

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24404017

研究課題名(和文) 東南アジアの水環境における薬剤耐性菌の発生源と耐性獲得経路の推定

研究課題名(英文) Estimation of sources of antibiotic resistant bacteria and analysis of their acquired resistance in Southeast Asian water environment

研究代表者

渡部 徹 (WATANABE, Toru)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10302192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：1) チャオプラヤ川流域の水環境から分離した大腸菌(316株)から、24種類の耐性遺伝子が検出された。ペニシリン系とテトラサイクリン系に対する耐性遺伝子の検出率が高かった。系統発生解析の結果、これらの菌株は5つのクラスターに分けられた。各耐性遺伝子の検出率はクラスター別に偏りがなく、耐性遺伝子の起源の推定までに至らなかった。

2) 熱帯条件下でのベンチスケール活性汚泥リアクターを用いた模擬下水処理実験では、病院排水レベルの濃度でノルフロキサシン(NOR)を添加するとリアクター内の大腸菌のNOR耐性率が増加した。また、河川で見られるような低濃度での曝露でも、NOR耐性が誘導される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：1) Twenty-four kinds of resistance genes were detected from isolates of *Escherichia coli* (n=316) from the Chao Phraya River in Thailand. Detection rates of resistance genes to penicillins and tetracyclines were relatively high. Phylogenetic analysis revealed that these isolates were categorized into five clusters. We could not find significant differences in detection rates of any antibiotic resistance genes among the clusters, indicating the difficulty to estimate origins of the resistance genes carried by *E. coli* based on their phylogenetic relationship.

2) We conducted an experiment to treat synthetic municipal wastewater using bench-scale reactor of activated sludge process in Thailand. It demonstrated the increase in resistant rate to norfloxacin (NOR) of *E. coli* in the reactor when NOR was added at a high concentration as reported in hospital wastewater. We also found that the NOR resistance of *E. coli* appeared to be induced by a low concentration of NOR (<50 ng/L) in river water.

研究分野：水環境工学

キーワード：薬剤耐性菌 大腸菌 水環境 耐性遺伝子 下水処理 病院排水 国際研究者交流 タイ王国

1. 研究開始当初の背景

東南アジア諸国では、感染症治療のための抗生物質の不適切な使用や、畜産や水産での過剰投与のために、薬剤耐性菌の問題が深刻化しつつある。研究代表者らの先行研究では、タイ王国のチャオプラヤ川の上流から下流にかけて広い範囲で薬剤耐性の大腸菌が見つかった(引用文献)。しかしながら、検出された耐性菌が流域のどこで発生したのか不明であり、現時点では対策について議論することができない。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究代表者らによる研究成果を進展させ、薬剤耐性菌の遺伝情報を解析することにより、同流域における耐性菌の発生源と耐性獲得経路を推定することを目的とする。

また、同流域内でも生活排水に由来して大腸菌と抗生物質が集まる下水処理場を主要な耐性菌発生源とみなし、ベンチスケールの下水処理リアクターを用いた実験により、種々な抗生物質をリアクターに投入した場合の大腸菌の耐性獲得の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は4つのタスクで構成され、各タスクでは以下の方法で研究を実施した。

(1)チャオプラヤ川流域における抗生物質耐性菌の検索

研究代表者らが、2011年1月にチャオプラヤ川流域の上流部から河口部までの全48地点で河川水中から単離した大腸菌の菌株(カセサート大学に保管)を用いる。

それに加えて、新たに同流域の下水処理場や病院などで、高濃度の抗生物質により汚染されていると考えられる排水も採取し、試料中の大腸菌を単離する。単離された菌株に対して、抗生物質耐性試験を実施する。

(2)耐性遺伝子の検出と遺伝情報にもとづく耐性菌発生源の推定

タスク1で単離された薬剤耐性大腸菌から、ゲノムおよびプラスミドを抽出する。抽出された遺伝子から、ハイスループットqPCR装置を用いて、4つの系列から全38種類の耐性遺伝子の一斉検出を行う。検出に用いるプライマー、プローブについては、 T_m 値が揃うように本研究で独自で設計する。

検出された耐性遺伝子の起源を探るために、PCR-RFLP法を用いて大腸菌の系統解析を実施する。PCR-RFLP法の標的とする遺伝子領域と、その遺伝子を断片化するための制限酵素の組合せを、試行錯誤法によって決定する。

(3)各種発生源における耐性菌発生ポテンシャルの評価

カセサート大学工学部環境工学科の実験室に、活性汚泥法による都市下水処理のベン

チスケールリアクター2基(1つは標準活性汚泥法SBR,もう1つは膜分離活性汚泥法SB-MBRを採用)を設置し、運転を開始する。実際の処理場から採取した種汚泥と、模擬下水を用いた定常運転が可能となった時点で、抗生物質を投入し、リアクター内の大腸菌の耐性スペクトルの変化を観測する。下水処理過程では抗生物質も分解されるため、耐性菌の増減とともに、抗生物質濃度の変化もモニタリングする。

(4)東南アジアの水環境における抗生物質耐性菌の発生源と耐性獲得経路の推定

タスク1~3の成果にもとづいて、チャオプラヤ川流域における抗生物質耐性菌の発生源と耐性獲得経路に関する結論をまとめる。さらに、流域住民の耐性菌への感染リスクを低減するために効果的な対策について、タイ国内の研究協力者とともに検討する。

4. 研究成果

(1)チャオプラヤ川流域における抗生物質耐性菌の検索

バンコク市内の都市下水処理場の流入下水で分離された大腸菌株では、ナリジクル酸(54%),テトラサイクリン(42%),およびサルファメトキサゾール(50%)で高い耐性率が確認された。これらの値は、他国で報告された都市下水中の大腸菌の耐性率よりも高かった。また、キノロン系の抗生物質については、流入下水に比べて活性汚泥中の大腸菌で耐性率が上昇していた。

同じくバンコク市内の病院の下水から分離された大腸菌では、ナリジクス酸(69%)とテトラサイクリン(76%)で耐性率が高かった。これらの耐性率は、上述した都市下水中の大腸菌よりもさらに高く、抗生物質の使用頻度が高い病院が、薬剤耐性菌の起源の一つであることを裏付ける結果が得られた。

(2)耐性遺伝子の検出と遺伝情報にもとづく耐性菌発生源の推定

チャオプラヤ川流域で分離された316株の大腸菌株から、38種類中24種類の耐性遺伝子が検出された(図1)。ampC遺伝子の検出率が最も高く(約60%),ペニシリン系とテトラサイクリン系の耐性遺伝子で検出率が高かった。

次に、同じ大腸菌株に対して、PCR-RFLP法による系統解析を行った。ここでのPCR-RFLP法はH抗原遺伝子を対象とし、制限酵素としてはHinf IとRsa Iの2つを併用した。その結果、チャオプラヤ川流域で分離された大腸菌の発生系統は5つのクラスターに分けられた(図2)。

検出率が高かった9種類の耐性遺伝子について、その起源を推定するため、地点別の検出率とその周辺の土地利用の相関を調べたが、ごく限られたケースを除いて有意な相関は確認できなかった。続いて、各耐性遺伝

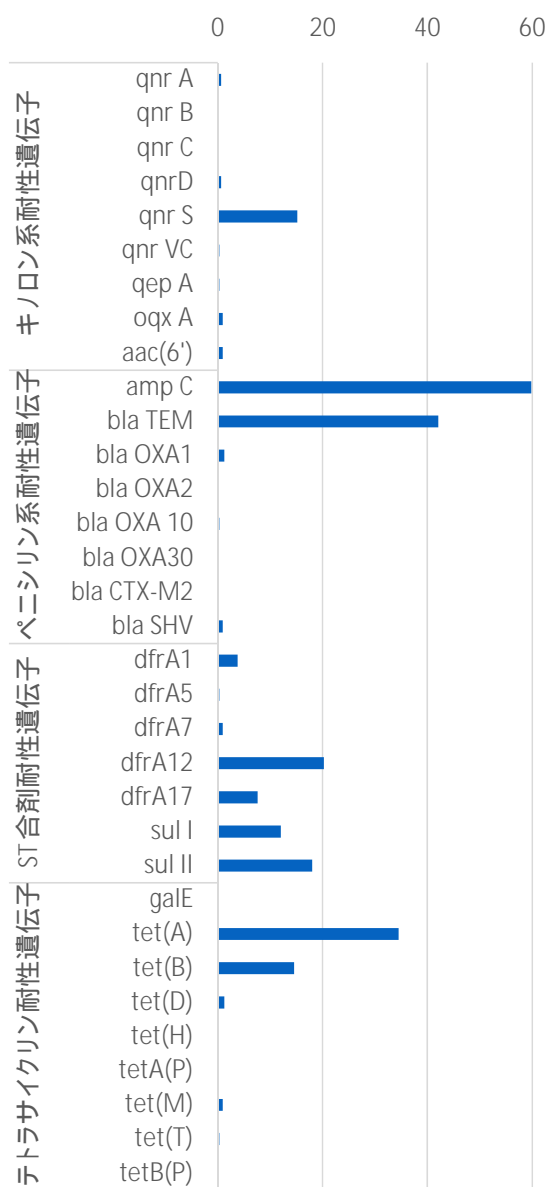


図1 チャオプラヤ川流域で分離された大腸菌株からの薬剤耐性遺伝子検出率 (%)

子の検出率をクラスター別に比較したが、検出率には偏りがなく (図3)、大腸菌は流域内に十分に伝播した後で耐性遺伝子を獲得したことが示唆された。

(3) 各種発生源における耐性菌発生ポテンシャルの評価

活性汚泥法による都市下水処理のベンチスケールリアクターには、実際の処理場から採取した種汚泥を接種し、模擬下水を用いた定常運転を行った (写真1)。第一の実験として、リアクターの形式 (SBR と SB-MBR) の違いや曝気時間等の運転条件に応じて、リアクター内の大腸菌の耐性スペクトルが変化することを観察した。その結果、耐性スペクトルの変化には明確な傾向は見られなかったが、クロラムフェニコール耐性率だけは、SB-MBR で時間経過とともに上昇した。SB-MBR は SBR に比べて汚泥の滞留時間が長いので、

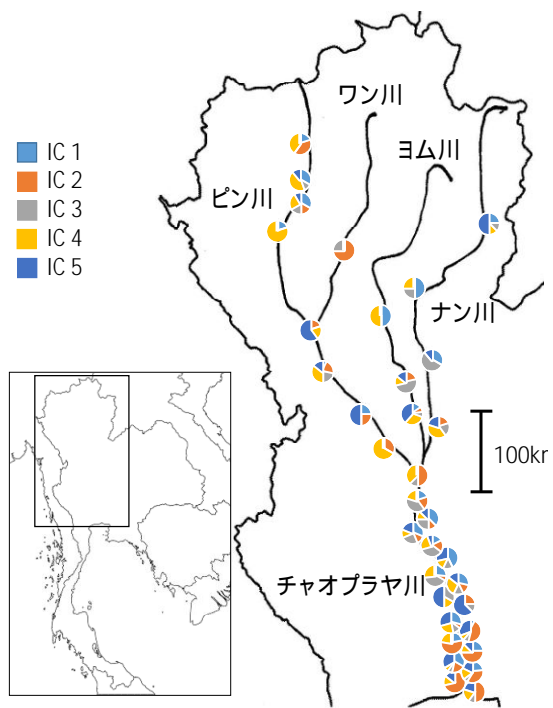


図2 各地点で分離された大腸菌株 (n=3~17) が属するクラスターの割合

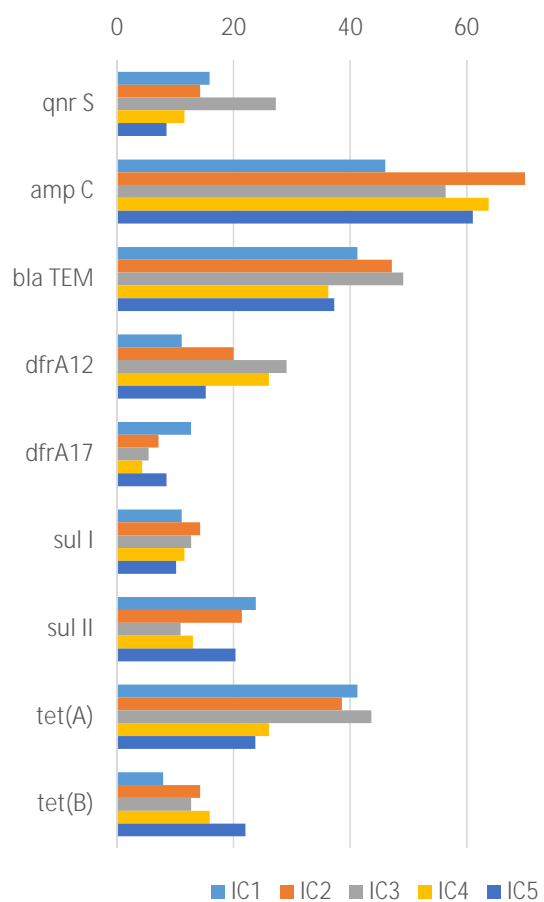


図3 各クラスターに属する大腸菌株からの耐性遺伝子検出率 (%)

長時間の処理の間に、汚泥に存在した大腸菌が耐性を獲得した可能性が考えられる。



写真1 活性汚泥リアクター
(SBRとSB-MBRが並列されており、同一の排水を用いた処理実験を行うことができる)

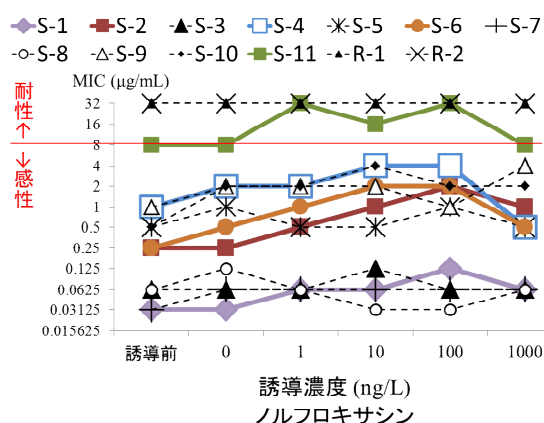


図4 低濃度のノルフロキサシンへの曝露による耐性の誘導(凡例のSとRはそれぞれ、誘導前の菌株が感受性株(n=11)、耐性株(n=2)であったことを示す)

第二の実験として、ノルフロキサシン(バンコク首都圏の下水処理場で最も高い濃度で検出された)を異なる濃度で添加した模擬下水の回分処理を行ったところ、添加濃度と大腸菌のノルフロキサシン耐性率の上昇との間には、明確な関係は見られなかった。ただし、さらにノルフロキサシン濃度を上昇させて0.01mg/L(病院排水レベル)で添加した系では、耐性大腸菌の割合が増加することが確認された。

また、別の実験では、河川で見られる低濃度(数~50ng/L)での曝露でも、大腸菌の最小阻害濃度(MIC)が上昇した(図4)。

(4)東南アジアの水環境における抗生物質耐性菌の発生源と耐性獲得経路の推定

上述の通り、タスク1~3の結果から、チャオプラヤ川流域の水環境から分離された大腸菌について、明確な耐性遺伝子の起源の推定までは至らなかったが、都市下水(特に病院排水)の処理で大腸菌の耐性率が上昇する事実と、河川中에서도耐性の獲得(耐性誘導)が起こる可能性を示すことができた。

<引用文献>

本多了, 渡部徹, 真砂佳史, Rungnapa Chulasak, Kulchaya Tanong, Chaminda Tushara G.G., Variga Sawaittayothin, Krison Wongsila, Varisara Sunthonwatthanaphong, Anupong Poonnotok, Chart Chiemchaisri, 古米弘明, タイ王国チャオプラヤ川流域における抗生物質耐性大腸菌の分布, 土木学会論文集(環境) 67(7), III_173-III_178, 2011

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Wilai Chiemchaisri, Phanida Deerut, Toru Watanabe, Ryo Honda, Chart Chiemchaisri. Effect of norfloxacin on antibiotic resistance of Escherichia coli: Comparison between sequencing batch reactor and sequencing batch membrane bioreactor. ASEAN Engineering Journal Part C, 4(1), 81-92, 2015, 査読有, URL: http://www.seed-net.org/sub_journal2_015_Part_C_Vol4_No_1.html

[学会発表](計11件)

林夢雨, 楊森, 野口愛, 本多了, 池本良子, 渡部徹, 石川県河北潟における抗生物質耐性菌の分布と季節変動, 第49回日本水環境学会年会, 平成27年3月16~18日, 金沢大学(石川県金沢市)

小澤耕平, 渡辺幸三, 本多了, 梶原晶彦, 渡部徹, チャオプラヤ川流域に生息する薬剤耐性大腸菌の起源推定のための系統発生解析, 平成26年度土木学会東北支部技術研究発表会, 平成27年3月7日, 東北学院大学(宮城県多賀城市)

Kohei Ozawa, Toru Watanabe, Horoaki Ito, Ryo Honda, Wilai Chiemchaisri and Kozo Watanabe. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of antibiotic resistant Escherichia coli for its source tracking. The 7th ASEAN Environmental Engineering Conference, Puerto Princesa, Palawan, Philippines, November 21-22, 2014

Chihiro Tachi, Ryo Honda, Eri Tsuchiya-Nakakahira, Tingting Gu, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Toru Watanabe. Impacts of final sedimentation process on profile of quinolone-resistance genes and their expression in Escherichia coli isolates from a

wastewater treatment process. Water and Environment Technology Conference, Tokyo, Japan, June 28-29, 2014

T. Phonsin, W. Chiemchaisri, C. Chiemchaisri, T. Watanabe, R. Honda. Change in antibiotic resistance of Escherichia coli during domestic wastewater treatment: comparison between sequencing batch reactor (SBR) and sequencing batch membrane bioreactor (SB-MBR). The International Conference on the Preservation and Rehabilitation of Urban Water Environment for Asian Core Program of NRCT, JSPS and ERDT, Bangkok, Thailand, November 23, 2013

K. Ozawa, H. Ito, T. Watanabe, R. Honda, Y. Masago, W. Chiemchaisri. Geographical distribution of tetracycline resistance genes carried by Escherichia coli in the Chao Phraya river and its tributaries. The International Conference on the Preservation and Rehabilitation of Urban Water Environment for Asian Core Program of NRCT, JSPS and ERDT, Bangkok, Thailand, November 23, 2013

K. Ozawa, T. Watanabe, H. Ito, Y. Masago, W. Chiemchaisri, R. Honda and A. Kajihara. Tetracycline resistance genes detected in Escherichia coli isolated from the Chao Phraya River and its tributaries in Thailand. The 5th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Daejeon, Korea, September 8-12, 2013

小澤耕平, 渡部徹, 伊藤紘晃, 真砂佳史, Chiemchaisri Wilai, 本多了, チャオブラヤ川流域から分離された大腸菌からのテトラサイクリン耐性遺伝子の検出, 土木学会平成 25 年度全国大会第 68 回年次学術講演会, 平成 25 年 9 月 4 ~ 6 日, 日本大学 (千葉県習志野市)

小澤耕平, 渡部徹, 伊藤紘晃, 梶原晶彦, 真砂佳史, Chiemchaisri Wilai, 本多了, チャオブラヤ川流域から分離された大腸菌のテトラサイクリン耐性遺伝子, 平成 24 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 平成 25 年 3 月 9 日, 東北大学 (宮城県仙台市)

小澤耕平, 渡部徹, 伊藤紘晃, 梶原晶彦, 水環境から分離された大腸菌のテトラサイクリン耐性遺伝子の検出, 第 18 回庄内・社会基盤技術フォーラム, 平成 25 年 1 月 24 日, 東北公益文科大学 (山形

県酒田市)

Nopparat Patchanee, Toru Watanabe, Wilai Chiemchaisri, Simanata Threedeach, Ryo Honda and Chart Chiemchaisri. Municipal wastewater treatment plants as a potential source of antibiotic resistant bacteria in Southeast Asia. 3rd Seminar on Asian Water Environment, Ho Chi Minh City, Vietnam, October 25-26, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 徹 (WATANABE, Toru)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号: 1 0 3 0 2 1 9 2

(2) 研究分担者

本多 了 (HONDA, Ryo)

金沢大学・理工研究域・助教

研究者番号: 4 0 4 2 2 4 5 6

(3) 連携研究者

真砂 佳史 (MASAGO, Yoshifumi)

東北大学・未来科学技術共同研究

センター・准教授

研究者番号: 5 0 5 0 7 8 9 5

(4) 研究協力者

Wilai Chiemchaisri

カセサート大学 (タイ王国)・工学部・

准教授

Chart Chiemchaisri

カセサート大学 (タイ王国)・工学部・

准教授