

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 ヌクレオ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, CPF, 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 CPF の耐性率が上流と比較して、有意に高かった。したがって、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。