

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0090

研究課題名（和文）革新的微生物モニタリング技術の開発と適用：アジアの水系感染症根絶への挑戦

研究課題名（英文）Development and application of innovative monitoring technologies of microorganisms: Challenge to eradication of waterborne infectious diseases in Asia

研究代表者

佐藤 久（Satoh, Hisashi）

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：80326636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：革新的な3種の微生物モニタリング技術を開発した。これらを使ってスリランカの水道水源となっている河川水の微生物量を測定した。これら研究を海外で行うことで、海外の共同研究者と強固な研究ネットワークを構築した。塩素消毒が微生物の不活化に有効であることを明らかにした。糞便汚染源が近くにあるか否かを簡便に判定する技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糞便汚染源が近くにあるか否かを簡便に判定する技術を開発した。この技術により、ヒト、モノ、カネがない途上国で簡単に水の衛生学的安全性を判定できるようになり、途上国の人々の疾病を減らし、平均寿命を押し上げることに貢献できる。

海外の共同研究者と強固な研究ネットワークを構築した。これにより今後多くの留学生を日本に受け入れることができ、インドネシアスリランカの水環境保全や上下水道処理技術の高度化に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Three innovative microbial monitoring techniques were developed. These were used to measure the microbial abundance of river water, which is the source of water supply in Sri Lanka. By conducting these studies overseas, we built a solid research network with overseas collaborators. We demonstrated that chlorine disinfection was effective in inactivating microorganisms. A simple technique was developed to determine whether a fecal contamination source was nearby.

研究分野：水環境工学

キーワード：センサ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SDGsの目標6は「安全できれいな水とトイレを世界中に」である。WHOによれば、2018年において世界で約20億人が糞便で汚染された飲料水を利用している。糞便には様々な病原体が混入するリスクが高いため、糞便で汚染された水を飲むと下痢症や、コレラや赤痢などの感染症にかかってしまう。改善された飲料水を使用できない人口の割合はオセアニア、サブサハラ、アジアで多い(図1)。例えばインドネシアのジョグジャカルタ市では水源の89%が糞便で汚染されている。スリランカでは飲料水の汚染は把握されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、アジアで飲料水由来の水系感染症を根絶することである。短期的な具体的な目的は、革新的な微生物モニタリング技術を開発することである。

3. 研究の方法

E. coli K-12 (ATCC 47,076)、*E. coli* (Migula) Castellani および Chalmers (ATCC25922)、*E. coli* 0157:H7 (RIMD 0,509,952)、*E. coli* 0111 (RIMD 05,092,017)、*E. coli* 026:H11 (RIMD 05,091,992)、*E. coli* 01:K1:H7 (JCM1649) および *Salmonella enterica* (JCM 1652) の純粋培養を用いた。-80 の50%グリセロール溶液中に保存したすべての株を、37 のLuria-ベルターニ(LB)プロス(BD Difco、#244,620、Franklin Lakes、NJ、USA)を用いて、シェーカーインキュベーター内で一晩活性化して定常状態に到達させた。いくつかの試料は、試験前に4-メチルウンベリフェリル-D-グルクロニド(MUG)またはpnitrophenyl-D-グルクロニドを含むLB培地中でさらに1時間インキュベートし、これをプレインキュベーションと名付けた。下水(WW)サンプルは、札幌市の下水処理場の最終沈殿池から得られ、大腸菌源として使用された。

河川水(RW)サンプルは、2022年9月から12月にかけて、札幌市の7つのサンプリングサイトから収集された。6つのサンプリング場所は、それぞれ、下水処理場-A、下水処理場-B、および下水処理場-Cの排出口の上流620mおよび下流180m、上流500mおよび下流120m、および上流500mおよび下流400mに位置していた。下水処理場-A、下水処理場-B、または下水処理場-Cの上流に下水処理場はなかった。下水処理場-A、下水処理場-B、および下水処理場-Cの上流には合流式下水道出口(CSOut)があったが、すべてのサンプルが晴天の日に収集されたため、CSOによる汚染は無視できた。平均的な河川流量では、下水処理場-A、下水処理場-B、および下水処理場-Cの排水は、それぞれ河川流量の約65%、40%、および70%に寄与している。1つのサンプリングサイトは、CSOutの200m下流に位置していた。

E. coli のiGUS活性は、以前の研究で開発された簡単なマイクロプレートアッセイを使用して決定された。簡単に説明すると、*E. coli* のインキュベーション用のMUGを含む培地(MPR培地)の一部(20 μ L)を、96ウェルマイクロプレート(TPPテクノプラスチックプロダクツAG、92,696、トラサジンゲン、Switzerland)の1つのウェルに添加した。その後、180 μ Lのサンプルを添加し、ピペティングによってマイクロプレートリーダー(MPR)培地と完全に混合した。純粋培養の測定では、各培養物を600nm(OD600)で0.3の吸光度に希釈し、さらに10倍希釈してサンプルを調製した。Milli-Q水をブランク対照として使用した。各サンプルに12個のウェルを使用した。MUGの分解によって生成される蛍光発生4-メチルウンベリフェロン(MU)を測定するために、35nmの帯域幅を有する360nmの励起フィルターおよび20nmの帯域幅を有する460nmの発光フィルターを備えたMPR(Tecan Trading AG、Tecan Infinite F200Pro、Mannedorf、Switzerland)にマイクロプレートを入れ、37に設定した。蛍光強度(F.I.)を10分ごとに24時間測定した。結果は12回の測定の平均として報告された。F.I.はインキュベーションの1時間と3時間の間でほぼ直線的に増加した;したがって、この期間中のF.I.の時間的変化は線形回帰によって適合され、その傾きは基質利用率と考えられた。基質利用率はiGUS活性に変換され、標準のシグマ品質管理試験手順(Sigma Aldrich、1998)に従って、1mLあたりの修正フィッシュマンユニット(MFU/mL)で表された。サンプルiGUS活性に対する塩素処理の影響を調べるために、サンプルを次亜塩素酸ナトリウムで1時間または4時間消毒した。次亜塩素酸塩濃度は、ポータブル残留塩素メーター(DR300、HACH、ラブランド、コロラド、USA)を使用して任意のタイミングで測定され、総Cl濃度は0.8~1.2mg-Cl₂/Lの間に維持された。iGUS活性の持続性を調べるために、プレインキュベートしたサンプルを、100倍または0.1%NaCl溶液で希釈したLB培地でインキュベートした。純粋な*E. coli* 培養物および処理されたWWおよびRWサンプルは、製造業者の指示に従って、Colilert®およびQuant-i-Tray/2000システム(IDEXX Laboratories、ウェス

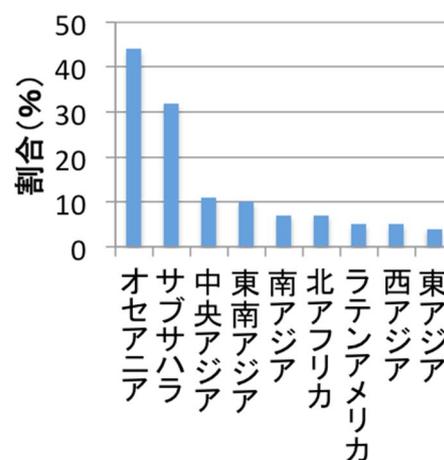


図1 改善された飲料水を使用できない人口の割合

トブルック、ME、USA)を使用する従来の方法によってカウントされた。*E. coli* 濃度は、最確数 (MPN)/mL として示された。

マイクロプレート iGUS 活性アッセイのために、DNA および mRNA を、それぞれ、Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA USA) および RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、製造業者の指示に従って、上記のマイクロプレートから収集した 200 μ L のサンプルの 1 セットから抽出した。その後、抽出した RNA から、PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Perfect Real Time; タカラバイオ株式会社、滋賀県、日本) を用いて、製造業者の指示に従って、cDNA を合成した。抽出した DNA と cDNA を以前の研究に従って TaqMan アッセイを用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 純粋な大腸菌培養における GUS 活性の誘導

図 1 は、純粋な *E. coli* K-12 培養物を MPR 培地中で異なる濃度で培養することによって生じた MU を経時的にモニターした際の 360 nm の励起および 460 nm の蛍光の F.I. の変化を示す。2.8 \times 10⁹ MPN/mL の大腸菌を含む元のサンプル (サンプル 1) および 10 倍に希釈したサンプル (すなわち、2.8 \times 10⁸ MPN/mL の大腸菌、サンプル 2) は、0 時間で F.I. の指数関数的増加を示した (図 1A)。対照的に、2.8 \times 10⁶ MPN/mL の大腸菌を含むサンプル (サンプル 3) の F.I. は、インキュベーションの約 4 時間まで直線的に増加し、その後指数関数的に増加した (図 1B)。2.8 \times 10⁶ MPN/mL (サンプル 4) から 0.28 MPN/mL (サンプル 11) の大腸菌のサンプルの F.I. も、指数関数的 F.I. 増加が開始する時間は遅れたが、F.I. の直線的な増加とそれに続く増加を示した。0.028 MPN/mL (サンプル 12) の大腸菌を含むサンプルの F.I. は、24 時間まで F.I. の指数関数的増加を示さなかった。

図 2 は、MPR 培地でインキュベートした処理済み WW サンプルにおける MU の F.I. と *uidA* 遺伝子およびその mRNA 分子のコピー数の経時変化を示している。

サンプルの *E. coli* 濃度は 3.2 \times 10³ MPN/mL であった。サンプルの F.I. は約 5 時間から増加し、約 8 時間で定常に達した。*uidA* 遺伝子濃度は同時に指数関数的に増加した (5 時間から 8 時間)。MPR 培地の F.I. の増加は *E. coli* の増殖に直接対応することが示された。*uidA* mRNA 濃度は 6 時間で増加し、7 時間で減少した。その結果、遺伝子 (*uidA*) の mRNA 転写物のレベルはその転写速度を直接反映するので、GUS は主に対数増殖期の初期に産生されることが示された。したがって、MPR でのインキュベーション前の元のサンプルにおける *E. coli* の GUS 活性として、誘導期における F.I. の直線的増加を仮定した。これを *E. coli* の iGUS 活性と定義し、図 2 のサンプルの iGUS 活性は、傾き (10 A.U./h) から 0.80 mM FU/mL と計算された。さらに、F.I. の指数関数的増加が開始した時間を対数増殖の開始時間と定義した。この定義に基づいて、図 1 に示された結果は次のようになった。サンプル 1 および 2 は、高い初期 *E. coli* 濃度のために、MPR 試験において *E. coli* 増殖の誘導期を示さなかった。より低い濃度の *E. coli* を含有するサンプル 3 から 12 は誘導期を受けたので、*E. coli* の iGUS 活性は、F.I. の直線的増加の傾きから推定することができた。図 1 に示されたサンプル中の *E. coli* の iGUS 活性も計算した。サンプル 3 の iGUS 活性は 2.5 mM FU/mL であり、サンプル中の *E. coli* 濃度の減少とともに減少した。

LB 培地 (図 1) で培養した *E. coli* K-12 の iGUS 活性は、処理した WW サンプル (図 2) よりも低かったため、純粋な *E. coli* K-12 培養物を MUG を含む LB 培地中で 1 時間プレインキュベートして、*E. coli* 細胞内に GUS を蓄積させた。図 3 は、プレインキュベートした *E. coli* K-12 の純

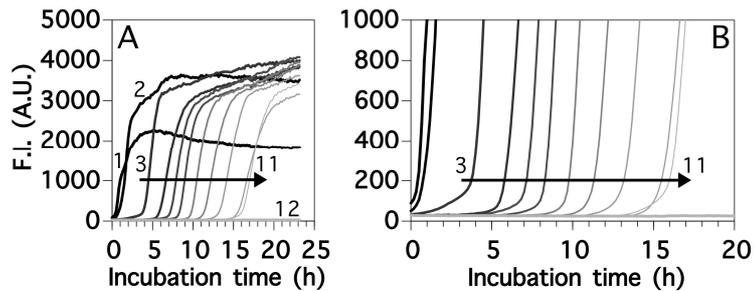


図 1. (A) 純粋な *E. coli* K-12 培養によって生じた MU の F.I. の経時的変化。(B) A の拡大図。グラフ上の数字はサンプル番号を示す。サンプル 1 の *E. coli* 濃度は 2.8 \times 10⁹ MPN/mL であった。サンプル 2 から 12 は、サンプル 1 を連続的に 10 倍希釈することによって調製した。

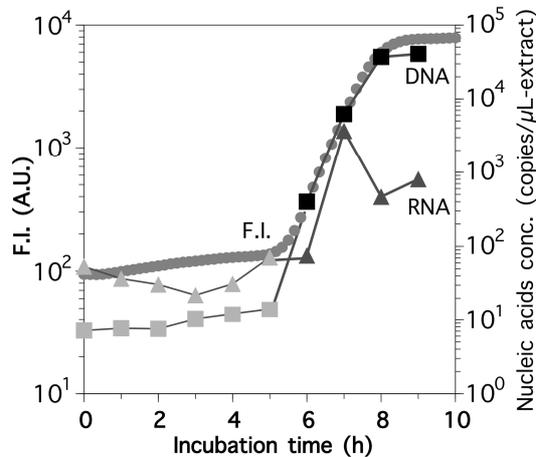


図 2. MPR 培地でインキュベートした処理済み WW サンプルにおける MU の F.I. および *uidA* 遺伝子とその mRNA のコピー数の経時変化。灰色のプロットは、検出限界 (70 コピー/ μ L-抽出物) 未満のデータを示す。

粹な培養物の F.I. の経時変化を示す。プレインキュベートした試料は、 2.4×10^9 MPN/mL の *E. coli* (試料 1) を含有し、これを Milli-Q 水で連続的に希釈した。試料 1 の F.I. は、インキュベーション 0 時間でも非常に高く (平均で 1350 ± 110)、プレインキュベーション中に GUS が産生され、MU が生成されたことを示した。約 10^7 MPN/mL の *E. coli* (図 3 の試料 3) でプレインキュベートし、その後希釈した試料は、約 10^7 MPN/mL の *E. coli* (図 1 の試料 3) でプレインキュベーションしなかった試料よりも高い iGUS 活性を示した。 10^6 MPN/mL (試料 4) およびより低い濃度の *E. coli* でプレインキュベートした試料の iGUS 活性も、プレインキュベーションしなかった試料よりも高く、*E. coli* 濃度と同程度であった。これらの結果は、uidA 遺伝子の発現のための基質を含む培地中で純粋な *E. coli* 培養物をインキュベートすると、GUS 産生が誘導されることを示している。

さらに、6 つの *E. coli* 株および Enterobacteriaceae に関連するモデル菌としての *Salmonella enterica* の iGUS 活性を測定した。6 つの *E. coli* 株の濃度は約 10^7 CFU/mL であった。4 つの *E. coli* 株の iGUS 活性は類似しており (11.6-14.9 mMFU/mL)、変動係数は 0.12 であった。これらの値は、図 3 に示されるように、試験で得られた *E. coli* 濃度と同程度の大きさで得られた値と類似している。4 つの *E. coli* 株からの培養液の濾液は iGUS 活性を示さず、GUS が細胞内に存在することを示した。*E. coli* O157:H7 (RIMD 0,509,952) および *E. coli* O111 (RIMD 05,092,017) はいずれも GUS をコードする uidA 遺伝子を保有しているが、iGUS 活性を示さない。このことは、uidA 発現が遺伝的および環境的因子の両方に依存することを示している。*Salmonella enterica* (JCM 1652) は uidA 遺伝子を保有していないため、iGUS 活性を示さなかった。

3.2. 純粋な *E. coli* 培養物の iGUS 活性および再増殖に対する塩素の影響

E. coli の iGUS 活性に対する塩素処理の影響を調べるために、 $1.0 \text{ mg-Cl}_2/\text{mL}$ で 2.7×10^6 の希釈した純粋な *E. coli* 培養物を 1 時間/L で塩素処理した。*E. coli* 細胞に GUS を蓄積するために、細胞を GUS 基質として p-nitrophenyl-D-グルクロニドと 1 時間培養した後、塩素処理を行った。塩素処理前の試料 (すなわち、無傷の試料) の F.I. は、 2.1 mMFU/mL の iGUS 活性で 2.7 時間で指数関数的増殖を開始した (図 4)。いくつかの *E. coli* 細胞は塩素処理によって死滅したため、塩素処理試料は対数増殖の開始時間が 9 時間に遅れを示した。以前の研究では、蛍光強度が MPR でしきい値を超えたインキュベーション時間を決定することによって、培養可能な *E. coli* 濃度を推定した。この方法を用いて測定した *E. coli* 濃度は、Colilert® 試験を用いて測定したものとほぼ正の相関を示した。対数増殖の開始時間の遅れは、元の試料中の培養可能な *E. coli* 濃度の減少を示す。塩素処理試料中の *E. coli* 濃度は 2.9 MPN/mL に減少した。塩素処理試料の iGUS 活性は 1.7 mMFU/mL であった。塩素処理試料 (1.7 mMFU/mL) と無傷試料 (2.1 mMFU/mL) の iGUS 活性の比は 0.81 であった。このことは、塩素処理は Colilert® 試験で *E. coli* 数を 6-log 減少させたが、iGUS 活性はわずか 19% しか減少しなかったことを示している。これは、塩素処理が *E. coli* 細胞のみを損傷し、塩素処理された *E. coli* 細胞内に存在する GUS のほとんどが活性のままであったためである可能性がある。

p-nitrophenyl-D-グルクロニドを含む LB 培地中で 1 時間前培養した純粋な *E. coli* 培養物は、 1.0 mg-Cl_2 で 4 時間塩素処理することにより、完全に消毒された (*E. coli* 0 MPN/mL)。無傷サンプル ($3.3 \times 10^6 \text{ MPN/L}$) の F.I. は、2.7 時間で指数関数的増殖を示し、iGUS 活性は 1.5 mMFU/mL であった (図 5)。対照的に、36 の塩素処理サンプルのうち、MPR 試験で指数関数的増殖を示した

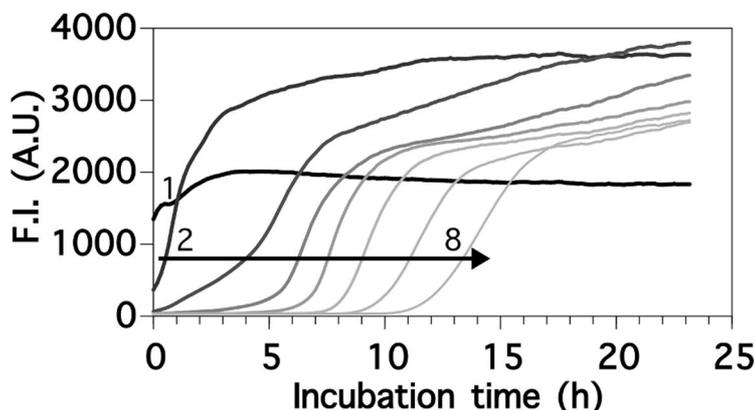


図 3. MUG を含む LB 培地中で 1 時間プレインキュベートした純粋な *E. coli* 培養物によって生じた MU の F.I. の経時変化。サンプル 1 中の *E. coli* 濃度は 2.4×10^9 MPN/mL であった。サンプル 2 から 8 は、サンプル 1 の 10 倍連続希釈によって調製した。

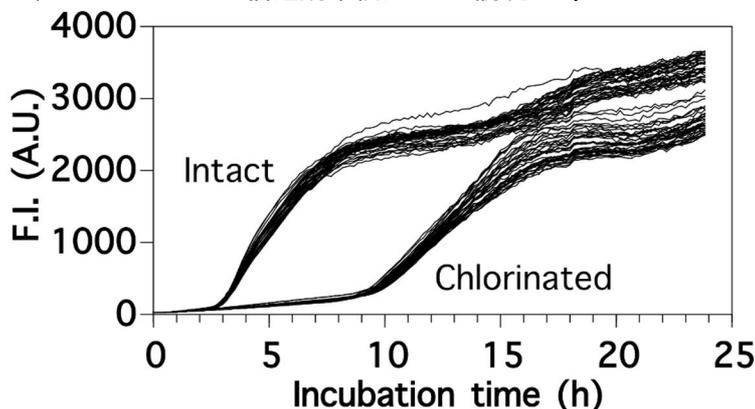


図 4. p-ニトロフェニル -D-グルクロニドを含む LB 培地中で 1 時間プレインキュベートした純粋な大腸菌培養によって生成された MU の F.I. の経時変化。プレインキュベーションと希釈の後、 2.7×10^6 MPN/mL の大腸菌を含むサンプルの半分を MPR を使用して F.I. 測定に供し、残りを塩素処理後の iGUS 活性評価に使用した。

のは1サンプルのみであり、36サンプル中35サンプルで *E. coli* が不活化されたことを示した。Colilert®試験および我々の方法はいずれも、*E. coli* がほぼ完全に不活化されることを示した (>9-log 減少)。対照的に、塩素処理サンプルの iGUS 活性は 0.28 mMFU/mL であり、無傷サンプルの iGUS 活性の 19%を占めた。これらの結果は、GUS が部分的に塩素処理から保護され、塩素処理された *E. coli* 細胞内に残っていることを示している。河川における大腸菌の 3.3 iGUS 活性

図6は、WWTP 排出口および CSOut の上流および下流で採取された RW サンプルの iGUS 活性を示している。ブランクサンプルの iGUS 活性は、我々の方法で 1.6 mMFU/mL と推定された。上流サンプルの iGUS 活性は <0.24 mMFU/mL であり、ほぼ濃度依存的な増加を示した。対照的に、下流サンプルの iGUS 活性は >0.21 mMFU/mL であった。興味深いことに、いくつかの上流サンプルは 10^4 - 10^5 MPN/mL の範囲の *E. coli* を含み、その中ですべての下流 *E. coli* が検出されたが、これらのサンプルのほとんどの iGUS 活性は下流サンプルよりも低かった。対照的に、下流 CSOut からいくつかのサンプル中の *E. coli* 濃度は、おそらく希釈のために比較的低かった (<10⁴ MPN/mL) が、それらの iGUS 活性は、同じ濃度範囲の *E. coli* を有する上流サンプル (<10⁴ MPN/mL) よりも高かった。これは、CSOut から排出された未処理の WW および処理された WW において、塩素処理を受けた場合でさえ、GUS が *E. coli* 細胞内で生存できるという事実によって説明される可能性がある。これらの結果は、糞便汚染に対する iGUS 活性の閾値 (0.21 mMFU/mL) を設定することによって、糞便汚染源を容易に特定できることを示している。

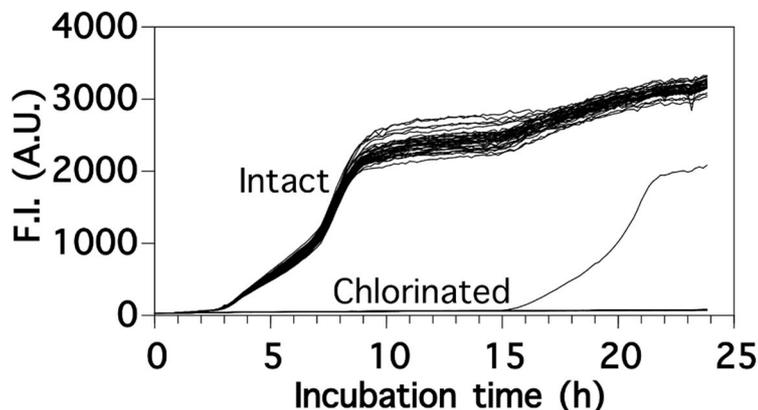


図5. p-ニトロフェニル-D-グルクロニドを含む LB 培地で1時間プレインキュベートした純粋な大腸菌培養によって生成された MU の F.I. の経時変化。プレインキュベーションおよび希釈後、 3.3×10^6 MPN/mL の大腸菌を含むサンプルの半分を MPR を使用して F.I. 測定に供し、残りを塩素処理後の iGUS 活性評価に使用した。

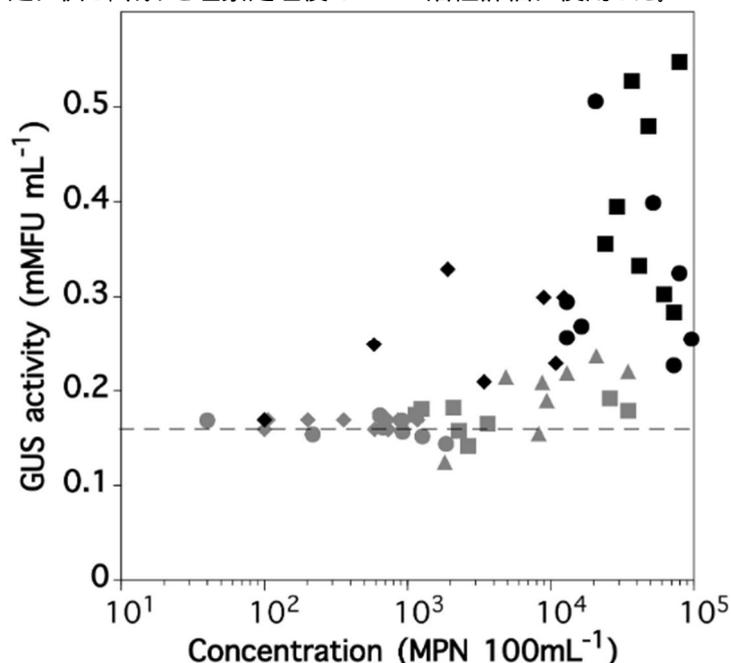


図6. 2020年9月から12月にかけて WWTP-A(丸)、WWTP-B(三角)、WWTP-C(四角)、CSOut(菱形)から採取した RW サンプルの iGUS 活性と *E. coli* 濃度の相関。黒と灰色で示された記号は、それぞれ各排出点の下流と上流で採取された RW サンプルを示す。破線は、ブランクサンプルの平均 GUS 活性を示す。

これらの結果は、糞便汚染に対する iGUS 活性の閾値 (0.21 mMFU/mL) を設定することによって、糞便汚染源を容易に特定できることを示している。

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 6件）

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Mohomed Niyaz Mohomed Shayan, Takeshiro Onodera, Ryuta Miyajima, Yuya Akazawa, Hisashi Satoh
2. 発表標題 Prevalence of Antibiotic Resistant Genes (ARG) in Urban Rivers
3. 学会等名 International conference on water convention of the Singapore International Water Week (SIWW, 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田翔介, 佐藤 久, 平野麗子
2. 発表標題 新規簡易微生物検出法による水道原水モニタリングの検討
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島芽梨, 平野麗子, 中屋佑紀, 佐藤 久
2. 発表標題 金ナノ粒子プローブを用いた環境中の病原体の検出
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島芽梨・中屋佑紀・佐藤久・平野麗子・高橋浩三
2. 発表標題 光導波路分光装置を用いた高感度簡易核酸モニタリング法の開発
3. 学会等名 第 58 回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Matsunaga, Hisashi Satoh
2. 発表標題 Development of a simple analytical method for determination of arsenate using FAM-labeled DNA and cerium oxide nanoparticles
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Matsunaga, Hisashi Satoh
2. 発表標題 Development of the simple analytical method for determination of Arsenate(V) using fluorescein-labeled DNA and cerium oxide nanoparticles
3. 学会等名 International Conference on the challenges in Environmental Science and Engineering (CESE 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Meri Nakajima, Hisashi Satoh
2. 発表標題 Simple assay for spectroscopic quantification of 16S rRNA of ammonia oxidizing bacteria using DNA-modified gold nanoparticles
3. 学会等名 International Conference on the challenges in Environmental Science and Engineering (CESE 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永 光司、齋藤 慎吾、平野 麗子、佐藤 久
2. 発表標題 Legionella pneumophila と特異的に結合する新規DNAアプタマーの探索
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 中島芽梨、平野麗子、高橋浩三、佐藤久
2. 発表標題 光導波路分光装置を用いた下水処理プロセスの微生物モニタリング
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 宮島龍太、赤澤優弥、小野寺岳史郎、佐藤久
2. 発表標題 新規簡易大腸菌分析技術を用いた都市河川の糞便汚染源の解明
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 小野寺岳史郎、岩崎隼、平野麗子、佐藤久
2. 発表標題 都市河川における病原遺伝子および薬剤耐性遺伝子の分布
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北大 佐藤久研究グループ
<https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSato/index-HisashiSato.html>

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	齋藤 伸吾 (Saito Shingo) (60343018)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	
研究分担者	山村 寛 (Yamamura Hiroshi) (40515334)	中央大学・理工学部・教授 (32641)	
研究分担者	丁 青 (Ding Qing) (70837476)	中央大学・理工学部・助教 (32641)	
研究分担者	中屋 佑紀 (Nakaya Yuki) (60868735)	北海道大学・工学研究院・助教 (10101)	

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