

多摩川における薬剤耐性遺伝子の動態に及ぼす
下水処理水の影響評価

2020年

春日郁朗

東京大学大学院工学系研究科・准教授

目次

1. 研究の目的	2
2. 研究の方法	2
2.1. サンプルリング	2
2.2. 水質	2
2.3. 微生物解析	3
2.3.1. 大腸菌群数・大腸菌数	3
2.3.2. 全菌数	3
2.3.3. 微生物群集構造	3
2.4. 定量 PCR.....	4
3. 結果及び考察	4
3.1. 水質の変化	4
3.2. 大腸菌群数・大腸菌数	5
3.3. 全菌数	6
3.4. 微生物群集構造	6
3.5. 定量 PCR.....	8
4. 結論と今後の課題	9
5. 参考文献	10

1. 研究の目的

多摩川流域では昭和 40 年以降、下水道の普及が急速に進み、現在では下水道普及率が 99%近くに達している。その結果、BOD に代表される汚濁指標は大幅に改善し、水質環境基準の類型見直しも行われるに至っている。このように、下水処理は都市河川である多摩川の水質改善を実現する重要な社会インフラであることに間違いはない。しかし、下水処理の普及により、多摩川の流量に占める下水処理水の割合は上昇しており、より安全・安心な水環境を保全するためには、下水処理水由来の未規制リスク因子に対する注意も欠かせない。

抗生物質などの薬剤が効かない薬剤耐性細菌の出現は、世界的にも喫緊の課題である。都市の水利用や親水活動における薬剤耐性リスクの実態は明らかになっていないが、多摩川のように下水処理水の影響が相対的に高い河川では、下水由来の薬剤耐性細菌の寄与が高いことが懸念される。従来、薬剤耐性細菌の研究は、培養法に基づく研究が主流であった。しかし、培養可能な細菌は全体のごく一部にすぎないことから、より包括的に薬剤耐性細菌の多様性や存在量を調査するためには、薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic Resistance Genes: ARGs) を直接標的とした分子生物学的手法が有用である。本研究では、複数の ARGs をマーカーとすることで、多摩川における ARGs の動態や多様性に、下水処理水がどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の方法

2.1. サンプルング

表 1、図 1 に示すように、2019 年 9 月、11 月、2020 年 1 月に採水を行った。2019 年 9 月の採水は、TM1~TM5 の 5 か所、同 11 月及び 2020 年 1 月については、最上流の下水処理場の処理水流入前後 (TM2, TM3) にて行った。なお、2019 年 11 月、2020 年 1 月の TM3 における採水については、台風の影響で日野橋が通行止めとなったため、河岸または直上流の立日橋を TM3 とした。試料は共洗いを十分に行ったマイティパックに採水し、クーラーボックスに入れて実験室に搬送した。

2.2. 水質

水温、pH、電気電導度はポータブル計器を用いて現地で測定した。試料の一部を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過した後、アンモニウム態窒素を測定した。測定には、HACH 社のキット (TNT830) を用いた。

表 1 採水一覧

採水日	地点	記号
2019年9月1日	楓橋	TM1
	拝島橋	TM2
	日野橋	TM3
	多摩川原橋	TM4
	二子橋	TM5
2019年11月28日	拝島橋	TM2
	日野橋（河岸）	TM3
2020年1月22日	拝島橋	TM2
	立日橋（日野橋の直上流）	TM3

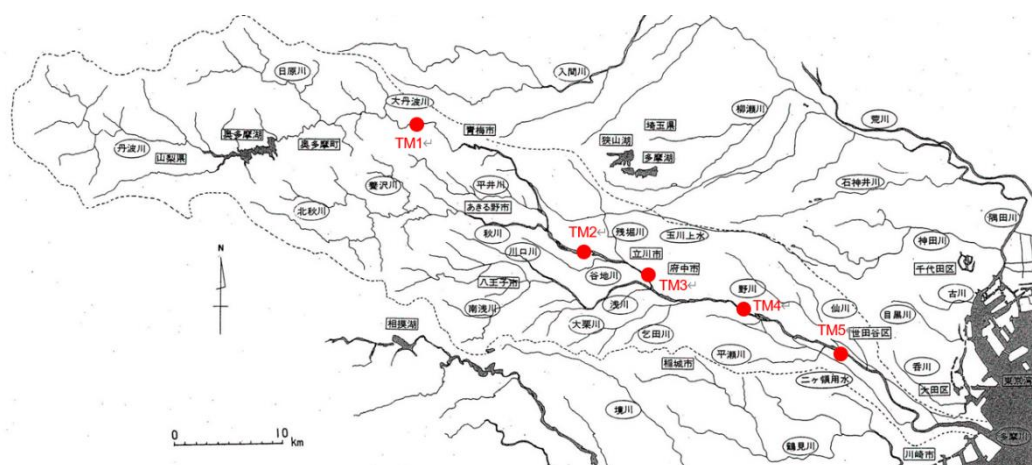


図 1 採水地点（地図は東急財団提供の図を使用）

2.3. 微生物解析

大腸菌群数・大腸菌数

クロモカルトコリフォーム寒天培地を用いて、河川水中の大腸菌群数、大腸菌数を計数した。リン酸緩衝液を用いて調製した希釈列試料 1 mL を培地に混釈し、37°C、24 時間培養した。

全菌数

河川水中の全菌数を計数するために、試料を SYBR Green I で染色し、フローサイトメトリー（Accuri C6, BD 社）を用いて計数した。計数にあたっては、適宜、リン酸緩衝液で希釈を行った。

微生物群集構造

流下過程における微生物群集構造の遷移を評価するために、2019 年 9 月に採水した試料を用いて、16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンシングを行った。孔径 0.2 μm のフィルターに試料をろ過し、FastDNA Spin kit for Soil

(MP Biomedicals) を用いて DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V4 領域を増幅した後、株式会社生物技研に試料を送付し、Miseq によるシーケンシング、QIIME2 を用いた解析を実施した。

2.4. 定量 PCR

2.3 で抽出した DNA を鋳型として定量 PCR を行った。Roche 社のサイバーグリーン法の専用試薬 (LightCycler480 SYBR Green I Master) を使い、LightCycler480 (Roche 社) で分析を行った。ARGs としては、サルファ剤耐性遺伝子 *sul1*、テトラサイクリン耐性遺伝子 *tetA* を定量すると共に、ARGs 汚染マーカーとしてクラス 1 インテグロン-インテグラーゼ *intI1*、全細菌の 16S rRNA 遺伝子を定量した。表 2 に使用したプライマーを示す。検量線は、これらの増幅断片を含む人工遺伝子を段階希釈したものを用いた。

表 2 プライマー一覧

標的遺伝子	プライマー配列 (5'-3')	Ref
<i>sul1</i>	<i>sul1_F</i> _(6)-492: CGCACCGAAACATCGCTGCAC	Pei <i>et al.</i> 2006
	<i>sul1_R</i> _(6)-492: TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	
<i>tetA</i>	<i>tetA_F</i> _(6)-542: GCTACATCCTGCTTGCCTTC	Lee <i>et al.</i> 2017
	<i>tetA_R</i> _(6)-542: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
<i>intI1</i>	<i>intI1F</i> 165: CGAACGAGTGGCGGAGGGTG	Gillings <i>et al.</i> 2015
	<i>intI1R</i> 476: TACCCGAGAGCTTGGCACCCA	
16S rRNA gene	341F: CCTACGGGAGGCAGCAG	Bru <i>et al.</i> 2008
	534R: ATTACCGCGGCTGCTGGCA	

3. 結果及び考察

3.1. 水質の変化

表 3 に、水温、pH、電気伝導度、アンモニウム態窒素濃度の結果を示す。

表 3 水質測定の結果

採水日	地点	水温 (°C)	pH	電気伝導度 (μ S/cm)	アンモニウム態窒素 (mg N/L)
2019/9/1	TM1	19.4	7.42	81	0.034
	TM2	22.9	7.61	137	0.055
	TM3	25.2	7.70	248	0.041
	TM4	29.2	7.75	275	0.089
	TM5	28.1	7.85	264	0.048
2019/11/28	TM2	10.1	7.85	110	0.016
	TM3	11.9	7.86	192	0.050
2020/1/22	TM2	4.3	8.39	137	0.016
	TM3	9.4	8.61	398	0.088

下水処理場からの処理水が流入する TM2→TM3、TM3→TM4 の各区間において、水温の上昇、電気伝導度の上昇、アンモニウム態窒素濃度の上昇がみられた。これらの変化は、特に 2020 年 1 月の調査において顕著であった。

3.2. 大腸菌群数・大腸菌数

図 2 に、大腸菌群数、大腸菌数の結果を示す。大腸菌群数は、いずれの調査においても TM2 から TM3 の間で増加する傾向を示した。上流から下流まで調査した 2019 年 9 月の結果では、TM3 から TM5 にかけてやや減少していた。大腸菌数については、2019 年 9 月の調査では、下水処理水が流入する前後（TM2→TM3, TM3→TM4）で顕著に増加した。特に TM2→TM3 では 16 倍に増加していた。2019 年 11 月の調査では、処理水の流入前後において大腸菌は検出されなかったが、2020 年 1 月の調査では、処理水の流入後においてのみ大腸菌が検出された。こうした糞便汚染指標細菌の変化は、下水処理水が多摩川の微生物相に大きな影響を与えていることを示している。

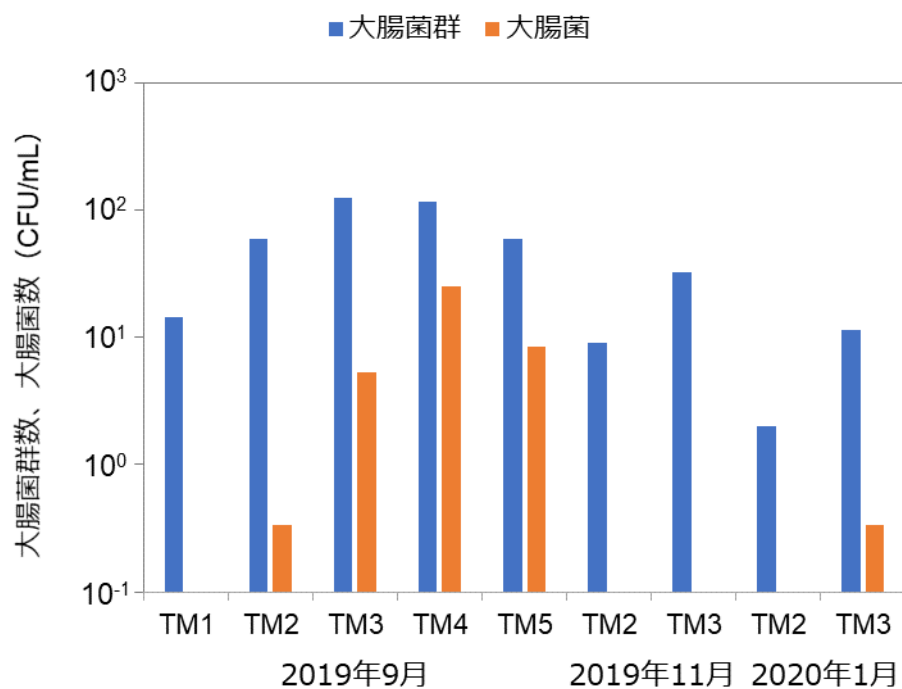


図 2 大腸菌群数・大腸菌数の変化

3.3. 全菌数

図 3 に全菌数の変化を示す。2019 年 9 月、2020 年 1 月の調査では、下水処理水の流入前後の TM2 から TM3 において、全菌数はそれぞれ 2 倍、11 倍増加

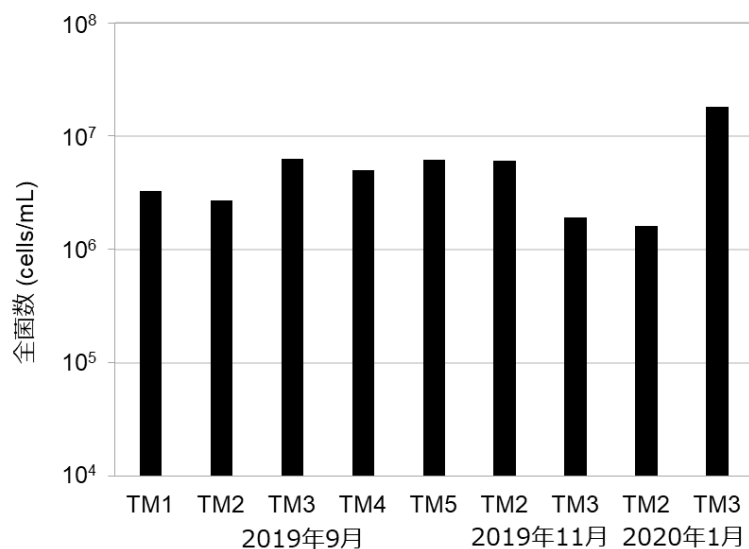


図 3 全菌数の変化

したが、2019 年 11 月には逆に全菌数は減少していた。明確な理由は不明である。2019 年 9 月の流下過程を見ると、TM3 以降は全菌数の値はほぼ一定で推移していた。

3.4. 微生物群集構造

2019 年 9 月の試料を用いて、流下過程の微生物群集の組成の変化を解析し、結果を図 4 に示した。TM2→TM3、TM3→TM4 において、微生物群集構造は大きく変化しておらず、下水処理水の流入によって群集構造全体が大きく変化する傾向は見られなかった。Comamonadaceae 科、*Sphingorhabdus* 属、*Flavobacterium* 属、Crocinitomicaceae 科、*Pseudarcicella* 属などの細菌群が優占していた。

個々の細菌群について、TM2→TM3 において相対濃度が 2 倍以上に増加したグループを表 4 に示した。これらの細菌群は、下水処理水に由来する外来の細菌群である可能性が高い。*Acinetobacter* のように、薬剤耐性を有する株が多く存在する細菌群も含まれていた。下水処理過程におけるこれらの細菌群の挙動や薬剤耐性遺伝子などとの関連について更なる調査が必要である。

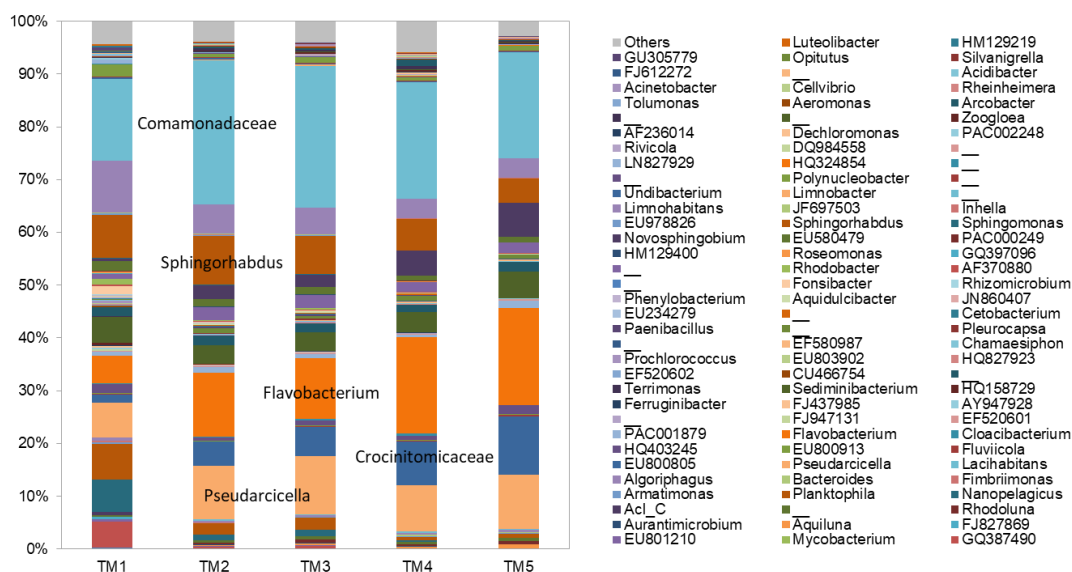


図4 微生物群集構造の変化

表4 TM2→TM3で相対割合が2倍以上に増加した細菌群

Order	Family	Genus	TM2→TM3 の変化倍率
Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	3.4
Frankiales	AB021325	EU801210	2.1
Micrococcales	Microbacteriaceae	Rhodoluna	2.2
Armatimonadales	Armatimonadaceae	Armatimonas	3.7
FJ612278	EF520601	EF520601	2.0
Oscillatoriales	Pseudanabaenaceae	Chamaesiphon	2.5
Oscillatoriales	—	—	5.0
CP011215	CP011215	—	2.9
Rickettsiales	FJ478621	HM129400	2.2
Methylophilales	Methylophilaceae	—	2.4
Neisseriales	Neisseriaceae	Rivicola	2.2
Rhodocyclales	Zoogloeaceae	Zoogloea	2.1
Rhodocyclales	—	—	2.7
Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	3.8
Silvanigrellales	Silvanigrellaceae	Silvanigrella	3.4

3.5. 定量 PCR

図 5 に、定量 PCR の結果を示す。本研究では、ARGs としてサルファ剤耐性遺伝子の *sul1*、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tetA* を対象遺伝子として測定した。なお、2019 年 9 月の結果を見ると、流下に伴って *sul1* 遺伝子のコピー数は単調に増加している。特に、下水処理水が流入する TM2→TM3 では 25 倍、TM3→TM4 では 2 倍に増加していた。最下流の TM5 におけるコピー数は、TM1 の 257 倍に達していた。2019 年 11 月の調査では、TM2 におけるコピー数が 9 月の調査時よりも低かったこともあり、TM2→TM3 において 92 倍増加していた。同様の傾向は *tetA* 遺伝子についても見られた。2019 年 9 月の調査では、下水処理水の流入がある TM2→TM3、TM3→TM4 の各区間においてコピー数がそれぞれ 4 倍ずつ増加していた。最下流の TM5 におけるコピー数は、TM1 の 16 倍であった。多摩川における ARGs のこうした変化は、下水処理水を通して河川水に ARGs が流入していることを示している。

ARGs の人為汚染マーカーとして知られる *intI1* のコピー数は、*sul1* や *tetA* の変化と整合しており、多摩川においても ARGs の汚染指標として有用である可能性が示された。全細菌の 16S rRNA 遺伝子についても、傾向は ARGs や *intI1* と一致しており、下水処理水に由来する負荷により ARGs や *intI1* を含む

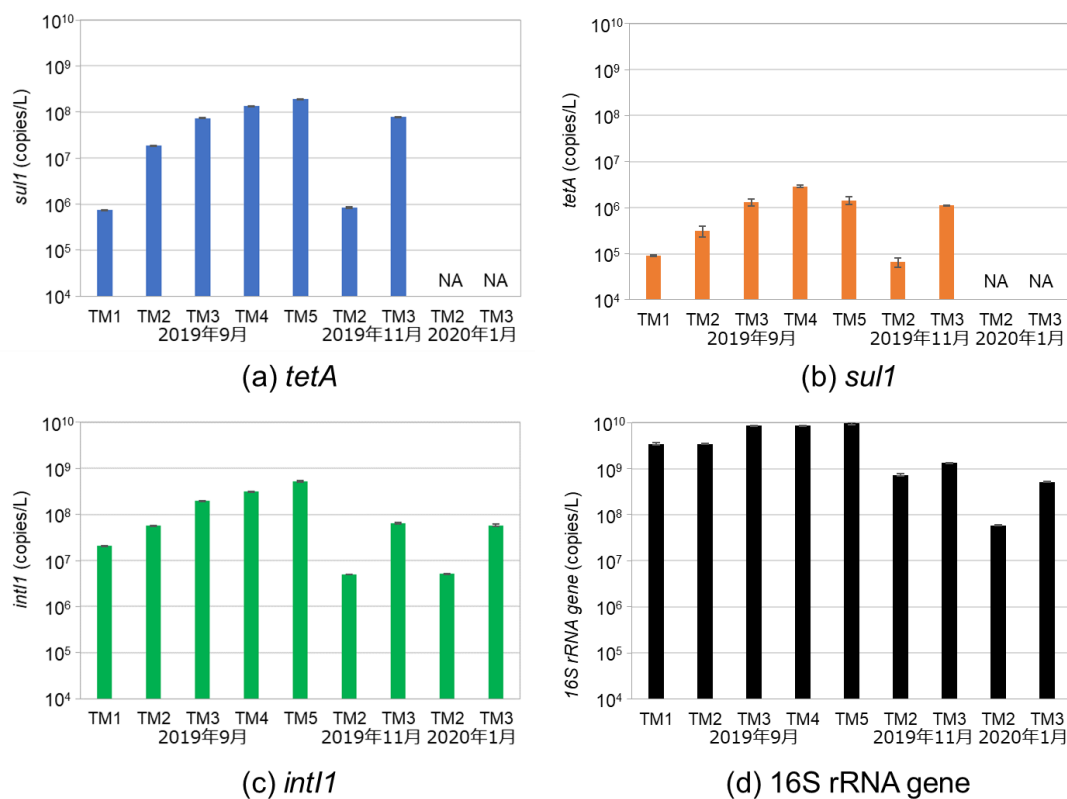


図 5 *sul1*, *tetA*, *intI1*, 16S rRNA 遺伝子コピー数の変化

細菌数が増加していることが推察された。2019年11月の全菌数（図3）では、TM2→TM3において減少していたが、16S rRNA 遺伝子コピー数は逆に増加していた。全体の傾向から判断すると、全菌数の測定において何らかの問題があったと考えられる。

sull、*tetA*、*intI1* の 16S rRNA 遺伝子に対する相対濃度を評価した。TM2→TM3の区間に着目すると、*sull*/16S rRNA 遺伝子は 0.53-0.12%→0.86-5.9%、*tetA*/16S rRNA 遺伝子は 0.009%→0.015-0.085%、*intI1* は 0.69-1.6%→2.3-4.9% にそれぞれ相対濃度が増加していた。このことから、下水処理水の流入に伴って、薬剤耐性遺伝子が河川水中で占める割合も高まっていることが推察された。

4. 結論と今後の課題

- (1) 下水処理水の流入は、多摩川の水質（水温、電気伝導度、アンモニウム態窒素濃度）に大きな影響を及ぼしている。
- (2) 微生物群集構造は全体的に大きな変化を示さなかったが、下水処理水の流入により相対濃度が増加している細菌群が存在していた。
- (3) 下水処理水の流入により、ARGs (*sull*, *tetA*) のコピー数が顕著に増加していることが明らかになった。流下に伴って 16S rRNA 遺伝子に対する薬剤耐性遺伝子の相対濃度が増加していることも明らかになった。
- (4) ARGs の人為汚染マーカーである *intI1* のコピー数の変化は、ARGs の変化と整合していた。

現在、下水処理水の細菌指標は大腸菌群数によって管理されているが、健全な水環境を維持していくためには、人為的な薬剤耐性細菌・薬剤耐性遺伝子の環境への拡散を制御していくことが必要である。そのためにも下水処理の果たす役割は重要であり、こうしたリスク因子を除去するための研究開発が今後更に必要になると考えられる。

5. 参考文献

- Bru, D., Martin-Laurent, F. & Philippot, L. 2008 Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(5), 1660–1663.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.G. 2015 Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* **9**(6), 1269–1279.
- Lee, J., Jeon J.H., Jang, H.M., Kim, S., Song, M.S., Kim, Y.A. 2017 Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *The Science of The Total Environment* **605-606**, 906–914.
- Pei, R., Kim, S.C., Carlson, K.H., Pruden, A. 2006 Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes. *Water Research* **40**(12), 2427–2435.

多摩川における薬剤耐性遺伝子の動態に及ぼす下水処理水の影響評価

(研究助成・学術研究 VOL. 49—NO. 343)

著 者 春日 郁朗

発行日 2020年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>