

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20461

研究課題名(和文)全ゲノム解析による河川水中の薬剤耐性腸内細菌科細菌の実態解明

研究課題名(英文)Whole-genome analysis of antimicrobial-resistant Enterobacterales in river water

研究代表者

五味 良太 (Gomi, Ryota)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：30794284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、抗生物質が効かない細菌(薬剤耐性菌)が世界規模で増加し、問題となっている。本研究では、河川水及び湖水といった環境水から単離したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)の全ゲノム配列を決定して、解析を行った。本研究の結果、環境水中のCREは、今まで報告例の少ない様々なカルバペネマーゼ遺伝子(FRI、GES-5、IMI、SFC、SFH-1)を保有することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、環境水中の薬剤耐性菌は、臨床現場では珍しい薬剤耐性遺伝子を保有することが判明した。これらの薬剤耐性遺伝子を保有した薬剤耐性菌が実際に人々に取り込まれ、アウトブレイクを引き起こすかは、今のところわかっておらず、今後の研究で明らかにしていく必要がある。しかし、本研究では臨床現場でも報告例のあるカルバペネマーゼと菌種の組み合わせが検出されたことから、今後注意して環境由来の薬剤耐性菌をモニタリングしていく必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The increase of antimicrobial-resistant bacteria is a global health concern. In the present study, we sequenced the genomes of carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) recovered from river and lake water. The results indicated that environmental CRE carry rare/novel carbapenemases, such as FRI, GES-5, IMI, SFC, and SFH-1.

研究分野：環境微生物学

キーワード：薬剤耐性菌 腸内細菌科細菌 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

近年、薬剤耐性菌が世界規模で増加し、問題となっている。これらの細菌により引き起こされた感染症は、治療の選択肢が限られることから、世界共通の脅威として認識されている。世界保健機関 (WHO) の報告 (Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014) によると、これらの薬剤耐性菌のうち、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae* (クレブシエラ)、黄色ブドウ球菌の3種は特に重要な病原体として挙げられている。中でも大腸菌とクレブシエラは臨床的に重要な腸内細菌科と呼ばれるグループに属しており、院内感染や市中感染の原因菌として大きな問題となっている。これらの薬剤耐性菌は、臨床現場だけの問題として捉えられがちだが、実は河川水や湖水といった環境水中にも存在することが知られている。しかし、環境水中の薬剤耐性菌については、詳細な遺伝学的知見が得られていないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、以下の(1)~(3)の目的・研究課題を設定した。

- (1) 河川水から薬剤耐性腸内細菌科細菌を単離し、全ゲノム配列を決定する
- (2) 決定したゲノム配列を保菌株と臨床分離株のゲノム配列と比較し、ゲノムの類似性・近縁性を決定する
- (3) 薬剤耐性遺伝子周辺の DNA 塩基配列について詳細な解析を行い、ゲノム上でそれらの遺伝子が置かれている状況 (薬剤耐性遺伝子周辺構造) を決定する

3. 研究の方法

(1) 2020年2月~2020年11月に、河川水および湖水のサンプリングを行い、選択培地を用いて、最後の皆と呼ばれている抗菌薬である、カルバペネムに耐性を示す耐性腸内細菌科細菌 (CRE) を単離した。

(2) 単離した CRE について、29種類の抗菌薬を用いて、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を行った。結果は CLSI の基準に従って判断した。

(3) 単離した CRE から DNA を抽出し、DNBSEQ 社のショートリードシーケンスと、Oxford Nanopore Technologies 社のロングリードシーケンスを用い、ゲノム配列を決定した。(注：シーケンス=塩基配列を決定すること、またその結果決定された塩基配列のこと。)

(4) 決定したゲノム配列を用い、Average Nucleotide Identity (ANI) 解析や digital DNA-DNA hybridization (dDDH) 解析を行うことで、菌種の同定を行った。また、kSNP3 を用いることで、全ゲノム1塩基多型に基づく系統樹を作成した。プラスミドの解析は、PlasmidFinder 2.1 と MOB-typer を用い、プラスミドレプリコン、relaxase、mate-pair formation type を検出することにより行った。ゲノムのアノテーションは、ISfinder、RAST、DFAST、ResFinder 4.1、Abricate (v1.0.1)、INTEGRALL、BLAST といった各種ソフトウェアを用いることで行った。Genomic island の検出には、IslandViewer 4 を用いた。

(5) 本研究で新しく発見したカルバペネマーゼバリエーションをコードする *bla*_{FRI-11}、*bla*_{SFC-2}、*bla*_{IMI-22}、*bla*_{IMI-23} については、これらの遺伝子及びその上流の領域を増幅するためのプライマーを設計して PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) を行った。その結果得られた PCR の増幅産物を対象として、大腸菌 DH5 α 株を用いてクローニングを行い、微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行うことで、カルバペネマーゼとしての機能を確認した。(注：カルバペネマーゼ=カルバペネム分解酵素)

4. 研究成果

(1) 本研究では、85の環境水サンプルから、21株の CRE を単離することができた。単離した CRE は、どの菌株も FRI、GES-5、IMI、SFC、SFH-1 といった、報告例の少ないカルバペネマーゼを産生することがわかった (表 1)。中でも SFC と SFH-1 については、1998年にポルトガルで単離された *Serratia fonticola* からしか報告例がなく、とても珍しいカルバペネマーゼであることがわかった。また、菌種についても *Raoultella planticola*、*Enterobacter asburiae*、*Enterobacter quasiroggenkampii*、*Serratia ureilytica*、*Serratia fonticola* 等、臨床分離株では比較的報告例が少ない菌種が目立った結果となった。しかし一方で、FRI 型のカルバペネマーゼを保有する *Enterobacter* 属菌は臨床分離株からも報告例があることから、必ずしもこれらの CRE が感染症

を引き起こさないとは言えないことが示唆された。

表1: 本研究で単離したCREの性質

菌株	菌種	カルバペネマーゼ	カルバペネマーゼ遺伝子が存在するレプリコン
JBIWA001	<i>Raoultella planticola</i>	GES-5	pJBIWA001_5 (IncP6, 32,930 bp)
JBIWA002	<i>Enterobacter asburiae</i> (ST1585)	FRI-8	pJBIWA002_1 (IncFII(Yp), 243,962 bp)
JBIWA003	<i>Enterobacter quasiroegenkampii</i> (ST929)	FRI-8	pJBIWA003_1 (IncFII(Yp), 221,552 bp)
JBIWA004	<i>Serratia ureilytica</i>	IMI-22, IMI-23	pJBIWA004_1 (IncFII(pRSB107), pSM22, 106,702 bp)
JBIWA005	<i>Enterobacter genomospecies 8</i> (ST930)	FRI-8	pJBIWA005_1 (IncFII(Yp), 191,037 bp)
JBIWA006	<i>Enterobacter asburiae</i> (ST1586)	FRI-11	決定できず
JBIWA007	<i>Enterobacter asburiae</i> (ST1586)	FRI-11	pJBIWA007_1 (IncFII(pECLA), IncR, 69,715 bp)
JBIWA008	<i>Enterobacter</i> sp. (ST1587)	FRI-11	pJBIWA008_3 (IncFII(pECLA), IncR, 73,531 bp)
JBIWA009	<i>Enterobacter asburiae</i> (ST1586)	FRI-11	決定できず
JBIWA010	<i>Enterobacter</i> sp. (ST1587)	FRI-11	決定できず
JBIWA011	<i>Serratia ureilytica</i>	IMI-22, IMI-23	決定できず
JBIWA012	<i>Serratia ureilytica</i>	IMI-22, IMI-23	決定できず
JSRIV001	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	染色体
JSRIV002	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	染色体
JSRIV003	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	決定できず
JSRIV004	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	染色体
JSRIV005	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	決定できず
JSRIV006	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-1, SFH-1	染色体
JSRIV007	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	決定できず
JSRIV008	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	決定できず
JSRIV009	<i>Serratia fonticola</i> (clade III)	SFC-2, SFH-1	決定できず

(2) 本研究では、 bla_{FRI-11} 、 bla_{SFC-2} 、 bla_{IMI-22} 、 bla_{IMI-23} という新たなカルバペネマーゼバリエントをコードする遺伝子が発見された。これらの遺伝子を大腸菌 DH5 α 株にクローニングしたところ、 bla_{SFC-2} と bla_{IMI-23} についてはカルバペネマーゼの MIC (minimum inhibitory concentration : 最小発育阻止濃度) に増加が見られたものの、 bla_{FRI-11} と bla_{IMI-22} については、本研究で用いた条件のもとではカルバペネマーゼの MIC の増加がみられなかった。このことから、 bla_{FRI-11} と bla_{IMI-22} は、弱いカルバペネマーゼをコードしていることが示唆された。

(3) 本研究で検出されたカルバペネマーゼ遺伝子の周辺構造についても解析を行った。その結果、*R. planticola* が保有する bla_{GES-5} については、33 kb の IncP6 プラスミド上に位置し、In2071 (カセットアレイ $bla_{GES-5-aacA3-aadA16}$) という、新たなクラス 1 インテグロン中に存在することがわかった。なお、このインテグロンは、2019 年に日本で単離された *Enterobacter roegenkampii* が保有するプラスミド pN260-3 中に存在するインテグロンと構造が類似していることもわかった。 bla_{FRI-8} については、191 kb~244 kb の IncFII(Yp) プラスミド上に存在し、 bla_{FRI-11} については、70 kb と 74 kb の IncFII(pECLA)/IncR プラスミド上に存在することがわかった。 bla_{IMI-22} と bla_{IMI-23} については、107 kb の、IncFII(pRSB107) と pSM22 レプリコンを保有する同一のプラスミド上に存在することがわかった。 bla_{SFC} と bla_{SFH-1} については、染色体上に存在する tRNA-Phe 遺伝子に挿入された Genomic island 中に共存することがわかった。なお、これら 2 つのカルバペネマーゼは、76 kb~131 kb と比較的近い距離に位置することがわかった。上述した 1998 年にポルトガルで単離された *S. fonticola* についてはドラフトゲノム配列が決定されており、この菌株においても、 bla_{SFC} と bla_{SFH} は、tRNA-Phe 遺伝子に挿入された Genomic island 中に存在することが示唆された。(注：ドラフトゲノム配列：完全長ゲノム配列とは異なり、ゲノムが断片化された状態で決定された配列のこと)

(4) 本研究により、環境水中の薬剤耐性菌は、臨床現場では珍しいカルバペネマーゼ遺伝子を保有する場合があることが判明した。一方で、臨床現場でも報告例のあるカルバペネマーゼと菌種の組み合わせも検出されたことから、今後注意して環境由来の薬剤耐性菌をモニタリングしていく必要があることが示唆された。

<引用文献>

Gomi R, Matsumura Y, Tanaka M, Ihara M, Sugie Y, Matsuda T, Yamamoto M. Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in Enterobacterales isolated from surface waters in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2022 in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryota Gomi, Kelly L. Wyres, Kathryn E. Holt	4. 巻 7
2. 論文標題 Detection of plasmid contigs in draft genome assemblies using customized Kraken databases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	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/mgen.0.000550	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 Gomi R, Matsuda T, Yamamoto M, Tanaka M, Ichiyama S, Yoneda M, Matsumura Y.	4. 巻 54
2. 論文標題 Molecular Characterization of a Multidrug-Resistant IncF Plasmid Carrying mcr-3.1 in an Escherichia coli Sequence Type 393 Strain of Wastewater Origin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Antimicrobial Agents	6. 最初と最後の頁 524-526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijantimicag.2019.06.024	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 Gomi R, Matsumura Y, Tanaka M, Ihara M, Sugie Y, Matsuda T, Yamamoto M.	4. 巻 77
2. 論文標題 Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in Enterobacterales isolated from surface waters in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Antimicrobial Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1237-1246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jac/dkac029	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 Ryota Gomi, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto, Michio Tanaka, Thomas Jove, Pei-Hsin Chou, Yasufumi Matsumura	4. 巻 26
2. 論文標題 Occurrence of class 1 integrons carrying two copies of the blaGES-5 gene in carbapenem-non-susceptible Citrobacter freundii and Raoultella ornithinolytica isolated from wastewater	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 230-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jgar.2021.06.014	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五味良太
2. 発表標題 環境水中に潜む耐性菌のモニタリング
3. 学会等名 第95回日本感染症学会・学術講演会 第69回日本化学療法学会総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Gomi, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto, Pei Hsin Chou, Michio Tanaka, Satoshi Ichiyama, Minoru Yoneda, Yasufumi Matsumura
2. 発表標題 Genomic characteristics of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in hospital and municipal wastewater
3. 学会等名 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology
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
---------	---------