

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14274

研究課題名（和文）水環境におけるESBL産生遺伝子の伝達機構の解明と環境保存性の評価

研究課題名（英文）Evaluation of the transmission and conservation of antibiotic resistance on ESBL-producing genes in water environment

研究代表者

西山 正晃（Nishiyama, Masateru）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10802928

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、国内外で分離報告が増加している基質特異性拡張型ラクタマーゼ（ESBL）産生菌に着目して、水環境におけるESBL産生菌の薬剤耐性機構の解明を環境中での耐性遺伝子の獲得と保存性から評価した。はじめに、日本国内で分離しているESBL産生菌の疫学調査と遺伝子解析による特徴付けを行い、ESBL産生菌の耐性機構の特徴を把握する。次に、環境中を模擬したin vitro実験によって環境水中に遊離した状態のESBL産生遺伝子獲得による薬剤耐性の発現、ならびにプラスミドの保持性とその伝達性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったESBL産生菌の特徴づけによって、都市下水のモニタリングでは、医療機関で検出されないようなESBL産生菌が、市中で蔓延していることが分かった。同様のモニタリングは国内外を問わず広く適用可能であり、ESBL産生菌以外の耐性菌についても、市中での蔓延状況を明らかにすることができると考えている。また、in vitro試験を用いたESBL産生菌の生残性と保存性の評価結果から、腸内細菌科細菌の中でも環境中での生残性が異なり、それらは耐性遺伝子に依存しないことを明らかとした。この結果は、環境中でのESBL産生菌の挙動や拡散の可能性を議論する上で重要なデータとなり得る。

研究成果の概要（英文）：The Infections caused by Antimicrobial Resistance Bacteria (ARB) are widely recognized as a major public health problem in the 21st century. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteria, which are resistant to a wide range of antibiotics in beta-lactam group, have been recognized worldwide as a threat causing nosocomial infections. To characterize the ESBL-Ent carried by healthy people, we isolated the bacteria from municipal wastewater and detected genes (*bla*) coding  $\beta$ -lactamase production. Also, We conducted an in-vitro experiment to evaluate persistence of antimicrobial-resistant bacteria (ARB) and conservation of relevant genes (ARGs) among them, focusing on coliform bacteria producing ESBL isolated in water environment.

研究分野：土木環境システム

キーワード：腸内細菌科細菌 ESBL 都市下水 プラスミド 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌と耐性菌に関連する耐性遺伝子は人類の公衆衛生を脅かす問題として広く認識されている。耐性菌の問題に対して現状のまま対策（i.e. 新規抗菌薬の開発や抗菌薬使用量の規制など）が講じられず、薬剤耐性菌が世界中で拡大すると想定した場合、2050年には薬剤耐性菌が原因となる死者数が1,000万人に、経済的な損失は1兆5000億ドルに達すると見積もられている<sup>1)</sup>。我が国では厚生労働省が主体となって2016年から2020年にかけて「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」が策定され、ヒトや動物の薬剤耐性率のサーベイランスの実施と耐性率低減に関する成果目標が設定されている。2019年の調査結果では、ヒト分野において世界各国で耐性率の増加が問題となっているカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, CRE）やバンコマイシン耐性腸球菌（Vancomycin-Resistant Enterococci, VRE）の耐性率は、わが国では1%未満と低い水準であることが記されている<sup>2)</sup>。その一方で、大腸菌の第三世代セフェム系薬やフルオロキノロン系薬への耐性率は増加傾向であることが浮き彫りとなり、国内における耐性菌の拡大が懸念されている。

基質特異性拡張型βラクタマーゼ（Extended spectrum β-lactamase, ESBL）産生菌は、ペニシリン系産生酵素を産生する細菌が突然変異し、第三世代セフェム系抗菌薬まで分解することが可能な遺伝子を獲得した細菌のことで、ペニシリン系のみならず、セフェム系やモノバクタム系といった複数のβラクタム薬に耐性を示す<sup>3)</sup>。特に*E.coli*や*Klebsiella*などに代表される腸内細菌科細菌がESBL産生遺伝子を獲得した場合、感染症治療が困難となることから世界中で問題となっている<sup>4)</sup>。ESBL産生遺伝子はRプラスミド上にコードされており、耐性遺伝子が同一の菌種のみならず、異なる細菌種にまで伝播することがわかっている<sup>5)</sup>。臨床のみならず環境中からもESBL産生菌は検出されており、環境中でそれらが原因となって耐性遺伝子が他の菌種に伝播する可能性はあるが、現在でもその有無は明らかになっていない。

薬剤耐性菌の出現・拡大を考えるうえで鍵となるのは、何処で耐性菌が発生し、どのようにして細菌が耐性遺伝子を獲得するのかである。薬剤耐性菌の出現は、医療機関や畜産場など特定環境において、ヒトや動物体内に存在する細菌の一部が突然変異で生まれること、あるいはプラスミドやトランスポゾンといった外来性耐性遺伝子の獲得することであると考えられる<sup>6)</sup>。これらの現象は生体内で発生していることは既に知られているが、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ならば、耐性菌の拡大が加速することが懸念される。様々な排水が流入する水圏環境では耐性遺伝子が伝播する可能性が指摘されている<sup>7)</sup>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これまで得られていない。また、プラスミドに代表される耐性機構は細菌の生存に無関係であるため、環境中に排出された耐性菌の耐性遺伝子は欠落すると言われているが、実際に環境中でどの程度保持できるのか不明である。

## 2. 研究の目的

上記に挙げた研究課題の解決に向けて、以下の2つの研究を行う必要があると考えた。

目的①：日本国内の下水処理場から分離されたESBL産生菌の疫学調査を実施し、ESBL産生遺伝子がコードされるプラスミドの特徴とその伝播宿主を明らかにする。

目的②：環境水中で遊離した耐性遺伝子の取り込みによる薬剤耐性獲得の可能性を明らかにし、細菌細胞内でのESBL産生耐性遺伝子の保存性とそれらの伝達性を評価する。

## 3. 研究の方法

### 研究内容①下水処理場から分離したESBL産生菌の疫学調査と耐性遺伝子の探索

本研究では応募者が参画したプロジェクトで日本の下水処理場から分離した1,841株のESBL産生菌について薬剤感受性や耐性遺伝子の検出などの疫学調査を実施した。単離菌株から腸内細菌科細菌にターゲットを絞り（594株）、16S rRNAの配列情報と生化学試験に基づいた菌種同定を行った。同定菌株に対して、PCR法によってAmbler分類に基づいてESBL産生遺伝子の型別を行った。Dallennelらの手法に準じて、ESBL産生遺伝子をAmblerの分類法より分類された4クラス（Class A, Class B, Class C, Class D）、20種類のβラクタマーゼ（*bla*）を型別した。また、PCR-based replicon typing（PBRT）によってプラスミドのタイピングを実施した。PBRTとは、PCRによって各Incグループに特徴的なプラスミド上の遺伝子領域を増幅することで、プラスミドを分類する手法である。プラスミドの抽出には、NucleoSpin®Plasmid EasyPure キット（タカラバイオ社）を使用した。プラスミドの分類は、PBRT 2.0 kit（DIATHEVA S.R.L）を使用し、付属の説明書に準じて行った。本キットは、8つのMultiplex PCRを実施して30種類のInc型に分類できる。これらの解析結果から、ESBL産生遺伝子を保有する細菌種、耐性遺伝子、およびプラスミドの型との関連性を把握するこ

とができ、環境分離株の特徴づけを行った。

#### 研究内容②：ESBL 産生耐性遺伝子を対象とした薬剤耐性の保持性の評価

研究内容①で得られた ESBL 産生菌について環境中での薬剤耐性能の保持性を評価することで、環境中での生残性を把握することができる。使用菌株には、ヒトから分離された標準株として NCTC13353 (*Escherichia coli*, *bla*<sub>CTX-M group1</sub>)、NCTC13462 (*Escherichia coli*, *bla*<sub>CTX-M group2</sub>)、NCTC13463 (*Escherichia coli bla*<sub>CTX-M group8</sub>)、NCTC13464 (*Enterobacter cloacae*, *bla*<sub>CTX-M group9</sub>) の 2 菌種 4 種類の ARGs を使用した。

4 種類の供試菌株を Luria-Bertani 寒天培地 (LB, 1.5%、BD) に塗抹し、37°C で 20 時間培養した。その後、形成された単一コロニーを 10mL の LB 液体培地に接種し、4 時間振とう培養した。培養後、1 mL の培養液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した。洗浄後の培養液を、10 mL の PBS を基質として、振とう培養と静置培養の条件で生残性と保存性について検討した。温度条件は 37°C と 20°C で行い、暗所条件下で 0 日目、1 日目、7 日目、以後 1 週間おきに最長 96 日間観察した。各経過日数に接種した菌液を、寒天平板法を用いてサンプル中の細菌数及び耐性菌数を列挙した。ARB の生残性と ARG の保存性の評価は、抗菌薬添加と無添加の LB 培地上に生育したコロニー数から算出した。生残率 (%) は、各培養日数における抗菌薬添加培地上のコロニー数を、培養初期 (0 日目) での抗菌薬添加培地上のコロニー数で除して算出した。プラスミドの保存率 (%) は、各培養日数における抗菌薬培地上のコロニー数を、抗菌薬無添加の培地を使用したコロニー数で除して算出した。生残率は、X 日後に生残した耐性菌の割合として算出した。

### 4. 研究成果

#### 4.1 下水処理場から分離した ESBL 産生菌の疫学調査と耐性遺伝子の探索

都市下水から選択培地上で大腸菌として生育した赤色コロニー 284 株に対して *uidA* を検出した結果、98% (279 株) が大腸菌と同定された (表-2)。腸内細菌科細菌として単離した青色コロニー 295 株について 16S rRNA に基づく菌種同定をした結果、9 種類の細菌が属レベルで同定された (表-1)。都市下水から *Aeromonas* 属と *Klebsiella* 属がそれぞれ 23.8% と 14.9% と高い割合で検出された。

都市下水から単離・同定された菌株における *bla* の検出率を表-2 に示す。試験を行った 20 種類の *bla*のうち、都市下水から 16 種類 (Class A : 10 種類、Class C : 4 種類、Class D : 1 種類、Class B : 1 種類) が検出され、多様な *bla* が検出された。Class A に分類される 10 種の *bla*のうち、都市下水からは全種類の *bla* が検出された。Class A の中でも *bla*<sub>CTX-M</sub> を保有する菌株の検出率が高く、その中でも *bla*<sub>CTX-M group-9</sub> の検出率が最も高かった (51.9%)。また、都市下水における *bla*<sub>KPC</sub> と *bla*<sub>GES</sub> を保有する菌株の検出率はそれぞれ、18.7% と 21.2% であった。Class A はペニシリン系薬を分解できるペニシリナーゼであり、セファロsporin 系は普通分解できず、基質特異性が狭くなっていることが特徴である。耐性遺伝子がプラスミド上にコードされているため他細菌に水平伝播が可能である。ESBL 産生菌が保有するペニシリナーゼ産生遺伝子には CTX-M 型、TEM 型、SHV 型の 3 種類が知られている。欧州では 1990 年代までは TEM 型、SHV 型の検出事例が多かったが、現在では世界中で CTX-M 型が主流になっている。日本では、TEM 型と SHV 型の検出率は欧州と比べて低く、CTX-M 型の検出率が高いことが特徴で、その中でも CTX-M group-9 型の割合が高いことが知られている。この日本の臨床で報告され

表-1 CHROMagar™ ESBL 培地上から単離した菌株の菌種とその割合

	都市下水	
	株数	割合
<i>E. coli</i>	279	46.8%
<i>Aeromonas</i>	142	23.8%
<i>Klebsiella</i>	89	14.9%
<i>Kluyvera</i>	52	8.7%
<i>Enterobacter</i>	4	0.7%
<i>Citrobacter</i>	12	2.0%
<i>Serratia</i>	8	1.3%
<i>Pseudomonas</i>	1	0.2%
<i>Stenotrophomona</i>	0	0.0%
<i>Acinetobacter</i>	1	0.2%
未同定株	8	1.3%

表-2 都市下水から単離した菌株からの *bla* の検出率 (N.D. は不検出を意味する)

Class	遺伝子	都市下水 (%)
A	<i>bla</i> <sub>CTX-M group-1</sub>	24.4
	<i>bla</i> <sub>CTX-M group-2</sub>	0.8
	<i>bla</i> <sub>CTX-M group-9</sub>	51.9
	<i>bla</i> <sub>CTX-M group-8/25</sub>	1
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	19.5
	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	5.1
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	18.7
	<i>bla</i> <sub>VEB</sub>	5.2
	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	2.2
	<i>bla</i> <sub>PER</sub>	1
C	<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	N.D.
	<i>bla</i> <sub>FOX</sub>	N.D.
	<i>bla</i> <sub>MOX</sub>	10.6
	<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	0.7
	<i>bla</i> <sub>CTT</sub>	0.7
	<i>bla</i> <sub>EBC</sub>	1.5
D	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	4.5
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	N.D.
B	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	0.2
	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	N.D.

ている遺伝子型別の特徴が、本研究でも確認された。ClassCは全6遺伝子のうち、*bla<sub>ACC</sub>*と*bla<sub>FOX</sub>*を除いた4つの*bla*が検出された。都市下水における*bla<sub>MOX</sub>*を保有する菌株の検出率は最も高かった(10.6%)。ClassDとClassBでは、*bla<sub>OXA-1</sub>*と*bla<sub>IMP</sub>*がそれぞれ4.5%と0.2%の割合で検出された。

表-3に、単離した腸内細菌科細菌におけるPBRTによって分類した各Inc型の検出数を示す。PBRTによる分類の結果、合計23種類のInc型が検出された。227株の腸内細菌科細菌のうち172株はいずれかのInc型に分類され、残りの55株からはいずれのInc型も検出されなかった。検出された172株のうち、IncFに分類されるIncFIIK(35.4%)とIncFIB KN(61.6%)の検出率が高かった(表-3)。イタリアで行われた臨床でのESBL産生菌の疫学調査でも両Incグループの検出率が高い傾向がみられ、*bla<sub>CTX-M-group-9</sub>*はIncFグループと関連があることが報告されている。この傾向は、図-1に示す菌種ごとのInc型と耐性遺伝子との関係からもわかる。また、IncFIIKとIncFIB KNは異なる4種類の腸内細菌科細菌から検出されおり、広範囲の宿主にこのInc型のプラスミドが伝播していると考えられる。*Klebsiella*からは19種類のInc型が検出され、プラスミドを授受しやすい特徴があると示唆され、接合伝達によるARGの伝播に寄与すると考えられる。今後は、プラスミドの伝達性に貢献する可動性遺伝子群の特徴を併せて分析することで、環境中でのプラスミドを介したARGの伝播の評価につなげる予定である。

表-3 単離した腸内細菌科細菌における各Inc型の検出数

	株数	IncA/C	IncBO	IncK	IncFIA	IncFIB	IncFIB KN	IncFIB KQ	IncFIB-M	IncFII	IncFIS	IncFIIK	IncFII	IncH2	IncHIB-M	IncIa	IncIy	IncI2	IncL	IncM	IncN	IncN2	IncP1	IncR	IncT	IncU	IncW	IncX	IncX1	IncX2	IncX4
<i>Klebsiella</i>	134	3			5	1	57	10	1	8	1	38		3		2	1					2		8	6	10	1	7	2	2	
<i>Kluyvera</i>	58	2			10		38	5		17		14					4				3			10	7	1	1	3	1	1	
<i>Serratia</i>	8					1						2										1	1	2	1		2				
<i>Citrobacter</i>	12	1					3			1		4		1			1		1			1									
<i>Enterobacter</i>	15						8			5	6	3		7											1		2				

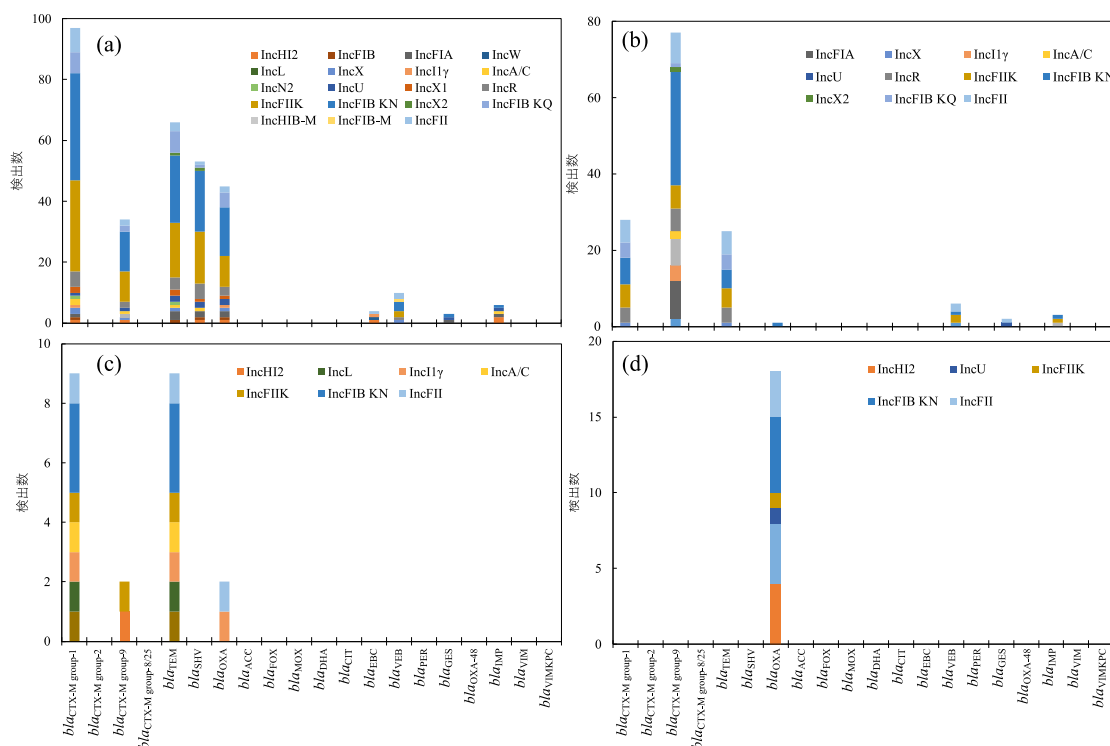


図-1 菌種ごとのInc型と耐性遺伝子との関係 ((a)*Klebsiella*、(b)*Kluyvera*、(c)*Citrobacter*、(d)*Enterobacter*)

#### 4. 2 ESBL 産生耐性遺伝子を対象とした薬剤耐性の保持性の評価

図-2(a)に 37°C条件下の生残率と保存率の推移を示す。E.coli は、1 日後で生残率が 30%以下に減少した一方で、E.cloacae の 1 週間後の生残率は 25%と他の菌株と比較して高く、菌種による生残性の違いが確認された。温度を 20°Cに低下させた場合の生残率は、いずれの菌株でも高くなり、20°Cにおける生残率は、37°Cと比較して全菌株で 5~20 倍高かった(図-2(b))。不活化速度定数の算出値からも、37°Cと比較して 20°Cで値が小さくなり、生残しやすいことが示されている。これは、大腸菌の生化学的変化によって生じる熱ストレスの影響が細胞死の誘発を引き起こしたことによって3)、37°Cの生残率が低くなったと考えられた。同一菌種かつ、同じ ARG を保有する菌株(E.cloacae、bla<sub>CTX-M</sub> group 9 gene)で標準株と環境株を比較すると、不活化速度定数はそれぞれ 0.147 と 0.93 であり、両者に差はみられなかった。このことから、単離起源の違いによる ARB の生残率の変化は確認されなかった。

37°Cにおける標準株の耐性遺伝子の保存率は 0~120%で推移し、約 1 ヶ月経過後も bla<sub>CTX-M</sub>-group 2 を除いて 90%程度であった。温度が 20°Cの場合では、bla<sub>CTX-M</sub> group 1 を除き、いずれの菌株も静置と振とう条件で保存率が低下した(90~12%)。同一菌株を比較した場合、温度が低い場合に耐性遺伝子の欠落が生じやすいと考えられた。環境株では、4 株いずれも 37°Cの培養条件下で約 1 ヶ月経過後も 98~100%と高い割合で保有していた。

UV 照射による 37°Cと 20°Cの生残率と保存率の推移を図-3 に示す。ARB の生残率は積算光量の増加に伴い減少し、37°C条件下では 3mW/cm<sup>2</sup> 以上になるとすべての菌株は 99% 死滅した。一方で、20°Cでは、3.5mW/cm<sup>2</sup> でも全ての菌株で 30%以上の生残率を示した。UV 照射条件下でも、暗所の実験と同様に 20°Cで生残率が高かった。全ての条件の ARGs の保存性は、どの積算光量でも 100%であったことは、UV による影響で ARG が脱離する前に ARB が死滅していると考えられた。

#### 引用文献

- 1) Jim O'Neill and supported by the Wellcome Trust and the HM Government. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tracking a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014
- 2) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会, 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2019.
- 3) World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
- 4) Center for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.
- 5) Rozwandowicz M, et al. J. Antimicrob. Chemother. 78, 1121-1137, 2018.
- 6) Mulvey MR, Simor AE. CMAJ. 180, 408-415, 2009.
- 7) Taylor NG, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. Trends. Ecol. Evol. 26(6), 278-284, 2011.
- 8) Dallennel, C, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae, J. Antimicrob. Chemother., 65, 490-495, 2010.

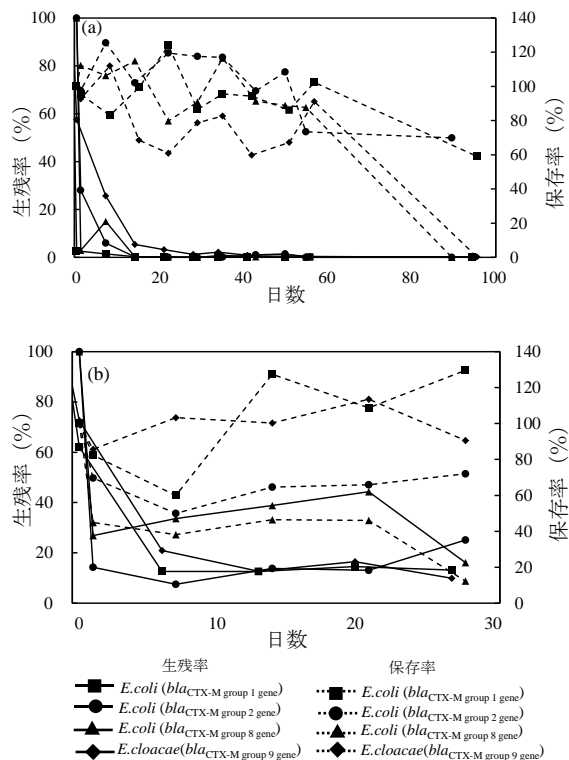


図-2 37°C (a) と 20°C (b) の振とう条件における ESBL 産生 Enterobacteriaceae の生残率と保存率

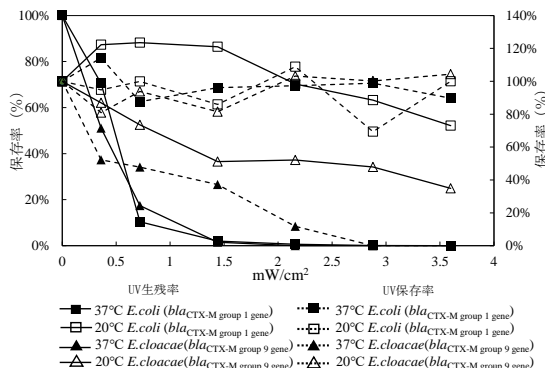


図-3 UV 照射による ESBL 産生 Enterobacteriaceae の生残率と保存率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹	4. 巻 78(7)
2. 論文標題 山形県の赤川水系から単離した大腸菌の系統発生群とその薬剤感受性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 土木学会論文集G(環境)	6. 最初と最後の頁 111_307-111_316
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 盧歆, 西山正晃, 渡部徹
2. 発表標題 都市下水と病院排水から単離したESBL産生腸内細菌科細菌が保有するプラスミドの特徴
3. 学会等名 土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山正晃, 米田一路, 渡部徹
2. 発表標題 山形県の河川におけるふん便指標細菌の薬剤感受性
3. 学会等名 第25回日本水環境シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹
2. 発表標題 山形県の河川から単離したESBL産生大腸菌の薬剤耐性プロファイルとジェノタイピング
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤静香、西山正晃、渡部徹
2. 発表標題 in vitro条件下におけるESBL産生Enterobacteriaceaeの生残性の評価
3. 学会等名 令和4年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shizuka SAITO, Toru WATANABE, Masateru NISHIYAMA
2. 発表標題 In-vitro Experiment to Evaluate Persistence of Coliform Bacteria Producing Extended-Spectrum $\beta$ -lactamase and Conservation of Relevant Genes
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference 2023
4. 発表年 2023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