

未来社会創造事業 探索加速型
「世界一の安全・安心社会の実現」領域
終了報告書(探索研究)

令和2年度 終了報告書

平成30年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：渡部 徹]

[山形大学農学部・教授]

[研究開発課題名：下水処理場での耐性菌リスクの検知と低減]

実施期間：平成30年11月15日～令和3年3月31日

§ 1. 研究実施体制

(1) 「リスク検知」グループ(山形大学, 東北大学)

① 主たる共同研究者: 渡部 徹 (山形大学農学部, 教授)

② 研究項目

- ・下水処理場における薬剤耐性菌のモニタリングによるリスク検知システムの構築

(2) 「リスク評価」グループ(宮崎大学, 山形大学)

① 主たる共同研究者: 鈴木 祥広 (宮崎大学工学部, 教授)

② 研究項目

- ・下水処理場から放流される薬剤耐性菌と耐性遺伝子が水環境の細菌に及ぼす影響

(3) 「リスク低減」グループ(金沢大学)

① 主たる共同研究者: 本多 了 (金沢大学理工学域, 准教授)

② 研究項目

- ・下水処理場での薬剤耐性菌の消長と耐性菌拡散防止のための処理技術の評価

§ 2. 研究実施の概要

モデル自治体の下水処理場の流入下水と病院排水を対象として、耐性菌(院内感染で問題となる ESKAPE と呼ばれる6種類)のモニタリングを1年間に渡って実施した。流入下水からはすべての耐性菌が検出された。特にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌と ESBL 産生腸内細菌科細菌の検出率は 100%であり、これらの耐性菌が既に市中に蔓延していることが明らかとなった。多剤耐性緑膿菌を除く5種類の検出率は病院排水よりも高く、下水処理場でのモニタリングによる耐性菌リスク検知の有効性を示すことができた(Nishiyama et al., 2021)。モニタリングで分離した菌株を分析することで、(1)同時期に両排水から同一の POT 値を有する MRSA 株が分離された、(2)日本ではほとんど確認されていない VRE が分離され、一部の菌株は耐性遺伝子の伝達能を有していた、(3)ESBL 産生腸内細菌科細菌の中に、カルバペネム耐性遺伝子を保有する菌株、これまで知られていない新規の ST 型、抗菌薬治療の「最後の切り札」コリスチンに耐性を示す菌株を発見した、などの薬剤耐性菌への対策を検討する上で重要な知見が得られた。これらの成果をもとに医療関係者に対するヒアリングを行った結果、モニタリングに対する強い期待を込めた回答が得られた。この下水のモニタリングは、昨今の新型コロナウイルス感染症対策にも通じるコンセプトである。

下水処理プロセスの前後では、糞便由来細菌の耐性率はほぼ変わらなかった。ただし、反応タンクには糞便に由来しない細菌も多く存在しているため、全細菌を対象とした耐性率は、活性汚泥以降から処理後の放流までに大きく減少した(Honda et al., 2020)。メタゲノム解析から得られた薬剤耐性遺伝子プロファイル比較より、下水には地域によらずフルオロキノロン系、セファロスポリン系、マクロライド系、アミノグリコシド系など WHO の重要薬剤リストの最高優先度で分類されている薬剤耐性が卓越していた。下水処理方式に関わらず耐性遺伝子の全量は処理後に減っていたが MBR 法と比較して標準活性汚泥法の処理水には、WHO 重要薬剤リストに対する耐性遺伝子が、より多く残っていることが示された。細胞外耐性遺伝子の除去を目指した実験室規模の MBR での模擬排水処理実験では、添加した細胞外プラスミド遺伝子のほとんどが流入後数時間で汚泥粒子に吸着し、その除去率は $2\log(99\%)$ 以上であること、膜ファウリングの進行に伴って細胞外プラスミドの除去率が向

上することが分かった。

リスク評価に関しては、下水処理場に流入する下水が好気性処理されて水環境へ放流される過程の中で大腸菌の生存と薬剤耐性率の変化を調べた。その結果、下水の好気性処理プロセスにおける大腸菌の生残性は系統群によって著しく異なり、処理で生残した大腸菌の薬剤耐性率がその後増加していた(2週間で耐性率が約2倍増加する例も確認)。また、河川水と下水から分離された大腸菌について、薬剤耐性試験(MIC試験)と全ゲノムベースの遺伝的アプローチを組み合わせる抗菌耐性を分析した。MIC試験による抗菌薬1剤以上の耐性率とゲノム上の1剤以上の薬剤耐性遺伝子の保有率は、それぞれ、18.3%と17.7%であり、ほぼ一致した。また、抗菌剤耐性遺伝子は、河川サンプルの株よりも下水サンプルからの株から高頻度で検出された(Ogura et al., 2020)。一方で、凝集・泡沫濃縮法とデジタルPCR法を組み合わせた耐性遺伝子検出技術も開発し、河川水中に32~98 copies/100 mLと極めて低い濃度で存在する遺伝子 *invA* の検出・定量に成功した。

【主要な成果】

Masateru Nishiyama, Susan Praise, Keiichi Tsurumaki, Hiroaki Baba, Hajime Kanamori, Toru Watanabe. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria ESKAPE among healthy people estimated by monitoring of municipal wastewater. *Antibiotics*, 10(5), 495, 2021

Ryo Honda, Chihiro Tachi, Mana Noguchi, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Toru Watanabe. Fate and seasonal change of *Escherichia coli* resistant to different antibiotic classes at each stage of conventional activated sludge process. *J. Water Health*. 18(6), 879-889, 2020

Ogura, Y., Ueda, T., Nukazawa, K., Hiroki, H., Xie, H., Arimizu, Y., Hayashi, T. and Suzuki, Y. Antimicrobial resistance is more prevalent in various lineages of *Escherichia coli* strains isolated from sewage than in those from rivers. *Scientific Reports* 10, 17880, 2020.