

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04348

研究課題名（和文）ワンヘルスアプローチの具現化に向けた下水管における薬剤耐性細菌の動態解明

研究課題名（英文）Dynamics of antibiotic resistant bacteria in sewer systems: Extending the One-Health Approach to environmental studies

研究代表者

松井 一彰 (Matsui, Kazuaki)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：40435532

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,820,000円

研究成果の概要（和文）：下水中における微生物群集と薬剤耐性遺伝子量の動態を遺伝子レベルで定量・把握し、データによるOne Healthアプローチ概念の実装化を試みた。通年で10以上の水温変動が生じる下水環境下では、細菌群集構造に季節的な周期がみられることが示された。下水中から検出された薬剤耐性遺伝子量は通年を通してほぼ一定であり、薬剤耐性能が特定の細菌群集に偏在している可能性は低いと考えられた。また可動遺伝子との相関から、薬剤耐性遺伝子の全てが水平伝播しているわけではないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

河川や湖沼と同様に、下水中においても微生物群集が季節変化していることを実証した。日本と米国の微生物叢の比較では、相対的な微生物量の80%以上が共通した微生物種で占められていることがわかった。また下水における薬剤耐性遺伝子量の通年変化を、初めてデータとして示した。さらに薬剤耐性遺伝子の拡散パターンが、可動遺伝子を介した拡散経路以外にも、もう一つ別に存在する可能性を示した。遺伝子の水平伝播環境中での薬剤耐性細菌の動態がほとんど明らかにされていない中、ヒトの生活圏での薬剤耐性遺伝子動態を示す事で、One Healthアプローチをより中味の伴った行動指針にできると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Data implementation is necessary to extend the One health approach concept to environmental studies. We investigated on the seasonal dynamics of microbial communities and the antibiotic resistance genes (ARGs) in sewer environment using metabarcoding analysis and quantitative PCR analysis. Time series analysis revealed that the bacterial community assemble into two distinct community states according to the wastewater temperature. Over eighty percent of the bacterial community compositions matched between the US and Japanese sewers. However, the time series analysis indicated that the amount of ARGs was not influenced by the wastewater temperature. Those results suggest that the dynamics of ARGs were independent of bacterial community shifts in the sewer environment.

研究分野：微生物生態学

キーワード：下水生態系 微生物群集 薬剤耐性遺伝子 time series

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本には総延長で約 42 万キロメートルの下水道管が張り巡らされており、都市の数メートル地下に広がる管路は、人間社会に最も近い水環境である。下水道管は汚水を滞り無く流す管として工学的に設計監理された空間であるため、管内の水質や生物群集についてはほとんど言及されてこなかった。他方、水域生態学における研究対象は河川や湖沼などの自然水域が中心で、下水管のような人工構造物内の生物群集については扱われてこなかった。下水道の普及が進むにつれて、下水管は汚水を流す管以外にも、地球の水域生態系として重要な空間になりつつある。

生態学では生物群集の種構成を調べると同時に、生物群集と環境パラメータとの関係や、生態系や生物群集の時間的な変遷も研究対象として扱う。また衛生管理の視点からも、下水管の薬剤耐性細菌や病原性細菌の動態に対する関心は高い。しかし現段階の研究では、細菌の種構成を明らかにする研究がはじまったばかりで、生物群集の時間的な変遷については全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、人工水域である下水管内の生態系構造と機能を解明し、人の健康に影響を及ぼさせないための下水道管理に活用させることを目的として (1) 下水道をフィールドとした水域生態調査手法の確立。(2) 下水道管内の微生物群集構造の経時的解析 (3) One Health アプローチ概念の具現化に向けた薬剤耐性細菌の動態解明を目指した。

3. 研究の方法

研究 (1) : 下水道をフィールドとした水域生態調査手法の確立

下水管内と河川や湖沼は水質環境が大きく異なる。そこで湖沼などで用いられる調査手法を、下水管サンプルの分析用に調整して有効な方法を検討した。特に DNA 抽出作業中に外部からの DNA 混入を避けられるように配慮した。また無視されがちな DNA 回収率についても検討した。正確かつ簡便に経時的データを取れるよう、下水微生物群集の DNA を回収・解析できる方法の確立を目指した。

研究 (2) : 下水道内の微生物群集構造の経時的解析

(1) で検証した手法を用いて、下水管内の微生物群集と環境項目の経時的な計測を進めた。自治体の下水管理者に協力を仰ぎながら、調査場所を調整した。調査の時間スケールは通年動態 (季節変動) を追跡することを主目的とした。微生物群集構造解析は、16S または 18S リボソーム DNA 遺伝子を対象としたメタバーコーディング解析を実施した。

研究 (3) : One Health アプローチ概念の具現化に向けた薬剤耐性細菌の動態解明

(1) で検証した手法を用いて、下水管内の微生物群集中に含まれる薬剤耐性遺伝子の動態を 2 年間追跡した。汎用されている薬剤への耐性遺伝子から、カルバペネム耐性のように存在量が少ないと予想される耐性遺伝子まで、10 種の薬剤耐性遺伝子を対象とした定量 PCR 条件を検討し、下水中における遺伝子動態を調査した。また遺伝子転移に関わるインテグロン遺伝子 (*int11*) およびトランスポゼース遺伝子 (*tniA*) を対象とした調査も実施し、下水中での薬剤耐性遺伝子の転移の可能性についても検討した。

4. 研究成果

研究 (1) : 下水道をフィールドとした水域生態調査手法の確立

下水試料を収集するための自動採水器設置場所と設置方法を何通りか検討した。下水中には予想よりも浮遊ゴミが多く、当初はポンプの採水口が数時間で詰まってしまう事象が頻発した。公共の事業所であるので、我々が作業できる範疇は限られている。そのような中、担当自治体や管理者からの協力を得て、採水口の周りを覆い、採水口を保護することで、連続 72 時間までは目詰まりを防ぎながらの採水が可能となった。

2019 年から 2020 年にかけて、下水の微生物研究を進めていた米国の研究協力者の研究室に滞在し、研究室での下水試料の取り扱い、フィルター濾過による下水からの微生物回収法、フィルターからの DNA 抽出法、PCR 阻害物質への対応などについての基礎を学んだ。しかし米国で使用していた DNA 抽出キットが日本では入手できないこと、また日本の下水には油成分が多めに含まれることから、日本の下水に合うように手法を再度見直した。米国では、下水試料を捕集したセルローズエステルフィルターを凍結させ、ファルコンチューブ内で物理的にフィルターを破碎した後に DNA 抽出キットへ試料を投入していた。ところがこの方法では、専用のクリーンルームを準備できない場合には、フィルター破碎時に外部から DNA が混入してしまう可能性がある。そこでフィルターを物理的に破碎せずに済むようにフィルターをポリカーボネート製に変更し、クロロホルムを用いて DNA 抽出キット内にてフィルターを溶解させる方法を採用した。この方法を用いることで、外部からの DNA 混入を防ぐと同時に、油成分の影響を解消することも出来た。DNA の回収率も米国で用いられていた方法と遜色がなかったため (11~19.4%)、下水越流水に対して本法を使用した例を報告した (Matsui and Miki 2023)。また採水した下水試料を有機物サイズの分布から評価し、処理できなかった有機物が野外環境水に与える影響の評価も同時に実施した (Lin et al. 2022)。

研究 (2) : 下水道内の微生物群集構造の経時的解析

研究 (1) で確立した調査手法を用いて、下水処理場への流入水質と微生物叢を月 2 回、1 年間に渡って調査した (図 1a)。処理場に流入する下水温は冬季 16°C から夏季の 29°C まで季節に合わせて変化が見られた。また下水中の全リン量、全窒素量、全有機炭素量も最大 2 倍程度の量的変化がみられた。全細菌数は期間中約 1.0×10^8 cells/ml で一定で、水温や水中のリン、窒素、炭素量が細菌の数には影響を及ぼさないことが想定された。その一方、16S rRNA 遺伝子のコピー数が期間中で最大 10 倍変化していたことから、細菌群集構造が変化している事が伺えた。

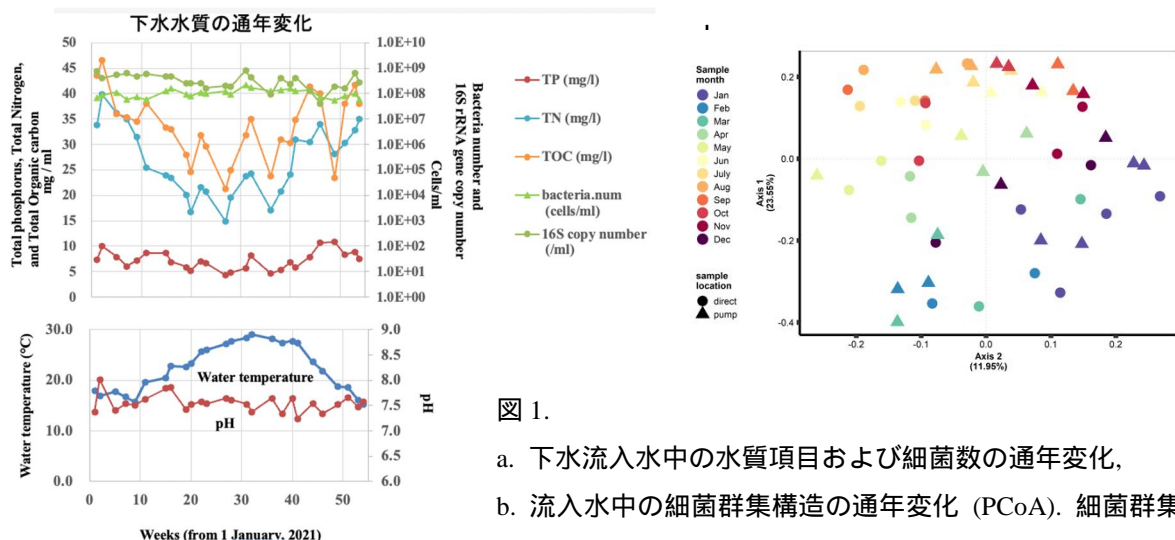


図 1.

- 下水流入水中の水質項目および細菌数の通年変化,
- 流入水中の細菌群集構造の通年変化 (PCoA). 細菌群集構造は 2 箇所て採水した結果を 1 枚にまとめている.

群集の変遷を追跡した(図1b)。水温が高い8月~9月と、水温が低くなる1~3月では、細菌の群集構造が異なる事。またその間の時期では水温の変化に合わせて細菌群集が遷移している様子がみられた。同様の傾向は米国の共同研究者も示唆している(LaMartina et al. 2021)。ASV または OTU レベルでの米国と日本の相違を共同で解析したところ、存在量でみると約 80-90% の菌叢が両国で一致することがわかった。研究期間中に世界的な感染症が拡大した影響から、2021 年をピークに実験資材の入手や研究試料のやり取りが滞り、微生物群集構造解析が当初の予定通りには進められなかった。しかし、真核生物の検出用 PCR プライマーの開発(Seto et al. 2022) や経時変化の解析手法の検討(Noriyuki et al. 2022) については他のデータセット等を用いるなどして検討をすすめた。下水試料を対象としたデータ収集が最終年度までずれ込んだため、当初予定していた理論による予測についてはデータ解析と合わせて継続する。

研究(3) : One Health アプローチの概念を具現化するための、薬剤耐性細菌の動態解明

研究(1)で確立した調査手法を用いて、下水処理場への流入水(2箇所)中に含まれる薬剤耐性遺伝子10種の動態を月2回、2年間に渡って調査した。図2aでは調査した代表的な6種を示している。存在量は遺伝子の種類によって大きく異なっていた。細菌の多くが16SrRNA遺伝子を複数コピー保持している事を勘案すると、少なく見積もっても10%以上の下水細菌が*qnrS*遺伝子を保持しており、この耐性遺伝子が下水細菌中に広く蔓延している事が示された。他方*mecA*のように一部の下水細菌にのみ保持されている耐性遺伝子もあり、薬剤耐性の種類によってその分布状況は大きく異なっていた。また下水環境では通年で細菌群集構造が変化しているにも関わらず、通年での薬剤耐性遺伝子の量には大きな変動が見られなかった。このように本研究では、これまで実証データが不足していた下水中の薬剤耐性遺伝子の動態について2年間の追跡データを得ることが出来た。細菌群集構造が季節的な変動パターンを示したのに対し、耐性遺伝子の動態は、季節に依存せず一年を通して一定量存在している実態もわかった。

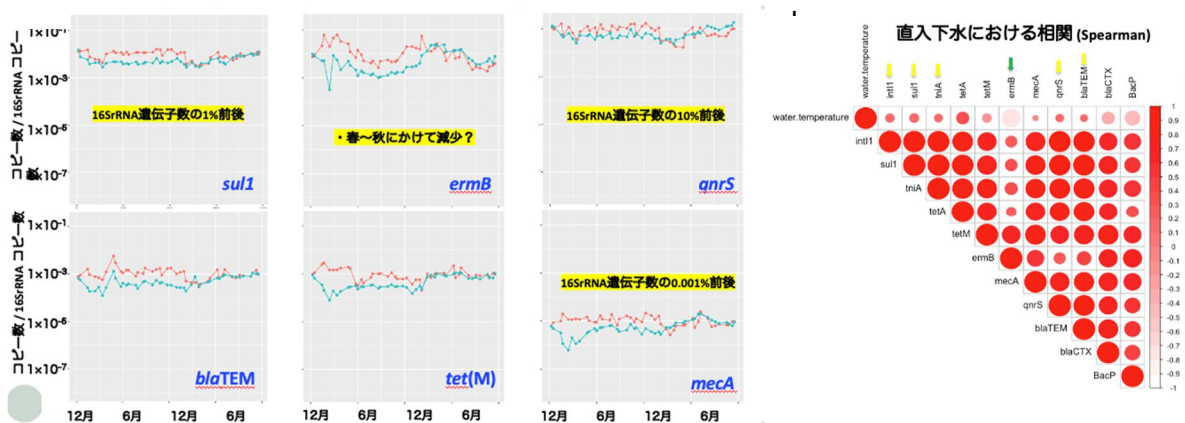


図 2.

- 下水流入水中における薬剤耐性遺伝子存在割合の通年変化,
- 下水流入水中の薬剤耐性遺伝子量と可動遺伝子(*int11*, *tmiA*)量との相関.

薬剤耐性遺伝子の蔓延には、インテグロンやトランスポゾンなどの「可動遺伝子」の関与が指摘されているが、その関係性を実証的に示した例は少ない。そこでインテグロン遺伝子(*int11*) およびトランスポゼース遺伝子(*tmiA*)と薬剤耐性遺伝子の存在量の関係性を比較した(図2b)。*qnrS* 遺伝子をはじめ、多くの耐性遺伝子は「可動遺伝子」量と高い相関を示し、遺伝子の水平伝播に

よる薬剤耐性遺伝子の拡散を支持する結果となった(図 2b, 矢印黄色)。その一方、*ermB* では相関がみられず、可動遺伝子の関与があまり考えられなかった(図 2b, 矢印緑色)。このように本研究では、これまで盲目的に示唆されてきた可動遺伝子動態と薬剤耐性遺伝子動態をリンクさせることができた。また薬剤耐性遺伝子の種類によっては、水平伝播以外の経路で蔓延している可能性がある事も同時に示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsui Kazuaki, Miki Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Microbial community composition and function in an urban waterway with combined sewer overflows before and after implementation of a stormwater storage pipe	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e14684 ~ e14684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.14684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Lin Hui, Matsui Kazuaki, Newton Ryan J., Guo Laodong	4. 巻 2
2. 論文標題 Disproportionate Changes in Composition and Molecular Size Spectra of Dissolved Organic Matter between Influent and Effluent from a Major Metropolitan Wastewater Treatment Plant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS ES&T Water	6. 最初と最後の頁 216 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsestwater.1c00391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Seto Kensuke, Nakada Takashi, Tanabe Yuuhiko, Yoshida Masaki, Kagami Maiko	4. 巻 114
2. 論文標題 <i>Aphelidium parallelum</i>, sp. nov., a new aphelid parasitic on selenastracean green algae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mycologia	6. 最初と最後の頁 544 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00275514.2022.2039487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noriyuki Suzuki, Kawatsu Kazutaka, Kaneko Shuji	4. 巻 146
2. 論文標題 Non linear time series analysis of the interaction between the citrus whitefly and the whitefly specialist ladybird	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Entomology	6. 最初と最後の頁 903 ~ 910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jen.13021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林由紀、田中佑佳、鶴井美桜、松井一彰
2. 発表標題 自然河川での薬剤耐性菌の動態
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会、福岡、口頭発表C01-06
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井 一彰、 鏡味 麻衣子、川津 一隆、三木 健
2. 発表標題 下水における薬剤耐性遺伝子の動態
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会、愛媛大学、口頭発表1-F-10-1
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 大友 優里、益田 玲爾、長田 稜、川津 一隆、近藤 倫生
2. 発表標題 状況依存性による生物群集指標の分類
3. 学会等名 日本生態学会第70回全国大会、仙台、口頭発表A03-05
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Maiko Kagami
2. 発表標題 The roles of chytrids in aquatic ecosystems
3. 学会等名 Chytrid workshop, Michigan USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学理工学部社会環境工学科環境生物科学研究室
https://www.civileng.kindai.ac.jp/laboratory/matsui_k/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鏡味 麻衣子 (Kagami Maiko) (20449250)	横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授 (12701)	
研究分担者	川津 一隆 (Kawatsu Kazutaka) (20747547)	東北大学・生命科学研究科・助教 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ニュートン ライアン (Newton Ryan)	ウィスコンシン大学ミルウォーキー校・School of Freshwater Sciences・Assistant Professor	
研究協力者	三木 健 (Miki Takeshi)	龍谷大学・先端理工学部・教授 (34316)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------