

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13856

研究課題名(和文) アジアの水環境におけるバンコマイシン耐性腸球菌の分布実態と伝播機構の解明

研究課題名(英文) Distribution and transmission mechanism of vancomycin-resistant enterococci in water environment of Asia

研究代表者

西山 正晃(Nishiyama, Masateru)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：10802928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジアと日本の水環境から試料を採取し、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の分布調査を実施した。タイと日本の下水処理場からVRE株のスクリーニングし、VREに関わる耐性遺伝子を検出した結果、vanAがタイと日本の流入下水からそれぞれ14%(139株)、0.5%(184株)検出された。日本とタイで分離したvanAを保有するVRE株20株について耐性遺伝子の伝播を評価したところ、日本で分離した菌株のみ伝播が確認され、その伝播率は 10^{-7} ～ 10^{-8} の範囲であった。一方、タイで分離した19株のVREは接合伝達による伝播が確認されなかったことから、伝播機構に差があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東南アジアの水環境を対象としたVREの調査を実施し、統一された方法で各国のVREの存在割合を算出したことで、各国におけるVREの拡散状況を明らかにできた。日本でも同様の調査を行い、東南アジア各国との検出結果と比較して日本でのVREの存在割合はタイやベトナムと比較して低いことは、日本での臨床でのVRE感染者数が低いことが要因であると考えられた。VREの中でもvanAの伝達性は日本とタイの分離株で異なったことは、耐性遺伝子を運ぶ機構が異なることを示唆しており、これらの違いが何故存在するかを証明するきっかけが得られた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the distribution of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in water environment of Southeast Asia (SE Asia). Samples were taken from the water environment such as drinking water and wastewater in SE Asia and Japan. Screening of VRE strains from wastewater treatment plants in Thailand and Japan were evaluated the resistance genes related to VRE, vanA was detected in 14% (139 strains) and 0.5% (184 strains) of inflow in Thailand and Japan, respectively. The transferability of resistance genes was evaluated by the filter mating among VRE (20 isolates) possessing vanA gene isolated from Thailand and Japan. The resistance gene transfer was confirmed only in the strains isolated in Japan, and the transferability was 10^{-7} to 10^{-8} . On the other hand, the 19 strains of VRE isolated in Thailand were not confirmed, suggesting that there is a difference in the mechanism of antibiotic resistance gene.

研究分野：土木環境システム

キーワード：バンコマイシン耐性腸球菌 東南アジア 薬剤耐性 水環境 下水処理場 水平伝播

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

感染症治療に処方される抗菌薬や家畜に対する成長促進剤の使用に伴い、薬剤耐性菌が出現し、薬剤耐性菌による感染症は世界的な問題となっている。薬剤耐性菌は、臨床現場のみならず、土壌や河川など生活環境中からも検出され始めており、拡大する薬剤耐性菌に関する正確な情報の蓄積とその情報に基づいた対策の考案は極めて重要な課題である。

バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci, VRE) は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染症の特効薬であるバンコマイシンに耐性を獲得した腸球菌であり、VRE による院内感染は国内外で拡大している。VRE に代表される薬剤耐性菌が環境中に存在すれば、環境中で耐性遺伝子が他の細菌へ伝播する可能性もあるが、現在でもその有無は明らかとなっていない。

これまでも多くの研究者が、様々な薬剤や耐性菌を含む排水が最終的に流入する水環境は、薬剤耐性菌が拡大する場となっている可能性が指摘している。薬剤耐性菌の拡大を防止するためにも、水環境における耐性遺伝子の伝播メカニズムを明らかにすることは極めて重要な研究課題である。薬剤耐性菌の出現・拡大を考えるうえで、何処で細菌が耐性を獲得し、どのような宿主に耐性遺伝子を伝播するのかを明らかにすることは、高濃度で細菌が集積する下水処理プロセスでも、耐性遺伝子が伝播する可能性が指摘されているが、実際に水環境中で細菌が薬剤耐性を獲得したり、耐性遺伝子を伝播したりすることを明確に示す知見は得られていない。

2 . 研究の目的

本研究では東南アジアの水環境におけるバンコマイシン耐性腸球菌の分布実態と耐性遺伝子の伝播宿主域の探査を目的として、まず、日本を含めた東南アジア諸国の水環境を対象とした広域調査を実施し、VRE を含む薬剤耐性腸球菌の分布実態を明らかにする。次に、環境中を模擬した実験環境下で *in vitro* 伝達実験を実施し、VRE のバンコマイシン耐性遺伝子が伝播するポテンシャルとその宿主領域を探査する。さらに、アジア諸国で分離した VRE 株や、*in vitro* 伝達実験によって耐性遺伝子が伝播した菌株のゲノム構造を解析して、バンコマイシン耐性遺伝子の伝播機構を解明する。

3 . 研究の方法

(1) 東南アジアの水環境を対象とした VRE の分布実態の調査

VRE の分布調査は、東南アジア (タイ、カンボジア、ベトナム) と日本 (山形県、宮城県) の水環境を対象に実施した。以下に各調査の試料の採取状況を示す。

①カンボジアの飲料水における調査

カンボジアでの調査は、トンレサップ湖で生活している住民が使用する飲料水を対象とした。試料は 2018 年から 2019 年にかけてトンレサップ湖内の 4 つの州 (Battambang (BB), Kampong Chhang (KC), Kampong Thom (KT), Siem Reap (SR)) の村落から計 281 試料した。腸球菌数は、腸球菌選択培地である Enterococcosel Agar を用いたメンブランフィルター法によって計数した。計数後、褐色から赤色を呈する陽性コロニーを各試料からランダムに 1~3 株選択して、TH Agar に単離・培養した。単離菌株の菌種同定には PCR 法を用い、腸球菌種の中でも主要な菌種として知られている *Enterococcus faecalis* と *Enterococcus faecium* を対象とした。薬剤感受性は Kirby-Bauer 法によるディスク法を採用した。検出された耐性菌のうち多剤耐性を示した腸球菌を対象に、遺伝学的特徴を MLST 解析によって調査した。

東南アジア (タイ、カンボジア、ベトナム) と日本 (山形県、宮城県) の下排水中における調査

東南アジア 3 カ国（タイ、ベトナム、カンボジア）と日本を対象として VRE の分布調査を実施した。調査は 2017 年から 2018 年にかけて以下の都市で行った；バンコク（タイ）、フエ（ベトナム）、プノンペン（カンボジア）、鶴岡市と仙台市（日本）。試料はベトナムとカンボジアでは生活排水を、タイと日本では下水処理場の流入下水を採水し、各一回での調査を行った。採取した試料から VRE を検出するために、CHROMagar™ VRE に試料を直接塗抹し、培養後の陽性コロニーを計数した。同じ試料から耐性菌と同種の感受性菌も検出するために、当該選択培地に抗菌薬が入っていない培地にも塗抹し、培養後のコロニーを計数した。両者のコロニー数の比率から、耐性菌の割合（%）を求め VRE の拡散状況を把握した。

下水処理場の流入下水を対象とした調査

タイ（バンコク）と日本（仙台市）では下水処理場を対象としたモニタリング調査を実施した。タイでは下水処理場の流入下水と活性汚泥を 2019 年 11 月から 2020 年 2 月まで、合計 16 試料採取した。仙台市では 2019 年 2 月から 2020 年 2 月まで下水処理場の流入下水を対象として実施した。で記載した VRE の検出方法を用い VRE を単離した。単離した VRE について腸球菌の菌種同定を PCR 法にて行った。さらに VRE の遺伝子型であるバンコマイシン耐性遺伝子（*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*）の検出を PCR 法にて行った。VRE が確定した菌株については、ドライプレートを用いた微量液体希釈法によって薬剤感受性を評価した。

(2) VRE からバンコマイシン耐性遺伝子が伝播する宿主領域の探査

VRE からバンコマイシン耐性遺伝子が伝播する宿主領域の探査では、VRE から 3 種の腸球菌へのバンコマイシン耐性遺伝子の伝播率から評価した。バンコマイシン耐性遺伝子の伝播は、薬剤耐性株（供与菌）から薬剤非耐性株（受容菌）への接合伝達による耐性遺伝子の伝播を計数することによって評価した。

①使用菌株

供与菌に使用した菌株は、上記の(1)-③で分日本とタイの下水処理場から分離した VRE 株を使用した。受容菌には、以前の研究で作成した *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* の 3 種と標準株として *E. faecalis* OG1RF 株を合わせた 4 種類を採用した。

伝播実験の概要

供与菌と受容菌を Brain Heart Infusion（BHI）液体培地にて培養し、両菌株の培養液を遠心分離後に上澄みを捨てた後、滅菌生理食塩水にて菌体をウォッシュした。上記の作業を 2 回繰り返す、液体培地を完全に除去した後、滅菌生理食塩水にて菌体濃度を 10^8 CFU/mL に調整した。薬剤耐性遺伝子の伝播実験は、混合比を 1 : 1 で実施した。

伝播実験は、Filter mating 法にて評価した。供与菌と受容菌の混合液をセルロース混合エステルメンブランフィルター（直径 47 mm, 孔径 0.45 μ m, Advantec）で吸引濾過し、BHI 培地上で 24 時間培養した。

伝播率の評価

各条件で培養した後、滅菌生理食塩水を使用して段階希釈し、受容菌、供与菌、および耐性遺伝子が伝播した接合完了体のコロニー数を計数することによって、伝播ポテンシャルを評価した。計数には、受容菌、供与菌、および接合完了体のそれぞれに対応した抗菌薬含有 BHI 培地を作製した。供与菌はバンコマイシン、受容菌はリファンピシンとフシジン酸、接合完了体はバンコマイシン、リファンピシン、およびフシジン酸を添加した薬剤含有培地を作製し、計数に使用した。各条件の培地に段階希釈した試料 100 μ L を滴下し、コンラージ棒を用いて塗抹した後、37°C で 48 時間培養した。培養後、生育したコロニーを計数した。薬剤耐性遺伝子の伝播率は、

受容菌に対する接合完了体の比によって評価した。

4. 研究成果

(1) 東南アジアの水環境を対象とした VRE の分布実態の調査

①カンボジアの飲料水における調査

採取した飲料水のうち合計 281 試料の飲料水のうち、68% (192 試料) から腸球菌が検出された。腸球菌はふん便汚染の指標細菌であり飲料水からは未検出であることが推奨されているが、トンレサップ湖から採水された飲料水からは腸球菌が確認され、ふん便汚染の深刻さが浮き彫りとなった。腸球菌が確認された試料から単離した全 416 株について *E. faecalis* と *E. faecium* のいずれかに同定された 356 株について薬剤感受性試験を実施した。注目すべきは、グラム陽性菌の特効薬であるバンコマイシンに対して耐性を示した腸球菌が 1 株 (0.27%) 検出された点である。カンボジアの飲料水中には極めて低い割合ではあるが、VRE が存在している可能性が考えられた。その他の抗菌薬への耐性をみるとシプロフロキサシン (CPFX) とエリスロマイシン (EM) に対しては、多くの腸球菌が耐性または中度耐性を示した (CPFX: 92.4%, EM: 81.4%)。テトラサイクリン系抗菌薬であるテトラサイクリン (TC)、チゲサイクリン (TGC)、ミノサイクリン (MINO)、ドキシサイクリン (DOXY) の耐性率を比較したところ、TGC の耐性率が極めて低かった (2%)。異なる 3 系統以上の抗菌薬に耐性を示した腸球菌を多剤耐性と定義した結果、18 株の多剤耐性株が検出され (図 2)、最大で 8 つの抗菌薬に耐性を示す *E. faecalis* が存在した。それらの菌株について MLST 解析を実施したところ、2 株が ST409 と ST81、1 株が ST32、ST34、ST116、ST369、ST585、残り 9 株は ST 型が同定できない菌株であった。未同定の 9 株は各ハウスキーピング遺伝子のアレル番号が得られているにもかかわらず、ST が決まらなかったことから、新規の株であることも考えられた。ST が決定された 9 株に関しても、多剤耐性 *E. faecalis* であった報告例はほとんどないことから、途上国であるカンボジアで得られた重要な情報となった。

| 腸球菌種 | 株数 | 単離地点 | ABPC | IPM | LVFX | VCM | CPFX | TC | TGC | MINO | DOXY | EM | 抗菌薬の数* |
|--------------------|----|--------------|------|-----|------|-----|------|----|-----|------|------|----|--------|
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KC | | | | | | | | | | | 7 (2) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KC | | | | | | | | | | | 7 (2) |
| <i>E. faecalis</i> | 7 | KC(5), KT(2) | | | | | | | | | | | 7 (3) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KC | | | | | | | | | | | 7 (4) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KT | | | | | | | | | | | 7 (4) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KC | | | | | | | | | | | 7 (5) |
| <i>E. faecalis</i> | 3 | KC | | | | | | | | | | | 7 (6) |
| <i>E. faecium</i> | 1 | BB | | | | | | | | | | | 8 (3) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KC | | | | | | | | | | | 8 (3) |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | KC | | | | | | | | | | | 8 (7) |

図 1 トンレサップ湖の飲料水から単離した腸球菌の薬剤感受性 (: 耐性, : 中度耐性, *括弧書きの数字は耐性を示す)

東南アジアと日本の下排水中における VRE の調査

東南アジア 3 カ国と日本における VRE の比較調査を行った結果、カンボジアの試料を除いて VRE が検出された。タイの 2 カ所の下水処理場における VRE の存在割合はそれぞれ 6.4% と 6.8% であった。日本の鶴岡市と仙台市の下水を対象とした調査では、VRE の割合はそれぞれ 0.12% と 0.48% であり、タイにおける VRE の存在割合が高かった。最も VRE の存在割合が高かったのはベトナム (18.9% と 14.9%) であり、低かったのは日本であった。日本における VRE の感染者報告数は諸外国と比較して低いことから、元来の VRE の保菌者が少ないことが下水から

の検出でもその影響が考えられた。1 回のみ調査ではあるが、①での結果でも VRE の割合が低かったことから、東南アジアの中でもカンボジアでの VRE の蔓延状況は諸外国と比較しても低いかもしれない。

下水処理場の流入下水を対象とした調査

タイと日本の下水処理場の流入下水を対象として VRE のモニタリング調査を実施した。タイでは 2019 年 11 月から 2020 年 4 月にかけて 2 つの都市下水処理場を対象とした VRE の調査を実施した。その結果、流入下水と活性汚泥の反応槽からそれぞれ、0.1~1.2% と 0.5~4.5% の存在割合で VRE 検出され、活性汚泥では流入下水と比較して高い割合で検出される傾向であった。日本では 2019 年 2 月から 1 年にわたって都市下水処理場の流入下水を対象とした調査した結果、タイの流入下水と同程度の VRE が検出された。

調査を通じてタイと日本でそれぞれ 139 株と 184 株の VRE を単離し、VRE についてバンコマイシン耐性遺伝子の保有を調査した結果、臨床で問題となる *vanA* がタイと日本の分離株からそれぞれ 19 株 (13.7%) と 3 株 (1.6%) 検出された。また、*vanB* 保有の VRE も日本とタイの分離株からそれぞれ 30 株 (21.6%) と 1 株 (0.5%) 検出された。東南アジアでもタイは臨床での VRE の分離報告が多い反面、日本ではほとんどないことが、本研究での分析結果にも反映していた。また、日本の水環境から VRE を分離した研究事例では初めてのことであった。

タイの下水処理場から分離した *vanA* または *vanB* 保有腸球菌株について薬剤感受性試験を実施した。VRE はバンコマイシンのみならず、その他の抗菌薬に対しても高度耐性化することが知られており、両バンコマイシン耐性遺伝子保有腸球菌ともに複数の抗菌薬に耐性を示した (表 1)。VRE 感染症の治療薬として使用されるリネゾリドに対して、*vanA* または *vanB* 保有株のそれぞれ 47.4% と 96.7% が耐性を示した。日本での分離株と異なりこれらの耐性機構を詳細に分析することでタイでの VRE の違いを明らかにできるかもしれない。

表 1 タイの下水処理場から分離した VRE の薬剤感受性

| | <i>vanA</i> 保有株 (n=19) | | | | <i>vanB</i> 保有株 (n=30) | | | |
|-----------|------------------------|------|----|-------|------------------------|------|----|----------|
| | 感受性 | 中度耐性 | 耐性 | 非感性率 | 感受性 | 中度耐性 | 耐性 | 非感性率 (%) |
| ベンジルペニシリン | 5 | 0 | 14 | 73.7% | 0 | 0 | 30 | 100% |
| アンピシリン | 5 | 0 | 14 | 73.7% | 0 | 0 | 30 | 100% |
| イミペネム | 4 | 0 | 15 | 78.9% | 24 | 1 | 5 | 20.0% |
| ミノサイクリン | 5 | 0 | 14 | 73.7% | 16 | 2 | 12 | 46.7% |
| エリスロマイシン | 0 | 11 | 8 | 100% | 0 | 0 | 30 | 100% |
| レボフロキサシン | 5 | 1 | 13 | 73.7% | 3 | 0 | 27 | 90.0% |
| ダブトマイシン | 14 | 0 | 5 | 26.3% | 1 | 0 | 29 | 96.7% |
| バンコマイシン | 2 | 0 | 17 | 89.5% | 0 | 0 | 30 | 100% |
| テイコプラニン | 5 | 0 | 14 | 73.7% | 1 | 0 | 29 | 96.7% |
| セフェピム | 0 | 4 | 15 | 100% | 0 | 2 | 28 | 100% |
| リファンピシン | 3 | 0 | 16 | 84.2% | 0 | 0 | 30 | 100% |
| 高度ゲンタマイシン | 1 | 0 | 18 | 94.7% | 7 | 0 | 23 | 76.7% |
| リネゾリド | 10 | 0 | 9 | 47.4% | 1 | 0 | 29 | 96.7% |

(2) VRE からバンコマイシン耐性遺伝子が伝播する宿主領域の探査

(2)では上記の日本とタイで分離した *vanA* を保有する VRE 株それぞれ 1 株と 19 株について *van* 耐性遺伝子の伝播実験を Filter mating 法にて実施した。その結果、日本で分離した *vanA* の菌株のみ伝播が確認され、その伝播率は 10^{-7} ~ 10^{-8} の範囲であった。その反面、タイで分離した 19 株の *VanA* 型 VRE は伝播が確認されなかったことから、伝播機構に差があると考えられた。この要因について、全ゲノム解析の結果から考察を開始している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Nishiyama, M., Mith, H., Nget, S., Say, S., In, S., Pu, J. and Watanabe, T. |
| 2. 発表標題 Investigation of antimicrobial resistance of enterococci collected from drinking water in Tonle Sap Lake, Cambodia |
| 3. 学会等名 The 4th international Symposium on Conservation and Management of Tropical Lakes (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Nishiyama, M., Afriani, S.D., Rasdi, A.M.F. and Watanabe, T. |
| 2. 発表標題 Antimicrobial resistance and virulence of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from wastewater treatment process. |
| 3. 学会等名 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 西山 正晃, Mith, H., Nget, S., Say, S., In, S., 浦 剣, 渡部 徹 |
| 2. 発表標題 カンボジアのトンレサップ湖で水上生活者が利用する飲料水源から単離した腸球菌の薬剤感受性とその遺伝学的特徴 |
| 3. 学会等名 第22回日本水環境学会シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 西山正晃、Shinta Dhewi Afriani、Abdurrahman Muhammad Fikri Rasdi、渡部徹 |
| 2. 発表標題 下水処理過程から単離した腸球菌の抗菌薬に対する薬剤感受性とそれらが保有する病原遺伝子との関係 |
| 3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会 |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|-----------|--|--|--|
| タイ | カセサート大学 | | | |
| カンボジア | カンボジア工科大学 | | | |