

【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（H26～H27；累計予算額 114,649 千円）

田中 宏明（京都大学）

## 1．研究実施体制

- （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）

## 2．研究開発目的

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．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)、G 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。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するという点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。

#### 4 . 委員の指摘及び提言概要

大腸菌群、大腸菌、腸管系ウイルスなどを中心に有用なデータが蓄積され、特に糞便指標として大腸菌群よりも大腸菌が適しているとの結果は行政施策に寄与するものとして評価できる。一方で、琵琶湖と東京湾では微生物の挙動が異なると考えられるので、水域間の比較・差異について十分な系統性を担保したうえでの結果提示にご留意いただくことと、個別サブテーマごとの論文だけでなく、全サブテーマを統合した論文発表も望まれる。

#### 5 . 評点

総合評点：A