

図 8. 各条件浸漬シリコンゴム板付着物の単位面積当たり ATP 値の推移

4. 各試験水の AOC 及び TOC、一般細菌数、従属栄養細菌数

表 10. 各試験水の AOC 及び TOC、一般細菌数、従属栄養細菌数

	AOC (mg/L)	TOC (mg/L)	一般細菌数 (cfu/mL)	従属栄養細菌数 (cfu/mL)
茨城県つくば市水道水	0.032	1.2	不検出	21
茨城県某所温泉水(源泉)	0.022	1.3	不検出	不検出
静岡県・温泉 A(源泉)	0.007	0.4	61	160
静岡県・温泉 B(源泉)	0.008	0.3	不検出	不検出
東京都・温泉 C(源泉)	1.7	28	40	660

菌数の単位は CFU/mL、検出限界は 1CFU/mL として、検出されないものを『不検出』とした。

各試験水の AOC 及び TOC、一般細菌数、従属栄養細菌数の結果を表 10 に示した。AOC 及び TOC と各細菌数との相関は確認されなかった。

AOC 及び TOC が他の 4 種類に比べて高い値を示した東京都・温泉 C を除き、AOC を縦軸に、TOC を横軸にプロットしたグラフを図 9 に示した。検体数が 4 と少ないが、AOC と TOC が比較的の高い相関($R^2=0.8172$)を示していた。今後も検体数を増やして、AOC 及び TOC の相関を確認する必要がある。

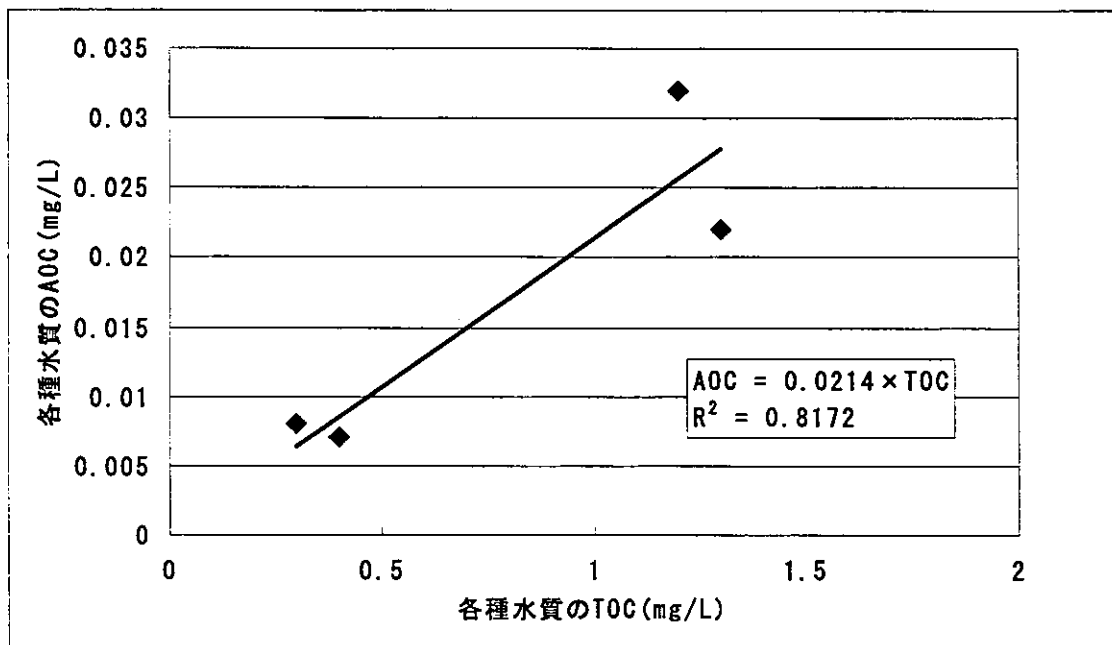


図9. 各試験水のAOC及びTOCの関係グラフ

D. 考察

つくば市水で遊離残留塩素を常時 0.2~0.4mg/L 維持した場合、過マンガン酸カリウム消費量が 35mg/L 程度存在しても微生物類の増殖を効果的に抑制出来る事が明らかとなった。また過マンガン酸カリウム消費量が 35mg/L 存在した条件で塩素剤を添加しない場合には一般細菌や従属栄養細菌の微生物類の増殖が 3~5 日で急激に増殖し、その後 7~14 日の間でレジオネラ属菌及びアメーバ類の大量増殖が確認された。これに対して、同じ殺菌を行わない条件でも、温泉水の場合は一般細菌数、従属栄養細菌数がつくば市水+グルコース 15mg/L の条件と比較して菌数が 2 ないし 3 桁程度低くなっている。また、レジオネラ属菌の増殖の程度は小さく、アメーバ類は定着しなかった。これは、つくば市水と温泉水の水質の違いに起因するものと考えられ、温泉水では塩化物イオン濃度が 6000mg/L と高いことが特徴であるが、どの項目が影響因子かは今後の課題である。

一方、バッチ試験の結果から、塩素剤による殺菌処理を実施しない場合、3 日以内に一般細菌数・従属栄養細菌数が増加し、3~7 日程度で壁面にバイオフィームが形成される事が示された。一旦定着した細菌類や、付着したバイオフィームは 1 ヶ月程度の長期間にわたり、あまり減少することなく維持される。当該実験は屋内で開放状態で行なっており、落下細菌等、各種の微生物の混入が考えられる。今回の試験ではレジオネラ属菌は 49 日間検出されなかったが、屋内であっても試験開始 28 日目にはアメーバ類が検出され始めており、比較的早い時期にレジオネラ属菌の定着し得る条件が設定されていることが示された。

つくば市水と温泉水では全般につくば市水の方が微生物の定着・増殖が容易なことが示された。原因は不明であるが、実験に供した温泉水中の成分物質には微生物の増殖に阻害的に働く物質が含まれている可能性も否定できない。また、有機物として添加したグルコースの効果はつくば市水、温泉水ともほとんど認められなかった。この件に関しては次年度において改めて確認する必要があるものとする。

今回の実験では、レジオネラ属菌の定着状況が循環式とバッチ式の実験条件で異なっていた。すなわち、循環式では塩素添加停止後 2 週間で高い菌数を検出したのに対して、バッチ式では塩素無添加の条件でも 49 日間不検出であった。この理由は明らかではないが、循環式は夏から秋にかけて、バッチ式は冬に実験を実施しており、かなり異なった実験条件といえる。従って、本件に関しては次年度において環境条件や時期を変えて再度実験する必要があるものと考えられる。

シリコンゴム板に付着するバイオフィームは 3~7 日程度で多く生成した。微生物の増殖の程度や、壁面へのバイオフィームの定着の程度は水質により大きく異なるが、グルコース添加はバイオフィーム形成には殆ど影響を与えなかった。

E. 結論

- ・ 本試験の結果から、塩素剤による殺菌処理を実施しない場合には 3 日以内に微生物類による汚染が進行することが示された。
- ・ 水中に浮遊する従属栄養細菌数の測定はその容器の内表面におけるバイオフィーム形成の指標として有用性があるものと考えられた。
- ・ 従属栄養細菌とレジオネラ属菌との数的相関は期待できないが、レジオネラ増殖に好適な環境か否かについての判断材料として用いることは可能と判断された。
- ・ 従属栄養細菌数の測定には時間がかかることから、その代替指標としてシリコンゴム板へのバイオフィーム付着状況を ATP 量として把握することを試みた。本方法は検査法として迅速性・簡便性共に優れており、今後は実機の貯湯槽にシリコン板を挿入・設置して微生物量と ATP 量との相関を検討する予定である。

厚生労働科学研究費補助金 健康科学総合研究事業
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

温水環境における細菌叢の PCR-DGGE 法による解析

主任研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
分担研究者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	福井 学	北海道大学 低温科学研究所
	縣 邦雄	アクアス つくば総合研究所
協力研究者	藪崎 裕昭	アクアス つくば総合研究所
	関根 寛	国立感染症研究所 寄生動物部

概要： 当該研究では、温水環境における微生物学的安全性に係る研究の一環として PCR-DGGE 法による水試料中の細菌叢の解析について検討している。循環式浴槽では濾過層の微生物の繁殖が *Legionella* 属菌の発生と感染事故につながる。*Legionella* 属菌が増殖するには宿主であるアメーバ等原生動物と原生動物を支持する細菌類の繁殖が必要であることがモデル浴槽を用いて実験的に確かめられてきたが、繁殖する微生物の内容については注意が向けられてこなかった。本研究では微生物叢に着目し、*Legionella* 属菌発生に到る微生物叢の挙動の解析を試みた。従来の細菌学的検査は培養法と生化学的性状に基づいて行われてきたが、細菌叢を解析するには多数のコロニーに対する操作が要求され多大な労力が必要であり、温水環境における細菌叢の解析は限られていた。PCR-DGGE 法は GC クランプつきユニバーサルプライマーを用いて PCR と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行い、複数の配列が混在する PCR 産物から塩基配列の違いを 1 つ 1 つのバンドとして分離解析する分子生物学的手法である。これを温水中の細菌群に応用すると、細菌の培養・釣菌・生化学解析を経ることなく、直接的に細菌叢の解析が可能である。本研究では研究を開始するにあたって基礎的資料の集積と応用に向けた泳動マーカーの開発を行なった。あわせて、モデル温水における微生物叢の経時変化を表す DGGE パターンを取得し、微生物叢が変化し続けるものであること、炭素源によって微生物叢に違いが生じることが示された。

A. 研究目的

循環式浴槽は水資源節約の観点から大変効果的といえるが、有機物除去に伴う微生物の繁殖に伴って *Legionella* 属菌が発生するという機能上の矛盾を抱えている。一方、温泉資源は有限であり、循環濾過の利用が続けられている施設は現在も相当数に上るものと予想される。*Legionella* 属菌対策として塩素消毒が行なわれる場合、一見、培養法で検出される *Legionella* 属菌数は確かに抑えられる。しかしながら濾過槽等のバイオフィーム中には *Legionella* 属菌が存在し、事実として PCR 法検査によって死菌が検出されることもあり、塩素消毒が途絶えれば直ちに *Legionella* 属菌の生菌が培養で検出されてもおかしくない状況にある。一方、過当競争が続く入浴施設での設備投資において、例えばバックアップを含む自動塩素注入装置を全ての施設で完備するのは極めて困難であり、マルチプルバリアの発想を取り入れた塩素消毒のみに依存しないレジオネラ対策を用意することが求められていると考えられる。さらに付け加えると、塩素処理が及ばないアメーバ内の *Legionella* 属菌をアメーバごと吸引した場合、高い発症確率と病原性を有することが予想され、単に浴槽水中の濃度だけの問題では無いことが示唆されている。従って、単純に培養不検出で安心するのではなく、循環式浴槽の系全体の *Legionella* 属菌を管理することが必要である。

循環式浴槽における *Legionella* 属菌の発生は機能上避けては通れないことがこれまでの研究で繰り返し喚起され、塩素消毒による安全性の担保が義務化されたが、*Legionella* 属菌の発生の機序に関する研究は限られている。これまでの研究で提言されてきた完全換水や徹底洗浄は、バイオフィームの蓄積を量的に捉えて対策の確立を目指したものと言える。一方、増殖している微生物を質的に捉えた研究も *Legionella* 属菌を理解する上で必要と考えられる。本研究では細菌叢に焦点を当てた後者の研究を行なうことを目的とし、循環式浴槽への PCR-DGGE 法の適用を試みた。

PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction -Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法は染色体 DNA の点変異の検出を目的に開発された方法であったが、Muyzer らが微生物生態学の分野へ適用したことを機にこの分野で急速に普及した (Muyzer ら、1993)。DGGE 法とは DNA 変性剤 (尿素とホルムアミド) の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で核酸の電気泳動を行なうことにより、長さの揃った複数種の 2 本鎖 DNA (ここでは PCR 産物) を、塩基配列の違い (一本鎖に解離し易さ) により分別する方法である。GC クランプ (GC に富む配列) 付きプライマーを用いた PCR により増幅された 2 本鎖 DNA を変性剤の濃度勾配があるゲル中で低濃度側から高濃度側へ泳動すると、変性剤の濃度上昇とともに 2 本鎖 DNA 間の水素結合が分断され 1 本鎖 DNA に解離する。ただし GC クランプ部分は水素結合が強く 2 本鎖が維持されることから、変性した DNA は 3 方向に伸びた形をとる。変性 DNA はゲル内を移動する速度が著しく低下し、その地点で集合してバンドを形成する。塩

基配列が異なれば A-T、G-C 間の水素結合の数と位置の違いから異なる変性剤濃度において解離することから、変性のし易さに応じて異なった位置にバンドを形成する。

PCR-DGGE では微生物の混合試料から核酸を抽出し、PCR で特異遺伝子を増幅し、塩基配列の違いで微生物をバンド1つ1つに分離するものである。これにより微生物の培養過程を経ることなく、一度に複数の微生物を検出することが可能である。培養不能な微生物の検出も可能である。さらに、得られたバンドの遺伝子配列から詳細な解析が可能である。本研究では温水環境の管理と *Legionella* 属菌発生機序の解析に向けた基礎研究として泳動マーカーの開発を行なった。あわせて、モデル温水における微生物叢の変化を経時的に追跡し、微生物叢の質的变化について比較を試みたので報告する。

B. 研究方法

試料採取、濃縮

末端給水栓水は研究所内の蛇口から5分間の捨水後に採水した。蛇口水をビーカーに受けて流水状態を保ち、ビーカーからチュービングポンプにより孔径0.2 μm の混合エステルフィルター（直径142 mm）に約50 Lの水を送水し、加圧濾過した。濃縮後のフィルターをハイブリバッグ（コスモバイオ）に入れ、精製水を適量加え、フィルター表面をバッグ越しになぞり濃縮物を剥離させ、50 ml 遠心管に濃縮物を回収した。

浴槽のバイオフィルムの採取は個人宅で行なった。浴槽の配管を滅菌綿棒でよく拭き、綿棒に付着したバイオフィルムを約5 ml の精製水に懸濁し、全量を核酸抽出に用いた。

モデル浴槽の温水は、基本的に同研究班における縣ら分担研究者により行なわれたポテンシャル実験より得た。すなわち、20 L 強の水道水あるいは温泉水（茨城県石岡市）にグルコース添加の有無の4種類を準備し、これを投げ込み式ヒーターと取り付けたプラスチック槽内（40×20 cm）で加温し、定期的に試料水200 ml を取得した。試料水、温泉水、グルコースは予め高圧蒸気滅菌（121°C、15分）から使用した。蒸発による試料水の減少については、蒸発分に相当する量の滅菌蒸留水を加えることで容量の低下を補った。200 mL の試料水は孔径0.2 μm の PTFE フィルター（直径43 mm）を用いて吸引濾過を行なった。0日目試料については1 L の試料水を用意し、同様に操作した。濃縮後のフィルターをハイブリバッグ（コスモバイオ）に入れ、精製水を適量加え、フィルター表面をバッグ越しになぞり濃縮物を剥離させ、15 ml 遠心管に濃縮物を回収した。

核酸抽出

各試料を遠心濃縮（7,000×G、10分間）して沈渣を得た。これを TE 緩衝液（10 mM Tris - 1 mM EDTA pH8.0）、1 M NaCl、Triton X-100 0.5% で 200 μl に

再懸濁し、75℃で5分間の不活化処理を行なった。続いて Lysozyme を 0.4mg/ml となるよう添加して 37℃で 15 分間細胞壁を溶解し、さらに Proteinase K を 0.1mg/ml となるよう添加して 50℃で 30 分間細胞を溶解した。再度 75℃で 5 分間加温し、Proteinase 阻害剤の PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride、Sigma) を 0.5mM となるよう添加して激しく攪拌した。10,000×G の条件で 1 分間遠心分離し、上清を PCR の鋳型とした。

PCR

PCR は基本的に石井ら (2000) の方法に従った。具体的には GC クランプつきプライマーの GC-341F (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3'、アンダーラインの配列が GC クランプ) と 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT -3'、R=A or G) を用いて PCR を行なった (Muyzer ら、1995)。反応液の組成は表 1 の通りである。反応プログラムは図 1 のとおりに行なった。サイクル数は鋳型量に合わせて計 30 サイクルから 40 サイクルの間で調整し、最も良好な産物が得られるようにした。産物は 2%アガロースゲル電気泳動で確認し、SYBR Gold 染色によりバンドの存在を確認した。

DGGE

泳動装置は D-code DGGE complete system (BioRad) を用いた。変性剤濃度勾配ゲルの作成は基本的に付属の手順書に従った。要点を記すと以下の通りである。20%ならびに 60%のホルムアミド (Sigma) を含む 6%のポリアクリルアミドゲル溶液 (BioRad) を用意し、それぞれに 10%APS を 144ul と TEMED 14.4ul を添加してから濃度勾配作成用の専用注入装置を用いて 2 液を混合しながらゲル板に注入し、4 時間の固化後にゲルを使用した。泳動条件は 1×TAE 緩衝液 (BioRad) 中で 60℃、70V 定電圧とし、16 時間の電気泳動を行なった。泳動後は SYBR Gold (Molecular Probes) で染色し、VisiBlue トランスイルミネータ (UVP) を用いて観察、写真撮影 (Doc-it、UVP)、ならびにバンドの切り出しを行なった。

切り出したバンドはホルムアミドと尿素を除くために 100ul の滅菌精製水ですすぎ、再度 100ul の滅菌精製水で懸濁してから上清 1ul を再 PCR の鋳型とした。産物は再度 DGGE で分離して 1 本のバンドであることを確認した後に塩基配列決定を行なった。分離が不十分であった場合は再度切り出し操作を行なった。

塩基配列決定

PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製した。配列決定用試薬は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1 (Applied

Biosystems)をメーカーの指示に従って用いた。塩基配列決定には ABI 310 (Applied Biosystems) を使用した。取得したデータの処理は SeqManII (Lasergene, DNASTar) を用いた。GenBank データベース上で得られた配列の Blast 検索を行ない、配列がおおむね 98%以上の一致率で種属名が明らかな場合は、試料番号に種属名を併記した。アライメントの作成は PileUp (GCG Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys) を使用した。アライメントの修正ならびに印刷は GeneDoc (Version 2.6, Nicholas et al., 1997) を使用した。系統樹の作成は MEGA2 (Version 2.1, Kumar et al., 2001) を用いて NJ 法で行なった。*Synechococcus elongatus* (GenBank accession no. D83715)、*Microcystis aeruginosa* (AJ133171)、*Anabaena spiroides* (AJ293116) は光合成細菌の分岐を確認するための比較対照として用いた。塩基配列決定のプライマーは前述の 907R と seq20_341f (5'- CCG CCT ACG GGA GGC AGC AG -3') を使用した。

従属栄養細菌の培養による検出

PGY 培地あるいは R2A 培地の寒天平板を用いて各試料水より従属栄養細菌の培養検出を行なった。培養温度は 20°C で 7 日間または 42°C で 2 日間とした。出現したコロニーは形態が異なるものを選択してグラム染色 (ファイバー G セット F、日水製薬) と塩基配列決定に供した。

C. 結果及び考察

マーカー作成

上水、浴槽バイオフィームより鋳型 DNA を得て PCR を行い、いずれも増幅が弱い傾向にあったが、DGGE で複数のバンドを検出することが可能であった (図 2)。DGGE ゲルから個々のバンドを切り出して塩基配列決定を行なった (表 2)。一部空欄が存在するのはバンドの存在に対して塩基配列が報告時点で取得できていないことを意味する。得られた配列の相同性検索の結果を見ると、データベースの登録配列と 100%一致しない配列が多数存在し、生物の多様性を表しているものと考えられた。比較的強いバンドとして現れた B7 と C7 は、由来が異なるが配列は一致しており、風呂バイオフィームとしての共通性が見出された (表 2)。

平行してそれぞれの試料より従属栄養細菌の培養を行った。得られたコロニーを外観から分類し、代表的なコロニーより DNA 抽出と PCR 増幅を行い、塩基配列を得た (表 3、4)。培養から得た塩基配列でもデータベースの登録配列と 100%一致しない配列が多数存在した。PGY 培地での検出では比較的産生色素が強く観察され、R2A 培地に比べて外観の区別がつけやすい傾向に感じられた。

得られた配列からアライメント (図 3) ならびに系統樹を作成した (図 4)。必ずしも DGGE で直接取得された配列と培養法のコロニーから得た配列は完全には一致しないが、近縁の種は分離されており、2 つの方法はおおむね対応

が取れていると考えられた。完全一致しない理由は、生物の多様性が配列取得の頻度をはるかに上回っていることに由来すると推測され、多数の微生物の一括検出を可能とする PCR-DGGE 法の必要性和優位性が改めて認識された。ただし例外的に、培養で検出されなかったグループの存在が認められた (図 4 下部)。A1 の phytoplankton を中心とした集団では培養検出された配列が近傍に存在しないが、近傍に葉緑体 E1、光合成細菌 (*Synechococcus elongatus*、*Microcystis aeruginosa*、*Anabaena spiroides*) が存在し、光合成細菌等生産者が PGY、R2A 培地では検出されないことに対応していると考えられた。また、3 箇所 (A6-A7-A8、B1-B2-B3、C4-C7-C8) で DGGE バンド位置が異なるにもかかわらず完全一致の配列が得られているが、異種複合体 (Hetero duplex) の形成が原因と考えられた。

DGGE は泳動条件の変化がバンド位置に影響を与えるが、比較対照として泳動マーカがあればゲル間での比較が容易になり、加えて既知バンドとの一致による同定判断が可能となる。本研究ではすでに DGGE バンドと塩基配列の対応が蓄積されつつあり、これらを利用して泳動マーカを作成した。マーカ作成に関しては、水道水に係る環境微生物の研究の結果と相互活用を企図しており、その詳細は「最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究」で報告した。概略を記すと、マーカの作成は塩基配列決定用に PCR 増幅されている各バンドを均一な濃度となるように混合することであり、作業としては容易だが、解析には有用である。上水から得たバンドの A1、A5、A7、A9 の 4 本よりマーカセット A、風呂バイオフィルムから得た B2、B4、B5、B7、B8、B9、C11 の 7 本よりマーカセット BD を用意した。今後蓄積される情報を加味してさらに充実させる予定である。

モデル浴槽における解析

縣ら分担研究者の協力の下、水道水と温泉水にグルコース添加の有無で条件を分けた計 4 通りのモデル温水を用意した。経時的に温水を採取して PCR-DGGE 法による微生物叢の推移を追跡した。1 番目の条件では 42°C に加温した滅菌水道水を人の往来がある室内に設置し、落下細菌の増殖が示された (図 5)。0 日目は元来水道水中に含まれていた細菌より得られているパターンであり、1 日目のパターンとは異なっていた。細菌はわずか 1 日で急速に増殖したことが培養で確認されているが、ここで複数のバンドが観察されている。3 日目には菌数がピークに達して以降の菌数に大きな変化は見られていない。3 日目でパターンも安定し、14 日目までは同様のパターンが続いた。その間に新たなバンドの出現と消失も観察され、細菌叢は定常状態には無く変化が続くことが示された。21 日目以降はそれまでとは異なるバンドが強く現れ、14 日目まで主であったバンドが消失し、細菌叢の劇的な交代が観察された。21 日目に強く現れたバンドも 42 日目には強度が低下する一方で別のバンドの強度が上がり、バ

ンドの本数がますます増加して多様になった細菌叢が示されていた。

人の入浴による汚れ負荷を表現する目的で水道水にグルコースを添加し、同様の追跡を行なった（図 6）。1 日目では水道水のみ条件（図 5、0 日目）と比較してバンドの本数が減少した。バンドの位置も異なっており、グルコースに親和性の高い細菌が優先的に増殖したものと考えられた。このバンドは5 日目をピークとして強度が減少し、変性剤濃度の低濃度側に強くバンドが現れた。水道水のみ条件と比較して菌叢の交代する時期が早まり、バンドの本数も乏しかった。試料水中の主要な炭素源が異なったことが反映されたと考えられ、モデル浴槽には本当の人の汚れを使用する必要性が示唆された。

温泉水を用いた場合では水道水の 2 条件とは異なるパターンが取得された（図 7）。炭素源や塩濃度の違いに従い、生育環境に適した細菌が優先的に増殖したと考えられた。追跡は 30 日目まで行なったがバンドの消長は比較的緩やかで、劇的な変動を見せた水道水の場合とは対照的であった。それでも 7 日目から徐々に現れ始めて 21 日目に強度がピークに達するバンドの挙動に合わせ、他のバンドが緩やかに消失していく様子が伺えた。

一方、温泉水にグルコースを添加した条件ではバンドの多様性が乏しく、変性剤低濃度側のバンドが強く現れており、主要となる炭素源の変化に従って菌叢の偏りが生じたものと考えられた（図 8）。しかし 30 日目ではほとんどのバンドが再び現れるようになったことから、種々の細菌が淘汰されてバンドが完全に消失するのではなく、多様性が常に増加する方向で安定して菌類が共存していると考えられた。

以上のことは温水中の細菌が基本的な生態学に従っていることを示唆しており、炭素源等環境に適した細菌が優先的に増殖すること、菌叢が常に変化し続けること、系に入った細菌は完全に淘汰されずに残ることが温水環境の試料を用いて明らかとなった。今後は実際の循環式浴槽に近い環境を有するモデルを用いて実験することが課題となった。なお偶然であるが、これらのモデル温水 100ml 中に *Legionella* 属菌が検出されなかった。細菌叢と *Legionella* 属菌の間に親和性の有無が存在することが考えられ、*Legionella* 属菌が発生する細菌叢との比較も検討したい。

D. 結論

循環式浴槽等温水環境への PCR-DGGE 法の応用による細菌叢の解析は可能であり、従来とは種類が異なる情報が得られつつある。従属栄養細菌の培養から得た配列と PCR-DGGE 法で得た配列はおおむね一致し、系統樹の上で同じ場所に位置した菌株が複数存在したことから、検出される細菌が大きく乖離することはないと考えられた。PCR-DGGE 法は多様な細菌叢を質的に解析する能力に優れているが、一方で用いる温水の初期条件に大きな影響を受けたことが

本研究で示され、実際の人の汚染が負荷された温水を用いての検討が必要と考えられた。

E. 参考文献

遠藤卓郎ら、厚生労働科学研究費補助金がん予防等健康科学総合研究事業「最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究」より分担研究報告書「水道における PCR-DGGE 法適用に向けた泳動マーカーの開発」、平成 16 年度

遠藤卓郎ら、厚生労働科学研究費補助金がん予防等健康科学総合研究事業「温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究」より総合研究報告書、平成 15 年度

遠藤卓郎ら、厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究「循環式浴槽システムにおける微生物管理手法に関する研究」研究報告書、平成 14 年度

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Mar;59(3):695-700.

石井浩介、中川達巧、福井 学(2000)微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用. *Microbes and Environments* 15: 59-73.

Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol.* 1995 Sep;164(3):165-72.

Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14
(<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>)

Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Ingrid B. Jakobsen, and Masatoshi Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics* Vol. 17, 12:1244-1245.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

泉山信司、八木田健司、下河原理江子、朝倉登喜子、遠藤卓郎、温水環境より分離した *Naegleria* 属アメーバの遺伝子型別、日本寄生虫学会、平成 16 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 PCR反應液組成

滅菌蒸留水	76.5 ul
10×Ex Taq緩衝液	10
dNTP (2.5 mM each)	10
Primer 1 (25pmol/ul)	1
Primer 2 (25pmol/ul)	1
鑄型DNA	1
Ex Taq (5U/ul)	0.5
計	100

表 2 PCR-DGGE 塩基配列決定

バンドNo.	Blast serch による相同性検索	相同性		
		一致率	Identities	Gaps
A1	phytoplankton ESR 3	99%	556/559	2/559
A2				
A3				
A4				
A5	Uncultured bacterium DSSD8、Uncultured bacterium DSSF72、 Uncultured bacterium HOCiCi7	99%	523/524	-
A6	Uncultured bacterium HOCiCi51、Uncultured bacterium HOCiCi9	95%	503/528	-
A7	Uncultured bacterium HOCiCi51、Uncultured bacterium HOCiCi9	95%	503/528	-
A8	Uncultured bacterium HOCiCi51、Uncultured bacterium HOCiCi9	95%	503/528	-
A9	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs272, ccs296, ccs2105, Beta proteobacterium AC1, Uncultured beta proteobacterium clone FTLpost11	100%	527/527	-
B1	Bacterium 364	95%	512/535	-
B2	Bacterium 364	95%	518/541	-
B3	Bacterium 364	95%	518/541	-
B4	Uncultured bacterium DSSD30	99%	526/528	-
B5	Uncultured alpha proteobacterium clone CLi292, Glacial Ice bacterium M3C1.8K-TD9, Uncultured bacterium DSSF16, HOCiCi46, Blastbacter sp.SMCC B0477, Erythromonas ursincola, Sphingomonas natatoria	100%	524/524	-
B6				
B7	Bromate-reducing bacterium B7, Uncultured bacterium clone L11, Acidovorax sp. DW126	100%	548/548	-
B8	Beta proteobacterium A0647, Pseudomonas saccharophila	99%	522/525	-
B9	Uncultured bacterium DSSF51	99%	523/524	1/524
C4	Bromate-reducing bacterium B7, Uncultured bacterium clone L11, Acidovorax sp. DW126	100%	548/548	-
C5				
C7	Bromate-reducing bacterium B7, Uncultured bacterium clone L11, Acidovorax sp. DW126	100%	548/548	-
C8	Bromate-reducing bacterium B7, Uncultured bacterium clone L11, Acidovorax sp. DW126	100%	540/540	-
C9	Bromate-reducing bacterium B7, Uncultured bacterium clone L11, Acidovorax sp. DW126	99%	537/538	1/538
C10				
C11	D. proteolyticus	95%	507/533	-

表3 培養で検出したコロニーの形態

検体名	検体種別	採集箇所	培地種	培養温度 (°C)	コロニーの特 徴		色調	形	隆起状態	周縁	表面の形状 等	透明度	粘稠度	その他の特 徴	備考
					直径(mm)	直径(mm)									
2001	蛇口水	研究所	PGY	20	0.5	0.5	橙色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	周縁は無色 透明	
2005	蛇口水	研究所	PGY	20	0.5	0.5	桃色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	周縁は無色 透明	
2009	蛇口水	研究所	PGY	20	0.5	0.5	白色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	周縁は無色 透明	
2021	蛇口水	研究所	PGY	20	0.7	0.7	黄色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	周縁は無色 透明	
2028	蛇口水	研究所	PGY	20	1.5	1.5	黄白色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	粘稠性	周縁は無色 透明	
2038	蛇口水	研究所	R2A	20	1.0~3.0	1.0~3.0	白色	円形	扁平状	波状	ラフ	不透明	乾燥状		
3001	風呂ハイア7ilA	S 個人宅	PGY	42	0.5	0.5	黄色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	周縁は無色 透明	
3010	風呂ハイア7ilA	S 個人宅	PGY	42	-	-	無~灰白色	不規則状	扁平状	全縁	スムーズ	透明	バター様		
3012	風呂ハイア7ilA	S 個人宅	PGY	42	-	-	無~灰白色	不規則状	扁平状	全縁	スムーズ	透明	バター様		

3015	風呂ハイタイプ	S	個人宅	PGY	42	0.8白色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	
3019-1	風呂ハイタイプ	S	個人宅	R2A	42	2.0~4.0白色	円形	半レンズ状 扁平状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	3023 に近似
3019-2	風呂ハイタイプ	S	個人宅	R2A	42	0.8白色	円形	半レンズ状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	3023 に近似
3023	風呂ハイタイプ	S	個人宅	R2A	42	2.0~4.0白色	円形	半レンズ状 扁平状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	
3027	風呂ハイタイプ	S	個人宅	R2A	42	0.2檸檬色	点状	半球状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	
3030-1	風呂ハイタイプ	I	個人宅	PGY	42	無色	不規則状	扁平状	全縁	スムーズ	透明	バター様	
3030-2	風呂ハイタイプ	I	個人宅	PGY	42	2.0白色	円形~不規則状	不規則状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	同縁は無色 透明
3054-1	風呂ハイタイプ	I	個人宅	R2A	42	0.1微白色	円形	半球状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	
3054-2	風呂ハイタイプ	I	個人宅	R2A	42	2.0微白色	円形~不規則状	不規則状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	
3105	風呂ハイタイプ	S	個人宅	R2A	42	0.1薄桃色	点状	半球状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	
3112-1	風呂ハイタイプ	I	個人宅	PGY	42	2.0白色	円形~不規則状	不規則状	全縁	スムーズ	半透明	バター様	3030-2 に近似
3112-2	風呂ハイタイプ	I	個人宅	PGY	42	微白色	不規則状	扁平状	全縁	スムーズ	透明	バター様	同縁は無色 透明

表 4 培養で検出したコロナーのグラム染色像と塩基配列決定

検体名	検体種別	グラム染色	グラム染色像による形態区分	基本的形態	配列様式	その他の特徴	Blast serch による相溶性検索	相同性	
								Identities	Gaps
2001蛇口水		-	桿状菌	短～細長い桿状			Porphyrobacter sp. KK351, KK348	100.0%527/527	-
2005蛇口水		-	桿状菌	細長い桿状		中央部に空洞	Uncultured bacteriu clone FB45-10, Methylobacterium sp.G296-5,BF15,PC30,etc	100.0%523/523	-
2009蛇口水		-	桿状菌	細長い桿状			Actinobacterium PL_GH1.1.B5, Mycobacterium sp. BPC5, M. mucogenicum strain ATCC49650, M. ratisbonense (Reverse のみの結果)	99.4%507/510	2/510
2021蛇口水		-	桿状菌	球桿～短桿状			Uncultured alpha Proteobacteriu, Sphingomonas sp. Oral clone AV069, Pseudomonas sp. RM2-2001 (Reverse のみの結果)	98.8%512/518	-
2028蛇口水		-	桿状菌	細長い桿状			Uncultured alpha Proteobacteriu, Sphingomonas sp. Oral clone AV069, Pseudomonas sp. RM2-2001 (Reverse のみの結果)	100.0%523/523	-
2038蛇口水		-	桿状菌	細長い桿状			Actinobacterium PL_GH1.1.B5, Mycobacterium sp. BPC5, M. mucogenicum strain ATCC 49650, M. ratisbonense (Reverse のみの結果)	100.0%531/531	-

3001	風呂ハイツ	-	桿状菌	細長い桿状	フライメント	Bacterium 364	95.9%	534/557	-
3010	風呂ハイツ	-	球菌	不規則な塊		Acinetobacter sp., Acinetobacter baumannii	100.0%	565/565	-
3012	風呂ハイツ	-	球菌	不規則な塊		Acinetobacter sp., Acinetobacter baumannii	99.8%	572/573	-
3015	風呂ハイツ	-	桿状菌	球桿～短桿状		Pseudomonas saccharophila, Beta proteobacterium	99.5%	557/560	-
3019-1	風呂ハイツ	-	桿状菌	細長い桿状	フライメント	Bromate-reducing bacterium B7, Uncultured bacterium clone L11, Acidovorax sp. DW126	100.0%	551/551	-
3019-2	風呂ハイツ	-	桿状菌	球桿～短桿状	中央部に空胞	Beta proteobacterium A0647, Pseudomonas saccharophila	99.2%	525/529	1/529
3023	風呂ハイツ	-	桿状菌	細長い桿状	フライメント	Uncultured bacterium clone L11、Bromate-reducing bacterium B7, Acidovorax sp. DW126	100.0%	565/565	-
3027	風呂ハイツ	-	桿状菌	細長い桿状		Uncultured bacterium clone EACUL1A4	96.7%	520/538	1/538
3030-1	風呂ハイツ	-	桿状菌	細長い桿状					
3030-2	風呂ハイツ	-	桿状菌	短～細長い桿状					
3054-1	風呂ハイツ	-	桿状菌	短～細長い桿状					

3054-2	風呂ハイイ7/ルム	-	桿状菌	球桿～短桿状					
3105	風呂ハイイ7/ルム	-	桿状菌	細長い桿状	Uncultured bacterium DSSF51 (Forward のみの結果)	99.6%520/522			-
3112-1	風呂ハイイ7/ルム	-	桿状菌	細長い桿状					
3112-2	風呂ハイイ7/ルム	-	桿状菌	短～細長い桿状					

1 cycle		
94°C	5 min.	
80°C	1 min.	ここでEx Taqを各チューブに添加
65°C	1 min.	
72°C	3 min.	
↓		
19 cycle		
94°C	1 min.	
64°C	1 min.	(1°C/cycleの温度低下設定による
72°C	3 min.	タッチダウン法を実施)
↓		
10 cycle		サイクル数を10から25で調整
94°C	1 min.	
55°C	1 min.	
72°C	3 min.	
↓		
1 cycle		
72°C	7 min.	
15°C	∞	

図1 PCRプログラム