

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：40115

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560031

研究課題名(和文) 幼児用簡易プールを例とした生活環境メタゲノミクスへの挑戦

研究課題名(英文) Challenge to life environmental metagenomics; a case study of children's paddling pool waters

研究代表者

澤辺 桃子 (Toko, Sawabe)

函館短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：10531121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：簡易プールでの水遊びは、塩素消毒が不十分なことから下痢性疾患のリスクを増大させる。そこで、水遊び後の水の細菌叢はどのように変化するかを調査した。衛生指標となる細菌数と使用人数との相関関係は見られなかった。次にヒトに対して病原性を有する細菌に注目してメタゲノム解析を行った。その結果、水遊び後の水はヒトの皮膚および腸内細菌による微生物汚染と合わせて、幼児の年齢とその行動によっては土壌細菌による汚染も生じ、病原菌が含まれることも明らかとなった。簡易プールの衛生管理にはヒトと環境の両方からの汚染に注意すべきことを科学的に示した。

研究成果の概要(英文)：Insufficient chloric sterilization of children's paddling pool waters increases the risk of diarrheal illness. Therefore, we investigated how the microbiota changes after pool use by children. Although indicator bacteria were evaluated in each sample, there was no correlation in the number of bacteria and the number of users observed. Next we applied 16S rRNA gene-based metagenome analysis to understand the dynamics of microbiota in the pool waters, especially regarding the bio-contamination by potential pathogens. The paddling pool water microbiota is likely to be a consortium of microbiota from human intestines and skin. Interestingly, the ratio of the microbiota was different depending on the age of the child, which means the pool water was also bio-contaminated by soil microbiota as a result of the children's behavior. We suggest the importance of sanitary measures in paddling pool waters after bio-contamination from both humans and the environment.

研究分野：微生物学

キーワード：メタゲノム解析 細菌叢 簡易プール

### 1. 研究開始当初の背景

簡易プールを用いた水遊びは、幼児教育における夏場の効果的な屋外活動である。水に慣れ、体力を養い、季節感を学ぶなどの目的で、保育所および幼稚園で広く取り入れられている。また、地域の子育て支援において欠かせない存在となった「子育てサロン」などでも簡易プールを用いた水遊びが行われている。一方で、簡易プールは、遊泳プールとは異なり、明確な衛生基準が設定されていないことから、病原性大腸菌等による集団感染の原因となることが指摘されている。2012年8月には、長野県、岡山県の保育所内で病原大腸菌 O26 による集団感染が起きており、奈良県では、簡易プールによる O26 感染拡大の事例もある。また、(財)東京顕微鏡院 伊藤 武氏の報告(環境衛生と微生物検査の葉「es」NO. 050)によると、1998~2009年の12年間における O26 による集団感染症報告件数 66 件のうち、54 事例が保育所、4 事例が幼稚園、その他は小学校、大学、家庭などとなり、圧倒的に保育所での事例が多く、幼児用プールを介した感染が主な原因に挙げられている。病原大腸菌 O26 は、O157 とは異なり、溶血性尿毒症候群(hemolytic uremic syndrome: HUS)の発症はみられず、重症化はないとされているが、家族や接触者への2次感染が多く見られ、感染力が非常に強いといわれている。これらの対策として、保育所では、「保育所における感染症対策ガイドライン(厚生労働省)」に従ってプールの塩素消毒が推奨されているが、薬液処理による幼児の健康被害への懸念から敬遠されているのが実情である。そのため、簡易プール内の水を入れ換えるなどの代替策がとられているが、具体的な水交換の目安などはなく、管理者の判断に任されている。簡易プールの管理者および保護者の多くは、微生物および病原微生物に関する知識を十分に持っているとは言えず、適切な衛生対策が行われていると断言するのは難しいのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究は簡易プール使用時の細菌学的リスクアセスメントを行うことで適切な衛生対策を行うための科学的根拠を示し、簡易プールを介した病原細菌による集団感染防止に寄与することを目的とする。また、メタゲノム解析を用いて簡易プール全体の細菌叢を把握し、微生物の相互関係を知ることで、感染条件への理解を深め、管理者および保護者への微生物に関する知識の啓蒙と集団感染防止に役立てたい。

### 3. 研究の方法

2013年および2014年の7月中旬~8月上旬に2か所の協力施設にて乳幼児が水遊びをした後のプール水を試料とした。シート培地(サニ太くん、JNC株式会社)を用いて一般

細菌数および大腸菌・大腸菌群数の測定、採水日の気温および利用のべ人数を記録した。なお、使用した水道水からは、一般細菌数、大腸菌、大腸菌群のいずれも検出しないことを確認した。さらに簡易プール使用者の体表などから混入した有機物量を把握するために全有機炭素(TOC)を測定した。これらの得られた結果について相互関連性を整理することで病原細菌による集団感染に関する頻度、可能性、重大度からリスク評価基準を明確にしてリスクの優先度を暫定的に設定することを試みた。

メタゲノム解析については、水遊び後、ポリタンクにて約5Lの水を採取し、加圧容器DV-5(Advantec)および窒素ガスによる加圧ろ過を行った。ろ過用フィルターには、ステリベックスフィルター(Merck Millipore Co.)を用いた。ろ過後のステリベックスフィルターは、細菌ゲノムDNA抽出を行うまで-20℃に冷凍保管した。ステリベックスフィルターの片側に1mLシリンジを装着し、リゾチーム(L7651, Sigma-Aldrich)およびリゾスタフィン(L7386, Sigma-Aldrich)溶液にて菌体溶解後、Wizard genomic DNA purification kit (Promega)にてDNA抽出した。Quantus™ と QuantiFluor™ ONE dsDNA System (Promega)を用いて、DNA濃度を測定し、メタゲノム解析試料とした。16S rRNAのV1-V2領域配列を454 GS Junior (Roche Applied Science)で解析し、1サンプルあたり3000リードの配列を得て細菌叢の変化、使用者の年齢による差異などを解析した。

### 4. 研究成果

細菌学的リスクアセスメントとして、一般細菌数、大腸菌群数、大腸菌数、TOCを測定し、気温および使用人数について記録した結果は次の通りである。気温は25~30℃、使用人数は4~16人の範囲であった。一般細菌数と使用人数に正の相関関係は全く見られず、大腸菌群数および大腸菌数についても使用人数との相関関係はなかった。また、簡易プール使用者の体表などから混入した有機物量を把握するために測定したTOC値は2.2~6.1 mg/Lとなり、すべての採水日で上昇し、水質基準値である3 mg/Lを上回った採水日もあった。しかし、使用人数とTOC値の間にも相関関係は見られなかった。

上述の通り一般細菌数、大腸菌群数、大腸菌数、TOC、気温ならびに使用人数において、それぞれの間で相関関係を示す結果は得られず、これらの項目の中から、リスク評価における確実な指標を選抜することはできなかった。これは、環境条件に関わらず簡易プールを使用することで衛生リスクが生じ、使用人数の多少に関わらず、2人以上が使用することでヒト-ヒト感染のリスクが生じることを示唆している。そこで、「遊泳用プールの衛生基準(厚生労働省 健発第0528003号平成19年5月28日)」の中で、定められて

いる(1) 大腸菌は検出されないこと、および(2) 一般細菌は200 CFU/mL以下であること、の2項目をハザードとして、リスク発生(感染)の可能性を設定した。病原性大腸菌が検出された場合、感染の可能性を「確実」とし、糞便汚染指標である大腸菌が検出された場合を「高い」、一般細菌が200 CFU/mL以上で大腸菌群が検出された場合を「可能性がある」、遊泳用プール基準を満たす一般細菌200 CFU/mL以下を「ほとんどない」と区分した(表1)。重篤度は、病原大腸菌による集団感染により死亡事例の発生を「致命的」とし、「重大」、「中程度」、「軽度」と区分した。頻度はヒト同士の接触頻度とし、2人以上でヒト-ヒト感染のリスクが生じることから、2人以上を「頻繁」に区分し、0~1人を「ほとんどない」として区分した。「軽度」または「ほとんどない」の区分に対しても点数を「1」として設定しているのは、絶対的な安全であるゼロは存在しないという前提からである。対策のリスクレベル(優先度)を決めるリスク評価は、加算方式を用いて重篤度、可能性、頻度の評価点数合計から設定した(表2)。評価点数12~20点をリスクレベルとし、簡易プールを使用した水遊びを直ちに中止するものである。健康被害が生じ、病原性大腸菌が検出されたケースが想定される。評価点数9~11点はリスクレベルとなり、健康被害は生じていないが、病原性大腸菌が検出されたケースが含まれ、消毒等の具体的な改善策を示す必要がある。評価点数6~8点は、糞便汚染指標となる大腸菌は検出されないケースが相当する。水遊び前の体調確認や水遊び前後のシャワーなどは忘れずに行うことは必要である。評価点数5点以下は、水遊びを行わなかった、あるいは、使用人数が1人であったケースとなる。これを基に簡易ミニプールでの水遊びが行われた各日の衛生リスク評価を行い、レベル(多少問題がある)もしくはレベル(重大な問題がある)と判定した。

表1 簡易プール使用における各リスク要素の区分と点数およびその目安

重篤度	点数	内容の目安
致命的	10	集団感染による死亡
重大	6	入院
中程度	3	通院
軽度	1	軽症もしくは健康被害なし
感染の可能性	点数	内容の目安
確実	6	病原大腸菌が検出される
高い	4	大腸菌が検出される
可能性がある	2	一般細菌200CFU/mL以上で大腸菌群が検出される
ほとんどない	1	一般細菌200CFU/mL以下
接触の頻度	点数	内容の目安
頻繁	4	使用人数2人以上
ほとんどない	1	使用人数0~1人(手足のみでの水遊びを含む)

表2 簡易プール使用におけるリスク評価(評価点数、内容、取扱基準)

リスクレベル	評価点数合計	評価内容	取扱基準
IV	12~20	直ちに解決すべき問題がある(受入不可能なリスク)	直ちに中止
III	9~11	重大な問題がある(リスク低減対策が必要)	優先的に改善する
II	6~8	多少問題がある(リスク低減対策が必要)	計画的に改善する
I	8以下	必要に応じリスク低減を実施する(直ちにリスク低減対策を要しない)	残っているリスクに応じて教育や設備配置をする

メタゲノム解析では10種類(T施設1~7, F施設1~3)の試料をそれぞれ細菌の各系統群(門)に分類したところ、プロテオバクテリア門が最も多く(76.2~100%)、次いでファームキ्यूテス門、バクテロイデス門、アクチノバクテリア門であった。デインコッカス・サーマス門も全ての試料で検出され、これら以外の系統群はほとんどみられなかった(図1)。検出された系統群はヒトの腸内および皮膚に存在することが知られているものである。

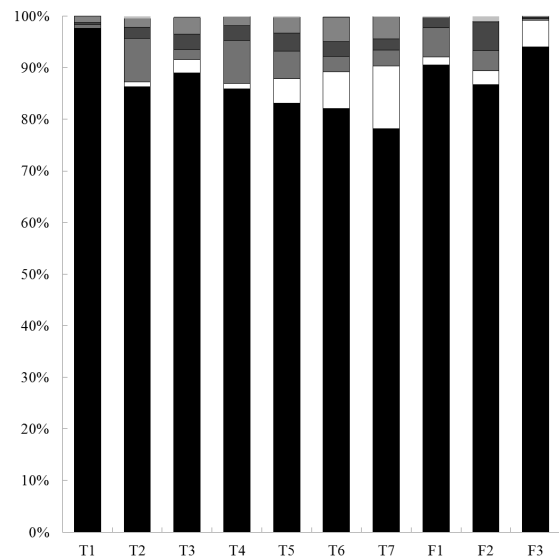


図1 系統群(門)の構成

■ Proteobacteria, □ Bacteroidetes, ■ Firmicutes, ■ Actinobacteria, ■ Deinococcus-Thermus, □ others.

プロテオバクテリア門では、腸内細菌科や多くの病原微生物を含む系統のガンマプロテオバクテリアの割合が50~97%と高く、ついで土壌由来で様々な化合物を分解できる能力をもつ細菌が含まれる系統のベータプロテオバクテリアの割合が高く、アルファプロテオバクテリア、デルタプロテオバクテリアの順であった。イプシロンプロテオバクテリアは、プロテオバクテリア門の中で1%以下しか含まれていなかったが、ヒトに対する病原性をもつ *Campylobacter spp.* (*C. coli* and *C. ureolyticus*) がみられた。しかし、サンプルごとの系統群比率は大きく異なり、使用者の年齢構成や衛生指標との関連性は見られず、PCoAプロット(Weighted UniFrac analysis)もサンプルごとに散在する結果となった(図2)。

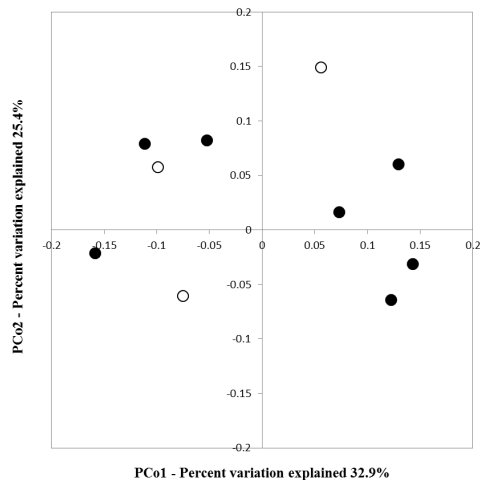


図 2 PCoA プロット (Weighted UniFrac analysis) : T 施設, : F 施設

次にF施設の試料について、プロテオバクテリア門の構成を綱レベルで比較した。F施設は、年齢ごとにプールを使用しており、F1試料は1~2才、F2試料は3~5才の乳幼児が使用したものである。3~5才児は、1~2才よりも簡易プールを出入りして水遊びをすることが多いことから、土壌細菌が多く含まれるベータプロテオバクテリアの割合が高くなったと考えられる(図3)。

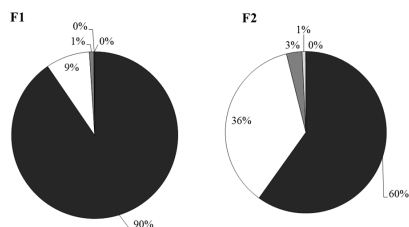


図 3 試料 F1 と F2 における系統群 (綱) での構成細菌比較

■ Gammaproteobacteria, □ Betaproteobacteria, ■ Alphaproteobacteria, □ Deltaproteobacteria, ■ Epsilonproteobacteria.

これら土壌細菌の中にはヒトに対する病原菌を含むバークホルデリア属やナイセリア属菌のリードがみられ、幼児の水遊びの方法によっては、土壌細菌由来の病原体と接触する可能性がある。

以上の結果から、簡易プールにおける水遊びでは、ヒトの皮膚および腸内細菌による微生物汚染とともに遊び方によっては、土壌細菌による汚染も生じることが明らかになった。簡易プールの衛生管理にはヒトおよび環境の両方からの汚染に注意することを明確に示すことができたことが本研究の最大の成果となる。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

澤辺桃子, 山田みつ子, 膨張式簡易プール水の衛生リスクアセスメント, 函館短期大学紀要 2014; 40, 21-26.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤辺 桃子 (Toko Sawabe)  
研究者番号: 10531121

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: