HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Establishment of a new approach for determining hygiene standard values for fecal pollution based on the acceptable risk of pathogen infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小林, 彩乃
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第11459号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55670
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ayano_Kobayashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　内　容　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　　博士（工学）　　氏名　小林 彩乃

学　位　論　文　題　名

Establishment of a new approach for determining hygiene standard values for fecal pollution based on the acceptable risk of pathogen infection

(病原微生物の許容感染リスクに基づく糞便汚染指標の水質基準値の設定)

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処理効率の指標として用いられてきた。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指摘されている。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の設定を推奨している。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している。すなわち、いわゆる「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。

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) 環境中の存在量が多く、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、及び 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問題が存在している。本研究は、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目的とした。

本論文は、8 章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章では、本研究の序論として研究背景や目的、本論文の構成を示した。

第 2 章では、本研究の対象である従来及び新規糞便汚染指標の現状、それらの指標を測定するための手法の標準化に関する報告、世界各国の水質基準及びその背景についての知見を中心に整理した。

第 3 章では、これまでに新規糞便汚染指標として、糞便汚染源となりうる宿主 (全種、ヒト、ウ

シ、ブタ等) に特異的な遺伝子マーカーが設計されているため、新たな汚染源として野鳥に着目し、ニワトリ、カモ、ニワトリ及びカモ特異的遺伝子マーカーの開発を行った。

第 4 章では、サンプルプロセスコントロール (SPC) 法及び Propidium monoazide(PMA) を併用した定量 PCR 法の確立を行った。河川水からの遺伝子マーカー定量において、菌体濃縮・回収操作による菌体の損失、菌体からの DNA 抽出操作による DNA の損失、及び阻害物質による PCR 増幅効率の低下など、様々な要因により定量値の変動が生じる。そこで、本章ではこれらの損失評価できるサンプルプロセスコントロールに着目した。また、定量 PCR 法の重大な課題点として、生菌由来 DNA と死菌由来 DNA の判断ができないため、感染性の評価が不可能であるということが挙げられる。そこで細胞不浸透性を有する PMA を用いて、死菌由来 DNA の PCR 阻害を利用した定量 PCR 法を確立した。

第 5 章では、宿主特異的遺伝子マーカーの環境中における挙動の把握を行った。現在に至るまで、宿主特異的遺伝子マーカーの環境中動態に関する知見が不足しているため、それらの河川水中動態やその変化に影響を与える水温や捕食者に関する調査を行った。

第 6 章では、定量的微生物学的リスク評価 (Quantitative Microbial Risk Analysis: QMRA) の点推定により、病原微生物の許容濃度の検討を行った。この許容濃度を水質基準値設定に用いることで、許容感染リスクに基づく水質基準値の設定が可能となる。

第 7 章では、指標と病原微生物の調査データに基づいて、濃度分布及び濃度比分布を推定し、指標と病原微生物濃度の量的関係を得た。ここで得られた指標と病原微生物濃度の量的関係及び第 6 章において求めた許容濃度に基づいて水質基準値としての指標濃度の決定を行った。

第 8 章は、総括であり、感染許容リスクに基づく水質基準値とそれらを用いた総合的な水管理について示した。