

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K18881

研究課題名（和文）アジア・アフリカの都市下水の全ゲノム解析による多剤耐性大腸菌プロファイリング

研究課題名（英文）Profiling of multidrug-resistant E. coli in urban sewage in Asia and Africa by using whole-genome sequencing

研究代表者

原田 英典（Harada, Hidenori）

京都大学・アジア・アフリカ地域研究研究科・准教授

研究者番号：40512835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：途上国由来の多剤（薬剤）耐性菌の広がりが世界的に懸念されている。本研究では、ウガンダにおける調査から、リスクの高いクローンの存在実態や薬剤耐性大腸菌の伝播実態を明らかにし、下水（またはし尿）サーベイランスと全ゲノム解析の組み合わせは、都市レベルでの薬剤耐性大腸菌の保有・排出状況を監視するための強力なツールとなりうることを示した。タイにおける調査から、下水処理場を経ても多量の薬剤耐性大腸菌が環境中に放出されており、人口密度と相関して薬剤耐性大腸菌の濃度が増加していることがわかった。これらより、薬剤耐性大腸菌の環境への排出実態と、その伝播の一旦を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

途上国由来の薬剤耐性菌の広がりが世界的に懸念されている。本研究では東南アジアではタイのバンコク、アフリカではウガンダのカンパラを対象に、都市レベルでの薬剤耐性大腸菌の広がりを下水調査により明らかにした。タイでは使用する抗菌薬に応じた耐性大腸菌がもっとも多くみられるとともに、人口密度に応じてその濃度も高まることがわかった。ウガンダでは、薬剤耐性大腸菌の全ゲノム解析から、世界的な高リスククローンが検出されたとともに、その耐性を決定する多様な因子が確認された。また、下水調査と全ゲノム解析の組み合わせが都市レベルの薬剤耐性の広がりを把握する有効なツールとなることを示した。

研究成果の概要（英文）：The global increase of antimicrobial resistance (AMR) is a major public health concern. Our study in Kampala, Uganda revealed the prevalence and transmission of AMR E. coli including high-risk clones, demonstrating that a combination of sewage (or fecal sludge) surveillance and whole-genome sequencing can be a powerful tool for monitoring AMR carriage in the underlying population. Also, our study in Bangkok, Thailand showed that large amounts of AMR E. coli were released into the environment even after passing through sewage treatment plants, and that the concentration of AMR E. coli increased in correlation with population density. These results indicated that substantial release and transmission of AMR E. coli in the environment in the target area.

研究分野：土木環境システム

キーワード：多剤耐性大腸菌 都市下水 アジア・アフリカ 全ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

開発途上国由来の多剤(薬剤)耐性菌の広がりが、近年世界的に大きく懸念されている(例えば Holmes et al, 2016)。多くの途上国では薬剤管理が適切でなく、「耐性菌の培養皿」とも言われる。例えば、インドからの旅行者が持ち込んだ多剤耐性菌(NDM-1 産生菌)がイギリスで拡散した問題(Pitout, 2010)は世界中で報道された(朝日、読売など、2010年8月)。しかし、その対策に向けた基盤情報となる多剤耐性菌の拡散の広域的な現況を把握するためのサーベイランスの実施は、施設・人材・予算の不足する途上国では容易ではない。

ところで、人間の糞便と尿は、薬剤耐性細菌感染を診断する主要なサンプルである。下水処理率が低い途上国であっても、下水は下水路で収集される。つまり下水は何万という人間の糞便と尿からなる代表性の高いコンポジットサンプルとも考えられる。下水を用いることで、都市レベルの多剤耐性菌の実態を効率的に把握できるだろう。加えて、多くの途上国では下水は未処理で環境中に排出される。下水中に多剤耐性細菌が検出されれば、環境を介した人間・動物への多剤耐性細菌の二次伝播の可能性を示唆する。

大腸菌のように臨床的に重要であり多くの研究が存在する細菌の場合、薬剤耐性関連遺伝子および病原性遺伝子がよく調べられているため、全ゲノム解析は薬剤耐性・病原性を特徴付けるための、費用対効果の高い最も信頼できる手法の一つになりつつある。加えて、細菌を全ゲノムに渡り一塩基多型レベルで識別すれば、系統樹解析により遺伝的近縁性を評価し、異なる地域の異なる株の薬剤耐性・病原性大腸菌の近縁性、類縁関係、さらには伝搬実態がわかる。

2. 研究の目的

本研究では東南アジアおよびアフリカの新興国であり多剤耐性菌の広がりが懸念される東南アジアおよびサブサハラアフリカを対象に、都市レベルの多剤耐性大腸菌のプロファイリングとして、都市レベルの多剤耐性・病原性パターンの詳細データを創出するとともに、その伝播および環境中への排出実態の解明を目指した。

3. 研究の方法

3.1 試料

東南アジア都市の典型としてタイの首都であるバンコク、およびサブサハラ・アフリカ都市の典型としてウガンダの首都であるカンパラを対象とした。コロナ禍の中で現地調査が困難な中であつたものの、バンコクでは、市内の3つの下水処理場および1つのし尿処理場において、流入水、各処理段階の排水および放流水を採取した。カンパラでは、1つの下水処理場の流入水および1つのし尿処理場の貯留槽からの排水を採取した。さらに、バンコクでは、下水処理場処理水の放流先のチャオプラヤ川での河川水を採取した。河川水試料は、タイの乾季である2021年3月にチャオプラヤ川下流域における12の採水地点から採取した。

3.2 実験方法

3.2.1 多剤耐性大腸菌のスクリーニングと培養による薬剤感受性試験

途上国で広く利用されるセフェム系第3世代、ニューキノロン系、および前者2種およびアミノグリコシド系の3剤耐性を持つ大腸菌株をスクリーニングするため、当該薬剤を含む大腸菌用の特定酵素基質培地(CHROMagar™ ECC, 関東化学)でのプレート培養により、下水およびし尿汚泥中の多剤耐性大腸菌を選択・単離した。それぞれ、セフェム系第3世代はセフトキシム(CTX)、ニューキノロン系はシプロフロキサシン(CIP)、およびアミノグリコシド系は(ゲンタマイシン, GM)を用いた。大腸菌は、(a) CHROMagar(抗菌薬なし)(b) CHROMagarにCTX(1 mg/L)(c) CHROMagarにCIP(1 mg/L)、および(d) CHROMagarにCTX(1 mg/L)、CIP(1 mg/L)およびGM(4 mg/L)を溶解した3種類の条件下で培養し、それぞれの耐性菌とした。

3.2.2 全ゲノム解析

単離株からDNAを抽出しライブラリを作成した上で、次世代DNAシーケンサー(MiSeq, イルミナ社)にてショートリードシーケンサーによる全ゲノム解析を行った。DNA抽出は、QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン, ドイツ)により行った。ライブラリの作成は、Nextera XT DNA Library Preparation Kit(イルミナ, CA)により行った。カンパラの試料の一部は、Oxford Nanopore Technologies(ONT)のロングリードシーケンサーにより全ゲノム解析を追加で行い、詳細な解析を行った。DNA抽出は、DNeasy PowerSoil Pro Kit(キアゲン, ドイツ)により行った。ライブラリの作成は、SQK-LSK109 kit(Oxford Nanopore Technologies, イギリス)により行った。シーケンスタイプ(ST)は、MLST(v2.19.0)を用いてマルチローカスシーケンスタイピングを行った。毒性遺伝子の検出は、VirulenceFinder データベースで行った。病原性大腸菌のタイプは、特定遺伝子の組み合わせによりExPEC, EHEC, EPEC, STEC, EIEC, ETECおよびEAECに分類した。一塩基多型による系統樹解析では、系統群Aに属する分離株について、ゲノムの90%以上に存在するSNPに基づき、kSNP3を用いて系統樹を作成した。

4. 研究成果

4.1 タイでの調査

タイの抗菌薬消費量報告において3剤の中で最も使用量が多かったCIP耐性大腸菌の存在割合が最も高かった。さらに、バンコク市内の3つの下水処理場および1つのし尿処理場の処理工程を経た薬剤耐性大腸菌のlog除去率は0.18-3.78であった。これらから、環境中への下水由来の薬剤耐性大腸菌の負荷量を推計したところ、上記の3タイプの耐性大腸菌についてそれぞれ 3.47×10^{13} , 5.47×10^{13} , および 1.07×10^{13} CFU/day が排出されており、水環境へ影響を及ぼす可能性が懸念された。

バンコクが位置するチャオプラヤ川下流域における抗菌薬耐性大腸菌 (*E. coli*) の発生状況を調査し、都市化が抗菌薬耐性大腸菌の分布に与える影響を評価した(図1)。その結果、チャオプラヤ川の幾何平均大腸菌濃度は624 CFU/100mLであった一方、CTXとCIPに対する耐性大腸菌の幾何平均濃度は、それぞれ86 CFU/100mLと182 CFU/100mLであった。薬剤耐性大腸菌の濃度と関連小流域人口との間には有意に正の相関係数が認められた($R=0.950, p<0.001$)。薬剤耐性大腸菌はチャオプラヤ川に広く分布し、バンコク都市圏内にて河川水中の濃度が最も高いことが示された。チャオプラヤ川の下流域における薬剤耐性大腸菌の調査からは、CTX耐性大腸菌およびCIP耐性大腸菌の濃度と人口密度との間には正の相関があった。

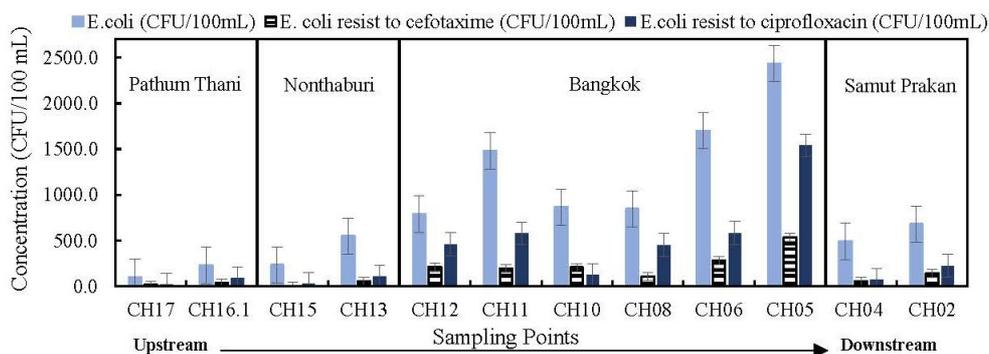


図1 チャオプラヤ川下流における大腸菌および薬剤耐性大腸菌濃度の推移(Sweattatut et al., 2022 より抜粋)

4.2 ウガンダでの調査

ウガンダで採取した都市下水(流入水)16試料およびし尿汚泥15試料を対象に、CTX耐性、CIP耐性、および前者2種およびGM耐性の3剤耐性を持つ大腸菌と推定された計192株を単離し、ショートリードシーケンサーによる全ゲノムデータを得た。このうち181株が大腸菌であることをゲノムデータから確認し、解析を進めた。

181株より、6つの異なる系統群からなる合計36のSTが検出され(図2)。系統群Aが最も多く($n=127$)、次いでB1($n=17$)、B2($n=17$)、C($n=8$)、F($n=2$)であった。6種類のESBL遺伝子(*bla*CTX-M-3, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-15, *bla*CTX-M-27, *bla*CTX-M-55, *bla*TEM-169)が分離株から検出され、*bla*CTX-M-15が優占していた。得られた分離株のゲノム配列解析の結果、優占するSTはし尿汚泥分離株と下水分離株でほぼ重なっていることが確認されたが、クローン構成には一部違いが見られた。し尿汚泥と下水の両方で、株選択に使用した抗菌薬にかかわらず、ST167($n=43$)、ST10($n=28$)、ST1284($n=17$)、およびST617($n=4$)を含むST10複合体が広く存在していることがわかった。また、世界的な高リスククローンであるST1193($n=10$)とST131($n=2$ clade A, $n=3$ subclade C1-M27, $n=1$ clade C2)も検出され、広域-ラクタマーゼ遺伝子(主に*bla*CTX-M-15)、*gyrA*と*parC*の変異など、多様なAMR決定因子が確認された。

Simpson多様性指数は、し尿汚泥分離株の方が下水分離株よりも全般的に高かった。本研究では、し尿汚泥処理場の一次沈殿槽の排水からサンプルを採取したが、この試料採取方法により、より多くの個人からのし尿汚泥が混在した試料を集めることができ、多様性が高くなったと考えられた。下水処理場の整備が進んでいない地域では、下水を用いたサーベイランスの実現が困難である一方で、し尿汚泥収集・処理を伴う分散型サニテーションは下水道未整備地域でも広く見られる。ただし、し尿汚泥は個人宅の便槽から集められるため、し尿汚泥は下水と比べて代表する人口が少ないという懸念があった。しかし、上記の結果からは、し尿汚泥処理場から採取した試料から分離された大腸菌の多様性が比較的高いことがわかった。し尿汚泥処理場やその他の指定されたし尿汚泥投棄場所(個々のピットラトリンではなく)から採取すれば、地域の集団規模の情報をより適切に捉えることができると考えられた。合わせて、ロングリードシーケンスの結果からは、多様なIncFプラスミドと染色体統合が、優勢なSTにおけるAMR遺伝子の拡散に大きく寄与していたことがわかった。

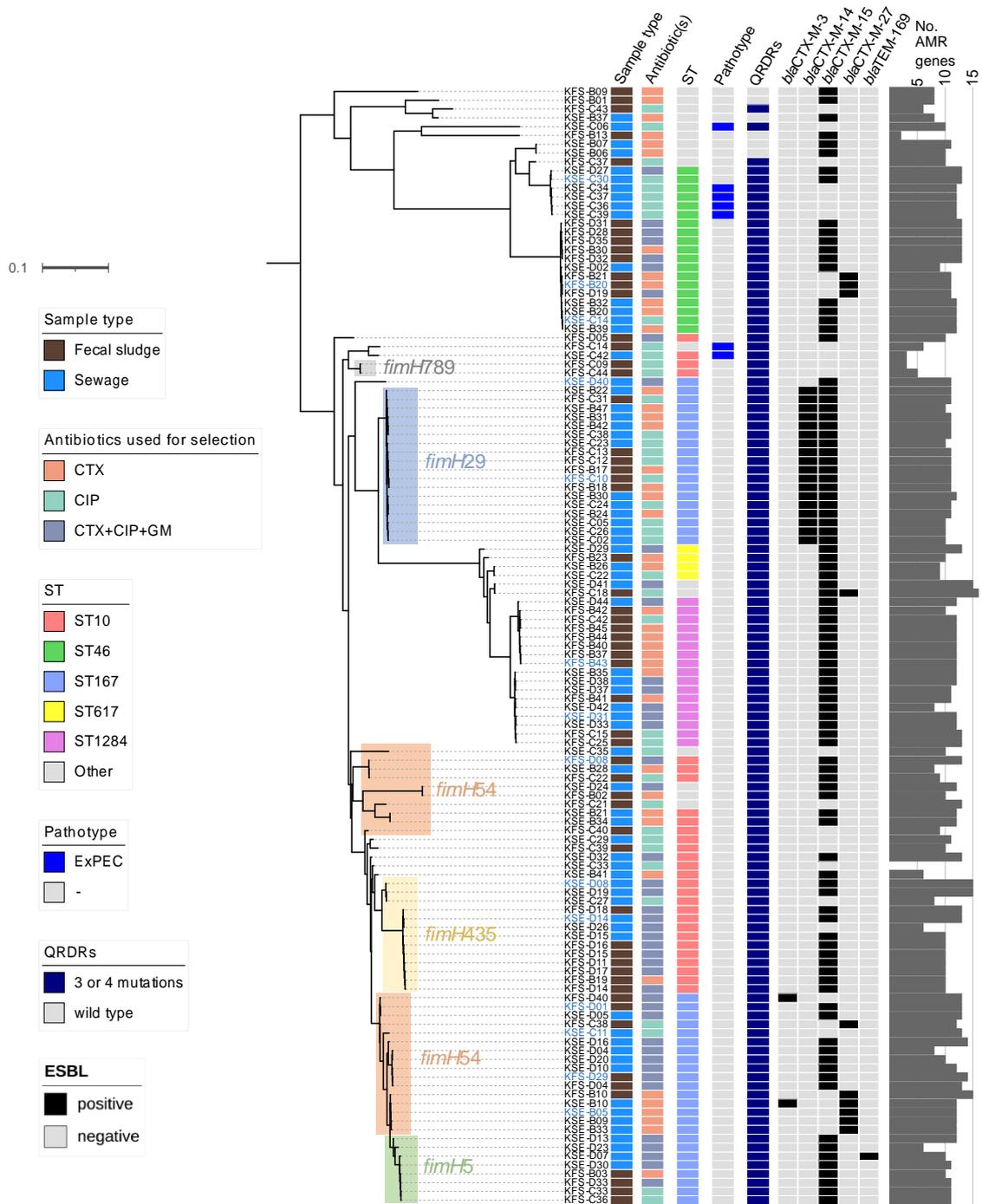


図2 ファイログループ A127 株の kSNP3 全ゲノム塩基多型に基づく系統樹 (Gomi et al., 2023 より抜粋)

4.3 まとめ

本研究では、ウガンダにおける調査からリスクの高いクローンの存在実態や薬剤耐性大腸菌の伝播実態が明らかになり、下水サーベイランス(またはし尿汚泥サーベイランス)と全ゲノム解析の組み合わせは、対象とする都市レベルの人口集団における薬剤耐性大腸菌の保有・排出状況をモニタリングするための強力なツールとなりうることを示した。さらに、タイにおける調査から、下水処理場を経ても多量の薬剤耐性大腸菌が環境中に放出されているとともに、周辺小流域の人口密度と相関して薬剤耐性大腸菌の濃度が増加していることがわかった。これらより、薬剤耐性大腸菌の環境への排出実態と、その伝播の一旦を明らかにすることができた。本研究では、研究期間がコロナ禍と重なり現地調査に制約があったものの、現在は再び活発な現地調査が可能な状況にある。今後は、下水サーベイランスによる薬剤耐性大腸菌の監視をより多くのアジア・アフリカ都市で実証し、新興国での薬剤耐性大腸菌の存在・伝播実態の解明に寄与するとともに、抗菌薬の使用データや臨床ベースの耐性菌感染データなどとの関連性を検討することで、アジア・アフリカ都市におけるより効果的な薬剤耐性大腸菌のモニタリングの実現に寄与できるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nopprapun Pimchanok, Boontanon Suwana Kitpati, Piyaviriyakul Pitchaya, Sweattatut Rawiwan, Fujii Shigeo, Harada Hidenori	4. 巻 20(5)
2. 論文標題 Human source identification by using a human-associated <i>Escherichia coli</i> genetic marker in the Mae Klong River, Thailand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Water and Health	6. 最初と最後の頁 794-802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/wh.2022.296	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 該当する
1. 著者名 Sweattatut Rawiwan, Boontanon Suwana Kitpati, Piyaviriyakul Pitchaya, Harada Hidenori, Fujii Shigeo	4. 巻 973
2. 論文標題 Antimicrobial Resistant <i>Escherichia coli</i> Distribution along the Lower Part of the Chao Phraya River, Thailand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 012005 ~ 012005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1755-1315/973/1/012005	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 該当する
1. 著者名 Harada Hidenori	4. 巻 -
2. 論文標題 Social Allocation of the Health Risks in Sanitation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Sanitation Triangle: Socio-Culture, Health and Materials	6. 最初と最後の頁 129 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-16-7711-3_8	査読の有無 無
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 Nopprapun Pimchanok, Boontanon Suwana Kitpati, Harada Hidenori, Surinkul Nawatch, Fujii Shigeo	4. 巻 82
2. 論文標題 Evaluation of a human-associated genetic marker for <i>Escherichia coli</i> (H8) for fecal source tracking in Thailand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Science and Technology	6. 最初と最後の頁 2929 ~ 2936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/wst.2020.525	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 該当する

1. 著者名 Pinchanok Nopprapun, Suwanna Kitpati Boontanon, Shigeo Fujii, Hidenori Harada	4. 巻 34(2)
2. 論文標題 Human-associated Escherichia coli Marker: Important Indicator to Evaluate River W	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thai Environmental Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 35-43
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 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 該当する

1. 著者名 Mai Tanaka, Hidenori Harada, Shigeo Fujii, Min Li Chua, Nguyen Duy, Hung, Nguyen Pham Hong Lien, Nghiem Trung Dung, Ryota Gomi	4. 巻 56(2C)
2. 論文標題 Fecal contamination and the proportion of human-associated E.coli along Nhue river, Viet Nam	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vietnam Journal of Science and Technology,	6. 最初と最後の頁 23-29
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 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 該当する

1. 著者名 M. Tanaka, H. Harada, S. Fujii, M. Chua, H. Nguyen, L. Nguyen, D. Nghiem, R. Gomi	4. 巻 27
2. 論文標題 Source identification of Escherichia coli by using a Human-associated genetic marker: A case study in Nhue River, Vietnam	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the 27th Joint KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering	6. 最初と最後の頁 118-124
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 該当する

1. 著者名 Ryota Gomi, Yasufumi Matsumura, Masaki Yamamoto, Mai Tanaka, Allan John Komakech, Tomonari Matsuda, Hidenori Harada	4. 巻 -
2. 論文標題 Genomic surveillance of antimicrobial-resistant Escherichia coli in fecal sludge and sewage in Uganda	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv (preprint server)	6. 最初と最後の頁 1-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.05.17.540885	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Rawiwan Sweattatut, Suwana Kitpati Boontanon, Pitchaya Piyaviriyakul, Hidenori Hidenori and Shigeo Fujii
2. 発表標題 Antimicrobial Resistant Escherichia coli Distribution along the Lower Part of the Chao Phraya River, Thailand
3. 学会等名 6th International Conference on Environmental Engineering and Sustainable Development 2021 (CEESD2021), Sanya, China (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidenori Harada, Suwana Kitpati Boontanon, Wutyi Naing, Shigeo Fujii
2. 発表標題 Occurrence of antimicrobial-resistant Escherichia coli in wastewater treatment plants and a fecal sludge treatment plant
3. 学会等名 Kyoto University International ONLINE Symposium 2020 on Education and Research in Global Environmental Studies in Asia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Harada
2. 発表標題 Water, Sanitation and Hygiene for Development in Asia and Africa
3. 学会等名 Seminar on Environmental Engineering between GSGES/ENFIT lab and Environmental Engineering Program, MOST, Taiwan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田英典
2. 発表標題 アジア・アフリカの現場から見たSDGs - SDG6（水・衛生）を例に -
3. 学会等名 EICA未来プロジェクト「若手技術者・研究者交流セミナー」第三回セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田英典
2. 発表標題 アジア・アフリカの衛生改善とサニテーションの価値
3. 学会等名 京大テックフォーラム「社会課題から読み解く「水・衛生問題」 ～SDGs・防災・減災へのアプローチ～」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenori Harada, Chua Min Li, Mai Tanaka, Nguyen Pham Hong Lien, Allan J Komakech, Nazmul Ahsan, Meki Chirwa, Imasiku Nyambe, Ryota Gomi, Shigeo Fujii
2. 発表標題 Cross-country performance of a human associated E. coli source tracking marker, H8, in Asia and Africa
3. 学会等名 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenori Harada, Min Li Chua, Shigeo Fujii, Imasiku Nyambe, Meki Chirwa
2. 発表標題 Fecal exposure assessment through various transmission pathways
3. 学会等名 8th Zambia Water Forum and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada, H., Tanaka, M., Fujii, S., Chua, M.L., Nguyen, D.H., Nguyen, P.H.L., Nghiem T.D., Gomi, R.
2. 発表標題 Proportions of human-associated Escherichia coli isolates along a heavily contaminated river in Vietnam
3. 学会等名 Water Microbiology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田英典
2. 発表標題 アフリカと水・衛生の価値
3. 学会等名 京大アジア・アフリカ塾2023京大アジア・アフリカ塾2023「産官学の立場から見たアフリカの現状と未来」第4回「公衆衛生・ヘルスケア」（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Taro Yamauchi, Seiji Nakao, Hidenori Harada	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature Singapore	5. 総ページ数 264
3. 書名 The Sanitation Triangle: Socio-Culture, Health and Materials	

1. 著者名 原田英典	4. 発行年 2019年
2. 出版社 学文社	5. 総ページ数 21
3. 書名 第5章 安全な水とトイレを世界中に（知る・わかる・伝えるSDGs I 貧困・食料・健康・ジェンダー・水と衛生，編著：阿部治，野田 恵）	

1. 著者名 五味良太	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北海道大学出版会	5. 総ページ数 4
3. 書名 指標としての大腸菌の意味とその定量方法，コラム ，『サニテーションと健康』（原田 英典，山内 太郎（編著）），講座サニテーション学 第4巻	

1. 著者名 原田 英典、山内 太郎（編著）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北海道大学出版会	5. 総ページ数 230
3. 書名 講座サニテーション学 第4巻 サニテーションと健康	

〔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	五味 良太 (Gomi Ryota) (30794284)	京都大学・工学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	松田 知成 (Matsuda Tomonari) (50273488)	京都大学・工学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	松村 康史 (Matsumura Yasufumi) (80726828)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	山本 正樹 (Yamamoto Masaki) (90726837)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

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
---------	---------