

遺伝子マーカーと次世代シーケンサーを利用した新しい病原微生物指標の研究開発

Development of new microbial indicators utilizing genetic markers and next generation sequencers

八戸工業高等専門学校 教授 矢口淳一

（研究計画ないし研究手法の概略）

近年、下水道の普及に伴って古くから下水道の整備を実施してきた大都市では雨天時に合流式下水道越流水（CSO）による糞便汚染が放流水域で顕在化しており、地方都市では下水処理水の上流での放流や野生動物の繁殖等によって従来汚染が認められなかった水域での糞便汚染が報告されている。このような糞便汚染の状況に対して、我が国では未だに微生物指標として大腸菌群が用いられており、糞便に由来しない自然由来の細菌を多量に検出してしまうと共に汚染源を特定できないという欠点があるため、汚染源を解明できず対策に繋がらない場合が多かった。また大腸菌群数の環境基準超過率は非常に高く、河川 AA 類型では過去 10 年間 80% を超え、全く改善されない状況が続いている。現在微生物指標の見直しが検討されているが、水域の糞便汚染に関する真の姿は全く不明である。そこで、本研究では嫌気性菌のため環境中で増殖しないことから近年注目されている腸内細菌である *Bacteroidales* 目の細菌群を使用して、汚染源別に特異的な遺伝子塩基配列を応用し汚染源を特定できる指標、遺伝子マーカーの研究開発を目指す。生活排水や畜産排水による汚染の可能性がある八戸市周辺の 4 河川で水質調査を実施し、ヒト、ウシ、ブタの糞便に特異的な遺伝子マーカーを適用して従来の大腸菌、大腸菌群指標と比較検証しながら糞便汚染の実態調査と汚染源の解明を行う。さらに、サンプル中のすべての細菌の DNA を網羅的に解析できる次世代シーケンサーを用いてアンプリコンシーケンス解析を実施し、病原性細菌の挙動と大腸菌などの従来指標細菌、遺伝子マーカーとの関係を検証する。また腸内細菌の系統樹解析による汚染源の追跡も実施する。

（1）調査水域

水質調査及びサンプリングは、八戸市周辺の 4 河川、馬淵川（尻内橋）、新井田川（新井田橋）、五戸川（尻引橋付近）、奥入瀬川（下田サーモンパーク）で行った。採水日は、7 月 16 日と 10 月 28 日の二日間である。また五戸川に関してはさらに上流から下流にかけて 4 地点（St.1:親水公園, St.2:新郷村役場前, St.3:下新井田橋付近, St.4:尻引橋付近）で調査と採水を行った。採水日は 9 月 20 日と 11 月 18 日の 2 日間である。図 - 1 に調査した 4 河川の採水地点を示した。



図 - 1 調査した八戸市周辺の 4 河川（馬淵川、新井田川、五戸川、奥入瀬川）

(2) 調査項目と調査方法

採水した河川サンプルの一般水質項目（pH, DO, 電気伝導度, 水温）の測定と、指標細菌（大腸菌群, 糞便性大腸菌群, 大腸菌）数を計測した。大腸菌群は MF-エンドウ培地, 糞便性大腸菌群は M-FC 培地, 大腸菌はクロモアガー培地をそれぞれ使用し、メンブレンフィルター法で細菌数を計数した。河川のサンプルを Sterivex filter でろ過濃縮後、Power Water Sterivex kit を用いた方法で DNA の抽出を行った。抽出した DNA のリアルタイム PCR は、SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-rad 社) を使用して Mini-Opticon システム (Bio-rad 社) で行った。糞便汚染の指標となる遺伝子マーカーとして、腸内細菌目 *Bacteroidales* の 16S rRNA 遺伝子断片 4 種類を用いた。糞便汚染全体を表すマーカーとして Gen¹⁾、ヒト糞便の遺伝子マーカーとして HF183²⁾、ブタ糞便には Pig-2-Bac³⁾、ウシ糞便に Rum-2-Bac⁴⁾ をそれぞれ用いた。各サンプルから抽出された DNA の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象に PCR 増幅し、(株) 生物技研に委託して次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を使用してアンプリコンシーケンス解析を行い、各サンプルの細菌叢解析を実施した。

(実験調査によって得られた新しい知見)

(1) 指標細菌の推移

八戸周辺の 4 河川における指標細菌の計数結果を図-2 に示した。大腸菌群数は $10^2 \sim 10^3$ 個/100mL 前後であり、いずれの採水地点も環境基準は 5,000 個/100mL なので、2 日間とも環境基準を満たしていた。大腸菌群数に対し、糞便性大腸菌群数は 1/10 程度、大腸菌数はほとんどが 1/10 以下となった。従って今回計測した大腸菌群数のほとんどが大腸菌以外の細菌であり、実際には大腸菌による汚染は少ないことが分かる。また、4 つの河川とも 7 月に比べて 10 月の指標細菌数が増加している。これは、サンプリングの数日前の降雨により河川が汚濁したためだと考えられる。

図-3 には五戸川における各地点の各指標細菌の計数結果を示した。五戸川の環境基準は St.1 と St.2 は 1000 個/100mL なので、9 月の計数結果を見ると St.2 でのみ環境基準を超過していた。また 9 月のデータは St.3, St.4 でも大腸菌群数が環

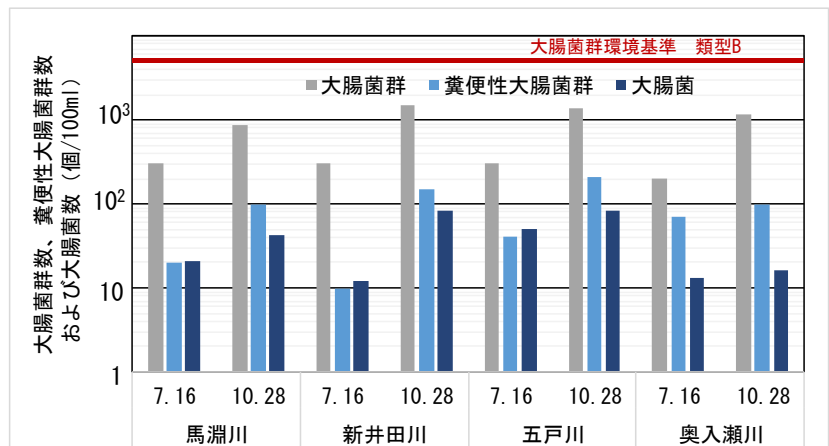


図-2 八戸市周辺 4 河川中の指標細菌数の推移

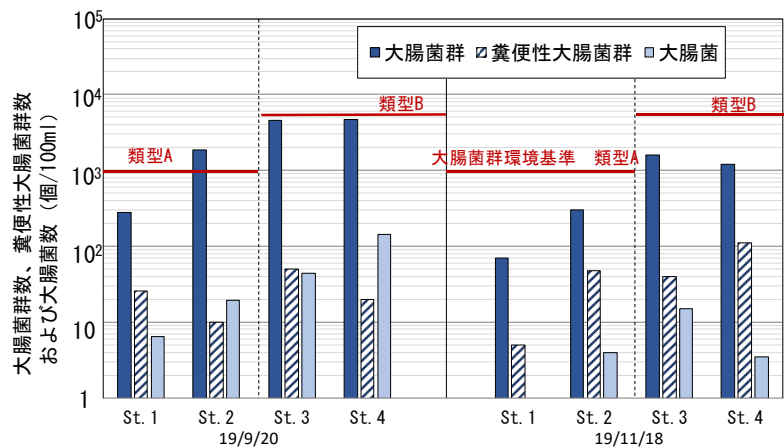


図-3 五戸川の 4 地点における指標細菌数の推移

境基準値に近く、汚染の影響が危惧される。多くの地点で大腸菌群数と糞便性大腸菌群数、大腸菌数には大きな差があり、実際の大腸菌による汚染の影響は小さい。11月は9月と比較するとほぼすべての地点で指標細菌数が減少しており、すべての地点で大腸菌群数の環境基準を満足していた。大腸菌群数に対する大腸菌数の割合も1/100程度であるため、大腸菌による糞便汚染のリスクは小さかった。

(2) 遺伝子マーカー濃度

4河川における遺伝子マーカー濃度を図-4に示した。糞便汚染全体を示すマーカーGenは、 $10^3 \sim 10^5$ copy数/100mL検出され、すべての河川で10月は7月より1オーダー以上増加した。これは図2に示した指標細菌数とも一致しており、特に五戸川では大幅な増加となった。ヒト糞便の影響を表わすマーカーHF183は7月の五戸川と10月の奥入瀬川で 10^2 copy数/100mL以上

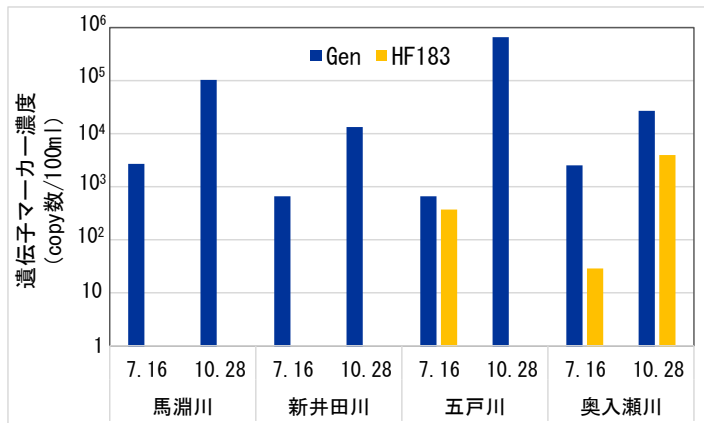


図-4 八戸市周辺4河川中の遺伝子マーカー濃度

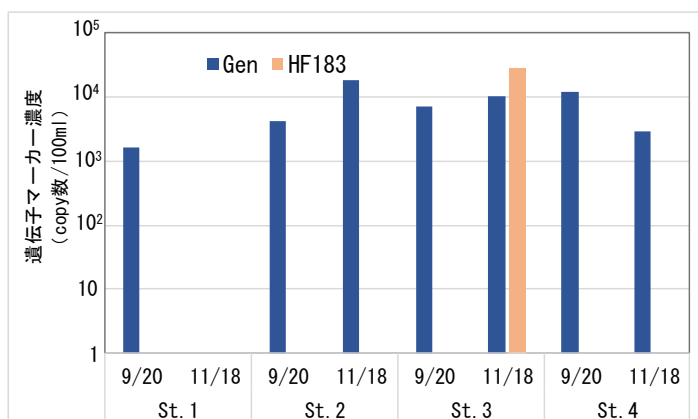


図-5 五戸川4地点の遺伝子マーカー濃度

検出され、Genで表した糞便汚染の大部分を占めていた。しかし10月の五戸川や他の河川では、検出されなかった。ブタとウシ糞便の指標であるPig-2-BacとRum-2-Bacのマーカーはいずれの河川でも検出されなかった。図-5には、五戸川4地点の遺伝子マーカー濃度を示した。Genマーカーは $10^3 \sim 10^4$ copy/100mL検出されているが、11月のSt.1では検出されなかった。9月と11月のマーカー濃度はSt.1を除いてほとんど差がなく、図-3の指標細菌数とは異なる結果となった。また汚染源の指標となるマーカーは、11月のSt.3のみヒトの糞便汚染を表すHF183が 10^4 copy数/100mL以上検出され、Genマーカーと同程度の濃度となった。しかし9月のSt.3や他の地点ではHF183は検出されず、Pig-2-BacとRum-2-Bacもすべての地点で検出されなかった。

(3) 河川中の細菌叢解析

次世代シーケンサーによる4河川の7月16日のサンプルにおける細菌叢解析結果を綱(class)レベルで構成割合が3%以上の細菌群のみ図-6に示した。4つの河川ともBetaproteobacteria綱、Actinobacteria門の細菌群がどち

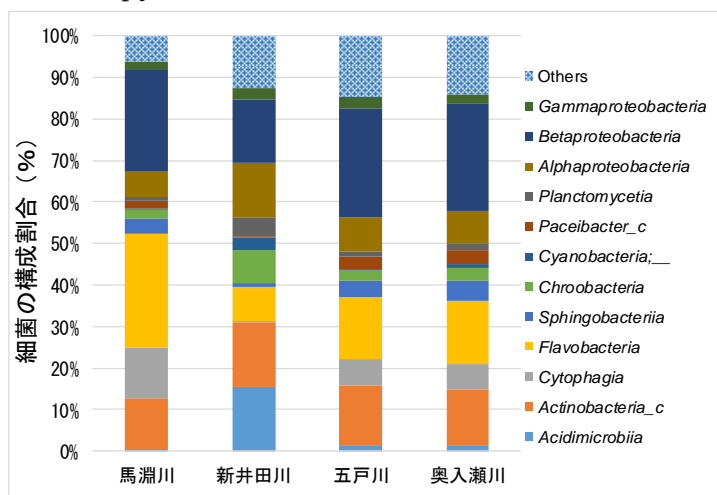


図-6 八戸市周辺4河川中の細菌叢解析結果(7/16)

らも 15%以上と多くの割合を占めていた。また新井田川は他の河川では少なかった *Acidimicrobiia* 綱、*Chroobacteria* 綱の細菌群が多く検出され、*Actinobacteria* 門、*Flavobacteria* 綱の割合は低いという結果となった。これは新井田川が海に近く、海水の流入による影響を受けているためだと考えられる。図-7には9月20日の五戸川4地点における細菌叢解析結果を綱(class)レベルで示した。構成割合が3%以下の細菌群は others に分類されている。

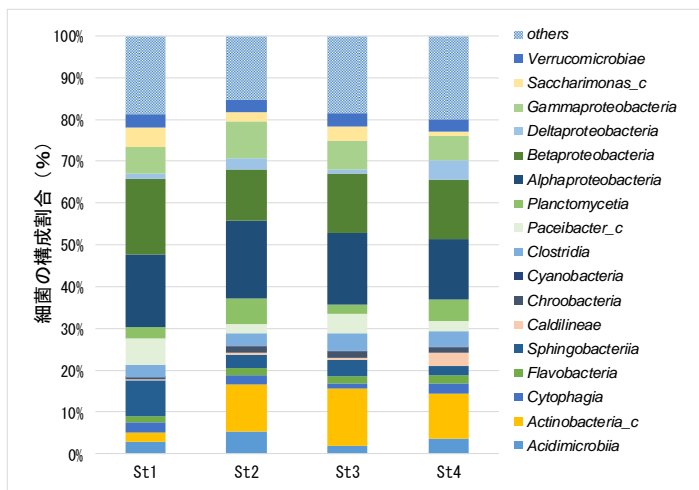


図-7 五戸川4地点の細菌叢解析結果(9/20)

すべての地点で *Betaproteobacteria* 綱、*Alphaproteobacteria* 綱の細菌群が 15%前後と多くの割合を占めていた。St.2~St.4の細菌叢はほぼ同じような構成をしていたが、St.1のみ細菌構成割合が異なっており、*Sphingobacteria* 綱が多く検出され、*Actinobacteria* 門の割合は低いという結果となった。10月28日に採水した4河川のサンプルと11月18日の五戸川のサンプルでも、それぞれ新井田川とSt.1は他の採水地点と異なる細菌叢を示した。

(4) 河川中の病原性細菌

本研究で検出された病原性細菌を含む属は56属(145属)で、図-8と9に全細菌に対する構成割合が0.2%以上の属を示した。また病原性細菌は11種(1538種)しか検出同定されず、種レベルでの解析は十分にできなかった。すべてのサンプルで病原菌を含む属の占める割合は、0.8~11.3%の範囲だった。特に五戸川のSt.3は最も高く、2日とも8%以上となった。出現割合が高い属は、図-8では *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Legionella*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas* 属、図-9ではさらに *Aeromonas*, *Mycobacterium* 属も高くなった。五戸川のSt.3では、9月20日には *Clostridium* と *Acinetobacter* 属の出現割合が高かったが、11月18日には *Mycobacterium* 属が最も多くを占めた。図-8と9では、検出された病原菌を含む属をヒトや動物の腸内に由来するか、環境起源か分類して

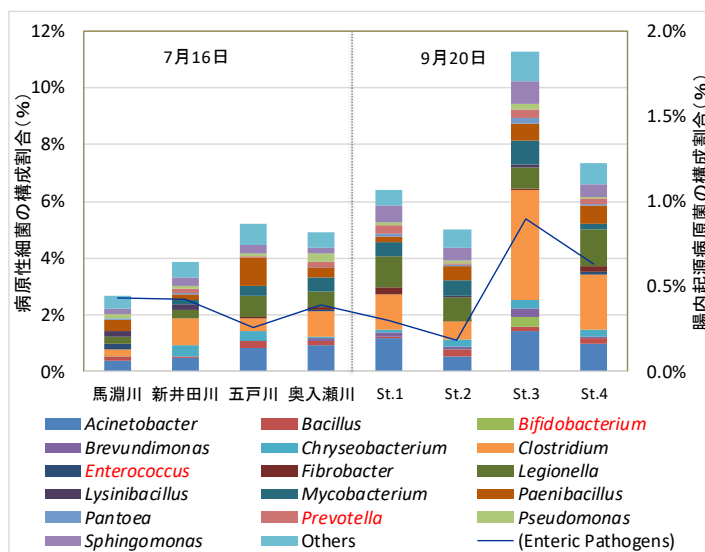


図-8 病原性細菌を含む属の河川中の分布(1)

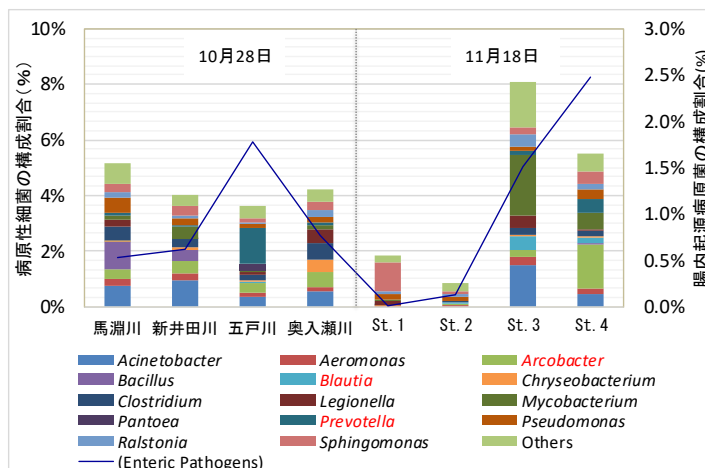


図-9 病原性細菌を含む属の河川中の分布(2)

(赤字で示した属は腸内由来)、腸内由来の病原性細菌の構成割合も示した⁵⁾。腸内由来の病原菌の占める割合は、すべてのサンプルで 0.011~2.47%の範囲だった。特に五戸川の St.3 と St.4 は、7月16日を除いて1%以上となった。

表-1には、検出同定された11種の病原性細菌を示した。いずれの細菌も検出頻度は低く、半数は1サンプルのみの検出だった。病原性細菌の割合は0.0~0.87%(median 0.076%)となり、9月20日に採水した五戸川の St.4 では、*Moraxella osloensis* が0.87%の構成割合を示した。これは、アンプリコン解析から得られた北京市内を流れる河川中の病原性細菌の割合⁵⁾の1/10程度だった。本研究の相同性解析では、細菌の16S rRNA 遺伝子のデータベースとして EzBioCloud 16S database を使用したが、本研究で検出された病原菌を含む56属に分類され構成比が0.2%以上の代表配列 OTU (Operating Taxonomic Units: 操作上の分類単位)については BLAST 検索も試みた。99.5%以上の一致率で病原性細菌と特定できたのは約2割(12/58)の OTU のみだった。本研究のアンプリコン解析で得られた配列の長さは420bp前後で、種レベルの系統解析は難しいかもしれない。

(5) 指標の相関性

本研究で得られた遺伝子マーカー濃度や病原性細菌の分布状況と従来から用いられている指標細菌濃度との関係を検討した。表-2には、各指標間のピアソン相関係数を示した。指標細菌として大腸菌群と大腸菌濃度、遺伝子マーカーには糞便汚染全体を示しほとんどのサンプルから検出された Gen マーカー濃度、さらに病原性細菌を含む属と腸内起源の属の全細菌に対する構成比の関係を求めた。大腸菌群と大腸菌濃度は、Gen マーカーを除いて属レベルの病原菌と腸内由来病原菌との間に相関性が認められた。一方 Gen マーカー濃度は、すべての他の指標との間に相関性は認められないことが示された。表-2の結果は、従来の指標細菌の方が Gen マーカーより指標性に優れていることを示しているが、サンプル数も多くなく、病原性細菌の解像度も低く今後さらに検討していく必要がある。

(6) 腸内細菌の系統樹解析

前述のように、腸内細菌目 *Bacteroidales* の16S rRNA 遺伝子断片を用いたヒト、ブタ、ウシ糞便の遺伝子マーカーは、HF183 が4サンプルで検出されたのみでブタとウシのマーカーはすべてのサンプルで検出されなかった。そこで糞便汚染の汚染源を特定するため、検出された腸内細菌の系統樹解析を試みた。*Bacteroides* と *Prevotella* の2つの属に分類された OTU について、MEGA software (Version 10.1.7) を使用して系統樹解析を実施した。対照に遺伝子マーカーの塩基配列、HF183 (AJ408993)、Pig-2-Bac(AF371872)、

表-1 本研究で検出された病原性細菌

pathogens detected	Detection Frequency	Relative abundance(%)		
		Range		
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1/16	0	~	0.072
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1/16	0	~	0.023
<i>Bacteroides uniformis</i>	1/16	0	~	0.053
<i>Clostridium butyricum</i>	2/16	0.046	~	0.12
<i>Clostridium botulinum</i>	1/16	0	~	0.075
<i>Coxiella burnetii</i>	1/16	0	~	0.0052
<i>Eubacterium tenue</i>	5/16	0.060	~	0.25
<i>Legionella feeleii</i>	2/16	0.0099	~	0.047
<i>Moraxella osloensis</i>	4/16	0.015	~	0.87
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	5/16	0.030	~	0.073
<i>Veillonella dispar</i>	1/16	0	~	0.012

表-2 各指標間のピアソン相関係数

Correlation coefficients	Total Coliforms	<i>E.coli</i>	Gen maker	pathogen (genus)	enteric pthogens
Total Coliforms	—	0.673	(0.419)	0.611	0.703
<i>E.coli</i>	0.673	—	(0.385)	0.499	0.575
Gen maker	(0.419)	(0.385)	—	(0.149)	(0.371)
pathogen(genus)	0.611	0.499	(0.149)	—	(0.503)
enteric pthogens	0.703	0.575	(0.371)	(0.503)	—

() ; p値が0.05以上となり相関性が棄却された関係を示す。

Rum-2-Bac (JX 096090)と、ヒト糞便由来の4サンプル(EU573838, EU573839, EU573847, EU573852)及びウシ糞便サンプル(EU551115)を用いた。図-10には、10月28日と11月18日の採水サンプルを近接結合法で解析した結果を示した。上位に位置するクラスターがヒト糞便に関連するもので、下位はブタの糞便に関連するクラスターとなっている。ウシ糞便は対照サンプルのみのクラスターで独立していた。ヒト糞便に関連するクラスターに属する OTU は、多くのサンプルから検出されているのに対し、ブタ糞便に関連する OTU は五戸川及び St.3 と St.4 から検出され、五戸川下流域におけるブタ糞便汚染の可能性が示唆された。

本研究では、遺伝子マーカーと次世代シーケンサーを用いて地方都市周辺河川における糞便汚染について解析した。今後、遺伝子マーカー感度の改善や次世代シーケンサーの解像度の向上に取り組み、さらなる糞便汚染の実態解明に繋げていきたい。

<参考文献>

- 1) Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L., Haugland, R. A.: Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *J Water Health* 6, pp.225-237 (2008)
- 2) Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., Siciliano, S. D.: Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology* 7, pp.249-259 (2005)
- 3) Mieskin, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 75, pp.3045-3054 (2009)
- 4) Mieszkin, S., Yala, J.F., Joubrel, R., Gourmelon, M.: Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 108, pp.974-984 (2010)
- 5) Cui, Q., Huang, Y., Wang H., Fang, T.: Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage. *Environmental Pollution* 249, pp.24-35 (2019)

(発 表 論 文)

得られた研究成果は、2020年度に開催される第57回環境工学研究フォーラム(土木学会環境委員会主催)等で研究発表する予定である。

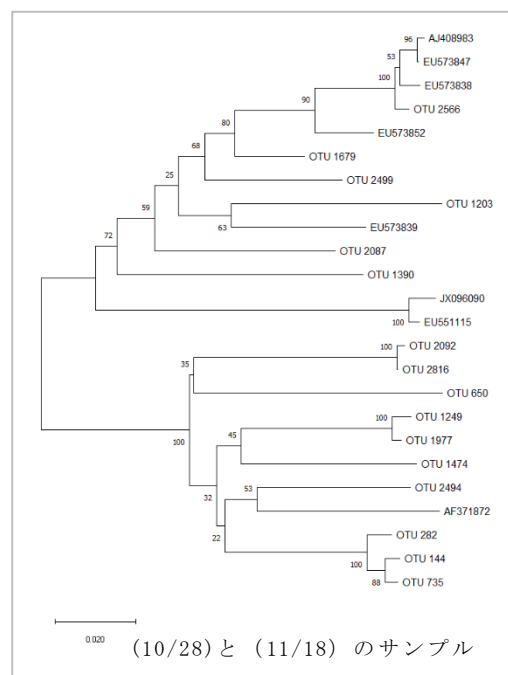


図-10 河川サンプルの系統樹解析