

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K14858

研究課題名(和文) 薬剤耐性遺伝子による水環境汚染の実態解明と環境中遺伝子不活化手法の開発

研究課題名(英文) Development of alternative disinfection methods to inactivate extracellular antibiotic resistance genes in aquatic environments

研究代表者

Amarasiri Mohan (Amarasiri, Mohan)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：50815537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では塩素、過酢酸、過ギ酸を用いた簡易消毒による薬剤耐性遺伝子(ARGs)不活化効果の評価を目的として、モデルARGにアンピシリン(Amp)耐性遺伝子をコードしたプラスミドpUC19を用い、その簡易消毒処理による物理的破壊の可能性をPCRで検証するとともに、大腸菌への形質転換効率を求めるとしてARGsの不活化効果を比較・評価した。遊離塩素は、1ppmの濃度でも時間依存性の高い消毒効果を示した。PAAおよびPFAの場合、不活化効率は初期濃度とともに増加し、時間依存性はほとんど無視できた。pUC19プラスミドへの物理的損傷が主要な不活化メカニズムであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果では、PAAおよびPFAの細胞外ARG不活化効率が遊離塩素に匹敵することを確認した。さらに、PAAとPFA消毒の場合塩素消毒で生成される有害な消毒副産物も生成されない。したがって、PAAとPFAは、薬剤耐性遺伝子の蔓延を最小限に抑えるために分散型施設で使用できる代替消毒剤と見なすことができる。厳格な薬剤消費規制なしに、低中所得国でさらに開発および使用することができます。本技術は、さらに開発され、厳格な薬剤消費規制がない低中所得国で、使用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the inactivation efficiency of extracellular antibiotic resistance genes (ARGs) by free chlorine (Cl), peracetic acid (PAA), and performic acid (PFA) using plasmid pUC19, which carries ampicillin resistant gene, as a model. Reduction of viable extracellular ARGs was evaluated by calculating the reduction of transformation frequency of pUC19 exposed to disinfectants with Escherichia coli competent cells. Free chlorine showed high and time-dependent disinfection effect even at 1 ppm concentration. For PAA and PFA, the inactivation efficiency increased with initial concentration and time dependency was almost negligible. A 2.3 and 2.9 log reductions of viable pUC19 was observed by PAA and PFA. PAA and PFA has not shown to generate harmful disinfection by products and therefore can be considered as alternative disinfectants usable in decentralized facilities to minimize the spread of antibiotic resistance.

研究分野：環境工学

キーワード：薬剤耐性遺伝子 塩素消毒 過酢酸消毒 過ギ酸消毒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬への耐性を有する薬剤耐性菌 (ARB) に関する問題が世界の注目を集めている。近年は新規の抗菌薬等の開発が停滞していることから、ARB の存在は、感染症に対する有効な治療法を確立してきた人類の努力を無に帰するリスクを孕むものとして危惧されている。国際化が著しく進展した現代では、世界のどこかで出現した ARB が国際的な交通網や物流網を介して、被害が世界中に拡大する恐れがある。ARB 問題に対して即時の措置が取られない場合、ARB に起因する世界の死者数は 2050 年までに年間 1, 000 万人を超えると推定されている。

先進国を中心に薬剤の適正使用等の対策も行われているが、水環境中では残存している薬剤耐性遺伝子 (ARGs) が形質転換等によって非耐性菌へと拡散し、新たな ARB が生起しているとの指摘もあり、その低減には ARGs の不活化が重要である。

2. 研究の目的

本研究では塩素、過酢酸、過ギ酸を用いた簡易消毒による ARGs 不活化効果の評価を目的として、モデル ARG にアンピシリン (Amp) 耐性遺伝子をコードしたプラスミド pUC19 を用い、その簡易消毒処理による物理的破壊の可能性を PCR で検証するとともに、大腸菌への形質転換効率を求めるとして ARGs の不活化効果を比較・評価した。

3. 研究の方法

3.1 簡易消毒による ARG 不活化効果の評価及び残留薬剤濃度の測定

0.1 ng/ μ L に調整した pUC19 を次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) (~1 mg/L)、過酢酸 (PAA) (~800 mg/L)、過ギ酸 (PFA) (~550 mg/L) の各消毒液 9 mL に 1 mL ずつ加えて消毒処理を行った。経時的 (0-10 分) に 10 mL ずつ採取し、残液中の残留薬剤濃度を吸光度法によって測定した。また、各時間消毒処理後の試料 1 mL にチオ硫酸ナトリウム及びカタラーゼを適宜添加して中和後、50 μ L の One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher) に 3 μ L 加えて形質転換し、Amp 含有 / 非含有 LB 寒天培地上のコロニー数をそれぞれ計数した。

3.2 定量 PCR 法による ARG のコピー数の計測及び評価

消毒前後の pUC19 濃度をインターカレーター法による Real-Time PCR で定量し、消毒による遺伝子数の低減効果を評価した。

4. 研究成果

各消毒剤の残留濃度の経時変化は、消毒剤の種類ごとに異なった。すなわち、NaOCl は消毒開始から 1 分以内に約 40 %減少し、その後は漸減した。PAA は消毒時間を通じてほとんど変化が認められなかった。PFA では、消毒開始後 2 分間で一旦約 17 %減少、その後の 2 分で約 8.4%増加した後、漸減した。pUC19 の大腸菌への形質転換効率から求めた pUC19 の不活化効率を図 1 で示した。NaOCl では消毒剤濃度と消毒時間の積である CT 値の増加に伴い不活化効率が高くなり、

CT 値が 1 ppm・min では約 1 log、約 2.9 ppm・min (4 分間) で pUC19 が完全に不活化され、約 3.1 log の不活化効率が得られた。PAA では、CT 値が約 750 ppm・min で約 1.7 log、約 7500 ppm・min では約 2.3 log の不活化効率となり、また、PFA では CT 値が約 540 ppm・min で約 2.7 log、約 5400 ppm・min では約 2.9 log の不活化効率となった。PAA 及び PFA では NaOCl と異なり、pUC19 の不活化効率は CT 値にほとんど依存せず、初期添加濃度に大きく依存した。pUC19 のコピー数は NaOCl 消毒の場合 10 分間で約 1.1 log 減少したが、PAA 及び PFA 消毒では初期濃度から変化が認められなかった。

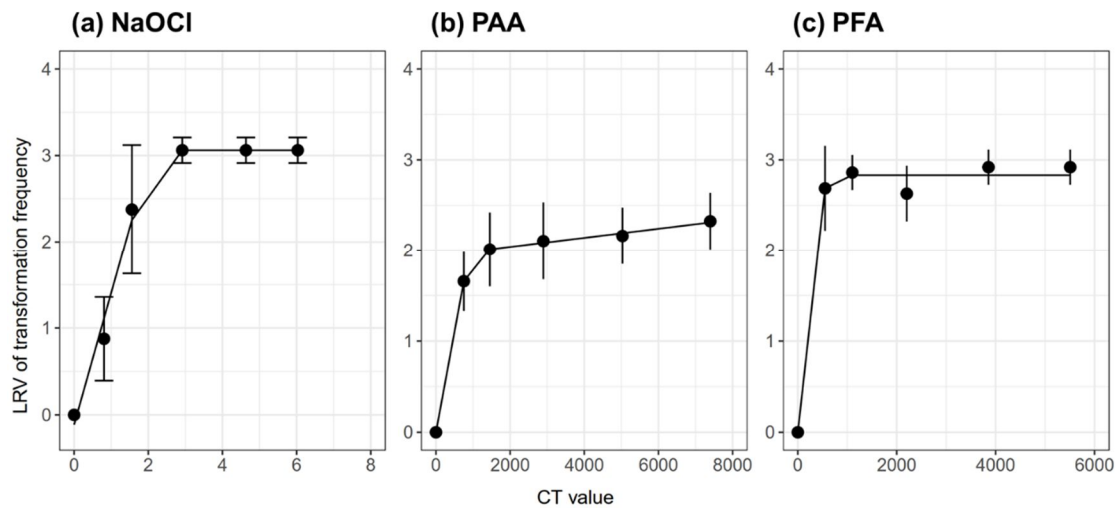


図 1 : (a) 遊離塩素、(b) 過酢酸、および (c) 過ギ酸による消毒処理後の pUC19 形質転換の減少。縦軸と横軸のスケールは、3つの消毒剤で異なる。3回の試行の平均値がモデリングに使用された。

pUC19 の不活化効率は NaOCl が最も高く、次いで PFA、PAA の順であった。また、PAA 及び PFA では、pUC19 の不活化効率が、一般に消毒操作の指標となる CT 値にほとんど依存せず、初期添加濃度が重要であることが明らかとなった。消毒に伴う pUC19 のコピー数の変化から、NaOCl では pUC19 の物理的破壊の可能性が示されたが、PAA 及び PFA ではコピー数に変化がなく、物理的破壊とは異なるメカニズムでの遺伝子の不活化が起きた可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小林大起、Amarasiri Mohan、古川隼士、佐野大輔、清 和成
2. 発表標題 環境DNAとして存在する薬剤耐性遺伝子への簡易消毒による不活化効果の評価
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 Kobayashi, H., Amarasiri, M., Furukawa, T., Sano, D., Sei, K.
2. 発表標題 Inactivation efficiency assessment of antimicrobial resistance genes (ARGs) existing as extracellular DNA using simple disinfection methods
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2021 (WET2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kobayashi, H., Amarasiri, M., Furukawa, T., Sano, D., Sei, K.
2. 発表標題 Inactivation efficiency assessment of antimicrobial resistance genes (ARGs) existing as extracellular DNA using simple disinfection methods
3. 学会等名 The 13th International Joint Workshop on Advanced Engineering Technology for Environment and Energy (The 13th AETEE) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林大起、安保龍二、Mohan Amarasiri、古川隼士、佐野大輔、清和成
2. 発表標題 簡易消毒による環境中の細胞外薬剤耐性遺伝子への物理的な消毒効果及び形質転換効率への影響の比較評価
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kobayashi, H., Ampo, R., Amarasiri, M., Furukawa, T., Sano, D., Sei, K.
2. 発表標題 Disinfection Of Extracellular Antimicrobial Resistant Genes (ARGs) Using Free Chlorine (Cl) And Peracetic Acid (PAA), Performic Acid (PFA)
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2022 (WET2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kobayashi, H., Amarasiri, M., Ampo, R., Furukawa, T., Sano, D., Sei, K.
2. 発表標題 Disinfection of extracellular antibiotic resistance genes using peracetic acid (PAA) and performic acid (PFA)
3. 学会等名 IWA World Water Congress & Exhibition 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	清 和成 (Sei Kazunari) (80324177)	北里大学・医療衛生学部・教授	
研究協力者	古川 隼士 (Furukawa Takashi) (90632729)	北里大学・医療衛生学部・准教授	
研究協力者	佐野 大輔 (Sano Daisuke) (80550368)	東北大学・工学研究科・教授	

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