

課題名 5-1402 水系感染微生物による水環境汚染の把握と指標微生物管理の限界に関する研究

課題代表者名 田中 宏明（京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター環境質予見分野・教授）

研究実施期間 平成26～27年度

累計予算額 114,647千円（うち平成27年度：55,853千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 病原ウイルス、衛生指標微生物、水環境、琵琶湖南湖、仙台沿岸域、東京湾、下水放流水、合流式下水道雨天時越流水

研究体制

- (1)琵琶湖南湖での下水放流による病原微生物と水生生物の影響（京都大学）
- (2)水環境中のウイルスと指標微生物の動態の把握（東京大学）
- (3)病原微生物の動態に与える環境因子の影響の評価（東北大学）

研究協力機関

北海道大学

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

世界保健機構（WHO）は、水道水質基準、農業灌漑再生水基準に指標微生物による管理と並行させ、定量的微生物リスク評価（QMRA）で原虫やウイルスなどの個別病原微生物の管理方法を導入してきたが、新たに水域でのリクレーション基準への適用を検討している。また米国環境保護庁（USEPA）でも、リクレーション利用基準は、これまでの疫学調査と衛生指標の関係に加え、新たにQMRAによる方法を検討している。また、消毒などによる水生生物への影響を回避するための残留塩素基準や総排水毒性試験（WET）が排出源で行われ、リクレーション利用と水生生物保護との両立を目指した水質管理がなされている。

一方、我が国の河川の水環境基準で大腸菌群数は達成率が低いが、土壌細菌などが検出されているため衛生指標として適当ではないと理解され、水環境での病原微生物管理が遅れた状態が続いている。このため、環境省は環境基準の衛生指標の見直しを検討中で、新しい衛生指標として、大腸菌とすることが検討されている。しかし、新たな衛生指標（大腸菌）の実態について、浄水過程を前提とした河川水質や水浴などのリクレーションの視点からの水域水質の知見は不十分で、現在検討されている大腸菌への衛生指標の変更と、今後導入されると想定される個別病原微生物による基準値の設定に対応するための基礎データも十分にそろっていない。さらに、衛生指標達成のために必要な消毒についても、塩素が与える水生生物への影響についての知見が必要であるが、不足しているのが現状である。

2. 研究開発目的

上記の点を鑑み、本研究では、今後導入されると想定されるQMRAによる水道原水、リクレーション用水の基準値の見直しに対応するため、水域に存在する様々な病原微生物を網羅的に把握し、衛生指標との関係を検討する。そこで、下水処理場や浄化槽などから排出され、放流先水域である湖沼および海域に存在する病原細菌、ウイルスと指標微生物の動態を把握するため、次世代シーケンサー、qPCR、培養法により調査を行う。東日本大震災で被災し機能停止した下水処理場の放流先海域でデータ収集を行うと共に、正常に稼働している下水処理場や浄化槽からの放流水を受ける水域を対象として調査を行う。さらに、クロラミン消毒に焦点をあて、水生生物への影響も調査する。このため、以下のサブテーマ(1)～(3)を京都大学、東京大学、東北大学が連携して実施する。

- サブテーマ(1)琵琶湖南湖での下水放流による病原微生物と水生生物の影響：京都大学
- サブテーマ(2)水環境中のウイルスと指標微生物の動態の把握：東京大学
- サブテーマ(3)病原微生物の動態に与える環境因子の影響の評価：東北大学

3. 研究開発の方法

(1) 琵琶湖南湖での下水放流による病原微生物と水生生物の影響

1) 琵琶湖南湖における病原微生物、指標微生物の調査

琵琶湖南湖を対象とし、月1回の定期調査を実施し、指標微生物及び病原微生物のデータを収集した。下水処理場3か所からの下水処理放流水が考えられるほか、合流式下水道では激しい降雨時には汚水が十分な処理を経ずに流入する。そこで、上記の3下水処理場の流入水及び下水処理放流水も収集し、分析に供した。

① 試料の収集

2014年7月から2016年3月にかけて、月に1度の頻度で琵琶湖南湖の複数地点で湖水試料を収集した。1地点につき約6 Lを滅菌済み容器にて捕集した。これら試料は指標微生物分析、ウイルス濃縮及び微生物群集構造解析に供した。また、2014年11月から2016年3月にかけて、月に1度の頻度で南湖沿岸に位置する3か所の下水処理場で流入水試料及び放流水試料を収集した。流入水試料は250 mLを滅菌済み遠沈管にて捕集した。また、放流水試料(約4 L)は塩素消費のためチオ硫酸ナトリウム(終濃度: 15 mg/L)を添加した滅菌済み容器にて捕集した。これら試料は指標微生物分析、ウイルス濃縮に供した。収集した試料は保冷したまま研究室へ輸送し、採取から24時間以内に指標微生物検出及びウイルス濃縮操作に供した。

② 指標微生物の定量

大腸菌、大腸菌群はXMG寒天培地を用いた平板培養法により検出・定量した。Fファージは宿主として *Salmonella typhimulium* WG49を用いたブラック形成法により検出・定量した。

③ ウイルスの定量

ウイルスは陰電荷膜法により濃縮した。濃縮水量は琵琶湖表層水について最大4 L、流入水及び放流水についてそれぞれ0.1 L、2 Lとした。濃縮液を用い、定量 RT-PCR(以下RT-qPCR)によるRNA定量を行った。濃縮液よりRNAを抽出し、RNAを逆転写反応(Reverse transcription: RT)に供し、cDNAを得た。得られたcDNAから、TaqManプローブを用いたqPCRによる各種ウイルス遺伝子の検出を試みた。測定対象はGI型及びGII型ノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、ロタウイルス(RV)、エンテロウイルス(EV)、アイチウイルス(AiV)、トウガラシ微斑ウイルス(pepper mild mottle virus: PMMoV)、GI型～GIV型FRNA大腸菌ファージ(FPH)である。

2) 合流式下水道雨天時越流水の発生の推定

合流式下水道ではある程度以上の降雨時には雨水吐やポンプ場から汚水と雨水の混じった下水が未処理で放流される雨天時越流の問題がある。滋賀県大津処理区合流区域における雨天時越流水の発生の有無と越流水量を降雨イベントから推測し、琵琶湖南湖での定期調査が雨天時越流イベントを捉えることができていたかどうかを検討した。

3) 次世代シーケンサーを用いたバクテリア群集構造の解析

次世代シーケンサーを用いた16S rRNA配列に基づくバクテリアの群集解析を、琵琶湖南湖水試料および近隣の下水処理場放流水試料に適用し、琵琶湖南湖でのバクテリア群集構造を調べた。水試料からのバクテリアを分離し、バクテリアからゲノムDNAを抽出、ライブラリー調整の後、次世代シーケンサーMiseq(イルミナ社)によって16S rRNAの配列データを得た。得られたデータ配列は解析サーバー Metagenomics RAST (MG-RAST) (<http://metagenomics.anl.gov/>)によって実施した。バクテリアの分類結果はClass(綱)レベルの分類で表示した。サンプルごとにどのバクテリア種がどのくらいの割合を占めているのかを算出し、サンプル間でバクテリアの群集構造を比較した。

4) 下水処理水の流入する都市河川における残留塩素と水生生物の影響

① 下水処理水の流入する都市河川における藻類種の変化

京都市南部を流れる小河川、山科川を対象にして、3地点において河川水を、2つの水処理場放流水を2地点で採取し、全残留塩素濃度を測定した。また、各地点において河床の石から付着藻類をコドラート法により採取し、その種類と数を調べた。

② 下水処理場での消毒による藻類に対する影響評価

下水処理水が海域へ放流された場合を想定して、下水の消毒に一般的に用いられている塩素の海藻への毒性影響を評価した。三角フラスコに下水試料を100mL入れ、次亜塩素酸ナトリウムを所定量注入し、注入後15分後の試料を生態毒性試験に供した。供試生物として、*Pyropia yezoensis*(スサビノリ)を用いた。スサビノリの葉長を定規を用いての目視および画像から解析ソフト(imageJ)を用いた。

5) 3次元蛍光分析による合流式下水道雨天時越流水の検出の基礎検討

琵琶湖南湖の湖水試料、および近隣の下水処理場の流入下水、放流水を3次元蛍光分析に供した。その後

のサンプルを3次元蛍光測定による多波長励起-蛍光マトリックス(Excitation-Emission Matrix)を得た。測定機器はAqualog (Horiba社)を用いた。

(2)水環境中のウイルスと指標微生物の動態の把握

①東京湾沿岸域における降雨後ウイルス汚染の実態調査

2014年6月の大型降雨後東京湾内の4地点(隅田川河口、目黒川河口、測線観測地点、お台場)で合計57試料をウイルス濃度測定のために採取した。試料は表層、中層、低層の水として、それぞれ水深0.5、3、5 mの試料を同時に採取した。

得られた試料から核酸抽出、逆転写、real-time PCRを行い、ノロウイルスGIおよびGII(NoV GI、GII)、アイチウイルス(AiV)およびトウガラシ微斑ウイルス(Pepper mild mottle virus, PMMoV)の濃度を定量した。また、指標細菌や物理化学的水質項目についても同時に測定を行った。

②二枚貝への腸管系ウイルス蓄積状況に基づいたヒト糞便由来の汚染履歴評価

2015年5、8、11月の大潮に合わせて、多摩川河口、鮫洲ポンプ場、中央防波堤中潮橋付近、葛西臨海公園沖の4箇所より、水試料、底泥試料、カキ試料を採取した。水試料は陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法によってウイルス濃縮した。カキ試料は解剖して中腸腺を摘出し、MilliQ水に懸濁した後、上清をウイルス濃縮試料とした。これらのウイルス濃縮試料から、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。底泥試料はISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン)を用いて核酸抽出を行った。抽出したRNAを逆転写した後、PMMoVのCoat protein(cp)遺伝子をターゲットとしてクローンライブラリを作成し、サンプル間の系統関係を比較解析した。

③環境中における大腸菌の増殖を評価する系の確立

ゲノムデータベース情報から腸内細菌科 *Enterobacteriales* の分裂関連遺伝子 *ftsZ* 配列を取得し、大腸菌 *E. coli* と比較することで、大腸菌特異的領域を探索した。定量PCRの使用に適したサイズとして、100塩基前後のプロダクトサイズでプライマーとプローブを設計し、実験に用いた。

Over night培養した *E. coli* K12株を 10^3 希釈した後、静止期まで30分毎にサンプリングしDNAおよびRNA試料を採取した。対数期に達した時点で核酸合成停止を意図してナリジクス酸添加系を用意し、以降16日後まで培養を継続した。また、比較の為に非分裂関連遺伝子であるトリプトファン代謝遺伝子 (*tnaA*) を同時に定量した。

④環境水中溶存有機物による大腸菌の増殖可能性の評価と増殖基質の探索

多摩川および矢上川から得られた河川水を滅菌処理した試料を培養液として大腸菌を植種したのち、暗所、30°Cの条件下で培養を行い、定期的に大腸菌数及び全菌数の測定を行った。コントロールとして最少培地、および大腸菌未植種の系を用意し、溶存有機物組成の異同について比較を行った。溶存有機物組成の分析には、低級カルボン酸の測定とOrbitrap型質量分析計による分析を用いた。

(3)病原微生物の動態に与える環境因子の影響の評価

本サブテーマでは東北沿岸海域調査として仙台市南蒲生浄化センターおよび放流先海域で調査を継続した。調査は2014年9月～2016年1月の計7回実施した。その間には新たに建設された南蒲生浄化センターの一列の運転が再開されている。海域の調査地点は定点観測点の①から④、流軸方向に①から⑤、沖合およそ2km(8月～10月)または5km(11月～2月)、および10km、そして南蒲生浄化センターでは、流入水と放流水の塩素消毒前後の3地点であり、合計14地点である。放流先海域での採水は表層で行った。

1) 調査項目

調査項目として、水温、透明度、塩分、電気伝導度(EC)、pH、全塩素、遊離塩素、結合塩素、濁度、SS、有機汚濁水質項目としては、BOD、COD、TOC、DOCを測定した。また指標細菌として、大腸菌群、大腸菌、腸球菌を測定した。細菌ウイルスであるファージは、体表面吸着ファージ(Somatic phage、S-phage)とF繊維特異的吸着ファージ(F-phage)を培養法で測定し、病原ウイルスはアイチウイルス(AiV)、エンテロウイルス(EntV)、ノロウイルスGI(GI NoV)、ノロウイルスGII(GII NoV)、アデノウイルス(AdV)の遺伝子数を定量PCR法で測定した。また、近年病原ウイルスの指標ウイルスとして注目されている植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)の遺伝子数も定量PCR法で測定した。

2) 難分解性医薬品の測定

調査項目の中に含めた難分解性医薬品70種の濃度を測定し、海域における移流・分解指標として着目した。指標細菌や病原微生物の海域での動態は、水温、塩分、SS、日光などの様々な環境因子に影響を受けると考えられているが、それぞれの要因ごとに動態を明らかにすることは困難であり、微生物の不活化による動態を明

らかにする上で、不活化以外の物理的な移流・拡散による濃度減少と分けて評価する必要がある。

難分解性医薬品は、指標細菌や病原ウイルスを代表とする病原微生物と同様に流入下水中に多量に含まれる。また、難分解性医薬品は安定性が非常に高く、生物分解されにくいことから、海流、潮汐などによる物質の希釈・拡散による濃度減少を評価するのに有効な指標であると考えられた。そこで、一次元円筒座標移流拡散方程式に基づいたモデル式から、希釈拡散の指標として有効な難分解性医薬品を選定した。さらに、難分解性医薬品濃度と微生物濃度の減衰を比較することで、海域での指標微生物や病原微生物の不活化などの動態も評価した。

3) 擬似太陽光照射による微生物不活化の評価

環境要因による不活化の影響を把握することを目的に、不活化要因のひとつである太陽光による影響を評価した。現在指標として用いられている大腸菌群、新たな指標候補である大腸菌および腸球菌、ウイルスの代替指標であるS-phage T4、F-phage Q β 、さらに、代表的な腸管系ウイルスでありウイルス指標として着目されているポリオウイルス(PoV)、AiVに対して、LEDソーラーシミュレーターを用いた擬似太陽光照射による不活化を評価した。

4) 放流先海域において検出される大腸菌の塩分耐性の評価

大腸菌はさまざまな水環境において糞便汚染の指標細菌として国際的に使われている。H24～25年度の環境研究総合推進費の海域における調査で、大腸菌は、濃度の減衰は見られるものの一定の濃度で検出されることが確認された。このことから、海域においても大腸菌が広範囲に分布している可能性が考えられ、塩分耐性を有していることが示唆された。そこで、海水と同程度の塩分を添加した特定酵素基質培地を用いたメンブレンフィルター法により検出される大腸菌を測定・単離し、塩分耐性を有する大腸菌の分布について調査した。

4. 結果及び考察

(1) 琵琶湖南湖での下水放流による病原微生物と水生生物の影響

1) 琵琶湖南湖における病原微生物、指標微生物の調査

① 琵琶湖南湖における大腸菌群と大腸菌濃度の相関

琵琶湖南湖での調査の結果、大腸菌群濃度は大腸菌濃度と相関がなく、その濃度も100倍以上となった。この結果は琵琶湖南湖における採水で検出された大腸菌群はほとんどが糞便ではなく土壌等に由来することを示唆している。少なくとも琵琶湖南湖においては、大腸菌群は糞便汚染を測るための指標として有効でないことが示唆された。

② 琵琶湖南湖での腸管系ウイルス及びウイルス指標の存在状況

琵琶湖南湖においてトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)、GI型大腸菌ファージ(GI-FPH)、GII型ノロウイルス(GII-NoV)、ロタウイルス(RV)、アイチウイルス(AiV)がそれぞれ高頻度で検出された。陽性率はPMMoVが最も高かった。リスク因子と考えられるウイルスとしてはGII-NoVおよびRVが高頻度で検出されたが、GI型ノロウイルス(GI-NoV)、エンテロウイルス(EV)、サボウイルス(SaV)はほとんど検出されなかった。GII-NoVについては一般的な冬季流行性とは異なり、6～8月の夏季においても検出されることがわかった。

③ 腸管系ウイルス間の濃度相関、及び腸管ウイルス濃度と指標細菌濃度の相関

GII-NoVとAiV、PMMoV、GI-FPHの検出濃度の比較を行った。加えて指標微生物である大腸菌との比較も行った(図1)。その結果、大腸菌はGII-NoVに比べて検出濃度が低く、濃度の相関も見られない結果となり、琵琶湖南湖では、大腸菌をウイルス汚染の指標として用いるのは不適切であることが示唆された。

AiVは測定した全ウイルス種の中で最もGII-NoVと類似した濃度分布であり、“病原ウイルスの存在を示す指標”として有効であると考えられた。一方、PMMoVは測定した全ウイルス中、最も高頻度で検出されたが、GII-NoV濃度との相関は見られなかった。また、全試料のうち88%からPMMoVが検出されている。これらの結果から、病原ウイルスが存在しない環境水中にもPMMoVが普遍的に存在すると考えられる。PMMoVは必ずしも病原ウイルスの流行を表していないが、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”としては有望であると言える。

ファージGI-FPHは検出頻度が二番目に高いウイルスでありPMMoVと同じく、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”として利用できる可能性が考えられる。また、GI-FPHもPMMoVと同じく必ずしも病原ウイルスの流行を表していないと考えられた。

④ 琵琶湖南湖での水利用における安全性評価

琵琶湖南湖での遊泳及び釣りによる感染リスクを、GI型～GIV型FRNA大腸菌ファージ(FPH)の合計濃度とブランク法でのFPHの比から推定した不活化率を用いて感染性GII-NoV濃度の評価を行った。琵琶湖南湖におけるレクリエーション利用にかかる感染リスクをQMRA手法により評価した結果、夏季に遊泳するとUSEPAが水道で想定する年間許容リスク 10^{-4} /年を超過する恐れがあるが、釣りに関しては通年で感染リスクは年間許容リスクよりも低いことが示された。

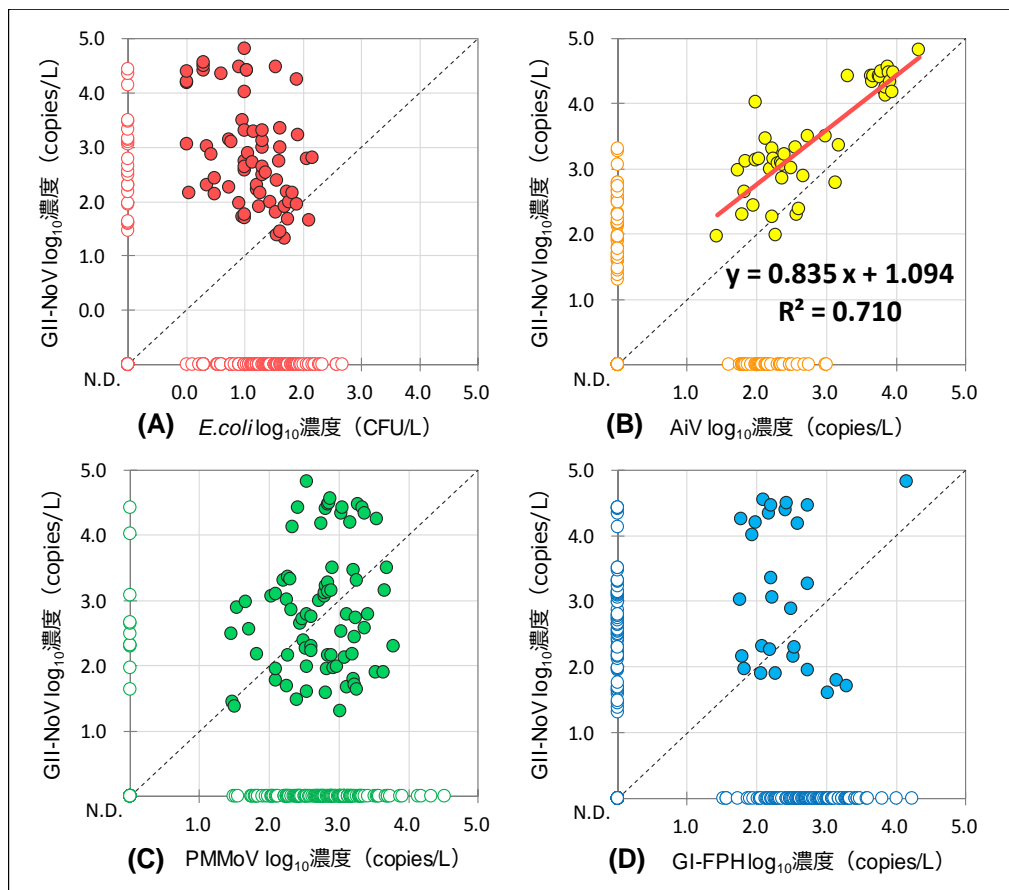


図1 GII-NoVと大腸菌 (A)、AiV (B)、PMMoV (C)、GI-FPH (D) の検出濃度比較。図中の斜線にプロットが位置する場合、GII-NoVとの濃度比が1:1となる。図中の”N.D.”は不検出を示す。

2) 合流式下水道雨天時越流水の発生の推定

2014年4月1日～2016年2月29日の期間について降雨強度に基づくCSOの発生を推測した。その結果、調査期間中に20回のCSOが発生したと推測された。しかし本研究における琵琶湖南湖の調査はCSO発生直後(1～2日以内)に行われた調査日は無く、本研究における琵琶湖南湖調査では微生物汚染に対するCSOの影響の有無を論じることは出来ない結果となった。

3) 次世代シーケンサーを用いたバクテリア群集構造の解析

ヒト腸内細菌の優占種である *Bacteroidia*、*Clostridial* について解析した結果、琵琶湖南湖での採水日毎の *Bacteroidia*、*Clostridia* 由来DNA濃度の変動が大きいこと、採水日毎の変動に比べて、サンプルの採水地点間の変動は小さいことが分かった。琵琶湖南湖においてはウイルスもバクテリアも、時間変動に比べて地点間差が小さい(時間変動の方が地点間差よりも大きい)ことが示唆された。また、琵琶湖水と下水処理場放流水の *Bacteroidia*、*Clostridia* 由来DNA濃度の比較結果から、バクテリア、ウイルスともに、放流水から高濃度で排出され、琵琶湖で希釈・拡散されることが示唆された。一方、興味深いことに、採水月によっては琵琶湖水と下水処理場放流水の *Bacteroidia*、*Clostridia* 由来DNA濃度は同レベルであった月もあり、この結果は、琵琶湖南湖においては、時期(季節)によっては下水処理場放流水にともなって排出された腸内細菌が琵琶湖南湖で蓄積している可能性があるか、下水処理場放流水以外の汚染源の寄与が大きい場合があるかが示唆された。

4) 下水処理水の流入する都市河川における残留塩素と水生生物の影響

都市河川において下水処理場水の流入直後では残留塩素濃度は上昇し、それに伴って河床に出現する付着藻類の平均出現種数の減少と多様性指数の低下が見られた。また、海域の重要な海藻であるスサビノリは残留塩素の毒性に対して敏感であることが示唆された。

5) 3次元蛍光分析による合流式下水道雨天時越流水の検出の基礎検討

琵琶湖南湖水、下水処理場での各処理プロセス後の水について3次元蛍光分析を行った結果、合流式下水

道の雨天時越流水の特異的マーカーとして使える可能性のある3次元蛍光スペクトルのピークを見出すことが出来た。

(2) 水環境中のウイルスと指標微生物の動態の把握

① 東京湾沿岸域における降雨後ウイルス汚染の実態調査

大腸菌は、初日の表層で高濃度を示しその後減少する一方、ウイルスの濃度変動は小さく、CSOの影響が乏しいことが確認された。全測点のデータについて、表層—低層間の濃度比をとると、図2のように変動した。最終日までに表層と低層の濃度比が1へ近づいており、CSOの影響によるウイルスと大腸菌の挙動は異なることを示している。

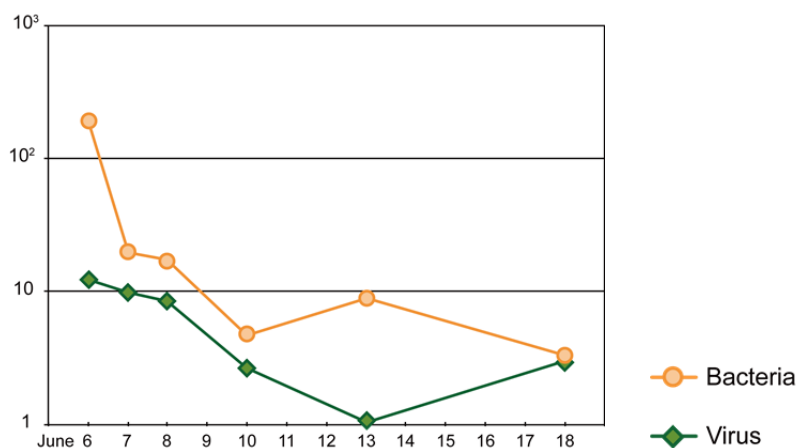


図2 表層—低層間の濃度比(全測点の平均値)

② 二枚貝への腸管系ウイルス蓄積状況に基づいたヒト糞便由来の汚染履歴評価

水試料およびカキ試料について、PMMoV coat protein遺伝子のクローンライブラリを作成し解析したところ、当該遺伝子は保存性が強く、水試料とカキ試料それぞれに含まれるウイルスに大きな系統的違いは認められない一方で、カキ試料には、水試料では見られない固有の配列が複数確認された。カキは、水中に含まれるウイルスと長期間に渡って接触しているため、一時の水試料では捉えられない、蓄積したウイルスの配列を含んでいたものと考えられる。

③ 環境中における大腸菌の増殖を評価する系の確立

大腸菌に特異的な分裂関連遺伝子 *ftsZ* のプライマーを設計し、培養実験で検出を行った。mRNAの発現は、*ftsZ* および *tnaA* 共に対数増殖期に入ってから検出され、どちらもゲノムDNAに対して 10^4 程度低い検出量であった。*ftsZ* 遺伝子については、対数増殖期後期にmRNAの発現量が横ばいとなっている点が、一般機能遺伝子の *tnaA* と異なる傾向として確認された。一方で、対数増殖期後、16日後までの生残曲線では、分裂関連遺伝子と一般機能遺伝子の生残には大きく異なる挙動は認められなかった。

④ 環境水中溶存有機物による大腸菌の増殖可能性の評価と増殖基質の探索

滅菌処理済河川水を培地とした実験では、30℃暗所という実験室内条件であるが、大腸菌の増殖を確認し、大腸菌が環境水中の溶存有機物を利用して増殖することが示された。イオンクロマトグラフィーにより酢酸、ギ酸、シュウ酸濃度を測定したところ、大腸菌がシュウ酸を増殖基質として利用している可能性が示唆された。一方で、他サンプルのカルボン酸は変化が見られないため、増殖に必須の有機物ではないと考えられる。

(3) 病原微生物の動態に与える環境因子の影響の評価

1) 被災下水処理場および下水処理場放流先海域における病原微生物および指標微生物の消長に関する現地調査

H26年9月～H28年1月の7回の試料採取において、測定した微生物の消毒効果は、細菌>ファージ>>ウイルスの順で確認された。腸管系ウイルスでは、殆どの試料において指標細菌とファージに比べて消毒効果は殆ど見られない。また、ノロウイルス(NoV)の場合は検出限界以下の場合も多く見られ、消毒効果は明確ではないが、検出された場合には他の病原ウイルスと同様に消毒効果は殆ど無いと考えられる。植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)は腸管系ウイルスに比べ高濃度で存在していた。また、消毒効果は病原ウイルスと同じく殆ど効果が無かった。

海域における指標細菌、ファージ、腸管系ウイルスおよびPMMoVの濃度は、放流口からの距離に比例して減

少した。この減少の程度はそれぞれの微生物間で差があり、指標細菌が最も減衰が大きく、次にF-phageであり、S-phage、腸管系ウイルスおよびPMMoVは指標細菌に比べて減衰が小さかった。この減衰は物理的な移流拡散によるものだけでなく、水温、塩分、日光などの様々な環境因子による微生物の不活化が原因と考えられる。移流拡散効果はすべての微生物について同じであることから、微生物間の減衰の差は環境因子に対する微生物間の感受性の差によって生じたものと推察される。したがって、指標細菌は病原ウイルスより海域の環境因子に対して感受性が高いと考えられる。

また、放流口からかなり離れた海域においても微生物が観測される場合があり、それぞれの微生物の環境因子に対する耐性について今後検討する必要がある。

2) 難分解性医薬品を用いた海域における指標微生物の移流・拡散と不活化の評価

測定した難分解性医薬品のうちCrotamitonが海域における適切な移流・拡散指標として最も有効であるとの結論を得た。Crotamiton濃度の減衰と調査結果を基にした海域での各微生物の濃度減衰の比較を行い、不活化による減衰を評価した。

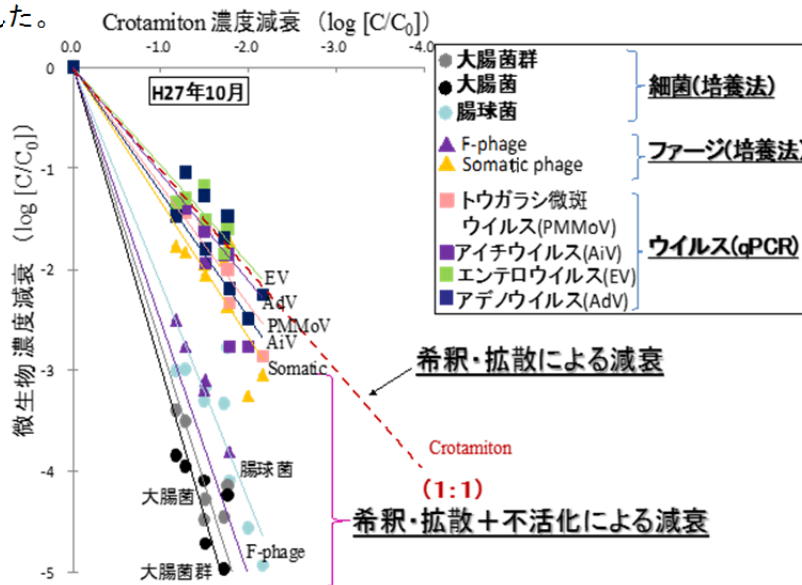


図3 Crotamitonの濃度減衰に対する微生物の濃度減衰プロット(H27年10月)

Crotamitonの減衰は移流拡散効果のみによることから、図3に示した傾き1の直線で表される。また、指標細菌である大腸菌群、大腸菌および腸球菌とF-phageは傾きが1より大きく、明らかに移流拡散だけでなく他の環境因子による不活化が起こっていることを示している。一方で、病原ウイルスのアイチウイルス(AiV)、エンテロウイルス(EntV)そしてアデノウイルス(AdV)と、PMMoVは、ほぼ傾きがCrotamitonの傾き1に近く、不活化による減衰の程度は低いと考えられる。このことから、これらの微生物は海域の環境因子に対して抵抗力を有していると考えられる。ただし、細菌、ファージは生菌数、感染性を測定しているが、ウイルスは遺伝子を定量し感染価を測定していないことから、ウイルスの不活化を考える場合にはさらに今後の検討が必要である。

3) 擬似太陽光照射による微生物不活化の評価

擬似太陽光照射による微生物の減衰は、大腸菌、腸球菌、S-phage T4、F-phage Q β 、ポリオウイルス(PoV)、AiVを対象に実施した。細菌における擬似太陽光による減衰は、照射開始後1~3hr程度で始まり、減衰速度は大腸菌が速く、腸球菌が太陽光に対する耐性が高いことが確認された。ファージは、F-phage Q β 、S-phage T4共に照射後24時間で減衰が確認され、減衰速度はS-phage T4が速いことが確認された。海域におけるファージの検出は、S-phageの方が比較的濃度が高く、検出率も高い傾向が確認されている。一方で、太陽光に対しては、S-phageの方が感受性は高いことが示唆された。このことから、海域におけるF-phageの減少には太陽光以外の環境要因がS-phageよりも強く影響している可能性が示唆された。PoVとAiVでは、殆ど減衰せず(192hrで約1~1.5 log)、減少速度に差はなかった。太陽光に対する感受性は、細菌>ファージ>>ウイルスであることが確認された。これらの結果から、太陽光による不活化を考慮する必要がある環境では、ウイルスの指標として細菌を使用することは難しいと考えられる。また、ファージが腸管系ウイルスの代替指標の候補として挙げられているが、ウイルスの減衰と差があることから環境中の他の不活化要因の影響についてさらに検証を進め検討する必要がある。

4) 放流先海域において検出される大腸菌の塩分耐性の評価

処理場試料の塩素添加前・初沈後水、海域試料の沖2 km、沖10 kmで、塩分非添加および塩分添加のクロモカルトコリフォーム寒天培地、および塩添加培地を用いた大腸菌の検出を行った。初沈後水において塩分耐性大腸菌と判定された細菌が高濃度で存在することが確認された。海域試料においても、塩分耐性を有する大腸菌と判定された細菌が検出された。

塩分添加クロモカルトコリフォーム寒天培地で大腸菌と判定された単離菌株においてtnaA遺伝子の検出を行った結果、処理場試料単離菌株では28/57(66.7%)からtnaA遺伝子が検出され大腸菌と確認された。一方で、海域試料単離菌株ではtnaA遺伝子は検出されず、大腸菌ではないことが確認された。今回、塩分耐性大腸菌は海域からは検出されなかったが、下水処理場には豊富に存在することから、海域にも存在する可能性がある。また、塩分添加酵素基質特定培地において、大腸菌と疑判定される細菌が存在することが確認された。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

1) 琵琶湖南湖における大腸菌群と大腸菌濃度の相関

琵琶湖南湖での調査の結果、大腸菌群濃度が大腸菌濃度の100倍以上となった。この結果は琵琶湖南湖における採水で検出された大腸菌群はほとんどが糞便ではなく土壌等に由来することを示唆している。少なくとも琵琶湖南湖においては、大腸菌群は糞便汚染を測るための指標として有効でないことが示唆された。

2) 琵琶湖南湖での腸管系ウイルス及びウイルス指標の存在状況

本研究は、2年間にわたって湖沼における腸管系ウイルスおよびウイルス指標の存在状況を毎月継続的に調査した初めての調査事例であり、大変貴重なデータである。調査の結果、トウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)、GI型大腸菌ファージ(GI-FPH)、GII型ノロウイルス(GII-NoV)、ロタウイルス(RV)、アイチウイルス(AiV)がそれぞれ高頻度で検出された。陽性率はPMMoVが最も高かった。リスク因子と考えられるウイルスとしてはGII-NoVおよびRVが高頻度で検出されたが、GI型ノロウイルス(GI-NoV)、エンテロウイルス(EV)、サポウイルス(SaV)はほとんど検出されなかった。GII-NoVについては一般的な冬季流行性とは異なり、6~8月の夏季においても検出されることがわかった。

3) 腸管系ウイルス間の濃度相関、及び腸管ウイルス濃度と指標細菌濃度の相関

GII-NoVとAiV、PMMoV、GI-FPHの検出濃度の比較を行った。加えて指標微生物である大腸菌との比較も行った。その結果、大腸菌はGII-NoVに比べて検出濃度が低く、濃度の相関も見られない結果となり、琵琶湖南湖では、大腸菌をウイルス汚染の指標として用いるのは不適切であることが示唆された。

AiVは測定した全ウイルス種の中で最もGII-NoVと類似した濃度分布であり、“病原ウイルスの存在を示す指標”として有効であると考えられた。一方、PMMoVは測定した全ウイルス中、最も高頻度で検出されたが、GII-NoV濃度との相関は見られなかった。また、全試料のうち88%からPMMoVが検出されている。これらの結果から、病原ウイルスが存在しない環境水中にもPMMoVが普遍的に存在すると考えられる。PMMoVは必ずしも病原ウイルスの流行を表していないが、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”としては有望であると言える。

ファージGI-FPHは検出頻度が二番目に高いウイルスでありPMMoVと同じく、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”として利用できる可能性が考えられる。また、GI-FPHもPMMoVと同じく必ずしも病原ウイルスの流行を表していないと考えられた。

4) 琵琶湖南湖での水利用における安全性評価

琵琶湖南湖での遊泳及び釣りによる感染リスクを、測定濃度から推定した感染性GII-NoV濃度を用いて評価を行った。琵琶湖南湖におけるレクリエーション利用にかかる感染リスクをQMRA手法により評価した初めての事例である。その結果、夏季に遊泳するとUSEPAが水道で想定している年間許容リスク 10^{-4} /年を超過する恐れがあるが、釣りに関しては通年で感染リスクは低いことが示された。

5) 降雨後の海域におけるウイルス汚染の空間的特性

降雨後の東京湾調査で検出したいずれのウイルスについても、中層、低層における濃度が表層に比べて大きくなる傾向が見られた。一方で、大腸菌濃度は表層における濃度が高い状態から、中層における濃度が高い状態、低層における濃度が高い状態への移行が見られた。ウイルス汚染の空間的な特性は降雨分布や汚濁流出源に影響されると考えられるため、今後は流出解析や3次元流動解析を用いて結果の解釈を行うのが望ましい。

6) ヒト糞便由来のウイルスを検出するためのツールとしてのカキの有用性

ヒト糞便由来のウイルスを長期的に蓄積していると考えられるカキに着目した調査においては、環境水中に存在するウイルス遺伝子型との異同を検討した。カキ試料には、水試料では見られない固有の配列が複数確認されたことから、水試料中に検出されていないウイルスを補足する試料として期待できる。

7) 水環境中における大腸菌の増殖について

大腸菌の分裂関連遺伝子に着目し、その発現を検出、定量する手法については、新たな系を確立することができた。今後、培養実験によって他の一般機能遺伝子と挙動の異なる点を探索することで、環境中における大腸菌の増殖活性を解析するツールとして活用することができると考えられる。

環境中における大腸菌の増殖について、大腸菌は、暗所かつ30度という限られた条件においては、滅菌された環境水中で増殖可能であることが確かめられた。大腸菌を指標細菌として利用する際には、大腸菌が環境水中で増殖しようということに注意してリスク管理をする必要がある。

8) 下水放流先海域における微生物の不活化を評価する手法の開発

南蒲生浄化センター周辺の海域での調査により、人為由来の難分解性医薬品や微生物が海域の広い範囲に分布していることが示された。下水処理水放流先海域の水質に対する下水処理水の寄与を難分解性医薬品を指標として評価し、微生物(指標細菌、ファージ、ウイルス)濃度と比較することで、放流先海域における微生物の不活化を評価する手法を開発した。これにより、海域において微生物が受ける様々な環境ストレスの大きさや、それが微生物の消長に与える影響を評価できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

本研究の成果は、環境省で現在、水質環境基準の生活環境基準項目の変更を検討している大腸菌の指標検討を行うための平成24年度生活環境項目新規基準等検討会の衛生指標WGおよび平成25年度大腸菌数環境基準検討会において、これまでの大腸菌群や腸球菌、ファージ、ウイルスなどの水域の存在実態や動態、下水処理過程や消毒過程での動態の相違を示し、リクレーション利用、水産用水、水道原水の視点からの水質環境基準の検討の基礎的知見を一部提供している。また環境省水環境課が平成24年、平成25年度に国立環境研究所と主催している、水質環境基準の生活環境項目のうち、水生生物基準の追加項目を検討するために「今後の水生生物保全に関する検討会」および水生生物保護を目的に新たにバイオアッセイを排水管理に導入するための「生物応答を利用した水環境管理手法の制度・運用分科会」で、本研究課題の一部の成果から塩素による水生生物への影響についての情報提供を行っている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

大腸菌群は、琵琶湖南湖では糞便指標としては不適切であり、大腸菌を用いる方が糞便指標としては適切である。ただし、海域、湖沼とも、ウイルスの存在が大腸菌を指標としても十分存在を反映できていないことから、水浴場の微生物学的水質基準は糞便性大腸菌群数や大腸菌だけではウイルス由来の感染リスク管理には不十分である。このため、ウイルスの存在を示す新たな指標も今後検討すべきであり、その候補として、PMMoV、AiVなどが考えられる。今後、本研究で開発された直接水域での病原微生物の動態を把握する方法などを用いてさらに情報を収集すべきである。また、新しい衛生指標として期待される大腸菌は、環境中で増殖するとすれば、汚染の過大評価に直結する環境政策上重要な問題である。本研究によって確立した分裂関連遺伝子の定量手法は、今後、培養実験によってその挙動に関するデータを蓄積することで、環境中における増殖活性を調査する手法として実用できる可能性がある。

塩素を用いた消毒では、付着性藻類の多様性に影響を与えていることが現地調査から示唆されていることから放流水の残留塩素の管理が今後重要な課題となると考えられる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 浅見達也、柴田智世、片山浩之、古米弘明: 第51回環境工学研究フォーラム(2014)
「親水活動による感染リスク評価に向けた東京湾沿岸域の降雨後ウイルス汚染実態調査」
- 2) 井原賢、堅川陽平、李善太、松田知成、山下尚之、田中宏明: 第17回日本水環境学会シンポジウム(2014)
「次世代シーケンサーを用いた、水環境における薬剤耐性遺伝子の大規模検出」
- 3) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明、金丸国夫、岩崎達行: 第17回日本水環境学会シンポジウム(2014)
「高濁度下水に対する紫外線消毒における紫外線照射量の検討」
- 4) Hiroaki Tanaka: Tsinghua University Water Safety Symposium held at Shenzhen, China (2014)

- ”Microbial pollution by discharge from municipal sewage treatment plants damaged by Tsunami “
- 5) 端昭彦、花本征也、山下尚之、田中宏明: 第49回日本水環境学会年会(2015)
「感染価を保持したFRNA フェージの定量的タイピングを目的とした濃縮手法の開発」
 - 6) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明: 第49回日本水環境学会年会(2015)
「琵琶湖南湖における腸管系ウイルス汚染の実態評価」
 - 7) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明: 第37回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム(2015)
「琵琶湖南湖におけるウイルス汚染の実態評価」
 - 8) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明: 日本オゾン協会第 24回年次研究講演会(2015)
「被災下水処理場での前凝集後の塩素とオゾン消毒でのMS2フェージの不活化効果の比較」
 - 9) Masaru Ihara, Yoshifumi Masago, Manami Inaba, Seiya Hanamoto, Akihiko Hata, Shinobu Kazama, Suntae Lee, Yohei Katakawa, Naoyuki Yamashita, Tomonari Matsuda, Hiroyuki Katayama, Tatsuo Omura, Hiroaki Tanaka: 18th International symposium on health-related water microbiology (2015)
“HOW DO MICROBES ATTENUATE IN WATER ENVIRONMENT? : COMPARATIVE ANALYSIS OF MICROBES AND CHEMICALS RELEVANT TO HUMAN WASTES”
 - 10) Akihiko Hata, Yuya Shirasaka, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 18th International symposium on health-related water microbiology (2015)
“Quantitative genotyping of infectious FRNA-phages at wastewater treatment plants in japan”
 - 11) Hiroaki Tanaka: Sixth Chemical Sciences & Society Symposium (CS3) (2015), Leipzig, Germany
”Water, Health, the Environment and Sanitation, A Japanese Perspective”
 - 12) 井原賢: 水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム(2015)
「水環境における病原微生物、指標微生物の実態調査」
 - 13) 山口武志、白坂勇也、端昭彦、井原賢、山下尚之、田中宏明: 水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム(2015)
「貯留管からの遮集下水を受け入れる高速凝集沈殿処理施設の健康関連微生物に着目した雨天時モニタリング調査計画」
 - 14) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明: 水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム(2015)
「被災下水処理場の暫定処理水での塩素消毒と代替消毒技術による指標微生物の不活化」
 - 15) T. Asami, K. Inoue, H. Katayama, T. Shibata and H. Furumai: The 6th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition (2015)
“Field Investigation of Wet-weather Viral Pollution in Coastal Area of Tokyo Bay”
 - 16) H. Katayama: 2nd International Forum on Asian Water Environment and Technology (2015)
“Virus Detection and Monitoring in Coastal Seawater”
 - 17) H. Katayama: Special seminar at Universitas Padjadjaran (2015)
“Virus Detection and Monitoring in Environment”
 - 18) Hiroaki Tanaka, Naoyuki Yamashita, Masaru Ihara, Akihiko Hata, Yuya Shirasaka, Takeshi Yamaguchi: China-Japan Joint Seminar on Wastewater Resource Reclamation and Reuse in the Course of Urbanization held at Tsinghua University, Graduate School at Shenzhen (2015)
“Are the waters currently improved in quality really swimmable?”
 - 19) H. Katayama: International Forum on Sustainable Future in Asia 1st NIES International Forum (2016)
“Health risk monitoring and management for sustainable urban environment”
 - 20) 片山浩之: 東京湾再生推進会議陸域対策分科会(2016)
「東京湾の微生物学的安全性」

7. 研究者略歴

課題代表者: 田中 宏明

京都大学大学院工学研究科修了、独立行政法人土木研究所水質チーム上席研究員、
博士(工学)、現在、京都大学大学院工学研究科教授

研究分担者

1) 田中 宏明(同上)

2) 片山 浩之

東京大学大学院工学系研究科修了、東京大学大学院新領域創成科学研究科講師
工学博士、現在、東京大学大学院工学系研究科准教授

3) 大村 達夫

東北大学工学部卒業、東北大学大学院工学研究科修了、
工学博士、現在、東北大学未来科学技術共同研究センター教授

5-1402 水系感染微生物による水環境汚染の把握と指標微生物管理の限界に関する研究

(1) 琵琶湖南湖での下水放流による病原微生物と水生生物の影響

京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	田中宏明
京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	山下尚之
京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	中田典秀
京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	井原賢
京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	端昭彦
京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	李善太

平成26～27年度累計予算額：39,491千円（うち平成27年度：19,237千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本研究では、現在検討が進められている大腸菌への衛生指標微生物の変更や、今後導入されると想定される定量的微生物リスク評価による環境基準値の見直しに対応するため、琵琶湖南湖および近隣の下水処理場において毎月の定期調査を2年間継続して行い、琵琶湖南湖に存在する様々なウイルス、細菌をリアルタイムPCR、培養法、次世代シーケンサーを組み合わせることで把握し、衛生指標微生物との関係を検討した。さらにウイルスの検出濃度を元にレクリエーション利用に伴うリスク計算を行い、USEPA提唱の水道水での年間許容感染リスク(10^{-4})を超過するかどうか検討した。また、合流式下水道の雨天時越流水の発生を検知するための3次元蛍光分析の有用性を検討した。また、下水処理水の流入する都市河川における残留塩素と藻類への毒性影響を調査した。

その結果、腸管系ウイルスと指標微生物の関係については、大腸菌濃度は大腸菌群やGII-ノロウイルスの濃度と相関が見られず、大腸菌群は糞便汚染の指標として不適切であり、また大腸菌をウイルス汚染の指標として用いることは不適切であることが示唆された。下水処理場からの放流水は大腸菌、腸管系ウイルス、Fファージの南湖への主要な排出源であると考えられた。また、ノロウイルス感染のリスク計算をした結果、南湖において夏季に遊泳するとUSEPAの水道水での年間許容リスクを超過する恐れがあるが、釣りに関しては通年で感染リスクは低いと示された。3次元蛍光分析を下水に適用した結果、雨天時越流水の発生のマーカーとなりうる3次元蛍光スペクトルのピークを見出した。都市河川において下水処理場水の流入直後では残留塩素濃度は上昇し、それに伴って河床に出現する付着藻類の平均出現種数の減少と多様性指数の低下が見られた。また、海域の重要な海藻であるスサビノリを用いた生態毒性試験を行ったところ、残留塩素に対してスサビノリは敏感であることが示唆された。

[キーワード]

病原微生物、琵琶湖南湖、下水放流水、リスク評価、水生生物影響

1. はじめに

世界保健機構（WHO）は、水道水質基準、農業灌漑再生水基準に指標微生物による管理と並行させ、定量的微生物リスク評価（QMRA）で原虫やウイルスなどの個別病原微生物の管理方法を導入してきたが、新たに水域でのリクリエーション基準への適用を検討している。また米国環境保護庁（USEPA）でも、リクリエーション利用基準は、これまでの疫学調査と衛生指標の関係に加え、新たにQMRAによる方法を検討している。一方、わが国ではこれまでリクリエーション利用に関する疫学データがなく、1世紀近く前の米国での疫学情報に基づいていたが、今回の環境基準の糞便性指標設定の検討に当たっても、科学的な安全性の議論ができていない。また、現在検討されている大腸菌の環境基準値の導入と、今後導入が想定されるウイルスなどの個別病原微生物による基準値の設定に対応するための基礎データも十分にそろっていない。また、塩素消毒プロセスを経た下水は、放流先水域の水生生物に対して影響を与える可能性がある、知見が不足しているのが現状である。

2. 研究開発目的

上記の背景を鑑みて、本研究では、以下を研究開発目標とした。

（1）琵琶湖南湖における病原微生物、指標微生物の調査

琵琶湖南湖において毎月の定期調査を行い2年間継続して行い、琵琶湖南湖に存在する様々なウイルス、細菌をリアルタイムPCR、培養法を組み合わせる網羅的に把握し、衛生指標微生物との関係を検討した。ウイルスについては、定量結果を元に、レクリエーション利用に伴うリスク計算を行い、USEPA提唱の年間許容感染リスク(10^{-4})を超過するかどうか検討した。

（2）合流式下水道雨天時越流水の発生の推定

合流式下水道の雨天時越流水の発生を推定し、（1）での調査との関わりを検討した。

（3）次世代シーケンサーを用いたバクテリア群集構造の解析

次世代シーケンサーを用いた16S rRNA配列に基づくバクテリアの群集解析を確立し、琵琶湖南湖水試料および近隣の下水処理場放流水試料に適用し、琵琶湖南湖でのバクテリア群集構造を調べることで、琵琶湖南湖でのヒト糞便汚染を探る方法を検討した。

（4）下水処理水の流入する都市河川における残留塩素と水生生物の影響

山科川へ放流する2つの下水処理場からの放流水に含まれる残留塩素の動態と放流先河川の付着藻類の分布に及ぼす影響を現地調査するとともに、放流先が海域である場合を想定したとき、海藻であるスサビノリを用いた残留塩素の生態毒性試験を行った。

（5）3次元蛍光分析による合流式下水道雨天時越流水の検出の基礎検討

（2）での下水処理場放流水の他に合流式下水道の雨天時越流水が、琵琶湖への流入する場合に、両者を区分してモニタリングするために、3次元蛍光測定装置の利用可能性を検討した。

3. 研究開発方法

（1）琵琶湖南湖における病原微生物、指標微生物の調査

琵琶湖南湖を対象とし、月1回の定期調査を実施し、指標微生物及び病原微生物のデータを収集した。なお、琵琶湖南湖は水道水源として利用されているほか、ボートや魚釣りなどのレクリエーション利用も活発である。主要な病原微生物汚染源としては周辺の下処理場3か所からの下水

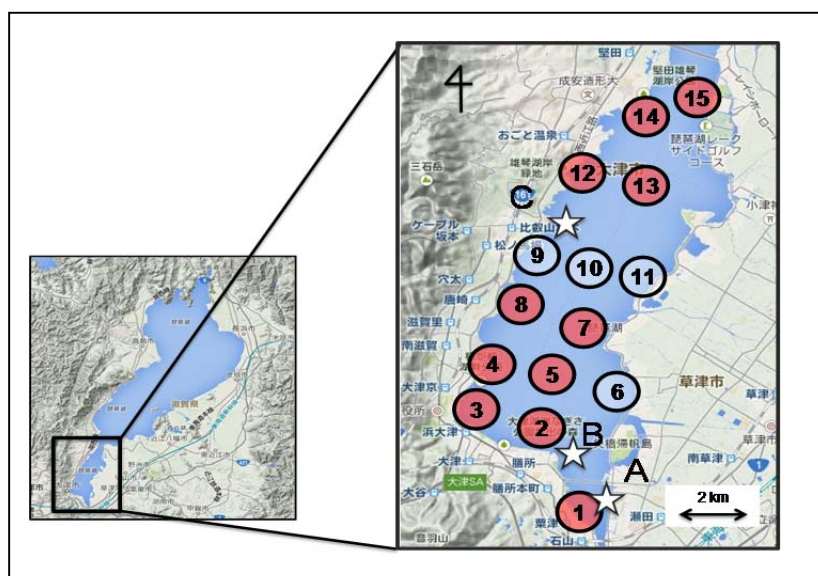
処理放流水が考えられるほか、激しい降雨時には合流式下水道からの越流水が十分な処理を経ずに流入する。そこで、上記の3下水処理場の流入水及び下水処理放流水（以下、放流水）も収集し、分析に供した。

1) 試料の収集

2014年7月から2016年3月にかけて、月に1度の頻度で琵琶湖南湖の複数地点で湖水試料を収集した。2014年7月から2015年3月までは15地点、2015年4月から2016年3月までは11地点で試料を収集した。バケツを用いて表層水を収集し、1地点につき約6 Lを滅菌済み容器（マイティーパック、1.8 L、マルエム）にて捕集した。これら試料は指標微生物分析、ウイルス濃縮（小容量法）及び微生物群集構造解析に供した。これに加え、2014年7月から2015年3月までは15地点中6地点、2015年4月から2016年3月までは11地点中4地点で表層水20 Lを同様に収集し、ウイルス濃縮（大容量法）に供した。

2014年11月から2016年3月にかけて、月に1度の頻度で南湖沿岸に位置する3か所の下水処理場で流入水試料及び放流水試料を収集した。流入水試料は250 mLを滅菌済み遠沈管（250 mL、Corning）にて捕集した。また、放流水試料（約4 L）は塩素消費のためチオ硫酸ナトリウム（終濃度：15 mg/L）を添加した滅菌済み容器（マイティーパック、1.8 L、マルエム）にて捕集した。これら試料は指標微生物分析、ウイルス濃縮（小容量法）に供した。

収集した試料は保冷したまま研究室へ輸送し、採取から24時間以内に指標微生物検出及びウイルス濃縮操作に供した。



図(1)-1. 調査対象地点。丸囲みの数字は湖水採水地点、図中星印（A-C）は下水処理場を示す。
赤色の地点は2015年4月以降の採水地点を示す。

2) 指標微生物の分析

大腸菌、大腸菌群はXMG寒天培地（ニッスイ）を用いた平板培養法により検出・定量した。試料1 mLもしくは5 mLをシャーレに添加し、寒天培地と混釈し、培地を固化させた後37°Cで一晩培養した。培養操作の後に形成したコロニーを計数し、存在濃度を求めた。なお、流入水試料など濃

度が高いと考えられる試料についてはリン酸緩衝液 (pH 7.0) により適宜希釈した後同様の操作に供した。また、特に低濃度と考えられる試料については50~1,000 mLを平板膜 (Analysis monitor: Advantec、孔径0.45 μm 、口径47 mmもしくはtype HA filter: Millipore、孔径0.45 μm 、口径47 mm) に通水した後、膜上に寒天培地を撒き、培養操作に供した。

Fファージは宿主として*Salmonella typhimulium* WG49を用いたブラック形成法 (Mooijman *et al.*, 2002) により検出・定量した。トリプトン1%、塩化ナトリウム 0.8%、グルコース0.1% (それぞれw/v) を含む寒天培地及び対数増殖期に達したWG49適量と試料5 mLをシャーレ上で混釈し、培地を固化させた後37°Cで一晩培養した。培養操作の後に形成したブラックを計数し、存在濃度を求めた。なお、流入水試料など濃度が高いと考えられる試料についてはリン酸緩衝液 (pH 7.0) により適宜希釈した後同様の操作に供した。また、特に濃度が低いと考えられる試料については、1試料あたりに10枚のシャーレを用いることで、50 mLからの検出とした。

3) ウイルス濃縮操作

小容量試料 (~4 L) 中のウイルスはKatayama *et al.* (2002) の手法により濃縮した。試料に終濃度25 mMで2.5 M 塩化マグネシウム水溶液を添加し、ニトロセルロース膜 (type HA, Millipore、孔径0.45 μm 、口径90 mm) に通水した。通水過程で膜に目詰りが生じた場合は通水を取りやめ、次の操作に移行した。続いて0.5 mM 硫酸 (pH 3.0) 200 mLを膜に通水した。さらに、1.0 mM 水酸化ナトリウム水溶液10 mLを膜に通水し、ろ液を捕集した。ろ液は0.5 mM 硫酸 50 μL 及び100 \times TE-Buffer (和光純薬) 100 μL と混合し、これを一次濃縮液とした。一次濃縮液全量を遠心式UF濃縮ユニット (centriprep YM-50, Millipore) による濃縮操作に供し、約650 μL の二次濃縮液を得た。濃縮水量は琵琶湖表層水について最大4 L、流入水及び放流水についてそれぞれ0.1 L、2 Lとした。

大容量試料 (20 L) 中のウイルスはHata *et al.* (2015)の手法により濃縮した。試料に終濃度25 mMで2.5 M 塩化マグネシウム水溶液を添加し、カートリッジ式ニトロセルロース膜 (opticap XL-2, Millipore、孔径0.5 μm 、膜面積 0.1 m^2) に通水した。続いて0.5 mM 硫酸 (pH 3.0) 2 L及び超純水1 Lを膜に通水した。さらに、1.0 mM 水酸化ナトリウム水溶液200 mLを膜に通水し、ろ液を捕集した。ろ液は0.5 mM 硫酸 1 mL及び100 \times TE-Buffer 2 mLと混合し、これを一次濃縮液とした。一次濃縮液全量を遠心式UF濃縮ユニット (centricon plus-70, Millipore) による濃縮操作に供し、約650 μL の二次濃縮液を得た。

4) 定量RT-PCRによるウイルスRNAの検出

二次濃縮液を用い、定量 RT-PCR (以下RT-qPCR) によるRNA定量を試みた。まず、二次濃縮液140 μL より、QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) によるRNA抽出操作に供し、RNA抽出液60 μL を得た。RNA抽出液 2.5 μL をHigh performance reverse transcription kit (Life technologies) による逆転写反応 (Reverse transcription: RT) に供し、cDNA 5 μL を得た。得られたcDNA 5 μL から、qPCRによる各種ウイルス遺伝子の検出を試みた。測定対象はGI型及びGII型ノロウイルス (NoV, Kageyama *et al.*, 2003)、サポウイルス (SaV, Oka *et al.*, 2006)、ロタウイルス (RV, Pang *et al.*, 2004)、エンテロウイルス (EV, Katayama *et al.*, 2002)、アイチウイルス (AiV, Kitajima *et al.*, 2013)、トウガラシ微斑ウイルス (pepper mild mottle virus: PMMoV, Zhang *et al.*, 2005)、

GI型～GIV型FRNA大腸菌ファージ (FPH、Wolf *et al.*, 2008)、マウスノロウイルス (MNV、Kitajima *et al.*, 2008) とし、プライマー、TaqManプローブは既往文献記載のものを使用した。

(2) 合流式下水道雨天時越流水の発生の推定

合流式下水道ではある程度以上の降雨時には雨水吐やポンプ場から汚水と雨水の混じった下水が未処理で放流される雨天時越流の問題がある。滋賀県大津処理区合流区域における雨天時越流水の量を降雨イベントから推測し、琵琶湖南湖での定期調査が雨天時越流イベントを捉えることができていたかどうかを検討した。

合流式下水道では少雨の際は雨天時越流が起こらないようにある程度の下水量を処理場まで流下させる。この量を遮集量という。本研究で対象とした滋賀県大津処理区合流区域では、降雨があると晴天時時間最大汚水量(Qとする)の1倍、すなわち1Q分の下水は遮集管によって遮集されA下水処理場まで流下し、下水処理の後に放流される。1Qを超える分の下水は貯留管に流れ込む。貯留管に流れ込んだ下水の一部はA下水処理場へ遮集され、高速凝集沈殿処理された後に放流される。遮集限界を超えた下水は貯留管で貯留されることになる。そして、貯留管での貯留限界をも超えた分の下水は、雨水吐から未処理のまま放流されることになる(未処理放流)。

気象庁ホームページより入手した大津アメダスの1時間降雨強度(mm/h)を入力値として、貯留管の遮集量(mm/h)・貯留量(mm)及び未処理放流量(mm/h)を1時間毎に計算した。計算条件は以下のよう設定した(図(1)-2も参照)。2014年4月1日～2016年2月29日までの期間について計算を実施した。

① 降雨量の計算：降雨強度(mm/h)、降雨時間(h)、および大津処理区合流区域の土地面積(155ha = $155 \times 10^4 \text{ m}^2$)より計算。例えば1.0mm/hの雨が1時間降った場合、約1,550m³に相当する

② 降雨の初期損失：考慮しない

③ 流出係数(地表面に到達した降雨に対し、浸透・蒸発等をせず地表に流出するものの割合)

：本試算では、大津処理区合流区域の全域に対して共通の流出係数を設定し適用した。その設定方法は、1: 各吐室の受け持つ処理区域毎に、土地利用形態に応じた流出係数を設定し、2: 処理区域毎の受け持つ土地面積の大津処理区合流区域全体の面積に対する比を算出(面積の広い処理区域は当然、大津処理区合流区域全体に対する流出係数の寄与は大きくなる)、3: 1で設定した処理区域毎の流出係数と2で算出した処理区域毎の土地面積の比から、大津処理区合流区域の全域の共通の流出係数を算出した。その値は0.57となった。さらに地表に流出した雨水の全量を下水道が受け入れると仮定した。

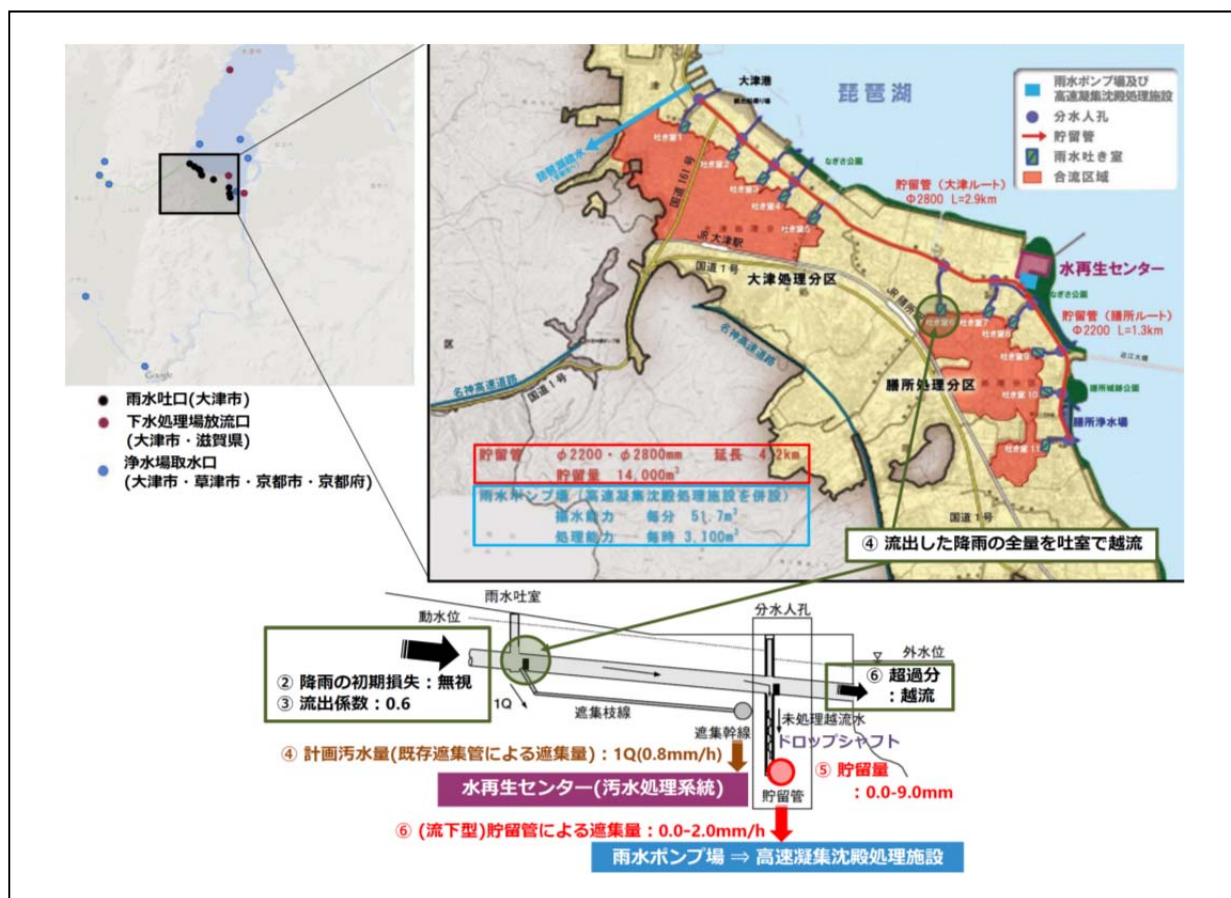
④ 遮集管の遮集量(雨水吐室で越流せず水再生センターへ流下する量)

：大津市では、晴天時時間最大汚水量ベースで1Q(雨水0.5～0.8mm/h相当)としている

：地表に流出した雨水の一部は遮集管によって遮集されるはずであるが、その量の正確な把握は不可能である。よって本研究では遮集管によって遮集される雨水はゼロと仮定し、全量が貯留管へ流れ込むと仮定した。つまり、遮集管による雨水の遮集量は無視した。

⑤ 貯留管の遮集能力：限界を2.0mm/hとし、超過した量が管内に貯留する

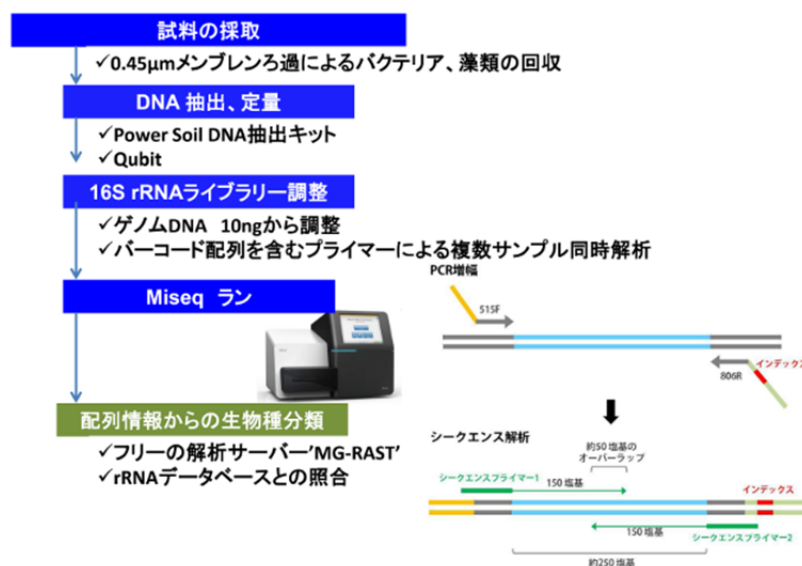
⑥ 貯留管の貯留能力：限界を9.0mmとし、超過した量がCSOとして環境中に放流される(未処理放流量)



図(1)-2 合流式下水道雨天時越流水発生予測、試算条件の説明
大津市、下水道機構の資料を基に作成

(3) 次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造の解析

次世代シーケンサーを用いた16S rRNA配列に基づく細菌の群集解析を、琵琶湖南湖水試料および近隣の下水処理場放流水試料に適用し、琵琶湖南湖での細菌群集構造を調べた。解析の流れを図(1)-3に示す。水試料からの細菌の分離、細菌からのゲノムDNAの抽出、次世代シーケンサー解析のためのライブラリーの調整、シーケンサーのラン、得られたデータのデータ解析を行った。



図(1)-3 次世代シーケンサーによる解析の流れ

a) 採水

2014年10月、2014年11月、2015年2月、2015年9月、および2016年1月に琵琶湖南湖水サンプルを採水した。採水地点は図(1)-1に示した通りである。また、2015年7月、2016年1月に琵琶湖南湖沿岸に位置する下水処理場3箇所（図(1)-1、A-C）で放流水試料を収集した。

b) バクテリアDNAの回収

琵琶湖水試料については2～4Lを混合セルロース膜(Millipore社製、直径90 mm、孔径0.45 μm)を用いたろ過によりバクテリアを膜面上に捕捉したのち、滅菌したフットボール型攪拌子を用いてセルロース膜から剥がし、エッペンチューブに回収した。回収したバクテリアから、PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO製)を用いてDNAを回収した。PowerSoil® DNA Isolation Kitは底質等に存在するバクテリアからのDNA回収に定評のあるキットである。具体的な操作手順はキットに添付のマニュアルに従った。

c) DNA濃度の測定

DNA濃度を正確に測定することは以降のPCR反応やライブラリーの出来を大きく左右するので、吸光度による測定では不十分である。よって、DNA濃度の測定はQubit®2.0 Fluorometer (Life Technologies製)を用いておこなった。なお、測定時の試料の量は1 μLとした。Qubit®2.0 Fluorometer はDNAに特異的に吸着する蛍光試薬を用いて濃度を高精度、高感度に測定する事が可能である。Qubit®2.0 Fluorometer による定量結果に基づいて、DNA濃度を1 ng/μLに調整した。回収されたDNA量がこれに満たないサンプルについては0.5 ng/μLに調整し、PCRに供した。

d) PCRによる16S rRNA V4領域の増幅

16S rRNA遺伝子V4領域をPCRにより増幅した。プライマーは515番目～806番目の塩基配列を挟むように設定した。プライマーにはバーコード配列が付加してあり、サンプル毎に異なるバーコード配列を使い分けることで最大96サンプルまで同時解析が可能である。PCR試薬はQuanti Fast SYBR Green PCR kit (QIAGEN社製)を用いた。

e) 次世代シーケンサー用のライブラリーの調整

PCR産物はQIA quick® PCR Purification Kit (QIAGEN製)を用いて精製した後、ライブラリー調

整へ供した。各サンプルの16S rRNA PCR産物を当量ずつ混合し、「16S rRNA PCRライブラリー」を作成した。リアルタイムPCRによる濃度確認を経て次世代シーケンサーへ供した。

f) MiSeqでの遺伝子配列解析

4 nMに調整したライブラリーをさらに12 pMに希釈して、illumina社製の次世代シーケンサーMiSeqへ供した。MiSeqランの試薬はMiSeq Reagent Kit、300 Cycles (illumina社)を用いた。このキットは、PCR産物の両端から150bpずつ、合計300bpの配列の解読が可能である。

g) データ解析

16S rRNAのアノテーション付は、フリーの解析サーバー Metagenomics RAST (MG-RAST) (<http://metagenomics.anl.gov/>)によって実施した。MG-RASTはBlast like Alignment Tool (BLAT) アルゴリズムを採用しており、ある閾値以上で類似性のある配列を検索してくれる。本研究では、閾値は塩基配列の相同性 (Min. % Identity Cutoff) を95%、最小の長さ (Min. Alignment Length Cutoff) を50base、e-valueの最大値を $1e^{-30}$ にセットして解析を行った。バクテリアの分類結果はClass(綱)レベルの分類で表示した。サンプルごとにどのバクテリア種がどのくらいの割合を占めているのかを算出し、サンプル間でバクテリアの群集構造を比較した。なお、ある種の藻類は葉緑体のような色素体を持つ。色素体DNAに含まれる16S rRNAの配列から藻類についても分類を行った。

(4) 下水処理水の流入する都市河川における残留塩素と水生生物の影響

1) 下水処理水の流入する都市河川における藻類種の変化

本研究で調査対象とした都市河川の山科川は、京都市南部を流れる小河川である。山科川には2つの下水処理場からの放流水 (STP1 (石田処理場)、STP2 (東宇治処理場)) があるのに加えてSTP2のおよそ400m下流でため池からの流入がある。また、山科川はSTP2のおよそ1.5km下流で宇治川に合流している。下水処理場とサンプリング地点の関係を図(1)-4に示す。3地点 (R1、R5、R6) において河川水を、2地点 (STP1、STP2) において下水処理場放流水を採取した。また、5地点 (R1、R2、R3、R4、R5) において付着藻類を採取した。R1はSTP1放流口の直上流、R2はSTP1放流口の直下流、R3はSTP2放流口の直上流、R4はSTP2放流口の直下流、R5はSTP2放流口のおよそ800m下流の地点である。

河川水および下水処理場放流水の採水はステンレス製のバケツで行い、ポリプロピレン製のボトルに入れ替えて持ち帰った。持ち帰ったサンプルは速やかにガラス繊維ろ紙 (GF/B、孔径 $1\mu\text{m}$ 、Whatman) で濾過し、ポリプロピレン製のボトルで 4°C で保存した。

付着藻類は河床の石から採取した。石を拾う際は周辺の石の中で比較的多く藻類が付着していると思われるものを選び、採取にはコドラート法を用いた。本手法は5cm四方の枠 (コドラート) とブラシを用いて、コドラートの内側の範囲にある石の表面の付着物すべてをこすり落とす方法である。種の同定・計数に使用するサンプルにはルゴール溶液を3%程度加えて保存した。下水放流水 (STP1、STP2) と河川水 (R3、R5) において全残留塩素濃度を測定した。



図(1)-4 都市河川におけるサンプリング地点

2) 下水処理場での消毒による藻類に対する影響評価

下水処理場では、活性汚泥処理の後に消毒が実施されて水域に放流されるが、消毒による水生生物への毒性影響が懸念される。そこで、下水処理水が海域へ放流された場合を想定して、海域における重要な藻類として海藻を用いた生態毒性試験を行い、下水の消毒に一般的に用いられている塩素の海藻への毒性影響を評価するとともに、実際の下水を用いて塩素消毒を適用した場合の水生生物への毒性影響についての検討を行った。

塩素消毒実験では300mL三角フラスコに下水試料を100mL入れ、次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬）を適当に希釈して調整した溶液を所定量注入し、注入後15分後の試料を生態毒性試験に供した。供試生物として、*Pyropia yezoensis*（スサビノリ）を用いた。*Pyropia yezoensis*はウシケノリ目ウシケノリ科アマノリ属に属するノリである。また、スサビノリは、日本で養殖されている代表的な海苔である。本研究では、兵庫県立農林水産技術総合センターから分譲された株を用いた。海藻の培地にはNPM培地を用いて行った。培地に用いたNaNO₃およびグリセロリン酸Naは和光純薬工業製のものを、クレワット32はナガセケムテックス社製のものをを用いた。また、スサビノリの生長の測定は定規を用いての目視および画像から解析ソフト(imageJ

(<http://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて行った。目視では、ノリをフラスコから取り出し、測定ができるようにピンセットを用いて広げたのち、葉長（ノリを広げてノリの育つ際に伸びる方向における最も長い部位の長さ）（ノリを広げて葉長と垂直方向に最も幅の広い部位の長さ）を測定した。

試験では、一つの試料に対して3連で実験を行った。300mL三角フラスコに試料を200mL入れた後、葉長が1cm程度になるように切ったスサビノリを入れ、シリコ栓をした。このフラスコを培養庫（東京理化器械株式会社、照明付インキュベーターFLI-2000T）の中で20℃±2℃、照度

1000luxの明暗条件(10時間明期/14時間暗期)で培養を行った。また、塩素消毒を行った下水試料を用いた実験では、下水への塩素注入率は5mg/Lとし、塩素添加した下水試料を培地に1、2、5、10、20%添加して試験を行った。また、試料の入った試験培地は3~4日に一回の割合で、0日目と同様の試料を入れた試験培地を用いて試験培地の入れ替えを行った。

(5) 3次元蛍光分析による合流式下水道雨天時越流水の検出の基礎検討

1) 水試料の採水及びろ過操作

琵琶湖南湖での採水地点、近隣下水処理場の位置は図1-(1)に示したとおり。2015年11月から2016年3月にかけて、月に1度の頻度で琵琶湖南湖の11地点で湖水試料を収集した。調査期間を通じて各地点で1試料、計55試料を収集した。バケツを用いて表層水を収集し、1地点につき約50 mLを無菌容器(遠沈管、50 mL、ビオラモ)にて捕集した。

2015年10月から2016年2月にかけて、月に1度の頻度で南湖沿岸に位置する2か所の下水処理場で放流水試料を収集した。調査期間を通じて各処理場(A、C)で1試料、計10試料を収集した。試料(約50 mL)は無菌容器(遠沈管、50 mL、ビオラモ)にて捕集した。これに加え、2015年11月から2016年2月にかけて、月に1度の頻度で南湖沿岸に位置する1か所の下水処理場(B)で放流水試料を収集した。調査期間を通じて1試料、計5試料を収集した。試料(約50 mL)は無菌容器(遠沈管、50 mL、ビオラモ)にて捕集した。

これら試料は保冷したまま研究室へ輸送し、遮光状態で冷蔵保存した。保存後48時間以内にニトロセルロース膜(type HA、Millipore、孔径0.45 μm 、口径47 mm)によるろ過操作に供し、得られたろ液を3次元蛍光測定に用いた。

2) 3次元蛍光測定

ろ液(約10 mL)を用い、3次元蛍光測定による多波長励起-蛍光マトリックス(Excitation-Emission Matrix、以下EEM)を得た。EEMとは、試料水中の蛍光をもつ溶存有機物を調べるために、ある波長で励起した時に試料水から発せられる蛍光の波長とその蛍光強度を測定し、3次元のスペクトルとして表した図である。本研究では縦軸を励起波長、横軸を蛍光波長とし、段彩法により蛍光強度を表すものとする。測定機器はAqualog(Horiba社製)を用いた。測定条件を表1-(1)に示す。

表1-(1). 3次元蛍光測定の場合

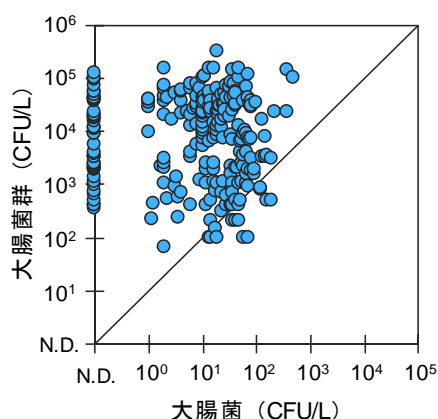
積分時間	波長設定	
	励起光	蛍光 (E_M) の受光
• Integration : 0.1s	<ul style="list-style-type: none"> • High : 800nm • Low : 240nm • Increment : 3nm 	<ul style="list-style-type: none"> • High : 244.13nm • Low : 826.63nm • Increment : 4.66nm (8 pixel)

4. 結果及び考察

(1) 琵琶湖南湖における指標微生物、病原微生物の調査

1) 琵琶湖南湖における大腸菌および大腸菌群の存在状況

下水試料など糞便に強く汚染された水中では、大腸菌と大腸菌群の濃度比は1:10程度となることが知られている (Costán-Longares et al., 2008, Water Res.)。しかしながら、本調査では、ほとんどの試料について、大腸菌群濃度が大腸菌濃度の100倍以上となった (図(1)-5)。この結果は琵琶湖南湖における採水で検出された大腸菌群はほとんどが糞便ではなく土壌等に由来することを示唆している。少なくとも琵琶湖南湖においては、大腸菌群は糞便汚染を測るための指標として有効でないことが示唆された。



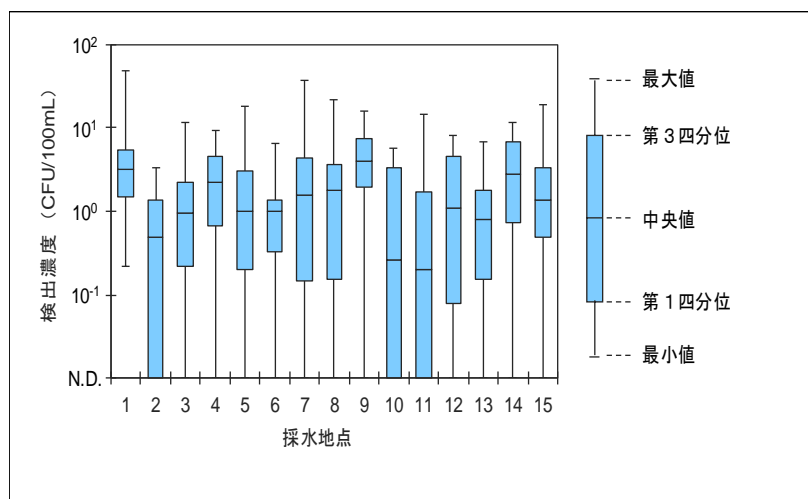
図(1)-5 琵琶湖南湖での大腸菌と大腸菌群の検出濃度比較。図中の斜線上にプロットが位置する場合、大腸菌と大腸菌群濃度比が1:10となる。軸上の” N. D. ” は不検出データ (検出下限値: 10^{-1} CFU/100 mL)。

琵琶湖南湖全15地点での大腸菌検出結果 (2014年7月～2016年2月、2015年4月以降は地点6、9、10、11を除く11地点でのみ採水) を図(1)-6に示した。大腸菌はおおむね 10^{-1} ～ 10^1 CFU/100 mL程度の濃度で検出された。特に下水処理場近傍である地点1および地点9ではそれぞれ中央値3.2 CFU/100 mL、4.0 CFU/100 mLで検出されており、他の地点よりも高濃度となる傾向にあった。さらに地点1では20回の採水日すべてで検出された。この結果から、少なくとも濃度ベースでは、琵琶湖南湖における大腸菌の主な汚染源の一つは下水処理水であることが示唆されるため、今後は負荷量ベースでの解析・検討を試みる必要がある。

地点1および地点9近傍の下水処理場における放流水中の大腸菌濃度は 10^2 ～ 10^4 CFU/100 mL程度であったことから、地点1に達するまでに1/10～1/1,000程度までに濃度が低下していると考えられた。遠方ではさらに濃度が低下しているが、これらの要因として、湖水による希釈、拡散、環境中での不活化が考えられる。

先に説明したように、琵琶湖南湖では大腸菌群数は糞便汚染の指標として適切ではないと考えられる。そこで、本研究で測定された大腸菌数と現行の環境基準との比較を試みる。現行の環境基準では、水浴や通常の水道浄水操作 (沈殿ろ過等) を想定している用途の湖沼A類型では大腸菌群数1,000 MPN/100mLと基準が定められている。現在、大腸菌の基準値が見直し中ではあり検討さ

れている数値が公開されていないので、仮に下水試料など糞便に強く汚染された水中での大腸菌と大腸菌群の濃度比の1:10程度 (Costán-Longares et al., 2008、Water Res.) を当てはめて考えると、A類型大腸菌群数に相当する大腸菌数は“100 /100mL”となる。図(1)-6に示したとおり、琵琶湖南湖の全採水地点で大腸菌数は100 /100mL未満となっており、琵琶湖南湖の大腸菌数は現在検討されている大腸菌の環境基準A類型程度を満たしていると考えられ、水浴や現状の水道利用の基準は満足されると想定できる。



図(1)-6 琵琶湖南湖での大腸菌検出結果 (2014年7月～2016年2月)。

縦軸上の” N.D. ” は不検出データ (検出下限値: 10^{-1} CFU/100mL) を示す。

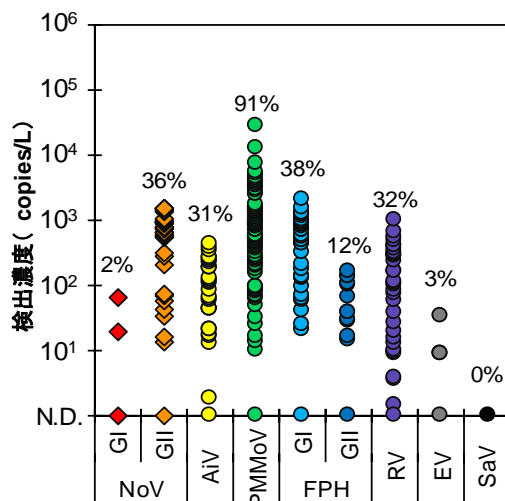
2) 琵琶湖南湖での腸管系ウイルス及びウイルス指標の存在状況

RT-qPCRによるウイルス遺伝子検出に際しては、20 Lの大容量濃縮および最大4 Lの小容量濃縮と、濃縮水量の異なる2種のウイルス濃縮手法を適用した。2014年7月から2015年3月までは、大容量濃縮を6地点 (地点1、6、8、10、12、15) で、小容量濃縮を15地点で実施した。2015年4月から2016年2月までは、大容量濃縮を4地点 (地点1、8、13、15) で、小容量濃縮を11地点 (地点6、9、10、11を除く) で実施した。

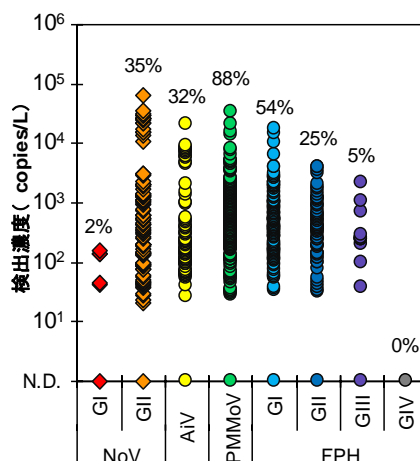
図(1)-7 に大容量濃縮試料からのウイルス検出結果 (2014年7月～2016年2月採水の計98試料)、図(1)-8に小容量濃縮試料からのウイルス検出結果 (2014年7月～2016年2月採水の計256試料) を示した。大容量濃縮試料からは対象とした9種のウイルス種のうち、8種が検出された。特にトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)、GI型大腸菌ファージ (GI-FPH)、GII型ノロウイルス (GII-NoV)、ロタウイルス (RV)、アイチウイルス (AiV) がそれぞれ89試料、37試料、35試料、31試料、30試料で陽性となり、高頻度で検出された。また、小容量濃縮試料からは対象としたウイルス8種のうち、7種が検出され、PMMoV、GI-FPH、GII-NoV、AiVがそれぞれ224試料、139試料、89試料、82試料で陽性となり、特に高頻度で検出された。これは大容量濃縮と同様の検出傾向であった。リスク因子と考えられるウイルスとしてはGII-NoVおよびRVが高頻度で検出されたが、GI型ノロウイルス (GI-NoV)、エンテロウイルス (EV)、サポウイルス (SaV) はほとんど検出されなかった。なお、AiVはヒトに感染するウイルスであり、病原性については不明確だが、ヒトに由来する糞便汚染を受けた水環境中で比較的高濃度となることが知られており (Hata et al., 2014)、GII-NoVお

よびRVは特に冬季にウイルス性胃腸炎の大流行を引き起こすウイルスである (Ahmed et al., 2014)。

大容量濃縮手法は小容量濃縮手法に比べて検出濃度が1 log程度低い傾向にあるが、より大量の水試料を濃縮したことにより、濃縮液中の有機物濃度が高まり、核酸抽出やRT-qPCR効率の低下が生じたためと考えられる。核酸抽出及びRT-qPCR効率阻害の影響を評価するため、試料中にマウスノロウイルス (MNV) 高濃度原液を添加し、添加濃度 (期待値) に対する検出濃度 (実測値) の比を計算した。この比をMNV回収率と呼ぶこととする。ここでは、MNV回収率が10%を下回った場合、検出阻害が生じたと判断し、1%を下回った場合、特に深刻な検出阻害が生じたと判断する (da Silva et al., 2007)。小容量濃縮試料でMNV回収率が10%を下回ったのは全256試料中7試料のみであったのに対し、大容量濃縮試料については全98試料中66試料でMNV回収率が10%を下回った。さらにそのうち16試料でMNV回収率が1%を下回った。このことから大容量濃縮操作により湖水試料中の有機物濃度も濃縮されることで、核酸抽出及びRT-qPCR効率阻害が生じたことが示唆された。このため、以下のデータは主に小容量濃縮試料を用いて評価する。



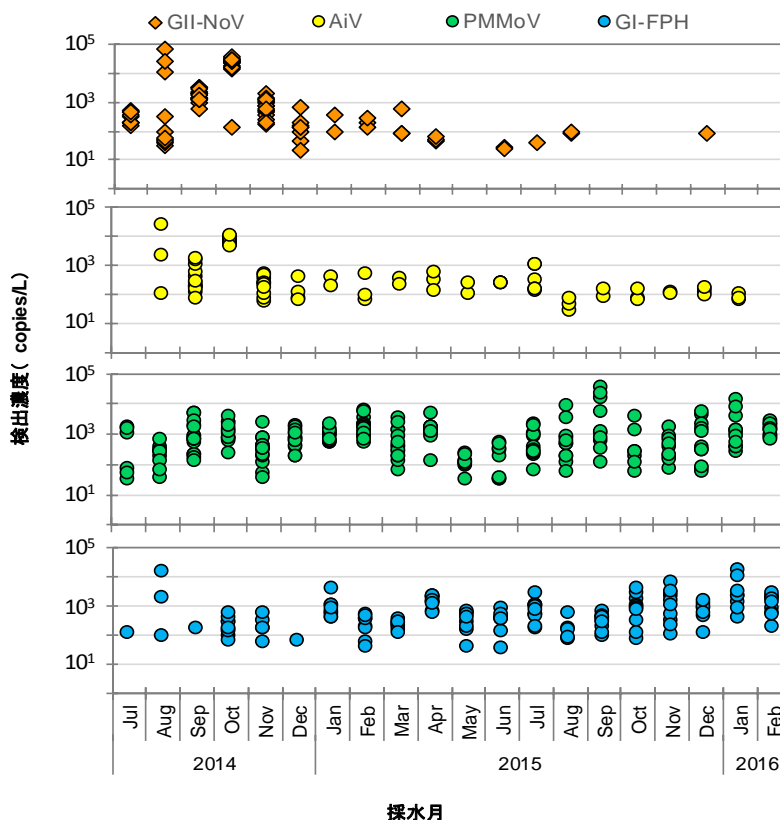
図(1)-7 琵琶湖南湖6地点における大容量試料 (20 L) からの腸管系ウイルス検出結果 (2014年7月~2016年2月、N = 98)。図中の数値は陽性率を示す。縦軸上の” N.D.” は不検出を示す。



図(1)-8 琵琶湖南湖15地点における小容量試料（2～4 L）からの腸管系ウイルス検出結果（2015年4月～2016年2月、N = 256）。図中の数値は陽性率を示す。縦軸上の” N.D.” は不検出を示す。

3) 琵琶湖南湖での腸管系ウイルス及びウイルス指標濃度の時間変動

図(1)-9に小容量濃縮手法適用時のGII-NoV、AiV、PMMoV、GI-FPHの陽性数を採水月ごとに示した。対象とした全256試料からの陽性率はPMMoVが最も高かった（224試料で陽性）。GII-NoVは2014年に90試料中72試料で陽性となり、高頻度かつ高濃度で検出されていたが、2015年以降は166試料中17試料で陽性と検出頻度が著しく低下した。検出濃度も $10^1 \sim 10^2$ copies/L程度と定量下限値付近の低濃度であった。検出濃度の時間変動に比べ、同採水月の検出濃度の地点間差は小さかった。また、一般的な冬季流行性とは異なり、6～8月の夏季においても検出された。AiVもGII-NoV同様、2014年に陽性率が高く、2015年以降は陽性率が低下する傾向にあった。調査期間を通して $10^2 \sim 10^3$ copies/Lの濃度で検出され、いずれの調査月も検出濃度の地点間差が小さかった。これに対して、PMMoV、GI-FPHは各調査月の検出濃度の地点間差が100～1,000倍と大きい傾向が見られた。さらに、PMMoVは調査期間を通して高頻度で検出される傾向にあり、GI-FPHは2014年と比べて2015年以降に陽性率が高くなる傾向が見られた。これらの結果から、琵琶湖南湖においてPMMoV、GI-FPHの濃度変動傾向はAiV、GII-NoVとは異なることが示唆された。



図(1)-9 琵琶湖南湖における各採水月のGII-NoV、AiV、PMMoV、GI-FPH検出結果
(2014年7月～2016年2月)。

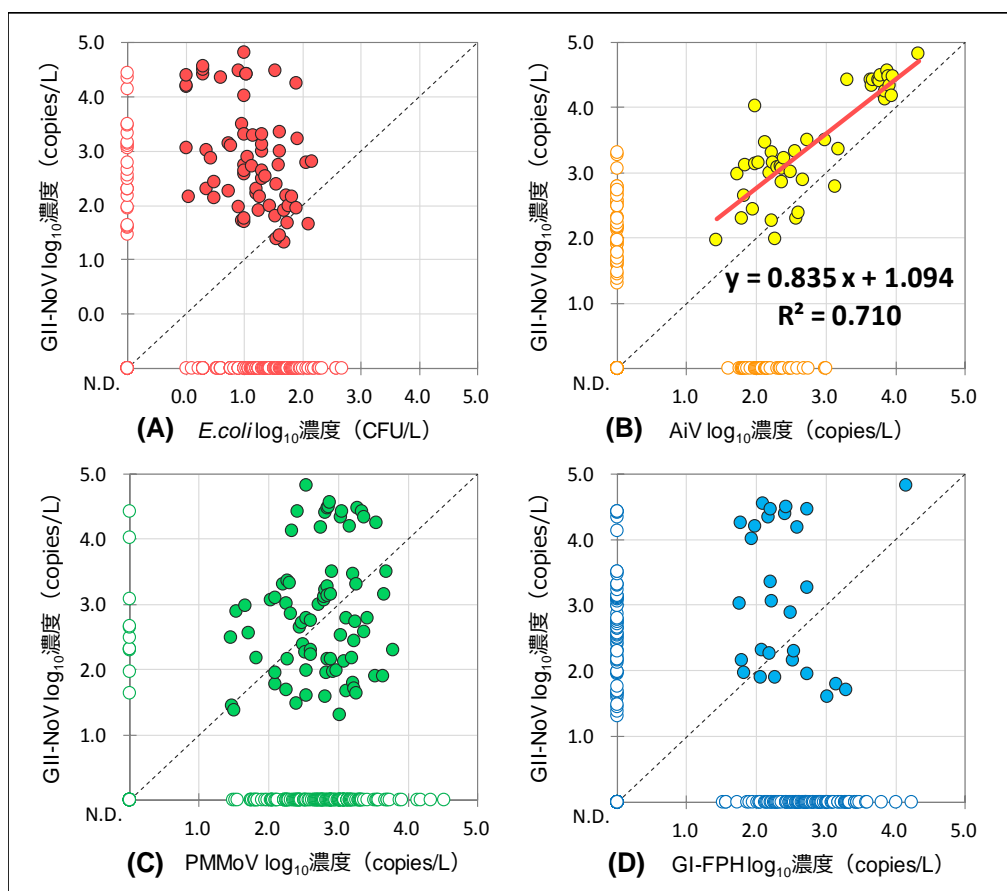
上記4種のウイルスの相互相関性を精査するため、図(1)-10に琵琶湖南湖の小容量濃縮試料から検出されたGII-NoVとAiV、PMMoV、GI-FPHの検出濃度の比較を示した。加えて指標微生物である大腸菌との比較も示した。大腸菌はGII-NoVに比べて検出濃度が低く、濃度の相関も見られない。さらに、GII-NoVが 10^4 copies/L以上と高濃度で検出された試料で大腸菌が不検出となることもあり、琵琶湖南湖では、大腸菌をウイルス汚染の指標として用いるのは不適切であることが示唆された。AiVは測定した全ウイルス種の中で最もGII-NoVと類似した濃度分布であった。特にGII-NoVが 10^4 copies/L以上の高濃度で検出された試料について、AiVも同様に高濃度で検出された。これらの結果から、AiVは“病原ウイルスの存在を示す指標”として有望であると考えられる。

一方、PMMoVは測定した全ウイルス中、最も高頻度で検出されたが、GII-NoV濃度との相関は見られなかった。また、全試料のうち88%からPMMoVが検出されている(図(1)-8)。これらの結果から、病原ウイルスが存在しない環境水中にもPMMoVが普遍的に存在すると考えられる。PMMoVは必ずしも病原ウイルスの流行を表していないが、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”としては有望であると言える。

GI-FPHは検出頻度が二番目に高いウイルスであり、PMMoVと同じく、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”として利用できる可能性が考えられる。その一方、前述の通り、GII-NoVとは検出された時期が大きく異なり濃度相関は見られなかった。また、PMMoVとは対照的に、GII-NoVが検出された89試料のうち34試料(38%)でしかGI-FPH

が検出されなかった。GI-FPHもPMMoVと同じく必ずしも病原ウイルスの流行を表していないと考えられる。

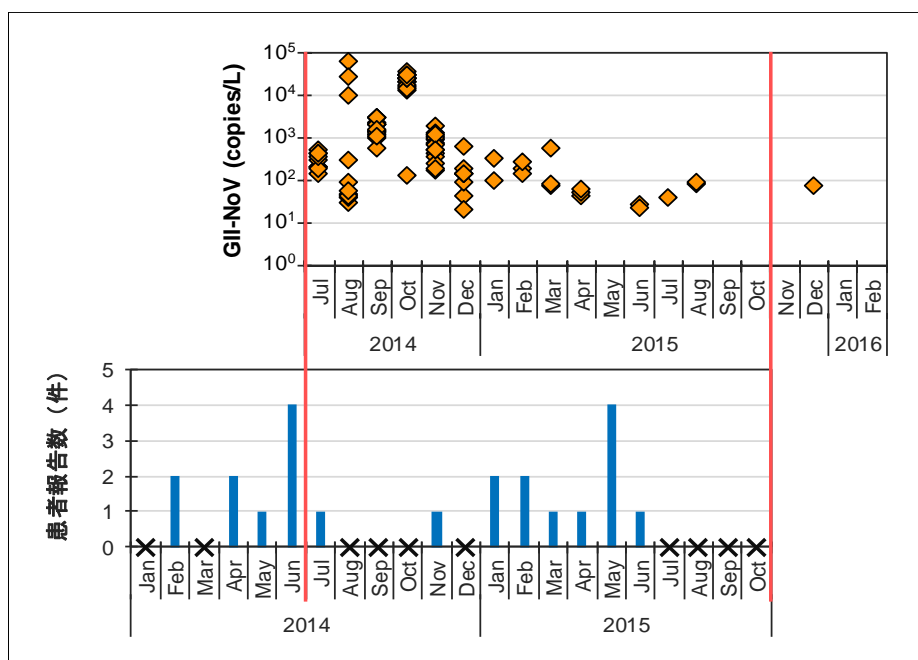
GII-NoVとAiVの相関が見られた理由として、GII-NoVおよびAiVは宿主がヒトに限られ、両者共に直径20 nm程度の正二十面体構造であることが考えられる。これに対し、PMMoVはヒトから高濃度で排出されるものの、宿主は植物であるため、ヒト糞便以外の汚染ソースがある可能性がある。また、長径300 nm、短径20 nm程度の棒状構造であり、湖流等の環境での減衰機構がGII-NoVと異なると考えられるため、GII-NoVと異なる濃度変動パターンを示したと考えられる。また、GI-FPHについてはGII-NoV、AiVと同様に正二十面体構造をしているが、ヒト以外にも鳥類の糞便等の汚染ソースがあるため、GII-NoVとは異なる濃度分布を示したと考えられる。



図(1)-10 小容量濃縮試料から検出したGII-NoVと大腸菌 (A)、AiV (B)、PMMoV (C)、GI-FPH (D) の検出濃度比較。図中の斜線にプロットが位置する場合、GII-NoVとの濃度比が1:1となる。図中の” N.D. ” は不検出を示す。

4) 琵琶湖南湖での水利用における安全性評価

琵琶湖南湖において6~8月の夏季からもGII-NoVが検出されたが、滋賀県感染症情報によると2014年、2015年ともに非流行期の5、6月にも滋賀県内にGII-NoV患者が存在していることが明らかになった(図(1)-11)。これらの患者の糞便とともに排出されたGII-NoVが下水処理場へ流入し、処理しきれずに残ったGII-NoVが琵琶湖に放流されたと考えられる。これにより、琵琶湖南湖において非流行期である夏季からもGII-NoVが検出されたと考えられる。



図(1)-11 琵琶湖南湖試料からのGII-NoV検出結果（上図）と
滋賀県内のGII-NoV患者報告数（下図）
滋賀県感染症情報月報2016年2月版を基に作成。

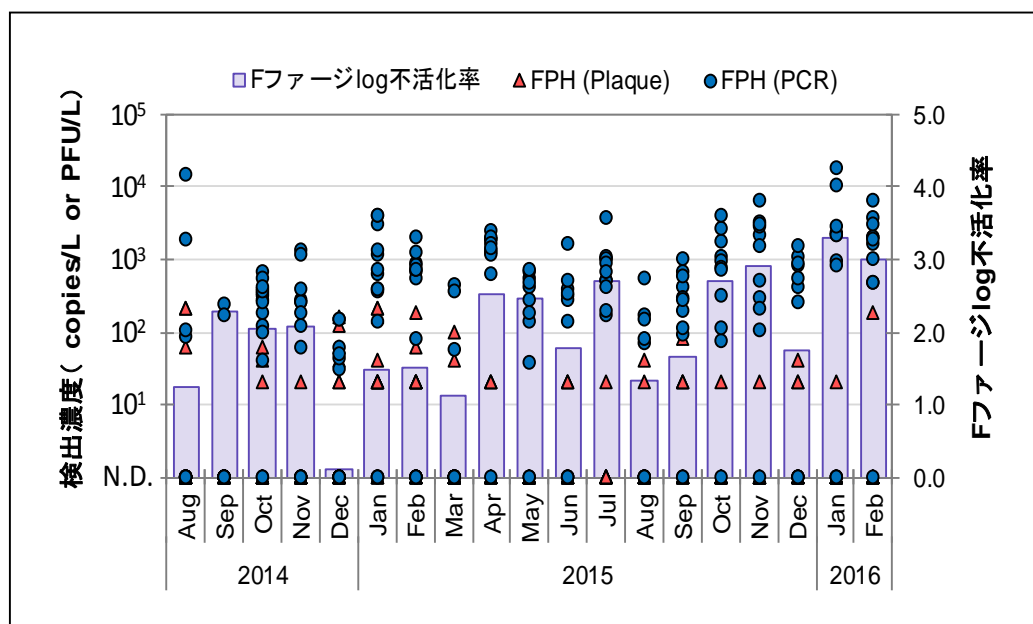
PCRによるウイルス検出ではウイルスの感染力は評価できないため、検出されたウイルスが不活化していることが考えられる。そこで、培養法（ブラック法）により感染価を有したFファージの検出を試みることで、他の腸管系ウイルスが感染力を保持していた可能性を検証した。加えて、PCRによるFファージの定量も試み、以下の式でFファージlog不活化率を算出した。

$$\text{Fファージlog不活化率} = -\log_{10} \frac{\text{培養法によるFファージ濃度 (PFU/L)}}{\text{PCRによるGI~GIV-FPH濃度の総和 (copies/L)}}$$

図(1)-12に琵琶湖南湖におけるFファージの検出結果及びFファージlog不活化率の季節変動を示した。培養法により測定したFファージ（FPH (Plaque)）の陽性率が22%（全241試料中53試料で陽性）と低い結果となった。しかし、2014年12月から2015年2月までの冬季においては同陽性率が53%（45試料中26試料で陽性）と高い傾向を示した。これに対して、PCRにより測定したGI~GIV-FPH（FPH (PCR)）の陽性率は全体で56%、冬季では58%と顕著な差は見られなかった。このため、Fファージlog不活化率は冬季に低くなる結果となった。

培養法によるGII-NoVの検出が確立されていないため、感染力を有するGII-NoV濃度を定量することはできない。そこで、GII-NoVの不活化率がFファージと同等であると仮定し、以下の式からPCRによるGII-NoV検出濃度から感染力を有するGII-NoV濃度を推定した。

$$\text{感染性GII-NoV} = \text{PCRによるGII-NoV検出濃度} \times \frac{\text{FPH (Plaque)}}{\text{FPH (PCR)}}$$



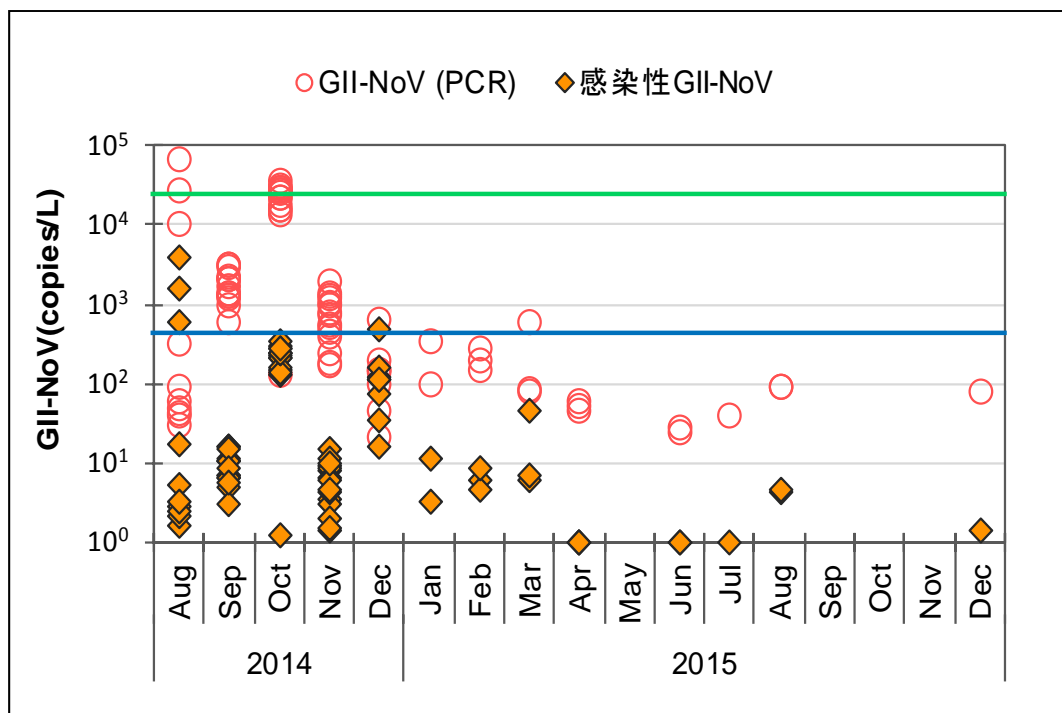
図(1)-12 琵琶湖南湖のFファージ検出結果及びFファージlog不活化率
Fファージlog不活化率は各採水月の平均値を棒グラフで表示した

そして、琵琶湖南湖でのレクリエーション利用による感染リスクを、推定した感染性GII-NoV濃度を用いて評価を試みた(図(1)-13)。曝露形態には遊泳時及び釣り時の誤飲を仮定し、表(1)-2に曝露頻度及び1回あたりの摂取量をまとめた(Asano et al., 1992)。GII-NoVの用量反応モデルにはベータ分布感染モデルを用いた(Teunis et al., 2008)。上記の曝露シナリオ及びベータ分布感染モデルから、年間許容感染リスク 10^{-4} (USEPA Surface Water Treatment Rule)を超過しないGII-NoV許容濃度を逆算した。遊泳時のGII-NoV許容濃度は 4.3×10^2 copies/L、釣り時のGII-NoV許容濃度は 2.6×10^4 copies/Lであった。

遊泳シーズンである2014年8月の3地点で、感染性GII-NoV濃度が遊泳時の許容濃度を超過した。不活化率が低かった2014年12月においても遊泳時の許容濃度を超過した。しかし、2014年10月をはじめ、他の採水月については感染力の補正後に許容濃度を下回ることが示された。釣りに関しては、2014年8月、10月にPCRによるGII-NoV検出濃度が許容濃度を超過していたが、感染力補正後の感染性GII-NoV濃度はすべての試料で許容濃度を下回った。以上より、遊泳及び釣りにおける感染リスクを評価したところ、夏季に遊泳すると年間許容リスクを超過する恐れがあるが、釣りに関しては通年で感染リスクは低いことが示された。今後は、Fファージの培養法の検出感度を向上させることでFファージの不活化率をより詳細に算出することや、GII-NoVとFファージの不活化率が同等であるという仮定を検証することが必要である。

表(1)-2 琵琶湖南湖での曝露形態別曝露頻度及び摂取量

曝露形態	曝露頻度	1回あたりの摂取量
遊泳中の誤飲	8回/年	30 mL/回
魚釣り中の誤飲	20回/年	0.2 mL/回



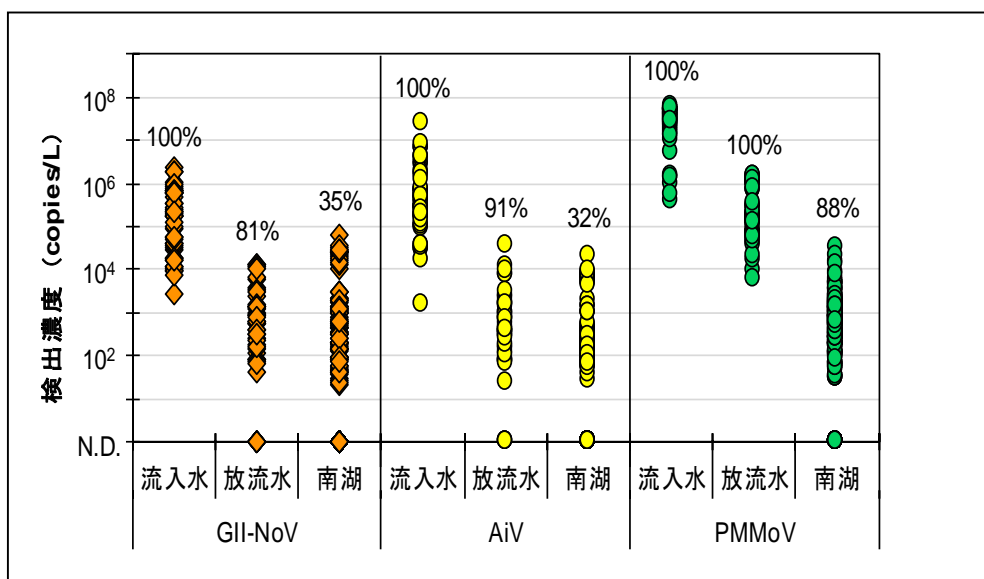
図(1)-13 琵琶湖南湖におけるPCRによるGII-NoV検出濃度及び感染性GII-NoV濃度の推定値
青線は遊泳時のGII-NoV許容濃度、緑線は釣り時のGII-NoV許容濃度を示す。

5) 近隣下水処理場での腸管系ウイルスの調査結果

南湖において大腸菌、腸管系ウイルス、Fファージは下水処理場近傍で特に高頻度で検出される傾向にあったため、下水処理場からの放流水は南湖への主要な排出源であると考えられる。そこで、2014年11月より南湖に放流する3か所の下水処理場で流入水試料及び放流水試料からの腸管系ウイルスの検出を試みた。これらの結果を南湖での検出結果と併せて図(1)-14にまとめた。ここで、処理場A及びBは地点1近傍に位置し、処理場Cは地点9の北部に位置する（図(1)-1参照）。GII-NoVは流入水47試料すべてから検出され、非流行期である夏季においても一定数の感染者が存在し、感染者糞便を通じて下水処理場へGII-NoVが流入していることが示された。さらに、下水処理によって2 log程度除去できているものの、放流水中にも47試料中38試料で $10^2 \sim 10^4$ copies/L程度の濃度で存在することが示された。南湖へ放流されたのち、検出頻度は小さくなるものの、湖水中でも同程度の濃度でGII-NoVが検出された。また、AiVもすべての流入水試料から検出され、一年中感染者が存在すると示唆された。GII-NoVと同様に下水処理によって3 log程度濃度が減少するが、南湖への放流後、湖水試料でも同程度の濃度で検出された。PMMoVは流入水・放流水とも

にすべての試料で検出され、濃度もGII-NoV、AiVに比べ高く、放流水中でも $10^4 \sim 10^6$ copies/Lと高濃度であった。南湖で希釈・拡散されるものの、放流水中の濃度が比較的高いため、湖水試料でも高い陽性率を示したと考えられる。

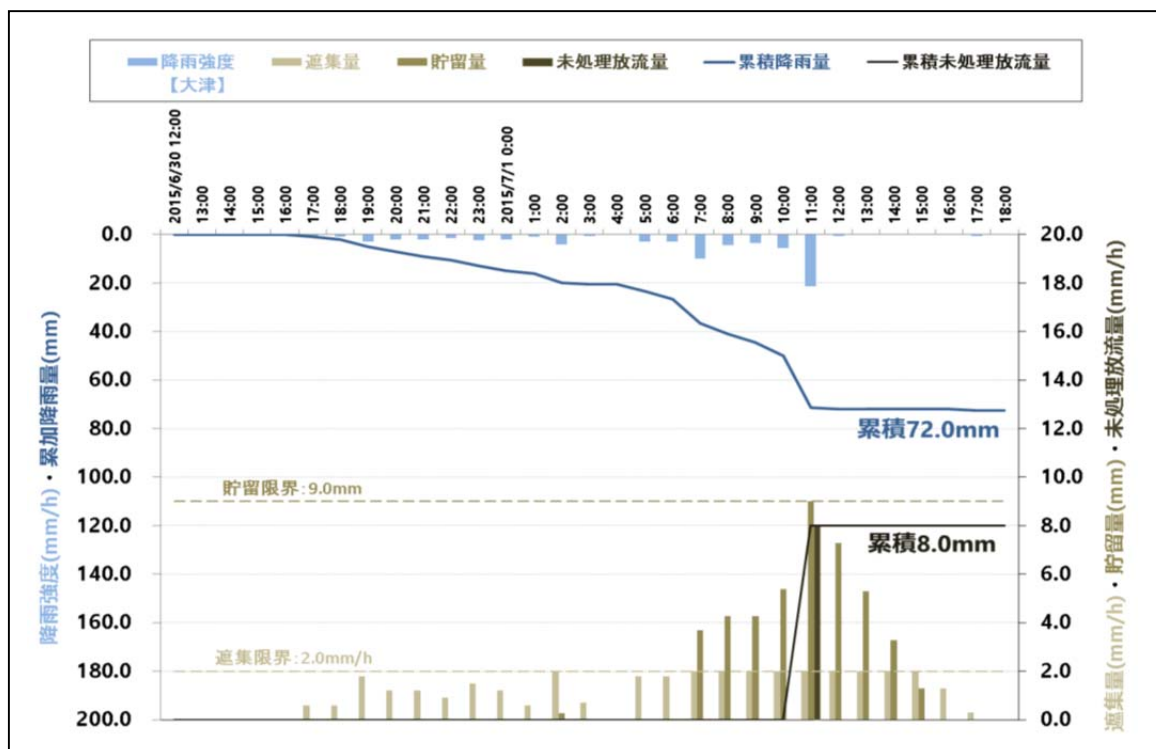
以上の結果から、南湖での陽性率及び検出濃度は下水処理場からの放流水中濃度に少なからず影響を受けていると示唆される。また、南湖で夏季においてもGII-NoVが検出された理由のひとつとして放流水から年間通して検出されることが挙げられる。ただし、下水処理場での採水日と琵琶湖南湖での採水日に約2週間の時間差があるため、放流直後の影響を捉えるためには下水処理場と琵琶湖南湖での採水日を同日に行う等の工夫が必要である。



図(1)-14 下水処理場流入水、放流水及び琵琶湖南湖試料からのGII-NoV、AiV、PMMoV検出結果
 図中の数値は陽性率を示す（下水処理場試料：N=47、琵琶湖南湖試料：N=256）。

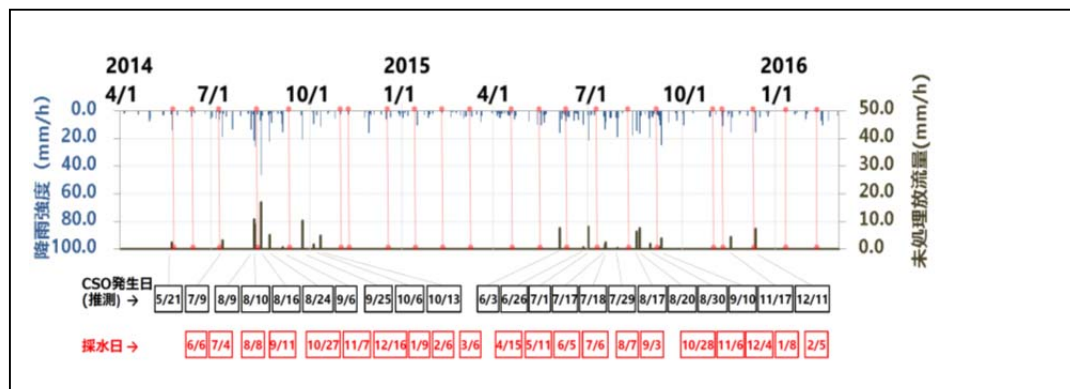
(2) 合流式下水道雨天時越流水の発生の推定

貯留管の遮集量(mm/h)・貯留量(mm)及び未処理放流量(mm/h)の計算例を図(1)-15に示す。この例は2014年6月30日17時～7月1日12時の独立の降雨イベントについて計算しており、計算の結果CS0(未処理放流)が発生したと推測される降雨イベントである。本例では、2014/7/1 2:00に貯留管の遮集能力の限界を超えて貯留管内への貯留が瞬間的に起こり、その量は0.3mmであった。同日の7:00に再び遮集能力の限界を超えて、貯留管内への貯留が開始した。さらに11:00に貯留能力の限界も超えてCS0が瞬間的に発生し、その量は6.7mm/hであった。その後は貯留量も減少し、CS0は発生しなかった。なお、遮集量は、6月30日17時の遮集の開始から7月1日16時の終了までの時間のうちに累積34.4mmであった。



図(1)-15 貯留管遮集量・貯留量および未処理放流量の計算例
2014年6月30日～7月1日の降雨イベントの計算例

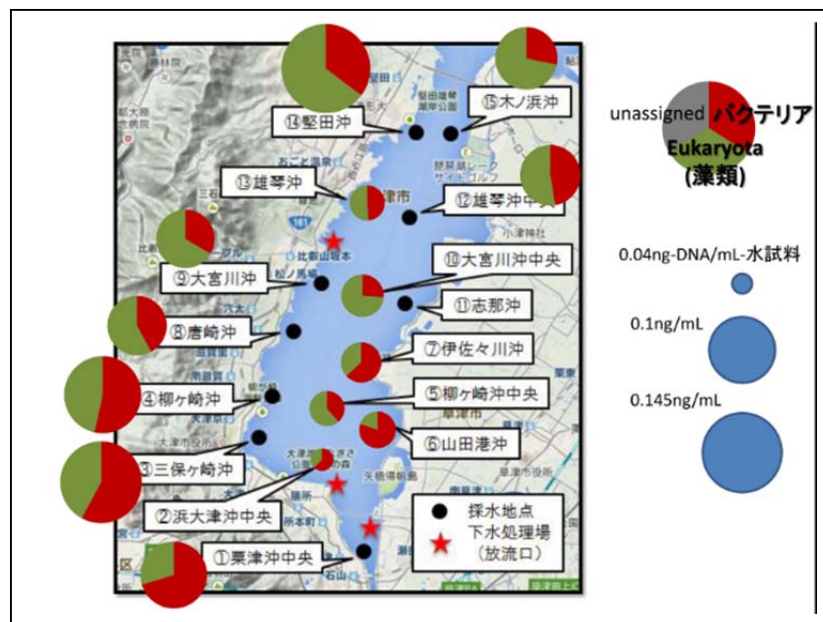
図(1)-15に示した例と同様に、2014年4月1日～2016年2月29日の期間について降雨強度に基づくCSOの発生を推測(未処理放流量の計算)した。その結果を図(1)-16に示す。この結果に基づくと、CSO発生直後(1～2日以内)に行われた調査はなかったと推測される。よって、本研究における琵琶湖南湖調査では微生物汚染に対するCSOの影響の有無を論じることは出来ない結果となった。琵琶湖南湖の調査は滋賀県也国土交通省が実施している月1回の定期調査に参加させていただく形で実施しており、CSOのタイミングに合わせる事が出来ない難しさがある。水系での微生物汚染に対するCSOの影響を評価するためには、採水の比較的容易な河川等で降雨イベント直後に調査することが必要である。



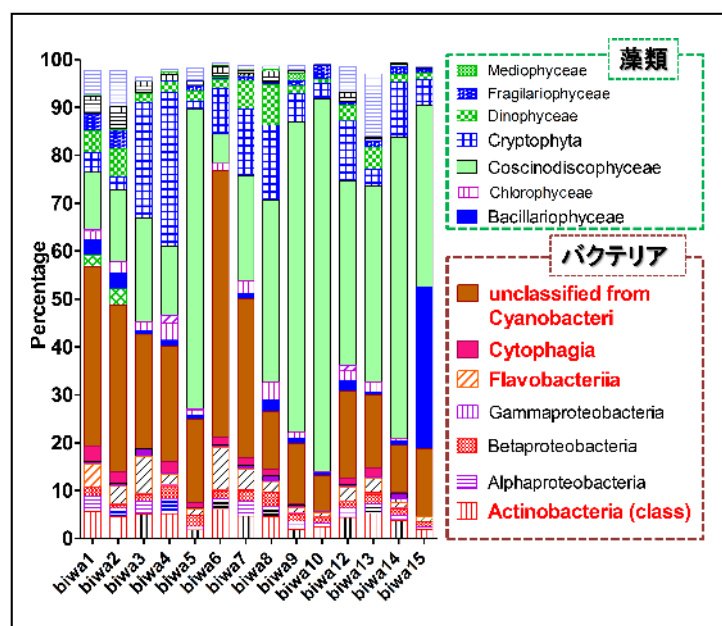
図(1)-16 2014年4月1日～2016年2月29日までのCSO発生予測結果

(3) 次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造の解析

琵琶湖南湖における細菌群集構造の解析結果を、2014年10月の琵琶湖南湖水サンプルを例に示す。図(1)-17は各地点で回収されたDNA濃度と、細菌由来、藻類由来のDNAの割合を示している。DNA濃度が最も高かった地点は地点③三保ヶ崎沖(0.145ng-DNA/mL)であった①栗津沖中央、④柳ヶ崎沖、⑧唐崎沖、⑭堅田沖の、湖西沿岸部でDNA濃度が高い傾向であった。一方、DNA濃度が最も低かった地点は地点②浜大津沖(0.038ng-DNA/mL)であった。細菌と藻類の割合でみると、沿岸部(地点③、④、⑥山田港沖、⑦伊佐々側沖)および瀬田川河口に近い地点①、②浜大津沖中央において細菌由来のDNAが50%以上の割合を占めていた。沖合から離れるほど(地点⑤柳ヶ崎沖中央、⑩大宮川沖中央)、また北湖に近い程(⑬雄琴沖、⑫雄琴沖中央、⑭堅田沖、⑮木ノ浜沖)、藻類由来のDNAが高い傾向が見られた。また、16S rRNA配列に基づいて放流先水域における細菌をclass(綱)レベルで分類した結果を図(1)-18に示す。各棒グラフは水域での各細菌綱の割合を色分けして示している。いずれの地点においても細菌の種類に大きな違いがないことが分かる。具体的には、いずれの地点においても *Cyanobacteria*、*Cytophagia*、*Flavobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Actinobacteria*が優占種であった。2014年11月、2015年2月、2015年9月、および2016年1月の琵琶湖南湖サンプルについても同様に、回収されたDNAの濃度測定と、細菌の群集構造を解析した。



図(1)-17 琵琶湖南湖でのDNA濃度、細菌DNAと藻類DNAの割合
2014年10月の調査結果。円の大きさはDNA濃度に比例。赤色：細菌由来DNA濃度の割合。
緑色：藻類由来DNA濃度の割合。

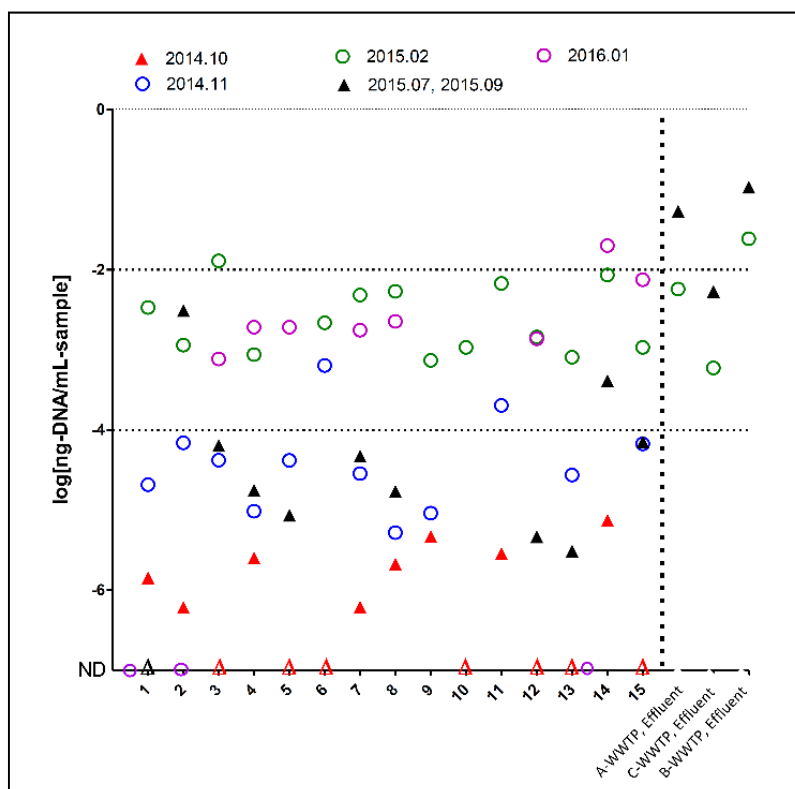


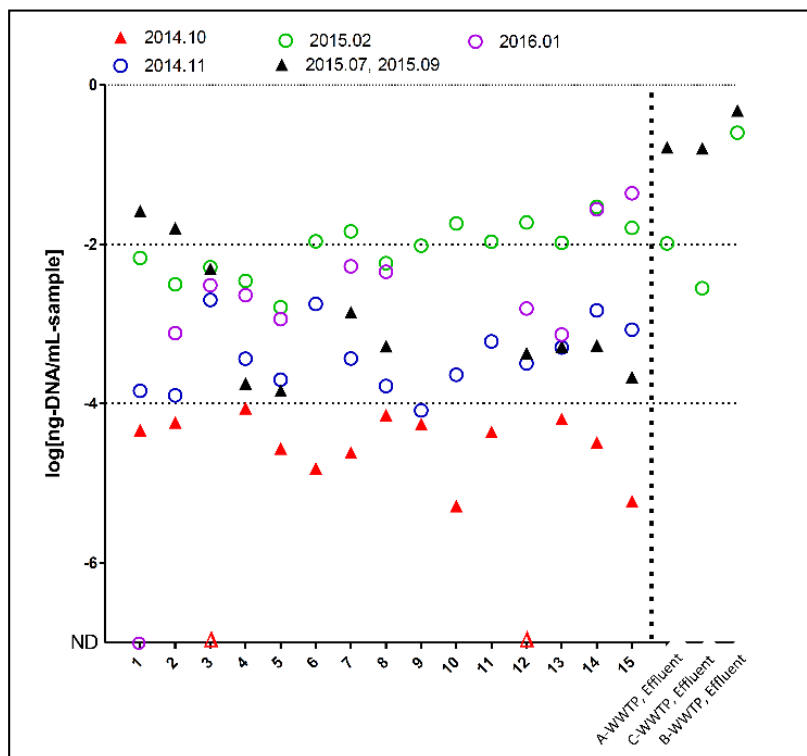
図(1)-18 琵琶湖南湖におけるバクテリア種

図1-(17)に示したバクテリア由来のDNA濃度 (ng-DNA/mL) と図1-(18)に示したclass(綱)レベルでの各バクテリア種の存在割合(%)から、各バクテリア種由来のDNA濃度 (ng-DNA/mL) を計算した。腸内細菌の優占種である *Bacteroidia*、*Clostridia* の各採水地点におけるDNA濃度の計算結果をそれぞれ図1-(19)、図1-(20)に示す。2014年10月、2014年11月、2015年2月、2015年9月、および2016年1月の結果を比較して示している。また、2015年7月、2016年1月の近隣下水処理場の放流水の解析結果も比較のため併せて示す。この結果から言えることは、採水月毎の *Bacteroidia*、*Clostridia* 由来DNA濃度の変動が大きいことである。2014年10月、2014年11月、2015年9月は 10^{-4} ng-DNA/mL以下の濃度に集中しているのに対して、2015年2月、2016年1月じゃ 10^{-3} ng-DNA/mL付近に分布している。この採水月毎の変動に比べて、同じ採水月でのサンプルの採水地点間の変動は小さいことがわかる。ウイルスのqPCRによる測定結果からも、「検出濃度の時間変動に比べ、同採水月の検出濃度の地点間差は小さかった」という結果がえられているが（『3』琵琶湖南湖での腸管系ウイルス及びウイルス指標濃度の時間変動』の項参照）、バクテリア群集解析の結果もこの結果と同じであった。つまり、琵琶湖南湖においてはウイルスもバクテリアも、時間変動に比べて地点間差が小さい（時間変動の方が地点間差よりも大きい）ことがわかる。

琵琶湖水と下水処理場放流水の *Bacteroidia*、*Clostridia* 由来DNA濃度の比較では、2015年7月および9月の調査では放流水中の濃度と琵琶湖水の濃度の間におおむね2log以上の差が見られた（図1-(19)、1-(20)、黒三角）。ウイルスのqPCR測定では、PMMoVが最も高頻度に下水放流水からも琵琶湖水からも検出されていたが、その濃度測定結果でも、放流水中の濃度と琵琶湖水の濃度の間におおむね2log以上の差が見られていた（図1-(14)）。バクテリア、ウイルスともに、放流水から高濃度で排出され、琵琶湖で希釈・拡散されることが示唆される。一方、興味深いことに、2015年2月の調査では、琵琶湖水と下水処理場放流水の *Bacteroidia*、*Clostridia* 由来DNA濃度は同レベルであった（図1-(19)、1-(20)、緑丸）。この結果は、琵琶湖南湖においては、時期（季節）

によっては下水処理場放流水にともなって排出された腸内細菌が琵琶湖南湖で蓄積している可能性を示唆している。もしくは、時期（季節）によっては下水処理場放流水以外の汚染源の寄与も大きいことを示唆している。ただし、バクテリアについては、下水処理場での採水日と琵琶湖南湖での採水日に約2週間の時間差があるため、このような結果になった可能性も考えられ、今後は下水処理場と琵琶湖南湖での採水を同日に行った上で、下水処理場以外の汚染源について検討していく必要がある。



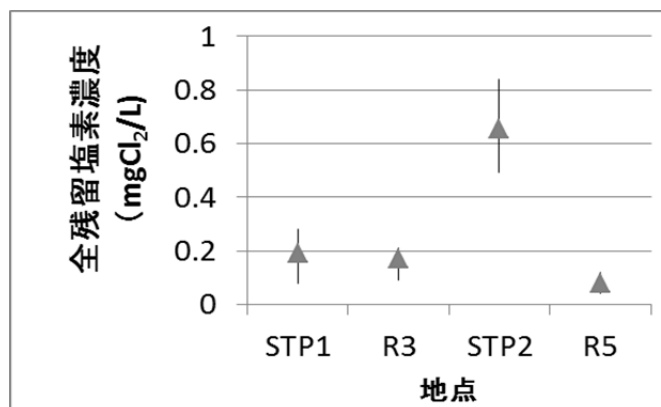


図(1)-20 琵琶湖南湖における*Clostridia*由来DNA濃度の地点間、採水日間比較
 Effluent: 放流水、ND: 検出されなかったことを示す。検出下限値は地点毎に若干の差があるが、おおむね 10^{-7} ng-DNA/mL。

(4) 下水処理水の流入する都市河川における残留塩素と水生生物の影響

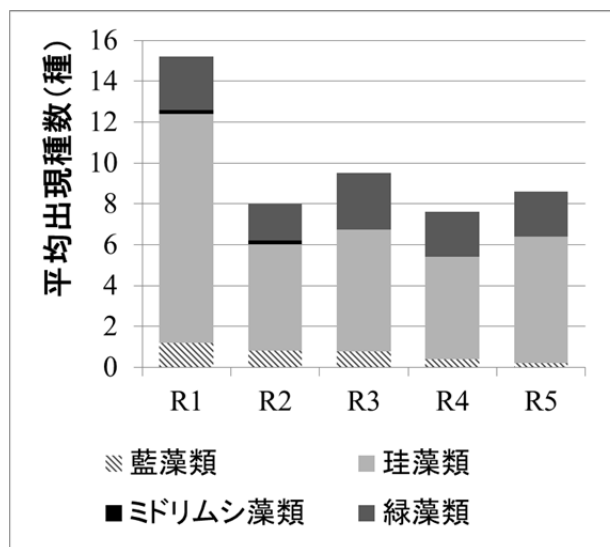
1) 下水処理水の流入する都市河川における藻類種の変化

京都市内を流れる都市河川の山科川において実施した6回の調査において、下水処理場放流水(STP1、STP2)と河川水(R3、R5)の全残留塩素濃度を測定した。その平均値と最大値、最小値を図(1)-21に示す。STP2の全残留塩素濃度の平均値が $0.65\text{mgCl}_2/\text{L}$ と最も高く、全ての測定においてSTP1よりも高かった。



図(1)-21 下水放流水及び河川水の全残留塩素濃度

山科川における下水処理水の流入と残留塩素の水生生物への影響を調べるために、河床の付着藻類の採取を行った。採取した試料からは、藍藻類2種、珪藻類22種、ミドリムシ藻類1種、緑藻類12種が同定された。各サンプリング地点における分類網ごとの平均出現種数を図(1)-22に示す。STP1放流水の流入後（R2）ではR1と比較して平均出現種数が大きく減少していることがわかる。また、放流口直下よりも河川流下後のほうが出現種数は増加する傾向が見られた。STP1放流水の流入後では珪藻類の出現種数が顕著に減少していた。また、河川下流にいくにつれ藍藻類の出現頻度が減少した。ミドリムシ藻類はR1とR2において1回ずつしか出現しなかった。緑藻類の平均出現種数は地点による変動があまりなかった。



図(1)-22 各地点における網ごとの平均出現種数

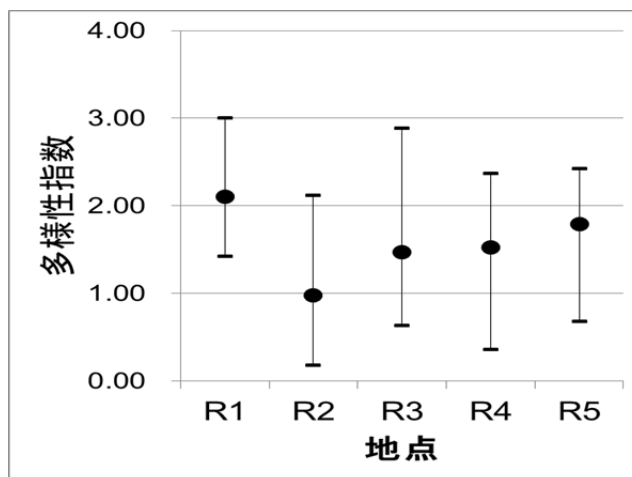
各地点・各調査日の付着藻類の多様性指数を計算した。図(1)-23に、各地点の多様性指数の平均値、最大値、最小値を示す。多様性指数（ H' ）は下式のShannonの式で計算した。

$$H' = - \sum \frac{n_i}{N} \log_2 \frac{n_i}{N}$$

N : 全藻類細胞数

n_i : 種*i*の細胞数

多様性指数 H' の平均値はR1で最も高い値となったが、下水処理水の流入後のR2で最も低い値となった。また、 H' の平均値は河川流下後のR2～R5にかけて徐々に上昇する傾向が見られた。この結果から、下水処理水の流入によって、河川河床に生息する付着藻類については、藻類の出現種数だけでなく多様性も大きく低下していることがわかった。



図(1)-23 各地点における多様性指数

山科川の各地点における付着藻類の付着藻類の優占種となっていた付着藻類は、藍藻類：*Homoeothrix janthina*、*Oscillatoria tenuis*、珪藻類：*Gomphonema parvulum*、*Nitzschia palea*、緑藻類：*Chlorolobion braunii*、*Stigeoclonium tenue*、*Scenedesmus quadricauda*の7種であった。*Homoeothrix janthina*は比較的清浄な河川に生息している。本研究では、この種は下水放流水の影響を受けていない河川上流である地点R1において高い細胞占有率で見られた。*Nitzschia palea*は汚濁した河川で典型的な種であると言われている。本研究では、この種はR1、R5において優占種として見られた。本種はR4でも多く見られたため、塩素に対してある程度耐性を持っていると考えられる。*Gomphonema parvulum*はR2、R4、R5において優占種として見られた。本種も塩素耐性を持っていると考えられる。*Nitzschia palea*と*Gomphonema parvulum*はすべてのサンプルから同定された。*Stigeoclonium* sp. は α 、 β 中腐水性水域の代表種として知られている。本研究では、この種は稀にしか見られなかったが、R4のサンプルにおいて優占種として見られた。

Chlorolobion sp. は残留塩素濃度の高い地点の優占種として見られることが知られている。本研究では、本種はR1では全く見られなかったが、R2～R5においては極めて高い細胞占有率で見られた。このような分布は非常に特徴的である。また、細胞占有率が90%を超えるサンプルもあった。地点R4において測定された全残留塩素濃度は0.49～0.82mgCl₂/Lの範囲であり、R4において*Chlorolobion braunii*が優占していた原因としては残留塩素の影響が非常に大きいためではないかと考えられ、残留塩素による他の藻類への生長阻害が*Chlorolobion*が優占種となるための重要な要因になっていると考えられる。緑藻類の平均出現種数はR1～R5まで概ね一定だが、R2～R5においてはほぼ毎回の調査で*Chlorolobion braunii*が見られている。そのため、やはり緑藻類も、*Chlorolobion braunii*以外の種は放流水の影響を受けて出現頻度が減少している。*Chlorolobion braunii*は高い残留塩素耐性と、STP1流入後の緑藻類に有利な栄養条件によって、他の付着藻類より急速に成長し基質である礫の表面を独占しているのではないかと推察される。

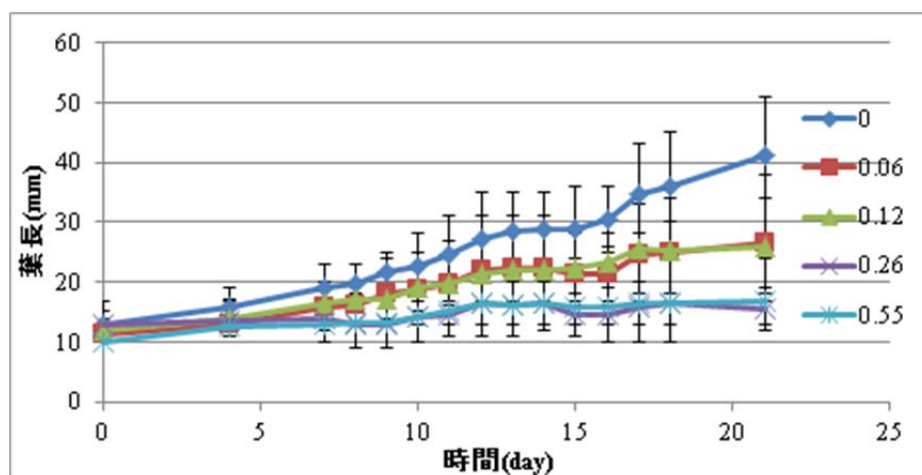
2) 下水処理場での消毒による藻類に対する影響評価

下水処理水が海域へ放流された場合を想定して、海域における重要な藻類として海藻を用いた

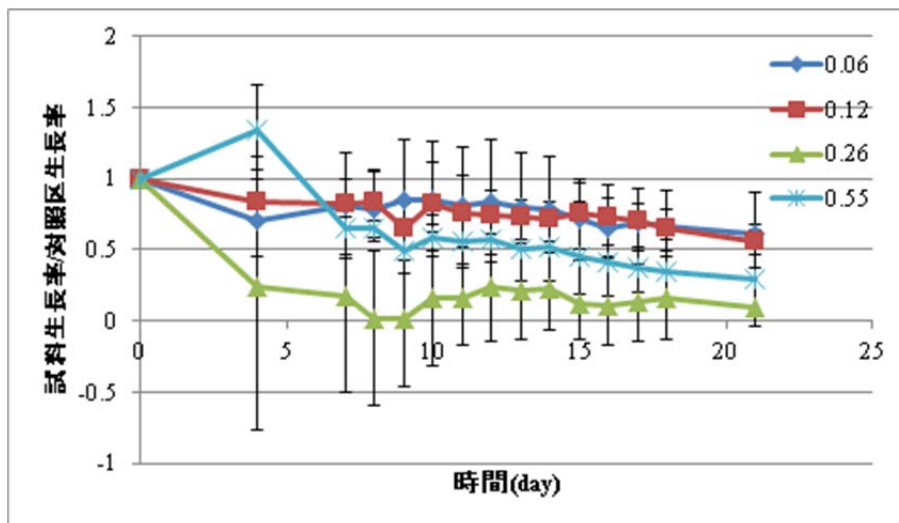
生態毒性試験を行い、下水の消毒に用いられている塩素の海藻への毒性影響の評価を行った。供試生物としては、*Pyropia yezoensis* (スサビノリ)を用いた。

*Pyropia yezoensis*に対する塩素による影響を次の図(1)-24、図(1)-25に示す。図(1)-25において成長率とは、n日目における葉長を0日目におけるそれらで割った値である。また、凡例中の単位はmg/Lである。

図(1)-24において、対照区の場合、葉長は21日間の培養で31mm程度（10mmから41mmへ生長）の生長が見られた。試料中の塩素濃度が0.06、0.12mg/Lのとき、葉長の生長は16mm程度（10mmから26mmへ生長）であり、対照区と比べ半分程度の生長しかみられなかった。遊離塩素濃度が0.26mg/L以上では5~7mm程度の生長しかみられなかった。また、このとき、*Pyropia yezoensis*が実験途中より白く変色するものもあり、その試料においては、ほとんど生長がみられなかった。図(1)-25においては、それぞれ時間ごとの各塩素濃度における成長率について対照区の葉長の生長率を1としたときの成長率を示している。生長率が負の値を示しているものは、0日目の長さより短くなったことを示している。図(1)-24において述べたように、遊離塩素濃度0.06、0.12mg/Lでは0.5程度の値が示され、0.26mg/Lを超えると生長率は非常に小さいことが示された。

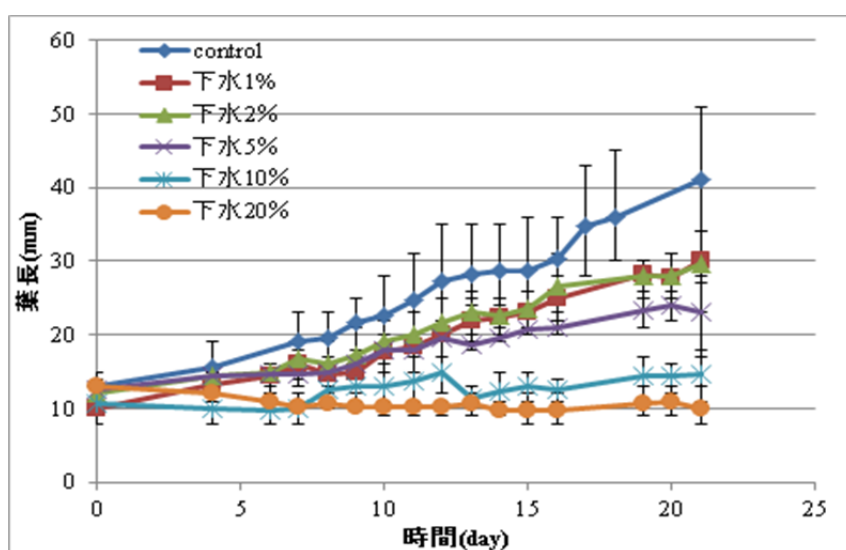


図(1)-24 塩素濃度(mg/L)と*Pyropia yezoensis*葉長の変化

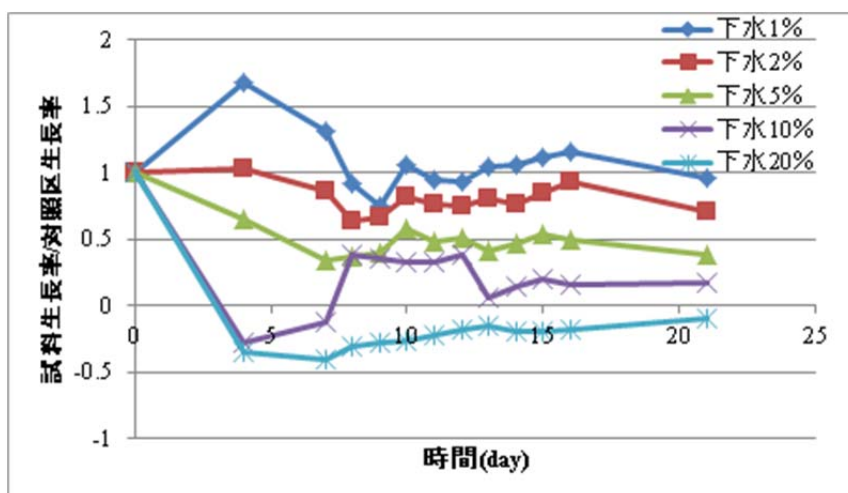


図(1)-25 塩素濃度(mg/L)と*Pyropia yezoensis*葉長の相対生長率の変化

つぎに、下水処理水が海域に放流されたことを想定して、塩素消毒した下水(塩素注入率 5mg/L)の添加による*Pyropia yezoensis*に対する影響について実験的に検討を行った。その結果を図(1)-26、図(1)-27に示す。図(1)-26では、それぞれ時間ごとの各下水添加率における葉長の変化を、図(1)-26では、それぞれ時間ごとの各下水添加率における対象区の葉長生長率を1としたときの生長率比を示している。図(1)-26において、下水添加率1、2、5、10%のときは、葉長はそれぞれ20、14、9、4mm程度生長し、塩素消毒した下水の添加率が高くなるにつれて葉長の生長は低くなった。また、下水添加率20%のときには、葉長の生長は0~1mmとなり、ほとんど生長が見られなくなった。また、下水添加率が10%を超えると、白く変色し生長しない試料がみられるようになった。また、図(1)-27の生長率比に関して、下水添加率1%のとき生長率はほとんど対照区と変わらず、添加率が上がるにつれて生長率は低下が見られた。このとき、下水添加率5%を超えたあたりから0.5を下回るようになり、顕著な葉長の生長阻害がみられるようになった。



図(1)-26 塩素消毒した下水の添加率と*Pyropia yezoensis*葉長の変化

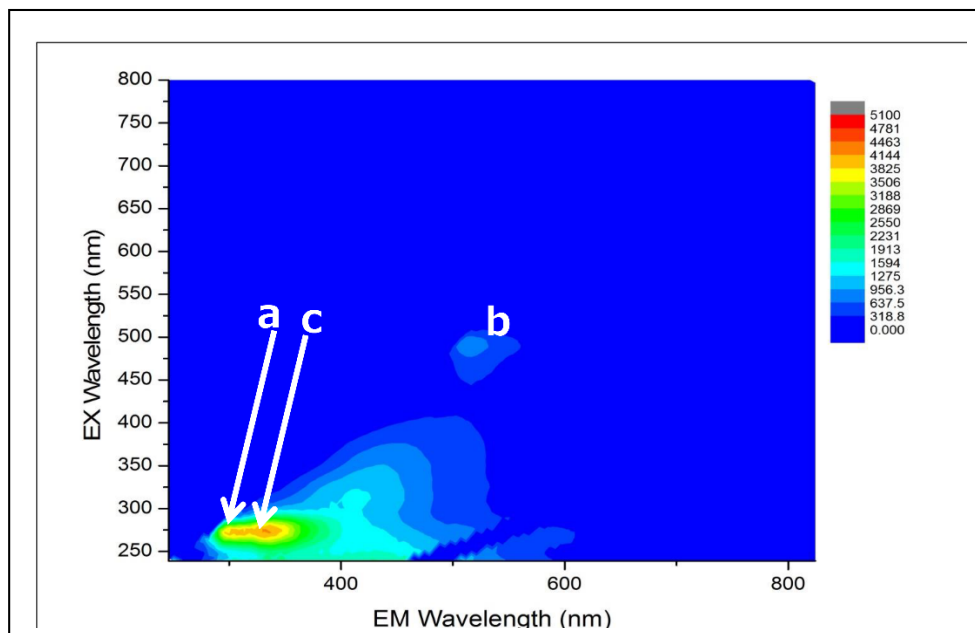


図(1)-27 塩素消毒した下水の添加率と*Pyropia yezoensis*葉長の相対生長率の変化

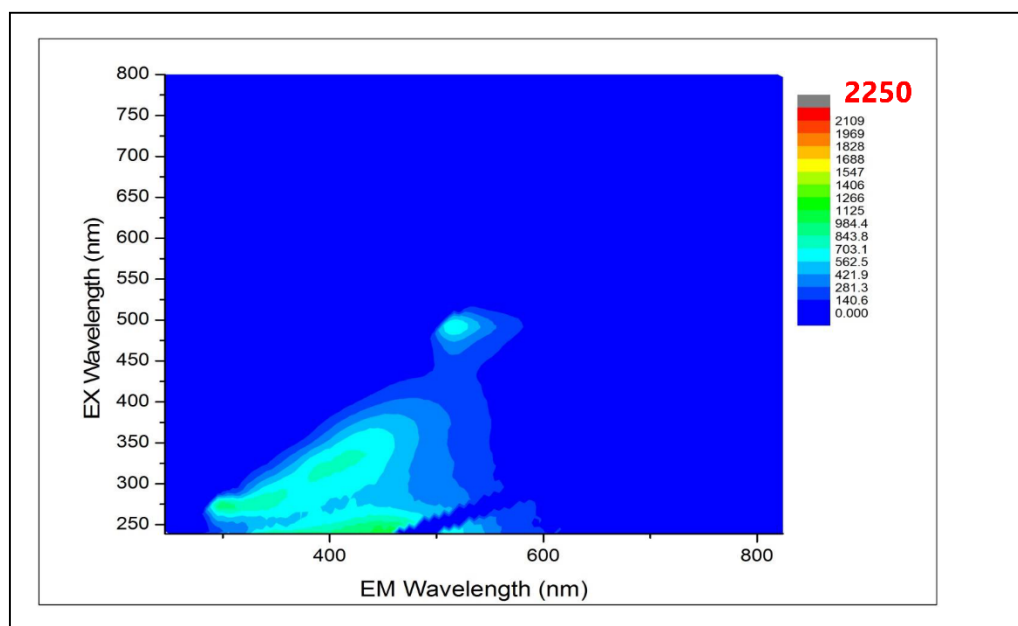
塩素消毒した下水を添加した実験においては、葉長の生長について下水添加率が20%を超えると、ほとんど生長しなくなり白く変色するのが見られた。ただし、下水添加によって試料中の塩分濃度が変化するため、塩分濃度による生長阻害であるのか、下水由来の生長阻害であるのか、今後検討していく必要がある。

(5) 3次元蛍光分析による合流式下水道雨天時越流水の検出の基礎検討

2015年11月から2016年3月にかけて毎月、琵琶湖南湖および近隣の3下水処理場において定期採水を行い、励起波長、蛍光波長、および蛍光強度の3次元スペクトルを調べた。下水処理場流入水および放流水の3次元スペクトルの測定結果の例をそれぞれ図(1)-28、図(1)-29に示す。流入下水においては、励起波長275nm、蛍光波長300~350nm付近の位置に強い蛍光波長のエリアが検出された。このエリアの中には励起波長275nm/蛍光波長300nmのピークと励起波長275nm/蛍光波長340nmのピークの二つがあるように見受けられた(それぞれ図(1)-28 aまたはc)。また、励起波長480nm/蛍光波長520nm付近の位置にもピークが検出された(図(1)-28 b)。一方、放流水からは流入下水と類似したパターンの3次元蛍光スペクトルが得られたが、蛍光の強度は流入下水に比べて弱くなっていることが確認された(図(1)-29)。特に、ピークa(励起波長275nm/蛍光波長300nm)については、流入下水での蛍光強度が放流水に比べて強く、合流式下水道の雨天時越流水の特異的マーカーとして使える可能性が考えられた。

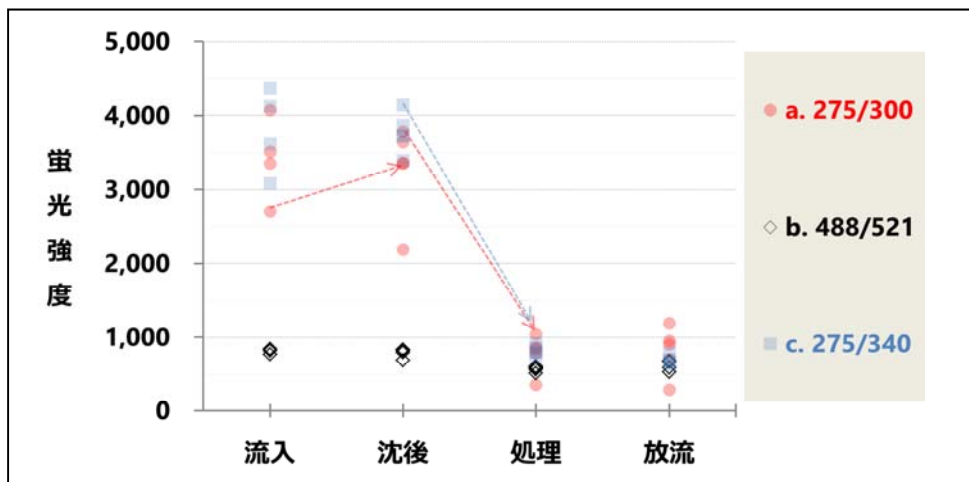


図(1)-28 下水処理場流入下水の3次元蛍光スペクトル
2016年1月 A下水処理場



図(1)-29 下水処理場放流水の3次元蛍光スペクトル
2016年1月 A下水処理場

下水処理に伴うピークa、b、cの蛍光強度の変遷を図(1)-30に示す。この図からも、ピークa、cの蛍光強度が生物処理によって大きく減少することが分かる。ピークa、cが、合流式下水道の雨天時越流水の特異的のマーカとして使える可能性が考えられた。

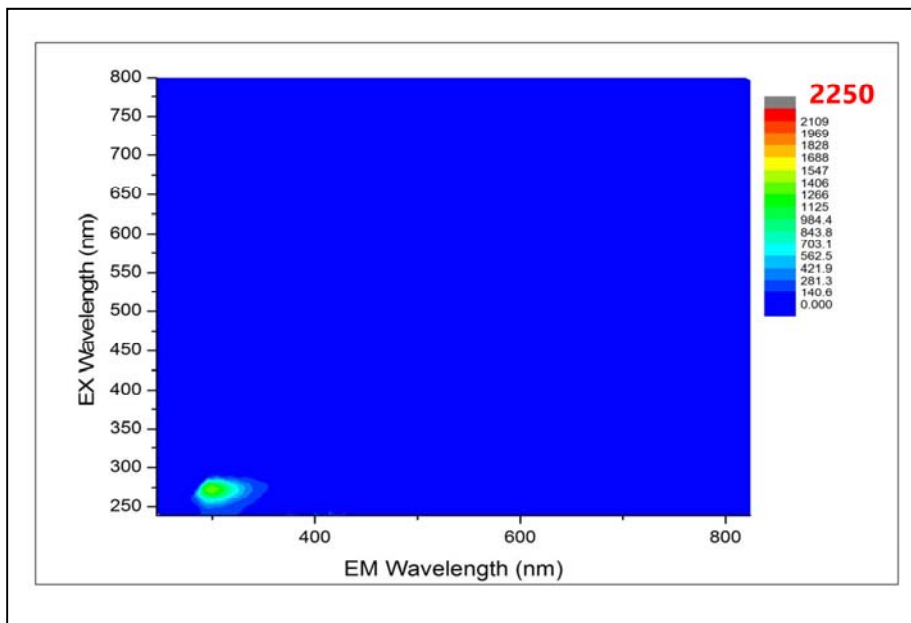


図(1)-30 下水処理に伴う蛍光強度の変化

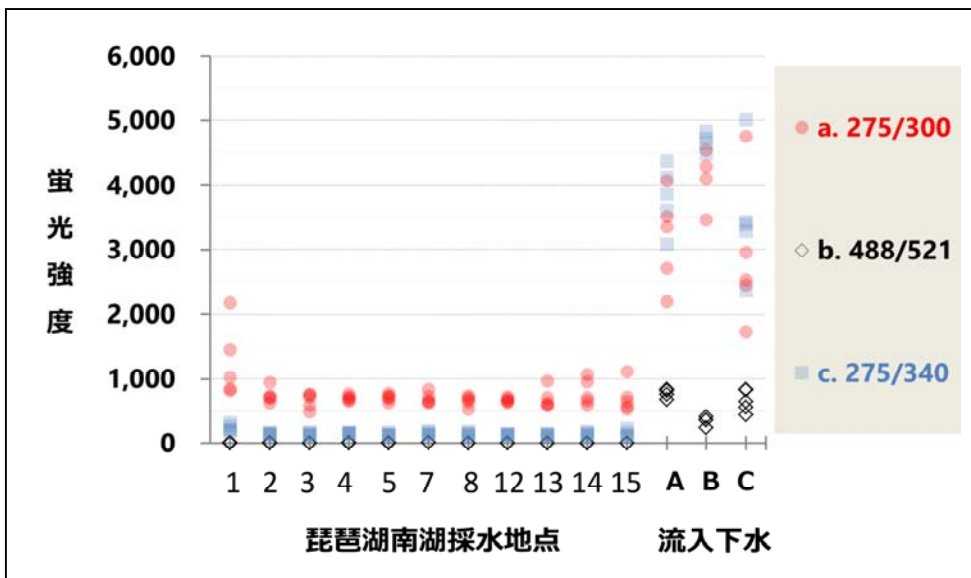
A 下水処理場の例。流入：流入下水、沈後：初沈越流水、処理：二次処理水、放流：放流水。

$n = 5$

琵琶湖南湖水の3次元蛍光スペクトルを2016年1月の地点1を例に図(1)-31に示す。流入下水のピークaと同じ位置にピークが見られた。他の採水地点、採水月についても同様に3次元蛍光スペクトルを得た。琵琶湖南湖の各採水地点における、ピークa、b、およびcの蛍光強度を図(1)-32に示す。ピークa、cは比較的強い強度で、全ての採水地点で採水期間を通じて検出されていることが分かる。これに対してピークbは蛍光強度が弱くほとんど検出されていない。今後は、採水が比較的容易な河川等での降雨イベント直後の採水を通じて、CS0を確実に捉えた状況下でのこれらのピークの蛍光強度の動態を把握し、CS0のマーカールとしての適性を検討することが課題である。なお、図(1)-32では地点1、13、14、および15に代表されるように、採水月での蛍光強度の変動が大きいことが分かる。『(2) 合流式下水道雨天時越流水の発生推定』の項で説明したように、降雨強度に基づくCS0の発生推定の結果(図(1)-16)からはCS0発生直後(1~2日以内)に行われた調査はなかったと推測されており、図(1)-32で見られる変動がCS0の影響を受けたものであるかは不明である。



図(1)-31 琵琶湖南湖水の3次元蛍光スペクトル
2016年1月 採水地点1



図(1)-32 琵琶湖南湖の各採水地点における、ピークa、b、およびcの蛍光強度

n = 5

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 琵琶湖南湖における大腸菌群と大腸菌濃度の相関

琵琶湖南湖での調査の結果、大腸菌群濃度が大腸菌濃度の100倍以上となった。この結果は琵琶湖南湖における採水で検出された大腸菌群はほとんどが糞便ではなく土壌等に由来することを示唆している。少なくとも琵琶湖南湖においては、大腸菌群は糞便汚染を測るための指標として有効でないことが示唆された。

2) 琵琶湖南湖での腸管系ウイルス及びウイルス指標の存在状況

本研究は、2年間にわたって湖沼における腸管系ウイルスおよびウイルス指標の存在状況を毎月継続的に調査した初めての調査事例であり、大変貴重なデータである。調査の結果、トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)、GI型大腸菌ファージ (GI-FPH)、GII型ノロウイルス (GII-NoV)、ロタウイルス (RV)、アイチウイルス (AiV) がそれぞれ高頻度で検出された。陽性率はPMMoVが最も高かった。リスク因子と考えられるウイルスとしてはGII-NoVおよびRVが高頻度で検出されたが、GI型ノロウイルス (GI-NoV)、エンテロウイルス (EV)、サポウイルス (SaV) はほとんど検出されなかった。GII-NoVについては一般的な冬季流行性とは異なり、6~8月の夏季においても検出されることがわかった。

3) 腸管系ウイルス間の濃度相関、及び腸管ウイルス濃度と指標細菌濃度の相関

GII-NoVとAiV、PMMoV、GI-FPHの検出濃度の比較を行った。加えて指標微生物である大腸菌との比較も行った。その結果、大腸菌はGII-NoVに比べて検出濃度が低く、濃度の相関も見られない結果となり、琵琶湖南湖では、大腸菌をウイルス汚染の指標として用いるのは不適切であることが示唆された。

AiVは測定した全ウイルス種の中で最もGII-NoVと類似した濃度分布であり、“病原ウイルスの存在を示す指標”として有効であると考えられた。一方、PMMoVは測定した全ウイルス中、最も高頻度で検出されたが、GII-NoV濃度との相関は見られなかった。また、全試料のうち88%からPMMoVが検出されている。これらの結果から、病原ウイルスが存在しない環境水中にもPMMoVが普遍的に存在すると考えられる。PMMoVは必ずしも病原ウイルスの流行を表していないが、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”としては有望であると言える。

ファージGI-FPHは検出頻度が二番目に高いウイルスでありPMMoVと同じく、“ウイルスを管理値以下に抑えることで病原ウイルスの流行に備えて安全を確保する指標”として利用できる可能性が考えられる。また、GI-FPHもPMMoVと同じく必ずしも病原ウイルスの流行を表していないと考えられた。

4) 琵琶湖南湖での水利用における安全性評価

現在環境基準として検討されている大腸菌の観点からは、琵琶湖南湖は水浴が可能なA類型レベルを満足できる考えられたが、琵琶湖南湖での遊泳及び釣りによる感染リスクを、GII-NoVの測定濃度からファージの不活化率を考慮して、推定した。この結果、夏季に琵琶湖南湖で遊泳するとUSEPAの水道水で想定している年間許容リスクを超過する恐れがあるが、釣りに関しては通年で感染リスクは低いことが示された。

5) 次世代シーケンサーを用いたバクテリア群集構造の解析

本研究は、琵琶湖南湖におけるバクテリア群集構造を、近隣下水処理場の放流水も含めて解析した初めての調査事例である。ヒト腸内細菌の優占種である*Bacteroidia*、*Clostridia*について解析した結果、採水月毎の*Bacteroidia*、*Clostridia*由来DNA濃度の変動が大きいこと、採水月毎の変動に比べて、同じ採水月でのサンプルの採水地点間の変動は小さいことが分かった。ウイルスのqPCRによる測定結果からも、検出濃度の時間変動に比べ、同採水月の検出濃度の地点間差は小さかった結果がえられており、バクテリア群集解析の結果もこの結果と同じであった。つまり、琵琶湖南湖においてはウイルスもバクテリアも、時間変動に比べて地点間差が小さい（時間変動の方が地点間差よりも大きい）ことがわかる。

琵琶湖水と下水処理場放流水の*Bacteroidia*、*Clostridia*由来DNA濃度の比較結果から、バクテリア、ウイルスともに、放流水から高濃度で排出され、琵琶湖で希釈・拡散されることが示唆された。一方、興味深いことに、採水月によっては琵琶湖水と下水処理場放流水の*Bacteroidia*、*Clostridia*由来DNA濃度は同レベルであった月もあり、この結果は、琵琶湖南湖においては、時期（季節）によっては下水処理場放流水にもなって排出された腸内細菌が琵琶湖南湖で蓄積している可能性が示唆された。もしくは、時期（季節）によっては下水処理場放流水以外の汚染源の寄与が大きいことが示唆された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

本研究の成果は、環境省で現在、水質環境基準の生活環境基準項目の変更を検討している大腸菌の指標検討を行うための平成24年度生活環境項目新規基準等検討会の衛生指標WGおよび平成25年度大腸菌数環境基準検討会において、これまでの大腸菌群や腸球菌、ファージ、ウイルスなどの水域の存在実態や動態、下水処理過程や消毒過程での動態の相違を示し、リクレーション利用、水産用水、水道原水の視点からの水質環境基準の検討の基礎的知見を一部提供している。また環境省水環境課が平成24年、平成25年度に国立環境研究所と主催している、水質環境基準の生活環境項目のうち、水生生物基準の追加項目を検討するために「今後の水生生物保全に関する検討会」および水生生物保護を目的に新たにバイオアッセイを排水管理に導入するための「生物応答を利用した水環境管理手法の制度・運用分科会」で、本研究課題の一部の成果から塩素による水生生物への影響についての情報提供を行っている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

琵琶湖南湖での調査の結果、大腸菌群濃度は大腸菌と無相関であり、大腸菌濃度の2オーダーを超える結果となった。この結果は琵琶湖南湖において検出された大腸菌群はほとんどが糞便ではないことを示唆しているため、少なくとも琵琶湖南湖においては、糞便汚染を測るための指標としては、大腸菌群は有効でなく、大腸菌への基準変更が必要である。

大腸菌は病原ウイルス濃度との相関がみられなかった。また琵琶湖南湖では、大腸菌が十分低い場合（現在検討されている大腸菌のA類型の基準案を下回る程度）でもウイルスが検出されることがあった。推定された水浴の感染リスクは、USEPAの想定する許容リスクよりも高い場合があることから、琵琶湖南湖の場合、水浴の適否を改定が予定されている大腸菌だけの判定で行うこ

とは不十分である可能性がある。よって、ウイルス汚染の指標が新たに必要であることが示唆される。今後検討すべきウイルス指標の候補としてはアイチウイルス (Aichi virus: AiV) やトウガラシ微斑ウイルス (pepper mild mottle virus: PMMoV) が考えられる。

塩素を用いた消毒では、付着性藻類の多様性に影響を与えていることが現地調査から示唆されていることから放流水の残留塩素の管理が今後重要な課題となると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) A. HATA, K. MATSUMIRI, M. KITAJIMA, and H. KATAYAMA: Food Environ. Virol., 7(1), 7-13 (2015)
“Concentration of Enteric Viruses in Large Volumes of Water Using a Cartridge-Type Mixed Cellulose Ester Membrane”
- 2) A. HATA, H. KATAYAMA, H. FURUMAI: Appl. Environ. Microbiol, 81(5), 1585-1593 (2015)
“Organic Substances Interfere with Reverse Transcription-Quantitative PCR-Based Virus Detection in Water Samples”

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 片山浩之、安井宣仁、猪又明子、田中宏明、岸田直裕、原本英司、渡部徹、真砂佳史、浅田安廣、端昭彦、佐野大輔、井原賢、稲葉愛美、水環境学会誌、37、12、424-433 (2014)
「水中の健康関連微生物に関する研究動向」
- 2) 井原賢、稲葉愛美、佐野大輔、臨床と微生物、42、685-689 (2015)
「衛生環境工学分野におけるマイクロバイオーーム研究」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 井原賢、堅川陽平、李善太、松田知成、山下尚之、田中宏明: 第17回日本水環境学会シンポジウム (2014)
「次世代シーケンサーを用いた、水環境における薬剤耐性遺伝子の大規模検出」
- 2) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明、金丸国夫、岩崎達行: 第17回日本水環境学会シンポジウム (2014)
「高濁度下水に対する紫外線消毒における紫外線照射量の検討」
- 3) 端昭彦、花本征也、山下尚之、田中宏明: 第49回日本水環境学会年会 (2015)
「感染価を保持したFRNA フェージの定量的タイピングを目的とした濃縮手法の開発」
- 4) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明: 第49回日本水環境学会年会 (2015)
「琵琶湖南湖における腸管系ウイルス汚染の実態評価」
- 5) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明: 第37回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム

(2015)

「琵琶湖南湖におけるウイルス汚染の実態評価」

6) 朴耿洙、山下尚之、田中宏明：日本オゾン協会第 24 回年次研究講演会 (2015)

「被災下水処理場での前凝集後の塩素とオゾン消毒でのMS2フェージの不活化効果の比較」

7) Masaru IHARA, Yoshifumi MASAGO, Manami INABA, Seiya HANAMOTO, Akihiko HATA, Shinobu KAZAMA, Suntae LEE, Yohei KATAYAMA, Naoyuki YAMASHITA, Tomonari MATSUDA, Hiroyuki KATAYAMA, Tatsuo OMURA, Hiroaki TANAKA, 18th International symposium on health-related water microbiology (2015)

“HOW DO MICROBES ATTENUATE IN WATER ENVIRONMENT? : COMPARATIVE ANALYSIS OF MICROBES AND CHEMICALS RELEVANT TO HUMAN WASTES”

8) Akihiko HATA, Yuya SHIRASAKA, Naoyuki YAMASHITA, Hiroaki TANAKA, 18th International symposium on health-related water microbiology (2015)

“Quantitative genotyping of infectious FRNA-phages at wastewater treatment plants in japan”

9) 田中宏明：第52回環境工学研究フォーラム 企画セッション (2015)

「今後の水環境保全に貢献する下水道システムの技術的課題と管理手法」

10) 井原賢：水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム(2015)

「水環境における病原微生物、指標微生物の実態調査」

11) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明：第50回日本水環境学会年会 (2016)

「琵琶湖南湖での通年調査をもとにした腸管系ウイルス濃度分布の把握」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

1) 「水系感染微生物による水環境汚染の把握と指標微生物管理の限界に関する研究」平成26年度アドバイザーボード会合 (平成27年1月14日、東京都、航空会館、出席者17名)

2) 環境研究総合推進費『水系感染微生物による水環境汚染の把握と指標微生物管理の限界に関する研究』報告会(2015年6月16日、仙台市 宮城県 保健環境センター 大会議室、観客50名)

3) 「水系感染微生物による水環境汚染の把握と指標微生物管理の限界に関する研究」平成27年度アドバイザーボード会合 (平成27年8月25日、仙台市、東北大学、出席者16名)

4) 南蒲生浄化センター復旧状況視察 (平成27年8月26日、仙台市、南蒲生浄化センター、参加者9名)

5) 日本水環境学会水中健康微生物研究委員会シンポジウム、水中の病原微生物によるリスク制御への総合対策に向けて(2015年12月15日、東京 発明会館、観客100名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

受賞

1) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明、年会学生ポスター発表賞（ライオン賞）：第49回日本水環境学会年会（2015）

「琵琶湖南湖における腸管系ウイルス汚染の実態評価」

2) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明、優秀ポスター賞、第37回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム(2015)

「琵琶湖南湖におけるウイルス汚染の実態評価」

3) 白坂勇也、端昭彦、山下尚之、田中宏明、第45回日本水環境学会年会 年会優秀発表特別賞（クリタ特別賞）、第50回日本水環境学会年会（2016）

「琵琶湖南湖での通年調査をもとにした腸管系ウイルス濃度分布の把握」

招待講演

1) Hiroaki TANAKA, Tsinghua University Water Safety Symposium, 2014/4/7, Shenzhen, China

“Microbial pollution by discharge from municipal sewage treatment plants damaged by Tsunami”

2) 田中宏明、京都技術士会平成27年2月例会特別講演、2015/2/7、京都

「水環境と水循環の問題を解決するための都市の水利用のあり方」

3) 田中宏明、平成27年度 産総研 エネルギー・環境シンポジウム「水資源の現状と循環利用のための技術展望～アジアに向けた技術貢献を目指して～」、2015/9/1、機械振興会館、東京

「持続可能な水環境を形成するための下水道の課題と期待」

4) 田中宏明、2015年度日立技術士会 関西RG講演会、2015/9/5、(株)日立製作所 関西支社 会議室、大阪中之島フェスティバルタワー 31階

「身近な“水”についての課題と展望」

5) Hiroaki TANAKA, Sixth Chemical Sciences & Society Symposium (CS3), 2015/9/14-18, Leipzig, Germany

“Water, Health, the Environment and Sanitation, A Japanese Perspective”

6) H. TANAKA, N. YAMASHITA, M. IHARA, A. HATA, Y. SHIRASAKA, T. YAMAGUCHI, China-Japan Joint Seminar on Wastewater Resource Reclamation and Reuse in the Course of Urbanization, 2015/12/6, Tsinghua University, Graduate School at Shenzhen

“Are the waters currently improved in quality really swimmable?”

7) 田中宏明、大阪府下水道協会幹部職員研修会、2016/2/12、シティプラザ大阪

「水環境改善に貢献してきた下水道が 今後の持続可能な都市水循環系構築に果たすべき課題」

8. 引用文献

Ahmed, Sharia M., et al. "Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a

- systematic review and meta-analysis." *The Lancet infectious diseases* 14.8 (2014): 725-730.
- Asano, T., et al. "Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data." *Water Science and Technology* 26.7-8 (1992): 1513-1524.
- Costán-Longares, Ana, et al. "Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities." *Water research* 42.17 (2008): 4439-4448.
- da Silva, Allegra Kyria, et al. "Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II." *Applied and Environmental Microbiology* 73.24 (2007): 7891-7897.
- Hata, Akihiko, et al. "Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows." *Science of the Total Environment* 468 (2014): 757-763.
- Hata, Akihiko, et al. "Concentration of Enteric Viruses in Large Volumes of Water Using a Cartridge-Type Mixed Cellulose Ester Membrane." *Food and environmental virology* 7.1 (2015): 7-13.
- Kageyama, Tsutomu, et al. "Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR." *Journal of clinical microbiology* 41.4 (2003): 1548-1557.
- Katayama, Hiroyuki, Akihiro Shimasaki, and Shinichiro Ohgaki. "Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater." *Applied and Environmental Microbiology* 68.3 (2002): 1033-1039.
- Kitajima, M., et al. "Use of murine norovirus as a novel surrogate to evaluate resistance of human norovirus to free chlorine disinfection in drinking water supply systems." *Environ. Eng. Res* 45 (2008): 361-370.
- Kitajima, Masaaki, et al. "Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of Aichi viruses in clinical and environmental samples." *Applied and environmental microbiology* 79.13 (2013): 3952-3958.
- Mooijman, Kirsten A., et al. "Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages." *Journal of virological methods* 103.2 (2002): 129-136.
- Oka, Tomoichiro, et al. "Detection of human sapovirus by real - time reverse transcription - polymerase chain reaction." *Journal of medical virology* 78.10 (2006): 1347-1353.
- Pang, Xiaoli L., et al. "Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea." *Journal of medical virology* 72.3 (2004): 496-501.
- Teunis, Peter FM, et al. "Norwalk virus: how infectious is it?" *Journal of medical virology* 80.8 (2008): 1468-1476.
- Wolf, Sandro, et al. "Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR." *Journal of*

virological methods 149.1 (2008): 123-128.

Zhang, Tao, et al. "RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses." PLoS Biol 4.1 (2005): e3.

(2) 水環境中のウイルスと指標微生物の動態の把握

東京大学大学院工学系研究科

片山浩之

小熊久美子

井上健太郎

平成26～27年度累計予算額：35,999千円（うち平成27年度：17,539千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

腸管系ウイルスは感染したヒトの消化器系器官中で複製された後、高濃度で糞便と共に排泄されるため、下水中にはウイルスが高濃度で含まれている。通常は、沈殿、生物処理、消毒等の処理を経て排出されるものの、大雨時には合流式下水道雨天時越流水(combined sewer overflow, CSO)が生じ、CSOは未処理の下水を環境水中に放出するため、発生時には不定期に受水域の微生物汚染が深刻化する。また一方で、受水域の汚染状況は年間を通じて一定ではなく、大きな変動が予想され、定期的に採水調査することだけでは、年間の汚染状況を把握することは困難である。それ故、リスク管理の観点について、降雨後環境中に排出されたウイルスの濃度、およびウイルスの遺伝子型に着目した汚染状況の把握が重要であると言える。また、我が国では微生物学的水浴場水質判定基準は、糞便性大腸菌群により定められているが、しばしば指標細菌の存在状況と腸管系ウイルス等の病原性ウイルスの存在状況との間には必ずしも相関が見られないことや、指標細菌自体の増殖可能性について指摘されている。それ故、新しい衛生指標として期待される大腸菌の環境中での増殖に関わる挙動は、状況を把握すべき重要な事項である。

本サブテーマでは、下記4点の課題を扱うことで、水環境中のウイルスと指標微生物の動態把握を試みた。①東京湾沿岸域における降雨後ウイルス汚染の実態調査、②二枚貝への腸管系ウイルス蓄積状況に基づいたヒト糞便由来の汚染履歴評価、③環境中における大腸菌の増殖を評価する系の確立、④環境水中溶存有機物による大腸菌の増殖可能性の評価と増殖基質の探索。

得られた成果としては、トウガラシ微斑ウイルスおよびアイチウイルスのウイルス指標としての適性に関する知見、カキ中腸腺に蓄積したウイルスによって環境中に排出されたウイルスの遺伝子型を広く把握する解析手法の確立、大腸菌の分裂関連遺伝子定量によって環境中における増殖活性を調査する手法の確立が挙げられる。

[キーワード]

腸管系ウイルス、ノロウイルス、トウガラシ微斑ウイルス、大腸菌、合流式下水道雨天時越流水

1. はじめに

腸管系ウイルスは感染したヒトの消化器系器官中で複製された後、高濃度で糞便と共に排泄されるため、下水中にはウイルスが高濃度で含まれている。東京都市圏から排出される下水は通常、沈殿、生物処理、消毒等の処理を経て排出されるものの、大雨時には合流式下水道雨天時越流水（combined sewer overflow, CSO）が生じてしまう。CSOは未処理の下水を環境水中に放出するため、CSO発生時には不定期に受水域のウイルス汚染が深刻化する。この傾向は東京湾沿岸域や東京23区域の都市河川において確認されている。このようなことから、CSO発生時にはウイルスの感染リスクが増加すると考えられ、実際にデンマークのコペンハーゲンでCSO発生時に開催されたトライアスロン大会における下痢症のアウトブレイク事例が報告されている（Andersen et al. 2013）。

一方で、東京湾の汚染状況は年間を通じて一定ではなく、大きな変動が予想され、定期的に採水調査することだけでは、年間の汚染状況を把握することは困難である。また、主にRNAでゲノムが構成される腸管系ウイルスは進化速度が速く、粒子表面のタンパクが変化すると、過去にヒトが獲得した免疫は役に立たず、少しのウイルス粒子だけで感染が成立してしまう。この点について、2015-2016年にかけては従来主流ノロウイルス（GII.4遺伝子型）が新型（GII.17遺伝子型）へと入れ替わる転換点となり、大きな話題となった。

以上のことから、リスク管理の観点について、降雨後環境中に排出されたウイルスの濃度、およびウイルスの遺伝子型に着目した汚染状況の把握が重要であると言える。

今後、2020年東京オリンピックではお台場においてトライアスロン競技、中央防波堤ではボート競技などが予定されている。過去にコペンハーゲンで生じたアウトブレイクのような事態が国際大会で繰り返されることはあってはならず、そのため、東京湾沿岸域のウイルス汚染状況把握は急務の問題であると言える。

また、我が国では微生物学的水浴場水質判定基準は、糞便性大腸菌群により定められているが、しばしば指標細菌の存在状況と腸管系ウイルス等の病原性ウイルスの存在状況との間には必ずしも相関が見られないことや、指標細菌自体の増殖可能性について指摘されている。それ故、新しい衛生指標として期待される大腸菌の環境中での増殖に関わる挙動は、状況を把握すべき重要な事項である。加えて、アイチウイルスやトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）は、糞便由来でありかつ水環境中に高濃度で存在することから、ウイルス汚染の指標となる可能性がある。

2. 研究開発目的

沿岸海域の汚染は、親水活動を介して人々に健康リスクをもたらす。中でも病原微生物の水系感染は曝露一回あたりのリスクが大きく、下痢症等による健康影響を直ちに引き起こす。そのため、感染リスクを適切に評価し、管理する必要がある。腸管系ウイルスによる沿岸海域の汚染が世界的に広く報告されており、またその感染力の強さゆえに、細菌や原虫のみならず腸管系ウイルスによる感染リスクも考慮する必要がある。また、親水活動を介した病原微生物リスクの主因はノロウイルスであるとする報告がなされており、実際にスウェーデンにおけるアウトブレイク事例が報告されている（Sartorius et al. 2007）。さらに、新しい遺伝子型をもつ腸管系ウイルスに対しては過去の流行によって得られた免疫が十分に機能しないため、感染リスクを適切に評価し、管理する必要がある。

以上のことから、本サブテーマでは下記の4点を目的に掲げた。

- 1) 市民の親水活動の場である東京湾沿岸域における、ノロウイルスを中心としたウイルス汚染実態の把握
- 2) 大量の海水を濾過するカキ等の二枚貝の中腸腺や、底泥に蓄積するウイルスに着目し、これらの遺伝子型を解析することで、東京湾に流れ込む海水に含まれるウイルスの蓄積データ取得
- 3) 分子生物学的手法によって分裂関連遺伝子発現を検出・定量することで、環境中における大腸菌の増殖を評価する系の確立
- 4) 環境水中において大腸菌が増殖しうることを確認し、環境水中において大腸菌が増殖基質としている溶存有機物の探索

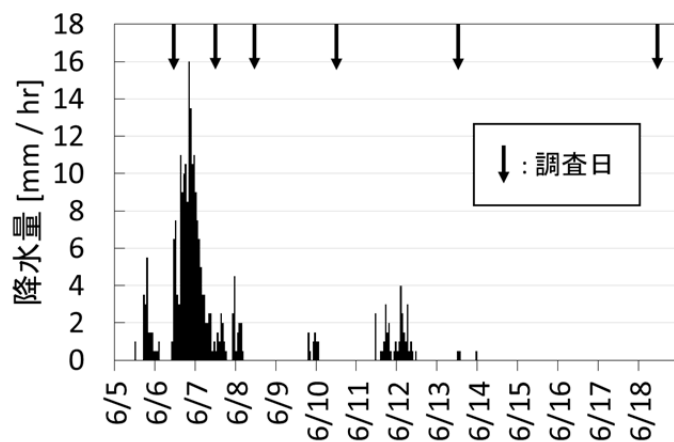
3. 研究開発方法

1) 東京湾沿岸域における降雨後ウイルス汚染の実態調査

2014年6月5日から6月18日にかけて、総降雨量247 mm、時間最大降雨量16 mm/hr の降雨が東京23区域において観測された（気象庁、大手町観測所）（図(2)-1）。時間最大降雨量は6月7日に記録された。なお、同地点において同年5月28日以降6月4日までの期間に降雨は観測されていない。

6月5日の降雨観測後 1、2、3、5、8、13日後（6月6、7、8、10、13、18日）に東京湾内の4地点（隅田川河口、目黒川河口、測線観測地点、お台場）で合計57試料をウイルス濃度測定のために採取した。隅田川河口および目黒川河口においては6月6、7、8、10日に、測線観測地点においては調査期間中の全日に、お台場においては6月13日を除く全日に採水を行った。各採水地点の位置関係を図(2)-2に示す。採水時は、船側に固定した鉄パイプを鉛直方向に下ろし、異なる水深にチューブの先端を固定してアスピレーターによる吸引を行うことにより、表層、中層、低層の水として、それぞれ水深0.5、3、5mの試料を同時に採取した。機器の接続等、採水方法の概略を図(2)-3に示す。なお、測線観測地点では鉄パイプを下ろしたまま船を測線上に航行させ、その間アスピレーターで海水を吸引し続けることによって試料を得た。大腸菌、大腸菌群、および塩濃度を含む物理化学的水質項目測定に際しても、同時に、同地点で鉛直方向3層から試料採取を行った。測線観測地点では、ウイルス測定用試料と異なり、航行中に一定の時間間隔で試料を採取した。

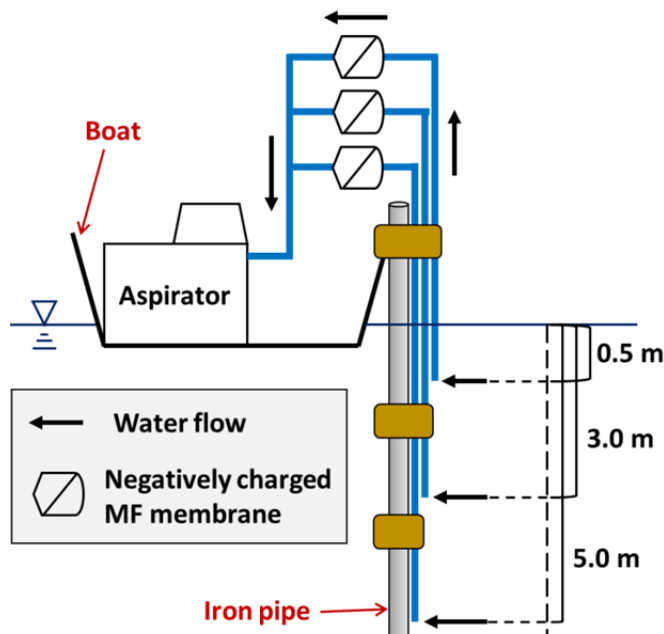
採取試料は、1次濃縮として、試料採取時にアスピレーターと接続させたカートリッジ型陰電荷MF膜にウイルスを吸着させ（図(2)-3）、東京大学でウイルスを誘出した。さらに、1次濃縮を終えた試料は4℃以下で冷蔵保存し、UF膜を用いた遠心ろ過により2次濃縮を行った。得られた濃縮試料に対して核酸抽出、逆転写、real-time PCRを行い、ノロウイルスGIおよびGII（NoV GI、GII）、アイチウイルス（AiV）およびPMMoVの濃度を定量した。また、RNAウイルス測定時には、検出阻害を評価するために、プロセスコントロールとしてマウスノロウイルス（MNV）を濃縮試料およびMilli-Q水に添加し、試料におけるMNV濃度が対照であるMilli-Q水における濃度の10%未満であった場合、検出阻害ありと判定した。検出阻害を軽減するためRNA抽出液の10倍希釈を行い、RNA抽出液の10倍希釈を行った場合と行わなかった場合のウイルス定量濃度を比較し、より濃度が高かったものを真の濃度に近い測定値とみなし採用した。また、指標細菌や物理化学的水質項目についても同時に測定を行った。



図(2)-1. 試料採取期間中の降雨状況



図(2)-2. 試料採取地点



図(2)-3. 試料採取方法の概略図

2) 二枚貝への腸管系ウイルス蓄積状況に基づいたヒト糞便由来の汚染履歴評価

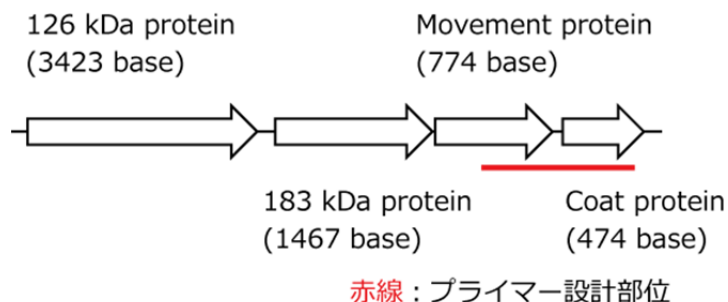
2015年5、8、11月の大潮干潮時に合わせて、多摩川河口、葛西臨海公園沖、中央防波堤中潮橋付近、鮫洲ポンプ場の4箇所より、水試料およびカキ試料を採取した。各採取地点の位置関係を図(2)-2に示す。表層水の採水にはバケツを用い、バンドン採水器を用いて得た水深2-3mの試料を低層水とした。水試料は陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法によってウイルス濃縮した。一方、カキ試料は解剖して中腸腺を摘出し、MilliQ水に懸濁した後、上清をウイルス濃縮試料とした。

得られた濃縮試料に対して核酸抽出、逆転写の後、PMMoV coat protein特異的プライマーでPCRを行った。PMMoV coat protein遺伝子のプライマーは、Letschert et al. 2002, Fraile et al. 2011を参考として、PMMoV特異的となるよう本研究で再設計したものをを用いた。PMMoVゲノム上のプライマーの設計位置を図(2)-4、特異性について図(2)-5、6に示す。

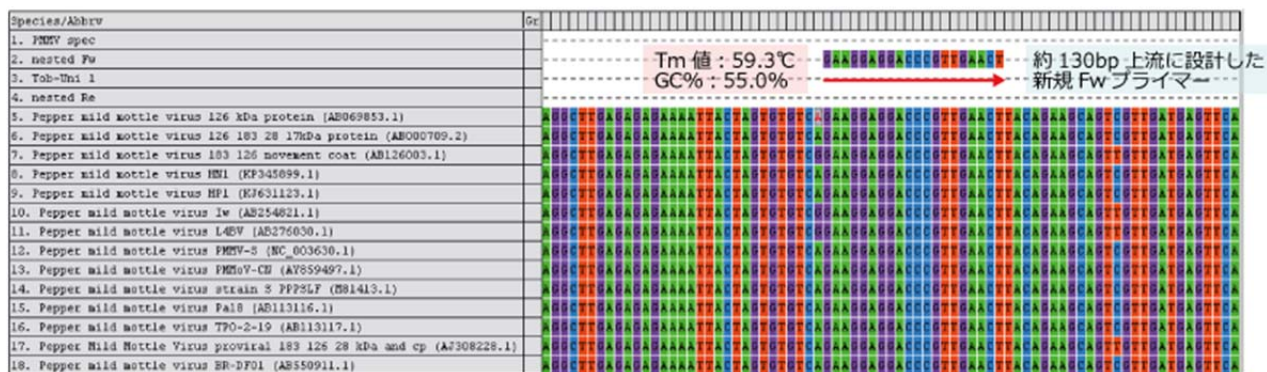
ここで得られたPCR産物に対し、DynaExpress TA PCR Cloning Kit (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Japan) を用いて、pTAC-1 vectorに挿入した。作成したプラスミドでJet Competent Cell (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Japan) を形質転換し、クローンライブラリを作成した。

クローンライブラリで得られた塩基配列について、解析ソフトウェアMEGA 6.06 (Tamura et al. 2013) を用いて多重置換配列を求めた後、Neighbor-Joining (NJ) 法によって、系統樹を作成し、サンプル間の系統関係を比較解析した。

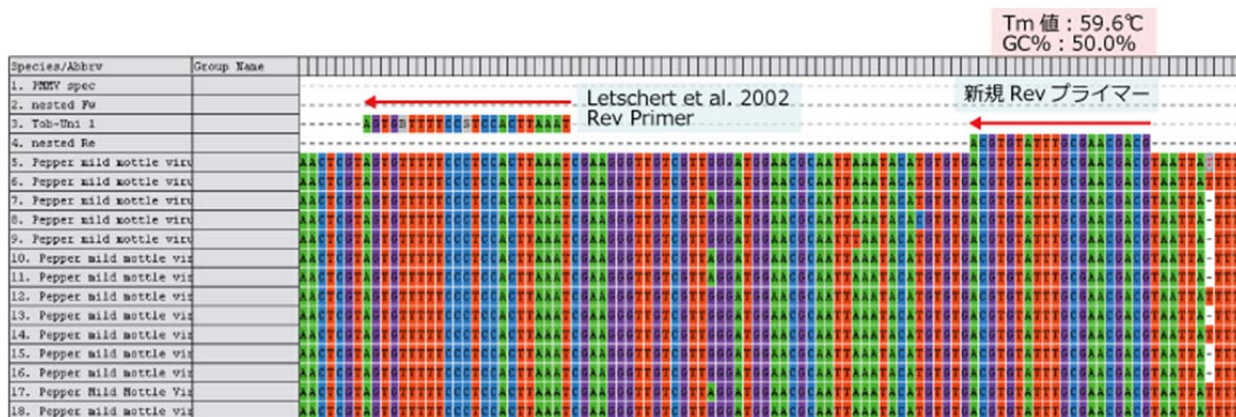
また、指標細菌についてはクロモカルトコリフォーム寒天ES (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を使用して測定した。



図(2)-4. PMMoVゲノム上における新規プライマー設計部位



図(2)-5. PMMoV特異的プライマー（フォワード側）の特異性



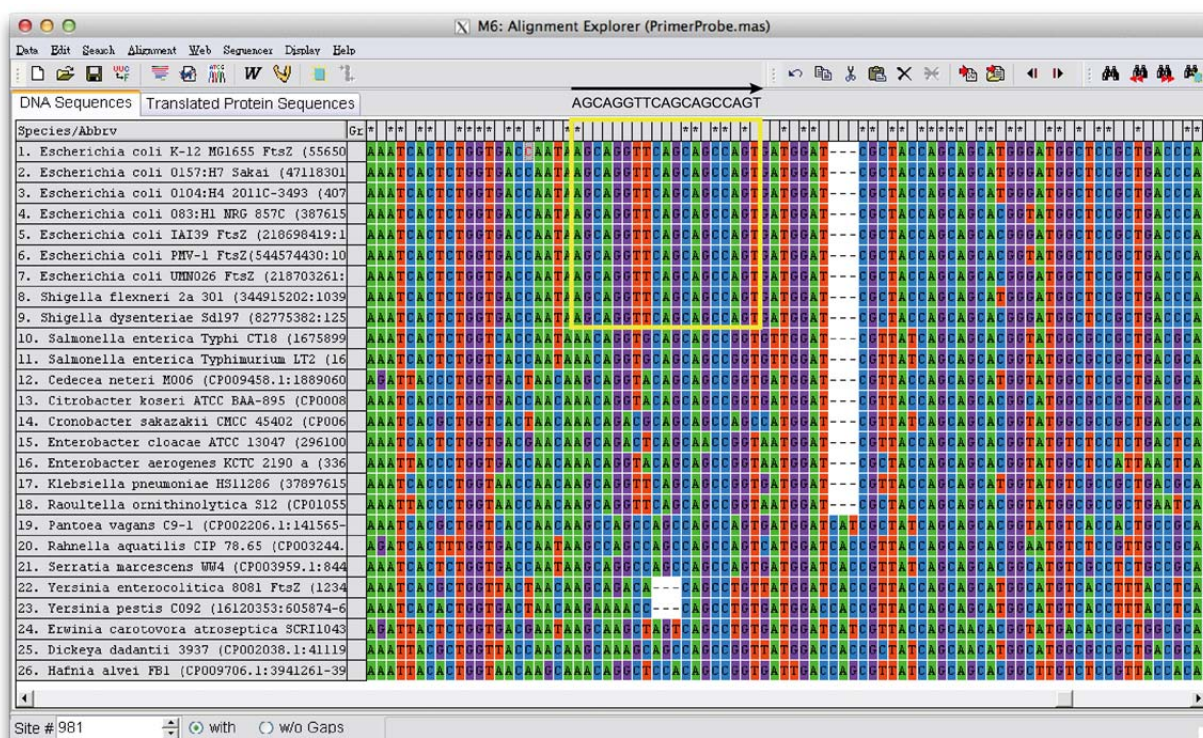
図(2)-6. PMMoV特異的プライマー（リバース側）の特異性

3) 環境中における大腸菌の増殖を評価する系の確立

National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で公開されているゲノム情報から腸内細菌科 *Enterobacteriales* の *ftsZ* 配列を取得し、大腸菌 *E. coli* と比較することで、大腸菌特異的領域を探索した。定量PCRの使用に適したサイズとして、100塩基前後のプロダクトサイズでプライマーとプローブを設計し、実験に用いた。プライマーおよびプローブの設計について、図(2)-7に示す。

Over night培養した *E. coli* K12株を 10^3 希釈した後、静止期まで30分毎にサンプリングしDNAおよびRNA試料を採取した。対数期に達した時点で核酸合成停止を意図してナリジクス酸添加系を用意し、以降16日後まで培養を継続した。

また、比較の為に非分裂関連遺伝子であるトリプトファン代謝遺伝子 (*tnaA*) を同時に定量した。



図(2)-7. 大腸菌特異的 *ftsZ* プライマーおよびプローブの設計部位

Tm値: Forward primer 61.2°C、Reverse Primer 61.4°C、Probe 59.5°C、Product Size: 104 bp

4) 環境水中溶存有機物による大腸菌の増殖可能性の評価と増殖基質の探索

本課題に用いる試料は、多摩川および矢上川から2015年12月15日採水した。採水地点を選定す

る際には、大腸菌が増殖しやすいと考えられる、下水処理水の影響を受けている河川水を中心に選んだ。多摩川における採水地点は、丸子橋の直上流地点であり、神奈川県川崎市の等々力水処理センターからの放流口付近である。そのため、下水処理水の影響を強く受けた河川水となっている。矢上川での採水は2地点において行った。1地点目は、神奈川県川崎市の加瀬水処理センターからの放流口付近であり、上記の多摩川からの試料同様に下水処理水の影響を強く受けている河川水である。2地点目は、鶴見川との合流点の直上流付近であり、1地点目から200 mほど下流の地点である。この地点で採水した試料も上記2試料ほどではないが、下水処理水の影響を受けている河川水である。

試料は採水後すぐに実験室に持ち帰り、濾過滅菌処理及び低温滅菌処理を行った。濾過滅菌処理には、孔径0.2 μm のメンブレンフィルター(Nuclepore, Whatman)を用いた。また、低温滅菌では、75°Cで1時間湯浴させた。

上記の通り滅菌した試料を以後、それぞれ河川水T、Y1、Y2と呼ぶこととする。河川水T、Y1、Y2の一般水質測定結果を表(2)-1に示す。

表(2)-1. 河川水T、Y1、Y2の一般水質

項目		T	Y1	Y2
採水時水温	(°C)	21.6	18.9	15.8
溶存酸素濃度	(mgO/L)	4.3	4.1	4.4
全塩素	(mg/L)	0.25	0.21	0.09
遊離塩素	(mg/L)	0.08	0.04	0.02
大腸菌数	(CFU/mL)	0	67	45
大腸菌群数	(CFU/mL)	0	366	181
全菌数	(cells/mL)	7.6×10^6	3.7×10^6	3.0×10^6
DOC	(mgC/L)	7.6	5.3	4.0
TN	(mgN/L)	18.0	9.0	6.5
NH ₄ ⁺ -N	(mgN/L)	11	0.76	0.37
NO ₂ ⁻ -N	(mgN/L)	0.92	ND	ND
NO ₃ ⁻ -N	(mgN/L)	3.7	7.7	4.9
PO ₄ ³⁻ -P	(mgP/L)	0.80	0.88	NA
SO ₄ ²⁻	(mg/L)	37	38	NA

大腸菌が環境水中において増殖したことを確かめるための対照試料として、大腸菌の最小培地であるM9培地から唯一の有機炭素源であるグルコースのみを除いた溶液を作成した。この試料を以後、M9-Gluと呼ぶ。M9-Gluは、大腸菌が増殖するために必要な成分のうち、有機物成分以外をすべて含む溶液ということになる。

試料中に大腸菌の種菌を培養しているLB培地由来の有機物成分が混入しないようにするために、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて大腸菌と有機物成分の分離を行った。さらに、栄養豊富な培地中に存在していた大腸菌を、本実験で用いる河川水中のような低栄養条件下に馴致させるために、PBS中で3時間放置した。その後、各培養系及び対照系に大腸菌数の初期濃度が $10^3 \sim 10^4$ cells/mL程度となるように植種を行った。

大腸菌の培養実験は、河川水T、Y1、Y2と、対照試料M9-Gluの4種類の試料に対して行った。上記の通り大腸菌を植種したのち、暗所、30°Cの条件下で培養を行い、定期的に大腸菌数及び全菌数の測定を行った。さらに、河川水T、Y1、Y2については、大腸菌を植種せずに、暗所30°Cで培養

を行うブランクを用意した。このブランクについても大腸菌数と全菌数の測定を定期的に行い、細菌が増殖していないことを確認した。培養実験が終わったのちに、大腸菌を植種し増殖した試料と、ブランク試料の溶存有機物組成の比較を行った。溶存有機物組成の分析には、低級カルボン酸の測定とOrbitrap型質量分析計による分析を用いた。

大腸菌数の測定は、クロモカルトコリフォーム寒天ESを用いて行った。全菌数の測定にはフローサイトメトリによる計数法を用いた。試料490 μL を無菌的にマイクロチューブに採取し、ジメチルスルホキシド(DMSO, WAKO, USA)で100倍希釈した染色液SYBR® Green I(Invitrogen, USA)及び、50 mM EDTAをそれぞれ5 μL ずつ加えた。この試料を遮光し37°Cで10分間インキュベートすることにより反応させ染色した。染色後、BD Accuri™ C6 フローサイトメーター(BD, USA)を用いて全菌数を測定した。なお、測定試料量は50 μL 、流速はmediumに設定した。また、試料を孔径0.2 μm のPTFEメンブレンフィルター(DISMIC, Advantec, Japan)でろ過し、同様に染色することでブランク試料とした。試料中の菌数が多い場合は、リン酸緩衝生理食塩水を用いて適宜希釈を行った。測定後はソフトウェアCFlow Plus(Accuri, USA)を用いてデータの解析を行った。

低級カルボン酸の測定はイオンクロマトグラフィーにより行った。低級カルボン酸は、酢酸、ギ酸、シュウ酸の3種類を測定対象とした。装置は881 Compact IC pro(Metrohm, Switzerland)を、カラムはMetrosep A Supp 5-250/4.0(shodex, Japan)を用いて測定を行った。溶離液には3 mM炭酸ナトリウムと1 mM炭酸水素ナトリウムの混合液を用い、流速は0.6 mL/minに設定した。標準液には、酢酸、ギ酸、シュウ酸の3種混合溶液を用い、0 $\mu\text{gC/mL}$ 、1 $\mu\text{gC/mL}$ 、5 $\mu\text{gC/mL}$ 、10 $\mu\text{gC/mL}$ 、50 $\mu\text{gC/mL}$ 、100 $\mu\text{gC/mL}$ の6段階の標準列を作成した。測定により得られた結果は、ソフトウェアMag IC Net 3.1を用いて分析を行った。

Orbitrap型質量分析計による分析は、試料の前処理、試料の固相抽出、質量分析の3つの段階で下記の通り行った。

①試料の前処理

Orbitrap型質量分析計で環境水を分析するためには、溶存有機物を濃縮させるために固相抽出を行う必要がある。そのために、試料を前処理する必要がある。まず、用いる試料を孔径0.3 μm のガラス繊維ろ紙であるGF-75(Advantec, Japan)でろ過した。次に、5 N塩酸を用いてpHを2.00に調整した。pHの微調整には、0.1 N塩酸や0.1 N水酸化ナトリウム水溶液を用いた。なお、本実験で使用するガラス器具は全てMilli-Qで十分にリンスし、アルミホイルに包みオーブン(550°C、6 h)で熱処理を行った。また、ガラス繊維ろ紙もアルミホイルに包み同様に熱処理した。

②試料の固相抽出

試料中の溶存有機物を濃縮するために、上記の通り前処理を行ったサンプル1 Lを10 mLに100倍濃縮した。固相抽出には、Bond Elut PPL カラム(Agilent Technologies, USA)を用いた。

試料をPPLカラムに通水させる前に、メタノール及び0.01 N塩酸を各カラムに20 mLずつ順に流してコンディショニングした。その後、1カラム当たり1 Lの試料を、真空ポンプを用いて通水した。通水時の圧力は約5 mmHgに調節した。試料の通水が終了した後、0.01 N塩酸を6 mLずつ各カラムに2回流すことにより洗浄し、真空ポンプで5分間乾燥した。乾燥後、各カラムにメタノール10 mLを正確に通して有機物を溶出させ、100倍に濃縮した試料を得た。メタノールでの溶出の際も、通水時と同様に真空ポンプを用い、圧力は5 mmHgに調整した。固相抽出によって得られた試料は、-20°Cで保管した。

③質量分析

上記の固相抽出によって得られた試料について、Orbitrap型質量分析計Exactive (ThermoFisher Scientific, Japan)によりフローインジェクション分析を行った。測定はネガティブイオンモードで行い、イオン化方法はエレクトロスプレーイオン化法を選択した。測定範囲は $m/z = 100-1000$ (質量分解能100,000)を対象とした。モバイルフェイズには、純粋メタノールを用いた。また、分析保持時間、1回の測定につき2分とした。

質量分析によって得られたデータについては、ソフトウェアSeive2.2 (ThermoFisher Scientific, Japan)を用いて解析を行った。

4. 結果及び考察

1) 東京湾沿岸域における降雨後ウイルス汚染の実態調査

隅田川河口、目黒川河口、測線観測地点、お台場の各地点から得られた合計57試料において、陽性率はPMMoV、ノロウイルスGII、アイチウイルス、ノロウイルスGIの順に高く、それぞれ79%、54%、46%、44%、となった。PMMoVの高い陽性率は、同ウイルスの優占性を示した先行研究を支持するものであったが、一方でアイチウイルスの陽性率はノロウイルスGIIよりも低く、必ずしも水環境中に優占して存在しているわけではない可能性が示された。しかしながら、下記に示すとおり、本調査において採取された試料中の阻害物質濃度が非常に高かったことから、検出阻害が完全に除去されず測定結果が不検出になった試料が多く存在し、各ウイルスの陽性率が過小評価されている可能性もある。

表(2)-2に検出阻害が見られた試料の割合を示す。RNA抽出液の10倍希釈を行わなかった場合のウイルス検出阻害が見られた試料の割合は、隅田川河口で25% (3/12)、目黒川河口で83% (10/12)、測線観測地点で83% (15/18)、お台場で93% (14/15)であった。また、検出阻害軽減化処理としてRNA抽出液の10倍希釈を行った結果、阻害が見られた試料の割合は、隅田川河口で17% (2/12)、目黒川河口で33% (4/12)、測線観測地点で39% (7/18)、お台場60% (9/15)となった。この結果は、RNA抽出液の10倍希釈により全体としてみれば検出阻害が軽減されたことを示しているが、一方で、軽減の程度には採水地点による差が見られることも示している。特に、お台場においてはRNA抽出液の10倍希釈を行った後にも60%の試料で検出阻害が見られた。水理学的な条件により、お台場の採水地点周辺海域に阻害物質が輸送され、蓄積されている可能性がある。さらに、阻害が見られた試料の割合を鉛直方向別に見ると、低層において中層より、中層において表層より検出阻害が強く見られることが分かる(表(2)-3)。この結果は、再び、水理学的な条件により、深さ方向に阻害物質濃度の勾配があることを示唆している。

表(2)-2. 阻害が見られた試料の割合 (%)

	隅田川	目黒川	測線	お台場	全体
希釈前	25	83	83	93	74
希釈後	17	33	39	60	39

表(2)-3. 鉛直方向別に見た、RNA抽出液希釈後に阻害が見られた試料の割合 (%)

	隅田川	目黒川	測線	お台場	全体
表層	0	0	17	60	21
中層	25	25	33	60	37
低層	25	75	67	60	58

表(2)-4に検出阻害軽減化処理を行わなかった場合の各ウイルスの陽性率を、表(2)-5にRNA抽出液の10倍希釈を行った後のウイルス陽性率を示す。表(2)-4および表(2)-5に示した結果の比較により、RNA抽出液の10倍希釈を行った場合に、いずれのウイルスに関しても陽性率が増加したことが分かる。

表(2)-4. 検出阻害軽減化処理を行わなかった場合のウイルス陽性率 (%)

ウイルス	隅田川	目黒川	測線	お台場	全体
PMMoV	75	42	50	20	46
AiV	67	0	22	7	23
NoV GI	75	0	14	7	23
NoV GII	75	8	22	0	25

表(2)-5. RNA抽出液の10倍希釈を行った後のウイルス陽性率 (%)

ウイルス	隅田川	目黒川	測線	お台場	全体
PMMoV	83	92	72	73	79
AiV	83	33	50	20	46
NoV GI	75	25	56	20	44
NoV GII	75	42	50	53	54

以下に、各採水地点におけるウイルスおよび大腸菌の挙動について述べる。

a) 隅田川河口における挙動 (図(2)-8)

6月6日において、ノロウイルスの濃度はGI、GII共に不検出となった。一方で同日試料の表層に関しては検出阻害が見られないため、ノロウイルスに関する結果は偽陰性ではないと考えられる。また、PMMoVやアイチウイルスが検出阻害の見られなかった表層で検出されており、大腸菌も全層から検出されたことから、同日中には採水地点においてCSOの影響があったと考えられる。併せて、ノロウイルスが6月7日以降の試料中で検出されたことから、到達時間にウイルス間の差が存在し、ノロウイルスは到達時間が遅い可能性がある。また、PMMoVの濃度が安定して高かったのに対し、他のウイルス濃度は8日に最高値を示したことから、PMMoV汚染はCSO発生前に既に存在した別の汚染源によるものであり、他のウイルスがCSOにより8日に排出された可能性もある。アイチウイルスの濃度が6月10日に向けて減少傾向を示したのに対し、PMMoVの濃度が減少傾向を見せなかったことから、先行研究による報告と同様に、PMMoVの水環境中における安定性の高さが示唆された。大腸菌の挙動はPMMoVの挙動との類似性を示した。

b) 目黒川河口における挙動（図(2)-9)

表層における挙動について、各ウイルス間で類似した傾向が見られた一方で、大腸菌の挙動はウイルスと異なる傾向を示した。また、6月6日の低層試料に関して、検出阻害が見られるのにも関わらず、ノロウイルスGIIの濃度が特異的に高い値で定量された。当採水地点における水深が5 mと浅く、低層試料が河床近傍から採取されたことから、特異的に高い値で検出されたノロウイルスGIIが底泥由来である可能性が考えられる。一方、他の試料におけるウイルス濃度が6月6日から7日にかけて増加したことから、CS0による汚染の影響が7日に到達したと考えられる。底泥由来と考えられるノロウイルスGIIは、7日の試料においては降雨やCS0の影響で流速の増加した河川水の剪断作用により巻き上がり、低層試料中で減少したと考えられる。

c) 測線観測地点における挙動（図(2)-10)

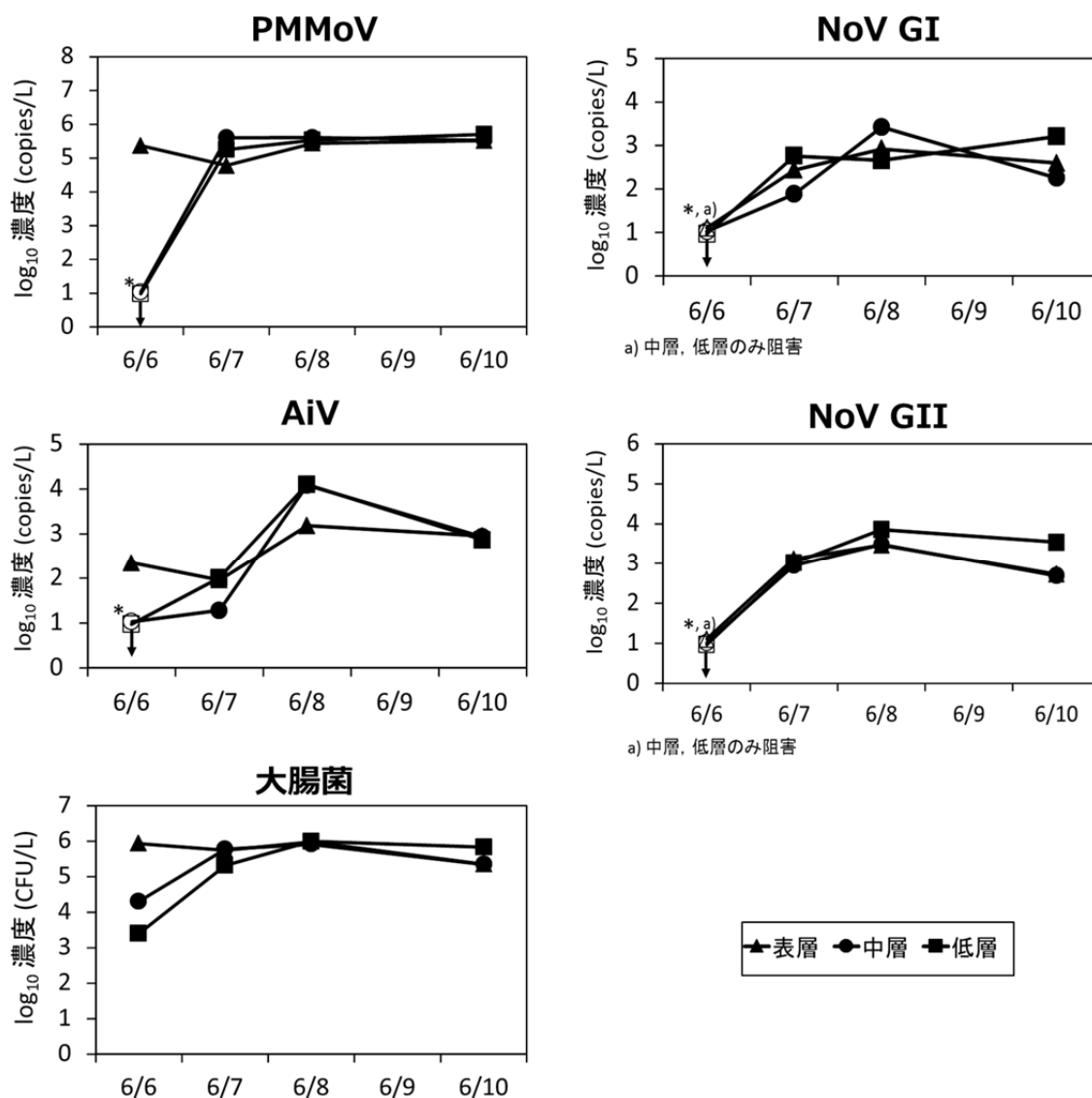
ウイルスと大腸菌の挙動が異なっており、概してウイルス濃度の減少は大腸菌濃度の減少に比べて遅く、ウイルスの方が環境中において安定的に存在していた可能性、もしくはCS0による汚染の影響が到達時間の差により遅れて生じた可能性がある。ただし、ウイルス濃度はreal-time PCRにより測定されており、ウイルスに関しては不活化を判定できないため、大腸菌の不活化による検出濃度の減少が、両者の濃度減少傾向の原因となっている可能性も考えられる。またウイルス間の比較においては、PMMoVとアイチウイルス、ノロウイルスGIとノロウイルスGIIがそれぞれ類似した挙動を示した。両者の挙動の差は、検出阻害の見られなかった6月8日の表層および中層試料においてノロウイルスGI、GIIが不検出となった点において顕著に見られる。ウイルス測定用に採取された試料に関しては、およそ2 kmの航行中に連続的に採取されたものであるため、濃度の定量結果は当該海域におけるウイルスの平均濃度をあらわしていると考えられ、ウイルス間に見られた挙動の差は試料の代表性により生じたものではないと考えられる。

d) お台場における挙動（図(2)-11)

前述したように、当採水地点においては、検出阻害の見られた試料の割合が他の採水地点と比べて高く、ウイルスの継時的な挙動を比較、評価することが困難であった。しかし、降雨終了時から約1週間が経過した6月18日になってもノロウイルスが検出されており、親水活動を介した感染リスクが持続していることを示唆している。また、測線観測地点におけるPMMoVおよびアイチウイルスの濃度が6月10日から6月18日にかけて一定または減少する傾向を示したのに対し、お台場においてはいずれも増加する傾向を示した。この傾向の差は、CS0による汚染の影響が到達するのに要する時間に関して、両採水地点における差があることを示唆している。大腸菌の挙動が両採水地点において類似した傾向を示したことに鑑みれば、ウイルス汚染の到達時間が細菌による汚染の到達時間に比べて長い可能性が示唆された。6月6日の低層試料におけるノロウイルスGIIの高い濃度は、当採水地点の水深が約5 mと浅かったことから、目黒川河口におけるものと同様に、底泥由来である可能性がある。また検出阻害の見られなかった6月10日の試料に関して、ノロウイルスが検出されている一方でアイチウイルスが不検出となったことから、アイチウイルスの測定によってノロウイルスの存在を予測できない場合があることが示された。

全体として、検出阻害が多く見られたことから、ウイルスの挙動を定量的に議論することが困

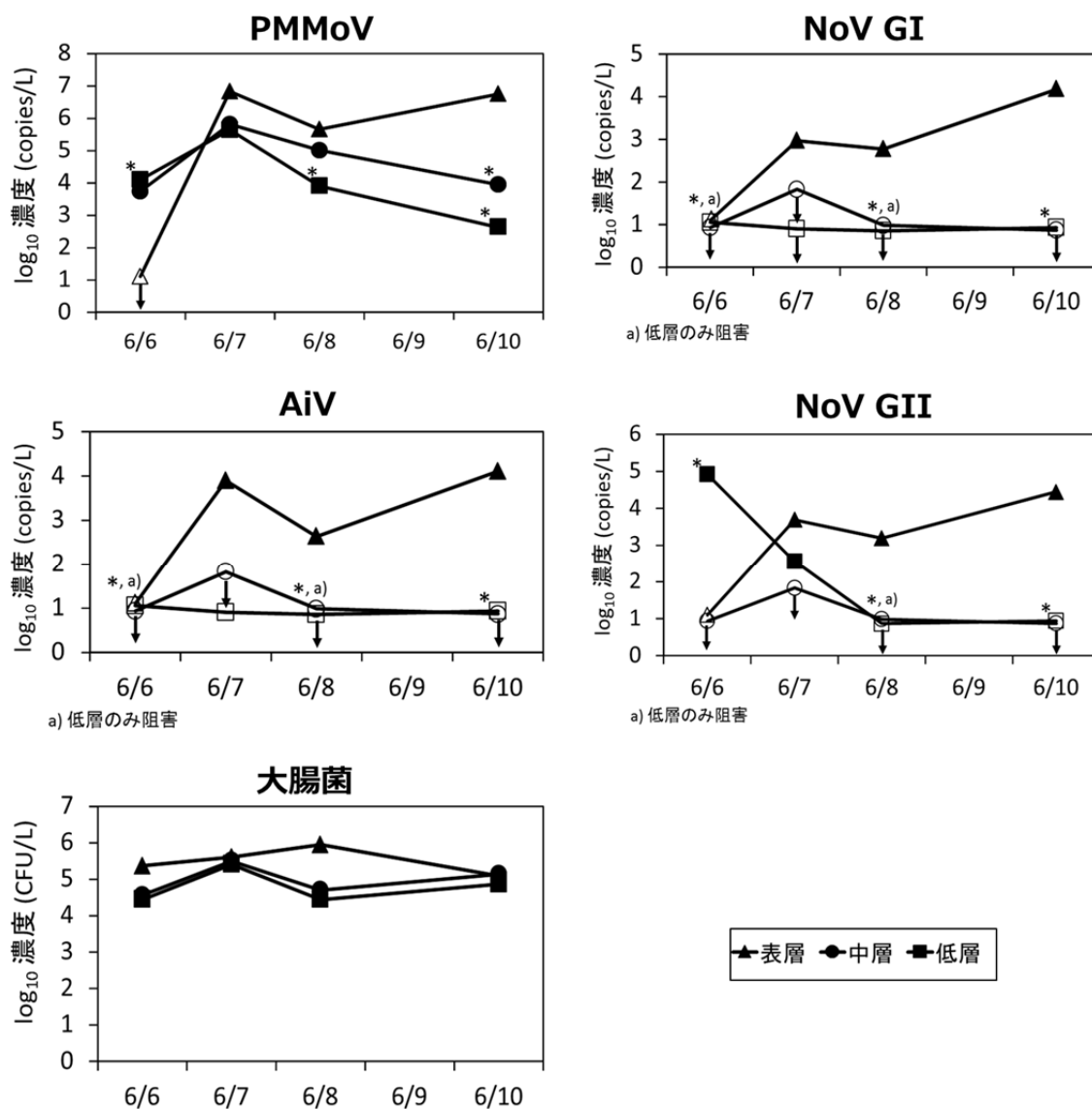
難であった。そのため、降雨後の沿岸海域におけるウイルス汚染の実態を適切に把握するためには、RNA抽出液の10倍希釈に加え、さらなる検出阻害の軽減化処理を施す必要があると考えられる。また、大腸菌に関しては、全体的に中層および低層における濃度のピークが表層におけるピークに遅れて現れる傾向が見られたが、ウイルスに関してはこのような傾向が見られなかった。ウイルスおよび大腸菌の鉛直方向における濃度分布は、沈降により表層から中層、低層へと推移していくことが予想されたが、この結果は、ウイルス粒子が調査期間中にあまり沈降していなかったことをあらわしている。ウイルス粒子は数十nmから数百nmの大きさを有しているため、環境中で他のコロイド粒子との凝集があまり起きていなかった、浮遊物質への吸着があまり起きていなかった等の理由により、輸送のメカニズムとして移流が沈降に対して卓越していたと考えられる。



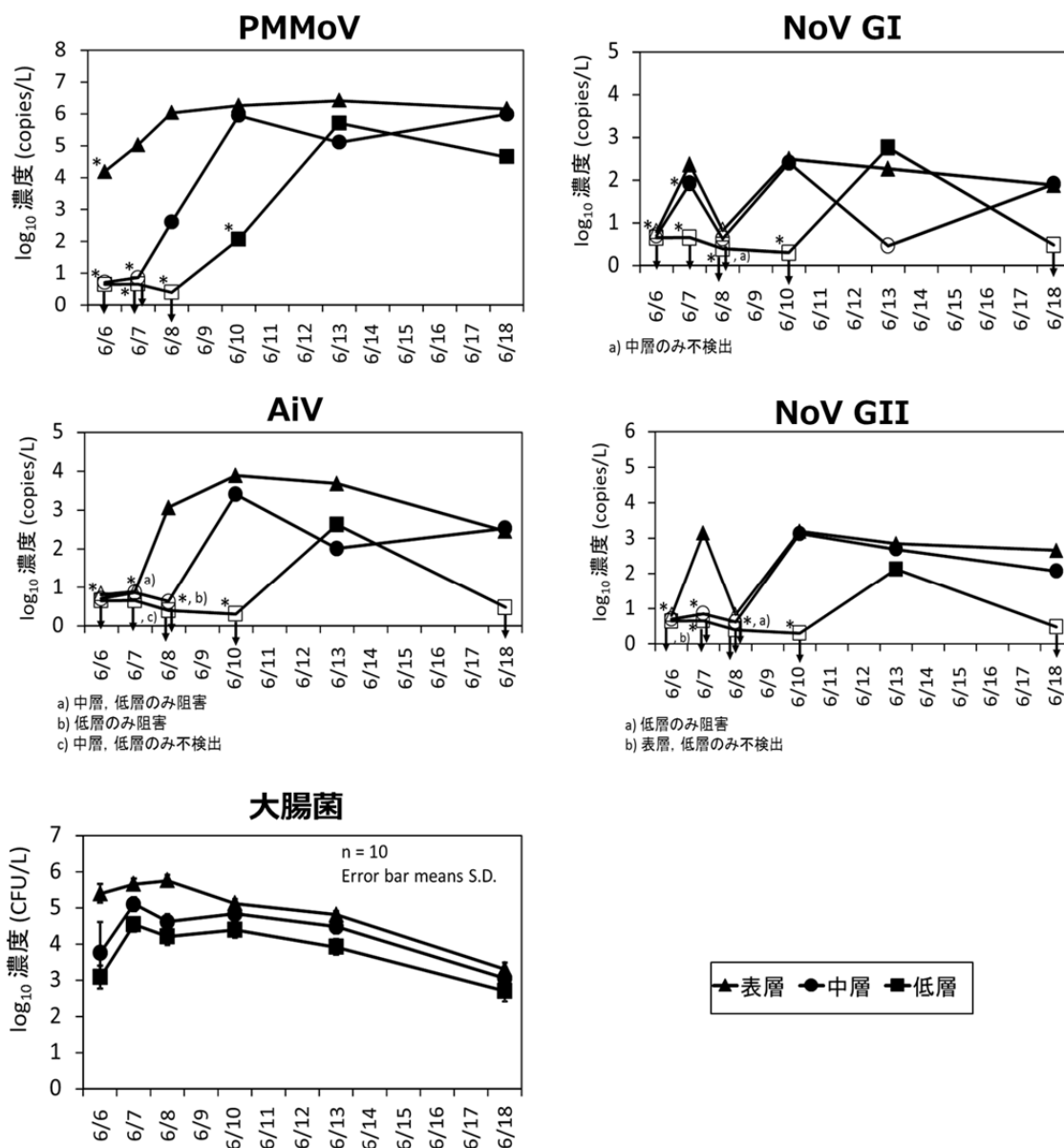
図(2)-8. 隅田川河口におけるウイルスおよび大腸菌の定量結果

白抜きのプロットは定量不可能値、下向き矢印は不検出、アスタリスク(*)は検出阻害を表す。

定量不可能値のプロットには検出下限値を代替的に用いた。

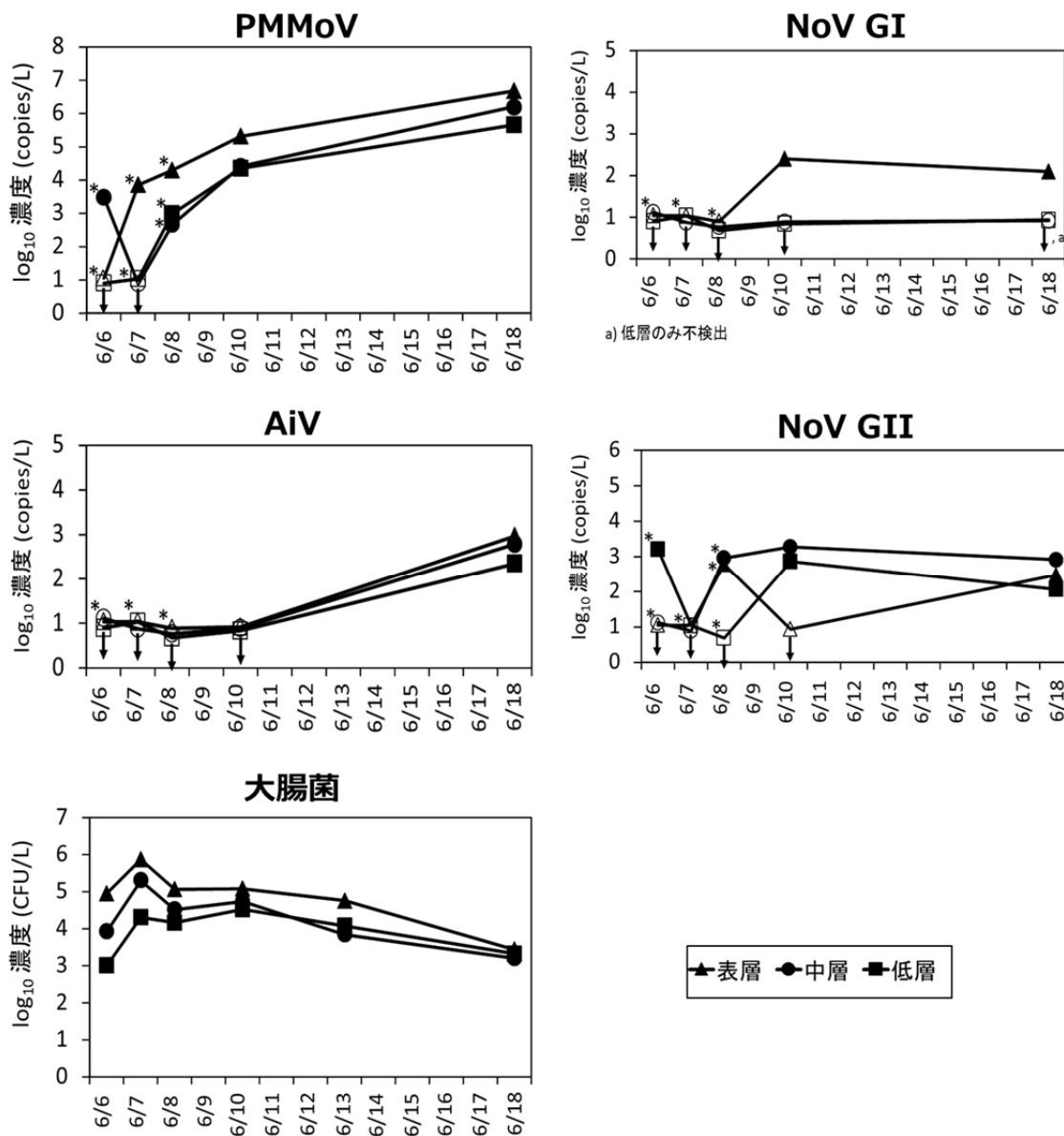


図(2)-9. 目黒川河口におけるウイルスおよび大腸菌の定量結果
 白抜きのプロットは定量不可能値、下向き矢印は不検出、アスタリスク(*)は検出阻害を表す。
 定量不可能値のプロットには検出下限値を代替的に用いた。



図(2)-10. 測線観測地点におけるウイルスおよび大腸菌の定量結果

白抜きのプロットは定量不可能値、下向きの矢印は不検出、アスタリスク(*)は検出阻害を表す。定量不可能値のプロットには検出下限値を代替的に用いた。また、大腸菌濃度に関しては測線上を航行中に一定の時間間隔で採取された10試料に関する幾何平均値を示し、その標準偏差をエラーバーで示した。



図(2)-11. お台場におけるウイルスおよび大腸菌の定量結果

白抜きのプロットは定量不可能値、下向きの矢印は不検出、アスタリスク(*)は検出阻害を表す。
 定量不可能値のプロットには検出下限値を代替的に用いた。

2) 二枚貝への腸管系ウイルス蓄積状況に基づいたヒト糞便由来の汚染履歴評価

東京湾内の4地点から水試料およびカキ試料を得た時点における環境パラメータを表(2)-6、7、8に、大腸菌および大腸菌群の濃度を表(2)-9、10に示す。空欄の試料については採取を行っていない。

表(2)-6. 東京湾サンプリング時の水温 (°C)

		5月	8月	11月	2月
多摩川	表層	24.4	23.2	14.5	9.2
	低層	23.0	24.0	14.0	
葛西臨海公園	表層	26.7	22.0	14.0	9.0
	低層	25.0	22.0		
中央防波堤	表層		22.6	15.5	9.9
	低層			16.0	
鮫洲	表層	27.3	23.2	14.0	9.6
	低層	22.9	25.3	16.0	

表(2)-7. 東京湾サンプリング時のpH

		5月	8月	11月	2月
多摩川	表層	7.61	7.75	7.60	7.73
	低層	8.07	7.70	7.63	
葛西臨海公園	表層	8.63	7.74	7.77	7.77
	低層	7.85	7.96		
中央防波堤	表層		7.50	7.68	8.21
	低層			7.71	
鮫洲	表層	7.53	7.47	7.89	7.52
	低層	7.30	7.57	8.15	

表(2)-8. 東京湾サンプリング時の塩分 (%)

		5月	8月	11月	2月
多摩川	表層	1	1.2	1.5	1.4
	低層	1.3	2.1	2.1	
葛西臨海公園	表層	0.1	0.2	1.1	1.5
	低層	0.5	0.2		
中央防波堤	表層		2.2	3	3.4
	低層			3.2	
鮫洲	表層	1.9	1.3	1.6	1.7
	低層	2.6	2.7	2.9	

表(2)-9. 東京湾サンプリング時の大腸菌群濃度 (CFU/100mL)

		5月	8月	11月	2月
多摩川	表層	1.5×10^2	2.0×10^2	3.4×10^3	3.3×10^2
	低層	5.5×10^2	6.6×10^1	3.0×10^2	
葛西臨海公園	表層	7.5×10^2	3.0×10^2	5.3×10^3	4.3×10^2
	低層	1.5×10^3	9.3×10^2		
中央防波堤	表層		-	2.9×10^3	1.0×10^2
	低層			2.1×10^3	
鮫洲	表層	6.0×10^2	2.6×10^2	1.5×10^4	1.1×10^3
	低層	2.5×10^2	3.3×10^1	3.3×10^3	

表(2)-10. 東京湾サンプリング時の大腸菌濃度 (CFU/100mL)

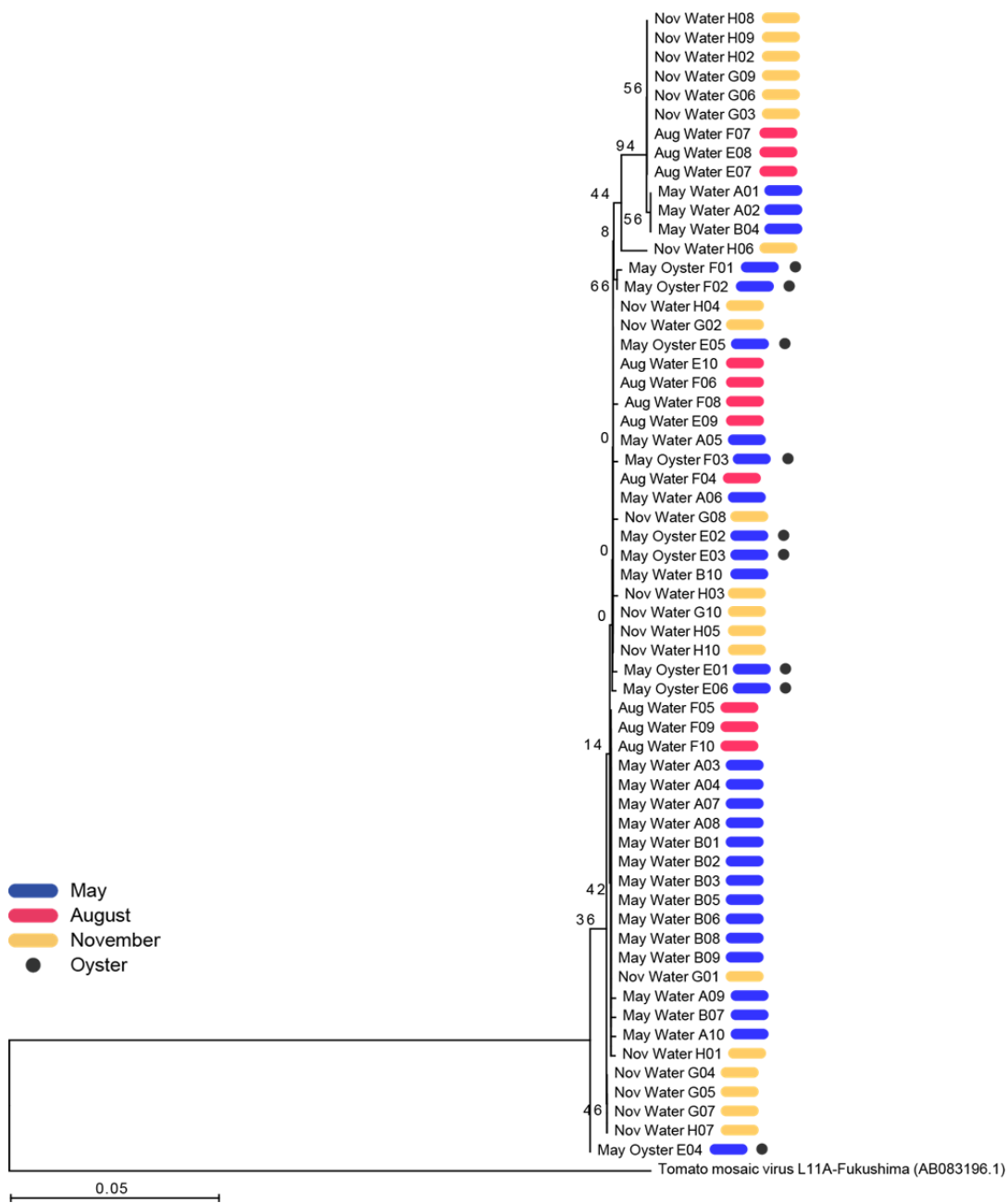
		5月	8月	11月	2月
多摩川	表層	-	3.3×10^1	2.5×10^2	-
	低層	1.5×10^2	-	1.0×10^2	
葛西臨海公園	表層	5.0×10^1	1.3×10^2	2.0×10^2	1.3×10^2
	低層	5.5×10^2	3.3×10^2		
中央防波堤	表層		-	1.1×10^3	1.0×10^2
	低層			3.3×10^2	
鮫洲	表層	4.5×10^2	6.6×10^1	3.3×10^3	3.3×10^2
	低層	3.0×10^2	-	2.1×10^3	

横線は検出限界以下

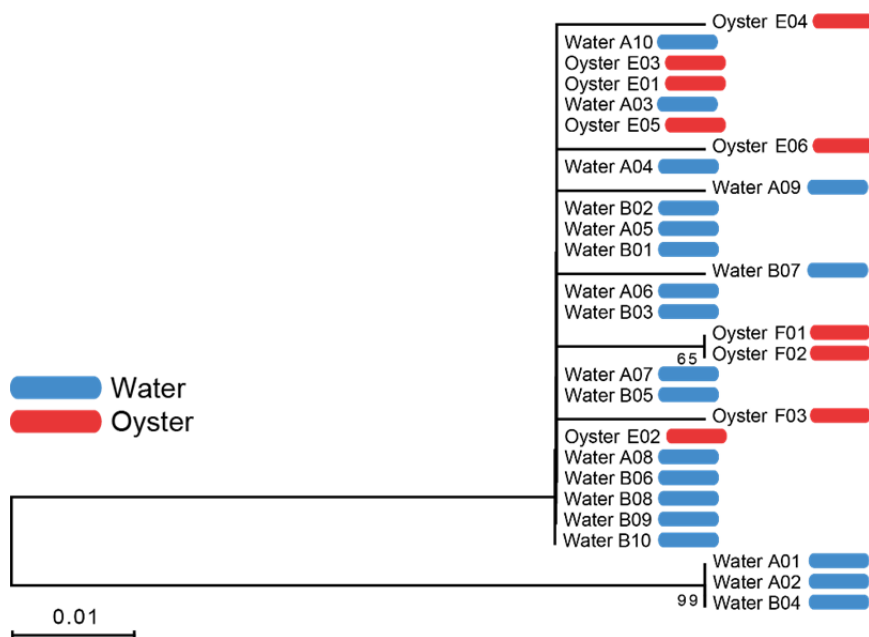
2015年11月のサンプリングにおいて、大腸菌および大腸菌群の濃度が比較的高い値を示していたが、これは前日の降雨によってCSOが発生していた為であると考えられる。

水試料およびカキ試料について、PMMoV coat protein遺伝子のクローンライブラリをそれぞれ8から20配列得た。図(2)-12は全試料、図(2)-13は5月の多摩川河口試料について、水中とカキに含まれるPMMoV coat protein遺伝子の系統関係を示している。

図(2)-12、13を見ると、PMMoV coat protein遺伝子は保存性が強く、水試料とカキ試料それぞれに含まれるウイルスに大きな系統的違いは認められない一方で、カキ試料には、水試料では見られない固有の配列が複数確認された。カキは、水中に含まれるウイルスと長期間に渡って接触しているため、一時の水試料では捉えられない、蓄積したウイルスの配列を含んでいたものと考えられる。



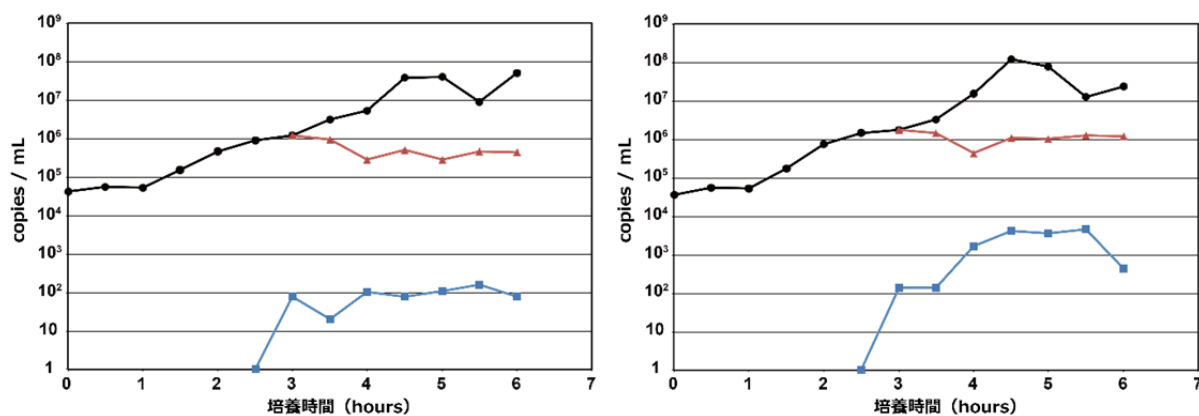
図(2)-12. 水試料およびカキ試料に含まれるPMMoVのcoat protein遺伝子系統関係 (NJ法)



図(2)-13. 5月多摩川河口試料の水およびカキに含まれるPMMoVのcoat protein遺伝子系統関係 (NJ法)

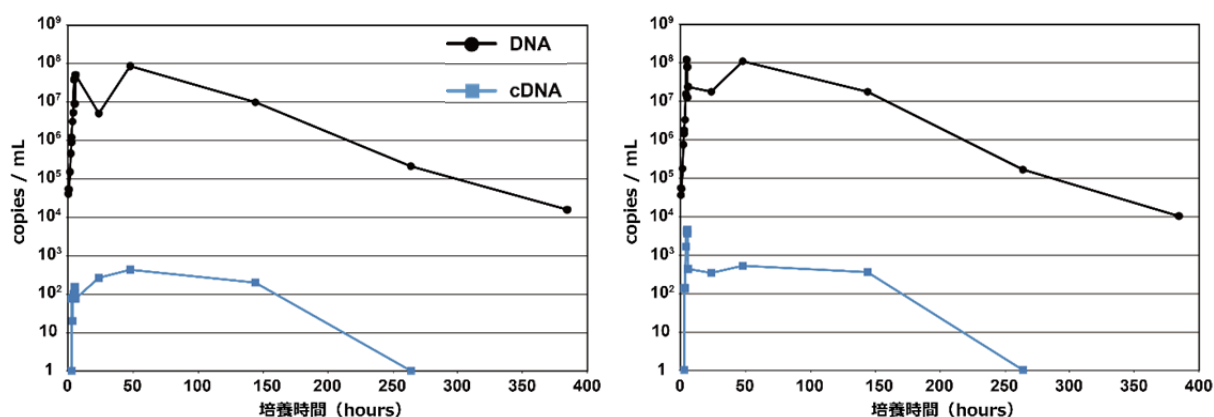
3) 環境中における大腸菌の増殖を評価する系の確立

大腸菌培養開始後6時間までの増殖曲線を図(2)-14に示す。mRNAの発現は、*ftsZ*および*tnaA*共に対数増殖期に入ってから検出され、どちらもゲノムDNAに対して 10^4 程度低い検出量であった。*ftsZ*遺伝子については、対数増殖期後期にmRNAの発現量が横ばいとなっている点が、一般機能遺伝子の*tnaA*と異なる傾向として確認された。



図(2)-14. 大腸菌培養開始後6時間までの増殖曲線 (左：*ftsZ*、右：*tnaA*)

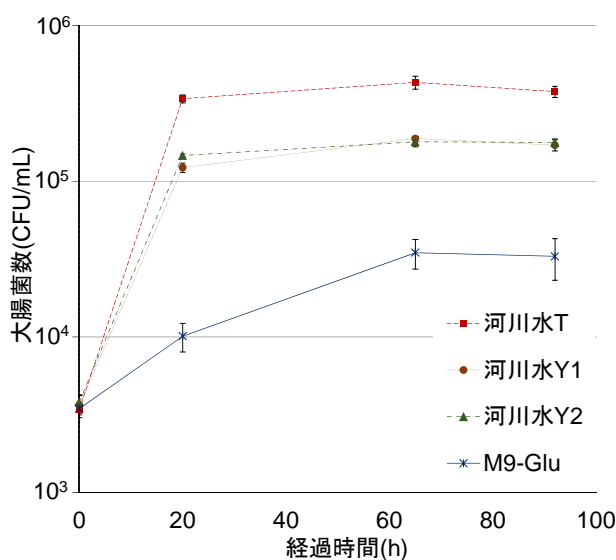
対数増殖期後、16日後までの生残曲線を図(2)-15に示す。*ftsZ*および*tnaA*共に、増殖が停止した後もmRNAが検出され、その濃度はゲノムDNAの 10^4 - 10^5 低い値を示した。本研究における培養実験条件においては、分裂関連遺伝子と一般機能遺伝子の生残には大きく異なる挙動は認められなかった。



図(2)-15. 大腸菌培養開始後16日までの生残曲線 (左: *ftsZ*、右: *tnaA*)

4) 環境水中溶存有機物による大腸菌の増殖可能性の評価と増殖基質の探索

各河川水及び対照試料に大腸菌を植種して培養を行い、大腸菌数の経時変化を測定した結果を図(2)-16に示す。図中のプロットは各河川水及び対照試料で行った3連の培養実験の平均値を、エラーバーは3連の標準誤差を表している。図(2)-16を見て分かる通り河川水T、Y1、Y2のいずれの河川水においても、対照試料であるM9-Gluよりも大腸菌数が増加していることが分かる。各サンプルにおける大腸菌数の増加量を見てみると、河川水Tにおいては3連の平均でおよそ 4.3×10^5 CFU/mL、河川水Y1及びY2においてはおよそ 1.8×10^5 CFU/mL増加している。この増加量は、対照試料における大腸菌数の増加量 3.4×10^4 CFU/mLと比較して有意に大きいことが確認できる。本実験の対照試料であるM9-Glu中には、大腸菌が増殖するために必要な成分が有機物以外すべて含まれている。この対照試料と比較して有意に大腸菌数が増加していることから、大腸菌が河川水中の溶存有機物を利用して増殖をしていることが分かる。なお、有機物を含んでいないM9-Glu中で大腸菌が少量ではあるが増殖している理由は定かではないが、大腸菌が体内に蓄積していた有機物を利用して増殖していたなどの理由が考えられる。



図(2)-16. 大腸菌数の経時変化

表(2)-11に、河川水Tの低級カルボン酸濃度の測定結果を示す。表中の値はそれぞれ、(3連の平均値 ± 標準誤差)を表している。河川水Tでは、酢酸及びギ酸は大腸菌の増殖により濃度に有意な変化は見られなかったが、シュウ酸は大腸菌の増殖に伴い減少している。大腸菌はシュウ酸をギ酸と二酸化炭素に分解し、さらにギ酸を二酸化炭素と水素に分解する酵素をもっている。また、これらの酵素は好気条件下で活動することができるため、本培養実験中においてもこの分解反応が進行する可能性がある。したがって、本培養実験において、河川水T中においては、大腸菌がシュウ酸を増殖基質として用いている可能性が示唆される。

シュウ酸以外のカルボン酸についてはほとんど変化が見られず、また、河川水Y1及びY2においては酢酸、ギ酸、シュウ酸のいずれも変化が見られなかった。これらのことから、シュウ酸は大腸菌の増殖に必須の有機物ではないこと、低級カルボン酸のほかに増殖基質として用いられている有機物が存在することが示された。

表(2)-11. 河川水Tにおける低級カルボン酸濃度(μgC/L)

		酢酸	ギ酸	シュウ酸
培養前	(n=1)	224	12.0	9.2
大腸菌 増殖なし	(n=3)	224 ± 4	12.1 ± 0.5	7.9 ± 4.3
大腸菌 増殖御	(n=3)	229 ± 1	12.6 ± 0.1	1.1 ± 1.1

河川水T、Y1、Y2について、Orbitrap型質量分析計によりフローインジェクション分析を行い、分析により得られたマススペクトルを、Sieve2.2を用いて比較し、各河川水中の溶存有機物のピークを検出した。

まず、得られたピークからバックグラウンドノイズを除くために、ピークの積分強度が一定以下のものを解析対象から除外した。さらに、モバイルフェイズであるメタノール中で積分強度の大きいピークを、試料由来の有機物ではないと判断し、除外した。

大腸菌が増殖した河川水と、大腸菌を植種していない河川水とで比較したときに、前者の方が小さくなっているピークを抽出した。抽出の際には、3連の培養実験での結果の平均値をt検定することにより有意な差があるかどうかを確かめた。さらに、大腸菌培養実験前の試料と比較して積分強度が小さくなっているものを抽出した。

上記の抽出作業により、大腸菌の増殖に伴い減少した有機物について、精密質量数から分子式を推定した。分子式の推定の際には、C、H、O、N、P、S、Clのみを使用した、実在しうる分子式のみを対象とした。これらの作業により、各河川水について250~300種類程度の有機物が、大腸菌の増殖に伴い減少したことが示された。

3種類の河川水すべてにおいて減少したピークは33種類しか抽出されず、また、減少率も平均で0.9程度であり、大腸菌は特定の有機物を絶対の増殖基質として利用しているのではなく、異なる環境水中においては異なる有機物を利用している可能性が示された。

また、各河川水において特に減少率が大きかったピークを表(2)-12に示す。これらの有機物の

多くは他の河川水中においては検出されず、各河川水特有のものであると考えられる。大腸菌は、それぞれの環境水中において、増殖基質として利用しやすい有機物を選択的に利用している可能性が示された。

表(2)-12に示したピークの推定分子式は、構成元素や不飽和度などが様々な有機物が存在する。したがって、大腸菌はこのような多種多様な有機物を増殖基質として利用可能であることがうかがえる。

表(2)-12. 特に減少率の大きかった有機物

河川水	m/z 測定値	推定分子式	減少率
Y2	194.0431	$C_5H_5N_7O_2$	0.65
Y2	204.0355	$C_9H_{13}Cl_2N$	0.64
Y2	210.9997	$C_7H_4N_2O_6$	0.65
Y1	229.0257	$C_{11}H_6N_2O_4$	0.28
Y1	246.0154	$C_{10}H_5N_3O_5$	0.59
Y1	252.0587	$C_{16}H_{12}ClN$	0.50
T	258.0359	$C_{11}H_{14}ClNO_2S$	0.61
T	259.0338	$C_{16}H_8N_2S$	0.59
Y1	261.0421	$C_8H_{12}N_3O_5S$	0.60
Y1	263.1143	$C_{12}H_{24}O_2S_2$	0.32
Y1	265.1479	$C_{12}H_{26}O_4S$	0.32
Y2	274.1390	$C_{17}H_{23}OS$	0.69
T	319.0863	$C_{14}H_{24}O_2S_3$	0.68
Y1	321.0624	$C_{16}H_{18}O_3S_2$	0.53
Y1	331.0657	$C_{18}H_{12}N_4OS$	0.66
Y1	344.1227	$C_{21}H_{19}N_3S$	0.65
Y1	345.0995	$C_{19}H_{14}N_4O_3$	0.54

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

降雨後の東京湾調査で検出したいずれのウイルスについても、中層、低層における濃度が表層に比べて大きくなる傾向が見られた。一方で、大腸菌濃度は表層における濃度が高い状態から、中層における濃度が高い状態、低層における濃度が高い状態への移行が見られた。ウイルス汚染の空間的な特性は降雨分布や汚濁流出源に影響されると考えられるため、今後は流出解析や3次元流動解析を用いて結果の解釈を行うのが望ましい。また、水環境中におけるノロウイルスGIIの濃度をさまざまな糞便汚染指標を用いた回帰モデルにより予測することを試みた最近の研究により、予測の精度は大腸菌や腸球菌といった従来の指標細菌に加え、ポリオーマウイルス等の新たに提案されている指標を加えることにより向上すると報告されている。本研究で扱ったアイチウイルスやPMMoVはノロウイルスと同様に一本鎖RNAを有するノンエンベロープウイルスであることから、その指標性について、さらなる検討がなされるべきであると考えられる。

ヒト糞便由来のウイルスを長期的に蓄積していると考えられるカキに着目した調査においては、環境水中に存在するウイルス遺伝子型との異同を検討した。カキ試料には、水試料では見られない固有の配列が複数確認されたことから、水試料中に検出されていないウイルスを補足する試料として期待できる。本研究では病原性の無いPMMoVを対象に検討を行ったが、今後、季節変動のあるノロウイルス等に応用し、年間汚染状況を把握する手法として利用することができると考えられる。

大腸菌の分裂関連遺伝子に着目し、その発現を検出、定量する手法については、新たな系を確立することができた。今後、培養実験によって他の一般機能遺伝子と挙動の異なる点を探索することで、環境中における大腸菌の増殖活性を解析するツールとして活用することができると考えられる。

環境中における大腸菌の増殖について、大腸菌は、暗所かつ30度という限られた条件においては、滅菌された環境水中で増殖可能であることが確かめられた。大腸菌を指標細菌として利用する際には、大腸菌が環境水中で増殖しようということに注意してリスク管理をする必要がある。また、環境水中での大腸菌の増殖に伴い減少する有機物を検出することができた。大腸菌は異なる環境水中では異なる溶存有機物を増殖基質として利用できる可能性が示された。また、大腸菌は多種多様な有機物を増殖基質として利用可能であることが示唆された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

<行政が活用することが見込まれる成果>

PMMoV濃度と大腸菌濃度の経時的な傾向を比較すると、PMMoVの残留期間が大腸菌よりも長い。これは、降雨後のウイルス汚染が細菌汚染よりも長く持続することを示唆している。我が国においては、水浴場の微生物学的水質基準は糞便性大腸菌群数により規制されているが、本研究の結果はこうした基準だけではウイルス由来の感染リスク管理には不十分であることを示していると考えられる。PMMoVやアイチウイルスは環境水中における濃度が他のウイルスに比べて高く、検出が比較的容易であるため、ウイルス指標となることが期待されている。本研究ではPMMoVの陽性率および濃度が他のウイルスよりも高く、アイチウイルスの陽性率はNoV GI、GIIと同程度であった。さらに、PMMoV濃度には下降傾向が見られなかったことから、水環境中で安定的であり、安全側の指標として機能すると考えられる。

ゲノムがRNAで構成される腸管系ウイルスは進化速度が速いため、粒子表面のタンパクが変化すると、過去にヒトが獲得した免疫は役に立たず、大きな流行に発展しやすい。それ故、リスク管理の観点からは、環境水中に存在する濃度情報の他に、遺伝子型の一覧を保有することが望ましい。本研究で検討した、カキ中腸腺に蓄積したウイルスの解析手法は、環境中に排出されたウイルスの遺伝子型を広く把握する手法として、応用できる可能性を持つものである。

また、新しい衛生指標として期待される大腸菌は、環境中で増殖するとすれば、汚染の過大評価に直結する環境政策上重要な問題である。本研究によって確立した分裂関連遺伝子の定量手法は、今後、培養実験によってその挙動に関するデータを蓄積することで、環境中における増殖活性を調査する手法として実用できる可能性がある。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

<査読付論文に準ずる成果発表>

1) T. AASAMI, K. INOUE, H. KATAYAMA, T. SHIBATA and H. FURUMAI: Full paper for The 6th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, submitted (2015)

“Field Investigation of Wet-weather Viral Pollution in Coastal Area of Tokyo Bay”

<その他誌上発表(査読なし)>

1) 片山浩之、安井宣仁、猪又明子、田中宏明、岸田直裕、原本英司、渡部徹、真砂佳史、浅田安廣、端昭彦、佐野大輔、井原賢、稲葉愛美：水環境学会誌、37、12、424-433 (2014)

「水中の健康関連微生物に関する研究動向」

(2) 口頭発表(学会等)

1) 浅見達也・柴田智世・片山浩之・古米弘明：第51回環境工学研究フォーラム (2014)

「親水活動による感染リスク評価に向けた東京湾沿岸域の降雨後ウイルス汚染実態調査」

2) T. ASAMI, K. INOUE, H. KATAYAMA, T. SHIBATA and H. FURUMAI: The 6th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition (2015)

“Field Investigation of Wet-weather Viral Pollution in Coastal Area of Tokyo Bay”

3) H. KATAYAMA: 2nd International Forum on Asian Water Environment and Technology (2015)

“Virus Detection and Monitoring in Coastal Seawater”

4) H. KATAYAMA: Special seminar at Universitas Padjadjaran (2015)

“Virus Detection and Monitoring in Environment”

5) H. KATAYAMA: International Forum on Sustainable Future in Asia 1st NIES International Forum (2016)

“Health risk monitoring and management for sustainable urban environment”

6) 片山浩之：東京湾再生推進会議陸域対策分科会 (2016)

「東京湾の微生物学的安全性」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

京都大学G報告書に記載

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

<学会等におけるポスター発表>

1) 井上健太郎、浅見達也、柴田智世、片山浩之、古米弘明：水中の健康関連微生物研究委員会シンポジウム（2015）

「東京湾奥部における降雨後ウイルス汚染の実態調査」

2) 井上健太郎、片山浩之、古米弘明：第50回日本水環境学会年会（2016）

「二枚貝および底泥の腸管系ウイルス蓄積状況に基づいたヒト糞便由来の汚染履歴評価」

8. 引用文献

- 1) Andersen et al. 2013 J Water Health 11: 636-646
- 2) Sartorius et al. 2007 Scand J Infect Dis 39: 323-331
- 3) Letschert et al. 2002 J Virological Methods 106: 1-10
- 4) Fraile et al. 2011 Mol Biol Evol 28: 1425-1437
- 5) Tamura et al. 2013 Mol Biol Evol 30: 2725-2729

(3) 病原微生物の動態に与える環境因子の影響の評価

東北大学未来科学技術共同研究センター	大村達夫
東北大学未来科学技術共同研究センター	真砂佳史
東北大学未来科学技術共同研究センター	稲葉愛美
東北大学未来科学技術共同研究センター	風間しのぶ
東北大学未来科学技術共同研究センター	今田義光
東北大学未来科学技術共同研究センター	三浦尚之
東北大学大学院工学研究科	久保田健吾
<その他の研究協力機関等>	
北海道大学大学院工学研究院	佐野大輔

平成26～27年度累計予算額：35,998千円（うち平成27年度：17,538千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

東日本大震災で被災した仙台市南蒲生浄化センターおよび処理水の放流先海域において、H26年9月～H28年1月の期間に7回、指標微生物および病原微生物の分布調査を行った結果、指標細菌、ファージ、ウイルスが沖10 kmにおいても検出されることがあり、海洋において幅広く分布していることが明らかになった。また、同じ試料において難分解性医薬品に着目し、海域における移流・拡散を評価する指標として選定を行った。一次元円筒座標移流拡散方程式に基づいた解析結果から適正な移流・拡散指標としてCrotamitonが選定された。さらに難分解性医薬品の濃度減衰と微生物の濃度減衰を比較することで、移流・拡散以外による微生物の不活化を評価した。その結果、放流先海域での移流・拡散を示す適正な指標としてCrotamitonの有効性が確認された。また、Crotamitonと微生物濃度の比較により細菌・ファージの移流・拡散以外の不活化による減衰が生じていることが示唆された。一方で、ウイルス濃度の減衰は移流・拡散のみにより生じていることが示唆されたが、ウイルスは遺伝子を定量し感染価を測定していないことから、ウイルスの不活化を考える場合には今後の検討が必要であった。そこで、水環境における微生物の不活化に影響する環境因子のひとつである太陽光による不活化をLEDソーラーシミュレーター（擬似太陽光）の照射により測定した。擬似太陽光照射による不活化は、細菌>>ファージ>ウイルスで生じており、細菌指標はウイルスの感染性の評価には適していないことが示唆された。また、ファージがウイルスに対する指標候補として挙げられているが、擬似太陽光によるファージとウイルスの不活化には差があった。また、下水処理場試料には塩分耐性を有する大腸菌が高濃度に存在していることが確認されたが、海域においては検出されなかった。

[キーワード]

指標細菌、病原ウイルス、難分解性医薬品、太陽光、塩分耐性

1. はじめに

近年、水質基準の改定が進められており、目的とした水利用に合わせた基準値や適正な指標の選定が重要な課題となっている。適正な指標や基準値を定めるためには、水環境における指標微生物や病原微生物の濃度変化や消長を現地調査により測定し、かつ、室内実験により、微生物の活性に影響を与えるさまざまな環境因子について評価する必要がある。現地調査および実内実験により得られたデータを蓄積し統合することで、病原微生物の環境水中の挙動解明を目指すとともに、指標微生物や指標化学物質による衛生学的水質管理に必要な知見を得る必要がある。

そこで、本サブテーマでは、実環境における調査として東日本大震災で被災し復旧段階にある仙台市南蒲生浄化センターおよび処理水放流先海域を対象に、指標微生物、病原微生物、各水質項目の現地調査を行った。

また、放流先海域における微生物濃度の減少には、太陽光、生物活性などの環境要因による不活化によるものと、海流、潮汐などによる移流・拡散による減少がある。指標微生物の有効性や病原微生物の感染リスクや汚染レベルは、指標微生物と病原微生物の室内実験による不活化効果の影響や下水到達率などと比較し評価する事が重要である。したがって、微生物の不活化と移流・拡散による減少を分けて濃度減衰を評価する必要があると考える。そこでパーソナルケア製品のうち、特に難分解性医薬品に着目し、適正な移流・拡散指標の選定と評価を行い、さらに、選定した医薬品と微生物の濃度減衰を比較し、微生物の不活化による減衰の評価を行った。

また、環境要因が微生物の活性に与える影響の評価として以下の室内実験を行った。水環境における微生物の不活化に影響する環境要因のひとつに太陽光が挙げられている。これまでに、UV照射による細菌やファージなどの不活化・消毒効果などが検討されてきたが、太陽光による不活化を測定した研究は少なく、ウイルスについては皆無である。そこで、LEDソーラーシミュレーター（擬似太陽光）を用い、細菌2種、ファージ2種、腸管系ウイルス2種に対する不活化を評価した。さらに、H24～H25年度の環境研究総合研究費で得られたデータによれば、海域においても大腸菌が幅広く分布していることが明らかになったことから、大腸菌は塩分に対する耐性を有している可能性がある。そこで、塩分耐性を有する大腸菌の存在・分布を明らかにした。

2. 研究開発目的

（1）被災下水処理場および下水処理場放流先海域における病原微生物および指標微生物の消長に関する現地調査

東日本大震災に伴う津波により被災し復旧段階にある仙台市南蒲生浄化センターの処理場内および放流先海域において定期的に水試料を採取し、各種水質項目の分析を行った。復旧段階にある浄化センターおよび放流先海域の試料から得られた測定結果より、処理段階および放流先海域における指標微生物および病原微生物の濃度変化から、微生物の消長について実測に基づいた調査を行った。現在衛生学的水質基準の見直しが進められていることを鑑み、現行の水質指標である大腸菌群をはじめ、糞便汚染指標として提案されている水質指標（細菌、ファージ）および病原ウイルスを含むヒトウイルスを測定した。また、目的（2）の医薬品およびパーソナルケア製品（Pharmaceutical and Personal Care Products; PPCPs）の特に難分解性医薬品に着目した放流先水域における適正な移流・拡散指標の選定のために採取試料中のPPCPsの測定も行った。

(2) 難分解性医薬品を用いた海域における指標微生物の移流・拡散と不活化の評価

下水処理水放流先海域における指標微生物および病原微生物の減衰・不活化はさまざまな環境要因の複合影響により生じている。放流先海域における濃度の減衰は、海流・潮汐・攪拌などによる単純な移流・拡散によって生じる。一方で不活化は、日光やSS、塩分濃度などの環境要因によって影響を受ける。指標・病原微生物の不活化を正確に評価するためには、移流・拡散と分けた濃度の減衰を評価する必要がある。そこで、下水処理場放流水に含まれる人為由来の難分解性医薬品に着目し、放流先海域での移流・拡散を示す適正な医薬品の選定と有効性の評価を行った。また、選定したPPCPsと指標微生物の濃度を比較し、移流・拡散以外の微生物の不活化を評価した。

(3) 擬似太陽光照射による微生物不活化の評価

現在、衛生学的水質基準の見直しが進められ、大腸菌群より指標性が高いと考えられている大腸菌や腸球菌が提案されている。指標性の高い指標微生物を選定するためには、環境要因による不活化の影響を把握する必要がある。環境中における微生物の不活化に影響する要因として温度・塩分・太陽光などが知られている。そのうち、太陽光による微生物の不活化に関する知見は乏しい。そこで、現在指標として用いられている大腸菌群、新たな指標候補である大腸菌および腸球菌、ウイルスの代替指標である体表面吸着ファージ (S-phage) T4、F特異的RNAファージ (F-phage) Q β 、さらに、代表的な腸管系ウイルスでありウイルス指標として着目されているポリオウイルス、アイチウイルスに対して、LEDソーラーシミュレーターを用いた擬似太陽光照射による不活化を評価した。

(4) 放流先海域において検出される大腸菌の塩分耐性の評価

大腸菌は、さまざまな水環境において糞便汚染の指標細菌として国際的に使われている。しかし、H24～25年度の環境研究総合推進費の海域における調査で、大腸菌は、濃度の減衰は見られるものの一定の濃度で検出されることが確認された。このことから、海域においても大腸菌が広範囲に分布している可能性が考えられ、塩分耐性を有していることが示唆された。すなわち、大腸菌は海域では塩分耐性により長期間生存し、沿岸域に広く定常的に分布していることになる。既存の研究においてこのような知見はなく、検出される大腸菌の性状を解析する必要がある。海水と同程度の塩分を添加した特定酵素基質培地を用いたメンブレンフィルター法により検出される大腸菌の測定・単離を行い、その性状を比較・検討した。

3. 研究開発方法

(1) 被災下水処理場および下水処理場放流先海域における病原微生物および指標微生物の消長に関する現地調査

2014年9月から2016年1月の期間に被災した仙台市南蒲生浄化センターおよび放流先海域において合計7回の試料採取を行った。試料採取地点を図(3)-1に示す。処理場内では、流入水、初沈後の塩素添加前、塩素添加後の放流水の3地点で採取を行った。放流先海域では、定点観測地点の定点①～④(下水放流口から0.9～2.2 km)、下水放流水の流軸方向に沿った流軸①～⑤(0.1～0.7 km)、沖合の2 km(8～10月・夏期)または5 km(11～2月・冬期)、および10 kmの11地点で表層水の採取を行った。



図(3)-1. 南蒲生浄化センターおよび放流先海域の調査地点

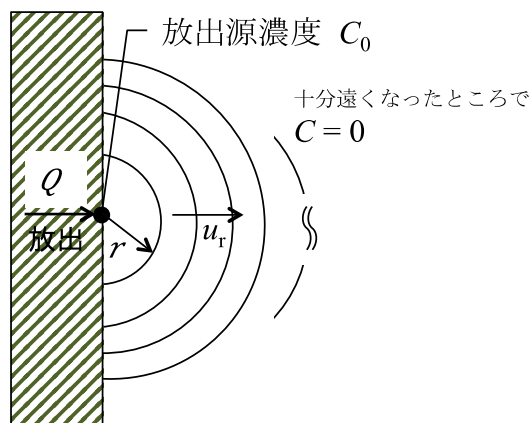
採取試料の測定項目を表(3)-1に示す。基礎水質項目として、水温、透明度、塩分、電気伝導度(EC)、pH、全塩素、遊離塩素、結合塩素、濁度、SS、有機汚濁水質項目としては、BOD、COD、TOC、DOCを測定した。また指標細菌として、大腸菌群、大腸菌、腸球菌を測定した。細菌は、メンブレンフィルター法(Ø47 mm、口径0.45 µm)でフィルター上に捕捉後、特定酵素基質培地(大腸菌群・大腸菌：クロモカルト コリフォーム寒天培地 ES (Merck-Millipore)、腸球菌：M-エンテロコッカス培地 (BD))の上で37 °C24時間、または48時間(腸球菌)培養した。細菌ウイルスであるファージについては、体表面吸着ファージ(S-phage)、F特異的RNAファージ(F-phage)の濃度を培養法で測定した。S-phageの測定には、modified Scholten's培地で培養した*E. coli* WG5を、F-phageはtryptone-yeast extract-glucose培地で培養した*Salmonella typhimurium* WG49を宿主として用いた。海域試料中のファージは低濃度であることが予想されたため、大容量試料の測定が可能であるGrabow and Coubrough(1986)¹⁾の手法を用い、100~1000 mlの試料を測定に供した。病原ウイルスは、陰電荷膜吸着法^{2),3)}によりウイルスを濃縮した試料からアイチウイルス(AiV)、エンテロウイルス(EntV)、ノロウイルスGI(GI NoV)、ノロウイルスGII(GII NoV)、アデノウイルス(AdV)の遺伝子数を定量PCR法で測定した(但し、AdVは沖合地点では測定していない)。また、近年病原ウイルスの指標ウイルスとして注目されているトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)の遺伝子数も定量PCR法で測定した。

表(3)-1. 測定項目

分類	測定項目
基礎水質項目	水温、透明度、塩分、EC、pH、全塩素、遊離塩素、結合塩素、濁度、SS
有機汚濁水質項目	BOD、COD、TOC、DOC
指標細菌（培養法）	大腸菌群、大腸菌、腸球菌
ファージ（培養法）	Somaticファージ（S-phage）、F-ファージ（F-phage）
ウイルス（定量PCR法）	アイチウイルス（AiV）、エンテロウイルス（EntV）、ノロウイルスGI（GI NoV）、ノロウイルスGII（GII NoV）、アデノウイルス（AdV）、トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）
難分解性医薬品	PPCPs、特に難分解性医薬品を多数含む70種

（2）難分解性医薬品を用いた海域における指標微生物の移流・拡散と不活化の評価

PPCPsに着目した移流・拡散を正確に評価する指標を選定した。PPCPsに含まれる難分解性医薬品のうち海域において殆ど分解されないものを選定できれば、海域における移流・拡散指標となりうると考えられた。その難分解性医薬品と動態が類似する指標細菌や病原微生物は海域で増殖ないしは不活化が起こらないことが推察された。



図(3)-2. 移流拡散モデルにおける変数の定義

ここで、 Q = 放流量、 r = 距離、 u_r = 流速とした。

図(3)-2に示したような半無限の海域（水深 H は一定）に下水浄化センターからの放流水（流量 Q ）が放出されたとする。この時、法線方向の流速 u_r は、

$$u_r = \frac{Q}{\pi r H}$$

である。

一次元円筒座標系の移流拡散方程式は、物質の濃度を C 、拡散係数を k として、

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(kr \frac{dc}{dr} \right) - \frac{Q}{\pi r H} \frac{dc}{dr} = 0$$

と表される。ここで、 $k=pr$ とおくと、

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(pr^2 \frac{dc}{dr} \right) - \frac{Q}{\pi r H} \frac{dc}{dr} = 0$$

これを $C=C_0$ のとき $r=0$ 、および $C=0$ のとき $r \rightarrow \infty$ の境界条件の下で解くと、

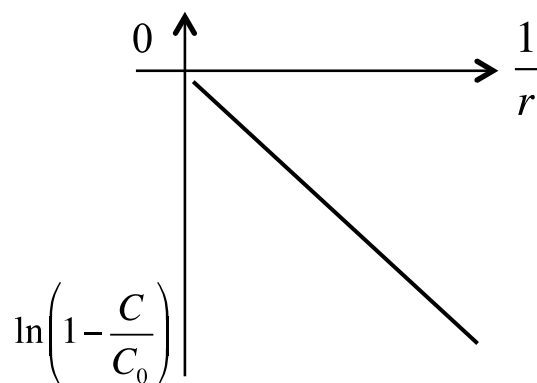
$$C = C_0 \left[1 - \exp \left(-\frac{Q}{\pi H p r} \right) \right]$$

したがって、上式を変形すると、

$$\ln \left(1 - \frac{C}{C_0} \right) = -\frac{Q}{\pi H p} \frac{1}{r}$$

と表された。すなわち、上式において $\frac{Q}{\pi H p}$ は定数なので、 $\ln \left(1 - \frac{C}{C_0} \right)$ は $\frac{1}{r}$ に比例すると考えられた。

すなわち、移流および拡散の効果でのみ濃度が減少する物質は、図(3)-3の直線上に乗り、移流・拡散の指標として利用可能であると考えられた。



図(3)-3. 移流および拡散の効果でのみ濃度が減少する物質の挙動を示す式

そこで、上記の式に C_0 =塩素処理後放流水、 C =海域試料の各PPCPs測定濃度を当てはめ適正な医薬品の選定と有効性の評価を行った。また、選定したPPCPsと指標微生物の濃度を比較し移流・拡散以外の微生物の不活化を評価した。

(3) 擬似太陽光照射による微生物不活化の評価

太陽光による指標微生物および腸管系ウイルスの不活化の評価は、細菌は*E. coli* (NBRC No. 102203)、腸球菌 (*Enterococcus faecalis* (NBRC No. 100480))、細菌ファージは、F-phageに*E. coli* phage Q β (F-phage Q β)、S-phageにEnterobacteria phage T4 (S-phage T4)、腸管系ウイルスはポリオウイルス (PoV) およびAiVを用いた。PBS(-)に懸濁した微生物をタンパク質低吸着性の24 wellプレート (Corning、Cat.No. 3473) に水密状態で添加した。石英ガラスプレートで蓋をした状態で緩やかに攪拌しながらLEDソーラーシミュレーター (WSLED 100SC、ワコム電創) を用いて、350~1100 nmの波長域の可視光を太陽光強度と同等になるように照射した。照射時溶液温度が22.4~27.8℃の条件下で、照射開始後、細菌は0、10、20、30、45分、1.0、1.5、2.0、3.0、6.0、12、18、24、36、48時間、ファージとウイルスは0、6、12、24、48、72、96、192時間の試料を回収し、濃度測定を行った。陰性対象区として、同様に用意した試料をアルミ箔で包み25℃条件下で培養し回収・培養を行った。*E. coli*はクロモカルトコリフォーム寒天培地 ES (Merck-Millipore)、腸球菌はM-エンテロコッカス培地 (BD) を用いた寒天培地法で、S-phage T4とF-phage Q β は、それぞれ*E. coli* WG5と*Salmonella typhimurium* WG49を宿主に用いたプラーク法で、PoVとAiVは、それぞれの感受性細胞であるINT407細胞とBGM細胞を用いたメチルセルロース封入プラーク法で測定した。

(4) 放流先海域において検出される大腸菌の塩分耐性の評価

水環境における塩分耐性を有する大腸菌の存在を確認するために、塩素処理前の初沈後水と沖合2 km、10 kmの試料を対象に、海水と同程度の塩分 (人工海水成分、3.5%) を添加したクロモカルトコリフォーム寒天培地 ES (Merck-Millipore) で培養し測定した。さらに、2015年8月、10月、12月、2016年1月に採取した試料において大腸菌と判定された青色コロニーを単離し、*tnaA*遺伝子の検出を行い、大腸菌か否かの判定を行った。これにより大腸菌の塩分耐性保有状況を調査した。

4. 結果及び考察

(1) 被災下水処理場および下水処理場放流先海域における病原微生物および指標微生物の消長に関する現地調査

1) 基礎水質項目

基礎水質項目については、表(3)-2に調査期間全体を通じた項目ごとの最小値、平均値、そして最大値を示した。ただし、透明度は海域のみ、塩素に関わる項目は放流水の放流前後と海域の流軸方向の採水点5カ所の測定値である。

2) 有機汚濁水質項目

有機汚濁水質項目であるBOD、COD、TOCそしてDOCは同様に表(3)-2に纏められているが、BODについては浄化センター流入水と放流水消毒前後での測定値である。BODは海域では測定されていない。また、H27年2月は有効データが得られなかった。調査期間におけるそれぞれの項目の最大値は流入水の値であり、BODの場合98.00~160.00 mg/Lであった。CODについては流入水と放流水消毒前後では2 mg/Lより高い値を示したが、海域全体ではほぼ2 mg/L以下であり環境基準のA類型を

満していた。このことは浄化センターの復旧期間であっても、有機汚濁に関しては軽微な状況であることを示している。

3) 指標細菌、ファージ、病原ウイルス、トウガラシ微斑ウイルスの動態

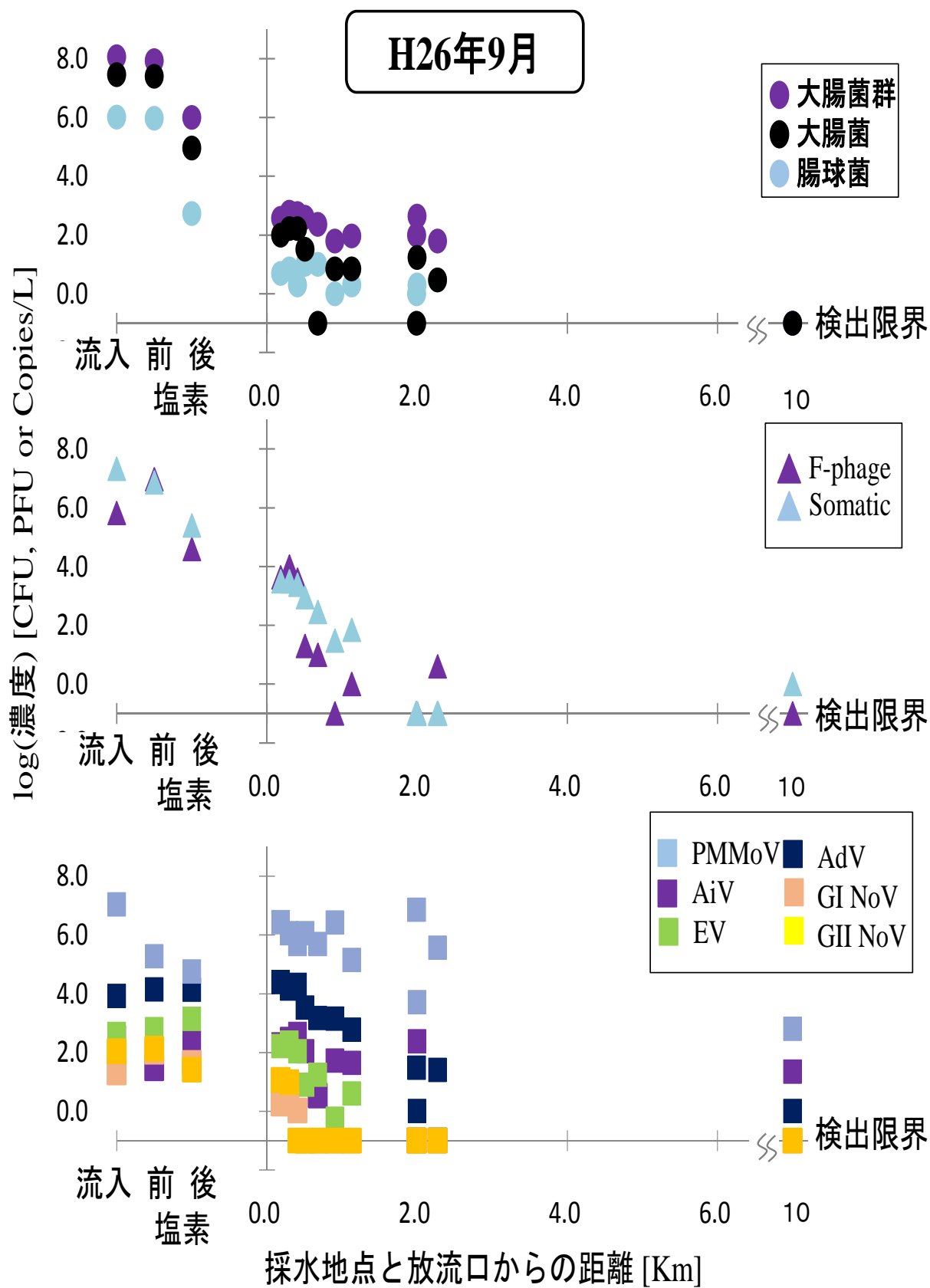
図(3)-4から図(3)-10にH26年9月～H28年1月の7回の試料採取における微生物測定結果をそれぞれ示した。H26年9月、H27年8月、12月、H28年1月の採取試料において指標細菌である大腸菌群、大腸菌そして腸球菌においては消毒効果ははっきりと確認された。一方で、H26年11月、H27年2月、10月の採取試料では1 log以上の消毒効果が確認されなかった。しかし、消毒効果が確認されなかったいずれの採取試料においても、沿岸から最近点に位置する海域の採取地点（流軸①）において、2 log以上の減少が確認され、排水に至るまでに残留塩素の効果で減衰していることが示唆された。S-phageとF-phageでは、最大で3 log程度の減少が確認されたが（H26年9月、F-phage）、他の試料においては0.25～2 log程度の減少であり、指標細菌と比較して消毒効果は低かった。また、腸管系ウイルスでは、最大で2 log程度の減衰が確認されたが、殆どの試料において指標細菌とファージに比べて消毒効果はあまり見られない。また、ノロウイルス（NoV）の場合は検出限界以下の場合も多く見られ、消毒効果は明確ではないが、検出された場合には他の病原ウイルスと同様に消毒効果は殆ど無いと考えられる。植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）は腸管系ウイルスに比べ高濃度で存在していた。また、消毒効果は病原ウイルスと同じく殆ど効果が無かった。

海域における指標細菌、ファージ、腸管系ウイルスおよびPMMoVの濃度は、放流口からの距離に比例して減少した。減少の程度はそれぞれの微生物間で差があり、指標細菌が最も減衰が大きく、次にF-phageであり、S-phage、腸管系ウイルスおよびPMMoVは指標細菌に比べて減衰が小さかった。距離に比例して減少する傾向が確認された一方で、沿岸から最遠方地点の沖10 kmにおいても、細菌、ファージ、ウイルスが存在することが確認された。放流先海域における減衰は物理的な移流拡散によるものだけでなく、水温、塩分、日光などの様々な環境要因による微生物の不活化が原因と考えられる。移流拡散効果はすべての微生物について同じであることから、微生物間の減衰の差は環境要因に対する微生物間の感受性の差違によって生じたものと推察される。したがって、指標細菌は病原ウイルスより海域の環境要因に対して感受性が高いと考えられる。

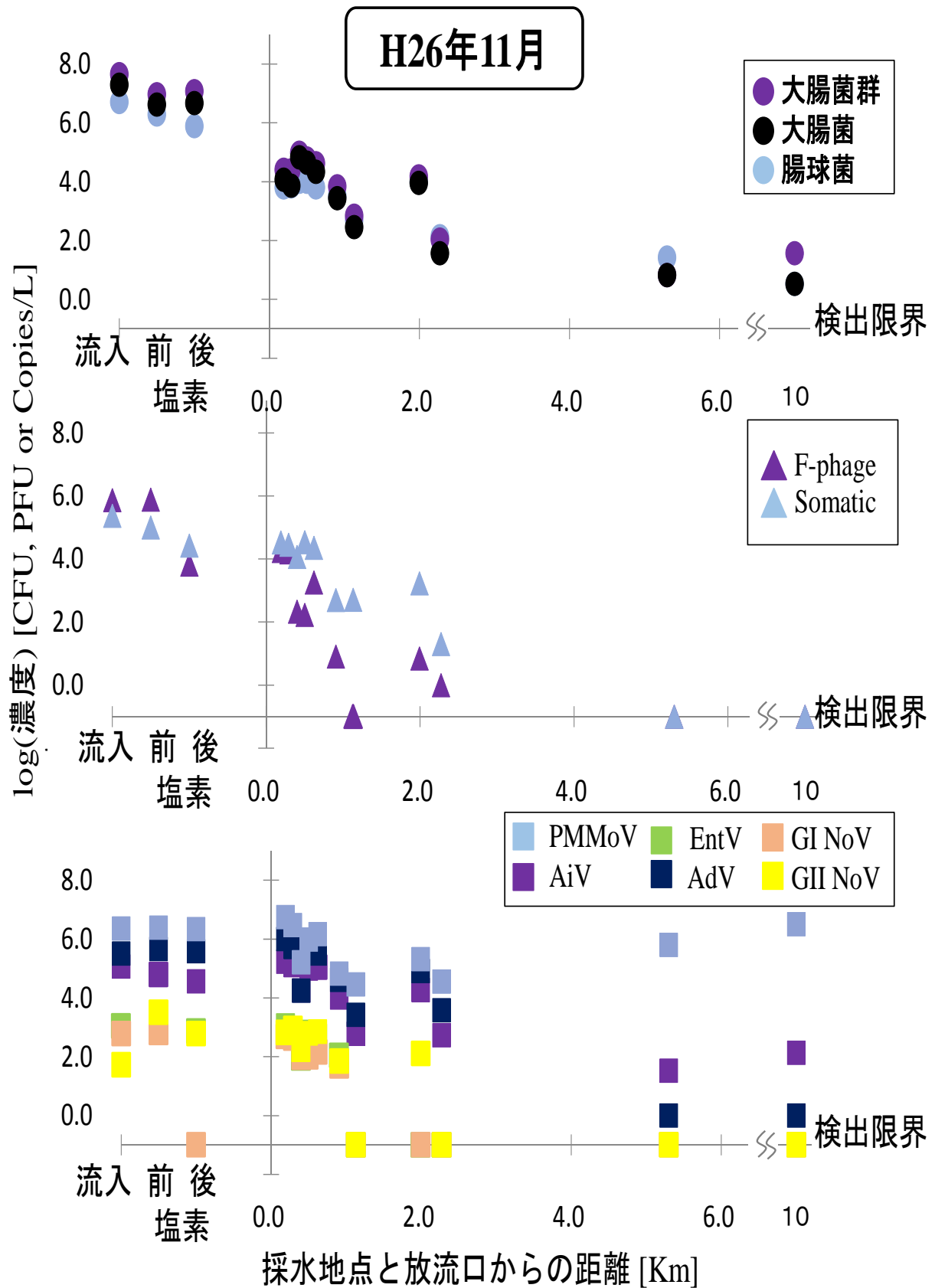
また、沖10 kmにおいても微生物が観測されることから、それぞれの微生物の環境因子に対する耐性について今後検討する必要がある。

表(3)-2. 基礎水質項目および有機汚濁水質項目の測定結果

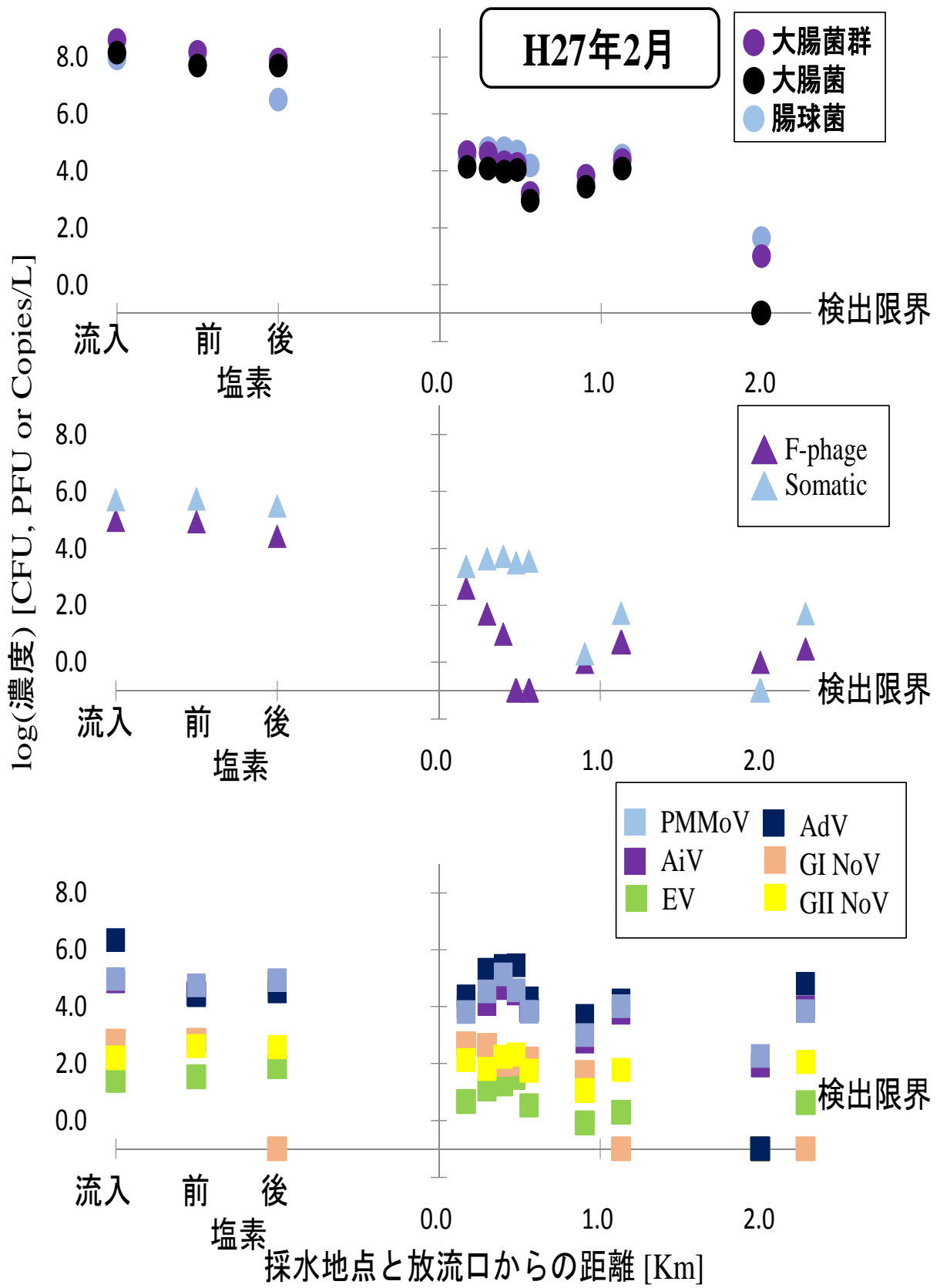
測定項目	水深 (m)	水温 (°C)	透明度 (m)	塩分	EC (mS/m)	pH	全塩素 (mg/L)	遊離塩素 (mg/L)	結合塩素 (mg/L)	濁度 (度)	SS (mg/L)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	TOC (mg/L)	DOC (Mg/L)
H26年9月	最小値	5.40	19.70	1.50	0.30	55.50	6.80	<0.1	<0.1	0.70	1.00	42.00	1.40	1.40	1.35
	平均値	13.29	21.55	3.34	21.49	3318.14	7.80	0.36	0.22	12.59	14.85	73.67	3.92	6.98	5.72
	最大値	18.50	23.90	5.90	29.60	4730.00	8.20	0.94	0.39	84.50	110.00	130.00	8.60	28.10	22.09
H26年11月	最小値	5.40	12.20	3.70	0.30	52.10	7.30	<0.1	<0.1	0.60	1.00	30.00	0.80	2.78	2.20
	平均値	16.05	13.90	4.78	23.01	3689.91	7.96	<0.1	<0.1	9.84	14.23	54.00	2.20	6.42	5.02
	最大値	28.40	18.20	7.50	32.20	5230.00	8.20	0.13	<0.1	82.10	120.00	100.00	5.40	17.52	13.30
H27年2月	最小値	7.60	7.00	2.10	0.30	59.90	7.30	<0.1	<0.1	2.10	3.00	—	0.50	0.88	0.73
	平均値	12.22	9.38	2.63	22.71	3639.92	8.08	<0.1	<0.1	13.31	16.25	—	17.38	8.05	6.53
	最大値	19.00	15.60	3.70	31.80	5080.00	8.30	<0.1	<0.1	76.70	100.00	—	100.00	29.15	22.23
H27年8月	最小値	3.70	24.50	2.50	0.30	54.40	7.00	<0.1	<0.1	0.70	1.00	38.00	1.40	1.40	1.30
	平均値	14.41	26.86	5.65	22.14	3560.19	7.88	0.52	<0.1	15.12	14.00	62.67	2.60	7.34	4.27
	最大値	27.80	28.10	16.00	29.40	4690.00	8.20	2.30	1.34	97.80	100.00	110.00	4.80	27.90	17.90
H27年10月	最小値	8.20	17.90	1.80	27.20	3850.00	8.10	<0.1	<0.1	1.00	1.00	30.00	1.10	0.80	0.70
	平均値	17.72	18.21	3.93	30.25	4732.73	8.14	<0.1	<0.1	17.99	20.08	76.67	1.99	6.65	5.24
	最大値	28.90	18.70	8.20	31.20	4960.00	8.20	0.10	<0.1	157.00	170.00	160.00	3.20	36.40	31.50
H27年12月	最小値	4.80	10.40	2.30	0.30	57.00	7.30	<0.1	<0.1	2.00	1.00	30.00	1.90	1.10	1.00
	平均値	16.15	12.69	3.44	22.25	3545.69	7.97	0.39	0.15	9.10	9.71	64.00	2.83	6.26	4.69
	最大値	28.70	18.20	4.90	31.70	5000.00	8.30	1.55	0.57	115.20	130.00	130.00	4.20	35.20	23.70
H28年1月	最小値	5.70	6.80	2.70	0.30	54.40	6.80	<0.1	<0.1	2.00	1.00	14.00	1.10	0.90	0.80
	平均値	16.21	9.55	3.64	22.33	3661.81	8.07	0.31	0.16	7.58	9.53	39.00	1.82	4.99	3.74
	最大値	28.50	17.00	4.50	31.80	5060.00	8.40	0.89	0.51	68.20	100.00	98.00	2.50	22.30	14.50



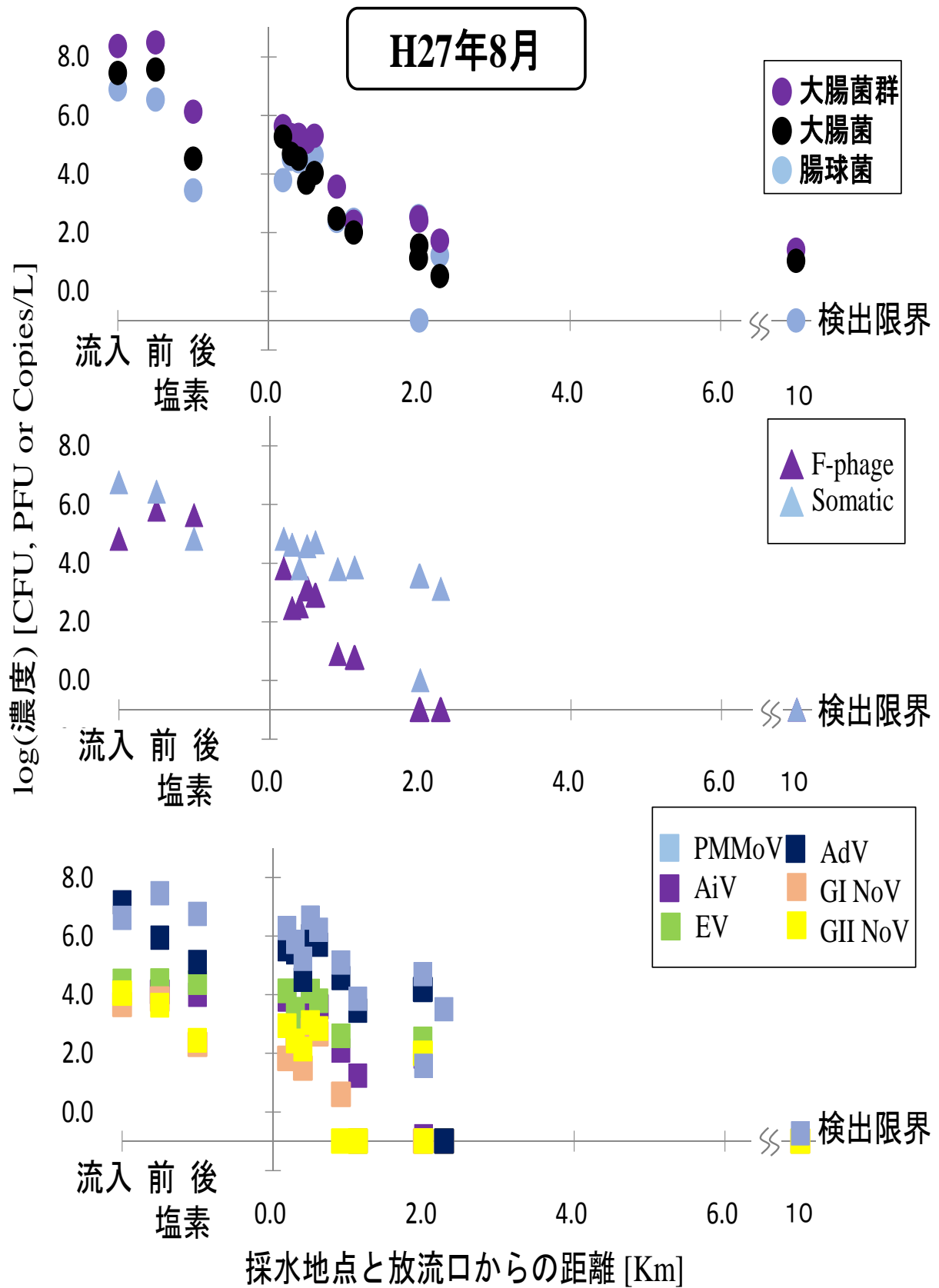
図(3)-4. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H26年9月)



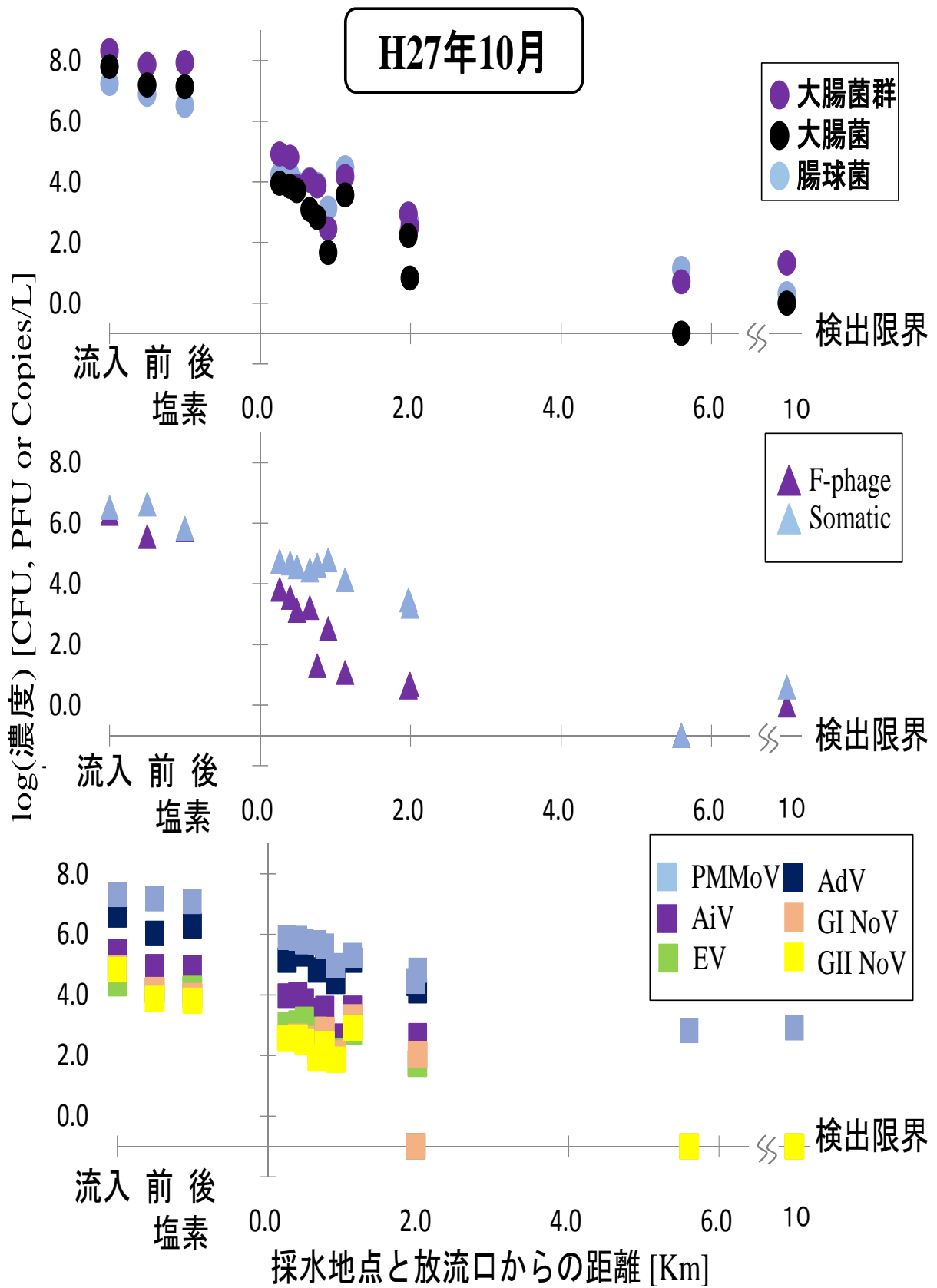
図(3)-5. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H26年11月)



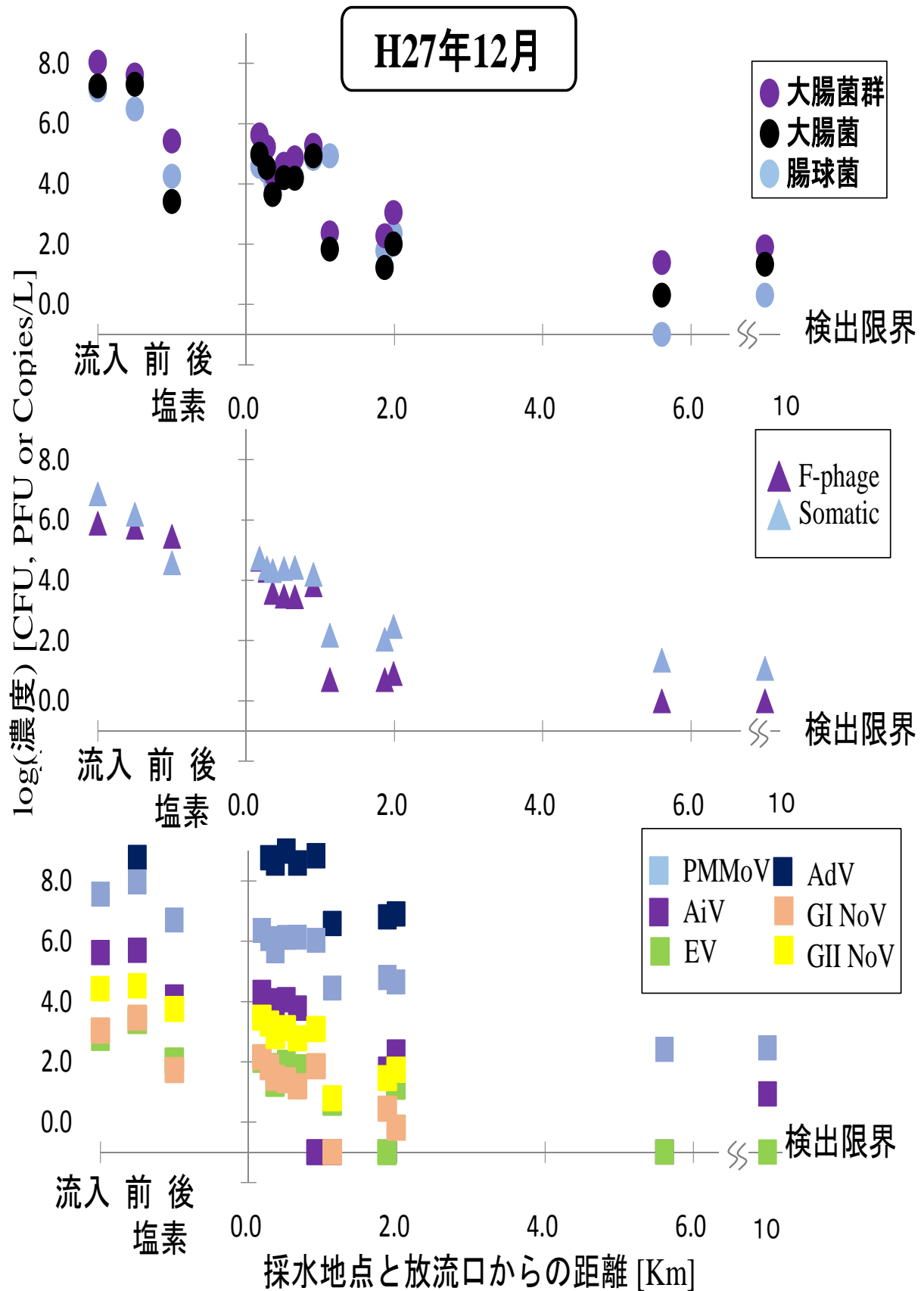
図(3)-6. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H27年2月)



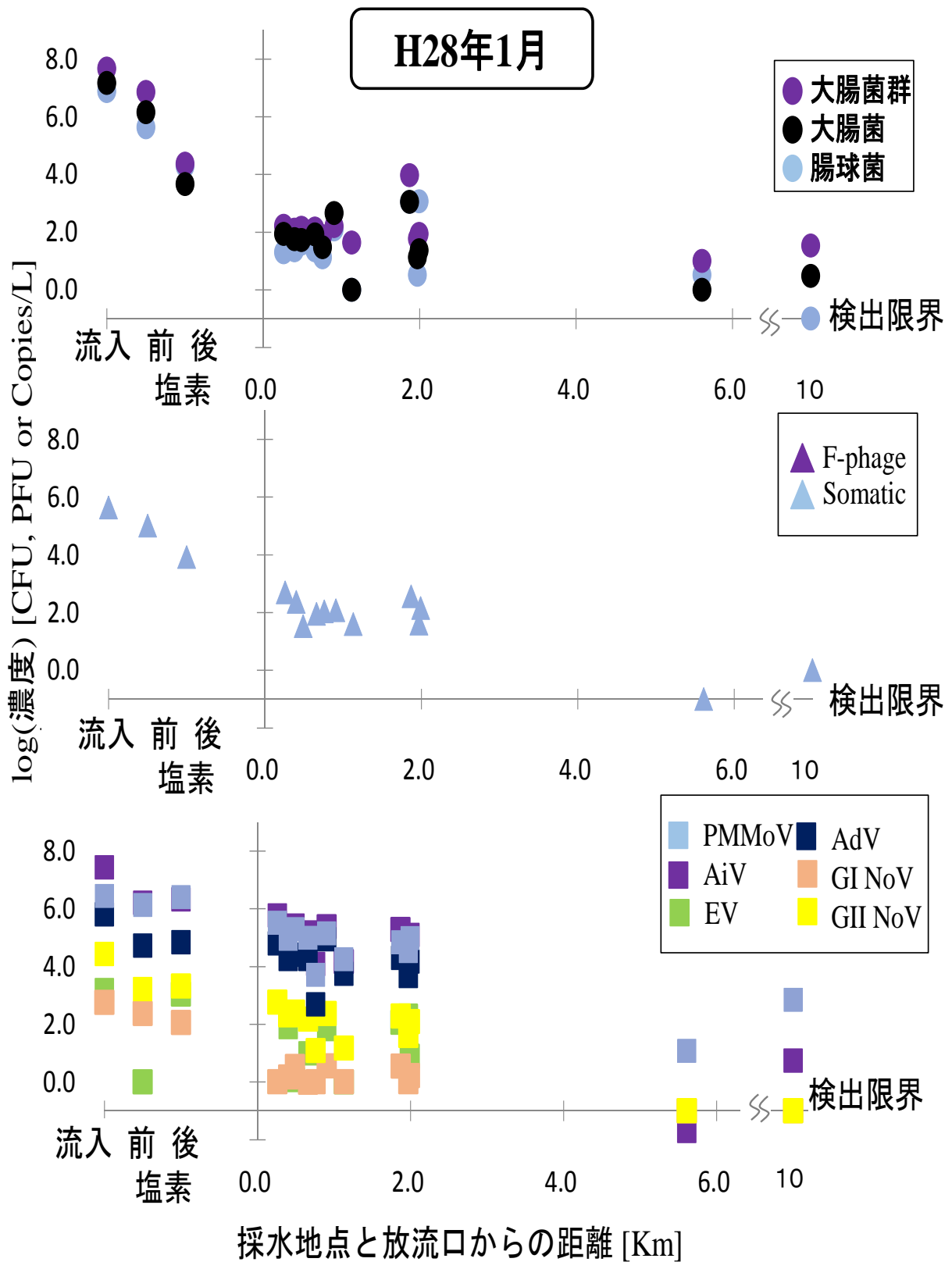
図(3)-7. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H27年8月)



図(3)-8. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H27年10月)



図(3)-9. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H27年12月)



図(3)-10. 放流先海域における、指標細菌、ファージ、ウイルスの減衰 (H28年1月)
 (F-phageは有効データが取れなかった。)

(2) 難分解性医薬品を用いた海域における指標微生物の移流・拡散と不活化の評価

1) 適正な移流・拡散指標の選定

測定した70種の難分解性医薬品のうち、7回のサンプリングで有効データが得られたPPCPsを抽出した。その結果、Acetaminophen (Ace)、Bezafibrate (Bez)、Caffeine (Caf)、Clarithromycin (Cla)、Crotamiton (Cro)、Diltiazem (Dil)、Disopyramide (Dis)、Indometacin (Ind)、Roxithromycin (Rox)、Sulfamethoxazole (Sulf)、Sulpiride (Sulp)、Theophylline (The)の13種が移流・拡散指標の候補として抽出された。これら13種において、距離に対する放流源濃度（放流水または流軸①の濃度）からの各地点の濃度減少を比較した結果、13試料における相関係数（ R ）の幾何平均値および p 値の荷重算術平均値がより小さく（直線性が高い）、医薬品の中で流入下水中により多く含まれるCrotamitonが移流・拡散の評価に有効な指標であることが示唆された（表）3-3）。

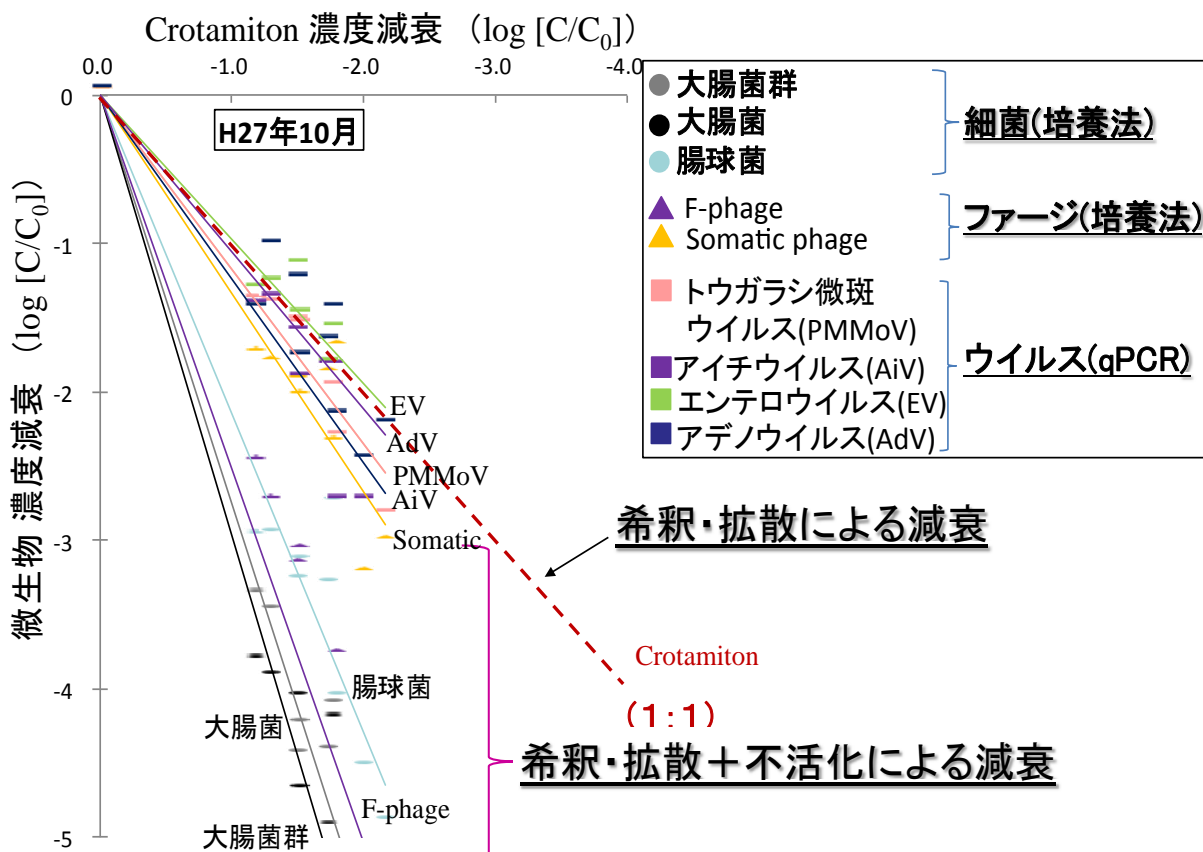
表(3)-3. 拡散指標の候補として測定した難分解性医薬品の放流口からの距離（ r ）および濃度（ C ）をモデル式に当てはめた際の相関係数（ R ）および p 値

	Dil	Dis	Ind	Rox	Sulf	Sulp	The		
p	0.016	0.054	0.016	0.022	0.033	0.017	0.088		
R	-0.83	-0.77	-0.85	-0.81	-0.81	-0.82	-0.68		
	Bez	Caf	Cla	Cro	DEET	Dil	Rox	Sulp	The
p	0.067	0.099	0.065	0.121	0.096	0.158	0.169	0.057	0.176
R	-0.67	-0.62	-0.69	-0.62	-0.60	-0.56	-0.53	-0.70	-0.52

2) Crotamitonから推定した各微生物の海域での動態評価

本項では、Crotamitonを指標として用い、Crotamitonの混入率（ $\log(C/C_0)$ ）と微生物存在率（ $\log(C/C_0)$ ）の比較を行い、移流・拡散以外の微生物の不活化を評価した。以下に移流・拡散指標との比較から評価される微生物の不活化に関する概念について述べる。

図(3)-11にH27年10月の調査結果を基にした海域での各微生物の濃度減衰とCrotamitonの濃度減衰を示した。この図より、Crotamitonの減衰は移流拡散効果のみによることから傾き1の直線で表される。また、この図において傾きが1より大きい指標細菌である大腸菌群、大腸菌および腸球菌とF-phageは明らかに移流拡散だけでなく他の環境要因による不活化が起こっていることを示している。また、S-phageも不活化が起こっていると考えられるが、その程度は指標細菌とF-phageに比べて小さい。一方で、傾きが1、または1より小さい場合は、移流・拡散のみによる減衰を示している。

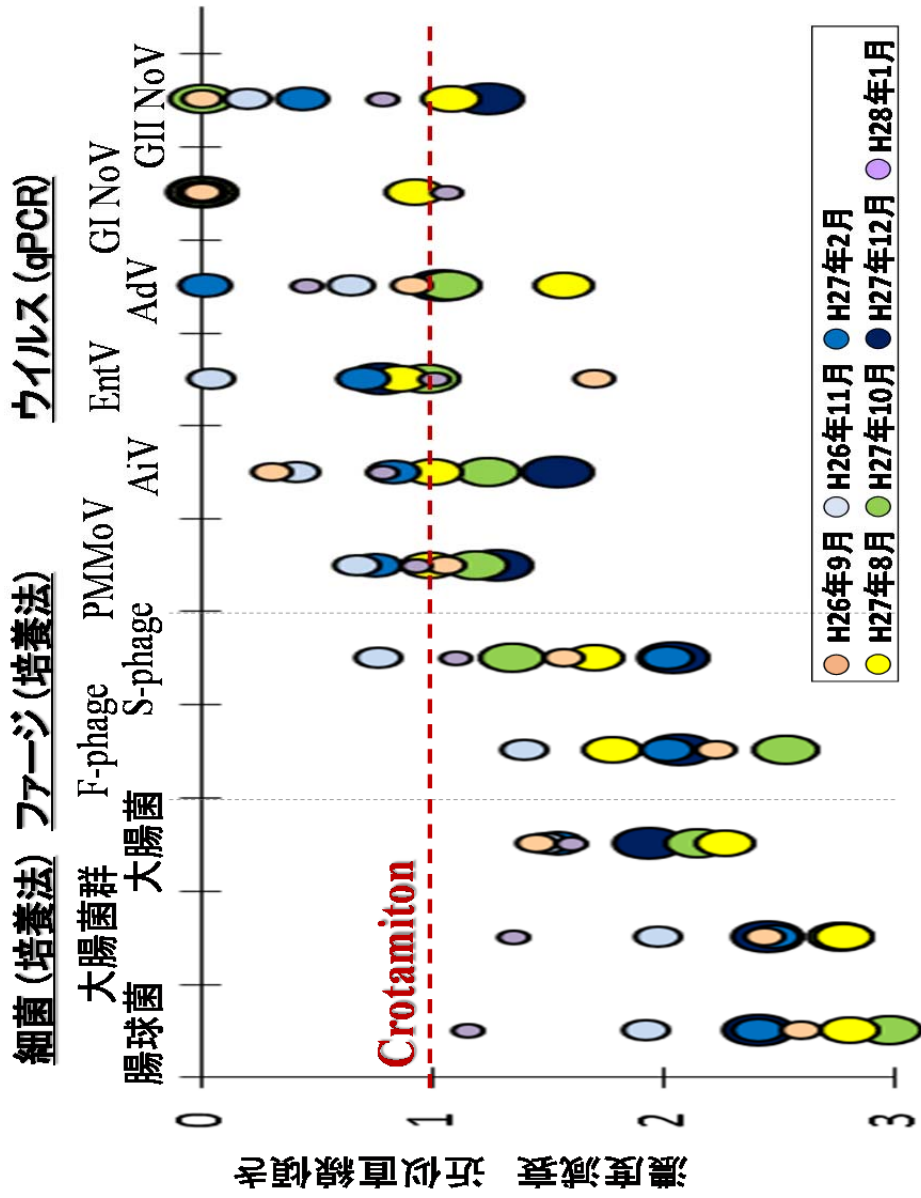


図(3)-11. Crotamitonの濃度減衰に対する微生物の濃度減衰プロット (H27年10月)

病原ウイルスのAiV、EntVそしてAdVと、PMMoVはほぼ傾きがCrotamitonの傾き1に近く、不活化による減衰の程度は低いと考えられる。このことから、これらの微生物は海域の環境要因に対して抵抗力を有していると考えられる。

図(3)-12にCrotamitonと比較した海域での各微生物の減衰直線の傾きを示した。傾きの図より、明らかに指標細菌とファージは海域で不活化が起こっており、不活化の効果は指標細菌の方が大きい。それに比べて病原ウイルスとPMMoVは傾きが1近くに散在しており、海域においてCrotamitonと類似した動態を示している。傾きにはかなりのばらつきもあるが、病原ウイルスは海域などの環境中での増殖は考えられないことから、不活化による減衰は小さいと考えて良いと判断できる。ただし、細菌、ファージは生菌数、感染性を測定しているが、ウイルスは遺伝子を定量し感染価を測定していないことから、ウイルスの不活化を考える場合には今後の検討が必要である。

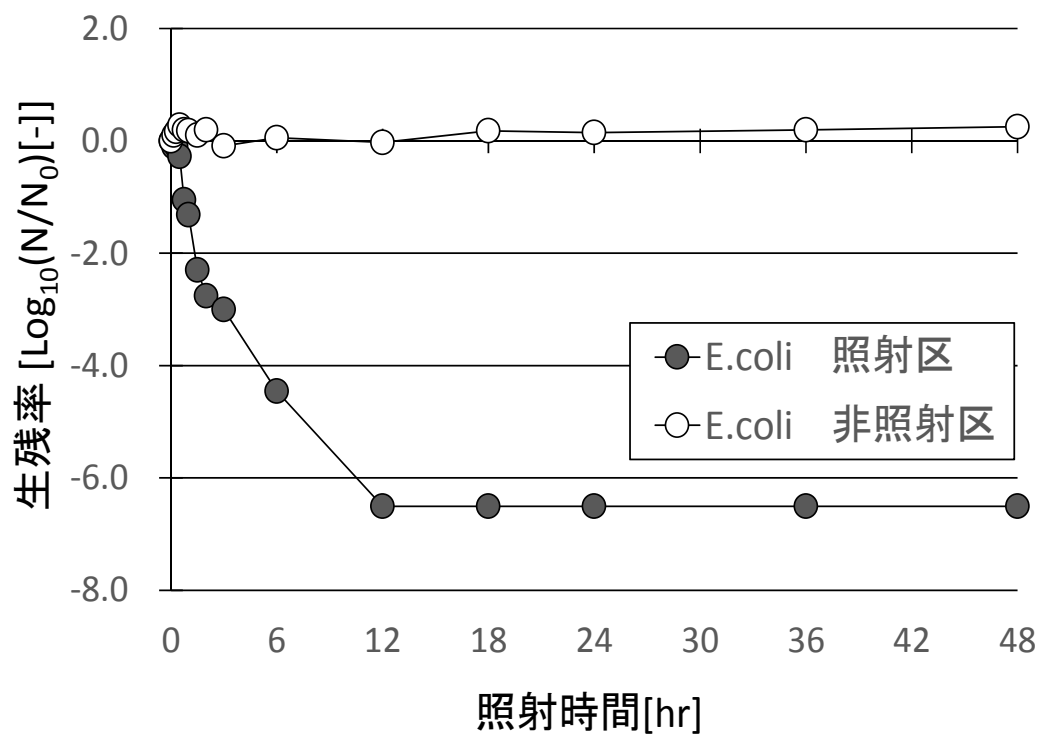
以上のことから、放流先海域での移流・拡散を示す適正な指標としてCrotamitonが有効性であることが確認された。また、移流・拡散指標と微生物濃度の比較により細菌・ファージの移流・拡散以外の不活化による減衰が生じていることが示唆された。



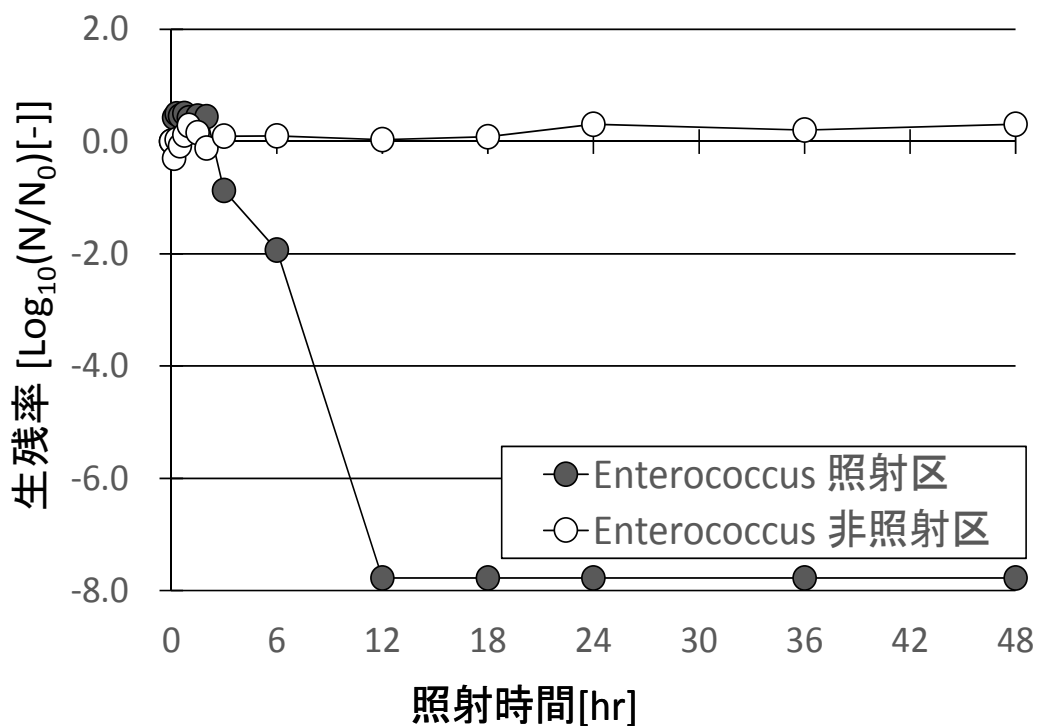
図(3)-12. Crotamitonと比較した指標細菌、ファージ、ウイルスの濃度減衰近似曲線の傾き

(3) 擬似太陽光照射による微生物不活化の評価

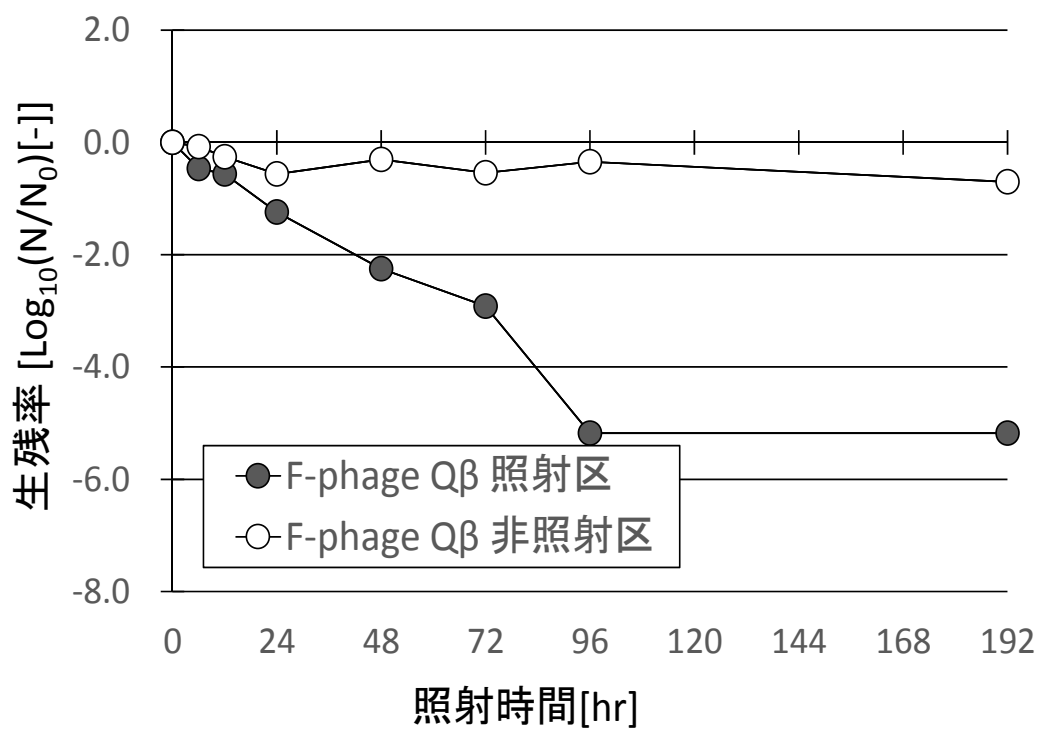
擬似太陽光照射によるPBS(-)中における各微生物生残率を図(3)-13～(3)-18に示す。大腸菌は照射開始45分後において約1 logの減少が確認され、以降、減少し続け12時間後に添加した大腸菌が検出限界以下となった(約6.5 logの減少)。腸球菌は照射開始3hrで約1 logの減少が確認され、6時間で約2 log、12時間後には添加した腸球菌が検出限界以下となった(約7.7 logの減少)。大腸菌、腸球菌は12時間後以降において全てで検出限界以下となったのは同じ傾向であったが、減少速度は大腸菌が速いことが確認され、腸球菌は大腸菌よりも太陽光に対する耐性が高いことが確認された。ファージは、F-phage Q β 、S-phage T4共に照射後24時間で約1 logと1.5 logの減少が確認され、照射開始後96時間で添加したファージが検出限界となった(共に約5 logの減衰)。添加したファージが検出限界以下となるまでの速さは同じであったが、照射開始12～72時間における減少速度はS-phage T4が速いことが確認された。海域におけるファージの検出は、S-phageの方が比較的濃度が高く、検出率も高い傾向が確認されている(図(3)-4～図(3)-10)。一方で、太陽光に対しては、S-phageの方が感受性が高いことが示唆されたことから、海域におけるF-phageの減少には太陽光以外の環境要因がS-phageよりも強く影響している可能性が示唆された。細菌とファージの太陽光による減少を比較すると、細菌が太陽光に対して感受性が高いことが確認された。代表的な腸管系ウイルスであるPoVとAiVでは、照射開始後192時間でそれぞれ約1.5 logと約2.0 logの減少が確認され、減少に僅かな差があったものの、減少速度に差はなかった。また、ウイルスは細菌、ファージに比べ太陽光に対する耐性が著しく高いことが確認された。太陽光に対する感受性は、細菌>ファージ>>ウイルスであることが確認された。前項の海域における移流・拡散指標による微生物の減衰を評価した結果においても細菌がファージ、ウイルスよりもより減衰傾向が高いことが確認され、本項の太陽光による減衰結果と一致している。環境中にはさまざまな不活化要因が存在しているが、太陽光というひとつの不活化要因による影響の結果からも、太陽光による不活化を考慮する必要がある環境では、ウイルスの指標として細菌を使用することは困難であると考えられる。また、ファージが腸管系ウイルスの代替指標の候補として挙げられているが、環境中の他の不活化要因の影響についてさらに検証を進め検討していく必要がある。



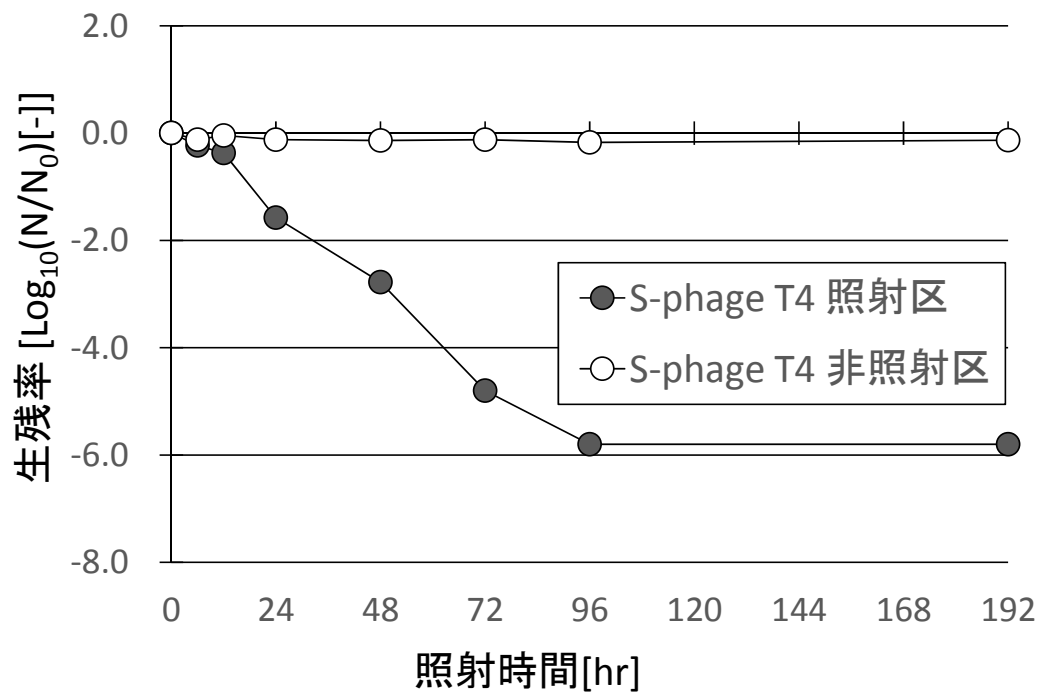
図(3)-13. *E. coli*における擬似太陽光照射後の生産率



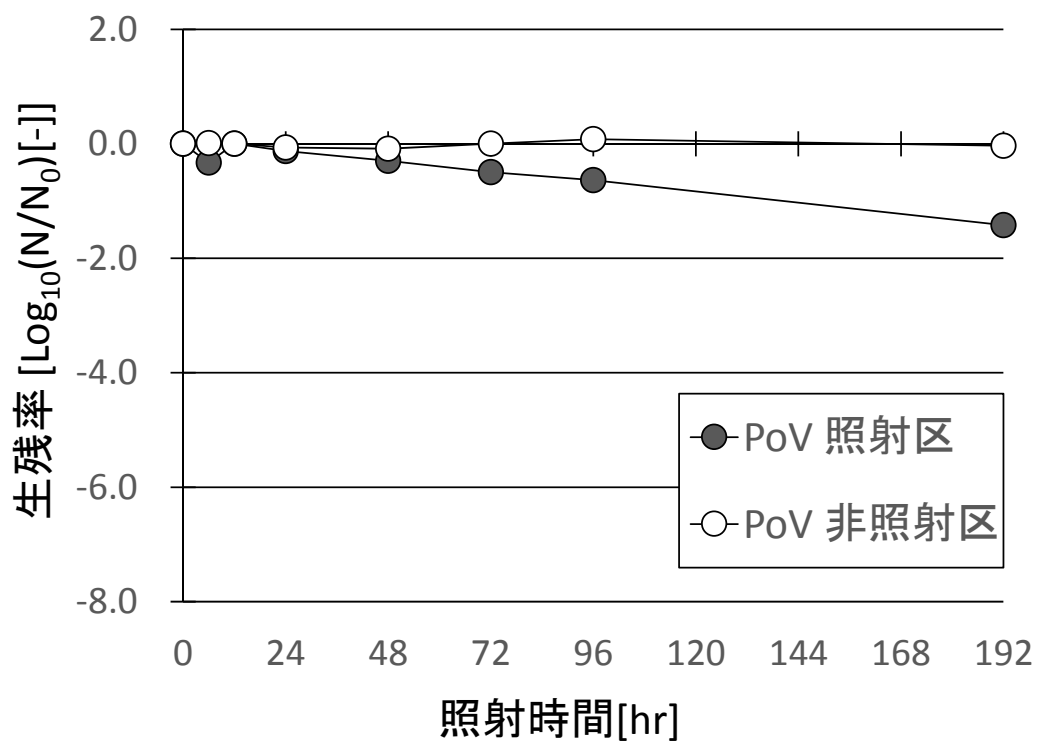
図(3)-14. *Enterococcus faecalis*における擬似太陽光照射後の生産率



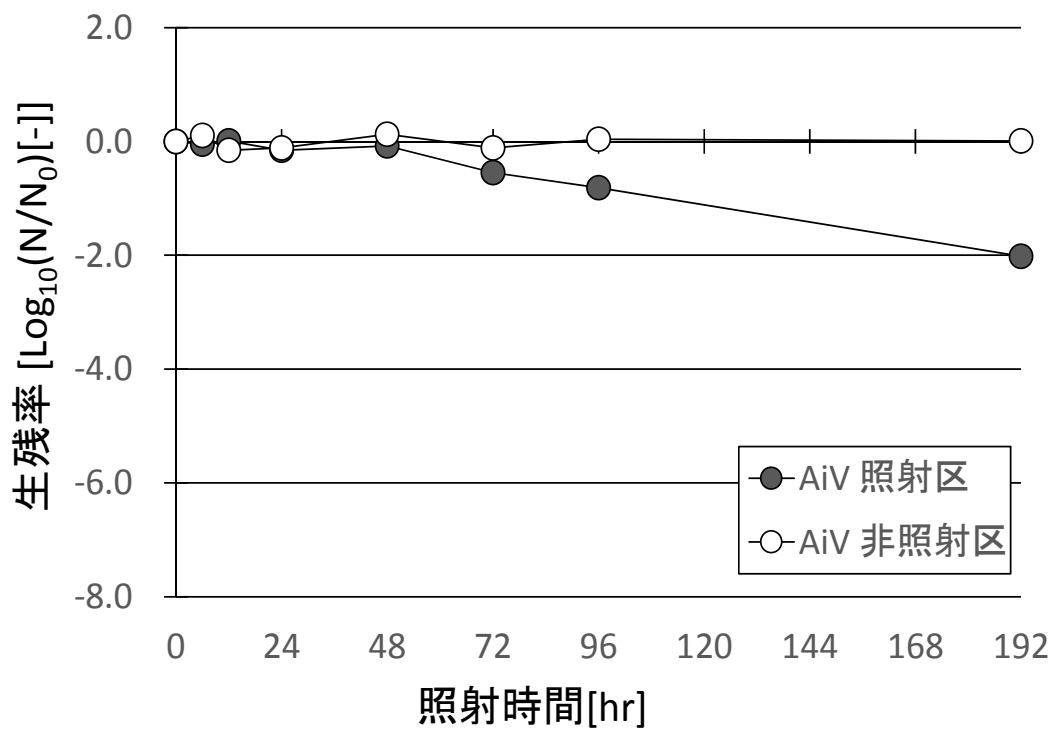
図(3)-15. F-phage Q β における擬似太陽光照射後の生残率



図(3)-16. S-phage T4における擬似太陽光照射後の生残率



図(3)-17. PoVにおける擬似太陽光照射後の生残率

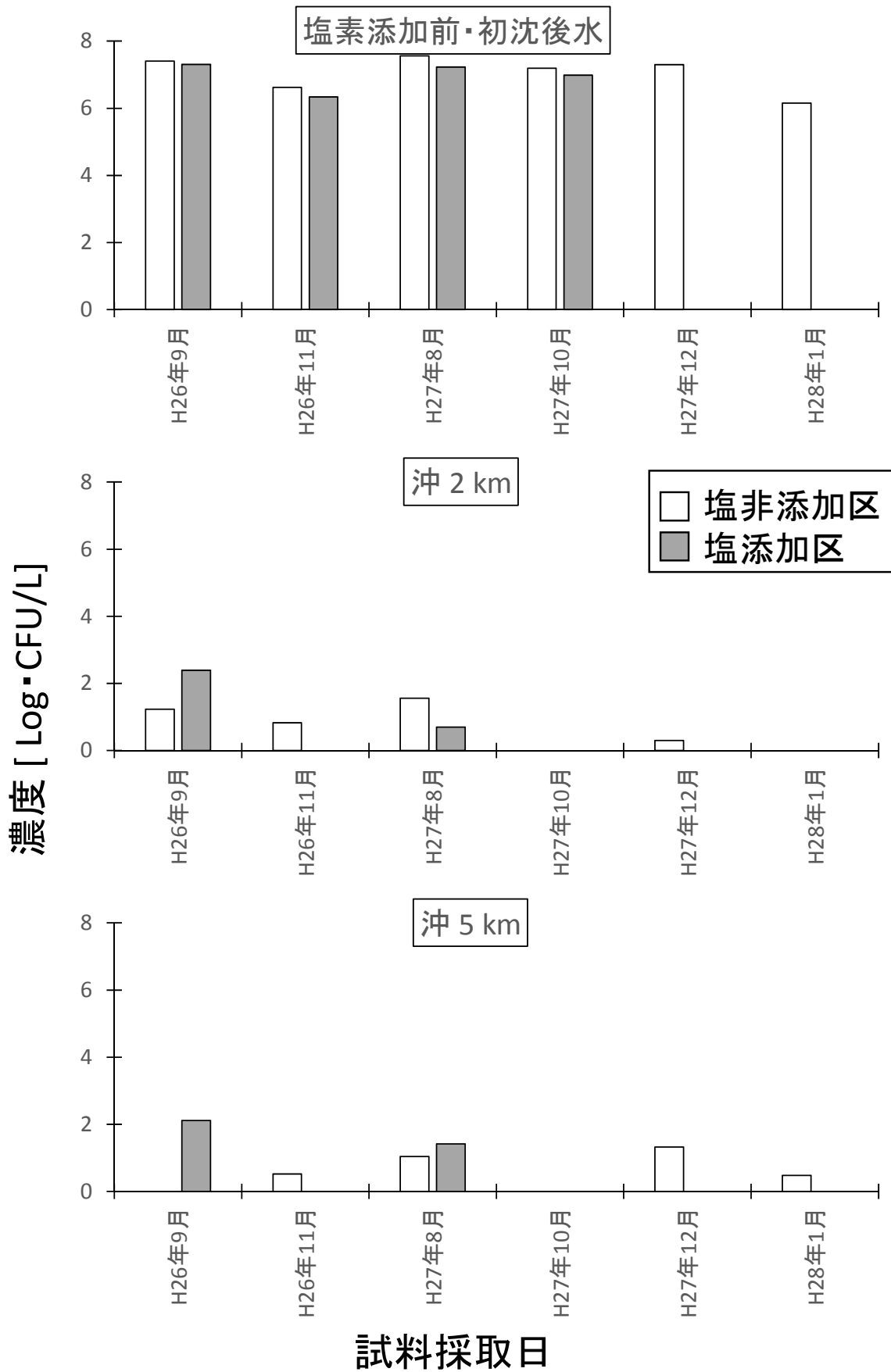


図(3)-18. AiVにおける擬似太陽光照射後の生残率

(4) 放流先海域において検出される大腸菌の塩分耐性の評価

処理場試料の塩素添加前・初沈後水、海域試料の沖2 km、沖10 kmにおける、塩分非添加培地、および塩分添加クロモカルトコリフォーム寒天培地を用いた大腸菌の検出結果を図(3)-19に示す。H27年2月の試料は、沖2 km、沖10 kmの試料採取を行っていないため実施していない。初沈後水において、H26年9月～H27年10月の試料において塩分耐性を有する大腸菌が大腸菌と同等の濃度で検出された。このことから、下水処理場の流入水には塩分耐性を有する大腸菌が高濃度に存在することが確認された。しかし、H27年10月および12月の試料からは検出されなかった。南蒲生浄化センターにおいてH27年11月に生物処理が再開されたことが塩分耐性を有する大腸菌が検出されなくなったことに影響している可能性がある。沖2 km、沖10 kmの試料において、H26年9月、H27年8月の試料から塩分耐性を有する大腸菌が検出された。そのうち、H26年9月の沖2 km、沖10 km、H27年8月沖10 kmでは塩分耐性を有する大腸菌がより高濃度で検出された。

初沈後水ではH27年8月、10月、沖2 km、沖10 kmではH27年8月の試料から検出された塩分耐性を有する大腸菌と判定された青色コロニーを単離し、大腸菌か否か正確に確認するために *tnaA* 遺伝子の検出を行った。初沈後水では各試料30コロニー、沖2 km、沖10 kmでは検出されたコロニー全てを釣菌し単離した株に対して実施した。単離株における *tnaA* 遺伝子検出結果を表(3)-4に示す。初沈後水から単離した大腸菌と判定された塩分耐性を有する細菌株のうちH27年8月、10月の試料においてそれぞれ19菌株（63.3%と70.4%）から *tnaA* 遺伝子が検出され大腸菌と確認された。一方で、沖2 km、沖10 kmの試料から単離した大腸菌と判定された塩分耐性を有する細菌株からは *tnaA* 遺伝子は検出されず、大腸菌ではないことが確認された。このことから下水処理場には塩分耐性を有する大腸菌が大量に存在しているものの、海域からは検出されないことが確認された。しかし、下水処理場試料には塩分耐性を有する大腸菌が豊富に存在することから下水処理水中にも存在している可能性はあり、低濃度ではあるが海域にも塩分耐性を有する大腸菌が存在する可能性がある。一方で、塩を添加した酵素基質特定培地において大腸菌とされたもののうち大腸菌ではない細菌が含まれていることが確認されたことから、塩を添加した酵素気質特定培地による大腸菌検出は正確性に欠ける可能性がある。



図(3)-19. 塩非添加培地および塩添加区培地から検出された大腸菌濃度

表(3)-4. 単離細菌株からの *tnaA* 遺伝子検出結果

採取地点	採取日	釣菌コロニー数	単離菌株数	<i>tnaA</i> 遺伝子検出菌株数 (%)
初沈後水	H27年8月	30	30	19 (63.3)
	H27年10月	30	27	19 (70.4)
沖2 km	H27年8月	15	0	0 (0.0)
沖 10km	H27年8月	27	0	0 (0.0)

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで海域環境中での病原微生物を含む環境微生物の挙動に関する研究は少なからず行われて来たが、主に大腸菌群を代表とする指標細菌に限られていた。その要因として、海域環境に存在する病原微生物起因の感染症は主に病原細菌によるものと考えられて来たからと判断される。しかしながら、近年ノロウイルスやA型肝炎ウイルスなどの病原ウイルスによる感染症が注目されて来ており、これまでの指標細菌による衛生的水質の評価のみでは対応できなくなって来ている。

そこで、本研究においてはこれまで研究が行われて来ている指標細菌の大腸菌群、大腸菌、腸球菌だけでなく、細菌ウイルスであるS-phageとF-phage、植物ウイルスのトウガラシ微斑ウイルス、そして病原ウイルスであるアイチウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスを仙台市南蒲生浄化センターの放流水地先海域で調査を行い、これらの環境微生物の挙動の比較を行った。このことにより、指標細菌の挙動はファージ、植物ウイルス、病原ウイルスの挙動とは異なることが、難分解性医薬品の挙動と比較することにより明らかになった。このことから、海域における病原ウイルス汚染の指標として、大腸菌群などの従来の指標細菌の有効性が疑われる結果が明らかとなった。

一方、病原ウイルスの挙動はF-ファージとトウガラシ微斑ウイルスの挙動と近くこれらの微生物が海域での病原微生物の指標微生物として有効である可能性を示すことが出来た。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

これまで海水浴などのレクリエーションの安全性評価においては、海域での衛生学的水質基準である大腸菌群数で評価されてきている。しかしながら、海域だけでなく、河川や湖沼の環境基準においても大腸菌群の有効性が検討されているところであり、本研究で得られた成果は大腸菌群数による水の衛生的安全性評価の検討に大いに貢献すると考えられ、河川、湖沼、海域の大腸菌群数による環境基準の見直しにとって多くの知見を提供できた。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 片山浩之、安井宣仁、猪又明子、田中宏明、岸田直裕、原本英司、渡部徹、真砂佳史、浅田安廣、端昭彦、佐野大輔、井原賢、稲葉愛美：水環境学会誌、37、12、424-433 (2014)
「水中の健康関連微生物に関する研究動向」
- 2) 井原賢、稲葉愛美、佐野大輔、臨床と微生物、42、685-689 (2015)
「衛生環境工学分野におけるマイクロバイオーーム研究」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 稲葉愛美、山下尚之、井原賢、田中宏明、三浦尚之、真砂佳史、風間しのぶ、端昭彦、片山浩之、井上健太郎、大村達夫：第50回日本水環境学会年会 (2016)
「難分解性医薬品を用いた海域における指標微生物の希釈・拡散と不活化の評価」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

京都大学G報告書に記載

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) W. O. K. Grabow and P. Coubrough: Applied and Environmental Microbiology, 52(3), 430-433 (1986) "Practical Direct Plaque Assay for Coliphages in 100-ml Samples of Drinking Water."
- 2) H. Katayama, A. Shimasaki and S. Ohgaki: Applied and Environmental Microbiology, 68(3), 1033-1039 (2002) "Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater."

- 3) A. Hata, K. Matsumori, M. Kitajima and H. Katayama: Food and environmental Virology, "Concentration of Enteric Viruses in Large Volumes of Water Using a Cartridge-Type Mixed Cellulose Ester Membrane."

Study on occurrence of waterborne pathogens in water environment and applicability of indicator microorganisms against pathogens

Principal Investigator: Hiroaki TANAKA

Institution: Kyoto University
1-2 Yumihama, Otsu, Shiga, 520-0811, JAPAN
Tel: +81-77-527-6222 / Fax: +81-77-524-9869
E-mail: htanaka@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: The University of Tokyo, Tohoku University

[Abstract]

Key Words: Pathogenic virus, Fecal indicator bacteria, Water environment, Lake Biwa, Sendai coastal area, Tokyo bay, Wastewater treatment plant effluent

World Health Organization (WHO) has been implementing the water quality management for pathogen control based on the fecal indicator bacteria (FIB) as well as the risk-based framework, Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA). QMRA was developed to control the risk from protozoa and viruses in waters, and has been applied to water quality standards for such as drinking water, reclaimed water for agricultural usage, and recreational or bathing waters. United States Environmental Protection Agency (USEPA) is also promoting water quality management based on QMRA framework.

On the other hand, in Japan, Total coliform (TC) has been still used as a fecal indicator in environmental water quality standards, and viewpoint for pathogenic virus control is still missing. Ministry of the Environment is now rethinking the environmental water quality standard to apply *E. coli* as FIB instead of TC. However, viewpoint for pathogenic virus control is still missing.

From these backgrounds, we aimed to investigate 1) the occurrence of FIBs and viruses include human enteric viruses in various environmental waters; and 2) the validity of FIBs as indicators for human enteric viruses in waters. We measured concentrations of these microbes in lake and coastal waters by using qPCR, culture methods, and next generation sequencing through two years monitoring, and analyze the correlation between them. We also compared the decrease of FIBs and human enteric viruses in coastal waters, and investigated the environmental factor that affect the attenuation of these bacteria and viruses in water environment.

We found that there was no correlation between the concentrations of FIBs (TC and *E. coli*) and human enteric viruses in lake water. In addition, decreasing pattern of concentrations of human enteric viruses in coastal water were different from those of FIBs. Concentrations of human enteric viruses decreased depending on the dilution of

wastewater discharge from the wastewater treatment plant in receiving water body, however, concentration of FIBs decreased by the dilution of wastewater discharge as well as inactivation of them. These results indicate that FIBs are not appropriate indicator for human enteric viruses in environmental waters. On the other hand, Aichi virus and Pepper mild mottle virus were detected with higher frequency and strong abundant compared to GI and GII NoV, and Enterovirus, and seemed to be useful indicator for human enteric viruses.

We also found that *E. coli* is able to proliferate in environmental water, which means that *E. coli* is not appropriate indicator for fecal contamination in environmental water. Further study is needed to investigate validity of *E. coli* as FIBs.