

抗生物質の添加に対する活性汚泥中の耐性遺伝子の応答

山形大学農学部 学生員○澁木理央
 山形大学農学部 正会員 西山正晃
 カセサート大学工学部 非会員 Chart Chiemchaisri
 カセサート大学工学部 非会員 Wilai Chiemchaisri
 山形大学農学部 正会員 渡部 徹

1. はじめに

抗生物質は、人間や家畜の細菌感染症の治療のみならず、養殖業や農業などでも使用されているが、その使用量の増加に伴い、抗生物質に耐性を持つ薬剤耐性菌の発生が世界的な問題となっている。この薬剤耐性菌の発生源の一つとして、下水処理場の活性汚泥システムの反応槽が疑われている。反応槽では、人間や家畜に由来する耐性菌が盛んに増殖し、耐性遺伝子の水平伝播の可能性があるためである。

我々のグループでは、タイと日本の下水処理場の活性汚泥を対象に、抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌の調査を実施してきた¹⁾。これまでに、活性汚泥に高濃度の抗生物質を添加して培養することで、抗生物質に耐性を示す細菌群集をスクリーニングし、科のレベルでその群集構造を明らかにすることができた。それらの細菌がどのようなメカニズムで抗生物質への耐性を示していたのかを知るために、本研究では、同じサンプルを用いて、抗生物質添加に対する活性汚泥中の耐性遺伝子の応答を調べた。

2. 方法

2.1 サンプルの概要

上述の先行研究¹⁾では、タイと鶴岡で採取した活性汚泥（正しくは汚泥混合液）が解析された。タイのバンコクでは、表1に示す下排水処理場で計4回（2016年3月、2017年3月、2017年8月、2017年12月）のサンプリングが、鶴岡の処理場では計3回（2016年1月、2016年7月、2017年10月）のサンプリングがそれぞれ行われた。さらに、2018年9月にはタイのBS下水処理場とKU大学排水処理施設から新たな汚泥サンプルが採取された。採取された汚泥サンプルから抗生物質に耐性を示す細菌群集を探索するために、高濃度の抗生物質を添加した液体培地中で培養することによる耐性菌のスクリーニングを行った。すなわち、①汚泥混合液のみのサンプル、②汚泥を液体培地で培養したサンプル、および③汚泥を抗生物質添加した液体培地で培養したサンプルで、そこに含まれる細菌群集の比較を行った。抗生物質として、ペニシリン系のアモキシシリン

表1 本研究で対象とした下水処理場の概要

処理場名	Dindang 下水処理場	Jatujak 下水処理場	Bang Sue 下水処理場	Siphraya 下水処理場	鶴岡市 浄化センター
略名	DD	JJ	BS	SPY	TSU
排水の種類	都市下水	都市下水	都市下水	都市下水	都市下水

処理場名	Kasetsart 大学	Chonprathan 病院	Klang 病院	Phayathai 2 International 病院
略名	KU	CP	KL	PY
排水の種類	大学排水	病院排水	病院排水	病院排水

（AMPC）とアンピシリン（ABPC）、フルオロキノロン系のシプロフロキサシン（CPFX）、セフェム系のセフェピム（CEPM）、テトラサイクリン系のテトラサイクリン（TC）、カルバペネム系のメロペネム（MRPM）とドリペネム（DRPM）を用いた。上記の①～③のサンプルからそれぞれ抽出したDNAを、次世代シーケンサーを用いた細菌群集解析に供し、残されたDNAサンプルを用いて耐性遺伝子の応答を調べた。

2.2 解析対象とする耐性遺伝子とその検出方法

上記の汚泥サンプルの多くからは、 β -ラクタム系抗生物質であるAMPC、ABPC、CPFX、CFPM、MRPM、DRPMとテトラサイクリン系抗生物質であるTCに耐性を示すEnterobacteriaceae科細菌が検出された。Enterobacteriaceae科細菌の中でも、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(Extended-spectrum β -lactamase: ESBL)産生菌は、現在の使用頻度が高い β -ラクタム系抗生物質を加水分解し、その効果を無くしてしまうため、人類に深刻な脅威を与える耐性菌として警戒されている²⁾。このことから本研究では、ESBL産生菌に関連する遺伝子を検出対象に選んだ。

汚泥サンプルから分離されたDNAを鋳型として、ESBL産生遺伝子の中でも日本での検出報告が多いCTX-M遺伝子と、古くからESBL産生遺伝子として知られているTEM遺伝子³⁾をそれぞれPCRによって検出した。PCRで

増幅が確認された汚泥サンプルについては、定量 PCR によってその耐性遺伝子の定量を実施した。同時に全ての細菌が持つ 16SrRNA 遺伝子の定量を行い、これを汚泥サンプル中の細菌数として、1 細菌あたりの耐性遺伝子数を推定した。

3. 結果及び考察

PCR による耐性遺伝子の検出結果を表 2 に示す。LB 培地のみで培養した全てのサンプルと、ABPC、AMPC をそれぞれ添加した全てのサンプルから CTX-M 遺伝子や TEM 遺伝子が検出された。細菌群集の解析結果と照らし合わせてみると AMPC 添加と ABPC 添加したものでは *Enterobacteriaceae* 科の割合が約 40%~80% と高く、この科の細菌が耐性遺伝子を保持していたことが推測される。

CPFX および CFPM を添加したサンプルには、耐性遺伝子が検出されなかったものもあった。一見矛盾するようではあるが、CTX-M 遺伝子は ESBL に分類されてはいるものの、in vitro ではセフェム系抗生物質であるセフトジジムをほとんど分解できないという報告がある³⁾。また、TEM 遺伝子のサブタイプには、TEM-1 遺伝子のようなペニシラーゼのみを産生し、CPFX や CFPM を分解できないものもある。こういった遺伝子を持つ菌は LB 培地中では増殖できたものの、CPFX や CFPM の存在下では増殖できなかったのかもしれない。

BS 下水処理場から 2 回目に採取した汚泥 (BS2) では、DRPM を添加したサンプルからも TEM 遺伝子が検出された。同じ日に KU 大学排水処理施設から採取した汚泥 (KU2) では DRPM を添加したサンプルで CTX-M 遺伝子が検出された。また、5 回目に BS 下水処理場から採取した汚泥 (BS5) では、MRPM を添加したサンプルからも CTX-M 遺伝子や TEM 遺伝子が検出された。カルバペネム系抗生物質である MRPM や DRPM は、現在 ESBL に対する第一選択薬として用いられているが、これらの結果は、MRPM や DRPM に耐性を示す ESBL 産生菌が汚泥中に存在する可能性を示している。

今後は耐性遺伝子や 16SrRNA 遺伝子の定量結果をもとに議論を深めたい。

表 2 PCR による各耐性遺伝子の検出結果

TEM 遺伝子										CTX-M 遺伝子														
	AMPC	ABPC	CPFX	CFPM	MRPM	DRPM	TC	LB	TH	TSA	原汚泥		AMPC	ABPC	CPFX	CFPM	MRPM	DRPM	TC	LB	TH	TSA	原汚泥	
BS1												BS1												
BS2												BS2												
BS3												BS3												
BS5												BS5												
DD1												DD1												
DD2												DD2												
DD3												DD3												
JJ1												JJ1												
JJ4												JJ4												
CP2												CP2												
PY2												PY2												
KU1												KU1												
KU2												KU2												
KU4												KU4												
KU5												KU5												
KL2												KL2												
KL4												KL4												
SPY1												SPY1												
TSU												TSU												

■ : 陽性 □ : 陰性 ▒ : サンプルなし

注) 表中のアルファベットと数字は以下のように汚泥試料の種類と培養条件を示す。

- BS, DD, JJ, CP, PY, KU, KL, SPY, TSU=サンプルを採取した処理場名
- 1~5=サンプリングの時期
- AMPC, ABPC, CPFX, CFPM, TC, MRPM, DRPM=培養時に添加した抗生物質名
- LB, TH, TS=培養に用いた培地名(このとき抗生物質は添加せずに培養)

参考文献

- 1) 三浦ら, 水環境学会誌, 印刷中, 2019
- 2) CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 65-66, 2013
- 3) 荒川宣親, 日本臨床微生物学雑誌, 13(3), 150-161, 2003