

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（Antibiotic Resistant Bacteria：ARB）の河川等における検出事例も報告され始めており、新たな水環境問題として危惧されている。ARB 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 ARB の一つである。一方で、下水中には膨大な微生物量、豊富な栄養塩類、および多種多様な抗生物質が含まれる可能性があることから、下水処理場は ARB の生存に適した環境になる可能性があり、水環境への主要な排出源として考えられる。しかしながら、下水処理過程における ARB およびその耐性遺伝子の存在実態および消長に関する知見・情報はそれほど多くないのが現状である。そこで本研究では、VRE およびその耐性遺伝子である *vanA*、*vanB* 遺伝子を対象とし、下水処理過程における調査を実施した。

2. 調査概要および実験方法

2.1 調査概要

下水および汚泥試料は、大分県内の下水処理場において採取した。試料採取は、2015 年 6 月から 2015 年 10 月に、月に 1 回行った。採取地点は、下水試料である地点 1 の最初沈澱池流入口、地点 2 の反応タンク、地点 3 の最終沈澱池越流口、および地点 4 の消毒槽と、汚泥試料である地点 5 の最初沈澱池汚泥、地点 6 の最終沈澱池汚泥、および地点 7 の返送汚泥とした。分析項目は、各種細菌として従属栄養細菌、大腸菌群、大腸菌、および腸球菌、ならびに一般水質項目（pH、電気伝導度）とした。

2.2 従属栄養細菌株の薬剤感受性

下水処理過程における ARB の存在実態を明らかにするために、単離・回収した従属栄養細菌株に対して薬剤感受性試験を行った。スクリーニング試験

は、96 ウェルプレートに従属栄養細菌懸濁液と濃度 $8.0 \mu\text{g/mL}$ に調整したバンコマイシン（VCM）水溶液を規定量添加し、その後 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 24 時間インキュベーションした。培養後、各ウェルの腸球菌株の増殖の確認を行った。この増殖が確認された従属栄養細菌株を用いて、日本化学療法学会の最小発育阻止濃度（MIC）試験を実施した。

2.3 下水・汚泥試料中の耐性遺伝子の定量

下水処理過程における *vanA* および *vanB* 遺伝子の消長を検討するために、リアルタイム定量 PCR 法を用いて、各試料中の遺伝子数（コピー数）を定量した。各試料からのゲノム DNA 抽出およびコピー数の定量は Furukawa et al. の報告に従って実施した¹⁾。

3. 結果と考察

3.1 細菌の計数

図 1 に各地点における従属栄養細菌の菌数を示す。下水試料である地点 1～4 について見ると、地点 1 の流入下水の従属栄養細菌数は、 $10^8 \sim 10^9$ 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、地点 4 の消毒水では $10^5 \sim 10^6$ cfu/100 mL まで削減した。従属栄養細菌の除去率は、3 log 以上であった。汚泥試料である地点 5～7 について見ると、地点 5 の初沈汚泥は $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/100 mL オーダーで検出されたが、地点 6 の終沈汚泥と地点 7 の返送汚泥は $10^8 \sim 10^9$ cfu/100 mL オーダーで検出された。腸

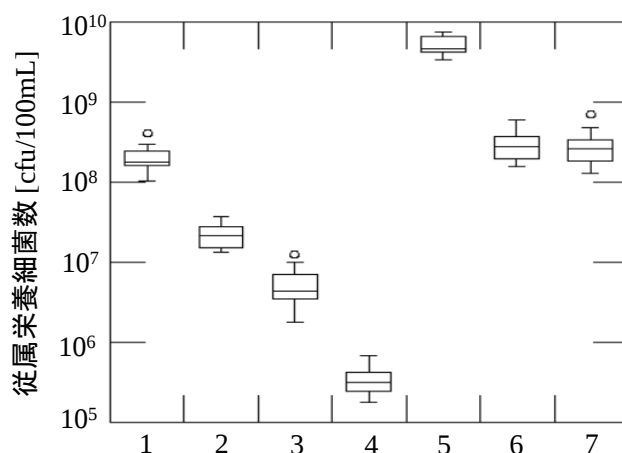


図1 下水・汚泥試料の従属栄養細菌数

表1 MIC試験の結果

試料	単離株数	陽性株数*	発育株数 [株]				
			VCM濃度 [$\mu\text{g/mL}$]				
			8	16	32	64	128
1	193	154	14	3	4	4	129
2	192	150	7	0	7	2	134
3	190	108	8	5	9	6	80
4	192	36	1	0	0	0	35
5	193	134	16	0	10	10	98
6	180	135	14	0	12	3	106
7	193	105	11	6	9	3	76

* 濃度8.0 $\mu\text{g/mL}$ のVCMに耐性を示した従属栄養細菌株数

球菌，大腸菌，および大腸菌群についても，従属栄養細菌と同様の結果が得られた．よって，下水処理プロセスによって，細菌は効果的に削減されることが確認された．

3.2 スクリーニング試験および MIC 試験

表1にスクリーニング試験によって濃度8.0 $\mu\text{g/mL}$ のVCMに耐性を示した従属栄養細菌株について実施した，MIC試験の結果を示す．その結果，7地点すべてで濃度128 $\mu\text{g/mL}$ のVCMに耐性を有する細菌数は，多数存在し，消毒水からも35株検出されたことから，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．また，汚泥中にもARBが存在することがわかった．

3.3 耐性遺伝子の定量

図2にリアルタイムPCR法による下水・汚泥試料の vanA 遺伝子の定量結果を示す． vanA 遺伝子は，7地点すべての試料から検出され，減少する傾向は示さなかった．また，下水試料と汚泥試料の耐性遺伝子のコピー数を比べると，汚泥試料からも下水と同程度あるいはそれ以上のコピー数で検出されることがわかった．また， vanB 遺伝子についても同様の結果が得られた．以上の結果より，消毒水からも耐性遺伝子が 1.3×10^3 copies/mL検出されていることから，

下水処理場においてもARBおよび耐性遺伝子が潜伏し，その一部は水環境中に放流されている可能性が示唆された．

4. まとめ

- 1) 下水処理場による従属栄養細菌の除去率は3 log以上であり，効果的に削減されることが確認された．
- 2) MIC試験より，7地点すべてで濃度128 $\mu\text{g/mL}$ のVCMに耐性を有する細菌が多数存在し，消毒水からも35株検出されたことから，下水処理場でVCMに耐性を有する細菌が存在することがわかった．
- 3) vanA および vanB 遺伝子のコピー数はどちらも減少する傾向を示さなかった．また，下水試料と汚泥試料のコピー数を比べると，耐性遺伝子は，汚泥試料の方が多いことから，汚泥中に残存する傾向があることがわかった．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，下水処理場からARBおよび耐性遺伝子が放流されている可能性が示唆された．

謝辞

本研究の一部は，科学研究費補助金(若手研究(B)，研究代表者：古川隼士，課題番号：15K21596)によって行われた．

参考文献

- 1) Furukawa, T., Hashimoto, R., and Mekata, T.: Quantification of vancomycin-resistant enterococci and corresponding resistance genes in a sewage treatment plant, Journal of Environmental Science and Health Part A, 50, 989-995, 2015.

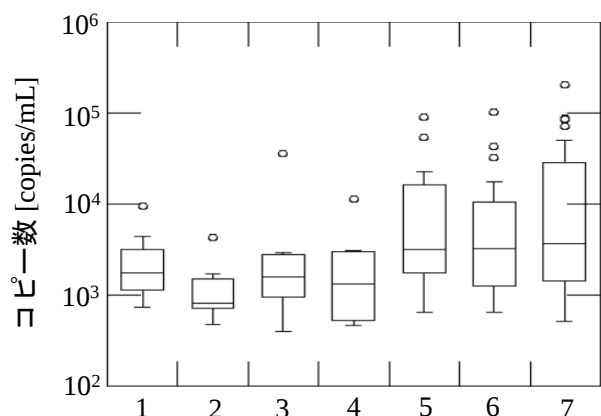


図2 耐性遺伝子の定量