

令和 2 年 7 月 1 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：17K09023

研究課題名(和文) 環境及び院内由来薬剤耐性菌におけるMLST解析を指標とした包括的監視体制の構築

研究課題名(英文) Construction of comprehensive monitoring system using MLST analysis against anti-microbial resistant isolates from the hospitalized patients and environments samples

研究代表者

岡崎 充宏 (OKAZAKI, Mitsuhiro)

東京工科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：40734869

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)：医療関連感染として問題となっている薬剤耐性菌の自然環境(多摩川河川中流域：東京)における汚染・拡散の動向を経年的(3年間)に調査した。釣菌した総大腸菌株のうちESBL産生株の検出頻度は常時3～6%を占め、流水し続けていることがわかった。これらの菌株の遺伝子解析(ESBL型、ST型)の結果は、ヒトにおける感染症の原因菌と同一タイプの菌株が多く見いだされた。さらに、これらの菌株は、本河川の河口沿岸にまで生息していることがわかった。毒素産生性のC. difficile株の検出頻度は60.5%で、病院感染と同等であった。そのほかの薬剤耐性菌(MRSAおよびVRE)は検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において自然環境における薬剤耐性菌の汚染調査の報告は少なく、また、ヒトへの感染症との関連性も不明確であった。今回の調査では、浄水やリクリエーションの場として利用される河川からの薬剤耐性菌株の効率的・正確な監視体制の構築と、さらに臨床現場において実施されている遺伝子解析を新規導入することで、ヒトへの曝露リスクの一端は、この河川に潜在していることを示した。このことは、現在の「水浴場の水質調査」では、薬剤耐性菌株を対象とした調査は含まれていないこともあり、今後の公衆衛生的感染防止対策のひとつとして薬剤耐性菌調査を導入すべきであろうと考える。

研究成果の概要(英文)：We investigated the trends of pollution and diffusion in the environment (the Tama River: Tokyo) of drug-resistant bacteria, which has become a problem as a medical-related infection, over the course of three years. It was found that the detection frequency of ESBL-producing strains among all Escherichia coli isolates was 3-6%. As a result of genetic analysis (ESBL type, ST type) of these isolates, many strains of the same type as the causative strain of human infectious disease were found. Furthermore, these strains were found to inhabit the estuary of the river. The frequency of detection of toxin-producing C. difficile strain was 60.5%, which was equivalent to hospital infection. Other drug-resistant bacteria (MRSA and VRE) were not detected.

研究分野：臨床微生物学、感染制御学

キーワード：薬剤耐性 遺伝子解析 one health 監視 MLST解析 ESBL産生 大腸菌 河川

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年に開催された世界保健総会において「薬剤耐性 (Antimicrobial resistance; AMR) に関するグローバル・アクション・プラン」が採択され、本邦においても AMR タスクフォースが設置された。このことは、近年、世界的に医療関連施設における薬剤耐性菌による感染や死亡事例といった社会性のある問題が増加し、その対策の構築は急務である。しかし、この対策は、医療現場だけの問題ではなく、すでに社会生活を営む健康人を含めた環境問題として包括的な対策 (one health approach) が重要であるという認識が共有されるようになった。それゆえに、薬剤耐性菌の人間社会における蔓延を防止することが医療関連感染対策に寄与することになる。このことは、水産・畜産動物、野生動物、愛玩動物及び食品関連など人間を取り囲む環境において広範囲にわたる薬剤耐性菌の詳細かつ正確な監視体制の構築も急務となることを示している。

これまでの環境水中を含む薬剤耐性菌の分布状況の調査は、水産・畜産と環境との関連調査において主にサルモネラ菌や大腸菌などの食中毒に関連する細菌を対象にした報告が多いなかで、医療関連感染において問題とされている薬剤耐性菌を対象に行った調査報告は、大腸菌やブドウ糖非発酵菌群 (主に自然耐性をもつ) といった限られた菌種であった。しかし、近年、薬剤耐性大腸菌に限らず、多様な腸内細菌群 (クレブシエラやプロテウスなど) や MRSA、VRE、*Clostridium difficile* などの施設内感染が報告されているものの、環境における調査報告はほとんど認められない。また、薬剤耐性遺伝子型及び MLST 等の型別解析においても詳細な報告がなされていない。以上の自然環境における薬剤耐性菌によるヒトへの感染暴露リスクの評価が不明瞭であることが、one health の概念から欠乏している現状である。

### 2. 研究の目的

都市河川水及びその河川の沿岸水から医療関連感染の原因菌として問題となっている MRSA、VRE、ESBL 産生大腸菌群、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示す腸内細菌や *C. difficile* などを分離し、それらの検出頻度や分離菌株が保有する薬剤耐性遺伝子を解析し、環境水における汚染・拡散の状況を把握する。本研究で分離された薬剤耐性菌株は MLST 法により遺伝子解析を行い、既知の院内患者由来分離菌株との相違性を検討し、環境由来薬剤耐性菌株によるヒト感染暴露リスクの評価を行う。以上の研究を遂行するために、効率的で継続可能な監視 (モニタリング) システムを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 河川水及び海水の採取及び時期

多摩川流域における東京都下水道局流域下水道本部占用の北多摩二号水再生センターの排水樋門から下流に 1.6km の地点を定点と定め、水面から 30cm 以内の範囲で滅菌ボトルに 1000mL 採水した。採取した河川水は保冷バッグに入れて輸送後、4℃ で保存し、24 時間以内に使用した。採水時期は、2017 年～2018 年の梅雨前と秋季の 2 回/年で実施した。また、東京湾内外の 3 箇所の海水を河川水と同様に採水した。

#### (2) 河川水及び海水の処理

採水からの薬剤耐性菌株の検出手順は、環境省の指針に準じた河川水の水質調査における糞便性大腸菌群数測定方法を基に、採水 100mL を 0.45µm ニトロセルロースフィルター (メルクミリポア) を用いて濾過した (M-FC 法)。濾過後、フィルターを選択培地上に置き、35℃、18 時間培養した。

#### (3) 対象とした薬剤耐性菌及び選択分離培地

以下に、検出を行った薬剤耐性菌及び選択分離培地 (カッコ内) を示す。MRSA (卵黄マンニト食塩培地: 栄研化学)、VRE (VRE 選択培地: 日本ベクトンデッキンソン)、ESBL 産生大腸菌群 (クロモアガー-ECC 寒天培地、クロモアガー-ESBL 寒天培地: いずれも関東化学)、カルバペネマーゼ産生大腸菌群; CPE (クロモアガー-mSuper CARBA 生培地: 関東化学)、*C. difficile* (CCMA 寒天培地: 日水製薬)

#### (4) 薬剤耐性菌の菌種同定及び薬剤感受性試験

菌種同定は、確認培地を用いた従来法に加え、臨床検査で使用されるマイクロスキャンコンボパネル (BECKMAN COULTER) 及び Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker) による質量分析を用いて行った。

薬剤感受性試験は CLSI に準拠したマイクロスキャンコンボパネル (BECKMAN COULTER) を用いて行った。このパネルは、菌種同定と薬剤感受性検査を同時に実施できる市販キットである。

#### (5) ESBL 遺伝子型及び MLST 解析

DNA 抽出はシカジーニアス DNA 抽出試薬 (関東化学) を用いて行った。遺伝子型の判定は、シカジーニアス ESBL 遺伝子型検出キット (関東化学) の説明書に準拠して行った。検出を試みた遺伝子型は、TEM 型、CTX-M-1 group、CTX-M-9 group、SHV 型、CTX-M-2 group 及び CTX-M-8 group の合計 6 種類を検索した。

ESBL 産生大腸菌の検出菌株を対象とした multilocus sequence typing (MLST) 解析は、7 つのハウスキーピング遺伝子 (adk、fumC、gyrB、icd、mdh、purA、recA) を PCR 法で増幅後精製し、シークエンス解析により得られた塩基配列をデータベース (CGEserver) で照合し、ST 型として決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各薬剤耐性菌の検出状況

本調査において各種の薬剤耐性菌の分離株数を表に示す。これらの菌株数は、採水 100mL 中の菌数を示した。もっとも多く検出された薬剤耐性菌は、ESBL 産生株で、そのうち *Escherichia coli* であった。次いで、*Klebsiella pneumoniae* であり、このことは臨床における検出と同様な結果を示した。*C. difficile* の検出も多く認められた。また、近年、極めて医療関連感染において問題となっているカルバペネマーゼ産生菌株が、*Enterobacter cloacae* complex において確認されたことは注目に値した。一方、医療関連施設及び市井感染にて高頻度に検出される MRSA は、検出されなかった。VRE に関しては、バンコマイシンに耐性を示さない菌株は、多数検出されたものの、耐性株は検出されなかった。

##### (2) ESBL 産生大腸菌株における経時的検出頻度

本調査においてもっとも検出された ESBL 産生大腸菌株の経時的検出頻度を図に示す。同時に、海水からの検出状況を示す。釣菌した総大腸菌数における本薬剤耐性菌株数の検出頻度は、3~6%の範囲で推移していること、また常時、流水していることが判明した。特に、海水の調査で、A(浮島)における検出頻度の高さは、傑出していた。この地点は、調査した多摩川の河口の汽水域にあたり、何らかの関係性が示された。

##### (3) ESBL 産生大腸菌株における ESBL 遺伝子型及び ST 型

ESBL 遺伝子型は、CTX-M group 9 型の単独株がもっとも高頻度に検出された。次いで、TEM/CTX-M group 9 の複合型、CTX-M group 1 型の単独型の順であった。近年の臨床由来株において CTX-M group 9 に属する CTX-M-14、CTX-M-27 及び CTX-M group 1 に属する CTX-M-15 の検出頻度が高いことが報告されていることから、本調査において判明した河川水由来株は、臨床由来株の河川への流出による可能性が示唆された。

MLST 解析によって判別した ST 型は、131 型と 38 型が優勢であった。これらの ST 型は、臨床由来株においても高頻度に検出されていることから、河川由来株との強い関連性が示唆された。以上の ESBL 型及び ST 型の解析結果から本河川水には、医療関連感染において問題となっている病原菌と同様の菌株が流出している可能性を認めた。このことは、本河川が、浄水やリクリエーションの場として市民が利用していることもあり、公衆衛生的な感染対策の必要性を示すとともに、ヒトへの感染暴露リスク評価に繋がる結果であった。また、多摩川流域に生活する市民における保菌状況の調査に活用できる可能性が示された。

##### (4) ESBL 産生大腸菌株における薬剤感受性

キノロン系抗菌薬のレボフロキサシンに対して約 70%の菌株が耐性を示した。そのなかで、ST 型の 131 型は、95%の菌株が耐性であった。

##### (5) 監視システムの構築

本研究において各種の薬剤耐性菌を分離するための選択培地、菌種同定のための MALDI-TOF MS、薬剤感受性試験のためのマイクロスキャンコンボパネル及び遺伝子型解析のための ESBL 遺伝子型検出キットや MLST 解析を導入し、組み入れることで検出菌株の詳細なデータを収集することが可能であった。また、それらのほとんどの試薬や物品は、市販されており操作性も容易であることから継続可能な監視を行うことが可能であった。以上のことから、本研究では、環境水における主要な薬剤耐性菌株の監視システムを構築することができた。

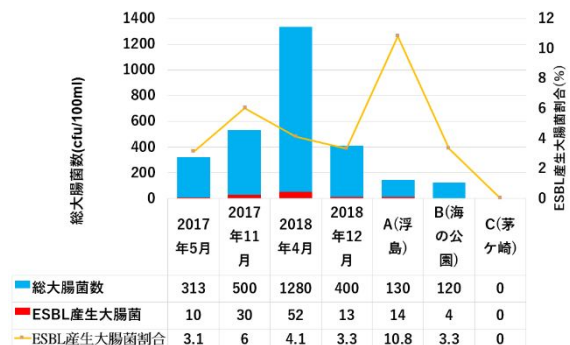
河川水における薬剤耐性菌株の分離株数

薬剤耐性菌	分離株数
ESBL <sup>*1</sup> 産生 <i>Escherichia coli</i>	105
ESBL産生 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
ESBL産生 <i>Klebsiella oxytoca</i>	2
ESBL産生 <i>Enterobacter cloacae</i>	1
ESBL産生 <i>Kluyvera ascorbata</i>	1
ESBL産生 <i>Raoultella ornithinolytica</i>	1
カルバペネマーゼ産生 <i>Enterobacter cloacae</i> complex	1
<i>Clostridium difficile</i>	48
MRSA <sup>*2</sup>	0
VRE <sup>*3</sup>	0
コリスチン耐性腸内細菌	0

\*1: extended spectrum  $\beta$ -lactamases

\*2: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

\*3: vancomycin resistant Enterococci



河川水および海水におけるESBL産生大腸菌の経時的検出頻度

ESBL産生大腸菌株のESBL遺伝子型

ESBL遺伝子型	20017年		2018年		Total	
	n (27株)	Prev. (%)	n (52株)	Prev. (%)	n (79株)	Prev. (%)
CTX-M group 1	3	10	11	21.2	14	17.1
CTX-M group 2	1	3.3	1	1.9	2	2.4
CTX-M group 8	0	0	1	1.9	1	1.2
CTX-M group 9	12	40	20	38.5	32	39
CTX-M group 1, 2, 9 <sup>*1</sup>	0	0	1	1.9	1	1.2
CTX-M group 8, 9 <sup>*2</sup>	0	0	1	1.9	1	1.2
TEM/CTX-M group 1	2	6.6	8	15.4	10	12.2
TEM/CTX-M group 9	7	23.3	9	17.3	16	19.5
SHV	0	0	0	0	0	0
TEM	2	6.6	0	0	2	2.4

\*1: CTX-M group 1/CTX-M group 2/CTX-M group 9

\*2: CTX-M group 8/CTX-M group 9

ESBL産生大腸菌株の経年的MLST型の検出頻度

ST型	2017年 (n=25)		2018年 (n=44)		Total (n=69)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
131	8 (32)	14 (31.8)	22 (31.9)			
38	5 (20)	10 (22.7)	15 (21.7)			
69	3 (12)	3 (6.8)	6 (8.7)			
2451	0	3 (6.8)	3 (4.3)			
other*	9 (36)	14 (31.8)	23 (33.3)			

\*1株以上検出されなかったMLST型を含む

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda M, Mizoguchi M, Oshida Y, Tatsuno K, Saito R, Okazaki M, Okugawa S, Moriya K	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical and microbiological characteristics and occurrence of Klebsiella pneumoniae infection in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of General Medicine	6. 最初と最後の頁 293-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJGM.S166940	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tabuchi F, Matsumoto Y, Ishii M, Tatsuno K, Okazaki M, Sato T, Moriya K, Sekimizu K	4. 巻 70
2. 論文標題 D-cycloserine increases the effectiveness of vancomycin against vancomycin-highly resistant Staphylococcus aureus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Antibiot (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 907-910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ja.2017.56	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 Sasaki S, Kishii K, Okazaki M	4. 巻 51
2. 論文標題 Contactless ammonia mapping for concentric colony pattern of Proteus mirabilis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Engineering of Japan	6. 最初と最後の頁 107-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1252/jcej.17we157	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 須田 育未、山本 乃絵瑠、丹澤 千恵、佐野 友紀、満島 尚平、花尾 麻美、岡崎 充宏
2. 発表標題 都市河川流水における毒素産生性Clostridium difficile株の汚染状況の調査報告
3. 学会等名 平成30年度 日臨技 関甲信支部・首都圏支部医学検査学会（第55回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田 彩里、野村 莉咲、橋口 果、戸口 明宏、大塚 喜人、花尾 麻美、岡崎 充宏
2. 発表標題 多摩川はESBL 産生大腸菌株のリザーバーになっている
3. 学会等名 平成30年度 日臨技 関甲信支部・首都圏支部医学検査学会（第55回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 花尾麻美，岸井こずゑ，戸口明宏，大塚喜人，岡崎充宏
2. 発表標題 都市河川流域において医療関連感染で問題となっている薬剤耐性菌の汚染状況
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山里佳子，瀨瀬安由，原川結里花，花尾麻美，佐藤智明，森屋恭爾，岡崎充宏，岸井こずゑ
2. 発表標題 河川・沿岸領域由来Stenotrophomonas maltophiliaの薬剤感受性解析
3. 学会等名 第12回日本臨床検査学教育学会学術大会（埼玉県立大学，埼玉県）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花尾麻美，岸井こずゑ，森屋恭爾，岡崎充宏
2. 発表標題 都市河川環境におけるESBL産生Escherichia coliの実態調査
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会（京王プラザホテル，東京）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Misawa Y, Okugawa S, Okazaki M, Okamoto Y, Yoshida A, Okuzumi K, Sone S, Yatomi Y, Moriya K
2. 発表標題 The biochemical and phenotypical characteristics of Staphylococcus pseudintermedius isolated from human
3. 学会等名 The 5th congress of AAMLS Asia Association of Medical Laboratory Scientists (Busan, Korea) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 花尾麻美, 岸井こずゑ, 大濱侑季, 佐藤智明, 森屋恭爾, 岡崎充宏
2. 発表標題 都市河川中流域におけるESBL 産生大腸菌群の汚染調査
3. 学会等名 第67回日本医学検査学会 (浜松, 静岡県)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 夢菜, 中村 好実, 関口 真央, 丸山 英行, 大塚 喜人, 花尾 麻美, 岡崎 充宏
2. 発表標題 本邦における沿岸海水中のESBL産生大腸菌株の検出および遺伝子型の分布状況の調査報告
3. 学会等名 2019年度 日臨技 首都圏支部・関甲信支部医学検査学会 (第56回)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	岸井 こずゑ  (KISHI Kozue)  (10629570)	東京女子医科大学・医学部・研究生    (32653)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	花尾 麻美 (HANA O Mami) (40756920)	東京工科大学・医療保健学部・助教  (32692)	
研究分担者	和田 裕雄 (WADA Hiroo) (50407053)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  (32620)	