

8.3 水環境中における病原微生物の消長に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：岡本誠一郎、諏訪守、桜井健介

【要旨】

公共用水域の安全性確保のため、病原微生物の消長や汚染源を明らかにし、対策手法の適正な評価にあたっては、迅速・簡便・安全に病原微生物の感染能力などを測定できる方法の開発が望まれている。本研究では、平成 18～22 年度にかけ、微生物混在系における耐性遺伝子伝播特性や薬剤（抗生物質）耐性菌の消長と消毒耐性の評価、分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の検討、ノロウイルス感染能力推定手法の開発について、各項目を達成目標に掲げ実施した。

その結果、下水処理水における抗生物質耐性菌の多剤耐性株の割合は、流入下水に比較して上昇するが、多剤耐性株の約 90%はアンピシリンに耐性を示した。これらの耐性株からは複数のプラスミド性耐性遺伝子が検出されたため、耐性菌の消長に大きな影響を及ぼしている可能性が明らかとなった。抗生物質耐性大腸菌株の塩素消毒による不活化では、耐性を有しない大腸菌株と比較して接触時間、添加濃度の若干量の増加で対応が可能なレベルであった。環境水等における抗生物質耐性菌の汚染実態の解明とともに、適正な消毒を実施することで下水処理場における制御の可能性を示した。

分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法では、FISH 法によるクリプトスポリジウムの感染能力を評価した。FISH 法の活用により実験動物や細胞培養法と比較して安価、簡易、迅速な評価を行える可能性を示した。

ノロウイルスに関しては、濃縮、抽出、逆転写等の影響要因を解明することで、検出濃度を向上させるための最適な測定条件を提案した。また、塩素、紫外線消毒によるネコカリシウイルスの遺伝子残存率と生残率の関係をノロウイルスに適用し、ノロウイルス遺伝子残存率から不活化効果を推定する手法の提案を行った。

キーワード：抗生物質耐性大腸菌、プラスミド性遺伝子、クリプトスポリジウム、FISH 法、ノロウイルス、リアルタイム RT-PCR 法

1. はじめに

近年、クリプトスポリジウム、ノロウイルス（NV）、薬剤（抗生物質）耐性菌などによる感染症が多発しており、大きな社会問題となっている。感染者などから排出されるこれらの病原微生物は様々な経路を経て最終的には公共用水域へ排出される。公共用水域の衛生学的安全性確保のため、病原微生物の消長を把握し汚染源を明らかにするとともに、対策手法の適正な評価にあたっては、迅速・簡便・安全に病原微生物の感染能力などを測定できる方法の開発が望まれている。

本課題では上記の要請を踏まえ、水環境中での抗生物質耐性菌の汚染実態や耐性遺伝子の伝播特性を評価するとともに、分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法を開発を目的としている。特に NV に関しては、現在のところ培養法による不活化判定を行うことができない課題がある。このため、代替指標の利

用を含め、唯一の検出法であるリアルタイム PCR 法（Real-time Polymerase Chain Reaction method）を活用した不活化判定手法を検討した。

本研究で研究対象としている病原微生物は抗生物質耐性大腸菌、クリプトスポリジウム、ウイルスは NV とした。22 年度は本研究課題の最終年度にあたるため、18 年度から実施した以下に示す各研究項目について得られた成果を取りまとめた。

- 1) 微生物混在系における耐性遺伝子伝播特性および耐性菌の消長と消毒耐性の評価
- 2) 分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の検討
- 3) ノロウイルス感染能力推定手法の開発

2. 研究目的および方法

2.1 微生物混在系における耐性遺伝子伝播特性および

耐性菌の消長と消毒耐性の評価

2.1.1 耐性遺伝子の保有状況

17年度までの調査結果から下水、河川水試料中の抗生物質耐性大腸菌は、アンピシリン (ABPC) やテトラサイクリン (TC) に耐性を示す株が最も多く検出されることが明らかとなっている。グラム陰性桿菌では ABPC などの耐性遺伝子のほとんどが R プラスミド上にあることから¹⁾、活性汚泥処理後の多剤耐性大腸菌の割合増加や水環境における多剤耐性大腸菌の存在は、R プラスミドによる耐性遺伝子の伝達が一因であるものと推定された。このため、耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的に、下水、河川水試料から得られた大腸菌株を対象に、その保有状況も含め定性分析を行った。

具体的には、ABPC に耐性を示した株が多いことから、 β -ラクタマーゼ関連の耐性遺伝子の検出を主に、blaTEM、blaSHV、blaCMY、blaCTX のプラスミド性耐性遺伝子、その他にも ampC の染色体上耐性遺伝子の定性を行った。菌株を 400 μ L の RNase-free 水に懸濁させ 100°C、15 分間煮沸することで遺伝子の抽出を行った。4°C、3 分間冷却させた後 13,000rpm・5 分間遠心処理しその上澄液中の耐性遺伝子を検出した。検出のためのプライマーやプローブは既存の報告例^{2) 3) 4) 5)} を各々参照するとともに、遺伝子検出のためのリアルタイム PCR 装置は LightCycler (ロシュ・ガヤグ・システムズ社) を使用した。

2.1.2 微生物混在系における多剤耐性株割合の変化

微生物混在系における多剤耐性株割合の変化では、家庭排水が主な負荷である B、D 下水処理場、病院排水が主である E 下水処理場を対象に、流入下水と処理水の耐性大腸菌株の耐性割合を各々比較することで評価を行った。抗生物質の耐性を把握するための感受性試験では ABPC、TC、レボフロキサシン (LVFX)、セフジニル (CFDN)、カナマイシン (KM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST)、ゲンタマイシン (GM)、イミペネム (IPM) の 8 種類とした。抗生物質含有ディスクは KB ディスク (栄研化学) を利用し、感受性試験の判定基準などは KB ディスクの手引きを参照した⁶⁾。

2.1.3 抗生物質耐性大腸菌の下水処理水中での消長

環境水中に放出された大腸菌の抗生物質耐性については、環境条件や細菌が保有する耐性遺伝子などの有無により、その消長に影響を及ぼしている可能性が推測される。このため、その消長に及ぼす影響の把握を目的に、抗生物質に対する感受性の異なる大腸菌を利用し、下水処理水中での耐性の変化を室内実験により把握した。

実験は D 下水処理場の二次処理水を対象とした感受性

試験から検出した大腸菌を利用した。8 種類の抗生物質に対して耐性の無い株、ABPC 耐性株、また ABPC を含め 3 剤の抗生物質に耐性を示した多剤耐性株である。0.22 μ m のフィルターでろ過を行った二次処理水中に各々の株を添加、20°C の恒温室内に放置し、1、7 日間後に採水し大腸菌の測定を行った。そのコロニーの感受性試験結果を基に耐性の変化について把握した。

2.1.4 塩素消毒耐性の評価

人畜由来汚濁負荷の影響を受ける下水・河川試料では抗生物質耐性大腸菌が存在するが、下水処理過程での活性汚泥処理や消毒プロセスを経ることで、その濃度は大幅に低下する。活性汚泥処理による除去では大腸菌の除去にも限界があることから、これを安全なレベルに低減するには、最終的には消毒により不活化を図る必要がある。このため、下水処理場で採用例の多い塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌の消毒耐性を把握することを目的に、下水、河川水試料から得られた 0~6 剤の抗生物質に耐性を示した大腸菌株の不活化実験を行った。併せて、比較のため感受性試験での精度管理用の大腸菌株 ATCC25922、35218 株を利用し、各々の塩素消毒耐性を明らかにすることで、下水処理場における対応の可能性を評価した。ここでは、各大腸菌株の塩素消毒耐性の比較を行うことから消毒条件の統一を図るため、各大腸菌株の培養を行い一定量に増殖させた後、遠心分離を行い上澄液を除去し沈渣として回収した菌株を生理食塩水に懸濁させ塩素消毒実験に供した。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 0~0.35mg/L、接触時間を 15 分間とした。

2.2 分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の検討

2.2.1 FISH 法によるクリプトスポリジウムの感染能力の評価

分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法では、FISH 法によるクリプトスポリジウムの感染能力を評価した。消毒によるクリプトスポリジウムの不活化効果を判定するためには、マウスによる実験動物法や細胞培養法による評価手法が用いられている。これらの手法により評価が進展しているが、実験動物や細胞培養の利用は操作の煩雑性や検出感度等の課題もあり、その適用は限定されたものとなっている。ここでは、分子生物学的手法の適用による感染能力判定手法の検討を目的としており、オーシストの塩素消毒等の不活化割合を FISH 法 (Fluorescence in situ hybridization method) により評価を行い、細胞培養法で得られた基礎

データと比較することで適用の可能性を検討した。表-1にはFISH法で用いたDNAプローブの特性⁷⁾を示す。FISH法の染色と併せ、オーシスト検出のためにイメージステインの蛍光抗体染色とDAPI染色を行った。

比較のため行った細胞培養法による塩素消毒の不活化評価では、ショ糖密度勾配遠心法により精製を行ったオーシストに有効塩素濃度が20mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、1~2時間接触させた後、チオ硫酸ナトリウムにて中和した。中和した試料は感染性評価のため、Intestine407細胞に接種した。接種後24時間培養を行った後、オーシストの増加が認められたものを陽性としMPN表にあてはめ、オーシスト数を求め不活化割合を算出した。

なお、実験には*Cryptosporidium parvum* HNJ-1株を利用した。

表-1 FISH法によるDNAプローブの特性

プローブ	塩基配列(5'-3')	特異性	文献
Cry1	CGGTTATCCATGTAAGTAAAG	C.parvum	7)

2.3 NV感染能力推定手法の開発

2.3.1 NVの検出濃度に及ぼす影響要因の解明

下水試料等からNVを検出する上で、検出濃度に及ぼす影響要因を解明するため、濃縮法、遺伝子抽出、逆転写反応、PCR実測値の各項目に着目し評価を行うことで、最適な測定条件の確立を目指した。

まず、NVの検出濃度の向上を目的として、水質性状の異なる試料を対象にPEGの最適添加濃度や逆転写反応に利用する抽出RNA量の最適化を検討した。

次いで、水中のウイルスを安定的に定量するにあたり、濃縮を行う必要があると考えられる。代表的なウイルス濃縮法としてはポリエチレングリコール沈殿法(PEG沈殿法)やセルロースを添加する方法、陽電荷膜または陰電荷膜の利用による方法、あるいは超高速遠心分離器により沈殿させる方法などがある。しかし、陽電荷膜は現在製造販売されておらず、また、超高速遠心法では高価な遠心分離器が必要となる。このため比較的安価かつ操作の容易性から、ここでは、PEG沈殿法、陰電荷膜法、さらには濃縮操作を行わない直接法の各種濃縮法により実下水試料中のNV濃度を測定し、その検出濃度から最適濃縮法の評価を行った。さらに、PEG沈殿法では遺伝子抽出カラムへの濃縮試料のSS負荷量、陰電荷膜法では膜への測定試料のSS負荷量を各々変動させウイルス検出濃度に及ぼす影響を評価した。

さらに、リアルタイムRT-PCR法によるNVの定量で

は、コントロールDNAを検量線として利用することで試料中のウイルス濃度の算定を行う。コントロールDNAによる検量線の評価では、低濃度域における定量値のバラツキが若干大きくなる可能性が指摘⁸⁾されており、非流行期における試料や高度処理水を測定対象とした場合、定量値へ及ぼす影響が大きくなると考えられる。このため、NV濃度の異なる実下水・河川水を用いて、多重測定を行い定量値へ及ぼす影響を評価した。

2.3.2 消毒によるネコカリシウイルス(FCV)とNV遺伝子量の減少およびFCVの不活化効果

NVは、現在のところ培養細胞などにより増殖させられないため、感染能力の有無を判定できない課題がある。衛生的安全性確保の観点から下水処理水の再利用水質基準等マニュアルが策定⁹⁾され水質基準等が提示されているが、上記課題もあり、NV濃度の基準値の設定には至っていない。ここでは、唯一の検出法であるリアルタイムRT-PCR法を活用してNV不活化判定手法を検討する。検討にあたっては、NV代替指標としてネコカリシウイルス(FCV)の適用に関しての提案¹⁰⁾があることから、NVの不活化効果を推定するための基礎データを得ることを目的に、NVとFCVの塩素、紫外線実験による遺伝子減少量の関係性を評価した。また、消毒によるFCVの遺伝子減少量と生残率を明らかにすることで、NVの不活化効果を推定した。

FCVの不活化評価では、ネコ腎臓細胞(CRFK細胞)により増殖させたFCV:F9株を用いた。細胞培養液の影響を取り除くため超高速遠心処理(140,000G,3時間)にてウイルスを精製した。このウイルス精製液に紫外線(UV波長254nm)を照射し、CRFK細胞にてウイルス培養を行い細胞変性によりプラークを計数し不活化割合を把握した。また、塩素消毒の実験条件ではウイルス精製液に次亜塩素酸ナトリウムを高濃度添加と低濃度添加の2ケースとし、接触時間を高濃度添加ケースでは15~30秒、低濃度添加ケースでは15分間とした。チオ硫酸ナトリウムにて中和を行った後、CRFK細胞の細胞変性によりプラークを計数した。FCV遺伝子の定量は、遺伝子の抽出、精製、逆転写反応の後、リアルタイムRT-PCR法により行った。FCVの検出に用いたプライマーは、Erwin Duizerらの方法¹¹⁾に準じた。

実下水中のNVを用いた消毒実験では、流入下水中から陰電荷膜法により濃縮・分離したNVを紫外線照射、塩素消毒を行った後、リアルタイムRT-PCR法によってウイルス濃度を定量した。NVの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法に

ついて」¹²⁾に準じた。リアルタイム PCR 装置は LightCycler (ロシュ・ダ・ヤグ・システムズ社) を使用した。

3. 研究結果および考察

3.1 微生物混在系における耐性遺伝子伝播特性および耐性菌の消長と消毒耐性の評価結果

3.1.1 耐性遺伝子の保有状況

下水、河川水試料から得られた大腸菌株を対象とした耐性遺伝子の保有状況について表-2に示す。下水試料から採取した大腸菌株は上記 2.1 の 8 剤の抗生物質に対する耐性の有無に関わらず、全ての株でプラスミド性の耐性遺伝子、また染色体上の耐性遺伝子が検出された。ABPC は β -ラクタム系抗菌薬の一種であるため、 β ラクタマーゼ関連の耐性遺伝子が検出されることは、ABPC に対して耐性を示す大腸菌が河川水・下水試料ともに多く存在していることを裏付けた結果となったと推定される。また、8 種類の抗生物質を対象とした感受性試験で耐性を示さなかった株でも耐性遺伝子を保有していることから、これらの株は 8 種類以外の他の抗生物質に対して耐性を示す可能性があるものと考えられた。今回、耐性遺伝子の定性に供した株は限られたものではあるが、全ての株で耐性遺伝子を保有していたことから、水環境中での薬剤耐性菌の汚染やその拡大を防止するには、各種排水処理施設での消毒の徹底を図る必要があるものと考えられた。

表-2 耐性遺伝子の保有状況

	流入下水 0剤耐性	流入下水 4剤耐性	二次処理水 1剤耐性	二次処理水 4剤耐性	二次処理水 6剤耐性
bla SHV	-	-	-	-	-
bla TEM	+	+	+	+	+
bla CTX	-	-	-	-	+
bla CMY	+	-	-	-	-
Amp C	+	+	+	+	+

陽性+ 陰性-

3.1.2 微生物混在系における多剤耐性株割合の変化

次いで、微生物混在系における多剤耐性株の割合の変化について図-1に示す。処理場毎に耐性菌に占める多剤耐性株の割合は若干異なるが、B、D、E 下水処理場とも流入下水に比較して処理水の多剤耐性株の割合が上昇していた。特に、E 下水処理場の処理水については、耐性菌に占める多剤耐性株の割合は 60%以上であり、病院系排水を処理する下水処理場は、多剤耐性株の生成に大きな影響を及ぼす可能性があると考えられた。上記、耐性遺伝子の保有状況では、試験に供した全ての株において耐性遺伝子が検出されたことから、処理水における多剤耐性株の割合の上昇は、耐性遺伝子の伝播が 1 つの要因

であると考えられた。微生物混在系において、耐性遺伝子の伝播により多剤耐性株の割合が上昇すると考えられたことから、下水処理場等においては抗生物質耐性菌の拡散を防止する上で消毒の徹底を講じなければならないであろう。

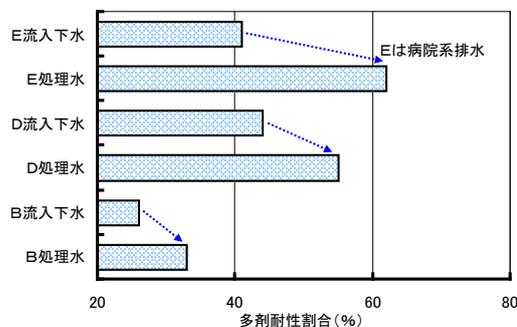


図-1 多剤耐性株割合の変化

3.1.3 抗生物質耐性大腸菌の下水処理水中での消長

下水処理水中における各種耐性株の感受性の変化について表-3に示す。8 種類の抗生物質に対する感受性試験結果から得られた各種耐性株として、無耐性株は 4 株 (16~18 コロニー)、ABPC 耐性株は 3 株 (12~15 コロニー)、3 剤耐性株は 2 株 (6~7 コロニー)、を用いて各々評価を行った。8 種類の抗生物質に対して耐性を示さない無耐性株については、その感受性に変化はなかった。しかし、ABPC のみに耐性を示した株では、二次処理水に添加してから 1、7 日後とも耐性を示さなくなった。これに対し、ABPC、TC、ST あるいは、ABPC、TC、KM の 3 剤に耐性を示した多剤耐性大腸菌は 1、7 日後とも耐性を維持しており、多剤耐性株であるか否かの違いにより抗生物質に対する感受性に変化が見られた。二次処理水から採取した大腸菌を利用し、採水日は異なるが同じ二次処理水に添加し実験を行っており、抗生物質の濃度の変化は少ないため、その影響が感受性の変化に関与することはないと推定される。

表-3 各種耐性菌株の感受性の変化

		感受性試験結果	1日目	7日目
無耐性株	No. 1	-	(0/5)	(0/5)
	No. 2	-	(0/3)	(0/5)
	No. 3	-	(0/5)	(0/3)
	No. 4	-	(0/5)	(0/3)
ABPC耐性株	No. 1	ABPC耐性	(0/5)	(0/5)
	No. 2	ABPC耐性	(0/5)	(0/4)
	No. 3	ABPC耐性	(0/5)	(0/3)
3剤耐性株	No. 1	ABPC、TC、ST耐性	(2/2)	(4/4)
	No. 2	ABPC、TC、KM耐性	(4/4)	(3/3)

() 内上段：耐性コロニー数、下段：供試コロニー数

3.1.4 塩素消毒耐性の評価

塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌株の不活化結果について図-2に示す。下水試料から採取した大腸菌株と薬剤感受性試験の精度管理に利用している大腸菌株（純粋株）を用いた結果である。図-2はCt値と各大腸菌株の生残率の関係から回帰式を求め、3log不活化のために必要なCt値を算出したものである。3log不活化のためのCt値は0剤耐性株では4.0、5.2mg・min/L、6剤耐性株では5.7mg・min/L必要であり、6剤耐性株は0剤耐性株と比較して若干ではあるが塩素消毒耐性が大きい傾向が見られた。0剤耐性株（純粋・野生大腸菌株）を基準とすると、6剤耐性株を3log不活化させるために必要なCt値は1.1~1.4倍量が必要であると見込まれたが、接触時間や塩素の添加濃度を若干量増加させることで、下水処理場において対応が可能なレベルと考えられた。これらの結果から、塩素消毒によるCt値を高めることで二次処理水中の多剤耐性大腸菌株を不活化させられる可能性が示された。

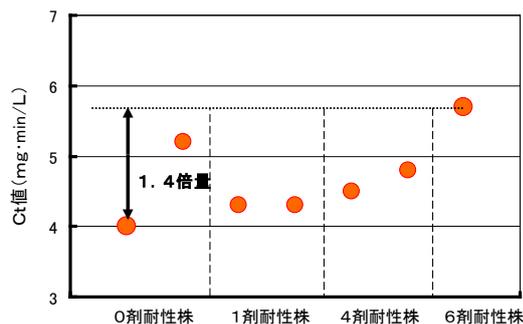


図-2 塩素消毒による3log不活化のためのCt値

3.2 分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の検討

3.2.1 FISH法によるクリプトスポリジウムの感染能力の評価

FISH法によるクリプトスポリジウムの感染能力評価結果を図-3、4に示す。図-3はクリプトスポリジウムを完全不活化させた場合の評価として熱処理を行ったものである。各々の評価において、クリプトスポリジウムの蛍光像を約100~300ocyst観察した結果である。100℃・5分間の熱処理を行ったことから、実際の生存率は0%であるが、熱処理を行った直後におけるFISH法の評価では、蛍光像の観察結果から見かけ上の生残率は45%となり、実際の生残率とは乖離したものとなった。しかし、160時間経過後に染色を行った評価では、蛍光状況から見かけ上の生残率が2%となり、実際の生残率に極めて近似した値が得られた。

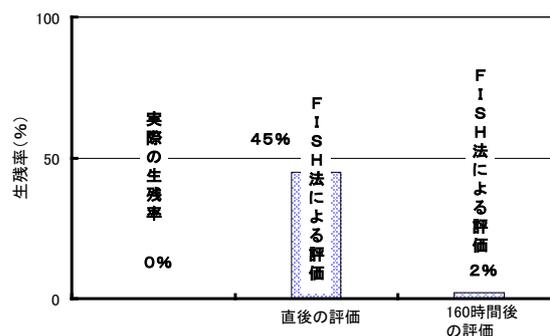


図-3 FISH法による生残率の評価(熱処理)

次いで、塩素消毒による生残率の評価結果を図-4に示す。クリプトスポリジウムの蛍光像を約50~250ocyst観察した結果である。塩素消毒前の生残率は96%と評価され、ほぼ全てのオーシストが感染能力を有しているものと考えられた。塩素消毒におけるCt値が1,200~2,400mg・min/Lの場合では、細胞培養法による評価で生残率は6~8%であり、既存の報告値^{13) 14)}とほぼ一致するものであった。FISH法による消毒直後の評価では蛍光状況から見かけ上の生残率が79%となり、細胞培養法の生残率と比較して乖離した値となった。しかし、100時間経過後に染色を行った評価では、蛍光状況から生残率が6%となり細胞培養法で得られた生残率とほぼ同一な結果が得られた。一定の時間を経過させることで、FISH法は細胞培養法とほぼ同一な生残率の評価の可能性が示されたが、その要因については、標的遺伝子が細胞の不活化後に分解するとの報告¹⁵⁾もあるが研究事例も少ないことから、今後、解明する必要があると考えられた。

これらの実験結果からFISH法では、不活化処理後に一定の時間を経過させることで適正な評価の可能性が示された。今後、上記要因の詳細な解明が必要ではあるが、FISH法の適用により実験動物法や細胞培養法と比較して安価、簡易、迅速な評価が行える可能性が示された。

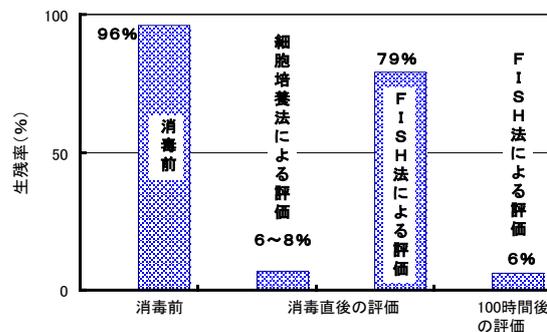


図-4 FISH法による生残率の評価(塩素消毒)

3.3 NV 感染能力推定手法の開発

3.3.1 NV の検出濃度に及ぼす影響要因の解明

PEG 沈殿法による PEG 添加濃度の最適化の検討結果を図-5 に示す。流入下水、処理水とも終濃度の 8% で NVG2 の検出濃度比が最大となった。次いで 10%、6% の順となっており、水質性状として SS 濃度などの異なる試料でも同様な傾向が見られた。カキの中腸腺からの検出では 12% とすることで回収量が高いとの報告²⁾ もあり若干の違いがあった。検討対象試料が水と中腸腺であり、試料の性状が異なるため若干の違いが現れたものと推定される。よって、通常の水試料を PEG 沈法で濃縮を行う際には、終濃度を 8% とすることで NV の検出濃度が最大になると考えられた。

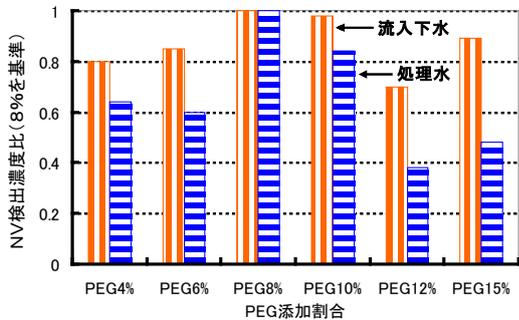


図-5 PEG 添加割合毎の検出濃度比

次に、流入下水を用いた各種濃縮法による検出濃度の評価結果を図-6、7 に示す。図-6 は PEG 沈殿法によるもので遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量範囲を 0.05~1.0mg/カラムとした。併せて直接法による検出結果も示したが、抽出カラムへの SS 負荷量範囲は 0.007~0.02mg/カラム程度となった。図-7 は陰電荷膜法によるものであり、膜への SS 負荷量範囲を 0.25~6.0mg/枚 (膜口径 90mm) とした。PEG 沈殿法は全ての試料において遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量をより低減させることで検出濃度が高まる傾向が見られ、一部の試料では最大検出濃度が 10^7 コピー/L レベルとなった。逆に抽出カラムへの SS 負荷量を増加させることで検出濃度は低下し 1.0mg/カラムの場合では 10^6 コピー/L レベルとなった。直接法では PEG 沈殿法に比較して遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量が低いため、検出濃度が高く維持されていた。PEG 沈殿法は遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量をより低減させることで検出濃度が高まり、その濃度は直接法に近づくものと考えられた。陰電荷膜法は、検出濃度に若干のバラツキが見られるものの、膜への SS 負荷量がほぼ 1mg/枚以下であれば検出濃度レベルはほぼ一定となっていた。しかし、PEG 沈殿法で最大検出濃度が

10^7 コピー/L レベルであった同一試料を陰電荷膜法で濃縮し測定することで最大検出濃度は 10^6 コピー/L レベルに低下した。また、全体的に PEG 沈殿法は陰電荷膜法に比べ最大検出濃度が高い傾向が見られた。さらに、陰電荷膜法でも膜への測定試料の SS 負荷量を増加させることで検出濃度が低下する傾向が見られた。

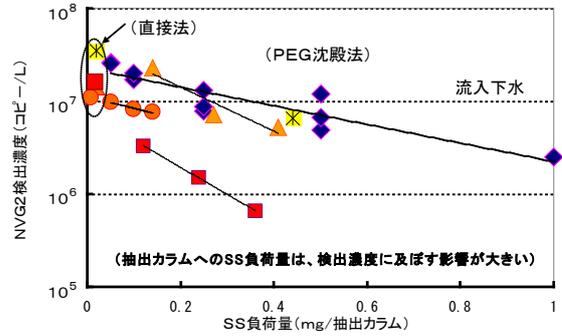


図-6 抽出カラムへのSS負荷量がNV検出濃度に及ぼす影響

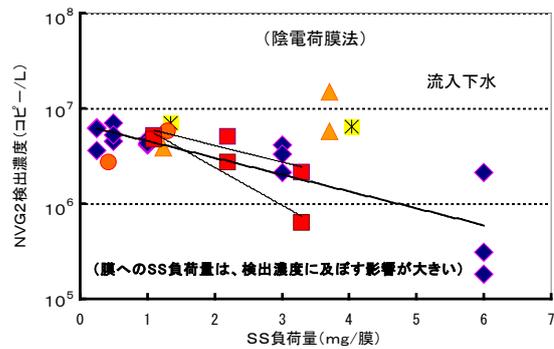


図-7 陰電荷膜へのSS負荷量がNV検出濃度に及ぼす影響

図-8 は、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化の検討結果である。流入下水、処理水を PEG 沈殿法により濃縮した試料から抽出した RNA を 0.2~1.0 μ g の範囲内で逆転写反応させ cDNA を作成し、リアルタイム RT-PCR 法により NV 濃度を測定したものである。ほぼ全てのケースで逆転写反応に用いる抽出 RNA 量を 0.5 μ g とすることで最大検出濃度が得られた。一般に酵素反応は基質濃度の増加とともに反応速度が増加する

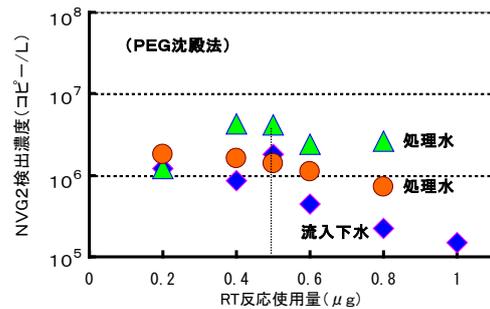


図-8 RT 反応使用量の違いによる検出濃度

が、基質濃度が過剰になると反応速度は平衡に達し減少する。逆転写反応も逆転写酵素による酵素反応であるため同様の傾向を示したものと考えられた。なお、流入下水と処理水で検出濃度に逆転が生じているが、これは試料の採水日が異なるためである。

図-9 は試料中の NV 濃度が異なることで定量値へ及ぼす影響を実下水・河川水を用いて、多重測定により評価した結果である。n=20 (同一試料の同時・多重測定) において、今回の実験範囲内における PCR 実測平均値から求めた換算濃度と変動係数には相関関係が見られ、PCR 反応容量が 20 μ L 系と 100 μ L 系では同一試料での換算濃度に大差はないものの、全体的に 100 μ L 系では変動係数が低下する傾向が明らかとなった。同一試料を 20 μ L と 100 μ L 系で同時・多重測定を行うことで、変動係数などに及ぼす影響を評価したが、20 μ L を 100 μ L 系に変更することで PCR の実測値は高まるため、変動係数の低下に一定の効果があり、安定した定量値が得られることが明らかとなった。また、低濃度試料においては PCR の実測値の変動係数が大きくなるため、特に、極低濃度試料では PCR の実測値において N.D. の評価となる可能性が高まる。このため、極低濃度試料の測定においては極力分析水量を多くするための多重測定等の概念を取り入れることが必要と考えられた。多重測定を行うことで分析水量が増加するため検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D. と評価されたデータの信頼性が向上すると考えられる。

以上のことから、試料中のウイルス濃度が極めて低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には、PCR の反応容量を増加、あるいは多重測定により分析水量を増加させ、安定した PCR 実測値を得る必要がある。

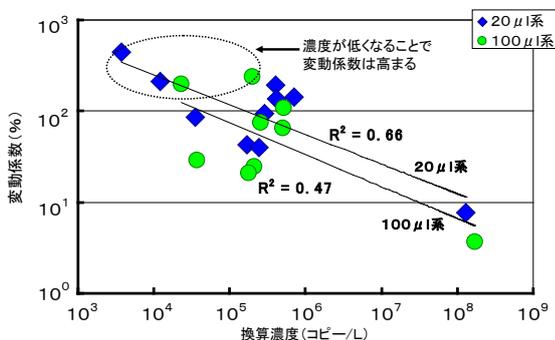


図-9 換算濃度と変動係数の関係

3.3.2 消毒によるネコカリシウイルス (FCV) と NV 遺伝子量の減少および FCV の不活化効果

塩素、紫外線消毒による NV と FCV 遺伝子量の残存率

の評価結果を図-10 (一部、他の実験結果¹⁶⁾ を含む)、11 に示す。塩素消毒による Ct 値や紫外線照射量を高めることで、FCV の遺伝子量は減少傾向を示しており、Ct 値や紫外線照射量と遺伝子残存率には相関関係が見られ、消毒により NV と FCV の遺伝子の定量値が減少することが確認された。さらに、FCV の遺伝子残存率と生残率の関係について整理したものを図-12、13 に示すが、塩素消毒での Ct 値は 0~200mg \cdot min/L、紫外線消毒では 0~60mWs/cm² の範囲内のものである。遺伝子量の残存率と生残率の評価においては、Ct 値や紫外線照射量に若干の違いがあるとともに、データ数は限定されるが、ともに相関関係が示されており、1log 程度の遺伝子残存率となれば生残率は 5~7log 程度低下することが明らかとなった。FCV の不活化実験では、3log の不活化に必要な塩素消毒の Ct 値は 40~50mg \cdot min/L、紫外線照射量においては 20mWs/cm² 程度であった (図-14、15)。同様の実験例でもほぼ同じ結果が得られている¹⁷⁾ ¹⁸⁾。塩素消毒の Ct 値や紫外線照射量を高めることで FCV の不活化効果が確認されたが、同じく代替指標としてのマウスノロウイルスを用いた塩素消毒の不活化評価結果では、Ct 値が 2mg \cdot min./L 程度で 4log 以上との報告例がある¹⁹⁾。また、他の腸管系ウイルスとしてエコーウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスを 3log 不活化させるための紫外線照射量は 20.5~27mW

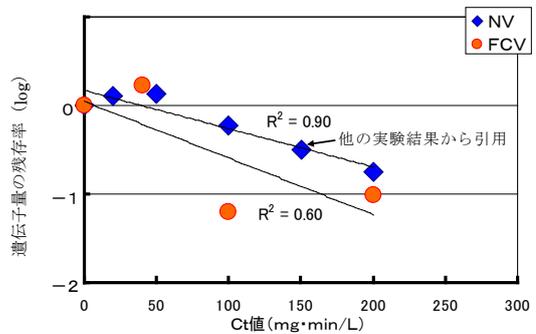


図-10 塩素消毒による NV と FCV 遺伝子残存率の関係

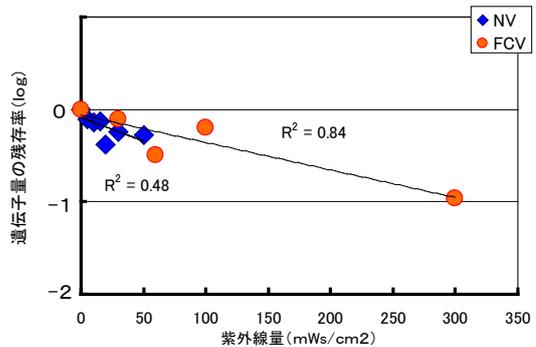


図-11 紫外線照射量と NV、FCV 遺伝子残存率の関係

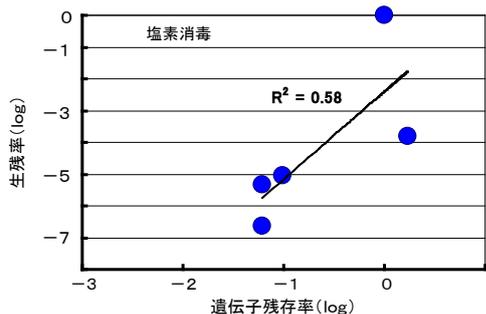


図-12 FCVの遺伝子残存率と生存率の関係

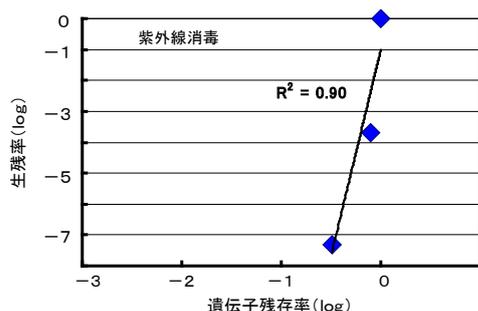


図-13 FCVの遺伝子残存率と生存率の関係

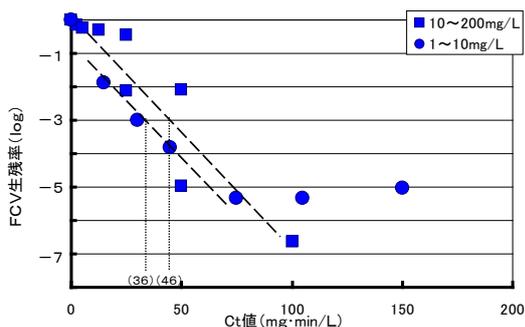


図-14 塩素消毒のCt値とFCVの生存率

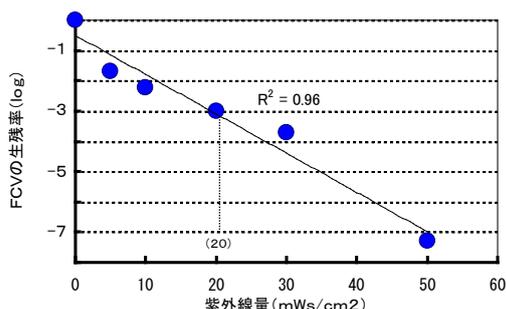


図-15 紫外線照射によるFCVの生存率

s/cm²、アデノウイルスは 119mWs/cm²と報告されている²⁰⁾。このため、これら FCV や腸管系ウイルスの紫外線耐性はアデノウイルスを除けばほぼ同レベルであると推定される。

以上のことから、塩素、紫外線消毒により NV と FCV の遺伝子の定量値に影響を及ぼすことが確認されたことや、類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案すると NV の消毒耐性は、それら他のウイルス

と大きく異なることは無いと推定される。この推定に基づけば、FCV の遺伝子残存率と生存率の関係から NV の不活化効果を推定することが可能である。一方、FCV や腸管系ウイルスの不活化効果を把握するためには、細胞培養法による評価となるため、大腸菌により培養が容易なファージを利用した評価手法についても検討する必要がある。

4. まとめ

本研究では、平成 18～22 年度にかけ、微生物混在系における耐性遺伝子伝播特性や薬剤（抗生物質）耐性菌の消長と消毒耐性の評価、分子生物学的手法を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の検討、ノロウイルス感染能力推定手法の開発について、各項目を達成目標に掲げ実施した。以下に得られた結果を示す。

- 1) 試験に供した全ての大腸菌株において耐性遺伝子が検出されたことから、処理水における多剤耐性株の割合の上昇は、耐性遺伝子の伝播が 1 つの要因であると考えられた。
- 2) 二次処理水に添加した大腸菌株は、多剤耐性株であるか否かの違いにより抗生物質に対する感受性に変化が見られた。
- 3) 塩素消毒による Ct 値を高めることで二次処理水中の多剤耐性大腸菌株を不活化させられる可能性が示されたが、水環境中での薬剤耐性菌の汚染やその拡大を防止するには、各種排水処理施設での消毒の徹底を図る必要があるものと考えられた。
- 4) FISH 法を適用することで、実験動物法や細胞培養法と比較して安価、簡易、迅速なクリプトスポリジウムの不活化評価が行える可能性が示された。
- 6) 下水試料等から NV を検出する上で、検出濃度に及ぼす影響要因として濃縮法、遺伝子抽出、逆転写反応、PCR 実測値の各項目に着目し評価を行うことで、最適な測定条件を確立した。また、低濃度域試料に対応した検出手法を提案した。
- 7) FCV の遺伝子残存率と生存率の関係を NV に適用し、NV 遺伝子残存率から NV の不活化効果を推定する手法を提案した。

参考文献

- 1) 橋本一、井上松久編、病原菌の薬剤耐性、機構の解明とその対策、学会出版センター
- 2) Y.Messai, T.Benhassine, M.Naim, G.Paul and R.bakour

8.3 水環境中における病原微生物の消長に関する研究

- (2006) Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* Clinical isolates from a hospital in Algiers, Rev Esp Quimioterap, 19(2),144-151.
- 3) S.Corvec, N.Caroff, E.Espaze, J.Marraillac, H.Druegon, A.Reynaud (2003) Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains, FEMS Microbiology Letters, 228, 187-191.
- 4) C.RANDEGGER, H.HACHLER (2001) Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 1730-1736.
- 5) S.zhao, et al. (2003) Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 5366-5371.
- 6) 細菌感受性試験用、KB ディスク栄研手引き.
- 7) G.Vesey, N.Ashbolt, E.Fricke, D.Deere, K, Williams, D.Veal A and M.Dorsch (1998) The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labeling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts, J.Appl.Microbiol,85(3),429-440.
- 8) 陶山明子、諏訪守、鈴木穰、尾崎正明 (2006) 下水試料からのノロウイルス定量法の検討、環境工学研究論文集 43,255-261.
- 9) 国土交通省地域整備局下水道部・国土交通省国土技術政策総合研究所 (2005)、下水処理水の再利用水質基準等マニュアル.
- 10) Antimicrobials Division U.S.EPA, CONFIRMATORY VIRUCIDAL EFFECTIVENESS TEST , Using Feline Calicivirus As Surrogate for Norovirus.
- 11) Duizer E, et al. (2004) Inactivation of caliciviruses, Applied and Environmental Microbiology, 70(8), 4538-4543.
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について.
- 13) (社) 日本水道協会、クリプトスポリジウム—解説と試験方法—
- 14) (社) 日本水環境学会、第 51 回日本水環境学会セミナー (2000)、病原性微生物による水系感染症の現状と対策、講演要旨集.
- 15) 橋本温、森田重光、平田強 (2009)、FISH 法—蛍光抗体染色法を併用したクリプトスポリジウムの判別の容易化、水環境学会誌 32(5),267-272.
- 16) 平成 22 年度 公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と制御に関する研究報告書 (2011)、独立行政法人土木研究所.
- 17) 笠井久会、吉永守 (2007) ネコカリシウイルスを指標としたカキのノロウイルス浄化法について、第 55 回日本ウイルス学会学術集会抄録集, 390.
- 18) TIwasaki, et al. (2007) Inactivation Effect of Ultraviolet Radiation on Norovirus (NV), 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 392.
- 19) 北島正章、松原康一、他 (2008) 上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルスの感染力価および遺伝子数の消長、第 42 回日本水環境学会年会講演集、(社) 日本水環境学会.
- 20) Charles P. Gerba, et al. (2002) Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light, Applied and Environmental Microbiology, 68(10), 5167-5169.

STUDY OF THE FATE OF PATHOGENS IN WATER ENVIRONMENTS

Budget: Grants for operating expenses

Research Period: FY2006–2010

Research Team: Material and Geotechnical
Engineering Research Group
(Recycling Team)

Authors: Seiichiro OKAMOTO
Mamoru SUWA
Kensuke SAKURAI

Abstract: In recent years, outbreaks of water-borne diseases have become a public health problem in Japan. In order to prevent outbreaks of infectious diseases caused by pathogenic microorganisms contained in water bodies, it is necessary to ensure that the natural water is safe with respect to pathogenic microorganisms. The aim of this study was to clarify the antibiotic resistance of bacteria in the water environment by investigating the concentration of antibiotic-resistant bacteria in treated wastewater, and to develop a molecular biology technique, the polymerase chain reaction method, to be used to detect pathogens of trace levels (such as Norovirus and *Cryptosporidium*).

The results are as follows: Multi-drug resistant *E.coli* possessed the resistant ability after kept in treated wastewater for one week, and when compared with non resistant *E.coli*, its resistance against chlorination was a little higher by 1.1-1.4 fold in terms of Ct value for 3-log inactivation.

FISH method was applied to the evaluation of the inactivation of *Cryptosporidium*, which showed almost the same capability of evaluation as the cell culture method at improved rapidness, cost and easiness.

Based on the Polyethylene glycol sedimentation concentration method, it was thought that the detected value of the Norovirus was improved by decreasing the SS loading of the concentrated sample against the gene extraction column. As for the amount of extraction RNA used for the reverse transcription reaction, 0.5µg of extracted RNA achieved the maximum detection concentration of the Norovirus. High efficiency in concentrating Norovirus was thought to be necessary for the accuracy of detection values, because the variation coefficient of the measured values by PCR increased when the concentration of Norovirus was low. Increasing the analysis volume of samples and conducting multiple measurements were important for lowering the variation coefficient of the measured values.

The sensitivity of Norovirus to disinfection was estimated to be similar to that of Feline Calicivirus based on the decreasing tendencies of genes of both viruses when exposed to chlorine and ultraviolet-ray, and the Feline Calicivirus was thought to be a possible substitution index for Norovirus when the characteristics of inactivation by disinfection are evaluated.