

異なる下水処理方式を対象とした多剤耐性菌割合と耐性遺伝子獲得の特徴

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○葛西 樹生
 正会員 上村 繁樹, 大久保 努
 新潟薬科大学 正会員 井口 晃徳
 近畿大学工業高等専門学校 正会員 安井 宣仁

1 目的

新型コロナウイルスによるパンデミック以降、開催された G7 では隠れたパンデミックへの備えとして薬剤耐性菌対策が重要課題に挙げられた¹⁾。薬剤耐性菌(以下 耐性菌)とは細菌の生育を阻害する効果を持つ抗生物質に対して耐性をもつ細菌のことであり、近年抗生物質の使用に伴い耐性菌も増加し、複数の種類の抗生物質の耐性をもつ多剤耐性菌も出現している。耐性菌による死亡者数は年々増加し、その死亡者の約半数がアジア地域に集中しており、抗生物質使用量の増加と適正な下水処理が施されないことによる水環境の悪化が要因として考えられる。

そのため現在、下水処理過程における耐性菌の動態に関する研究が進められている。途上国での実装が進められている DHS (Down-flow Hanging Sponge) システムを対象として、下水処理前後で多剤耐性菌割合が増加する傾向が確認されている²⁾。活性汚泥法でも同様の傾向を示しており³⁾、汚泥滞留時間や保持汚泥濃度の違いが、薬剤耐性遺伝子の受け渡し環境の形成に影響していると考えられた。

種々ある下水処理技術での耐性遺伝子の伝搬機構や耐性菌群集の動態は不明な点が多く、それら特徴を明らかにすることは耐性菌パンデミックを制御する上で重要である。本研究では、最初沈殿池下水を処理する DHS 法と標準活性汚泥法を対象とし、処理前後における耐性菌割合や微生物群集の変化を解析し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2.1 実験試料

実験に供した試料は、国内で稼働中の DHS リアクター (HRT3.2 時間) より採取し、最初沈殿池の初沈下水 (Inf) 及び 5 段目処理水 (D-Eff)、比較対象として同じ最初沈殿池から分流している活性汚泥処理水 (K-Eff) の計 3 種類を対象とし、年 4 回測定した。

2.2 薬剤感受性試験手順

キーワード 多剤耐性菌, DHS, 微生物濃度, *Escherichia* 属, *Shigella* 属

連絡先 〒292-0041 千葉県木更津市清見台東 2-11-1 木更津高専 TEL : 0438-30-4165 E-mail : okubo@c.kisarazu.ac.jp

以下の手順に従って、薬剤耐性菌を測定した。

1. 採取した試料を 0.1% ペプトン水にて希釈し、クロモカルトコリフォーム寒天培地 (メルク株式会社) にて 35°C, 24 時間培養する。
2. 生成したコロニー数をカウントした後、白金耳にてコロニーを 1 個ずつ釣菌しトリプトソイブイオン液体培地 (日本製薬株式会社) に接種し 35°C, 4 時間培養する。各試料にて形成された 96 コロニーを釣菌した。
3. 培養した培養液 80 μ L をミューランヒントン S 寒天培地 (栄研化学株式会社) に塗布し、抗生物質を含有した KB ディスク (栄研化学株式会社) をミューランヒントン S 寒天培地上に貼付け、35°C, 18 時間培養する。本実験では、表 1 に示した 6 種類の抗生物質 (カナマイシン (KM), セフジニル (CFDN), アンピシリン (ABPC), テトラサイクリン (TC), レボフロキサシン (LVFX), スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST)) に対し耐性の有無を評価する。
4. 発現した阻止円の直径 (mm) を測り、表 1 の判定に従い耐性を判定する。本実験では、「耐性」及び「中耐性」を判定域として扱う。

表 1 薬剤耐性判定表

抗生物質	阻止円の直径 (mm)		
	耐性	中耐性	感性
カナマイシン (KM)	≤13	14-17	18≤
セフジニル (CFDN)	≤16	17-19	20≤
アンピシリン (ABPC)	≤13	14-16	17≤
テトラサイクリン (TC)	≤11	12-14	15≤
レボフロキサシン (LVFX)	≤13	14-16	17≤
スルファメトキサゾール トリメトプリム (ST)	≤11	11-15	16≤

2.3 サンガーシーケンスによる微生物種の同定

2.2 薬剤感受性試験手順 3 のシングルコロニー由来の各培養液を 96 ウェルプレートに分注し、ダイレクト PCR 法により真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅させた。増幅 DNA 断片をサンガー法により解読し、500-600 bp を BLAST 解析により微生物種の同定 (属レベル) を行った。

3 実験結果及び考察

3.1 多剤耐性菌の存在割合の変化

図1に処理前後における多剤耐性菌の存在割合の変化を示す。また、1個釣菌した菌の内、X種類以上の抗生物質の耐性を持つ菌をX剤耐性菌とし、X耐性菌が全体で釣菌した96個の内、どの程度存在するのかを百分率で表したものを本研究では存在割合と定義し、以下の式(1)で示す。

$$\text{存在割合(\%)} = (X/96) \times 100 \quad (1)$$

1~6剤耐性菌で分類した結果、Inf < K-Eff < D-Eff と存在率は上昇した。K-Effにおいては、1~4剤耐性菌存在割合をInfと比べるとそれぞれ17%、13%、9%、6%上昇し、D-Effも同様に29%、24%、20%、13%上昇した。一方、5と6剤耐性菌はD-Effで比較的多く検出され、多剤耐性菌はDHS処理前後で残存または耐性遺伝子の受け渡しにより積極的に行われていることが示唆される。これらの結果より、活性汚泥含めて下水処理においては、汚泥濃度と汚泥滞留時間が耐性菌の動態に影響すると考えられる。

3.2 微生物群集解析結果

微生物群集解析では、全体的にサンプル毎や季節変化などで一定な傾向を観察することはできなかった。しかし、微生物群集で半分以上の割合を占めた *Escherichia* 属及び *Shigella* 属に着目し、図2に *Escherichia* 属及び *Shigella* 属における各種抗生物質耐性率の変化の比較を示した。全体的にどちらも Inf < K-Eff < D-Eff で耐性率は上昇しており、*Shigella* 属の ABP 耐性率や Inf の耐性率は *Escherichia* 属よりも高い傾向を示した。しかし、比較的 *Escherichia* 属の方が処理前後で耐性率の伸びは大きく、LVX は Inf では2%からK-Effで7%、D-Effで30%とDHS処理前後で特に大きく上昇し、KMでも同様の傾向を示した。以上のように同じ腸内細菌科である微生物でも属レベルの違いによって薬剤耐性遺伝子の獲得に対して特異的な特徴を有することが示唆された。

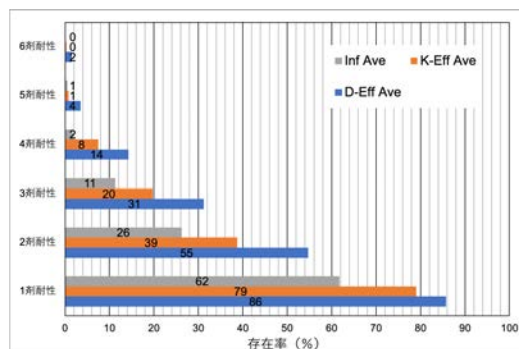


図1 処理前後における多剤耐性菌割合の変化

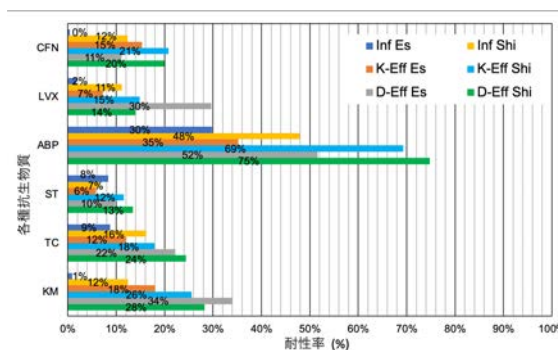


図2 *Escherichia*属及び*Shigella*属における各種抗生物質耐性率の変化の比較

4 まとめ

1年間における、最初沈殿池水、活性汚泥処理水及びDHS処理水を対象とした薬剤感受性試験と微生物群集解析を行った結果を以下に示す。

- 多剤耐性菌存在割合は、Inf < K-Eff < D-Effの順となった。
- 下水処理過程における薬剤耐性遺伝子の伝播や受け渡しは、微生物濃度と汚泥滞留時間が影響すると示唆された。
- *Escherichia* 属は *Shigella* 属と比べ、薬剤耐性遺伝子の獲得に優れている特徴を有することが示された。

以上の結果により、DHS法が大腸菌を効率的に処理できる反面、処理水中には薬剤耐性菌割合が高くなることが明らかになった。加えて、薬剤耐性菌は無耐性の菌と比べて、塩素消毒及びUV耐性を有することが知られている⁴⁾。これらの結果を踏まえ、薬剤耐性菌を水環境に排出し新たな耐性菌を生み出さないためにも、薬剤耐性菌除去を目的とした効率的な消毒方法の検討が必要である。

参考文献

- 1) 日本経済新聞、薬剤耐性菌次のパンデミックの恐れもコロナで懸念、ナショナルグラフィック、<https://www.nikkei.com/article/DGXZQOUD072CQ0X00C22A2000000/>, 閲覧日2022年12月1日。
- 2) 葛西ら、下水処理DHSシステムにおける薬剤耐性菌割合と微生物群集の変遷、土木学会第49回関東支部技術研究発表会、2022。
- 3) 平成22年度下水道管径調査研究年次報告書、水環境中における病原微生物の消長に関する研究、土木研究所資料。
- 4) 安井宣仁、薬剤耐性大腸菌の塩素・紫外線照射による不活性化特性、近畿大学工業高等専門学校研究紀要、3, pp.91-95, 2019。