

バクテロイデスを指標とした甲府盆地河川水中の糞便汚染源解析

山梨大学	学生会員	○古川琴美
山梨大学（現・山梨県庁）	非会員	長田瑠衣
山梨大学大学院	非会員	Bikash Malla
山梨大学大学院	正会員	原本英司
山梨大学大学院	正会員	坂本康

1. はじめに

現在、河川の糞便汚染の指標として大腸菌群が用いられているが、環境基準類型が AA や A の河川においても大腸菌群が頻繁に検出されている。そのため、糞便汚染の指標を大腸菌に変更することが検討されているが、明確な糞便汚染源が存在しないと河川源流域から大腸菌が検出されることがある。さらに、大腸菌群や大腸菌を測定するのみでは、糞便汚染源の特定やその汚染源からの影響を評価することができない。ヒトをはじめとした動物の腸内にはビフィズス菌やバクテロイデスが多く存在している。糞便中の細菌組成は腸内細菌と同様であるとされているため^{1) 2)}、糞便中にもバクテロイデスは多く存在しており、糞便汚染源解析を行う際の指標に適していると考えられている。また、バクテロイデスには宿主特異性があるとされているため、河川などの環境水中における糞便汚染源を、ヒトやブタ、反芻動物、トリなどの宿主別に解析することが可能になる。本研究では、バクテロイデス遺伝子マーカーを用いた糞便汚染源解析を行った。しかし、バクテロイデス遺伝子マーカーはヒトやブタ、反芻動物などの生物ごとに適するプライマー及びプローブが異なるとされている。これは遺伝的要因や食習慣、地形的条件などの要因によるものであるとされる^{3) 4) 5)}。そのため、バクテロイデスの測定に用いられている複数の定量 PCR 系の中で、地域によって適切なものを選別することが必要である。

本研究では、糞便汚染源解析におけるバクテロイデス遺伝子マーカーの有効性を検討することを目的として、甲府盆地におけるヒト、ウシ及びブタの糞便汚染源試料をもとに最適なマーカーの検討を行った。後に甲府盆地の河川水試料を採取し、河川水への適用を試みた。

2. 研究方法

1) 試料の採取

糞便汚染源試料として、下水流入水 9 試料、下水処理水（塩素消毒前の 2 次処理水）11 試料、合併浄化槽排水 3 試料、ウシ糞便 17 試料、ブタ糞便 1 試料、豚舎排水 2 試料、ブタ飼育施設の近隣河川水 17 試料を採取した。また、山梨県公共用水域水質測定地点から選抜した 20 地点において河川水を 2 回採取した（計 40 試料）。

キーワード バクテロイデス, 糞便汚染源解析, 河川水

連絡先 〒400-8511 山梨県甲府市武田 4-3-11 B-3 号館 B3-311 号室 TEL : 055-220-8725

E-mail: eharamoto@yamanashi.ac.jp

2) 水試料中におけるバクテロイデスの濃縮方法

河川水 500mL、下水流入水 10mL、下水処理水及び合併浄化槽排水 100mL 各々混合セルロース膜（孔径 $0.22\mu\text{m}$ 、直径 47mm、Merck Millipore Ltd を用いてろ過した。その後、膜を回収し、フットボール型攪拌子と PET 溶液（ $0.2\text{g/L Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.3\text{g/L C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 0.1mL/L Tween80 、 $\text{pH } 7.4$ ）10mL を入れた 50mL 遠沈管に添加し、数 mm 四方以下になるまで破碎した。スポイトを用いて溶液の全量を回収し、新しい遠沈管へ移した。元の遠沈管に PET 溶液 5mL を加え、同様の操作を繰り返し、全量 15mL を回収した。10 分間遠心（ 4°C 、 $2000\times g$ ）した後、上清を除去し、遠心した遠沈管に PBS（－） $200\mu\text{L}$ を加え、同様の作業を繰り返して全量 1mL になるまで回収し、濃縮液とした。

3) 糞便試料におけるバクテロイデスの濃縮方法

糞便試料を十分に混和した後、新しい 50mL 遠沈管に約 0.3g 取り出した。その 50mL 遠沈管に PBS（－）を糞便試料に対し 1%となるように加え、溶液が均一になるまで約 5 分間攪拌した。2mL チューブに攪拌した溶液を 1mL 加え、 4°C 、 $2000\times g$ の条件下で 10 分遠心し、細菌を沈渣に分離した。上清を除去した後、チューブに PBS（－）を全量 1mL となるように加えた。

4) リアルタイム PCR によるバクテロイデスの検出方法

QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて濃縮液 $200\mu\text{L}$ から細菌 DNA を $200\mu\text{L}$ 抽出し、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR は Thermal Cycler Dice® Real Time System TP800 を用い TaqMan(MGB) プローブまたは SYBR Green による蛍光強度の増加量を測定した。TaqMan (MGB) プローブについては *gyrB* (Lee et al 2010⁶⁾) と BacHum (Kildare et al 2007⁴⁾)、HF183 (Haugland et al 2010³⁾)、BacR (Reischer et al 2006⁷⁾)、BacCow (Kildare et al 2007⁴⁾) を使用した。SYBR Green については Pig2Bac (Dick et al 2005⁸⁾) を使用した。初めに糞便試料をリアルタイム PCR にかき、適切なプライマー及びプローブを決定した。プライマー及びプローブの決定は感度（陽性考えられる試料を陽性であると判断した割合）、特異度（陰性であると考えられる試料を検出しなかった割合）、正確度（感度において正確に検出した試料数と、特異度において正確に検出しなかった試料数の合計を、全試料で割った数値）から最適なものを選択した。その後、決定したプライマー及びプローブを用いて河川水試料のリアルタイム PCR を行った。

3. 結果及び考察

1) リアルタイム PCR の検出結果及び最適なバクテロイデス遺伝子マーカーの検討

表 1 に各汚染源試料におけるバクテロイデス遺伝子マーカーの陽性率を示す。ヒト糞便汚染源試料である下水流入水、下水処理水、及び合併浄化槽排水の平均陽性率を求めると、*gyrB* や BacHum、HF183 の全てのマーカーが 96%以上であった。反芻動物糞便汚染源試料であるウシ糞便では、BacR、BacCow のいずれもが 90%以上を示した。ブタ糞便汚染源試料であるブタ飼育施設の河川水は上流を高橋、下流を万年橋で採取したものを使用した。PF163-SYBR について、下流でブタによる汚染が大きいはずであるにもかかわらず上流と大きな差は見られなかった。

表 2 に示すように、ヒトを対象としたバクテロイデス遺伝子マーカーについては感度 100%、特異度 0%、正確度 57%であった HF183 は不適であると判断した。BacHum は、感度 100%、正確度 89%であり *gyrB* よりも高い値であったため BacHum が適切であると判断した。反芻動物を対象としたバクテロイデス遺伝子マーカーについては特異度 40%であった BacCow に対し、特異度 100%、であった BacR の方が適切であると判断した。また、ブタについては感度 35%、特異度 54%および正確度 44%であった PF163-SYBR に対し、感度 100%、特異度 66%、正確度 77%であった Pig2Bac の方が適切であると判断した。以上のことから、本研究においては、ヒトを対象とするバクテロイデス遺伝子マーカーとして BacHum、反芻動物を対象と

したバクテロイデス遺伝子マーカーとして **BacR**、ブタを対象としたバクテロイデス遺伝子マーカーとして **Pig2Bac** が有効であると判断し、今後これらのバクテロイデス遺伝子マーカーを用いて河川試料への適用を行い、バクテロイデスの有効性について検討する。

表 1 バクテロイデス遺伝子マーカーを用いた糞便汚染源試料ごとの陽性率 (%)

糞便汚染源試料	陽性であった試料/全試料 (%)						
	ヒト			反芻動物		ブタ	
	<i>gyrB</i>	BacHum	HF183- TaqMan	BacR	BacCow	Pig2Bac	PF163- SYBR
下水流入水	9/9 (100)	9/9 (100)	9/9 (100)	3/9 (33)	9/9 (100)	0/9 (0)	9/9 (100)
下水処理水	8/9 (89)	9/9 (100)	9/9 (100)	0/9 (0)	1/9 (11)	1/9 (11)	6/9 (67)
合併浄化槽排水	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	2/2 (100)
ウシ糞便	4/15 (27)	4/15 (27)	15/15 (100)	14/15 (93)	15/15 (100)	12/15 (80)	15/15 (100)
河川水 (ブタ飼 育施設上流)	8/9 (89)	9/9 (100)	9/9 (100)	3/9 (33)	7/9 (78)	3/9 (33)	6/9 (67)
河川水 (ブタ飼 育施設下流)	17/17 (100)	17/17 (100)	17/17 (100)	11/17 (65)	17/17 (100)	17/17 (100)	14/17 (82)

表 2 各マーカーの感度、特異度及び正確度

	正しく検出できた試料/全試料 (%)						
	ヒト			反芻動物		ブタ	
	<i>gyrB</i>	BacHum	HF183- TaqMan	BacR	BacCow	Pig2Bac	PF163- SYBR
感度	95 (19/20)	100 (20/20)	100 (20/20)	93 (14/15)	100 (15/15)	100 (17/17)	82 (14/17)
特異度	73 (11/15)	73 (11/15)	0 (0/15)	85 (17/20)	40 (8/20)	63 (23/35)	9 (9/35)
正確度	86 (30/35)	89 (31/35)	57 (20/35)	89 (31/35)	66 (23/35)	75 (39/52)	33 (17/52)

2) 各流域とその合流地点における大腸菌濃度

表 3 に富士川と笛吹川、またその合流地点すぐ下流の富士橋における、大腸菌濃度の平均と最大・最小値を示した。濃度は最確数表によって算出し、単位は MPN (Most probable number) /100mL とした。富士川と笛吹川を比較すると、いずれも笛吹川の大腸菌濃度が高くなっていることが分かる。また、10-11 月は 12 月に比べ、大腸菌濃度が高くなっている。これは、台風による降雨の影響が大きいと考えられる。

表 3 各水域における大腸菌濃度の平均と最大・最小値

流域・地点名	地点数	大腸菌濃度(MPN/100mL)			
		2017 年 10-11 月		2017 年 12 月	
		幾何学平均	最大・最小値	幾何学平均	最大・最小値
富士川	7	118.6	3.0~1986.3	78.7	31.0~686.7
笛吹川	12	256.4	35.9~2419.6	92.7	7.4~686.7
富士橋	1	43.7	43.7	686.7	686.7

参考文献

- 1) 平山和宏 2014 腸内細菌叢の基礎 モダンメディア 60 巻 10 号 p307-311
- 2) 理化学研究所ニュース No.64 July 1980
- 3) Performance of PCR-Based Assays Targeting Bacteroidales Genetic Markers of Human Fecal Pollution in Sewage and Fecal Samples
ORIN C. SHANKS , KAREN WHITE , CATHERINE A. KELTY , MANO SIVAGANESAN , JANET BLANNON , MARK MECKES , MANJU VARMA , AND RICHARD A. HAUGLAND Environ. Sci. Technol. 2010, 44, 6281-628
- 4) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human, cow, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach
Beverly J. Kildare , Christian M. Leutenegger , Belinda S McSwain , Dustin G. Bambic , Veronica B. Rajal , Stefan Wuertz
WATER RESEARCH 41 (2007) 3701-3715
- 5) Evaluation of Swine-Specific PCR Assays Used for Fecal Source Tracking and Analysis of Molecular Diversity of Swine-Specific “Bacteroidales” Populations
Regina Lamendella , Jorge W. Santo Domingo , Anthony C. Yannarell , Shreya Ghosh , George Di Giovanni , Roderick I. Mackie , and Daniel B. Oerther
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. p. 5787-5796
- 6) Evaluation of new gyrB-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination
Chang Soo Lee , Jiyoung Lee
Journal of Microbiological Methods 82 (2010) 311-318
- 7) Quantitative PCR Method for Sensitive Detection of Ruminant Fecal Pollution in Freshwater and Evaluation of This Method in Alpine Karstic Regions
Georg H. Reischer , David C. Kasper , Ralf Steinborn , Robert L. Mach , and Andreas H. Farnleitner
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 2006. p. 5610-5614
- 8) Quantification of *Escherichia coli* by kinetic 5'-nuclease polymerase chain reaction (real-time PCR) oriented to *sfmD* gene
E. Kaclikova , D. Pangallo , K. Oravcova , H. Drahovska , T. Kuchta
Letters in Applied Microbiology. Aug. 2005. p132-135