

## リアルタイム PCR 法による下水処理過程における薬剤耐性遺伝子の定量

大分工業高等専門学校 正会員 ○古川 隼士  
 大分工業高等専門学校 学生会員 橋本 怜奈  
 独立行政法人水産総合研究センター 非会員 米加田 徹  
 宮崎大学大学院 学生会員 西山 正晃  
 宮崎大学 正会員 鈴木 祥広

### 1. はじめに

近年、感染症の治療薬として利用されている抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌の発生が問題となっており、河川等の水環境における検出・感染事例も報告され始めている<sup>1, 2)</sup>。また、2010年には耐性菌の感染者が死亡するケースも報告されており、社会的な衝撃を与えている。薬剤耐性菌の中でも、バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci : VRE) は、現存するすべての抗生物質に耐性を示すことが指摘されていることから、重大な感染症を引き起こす原因菌として問題視されている薬剤耐性菌の1つである。薬剤耐性菌は、通常、流域で発生し排水等に含まれる可能性があり、それを介して河川や沿岸域に流入すると考えられる。その結果、薬剤耐性菌の水系全体への拡散、さらには耐性遺伝子が他の微生物へ水平伝搬することによる新規の薬剤耐性菌の発生が危惧される。

一方で、下水道は都市域から薬剤耐性菌をはじめとする病原性微生物を効果的に集約することができるシステムであるといえる。したがって、薬剤耐性菌、およびその耐性遺伝子を効果的に不活性化できるプロセスを下水処理システムに導入できれば、水環境への拡散を大幅に削減することが可能となると考えられる。しかしながら、従来の下水処理システムにおける薬剤耐性菌、あるいは耐性遺伝子の存在実態および消長に関する知見・情報は少ないのが現状である。そこで、本研究では、VREのバンコマイシン耐性遺伝子である *vanA*、および *vanB* を対象とし、下水処理プロセスにおける存在実態を明らかにすることを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2. 1 試料採取および腸球菌の計数

水試料は、大分県内のA下水処理場において採取した。試料採取は、2013年6月20日、11月7日、および2014年1月17日に行った。採取場所は、最初沈澱池流入口(流入下水)、反応タンク(反応タンク水)、最終沈澱池越流口(二次処理水)、および消毒槽(消毒水)とし、各槽からロープ付きバケツで採取し、1-Lポリエチレン瓶に保存して実験室に持ち帰った。

腸球菌数の計数は、メンブランフィルター法に従って行った。10 μL~100 mLの水試料をメンブランフィルター(Advantec, 孔径 0.45 μm)を用いてろ過し、フィルターを腸球菌選択培地である membrane-Enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside 寒天培地(mEI培地)上に載せ、41±0.5 °Cで24時間培養した。培養後、フィルター上の青色のコロニーを腸球菌として計数した。

#### 2. 2 DNA抽出

各水試料の前処理として、はじめに最初沈澱池流入口および反応タンクから採取した試料は、ふるい(目開き 150 μm)に通水させ夾雑物を除去した。10~500 mLの各下水試料をメンブランフィルター(Millipore, 孔径 0.45 μm)を用いてろ過し、10 mLの滅菌済蒸留水を入れた50-mL遠心管にフィルターを入れ、10分間のボルテックス操作を行った。フィルターを取り除いた遠心管は、14,000 rpmで10分間の遠心分離を行い、上澄を除去した。遠心管中の沈殿物について、DNeasy Blood & Tissue Kit(Quiagen)を用いてDNA抽出を行った。使用方法はキットの説明書に従った。DNA抽出液は、以降の実験に用いるまで-20 °Cで保存した。

#### 2. 3 リアルタイム PCR 法による定量

リアルタイム PCR 法によるバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*) の定量は、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (東洋紡)を用いて行った。

表1 プライマーとプローブの塩基配列

標的遺伝子		塩基配列 (5'-3')	配列位置
<i>vanA</i>	Forward primer	TCAGGCTGCA GTACGGAATCT	640-660
	Reverse primer	GTCCTCGTCTCTGCTGAA	750-731
	TaqMan probe	AAAACGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGA	700-727
<i>vanB</i>	Forward primer	GTCGGCGAAGTGGATCAAAT	655-674
	Reverse primer	TGGAACGATAATCATCGCATTC	756-735
	TaqMan probe	AGCCACGGTATCTTCCGCATCCATC	682-706

使用法はキットの説明

書に従い、反応液のプライマーおよびプローブの最終濃度は、それぞれ 0.3 μM および 0.25 μM とした。プライマーおよびプローブは、Primer Express Software

キーワード 薬剤耐性菌, バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE), *vanA*, *vanB*, リアルタイム PCR 法  
 連絡先 〒870-0152 大分県大分市牧 1666 番地 TEL. 097-552-7614

Version 3.0.1 (Applied Biosystems) を用いて設計した (表 1)。反応液は, Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems) に供し, 反応条件は, 95 °C で 60 秒の初期変性後, 95 °C で 15 秒および 60 °C で 45 秒のサイクルを 45 回繰り返した。

3. 結果と考察

3. 1 各下水試料における腸球菌数

図 1 に各下水試料の腸球菌数を示す。流入下水試料からは,  $1.2 \times 10^6$  CFU/100 mL の濃度で腸球菌が検出された。しかしながら, 下水処理プロセスを経ることで腸球菌数は減少していき, 消毒水の試料中の腸球菌数は 10 CFU/100 mL 以下であった。腸球菌は, 下水処理プロセスによって極めて効果的に除去されていることが確認された。

3. 2 VRE 耐性遺伝子の定量

図 2 にリアルタイム PCR 法による各下水処理試料の VRE 耐性遺伝子の定量結果を示す。*vanA* 遺伝子は, 11 月 7 日の流入下水, および 1 月 17 日の反応タンク水と二次処理水の各試料を除くすべての試料から検出された。最も高濃度で *vanA* 遺伝子が検出された下水試料は, 6 月 20 日の流入下水試料であった ( $2.4 \times 10^3$  copy/mL)。*vanB* 遺伝子についてみると, *vanB* 遺伝子は 6 月 20 日の流入下水および二次処理水, ならびに 11 月 7 日の消毒水の各試料を除いて検出された。*vanB* 遺伝子が比較的高濃度で検出された試料は, 6 月 20 日 ( $9.2 \times 10^2$  copy/mL) と 1 月 17 日 ( $1.1 \times 10^3$  copy/mL) のいずれも消毒水試料であり, 11 月 7 日とは対照的であった。また, 各水試料における耐性遺伝子の変動を概観すると, VRE 耐性遺伝子は各処理過程において減少する傾向は示さなかった。したがって, 下水処理過程において腸球菌は除去されるが, 耐性遺伝子は下水試料中に残存している可能性が示唆された。

4. まとめ

- (1) 下水処理過程において, 腸球菌は効果的に除去されている。
- (2) *vanA* および *vanB* 耐性遺伝子は, ほとんどの下水試料から検出され, 各処理過程においても減少する傾向は示さなかった。
- (3) 下水処理過程において VRE 耐性遺伝子は, 下水試料中に残存していることが示唆された。

謝辞

本研究は, 公益財団法人発酵研究所平成 25 年度一般研究助成, および公益財団法人クリタ水・環境科学振興財団平成 25 年度国内研究助成の一環として実施した。記して謝意を表する。

参考文献

- 1) Servais, P., and Passerat, J., Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total Environ.*, 408, 365-372, 2009.
- 2) Sidrach-Cardona, R., and Bécares, E., Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands. *Ecol. Eng.*, 50, 107-111, 2013.

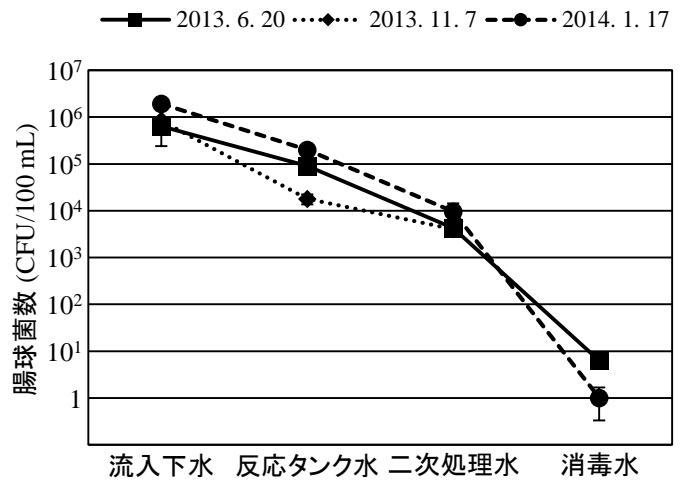


図1 各下水試料の腸球菌数

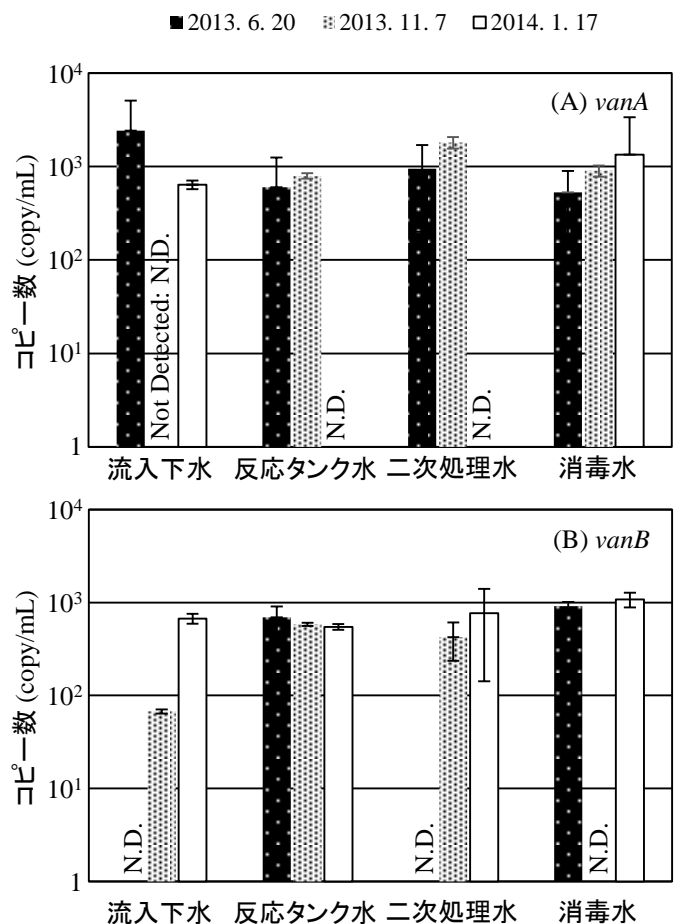


図2 VRE耐性遺伝子の定量