

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21984

研究課題名（和文）都市水循環が選択してしまう薬剤耐性因子の網羅的探索と集積機構の解明

研究課題名（英文）Unraveling diversity and enrichment mechanism of antimicrobial resistance factors selected by urban water cycle

研究代表者

春日 郁朗（Kasuga, Ikuro）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：20431794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ベトナム及び日本の水環境を対象として、ハイスループット定量PCRを用いて薬剤耐性遺伝子の一斉スクリーニングを実施した。未処理汚水による水環境の汚染が顕著なベトナムでは、これらの遺伝子の相対濃度が日本の水環境よりも高く、水利用を通じた薬剤耐性遺伝子の循環が生じるリスクが高いことが推測された。また、日本の都市河川でも、塩素消毒をした下水処理水の放流により、薬剤耐性遺伝子の濃度や組成は影響を受けていた。水環境中の薬剤耐性細菌のDNAをEdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine)で標識する手法開発を試みたが、蛍光強度の感度改善を実現することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬が効かない薬剤耐性細菌の問題は、社会の大きな健康リスクとなっている。社会における薬剤耐性細菌の動態については不明な点が多い。大半の下水が未処理のまま水環境に放出されているベトナムでは、水環境中の薬剤耐性遺伝子の相対濃度が、日本の水環境と比較しても高い傾向が確認された。また、日本の都市河川においても、下水処理水が放流された後の下流では薬剤耐性遺伝子の濃度や組成の変化が見られた。これらの結果は、薬剤耐性遺伝子の環境中の動態に、水の利用や処理の状況が影響を及ぼしていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Simultaneous screening of antimicrobial resistance genes (ARGs) in aquatic environments in Vietnam and Japan was conducted using high-throughput quantitative PCR. The relative concentrations of ARGs in aquatic environment in Vietnam, where the release of untreated sewage significantly contaminates aquatic environment, were higher than those in Japan. It suggests that a higher risk of circulation of ARGs via water use in Vietnam. In urban rivers in Japan, the concentration and composition of ARGs were affected by the discharge of chlorinated effluents from wastewater treatment plants. We attempted to develop a method to label DNA of antimicrobial-resistant bacteria in aquatic environment with EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine). However, we could not improve the sensitivity of fluorescence intensity.

研究分野：環境工学

キーワード：薬剤耐性遺伝子 都市下水 都市河川 水利用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質が効かない病原微生物の出現は、世界的にも喫緊の課題であり、2050年には薬剤耐性細菌による死亡者が年間1000万人に達し、がんによる死亡者数を上回るという驚愕の予測がなされている(O'Neill, 2014)。しかし、都市の水利用における薬剤耐性細菌のリスクの研究は断片的な報告にとどまっており、定まった見解は未だない。薬剤耐性遺伝子やプラスミドなどの薬剤耐性因子を保有する薬剤耐性細菌の中で、例えば、塩素耐性が高く、再増殖する能力に優れた種類は、浄水処理や下水処理の塩素消毒後も生残し、都市の水循環系で優占する可能性が高い。多くの都市では、下水処理水を含む河川水を水道原水として再利用しており、「ヒト 下水 表流水 水道水 ヒト」という人工的な水循環が存在している。このような都市水循環のフレームの中で薬剤耐性因子の動態を評価した研究例は少なく、現行の水質管理においても考慮されていないのが現状である。

2. 研究の目的

多くの都市では、上流の都市由来の下水処理水を含む河川水を水道原水として利用しており、下水処理水の非意図的な間接的再利用による人工的な水循環が存在する。こうした都市の水循環では、浄水処理や下水処理を介して特定の薬剤耐性因子が選択・集積されている可能性がある。そこで本研究では、抗生物質の使用状況や下水処理水の二次処理率が大きく異なる日本とベトナムの水環境を対象とし、薬剤耐性因子を網羅的に探索すると共に、それらの都市水循環系における動態に関する知見を得ることを目的とする。また、環境中で増殖能力の高い薬剤耐性細菌を培養法によらずにスクリーニングするために、増殖した細菌をチミジンアナログで標識する手法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 都市水循環における薬剤耐性因子の動態調査

下水処理水の影響の異なる関東地方の都市河川(水道水源を含む)、下水処理場から試料を採取した。また、ベトナムについては、ハノイ近郊の河川、湖沼、都市排水路、下水処理場から試料を採取した。下水処理プロセスで塩素消毒を行っている場合は、流入水と共に、塩素消毒後の放流水も採取した。一般水質項目や糞便汚染指標の測定に加えて、試料からDNAを抽出し、異なる薬剤耐性因子を定量PCRで分析した。また、複数の薬剤耐性因子を網羅的に解析するために、ハイスループット定量PCRを用いて、薬剤耐性因子の一斉スクリーニングも実施した。

(2) チミジンアナログとClick反応による薬剤耐性細菌の標識と検出の検討

増殖能の高い薬剤耐性細菌を単離培養によらずに網羅的に捉えるために、チミジンアナログであるEdU(5-ethynyl-2-deoxyuridine)を用いた検出手法を検討した。EdUは、従来のチミジンアナログと比較して、抗原抗体反応を介さないこと、標識にDNAの変性が不要であるなどの利点がある。水試料にEdUと抗生物質を添加し、細菌を培地無添加の状態で培養した。増殖時に合成されたDNAに取り込まれたEdUをClick反応で蛍光標識し、単一細胞レベルで検出・分取することを試みた。モデル細菌として日本の都市河川から単離したセフトキシム耐性大腸菌を用い、条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) 日本とベトナムの下水の比較

日本の関東地方及びベトナム国ハノイで採取した下水を対象として、384種類の薬剤耐性因子の存在状況をハイスループット定量PCRで評価した。日本の下水からは191種類、ベトナムの下水からは195種類の薬剤耐性因子が検出された。このうち、両方で共通していたのは156種類であった。共通して検出された156種類の薬剤耐性因子の16S rRNA遺伝子に対する相対濃度を比較したところ、ベトナムの下水中の相対濃度の方が日本の下水中の相対濃度よりも高い薬剤耐性因子は109種類、逆に日本の方がベトナムよりも相対濃度が高い薬剤耐性因子は47種類あった。前者の中には、コリスチン耐性遺伝子*mcr-1*のように臨床的にも重要な遺伝子が含まれていた。ベトナムの下水中の相対濃度が高い薬剤耐性因子が多かった要因としては、ベトナムにおける抗菌薬の過剰使用など社会的な条件が影響していると推察された。

(2) 日本の水環境

関東地方の27の河川を対象として、合計70種類の薬剤耐性因子のスクリーニングをハイスループット定量PCRによって行った。下水処理水を含まない河川よりも、下水処理水を受け入れる河川の方が検出遺伝子数は多く、下水処理水が河川水中の薬剤耐性因子の存在状況に影響を与えていることが明らかになった。また、各遺伝子の検出頻度を見ると、可動遺伝子であるクラス1インテグロンが最も多く検出されており、都市河川に普遍的に分布していることが示唆

された。16S rRNA 遺伝子に対する薬剤耐性因子の相対濃度の合計値は、環境類型とは明確な関連は見出だせなかった。しかし、図 1 に示すように、同一河川の上流から下流にかけての変化を解析すると、下水処理水の流入によって薬剤耐性因子の濃度が上昇することは確認された。このように、都市の水利用や水処理によって、水環境中の薬剤耐性因子の動態は大きな影響を受けていることが推察された。

(3) ベトナムの水環境

ベトナムの下水中濃度の方が日本の下水中濃度よりも高いことが示唆された *mcr-1* 遺伝子に標的を絞り、ハノイ市内の水環境における *mcr-1* 遺伝子の濃度を定量 PCR で調査した。*mcr-1* は多くの水環境から検出されたが、都市下水中の濃度が最も高い傾向が認められた。また、*mcr-1* の濃度とヒト糞便指標である crAssphage 濃度との相関をとると、両者には有意な正の相関が認められた。このことは、水環境中の *mcr-1* の起源が未処理下水であることを強く示唆している。ベトナム全土では、下水の約 90% が未処理のまま放出されている。未処理下水により有機物や栄養塩などの汚濁だけでなく、*mcr-1* のように臨床上も重要な薬剤耐性因子も拡散していることが示された。また、ハノイでは、水道水源として地下水に依存している割合が高いが、浅井戸からも *mcr-1* は検出されている。腐敗槽などからの漏洩が、薬剤耐性因子による地下水汚染も引き起こしていることが推察された。

ベトナム北部の水環境から採水した試料を対象として、ハイスループット定量 PCR により 144 種類の薬剤耐性因子のスクリーニングを実施した。都市近郊の河川では、上流から下流にかけてこれらの遺伝子の相対濃度が著しく増加し、下流では都市下水の相対濃度と同程度に達していた。また、95%以上の試料から共通して検出された遺伝子には、クラス 1 インテグロンやサルファ剤耐性遺伝子などが含まれていた。ハイスループット定量 PCR による各遺伝子の相対濃度を用いて、試料のクラスター解析を実施したところ、下水・都市排水路、河川上流、人為的汚染の影響を受けた河川下流の 3 種類にクラスターが分類され、薬剤耐性因子の検出パターンにより水環境汚染の類型化ができることが示唆された。

(4) チミジンアナログと Click 反応による薬剤耐性細菌の標識と検出の検討

培養法に依存せずに薬剤耐性細菌を検出する方法として、抗生物質存在下で増殖能を有する細菌の DNA を EdU で標識する実験を行った。下水処理水が流入する都市河川から単離したセフトキシム耐性大腸菌を用いて、河川水マトリックス中での予備的な検討を行ったが、フローサイトメトリーで検出する際のノイズシグナルが予想以上に大きく、有意な標識を得ることはできなかった。EdU 濃度、前培養時間、EdU 添加後の標識時間などの条件を変更して、EdU 陽性細胞の蛍光強度の上昇を目指したが、改善には至らなかった。

<引用文献>

O'Neill, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations/the Review on Antimicrobial Resistance, 2014.

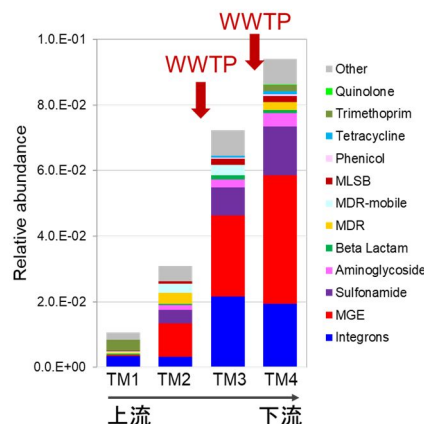


図 1 関東地方の都市河川における上流から下流における薬剤耐性因子の相対濃度の変化

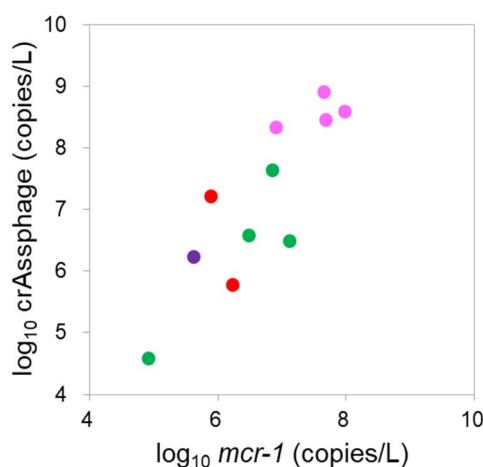


図 2 ベトナムの水環境におけるコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 濃度と crAssphage 濃度との関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nga Thi Nguyen, Miaomiao Liu, Hiroyuki Katayama, Taichiro Takemura, and Ikuro Kasuga	4. 巻 72
2. 論文標題 Association of the colistin resistance gene mcr-1 with fecal pollution in water environments in Hanoi, Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 275-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/lam.13421	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 Thi My Hanh Vu and Ikuro Kasuga	4. 巻 496
2. 論文標題 Prevalence of plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in domestic wastewater	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 12015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1755-1315/496/1/012015	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 Minh Ngoc Pham and Ikuro Kasuga	4. 巻 496
2. 論文標題 Profiling fecal pollution in rivers in Hanoi, Vietnam, using host-specific Bacteroidales and crAssphage markers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 12014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1755-1315/496/1/012014	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 Ikuro Kasuga, Kyoka Nagasawa, Masato Suzuki, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai	4. 巻 10
2. 論文標題 High-throughput screening of antimicrobial resistance genes and their association with class 1 integrons in urban rivers in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Environmental Science	6. 最初と最後の頁 825372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fenvs.2022.825372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Thi My Hanh Vu and Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Transmission of colistin resistance gene from water to aquatic vegetables due to untreated wastewater reuse for irrigation in Hanoi, Vietnam
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Evaluation of antimicrobial resistance in water-food nexus in Vietnam
3. 学会等名 VNU Vietnam -Japan University Scientific Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 The screening of antibiotic resistance genes in water environments in Vietnam and Japan
3. 学会等名 Resistomap Webinar Series -Introduction to the environmental dimension of antibiotic resistance- (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Dissemination of antimicrobial resistance in water environment in Vietnam
3. 学会等名 10th International Forum for Green Technology and Management (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長澤杏香, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明
2. 発表標題 Class 1インテグロンを指標とした都市河川における薬剤耐性遺伝子汚染の評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Thi My Hanh VU, Ikuro Kasuga, and Hiroyuki Katayama
2. 発表標題 Prevalence of Plasmid-mediated Colistin Resistance Gene mcr-1 in Domestic Wastewater
3. 学会等名 5th International Symposium on Sustainable Future in Asia/5th NIES International Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Tackling Antimicrobial Resistance in the Context of SDGs in Asia
3. 学会等名 5th International Symposium on Sustainable Future in Asia/5th NIES International Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Antimicrobial resistance associated with fecal pollution in water environment in Hanoi, Vietnam
3. 学会等名 1st Symposium of JSPS Core-to-Core Program: "Center of Excellence in Health Risk Assessment for Adaptation to Climate Change" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Thi Nga Nguyen, Miaomiao Liu, Hiroyuki Katayama, and Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Different Water Environments in Hanoi, Vietnam
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春日郁朗, Nguyen Thi Nga, Liu Miaomiao, 片山浩之
2. 発表標題 ハノイの水環境における薬剤耐性遺伝子汚染の実態
3. 学会等名 第22回水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	片山 浩之 (Katayama Hiroyuki) (00302779)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	
研究 分担者	竹村 大地郎 (Takemura Taichiro) (60572899)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	

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
---------	---------