

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号： 82114  
研究種目： 若手研究  
研究期間： 2018～2019  
課題番号： 18K13863  
研究課題名（和文）環境水と下水処理場における大腸菌ファージ種の網羅的検出による微生物汚染源の追跡  
  
研究課題名（英文）Microbial source tracking by metagenomic analysis of infectious F-specific RNA bacteriophage strains in environmental water and wastewater treatment plant  
  
研究代表者  
李 善太（Lee, Suntae）  
  
国立研究開発法人土木研究所・土木研究所（先端材料資源研究センター）・研究員  
  
研究者番号： 60771962  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：宿主菌による前培養後に次世代シーケンス(NGS)を行うことで感染力を有するF特異RNAファージ(FRNAPH)種を網羅的に検出することができた。この手法を用いて下水試料から感染力を有する32のFRNAPH種を検出することができた。さらに、消毒後に残存する消毒耐性が強い可能性があるFRNAPH種も特定することができた。FRNAPH遺伝子群が検出されたブタの糞便試料を用いて本研究で開発した手法により検出した結果、GIVに属するFIが多く検出された。このことから、環境水中においてFRNAPHのGIVに属するFIを検出することで、ブタ由来の微生物汚染の有無を確認できる可能性が示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主菌を用いた前培養後にNGSを行う方法により、感染力を有する大腸菌ファージ種を網羅的に検出する方法を開発することができた。NGSの研究の中で感染力の有無を考慮した事例は少ないことから、他のNGS関連の研究においても応用できる手法となることが期待される。また、下水処理場の流入水や二次処理水においてどのようなFRNAPH種が存在しているか調査した研究は本研究結果が初である。さらに、ブタの糞便中に存在する感染力を有したFRNAPH種を特定することができたことから、今後、環境水中における微生物汚染源の正確な特定に繋げ、水質改善やリスクアセスメントを行なっていくことが可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study uses a novel method; i.e., culture combined with next-generation sequencing (IC-NGS) to investigate the diversity of infectious F-specific RNA bacteriophage (FRNAPH) strains. The IC-NGS results successfully reflected the infectivity of FRNAPHs by evaluating the relationship between IC-NGS results and the IC-PCR, which can detect infectious FRNAPH genotypes. A total of 32 infectious strains belonging to FRNAPH GI (nine strains), GI-JS (two strains), GII (nine strains), GIII (seven strains), and GIV (five strains) were detected in wastewater samples. The diversity of infectious FRNAPH strains in the disinfected samples indicates that certain strains are more resistant to chlorine and ultraviolet disinfection. The diversity of infectious FRNAPH strains in swine feces samples was also investigated using IC-NGS. FI was the most predominant strain of FRNAPH GIV in swine feces samples. These data suggest that FI is a promising new indicator of swine fecal pollution.

研究分野： 水環境工学

キーワード： 大腸菌ファージ 次世代シーケンス 感染力 網羅的検出 F特異RNAファージ 微生物汚染源追跡 下水処理場 消毒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人獣共通感染症とは、人と人以外の脊椎動物の両方に感染する細菌やウイルスなどの病原体により生じる感染症のことである。畜産地域においては家畜から排出された病原体が環境水中に流入され、下流域での水利用により人に感染することが懸念される。このような感染症を予防するため、環境水中における微生物汚染を追跡して汚染源を正確に特定し、水質改善やリスクアセスメントを行うことが必要である。

大腸菌に感染するウイルスの大腸菌ファージは、環境水や下水処理場の流入及び放流水に多く存在していることから、微生物汚染源追跡に多く用いられる。大腸菌ファージに属する F 特異 RNA ファージは、それぞれの遺伝子群によって人や家畜など、それぞれ由来が異なるとの報告がなされている<sup>1)</sup>。しかし、遺伝子群全体を汚染源追跡の対象としているため、汚染源の正確な特定につながっていないのが現状である。もし、大腸菌ファージの遺伝子群に属する種を迅速及び網羅的に検出することができれば、より正確な微生物汚染源を特定することが可能であると考えられる。

近年、試料中の遺伝子の塩基配列を高速に読み出すことが可能な次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing; NGS) が環境分野に導入され、その塩基配列の情報から環境中に存在する多くの生物が検出された。この NGS を用いることで、環境水や下水処理場に存在する大腸菌ファージの種を迅速及び網羅的に検出することが可能であると考えられる。しかし、NGS により読み出される遺伝子情報には限界があるため、試料中で多くの割合を占める生物らが検出される。環境水や下水処理場の試料中には多くの生物種 (藻類、細菌類など) が含まれており、これらの遺伝子量と比べて大腸菌ファージの遺伝子量は極めて少ない。このことから、試料から NGS により大腸菌ファージ種を検出するためには適切な前処理が必要である。さらに、NGS によりえられる遺伝子情報は、試料中の生物の遺伝子をターゲットとしていることから、大腸菌ファージ種の感染力の有無に関係なく検出してしまう。そのため、下水処理場の放流水を試料として用いた場合、放流前の消毒処理により不活化された大腸菌ファージ種まで検出してしまう可能性が考えられる。そのため、消毒処理から感染力を失った大腸菌ファージ種を区別して測定する手法を開発する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) NGS を用いた感染力を有する大腸菌ファージ種の網羅的検出手法を開発し、(2) 環境水および下水処理場における大腸菌ファージ種を用いた微生物汚染源の追跡を目指した。NGS を用いて生物種を検出する多くの研究では、感染力の有無を考慮していない。そこで、感染力の有無を区別する新たな前処理方法を提案し、検出手法を開発することを目的とした。この手法を用いて環境水へ流入する排出源に存在する大腸菌ファージ種を網羅的に検出することで、大腸菌ファージ種を用いた微生物汚染源追跡が可能になると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) NGS を用いた感染力を有する大腸菌ファージ種の網羅的検出手法を開発

大腸菌ファージとして、それぞれの遺伝子群によって人や家畜など、それぞれ由来が異なることが報告されている F 特異 RNA ファージ (F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH) を対象とした。感染力を有する FRNAPH 種の網羅的検出を目的に、遺伝子量の確保と感染力の失った FRNAPH 種を区別するため、試料中の FRNAPH 種を宿主菌による前培養により高濃度に増殖させ、NGS を行う方法を試みた。用いた試料としては、採水日が異なる試験水 (下水処理水) と

に高濃度に培養した FRNAPH を添加させた添加原水 と (初期濃度  $10^7$ – $10^9$  MPN/L) また、その添加原水 と をそれぞれ用いて塩素と紫外線消毒実験を実施し得た試料の塩素 と および紫外線 と を用いた。塩素 と の残留遊離塩素濃度からの  $C_t$  値はそれぞれ 24、20 mg-min/L であり、紫外線 と の紫外線照射量はそれぞれ 61、56 mJ/cm<sup>2</sup> であった。前述した合計 6 個の試料を宿主菌である WG49 を含む液体培地に添加し、37 °C で 24 時間培養して試験水中および消毒後に残存する感染力を有した FRNAPH 種を増殖させた。宿主菌を取り除くため、2000 rpm、4 °C で 10 分間遠心分離し、その上澄液を 0.45 µm のメンブレンフィルターでろ過した。その後、Amicon Ultra-15 を用いて培地成分を取り除き、RNase ONE (Promega) にて浮遊 RNA を分解した。前処理した試料からの RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (Qiagen) および QIAcube (Qiagen) にて行った。抽出した RNA は Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina) を使用してバクテリア由来の rRNA を除去・精製した後、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) を使用してライブラリ調製を行った。ポリ A 鎖を有しない FRNAPH の RNA は、ライブラリ調製の最初の段階に行われる mRNA 精製プロセスにより取り除かれてしまうため、このプロセスを省略して次の段階である断片化プロセスから実施した。調製したライブラリを 1% のアガロースゲル電気泳動 (E-Gel EX Agarose Gel, Invitrogen) に供して 300–650 bp のバンドを切り出し、MonoFas DNA Purification Kit (GL Sciences) を使用して切り出し産物の精製を行った。精製した cDNA の濃度を Qubit Fluorometer (Invitrogen) により定量し、その濃度から 4 nM にブーリング後、v3 reagent kit を用いて次世代シーケンサーの Miseq (Illumina) に供した。得られたシーケンスは Galaxy platform (<https://galaxy.dna.affrc.go.jp>) にて、Trimmomatic によるトリミングと FastQC によるクオリティチェックを行い、Trinity による de novo assembly を行って contig (得られたシーケンスの断片配列を重ね合わせ連結させた配列) を得た。得た contig は NCBI の塩基配

列データベース (nt) を用いた BLASTn 解析 (Ver. 2.7.1+) により相同性が一番高かった種を同定した (E-value :  $<10^{-3}$ )。さらに、BLASTn 解析により得た結果を MEGAN (Ver. 6.12.0) により分類した。

NGS により得た FRNAPH 種の検出結果に感染力が反映されているかを検討するために、NGS に用いた同じ試料を IC-PCR<sup>2)</sup>による FRNAPH 遺伝子群の定量結果(感染力を反映する)と、PCR<sup>3)</sup>を用いた FRNAPH 遺伝子群の遺伝子定量結果(感染力の有無に関係なく対象遺伝子を検出)と比較した。

#### (2) 環境水および下水処理場における大腸菌ファージ種を用いた微生物汚染源の追跡

動物糞便試料として、2019年10月から12月の間に、ウシ(3試料)、ブタ(10試料)、イヌ(3試料)、ネコ(3試料)およびニワトリ(12試料)の糞便を採取した。また、食肉加工工場の浄化槽流入水(屠畜場排水)試料として、ブタ(4試料)とニワトリ(2試料)の屠畜場排水を採取した。動物糞便試料4-7gを20mLのPBSで懸濁させ、1 $\mu$ mのメンブレンフィルター(ガラスファイバー)でろ過し、FRNAPHの宿主菌(WG49)を含んだ培地と混合培養後、PCR<sup>3)</sup>により感染力を有したFRNAPH遺伝子群を検出した。屠畜場排水試料中の感染力を有するFRNAPH遺伝子群の濃度は、IC-PCR<sup>2)</sup>により定量した。また、FRNAPH遺伝子群が検出されたブタの糞便試料4つ(ブタ1、ブタ2、ブタ3、ブタ4)を用いて、(1)で開発した、感染力を有するFRNAPH種の網羅的検出手法により遺伝子群に属する種を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) NGSを用いた感染力を有する大腸菌ファージ種の網羅的検出手法を開発

宿主菌による前培養により高濃度に増殖させ、NGSを行うことで、検出結果に感染力が反映されるかを検討するために、NGSによりFRNAPH種に同定された contig 数を遺伝子群別に整理し、その存在割合の結果と、IC-PCRによる感染力を有するFRNAPH遺伝子群の定量結果(感染力を反映している)からの存在割合および、PCRによるFRNAPH遺伝子群の遺伝子定量結果(感染力を反映していない)からの存在割合と比較した(図1)。なお、存在割合の算出には、NGSはFRNAPH種に同定された contig 数、IC-PCRとPCRはそれぞれの濃度(MPN/L, copies/L)を用いた。NGSによる存在割合の結果は感染力が反映されていないPCRの結果と比べて感染力が反映されているIC-PCRの結果と類似していた(図1)。PCRによる結果では、全ての試料でGII遺伝子群が97%以上の存在割合で存在しており、その他の遺伝子群と比べて30-1000倍以上濃度が高かった。

PCRによる結果でGIIの存在割合が極端に高かったのは、他の遺伝子群はPCRによる濃度(copies/L)がIC-PCRによる濃度(MPN/L)より1-100倍高かったが、GIIは1000-100,000倍高かったことが原因である。IC-PCRは感染力を反映するがPCRは感染力を反映しないため、NGSで用いた試料中でGIIは他の遺伝子群と比べて感染力を有しない状態で多く存在(PCRにより検出されたGII遺伝子の99.9-99.999%は感染力を有していない)していることが考えられる。そのため、もしNGSによる結果に感染力が反映されていなかった場合には、PCRの結果と同様にGIIの存在割合が他の遺伝子群と比べて極端に高かったことが推測される。しかし、NGSによる結果ではGIIの存在割合が他の遺伝子群と比べてそれ程高く無く、感染力を反映しているIC-PCRの結果と類似していた。このことから、宿主菌を用いた前培養を行うことで、NGSにより試料中の感染力を有するFRNAPH種を検出することができたと考えられる。

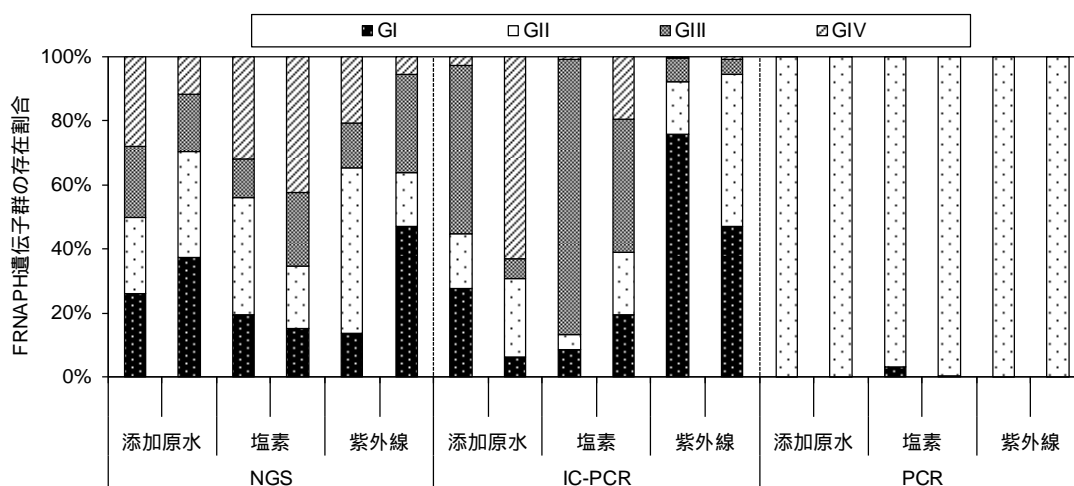


図1 NGS、IC-PCR、PCRによる検出結果から算出した試料中におけるFRNAPH遺伝子群の存在割合

(2) 環境水および下水処理場における大腸菌ファージ種を用いた微生物汚染源の追跡

動物糞便試料における感染力を有した FRNAPH 遺伝子群の検出結果では、ブタの糞便のみ GIV が 60%の陽性率で検出された(表 1)。ブタの屠畜場排水では、GII 以外の遺伝子群(GI、GIII、GIV)が全ての試料で検出(100%)された。ニワトリの屠畜場排水では、GI と GII が 50%、GIII と GIV が 100%の陽性率で検出された。ブタの屠畜場排水で検出された感染力を有した FRNAPH 遺伝子群の濃度は(図 2) GI が 3.0-5.0 log(MPN/L)、GIII が 2.6-4.4 log(MPN/L)、GIV が 5.0-8.0 log(MPN/L)であり、GIV が最も高かった。

FRNAPH 遺伝子群の中で GI と GIV は動物由来であり、GII と GIII は人由来であることが報告されている<sup>1)</sup>。本調査結果、GIV はブタの糞便から高い陽性率で検出されたことと、ブタの屠畜場排水中に他の遺伝子群と比べて高濃度で存在していたことから、動物の中でもブタ由来の可能性が高いことが示された。既往の研究で、下水処理場の流入水では、他の遺伝子群と比べて GII と GIII が高濃度で検出されることが報告されているが<sup>1)</sup>、本調査と同じ地域の下水処理場において GIV が GII および GIII と同程度の濃度で検出されたことが報告されている<sup>3)</sup>。この原因として本調査結果から、この地域の下水処理場の流入水にはブタ由来の排水が多く混入している可能性が示唆された。

表 1 動物糞便および屠畜場排水における感染力を有した FRNAPH 遺伝子群の検出結果

	試料数	陽性試料数(陽性率)			
		GI	GII	GIII	GIV
糞便					
ウシ	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
ブタ	10	0(0)	0(0)	0(0)	6(60)
イヌ	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
ネコ	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
ニワトリ	12	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
屠畜場排水					
ブタ	4	4(100)	0(0)	4(100)	4(100)
ニワトリ	2	1(50)	1(50)	2(100)	2(100)

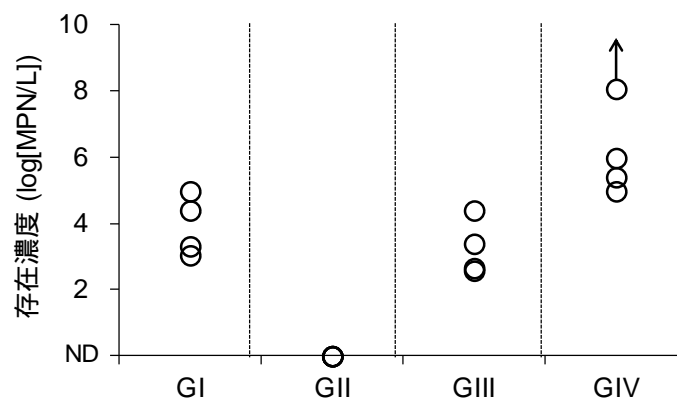


図 2 ブタの屠畜場排水中に存在する感染力を有した FRNAPH 遺伝子群の定量結果

表 2 に、FRNAPH 遺伝子群が検出されたブタの糞便試料 4 つ(ブタ 1、ブタ 2、ブタ 3、ブタ 4)における感染力を有する FRNAPH 種の網羅的検出結果を示す。GIV が検出されたブタの糞便試料 4 つ全てにおいて他の遺伝子群に属する種も検出されたが、GIV に属する FI がその他の種と比べてより多く検出された。従って、ブタの糞便中には GIV に属する FI が感染力を有して存在している可能性が高いことが確認された。このことから、環境水中において FRNAPH の GIV に属する FI を検出することで、ブタ由来の微生物汚染の有無を確認できる可能性が示唆された。

表2 プタの糞便試料における感染力を有した FRNAPH 種の検出結果

FRNAPH 遺伝子群	FRNAPH 種	BLASTn解析によりFRNAPH 種に同定されたcontig数			
		糞便			
		ブタ1	ブタ2	ブタ3	ブタ4
GI	MS2	1		1	
	DL1	1			
	J20		1		1
	fr		1		
	DL16		1		
GI-JS	DL52	4		2	
	DL54	1			1
GII	DL20		1		1
	GA				
	DL10				
	JP34	1			
	BZ13				
GIII	HL4-9	2	1		
	Qβ	1			
	TW18	2			2
	VK	1	2		2
	BR12	2	1		1
	BZ1				
GIV	FI	23	20	75	12
	BR1	1			
	BR8				1
	HB-P22	1		5	
	HB-P24		1		
	SP			1	
	NL95	2			

< 引用文献 >

- 1) Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D.: Evaluation of F + RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 69, pp. 6507–6514, 2003.
- 2) Lee, S., Tasaki, S., Hata, A., Yamashita, N., Tanaka, H.: Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes, *Environ. Technol.*, Vol. 40, pp. 2527–2537, 2019.
- 3) Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H.: Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant, *J. Water Health*, Vol. 17, pp. 50–62, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Suntae Lee, Mamoru Suwa, Hiroyuki Shigemura	4. 巻 17
2. 論文標題 Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Water and Health	6. 最初と最後の頁 50～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/wh.2018.367	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 Suntae Lee, Mamoru Suwa, Hiroyuki Shigemura	4. 巻 8
2. 論文標題 Metagenomic Analysis of Infectious F-Specific RNA Bacteriophage Strains in Wastewater Treatment and Disinfection Processes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 217～217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens8040217	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 李善太、諏訪守、重村浩之	4. 巻 75
2. 論文標題 下水処理水中のF特異RNAファージ遺伝子群の塩素と紫外線消毒による不活化効果と消毒後残存株の特定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 環境工学研究論文集	6. 最初と最後の頁 111_161～111_171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2208/jscej.75.7_111_161	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李善太，諏訪守，重村浩之
2. 発表標題 下水処理場における大腸菌ファージ種の網羅的検出
3. 学会等名 第21回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李善太, 諏訪守, 重村浩之
2. 発表標題 紫外線消毒によるノロウイルスとF特異RNAファージ遺伝子群の低減効果の評価
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 李善太, 諏訪守, 重村浩之
2. 発表標題 次世代シーケンサーによる感染力を有したF特異RNAファージ種の網羅的検出
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 李善太, 諏訪守, 重村浩之
2. 発表標題 下水処理水中のF特異RNAファージ遺伝子群の塩素と紫外線消毒による不活化効果と消毒後残存株の特定
3. 学会等名 第56回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李善太, 諏訪守, 重村浩之
2. 発表標題 水環境や下水道への動物由来排出源におけるF特異RNAファージの実態調査
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----