

# 下水処理過程におけるバンコマイシン耐性腸球菌の存在実態調査

大分工業高等専門学校 学生員 ○橋本怜奈  
大分工業高等専門学校 正会員 古川隼士  
水産総合研究センター 非会員 米加田徹

## 1. はじめに

近年、河川や湖沼等の陸水のみならず、沿岸域においてもふん便性指標細菌による汚染・感染に関する事例が報告されている。また、抗生物質に対して抵抗性を示すふん便指標細菌も環境中から検出されていることが、先進国とされる日本や欧米においても問題視されている。バンコマイシン耐性腸球菌 (*vancomycin resistant enterococci*; 以下 VRE) は、現存するすべての抗生物質に耐性がある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<sup>1)</sup>。VREは腸球菌であるため、重要な発生源の1つとして、下水処理場も考えられる。しかしながら、下水処理場で、下水処理を行い、薬剤耐性菌自体は不活化するが、耐性遺伝子が残存する場合がある。

そこで本研究では、薬剤耐性菌の発生源のひとつとして考えられている下水処理場における VRE とその耐性遺伝子 (*vanA*, *vanB*) の消長を明らかにすることを目的とした。具体的には、①下水試料から回収した腸球菌株について最少発育阻止濃度 (MIC) 試験を実施し、VRE の存在実態を明らかにした。同時に、②下水試料から抽出したゲノム DNA について、リアルタイム PCR 法によって耐性遺伝子を定量し、その消長について検討した。

## 2. 実験材料および方法

### 2. 1 調査概要

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、2014 年 1 月 17 日、10 月 28 日、および 12 月 10 日に行った。採取場所は、①最初沈澱池流入口 (流入下水)、②反応タンク (反応タンク水)、③最終沈澱池越流口 (二次処理水)、および④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り、直ちに分析に用いた。2014 年 10 月 28 日と 12 月 10 日の水試料は、耐性遺伝子のみを調査対象とした。

### 2. 2 腸球菌の計数と単離・回収

腸球菌の計数は、メンブレンフィルター法に従って行った。10  $\mu$ L~300 mL の水試料をメンブレンフィルター (孔径 0.45  $\mu$ m, Advantec) でろ過した。ろ過したメンブレンフィルターを mEI 寒天培地に置き、これを

41.0 $\pm$ 1.0  $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後にフィルター上に形成された青色のコロニーを腸球菌として計数した。計数後、各試料のコロニーを単離・回収し、MIC 試験に供した。

### 2. 3 MIC 試験

MIC 試験は、日本化学療法学会により設定された抗菌薬感受性測定 of 標準法に基づき、一部改変して実施した<sup>2)</sup>。

### 2. 4 水試料中からの DNA の抽出

10~500 mL の各下水試料をメンブレンフィルター (Millipore, 孔径 0.45  $\mu$ m) 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、PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MO BIO) 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  $^{\circ}$ C で保存した。

### 2. 5 リアルタイム PCR 法による耐性遺伝子の定量

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。使用方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  $\mu$ M および 0.25  $\mu$ M とした。プライマーおよびプローブは、Primer Express Software Version 3.0.1 (Applied Biosystems) を用いて設計した。反応液は、Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems) に供し、反応条件は、95  $^{\circ}$ C で 60 秒の初期変性後、95  $^{\circ}$ C で 15 秒および 60  $^{\circ}$ 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 腸球菌の計数

図 1 に各地点における腸球菌数を示す。流入下水の腸球菌数は、10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cfu/100 mL オーダーで検出されたが、下水処理プロセスを経ることで、10 cfu/100 mL 以下まで減少した。腸球菌の除去率は、5 log 以上であった。このことから、下水処理プロセスによって、腸球菌は効果的に削減されることが確認された。

### 3. 2 MIC 試験

表 1 に MIC 試験の結果を示す。単離株数は、流入下水は 159 株、反応タンク水は 158 株、二次処理水は 157

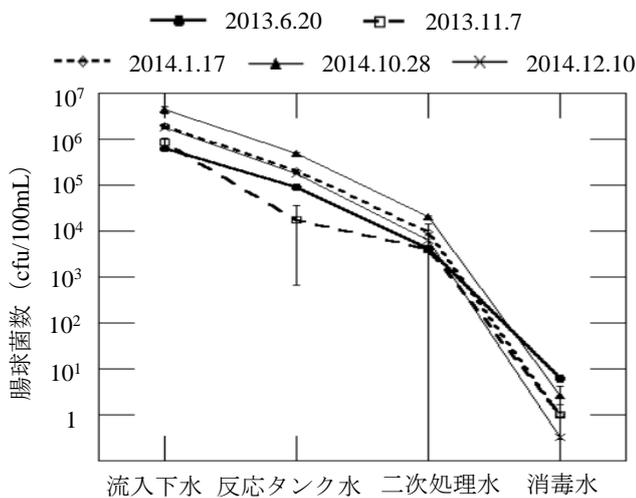


図1 各下水試料の腸球菌数

株, 消毒水は 31 株単離した. 耐性菌の株数は, 流入下水と反応タンク水で濃度 128  $\mu\text{g/mL}$  のバンコマイシン (VCM) に耐性をもつ菌が 1 株ずつ検出された. また, 4 地点すべてで低濃度の VCM に耐性をもつ菌が検出された. 以上の結果から, 下水処理場で VCM に耐性をもつ菌が存在することがわかった.

### 3. 3 薬剤耐性遺伝子の定量

図 2 にリアルタイム PCR 法による下水処理試料の 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. *vanB* 遺伝子についてみると, 6 月 20 日の流入下水および二次処理水, 11 月 7 日の消毒水, 10 月 28 日の二次処理水, および 12 月 10 日の反応タンク水の各試料を除いて検出された. *vanA* 遺伝子と *vanB* 遺伝子を概観すると, どちらもコピー数が減少する傾向を示さなかったことがわかる. さらに, 消毒水からも耐性遺伝子が検出されていることから, 下水処理過程において腸球菌自体は除去されるが, 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) 下水処理場における腸球菌数は, 下水処理過程を経ることで減少することが確認された.

(2) MIC 試験により, VCM に耐性をもつ菌が存在することがわかった.

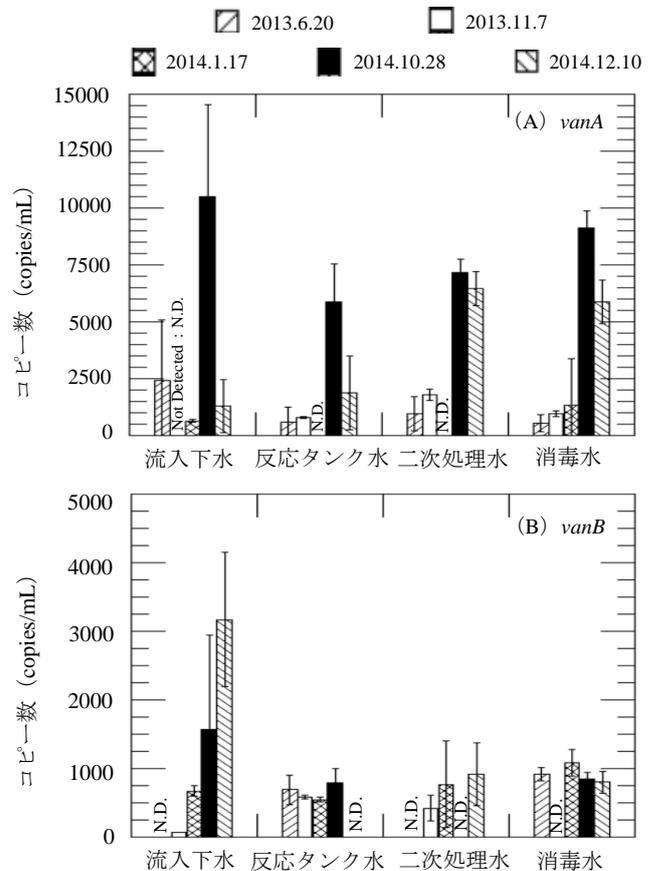


図2 VRE耐性遺伝子の定量

(3) VRE 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.

## 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) Ham, Y., Kobori, H., Kang, J., Matsuzaki, T., Iino, M., and Nomura, H.; Distribution of antibiotic resistance in urban watershed in Japan, *Environmental Pollution*, 162, 98-103, 2012.
- 2) 日本化学療法学会抗菌感受性測定法検討委員会報告;微量液体希釈による MIC 測定法(微量液体希釈法) -日本化学療法学会標準法-, *CHEMOTHERAPY*, 38, 102-105, 1989.

表1 MIC試験の結果

採取場所	単離株数	発育株数 (株)							
		VCM濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )							
		0	2	4	8	16	32	64	128
流入下水	159	155	1	2	0	0	0	0	1
反応タンク水	158	155	1	1	0	0	0	0	1
二次処理水	157	152	2	3	0	0	0	0	0
消毒水	31	27	3	1	0	0	0	0	0