

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：51101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K06559

研究課題名(和文)ゲノム分子生物学による生存可能な病原性細菌の直接計数法の研究開発

研究課題名(英文) Evaluation of PMA-PCR and RT-PCR methods combined with 16S rRNA illumina sequencing techniques for detection of live bacterial community

研究代表者

矢口 淳一 (YAGUCHI, JUNICHI)

八戸工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：80342450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンサーによる生理的活性のある細菌の細菌叢解析のため、アンプリコンシーケンス解析においてPCR、PMA-PCR、RT-PCRを比較した。まず、熱処理した排水サンプルに培養した大腸菌と糞便性連鎖球菌を添加して3つのPCR法と2段階で増幅を行うPMA-nestedPCRで細菌叢を解析したところ、RT-PCRのみはほぼ添加量を反映した細菌叢が得られた。次に生活排水、その処理水、河川水と消化汚泥に3つのPCR法を適用して細菌叢解析を行ったところ、4つのサンプルとも手法によって多様性が大きく異なり、分析手法によって活性のある細菌叢に顕著な違いがあることが知られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大腸菌など指標生物に基づく糞便汚染の評価法を革新するスタートの研究と位置付けることができ、研究開発した生理的活性のある細菌群のみを菌叢解析する手法によって、活性を維持している病原性細菌の水環境中での挙動を把握することができ、感染リスクの評価と污染源対策を通じてリスクマネジメントに大きく貢献できる。開発した手法を2つの下水処理場に適用して病原性細菌の挙動解析を行ったところ、Mycobacterium属の細菌が塩素消毒後も活性を維持して残存していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, PCR with selective membrane-permeable dye, PMA(Propidium monoazide) (PMA-PCR) and RNA targeted reverse transcription PCR(RT-PCR) combined with illumina 16S rRNA sequencing techniques were developed to detect viable microbial community in environmental water samples. Microbial community analysis of the heated-treated primary effluent spiked with two viable enteric bacteria showed that the amplicon sequencing based on PMA-PCR and RT-PCR methods were effective for the detection of physiologically active bacterial community. Especially, RT-PCR method based on RNA was able to detect both of active enteric bacteria more appropriately than PMA-based methods. Four environmental samples including primary effluent, chlorinated effluent, river water and digested sludge were assessed the viability of bacterial community using PCR, PMA-PCR and RT-PCR method. Three methods had their quite different community structures from each other according to beta diversity analysis.

研究分野：環境衛生工学

キーワード：アンプリコンシーケンス解析

PMA rRNA 病原性細菌 RT-PCR 多様性解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水中の病原性微生物による感染リスクを適切に管理するためには、存在するすべての病原微生物を測定することが理想であるが、病原微生物の検出、同定には高度の専門知識と技術及び時間が必要であり、すべての病原菌を検査することは到底困難であったため、有用な代替指標として大腸菌などの指標細菌が考慮され、微生物汚染の指標として1世紀以上にわたって公衆衛生や食品衛生環境の改善に貢献してきた。しかし前世紀末から新しい感染症が次々と発生して衛生上重大な脅威となっており、指標細菌の限界や問題点も指摘されている<sup>1)</sup>。ところで近年の分子生物学の著しい発展は、正に“ゲノム革命(Genome Revolution)”と呼ぶに相応しく、新しいDNA塩基配列解読装置、次世代シーケンサーの登場は、試料中に存在する病原性微生物を含むすべての微生物を検出、定量することを可能にしつつある。次世代シーケンサーは、解読速度が極めて速いだけでなく、一度の解析で数十万～数十億の核酸分子に由来する塩基配列情報が得られ<sup>2)</sup>、19世紀からわれわれが理想としたことを実現できる可能性がある。ところがDNAは細胞死滅後も比較的長期間にわたって環境中で保持されるため<sup>3)</sup>、次世代シーケンサーでは死滅した生理的活性のない細菌もすべて検出されてしまう。われわれは、生理的活性のある細菌と死滅した細菌を区別する方法を研究開発し、VBNC(Viable but non-culturable;生きているが培養できない)状態を含む生理的活性のある大腸菌のみを水環境試料や排水プロセスから定量し、水環境中にはVBNC状態の大腸菌が多数存在することを報告してきた<sup>4)5)</sup>。

本研究では次世代シーケンサー技術と生理的活性のある細菌を検出できる測定法とを組み合わせ、生理的活性のあるすべての病原性細菌を検出、定量する方法を研究開発する。さらに開発した検出法を水環境や上下水道、排水処理施設などに適用して、生理的活性のあるすべての病原性細菌の挙動を解析する。

### 2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンサー技術を活用して生理的活性のあるすべての病原性細菌のみを検出・定量する方法を研究開発し、開発した手法を水環境や上下水道システムに適用してそれらの挙動を明らかにし、それに基づいて水系からの病原性細菌感染リスクを再評価することを目的とする。100年以上にわたって行われてきた大腸菌などの代替指標に基づく評価法を革新する第1歩となる研究であり、リスク再評価により現行の指標細菌による評価や微生物基準を検証し、さらに上下水道システムなどプロセスの改善策を提案する。

### 3. 研究の方法

#### (1) RT-PCR法の確立

細菌細胞中のrRNAを直接利用できるRT-PCR(reverse transcription;逆転写)法を確立するため、まず逆転写とPCRを連続して行うone-step反応と逆転写とPCRを別々に行うtwo-step反応により、大腸菌から抽出したRNAを用いて行ったRT-PCR法のRNA濃度と閾値サイクル数の関係を求め、それぞれの検出感度を比較した。さらに検出感度に優れたtwo-step反応を、八戸高専生活排水処理施設の排水サンプルと八戸周辺の河川水サンプルに適用して、大腸菌の23S rRNA遺伝子を用いたPCR法とRT-PCR法で大腸菌のDNAとRNA濃度を求めた。

#### (2) ろ過濃縮菌体のPMA処理方法の検討

フィルターろ過時におけるPMA処理方法は研究者によって大きく異なっており、細菌細胞を傷つけない前処理方法の検討が必要である。本研究では、まずメンブレンフィルターによるろ過濃縮時に細菌が損傷を受けて死滅しているかどうか、蛍光染色試薬を用いて検討した。次にPMA処理液について、超純水とPBS(Phosphate buffered salts)の違いによって大腸菌が死滅しPMA-PCRによる計測菌数への影響が生じるか検討した。またPMA処理方法の検討では、3つの異なる処理方法を用いてPMA-PCRを行い、処理条件の違いによる計数への影響について検討した。

#### (3) 生理的活性のある細菌群の検出方法の検討

本研究では次世代シーケンサー技術とPMA-PCRやRT-PCRなどの生菌検出手法を組み合わせ、生理的活性のある細菌のみを網羅的に検出する方法について検討した。八戸高専の生活排水処理施設から採取した最初沈殿池流出水を熱処理した後に、培養した二つの菌体を添加して4種類のPCRを適用し、活性のある細菌を選択的に検出可能か次世代シーケンサー-MiSeq(Illumina)で解析を行った。2段階のPCRから構成されるnested-PCRでは、First PCRとして16S rRNA遺伝子全長を対象に、Second PCRでは他のサンプルと同様にV3-V4領域を対象にPCRによるDNA増幅を行った。また菌体を添加しない場合のサンプルも作製して同様に解析し、細菌叢解析や多様性解析によって得られた結果を比較した。次に、得られた結果を基に本手法を八戸高専排水処理施設の最初沈殿池流出水と塩素殺菌後の処理水、河川水及び消化汚泥に適用した。

#### (4) 排水処理プロセスにおける病原性細菌の挙動解析

生理的活性のある全ての細菌、特に病原性細菌を排水処理プロセスから網羅的に検出し、その挙動を明らかにすることを目的として、青森県内の2つの下水処理場から流入水や最終沈殿池流出水に加え、塩素消毒後の処理水を採取した。サンプルから抽出されたDNAとRNAに対してPCR法、PMA-PCR法及びRT-PCR法を適用し、PCR産物を精製後、細菌叢を次世代シーケンサーMiSeqで解析した。PMA試薬にはBiotium社のPMAXXを使用した。サンプルのDNA増幅は16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を対象に行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) RT-PCR 法による活性のある大腸菌の計数

大腸菌から抽出した RNA を用いて行った RT-PCR 法の one-step 反応と two-step 反応の結果を図 1 に示した。Two-step 反応ではすべての RNA に対応するランダムプライマーと特定の塩基配列 (23S857) のみに反応するリバープライマーの 2 つを使用した。one-step 法とリバープライマーを使用した two-step 法は、 $10^1$  (copy 数/PCR 反応液) レベルより RNA 濃度が低くなると閾値サイクル数が増加せず、 $10^1$  (copy 数/PCR 液) までしか安定した定量が望めない結果になった。ランダムプライマーを使用した two-step 法は、 $10^0$  (copy 数/PCR 液) まで定量できており、3 つの反応の中で最も閾値数が増加した。そこで実際のサンプルに適用する場合、ランダムプライマーを用いた two-step 法を使用することにした。

図 2 には河川サンプルに実際に適用した PCR と RT-PCR 法の計数結果を指標細菌濃度と比較して示した。糞便性大腸菌群数と大腸菌数は、 $10^1 \sim 10^2$  (cfu/100mL) レベルであったが、大腸菌の 23S rRNA 遺伝子のプライマー EC23S と EC23S857 で測定した DNA 濃度は  $10^3$  (copy 数/mL) レベルであった。uidA 遺伝子のプライマー U75 では DNA は両河川とも検出されなかった。RT-PCR で測定した RNA 濃度は DNA 濃度より高く、 $10^3 \sim 10^4$  (copy 数/mL) レベルとなった。EC23S, EC23S857 何れも [rRNA/rRNA 遺伝子] の比は 1.0 以上となり、細菌数よりもリボソームが多数存在していることを示している。

##### (2) ろ過濃縮菌体の PMA 処理方法

蛍光染色試薬 BacLight を用いた実験では、類家<sup>6)</sup>の実験と同様にメンブレンフィルターによってろ過された大腸菌のほとんどが赤色に染色され、細胞膜が損傷していることを示した。しかし、ろ過濃縮した大腸菌体に他の生理的活性のある細菌計数方法である DVC 法<sup>7)</sup>を適用した結果、伸長肥大した活性のある細菌の割合がろ過前とほぼ同じ割合を示した。従ってろ過によって細胞が必ずしも死滅するわけではなく、BacLight で赤色に染色されても生存していることが分かった。

ろ過濃縮した大腸菌液に対する PMA 処理方法の検討では、PMA 濃度が  $50 \mu\text{M}$  以上で処理する場合、処理液には必ず PBS を使用する必要があることが分かった。そこで処理液に PBS を使用し、3 つの PMA 処理方法を用いて PMA-PCR の計数値への影響を検討した。図 3 には PMA-PCR で得られた大腸菌の計数結果を示した。コントロールには、浮遊状態の大腸菌液に PMA 処理を施したサンプルを用いた。図 3 では類家<sup>6)</sup>の方法はコントロールに近い値を示しており比較的高い濃度で生菌の DNA を回収できていると考えられる。しかし Krapf<sup>8)</sup>と Pang<sup>9)</sup>の PMA 処理方法を適用した結果は、類家<sup>6)</sup>の方法の大腸菌数に比べ 1~2 オーダー低い値となっている。これは、類家<sup>6)</sup>の方法がろ過フィルターホルダーにフィルターをセットしたままの状態 PMA 処理を行うのに対し、それ以外の 2 つの方法ではろ過フィルターホルダーからフィルターを取り外して PMA 処理を行うため、処理過程で菌体の損失や DNA の回収率が減少してしまったと考えられる。類家<sup>6)</sup>の方法は処理プロセスが簡便であり、従って今回比較を行った 3 つの手法ではろ過濃縮菌体に対する PMA 処理は類家<sup>6)</sup>の方法が最も適していると考えられる。

##### (3) 生理的活性のある細菌群の菌叢解析

熱処理した初沈流出水に培養した腸内細菌を 2 菌体添加し、図 4 に示したように 4 種類の PCR で DNA 増幅を行い、次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス解析で細菌叢を解析した。それぞれのサンプル内で存在割合が 1%以上の細菌を科

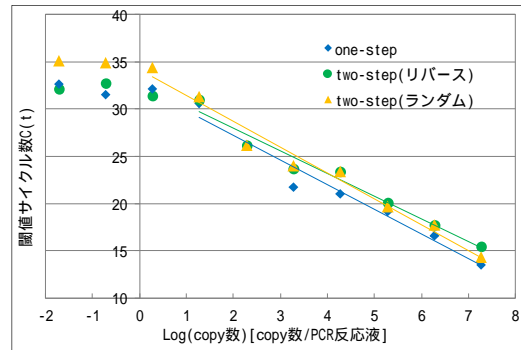


図 1 RT-PCR 法による大腸菌の検出

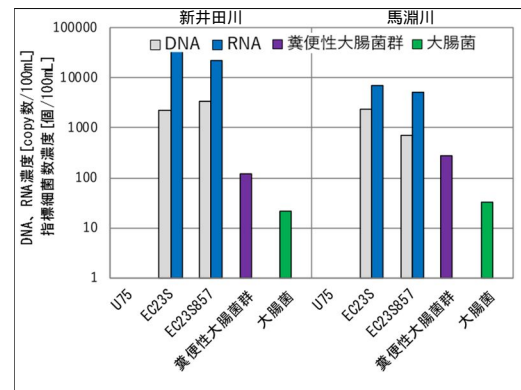


図 2 実河川における PCR と RT-PCR 法による大腸菌の計数結果

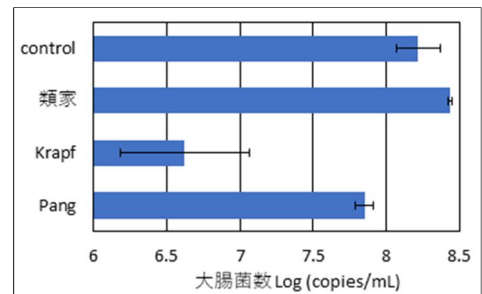


図 3 3 つの PMA 処理方法を使用した PMA-PCR 法による大腸菌計数結果

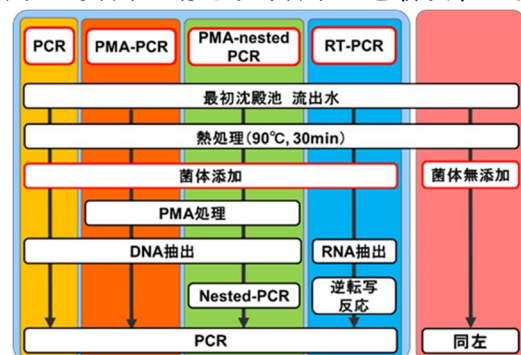


図 4 4 種類の PCR による試料作製手順

レベルで抽出した細菌叢解析結果を図 5 に示した。図中の *Enterococcaceae* と *Enterobacteriaceae* 科の細菌は 1 つの OTU を表し、それぞれ添加した *Enterococcus faecalis* と *Escherichia coli* と blast による同源性検索の結果、100%一致した。PCR のみを用いた二つのサンプルは、菌体添加の有無にかかわらず傾向が類似した細菌叢を示しており、二つの添加菌体は殆ど検出されなかった。これに対して PMA-PCR や RT-PCR を適用したサンプルにおいては添加した二つの菌体を検出できており、生理的活性のある細菌を検出可能であることが示された。特に RT-PCR を適用したサンプルでは試料由来の細菌に対し、ほぼ添加量に応じた割合で添加菌体を検出できていることから、より選択的に活性のある細菌を検出可能であると考えられる。しかし PMA-PCR と RT-PCR 法を適用した 2 つのサンプルを比較すると、互いの細菌叢の傾向は異なっていた。また、PCR のみ適用したサンプルを除いて *Clostridiaceae* 科の細菌が、比較的高い割合で検出された。*Clostridiaceae* 科の細菌には耐熱性の芽胞形成細菌が属しており、熱処理によって死滅していない、あるいは芽胞によって DNA や RNA が保持されていたと考えられる。そのため、高温下でも不活性化できなかった細菌が検出できていることから選択的に生理的活性のある細菌を検出可能であるといえる。さらに PMA-nested PCR と PMA-PCR を適用したサンプルを比較すると、菌体を添加した場合としない場合のどちらもそれぞれ細菌叢がよく類似しており、nested-PCR による PMA の分別効果への影響は殆ど生じていないことが分かった。

八戸高专生活排水処理施設から採取した初沈流出水と塩素殺菌後の処理水、及び馬淵川から採取した河川水に PCR, PMA-PCR 及び RT-PCR それぞれ適用し、アンプリコンシーケンス解析を行った。全サンプル内で存在割合が 1%以上の細菌を門レベルで抽出した細菌叢解析結果を図 6 に示した。初沈流出水及び河川水では PCR と PMA-PCR を適用したサンプルの細菌叢が類似しており、PMA による生菌と死菌の分別効果が発揮されなかった。これは試料中に活性のある細菌が多く存在しているためであると考えられる。一方で RT-PCR を用いたサンプルは他サンプルと異なり RNA 量に基づいて解析されるため、細菌叢も異なる傾向を示した。処理水に関しては塩素殺菌されているため、PMA による分別効果や、分解されやすく死細胞中や細胞外の存在量が少ない RNA によって生理的活性のある細菌を検出できていると考えられる。

多様性とはサンプル間の多様性を示す指標であり、各水環境試料に対して多様性解析を実施した。3 つのサンプルとも同じ PCR 増幅手法を用いた場合、多様性は類似していた。一方 PCR 増幅手法が違う場合は多様性が大きく異なっており、手法によって活性のある細菌叢に顕著な違いがあることが知られた。

#### (4) PMA と PMAxx 試薬の比較

Biotium 社から新たに発売された PMAxx と従来の PMA 試薬の分別効果を比較した。大腸菌液から、未処理、熱処理、これらを等量混合したサンプルを作製し、大腸菌濃度は一定として PMA-PCR による閾値サイクル数を図 7 にまとめた。未処理サンプルは、試薬無添加に比べ、試薬を添加した場合は閾値サイクル数が増加しているが、PMA と PMAxx の違いによる大きな差は見られなかった。熱処理サン

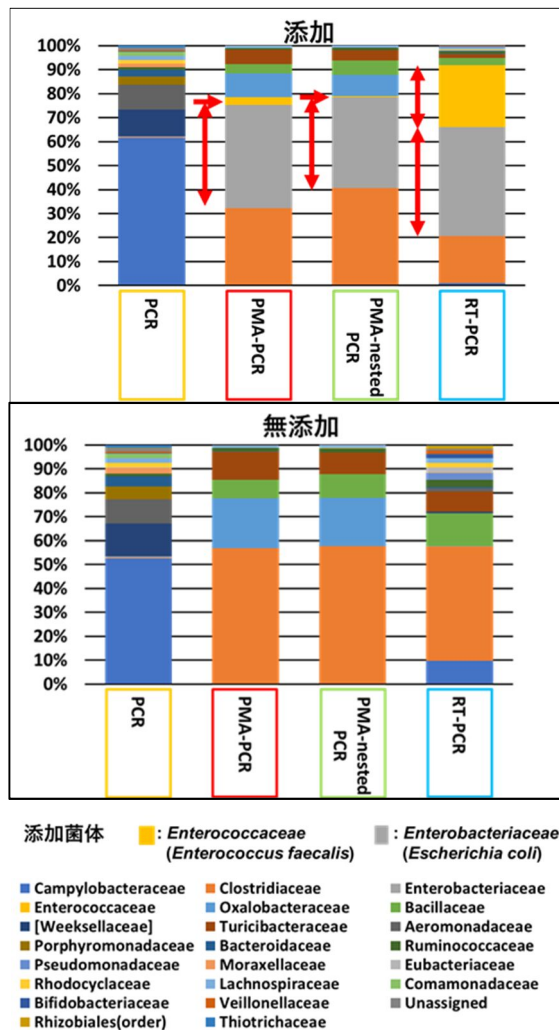


図 5 腸内細菌 2 菌体を添加した熱処理初沈流出水サンプルの細菌叢解析結果 (科レベル, 出現率 1%以上)

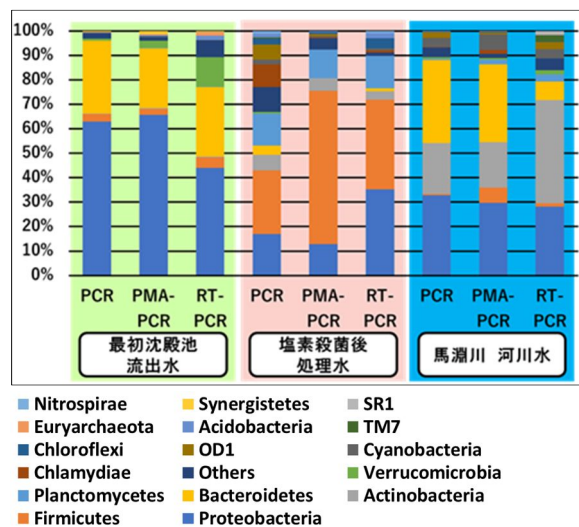


図 6 3 つの水環境サンプルの細菌叢解析結果 (門レベル, 出現率 1%以上)

プルでは、無添加に比べ PMA、PMAxx を添加すると閾値サイクル数が増加し、PMAxx は PMA よりも増加していた。特に混合菌体については、PMA、PMAxx の両者とも、未処理サンプルの値と近い値となり、両試薬とも死滅細菌の DNA を修飾し生存細菌との分別ができていることが考えられる。未処理サンプルと熱処理サンプルの閾値サイクル数の差は、PMAxx の方が大きく、また混合菌体と未処理サンプルの差は PMAxx の方が小さいため、PMAxx の方がより高い分別効果があると考えられる。最適添加濃度を求める実験から、50 $\mu$ M 以上で PMAxx の適切な分別効果が得られることが分かった。

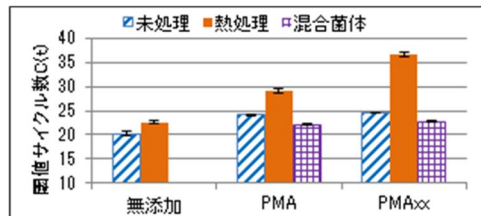


図7 PMA と PMAxx 試薬による大腸菌の分別効果

#### (5) 排水処理プロセスにおける病原性細菌の挙動解析

2つの下水処理場の処理工程3地点で採取したサンプルに、PCR法とPMA-PCR法及びRT-PCR法を適用し、アンプリコンシーケンス解析で細菌叢解析を行った。M浄化センターの流入水では、RT-PCR法の細菌叢のみ他の2方法と異なっていたのに対し、最終沈殿池流出水と処理水では3つの方法とも解析された細菌叢は大きく異なり、PMA-PCR法とRT-PCR法でもかなり違いが見られた。T処理場の解析結果では、最終沈殿池流出水と処理水でRT-PCR法で得られた細菌叢のみ他の2方法と異なっていた。M浄化センターとT処理場の病原性細菌の組成割合について属レベルで解析した結果を図8と9にそれぞれ示した。流入水中では活性をもった *Acinetobacter* 属と *Arcobacter* 属が多く存在しているが、処理過程で除去され処理水中に残存していても活性は低いと考えられる。T下水処理場では、流入水中のほとんどの病原菌は最終沈殿池流出水までに除去されていた。また2つの処理場とも *Mycobacterium* 属の細菌が最終沈殿池流出水と処理水のPMA-PCR法とRT-PCR法で得られた細菌叢で組成割合が高く、塩素消毒後も活性を維持して残存していることが知られた。

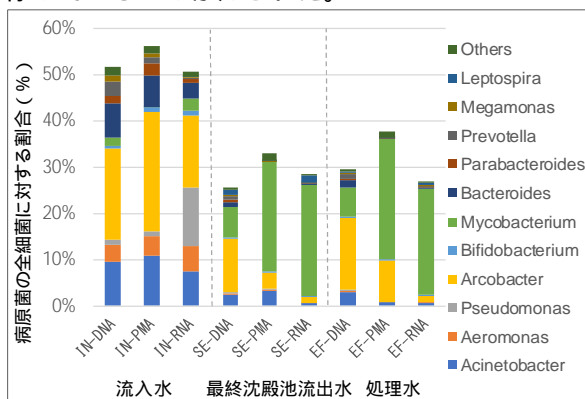


図8 M浄化センターの病原性細菌の組成割合 (属レベル, 出現率1%以上)

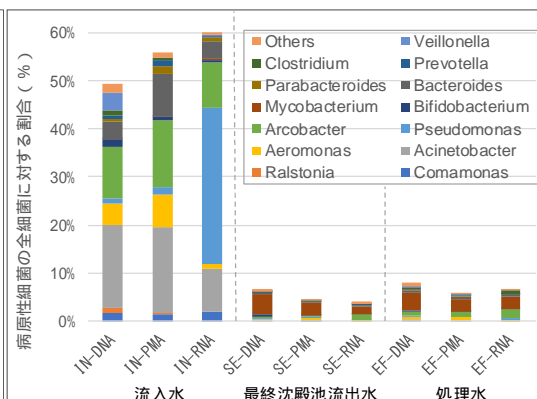


図9 T処理場の病原性細菌の組成割合 (属レベル, 出現率1%以上)

#### < 引用文献 >

- 1) 平田強: 微生物汚染指標, 「水質衛生学」(金子光美編), pp.468-479, 技報堂出版 (1996)
- 2) 野田尚宏, 関口勇地: 次世代DNAシーケンサー技術による環境中の複合微生物相解析の現状と今後の展望, 水環境学会誌, Vol.35, pp.290-297(2012)
- 3) Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., and Daffonchio, D.: Release and persistence of extracellular DNA in the environment, Environ. Biosaf. Res, Vol.6, pp.37-53(2007)
- 4) Yokomachi N. and Yaguchi J.: Enumeration of viable *Escherichia coli* by real-time PCR with propidium monoazide, Water Science & Technology, Vol.66, pp.2065-2073 (2012)
- 5) Ueno R., Ruike W., Kaneko N. and Yaguchi J.: Selective Quantification of Viable *Escherichia coli* in Water Environment using real-time PCR with Propidium Monoazide, The 6th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Beijing, China, Poster-N0009 (2015)
- 6) 類家 涉, 山本 歩, 矢口 淳一, 久保田 健吾, 李 玉友: PMA-qPCR法へのLED光源の適用とろ過濃縮の影響, 土木学会論文集G (環境), Vol.72, No.7, pp.315-323(2016)
- 7) Kogure K., Shimidu U. and Taga N.: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, Can J. Microbiol., Vol.25, pp.415-420(1979)
- 8) Krapp T., Kuhn R.M., Kauf P., Gantenbein-Demarchi C.H. and Fieseler L.: Quantitative real-time PCR does not reliably detect single fecal indicator bacteria in drinking water, Water Science and Technology: Water Supply, Vol.16, pp.1674-1682(2016)
- 9) Pang Y-C., Xi J-Y., Xu Y., Huo Z-Y. and Hu H-Y.: Shifts of live bacterial community in secondary effluent by chlorine disinfection revealed by Miseq high-throughput sequencing combined with propidium monoazide treatment, Appl Microbiol Biotechnol, Vol.100, pp.6435-6446(2016)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 日脇陸生、矢口淳一	4. 巻 53
2. 論文標題 PMA-qPCR法における過濃縮の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 八戸工業高等専門学校紀要	6. 最初と最後の頁 67-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.24704/hnctech.53.0_Cover1">https://doi.org/10.24704/hnctech.53.0_Cover1</a>	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日脇陸生、山本 歩、矢口淳一
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた生理的活性のある細菌の網羅的解析
3. 学会等名 第55回環境フォーラム（土木学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日脇陸生、山本 歩、矢口淳一
2. 発表標題 効果的な生理的活性のある細菌の網羅的解析
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 成田健志、高島 慧周、矢口淳一
2. 発表標題 PMAxx試薬による生理的活性のある細菌の分別効果
3. 学会等名 平成30年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長森 郷仁, 成田 健志, 矢口 淳一
2. 発表標題 rRNAを利用した生存可能な大腸菌の計数について
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junichi Yaguchi, Narita Kenshi, Satomi Nagamori
2. 発表標題 Enumeration of Viable Escherichia coli in Wastewater and River Water Utilizing RNA-Based RT-qPCR Method
3. 学会等名 IWA-ASPIRE Conference and Exhibition 2019 (Hong Kong) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢口 淳一, 成田 健志, Nur Dianna binti Ibrahim
2. 発表標題 下水処理プロセスにおける生理的活性のある細菌群の挙動解析
3. 学会等名 令和元年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢口 淳一, 成田 健志, Nur Dianna binti Ibrahim
2. 発表標題 排水処理プロセスにおける活性のある病原性細菌の挙動について
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
研究 分担 者	山本 歩  (YAMAMOTO AYUMU)  (60523800)	八戸工業高等専門学校・その他部局等・准教授   (51101)	