

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420534

研究課題名(和文) ノロウイルスおよびヒトソーストラッキングの指標としての嫌気性芽胞菌の有効性

研究課題名(英文) Efficacy of anaerobic spores as indicator for Noro virus and microbial source tracking

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気性芽胞菌のノロウイルスなどの腸管系ウイルス指標およびソーストラッキング指標としての有効性を評価した。

海域の調査で、大腸菌はノロウイルス陽性11試料中4試料のみ陽性であったのに対して、嫌気性芽胞菌は全ての試料で検出され、ノロウイルスG2と高い相関が認められた。また、ヒト、動物の糞便由来試料の調査で、嫌気性芽胞菌cpe遺伝子保有株は、ヒト由来排水に偏在し、ヒト糞便汚染のソーストラッキング指標となる可能性が示された。ハンドフォード改良寒天培地のエリスロマイシン濃度は嫌気性芽胞菌の検出に影響を与えることが示され、力価を現行の半減程度に削減することで改善できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the efficacy of anaerobic spores (*Clostridium perfringens*) as indicator for intestinal virus and microbial source tracking were investigated.

Concentrations of *C. perfringens* in coastal sea water were significantly correlated between Norovirus G2. *C. perfringens* were detected from all samples of Norovirus positive (11 samples), whereas, *E. coli* were only detected from only 4 of 11 Norovirus positive samples. Because of cpe positive *C. perfringens* isolates were detected from only human related wastewater samples, detection of cpe positive isolates were useful microbial source tracking indicator as human fecal pollution of surface waters. Concentration of Erythromycin in Handford Agar, which used for separation culture of *C. perfringens* from water samples, affected to growth and detection of *C. perfringens*.

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 ノロウイルス PMMoV 糞便汚染指標 ソーストラッキング指標

## 1. 研究開始当初の背景

嫌気性芽胞菌は保存性の高い糞便汚染指標であり、水源水域の原虫の汚染指標としても用いられている。研究代表者は、嫌気性芽胞菌の毒素遺伝子を調べ、ウェルシュ菌エンテロトキシン(*cpe*)遺伝子保有株がヒト由来の糞便汚染のソーストラッキング指標となる可能性について検討している。さらには、海域の予備調査において嫌気性芽胞菌の海域での生残性は大腸菌と比較して著しく高いことを示した。

これらのことを踏まえ、本研究では、先行研究の成果、すなわち *cpe* 遺伝子によってヒト由来の糞便汚染の識別が可能であること、海域で大腸菌よりも生残性が高いウイルスなどの指標となる可能性が高いことという嫌気性芽胞菌の新たな可能性に着目し、現行の「原虫の指標」に加えて「ノロウイルスなどヒトのみに感染する腸管系ウイルスの指標」、「ヒトソーストラッキングの指標」および「大腸菌系を補完する生残性の高い新しい海域の糞便汚染指標」の機能をあわせ持つ、汎用性の高い「総合的な糞便汚染指標」(原虫+ウイルス+ソーストラッキング+海域の指標)として用いることはできないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、現在「水道水源の原虫汚染のおそれの判断の指標」として用いられている「嫌気性芽胞菌」の意義を拡張し、従来の糞便汚染指標では評価困難な、ノロウイルス(ヒト固有)などの腸管系ウイルスの指標、ヒト由来糞便汚染指標(ソーストラッキング指標)、海域の糞便汚染指標などとしての有効性を評価し、新たな「総合的な糞便汚染指標」の構築を目指す。

現在までの先行研究を基に、海域、河川などで嫌気性芽胞菌の遺伝子型ごとの分布、ノロウイルスや現状の糞便汚染指標との相関性を評価するとともに、高感度な検出方法などについて評価する。

## 3. 研究の方法

### 1) 海域における嫌気性芽胞菌、大腸菌、PMMoV およびノロウイルスの調査

広島湾の環境基準の測定定点5カ所を対象にサンプリングを行い、ノロウイルス、PMMoV、嫌気性芽胞菌および大腸菌濃度を測定した。主にノロウイルスの検出される可能性の高い冬季に、各採水地点3~5回の採水を行い、17試料を得た。

PMMoV およびノロウイルスは、海水試料を船上でUF膜モジュールを用いて吸引ろ過し、研究室に持ち帰り遊出、遺伝子抽出して、qPCR法でその遺伝子を検出・定量した(Katayama *et al.*, 2002)。

嫌気性芽胞菌および大腸菌は試料を持ち帰り、ハンドフォード改良寒天培地法およびコリラート(18)法で定量した(上水試験方

法)。なお、本項目で用いたハンドフォード改良寒天培地は、オレアンドマイシンを含有するもの(関東化学(株))を用いた。

### 2) 各種水域における嫌気性芽胞菌の毒素遺伝子型分布

下水流入水(2カ所)、食肉センター排水(1カ所)、養豚場排水(1カ所)および牛糞便(牛舎2カ所)を採取し、嫌気性芽胞菌をハンドフォード改良寒天培地で分離した。分離後、コロニーを単離し、血液寒天培地で増菌したのち、6つの毒素遺伝子(*cpa*, *cpb*, *cpb2*, *iap*, *ext*, *cpe*)を標的としたマルチプルPCR法(van Asten AJ *et al.*, 2009)で、各遺伝子の保有状況を調べた。なお、本項目で用いたハンドフォード改良寒天培地は、オレアンドマイシンを含有するもの(関東化学(株))を用いた。

### 3) ハンドフォード改良寒天培地2種による嫌気性芽胞菌検出能の比較

抗菌剤の組成の異なる市販のハンドフォード改良寒天培地(E培地(エリスロマイシン含有、栄研化学(株))およびO培地(オレアンドマイシン含有)関東化学(株))を用い、河川水(広島県江の川水系西城川(3試料)および戸郷川(15試料)と神奈川県相模川水系相模川(15試料)の2水系)および下水流入水(広島県2カ所)から嫌気性芽胞菌を分離定量した。それぞれの培地から分離した株を血液寒天で増菌培養し、増菌培養した菌株について、エリスロマイシン含有検査ストリップ(ETEST エリスロマイシン、シスメックスピオメリュー)を用いてエリスロマイシンに対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

## 4. 研究成果

### 1) 広島湾における嫌気性芽胞菌、大腸菌、PMMoV およびノロウイルスの調査

広島湾の5地点で採取した試料の嫌気性芽胞菌、大腸菌濃度およびPMMoV、ノロウイルスG<sub>1</sub>、ノロウイルスG<sub>2</sub>遺伝子の1Lあたりのコピー数をTable 1に示した。

それぞれの濃度分布は、PMMoVは $10^4$  copies/L以上、嫌気性芽胞菌は1~1,700 cfu/Lであったのに対して、大腸菌は $10^0$  MPN/Lオーダーの地点がほとんどであり、沿岸域の河川の影響を受ける地点の一部の試料のみ $10^1$ - $10^3$ オーダーであった。

また、全17試料、1Lの試験において、糞便汚染指標である大腸菌、嫌気性芽胞菌およびPMMoVは、すべての試料から検出されたのに対して、最も一般的な糞便汚染指標である大腸菌の検出率は58%(10/17)であった。

ノロウイルス感染症の起因ウイルスであるノロウイルスG<sub>1</sub>およびG<sub>2</sub>の遺伝子は、G<sub>1</sub>は1試料のみから検出されたのに対して、G<sub>2</sub>は11試料(64%)から検出された。ノロウイルスが検出された試料では、嫌気性芽胞菌およびPMMoVは、濃度の違いはあるものす

すべての試料で検出されたのに対して、7 試料では大腸菌が検出されなかった。

ノロウイルス G の検出された 11 試料について、ノロウイルスの遺伝子コピー数と大腸菌、嫌気性芽胞菌および PMMoV 遺伝子のコピー数の関係を Fig. 1 に示した。ノロウイルス G の 1L あたりのコピー数と PMMoV は極めて高い相関が認められ、相関係数は  $r^2 = 0.7106$  であった。次いで、嫌気性芽胞菌も高い相関が認められ、 $r^2 = 0.6079$  であった。一方で、大腸菌とノロウイルスの相関係数は  $r^2 = 0.3783$  と相関関係は認められなかった。

このように、海域における糞便汚染指標とノロウイルスの関係について、最も一般的な糞便汚染指標である大腸菌は、濃度分布、検出率および濃度の回帰分析においても、ノロウイルスの汚染を評価するための指標としては問題があることが示された。特に、ノロウイルスの遺伝子が検出される試料においても大腸菌が検出されないケースがあり、現行の海域の糞便汚染指標や水産利用における海域の汚染指標として十分ではないことが示された。

一方で、嫌気性芽胞菌と PMMoV は、ノロウイルスの汚染を評価する指標としての高い可能性が示された。このうち、PMMoV はヒト由来の糞便汚染指標として注目されているが、海水中での挙動が同じウイルスであるノロウイルスと類似していると考えられ、検出濃度も高いことからノロウイルスの汚染指標としても有効性が高いものと考えられる。また、嫌気性芽胞菌は、今回の調査でも明らかになったように、大腸菌と比較して海水中で海水中での生残性も高く、ノロウイルスとの相関がみられた。PMMoV と比較するとその相関や検出感度などは劣るものの、試料からの分離定量が極めて容易であり、通常の培養法(嫌気培養)で計数することが可能である。したがって、大腸菌では十分に評価することのできないノロウイルスの汚染の可能性を示す指標として極めて有効であると考えられた。

Table 1 Concentrations of indicator bacteria and viruses in coastal area

	<i>E.coli</i>	<i>C. perfringens</i>	PMMoV	Nov GI	Nov GII
	(cfu/L)	(cfu/L)	(copies/L)	(copies/L)	(copies/L)
st.1 (n=3)	20 - 7,000	69 - 1,700	82,000 - 240,000	ND* - 2,600	ND* - 11,000
st.2 (n=3)	1 - 7	36 - 130	47,000 - 110,000	ND*	ND* - 2,800
st.3 (n=3)	< 1 - 3	30 - 67	140,000 - 210,000	ND*	ND* - 8,900
st.4 (n=3)	1 - 3	28 - 95	27,000 - 86,000	ND*	ND* - 1,500
st.5 (n=5)	< 1	1 - 21	15,000 - 65,000	ND*	ND* - 2,000
No. of positive samples	10/17	17/17	17/17	1/17	11/17

\*ND of Nov: detection limit were ranged from 42 - 330 copies/L

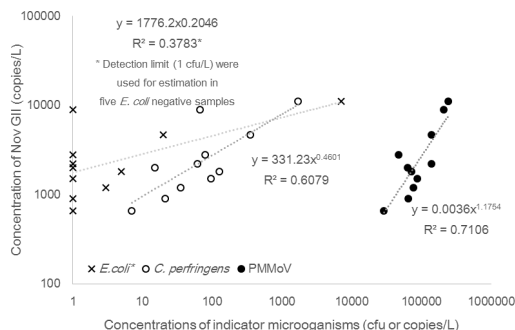


Fig. 1 Correlations between Nov GII and indicators

一方で、今回の試験では、ノロウイルスおよび PMMoV は q-PCR 法にて遺伝子の標的コピー数を、大腸菌および嫌気性芽胞菌は生菌数を測定した。検出法による差やその意義については再度検討が必要である。

## 2) 各種水域における嫌気性芽胞菌の毒素遺伝子型分布

各種糞便汚染源において嫌気性芽胞菌の毒素遺伝子型ごとの分布を評価し、その分布によって嫌気性芽胞菌をソーストラッキング指標として利用することを目的に、下水、食肉センター排水、養豚場排水および牛舎で採取した牛糞便から分離した嫌気性芽胞菌の毒素遺伝子の保有状況を調査した。先行の研究で、下水流入水において *cpe* 遺伝子保有の嫌気性芽胞菌が検出される傾向が見られたため、そのデータの補完するために、3 つの下水処理場の流入水から分離した 366 株について遺伝子の保有状況を調べた (Fig. 2)。下水流入水では、*cpa* 遺伝子を有し、ウェルシュ菌と判断された菌株がほとんどであり、すべて A 型のウェルシュ菌であった。このうち、エンテロトキシンをコードする *cpe* 遺伝子保有株は 109 株で全体の 29.8% であった。

一方で、牛、豚の処理を行う食肉センターの排水、養豚場の排水および牛舎の糞便から採取したそれぞれ 109, 128 および 129 分離株からは、牛糞便から 1 株の *cpe* 保有株が分離されたものの、他はすべて *cpe* の保有は確認されなかった。

このように、*cpe* 遺伝子を保有するウェルシュ菌は、ヒト由来の下水流入水からのみ分離され、有意な偏在性が確認されたことから、ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子保有株はヒト由来排水のソーストラッキング指標として用いることの可能性を見出した。

これらを踏まえ、広島県の江の川水系西城川流域の調査を行った。広島県庄原市内を流下する西城川の 700m の範囲を調査した結果、下水処理場放流水および市街地流域の都市下水路の流入の上流および下流で *cpe* 保有株の分離状況が異なり、上流部では 1.6% の嫌気性芽胞菌が *cpe* 遺伝子を保有していたのに対して、放流水 (16.4%) および都市下水路 (8.4%) の流入後の下流部では 11.9% に上昇し、実河川においてもヒト由来排水の流入を評価することが可能であった (ただし、検査株数が少なく暫定値)。

このように、本研究では嫌気性芽胞菌の新たな機能として、ヒト由来糞便汚染のソーストラッキング指標としての有効性を明らかにし、特にヒト固有の腸管系ウイルスであり、冬季下痢症の原因となるノロウイルスの汚染を評価する指標としての意義を見出した。

## 3) ハンドフォード改良寒天培地 2 種による嫌気性芽胞菌検出能の比較

嫌気性芽胞菌の検出と定量にはハンドフ

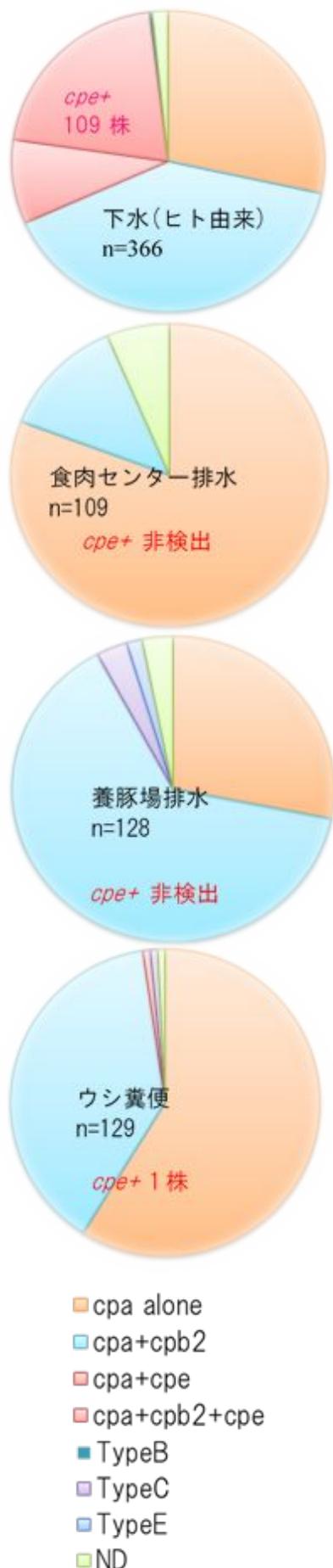


Fig.2 Distribution of *C. perfringens* isolates using toxin gene.

オート改良寒天培地を用いた嫌気培養法がわが国では一般に用いられている(上水試験方法)。このオート改良寒天培地にはマクロライド系の抗菌剤としてオレアンドマイシンが含まれるが、オレアンドマイシンの供給体制の問題などから、エリスロマイシンを含む培地も同様に用いられている。両培地の検出感度は同等であるとする報告(日水協調査委、2010)がある一方で、オレアンドマイシン培地の検出感度が高い側にばらつく傾向示されている(厚労省検討会資料、2010)。さらには、研究代表者らの予備的な検討でも同様にオレアンドマイシン培地の優位性が確認されていることから、嫌気性芽胞菌の指標としての発展性に欠かせない条件として、より高感度で安定した嫌気性芽胞菌の検出・定量を検討するために両培地の比較を行った。

Fig. 3に河川水(広島県江の川水系戸郷川、西城川および神奈川県相模川水系相模川)を両培地で検査した際の嫌気性芽胞菌濃度をプロットした。いずれの河川の試料においても、オレアンドマイシンを含有するO培地で得られた嫌気性芽胞菌濃度が高い傾向を示し、その濃度比はO培地1に対してE培地0.64(n=33)であった。

同様に広島県内の1か所の下水処理場の下水流入水9試料について両培地を評価したところ、河川水よりはばらつきが大きいものの、いずれの試料においても河川水と同様にO培地で得られた嫌気性芽胞菌濃度が高くなる傾向が示された(Fig. 4)。

両培地での定量値が大きく異なることは、嫌気性芽胞菌を現行の原虫の汚染の恐れ判断指標として用いる場合のみならず、本研究で新たに提案するノロウイルスなどの腸管系ウイルス指標やソーストラッキング指標としての評価を行う際においても大きな問題となる。したがって、両培地の同等性を確保することを目的として、両培地に添加されるマクロライド系抗菌剤の違い、すなわち感度が低くなる傾向のあるエリスロマイシンに関して詳細な評価を行った。

下水流入水を試料に、両培地を用いて嫌気性芽胞菌を培養し、形成されたコロニーをランダムに30個(E培地)および58個(O培地)釣菌し、増菌した。それぞれの分離株のエリスロマイシンに対するMIC値を測定し、その出現分布をFig.5示した。

感度の高いO培地(オレアンドマイシン含有)の培地の分離株では、エリスロマイシンに対するMIC値は0.016~>256 μg/Lに分布し、MIC値2 μg/L以下の低濃度の存在でも発育が抑制される株が6割近く存在した。一方で、E培地(エリスロマイシン含有)から分離した株のエリスロマイシンに対するMIC値は2 μg/L以下の株は存在せず、2~>256 μg/Lであった。このことから、E培地では、O培地では発育したこのMIC値2 μg/L以下の嫌気性芽胞菌の発育が阻害され、結果としてO培地

と比較した検出感度が低下したものと考えられた。

現行の E 培地には処方上 100 µg/L の濃度で含有している。オートクレーブなどの加熱処理によって、培養に用いるプレート上の培

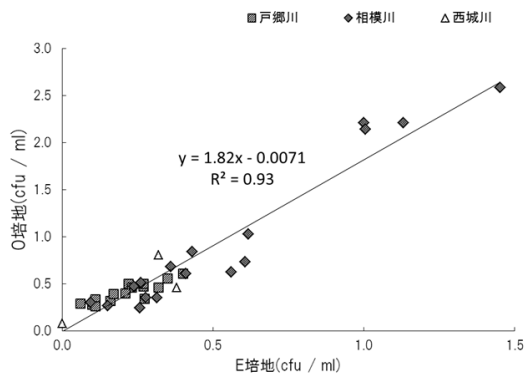


Fig. 3 Correlation between concentrations of *C. perfringens* based on 0 and E Handford Agar from river water samples.

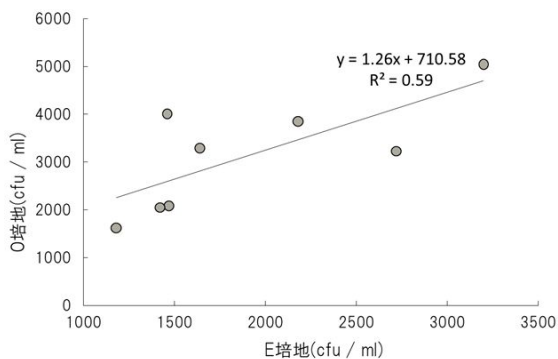
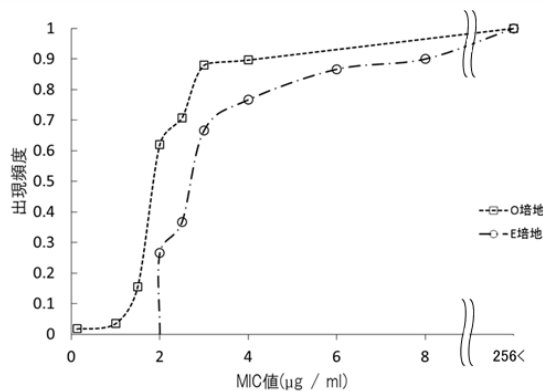


Fig. 3 Correlation between concentrations of *C. perfringens* based on 0 and E Handford Agar from sewage samples.

Fig.5 Distribution of Erythromycin MIC



value of *C. perfringens* isolate from sewage samples.

地中のエリスロマイシンの力価は、E 培地で発育が確認された株の中の最小の MIC 値、すなわち 2µg/L 程度と推定される。Fig.5 の出現分布から推定して、エリスロマイシン力価を現状の半分である 1µg/L に下げた場合、ほぼ 0 培地での MIC 値分布のほぼ 98%の株の発育が可能になると推定される。従って、現在のハンドフォード改良寒天培地(E 培地)のエリスロマイシンの処方を半減させ、力価で 1µg/L 程度にすることで、0 培地と同等の性能で嫌気性芽胞菌を検出できる可能性が示された。

一方で、エリスロマイシンにより抑制されていた非嫌気性芽胞菌(ウェルシュ菌)が発育することで、分離精度が低くなる可能性がある。また、水域による分布状況の差も評価する必要もある。これらのことから、多くの水域から分離した株を用いた調査やエリスロマイシン濃度を低下させた培地での検出状況の評価してゆく必要がある。

<引用文献>

Hiroyuki Katayama\*, Akihiro Shimasaki, and Shinichiro Ohgaki (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater, Appl. Environ. Microbiol. 68(3), 1033-1039

日本水道協会：上水試験方法 V. 微生物編、pp.81-88、2011.

van Asten AJ, van der Wiel CW, Nikolaou G, Houwers DJ, Grone AA: Multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens*. Vet. Microbiol. 136(3-4), 411-412, 2009.

日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会微生物・生物部門：新処方ハンドフォード改良培地の性能評価、水道協会雑誌、79(12)、66-71、2010. 検討会資料

平成 22 年度第 2 回 水道における微生物問題検討会「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法」における指標菌検査方法の見直しについて、資料 4 別添、厚生労働省

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 2 件)

横内朝香, 中野勲, 橋本温 (2017) 抗菌剤の異なる 2 種のハンドフォード改良培地の河川水および下水流入水からの嫌気性芽胞菌の検出・定量性, 水道協会雑誌

10(in press)

A. Hashimoto, H. Tsuchioka, K. Higashi, N. Ota and H. Harada (2016) Distribution of enterotoxin-positive *Clostridium perfringens* is a potential source tracking indicator of human fecal pollution in aquatic environments, *Journal of Water and Environmental Technology*, 14(6), 447-454 DOI:10.2965/jwet.16-022

〔学会発表〕(計9件)

横内朝香, 中野勲, 市原健太郎, 三原宏啓, 橋本温 (2017) 実河川における cpe+ ウェルシュ菌の分布とソーストラッキング指標としての有効性, 第 51 回日本水環境学会年会, 熊本

横内朝香, 中野勲, 市原健太郎, 三原宏啓, 橋本温 (2016) ソーストラッキング指標としての嫌気性芽胞菌から見た相模川水系の特性, 環境技術学会第 16 回年次大会, 姫路

横内朝香, 中野勲, 市原健太郎, 三原宏啓, 橋本温 (2016) ハンドフオード培地を用いた高感度な嫌気性芽胞菌の定量, 日本水道協会 平成 28 年度全国会議(水道研究発表会), 京都

横内朝香, 土岡宏彰, 橋本温 (2016) 嫌気性芽胞菌の定量用培地 2 種のウェルシュ菌検出感度第 50 回日本水環境学会年会, 徳島

A. Hashimoto, H. Tsuchioka, A. Yokouchi, T. Wada, H. Katayama and H. Harada (2015) Occurrence of Norovirus and fecal indicators in the coastal waters of Hiroshima, Japan, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Lisbon.

土岡宏彰, 横内朝香, 原田浩幸, 片山浩之, 橋本温 (2015) 都市沿岸海域におけるノロウイルスおよび嫌気性芽胞菌の分布特性, 第 49 回日本水環境学会年会, 金沢

横内朝香, 木村大将, 土岡宏彰, 橋本温 (2015) 水道水源およびヒト/家畜由来排水における嫌気性芽胞菌の遺伝子型分布, 第 49 回日本水環境学会年会, 金沢

土岡宏彰, 泉山信司, 原田浩之, 和田貴臣, 橋本温 (2014) 指標細菌等の濃縮・回収法としての粉体ろ過法の適用性, 平成 26 年度全国会議(水道研究発表会), 名古屋

土岡宏彰, 橋本温 (2014) ヒト由来糞便汚染のソーストラッキング指標としての嫌気性芽胞菌の可能性, 第 17 回日本水環境学会シンポジウム, 滋賀

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 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

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者 ( )