

多摩川流域における親水活動を介した 健康関連微生物の水系感染リスクの評価

2012年

原本 英司

山梨大学大学院医学工学総合研究部 助教

研究成果報告書

多摩川流域における親水活動を介した健康関連微生物の水系感染リスクの評価

山梨大学大学院医学工学総合研究部

原本 英司

1. はじめに

ノロウイルスやクリプトスポリジウムに代表される水系感染性の病原微生物は、水や食品などを介して経口的にヒトに感染し、下痢や嘔吐、発熱などの様々な症状を引き起こし、糞便中に高濃度に排出される。下水処理場や浄化槽での処理を経た水に感染力を有した病原微生物が含まれる場合、病原微生物は河川を流下し、水道水の飲用や親水活動での誤飲、海産物の喫食などを通じてヒトへの再感染を引き起こす可能性がある。このいわゆる「水系感染リスク」については、水環境中での病原微生物の存在実態に関する知見が不足していることが主な原因となり、十分には明らかにされていないのが現状である。

多摩川の河川敷は、沿岸のみならず首都圏全域に住む人々にとっての憩いの場となっており、本川、支川を問わず、上流域から下流域までの広い地域で親水活動に利用されている。また、表流水や伏流水は水道原水として利用されており、水道水源としても重要な河川である。しかしながら、多摩川流域における病原微生物の存在実態については部分的にしか明らかにはなっていない。特に、様々な種類の病原微生物を網羅的に測定した調査事例がないため、より正確な水系感染リスクの評価につながり得る知見の獲得には至っていない。

本研究では、代表的な水系感染性の病原微生物であるウイルスと原虫を研究対象に取り上げ、多摩川の上流域から下流域における病原微生物の濃度変動特性を明らかにすることを試みた。また、遺伝子解析により、検出された病原微生物のヒトへの水系感染リスクの有無を評価した。さらに、病原微生物と並行して指標微生物を測定することにより、病原微生物の濃度変動特性との差異を比較した。

2. 調査方法

2.1 調査対象地点の概況

調査対象地点として、多摩川本川の上流域、中流域および下流域から各1地点（地点1～3）を選定した。

上流域の地点1は羽村取水堰であり、小作浄水場、東村山浄水場および玉川上水へと上流からの河川水の一部が導水され、残りの河川水が下流へと放流されている。本研究では、堰から下流へと放流された直後の河川水を採取した。

地点2地点は稲城大橋の約200m下流の地点であり、稲城大橋の上流側に北多摩一号水再生センターが立地している。また、採水地点から約3km上流に南多摩水再生センターが立地しており、地点2は両方の下水処理場の放流水の影響を強く受けられていると考えられる。地点1と2の間には他にも複数の下水処理場が見られ、立川市錦町下水処理場、北多摩二号水再生センターおよび浅川水再生センターの3ヶ

所の下水処理場が集中して立地している。さらに、府中四谷橋付近で多摩川に合流する浅川の流域には八王子市北野下水処理場が立地しており、地点2と3では、これらすべての下水処理場の放流水の影響を受けていると考えられる。

地点3は二子橋の真下の地点であり、約1km上流には砧下水再生センターが立地している。砧浄水場および砧下浄水場においては、多摩川の伏流水を水道原水として用いており、世田谷区の一部に給水している。なお、三鷹市東部下水処理場からの放流水を受けている仙川は、野川と合流した後に多摩川へと注いでいるが、地点3の約500m下流が合流地点であるため、本研究では三鷹市東部下水処理場の影響は受けていないと判断した。

2.2 試料の採取

2011年1月～2012年2月の14ヶ月間、毎月1回の頻度で地点1～3において河川水（表流水）を採取した。各地点で採取した試料は、高圧蒸気滅菌（121℃、15分間）したポリ容器（容量1L）4本に満水になるまで入れ、保冷剤を入れたクーラーボックス内で冷蔵して山梨大学の実験室まで輸送した。

2.3 水質項目の測定

採取直後の試料を用い、現地にて携帯型水質分析計（Hanna Instruments）によって水温とpH、電気伝導度を測定した。また、実験室において、簡易水質分析計（Hach）を用いて濁度を測定した。

2.4 指標微生物の測定

指標微生物として、大腸菌群、大腸菌、嫌気性芽胞菌およびF特異大腸菌ファージ（Fファージ）を測定した。

大腸菌群と大腸菌は、クロモカルト・コリフォーム培地（Merck）を用いた単層法によって測定した。シャーレに試料1mLと寒天培地約10mLを添加して十分に混和し、静置凝固させた後、37℃で約24時間培養した。試料は、必要に応じてLB broth base（Invitrogen）で10倍段階希釈してシャーレに添加した。青色から紫色を呈したコロニーを大腸菌とし、赤色を呈したコロニーとの合計を大腸菌群とした。

嫌気性芽胞菌は、ハンドフォード改良培地（栄研化学）を用いた三重層法によって測定した。前処理として、試料25mLを75℃で20分間加熱した。寒天培地約10mLを静置凝固させたシャーレに試料1mLまたは5mLを添加し、寒天培地約10mLを加えて十分に混合した。さらに、寒天培地約10mLを添加して静置凝固させた後、酸素吸収・炭酸ガス発生剤（三菱ガス化学）と共に角型ジャー（容量2.5L、三菱ガス化学）に入れた。45℃で約24時間培養後、形成した黒色のコロニーを計数した。

Fファージは、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49を宿主菌に用いたブラック法によって測定した。測定前日に、液体培地（トリプトン（Sigma）10g/L、D(+)-グルコース（キシダ化学）1g/L、NaCl（キシダ化学）8g/L、CaCl₂・H₂O（0.3g/mL、キシダ化学）1mL/LおよびMgSO₄・H₂O（0.15g/mL、キシダ化学）1mL/L）6mLにナリジキシン酸溶液（100g/L、Sigma）6μLおよびカナマイシン溶液（20g/L、Sigma）6μLを添加し、宿主菌保存液4～6μLを加えて37℃で約24時間振とう培養した。寒天培地は、液体培地100mLに対してBacto agar（Difco）を0.9gの割合で添加したものを高圧蒸気滅菌（121℃、15分間）して50℃で保温し、シャーレへの添加直前に、ナリジキシン酸溶液100μL、カナマイシン溶液100μLおよび前日から振とう培養した宿主菌を含む液体培地適量を加えて作成した。試料1mLまたは5mLを入れたシャーレに寒天培地約10mLを添加し、十分に混合して静置凝固した。37℃で約24時間

培養後、形成したブラックを計数した。なお、測定の都度、MacConkey Agar (Difco) を用いて宿主菌を培養し、赤色のコロニーが優占して形成され、その濃度が約 10^8 colony-forming units (CFU) /mL であることを確認した。

指標微生物の濃度は、最適な希釈列のシャーレ 2 枚の計数値を平均し、測定に供した試料量と希釈倍率を考慮することで算出した。濃度単位は、大腸菌群、大腸菌および嫌気性芽胞菌が CFU/mL、F フェージが plaque-forming units (PFU) /mL である。各指標微生物の検出限界は、大腸菌群と大腸菌が 0.5 CFU/mL、嫌気性芽胞菌が 0.1 CFU/mL および F フェージが 0.1 PFU/mL であった。

2.5 病原微生物の測定

2.5.1 病原微生物の濃縮

本研究で調査対象とした病原微生物は、原虫として、クリプトスポリジウムとジアルジア、ウイルスとして、ヒトアデノウイルス、ノロウイルス GI, GII およびアイチウイルスの計 6 種類とした。いずれもヒトに感染することが知られており、疫学的に重要な病原微生物である。

病原微生物の濃縮には、ウイルスと原虫を同一試料から同一操作で濃縮可能な手法である陰電荷膜破砕型濃縮法 (原本ら, 2010) を用いた。試料 2L に 2.5mol/L $MgCl_2$ 20mL を添加して十分に混合した後、陰電荷膜 (混合セルロース膜, 直径 90mm, 孔径 0.8 μ m, Millipore) で全量をろ過した。ろ過後の陰電荷膜をフィルターホルダーから剥がし、PET 溶液 ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ (関東化学) 0.2g/L, $C_{10}H_{13}N_2O_8Na_3 \cdot 3H_2O$ (和光純薬) 0.3g/L, Tween 80 (Research Organics) 0.1mL/L) 15mL とフットボール型攪拌子を入れた遠沈管 (容量 50mL) 内で激しく攪拌して膜を数 mm 四方以下に破砕した。スポイトを用いて溶液の全量を新しい遠沈管に移し入れ、遠心 (2,000 $\times g$, 10 分, 4 $^{\circ}C$) し、ウイルスを上清、原虫を沈渣へと分離した。

2.5.2 原虫の定量

ウイルスの検出用に上清 (約 15mL) を分取後、沈渣に PBS (-) (和光純薬) 約 10mL を添加して軽く攪拌し、再度遠心 (2,000 $\times g$, 10 分, 4 $^{\circ}C$) した。上清を除去して沈渣に PBS (-) 約 5mL を加え、軽く攪拌した。この溶液には原虫以外の細菌も含まれると考えられることから、その検出のために 0.5mL を分取してマイクロチューブ (容量 2mL) に移し入れ、残りの溶液約 4.5mL は L10 チューブ (Invitrogen) に移し入れた。PBS (-) 約 5mL を遠沈管に加えて濁質の残液を回収し、L10 チューブに移し入れて約 9.5mL の原虫濃縮液を得た。

Dynabeads GC-Combo (Invitrogen) を用いた免疫磁気ビーズ法によって L10 チューブ中の原虫を約 110 μ L に精製した。この精製試料の半量 (約 55 μ L) を親水性 PTFE 膜 (直径 25mm, 孔径 1.0 μ m, Advantec) で吸引ろ過し、EasyStain (BTF) を用いた直接蛍光抗体法に供してプレパラートを作製した。蛍光顕微鏡 (Olympus) でプレパラートを観察し、クリプトスポリジウムとジアルジアを計数した。計数結果と検査水量を考慮し、元の試料中のクリプトスポリジウムとジアルジアの濃度 (oocysts/L または cysts/L) を算出した。

2.5.3 原虫の遺伝子解析

残り半量の精製試料 (約 55 μ L) を用い、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) とジアルジア (*Giardia intestinalis*) の遺伝子型の同定を試みた。精製試料に 1% Triton X-100 (MP Biomedicals) 5.5 μ L

を添加し、凍結融解（ -80°C 10分、 56°C 10分）を10回繰り返してオーシストおよびシストから核酸を抽出した。

クリプトスポリジウムのNested PCRには、18S rRNA 遺伝子領域に特異的なプライマー（Xiao *et al.*, 1999 ; Xiao *et al.*, 2000）を使用した。18S rRNA は感染性を有するクリプトスポリジウムのオーシスト内で大量に発現しており、PCR の前段にRNA の逆転写反応（Reverse transcription, RT）を追加することで高感度の検出が可能となるため（岸田ら, 2010），本研究でも逆転写反応を採用し、RT-nested PCR を実行した。核酸抽出液から $5\mu\text{L}$ を分取して High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems）を用いた逆転写反応に供し、cDNA 溶液 $10\mu\text{L}$ を得た。この cDNA 溶液に 1st PCR 反応液 $40\mu\text{L}$ を添加し、PCR（ 94°C 2分→（ 94°C 30秒→ 55°C 30秒→ 72°C 1分）×35回→ 72°C 7分）に供した。1st PCR 産物から $2\mu\text{L}$ を分取して 2nd PCR 反応液 $48\mu\text{L}$ と混合し、同様の温度条件にて PCR を実行した。PCR 反応液の調整には Premix Ex Taq Hot Start Version（TaKaRa Bio）を用い、プライマーの濃度は各 $0.3\mu\text{mol/L}$ とした。

ジアルジアのSeminested PCRは、Glutamate dehydrogenase（GDH）遺伝子領域を増幅させるプライマー（Read *et al.*, 2004）を用いて実行した。核酸抽出液から $5\mu\text{L}$ を分取して 1st PCR 反応液 $45\mu\text{L}$ と混合し、PCR（ 94°C 2分→（ 94°C 30秒→ 56°C 30秒→ 72°C 1分）×35回→ 72°C 7分）に供した。1st PCR 産物から $2\mu\text{L}$ を分取して 2nd PCR 反応液 $48\mu\text{L}$ と混合し、同様の温度条件にて PCR を実行した。PCR 反応液の組成はクリプトスポリジウムの場合と同様とした。

2nd PCR 産物 $10\mu\text{L}$ を 2%アガロースゲル（TaKaRa Bio）を用いた電気泳動に供した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーター（UVP）で目的の長さ（クリプトスポリジウム：約 850bp ，ジアルジア：約 450bp ）の PCR 産物の生成の有無を確認した。PCR 産物の生成が確認された場合は、ゲルから PCR 産物を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen）で $50\mu\text{L}$ に精製した後、ABI 3730xl DNA Analyzer（Applied Biosystems）を用いたダイレクトシーケンシングによって塩基配列を決定した。得られた塩基配列から両端のプライマー部位を除いた領域に対し、日本 DNA データバンクへの登録株も含め、近隣結合法を用いて系統樹を作成し、原虫の遺伝子型を同定した。

2.5.4 ウイルスの定量

ウイルスの検出用に分取した上清（約 15mL ）のうちの 1mL をウイルス濃縮液としてマイクロチューブ（容量 2mL ）に入れて凍結保存した。

ヒトアデノウイルスの定量は以下の通りに行った。ウイルス濃縮液から $200\mu\text{L}$ を分取し、QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen）を用いて DNA 抽出液 $200\mu\text{L}$ を得た。DNA 抽出液から $5\mu\text{L}$ を分取し、PCR 反応液 $20\mu\text{L}$ （Premix Ex Taq（Perfect Real-Time）（TaKaRa Bio） $12.5\mu\text{L}$ ，プライマー（ $10\mu\text{mol/L}$ ）各 $1\mu\text{L}$ ，TaqMan プローブ（ $5\mu\text{mol/L}$ ） $1\mu\text{L}$ ，PCR-grade water $4.5\mu\text{L}$ ）と混合してリアルタイム PCR を実行した。使用したプライマーと TaqMan プローブは、ヒトアデノウイルスの全血清型の増幅が可能ないように設計されたものである（Heim *et al.*, 2003）。リアルタイム PCR 装置には Thermal Cycler Dice Real Time System TP800（TaKaRa Bio）を使用し、 95°C で30秒間加熱した後、 95°C で5秒間と 58°C で30秒間からなる PCR サイクルを45回繰り返した。

ノロウイルス GI, GII およびアイチウイルスの定量は以下の通りに行った。ウイルス濃縮液から $140\mu\text{L}$ を分取し、QIAamp Viral RNA Mini Kit（Qiagen）を用いて RNA 抽出液 $60\mu\text{L}$ を得た。RNA 抽出液から $23\mu\text{L}$ を分取し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems）を用いた逆転写反応

によって cDNA 溶液 46 μ L を得た。cDNA 溶液から 5 μ L を分取し、PCR 反応液 20 μ L (Premix Ex Taq (Perfect Real-Time)) (TaKaRa Bio) 12.5 μ L, プライマー (10 μ mol/L) 各 1 μ L, TaqMan プローブ (5 μ mol/L, ノロウイルス GI および GII) または TaqMan MGB プローブ (5 μ mol/L, アイチウイルス) 1 μ L, PCR-grade water 4.5 μ L) と混合してリアルタイム PCR を実行した。使用したプライマーと TaqMan プローブまたは TaqMan MGB プローブは、ノロウイルス GI および GII, アイチウイルスそれぞれに特異的なものである (Kageyama *et al.*, 2003 ; 端ら, 2009)。リアルタイム PCR 装置には Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa Bio) を使用し、95 $^{\circ}$ C で 30 秒間加熱した後、95 $^{\circ}$ C で 5 秒間と 56 $^{\circ}$ C (ノロウイルス GI および GII) または 60 $^{\circ}$ C (アイチウイルス) で 30 秒間からなる PCR サイクルを 45 回繰り返した。

各ウイルスについて、1 試料あたり 2 ウェルを用いてリアルタイム PCR を実行した。検量線は、人工合成オリゴ DNA (日本遺伝子研究所 ; ヒトアデノウイルス, ノロウイルス GI および GII) またはプラスミド DNA (アイチウイルス) を TE バッファーで 10 倍段階希釈して作成した。定量結果と検査水量を考慮し、元の試料中の各ウイルスの濃度 (copies/L) を算出した。

2.5.5 ヒトアデノウイルスの遺伝子解析

リアルタイム PCR で 2 ウェル共にヒトアデノウイルス陽性と判定された試料に対し、Nested PCR とダイレクトシーケンシングによってヒトアデノウイルスの遺伝子型 (血清型) の同定を試みた。DNA 抽出液から 5 μ L を分取して 1st PCR 反応液 45 μ L と混合し、PCR (94 $^{\circ}$ C 2 分 \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 分) \times 35 回 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7 分) に供した。1st PCR 産物から 2 μ L を分取して 2nd PCR 反応液 48 μ L と混合し、同様の温度条件にて PCR を実行した。PCR 反応液の調整には Premix Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa Bio) を用い、プライマーの濃度は各 0.3 μ mol/L とした。使用したプライマーは、ヒトアデノウイルスの既知の血清型すべてを増幅可能なものであり、1st PCR では約 480bp (Xu *et al.*, 2000), 2nd PCR では約 440bp (Ko *et al.*, 2003) の Hexon 遺伝子領域を増幅対象としている。

原虫と同様の手順により、アガロース電気泳動、PCR 産物の精製およびダイレクトシーケンシングに供し、ヒトアデノウイルスの遺伝子型を決定した。

2.6 バクテロイデスの測定

遠心操作によって原虫とウイルスを分離した際、沈渣には原虫以外の細菌も多数含まれることが考えられる。すなわち、本研究で使用した陰電荷膜破碎型濃縮法は、既存の研究で回収率の測定対象としていたウイルスと原虫のみならず、細菌の濃縮に対しても有効となる可能性がある。この可能性を評価するため、沈渣の一部を用い、細菌の 1 種であるバクテロイデスの検出を試みた。

沈渣から 200 μ L を分取し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出液 200 μ L を得た。DNA 抽出液から 5 μ L を分取し、PCR 反応液 20 μ L (Premix Ex Taq (Perfect Real-Time)) (TaKaRa Bio) 12.5 μ L, プライマー (10 μ mol/L) 各 1 μ L, TaqMan MGB プローブ (5 μ mol/L) 1 μ L, PCR-grade water 4.5 μ L) と混合してリアルタイム PCR を実行した。プライマーと TaqMan MGB プローブには、ヒト (Lee C.S. and Lee J., 2010), ブタ (Mieszkina *et al.*, 2009) および反すう動物 (Reischer *et al.*, 2006) それぞれに特異的とされているものを使用した。リアルタイム PCR 装置には Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa Bio) を使用し、95 $^{\circ}$ C で 30 秒間加熱した後、95 $^{\circ}$ C で 5 秒間と 60 $^{\circ}$ C で 30 秒間からなる PCR サイクルを 45 回繰り返した。

各グループについて、1 試料あたり 2 ウェルを用いてリアルタイム PCR を実行した。検量線は、人工

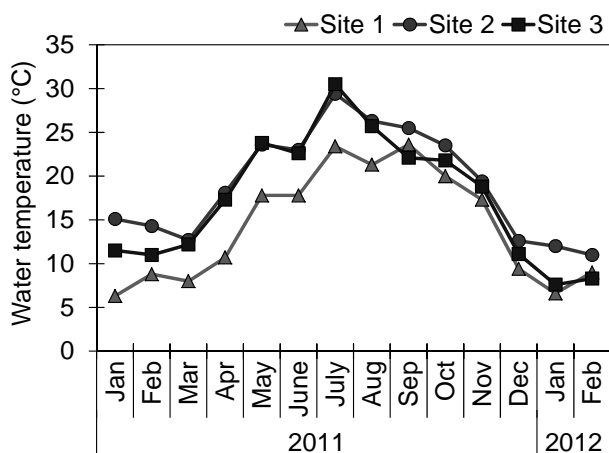
合成プラスミド DNA (TaKaRa Bio) を TE バッファーで 10 倍段階希釈して作成した。定量結果と検査水量を考慮し、元の試料中の各グループのバクテロイデスの濃度 (copies/L) を算出した。

3. 調査結果および考察

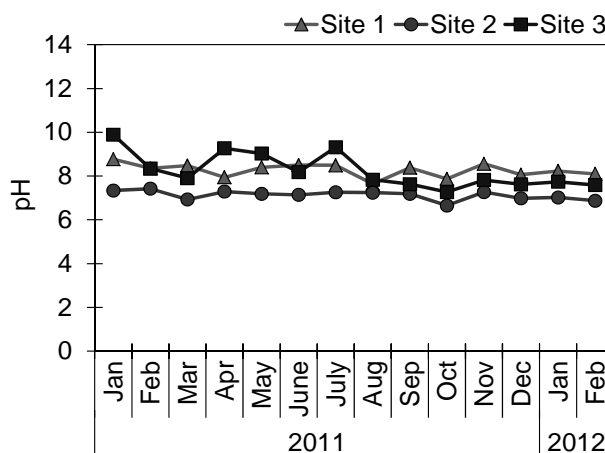
3.1 水質項目の測定結果

水温, pH, 電気伝導度および濁度の測定結果を図 3.1 に示す。水温は, 6.3~30.5°C であり, 各地点共に類似した変動特性を示した。pH は, 年間を通して比較的安定した値 (6.7~9.9) を示した。電気伝導度は, 地点 2 は 261~486 μ S/cm, 地点 3 は 178~401 μ S/cm の範囲で変動し, 夏期に低下する傾向が見られた。一方, 地点 1 における電気伝導度は 69~128 μ S/cm と低く, 明確な季節変動は見られなかった。濁度は, 大型台風による河川流量の増大のため, 2011 年 9 月はいずれの地点においても非常に高い値 (116~298FAU) を示した。地点 1 においては 2011 年 10 月にも高い濁度 (78FAU) が得られたが, その他の試料における濁度は概ね 10FAU 以下であった。

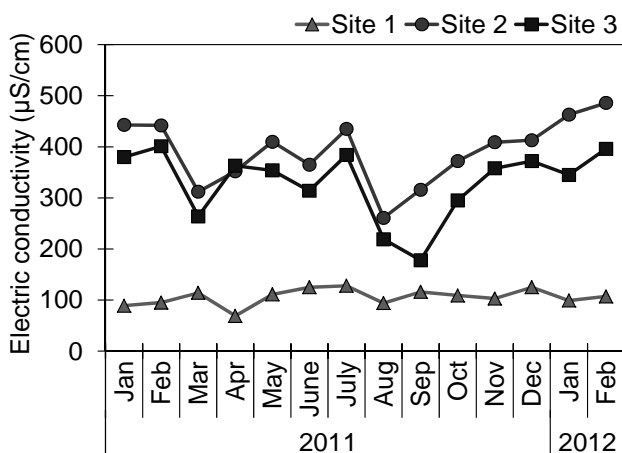
A) 水温



B) pH



C) 電気伝導度



D) 濁度

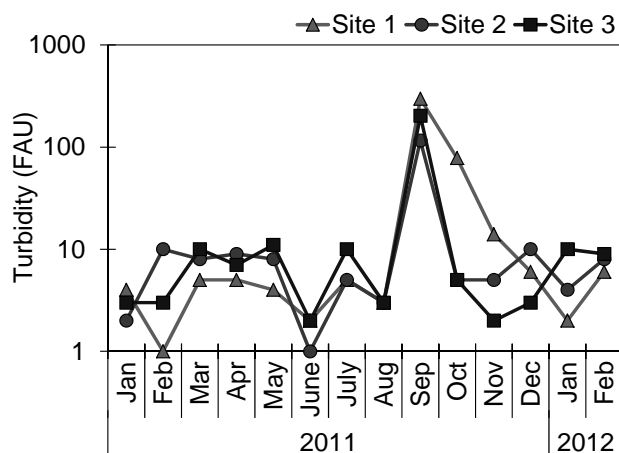


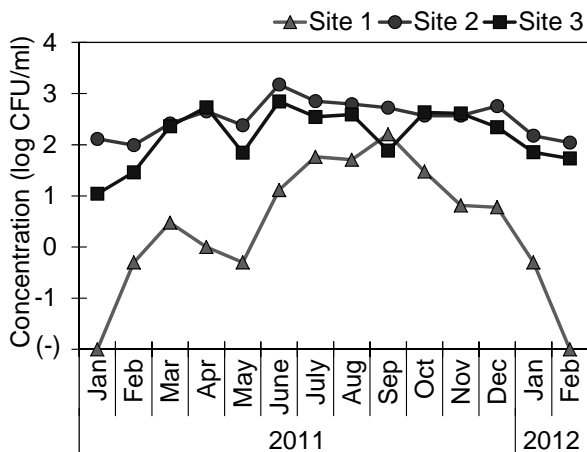
図 3.1 水質項目の変動

3.2 指標微生物の測定結果

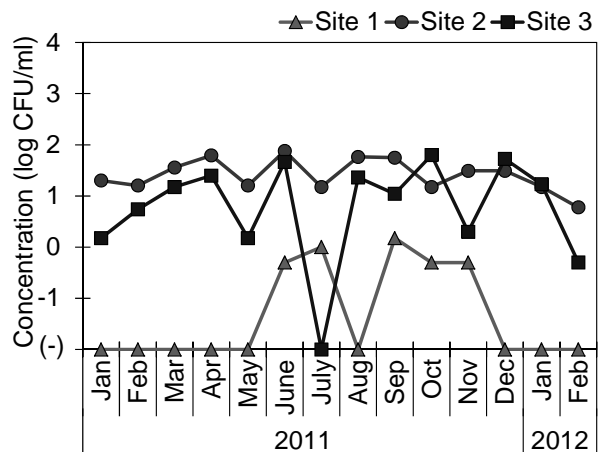
指標微生物の陽性率は、大腸菌群が 95% (40/42)、大腸菌が 76% (32/42)、嫌気性芽胞菌が 64% (27/42) および F フェージが 60% (25/42) であった。また、陽性試料中の指標微生物の濃度は、大腸菌群が 0.5 ~ 1,500 CFU/mL、大腸菌が 0.5 ~ 76 CFU/mL、嫌気性芽胞菌が 0.3 ~ 18 CFU/mL および F フェージが 0.2 ~ 6.6 PFU/mL であった。

図 3.2 に示す通り、指標微生物の陽性率と濃度は、採水地点によって大きく異なる値を示した。地点 2 では、いずれの指標微生物もすべての試料から検出され、その濃度も他の 2 地点よりも高い値で推移した。地点 3 においても指標微生物は高い陽性率で検出され、大腸菌群が 100% (14/14)、大腸菌と嫌気性芽胞菌が 93% (13/14)、F フェージが 79% (11/14) であった。地点 2 と 3 に比べ、地点 1 における指標微生物の陽性率と濃度は大幅に低く、大腸菌群と大腸菌の陽性率はそれぞれ 86% (12/14) および 36% (5/14) であり、嫌気性芽胞菌と F フェージはいずれの試料からも検出されなかった。このことより、地点 1 と地点 2 の間に複数立地する下水処理場が指標微生物の主要な排出源であることが示唆された。地点 1 における大腸菌群と大腸菌の濃度は夏期に高い値を示しており、この原因として、降雨による地表面あるいは河川底質からの微生物の流出、また、上流の奥多摩湖付近での観光客の増加による微生物の排出負荷量の増大が考えられる。

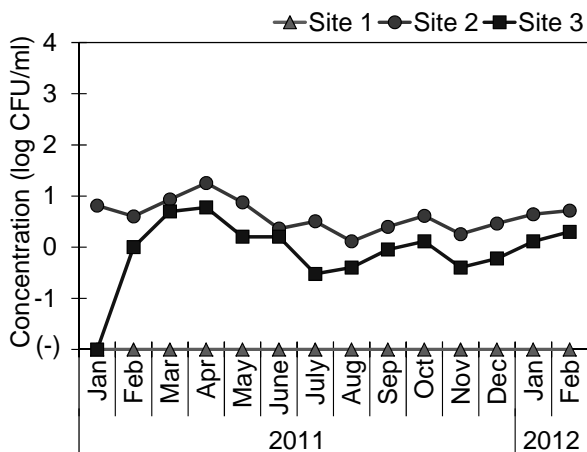
A) 大腸菌群



B) 大腸菌



C) 嫌気性芽胞菌



D) F フェージ

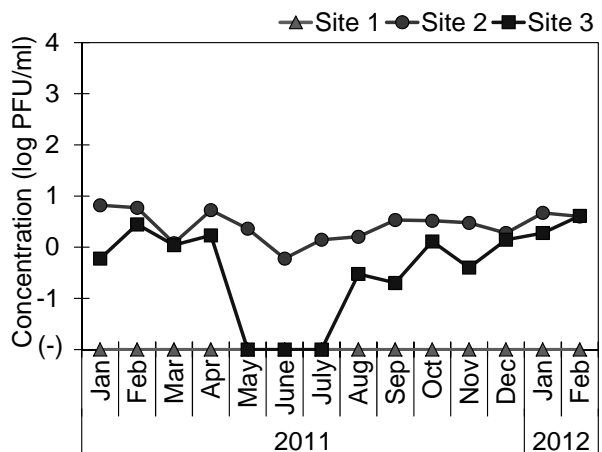


図 3.2 指標微生物の濃度変動

3.3 原虫の測定結果

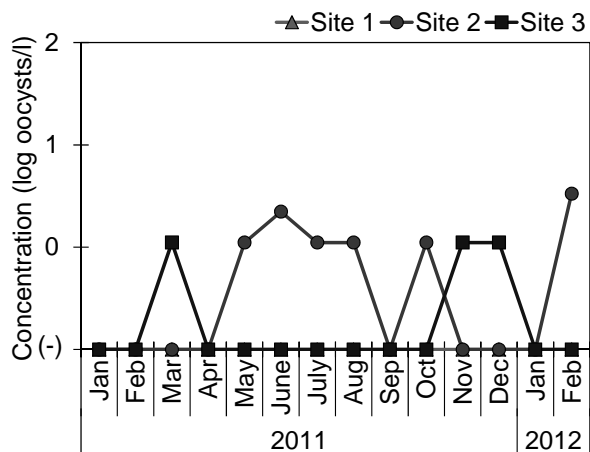
蛍光顕微鏡観察による原虫の測定結果を図3.3に示す。クリプトスポリジウムは42試料中9試料(21%)、ジアルジアは25試料(60%)から検出され、それぞれの最大濃度は3.3 oocysts/Lと15.6 cysts/Lであった。地点別では、クリプトスポリジウムとジアルジア共に地点2における陽性率が最も高く、クリプトスポリジウムは14試料中6試料(43%)、ジアルジアは14試料すべてから検出された。地点3においては、クリプトスポリジウムは14試料中3試料(21%)、ジアルジアは10試料(71%)から検出された。一方、地点1においては、2011年2月にジアルジアが1.1 cysts/Lの濃度で検出された以外は、いずれの試料からも原虫は検出されなかった。これらの地点別の原虫の陽性率の差異は、指標微生物と同様の傾向であった。

遺伝子解析を目的としてRT-nested PCRを実行した結果、3地点で採取した42試料いずれからもクリプトスポリジウムは検出されなかった。この結果より、逆転写反応に供した試料中に感染性を有したクリプトスポリジウムに由来するRNAは存在しなかったことが示唆された。

Seminested PCRにより、ジアルジアは42試料中3試料(7%)から検出された。表3.1に示す通り、これらの3試料は地点2において冬期に採取されたものであり、蛍光顕微鏡観察によって得られた濃度は 7.4 ± 1.3 cysts/L (6.7~8.9 cysts/L, $n = 3$)であった。地点2で採取した試料のうち、Seminested PCRで陰性となった11試料におけるジアルジアの濃度は 5.3 ± 4.1 cysts/L (1.1~15.6 cysts/L, $n = 11$)であり、Seminested PCR陽性試料中のジアルジア濃度との間に有意差は認められなかった(t 検定, $P > 0.05$)。本研究で対象とした河川水のような原虫濃度が低い環境試料の場合、定性PCRで安定した陽性結果を得ることは困難であると考えられる。その原因として、原虫個体からの効率的な核酸抽出が困難であること、また、定性PCRの検出感度が必ずしも十分ではないことが挙げられる。

ジアルジア陽性となった3試料から得たPCR産物をダイレクトシーケンシングに供した結果、2試料で塩基配列解析対象領域の全長(393bp)の決定に成功した。1試料については、全長の決定はできなかったものの、塩基配列の解析に用いるには十分な長さ(307bp)は決定することができた。図3.4の系統樹にも示す通り、3試料すべてがヒトや様々な動物に感染する人獣共通感染型であるA型に分類された。遺伝子解析に成功した試料数に限りがあるものの、本研究の結果より、多摩川の河川水中を流下している原虫の多くはヒトへの感染性を有している可能性が示唆された。

A) クリプトスポリジウム



B) ジアルジア

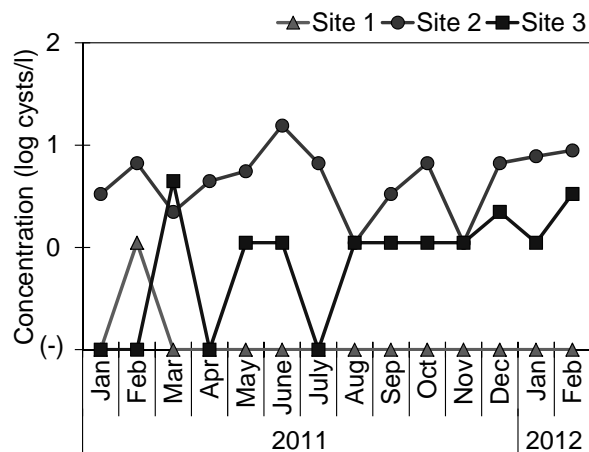


図 3.3 原虫の濃度変動

表 3.1 ジアルジアの遺伝子解析結果 (Seminested PCR 陽性試料)

採水地点	採水年月	蛍光顕微鏡観察		遺伝子解析		
		蛍光顕微鏡 観察結果	濃度 (cysts/L)	Seminested PCR 結果	解読塩基長 (bp)	遺伝子型
地点 2	2011 年 2 月	+	6.7	+	393	A
	2011 年 12 月	+	6.7	+	307	A
	2012 年 2 月	+	8.9	+	393	A

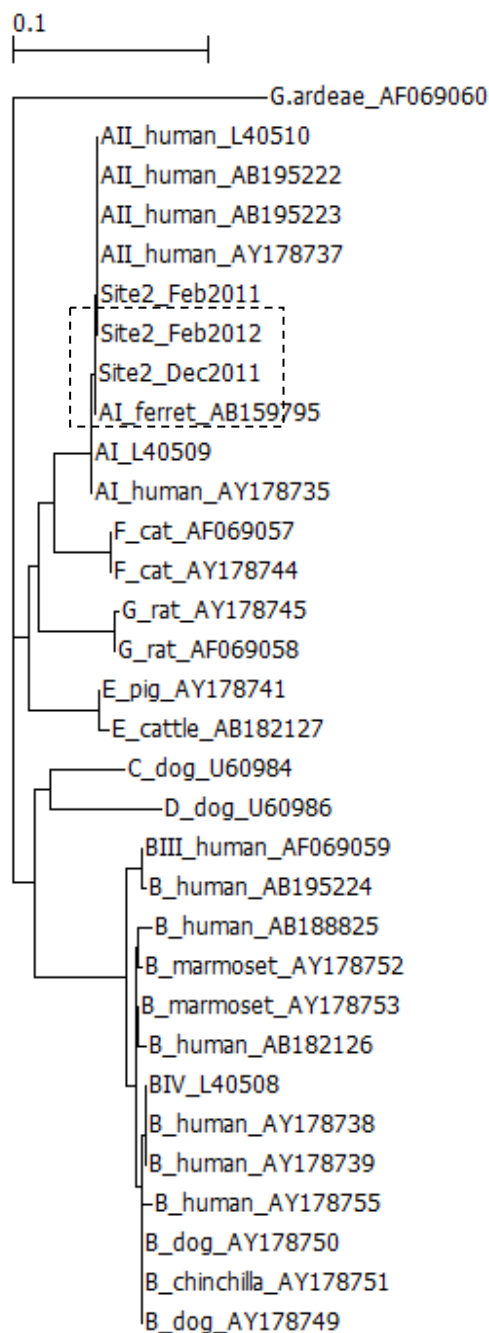


図 3.4 ジアルジアの系統樹

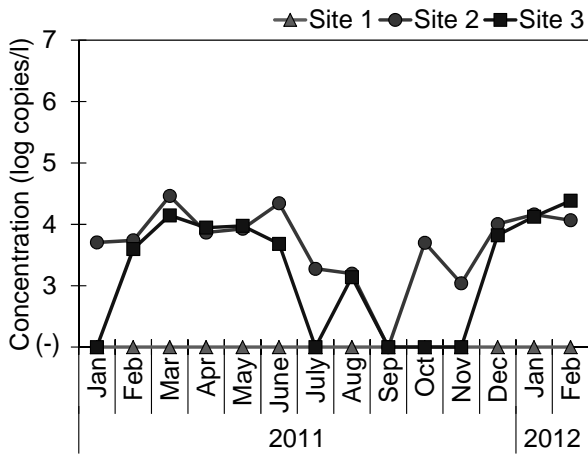
3.4 ウイルスの測定結果

本研究で測定対象とした4種類のウイルスの濃度変動を図3.5に示す。ウイルスの陽性率は、ヒトアデノウイルスが52% (22/42)、ノロウイルス GI が67% (28/42)、ノロウイルス GII が17% (7/42) およびアイチウイルスが55% (23/42) であった。採水地点別のウイルスの陽性率は、地点1が0~14%と低かったのに対し、地点2では21~100%、地点3では21~64%と高い値を示した。いずれか1種類以上のウイルスが検出された試料数は、地点1では3試料(21%)、地点2では14試料(100%)、地点3では12試料(86%)であり、3地点合計では29試料(69%)となった。

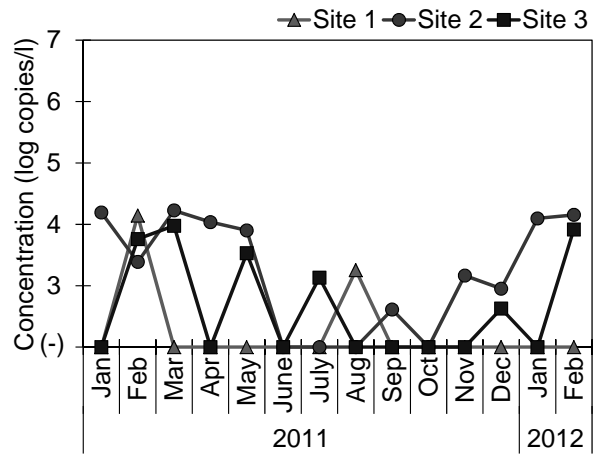
ウイルスの最大濃度は、ヒトアデノウイルスが29,000 copies/L、ノロウイルス GI が16,800 copies/L、ノロウイルス GII が138,000 copies/L およびアイチウイルスが3,150,000 copies/L であり、いずれも地点2において観測された。ヒトアデノウイルスは、世界中の多くの水環境中から高い陽性率で検出されているため、ウイルス指標として有望視されている(Jiang, 2006)。本研究においても、下水処理水を受容する中下流域からヒトアデノウイルスが高い陽性率と濃度で検出されたものの、ヒトアデノウイルスよりもアイチウイルスの方が高濃度で検出された。特に、地点2においては、最低でも38,400 copies/Lの濃度でアイチウイルスが検出されており、新たなウイルス指標としてのアイチウイルスの有効性(北島ら, 2011)が支持されたとと言える。

リアルタイムPCRで2ウェルがヒトアデノウイルスに対して陽性となった14試料(地点2:8試料, 地点3:6試料)について、Nested PCRとダイレクトシークエンシングに供した結果を表3.2に示す。Nested PCRにより、14試料中9試料(64%)から特異的な長さのPCR産物が得られた。ダイレクトシークエンシングの結果、322~347bpの塩基配列の同定に成功した。図3.6の系統樹にも示す通り、8試料が41型、1試料が40型に分類された。40型と41型は、いずれも胃腸炎に関与する遺伝子型であり、下水や河川水中に存在するヒトアデノウイルスの中で優占していることが知られている(Haramoto *et al.*, 2007)。本研究で得られた結果もこの知見を支持するものであり、多摩川の河川水中には水系感染リスクを有する遺伝子型が優占していることが明らかとなった。

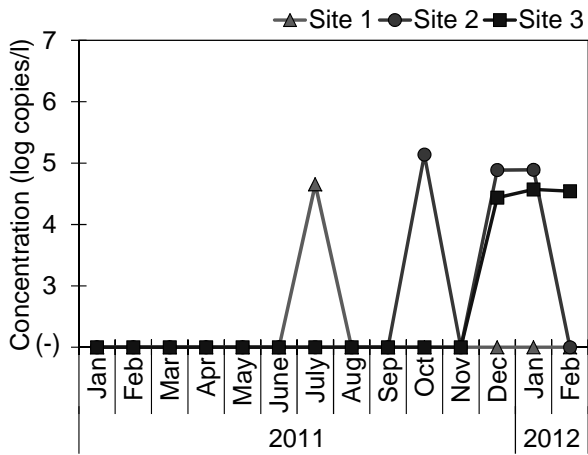
A) ヒトアデノウイルス



B) ノロウイルス GI



C) ノロウイルス GII



D) アイチウイルス

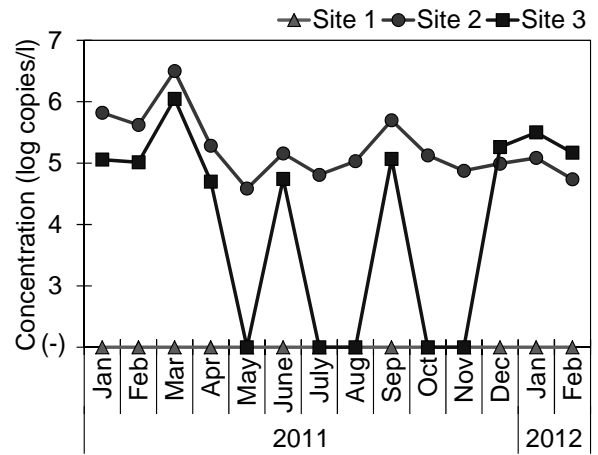


図 3.5 ウイルスの濃度変動

表 3.2 ヒトアデノウイルスの遺伝子解析結果（リアルタイム PCR 2 ウェル陽性試料）

採水地点	採水年月	リアルタイム		遺伝子解析		
		PCR		Nested PCR 結果	解読塩基長 (bp)	遺伝子型
		リアルタイム PCR 結果	濃度 (copies/L)			
地点 2	2011 年 1 月	++	5,070	—		
	2011 年 4 月	++	7,370	—		
	2011 年 5 月	++	8,460	+	347	41
	2011 年 6 月	++	22,100	+	347	41
	2011 年 7 月	++	1,890	+	345	41
	2011 年 12 月	++	10,100	+	346	41
	2012 年 1 月	++	14,500	+	326	40
	2012 年 2 月	++	11,700	+	347	41
地点 3	2011 年 3 月	++	14,000	+	322	41
	2011 年 4 月	++	8,850	—		
	2011 年 6 月	++	4,800	—		
	2011 年 12 月	++	6,650	—		
	2012 年 1 月	++	13,300	+	374	41
	2012 年 2 月	++	24,200	+	347	41

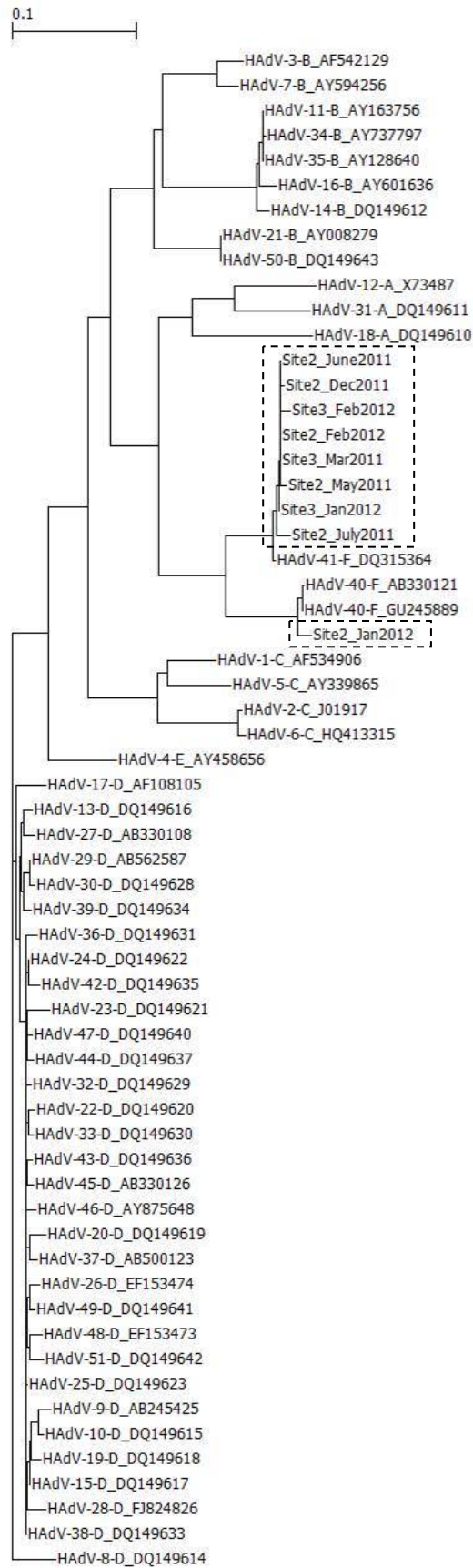


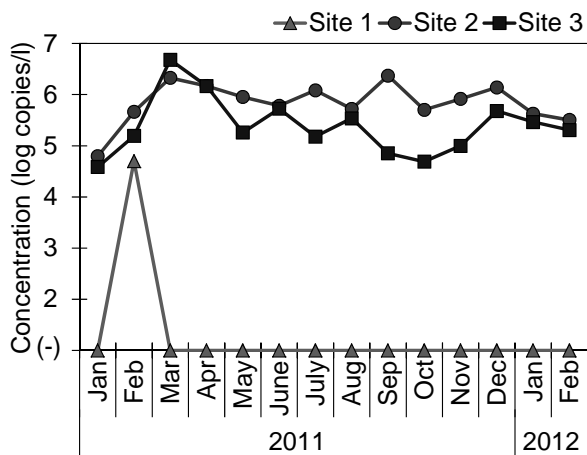
図 3.6 ヒトアデノウイルスの系統樹

3.5 バクテロイデスの測定結果

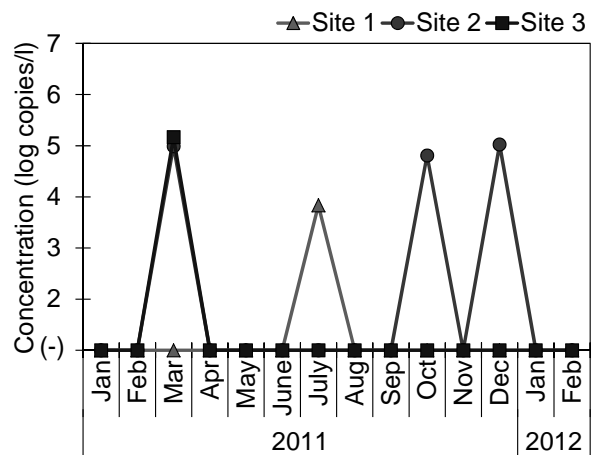
本研究で使用した陰電荷膜破碎型濃縮法の細菌への有効性を検証するため、ヒト、ブタおよび反すう動物に特異的なリアルタイム PCR を実行した結果を図 3.7 に示す。ヒトに特異的なバクテロイデスは、地点 2 と 3 で採取したすべての試料から 38,400~4,780,000 copies/L の高濃度で検出されたが、地点 1 で採取した試料では 1 試料のみが陽性と判定された。この結果は、地点 1 に比べ、地点 2 と 3 におけるヒト由来の糞便汚染の程度が強いことを示すものである。また、陰電荷膜破碎型濃縮法がバクテロイデスをはじめとした細菌に対して有効であることを示唆する結果でもある。

42 試料中 5 試料 (12%) がブタ、13 試料 (31%) が反すう動物に特異的なバクテロイデスに対して陽性と判定された。多摩川の流域内にはブタや反すう動物はほとんど生息しないことから、ヒトをはじめとした他の宿主に特異的なバクテロイデスと反応している可能性が考えられる。これまでに開発されているバクテロイデスのリアルタイム PCR 検出系の中には、宿主特異性の点で問題があるとされているものもあることから、本研究で使用したリアルタイム PCR 検出系の宿主特異性を検証することは今後の課題である。

A) ヒト特異的バクテロイデス



B) ブタ特異的バクテロイデス



C) 反すう動物特異的バクテロイデス

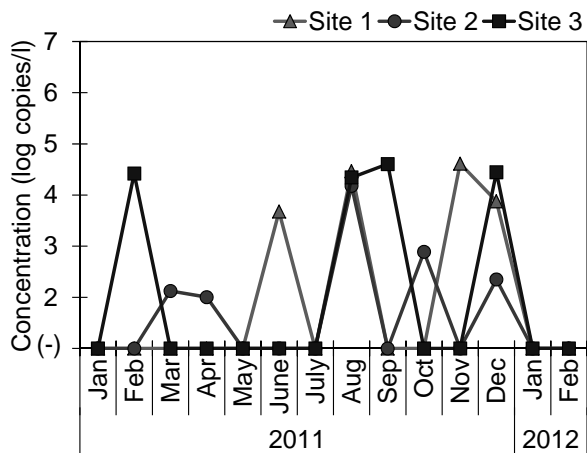


図 3.7 バクテロイデスの濃度変動

3.6 感染性を有する病原微生物の濃度の算出

本研究では、河川での親水活動による病原微生物の水系感染リスクの算出につながる知見を得ることを目的としているが、水系感染リスクを算出するためには、感染力を有する病原微生物の存在濃度、親水活動での病原微生物の摂取量、病原微生物の用量・反応モデルなどに関するデータ（パラメータ）が必要である。これらのデータには不確かな部分が非常に大きく、結果として、正確な水系感染リスクを評価することは不可能である。そこで、本研究では、水系感染リスクを明らかにするための第一段階として、各病原微生物の濃度を積算することにより、河川水中の病原微生物の総合的な汚染濃度を明らかにすることを試みた。

濃度積算の際には、蛍光顕微鏡観察によって定量した原虫はすべて感染力を有していたと仮定した。一方、リアルタイム PCR で定量したウイルスについては、感染力を失ったものが大部分を占め、定量値の 0.001~1% 程度のウイルスのみが感染力を有していたと考えられる。この数値は水試料やウイルスの種類によって大きく変化すると考えられるが、本研究ではすべてのウイルスに対して 0.1% のみが感染力を有していたと仮定した。すなわち、各ウイルスの濃度を 1,000 で除した値を積算した。

感染力を有する病原微生物の濃度を積算したものを図 3.8 に示す。地点 2 における病原微生物の濃度は 62~3,200 pathogens/L となり、年間を通して高い値で推移していることが分かった。地点 3 では、地点 2 よりも病原微生物の濃度変動幅が大きく、夏期から秋期にかけて濃度が低くなる傾向にあった。地点 1 における病原微生物の濃度は、大部分の試料で検出限界未満となった。

地点 1 においては、夏期には水遊びや遊漁をする人が多く見られたが、病原微生物による河川水の汚染の程度は非常に低く、このような親水活動には適した地点であることが分かった。地点 3 は、バーベキュー広場内に位置する地点であり、夏期には多くの利用者で賑わい、手足を水に浸けて遊ぶ人も見られた。夏期の病原微生物の濃度は 1~100 pathogens/L 程度であったことから、誤飲水量の少ない親水活動に対する水系感染リスクは許容範囲内であることが示唆された。一方、地点 3 においては、夏期においても 100 pathogens/L を上回る濃度レベルでの病原微生物の汚染が生じているため、誤飲水量の少ない親水活動にも適さない可能性が高い。実際に、調査地点付近で水に浸かっての親水活動は一度も確認できなかった。以上のことから、河川水中の病原微生物の濃度と親水活動の形態との間には整合性の取れた関係が成り立っていたと言える。

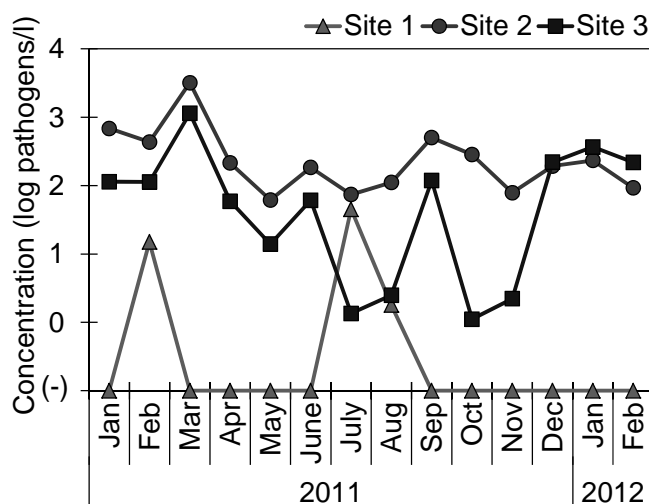


図 3.8 感染力を有する病原微生物の濃度（推定値）

4. まとめ

本研究では、多摩川の河川水中における水系感染性の病原微生物の存在実態の解明を試みた。本研究で得られた知見は以下に示す通りである。

- 1) 指標微生物の陽性率は、大腸菌群が 95% (40/42), 大腸菌が 76% (32/42), 嫌気性芽胞菌が 64% (27/42) および F フェージが 60% (25/42) であり, 陽性試料中の濃度は, 大腸菌群が 0.5~1,500 CFU/mL, 大腸菌が 0.5~76 CFU/mL, 嫌気性芽胞菌が 0.3~18 CFU/mL および F フェージが 0.2~6.6 PFU/mL であった。上流域の地点 1 に比べ, 中流域の地点 2 と下流域の地点 3 における指標微生物の陽性率および濃度は非常に高く, 地点 1 と地点 2 の間に複数立地する下水処理場が指標微生物の主要な排出源であることが示唆された。
- 2) 蛍光顕微鏡観察によって原虫の検出を試みた結果, クリプトスポリジウムは 42 試料中 9 試料 (21%), ジアルジアは 25 試料 (60%) から検出され, それぞれの最大濃度は 3.3 oocysts/L と 15.6 cysts/L であった。地点別では, 地点 2 における原虫の陽性率が最も高く, 地点 3 がそれに続き, 地点 1 ではほぼすべての試料が陰性となった。この原虫の検出結果は, 指標微生物と同様の傾向であった。また, 遺伝子解析の結果, クリプトスポリジウムは 42 試料いずれからも検出されなかったものの, ジアルジアは 3 試料 (7%) から検出され, いずれも人獣共通感染型である A 型に同定された。この結果は, 多摩川の河川水中を流下している原虫の多くがヒトへの感染性を有している可能性を示唆するものであった。
- 3) リアルタイム PCR によってウイルスの検出を試みた結果, ヒトアデノウイルスは 52% (22/42), ノロウイルス GI は 67% (28/42), ノロウイルス GII は 17% (7/42) およびアイチウイルスは 55% (23/42) の試料から検出された。いずれか 1 種類以上のウイルスが検出された試料数は, 地点 1 では 3 試料 (21%), 地点 2 では 14 試料 (100%), 地点 3 では 12 試料 (86%) であった。測定対象としたウイルスの中ではアイチウイルスが最も高い濃度で検出され, 現在提案されているヒトアデノウイルスよりもウイルス指標として適していることが示唆された。また, ヒトアデノウイルスの遺伝子解析結果より, 胃腸炎に関与する水系感染性の遺伝子型である 40 型 (1 試料) と 41 型 (8 試料) が優占して存在していることが明らかとなった。
- 4) バクテロイデスの検出を試みた結果, 地点 2 と 3 で採取したすべての試料からヒトに特異的なバクテロイデスが高濃度 (38,400~4,780,000 copies/L) で検出され, 本研究で使用した陰電荷膜破碎型濃縮法が細菌の濃縮に対しても有効であることが示された。
- 5) 水系感染リスクの評価につながる知見として, 感染力を有する病原微生物の濃度を推定した結果, 地点 2 における濃度が 62~3,200 pathogens/L と最も高い値で推移すること, 地点 3 では夏期から秋期にかけて比較的低い濃度になること, 地点 1 では年間を通して非常に低い濃度を示すことが明らかとなった。これらの地点別の病原微生物の濃度と親水活動の形態との間には整合性の取れる関係が成り立っていた。

謝辞

本研究の実施にあたり，山梨大学大学院医学工学総合研究部修士課程の小田切美希氏に健康関連微生物の測定を補助して頂いた。また，アリゾナ大学農学・生命科学部の北島正章氏にアイチウイルスの測定に関して助言を頂いた。ここに記して深謝する。

参考文献

- 1) 原本英司，片山浩之，浅見真理，秋葉道宏，国包章一（2010）河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発，水道協会雑誌，Vol. 79, No. 10, pp. 2～11.
- 2) Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R., Lal, A. A. (1999) Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 4, pp. 1578～1583.
- 3) Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A. A. (2000) Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 12, pp. 5492～5498.
- 4) 岸田直裕，古川一郎，黒木俊郎，猪又明子，泉山信司，森田重光，秋葉道宏（2010）リアルタイム RT-PCR 法を用いた河川試料水中のクリプトスポリジウムの高感度定量，日本水処理生物学会誌，Vol. 46, No. 4, pp. 181～189.
- 5) Read, C. M., Monis, P. T., Thompson, R. C. A. (2004) Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 4, No. 2, pp. 125～130.
- 6) Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., Pring-Akerblom, P. (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR, *Journal of Medical Virology*, Vol. 70, No. 2, pp. 228～239.
- 7) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., Katayama, K. (2003) Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No.4, pp. 1548～1557.
- 8) 端昭彦，北島正章，山下照夫，皆川洋子，片山浩之，大垣眞一郎（2009）Real-time RT-PCR によるアイチウイルスの核酸検出および遺伝子型識別法の開発，第 57 回日本ウイルス学会学術集会抄録集，p. 131.
- 9) Xu, W., McDonough, M. C., Erdman, D. D. (2000) Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38, No. 11, pp. 4114～4120.
- 10) Ko, G., Cromeans, T. L., Sobsey, M. D. (2003) Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 12, pp. 7377～7384.
- 11) Lee, C. S., Lee, J. (2010) Evaluation of new *gyrB*-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 82, No. 3, pp. 311～318.
- 12) Mieszkin, S., Furet, J. P., Corthier, G., Gourmelon, M. (2009) Estimation of pig fecal contamination in a

river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 10, pp. 3045~3054.

- 13) Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L., Farnleitner, A. H. (2006) Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 8, pp. 5610~5614.
- 14) Jiang, S. C. (2006) Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review, *Environmental Science & Technology*, Vol. 40, No. 23, pp. 7132~7140.
- 15) 北島正章, 端昭彦, 原本英司, 片山浩之, 古米弘明 (2011) 下水および河川水中におけるアイチウイルスの挙動の定量的解析, 第45回日本水環境学会年会講演集, p. 438.
- 16) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S. (2007) Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 103, No. 6, pp. 2153~2159.

多摩川流域における親水活動を介した健康関連微生物の水系感染リスクの評価

(研究助成・学術研究VOL. 41—NO. 299)

著 者 原本 英司

発行日 2012年12月1日

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>