

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01909

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた地下水における病原微生物汚染の実態把握とリスク管理

研究課題名(英文) Investigation on microbial pathogens in groundwater by using next-generation sequencing and their risk management

研究代表者

秋葉 道宏 (Akiba, Michihiro)

国立保健医療科学院・その他部局等・部長

研究者番号：00159336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：地下水試料から効率的にウイルスおよび細菌を濃縮し核酸を抽出する手法を考案した。深井戸から採水された水道原水試料では、1検体からロタウイルスA遺伝子が、別な1検体から反芻動物に特異的なバクテロイデス目細菌遺伝子が検出された。また、浅井戸の試料からは、ノロウイルスGII、ロタウイルスA及びアルコバクター属菌が検出された。収集した試料を対象にヒト下水汚染の化学物質マーカーとして提案されているカルバマゼピンを測定したところ、最大で36 ng/Lの濃度で検出された。さらに、定量的微生物リスク評価のアプローチを用いて、許容感染リスクを満たすために処理に求められるウイルス不活化効率を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国ではこれまでに、地下水の飲用が原因と疑われる健康被害の発生時を除いて、地下水における病原微生物の調査は行われてこなかった。本研究では、考案した高効率な地下水試料からのウイルス・細菌濃縮法を用いて、国内で初めて地下水の病原微生物汚染実態を調査した。水道原水として使用されている深井戸や飲用井戸(浅井戸)における病原ウイルスや病原細菌遺伝子の存在が明らかにされ、水道事業体、地方自治体の環境衛生部局、および保健所等において地下水中の病原微生物によるリスク管理を検討する上で有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：An efficient method for the recovery of nucleic acids from viruses and bacteria in groundwater samples has been developed. Genomes of rotavirus A and ruminant-specific Bacteroides were detected in groundwater used for drinking water production. Norovirus GII, rotavirus A, and Arcobacter genomes were detected in groundwater samples from private wells. Carbamazepine, which has been proposed as a persistent indicator of wastewater contamination, was also detected at concentrations up to 36 ng/L. We also evaluated the log reduction values required to inactivate viruses based on the observed data using the quantitative microbial risk assessment approach.

研究分野：水道工学

キーワード：地下水 ウイルス バクテロイデス カルバマゼピン 残留医薬品 ソーストラッキング QMRA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における飲料水による健康被害は、高度経済成長による上下水道の普及に伴い著しく減少した。現在では水道普及率が97%以上に達しており、水道法に基づき、諸外国と比較しても高いレベルで飲料水の水質管理が行われている。しかしながら、近年においても健康被害を伴う水質事故は発生しており、地下水を取水する小規模の水道施設や飲用井戸における発生割合が高い¹⁾。その原因の9割以上が病原微生物であり、腸管出血性大腸菌をはじめとする病原細菌による事故が最も多く、またウイルスを原因とする事故が近年増加傾向にある。我が国の地下水における微生物汚染の実態は、一般細菌や大腸菌等の指標細菌を除いて十分に明らかにされておらず、調査データに基づく適切なリスク管理方法の提案が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、地下水中の病原ウイルスと病原細菌を対象として、効率的な試料の前処理方法を検討し、その手法を用いて国内初の地下水における病原微生物汚染実態調査を実施することを目的とした。さらに、その調査結果に基づき定量的微生物リスク評価 (quantitative microbial risk assessment, QMRA) のアプローチを用いて、許容感染リスクを満たすために処理に求められる不活化効率を検討した。具体的なタスクとしては、

- 1) 地下水試料からウイルスと細菌を同時に濃縮し核酸を抽出・精製する手法を検討すること、
- 2) 水道原水や飲用として使われている深井戸や浅井戸から地下水試料を採水し、検討した手法を用いて病原微生物による汚染実態を調査すること、
- 3) 収集した地下水試料と対象に、糞便汚染を示す宿主特異的バクテロイデス目細菌遺伝子マーカーやヒト下水汚染を示す化学物質マーカーとして提案されているカルバマゼピンを測定し、微生物学的及び化学的ソーストラッキング手法の地下水への適用性を評価すること、
- 4) 微生物汚染が確認された地下水試料を細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシングに供し、門や綱レベルの細菌叢及び病原性を有する種が含まれる属を明らかにすること、
- 5) 観測されたウイルス濃度に基づき QMRA のアプローチを用いて、許容年間感染リスク 10^{-4} を満たすために消毒等の処理に求められるウイルスの対数減少値 (log reduction value, LRV) を算出すること

を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 濃縮方法の検討

2017年9月から11月の期間に、国内の浄水場の協力を得て、7地点の深井戸から水道原水試料(20L)を15検体収集した。試料20Lにマウスノロウイルス(MNV)S7-PP3株をおよそ 10^8 copies 添加・混合し、下水、河川水、及び海水試料からのウイルス濃縮に実績がある陰電荷膜法²⁾を地下水試料にも適用可能か評価した。すなわち、試料に塩化マグネシウムを25mMとなるように添加し、孔径0.45 μ m、直径142mmの混合セルロースエステル(MCE)膜(HAWP14250, Merck)を用いてろ過した。次に0.5mMの硫酸を500mLろ過することにより膜を洗浄した後に、1mM水酸化ナトリウム溶液を45mLろ過し、膜からウイルス粒子を誘出した²⁾。陰電荷膜法の濃縮液は、遠心式フィルターユニット(Centriprep YM-50, Merck)を用いた限外ろ過により1mLにまで濃縮した。濃縮液及びウイルスを誘出させた後のMCE膜から、NucliSENS mini MAG (bioMérieux)を用いて核酸を抽出・精製した。MNV RNA濃度は、既往のプライマー・プローブ³⁾、RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific)、及びLightCycler 480 System II (Roche)を用いたリアルタイムRT-PCR法により定量した。

(2) 地下水試料の収集、濃縮、微生物遺伝子検出

2017年12月から2018年3月の期間に、上記の浄水場の協力を得て、水道原水試料(20L)を22検体収集した。また、一般的に深井戸よりも水質が汚染されるリスクが高い浅井戸の実態も調査するため、2018年10月から12月に61検体、2019年11月に49検体、計110検体の試料を飲用井戸から採水した。

(1)の検討の結果、膜からのウイルス誘出効率が低く、ウイルスが膜に残存することが確認されたため、誘出操作を行わずに膜から直接ウイルス核酸を抽出する手法(同時に細菌の核酸も抽出される)を用いて試料を濃縮し、リアルタイムRT-PCR法によりノロウイルスGI(NoV GI)、ロタウイルスA(RVA)、及びトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)、ヒト、ブタ、反芻動物それぞれに特異的なバクテロイデス目細菌の遺伝子を定量検出した⁴⁻⁹⁾。2018年度に採水した61検体については、下痢症や敗血症を引き起こすアルコバクター属菌遺伝子¹⁰⁾も試験した。

(3) 化学物質マーカーの検出

収集した地下水試料(N=147,それぞれ200mL)を固相抽出(OASIS HLB, 225mg; Waters)により濃縮した後に、LC-MS/MS(Acquity TQD; Watersあるいは3200Qtrap; AB Sciex)を用いてカルバマゼピン(CBZ)の濃度を測定した。固相抽出前にCBZ-d10を添加し、CBZの回収率の補正を行った。CBZの定量下限値は0.25~0.6ng/Lであった。

(4) 細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシング

2018 年度に浅井戸から採水した 61 検体中 15 検体を選抜し、MiSeq (Illumina) を用いた細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシングに供し、米国バイオセーフティ学会 (American Biological Safety Association) による定義でバイオセーフティレベル (BSL) 2 または 3 に分類される種を 1 つでも含む場合、病原性を有する (可能性のある) 属であるとした。

(5) ウイルス不活化効率の算出

地下水試料から検出された NoV GII 遺伝子がすべて感染性を有するウイルス粒子に由来し、その水を処理せずに 1 日に 200 mL 飲用すると仮定して、報告されている二種類の用量反応モデル (ベータ・ポアソンモデルパラメータ: $\alpha=0.04$, $\beta=0.055^{11)}$ または $\alpha=2.91$, $\beta=2734^{12)}$ を用いて感染確率及び年間感染リスクを計算した。また、地下水中の NoV GII 濃度と年間感染リスクの関係式から、許容年間感染リスク 10^{-4} を満たす NoV GII 濃度を算出し、実測値と比較することで、処理に求められるウイルスの LRV を算出した。

4. 研究成果

(1) 濃縮方法の検討

試料に添加した MNV の回収率は、濃縮液で 0.001~13% (幾何平均値: 0.2%)、ウイルスを誘出させた後の MCE 膜で 0.2~83% (幾何平均値: 7.2%) であり、本研究で収集した地下水試料では膜からウイルスが効率良く誘出されないことがわかった。この原因として、地下水試料中に含まれる懸濁物質によって膜の孔が目詰まりした可能性が考えられた。そこで、ウイルスを吸着させた MCE 膜から直接ウイルス核酸を抽出する手法¹³⁾を用いて、汚染実態を調査することとした。この手法では、膜に物理的に捕捉された細菌の核酸も抽出されるため、ウイルスと細菌の抽出核酸試料を同時に得ることが可能となる。

(2) 地下水の微生物汚染実態

2017 年 12 月から 2018 年 3 月に採水された 22 検体の水道原水試料では、膜から直接ウイルス核酸を抽出する手法により、MNV 回収率は 1~100% (幾何平均値: 25%) と、一部の試料を除いて安定してウイルスを回収できた。その結果、1 検体から RVA 遺伝子が 110 copies/L の濃度で、別な 1 検体から反芻動物に特異的なバクテロイデス目細菌遺伝子が 52 copies/L の濃度で検出された。後者の試料が採水された深井戸は山間部に位置しており、シカ等の野生の反芻動物の糞便による一時的な汚染が考えられた。

2018 年度に調査した浅井戸試料 (N=61) では、MNV の回収率が 3 検体を除いて 1~80% (幾何平均値: 16%) だった。4 検体 (6.6%) が NoV GII 陽性であり、濃度の最大値はおよそ 180 copies/L だった (表 1)。PMMoV は上記とは異なる 14 検体 (23%) で陽性で、濃度の最大値は 5200 copies/L だった。RVA は、不検出だった。また、アルコバクター属菌が 3 検体から検出され、当該検体は PMMoV も陽性だった。大腸菌及び PMMoV は、NoV GII が検出された検体では不検出であり、地下水では NoV GII を直接検査するか、地下水中の挙動が類似した指標を選定することが重要と考えられた。宿主特異的なバクテロイデス目細菌遺伝子は、ヒト、ブタ、及び反芻動物に特異的なマーカーがそれぞれ 1 検体から検出された。

2019 年度に収集した浅井戸試料 (N=49) では、1 検体から RVA 遺伝子が検出された。また、上記とは異なる 26 検体 (53%) から PMMoV が検出された。RVA が陽性だった検体からは大腸菌も検出されたが、PMMoV 陽性試料は大腸菌及び宿主特異的なバクテロイデス目細菌遺伝子がすべて不検出だった。以上の結果から、国内の地下水における病原ウイルス及び病原細菌の汚染実態が明らかにされるとともに、地下水の病原ウイルス汚染に対しては、PMMoV やバクテロイデス目細菌遺伝子マーカーの指標性は十分でないことがわかった。

表 1. NoV GII が検出された地下水試料の測定結果

検体名	MNV 回収率 [%]	ウイルス濃度 [copies/L]			バクテロイデス濃度 [copies/L]			CBZ [ng/L]	一般細菌 [CFU/mL]	大腸菌
		NoV GII	RVA	PMMoV	Bac Hum	Bac Pig	Bac Rum			
I02	1	35	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	-	-
NT-E	4	57	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	70	不検出
FC-B	8	15	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	1.6	85	不検出
KD-E	27	180	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	2.5	0.5	不検出

(3) 化学物質マーカーの検出

2017 年度に 7 地点から収集した水道原水試料 (N=37) の CBZ 濃度は、不検出 (<0.6 ng/L) ~13.6 ng/L であり、採水地点によって差が見られた。山間部の 3 地点では期間を通じて不検出、また、陽性だった 4 地点では採水月による濃度変動はほとんど認められず、ヒト下水汚染を示す有用な化学物質マーカーの一つと考えられた。

2018年度の浅井戸試料(N=61)では、CBZは31検体(51%)から検出され、濃度の最大値は35 ng/Lだった。そのうちウイルスや細菌の遺伝子が陽性だった試料は、6検体だった。2019年度の浅井戸試料(N=49)においては、CBZは34検体(69%)から検出され、濃度の最大値は36 ng/Lだった。そのうち31検体(91%)では、RVAまたはPMMoVが陽性だった。

(4) 細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシング

15検体に対する細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンシングの結果、合計 2,035,124 配列(1試料あたり 99,697~243,241 配列)が得られた。図1に示すように、門(phylum)レベルの分類では、14検体で *Proteobacteria* が最も優占(34.7~69.7%)しており、1検体では *Actinobacteria* が優占(71.9%)していた。また、図2に示すように、綱(class)レベルの分類では、6検体で *Gammaproteobacteria*(15.8~30.4%)、4検体で *Betaproteobacteria*(20.2~46.2%)、3検体で *Alphaproteobacteria*(19.7~33.9%)、1検体で *Actinobacteria*(71.8%)、1検体で *Koll11*(22.1%)が優占していた。

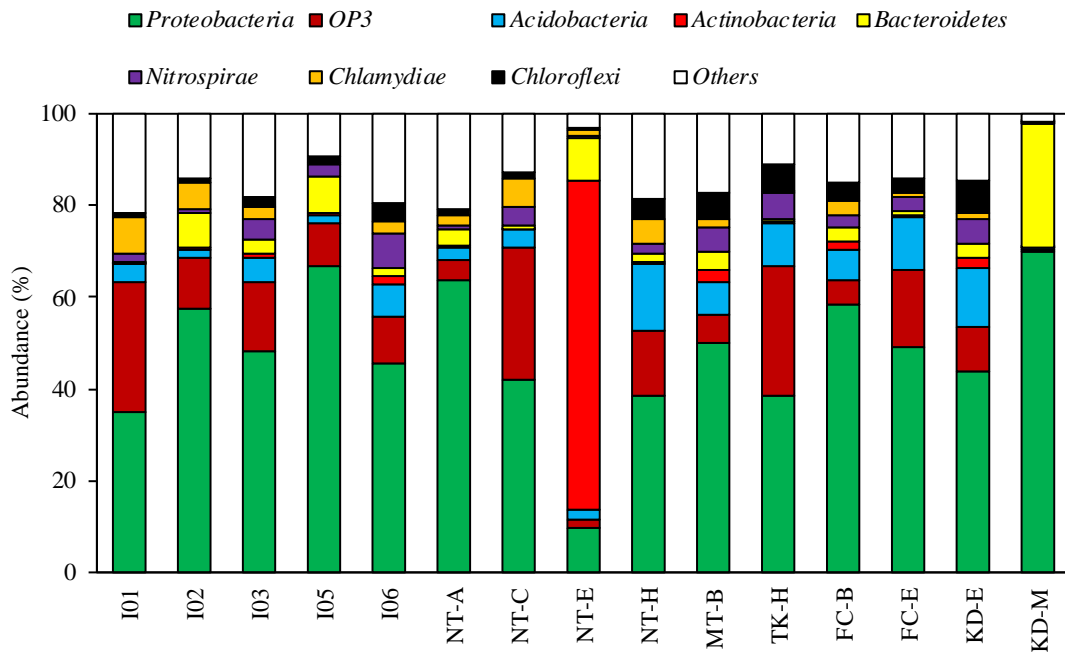


図1. 門(phylum)レベルに基づく細菌 16S rRNA 遺伝子の分類結果

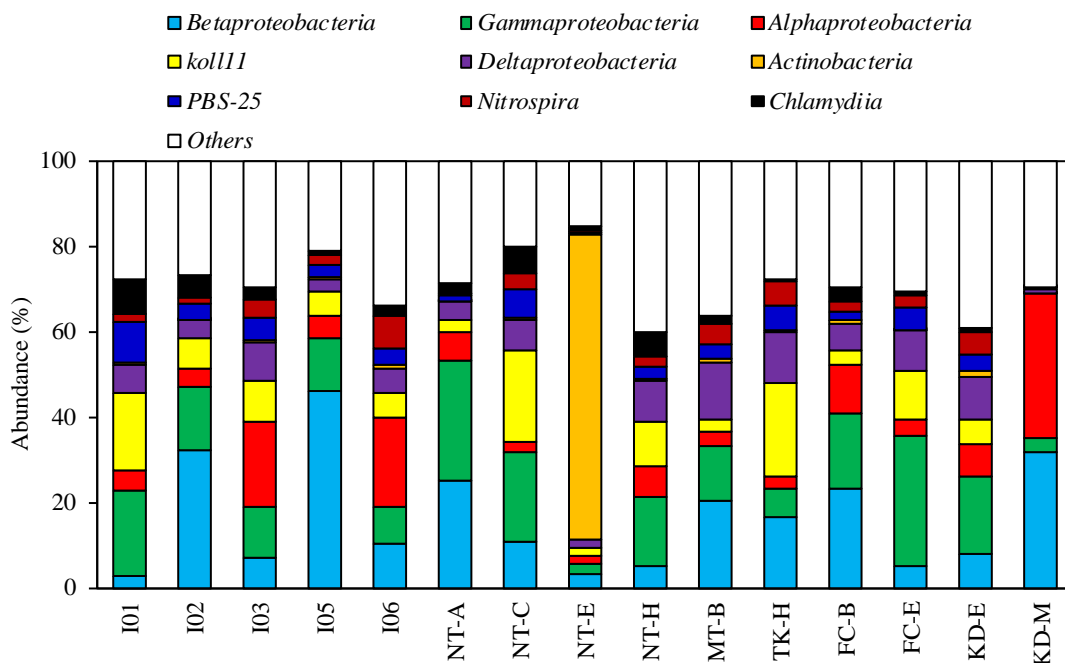


図2. 綱(class)レベルに基づく細菌 16S rRNA 遺伝子の分類結果

これらは 421 種類の属 (genus) に分類され、そのうち 89 種類 (21.1%) は病原性を有する属であると判定された。89 種類のうち 19 属 (*Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* 等) は、15 検体いずれか 1 種類以上から 0.1% 以上の配列割合 (分布率) で検出されており、存在比の高い属であった。特に高い配列割合で検出された病原性を有する属として、*Acinetobacter* が「FC-E」において 20.44%、*Chromobacterium* が「I02」において 20.82%、*Flavobacterium* が「NT-E」において 8.84% の値を示した。

(5) ウイルス不活化効率の算出

実際に飲用されている井戸を含めて計 4 地点から NoV GII 遺伝子が 15~180 copies/L の濃度で検出されたため、年間許容感染リスクを満たすために必要なウイルス不活化効率を算出した。それらの地下水を 200 mL 飲用することによる感染確率は Teunis et al. (2008) のモデルパラメータ¹¹⁾では 0.15~0.23、Schmidt (2015) のパラメータ¹²⁾では 0.003~0.038 と計算された (図 3A)。年間感染リスクは、それぞれ 1.0、0.69~1.0 となった (図 3B)。年間感染リスク 10^{-4} となる NoV GII 濃度は、それぞれ 1.9×10^{-6} 、 1.3×10^{-3} copies/L である。したがって、当該井戸の水を飲用する際には、消毒処理等により、NoV GII 濃度を Teunis et al. (2008) のモデルパラメータでは 6.9~8.0 log、Schmidt (2015) のパラメータでは 4.1~5.2 log 低減する必要がある。

本研究では、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検出された遺伝子数を全て感染性ウイルス粒子由来と仮定しているため、ウイルスの LRV は実際よりも大きく計算された可能性がある。地下水のウイルス汚染に対して大腸菌やバクテロイデス目細菌遺伝子マーカーの指標性は十分でないことから、地下水の飲用による健康被害のリスクを管理するためには消毒等の適切な処理が重要であることが改めて示された。

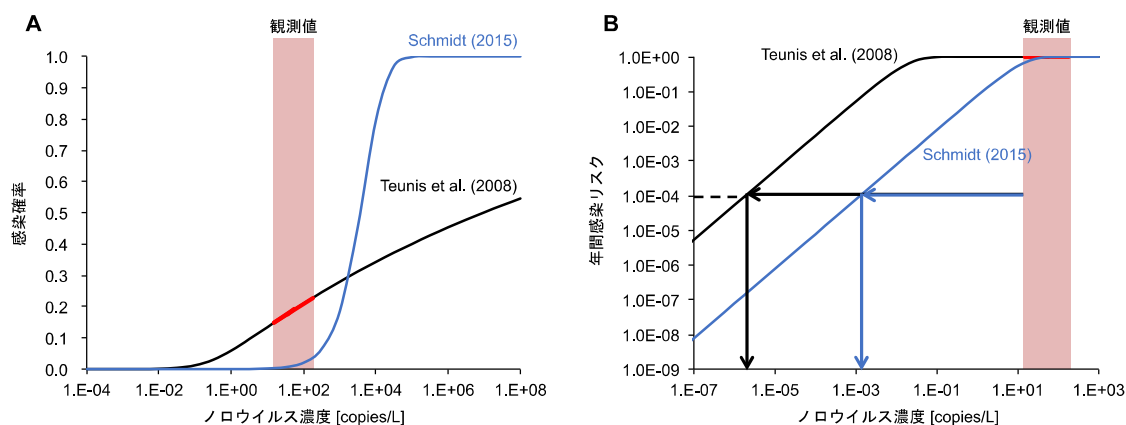


図 3 . 水中のノロウイルス濃度と感染確率 (A) 及び年間感染リスク (B) の関係。Teunis et al. (2008) 及び Schmidt (2015) の用量反応モデルパラメータを用いて計算した^{11, 12)}。

参考文献

- 1) 岸田ら, 保健医療科学, 64 (2), 70-80, 2015 .
- 2) Katayama et al., Applied and Environmental Microbiology, 68 (3), 1033-1039, 2002.
- 3) Kitajima et al., Journal of Virological Methods, 169 (2), 269-273, 2010.
- 4) Miura et al., Food and Environmental Virology, 10 (2), 176-186, 2018.
- 5) Haramoto et al., Applied and Environmental Microbiology, 79 (23), 7413-7418, 2013.
- 6) Zhang et al., PLoS Biology. 4 (1):e3, 2006.
- 7) Lee and Lee, Journal of Microbiological Methods, 82 (3), 311-318, 2010.
- 8) Mieszkin et al., Applied and Environmental Microbiology, 75 (10), 3045-3054, 2009.
- 9) Reischer et al., Applied and Environmental Microbiology, 72 (8), 5610-5614, 2006.
- 10) Ghaju Shrestha et al., Microbes and Environments. 33 (3), 309-316, 2018.
- 11) Teunis et al., Journal of Medical Virology, 80 (8), 1468-1476, 2008.
- 12) Schmidt, P.J., Risk Analysis, 35 (7), 1364-1382, 2015.
- 13) Miura et al., Food and Environmental Virology, 11(1), 9-19, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦尚之, 儀間ありさ, 荒川直子, 篠原成子, 松村諭, 越後信哉, 原本英司, 秋葉道宏
2. 発表標題 地下水における病原ウイルス汚染実態調査に向けた検討
3. 学会等名 平成30年度水道研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋葉道宏, 島崎大
2. 発表標題 災害時における医療施設の水確保
3. 学会等名 第24回日本災害医学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧野博之, 三浦尚之, 越後信哉, 原本英司, 秋葉道宏
2. 発表標題 病原ウイルスによる地下水汚染の実態調査
3. 学会等名 令和元年度水道研究発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原本 英司 (Haramoto Eiji) (00401141)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小坂 浩司 (Kosaka Koji) (60370946)	国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官 (82602)	
研究分担者	越後 信哉 (Echigo Shinya) (70359777)	京都大学・工学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	三浦 尚之 (Miura Takayuki) (70770014)	国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官 (82602)	