

平成30年6月14日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05223

研究課題名(和文) 遺伝子解析にもとづく熱帯アジアの下廃水処理施設における薬剤耐性菌の挙動解明

研究課題名(英文) Genetic analysis for behavior of antibiotic resistant bacteria at wastewater treatment plants in tropical Asia

研究代表者

渡部 徹 (WATANABE, Toru)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：10302192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：タイ・バンコク市内の下廃水処理場で採取した活性汚泥試料を高濃度の抗菌薬を添加したLB培地で培養し、汚泥中で耐性遺伝子の保持または伝播に関する細菌を同定した。都市下水処理施設3カ所の汚泥では、アモキシシリン、アンピシリン、シプロフロキサシンを添加して培養すると腸内細菌科の割合が増加し、同科に属する耐性菌の存在が示唆された。病院や大学の排水処理施設で採取した汚泥に関する解析でも、同様の結果が得られた。下廃水処理の各プロセスにおける耐性遺伝子qnrSとsul1の全活性に対する発現量は、流入水のそれよりも高い傾向が見られたが、各プロセスでの酸素や薬剤等による環境ストレスへの応答とは相関はなかった。

研究成果の概要(英文)：Bacteria, which play an important role in carrying and transferring antibiotic-resistance genes (ARGs) in activated sludge process, were separated by incubation of sludge samples from wastewater treatment plants in Bangkok, Thailand, in the presence of antibiotics at a high concentration, followed by identification using next-generation sequencing technique. Percentage of Enterobacteriaceae clearly increased when sludge samples from 3 plants treating municipal wastewater were incubated with amoxicillin, ampicillin or ciprofloxacin, which demonstrates the presence of resistant bacteria belonging to this family. Similar results were obtained for sludge samples from hospital and university wastewater treatment plants. Expression level of ARGs (qnrS and sul1) relative to the total bacteriological activity was higher in the treatment process than in the influent, although it was not significantly correlated with response to stresses such as increased concentration of oxygen or antibiotics.

研究分野：水環境工学

キーワード：薬剤耐性菌 下廃水処理 東南アジア 遺伝子解析 耐性遺伝子 活性汚泥 次世代シーケンス解析 細菌群集解析

1. 研究開始当初の背景

熱帯アジアの国々では、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、薬剤耐性菌による水環境汚染が深刻化している。研究代表者らの先行研究では、タイ王国チャオプラヤ川の上流から下流にかけて広範囲で薬剤耐性の大腸菌が検出された。特に人口が多い都市域での耐性率が高く、排出源として都市下水とその処理水が強く疑われた。

活性汚泥プロセスに代表される生物学的な下廃水処理プロセスでは、反応槽内で多種多様な微生物が高濃度で共存しながら活発に増殖を繰り返すことで、耐性遺伝子の水平伝播が起こりやすい環境にある。多くの病原微生物は活性汚泥の中で急速に増殖をすることはないが、活性汚泥に適応した非病原微生物が耐性遺伝子を保有する場合には、水平伝播により病原微生物が耐性遺伝子を取り込む可能性がある。また、流入下水には（特に病院排水では）その地域で使用された抗生物質が含まれており、その存在下で耐性菌が選択されることも考えられる。これらの特徴から、都市下水処理施設における耐性菌に関する研究例は多いが、ほとんど中緯度温帯の先進諸国からの報告であり、本研究のように熱帯アジアを対象にした研究は限られる。

熱帯アジア都市の下廃水処理施設では、先進諸国と同様の活性汚泥プロセスが採用されることが多いが、処理プロセスを通じて水温が高い、流入下水の有機物濃度が低い、という理由から、活性汚泥の性質（すなわち、汚泥を構成する微生物叢）は温帯の先進諸国とは異なる。また、治療で使われる抗生物質の違いによって、流入下水に含まれる抗生物質の種類や濃度、耐性菌の濃度やそのプロファイルも異なるため、熱帯アジアの下廃水処理施設で耐性菌は独特の挙動を示すものと予想している。

2. 研究の目的

本研究は、熱帯アジアの代表国であるタイ王国において、都市下廃水処理施設での薬剤耐性菌の挙動を明らかにすることを目的とする。具体的には、都市下廃水処理施設において、処理過程での耐性菌の挙動（耐性遺伝子の消長、耐性遺伝子の保持または伝播に重要な役割を果たす細菌種）について、次世代シーケンズ解析等の遺伝子解析により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 活性汚泥中の薬剤耐性菌の挙動解析

活性汚泥の採取

研究対象として、活性汚泥法が導入されているタイ・バンコク市内の都市下水処理場4か所（BS, DD, JJ, SPY）、大学排水処理施設1か所（KU）、病院排水処理施設3か所（KL, PY, CP）を選んだ。BS処理場は最大日処理量が150000m³/dayでステップフィード式活性

汚泥法を用いている。DD処理場は処理量がより多く（350000m³/day）、標準活性汚泥法を用いている。JJ処理場は処理量がさらに多く（750000m³/day）、循環式活性汚泥法を用いている。SPY処理場は処理量が3000m³/dayの小規模な都市下水処理場で、接触安定活性汚泥法を用いている。

大学排水処理施設であるKU処理場は標準活性汚泥法を用いている。病院の排水処理施設のうちCP処理場は処理量が450m³/dayで、標準活性汚泥法を使用している。KL, PY処理場は活性汚泥法を使用しているが、詳しいデータが得られなかった。

比較のために、山形県鶴岡市の下水処理場（TSU）においても活性汚泥混合液を採取した。この処理場は標準活性汚泥法を用いており、処理量は56100m³/dayである。

活性汚泥細菌の培養

採取した汚泥混合液1mL、抗菌薬を添加した液体培地9mLを混合させたものを滅菌済の50mL遠心管に加えた。通気のために滅菌した綿で蓋をし、37℃で24時間振とう培養した。液体培地は、できるだけ選択性の低いLB培地を用いた。

汚泥の培養時には、抗菌薬として、アモキシシリン（AMPC）、シプロフロキサシン（CPFX）、アンピシリン（ABPC）、テトラサイクリン（TC）、セフェム（CFPM）、ドリペナム（DRPM）、メロペナム（MRPM）のいずれかを1000μg/mLの濃度で添加した。この濃度は、グラム陽性菌または陰性菌に関して知られている最小発育阻止濃度の5~10倍に相当する。高濃度の抗菌薬を添加した上で短時間の培養を行うことで、培養中に新たな耐性菌が発生することを最小限にした。

活性汚泥細菌の同定

培養前後の汚泥試料から、Fast DNA SPIN Kit for Soil（MP Biomedicals, USA）を用いてDNAの抽出を行った。DNA抽出液に対して、16S rRNA遺伝子のV4領域を対象としたPCR法を行った。増幅した遺伝子断片を精製し、次世代シーケンサーMiSeq（Illumina, USA）によってその配列を解析した。得られた配列情報は、キメラ配列を除去した後に、群集構造解析ソフトウェアQiime ver 1.9を使用して、97%以上の相同性でOTU（Operational Taxonomic Units：操作的分類単位）にクラスタリングした。その後、既存のデータベース（Green genes）と照合して汚泥混合液に生息していた細菌種とその構成を明らかにした。

ヒト病原菌が多く含まれる腸内細菌科に属するOTUについては、属以下の分類も詳しく調べた。データベースに適切な配列がなく、属以下が同定できなかったOTUについては、OTUと参考株との統計解析を系統樹作成ソフトであるMEGA ver5.2を用いて行い近縁な種を明らかにした。

参考株には、NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) から腸内細菌科の代表的な細菌をいくつかピックアップして用いた。

(2) 下水処理プロセスにおいて薬剤耐性菌の増加に影響を与える因子

嫌気好気活性污泥法による実下水処理場を対象として、流入水、嫌気槽、好気槽、返送污泥の各試料を採取した。採取した污泥より RNA と DNA を抽出した。薬剤耐性遺伝子およびストレス等の細胞応答に関連する遺伝子(表1)の mRNA 発現量を、RT-qPCR にて定量し、試料中存在する対象遺伝子 DNA 量を qPCR にて定量した。

表1. 検出対象とした遺伝子

遺伝子	機能	遺伝子	機能
qnrS	キノロン系薬剤耐性	acrA, toIC	排出ポンプ
sul1	サルファ剤系薬剤耐性	ompC, ompF	ポーリン
oxyR	酸化ストレス	soxS	ストレス応答
rpsL	タンパク合成(細胞活性)	16S rRNA	細胞活性

対象遺伝子の発現量は、以下の2つの標準化を行った後に評価を行った。

全細胞活性に対する発現量

試料中の微生物活性に対する発現量は、rpsL 遺伝子の発現量によって対象遺伝子の mRNA 発現量を標準化することによって得た。

試料中の対象遺伝子 DNA 存在量に対する発現量

対象遺伝子を保有する微生物における対象遺伝子の活性率は、対象遺伝子の mRNA 発現量を試料中の同じ対象遺伝子の DNA 存在量に対して標準化することによって得た。

4. 研究成果

(1) 活性污泥中の薬剤耐性菌の挙動解析

都市下水処理場における活性污泥細菌の群集構造(図1)

バンコクの都市下水処理施設3カ所(JJ, BS, DD)に存在する活性污泥細菌の群集構造は類似しており、Proteobacteria 門や Chloroflexi 門の細菌が優占していた。一方で SPY 処理場では、他の3カ所と比べて Firmicutes 門と Chloroflexi 門の割合が高く、Proteobacteria 門の割合が低かった。日最大処理量が少ないことと、接触安定活性污泥法というやや特殊な方法を用いているからかもしれない。

鶴岡市の下水処理場の污泥細菌群集は、Proteobacteria 門が多い点はバンコクの処理場と共通していたが、Bacteroidetes 門の割合が高い点ではバンコクの処理場とは異なっていた。

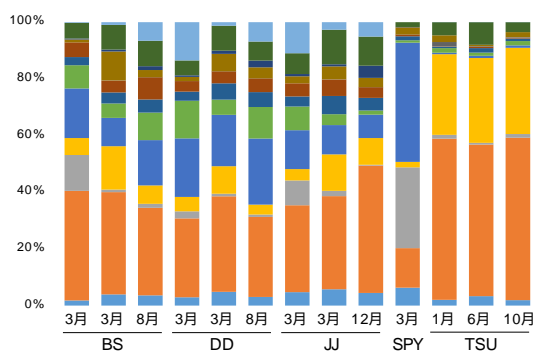


図1. 都市下水処理場における活性污泥細菌の群集構造(スペースの都合で凡例を省略するが、色の違いは細菌が属する門が異なることを示す)

培養による細菌群集構造の変化(図2)

培養前の活性污泥細菌の38.5-50.7%は、科のレベルまでは同定できなかった。これに対して、LB 培地で培養すると、その割合が5.9%以下まで減少した。LB 培地を用いて培養することで、培地に適した細菌群集がより活発に増殖した結果、他の細菌群集の割合が低下したと考えられる。例えば BS1, DD1, JJ1, BS2, DD2, JJ2 では、Porphyromonadaceae 科、Comamonadaceae 科や Peptostreptococcaceae 科の細菌がよく増殖した。BS3, DD3, JJ4 では、Aeromonadaceae 科、Enterobacteriaceae 科および Moraxellaceae 科の細菌がよく増殖した。これらの細菌が LB 培地に適応できた菌であることが分かる。

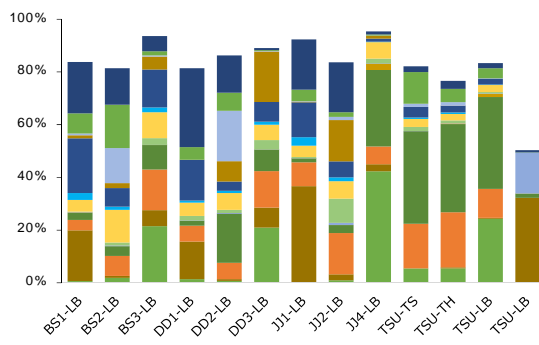


図2. 培養後の活性污泥細菌の群集構造(スペースの都合で凡例を省略するが、色の違いは細菌が属する科が異なることを示し、出現頻度が高い科だけをまとめたため、合計が100%に満たない)

抗菌剤の添加による群集構造の変化

AMPCまたはABPC存在下で培養した場合(図3)には、バンコク、鶴岡の処理施設ともに、培養後の污泥試料には、Enterobacteriaceae 科が最も高い割合で存在していた。都市下水処理場の污泥中に生息する Enterobacteriaceae 科は AMPC に耐性を持っていることがわかる。また、JJ1 と DD1 の污泥に AMPC 添加したサンプルでは Porphyromonadaceae 科がそれぞれ 20.9%、15.2%と優占しており、これらの処理場の活

性汚泥には AMPC に耐性を示す Porphyromonadaceae 科の細菌が存在していた。同様に、DD3 の汚泥からは ABPC 耐性の Moraxellaceae 科の細菌が高頻度 (45.6%) で見つかった。

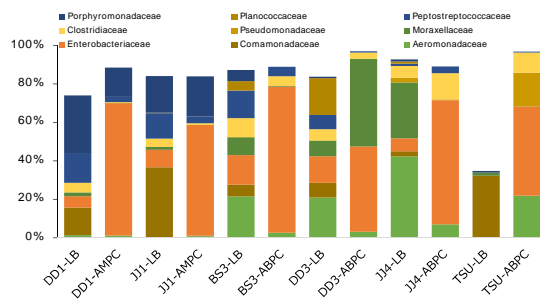


図3 . AMPC または ABPC 存在下で培養した場合の活性汚泥細菌の群集構造の変化 (色の違いは細菌が属する科が異なることを示し、出現頻度が高い科だけをまとめたため、合計が100%に満たない)

TC 存在下で培養したときの細菌群集の変化には共通した傾向が見られなかった。少なくとも、抗菌薬無添加で培養したときに優占していた Porphyromonadaceae 科や Enterobacteriaceae 科はほとんど存在しておらず、これらの科には TC に耐性を示す細菌がいなかったようである。

CPFX 存在下で培養した場合には、1 試料 (2016 年 3 月に DD 処理場から採取) を除いて、培養後の汚泥中には Enterobacteriaceae 科が高い割合を占めていた。

CFPM 存在下で培養したとき (図 4), JJ2, BS3, DD3 では、Enterococcaceae 科の割合が 46.2-73.0% と著しく上昇した。CFPM はこの科に属する腸球菌に効果がないことが知られているため、ここでの汚泥の培養においても生き残ったのであろう。2017 年 8 月の BS, DD 処理場では CFPM に耐性を持つ Bacillaceae 科がそれぞれ 28.8%, 20.1% を占めていた。鶴岡市の汚泥試料 (TSU-CFPM) を培養すると Other の割合が高くなった。

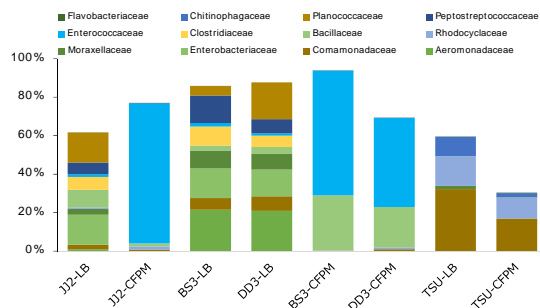


図4 .CFPM 存在下で培養した場合の活性汚泥細菌の群集構造の変化 (色の違いは細菌が属する科が異なることを示し、出現頻度が高い科だけをまとめたため、合計が 100% に満たない)

DRPM 存在下で培養すると、パンコクの汚泥試料では、CFPM と同様に Enterococcaceae 科が増加した。DRPM も CFPM と同じく腸球菌に効果がないことが原因であろう。2017 年 3 月に採取した BS 処理場の試料については、Bacteroidaceae 科も多く見られた (32.7%)。

DRPM と同じカルバペネム系の抗菌薬である MRPM 存在下で培養すると、2017 年 8 月に BS および DD 処理場で採取した汚泥試料では Enterococcaceae 科が増加した。一方、2017 年 12 月に採取した JJ 処理場の試料では、腸球菌は検出されず、その細菌群集の構成は抗菌薬無添加で培養した条件と類似していた。同じクラスの抗菌薬であるにも関わらず、添加後の細菌群集がこれだけ大きく異なることは興味深い結果であり、カルバペネム耐性が世界的な問題となっていることも考えると、今後深く研究されるべき現象である。

大学および病院の排水処理施設の結果

都市下水処理場で採取した活性汚泥と、大学の排水 (KU) や病院排水 (CP, KL, PY) を処理する汚泥の群集構造は類似しており、下排水の排出源の影響は小さかった。

抗菌薬を加えた場合についても、都市下水処理場での群集構造と大きな違いはなく、都市下水または病院排水に特有な耐性菌と見出すことはできなかった。

腸内細菌科に属する耐性菌の詳細な解析

Enterobacteriaceae 科に属する耐性菌の菌株は、その大部分が属不明であった。属不明の OTU について、その代表配列を幾つかの病原菌の参照株の配列と比較するため、系統樹を作成した (図 5)。

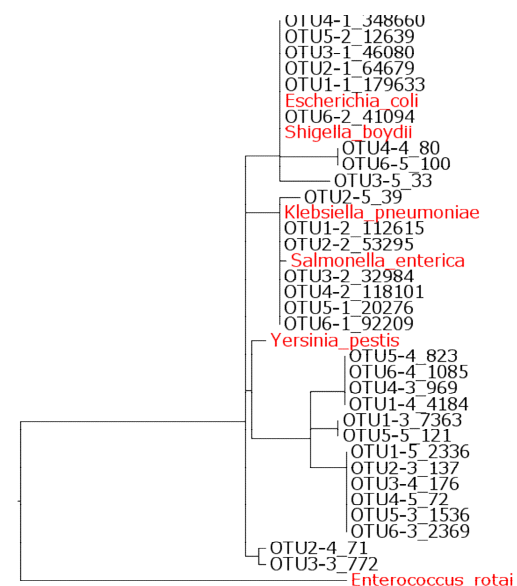


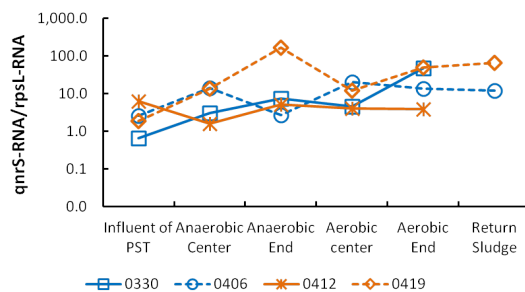
図5 . 腸内細菌科の活性汚泥細菌のうち属が不明であった菌株の発生系統樹 (出現頻度が高いものを対象とし、赤字は参照株である)

その結果、高い相同性がないものの、出現頻度の高い耐性菌株は大腸菌や赤痢菌と1つのグループ、あるいは、クレブシエラ菌やサルモネラ菌と1つのグループを構成しており、これらと近縁の菌株であることが分かった。

(2) 下水処理プロセスにおいて薬剤耐性菌の増加に影響を与える因子

キノロン系薬剤耐性遺伝子 *qnrS*、サルファ剤系薬剤耐性遺伝子 *sul1* の全活性に対する発現量は、どちらも流入水よりプロセス中で高くなる傾向がみられた(図6)。ただし、*sul1* については活性が低くなった日もあった。また、嫌気槽と好気槽については、発現量に顕著な差はみられなかった。また、酸素や薬剤等微量汚染物質によるストレス応答に関する活性との相関はみられなかった。

(a) *qnrS*



(b) *sul1*

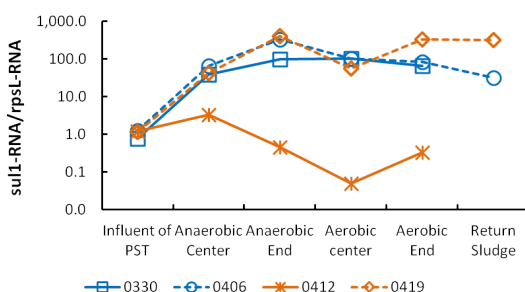
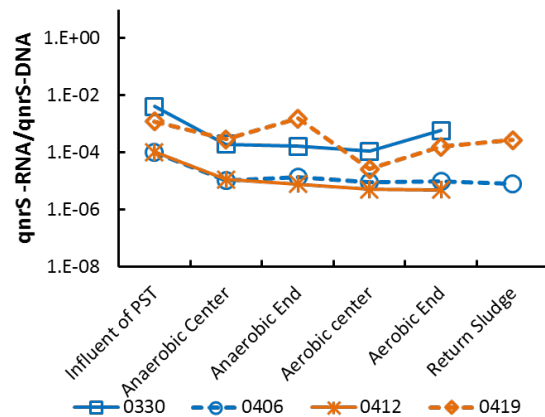


図6．各採水地点における薬剤耐性遺伝子 *qnrS*(a), *sul1*(b)の細胞活性 (rpsL) に対する発現量

一方、各試料中に存在する薬剤耐性遺伝子 DNA 量に対する発現量は、プロセスによる増減はほとんどみられなかった(図7)。これらの結果から、下水処理プロセスにおいて、薬剤耐性遺伝子を保有する細菌の薬剤耐性活性は変化しないが、細胞活性を持つ薬剤耐性菌の割合が増加したことによって、汚泥中の薬剤耐性活性が高くなったと考えられた。すなわち、流入水中の細菌によるプロセスにおける環境条件(曝気や下水中の薬剤等)に対する応答よりは、何らかの要因によって活性汚泥中に徐々に薬剤耐性菌が集積されていることが、下水処理プロセスにおける薬剤耐性活性の増加の原因となっていることが

示唆された。

(a) *qnrS*



(b) *sul1*

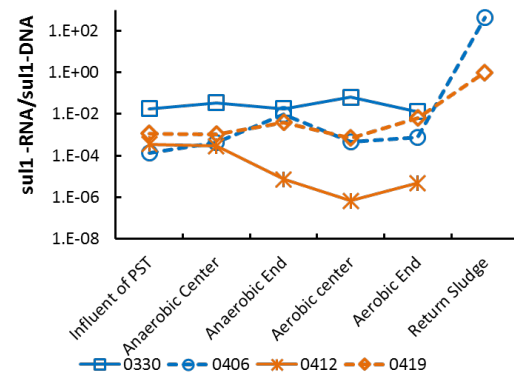


図7．各採水地点における薬剤耐性遺伝子 *qnrS*(a), *sul1*(b)の DNA 量に対する発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Sulfikar, Ryo Honda, Mana Noguchi, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Toru Watanabe. Effects of sedimentation and aeration on antibiotic resistance induction in an activated sludge process. Journal of Water Environment and Technology, Vol.16, No.2, pp.94-105, 2018, 査読有
<https://doi.org/10.2965/jwet.17-046>

Ryo Honda, Toru Watanabe, Variga Sawaittayotin, Yoshifumi Masago, Rungnapa Chulasak, Kulchaya Tanong, G. Tushara Chaminda, Krison Wongsila, Chawala Sienglum, Varisara Sunthonwatthanaphong, Anupong Poonnotok, Wilai Chiemchaisri, Chart Chiemchaisri, Hiroaki Furumai, Kazuo Yamamoto. Impacts of urbanization on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia*

coli in the Chaophraya River and its tributaries. *Water Science and Technology*, 73(2), 362-374, 2016, 査読有
<https://doi.org/10.2166/wst.2015.502>

[学会発表](計12件)

K.A.H.S. Sewwandi, Sulfikar, G.G.T. Chaminda, R. Honda, M. Kumar. Antibiotic Resistant *Escherichia coli* in Kelani River, Sri Lanka. The 3rd International Symposium on Advances in Civil and Environmental Engineering Practices for Sustainable Development, Galle, Sri Lanka, March 15, 2018

伊掛賢人, 楊森, 本多了, 池本良子, 渡部徹, 下水処理プロセスにおける薬剤耐性遺伝子の消長, 第52回日本水環境学会年会, 北海道札幌市, 2018年3月15-17日

三浦逸実, 西山正晃, 浦剣, Chiemchaisri Chart, Chiemchaisri Wilai, 渡部徹, 抗菌薬に耐性を示す活性汚泥細菌の群集解析, 平成29年度土木学会東北支部技術研究発表会, 福島県郡山市, 2018年3月3日

Itsumi Miura, Jian Pu, Toru Watanabe. Species identification of antibiotic resistant bacteria in activated sludge using pyrosequencing. 7th IWA-ASPIRE Conference 2017, Kuala Lumpur, Malaysia, September 11-14, 2017

Sulfikar, Ryo Honda, Mana Noguchi, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Toru Watanabe. Effects of sedimentation and aeration on antibiotic resistance induction in an activated sludge process. *Water and Environment Technology Conference 2017*, Sapporo, Japan, July 22-23, 2017

本多了, Sorn Sovannlaksmy, 周藤真裕, 林夢雨, 野口愛, 松浦哲久, 池本良子, 渡部徹, 湖沼環境における薬剤耐性菌の耐性強化の可能性とその要因, 第54回環境工学研究フォーラム, 岐阜県岐阜市, 2017年11月17-19日

三浦逸実, 西山正晃, 浦剣, Prayoga Windra, Chart Chiemchaisri, Wilai Chiemchaisri, 渡部徹, 活性汚泥に存在する抗菌薬に耐性を示す細菌叢の検索, 第54回環境工学研究フォーラム, 岐阜県岐阜市, 2017年11月17-19日

三浦逸実, 浦剣, 風間しのぶ, 今田義光, 渡部徹, 抗生物質に耐性を示す活性汚泥細菌の検索, 土木学会第71回年次学術講演会仙台市, 2016年9月7-9日

周藤真裕, 本多了, 野口愛, 池本良子, 渡部徹, 湖水の水温と滞留時間が抗生物質耐性誘導に与える影響, 第50回日本水環境学会年会, 徳島県徳島市, 2016年3月16-18日

三浦逸実, 伊藤紘晃, 風間しのぶ, 今田義光, 渡部徹, 抗生物質添加による活性汚泥細菌に対する影響, 平成27年度土木学会東北支部技術研究発表会, 岩手県盛岡市, 2016年3月5日

三浦逸実, 伊藤紘晃, 風間しのぶ, 今田義光, 渡部徹, 抗生物質添加による活性汚泥細菌の種構成変化, 第21回庄内・社会基盤技術フォーラム, 山形県酒田市, 2016年1月21日

渡部徹, 途上国の水と衛生, 感染症のリスク, 日本生物工学会 2015年度北日本支部仙台シンポジウム, 宮城県仙台市, 2015年9月4日(招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 徹 (WATANABE, Toru)
山形大学・農学部・教授
研究者番号: 10302192

(2) 研究分担者

本多 了 (HONDA, Ryo)
金沢大学・地球社会基盤学系・准教授
研究者番号: 40422456

(3) 連携研究者

西山 正晃 (NISHIYAMA, Masateru)
山形大学・農学部・助教
研究者番号: 10802928

(4) 研究協力者

CHIEMCHAISRI, Chart
カセサート大学(タイ)・工学部・准教授

CHIEMCHAISRI, Wilai
カセサート大学(タイ)・工学部・准教授