

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

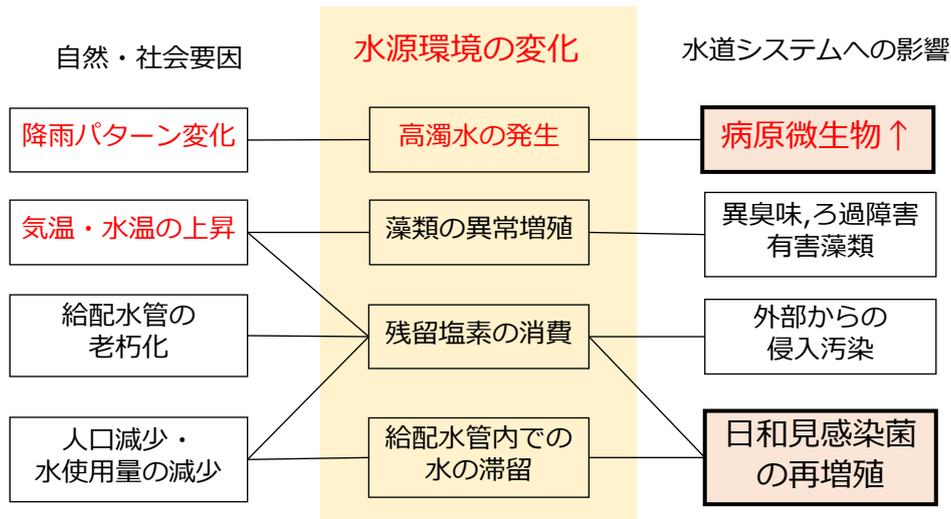
高解像度の遺伝子解析手法を用いた 琵琶湖・淀川水系における病原細菌の一斉検出

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</i> subsp. <i>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</i> subsp. <i>acnes</i>	3.2
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	5.3
<i>Escherichia coli</i> (K-12株)	7.4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>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



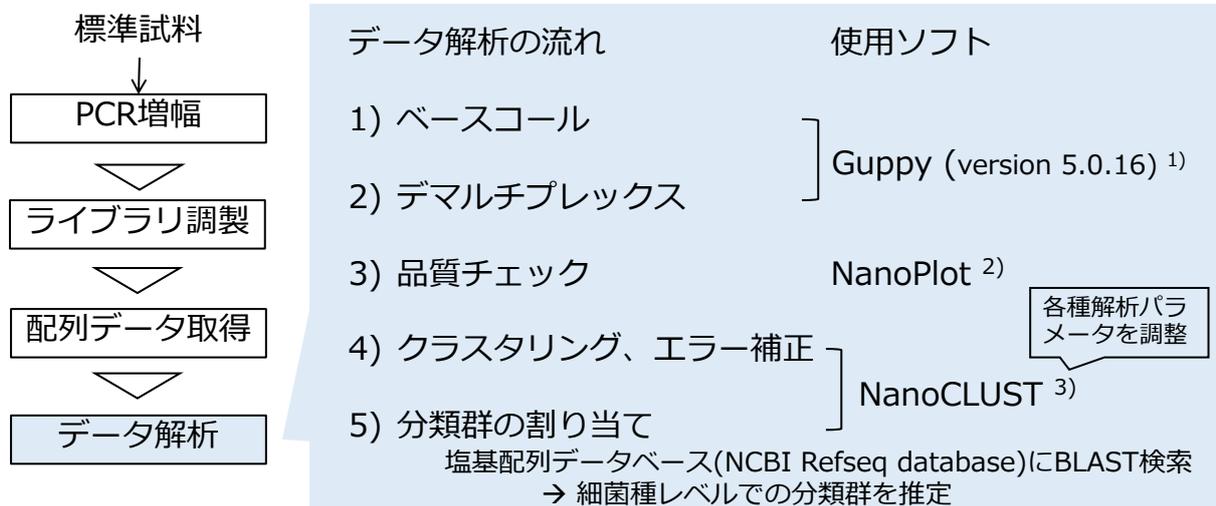
9

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

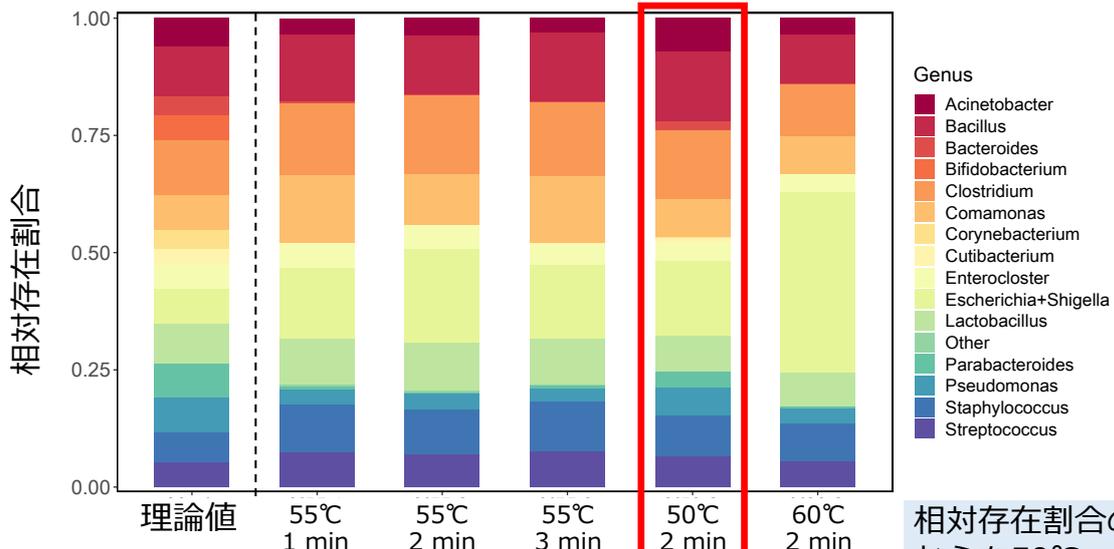
• 種レベルまでの同定精
度は概ね良好

• *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: 理論値 0, 55°C 1 min 0.37, 55°C 2 min 0.38, 55°C 3 min 0.39, 50°C 2 min 0.28, 60°C 2 min 0.41

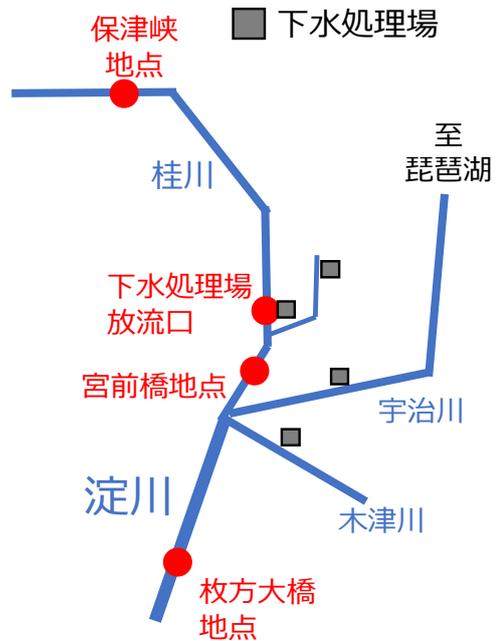
相対存在割合の観点
からも50℃・2分が
最適 → 採用

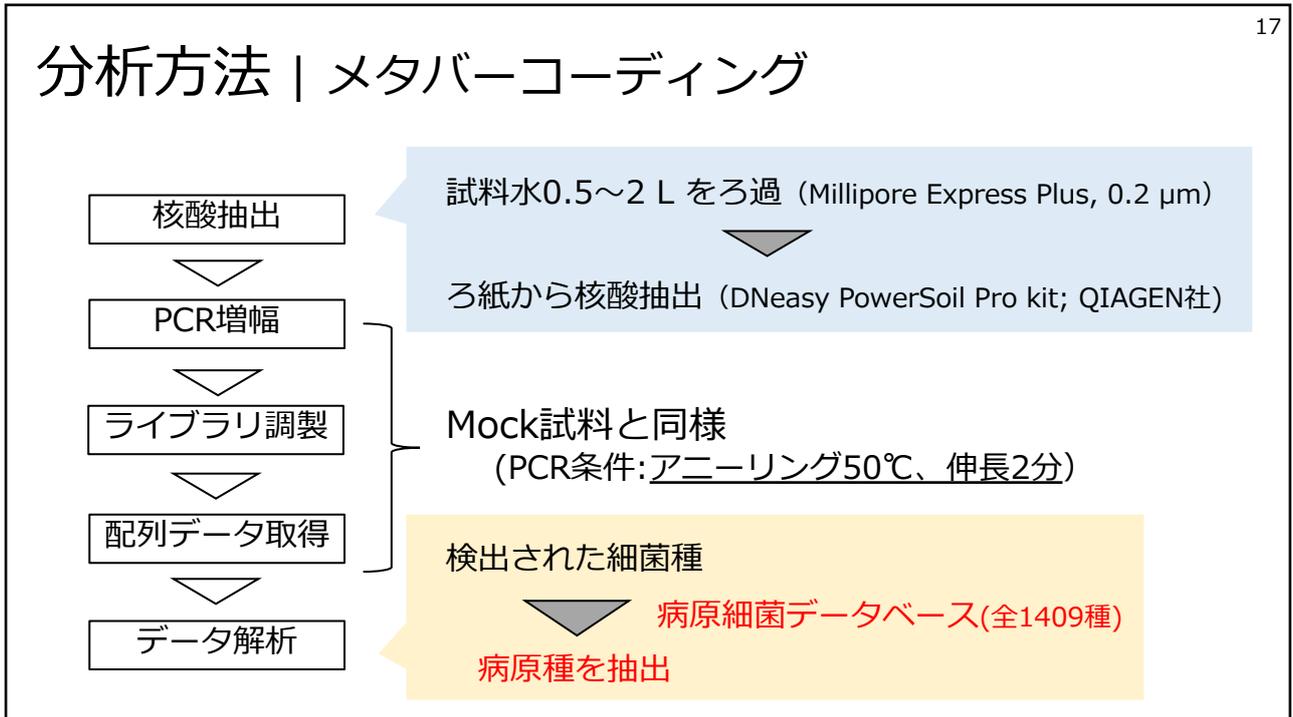
14

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





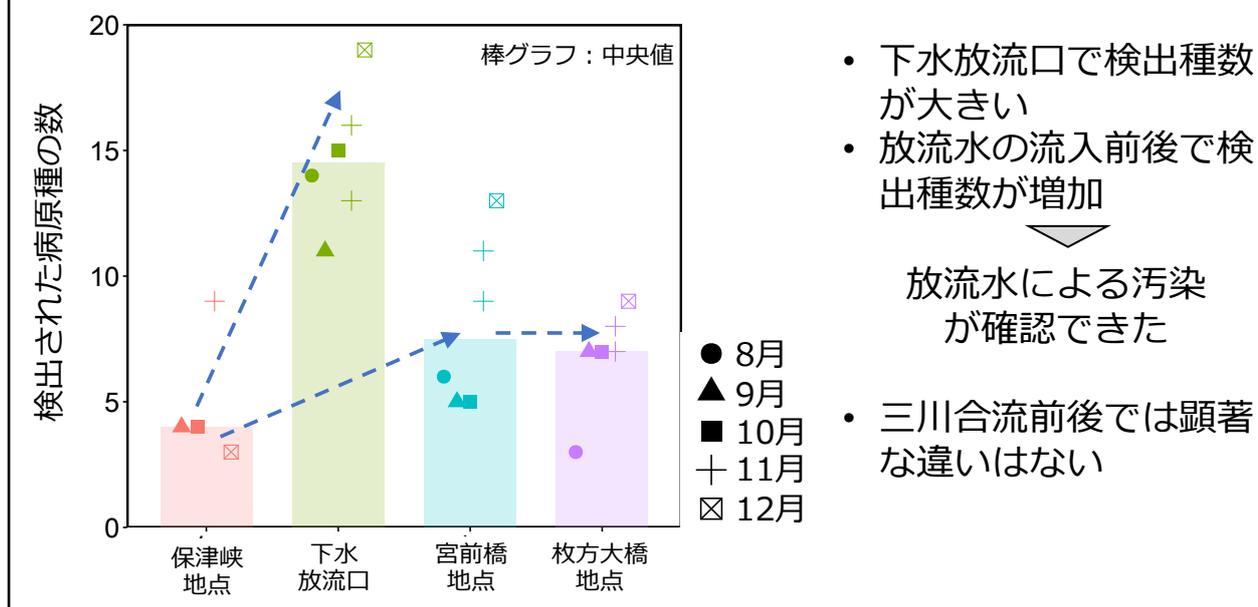
17



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