

学 術

モンゴルトール川流域における遊牧家畜糞便
由来病原性微生物のモニタリング

多田千佳、琴賀丘朋絵、高田 萌、中井 裕

東北大学大学院農学研究科

要 約

モンゴルでは、過放牧に伴い、水飲み場への家畜の集中が起こっており、遊牧家畜糞便による河川水質汚染が懸念される。本研究では、2012年から2014年にかけて遊牧家畜（ウマ、ヒツジ・ヤギ、ウシ）の糞便およびトール川の河川水の病原性微生物（大腸菌、*Cryptosporidium*, *Giardia*）についてモニタリング調査した。既往報告との比較から、モンゴルの遊牧家畜は、他国の家畜の病原性微生物の陽性率に比較して高い傾向にあった。これらの結果より、モンゴルにおける遊牧家畜の糞便による河川汚染と健全な水環境保全について考察した。

I はじめに

モンゴルでは、過去68年間、降水量は7%減少している。河川・湖沼に水を供給してきたモンゴルの氷河・万年雪は、1983年、659km³あったが、2002年までに主な地域で30%減少したと言われ、水資源の枯渇が懸念される。

社会的には、モンゴルは社会主義体制下で森林・草地生態系と水分循環などのバランスをとる遊牧型社会を維持してきたが、ベルリンの壁崩壊の1989年、民主化政策を導入し、市場経済化によって、牧畜経営の裁量は個人に委ねられ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ラクダなど家畜の数は増加傾向にある（National Statistical office of Mongolia, 2007）。また、民主化により土地の利用も自由化され、都市近郊や豊富な水資源の周辺など利便性の高い地域に多くの遊牧民が移動する傾向にあり¹⁾、都市郊外で放牧される家畜の増加と過密化が進みつつある。これら社会的背景により、水飲み場に家畜が集中し、糞尿によって河川水の水質汚染が起こり始めている²⁾。

本研究では、2012年より、モンゴルの首都ウランバートルの中心を流れるトール川流域において、遊

牧家畜の糞便および河川水について家畜動物糞便由来病原性微生物のモニタリングと水質汚染について調査を行った。

II 材料と方法

2.1 糞便試料と水試料

試料採取は、モンゴル国トール川流域にて、2012年7月～8月と2013年8月、2014年8月に行った。調査地点を図1に示す。河川の調査地点は、トール川沿いに上流のテレルジ（北緯47°52.656、東経107°36.733）、中流のガチョルト（北緯47°55.535、



図1 モンゴル・トール川での調査地点

東経107°9.824)、下流のルン(北緯47°51.772、東経105°12.248)の3地点で行った。

糞便は、水場周辺の家畜が去った後、地面にある糞便を目視にて新鮮と判断されたものを採取し、ポリエチレン袋に入れ、DNA抽出まで4℃で保存した。動物種の判定は、糞便の形状によって行った。

2012年は、ウシ糞便を28試料、ウマ糞便を19試料、ヤギおよびヒツジ糞便を12試料、2013年の試料採取ではウシ糞便を25試料、ウマ糞便を46試料、ヤギおよびヒツジ糞便は56試料を得た。

水試料は、水深約5cmの表層水を10ℓ採取し、ポリエチレンタンクに移し、前処理までは室温保存した。試料水は孔径0.2μmのメンブレンフィルター(Merk MILLIPORE, Darmstadt, Germany)で濾過し、試料水中の微生物をフィルター上に回収した。回収後フィルターは15ml容遠心チューブに入れ、滅菌水加えて振盪し、フィルターと微生物を分離した。その後、懸濁した微生物液を5000×gで10分間遠心して微生物を沈殿させ、上清を捨てた後、沈殿物をDNA抽出に供試した。

2.2 DNA抽出

糞便試料および水試料からのDNA抽出は、FavorPrep Stool DNA Isolation Mini Kit (Favorgen

Biotech Corporation, Taiwan)を用いた。抽出DNA試料は、解析まで-20℃で保存した。

2.3 PCR

得られたDNAサンプルで、病原性大腸菌、*Cryptosporidium*, *Giardia*に特異的なプライマー(表1)を用いてPCR増幅し、電気泳動によるバンド検出によって、その有無を判断した。

PCR増幅にはEmerald Amp PCR Master Mix (Takara Bio Inc, Otsu, Shiga, Japan)を用いた。

真正細菌16S rRNA 遺伝子のV3領域について(Forward: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', Reverse: 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3')のプライマーセットにてPCRを行った。テンプレートは1μlを添加した。熱変性は98℃で10秒、アニーリングは56℃で45秒、伸長反応は72℃で1分として、30サイクルを行った。*Cryptosporidium*のPCR増幅反応はEmerald Amp PCR Master Mix (Takara Bio Inc, Otsu, Shiga, Japan)、最終濃度0.2μM プライマーペア、1μl テンプレートを用いた。PCR条件は、熱変性98℃で10秒、アニーリング55℃で45秒、伸長反応72℃で1分で35サイクルで行った。PCR反応のポジティブコントロールとして *Cryptosporidium parvum* HNJ-1株の抽出DNA溶液を用い、ネガティ

表1 病原性微生物の検出に用いたマーカー遺伝子

検出対象	マーカー遺伝子	産物長	引用文献
<i>Cryptosporidium</i> sp.	18S rRNA	830 bp	Xiao et al., 1999
<i>Giardia</i> sp.	18S rRNA <i>gdh</i>	292 bp 432 bp	Hopkins et al., 1997 Read et al., 2004
<i>Escherichia coli</i>	<i>malB</i>	585 bp	Wang et al., 1996
EPEC	<i>eae</i> <i>bfpA</i>	454bp 254 bp	Yu et al., 1992 Roberto et al., 2004
EIEC	<i>invE</i>	382 bp	Bii et al., 1993
EHEC	<i>Stx 1</i> <i>Stx 2</i>	350 bp 110 bp	Pal et al., 1998 Pal et al., 1999
ETEC	<i>estA1</i> <i>estA2-4</i> <i>eltB1</i>	239 bp 133 bp 402 bp	Nada et al., 2010 Nada et al., 2011 Nada et al., 2012
EAEC	<i>aggR</i> pCVD432	308 bp 630 bp	Nataro et al., 1995 Schmidt et al., 1995

ブコントロールとして滅菌 Milli-Q 水を用いた。増幅産物の 3 µl を、1.5% アガロースゲルを用いた電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで染色後、UV トランスイルミネーターにて増幅を確認した。一部の増幅産物については、電気泳動装置 MultiNa (SHIMADZU, Tokyo, Japan) を用いて増幅を確認した。

2.4 クローニング

FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co,Ltd, Tokyo, Japan) を用いて増幅産物を精製した。精製産物を pGEM-T Easy Vector (Promega, Tokyo, Japan) へ導入し、大腸菌 Competent Quick DH5α (TOYOBO, Osaka, Japan) へ形質転換を行った。プレート上に形成されたコロニーは、コロニーダイレクト PCR により目的断片の挿入を確認した。コロニーダイレクト PCR ではM13プライマー F4とRVを用いて行った。PCR 反応は、Emerald Amp PCR Master Mix (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)、最終濃度 0.2µM プライマーペアの組成による PCR を行った。増幅産物は電気泳動し、目的遺伝子の挿入を確認した。

2.5 DNAシーケンシング

増幅が確認した PCR 産物を ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, USA) 処理により精製した。精製産物 1 µl を Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ver3.1 (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) によるサ

イクルシーケンス反応へ供し、3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列は BLAST による相同性検索によって同定した。

Ⅲ 結果および考察

3.1 トール川周辺のウマ糞便から検出された病原性大腸菌

表 2 に各地点で採取された糞便の病原性大腸菌の検出結果を示す。2012年の調査では、トール川周辺で採取されたウマ糞便からはEPECおよびEHECが検出され、ETECおよびEAECは検出されなかった。EPECの検出は、上流・中流・下流の全地点のウマ糞便10個から2つ検出され、陽性率20%であった。EHECでも2つ検出され、陽性率20%である。しかし、EPECはテレルジ、ガチョルトと上流、中流で検出されたのに対し、EHECではガチョルト、ルンで検出された違いがあった。

2013年では、EPECおよびEHECに加え、2012年には検出されなかったETEC (2/28) とEAEC (1/16) も検出された。EPECの陽性率は24.2%、EHECは12.2%と2012年と多少の変動があった。EPECについては、2012年と同様に下流のルンでは検出されなかった。EHECでは、2012年と同様にルンでも検出され、ルンの糞便だけで見ると陽性率は40%と高く、2012年は1つのサンプルが陽性 (1/1) だったことから考えると、ルン近辺に暮らす

表 2 2012年および2013年のウマ、ヒツジ・ヤギ、ウシの糞便の病原性大腸菌陽性率

	ウマ			ヒツジ・ヤギ			ウシ		
	テレルジ	ガチョルト	ルン	テレルジ	ガチョルト	ルン	テレルジ	ガチョルト	ルン
EPEC									
2012年	1/3(33%)	1/6(16.7%)	0/1(0%)	-	-	0/5(0%)	0/8(0%)	0/9(0%)	0/3(0%)
2013年	3/12(25%)	5/15(31.3%)	0/5(0%)	2/12(16.7%)	1/17(5.7%)		3/8(37.5%)	0/3(0%)	2/7(29%)
EHEC									
2012年	0/3 (0%)	1/6(16.7%)	1/1 (100%)	-	-	5/5(100%)	8/8(100%)	4/9(44%)	3/3(100%)
2013年	2/12(16.7%)	0/16(0%)	2/5(40%)	5/12(41.7%)	10/17(58.8%)	1/10(10%)	1/8(12.5%)	0/3(0%)	0/7(0%)
ETEC									
2012年	0/3 (0%)	0/6(0%)	0/1 (0%)	-	-	0/5(0%)	0/8(0%)	0/9(0%)	0/3(0%)
2013年	1/12(8.3%)	1/16(6.3%)	0/5(0%)	0/12(0%)	0/17(0%)	0/10(0%)	0/8(0%)	1/3(33%)	1/7(14%)
EAEC									
2012年	0/3 (0%)	0/6(0%)	0/1 (0%)	-	-	0/5(0%)	0/8(0%)	0/9(0%)	0/3(0%)
2013年	0/12(0%)	1/16(6.3%)	0/5(0%)	0/12(0%)	0/17(0%)	0/10(0%)	0/8(0%)	0/3(0%)	0/7(0%)

ウマは、上流(16.7%、2013)や中流(16.7%、2012)で暮らすウマに比較して、EHECを保菌するものが多いと考えられた。

3.2 トール川周辺のヒツジ・ヤギ糞から検出された病原性大腸菌

2012年では、テレルジおよびガチョルトでは糞便を採取できなかった(表2)。ルンでのみ採取ができた。採取した糞便すべてからEHECが検出された。2013年では、EPECおよびEHECが検出された。EPECはテレルジとガチョルト、EHECは全ての地点で検出された。EPECの陽性率は7.7%、EHECは38.5%となった。また、Faganら(1999)の結果³⁾でも、4つのヒツジの群れから採取した糞便にstx遺伝子は54%で検出されたと報告がある。これらから、ヒツジ・ヤギのEHEC保菌率は非常に高いことがわかる。EHECは人間への危険性も高いことから、ヒツジ・ヤギの糞便が河川水や井戸水に入らないように注意する必要がある。

3.3 トール川周辺のウシ糞から検出された病原性大腸菌

2012年には、EHECのみが検出された(表2)。全ての地点のウシ糞便から検出され、非常に高い陽性率で、上流100%(8/8)、中流44.4%(4/9)、下流100%(3/3)で、平均75%であった。2013年は、EPEC、EHEC、ETECが検出された。EPEC陽性率は27.8%、EHEC 5.6%、ETECは11.1%となった。

EHECについては、我々の調査では、2012年は陽性率75%と高く、2013年は5.6%となり、変動が大きかった。西アフリカに位置するブルキナファソの2010年3月～8月の調査では⁴⁾、食肉処理場のウシ304頭から採取した糞便から37%のEHEC検出があった。オーストラリアで4つのウシの群れから採取した糞便では19%からstx遺伝子が検出された³⁾。Kobayashiら(2001)⁵⁾による日本の調査では、1998年に行った関東甲信越地域の78の農場で、183の乳牛糞便サンプルの69%がstx遺伝子陽性であり、高い陽性率であった。よって、EHECについては、遊牧や舎飼いに関わらず、ウシの保菌率が高い傾向にあると考えられた。

EPECについては、内モンゴルの乳牛では、101の健康なウシから採取した糞便の22からatypical EPEC

(eaeA+bfpA-)が検出され、21.7%の陽性であった⁶⁾。西アフリカのブルキナファソの調査では、食肉処理場のウシ304頭から採取した糞便の8%がEPEC陽性であった⁴⁾。これらの報告と比較して、2013年のモンゴルでの調査結果EPEC陽性率27.8%は、既往研究より高いことが示された。

3.4 トール川周辺の糞便から検出された寄生性原虫

2012年には、寄生性原虫の検出はなかったが、2013年ウシの糞便から、*Giardia*が検出された。また、翌年2014年の調査では、河川上流テレルジにいたウシの糞便から*Cryptosporidium*、*Giardia*が検出された。また、河川下流域ルンの河川水からは、*Giardia*が検出された。本*Giardia*は、上流テレルジのウシ糞便から検出された*Giardia*と同じものであった。これより、上流の糞便から下流の河川水への汚染の可能性も考えられる。

これまで、日本の河川では、神奈川県相模川水系において1997年4月～12月まで、最大水量100Lでショ糖浮遊法による顕微鏡観察による原虫検出調査が報告され、100L中に3～9 cells検出されている⁷⁾。利根川・江戸川水系では、2000年11月と2001年2月の調査では、2000年11月では0-2cells/10Lの*Cryptosporidium*の検出があった。11月と比較して2001年2月には検出個数が多くなる傾向が見られ、場所によっては数十cells/10Lが検出されている⁸⁾。

本研究の調査では、10LサンプルからのDNA抽出による検出方法で、*Cryptosporidium*の検出ができなかった。これより、PCRによる検出感度が、ショ糖浮遊法に比較して低い可能性がある。今後、DNAによる検出感度を高めるため、より大量の試水の濾過によるDNA抽出や、PCR阻害物質の除去などの改善が必要である。我々が調査したモンゴルのトール川はCOD 10mg/L程度と汚濁が著しく、日本の環境省の生活環境の保全に関する環境基準(河川)のEランクに該当する。相模川水系の水質ではCOD1 mg/L未満(山梨県、平成9年度公共用水域水質測定結果)で、環境基準ではAAからAにあたる水質で調査されており、河川水質の有機物量の違いも微生物の検出感度に影響している可能性がある。以上の様に、日本の河川でも*Cryptosporidium*の検出がされていることから、遊牧家畜糞便が直接入っているモンゴル、トール川には、*Cryptosporidium*の存在の

危険性の可能性が十分に考えられ、引き続き、より高感度の手法によるモニタリングが必要である。

3.6 トール川の河川水からの病原性大腸菌の検出

2012年、2013年における河川水からの病原性大腸菌の検出はなかったものの、検出感度が低い可能性も考えられた。我々の調査では、2014年にトール川試験水をDHL寒天培地で培養した際には、約50-130 CFU/mlの大腸菌群コロニーが検出されている。今回、採取したコロニーからはPCRによる病原性大腸菌検出はなかった。しかし、培養結果より河川水は多くの大腸菌群に汚染されていることが明かであった。日本の生活環境の保全に関する環境基準（河川）では、Bランクで5,000MPN/100mL以下であり、トール川は、大腸菌群の汚染も著しく高いことがわかる。

南アフリカBerg Rivers では、 $1.1 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^6$ microorganisms/100mlの腸内細菌が検出され¹⁰⁾、われわれのモンゴルのトール川の大腸菌群数の結果130CFU/mlに近い。そのとき、病原性大腸菌は、コンベンショナルなPCRによってEIEC, EHEC, EAEC が検出され、realtimePCRでは、それに加えてEPECも検出されている⁹⁾。

我々の調査では、大腸菌群が一番多かった下流ルンの地域でも、病原性大腸菌を検出することができなかった。彼ら⁹⁾は、500mlの試験水を遠心したのち、そのペレットを2 ml of LB broth で37℃ 6時間培養した後に、DNA抽出を行っていることや、PCR時に10 μ lのDNAテンプレートを入れるなどしており、我々の方法に比較して、より検出感度を上げる工夫がされている。こういったことから、モンゴルのトール川には、今回は目的遺伝子のPCRによるバンド検出はできなかったが、より感度を高める事で検出される可能性が十分に考えられた。

3.7 遊牧家畜糞尿による河川水汚染と家畜の関係

表3に示すように、上流（テレルジ）、中流（ガチョルト）、下流（ルン）において、下流のルンでは硝酸態窒素濃度が、他より高く、汚染されていることがわかる。また、テレルジ、ルンのCOD値も10mg/L以上と高く、日本の河川における生活環境の保全に関する環境基準の最も低いランクEにあたり、非常に水質汚染が高い状態であった。

表3 トール川サンプリング地点による水質（2013年）

	テレルジ (上流)	トール川 ガチョルト (中流)	ルン (下流)
COD (mg/L)	14.9	2.3	11.0
PO ₄ -P (mg/L)	N.D.	N.D.	0.1
NH ₄ -N (mg/L)	0.05	0.03	N.D.
NO ₃ -N (mg/L)	0.24	0.14	1.24

2012年および2013年の本調査では、病原性大腸菌や寄生性原虫は、河川水から検出されなかったが、2014年には検出されたため、家畜糞尿による河川水汚染が生じていると示唆された。同時期に、吉原らと行った子ヒツジを用いた飲料水と子ヒツジの増体量などを調査した結果では、トール川下流のルンの水を飲むと子ヒツジのEPECの感染率が高まることを示された¹⁰⁾。

我々が調査した、モンゴルの遊牧家畜の病原性大腸菌の陽性率は、これまでの既往研究報告に比較して高い傾向にあった。このことは、遊牧家畜の糞尿は河川水を汚染し、また、その汚染によって、それらを飲む家畜の感染が拡大していることが考えられた。また、今回は、家畜動物のみを対象としたが、モンゴルのトール川では、特にルンのような下流域では、遊牧民がその河川水を用いて洗濯をしたり、川で泳いだりする光景が見られたため、人間の健康へも悪影響を及ぼしている可能性がある。2004年にSarantuyaらが報告した、モンゴルの子どもの病原性大腸菌の感染状況では、EPECも下痢糞便から3.8%検出されている¹¹⁾。また、EAECについては下痢糞便から15.1%の検出率であった。今回、ウシ糞便からよく検出されたEHECについては、2004年の子どもの下痢からは検出されていないが、我々の調査で2013年のウマ糞便から検出されたEAECは子どもの下痢糞便に多く存在したことから、ウマ由来の糞便の河川水汚染が、子どもの健康へ悪影響を与えている可能性は十分考えられる。実際に、写真1にあるように、下流ルンでは、ウマが橋のたもとに集中し、その岸に大量のウマ糞便が落ちていた。今後の注意が必要である。

モンゴルの遊牧状況は、われわれが調査を始めた2012年から比較しても、現在は、大きく様変わりしている。以前は、自由に入れた牧草地に、柵がされ、定牧に移行してきている。定牧により、ますます糞尿の河川流域や水飲み場への集中負荷が考えられ、



写真1 モンゴルのトル川下流ルンにおけるウマとその糞の様子

ウマは、日陰を求めて、橋のたもとに何十頭と集中している。川岸はウマの糞便が多く落ちている。

これに伴う、水汚染とそれを飲用する動物また人間への病原性微生物の感染率上昇が懸念される。今後、家畜放牧の管理方法や水飲み場の管理などの管理体制を整える事が、モンゴルの水環境とそこに暮らす動物・人間の健全性につながると言える。

謝 辞

本研究は、科研費基盤(B)24405046「モンゴルにおける持続可能な水環境保全と水利用のための遊牧システムの形成」にて遂行しました。本調査にあたり、モンゴル農業大学、モンゴル衛生研究所、モンゴルの現地のスタッフの皆様に多大なご協力をいただきました。ここに感謝いたします。

参考文献

- 1) Sternberg, T. (2008) Environmental challenges in Mongolia's dryland pastoral landscape, Journal of Arid Environments, Volume 72(7), 1294-1304
- 2) Maasri A, Gelhaus J (2011) The new era of the livestock production in Mongolia : Consequences on streams of the Great Lakes Depression. The Science of the Total Environment, 409 (22), 4841-4846
- 3) Fagan, P.K., Hornitzky, M.A., Bettelheim, K.A, Djordjevic, S.P (1999) Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), Intimin (eaeA), and Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) hemolysis (EHEC hlyA) genes in animal feces by Multiplex PCR, Appl. Environ. Microbiol., vol.65(2), 868-872
- 4) Kagambega, A., Martikainen, O., Siitonen, A., Traore, A.S., Barro, N., Haukka, K. (2012) Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso, vol.1(3), 276-284
- 5) Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M., Morozumi, T., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S., Yamamoto, K. (2001) Prevalence and characteristics Shiga toxin-producing Escherichia coli from healthy cattle in Japan, Appl. Environ. Microbiol., vol.67(1), 484-489
- 6) Huasai, S., Chen, A., Wang, C., Li, Y., Tongrigrig, B. (2012) Occurrence and characteristics of virulence genes of Escherichia coli strains isolated from healthy dairy cows in inner Mongolia, China, Brazilian J. Microbiology, 528-534
- 7) 橋本温、河井健作、西崎綾、松本かおり、平田強 (1999) 相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染とその汚染指標の検討、水環境学会誌, 22, 282-287
- 8) 保坂三継 (2006) クリプトスポリジウムとジアルジアによる水環境及び水道水の汚染、東京健康研年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H., 57, 31-42
- 9) Ndlovu, T., Le Roux, M., Khan, W., Khan, S. (2015) Co-detection of virulent Escherichia coli genes in surface water sources. PLoS One., 10(2), e0116808.
- 10) Yoshihara, Y., Tada, C., Takasa, M., Purevdorj, N.O., Chimedtsuren, K., Nakai, Y. (2016) Effect of water source on health and performance of Mongolian free-grazing lambs, Small Ruminant research, 137, 81-84
- 11) Sarantuya, J., Nishi, J., Wakimoto, N., Erdene, S., Nataro, J.P., Sheikh, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Miyata, K., Kawano, K. (2004) Typical Enteroggregative Escherichia coli Is the Most Prevalent Pathotype among E. coli Strains Causing Diarrhea in Mongolian Children, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2004, p.133-139

プロフィール

- | | |
|-------------------|---------------------------------|
| 平成8年3月 | 東北大学農学部 応用動物科学系卒業 |
| 平成10年3月 | 東北大学大学院農学研究科 畜産学専攻修了 |
| 平成14年3月 | 筑波大学大学院農学研究科 応用生物化学専攻修了 博士取得 |
| 平成10年
～平成13年 | (財)茨城県科学技術振興財団 霞ヶ浦水質浄化プロジェクト研究員 |
| 平成14年
～平成17年 | (独)産業技術総合研究所 エネルギー利用部門特別研究員 |
| 平成17年
～平成20年 | 沖縄工業高等専門学校生物資源工学科助手と助教 |
| 平成20年
～平成21年1月 | (独)産業技術総合研究所 バイオマス研究センター特別研究員 |
| 平成21年2月 | 東北大学大学院農学研究科准教授 |