

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560641

研究課題名(和文)微生物群集構造解析と同位体分析の結合による水汚染ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Pollution dynamics of groundwater analyzed by microbial community structures and stable isotopes

研究代表者

西田 継 (NISHIDA, Kei)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：70293438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ネパールのカトマンズ地域で浅層地下水汚染の調査を行い、雨水浸透や水位上昇等の水文学的变化が微生物汚染の引き金になること、複数地点の地下水に病原性微生物が混入しており、家畜排泄物も一因であることを明らかにした。また、地理的条件と水利用形態の情報を加味した解析により、人口と下水施設の老朽化が重なった地区に汚染が偏る可能性を地理統計学的に推定するとともに、地下水汚染に加えて、慢性的な水不足と断続的な給水、水道水の貯蔵、これらが引き起こす水源確保の不安定さが、下痢症発症と関連することを医学統計学的に示した。従って、いわゆる見かけ上の衛生施設整備率の向上は健康影響の低減に必ずしも直結しないと結論づけた。

研究成果の概要(英文)：Field surveys of shallow groundwater were conducted to collect primary data of hydrology and water quality including microbial community structures and stable isotopes in Kathmandu, Nepal. Hydrologic factors (rainwater infiltration and water table increase) triggered the microbial contamination. Pathogens (BSL 2 or more) prevailed in multiple wells, livestock feces were supposedly one of the pollution sources in the area. Geostatistical analysis showed that districts with both dense population and damaged sewer might be hot spots of the pollution. Multivariate analysis showed that, in addition to water quality, chronic shortage and intermittent supply of piped water, storage of the water and instability of source were significantly related to diarrhoea occurrence. Thus, apparent improvement of sanitary infrastructures does not necessarily contribute for reducing health impact effectively and a master plan should be established on the basis of understanding the diverse water use.

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：国際研究交流 ネパール 地下水 微生物汚染 安定同位体比

1. 研究開始当初の背景

アジアでは現在も安全な飲み水を手に入れる人は限られており、水が関わる健康影響を減らすことは最優先課題であるといえる。世界各国が定めたミレニアム開発目標では、2015年までに「安全な飲料水及び衛生施設を継続的に利用できない人の比率を半減」させ、「5歳未満児の死亡率を1/3」にするとしている。それに対し、例えば、人口集中の著しいネパールのカトマンズ市内では、5歳未満児死亡率は5.1% (日本は0.4%) であり、その原因の20%である下痢に深く関わる水系感染症の対策は急務である (UNICEF, 2010) にもかかわらず、表流水と灌漑水道のほぼ全て、井戸水の多くが深刻な糞便汚染の影響を受けていることが確認されている (Warner ら, Hydrogeology Journal, 2007)。

2. 研究の目的

水系の微生物汚染に対して、一般水質、微生物群集構造解析、安定同位体比分析等の結果を統合し、アジアモンスーン域において時空間的に変化する水汚染の原因を解明する。水汚染が深刻で、代表者らが研究体制を整備しているネパールのカトマンズ盆地をケーススタディとする。特に、現地で生活用水としての依存度が著しく高い浅層地下水を対象とし、健康関連微生物に注目する。本研究の成果として得られる知見と方法論が、モデル解析等により発展、一般化され、他の地域や水汚染現象へも応用できる水資源管理と健康管理の基盤作りを目指す。解析の具体的な対象は以下の通りである。

- (1) 水文環境の同位体等による分析: 安定同位体比を水文トレーサーとして活用し、河川と地下の水文環境を可視化する
- (2) 微生物群集構造解析: 微生物の群集構造を解析する分子生物学的な手法を開発し、汚染に関わる微生物相の全体像を把握する
- (3) 最後に、群集構造と水文環境の情報を結合し、時空間的に変化する病原微生物汚染のダイナミズムの解明に発展させる

3. 研究の方法

地下水、雨水、河川水等の水文・水質に関する1次データと、気象、地形、土地利用等の2次データを主に海外現地調査により取得し、地下水流動と微生物汚染の情報を抽出した。

1年目の平成23年度は、浅層地下水の現地採取を乾季(5月)と雨季(8月末~9月)に行った。その後、特に季節変化の傾向が強く現れる地点を対照地点とともに選定し、現地の連携機関の協力を得て、23年雨季后半(9月)から24年雨季終了まで、水質と水位の毎月観測を実施した。さらに、23年の乾季(1月)と24年の雨季(9月)に現地調査を追加実施した。

現地調査終了後に随時日本の実験室に試料を持ち帰り、一般水質と水および溶存酸素成分の安定同位体比を分析した。

微生物群集構造解析については、1年目にクローンライブラリ法、2年目にDNAマイクロアレイ法による分析を重点的に実施した。その際、現地における遺伝子試料の前処理方法を改良し、抽出と検出の効率を格段に向上させた。

4. 研究成果

各年度の主な成果は以下の通りである。
平成23年度: 過去の浅層地下水の乾季及び雨季データに今回のデータを加えて統計解析を行った結果、雨季に大腸菌濃度が高くなる地点とそのような傾向が見られない地点が存在することが判った。また、対象地域で発生している地下水の微生物汚染は非系統的かつ局所的である可能性が高く、原因究明のために従来の地理統計学的方法論を直接適用するのは困難と判断し、当初計画していた既存モデルによる水文環境の解析方法を変更して、影響因子の層別化と水質トレーサー解析により、微生物の消長に影響する水移動の概要を把握することとした。水中微生物の遺伝子解析に関する予備的知見としては、クローンライブラリ法により、汚染度が高い水試料では群集構造の多様性が減少し易い可能性があること、高病原性種が検出され易い傾向にあること、などが示された。

平成24年度: 現地連携機関に依頼し、数地点について雨季終了時期まで毎月水質と地下水位データを継続的に取得した結果、雨季は乾季に比べて指標微生物濃度が統計学的に有為に高くなり、期間雨量とも良く対応すること、地下水位の変動が水質に影響を及ぼしている地点は透水性が高いか、井戸の構造が古い可能性があることが分かった。また、一般水質を用いて地下水への下水混入率を試算した。微生物群集構造については、クローンライブラリ法により1年目からさらに詳しい解析を進め、逆に汚染度が低い地点に特徴的な種を発見した。また、DNAマイクロアレイ法により、供試試料の大部分に病原性細菌(合計71種)が存在すること、そのうち約70%がバイオセーフティーレベル2であること、複数地点に共通する属が見られること、動物の排泄物も一因であることなどを確認した。

平成25年度: 取得データを詳細かつ統合的に解析するため、地理的条件と水利用形態の情報を加味して、汚染機構と影響のモデル化を試みた。その結果、人口と下水施設の老朽化が重なった地区に汚染が偏る可能性を地理統計学的に推定した。また、地下水汚染に加えて、慢性的な水不足と断続的な給水、水道水の貯蔵、これらが引き起こす水源確保の不安定さが、下痢症発症と関連することを医学統計学的に示した。従っ

て、いわゆる見かけ上の衛生施設整備率の向上は健康影響の低減に必ずしも直結せず、短期的には適切な衛生行動、中期的には水源安全性の分類、長期的には下水施設改修など、地域の状況を理解した水管理計画が重要であると結論づけた。

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 13 件)

Sadhana Shrestha, Takashi Nakamura, Rabin Malla and Kei Nishida, Seasonal variation in the microbial quality of shallow groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal. *Water Science & Technology*, DOI : 10.2166/ws.2013.213, 2013 (査読あり)

Salina Shrestha, Yoko Aihara, Kanako Yoden, Zentaro Yamagata, Kei Nishida, Naoki Kondo, Access to improved water and its relationship with diarrhoea in Kathmandu Valley, Nepal: a cross-sectional study. *British Medical Journal Open*, 3, DOI : 10.1136/bmjopen-2012-002264, 2013 (査読あり)

Salina Shrestha, Sadhana Shrestha Malla, Yoko Aihara, Naoki Kondo, Kei Nishida, Water quality at supply source and point of use in the Kathmandu Valley. *Journal of Water and Environment Technology*, 11, 331-340, 2013 (査読あり)

Hashimoto M, Suetsugi T, Sunada K, Ichikawa Y, Kondo N, Nishida K, Estimation of diarrhoea incidence through flooding simulation in low-income community areas in Dhaka City, Bangladesh. *South East Asia Water Environment*, 5, 67-73, 2013 (査読あり)

Do Thu Nga, Yasushi Sakamoto, Futaba Kazama, Kei Nishida, Application of Material Flow Analysis in assessing nutrient fluxes in Day - Nhue river basin, Vietnam. *South East Asia Water Environment*, 5, 41-46, 2013 (査読あり)

Yureana Wijayanti, Takashi Nakamura, Kei Nishida, Eiji Haramoto, Yasushi Sakamoto, Groundwater nitrate contamination in small agriculture area: assessing the source and process using isotopes and ions. *Journal of Japan Society of Civil Engineers B1*, 69, 4, 223-228, 2013 (査読あり)

Yureana Wijayanti, Takashi Nakamura, Kei Nishida, Eiji Haramoto, Yasushi Sakamoto, Seasonal differences and source estimation of groundwater nitrate contamination. *Journal of Water*

and Environment Technology, 11, 3, 163-174, 2013 (査読あり)

Takashi Nakamura, Saroj Kumar Chapagain, Vishnu Prasad Pandey, Ken'ichi Osaka, Kei Nishida, Sadhana Shrestha Malla, Futaba Kazama, Shallow groundwater recharge altitudes in the Kathmandu Valley. *Kathmandu Valley Groundwater Outlook*, 39-45, 2012 (査読あり)

Yasuhiro Tanaka, Kei Nishida, Takashi Nakamura, Saroj Kumar Chapagain, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Kazuhiro Mori, Yasushi Sakamoto, Futaba Kazama, Characterization of microbial communities distributed in the groundwater pumped from deep tube wells in the Kathmandu Valley of Nepal. *Journal of Water and Health*, 10, 1, 170-180, DOI:10.2166/wh.2011.086, 2012 (査読あり)

Yureana Wijayanti, Takashi Nakamura, Kei Nishida, Eiji Haramoto, Yasushi Sakamoto, Identification of groundwater recharge and nitrate pollution in the Kanegawa Alluvial Fan of the Kofu Basin, Japan, using stable isotopes and ions. *Annual Journal of Hydraulic Engineering*, 56, 199-204, 2012 (査読あり)

橋本雅和, 末次忠司, 砂田憲吾, 市川温, 近藤尚己, 西田継, バングラデシュ・ダッカにおける氾濫解析のための主要氾濫因子に対する感度分析に関する研究, *河川技術論文集*, 18, 487-492, 2012 (査読あり)

Eiji Haramoto, Kaoru Yamada, Kei Nishida, Prevalence of protozoa, viruses, coliphages and indicator bacteria in groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105, 12, 711-716, DOI : 10.1016/j.trstmh.2011.08.004, 2011 (査読あり)

Nga Do-Thu, Antoine Morel, Hung Nguyen-Viet, Phuc Pham-Duc, Kei Nishida, Thammarat Kootattep, Assessing nutrient fluxes in a Vietnamese rural area despite limited and high uncertainty data. *Resources, Conservation and Recycling*, 55, 9-10, 849-856, DOI : 10.1016/j.resconrec.2011.04.008, 2011 (査読あり)

[学会発表](計 19 件)

Nishida Kei, Water Research Needs You (Plenary Speaker). 1st International Young Researcher's Workshop on River

Basin Environment and Management, 2014.2.9, Asian Institute of Technology, Thailand

Sadhana Shrestha, Nishida Kei, Risk of diarrhea from shallow groundwater contaminated with enteropathogens in the Kathmandu Valley, Nepal. 1st International Young Researcher's Workshop on River Basin Environment and Management, 2014.2.9, Asian Institute of Technology, Thailand

Sadhana Shrestha, Takashi Nakamura, Eiji Haramoto, Kei Nishida, Estimating health risk from enteropathogenic microorganisms in shallow groundwater of 40 Kathmandu Valley, Nepal. Water and Environment Technology Conference 2013, 2013.6.16, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan

西田 継, ネパール・カトマンズの水環境汚染と健康影響(招待講演). 地球惑星科学連合 2013 年大会, 2013.5.22, 日本、千葉、幕張メッセ

Sei K, Hinoura T, Miyauchi K, Chapagain SK, Matsuzawa H, Nakamura T, Tanaka Y, Inoue D and Nishida K, DNA MICROARRAY ANALYSIS OF BACTERIAL PATHOGENS IN SHALLOW WELL GROUNDWATER IN THE KATHMANDU VALLEY, NEPAL. 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 15-20 Sep 2013, The Majestic Palace Hotel, Florianopolis, Brazil

Daisuke Inoue, Noriko Suzuki, Takuji Hinoura, Kaori Miyauchi, Junqin Pang, Saroj K. Chapagain, Hiroaki Matsuzawa, Yasuhiro Tanaka, Michihiko Ike, Kei Nishida and Kazunari Sei, Comprehensive detection of bacterial pathogens in the shallow well groundwater in Kathmandu Valley, Nepal, using a DNA microarray. The 4th IWA Asia-Pacific Young Water Professionals Conference, 2012.12.8, Miraikan, Tokyo, Japan

Masakazu Hashimoto, Tadashi Suetsugi, Kengo Sunada, Yutaka Ichikawa, Naoki Kondo and Kei Nishida: Estimation of diarrhoea incidence through flooding simulation in low-income community areas in Dhaka City, Bangladesh. The 10th International Symposium on Southeast Asian Water Environment, 2012.11.10, Hilton Hanoi Opera Hotel, Hanoi, Vietnam

Nakamura, T., K. Osaka, K. Nishida, S. K. Chapagain, Y. Hiraga and F. Kazama, Nitrate-organic carbon relationship in groundwater denitrification in Kathmandu Valley, Nepal. The 10th

International Symposium on Southeast Asian Water Environment, 2012.11.9, Hilton Hanoi Opera Hotel, Hanoi, Vietnam

Shrestha S, Aihara Y, Kanako Y, Yamagata Z, Nishida K, and Kondo N, Water Use, Sanitary Conditions and Water Borne Diseases in the Kathmandu Valley, Nepal. The 44th Asia Pacific Academic Consortium for Public Health Conference, 2012.10.15, University of Colombo, Colombo, Sri Lanka.

Shrestha S, Aihara Y, Kondo N, Kanako Y, Yamagata Z and Nishida K, Impact of Water Use on Diarrhoeal Diseases in the Kathmandu Valley Nepal. Water Environment and Technology Conference 2012, 2012.6.30, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Sadaaki Shimura, Sadhana Shrestha Malla, Akiko Sakamoto, Takashi Nakamura, Yasuhiro Tanaka, Hiroaki Matsuzawa, Eiji Haramoto, Naoki Kondo, Futaba Kazama, Yasushi Sakamoto, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Kei Nishida, Analyzing faecal contamination of shallow groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal. Water and Environment Technology Conference 2012, 2012.6.30, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Eiji Haramoto, Sadaaki Shimura, Takashi Nakamura, Ken'ichi Osaka, Kei Nishida, Yasushi Sakamoto: Occurrence of waterborne pathogens in aquatic environments in the Kathmandu Valley, Nepal. 112th General Meeting of American Society for Microbiology, 2012.6.18, Moscone Convention Center, San Francisco, USA

井上 大介、日野浦拓之、宮内華織、Saroj K Chapagain、松澤宏朗、中村高志、田中靖浩、西田 継、清和成、ネパール・カトマンズ盆地の浅井戸地下水における病原性細菌分布の DNA マイクロアレイ解析、第 47 回日本水環境学会年会、2013.3.11、日本、大阪、大阪産業大学

日野浦拓之、鈴木倫子、宮内華織、龐俊琴、Saroj K Chapagain、松澤宏朗、田中靖浩、井上 大介、池道彦、西田 継、清和成、DNA マイクロアレイを用いたネパール・カトマンズ盆地の地下水における病原性細菌汚染の解析、水処理生物学会第 49 回大会、2012.11.24、日本、東京、北里大学

原本英司、北島正章、西田 継：ネパール・カトマンズ盆地の水試料を対象としたアイチウイルスの定量および遺伝子解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012.11.14、日本、大阪、大阪国際会議場
相原洋子、Salina Shrestha、近藤尚己、風間ふたば、西田 継、山縣然太郎 . ネパー

ルの 5 歳未満児の下痢罹患と上下水道施設へのアクセス：2001～2011 年の国民健康調査からの検討、第 27 回日本国際保健医療学会、2012.11.4、日本、岡山、岡山大学

志村禎章, Sadhana Shrestha Mall a, Saroj K Chapagain, 坂本明子, 中村高志, 尾坂兼一, 原本英司, 近藤尚己, 井上大介, 清和成, 坂本康, 風間ふたば, 西田継: カトマンズ盆地における都市地下水の糞便汚染の解析、日本地球惑星科学連合 2012 年大会、2012.5.24, 日本、千葉、幕張メッセ

松澤宏朗, 田中靖浩, 中村高志, 尾坂兼一, 遠山忠, 高瀬晶弘, Saroj K Chapagain, 井上大介, 清和成, 森一博, 坂本康, 風間ふたば, 西田継. ネパールカトマンズ盆地における地下水中の微生物群集解析、日本地球惑星科学連合 2012 年大会、2012.5.24, 日本、千葉、幕張メッセ

中村高志, 尾坂兼一, Saroj K Chapagain, 志村禎章, 西田継, 坂本康, 風間ふたば、カトマンズ盆地の都市地下水の水質・水文条件が硝酸イオン濃度分布に与える影響、日本地球惑星科学連合 2012 年大会、2012.5.24, 日本、千葉、幕張メッセ

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.facebook.com/ICRE.UY>

6. 研究組織

(1)研究代表者：西田 継 (NISHIDA, Kei)
山梨大学医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：70293438

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者：清 和成 (SEI, Kazunari)
北里大学医療衛生学部・教授
研究者番号：80324177