

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

(地独)大阪健康安全基盤研究所 生活環境課
肥塚 利江

1. はじめに

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、河川水等には、下水処理場や浄化槽の処理水、動物飼育施設の廃水、また野生動物の排泄物等、ヒトをふくめ種々の動物由来のふん便汚染源があると考えられるが、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となっている。しかし、現在の河川等の環境基準として用いられている大腸菌群や新たに基準として検討されている大腸菌では、ふん便汚染源の推定はできない。

一方、近年、海外では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指標として利用し、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。しかし、国内でこれらの遺伝子マーカーを河川水等の実試料に適用した研究はまだ少なく、淀川を含む関西地区での調査はほとんどなされていないのが現状である。また、このような腸内微生物の遺伝子マーカーでふん便汚染源を推定できるとする根拠は、それらが食事や生理機能の違いにより、人間や動物の腸に特有であるということによっており、海外で有用であったものが国内で有用であるかどうかは不明である。

そこで、淀川支川上流の浄化槽面整備地区を対象にまず、ヒトふん便を含む浄化槽処理水等や野生動物(シカ、イノシシ)のふん便を用いて、ヒトふん便用マーカー2種(ヒト特異バクテロイデスマーカー; HF183/BacR287¹⁾ [以下、HF183]、ヒト特異ウイルスマーカー; *CrAssphage* CPQ_056²⁾ [以下、CPQ_056])、反芻動物特異バクテロイデスマーカー (Bac_R³⁾) およびブタ特異バクテロイデスマーカー (Pig2_Bac⁴⁾ [以下、Pig2]) がそれぞれヒト、シカおよびイノシシのふん便指標として有用か確認した上で、浄化槽処理水流入前後および淀川本流の河川水実試料において、これら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 (All_Bac⁵⁾) の調査を行ったので、報告する。

2. 調査方法

2.1 試料

2.1.1 微生物遺伝子マーカーの有用性確認用試料

各種微生物遺伝子マーカーの有用性確認のために、図1に示す浄化槽面整備地域において、以下の試料の採取を行った。

(1)浄化槽; 2020年5月~11月に浄化槽18基において処理水17試料、流入水10試料を採取した。なお、7基で処理水および流入水各1試料、1基で処理水2試料、流入水1試料を採取したが、同一の浄化槽では同一の結果であったため試料数は18として計

数した。

(2)シカふん；2019年4月、2020年4月および11月に、8試料採取した。

(3)イノシシふん；2020年4月および11月に、5試料採取した。

2.1.2 河川調査用試料

各種微生物遺伝子マーカーの河川水実試料での調査のため、図1に示す浄化槽面整備地域および図2に示す淀川本流において、以下の試料を採取した。

(1)浄化槽面整備地域；この地域は、淀川水系猪名川の支流である箕面川の上流域（図2）の山の頂に位置する約60戸からなる集落で、そのほとんどに浄化槽が設置され、処理水は地区中央を流れる小河川に流入している。採取は、①浄化槽処理水が流入する前で人為的な汚染源のない河川上流および②処理水流入後の河川下流において2020年1月～12月に月1回計12回行った。

(2)淀川本流；三川（桂川・宇治川・木津川）合流後の3地点（Y①枚方大橋、Y②鳥飼仁和寺大橋、Y③豊里大橋）で2020年11月に1回採取を行った。淀川の三川合流点下流域にはいくつかの浄水取水口があり、大阪府や兵庫県の水道水源となっているが、上流三川には下水処理場の処理水が流入している。また、採取3地点には親水公園が整備されており、釣りや水上バイク等のリクレーションにも利用されている。



図1 採水地点（浄化槽面整備地域）

- ①河川上流：浄化槽処理水流入前
- ②河川下流：浄化槽処理水流入後



図2 採水地点（淀川本流）

- Y①：枚方大橋（左岸）
- Y②：鳥飼仁和寺大橋（右岸）
- Y③：豊里大橋（左岸）

2.2 河川水におけるふん便性指標細菌類の測定

上記河川水試料について、大腸菌数および大腸菌群数を測定した。測定法は、ラウリル硫酸 X-GAL・MUG プロス（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）⁶⁾ とし、36°C 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。

2.3 リアルタイム PCR 用試料の前処理

2.3.1 微生物遺伝子マーカーの有用性確認用試料

採取した試料は、浄化槽処理水等については、ウイルスを吸着させるため塩酸で pH を 3.5 とし、直径 47mm、孔径 0.45 μm のセルロース混合エステル製のメンブレンフィルター（メルクミリポア社）でろ過し、ウイルスおよび細菌の同時濃縮⁷⁾を行った。ろ過量は、目詰まりに応じて 10~500ml とした。ろ過フィルターからの DNA 抽出は、環境 DNA 調査・実験マニュアル⁸⁾のグラスファイバーフィルターからの DNA 抽出法に準じて、サリベットチューブ（ザルスタット社）および QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社）を用いて行った。

また、ふん便試料については、約 0.4~1g を 50ml のチューブに入れ、D-PBS(-)を加え、ボルテックスミキサーで攪拌破砕しながら 40ml にメスアップしたのから 200 μl をとり、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社）を用いて DNA の抽出精製を行った。

双方とも最終の DNA 抽出液は 200 μl とした。

2.3.2 河川調査用試料

採取した河川水試料は、浄化槽処理水等と同様、塩酸で pH を 3.5 とし、直径 47mm、孔径 0.45 μm のセルロース混合エステル製のメンブレンフィルターでろ過濃縮後、サリベットチューブおよび QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA 抽出を行った。ろ過量は 500 または 1000 ml とし、最終の DNA 抽出液は 200 μl とした。

2.4 リアルタイム PCR 法を用いた各種微生物遺伝子マーカーの測定

上記 DNA 抽出液を鋳型として、表 1 のプライマーおよびプローブを用いて各種微生物遺伝子マーカーのリアルタイム PCR を行った。PCR 反応液は、Probe qPCR Mix（タカラバイオ社製）12.5 μl 、プライマー各 400nM、プローブ 200nM、DNA 抽出液 5 μl とし、

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 CGCTACTTGGCTGGTTCAG FAM€CATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTBHQ1
HF183/BacR287	Human <i>Bacteroides</i>	ATCATGAGTTCACATGTCCG CTTCCTCTCAGAACCCTATCC FAM€TAATGGAACGCATCCCMGB
CPQ_056	Human <i>CrAssphage</i>	CAGAAGTACAACTCCTAAAAACGTAGAG GATGACCAATAACAAGCCATTAGC FAMAATAACGATTTACGTGATGTAACBHQ1
Bac_R	Ruminant <i>Bacteroides</i>	GCGTATCCAACCTTCCCG CATCCCATCCGTTACCG FAM€TTCCGAAAGGGAGATTMGB
Pig2Bac	Pig <i>Bacteroides</i>	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT ACCTCATACGGTATTAATCCGC FAM€CCACGGGATAGCCMGB

RNase-free Water (タカラバイオ社製) で全量を 25 μl とし、各試料 2 反応ずつ行った。PCR 条件は、95°C 30 秒、95°C 5 秒・60°C 30 秒を 45 サイクルとした。また、標準試料として、1×10¹~1×10⁷ コピー/5 μl 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。リアルタイム PCR 装置は、ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System を用いた。

3. 結果と考察

3.1 各種微生物遺伝子マーカーの有用性

表 2 に各種微生物遺伝子マーカーの有用性確認試料における陽性率および感度、特異度を示す。

感度(真陽性率 ; host sensitivity)および特異度(真陰性率 ; host specificity)は、図 3 に示すように計算され、感度は対象物が含まれる試料を正しく陽性と判定する確率、特異度は対象物を含まない試料を正しく陰性と判定する確率となっている。今回は、ヒトふん便特異マーカーに関しては、浄化槽処理水等を対象物を含む試料、シカおよびイノシシのふん便を対象物を含まない試料、また、反芻動物特異マーカーに関しては、シカふん便を対象物を含む試料、浄化槽処理水等およびイノシシのふん便を対象物を含まない試料とした。なお、ブタ特異マ

		対象物	
		あり	なし
細菌	+	A(真陽性)	B(偽陽性)
	-	C(偽陰性)	D(真陰性)

$$\text{感度(真陽性率)} = A/(A+C)$$

$$\text{特異度(真陰性率)} = D/(B+D)$$

図3 感度および特異度の計算式

表2 各種微生物遺伝子マーカーの有用性確認試料における陽性率および感度、特異度

試料		ヒト特異			反芻動物特異	ブタ特異
		All_Bac	HF183	CPQ_056	Bac_R	Pig2
浄化槽 処理水・流入水	陽性数/試料数	18/18	18/18	8/18	0/18	-
	陽性率(%)	100%	100%	44%	0%	-
シカ糞	陽性数/試料数	8/8	5/8	0/8	8/8	0/6
	陽性率(%)	100%	63%	0%	100%	0%
イノシシ糞	陽性数/試料数	5/5	2/5	0/5	5/5	0/3
	陽性率(%)	100%	40%	0%	100%	0%
感度(%)		100%	100%	44%	100%	-
特異度(%)		-	46%	100%	78%	-

カーである Pig2 に関しては、ブタと分類的には同種であるイノシシのふん便を対象物を含む試料としたが、シカのふん便からはもちろんイノシシのふん便からも検出されず、イノシシのふん便指標としては有用とは考えられなかった。従って、この後の検証および河川水調査においては Pig2 の PCR は行っていない。

その他の結果については、次の通りであった。

①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 (All_Bac) に関しては、全ての浄化槽試料およびふん便試料から検出され、感度は 100% であった。

②ヒト特異マーカーのうち、バクテロイデスマーカーである HF183 は、浄化槽試料全てで陽性となり、感度は 100% であったが、ヒトのふん便が含まれていないはずのシカふんやイノシシふんでも陽性となるものがあり(陽性率は、それぞれ 63% および 40%)、特異度は 46% と低かった。一方、ウイルスマーカーである CPQ_056 は、ヒトのふん便が含まれていないシカふんやイノシシふんからは検出されず、特異度は 100% であったが、ヒトのふん便が含まれているはずの浄化槽試料で検出されないことがあり、感度は 44% であった。

一般的に感度においても特異度においても 80% 以上であれば有用とされ、感度 < 80% であっても特異度 > 90% であれば使用可能であるとされている^{2,9)}。今回の結果では、CPQ_056 では特異度 > 90% で使用可能ということになるが、感度が 44% と低く、陽性を見落とす可能性がある。逆に HF183 は、特異度が低く使用可能な範囲ではないが、感度が 100% であったことから、ヒトふん便汚染の見落としの可能性が低くなると考えられる。従って、これら 2 つのヒトふん便特異マーカーは、併用するのが良いと考えられた。

③反芻動物特異マーカーである Bac_R は、反芻動物であるシカのふん全てで検出され、感度は 100% であった。特異度においては、浄化槽試料からは検出されなかったが、反芻動物ではないイノシシのふん全てから検出され、78% とやや低くなった。しかし、シカおよびイノシシのふん便マーカーと考えると特異度は 100% となる。シカとイノシシの区別はつかないが、ヒトふん便とシカおよびイノシシのふん便の区別はつくことから、今回は、Bac_R は、シカおよびイノシシのふん便のマーカーとして使用した。

3.2 浄化槽面整備地域におけるふん便汚染調査

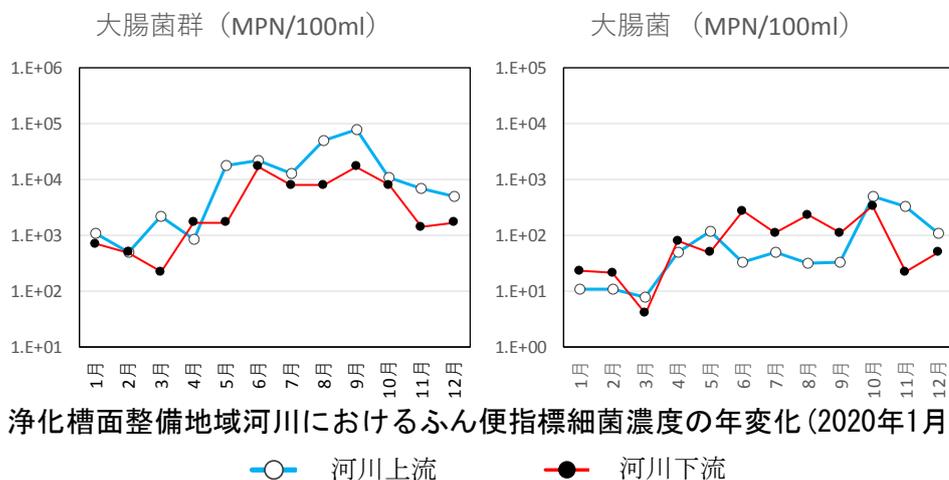


図4 浄化槽面整備地域河川におけるふん便指標細菌濃度の年変化(2020年1月~12月)

○ 河川上流 ● 河川下流

3.2.1 ふん便性指標細菌類

図4に浄化槽面整備地域の河川における大腸菌群数および大腸菌数の年変化を示す。この地域の大腸菌群数および大腸菌数は、河川上流の大腸菌数では顕著ではないが、冬から春先にかけて高く、夏場に低い傾向がみられた。また、河川上流では人為的汚染源がなく、上流と下流の間に浄化槽処理水が流入しているにもかかわらず、特に大腸菌群数で上流が下流を上回る傾向があった。

3.2.2 各種ふん便汚染源追跡指標(微生物遺伝子マーカー)

図5に浄化槽面整備地域の河川における各種微生物遺伝子マーカーの年変化を示す。ヒトを含め動物由来のもの全てを検出する All_Bac においては、上流で $1.2 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ copies/100ml、下流で $4.3 \times 10^5 \sim 5.2 \times 10^6$ copies/100ml の間で推移しており、上記ふん便性指標細菌類のような季節変化は見られなかった。また、常に下流が上流より高い傾向にあった。

シカおよびイノシシふん便を検出する Bac_R においては、上流の1月および12月で検出できなかったが、下流では、年間を通じて検出され、そのコピー数は、上流で $4.7 \times 10^1 \sim 2.2 \times 10^3$ copies/100ml、下流で $4.5 \times 10^2 \sim 3.6 \times 10^4$ copies/100ml であった。Bac_R においても季節的な変化は認められず、また、下流が上流より高い傾向にあった。

ヒト特異マーカーである CPQ_056 および HF183 においては、上流では検出されず、下流では、11月に CPQ_056、5、6月に HF183 が検出されなかったが、その他においては、CPQ_056 で $1.4 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^4$ copies/100ml、HF183 で $1.3 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^3$ copies/100ml の範囲で検出された。また、これらにおいても季節変化は認められなかつ

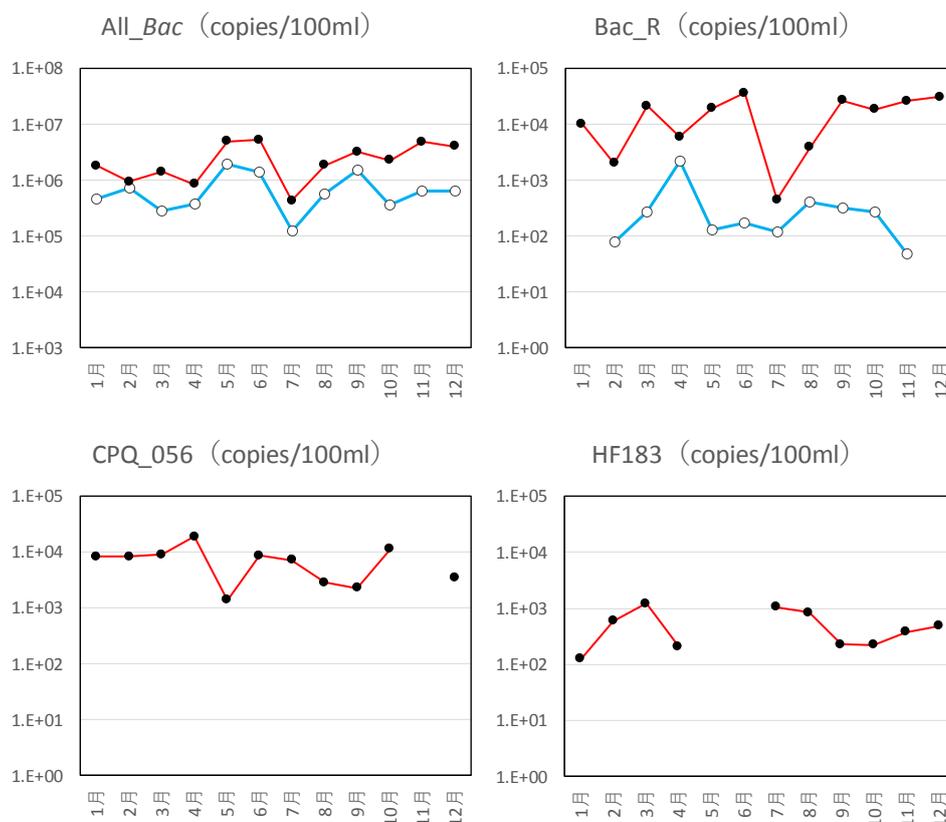


図5 浄化槽面整備地域河川における各種微生物遺伝子マーカーの年変化(2020年1月~12月) ○ 河川上流 ● 河川下流

た。

以上のことから、この地域のふん便汚染は、シカおよびイノシシ等の野生動物とヒト由来のものがあると考えられた。また、ヒト由来のふん便汚染は浄化槽処理水が流入した後にのみ見られ、浄化槽処理水流入の影響がみられた。

また、ふん便性指標細菌である大腸菌群数および大腸菌数では、特に大腸菌群数において冬から春先に低く夏に高い傾向があった。この傾向は、2016年4月～2017年3月¹⁰⁾および2017年9月～2018年8月¹¹⁾の調査でもみられたが、今回、各種ふん便用マーカーではそのような傾向はみられなかった。ふん便性指標細菌類については、大腸菌群には水や土壌等の自然由来の細菌も含まれており¹²⁾、また、大腸菌も含めて環境中で増殖するという指摘もあり¹³⁾、これら指標細菌の季節的変動は、ふん便汚染の変動を表してはいない可能性もあると考えられた。しかし、各種ふん便用マーカーはDNAを標的にしていることから、死菌も検出していると考えられ、さらに、検討が必要であろうと考えられた。

3.3 淀川本流のふん便汚染調査

3.3.1 ふん便性指標細菌類

図6に淀川における2020年11月の大腸菌群数および大腸菌数の値を図4の浄化槽面整備地域の河川における年変化のグラフ上にプロットしたものを示す。

淀川本流における大腸菌群数および大腸菌数は、猪名川支川箕面川上流に位置する浄化槽面整備地域と同様な値であった。

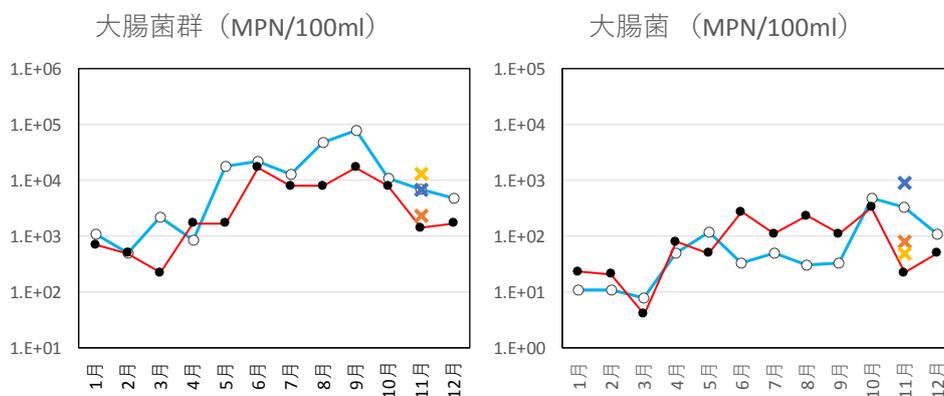


図6 淀川3地点におけるふん便指標細菌濃度(2020年11月)

× 枚方大橋(左岸) × 鳥飼仁和寺大橋(右岸) × 豊里大橋(左岸)
(図4の浄化槽面整備地域のグラフ上に示した ○河川上流 ●河川下流)

3.2.2 各種ふん便汚染源追跡指標(微生物遺伝子マーカー)

図7に淀川における2020年11月の各種微生物遺伝子マーカーのコピー数の値を図5の浄化槽面整備地域の河川における年変化のグラフ上にプロットしたものを示す。

ヒトを含め動物由来のもの全てを検出する All_Bac においては、 $1.3 \times 10^7 \sim 5.7 \times 10^7$ copies/100ml と箕面川上流の浄化槽面整備地域の値 ($1.2 \times 10^5 \sim 5.2 \times 10^6$ copies/100ml) より1～2桁高い値であった。

シカおよびイノシシふん便を検出する Bac_R は、淀川本川では検出されなかった。

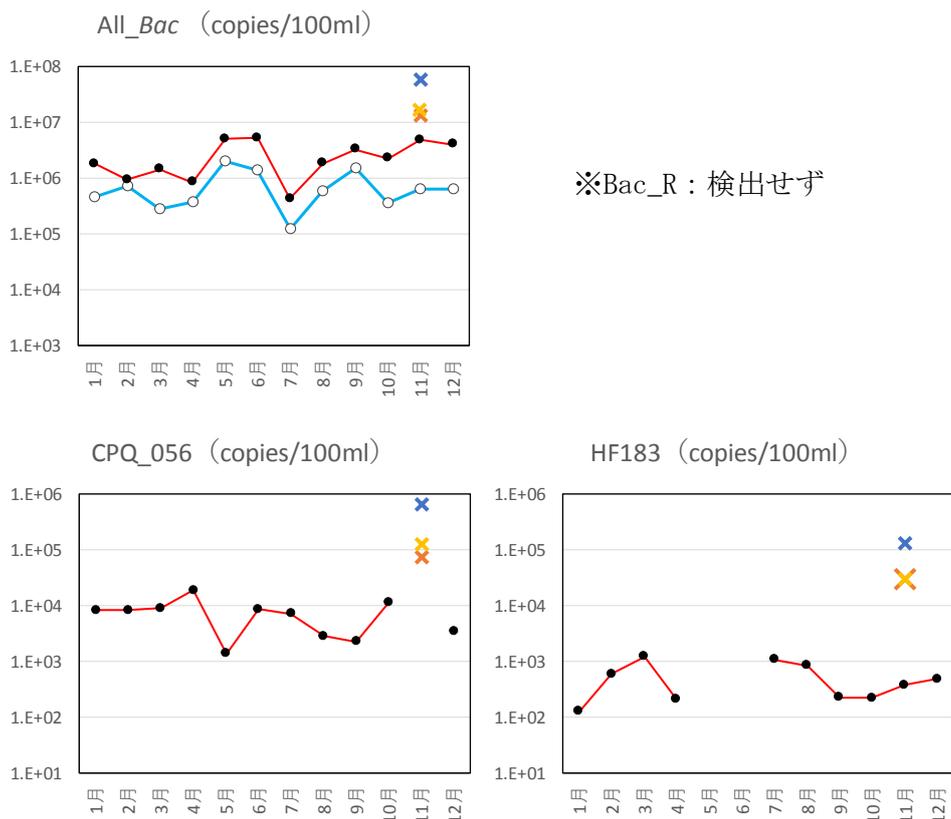


図7 淀川3地点における各種微生物遺伝子マーカーのコピー数(2020年11月)

× 枚方大橋(左岸)
 × 鳥飼仁和寺大橋(右岸)
 × 豊里大橋(左岸)
 (図5の浄化槽面整備地域のグラフ上に示した)
○ 河川上流
● 河川下流

ヒト特異マーカーにおいては、CPQ_056で $7.3 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^5$ copies/100ml と箕面川上流の値 ($1.4 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^4$ copies/100ml) より 1~2桁、HF183で $3.0 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ copies/100ml と箕面川上流の値 ($1.3 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^3$ copies/100ml) より 1~3桁高い値であった。

以上のことから、三川(桂川・宇治川・木津川)合流後の淀川本流のふん便汚染は、微生物遺伝子マーカーから見ると箕面川上流に比べて大きく、また、ヒト由来のものが多いのではないかと考えられた。しかし、大腸菌群数および大腸菌数では、箕面川上流域と同様な値であり、この結果と矛盾する。先にも述べたように、大腸菌群数および大腸菌数は、環境由来のものも含まれる、環境中で増殖する可能性もある等、ふん便汚染を適切に反映していない可能性が、また微生物遺伝子マーカーにも死菌が含まれると考えられ、今後、検討が必要であろうと考えられた。

4. まとめ

4-1. 各種汚染源追跡指標の有用性

- ・ ブタ用マーカー (Pig2_Bac) は、イノシシふんからは検出されず、イノシシ用マーカーとしては使用不可であった。
- ・ 反芻動物用マーカー (Bac_R) は、シカおよびイノシシ用として使用可と考えられた。
- ・ 2つのヒト用マーカー (HF183 および CPQ_056) は、併用するのが良いと考えられ

た。

4-2. 猪名川支川上流域の浄化槽面整備地域の浄化槽処理水流入前後における調査

- ・ この地域のふん便汚染は、野生動物由来およびヒト由来のものであり、浄化槽処理水流入前の上流におけるふん便汚染は、ヒト由来ではなく動物由来のものが大きいと考えられた。
- ・ 大腸菌群数等の季節的変化等は必ずしも、ふん便汚染の多寡を表してはいない可能性があると考えられた。

4-3. 淀川本流の調査

- ・ 淀川本流のふん便汚染は、猪名川支川上流域に比べて大きく、汚染源としてはヒト由来のものが大きいのではないかと考えられた。

5. 謝辞

本研究は、令和2年度 財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の「水質保全研究助成」による援助を受けて実施しました。また、本研究を遂行するに当たり、河川水、浄化槽処理水および流入水の採水また、動物ふん便の採取について豊能町の中野仁氏、百合竜三氏に多大なるご協力いただきました。ここに記して厚くお礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Shanks OC, Kelty CA, Oshiro R, Haugland RA, Madi T, Brooks L, Field KG, Sivaganesan M, Data Acceptance Criteria for Standardized Human-Associated Fecal Source Identification Quantitative Real-Time PCR Methods., *Appl Environ Microbiol*, 82: 2773-2782 (2016)
- 2) Ahmed W, Gyawali P, Feng S, McLellan SL, Host-Specificity and Sensitivity of the Established and Novel Sewage-Associated Marker Genes in Human and Non-Human Fecal Samples., *Appl Environ Microbiol*, 85: e00641-19 (2019)
- 3) Reischer GH, Kasper DC, Steinborn R, Mach RL, Farnleitner AH, Quantitative PCR Method for Sensitive Detection of Ruminant Fecal Pollution in Freshwater and Evaluation of This Method in Alpine Karstic Regions., *Appl Environ Microbiol*, 72: 5610-5614(2006)
- 4) Mieszkin S, Furet J, Corthier G, Gourmelon M, Estimation of Pig Fecal Contamination in a River Catchment by Real-Time PCR Using Two Pig-Specific Bacteroidales 16S rRNA Genetic Markers., *Appl Environ Microbiol*, 75: 3045-3054 (2009)
- 5) 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*, 72: 4214-4224 (2006)
- 6) 下水試験方法 2012年版, 日本下水道協会.
- 7) Ahmed W, Harwood V, Gyawali P, Sidhu J, Toze S, Comparison of Concentration Methods for Quantitative Detection of Sewage-Associated Viral Markers in Environmental Waters., *Appl Environ Microbiol*, 81: 2042-2049 (2015)
- 8) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.1 (2019年4月25日発行) 一般社団法人環境 DNA 学会
- 9) Ahmed W, Hughes B, Harwood VJ, Current Status of Marker Genes of *Bacteroides* and Related Taxa for Identifying Sewage Pollution in Environmental Waters., *Water*, 8: 231

(2016)

- 10) 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
- 11) 肥塚利江：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,(公財)大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成, 平成 29 年度
http://www.daido-life-welfare.or.jp/research_papers/29/welfare_28.pdf
- 12) 水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準の見直しについて (第2次報告案)、中央環境審議会水環境部会生活環境項目環境基準専門委員会、令和3年2月
- 13) 中野仁：浄化槽処理水の大腸菌群と大腸菌の環境中での消長,大阪府立公衆衛生研究所研究報告,54,64-69, (2016)