

第 438 回雑誌会

(Oct. 6, 2025)

(1) Detection of SARS-CoV-2 Proteins in Wastewater Samples by Mass Spectrometry

Lara-Jacoba, L. R., Islam, G., Desaulniers, J. P., Kirkwood, A. E., and Simmons, D. B. D. *Environmental Science & Technology*, **56**, 5062-5070, 2022.

Reviewed by R. Tachibana

下水疫学調査 (WBE) は、COVID-19 の蔓延状況を監視する手法として、世界中で広く使用されている。COVID-19 を対象とした WBE では、RT-qPCR を用いた SARS-CoV-2 RNA 検出法が最も一般的に使用されており、LC-MS/MS を用いた WBE は、ほとんど検討されていない。そこで本研究では、LC-MS/MS を用いて、下水中の SARS-CoV-2 タンパク質の存在を評価し、WBE への適応可能性を検討することを目的とした。試料は、2020 年 10 月から 2021 年 4 月までの 15 週間にかけて、カナダのオンタリオ州に位置する 2 つの下水処理場 (WWTP1, WWTP2) から、計 115 サンプルの流入下水を採取した。試料にアセトンを追加し、遠心分離によってタンパク質を沈殿させた後、還元剤で還元処理を行った。さらに、ヨードアセトアミドを用いてアルキル化を行い、その後、ギ酸でタンパク質をペプチドに消化した。最後に、LC-MS/MS を用いてペプチドを検出し、UniProt でタンパク質を同定した。また、SARS-CoV-2 タンパク質と RNA による WBE の特徴を比較するため、流入下水から RNA を抽出し、RT-qPCR による解析を行った。そして、タンパク質と RNA の検出強度に対して、前後 15 日間の新規 COVID-19 症例数とのクロスコリレーション解析を行い、各日数差における相関を調査した。その後、最大の相関係数が得られた日数差について、ピアソン相関分析で統計的有意性を検定した。

LC-MS/MS によって、7 種類の SARS-CoV-2 タンパク質に由来する 245 種類のペプチドが同定された。7 種類の SARS-CoV-2 タンパク質の中で、最も頻繁に検出されたタンパク質は pp1ab であり、陽性サンプルの 97.82% で検出された。これは、pp1ab が COVID-19 患者の糞便や尿中に豊富に存在する可能性や、他の SARS-CoV-2 タンパク質と比較して分子量が大きく (794,058Da)、分解されにくいことに起因すると考えられる。クロスコリレーション解析とピアソン相関分析の結果、pp1ab は WWTP1 と WWTP2 において、それぞれ 6 日と 5 日前の新規 COVID-19 症例数と最大の相関係数 ($r=0.4527, 0.4945$) を示した ($p<0.0001$)。一方の RNA は、WWTP1 と WWTP2 において、それぞれ 4 日と 10 日後の新規 COVID-19 症例数と最大の相関係数 ($r = 0.7556, 0.4500$) を示した ($p < 0.0001$)。このことから、pp1ab は COVID-19 感染直後に体内で生産され、SARS-CoV-2 RNA に先行して下水中に排出されることが明らかになった。したがって、LC-MS/MS を用いた下水中の pp1ab の監視は、COVID-19 の蔓延状況を早期に把握することができる可能性を示すとともに、タンパク質を用いた WBE の有用性を示唆した。

(2) The role of bacteriophages in facilitating the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment plants

Qiang, W., Min, W., Qingxiang, Y., Lingran, F., Hao, Z., Ruifei, W. and Ruimin, W.
Water Research, **268**, 122776, 2025.

Reviewed by M. Hayashida

水平伝播は、薬剤耐性遺伝子 (ARGs) を拡散する主要なプロセスであり、ファージは形質導入や形質転換に寄与している。また、下水処理場は薬剤耐性菌のホットスポットであり、遺伝子の水平伝播によって ARGs が拡散している。そこで本研究は、ファージによる ARGs やプラスミドの拡散など、ファージが ARGs の水平伝播に与える影響を明らかにすることを目的とした。試料は、中国の下水処理場の曝気槽から排水と汚泥の混合物を採取し、0.22 μm フィルターでろ過してファージ濃縮液を作成した。また、アモキシシリン、アジスロマイシン、テトラサイクリンを混合した培養液によって、試料水から多剤耐性菌 (MRB) のスクリーニングを行った。その後、MRB 培養液とファージ濃縮液、3 種類の抗菌薬を混合し、37°C で 10 日間共培養した (共培養区)。さらに、ファージが ARGs の水平伝播に与える影響を明らかにするため、オートクレーブ処理したファージ濃縮液を用いた同様の操作も行った (対照区)。そして、各混合液中の細胞内 DNA (iDNA)、細胞外 DNA (eDNA)、ファージ DNA を抽出し、遺伝子解析によって菌叢解析と ARGs、プラスミドの検出を行った。

遺伝子解析の結果、培養前後の混合溶液から 11 種の ARGs が検出された。そのうち 9 種の ARGs が、共培養の過程でファージ DNA において有意に増加しており ($p < 0.05$)、*ermB* が最も多く検出された。iDNA と eDNA における ARGs は共培養後に増加したが、細菌叢の変化は確認されなかった。このことから、iDNA と eDNA における ARGs の増加は、特定の MRB の増加ではなく、ファージによる形質導入あるいはファージの溶菌作用による細胞外への ARGs の放出に起因していることが示唆された。また、共培養前にはファージ DNA のみで検出された 5 種の ARGs が、培養後の iDNA においても検出されたことから、ファージが保有する ARG が形質導入によって細菌に伝播したと推察された。さらに、共培養区で 291 種、対照区で 191 種の細胞外プラスミドが検出されており、ファージの作用によって、細胞外プラスミドの種類が増加した。加えて、より多くの ARGs をコードしやすいと考えられる長鎖プラスミド (20 kb 以上) の数は、共培養区において多かった。ファージは、形質導入における ARGs のベクターとして機能するだけでなく、宿主のプラスミドを放出させることで、その他の細菌の形質転換も助長する可能性が示唆された。以上のことから、ファージは ARGs の水平伝播を多面的に促進する存在であると考えられる。