的に採取し PMMoV の遺伝子コピー数を逆転写-qPCR で計測して評価したところ、遊離塩素、過酢酸ともに CT 値 600 および 800 mg・min/L 以上で接触させた場合でも検出された遺伝子コピー数に大きな変化は見られなかった。

PMMoV はエンベロープを持たない 1 本鎖 RNA ウイルスであり、qPCR では逆転写反応の後形成された DNA を定量しているが、遊離塩素および過酢酸ではカプシドに内包された RNA は逆転写-qPCR で検出できるレベルでは残存していることが示された。

このため、逆転写反応の前に PMA 処理を行い、カプシドへの損傷を評価したところ、遊離塩素に接触させた系では、CT 値の増加に伴って検出される遺伝子コピー数の減少が認められ、CT 値 500 mg・min/L で 3 log 程度の不活化が確認された。一方、過酢酸に接触させた場合は、PMA 処理を行っても今回の過酢酸濃度および接触時間では検出された遺伝子コピー数に減少は認められず、過酢酸が PMA のカプシドの浸透性を変化させるような損傷を与えてはいない事が明らかになった。

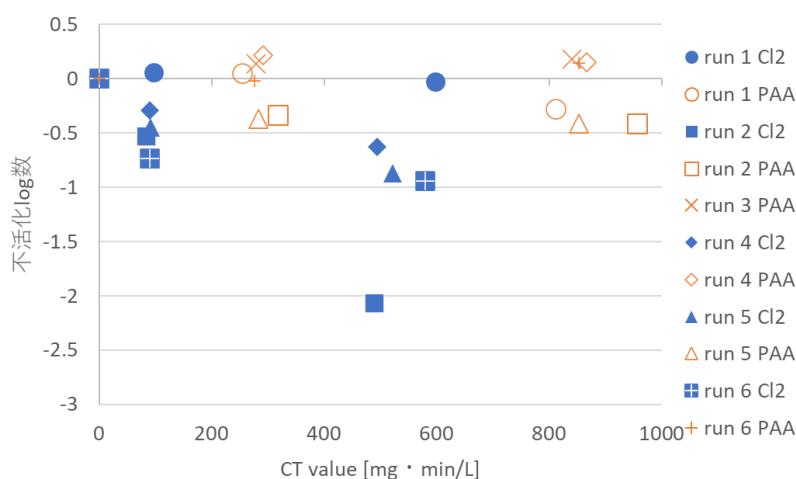


図 5.3.6 塩素および過酢酸による下水放流水中 PMMoV の不活化(PMA 処理なし)

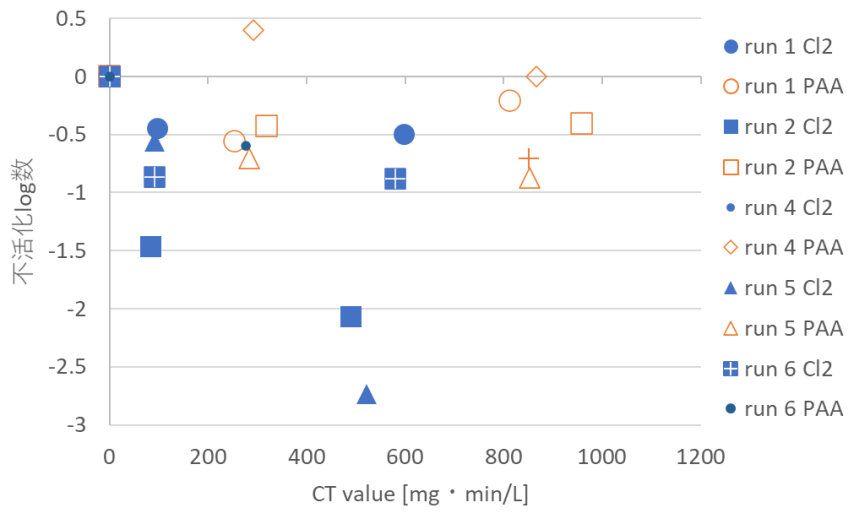


図 5.3.7 塩素および過酢酸による下水放流水中 PMMoV の不活化(PMA 処理あり)

5.4 考察

本章では、下水放流水等に存在する大腸菌、ウェルシュ菌芽胞および PMMoV の過酢酸による不活化について評価した。

過酢酸による大腸菌およびウェルシュ菌芽胞の消毒において、過酢酸は一般に使用されている塩素と比較して、ゆっくりと不活化が進行し、精製水中の大腸菌の不活化では低い CT 値で遅滞期が生じるマルチヒット型の不活化で表現されるとともに、有機物が共存する下水放流水中で不活化効率が著しく低下した遊離塩素と異なり、長時間その濃度を維持し、不活化が進むことが示された。一方で、今回実験を行った 10 mg/L、最大 120 分の接触の条件では、大腸菌、ウェルシュ菌芽胞ともに同 CT 値での過酢酸の不活化効率は遊離塩素よりも低くなった。

この特性は、塩素の高い酸化力による不活化と比較して、過酢酸による微生物の不活化は過酢酸から発生する塩素より酸化力の低い過酸化水素による酸化作用と、過酢酸による細胞内の代謝阻害等[133]によるものと考えられ、この特性を考慮した上で大腸菌やウェルシュ菌芽胞の十分な不活化を担保した過酢酸による下水放流水の消毒を考える場合には、十分な CT 値を確保するために接触時間を確保する、あるいは注入量を高めるなどの工夫が必要であると考えられた。

このうち十分な接触時間の確保については、本章で示したように過酢酸はこれらを有機物共存下でもその濃度が減衰しないことが大きなアドバンテージになると考えられ、一般的な下水処理工程のうち、生物処理等が終了した段階の最終沈殿処理などプロセスの早い段階から注入の手法によって接触時間を増やす事ができると考えられる。

過酢酸は塩素と比較して放流先の水環境への影響や消毒副生成物の問題が少ないという利点があるため、下水放流水の消毒剤としての使用例[64][134]もあるが、一方で、過酢酸は分解過程で有機酸である酢酸を発生させることから、注入量の増加については、有機汚濁源としての影響については考慮する必要がある。この有機汚濁源としての過酢酸については、下水処理水に過酢酸を 5 mg/L 注入した場合、13 mg/L の酢酸が生成され、COD の増分は 14 mg/L となることが報告されている[139]。今回の実験に用いた過酢酸の注入量は 10 mg/L であるが、一例としてわが国では環境省が定める一般排水基準における COD の排出基準は 160 mg/L (日間平均 120 mg/L) であり、放流水中に 10 mg/L の濃度での過酢酸の注入による COD の増加は 18%程度であることから、環境への COD 負荷は小さいものである。加えて、今回実験を行った 10 mg/L を超える過酢酸注入量での消毒についてもマージンはあるものと考えられ、CT 値確保のために過酢酸の注入量を高め、反応時の濃度を高めることも可能であると考えられる。

このように、過酢酸は十分な CT 値を確保する事で、下水処理水等の放流先への影響の小さい消毒剤として有効に利用できるものと考ええる。

加えて本章では、下水放流水が環境の大きな汚染源の一つとなり[23]、芽胞を形成して塩素消毒に耐性を有する[119]ウェルシュ菌芽胞の不活化について評価した。

過酢酸の下水や下水放流水中の細菌の不活化については、古くから様々な検討がなされ[139]、大腸菌群(Total and Fecal coliform)、大腸菌(*E. coli*)、腸球菌(*Enterococci*)、糞便連鎖球菌(*Fecal Streptococci*)などについて、有機物共存下でも総じて CT 値 400 mg/L 以上で 3 log 以上の不活化率が報告されており[139]、本研究の大腸菌の不活化率はこれらの報告とほぼ同等であった。一方で、過酢酸による芽胞の不活化については、古くにはその効果が低いことが指摘されていたが[139]、近年下水を試料水としたパイロットスケールでの評価では過酢酸がウェルシュ菌不活化において塩素に劣らない効果を発揮したとの報告[140]もある。いずれにしてもウェルシュ菌に対する過酢酸不活化効果に関する知見は少なく、いまだ十分に蓄積されているとは言えない。

過酢酸による下水放流水中のウェルシュ菌の不活化は遊離塩素と比較して不活化効果は低く、ばらつきも見られたものの、CT 値 1000 mg・min/L 以上で 1~3 log の不活化が可能であった。ウェルシュ菌を含む芽胞については、塩素を含む消毒剤に耐性を有し、ウェルシュ菌芽胞については、その食中毒起因株の下水放流水を起源とする河川等の水環境や二枚貝の汚染が報告されており[33]、一般に用いられている塩素での消毒では十分にコントロールできていないのが現状である。加えて、有機物共存下での効果の減衰や放流先の環境への影響を考えた場合に、より高い注入量での使用などには限界がある。接触時間を十分に確保した過酢酸での消毒を塩素消毒と併用する等の手法は、ウェルシュ菌芽胞のコントロールを視野に入れた下水放流水の消毒法として有用であると考えられた。

過酢酸のウイルスの不活化については、下水放流水中で DNA あるいは RNA フェージに対して高い不活化効果があること[139]、同 CT 値で total coliform を 3 log 不活化に対し、MS2 フェージを 1-1.5 log 達成したとの知見がある[141][142]。一方で、ポリオウイルスのように高い耐性が報告されているものもある[139]。また過酢酸を 100 ppm × 2 min で MS2 フェージは 1.8 log、poliovirus は 1.2 log、φ x-174 は 2.2 log の不活化効果があり、これらの結果は過酢酸の効果がウイルス種に特異性であり、またウイルスの物理的性状に左右されているとの指摘がある[143]。

過酢酸のウイルス不活化機序に関する先行研究では、同じ Reoviridae 科に属する二本鎖 RNA、ノンエンベロープウイルスである Tulane virus (TV) と Rotavirus (RV) を供試したところ、過酢酸による RV 不活化は宿主受容体への結合よりもゲノム損傷によって引き起こされる。一方で TV に対する過酢酸の不活化はゲノム損傷ではなく主に結合の喪失の結果として引き起こされた[144]。過酢酸を効果的に導入するには不活化機序の解明は不可欠であるが、評価の困難さから、いまだ確定的な報告はなされていない。

本章では、下水中に多数存在し、糞便汚染指標ともなる PMMoV の過酢酸による不活化効果を PMA-RT-qPCR で評価する試みを行った。PMA 処理は塩素での PMMoV の不活化については評価できる可能性が示された。一方で、過酢酸のマイルドな作用は PMMoV のカプシドの浸透性を変化させるような損傷を与えていないことが予想され、ウイルスの過酢酸による不活化効果は PMA-RT-qPCR を用いても評価することは難しく、ウイルスの感染性

等についての評価は、培養系による評価が必要であることが示された。

本論文第3章では、市販じゃがいもからは食中毒原因菌である *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が多数検出されており、土壌との親和性が高い根菜類がウェルシュ菌食中毒の原因食材として注視されるべき点を述べた。また第4章ではヒト下水放流水が *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の水環境への汚染源となり、放流先河川を通じて海産物を汚染している実態や、土壌や灌漑用水を通じて農作物を汚染している可能性について言及した。

cpe 遺伝子保有ウェルシュ菌はヒト糞便に偏在するため、各家庭に設置された浄化槽や下水道を通じて下水処理施設に集積される。この際ヒト下水処理施設は本菌の環境への流出を制御する最後の砦ともいえる設備となるが、現状添加されている塩素剤だけでは十分な不活化処理がなされているとは言えない。このため本章では塩素に代替あるいは補完する消毒剤として過酢酸を評価し、*cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境循環や下水放流水を起因とする食中毒ルートの制御が可能となるか検討を行った。本章で示した結果ではまだ十分な不活化効果を得られたとは言い難いが、過酢酸は塩素と異なる不活化機序を有すると目され、また塩素に比べ放流先環境への負荷が少ないことから、今後はCT値を増加させられる余地があると期待される。

5.5 結論

今回過酢酸による大腸菌、ウェルシュ菌、PMMoVの不活化を試みた。

過酢酸は、下水放流水中の大腸菌は効果的に不活化できるものの、ウェルシュ菌、PMMoVでは大腸菌と比較して不活化効果が低かった。この中でも芽胞を形成するウェルシュ菌は、塩素のみでは十分な不活化がなされず、放流水中でも 10^1 cfu/mL[23]など高濃度で検出され、ヒト下水の放流水が環境の汚染源として問題とされている[73]。

今回の実験では過酢酸は塩素と比較して十分な残存性が確保でき、下水放流水などの消毒に適しているものと推察された。また同じ注入量による CT 値 $1000 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$ 程度の条件においては、ウェルシュ菌芽胞の不活化効率は塩素より劣ったものの、最大で 1-3 log の不活化が確認できた。

以上より過酢酸は下水放流水消毒剤として期待でき、今後は塩素代替/塩素補完に向けたさらなる研究が重要となるであろう。

第6章 総括

本論文では、エンテロトキシン (*cpe*) 遺伝子保有ウェルシュ菌の水系から食系における循環の実態や食品の汚染とその経路について調査、考察を試みた。また本菌による水環境の汚染源の一つである下水処理施設において、不活化・制御を目的として塩素代替消毒剤である過酢酸について評価を行った。以下本研究にて得られた知見をまとめ、展望を記し、総括とする。

6.1 ウェルシュ菌食中毒原因食材としてのじゃがいもの意義

第3章ではウェルシュ菌食中毒原因菌である *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の市販じゃがいも汚染状況調査を行った。ウェルシュ菌食中毒の原因食品がカレーやシチューのような大量調理かつ多様な食材を必要とする食品であることから、現在に至るまで原因食材の確定的な特定はなされてこなかった。一方ウェルシュ菌がヒトおよび動物腸管常在菌であるため、古くから慣習的に食肉が原因食材として疑われてきた。近年遺伝子解析技術の発達により食中毒原因物質はウェルシュ菌が産生する *cpe* 毒素であり、本毒素をコードする遺伝子を持ったウェルシュ菌は市販食肉からはほぼ検出されていなかった。

先行する研究ではヒト下水放流水に多量に存在する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が、ヒト下水処理施設放流水から河川を通じ、海域に至り、貝を汚染しているとの報告があった。また市街地土壌からも *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は検出されていたため、第3章では *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の食品汚染経路の一つとして、ヒト下水放流水から土壌、土壌から根菜類という道筋を想定し、市販じゃがいもの調査を行った。結果日本各地で収穫されたじゃがいも 30 試料からは市販食肉から検出されるよりも多く、かつ高頻度 (22%) に *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌が検出された。じゃがいもは多くの食品に用いられる一般的な食材であり、ウェルシュ菌食中毒の原因食品であるカレーやシチュー類にもしばしば使用される。このためウェルシュ菌食中毒原因食材として従来指摘されていなかった根菜類の衛生管理に対する食品衛生上の意義について新たな知見を得ることができた。

6.2 *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の汚染源としてのヒト下水放流水とその環境負荷

第4章では、第3章で得られた根菜類をはじめとする農作物のウェルシュ菌汚染ルートの1つになる可能性がある下水放流水の *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の分布とその河川等の水環境での負荷について検討した。また同時にヒト糞便に偏在する *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌の環境中での挙動を追跡することで、ヒト由来糞便汚染の探索指標 (MST:microbial source tracking) としての意義について2カ所の実河川において評価した。下水放流水中には *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌は常に 10^5 cfu/mL のオーダーで存在し、放流先河川において長期間生残および長距離にわたって生残していること、ヒト由来の排水はウェルシュ菌

の点あるいは面汚染源となることが明らかとなった。また *cpe* 遺伝子保有ウェルシュ菌がヒト糞便汚染を評価する際の MST 指標として有効であること、その定量によりヒト糞便汚染の強度が推定可能であることなどを実環境において明らかにし、ヒト腸管由来病原微生物の汚染状況の把握と食水系感染症の制御に資する情報を得ることができた。

6.3 下水放流水中ウェルシュ菌芽胞制御のための塩素代替消毒剤としての過酢酸の評価

第 5 章では、水環境の大きな汚染源となっている下水処理施設放流水中のウェルシュ菌の制御を目的として、従来型消毒剤である塩素を補完する新たな消毒剤としての過酢酸について評価を行った。ウェルシュ菌は芽胞を形成することから、下水放流水に主たる消毒剤として用いられている塩素に対し強い耐性を持つことが知られており、第 4 章で述べた通り、下水放流水から多負荷量のウェルシュ菌が環境中に放出されている。5 章では近年イタリアをはじめとする諸外国でも環境への負荷の小さい消毒剤として下水放流水の消毒への導入が検討されている過酢酸のウェルシュ菌の不活化効果について調査を行った。過酢酸は有機物の共存する下水放流水中でも有機物による消費を受けずに濃度を維持することが可能であり下水放流水中に存在する野生株のウェルシュ菌の不活化実験において、濃度時間積 $1200 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$ での接触で最大 3.5 log 不活化が達成された。このことから、水環境や灌漑用水を通じた農作物のウェルシュ菌汚染源となる可能性がある下水放流水中のウェルシュ菌の消毒法の 1 つとして、過酢酸による消毒の効果と意義を見出すことができた。

以上より本論文の研究成果は、細菌性食中毒の上位を占めているものの、感染ルートがいまだ未解明であるウェルシュ菌食中毒に対し、ヒトから水系に至り、食品を汚染するという環境中での汚染ルートの可能性を明らかに、その循環の推定と制御に関する新しい知見を有し、食品衛生および環境衛生分野における微生物学的な安全性の向上に貢献できるものと思われる。

参考文献

- [1] 金子光美, 水質衛生学. 技法堂出版株式会社, 2003.
- [2] World Health Organization, “Guidelines for drinking-water quality, 4th edition,” 2011.
- [3] 金子光美, 水の消毒. 日本環境整備教育センター, 1997.
- [4] M. Bouzid, P. R. Hunter, R. M. Chalmers, and K. M. Tyler, “Cryptosporidium pathogenicity and virulence,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 26, no. 1, pp. 115–134, 2013.
- [5] E.-A. El-Sayed and Y. Nishikawa, “Cryptosporidium species and cryptosporidiosis in japan: A literature review and insights into the role played by animals in its transmission,” *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 82, no. 8, pp. 1051–1067, 2020.
- [6] D. Lees, “Viruses and bivalve shellfish,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 59, no. 1–2, pp. 81–116, 2000.
- [7] F. E. Adeyemo, G. Singh, P. Reddy, F. Bux, and T. A. Stenström, “Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of Cryptosporidium and Giardia in wastewater,” *PLoS One*, vol. 13:14, no. 5, 2019.
- [8] T. Hirata, K. Kawamura, S. Sonoki, K. Hirata, M. Kaneko, and K. Taguchi, “Clostridium Perfringens, as an Indicator Microorganism for the Evaluation of the Effect of Wastewater and Sludge Treatment Systems,” *Water Sci. Technol.*, vol. 24, no. 2, pp. 367–372, 1991.
- [9] P. Payment and E. Franco, “Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 8, pp. 2418–24, 1993.
- [10] J. Jang, H. G. Hur, M. J. Sadowsky, M. N. Byappanahalli, T. Yan, and S. Ishii, “Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 123, no. 3, pp. 570–581, 2017.
- [11] K. Akama and S. Otani, “Clostridium perfringens as the flora in the intestine of healthy persons,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 23, pp. 161–175, 1970.
- [12] 小西健一, 山岸高由, 石坂伸太郎, 坂本憲市, and 桜井信也, “土壌における Clostridium perfringens の出現率と生残性について,” *日本細菌学雑誌*, vol. 36, pp. 459–464, 1981.
- [13] J. Vierheilig *et al.*, “Clostridium perfringens is not suitable for the indication of fecal pollution from ruminant wildlife but is associated with excreta from nonherbivorous animals and human sewage,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 16, pp. 5089–5092, 2013.
- [14] L. Lucia Bonadonna, R. Briancesco, M. Massimo Ottaviani, and E. Veschetti, “Occurrence of Cryptosporidium oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables,” *Environ. Monit. Assess.*, vol. 75, no. 2, pp. 241–252, 2002.
- [15] S. Ishii and M. J. Sadowsky, “Escherichia coli in the environment: Implications for water quality

- and human health,” *Microbes Environ.*, vol. 23, no. 2, pp. 101–108, 2008.
- [16] S. I. J. Jang, H.-G. Hur, M.J. Sadowsky, M.N. Byappanahalli, T. Yan, “Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review,” *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 123, no. 3, pp. 570–581, 2017.
- [17] W. S. Boehm AB, Ashbolt NJ, Colford JM Jr, Dunbar LE, Fleming LE, Gold MA, Hansel JA, Hunter PR, Ichida AM, McGee CD, Soller JA, “A sea change ahead for recreational water quality criteria,” *J. Water Health*, vol. 7(1), pp. 9–20, 2009.
- [18] D. L.Sorensen, S. G.Eberl, and R. A.Dicksa, “Clostridium perfringens as a point source indicator in non-point polluted streams,” *Water Res.*, vol. 23, no. 2, pp. 191–197, 1989.
- [19] A. Hashimoto, H. Tsuchioka, K. Higashi, N. Ota, and H. Harada, “Distribution of Enterotoxin Gene-positive *Clostridium perfringens* Spores among Human and Livestock Samples and its Potential as a Human Fecal Source Tracking Indicator,” *Journal of Water and Environment Technology*, vol. 14, no. 6. pp. 447–454, 2016.
- [20] T. M. Scott, J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah, and J. Lukasik, “Microbial source tracking: current methodology and future directions,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 12, pp. 5796–803, 2002.
- [21] L. Fewtrell and D. Kay, “Recreational Water and Infection : A Review of Recent Findings,” pp. 85–94, 2015.
- [22] S. R. Mueller-spitz, L. B. Stewart, J. V. Klump, and S. L. Mclellan, “Freshwater Suspended Sediments and Sewage Are Reservoirs for Enterotoxin-Positive *Clostridium perfringens* □,” vol. 76, no. 16, pp. 5556–5562, 2010.
- [23] H. Suzuki, K. Oonaka, and A. Hashimoto, “Evaluation of *C. perfringens* Cpe-positive strain as a source tracking indicator of human contamination in freshwater environments,” *journal water Environ. Technol.*, vol. 19, no. №1, 2021.
- [24] A. Johansson, A. Aspan, E. Bagge, V. Båverud, B. E. Engström, and J. Karl-Erik, “Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge,” *BMC Microbiol.*, vol. 6, no. 47, 2006.
- [25] 仲西寿男・丸山務, 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規出版, 2009.
- [26] D. H. Strong, J. C. Canada, and B. B. Griffiths, “Incidence of *Clostridium perfringens* in American foods,” *Appl. Microbiol.*, vol. 11, no. July, pp. 42–44, 1963.
- [27] J.-W. Chon *et al.*, “Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 22, no. 4, pp. 530–534, 2012.
- [28] T. Fujisawa, K. Aikawa, T. Takahashi, S. Yamai, and S. Ueda, “Occurrence of clostridia in commercially available curry roux,” *Food Hyg. Saf. Sci.*, vol. 42, no. 6, pp. 394–397, 2001.
- [29] J. R. Matches, J. Liston, and D. Curran, “*Clostridium perfringens* in the Environment,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 28, no. 4, pp. 655–660, 1974.

- [30] B. E. Grass, J. E., Gould, L. H., & Mahon, "Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathogens and Disease*," vol. 10, no. 2, pp. 131–136, 2013.
- [31] R. Hall, Herbert E. Angelotti, "Clostridium perfringens in Meat and Meat Products," *Appl. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 352–357, 1965.
- [32] Y. Miki, K. Miyamoto, I. Kaneko-Hirano, K. Fujiuchi, and S. Akimoto, "Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 17, pp. 5366–5372, 2008.
- [33] K. Yanagimoto, K. Uematsu, T. Yamagami, and E. Haramoto, "The circulation of type f clostridium perfringens among humans, sewage, and ruditapes philippinarum (Asari clams)," *Pathogens*, vol. 9, no. 8, pp. 1–14, 2020.
- [34] J. Li, S. Sayeed, and B. A. McClane, "Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 22, pp. 7218–7224, 2007.
- [35] W. A. Brungs, "Effects of Residual Chlorine on Aquatic Life," *J. (Water Pollut. Control Fed.)*, vol. 45, no. 10, pp. 2180–2193, 1973.
- [36] S. Tak and A. Kumar, "Chlorination disinfection by-products and comparative cost analysis of chlorination and UV disinfection in sewage treatment plants: Indian scenario," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 34, pp. 26269–26278, 2017.
- [37] V. Mezzanotte, M. Antonelli, S. Citterio, and C. Nurizzo, "Wastewater Disinfection Alternatives: Chlorine, Ozone, Peracetic Acid, and UV Light," *Water Environ. Res.*, vol. 79, no. 12, pp. 2373–2379, 2007.
- [38] G. McDonnell, *Block's Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 2001.
- [39] M. Wagner, D. Brumelis, and R. Gehr, "Disinfection of Wastewater by Hydrogen Peroxide or Peracetic Acid: Development of Procedures for Measurement of Residual Disinfectant and Application to a Physicochemically Treated Municipal Effluent," *Water Environ. Res.*, vol. 74, no. 1, pp. 33–50, 2002.
- [40] M. G. C. Baldry, M. S. French, and D. Slater, "The activity of peracetic acid on sewage indicator bacteria and viruses," *Water Sci. Technol.*, vol. 24, no. 2, pp. 353–357, 1991.
- [41] J. I. Julian I. Rood *et al.*, "Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme," *Anaerobe*, vol. 53, pp. 5–10, 2018.
- [42] M. A. Navarro, B. A. McClane, and F. A. Uzal, "Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins," *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 5, 2018.
- [43] J. Li, K. Miyamoto, S. Sayeed, and B. A. McClane, "Organization of the cpe Locus in CPE-Positive *Clostridium perfringens* Type C and D Isolates," *PLoS One*, vol. 5, no. 6, 2010.
- [44] J. F. Kokai-Kun, J. G. Songer, J. R. Czeuczulin, F. Chen, and B. A. McClane, "Comparison of

- Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 32, no. 10, pp. 2533–2539, 1994.
- [45] 山中英明、藤井建夫、塩見一雄, *食品衛生学 第3版*. 恒星社厚生閣, 2012.
- [46] 久保義博, 河合幸一郎, 坂本憲市, 山岸高由, and 小西健一, “ウェルシュ菌の水質指標性に関する研究,” *環境科学会誌*, vol. 5, no. 3, pp. 173–185, 1992.
- [47] M. Saito, “Production of Enterotoxin by *Clostridium perfringens* Derived from Humans, Animals, Foods, and the Natural Environment in Japan,” *J. Food Prot.*, vol. 53, no. 2, pp. 115–118, 1990.
- [48] B. Canard, B. Saint-Joanis, and S. T. Cole, “Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1421–1429, 1992.
- [49] 上田成子, “ウェルシュ菌,” *モダンメディア*, vol. 64, no. 4, pp. 14–19, 2018.
- [50] D. D. Mattia and K. Manikonda, “Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff MMWR Editorial Board,” *Surveill. Summ. MMWR*, vol. 6262, no. 2, pp. 1–11, 2018.
- [51] 品川邦汎, *食中毒予防必携 第3版*. 社団法人日本食品衛生協会, 2013.
- [52] G. C. Lucilla Iacumin, “A survey of a blown pack spoilage produced by *Clostridium perfringens* in vacuum-packaged wurstel,” *Food Microbiol.*, vol. 94, 2021.
- [53] 久米田裕子, “行政検査から見えてくる現代の食中毒菌および真菌汚染事情,” *日本食品微生物学会雑誌*, vol. 33, no. 3, pp. 115–120, 2016.
- [54] 岐阜市保健所, “刑務所の食事によるウェルシュ菌食中毒,” *食品衛生学雑誌*, vol. 40, no. 5, p. 380, 1999.
- [55] J. E. Grass, L. H. Gould, and B. E. Mahon, “Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 10, no. 2, pp. 131–136, 2015.
- [56] F. A. Uzal *et al.*, “Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease,” *Future Microbiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 361–377, 2014.
- [57] J. W. Bisson and V. J. Cabelli, “*Clostridium perfringens* as a water pollution indicator,” *J. Water Pollut. Control Fed.*, vol. 52, no. 2, pp. 241–248, 1980.
- [58] L. V Venczel, M. Arrowood, M. Hurd, and M. D. Sobsey, “Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 4, pp. 1598–1601, 1997.
- [59] O. Savichtcheva and S. Okabe, “Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives,” *Water Research*, vol. 40, no. 13, pp. 2463–2476, 2006.
- [60] K. N. Hellein, C. Battie, E. Tauchman, D. Lund, O. A. Oyarzabal, and J. E. Lepo, “Culture-based

- indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters,” *J. Water Health*, vol. 9, no. 4, pp. 695–707, 2011.
- [61] Rebekah Henry *et al.*, “Effect of environmental parameters on pathogen and faecal indicator organism concentrations within an urban estuary,” *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 174, no. 5, pp. 18–26, 2016.
- [62] V. J. Harwood, C. Staley, B. D. Badgley, K. Borges, and A. Korajkic, “Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–40, 2014.
- [63] World Health Organization, *Guideline for drinking-water quality*, Fourth ed. 2011.
- [64] S. Rossi, M. Antonelli, V. Mezzanotte, and C. Nurizzo, “Peracetic Acid Disinfection: A Feasible Alternative to Wastewater Chlorination,” *Water Environ. Res.*, vol. 79, no. 4, pp. 341–350, 2007.
- [65] S. Stampi, G. De Luca, and F. Zanetti, “Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents,” pp. 833–839, 2001.
- [66] M. Kitajima, B. C. Iler, I. L. Pepper, and C. P. Gerba, “Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - identification of potential viral indicators,” *Sci. Total Environ.*, vol. 488–489, pp. 290–296, 2014.
- [67] B. W. Schmitz, M. Kitajima, M. E. Campillo, C. P. Gerba, and I. L. Pepper, “Virus Reduction during Advanced Bardenpho and Conventional Wastewater Treatment Processes,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 17, pp. 9524–9532, 2016.
- [68] M. Richardson and P. E. Granum, “The amino acid sequence of the enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A,” *FEBS Lett.*, vol. 182, no. 2, pp. 479–484, 1985.
- [69] 厚生労働省, “令和2年(2020年) 食中毒発生状況,” 2020.
- [70] Centers for Disease Control and Prevention, “Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017 Annual Report” 2017.
- [71] T. A. Roberts, “Heat and Radiation Resistance and Activation of Spores of *Clostridium welchii*,” *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 31, no. 1, pp. 133–144, 1968.
- [72] Q. Wen and B. A. McClane, “Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 5, pp. 2685–2691, 2004.
- [73] L. F. La Sala *et al.*, “Carriage of *Clostridium perfringens* by benthic crabs in a sewage-polluted estuary,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 97, no. 1–2, pp. 365–372, 2015.
- [74] A. J. A. M. van Asten, C. W. van derl Wie, G. Nikolaou, D. J. Houwers, and A. Gröne, “A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates,” *Vet. Microbiol.*, vol. 136, no. 3–4, pp. 411–412, 2009.
- [75] 櫻井純, 本田武司, 小熊恵二, 細菌毒素ハンドブック. 株式会社サイエンスフォーラム, 2002.

- [76] P. Fach and M. R. Popoff, "Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 11, pp. 4232–4236, 1997.
- [77] G. O. H. S. Guran, "Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 57, no. 1, pp. 77–82, 2013.
- [78] 畑江敬子, "食中毒の予防," 日本調理科学会誌, vol. 43, no. 5, pp. 322–325, 2010.
- [79] 厚生労働省食肉流通HACCP導入マニュアル作成委員会, 小規模な食肉処理業向けHACCPの考え方を取り入れた衛生管理のための手引書. 2019.
- [80] S. C. Read, C. L. Gyles, R. C. Clarke, H. Lior, and S. McEwen, "Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario.," *Epidemiol. Infect.*, vol. 105, no. 1, pp. 11–20, 1990.
- [81] E. Scallan *et al.*, "Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 7–15, 2011.
- [82] M. J. Da Silva Felício MT, Hald T, Liebana E, Allende A, Hugas M, Nguyen-The C, Johannessen GS, Niskanen T, Uyttendaele M, "Risk ranking of pathogens in ready-to-eat unprocessed foods of non-animal origin (FoNAO) in the EU: initial evaluation using outbreak data (2007-2011).," *International J. food Microbiol.*, vol. 195, pp. 9–19, 2015.
- [83] World Health Organization, "Water Quality and Health. Drinking water chlorination," 2014.
- [84] D. A. Holcomb and J. R. Stewart, "Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality," *Curr. Environ. Heal. Reports*, vol. 7, no. 3, pp. 311–324, 2020.
- [85] A. K. Brian R. McMinn, Nicholas J. Ashbolt, "Bacteriophages as indicators of fecal pollution and enteric virus removal," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 65(1), pp. 11–26, 2017.
- [86] V. J. Harwood, C. Staley, B. D. Badgley, K. Borges, and A. Korajkic, "Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–40, 2014.
- [87] A. M. Pourcher, L. A. Devriese, J. F. Hernandez, and J. M. Delattre, "Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 70, no. (6), pp. 525–530, 1991.
- [88] T. R. Desmarais, H. M. Solo-Gabriele, and C. J. Palmer, "Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 3, pp. 1165–72, 2002.
- [89] I. G. Resnick and M. A. Levin, "Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 42, no. 3, pp. 433–438, 1981.
- [90] M. W. Rhodes and H. Kator, "Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 87, no. 4, pp. 528–535, 1999.

- [91] S. Seurinck, T. Defoirdt, W. Verstraete, and S. D. Siciliano, "Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater.," *Environ. Microbiol.*, vol. 7, pp. 249–259, 2005.
- [92] H. C. Green *et al.*, "Improved HF183 quantitative real-time PCR assay for characterization of human fecal pollution in ambient surface water samples," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 10, pp. 3086–3094, 2014.
- [93] W. C. Jennings, E. C. Chern, D. O'Donohue, M. G. Kellogg, and A. B. Boehm, "Frequent detection of a human fecal indicator in the urban ocean: Environmental drivers and covariation with enterococci," *Environ. Sci. Process. Impacts*, vol. 20, no. 3, pp. 480–492, 2018.
- [94] Shrestha *et al.*, "microbial source tracking at chicago beaches under dry and wet weather conditions.," in *20th Symposium on Health-Related Water Microbiology*, 2019.
- [95] A. M. Abdelzaher *et al.*, "Daily measures of microbes and human health at a non-point source marine beach," *J. Water Health*, vol. 9, no. 3, pp. 443–457, 2011.
- [96] 岩本和也, "cpe 遺伝子保有 ウェルシュ菌のヒトソーストラッキング指標としての有効性の評価 修士論文(未公開)," 県立広島大学 総合学術研究科, 2018.
- [97] "statistical data," *Kiyokawa city*. [Online]. Available: https://www.town.kiyokawa.kanagawa.jp/material/files/group/5/2_jinkou.pdf. [Accessed: 25-Jan-2019].
- [98] "Water management land and conservation," *Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism*. [Online]. Available: https://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/jiten/nihon_kawa/0309_sagami/0309_sagami_00.html. [Accessed: 03-Mar-2020].
- [99] K. K. Vadde, A. J. McCarthy, R. Rong, and R. Sekar, "Quantification of Microbial Source Tracking and Pathogenic Bacterial Markers in Water and Sediments of Tiaoxi River (Taihu Watershed)," *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. April, pp. 1–19, 2019.
- [100] S. M. Genes and F. Samples, "Host Specificity and Sensitivity of Established and Novel," no. May, 2019.
- [101] I. Ahmed Hamzaac, L. Jurzika, K. Überlab, and M. Wilhelma, "Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water," *Water Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 1358–1368, 2011.
- [102] D. W. Griffin, C. J. Gibson, E. K. Lipp, K. Riley, J. H. Paul, and J. B. Rose, "Erratum: Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida keys (*Applied and Environmental Microbiology* (1999) 65:9 (4118–4125)),," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 2, p. 876, 2000.
- [103] C. Tartera, F. Lucena, and J. Jofre, "Human origin of Bacteroides fragilis bacteriophages present in the environment," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 55, no. 10, pp. 2696–2701, 1989.

- [104] A. Puig, N. Queralt, J. Jofre, and R. Araujo, "Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 4, pp. 1772–1776, 1999.
- [105] M. Corso, C. Galey, R. Seux, and P. Beaudou, "An assessment of current and past concentrations of trihalomethanes in drinking water throughout France," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 8, 2018.
- [106] J. Zheng, C. Su, J. Zhou, L. Xu, Y. Qian, and H. Chen, "Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants," *Chem. Eng. Journal*, vol. 317, pp. 309–316, 2017.
- [107] Y. Aratani, A. Tajima, and M. Minamiyama, "Relationship of nutrient and residual chlorine concentration in treated wastewater with periphytic algae grown in a stream receiving treated wastewater," *Water Sci. Technol.*, vol. 55, no. 1–2, pp. 375–386, 2007.
- [108] C. M. Shanks, J.-B. Sérodes, and M. J. Rodriguez, "Spatio-temporal variability of non-regulated disinfection by-products within a drinking water distribution network," *Water Res.*, vol. 47, no. 9, pp. 3231–3243, 2013.
- [109] S. D. Richardson, M. J. Plewa, E. D. Wagner, R. Schoeny, and D. M. Demarini, "Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research," *Mutat. Reserch/Reviews Mutat. Reserch*, vol. 636, no. 1–3, pp. 178–242, 2007.
- [110] S. Monarca, D. Feretti, C. Zani, M. Rizzoni, S. Casarella, and B. Gustavino, "Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant bioassays," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 46, no. 2, pp. 96–103, 2005.
- [111] L. Guzzella *et al.*, "In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants," *Mutat. Reserch/Genetic Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 564, no. 2, pp. 179–193, 2004.
- [112] S. W. Krasner, "The formation and control of emerging disinfection by-products of health concern," *Philos. Trans. R. Soc.*, vol. 367, pp. 4077–4095, 2009.
- [113] D. M. Leme and M. A. Marin-Morales, "Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application," *Mutat. Reserch/Reviews Mutat. Reserch*, vol. 682, no. 1, pp. 71–81, 2009.
- [114] S. M. Fletcher, D. Stark, and J. Ellis, "Prevalence of gastrointestinal pathogens in sub-saharan africa: Systematic review and meta-analysis," *J. Public Health Africa*, vol. 2, no. 2, pp. 127–137, 2011.
- [115] H. Abeywardena, A. R. Jex, and R. B. Gasser, "A Perspective on cryptosporidium and giardia, with an emphasis on bovines and recent epidemiological findings," *Adv. Parasitol.*, vol. 88, no. January, pp. 243–301, 2015.
- [116] A. T. Campbell, L. J. Robertson, M. R. Snowball, and H. V. Smith, "Inactivation of oocysts of

- Cryptosporidium parvum by ultraviolet irradiation,” *Water Res.*, vol. 29, no. 11, pp. 2583–2586, 1995.
- [117] G. F. Craun *et al.*, “Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 507–528, 2010.
- [118] R. Thompson, C. Andrew, C. S. Palmer, and R. O’Handley, “The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals,” *Vet. J.*, vol. 177, no. 1, pp. 18–25, 2008.
- [119] J. W. Bisson and V. J. Cabelli, “Clostridium perfringens as water pollution indicator,” *J. water Pollut. Control Fed.*, vol. 52, no. 2, pp. 241–248, 1980.
- [120] T.-T. Fong and E. K. Lipp, “Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality ... Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality,” vol. 69, no. March, pp. 357–371, 2014.
- [121] C. P. Gerba, W. Q. Betancourt, and M. Kitajima, “How much reduction of virus is needed for recycled water: A continuous changing need for assessment?,” *Water Res.*, vol. 108, no. January, pp. 25–31, 2017.
- [122] A. G. Johnson Lin, “Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses,” *Int. J. Environ. Health Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 484–506, 2013.
- [123] R. L. Atmar *et al.*, “Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, pp. 1553–1557, 2008.
- [124] A. Hata, M. Kitajima, and H. Katayama, “Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 114, no. 2, pp. 545–554, 2013.
- [125] A. T. Rachmadi *et al.*, “Free-chlorine disinfection as a selection pressure on norovirus,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, no. 13, pp. 1–14, 2018.
- [126] V. Mezzanotte, M. Antonelli, S. Citterio, and C. Nurizzo, “Wastewater disinfection alternatives: Chlorine, ozone, Peracetic acid, and UV light,” *Water Environ. Res.*, vol. 79, 2007.
- [127] S. Vilhunen, H. Särkkä, and M. Sillanpää, “Ultraviolet light-emitting diodes in water disinfection,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 439–442, 2009.
- [128] 平田 強, 岩崎 達行, 大瀧 雅寛, 片山 浩之, 神子 直之, 木村 憲司土佐 光司, 紫外線照射 —水の消毒への適用性—. 技法堂出版株式会社, 2008.
- [129] I. N. A. Fenu, G. Guglielmi, J. Jimenez, M. Sperandio, D. Saroj, B. Lesjean, C. Brepols, C. Thoeye, “Activated sludge model (ASM) based modelling of membrane bioreactor (MBR) processes: A critical review with special regard to MBR specificities,” *Water Res.*, vol. 44, no. 15, pp. 4272–4294, 2010.
- [130] S. Stampi, G. De Luca, and F. Zanetti, “Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the

- disinfection of sewage effluents,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, pp. 833–838, 2001.
- [131] S. Bonetta *et al.*, “Peracetic Acid (PAA) Disinfection: Inactivation of Microbial Indicators and Pathogenic Bacteria in a Municipal Wastewater Plant,” *Water*, vol. 9(6), no. 427, 2017.
- [132] L. Liberti and M. Notarnicola, “Advanced treatment and disinfection for municipal wastewater reuse in agriculture,” *Water Sci. Technol.*, vol. 40, no. 4–5, pp. 235–245, 1999.
- [133] M. Tutumi, K. Imamura, S. Hatano, and W. Watanabe, “Antimicrobial Action of Peracetic Acid,” *J. Food Hyg.*, vol. 15, pp. 443–447, 1973.
- [134] M. Antonelli, A. Turolla, V. Mezzanotte, and C. Nurizzo, “Peracetic acid for secondary effluent disinfection: a comprehensive performance assessment,” *Water Sci. Technol.*, vol. 68, no. 12, pp. 2638–2644, 2013.
- [135] E. M. Symonds, K. H. Nguyen, V. J. Harwood, and M. Breitbart, “Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management,” *Water Res.*, vol. 144, pp. 1–12, 2018.
- [136] P. Colson *et al.*, “Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, 2010.
- [137] R. G. Sinclair, J. B. Rose, S. A. Hashsham, C. P. Gerba, and C. N. Haas, “Criteria for Selection of Surrogates Used To Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 6, pp. 1969–1977, 2012.
- [138] E. Haramoto *et al.*, “Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 23, pp. 7413–7418, 2013.
- [139] M. Kitis, “Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review,” *Environ. Int.*, vol. 30, no. 1, pp. 47–55, 2004.
- [140] R. Briancesco, E. Veschetti, M. Ottaviani, and L. Bonadonna, “Peracetic acid and sodium hypochlorite effectiveness in reducing resistant stages of microorganisms,” *Cent. Eur. J. Public Health*, vol. 13, no. 3, pp. 159–162, 2005.
- [141] J. Koivunen and H. Heinonen-Tanski, “Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments,” *Water Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 1519–1526, 2005.
- [142] F. Zanetti, G. De Luca, R. Sacchetti, and S. Stampi, “Disinfection efficiency of peracetic acid (PAA): Inactivation of coliphages and bacterial indicators in a municipal wastewater plant,” *Environ. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1265–1271, 2007.
- [143] J. Lukasik *et al.*, “Reduction of poliovirus 1, bacteriophages, Salmonella montevideo, and Escherichia coli O157:H7 on strawberries by physical and disinfectant washes,” *J. Food Prot.*, vol. 66, no. 2, pp. 188–193, 2003.
- [144] M. Fuzawa, H. Bai, J. L. Shisler, and T. H. Nguyen, “The Basis of Peracetic Acid Inactivation Mechanisms for Rotavirus and Tulane Virus under Conditions Relevant for Vegetale Sanitation,”

Appl. Environ. Microbiol., vol. 86, no. 19, 2020.

謝辞

本研究を行うにあたり、修辞ご指導くださいました県立広島大学生物資源科学部生命環境学科橋本温教授に厚く御礼申し上げます。橋本温教授には学内でのご指導のほか、研究会への参加や国内だけでなく国際学会で発表する機会を与えて下り、大変貴重な経験をさせていただきました。心から感謝いたします。

また、県立広島大学生物資源学部地域資源開発学科の原田浩幸教授、県立広島大学生物資源学部生命環境学科の西村和之教授、県立広島大学生物資源学部生命環境学科の三苦好治教授には、本学位論文の審査にあたり、多くのご助言、ご指導を頂き心よりお礼申し上げます。

修士課程においてご指導賜りました麻布大学環境保健学部平田強先生にも心より御礼申し上げます。

社会人である私を温かく受け入れていただいた研究室のメンバーに謝意を表します。博士前期課程修了生岩本和也様、中本佳奈様、過酢酸グループ藤田久美子様、鶴巢和樹様には研究をサポートいただき心より感謝いたします。じゃがいもグループ沖克典様、小津野璃子様には貴重なデータをご提供いただき深く感謝申し上げます。

職場である鈴研株式会社職員一同には出張時の生産調整や業務調整等のご協力いただき心より感謝いたします。

最後に、妻と長男、長女および母、そして博士課程在籍中に永眠した父であり指導者でもあった鈴木晴光にいつも温かく支えられ研究を遂行することが出来ました。

研究を支えていただいた多くの方に深謝申し上げます。