

報告 : Report

下水における抗生物質耐性細菌の分布とその耐性遺伝子の  
水平伝播能力の検証  
Isolation of antibiotic resistance bacteria in sewage and testing the possibility of  
horizontal gene transfer

森川聖也<sup>1</sup>, 西田翔大<sup>2</sup>, 松井一彰<sup>1,2,3</sup>  
Seiya Morikawa<sup>1</sup>, Shota Nisida<sup>2</sup> and Kazuaki Matsui<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>近畿大学大学院総合理工学研究科, <sup>2</sup>近畿大学理工学部社会環境工学科  
<sup>3</sup>近畿大学理工学総合研究所

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Kindai University

<sup>2</sup>Department of Civil and Environmental Engineering, Kindai University

<sup>3</sup>Science and Technology Research Institute, Kindai University

(Received May 7, 2022)

概要

ワンヘルスアプローチの具現化を目指して、都市の下水中を対象にした抗生物質耐性細菌数の評価と耐性遺伝子の水平伝播の可能性について検討した。Luria-Bertani 寒天培地を用いた試験では、3種類の抗生物質に耐性を示す多剤耐性細菌の割合が、培養可能な細菌の約 0.17%だった。多剤耐性を示した細菌の 80%以上がプラスミド DNA を保持しており、その中には大腸菌への形質転換が可能なプラスミドも含まれていた。様々な細菌間で抗生物質耐性遺伝子が水平伝播しうる下水中は、抗生物質耐性細菌の動態管理を進める上で、無視できない水環境であると考えられる。

キーワード(Keywords): multi-drug resistance, plasmid, mobile DNA, transformation

## 1. 諸言

病原微生物による感染症治療に用いられる化合物のうち、微生物が産生する物質は抗生物質と呼ばれる。人類が抗生物質を利用できるようになったのは20世紀に入ってからのことであるが、ヒトや家畜の臨床現場では、抗生物質が効かなくなった抗生物質耐性細菌の発生が問題視されて久しい。細菌が高濃度の抗生物質に曝露されると、耐性を獲得した抗生物質耐性細菌が選択されることはよく知られている。近年では、ヒト以外にも畜産や水産養殖の場にて抗生物質が使用される機会が広がっており、安易かつ不適切な使用が、抗生物質耐性細菌の発生と選択を加速させていると指摘されている。

性を持たない単細胞生物である細菌は、他の細菌や環境中から DNA を取り込んで自らの遺伝情報として利用する（遺伝子の水平伝播）能力を有している<sup>1)</sup>。また一部の細菌では、死んだ生物から放出された DNA を取り込んで使用する「形質転換現象」もみられる。このことから、遺伝子の水平伝播を介して、抗生物質耐性遺伝子が更に細菌間に蔓延する可能性も指摘されている<sup>2)</sup>。

新たな抗生物質の開発が減少している昨今、抗生物質耐性細菌問題は国際社会でも大きな課題となっている。このまま対策が講じられないと、抗生物質耐性を有した病原性細菌による死者数が、2050年には年間1000万人に到達し、癌を越えて人類の死亡原因の第一位になると推定した報告も出されている<sup>3)</sup>。そのような事態に備えて、世界保健機構（World Health Organization: WHO）では2015年5月に「薬剤耐性

に関する国際行動計画」を採択し、日本においても薬剤耐性(AMR)対策アクションプランが2016年4月に策定された。このような状況の中、ヒトだけでなく、家畜や野外環境を含めて包括的に抗生物質耐性細菌の動態管理を目指す「ワンヘルス（One health）アプローチ」が提唱されはじめている<sup>4)</sup>。しかし概念的な取り組みが進む中、対象とすべき野外環境の設定のように具体的な問題への取り組みについては、まだまだ手探りの状態が続いている。

都市部で使用される水は下水道を通じて回収され、下水処理場で処理される。地球上ではすでに人口の半分以上が都市に集中し、ヒトの生活圏の数メートル地下を流れる下水の量も年々増加している。このような状況の中、腸内細菌、病原細菌、抗生物質耐性細菌などが混合される場として、下水環境の位置づけは益々重要になると予想される。そこで本報告では、ワンヘルスアプローチを具現化する目的で、下水中に生息する抗生物質耐性細菌数の評価と、耐性遺伝子の水平伝播の可能性を検討したのでその一部を紹介したい。

## 2. 実験方法

### 2.1 下水中に生息する、培養可能な抗生物質耐性細菌の評価

本研究では作用機序の異なる3種類の抗生物質を用いて耐性細菌の数を検討した。用いたのは細胞壁合成阻害薬のアンピシリン [Ampicillin: Ap]、核酸合成阻害薬のカナマイシン

[ Kanamycin: Km ]、タンパク質合成阻害薬のクロラムフェニコール

[ Chloramphenicol: Cm ] である。培地

中での抗生物質濃度は、Ap が 50 µg/ml、Km が 10 µg/ml、Cm が 25 µg/ml とした。

2021年12月22日に大阪市平野下水処理場で採水した流入下水試料水を、0～3種の異なる組合せの抗生物質を含むLuria-Bertani (LB)寒天培地上に100 µlずつ滴下し、スプレッダーを用いて寒天培地表面全体にいきわたらせた。下水を塗布した培地を37℃で20～24時間培養後、表面上に形成されたコロニー数を目視で計数した。培地上のコロニーが重なり合わないよう、リン酸緩衝食塩水を用いて適宜下水を希釈して実験を実施した。抗生物質の組合せ毎に5枚の寒天培地を用いた計数をおこない、平均値を求めた。

## 2.2 プラスミドDNA保持率の検討

細菌の抗生物質耐性獲得には、プラスミドDNAが関与していることが多い。そこでAp, Km, Cmの3種類に耐性を持つ多剤耐性細菌のコロニー50個のうち、25個のコロニーからプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドDNAを、アガロースゲル電気泳動にかけ、大きさ別に各コロニー中のプラスミドDNAの種数を比較した。

## 2.3 形質転換実験

2.2にて25コロニーより抽出したプラスミドDNAを、塩化カルシウムで処理した大腸菌*Escherichia coli* JM109株へそれぞれ形質転換させ、Apを含

むLB寒天培地上でコロニーを形成(形質転換)できるかどうかを確認した。コロニーを確認できた時は、再度プラスミドDNAを抽出し、導入前のプラスミドDNAと導入後のコロニーから抽出したプラスミドDNAの大きさが同一かどうかをアガロースゲル電気泳動にて確認した。またKm, Cmに対する耐性についても同時に評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 下水中に生息する、培養可能な抗生物質耐性細菌の現存量

本実験で評価できるのは、下水中に生息する好気性で有機物を好み、37℃で増殖できる細菌群である。抗生物質を含まない培地上で計数されたコロニー数は、下水1mlあたり平均39万3千個であった。このコロニー数は、蛍光顕微鏡を用いて計数した下水中の全細菌数の約0.37%である。環境サンプル中から、1種の培地を用いて培養できる細菌数は1%未満であることがよく知られていることから、今回の計数値は妥当であると考えられる。この39万3千個を母集団とみなしたときに、1～3種類の抗生物質に耐性を持つ細菌の割合は、表1の通りである。

KmとCmはグラム陰性細菌とグラム陽性細菌どちらにも作用するが、Apはグラム陰性細菌にのみ作用する。複数の抗生物質を組み合わせる事が、細菌の増殖抑制に効果的である事がわ

LB寒天培地に添加した抗生物質	Ap, Km, Cm	Ap, Cm	Ap, Km	Ap	抗生物質無し
抗生物質を含まないLB寒天培地上のコロニー数に対する検出されたコロニーの百分率 (±標準偏差)	0.17 (±0.06)	0.22 (±0.09)	4.4 (±0.7)	12 (±7.0)	100 (±37.0)

表 1 培養可能な細菌に含まれる抗生物質耐性細菌の割合

かる一方、同時に2つ以上の抗生物質に耐性を示す多剤耐性細菌が、下水中にも存在していることが明らかになった。

### 3.2 3種類の抗生物質に耐性を持つ細菌コロニーにおけるプラスミドDNA保持率の検討

電気泳動の結果を図1に示した。また、写真から計数したサンプル番号1から25のプラスミドDNAの大きさと数を表2に示した。コロニーを形成した25種類のAp, Km, Cm耐性細菌のうち、21種類がプラスミドDNAを持っていることが確認できた。今回の評価では、抗生物質3種類に耐性を持つ細

菌種の80%以上が、水平伝播する可能性のあるプラスミドDNAを保持していたことが明らかになった。

### 3.3 形質転換実験

各コロニーから抽出したプラスミドDNAを大腸菌に形質転換させたところ、サンプル番号11を用いた実験にて形質転換が確認された。形質転換した大腸菌からもプラスミドDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動にて確認したところ、形質転換前後で同じ大きさのプラスミドDNAが確認された(図2)。形質転換した大腸菌は、Apに加えてKmおよびCmにも耐性

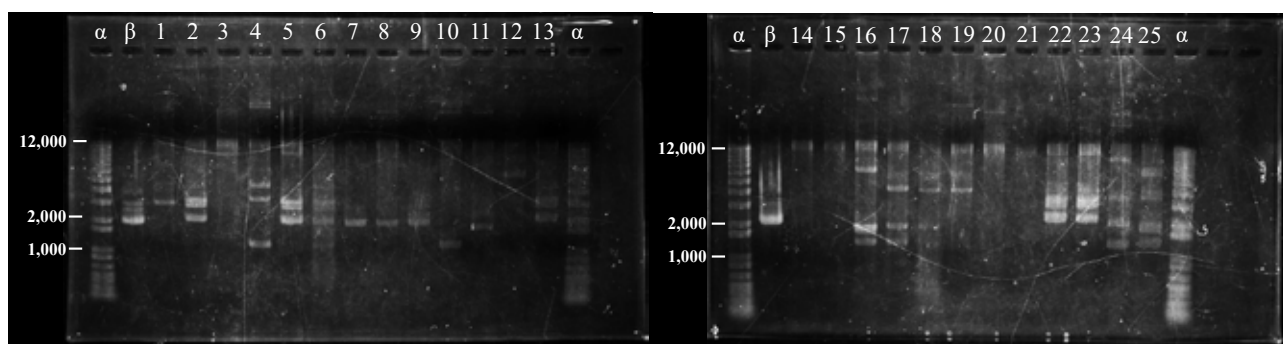


図1 Ap、Km、Cm耐性細菌より抽出したプラスミドDNAのアガロースゲル電気泳動写真  
 $\alpha$  - サイズマーカー DNA,  $\beta$  - プラスミド pUC18 (2,686bp)  
 1から25の数字はコロニーの番号

表2 図1より確認された、各コロニー中が持つプラスミドDNAの大きさ

サンプル バンドの位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
12,000bp以上				○						○	○					○			○	○					
5,000bp以上 12,000bp未満					○							○				○								○	○
2,000bp以上 5,000bp未満	○	○		○	○	○							○				○	○	○			○	○		○
2,000bp		○			○	○	○	○	○		○		○				○	○				○	○	○	
1,650bp以上 2,000bp未満																○									○
1,000bp以上 1,650bp未満				○						○						○	○							○	○

を示した。このように、サンプル11番が持つ大きさが12,000bp以上のプラスミドは、形質転換可能な Ap, Km, Cm 耐性に寄与する多剤耐性因子であることが明らかとなった。

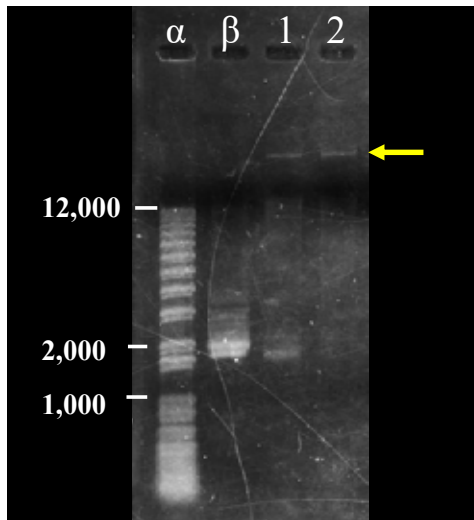


図 2 アガロースゲル電気泳動による形質転換が可能な多剤耐性プラスミド DNA の確認  
 $\alpha$  - サイズマーカー DNA  
 $\beta$  - プラスミド pUC18 (2,686bp)  
 1- サンプル11番より抽出したプラスミド DNA  
 2- 形質転換後の大腸菌より抽出したプラスミド DNA

本調査を通じて、下水中には培養可能な多剤耐性細菌が存在する事、またその細菌が持つ抗生物質耐性遺伝子は水平伝播されうることを実験的に示した。今後、細菌種の特異性やプラスミドの DNA 配列を明らかにし、定量PCR等を用いた動態解析を進める事で、下水環境中における抗生物質耐性細菌や抗生物質耐性遺伝子の挙動実態を明らかにできると考えられる。

#### 4. 参考文献

- 1) 松井一彰, 微生物生態系における細菌の遺伝子水平伝播現象. 原生動物学雑誌 **48**, 31-43 (2015)
- 2) 和知野純一, 薬剤耐性獲得機構: グラム陰性菌を中心に. 日本臨床微生物学会雑誌 **30**, 1-12 (2020)
- 3) J. O'Neil J, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance, London 2016 (2016)
- 4) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会, 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書2020 (2020)