

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11680

研究課題名(和文) 泡沫濃縮と次世代シーケンシングを利用した水環境中の病原細菌一斉検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a simultaneous detection for pathogenic bacteria by foam concentration and NGS analysis existing in the water environment

研究代表者

鈴木 祥広 (Suzuki, Yoshihiro)

宮崎大学・工学部・教授

研究者番号：90264366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水環境中の病原性細菌による水系感染症は、世界の最重要問題となっている。そこで、水環境における病原性細菌の情報を正確、かつ一斉に取得できる手法の開発が必要である。本研究では、大腸菌病原遺伝子7種類を対象に、Multiplex PCR法による標的遺伝子の一斉増幅およびNGS法による塩基配列の一斉解析を組み合わせた検出法の開発を検討した。新規の遺伝子定量法であるデジタルPCR法のコピー数とNGS法のリード数の関係は、正の相関を示した。本研究のMultiplex PCR法とNGS法による一斉検出法は、7種類の標的遺伝子を一斉検出でき、かつNGS法のリード数からコピー数の推定が可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性細菌の検出技術が発展しているにも関わらず、水環境において、それら病原性細菌の一斉検出法は確立されておらず、情報・知見が乏しいのが現状である。本研究では、Multiplex PCR法における多数の標的遺伝子を一斉に増幅させるプロセスとNGS法による塩基配列の一斉解析のプロセスを組み合わせ、水環境における病原性細菌の一斉検出法の開発した。この開発した方法によって、これまで得られていなかった水環境における病原性細菌の存在実態と分布が追跡できる。

研究成果の概要(英文)：Waterborne diseases due to pathogenic bacteria in the water environment are a serious problem all over the world. Therefore, it is necessary to develop a method that can accurately and simultaneously obtain information on pathogenic bacteria in the water environment. In this study, the development of a detection method that combines the simultaneous amplification of target genes using the Multiplex PCR method and the simultaneous analysis of base sequences by the NGS analysis were investigated for seven types of E. coli pathogenic genes. As a result of the Multiplex PCR method, it was possible to simultaneously detect 5 out of 7 target genes. The relationship between the copy number of the digital PCR method established as a quantitative analysis and the read number of the NGS analysis, five types of E. coli pathogenic genes showed a positive correlation. In addition, it was suggested that the copy number can be estimated from the number of reads.

研究分野：環境水質工学

キーワード：水系感染症 病原細菌 病原遺伝子 一斉検出・定量 マルチプレックスPCR NGSシーケンシング コピー数 リード数

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水環境には人間活動や産業活動を起源とする多種多様な細菌が存在している。そして、その中には病原性を有する細菌も存在する 1)。このような水環境中に存在する病原性細菌による水系感染症は、世界中の最重要問題となっている 2)。病原性細菌を含む細菌の検出法として、細菌の DNA や RNA を標的とした様々な検出技術が開発されており、急速に発展している。その代表的な検出技術である PCR 法は、標的とする細菌の DNA を増幅させて検出する方法 3) であり、複数の遺伝子を同時に増幅させ、細菌を検出する Multiplex PCR 法も開発されている。一方、近年注目されている検出技術の一つである次世代シーケンシング (NGS) 法は、塩基配列の異なる膨大な数の遺伝子を一斉に解析できるため、細菌の一斉検出への展開も可能である。

2. 研究の目的

病原性細菌の検出技術が発展しているにも関わらず、水環境において、それら病原性細菌の一斉検出法は確立されておらず、情報・知見が乏しいのが現状である。そこで本研究では、Multiplex PCR 法における多数の標的遺伝子を一斉に増幅させるプロセスと NGS 法による塩基配列の一斉解析のプロセスを組み合わせ、水環境における病原性細菌の一斉検出法の開発を検討した。

3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子

病原性大腸菌の標的遺伝子は、腸管凝集付着性大腸菌の *aggR*、腸管出血性大腸菌の *stx1*, *stx2*、腸管侵入性大腸菌または赤痢菌の *ipaH*、腸管病原性大腸菌の *eae*、腸管毒素原性大腸菌の *STh*、LT の 7 種類を対象とした。また、大腸菌の特異遺伝子である *uidA* 遺伝子も対象とした。

(2) プライマー設計

各標的遺伝子について、5 つ以上の遺伝子配列を GenBank データベースから取得した。その後、Primer3Plus を用いて、増幅サイズが 300~350 bp の範囲となるように設計した。また、*eae* 遺伝子と *uidA* 遺伝子のプライマーは既存のものを参考に作成した。

(3) Multiplex PCR 法

実験は、KAPA Taq Extra PCR Kit を用いて行った。プライマーは終濃度が 0.25 μM となるように調整し、標的遺伝子は、PCR Grade Water で 1,000 倍希釈したものを 1 μL 使用した。Multiplex PCR 反応は、以下の条件で実施した：最初熱変性を 95 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間、58 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間を 40 サイクル、最終伸長反応を 72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分間。

(4) デジタル PCR 法による標的遺伝子の定量

NGS 法で得られたリード数と dPCR 法で定量した遺伝子濃度を比較し、本研究の一斉検出法をより定量的に評価するため、病原大腸菌遺伝子を定量した。その後、検量線を作成し、検出限界値を決定した。プライマーとプローブは終濃度が 0.9 μM と 0.25 μM となるように調整した。反応条件は以下のとおりである：最初熱変性を 95 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間、95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒間、58 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間を 40 サイクル。

(5) 次世代シーケンサーによる増幅産物の解析

増幅産物の量に対するリード数の変化を確認するため、標的とした大腸菌病原遺伝子の標準 DNA から 5 段階の 10 倍希釈系列を作成し、PCR 反応を行った。その後、PCR 増幅産物を用いてライブラリー調整し、DNBSEQ G400 (MGI Tech) によって 2x200 bp の条件でシーケンシング解析を行った。得られた塩基配列とプライマー設計の際に取得した遺伝子配列情報を比較することによって、各大腸菌病原遺伝子のリード数を求めた。

4. 研究成果

(1) Multiplex PCR 法による大腸菌病原遺伝子の検出

今回はプライマー (8 対) をすべて混合した反応液に 1 つの標的遺伝子を添加して PCR 反応を行ったため、各標的遺伝子と大腸菌の特異遺伝子である *uidA* 遺伝子の二つのバンドがそれぞれのサンプルで確認された。*stx1*, *stx2*, *ipaH*, *STh*, および LT の 5 つの病原遺伝子については、設計した増幅サイズのバンドが確認された。*aggR* 遺伝子と *eae* 遺伝子は増幅が確認されなかったが、*aggR* と *eae* の病原性遺伝子については、Single PCR 法で増幅が確認された。

(2) NGS 法による増幅産物の解析

mPCR 法では *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *STh*, および LT の 5 つの病原遺伝子と *uidA* 遺伝子、Single PCR 法では *aggR* と *eae* の病原性遺伝子をそれぞれ増幅させた。電気泳動結果から *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *STh*, LT, および *aggR* と *uidA* 遺伝子については 1 倍希釈と 10 倍希釈の試料においてバンドが確認された。*eae* については全ての試料でバンドが確認された。各 PCR 産物は等量混合し、シー

ケンシング解析に供した。

表-1に、作製した増幅産物をNGS法で解析した結果を示す。aggR, stx1, stx2, ipaH, LT, およびuidAは希釈倍率の増加に伴い、検出されるリード数が減少する傾向にあった。一方で、eaeは希釈倍率の増加に伴い、リード数の増加傾向が見られた。STh遺伝子についてはどの希釈段階においても遺伝子配列が検出できなかった。また、各遺伝子で検出されるリード数に違いが見られた。濃度が最も濃く比較的PCR反応で増幅されやすいであろう1倍希釈の試料では、最も多くのリード数が検出されたeae (726,944 reads) と最も少ないリード数のaggR (150 reads) において3オーダーほどリード数の差が確認された。

aggR, stx1, stx2, ipaH, LT, およびuidAの遺伝子は電気泳動による増幅確認で10倍希釈までしかバンドが確認できなかった。しかしながら、NGS法で解析を行うことによって100倍希釈の試料においても存在の有無を確認することが可能であった。このことから、NGS法による解析は、電気泳動で遺伝子の有無を確認するよりも高感度で標的遺伝子を一斉検出することができると示唆された。

(3) dPCR法のコピー数とNGS法のリード数の関係

aggR, stx1, stx2, ipaH, eae, LT, およびuidAにおけるコピー数とリード数の相関関係を調査したところ、それぞれの相関係数は0.978, 0.998, 0.986, 0.970, -0.896, 0.985, および0.976であり、eae遺伝子以外は正の相関を示した。eae遺伝子のプライマーは他の遺伝子と比較してアダプターの付加効率が良く、PCR産物の量が多かった可能性がある。そのため、PCR産物の総量が少ない試料ほど他の遺伝子のPCR産物とのアダプターの付加の競合が生じづらく、優先的にライゲーションしたと考えられる。そして、NGS法のライブラリー調整時のPCR反応でさらに増幅し、PCR産物の量が少ない試料ほど多くのeae遺伝子配列が検出されたと示唆された。本研究で対象とした7種類の病原遺伝子において、正の相関を示した5種の遺伝子(aggR, stx1, stx2, ipaH, LT)は、Multiplex PCR法とNGS法を組み合わせた遺伝子のリード数から、遺伝子のコピー数を推定することが可能である。また、各遺伝子のリード数に半定量的な情報が得られる。

表-1 NGS解析によって得られた標的遺伝子のリード数

標的遺伝子	リード数 (reads)					
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
EAEC <i>aggR</i>	150	78	24	6	1	
EHEC	<i>stx1</i>	2,097	231	2	0	0
	<i>stx2</i>	53,020	25,154	42	1	12
EIEC <i>ipaH</i>	467,538	358,291	15,070	1,309	815	
EPEC <i>eae</i>	726,944	1,055,850	1,658,543	1,568,295	1,798,269	
ETEC	<i>STh</i>	0	0	0	0	0
	<i>LT</i>	8,469	1,282	64	13	0
<i>E. coli uidA</i>	7,586	2,787	229	106	254	

4. まとめ

(1) 設計したプライマーを使用して7種類の大腸菌病原遺伝子うち、5種類をMultiplex PCR法、残りの2種類をSingle PCR法で遺伝子増幅することで大腸菌病原遺伝子の一斉検出が可能である。

(2) NGS法による解析の結果、PCR法で遺伝子増幅の有無を確認する従来の検出法と比較して、NGS法による解析は高感度かつ多数の遺伝子を一斉検出できる。

(3) dPCR法のコピー数とNGS法で検出された各標的遺伝子のリード数の関係を検討したところ、標的遺伝子のaggR, stx1, stx2, ipaH, LT, およびuidAが正の相関を示し、NGS法のリード数からコピー数を推定することが可能であった。

参考文献

- 1) 岸田直裕, 今野祥顕, 原本英司, 浅見真理, 秋葉道宏: 我が国における水道原水中の水系感染性ウイルスおよび原虫の存在実態と指標微生物の有効性, 水道協会雑誌, Vol. 82, No. 10, pp. 2-10, 2013.
- 2) 金子光美: 水系感染症の発生とその対策技術, 環境技術, Vol. 32, No. 6, pp. 426-432, 2003.
- 3) Toze, S.: PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater, Water Research, Vol. 33, pp. 3545-3556, 1999.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki, Y., Hashimoto, R., Xie, H., Nishimura, E., Nishiyama, M., Nukazawa, K., Ishii, S.	4. 巻 690
2. 論文標題 Growth and antibiotic resistance acquisition of Escherichia coli in a river that receives treated sewage effluent.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science of the Total Environment	6. 最初と最後の頁 696-704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2019.07.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jikumaru, A., Ishii, S., Fukudome, T., Kawahara, Y., Iguchi, A., Masago, Y., Nukazawa, K., Suzuki, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Fast, sensitive, and reliable detection of waterborne pathogens by digital PCR after coagulation and foam concentration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nukazawa, K., Akahoshi, K., Suzuki, Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Are bacteria potential sources of fish environmental DNA?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0230174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 鈴木祥広, 遠藤圭吾, 大幸和佳奈, 糠澤桂, 古橋勇一, 仲元寺宣明	4. 巻 42
2. 論文標題 下水消化汚泥の遠心脱水プロセスにおける高分子凝集剤の最適薬注率の設定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 269-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nukazawa, K., Kajiwara, S., Saito, T., Suzuki, Y.	4. 巻 145
2. 論文標題 Preliminary assessment of the impacts of sediment sluicing events on stream insects in the Mimi River, Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecological Engineering	6. 最初と最後の頁 105726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoleng.2020.105726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, Y., Imafuku, Y., Nishiyama, M., Teranishi, K., Nukazawa, K., Ogura, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 A highly efficient method for concentrating DNA from river water by combined coagulation and foam separation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Separation Science and Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01496395.2019.1565774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki, Y., Teranishi, K., Matsuwaki, T., Nukazawa, K., Ogura, Y.	4. 巻 640-641
2. 論文標題 Effects of bacterial pollution caused by a strong typhoon event and the restoration of a recreational beach: Transitions of fecal bacterial counts and bacterial flora in beach sand	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science of the Total Environment	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2018.05.265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Yoshitoshi, Ueda Takuya, Nukazawa Kei, Hiroki Hayate, Xie Hui, Arimizu Yoko, Hayashi Tetsuya, Suzuki Yoshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different Escherichia coli lineages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75065-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shimizu, H., Jikumaru, A., Nukazawa, K., Masago, Y., Ogura, Y., Ishii, S., Suzuki, Y.
2. 発表標題 Development of Comprehensive Detection Method of Pathogenic Bacteria from River Water Combining Foam Concentration and Bacterial Flora Analysis.
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2019 (WET2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, Y., Furukawa, T., Nukazawa, K.
2. 発表標題 A Proposal of Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Applying Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)
3. 学会等名 AOGS2019 in Singapore (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki, H., Kobayashi, I., Sakamoto, S.H., Uemura, R., Nukazawa, K., Suzuki, Y.
2. 発表標題 Resistant Escherichia Coli Isolated from Livestock, Wild Animals and Wastewater in a Stock Farm.
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2019 (WET2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水宏樹, 真砂佳史, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 Multiplex PCR 法による病原大腸菌 7 種の一斉検出系の確立.
3. 学会等名 54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木祥広, 西村恵美, 糠澤桂
2. 発表標題 自然河川における大腸菌と腸球菌の薬剤耐性率の比較および汚染源の推定
3. 学会等名 第22回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片淵真人, 清水宏樹, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 凝集・泡沫濃縮法を利用した河川水からの病原大腸菌の検出・単離手法の開発
3. 学会等名 54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村恵美, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 自然河川の最上流域から検出される薬剤耐性菌の供給源の推定
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水宏樹, 軸丸淳史, 糠澤桂, 真砂佳史, 小椋義俊, 石井聡, 鈴木祥広
2. 発表標題 泡沫濃縮と菌叢解析を組み合わせた河川水からの病原性細菌の網羅的検出法の開発
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣木颯, 畔柳聡, 坂本信介, 小林郁雄, 上村涼子, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 畜産場のウシ, ネズミ, および畜産排水における薬剤耐性大腸菌の実態調査
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xie, H., Hashimoto, R., Nukazawa, K., Suzuki, Y.
2. 発表標題 Antibiotic resistance profiles of regrowth Escherichia coli in urban rivers inflowing treated wastewater
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 軸丸淳史, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 河川上流から河口域に至るDNA濃度の変化
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村恵美, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 自然河川の最上流域における大腸菌と腸球菌の薬剤耐性株の存在実態
3. 学会等名 第55回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xie, H., Nukazawa, K., Suzuki, Y.
2. 発表標題 Changes in phylogroups and antibiotic-resistant profiles of Escherichia coli in municipal wastewater under aerobic condition
3. 学会等名 第55回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jikumaru, A., Imafuku, Y., Teranishi, K., Nukazawa, K., Ogura, Y., Suzuki, Y.
2. 発表標題 Development of high efficiency concentration method of DNA from river water by combined process of coagulation and form separation
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura, E., Sugita, K., Sakamoto, S.H., Nukazawa, K., Suzuki, Y.
2. 発表標題 Comparison of antibiotic-resistant Escherichia coli collected from uninhabited island and urban ponds in Miyazaki, Japan
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu, H., Masago, Y., Ogura, Y., Nukazawa, K. and Suzuki, Y.
2. 発表標題 Establishment of simultaneous detection system for seven Escherichia coli pathogenic genes from water environment
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (WET2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Xie, H., Nukazawa, K. and Suzuki, Y.
2. 発表標題 Antibiotic resistant coliform bacteria survived in treated sewage transfer antibiotic resistance to susceptible Escherichia coli
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (WET2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水宏樹, 真砂佳史, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 Multiplex PCR 法による病原大腸菌 7 種の一斉検出系の確立
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 謝暉, 糠澤桂, 小椋義俊, 鈴木祥広
2. 発表標題 好気性条件で攪拌処理した下水中の生残大腸菌における薬剤耐性率と系統群
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 謝暉, 小椋義俊, 糠澤桂, 鈴木祥広
2. 発表標題 下水処理水中に生残する薬剤耐性大腸菌群から河川由来の感受性大腸菌への薬剤耐性の伝播
3. 学会等名 第 55 回 日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井 荘一郎, 鈴木 祥広, 糠澤 桂
2. 発表標題 コロイド吸着と泡沫濃縮を利用した 細胞外DNAの超高感度検出・定量法の開発
3. 学会等名 2020年度日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学工学部社会環境システム工学科水環境研究室（鈴木・糠澤研究室） http://www.suzuki-labo.com/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	真砂 佳史 (Sasago Yoshifumi) (50507895)	国際連合大学サステイナビリティ高等研究所・サステイナビリティ高等研究・その他 (82691)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------