

研究助成実施報告書

助成実施年度	2021 年度
研究課題（タイトル）	「美しい都市河川を守る」～河川環境保全のための病原性・薬剤耐性遺伝子モニタリングに有用な有機物フィンガープリントの探索～
研究者名※	中屋 佑紀
所属組織※	北海道大学大学院工学研究院 環境工学部門 助教
研究種別	研究助成
研究分野	都市環境工学
助成金額	150 万円
発表論文等	

※研究者名、所属組織は申請当時の名称となります。

（ ）は、報告書提出時所属先。

大林財団 2021 年度研究助成実施報告書

所属機関名 北海道大学大学院工学研究院
申請者氏名 中屋 佑紀

研究課題	「美しい都市河川を守る」～河川環境保全のための病原性・薬剤耐性遺伝子モニタリングに有用な有機物フィンガープリントの探索～
(概要) 北海道を流れる十勝川において薬剤耐性遺伝子の流域レベルでのモニタリングを行い、3次元蛍光分光法・$^1\text{H-NMR}$ (プロトン核磁気共鳴) 分光法・質量分析により測定した溶存有機物の消長と比較した。都市部では下水処理水に由来すると考えられる腐植物質様溶存有機成分や抗菌薬、薬剤耐性遺伝子の負荷が考えられた。また、酪農の盛んな地域を流れてきた支流が合流することで、動物用抗菌薬の負荷が増大する可能性が考えられた。また、一部の採水日では薬剤耐性遺伝子や抗菌薬が検出限界以下となった。採水日によって負荷源やその性質が異なることが示唆された。薬剤耐性遺伝子のモニタリングに有用な有機物フィンガープリントを見出すために、今後は想定される負荷源を絞り込んだうえで、より採水日を増やして解析する必要がある。	

1. 研究の目的

我々の研究グループでは、札幌市を流れる河川水中の大腸菌や薬剤耐性遺伝子を高頻度かつ広域にわたって分析し、下水処理水や雨天時越流水などによる一時的な汚染を大腸菌や薬剤耐性遺伝子の量の増減からモニタリングすることに成功している。都市河川の環境保全のために、病原菌や薬剤耐性菌を「簡易に」「定量的に」「高頻度・広域に」モニタリングすることは重要である。モニタリングは水環境に影響を及ぼす特定の因子に着目して行われる。例えば、有機態のリンや窒素の増減は水域の富栄養化・貧栄養化に影響することから、水質指標として古くから注目されている。また、水質汚濁防止法は人体や生活環境に悪影響を及ぼす複数の化学物質を指定している。近年ではこれらの指定有害物質の前駆物質や未知のリスク因子、ヒトや家畜用の医薬品を含めた化学物質のモニタリング方法として、質量分析が注目されている。また、河川水の有機物の特徴づけに NMR 法や 3 次元蛍光分光法を利用する研究もある。これらの精密分析法では多様な物質をそれらの特徴で分類した「スペクトル」という形で分析結果がまとめられる。従って、スペクトルをフィンガープリントとして利用することで定量的に河川水質をモニタリングできる可能性がある (有機物フィンガープリント)。一方で、大腸菌は糞便汚染の指標として下水処理水や河川水のモニタリングに適用されている。近年では、都市河川における親水レクリエーション域の開発の進展に伴い河川水中の病原菌や薬剤耐性菌の挙動が注目されており、河川水中の細菌叢のメタゲノム解析による網羅的な分析が行われるようになってきた (分子生物学的分析)。これらの「有機物フィンガープリント」と「分子生物学的分析」を組み合わせ、特定の河川を流域横断的に高頻度に分析する研究は例がない。

本研究は、病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子の流域レベルでのモニタリングに対し傍証的・相補的な有機物のフィンガープリントを得ることを狙って、3次元蛍光分光法・¹H-NMR（プロトン核磁気共鳴）分光法・質量分析などの溶存有機物分析により汚染源のソーストラッキングや汚染のモニタリングにおいて有効な指標を見出すことを目的とし、酪農・農業地帯と帯広市を中心とする都市部を貫流する十勝川を対象とした縦断的な水質調査を行った。

2. 研究の経過

十勝川にかかる5つの橋において、2022年6月～同年11月にかけて月に1回の頻度で採水と水質分析を行った。溶存有機物の3次元蛍光分光法および¹H-NMR分光法による分析を行い、有機物に関するパラメーターを得た。本研究の目的に対応する薬剤耐性遺伝子として、βラクタム系抗菌薬耐性遺伝子である *bla_{IMP}*、マクロライド系抗菌薬耐性遺伝子として *mphE*、多剤耐性遺伝子として *msrE* の河川水中での遺伝子濃度を求めた。また、一部のヒトおよび家畜用抗菌薬の河川水中での濃度を、固相抽出により濃縮後に液体クロマトグラフィー質量分析法（外部標準法）により定量した。薬剤耐性遺伝子や抗菌薬は一部の採水日、採水地点で定量限界以下となったが、定量可能なデータについて溶存有機物の変化や大腸菌数などの他の指標と対応付けて考察することができた。

3. 研究の成果

十勝川の河川水は、上流から順に共栄橋（TK1）、祥栄橋（TK2）、十勝大橋（TK3）、十勝中央大橋（TK4）、茂岩橋（TK5）で採水した。採水後、実験室で浮遊物質（SS）、大腸菌数、大腸菌群数、BODを測定し、さらに細菌のDNAを抽出しqPCR法にて遺伝子量を測定した。溶存有機物の分析のため、まず河川水をガラス繊維ろ紙（Whatman, 0.47 μm GF/F: 450℃で4時間加熱後、純水で洗浄）でろ過し試料水とし、不揮発性有機炭素量（NPOC）をTOC-L（Shimadzu）により測定した。試料水3 mLを紫外可視分光光度計（Jasco, V630）および蛍光分光光度計（Jasco, FP-6600）で測定し、紫外可視および3次元蛍光スペクトルを得た。また、試料水を先行研究（Li et al., 2016, Anal. Chem. 88, 6680–6688.）に基づきカラム（Bond elute PPL 500 mg, Agilent）に通水し、補足した溶存有機物をメタノールに溶出した。これを乾燥後、重メタノール溶媒で再溶解した濃縮液を¹H-NMR分光法（Bruker, 600 MHz Avance III）により分析した。試料水をInertSep SlimJ PLS3（ジーエルサイエンス）を用いて固相抽出法で濃縮し、LC/MS法（外部標準法）によりいくつかの抗菌薬の濃度を定量した。

bla_{IMP}、*mphE*、*msrE*の河川水中での遺伝子濃度を図1に示す。7月と8月に採水した試料ではどの薬剤耐性遺伝子も検出限界以下であった。薬剤耐性遺伝子が検出可能だった採水日については、いずれの遺伝子も上流から下流にかけて存在していることが分かった。

本研究で測定した3次元蛍光スペクトルの一例として、7月のTK5のスペクトルを図2に示す。顕著なピークとして、多くの先行研究で陸域（土壌）由来の腐植様物質に由来すると考えられているピークAおよびCが認められた。本報告では、蛍光スペクトルから得られた溶存有機物のパラメーターとして励起波長345 nm、蛍光波長430 nmのピークCの蛍光強度に着目した。

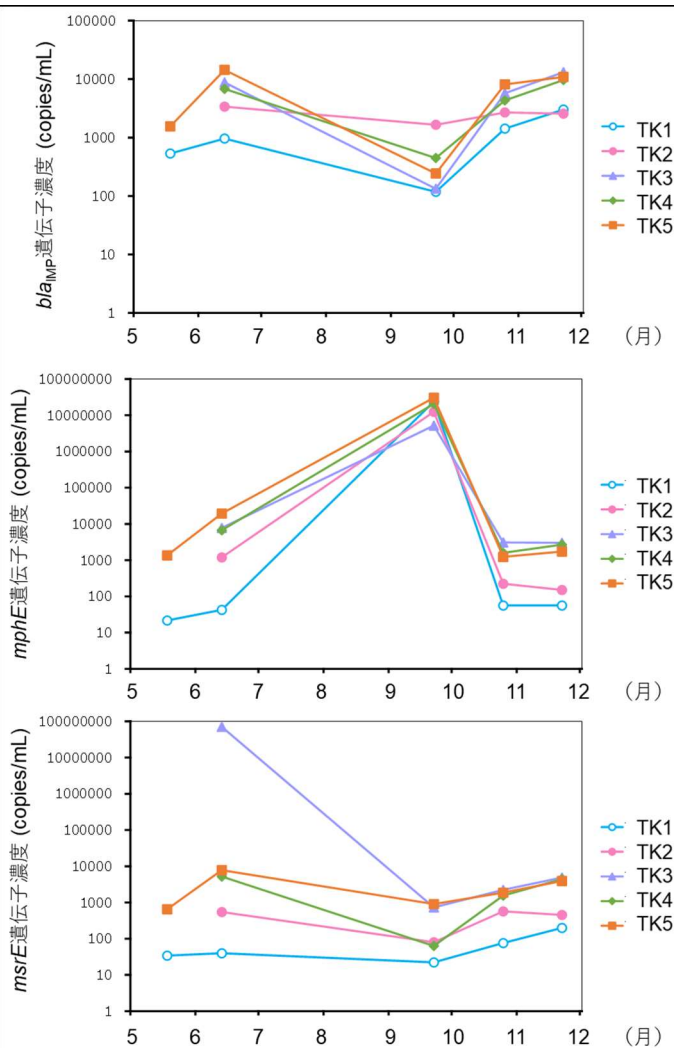


図 1. 各採水月における薬剤耐性遺伝子濃度.
5 月には TK1 と TK5 でのみ採水を行っており、
参考のためにプロットした.

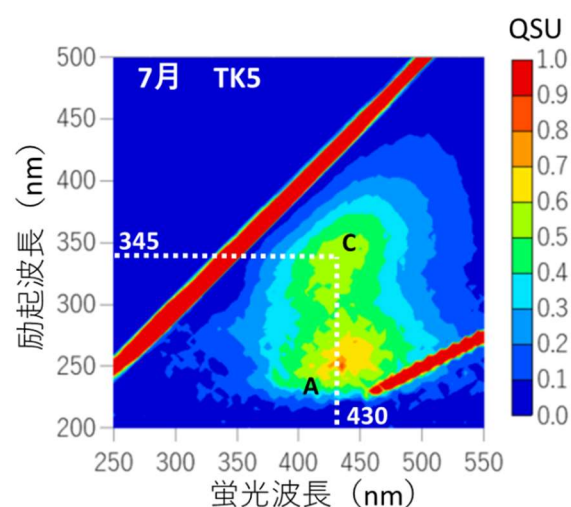


図 2. 7 月の TK5 における溶存有機物の
3 次元蛍光スペクトル.

7 月の試料について、縦軸を相対的な流下距離、横軸をピーク C 強度、SS、大腸菌数、BOD、抗菌薬濃度としたものを図 3 に示す. この採水日には、ピーク C 強度、SS、大腸菌数、BOD の流下に伴う変化が互いに類似していたことから、共通の負荷源や希釈要因を持つことが推定された. 具体的には、TK1 と TK2 の間、TK2 と TK3 の間、および TK4 と TK5 の間に存在する人口密集地（帯広市街地など）の下水処理場の放流水による負荷の増大、TK3 と TK4 の間で十勝川に合流する支流（とくに流量の大きいものとして音更川、札内川）による希釈が考えられた. ヒト用抗菌薬であるクラリスロマイシンはいずれの地点でも検出限界以下であり、動物用抗菌薬であるリンコマイシンは TK3 以降に検出された. 支流の合流がある TK3 と TK4 の間でリンコマイシン濃度が上昇していることから、この間の支流では下水処理場によるピーク C、SS、大腸菌数、BOD の負荷は十勝川に比べて低かった一方で、動物用抗菌薬の負荷が高かった可能性がある. 十勝川およびその支流の流域は酪農も行われている地域であり、牧場からの表面流出が考えられる.

薬剤耐性遺伝子と抗菌薬が検出可能だった 11 月の試料について、流下距離とピーク C、SS、大腸菌、抗菌薬（クラリスロマイシン・リンコマイシン）、薬剤耐性遺伝子の濃度の関係を図 4 に

示す。ピーク C については 7 月と同様に下水処理場による負荷が考えられたが、TK4 と TK5 の間にピーク C 強度の増大は見られなかった。また、SS および大腸菌数について流下に伴う増加が 7 月に比べて小さかった。7 月と 11 月では顕著な負荷源やその特性が異なっている可能性がある。例えば、溶存態であるピーク C と懸濁態である SS や大腸菌とでは、下水処理場の処理能力に依存して処理水での濃度が異なる挙動を示すことが想定される。クラリスロマイシンについては TK4 と TK5 の間で、リンコマイシンと 3 つの薬剤耐性遺伝子については TK2 と TK3 の間で顕著な増加が見られた。支流や下水処理水による十勝川へのすべての流入水を個別に測定することは難しいため、抗菌薬や薬剤耐性遺伝子の具体的な汚染源を推定することは難しいが、他の水質指標と同様に流入や希釈による負荷の変化を受けていると考えられる。ピーク C や抗菌薬濃度といった溶存態物質の変化から、11 月の十勝川の溶存有機物の組成は変動していることが予想された。しかし、¹H-NMR 分光法により推定した溶存有機物のプロトン組成（図 5）は上流から下流にかけて大きな変化は見られなかった。溶存有機物のうち、3 次元蛍光分光法では蛍光成分のみ、¹H-NMR 分光法では固相抽出時にカラムで補足可能だった画分のみ、抗菌薬濃度は数十 nM/L オーダーの微量成分を捉えているため、それぞれの挙動に整合性が見られなかったと考えられる。

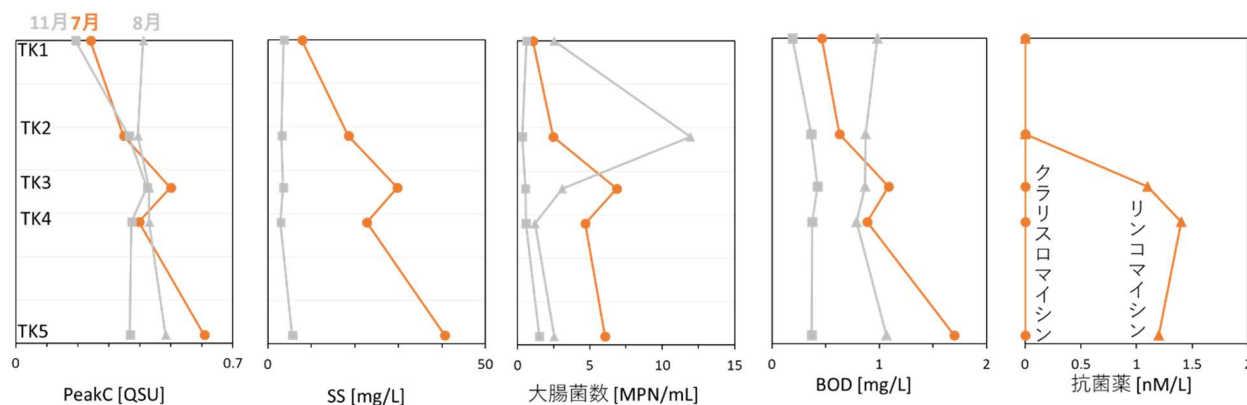


図 3. 7 月の流下距離に対するピーク C 強度，SS，大腸菌数，BOD，抗菌薬濃度の関係。

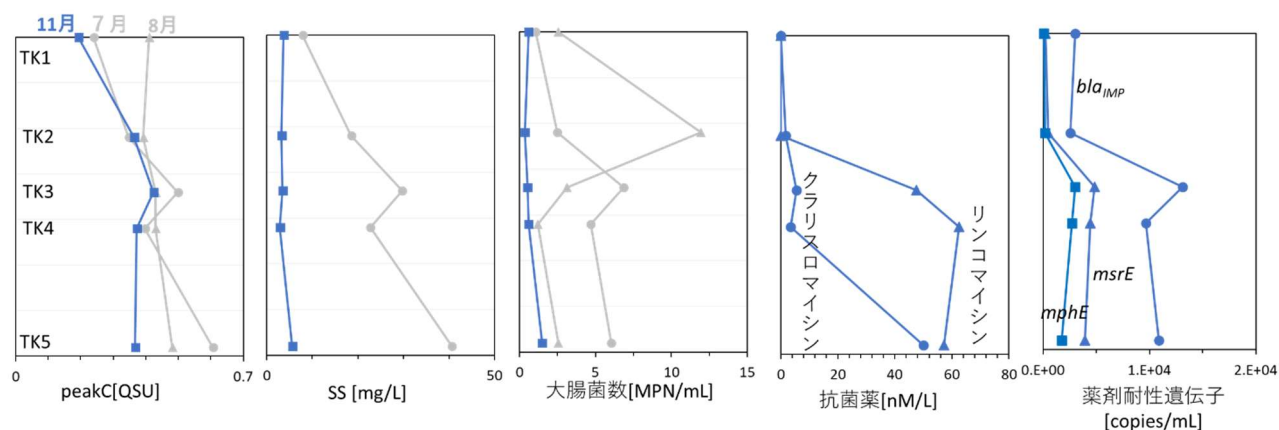


図 4. 11 月の流下距離に対するピーク C 強度，SS，大腸菌数，抗菌薬濃度，薬剤耐性遺伝子濃度の関係。

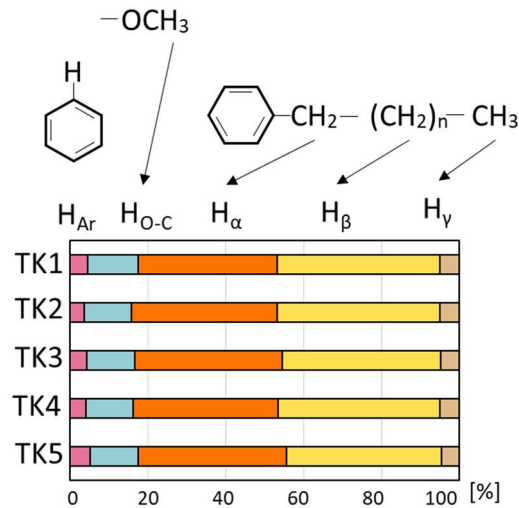


図5. 11月の各採水地点におけるプロトン組成. 左から芳香族プロトン, 置換脂肪族プロトン, 脂肪族プロトン (芳香族炭素などから見て α 位, β 位, γ 位以上のプロトン) の割合を示す.

4. 今後の課題

一部の採水日では薬剤耐性遺伝子や抗菌薬が検出限界以下となった. また, 採水日によって負荷源やその性質が異なることが示唆された. 薬剤耐性遺伝子のモニタリングに有用な有機物フィンガープリントを見出すためには, 薬剤耐性遺伝子濃度を含むすべての水質パラメーターの多変量解析が有用だと考えられるが, 薬剤耐性遺伝子とのフィンガープリントの対応関係を一般化するためには, 採水日を増やしてデータ量を確保する必要がある. 今後は想定される負荷源を絞り込んだうえで, より採水日を増やして解析する.