

PFGE 法を用いた沿岸域レクリエーション用水域のふん便汚染源追跡

宮崎大学大学院農学工学総合研究科	学生員	○古川 隼士
宮崎大学農学部	非会員	吉田 照豊
宮崎大学工学部	正会員	鈴木 祥広

1. はじめに

沿岸域には、河川を通じて人間の生活や農業・畜産業、その他の産業活動など、陸域においてさまざまな過程で使用された水が処理され、その一部は未処理のままで流入する。その結果として、汚濁物質、有害物質、あるいは病原性微生物も沿岸域に流入する可能性がある。一方において、沿岸域の一部は、海水浴場やヨットハーバーなどのレクリエーション用水域として重要な役割を果たしているため、人間が直接的あるいは間接的に汚染物質や病原性微生物に暴露される可能性も否定できない。実際に、近年ではレクリエーション用水域の表層水における高濃度の大腸菌や腸球菌が、遊泳者の胃腸管系疾病の増加に強く関与していることが報告されている¹⁾。このような背景から、沿岸域レクリエーション用水域の公衆衛生や細菌学的安全性を確保するために、遺伝子学的手法や生化学的手法といった種々の手法を用いたふん便性細菌の汚染源追跡に関する研究が積極的に行われている²⁾。先端的な分子生物学的解析手法であるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法は、同一菌種間の遺伝子構造の比較が可能であり、院内感染における感染経路の追跡標準法として確立されつつある手法である。これまでの研究で著者らは、PFGE 法によって腸球菌の遺伝子型による識別・分類に成功しており、汚染源追跡のツールとして利用できる可能性を示唆している³⁾。本研究では、宮崎市内の青島海水浴場をモデルエリアとして設定し、海水浴場と汚染源となりうる五つの河川から、それぞれふん便指標細菌である腸球菌を単離し、PFGE 法による遺伝子型解析、および系統樹解析によって、ふん便汚染の汚染源となる河川の特定について試みた。

2. 実験材料および方法

2. 1 腸球菌の計数および回収方法

水試料は 2009 年 6 月 25 日に青島海水浴場と、汚染源の可能性のある河川として、大淀川、清武川、加江田川、知福川、ならびに突浪川から採取した。採取した水試料はポリエチレン容器に保存し、実験室に持ち帰ったあと直ちに実験に用いた。ふん便指標細菌である腸球菌の計数はメンブランフィルター法によって行った。水試料をメンブランフィルター（Advantec, 孔径 0.45μm）を用いてろ過し、フィルターを腸球菌選択培地である mEI 培地にのせ、41±0.5°C で 24 時間培養した。培養後、フィルター上の青色のコロニーを腸球菌として計数した。計数後、mEI 培地上の腸球菌のコロニーは、栄養培地である Todd Hewitt 培地（Difco, 寒天 1.5%）に釣菌し、37±1.0°C, 48 時間培養したものを腸球菌株として回収した。腸球菌株は、青島海水浴場から 190 株、大淀川、清武川、加江田川、知福川、ならびに突浪川からそれぞれ 70 株を単離・回収し、以降の腸球菌種同定試験に用いた。

2. 2 腸球菌種の同定

PFGE 法による同一菌種間の遺伝子型特性を比較するためには、ふん便指標細菌となる菌種を正確に同定する必要がある。本研究では腸球菌の中でも、人畜の腸管内に多く存在しているとされる *Enterococcus faecium* と *E. faecalis* をふん便指標細菌とした。両菌種の同定は PCR 法と生化学性状試験を併用して実施した。はじめに、すべての腸球菌株を PCR 法によって同定した。PCR 法によって *E. faecium* あるいは *E. faecalis* として同定された菌株は、次いで生化学性状試験、グラム陽性球菌同定キット Api 20 Strep（bioMérieux）によって菌種を確認した。実験方法および手順はキットの使用説明書に従った。PCR 法と生化学性状試験のいずれの試験においても、同一菌種として同定された菌株のみを回収し、PFGE 法による遺伝子型解析を行った。

2. 3 PFGE 法

PFGE 法による解析は、ジーンパスグループ 1 試薬キット（Bio Rad）を用いて付属のマニュアルに従い、一部改変して行った。各菌株の DNA プラグは、制限酵素 *Sma* I で消化後、CHEF DR® II（Bio Rad）で電気泳動を行った。電気泳動は、電圧 6V/cm、電場角度 120 度、スイッチタイム 5.3~34.9 秒、および泳動時間 20 時間の条件で行った。泳動後の DNA 断片は画像として取り込み、Gene Profiler（Scanalytics）を用いて解析し、系統樹を作成した。

3. 結果と考察

3. 1 指標細菌種の選定

表 1 に PCR 法と生化学性状試験のいずれの試験においても、同一菌種として同定された *E. faecium* と *E. faecalis* の菌株数を示す。青島海水浴場から単離した腸球菌株 190 株のうち、*E. faecium* と *E. faecalis* は、それぞれ 40 株と 0 株同定された。大淀川、清武川、加江田川、知福川、および突浪川において、それぞれから単離した腸球菌株 70 株のうち、

表1 腸球菌の計数と腸球菌種の同定結果

採取地点	腸球菌の計数	腸球菌種の同定		
	腸球菌数	単離株数	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
	(CFU/100mL)	(株)	(株)	(株)
青島海水浴場	435	190	40	0
大淀川	123	70	19	8
清武川	37	70	13	13
加江田川	29	70	8	8
知福川	16	70	6	0
突浪川	162	70	38	5

キーワード：ふん便汚染源追跡、沿岸域レクリエーション用水域、PFGE 法、腸球菌、系統樹解析

連絡先：〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1, TEL. 0985-58-7339, FAX. 0985-58-7344

E. faecium と *E. faecalis* は、それぞれ 19 株と 8 株、13 株と 13 株、8 株と 8 株、6 株と 0 株、および 38 株と 5 株同定された。清武川と加江田川において *E. faecium* と *E. faecalis* が同数であったものの、その他の水試料からは *E. faecium* の方が多く同定された。特に、青島海水浴場において、*E. faecium* が 40 株同定されたのに対して、*E. faecalis* は 0 株であった。したがって、沿岸域におけるふん便汚染の指標細菌種としては、*E. faecium* の方が適当であると判断し、各地点から単離・回収した *E. faecium* 株（青島海水浴場、40 株；大淀川、19 株；清武川、13 株；加江田川、8 株；知福川、6 株；突浪川、38 株）を用いて PFGE 法による遺伝子型の解析を行った。

3. 2 PFGE 法による遺伝子型解析

PFGE 法による遺伝子型の解析によって、青島海水浴場、大淀川、清武川、加江田川、知福川、および突浪川の *E. faecium* 株は、それぞれ 30 (40 株)、19 (19 株)、11 (13 株)、8 (8 株)、6 (6 株)、および 12 (38 株) のバンドパターンを示した。これらのバンドパターンを用いて系統樹を作成した（図 1）。系統樹において、極めて関連性が高い類似性 0.9 で解析すると、大淀川の遺伝子型 O-3、O-2、および O-13 が、それぞれ青島海水浴場の遺伝子型 A-1、A-28、および A-13 と同じクラスターに分類された。清武川の遺伝子型では、Ki-9 が A-1 と 0.9 以上の類似性を示した。突浪の遺伝子型 Tsu-1 も同様に青島海水浴場の A-1 と 0.9 以上の類似性を示した。しかしながら、突浪の主要な遺伝子型であった Tsu-1 (12 株) と Tsu-2 (13 株) は、いずれも青島の遺伝子型とは関連性が低かった。加江田川と知福川の遺伝子型はいずれも、青島海水浴場の遺伝子型とは高い類似性を示さなかった。以上の結果から考察すると、大淀川を起源とするふん便性細菌が、青島海水浴場へ流入している可能性が高いことが推察される。また、清武川と突浪川から単離した *E. faecium* 株も青島海水浴場の *E. faecium* 株と高い類似性を示すものがあつたため、これらの二河川も汚染源としての可能性があることが示唆された。青島海水浴場の遺伝子型との類似性が低かった加江田川と知福川は、両河川の腸球菌数を考慮しても（表 1）、青島海水浴場のふん便汚染の汚染源としての可能性は低いと考えられる。

以上のことから、PFGE 法を水環境に適用させることによって、沿岸域レクリエーション用水域におけるふん便汚染の汚染源となりうる河川を推定できることが確認された。今後は、汚染源として推定できた河川について、その下流から上流における数地点から *E. faecium* 株を回収し、同様に PFGE 法による遺伝子型の解析をすることで、より詳細に汚染源を特定あるいは推定できるかについて検討することを予定している。

4. まとめ

(1) PCR 法と生化学性状試験による菌種同定によって、沿岸域レクリエーション用水域におけるふん便指標細菌は *E. faecium* が適していることがわかった。

(2) PFGE 法による遺伝子型の解析、および系統樹解析によって、青島海水浴場には大淀川を起源としたふん便性細菌が流入していることが示唆された。

(3) PFGE 法はふん便汚染源追跡のツールとして利用できる。

参考文献

- 1) Cabelli, V. J., Dufour, A. P., McCabe, L. J. and Levin, M. A. (1982) Swimming-associated gastroenteritis and water quality, *Am. J. Epidemiol.*, **115**, 606-616.
- 2) Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R. and Mazumder, A. (2004) Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods *J. Environ. Manage.*, **73**, 71-79.
- 3) 古川隼士, 吉田照豊, 高橋寛敬, 鈴木祥広 (2009) 発生源の異なるふん便汚染水試料から単離した腸球菌のパルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析: 汚染源追跡手法のツール, 日本水環境学会シンポジウム講演集, 279-284.

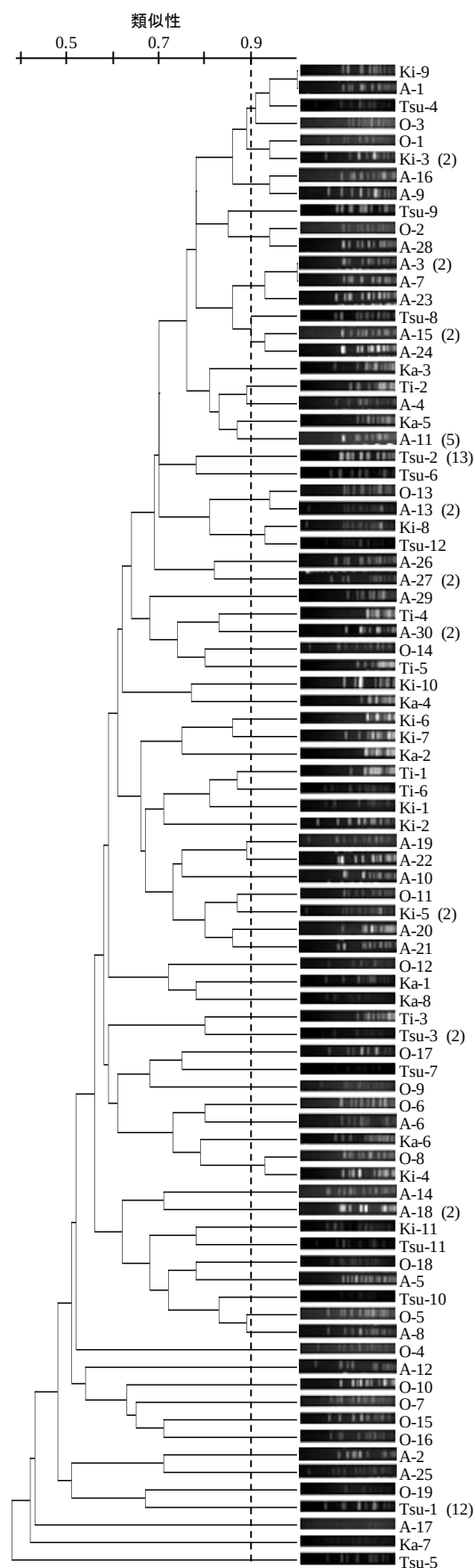


図1 *E. faecium* の遺伝子型の系統樹
A, 青島海水浴場；O, 大淀川；Ki, 清武川；
Ka, 加江田川；Ti, 知福川；Tsu, 突浪川（菌
株数, ないものはすべて 1 株）