

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06622

研究課題名(和文) 临床上注意を要する薬剤耐性菌・耐性遺伝子の都市用排水システムでの挙動

研究課題名(英文) Fate of clinically important antibiotic-resistant bacteria and genes in water and wastewater systems

研究代表者

浦瀬 太郎 (URASE, Taro)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60272366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗生物質耐性菌対策として、医療/畜産/環境を一体として取り組むワンヘルス・アプローチが有効である。低頻度の耐性菌を効率よく環境試料から釣菌するために、選択剤を培地にMIC(最小発育阻止濃度)より大幅に低い濃度で添加釣菌し、その後、釣菌株の性質を加味して定量する方法を試みた。下水処理水中の大腸菌のうち基質拡張型β-ラクタマーゼを産生する菌の比率は約5%であり、臨床分離株よりも比率が低かった。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌を分離するためには、*Stenotrophomonas maltophilia*の妨害を避ける工夫が必要であった。膜分離による排水処理は耐性菌、耐性遺伝子双方の抑制に有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性の問題は、今後の細菌感染症治療の上で、大きな障害になると予想されている。また、外来患者の耐性菌保有率が高くなってきていることから、この問題が院内感染だけの問題でないことも明らかである。本研究で、医療-環境-畜産を一体としてモニタリングする手法を開発し、その相互の耐性菌比率を比較することにより、耐性菌の広がりに対する環境の役割を明らかにすることができた。また、2020年の新型コロナウイルス感染でも明らかになったが、検査対象に依存しないモニタリングとなる下水中の病原体モニタリング手法の確立は、今後の感染症でも流行の広がりやピーク予測に有効に機能することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The importance of "One health approach" interconnecting human, animal, and environmental health has been recognized. An efficient detection and isolation method for resistant bacteria with low incidences in the environment was examined by using agar plates containing considerably lower concentrations of antibiotics than MIC breakpoints. The ratio of extended spectrum β-lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* in treated wastewater at 11 different locations was approximately 5%, which was lower than the ratio for clinical isolates. It is essentially important to exclude the effect of the presence of *Stenotrophomonas maltophilia* for the quantification of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). Membrane bioreactor in wastewater treatment had advantages for the reduction of not only antibiotic-resistant bacteria (ARB) but antibiotic-resistant genes (ARG).

研究分野：工学(環境衛生工学)

キーワード：薬剤耐性菌 ESBL カルバペネム耐性 下水 下水処理 環境水

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質(合成抗菌薬を含む)が細菌感染症の治療に用いられるようになって、すでに100年近い歴史がある。抗生物質の使用により感染症による死亡は大きく減少したが、抗生物質が効かない細菌(薬剤耐性菌)の広がりが生じるようになった。これまで、つぎつぎに抗菌スペクトルの広い抗生物質が発見、もしくは、新規に合成され、薬剤耐性菌の広がりに対抗してきたが、新しい抗生物質の開発が近年鈍化してきている。

WHO(世界保健機関)は耐性菌コントロールを2011年頃から大きな課題としてとりあげ、それを受けて、2013年には主要8か国首脳会議(G8)で、薬剤耐性の脅威に関する共同声明が採択され、わが国でも2016年に「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」がまとめられた。医療/畜産/環境を一体として取り組むワンヘルス・アプローチが提唱されている。こうした流れを受け、環境中の薬剤耐性菌や耐性遺伝子の存在、また、その水環境システム(上下水道処理プロセスなど)における挙動が注目されてきた。

2. 研究の目的

人用抗生物質は、畜産用抗生物質よりも使用量が少ないが、耐性菌の存在が感染症治療の支障に直結しやすい。第一に、本研究では、臨床で問題となっている基質拡張型-ラクタマーゼ産生大腸菌やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を対象にそのモニタリング手法(選択培養方法、定量的耐性菌比率測定方法)を明らかにする。第二に下水処理水や環境水に含まれるこれら大腸菌などの指標細菌に占める薬剤耐性菌の比率を定量的に明らかにする。第三に、排水処理システムにおける薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子の挙動について検討する。こうした検討により、薬剤耐性菌の自然環境-病院間での移動経路を明らかにする。また、薬剤耐性菌の伝播リスク制御のかなめとしての下水道の役割を再評価する。

3. 研究の方法

多摩川河川水、淀川河川水、神奈川県内河川、本学の廃水処理施設、関東地方の下水処理場の最初沈でん池上澄及び放流水を対象に、大腸菌およびそれに類縁の腸内細菌科細菌を特定酵素基質培地上で培養した。また、低頻度で存在するヒト用抗生物質に対する耐性菌を効率よく釣菌するために、培地に直接、セフトキシムやメロペネムなどの選択剤を添加して釣菌する方法を検討した。数段階の濃度で選択剤を添加した培地上に生じるコロニー数を選択剤なしの培地上に生じるコロニー数で割り、耐性菌比率とした。また、得られた菌株の菌種を16S rRNA 遺伝子の全長シーケンスから同定した。

4. 研究成果

2種類の特定酵素基質培地を使用した場合を比較すると、クロモアガー-ECC培地はコロモカルト培地よりも大腸菌の選択特異性が高く、大腸菌以外の細菌を比較的排除できることから、大腸菌や薬剤耐性大腸菌を釣菌するうえでクロモアガー-ECC培地は優れていた。まず、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)を選択培養するために、クロモアガー-ECC培地にメロペネム(MPM)を添加して選択圧を加えて培養する方法を検討した。この方法では、*Escherichia coli*(大腸菌)はほとんど見いだされず、他の腸内細菌科細菌もほとんど釣菌されなかった。一方、腸内細菌科以外の細菌である *Stenotrophomonas maltophilia* が多数分離され、ほかに、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa* などカルバペネム耐性が臨床で広がっているとされる菌種が環境からも分離された。とくに、カルバペネムに対して自然耐性を持つ *Stenotrophomonas maltophilia* の存在は、メタロ-ラクタマーゼをコロニー付近に分泌することによって、培地の選択圧を減少させ、この方法でのCREの分離を著しく妨害することが明らかになった。実際に腸内細菌特有の *rpIP* 遺伝子を保有している株は、釣菌されたカルバペネム耐性菌のうち、44%(37培養株)に過ぎなかった。そこで、高温培養法(42℃培養)を検討したところ、*rpIP* 遺伝子保有率は78%(42培養株)に向上し、培養温度を37℃から42℃にすることでメタロ-ラクタマーゼ産生菌の分離率が55%~50%にまで減少し、同酵素を保有する *Stenotrophomonas maltophilia* の生育を抑制することができた。高温培養で得られるカルバペネム耐性腸内細菌の菌種は、*Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Escherichia/Shigella* 属など CRE であった。種レベルでは、臨床分離株の報告例と傾向が異なり、菌種同定方法の影響や下水で集められる菌種の偏りの影響が示唆された。

一方、培地にセフトキシム(CTX)を添加することにより、基質特異性拡張型-ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌の培養を試みた。コロニー形成速度を調べたところ、抗生物質を含まない ECC 培地上では1日の培養で最終形成コロニー数の86%-92%(大腸菌)および81-87%(大腸菌群)が生育したのに対し、CTXを4 µg/mlで添加した場合にはそれぞれ94%(大腸菌)および65%(大腸菌群)となり、大腸菌以外の腸内細菌科細菌のコロニー形成速度がセフトキシムの添加により抑制されるものの大腸菌は1日での培養がおおむね可能とみられた。さらに、河川水サンプルに含まれる耐性菌の定量方法として、耐性遺伝子量を定量的PCRによって定量する方法を試みたところ、各ESBL産生遺伝子量は *ybbW* (大腸菌)、*rpIP* (腸内細菌科)の遺伝子量よりも多く、大腸菌群以外の菌種によってESBL産生遺伝子が保持されていることが明らかになった。CTXを4 µg/ml添加した培地で得られるコロ

二一数は全大腸菌の約 4%であり、これは、無添加の培地に生育する 1 株 1 株の大腸菌に対して、MIC 試験を行い CTX 濃度 64 $\mu\text{g/ml}$ 以上の MIC を耐性菌とみなした場合の比率と等しかった。CLSI の基準にしたがい MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 以上を CTX 耐性菌とみなす場合に CTX 耐性菌を環境中から釣菌するには、CTX 添加濃度は、MIC より大幅に低い 0.25 $\mu\text{g/ml}$ が適切であることを見出した。

CTX 耐性大腸菌では、 β -ラクタム以外にフルオロキノロン系やアミノグリコシド系抗生物質に対しても耐性を持つ割合が、感受性の大腸菌よりも 2~7 倍程度多く、多剤耐性菌の割合が高いことがわかった。一般に ESBL 産生大腸菌がフルオロキノロンにも耐性を持ちやすいことは、臨床分離菌に対する研究でも広く知られており、環境分離菌でもそのことが確かめられた。この結果から、 β -ラクタムに対する耐性とフルオロキノロンに対する耐性が独立に個々の病院や個々の下水処理施設で細菌に獲得され、そうした耐性菌が下水道から環境へ放流されていると考えることは適切ではなく、ST131 など世界的な臨床での流行株を下水道が収集しているに過ぎないことが示唆される。

関東地方の 11 か所の下水処理場の処理水 16 サンプルに対して、カルバペネム耐性腸内細菌、および、ESBL(基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ)産生大腸菌の調査をおこない、それらの選択的培養の方法の検討、耐性菌比率、取得菌株の特徴を調べた。処理水に残留塩素が検出される大腸菌濃度の低い 4 処理場を除いて、下水処理場の放流水に含まれる大腸菌の濃度範囲は、15 CFU/mL ~ 140 CFU/mL となった。そのうち、CTX 耐性大腸菌(培地への CTX 添加濃度 0.25 $\mu\text{g/ml}$, MIC 4 $\mu\text{g/ml}$ 相当)の割合は 3.5% ~ 8.9% で、その 87% に ESBL 産生能があった。得られた ESBL 産生菌割合はその流域での健常者を含めた腸内環境の平均値と考えられ、臨床分離株での耐性菌分離比率に比べて低かった。下水処理施設において、耐性菌のみが選択的に生き残っている可能性は低く、病院排水などの耐性菌比率の高い排水が健常者の排水によって希釈され、非選択的な大腸菌の除去や不活化を処理施設で受けたあと、下水処理水に一部の大腸菌や耐性大腸菌が残留していることが示唆された。一方、各処理水における 37 ~ 48 時間培養で得られる腸内細菌のうちカルバペネム耐性菌数は、菌数が少なく定量性の低い 4 処理場を除いて、0.033% ~ 6.58% であった。ただし、それらには、自然耐性菌である *Stenotrophomonas maltophilia* が含まれていると考えられた。

神奈川県内の河川において、環境水中の ESBL 産生大腸菌について、その存在割合、菌種、経年変化を調べた。大腸菌釣菌株のすべてが 16S rRNA 解析で *Escherichia/Shigella* 属であり、特定酵素基質培地による菌種選択性は良好であった。アンピシリン、テトラサイクリン、スルファメトキサゾールなど古典的な抗生物質への耐性菌が主体の河川(畜産などに由来する大腸菌が多いと推定される河川)では、耐性率は、10 年前の調査と比べて減少した。人用の抗生物質に対する耐性菌の見られる河川(下水処理水などヒトに由来する大腸菌が多いと推測される河川)においては、古典的な抗生物質に対する耐性率は 10 年前の調査に比較し減少していたが、第 1 ~ 第 3 世代のセファロスポリン薬などヒト用抗生物質に対する耐性は、横ばいかむしろ増加していた。以上から、10 年間での河川水中大腸菌の耐性プロファイルの変化が明らかになった。

野外の鳥類の糞便に含まれる大腸菌の耐性を調べた。ハトの糞便中の大腸菌では、ヒト用の抗生物質に対する耐性はもちろん、アンピシリンやテトラサイクリンといった古典的な抗生物質に対する耐性菌もほとんど見つからなかった。カモのほうはやや耐性菌比率が高く、それぞれの鳥の生活圏の違いをあらわしていると考えられた。

膜分離法による排水処理によって、薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子を高度に処理した処理水を得るための基礎実験を行った。0.4 μm あるいはそれ以上の孔径を持つ膜で活性汚泥を分離した場合には、常に透過側に細菌が検出されたが、0.2 μm の孔径の分離膜を用いた場合には、散発的に透過側に細菌が検出された。膜分離によって得られた処理水に含まれる 16S rRNA 遺伝子の濃度は、遠心分離上澄水に含まれる同遺伝子濃度の 1/5 ~ 1/500 であり、膜分離法は従来の排水処理方法に比較して、薬剤耐性菌、薬剤耐性遺伝子の双方の抑制が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 URASE Taro, TSUTSUI Hirofumi, INOU Takeshi, CHEN Hao Yang	4. 巻 40
2. 論文標題 Effect of Antimicrobials in Feed Wastewater on the Performance of Two-stage Membrane Bioreactor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society on Water Environment	6. 最初と最後の頁 107 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2965/jswe.40.107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 URASE Taro, TSUTSUI Hirofumi, NAKAMURA Kazuya	4. 巻 41
2. 論文標題 Analysis of Odor of Treated Wastewater by Gas Chromatography with Olfactometry Detection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society on Water Environment	6. 最初と最後の頁 11 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2965/jswe.41.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsui Hirofumi, Urase Taro	4. 巻 17
2. 論文標題 Retention of Bacteria and DNA by Microfiltration Membranes in Wastewater Reclamation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology	6. 最初と最後の頁 194 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2965/jwet.18-086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nazhakaiti Pahaerdin, Tsutsui Hirofumi, Urase Taro	4. 巻 9
2. 論文標題 Aerobic and Anaerobic Biological Degradation of Pharmaceutically Active Compounds in Rice Paddy Soils	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2505 ~ 2505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/app9122505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsutsui Hirofumi, Urase Taro	4. 巻 17
2. 論文標題 Characterization of Extended Spectrum β -lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> in the Environment Isolated with Different Concentrations of Cefotaxime	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology	6. 最初と最後の頁 262 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2965/jwet.18-091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 浦瀬太郎	4. 巻 43(A), 3
2. 論文標題 都市河川における薬剤耐性菌の存在実態(解説記事)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 89 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Pahaerdin Nazhakaiti, Nakazawa Ayane, Tsutsui Hirofumi, Urase Taro
2. 発表標題 Degradation of Specific Pharmaceuticals in the Different Paddy Soils
3. 学会等名 水環境学会年会, 53, pp121 (甲府, 2019年3月7日発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 年 国蕊, 小向博智, 筒井裕文, 浦瀬太郎
2. 発表標題 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の単離のための42 培養法の有効性
3. 学会等名 水環境学会年会, 53, pp361 (甲府, 2019年3月9日発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筒井裕文, 浦瀬太郎, 岡田 峻, 藤野和幸
2. 発表標題 水環境中に存在するカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の特徴
3. 学会等名 第54回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 筒井裕文, 稲生武士, 野添耀平, 岡安 晃, 付 聡, 浦瀬太郎
2. 発表標題 ラボスケール膜分離活性汚泥リアクターに投入した薬剤耐性大腸菌とその耐性遺伝子の挙動
3. 学会等名 第52回水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤美桜, 年 国蕊, 小野日菜子, 浦瀬太郎
2. 発表標題 環境中から分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の菌種
3. 学会等名 第52回水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京工科大学水環境工学(浦瀬)研究室
<http://www.cloud.teu.ac.jp/public/BTF/urase/index.html>
 研究紹介(浦瀬研の研究内容の概要)
https://urase-lab.bs.teu.ac.jp/?page_id=9
 水環境中の抗生物質耐性菌
https://urase-lab.bs.teu.ac.jp/?page_id=181

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松井 徹 (MATSUI Toru) (90372812)	東京工科大学・応用生物学部・教授 (32692)	