

学 位 論 文 題 名

Application of *Bacteroides* spp. as Alternative Indicator  
of Fecal Pollution in Natural Waters

(宿主特異的 *Bacteroides* 遺伝子マーカーを指標とした  
糞便性汚染源の特定)

学位論文内容の要旨

Identification and quantification of microbial contaminants of fecal origin are major priority in the control of drinking and recreational water qualities. Fecal pollution could lead to the transmission of pathogens and, therefore, to waterborne diseases. This fecal material can be originated from point source discharges such as raw sewage, storm water, effluent from wastewater treatment plants and industrial sources. In addition, non-point source discharges such as agriculture, forestry, wildlife and urban run-off can also impair water quality. If the origin of fecal contamination and pathogens could be correctly identified, management and remediation efforts could be allocated in more-cost effective and efficient manner.

Since the enteric pathogens appear intermittently in natural waters at low concentrations, and detection and quantification of each pathogenic bacterium is labor-intensive and not easy to perform for most cases, the routine microbiological water analyses are based on detection of indicator organisms, which share the same habitats. Application of conventional and alternative fecal indicators has greatly enhanced our abilities to reduce health risk associated with the use of surface waters. New molecular techniques have shown that combined use of conventional and alternative indicators for fecal pollution increases both the detection sensitivity and specificity of fecal pollution and associated pathogens. In this study, we proposed a new polymerase chain reaction (PCR) - based approach using 16S rRNA gene markers of enteric anaerobes, *Bacteroides-Prevotella* spp., as alternative fecal indicator for discriminating human, cow, and pig fecal contamination in environmental waters without culturing indicator organisms. Human-, cow-, and pig-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers were newly designed to evaluate host-specific fecal pollution in natural waters. It was shown that these markers can be recovered from environmental water samples indicating the ability to distinguish the source of fecal pollution. In addition, host-specific fecal contamination was also quantified using designed genetic markers.

In this study, the relationships between level of host-specific *Bacteroides* markers and the presence of enteric bacterial pathogens were investigated. Additionally, the persistence of these genetic markers in non-host water environments was investigated.

16S rRNA-based molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR), real-time and multiplex PCR, and terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) techniques were used to identify and quantify the host-specific *Bacteroides-Prevotella*. In this research, a novel fluorescence-based live/dead staining technique combined with Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was designed to study the persistence of *Bacteroides* spp. in water environments.

It was concluded that since one indicator might not represent the relative abundance of all pathogenic bacteria, viruses and protozoa, combined application of alternative indicators with

conventional ones could lead to more comprehensive results about fecal contamination, its source and association with pathogenic microorganisms.

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 岡 部 聡  
副 査 教 授 渡 辺 義 公  
副 査 教 授 船 水 尚 行  
副 査 教 授 松 井 佳 彦

## 学 位 論 文 題 名

### Application of *Bacteroides* spp. as Alternative Indicator of Fecal Pollution in Natural Waters

(宿主特異的 *Bacteroides* 遺伝子マーカーを指標とした  
糞便性汚染源の特定)

糞便による飲料水源や養殖漁業水域の汚染により、今日に至ってもなお水系病原微生物による感染症事例が報告されており、早急の汚染防止対策が求められている。適切かつ迅速な糞便汚染防止対策を講じるためには、より正確に糞便汚染を定量しその汚染源を特定することが重要である。しかし、現行の糞便性汚染指標（大腸菌群および糞便性大腸菌群）では、汚染源の特定が不可能であるうえ、特異性および迅速性（検出に少なくとも24時間要する）に欠ける、など多くの問題点が指摘されており、新たな糞便汚染指標の確立とその迅速かつ正確なモニタリング手法の開発が急務となっている。これまで、糞便汚染源の特定を行うために、*Bifidobacterium* などの新たな汚染指標細菌の提案やコプラスタノールなどの化学物質を指標とした研究例が報告されている。しかし、糞便性汚染源の特定に加え宿主動物毎の汚染度を定量的に評価することが可能な手法に関する研究例はない。

以上の背景の下に本学位論文では、哺乳動物が保有する腸内蛋白質分解細菌の最優占種である、*Bacteroides*属や*Prevotella*属の16S rRNA遺伝子マーカーを新たな糞便性汚染指標として提案している。さらに、培養を介さない分子生物学手法（16S rDNAクローンライブラリー法やTerminal Restriction Fragment Length Polymorphism: T-RFLP法、real-time PCR法）を用い、宿主特異的16S rRNA遺伝子マーカーを検出・定量することにより、水環境中の糞便汚染源（人間、牛、豚等）を特定し、宿主動物毎の汚染度を総合的かつ定量的に評価できるモニタリング手法の開発を目的としたものである。このように、宿主特異的遺伝子マーカーを迅速（1日程度）かつ簡便に定量できれば、汚染度および汚染源をより正確に把握することが可能となり、安全で効率的な水域利用や具体的な汚染防止対策が可能となる。

第1章は、緒言であり、研究の背景と必要性および糞便汚染の現状とその対策についてまとめている

第2章では、現行の糞便性汚染指標の特徴と問題点、これまでの研究によって提案されている新たな代替汚染指標微生物の種類および特性、近年発展がめざましい分子生物学的手法を用いた新たなモニタリング手法などに関する膨大な文献レビューを行っている。これまで、このような観点から網羅的にまとめられた文献レビューは無く極めて貴重なものである。

第3章では、ヒト、ウシ、ブタの糞便試料からそれぞれ52、53、60クローン、河川水試料から120クローンを系統解析し、宿主毎に特異的な *Bacteroides* 属や *Prevotella* 属の16S rRNA 遺伝子マーカーを探索した。その結果、*Bacteroides* 属と *Prevotella* 属のグループに共通するマーカーとヒト特異的マーカーをそれぞれ1つ、ウシ特異的マーカーを3つ、ブタ特異的マーカーを2つ決定することに成功した。また、河川水からもこれらのマーカーが検出されたことから、これらの宿主特異的16S rRNA 遺伝子マーカーを検出することにより、環境中の糞便汚染源の特定できることが示唆された。これら遺伝子マーカーを検出・定量するために、宿主特異的な real-time PCR 用プライマーセットを設計し、その特異性を評価した後、PCR 増幅の条件設定を行った。その結果、 $6.0 \times 10^1$  から  $6.0 \times 10^8$  copies/PCR の範囲で検出可能な再現性の高い real-time PCR 法を確立した。また、本手法は実際の河川（A-B 類型）に適用可能であり、河川流域の土地利用状況から推測される糞便汚染状況と概ね合致する結果となり、本法が糞便汚染源の特定と汚染度の定量に有効であることが示されている。

第4章では、本研究で提案する *Bacteroides-Prevotella* 属の16S rRNA 遺伝子マーカーと現行の糞便性汚染指標細菌（大腸菌群数および糞便性大腸菌数）との相関および病原微生物の存在との相関を、河川水、下水および下水汚泥を対象として評価した。病原微生物の検出には、各種病原微生物の保有する毒素遺伝子をターゲットとしたPCR法を用いた。その結果、ヒト特異的マーカーは *Salmonella* spp. の検出頻度と正の相関関係が、*Bacteroides-Prevotella* 属に共通マーカーは、毒素原性大腸菌(enterotoxigenic *E.coli*; ETEC)の検出頻度と正の相関関係があることが確認された。

第5章では、これまでに示した *Bacteroides-Prevotella* 属の16S rRNA 遺伝子マーカーの環境水中での挙動と実際の *Bacteroides* の生存特性を比較した。*Bacteroides* の生存を定量的に把握するために、live/dead 染色法と蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を組み合わせた手法（LDS-FISH 法）を新たに開発している。この LDS-FISH 法は、複合系微生物群集において、目的とする細菌の生死を迅速かつ高感度に識別・定量できる方法であり、独創性・新規性の高い研究である。実験の結果、16S rRNA 遺伝子マーカーは細菌の死後も3週間にわたって残存し検出されることが確認された。

以上要するに著者は、新たな糞便性汚染の指標として宿主特異的 *Bacteroides-Prevotella* 属の16S rRNA 遺伝子マーカーを特定し、各種分子生物学的手法を用いて検出・定量することにより、汚染源の特定と汚染度の同時定量が可能であることを示したものであり、水環境工学および環境微生物工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。