

河川流域における腸球菌の実態調査と菌種同定に関する基礎的検討

宮崎大学工学部 ○高橋 寛敬(学), 花ヶ崎 宣昌, 鈴木 祥広(正)

宮崎大学農学部 古川 三記子 吉田 照豊

1. はじめに

世界的に見ても水質保全技術・管理が最も進んでいる我が国の水環境において、ふん便に由来する病原性細菌・ウイルス汚染による人間への感染・発症のリスクは、それほど低くないことが報告され始めてきている。一見、清浄と判断されがちな沿岸都市域の水環境においても、細菌学的には高いリスクに遭遇している可能性を否定できない。真に安心して生活できる水環境を構築するためには、流域水系におけるふん便性細菌の汚染源を追跡できる手法の開発が強く望まれる。このような背景において、細菌の遺伝子型別解析法は、細菌の検出・同定に極めて有効な手法の一つである。

そこで本研究では、人畜のふん便性汚染指標細菌である腸球菌(*Enterococci*)に着目し、大淀川流域における細菌調査を実施するとともに、指標細菌としての腸球菌の有用性について検討した。

2. 実験方法

2.1 流域調査概要

宮崎県大淀川流域を調査対象とし(図1)、大淀川本流、支流河川およびその合流点下流について計9地点で採水した。試料は、ロープ付きバケツを用いて河川表層水を採水し、洗浄・滅菌済 1L ポリビンに採取した。採取した試料は冷蔵して実験室に持ち帰り、直ちに腸球菌をメンブランフィルター法(MF法)で計数した。調査期間は2005年7月から2006年7月とし、計4回の調査を実施した。

2.2 腸球菌採取

ヒトの腸球菌を単離するため、ペットの保有が禁じられている住宅団地のコミュニティープラント排水(プラント排水)を採取した。プラント排水は、レンサ球菌選択培地(Difco, KF Streptococcus 寒天培地:KF培地)に直接塗布し、ブタとウシのふん便は滅菌生理食塩水に懸濁させてKF培地に塗布した。このKF培地を37℃, 48時間培養し、赤色またはピンク色のコロニーをKF培地による腸球菌と判定した。それぞれの試料について、シングルコロニーを釣菌し、Todd Hewitt 培地(Difco, TH培地)に単離して、37℃, 48時間培養した。また、ブタとウシのふん便の腸球菌も調査した。

2.3 レンサ球菌検出試験による *Enterococcus* の判定

Enterococcus 属の同定には、ラテックス凝集法を原理とした連鎖球菌抗原キットのレンサ球菌検出用(BIO RAD)を用いた。測定操作法に従い、1.5mL チューブに、抽出材を10mL 加え溶解させた抽出液300μL 採取し、TH培地のコロニーを数個釣菌して、抽出液に懸濁させた後、15分間酵素抽出反応させた。続いて、反応プレート上で、A, B, C, D, FおよびGまでの各ラテックス試薬と被検菌株の抽出液を1滴ずつ滴下し、攪拌棒を用いて混和させ、1分以内における凝集の有無から陽性・陰性を判定した。D試薬に陽性を示した *Enterococcus* 属、すなわちD群には *E. faecalis* と *E. faecium* および *E. durans* が含まれる。

2.4 EF 寒天培地による *E. faecalis* と *E. faecium* 鑑別試験

鑑別試験の培地には、腸球菌用EF寒天基礎培地(ニッスイ, EF培地)を用いた。TH培地からEF培地に分離させ、37℃, 48時間で培養後、培地上の集落の色で *E. faecalis* と *E. faecium* を鑑別した。

2.5 性状試験(api 20 Strep)による菌種の同定

性状試験には、培養同定・一般細菌キットのapi 20 Strep(BIOMERIEUX)を用いた。測定操作法に従い、37℃, 24時間好気条件下で培養した。24時間培養した後、判定表に従って判定した。

2.6 ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による菌種の同定

ヒト由来株の *Enterococcus* 株を対象として、PCR法による *E. faecalis* と *E. faecium* の2つの菌種に分離した。すなわち、D群陽性判定の各菌株をTH培地に植種し、37℃, 24時間で培養して各菌株を増殖させ、続いて、Insta Gene Matrix液を用いてDNA抽出を行った。次に、16S rDNA領域を特異的に増幅するプライマーを用いてPCR法による菌種の同定を行った。

3. 実験結果

3.1 大淀川流域の腸球菌数

調査期間における大淀川流域の各地点の腸球菌数を図2に示す。上流点のSt.1は $2 \times 10^0 \sim 1.5 \times 10^2$ と低い菌数で変動している。2005年10月13日は、全体的に高くなっているが、台風14号の襲来を受けて、1ヵ月後の調査であり、洪水等によるふん便性細菌の流出が示唆された。しかしながら、支流のSt.3では、極めて高い腸球菌数を示し、他の地点よりも常にオーダー高い。St.3点の上流にはふん便汚染源が存在する可能性が高いと推察される。また、下流のSt.9点では腸球菌数は減少し、 $6.5 \times 10^0 \sim 8.7 \times 10^1$ の範囲で変動した。合流した水量によって腸球菌数の高い河川水が希釈されたと考えられる。

キーワード: *Enterococcus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, 同定

連絡先: 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1 宮崎大学 Tel 0985-58-7339

3.2 EF 培地による菌種の同定

KF 培地でコロニーを形成した全菌株において、90%がD群として判定された。EF 培地で鑑別した結果、*E. faecalis* が11株、*E. faecium* が12株検出された。

3.4 性状試験によるプラント排水中の腸球菌の同定

D群で判定された菌株のうち18株を性状試験に用いた。図3にはヒト由来菌株に対する性状試験で*E. faecalis* あるいは*E. faecium* と同定された菌株の割合を示す。*E. faecium* が13株(72%)と最も多く分離され、*E. faecalis* が2株(11%)となった。

3.5 PCR によるプラント排水中の腸球菌の同定

図4には、ヒト由来の菌株において、D群と判定された全菌株(28株)についてPCR法によって*E. faecalis* あるいは*E. faecium* と同定された菌株の割合を示す。*E. faecium* が17株(62%)と最も多く分離され、*E. faecalis* が4株(13%)となった。残りの7株(25%)は*E. faecalis* と*E. faecium* 以外の *Enterococcus* 属である *E. durans* などの可能性が考えられる。api 20 Strep を用いた性状試験とPCR法による*E. faecalis* と*E. faecium* の同定結果はほぼ一致した。一方、EF 培地による鑑別は他の2つの結果と大きく異なる結果を示した。

性状試験とPCR法で同定された菌株について、同種間の遺伝子型別解析が可能であるパルスフィールド電気泳動法を適用することによって、汚染源の腸球菌が特長づけられると考えられる。

4. まとめ

(1) 大淀川流域では、小さな支流河川において極端に高い腸球菌数が検出されたが、本流の大水量の河川水によって希釈され、本流の腸球菌数は $9.5 \times 10^0 \sim 1.7 \times 10^2$ に維持されていると考えられる。

(2) コミュニティープラント排水の細菌において、D群と判定された全菌株75%が*E. faecalis* あるいは*E. faecium* のいずれかであることが性状試験とPCR法によって確認された。

(3) 性状試験とPCR法による菌種の同定の結果はほぼ一致した。全菌株の13%は*E. faecalis*、62%は*E. faecium*であった。排水中の腸球菌は*E. faecium* が大部分を占めること示唆された。

本研究は、「農林畜産廃棄物利用による地域資源循環システムの構築(代表: 宮崎大学 杉本安寛)」の援助によって行われた。

参考文献

- 1) Dongyou L., et al: PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*, Research in Microbiology, 156(2005) 944-948
- 2) Shuqiu C., et al: A PCR Assay for Identification of *Enterococcus faecium*, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 1997, p.1248-1250

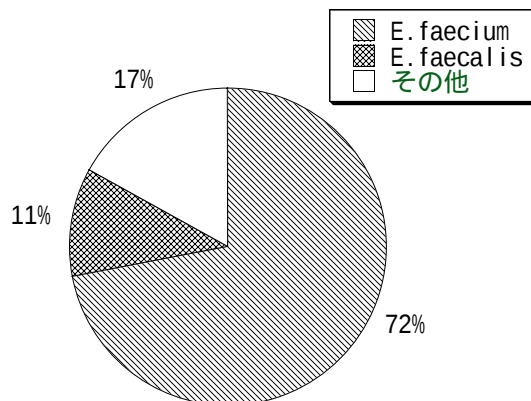


図3 api 20 Strep による *E. faecalis* と *E. faecium* の菌株の割合

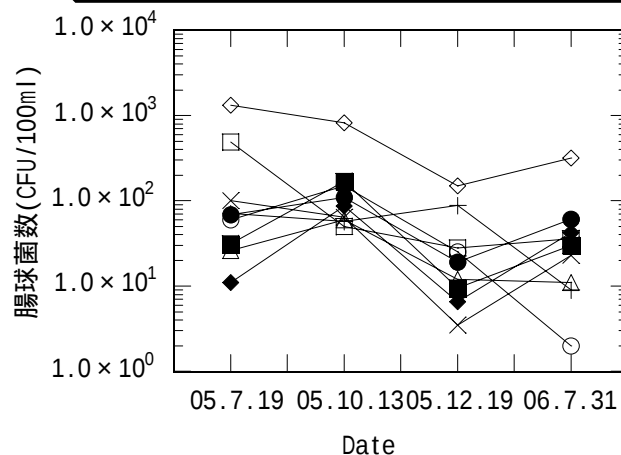
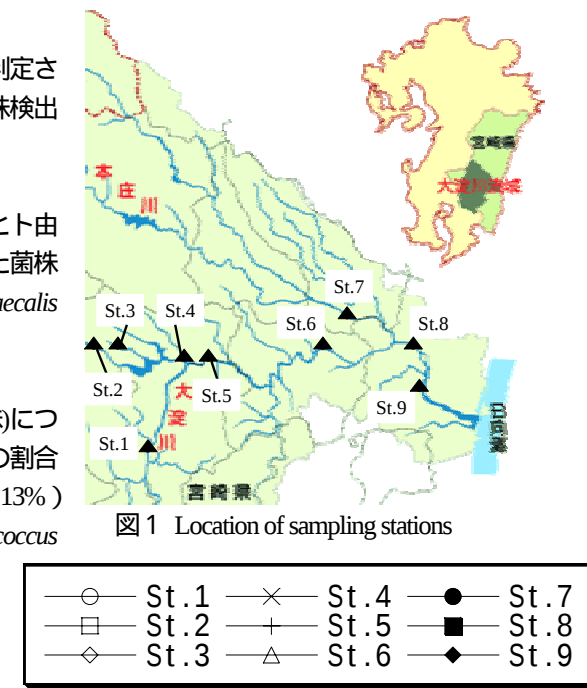


図2 大淀川各地点の腸球菌数

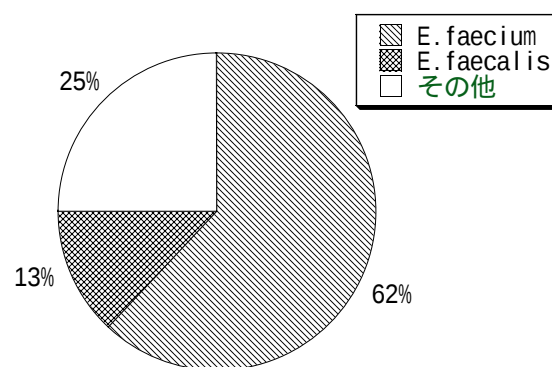


図4 PCR 法による *E. faecalis* と *E. faecium* の菌株の割合