

研究助成テーマ；淀川流域における感染性病原微生物の 実態把握と遊泳等による感染リスク推定モデルの構築

京都大学大学院 工学研究科 浅田安廣

1. はじめに

かつては水系感染事例が頻発していたものの、上下水道の整備によりその事例数は減少していった。しかし、十分に整備が進んだ現代で未だに水系感染事例が生じている¹⁾ことも事実である。その主な原因として、水源汚染が挙げられる¹⁾。このような状況を食い止め、常に微生物学的安全性を確保するためには、日常の水源状況把握といった水源管理が重要となる。

琵琶湖・淀川水系は、滋賀県、京都府、大阪府などの多くの人々の水道水源である。しかし、その水源は滋賀県あるいは京都市の下水処理放流水が混在しており、擬似的に水を反復利用している状況となっている。そのため、上水道に関わる微生物学的安全性の確保には、水源管理と適切な処理が必要不可欠である。さらに将来、淀川に水浴場などのレクリエーション施設を設置した場合、非意図的に河川水を曝露することになることから、非意図的の曝露による健康被害の発生を未然に防ぐためにも日常の河川汚染状況把握といった微生物モニタリングが重要となる。そして、微生物学的安全性が確保可能な基準を設ける必要がある。

河川の微生物汚染状況把握には、大腸菌群、近年では大腸菌数の測定が行われてきている。病原微生物自体は測定が煩雑であり、簡便かつ日常的にモニタリングを行うことは現実的ではないことから、このように簡便に測定可能な指標細菌を用いてモニタリングが行われているのが現状である。そのため、実際の病原微生物がもたらすヒトへの健康影響は把握できていなく、微生物学的安全性が確保可能かは明らかとなっていない。そこで、定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment: QMRA)手法を用いて、病原微生物の感染リスクを定量化し、許容リスクレベルに対する病原微生物の濃度に関して検討を行うことが必要となる。

以上の背景を踏まえ、本研究では病原微生物として重要な水系感染症原因微生物である *Campylobacter jejuni* (以降、*C. jejuni* と記載)とアデノウイルスを取り上げ、淀川水系での存在状況・汚染源を把握し、その安全性の評価を行う。その際、非意図的に河川水を曝露した病原微生物の感染リスクの推定モデルの構築を行うことを目的とする。

ここで取り上げた *C. jejuni*、アデノウイルスは共に、胃腸炎以外にも重篤な疾病を引き起こす病原微生物である。*C. jejuni* は、胃腸炎回復後に続発症として、難病に指定されている神経疾患のギラン・バレー症候群、炎症性疾患の炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)など重要な疾病を引き起こしている。さらに食品安全委員会が推定した年間延べ1.5億人が *C. jejuni* 感染者であるという評価²⁾を考慮すると、下水には常に高濃度で *C. jejuni* が排出されていると考えられる。アデノウイルスは、血清型で引き起こされる疾病は異なるが、胃腸炎、咽頭結膜炎(プール熱)、肺炎などがある。そして、遊び、泳げる河川を想定する場合、特に子供の河川水の曝露・接触によりアデノウイルスが感染し、咽頭結膜炎、胃腸炎を引き起こす可能性がある。以上、これらの病原微生物は微生物リスク管理を行う上で重要な微生物であると判断できる。

また近年、遺伝子に基づいた分子生物学的手法により病原微生物の測定が可能となってきたものの、遺伝子に基づいた測定方法では、死活あるいは感染能を失った病原微生物も含めて測定してしまうことから、存在量と潜在リスクを過大評価する危険性がある。そのため、病原微生物の存在量を把握する際にはヒトに直接影響を及ぼす感染能を持った病原微生物数を測定することが重

要となる。

そこで本研究では、淀川水系の主要河川を選定し、病原微生物として *C. jejuni*、アデノウイルスの感染性微生物数を測定する。そして、病原微生物の非意図的曝露による感染リスクの推定モデルと得られた存在量データから QMRA により感染確率を推定し、その安全性を考察する。

2. 方法

本研究は2種類の実験的検討から構成される。まず、1) 河川水中の病原微生物ならびに指標微生物(大腸菌)数の測定、そして、2) 水浴による病原微生物感染リスクの定量化を行い、最後に本研究で得られたこれらのデータから微生物学的安全性について評価する。

2.1. 河川水中の病原微生物ならびに指標微生物数の測定

1) サンプリングについて

河川水については、採水場所として桂川(納所地点、宮前橋付近)、宇治川(宇治川三山地点、御幸橋付近)、木津川(八幡地点、旧京阪国道沿い)、淀川(淀川河川公園付近)を選定した。

採水用バケツと採水瓶は、あらかじめ 180 °C、2 時間の乾熱滅菌を行った。また採水用ポリタンクは、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液に一晩つけ置き有機物汚染を除去し、十分に洗浄した後、250 ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液に一晩つけ置き消毒した上で十分に洗浄したものを使用した。各採水地点で試料水を採取した後、保冷した状態で実験室まで運搬し、測定まで 4 °C で保存した。

2) リアルタイム PCR による病原微生物の検出

C. jejuni に関してはリアルタイム PCR による検出、アデノウイルスに関してはリアルタイム PCR による検出・定量まで行った。詳細な実験方法を以下に示す。なお、リアルタイム PCR 機器としては StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いており、全ての試料においてコントロール遺伝子を用いた PCR 阻害評価を行い、PCR 阻害がないことを確認している。

C. jejuni の検出

河川水試料 3 L を滅菌した孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC, A020A090C) を用いて加圧ろ過を行った後、フィルター付着物をリン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁させた。その後、DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) を用いて鋳型 DNA を抽出した。最後に、Cycleave® PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing Kit を用いて、鋳型 DNA 試料から *C. jejuni* の検出を行った。

アデノウイルスの検出

試料水を滅菌済 2 L 広口丸型ボトル (Thermo Scientific) に入れ、塩化ナトリウム (最終濃度 0.4 M)、8% (w/v) Polyethylene Glycol 6000 molecular biology grade (SERVA Electrophoresis) を加え、完全に溶解するまで攪拌し、4 °C で一晩静置した。一晩静置後、この溶液を Beckman Avanti HP-26XP (Beckman Coulter) を用いて 4 °C、10000 rpm で 45 分間遠心分離し、上澄み水を捨てた。続いてボトル壁面の付着物に対して滅菌済み PBS を 2 mL 加え、4 °C で 1 時間静置して再懸濁した。再懸濁後に 2 分間の超音波洗浄を加え、懸濁液にクロロホルム 2 mL を加えて 15 分間振り混ぜた。そして 12000 rpm、10 分間の遠心分離、クロロホルム層の吸引除去を行った後、さらにクロロホルム 2 mL を加え同様の操作を行った。最後に微生物汚染による影響を軽減するため、Antibiotic-Antimycotic 100X (Life technologies) を最終濃度 1% (v/v) となるように加えこれを濃縮試料とした。

続いて濃縮試料から 200 μL 採り、High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) を用いてウイルス核酸を抽出した。そして、Lion (2003) らの方法³⁾を参照し、リアルタイム PCR によるウイルス核酸の定量を行った。なお、濃縮の際のウイルス粒子ロスを考慮するために、ATCC で購入した Human Adenovirus 40 (VR-931) を用いて回収率を求め、ウイルス濃度算出に用いた。

3) 河川水中の感染性病原微生物数の測定

感染性 *C. jejuni* の定量

河川水試料 3 L (30 本分) を滅菌した孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC, A020A090C) を用いて加圧ろ過を行った後、20 mL の Bolton 培地 (OXOID) に浸けて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間微好気培養を行った。24 時間培養後、培養液 2 mL を Preston 培地 (OXOID) 10 mL に添加し、42 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間微好気培養した。増菌培養後に培養液 1 mL を DNA 抽出し、*C. jejuni* に特異的な *mapA* 遺伝子の 2 種類のプライマー⁴⁾ を用いて PCR により *C. jejuni* の検出を行った。なお、PCR にはサーマルサイクラー (TAKARA PCR Thermal Cycler Dice, タカラバイオ) を用いた。

最後に、1.5% アガロースゲル電気泳動により増幅断片を分離し、電気泳動後のエチジウムブロマイドで染色後、UV トランスイルミネーターで増幅断片を確認した。陽性試料数に基づいて、MPN 法で感染性 *C. jejuni* 濃度を算出した。

感染性アデノウイルスの定量

独立行政法人理化学研究所から分与されたヒト結腸癌由来の細胞株である CaCO-2 (RBRC-RCB0988) を用いて感染実験を行った。感染実験は、Pintó et al. (1994)⁵⁾ を参考にし、本研究室で構築した手法に基づいた。以下に手順を示す。

CaCO-2 細胞を 70~80% 程度に集密するまで培養したウェルに対して、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のトリプシン処理で表面抗原を開裂・活性化させたウイルス試料 (1, 10, 100 倍希釈試料) 80 μL を接種した。なお、各希釈段階に対し、3 ウェルを用いた。そして、37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 分間の培養により、ウイルスを細胞に吸着させた。その後、培養液を取り除き、FBS 無添加の MEM 培地を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 7 日間細胞培養を行った。7 日間の培養後、得られた培養液の凍結融解を 3 回繰り返し、細胞内に保持されているウイルス粒子を抽出した。抽出したウイルス粒子から High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) を用いてウイルス核酸を抽出した。

続いて、リアルタイム PCR で使用したアデノウイルス F 型検出用プライマー対³⁾ を用いて PCR によるアデノウイルスの検出を行った。最後に、2.0% アガロースゲル電気泳動により増幅断片を分離し、電気泳動後のエチジウムブロマイドで染色後、UV トランスイルミネーターで増幅断片を確認した。各希釈段階の陽性試料数に基づいて、MPN 法で感染性ウイルス濃度を算出した。

4) 河川水中の大腸菌数の測定

大腸菌濃度測定の手順は、培養に特定酵素基質培地を用いて陽性試料を定性的に判定し、3 段階 5 本 MPN 法によって最確数を確定した。培養には上水試験方法に記載されている IPTG 添加 ONPG-MUG 培地を用いた⁶⁾。

まず、ねじ口瓶試験管に IPTG 添加 ONPG-MUG 培地を 10 mL ずつ分注し、試料水を十分振り混ぜ、接種量が 10 mL, 1 mL, 0.1 mL, 0.01 mL となるよう、必要に応じて希釈した上で、分注した培地に 10 mL を添加した。接種後、37 $^{\circ}\text{C}$ で、24 時間培養を行った。

培養後、黄変が認められたねじ口瓶試験管に紫外線ランプ (366 nm) を照射し、蛍光の有無を調べた。この時、陽性確認液よりも蛍光が強い場合は陽性と判定し、弱い場合は陰性と判定した。そして陽性数から 3 段階 5 本 MPN 法によって最確数を確定した。

2.2. 水浴による病原微生物感染リスクの定量化

ここでは、河川でのレクリエーションとして最も曝露量が多いと想定される水浴を微生物リスク定量化のシナリオとして設定した。詳細なシナリオについては、表 1 に示す。

表1 水浴による曝露シナリオ⁷⁾

接触形態	被曝露者	曝露形態	曝露頻度	1回当たりの摂取量
水浴	水浴者	水浴中の誤飲	40 日/年	100 mL/日

まず、得られた淀川河川水中の感染性 *C.jejuni*、アデノウイルス濃度に非意図的曝露量⁷⁾を乗ずることでヒトが1日の水浴により摂取する *C.jejuni*、アデノウイルス摂取量を求めた。さらに各用量-反応モデル式^{8,9)}(式1, 2)を用いて、一回当たりの感染確率(P_d)人⁻¹回⁻¹を算出した。そして、1年間の水浴日数⁷⁾に基づいて、式(3)を用いて各病原微生物曝露による年間の感染確率 P_y 人⁻¹年⁻¹を算出した。

$$P_d = 1 - \exp(-0.686 \times D) \quad (\text{式1: } C.jejuni \text{ 用量-反応モデル})^8$$

$$P_d = 1 - \exp(-0.4172 \times D) \quad (\text{式2: アデノウイルス用量-反応モデル})^9$$

$$P_y = 1 - (1 - P_d)^{40} \quad (\text{式3: 年間水浴日数40日})$$

ここで、 D は微生物摂取量(個)を表す。

3. 結果と考察

3.1. 河川水中の *C.jejuni* ならびにアデノウイルス遺伝子の検出状況

桂川、淀川に関しては、2015年9月～2016年1月まで毎月1回、木津川、宇治川に関しては、2015年11月～2016年1月まで毎月1回測定を行った。

C.jejuni 遺伝子の検出結果では、桂川の12月試料のみ検出が確認された。一方、アデノウイルス遺伝子の検出結果は、全試料で検出が確認された。図1にアデノウイルスの定量結果をまとめる。

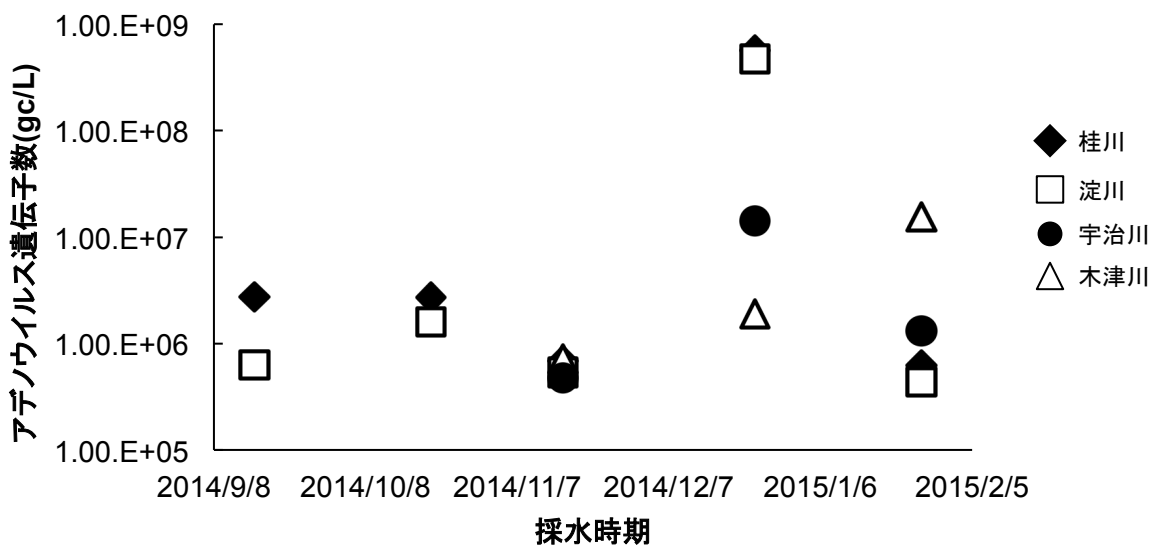


図1 各河川におけるアデノウイルス遺伝子数の定量結果

各河川の定量結果は、桂川で $6.2 \times 10^5 \sim 5.7 \times 10^8 \text{ gc/L}$ 、淀川で $4.3 \times 10^5 \sim 4.8 \times 10^8 \text{ gc/L}$ 、木津川で $7.2 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^7 \text{ gc/L}$ 、宇治川で $4.7 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^7 \text{ gc/L}$ であった。各河川には、規模の大小はあるものの下水処理後の放流水が流れていることから、各河川に高濃度にアデノウイルスが検出された可能性が高い。さらに宇治川の上流部には琵琶湖が存在することから、アデノウイルス自体は琵琶湖流域から流下している可能性も考えられる。

3.2. 河川水中の感染性 *C. jejuni* ならびにアデノウイルス濃度

桂川、淀川の感染性 *C. jejuni* 濃度を表 2 に、4つの河川の感染性アデノウイルス濃度測定結果を遺伝子数も含めて表 3 にまとめる。

表 2 桂川、淀川の感染性 *C. jejuni* 定量結果

採水日	桂川	淀川
	感染性 <i>C. jejuni</i> 濃度 (MPN/L)	感染性 <i>C. jejuni</i> 濃度 (MPN/L)
2014/9/10	0.011	ND
2014/10/21	ND	0.011
2014/11/16	0.011	ND
2014/12/24	0.07	0.011
2015/1/26	0.011	ND

表 3 各河川の感染性アデノウイルス定量結果

採水日	桂川		淀川	
	アデノウイルス遺伝子数 (gc/L)	感染性アデノウイルス粒子数 (MPNIU/L)	アデノウイルス遺伝子数 (gc/L)	感染性アデノウイルス粒子数 (MPNIU/L)
2014/9/16	2.8×10^6	ND	6.3×10^6	ND
2014/10/21	2.7×10^6	ND	1.6×10^6	ND
2014/11/16	6.8×10^5	ND	5.4×10^5	ND
2014/12/24	5.7×10^8	6.0×10^3	4.8×10^8	5.6×10^2
2015/1/26	6.2×10^5	1.5×10^3	4.3×10^5	ND
採水日	木津川		宇治川	
	アデノウイルス遺伝子数 (gc/L)	感染性アデノウイルス粒子数 (MPNIU/L)	アデノウイルス遺伝子数 (gc/L)	感染性アデノウイルス粒子数 (MPNIU/L)
2014/11/16	7.2×10^5	ND	4.7×10^5	ND
2014/12/24	1.9×10^6	ND	1.4×10^7	ND
2015/1/26	1.5×10^7	6.0×10^3	1.3×10^6	1.5×10^3

感染能を持つ *C. jejuni* は低濃度でありながら、10月を除き毎月桂川で存在が確認されていた。これは、桂川流域に流れている下水処理後の放流水が影響を及ぼしていると推察される。一方、感染性アデノウイルスは定量下限が高いことから検出数は *C. jejuni* に劣るものの、濃度自体は特に桂川において高濃度で確認された。そして遺伝子の検出結果も踏まえると、桂川河川自体に感染性の病原微生物が高い濃度で存在し下流部へ流下してくる可能性が高いといえる。また表 2, 3 から分かるように、*C. jejuni*, アデノウイルス共に感染性の微生物濃度が高く確認された場合、遺伝子数も高い濃度で検出されていることから、微生物汚染を把握する上で遺伝子数の測定が有用である可能性が示唆される。

3.3. 指標微生物と感染性病原微生物の相関性

各河川の大腸菌存在量を図 2 にまとめる。10月の桂川、淀川の場合のみ高濃度の大腸菌検出が確認されたが、その他のケースは各河川とも同程度濃度で存在していた。

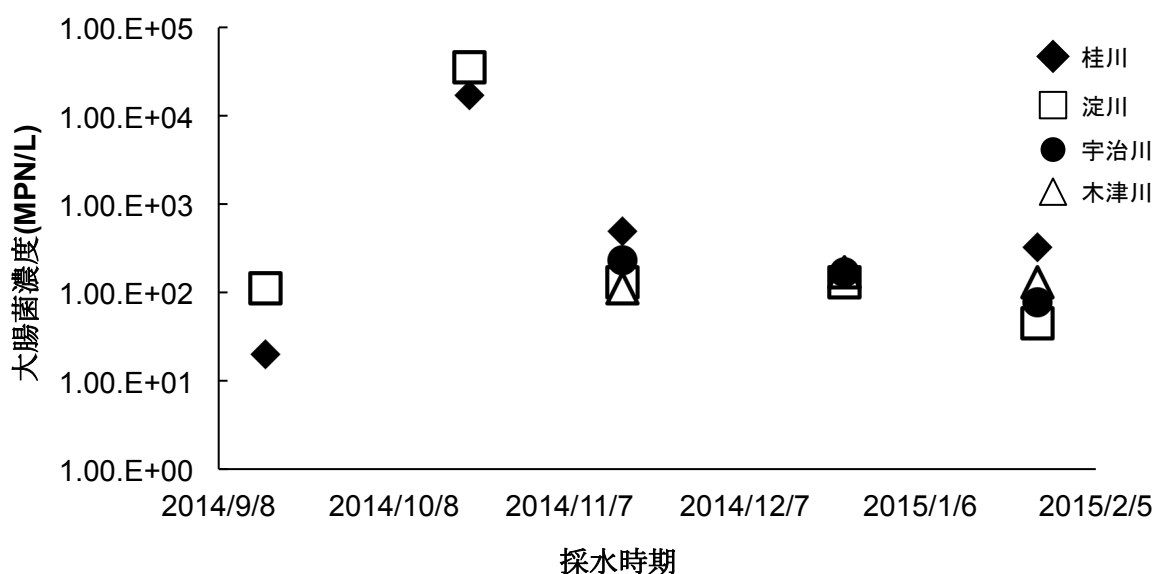


図 2 各河川における大腸菌定量結果

続いて、感染性微生物濃度と大腸菌濃度の相関性について図 3 にまとめる。ウイルスに関しては、サイズや挙動等が異なることから相関性が低いと想定され、*C. jejuni* に関しては同様な挙動を示す可能性があることから相関性があると想定していたが、結果として *C. jejuni*, アデノウイルス共に相関性が低い結果となった。

さらに感染性 *C. jejuni* が桂川で検出されなかった 10月に、大腸菌が高濃度で検出されているという結果が得られた。*C. jejuni* の排出源はヒト、鳥が主である一方で、大腸菌に関しては様々な動物から排出されている。このような排出源の相違が今回の結果に影響している可能性があり、大腸菌は病原微生物の汚染状況を把握する指標として限界がある可能性があると考えられる。

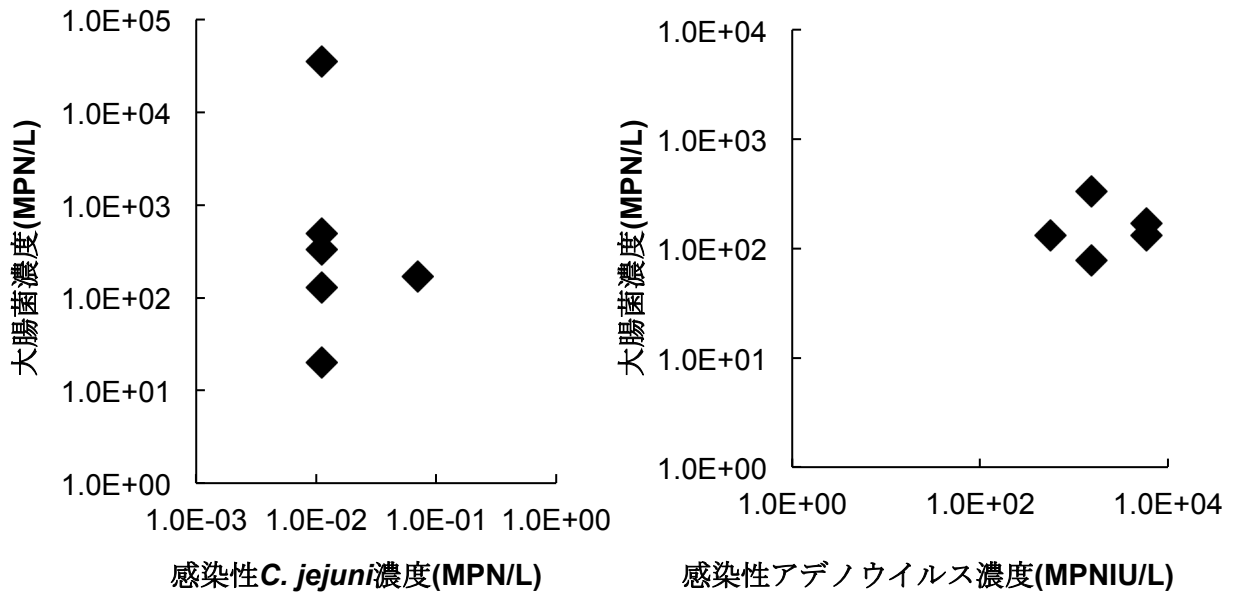


図3 各病原性微生物濃度と大腸菌濃度の相関性

3.4. 水浴による病原微生物感染リスクの定量化

本研究では淀川の感染性データを用いて、水浴による病原微生物の感染リスク定量化を試みた。ここで使用したデータ数は、*C. jejuni*、アデノウイルスともに1データのみであるため、以下に示すリスク値は今回の調査におけるリスクの最大値であることに注意が必要である。1回水浴した場合と40回水浴を行った場合の感染リスクの定量結果を図4にまとめる。

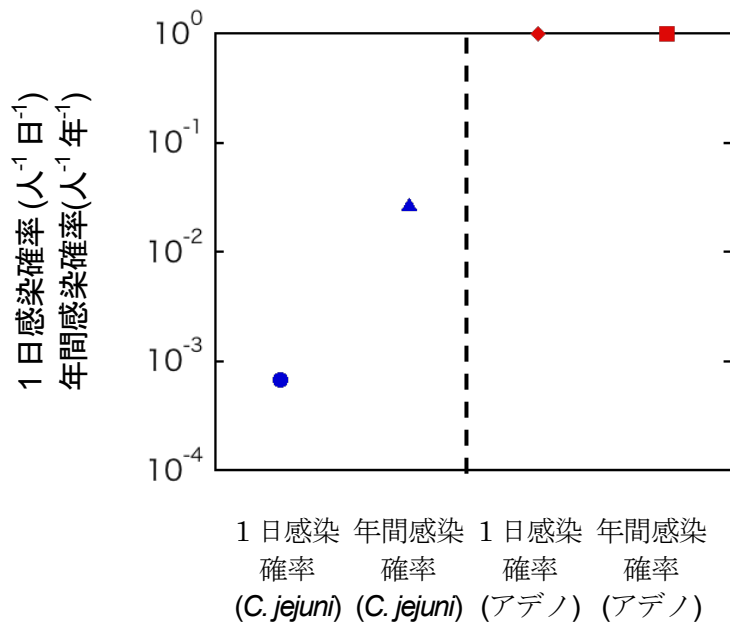


図4 各病原性微生物の水浴による感染確率の推定結果

*C. jejuni*については、1回の水浴による感染リスクは $0.0007 \text{ 人}^{-1} \text{ 日}^{-1}$ 、年間40日の水浴による感染リスクは $0.03 \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ となった。その一方で、アデノウイルスは1日の水浴にも関わらず感染確率が100%となった。続いて、年間感染確率を $0.001 \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ と設定した場合の各病原微生物濃度と必要な要求処理能について図5にまとめる。*C. jejuni*については $1.4 \log_{10}$ と比較的対応可能な結果となったが、アデノウイルスについては約 $6.0 \log_{10}$ と消毒耐性が強いウイルスに対して高い要求処理能であるといえる。そのため、河川の微生物学的安全性の確保には下水処理でのウイルス制御、ならびに水環境中の感染性ウイルスのモニタリングが重要であると考えられる。

しかし、今回の検討はあくまでも高いリスクを想定した場合であり、より正確なリスクを推定していくためには、定期的に感染性を持つ微生物濃度を収集していく必要がある。また、将来的に微生物リスク管理を行っていくためには、大腸菌にかわる指標微生物あるいは遺伝子数からの汚染度合予測などを管理に必要な基準となる測定項目を検討していく必要があると考えられる。

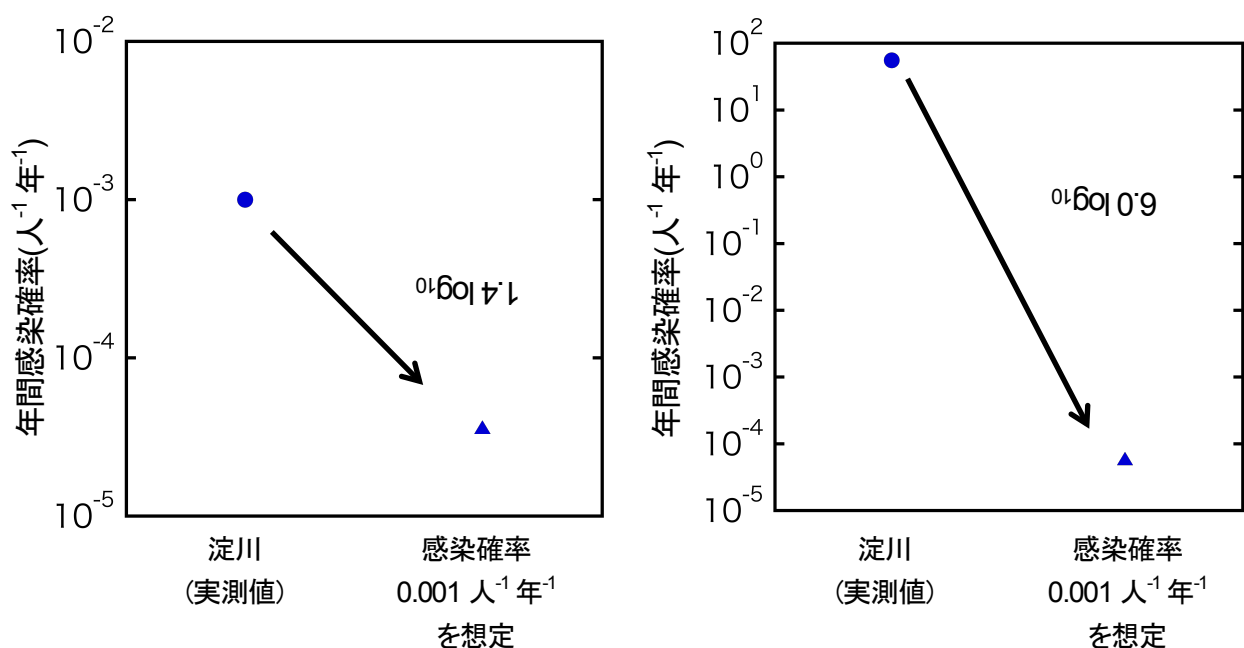


図5 水浴による年間感染確率(0.001 人⁻¹ 年⁻¹)を満たすのに必要な要求処理能

4. まとめ

本研究では、淀川水系を対象とし、感染性を持つ*C. jejuni*およびアデノウイルスの濃度を測定するとともに、淀川での水浴を想定した場合の感染リスクの定量化を試みた。以下に得られた知見を述べる。

- 1) 各河川で、感染性の*C. jejuni*およびアデノウイルスの存在を確認し、下流部である淀川でも感染能を保持したまま、病原微生物が流下してくる可能性を示した。
- 2) 指標微生物である大腸菌濃度と各病原微生物濃度の相関性がなく、指標微生物としての大腸菌の限界について指摘した。
- 3) 淀川での水浴を想定した場合、*C. jejuni*よりアデノウイルスの感染リスクの方が高く、さらにアデノウイルスの場合、1回の水浴でも100%感染することを示した。
- 4) 水浴を想定した場合に1000人に1人のレベルまで感染確率を低減させるためには、アデノウイルスの場合最大で $6 \log_{10}$ の制御が必要であり、下水処理でのウイルス制御、ならびに水環境中の感染性ウイルスのモニタリングの重要性が示唆された。

参考文献

- 1) 山田俊郎, 秋葉道宏: 最近 10 年間の水を介した健康被害事例, 保健医療科学, Vol. 56, No. 1, pp.16-23, 2007.
- 2) 春日文子, 窪田邦宏: 宮城県における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定(微生物に起因する原因不明食中毒の実態調査に関する研究), 厚生労働科学研究費補助金 食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究 平成20年度分担研究報告書, pp.127-155, 2009
- 3) Lion, T., Baumgartinger, R., Watzinger, F., Martin, M.S., Suda, M., Preuner, S., Futterknecht, B., Lawitschka, A., Peters, C., Potschger, U., Gadner, H.: Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease, *Blood*, Vol.102, No.3, pp.1114-1120, 2003.
- 4) Khan, I. U., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., and van Bochove, E., Edge, T. A.: A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds, *J. Microbiol. Methods*, Vol.79, pp.307-313, 2009.
- 5) Pintó, R. M., Diez, J. M. and Bosch, A.: Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses, *J. Med. Virol.* Vol.44, pp.310-315,1994.
- 6) 日本水道協会: 上水試験法 微生物編, pp.65-72, 日本水道協会, 2011.
- 7) 国土交通省: 「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会」最終報告全文, URL: <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/info/kuriputo/all000704.html> (2015年3月31日時点).
- 8) Itoh, S.: Effect of the ratio of illness to infection of *Campylobacter* on the uncertainty of DALYs in drinking water, *J. Water Environ. Technol.*, Vol.11, pp.209-224, 2013.
- 9) Mena, K. D., Gerba, C. P. : Waterborne Adenovirus, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol.198, pp.133-167, 2009.