

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651025

研究課題名(和文) 下水処理場における薬剤耐性遺伝子の存在実態および河川への拡散実態の把握

研究課題名(英文) Occurrence of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant and discharge into river

研究代表者

井原 賢 (Masaru, Ihara)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70450202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いた薬剤耐性遺伝子の網羅的検出系を下水サンプルへ適用し、下水処理場内での薬剤耐性遺伝子の種類と数の変化を調べた。その結果、薬剤耐性遺伝子の種類と数が下水処理に伴い減少していることが確認できた。流入下水では115種類の薬剤耐性遺伝子が検出されたが、二次処理水では91種類に減少していた。このように、下水処理過程での薬剤耐性遺伝子の減少は確認できたが、その一方で放流水からも95種類の薬剤耐性遺伝子が検出されており、下水処理場から環境中へ遺伝子情報が拡散している可能性が危惧された。このことは、河川流下過程における薬剤耐性遺伝子の種類と検出数の比較からも示唆された。

研究成果の概要(英文)：I investigated the occurrence and fate of Antibiotic resistance genes (ARGs) in wastewater treatment plant(WWTP) by using next generation sequencer. WWTP influent, primary effluent, secondary effluent, and final effluent were collected at WWTP A in Japan. As a result, 115 kinds of ARGs were detected in influent, which were reduced to 91 in secondary effluent. This result indicates that many kinds of ARGs are entered into WWTP, and some of them can be removed during biological treatment in WWTP. 95 kinds of ARGs were still detected in final effluent, which means ARGs may spread out from WWTP and enter into water environment. I also confirmed that kinds and amount of ARGs were increased at downstream side of wastewater effluent in river basin. This result also indicates that ARGs may spread out from WWTP and enter into water environment.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：薬剤耐性遺伝子 次世代シーケンサー 下水処理場 河川 群集解析 網羅的解析

## 1. 研究開始当初の背景

抗生物質の使用量が増加するに伴い、抗生物質を投与しても死なない菌、いわゆる抗生物質耐性病原菌の報告例が相次いでいる。ヒトの健康に対する重大な問題となっている。例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)などによる院内感染等が深刻な問題となっている。一方で、近年、下水処理場や河川水等の水環境から抗生物質および実に多数の薬剤耐性遺伝子が検出されている。このことから、ヒトや家畜・ペットに投与された抗生物質や、ヒトや動物の体内で発生した薬剤耐性菌が尿尿を通じて下水処理場へと流入し、下水処理水の放流に伴って河川等の水環境へ拡散している可能性が懸念される。つまり、下水処理場が薬剤耐性遺伝子の集積場、水環境に対する汚染源となっている可能性である。水環境中のバクテリアはウイルスからの遺伝子導入やバクテリア同士の接合、プラスミドの直接的な取り込み等の水平伝播メカニズムを通じて、容易に遺伝情報を交換する<sup>1)</sup>。下水処理場内での微生物コミュニティ、特に活性汚泥の内部で、薬剤耐性遺伝子が伝播し、水環境中へ放出されているとすれば、ヒトの健康を脅かす上で、大問題である。

従来の PCR 法では、約 380 種類ある既知の薬剤耐性遺伝子を網羅的に検出・定量することは不可能である。本研究は 1 回の解析で 15 億塩基対の遺伝子配列を決定できる次世代シーケンサーを用いて下水処理場における下水処理プロセス、および放流先河川水での薬剤耐性遺伝子および水平伝播関連遺伝子の塩基配列を網羅的に解読することに挑戦する画期的な試みである。

## 2. 研究の目的

下水処理場における下水処理プロセス、および下水処理水の放流先である河川水に含まれる、薬剤耐性遺伝子および水平伝播に関わる遺伝子(以下、薬剤耐性遺伝子と記す)の存在実態を網羅的・半定量的に明らかにする。下水処理場への流入下水、最初沈殿池越流水(初沈越流水)、最終沈殿池越流水(二次処理水)、塩素消毒後の放流水(塩素処理水)、および初沈汚泥、活性汚泥における薬剤耐性遺伝子プロファイルと比較することで、下水処理プロセスにおける薬剤耐性遺伝子の挙動を把握する。また、下水処理場放流水およびその放流先の河川水における薬剤耐性遺伝子プロファイルと比較する。これら 2 つの内容の調査を通じて、薬剤耐性遺伝子の拡散の観点から下水処理場が水環境へ及ぼすインパクトの大きさについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 3.1 サンプリング

2012 年の 2 月に、国内の A 下水処理場において流入下水、初沈越流水、二次処理水、塩素処理水、初沈汚泥、および活性汚泥等を

採取した。下水、汚泥ともに、1 日の中で 3 時間おきに 3 回の採取を行い、研究室に輸送後、24 時間以内に等量コンジットを調整し、サンプルの前処理を行った。なお、塩素処理水については、塩素が残留しているため、中和剤として試料 1 L に対して 10 %チオ硫酸ナトリウム 1 mL を予めガラス瓶に入れて採水した。

また、淀川流域の中で下水処理場放流水の割合が高い桂川下流域においても調査を実施した。B 下水処理場の放流水、その上流域に位置する C 橋、および下流域に位置する D 橋にて採水した。採水は 2013 年 1 月、6 月、8 月、10 月の 4 回実施した。試料の採水は、ロープをつけたステンレス製のバケツあるいはヤカンを用いておこない、高圧蒸気滅菌したガラス瓶に採水した。下水処理場放流水の試料に関しては、消毒剤である塩素が残留している可能性があるため、中和剤として試料 1 L に対して 10 %チオ硫酸ナトリウム 1 mL を予めガラス瓶に入れて採水した。採水後、瓶は冷却材を入れたクーラーボックスに入れて速やかに実験室に運搬した。

### 3.2 バクテリア回収、DNA 抽出

30 ~ 100 mL の下水サンプルを孔径 0.45 μm のろ紙でろ過し、バクテリアを回収した。PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc, USA)を用いて DNA を抽出した。汚泥サンプルについては、汚泥 2 ~ 3 g から DNA を抽出した。抽出した DNA の濃度は Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA)を用いて測定し、ライブラリーの調整に供した。

### 3.3 薬剤耐性遺伝子ライブラリーの調整

Rafael らの報告<sup>2)</sup>に従い、192 種類の薬剤耐性遺伝子を解析対象とした。192 種類の薬剤耐性遺伝子に対するプライマーを全て混合し PCR 反応を行った。サーマルサイクラーの条件も Rafael らの報告に従った。試料ごとに別々に PCR 反応を行った。PCR 産物のサイズは薬剤耐性遺伝子によって異なるが、概ね 140 ~ 250 bp である。イルミナの TruSeq DNA sample preparation kit を用いて、PCR 産物に対して、試料ごとに異なるアダプター配列を付加した。試料ごとに異なるインデックス配列を含むアダプター配列を付加することによって、インデックス配列情報を基に次世代シーケンサーで得られた配列情報がどの試料由来であるかを識別可能となる。アダプターを付加した PCR 産物は精製後、リアルタイム PCR によって定量し、各試料由来の PCR 産物を等量混ぜ「薬剤耐性遺伝子ライブラリー」とした。

### 3.4 16S rRNA ライブラリーの調整

本研究では、薬剤耐性遺伝子の網羅的検出と同時に、16S rRNA V4 領域を対象にメタゲノム解析を行った。V4 領域(254bp)に対するプライマーを用いて試料ごとに PCR 反応を

行った。プライマーには、V4 領域を認識する配列に加えて識別用のインデックス配列が含まれるよう設計している。薬剤耐性遺伝子のライブラリーと同様に、試料ごとに異なるインデックス配列を付加することによって、インデックス配列情報を基に次世代シーケンサーで得られた配列情報がどの試料由来であるかを識別可能となる。PCR 産物は精製後、リアルタイム PCR によって定量し、各試料由来の PCR 産物を等量混ぜ「16S rRNA ライブラリー」とした。

### 3.5 次世代シーケンサー

イルミナ社製の次世代シーケンサーMiSeqを用いた。「薬剤耐性遺伝子ライブラリー」と「16S rRNA ライブラリー」をある比率で混合し、同時にランを行った。本研究では、300base の配列を解読する試薬を用いた。

### 3.6 データ解析

次世代シーケンサーによって得られたリードの配列情報が、どの薬剤耐性遺伝子に該当するかのアノテーション付は CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio)を用いて行った。具体的には、対象とする 192 種類の薬剤耐性遺伝子の配列情報 (reference) を GenBank から取得し、次世代シーケンサーで得られた配列情報を照合することでアノテーション付した。Reference との相同性が 80%以上の配列を対象とする薬剤耐性遺伝子として採用した。検出された薬剤耐性遺伝子の種類と、各薬剤耐性遺伝子の数(リード数)を、試料間で比較した。具体的には、下水処理場内の試料については、各処理プロセスにおける DNA 濃度 (水試料 : ng-DNA/mL-sample、汚泥試料 : ng-DNA/mg-sludge)に各耐性遺伝子のリード数の割合をかけることで、各耐性遺伝子の濃度(水試料 : ng-DNA/mL-sample、汚泥試料 : ng-DNA/mg-sludge)を算出した。こうすることで半定量的ではあるが、各耐性遺伝子の存在量を試料間で比較した。淀川流域桂川の上流域、下流域試料、および中間地点の下水処理場放流水試料については、リード数の 4 回の調査の中央値と最大値、最小値から試料間の薬剤耐性遺伝子の種類と数を比較した。

16S rRNA のアノテーション付は、フリーの解析サーバー Metagenomics RAST (MG-RAST) (<http://metagenomics.anl.gov/>)によって実施した。閾値は 95%にセットして解析を行った。Class レベルおよび Genus レベルでの細菌の分類を行い、試料ごとにトータルのリード数に対する個々の Class または Genus のリードの割合を算出し、試料間で細菌の群集構造を比較した。

## 4. 研究成果

### 4.1 下水処理プロセスにおける薬剤耐性遺伝子のプロファイルの変化

流入下水において、トータルで約 20 万リ

ードの配列が得られ、115 種類の薬剤耐性遺伝子が検出された。検出された個々の薬剤耐性遺伝子のリード数は数リードから数万リードまでの大きな幅がみられた。数万リード以上検出された薬剤耐性遺伝子は以下のとおりである。 *aacA7*(GenBank Accession number: AF263520), *strB* (NC004840)、*aadA12* (AY665771、以上、アミノグリコシド系に対する耐性遺伝子)、*acrD* (U12598、multidrug efflux ポンプに対する耐性遺伝子)、*blaTEM-1b* (AJ851089)、*ges3* (AY494717)、*oxa10* (AY115475)、*oxa5* (X58272、以上、βラクタム系に対する耐性遺伝子)、*catB4* (AF322577、クロラムフェニコールに対する耐性遺伝子)、*ermB* (M11180)、*mefA* (AJ71549)、*mefE* (AF274302、以上マクロライド系に対する耐性遺伝子)、*qacF* (AY139598)、*qacE delta1* (AJ698325、以上、small multidrug efflux プロテイン)、*sul1* (NC006388、スルホンアミド系に対する耐性遺伝子)、*tet (M)* (X90939)、*tetA* (L06940)、*tetQ* (L33696、以上テトラサイクリンに対する耐性遺伝子)等であった。

流入下水、初沈越流水、二次処理水、塩素処理水、初沈汚泥、活性汚泥での一部の薬剤耐性遺伝子濃度(水試料 : ng-DNA/mL-sample、汚泥試料 : ng-DNA/mg-sludge)の比較を図 1 に示す。

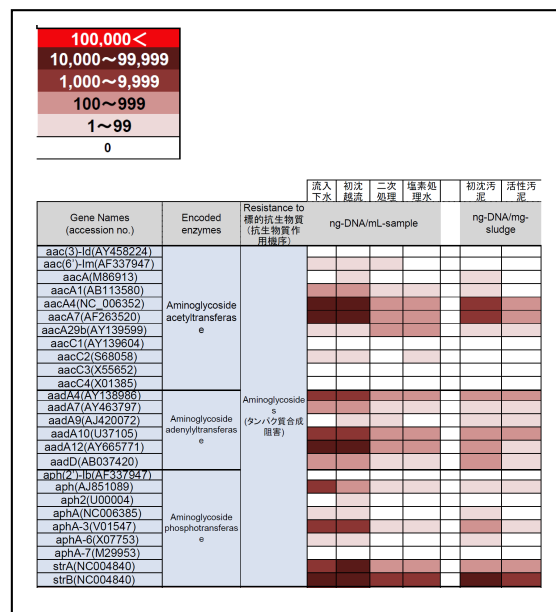


図 1 処理プロセスでの薬剤耐性遺伝子の变化

図 1 より、流入下水で検出された薬剤耐性遺伝子の種類と濃度が初沈越流水、二次処理水で減少していることが確認された。ほとんどの薬剤耐性遺伝子の濃度は、最終沈澱池越流水では、流入下水に比べて、100~1000 分の一に減少していた。また、初沈汚泥でも流入下水とほぼ同じ種類の耐性遺伝子が検出されたが、活性汚泥では、初沈汚泥に比べて、その濃度は 10~100 分の一に減少していた。検出された薬剤耐性遺伝子の種類の数その

ものも処理過程で減っており、流入下水で115種類検出されていたのに対して二次処理水では91種類、塩素処理水では95種類に減少していた。この結果から、下水処理場には流入下水によって多種類の薬剤耐性遺伝子が流入していること、および下水処理過程でそれらがある程度除去されていることが確認できた。

#### 4.2 バクテリア群集構造の解析

下水処理場内の各試料に対して、数千リードの16S rRNA 遺伝子配列が得られた。流入下水における Class レベルのバクテリアの分類は以下の通りであった。Unknown バクテリア (約 25%)、Clostridia (20%)、Gammaproteobacteria (15%)、Bacteroides (15%)、Negativicutes (8%)、Bacilli (5%)、Actinobacteria (4%)、Flavobacteriia (2%)、Epsilonproteobacteria(1%)、Betaproteobacteria (1%) であった。これらのうちで、Actinobacteria、Flavobacteriia、Betaproteobacteria 以外のバクテリアについては下水処理過程でのリード数の割合の減少が確認された。さらに、Genus レベルで解析した場合、薬剤耐性菌の報告例のある Actinobacter、Pseudomonas、Bacteroides、Prevotella、Enterococcus および Streptococcus 等リード数の割合の減少が確認された。薬剤耐性遺伝子の下水処理過程でのリード数の減少と関連が考えられる。

#### 4.3 桂川における薬剤耐性遺伝子のプロフィールの変化

桂川の上流域に位置するC橋、下流域に位置するD橋、および中間地点のB下水処理場放流水試料における薬剤耐性遺伝子のリード数を図2に示す。プロットは4回の調査の中央値、エラーバーは最大値と最小値を示す。

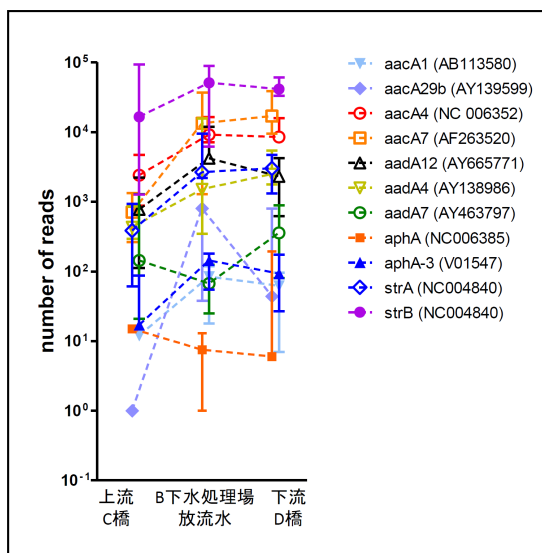


図2 河川流下過程での薬剤耐性遺伝子の変化

多くの薬剤耐性遺伝子で、上流域に比べて

下水処理場放流水に含まれる薬剤耐性遺伝子の存在量が多いことがわかる。また、下流域では、下水処理場放流水よりは少ないが、上流域よりは存在量が増えていることがわかる。下水処理場放流水の影響が疑われる。

#### 4. 結論

流入下水において115種類の薬剤耐性遺伝子が検出された。検出されたリード数は、最終沈澱池越流水では流入下水に比べて100~1000分の一に減少していた。16S rRNAに基づくバクテリア群集構造解析の結果からも、薬剤耐性遺伝子の検出の報告例がある既知のバクテリアの割合が下水処理によって減少することが確認できた。下水処理によるバクテリア除去に伴って、薬剤耐性遺伝子が除去されていることが示唆された。

河川において、下水処理場からの放流水が入ってくる前後で薬剤耐性遺伝子の存在量に変化しており、河川環境への下水処理場からの薬剤耐性遺伝子の排出が懸念された。

#### 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 0件)

[学会発表](計 5件)

1) 井原賢, 堅川陽平, 李善太, 松田知成, 山下尚之, 田中宏明. 次世代シーケンサーを用いた、下水処理場における薬剤耐性遺伝子の網羅的検出. 第16回水環境学会シンポジウム 2013

2) Ihara M, Lee S, Katakawa Y, Yamashita N, Matsuda T, Tanaka H: Analysis of microbial community in wastewater treatment plant by next generation sequencing, 17th IWA International Health Related Water Microbiology, Santa Catarina, Brazil, 2013.9.17

3) 井原賢, 李善太, 堅川陽平, 花本征也, 佐久間亮輔, 松田知成, 山下尚之, 田中宏明, 次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析, CREST横断ミーティング「病原微生物と持続可能な水利用」, 2013.10.22

4) Masaru Ihara, Suntae Lee, Yohei Katakawa, Naoyuki Yamashita, Tomonari Matsuda, Hiroaki Tanaka, 下水中の微生物のメタゲノム解析および薬剤耐性遺伝子の検出, 第3回NGS現場の会, 2013.9.4 神戸

5) Masaru Ihara, Tomonari Matsuda, Suntae Lee, Hiroaki Tanaka: Basic consideration of detection of pathogens using next generation sequencer, 4th IWA Young Water Professional Conference 2012, Tokyo, Japan

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井原賢（ ）

研究者番号：70450202

##### (2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

松田知成（ ）

研究者番号：50273488

田中宏明（ ）

研究者番号：70344017

山下尚之（ ）

研究者番号：90391614

中田典秀（ ）

研究者番号：00391615