

平成22年5月1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18360252
 研究課題名（和文） 水環境における消毒耐性ヒト病原微生物の出現と挙動に関する研究
 研究課題名（英文） Prevalence and behavior of human enteric pathogens in water environment
 研究代表者
 平田 強（HIRATA TSUYOSHI）
 麻布大学・環境保健学部・教授
 研究者番号：50005493

研究成果の概要（和文）：下水のクリプトスポリジウムとウイルス調査を行った。クリプトスポリジウムは夏季に多い傾向が認められた。下水からは様々な遺伝子型が検出された。ノロウイルス濃度は冬季に高く夏季に少ないが、下痢症患者の発生数と下水ノロウイルス濃度との間に関連が認められた。陰電荷膜法における膜へのウイルスの吸着、酸洗浄アルカリ誘出による膜からの回収はウイルスの種類により異なること、直径 90mm 膜の場合、下水のろ過水量は 100mL 以内とすべきことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Prevalence of Chlorine-resistant *Cryptosporidium* and noroviruses in municipal wastewater was investigated. The concentration of *Cryptosporidium* was high in August and September. Various genotypes of *Cryptosporidium* were found in wastewater. The level of noroviruses in wastewater was high in winter season and low in summer. Positive relation was found between the concentrations of noroviruses and reported cases of diarrhea, suggesting that the survey of enteric pathogens in wastewater will contribute to know the prevalence of infectious diseases. Additional study on the recovery of a virus concentration method from water using negatively-charged membrane filter revealed that the recovery was greatly dependent on not only the species of viruses but also filtration volume of water and that the filtration volume of wastewater should not exceed 100 mL when 90 mm diameter filter was used in order to avoid significant depletion of virus recovery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	10,000,000	300,000	13,000,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：塩素耐性病原微生物、クリプトスポリジウム、ノロウイルス、遺伝子解析、陰電荷膜、ウイルス回収

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

世界の先進国で、クリプトスポリジウムやジアルジアなどの原虫やノロウイルスによる水系感染症が発生している。わが国でも、クリプトスポリジウムやノロウイルスの水系感染が発生している。これらの感染症は塩素消毒した水であっても生じており、水の微生物衛生が塩素消毒で必ずしも担保されないという点で、水の微生物衛生上の大きな課題となっている。このため、水の微生物リスク評価の精度の向上や上下水処理対策の立案のために、これらの塩素耐性病原微生物の水環境における存在濃度や出現特性あるいは下水中の存在量や下水処理過程における除去性や挙動などを明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

(1) 都市下水におけるクリプトスポリジウムの遺伝子型別出現分布特性を明らかにする。
 (2) 都市下水におけるノロウイルス GI と GII の出現濃度と下水処理による除去性を評価する。
 (3) 上記 2 つに加えて、(2)の研究の推進過程で、陰電荷膜法の濃縮回収能力に問題があることが明らかになり、信頼性のある定量情報が得られないおそれがあることが明らかになったことから、陰電荷膜の濃縮回収に及ぼす下水のろ過水量の影響についても並行的に研究した。

3. 研究の方法

(1) クリプトスポリジウム調査

東京都特別区内の下水処理場の最初沈殿池流出水を対象とし、クリプトスポリジウムオーシストを個別にピックアップしたのち、遺伝子解析した。遺伝子解析は Hashimoto et al (2006) の方法に準拠した。

(2) ノロウイルス調査

東京都下の M 市の下水処理場の最初沈殿池流出水を対象とした。試料からのウイルスの濃縮回収には、Katayama et al (2002) の開発した陰電荷膜法 (HA フィルターろ過吸着+酸洗浄+アルカリ誘出) を用いた。ノロウイルス GI、GII の検出には、RT-PCR 法を用い、real time PCR 法で定量した。

(3) 陰電荷膜法のウイルス濃縮回収能調査

Katayama et al (2002) の開発した陰電荷膜法の濃縮回収能力を明らかにするために、東京都下の M 市の下水処理場最初沈殿池流出水を対象とし、異なる水量でろ過した時のウイルス回収数を比較し、ろ過水量がウイルス回収に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) クリプトスポリジウム調査

処理場 S では、計 4 年分の調査データについて解析した。その結果、*Cryptosporidium* の濃度は、顕微鏡観察により殻のみと判断したオーシストと残体あるいはスポロゾイト様内部構造が確認できたオーシストを合わせた全オーシスト、残体あるいはスポロゾイト様内部構造が確認できたオーシストともに 8 月または 9 月に統計的に有意に高かった。遺伝子型については、合計 19 試料 160 個のオーシストから 10 個の種/遺伝子型が検出された。その割合は *C. hominis*: 56.9% (91/160), *C. parvum*: 17.5% (28/160), *C. meleagridis*: 8.8% (14/160), *C. suis*: 6.3% (10/160), *C. parvum* isolate from human: 4.4% (7/160), 環境分離株: 3.1% (5/160), *Cryptosporidium* sp. pig genotype II: 1.3% (2/160), *C. parvum* isolate from mouse: 0.6% (1/160), *Cryptosporidium* sp. cervine genotype: 0.6% (1/160) および *C. andersoni*: 0.6% (1/160) であった。ヒトまたは人獣共通タイプである *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. parvum* isolate from human が全体の約 90% と高い割合を占め、*C. suis*, *C. andersoni*, *C. parvum* isolate from mouse, *Cryptosporidium* sp. pig genotype II, *Cryptosporidium* sp. cervine genotype といったヒト以外の動物を宿主とするタイプは 9.4% と少なかった。19 試料における出現頻度は、*C. hominis* が 79% (15/19) と最も高く、*C. parvum* が 68% (13/19), *C. meleagridis* が 37% (7/19), *C. parvum* isolate from human が 26% (5/19), *C. suis* が 21% (4/19), 環境分離株が 16% (3/19), *Cryptosporidium* sp. pig genotype II が 11% (2/19), *C. parvum* isolate from mouse, *C. andersoni*, *Cryptosporidium* sp. cervine genotype が 5% (1/19) であった。また、最大濃度となった 8 月、9 月にヒトを宿主とする *C. hominis* および *C. parvum* isolate from human の割合も高くなる傾向があった。

処理場 N では、5 試料から単離した計 547 個のオーシストについて遺伝子型を調査したところ、33 個 (6%) のオーシストから 6 つの種/遺伝子型が検出された。その割合は、*C. hominis*: 64% (21/33), *C. parvum*: 21% (7/33), *C. meleagridis*: 3% (1/33), *C. parvum* isolate from ferret: 6% (2/33), *C. felis*: 3% (1/33), *C. canis*: 3% (1/33) であった。処理場 S 同様、ヒトまたは人獣共通に感染するタイプが全体の約 90% となり、高い比率で存在することが明らかとなった。また、濃度が有意に高かった 1 試料の遺伝子型を調査したところ、ヒト由来の *C. hominis* が全体の 95% にも上り、処理場 S 同様、濃度が高いときヒト型の *Cryptosporidium* が多くなった。したがって、下水における濃度上昇時には集水域内で感染者が発生していたことが推測される。

一部の環境試料から分離したオーシストについて、1 または 0.5 オーシスト相当分の DNA を用いて 2 種類のプライマーセットで試験した。どちらのプライマーにおいても環境分離株での検出感度は *C.*

parvum HNJ-1 株の場合よりも明らかに低かった。また、0.5 オーシスト相当の場合、種/遺伝子型が識別できたオーシストは片方のプライマーセットを用いた場合のみであった。

下水における遺伝子型分布と河川水における分布を比較するために、河川水 3 試料について遺伝子型を調査した。計 33 個のオーシストについて遺伝子型を調査したところ、15 個 (45.5%) のオーシストから 5 つの種/遺伝子型が検出された。その割合は、*C. suis*: 66% (10/15), *Cryptosporidium* sp. pig genotype II : 13% (2/15), ヘビ分離株の *Cryptosporidium* sp. km732 : 7% (1/15), 環境分離株 : 7% (1/15) および未登録の配列 : 7% (1/15) であった。*C. suis* や *Cryptosporidium* sp. pig genotype II といったブタ由来のオーシストが全体の約 80% を占め、ヒトまたは人獣共通に感染する種が高い割合を占めた下水の分布とは異なった。

以上のように、2 箇所の下水処理場の調査ではヒトまたは人獣共通タイプのオーシストが高頻度で検出された。また、*C. hominis* は遺伝子型分布において高い割合を占めていることから、感染症統計に現れない低レベルの感染が起きていると考えられ、このような低レベルの感染を発見するには、本法のように個々のオーシストの遺伝子型を解析する手法が有効であることが明らかになった。

(2) ノロウイルス調査

ノロウイルス G1 及び G2 は最初沈殿池水全試料から検出され、A 下水処理場で、G1 は $1.7 \times 10^3 \sim 4.4 \times 10^6$ PDU/L, G2 は $1.6 \times 10^4 \sim 5.4 \times 10^6$ PDU/L の範囲で検出され (n = 34), B 下水処理場でも、G1 は $1.3 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^7$ PDU/L, G2 は $2.0 \times 10^5 \sim 8.0 \times 10^6$ PDU/L の範囲で検出された (n = 6)。

A 下水処理場における通年モニタリングにおいて、ノロウイルスの非流行期と考えられている夏季 (6~8 月) にも流行期 (12~3 月) レベルのノロウイルス濃度が検出された。

標準活性汚泥法による除去指数の幾何平均値は 3.34 log (G1, n = 34) 及び 3.84 log₁₀ (G2, n = 34), 2 段式嫌気・好気活性汚泥法では 3.32 log (G1, n = 6) 及び 3.69 log (G2, n = 6) であり、両者に有意な差異は認められなかった。

B 下水処理場全体のノロウイルス G1 及び G2 の除去指数は G1 で 2.39~>6.21 log, G2 で 3.64~>6.00 log の範囲であり、生物処理で 3.32 log (1.94~4.12 log) と 3.69 log (2.02~4.50 log), 砂ろ過処理で 0.47 log (0.03~1.50 log) と 0.90 log₁₀ (0.26~2.16 log), オゾン処理で 1.19 log (0.67~1.91 log) と 0.95 log (0.20~>1.37 log) であり、生物処理が除去に大きく寄与していることが示された。

急性胃腸炎患者報告数と最初沈殿池水中の全ノロウイルス濃度の比は、ノロウイルスの流行期と考えられている冬季で約 10⁴ PDU/L/人で 4~7 月も冬季と同じレベルにあることから、この集水域では、この比がおよ

そ 10 分の 1 に下がっていた 8~10 月を除いて、胃腸炎患者発生報告数に比例するノロウイルス感染者が生じている可能性を強く示唆している。

(3) 陰電荷膜法のウイルス濃縮回収能調査
水環境中に存在するウイルスの濃度は低い
ため、検出には濃縮操作が必要である。水量に応じてスケールアップできることや、ウイルス濃度が低い試料水に対しても適用可能であることから、膜を用いたウイルス濃縮が近年の主流になってきており、なかでも片山ら (2002) が開発した陰電荷膜法 (陽イオン添加によるウイルス粒子の膜への吸着→酸洗浄による陽イオンの洗い出しとウイルスの再吸着→アルカリ誘出) は操作が簡便であることから普及が進みつつある。

下水流入水にポリオウイルスやノロウイルスを添加したときの陰電荷膜法による回収率は、MilliQ 水や水道水に添加した時と比べ低くなるという知見や、ポリオウイルスと大腸菌ファージ Qβ では回収率が異なるなどの知見がこれまでに報告されている。しかし、Qβ とともに病原性ウイルスの代替指標として研究が進められている大腸菌ファージ MS2 の陰電荷膜への吸着率や回収率に関する情報はまだ報告されていない。

そこで本研究では、MS2 を供試ファージとし、また、共存物質のない水として MilliQ 水、共存物質の少ない水として水道水、共存物質の多い水として放流水と下水 (最初沈殿池流出水) を試料水として陰電荷膜への吸着及び陰電荷膜からの回収に関する基礎的実験を行った。その結果、MS2 の吸着率はこれまで報告されているポリオウイルスやノロウイルス、Qβ の吸着率と比較して低いことが明らかとなった。また、各試料水における MS2 の吸着率は、共存物質の量が増えるにつれて低下する現象が観察され、特に放流水と下水で低下が顕著であった。本実験で用いた放流水及び下水はあらかじめ GF/D フィルターでろ過した後、さらに HA 膜 (0.45µm) でろ過して調製している。このため、HA 膜を通過したコロイド状の有機物が添加した陽イオン (マグネシウム) とコロイド-マグネシウム複合体を形成し、コロイドと競合関係にある MS2 の吸着座をふさいだ結果、吸着率の低下が生じたものと考えられた。

陰電荷膜に吸着した MS2 を膜から誘出させることは困難であり、MilliQ 水からの回収率よりも下水や放流水からの回収率の方が低かった。ポリオウイルス、ノロウイルス、Qβ を用いた研究においても同じ傾向が報告されており、ウイルスの回収率は原水水質の影響を強く受けることが確認された。ファージ濃縮過程において、ファージの誘出を阻害する物質も濃縮されているのではないかと考えられた。

水環境中のウイルスは低濃度であり、その検出には濃縮操作が必要である。これまで陽電荷膜や陰電荷膜を用いた濃縮方法が検討されてきたが、その中で 2002 年に片山らが開発した陰電荷膜法（試料水への $MgCl_2$ 添加による膜へのろ過吸着、酸洗浄、アルカリ誘出）が非常に有効な方法の 1 つとして挙げられている。しかし、膜を用いた濃縮操作では試料水中に含まれている夾雑物がウイルス回収に影響を及ぼすことが報告されている。

そこで本研究では、陰電荷膜法について急性胃腸炎の主な原因であるノロウイルス genogroup 1 及び 2 (以下, G1 及び G2) を対象とし、ろ過水量が下水処理場の最初沈澱池流出水からのウイルス回収に及ぼす影響について調べた。

その結果、直径 90mm の HA フィルターの場合、ろ過水量 100mL のときのウイルス回収量に対する、各ろ過水量のウイルス回収量比で評価すると、ろ過水量 10~100mL の範囲で、ろ過水量とウイルス回収量比との間に比例関係が見られた（回帰式: $y = 0.015x^{0.903}$ $r = 0.865$ (G1), $y = 0.0047x^{1.19}$ $r = 0.928$ (G2))。しかし、ろ過水量 200mL になるとウイルス回収量比に減少が見られ、その減少傾向は 300mL になるとさらに顕著であった。そこで試料水量 300mL の場合について、ろ液を 100mL ずつ順次集め、ろ液に漏出したウイルス量を測定した。漏出量が最も多かったのは G2 の 200~300mL であったが、漏出率は 15.6% であり、HA フィルターのウイルス捕捉能力が大きく減少したわけではなかった。

次に、試料水 300mL をろ過した HA フィルターをアルカリ誘出した後、さらにそのフィルターをアルカリ誘出液中に浸して 1 分間超音波処理し、ウイルスの誘出の向上を試みたが、ウイルスは回収されなかった。

このように、下水のろ過水量が 100mL を超えると、フィルターに捕捉されたウイルスの誘出が大きく妨害されるようになることから、定量値に信頼性のある評価ができるのはろ過水量 100mL までである。直径 90mm のろ過水量 100mL は、単位面積当たりでは $2.3mL/cm^2$ に相当する。下水試料で異なる大きさの HA フィルターを用いて定量的な調査を行う場合は、このろ過水量以内とする必要がある。

この実験的研究で追加的に得られた成果は、陰電荷膜法を用いてウイルス汚染を定量的に把握するには、ろ過水量をどれだけの量にするのが非常に重要であることを強く示している。今後、各種の水について、同様の検討と、回収率に及ぼす水質の影響の定量化が必要であり、陰電荷膜法をウイルス汚染の定量的評価に使用するために早急に取り組むべき新たな課題といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

①橋本温、森田重光、平田強: FISH 法—蛍光抗体染色法を併用したクリプトスポリジウムの判別の容易化、水環境学会誌 32(5), 267-272 (2009)

〔学会発表〕(計 1 件)

①平田強、関本英理子、高田瞬: 陰電荷膜によるウイルス回収に及ぼすろ過水量の影響、第 61 回全国水道研究発表会、2010, 5. 19-21 新潟市

〔図書〕(計 1 件)

平田強編著、紫外線照射—水の消毒への適用性—, 技報堂 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 強 (HIRATA TSUYOSHI)

麻布大学・環境保健学部・教授

研究者番号: 50005493

(2) 研究分担者

橋本温 (HASHIMOTO ATSUSHI)

阿南工業高等専門学校・講師

研究者番号: 5610199922

(3) 連携研究者

小澤香織 (OZAWA KAORI)

麻布大学大学院・環境保健学研究科・修士課程学生

守屋孝志 (MORIYA TAKASHI)

麻布大学大学院・環境保健学研究科・修士課程学生

鈴木裕之 (SUZUKI HIROYUKI)

麻布大学大学院・環境保健学研究科・修士課程学生