

機関番号：17601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19510089
 研究課題名（和文） 沿岸都市域におけるふん便性細菌の汚染状況の把握と汚染源追跡手法の開発
 研究課題名（英文） Monitoring of fecal bacteria and microbial source tracking in coastal urban area
 研究代表者
 鈴木 祥広（Suzuki Yoshihiro）
 宮崎大学・工学部・准教授
 研究者番号：90 264366

研究成果の概要（和文）：沿岸レクリエーション用水域におけるふん便性細菌の汚染源追跡手法として、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を水環境に適用させ、本手法の有用性を検討した。ふん便汚染の指標細菌である腸球菌種の同定・回収方法から、PFGE法を用いた遺伝子型の解析までの一連の汚染源追跡アプローチ法を確立した。青島海水浴場における実証調査では、大淀川から単離した菌株と青島海水浴場から単離した菌株のPFGE型（DNAフィンガープリント）が非常に高い類似性を示したことから、青島海水浴場には、大淀川を起源とするふん便性細菌が流入していることを推察した。

研究成果の概要（英文）：The PFGE analysis using enterococci is a potential tool for the MST of fecal indicator bacteria that can be applied to the study of the coastal environment. Significance and Impact of the study: This is one of the studies that PFGE was applied to the coastal environment. The approach using PFGE could estimate the river that is source of fecal pollution in Aoshima Beach. By applying PFGE as a tool of MST method, detailed information of fecal pollution in coastal area can be provided.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究代表者の専門分野：環境水質工学

科研費の分科・細目：複合新領域・環境技術

キーワード：沿岸都市域，ふん便性細菌汚染，沿岸域実態調査，腸球菌，汚染指標細菌

1. 研究開始当初の背景

沿岸域には、河川を通じて人間の生活や農業・畜産業、その他の産業活動など、陸域においてさまざまな過程で使用された水が処理され、その一部は未処理のまま流入する。その結果として、汚濁物質、有害物質、あるいは病原性微生物も沿岸域に流入する可能性がある。一方において、沿岸域の一部は、

海水浴場やヨットハーバーなどのレクリエーション用水域として重要な役割を果たしているため、人間が直接的あるいは間接的に汚染物質や病原性微生物に暴露される可能性も否定できない。実際に、近年ではレクリエーション用水域の表層水における高濃度の大腸菌や腸球菌が、遊泳者の胃腸管系疾病の増加に強く関与していることが報告され

ている。このような背景から、沿岸域レクリエーション用水域の公衆衛生や細菌学的安全性を確保するために、遺伝子学的手法や生化学的手法といった種々の手法を用いたふん便性細菌の汚染源追跡に関する研究が積極的に進められている。

2. 研究の目的

先端的な分子生物学的解析手法であるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、同一菌種間の遺伝子構造の比較が可能であり、院内感染における感染経路の追跡標準法として確立されつつある手法である。これまでの研究で著者らは、PFGE 法によって腸球菌の遺伝子型による識別・分類に成功しており、汚染源追跡のツールとして利用できる可能性を示唆している³⁾。本研究では、宮崎市内の青島海水浴場をモデルエリアとして設定し、海水浴場と汚染源となりうる五つの河川から、それぞれふん便指標細菌である腸球菌を単離し、PFGE 法による遺伝子型解析、および系統樹解析によって、ふん便汚染の汚染源となる河川の特定について試みた。

3. 研究の方法

(1) 腸球菌の計数および回収方法

水試料は2009年6月25日に青島海水浴場と、汚染源の可能性のある河川として、大淀川、清武川、加江田川、知福川、ならびに突浪川から採取した。採取した水試料はポリエチレン容器に保存し、実験室に持ち帰ったあと直ちに実験に用いた。ふん便指標細菌である腸球菌の計数はメンブランフィルター法によって行った。水試料をメンブランフィルター (Advantec, 孔径 0.45 μm) を用いてろ過し、フィルターを腸球菌選択培地である mEI 培地にのせ、41±0.5° C で 24 時間培養した。培養後、フィルター上の青色のコロニーを腸球菌として計数した。計数後、mEI 培地上の腸球菌のコロニーは、栄養培地である Todd Hewitt 培地 (Difco, 寒天 1.5%) に釣菌し、37±1.0° C, 48 時間培養したものを腸球菌株として回収した。腸球菌株は、青島海水浴場から 190 株、大淀川、清武川、加江田川、知福川、ならびに突浪川からそれぞれ 70 株を単離・回収し、以降の腸球菌種同定試験に用いた。

(2) 腸球菌種の同定

PFGE 法による同一菌種間の遺伝子型特性を比較するためには、ふん便指標細菌となる菌種を正確に同定する必要がある。本研究では腸球菌の中でも、人畜の腸管内に多く存在しているとされる *Enterococcus faecium* と *E. faecalis* をふん便指標細菌とした。両菌種の同定は PCR 法と生化学性状試験を併用して実施した。はじめに、すべての腸球菌株を

PCR 法によって同定した。PCR 法によって *E. faecium* あるいは *E. faecalis* として同定された菌株は、次いで生化学性状試験、グラム陽性球菌同定キット Api 20 Strep (bioMerieux) によって菌種を確認した。実験方法および手順はキットの使用説明書に従った。PCR 法と生化学性状試験のいずれの試験においても、同一菌種として同定された菌株のみを回収し、PFGE 法による遺伝子型解析を行った。

(3) PFGE 法

PFGE 法による解析は、ジーンパスグループ 1 試薬キット (Bio Rad) を用いて付属のマニュアルに従い、一部改変して行った。各菌株の DNA プラグは、制限酵素 Sma I で消化後、CHEF DR® II (Bio Rad) で電気泳動を行った。電気泳動は、電圧 6V/cm、電場角度 120 度、スイッチタイム 5.3~34.9 秒、および泳動時間 20 時間の条件で行った。泳動後の DNA 断片は画像として取り込み、Gene Profiler (Scanalytics) を用いて解析し、系統樹を作成した。

表 1 腸球菌の計数と腸球菌種の同定結果

採取地点	腸球菌の計数		腸球菌種の同定	
	腸球菌数 (CFU/100mL)	単離株数 (株)	<i>E. faecium</i> (株)	<i>E. faecalis</i> (株)
青島海水浴場	433	190	40	0
大淀川	123	70	19	8
清武川	37	70	13	13
加江田川	29	70	8	8
知福川	16	70	6	0
突浪川	162	70	38	5

4. 研究成果

(1) 指標細菌種の選定

表 1 に PCR 法と生化学性状試験のいずれの試験においても、同一菌種として同定された *E. faecium* と *E. faecalis* の菌株数を示す。青島海水浴場から単離した腸球菌株 190 株のうち、*E. faecium* と *E. faecalis* は、それぞれ 40 株と 0 株同定された。大淀川、清武川、加江田川、知福川、および突浪川において、それぞれから単離した腸球菌株 70 株のうち、*E. faecium* と *E. faecalis* は、それぞれ 19 株と 8 株、13 株と 13 株、8 株と 8 株、6 株と 0 株、および 38 株と 5 株同定された。清武川と加江田川において *E. faecium* と *E. faecalis* が同数であったものの、その他の水試料からは *E. faecium* の方が多く同定された。特に、青島海水浴場において、*E. faecium* が 40 株同定されたのに対して、*E. faecalis* は 0 株であった。したがって、沿岸域におけるふん便汚染の指標細菌種としては、*E. faecium* の方が適当であると判断し、各地点から単離・回収した *E. faecium* 株 (青島海水浴場, 40 株; 大淀川, 19 株; 清武川, 13

株；加江田川，8株；知福川，6株；突浪川，38株）を用いて PFGE 法による遺伝子型の解析を行った。

(2) PFGE 法による遺伝子型解析

PFGE 法による遺伝子型の解析によって，青島海水浴場，大淀川，清武川，加江田川，知福川，および突浪川の *E. faecium* 株は，それぞれ 30 (40株)，19 (19株)，11 (13株)，8 (8株)，6 (6株)，および 12 (38株) のバンドパターンを示した。これらのバンドパターンを用いて系統樹を作成した (図 1)。系統樹において，極めて関連性が高い類似性 0.9 で解析すると，大淀川の遺伝子型 O-3，O-2，および O-13 が，それぞれ青島海水浴場の遺伝子型 A-1，A-28，および A-13 と同じクラスターに分類された。清武川の遺伝子型では，Ki-9 が A-1 と 0.9 以上の類似性を示した。突浪の遺伝子型 Tsu-4 も同様に青島海水浴場の A-1 と 0.9 以上の類似性を示した。しかしながら，突浪の主要な遺伝子型であった Tsu-1 (12株) と Tsu-2 (13株) は，いずれも青島の遺伝子型とは関連性が低かった。加江田川と知福川の遺伝子型はいずれも，青島海水浴場の遺伝子型とは高い類似性を示さなかった。以上の結果から考察すると，大淀川を起源とするふん便性細菌が，青島海水浴場へ流入している可能性が高いことが推察される。また，清武川と突浪川から単離した *E. faecium* 株も青島海水浴場の *E. faecium* 株と高い類似性を示すものがあつたため，これらの二河川も汚染源としての可能性があることが示唆された。青島海水浴場の遺伝子型との類似性が低かった加江田川と知福川は，両河川の腸球菌数を考慮しても (表 1)，青島海水浴場のふん便汚染の汚染源としての可能性は低いと考えられる。以上のことから，PFGE 法を水環境に適用させることによって，沿岸域レクリエーション用水域におけるふん便汚染の汚染源となりうる河川を推定できることが確認された。今後は，汚染源として推定できた河川について，その下流から上流における数地点から *E. faecium* 株を回収し，同様に PFGE 法による遺伝子型の解析をすることで，より詳細に汚染源を特定あるいは推定できるかについて検討することを予定している。

(3) 総括

- ①PCR 法と生化学性状試験による菌種同定によって，沿岸域レクリエーション用水域におけるふん便指標細菌は *E. faecium* が適していることがわかった。
- ②PFGE 法による遺伝子型の解析，および系統樹解析によって，青島海水浴場には大淀川を起源としたふん便性細菌が流入していることが示唆された。

③PFGE 法はふん便汚染源追跡のツールとして利用できる。

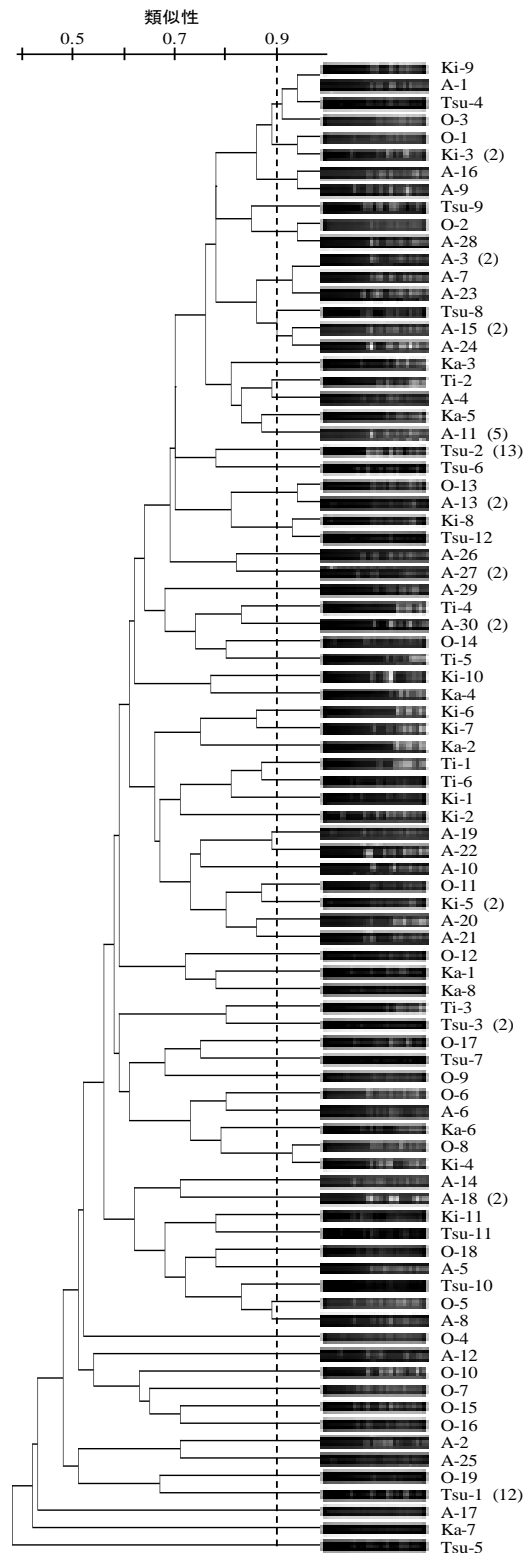


図 1 *E. faecium* の遺伝子型の系統樹
A, 青島海水浴場；O, 大淀川；Ki, 清武川；
Ka, 加江田川；Ti, 知福川；Tsu, 突浪川 (菌
株数, ないものはすべて 1 株)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①古川隼士, 吉田照豊, 鈴木祥広. 2011. 沿岸域から単離した腸球菌の PFGE 法による遺伝子型解析. 環境技術, 査読有, Vol.40, pp.138-143.
- ②Furukawa T, Yoshida T, Suzuki Y. 2011. Application of PFGE to source tracking of fecal pollution in coastal recreation area: A case study in Aoshima Beach, Japan. Journal of Applied Microbiology, 査読有, Vol.110, pp. 688-696.
- ③古川隼士, 田中昭彦, 吉田照豊, 鈴木祥広. 2010. 海水との混合による都市河川水中のふん便性細菌の挙動に関する基礎的検討. 環境技術, 査読有, Vol.39, pp.170-176.
- ④古川隼士, 川畑勇人, 吉田照豊, 鈴木祥広. 2010. 宮崎沿岸都市域のレクリエーションエリアにおけるふん便性細菌の実態調査. 環境技術, 査読有, Vol.39, pp.493-499.
- ⑤Furukawa T, Yoshida T, Suzuki Y. 2010. Biota of fecal bacteria concentrated in the stable foam formed along the water's edge in coastal zones. Bubble Science, Engineering and Technology, 査読有, Vol. 2, pp.25-30.

[学会発表] (計 6 件)

- ①古川隼士, 高見徹, 吉田照豊, 鈴木祥広. 2011. PFGE 法を用いたふん便性細菌の汚染源追跡: 大分県スパビーチにおけるケーススタディ. 平成 22 年度日本水環境学会九州支部研究発表会講演概要集, p.15, 福岡大学.
- ②古川隼士, 川畑勇人, 鈴木祥広. 2010. 沿岸レクリエーション用水域におけるふん便性細菌の実態調査. 第 47 回環境工学研究フォーラム講演集, pp.72-174, 高知大学.
- ③古川隼士, 川畑勇人, 鈴木祥広. 2010. 沿岸レクリエーションにおける細菌学的調査. 平成 21 年度日本水環境学会九州支部発表会講演要旨集, p.12, 北九州市立大学.
- ④古川隼士, 吉田照豊, 鈴木祥広. 2010. PFGE 法を用いた沿岸域レクリエーション用水域のふん便汚染源追跡. 土木学会第 65 回年次学術講演会講演概要集(CD-ROM) VII 部門, pp.363-364, 北海道大学.
- ⑤Furukawa T, Yoshida T, Suzuki Y. 2010. Source tracking of fecal pollution in coastal recreation area using PFGE. Water and Environment Technology

Conference International Forum for Scientists and Engineers, p.46, 横浜国立大学.

- ⑥古川隼士, 吉田照豊, 鈴木祥広. 2009. 河口・沿岸水からの腸球菌の単離・同定に関する基礎的検討. 土木学会第 64 回年次学術講演会講演概要集(CD-ROM) VII 部門, pp.63-64, 福岡大学.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 祥広 (SUZUKI YOSHIHIRO)
宮崎大学・工学部・准教授
研究者番号: 90 264366

(2) 研究分担者

吉田 照豊 (YOSHIDA TERUTOYO)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号: 20240294