

B-5 PFGE法を用いた大分県スパビーチにおける ふん便性細菌の汚染源となる河川の特定

○古川 隼士^{1*}・高見 徹²・吉田 照豊³・鈴木 祥広⁴

¹宮崎大学IR推進機構 (〒889-1692 宮崎市清武町木原5200番地)

²大分工業高等専門学校都市・環境工学科 (〒870-0152 大分市大字牧1666番地)

³宮崎大学農学部海洋生物環境学科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

⁴宮崎大学工学部土木環境工学科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

* E-mail: furukawa@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

近年、沿岸域において、水系感染症を引き起こす病原性微生物(ノロウイルス, クリプトスポリジウム, ジアルジア)による汚染が問題となっており¹⁾, これら病原性微生物の水環境中での検出事例, およびヒトへの感染・発症事例は年々増加している。このような背景から、沿岸レクリエーション用水域等を含めた水環境において、病原性微生物の存否, および潜在的リスクの指標となるふん便指標細菌(ふん便性大腸菌群, 大腸菌, 腸球菌)の検出方法, および汚染状況の把握に関する研究が積極的に行われ, 知見・情報が集積している。さらに, 遺伝子工学的手法や生化学的手法を用いて, 沿岸域におけるふん便性細菌の汚染源追跡手法の開発に関する研究も推進されており, その成果も報告されてきている²⁾。しかしながら, ふん便性微生物の汚染源追跡の標準法として確立された手法はないのが現状である。

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法は, 従来, 院内感染の感染経路・感染源の追跡や食中毒原因物質の特定に利用されており, 現時点の分子疫学的解析において, 最も信頼される手法である。また, ふん便性微生物の追跡手法として研究されているPCR法をベースとした手法等と比較して, PFGE法は感度, 識別能力, および再現性ははるかに高い。著者らは, PFGE法を沿岸レクリエーション用水域におけるふん便性細菌の汚染源追跡手法として適用させる試みを行っており, その有効性を示唆している^{2,3)}。

本研究では, 大分県別府市のスパビーチを沿岸レクリエーション用水域のモデルエリアとして設定し, スパビーチと汚染源候補として選定した4河川から, ふん便指標細菌である腸球菌を単離・同定し, PFGE法による一連の遺伝子型解析によって, 汚染源となる河川の特定について試みた。

2. 材料および方法

(1) 調査地点

調査は, 大分県別府市の的ヶ浜公園の敷地内にあるスパビーチ(北緯33度27分, 東経131度50分), およびふん便汚染の汚染源となる可能性のある三河川(春木川, 境川, 朝見川)とスパビーチに隣接する都市排水路を対象に実施した(図1)。汚染源候補河川である春木川, 境川, および朝見川における流域面積と流路延長は, それぞれ8.6 km²と6.3 km, 12.2 km²と6.9 km, および10.9 km²と5.0 kmである。2009年7月21日に各地点の表層水(水深約50 cm)を採取し, ポリエチレン容器に保存した。採取した試料は実験室に持ち帰ったあと, 直ちに実験に用いた。

(2) 腸球菌の計数および菌種同定方法

腸球菌の計数および回収はメンブランフィルター法によって実施した。100 mLあるいは10 mLの水試料をメンブランフィルター(Advantec, 孔径0.45 μm)を用いてろ過し, フィルターを

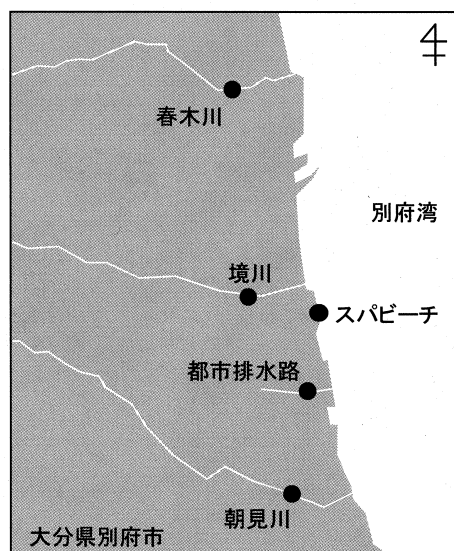


図1 スパビーチおよび汚染源候補河川

腸球菌選択培地であるmembrane-Enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside寒天培地(mEI培地)上に載せ、41±0.5℃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。水試料の腸球菌数は三連のものを平均し、100 mLあたりに換算した。腸球菌数の計数後、フィルター上の青色のコロニーをTodd Hewitt寒天培地(DIFCO, 寒天1.5%)に釣菌し、37±1.0℃で48時間培養したものを腸球菌株として回収し、腸球菌種の同定試験に用いた。

腸球菌種の同定はPCR法とApi 20 Strep (bioMerieux)を併用して実施した。本研究では、腸球菌の中でも特に人畜の腸管内に多く存在しているといわれている*Enterococcus faecium*と*Enterococcus faecalis*をふん便指標細菌として用いた。はじめに、すべての腸球菌株をPCR法によって同定し、*E. faecium*および*E. faecalis*として同定された菌株は、次いで、Api 20 Strepによって菌種を確認した。PCR法とApi 20 Strepの両試験において、同一菌種として同定された菌株のみを指標細菌として回収した。

各水試料から回収した腸球菌株のDNA抽出には、InstaGene Matrix(BIO RAD)を用いて、付属の使用説明書に従って実施した。抽出DNAをテンプレートとして、PCR法による同定試験を実施した。PCR反応溶液は、Takara Ex Taq®(Takara)を用いて、2.0 μLの10×Ex Taq Buffer, 1.6 μLのdNTP Mixture(最終濃度:各0.2 mM), 各2.0 μLのプライマー(1.0 μM), 0.2 μLのTakara Ex Taq(1.0 U), 8.0 μLのテンプレートDNA, および4.2 μLの滅菌蒸留水を加え、全量20 μLとした。*E. faecium*, および*E. faecalis*のプライマーは、それぞれEfm-fw(5'-GAAAAACAATAGAAGAATTAT-3')とEfm-rv(5'-TGCTTTTITGAATTCTTCTTTA-3')⁴⁾, およびEfs-fw(5'-GCCACTATTCTCGGACAGC-3')とEfs-rv(5'-GTCGTCCCTTTGGCAAATAA-3')⁹⁾を用いた。PCR反応は以下に示す条件で行った。95℃で4分間の変性処理後、95℃で30秒、アニーリングを54℃(*E. faecium*)あるいは62℃(*E. faecalis*)で1分間、および72℃で1分間を30サイクル行った。その後、最終伸長反応を72℃で5分間行った。PCR反応後、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色してPCR産物を確認した。

PCR法によって、*E. faecium*あるいは*E. faecalis*同定された菌株は、さらにApi 20 Strepによって菌種を確認した。Api 20 Strepは付属の使用説明書に従って実施した。

(3) PFGE法による遺伝子型解析

PFGE法による遺伝子型解析は、CHEFバクテリア用DNAプラグキット(BIO RAD)を用いて実施した。菌株のDNAプラグ

は、制限酵素SmaI(Takara)で処理した後、CHEF DR® II(BIO RAD)で電気泳動を行った。泳動条件は、電圧6.0 V/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時間とした。分子量マーカーはLambda DNA Ladders(48.5 kb-1.0 Mb, Takara)を用いた。泳動後のDNA断片はGene Profiler(Scanalytics)を用いて解析し系統樹を作成した。

3. 結果と考察

(1) 各地点の腸球菌数および菌種同定

表2に各試料採取地点の腸球菌数, および*E. faecium*と*E. faecalis*の菌種同定結果を示す。スパビーチの水試料における腸球菌数は、 $2.6 \times 10^2 \pm 10.8$ CFU/100 mL(mean±SD, n=3)であり高濃度で検出された。US EPAの沿岸域における腸球菌数の基準値は104 CFU/100 mLであり、スパビーチは基準値の2倍以上で検出された。各河川水試料についてみると、腸球菌数は春木川と朝見川において非常に高濃度で検出された。これに対して、境川と都市排水路の腸球菌数は他の2河川と比較して1オーダー程度低い濃度であり、腸球菌数は各河川によって大きく変動した。

腸球菌数の計数後、mEI培地上のコロニーを単離・培養してPCR法とApi 20 Strepによって、*E. faecium*と*E. faecalis*の同定試験を行った。スパビーチから単離した150株のうち、PCR法とApi 20 Strepの両方で同一菌種として同定された菌株は、*E. faecium*と*E. faecalis*でそれぞれ89株と11株であり、*E. faecium*の方が非常に多く存在した(表2)。各河川については、春木川において*E. faecalis*が高頻度で同定されたものの、境川、都市排水路、および朝見川においては、*E. faecium*と*E. faecalis*がほぼ同程度の割合で同定された。河川と海水を含む沿岸水では、*E. faecium*と*E. faecalis*の存在割合が変化したことから、両腸球菌種は水環境中における生残性が異なることが考えられる。両腸球菌種は、主に人畜のふん便に由来するとされており、朝見川を除く4地点(スパビーチ、春木川、境川、都市排水路)は、人畜を起源とするふん便性細菌による汚染の影響を強く受けていることがわかった。

(2) 遺伝子型解析

全5地点から回収した*E. faecium*および*E. faecalis*株について、それぞれPFGE法による遺伝子型解析を行った。スパビーチ、春木川、境川、都市排水路、および朝見川の*E. faecium*株は、それぞれ12種類(89株)、9種類(10株)、20種類(27株)、15種類(20株)、および7種類(9株)のPFGE型(遺伝子型)を示した。

表2 各地点における腸球菌数および腸球菌種の同定

地点	腸球菌数 (CFU/100 mL)	単離株数 (株)	腸球菌種の同定	
			<i>E. faecium</i> (株)	<i>E. faecalis</i> (株)
スパビーチ	$2.6 \times 10^2 \pm 10.8^*$	150	89	11
春木川	$5.2 \times 10^2 \pm 48.1$	100	10	63
境川	$9.3 \times 10^1 \pm 15.3$	100	27	28
都市排水路	$6.7 \times 10^1 \pm 45.1$	100	20	28
朝見川	$3.6 \times 10^2 \pm 75.1$	100	9	8

*平均値±SD

図2に全 *E. faecium* 株から得られたPFGE型の系統樹を示す。PFGE法における遺伝子型の系統樹解析において、類似性 (Similarity) が0.9以上を示した菌株同士は極めて関連性が高いと評価される。そこで、類似性レベルを0.9と設定して解析すると、境川のPFGE型であるSa-1型は、スパピーチの主要なPFGE型であるSp-3型(72株)と同じクラスターに分類された。また、都市排水路のPFGE型であるUd-9型およびUd-13型についても、スパピーチのPFGE型のSp-2型およびSp-12型と、それぞれ同じクラスターに分類された。他の汚染源候補である2河川について見てみると、いずれの河川から得られたPFGE型も、類似レベル0.9ではスパピーチのPFGE型と同じクラスターに分類されなかった。

以上の結果から、境川を起源とするふん便性細菌がスパピーチに流入していることが推察された。スパピーチに隣接する都市排水路についても、汚染源である可能性があると考えられる。また、各地点から回収した *E. faecalis* についても、同様にPFGE法による遺伝子型の解析を行ったところ、境川のPFGE型がスパピーチのPFGE型と類似性0.9以上を示した。各河川の腸球菌濃度についてみると、汚染源と推定された境川と都市排水路は、他の河川と比較しても低濃度であったことから、高濃度のふん便性細菌が検出された河川が必ずしもふん便汚染の汚染源とはならないことがわかった。PFGE法を用いて腸球菌の遺伝子型を比較することによって、高感度に汚染源となる河川を推定できることが示唆された。

4. まとめ

- (1) スパピーチの腸球菌は非常に高濃度 (2.6×10^2 CFU/100 mL) で検出され、各河川についても $10^2 \sim 10^3$ CFU/100 mLオーダーであり、高濃度であった。
- (2) 腸球菌種の同定試験において、スパピーチからは *E. faecium* が高頻度で同定された。河川については、*E. faecium* と *E. faecalis* の存在割合が変動した。
- (3) PFGE法による腸球菌種の遺伝子型解析において、境川と都市排水路のPFGE型がスパピーチのPFGE型と非常に高い関連性を示したことから、これら二河川を起源とするふん便性細菌が流入していることが推察された。
- (4) ふん便指標細菌の回収からPFGE法による遺伝子型解析の一連のアプローチ法によって沿岸レクリエーション用水域におけるふん便汚染の汚染源を推定できることが示唆された。

参考文献

- 1) Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., and Lukasik, J., Microbial source tracking: current methodology and future directions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5796-5803, 2002.
- 2) Furukawa, T., Yoshida, T., and Suzuki, Y., Application of PFGE to source tracking of fecal pollution in coastal recreation area: A case study in Aoshima Beach, Japan, *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 688-696, 2011.
- 3) Furukawa, T., Takahashi, H., Yoshida, T., and Suzuki, Y., Genotypic analysis of enterococci isolated from fecal-polluted water from different sources by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for application to microbial source tracking, *Microbes*

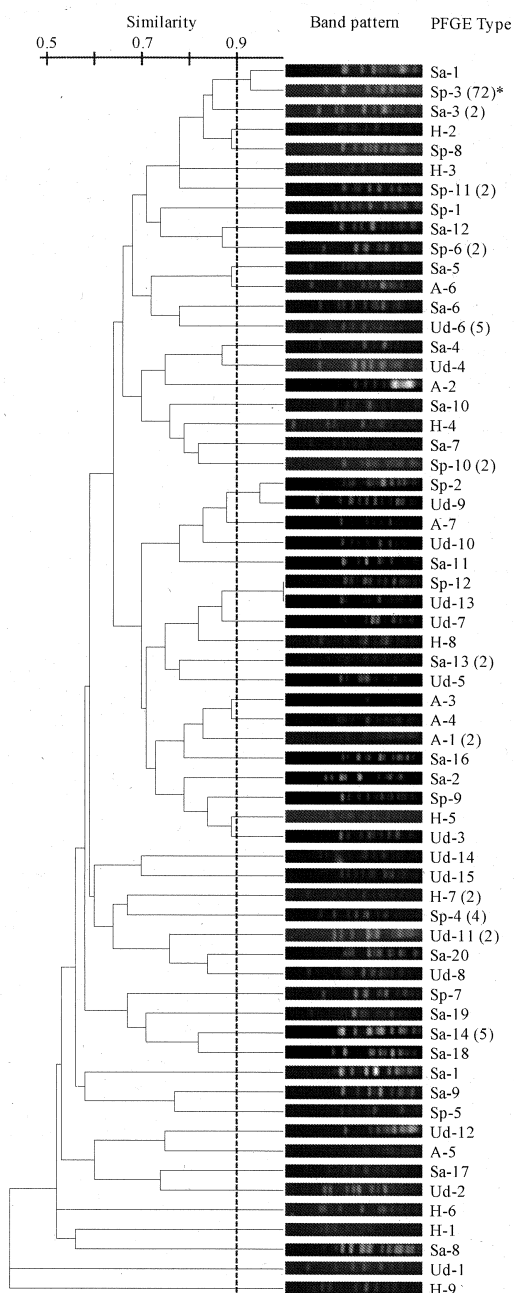


図2 全 *E. faecium* 株の PFGE 型の系統樹

* Sp: スパピーチ, H: 春木川, Sa: 境川, Ud: 都市排水路, A: 朝見川, 括弧内の数はその PFGE 型を示した菌株数, 数がないものは全て 1 株

Environ., **26**, 181-183, 2011.

- 4) Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., and Barrett, J. B., Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3558-3565, 2004.
- 5) Liu, D., Wang, C., Swiatlo, E. J., and Lawrence, M. L., PCR amplification of species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*, *Res. Microbiol.*, **156**, 944-984, 2005.