

令和 7 年 5 月 30 日現在

機関番号：52501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H04330

研究課題名（和文）耐性菌パンデミック回避を目指す下水処理システムの最適化

研究課題名（英文）Optimization of Wastewater Treatment Systems for the Prevention of an Antimicrobial-Resistant Bacteria Pandemic

研究代表者

大久保 努（OKUBO, TSUTOMU）

木更津工業高等専門学校・環境都市工学科・教授

研究者番号：60581519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、下水処理場での薬剤耐性菌の動態を明らかにするため、高感度検出法の開発、処理過程での動態解析、ならびに有効な消毒技術の評価を行った。CARD-FISHおよびFACSによる新規検出法を確立し、薬剤耐性菌を特異的に可視化・濃縮する手法を構築した。さらに、異なる処理方式での耐性菌の増減傾向を定量的に把握し、紫外線と塩素系薬剤の併用による高効率な不活化処理の有効性を実証した。本成果により、下水処理を通じた耐性菌制御へ向けた科学的知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、下水処理場に流下してくる薬剤耐性菌に対して、分子生物学的手法と環境工学的アプローチを融合させた新たな評価体系を提示した点で学術的に意義深い。特に、培養に依存しない高感度検出法の確立と、処理過程での耐性菌動態の可視化は、微生物生態学および公衆衛生学に貢献する。また、実用性の高い消毒技術の提案は、将来の下水処理政策や水再利用技術の高度化、さらには薬剤耐性対策に資するものであり、社会的にも極めて重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the presence and behavior of antimicrobial-resistant (AMR) bacteria in wastewater treatment plants. To achieve this, we developed a high-sensitivity detection method, analyzed the dynamics of AMR bacteria during the treatment process, and evaluated the effectiveness of disinfection technologies. A novel detection approach combining CARD-FISH and FACS was established, enabling specific visualization and enrichment of AMR bacteria. Furthermore, we quantitatively assessed the changes in resistant bacterial populations under different treatment methods and demonstrated the high efficiency of combined ultraviolet (UV) and chlorine-based disinfection. These findings provide a scientific foundation for controlling AMR bacteria through wastewater treatment.

研究分野：下水処理

キーワード：薬剤耐性菌 下水処理 消毒システム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、医療や畜産における抗生物質の使用が増加する中で、これらの薬剤に耐性を示す耐性菌が水環境中に拡散し、深刻な公衆衛生問題として国際的に注目されている。特に、下水処理場は、薬剤耐性菌や耐性遺伝子が集積する場所として指摘されており、これらの耐性を持った細菌が高濃度で下水中に存在し、最終的には環境中に放出されることが懸念されている。薬剤耐性菌は、人間の感染症を治療する上で新たな障壁を生み、最悪の場合、治療が効かない病気を引き起こすことに繋がる。そのため、下水処理場における耐性菌の動態を評価し、環境中での拡散経路や、その拡散を抑えるための技術の開発は、今後の公衆衛生を守る上で重要な課題となっている。

しかし、これまでの研究では、環境中の薬剤耐性菌を正確に把握する方法や、下水処理場での耐性菌の動態を追跡する技術が不十分であり、検出法や消毒技術に課題が残されていた。特に、薬剤耐性菌の検出に関しては従来の培養法では時間がかかるだけでなく、菌種や耐性の幅広さを網羅的に検出することが困難である。また、下水処理の過程で耐性菌がどのように変動し、最終的に放出されるのかを明確にするためには、新たな検出手法や評価法の導入が必要とされていた。さらに、耐性菌に対する消毒技術についても、従来の消毒法が十分に効果を発揮するかどうかは未検証であり、実用性ある新規な消毒法の確立が急務であった。

このような背景から、本研究は、薬剤耐性菌の検出から消毒技術の有効性評価に至るまで、下水処理システムにおける薬剤耐性菌の動態を追跡する新しいアプローチの確立を目指して開始した。

## 2. 研究の目的

本研究は、下水処理システムにおける薬剤耐性菌の存在状況とその変動を把握し、環境中における薬剤耐性遺伝子の検出・濃縮技術の開発、さらにそれらに対する効果的な消毒技術の確立を目的とした。具体的には、培養に依存せずに耐性菌を検出できる高感度な分子生物学的手法 (CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition - Fluorescence In Situ Hybridization) 法や FACS、次世代シーケンズ解析) の最適化と実用化を図るとともに、多剤耐性菌 (2 剤以上の抗生物質に耐性を有する細菌) に対する紫外線や塩素処理といった消毒方法の有効性を科学的に評価し、最終的には現場への適用を見据えた消毒手法の提案を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 高感度耐性菌検出法の開発

モデル微生物として pCR-2.1 プラスミドを保持する *Escherichia coli* K-12 株を用い、16S rRNA を標的とする HRP (Horseradish Peroxidase) 標識プローブおよび Ampicillin 耐性遺伝子 TEM-1 を標的とする HRP 標識プローブを設計し、CARD-FISH のハイブリダイゼーション条件を体系的に検討した。従来のシグナル増幅試薬 (TSA) では低コピー遺伝子の検出感度が不十分であったため、蛍光強度を約 20 倍に高めた TSA-plus 試薬を導入し、蛍光シグナルの増強を図った。CARD-FISH 後の細胞を FACS で分取し、回収分画の耐性遺伝子コピー数を定量 PCR 法で測定して濃縮効率を評価した。さらに、活性汚泥を環境試料として適用し、方法論の実用性を検証した。加えて、ESBL 遺伝子を標的とした CARD-FISH も試行し、高コピー型および低コピー型プラスミドでの検出感度の差異を解析した。

### (2) 下水処理過程における薬剤耐性菌の動態解析

下水処理場における耐性菌の動態を評価するため、国内の下水処理場における実試料を対象とした。下水処理方式は、標準活性汚泥法と DHS (Down-flow Hanging Sponge) 法の 2 種類を対象とし、それぞれの処理過程で薬剤耐性菌の割合や微生物群集を評価した。薬剤感受性試験では、カナマイシン (KM)、セフジニル (CFDN)、アンピシリン (ABPC)、テトラサイクリン (TC)、レボフロキサシン (LVFX)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST) の 6 種類の抗生物質を用いた。微生物種の同定は、シングルコロニー由来の各培養液を 96 ウェルプレートに分注し、ダイレクト PCR 法により真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅させた。増幅 DNA 断片をサンガー法により解読し、500-600 bp を BLAST 解析により属レベルで同定した。

### (3) 薬剤耐性菌に対する消毒技術の評価

薬剤耐性菌を効果的に不活化するため、紫外線照射と塩素系薬剤を使用した消毒処理の有効性を検討した。紫外線照射に関しては、低圧 UV ランプと高圧紫外線ランプの両方を使用し、波長ごとの不活化効率を比較した。特に、深紫外 LED を用いた照射が従来の UV ランプに比べて高い不活化効果を示すことが予想された。加えて、紫外線と塩素系薬剤 (次亜塩

素酸、クロラミン、二酸化塩素)との併用効果を検証し、複合消毒処理による相乗効果を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高感度耐性菌検出法の確立

最適化したCARD-FISHにより、16S rRNAとTEM-1を標的とした*E. coli*細胞の高特異度な可視化に成功した(図1)。TSA-plus試薬の導入によって蛍光シグナルが大幅に向上し、FACSによる目的細胞の分取が可能なレベルの強度を確保した。活性汚泥サンプルに手法を適用したところ、分取後の画分でTEM-1コピー数が最大45倍に増加し、薬剤耐性菌を特異的に濃縮できることを実証した。ESBL遺伝子については高コピー型プラスミドでの検出に成功した一方、低コピー型プラスミドでは依然として検出感度が不足することが明らかとなり、低コピー遺伝子に対応する新たな増幅・検出技術の開発が今後の課題として浮き彫りになった。本研究により、高感度CARD-FISHとFACS、NGSを組み合わせた耐性菌解析プラットフォームの基盤が構築され、薬剤耐性遺伝子と宿主細菌系統の対応づけに向けた技術的見通しが得られた。

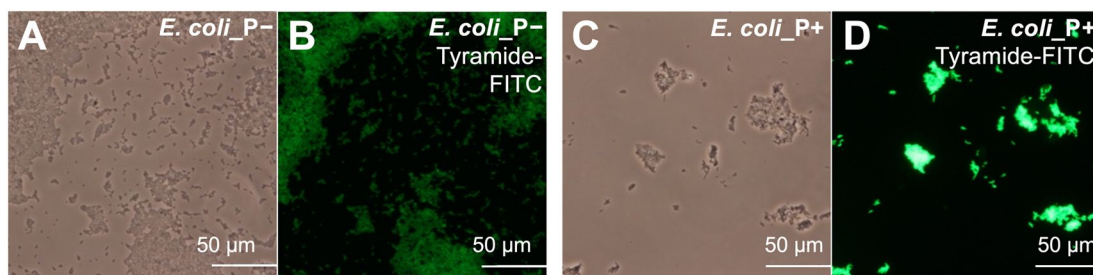


図1 TSA-plus試薬を用いた*E. coli*菌体へのCARD-FISH法の適用結果

(A, B; プラスミドDNA非保有*E. coli*(同一視野), C, D; プラスミドDNA保有*E. coli*(同一視野), A, C; 位相差観察, B, D; Tyramide-FITC蛍光観察)

##### (2) 下水処理過程における耐性菌の動態解析

成果として、下水処理場における薬剤耐性菌の挙動に関する定量的な動態解析を通じて、処理方式別の耐性菌の消長を明らかにした点が挙げられる。一例として、同一下水を処理する、最初沈殿池水(初沈下水)標準活性汚泥処理水及びDHS処理水を対象とした薬剤感受性試験と微生物群集構造解析の結果を示す。

図2に処理前後における多剤耐性菌の存在割合の変化を示す。また、1個釣菌した菌の内、X種類以上の抗生物質の耐性を持つ菌をX剤耐性菌とし、X耐性菌が全体で釣菌した96個の内、どの程度存在するのかを百分率で表したものを本研究では存在割合(%)と定義した。1~6剤耐性菌で分類した結果、Inf(初沈下水)<K-Eff(標準活性汚泥処理水)<D-Eff(DHS処理水)と存在率は上昇した。K-Effにおいては、1~4剤耐性菌存在割合をInfと比べるとそれぞれ17%、13%、9%、6%上昇し、D-Effも同様に29%、24%、20%、13%上昇した。一方、5剤と6剤耐性菌はD-Effで比較的多く検出され、多剤耐性菌はDHS処理前後で残存または耐性遺伝子の受け渡しがより積極的に行われていることが示唆された。これらの結果より、活性汚泥含めて下水処理においては、汚泥濃度と汚泥滞留時間が耐性菌の動態に影響すると考えられた。

微生物群集解析では、全体的にサンプル毎や季節変化などで一定な傾向を観察することはできなかった。微生物群集で半分以上の割合を占めた*Escherichia*属及び*Shigella*属に着目し、図3に*Escherichia*属及び*Shigella*属における各種抗生物質耐性率の変化の比較を示した。全体的にどちらもInf<K-Eff<D-Effで耐性率は上昇しており、*Shigella*属

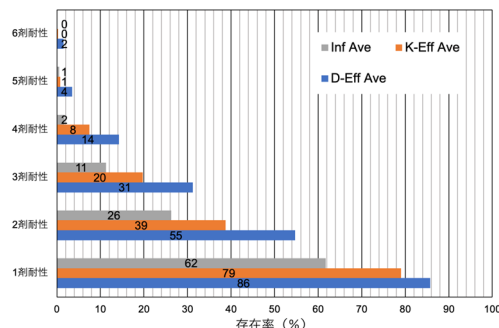


図2 対象試料における多剤耐性菌割合

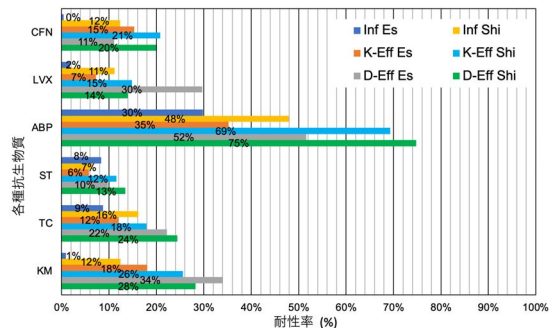


図3 *Escherichia*属及び*Shigella*属の耐性率

の ABP 耐性率や Inf の耐性率は *Escherichia* 属よりも高い傾向を示した。しかし、比較的 *Escherichia* 属の方が処理前後で耐性率の伸びは大きく、LVX は Inf では 2% から K-Eff で 7%、D-Eff で 30% と DHS 処理前後で特に大きく上昇し、KM でも同様の傾向を示した。以上のように同じ腸内細菌科である微生物でも属レベルの違いによって薬剤耐性遺伝子の獲得に対して特異的な特徴を有することが示唆された。

### (3) 薬剤耐性菌に対する消毒技術の評価

本研究では、薬剤耐性菌に対する各種消毒技術の有効性を定量的に比較・評価し、より効果的な処理手法を提示することを目的とした。とくに、深刻化する多剤耐性大腸菌の環境中における制御を念頭に、紫外線照射（深紫外 LED および低圧紫外線ランプ）ならびに各種塩素系薬剤（次亜塩素酸ナトリウム、クロラミン、二酸化塩素）を用いた消毒処理を実施し、単独処理および併用処理の不活化効果を総合的に検討した。

具体的には、薬剤耐性を有する多剤耐性大腸菌およびウイルス指標として広く用いられる大腸菌ファージ（Qβ, MS2）を対象とし、主波長の異なる紫外線光源（UV-LED：265nm および 278nm、低圧水銀ランプ：254nm）による不活化特性を評価した。とくに多剤耐性大腸菌については、紫外線照射後の光回復挙動にも着目し、波長依存性と消毒効果への影響を詳細に解析した。その結果、光回復の程度は照射波長によって顕著に異なり、消毒性能に与える影響も大きいことが確認された（図 4）。

また、不活化評価においては、消費電力あたりの不活化効率を新たな指標として導入し、エネルギー効率の観点から光源ごとの性能比較を行った。その結果、深紫外 LED（とくに 278nm）は、従来の 254nm 低圧水銀ランプに比べ、より高効率での不活化が可能であることが明らかとなった（図 5）。

さらに、塩素系薬剤（次亜塩素酸ナトリウム、クロラミン、二酸化塩素）と紫外線照射の併用による複合消毒処理では、特に二酸化塩素と 278nm UV-LED を組み合わせた同時処理が単独処理に比べて 1.2～1.7 倍の相乗的な不活化効果を示すことが判明した（図 6）。これにより、薬剤耐性菌に対する複合的な制御技術の有効性が実証され、既存の下水処理システムへの実装に向けた科学的知見が得られた。

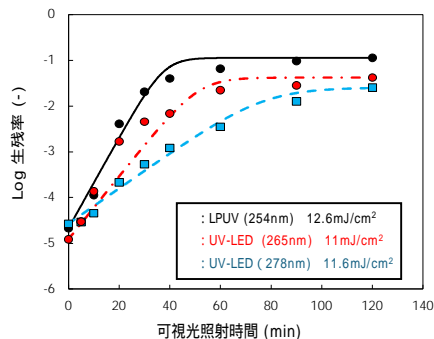


図 4 多剤耐性大腸菌（6 剤）の紫外線照射後における光回復特性

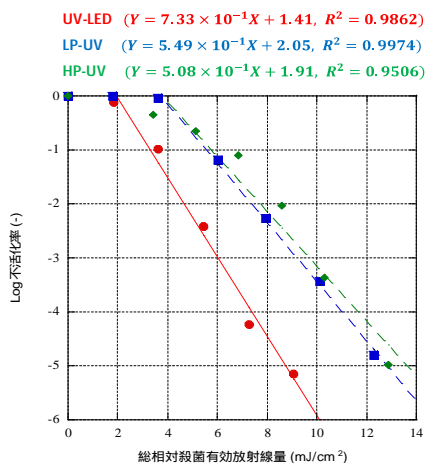


図 5 各紫外線照射における多剤耐性大腸菌（6 剤）の不活化特性

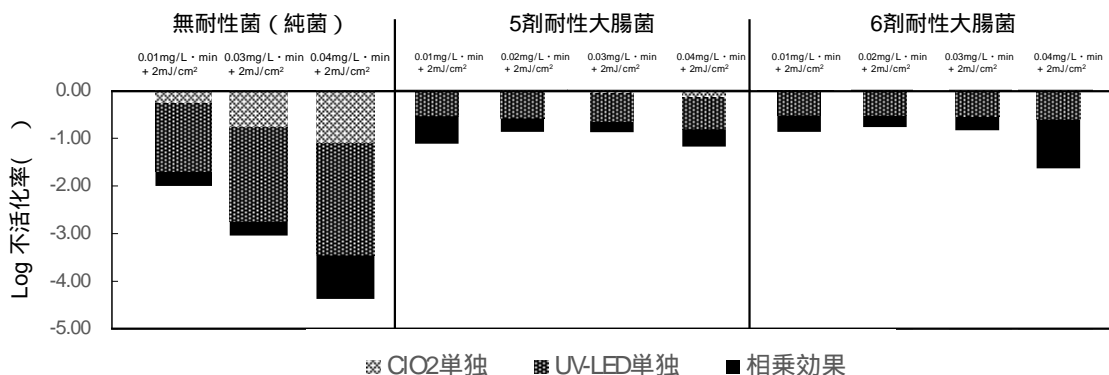


図 6 二酸化塩素 UVLED(278nm)照射の同時処理における薬剤耐性菌の不活化特性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 安井宣仁	4. 巻 14
2. 論文標題 深紫外線(UV-LED)照射における病原微生物の不活化特性に関する研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 近畿大学工業高等専門学校研究紀要	6. 最初と最後の頁 99-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井口 晃徳, 五十嵐 光哉, 星野 琴音, 山本 凌太, 堀 沙織里, 山口 利男, 上村 繁樹, 大久保 努, 重松 亨	4. 巻 79
2. 論文標題 高感度蛍光 in situハイブリダイゼーション法と蛍光細胞分取装置を使用した培養非依存的な環境中の薬剤耐性菌の網羅的検出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 土木学会論文集G (環境)	6. 最初と最後の頁 23-25045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2208/jscej.23-25045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安井宣仁	4. 巻 47
2. 論文標題 紫外線照射における薬剤耐性菌の不活化と光回復	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 103-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安井宣仁	4. 巻 18
2. 論文標題 二酸化塩素-紫外線照射の複合処理における薬剤耐性大腸菌の不活化特性	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 近畿大学工業高等専門学校紀要	6. 最初と最後の頁 81-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井口晃徳	4. 巻 50
2. 論文標題 『未知なる微生物』との戦い 薬剤耐性菌	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 創造	6. 最初と最後の頁 16-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安井宣仁, 高橋洋輝
2. 発表標題 深紫外LED照射における薬剤耐性大腸菌の消毒特性
3. 学会等名 第51回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 葛西樹生, 井口晃徳, 安井宣仁, 上村繁樹, 大久保努
2. 発表標題 異なる下水処理方式を対象とした多剤耐性菌割合と耐性遺伝子獲得の特徴
3. 学会等名 土木学会第50回関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 葛西樹生, 井口晃徳, 安井宣仁, 上村繁樹, 大久保努
2. 発表標題 下水処理DHSシステムを対象とした微生物群集が有する抗生物質耐性率の変化
3. 学会等名 土木学会全国大会第77回年次学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葛西樹生, 井口晃徳, 安井宣仁, 上村繁樹, 大久保努
2. 発表標題 下水処理DHSシステムにおける薬剤耐性菌割合と微生物群集の変遷
3. 学会等名 第49回土木学会関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口晃徳, 山本凌太, 堀紗織里, 重松亨
2. 発表標題 高感度FISH法と蛍光活性化セルソーティングを併用した薬剤耐性菌の網羅的な検出技術の開発
3. 学会等名 第39回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋洋輝, 安井宣仁
2. 発表標題 深紫外LEDを用いた薬剤耐性菌の消毒特性に関する研究
3. 学会等名 第27回高専シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水無咲妃, 大平夏生, 上村繁樹, 大久保努
2. 発表標題 下水処理過程における耐性菌の動態と抗生物質が処理性能に与える影響
3. 学会等名 第47回土木学会関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹生慶希, 上村繁樹, 大久保努, 安井宣仁
2. 発表標題 活性汚泥濃度が大腸菌の吸着と死滅に与える影響
3. 学会等名 第47回土木学会関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiki Saso, Ikumi Matsuoka, Shigeki Uemura, Tsutomu Okubo
2. 発表標題 Detection of multidrug-resistant Escherichia coli in different types of sewage treatment systems
3. 学会等名 International Workshop on Effective Engineering Education 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saki Mizunashi, Miho Umezawa, Shigeki Uemura, Tsutomu Okubo
2. 発表標題 Survival of antibiotic-resistant bacteria in sewage treatment process and effects on antibiotics on treatment performance
3. 学会等名 International Workshop on Effective Engineering Education 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安井宣仁
2. 発表標題 紫外線照射における薬剤耐性大腸菌の不活化と光回復特性
3. 学会等名 第 59 回環境工学研究フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口晃徳、五十嵐光哉、星野琴音、山本凌太、堀沙織里、山口利男、重松亨
2. 発表標題 薬剤耐性プラスミドと耐性菌種を結びつける培養非依存的な薬剤耐性菌検出法の開発と適用
3. 学会等名 第27回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0150357">https://researchmap.jp/read0150357</a> ResearchGate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Tsutomu-Okubo">https://www.researchgate.net/profile/Tsutomu-Okubo</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上村 繁樹  (UEMURA SHIGEKI)  (60300539)	木更津工業高等専門学校・環境都市工学科・教授   (52501)	
研究分担者	井口 晃徳  (IGUCHI AKINORI)  (60599786)	新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授   (33101)	
研究分担者	安井 宣仁  (YASUI NOBUHITO)  (90547481)	近畿大学工業高等専門学校・総合システム工学科 都市環境コース・准教授   (54103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------