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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士 (工学)　　氏名　小林 彩乃

審査担当者　主　査　教　授　岡部 聡
副　査　教　授　船水 尚行
副　査　教　授　高橋 正宏
副　査　准教授　佐野 大輔

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) 指標として、大腸菌や大腸菌群数、糞便性大腸菌群数、腸球菌濃度などが用いられている。しかしながら、これら糞便性汚染指標の測定は、糞便に由来しない大腸菌群の存在、水環境中での増殖、測定の特異性および定量性の低さなど多くの問題点が指摘されている。このような背景を受けて、新たな糞便性汚染指標として、宿主動物に特異的に存在する細菌の各種遺伝子配列 (遺伝子マーカー) が提案され、その定量法の開発が盛んに行われている。迅速かつ簡便な人畜糞便性汚染源の特定と汚染度の同時定量が可能となれば、より安全で効率的な水利用や具体的な汚染防止対策の提案が可能となる。

しかしながら、水系感染症を引き起こす病原微生物の実際の水環境中における挙動は、糞便汚染指標細菌の挙動とは異なることが知られている。さらに、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。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。特に、飲料水基準に関して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。

そこで本研究では、従来の糞便指標微生物の欠点を補う新たな指標として、糞便汚染源追跡に用いられる Bacteroides-Prevotella 属宿主特異的 16S rRNA 遺伝子マーカーに着目し、各種宿主特異的遺伝子マーカーの定量方法の確立を行うとともに、環境水中の遺伝子マーカー濃度と病原微生物濃度の関連を明らかにし、その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に基づき確立するプロセスを構築することを目的としている。

本論文は、8 章から構成されており、各章の概要を以下に示す。

第 1 章では、本研究の序論として研究背景や目的、本論文の構成が示されている。

第 2 章では、 従来及び新規糞便汚染指標および測定手法としての標準化における課題、世界各国の水質基準及びその設定についての知見を整理している。

第 3 章では、これまでに新規糞便汚染指標として、ヒト、ウシ、ブタを標的とした宿主特異的 Bacteroides-Prevotella 属 16S rRNA 遺伝子マーカーを開発している。本章では、新たに鳥類による糞便汚染を考慮し、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い、その定量 PCR 法の確立を行っている。

第 4 章では、河川水試料から宿主特異的遺伝子マーカーを定量する場合、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に誤差が生じる。さらに、一般的な定量 PCR 法では、生菌由来 DNA と死菌由来 DNA の判断ができないため、感染性の評価が困難である。本章では、これらの測定誤差を補正するために、サンプルプロセスコントロール (SPC) 法を確立した。さらに、生菌および死菌由来 DNA を分離して定量するために、細胞不浸透性の Propidium monoazide(PMA) を併用した定量 PCR 法を確立している。

第 5 章では、宿主特異的遺伝子マーカーの実際の水環境中における挙動の把握を行っている。宿主特異的遺伝子マーカー、すなわち嫌気性 Bacteroides-Prevotella 属細菌の消長は、水温、栄養塩類濃度、日射など様々な環境因子に影響されると考えられる。本章では、Bacteroides-Prevotella 属宿主特異的遺伝子マーカーの河川水中動態に及ぼす水温や捕食者の影響について調査を行っている。

第 6 章では、4 章で確立した SPC 法および PMA 法を用いた定量 PCR 法を用いて、3 章で開発した宿主特異的遺伝子マーカーを含む宿主特異的遺伝子マーカーと各種水系病原微生物 (細菌、ウイルス) 濃度の定量を行い、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ている。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ことを示している。

第 7 章では、宿主特異的遺伝子マーカー (糞便汚染指標) と病原微生物の調査データに基づいて、両者の濃度分布及び濃度比分布を推定し、糞便汚染指標と病原微生物濃度の量的関係を得た。ここで得られた糞便汚染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宿主特異的遺伝子マーカー濃度の決定を行っている。

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の設定方法およびそれらを用いた統合的水管理手法についてまとめている。

これを要するに、著者は、新規糞便汚染指標として、宿主特異的遺伝子マーカーの定量法を確立し、これを用いて河川中の病原微生物濃度との関連を明らかにしたうえで、許容感染リスクに基づく水質基準値設定が可能であることを明らかにしており、水環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるのもと認める。