

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19403

研究課題名(和文) 病院汚水中薬剤耐性菌の実態解明：汚水は薬剤耐性菌の拡散経路となっているのか？

研究課題名(英文) Dissemination of antimicrobial-resistant bacteria from hospital sewage to natural environments

研究代表者

大久保 寅彦 (Okubo, Torahiko)

北海道大学・保健科学研究所・講師

研究者番号：90762196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：マンホール汚水から基質拡張型ラクタマーゼ産生大腸菌(n=44)を分離した。分離頻度は一般施設汚水と病院汚水との間で有意差はなかったが、病院汚水由来株はラクタム耐性に加えてフルオロキノロン系にも耐性を示した。以上より、汚水は薬剤耐性菌が環境中へ拡散する経路として重要であり、特に病院汚水には耐性化の進んだ薬剤耐性菌が含まれていることが示された。また、汚水からAnteglaucoma harbinensis他9株の繊毛虫を株化した。Anteglaucomaはレジオネラ感受性というユニークな性状を示したことから、レジオネラの病原因子の探索ツールとして有用な繊毛虫を副次的に得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では汚水から薬剤耐性菌を検出できたことに加え、病院汚水と一般施設汚水との間で薬剤耐性菌の質的・量的な差を比較することができた。このことから、病院汚水には単に薬剤耐性菌が含まれるだけでなく、より耐性化が進んだ高度耐性菌が含まれることを明らかにした。薬剤耐性菌の環境中への拡散は世界的な懸念事項となっているため、その対策が求められている。本研究の成果は病院汚水に対して耐性菌拡散防止対策が必要なことを示す具体的なエビデンスを示しており、臨床と環境をつなぐワンヘルスアプローチに関わる知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* (n=44) were isolated from manhole sewage. Although there was no significant difference in the frequency of resistance between general facility sewage and hospital sewage, the hospital sewage-derived strain was resistant to fluoroquinolones in addition to β -lactam resistance. These results indicate that sewage is an important pathway for the spread of drug-resistant bacteria into the environment, and that hospital sewage in particular contains drug-resistant bacteria that have become highly resistant. In addition, *Anteglaucoma harbinensis* and nine other strains of ciliates were isolated from sewage. *Anteglaucoma* showed a unique characterization of *Legionella* susceptibility, which provided a secondary ciliate useful as a tool in the search for virulence factors of *Legionella*.

研究分野：微生物間相互作用

キーワード：薬剤耐性菌 微生物間相互作用 繊毛虫 ワンヘルス

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌は世界的に拡散しており、特に基質拡張型ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌やカルバペネム耐性菌の増加が臨床現場での問題となっていた。この状況は研究開始当初から現在に至るまで変わっていない。こうした耐性菌は抗菌薬使用が多い病院で選択・増加すると考えられ、患者の尿または糞便を介して病院汚水に排出される。病院内部における耐性菌制御策は WHO が指針を定めているのに対し、病院汚水は何ら規制されていないため、病院汚水が薬剤耐性菌の排出元として重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

一方、汚水には細菌だけでなく原生生物や扁形動物など多数の微生物が生息している。代表者らの先行研究で、原生生物の繊毛虫 *Tetrahymena* をカルバペネム耐性菌・カルバペネム感受性菌と共培養すると、耐性菌から感受性菌への薬剤耐性遺伝子プラスミドの接合伝達が促進されることを明らかにした (Matsushita *et al.*, *Microbiol Immunol* 62:720-728, 2018)。この結果を踏まえ、研究開始当初に「病院患者のもつ薬剤耐性菌が汚水を介して排出され、汚水の中で繊毛虫を介した耐性遺伝子の水平伝播が生じ、耐性菌が野外環境に拡散する」という仮説を着想した。

2. 研究の目的

本研究では上記仮説を元に、(1)病院汚水に含まれる薬剤耐性菌の検出および性状解析により汚水中の耐性菌の実態を明らかにすること、(2)汚水から繊毛虫を分離し、耐性菌との共培養で薬剤耐性遺伝子プラスミドの伝達が促進されるかどうかを明らかにすること、の2つを目的に実験を行ない、病院汚水における薬剤耐性菌の挙動を検討することとした。また、汚水由来の繊毛虫に関する知見は乏しいため、ユニークな繊毛虫が分離できた場合には性状解析を行なうこととした。

3. 研究の方法

(1) 汚水からの細菌分離：病院汚水および一般施設汚水 (大学内の図書館等の汚水、比較用) をマンホールから採材し、総菌数 (トリプトソイ寒天培地)、大腸菌群数 (マッコンキー寒天培地) およびセフトキシム (CTX) 耐性菌数 (培地に CTX2mg/L 添加) を算出した。

(2) 分離株の性状解析：分離株は菌種同定後に PCR およびシーケンス解析で耐性遺伝子型を特定した。薬剤感受性試験は寒天平板希釈法で実施して最小発育阻止濃度を決定した。

(3) 繊毛虫の分離：汚水を Rice 培養液 (Page's amoeba saline に滅菌玄米 1 粒/mL を加えたもの) で 22 培養し、明確な増殖を示したものはシリンジを用いた泳出デバイスを用いて単離した。種類は 18S rRNA 遺伝子または *cox1* 遺伝子の PCR とシーケンスで同定した。

(4) 繊毛虫と耐性菌の共培養：繊毛虫と供与菌 (汚水由来 CTX 耐性大腸菌、blaCTX-M-1group 遺伝子をプラスミドに保有) および受容菌 (大腸菌 J53、染色体上にアジ化ナトリウム耐性遺伝子を保有) を MOI 1,000 で混合し、30 24 時間静置後に CTX・アジ化ナトリウム添加培地に接種して伝達菌を選択した。伝達頻度は総菌数に占める伝達菌数の比率として算出した。

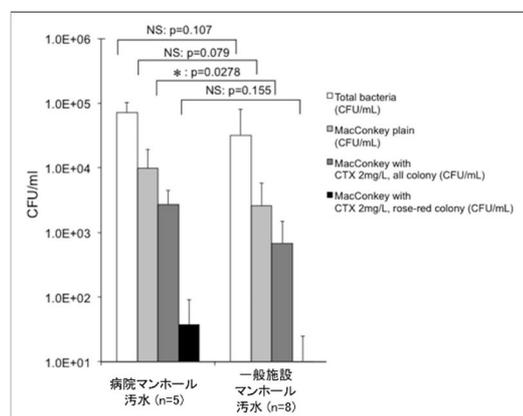
(5) 汚水由来繊毛虫 *Anteglaucoma* とレジオネラの共培養：*Anteglaucoma* は Sonneborn's *Paramecium medium* で培養、*Legionella pneumophila* JR32GFP は BCYE 培地で培養した。MOI 10,000 で混合して 22 で共培養し、共培養時の形態及び繊毛虫の生死を顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

本研究中に得た成果は以下 (1) ~ (4) の通りである。

(1) 病院汚水には一般施設汚水と比べて高度耐性化した薬剤耐性菌が多く含まれる

病院マンホール汚水 (n=5) および一般施設マンホール汚水 (n=8) から大腸菌を分離した結果、総菌数・マッコンキー培地発育菌数は病院汚水と一般施設汚水で同程度 (p=0.107 および p=0.079) だったが、CTX 添加マッコンキー培地での発育菌数は病院汚水で有意に多くなった (p=0.0278, 右図)。これは病院から CTX 耐性菌が高頻度に排出されていることを示しており、当初の想定と一致した。また、分離菌株の解析の結果、CTX 耐性大腸菌は全て ESBL 産生株であり、国内の臨床現場で頻繁に報告される CTX-M-1group 型または CTX-M-9group 型のいずれかまたは両者を保有していた。さらに、解析した ESBL 産生大腸菌のうち病院汚水由来株 (n=5) はいずれもシプロフロキサシン耐性を示し



たのに対し、一般施設汚水由来株 (n=3) はシプロフロキサシン感受性であった。これらの結果は病院汚水には一般施設汚水と比べて多くの薬剤耐性菌が含まれており、かつ、その耐性菌は一般施設汚水由来株よりも高度耐性化が進んでいることを示している。このように、病院汚水は量的にも質的にも薬剤耐性菌が野外環境に拡散するソースだと確認でき、当初到底を証明する知見を得ることができた。研究成果は下記論文(1)として公開済みである。

(2) 汚水から繊毛虫の株化に成功した

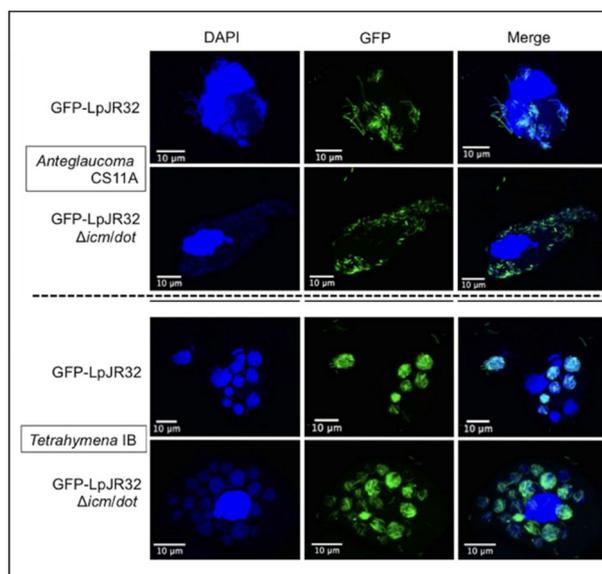
汚水から *Anteglaucoma harbinensis*, *Tetrahymena pyriformis*, *Uronema nigricans* など9株の株化に成功した。これらの繊毛虫は以下(3)(4)の成果につながった。

(3) 野外由来繊毛虫には細菌間のプラスミド伝達促進効果は確認できなかった

代表者の先行研究では繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* が薬剤耐性プラスミドの細菌間水平伝達を促進することを明らかにしていたため、下水由来薬剤耐性大腸菌-プラスミド受容用大腸菌の共培養系に繊毛虫を添加した接合伝達試験を実施した。繊毛虫添加時の伝達頻度は 4.26×10^{-5} となり、繊毛虫非添加時の伝達頻度 1.95×10^{-5} よりも上昇したものの有意差は認められなかった。当初想定では先行研究と同様の結果を期待していたが、今回の結果は一致しなかった。そのため、汚水中で繊毛虫を介した薬剤耐性プラスミドの細菌間伝達が促進されるのではないかという仮説の証明には至らなかった。

(4) 汚水由来繊毛虫 *Anteglaucoma* はレジオネラに対して高い感受性を示した

上記(2)で汚水から分離した *Anteglaucoma harbinensis* は全長約 30-40 μ m の繊毛虫で、大きな細胞口をもつことが特徴である。この繊毛虫の性状を調べる過程で、*Legionella pneumophila* JR32 との共培養実験(MOI 10,000, 30)を行ない、実験室で汎用される繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* での結果と比較した。その結果、*Tetrahymena* はレジオネラ存在下でも生残し続けるのに対し、*Anteglaucoma* はレジオネラ存在下で48時間以内に死滅することを発見した。この現象は、レジオネラの型分泌装置欠損株 (*icm/dot*) では見られなかったことから、レジオネラが型分泌装置依存的に *Anteglaucoma* を殺滅したことが示された。共培養時の細胞形態を観察すると、*Tetrahymena* 細胞内ではレジオネラが食胞に包含されていたのに対し、



Anteglaucoma では食胞が崩壊してレジオネラが細胞質内に拡散していた(右図)。レジオネラは野外環境中ではアメーバを好適宿主とすることが知られているが、繊毛虫を積極的に殺滅する事例は報告が無い。以上のことから、*Anteglaucoma* はユニークなレジオネラ感受性繊毛虫だと考えられた。この繊毛虫を用いることでレジオネラの未知エフェクター分子を検出できる可能性を考慮し、トランスポゾン挿入変異株ライブラリ(n=782)を作成し、*Anteglaucoma* を殺滅しなくなった変異株の解析を行なった。解析はまだ途上(n=82)だが、既に16株の候補株を選抜し、

型分泌装置関連遺伝子やプロテアーゼ遺伝子がトランスポゾン挿入で破壊されると殺滅能を失うことを明らかにしつつある。この成果(4)は当初想定していなかったものであるが、上記コンセプトで科研費基盤研究Cが令和4年度から採択されており、今後の研究につながる有用な繊毛虫を分離することができたといえる。研究成果は下記論文(2)として公開済みである。

【論文発表】

(1) Okubo T, Hasegawa T, Yamaguchi H, et al. Screening of hospital-manhole sewage using MacConkey agar with cefotaxime reveals extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents 54:831-833, 2019. 英語・査読あり

(2) Kawashiro A, Okubo T, Yamaguchi H, et al. Wild ciliates differ in susceptibility to *Legionella pneumophila* JR32. Microbiol 167:001078, 2021. 英語・査読あり

【受賞】

(1) Abstract Award. Kawashiro A, Onuma R, Okubo T, Yamaguchi H, et al. Interaction between *Legionella pneumophila* and ciliates isolated from sewage and a sink trap. World Microbe Forum 2021, online. 国際学会、英語ポスター発表

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Okubo Torahiko, Hasegawa Takaki, Fukuda Akira, Thapa Jeewan, Usui Masaru, Tamura Yutaka, Yamaguchi Hiroyuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Screening of hospital-manhole sewage using MacConkey agar with cefotaxime reveals extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Antimicrobial Agents	6. 最初と最後の頁 831 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijantimicag.2019.08.004	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 Kawashiro Airi, Okubo Torahiko, Nakamura Shinji, Thapa Jeewan, Miyake Masaki, Yamaguchi Hiroyuki	4. 巻 167
2. 論文標題 Wild ciliates differ in susceptibility to <i>Legionella pneumophila</i> JR32	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology (Reading)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.001078	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川代 愛梨, 大沼 零士, 大久保 寅彦, タバ ジーワン, 山口 博之
2. 発表標題 下水処理場からシリンジ分離法を用いて株化した繊毛虫とレジオネラの相互作用
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川 貴生, 大久保寅彦, 山口博之
2. 発表標題 マンホール下水からのESBL産生菌分離を下水由来繊毛虫を介したESBL遺伝子伝達の検証
3. 学会等名 第92回細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawashiro Airi, Onuma Reiji, Okubo Torahiko, Thapa Jeewan, Yamaguchi Hiroyuki
2. 発表標題 Interaction between Legionella pneumophila and ciliates isolated from sewage and a sink trap
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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