

研 究 報 告

令和 7 年 4 月 24 日

公益財団法人 前田記念工学振興財団

理 事 長 岸 利 治 殿

研究代表者

所 属 : 京都大学大学院 工学研究科

氏 名 : 中西智宏

研究課題名：水道水源における病原性原虫リスクの分布：宿主特異的遺伝子マーカー
の微生物リスク評価への活用

助成金額：100万円

研究実施期間：自 令和6年4月1日 ～ 至 令和7年3月31日

水道水源における病原性原虫リスクの分布：宿主特異的遺伝子マーカーの微生物リスク評価への活用

Distribution of protozoan risk in drinking water source: quantitative microbial risk assessment with host-specific genetic markers

京都大学大学院 工学研究科 講師 中西智宏

（研究計画ないし研究手法の概略）

1. 研究の背景・目的

クリプトスポリジウムとジアルジアといった病原性原虫は、我が国の水道水の微生物リスク管理において重要な制御対象であり続けている。これらの原虫はヒトや動物の糞便に由来するため、浄水場の上流に下水処理場の放流口が存在するような地域では特に注意が必要である。例えば、近畿地方最大の水道水源である琵琶湖・淀川流域には上流～中流域に多くの下水処理場が存在し（図1）、下流域で実質的に下水の飲用再利用がなされている。このような流域は当該流域に限らず全国的に存在し、流域全体を見据えた原虫リスクの評価が必要となっている。

原虫は水環境中で低濃度で存在し、また測定法が煩雑なため、汚染度の判断には大腸菌や嫌気性芽胞菌のような指標細菌が用いられてきた。しかし、これらの指標菌では自然環境中の常在菌（糞便に由来しない菌）も検出される等の問題があり、原虫リスクを過大評してしまう可能性がある。一方、近年は微生物起源解析の研究分野において特定の動物による糞便汚染を特異的に検出できる遺伝子マーカーが数多く開発されている。遺伝子マーカーによって原虫の宿主動物による糞便汚染を特異的に検出できれば、原虫汚染・リスクを正確に評価できる可能性がある。しかし、水道水源において遺伝子マーカーが原虫とともに測定された例は皆無であり、同一試料での濃度データの蓄積が望まれる。

以上を踏まえ、本研究では琵琶湖・淀川水系におけるクリプトスポリジウム・ジアルジア、指標細菌、宿主特異的遺伝子マーカーを定量し、原虫の汚染実態の把握、由来（ヒト/動物）ごとの糞便汚染の状況の把握、さらにはこれらデータを用いた定量的微生物リスク評価を行った。

2. 研究方法

2.1 琵琶湖・淀川水系における原虫・指標菌・各種遺伝子マーカーの定量調査

図1に示す5つの地点で河川水あるいは下水処理水を採水した（図1）。河川水を宇治川上流の瀬田川大橋にて4試料、桂川の松尾橋、宮前橋地点にてそれぞれ6試料、淀川大橋にて4試料採水した。また、下水処理水は桂川に放流するA下水処理場の放流口から7試料採取した。なお、平水時の河川流量に占める下水処理水の混入割合を推定したところ、瀬田川大橋、松尾橋、枚方大橋では数%程度、宮前橋地点では39%と高いことが分かっている。

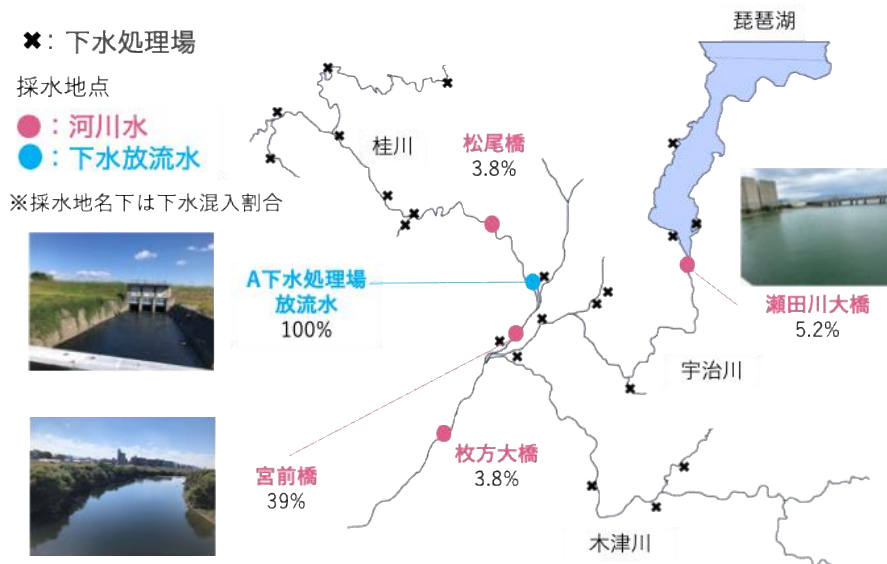


図1 採水地点

採水した試料に対して、各種微生物の濃度を下記のように測定した。

クリプトスポリジウム・ジアルジアの測定は上水試験方法¹⁾に則り、親水性メンブレンフィルターによる水試料の濃縮、免疫磁気ビーズ（ARK Capture C/G-Mag Purification Kit; アーク・リソース社）による分離精製、染色キット（ARK Checker C/G - DyLight488; アークリソース社）を用いた蛍光観察によって測定した。クリプトスポリジウム・ジアルジア特有の蛍光を示した粒子について、（オー）シスト内部の核の有無も判定しながら計数した。

大腸菌・嫌気性芽胞菌は上水試験方法¹⁾にしたがって培養・計数した。宿主特異的遺伝子マーカーとしてバクテロイデス目細菌に着目し、ヒト糞便・下水、ブタ、反芻動物に特異的なマーカーとしてそれぞれ HF183²⁾、Pig2Bac³⁾、BacR⁴⁾を定量 PCR 法によって測定した。孔径 0.22 μm PES メンブレンフィルターを用いて試料水 1 L を吸引ろ過したあと、PowerSoil Pro (Qiagen) キットを用いて DNA 抽出した。抽出液を鋳型として、PrimeTime® Gene Expression Master Mix (IDT 社) を用いて定量 PCR を行った。プライマーは既報²⁻⁴⁾と同様のものを、定量機器としては StepOnePlus (Applied Biosystems) を用いた。

さらに、ヒト・下水に特異的なウイルスとしてトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)、F 特異 RNA フェージ (FRNAPH) GII 型を、動物系の糞便に特異的なウイルスとして FRNAPH GI 型を測定した。試料水 2 L を孔径 10 μm の親水性 PTFE メンブレンフィルターでろ過することで粗大な懸濁粒子を除去した後、既報⁵⁾の陰電荷膜法にしたがってウイルスを濃縮した。さらに Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega) を用いて二次濃縮および核酸抽出を行なった。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行った後、上記と同様のキットを用いて定量 PCR 法によって定量した。プライマーは既報^{6, 7)}を参照した。なお、所定濃度のマウスノロウイルスを濃縮前サンプルに添加することによって濃縮過程での回収率を把握した結果、1 次～2 次濃縮の全体で概ね 1 % 以上の回収率が得られていることを確認した。

2.2 定量的微生物リスク評価(QMRA)

2.2.1 ジアルジアの実測濃度に基づいたリスク評価

本研究では逆 QMRA という手法(図2)を用いて、河川水や下水処理放流水を水道原水とした場合に安全確保のために浄水処理に要求されるジアルジア除去能を推算した。なお 2.1 の調査においてクリプトスポリジウムよりもジアルジアが頻繁に検出されたため、後者をリスク評価対象とした。

まず、宮前橋地点の桂川河川水と A 下水処理場放流水における実測ジアルジア濃度に感染性シストの割合を乗じることで感染性ジアルジア濃度を推定した。

この割合は、2.1 で検出されたジアルジアシストのうち核が確認された個体の平均割合(河川水：9.3%，下水処理放流水：19%)を用いた。一方、許容年間感染確率を $10^{-4}/(\text{人} \cdot \text{年})$ とした場合に、それに対応する飲料水中の感染性ジアルジアの許容濃度を推定した。これにはジアルジアの用量-反応関係⁸⁾や非加熱飲水量データ⁹⁾を用いた。最後に、この許容濃度と対象水中の感染性ジアルジア濃度を比較することによって要求除去能を推算した。

なお、以上の計算では不確実性に対応するため各パラメータに分布形を仮定し、試行回数 10 万回のモンテカルロシミュレーションを行った。河川水、下水処理放流水中のジアルジア濃度は、それぞれ $\mu=2.4$, $\sigma=0.55$ 、 $\mu=3.6$, $\sigma=0.52$ の対数正規分布を当てはめた。なお、適合に用いた測定データは本プロジェクト以前から蓄積している 14 検体、18 検体分を利用した。また、非加熱飲水量⁹⁾には指数分布(比率 3.06×10^{-3})を当てはめた。用量-反応関係(指数モデル)における γ には三角分布(最小値 0.009798, 最頻値 0.0198 最大値 0.03582)を当てはめた⁸⁾。

2.2.2 指標菌/遺伝子マーカー濃度とジアルジアリスクの関係

2.1 における測定データを用いて、各種指標菌・遺伝子マーカー濃度とジアルジアリスク(=要求除去能)との関係を明らかにした。桂川河川水(宮前橋地点)と A 下水処理場放流水における測定データから、ジアルジア濃度に対する大腸菌、嫌気性芽胞菌、HF183、PMMoV 濃度の比率を検体ごとに計算し、三角分布(最頻値には中央値を使用)を当てはめた。任意の指標菌・遺伝子マーカー濃度に対してこの濃度比を乗じることで原水中のジアルジア濃度を推定し、以降は 2.2.1 と同様にして要求除去能を推算した。

(実験調査によって得られた新しい知見)

3. 結果と考察

3.1 河川水と下水処理水における原虫・遺伝子マーカーの定量結果

表1に各地点における原虫の測定結果をまとめる。いずれの試料でもクリプトスポリジウムを明らかに同定できた粒子は確認されず検出率は 0%であった。一方、ジアルジアは河川水、下水処理放流水から頻繁に検出された。まず、A 下水処理場放流水からは 12~38 cysts/10 L と最も高濃度で検出された。さらに、その放流水の影響を強く受けている桂川宮前橋地点でも検出率 100%で 6~16 cysts/10L と比較的高濃度であった。一方、河川の上流部(松尾橋、瀬田川大橋地点)では検出率が低かった。これより、当該水系では下水処理水由来のジアルジアが河川に流入しており、流下過程で濃度が上昇することが明らかとなった。

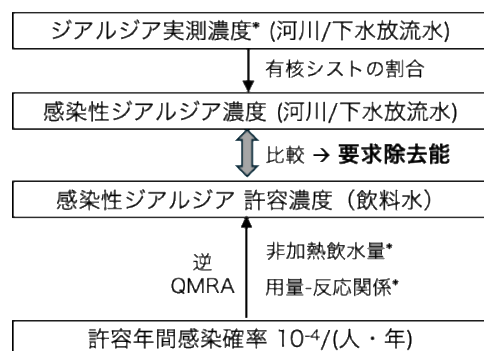


図2 QMRA の手順

(*を付した変数には分布系を設定)

表1 クリプトスポリジウム・ジアルジアの測定結果

地点	検体数	クリプトスポリ	ジアルジア（濃度単位：cyst/10L）			
		ジウム検出率(%)	検出率(%)	最小値	平均	最大値
松尾橋	6	0	17	NA	2	NA
瀬田川大橋	4	0	0	<1	<1	<1
宮前橋	6	0	100	6	11	16
枚方大橋	4	0	50	2	3	4
A 下水処理場放流水	7	0	100	12	26	38

NA:1 検体のみ検出のため計算なし

次に、図3、図4にバクテロイデス目細菌、ウイルスの各種マーカーの測定結果を示す。ヒトに特異的な HF183 や FRNAPH GII は下水処理放流水で濃度が高い傾向にあったものの、地点間で河川水中の濃度に大きな違いは見られなかった。特に上流の松尾橋・瀬田川大橋地点でも 5～6 log copies/L と高濃度となることが多かった。本研究では糞便汚染の発生源として下水処理場を想定したが、それ以外の汚染源の存在による影響が考えられた。一方、同様にヒト特異的なマーカーである PMMoV は、下水処理放流水や宮前橋地点の河川水で 6 log copies/L 前後と、その他の地点（3～5 log copies/L）よりも 1～2 log ほど高濃度であった。これは河川水に占める下水処理放流水の混入割合とも整合していた。

また、ブタに特異的な遺伝子マーカーである Pig2Bac は河川水中で低濃度か不検出となることが多く、畜産場などに由来するブタの汚染が小さいことが分かった。一方、反芻動物に特異的な BacR やヒト以外の動物全般に特異的な FRNAPH GI は、瀬田川大橋でやや低い傾向が見られたものの、その他の地点で広く検出された。下水処理場からの放流によって濃度が上昇している様子は見られず、野生動物による糞便汚染の状況が地点によって異なることが推察された。

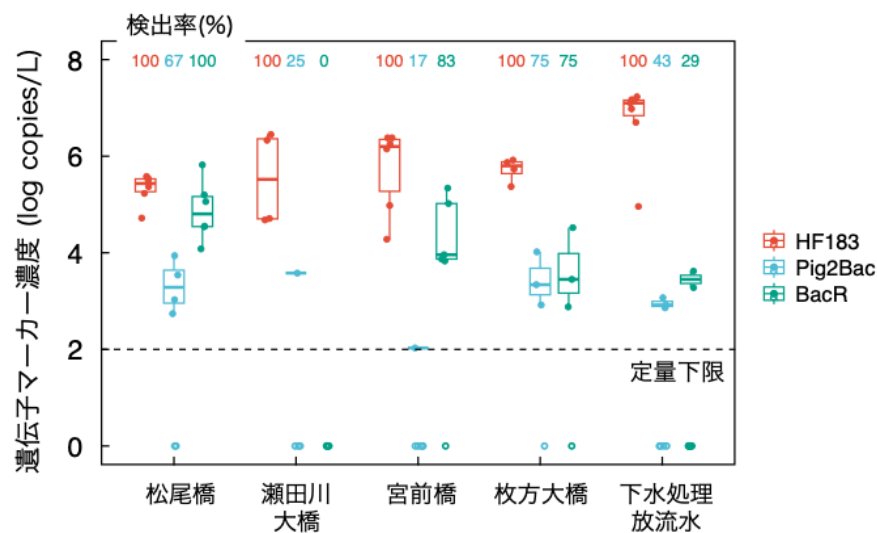


図3 バクテロイデス目細菌マーカー(HF183, Pig2Bac, BacR)の測定結果。
(不検出データは 0 log copies/L として表示)

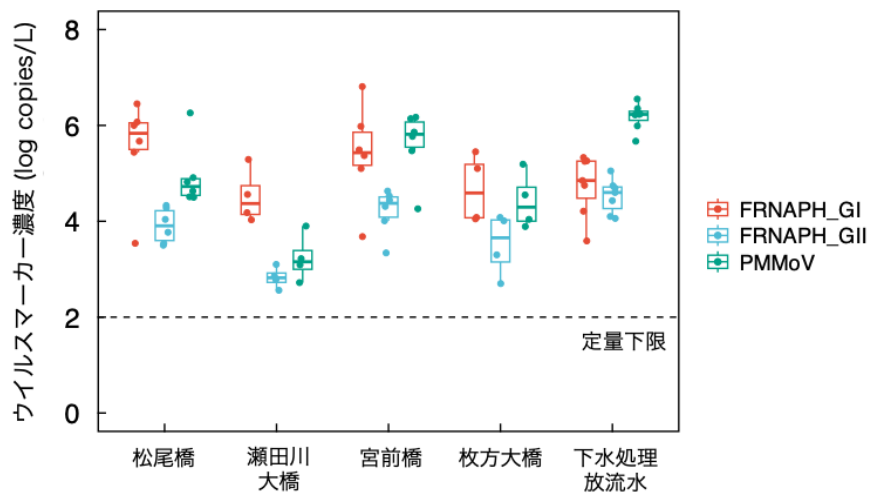


図4 ウイルスマーカー(FRNAPH GI/GII 型、PMMoV)の測定結果
(不検出データは 0 log copies/L として表示)

3.2 定量的微生物リスク評価

3.2.1 実測ジアルジア濃度に基づいた要求処理能の推算

図5に桂川宮前橋地点と A 下水処理場放流水のそれぞれを水道原水として利用する場合に、安全確保のために浄水処理に求められるジアルジア除去 $\log_{10}$ 数を推算した結果を示す。中央値で宮前橋地点河川水は $3.23 \log_{10}$ 、下水処理放流水は $4.05 \log_{10}$ のジアルジア除去が必要であると推算された。凝集沈殿・砂ろ過からなる急速ろ過プロセスにおけるジアルジアの除去能の範囲は $2.1 \sim 5.1 \log_{10}$ 、中央値で $3.3 \log_{10}$ 、平均値は $3.4 \pm 0.9 \log_{10}$ と報告されている¹⁰⁾。つまり、対象水中のジアルジア濃度は通常の急速ろ過プロセスのみでは十分な安全性が確保できないほどの高濃度であることが明らかとなった。なお、今回対象とした宮前橋地点は琵琶湖・淀川水系の中でも下水処理水の影響を最も強く受けている地点であり、本評価は安全側に立ったものであることには留意が必要である。実際には当該地点の河川水が水道原水として直接使用されるわけではないため、現状の浄水処理や水源管理に追加の対策が求められるわけではない。しかし、本研究によって、下水処理水の影響がきわめて強い河川では通常の浄水処理によって原虫リスクを十分に管理できない可能性が示された。

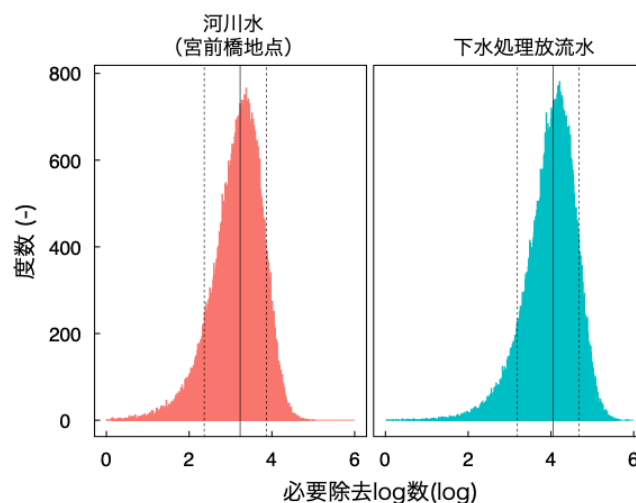


図5 ジアルジアの実測濃度に基づいて試算された必要除去 $\log$ 数
(試行回数 100,000 回, 点線は 10%tile, 90%tile 値、実線は中央値を示す)

3.2.2 指標菌/遺伝子マーカー濃度とジアルジアリスクの関係

指標細菌・遺伝子マーカー（HF183/PMMoV）濃度に対するジアルジア濃度の濃度比を算出し、原水中の任意の指標・マーカー濃度に対してジアルジアのリスクを要求除去能として推算した結果を図6に示す。一般的な急速ろ過プロセスにおけるジアルジアの除去能を $3 \log_{10}$ とすると、図中の点線との交点が原水中に許容できる微生物濃度の目安と考えることができる。図6によれば、大腸菌で $2.3 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$ 、嫌気性芽胞菌で $2.5 \log \text{CFU}/100 \text{ mL}$ 、HF183で $5.4 \log \text{ copies}/\text{L}$ 、PMMoVで $5.1 \log \text{ copies}/\text{L}$ （いずれも中央値）が許容濃度として推算された。このように、指標菌や遺伝子マーカー濃度とジアルジアによるリスクの大きさを関連付けることができたことが本研究の主要な成果である。

なお、この計算では、1) ジアルジアと指標菌・遺伝子マーカーの間に一定の濃度相関があること、2) 宮前橋地点の河川水や A 下水処理場放流水のデータを用いて算定された濃度比が流域全体で変わらないこと等の多くの仮定をしている点には注意を要する。今後、このような評価が有効となる水域の条件等について整理することが必要である。また、クリプトスポリジウムやジアルジアは人獣共通の病原体であり、畜産施設等の動物系の汚染源も重要となる。そのような水系で有効となる遺伝子マーカーの探索やリスク評価が今後の課題である。

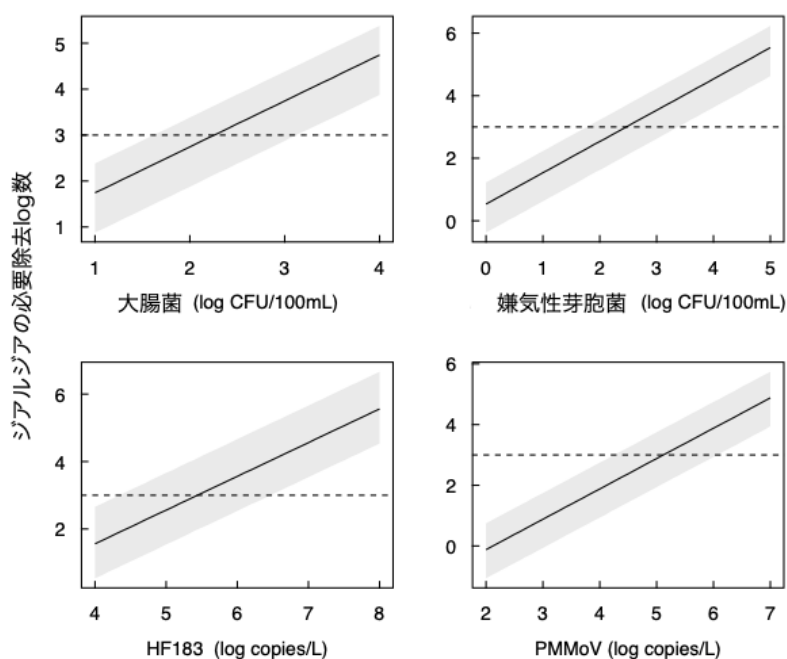


図6 原水中の大腸菌・嫌気性芽胞菌・HF183・PMMoV 濃度と原虫の必要除去 log 数の関係
（グレーの帯は 10%tile、90%tile 値の範囲を示す。点線は $3 \log_{10}$ の除去能を示す。）

参考文献：

- 1) 公益社団法人 日本水道協会：上水試験方法 2020 年版 IV.微生物編 V.生物編．東京，日本水道協会，2020，494p.
- 2) Green et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 80, No. 10, pp. 3086–3094, 2014.
- 3) Mieszkin et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 75, No. 10, pp. 3045–3054, 2009.
- 4) Reischer et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 72, No. 8, pp. 5610–5614, 2006.
- 5) 片山ら，水環境学会誌，Vol. 25, No. 8, pp. 469–475, 2002.
- 6) Wolf et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol. 76, No. 5, pp. 1388–1394, 2010.
- 7) Zhang et al., PLOS Biology, Vol. 4, No. 1, pp. e3, 2005.
- 8) Rose et al., Vol. 81, No. 6, pp. 709–713, 1991.
- 9) 小松ら，水道協会雑誌，Vol. 82, No. 3, pp. 16–25, 2013.
- 10) Hijnen, and Medema, IWA Publishing, 2010, 113p., ISBN978-1-84339-373-3.