

課題番号	Q20E-03
課題名 (和文)	都市下水処理場放流水中の薬剤耐性腸内細菌科細菌が保持するプラスミドの特徴づけ
課題名 (英文)	Characterization of plasmids isolated from carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wastewater treatment plants in Japan
研究代表者	所属 (学部、学科・学系・系列、職位) 理工学部, 建築・都市環境学系 助教 氏名 筒井 裕文
共同研究者	所属 (学部、学科・学系・系列、職位)
	氏名
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位)
	氏名
	所属 (学部、学科・学系・系列、職位)
氏名	

研究成果の概要 (和文)

荒川流域の都市下水処理場より採取した下水試料から釣菌した 55 株について、薬剤耐性に関する特性と保持するプラスミドの特徴を調査した。釣菌した 55 株のうち、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)が 22 株検出された。またカルバペネマーゼ産生株は 30 株、うち 16 株はメタロ β ラクタマーゼ産生であった。また、34 株で 10 kb 以上のプラスミドが確認され、泳動パターンも複数認められた。このことから、市中では比較的多様な CRE およびカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)が存在していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)

Characteristics of antimicrobial resistant and plasmid profiles were investigated about 55 strains isolated from WWTP located at ARAKAWA river basin. Total 22 strains were determined as carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), and 30 strains produced carbapenemase (16 strains produced metallo- β -lactamase). In addition, over 5 electrophoresis patterns with large(> 10kb) size plasmid were observed. From these results, various CRE and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) with transmissible plasmid would exist in cities of ARAKAWA river basin.

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬は感染症治療において必要不可欠な医薬品であり、それら抗菌薬への耐性を獲得した薬剤耐性菌の出現と拡がり世界的に非常に大きな問題となっている。2019年には国連から「NO TIME TO WAIT」というタイトルで薬剤耐性菌への対策が勧告され、2050年までに薬剤耐性菌による死者数が年間1,000万人にのぼると試算されおり、日本でも厚生労働省を中心にヒト、動物、環境の垣根を超えた包括的な対策（one health approach）というコンセプトのもと、臨床、基礎、環境など多様な領域で薬剤耐性菌に関する調査が進められている。一方で環境中における薬剤耐性菌のひろがりについては十分な調査がなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、世界的に大きな問題となりつつあるカルバペネム耐性腸内細菌化細菌（CRE）に着目する。CREは抗菌薬の切り札と呼ばれるカルバペネム系薬剤に耐性を示すことから治療が困難となり、致死率が高いという臨床的な問題が大きいほか、現在世界的に耐性が拡がっており、その経路を明らかにすることが重要である。また、下水処理場には地域の住民の排せつ物が集められるため、その地域における薬剤耐性菌の存在状況を網羅的に調べることが可能であり、感染症を引き起こした患者のみを調査できる臨床現場よりも薬剤耐性菌の現状や拡散経路を調べるうえで適しているといえる。そこで、下水処理場から放出される処理水中に存在するCREの宿主とプラスミドの関係を明らかにすることで、市中におけるCREの存在状況を把握するとともに、近い将来の流行を予測することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 下水試料からのCRE検出方法の検討

荒川流域の都市下水処理場から採取した最初沈殿池流入水を試料として、メロペネム(MPM)を

0.125 µg/mLとなるように添加したChromagar ECC培地およびChromagar mSuperCarba培地を用いてCREの検出を試み、適切な検出方法を調査した。

(2) 下水試料から検出されたCREの特徴づけ

荒川流域の都市下水処理場から採取した下水試料からmSuperCarba培地を用いて検出した55個のコロニーを釣菌し、単独菌株であることを画線培養で確認したのち、非腸内細菌の検出をTSI testにより、薬剤耐性プロファイルをKB diskを用いたディスク拡散法により、そしてカルバペネム系薬剤の分解酵素であるカルバペネマーゼ産生能をm-CIM testにより、その中でもメタロβラクタマーゼ産生能をe-CIM testにより、カルバペネマーゼ産生遺伝子の検出をシカジーニウス®カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット2（関東化学）により調査した。なお、薬剤耐性の有無の判定はCLSI M100Ed31に準じて実施した。さらに釣菌株の保持するプラスミドの抽出粗液を電気泳動に供することで大まかなプラスミドのサイズを調査した。

4. 研究成果

(1) 下水試料からのCRE検出方法の検討

培地上に生育したコロニー数を比較したところ、同じ試料量に対してmSuperCarba培地を用いた場合は2.2~5.1倍程度の細菌が検出された。また、MPM添加ECC培地上に生育したコロニーはサイズが小さく、生育状況が悪いことが示唆された。よって、一般的な腸内細菌科細菌との閾値であるEcological cutoff値を用いた場合でも濃度が高かった可能性が示されたため、以降の検討ではmSuperCarba培地を用いることとした。

(2) 下水試料から検出されたCREの特徴づけ

下水試料から釣菌された55株をTSI testに供したところ、いずれも糖発酵が認められたことから、釣菌株は非腸内細菌での誤検出例の多い*Aeromonas hydrophila*や*Stenotrophomonas maltophilia*である可能性は低いといえた。ディ

スク拡散法で薬剤耐性を調査したところ、全ての株が何らかのカルバペネム系薬剤に中度以上の耐性を示した。また、国内の CRE の定義に一致する性状を示した株が 22 株(40%)認められた。また、非 CRE を含む計 30 株がカルバペネマーゼ産生であり、そのうち 16 株がメタロ β ラクタマーゼ産生であった。また、主にカルバペネマーゼ産生遺伝子として KPC 型、GES 型が検出された。

55 株から抽出したプラスミドを調査したところ、34 株で 10 kb 以上のサイズのプラスミドを保持していることが確認され、また電気泳動のパターンも少なくとも 5 パターン以上の多岐にわたることが示された。カルバペネマーゼ産生遺伝子は染色体上に存在する場合とプラスミドに存在する場合が報告されており、今回検出された株について産生遺伝子の存在場所を明らかにすることで水平伝播のリスク評価が可能であると考えられる。

以上の結果から、荒川流域の地域において多様なカルバペネム耐性腸内細菌科細菌が存在する可能性が示唆され、さらに水平伝播の可能性のあるプラスミドも検出された。このことから、継続した調査とともに、検出された耐性株の具体的な耐性機構の調査、さらには臨床現場で検出されている耐性株との関連性についてより詳細に調査を進める必要性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)