

琵琶湖・淀川水質保全機構
令和3年度 水質保全研究助成 成果報告会

1

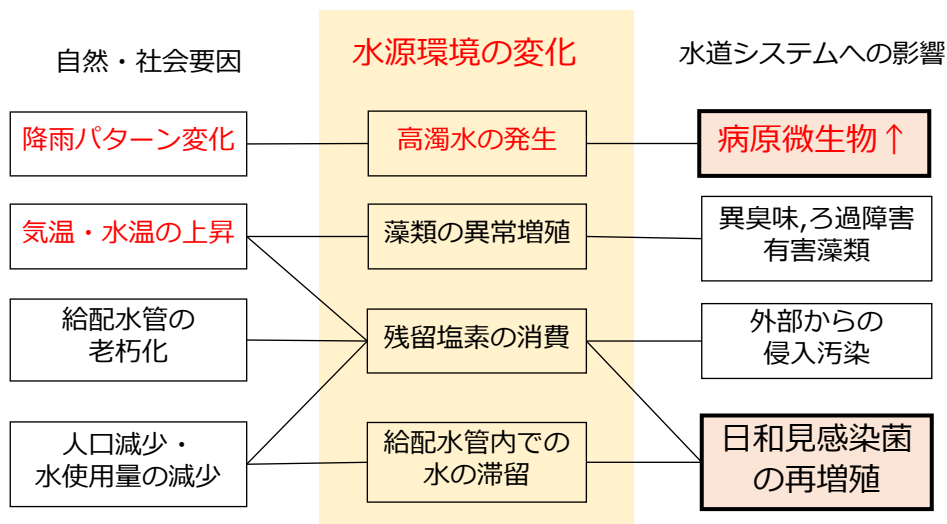
高解像度の遺伝子解析手法を用いた 琵琶湖・淀川水系における病原細菌の一斉検出

京都大学大学院 工学研究科
中西 智宏、曾 潔

1

背景 | 水道システムにおける微生物問題

2



水源における病原微生物の存在実態を把握することが重要

2

背景 | 病原微生物の一斉検出の有用性

これまでの助成研究
における対象微生物

- 細菌
 - レジオネラ
 - カンピロバクター
 - 薬剤耐性菌
 - ウイルス
 - アデノウイルス
 - 原虫
 - クリプトスポリジウム
 - ジアルジア
- など

定量的微生物リスク評価(QMRA)

対象微生物の決定

水中濃度の調査

曝露評価

感染確率の推定

重要な病原体に
「当たりをつけた」
評価とならざるを得
ない

水道原水での病原微生物を一斉検出
できれば、リスク評価・管理に有用

背景 | 細菌の一斉検出における分類解像度

| 分類階級 | 分類名 |
|-------|-------------------------|
| 界 | <i>Bacteria</i> |
| 門 | <i>Proteobacteria</i> |
| 綱 | <i>γ-Proteobacteria</i> |
| 目 | <i>Legionellales</i> |
| 科 | <i>Legionellaceae</i> |
| 属 | <i>Legionella</i> |
| 種 | <i>L. pneumophila</i> |
| 血清型など | (SG1) |

病原体の検出には最低でも
「種」レベル
までの同定が必要

既存の超並列DNAシーケンサー
→ 属レベルまでしか同定できない




病原細菌の一斉検出のためには
より精緻な分類群の推定が必要

背景 | ロングリードによる分類解像度の向上

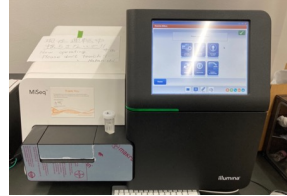
5

ショートリード (従来法)

塩基長 : ~500 bp (16S rRNA遺伝子のV3-V4領域など)




種 1  全ての種で同じ配列が検出
 種 2 
 種 3  病原種の識別が困難

従来型HTS (Illumina社Miseq)

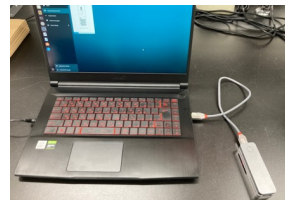


ロングリード (本研究で用いる手法)

塩基長 : 1500 bp (16S rRNA遺伝子全長)

種 1  可変
 種 2 
 種 3  種によって異なる配列を検出
 高い精度で病原種の検出が可能

ロングリード型HTS



技術的な課題 :

- 塩基配列の解読エラーが多い
- データ解析方法が未確立

5

本研究の目的

6

- 16S rDNA全長を対象とした細菌のメタバーコーディング手法における適切な分析条件の決定
- 本手法を琵琶湖・淀川水系に適用し、流域における病原細菌の多様性や分布を把握すること

6

16S rDNA全長を解読対象とした 細菌の一斉検出手法における 検出感度・精度のチェック

7

方法 | 標準DNA試料

既知の細菌種由来のDNAが既知の濃度
で混合された標準試料

使用製品：

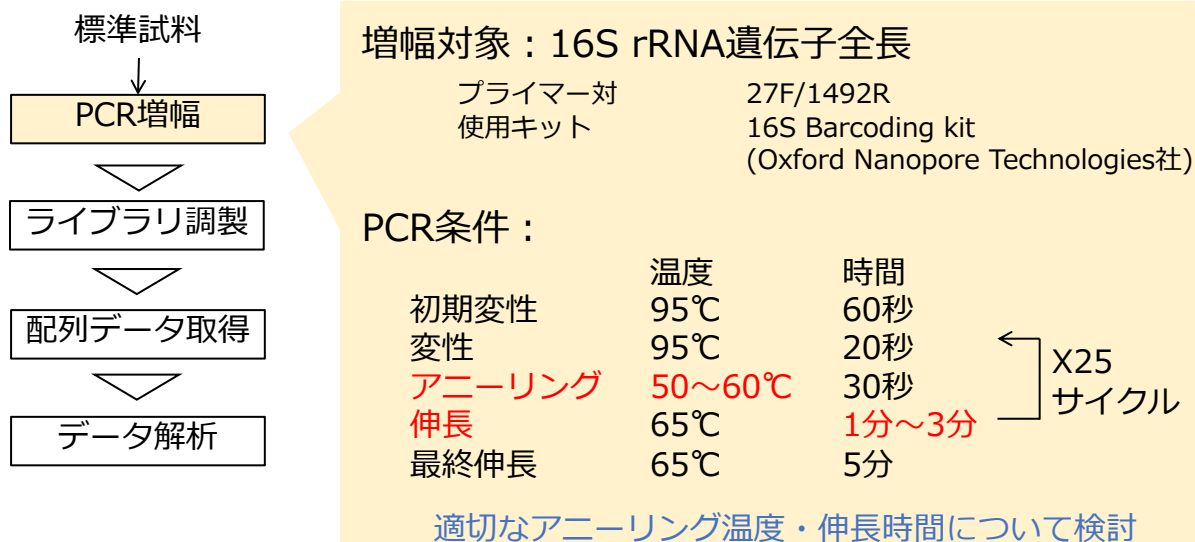
NBRC Microbial DNA Cocktail

(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)

| 学名 | 16S rDNAの存在 割合 (理論値) (%) |
|---|--------------------------------|
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 6.3 |
| <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> | 10.5 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | 4.2 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 5.3 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 11.6 |
| <i>Comamonas terrigena</i> | 7.4 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 4.2 |
| <i>Cutibacterium acnes subsp. acnes</i> | 3.2 |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 5.3 |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | 7.4 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> | 8.4 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | 7.4 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 7.4 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 6.3 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 5.3 |

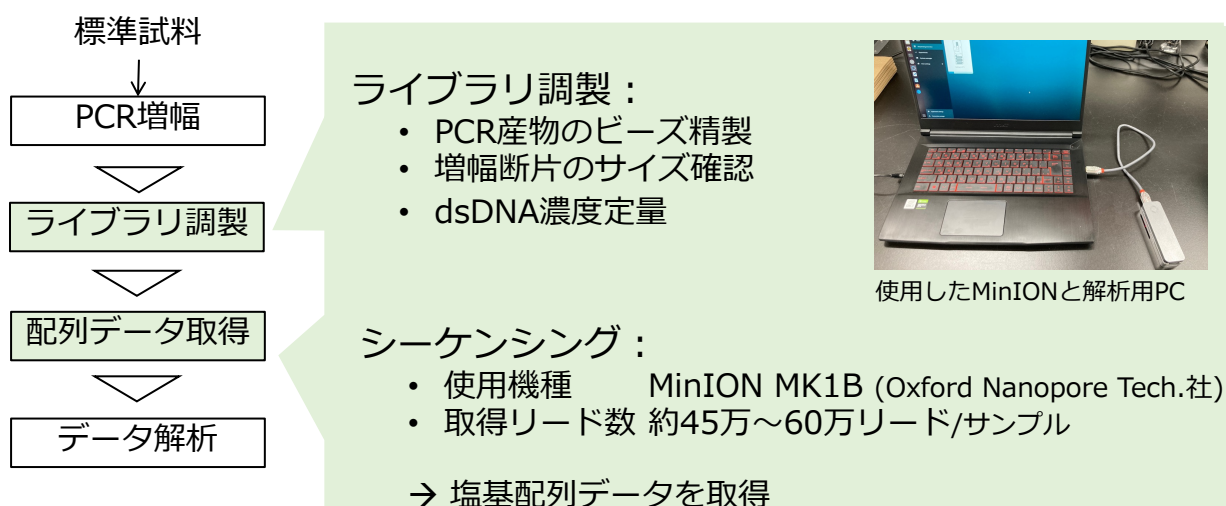
8

方法 | PCR増幅



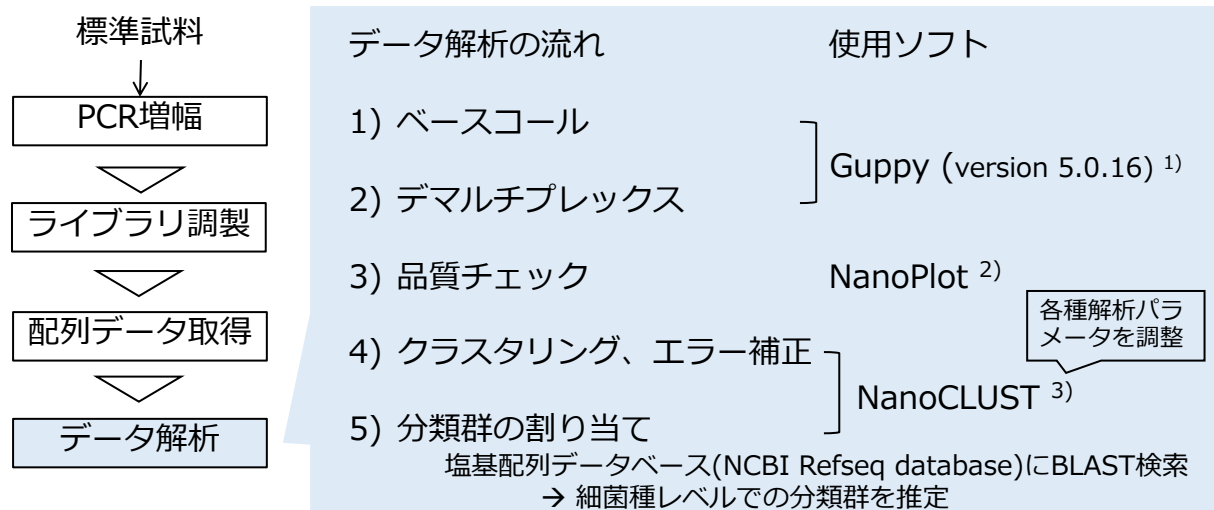
9

方法 | ライブラリ調製~シーケンシング



10

方法 | データ解析



1) Oxford Nanopore Tech.社 2)Coster et al.(2018) *Bioinformatics* 34(15),1666-1669. 3) Rodriguez-Pérez et al. (2020) *Bioinformatics* 37(11), 1600-1601.

11

結果 | 種レベルでの検出精度/感度

| アニーリング 温度(°C) | 伸長時間 (min) | 検出された/されなかった種の数 | | | 真陽性 真陽性+偽陽性 | 真陽性 真陽性+偽陰性 | 適合率と 再現率の 調和平均 F値 |
|------------------|---------------|-----------------|----------|----------|----------------|----------------|----------------------------|
| | | 真陽性数 | 偽陽性数 | 偽陰性数 | 適合率 (-) | 再現率 (-) | |
| 55 | 1 | 12 | 5 | 3 | 0.71 | 0.80 | 0.75 |
| 55 | 2 | 11 | 5 | 4 | 0.69 | 0.73 | 0.71 |
| 55 | 3 | 13 | 6 | 2 | 0.68 | 0.87 | 0.76 |
| 50 | 2 | 13 | 6 | 2 | 0.68 | 0.87 | 0.76 |
| 60 | 2 | 11 | 4 | 4 | 0.73 | 0.73 | 0.73 |

精度/感度のバランスを最も良く取れているPCR条件に決定

12

結果 | 標準DNA試料に対する検出結果 (例)

13

| 真の細菌種 | 検出された細菌種 | 真の配列に対する類似性 (%) |
|---|---------------------------------------|-----------------|
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> | <i>Acinetobacter radioresistens</i> | 99.8 |
| <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | 100 |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | <i>Bacteroides uniformis</i> | 99.8~99.9 |
| <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 不検出 | - |
| <i>Clostridium butyricum</i> | <i>Clostridium butyricum</i> | 100 |
| <i>Comamonas terrigena</i> | <i>Comamonas terrigena</i> | 100 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | <i>Corynebacterium striatum</i> | 99.5 |
| <i>Cutibacterium acnes subsp. acnes</i> | <i>Cutibacterium acnes</i> | 100 |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i> | <i>Enterocloster clostridioformis</i> | 99.0 |
| <i>Escherichia coli</i> (K-12株) | <i>Escherichia fergusonii</i> | - |
| | <i>Escherichia marmotae</i> | 誤検出 |
| | <i>Shigella boydii</i> | - |
| | <i>Shigella flexneri</i> | - |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 99.9 |
| | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 99.9 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | <i>Parabacteroides distasonis</i> | 97.9~99.4 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | <i>Pseudomonas putida</i> | 99.9 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Staphylococcus caprae</i> | 誤検出 |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 99.9 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Streptococcus mutans</i> | 100 |

PCR条件：
アニーリング50℃
伸長反応2分

赤字：
種レベルまで正しく同定
できた種

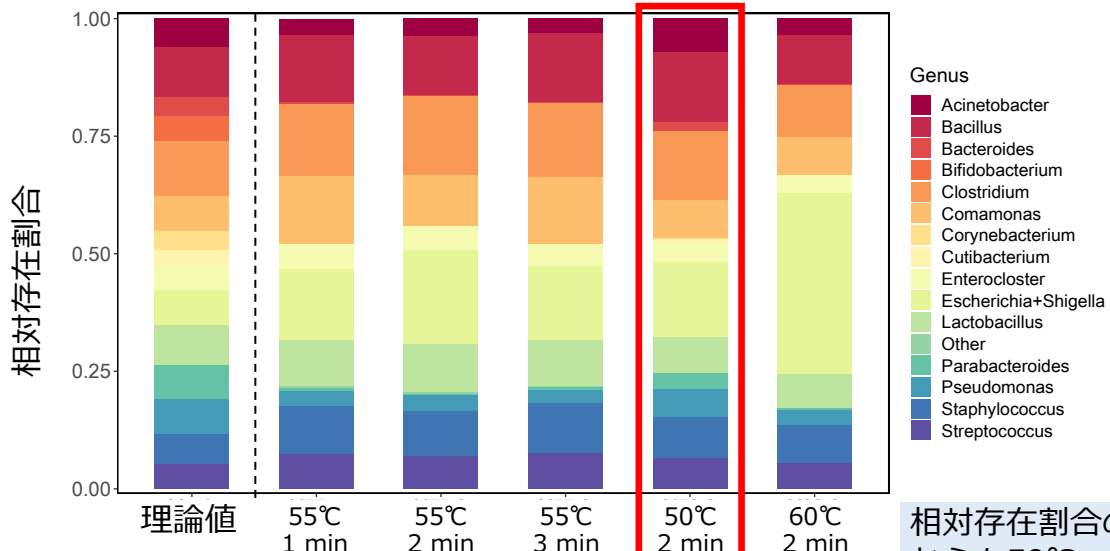
• 種レベルまでの同定精
度は概ね良好

• *Escherichia*属のよう
な16S rDNAの相同性
が高い菌種は検出が難
しい

13

結果 | 各細菌種の相対存在割合

14



Bray-Curtis
非類似度

0 0.37 0.38 0.39 0.28 0.41

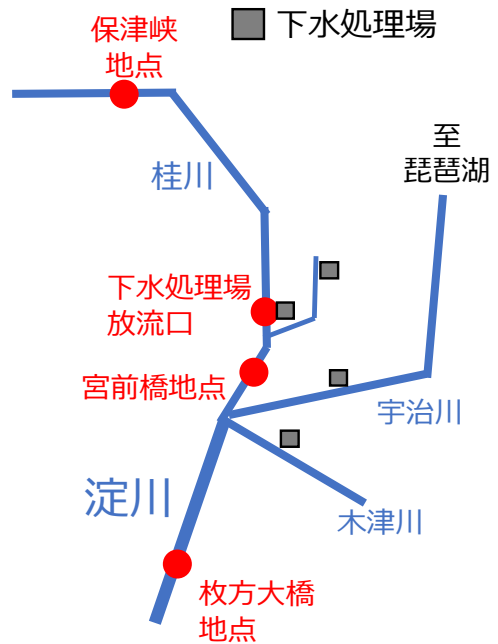
相対存在割合の観点
からも50℃・2分が
最適 → 採用

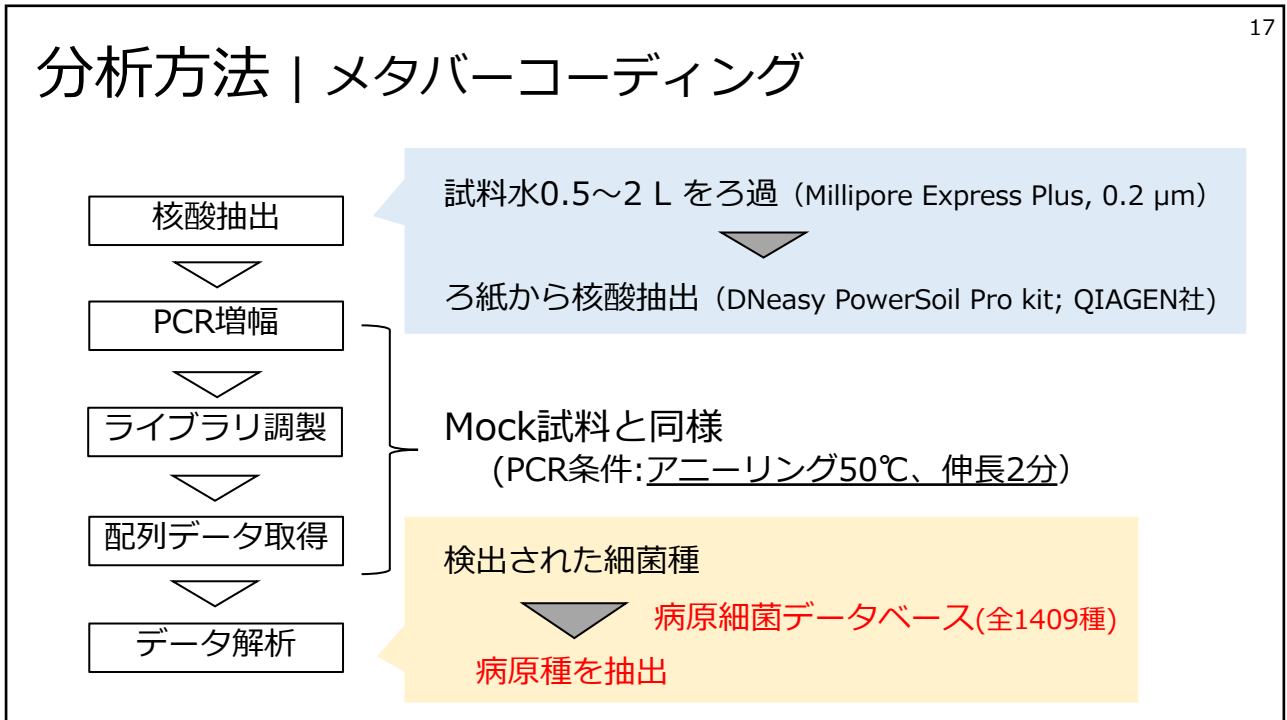
14

桂川～淀川水系における病原細菌の一斉検出

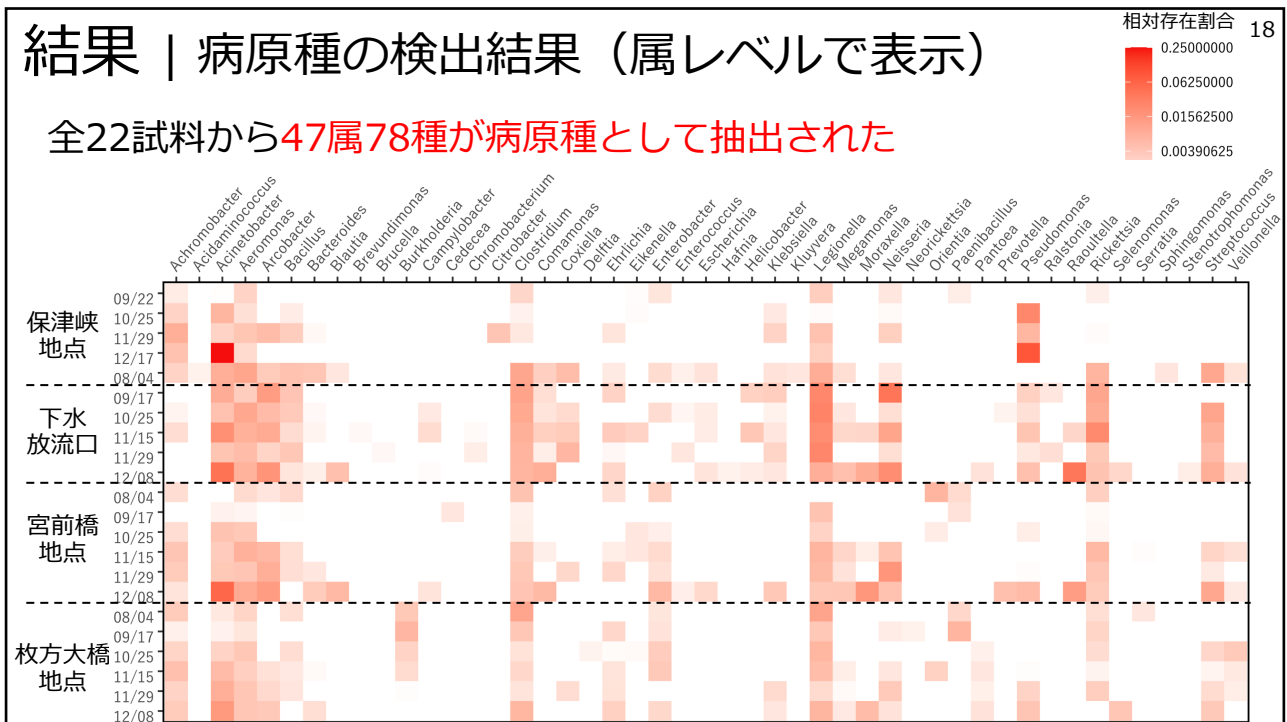
方法 | 調査地点

- 保津峡地点
- 下水処理場 放流水
- 宮前橋地点
- 枚方大橋地点





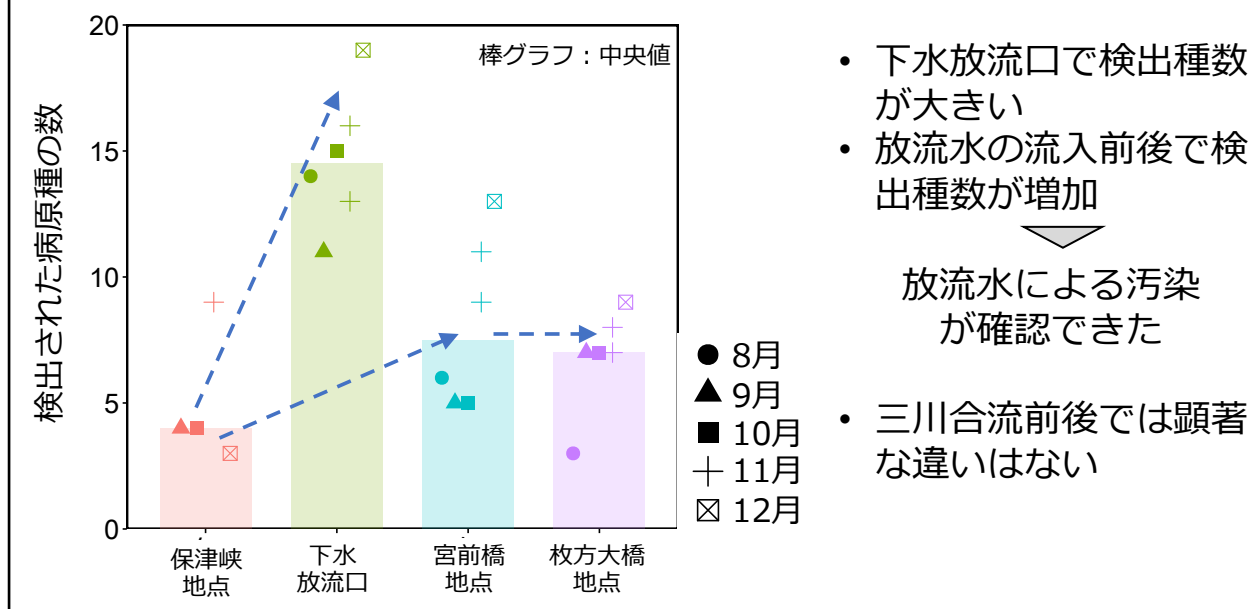
17



18

結果：各地点での病原種の検出数

19



19

まとめ

20

- ロングリード型HTSを用いて、種レベルでの解像度を向上させた細菌一斉検出手法を整備できた
- 桂川～淀川水系と下水処理放流水から計31属78種の病原細菌を検出
→ 下水処理水の合流によって病原細菌の種数が増加することを確認

▽
リスク評価対象とする病原種のスクリーニングに有用

謝辞：

本研究は公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の「令和3年度水質保全研究助成」を受けて実施されました。ここに記して謝意を表します。

20