

水系のふん便性汚染指標細菌である腸球菌の検出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) 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沿岸都市を構築するためには、水環境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、細菌の分子生物学的解析法は、細菌の検出・同定に極めて有効な手法の1つである。そこで、人畜のふん便性汚染指標細菌である腸球菌(*Enterococcus*)に着目し、ヒト、ウシおよびブタの3種類の異なるふん便を対象として、腸球菌の検出法および菌種の同定法に関する基礎的研究を行った。

2. 実験方法

2.1 試料採取

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を採取した。ブタのふん便は養豚場のふん便回収・廃棄物、ウシについては学内で飼育されているウシのふん便(10 サンプルのコンポジット)を採取した。コミュニティープラント排水は、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°C, 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°C, 48時間培養した。

2.2 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300 µL 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。

2.3 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°C, 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。*E. faecalis* の特異プライマーとして (pEf*faecalis*-F:5'-GCCACTATTTCTCGGACAGC-3', pEf*faecalis*-R:5'-GTCGTCCCTTTGGCAAATAA-3')¹⁾を用い、*E. faecium* の特異プライマーには (pEf*faecium*-F:5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG, pEf*faecium*-R:5'-TATGACAGCGACTCCGATTCC)²⁾を用いた。増幅プログラムの条件は次のとおりである。前熱変性、94°C, 2分; 熱変性、94°C, 20秒, アニール、62°C, 20秒, 伸張反応、72°C, 45秒を30サイクル; 最終伸張反応を72°C, 2分を行った。電気泳動は1%アガロースゲルで行い、それぞれの菌種特異のPCR産物の増幅を確認して同定した。PCR法において *E. faecalis* と同定した泳動バンドを図1に示す。*E. faecalis* のプライマーのみで特異の遺伝子が増幅される。図2は *E. faecium* と同定した泳動バンドである。図1とは逆にPCR法において *E. faecium* と同定された泳動バンドを示す。*E. faecium* のプライマーのみで特異の遺伝子が増幅される。

キーワード: *Enterococcus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, 同定, プライマー

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

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

PCR 法による同定と従来の選択培地による鑑別法を比較した。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°C、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。

3. 実験結果

3.1 *Enterococcus* の存在割合

図3には、レンサ球菌用の選択培地である KF 培地で陽性コロニーを形成した菌株について、レンサ球菌検出試験で D 群判定された菌株、すなわち腸球菌の割合を示す。ヒト、ウシおよびブタのふん便においても 85%前後の高い割合で腸球菌が占めていた。特に、コミュニティプラント排水から単離したヒト由来のサンプルは、90%と最も高かった。KF 培地で形成される陽性コロニーのほとんどは D 群の腸球菌 *E. faecalis*, *E. faecium* あるいは *E. durans* であることがわかった。一般には、水環境の腸球菌の大部分が *E. faecalis* と *E. faecium* が占めると言われている。

3.2 PCR による菌種の同定

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)に対する PCR 法で *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 19 株 (68%) と最も多く分離され、*E. faecalis* が 4 株 (14%) となった。残りの 5 株 (18%) 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。

3.3 EF 培地による菌種の同定

PCR 法において *E. faecalis* と *E. faecium* と同定された計 23 株について、EF 培地で鑑別した結果、*E. faecalis* が 11 株検出され、*E. faecium* が 12 株検出された。PCR 法と EF 培地による結果を比較すると、PCR により検出された *E. faecium* 19 株中 9 株が、EF 培地では *E. faecalis* と鑑別された。また、PCR 法で検出された *E. faecalis* 4 株のうちの 1 株が EF 培地では *E. faecium* と鑑別された。

4. まとめ

- (1) KF 培地で形成される陽性コロニーのほとんどは D 群の腸球菌 *E. faecalis*, *E. faecium* および *E. durans* であることがわかった。
- (2) D 群と判定された全菌株の 80%は *E. faecalis* あるいは *E. faecium* のいずれかであることが PCR 法によって確認された。
- (3) PCR 法による菌種の同定と EF 培地による鑑別とは異なる結果が得られた。

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

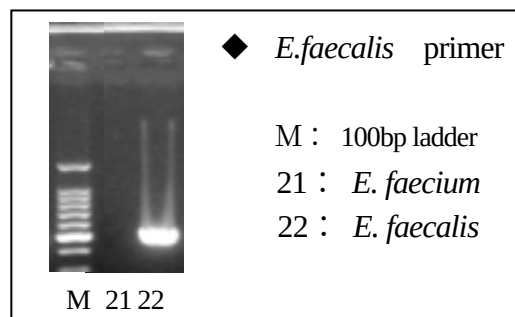


図1 PCR 法による *E. faecalis* の泳動バンド

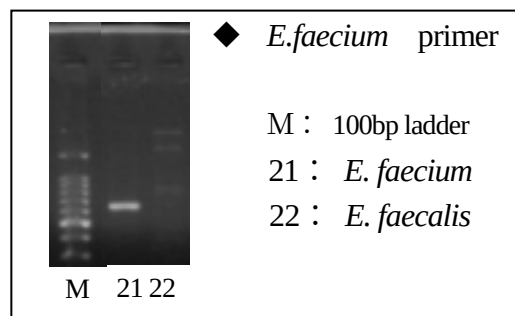


図2 PCR 法による *E. faecium* の泳動バンド

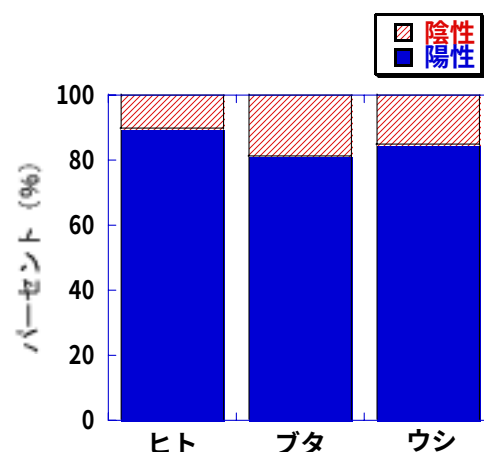


図3 各種のふん便の腸球菌の割合

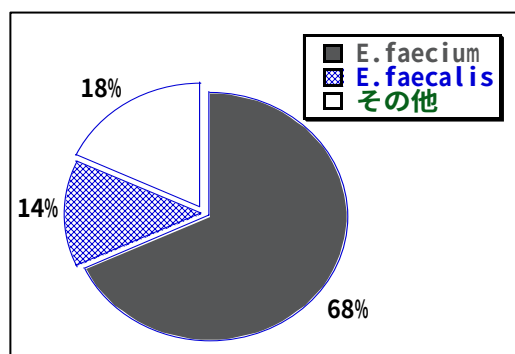


図4 PCR 法による *E. faecalis* と *E. faecium* の菌株の割合