

下水中の病原微生物の網羅的検出法の開発に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 27～平 28

担当チーム：材料資源研究グループ

研究担当者：植松龍二、諏訪守、安井宣仁

【要旨】

本研究では感染症発生情報を提供出来るシステムを構築するための、基礎データの集約とデータベース化を図るために下水中病原微生物の網羅的検出法を開発することを目的とした。網羅的な検出には、近年の遺伝子解析技術の向上により医学分野で検討事例のある、次世代シーケンサー (NGS) を用い検討することとした。下水を対象とした NGS による網羅的な病原微生物の検出に関する検討事例は、国内外でも極めて少ないため、網羅的検出法に関する最適化された測定手法はない。

本研究において、網羅的検出法により得られる「下水中の病原微生物のデータ」は、今後、下水処理プロセスでの病原微生物のリスク制御を検討する上で、有効な情報となり得ると考えられる。NGS による分析には、前処理として対象試料の核酸を抽出する必要があるが、感度よく精度の高いデータを得るためには核酸抽出効率を高め、最適な純度を得ることが重要である。このため、下水試料を対象に異なる核酸抽出方法を検討し、NGS 分析に最適な前処理方法を評価した。また、NGS 分析用の流入下水、二次処理水を隔週で計 48 サンプル採水し、開発した抽出方法を用いて 48 サンプルの NGS 分析および解析を行った。

その結果、0.45 μm フィルターで試料を補足し、ビーズを用いてフィルター表面上を処理することで、最適な核酸濃度および純度を得られ、下水・下水処理水を対象とした際の NGS 分析に適した核酸抽出方法が確立できた。NGS の分析・解析では、流入下水は全体を通して約 30～50%、処理水は 15～20% の遺伝子の配列情報がヒットし生物種を分類することができた。流入下水は 90% 以上が細菌 (Bacteria) であったのに対して、二次処理水は植物と真菌 (Plants and Fungi) の割合が増加している傾向が確認された。
キーワード：病原微生物、次世代シーケンサー、遺伝子配列情報、核酸抽出

1. はじめに

近年、医学領域では病原微生物、主にウイルスや細菌等の検出・測定技術が向上してきており、疾患原因となるウイルス等の検知が可能になってきている。それに伴い、環境分野でも河川水や海域、下水試料等から様々な病原微生物が検出可能となり、それらの存在実態が徐々に明らかとなってきている^{1) 2)}。これらの検出・測定技術等を応用して、流入下水中の病原微生物を迅速に測定し、ヒトへの健康被害拡大防止のための感染症発生情報を提供出来るシステムの開発が望まれている³⁾。

様々な病原微生物が検出・測定可能になってきているなか、下水に着目すると原虫、腸管系ウイルス、細菌、その他の感染性ウイルス等が感染者あるいは不顕性感染者の糞便から下水中に混入する可能性がある。これらの病原微生物の検出の現状については、混入する可能性がある全ての病原微生物を検出することが望ましいが、現状では主に遺伝子解析手法

(PCR 法等) により、個々の病原微生物を定量測定することに留まっているため、特定の病原微生物を対象とした情報しか得られない。感染症発生情報を提供出来るシステムの開発には、測定対象とした試料中に混入可能性のある病原微生物の存在種や、その割合などの基本的なデータが必要となる。このため、現在顕在化している個々の病原微生物のみならず、新たな問題となる可能性のある病原微生物などを含め、網羅的に複数の病原微生物の存在実態を把握できる検出法を開発する必要がある。また、網羅的検出法により得られる下水中の病原微生物のデータは、下水処理プロセスでの病原微生物のリスクを制御・検討する上で、有効な情報となり得る。

本研究では、感染症発生情報を提供出来るシステムの構築に必要な基礎データの集約とデータベース化を図るため、病原微生物の網羅的検出法の開発を目的とするものである。具体には、医学分野で検討事例のある、次世代シーケンサー (以下、NGS と

記す)を下水試料に適用するための最適な前処理方法の提案と、その成果を基に下水試料中に含まれる生物種等の解析・評価を行った。

2. 研究方法および研究結果

下水試料を対象としたNGSによる網羅的な病原微生物の検出に関する検討事例は、国内外でも極めて少ないため、網羅的検出法に関する最適化された測定手法はない。

NGSによる分析には、前処理として対象試料の核酸を抽出する必要があるが、感度よく精度の高いデータを得るためには核酸抽出効率を高め、最適な純度を得ることが重要である。しかしながら、現状では下水試料を対象とした最適な核酸抽出方法が確立されていない。そこで、本研究では、既往の研究成果等で示されている抽出方法ならびに本研究で開発した抽出方法を下水試料に適用し、NGS分析に最適な前処理方法を評価した。

次いで、前処理方法の評価結果を基にした核酸抽出方法を適用し、NGS分析装置(Miseq, Illumina社製)により対象試料の全48サンプル中の塩基配列データを取得し、下水および処理水に含まれる生物種等の解析・評価を行った。

2.1 NGS前処理：核酸抽出方法の評価

NGSに使用できる核酸の状態は、二本鎖のDNA(dsDNA)である必要があり、抽出後の後段の分析において精度良く行える最低濃度として二本鎖DNA(dsDNA: double-stranded DNA)濃度が $>25\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上必要である。またdsDNAの純度が1.8~2.0の範囲であることが望ましい。これらの条件を満たすことが可能な抽出方法を検討した。

A 下水処理場の流入下水を抽出検討用試料とし、4種類の異なる核酸抽出方法で検討を行った。以下に本研究で検討した4種類の核酸抽出方法を示す。

抽出方法①

PEG沈法により濃縮した下水試料をQIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN社製)を用い、手順書に従い抽出を行った。

抽出方法②

抽出方法①と同様にPEG沈法により濃縮した試料を、ウイルスの抽出に最適化されたkitであるQIAamp

MinElute Virus Spin Kit(QIAGEN社製)を用い、手順書に従い抽出を行った^{4) 5)}。

抽出方法③

懸濁物質や粒子内に付着している濁質から効率的に核酸を抽出するために、濃縮方法を抽出方法①、②のPEG沈法から変更し、 $0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルターで下水をろ過し、フィルターに捕捉された試料からQIAamp MinElute Virus Spin Kit(QIAGEN社製)を用い核酸の抽出を行った。

抽出方法④(本研究で開発した手法)

抽出方法③における前処理と同様に $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、フィルターに捕捉された試料をビーズが入ったチューブに入れ、フィルター表面上をビーズで剥がす工程を追加した。具体的にはビーズ入のチューブにフィルターを充填し専用のボルテックスで5分間混合させ、フィルター表面上に捕捉した濁質を効果的に剥がし核酸の抽出を行った。核酸の精製はPowerWater DNA Isolation Kit(MO BIO社製)を用い手順書に従った。

各抽出方法で得られた抽出液は、Nanodrop 2000c(ThermoFisher製)を用い、核酸(DNA)純度を測定し、dsDNA濃度はQubit3.0(ThermoFisher製)を用い定量した。

2.2 核酸抽出方法の評価結果

図-1に各抽出方法におけるdsDNA濃度および純度を示す。図-1より抽出方法①、②では抽出後の後段分析が精度良く行える最低濃度であるdsDNA濃度が $25\text{ng}/\mu\text{L}$ 未満であり、DNAの純度が3~3.5と非常に高かった。純度が高すぎる場合、夾雑物の影響があると考えられ、抽出方法①および②は下水試料を対象とした際のNGS分析の抽出方法としては不向きであると判断した。一方、抽出方法③では濃縮方法をPEG沈法から $0.45\mu\text{m}$ フィルターに通水しフィルター上に捕捉された試料を用いて抽出を行ったが、抽出方法①、②と比較して、DNAの純度も後段の分析に最適な1.9程度であり、dsDNA濃度は数倍程度増加した。しかしながら、NGS分析における後段分析の精度が良く行える最低濃度($>25\text{ng}/\mu\text{L}$)には達しなかった。本研究で開発した抽出方法④は、dsDNA濃度が約 $140\text{ng}/\mu\text{L}$ 、DNA純度も1.8~1.9と良好であった。抽出方法④はフィルターに捕捉された試料をビーズによりフ

フィルター表面上から剥がし取るため、抽出効率が他の抽出方法と比較して向上した可能性が考えられた。

以上より抽出方法④を用いることで、核酸抽出効率が増加し、分析可能な最適な純度の DNA の抽出が可能となり、下水・下水処理水を対象とした際の NGS 分析に適した核酸抽出方法が確立できた。

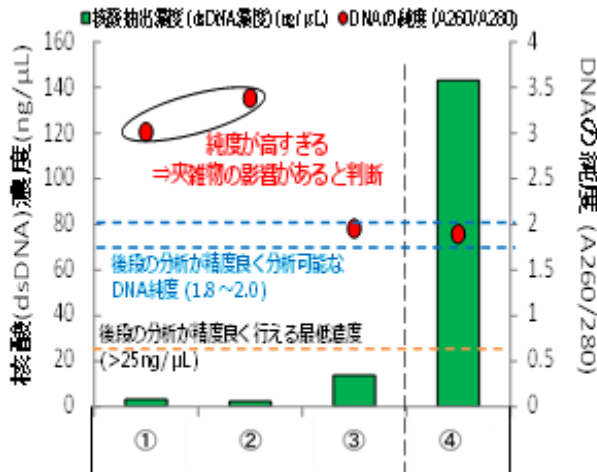


図-1 異なる抽出方法による dsDNA 濃度と DNA 純度

2. 3 実処理施設での NGS 用試料の採水

本研究では、対象試料として A 下水処理場の流入下水および凝集剤添加標準活性汚泥法、A2/O 法の処理方式の異なる二次処理水を、施設内滞留時間を考慮して、H. 27 年 7 月～H. 28 年 6 月の期間、隔週で採水し NGS 分析用試料として 48 サンプルを得た。上記 2.1 で開発した抽出方法により、NGS を用い病原微生物を網羅的に検出することを試みた。なお、季節変動等を考慮するために試料は隔週で採水を行った。

採水した試料は直ちに分析室へ持ち帰り SS、濁度、T-N、T-P、pH、COD_{cr}、大腸菌、大腸菌群の一般水質を測定した。併せて NGS 用の前処理として 0.45 μm のフィルターに試料を通水し、抽出方法④を用い核酸の抽出を行った。なお分析を即座に行えない試料は、フィルターを -80℃ で保管し 1 ヶ月以内に抽出作業を実施した。

2. 4 NGS による分析・解析方法

分析方法

2.3 項で採水した試料および本研究で開発した核酸抽出方法により、NGS 装置 (Miseq, Illumina 社製) を用い、試料水中に含まれる生物種の遺伝子解析を実施した。核酸抽出した試料は Nextera XT DNA

Library Preparation kit (Illumina 社製) を用い、ライブラリー調整を行った後、kit の手順書に従い調整を行った後、NGS に供した。

なお NGS は 1 RUN で異なる 96 サンプルの遺伝子情報 (塩基配列データ) を取得できるため、従来の qPCR 法やその他のシーケンス解析法よりも簡便かつ迅速に大量のデータが取得可能なツールである。

解析方法

NGS により取得した塩基配列データはサンプル毎に膨大な塩基配列データが無作為に得られるため、NGS により取得したデータの情報処理を行う必要がある。本研究では以下の手順によりデータ解析を試みた。

(1) データの加工および配列抽出

① Illumina アダプター配列のトリミング

NGS では、サンプルを一度にスプールするためサンプルを識別できるようにサンプル毎に異なるアダプターが付加されているため、リード配列末端で該当配列: Read 1 3' 末端側

CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCACGAGAC

Read 2 3' 末端側

CTGTCTCTTATACACATCTGACGCTGCCGACGA

と最低 5 塩基以上オーバーラップする領域をミスマッチ許容率 20% でトリミングを行う。

② 低 QV (クオリティー) 領域のトリミング

上記①処理後のリードデータについて、20 塩基の window を 5' 側から差スライドさせていき、平均 QV が 20 未満となった領域をトリミングした。トリミング後、Read 1/Read 2 とともに 50 塩基以上残存したリードのみを出力する。

③ Read 1/Read 2 の結合

②処理後のリードデータを、Read 1/Read 2 配列の 3' 側末端で最低 6 塩基以上オーバーラップする領域を検索 (ミスマッチ許容率=8%) し、オーバーラップ部分を連結する。

④ BLAST 解析用クエリ配列の抽出

連結処理を行ったデータより配列長の長い順に 1 サンプルあたり 10,000 配列、合計 480,000 配列 (10,000 配列 × 48 サンプル分) の配列を抽出し、データベース上に登録されている検索用のクエリ配列セットを作成する。

(2) 抽出塩基配列のBLAST解析

上記(1)にて作成したクエリ配列セットをインプットデータとして、指定配列データベース：NCBI NR(non-redundant nucleotide) Database に対するBLAST 検索を行い、ヒット情報を出力する。

2. 5 解析結果

表-1 に 48 試料分のNGS により取得リード数、解析方法(1) 工程①、②の処理後の残ったリード数、結合処理後のリード数、取得リード数に対する結合リード数の割合、結合配列の平均長(bp)を示す。

本研究で用いた流入下水、下水処理水中の塩基配列数として平均712,715 リード数が得られ、解析方法に従い加工し、結合して得られたデータ数は取得データの約60~80%であった。概ね本研究で開発した抽出方法を用いることで良好な結果が得られた。

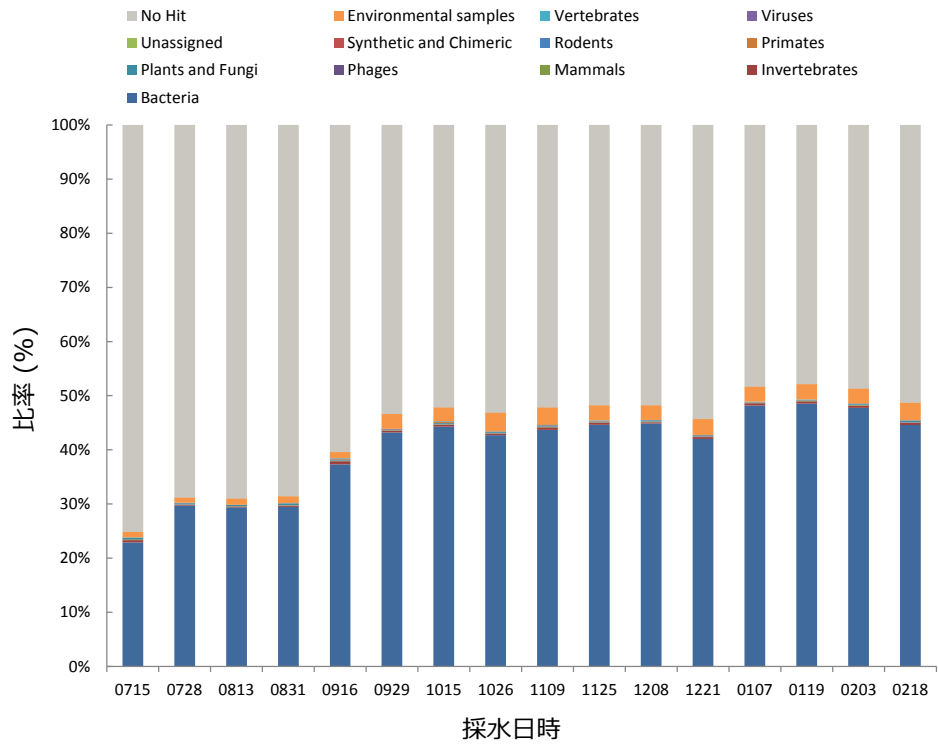
表-1 で得られた結果、結合されたリード数から配列長の長い順に10,000 配列を抽出し、BLAST 解析を行った結果を図-2,3 に示す。

結合した塩基配列を細菌(Bacteria)、無脊椎生物(Invertebrates)、哺乳類(Mammals)、ファージ(Phage)、植物と真菌(Plants and Fungi)、霊長類(Primates)、げっ歯類(Rodents)、キメラ合成(Synthetic and Chimeric)、ウイルス(Virus)、脊椎生物(Vertebrates)、環境試料^{*1}(Environmental Samples)、割り当てなし^{*2}(Unassigned)の計12種に分類し、各下水および下水処理水中に存在する生物種を同定した。(^{*1}環境試料(Environmental Samples)は環境から直接クローニングされた無名配列を示す。^{*2}割り当てなし(Unassigned)はデータベース上でヒットするが、12種の分類に割り当てられない配列である。)

表-1 各試料のNGSにより取得/トリミング/結合リード数

Sample ID	Date	Sample Name	取得リード数	トリミング後リード数	結合リード数	結合割合(%)	結合配列の平均長(bp)
1	7月15日	流入下水	567,058	549,941	432,124	76.20	288.96
2	7月16日	凝集剤添加 活性汚泥法処	601,119	582,792	462,763	76.98	282.60
3		A2/O法 処理水	360,579	348,600	279,515	77.52	279.56
4	7月28日	流入下水	683,692	662,763	558,356	81.67	263.55
5	7月29日	凝集剤添加 活性汚泥法処	878,322	855,104	710,424	80.88	260.21
6		A2/O法 処理水	755,832	735,448	620,518	82.10	260.28
7	8月13日	流入下水	585,510	566,841	450,171	76.89	286.14
8	8月14日	凝集剤添加 活性汚泥法処	693,051	668,787	542,285	78.25	267.05
9		A2/O法 処理水	1,038,152	1,000,393	772,300	74.39	289.38
10	8月31日	流入下水	563,067	548,396	438,898	77.95	287.32
11	9月1日	凝集剤添加 活性汚泥法処	800,533	782,323	644,261	80.48	270.46
12		A2/O法 処理水	720,501	700,012	566,534	78.63	276.91
13	9月16日	流入下水	455,727	431,575	352,315	77.31	257.88
14	9月17日	凝集剤添加 活性汚泥法処	306,755	290,965	233,670	76.17	265.71
15		A2/O法 処理水	292,741	272,508	207,149	70.76	278.75
16	9月29日	流入下水	323,581	308,740	251,518	77.73	267.85
17	9月30日	凝集剤添加 活性汚泥法処	1,024,041	987,514	866,404	84.61	223.20
18		A2/O法 処理水	645,899	601,873	465,723	72.10	252.90
19	10月15日	流入下水	691,242	669,915	582,472	84.26	245.60
20	10月16日	凝集剤添加 活性汚泥法処	652,665	611,575	436,861	66.93	276.32
21		A2/O法 処理水	421,130	392,120	293,648	69.73	252.32
22	10月26日	流入下水	380,929	354,646	263,000	69.04	229.45
23	10月27日	凝集剤添加 活性汚泥法処	372,725	342,073	240,844	64.62	229.68
24		A2/O法 処理水	402,045	372,289	270,847	67.37	229.25
25	11月9日	流入下水	1,538,067	1,498,784	1,296,511	84.29	250.81
26	11月9日	凝集剤添加 活性汚泥法処	1,116,415	1,081,030	862,763	77.28	264.99
27		A2/O法 処理水	18,470	14,530	13,868	75.08	138.17
28	11月25日	流入下水	836,946	806,705	686,930	82.08	244.47
29	11月26日	凝集剤添加 活性汚泥法処	1,179,564	1,123,529	913,416	77.44	238.64
30		A2/O法 処理水	961,426	908,489	660,421	68.69	253.49
31	12月8日	流入下水	862,634	840,791	719,995	83.46	261.16
32	12月9日	凝集剤添加 活性汚泥法処	524,529	497,546	348,575	66.45	295.45
33		A2/O法 処理水	1,287,760	1,249,457	965,330	74.96	298.70
34	12月21日	流入下水	593,390	577,975	483,475	81.48	273.19
35	12月22日	凝集剤添加 活性汚泥法処	556,871	527,777	355,661	63.87	283.17
36		A2/O法 処理水	746,339	720,551	580,789	77.82	256.78
37	1月7日	流入下水	648,965	617,088	495,599	76.37	269.83
38	1月8日	凝集剤添加 活性汚泥法処	718,029	666,407	500,474	69.70	268.82
39		A2/O法 処理水	836,621	796,468	636,108	76.03	268.09
40	1月19日	流入下水	910,915	860,285	694,159	76.20	258.39
41	1月20日	凝集剤添加 活性汚泥法処	933,813	851,667	560,002	59.97	300.49
42		A2/O法 処理水	905,628	852,733	672,546	74.26	260.53
43	2月3日	流入下水	963,087	922,307	711,834	73.91	289.71
44	2月4日	凝集剤添加 活性汚泥法処	732,819	692,817	533,106	72.75	273.08
45		A2/O法 処理水	783,663	754,639	607,109	77.47	274.46
46	2月18日	流入下水	503,879	482,138	384,493	76.31	278.86
47	2月19日	凝集剤添加 活性汚泥法処	837,924	795,134	599,055	71.49	285.06
48		A2/O法 処理水	995,693	957,304	791,381	79.48	263.63

流入下水



二次処理水 (凝集剤添加活性汚泥法 (1系)、A2/O法 (2系))

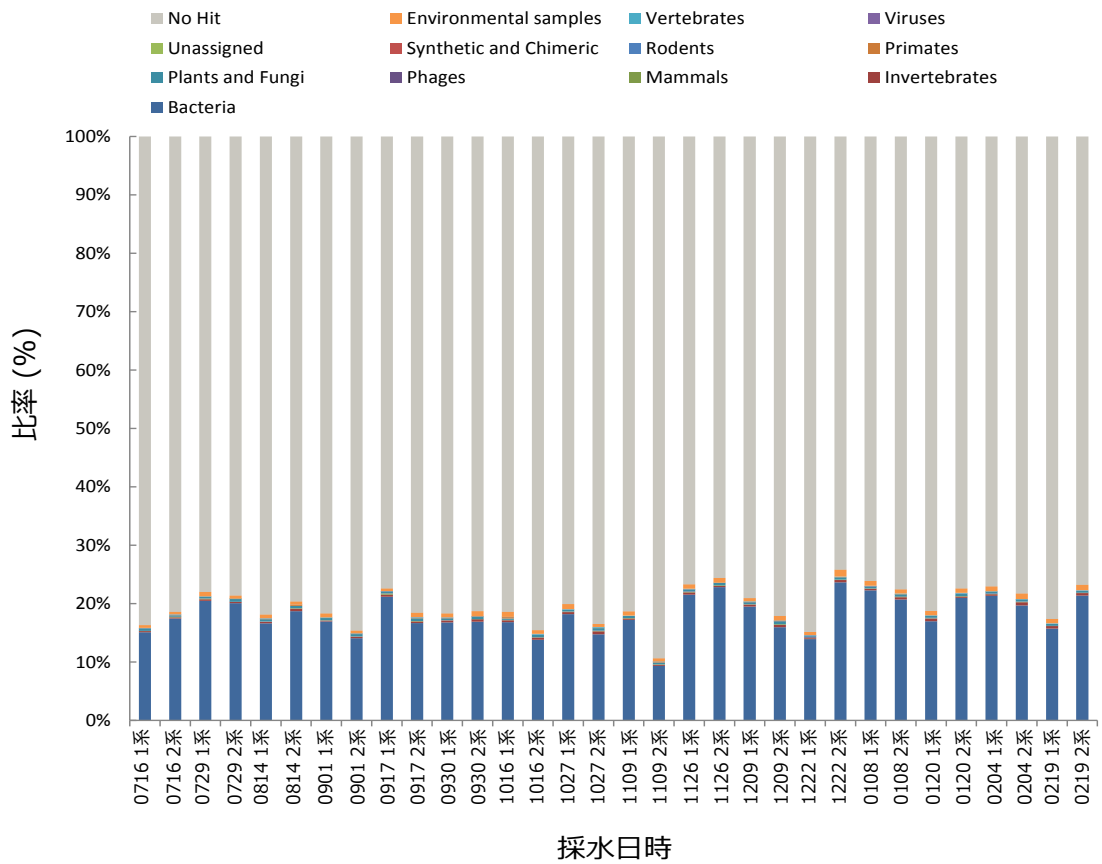
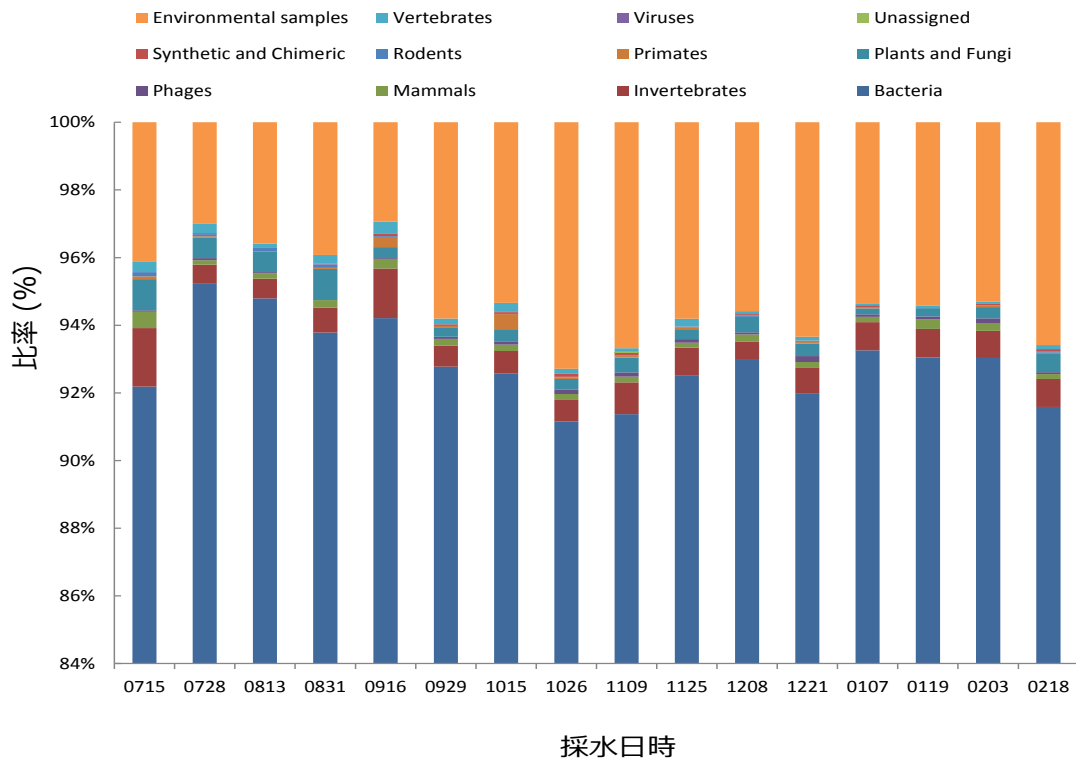


図-2 抽出配列の BLAST 解析結果 (流入下水/処理水中の生物種の同定結果)

流入下水



二次処理水 (凝集剤添加活性污泥法 (1系)、A2/O法 (2系))

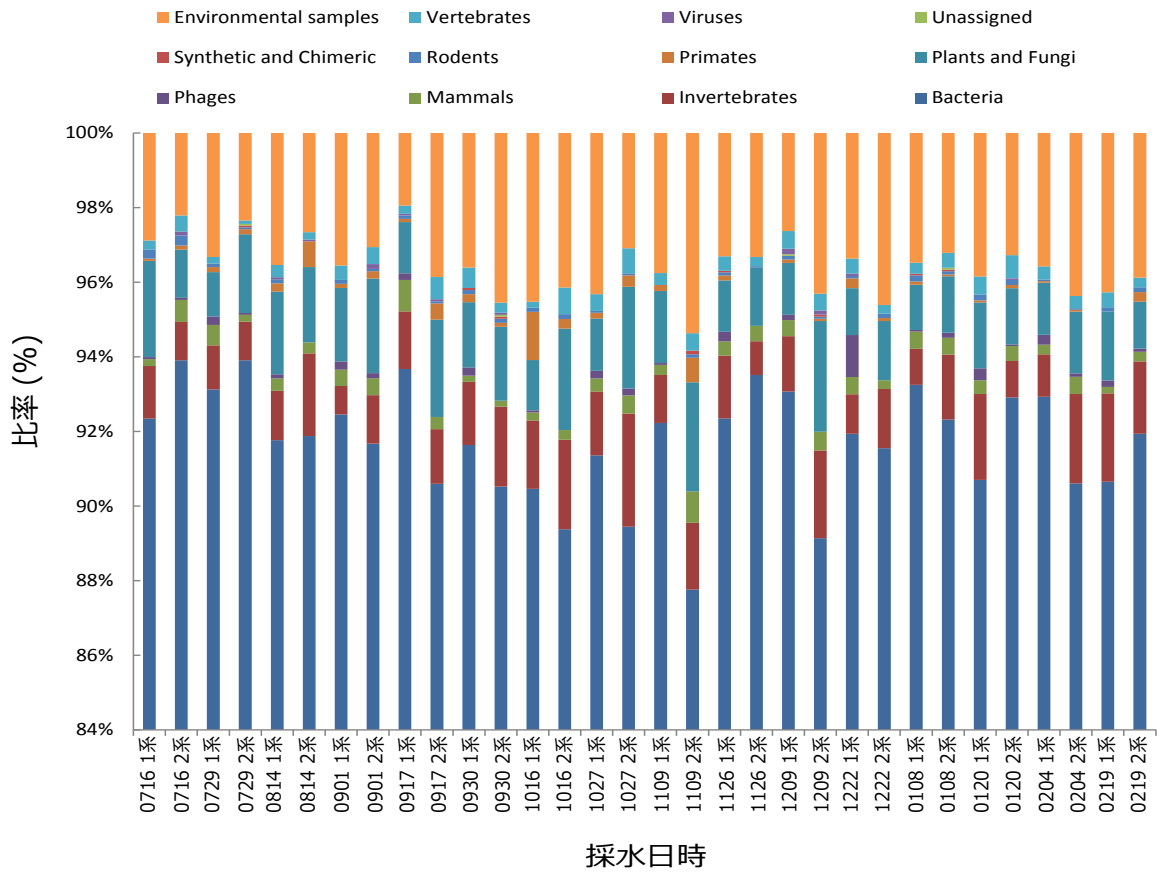


図-3 抽出配列のBLAST解析結果 (流入下水/処理水中の生物種の同定結果) (ヒット情報のみ抽出)

図-2には、得られた塩基配列全ての割り当てを示す。図-3には、データベース上でヒットしなかった配列を除いた際の結果を示す。図-2より流入下水は全体を通して、約30～50%の遺伝子の配列情報がヒットし生物種を分類することができた。また7、8月の夏場より9月～翌年1月の秋から冬にかけて同定率が増加する傾向が確認された。一方、二次処理水は季節的、処理方式で大きな生物種の変化は確認できず、概ね15～20%の遺伝子配列情報がヒットした。既往の研究報告では、下水再生水からDNAを抽出しデータベース上で検索した結果、約30%がヒットした報告されていることから、本研究で開発した手法によるNGS解析は既往の報告と比較しても遜色がないと考えられた。

図-3においては、ヒットした情報のみを整理した結果、流入下水は90%以上が細菌(Bacteria)であったのに対して、二次処理水は植物と真菌(Plants and Fungi)の割合が増加している傾向が確認された。また流入下水とは異なり、処理水中に存在する可能性のある生物種として細菌類が減少し、その他生物種が占める割合が増加している傾向が確認された。

3. 今後の検討課題

下水および下水処理水中に含まれる病原微生物を網羅的に検出する手法の開発を試みた結果、各試料から約20～50%の生物種を同定することが可能であった。今後は、同定された種から病原微生物、主にウイルスを対象により精度よく検出、同定できる手法と解析方法を検討していくことで、下水中に混入可能性のあるウイルス種や、その割合を評価できるものと考えられる。

4. まとめ

本研究では、NGS分析における前処理として核酸抽出方法を検討し、実処理場の下水および処理水を採水しNGS分析した結果以下の知見を得た。

1) 抽出方法として、0.45 μ mのフィルターで試料をろ過し、フィルター上に捕捉された試料をビーズにより剥がす工程を経ることで、NGS分析に最適な核酸濃度および純度を得ることが出来た。

- 2) 1)で確立した抽出方法を用い、実処理場で下水および処理水を採水し、NGS分析を行った結果、流入下水は全体を通して約30～50%、処理水は15～20%の遺伝子の配列情報がヒットし生物種を分類することができた。
- 3) 流入下水は90%以上が細菌(Bacteria)であったのに対して、二次処理水は植物と真菌(Plants and Fungi)の割合が増加している傾向が確認された。

参考文献

- 1) 津森ジュン, 日高平, 對馬育夫: 遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発, No.4309, ISSN:0386-5878, 土木研究所資料, 2015.
- 2) Rosario K., Nilsson C., Lim YW., Ruan Y., Breitbart M., Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water, Environmental Microbiology, Volume 11, Issue 11, PP.2806-2820, 2009.
- 3) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部, 公益社団法人日本下水道協会: 下水道政策研究員委員会 報告書 新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～, 2014年7月, p.4.85-4.105.
- 4) 諏訪守, 岡本誠一郎, 尾崎正明, 陶山明子: 下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響, 下水道協会雑誌, 46(512), pp.91-101, 2009.
- 5) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介: 下水道におけるウイルス対策手法に関する検討調査, 平成22年度下水道関係調査研究年次報告書集, No.4191, ISSN 0386-5878, 土木研究所資料, 2010.