

令和元年6月24日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00604

研究課題名(和文) 都市河川・湖沼への抗生物質拡散と環境微生物生態系への影響を評価する

研究課題名(英文) Antimicrobial resistance and their impact of microbial ecosystem in urban river and pond

研究代表者

西川 可穂子(Nishikawa, Kahoko)

中央大学・商学部・教授

研究者番号：20345416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全ての調査地点の都内表層水には、薬剤耐性菌が検出された。薬剤耐性菌は二剤以上の抗菌剤に耐性があるものが半数以上で、スクリーニングした抗菌剤の中では、アンピシリンとスルバクタムの合剤、およびクラリスロマイシンに耐性を示すものが多かった。これらの薬剤は、抗菌スペクトラムが広いためよく利用されている上に、どちらも日本では25年以上利用されている歴史がある。更に、表層水中の薬剤耐性遺伝子を調べたところ、ラクタムに関する耐性遺伝子が多く検出された。これらは人の薬剤耐性で問題となっている主要なものである。以上の結果から、ヒトへの抗菌剤の利用が表層水中の薬剤耐性に反映されている事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌剤の使用が世界的に増大したことにより、多剤薬剤耐性菌が出現しやすくなっている。現在、世界で70万人の人々が薬剤耐性による感染症で死亡したと推定されており、この状態を改善するために、わが国も2016年から2020年の5年間で「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」を実施している。人、動物、環境の3分野が総合的に対策を行う「ワンヘルス・アプローチ」が重要だが、日本においては環境分野の調査が進んでいない。そこで、本研究では大都市東京における川や池における薬剤耐性の分布やその特徴を調査し、今後の薬剤耐性へどのようなアプローチが必要か検討する知見を得る。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial resistant bacteria (ARB) were detected in the urban surface water of all survey points (20 sites) in Tokyo. More than half of ARB are resistant to two or more antimicrobial agents. Especially, resistance to ampicillin with sulbactam (62%) and clarithromycin (54%) was frequently detected; both are used in the clinical setting for a long time, more than 25 years in Japan. Furthermore, we detected a huge amount of antimicrobial resistance (AMR) gene from surface water. The most frequent AMR genes were related to  $\beta$ -lactam, which are a class of broad-spectrum antibiotics. These AMR genes are a critical problem for the treatment of infectious disease. Consequently, it is considered that human antimicrobial use has an impact on AMR in surface water.

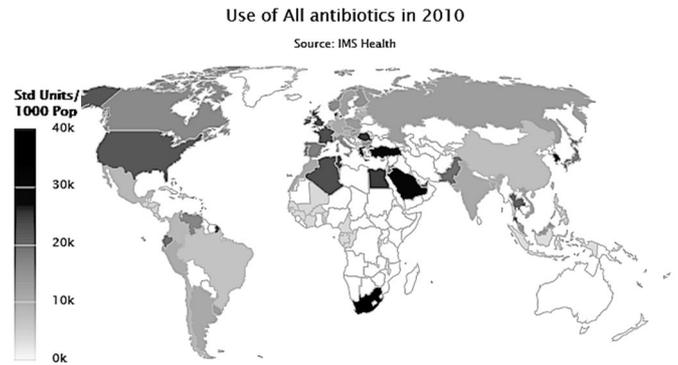
研究分野：環境微生物

キーワード：薬剤耐性 表層水 河川

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

抗菌剤の使用が世界的に増大していることが、有名な科学雑誌 nature 誌などで取り上げられるなど、医療関係者以外の人々にも注目されるようになってきている (右図: Readon, *Nature news* 2015.)。世界的に抗菌剤の使用が拡大したことにより、多剤薬剤耐性菌が出現しやすくなり、多くの人々が死に至っている。これに危機感をもった世界保健機関 (WHO) は、2015 年 5 月の世界保健総会で、「薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクション・プラン」を採択し、その際、加盟各国に 2 年以内の自国の行動計画の策定を求めた。それに対応し、わが国も 2016 年から 2020 年の 5 年間で「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」を実施することにした。日本での抗菌剤の使用量は、概ね動物 6 割、人 3 割、農業 1 割である ([https://amr-onehealth.ncgm.go.jp/statistics\\_cat/antibiotic/](https://amr-onehealth.ncgm.go.jp/statistics_cat/antibiotic/))。従って、AMR 対策は臨床の場だけに限らず、産業動物、環境の 3 分野に対して包括的に対策をとる“ワンヘルス・アプローチ”という概念が必要となる。



日本の抗菌物質の使用量は、世界的に見ても多く、年間 1,693 トン (2012 年度) である (深澤ら 2012)。その用途は、臨床と動物用医薬品がほとんどを占める。動物医薬品は、感染の治療のほかに、家畜や養殖魚の成長を促進する目的で飼料添加物として利用されている (Butaye et al, *Clinical Microbial* 2003, Chelossiet al, 2003)。飼料と共に抗菌剤が毎日摂取されるということは、畜産動物の体内で薬剤耐性菌が選択される状況が常態化することでもある。したがって、動物の腸内細菌で薬剤耐性を獲得したものが、糞便から野外環境へ拡散することが予想されるのだが、日本においてはその経路に関しては明確な調査がされていなかった。水環境は、その拡散経路の一つとして重要であると考えられるが、身近な表層水について、大腸菌以外の AMR について詳細な調査は少ない。

当時、海外では薬剤耐性菌が環境から分離された報告が相次いでいた (Ash et al, 2002)。特に、2013 年に公表された米国ハドソン川での耐性菌 (アンピシリン・テトラサイクリン) の検出を報告した論文 (Young et al, *J. Water and Health*) は、「多剤耐性菌が環境中に高頻度の確率で拡散している事実とその状況が公衆衛生へ及ぼすリスクの高さ」を指摘し、重要であった。

一方、日本における耐性菌のサーベイランスは、厚生労働省が実施している院内感染による調査があったが、水環境への拡散についての調査は包括的には実施されていなかった。清野ら (水環境学会誌、2004) が、都市河川の多摩川・鶴見川、また農業地帯を流れる河川の金目川で、水環境中における人用・動物用医薬品の濃度を報告していた。その結果、サルファ剤が全地点で検出されており、特に、金目川では多摩川・鶴見川の約 2 ~ 5 倍高濃度で検出されていた。これは畜産由来のサルファ剤であると推定されている。多摩川、鶴見川、金目川では、上述のように抗菌剤が検出されており、これらの抗菌剤が表層水中の薬剤耐性菌の存在に影響するのかという点について、日本の河川において検討が必要であると思われた。抗菌剤の選択圧がかかる環境で耐性菌が出現した場合、表層水中の微生物層内で耐性菌の薬剤耐性遺伝子が種を超えて水平伝播し、自然界で新たに薬剤耐性を獲得する細菌が出現する可能性は否定できない (Davies et al, 2010)。日和見菌や病原性が認識されていない環境菌

が薬剤耐性を持つことで、免疫抵抗力の低下した人（患者）に対する細菌感染の原因菌となるリスクが高まることも懸念される。こうしたことから、東京都内の表層水の環境菌を含めた薬剤耐性調査が必要であると考えられた。

## 2．研究の目的

本研究の目的は、第一に東京都内における表層水中の薬剤耐性菌の存在の有無と分布を広く確認することである。特に市民がアクセスしやすい河川・池が公衆衛生上重要だと思われたのでこれを対象とした。第二に、得られた薬剤耐性の傾向について調査をし、耐性菌が検出された試料中の耐性遺伝子の確認と細菌叢の変化の有無を確認することである。第三に、細菌叢における耐性遺伝子の水平伝播について検討することである。

## 3．研究の方法

### 1) 調査地点と採水方法

本研究では、東京都内を中心に全20ヶ所において採水を行なった（図1-2）。水面15cm下の表層水を試料水として1-2Lを採水し、採水後6時間以内に行過および寒天培地への塗布を行い、細菌の分離培養を実施した。

### 2) 表層水中の細菌の分離

環境菌の単離のために、標準寒天培地・クロムアガー培地・R2A寒天培地の3種の培地を用いて25°Cで3日間培養し、生菌数測定及びそれぞれの培地からの環境菌の単離を行った。単離した菌は、液体培地(nutrient broth)により37°Cで一夜増菌し、薬剤感受性試験に用いた。

### 3) 抗菌剤薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、disc diffusion method(Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI ガイドライン 2015)で実施した。Huller-Minton 培地(BD)に分離菌を塗布した後、市販薬剤ディスク(BBLTM Sensi-Disc™ susceptibility testing kit)を用いて、薬剤耐性の有無を判定した。薬剤感受性の判定は CLSI ガイドライン(2015)を採用した。薬剤は6試薬;アミノグリコシド系から amikacin, 30 µg (AN30), テトラサイクリン系から tetracycline, 30 µg (TE30), ペニシリン系とラクタマーゼ阻害剤の合剤から ampicillin with sulbactam, 10/10 µg (SAM30), キノロン系から levofloxacin, 5 µg (LVX5), カルバペネム系から imipenem, 10 µg (IMP10), マクロライド系から clarithromycin, 15 µg (CLR15)を選択した。

### 4) 薬剤耐性菌の同定

単離した菌は改めて増菌し、一部を14,000 xgで1分間遠心分離し沈査を得た。これに1% (v/v) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (pH8.0)を含む0.3mLのTris-EDTA (TE)緩衝液を加え、100°Cで10分間煮沸した。これを再び14,000 xgで1分間遠心分離し、上澄み液を鋳型DNAとして用いた。鋳型DNAはbacterial 16S rDNA Fast PCR Kit (800) (TaKaRa, Tokyo, Japan)を用いて増幅した。PCRによる増幅条件は、94°C 30秒-60°C 60秒-72°C 60秒を30サイクル実施した。PCR生成物は、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit (TaKaRa, Japan)を用いて精製をし、精製後のPCR生成物は、the Eurofins Genomics Companyに依頼し、配列を決定した。決定した配列を基にthe NCBI nucleotide BLASTデータベースで相同性検索を行い、相同性(identity)が99%以上のものを同定した。

### 5) メタゲノム解析 (微生物叢解析と耐性菌遺伝子の検出)

水試料から MoBio PowerWater DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Chicago, IL,

USA)を使って、DNA を抽出し、微生物叢解析には illumina16SrRNA16S シーケンスプロトコルに従ってメタゲノム解析を実施した。得られたデータは、illumina 社が提供するクラウドベースのハブ BaseSpace により解析をした。耐性遺伝子の検出には、ショットガンメタゲノミクス法を用いた。ショットガン法では、状態の良いサンプルを複数選び、同時に分析をした。Nextera XT DNA Library Preparation Kit と Nextera XT Index Kit (Illumina, Inc.)を用いて、ペアードエンドライブラリーを調整し、Nextera XT index kit を用いて調整し、2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix を用いてターゲット遺伝子の増幅を行い、MiniSeq High Output Reagent Kit により MiniSeq (Illumina 社)で配列を決定した。配列情報は、ギャラクシーベースのメタゲノムパイプラインである AmrPlusPlus へ入力し、The MEGARes database(<https://megares.meglab.org/>)を基に、耐性遺伝子情報を得た。



図1 調査地点(全体図)

図2 東京都内調査地点

#### 4. 研究成果

##### 1) 東京都内表層水から分離された薬剤耐性

薬剤耐性菌の検出結果を表1に示す。全ての調査地点で分離菌が検出され、合計86菌株となった。試験薬剤6剤のうち、SAM20が最も多く86菌株中55菌株に耐性があった(64%)。次いで、CLR15が46菌株に耐性があった(54%)。その他の薬剤についても耐性菌は検出されたが、TE30

で14菌株(16.3%)、AN30で

10菌株(11.6%)、LVX5とIMP

は5菌株(5.8%)と、SAM20およびCLR15と比較して少ない

結果となった。これらの中には、二剤以上に薬剤耐性を示すものが49%(42菌)あった。

SAM20とCLR15の二剤に薬剤耐性を示すものが21菌株で最も多く、この他には、SAM20とIPM10、またはTE30に耐性を示すものが検出された。

SAM20とCLR15は、抗菌スペクトラムが広く、日本ではどちらも長期間使用されている

薬剤である。三剤以上の薬剤耐性では、SAM20、CLR15、TE30の組み合わせが多かった。四剤に耐性を示すものには、SAM20、CLR15、TE30の組み合わせに加え、AN30、IPM10、LVX5のいずれか

表1. 薬剤耐性菌の検出数と薬剤耐性

調査地点	分離株	TE30	SAM20	AM30	LVX5	IPM10	CLR15
St2	4		4	3			2
St3	1			1			1
St4	5	1	2			1	1
St5	4		3	1			2
St6	3		1		1		1
St8	3	1	3	1			2
St9	4		2				1
St10	3		1				2
St11	4						2
St12	3		3				2
St13	3		1				2
St14	2	1	2				
St15	3				2		1
St16	4	1	4	1	2		1
St17	3		3				2
St18	4		4				4
St19	8	1	2				2
St20	6		4				5
St21	7	2	6	1		1	4
St22	12	7	12	2		3	9
合計	86	14	55	10	5	5	46
検出率(%)		16.3	64.0	11.6	5.8	5.8	53.5

薬剤である。三剤以上の薬剤耐性では、SAM20、CLR15、TE30の組み合わせが多かった。四剤に耐性を示すものには、SAM20、CLR15、TE30の組み合わせに加え、AN30、IPM10、LVX5のいずれか

に耐性を示すものが検出された。

## 2) 分離菌の同定

16S rDNA sequence analysis により, 分離菌の同定を試み, 16 菌株を同定した。結果を表 2 に示す。表 2 の既報の欄には, 過去に同定された菌と同じ菌または非常に近いと思われる種に関する報告があったものを示した。臨床関連報告は\*1、動物由来の菌は\*2、植物由来の菌は\*3、環境菌に類する報告は\*4 とした。この結果から、表層水中から分離された薬剤耐性菌には、臨床で報告されている病原菌から環境菌まで様々な領域の菌が存在していた。特に、植物由来や環境菌が薬剤耐性を獲得した過程については、臨床菌の影響がどの程度あるのかについて、今後詳細な検討が必要である。

表 2 分離菌の同定結果

耐性薬剤	調査地点	同定された菌	既報
SAM & CLR	St.8	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain KCTC 2190	*1 (Miro et al 1995)
	St.12	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain	*1 (Seng et al. 2016)
	St.12	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469	*2 (Simmons et al 2016)
	St.17	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain NBRC 103162	*2 (Nishimori et al 2000)
	St.18	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	*1 (Mazza et al 1992)
CLR	St.10	<i>Hafnia paralvei</i> strain ATCC 29927	*1 (Osuka et al 2011)
	St.13	<i>Bacillus subtilis</i> strain 168	*1 (Steinmetz & Richter 1994)
SAM	St.12	<i>Chryseobacterium rhizoplanae</i> strain JM-534	*3 (Kampfer et al 2015)
	St.13	<i>Exiguobacterium indicum</i> strain	*4 (Chaturvedi & Shivaji 2006)
	St.14	<i>Acinetobacter junii</i> strain ATCC 17908	*1 (Yoon et al 2016)
	St.16	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	*1 (Mazza et al 1992)
LVX	St.15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	*1 (Mazza et al 1992)
	St.15	<i>Bacillus cereus</i> strain xqq03	*4 (Fenselau et al 2008)
TE, SAM, AN	St.8	<i>Chryseobacterium joostei</i> strain V4	*4 (Hugo et al 2003)
	St.14	<i>Chryseobacterium tractae</i> strain 1084-08	*2 (Zamora et al 2012)
SAM, AN, LVX	St.16	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	*1 (Mazza et al 1992)

既報欄：臨床(\*1), 動物(\*2), 植物(\*3), 環境(\*4)。

## 3) 表層水中の薬剤耐性遺伝子 (AMR 遺伝子)

都内表層水試料 (St.2, St.5, St.8, St.10, St.12, St.13) の薬剤耐性遺伝子を解析した。23 の AMR クラスの遺伝子が検出されたが、上位 10 位の結果を表 3 に示す。全体で 3,825 の AMR 遺伝子が検出され、遺伝子配列の取得データ数 (Hits 数) が最も多いのは、ラクタムに関する遺伝子 (Hits 数 16,551) だった。検出された AMR 遺伝子の内訳は、Class A beta-lactamases (1,141 遺伝子), Class D beta-lactamases (393 遺伝子), Class C beta-lactamases (312 遺伝子), Class B beta-lactamases (257 遺伝子), その他 (35 遺伝子) の順に多かった。二番目に取得データ数が多かったのは、多剤耐性 (multi-drug resistance) に関する遺伝子 (Hits 数 10,854) で 191 の AMR 遺伝子が検出された。三番目に Hits 数が多かったのは、フルオロキノロンに関するもので、217 AMR 遺伝子であった。

表 3 表層水中の薬剤耐性遺伝子のヒット数

Frequency in Data	AMR Class	Hits **
1	Beta-lactams	16,551
2	Multi-drug resistance	10,854
3	Fluoroquinolones	8185
4	Aminoglycosides	5944
5	MLS	5269
6	Rifampin	5122
7	Tetracyclines	4697
8	Glycopeptides	4689
9	Aminocoumarins	2292
10	Phenicol	2091

## 4) 調査地点の水試料中の微生物叢解析

12の水試料の調査地点について主座標分析(PCoA)をした。結果を図3に示す。微生物叢の類似性が高いのは、点線で囲んだ部分で、すべて多摩川の調査地点である。それぞれの調査地点は離れており、途中から小さな支流や排水などが入り込んでいる地点などを含んでいたが、微生物叢には大きな変化がなかった。調査地点をさらに遠く離れた下流や上流で実施すると変化が出る可能性はあるが、大きな変化がない要因の一つに、多摩川の河川水量が比較的多いことが挙げられるだろう。一方、その他の調査地点は、それぞれ異なる水系の池や河川であり、存在する細菌叢も特有であることがわかった。

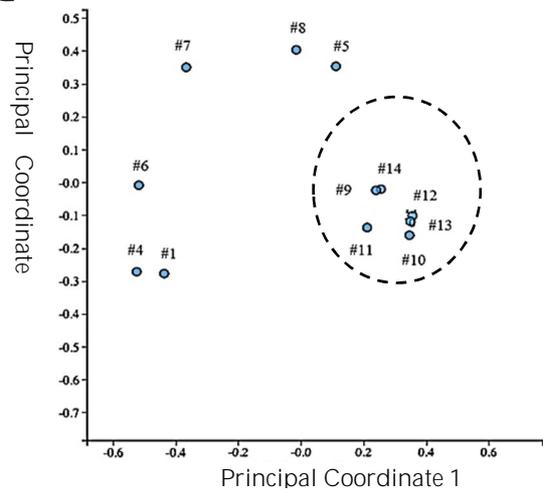


図3 細菌叢の主座標分析

本研究により、予想以上に環境水には、AMRが存在し、それらはヒトの抗菌剤使用に色濃く反映されていることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

蜂谷真基、金子直樹、西川可穂子、東京都内の表層水に含まれる薬剤耐性菌に関する調査～薬剤耐性の傾向と分布から見えてくる現状～環境情報科学 学術研究論文 32、pp.313-16、2018、査読有り

西川可穂子、環境中に拡散する薬剤耐性菌 ～どうして川や池に存在するのか～中央大学論集 39、pp.17-27、2018、査読無し

〔学会発表〕(計 3 件)

K Nishikawa, T Suzuki, T Iwai, Y Koyama, N Kaneko, M Hachiya, "Frequency of antimicrobial resistance in bacteria at urban pond and river in Tokyo." The 18<sup>th</sup> International Conference on Diffuse Pollution and Eutrophication, LA 2017.

K Nishikawa, T Suzuki, "Resistome analysis of surface water from two ponds and two rivers in Tokyo." SETAC Europe 28th Annual Meeting, abstract WE285, Rome 2018.

西川可穂子、鈴木孝昌、河川の環境 DNA から読み解く薬剤耐性の現状とその考え方、第 21 回日本水環境学会シンポジウム講演集 2018 p195-6、招待講演

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称： 発明者： 権利者： 種類： 番号： 出願年： 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称： 発明者： 権利者： 種類： 番号： 取得年： 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木孝昌

ローマ字氏名：Suzuki Takayoshi

所属研究機関名：国立医薬品食品衛生研究所

部局名：遺伝子医薬部

職名：室長

研究者番号(8桁): 30226526

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。