

29. ふん便汚染源追跡マーカー調査のための細菌および

ウイルス DNA 同時濃縮精製法の検討

○肥塚 利江 (大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

併用がより有効であると考えられる、細菌およびウイルス系のヒト用ふん便汚染源追跡マーカー（微生物遺伝子マーカー）を環境水から検出するため、水中の細菌およびウイルス DNA の同時濃縮精製法を比較検討する。

【研究の必要性】

水道原水やレクリエーション水として用いられている河川水等のふん便汚染状況を把握することは、地域住民の健康保全対策上重要である。また、クリプトスポリジウム等のふん便由来の病原微生物は宿主特異性があり、汚染源によりヒトへの感染性に違いがあるため、ふん便汚染の汚染源の判別も重要である。そのため、近年、バクテロイデス属菌等の腸内細菌や *CrAssphage* 等の腸内ウイルスの遺伝子マーカーをふん便汚染源追跡マーカーとして利用し、汚染源の推定を行う手法が広く用いられるようになってきている。

当所では、各種ふん便汚染源追跡マーカーについて、浄化槽処理水等や野生動物のふん便を用い、感度および特異度を求め、それらの国内での有用性についての確認を行ってきた。その結果、ヒトふん便マーカーである細菌系マーカー； *Bacteroides* HF183/BacR287 では感度は高いが特異度が低く、ウイルス系マーカー； *CrAssphage* CPQ_056（以下、CPQ_056）では感度は低いが高特異度となり、ヒト用マーカーとしては、これらを併用するのが良いと考えられたり。

これらの腸内細菌やウイルスは、河川水等の環境水中では、一般的に数が少ないので濃縮操作が必須であり、これらのマーカーを実試料で併用するためには、細菌およびウイルスを同時に濃縮精製できる手法が必要である。海外では、細菌およびウイルスを同時に濃縮・精製するため、塩酸で pH を 3.5 程度にしたうえで、孔径 0.45 μm 程度のセルロース混合エステルフィルター等の陰電荷膜でろ過することで、細菌をろ過で物理的に、ウイルスをフィルター上に吸着させて濃縮し、DNeasy PowerWater Kit（キアゲン社）等の市販のキットを用いてフィルターから直接 DNA を抽出精製する方法が用いられている²⁾。

しかし、この方法は、回収率が低いとの指摘もあり、また、DNA の抽出精製に使用するキットが非常に高価であることなど問題がある。

そこで、上記、細菌系およびウイルス系マーカーが確認されている浄化槽処理水や河川水を用い、陰電荷膜にウイルスを吸着させる濃縮前処理法とろ過フィルターから DNA を抽出精製する方法に分け、細菌とウイルスの DNA の同時濃縮精製法の比較検討を行った。

【研究計画】

1. 濃縮時の前処理法の検討

(1)試料；ウイルス系のヒト用ふん便汚染源追跡マーカー（CPQ_056）が確認されている浄化槽処理水を採取し、希釈水（水道水を孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過したもの）で10倍に希釈したもの 200ml を21本作製し、各7本を後述の3つの方法で前処理し、それぞれの試料を孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ のセルロース混合エステルフィルターでろ過濃縮し、前処理法ごとに順次、後述のサリベットチューブを用いた方法で直接フィルターからDNAの抽出精製を行った。抽出物の最終容量はすべて $200\ \mu\text{l}$ とした。

(2)前処理法；ウイルスを陰電荷膜に吸着しやすくするため、以下の処理を行った。

①塩酸で pH を 3.5 に調整²⁾

② 2.5M MgCl_2 を 100ml につき 1ml の割合で添加³⁾

③ 2.5M MgCl_2 を 100ml につき 1ml の割合で添加した後、塩酸で pH を 3.5 に調整⁴⁾

2. フィルターからの DNA 抽出精製法の検討

(1)試料

①浄化槽処理水：上記、濃縮時の前処理法の検討時に用いたものと同じ浄化槽処理水を同様に希釈したものを21本作製し、それぞれ塩酸で pH を 3.5 に調整後、孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ のセルロース混合エステル製フィルターでろ過濃縮し、順次、後述の(2)①～③の方法で各7枚ずつDNAを抽出精製した。抽出物の最終容量はすべて $200\ \mu\text{l}$ とした。

②河川水：淀川河川水を約 10L 採取し、塩酸で pH を 3.5 に調整後、 $300\ \text{ml}$ ずつ28試料を浄化槽処理水と同様にろ過濃縮し、順次、後述の(2)①～④の方法で各7枚ずつDNAを抽出精製した。抽出物の最終容量はすべて $200\ \mu\text{l}$ とした。

(2)抽出精製法

①サリベットチューブ法：環境DNA調査・実験マニュアル⁵⁾のグラスファイバーフィルターからのDNA抽出精製法に準じて、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社）を用いて行った。即ち、サリベットチューブ（ザルスタット社）の上部に中表にフィルターをいれ、ALbuffer と proteinaseK を 10:1 の割合で混合したものをフィルターの内側にいれ、 56°C の恒温槽で30分以上処理した後、遠心機でチューブ下部にろ液を集めた。エタノールをチューブ下部のろ液に添加し、ピペッティング混合後、キットの説明書通りにDNA精製を行った。

②チューブ法： 5ml のマイクロチューブにフィルターを入れ、チューブ内で QIAamp DNA Mini Kit を用いて抽出を行った。即ち、ALbuffer と proteinaseK を 10:1 の割合で混合したものをチューブに添加し、 56°C の恒温槽で30分以上処理した後、フィルターを取り出し、エタノールを添加し、ピペッティング混合後、キットの説明書通りにDNA精製を行った。

③DNeasy PowerWater Kit（キアゲン社）を用いた方法：フィルターを中表にしてビーズチューブに入れ、キットの説明書通りにDNAの抽出精製を行った。

④DNeasy PowerSoil Pro Kit（キアゲン社）を用いた方法：本来、土壌からのDNA抽出精

製用のキットであるが、環境水からの回収に使用している文献があったため⁶⁾、河川水試料を用いた検討に用いた。フィルターを半分に割り、中表に巻いてビーズチューブに入れ、キットの説明書通りにDNAの抽出精製を行った。

3. 定量PCR および結果の比較

DNA抽出液を鋳型とし、表1のプライマー/プローブを用いて細菌系のバクテロイデス属特異遺伝子マーカー；All_Bacteroides（以下、All_Bac）およびウイルス系のヒトふん便用マーカー（CPQ_056）の定量PCRを行った。PCR反応液は、Probe qPCR Mix（タカラバイオ社製）12.5 μ l、プライマー各400nM、プローブ200nM、DNA抽出液5 μ lとし、RNase-free Water（タカラバイオ社製）で全量を25 μ lとし、各試料2反応ずつ行った。PCR条件は、95°C30秒、95°C5秒・60°C30秒を45サイクルとした。また、標準試料として、 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$ コピー/5 μ lの範囲の人工合成遺伝子（ユーロフィンジェノミクス社製）をEasyDilution（タカラバイオ社製）で段階希釈し、検量線を作成してコピー数の定量を行った。定量PCR装置は、ABI 7900HT Fast Real-Time PCR Systemを用いた。

得られた定量PCRの結果を用いて前処理法および抽出精製法ごとに細菌系およびウイルス系のマーカーの回収コピー数濃度に差があるか、医薬学データ用統計解析プログラム⁷⁾のSteel-Dwassの多重検定を用い、比較検討を行った。

表1 各種微生物遺伝子マーカー検出系のプライマーおよびプローブ

	Target	Primer and probe sequence (5'-3')
All_Bac	All <i>Bacteroides</i>	GAGAGGAAGGTCCCCAC CGCTACTTGGCTGGTTCA FAM-CCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCT-BHQ1
CPQ_056	Human <i>CrAssphage</i>	CAGAAGTACAACTCCTAAAAACGTAGG GATGACCAATAACAAGCCATTAGC FAM-AATAACGATTTACGTGATGTAAC-MGB

【実施内容・結果】

1. 濃縮時の前処理法の検討

図1に浄化槽処理水におけるAll_BacおよびCPQ_056の濃縮時前処理法別の回収コピー数濃度（コピー数/ml）の分布の箱ひげ図を示す。

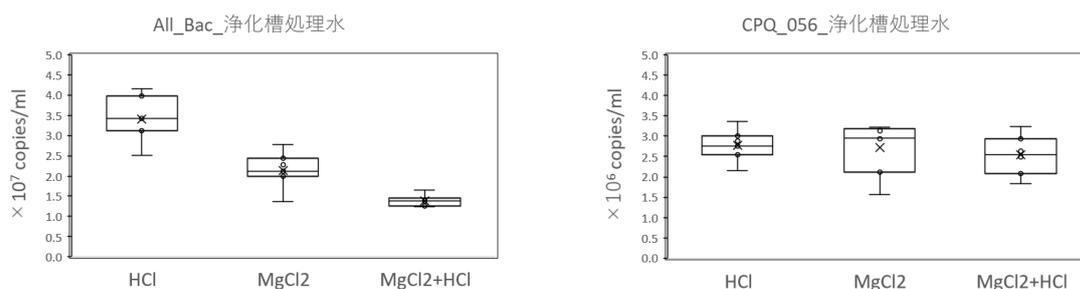


図1 濃縮前処理法別の箱ひげ図

HCl: 塩酸でpHを3.5に調整、MgCl₂: 2.5M MgCl₂を1m³/100m³添加、MgCl₂+HCl: 2.5M MgCl₂を1m³/100m³添加後塩酸でpHを3.5に調整

濃縮前の前処理法では、ウイルス系のマーカーである CPQ_056 においては、すべて 5% 水準で有意差がなかった。しかし、細菌系のマーカーである All_Bac においては、すべての方法の間に有意差があり、塩酸で pH を下げる方法で回収されたコピー数が他より多かった。

2. フィルターからの抽出精製法の検討

図 2 に浄化槽処理水および河川水における All_Bac および CPQ_056 の抽出精製法別の回収コピー数濃度（コピー数/ml）の分布の箱ひげ図を示す。

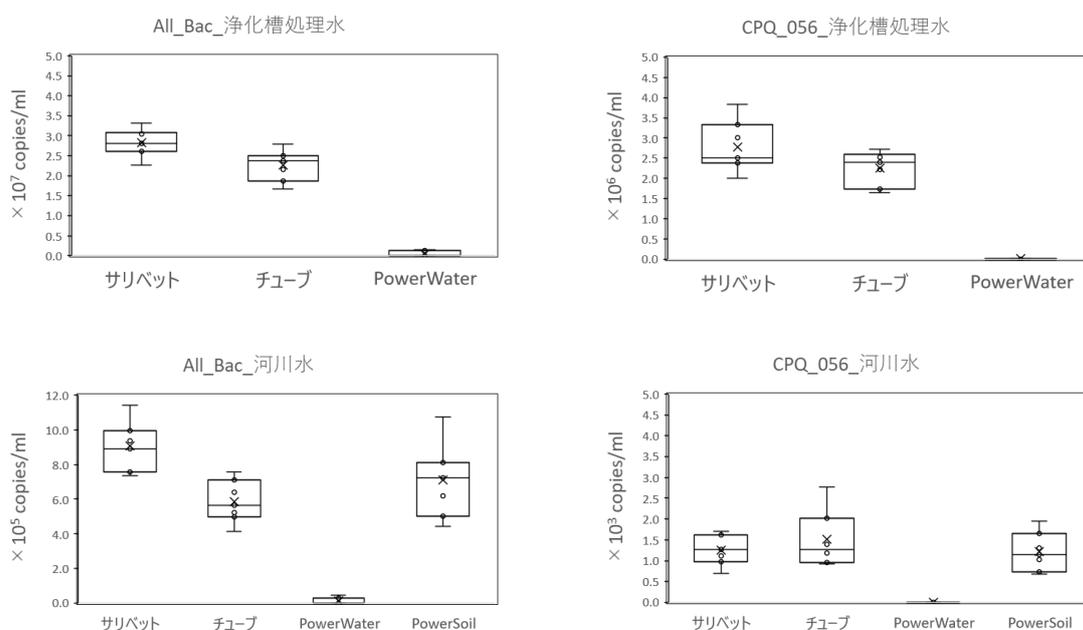


図2 抽出精製法別の箱ひげ図

サリベット：サリベットチューブを使用、チューブ：5m ϕ チューブを使用、
PowerWater：Dneasy Power Water Kitを使用、PowerSoil：Dneasy Power Soil Pro Kitを使用

DNeasy PowerWater Kit を用いた方法では、すべてにおいて、他の方法より 1~5 桁回収コピー数が少なく、検出されない場合もあった。サリベットチューブ法およびチューブ法では、浄化槽処理水、河川水とも、All_Bac では、5%水準で有意差があり、サリベットチューブ法で回収コピー数が多かったが、CPQ_056 では、有意差はなかった。また、河川水でのみ行った DNeasy PowerSoil Pro Kit を用いた方法は、両方のマーカーで、サリベットチューブ法、チューブ法と有意差はなかった。

【考察と今後の課題】

濃縮時の前処理法では、ウイルス系マーカーでは、回収コピー数に差がなかったが、細菌系では、“塩酸で pH を 3.5 に調整” > “MgCl₂ を添加” > “MgCl₂ を添加後に塩酸で pH を 3.5 に調整” の順であった。

本来、濃縮前の前処理は、ウイルスを陰電荷膜に吸着させ、回収するためのものであり、細菌系のはフィルターの孔径により物理的に回収できるはずである。しかし、今回の結果では、ウイルス系マーカーに差はなく、原因は不明であるが細菌系のマーカーに差が出た。従って、今後、DNA 同時濃縮法の前処理法としては、塩酸で pH を下げる方法を採用することとした。

フィルターからの抽出精製法では、水をろ過したフィルターからの抽出キットである DNeasy PowerWater Kit で回収コピー数が極端に低く、その他の方法では、細菌系マーカールでのみ、サリベットチューブ法、チューブ法で差があり、サリベットチューブの回収コピー数が多かった。河川水でのみ行った DNeasy PowerSoil Pro Kit は、サリベットチューブ法、チューブ法と差がなかった。しかし、DNeasy PowerSoil Pro Kit はサリベットチューブ法、チューブ法で使用している、抽出精製キット(QIAamp DNA Mini Kit)より 2 倍近い価格であること、また、DNeasy PowerSoil Pro Kit は本来、土壌からの DNA 抽出精製用のキットであり、ろ過フィルターをビーズチューブに入れにくいという難点があることから、抽出精製法としては、より安価で扱いやすいサリベットチューブ法を採用することとした。

今後、今回採用した方法を用いて、河川水実試料を濃縮精製し、ヒト以外の細菌系ふん便汚染追跡マーカーも含めたふん便汚染実態の調査を行いたい。

【参考文献】

- 1) 肥塚利江: 淀川水系における各種ふん便汚染源追跡指標 (微生物遺伝子マーカー) の調査, (公財)琵琶湖・淀川水質保全機構令和 2 年度水質保全研究助成成果報告書.
- 2) Ahmed W. *et al.*: A duplex PCR assay for the simultaneous quantification of Bacteroides HF183 and crAssphage CPQ_056 marker genes in untreated sewage and stormwater. *Environ Int* 2019, 126, 252-259.
- 3) 原本英司 他: 河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発, *水道協会雑誌* 2010,79(10), 2-11.
- 4) 国立感染症研究所: ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル.
- 5) 一般社団法人環境 DNA 学会: 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.1. 2019.
- 6) Wu Z. *et al.*: Comparative fate of CrAssphage with culturable and molecular fecal pollution indicators during activated sludge wastewater treatment. *Environ Int* 2020, 136, 105452.
- 7) 医薬学データ用統計解析プログラム, <http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/>

【経費使途明細】

使 途	金 額
DNA 濃縮精製用キット (QIAamp DNA Mini kit 等)	112,145 円
qPCR 用プライマー、プローブ、陽性コントロール	101,200 円
qPCR 用試薬 (Probe qPCR Mix(TaKaRa))	28,248 円
その他 (チップ、チューブ等)	55,605 円
振込手数料	3,322 円
合 計	300,520 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円