

京都大学	博士 (工 学)	氏名	曾 潔 (Zeng Jie)
論文題目	Quantitative microbial risk assessment of small water supply systems with simultaneous detection of pathogenic bacteria (小規模水供給システムにおける病原細菌の一斉検出法を活用した定量的微生物リスク評価)		
(論文内容の要旨)			
<p>定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)手法は水道水の微生物的安全性を評価および管理するために使用される。この QMRA では、一般に、特定の病原体を取り上げてリスク評価を行うが、それでは他の病原体を見逃す可能性がある。本研究では、病原細菌を種レベルで一斉検出し、リスクを定量化する方法を構築することを目的としている。一方、飲料水供給施設等の小規模水供給施設においては、浄水処理や消毒が不十分である場合も少なくない。小規模水道にあっては、病原微生物に対する安全確保を優先させる必要があるが、そのような水道原水について病原微生物に関する検査が行われることは皆無とってよい。本研究は、飲料水の微生物的安全性を確保する方法として、限定的な情報の下で採りうる方法から、新規に構築した遺伝子の網羅解析法を導入する方法までを体系的に論じている。本論文は 7 章で構成されている。</p> <p>第 1 章は序論であり、本論文の背景、目的、構成を述べている。</p> <p>第 2 章は文献考察であり、本論文の位置づけと研究の意義を明らかにしている。まず、小規模水供給施設に注目する必要性と課題について述べ、微生物リスク管理の重要性を指摘した。また、微生物リスクを管理する手段として定量的微生物リスク評価(QMRA)手法を示し、小規模水供給施設における病原微生物データ収集の位置付けを論じた。さらに、QMRA 研究のための病原細菌データ収集方法について概説し、ハイスループットのロングリードシーケンシング手法が必要であることを指摘している。同時に、ロングリードシーケンシング技術としてナノポアシーケンシング法を導入する必要性を示した。</p> <p>第 3 章では、ナノポアシーケンシングを用いて 16S rRNA 遺伝子全長(FL-16S)の種レベルでの解像度を評価している。ナノポアシーケンシングのエラー率は高いため、FL-16S の種レベルでの解像度が懸念される。この問題に対して、まず既知の種構成を持つ標準試料を使用して、FL-16S の解像度を評価した。その結果、FL-16S は、種レベルまでの分類において、感度 80%以上、精度約 70%を示した。これを環境水サンプルに適用した結果、45 属におよぶ病原細菌が検出されたが、種レベルでの検出信頼性は限定的であることを指摘した。そのうえで、FL-16S を標的としたナノポアシーケンシングの種レベルでの解像度を改善するためには、同法の精度を向上させることが必要であることを指摘した。</p> <p>第 4 章では、FL-16S を標的としたナノポアシーケンシングに独自の分子識別子(UMI)取り入れた方法(UMI 法)を使用して、小規模水供給施設で利用される原水中の病原細菌の種類と特徴を把握した。まず、既知の種構成を持つ標準試料を用いて、UMI 法の精度などのパフォーマンスを確認した。その後、UMI 法を小規模水供給施設の原水試料に適用</p>			

した。その結果、調査対象とした4か所の原水から、病原細菌として最大33属、49種を検出した。この手法を適用することによって、各原水に含まれる細菌の種類数と量の特徴を指摘している。すなわち、上流の渓流水における細菌群集と病原細菌群集は、下流の河川水や下水処理水とは有意に異なることを示した。まず、前者は後者よりも病原細菌の存在量が少なかった。また、上流渓流水中の病原細菌群集は、腸内病原細菌も検出されるものの、主に環境由来の種で構成されている。一方、下流河川水と下水処理水中には、糞便汚染に由来する種がより多く存在していた。

第5章では、小規模水供給施設の水質および微生物リスクを評価している。4か所の小規模水利用施設を対象として、最大2年半、33回に及ぶ調査を行った結果に基づいて、原水を飲用利用した場合の年間感染確率を推定した。まず、上流の渓流水であっても、糞便汚染指標である大腸菌および嫌気性芽胞菌が検出されることを示した。その後、第4章で検出した病原細菌の濃度を推定し、それらによる感染確率を定量化した。比較対照として、従来型のショートリードシーケンシング手法および指標微生物を用いたリスク評価も行った。この結果、大腸菌などの指標細菌を用いた場合よりも、ロングリードシーケンシングによる一斉検出手法を適用する方がリスク評価における不確実性を低減できることなどを示した。また、調査対象とした原水は病原微生物の観点から飲用水としては適さず、浄水処理が必須であることを指摘した。

第6章では、限定的な情報の下で、小規模水供給施設の微生物的安全性を確保するためのアプローチを提示している。小規模水供給施設においては病原微生物とその濃度について調査されることは皆無とあってよい。これに対して、大腸菌検査などの追加調査を実施できる場合を想定し、計5種類のケースを設定した。この結果、調査対象とした4か所の小規模水供給施設では、飲料水としての微生物的安全性を確保するためには最大で6.5 log₁₀の除去・不活化が必要であることを示した。また、原水に関する情報が限定的な場合には安全側の評価にならざるを得ないが、追加調査を行うほど制御すべきリスクを限定できるので、必要浄水処理能の大きさも適切に設定できることを指摘した。

第7章は結論であり、各章で得られた成果、および今後の課題について要約している。

(論文審査の結果の要旨)

定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)手法は水道水の微生物的安全性を評価および管理するために使用される。この QMRA では、一般に、特定の病原体を取り上げてリスク評価を行うが、それでは他の病原体を見逃す可能性がある。本研究では、病原細菌を種レベルで一斉検出し、リスクを定量化する方法を構築することを目的としている。一方、飲料水供給施設等の小規模水供給施設においては、浄水処理や消毒が不十分である場合も少なくない。小規模水供給施設にあっては、病原微生物に対する安全確保を優先させる必要があるが、病原微生物に関する検査が行われることは皆無とあってよい。本研究は、小規模水供給施設の微生物的な安全性を確保する方法として、16S rDNA 全長の網羅解析法を導入し、リスクの定量を行ったものである。得られた主な成果は以下の通りである。

1. 水中病原体に対する既存の一斉検出手法では、16S rDNA の部分配列 (~420 bp) を網羅解読するが、これでは細菌の属レベルまでの分類群を推定できるだけである。一方、病原性の有無の判断には種レベルで検出する必要があり、本研究では 16S rDNA 全長の網羅解析による病原細菌の一斉検出手法を構築した。また、同手法の信頼性についても定量的に評価している。

2. 淀川水系において、上流の渓流水、桂川と淀川の河川水、下水処理場放流水を対象として、構築した方法を適用した。この結果、上流の渓流水において合計 33 属、49 種病原細菌を検出したほか、河川水と下水処理水において合計 107 の病原細菌種を検出するとともに、病原細菌群集の特徴を指摘した。

3. 4 か所の小規模水供給施設を対象として、最大 2 年半、33 回に及ぶ調査を行った結果および一斉検出の結果に基づいて、原水を飲用利用した場合の年間感染確率を推定した。この結果、大腸菌などの指標細菌を用いた場合よりも、上記の一斉検出手法を適用する方がリスク評価における不確実性を低減できることなどを示した。

4. 小規模水供給施設での水利用を念頭に、大腸菌試験の結果と追加の調査を実施する可能性に基づいて、5 つのケースを設定し、原水のリスク評価を行うとともに、浄水処理において必要となる除去・不活化能を求めた。この結果、原水に関する情報が限定的な場合には安全側の評価にならざるを得ないが、追加調査を行うほど制御すべきリスクを限定できるので、必要浄水処理能の大きさも適切に設定できることを指摘した。

本論文で得られた成果は、16S rDNA 全長の網羅解析法を導入することによって病原細菌の種レベルでの一斉検出を可能にするとともに、小規模水供給施設を含む飲料水の安全性確保に貢献するものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 5 年 8 月 9 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。