

奨励金No.1537

DNA メタバーコーディングによる病原細菌の高精度な一斉検出手法の確立と小規模水道地域への適用

中西 智宏

京都大学大学院 工学研究科 助教

Simultaneous detection of pathogenic bacterial species in small-scale water supply systems by high-accuracy long-read DNA metabarcoding

Tomohiro Nakanishi,

Graduate School of Engineering, Kyoto University, Assistant Professor



我が国に多数存在する小規模な水供給施設においては、安全な飲料水の持続的供給が困難になりつつある。本研究は実際の飲料水供給施設を対象として原水中の病原細菌の存在実態を蓄積し、必要十分な浄水・消毒処理レベルを提示することを目的とした。具体的には、新規の遺伝子解析手法によって原水中の病原細菌を網羅的に検出・同定したあと、安全性を確保するために浄水処理に求められる微生物除去・不活化能を推算した。

In small-scale water supply systems in Japan, providing microbiologically safe drinking water is increasingly difficult. This study aims to gather data on pathogenic bacteria in raw water from these facilities and propose necessary levels of purification and disinfection. Using high-throughput sequencing technology, we comprehensively identified pathogenic bacteria present in the raw water. Based on these findings, we estimated the required log reduction in bacteria through water treatment to ensure safety.

1. 研究内容

1.1 背景・目的

わが国の上水道は成熟した社会インフラにみえるが、小規模な水道施設を有し人口減少が進んでいる地域が山間部を中心に数百カ所存在する。その典型が飲料水供給施設であり、水道法の適用を受けないため水質検査を行う義務もなく、多くは地元住民によって管理されている。水源が沢水にも関わらず塩素消毒がなされず、飲料水としての微生物的安全性が保証できない地域も多い。実際、国内で発生する水質事故の多くはこのような小規模集落で起きている¹⁾。これらの集落で安全な水質管理を実現するためには、原水中の病原微生物のリスクを的確に把握し、科学的に見て必要十分な浄水処理を導入することが必須である。しかし、

このような水源は都市部の水源に比べて病原微生物に関する知見が少ないため、特定の病原体や汚染指標によって微生物リスクを推定することは不可能である。多種多様な病原体を幅広く検出し、重要な病原体を見極めたリスク評価が必要な状況である。

上記を鑑みて、本研究は小規模水供給システムの水源に存在する病原細菌を網羅的に検出することで特徴を把握するとともに、安全性を確保するために必要十分な浄水処理レベルを提示することを目的とした。具体的な検討課題を以下に列挙する。

- (1) 水中の細菌群を種レベルで高精度に一斉検出するための遺伝子解析手法を整備すること。
- (2) (1) の手法の適用によって小規模水供給シス

テムにおける病原細菌を網羅検出し、病原細菌の群集としての特徴を洗い出すこと。

- (3) (2) の情報を定量的微生物リスク評価 (Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA) 手法に活用することで、対象地域で必要十分な浄水処理レベルを提示すること。

1.2 方法

1.2.1 分析方法の整備

細菌群を種レベルの高い分類解像度で一斉検出・同定するために、完全長の 16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンシング法のプロトコルを整備した。従来機器よりも長鎖 DNA を解読可能なナノポア型超並列シーケンサー (MinION, Oxford Nanopore Technologies 社) と、シーケンサーによる解読エラーを補正できる Unique Molecular Identifier (UMI) 法²⁾ を採用し、分析プロトコルを決定した。複数の細菌種が既知濃度で混合された標準 DNA 試料 (NBRC 微生物カクテル、DNA-Mock-001) に対して本手法を適用し、各細菌種の同定精度や相対割合の測定精度をチェックした。

1.2.2 小規模水供給システムにおける病原細菌の一斉検出

京都府と滋賀県に存在する 4 つの飲料水供給施設 (SWSS_A~SWSS_D) を調査対象とした。いずれも山間地域に存在しており、渓流水が未処理のまま生活用水として使用されている (図 1)。この渓流水を 2021-2022 年に複数回採水した。孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターに濃縮後、DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) によってろ紙から DNA を抽出した。得られた抽出 DNA を対象として 1.2.1 の分析手法を適用することで細菌群を種レベルまで一斉検出・同定し、さらに病原性を有する細菌種を抽出した。なお、SWSS_B と SWSS_C については異なる採水日の DNA サンプルを等量混合して分析した。

1.2.3 定量的微生物リスク評価 (QMRA)

病原種の一斉検出結果を用いて、飲用水としての安全性を確保するために浄水処理に求められる微生物除去・不活化 log 数を QMRA 手法によって推算した。具体的には、1) 全細菌に占める各病原種の相対存在割合、2) 水中の全細菌 (16S rRNA 遺伝子) 濃度、3) 全細菌に占める生菌の平均割合といった情報を用いて、検出されたそれぞれの病



図 1. 対象とした小規模水供給システムの様子

原細菌に対して生菌濃度を推定した。1) は遺伝子解析の結果を用いた。2) は qPCR 法で測定、3) は蛍光顕微鏡観察で全細菌数／生菌数を別途測定することで推定した。さらに非加熱飲水量、用量-反応関係を用いて、対象の渓流水を飲用した場合の年間感染確率を各病原種に対して推算した。最後に、WHO の定める許容感染確率 $10^{-4}/(\text{人} \cdot \text{年})$ を満足するために必要な除去・不活化 log 数を推算した。

1.3 結果と考察

1.3.1 標準 DNA を用いた分析手法の妥当性検証

標準 DNA 試料を用いて今回の分析手法による塩基配列の読解精度、細菌種の同定精度、細菌組成の再現性などを検証した結果、いずれも十分な精度が得られることを確認した（データ不掲載）。

1.3.2 小規模水供給システムにおける病原細菌の一斉検出

対象地域における病原細菌の一斉検出結果を図2に示す。図2はヒートマップとなっており、赤色が濃いほど全細菌に占める相対存在割合（%）が大きいことを示す。SWSS_A では7検体から合計28属42種が、SWSS_B、SWSS_C ではそれぞ

れ混合 DNA サンプル1検体ずつから4属6種、5属7種が、SWSS_D では4検体から8属9種が病原細菌種として検出された。全細菌に占める病原細菌の割合（平均値）は4つの地域で0.12~0.25%の範囲であった。例えばSWSS_A では *Aeromonas hydrophila*、*Bacillus mycoides*、*Paraclostridium bifermentans*、*Lysinibacillus sphaericus* などが頻繁に検出された。以上のように、小規模水供給システムにおける病原細菌を網羅的に検出できたことが本研究の主要な成果の1つである。なお、下水処理水の影響を受けた都市域の河川水に対しても同様の分析を実施しており（別プロジェクト）、その比較から、今回のような清澄な渓流水では自然環境中の常在菌が多く、下水や動物ふん便由来の病原種が比較的少ないことが明らかとなっている。

1.3.3 感染確率および安全性確保に必要な浄水処理レベルの試算

検出されたそれぞれの病原種に対して、QMRA 手法によって年間感染確率を推算した結果を図3に示す。多くの病原種について、年間感染確率が許容レベルである $10^{-4}/(\text{人} \cdot \text{年})$ を上回っていることから、清澄な渓流水であっても未処理のまま飲用等することは適切ではないことが示された。

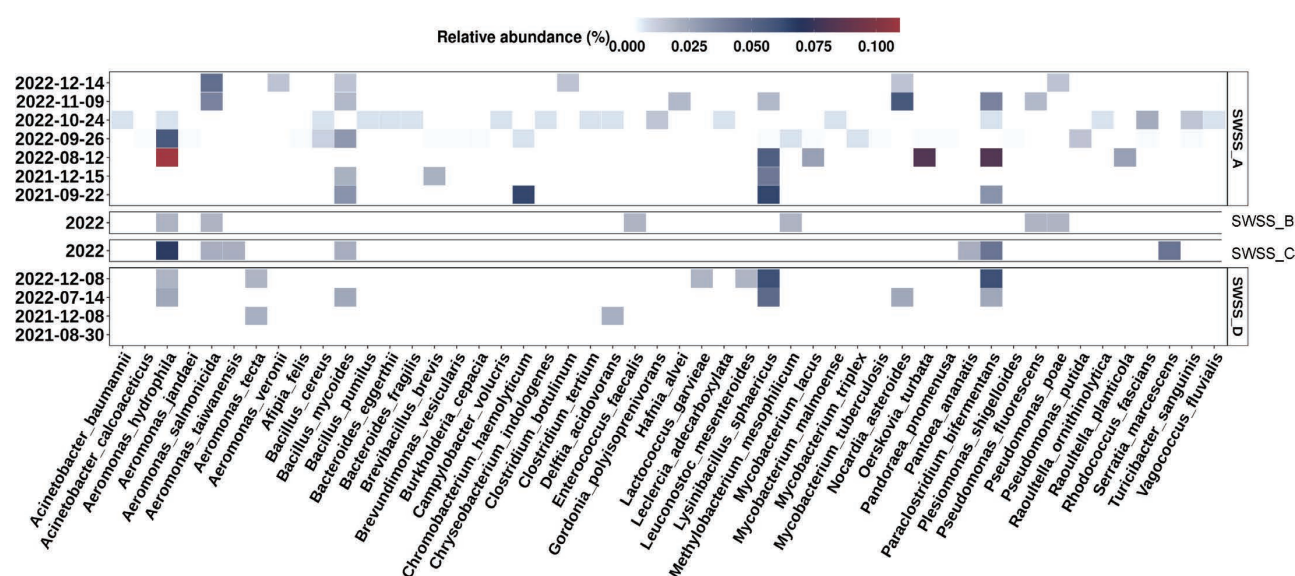


図2. 病原細菌種の一斉検出結果（日付は採水日を示す）

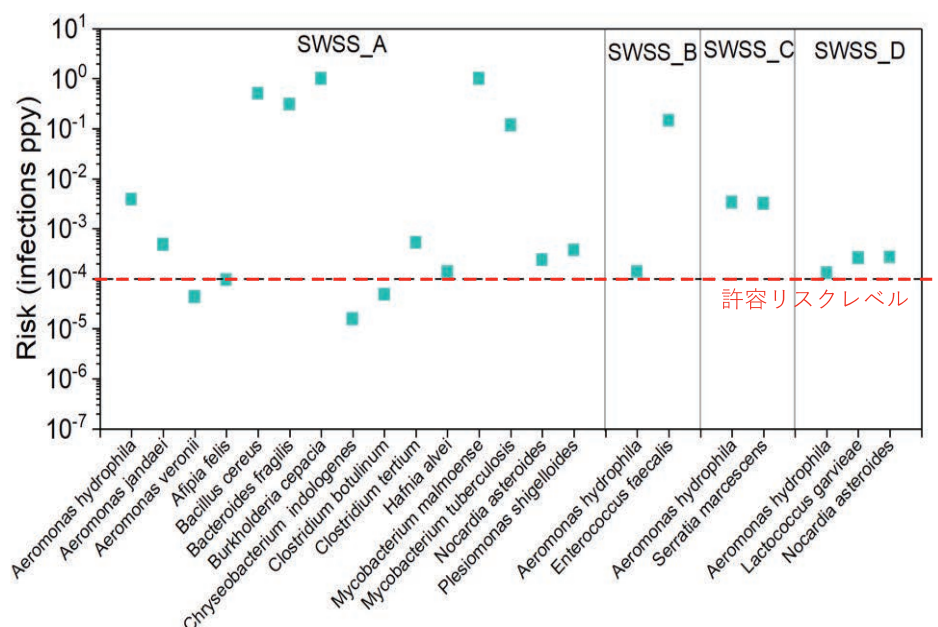


図3. 検出された細菌種ごとの年間感染確率の推算結果

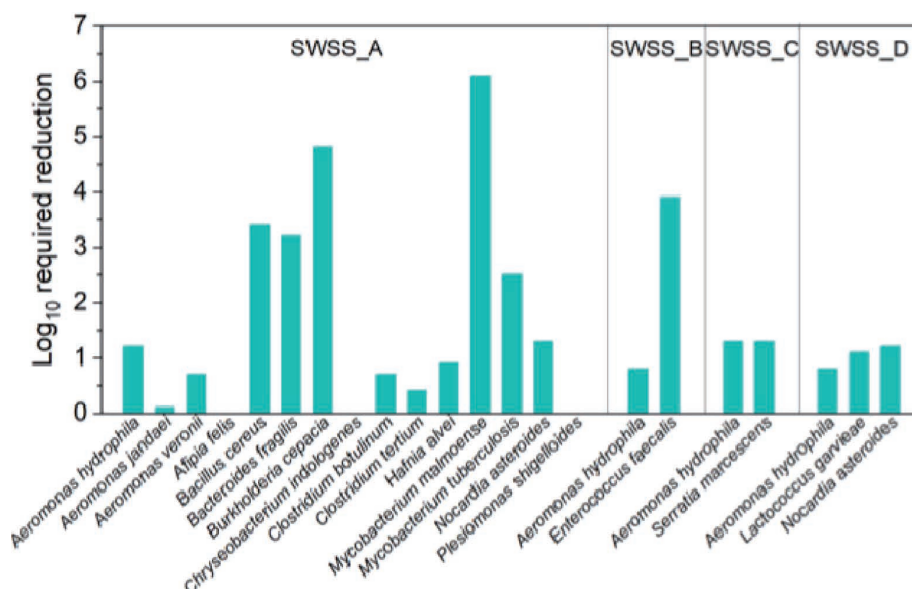


図4. 安全性確保のために浄水処理に求められる LRV の推算結果

続いて、図4に安全性確保のために浄水処理に求められる微生物の除去・不活化log数（Required Log Reduction; LRV）の推算結果を示す。例えばLRV値が2log、3logの場合、それぞれ99%、99.9%の除去・不活化が必要であることを意味する。SWSS_Aでは最大6.1logという大きなLRV値が推算された。単独の水処理で6logの除去・不活化を達成することは困難と考えられ、簡易な

砂ろ過や塩素消毒、紫外線消毒といった様々な浄水操作の組み合わせが必要となる可能性が示された。

なお、今回検出された病原細菌の大半はヒトへの曝露経路や用量-反応関係に関する知見がなく、様々な仮定のもとでリスク推算を行った（例えば同属の別の病原種の感染モデルを借用するなど）。そのため、推算結果には大きな不確実性が存在し

ている点には注意が必要である。このような限定的な情報のもとでのリスク評価や、大腸菌などの指標微生物濃度も踏まえたリスク評価・管理の手法を整備することが望ましい。

1.4 参考文献

- (1) 岸田直裕ら (2015) 我が国における過去 30 年間の飲料水を介した健康危機事例の解析 (1983～2012 年)、*J. Natl. Inst. Public Health*, Vol. 64, No. 2, pp. 70-80.
- (2) Karst et al. (2021) High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing, *Nature methods*, 18(2), 165-169.

2. 発表（研究成果の発表）

1. Zeng, J., Nakanishi, T., Ichiki, S. and Itoh, S.: Identification of Pathogenic Bacteria in Small-scale Water Supply Systems using Nanopore Full-length 16S rRNA Sequencing, 21st International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 3 pages, Darwin, Australia, June, 2023.
2. 曾潔、一木駿介、中西智宏、伊藤禎彦：小規模水供給施設における病原細菌種の網羅的検出と特性把握、第 58 回日本水環境学会年会講演集、p.60、2024 年 3 月、福岡。