

水域の微生物リスク評価に用いる糞便汚染指標細菌
およびその測定法に関する研究

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

令和元年 9 月

(2019 年)

土 岡 宏 彰

- 目次 -

第1章 序論	1
1.1 本研究の背景	1
1.1.1 水中の微生物リスク	1
1.1.2 糞便汚染指標細菌の役割と課題	3
1.1.3 定量的微生物リスク評価と微生物モニタリングの重要性	5
1.2 本研究の目的および論文の構成	6
第2章 ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌のケーキろ過濃縮・定量法の開発	9
2.1 緒言	9
2.1.1 ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌のケーキろ過濃縮法の開発	9
2.1.2 MPN法 (Colilert-18) への適用性評価と海水中の大腸菌測定への応用	11
2.2 材料と方法	13
2.2.1 ハイドロキシアパタイト粉体	13
2.2.2 ろ過性能評価試験	13
2.2.3 大腸菌株と培養条件	13
2.2.4 試料水の採取	13
2.2.5 ハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキろ過濃縮法	14
2.2.6 大腸菌の定量	16
2.2.7 ビブリオ属の分離	16
2.2.8 DNA抽出と大腸菌 16S rRNA 遺伝子の増幅	16
2.3 結果	18
2.3.1 ハイドロキシアパタイト粉体添加によるろ過性能の改善効果	18
2.3.2 ハイドロキシアパタイト粉体の大腸菌の増殖に対する影響	18
2.3.3 ハイドロキシアパタイト粉体ケーキろ過法による大腸菌の回収率	20
2.3.4 HAP ケーキろ過と Colilert-18 の組み合わせ法を用いた河川水中の大腸菌測定	21
2.3.5 HAP ケーキろ過/Colilert-18 法を用いた海水中の大腸菌測定	22
2.4 考察	25

2.5 結論	27
第3章 ウェルシュ菌芽胞のソーストラッキング指標としての有効性評価	28
3.1 緒言	28
3.2 材料と方法	30
3.2.1 試料採取	30
3.2.2 ウェルシュ菌芽胞の定量	32
3.2.3 ウェルシュ菌主要毒素遺伝子のスクリーニング	32
3.2.4 大腸菌の定量	34
3.3 結果	35
3.3.1 各種糞便由来試料におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌の濃度分布	35
3.3.2 各種糞便由来試料におけるウェルシュ菌芽胞の毒素遺伝子の保有状況	37
3.4 考察	40
3.5 結論	43
第4章 ウェルシュ菌芽胞の海域におけるノロウイルス指標としての有効性評価	44
4.1 緒言	44
4.2 材料と方法	46
4.2.1 試料水の採取	46
4.2.2 ウェルシュ菌芽胞の定量	47
4.2.3 ウェルシュ菌主要毒素遺伝子のスクリーニング	48
4.2.4 大腸菌の定量	48
4.2.5 ウイルスの定量	48
4.2.5.1 試料水の一次濃縮	49
4.2.5.2 二次濃縮	50
4.2.5.3 核酸抽出	51
4.2.5.4 逆転写反応	52
4.2.5.5 リアルタイムPCR法を用いたウイルス濃度の定量	53
4.2.5.6 マウスノロウイルスの回収率評価	56
4.3 結果	57

4.3.1 海域におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌の濃度分布	57
4.3.2 マウスノロウイルスの回収率	59
4.3.3 ノロウイルスおよび指標微生物の定量結果と相関	60
4.3.4 海水試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の毒素遺伝子の保有状況	64
4.4 考察	66
4.5 結論	68
第5章 総括	69
5.1 ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌のケーキろ過濃縮法の開発	69
5.2 ウェルシュ菌芽胞のヒトソーストラッキング指標、海域のノロウイルス指標としての有効性	70
参考文献	72
謝辞	83

第 1 章

序論

1.1 本研究の背景

1.1.1 水中の微生物リスク

水系感染症を引き起こす病原微生物による飲料水源、水道水源、水産養殖やレクリエーショナル水域の汚染状況を把握することは、安全な飲料水の確保、安全な水道水の供給、水産物の衛生管理や遊泳者の健康保護等の観点から重要である。水環境中には図 1-1 に示したように病原性を有する様々な細菌、原虫、ウイルスが存在している (World Health Organization, 2011)。主な伝播経路は、摂取または飲用により胃腸に感染する経路、エアロゾルの吸入により呼吸器に感染する経路、入浴時に接触することにより皮膚、粘膜に感染する経路の 3 つである。このうち、飲料水や食物の摂取、親水活動において特に問題となるのは、糞便と共に環境中に排出され、糞便を経口摂取することにより感染 (糞口感染) する腸管系病原微生物によるリスクである。

腸管系病原微生物は下痢症などヒトに様々な疾患を引き起こす。下痢症は、5 歳未満の子供では死亡原因の第二位の疾患となっており、毎年およそ 17 億人が下痢症を発症し、およそ 525,000 人が亡くなっている (World Health Organization, 2017)。下痢症による 5 歳未満の子供の死亡のほとんどは、汚染された水の摂取、トイレ等の衛生施設の欠如、不十分な衛生環境に起因している (Black et al., 2003)。世界の疾病負担研究 2015 (The Global Burden of Disease Study 2015) では、下痢症の世界的な罹患率、死亡率および病因に関する研究が行われ、安全な水へのアクセスと衛生環境の改善により、2015 年における 5 歳未満の子供の下痢症による死亡者数は 2005 年と比較して 34.3%減少したと報告されている (GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017)。しかし、サハラ以南のアフリカや南アジア等においては依然として下痢症による 5 歳未満の子供の死亡率は高い (図 1-2)。また、2019 年 6 月にユニセフと WHO より発表された水と衛生に関する共同監査報告書 (United Nation Children's Fund and World Health Organization, 2019) によると、2017 年時点において、世界のおよそ 22 億人が安全に管理された飲み水にアクセスできず、42 億人が安全に管理された衛生施設 (トイレ) を使用できず、30 億人が石鹸や水が備わった基本的な手洗い施設のない環境で生活しているとされ、開発途上国や貧

困国、特にその村落部において下痢症は今なお深刻な問題となっている。

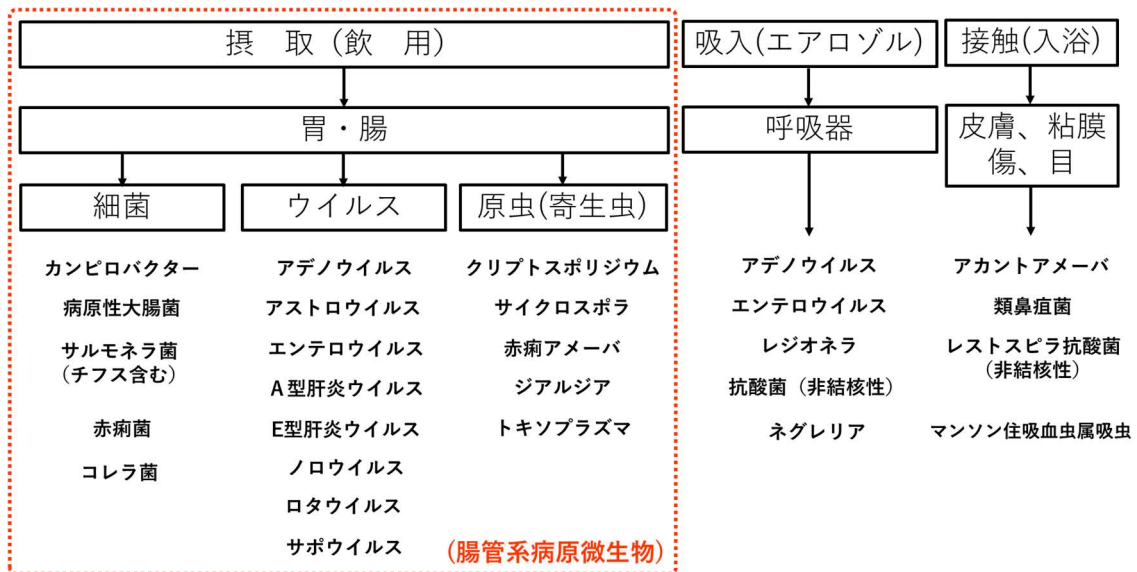


図 1-1 水系病原微生物と伝播経路

(World Health Organization, 2011 をもとに作成、一部改変)

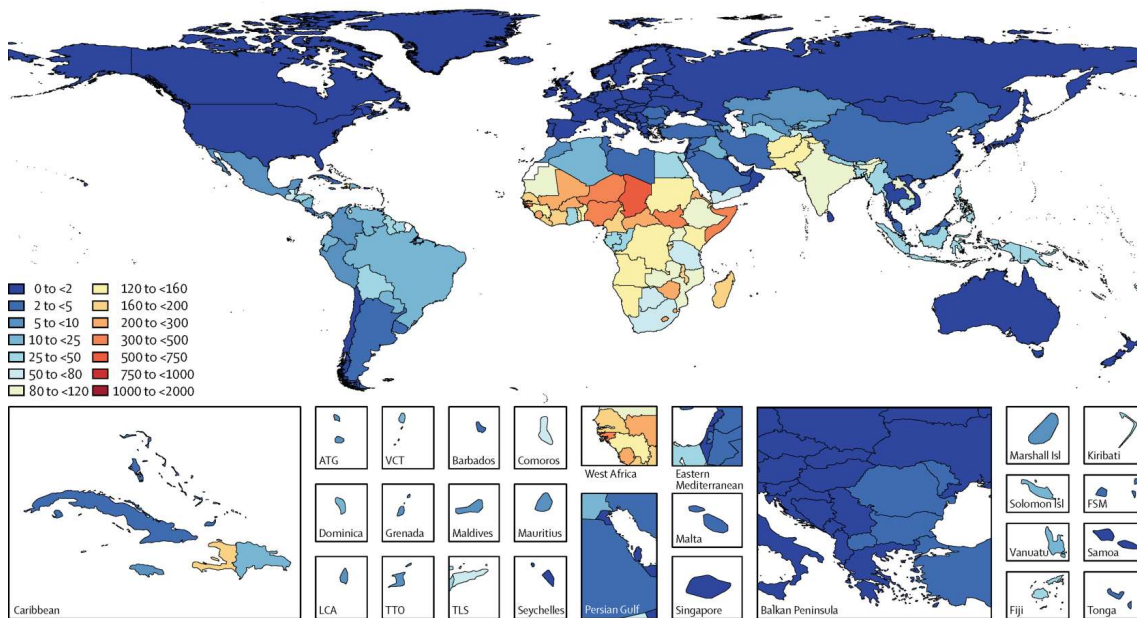


図 1-2 2015 年における下痢症による 5 歳未満の子供の死亡率 (100,000 人あたり)

(GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017 より引用)

一方、先進国においては、近代水道の発展と下水道施設の整備により、水系感染症の発生は劇的に減少した。わが国では 1887 年に横浜で初めて近代水道による給水が開始され、都市を中心に敷設が進められた（日本水道協会, 2015）。当初の水道は、水をろ過するだけで連続的な塩素消毒は行われていなかったが、第二次世界大戦後に GHQ より塩素消毒の徹底が指示され、1957 年（昭和 32 年）に制定された水道法において塩素消毒が義務付けられた（平林, 1988）。その結果、上水道の普及に伴い、コレラ、赤痢、腸チフス、パラチフスといった病原細菌による水系感染症は劇的に減少した（金子, 2006）。しかし、1980 年代より耐塩素性病原微生物であるクリプトスポリジウムによる水道を介したアウトブレイクが欧米で発生し（D'Antonio et al., 1985; MacKenzie et al., 1994）、わが国でも 1994 年に神奈川県平塚市の雑居ビルの簡易専用水道を介したアウトブレイク（黒木ら, 1996）、1996 年に埼玉県越生町の水道を介したアウトブレイクが発生し（埼玉県衛生部, 1997）、塩素消毒では制御できない耐塩素性病原微生物の存在が認知された。また、分子生物学の目覚ましい発展により、水の衛生分野においても、PCR 法などの感度の高い遺伝子検出法の導入が進められており、これまで培養の不可能であったノロウイルスなどを含めた様々なウイルスの水環境中での汚染実態が明らかにされてきている（Kishida et al., 2012; Mackowiak et al., 2018; Wyn-Jones et al., 2011）。さらに、近年では、豪雨等の極端な気象現象が頻繁に発生し、合流式下水道の雨天時越流水による水環境の病原微生物汚染も問題視されている（Fong et al., 2010; Hata et al., 2014; Madoux-Humery et al., 2016）。以上のように、わが国を含めた先進国においても水系感染症は過去の問題ではなく、現在進行形の課題である。

1.1.2 糞便汚染指標細菌の役割と課題

水系感染症を引き起こす病原微生物には、前項の図 1-1 に示したように様々な生物種が存在している（World Health Organization, 2011）。微生物リスクを評価するためには、水中に存在する可能性のあるすべての病原微生物を測定することが理想的ではあるが、各々に専門知識と技術が要求され、時間とコストがかかることから現実的ではない。そのため、病原微生物の汚染指標として、大腸菌を代表とした糞便汚染指標細菌が測定され、その代替とされている（National Research Council, 2004. Saxena, 2015; Tallon, 2005）。これは、水系感染病原微生物の多くが腸管系病原微生物であり、動物の腸管内で増殖し

て糞便とともに環境中へ排出されることから、糞便汚染を検知することで病原微生物による汚染の可能性を評価していることになる。例えば、わが国では、水道水質基準として大腸菌、水浴判定基準として糞便性大腸菌群、環境基準や食品衛生法において生食用かきの海域の基準として大腸菌群が糞便汚染の指標として用いられている（表 1-1）。このうち、水道水質基準については、平成 15 年に大腸菌群から大腸菌に変更された。このことは、大腸菌群には自然環境由来の種が含まれており、糞便汚染の指標性に乏しいことが以前より指摘されていたこと（Gavini et al., 1985; Leclerc et al., 2001; McLellan et al., 2001）、大腸菌を迅速、簡便かつ特異的に測定可能な酵素基質培地法が新たに開発されたこと（Rompre et al., 2002）が主な理由である。また、環境省（中央環境審議会水環境部会生活環境項目環境基準専門委員会）においても、現行の環境基準である大腸菌群数から大腸菌数に変更することについての議論が進められている。これらの糞便汚染指標細菌は、水道水や水浴場の安全性、水道水源や魚介類の養殖水域の水質評価に重要な役割を果たしており、特に病原細菌に対する指標として有用な評価手法となっている（Leclerc et al., 2001）。その一方で、クリプトスポリジウム等の耐塩素性原虫やウイルスと比較して、消毒耐性や環境中での生残性が低く、環境中での挙動が異なっていることが報告されている（Baggi et al., 2001; Grabow et al., 2001; Noble and Fuhrman et al., 2001; 佐野大輔ら, 2006）。このことから、現行の大腸菌を中心とした糞便汚染指標細菌では病原性原虫やウイルスの指標としては不十分であると考えられている。

表 1-1 各種水質基準において採用されている糞便汚染指標細菌の例

名 称	区分、類型等	指標細菌	基準値
水道水質基準	—	大腸菌	検出されないこと
水浴場水質判定基準	水質AA（適）	糞便性大腸菌群	不検出
	水質A（適）		100個/100mL以下
	水質B（可）		400個/100mL以下
	水質C（可） ^a		1,000個/100mL以下
環境基準	AA（水道1級、自然環境保全）	大腸菌群	50 MPN/100mL以下
	A（水道2級、水産1級、水浴）	大腸菌群	1,000 MPN/100mL以下
	B（水道3級、水産2級）	大腸菌群	5,000 MPN/100mL以下
生食用かきの加工基準	原料かきの採取海域	大腸菌群	70 MPN/100 mL以下

^a 1,000個/100mLを超えるものは不適

1.1.3 定量的微生物リスク評価と微生物モニタリングの重要性

水中の微生物リスク評価には、前項で述べたように糞便汚染指標細菌を用いて病原微生物汚染を間接的に評価する手法のほか、近年では、水中の病原微生物濃度を直接測定し、感染リスクを定量的に評価する手法が着目されている。本手法は定量的微生物リスク評価（Quantitative Microbial Risk Assessment: QMRA）と呼ばれ、病原微生物により汚染された水をヒトが摂取することにより発生する感染リスクを数値として表すことができる（Haas et al., 1999）。感染リスクは、図 1-3 に示したように、水中の病原微生物濃度と摂取量（水道水の飲水量、遊泳時の誤飲量など）から病原微生物の摂取量（暴露量）を計算し、用量-反応関係から求められる。

QMRA を用いた病原微生物のリスク評価は、上記の手順から推定されたリスクが許容可能な程度なのか、許容可能でなかった場合、どの程度リスクを低減する必要があるのかの判断材料に利用することが重要となる。例えば、WHO は、飲料水水質ガイドライン第 4 版において、浄水処理施設の処理性能目標値の設定は QMRA に基づき設定することを推奨している（World Health Organization, 2011）。すなわち、水道水を接種した場合のある種の病原微生物に対する許容感染確率から先に示した QMRA の手順を逆算することにより水道水中の病原微生物の許容濃度を算出することができ、水道原水中の

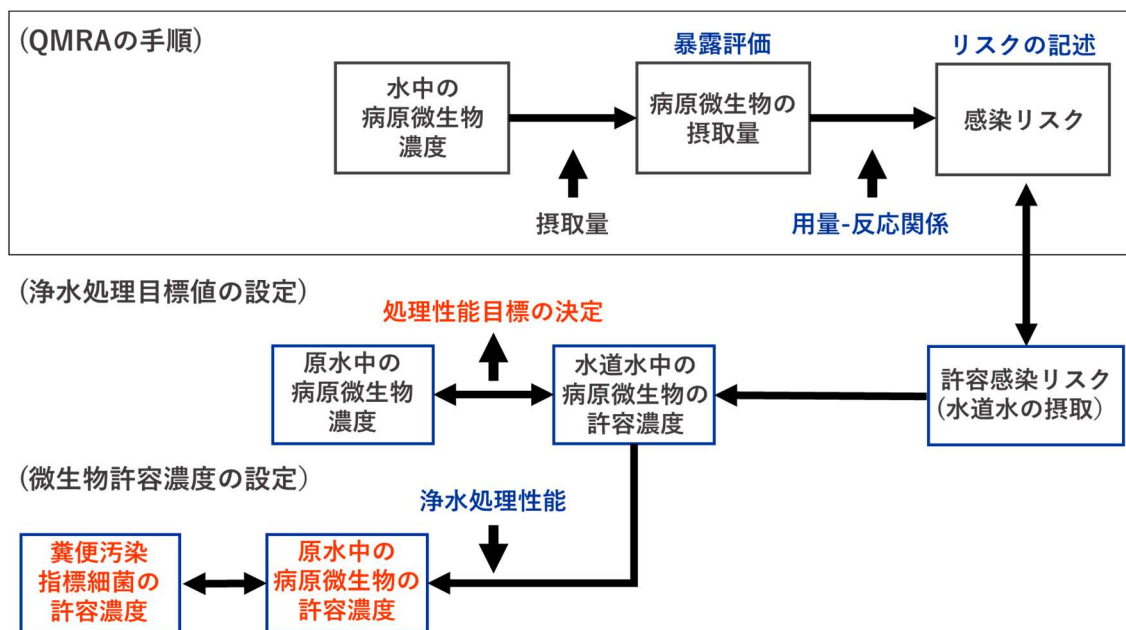


図 1-3 QMRA の手順と水道水摂取による許容感染リスクと微生物濃度の関係

病原微生物濃度の測定データから浄水処理工程をどの程度強化すべきかの判断を行うことができる（図 1-3）。別のアプローチでは、浄水処理性能（対数除去値）が明らかでない場合は、許容感染リスク以下とするための水道原水中の許容可能な病原微生物濃度が算出でき、管理することも可能である。また、水中の病原微生物と糞便汚染指標細菌の濃度比の分布を求めることにより、病原微生物よりも測定の容易な糞便汚染指標細菌を用いて管理を行うことも提案されている（小林ら, 2016）。

このように、QMRA に基づいた工程管理を導入することで、水道原水中の病原微生物濃度および糞便汚染指標細菌濃度を把握することの重要性が高まってくるものと思われる。また、QMRA に基づく水の微生物学的安全性評価と管理は水道分野だけでなくレクリエーション水域や水産養殖水域の評価にも広く用いていくことが必要であり、水利用形態別、水域別に微生物モニタリングデータを取得し、蓄積していくことが今後益々重要になるものと思われる。

1.2 本研究の目的および論文の構成

前節の 1.1.3 で述べたように、QMRA により水中の微生物リスク評価や管理を行う場合、水道原水、レクリエーション用水、水産用水等に利用される河川水、海水等の環境水中の病原微生物濃度や糞便汚染指標細菌濃度を把握することが重要となる。一般的に水中の微生物濃度は低く、病原微生物や糞便汚染指標細菌を測定するためには、試料水の濃縮が必要となる。試料水の濃縮にはメンブレンフィルター法が採用されているが、試料水中の懸濁物質による膜の閉塞や夾雑菌のマスキングによる判定妨害等が問題となり、ろ過水量が十分に得られず感度良く測定することが困難な場合がある。また、糞便汚染指標細菌の測定では最確数法（Most Probable Number method: MPN 法）も常用されているが、検水量は通常 100 mL が最大である。そのため、日常的に使用されているこれらの測定法では、高濁度試料水を含めた様々な水質を有する水道原水やレクリエーション用水等の環境水を高感度かつ高精度に定量することは困難であるのが現状である。QMRA に基づいた水の衛生管理を行っていくためには、環境水中の病原微生物濃度や糞便汚染指標細菌濃度の定期的なモニタリングとデータの蓄積が重要となるため、様々な水質に適用可能な簡便な定量法の開発が望まれる。

前節の 1.1.2 において、大腸菌を中心とした糞便汚染指標細菌は耐塩素性原虫やウイ

ルスに対する指標としては不十分であることを述べた。ウイルスの指標については、環境中に大量に存在する別種のウイルスを指標として用いる多くの研究が行われているが、ウイルスを代替指標として利用する場合、ファージを除き PCR 法による評価がほとんどであり、コスト、簡便性、技術面等に課題があると言える。そのため、大腸菌と同じく簡便な培養法で評価可能なウイルス指標の確立が必要であると思われる。

以上のことから、本研究では、高濁度試料水等の環境水モニタリングに適用可能な高感度かつ高精度な細菌の濃縮・定量法の開発と、海域のノロウイルス指標としてウェルシュ菌芽胞に着目し、その有効性について評価することを目的とした。また、ウェルシュ菌芽胞については、ソーストラッキング（糞便汚染源の起源解析）指標としての可能性についても評価を行った。

本論文の構成を図 1-4 に示した。本章に続く第 2 章では、高濁度試料水に適用可能な細菌のろ過濃縮法として、ハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキろ過濃縮法の開発について論述した。第 3 章および第 4 章では、ウェルシュ菌芽胞の「ソーストラッキング指標」、「ノロウイルス指標」としての有効性について、ヒトおよび家畜糞便由来試料、沿岸海水試料の調査結果からそれぞれ論述した。最後に第 5 章では、本研究を総括し、今後の展望について論述した。

第1章 序論



課題：環境水モニタリングに適した高感度かつ高精度な細菌の濃縮・定量法の開発

第2章 ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌のケーキろ過濃縮・定量法の開発

課題：ノロウイルス汚染を適切に評価できる指標の確立

第3章 ウェルシュ菌芽胞のヒトソーストラッキング指標としての有効性評価

第4章 ウェルシュ菌芽胞の海域におけるノロウイルス指標としての有効性評価



第5章 総括

図 1-4 本論文の構成

第2章

ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌の ケーキろ過濃縮・定量法の開発

2.1 緒言

2.1.1 ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌のケーキろ過濃縮法の開発

水道水源、水産養殖やレクリエーション水域の病原微生物汚染の状況を把握することや指標細菌を用いた糞便汚染モニタリングは、安全な水道水の供給、水産物の衛生管理や遊泳者の健康保護等の観点から重要である。近年、水道分野においても危害分析重要管理点（Hazard Analysis Critical Control Point: HACCP）に基づく工程管理やQMRAに基づいた工程管理の重要性がWHO（2011）より提唱されており、上水検査に加え、水道原水の検査の重要性が高まっている。また、QMRAに基づいた水の衛生管理は水道分野だけでなくレクリエーション水域や水産養殖水域の評価にも広く利用していくことが重要であり、水利用形態別、水域別に微生物モニタリングデータを取得し、蓄積していくことは今後益々重要になるものと思われる。

現在、水中の細菌濃度を評価する手法としては一般的に表2-1に示した3種類の培養法が利用されている。それぞれメリット、デメリットがあり、用途により使い分けられている。例えば、メンブレンフィルター法はろ過水量を柔軟に調整できるため、低濁度試料水では大容量ろ過が可能であり、水中の細菌を感度良く測定することができる。しかしながら、高濁度試料水では膜の閉塞により適用が困難であり、夾雑菌の多い試料水ではマスキングによる計数妨害が生じる可能性がある。MPN法は高濁度水や夾雑菌の多い試料水に比較的適用しやすく、簡便な定量キットが販売されている等のメリットがある。一方、デメリットとして、試料水中の溶存物質による試験結果への影響や、検水量の問題がある。検水量は、時間、試薬および物理的測定空間を確保すれば増加させることは可能であるが日常のモニタリング検査には採用することは困難であり、通常100mLで測定されている。

表 2-1 細菌の定量培養法 (Koster et al., (2003) から一部抜粋、改変)

方法	メリット	デメリット
混積培養法	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡便 ・ 低コスト 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 検水量：最大 1 mL
MPN 法 ^a	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高濁度試料水に適用可能 ・ 区間推定値 ・ 簡便な定量キット 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試料水中の溶存物質の影響 (⇒偽陰性、偽陽性) ・ 検水量：通常 100 mL (大容量を測定する場合には、時間、コスト、物理的スペース等が必要)
MF 法 ^b	<ul style="list-style-type: none"> ・ 検水量を柔軟に変更可能 (大容量ろ過による高感度化) ・ 溶存物質の除去 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高濁度試料水には適用困難 ・ 夾雑菌によるマスキング (判定妨害)

^a MPN 法：最確数法

^b MF 法：メンブレンフィルター法

環境水は表流水、伏流水、井戸水、海水等、種類は様々であり、水域ごとに水質が異なることから、高濁度試料水を含めた様々な水質に適用可能な測定法が必要となる。また、QMRA によるリスク評価を行うためには水中で低濃度に存在する糞便汚染指標細菌や病原細菌を評価する必要があり、感度の高い測定法が求められる。しかしながら、表 2-1 に示したような現行の細菌の定量培養法では、高濁度試料水への対応と大容量ろ過による高感度測定への同時対応は困難である。

そこで本研究では、メンブレンフィルター法のろ過性能を簡便に向上させ、既存の定量法である MPN 法と組み合わせ可能な細菌のろ過濃縮法として、ハイドロキシアパタイト粉体 (Hydroxyapatite powder: HAP) を用いたケーキろ過濃縮法を開発することを目的とした。ケーキろ過法は珪藻土やパーライトなどの粉体をろ過助剤として試料水等に添加してろ過を行う手法である。ろ過助剤を加えるため、通常のメンブレンフィルター法と比較してろ過性能が向上し、特に高濁度試料水への適用性が向上する。ケーキろ過法を細菌の濃縮法として利用した例は、主にサルモネラを対象としたものがいくつか報告されている (Brezenski et al., 1969; Cheng et al., 1971)。また、Presnell (1976) らはサル

モネラのほか、糞便汚染指標細菌である大腸菌群をケーキろ過濃縮し、複数発酵管法 (MPN 法) により定量を行っている。しかしながら、これらの報告は定性的な利用にとどまるものや、定量的に利用されていてもケーキろ過法自体の回収率評価は行われていない。また、いずれの報告も十数年前のものであり、現在主流となっている特定酵素基質培地との適用性については不明である。

本章ではまず初めに、高濁度モデル水を用いて HAP ケーキろ過法のろ過性能評価を行った。次に大腸菌をモデル細菌として用いた添加回収率評価を行った。なお、HAP をろ過助剤として使用するにあたり、HAP が細菌の発育に影響を与えないことや判定時の視認性に影響を与えないことを確認する必要があるため、事前に HAP 混在下で大腸菌の培養試験を実施した。

2.1.2 MPN 法 (Colilert-18) への適用性評価と海水中の大腸菌測定への応用

培養法をベースとした大腸菌の測定法は、大腸菌が特異的に保有する酵素活性を指標とした特定酵素基質培地法が主流となっている。そのうちのひとつである Colilert-18 法は培養時間が 18 時間であり、24 時間の培養が必要なその他の培地と比較して迅速性に優れている。また、キット化されたトレイ (Quanti-Tray/2000) と組み合わせることにより簡便に定量できることから、水道水、水道原水、レクリエーション用水 (淡水、海水)、排水等の様々な水の測定法として世界的に広く利用されている (IDEXX, 2013)。Colilert-18 培地は特定酵素基質として *ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) と 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) を含んでおり、大腸菌が保有する β -D-ガラクトシダーゼと β -D-グルクロニダーゼにより特異的に加水分解される。測定者はその代謝産物を色の変化 (黄色) と UV 照射下での蛍光の有無を確認することにより、追加試験を行うことなく簡便に大腸菌を検出、定量することが可能となる。

しかしながら、Colilert-18 を含む特定酵素基質培地を用いた大腸菌の測定法は、特異性についてこれまでにいくつかの問題が指摘されてきた。例えば、大腸菌以外の β -D-ガラクトシダーゼ活性を有する非標的細菌として *Aeromonas* spp.、*Vibrio* spp.、*Flavobacterium* spp. (Covert et al., 1989; Davies et al., 1995; Landre et al., 1998)、 β -D-グルクロニダーゼ活性を有する非標的細菌として *Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Flavobacterium* spp.、*Vibrio* spp.、*Yersinia* strains 等が報告されている (Baudart et al., 2009; Feng and Hartman,

1982; Petzel et al., 1986; Ralovich, 1991; Trepeta and Edberg, 1984)。そのため、これらの細菌が試料水中に存在し、培養中に培地成分により選択的に抑制されない場合、培地中の基質を代謝して偽陽性を引き起こす可能性がある。特に Colilert-18 では、海水中の大腸菌測定において深刻な偽陽性が報告されており、Pisciotta (2002) らはフロリダ沖の海水を測定した結果、大腸菌が糞便性大腸菌群と比較して 10-100 倍高く検出され、ビブリオなどの好塩性細菌が原因であったと報告している。これらのことから、Colilert-18 を用いて海水中の大腸菌を測定する場合は、好塩性細菌の影響を十分に考慮する必要がある。

Colilert-18 を用いて海水中の大腸菌を測定する場合、偽陽性を回避する方法として、試料水を 10 倍以上希釈し塩濃度を下げて測定することが推奨されている (ISO 9308-2, 2012)。しかしながら、簡便に定量可能な Quanti-Tray/2000 を用いる場合、検水量は最大で 10 mL となり、希釈法では低濃度に存在している大腸菌の検出性やその値の信頼性が低下する。また、大腸菌は一般的に海水中では塩分、太陽光による不活化、光回復の抑制、捕食活動等によって生残性が低下することが報告されている (Anderson et al., 1979; Chan and Killick, 1995; Chandran et al., 2005; Oguma et al., 2013; Sinton et al., 2002)。下水など糞便汚染源からの影響を強く受ける水域を除いて大腸菌濃度は低濃度であると考えられ、偽陽性を回避するために希釈によって塩分濃度を低下させることは好ましくない。

そこで、本章の後半では、好塩性細菌による偽陽性を回避し、コリラート 18 を容易に海水試料に適用可能な方法として、希釈することなく塩類を除去可能なケーキろ過による前処理法の導入を検討した。なお、海水試料への適用性を評価する前に、ビブリオ属の影響のない淡水 (河川水) を用いて、HAP ケーキろ過法と Colilert-18 法が組み合わせ可能か、Colilert-18 法のみで測定した結果と比較することで同等性について評価を行った。その後、本組み合わせ法を海水試料の大腸菌測定に応用し、本法より得られた大腸菌数を Colilert-18 原法や参照法と比較し、さらには黄色/蛍光を示した大腸菌推定陽性ウェルについて PCR 法により大腸菌の存在の有無を検証することで、その適用性について評価を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 ハイドロキシアパタイト粉体

メディアン径 20 μm のハイドロキシアパタイト粉体 (AP-20; 積水化成品工業) を乾熱滅菌器で 180°C、1 時間滅菌したものを試験に用いた。

2.2.2 ろ過性能評価試験

高濁度水を用いて HAP 添加と HAP 未添加の場合のろ過効率を比較した。高濁度水は河口域より採取した底泥を水道水に懸濁させて調製し、濁度計 (WA6000; 日本電色工業) を用いて試料水濁度を測定した。その後、水道水を用いて 2 倍希釈を行い、希釈前と希釈後の 2 種類の高濁度水を用いて評価を行った。高濁度水 1,000 mL に対して、HAP 0.5 g を添加し、直径 47 mm、孔径 0.45 μm のセルロース混合エステルフィルター (アドバンテック東洋) で吸引ろ過を行った (ボディフィードろ過)。HAP を添加せず同様に試験したものを比較対照とした。ろ過を開始して 5 分後に吸引を停止し、ろ液の重量を測定した。ろ液の重量は、ろ過後のろ液を含む吸引瓶の重量からろ過前の吸引瓶の重量を減算することで求めた。なお、測定は各条件につき $n=3$ で行った。

2.2.3 大腸菌株と培養条件

大腸菌とハイドロキシアパタイト粉体の共培養試験および添加回収試験では、大腸菌 ATCC11775 株を用いた。15%グリセロール含有 Luria-Bertani (LB) ブロス (1.0%トリプトン、0.5%イーストエキス、1.0%塩化ナトリウム) 中に -80°C で凍結保存しておいた大腸菌を LB ブロスに一白金耳接種し、36°C で 20–24 時間培養した。その後、培養液 10 μL を新鮮な LB ブロスに接種し 36°C で 20–24 時間培養した。リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) を用いて 10 倍段階希釈を行い、任意の大腸菌数に調整したものを試験に供した。

2.2.4 試料水の採取

2015 年 11 月から 2016 年 7 月に広島県内の異なる 8 つの河川水を採取した。試料水は 500 mL 容滅菌ガラス瓶に採取し、10°C 以下に保冷し 12 時間以内に試験に供した。同様に、2015 年 11 月に広島湾の異なる 3 つの海水を採取した。試料水は 2,000 mL 容滅菌ガラス瓶に採取し、10°C 以下に保冷し 12 時間以内に試験に供した。

2.2.5 ハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキろ過濃縮法

ハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキろ過濃縮法の概略図を図 2-1A に示した。フィルターベース上に支持フィルターとして直径 47 mm、孔径 0.45 μm の滅菌セルローズ混合エステルメンブレンフィルター（アドバンテック東洋）を載せ、250 mL 容ガラスファンネルをセットした。0.5 g のハイドロキシアパタイト粉体を添加した PBS（200 mL 程度）をファンネルに注ぎ入れ、吸引ろ過を開始し、続けて 300 mL 程度の PBS を追加して連続的にろ過することによりメンブレンフィルター上にケーキ層を形成させた（プレコートろ過）。その後、試料水（河川水 100 mL または海水 1,000 mL）または添加試験においては大腸菌を添加した PBS を全量ろ過した。なお、添加回収試験では、プレコートろ過のほか、試料水中に 0.5 g のハイドロキシアパタイト粉体を直接加えるボディフィードろ過についても検討した。

ろ過後、20 mL の PBS の入った 50 mL 容遠沈管または 100 mL の滅菌精製水の入った Colilert vessel (IDEXX Laboratories) にケーキ層をメンブレンフィルターごと回収した。ケーキ層は数秒のボルテックスもしくは数回の転倒混和により溶液中に再分散させ、これをケーキろ過濃縮物とした。

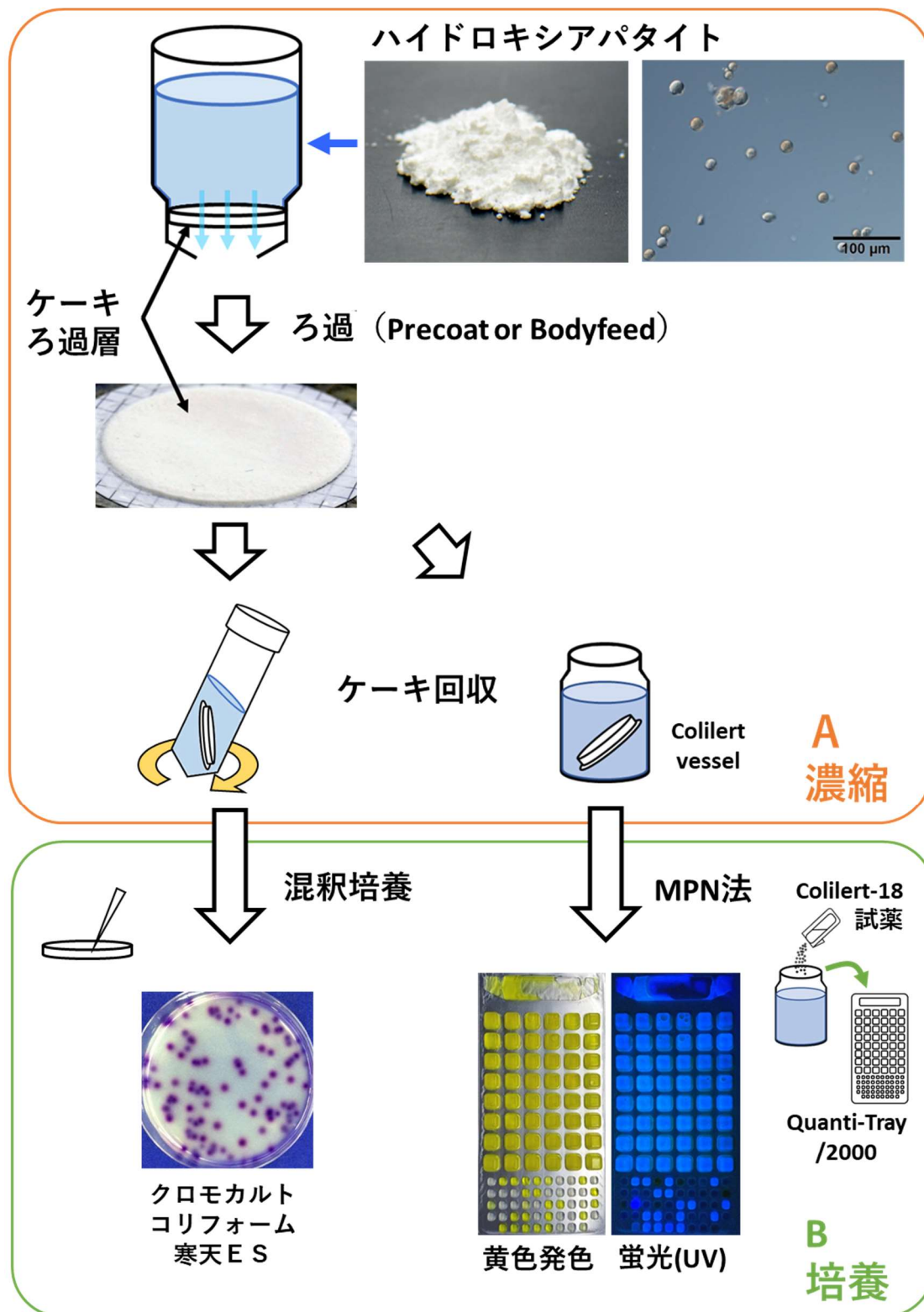


図 2-1 ハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキろ過濃縮・定量法の概略図
 プレコートろ過はあらかじめフィルター上に HAP のケーキ層を形成させて試料水をろ過する方法、ボディフィードろ過は試料水中に HAP を添加してろ過する方法である。

2.2.6 大腸菌の定量

混釈培養法

共培養試験および添加回収試験で用いた。試験水 1 mL を滅菌シャーレに接種し、クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES (メルクミリポア) を用いて混釈培養を行った。36°C で 24 時間培養後、濃紫色の集落を大腸菌数として計数した(図 2-1B)。なお、測定は n=2 で行った。

Colilert-18 法

試料水原液、滅菌精製水を用いて 10 倍希釈した試料水、もしくはケーキろ過濃縮試料水に Colilert-18 試薬を加え完全に溶解させた。その後、全量を Quanti-Tray/2000 (IDEXX Laboratories) に注ぎ入れ、専用シーラーで封じ、36°C で 18-24 時間培養した。黄色に発色 (Y) し、365-nm UV 照射下で蛍光(F)を発するウェルを大腸菌陽性ウェルとして計数し、専用の MPN 表から大腸菌の最確数を求めた(図 2-1B)。

改良 m-TEC 法

海水中の大腸菌濃度を評価するために、海水に適用可能な U.S. Environmental Protection Agency (2009)の標準法 Method1603 を参照法として用いた。海水 100 mL を直径 47 mm、孔径 0.45 μm の滅菌セルロース混合エステルメンブレンフィルター (アドバンテック東洋) で吸引ろ過した。メンブレンフィルターを HiCrome modified m-TEC 培地 (シグマアルドリッチ) の表面に密着させ、35°C で 2 時間培養し、その後、44.5°C で 22 時間培養を行った。赤色またはマゼンタ色の集落を大腸菌数として計数した。なお、測定は n=2 で行った。

2.2.7 ビブリオ属の分離

ビブリオ属の増殖を確認するために、Quanti-Tray/2000 上で大腸菌陽性を示した YF ウェル中の培養液 1 μL を TCBS 寒天培地 (オキシイド) に画線塗抹し、36°C で 18 時間培養した。培養後、黄色もしくは緑色の集落をビブリオ属として同定した。

2.2.8 DNA 抽出と大腸菌 16S rRNA 遺伝子の増幅

Quanti-Tray/2000 上で大腸菌陽性を示した YF ウェル中の大腸菌の存在を確認するために、PCR により培養液中の大腸菌 16S rRNA 遺伝子のスクリーニングを行った。Quanti-Tray/2000 一枚につき 4 つまたは 5 つの YF ウェルをランダムに選択した。裏面をアル

コールで消毒し、1 ウェルにつき培養液 1 mL を無菌的に採取し、20,000 ×g で 10 分間遠心後、上清を除去して得られた沈査を滅菌精製水 50 μL で再懸濁した。ヒートブロックを用いて 100°C で 10 分間加熱してゲノム DNA を抽出し、20,000 ×g で 5 分間冷却遠心して得られた上清を PCR 用のテンプレートとした。大腸菌 16S rRNA 遺伝子検出用プライマーとして Sabat (2000)らが報告した ECA75F と ECR619R を用いた (表 2-2)。反応液は表 2-3 に示した組成表に従って調製し、表 2-4 に示した条件にて PCR を行った。

表 2-2 大腸菌 16SrRNA 遺伝子検出用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	増幅サイズ (bp)	参考文献
ECA75F	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC	544	Sabat et al., 2000
ECR619R	AGCCCGGGGATTCACATCTGACTTA		

表 2-3 PCR 反応液組成

試 薬	添加量
2×Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)	12.5 μL
Forward primer (ECA75F)	10 pmol
Reverse primer (ECR619R)	10 pmol
熱抽出 DNA サンプル	2.5 μL
滅菌精製水	up to 25 μL

表 2-4 PCR 反応条件

ステージ	サイクル数	ステップ	温度	時間
1	1	1	94°C	2 分
2	40	1	94°C	45 秒
		2	72°C	45 秒
3	1	1	72°C	10 分
		2	4°C	ホールド

参考文献 Sabat et al., 2000

2.3 結果

2.3.1 ハイドロキシアパタイト粉体添加によるろ過性能の改善効果

HAP 添加を添加したケーキろ過法のろ過性能を評価するために、濁度 49 度および濁度 98 度の高濁度試料水を調製し、HAP 未添加の場合とろ過水量を比較した (図 2-2)。その結果、濁度 49 度の試料水では、HAP 未添加で 5 分間当たりのろ過水量が平均 238 mL であったのに対し、HAP を添加したケーキろ過法ではろ過水量は平均 749 mL となり、未添加と比較してろ過水量がおよそ 3.2 倍増大した。また、濁度 98 度の試料水では、HAP 未添加でろ過水量が平均 160 mL であったのに対し、HAP を添加したケーキろ過法ではろ過水量は平均 454 mL となり、未添加と比較してろ過水量がおよそ 2.8 倍増大した。

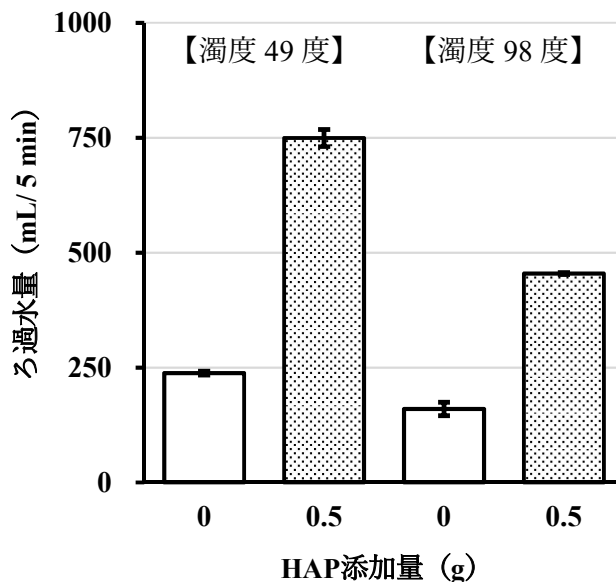


図 2-2 HAP 添加の有無におけるろ過水量の比較

2.3.2 ハイドロキシアパタイト粉体の大腸菌の増殖に対する影響

HAP が大腸菌の増殖や定量結果に影響を及ぼすかどうかを確認するために、HAP 混在下で大腸菌の培養試験を行った。

Colilert-18 培地

Colilert-18 試薬を溶解した精製水 100 mL に大腸菌液 1 mL と HAP 0.5 g を加え転倒混

和により攪拌後、Quanti-Tray/2000 に全量移し入れ、36°C で 18–20 時間培養した。HAP を添加せず同様に試験したものを比較対照とした。結果、HAP を添加した場合においても、大腸菌の陽性ウェルは黄色発色、UV 下での蛍光発光ともに明瞭に観察でき、容易に陽性/陰性判定が可能であった (図 2-3A, B)。また、陽性ウェル数から求めた大腸菌 MPN は HAP 添加と未添加で同程度であり、比 (添加/未添加) の平均値は 0.92 (range = 0.77–1.19) であった (表 2-5)。

クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES

滅菌シャーレに大腸菌液 1 mL と HAP 0.05 g を添加し、クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES と混釈後、36°C で 24 時間培養した。HAP を添加せず同様に試験したものを比較対照とした。結果、培地中に発育した大腸菌集落は HAP 混在下においても、明瞭に観察でき、計数作業に影響を及ぼさなかった (図 2-3C)。また、大腸菌数は HAP 添加と未添加で同程度であり、比 (添加/未添加) の平均値は 0.98 (range = 0.93–1.05) であった (表 2-5)。

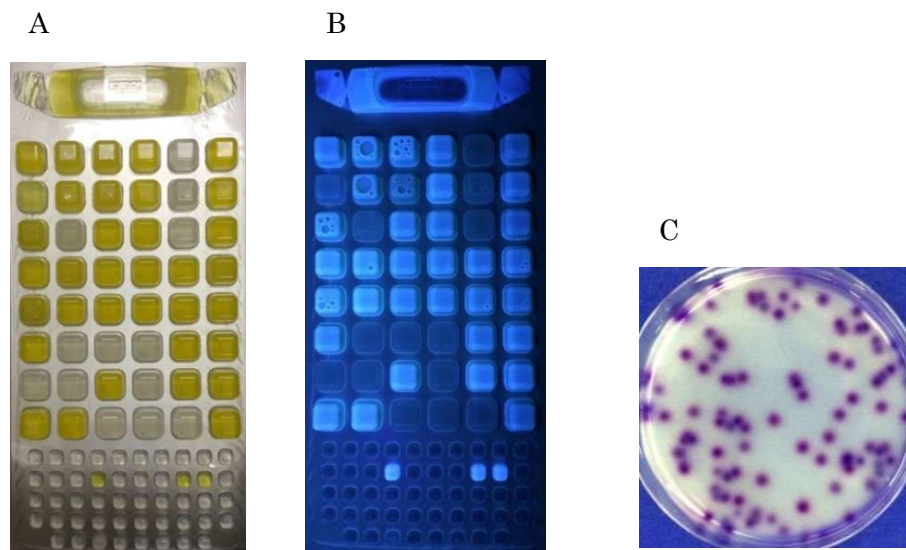


図 2-3 HAP 混在下における培地中での大腸菌の増殖
(A) Colilert-18 培地 (黄色発色)、(B) Colilert-18 培地 (UV 照射下において
蛍光発光)、(C) クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES (濃紫色集落)

表 2-5 HAP 添加/未添加における Colilert-18 培地およびクロモカルトコリフォーム寒天培地 ES 中の大腸菌数の比較

培地名	Test no.	<i>E. coli</i> (MPN/100 mL or CFU/dish)		比 ^a	比の平均
		HAP 添加	HAP 未添加		
Colilert-18	1	260.3	325.5	0.80	0.92
	2	547.5	461.1	1.19	
	3	62.4	80.9	0.77	
クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES	1	63	60	1.05	0.98
	2	73	77	0.95	
	3	93	100	0.93	

^a HAP 添加/HAP 未添加

2.3.3 ハイドロキシアパタイト粉体ケーキろ過法による大腸菌の回収率

本実験では、HAP をろ過助剤として用いたケーキろ過法（プレコートおよびボディフィード）の回収率を評価した。試料水 500 mL に 10^4 オーダー（CFU）の大腸菌をスパイクした（n=3）。ケーキろ過法により試料水を全量ろ過した後、PBS 20 mL が入った 50-mL 容遠沈管にろ過ケーキ全量を回収した。ボルテックスミキサーを用いて 1-2 秒程度の攪拌操作を 3 回繰り返し、ろ過ケーキを PBS 中に分散させた。分散溶液と PBS を用いて調製した 10 倍希釈液 1 mL をシャーレに接種し、クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES で混釈培養を行った。HAP を添加せず同様に試験したものを比較対照とした。表 2-6 に大腸菌の回収率を示した。プレコートろ過とボディフィードろ過の回収率はそれぞれ 82%、80%であった。一方、HAP を添加していない従来のメンブレンフィルター法では回収率は 48%と低く、HAP ケーキろ過法は有意に高い回収率を示した（two-sided Student's t- test; $p = 0.002$ (precoat) and $p = 0.006$ (body feed)）。

表 2-6 HAP ケーキろ過法による大腸菌の回収率

添加大腸菌数 (CFU)	n	HAP	回収した大腸菌数 (CFU)		回収率 (%)
			Mean	Range	
1.3×10^4	3	添加 (precoat)	1.1×10^4	$1.0 \times 10^4 - 1.1 \times 10^4$	82 (0.002) ^a
1.3×10^4	3	添加 (body feed)	1.0×10^4	$9.6 \times 10^3 - 1.1 \times 10^4$	80 (0.006) ^a
1.3×10^4	3	未添加	6.3×10^3	$6.1 \times 10^3 - 6.5 \times 10^3$	48

^a HAP 未添加の回収率とスチューデントの t 検定を行った結果算出された P 値

2.3.4 HAP ケーキろ過と Colilert-18 の組み合わせ法を用いた河川水中の大腸菌測定

HAP ケーキろ過法を Colilert-18 法の前処理法として組み合わせ可能か評価するために、河川水中の大腸菌を測定し、Colilert-18 法のみで測定した結果と比較した。河川水 100 mL を HAP ケーキろ過法で濃縮し、ろ過ケーキ全量を滅菌脱イオン水 100 mL に回収した。Colilert-18 試薬を加え、支持フィルターを除いた全量を Quanti-Tray/2000 に移し培養した。河川水 100 mL を Colilert-18 法で直接培養したものを比較対照とした。図 2-4 に示したように HAP ケーキろ過と Colilert-18 の組み合わせ法（以下、HAP ケーキろ過/Colilert-18 法とする）は Colilert-18 法と極めて強い相関が認められた ($r^2 = 0.98$, $P < 0.00001$)。一方、両データから求めた回帰直線の傾きはわずかに 1.0 を下回っていたことから、HAP ケーキろ過/Colilert-18 法は Colilert-18 法と比較して大腸菌数を低く見積もる可能性があることを示唆していた。しかしながら、ほとんどのデータは $y = x$ (破線) 付近にプロットされており、HAP ケーキろ過/Colilert-18 法から得られた大腸菌濃度は Colilert-18 法のみから得られた大腸菌濃度と比較して平均 90%以上 (63%–117%) であった。

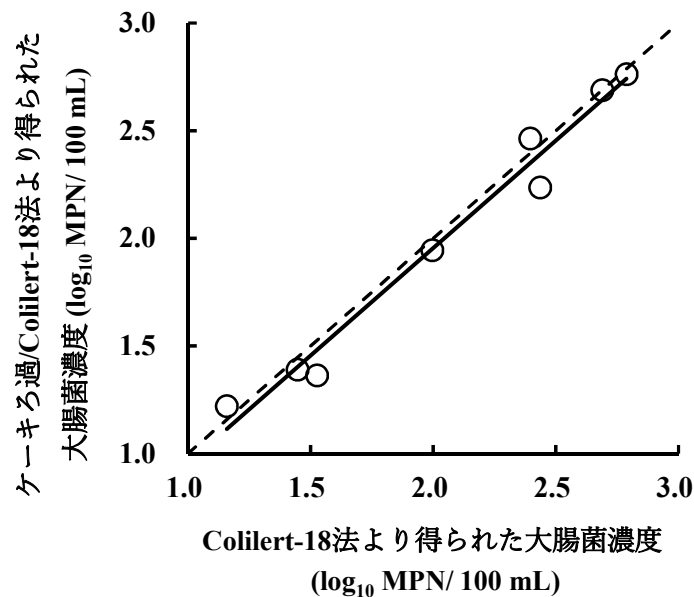


図 2-4 Colilert-18 法および HAP ケーキろ過/Colilert-18 法を用いて定量した河川水中の大腸菌濃度の単回帰分析

単回帰式 ($y = 0.9987x - 0.0425$, $r^2 = 0.98$) を実線で示した。破線は両法より得られた大腸菌濃度が等しいことを示す ($y = x$)。

2.3.5 HAP ケーキろ過/Colilert-18 法を用いた海水中の大腸菌測定

Colilert-18 法を用いて海水中の大腸菌を測定する場合、 β -D-ガラクトシダーゼや β -D-グルクロニダーゼ活性を有するビブリオ等の好塩性細菌によって偽陽性が引き起こされる (Pisciotta et al., 2002)。本項では、Colilert-18 法 (試料水の希釈あり/なし)、HAP ケーキろ過/Colilert-18 法および参照法として改良 m-TEC 法を用いて、9 つの海水試料中の大腸菌濃度を測定した (表 2-7)。

海水試料を希釈せず Colilert-18 法により直接培養した結果、9 つすべての海水試料で大腸菌陽性となり、他の測定法より得られた大腸菌濃度と比較して見かけ上著しく高い値を示した。しかし、この大腸菌陽性反応を示したウェル (YF 陽性ウェル：黄色に発色し、UV 照射下で蛍光発光したウェル) から大腸菌の 16S rRNA 遺伝子が検出され、大腸菌の存在が確認されたのは、39 ウェル中わずか 3 ウェルのみであった。このことから、ほとんどの YF 陽性ウェルは大腸菌以外の細菌の増殖により引き起こされた偽陽性 (偽陽性率=92%) (表 2-8) であると推察され、Pisciotta (2002) らの報告通り、海水試料を Colilert-18 法で試験した場合には、正確な大腸菌の定量ができないことが確認された。また、YF 陽性ウェル中の培養液を TCBS 寒天培地に一白金耳画線塗抹して培養した結果、プレート一面にビブリオ属と思われる黄色や緑色の集落の発育が認められ、グルクロニダーゼ活性を有するビブリオ属により偽陽性が発生している可能性が示唆された。

これらの偽陽性を回避するために、ISO 法 (ISO 9308-2, 2012) や製品取扱説明書では、試料水を 10 倍に希釈し、塩濃度を下げることで偽陽性を引き起こす好塩性細菌の増殖を抑制する方法が示されている。ところが、試料水を希釈して測定した場合は、試験水量は 10 mL に減少し、大腸菌が検出されたのは 9 試料中サンプル 1 とサンプル 2 のわずか 2 試料のみであった。また、2 試料で得られた大腸菌濃度は 100 mL 換算でそれぞれ 10 MPN (95%信頼区間, 1-55)、52 MPN (95%信頼区間, 23-119) であった。これらの定量値は検出限界値 (1 MPN/10 mL) 付近であり、95%信頼区間が広く、推定精度は低かった。

一方、ケーキろ過/Colilert-18 法では良好な結果が得られた。試料水 1,000 mL をケーキろ過法により濃縮後、Colilert-18 を用いて定量を行った結果、9 試料中 8 試料から大腸菌が検出され、大腸菌濃度は 100 mL 換算で 0.4-17.9 MPN であった (検出限界値=1 MPN/1,000 mL)。これらの値は、希釈法と比較して 95%信頼区間が狭く、推定精度が向

上しており、参照法とした改良 m-TEC 法により得られた大腸菌濃度と同程度であった。YF 陽性ウェル中の大腸菌の存在の有無を PCR により確認した結果、試験した 39 ウェル全てから大腸菌 16S rRNA 遺伝子が検出された（偽陽性率=0%）（表 3-7）。また、培養液を TCBS 寒天培地に一白金耳画線塗抹して培養した結果、ビブリオ属と思われる集落の発育は認められず、検出された場合もごくわずかであった。

表 2-7 Colilert-18 法（試料水の希釈あり/なし）、HAP ケーキろ過/Colilert-18 法および改良 m-TEC 法を用いた海水中の大腸菌の定量結果

海水 試料	Colilert-18 (MPN/100 mL) ^a			改良 m-TEC (CFU/100 mL)
	希釈なし	10 倍希釈	HAP ケーキろ過 ^b	
1	387.3 (245.9–567.0)	10 (1–55)	17.25 (12.30–23.55)	7
2	307.6 (195.3–471.2)	52 (23–119)	17.89 (12.40–25.78)	13
3	86.2 (63.2–115.4)	< 10 (0–37)	< 0.1 (0.00–0.37)	< 1
4	365.4 (231.9–555.5)	< 10 (0–37)	3.88 (2.61–5.47)	4
5	387.3 (245.9–567.0)	< 10 (0–37)	0.41 (0.17–0.95)	< 1
6	201.4 (135.7–284.0)	< 10 (0–37)	0.52 (0.23–1.19)	< 1
7	325.5 (206.6–498.1)	< 10 (0–37)	2.72 (1.73–4.02)	1
8	224.7 (147.0–343.5)	< 10 (0–37)	1.5 (0.87–2.40)	1
9	152.9 (112.0–206.2)	< 10 (0–37)	2.03 (1.21–3.22)	1

^a 括弧内の数字は 95%信頼区間を表す。^b HAP ケーキろ過法により試料水 1,000 mL をろ過濃縮後、Colilert-18 法を用いて大腸菌を定量した。

表 2-8 Colilert-18 法（試料水の希釈なし）および HAP ケーキろ過/Colilert-18 法より検出された YF 陽性ウェルの偽陽性率

海水 試料	Colilert-18 法（希釈なし）			HAP ケーキろ過/Colilert-18 法				
	n ^a	ウェル数 ^b		偽陽性率 (%)	n	ウェル数		偽陽性率 (%)
		陽性	陰性			陽性	陰性	
1	5	0	5		5	5	0	
2	5	2	3		5	5	0	
3	0	-	-		0	-	-	
4	5	0	5		5	5	0	
5	4	0	4		4	4	0	
6	5	0	5		5	5	0	
7	5	1	4		5	5	0	
8	5	0	5		5	5	0	
9	5	0	5		5	5	0	
total	39	3	36	92	39	39	0	0

^a 確認試験を実施した YF 陽性ウェル数。^b YF 陽性ウェル内の培養液から大腸菌 16S rRNA 遺伝子が検出された場合を陽性、検出されなかった場合を陰性（偽陽性）とした。

2.4 考察

本章では、高濁度水等の様々な水質に対応可能な細菌のろ過濃縮・定量法として、HAPを用いたケーキろ過法を開発することを目的とした。濁度 49 度および濁度 98 度の高濁度水を用いたろ過性能評価試験では、HAP ケーキろ過法は HAP 未添加の場合と比較して 3 倍程度のろ過水量の増大が認められた。このことは、メンブレンフィルター上に積層されたケーキ層は試料水中の懸濁物質と HAP が混在したものであり、HAP 未添加と比較して形成されるケーキ層の空隙率が高いことが理由であると考えられた。また、大腸菌をモデル細菌として用いた添加回収試験では、プレコートろ過およびボディフィードロ過ともに 80%以上の高い回収率を示し、HAP を添加しない通常のメンブレンフィルター法と比較して有意に高い回収率であることが確認された。一般的に通常のメンブレンフィルター法は、メンブレンフィルター内部に捕捉された細菌を回収するために十分な攪拌操作が必要となる。例えば、Smith (1993) らは様々な材質のフィルターを用いてレジオネラの回収率の比較を行っているが、攪拌ミキサーを用いて最大速度で 2 分間の攪拌操作を行っている。しかしながら、最も高い回収率であったポリカーボネートメンブレンフィルターでさえ 59%の回収率であり、本実験で使用したメンブレンフィルターと同じ材質であるセルロース混合エステルメンブレンフィルターでは 40%と十分な回収率が得られていない。一方、本研究で開発したケーキろ過法は、支持フィルター上に積層させたケーキろ過層の内部もしくは上部で細菌を捕捉しているため、支持フィルターごとケーキ層を回収でき、数回の転倒混和により容易に液中に再分散することが可能であった。このような特徴からケーキろ過法は通常のメンブレンフィルター法と比較して、低労力かつ高い回収率で細菌を回収することができると考えられた。

ケーキろ過法と MPN 法を組み合わせることのメリットの一つはろ過濃縮工程において、試料水中の溶存物質を除去できる点である。本章の後半では、ケーキろ過法のメリットを最大限発揮するために Colilert-18 培地を用いた MPN 法との組み合わせ法を考案し、海水中の大腸菌測定に適用した。Colilert-18 法を用いて海水中の大腸菌を測定した場合、好塩性細菌による疑陽性の問題が指摘されており、現行法では試料水を 10 倍希釈するしか対処法は示されていない。実際、当該調査対象水域においても Colilert-18 法のみを用いて大腸菌を定量した場合、参照法よりも 10–100 倍高い結果となった。一方、ケーキろ過/Colilert-18 法より得られた大腸菌濃度は参照法と同程度であり、確認試験を実施したすべての YF ウェルから大腸菌が検出され、疑陽性は認められなかった。海水

中の偽陽性の起因菌の大部分が増殖に Na^+ を必要とするビブリオ属である (Baudart et al., 2009; Sercu et al., 2011)。ビブリオ属は *Vibrio cholerae* と *Vibrio mimicus* 以外の種はすべて Na^+ 要求性であり (Farmer et al., 2005)、*V. cholerae* と *V. mimicus* は β -D-ガラクトシダーゼ活性は有する (Davis et al., 1981) が、 β -D-グルクロニダーゼ活性は有していない (1% positive according to the percent chart in BD BBL Crystal MIND software)。ケーキろ過/Colilert-18 法では YF ウェル中のビブリオ属の増殖が効果的に抑制されていた事実からも、試料水中の Na^+ を完全に除去できるケーキろ過法は偽陽性を抑制可能な効果的な手法であることが確認された。

Baudart (2009)らはフランスの海水浴場から分離したグルクロニダーゼ活性を有する大腸菌以外の細菌について、優勢に分離されたビブリオ等を対象に酵素活性の強さを評価している。これによると、ビブリオのグルクロニダーゼ活性は種や株により異なり、特に *V. harveyi* の一部の株は大腸菌よりも著しく活性が高いと報告している。ビブリオは海水温の変化とともにその存在量は変動することが知られており (Thompson et al., 2004; Blackwell and Oliver, 2008)、海域によって分布しているビブリオの種類や存在量は異なるものと思われる。本研究結果は、Pisciotta (2002)らの研究結果とともに、培養液中の塩類濃度を低下させることで、好塩性細菌による偽陽性を抑制できる可能性を示すものであるが、より広範な地域においてさらなる検証が必要であるかもしれない。

また、ケーキろ過法のもう一つの特筆すべき点は、 Na^+ の除去を希釈によらずに行うことができ、さらにはろ過濃縮により大容量の試料水の測定が可能になる点である。現状では、試料水を少なくとも 10 倍に希釈することにより Na^+ 濃度を低下させているが、この場合の検水量は 10 mL となり検出感度の低下が問題となる。Tiwari (2016)らは、EU 指令 (2006/7/EC) において指定されている海水中の大腸菌測定法である Miniaturized Most Probable Number (MMPN)法 (ISO 9308-3 1998) は、培養時間が長く、検水量が 10 mL 以下と少ないことから、代替法としてのコリラート法の可能性を評価している。また、European Microbiology Expert Group (2016)は、検水量の少ない MMPN 法で得られた大腸菌の定量値は、ポアソン分布の特性から低い値のばらつきが大きく、パーセントイル計算に基づいた海域の分類において、誤分類につながる可能性を指摘している。コリラート法を海水試料へ適用するための現状の希釈法は MMPN 法で挙げられている課題に同様に当てはまるものであるが、ケーキろ過法を組み合わせることで検水量の低下を回避でき、さらには本調査事例のように 100 mL 以上の試料水を濃縮することで信頼区

間の狭い、すなわち、より精度の高い定量結果を得ることができることから、上記課題を解決できる強力なツールになることが期待される。

2.5 結論

本研究では、メンブレンフィルター法のろ過性能を向上させ、MPN 法に適用可能な細菌のろ過濃縮・定量法として、HAP を用いたケーキろ過濃縮法を開発した。高濁度水を用いたろ過性能評価試験ではケーキろ過法は試料水 1 L あたり 0.5 g というわずかな量の HAP を添加するだけで、未添加と比較してろ過水量を 3 倍程度向上させることができた。大腸菌をモデル細菌として用いた添加回収率試験では 80%以上の高い回収率が認められ、通常メンブレンフィルター法と比較して菌体の回収操作が容易であった。また、ケーキろ過法を特定酵素基質液体培地である Colilert-18 を用いた MPN 法と組み合わせ、海水中の大腸菌測定に適用することで、従来指摘されてきたビブリオ属等の好塩性細菌による偽陽性が抑制され、試料水の濃縮により感度が向上し、精度の高い定量値を得ることが可能となった。以上より、本研究で開発したケーキろ過法は、高濁度水や海水などの様々な水質を有する環境水の細菌試験に広く適用可能であり、QMRA を考慮した高感度かつ高精度な細菌の測定法としての利用が期待される。

第3章

ウェルシュ菌芽胞のソーストラッキング指標 としての有効性評価

3.1 緒言

水環境中の病原微生物汚染の評価には、直接病原微生物を測定するほか、大腸菌等の糞便汚染指標細菌が用いられている（APHA -AWWA-WEF, 2012; 日本水道協会, 2011）。糞便汚染指標細菌を用いるのは、水系感染症を引き起こす病原微生物の多くが動物の腸管由来であり、糞便と共に水環境中に排出されることから、糞便汚染の有無を評価することで代替的に病原微生物の汚染の恐れを判断を行うためである。病原微生物や糞便汚染指標細菌が検出された場合、汚染源を特定して発生源対策を講じることは、水道水源の確保やレクリエーション水域における遊泳者の健康保護等の観点から重要である。しかし、多くの病原微生物はヒトやヒト以外の動物にも感染し、大腸菌等の多くの糞便汚染指標細菌は宿主特異性が低く、多様な動物の腸管内に常在していることから、汚染源推定に利用することは困難である。そのため、近年では、糞便汚染源となる宿主に特異的に存在する種やその遺伝子型を利用して、糞便汚染起源を識別する試み（微生物ソーストラッキング）が行われている。代表的な遺伝子マーカーとしてバクテロイデスを利用したもの（Okabe et al., 2007; Layton et al., 2006）や、ファージの群別を利用したもの（Haramoto et al., 2012）が知られている。しかしながら、現状においてソーストラッキングに適した指標マーカーについての知見はまだ不十分であり、新たな遺伝子マーカーの探索や有効性の検証が必要である。

そこで本章では、ウェルシュ菌芽胞に着目し、ソーストラッキング指標としての可能性について評価を行った。ウェルシュ菌は温血動物の腸管内に普遍的に存在している常在菌であり、糞便汚染指標細菌のひとつである。ウェルシュ菌は動物の腸管内で芽胞を形成し、環境中に芽胞の状態では排出されるため、様々な環境ストレスや消毒に対して高い抵抗を有している（Toranzos et al., 1997; Yates et al., 2007; Wu et al., 2011）。このことは大腸菌等の他の糞便指標細菌と大きく異なる特徴であり、水環境における保存性の高い糞便汚染指標として着目されている。そのため、わが国では水道水源の耐塩素性原虫の

汚染の恐れを判断指標として利用されている。また、浄水施設の急速砂ろ過や下水の活性汚泥処理におけるクリプトスポリジウムやジアルジアの除去性能指標としての有用性 (Payment et al., 1993; Hirata and Hashimoto, 1997) や、原虫やその他の耐塩素性病原微生物の浄水処理効率を評価する指標としての有用性が報告されている (Bisson and Cabelli, 1980; Payment et al., 1993; Ashbolt et al., 2001; Cizek et al., 2008)。

ウェルシュ菌は4種類の主要毒素 (α 、 β 、 ϵ 、 τ) の産生性からA~Eの5つの毒素型に分類される (Brooks et al., 1957)。すべてのウェルシュ菌は α 毒素を産生し、いくつかのA型ウェルシュ菌は食中毒の原因となるエンテロトキシンを産生する。

本章では、まずヒトおよび家畜糞便由来試料中のウェルシュ菌芽胞および大腸菌濃度を測定し、各種糞便由来試料におけるウェルシュ菌芽胞の分布特性を評価した。続いて、各種糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌芽胞について、マルチプレックスPCRによりウェルシュ菌の主要毒素遺伝子のスクリーニングを行い、毒素遺伝子型を特定するとともに、ソーストラッキング指標としての可能性について評価を行った。

3.2 材料と方法

3.2.1 試料採取

本研究で用いた試料の概要を表 3-1 に示した。ヒト糞便由来試料として広島県内の下水処理場 3 施設 (S, M, H) の流入下水および放流水を採取した。流入水は 1 L 採取し、放流水はあらかじめチオ硫酸ナトリウムを添加しておいた滅菌容器に 1-2 L 採取し、直ちに脱塩素処理を行った。S 下水処理場と M 下水処理場の一日当たりの処理能力はそれぞれ 5,000 m³、10,000 m³ 以下の小規模施設である。一方、H 下水処理場は都市部に位置しており、一日当たりの処理能力は 300,000 m³ 超の大規模施設である。

家畜糞便由来試料として、広島県内の牛舎 2 施設、養豚場 1 施設、養鶏場 (GP センター) 2 施設より、糞便または排水を採取した。ウシ糞便試料は堆肥舎に集積された固形糞便を採取し、ブタ糞便試料はブタが排泄したし尿混合物を水で洗い流しプールしたスラリー状の排水を 1 L 採取した。トリ糞便試料は施設側で採取された固形糞便を回収した。計 6 試料のうち、4 試料は回収日当日に施設側で採取された新鮮な糞便試料であったが、残り 2 試料は 2 日程度経過した古い糞便試料であった。さらに、より広範でサイズの大きな試料を得ることを目的として、広島県内の食肉処理場内に設置された排水処理施設の流入下水 (排水) と処理水を 1 L 採取した。サンプリングは 2 回行い、1 回目のサンプリング日の処理頭数はウシ 10 頭、ブタ 86 頭、2 回目のサンプリング日の処理頭数はウシ 125 頭、ブタ 258 頭であった。

ウシおよびトリ糞便試料は固形試料のため、PBS を用いて 10 倍希釈したものを試料原液とした。ウシ糞便試料は 1 g の糞便を遠沈管に量り取り、9 mL の PBS を加え、ミキサーで激しく攪拌したものを試料原液とした。トリ糞便試料は 10 g の糞便を滅菌フィルターバックに量り取り、PBS を 10 倍となるように加え、均一となるよう手で振り混ぜたものを試料原液とした。その他の試料は液体であったためそのまま試験に供した。

表 3-1 試料概要

採取場所		試料種別	由来	サンプリング回数
下水処理場	S	流入下水	ヒト	13
	M	流入下水		3
	H	流入下水		2
下水処理場	S	放流水	ヒト	19
	M	放流水		
	H	放流水		
牛舎	A	糞便	ウシ (乳牛)	5
	B	糞便		5
養豚場		排水 (し尿混合物)	ブタ	11
養鶏場	A	糞便	トリ (採卵鶏)	3
	B	糞便		3
食肉処理場		排水	ウシ ブタ	2
		処理水		2

3.2.2 ウェルシュ菌芽胞の定量

試料原液 10–20 mL を滅菌ねじ口試験管（硬質ガラス製）に分注し、75°C の高温水槽に 20 分間浸して加熱処理を行った。氷水に浸け速やかに冷却した後、試料原液 1 mL および PBS を用いて調製した 10 倍段階希釈液 1 mL ずつをあらかじめハンドフォード改良培地（MAST、関東化学（株））を薄く固化しておいた滅菌シャーレに接種した（ $n \geq 2$ ）。ハンドフォード改良培地を加えて十分に混釈し、培地が固化した後、さらにハンドフォード改良寒天培地を重層（三重層）した。シャーレを嫌気ジャー内にガス濃度調整剤（アネロバック・ケンキ、三菱ガス化学）とともに入れ、45°C で 24 時間嫌気培養を行った。培養後、発育してきた黒色集落をカウントし、シャーレ 1 枚当たりの平均集落数を算出し、希釈倍率を乗じて 1 mL あたりのウェルシュ菌芽胞数を求めた。

3.2.3 ウェルシュ菌主要毒素遺伝子のスクリーニング

ハンドフォード改良培地上に発育した黒色の単一集落をランダムに釣菌し、コロンビア 5% 羊血液寒天培地（日本 BD）に画線塗抹して 36°C で 24 時間嫌気培養を行った。発育した集落を Tris-EDTA 緩衝液 1 mL 中に懸濁し、DNA 抽出操作を行うまで -20°C で保管した。

菌懸濁液 5 μ L を PCR 用チューブにとり、10% TritonX（TritonX 100 を滅菌蒸留水で 10 倍希釈して調製）1 μ L、滅菌精製水 4 μ L を加え、サーマルサイクラーを用いて 95°C で 5 分間加熱処理した溶液全量を PCR 用のテンプレートとした。ウェルシュ菌主要毒素遺伝子のスクリーニングには、Van Asten（2009）らが報告した 6 つのウェルシュ菌毒素遺伝子を同時検出可能な表 3-2 に示したプライマーを用いた。反応液は表 3-3 に示した組成表に従って調製し、表 3-4 に示した条件にて PCR を行った。なお、陽性コントロールとして *Clostridium perfringens* NCTC 4964 および NCTC 8084 (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*) と下水試料から分離された *C. perfringens* (*cpa*, *cpe*, *cpb2*) を用い、陰性コントロールとして滅菌精製水を用いた。

表 3-2 ウェルシュ菌主要毒素遺伝子検出用プライマー

毒素遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'→3')	増幅サイズ (bp)
<i>cpa</i> (α 毒素)	CPAlphaF	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324
	CPAlphaR	CCTCTGATACATCGTGTAAG	
<i>cpb</i> (β 毒素)	CPBetaF3	GCGAATATGCTGAATCATCTA	195
	CPBetaR3	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	
<i>cpb2</i> (β2 毒素)	CPBeta2totalF2	AAATATGATCCTAACCAAMAA	548
	CPBeta2totalR	CCAAATACTYTAATYGATGC	
<i>etx</i> (ε 毒素)	CPEpsilonF	TGGGAACTTCGATACAAGCA	376
	CPEpsilonR2	AACTGCACTATAATTTCTTTTCC	
<i>iap</i> (ι 毒素)	CPiotaF2	AATGGTCCTTTAAATAATCC	272
	CpiotaR	TTAGCAAATGCACTCATATT	
<i>cpe</i> (エンテロトキシン)	CPEnteroF	TTCAGTTGGATTTACTTCTG	485
	CPEnteroR	TGTCCAGTAGCTGTAATTGT	

M = A or C, Y = C or T

参考文献 Van Asten et al. (2009)

表 3-3 PCR 反応液組成

試 薬	添加量
2×Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO)	25 μL
Forward primer (<i>cpb2</i>)	20 pmol
Reverse primer (<i>cpb2</i>)	20 pmol
Forward primer (<i>cpb2</i> 以外)	10 pmol
Reverse primer (<i>cpb2</i> 以外)	10 pmol
熱抽出 DNA サンプル	10 μL
滅菌精製水	up to 50 μL

表 3-4 PCR 反応条件

ステージ	サイクル数	ステップ	温度	時間
1	1	1	94°C	10 分
2	40	1	94°C	30 秒
		2	53°C	90 秒
		3	72°C	90 秒
3	1	1	72°C	7 分
		2	4°C	∞

3.2.4 大腸菌の定量

試料原液 100 mL または滅菌精製水を用いて調製した 10 倍段階希釈液 100 mL に Colilert 試薬 (IDEXX Laboratories) を加え完全に溶解させた。その後、全量を Quanti-Tray/2000 (IDEXX Laboratories) に注ぎ入れ、専用シーラーで封じ、36°C で 24 時間培養した。黄色に発色 (Y) し、365-nm UV 照射下で蛍光 (F) を発するウェルを大腸菌陽性ウェルとして計数し、専用の MPN 表または専用のソフトウェア (MPN Generator, IDEXX) から大腸菌の最確数 (MPN) を求めた。

また、H 下水処理場の一部の放流水試料は、メンブレンフィルター法により大腸菌を測定した。滅菌セルロース混合エステルメンブレンフィルター (直径 47mm, 孔径 0.45 μm, アドバンテック東洋) を吸引ろ過ユニットにセットし、1 枚当たり最大で 500 mL の試料水を吸引ろ過した (2 枚以上、合計最大ろ過量: 1L)。ろ過後、メンブレンフィルターをクロモカルトコリフォーム寒天 ES 培地 (メルクミリポア) の表面に密着させ、36°C で 24 時間培養を行った。なお、菌の遊走を抑制する為、培地に終濃度 1.5% となるように細菌用粉末寒天 (日水製薬) を追加した。培養後、フィルター上に発育した暗紫色の集落を大腸菌数として計数した。メンブレンフィルター 1 枚当たりの平均集落数を求め、ろ過水量で除することにより 1 mL あたりの大腸菌濃度を算出した。

3.3 結果

3.3.1 各種糞便由来試料におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌の濃度分布

ヒト下水試料と家畜糞便由来試料中のウェルシュ菌芽胞と大腸菌の濃度を表3-5に示した。ウェルシュ菌芽胞濃度は流入下水中で平均 4.0×10^3 CFU/mL、塩素消毒された放流水中で平均 2.0×10 CFU/mL であった。大腸菌濃度は流入下水中で平均 1.1×10^5 CFU/mL であり、ウェルシュ菌芽胞濃度よりも 10 倍以上高濃度で存在していた。一方、放流水中の大腸菌濃度の平均値は 2 CFU/mL であり、いずれもウェルシュ菌芽胞濃度よりも低い値であった。なお、流入下水 (S 浄化センターおよび M 浄化センター) の一部の試料 (n=6) において乾燥重量 1 g あたりの濃度を算出した結果、ウェルシュ菌芽胞濃度は平均で 2.5×10^7 CFU/g (標準偏差: $SD = 3.3 \times 10^7$)、大腸菌濃度は平均で 4.7×10^8 CFU/g ($SD = 3.2 \times 10^8$) であった (図 3-1)。

家畜糞便由来試料中のウェルシュ菌芽胞の平均濃度は、ウシで 2.1×10^4 CFU/g (wet)、ブタで 8.2×10^2 CFU/mL (sulury)、トリで 6.1×10^3 CFU/g (wet) であった。また、大腸菌の平均濃度はウシで 7.0×10^6 CFU/g (wet)、ブタで 5.7×10^6 CFU/mL (sulury)、トリで 3.1×10^8 CFU/g (wet) であった。なお、一部の試料において乾燥重量 1 g あたりの濃度を算出した結果、ウェルシュ菌芽胞濃度はウシで平均 4.4×10^5 CFU/g (n=5, $SD = 7.2 \times 10^5$)、ブタで平均 2.4×10^3 CFU/g (n=3, $SD = 3.1 \times 10^3$)、トリで平均 4.7×10^4 CFU/g (n=4, $SD = 6.5 \times 10^4$) であり、大腸菌濃度はウシで平均 8.6×10^7 CFU/g (n=5, $SD = 4.6 \times 10^7$)、ブタで平均 4.3×10^8 CFU/g (n=3, $SD = 3.7 \times 10^3$)、トリで平均 2.4×10^9 CFU/g (n=4, $SD = 3.9 \times 10^9$) であった (図 3-1)。

乾燥重量 1 g あたりの評価では、大腸菌濃度はヒト下水試料と家畜糞便由来試料ともに、おおよそ 10^8 オーダー前後の高い濃度であったが、ウェルシュ菌芽胞濃度は家畜糞便由来試料中で 10^3 – 10^5 CFU/g と低い値を示し、ヒト下水試料中で 10^7 CFU/g と有意に高い濃度で存在していた (two-sided Student's t-test; ウシ: $p = 0.001$, ブタ: $p = 0.0001$, トリ: $p = 0.0005$)。一方、各種糞便由来試料中には糞便以外に含まれる内容物が異なっていることから、乾燥重量 1 g あたりでの比較は、糞便中での両指標細菌の濃度分布特性を正確に評価できていない可能性も考えられる。そこで、各試料中のウェルシュ菌芽胞と大腸菌の濃度比 (EC/CP 比) を測定毎に求め、これらの濃度比の幾何平均値を求めた (表 3-5)。その結果、EC/CP 比はヒト流入下水試料で 29、ウシ糞便で 863、ブタし尿混合物で 6,824、そしてトリ糞便で 35,110 と最も高い値を示した。このことから、大腸菌

に対するウェルシュ菌芽胞の相対濃度はヒト糞便由来試料で最も高く、家畜糞便由来試料と比較して 10 倍から 1,000 倍高い傾向が認められた。なお、塩素消毒された放流水の EC/CP 比は 0.008 であり、消毒耐性の高いウェルシュ菌芽胞の濃度は大腸菌と比較して相対的に極めて高いことが確認された。また、採取後二日程度放置されていたトリ糞便試料 (n=2) では、芽胞菌濃度は平均 1.1×10^7 CFU/g (wet)、大腸菌濃度は平均 3.4×10^5 CFU/g (wet) であった。新鮮な糞便試料と比較して大腸菌濃度が 3 log 程度減少しており、EC/CP 比は 0.07 と相対濃度比が逆転していた。

表 3-5 ヒト下水試料と家畜由来糞便試料中のウェルシュ菌芽胞と大腸菌濃度

	ウェルシュ菌芽胞 (CP)		大腸菌 (EC)		EC/CP 比	n
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	幾何平均	
	流入下水*	4.0×10^3	3.7×10^3	1.1×10^5	7.9×10^4	
放流水 (塩素消毒) *	2.0×10	1.0×10	2	5	0.008	19
ウシ糞便**	2.1×10^4	4.1×10^4	7.0×10^6	6.3×10^6	863	10
ブタし尿混合物***	8.2×10^2	1.9×10^3	5.7×10^6	1.0×10^7	6,824	11
トリ糞便 (fresh) **	6.1×10^3	8.6×10^3	3.1×10^8	5.1×10^8	35,110	4

* CFU or MPN/ mL ** CFU or MPN/ g (wet) ***CFU or MPN/ mL (sulury)

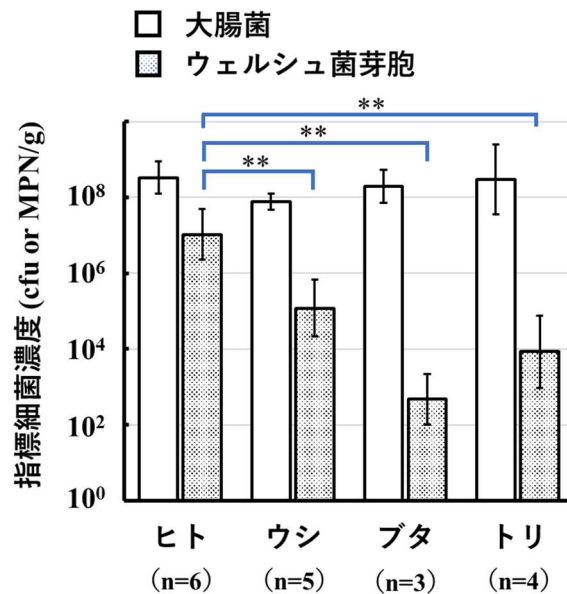


図 3-1 各種糞便試料中の大腸菌とウェルシュ菌芽胞（嫌気性芽胞菌）の分布特性
**p<0.01

3.3.2 各種糞便由来試料におけるウェルシュ菌芽胞の毒素遺伝子の保有状況

ヒト糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の主要毒素遺伝子の保有状況を確認するために、下水処理場の流入下水および放流水から分離されたウェルシュ菌芽胞（ハンドフォード改良培地中に発育した黒色集落）計 630 株を対象にマルチプレックス PCR を行った（表 3-6）。その結果、630 株中 604 株（96%）からウェルシュ菌 α 毒素遺伝子 (*cpa* 遺伝子) が検出され、このうち 603 株が A 型ウェルシュ菌に分類された（96%）。A 型ウェルシュ菌のうち、388 株は *cpa* 遺伝子と *cpb2* 遺伝子を保有しており、このうち 111 株がエンテロトキシン遺伝子 (*cpe* 遺伝子) も保有していた。残り 215 株は *cpa* 遺伝子のみを保有しており、このうち 35 株が *cpe* 遺伝子も保有していた。その他に分離された毒素型は B 型ウェルシュ菌 1 株のみであり、試験した 630 株中 26 株からはウェルシュ菌の主要毒素遺伝は検出されなかった。

一方、家畜糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌芽胞計 486 株を対象に主要毒素遺伝子のスクリーニングを行った結果、486 株中 425 株（87%）から *cpa* 遺伝子が検出され、このうち 418 株が A 型ウェルシュ菌に分類された（86%）。ブタおよびトリ糞便由来試料では *cpa* 遺伝子と *cpb2* 遺伝子を保有する A 型菌が優勢であり、ウシ糞便、食肉処理場排水および処理水では *cpa* 遺伝子のみを保有する A 型菌が優勢であった。そ

のほか、C型ウェルシュ菌がウシおよびブタ糞便由来試料から5株、E型ウェルシュ菌がブタ糞便由来試料から2株分離され、D型ウェルシュ菌は検出されなかった。なお、486株中61株からはウェルシュ菌主要毒素遺伝子は検出されず、その大部分がトリ糞便試料からの分離株であった。

ヒト糞便由来試料と家畜糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の *cpe* 遺伝子陽性率を表3-7に示した。ヒト糞便由来試料では分離した630株のうち、146株から *cpe* 遺伝子が検出された（陽性率：23%）。一方、家畜糞便由来試料では、486株のうち *cpe* 遺伝子を保有していたのは、ウシ糞便試料から分離されたわずか1株のみであった。なお、*cpe* 遺伝子の陽性率に季節的な変動は認められなかった。

表 3-6 各種糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の毒素遺伝子型

毒素型 毒素 遺伝子	A				B	C	D	E	不 検 出	<i>cpa</i> 遺伝子 陽性率(%)
	<i>cpa</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb2</i>	<i>cpa</i> + <i>cpe</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb2</i> + <i>cpe</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb</i> + <i>etx</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb</i>	<i>cpa</i> + <i>etx</i>	<i>cpa</i> + <i>iap</i> + <i>cpb2</i>		
流入下水	75	85	25	41	1	0	0	0	3	99 (227/230)
放流水	105	192	10	70	0	0	0	0	23	94 (377/400)
ヒト由来 試料合計	180	277	35	111	1	0	0	0	26	96 (604/630)
ウシ糞便	76	50	1	0	0	1	0	0	1	99 (128/129)
ブタし尿 混合物	36	82	0	0	0	4	0	2	4	97 (124/128)
トリ糞便	19	52	0	0	0	0	0	0	49	59 (71/120)
食肉処理 場排水	29	3	0	0	0	0	0	0	7	82 (32/39)
食肉処理 場処理水	59	11	0	0	0	0	0	0	0	100 (70/70)
家畜由来 試料合計	219	198	1	0	0	5	0	2	61	87 (425/486)

表 3-7 各種糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌芽胞のエンテロトキシン遺伝子陽性率

分離源	<i>cpe</i> 遺伝子陽性株数/試験菌株数	<i>cpe</i> 遺伝子陽性率(%)
下水処理場 流入下水	66/230 S 下水処理場: 54/175、M 下水処理場: 10/45、 H 下水処理場: 2/10	29
下水処理場 放流水	80/400 S 下水処理場: 29/81、M 下水処理場: 10/45、 H 下水処理場: 41/274	20
ヒト由来糞便試料合計	146/630	23
ウシ糞便	1/129	0.8
ブタし尿混合物	0/128	0
トリ糞便	0/120	0
食肉処理場 排水・ 処理水	0/109	0

3.4 考察

本章では、ウェルシュ菌芽胞のソーストラッキング指標としての有効性を評価することを目的として、ヒトおよび家畜糞便由来試料におけるウェルシュ菌芽胞の分布特性と分離されたウェルシュ菌の主要毒素遺伝子の保有状況を評価することにより宿主に特徴的な遺伝子マーカーの探索を行った。

各種糞便由来試料中のウェルシュ菌芽胞濃度は、ヒト下水試料で最も高く乾燥重量 1 g あたり平均 2.5×10^7 CFU であり、ウシ、ブタ、トリ糞便由来試料中に存在するウェルシュ菌芽胞濃度と比較して有意に高い濃度であった。このことは、ウェルシュ菌芽胞は家畜の糞便汚染を検出する指標としてよりもヒト糞便汚染を検出する指標として有利であることを示唆している。ウェルシュ菌がヒト糞便中で高濃度に存在していることは、いくつかの先行研究においても報告されている。例えば、ヒト糞便中に 10^3 – 10^7 CFU/g のウェルシュ菌が検出されたとの報告 (Geldreich, 1978) や調査対象とした健康なヒト

の 63%の糞便試料から $10^{5.5\pm 6}$ CFU/g のウェルシュ菌芽胞が検出されたとの報告がある (Carman et al., 2008)。一方、家畜糞便試料中のウェルシュ菌濃度は、例えば、ウシで 60 CFU/g (wet)、ヒツジで 70 CFU/g (wet)、ウマで <10 CFU/g (wet) との報告例 (Sorensen et al., 1989) や、ウシで 200 CFU/g (wet)、ブタで 3,980 CFU/g (wet)、ヒツジで 199,000 CFU/g (wet) との報告 (Geldreich, 1978) がある。さらに別の調査では、糞便中のウェルシュ菌芽胞濃度は、ブタで 2.9×10^5 CFU/g、トリで 4.6×10^3 CFU/g、イヌとネコからそれぞれ 3.3×10^6 CFU/g、 3.6×10^5 CFU/g であると報告されている (Cox et al., 2005)。以上のように、ウェルシュ菌やその芽胞は、一部の動物において高濃度で存在し、また、調査ごとに報告値にばらつきはあるものの、全体的な傾向として、家畜糞便試料中よりもヒト糞便試料中で高濃度に存在していると考えられる。

一方、本研究で調査対象とした糞便試料は、液状、スラリー状、固形と形状が異なり、糞便以外の物質の混入率は試料ごとに異なっていると考えられることから、それぞれのデータを直接比較することは問題があるとも言える。そのため、本研究では大腸菌とウェルシュ菌芽胞の濃度比 (EC/CP 比) による評価も行った。その結果、ウェルシュ菌芽胞はヒトと家畜糞便由来試料中では大腸菌に対する相対的な存在量が異なっていたことから、EC/CP 比は糞便汚染の汚染源推定に利用できる可能性が示唆された。すなわち、各種糞便由来試料における EC/CP 比の幾何平均値を求めるとヒトで 29 であったのに対し、家畜ではウシで 863、ブタで 6,824、トリで 35,110 となり、EC/CP 比が大きくなったことから、数値が高い場合は家畜糞便による汚染が直近で起こった可能性が高いと評価できるかもしれない。一方、EC/CP 比が小さい場合はヒト汚染の影響と評価でき、さらに 1 を下回るような場合は、ウェルシュ菌の高い生残性から汚染源から離れた遠方の汚染や古い汚染、さらには塩素消毒された放流水等の影響を検出していると評価できる可能性も考えられる。ただし、EC/CP 比による汚染源推定は、多数の汚染源が存在するような水域では適用が困難と考えられ、汚染源が少なく複雑な環境要因が大きく働かないような単純な水域においてのみ適用可能であると考えられる。

各種糞便由来試料から分離されたウェルシュ菌の主要毒素遺伝子の保有状況調査から、ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子 (*cpe* 遺伝子) はヒトソーストラッキング指標の遺伝子マーカーとして利用できる可能性が示唆された。各種糞便試料から分離されたウェルシュ菌はヒト、ウシ、ブタ、トリともに A 型菌に最も多く分類され、毒素型により宿主を識別することは困難であった。一方、*cpe* 遺伝子はヒト糞便由来試料から特

異的に検出され、家畜糞便由来試料ではウシから分離されたわずか1株のみであったことから、*cpe* 遺伝子はヒト糞便汚染の存在を示す指標となりうると考えられた。

ヒトおよび家畜糞便試料や精肉中の *cpe* 遺伝子陽性ウェルシュ菌の検出頻度に関するいくつかの調査報告によると、その検出頻度は一様ではない。例えば、健康な調理従事者の 18.4%の糞便中からエンテロトキシン陽性ウェルシュ菌が検出されたとの報告 (Heikinheimo et al., 2006) や 23 名の健康人の糞便から分離された A 型ウェルシュ菌 43 株のうち 3 株がエンテロトキシン遺伝子陽性 (陽性率: 6.9%) であったと報告されている (Carman et al., 2008)。さらに、80 名の調理従事者の糞便からエンテロトキシン陽性株が 5 株分離された (陽性率 6%) との報告 (Saito, 1990) や 1,774 の糞便試料からエンテロトキシン陽性株が 18 株分離された (陽性率 1.0%) との報告がある (門間ら, 1994)。以上のように、*cpe* 遺伝子陽性ウェルシュ菌の検出頻度は調査報告毎に異なっているが、エンテロトキシン陽性ウェルシュ菌がヒト糞便試料から検出されることは当該研究以外にも報告されており、ヒトはエンテロトキシン陽性ウェルシュ菌の重要なソースであると示唆される。

一方、いくつかの報告では、動物糞便試料からエンテロトキシン陽性ウェルシュ菌の分離頻度は低頻度であることが報告されており、本研究の結果と一致している。例えば、ウシ糞便 10 試料のうち 1 試料からエンテロトキシン遺伝子が検出され、ブタ糞便 10 試料からは検出されなかったとの報告 (Miwa et al., 1996) や、トリ糞便 76 試料、ブタ糞便 131 試料、ウシ糞便 51 試料からエンテロトキシン陽性試料は認められず、イヌ糞便 106 試料中 2 試料のみ陽性であったとの報告がある (Saito, 1990)。また、Siqueira (2012) らはトリ、ウシ、ブタの糞便から分離された 73 株からエンテロトキシン陽性株は検出されなかったと報告している。

また、市販食肉やその他の食品サンプルを対象とした調査においてもエンテロトキシンの検出は低頻度であることが報告されている。例えば、牛肉、鶏肉、豚肉の計 200 試料中 142 試料からウェルシュ菌が分離されたが、エンテロトキシン陽性株は牛肉の 2 試料と鶏肉の 1 試料のみであったとの報告 (Miki et al., 2008) や、食品 887 サンプルのうち 278 サンプルからウェルシュ菌が検出され、エンテロトキシン陽性はわずか 10 サンプルであった (Wen et al., 2004) との報告がある。一方、例外として DNA ハイブリダイゼーションを用いた評価において、ウマから 14%、ウシから 22%、家禽から 10% のエンテロトキシンが検出されたとの報告がある (Tschirdewahn et al., 1991)。

以上のように、先行研究においても、エンテロトキシン陽性ウェルシュ菌はヒト糞便試料中に偏って分布している傾向が確認されることから、*cpe* 遺伝子はヒトソーストラッキング指標として有効であると示唆され、ノロウイルス、*Cryptosporidium hominis* 等のヒトに特異的に感染する病原微生物の汚染評価に利用できる可能性が考えられる。一方、一部では家畜試料から *cpe* 遺伝子が検出された報告があること、エンテロトキシン陽性ウェルシュ菌の保菌者は、地理、年齢、食生活、健康状態等により偏っている可能性も考えられることから、広範かつより大きなサンプルサイズを対象としたさらなる調査が必要であると思われる。

3.5 結論

本研究では、ヒトおよび家畜糞便由来試料中のウェルシュ菌芽胞濃度を測定し、分離したウェルシュ菌について主要毒素遺伝子の保有状況を調査した。ウェルシュ菌芽胞の平均濃度はヒト流入下水中で 2.5×10^7 CFU/g であり、家畜糞便由来試料では、ウシで 4.4×10^5 CFU/g、ブタで 2.4×10^3 CFU/g、トリで 4.7×10^4 CFU/g であった。大腸菌はヒトおよび家畜糞便由来試料中に同程度の濃度で存在していたが、ウェルシュ菌芽胞は家畜よりもヒト糞便由来試料中で有意に高い濃度で存在していた。分離株全 1,116 株中 1,029 株（ヒト由来試料 630 株から 604 株、家畜由来糞便試料 486 株から 425 株）からウェルシュ菌 α 毒素遺伝子が検出され、そのほとんどが A 型菌に分類され、宿主間において毒素型に顕著な差は認められなかった。一方、*cpe* 遺伝子はヒト糞便由来株から 23% の割合で特異的に検出され（630 株中 146 株）、家畜糞便由来株では 486 株中わずか 1 株しか検出されなかったことから、ヒトソーストラッキング指標としての可能性が示唆された。

第4章

ウェルシュ菌芽胞の海域におけるノロウイルス指標 としての有効性評価

4.1 緒言

都市沿岸海域は海水浴などのレクリエーションやカキ等の魚介類の養殖に利用されており、これらの水域の微生物リスクを適切に評価することは、遊泳者の健康保護、魚介類の衛生管理の観点から重要である。都市沿岸海域において、管理すべき重要な微生物リスクのひとつにノロウイルスリスクが挙げられる。ノロウイルスは冬季に代表する食中毒原因微生物であり、汚染された二枚貝の生食や保菌者によって汚染された食品の摂取により食中毒が引き起こされる。特に、カキは生食されることから微生物リスクが高く、養殖水域のノロウイルス汚染評価を行い、管理していくことは極めて重要であると思われる。また、ノロウイルスは下水中では季節による濃度変動はあるものの、年間を通じて検出されることが報告されており（三浦ら, 2016）、合流式下水道からの雨天時越流水による水域の微生物汚染の実態（Katayama et al., 2004; Rodríguez et al., 2012）を考慮すると、ノロウイルスは海水浴などの親水活動においても重要な微生物リスクのひとつであると考えられる。

わが国では海域の微生物学的水質は糞便汚染指標細菌を用いた評価が行われている。例えば、海水浴場の水浴判定基準として糞便性大腸菌群、生食用カキの養殖海域の衛生基準や海域の環境基準として大腸菌群が定められている。しかしながら、これらの指標細菌は病原細菌に対する指標としては有効であるものの、消毒耐性や生残性の異なる腸管系ウイルスとは相関が必ずしも認められない（Griffin et al., 2003; Jiang et al., 2001）。特に大腸菌は塩分存在下では生残性が低下することが報告されており（Anderson et al., 1979）、現行の大腸菌群や糞便性大腸菌群を用いた評価では海域におけるノロウイルスなどの腸管系ウイルス汚染を適切に評価できているとは考えにくい。

そこで本研究では、芽胞を形成することから保存性の高い糞便汚染指標細菌であるウェルシュ菌芽胞に着目し、海域における糞便汚染指標、特にノロウイルス指標としての有効性について評価を行った。初めに、沿岸海水試料を用いてウェルシュ菌芽胞および

大腸菌濃度を測定し、海域におけるウェルシュ菌芽胞の分布特性の評価を行った。次に、ノロウイルスの測定を行い、ウェルシュ菌芽胞等との相関を評価した。さらに、全調査期間を通じて、海域から分離されたウェルシュ菌の主要毒素遺伝子の保有状況を調査し、前章においてヒトソーストラッキング指標としての可能性が示唆された *cpe* 遺伝子について、各測定地点における陽性率を評価することにより、ヒトソーストラッキング指標としての有効性について評価を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 試料水の採取

2013年7月から2014年6月にかけて広島湾海域の11の定点にて月1回の頻度で海水を採取した(図4-1)。St.1は公共用水域の補助地点、St.2~St.8は環境基準点、St.9~St.11は独自に設定した地点である。試料水は2L容滅菌済ポリプロピレン製容器に採取し、10°C以下に保冷して12時間以内に指標細菌(ウェルシュ菌芽胞および大腸菌)の定量を行った。

また、2014年11月から2015年2月にかけて広島湾海域の5定点(St.1, St.3, St.4, St.6およびSt.11)にてノロウイルスと指標微生物(ウェルシュ菌芽胞、大腸菌およびトウガラシ微斑ウイルス)の定量を行った。ウェルシュ菌芽胞と大腸菌定量用に滅菌済ポリプロピレン製容器に海水を2L採取し、10°C以下に保冷して12時間以内に試験に供した。ノロウイルスとトウガラシ微斑ウイルスは、船上で陰電荷膜に最大100Lの海水試料を通水後、10°C以下に保冷して12時間以内に次工程の試験に移行した。

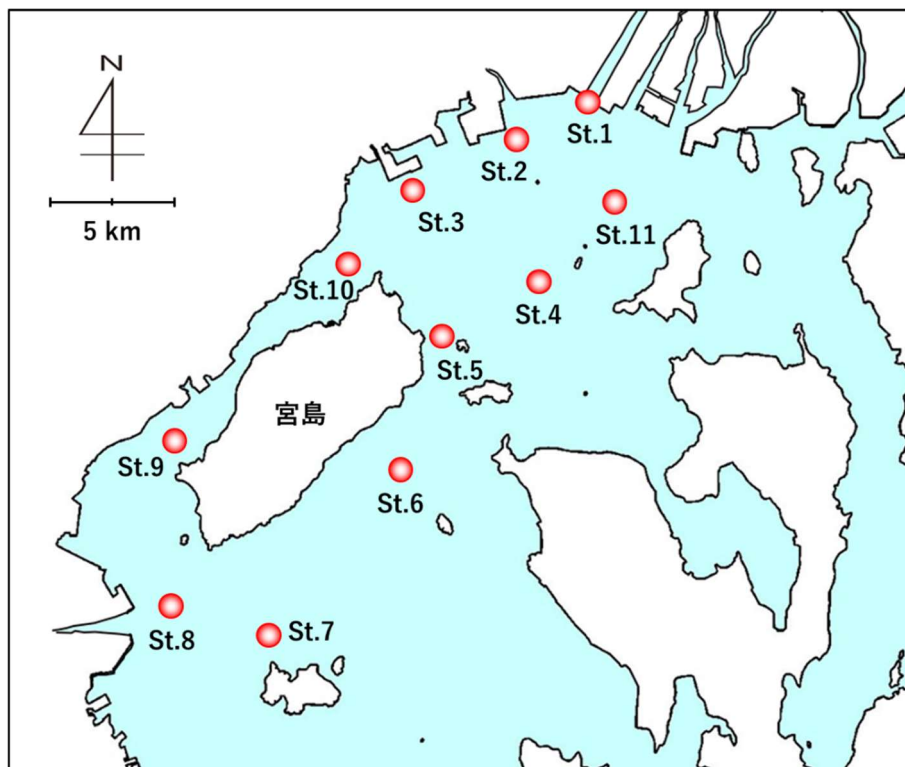


図4-1 採水地点(広島湾海域)

4.2.2 ウェルシュ菌芽胞の定量

ウェルシュ菌芽胞の定量方法の概略図を図 4-2 に示した。滅菌セルロース混合エステルメンブレンフィルター（直径 47mm, 孔径 0.45 μm , アドバンテック東洋）を吸引ろ過ユニットにセットし、予想される濃度に応じて試料水 10–500 mL を吸引ろ過した（2 枚以上、合計最大ろ過量: 1 L）。ろ過後、メンブレンフィルターをあらかじめ滅菌 PBS を入れておいた滅菌ねじ口試験管（硬質ガラス製）に投入し、75°C で 20 分間加熱処理を行った。氷水に浸け速やかに冷却した後、メンブレンフィルターを取り出し、ハンドフォード改良平板培地の表面に密着させ、フィルター全面を覆うように培地を重層した。ねじ口試験管内に残った PBS は新たな滅菌セルロース混合エステルメンブレンフィルターに吸引ろ過し、別のハンドフォード改良培地上に載せ、培地を重層した。培地が固化した後、再度ハンドフォード改良培地を重層（三重層）し、嫌気ジャー内にガス濃度調整剤（アネロパック・ケンキ）とともに入れ、45°C で 24 時間嫌気培養を行った。培養後、発育してきた黑色集落をウェルシュ菌芽胞とてカウントした。すべてのシャーレの合計黑色集落数を合計検水量で除することにより 1 mL あたりの嫌気性芽胞菌数を求めた。

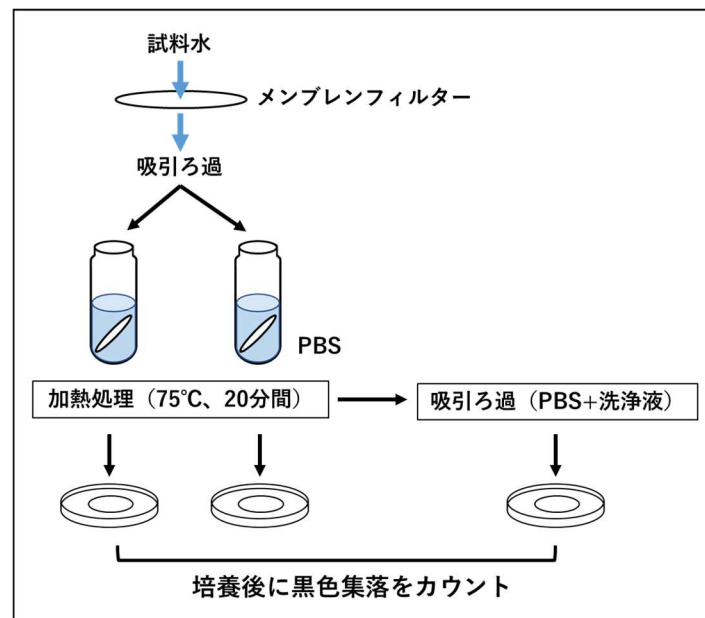


図 4-2 ウェルシュ菌芽胞の定量方法

4.2.3 ウェルシュ菌主要毒素遺伝子のスクリーニング

第4章 4.2.3に記載した方法と同様に実施した。ただし、DNA抽出とPCR反応はすべて4.2.3に記載した液量の半量で実施した。

4.2.4 大腸菌の定量

第4章 4.2.4に記載したメンブレンフィルター法と同様に実施した。

4.2.5 ウイルスの定量

海水中のウイルス濃度は一般的に低濃度であり、試料水の濃縮操作が必要である。本研究では、Katayama (2002) らが開発した陰電荷膜法を用いて船上で試料水のろ過濃縮を行った（一次濃縮）。その後、試験室にサンプルを持ち帰り、限外ろ過膜を用いて二次濃縮を行った後、逆転写反応、リアルタイム PCR により、ノロウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルスの定量を行った。なお、核酸抽出操作以降のプロセスコントロールとして二次濃縮液にマウスノロウイルスを添加した。滅菌精製水に同量のマウスノロウイルスを添加して得られた定量値を基準として、各試料におけるマウスノロウイルスの回収率を求め、PCR 阻害の影響を評価した。以下にウイルスの定量方法の概略図を示した（図4-3）。

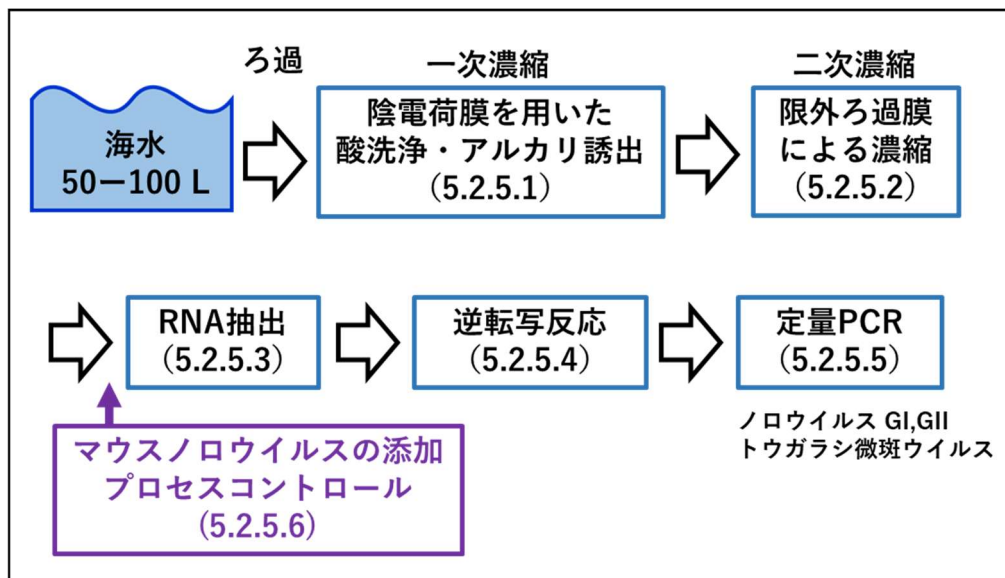


図 4-3 ウイルスの定量方法の概略図

4.2.5.1 試料水の一次濃縮

必要な器具と試薬

- ・カートリッジ型陰電荷膜：Opticap XL2 milligard (KW06A02HH3, プリーツ状フィルター, 孔径 0.5 μm , ろ過面積 0.1 m^2 , メルクミリポア)
あらかじめカートリッジの両端に高圧蒸気滅菌した酸化物処理シリコンチューブを連結した。試料水取り込み側のチューブの先端にステンレス製ホースニップルを重りとして取り付け、送液側に PP 製チューブコネクタを取り付けた。
- ・酸化物処理シリコンチューブ (コールパーマー)
- ・PP 製チューブコネクタ (アラム)
- ・流量計 (OF10ZZWN, 愛知時計電機)
- ・循環アスピレーター
- ・流量計、アスピレーター連結用シリコンチューブ
- ・酸洗浄液 (用時調製)：精製水 2 L に 100 mM H_2SO_4 (pH1.0) 10 mL を添加した溶液
- ・アルカリ誘出液 (用時調製)：精製水 200 mL に 100 mM NaOH (pH12.8) 2 mL を添加した溶液 (pH10.8 以上)
- ・100×TE buffer：10×TE Powder (和光純薬工業) を精製水 100 mL に溶解した溶液
- ・マイティーバック (No.360, 360 mL, マルエム)：使用直前に 100×TE buffer 2 mL と 100 mM H_2SO_4 (pH1.0) を 1 mL ずつ添加した。

方法

図 4-4 に示したように、試料水取り込み側から、カートリッジ型陰電荷膜、流量計、アスピレーターの順にシリコンチューブを用いて接続した。カートリッジ型陰電荷膜の試料水取り込み側に連結したシリコンチューブの先端を水面に沈め、吸引ろ過を行い、表層水中のウイルスを陰電荷膜に吸着させた。ろ過の際、定期的に 1 分間当たりの積算流量を確認し、1 L/min 以下となった場合は膜が閉塞したと判断してろ過を中止した。ろ過水量は予想されるウイルス量に応じて 50–100 L とし、流量計に表示された積算流量により確認した。ろ過が完了した後、カートリッジ型陰電荷膜と両端に取り付けたシリコンチューブを連結したまま回収し、10°C 以下に保冷して試験室に持ち帰った。

カートリッジの試料取り込み側に連結したシリコンチューブの先に滅菌済み PP ロートを連結し、カートリッジの出口側に連結したシリコンチューブをアスピレーターに接

続した。出口側に連結したシリコンチューブを折り曲げ、流路を閉じた状態にして、酸洗浄液を注ぎ入れ、ハウジングおよびロート内に酸洗浄液を満たした。この時、ハウジング内が水密となるよう注意した。その後、出口側の折り曲げたシリコンチューブをもとに戻して一気に通水し、酸洗浄液全量を通水させた。カートリッジを様々な方向に傾け、ハウジング内に残った酸洗浄液を完全に通水させた。

続けて、精製水 1 L を用いて酸洗浄と同様の手順で洗浄操作を行った後、アルカリ溶液を用いてウイルスを回収した。カートリッジの出口側に取り付けたシリコンチューブとアスピレーターの間にはベルジャーを取り付け、ベルジャー内に誘出液を回収するためのマイティーバックをセットした。出口側に連結したシリコンチューブを折り曲げ、流路を閉じた状態にし、アルカリ誘出液 200 mL を注ぎ入れ、ハウジングおよびロート内をアルカリ誘出液で満たした。水密状態を 3 分間ほど保持した後、一気に通水させ、マイティーバックにアルカリ誘出液を回収した。マイティーバック内にはあらかじめ酸と緩衝液を添加しているため、pH は中性付近で安定となる。以上より得られた溶液を一次濃縮液とし、二次濃縮操作に移行するまで冷蔵庫で保管した。

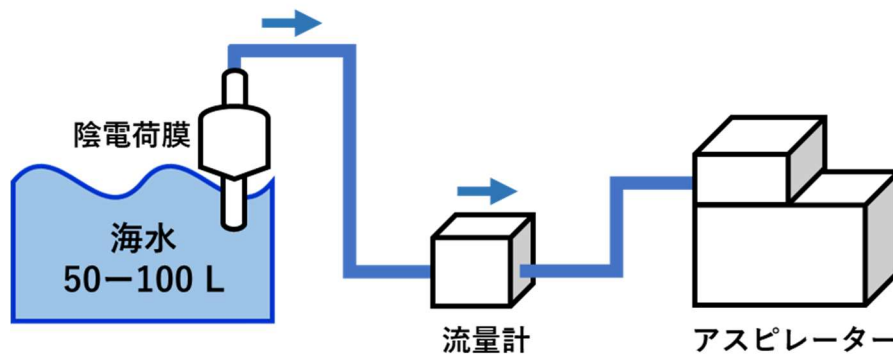


図 4-4 カートリッジ型陰電荷膜を用いたろ過装置の概略図

4.2.5.2 二次濃縮

遠心式限外ろ過フィルター（アミコンウルトラ-15、分画分子量 30 kDa、メルクミリポア）を用いて一次濃縮液（200 mL）の濃縮を行った。1 サンプルにつき 4 本の限外ろ過フィルターを使用した。フィルターデバイス内に 15 mL ずつ一次濃縮液を添加し、スイング式遠心ローターにセットして 4,000×g で 5 分間遠心することにより、200 μL 程度の濃縮液を得た。ろ液を捨て、一次濃縮液 15 mL を新たに追加し、同様に遠心を行った。

一次濃縮液全量をろ過するまで上記操作を繰り返し行った。全量ろ過した後、マイティーマック内に滅菌精製水 20 mL を加え洗浄し、洗浄液全量を遠心ろ過した。ろ過速度は徐々に低下していくため遠心時間はろ過速度に合わせて 15 分程度まで延長した。最終的に得られた 4 本のフィルターデバイス内のウイルス濃縮液は滅菌済 2 mL 容スクリーキャップチューブに全量回収した。濃縮液回収後のチューブ重量からチューブの風袋重量を差し引き、二次濃縮液量を算出した。なお、二次濃縮液は次工程である RNA 抽出操作に移行するまで、-80°C で凍結保存した。

4.2.5.3 核酸抽出

測定対象としたノロウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルスは RNA ウイルスである。そのため、QIAamp viral RNA mini kit (キアゲン)を用いて以下の手順に従って二次濃縮液から RNA を抽出した。なお、本操作以降のプロセスコントロールとしてマウスノロウイルスを各サンプルに添加し、並行して精製水にマウスノロウイルスを添加し同様に試験したものを比較基準とした。

- 1) Buffer AVL を 2 mL 容スクリーキャップチューブに 560 μ L ずつ分注し、マウスノロウイルスを 1 μ L ずつ添加した。
- 2) 二次濃縮液 140 μ L または滅菌精製水で 10 倍希釈した二次濃縮液 140 μ L を上記の溶解液に加え、15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温に 10 分間インキュベートした。なお、二次濃縮液の代わりに精製水を 140 μ L 加え、同様に処理したものを比較基準用サンプルとした。
- 3) チューブをスピンドウンした後、99.5%エタノール (試薬特級、和光純薬工業) を 560 μ L 添加し、15 秒間ボルテックスミキサーで十分に攪拌した。
- 4) チューブをスピンドウンした後、試料を 630 μ L ずつカラムに添加し、6,000 \times g で 1 分間遠心して、核酸をシリカメンブレンに結合させた。
- 5) カラムを別のコレクションチューブに移し、残りの試料全量をカラムに添加し、同条件で遠心した。
- 6) カラムを別のコレクションチューブに移し、Buffer AW1 を 500 μ L 添加し、同条件で遠心した (シリカメンブレンの洗浄)。
- 7) カラムを別のコレクションチューブに移し、Buffer AW2 を 500 μ L 添加し、20,000 \times g

- で3分間遠心した（シリカメンブレンの洗浄）。
- 8) さらにカラムを別のコレクションチューブに移し、20,000×gで1分間遠心し、カラム内に残存した Buffer を完全に除去した。
 - 9) カラムを 1.5 mL 容マイクロ遠心チューブに移し、Buffer AVE を 60 μL ずつ添加して室温で1分間インキュベートした後、6,000×gで1分間遠心して得られた溶液を RNA 抽出液とした。
 - 10) 直ちに次工程の逆転写反応を行わない場合は、-80°C で凍結保存した。

4.2.5.4 逆転写反応

RNA 抽出サンプルを用いて逆転写反応により cDNA を合成した。本研究では、ノロウイルスとトウガラシ微斑ウイルス、さらにはプロセスコントロールとして添加したマウスノロウイルスを測定対象ウイルスとしているため、種特異的プライマーではなく、まとめて逆転写反応が可能なランダムプライマーを用いた。反応液は表 4-1 に示した組成表に従って調製し、表 4-2 に示した条件にて反応を行った。

表 4-1 逆転写反応液組成

試 薬	添加量 (μL)
10× RT Buffer*	5
25× dNTP Mix (100 mM)*	2
10× RT Random Primers*	5
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/μL)*	2.5
RNase Inhibitor (20 U/μL)**	2.5
抽出 RNA サンプル	25
滅菌精製水	8
total	50

* High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

** RNase Inhibitor (20U/μL) (Applied Biosystems)

表 4-2 逆転写反応条件

ステージ	サイクル数	ステップ	温度	時間
1	1	1	25°C	10 分
2	1	1	37°C	120 分
3	1	1	85°C	5 分
4	1	1	4°C	∞

4.2.5.5 リアルタイム PCR 法を用いたウイルス濃度の定量

逆転写反応により合成された各種ウイルスの cDNA 濃度を TaqMan リアルタイム PCR 法により定量した。本研究では、ノロウイルス GI (Norovirus GI: NoV GI)、ノロウイルス GII (Norovirus GII: NoV GII)、トウガラシ微斑ウイルス (Pepper mild mottle virus: PMMoV) およびマウスノロウイルス (Murine norovirus: MNV) を測定対象とした。測定対象とする各ウイルスの標的領域を含む標準プラスミド DNA 溶液の段階希釈系列を試料と同時に反応させ、得られた Ct 値から検量線を作成し、各試料における一反応チューブ当たりの平均ウイルス濃度を算出した (2 ウェルの平均)。これを二次濃縮液量、希釈倍率、各反応工程における試料液量の割合から逆算して、試料水 1 L あたりのウイルス濃度を算出した。

PCR 反応液は表 4-3 に示した組成表に従って調製し、表 4-4 に示した条件にて反応を行った。また、使用したプライマーおよびプローブ配列を測定対象ウイルス毎に表 4-5 ~ 表 4-7 に示した。以下に操作手順を記した。

- 1) 表 4-3 に示した反応液を必要量調製し、ウェル (MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip, Applied Biosystems) に 20 μL ずつ分注した。
- 2) 各試料につき 2 ウェルずつ使用し、cDNA を 5 μL ずつ添加した。
- 3) 滅菌精製水で 10 倍段階希釈して 10^5 – 10^0 copies/5 μL の濃度に調整した標準 DNA 溶液を 5 μL ずつウェルに添加した。標準 DNA の測定は希釈系列ごとに 3 ウェルずつ使用した。
- 4) 陰性対象として、滅菌精製水を 2 ウェルに 5 μL ずつ添加した。
- 5) 全てのウェルに蓋 (MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip, Applied Biosystems) を取り付け、軽く遠心した。

- 6) 反応チューブを反応プレートにセットし、7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて表 4-4 に示した反応条件で PCR を行った。
- 7) 反応終了後、標準 DNA 濃度の常用対数値と、これに相対する Ct 値より作成された検量線をもとに、各試料の Ct 値から反応チューブ当たりのウイルス濃度を求めた。各試料とも 2 ウェルずつで評価したため、2 ウェルの平均値をウイルス濃度とした。一方のウェルが不検出 (Undetermined) の場合は 0 copy として平均値を算出した。

表 4-3 リアルタイム PCR 反応液組成

試 薬	添加量
TaqMan™ Gene Expression Master Mix (2×)	12.5 μL
Forward primer	10 pmol ^a
Reverse primer	10 pmol
TaqMan probe	表 4-5~表 4-7 参照 ^b
cDNA サンプル (RT 反応液)	5 μL
滅菌精製水	up to 25 μL

^a ノロウイルス GII は Forward primer を 2 種類使用した

^b 表 4-5~表 4-7 に示した終濃度となるようプローブを添加した

表 4-4 リアルタイム PCR 反応条件

ウイルス	ステージ	サイクル数	ステップ	温度	時間
NoV GI/GII, MNV	1	1	1	95°C	10 分
	2	50	1	95°C	15 秒
			2	56°C	60 秒
PMMoV	1	1	1	95°C	10 分
	2	50	1	95°C	15 秒
			2	60°C	60 秒

表 4-5 ノロウイルス測定用プライマーおよびプローブと反応液中の濃度

プライマー ・プローブ	塩基配列 (5'→3') ^a	終濃度 (μ M)	増幅 サイズ (bp)	参考文献
NoV GI 測定用				
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	0.4	85	Kageyama et al., 2003
COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	0.4		
RING1-TP(a)	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA- TAMRA	0.3		
RING1-TP(b)	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA - TAMRA	0.1		
NoV GII 測定用 ^b				
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	0.4	85	Kageyama et al., 2003
ALPF	TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG	0.4	98	西尾, 2003
COF2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	0.4		Kageyama et al., 2003
RING2AL- TP	FAM-TGGGAGGGSGATCGCRATCT- TAMRA	0.2		西尾, 2003

^a B (T, C, G); N (A, T, C, G); R (A, G); S (C, G); Y (T, C).

FAM, 6-carboxy-fluorescein reporter dye; TAMRA, carboxy tetramethyl-rhodamine.

^b NoV GII はフォーワードプライマーを2種類使用した

表 4-6 トウガラシ微斑ウイルス測定用プライマーおよびプローブと反応液中の濃度

プライマー ・プローブ	塩基配列 (5'→3') ^a	終濃度 (μ M)	増幅 サイズ (bp)	参考文献
PMMV-FP1	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTGA	0.4	68	Zhang et al., 2006
PMMV-RP1	TTGTTCGGTTGCAATGCAAGT	0.4		
PMMV-Probe1	FAM-CCTACCGAAGCAAATG-NFQ- MGB	0.2		

^a FAM, 6-carboxy-fluorescein reporter dye; FNQ, Non Fluorescent Quencher; MGB, Minor Grove Binder.

表 4-7 マウスノロウイルス測定用プライマーおよびプローブと反応液中の濃度

プライマー ・プローブ	塩基配列 (5'→3') ^a	終濃度 (μ M)	増幅 サイズ (bp)	参考文献
MKMNVF	CGGTGAAGTGCTTCTGAGGTT	0.4	60	北島ら, 2008
MKMNVR	GCAGCGTCAGTGCTGTCAA	0.4		
MKMNVP	FAM-CGAACCTACATGCGTCAG- NFQ-MGB	0.3		

^a FAM, 6-carboxy-fluorescein reporter dye; FNQ, Non Fluorescent Quencher; MGB, Minor Groove Binder.

4.2.5.6 マウスノロウイルスの回収率評価

マウスノロウイルスをプロセスコントロールとして用いた検出阻害の評価では、精製水に添加したサンプルのマウスノロウイルスの定量値を基準として、各試料のマウスノロウイルスの定量値から回収率を算出した。回収率が10%以下であった試料では、核酸抽出以降の操作で検出阻害があったと判断した。なお、マウスノロウイルスの回収率をもとに、ノロウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルスの濃度補正は行わなかった。

4.3 結果

4.3.1 海域におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌の濃度分布

表 4-8 に 2013 年 7 月から 2014 年 6 月にかけて調査した各測定地点におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌の陽性率を示した。ウェルシュ菌芽胞は St. 7 および St. 9 を除く全ての測定地点において 100%の陽性率であり、St. 7 および St. 9 においてもそれぞれ 67%、92%と高い陽性率を示した。一方、大腸菌はすべての測定試料で陽性となったのは太田川放水路の河口域に位置する St. 1 のみであった。沿岸から離れた測定地点になるほど、陽性率が低下する傾向が認められた。

各測定地点における陽性試料から求めた両指標細菌の対数平均値を表 4-9 に示した。ウェルシュ菌芽胞および大腸菌の平均濃度はともに St. 1 で最も高く、平均値はウェルシュ菌芽胞で $10^{2.24\pm 0.51}$ CFU/L、大腸菌で $10^{2.00\pm 0.67}$ CFU/L であった。大腸菌濃度は、St. 1 以外の地点では、二級河川の河口域に位置する St. 2 と天満川や太田川等の河口域に近い St. 11 で、それぞれ $10^{1.28\pm 0.34}$ CFU/L、 $10^{1.50\pm 0.90}$ CFU/L の濃度を示したが、残りの 8 地点ではすべて 10 CFU/L 未満の低濃度であった。一方、ウェルシュ菌芽胞は、 10^2 CFU/L 以上の濃度であったのは St. 1 のみであったが、St. 6 を除くその他の 9 地点全てにおいて平均濃度は 10^1 – 10^2 CFU/L であり、当該調査対象水域において大腸菌よりも高濃度で存在していることが確認された。

次に、ウェルシュ菌芽胞 (CP) と大腸菌 (EC) の濃度比 (CP/EC) を求め、地点毎に比較を行った (表 4-9)。その結果、全地点とも 1 以上の値を示し、海域ではウェルシュ菌芽胞は大腸菌よりも相対的に高い濃度で存在することが確認された。CP/EC 比は太田川河口に位置する St. 1 で最も低く 1.7 の値を示した。St. 1 から沖合 5 km 程度離れた St. 4 では 14.6 を示し、St. 1 と比較して大腸菌に対するウェルシュ菌芽胞の相対濃度が大きくなっており、ウェルシュ菌芽胞と大腸菌の生残性の差が要因であると推察された。一方、さらに沖合地点である St. 5、St. 6 および St. 7 では St. 1 より値が大きいものの、St. 4 と比較して小さな値を示した。これは、St. 5 から St. 7 では大腸菌の不検出が増えるとともに、嫌気性芽胞菌濃度も低下するためであると考えられた。本評価では大腸菌が不検出の場合に定量下限値である“1”を用いたが、沖合地点であるほど、大腸菌濃度は低濃度であると考えられる。仮に、定量下限値の 1/10 の値である“0.1”を代入した場合、St. 5 で 20.9、St. 6 で 21.4、St. 7 で 36.8 を示し、CP/EC 比は大きく増大した。なお、St. 3 は 13.3 と高い CP/EC 比を示した。当該調査地点は下水処理場の放流口の近傍に位

置しており、下水放流水の影響を強く受けていると考えられた。

表 4-8 各測定地点におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌の陽性率

地点 番号	サンプリング 回数	ウェルシュ菌芽胞		大腸菌	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
1	12	12	100	12	100
2	12	12	100	11	92
3	12	12	100	8	67
4	12	12	100	9	75
5	12	12	100	6	50
6	12	12	100	3	25
7	12	8	67	3	25
8	11	11	100	6	55
9	12	11	92	6	50
10	12	12	100	7	58
11	6	6	100	5	83

表 4-9 各測定地点におけるウェルシュ菌芽胞および大腸菌濃度

地点 番号	ウェルシュ菌芽胞			大腸菌			CP/EC 比 ^a
	対数平均	対数 標準偏差	n	対数平均	対数 標準偏差	n	
1	2.24	0.51	12	2.00	0.67	12	1.7
2	1.95	0.44	12	1.28	0.34	11	6.0
3	1.50	0.36	12	0.56	0.37	8	13.3
4	1.43	0.47	12	0.35	0.47	9	14.6
5	1.11	0.79	12	0.58	0.79	6	6.6
6	0.64	0.70	12	0.26	0.45	3	3.8
7	1.15	0.83	8	0.55	0.13	3	8.7
8	1.12	0.89	11	0.45	0.59	6	7.6
9	1.08	0.61	11	0.50	0.40	6	6.5
10	1.25	0.47	12	0.16	0.32	7	14.2
11	2.07	0.75	6	1.50	0.90	5	6.6

^a 対数変換前の各測定値について、ウェルシュ菌芽胞（CP）を分子、大腸菌（EC）を分母にとり、試料毎の CP/EC 比を求め、地点ごとに比の幾何平均値を求めた。なお、大腸菌のみが不検出の場合は、定量下限値である 1 を用いて評価した。

4.3.2 マウスノロウイルスの回収率

通常、水環境中に存在するウイルスは低濃度であるため、試料水の濃縮操作が必要となる。しかし、濃縮工程においてフミン質等の PCR 阻害の原因となる物質も濃縮されるため、プロセスコントロールを用いた反応阻害の評価が必要となる。本研究では、核酸抽出前の二次濃縮液にマウスノロウイルスをプロセスコントロールとして添加し、精製水に同様に添加したものを基準として回収率を算出した。

表 4-10 に 11 月および 12 月の調査試料におけるマウスノロウイルスの回収率を示した。二次濃縮液を希釈せず測定した場合のマウスノロウイルスの回収率は <0.0002%–0.15% と極めて低く、検出阻害が認められた。一方、二次濃縮液を滅菌精製水で 10 倍に希釈した場合、マウスノロウイルスの回収率は大きく改善された。そのため、本研究ではすべての試料について二次濃縮液を 10 倍希釈して試験を行うこととした。なお、回収率が 10% 以下の場合は、検出阻害が認められたと判断した。

表 4-10 マウスノロウイルスの回収率

サンプル番号	二次濃縮液の希釈倍率	
	× 1	×10
1 (11 月調査 St. 1)	0.09%	75.2%
2 (11 月調査 St. 4)	0.15%	82.0%
3 (11 月調査 St. 6)	0.60%	49.3%
4 (12 月調査 St. 3)	0.14%	21.9%
5 (12 月調査 St. 6)	0.004%	8.9%
6 (12 月調査 St. 12)	<0.002%	7.0%

4.3.3 ノロウイルスおよび指標微生物の定量結果と相関

広島湾海域および広島湾西部海域の計 5 地点 (St. 1, St. 3, St. 4, St. 6 および St. 11) において、ノロウイルスおよび指標微生物の測定を行った。指標微生物はウェルシュ菌芽胞、大腸菌およびトウガラシ微斑ウイルスを測定対象とした。各測定地点における指標微生物とノロウイルス濃度を表 4-11、測定地点別の濃度推移を図 4-5 に示した。ノロウイルス GI は 17 試料中、2015 年 1 月 6 日に St. 1 から採水した 1 試料のみから検出された ($10^{3.62}$ copies/L)。ノロウイルス GII は 17 試料中 12 試料で陽性となり、2014 年 12 月に St. 3 から 1L あたり $10^{1.79}$ copies 検出され、2015 年 1 月 6 日以降はすべてのサンプリング地点から検出された。2015 年 1 月 6 日の St. 1 の試料で $10^{4.33}$ copies/L と最も高い濃度を示し、その後は $10^{2.04}$ – $10^{3.49}$ copies/L の濃度で検出された。トウガラシ微斑ウイルスおよびウェルシュ菌芽胞はすべての試料から検出され、それぞれ $10^{2.80}$ – $10^{4.87}$ copies/L、 $10^{0.00}$ – $10^{3.23}$ CFU/L の濃度で存在していた。特に、トウガラシ微斑ウイルスは全調査期間を通じてノロウイルス GII よりも高い濃度で存在していた。大腸菌は 25 試料中 17 試料から検出され、 $10^{0.00}$ – $10^{3.85}$ copies/L の範囲で検出された。2015 年 1 月 6 日の St. 6、1 月 20 日の St. 3 および St. 6、2 月の St. 6 の 5 試料については、ノロウイルス GII が検出されていたが大腸菌は検出されなかった。

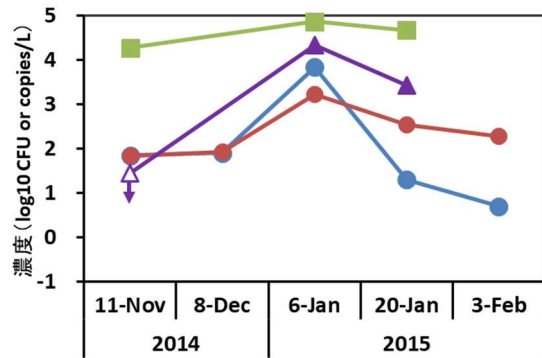
次に、ノロウイルス GII 濃度と各指標微生物濃度の相関を評価した (図 4-6)。横軸に各指標微生物濃度をプロットし、縦軸にノロウイルス GII 濃度をプロットした散布図を作成し相関係数を求めた。その結果、トウガラシ微斑ウイルス濃度とノロウイルス GII 濃度の相関係数は 0.845 ($P < 0.00001$) と最も高い値を示した。次いで、ウェルシュ菌

芽胞濃度との相関係数は 0.760 ($P < 0.001$)、大腸菌濃度との相関係数は 0.698 ($P < 0.01$) となり、共に高い値を示した。

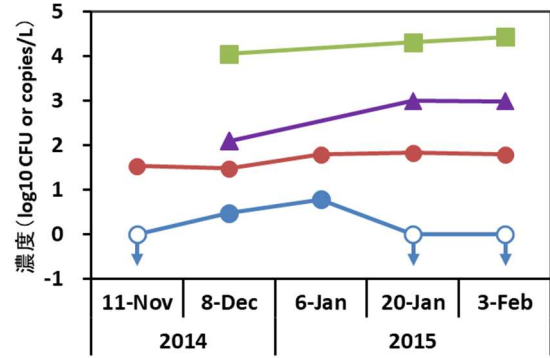
表 4-11 海水中のノロウイルス GI, GII および指標微生物濃度

地点名	n	ウェルシュ菌	大腸菌	n	PMMoV	NoV GI	NoV GII
		芽胞			(log ₁₀ copies/L)		
		(log ₁₀ CFU/L)					
St. 1	5	1.84–3.23	0.70–3.85	3	4.27–4.87	ND–3.62	ND–4.33
St. 3	5	1.48–1.83	ND–0.78	3	4.05–4.43	ND	1.79–2.99
St. 4	5	1.45–1.98	0.00–0.90	3	3.81–4.48	ND	ND–3.49
St. 6	5	0.00–1.32	ND	3	2.80–4.19	ND	ND–2.92
St. 11	5	1.43–2.15	0.00–1.30	5	3.43–4.48	ND	ND–3.29
陽性数		25/25	17/25		17/17	1/17	12/17

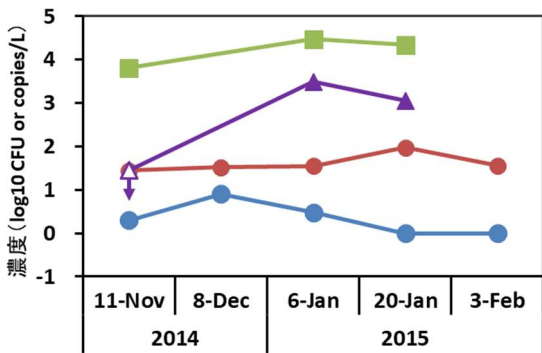
St. 1



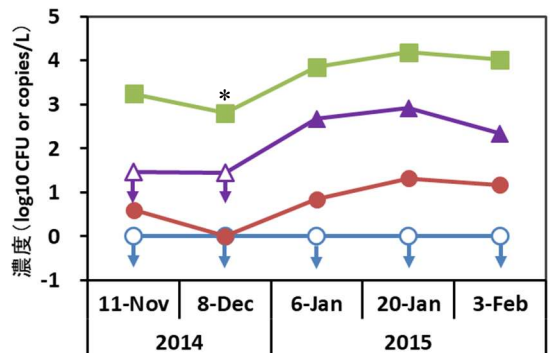
St. 3



St. 4



St. 6



St. 12

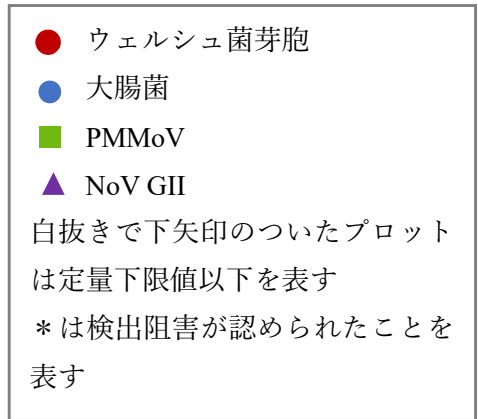
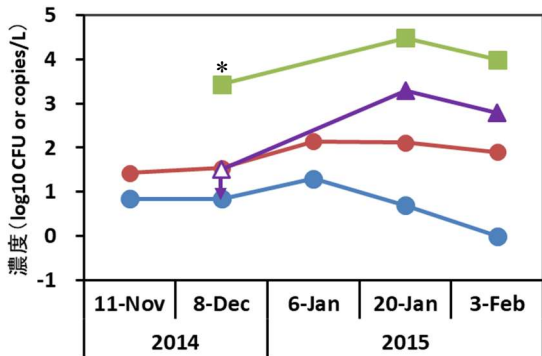
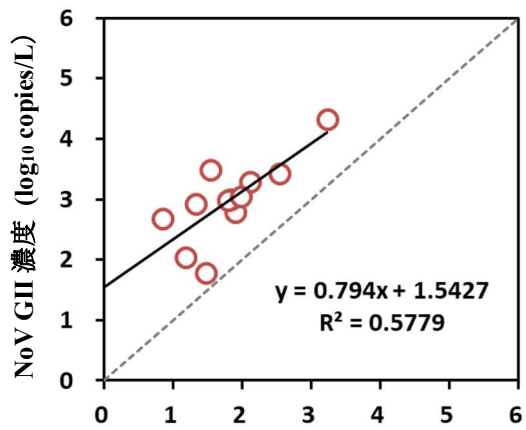
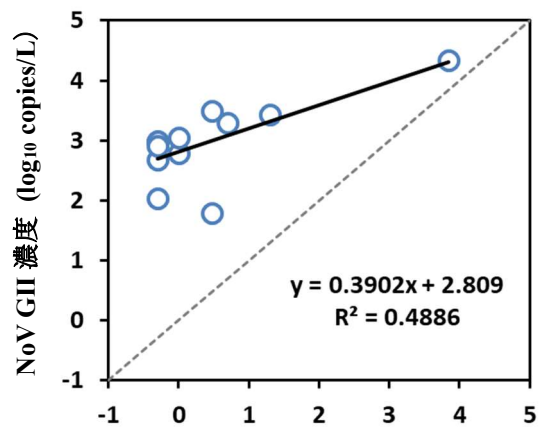


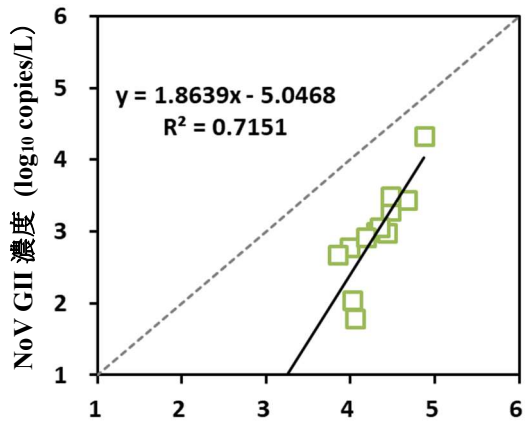
図 4-5 各測定地点におけるノロウイルス GII および指標微生物濃度の推移



ウェルシュ菌芽胞濃度 (\log_{10} CFU/L)



大腸菌濃度 (\log_{10} CFU/L)



PMMoV 濃度 (\log_{10} copies/L)

図 4-6 ノロウイルス GII 濃度と指標微生物濃度との相関

4.3.4 海水試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の毒素遺伝子の保有状況

海水試料から分離されたウェルシュ菌芽胞について、マルチプレックス PCR を用いて主要毒素遺伝子の保有状況を評価した（表 4-12）。その結果、合計 1,320 株中 1,233 株（93%）から *cpa* 遺伝子が検出され、このうち 1,229 株が A 型ウェルシュ菌に分類された（93%）。A 型ウェルシュ菌は各測定地点において 86%から 100%の範囲で検出され、すべての測定地点において最も多く検出された。A 型ウェルシュ菌のうち、711 株は *cpa* 遺伝子と *cpb2* 遺伝子を保有しており、このうち 80 株 *cpe* 遺伝子も保有していた。残り 518 株は *cpa* 遺伝子のみを保有しており、このうち 17 株が *cpe* 遺伝子も保有していた。その他の毒素型は、St. 1 より D 型が 3 株、E 型が 1 株分離され、B 型と C 型菌は分離されなかった。

海水試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の *cpe* 遺伝子の陽性率を表 4-13 に示した。合計 1,320 株中 97 株のウェルシュ菌が *cpe* 遺伝子を保有していた（7%）。地点別には St. 1 と St. 6 において陽性率が 4%と最も低く、St. 3 および St. 9 で 11%と最も高い陽性率を示し、地点間で最大 2.8 倍程度の差が認められた。

表 4-12 海水試料から分離されたウェルシュ菌芽胞の毒素遺伝子の保有状況

毒素型 毒素 遺伝子	A			B	C	D	E	不 検 出	<i>cpa</i> 遺伝子 陽性率(%)	
	<i>cpa</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb2</i>	<i>cpa</i> + <i>cpe</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb2</i> + <i>cpe</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb</i> + <i>etx</i>	<i>cpa</i> + <i>cpb</i>	<i>cpa</i> + <i>etx</i>			<i>cpa</i> + <i>iap</i> + <i>cpb2</i>
St. 1	62	121	2	7	0	0	3	1	12	94 (196/208)
St. 2	42	37	0	6	0	0	0	0	8	91 (85/93)
St. 3	87	78	2	20	0	0	0	0	19	91 (187/206)
St. 4	71	107	4	9	0	0	0	0	11	95 (191/202)
St. 5	34	27	2	2	0	0	0	0	8	89 (65/73)
St. 6	42	40	0	4	0	0	0	0	7	92 (86/93)
St. 7	21	22	2	2	0	0	0	0	0	100 (47/47)
St. 8	23	32	1	3	0	0	0	0	4	94 (59/63)
St. 9	26	29	0	8	0	0	0	0	10	86 (63/73)
St. 10	34	42	1	6	0	0	0	0	1	99 (83/84)
St. 11	59	96	3	13	0	0	0	0	7	96 (171/178)
海水試料 合計	501	631	17	80	0	0	3	1	87	93 (1233/1320)

表 4-13 海水試料から分離されたウェルシュ菌芽胞のエンテロトキシン遺伝子陽性率

地点名	<i>cpe</i> 遺伝子陽性株数/試験菌株数	<i>cpe</i> 遺伝子陽性率(%)
St. 1	9/208	4
St. 2	6/93	6
St. 3	22/206	11
St. 4	13/202	6
St. 5	4/73	5
St. 6	4/93	4
St. 7	4/47	9
St. 8	4/63	6
St. 9	8/73	11
St. 10	7/84	8
St. 11	16/178	9
海水試料合計	97/1320	7

4.4 考察

本章では、ウェルシュ菌芽胞の海域における糞便汚染指標、特にノロウイルス指標としての可能性について評価を行った。当該調査対象地点は、広島湾海域と広島湾西部海域にあたり、広島湾海域には一級河川である太田川（流域面積：約 1,400 km²）が流入し、広島湾西部海域には一級河川である小瀬川（流域面積：約 300 km²）が流入している。また、沿岸海域には複数の中規模から大規模下水処理場が点在している。

河口域を除くすべての調査地点においてウェルシュ菌芽胞は大腸菌よりも陽性率が高く、高濃度に存在しており、ウェルシュ菌芽胞は大腸菌よりも海水中で長期間生残していることが示唆された。ウェルシュ菌芽胞が水環境中でその他の指標細菌と比較して長く生残することは先行研究においていくつか報告されている。例えば、糞便汚染源に最も近い場所では大腸菌濃度はウェルシュ菌濃度より高いが、糞便汚染源から離れるにつれ大腸菌濃度は急速に減少したとの報告(Bisson and Cabelli, 1980)や、小川において、

ウェルシュ菌芽胞の濃度は糞便連鎖球菌や大腸菌群よりもヒト糞便汚染の影響をよりの確に示したとの報告がある (Sorensen et al., 1989)。また、ウェルシュ菌は海水や淡水の堆積物において、大腸菌、糞便連鎖球菌、大腸菌群よりも豊富に存在していると報告されている (Davies et al., 1995)。本調査研究結果は、ウェルシュ菌芽胞は海域においても生残性の高い糞便汚染指標であることを示しており、大腸菌では検出できない糞便汚染を検出可能な保存性の高い指標としての利用が期待された。

ノロウイルス GII 濃度と各指標微生物濃度の相関係数は、トウガラシ微斑ウイルスが 0.84 と最も高く、次いでウェルシュ菌芽胞、大腸菌の順にそれぞれ 0.76、0.69 と共に高い値を示した。このことから、本調査対象水域では、評価したすべての指標微生物がノロウイルスの挙動指標敏江有効である可能性が示唆された。しかしながら、定性的な評価では、大腸菌はノロウイルスが検出された 12 試料中 5 試料で検出されておらず、ノロウイルス指標としては不十分であることが確認された。一方、ウェルシュ菌芽胞はノロウイルス濃度よりも低濃度ではあるが、大腸菌よりも高濃度に存在し、ノロウイルスが検出された試料すべてからウェルシュ菌芽胞も検出されたことからノロウイルス指標としての有効性が示唆された。トウガラシ微斑ウイルスはノロウイルスよりも 10 倍程度高濃度に存在しており、相関も最も高かったことから、ノロウイルス指標として有効であると思われる。ウェルシュ菌芽胞はトウガラシ微斑ウイルスと比較して低濃度であり、低濃度のノロウイルス汚染を検出できない可能性も考えられるが、培養法であるため試料水からの分離定量が極めて容易であることは大きなメリットである。

海水試料から分離されたウェルシュ菌について *cpe* 遺伝子の保有状況を調査した結果、すべての調査地点から *cpe* 遺伝子陽性ウェルシュ菌が検出され、その陽性率は全地点平均で 7%であった。このことから、調査対象としたすべての地点においてヒト糞便汚染が到達していることが示唆された。*cpe* 遺伝子陽性ウェルシュ菌はヒト糞便由来試料から 23%の割合で分離されるとの前章の結果を考慮すると、海域では半分以上が動物由来の糞便汚染であると推察することができる。各測定地点における *cpe* 遺伝子の陽性率は 4-11%と幅があり、地点により陽性率に差が認められた。St. 3 および St. 9 では *cpe* 遺伝子陽性率が 11%と最も高い値を示したが、両地点の近傍には下水処理施設が存在しており、ヒト糞便汚染の影響を強く受けるためであると考えられた。一方、太田川河口域に位置する St.1 では *cpe* 遺伝子陽性率が 4%と最も低い値であったが、太田川上流域には家畜関連施設が 40 数施設存在しており、相当量の家畜糞便が混入している可能性

が推察された。以上のことから、*cpe* 遺伝子はヒトソーストラッキング指標として有効であることが示唆された。

4.5 結論

本研究では、ウェルシュ菌芽胞の海域における糞便汚染指標、特にノロウイルス指標としての有効性について評価を行った。ウェルシュ菌芽胞は河口域を除く全ての調査地点において大腸菌よりも常に高い濃度で存在しており、海域における保存性の高い糞便汚染指標細菌であることが確認された。また、ウェルシュ菌芽胞は大腸菌では検出できないノロウイルス汚染を検出することが可能であり、ノロウイルス濃度と高い相関が認められたことからノロウイルスの挙動指標としての可能性も示唆された。

cpe 遺伝子陽性率はヒト下水処理施設の放流口の近傍に位置する地点において高い値を示したことから、*cpe* 遺伝子はヒトソーストラッキング指標として有効であることが示唆された。

第5章

総括

本研究では、高濁度試料水に適応可能な細菌のケーキろ過濃縮法の開発(第2章)と、ウェルシュ菌芽胞のソーストラッキング指標(第3章)、海域のノロウイルス指標(第4章)としての有効性について評価を行った。以下、第2章並びに第3章および第4章について得られた知見をまとめ、展望を記し、総括とする。

5.1 ハイドロキシアパタイト粉体を用いた細菌のケーキろ過濃縮法の開発

本研究では、HAPをろ過助剤として用いた細菌のケーキろ過濃縮法を開発した。図5-1にHAPケーキろ過濃縮法の特徴と展望をまとめた。本法は0.5gのHAPを試料水に添加するか、もしくはあらかじめフィルター上部にHAPからなるケーキ層を形成させてろ過する手法である。通常のメンブレンフィルター法にHAPを加えるだけの簡便な操作であるが、メンブレンフィルター法と比較して、ろ過性能が向上し、捕捉した細菌を簡便かつ高い収率で回収できる特徴を有していた。さらに、本法は特定酵素基質培地を用いたMPN法に組み合わせ可能であり、MPN法の高感度化、高精度化を実現した。特に、海水中の大腸菌測定に適用した場合、Colilert-18原法と比較して、感度が100倍にまで高まり、特異性を著しく向上させることができた。このことは、一般に最大で100mLの評価が限界であったMPN法に濃縮法を付与できたこと、ろ過工程において試料水中の溶存塩類を除去でき、その結果、偽陽性を引き起こす好塩性細菌の増殖を抑制できたことが理由であった。

本研究ではモデル細菌として糞便汚染指標細菌である大腸菌を用いて評価を行ったが、本法は腸球菌や本論文の後半で議論したウェルシュ菌芽胞等のその他の糞便汚染指標細菌の測定にも適用可能であると考えられる。また、病原細菌の定量培養への応用も考えられ、これまでの定性的な評価から定量的な評価への利用が期待される。

序論で述べたように、水道原水やレクリエーション用水等の微生物学的安全性を評価するためには、水利用形態別、水域別に水中の病原細菌や指標細菌濃度をモニタリングし、得られたデータに基づいてQMRAによりリスク評価を行うことが重要となる。本法は、高濁度試料水を含む様々な水質の細菌試験に広く適用可能であると考えられ、

QMRA に利用可能な高感度かつ高精度な細菌の定量法として有益なツールとなると期待される。

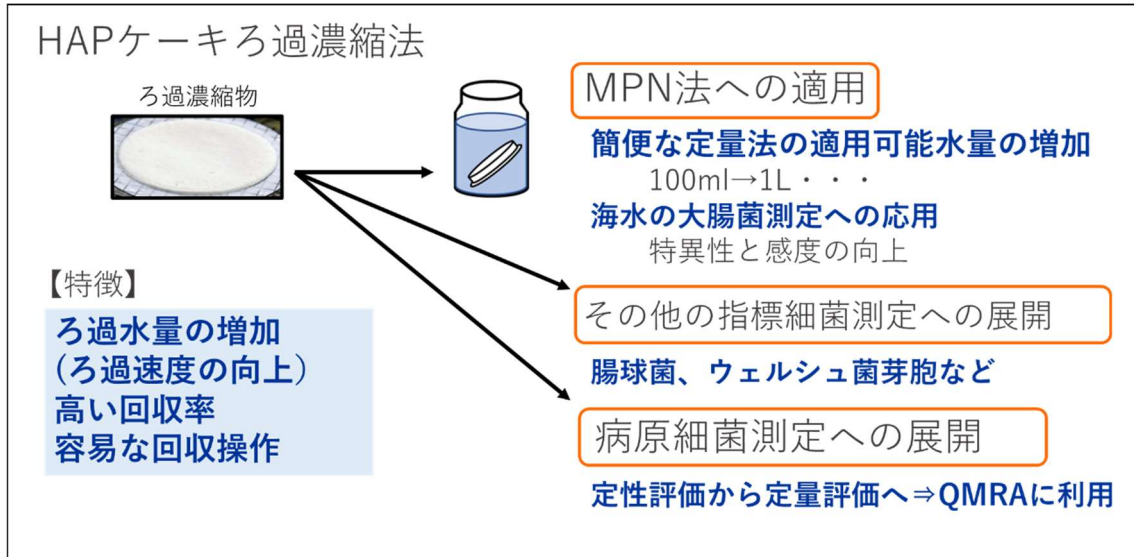


図 5-1 HAP ケーキろ過濃縮法の特徴と今後の展開

5.2 ウェルシュ菌芽胞のヒトソーストラッキング指標、海域のノロウイルス指標としての有効性

本研究では、ウェルシュ菌芽胞の「ヒトソーストラッキング指標」と「海域のノロウイルス指標」の二つの新たな指標機能を見出した。ヒトおよび家畜糞便由来試料の調査より、*cpe* 遺伝子を保有するウェルシュ菌はヒト糞便由来試料中に特異的に分布（陽性率：23%）しており、*cpe* 遺伝子はヒトソーストラッキング指標となる可能性が示唆された。また、沿岸海域の調査より、ウェルシュ菌芽胞は海域において保存性の高い糞便汚染指標として、大腸菌では検出できない糞便汚染の検出が可能であり、ノロウイルスと高い相関が認められたことから濃度指標となりうる可能性が示唆された。

ウェルシュ菌芽胞は現在、クリプトスポリジウム等の耐塩素性原虫の汚染の恐れ判断指標として利用されているが、本研究で新たに見出した「ヒトソーストラッキング指標」、「海域のノロウイルス指標」としての指標機能を加えることで、水域の微生物リスク評価に広く利用可能な汎用性の高い糞便汚染指標細菌としての役割が期待される。

最後に本研究で見出したウェルシュ菌芽胞の二つの指標機能を利用したノロウイルスリスクを考慮した生食用カキ養殖海域の評価について提案する。現在、カキの生食用海域の基準は大腸菌群により定められているが、指標性や生残性の低さからウイルスリスクを適切に評価できているとは考えにくい。そのため、生残性の高いウェルシュ菌芽胞を合わせて測定することにより、ノロウイルス汚染を考慮したリスク評価が可能になると考えられる。さらに、ノロウイルスはヒト由来であるため、ウェルシュ菌のもう一つの指標機能であるヒトソーストラッキング指標としての機能を合わせて利用することが重要になると思われる。すなわち、検出されたウェルシュ菌芽胞濃度に *cpe* 遺伝子の陽性率を掛け合わせることで、ヒト由来のウェルシュ菌芽胞濃度が評価でき、養殖水域ごとにヒト糞便汚染の強度を評価することができると考えられる。以上のことから、ウェルシュ菌芽胞をカキ養殖水域の評価に利用することでノロウイルスリスクを考慮した生食用カキ養殖海域の指定が行え、適切な衛生管理に役立てることができるものと期待される。

- 参考文献 -

- [1] APHA–AWWA–WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, D.C.
- [2] Anderson, I.C., Rhodes, M., Kator, H., 1979. Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 1147–1152.
- [3] Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality. *Water Quality-Guidelines, Standards and Health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease* (Fewtrell, L., Bartram, J., eds). IWA Publishing, London. 289–316.
- [4] Baggi, F., Demarta, A., Peduzzi, R., 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res. Microbiol.* 152, 743–751.
- [5] Baudart, J., Servais, P., De Paoli, H., Henry A., Lebaron, P., 2009. Rapid enumeration of *Escherichia coli* in marine bathing waters: potential interference of nontarget bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 107, 2054–2062.
- [6] Bisson, J.W., Cabelli, V.J., 1980. *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52, 241–248.
- [7] Black, R.E., Morris, S.S., Bryce, J., 2003. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet.* 361, 2226–34.
- [8] Blackwell, K.D., Oliver, J.D., 2008. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholera*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. *J. Microbiol.* 46, 146–153.
- [9] Brezenski, F.T., Russomanno, R., 1969. The detection and use of salmonellae in studying polluted tidal estuaries. *J. Water Pollut. Control Fed.* 41, 725–737.
- [10] Brooks, M. E., M. Sterne, and G. H. Warrack. 1957. A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol. Bacteriol.* 74, 185–195.

- [11] Carman, R.J., Sayeed, S., Li, J., Genheimer, C.W., Hiltonsmith, M.F., Wilkins, T.D., McClane, B.A., 2008. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaerobe*. 14, 102–108.
- [12] Chan, Y.Y., Killick, E.G., 1995. The effect of salinity, light and temperature in a disposal environment on the recovery of *Escherichia coli* following exposure to ultraviolet-radiation. *Water Res.* 29, 1373–1377.
- [13] Chandran, A., Hatha, A.A.M., 2005. Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in a tropical estuary. *Water Res.* 39, 1397–1403.
- [14] Cheng, C.M., Boyle, W.C., Goepfert, J.M., 1971. Rapid quantitative method for *Salmonella* detection in polluted waters. 21, 662–667.
- [15] Cizek, A.R., Characklis, G.W., Krometis, L.A., Hayes, J.A., Simmons, O.D., Di Lonardo, S., Alderisio, K.A., Sobsey, M.D., 2008. Comparing the partitioning behavior of *Giardia* and *Cryptosporidium* with that of indicator organisms in stormwater runoff. *Water Res.* 42, 4421–4438.
- [16] Covert, T.C., Shadix, L.C., Rice E.W., Haines, J.R., Freyberg, R.W., 1989. Evaluation of the auto analysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2443–2447.
- [17] Cox, P., Griffith, M., Angles, M., Deere, D., Ferguson, C., 2005. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5929–5934.
- [18] Davies, C.M., Apte, S.C., Peterson, S.M., 1995. Possible interference of lactose-fermenting marine vibrios in coliform beta-D-galactosidase assays. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 387–393.
- [19] Davies, C.M., Long, J.A., Donald, M., Ashbolt, N.J., 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1888–1896.
- [20] Davis B.R., Fanning, G.R., Madden, J.M., Steigerwalt, A.G., Bradford, H.B., Jr., Smith, H.L. Jr., Brenner, D.J., 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholera* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* 14, 631–639.

- [21] D'Antonio, R.G., Winn, R.E., Taylor, J.P., Gustafson, T. L., Current, W. L., Rhodes, M. M., Gary, Jr. G. W., Zajac, R. A., 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*. 103, 886–888.
- [22] European Microbiology Expert Group, 2016. Current state of enumeration methods for *Escherichia coli* in regulatory bathing water quality monitoring in Europe. EMEG Outline Paper, European microbiology bathing water sub-expert group, 30th September 2016. Available from: http://circabc.europa.eu/sd/a/9710f5b5-c1fa-47a0-962c-5e2150677f3e/EMEG%20BW%20E%20%20coli%20Outline%20Paper_30-09-2016.pdf
- [23] Farmer, J.J., III, Janda, J.M., Brenner F.W., Cameron D.N., and Birkhed K.M.. 2005. *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}, p. 494–546. In Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., and Garrity G.M. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 2, part B. Springer, New York, NY.
- [24] Feng, P.C.S., Hartman, P.A., 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1320–1329.
- [25] Fong, T.T., Phanikumar, M.S., Xagorarakis, I., Rose, J.B., 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a michigan river. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 715–723.
- [26] GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 909–948.
- [27] Gavini, F., Leclerc, H., Mossel, D.A.A., 1985. Enterobacteriaceae of the “coliform group” in drinking water: Identification and worldwide distribution. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 312–318.
- [28] Geldreich, EE., 1978. Bacterial population and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In: *Indicators of Viruses in Water and Food* (Berg, G., ed.) Ann Arbor Science Publishers, Michigan, U.S. 51–97.
- [29] Grabow, W. O., Taylor, M. B. and de Villiers, J. C., 2001. New methods for the detection of viruses: Call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci. Technol.* 43, 1–8.

- [30] Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB. 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 129–143.
- [31] Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 1999. Quantitative microbial risk assessment. John Wiley & Sons, Inc. (金子光美監訳, 2001. 水の微生物リスクとその評価. 技報堂出版)
- [32] Haramoto, E., Otagiri, M., Morita, H. and Kitajima, M. 2012. Genogroup distribution of F-specific coliphages in wastewater and river water in the Kofu basin in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 367–373.
- [33] Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M., Furumai, H., 2014. Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Sci Total Environ.* 468–469, 757–63.
- [34] Heikinheimo, A., Lindström, M., Granum, PE., Korkeala, H., 2006. Humans as reservoir for enterotoxin gene – carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1724–1729.
- [35] Hirata, T., Hashimoto, A., 1997. A field survey on occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in sewage treatment plants. International symposium on waterborne *Cryptosporidium*. 183–194.
- [36] IDEXX Laboratories, 2013. Product Approvals and Acceptances Worldwide brochure. IDEXX Laboratories, Carlsbad, CA.
- [37] ISO 9308-2, 2012. Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part2: Most probable number method. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- [38] ISO 9308-3, 1998. Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and wastewater. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- [39] Jiang, S., Noble, R., Chu, W., 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 179–184.

- [40] Kageyama, T, Kojima, S, Shinohara, M, Uchida, K, Fukushi, S, Hoshino, FB, Takeda, N, Katayama, K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41, 1548–1557.
- [41] Katayama, H., A. Shimasaki, and S. Ohgaki. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033–1039.
- [42] Katayama, H., Okuma, K., Furumai, H., Ohgaki, S., 2004. Series of surveys for enteric viruses and indicator organisms in Tokyo Bay after an event of combined sewer overflow. *Water Sci. Technol.* 50, 259–262.
- [43] Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M., Akiba, M., 2012. One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. *Water Res.* 46, 2905–2910.
- [44] Koster, W., Egli, T., Ashbolt, N., Botzenhart, K., Burlion, N., Endo, T., Grimont, P., Guillot, E., Mabilat, C., Newport, L., Niemi, M., Payment, P., Prescott, A., Renaud, P. and Rust, A., 2003. ‘Analytical methods for microbiological water quality testing’, in *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*, OECD/WHO Drinking Water Quality Series. IWA Publishing, London. 237–295.
- [45] Landre, J.P.B., Gavriel, A.A., Lamb, A.J., 1998. False-positive coliform reaction mediated by *Aeromonas* in the Colilert defined substrate technology system. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 352–354.
- [46] Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., Sayler, G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4214–4224.
- [47] Leclerc, H., Mossel, D.A.A., Edberg, S.C., Struijk, C.B., 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 201–234.
- [48] MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E.,

- Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Engl. J. Med.* 331, 161–167.
- [49] Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I. A., Jurzik, L., Wingender, J., 2018. Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Sci. Total Environ.* 626, 650–659.
- [50] Madoux-Humery, A.S., Dorner, S., Sauve, S., Aboulfadl, K., Galarneau, M., Servais, P., Prevost, M., 2016. The effects of combined sewer overflow events on riverine sources of drinking water. *Water Res.* 92, 218–227.
- [51] Mclellan, S.L., Daniels, A.D., Salmore, A.K., 2001. Clonal populations of thermotolerant Enterobacteriaceae in recreational water and their potential interference with fecal *Escherichia coli* counts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4934–4938.
- [52] Miki, Y., Miyamoto, K., Kaneko-Hirano, I., Fujiuchi, K., Akimoto, S., 2008. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5366–5372.
- [53] Miwa, N., Nishina, T., Kubo, S., Fujikura, K., 1996. Nested polymerase chain reaction for detection of low levels of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in animal feces and meat. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 197–203.
- [54] National Research Council, 2004. Indicators for Waterborne Pathogens. The National Academies Press, Washington, D.C.
- [55] Noble, R.T., and Fuhrman, J.A., 2001. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia* 460:175–184.
- [56] Oguma, K., Izaki, K., Katayama, H., 2013. Effects of salinity on photoreaction of *Escherichia coli* after UV disinfection. *J. Water Health* 11, 457–464.
- [57] Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., Ito, T., 2007. Quantification of host-specific

- Bacteroides– Prevotella 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 890–901.
- [58] Payment, P., Franco, E., 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2418–2424.
- [59] Petzel J.P., Hartman, P.A., 1986. A note on starch hydrolysis and beta-glucuronidase activity among flavobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 421–426.
- [60] Pisciotta, J.M., Rath, D.F., Stanek, P. a, Flanery, M., Harwood, V.J., Flanery, D.M., 2002. Marine Bacteria Cause False–Positive Results in the Colilert–18 Rapid Identification Test for *Escherichia coli* in Marine Bacteria Cause False–Positive Results in the Colilert–18 Rapid Identification Test for *Escherichia coli* in Florida Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 539–544.
- [61] Presnell, M.W., Andrews, W.H., 1976. Use of the membrane filter and a filter aid for concentrating and enumerating indicator bacteria and *Salmonella* from estuarine waters. 10, 549–554.
- [62] Ralovich, B., Ibrahim, G.A.M., Fabian, A., Herpay, M., 1991. What is the diagnostic value of beta-D-glucuronidase (BDG) activity of bacteria using Fluorocult ECD agar for their cultivation? *Acta. Microbiol. Hung.* 38, 147–154.
- [63] Rodríguez, R.A., Gundy, P.M., Rijal, G.K., Gerba, C.P., 2012. The impact of combined sewage overflows on the viral contamination of receiving waters. *Food Environ. Virol.* 4, 34–40.
- [64] Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, MR., Laurent, P., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol Methods.* 49, 31–54.
- [65] Sabat, G., Rose, P., Hickey, W.J., Harkin, J.M., 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 844–849.

- [66] Saito, M., 1990. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods, and the natural environment in Japan. *J. Food Prot.* 53,115–118.
- [67] Saxena, G., Bharagava, R. N., Kaithwas, G., Raj, A., 2015. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *J. Water Health.* 13, 319–339.
- [68] Sercu, B., Van De Werfhorst, L.C., Murray, J.L., Holden, P.A., 2011. Cultivation-independent analysis of bacteria in IDEXX Quanti-Tray/2000 fecal indicator assays. *App. Environ. Microbiol.* 77, 627–633.
- [69] Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A., Davies-Colley, R.J., 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1122–1131.
- [70] Siqueira, FF., Almeida, MO., Barroca, TM., Horta, CC., Carmo, AO., Silva, RO., Pires, PS., Lobato, FC., Kalapothakis, E., 2012. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (plc) reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.* 159, 397–405.
- [71] Smith, L., Carroll, K., Mottice, S., 1993. Comparison of membrane filters for recovery of Legionellae from water samples. *App. Environ. Microbiol.* 59, 344–346.
- [72] Sorensen, DL., Eberl, SG., Dicksa, RA., 1989. *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted streams. *Water Res.* 23, 191–197.
- [73] Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K. T., 2005. Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. *Water Air Soil Pollut.* 166, 139–166.
- [74] Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., Polz, M.F., 2004. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *App. Environ. Microbiol.* 70, 4103–4110.
- [75] Tiwari, A., Niemelä, S.I., Vepsäläinen, A., Rapala, J., Kalso, S., Pitkänen, T., 2016. Comparison of Colilert–18 with miniaturized most probable number method for monitoring of *Escherichia coli* in bathing water. *J. Water Health* 14, 121–131.
- [76] Toranzos, GA., McFeters, GA., 1997. Detection of indicator microorganisms in

- environmental freshwaters and drinking waters. In: Manual of Environmental Microbiology (Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V., eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C, USA. 184–194.
- [77] Trepeta, R.W., Edberg, S.C., 1984. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 19, 172–174.
- [78] Tschirdewahn, B., Notermans, S., Wernars, K., Untermann, F., 1991. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. Int. J. Food Microbiol. 14, 175–178.
- [79] U.S. Environmental Protection Agency, 2009. Method, 1603. *Escherichia coli* (E. coli) in Water by Membrane Filtration using Modified Membrane-Thermotolerant *Escherichia coli* Agar (modified m TEC). EPA-821-R-09-007. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- [80] United Nation Children’s Fund and World Health Organization, 2019. Progress on household drinking water, sanitation and hygiene|2000-2017.
- [81] Van Asten, A.J., Van der Wiel, C.W., Nikolaou, G., Houwers, D.J., Gröne, A. 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol., 136, 411–412.
- [82] Wen, Q., McClane, B.A., 2004. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2685–2691.
- [83] World Health Organization, 2011. Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth edition. Geneva: World Health Organization.
- [84] World Health Organization, 2017. Diarrhoeal disease. [WWW Document]. URL <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- [85] Wu, J., Long, S.C., Das, D., Dorner, S.M., 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. J. Water Health, 9, 265–278.
- [86] Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D’Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Holler, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., Lopez-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk,

- R., Wyer, M., 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.* 45, 1025–1038.
- [87] Yates, M.V., 2007. Classical indicators in the 21st century – far and beyond the coliform. *Water Environ. Res.* 79, 279–286.
- [88] Zhang, T., M. Breitbart, W. H. Lee, J. Q. Run, C. L. Wei, S. W. Soh, M. L. Hibberd, E. T. Liu, F. Rohwer, and Ruan, Y., 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4:e3.
- [89] 金子光美, 2006. 水の安全性と病原微生物—その歴史と現状、そして未来. *モダンメディア*. 52, 76–83.
- [90] 環境省 水・大気環境局, 2018. 平成 29 年度公共用水域水質測定結果.
- [91] 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎, 2008. 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明. *環境工学研究論文集* 45, 361–370.
- [92] 黒木俊郎, 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志朗, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣勲, 井関基弘, 1996. 神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症. *感染症学雑誌*. 70, 132–140.
- [93] 小林彩乃, 佐野大輔, 加藤毅, 伊藤寿宏, 宮村明帆, 三浦尚之, 石井聡, 岡部聡, 2016. 水中病原体の許容感染リスクに基づいた水質衛生基準候補値の算出方法に関する提案. *土木学会論文集 G (環境)*, 72, 40–49.
- [94] 埼玉県衛生部, 1997. クリプトスポリジウムによる集団下痢症—越生町集団下痢症発生事件—報告書.
- [95] 佐野大輔, 植木洋, 渡部徹, 2006. 水中病原ウイルスによる水環境汚染の実態. *モダンメディア*. 52, 115–124.
- [96] 西尾治, 2003. ノロウイルスの検出法. 国立感染症研究所.
- [97] 日本水道協会, 2011. 上水試験方法.

- [98] 日本水道協会, 2015. 水道のあらまし 第6版.
- [99] 平林敏彦, 1988. 消毒の意義とその必要性. 水質汚濁研究. 11, 272-276.
- [100] 三浦尚之, 風間しのぶ, 今田義光, 真砂佳史, 当広謙太郎, 真中太佳史, 劉曉芳, 齊藤繭子, 押谷仁, 大村達夫. 2016. 感染性胃腸炎流行の早期検知を目的とした下水中ノロウイルスモニタリングの有用性. 土木学会論文G(環境), 72, III_285-III_294.
- [101] 門間千枝, 柳川義勢, 楠淳, 甲斐明美, 新垣正夫, 尾畑浩魅, 伊藤武, 太田建爾, 工藤泰雄, 1994. ヒトふん便から分離された耐熱性芽胞形成ウエルシュ菌の血清型とエンテロトキシン産生性. 東京衛研年報. 45, 11-15.

- 謝辞 -

本研究を行うにあたり、終始ご指導くださいました県立広島大学生命環境学部環境科学科の橋本温准教授に厚くお礼申し上げます。橋本温准教授には、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くださり、大変貴重な経験をさせていただきました。心より感謝いたします。

また、県立広島大学生命環境学部環境科学科の原田浩幸教授、県立広島大学生命環境学部環境科学科の西村和之教授、県立広島大学生命環境学部生命科学科の森永力教授には、本学位論文の審査にあたり、多くのご助言、ご指導をいただき、心よりお礼申し上げます。

国立感染症研究所の遠藤卓郎博士には社会人ドクターとして学位取得に挑戦したいという私の意を組んでいただき、橋本温准教授をご紹介していただきました。また、第2章の研究を遂行するにあたり、国立感染症研究所の泉山信司博士と共に、研究計画の立案から論文の執筆まで、多大なるご助言とご指導をいただいたことに心より感謝いたします。

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻の片山浩之教授には、第4章の研究を遂行するにあたり、海水中のウイルスの濃縮方法や定量方法について、ご指導をいただいたことに心より感謝いたします。

研究室のメンバーには、社会人である私を研究室の一員として温かく受け入れてくれたことをうれしく思っております。また、博士課程前期卒業生の住吉祐介氏、横内朝香氏、中野勲氏、中本佳奈氏、岩本和也氏には、研究をサポートしていただいたことに心より感謝いたします。

職場である一般財団法人広島県環境保健協会には、学位取得に向けて挑戦することを快諾していただき、諸先輩方、同僚には、業務調整等のご協力をいただいたことに心より感謝いたします。

最後に、いつも温かく支えてくれた妻と、元気づけてくれた1歳の娘に心より感謝いたします。