

氏名・本籍	土岡 宏彰 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第50号
学位授与の日付	令和元年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	水域の微生物リスク評価に用いる糞便汚染指標細菌および その測定法に関する研究
学位論文審査委員	主査 准教授 橋本 温 副査 教授 原田 浩幸 教授 西村 和之 特任教授 森永 力

学位論文の要旨

水道水源、水産養殖やレクリエーション水域の病原微生物リスクを評価することは、安全な飲料水や水産物の供給、遊泳者の健康保護等の観点から重要である。水域の病原微生物リスクを評価するためには、水中に存在する可能性のあるすべての病原微生物を測定することが望ましいが、水系病原微生物にはコレラ、赤痢などの細菌、クリプトスポリジウムなどの原虫、ノロウイルスなどのウイルスなど様々な生物種が存在し、各々に専門知識と技術が要求され、時間とコストがかかることから現実的ではない。そのため、病原微生物の汚染指標として、大腸菌を中心とした糞便汚染指標細菌が測定され、その代替とされている。しかしながら、大腸菌は細菌に対する汚染指標としては有効であるものの、細菌と比較して消毒耐性や環境中での生残性の高い原虫や生物学的特性の大きく異なるウイルスの指標としては不十分であると考えられている。また、近年、活発に研究が進められている糞便汚染起源解析 (微生物ソーストラッキング) に適した指標についての知見はまだ不十分であり、新たな指標の探索や有効性の検証が必要である。

昨今、水道分野においても HACCP の概念が導入され、終製品である上水の検査に加えて、工程管理や原料である水道原水の検査の重要性が認識され始めている。さらに、定量的微生物リスク評価 (QMRA) についても検討がなされ、許容感染リスクから原水中の許容される病原微生物濃度の推定などが試みられ、これらの視点からも水道原水の検査の重要性が高まっている。また、QMRA は水道分野だけでなくレクリエーション水域や水産養殖水域への適用も検討されており、水利形態別、水域別に水質データを取得し、蓄積していくことが重要となる。しかしながら、一般に水中の病原微生物濃度は低く、測定には試料水の濃縮手法としてメンブレンフィルター

(MF) 法が用いられるが、高濁度水等、水質によっては濃縮量を十分に得られないことや夾雑菌のマスキングにより正確な計数が阻害されるなどの問題がある。そのため、試料の水質に幅広く対応可能な簡便な濃縮法が求められている。

以上の課題に対応するために、本研究では、MF 法のろ過性能を簡便に向上させ、既存の定量法と組み合わせ可能な細菌のケーキろ過濃縮法を開発するとともに、海域の大腸菌測定に適用し、感度と特異性の向上を図った（第 2 章）。また、生残性の高い糞便汚染指標細菌であるウェルシュ菌芽胞に着目し、「ソーストラッキング指標」、「海域のウイルス指標」としての新たな指標機能の可能性について研究を行った（第 3 章および第 4 章）。

本論文は第 1 章から第 5 章で構成した。第 1 章では、本研究の背景および目的について述べた。

第 2 章では、高濁度試料水の細菌試験に適用可能なケーキろ過濃縮・定量法の開発について述べた。ハイドロキシアパタイト粉体を用いた本ケーキろ過濃縮法は、大腸菌を用いた添加回収試験の結果、80%以上の回収率が認められ、従来の MF 法と比較して有意に高い回数率であった。また、Colilert-18 (Quanti-Tray/2000) 法と組み合わせた河川水中の大腸菌測定では、原法と高い相関が認められ、さらには、本法を海水の大腸菌測定に適用することで、特異性が向上し感度を 100 倍に高めることができた。これらの結果と既存の文献情報を併せて、本法の利点と可能性について考察した。

第 3 章および第 4 章では、ウェルシュ菌芽胞の「ソーストラッキング指標」、「ノロウイルス指標」としての有効性について、ヒトおよび家畜糞便由来試料、沿岸海域の海水試料の調査結果からそれぞれ論述した。

第 3 章では、ヒトおよび家畜（ウシ、ブタ、トリ）糞便由来試料中のウェルシュ菌芽胞濃度を測定し、それぞれの分離株について、6 つのウェルシュ菌毒素遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR により毒素型を調べ、その分布特性について述べた。ウェルシュ菌芽胞は家畜糞便由来試料よりもヒト糞便由来試料中に多く存在しており、ヒトおよび家畜糞便由来株ともに A 型ウェルシュ菌がも多く分離された。また、ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子 (*cpe* 遺伝子) はヒト糞便由来株では全 630 株中 146 株から検出された（約 23%）のに対し、家畜では全 486 株中ウシ糞便由来の 1 株のみであった。既存の文献情報と併せて、ヒトソーストラッキング指標としての *cpe* 遺伝子の可能性について考察した。

第 4 章では、ウイルス指標としてのウェルシュ菌芽胞について、大腸菌との濃度比較、ノロウイルスとの濃度相関から、その有効性について述べた。はじめに、広島湾海域 11 地点における、ウェルシュ菌芽胞と大腸菌濃度を測定し、ウェルシュ菌芽胞濃度は大腸菌濃度よりも有意に高く、海域においても保存性の高い糞便汚染指標であることを示した。次に、ノロウイルス流行シーズンに、海域 5 地点においてノロウイルスの濃度を同時に測定し、指標微生物との相関を評価した。その結果、ウェルシュ菌芽胞とトウガラシ微班ウイルスはノロウイルス GII と高い相関が認められた。一方、大腸菌は相関が認められたものの、不検出データが多く、ノロウイルス GII が検出された全 12 試料中 5 試料において大腸菌は検出されなかった。海水試料から分離したウェルシュ菌芽胞の *cpe* 遺伝子保有率と既存の文献情報とを併せて、ウェルシュ菌芽胞の海域におけ

るウイルス指標としての可能性について考察した。後に、第5章では、本研究を総括した。第2章で開発した細菌のケーキろ過濃縮法と第3章および第4章で検討したウェルシュ菌芽胞の水質指標としての評価結果を基に、水域の微生物学的リスク評価および管理に向けた展望について論述した。