

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：51101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K14864

研究課題名（和文）バクテリオファージを用いた下水処理における薬剤耐性菌の制御手法の開発

研究課題名（英文）Use of bacteriophage therapy to control antimicrobial resistance bacteria during wastewater treatment

研究代表者

李 善太（Lee, Suntae）

八戸工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：60771962

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）：下水処理場における薬剤耐性菌に感染するファージの存在実態を明らかにし、その薬剤耐性菌感染ファージを用いた下水処理場での制御手法について検討した。様々な薬剤耐性菌に感染するファージを収集して薬剤耐性菌感染ファージのライブラリを作製し、これらから調製したファージカクテルを添加することで、下水処理過程に薬剤耐性菌の割合を減少させることができた。また、添加タイミングや濃度についても最適な条件を見極めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下水処理過程においてファージを添加することで薬剤耐性菌の割合を減らせることを確認できた。このような成果は、環境工学分野において新たな視点でのファージセラピーの利用可能性を確認することができたと考えられる。薬剤耐性菌の問題は環境分野のみならず、ヒト、動物、農業、食品の各分野においても問題となっているため、One healthアプローチの視野に立ち、全ての分野でこれらの研究成果を応用することができると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to reduce antimicrobial-resistant bacteria (ARB) content in wastewater treatment plants using bacteriophage (phage) in the secondary treatment phase. The effectiveness of reducing ARB content by spiking wastewater with phage was evaluated in a laboratory by treating isolated ARB with phages from wastewater samples. Before biological treatment, the percentage of ARB isolates that have the same antibiotic resistance as the added ARB was 90%~100%. After biological treatment without phage cocktail, this percentage was over 90%. In contrast, this percentage was 5%~83% after biological treatment with phage cocktail. These results suggest that spiking phage can reduce ARB content during wastewater treatment.

研究分野：環境工学

キーワード：薬剤耐性菌 抗生物質耐性大腸菌 大腸菌ファージ 下水処理場 ファージセラピー 制御方法 存在実態 ファージ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、抗生物質の効かない細菌の薬剤耐性菌が世界中で問題になっており、アメリカ疾病予防管理センター (CDC) は米国において薬剤耐性菌による感染者が最低でも年間 200 万人以上、死亡者は 2.3 万人以上に及ぶと報告している (CDC, 2013)。また、英国では薬剤耐性菌に対して何も対策を取らなければ、現在の世界の死亡原因の 1 位である癌 (800 万人/年) を超えて 2020 年には薬剤耐性菌感染症による死亡者が 1,000 万人/年になると警告している (O'Neill et al., 2016)。そのため、日本国内においても 2016 年 4 月 5 日に「薬剤耐性対策アクションプラン」を決定し、ヒト、動物、農業、食品および環境の各分野において One health アプローチの視野に立ち、薬剤耐性菌に対して集中的に取り組むべき対策について取りまとめている (厚生労働省、2016)。

薬剤耐性菌は常に蔓延しており、健常者の糞便や人為的な影響が直接及ばない自然環境および野生動物からも確認されているが、多くは保菌者から排出された薬剤耐性菌を含む生活排水や病院排水などに高い割合で存在している (Azuma et al., 2019)。これらの排水は下水道に流入されるため、下水処理場において薬剤耐性菌への対策を行うことが効果的であると考えられる。一方、日本国内における下水処理場の多くでは、病原微生物の除去・不活化のために塩素や紫外線を用いた消毒を行っているが、塩素消毒強化に伴い薬剤耐性菌の存在割合が増加する傾向があることや (諏訪ら、2017)、抗生物質に耐性を持たない大腸菌と比べて耐性を持つ大腸菌を不活化させるためにはより多くの紫外線量が必要であることが報告されている (安井ら、2016)。そのため、薬剤耐性菌を対象とした新たな制御手法を検討し、下水処理場において効果的な対策を立てる必要があると考えられる。

薬剤耐性菌に対する新たな対抗手段の一つとしてファージセラピーが注目を集めている。ファージセラピーは細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ (以下、ファージ) を利用した細菌感染症治療法である。「悪夢の耐性菌 (カルバペネム耐性腸内細菌科細菌)」の発生などによる切り札として注目されており、近年、実際にファージセラピーによる治療に成功したパターンソン症例が報告されている (Schooley et al., 2017)。このファージセラピーの方法論は医学分野だけでなく One health アプローチの視野から環境分野にも利用できると考えられ、特に下水処理場における薬剤耐性菌に対する制御手法として有効な方法となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、水環境中における薬剤耐性菌に感染するファージの存在実態を明らかにし、その薬剤耐性菌感染ファージを用いた下水処理場における薬剤耐性菌の制御手法の検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 下水処理場における薬剤耐性菌に感染するファージの実態調査

八戸工業高等専門学校排水処理施設の流入水 (八戸高専流入水)、放流水 (八戸高専放流水)、青森県 A 下水処理場の流入水 (流入水 A)、二次処理水 (二次処理水 A)、放流水 (放流水 A) から単離した多剤耐性大腸菌を宿主菌として用い、家畜排水が流入している馬淵川 (櫛引橋) と浅水川 (豊崎橋)、家畜排水が流入しない田面木池と坂牛川の試料および青森県 A 下水処理場の流入水と二次処理水を対象に、試料中に存在するファージを重層寒天培地法により検出した。

(2) 薬剤耐性菌感染ファージを用いた下水処理場での制御手法の検討

八戸高専の排水処理施設の流入水から、アンピシリン、レボフロキサシン、テトラサイクリン、スルファメトキサゾール・トリメトプリムの 4 剤に耐性を示す多剤耐性大腸菌 (宿主菌 A) と、アンピシリン、セフジニル、レボフロキサシン、スルファメトキサゾール・トリメトプリム、ゲンタマイシンの 5 剤に耐性を示す多剤耐性大腸菌 (宿主菌 B) を検出した。宿主菌 A と B を用いて青森県 B 下水処理場の流入水を対象に 6 回の調査を実施し、それぞれ異なる日から 3 種の大腸菌ファージを検出し、実験に用いた。

八戸高専の排水処理施設の曝気槽から採取した混合液を高濃度に培養した宿主菌 A を添加し、十分混合後、単離して高濃度に培養した宿主菌 A に感染する大腸菌ファージ 3 種をカクテル化し、添加した。坂口フラスコにて振とう培養することにより生物処理を行った。生物処理前 (宿主菌添加後) および生物処理後 (ファージあり、なし) の上澄み液を採取し、それぞれ検出した大腸菌を薬剤感受性試験により、添加した宿主菌 A と同様の抗生物質に耐性をもつ大腸菌の割合を算出した。同様の実験を 3 回繰り返し実施し、宿主菌 B においても同様の実験を 2 回実施した。

4. 研究成果

(1) 下水処理場における薬剤耐性菌に感染するファージの実態調査

宿主菌の薬剤耐性数から見ると、より多くの薬剤に耐性を有する宿主菌 A、B、C (5 剤) と D (4 剤) に感染するファージが、2、3 剤に耐性を有する宿主菌 (E~P) に比べて検出率が高

かった（表1）。宿主菌の起源から見ると、流入水が起源である宿主菌 A、B、D、E、F、J、K、L に感染するファージが二次処理水や放流水を起源とする宿主菌と比べて検出率が高かった。耐性を示す薬剤の種類から見ると、CFN、LVX に耐性を持つ宿主菌 A、B、C、D、L、N に感染するファージがその他の薬剤に耐性を持つ宿主菌と比べて検出率が高かった。また、環境水の試料からは用いた宿主菌に感染するファージは検出されなかった。これらの結果から、抗生物質耐性大腸菌に感染する大腸菌ファージは、河川より下水処理場で検出され、宿主菌の薬剤耐性数や起源、耐性を示す薬剤の種類により検出率が異なる可能性が見られた。

ID	宿主菌			大腸菌ファージの濃度[log(PFU/mL)]								
	起源	薬剤耐性数	薬剤	流入水					二次処理水			
				7/11	9/6	9/25	10/24**	10/24**	7/11	9/6	9/25	10/24
A	八戸高専流入水	5	ABP,CFN,LVX,ST,GM	0.90	1.53	3.32	0.81	1.44	0.85		1.73	検出*
B	流入水A	5	ABP,LVX,TC,ST,GM		1.95	1.60	1.53	> 2.50		1.26	1.00	
C	放流水A	5	ABP,CFN,TC,KM,GM		1.38	1.41	0.74	1.80			0.98	0.40
D	八戸高専流入水	4	ABP,LVX,TC,ST	1.22	1.55	1.40	1.50	2.30	0.48			0.18
E	八戸高専流入水	3	ABP,TC,ST	0.54	1.27	0.65	1.52	0.30			検出*	
F	八戸高専流入水	3	ABP,TC,ST									
G	二次処理水A	3	ABP,TC,ST		検出*					検出*	検出*	検出*
H	二次処理水A	3	ABP,TC,ST									
I	放流水A	3	ABP,ST,GM									
J	八戸高専流入水	2	ABP,GM		2.43	2.79	2.10	2.58		2.09	2.24	2.08
K	流入水A	2	ABP,TC			0.54		> 2.50			0.30	
L	流入水A	2	ABP,CFN	1.65	1.77	1.29	1.43	1.80	0.54		1.32	0.90
M	二次処理水A	2	ABP,TC									
N	二次処理水A	2	ABP,CFN		検出*	検出*						
O	放流水A	2	ABP,ST									
P	八戸高専放流水	2	ABP,TC	0.81	0.18	1.15	1.06	検出*				

*定量下限値以下(1PFU/ml) **流入水の系列が違う試料を採取
 ABP:アンピシリン, CFN:セフジニル, LVX:レボフロキサシン, TC:テトラサイクリン, ST:スルフアトキサゾール・トリメトプリム, GM:ゲンタマイシン

表1 A 下水処理場の 大腸菌ファージ濃度

(2) 薬剤耐性菌感染ファージを用いた下水処理場での制御手法の検討

生物処理前の試料から検出した大腸菌は、全て添加した宿主菌と同様の抗生物質に耐性を示した（図1）。大腸菌ファージを添加せずに生物処理を行った結果（図1、ファージなし）では、98%（宿主菌 A）と 73%（宿主菌 B）が添加した宿主菌と同様の抗生物質に耐性を示していた。一方、大腸菌ファージを添加した結果（図1、ファージあり）では、65%（宿主菌 A）と 0%（宿主菌 B）が添加した宿主菌と同様の抗生物質に耐性を示しており、大腸菌ファージを添加しなかった場合と比べて割合が大きく低下していた。生物処理前後における大腸菌濃度を定量した結果（表2）大腸菌ファージの添加有無に関係なく平均 2.2-log~3.6-log 濃度が低下していた。以上の結果から、生物処理過程において添加した大腸菌ファージが宿主菌である多剤耐性大腸菌に感染し、除去できる可能性が示された。また、生物処理前後の大腸菌濃度の低下において、大腸菌ファージの添加有無による差がなかったことから、大腸菌ファージ添加による生物処理での大腸菌除去への影響は無いと考えられた。

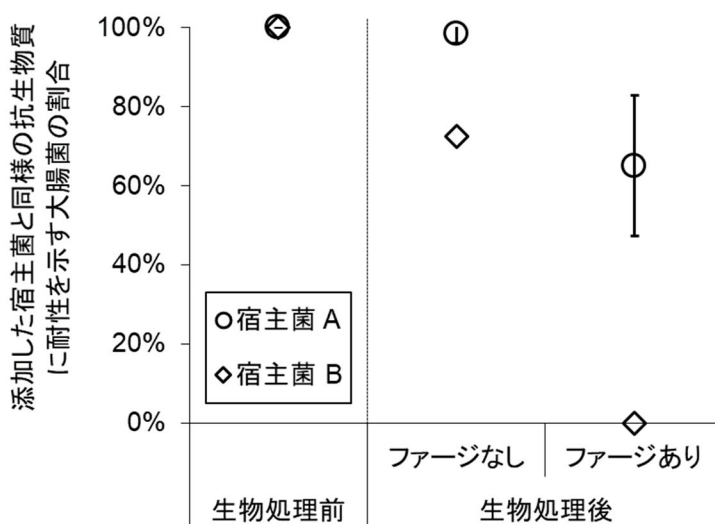


図1 大腸菌ファージの添加有無における生物処理前後の添加した宿主菌と同様の抗生物質に耐性を示す大腸菌の割合

表 2 大腸菌ファージの添加有無における生物処理前後の大腸菌濃度の定量結果

添加した 宿主菌ID	大腸菌の平均濃度 (log[CFU/mL]) ± 標準偏差		
	生物処理前	生物処理後	
		ファージなし	ファージあり
A	6.91 ± 0.15	3.88 ± 0.50	3.28 ± 0.59
B	4.62	2.41	2.07

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Suntae Lee, Mamoru Suwa, Hiroyuki Shigemura
2. 発表標題 Metagenomic Analysis of RNA Viruses in Wastewater for Comprehensive Detection of Viral Infectious Diseases
3. 学会等名 IWA World Water Congress & Exhibition 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李善太、諏訪守、重村浩之
2. 発表標題 動物糞便および食肉加工工場の浄化槽におけるF特異RNAファージの存在実態調査
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤千紘、李善太
2. 発表標題 大腸菌ファージを用いた下水処理過程での抗生物質耐性大腸菌の除去に関する基礎的検討
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 田村澪、藤原光李、李善太
2. 発表標題 下水処理場における抗生物質耐性大腸菌とそれに感染する大腸菌ファージの存在実態調査
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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