



Title	t-RFLP法によるBacteroidesを指標とした河川の糞便性汚染の評価
Author(s)	伊藤, 司; 岸田, 秀; 岡山, 紀子 他
Description	第10回衛生工学シンポジウム (平成14年10月31日 (木) -11月1日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 4 環境計測 . P4-5
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 10, 117-120
Issue Date	2002-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7115
Type	departmental bulletin paper
File Information	10-4-5_p117-120.pdf



4-5 t-RFLP 法による *Bacteroides* を指標とした河川の糞便性汚染の評価

北海道大学大学院工学研究科 ○伊藤 司 岸田 秀 岡山 紀子 岡部 聡 渡辺 義公

1. 研究背景

糞便性汚染には病原性微生物が含まれる恐れがあり、河川において糞便性汚染が存在すると、水浴、貝の採集などを通して病原性微生物が人へ感染する恐れがある。したがって、河川への糞便性汚染を防ぐことが望まれるが、河川への糞便性汚染の混入を防ぐには、河川の糞便性汚染の由来を特定する必要がある。人畜共通の病原細菌である *Salmonella* においては、その多くが家畜から排出されるとされており、このような観点からも人と動物の糞便汚染を判別することは重要であるといえる。糞便性汚染の由来を特定する手法は今までに様々な手法が提案されているが、本研究では迅速・簡便に糞便汚染の由来を特定できる t-RFLP 法という手法の適用を試みた。更に、現在環境基準では糞便性汚染の指標として大腸菌群数を用いているが、大腸菌群数の環境基準達成率は他の項目に比べて非常に低い(Table 1)。大腸菌群数は、糞便由来の大腸菌群だけでなく、土壌や河川に元来存在する非糞便由来の細菌まで評価している可能性がある」と指摘されている。病原性微

Table1 生活環境項目の水域類型別の環境基準適合状況(平成10年度)

水域類型 項目	AA	A	B
pH	97.1	97.1	95.1
DO	99.0	94.0	98.0
BOD	87.0	87.3	82.2
SS	97.5	94.7	91.8
大腸菌群数	15.9	29.0	45.6

単位(%)

生物の感染リスクを評価する上で、より有効で正確な新しい糞便性汚染の指標の開発が望まれている。

ヒトの腸内で最優勢の菌は *Bacteroides* 属であるが、*Bacteroides* 属は宿主によって特有の種が存在するとも言われており、このような背景から *Bacteroides* 属は新たな糞便性汚染の指標となり得ると考えられる。

そこで本研究では、*Bacteroides* 属を指標とし、t-RFLP 法を用いて、河川における糞便性汚染の発生源の特定を含めて河川の糞便性汚染を評価することを目的として、研究を行った。また、日本における糞便発生量の上位3種がヒト、ウシ、ブタであり、それぞれ日本全体の糞便発生量 15900t の約 46%、31%、13% を占めている現状(96年度)¹⁾を鑑み、本研究では、糞便汚染の発生源としてヒト、ウシ、ブタを対象に実験を行った。

2. 実験方法

青年男性8名、ウシ4頭、ブタ3頭の糞便からDNAを抽出し、*Bacteroides-Prevotella* に特異的なプライマー(Bac32F (FAMにより蛍光標識ラベル)-Bac708R、Table2²⁾)を用い、PCRにより増幅した。PCR増幅産物を制限酵素 *AciI* 及び *HaeIII* を用いて切断し、切断された増幅産物の5'末端断片(Terminal Fragment)長を、ABI PRISM 310 genetic Analyzerにより分析し、それぞれの動物の糞便から得られる t-RFLP パターンを調べた。また、ヒト、ウシ、ブタそれぞれの糞便から抽出したDNAに対しプライマー Bac32F-Bac708R を用いてクローンライブラリーを作成した。ここで得られたそれぞれのクローンに対して塩基配列の解析を行い、系統樹を作成した。さらに、

このとき得られた塩基配列から予測される切断位置と、実際に各クローンが示す t-RFLP の結果との比較を行った。

次に、本手法を用いて河川の糞便性汚染状況の評価を行った。評価対象河川として、上流に下水処理場、中流に養豚場、下流に牛の放牧場が存在する札幌市 A 川 (図-1) を選び、サンプリングは 2001 年 9 月 19 日、10 月 18 日、11 月 15 日の 3 回行った。また、河川水は各々のポイントで 50ml 採取し、これを遠心分離によってペレットにしたものに対して、t-RFLP 法を適用した。

Table2 Primers used in this study (5'→3')

Bac32F	AACGCTAGCTACAGGCTT
Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG

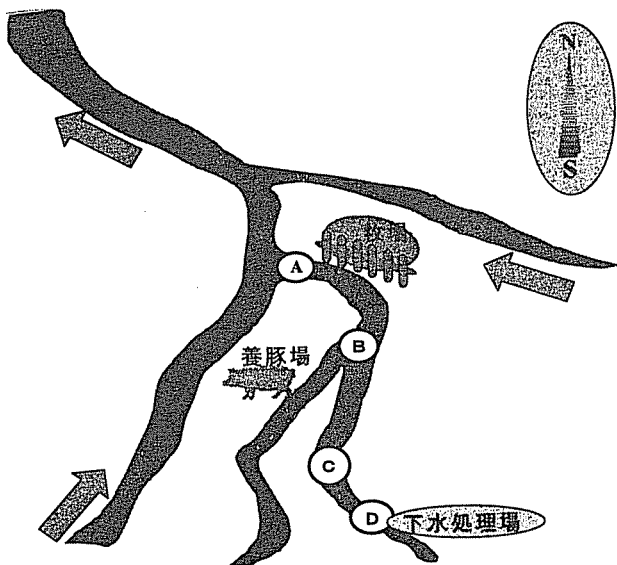


図 1. 調査対象河川 ～札幌市 A 川～

3. 実験結果

ヒト、ウシ、ブタそれぞれの糞便に対して制限酵素 *Aci*I を用いて t-RFLP 法を行った結果を図-2 に示す。ヒトの糞便からはヒト糞便に特異的な 143bp のピークが、ウシの糞便からは 121bp, 139bp, 213bp のピークが、ブタの糞便からは 190bp のピークが得られた。

次に制限酵素 *Hae*III を用いて t-RFLP 法を行った結果を図-3 に示す。ヒトの糞便からは、ヒト糞便に特異的な 117bp のピークが、ウシの糞便

からは 103bp, 225bp のピークが得られたが、制限酵素 *Hae*III を用いた場合には、ブタの糞便に特有と考えられるピークは得られなかった。これらのピークをそれぞれの宿主動物による糞便汚染のマーカーとして用いた。

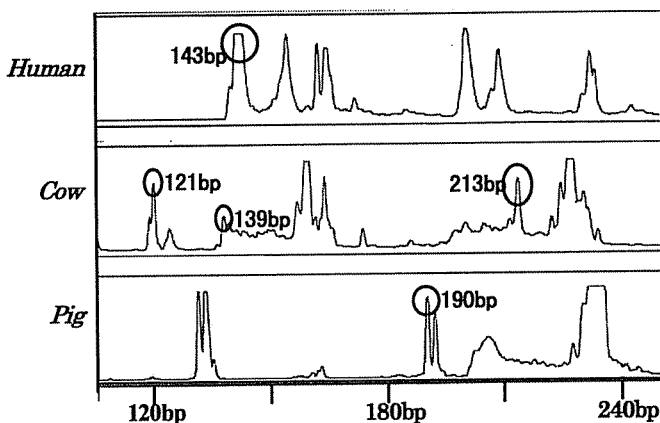


図 2. 各種動物糞便に対する t-RFLP(制限酵素 *Aci* I)

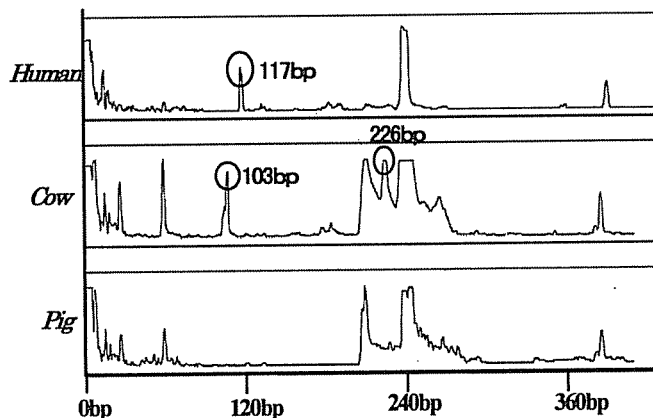


図 3. 各種動物糞便に対する t-RFLP(制限酵素 *Hae* III)

ヒト、ウシ、ブタそれぞれの糞便から抽出した DNA に対しプライマー Bac32F-Bac708R²⁾ を用いて作成したクローンライブラリーの各クローンの塩基配列を解析し、ClustalW および近隣結合法により系統解析を行った結果を図-4 に示す。それぞれの糞便由来のクローンは系統学的に近縁なクラスターを形成しており、それぞれの宿主動物毎に特有の種が存在することが示された。

これらのクローンに対し、直接に t-RFLP 法を適用した結果、塩基配列から予測される t-RFLP

の結果と実際の t-RFLP の結果は 2 bp 以下の誤差で一致し、t-RFLP 法の精度の高さが確認された。さらに、このプライマーで検索されるデータベース³⁾上の各クローンも含め、制限酵素での切断位置を解析したところ、ウシ由来のピークと考えた 5 つのピークと、ヒト由来のピークと考えた 2 つのピークのうち 1 つが、それを生じるであろう塩基配列を持った種であることを特定できた。しかし、ブタ特有のピークを生じる塩基配列を持つ種は見つからなかった。

次に 9 月 19 日の河川サンプルに対する t-RFLP の結果を示す。まず、制限酵素 *Aci* I を用いた結果が図-5 であり、上流の下水処理水放流点 (point D) よりも下流域の河川水 (point C、B、A) から

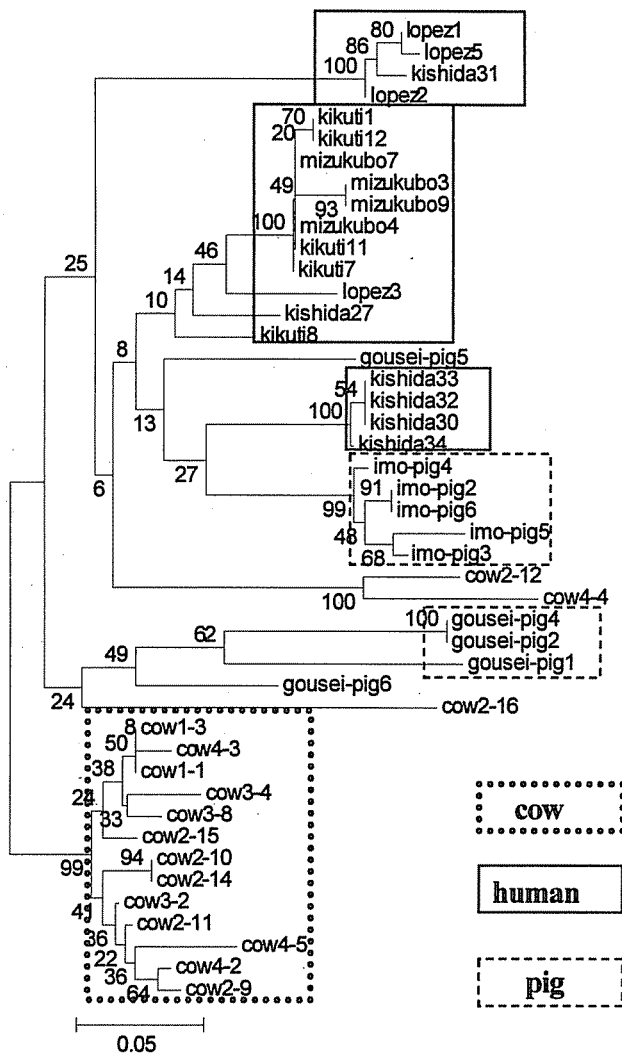


図-4 各動物の糞便から得られたクローンの系統樹

ヒト由来と考えられるピーク (143bp) が検出され、ウシ由来と考えられるピーク (121bp) は牧場付近の河川水(point A)からのみ検出された。

次に、制限酵素 *Hae* III を用いた結果を図-6 に示す。制限酵素 *Hae* III を用いた場合には、上流の下水処理水放流点 (point D) よりも下流域の河川水 (point C、B、A) からヒト由来と考えられるピーク (117bp) が検出され、ウシ由来と考えられるピーク (103bp) は牧場の河川水(point B)からのみ検出された。

しかし、*Aci* I、*Hae* III のどちらの制限酵素を用いた場合にも、養豚場の存在する付近の河川水からブタ由来と考えられるピークは検出されなかった。また、全てのポイントで大腸菌群数は B 類型

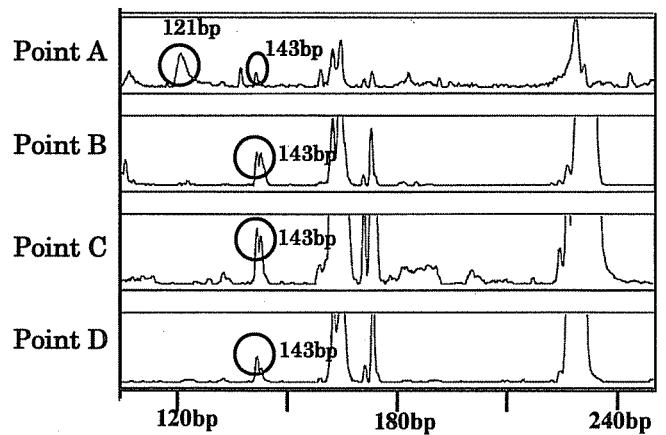


図-6 9月19日の札幌市A川の各サンプリング地点における t-RFLP(制限酵素はHae IIIを用いた)

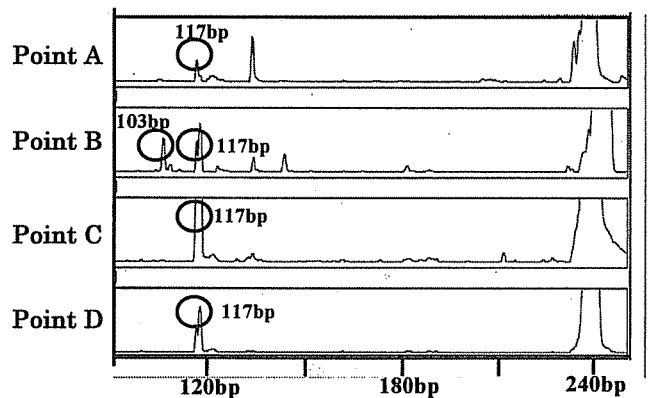


図-5 9月19日の札幌市A川の各サンプリング地点における t-RFLP(制限酵素はAci Iを用いた)

の環境基準値 (5×10^3 MPN/100ml) 以下であった。サンプリングは 3 回行ったが、それぞれ同様の傾向を示した (Table3)。

Table3 各サンプリング時における河川の糞便性汚染状況

9月19日		Cow marker					Human marker		
大腸菌群数 (MPN/100ml)		121	139	213	103	225	143	117	
A	1.1×10^3	+	+	-	-	-	+	+	
B	1.1×10^3	-	-	-	+	-	+	+	
C	26×10^3	-	-	-	-	-	+	+	
D	22×10^3	-	-	-	-	-	+	+	
		Aci I			HaeIII		Aci I		HaeIII

10月18日		Cow marker					Human marker		
大腸菌群数 (MPN/100ml)		121	139	213	103	225	143	117	
A	45×10^2	+	-	-	-	-	+	+	
B		ND							
C	45×10^2	-	-	-	-	-	+	+	
D	1.1×10^3	-	-	-	-	-	+	+	
		Aci I			HaeIII		Aci I		HaeIII

11月15日		Cow marker					Human marker		
大腸菌群数 (MPN/100ml)		121	139	213	103	225	143	117	
A		-	+	-	-	-	+	+	
B		-	+	-	-	-	+	+	
C		-	-	-	-	-	+	+	
D		-	-	-	-	-	+	+	
		Aci I			HaeIII		Aci I		HaeIII

4. 考察

本研究で用いた t-RFLP 法は、そのほとんどが培養の難しい嫌気性菌である腸内細菌に対し、培養を介さない手法であり、培養におけるバイアスがかからず、糞便汚染源を簡便・迅速に特定できるという点では有用な手法であると言える。しかし、本手法により糞便汚染が確認されたとしても、糞便汚染が即病原性微生物による危険性を表しているとは限らない。重要なのは糞便性汚染の程度であるが、本手法は定量性に欠けるという欠点がある。ピークの高さは、ある程度は菌の存在量を反映しているとはいえ、厳密には多くのバイアスがかかっており、ピークの大きさをそのまま存在量と考えることはできない。定量性に欠けるという欠点を克服するためには、それぞれのピークの検出限界を知ることが有効であ

ると考えられる。本研究で用いた *Bacteroides-Prevotella* 以外にも *Bifidobacterium* などの菌に対しても適用することによって、ヒト、ウシ、ブタのそれぞれに特有と考えられるピークを多数用意し、それぞれのピークの検出限界を調べておけば、大雑把ながら糞便汚染の程度を把握することができるであろう。

5. まとめ

(1) ヒト、ウシ、ブタの糞便に含まれる

Bacteroides-Prevotella は宿主毎に系統学的に近縁なクラスターを形成しており、t-RFLP 法によりそれぞれの宿主に特有な菌を検出することで、糞便性汚染の由来を特定できることが分かり、また、新たな糞便性汚染の指標となり得ることが示唆された。

(2) t-RFLP 法は簡便・迅速な手法であり、さらに塩基配列から推測される切断位置と 2 塩基の誤差で t-RFLP 法のピークが確認されたことから、本手法は迅速でかつ正確な手法であることが確認された。

(3) t-RFLP は定量性に欠けるという問題がある。

5. 今後の方針

北海道は酪農業が多く、家畜糞便による河川水や地下水の汚染、水道水への病原菌の混入が深刻化している。本研究では、t-RFLP 法を用いて糞便汚染源を迅速 (1-2 日間程度) に特定できることが確認できた。汚染源を特定できれば、具体的かつ効果的な汚染防止策が立てられる。しかし、面源汚染メカニズムとその実態を把握し、より効果的な汚染源対策を提案するには、糞便汚染源の定量評価が重要でその手法の開発について今後検討する必要がある。

参考文献

- 1) 農林中金総合研究所；畜産環境問題の現状と課題 <http://www.nochuri.co.jp/report/pdf/n9909re3.pdf>
- 2) Bernhard, A. E. and G. F. Katharine 2000. *Appl Environ Microbiol* 66: 1587-1594
- 3) 日本 DNA データバンク: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>