

B-5 微生物遺伝子マーカーを用いた 水道水源河川中の糞便汚染源解析

○渡辺 亮^{1*}・黒川 恵未²・原本 英司³・森田 久男⁴・岸田 直裕⁵・
浅見 真理⁵・秋葉 道宏⁵・坂本 康³

¹山梨大学大学院医学工学総合教育部（〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11）

²山梨大学工学部（〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11）

³山梨大学大学院総合研究部（〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11）

⁴埼玉県企業局（〒330-0063 埼玉県さいたま市浦和区高砂3-14-21）

⁵国立保健医療科学院（〒351-0197 埼玉県和光市南2-3-6）

* E-mail: g13mr005@yamanashi.ac.jp

1. はじめに

水環境中のクリプトスポリジウムやジアルジア、ノロウイルスなどの病原微生物の存在は、下水処理場や浄化槽、家畜飼育施設からの排水、野生動物の糞便による汚染の影響を受けている。そのため、飲料水の摂取による水系感染症のリスクを把握する上で、宿主特異的なバクテロイデスやF特異RNA大腸菌ファージ（F-RNAファージ）などの微生物遺伝子マーカーを用いた糞便汚染源解析は重要であるといえる。

本研究では、水道水源河川で採取した河川水中のヒト、ブタ、反芻動物を宿主とするバクテロイデスとF-RNAファージのI～IV群を測定し、平水時および降雨イベント時における糞便汚染源を解析した。

2. 実験方法

(1) 試料の採取

2011年5月～2012年1月の9ヶ月間に毎週1回の頻度で利根川の表流水を採取した（計50回）。この中には3～5日間にわたって経日的な採水を実施した降雨イベントが含まれている（2011年5月10～12日，2011年5月24～26日，2011年7月19～21日，2012年1月20～24日の計4回）。

(2) F-RNAファージの測定

a) F特異大腸菌ファージの定量およびブラックの単離

Salmonella enterica serovar Typhimurium WG49を宿主菌と

て用いたブラック法¹⁾によってF特異大腸菌ファージ（Fファージ）を測定した。形成したFファージのブラックを1試料あたり最大8個（合計278個）単離し、滅菌MilliQ水500μLに溶解した。

b) F-RNAファージの定量PCR

分取したブラック溶解液から加熱処理によって核酸を抽出した後、High capacity cDNA reverse transcription kit（Life Technologies）を用いた逆転写反応に供した。F-RNAファージのI群に特異的な定量PCR（40サイクル）²⁾に供し、Ct値を決定した。その際、Ct値が20以下の場合にはそのブラックはI群に属すると判断した。一方、Ct値が20を超える場合には他の遺伝子群がより優占している可能性を考え、II，III，IV群の順に同様の手順で定量PCR²⁾に供した。

c) F-RNAファージの各遺伝子群の年間平均濃度の算出

まず、Fファージの年間平均濃度を算出した。この時、Fファージが非検出だった試料には、検出限界（50 plaque-forming units (PFU) / L）の1/10の値（5 PFU/L）を与えてFファージの年間平均濃度を計算した。続いて、算出したFファージの年間平均濃度と各遺伝子群が年間単離ブラック数に占める割合を基に、F-RNAファージの各遺伝子群の年間平均濃度を算出した。

(3) 宿主特異的バクテロイデスの測定

まず、宿主特異的バクテロイデスの濃縮を行った。試料100mLを混合セルロース膜（孔径0.45μm，直径47mm，Merck Millipore）でろ過後，膜をPET溶液10mLとフットボール型攪拌子が入った遠沈管内で破碎した。スポイトで

懸濁液の全量を新しい遠沈管に移した後、元の遠沈管にPET溶液5mLを加えて同様の操作を行った。遠心分離操作（2000×g, 10分, 4℃）を行い、得られた沈渣の量が1mLになるようPBS（－）を添加し濃縮液とした。続いて、濃縮液からQIAamp DNA mini kit（Qiagen）を用いてDNAを抽出した後、ヒト、ブタ、反芻動物を宿主とするバクテロイデスに特異的なプライマーおよびプローブ³⁻⁵を用いた定量PCR（45サイクル）に供した。

宿主特異的バクテロイデスの年間平均濃度を算出する際、非検出であった試料には、検出限界（10 copies/L）の1/10の値（1 copy/L）を与えて計算した。

3. 実験結果

(1) 試料から単離したFファージのブラックの同定

試料から単離したFファージのブラックを同定した結果、F-RNAファージのII群が54%（151/278）と単離したブラックの中で最も優占して存在していた。I群は22%（62/278）、III群は5%（15/278）、IV群は0%（0/278）であった。

(2) 試料中のF-RNAファージの各遺伝子群の濃度

F-RNAファージ各遺伝子群の濃度変動を図-1に示す。年間平均濃度は、F-RNAファージII群が2.03 log PFU/mLで最も高かった。その次に濃度が高かったI群は1.58 log

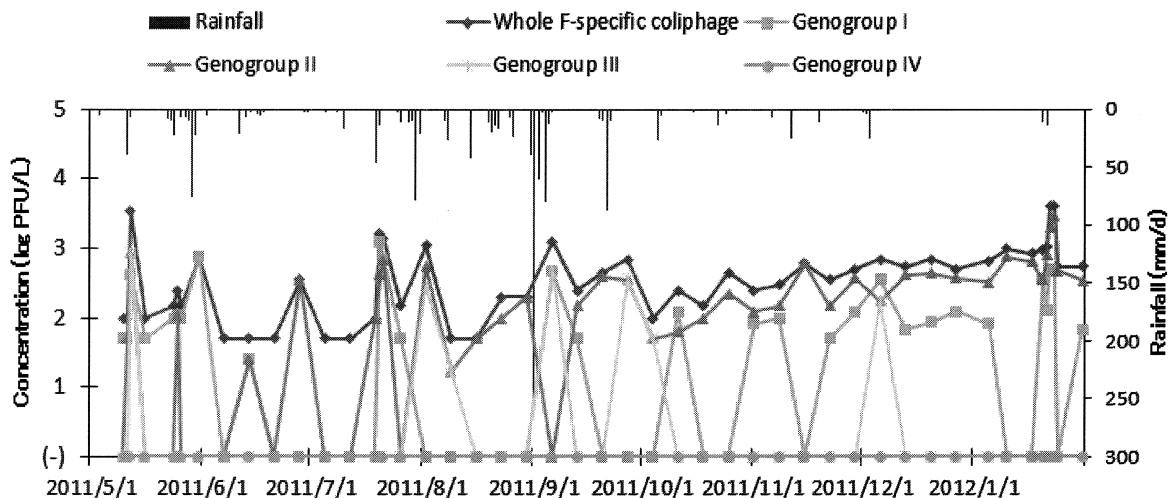


図-1 F-RNA ファージ各遺伝子群の濃度変動

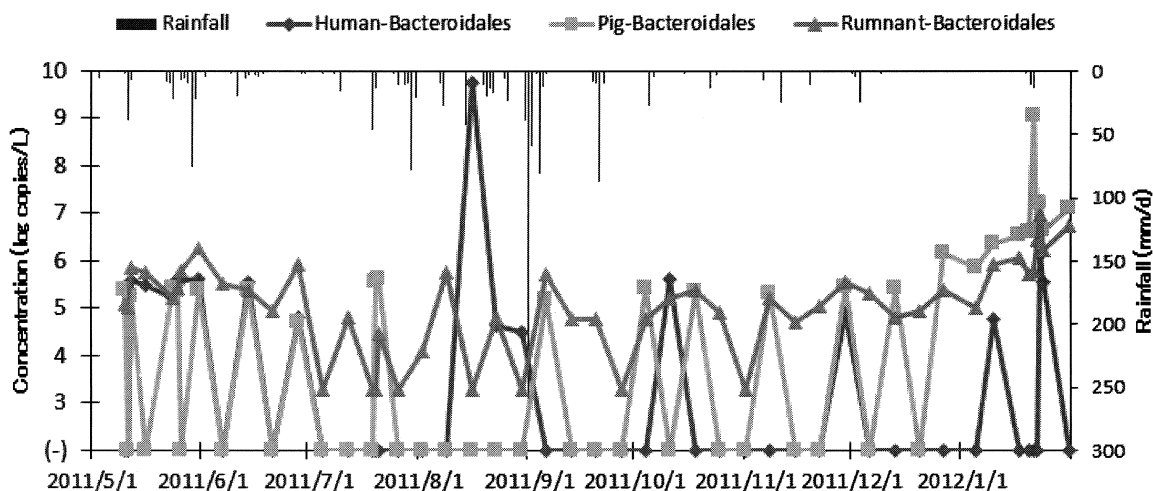


図-2 宿主特異的バクテロイデスの濃度変動

PFU/mLであった。また、冬季において、Fファージ全体の濃度とF-RNAファージII群の濃度が高くなる傾向にあり、4回の降雨イベント全てにおいて、F-RNAファージI群とII群の濃度が上昇する傾向にあった。一方、III群とIV群はほとんど検出されなかった。

(3) 試料中の宿主特異的バクテロイデスの濃度

宿主特異的バクテロイデスの濃度変動を図-2に示す。陽性率はヒトバクテロイデスが32% (16/50)、ブタバクテロイデスが50% (25/50)、反芻動物バクテロイデスが84% (42/50)となり、反芻動物バクテロイデスが最も高い陽性率で検出された。また、それぞれの年間平均濃度は4.03, 4.62, 5.09 log copies/Lであった。この結果から、採水地点の上流にある家畜飼育施設からの糞便汚染の可能性が示唆された。

2011年8月16日に採取した試料において、ヒトバクテロイデスが9.76 log copies/Lと高濃度で検出され、この時にヒトの強い糞便汚染を受けていた可能性が示唆された。この前々日に42.5mm/dの降雨があったが、FファージおよびF-RNAファージ各遺伝子群、大腸菌、大腸菌群の濃度、濁度は平常時と同程度であった。

冬季において、それぞれのバクテロイデスは濃度が高くなる傾向にあった。また、4回の降雨イベント全てにおいて、バクテロイデスの濃度が上昇する傾向にあった。特にブタバクテロイデスは、いずれの降雨イベントにおいても、急激な濃度上昇を示した。この結果から、降雨出水時には上流の畜産飼育施設からの表面流出などの影響を受けていることが示唆された。

(4) 糞便汚染と水系感染症のリスク

冬季および降雨出水時において、宿主特異的バクテロイデスと病原性ウイルスの指標として用いられているF-RNAファージI群とII群の濃度が上昇したことから、冬季と降雨時にはヒトおよび家畜由来の糞便汚染による水系感染症のリスクが高まることが示唆された。また、同じ首都圏を流れ、中流に下水処理場が存在する多摩川での研究事例⁹⁾と比較した。多摩川では中・下流地点のヒトバクテロイデスの濃度が6.3~6.9 log copies/Lであったのに対し、ブタ・反芻動物バクテロイデスの濃度が3.0~3.5 log copies/Lと低い値であった。それと異なり、ヒトのみならず、上流に位置する畜産飼育施設からの糞便汚染もを受けていることが利根川の特徴であるといえる。

4. まとめ

本研究では、水道水源河川の一つである利根川で採取した試料を用いて糞便汚染源の解析を行った。その結果、河川水がヒトのみならず家畜の糞便汚染の影響を受けていることが分かった。また、冬季と降雨時には、ヒトおよび家畜由来の糞便汚染による水系感染症のリスクが高まることが示唆された。今後は、降雨出水時における糞便汚染の詳細な実態を調査するため、降雨出水時に採水間隔を短く設定して糞便汚染源の解析を行う予定である。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金(26289182)および河川整備基金助成事業(23-1211-014)の助成により実施した。

参考文献

- 1) Muniesa M, Payan A, Moce-Llivina L, Blanch A.R. and Jofre J.: Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water, *Water Research*, Vol. 43, No. 6, pp.1559-1564, 2009.
- 2) Wolf S., Hewitt J., Rivera-Aban M. and Greening G.E.: Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 149, No. 1, pp. 123-128, 2008.
- 3) Lee C.S. and Lee J.: Evaluation of new *ggrB*-based real-time PCR system for detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 82, No. 3, pp. 311-318, 2010.
- 4) Furet J. P., Corthier G. and Gourmelon M.: Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No.10, pp. 3045-3054, 2009.
- 5) Reischer. G. H, Kasper D. C., Steinborn R., Mach R.L. and Famleitner A.H.: Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 8, pp.5610-5614, 2006.
- 6) Watanabe M, Fujino S, Haramoto E., Nishida K. and Sakamoto Y.: Analysis of fecal contamination of environmental water in the Kofu basin and the Tamagawa River using host-specific *Bacteroidales* and F-specific RNA coliphage genetic markers, *Proceedings of Water and Environment Technology Conference 2014*, p.46, 2014.