

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630226

研究課題名(和文) 病原性細菌による水環境汚染の実態解明に資する病原性細菌の網羅的定量解析手法の開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive quantification method for pathogenic bacteria that contributes to the clarification of the occurrence of pathogenic bacteria in the aquatic environment

研究代表者

井上 大介 (INOUE, Daisuke)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：70448091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多様な病原性細菌の一斉定量解析法の開発と、それを用いた水環境中の病原性細菌汚染実態の解明を目指し、DNAインターカレーター処理を用いた水中の生菌DNA選択的検出法の開発、DNAマイクロアレイを用いた900種余の病原性細菌の一斉定量解析法の開発、国内外の水環境における病原性細菌汚染のデータ基盤の整備に取り組んだ。本研究の結果から、ある程度多様な細菌種に有効なDNAインターカレーター処理条件を明らかにし、多様な病原性細菌の一斉定量解析法の確立に向けたヒントを得ることができた。また、相模川水系及びネパール・カトマンズ盆地の水試料における病原性細菌汚染の状況を把握することができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a comprehensive quantification method for over 900 species of pathogenic bacteria and to clarify the occurrence of those pathogenic bacteria in the aquatic environment using the developed method. To these aims, this study tried to develop a selective detection method of viable bacteria in water using DNA intercalating treatment, to develop a quantitative DNA microarray method to simultaneously quantify over 900 pathogenic bacterial species, and to understand the occurrence of pathogenic bacteria in aquatic environments in Japan and other countries. Results of this study clarified the DNA intercalating treatment conditions useful for various bacterial species to some extent, and showed some important hints for the establishment of a quantitative DNA microarray method. In addition, this study could grasp the occurrence of over 900 pathogenic bacterial species in the Sagami River basin and in water samples collected from the Kathmandu valley, Nepal.

研究分野：生物環境工学

キーワード：病原性細菌 水環境 網羅的定量解析 DNAマイクロアレイ DNAインターカレーター処理

1. 研究開始当初の背景

病原菌による水環境汚染は、人間の健康を脅かす世界的に重大な問題である。世界保健機構の報告によれば、世界で約 11 億人が安全な飲料水を利用できず、年間約 40 億の下痢発生件数のうち 88%が衛生学的に安全でない飲料水の利用に起因しており、下痢による死亡者は年間 180 万人(殆どが 5 歳未満児)にも上っている。また、病原菌汚染による健康被害は、既に衛生施設が充実している日本をはじめとする先進諸国においても後を絶たず、病原菌汚染の本質的な解決には未だ程遠いのが現状である。水の衛生学的安全性は、古くから、大腸菌群等の糞便汚染指標を用いて評価・管理されてきたが、上記のような状況を改善させるためには、実際に水系感染症を引き起こす可能性のある病原微生物による水環境汚染の実態を解明することが不可欠である。特に、多くの既往研究で報告されているように、現行の糞便汚染指標とは明確な相関を示さない病原性細菌が数多く存在している事実を踏まえると、既存の指標細菌に限らず、多種の病原性細菌を網羅的にモニタリングし、それらによる汚染実態を明らかにすることが重要といえる。

環境微生物のモニタリング手法には、培養法、免疫学的手法、分子生物学的手法がある。これらの中で、多種類の微生物を一斉に検出する手法としては、分子生物学的手法に分類される DNA マイクロアレイ解析が最も有望な手法である。しかし、DNA マイクロアレイ解析は元来、定性的な手法であり、定量性に問題を有する。他方、DNA をターゲットとした解析では、培養困難な菌や viable but nonculturable (VBNC) 菌も検出できる反面、死菌由来の DNA まで検出することにより、過大評価をもたらす可能性がある。そこで、これらの問題点を払拭し、多種多様な病原性細菌を対象とした、生菌のみを選択的に定量することのできる新たな解析手法が求められている。

2. 研究の目的

先に述べた背景から、本研究では、900 種余の病原性細菌を一度に定量解析する新規解析手法を開発し、それを活用して水環境における病原性細菌汚染の実態を解明することを目標に掲げて研究を実施した。具体的には、DNA インターカレーター処理を用いた水中の生菌 DNA 選択的検出法の開発、DNA マイクロアレイを用いた 900 種余の病原性細菌の一斉定量解析法の開発、国内外の水環境における病原性細菌汚染のデータ基盤の整備を試みた。

3. 研究の方法

(1) 調査地域および水試料

国内の調査は相模川水系において実施し、本流の 4 地点、ならびに支流である鳩川の 2 地点、姥川の 3 地点を採水地点に選定した。

相模川は飲用水をはじめ、様々な用途の水資源として用いられている一級河川である。調査は、季節的な微生物群集の変化を考慮して、2012 年 7 月から 2015 年 1 月にかけて複数回実施した。他方、海外の調査はネパール・カトマンズ盆地において実施した。ネパールでは、1990 年の民主化以降、急激な都市化、首都カトマンズにおける急激な人口増加が進行し、それに伴い水需要も急増してきたが、衛生設備の普及が追いつかず、多くの人々が不衛生な飲料水及び生活用水の利用を余儀なくされており、水系感染症による健康被害が重大な社会問題のひとつになっている。本研究では、2014 年 9 月(雨期)に調査を実施し、市販の飲用ボトル水 10 試料、浅井戸地下水 10 試料、深井戸地下水 3 試料、公共水場水 1 試料、湧水 2 試料、河川水 2 試料を解析試料として採取した。

(2) 一般水質分析

理化学指標として、水温、pH、溶存有機性炭素、窒素、リンの測定を行った。また、微生物指標として、一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌、大腸菌群の測定を行った。

(3) DNA インターカレーター処理

水試料に使用する DNA インターカレーター処理条件の最適化は、5 種類の菌株(グラム陰性菌の代表として *Escherichia coli* NBRC3301、*Pseudomonas putida* NBRC100650、低 GC グラム陽性菌の代表として *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NBRC13719^T、*Enterococcus faecalis* NBRC100480^T、高 GC グラム陽性菌の代表として *Rhodococcus equi* JCM1311^T)を用いて行った。

DNA インターカレーター処理は、水試料より調製した菌懸濁液(条件検討時には上記菌株を接種)に対して、エチジウムモノアザイド(EMA)あるいはプロピジウムモノアザイド(PMA)を終濃度が 0-100 µg/ml になるように添加し、暗所・氷上で 15 分間インキュベートした後、LED Crosslinker 12(タカラバイオ)による 15 分間の光照射を行うことで実施した。

(4) DNA テンプレートの調製

水試料中の微生物は、孔径 0.22 µm のメンブレンフィルターを用いて濾過集菌し、TE 緩衝液に再懸濁・濃縮させた。必要に応じて上記の DNA インターカレーター処理を行った後、シカジーニアス DNA 抽出試薬(関東化学)を用いて微生物 DNA を抽出し、病原性細菌の解析に供した。

(5) 病原性細菌の解析

本研究では、人、動物、植物及び魚介類に対する病原性細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とする 941 種類の DNA プロンプ(バイオセーフティレベル(BSL) 2、3: 632 種、日和見感染を示す BSL1: 309 種)を搭載した DNA マイ

クオアレイを用いて、病原性細菌の網羅的検出を行った。解析では、まず、リバースプライマーの5'末端をCy3で蛍光標識したプライマー[8UA, 907R-Cy3]を用いて真正細菌16S rRNA遺伝子の部分配列をPCR増幅した。ここで得られた増幅産物を精製・濃縮した後、600ng相当をDNAマイクロアレイ解析に供した。本研究で使用するDNAマイクロアレイはeArray(アジレント・テクノロジー)を用いて作製しており、マイクロアレイハイブリダイゼーション(55、10rpm、16時間)前のサンプル調製と、その後のマイクロアレイスライドの洗浄は同社のプロトコルに準じた。洗浄したマイクロアレイスライドは、GenePix 4000B(Intermedical)を用いて各プローブのCy3蛍光強度を読み取り、シグナルノイズ比(S/N比)として数値化して、陽性/陰性の判定等のデータ処理を行った。

また、特定の病原性細菌の定量は、対象細菌(グループ)を特異的に検出可能なプライマーを使用したreal-time PCR法または最確数PCR法(MPN-PCR法)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 多様な細菌種の生菌選択検出に有効なDNAインターカレーター処理条件の検討

系統分類学的に多様な細菌種の生菌DNAの選択検出に適したDNAインターカレーター処理条件を明らかにするため、滅菌生理食塩水に5種類の試験菌株の生菌または死菌を植種した菌懸濁液に対して異なる濃度でEMAまたはPMAを添加してDNAインターカレーター処理を行い、real-time PCR法を用いて各処理条件における生菌選択検出(死菌排除)の可能性について検討した。代表的な結果として、*P. putida*を用いた試験結果を図1に示す。いずれの菌においても、EMA/PMAを添加しない場合には死菌でも生菌と同程度の定量値を示したが、1µg/mlのEMAまたはPMAで処理することによって死菌における定量値が98%以上低下し、添加濃度の上昇に伴ってさらに低下した。他方、生菌においても、

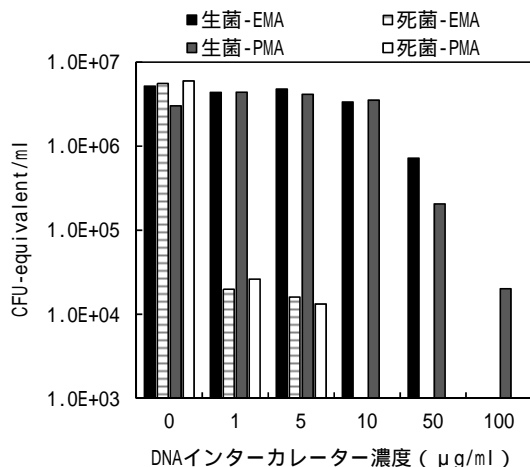


図1 *P. putida* NBRC100650を用いたDNAインターカレーター処理条件の検討結果

EMA/PMA処理を行うことにより、濃度依存的に定量値が低下し、EMA/PMAの毒性による効果が観察された。全菌株における結果から、生菌の定量値の低下が少なく、死菌を高効率に排除できるEMA/PMA濃度は1µg/mlであることが明らかになった。

また、*P. putida*, *E. faecalis*, *R. equi*の生菌または死菌を河川水(相模川、姥川より採取した2試料)に植種し、上で決定した条件でDNAインターカレーター処理を行い、環境水試料における処理効果について検討した。その結果、*P. putida*においては、死菌だけでなく、生菌の定量値も減少することが観察されたものの、*E. faecalis*と*R. equi*では、試料中の共存微生物濃度によらず、生菌の選択検出が可能であった。このことから、本研究で決定したDNAインターカレーター処理は、さらなる検討の余地はあるものの、ある程度多様な細菌種に対して有効であることが示唆された。

さらに、相模川及び姥川の河川水試料を対象として、DNAインターカレーター処理を適用したDNAマイクロアレイによる病原性細菌の網羅的検出を試みた。DNAインターカレーター処理を行わずにDNAマイクロアレイ解析を行った場合には、相模川及び姥川の河川水試料において、それぞれ221種及び233種の病原性細菌が検出された。一方、EMAまたはPMAを用いてDNAインターカレーター処理を行った試料に対してDNAマイクロアレイ解析を実施した結果、相模川の試料ではそれぞれ44種及び21種、姥川の試料ではそれぞれ276種及び64種の病原性細菌が検出され、一部を除き、DNAインターカレーター処理を行わなかった場合に比べて検出される病原性細菌種が少なかった(図2)。以上の結果から、河川水中の病原性細菌DNAの多くは死菌等に由来している可能性が考えられ、病原性細菌汚染の実態解明を行うにあたっては、生菌のみを選択的に検出することが重要であることが改めて示された。また、2種類のDNAインターカレーターにおける異なる結果は、各

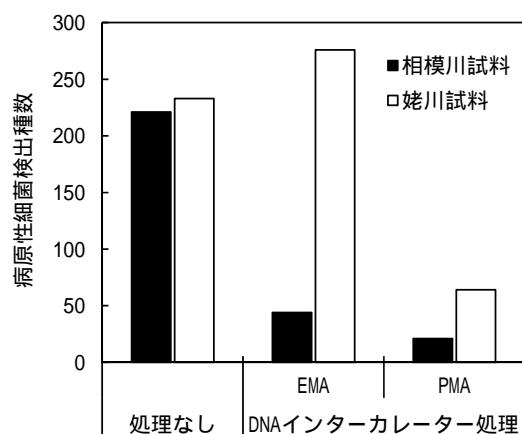


図2 DNAインターカレーター処理の有無による病原性細菌のDNAマイクロアレイ解析結果の相違

DNA インターカレーターによる効果が細菌種によって異なることに起因するものと考えられ、評価対象となる病原性細菌種による使い分けや、両 DNA インターカレーターの併用等も含めて、さらに検討が必要であると考えられた。

(2) DNA マイクロアレイを用いた多種多様な病原性細菌の一斉定量解析法に関する検討

当初の DNA マイクロアレイフォーマットを用いた解析では、試料中における各病原性細菌の相対量を S/N 比によって比較することはできたが、試料中における実際の存在量を知ることが困難であった。そこで、本研究では、DNA マイクロアレイに真正細菌 16S rRNA 遺伝子ユニバーサルプローブを追加で搭載することにより、ユニバーサルプローブの S/N 比、各病原性細菌に対するプローブの S/N 比、試料中の真正細菌数 (real-time PCR 法による定量値) を基にして、試料中における各病原性細菌の存在量を把握することが可能であると考え、ユニバーサルプローブを追加した新たな DNA マイクロアレイフォーマットを設計した。しかし、検討の結果、本手法による定量においては、ユニバーサルプローブ及び病原性細菌プローブにおけるハイブリダイゼーション効率が同一であることが不可欠であることが明らかとなり、定量性の確保には更なる検討が必要であることが明らかになった。具体的な代替案の一つとして、病原性細菌プローブと等しいハイブリダイゼーション効率が得られ、かつ、環境中の微生物 DNA とはハイブリダイズしない定量用プローブを新たにデザインして DNA マイクロアレイに搭載し、定量用プローブに特異的にハイブリダイズする内部標準 DNA を既知濃度で試料に添加して解析する方法が考えられた。

(3) 相模原水系における病原性細菌汚染の実態把握

相模川 4 地点、鳩川 2 地点、姥川 3 地点において、合計 8 回 (72 試料) の調査を行った。水質分析の結果、相模川に比べて支流の鳩川及び姥川において、窒素濃度や微生物指標 (一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌、大腸菌群) が高いケースが多く見られた。特に、姥川の上流に位置する採水地点では、他の採水地点に比べて微生物指標が非常に高値を示した。これらの結果から、本流であり、様々な用途の水源に利用されている相模川は良好な水質であるが、支流である鳩川、姥川では生活排水及び工場排水に由来する汚染が生じていることが示唆された。

72 試料の河川水試料に対して DNA マイクロアレイ解析を行った結果、標的とする 941 種のうち、相模川では 47-325 種、鳩川では 88-299 種、姥川では 38-305 種が検出された (図 3)。全体では、802 種が少なくとも 1 試料で検出され、その内 530 種が BSL2 または BSL3 に分類される病原性細菌であった。河川

別では、相模川、鳩川、姥川において、それぞれ 32-205 種、49-184 種、24-188 種の病原性細菌が検出された。8 割以上の試料で検出され、時季や汚染度に関係なく、河川水中に比較的普遍的に存在すると考えられた病原性細菌種は 77 種に上り、その中には *Enterobacter* 属や *Erwinia* 属、*Klebsiella* 属、*Salmonella* 属、*Serratia* 属等の糞便に関連するものも含まれた。特に、水質分析において糞便汚染が推測された姥川上流の採水地点では、糞便に関連するこれらの種が常に検出され、水質汚染状況と合致する結果が得られた。

また、15 試料以上 (全試料の 2 割以上) で検出された 256 種の病原性細菌を対象として、一般水質項目との相関を調べた。DNA マイクロアレイ解析では、各病原性細菌プローブの S/N 比を定量データとして用いて相関を調査した結果、病原性細菌種及び水質項目によらず、有意な相関は認められなかった。このことから、現行の微生物指標や理化学指標では病原性細菌の存在実態を把握しきれていない可能性のあることが改めて示唆された。河川水中に頻出する病原性細菌種の内、一般水質項目と有意な相関を示さなかったものは、病原性細菌汚染を把握するための指標菌として利用できる可能性があり、環境水中における挙動についてさらに知見を深めることが必要であると考えられた。

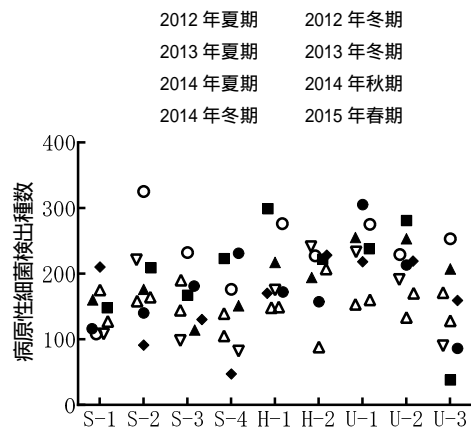


図 3 DNA マイクロアレイを用いた相模川 (S-1、S-2、S-3、S-4) 鳩川 (H-1、H-2) 姥川 (U-1、U-2、U-3) における病原性細菌の検出結果

(4) ネパール・カトマンズ盆地における病原性細菌汚染の実態把握

カトマンズ盆地より採取した 28 試料の水質分析の結果、人々の生活に利用される地下水及び公共水場水において高濃度の窒素汚染が散見された。また、25 試料で大腸菌群、19 試料で大腸菌が検出され、糞便汚染が広く生じていることも示唆された。特に、河川水、浅井戸地下水、公共水場水において検出濃度が高く、飲用ボトル水でも大腸菌が検出されるケースがあった。また、浅井戸地下水にお

いては、市街地よりも郊外で特に微生物指標が高濃度であった。水質分析の結果から、生活用水として広く利用されている地下水と公共水場水、さらに市販の飲用ボトル水においても、飲用に適さない深刻な窒素・微生物汚染が生じていることが示唆された。

28 試料の DNA マイクロアレイ解析の結果、検出された病原性細菌種は 411 種に上り、その 6 割以上が BSL2 または BSL3 に分類される病原性細菌種であった。試料の種類別では、飲用ボトル水で 10-226 種、浅井戸地下水で 9-195 種、深井戸地下水で 13-89 種、公共水場水で 39 種、湧水で 14-150 種、河川水で 8-32 種が検出され(図 4)、解析試料数に違いはあるものの、飲用ボトル水と浅井戸地下水に多様な病原性細菌種が存在することが示唆された。また、浅井戸地下水の立地場所に注目すると、水質汚染の深刻な郊外において、市街地よりも多様な病原性細菌が存在することが示唆された。

検出された 411 種の病原性細菌の内、10 種が 8 割以上の試料で検出され、その中には、BSL2 に分類される *Legionella* 属も含まれた(表 1)。また、糞便に関連する *Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Serratia* 属は 6 割以上の試料において検出され、飲用ボトル水でもそれぞれ 8 試料、8 試料、7 試料で検出された。これらの結果は前述の水質分析結果と合致しており、飲用ボトル水において深刻な病原性細菌汚染が生じていることが改めて示唆された。

多くの試料で検出された *Legionella* 属に関して、属特異的プライマーを用いた MPN-PCR 法による定量を行った。飲用ボトル水 1 試料、浅井戸地下水 9 試料、湧水 1 試料、河川水 2 試料の 13 試料において、 2.7×10^3 - 4.5×10^5 MPN-copies/100ml の濃度で検出された。また、その増幅産物のクローンライブラリ解析から、*Legionella pneumophila* が最も広く存在することが示唆された。

BSL3 に分類される病原性細菌では、*Anaplasma marginale/centrale* が 14 試料、

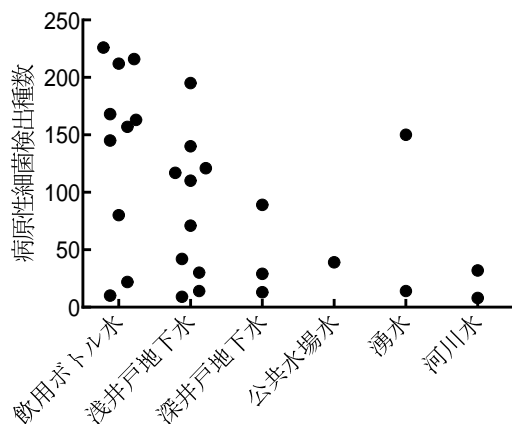


図 4 DNA マイクロアレイを用いたネパール・カトマンズ盆地の水試料における病原性細菌の検出結果

Brucella melitensis と *Salmonella enterica* がそれぞれ 6 試料で検出され、比較的多くの試料に存在する可能性が考えられた。そこで、*Brucella* 属を対象として、MPN-PCR 法による定量を試みた結果、5 試料において 2.7×10^3 - 3.3×10^5 MPN-copies/100ml の濃度で検出された。*Brucella* 属細菌が検出された試料では大腸菌群数及び大腸菌数が比較的良かったことから、糞便汚染とは異なる経路で汚染が生じている可能性が考えられた。

また、6 試料以上(全試料の 2 割以上)で検出された 182 種の病原性細菌種を対象として水質項目との相関を調べた結果、14 種がいずれかの水質項目と有意な正の相関を示したが、残りの 168 種はいずれの水質項目とも有意な相関を示さなかった。これらの結果から、現行の水質評価指標のみでは、現地の病原性細菌汚染の状況を把握することは困難であり、その汚染を評価するための新たな指標が必要であることが示唆された。

表 1 ネパール・カトマンズ盆地の多くの水試料で検出された病原性細菌種

病原性細菌種	検出率
<i>Arthrobacter globiformis</i>	93%
<i>Brevibacterium otitidis</i>	86%
<i>Legionella longbeachae</i>	93%
<i>Legionella pneumophila</i>	89%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82%
<i>Pseudomonas cichorii</i>	100%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96%
<i>Pseudomonas marginalis</i>	96%
<i>Pseudomonas syringe</i>	93%
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	93%

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Daisuke Inoue, Takuji Hinoura, Noriko Suzuki, Junqin Pang, Rabin Malla, Sadhana Shrestha, Saroj Kumar Chapagain, Hiroaki Matsuzawa, Takashi Nakamura, Yasuhiro Tanaka, Michihiko Ike, Kei Nishida, Kazunari Sei, High-throughput DNA microarray detection of pathogenic bacteria in shallow well groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal, Current Microbiology, 査読有、70 巻、2015、43 - 50
DOI : 10.1007/s00284-014-0681-x

[学会発表](計 8 件)

吉永隼人、井上大介、Bikash Malla、田中靖浩、Jeevan B. Sherchand、原本英司、清和成、ネパール・カトマンズ盆地の各種水試料中における病原性細菌汚染の実態調査、日本水処理生物学会第 52 回大会、2015 年 11 月 11-13 日、北九州

国際会議場（福岡県北九州市）
Kazunari Sei、Hayato Yoshinaga、Tomoharu Kamibayashi、Kaori Miyauchi、Takuji Hinoura、Daisuke Inoue、Monitoring of bacterial pathogens in Sagami River basin for the grasp of the river pollution by bacterial pathogens、18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2015)、2015年9月13-19日、Lisbon (Portugal)
Hayato Yoshinaga、Daisuke Inoue、Bikash Malla、Rajani Ghaju、Dinesh Bhandari、Sarmila Tandukar、Yasuhiro Tanaka、Jeevan B. Sherchand、Eiji Haramoto、Kazunari Sei、Comprehensive analysis of pathogenic bacteria occurred in jar water, community well groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal、Water and Environment Technology Conference 2015 (WET2015)、2015年8月5-6日、日本大学駿河台キャンパス(東京都千代田区)
吉永隼人、上林智遥、宮内華織、日野浦拓之、井上 大介、清和成、DNA マイクロアレイを用いた相模川水系の病原性細菌汚染の調査、日本水処理生物学会第51回大会、2014年11月12-14日、山梨県JA会館(山梨県甲府市)
井上 大介、上林智遥、吉永隼人、清和成、様々な細菌種の生菌選択検出に適用可能なDNAインターカレーター処理法の開発、第48回日本水環境学会年会、2014年3月17-19日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)
井上 大介、上林智遥、吉永隼人、宮内華織、日野浦拓之、清和成、DNA マイクロアレイを用いた相模川水系における病原性細菌分布の網羅的解析、日本水処理生物学会第50回大会、2013年11月13-15日、神戸市水道局たちばな職員研修センター(兵庫県神戸市)
Kazunari Sei、Takuji Hinoura、Kaori Miyauchi、Saroj K. Chapagain、Hiroaki Matsuzawa、Takashi Nakamura、Yasuhiro Tanaka、Daisuke Inoue、Kei Nishida、DNA microarray analysis of bacterial pathogens in shallow well groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal、17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (WaterMicro2013)、2013年9月15-20日、Florianópolis (Brazil)
Takuji Hinoura、Noriko Suzuki、Junqin Pang、Rabin Malla、Shrestha Malla、Saroj K. Chapagain、Hiroaki Matsuzawa、Yasuhiro Tanaka、Daisuke Inoue、Michihiko Ike、Kei Nishida、Kazunari Sei、Comprehensive detection of

pathogenic bacteria in shallow groundwater in Kathmandu Valley, Nepal, using DNA microarray、6th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy-Environment, Energy and Sustainable Development、2013年8月4-6日、大阪大学吹田キャンパス(大阪府吹田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 大介 (INOUE, Daisuke)
北里大学・医療衛生学部・准教授
研究者番号：70448091

(2) 研究分担者

清 和成 (SEI, Kazunari)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：80324177

岩下 正人 (IWASHITA, Masato)
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号：00137895