

B-22 微生物学的安全性を担保するための科学的根拠に基づく衛生水質基準値設定方法の提案

○小林彩乃^{1*}・佐野大輔²・小澤就志¹・加藤 毅³・三浦尚之²・石井 聡²・岡部 聡²

¹ 北海道大学 大学院工学院 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

² 北海道大学 大学院工学研究院 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

³ 群馬大学 大学院工学研究科 (〒376-8515群馬県桐生市天神町1-5-1)

* E-mail: ayano-koba@ec.hokudai.ac.jp

1. 研究背景

環境水や飲料水における糞便汚染（病原微生物汚染）の指標としては、従来より大腸菌濃度や大腸菌群数、糞便性大腸菌群数、腸球菌濃度などの指標微生物濃度が用いられ、我が国における衛生事情の改善・維持に大きく寄与してきた。指標微生物濃度は、病原微生物濃度との間に相関があるという仮定に基づいて、糞便汚染や上下水道処理における病原微生物の処理効率指標として用いられている。しかしながら、水系感染症を引き起こす病原微生物の挙動は、糞便汚染指標細菌のそれとは実際には異なることが報告されており、従来型の糞便汚染指標濃度により病原微生物濃度の制御を適切に行うことは必ずしも容易ではないと認識されるようになった。加えて、これらの糞便汚染指標の基準値は病原微生物の許容感染リスクに基づき理論的に設定されたものではないことも問題視されている。世界保健機関（WHO）は、水の微生物学的安全性を担保するために、飲料水や再生水などの水利用形態別にモニタリング項目や基準値を設定することを推奨している。例えばWHOのガイドラインでは、飲料水基準は疫学的情報と定量的微生物リスク評価（QMRA）に基づいて設定するべきであると述べられている。すなわち、「科学的根拠のある」基準値を水利用形態別に設定することが、グローバルスタンダードとなりつつある状況にある。

本研究では、従来型の指標微生物の欠点を補う新たな衛生指標として、糞便汚染源追跡に用いられる「宿主特異的遺伝子マーカー」、とりわけ最も広汎に用いられている *Bacteroides-Prevotella* 属16S rRNA遺伝子マーカーに着目した。宿主特異的遺伝子マーカーは、糞便汚染源の特定や汚染の定量的評価を行うために開発された新規糞便汚染指標である。 *Bacteroides-Prevotella* 属16S rRNA遺伝子マーカーを指標とする利点は、①存在量が多く、迅速に検出可能、②宿主特異性が高いため、汚染源が特定可

能、③水環境中ではほとんど増殖不可能、及び④汚染度を定量的に評価可能、などが挙げられる。しかしながら、遺伝子マーカーを新規糞便汚染指標として用いるためには、①指標微生物（遺伝子マーカー）と病原微生物の環境中における量的関係が不明であること、②許容感染リスクに基づいた水利用形態別の基準値が遺伝子マーカー量を用いて設定された例はないこと等の課題を克服する必要がある。そこで本研究では、環境水中遺伝子マーカー量と病原微生物量の調査データに基づいて、微生物学的安全性を担保する水質基準を許容感染リスクベースで確立するプロセスを構築することを最終目標とした。

2. コンセプト

本研究で提案する水質基準値設定手法の特徴は、河川水中の遺伝子マーカー及び病原微生物の濃度分布をベイズモデル¹⁾によって推定し、それらを用いて遺伝子マーカー及び病原微生物の濃度比分布を求める点にある。今回用いたベイズモデルは、不検出データに検出限界値や0などの特殊な値を代入することなく、不検出データが存在するという条件下における陽性サンプルのデータから分布全体を推定するものである。

本研究において、許容感染リスクに基づく水質基準の設定は、以下の6つのステップにより行った。

- (1) 遺伝子マーカー及び病原微生物濃度の調査
- (2) 遺伝子マーカー及び病原微生物の濃度分布推定（ベイズモデル）
- (3) 遺伝子マーカー及び病原微生物の濃度比分布推定
- (4) 濃度比のシミュレーション値の作成
- (5) Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA) による病原微生物の許容水中濃度算出
- (6) 病原微生物濃度が許容水中濃度以下となる遺伝子マーカー濃度の設定（水質基準値の提案）

3. 実験方法

(1) 遺伝子マーカー及び病原微生物の定量

札幌市内の6地点（全て類型Bに分類される）において、5Lの河川水を採水し、水質分析（水温、pH、BOD、SS、DO、EC、全窒素、全リン、大腸菌群数、大腸菌濃度）を行った。採水は、2012年1月から2013年1月まで一ヶ月に2回の頻度で行った（ $n=144$ ）。細菌分析用に河川水を約3000倍まで濃縮し、ウイルス分析用に河川水を約500倍まで濃縮した。濃縮液の半量に対してPMA処理を行った。PMA処理は、最終濃度100 μ MとなるようにPMA溶液をサンプルに添加し、5分間暗所で静置後に10分間ハロゲンランプ照射にて反応させることで行った濃縮液及びPMA処理濃縮液よりDNAを抽出した。遺伝子マーカー（全、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリ、カモ、ニワトリ+カモ特異的）²³⁾及び病原体遺伝子（*Norovirus* GI⁹⁾, *Sapovirus*⁵⁾, *Campylobacter* spp.⁶⁾, *Salmonella* spp.⁶⁾, pathogenic *Escherichia coli*⁶⁾）は定量PCR法により定量した。定量操作（濃縮、DNA又はRNA抽出、定量PCR）における阻害を補正するために、細菌及びウイルス回収のプロセスコントロールとしてMG1655 Δ lac:kan⁷⁾及びマウスノロウイルス⁸⁾をそれぞれ用いた。

(2) 遺伝子マーカー濃度及び病原微生物濃度分布、及び濃度比分布の推定

河川水中における遺伝子マーカー濃度分布及び病原微生物濃度分布を推定するため、水中の遺伝子マーカー及び病原微生物濃度を用いた。濃度分布の推定はベイズ推定によって行った。推定した遺伝子マーカー濃度分布と病原微生物濃度分布から遺伝子マーカーと病原微生物の濃度比分布を得た。

(3) 病原微生物の感染許容濃度算出

河川水中における病原微生物の許容濃度を算出する

ため、QMRAの手法による点推定を行った。対象河川は類型Bに分類されるため、以下の仮定を採用した。

- 河川水は飲用原水として用いられる
- 高度浄水処理により、ウイルスは8-log、細菌は10-log減少する
- 1日1人当たり1Lの水道水を消費する
- 感染リスクは 10^{-4} infection/yearとする
- 表1に示すベータポアソンパラメータ(N_{50}, α)を用いる
- 1菌体当たり1copyの対象遺伝子を有し、1copyを感染単位とする

(4) 水質基準値としての遺伝子マーカー濃度の決定

濃度比分布を用い、遺伝子マーカーと病原微生物の量的関係を得た。まず、濃度比分布に従うように10000個の濃度比の値をシミュレートした。暫定的に遺伝子マーカー濃度を設定すると、設定した遺伝子マーカー濃度及びシミュレーションによって得られた濃度比より、病原微生物濃度を得ることができる。遺伝子マーカー濃度を 10^{-4} から 10^4 copies/mLまで変化させ、繰り返しこの計算を行った。また、本研究では安全率を10とし、基準達成率が99%（すなわち、事故率が1%）となるように水質基準値を設定することとした。

4. 結果

河川水中における遺伝子マーカー濃度分布及び病原微生物濃度分布を推定し、推定した遺伝子マーカー濃度分布と病原微生物濃度分布から遺伝子マーカーと病原微生物の濃度比分布を算出した。計算結果の例として、ヒト特異的遺伝子マーカー及び*Norovirus* GI濃度の予測分布（図1(A)、1(B)）及び、この2つの予測分布より求めた濃度比分布を示す（図1(C)）。表1に、仮定に従って計

表1 病原体のベータポアソンパラメータ、河川水中の許容濃度及び許容感染リスクに基づく水質基準値

病原微生物	パラメータ N_{50}	α	参考文献	感染リスク (infection/year)	許容濃度 (copies/L)	事故率	水質基準値 (copies/L)
<i>Norovirus</i> GI	1.3x10 ⁶	0.631	9)		2.8x10 ⁷		2.2x10 ⁵
<i>Sapovirus</i>					2.8x10 ⁷		2.7x10 ⁶
<i>Salmonella</i> spp.	2.4x10 ⁴	0.313	10)	10 ⁻⁴	2.5x10 ⁷	1%	1.9x10 ⁶
pathogenic <i>E. coli</i>	2.1x10 ²	0.373	11)		2.9x10 ⁵		1.3x10 ⁵
<i>Campylobacter</i> spp.	9.0x10 ²	0.145	12)		1.4x10 ⁵		1.2x10 ⁵

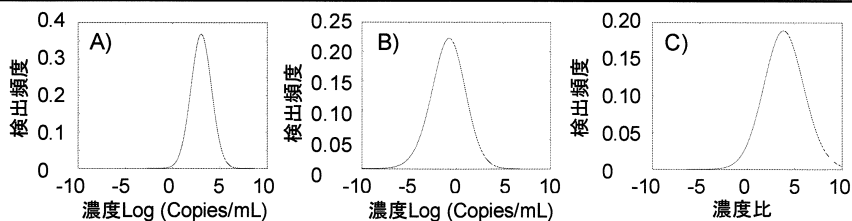


図1 (A)遺伝子マーカー及び(B)ノロウイルス GI濃度の予測分布及び(C)濃度比の分布

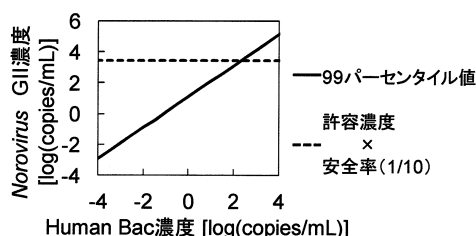


図2 ヒト特異的遺伝子マーカーが $10^4 \sim 10^4$ copies/mL で検出された場合に検出されるノロウイルス GII 濃度とノロウイルス GII の許容濃度

算された河川中における病原微生物の許容濃度を示す。図1(C)の濃度比分布と *Norovirus* GII の河川水中許容濃度を用いて求めた量的関係を図2に示す。99パーセンタイル値の意味を図2におけるヒト特異的遺伝子マーカー濃度が 10^4 copies/mL のデータを例に挙げて説明すると、「ヒト特異的遺伝子マーカーが 10^4 copies/mL の濃度で検出される時、99%の確率でノロウイルスは 10^3 copies/mL よりも低い濃度で検出される」ということを示している。

本研究では安全率を10とし、病原微生物の最終的な河川水中許容濃度を求めた。図2において、99パーセンタイル値と *Norovirus* GII の許容濃度の交点におけるヒト特異的遺伝子マーカー濃度が水質基準値として設定される濃度となる。各病原微生物に対する水質基準値としてのヒト特異的遺伝子マーカー濃度は表1に示されている。表1より、今回調査した全ての病原微生物を達成率99%で管理するためには、水質基準値としてのヒト特異的遺伝子マーカー濃度は 1.2×10^3 copies/L に設定する必要があるという結果が得られた。

5. 結論

本研究では、*Bacteroides-Prevotella* 属16S rRNA遺伝子マーカーを用い、許容感染リスクに基づく水質基準の設定方法を提案した。今回調査した全ての病原微生物を達成率99%で管理するためには、水質基準値としての遺伝子マーカー濃度は 1.2×10^3 copies/L に設定する必要がある。この達成率は暫定的に設定したものであり、病原微生物の制御に要求されるレベルによっては99.9%又は99.99%に変更して基準値の設定が可能である。また、水質基準値としての遺伝子マーカー濃度が、 1.2×10^3 copies/L に設定された場合、この濃度は一般的な遺伝子マーカーの検出手法（濃縮、DNA抽出、定量PCR法による定量）で検出可能である。

参考文献

1) Paulo, M. J., van der Voet, H., Jansen, M. J., ter Braak, C. J., and van

- Klaveren, J. D.: Risk assessment of dietary exposure to pesticides using a Bayesian method. *Pest Manag. Sci.*, Vol. 61, No. 8, pp.759-766, 2005.
- 2) Okabe, S., Okayama, N., Savicht cheva, O. and Ito, T. : Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16 S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, No. 4, pp. 890-901, 2007.
- 3) Kobayashi, A., Sano, D., Hatori, J., Ishii, S. and Okabe, S. : Chicken- and duck-associated *Bacteroides-Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 97, No. 16, pp. 7427-7437, 2013.
- 4) Allegra, K. S., Jean-Claude, L. S., Sylvain, P., Monique, P., Menachem, E., and Françoise, S. G.: Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 73, No. 24, pp. 7891-7897, 2005.
- 5) Oka, T., Katayama, K., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F. T., White, P. A., and Takeda, N.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, Vol. 78, No. 10, pp.1347-1353, 2006.
- 6) Ishii, S., Segawa, T. and Okabe, S. : Simultaneous Quantification of Multiple Food- and Waterborne Pathogens by Use of Microfluidic Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 79, No. 9, pp. 2891-2898, 2013.
- 7) Kobayashi, A., Sano, D., Taniuchi, A., Ishii, S. and Okabe, S. : Use of a genetically-engineered *Escherichia coli* strain as a sample process control for quantification of the host-specific bacterial genetic markers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-013-5188-z
- 8) Kitajima, M., Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Katayama, H., Takeda, N., and Katayama, K.: Developme nt and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses. *J. Virol. Methods.*, Vol. 169, No. 2, pp. 269-273, 2010.
- 9) Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., and Calderon, R. L.: Norwalk virus: how infectious is it?. *J. Med. Virol.*, Vol. 80, pp. 1468-1476, 2008.
- 10) Haas, C. N., Rose, J. B., and Gerba, C.P.: *Quantitative Microbial Risk Assessment*. John Wiley & Sons, 1999.
- 11) Teunis, P. F., Ogden, I. D., Strachan, N.J.: Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiol. Infect.*, Vol. 136, No. 6, pp. 761-770, 2008.
- 12) Medema, G. J., Teunis, P. F., Havelaar, A. H., Haas, C.N.: Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 30, pp.101-111, 1996.