

微生物遺伝子マーカーを用いた水環境中の糞便汚染評価手法の開発

Evaluation of human-animal fecal contamination of environmental water using microbial genetic markers

山梨大学大学院医学工学総合研究部 助教 原本 英司

(研究計画ないし研究手法の概略)

1. はじめに

ノロウイルスに代表される水系感染性の病原微生物は、水環境中に広く存在し、ヒトのみならず多くの動物にも感染することが知られている。親水活動や飲料水の摂取を介した病原微生物のヒトへの水系感染リスクを解明し、制御していく上で、ヒト・動物由来の糞便汚染を区別することは重要な課題となる。本研究では、高精度な糞便汚染源解析を可能にすることを目的とし、複数の微生物遺伝子マーカーを併用した新しい糞便汚染評価手法の開発を試みた。

2. 研究方法

2.1 研究試料の採取

2013年7～10月に毎月1回の頻度で富士川（富士橋地点）の河川水（表流水）を採取した。また、山梨県内の下水処理場において下水処理水（塩素消毒前の2次処理水）を採取した。採取した試料は冷蔵状態で山梨大学内の実験室に輸送し、実験時まで冷蔵保存した。

2.2 基本的な水質指標の測定

試料約10mLを用い、簡易水質分析計（HACH）によって濁度を測定した。また、必要に応じて試料をLB Broth Base（Invitrogen）溶液で希釈し、クロモカルト・コリフォーム寒天培地（Merck Millipore）を用いた培養法によって大腸菌群と大腸菌を測定した。

2.3 モデル微生物の選定

濃縮操作条件の最適化の検討に用いる微生物遺伝子マーカーとして、F特異大腸菌ファージとヒトバクテロイデスを選定した。通常、濃縮法の最適化においては、モデル微生物を高濃度で添加した試料を用い、添加した微生物量に対する回収された微生物量の割合から回収率を算出し、異なる濃縮条件による回収率の差異が比較されることが多い。しかしながら、この方法では、試料中に元々存在する微生物の多くが濁質と吸着していると考えられることから、モデル微生物を用いて得られた回収率が必ずしも有効な値であるとは限らない。そこで、本研究では、試料中に既知量の微生物は添加せず、元々存在する微生物を測定対象として実験を実施した。

F特異大腸菌ファージは、粒径などの性状がヒト腸管系ウイルス（ノロウイルスやエンテロウイルスなど）と類似しており、培養法による測定が容易であることから選定した。さらに、核酸としてRNAを有するF特異RNA大腸菌ファージは、塩基配列の相同性に基づいて分類される4種類の遺伝子群によって宿主特異性が異なることが報告されており、濃縮法の開発に続く水環境中の糞便汚染源解析においても有効となることが期待される。バクテロイデスは、現在、微生物遺伝子マーカーとして世界中で最も広く用いられている微生物であり、多くの宿

主に特異的なものが知られているが、本研究ではヒトに特異的とされているバクテロイデスを測定対象として選定した。

2.4 陰電荷膜破碎型濃縮法による濃縮操作

微生物遺伝子マーカーの濃縮法として、ウイルスと原虫を同一試料から同一操作で濃縮可能な手法として開発された陰電荷膜破碎型濃縮法¹⁾を基に、微生物遺伝子マーカーの最適濃縮操作条件を検討した。

試料1Lに2.5M MgCl₂を25mMとなるように添加して十分に混合した後、陰電荷膜(混合セルロース膜, Merck Millipore)で全量をろ過した。ろ過後の陰電荷膜をフィルターホルダーから剥がし、PET溶液(0.2g/L Na₄P₂O₇·10H₂O, 0.3g/L C₁₀H₁₃N₂O₈Na₃·3H₂O, 0.1mL/L Tween 80)10mLとフットボール型攪拌子を入れた遠沈管内で激しく攪拌して膜を破碎した。スポイトを用いて懸濁液の全量を新しい遠沈管に移し入れた後、PET溶液5mLを用いて同様の操作を繰り返し、計15mLの懸濁液を得た。遠沈管を遠心(2,000×g, 10分, 4°C)し、上清をF特異大腸菌ファージの濃縮液とした。沈渣にリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))を添加して攪拌し、ヒトバクテロイデスの濃縮液とした。濃縮操作条件として、陰電荷膜の孔径(GS膜:0.22μm, HA膜:0.45μm, AA膜:0.8μm)と直径(47mm, 90mm)、試料のろ過水量(直径47mmの膜:400mL(GS膜)または500mL(HA膜, AA膜)、直径90mmの膜:1,600mL(GS膜)または2,000mL(HA膜, AA膜))、沈渣に添加するPBS(-)の液量(1mL, 10mL)を変化させて実験を行った。

2.5 モデル微生物の定量

濃縮操作前の試料および上清中のF特異大腸菌ファージの濃度は、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49を宿主菌に用いたブラック法によって定量した。沈渣中のヒトバクテロイデスの濃度は、QIAamp DNA mini kit(Qiagen)を用いて抽出したDNAをテンプレートとし、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800(Takara Bio)を用いた定量PCRによって定量した。プライマーと蛍光プローブは、ヒトバクテロイデスへの特異的が確認されているものを使用した²⁾。濃縮操作条件の比較には、F特異大腸菌ファージの場合は回収率(濃縮操作前の試料中のファージ量に対する上清中のファージ量の割合)、ヒトバクテロイデスの場合は沈渣中への回収量から算出される試料中の濃度を用いた。なお、幾何平均の算出に際し、非検出の試料に対しては検出下限値を考慮して妥当な数値を与えた。

2.6 水道水源河川におけるバクテロイデスの存在実態の調査

2011年5月~2012年4月の1年間に国内の水道水源河川において採取し、試料100mLを直径47mmのHA膜でろ過した状態で冷凍保存していたアーカイブ試料を用い、ヒト、ブタ³⁾および反芻動物⁴⁾に特異的な3種類のバクテロイデスを定量PCRによって測定した。HA膜からのバクテロイデスの濃縮操作は2.4節にしたがい、沈渣に添加するPBS(-)の液量は1mLとした。

(実験調査によって得られた新しい知見)

3. 研究結果

3.1 基本的な水質項目の測定結果

表1に示すように、河川水中の濁度は5~27 FAU、大腸菌群の濃度は530~770 CFU/mL、大腸菌の濃度は1.8~6.4 CFU/mLであった。また、下水処理水中の濁度は3~6 FAU、大腸菌群の濃度は790~5,900 CFU/mL、大腸菌の濃度は120~470 CFU/mLであった。これらの値は、平常

時に観測され得る範囲内であり，以降の実験を実施する上で支障はないことが確認された。

表1 基本的な水質項目の測定結果

採取年月	河川水			下水処理水		
	濁度 (FAU)	大腸菌群 (CFU/mL)	大腸菌 (CFU/mL)	濁度 (FAU)	大腸菌群 (CFU/mL)	大腸菌 (CFU/mL)
2013年7月	6	630	2.4	4	5,900	310
2013年8月	5	720	1.8	4	790	120
2013年9月	7	770	3.1	6	2,200	470
2013年10月	27	530	6.4	3	2,100	160

3.2 F特異大腸菌ファージの回収率の測定結果

陰電荷膜の孔径と直径を変化させてF特異大腸菌ファージの回収率を測定した結果を図1に示す。最も孔径が小さいGS膜（孔径 $0.22\mu\text{m}$ ）を用いた場合，膜の直径およびろ過水量に関わらず，河川水から平均25%前後の回収率（直径47mm：26.8%，直径90mm：24.0%）が得られた。下水処理水からも平均20%以上の回収率（直径47mm：21.0%，直径90mm：21.8%）が得られており，水試料一般に対して有効となる濃縮操作条件であることが示唆された。HA膜（孔径 $0.45\mu\text{m}$ ）を用いた場合，直径47mmの膜からはGS膜と同等の回収率（平均20.6%）が得られたものの，直径90mmの膜からの回収率は平均5.3%と低い値であった。膜の単位面積あたりのろ過水量はいずれの直径の膜でも同程度であったため，膜へのファージの吸着率に大きな差があったとは考えにくく，測定試料数を増加させてより詳細に検討する必要があると言える。一方，孔径 0.8mm のAA膜からの回収率が低かった点については，吸着率の低下の可能性によって説明することが可能であると考えられる。

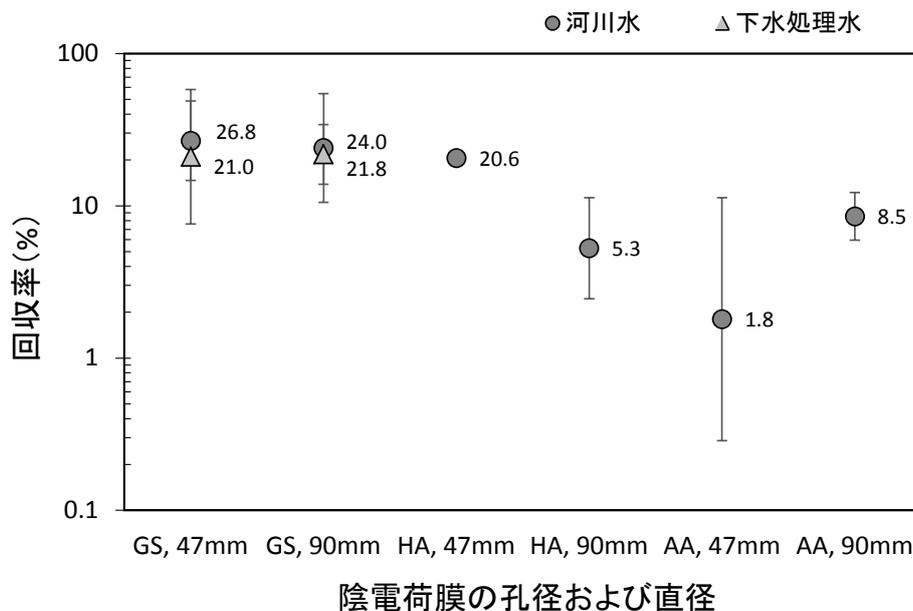


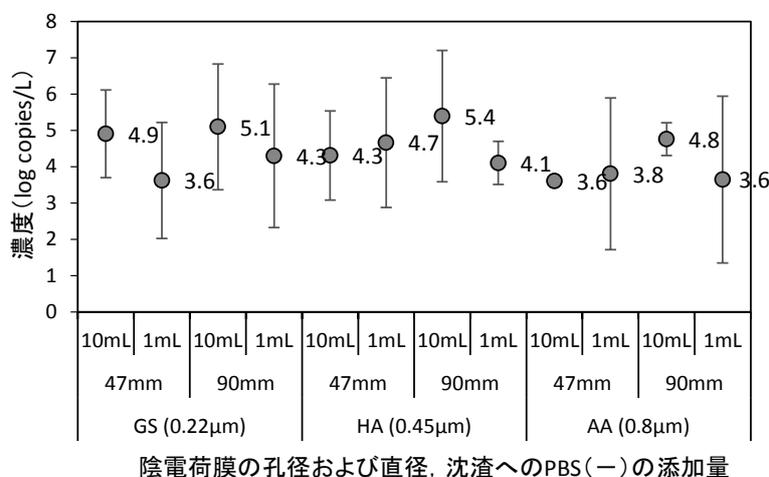
図1 陰電荷膜の孔径と直径を変化させた場合のF特異大腸菌ファージの回収率の測定結果
(n = 4)

3.3 ヒトバクテロイデスの回収率の測定結果

図2に示すように、定量PCRで測定したヒトバクテロイデスの濃度は、濃縮操作条件によって変動し、河川水で平均 $10^{3.6} \sim 10^{5.4}$ copies/L、下水処理水で平均 $10^{5.6} \sim 10^{6.6}$ copies/Lであった。陰電荷膜の直径とろ過水量を増加させることによるヒトバクテロイデス濃度の顕著な上昇効果は見られなかった。河川水から得られた沈渣へのPBS（-）の添加量を変化させた場合においては、添加量が10mLよりも1mLの試料の方がヒトバクテロイデス濃度が低くなる傾向にあり、濃縮倍率が10倍高くなることによるDNA抽出効率あるいは定量PCRの反応効率の低下が生じている可能性が示唆された。しかしながら、この傾向は下水処理水の場合には顕著ではなく、濃縮操作条件が定量値に及ぼす影響については今後より詳細に検証する必要がある。

F特異大腸菌ファージとヒトバクテロイデスの両方の微生物遺伝子マーカーの回収率あるいは濃度の測定結果を勘案すると、F特異大腸菌ファージに対して安定して高い回収率を示す点から、GS膜（孔径 $0.22 \mu\text{m}$ ）を用いることが最適であると判断できる。また、HA膜（孔径 $0.45 \mu\text{m}$ ）も濃縮操作条件によってはGS膜と同程度の効率での検出が可能であり、GS膜よりもより多量のろ過が可能なることから、HA膜を用いた濃縮操作も有効となることが期待される。

A) 河川水



B) 下水処理水

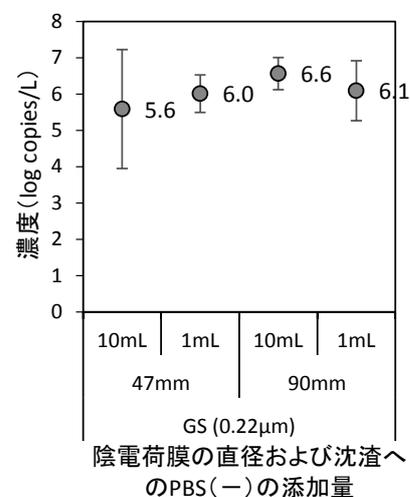


図2 陰電荷膜の孔径と直径、沈渣へのPBS（-）の添加量を変化させた場合のヒトバクテロイデスの回収率の測定結果（n = 3）

3.4 水道水源河川からのバクテロイデスの検出結果

各宿主に特異的なバクテロイデスのうち、反芻動物バクテロイデスが88.6%（62/70）と最も高い陽性率で検出され、ブタバクテロイデスが61.4%（43/70）、ヒトバクテロイデスが38.6%（27/70）の陽性率を示した。調査対象地点の上流域はウシやブタの飼育が盛んな地域として知られており、反芻動物とブタに特異的なバクテロイデスが高い割合で検出された本研究の結果と整合性のあるものであった。図3に示すように、各バクテロイデスの濃度は $10^4 \sim 10^7$ copies/L程度であり、冬期に上昇する傾向が認められた。これは、冬期の河川流量の減少に起因するものと推察された。夏期に採取した1試料から非常に高濃度（ 5.8×10^9 copies/L）でヒトバクテロイデスが検出されており、突発的な非常に強いヒト糞便汚染を受けていたことが示唆された。

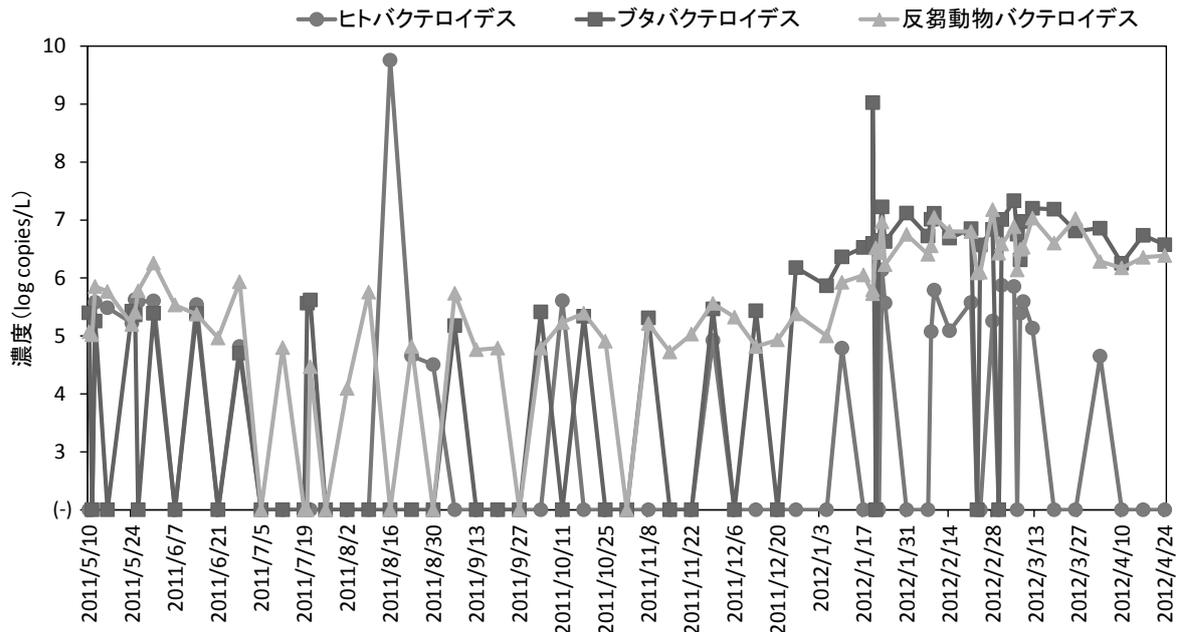


図3 水道水源河川からのヒト，ブタおよび反芻動物バクテロイデスの測定結果

4. まとめ

本研究では、複数の微生物遺伝子マーカーの検出に最適な濃縮操作条件を実験的に決定した。また、3種類のバクテロイデスを測定対象とし、水道水源河川における糞便汚染の実態を定量的に明らかにすることができた。本研究で得られた成果は、今後の水環境の保全につながり得るものであり、さらなる研究の進展が期待される。

参考文献

1. 原本英司，片山浩之，浅見真理，秋葉道宏，国包章一（2010）河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発，水道協会雑誌，**79**(10):2-11.
2. Lee, C. S., J. Lee (2010) Evaluation of new *gyrB*-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination, *J. Microbiol. Methods*, **82**(3):311-318.
3. Mieszkina, S., J. P. Furet, G. Corthier, M. Gourmelon (2009) Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(10):3045-3054.
4. Reischer, G. H., D. C. Kasper, R. Steinborn, R. L. Mach, A. H. Farnleitner (2006) Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(8):5610-5614.

（発表論文）

1. Makoto Watanabe, Saki Fujino, Eiji Haramoto, Kei Nishida, Yasushi Sakamoto: Analysis of fecal contamination of environmental water in the Kofu basin and the Tamagawa River using host-specific Bacteroidales and F-specific RNA coliphage genetic markers. Water and Environment Technology Conference 2014 (WET2014) (2014年6月発表予定)