

第 227 回雑誌会

(Sep. 1, 2015)

(1) 多摩川の大腸菌群の遺伝子解析

和波 一夫, 石井 真理奈, 木瀬 晴美

東京都環境科学研究所年報 **39**, 20-30 (2010).

レビュー：太田 優治

現在, 環境基本法における水質汚濁の環境基準項目は, 大腸菌群であり, BGLB 最確数法 (BGLB 法) によって測定している。しかし, BGLB 法はふん便指標細菌の他に, 自然由来の菌種も測定している可能性が指摘されている。また, 公共用水域における大腸菌群の菌種は, 十分に把握されていないのが現状である。そこで本研究では, 分子生物学的手法を用いて大腸菌群の菌種の推定を行った。調査は, 下水処理場放流水が流入していない和田橋 (青梅市和田 2 丁目), 日野用水堰 (八王子市平町) および H 下水処理場放流水路 (八王子市小宮町) の計 3 地点を対象とし, 2009 年 9 月から 11 月の間に月 1 回実施した。測定は BGLB 法と特定酵素基質培地法 (ONPG-MUG 法) で行い, 陽性反応を示した培養液を PCR-DGGE 法の試料として用いた。また, PCR-DGGE 法によって得られた増幅産物について塩基配列の解読を行い, 菌種の同定を行った。

和田橋と日野用水堰の大腸菌群数は, それぞれ $4.6 \times 10^2 \sim 7.9 \times 10^3$ (MPN/100ml) と $2.4 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$ (MPN/100ml) であり, 環境基準 (50MPN/100ml 以下) と比較して, それぞれ 9~98 倍と 0.7~2.6 倍の高い値を示した。また, BGLB 法と ONPG-MUG 法から検出された細菌について菌種同定を行った結果, 合計 40 種の菌種が同定された。その内, ふん便性の菌種である *Citrobacter braaki* は, 全地点において検出された。非ふん便性の菌種と推定された菌種は 9 種 (*Aeromonas hydrophila*, *Erwinia carotovora*, *Kluyvera intermedia*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium cypripedii*, *Pseudomonas gessardii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yokenella regensburgei*) であった。擬陽性の反応を起こす *Aeromonas hydrophila* は, BGLB 法で検出されたが, ONPG-MUG 法では検出されなかった。その一方で, ONPG-MUG 法では *Erwinia carotovora* と *Pectobacterium carotovorum* の 2 種類が多く検出された。そのため, BGLB 法と ONPG-MUG 法の大腸菌群数が大きく異なる場合, 菌種構成による影響を受けている可能性が考えられた。また, 9 月, 10 月および 11 月の調査における非ふん便性菌種数は, それぞれ 1~4 種, 0~2 種, 2~4 種であり, 各月によって菌種の構成は異なった。以上のことから, BGLB 法と ONPG-MUG 法で検出される細菌は, ふん便由来ではない菌種も存在することが明らかとなり, その中でも *Aeromonas hydrophila* が最も多く検出された。

(2)オゴノリ類 6種の成長と生残に及ぼす温度, 光量, 塩分の影響

馬場 将輔

海生研研報 20, 41-56 (2015).

レビュー: 中田 光紀

紅藻オゴノリ類は, 熱帯から温帯の浅海域に広く生息し, 全世界で採藻, 養殖が実施されている。国内では, オゴノリ類に及ぼす環境要因 (水温, 光量, 塩分) の影響について, それぞれ室内培養実験が実施されている。しかしながら, これらの実験の多くは, 単一の環境要因について検討したものであり, 複合要因の影響を調査した実験は少ない。そこで本研究では, オゴノリ類 6種の生長と生残に及ぼす水温, 光量, および塩分の影響を室内培養によって調査した。供試生物は, クビレオゴノリ, シラモ, カバノリ, ツルシラモ, オゴノリ, セイヨウオゴノリとし, 実験室内で培養した藻体を試験に使用した。生長に及ぼす水温の影響は, 10, 15, 20, 25, 30, 32, 34, 36, 38°C の 9 条件とし, 20 日培養後の日間生長率から評価した。また, 生残に及ぼす水温の影響は, 32~37°C の 6 段階とし, 10 日間の通気培養後の生死を判別して評価した。光量の影響は, 水温 20°C の一定とし, 40, 80, 120, 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の 4 条件における 20 日間培養後の日間生長率を求めて評価した。さらに, 生長に及ぼす水温と塩分の影響は, 水温 15, 20, 25, 30, 34°C と塩分 8, 16, 24, 32 psu を組み合わせた 20 条件で 20 日間培養し, 日間生長率から評価した。生残に及ぼす水温と塩分の影響は, 水温 10, 15, 20, 25, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40°C と塩分 8, 16, 24, 32 psu を組み合わせた 44 条件において 4 日間培養後の生残率から評価した。

オゴノリ類各種の生長適温と生育上限温度は以下の通りであった: クビレオゴノリ, 25°C と 34°C; シラモ, 20~25°C と 33°C; カバノリ, 20~25°C と 34°C; オゴノリ, 20~25°C と 36°C; ツルシラモ, 20°C と 34°C; セイヨウオゴノリ, 15~20°C と 34°C。光量の影響を検討した結果, オゴノリの日間生長率は, 他のオゴノリ類 5 種と比較して 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ で有意に高く, 全 6 種の中で唯一, 光量の増加に伴って日間生長率も増加する傾向を示した。次に水温と塩分の複合影響を検討した結果, 日間生長率が有意に高くなる水温と塩分は以下の通りであった: クビレオゴノリ, 25°C と 32 psu; オゴノリ, 20°C と 16~32 psu; その他 4 種, 20°C と 32 psu。さらに, 異なる水温と塩分の生残率を算出した結果, オゴノリは水温 10~34°C, 塩分 8~32 psu の範囲で生残率 100%となり, 全 6 種の中で, 生残率 100%となる水温と塩分濃度の範囲が最も広がった。以上の結果から, 水温ならびに塩分の変化に対して最も耐性の強い種はオゴノリであると示唆された。

(3)質量分析装置 MALDI バイオタイパーによる *Streptococcus* 属菌を対象とした同定性能の検討

太田 悠介, 松本 竹久, 春日 恵理子, 堀内 一樹, 根岸 達哉, 矢口 ともみ
名取 達矢

日本臨床微生物学雑誌 25(2), 31-36 (2015).

レビュー：松脇 知典

Streptococcus 属菌には、疾患の原因となる細菌種も含まれ、臨床上重要な細菌である。細菌の同定手法として、遺伝子学的手法や生化学的手法が挙げられる。しかしながら、いずれの手法も時間と労力を要することから、新たな検査法の開発が望まれている。近年、細菌の同定を迅速かつ正確に行うことのできる、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) が臨床現場において普及し始めている。そこで本研究では、*Streptococcus* 属菌 17 菌種合計 135 株を対象として、MALDI バイオタイパーによる同定性能の検討を行った。また、MALDI バイオタイパーによる同定は、On plate 法またはエタノール・ギ酸抽出法で行い、データベースは biotyper 3.1 を用いた。なお、MALDI バイオタイパーによる同定結果の精度は、16S rRNA 遺伝子と recA 遺伝子に基づく遺伝子学的検査によって得られた同定結果と比較し、評価した。

MALDI バイオタイパーを用いた菌株の同定結果は、遺伝子学的検査結果と比較して、属レベルで 100% (135/135)、菌種レベルで 81.5% (110/135) 一致した。その一方で、遺伝子学的検査と菌種が不一致となった 22 株 (*S. mitis* group 13 株, *S. oralis* 4 株, *S. mitis* 3 株, *S. tigurinus* 2 株), 2 株 (*S. oraris* 1 株, *S. infantis* 1 株) および 1 株 (*S. infantarius* 1 株) は、MALDI バイオタイパーを用いた場合それぞれ、*S. pneumoniae*, *S. peroris* および *S. lutei* と同定された。MALDI バイオタイパーによって *S. pneumoniae* と同定された 22 株は、rRNA 遺伝子配列が近似した菌種であるため、細菌のリボソームサブユニットタンパク質を主な標的とする MALDI バイオタイパーを用いた菌種の同定は、困難であったと考えられる。また、On plate 法またはエタノール・ギ酸抽出法のいずれの場合でも、同様の菌種が同定された。以上の結果から、MALDI バイオタイパーは、*Streptococcus* 属菌を正確に同定できることが明らかとなった。しかしながら、遺伝子学的に近縁な菌種の同定やリファレンススペクトラの少ない菌種の識別は困難であり、リファレンスライブラリの充実や追加検査を行う必要が示唆された。