

第 409 回雑誌会

(May. 10, 2024)

(1) Regulation of quorum sensing for the manipulation of conjugative transfer of antibiotic resistance genes in wastewater treatment system

Qiu, X., Wang, B., Ren, S., Liu, X. and Wang, Y.

Water Research, **253**, 121222 (2024).

Reviewed by K. Tsuda

接合伝達による薬剤耐性遺伝子 (ARG) の拡散は、国際的な問題となっている。特に、バイオフィームは細菌密度が高いため、浮遊細菌と比較して、接合伝達に適した環境である。細胞間のコミュニケーションであるクオラムセンシング (QS) は、バイオフィームの形成において重要な役割を果たしている。そこで本研究では、QS 阻害剤であるバニリンが ARG の接合伝達に与える影響を評価し、そのメカニズムを解明することを目的とする。接合実験では、ドナーとして 3 種類の ARG を有するプラスミドを持つ *Escherichia coli* 標準株 (*E. coli* DH5 α)、レシピエントとして *Pseudomonas aeruginosa* 標準株 (PAO1) を用いた。LB 培地とバイオフィームに混合比 1:1 で DH5 α と PAO1 を添加し、バニリンを 4 段階の濃度 (0, 0.025, 0.05, 0.1g/L) で添加した後、37°C で 4 時間培養した。その後、抗菌薬を添加した平板培地上に生育したコロニー数から接合伝達頻度を求めた。さらに、水平伝播グローバル制御、DNA の伝播複製 (Dtr), 外膜タンパク質, QS, 細胞外高分子物質 (EPS) 分泌, および運動性に関連する遺伝子の発現量をコントロール試料と比較し、バニリンの添加による細胞特性の変化を評価した。また、DH5 α と PAO1 の細胞膜透過性、活性酸素産生、バイオフィーム、および病原性因子について、バニリンの添加による変化を評価した。

LB 培地における接合実験において、接合伝達頻度はバニリンの濃度上昇に伴って抑制され、0.1g/L で伝達頻度が 70.4% 減少した。また、バニリンの濃度上昇によって水平伝播グローバル制御遺伝子の発現量が増加した。一方で、Dtr 遺伝子の発現量は減少した。外膜タンパク質遺伝子の発現量、細胞膜透過性、および活性酸素産生には、有意な変化は見られなかった。バイオフィームにおける接合実験では、バニリンの添加によって伝達頻度が 83.3% 減少した。バニリンの濃度上昇によって QS 遺伝子と EPS 分泌遺伝子の発現量は減少した。また、PAO1 が形成するバイオフィームのバイオマスも減少した。さらに、バニリンは QS の阻害により、PAO1 において重要な病原性因子であるピロシアン産生の抑制と運動性に関連する遺伝子の発現を減少させることが示唆された。これらの結果から、バニリンを添加することで、細菌の遺伝子発現量に変化し、バイオフィーム生成が阻害されることによって、接合伝達が抑制されることが明らかになった。

(1) Temporal and spatial relationships of CrAssphage and enteric viral and bacterial pathogens in wastewater in North Carolina

Wu, H., Juel, M. A. I., Eytcheson, S., Aw, T. G., Munir, M., Molina, M.
Water Research, **239**, 120008, 2023.

Reviewed by R. Nakamura

下水に起因する腸管疾患は、公衆衛生における重要な懸念事項の一つである。近年、新たなヒト関連糞便汚染指標として cross-assembly bacteriophage (crAssphage) が注目されている。メタゲノム解析によって crAssphage が人の腸内から大量に検出され、人の糞便汚染と強く関連していることが報告された。しかし、下水中の crAssphage と腸内病原微生物との相関や季節および地理的な影響に関する報告はない。そこで本研究では、流入下水中の腸内病原ウイルス (HAdV : human adenoviruses, Enterovirus, Norovirus) および病原細菌 (*stx2*, *Campylobacter*, *Salmonella*) の微生物水質指標としての crAssphage の有用性を検討した。また、crAssphage, 腸内病原ウイルス, および病原細菌の時間的・空間的変動を調査することを目的とした。流入下水は、2021 年 1 月～2022 年 2 月の期間、ノースカロライナ州にある 4 つの下水処理場から毎週採水した (147 samples)。採水された流入下水 3 L をデットエンド中空糸限外ろ過装置で濃縮し、溶出液 200 mL を得た。病原細菌は溶出液 20 mL を 0.45 μm フィルターでろ過し、Qiagen PowerLyzer PowerSoil kit を用いて DNA を抽出した。crAssphage および腸内病原ウイルスは、ビーフエキス・セライト法を用いて二次濃縮し、0.2 μm フィルターでろ過した後、Qiagen All Prep PowerViral Kit を用いて DNA と RNA を抽出した。各 DNA および RNA 抽出液は、qPCR 法および逆転写 qPCR 法を用いて遺伝子数の定量を行った。

crAssphage は、すべての流入下水試料から高濃度 (2.46×10^8 gc/L) に検出され、腸内病原ウイルスおよび病原細菌の濃度と比較して、 $10^2 \sim 10^4$ gc/L 高いことが確認された。crAssphage, 腸内病原ウイルス, および病原細菌についてスピアマンの順位相関を行った結果、crAssphage は HAdV, Enterovirus, Norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* と有意な相関が確認された ($p < 0.05$)。しかし、crAssphage は *stx2* と有意な相関は確認されなかった ($p = 0.77$)。さらに、調査したすべての微生物の季節と空間変動について一元配置分散分析を行った結果、季節間で微生物濃度に有意差が確認された ($p < 0.01$)。特に、crAssphage は春から夏の濃度と比較して秋から冬の濃度が有意に高かった ($p < 0.05$)。しかし、crAssphage, HAdV, Enterovirus, Norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* は下水処理場間で有意差は確認されなかった。これは、crAssphage が下水処理場の規模、下水集水域の都市化のレベルによる影響を受けず、空間変動が小さいことを示している。以上の結果から、crAssphage は水環境中の微生物水質指標として適していることが示唆された。

(2) Horizontal gene transfer in activated sludge enhances microbial antimicrobial resistance and virulence

Fang, G.Y., Liu, X.Q., Jiang, Y.J., Mu, X.J. and Huang, B.W.

Science of the Total Environment, **912**, 168908, 2024.

Reviewed by S. Tamai

活性汚泥処理は、下水中の有機物を除去する上で重要な技術である。しかしながら、下水処理場には薬剤耐性遺伝子（ARG）や病原遺伝子（VFG）を保有する細菌が存在することから、下水処理場における遺伝子の水平伝播（HGT）が懸念されている。特に、活性汚泥中は細菌密度が極めて高く、水中に存在する重金属や抗菌薬によって HGT が促進されることから、ARG や VFG を保有する細菌が蔓延するリスクが極めて高い。そこで本研究では、活性汚泥サンプルのメタゲノム解析を実施し、下水中の細菌における ARG と VFG の拡散の実態を調査することで、ヒトの健康に対するリスクを評価した。メタゲノム解析には、香港の下水処理場の活性汚泥処理地点から 9 年間にわたって収集された 97 個のゲノムデータを使用した。DNA 抽出には Fast DNA spin kit for soil を使用し、Illumina HiSeq 4000 で配列を取得した。全てのゲノムから 478 個のメタゲノムアセンブリゲノム（MAG）を作成し、MAG から HGT の履歴、ARG、および VFG の検出を行った。

HGT の履歴について解析したところ、1056 例の HGT イベントが確認され、その内の 59 例（5.6%）は伝播後の経過時間が少なく、伝播履歴の新しいことが明らかになった。活性汚泥中の伝播履歴の新しい遺伝子の割合は、既往の研究における海水やヒト腸内細菌叢での割合（<1%）よりも有意に高かった。活性汚泥処理槽では、細菌のストレス因子が多いことから、頻繁に HGT が起こっていると推察される。また、HGT に関連した主要な細菌は Alphaproteobacteria（35.4%）、Gammaproteobacteria（19.5%）、および Bacteroidia（13.4%）であり、ほとんどの HGT は、同一の分類群の細菌の間で行われ、異なる分類群での伝播は稀であった。伝播した遺伝子の機能を検索したところ、糖質・アミノ酸代謝や遺伝子の保存・伝達にかかわる遺伝子が頻繁に検出された。すなわち、細菌はこれらの遺伝子を獲得することによって、活性汚泥中での生存が有利になることが示唆された。続いて、ARG と VFG の伝播イベントを検索したところ、それぞれ 30 例と 27 例の伝播イベントが確認された。また、ARG と VFG は水平伝播した遺伝子中での存在量が多く、活性汚泥中において ARG と VFG の伝播が促進されたことを示している。一部の細菌が HGT に深く関連していたことから、薬剤耐性菌や病原細菌の蔓延を防ぐためには、活性汚泥中の細菌叢の高度な管理が重要である。

第 411 回雑誌会
(June. 14, 2024)

(1) Microbial communities in the water surface microlayer and associations with microbes in aerosols, beach sand, and bulk water

Abdool-Ghany, A. A., Klaus, J. S., Sosa Villegas, L. E., D'Alessio, T., Gidley, M. L., Sinigalliano, C. D., Gaston, C., and Solo-Gabriele, H. M.
FEMS Microbiology Ecology, **99(5)**, 2023.

Reviewed by R. Funaguma

沿岸環境（海表面マイクロ層、海水、海砂、エアロゾル）には、多様な微生物が存在する。その中には、人間に健康被害を及ぼす可能性のある病原性細菌が含まれている。また、合流式下水道のオーバーフローによる沿岸域の汚染や大潮によって、病原性細菌の曝露が促進する可能性が報告されている。しかしながら、沿岸環境中の微生物叢と下水や大潮の影響による微生物叢の変化を調査した研究は少ない。そこで本研究では、海表面マイクロ層、海水、海砂、エアロゾルの微生物叢の比較、ならびに下水の流入と大潮が微生物叢に与える影響を評価した。各試料は、2019 年 9 月から 2020 年 2 月の期間で採取した。細菌の計数には、一般海洋細菌と腸球菌でそれぞれ Marine 寒天培地と mEI 寒天培地を用いた。菌叢解析は、各サンプルの DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象として実施した。菌叢解析後、海表面マイクロ層と海水に含まれる細菌の存在量に対するエアロゾルに含まれる細菌の存在量の比をエアロゾル化係数（AF 値）として算出し、各細菌のエアロゾルへの移行のしやすさを評価した。

海表面マイクロ層と海水における一般海洋細菌は、通常時が 1.61×10^4 CFU/100 mL であるのに対し、大潮の日は 2.50×10^4 CFU/100 mL となり、細菌数が有意に増加した。また、海表面マイクロ層と海水における腸球菌数は、通常時が 22 CFU/100 mL であるのに対し、下水が流入した日は 100 CFU/100 mL となり、腸球菌数は有意に増加した。海砂の一般海洋細菌は、最大 3.97×10^4 CFU/g、腸球菌は、最大 50 CFU/g となり、海表面マイクロ層と海水の細菌数との有意な相関は確認されなかった。また、エアロゾルの一般海洋細菌は最大で 65 CFU/m³、一方の腸球菌はすべてのサンプルが検出限界以下（ <0.2 CFU/m³）であった。各試料の菌叢解析を行った結果、海表面マイクロ層と海水では *Synechococcus* 属、エアロゾルでは *Staphylococcus* 属と *Porphyrobacter* 属が優占的であった。また、海表面マイクロ層では、大潮時に病原性細菌である *Vibrio* 属の相対存在量が増加し、下水流入時に *Mycobacterium* 属と *Legionella* 属の相対存在量が増加した。AF 値を算出した結果、病原性細菌である *Corynebacterium* 属や *Vibrio* 属等が海表面マイクロ層と海水からエアロゾルへ移行しやすい細菌であることが確認された。

第 412 回雑誌会

(June. 21, 2024)

Determination of trace antibiotics in water and milk via preconcentration and cleanup using activated carbons

Liu, Y., Wu, Z., Barge, A., Boffa, L., Martina, K. and Cravotto, G.

Food Chemistry, **385**, 132695 (2022).

Reviewed by R. Kondo

酪農場において、生乳中に残留する抗生物質 (ABX) が懸念されている。生乳中に微量で存在する ABX 濃度を測定するために、固相抽出 (SPE) 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) が広く用いられている。しかしながら、市販の SPE カラムを用いる場合、生乳中のタンパク質等を除去する必要がある。そこで SPE カラムの吸着材として、安価かつ ABX を選択的に吸着する活性炭 (AC) に着目した。本研究では生乳中の微量 ABX として、スルファモノメトキシシン (SMM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、塩酸セフトチオフル (CEF) およびマルボフロキサシン (MAR) を対象とし、AC-SPE-HPLC 法による ABX の回収法を検討した。ABX が含まれない市販の低温殺菌脱脂乳に SMM, OTC, CEF および MAR をそれぞれ 0.02-1.00 µg/mL 添加して生乳サンプルを調製した。AC カラムは、粉末 AC (10 mg) をガラスシリンジに入れて作製した。また、生乳サンプルの粘性を除去するため、キレート剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加し、無添加サンプルと回収率を比較した。AC カラムに 5-80 mL の生乳サンプルを連続的に通し、ABX を AC に吸着させた。次に、2 mL の 30% 水酸化アンモニウム/エタノール (v/v : 1/19) 溶出液を用いて、AC カラムから ABX を溶出した。その後、回収した溶出液を窒素パージによって 0.5 mL に濃縮し、HPLC で分析した。

EDTA 無添加の生乳サンプルからの ABX 平均回収率は、SMM : 96.0%, OTC : 79.9%, CEF : 37.6%, MAR : 39.2% となった。これに対して、EDTA 添加生乳サンプルの平均回収率は、SMM : 99.1%, OTC : 99.3%, CEF : 68.9%, MAR : 61.4% であり、EDTA 無添加と比較して、回収率が向上した。EDTA の添加によって、ABX、タンパク質および金属イオンが分離したために、回収率が向上したと推察される。HPLC 法では、濃縮液中の乳成分の残留による分析阻害は認められなかった。また、6 回繰り返し試験を実施した結果、各 ABX 回収率に対する相対標準偏差は、それぞれ SMM : 2.4-6.3%, OTC : 3.1-6.5%, CEF : 2.2-4.0%, MAR : 1.2-2.4% であり、再現性は良好であった。以上のことから、従来法と比較して、AC-SPE-HPLC 法は安価かつ迅速な ABX 分析方法として利用できる可能性がある。

第 413 回雑誌会

(Jul. 4, 2024)

(1) Tracking the source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the aquatic environment in Shiga, Japan, through whole-genome sequencing

Ma, C., Ihara, M., Liu, S., Sugie, Y. and Tanaka, H.

Environmental Advances, 8, 100185 (2022).

Reviewed by R. Matsuyama

薬剤耐性菌による感染症は、公衆衛生における最重要な問題である。なかでも薬剤耐性大腸菌 (AR-*E. coli*) は、臨床株や動物株から多数検出されている。また、AR-*E. coli* は水環境中にも広く存在し、琵琶湖においても頻繁に検出されている。そこで本研究では、琵琶湖の湖水、流入河川水 (河川水)、琵琶湖周辺の下処理施設の流入水および放流水の AR-*E. coli* を収集し、その発生源の特定を目的とした。試料水からメンブレンフィルター法で大腸菌を捕捉し、非選択株 98 株、アンピシリン耐性株 (AMP-*E. coli*) 72 株、テトラサイクリン耐性株 (TC-*E. coli*) 47 株、合計 217 株を収集した。各大腸菌株は DNA を抽出し、全ゲノム配列を取得した。大腸菌株の系統群は ClermonTyping によって A, B1, B2, C, D, E, F に分類し、13 種の大腸菌宿主特異的遺伝子マーカー (ヒト 4 種, ウシ 2 種, ブタ 3 種, ニワトリ 4 種) で宿主を決定した。また、宿主の割合から各試料水の大腸菌の類似性を評価した。

非選択株の最優占系統群は、流入水、放流水、湖水において、それぞれ B2 (4/9 株), B1 (19/50 株), B1 (24/39 株) であった。各試料の非選択株における最優占宿主は、流入水ではヒト (3/9 株), 放流水ではヒト (14/50 株), 湖水ではニワトリ (10/39 株) であった。B1 は家畜から分離された大腸菌の主な系統群であるとされており、湖水は主に畜産による糞便汚染を受けていると考えられる。AMP-*E. coli* 株の最優占系統群は、流入水で B2 (7/18 株), 放流水で B1 と B2 (9/30 株), 湖水では D (9/24 株) であった。AMP-*E. coli* 株の宿主は、ニワトリの占める割合が最も多く、流入水で 8 株, 放流水で 11 株, 湖水で 4 株であった。また、TC-*E. coli* 株の最優占系統群は、流入水で B2 (4/11 株), 放流水で B2 (5/12 株), 河川水で B1 (12/24 株) であった。TC-*E. coli* 株の主要な宿主の割合は、流入水でヒト (3/11 株), 放流水でヒトとニワトリ (5/12 株), 河川水でニワトリ (7/24 株) であった。また、Morishita-Horn 指数によって類似性を評価した結果、湖水と放流水の AMP-*E. coli* 株は、宿主の類似度が高かった。一方で、TC-*E. coli* 株は、全てのサンプル間で宿主の類似度は低かった。以上のことから、琵琶湖における AR-*E. coli* は、ニワトリが主な発生源であると推察される。全ゲノム解析と宿主特異的遺伝子マーカーを組み合わせることで AR-*E. coli* の発生源を特定できることが示唆された。

第 414 回雑誌会

(Jul. 12, 2024)

(1) Wastewater-based proteomics: A proof-of-concept for advancing early warning system for infectious diseases and immune response monitoring

Jagadeesan, K. K., Elliss, H., Standerwick, R., Robertson, M. Barden, R., Hordern, B. K.

Journal of Hazardous Materials Letters, 5, 100108, 2024.

Reviewed by R. Tachibana

SARS-Cov-2 の流行により、ウイルスを監視する新たな手法として下水疫学が注目されている。しかし、下水疫学によるウイルス検出だけでは、集団の免疫応答を理解し、有病率を推測することは不十分である。そこで本研究では、下水中のコロナウイルスの検出に用いられる SARS-Cov-2 スクロカプシドタンパク質 (NCAP) と、ウイルス感染によって急激に増加する C 反応性タンパク質 (CRP) に着目し、これらのタンパク質の一斉検出による集団感染の早期診断を目的とした。下水試料は、新規症例数 2 件の A 日と新規症例数 118 件の B 日に、イングランドの下水処理場から採水した。初めに、下水試料 35 mL に同量の超純水を加え、遠心式フィルターユニットで遠心分離を行い、濃縮液 350 μ L を得た。タンパク質のまま質量分析を行うことが困難であるため、次に、タンパク質のペプチド化を実施した。NCAP は既報に従って消化し、CRP は TCEP 法、DTT 法、および RapiGest 法の 3 種類のタンパク質消化法を比較し、最適な消化法を検討した。また、タンパク質の検出において、タンパク質の固有ペプチドの決定が重要である。そこで、長さや疎水性が異なる 3 種類の NCAP と CRP のペプチドを比較し、最適なペプチドを検討した。さらに、3 種類の質量分析法 (UHPLC-QQQ, UHPLC-QTOF, MALDI-TOF/TOF) を比較し、最適な質量分析計を検討した。

タンパク質の消化法を比較したところ、CRP では RapiGest 法が最適であり、CRP-1 と CRP-2 を検出することが可能であった。また、質量分析計を比較したところ、UHPLC-QQQ が最も感度が高く、下水中の NCAP と CRP を検出することができたが、UHPLC-QTOF と MALDI-TOF/TOF では検出できなかった。UHPLC-QQQ による質量分析において、A と B の両日とも、NCAP-1 と CRP-2 のみが検出された。CRP の人口正規化 1 日負荷量 (PNDL) を見積もると、A 日で 0.8 ± 0.5 mg/day/1000 人、B 日で 0.5 ± 0.6 mg/day/1000 人であった。健康な集団の CRP の PNDL は 2.4 g/day/1000 人され、A と B 両日よりも高いため、CRP は年齢や性別などの様々な要因によって影響を受ける可能性が示された。また、SARS-Cov-2 の PNDL は A 日で 2.6 ± 0.3 mg/day/1000 人、B 日で 4.7 ± 1.5 mg/day/1000 人であった。SARS-Cov-2 の PNDL の濃度は新規症例数と比例しており、新規症例数と相関がある可能性が考えられる。そのため、SARS-Cov-2 の PNDL は下水処理施設の集水域内での新規症例数を反映していることが示唆された。

(2) Effect of Urban Wastewater Discharge on the Abundance of Antibiotic

Resistance Genes and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Two Italian Rivers

Pantanella, F., Lekunberri, I., Gagliardi, A., Venuto, G., Sánchez-Melsió, A., Fabiani, M., Balcázar, J.L., Schippa, S., De Giusti, M., Borrego, C. and Solimini, A.

International journal of Environmental Research and Public Health, **17**, 6813, 2020.

Reviewed by R. Kashima

排水処理施設（WWTP）は、薬剤耐性菌（ARB）の発生および薬剤耐性遺伝子（ARG）の拡散の場であると考えられている。ARB や ARG を含む放流水が河川に放流されることによって、受水域での遺伝子の水平伝播が生じ、ARB の蔓延するリスクが懸念されている。そこで本研究では、上流部に農村や牧草地帯が広がるアローネ川とローマ市街地を流下するテヴェレ川において、WWTP 放流水が ARG と薬剤耐性大腸菌（AR-*E.coli*）の存在量に及ぼす影響を検討した。試料水として、放流水流入前の河川水（上流水）、放流水、放流水流入後の河川水（下流水）、河口付近の海水を 2016 年 9 月、12 月、2017 年 4 月の計 3 回採取した。大腸菌は TBX 培地で計数し、9 種の薬剤を用いて、ディスク拡散法によって薬剤耐性を評価した。また、各試料水から DNA を抽出し、16s rRNA, *int11*, *ermB*, *tetW*, *qnrS*, *sull*, *bla_{TEM}* を qPCR 法で定量した。さらに、季節の影響を考慮して統計解析を行い、各河川におけるターゲット遺伝子の存在量の差異を評価した。

16srRNA 遺伝子コピー数を比較すると、サンプリング時の季節によらず、市街地を流下するテヴェレ川の方がアローネ川よりも高かった。両河川の ARG で有意が生じたのは、*ermB* と *qnrS* であった。河川の地点別では、アローネ川における WWTP 放流水において、*sull* のコピー数が上流水と比較して有意に高かった。一方、テヴェレ川では有意な差は見られなかった。大腸菌数においても 16s rRNA と同様であり、季節によらず、テヴェレ川が高かった。薬剤耐性率は、両河川のすべての地点において、TC, AMPC, TMP/SMX, CPFX, CP で 10~40% となり、高い値を示した。ロジスティックス回帰分析を実施したところ、アローネ川の WWTP 放流水と下流水では、TC と CPFX の耐性率が上流と比較して、有意に高かった。しがたって、農村や牧草地帯を流会するアローネ川は、WWTP による影響を受けていると考えられる。これに対して、市街地のテヴェレ川では、すべての抗菌薬において、放流水と下流水で有意な差は見られなかった。以上より、農村や牧草地帯を流会するアローネ川では、WWTP の影響を受けていることが示された。一方で、市街地のテヴェレ川では WWTP の影響が示されなかったため、WWTP よりも上流に汚染源が存在していると考えられる。

第 415 回雑誌会

(Jul. 19, 2024)

(1) *Cylindrospermopsin enhances the conjugative transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes through glutathione biosynthesis inhibition*

Yang, S., Cao, J., Zhao, C., Zhang, X., Li, C., Wang, S., Yang, X., Qiu, Z., Li, C. Wang, J., Xue, B. and Shen, Z.

Ecotoxicology and Environmental Safety, **276**, 116288 (2024).

Reviewed by K. Tsuda

シアノバクテリアが産生する毒素であるシアノトキシンの 1 種、シリンドロスペルモペプシン (CYN) は、全世界の水環境中から検出されている。同様のシアノトキシンの一種であるマイクロシスチンは、細胞膜透過性の増加によって、薬剤耐性遺伝子 (ARG) の接合伝達を促進することが報告されている。しかしながら、CYN が ARG の接合伝達に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで本研究では、水環境中で検出される濃度の CYN が ARG の接合伝達に与える影響を評価し、そのメカニズムを解明することを目的とした。接合実験では、3 種類の ARG を保有するプラスミドを持つ *Escherichia coli* (*E. coli*) HB101 をドナー、リファンピシン耐性の *E. coli* K12 をレシピエントとして使用した。LB 培地に混合比 1:1 で *E. coli* HB101 と *E. coli* K12 を添加し、CYN を 5 段階の濃度 (0, 0.1, 1, 10, 100 µg/L) で添加した後、37°C で各時間 (4, 8, 16, 24 h) 培養した。その後、抗菌薬入りの培地で生育したコロニー数から接合頻度を求めた。さらに、活性酸素の産生、細胞膜透過性、活性酸素を還元的に消去するグルタチオン (GSH) の合成、抗酸化酵素活性、および細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) 量を control と比較し、CYN の添加による細胞特性の変化を評価した。また、RNA を抽出し、Illumina NovaSeq 6000 Platform で塩基配列を取得した。

各条件での接合頻度を比較したところ、CYN 濃度 10 µg/L、16 時間培養後において、接合頻度は最も高く (3.3×10^{-3})、control の 6.5 倍であった。CYN の添加による細胞特性の変化を比較したところ、活性酸素量は、全 CYN 濃度において control よりも増加しており、10 µg/L では約 2 倍に増加した。さらに、CYN の添加によって、抗酸化酵素、酸化ストレス応答に関与する遺伝子、DNA 修復遺伝子、および SOS 反応関連遺伝子の発現量が増加した。一方で、GSH 合成関連遺伝子は 0.6-0.8 倍に減少し、細胞内の GSH 量は低下した。細胞膜透過性は、2 時間後に 1.2-1.3 倍に増加し、細胞膜透過性の変化に関連する遺伝子の発現量も増加した。また、細胞内の ATP 量も増加しており、ATP の合成に関連する遺伝子の発現量も増加した。これらの結果から、CYN は、活性酸素量の増加と細胞内の GSH 量の低下を引き起こし、膜透過性と細胞内の ATP 量を増加させることで、ARG の接合伝達を促進することが明らかになった。

(2) Differential induction of Shiga toxin in environmental *Escherichia coli* O145:H28 strains carrying the same genotype as the outbreak strains

Carter, M. Q., Pham, A., Du, W. X. and He, X.

International Journal of Food Microbiology, **339**, 109029, 2021.

Reviewed by R. Nakamura

志賀毒素産生大腸菌（STEC）は、表現型によって病原性が大きく異なる。この多様性は、病原遺伝子の種類と遺伝子構造の違いに起因している。STEC の主要な血清型として O157 が挙げられるが、O145 の危険性も報告されている。STEC が保有する志賀毒素遺伝子は、prophage ゲノム上に存在するため、志賀毒素（Stxs）の産生には prophage の誘導が必須である。本研究では、STEC O145:H28 株（臨床株 2 株、環境由来株 12 株：牛由来 10 株、河川水由来 1 株、河川底質由来 1 株）について、牛の腸内環境や畜産で使用する抗菌薬などのストレスによる Stxs 産生量の変化を検討し、株ごとの Stxs 産生量の違いを遺伝子解析によって考察した。STEC の DNA はフェノール/クロロホルムによって抽出した。抽出した DNA は、PacBio RS II を用いて全ゲノム配列を決定した。その後、遺伝子解析によって、STEC 株の遺伝的多様性を評価し、系統分類を行った。さらに、Stx-prophage の推定挿入部位を決定し、Stx-prophage ゲノム配列の類似性解析と相同性解析を行った。ストレス試験では、STEC O145:H28 株を培養し、マイトマイシン C（MMC）、エンフロキシサシン、塩酸（HCl）、過酸化水素（H₂O₂）の 4 種類のストレスを与え、Stxs の産生量の比較をした。Stxs の産生量は、ELISA 法を用いて定量した。

遺伝子解析の結果、全ての臨床株と環境由来株が ST-78 に分類された。12 株の環境由来株の中で牛由来株の Stx2a-prophage のみが、米国の臨床 STEC O145:H28 株とドイツの臨床 STEC O104:H4 株の Stx2a-prophage と高い配列類似性を示した。また、牛由来 STEC O145:H28 株の中には、STEC O157:H7 と同様の高い病原性に関連する遺伝子を持つ Stx2a-prophage を保有する株が存在した。ストレス試験の結果、MMC 処理後には、全ての STEC 株の Stxs 産生量が有意に増加し、Stx1a 産生量は最大 99.4 倍、Stx2a 産生量は最大 509 倍に増加した。抗菌薬のエンフロキシサシン処理後にも、全ての STEC 株の Stxs 産生量が有意に増加し、Stx1a 産生量は最大 119 倍、Stx2a 産生量は最大 30.3 倍に増加した。胃酸環境を模擬した HCl 処理後にも、Stxs 産生量は有意に増加した。好中球によるストレスを模擬した H₂O₂ 処理後には、11 株の STEC 株の Stxs 産生量が有意に増加したが、Stxs 産生量増加率は、4 つの条件の中で最も低かった。ほぼ同一の Stx-prophage を持つ菌株間で Stxs の産生量に差があることから、宿主細菌が Stxs の産生を制御する役割を担っていることが示唆された。以上より、Stx-prophage は、牛の腸内環境や畜産で使用する抗菌薬などのストレスによって、誘導が促進され、環境中に拡散されていることが推察された。

第 416 回雑誌会
(August 1, 2024)

(1) Metagenome sequencing reveals shifts in phage-associated antibiotic resistance genes from influent to effluent in wastewater treatment plants

Li, Z., Guo, X., Liu, B., Huang, T., Liu, R. and Liu, X.

Water research, **253**, 121289, 2024.

Reviewed by S. Tamai

下水処理場は公衆衛生上極めて重要な施設であるが、下水中には多くの薬剤耐性菌（ARB）と薬剤耐性遺伝子（ARG）が存在している。また、下水中にはファージが細菌の 10 倍以上存在していることが報告されており、ファージを介した遺伝子の伝播方法である形質導入による ARG の伝播が危惧されている。近年、水環境中に存在するファージが ARG を保有していることが報告されているが、高濃度の細菌とファージが存在する下水処理場における ARG のプロファイルとファージが保有する ARG（vir-ARG）の関係は明らかになっていない。そこで本研究では、下水処理場の ARG と vir-ARG のプロファイルを解析し、下水処理場における細菌とファージのレジストームと形質導入の関係を評価した。中国東部の下水処理場 9 箇所から採取した流入水と放流水を 0.22 μm フィルターでろ過し、ろ過後のフィルターから DNA を抽出し、Illumina HiSeq によって DNA 配列を取得した。配列データから contig アセンブルし、ARG と可動遺伝因子（MGE）の検出を行い、ARG と MGE の相関を解析した。

各処理場の ARG の相対存在量を比較すると、全ての処理場において、放流水の ARG の存在量は、流入水よりも 57.2~96.7%減少しており、処理工程によって ARG の存在量が減少することが明らかになった。MGE の解析の結果、安定性/転移/防御（STD）、組織間転移（T）、ファージ（P）の機能を持つ MGE が放流水において有意に増加し、統合/切除（IE）の機能を持つ MGE は存在量が低下した。特に、P-MGE は存在量が 1.7 倍に増加し、放流水中における遺伝子の伝播はファージが関与していることが示唆された。さらに、放流水における ARG の相対存在量は、IE、P、複製/組み換え/修復、STD の機能を持つ MGE の存在量と有意な相関が確認され、放流水の ARG プロファイルの形成に MGE が重要な役割を果たしていることが明らかになった。放流水の vir-ARG について解析したところ、既往の研究における淡水や土壌のファージよりも多くの種類の ARG が検出された。また、流入水と放流水の主要な ARG のプロファイルは、vir-ARG と P-MGE に有意な相関があり、下水処理場の ARG プロファイルの形成にファージが大きく関与していることを示唆している。ARG と MGE の共局在を解析したところ、放流水では P-MGE が主要な ARG と共局在しており、P-MGE が放流水の ARG と関連していることが明らかになった。これらの結果は、下水処理場におけるファージによる ARG の拡散の潜在的なリスクを示している。

第 417 回雑誌会

(Sep. 13, 2024)

(1) Seasonal occurrence of multiple classes of antibiotics in East China rivers and their association with suspended particulate matter

Wang, K., Su, Z., Reguyal, F., Bian, R., Li, W., Yu, H., Sun, Y., Zhuang, Y. and Shang, Science of the Total Environment, **853**, 158579 (2022).

Reviewed by R. Kondo

水環境中における抗生物質 (ABX) の存在は、薬剤耐性菌が発生する原因である。また、有機汚染物質は浮遊粒状物質 (SPM) に収着することから、SPM は汚染物質の拡散の原因となり得る。したがって、SPM は水環境中において ABX の担体として働いている可能性がある。しかしながら、ABX の担体として SPM を評価した例は少ない。そこで本研究では、スルホンアミド系 (SAs) 19 種、フルオロキノロン系 (FQs) 14 種、テトラサイクリン系 (TCs) 7 種、マクロライド系 (MLs) 5 種の合計 45 種の ABX を対象とし、ABX 存在量の季節的变化と SPM との関連性を評価した。中国の小清川の 44 地点と黄河の 35 地点において、雨季 (夏)、乾季 (冬)、および平水期 (春) に試料を採取した。SPM からの ABX の抽出には、マイクロ波支援抽出法を用いた。そして、抽出液を固相抽出法で精製・濃縮し、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) によって総 ABX 濃度を測定した。また、河川水中の SPM 濃度は、濁度を用いて全懸濁物質 (TSS) として算出し、重回帰分析を用いて、ABX 濃度と TSS の関連性を解析した。さらに、水生生物に対する ABX の生態学的リスクは、ABX 濃度と予測無影響濃度の比であるリスク定量値 (RQ 値) から評価した。

HPLC によって、小清川で 35 種、黄河で 31 種の ABX が検出された。小清川と黄河における各種の ABX 平均濃度は次の通りである：小清川, SAs 14.0 µg/L, FQs 24.8 µg/L, MLs 1.1 µg/L ; 黄河, SAs 15.4 µg/L, FQs 15.4 µg/L, MLs 1.6 µg/L。なお、両河川から TCs は検出されなかった。総 ABX 濃度は乾季に最も高く、続いて順に平水期、雨季に低下した。これは季節による薬剤の使用量増加や日照不足による薬剤の分解速度の低下、流量の増減が原因と考えられる。次に、総 ABX 濃度と TSS の関係を重回帰分析で評価したところ、どちらの河川においても正の相関が確認された。SPM に収着した総 ABX 量は 6.5-26.1 µg/g、溶存 ABX 濃度は 0.2-3.2 ng/mL と算出された。さらに、検出された ABX の SPM/水相間において分配係数が 3000 以上であり、水環境中では、ほとんどの ABX は SPM に収着していることが示唆された。また、全調査地点の約 70%において、RQ 値は 0.1 未満であり、ABX が水生生物に与えるリスクは低いことが明らかになった。以上の結果から、水環境中において SPM の移動が ABX 拡散の要因となっている可能性が示唆された。

第 418 回雑誌会

(Sep. 20, 2024)

(1) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance in municipal and hospital wastewaters in Czech Republic: Culture-based and metagenomic approaches

Kutilova, I., Medvecky, M., Leekitcharoenphon, P., Munk, P., Masarikova, M., Davidova-Gerzova, L., Jamborova, I., Bortolaia, V., Pamp, S. J. and Dolejska, M.

Environmental Research, **193**, 110487, 2021.

Reviewed by R. Kashima

下水処理場（WWTP）は、薬剤耐性菌（ARB）と薬剤耐性遺伝子（ARG）のホットスポットと考えられている。すなわち、WWTP をモニタリングすることで、薬剤耐性の発生や拡散を追跡することができる。そこで本研究では、病院排水、都市下水、河川水における、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌の全ゲノムと排水中の DNA を解析して、ARB と ARG の拡散の実態を評価した。試料は、病院の WWTP（流入水、放流水）、病院から都市下水処理場に流入する下水、都市下水処理場（流入水、放流水）、都市下水処理場の放流先である河川の 6 地点から採取した。試料から ARB を選択するために、2 mg/L のセフトキシム（CTX）を添加した大腸菌・大腸菌群選択培地で培養した。生育した CTX 耐性菌は、MALDI-TOF-MS で菌種を同定し、大腸菌と同定された 158 株を分離した。分離株はディスク試験によって ESBL 産生を確認し、ディスク拡散法によって薬剤感受性試験を行った。続いて、ESBL 大腸菌 78 株と各試料水から抽出した DNA に対してメタゲノム解析を実施し、それぞれの遺伝子多様性を比較した。

総大腸菌に占める CTX 耐性大腸菌の割合は、0.0～4.8%であった。CTX 耐性株の 95.6% (151/158 株) が ESBL 産生大腸菌であり、82.9% (131/158 株) が多剤耐性菌であった。また、ESBL 産生大腸菌の 98.7% (149/151 株) が *bla*_{CTX-M} を保有していた。CTX 耐性株は、高い遺伝的多様性を示し、66 のクラスターに分類された。メタゲノム解析の結果、ESBL 産生大腸菌は遺伝子の多様性が高く、臨床的に重要な Sequence type が多く検出された (ST38, ST131, ST635, ST10)。また、腸管外病原性大腸菌が 28.2% (22/78 株) 検出され、その内の 10 株は都市下水処理場の放流水から検出されており、放流域の河川における健康リスクとなる可能性がある。各試料水のメタゲノム解析の結果、ARG の多様性は病院 WWTP の流入水において最も高かった。以上のことから、ESBL 産生大腸菌が広範囲に存在し、病原性を有した ESBL 産生大腸菌が河川水中に放流されている実態が明らかになった。

(2) Proteomics analysis of serum and urine identifies VCP and CTSA as potential biomarkers associated with multiple myeloma

Fu, W., Song, Y., Zhao, R., Zhao, J., Yue, Y. and Zhang, R.
Clinica Chimica Acta, **552**, 117701, 2024.

Reviewed by R. Tachibana

多発性骨髄腫（MM）は、高カルシウム血症、腎不全、貧血、骨病変などを発症する癌である。MM には特定の臨床症状がないため、早期診断が困難である。MM 患者の 1~2%は、診断に用いられる M タンパク質と血清遊離軽鎖の濃度が正常であるため、疾病患者において特異的なバイオマーカーを発見することが求められている。そこで本研究では、血清および尿中の差次的発現タンパク質（DEP）を同定し、MM の新たなバイオマーカーを特定することを目的とした。試料は 2021 年 4 月から 2022 年 1 月の期間中、北京朝陽病院から新規 MM 患者の血清（n=4）と尿（n=8）、MM が完治した患者の血清（n=4）と尿（n=8）、対照として健常者の血清（n=5）と尿（n=5）を採取した。タンパク質濃縮キットによって、試料からタンパク質を濃縮し、タンパク質を消化した。その後、プロテオミクス解析によって、MM 患者の血清と尿に含まれるタンパク質を同定した。次に、タンパク質間相互作用（PPI）ネットワーク解析によって、MM のバイオマーカーとして有用な DEP を選定した。また、DEP の特異性は、ヒト MM 細胞株（2 株）と非ヒト MM 細胞株（1 株）を用い、選定されたウェスタンブロッティング（WB）によって確認した。さらに、ELISA 法で、新規 MM 患者（30 人）、完治患者（30 人）および健常者（18 人）の血清中の DEP 濃度を測定した。その後、DEP 濃度を用いた ROC 解析により、MM 患者の診断精度を AUC 値（1 に近いほど特異度および感度が高い）で評価し、MM のバイオマーカーとしての有用性を検討した。

プロテオミクス解析によって、血清から 1,653 種、尿から 4,519 種の DEP が同定された。また、PPI ネットワーク解析結果から 6 つの DEP が MM の発症に関連していることが示唆された。これらの DEP について WB で調べたところ、どちらのヒト MM 細胞株においても、6 つ全ての DEP の発現が確認された。サンプルからの検出の容易さと市販の抗体との親和性を考慮し、2 つの DEP（VCP, CTSA）を最適なバイオマーカーとして選定した。2 つの DEP の濃度を ELISA 法で測定したところ、どちらの濃度も新規患者において有意に高かった。さらに、ROC 解析の結果、VCP と CTSA の組み合わせは、AUC 値が 0.883 と高い値を示した。また、VCP, CTSA, アルブミン、およびヘモグロビンの組み合わせでは、AUC 値は 0.981 とより優れた指標であることを示した（特異度 100%, 感度 86.7%）。以上のことから、VCP と CTSA の組み合わせが MM 診断のためのバイオマーカーとして有用であることが示された。

第 419 回雑誌会

(Oct. 8, 2024)

(1) Phages in different habitats and their ability to carry antibiotic resistance genes

Wang, Y., Zhang, Z., Kang, J., Chen, B., Hong, W., Lv, B., Wang, T., Qian, H.

Journal of Hazardous Materials, **469**, 133941, 2024.

Reviewed by R. Nakamura

薬剤耐性菌による健康被害は、国際的な問題となっている。細菌は、ファージを介した遺伝子の伝播方法である形質導入によって、薬剤耐性遺伝子 (ARGs) を獲得することが可能である。しかし、形質導入による ARGs の伝播に関する情報は乏しい。そこで本研究では、3 つの生態環境 (水環境, 陸域, ヒト関連環境) におけるファージの構成とファージの種の相互作用について、ファージのメタゲノム解析によって検討した。そして、各生態環境における ARGs を保有するファージ (pARGs) の実態から、ヒトの健康に対するリスクを評価した。各生態環境から収集された 2781 個のメタゲノムのデータから、ファージと pARGs の存在量を算出した。また、ネットワーク解析によってファージの種間相互作用を確認した。pARGs の健康リスク評価は、4 つの指標 (ヒトへの曝露可能性, 移動性, 病原性, 臨床での使用頻度) に基づいて行った。

2781 個のメタゲノムデータから 360,353,103 個のウイルス配列が確認され、そのうち 95.86% がファージと同定された。すべての生態環境において、*Caudoviricetes* 綱 (水環境: 79.34%, 陸域: 86.39%, ヒト関連環境: 89.83%) と *Malgrandaviricetes* 綱 (6.51%~13.57%) の検出頻度が高かった。そこで、ネットワーク解析したところ、陸域において複雑なファージの相互作用が確認された。また、陸域はその他の生態環境と比較して、ファージの種数と多様性が有意に高かった。このことから陸域のファージの多様性は、複雑な種間相互作用によって引き起こされた可能性がある。総ファージ数に対する pARGs の相対存在量は、水環境で 7.50%, 陸域で 7.67%, ヒト関連環境で 4.95% といずれも極めて低い値であった。すべての生態環境に共通して、*Caudoviricetes* 綱, *Faserviricetes* 綱, *Megaviricetes* 綱, *Malgrandaviricetes* 綱の 4 つのファージ綱が検出され、グリコペプチド系, MLS 系, テトラサイクリン系の抗菌薬に対する高い ARGs 保有率 (80%以上) を示した。これに対して、その他のファージ綱の ARGs 保有率は極めて低く、pARGs が特定のファージに強く偏っていることが示唆された。また、pARGs のヒト関連環境の健康リスクは、水環境と陸域と比較して、約 50 倍高いことが確認された。特に、中国東部や南米北東部において pARGs によるリスクが顕著に高く、人口密度や工業活動、農業活動などの人為的要因が pARGs の健康リスクの増加に寄与していることが推察された。これらの結果から、pARGs は、特にヒト関連環境において、ARGs の伝播・拡散に重要な役割を持つことが示唆された。

(2) Nano-silver treatment reduces bacterial proliferation and stem bending in cut gerbera flowers: An in vitro and in vivo evaluation

Liu, J., Lai, L., Liu, H., Li, H., Yu, G., Sun, Y. and He, S.

Postharvest Biology and Technology, **180**, 111595, 2021.

Reviewed by R. Matsuzono

切り花は、花器水中で細菌が増殖すると、細菌が茎内を閉塞させることで吸水が阻害され、花の寿命が縮まることが報告されている。一般的に、花器水中の細菌の増殖抑制には、ナノ銀が広く用いられている。そこで本研究では、切り花に存在する細菌に対するナノ銀の増殖抑制効果を評価した。切り花試料として用いたガーベラは、中国・広州の切り花卸売市場から購入した。栽培期間 3 日目の茎内部から細菌を抽出し、茎内の閉塞の原因と考えられる菌種を同定した。同定した茎閉塞原因細菌の切り花への影響を評価するために、細菌を各濃度 (10^3 , 10^4 , 10^5 CFU/mL) で花器水に添加し、試料の寿命と植物の新鮮重量を評価するための指標である相対新鮮量(RFW)と吸水量(WU)を測定し、茎の断面を画像解析によって評価した。ナノ銀の有効性は、茎閉塞原因細菌への最小発育阻止濃度(MIC)試験とナノ銀前処理(5, 10 mg/L)を実施したときの試料の寿命と RFW, WU, 画像解析によって評価した。ナノ銀の前処理として、試料に 0, 5, 10 mg NS/L のパルス処理を 24 時間行った。

試料の茎端から同定された細菌は、*Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter junii*, *Bacillus stearothermophilus*, *Myroides sp.* の 4 種であった。これらの 4 種の細菌は花器水に添加した細菌数が多くなるにつれて試料の寿命, RFW, WU が有意に減少した。*Pseudomonas sp.* のみ細菌数が 10^3 - 10^4 CFU/mL の範囲では、コントロールに対して、試料の寿命に有意差は見られなかったが、全体として花瓶の水に加える細菌数が多いほど、細菌の種類に関係なく切り花の花瓶寿命は短くなった。このことから、花器水中の細菌が花の寿命に影響を及ぼしていることが示唆された。4 種の細菌に対するナノ銀の MIC を測定した結果、*A. junii* と *Myroides sp.* は 2.5 mg/L, *B. Stearothermophilus* は 5 mg/L, *Pseudomonas sp.* は 7.5 mg/L となった。また、前処理した試料は、コントロールと比較して 3 日以上寿命が伸び、良好な鑑賞品質を維持していた。さらに、画像解析においても、ナノ銀前処理によって茎切断面における細菌のコロニー形成がコントロールと比較して減少していることが確認された。これはナノ銀の前処理によって、細菌の増殖抑制作用が働いたためであると考えられる。以上のことから、ナノ銀の前処理は、花器水中での細菌増殖を効果的に抑制することで、茎内の閉塞を緩和し、切り花の寿命を延ばすことができる。

第 420 回雑誌会

(Oct. 17, 2024)

(1) Submicron aerosols share potential pathogens and antibiotic resistomes with wastewater or sludge

Yang, T., Jiang, L., Bi, X., Cheng, L., Zheng, X., Wang, X. and Zhou, X.

Science of The Total Environment, **821**,153521, 2022.

Reviewed by R. Funaguma

下水処理場（WWTP）は、病原細菌と薬剤耐性遺伝子（ARG）を拡散させる重要なスポットである。粒子状物質（PMs）には、細菌や ARG が含まれ、ヒトの健康に悪影響を与える可能性がある。特に、PM_{1.0}（直径 1.0 μm 未満の PMs）は、ヒトに曝露した場合、脳や心臓などへ運ばれることが報告されている。そこで本研究では、WWTP の PM_{1.0} における病原細菌と ARG の存在実態と PM_{1.0} 中の病原細菌と ARG の発生源や PM_{1.0} への移行機構について検討した。試料は、中国の済南市に位置する WWTP を対象とし、ろ過槽、嫌気槽、曝気槽、汚泥脱水室から PM_{1.0} 試料、下水試料、および汚泥試料を採取した。また、WWTP による PM_{1.0} の影響を調査するために、WWTP の風上地点と風下地点の PM_{1.0} 試料も採取した。各試料から DNA を抽出し、16S rRNA の V4 領域を対象にした菌叢解析を行った。さらに、Illumina HiSeq により配列を取得し、ARG の分類を行った。また、PM_{1.0} で検出された病原細菌と ARG の解析から発生源を追跡した。そして、検出されたそれぞれの病原細菌と ARG について、エアロゾルでの存在量に対する下水、または汚泥での存在量の比から、エアロゾルによる病原性細菌と ARG の拡散を AF_{potential pathogen}, AF_{ARG} として評価した。

PM_{1.0} における病原細菌の相対存在率は、汚泥脱水室が最も高く（29.44 %）、ARG の存在量は曝気槽が最も多かった（0.33 copies/16S rRNA）。風上地点と風下地点における病原細菌の相対存在率を比較すると、風下地点の方が約 2.4 倍高く、同様に、ARG の存在量も風下地点の方が約 1.6 倍多かった。さらに、大気中から検出された PM_{1.0} 中の病原細菌と ARG の 37.55～72.45 %が下水や汚泥由来であったことから、WWTP から周辺の大気環境へ病原性細菌や ARG が拡散されている可能性が示された。病原細菌と ARG のネットワーク解析を行った結果、病原細菌と ARG に有意かつ強い相関が確認された（ $P \leq 0.05$, $r > 0.7$ ）。また、*Proteobacteria* 門と *Actinobacteria* 門が ARG を保有している主要な細菌であった。さらに、AF_{potential pathogen} と AF_{ARG} は、特に *Mycobacterium* 属（14.24）と *Pseudomonas* 属（6.56）、および TEM-101（23.74）が高く、下水や汚泥から大気へ拡散されやすい細菌と ARG であることが示唆された。以上の結果から、WWTP は、病原性細菌と ARG を大気環境に拡散させる汚染源となっている可能性がある。

(2) The genomic epidemiology of *Escherichia albertii* infecting humans and birds in great britain

Bengtsson, J.R., Baker, S, K., Cunningham, A.A., Greig, R. D., John, K. S., Macgregor, K. S., Seilern-Moy, K., Spiro, S., Chong, C. C., Silva, D. M. P., Jenkins, C. and Lawson, B.
Nature communications, **14**, 1707 (2023).

Reviewed by R. Matsuyama

Escherichia albertii は、志賀毒素産生遺伝子である *stx2* や *eae* などの病原遺伝子を保有しており、人獣共通感染細菌であることが報告されている。しかし、検出や同定、疫学的なデータなどについては知見が乏しい。そこで本研究では、イギリス全土のヒトと鳥類に由来する *E. albertii* の全ゲノムを分析することで、遺伝的な特性について明らかにすることを目的とした。ヒト由来の *E. albertii* は、2014 年から 2021 年の期間における病院患者の糞便検体から *eae* を保有する株を選定し、計 83 株単離した。鳥類由来の *E. albertii* 株も同様に、2000 年から 2019 年の期間において、*E. albertii* に感染した鳥類から *eae* 保有株を計 79 株単離した。単離した *E. albertii* 株 (162 株) の DNA を抽出し、全ゲノム配列を取得した。取得した配列の一塩基多型を用いてベイズ解析を行い、系統分析とクラスタリングを行った。コアゲノムを比較するために、Enterobase に公開されている *E. albertii* (475 株) と本研究の単離株を用いて、コアゲノム MLST ツリーを構築した。さらに、取得配列をデータベースと照合し、病原性遺伝子 (VG) と薬剤耐性遺伝子 (ARG) を検出した。

本研究で解析した 162 株は、7 つの系統と 8 つのベイズ解析 (BAPS) クラスターに分類された。BAPS の 5 つのクラスター (クラスター1-5) はヒト由来株のみで構成され (100%)、BAPS クラスター6 と 7 は主に鳥類由来株で構成された (80%以上)。BAPS によって、本研究のヒト由来株と鳥類由来株を明確に分類することができた。コアゲノムを比較したところ、単離株は各 BAPS クラスターで系統樹に広く分散したことから、コアゲノムは多様であることが示唆された。各 VG 検出率は、*eae* で 99.4% (161/162 株)、細胞致死性膨張毒素産生遺伝子である *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* は 94.4% (153/162 株) 以上であった。また、23.4% (38/162 株) の株が *stx2f* を保有していたが、そのうちの 97.4% (37/38 株) が鳥類由来株であった。さらに、全株がホスホマイシン (*uhpT*) とキノロン系抗菌薬 (*parE*) に耐性を示す ARG を保有していた。その他の ARG を保有する 80 株のうちの 79 株がヒト由来株であり、*bla_{TEM-1}* などの β ラクタム系抗菌薬に耐性を示す ARG を保有する株も確認された。以上のことから、鳥類由来の *E. albertii* 株は *stx2f* を保有し、ヒト由来の *E. albertii* 株は、鳥類由来株よりも薬剤耐性遺伝子を多く保有することが明らかになった。

第 421 回雑誌会

(Oct. 30, 2024)

(1) Water temperature disturbance alters the conjugate transfer of antibiotic resistance genes via affecting ROS content and intercellular aggregation

Li, Y., Zheng, Q., Lu, Y., Qiao, Y., Guo, H., Ma, Q., Zhou, J., Li, H., and Wang, T.

Journal of Hazardous Material, **479**, 135762 (2024).

Reviewed by K. Tsuda

薬剤耐性遺伝子 (ARG) の伝播は、可塑剤、有機汚染物質、殺菌剤などの化学物質による水質汚染によって促進されることが知られている。しかし、これらの研究は、主に化学物質が ARG の接合伝達に与える影響に焦点を当てており、水環境固有の条件が接合伝達に及ぼす影響については十分に考慮されていない。そこで本研究では、水温の変動が ARG の接合伝達に与える影響を評価し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。接合実験のドナーには 3 種類の ARG を持つ *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α を用いた。また、ストレプトマイシン耐性の *E. coli* をレシピエントに使用した。LB 培地にドナーとレシピエントの菌数を 1:1 で混合し、各温度条件下で 16 時間培養後、抗菌薬を含む培地で生育したコロニー数から接合頻度を算出した。温度条件は、一定温度 (5, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40°C)、加温条件 (5°C から 30°C に上昇)、冷却条件 (30°C から 5°C に低下) の 3 つに設定した。さらに細胞膜透過性、細胞間凝集、活性酸素 (ROS) および細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) 量を各温度条件で比較し、温度の変動による細胞特性の変化を評価した。また、RNA を抽出し、ハイスループットシーケンスによって塩基配列を取得した。

各温度条件における接合頻度を比較したところ、低温の 5°C で 7.16×10^{-7} と最も低く、30°C で 2.18×10^{-5} と最も高かった。また、加温条件では 4.11×10^{-6} 、冷却条件では 1.55×10^{-5} であり、一定温度の 5°C と比較して、接合頻度は増加した。胞間凝集に関しても、接合頻度と同様に 5°C で最も低く、30°C において最も高かった。細胞間凝集に影響を与えるクオラムセンシングや線毛に関連する遺伝子の発現量は、水温が上昇するにつれて増加する傾向が見られた。一方で、細胞膜透過性は、20°C で最も高く、各温度条件での接合頻度の変化と一致しなかった。細胞内 ROS 量は、5°C と比較して、30°C と冷却条件において有意に高かった。また、細胞内 ATP 量は 5°C で最も低く、冷却条件で最も高かった。30°C と冷却条件において ROS 量と ATP 量が高い理由は、初期の水温が高いほど細菌の活性が高いためと考えられる。細胞間凝集、細胞膜透過性、ROS 量、および ATP 量が ARG の接合伝達に及ぼす影響を比較した結果、細胞内の ROS 蓄積が最も影響を及ぼすことが示された。細胞内 ROS 量は、ARG の接合伝達に直接的な影響を与えるだけでなく、細胞間凝集、細胞膜透過性、細胞内 ATP 量にも間接的に影響を与えた。これらの結果から、温度の変動は、細胞内 ROS 量に影響を及ぼし、それが細胞間凝集、細胞膜透過性、細胞内 ATP 量に間接的な影響を与えることによって、ARG の接合伝達を促進することが明らかになった。

第 422 回雑誌会

(Nov. 6, 2024)

Identification of protein biomarkers in wastewater linked to the incidence of COVID-19

Devianto, L. A., Amarasiri, M., Wang, L., Iizuka, T. and Sano, D.

Science of The Total Environment, **951**, 175649, 2024.

Reviewed by R. Tachibana

下水疫学（WBE）は、下水を通じて感染症の原因となる病原体を監視する手法である。既往の研究において、下水中から SARS-CoV-2 を検出することによって、COVID-19 の感染者数を予測することが可能であるとされる。しかし、SARS-CoV-2 の検出には、高いスキルと高価な装置が必要とされる。その一方で、COVID-19 の感染者数と炎症反応や免疫応答に関連するタンパク質には有意な相関があることが報告されており、検出方法も ELISA 法や質量分析法など簡便な手法が確立されている。そこで本研究では、SARS-CoV-2 の WBE サーベイランスに適応できるタンパク質と COVID-19 感染者数の相関関係を分析した。下水試料は 2020 年 8 月から 2021 年 10 月の期間、仙台市の下水処理施設から 19 回採取した。下水試料 50mL を遠心分離し、上澄み液から固相抽出法によってタンパク質を濃縮・精製した。精製したタンパク質をトリプシン消化によりペプチドに分解し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LC-MS/MS）でタンパク質を検出した。タンパク質は、機能的役割に分類し、感染症に関連するヒト由来のタンパク質を同定した。さらに、スピアマンの順位相関検定によって、COVID-19 の感染者数と感染症に関連するヒト由来のタンパク質の相関関係を解析した。

LC-MS/MS により、ペプチド数が 3 以上のタンパク質が 1,382 種類同定された。そのうち、ヒト由来のタンパク質は 248 種類（17.9%）、そして感染症に関連するヒト由来のタンパク質が 44 種類（3.2%）検出された。感染症に関連するヒト由来のタンパク質を機能的役割に分類した結果、抗菌・抗ウイルス（AMAV）群および免疫グロブリン（Ig）群が優占的であった。また、感染症に関連するタンパク質と Ig 群のタンパク質量に対する COVID-19 感染者数は、順位相関検定において有意な相関が確認された（感染症に関連するタンパク質、 $R=0.56$, $p=0.038$, Ig 群、 $R=0.64$, $p=0.017$ ）。しかし、AMAV 群は有意な相関が確認されなかった（ $R=0.48$, $p=0.087$ ）。また、Ig 群に含まれる代表的な IgA, IgG, および IgM についても順位相関検定の解析を行ったが、これら 3 つのタンパク質と感染者数は、有意な相関が確認されなかった（ $p \geq 0.05$ ）。Ig 群全体では感染者数と有意な相関が確認されたが、IgA, IgG, IgM からは有意な相関は確認されなかった。これは、今回測定しなかった IgD や IgE に起因していると考えた。感染者数と相関が確認されたタンパク質を WBE へ応用することで、COVID-19 の感染症の蔓延防止に寄与することが期待される。

第 423 回雑誌会

(Nov. 11, 2024)

(1) Nationwide surveillance reveals frequent detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Dutch municipal wastewater

Blaak, H., Kemper, M. A., Man, H. D., Leuken, J. P.G., Schijven, J. F., Passel, M. W. J., Schmitt, H. and Husman, A. M. R.

Science of The Total Environment, **776**, 145925, (2021) .

Reviewed by R. Kashima

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）は、臨床的に重要な抗菌薬に耐性を示すため、ヒトの健康に深刻な影響を与える。オランダにおける CPE の検出は、臨床環境に限定されており、非臨床環境における知見は少ない。一方で、近年、下水疫学が薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の分布と特徴を広範囲に把握するための有効的な手段とされてきている。そこで本研究では、オランダ全土の下水処理場（WWTP）における CPE の保菌率と分布を調査し、医療施設との関連性を評価した。オランダ国内における 100 施設の WWTP を対象とし、各 WWTP から流入水と放流水を採取した。試料水から CPE を選択するため、CPE 選択培地と OXA-48 型 CPE 選択培地で培養し、単離株を MALDI-TOF MS で菌種同定した。CPE と同定された 1162 株の DNA を抽出し、PCR によってカルバペネマーゼ（CP）遺伝子（OXA-48, KPC, NDM, VIM）を検出した。さらに、CP 遺伝子を保有していた大腸菌と *K. pneumoniae* の Sequence Type(ST)を解析した。また、CPE は基質特異拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生菌に含まれると仮定し、ESBL 産生菌の有病率をもとに、CPE の有病率を算出した。ESBL 産生菌は、ESBL 選択培地を用いて培養した。

CPE は、100 施設のうち、89 施設から検出され、細菌数は流入水で $0 \sim 2.0 \times 10^4$ CFU/L、放流水で $0 \sim 6.6 \times 10^2$ CFU/L であった。また、CP 遺伝子の検査において、OXA-48-like が最も多く検出された（88/89 施設）。CPE の有病率は 0.02% であり、既報の臨床環境における有病率と一致した。 χ^2 乗検定によって CPE 数と WWTP の処理人口、および医療施設の有無について相関を解析した。その結果、CPE 数は、WWTP の処理人口、医療施設の有無、大腸菌および ESBL 産生大腸菌数に対して正の相関を示した。一方で、周辺に医療施設の無い WWTP においても CPE の検出率は 70% となった。そこで、線形回帰分析を行った結果、CPE 数は WWTP の処理人口と大腸菌数にのみ相関を示した。2 つの解析の結果から、WWTP における CPE は、医療施設と無関係な一般家庭から排出されていると考えられる。また、ST は、大腸菌で 54 種、*K. pneumoniae* で 41 種となり、多様な ST が検出され、同一のクローンによる拡散ではないことがわかった。以上の結果から、オランダ全土に分布している CPE は、医療施設よりも一般家庭との関連が高く、人々の間で蔓延している可能性が示唆された。

(2) Factors Affecting the Adsorption of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) by Colloidal Activated Carbon.

Hakimabadi, G. S., Taylor, A. and Pham, L. A.

Water Research, **242**, 120212, (2023).

Reviewed by R. Kondo

ペルフルオロアルキル化合物やポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) は、水成膜泡消火薬剤 (AFFF) として広く使用されているが、人体への健康被害が報告されている。PFAS はコロイド状活性炭 (CAC) による吸着除去が有効であるが、AFFF 中の共存物質が PFAS の吸着除去に及ぼす影響について考慮した研究は少ない。そこで本研究では、AFFF 中の共存物質であるベンゼン、トリクロロエチレン (TCE)、1,4-ジオキサン、エタノール、ジエチレングリコールブチルエーテル (DGBE) 存在下での CAC の PFAS 吸着能力を評価した。加えて水環境中の主な溶存有機物の一つであるフルボ酸 (FA) 存在下の吸着能力も評価した。試料水は、炭酸水素ナトリウム水溶液 (1 mM) に PFAS として、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) 530 µg/L とペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 650 µg/L を添加して作成した。粒径 0.6 µm の CAC を試料水に 0.11–0.70 g/L となるように注入し、72 時間振とうして吸着試験を行った。その後、CAC を分離し、処理水中の残留 PFAS 濃度を LC/MS/MS で測定した。CAC の吸着性能は、フロインドリッヒ吸着等温式のフロインドリッヒ定数 (K_f) と吸着安定性を示す指数項 (n) を用いて、共存物質の影響を評価した。

共存物質の影響が無い場合、PFOA の K_f は $79 \text{ L}^n/\text{g} \cdot \text{mg}^{n-1}$ ($n=0.56$)、PFOS の K_f は $5348 \text{ L}^n/\text{g} \cdot \text{mg}^{n-1}$ ($n=0.92$) となった。1,4-ジオキサンとエタノールの共存は、PFOA と PFOS の吸着にほとんど影響を及ぼさなかった。しかしながら、DGBE が共存した場合には、PFOA の K_f は 0.10 倍、PFOS では 0.015 倍となり、PFAS の吸着が阻害された。CAC の注入によって、DGBE の 47–92% が除去されており、 n 値も減少 (PFOA : 0.23–0.38, PFOS : 0.44–0.47) したことから、DGBE は PFAS よりも CAC に強固に吸着することによって、PFAS の吸着を阻害したと推察される。ベンゼンと TCE の存在下では、PFOA の K_f は 1.3 倍となった。これは、CAC の細孔内表面にベンゼンと TCE が非水溶性液相 (NAPL) を形成し、NAPL に溶解しやすい PFOA が吸着を促進されたと考えられる。一方で、PFOS では、TCE の共存下で K_f が 0.13 倍となり、PFOS の吸着が TCE と競合したことが示唆された。また、FA が共存した場合には、PFOA と PFOS の K_f は、それぞれ 0.03 倍と 0.30 倍となり、吸着を阻害した。これについても競合吸着が原因であると考えられる。以上のことから、共存物質の種類によって PFAS の吸着除去に及ぼす影響が異なることが示された。

第 424 回雑誌会

(Nov.21 , 2024)

(1) Role of Nano-silver and bacterial Strain *Enterobacter cloacae* in Increasing Vase Life of Cut Carnation 'Omea'

Naing, H. A., Win, M. N., Han, J., Lim, B. K. and Kim K. C

Frontiers in Plant Science, **8**, 1590, 2017

Reviewed by R. Matsuzono

カーネーションは、エチレン生成による花卉の内巻きと、細菌が茎内に蓄積することで吸水が阻害され、花の寿命が縮まることが報告されている。ナノ銀は、エチレン生合成遺伝子発現や、細菌の増殖を抑制するため、花の寿命を延ばすことができる。そこで本研究では、花の老化に関連するパラメータ（花の寿命、相対新鮮量（RFW）、細菌数、茎内部の SEM 観察、エチレン生成量、システインプロテアーゼ阻害遺伝子（DcCPI）発現量、抗酸化活性）を測定することで、花の老化プロセスにおけるナノ銀の効果を評価した。試料は、永州地域で収穫したカーネーションを用いた。ナノ銀前処理として、各濃度（25, 50 mg/L）のナノ銀水溶液にカーネーションを 24 時間浸し、浸した茎を水道水で十分洗い流した後、花瓶に移し、9 日間培養した。その後、コントロールのパラメータと比較することでナノ銀の効果を評価した。また、コントロールの栽培期間 6 日目の茎内部から細菌を抽出し、細菌の計数と 16S rDNA による菌種の同定を行った。さらに、優占菌種がカーネーションに与える影響を評価した。

ナノ銀 50 mg/L による前処理の結果、コントロールと比較して、茎部における細菌数は 2.7×10^{10} CFU/mL から 0 CFU/mL に抑制された。また、エチレン生成量を約 30%、DcCPI の発現を約 80% 低下させ、抗酸化活性を増加させることで、切り花の寿命は 5 日以上延長した。また、25 mg/L のナノ銀前処理は、50 mg/L よりも花の寿命を 2 日延長し、エチレン生成をより抑制した。このことから、ナノ銀前処理を行うことで細菌数やエチレン生成量の減少、抗酸化活性の増加などの作用によって花の寿命を延ばすことがわかった。コントロールの栽培期間 6 日目の茎内において優占的であった細菌種は、*Enterobacter cloacae*（40%）であった。*E. cloacae* の懸濁液（ 10^7 CFU/mL）を花器水に添加したところ、コントロールと比較して、花の寿命は 3 日延長し、RFW は約 70% 増加した。これに対して、エチレン生成量は約 40% 減少した。*E. cloacae* によって、多数のパラメータで花の老化を抑制する結果が示された。*E. cloacae* が花の老化を早める可能性のある細菌の増殖を抑制することで、花の寿命を延ばしたと予想される。また、*E. cloacae* が特定の酵素（ACC デアミナーゼ）を産生することで、エチレン生成量を減少させたと考えられる。以上のことから、ナノ銀と *E. cloacae* は、花の寿命を延長させるために有効であり、切花の品質向上に寄与する。

(2) Quantification and Characterization of Microbial Emissions over the Northeastern Atlantic Using Mesocosm Experiments

Zinke, J., Freitas, G., Salter, M. E., Lundin, D., Aggarwal, S., Zieger, P., Mohr, C. and Foster, R. A.

ACS Environmental Science & Technology air, 1, 3, 2024.

Reviewed by R. Funaguma

バイオエアロゾルは、波の破碎と気泡の破裂によって、海洋飛沫エアロゾル (SSA) とともに、海水から大気中へ放出される。SSA のメソコスム研究では、海水と比較して、エアロゾルに微生物が、最大 2500 倍濃縮され、特定の細菌種が、SSA に移送されることがわかっている。そこで本研究では、SSA を実験室で模擬発生させ、海水とエアロゾルにおける細胞数とエアロゾルへ移行しやすい細菌種について調査した。海水試料は、2022 年 5 月から 7 月の間に計 20 回、ポルトガルのポルトアフォンソで採取した。採取後、試料をメソコスム実験水槽に注入し、波の碎波と気泡の破裂を 48 時間シミュレートすることで、SSA を発生させた。メソコスム実験水槽に装着したフィルターは、細胞数の計数、無機イオンの分析、ならびに菌叢解析に供した。細胞数は、染色液を用いて計数した。また、細菌の濃縮倍率は、エアロゾルの細胞数に対する海水の細胞数の比を、それぞれの Na^+ 濃度で正規化した。菌叢は、16s rRNA の V3-V4 領域を対象として解析した。さらに、海水からエアロゾルへの細菌の濃縮傾向は、検出された各細菌のエアロゾルの存在量に対する海水の存在量の比から、Aerolization factor (AF) 値として評価した。

エアロゾルの細胞数は、海水の細胞数と比較して、平均で 47 倍多く、エアロゾルに細菌が濃縮された。菌叢解析によって、海水は *Alphaproteobacteria* 綱、エアロゾルは *Gammaproteobacteria* 綱が優占種であった。また、 α 多様性は、海水と比較してエアロゾルの方が低かった。さらに、 β 多様性は、海水とエアロゾルで異なるクラスターを形成した。以上の結果から、海水とエアロゾルの菌叢に明確な違いが確認され、特定の細菌が海水からエアロゾルに移送されたことがわかった。AF 値が高い細菌 (AF=5~25) は、*Alphaproteobacteria* 綱 (*Lentibacter* 属や *Roseobacter* 属等)、*Actinobacteria* 門、ならびに *Bacilli* 門であった。これらの細菌は、好気性細菌であるという特徴は一致しているが、細菌の形状、運動性、グラム染色による分類では異なる特徴を持っていた。AF 値が低い細菌 (AF<1) の中には、AF 値の高い細菌であった *Alphaproteobacteria* 綱が含まれており、*Alphaproteobacteria* 綱の *SAR11 clade II* や *SAR11 clade 1a* 等は、AF<1 であった。これらの結果から、エアロゾルへの濃縮傾向は、近縁の細菌種でも異なり、各細菌固有のものであることが示唆された。