

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12357

研究課題名(和文) 水域生態系における薬剤耐性菌の伝播と感染メカニズムの解明への挑戦

研究課題名(英文) Transmission and infection mechanism of drug-resistant bacteria in aquatic environments

研究代表者

小林 由紀 (KOBAYASHI, Yuki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80759457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、薬剤耐性菌の蔓延とともに、多剤耐性化した菌の出現も報告されており、世界的にも極めて深刻な問題となっている。院内環境やヒト体内において薬剤耐性菌に対する研究報告はされているものの、自然環境中における多剤耐性菌の動態についての知見は乏しい。そこで、本研究では真締川流域を調査地とし、グラム陰性桿菌を対象とした水環境中に存在する耐性菌を検出、相同性検索を目的とした。本研究では、マッコンキー寒天培地に発育し得るグラム陰性桿菌に主眼を置き検索した結果、多剤耐性菌(Pseudomonas属、Serratia属、Ochrobactrum属)や、Klebsiella属のESBL産生菌が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2016年に厚生労働省により、WHOの「薬剤耐性に関する国際行動計画」アクションプランが制定された。これは、ヒトの健康を守るためには、人間だけでなく動物や環境も考慮しながら対策を行う必要があるという概念である「ワンヘルス・アプローチ」の視点から作成されたものである。今や薬剤耐性菌問題は人だけに着目するのではなく、動物や環境にも目を向けた対策を取る必要に迫られている。水環境中では、畜産農場や水産養殖場処理水や病院排水などで、多くの薬剤耐性菌が存在するといわれており、本研究ではグラム陰性桿菌を対象とした多剤耐性菌を検出した。この結果は環境における耐性菌対策を取る上で非常に重要な結果である。

研究成果の概要(英文)：Inappropriate use of antibiotics gave rise to increasing cases of infections caused by drug-resistant and/or multi-drug resistant bacteria in recent years, thus making it a major social problem. Although it is already known that multi-drug resistant bacteria and its genes can be detected in the hospital or in human body, there are a still wide gap in our understanding of their dynamics in the natural environment. In this study our objective is to investigate their environmental presence using sequencing analysis and homology studies. Our results show that multidrug-resistant bacteria were present in all the collected water samples and with the genus Pseudomonas (26.7%), Serratia (20.0%), and Ochrobactrum (20.0%) representing the major populations. These results suggest that there are more multi-drug-resistant bacteria in the water environment including of ESBL producer/s.

研究分野：環境微生物

キーワード：薬剤耐性菌 ワンヘルス 自然河川 腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、薬剤耐性菌の蔓延とともに、多剤耐性化した菌の出現も報告されており、世界的にも極めて深刻な問題となっている。院内環境やヒト体内において薬剤耐性菌に対する研究報告はされているものの、自然環境中における多剤耐性菌の動態についての知見は乏しい。

2016年に厚生労働省において、我が国としては初めて、WHOの「薬剤耐性に関する国際行動計画」を踏まえたアクションプランが制定された。これは、ヒトの健康を守るためには、人間だけでなく動物や環境も考慮しながら対策を行う必要があるという概念である「ワンヘルス・アプローチ」の視点から作成されたものである。

水環境中では、畜産農場や水産養殖場、下水処理場・製薬工場の処理水や病院排水などで、多くの薬剤耐性菌が存在しており、既に水産養殖業により河川中のテトラサイクリン耐性遺伝子が多様化した<sup>1)</sup>という報告がある。このようなホットスポットと言われる場所を中心として、耐性遺伝子は様々なルートをたどりながら環境中に伝播・拡散している。この他にも、中国南部の灌漑水・灌漑土壌において灌漑土壌よりも灌漑水に薬剤耐性遺伝子が多く検出された<sup>2)</sup>という報告や、ハリケーンによる洪水の水中に大腸菌の(*sul1*) (*int11*)遺伝子が多く検出された<sup>3)</sup>という環境中での耐性遺伝子の出現報告もある。さらに、イエバエから *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する ESBL 産生大腸菌が分離されたという、昆虫体内からの薬剤耐性菌、薬剤耐性遺伝子の検出が複数報告されている。薬剤耐性菌の動態を把握し、耐性遺伝子が伝播する原因、およびメカニズムを理解することはこれからの薬剤耐性問題を解決する上で非常に重要である。しかし、環境中の薬剤耐性菌や多剤耐性菌、およびその耐性遺伝子の動態に関する知見は、非常に乏しいのが現状である。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では真締川流域を調査地とし、グラム陰性桿菌を対象とした水環境中に存在する多剤耐性菌を検出、および分離されたすべての菌の相同性検索を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 調査期間、調査地

2020年5月(4日, 6日, 8日), 6月(1日, 3日, 5日), 7月(1日, 3日, 5日), 8月(24日, 26日, 28日)の4か月間、真締川流域の3地点(A: 河口より約3.1km, B: 河口より約1.4km, C: 河口)において、計12回採水を行った。バケツにて採水を行い、ポータブル水質計 WTW® Multi 3620 IDS SET G 2FD56G (Xylem Japan)にて物理的環境要因である水温、電気伝導度、pH、溶存酸素濃度(DO)を測定した。滅菌したポリプロピレン製ボトルに採水した河川水を2L入れ、クーラーボックスにて保冷した状態で1時間以内に研究室に持ち帰った。

#### (2) 培養法

採水した河川水を滅菌水で希釈し、0.22 $\mu$ m フィルター(MF-Millipore™ 0.22 $\mu$ m MCE Membrane)上に濾過した。河川水を濾過したフィルターは、薬剤を添加していないマッコンキー寒天培地(日本製薬株式会社)上、アンピシリンナトリウム(ABPC)、セフトキシムナトリウム(CTX)、テトラサイクリン塩酸塩(TC)を添加したマッコンキー寒天培地上にそれぞれ乗せ、30℃, 48時間培養した。薬剤濃度は全て100 $\mu$ g/mlとした。薬剤添加培地は1サンプルにつき3プレート用いた。培養後のコロニー数をそれぞれ計測し、生菌数を求めた。

#### (3) 薬剤感受性試験

各月の最終日の水サンプルでマッコンキー寒天培地上に生育したコロニーを可能な限り全てピックアップし、ハートインヒュージョン培地に単離培養後、薬剤感受性試験に供した。滅菌済み 10 % PBS (Wako) にコロニーを懸濁させ、菌液の濁度を McFarland 0.5 に調整し、滅菌綿棒を用いてミュラー・ヒントン寒天培地に塗布した。その上に、7 種類のディスク(ABPC, セファゾリン, CTX, イミペネム, クロラムフェニコール, ストレプトマイシン 10, TC)(Becton, Dickinson and Company)を置き、30℃, 24 時間培養後、阻止円を測定し、感受性を確認した。

#### (4) 菌種の同定

##### 1) PCR (polymerase chain reaction)

LB 液体培地で 30℃ 48 時間振盪培養し、遠心して菌を回収後、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega corporation)を用いて DNA を抽出した。PCR チューブに Buffer (5.0μL), dNTP (5.0μL), F-primer (2.5μL), R-primer (2.5μL), MgSO<sub>4</sub> (3.0μL), KOD plus Neo (TOYOBO)(1.0μL), DW (26.0μL), DNA 濃度を 50 ng/μL に調整した DNA 抽出液 (5.0μL)を入れ混合した。両プライマーは、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を含む 560bp を増幅させるプライマーを用いた。94℃ 5 分を 1 回, 94℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 30 秒を 30 サイクル, 72℃ 5 分を 1 回, 4℃ で反応停止の条件で増幅した。

#### (5) 塩基配列決定

作成した PCR 産物を、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)を用いて DNA を精製した。これを本学の遺伝子実験施設に解析を依頼し、得られた解析結果の波形を元に、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)で相同性検索を行った。

#### (6) ESBL/MBL

##### 1) スクリーニング

3. で用いたサンプルを、ESBL/MBL スクリーニング寒天培地(極東バイタルメディア)上に播種した。30℃, 24 時間培養後、判定を行った。

#### (7) 確認試験

ESBL/MBL スクリーニング寒天培地の結果で陽性を呈したサンプルに対して、ESBL 確認試験を行った。滅菌済み 10% PBS にコロニーを懸濁させ、菌液の濁度を McFarland 0.5 に調整し、滅菌綿棒を用いてミュラー・ヒントン寒天培地に塗布した。ESBL 阻害剤を含んだオグメンチンディスク(Becton, Dickinson and Company)を中央に置き、約 2cm 離れた場所かつ各薬剤ディスク間の距離が約 2.5cm になるようにセファゾリン、アズトレオナム(Becton, Dickinson and Company), CTX, のディスクを置いた。30℃, 18 時間培養後、阻止円の拡張・阻止帯の出現を確認できたものを ESBL 産生菌とした。

## 4. 研究成果

### (1) 調査地の水サンプルの物理的環境要因

水温は 5 月から 8 月にかけて全ての地点で上昇した(A:17.3 - 25.1℃, B:18.0 - 27.6℃, C:17.8 - 27.9℃)。電気伝導度は C 地点で高値(A:190.1 - 249.3 μS/cm, B:5.0 - 25.5 mS/cm, C:35.5 - 47.7mS/cm), pH も C 地点で高値だった(A:7.533 - 7.728, B:7.550 - 7.691, C:8.104 - 8.186)。DO は 5 月から 8 月にかけて低下した(A: 7.57 - 9.03 mg/L, B: 7.04 - 7.92 mg/L, C: 7.32 - 9.86 mg/L)。

## (2) 培養法

薬剤無添加培地での生菌数は、A 地点、C 地点では 7 月、B 地点では 8 月が最も多かった(A: 713-1717CFU/mL, B: 600-2320CFU/mL, C: 16-342CFU/mL)。

薬剤無添加培地での生菌数を母数とした、薬剤添加培地での生菌数から算出した耐性菌検出率は、全ての地点、時期において、ABPC 耐性菌が最も多く、30~40%の検出率を示した(A: 12.9-34.5%、B: 9.4-33.0%、C: 7.2-34.0%)(図 1)。CTX、TC 耐性菌の検出率はいずれも数%だった(CTX、A: 0.2 - 2.4%、B: 0.2-3.1%、C: 0.1 - 2.1%)(TC、A: 0.3 - 0.6%、B: 0.1 - 0.6%、C: 0.1 - 0.9%)(図 2, 3)。

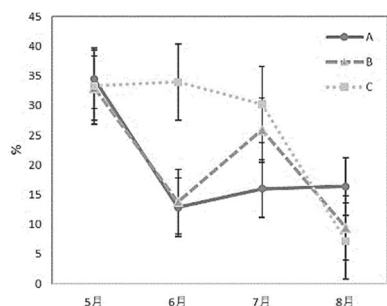


図 1. ABPC 耐性率

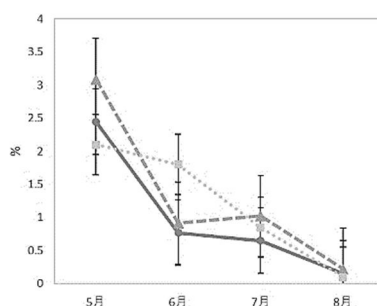


図 2. CTX 耐性率

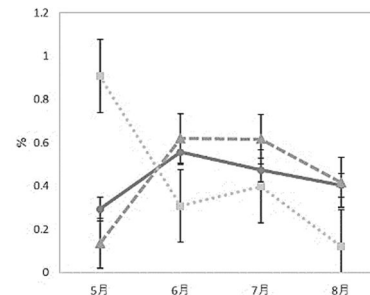


図 3. TC 耐性率

## (3) 薬剤感受性試験

単離できた 30 コロニーの薬剤感受性試験の結果から、全ての菌が ABPC に耐性かつ、2 剤以上に耐性を示していることが確認できた (2 剤耐性: 10.0%、3 剤耐性: 26.7%、4 剤耐性: 30.0%、5 剤耐性: 26.7%、6 剤耐性: 1.0%、7 剤耐性: 1.0%)。

## (4) 菌種の相同性検索

塩基配列決定の結果をもとに、DDBJ にて相同性検索を行った。全ての菌において相同性 99%以上の結果を得た(表 1)。Pseudomonas 属や Serratia 属、Ochrobactrum 属が主に検出された(表 2)。自然耐性は「-」で示す。自然耐性を除いても 2 剤以上の耐性を示す菌が多く見られた。

## (5) ESBL/MBL

ESBL/MBL スクリーニング試験の結果が不明瞭だったため、全てのサンプルに対して確認試験を行った。確認試験の結果、ESBL 産生が疑われたものは、Serratia marcescens、Klebsiella aerogenes、Klebsiella pneumoniae の 3 菌種だった。

## (6) 考察

本研究では、マッコンキー寒天培地に発育し得るグラム陰性桿菌に着目し、多くの多剤耐性菌を検出した。しかし、環境中には人工培地に発育しない細菌が多く存在しており、本研究では環境中に存在するごく一部の細菌の検出を試みたに過ぎない。従って環境中にはより多くの多剤耐性菌が存在していることが推測される。

また、本研究では多剤耐性菌、ESBL 産生を疑う菌を確認したが、強病原性菌は認めなかった。薬剤耐性遺伝子はプラスミドにコードされているものが多いため、環境条件次第では非病原性菌が保有する薬剤耐性遺伝子が強病原性菌へと水平伝播することは可能である。今後は、化学的、生物学的環境要因を分析するとともに、プラスミド等にコードされた薬剤耐性遺伝子および遺伝子型を検出し、薬剤耐性遺伝子が伝播するメカニズムを明らかにして行く予定である。

表 1 分離した細菌株の塩基配列決定

5A	<i>Pseudomonas</i> sp. Strain	7B	<i>Klebsiella aerogenes</i> strain
5B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain	7C	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
5C	<i>Serratia marcescens</i> strain	7D	<i>Chromobacterium vacinii</i> strain
5D	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7E	<i>Ochrobacterum</i> sp.
5E	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain	7F	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
5F	<i>Pseudomonas</i> sp. Strain	7G	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain	7H	<i>Serratia marcescens</i> strain
6B	<i>Rahnella aquatilis</i>	8A	<i>Klebsiella aerogenes</i> strain
6C	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	8B	<i>Klebsiella aerogenes</i> strain
6D	<i>Ochrobactrum</i>	8C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain
6E	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	8D	<i>Stenotrppomonas maltophilia</i>
6F	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	8E	<i>Chromobacterium vacinii</i> strain
6G	<i>Serratia marcescens</i> strain	8F	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
6H	<i>Serratia marcescens</i> strain	8G	<i>Serratia marcescens</i> strain
7A	<i>Chromobacterium caccinii</i>	8H	<i>Serratia marcescens</i> strain

表 2 分離した細菌株の感受性試験結果

	ABPC	CEZ	CTX	IPM	CP	SM10	TC
5A	R	R	R	S	I	S	S
5B	-	R	-	S	-	I	-
5C	-	-	S	S	S	R	-
5D	-	R	S	R	S	S	S
5E	-	R	-	S	-	R	-
5F	R	R	R	I	R	S	S
6A	-	R	-	S	-	R	-
6B	R	-	S	S	S	S	S
6C	R	R	R	S	R	R	I
6D	R	R	R	S	R	R	S
6E	R	R	R	S	R	R	S
6F	R	R	R	S	R	R	S
6G	-	-	S	S	I	S	-
6H	-	-	S	S	I	S	-
7A	R	R	R	I	I	I	S
7B	R	R	S	S	S	S	S
7C	R	R	R	S	R	S	S
7D	-	R	R	I	S	R	S
7E	R	R	R	S	R	R	S
7F	R	R	R	I	R	R	S
7G	R	I	S	S	R	R	R
7H	-	-	S	S	I	S	-
8A	R	R	R	S	S	S	R
8B	R	R	S	S	S	S	S
8C	-	R	-	S	-	R	-
8D	-	-	-	-	R	R	R
8E	-	R	R	I	I	R	S
8F	R	R	R	S	R	R	S
8G	-	-	S	S	I	S	-
8H	-	-	S	S	R	S	-

< 引用文献 >

I. 参考文献

- 1) Monika H, Ewa K, Iwona G . The impact of a freshwater fish farm on the community of tetracycline-resistant bacteria and the structure of tetracycline resistance genes in river water , *Chemosphere* 128 , 2015 , 134–141
- 2) Pan M , Chu L M. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China , *Science of The Total Environment* 2018 , 624 , 145-152
- 3) Yu P , Zaleski A , Li Q , He Y , Mapili K , Pruden A , Alvarez P , Stadler L. Elevated Levels of Pathogenic Indicator Bacteria and Antibiotic Resistance Genes after Hurricane Harvey's Flooding in Houston , *Environmental Science Technology Letters* , 2018 , 481-486

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林由紀 田中佑佳 鶴井実桜 松井一彰
2. 発表標題 自然河川での薬剤耐性菌の動態
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中佑佳 鶴井実桜 小林由紀
2. 発表標題 原生生物による薬剤耐性菌捕食作用の評価
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴井実桜 田中佑佳 小林由紀
2. 発表標題 水環境中の薬剤耐性菌の動態
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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	松井 一彰  (MATSUI Kazuaki)  (40435532)	近畿大学・理工学部・教授    (34419)	

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