

## B-67 新しい糞便汚染指標の開発

小倉 優大<sup>1</sup>・矢口 淳一<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>八戸工業高等専門学校 専攻科 建設環境工学専攻 (〒039-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

<sup>2</sup>八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 (〒039-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

\* E-mail: yaguchi-z@hachinohe-ct.ac.jp

### 1. はじめに

水域に存在している病原生物は、種類が多く性状も異なり、その全ての分離と同定を行うことが困難であるために、より容易に試験可能な微生物が対象とする病原生物の代替指標として使用される。人畜の糞便汚染のある水域では病原生物の存在する可能性が高く、その指標として糞便中に多量に存在する大腸菌が広く用いられている。大腸菌群は、当時大腸菌のみを効率よく検出できる方法が存在しなかったために導入された代替指標であるが、大腸菌ではなく大腸菌群を指標としていることに起因する問題点として、近年糞便に由来しない大腸菌群の存在や下水や環境水中での増殖などが指摘されている<sup>1)</sup>。このため、指標として大腸菌群を用いると、糞便汚染がないかあるいは極めて少ないにも関わらず環境由来の大腸菌群が検出される結果、糞便汚染の過大評価につながる恐れがある。また従来の培養を基本とした方法では長時間の培養を必要とし、さらに人間と動物の糞便汚染を区別できないため、汚染原因の解明が難しい。そこで糞便汚染を厳密に特定するため、大腸菌、糞便性連鎖球菌をターゲットにリアルタイム PCR 法を適用して遺伝子レベルでターゲットのみを迅速かつ特異的に検出する方法を検討し、新しい糞便汚染指標の研究開発を行った。

### 2. 実験材料および方法

#### 2-1 実験材料

大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649<sup>T</sup>)、糞便性連鎖球菌 *Enterococcus faecalis* (NBRC100480<sup>T</sup>)、*E. faecium* (NBRC100485<sup>T</sup>)、*E. faecium* (NBRC100602)、*Enterobacter aerogenes* (JCM1235<sup>T</sup>) を理化学研究所系統保存施設および NITE バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門からそれぞれ購入して実験に使用した。

#### 2-2 実験方法

##### 2-2-1 DNA の抽出

ターゲット遺伝子の検出実験では InstaGene Matrix

(Bio-rad 社) を使用して DNA の抽出を行った。また大腸菌と糞便性連鎖球菌の定量実験では QIAamp DNA Stool 抽出キット (Qiagen 社) を使用した。抽出方法は各社のプロトコールに従った。水域および生活排水処理施設の調査では、採水したサンプルをポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 0.4 $\mu$ m、直径 47mm) を使用して 10~400 倍にろ過濃縮し、ガラスビーズを用いてミニビードピーダー (家田貿易 Model 3110BX、4800RPM、60sec) でろ紙を粉砕後、QIAamp DNA Stool 抽出キットを用いる方法で DNA を抽出した。

##### 2-2-2 リアルタイム PCR

大腸菌および糞便性連鎖球菌のリアルタイム PCR は MiniOpticon システム (Bio-rad 社) で行った。大腸菌については、大腸菌の選択的検出に使用される  $\beta$ -グルクロニダーゼ酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとして、IQ Supermix (Bio-rad 社) を使用し、Frahm & Obs<sup>2)</sup> が用いたプライマーおよびプローブを使用して、Reverse Primer のみ濃度を 300 (nM) に変更した。糞便性連鎖球菌については、SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-rad 社) を使用し、すべての *Enterococcus* 属に共通するリボソーム RNA の 23S-rRNA 遺伝子領域をターゲットとするプライマー<sup>2)</sup> を使用した。

##### 2-2-3 DNA 定量実験

大腸菌 *E. coli* (JCM1649<sup>T</sup>)、糞便性連鎖球菌 *E. faecalis* (NBRC100480<sup>T</sup>) を培養後、DNA を抽出し、抽出後の DNA 量は紫外線吸光度計 (日本分光製 V-630BIO 型) で測定した。測定した DNA 量から Whelan らの式<sup>3)</sup>に基づいて遺伝子コピー数を計算した。そしてリアルタイム PCR によって DNA 増幅が検出される閾値サイクル数と遺伝子コピー数の関係を求め検量線を作成した。

##### 2-2-4 生活排水処理施設の調査

八戸高専生活排水処理施設 (長時間エアレーション法、

処理水量 330m<sup>3</sup>/日)の曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水を採水して大腸菌および糞便性連鎖球菌を計数した。大腸菌の計数は、EC-MUG 培地 (Difco) による MPN 法<sup>4)</sup>とリアルタイム PCR 法により行った。また、大腸菌群、糞便性大腸菌群の計数をそれぞれ MF-Endo 寒天培地 (Difco) および M-Fc 培地 (Difco) によるメンブレンフィルタ法<sup>4)</sup>で行い、大腸菌数と比較した。糞便性連鎖球菌の計数は、M-E 寒天培地 (Difco) によるメンブレンフィルタ法<sup>4)</sup>とリアルタイム PCR 法によって行った。

### 2-2-5 水域の調査

図1に示した青森県八戸市の新井田川と八戸港湾地区4地点でサンプルを採水し、生活排水処理施設の調査と同様の方法で大腸菌、大腸菌群、糞便性大腸菌群および糞便性連鎖球菌を計数した。また MPN 法による大腸菌の計数では、10mL の試料が必要な場合には培地の濃度を2倍にして使用し、100mL の試料が必要な場合にはポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 0.2 μm、直径 47mm) を使用してサンプルをろ過し、ろ紙を培地に添加して培養した。

## 3. 結果および考察

### 3-1 DNA 増幅の検出と DNA 定量実験

糞便性連鎖球菌の 23S-rRNA 遺伝子の検出では購入した3つの *Enterococcus* 属の細菌で検出され、大腸菌 *E. coli* や *E. aerogenes* では検出されなかった。大腸菌の *uidA* 遺伝子の検出では、購入株では大腸菌 *E. coli* 以外からは検出されず、八戸高専生活排水処理施設流入水からも検出することができた。また DNA 増幅が検出可能だった遺伝子をターゲットに、大腸菌と糞便性連鎖球菌の DNA 定量実験を行い検量線を作成した。検量線の傾きからは

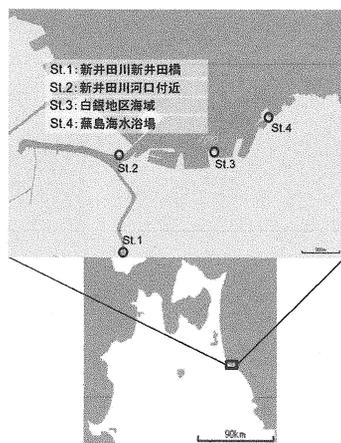
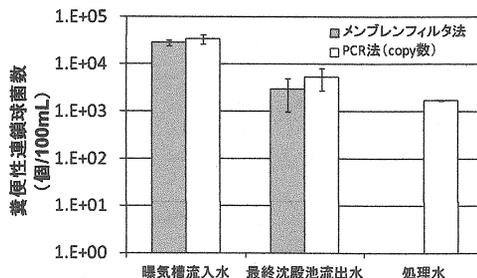
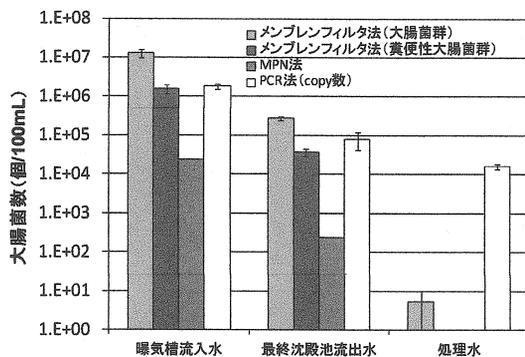


図1 調査水域

DNA の増幅効率 (E) が求められ<sup>5)</sup>、理想的な PCR では各サイクルで copy 数が2倍となり、これは増幅効率が2であることに相当してパーセンテージで表すと 100% となる。増幅効率が 100% に近いほど精度が高くなることを意味する<sup>5)</sup>。作成した検量線から大腸菌は増幅効率 (E) =1.92、%効率=92.1%、決定係数 R<sup>2</sup>=0.995 という結果が得られ、また糞便性連鎖球菌についても増幅効率 (E) =2.04、%効率=103.9%、決定係数 R<sup>2</sup>=0.997 となった。本実験と同じ *uidA* と 23S-rRNA 遺伝子を使用した Frahm & Obst<sup>2)</sup>の実験では、大腸菌は増幅効率 (E) =1.9、%効率 90% となり、糞便性連鎖球菌についても増幅効率 (E) =2.1、%効率 110% となっており、大腸菌、糞便性連鎖球菌ともに本実験の方が増幅効率が 100% に近く、データの変動も少ないことから精度の高い値が得られたといえる。

### 3-2 生活排水処理施設の調査

図2に八戸高専生活排水処理施設の曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水のそれぞれについてメンブレンフィルタ法、MPN 法、PCR 法によって計数した大腸菌群、糞便性大腸菌群および大腸菌の計数結果を示した。また図3にはメンブレンフィルタ法、PCR 法により計数した糞便性連鎖球菌の計数結果を示した。PCR 法で求めた大腸菌数、糞便性連鎖球菌数は遺伝子 copy 数で表した。曝気槽流入水、最終沈殿池流出水では PCR 法による大腸菌の計数値は、大腸菌群と糞便性大腸菌群の中間に位置し、MPN 法で計数された大腸菌数より 2 オー

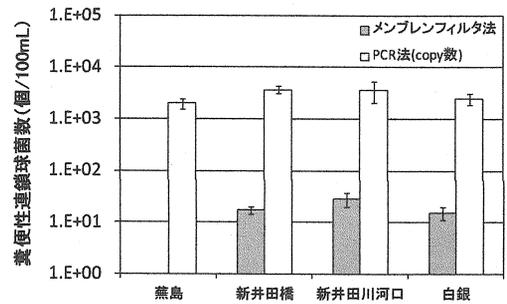
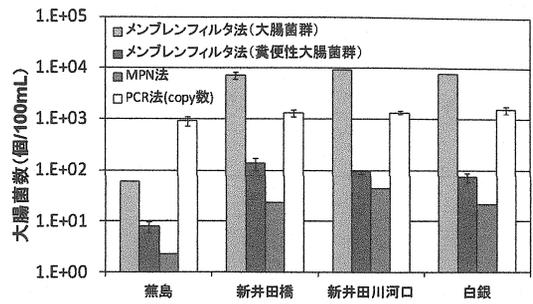


ダー程度大きかった。一方処理水では大腸菌群と PCR 法の大腸菌は検出されたが、糞便性大腸菌群と MPN 法の大腸菌は検出されず、流入水と最終沈澱池流出水とは異なり大腸菌群や糞便性大腸菌群と PCR 法の大腸菌との間に大きな違いが見られた。また糞便性連鎖球菌数は、曝気槽流入水、最終沈澱池流出水で計数値が 2 つの方法でほぼ等しく、流入水では  $1 \times 10^4$  個/100mL レベルで、最終沈澱池流出水では流入水に比べて 1 オーダー低い値を示した。さらに処理水では PCR 法で最終沈澱池流出水と同程度計数できたが、メンブレンフィルタ法では検出されなかった。このように大腸菌と糞便性連鎖球菌の PCR 法と従来法である MPN 法やメンブレンフィルタ法で計数値に差が見られたのは、検出できる細菌の状態の違いがあるためだと考えられる。培養を基本とする方法である MPN 法やメンブレンフィルタ法は培養可能な状態にある細菌のみ検出できるが、最近水環境中には生存しているものの培養できない状態 (viable but non-culturable; VNC) にある細菌が少なからず存在することが明らかになっている<sup>9)</sup>。これに対し、PCR 法では VNC 状態の細菌や細菌死滅後も一定期間細胞内の DNA は保持されるため死滅した細菌も検出できる。これにより計数値に差が生じたと考えられる。

### 3-3 水域の調査

図 4 に調査水域 4 地点でメンブレンフィルタ法、MPN 法、PCR 法によって計数した大腸菌群、糞便性大腸菌群および大腸菌の計数結果を示した。新井田橋、新井田川河口、白銀の 3 地点では使用した計数方法はほぼ等しい細菌濃度を示し、大腸菌群  $1 \times 10^4$  個/100mL、PCR 法  $1 \times 10^3$  copy 数/100mL、糞便性大腸菌群  $1 \times 10^2$  個/100mL、MPN 法  $1 \times 10^1$  個/100mL 程度であった。一方蕪島では PCR 法の計数値は他の 3 地点と同程度だったが、他の計数方法では 1~2 オーダー低くなった。図 5 にはメンブレンフィルタ法、PCR 法により計数した糞便性連鎖球菌の計数結果を示した。PCR 法で検出された糞便性連鎖球菌は 4 つの地点とも  $1 \times 10^3$  copy 数/100mL のオーダーだった。これに対しメンブレンフィルタ法では新井田橋、新井田川河口、白銀の 3 地点では、 $1 \times 10^4$  個/100mL のオーダーであったが、蕪島では検出されなかった。水域の調査では MPN 法と PCR 法による大腸菌の計数値と、メンブレンフィルタ法と PCR 法による糞便性連鎖球菌の計数値との間にそれぞれおよそ 2 オーダーの差が見られ、生活排水処理施設の調査と同様に死滅したあるいは VNC 状態にある大腸菌や糞便性連鎖球菌の存在が影響している可能性がある。

新しい指標として研究した PCR 法は、VNC 状態にある細菌も検出できるため、培養可能な細菌しか検出できない従来の指標より安全側に立った指標と考えられるが、



死滅した細菌も検出してしまうため過大評価となる可能性もある。

### 4. まとめ

DNA 増幅が検出できた大腸菌の *uidA* 遺伝子、糞便性連鎖球菌の 23S-rRNA 遺伝子をターゲットにして大腸菌と糞便性連鎖球菌の閾値サイクル数と遺伝子コピー数の検量線を作成し、排水処理施設や水域の調査を行った。その結果、長時間の培養を必要とする方法に比べて、PCR 法では大腸菌と糞便性連鎖球菌を迅速に計数することができた。しかし排水処理施設の処理水では大腸菌、糞便性連鎖球菌ともに他の指標ではほとんど不検出だったのに対し、PCR 法では検出され、過大評価につながる可能性も示唆された。

**参考文献** 1)平田強：微生物汚染指標、金子光美編著、水質衛生学、技報堂出版、東京、pp.468-479、1996 2)Frahm,E and Obst,U, Journal of Microbiological Methods, Vol.52,pp.123-131,2003 3)Whelan, J.A, Russell, N.B, Whelan, M.A, Journal of Immunological Methods, Vol.278,pp.261-269,2003 4)日本下水道協会：下水試験法 上巻, pp.698-725,1997 5)日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 ライフサイエンス事業本部：アプリケーションガイド Real-Time PCR,pp6-10,2007 6)木暮一啓, 科学, Vol.69,No.6,pp.508-516, 1999