

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06620

研究課題名(和文)嫌気性芽胞菌の「機能的」「網羅的」な糞便汚染指標としての活用とリスク評価への応用

研究課題名(英文) Utilization of anaerobic spore bacteria as "functional" and "exhaustive" fecal contamination indicators and application to microbial risk assessment

研究代表者

橋本 温 (Hashimoto, Atsushi)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：30332068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先行の研究で明らかになっているヒト由来汚染源での嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌) cpe遺伝子保有株の偏在性を利用し、川流域のヒト糞便汚染のソーストラッキング指標としての有効性の評価に加えて、食中毒起因菌である本菌の消毒法について検討した。家畜系ポイントソースを受ける河川およびヒト由来のポイントソースおよびノンポイントソースを受ける河川におけるフィールド調査において、cpe保有株のMST指標およびウイルス指標としての有効性が明らかになった。また、消毒実験によって有機物共存下での過酢酸による消毒効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌などの細菌が糞便汚染指標として用いられてきた。これらの指標細菌は、水などの糞便汚染の有無を評価する指標として機能してきているものの、人を含む様々な動物に由来する糞便汚染の識別、原虫やウイルス等を含む糞便-経口感染する微生物の指標としての効果は限定的である。本研究では、糞便汚染の汚染源識別指標(MST)指標としての「機能」性と原虫、ウイルスも含む「網羅」的な指標としての嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌)の意義を示した。これは、水道水源の微生物学的水質の評価を行う際に単なる糞便汚染の評価からより進歩した評価を行うことができるツールを示すものであり、微生物学的安全性の確保に有効に役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Utilizing the ubiquity of anaerobic spore bacteria (*C. perfringens*) cpe gene-positive strains in human-derived fecal sources, which has been revealed in previous studies, to evaluate its effectiveness as a microbial source tracking indicator for human fecal pollution in river basins. In addition, the disinfection efficacy of peracetic acid against this spores was examined.

In field surveys on rivers receiving livestock point sources and human-derived point sources and non-point sources, the effectiveness of cpe-positive strains as MST and virus indicators was revealed. In addition, the disinfection experiment confirmed the disinfection effect of peracetic acid in the presence of organic substances.

研究分野：水質衛生学

キーワード：嫌気性芽胞菌 ウェルシュ菌 糞便汚染指標 ソーストラッキング MST

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行の水の糞便汚染指標は、古くから主に大腸菌を中心とする糞便汚染指標細菌が用いられ、細菌を起因とした糞便経口伝播する水系感染症の制御に大きな効果をもたらした。大腸菌は培養法で同定、計数の検査が可能であり、容易な操作で計測できることから今日でも重要な指標の一つである。一方で、この大腸菌を中心とした糞便汚染指標による評価は、大腸菌が環境中で再増殖すること、ウイルスや原虫よりも生残性が低いことがあること並びに温血動物に広く普遍的に存在することから汚染源探査(ソーストラッキング)指標としての意味が低い事など、いくつかの問題点も指摘されている。

研究代表者らは、現在までに嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌)の水処理における除去性や水環境での分布に関する研究を実施し、嫌気性芽胞菌が「水道原水のクリプトスポリジウムの汚染の恐れ」の判断指標」として採用される際の基礎的な情報を提供した。これらの研究を進展させ、ヒト、家畜由来の糞便や排水を調査し、嫌気性芽胞菌のうちの *cpe*(エンテロトキシン)遺伝子の保有株が、ヒト糞便由来の試料(下水)からのみ高率(約 30%)に検出され、家畜(豚/牛/鶏)糞便からは検出されないことを示し、*cpe* 保有株がヒト糞便汚染の指標となりうる可能性を明らかにした[Hashimoto *et al.*, 2016 他]。加えて、広島湾での調査で、嫌気性芽胞菌濃度とノロウイルスや指標ウイルスである PMMoV 濃度には高い相関があることを確認した[Hashimoto *et al.*, 2015 他]。

これらを背景に、本研究では嫌気性芽胞菌を利用した、機能的かつ網羅的な糞便汚染指標の確立を目指し、嫌気性芽胞菌の実環境での分布および生残性の評価を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、先行の研究成果を応用・発展し、嫌気性芽胞菌の「原虫」および「保存性の高い糞便汚染」の指標という従来からの機能に、新たな可能性である以下の 3 点、

すなわち

「水域のヒト糞便汚染の地理的/時間的な寄与度を評価できる指標」

「腸管系ウイルス(ノロウイルスなど)の汚染指標」

を加えることで、嫌気性芽胞菌を汎用性の高い、「機能的」「網羅的」な糞便汚染指標(原虫 + ウイルス汚染 + ヒト糞便汚染の地理的/時間的な寄与度評価 + ソーストラッキング)として進展させ、水域の糞便汚染の定量的なリスク評価に役立てることを目的とした。この目的を達成するために、河川等の実際の環境、特にヒトや家畜の糞便汚染が明らかモデル河川での嫌気性芽胞菌および *cpe* 保有株の存在状況の評価を行った。

また、河川水中等での生残性を評価するために、他の指標細菌および指標ウイルスとともに河川水中等での減衰を室内実験で評価比較した。加えて、塩素消毒に耐性を有する嫌気性芽胞菌の消毒による不活化を塩素と芽胞の不活化に効果のある過酢酸を用いて評価し、嫌気性芽胞菌の消毒剤耐性についての情報と新しい消毒法の模索を行った。

3. 研究の方法

3.1 河川等の実環境での *cpe* 保有株の分布と流域状況の調査

(1) 調査地点

実河川における *cpe* 保有ウェルシュ菌の分布状況の評価するために、広島県西城川水系西城川および戸郷川の 4 地点(ヒト関連排水(下水処理場放流水)の流入が認められるポイントソースのモデル)について 10 回、神奈川県相模川水系の小鮎川 2 地点(家畜関連排水の流入が認められるポイントソースのモデル)および同水系永池川 2 地点(ヒト関連排水(人口集中エリアから流入する浄化槽排水)の流入するノンポイントソースのモデル)について 6 回のサンプリングを行い調査した。

(2) 調査項目および調査方法

1) 大腸菌および腸球菌数

一定量の試料をコリラートあるいはエンテロラート培地と混合し、QT トレイに入れて培養した。24 時間 37 度で培養したのち、使用法に従い陽性判定を行い陽性セル数から最確数を求めて、各試料中の濃度を定量した。

2) 嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌)および *cpe* 保有株

試料を加熱処理(75 度 20 分)したのち、ハンドフォード改良寒天培地/嫌気培養法にて検出、定量した。定量後、それぞれ培地からコロニーをランダムに単離して、血液寒天培地を用いて増菌培養した。増菌培養した株の毒素遺伝子の保有状況を毒素遺伝子を標的とした PCR 法[Hashimoto *et al.*, 2016]で調べた。*cpe* 遺伝子保有株の割合から、各試料中の *cpe* 保有株の濃度を求めた。

3) 流域の状況調査

河川流域の人口、下水道普及率、下水道接続率、家畜飼育頭数、合併式浄化槽使用数などの情報を、神奈川県および広島県、周辺各市町村の公開情報(人口統計、特定事業場統計、その他)などから収集した。また、河川流量のデータを国土交通省および神奈川県の情報から得た。永池川および戸郷川の流量については現地で断面と流速の実測を行い、推定した。加えて、現地の踏査を行い、その流域の状況を調査した。

3.2 河川水中での *cpe* 保有株およびウイルスの生残性評価

(1) 模擬河川水と曝露実験

河川水(西城川表流水)にチオ硫酸ナトリウムで脱塩素した下水放流水 10%を添加し、試料とした。本試料 150ml をプラスチック製滅菌フラスコに 7 本に分注した。試料の入ったフラスコを遮光し 20 °C の状態で 0, 1, 2, 7, 20, 35 および 47 日間培養し、各測定日にそのうち 1 本のフラスコを開封し、嫌気性芽胞菌、腸球菌および大腸菌数を上述の方法で測定した。また、同試料から RNA を抽出したのち、逆転写を行い、抽出試料中のトウガラシ紫斑病ウイルス(PMMoV)濃度を本ウイルスの DNA 配列を標的とした RT-qPCR 法で測定した。また、PMMoV については、生残している可能性の高い PMMoV 数の評価を試みるために、抽出 RNA 試料を PMA 処理を行った場合についても検討し、計数した。

3.3 嫌気性芽胞菌、指標細菌および指標ウイルスの過酢酸による不活化

嫌気性芽胞菌、指標細菌および指標ウイルスの混入する下水放流水(塩素消毒前)を下水処理場に採水し、実験を行った。試料に過酢酸を 10ppm となるように添加し、接触時間ごとに採水しチオ硫酸ナトリウムで消毒剤を中和したのち、大腸菌はコリラート法、嫌気性芽胞菌はハンドフールド改良寒天培地法で定量し、初期値と比較して不活化率を求めた。

4 . 研究成果

4.1 河川等の実環境での *cpe* 保有株の分布と流域状況の調査

図 1 に調査のモデル地点とした西城川水系(ヒトポイントソース)と相模川水系の小鮎川(家畜ポイントソース)および永池川(ヒトノンポイントソース)の概略と検出された嫌気性芽胞菌のうち、*cpe* 遺伝子保有株の割合(*cpe* 保有率)を示した。

それぞれの試料からランダムに分離した 166 から 258 株の嫌気性芽胞菌の検査で得られた *cpe* 保有率は、西城川では SP1 で 13%であったのに対して、SP2(30.2%:下水処理場放流水)および SP3(20.4%:市街地を流れる戸郷川)の流入を受けた SP4 では 21.5%と上昇した。SP2 は計画人口約 8,000 人の市街地をカバーする下水処理場のオキシデーショディッチ処理および塩素処理後の放流水であり、戸郷川(SP4)は市街地の下水道未接続世帯(約 300 世帯)の合併式浄化槽放流水の流入を受けている。これらの人に由来する排水の流入によって西城川の嫌気性芽胞菌の *cpe* 保有率は 13%から 22%に増加した。加えて、下水処理場の放流量、西城川および戸郷川の河川流量から推測した *cpe* 保有嫌気性芽胞菌の推定負荷量は合致し、2 つのヒト関連排水のポイントソースの流入によって SP4 では *cpe* 陽性率が上昇することが示された。

また、相模川水系の永池川流域は、人口約 6 万人の住宅密集地であり、流域下水が整備されているものの、約 3%(2000 人)の下水道未接続人口で、古くから生活雑排水による汚濁河川としてその対策が続けられている。周辺に家畜等の飼育施設も存在しない。この河川の調査地点である SP5, 6 とともに 26%の *cpe* 陽性率が確認され、ノンポイントソースにヒト排水の流入においても同様に高い *cpe* 保有率が観察された。

一方、同水系の小鮎川では、約 5,000 頭の頭数の養豚場からの排水を受ける前後の 2 地点で採水を行市調査したが、大腸菌、嫌気性芽胞菌濃度ともに排水の流入によって増加するものの、*cpe* 保有率は 3.6%と 3.9%とほぼ変化が認められなかった。

嫌気性芽胞菌 *cpe* 保有株は、先行の研究[Hashimoto et al., 2016]で家畜由来試料からは検出されず、ヒト由来配水からのみ特異的に検出されることが明らかになっているが、本研究では実際の河川等の水環境において、ヒト由来の糞便汚染を評価できる MST 指標として機能することが明確化された。

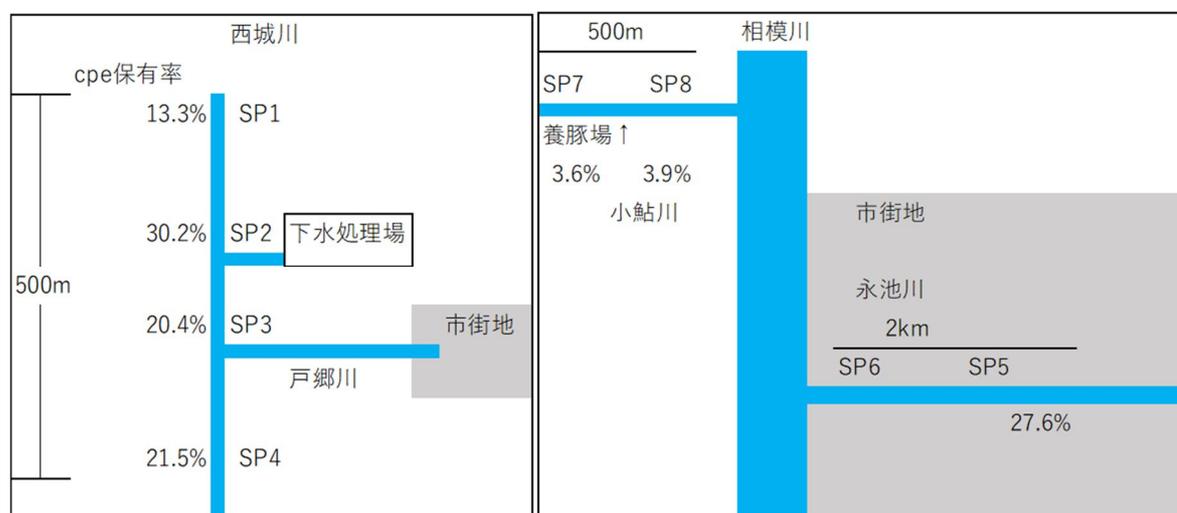


図 1 人および家畜由来排水の流入による嫌気性芽胞菌 *cpe* 保有株の分離率の変化

4.2 河川水中での嫌気性芽胞菌およびウイルスの生残性評価

河川水に下水を 10%混入させ、経過時間ごとにその濃度を計測して評価した大腸菌(EC)、大腸菌群、腸球菌(ECC)、嫌気性芽胞菌(ACC)、PMMOV および PMA 処理後の PMMoV の生残率を図 2 に示した。

培養法によって生菌数を評価している大腸菌群、大腸菌、腸球菌の濃度は、実験開始直後の 1 日目および 2 日目から急速に減少し、2 日後には初期値の-2log、20 日後には-3log にまで減少した。これは、芽胞を形成しない大腸菌や腸球菌は河川水中では急速に死滅し、培養による検査法で検出できなくなることを示しており、生残性の高い病原性原虫や一部の腸管系ウイルスの汚染を適切に評価できない可能性を示している。

一方、腸管系ウイルスの動向を示す指標として用いた PMMoV は 7 日後においても 0.5log 程度、47 日後においても 1log 程度の減少しか認められなかった。PMMoV は RNA ウィルスであり、本研究ではその定量法として RT-qPCR を用いたが、本法はウィルスの生死に関係なく、RNA が残存していれば検出され、この結果は生残している PMMoV の状況を反映しているとは言えない。すなわち、感染性を失ったウィルスでも RNA さえ残存していれば陽性となり、計数されることから、ウィルス数を過大に評価している可能性がある。そこで、生存している可能性の高いウィルスの検出を試みるために、RNA を抽出した試料を PMA (Propidium monoazide) で処理し、カプシドの壊れたウィルス粒子中の RNA あるいはフリーの RNA と PMA を可視光線の照射によって結合させ、これら生存している可能性の低いウィルス由来の RNA の検出を阻害して RT-qPCR をおこなった。PMA 処理と未処理で評価したウィルスの生残性の結果は 1 日目、7 日目などの初期には両者に 0.2-0.1log 程度のわずかな差が生じ、PMA 処理後のウィルス数が小さくなる傾向が見られた。この両者の差は 47 日後の試料においては 1log 程度にまで広がった。PMA 処理ののち qPCR 評価したウィルスの生残性は、少なくともカプシドに損傷を受けているウィルスを除外したものであると考えることができ、その不活化は 20 日で-2log、47 日には-2.5log となった。

この PMMoV の時間による不活化率を前述の指標細菌(大腸菌等)と比較すると常に-1log 以上細菌の生残率が低くなり、培養法による細菌の生菌数の評価では、より生残性の高いと考えられるウィルスの挙動を十分に把握できない可能性があることが示された。

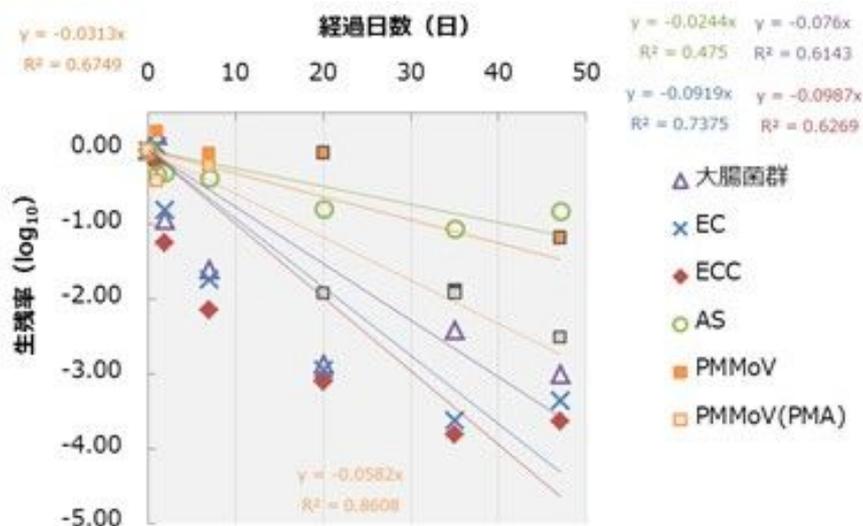
一方で、芽胞を形成する嫌気性芽胞菌の生残性は、芽胞を形成しない生菌を評価する大腸菌、大腸菌群および腸球菌よりも高く、7 日で-0.5log 程度、47 日でも-0.8log 程度の減少であった。この生残率の減少の程度は、RT-qPCR で計測した PMA-PMMoV と比較すると生残性は高く、PMA 処理を行わない PMMoV の生残率よりは低い結果となり、PMA 処理および未処理の中間の値となった。このように、嫌気性芽胞菌は、ウィルスの生残性を評価する場合においては、大腸菌などの生菌の測定よりもよりウィルスの減少速度に類似したものとなることから、有用な腸管系ウィルスの生残性評価の指標となりうる可能性が示された。

これらの事から、嫌気性芽胞菌は、現在までに使用されている原虫の汚染の恐れ of 判断指標としての機能に加えて、大腸菌などの従来の培養法による評価法では十分に評価ができないウィルスの指標の候補であり、その生残性の高さから環境中で生残するウィルスの存在を評価できる可能性があることが示された。

4.3 嫌気性芽胞菌、指標細菌および指標ウイルスの過酢酸による不活化

本研究では、嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌)を新たな機能を持ち、ウィルスや原虫も網羅して評価できる糞便汚染指標として評価した。一方で、ウェルシュ菌のうち、今回の研究で MST 指標としての意義を示した *cpe* 遺伝子保有株はウェルシュ菌食中毒の起因菌であり、国内外で細菌性食中毒の主要な要因となっている。

本研究で示したように、ウェルシュ菌 *cpe* 保有株は、下水放流水などヒトの糞便汚染に関連する塩素消毒が施された放流水に多量に含まれる。したがって、その感染経路等については今後の検討が必要であるものの、水系あるいは灌漑などを通じて農作物等、さらには水産物などの汚染源として、下水等の放流水のリスクについては十分な注意と検討が必要であると考え



られる。そこで、本研究では、塩素では十分な制御ができないウェルシュ菌の制御を目的として、芽胞に対する不活化効果が示されている過酢酸(PAA)を用いた下水放流水の消毒を試みた。

初期濃度 10mg/L になるように下水放流水に PAA を添加し、時間ごとの PAA 濃度を測定して接触時間とともに CT 値を求めた。CT 値と不活化 log 数の関係を図 3 に示した。PAA は大腸菌および大腸菌群に対しては極めて高い不活化効果を示し、接触時間数分で 2-3log の不活化が可能であった。一方で、ウェルシュ菌の 1log の不活化には CT 値 500mg・min/L、接触時間で 1 時間近くの時間を要した。また、比較した塩素消毒の実験では、下水放流水との接触後、直ちに減衰し、長時間不活化効果が継続することは認められなかったが、PAA では有機物の共存下でも不活化効果が持続し、CT 値 1,000 mg・min/L を超えるところで最大で 2-3log の不活化効果が期待できた。

PAA は緩やかではあるが、有機物共存下でも有効にウェルシュ菌芽胞の不活化が可能であること、放流先の環境への負荷が塩素と比較して低いこと、加えて塩素とは異なる作用機序で不活化効果を示すことなどから、現在の下水放流水からは多量に検出される塩素消毒耐性であり食中毒の起因菌であるウェルシュ菌を不活化する消毒法として、塩素を補完する形で使用することができる可能性が示された。一方で、PAA が効果を発揮するためには十分な接触時間あるいは CT 値を確保する必要があるため、下水処理工程において添加工程の工夫、放流先に影響を及ぼさない添加濃度の決定など、実用に当たっては検討が必要であることも明らかになった。

4.4 「網羅的」「機能的」な糞便汚染指標としての嫌気性芽胞菌の意義

嫌気性芽胞菌はそのほとんどがウェルシュ菌であり、温血動物の腸管に城砦する芽胞形成細菌である。従来から糞便汚染指標として用いられてきており、特に、その生残性の高さから、わが国ではクリプトスポリジウム等の原虫の汚染の恐れを判断指標として用いられてきた。一方で、環境中での生残性の高さが過去の糞便汚染の過大評価することや糞便中での現存量の少なさなどが糞便汚染指標としての欠点とされてきた。

本研究では、先行の研究成果を応用・発展し、嫌気性芽胞菌の「原虫」および「保存性の高い糞便汚染」の指標という従来からの機能に、新たな可能性である以下の 3 点、すなわち

「水域のヒト糞便汚染の地理的/時間的な寄与度を評価できる指標」

「腸管系ウイルス(ノロウイルスなど)の汚染指標」

を加えることで、嫌気性芽胞菌を汎用性の高い、「機能的」「網羅的」な糞便汚染指標(原虫+ウイルス汚染+ヒト糞便汚染の地理的/時間的な寄与度評価+ソーストラッキング)指標として発展させることを目的として検討を行ってきた。その結果、家畜糞便由来排水の流入するポイントソースでの *cpe* 保有ウェルシュ菌の割合が変化しないこと、ヒト糞便由来のポイントソースおよびノンポイントソースによる流入を受ける河川での高い保有率などの実態を明らかにし、ヒト由来の糞便汚染のソーストラッキング指標としての有効性を示した。このことから、嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌)は、従来の糞便汚染指標としての意義に付加して、ソーストラッキングを加えた「機能的」な指標であることが示された。

また、河川水中での減少を評価した検討で、従来の指標である大腸菌等が早期に減少してしまうことに対して、ウェルシュ菌は PMMoV と同程度に生残することが示された。このことは、現在用いられているウェルシュ菌の指標としての機能、すなわち、クリプトスポリジウム等の原虫の汚染の恐れを判断指標としての機能に加えて、ウイルスの指標としての意義を確認したものであり、ウェルシュ菌の広い生物種に対して有効であるという意味での「網羅的」な指標としての可能性を示すものである。

ウェルシュ菌は大腸菌を中心とした糞便汚染指標では把握することのできない「汚染源の探索」の機能を有し、「原虫」に加えて「ウイルス」と類似した生残性を有する指標であり、大腸菌を補完して、水系の糞便汚染の評価をより広い観点から行うことのできる優れた指標であることが示された。

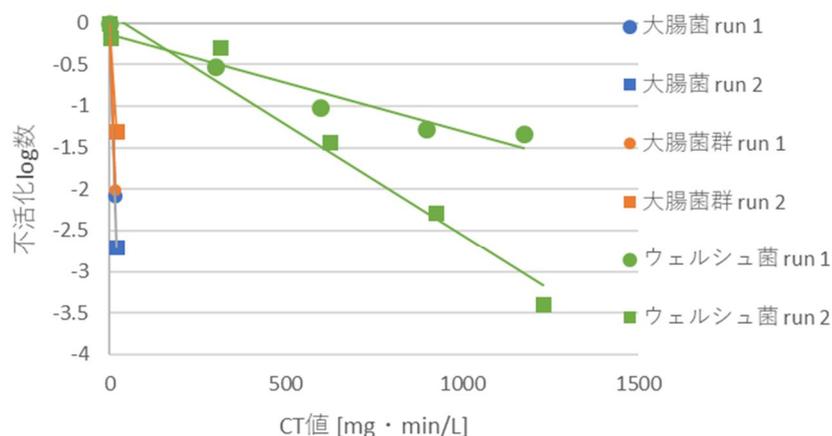


図3 PAAによる大腸菌/大腸菌群/ウェルシュ菌の不活化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中本佳奈, 野田司, 岩本和也, 橋本温
2. 発表標題 河川水中での糞便汚染指標細菌およびウイルスの挙動
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本温
2. 発表標題 定量的微生物リスク評価を用いた水道水質管理の試み
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第45回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中本佳奈, 岩本和也, 土岡宏彰, 高田真那, 橋本温
2. 発表標題 嫌気性芽胞菌のソーストラッキング指標およびウイルス指標としての特性
3. 学会等名 日本水環境学会第52回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H.Suzuki, K.Oonaka and A.Hashimoto
2. 発表標題 Inactivation of <i>Clostridium perfringens</i> in sewage water using peracetic acid preparation
3. 学会等名 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田司、広谷博史、橋本温
2. 発表標題 PMMoVおよびウェルシュ菌の河川水中での挙動
3. 学会等名 第19回環境技術学会年次大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----