

【原著】

弘前市周辺の河川等の水系における汚染状況

工藤美里*¹ 吉岡翔*¹ 吉田千賀雄*² 藤岡美幸*³

(2018年12月20日受付, 2019年3月4日受理)

要旨 : 病原微生物に汚染された水の摂取により起こる感染症を水系感染症といい、現在の日本では低頻度ながらも発生の報告がある。本研究では2018年6月から2018年8月にかけて弘前市周辺から採取された河川水20検体を対象として、水系感染症および食中毒の主要な原因菌である *Escherichia* 属, *Campylobacter* 属, *Vibrio* 属について調査した。調査の結果、18検体から *E. coli* が検出された。*E. coli* 未検出の2検体の塩分濃度はいずれも高値を示し、高濃度域での発育抑制が示唆されたが、一方で高濃度で *E. coli* 検出を認めた検体もあったことから、*E. coli* が発育可能な塩分濃度について詳細な調査が必要であると考えられた。また、*E. coli* 検出時における HI プイヨンの前培養温度を 37°C から 40°C へ変更した結果、*E. coli* 検出率が増加したことから、前培養温度は 40°C がより適切であると考えられた。さらに、対象河川水3検体から *astA* 遺伝子を持つ *E. coli* が検出され、河川水を飲むことによる水系感染症発生の危険性が予想された。

キーワード : 弘前市周辺河川, 水系感染症, *Escherichia* 属, *astA* 遺伝子

I. はじめに

病原微生物に汚染された水の摂取により起こる感染症を水系感染症という¹⁾。近年の日本では上下水道の普及に伴い、水系感染症の発生は著しく減少したものの、現在も低頻度ながら発生の報告がある^{2,3)}。我が国における飲料水の汚染事故の主要な原因菌である下痢原性大腸菌およびカンピロバクターによる感染は、井戸水や湧水の飲用によるものが多い^{4,5)}。一方、食品の摂取により発症する食中毒のうち、我が国において主要な原因菌である腸炎ピブリオ⁶⁾は、河口域～沿岸域に存在する⁷⁾。弘前市周辺では河川等の水系汚染について、その調査が積極的に行われていないことから、本研究では、弘前市周辺を中心に河川等の汚染状況を把握するために、河川等の水を対象として、*Escherichia* 属, *Campylobacter* 属, *Vibrio* 属について調査した。

II. 対象および方法

1. 対象河川水

対象は2018年6月から2018年8月までに弘前市、能代市、八戸市および青森市で採取された河川水20検体とした。

2. 方法

1) 採水法

容量 100 mL の滅菌瓶を水中に横向きに入れ、直接採水を行った。採水時には、採水日時および時間、河川名および採水地点名、採水者名、前日および当日の天候、気温および水温、塩分濃度(塩分計, 測定範囲 0~10.00 ppt, ニッコー・ハンセン), pH(pH メーター, 測定範囲-2.00~19.99, アズワン), 試料の外観およびその他の備考を測定し記録した。

2) 採水後の処理

硬質ガラス製ロートおよび定性濾紙 No.2 (ADVANTEC) を用いて検体を濾過したものを濾液検体とした。1.5 mL チューブ3本に濾液検体を1 mL ずつ分注し 3,000 rpm, 5 分間遠心し、上清を捨てた沈渣成分を濃縮検体とした。沈渣量は *Escherichia* 属検査用を 100 μ L, *Campylobacter* 属検査用を 500 μ L, *Vibrio* 属検査用を 100 μ L とした。

3) *Escherichia* 属の検査手順

濾液検体 1 mL を EC ブロス (栄研) 10 mL に接種し、40°C, 24 時間培養した。同時に、濃縮検体 0.1 mL を HI プイヨン (ニッスイ) 2 mL に接種し、37°C (検体 7 以降は 40°C に変更), 24 時間前培養後、HI プイヨン 1 mL を EC ブロス 10 mL に接種し 40°C, 24 時間培養した。その後の手順は共通であり、EC ブロスを EMB 培地 (栄研) に 1 白金耳塗抹し、37°C, 24 時間培養した。EMB 培地上の金属光沢を伴うコロニーは *Escherichia coli* を疑い、*E. coli* 16S rRNA を標的とした PCR を実施した。ここで *E. coli* と同定されたものは、さらに下痢原性大腸菌関連遺伝子を標的とした PCR を実施した。EMB 培地上の金属光沢を伴わない無色透明なコロニーはソルビトールマッコンキー培地 (ニッスイ) に塗抹し、37°C, 24 時間培養した。ソルビトールマッコンキー培地上の無色透明なコロニーは *Escherichia albertii* を疑い、PCR による同定を進めることとした。今回、PCR による同定まで至ったのは *E. coli* のみであったため、

*1 弘前大学医学部保健学科 検査技術科学専攻
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

*2 弘前大学大学院保健学研究科 博士前期課程
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

*3 弘前大学大学院保健学研究科
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-39-5970
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

表1 使用プライマー塩基配列

Target gene	Size(bp)	Primer	Sequence(5' to 3')	Reference
<i>E. coli</i> 16S rRNA	544	ECA 75F	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC	8)
		ECR 619 R	AGGCCCGGGGATTTACATCTGACTTA	
<i>stx1</i>	817	V1	AGTTAATGTGGTGGCGAA	9)
		V5	GACTCTTCCATCTGCCG	
<i>stx2</i>	474	V3	TTCGGTATCCTATTCCCG	9)
		V4	TCTCTGGTCATTGTATTA	
<i>eaeA</i>	454	EA-1	AAACAGGTGAAACTGTTGCC	10)
		EA-2	CTCTGCAGATTAACCTCTGC	
<i>astA</i>	106	EAST-1 S	GCCATCAACACAGTATATCC	10)
		EAST-1 AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC	
<i>bfpA</i>	324	EP-1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	11)
		EP-2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	
<i>aggR</i>	254	AggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	12)
		AggRks2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
<i>elt</i>	130	LT-1	AGCAGGTTTCCCACCGATCACCA	13)
		LT-2	GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	
<i>esth</i>	166	STh-1	CCCTCAGGATGCTAAACCAG	14)
		STh-2	TTAATAGCACCCGGTACAAGC	
<i>estp</i>	186	STp-1	TCTGTATTATCTTTCCCCTC	14)
		STp-2	ATAACATCCAGCACAGGC	
<i>invE</i>	382	EIECI-1	ATATCTCTATTCCAATCGCGT	15)
		EIECI-5	GATGGCGAGAAATTATATCCCG	

実際に使用した *E. coli* 関連遺伝子のプライマー塩基配列を表1に示す。

4) *Campylobacter* 属の検査手順

濃縮検体 0.5 mL をボルトンブイオン (関東化学) 2.5 mL に接種し、ウマ血 150 μ L およびボルトンサプリメント (関東化学) 30 μ L を加え、37°C、24 時間微好気培養 (アネロパック、三菱ガス化学) した。ボルトンブイオンを1白金耳バツラー培地 (関東化学) に塗抹し、37°C、48 時間微好気培養後、培地上のコロニーについてグラム染色を行い、らせん状の陰性桿菌を確認した。その後はオキシダーゼ試験を実施し、陽性の場合には馬尿酸塩加水分解試験¹⁶⁾およびPCRにより種の同定を行った。

5) *Vibrio* 属の検査手順

3%NaCl 加アルカリペプトン水 (ニッスイ) 3 mL に濃縮検体 0.1 mL を接種し、37°C、24 時間培養後、アルカリペプトン水を1白金耳 TCBS 培地 (ニッスイ) に塗抹し、37°C、24 時間培養した。培地上のコロニーについてオキシダーゼ試験を実施し、陽性の場合には PCR により種の同定を行った。

6) PCR

各選択培地上のコロニーを HI 寒天培地に塗抹し、37°C、24 時間分離培養した。培地上の 1 コロニーを TE buffer (pH8.0, 和光純薬工業) 1.0 mL に懸濁し、100°C5 分間加熱後 10,000 rpm で 5 分間遠心した上清をテンプレートとし

た。いずれの遺伝子検索も 1 検体当たりの PCR 反応量は滅菌蒸留水 18.375 μ L、10 \times ExTaqTM buffer (TaKaRa) 2.5 μ L、dNTP mixture (TaKaRa) 1 μ L、10 \times 5 U Ex TaqTM polymerase (TaKaRa) 0.125 μ L、テンプレート 2.5 μ L、25 μ M プライマー各 0.25 μ L とし、全量を 25 μ L とした。PCR の条件は、前熱変性を 94°C1 分間行い、熱変性 94°C1 分間、アニーリング 60°C1 分間、伸長反応 72°C1 分間を 25 サイクル、最終伸長反応を 72°C10 分間行った。PCR 産物はエチジウムブロマイド加 2.5% アガロースゲルにて 100V 30 分間電気泳動 (Mupid-21, コスモバイオ社) を行い、UV 照射にて遺伝子の存在を確認した。

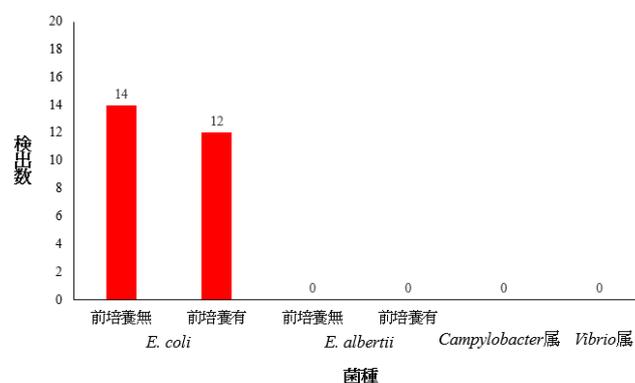


図1 検出結果

表2 各検体の測定結果

検体番号	採水地点	天候		気温 (°C)	水温 (°C)	塩分濃度 (ppt)	pH	<i>E. coli</i>		<i>astA</i> 遺伝子		前培養温度 (HIブイヨン, °C)
		前日	当日					前培養無	前培養有	前培養無	前培養有	
1	弘前市	晴れ	晴れ	24.0	18.0	0.40	8.06	+	-	-	-	37
2	弘前市	晴れ	晴れ	23.0	18.0	0.30	8.12	+	+	-	-	37
3	弘前市	晴れ	晴れ	23.0	18.0	0.30	8.05	+	+	-	-	37
4	能代市	晴れ	晴れ	25.0	21.0	1.00	7.43	+	-	-	-	37
5	八戸市	晴れ	晴れ	28.0	19.0	>10.00	7.84	+	-	-	-	37
6	八戸市	晴れ	晴れ	28.0	23.0	>10.00	7.80	-	+	-	-	37
7	青森市	晴れ	晴れ	23.0	22.5	>10.00	8.07	-	-	-	-	40
8	青森市	晴れ	晴れ	23.0	23.0	>10.00	8.11	-	-	-	-	40
9	青森市	晴れ	晴れ	23.0	25.0	>10.00	8.05	-	+	-	-	40
10	弘前市	晴れ	晴れ	33.0	25.0	0.10	7.47	+	+	-	-	40
11	弘前市	晴れ	晴れ	33.0	23.0	0.40	7.65	+	+	-	-	40
12	弘前市	晴れ	晴れ	33.0	25.0	0.30	7.75	+	-	-	-	40
13	弘前市	晴れ	晴れ	33.0	23.0	0.30	7.58	+	+	-	-	40
14	弘前市	晴れ	晴れ	33.0	23.0	0.30	7.76	+	+	-	-	40
15	青森市	雨	曇り	21.0	20.0	0.40	7.36	+	-	-	-	40
16	青森市	雨	曇り	21.0	19.0	1.00	7.24	-	+	-	+	40
17	青森市	雨	曇り	22.0	19.0	0.10	7.08	+	-	-	-	40
18	青森市	雨	曇り	21.0	17.0	0.10	6.74	+	+	+	+	40
19	青森市	雨	曇り	22.0	17.0	0.10	6.66	+	+	+	-	40
20	青森市	雨	曇り	22.0	17.0	0.10	6.70	-	+	-	-	40

III. 結果

対象河川水全 20 検体から、前培養検体では 12 検体、前培養なしの EC ブロス単独培養検体では 14 検体の *E. coli* が検出された。*E. albertii*, *Campylobacter* 属, *Vibrio* 属は未検出であった (図 1)。各検体の測定結果を表 2 に示す。今回、検体 1~6 までは HI ブイヨンの前培養温度を 37°C に設定していたが、検体 7 以降は 40°C に変更した。*E. coli* 検出率は、前培養温度 37°C の場合の前培養検体では 50%、EC ブロス単独培養検体では 83% であった。また、前培養温度 40°C の場合は前培養検体および EC ブロス単独培養検体ともに 64% であった。さらに、青森市の浅虫海水浴場付近 2

検体からは *E. coli* の検出は認められなかった (図 3)。対象河川水 3 検体のべ 4 検体 (前培養検体 2 検体, EC ブロス単独培養検体 2 検体, うち 1 検体は同一検体) から, *astA* 遺伝子を持つ *E. coli* が検出された (図 2)。

IV. 考察

E. coli の検出法として、検体を EC ブロスに接種し培養後、EMB 培地に塗抹・培養する方法¹⁷⁾が報告されているが、本研究では検体中の菌量が少ない場合の検出率を高めるために、検体を HI ブイヨンで前培養した後に EC ブロスに接種する方法を併用した。*E. coli* 検出率は、HI ブイヨンの前培養温度が 37°C の場合には、EC ブロス単独培養検体が前培養検体よりも高くなった。一方で、HI ブイヨンの前培養温度が 40°C の場合には、EC ブロス単独培養検体と前培養検体とで *E. coli* 検出率は同様であった。このことから、前培養温度が 37°C の場合には、*E. coli* 以外の菌が増殖し、目的とする *E. coli* を検出できない可能性が考えられる。*E. coli* は腸内細菌科の他の菌種と比較して熱に抵抗性を持つ^{18,19)}ことから、*E. coli* 以外の菌を抑制するために前培養温度は 40°C がより適切であると考えられる。また、EC ブロス単独培養と HI ブイヨンで前培養を行う方法のどちらがより適した検査手順であるかについては検討が必要であり、今後検体数をより増やして調査する必要があると思われる。

今回、いずれの検査手順でも *E. coli* が検出されなかった検体は全 20 検体中 2 検体であり、これらの塩分濃度はいずれも 10.00 ppt(1.00%)以上であった。これは、*E. coli* がよく発育する普通寒天培地の塩分濃度 5.00 ppt(0.50%)²⁰⁾の 2 倍以上の値である。仲山²¹⁾によると、*E. coli* は非好塩菌に分

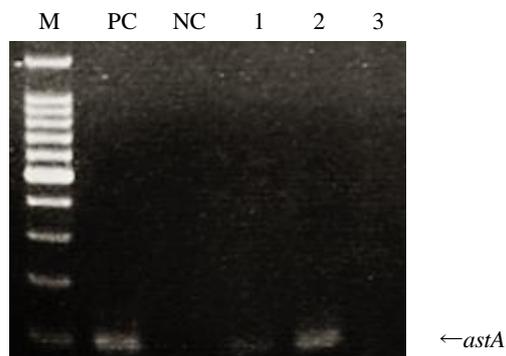


図2 PCRによる遺伝子検索結果の一例

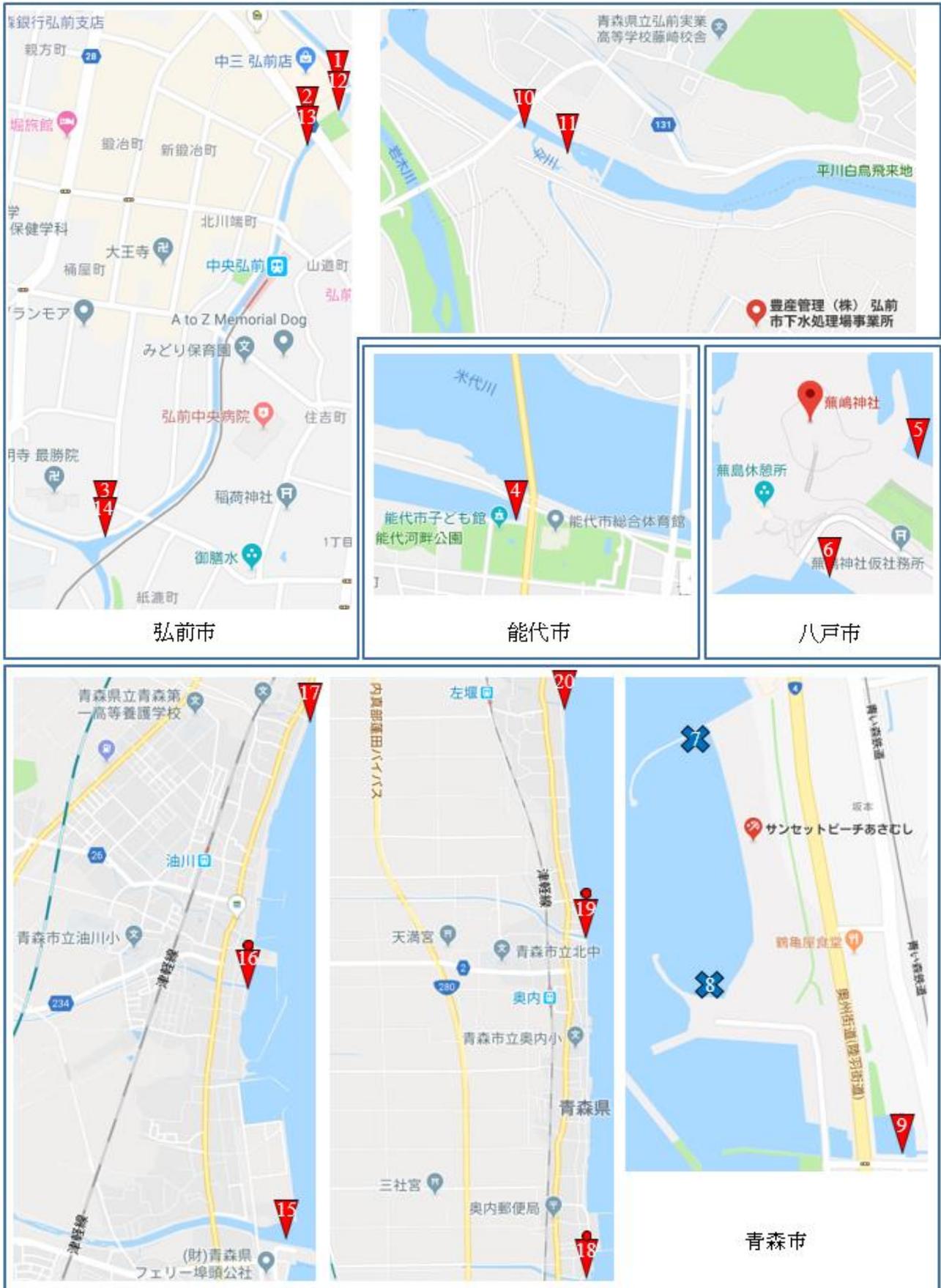
M : Marker (100-bp ladder)

PC : 陽性コントロール (*astA*, 106 bp)

NC : 陰性コントロール

1, 2 : *astA* 陽性株

弘前市周辺の河川等の水系における汚染状況



▼ : *E. coli*検出 ● : *astA*遺伝子検出 ✕ : *E. coli*未検出

Google mapより

図3 各採水地点での *E. coli* 検出結果

類され、塩により増殖が阻害されるが、本研究においても高塩分濃度域での *E. coli* の発育抑制が示唆された。一方で今回、塩分濃度 10.00 ppt 以上で *E. coli* 検出を認めた検体もあった。石田ら²²⁾が人工海水用いて海水環境における *E. coli* の増殖及び耐塩性誘導について調査した研究では、*E. coli* は酵母エキスのような有機物の存在によって耐塩性が誘導され、河口周辺や海水のような高塩分濃度環境に適応することができ、また耐塩性の保持に有効な人工海水の成分を検討した結果、浸透圧を維持する NaCl と Mg イオンおよび Ca イオンの共存が必要であったと報告している。したがって今回高塩分濃度域で *E. coli* 検出を認めた検体では、上記のような有機物やイオンの含有条件が整っていたため、*E. coli* が存在可能であったと推測される。

さらに今回、対象河川水 3 検体のべ 4 検体から *astA* 遺伝子を持つ *E. coli* が検出された。これらは河川水の pH が 6.66~7.24 域で検出され、他水域より低い pH であった。*E. coli* は発育可能な pH 域が pH4~10 であり、さらに低い pH にも抵抗性がある¹⁸⁾とされることから、今回の pH 域について *E. coli* の生育に影響はないものと考えられる。ヒトに下痢症を引き起こす *E. coli* はその病原性の違いから、腸管出血性、腸管病原性、腸管毒素原性、腸管組織侵入性、腸管凝集付着性の 5 種類に大別される⁵⁾。*astA* 遺伝子は耐熱性エンテロトキシン EAST-1 をコードし、腸管凝集付着性の *E. coli* も保有されるが、他の *E. coli* も保有するとの報告もある²³⁾。また健康人から検出されるとの報告²³⁾がある一方で、単独でのアウトブレイクの報告²⁴⁾もある。涌島ら²⁵⁾は、*astA* 遺伝子を持つ *E. coli* が下痢原性を発揮するには、腸管定着因子を併せ持つ必要があり、健康人から検出される場合にはこの定着因子を持たないために、通過菌として作用するのではないかと述べている。また、Vila ら²⁶⁾は *astA* 遺伝子保有菌と下痢症との間に有意な関連性があると報告している。*astA* 遺伝子保有菌による下痢症発生の機序については未だ明らかでない部分も多いが、各下痢原性大腸菌も保有しているとの報告²³⁾もあることから、下痢症に関与している可能性は否定できない。よって、河川水を直接飲用することで、菌量が多数であればもちろん、たとえ微量であっても *astA* 遺伝子保有菌が体内に取り込まれ、単独での増菌あるいは他菌との共生により、水系感染症が発生する危険性が予想された。

今後は河川の上流、中流、下流別検体や、井戸水や湧水由来の検体など、様々な条件下での水系検体を対象に調査を進めることで、弘前市周辺の水系における汚染状況がより明らかになると考えられる。

利益相反 本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

引用文献

- 1) 東京都健康安全研究センター：くらしの健康. <http://www.tokyo-eiken.go.jp/assets/issue/health/05/2-1.html>(2018-11-27)
- 2) 奥沢英一, 濱田篤郎：開発途上国における水系感染症とその実態. *J Natl Inst Public Health*, 49(3):236-244, 2000.
- 3) 金子光美：水の安全性と病原微生物—その歴史と現状、そして未来. モダンメディア [水中の健康関連微生物シリーズ], 52(3):76-83, 2006.
- 4) 厚生労働省：水質汚染事故等の発生状況. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html>(2018-11-27)
- 5) 吉田眞一, 柳雄介, 他：戸田新細菌学. pp214-215, 南山堂, 東京, 2013.
- 6) 岡田淳, 設楽政次, 他：臨床検査学講座 微生物学／臨床微生物学. pp164-166, 医歯薬出版, 東京, 2010.
- 7) 中込治, 神谷茂：標準微生物学. p221, 医学書院, 東京, 2015.
- 8) Sabat G, Rose P, et al.: Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in Soil. *Appl Environ Microbiol*, 66(2):844-849, 2000.
- 9) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の PCR 法による検出. *臨床と微生物*, 18:507-513, 1991.
- 10) Yatsuyanagi J, Saito S, et al.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J Clin Microbiol*, 40(1):294-297, 2002.
- 11) Gunzberg ST, Tornieporth NG, et al.: Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol*, 33(5):1375-1377, 1995.
- 12) Ratchtrachenchai OA et al.: Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. *Buit Dept Med Sci*, 39:211-220, 1997.
- 13) Pollard DR, Johnson WM, et al.: Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28(3):540-545, 1990.
- 14) Schultsz C, Pool GJ, et al.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol*, 32(10):2393-2397, 1994.
- 15) 伊藤文明, 荻野武雄, 他：混合プライマーを用いた PCR による下痢原性大腸菌の病原因子の同時検出法. *日本臨床*, 50:343-347, 1992.
- 16) 藤岡美幸, 大友良光, 他： *Campylobacter jejuni* と *C. coli* を同定する馬尿酸塩加水分解試験に用いる至適菌濃

- 度. 医学検査, 63(2):168-172, 2014.
- 17) 一戸正勝, 金子精一, 他: 図解 食品衛生学実験. p52, 講談社, 東京, 2004.
 - 18) 坂崎利一: 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. p210-297, 中央法規出版, 東京, 2000.
 - 19) Ryan M, Oanh N, et al.: Functional Analysis of Genes Comprising the Locus of Heat Resistance in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 83(20):1400-1417, 2017.
 - 20) 日水製薬製品コード: 普通寒天培地 (顆粒) . <https://cosmokai.com/youran/05514.pdf>(2018-11-27)
 - 21) 仲山英樹: 好塩菌の塩ストレス適応機構とその応用. 生物工学, 90(11):696-700, 2012.
 - 22) 石田昭夫, 上野友美: 海水環境における大腸菌の増殖と耐塩性誘導. Microbes Environ, 11(3):67-72, 1996.
 - 23) 藤岡美幸, 月足正辰, 他: MultiplexPCR を用いた健康人における下痢原性大腸菌の保有状況. 医学検査, 60(6):871-874, 2011.
 - 24) Yatsuyanagi J, Saito S, et al.: Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the astA gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. J Clin Microbiol, 41(5): 2033-2039, 2003.
 - 25) 涌島三津子, 王麗麗, 他: 非定型下痢原性大腸菌について 1 —腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1) 遺伝子保有大腸菌—. 生活衛生, 54(4):271-284, 2010.
 - 26) Vila J, Gene A, et al.: A case-control study of diarrhea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin(EAST-1). J Med Microbiol, 47:889-891, 1998.

【Original article】

**The study of water contamination in the riverine system
around Hirosaki area**

MISATO KUDO^{*1} SHO YOSHIOKA^{*1} CHIKAO YOSHIDA^{*2}
MIYUKI FUJIOKA^{*3}

(Received November 27, 2018 ; Accepted March 4, 2019)

Abstract: Waterborne diseases are caused by intake of water contaminated by pathogenic microorganisms, and at present, outbreaks of waterborne diseases are sometimes reported in Japan. During June 2018 to August 2018, 20 water samples were collected from the rivers around Hirosaki area, and *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., and *Vibrio* spp. that are known to cause waterborne diseases or foodborne diseases were investigated. As a result, *E. coli* was detected from 18 samples, and salinity concentration of 2 samples that did not contain *E. coli* were both over 10.00 ppt. In the progress of detection of *E. coli*, pre-culture temperature was changed from 37°C to 40°C, and detection rate of *E. coli* was increased. Therefore, it is considered that 40°C is much suitable for pre-culture temperature. *E. coli* that harbored the *astA* gene was detected from 3 samples. The *astA* gene is one of the diarrheagenic *E. coli*-related gene, and has been reported to be detected from healthy participants. On the other hand, it has been reported that the *astA* gene causes outbreaks alone, so in this study, it is estimated that intake of these water from the rivers may cause waterborne diseases.

Keywords: Hirosaki area, Waterborne disease, *Escherichia* spp., *astA* gene