

28. バクテロイデス遺伝子マーカーを用いた河川水等の ふん便汚染調査

○肥塚 利江 （大阪健康安全基盤研究所）

【研究目的】

河川水等の環境水のふん便汚染指標である大腸菌群等のふん便性指標細菌類は、ふん便汚染を正確に表していないとされており、汚染源推定も行えない。そこで、汚染源推定が行えるとされるバクテロイデス遺伝子マーカーを用いて河川水の調査を行い、各種ふん便性指標細菌類の変動がヒト由来か否の推定を行う。

【研究の必要性】

水道原水やレクリエーション水として利用されている河川水中のふん便汚染状況の把握は地域住民の健康保全対策上重要であるが、現在、ふん便性汚染評価に使用されている大腸菌群数は、“土壌細菌が含まれる”“夏に高く、冬に低い等ふん便汚染に関係なく変動する”等、ふん便汚染を正確に表していないとの指摘がある。

当所では、平成 28 年度に浄化槽面整備地域の河川において、浄化槽処理水の流入が河川のふん便汚染に与える影響を評価する目的で、浄化槽処理水が流入する前の上流地点と流入後の下流地点および浄化槽処理水について、各種ふん便性汚染指標細菌（大腸菌群、大腸菌、ふん便性連鎖球菌、腸球菌等）の調査を行った。その結果、ふん便性細菌としての指標性が低いとされている大腸菌群のみでなく、よりふん便汚染を正確に表すとされる大腸菌やふん便性連鎖球菌、腸球菌においても、河川水中の細菌数は、浄化槽処理水の細菌数の変動によらず変動していると考えられた。また、生活排水の影響を受けないとされている上流地点でも夏の一時期に全てのふん便性指標細菌が増大しており、浄化槽処理水からのふん便汚染以外のものがふん便性指標細菌の変化に影響している可能性があるのではないかと考えられた¹⁾。

これらのふん便性指標細菌類の変動がヒト由来であるかその他の動物由来であるかを区別することは、汚染源を推定しその対策をとる上で重要である。そこで本研究では、このふん便性汚染指標細菌類の変動がヒト由来のものであるか否かまた、他の動物のふん便の流入によるものかを確認するため、ヒト由来のふん便性汚染を検出できるとされるヒト特異バクテロイデス遺伝子マーカーおよびヒトを含め動物由来のもの全てを検出するバクテロイデス属特異遺伝子マーカーについて、上記浄化槽整備地域の河川水（生活排水の影響を受けない上流地点および当該地域に整備された浄化槽の処理水流入後の下流地点）において調査を行った。

また、これらマーカーの有用性を確認するため、平成 28 年度に採取した浄化槽処理水や下水処理水の保存試料についてもこれらマーカーの調査を行い、ヒトふん便が含まれる試料において、検出できるかを検討した。

【研究計画】

1. 試料

(1)河川水：下記2地点について、平成29年9月～平成30年8月の期間、月1回採取を行った。

①浄化槽整備地域の河川において、その処理水が流入する前の生活排水の影響を受けていない上流域の地点。

②①の河川の浄化槽処理水が流入した後の地点。

いずれも、500mlの滅菌びん2本に採取し、持ち帰ったその日に下記のふん便性指標細菌類の検査を行い、500mlを直径47mm、孔径0.22 μ mのセルロース混合エステル製フィルター（ミリポア社製）でろ過濃縮し、-80℃で保存しバクテロイデス遺伝子マーカーの調査用試料とした。

また、参考として、平成28年9月～平成29年8月まで上記2地点で採取した試料80ml～100mlを孔径0.22 μ 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、-80℃で保存したものにおいてもバクテロイデス遺伝子マーカーの検査を行った。

(2)浄化槽処理水等：浄化槽3基および下水処理水2ヶ所について平成28年9月または10月～平成29年2月の間、月1回採取したもの、および浄化槽9基の1回採取試料、それぞれ50ml～100mlを孔径0.22 μ 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、-80℃で保存し、バクテロイデス遺伝子マーカーの検出率調査用試料とした。

2. 調査法

(1)ふん便性指標細菌類の検査：上記河川水試料について、大腸菌・大腸菌群およびふん便性連鎖球菌を検査した。検査法は、大腸菌・大腸菌群はラウリル硫酸X-GAL・MUGブロス(エルメックス社製)を用いた特定酵素基質培地法最確数法(5本法)²⁾とし、36℃24時間培養の後、青色を呈したものを大腸菌群、ブラックライト照射で青白蛍光を呈したものを大腸菌陽性とした。ふん便性連鎖球菌は、M-エンテロコッカス寒天培地、メンブレンフィルター法²⁾とし、検水(1～100ml)をろ過した直径47mm、孔径0.45 μ mの滅菌済みセルロース混合エステル製フィルター（ミリポア社製）をM-エンテロコッカス寒天培地（Difco社製）に貼り付け、36℃48時間培養の後、桃色～深紅色のコロニーを計数した。

(2)バクテロイデス遺伝子マーカーの調査：-80℃保存のフィルター濃縮試料について原本らの方法³⁾でフィルターから回収して濃縮液1mlとし、内200 μ lをQIAamp DNA Mini Kit(Qiagen社製)でDNAを抽出精製し最終容量200 μ lとした。このDNA抽出液を鋳型とし、表1のプライマー／プローブ^{4,5)}を用いてバクテロイデス属特異遺伝子マーカーおよびヒトバクテロイデス特異遺伝子マーカーの定量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℃30秒、95℃5秒・60℃30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。

表1 バクテロイデス遺伝子検出に用いたプライマーおよびプローブ

種類		配列(5'-3')	文献
バクテロイデス属特異	プライマー1	GAGAGGAAGGTCCCCAC	4)
	プライマー2	CGCTACTTGGCTGGTTCAG	
	プローブ	FAM-CCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCT-BHQ1	
ヒト特異バクテロイデス	プライマー1	GGCGGTCTTCCGGGTAAA	5)
	プライマー2	CACACTTCTGCGGGTCTTTGT	
	プローブ	FAM-TGGCCGACTGCTC-MGB	

【実施内容・結果】

1. ふん便性指標細菌濃度の経年変化

各種ふん便性指標細菌濃度の採取期間中の経年変化を図1に示す。

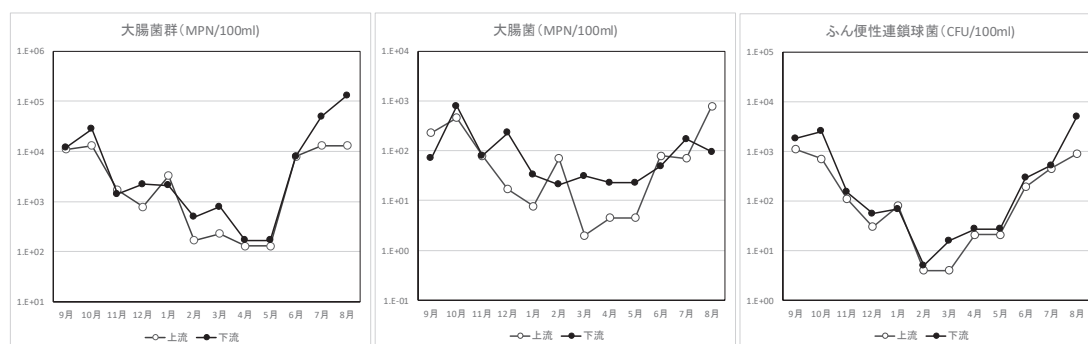


図1 各種ふん便性指標細菌濃度の経年変化（平成29年9月～平成30年8月）

各種ふん便性指標細菌濃度は、大腸菌群では、上流： $1.3 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^4$ MPN/100ml、下流： $1.7 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^5$ MPN/100ml、大腸菌では、上流： $2.0 \sim 7.9 \times 10^2$ MPN/100ml、下流： $2.3 \times 10^1 \sim 7.9 \times 10^2$ MPN/100ml、ふん便性連鎖球菌では、上流： $4.0 \sim 1.1 \times 10^3$ CFU/100ml、下流： $5.0 \sim 4.9 \times 10^3$ CFU/100mlの範囲で変動しており、平成28年度の調査¹⁾と同様、大腸菌群、ふん便性連鎖球菌において夏場に高く、冬から春先にかけて低い傾向が見られた。また、大腸菌においても下流においては顕著ではなかったものの上流で同様な傾向が見られた。

2. バクテロイデス遺伝子マーカーの調査

(1) ヒトふん便を含む試料におけるバクテロイデス遺伝子マーカーの検出状況

各種処理水におけるバクテロイデス遺伝子マーカーの検出状況を表2に示す。

表2 各種処理水におけるバクテロイデス遺伝子マーカーの検出状況

	検体数	バクテロイデス属特異遺伝子マーカー			ヒト特異バクテロイデス遺伝子マーカー		
		検出数	検出率 (%)	検出濃度 コピー/100ml	検出数	検出率 (%)	検出濃度 コピー/100ml
下水処理場	10	10	100	$1.5 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^8$	10	100	$2.6 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^5$
浄化槽	26	26	100	$4.5 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^9$	22	85	$7.6 \times 10^1 \sim 5.9 \times 10^5$
合計	36	36	100	$4.5 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^9$	32	89	$7.6 \times 10^1 \sim 5.9 \times 10^5$

下水処理場2ヶ所の処理水試料10件および浄化槽12ヶ所の処理水試料26件、計36件で各種バクテロイデス遺伝子マーカーの検出を試みた結果、バクテロイデス属特異遺伝子マーカーについては、全ての処理水で検出され、その濃度は、 $4.5 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^9$ コピー

/100ml であった。また、ヒト特異バクテロイデス遺伝子マーカーについては、浄化槽処理水の一部で検出できず(26 件中 22 件で検出、検出率 85%)、全体での検出率は 89%であり、その濃度は、 $7.6 \times 10^1 \sim 5.9 \times 10^5$ コピー/100ml であった。

(2) 浄化槽処理水流入河川水におけるバクテロイデス遺伝子マーカー調査

バクテロイデス属特異遺伝子マーカーのコピー数の採取期間中の経年変化を図 2 に示す。

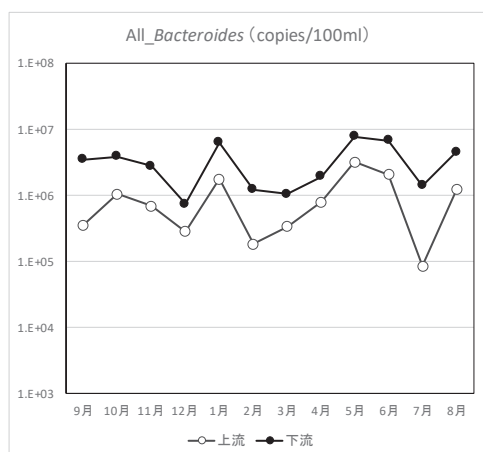


図2 バクテロイデス属特異遺伝子マーカーのコピー数の経年変化
(平成29年9月～平成30年8月)

ヒトを含め動物由来のもの全てを検出するバクテロイデス属特異遺伝子マーカーでは、ふん便性指標細菌類にみられた夏に高く冬に低い傾向は認められず、上流： $8.5 \times 10^4 \sim 3.2 \times 10^6$ コピー/100ml、下流： $7.4 \times 10^5 \sim 7.7 \times 10^6$ コピー/100ml で推移していた。また、わずかではあるが常に下流の方が上流よりコピー数濃度が高い傾向があった。

ヒト特異バクテロイデス遺伝子マーカーの調査では、上流地点では、参考として行った平成 28 年 9 月からの試料も含め、平成 30 年 8 月までの 24 試料全てで検出されなかった。しかし、下流地点では、全 24 試料中 4 試料で $3.8 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^3$ コ

ピー/100ml 検出された。

【考察と今後の課題】

1. ヒト特異バクテロイデス遺伝子マーカーの含ヒトふん便試料における検出率について

ヒトのふん便が含まれると考えられる下水処理水および浄化槽処理水において調査を行った結果、検出率（感度）は 89%であった。感度（host sensitivity）>80%は一般的に許容可能とされる⁶⁾が、原本ら³⁾は、今回と同一のヒト特異マーカーを用いて下水処理水やコミュニティプラント排水受容河川水等ヒトふん便汚染が想定される試料を調査した結果、陽性率は 100%であったとしている。原本らは、下水処理水等を調査する際、500ml の試料を使用しているが、今回、感度調査用に使用した浄化槽処理水等の試料は、50~100ml と比較的少なく、検出できる濃度を下回っていた可能性もあると考えられる。今後、試料量を増やして再検討する必要もあると考えられた。

2. ふん便性汚染指標細菌濃度の変動について

平成 28 年度の調査¹⁾と同様、今回の調査でも各種ふん便性汚染指標細菌濃度は、夏に高く冬に低い傾向が見られた。また、その濃度レベルが浄化槽処理水流入より上流、下流で変わらないことから、今回も下流の夏場における各種細菌濃度の上昇は、浄化槽処理水流入の影響ではなく、上流の濃度変動の影響であろうと考えられた。

また、今回、上流において夏場に何らかのふん便の流入の増大があったのか、また、それがヒトふん便によるものか確認するため、バクテロイデス遺伝子マーカーの測定を試みた。その結果、ヒトを含め動物由来のもの全てを検出するバクテロイデス属特異遺伝子マーカーでは、各種細菌類でみられたような変動はみられず、上流において夏場にふん便の流入の増大があったとは認められなかった。また、検出頻度は少ないもののヒト特異バク

テロイデス遺伝子マーカーは下流でのみ検出された。以上のことから、夏場における各種ふん便性汚染指標細菌濃度の上昇は、ふん便の流入が増大したわけではなく、環境中での増殖等他の原因ではないかと考えられた。また、上流のふん便汚染の原因は、ヒト以外の動物由来の可能性があり、今後、ふん便汚染の原因を究明するため、ヒト以外の動物に特異な遺伝子マーカーによる調査を行う必要があると考えられた。

また、今回、バクテロイデス遺伝子マーカー調査では、河川水 500ml を濃縮して行ったが、ヒト特異バクテロイデス遺伝子マーカーは浄化槽排水が流入している下流でも検出されないことが多かった。今後は、多量の試料を濃縮して調査する必要があると考えられた。

【参考文献】

- 1) 奥村早代子: 琵琶湖・淀川水系において各種排水処理水がふん便性細菌汚染に与える負荷影響の評価について, (公財)琵琶湖・淀川水質保全機構平成 28 年度水質保全研究助成成果報告書. http://www.byq.or.jp/josei/h28/accomplishment_report/14_report_okumura.pdf#view=fitv
- 2) 下水試験方法 2012 年版, 日本下水道協会.
- 3) 原本英司, 渡辺亮, 森田久男, 岸田直裕, 秋葉道宏, 坂本康 : バクテロイデス遺伝子マーカーを用いた河川水中のふん便汚染源解析. *用水と廃水*. 2016, 58, 589-595.
- 4) Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Sayler G. : Development of *Bacteroides* 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Estimation of Total, Human and Bovine Fecal Pollution in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 4214-4224.
- 5) Lee CS, Lee J. : Evaluation of New GyrB-based Real-time PCR System for the Detection of *B. fragilis* as an Indicator of Human-specific Fecal Contamination. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 82, 311-318.
- 6) Ahmed W., Hughes B., Harwood V.J. : Current Status of Marker Genes of *Bacteroides* and Related Taxa for Identifying Sewage Pollution in Environmental Waters. *Water* 2016, 8(6), 231.

【経費使途明細】

使 途	金 額
人工遺伝子合成	67,716 円
qPCR 用プライマー	1,512 円
qPCR 用プローブ	84,348 円
qPCR 用試薬 (Probe qPCR Mix (TaKaRa))	93,096 円
精製用試薬 (QIAamp DNA Mini kit)	23,382 円
その他試薬類	8,022 円
その他消耗品	18,468 円
振込手数料	3,456 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円