



報道機関 各位

2024年11月6日
国立大学法人信州大学

病院下水における基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生大腸菌およびカルバペネマーゼ産生グラム陰性菌の経時的動態解析

【研究成果のポイント】

- 2021年1月から11月までの間、隔月に採取した病院下水中に検出された大腸菌 (*Escherichia coli*) 総菌数に対する基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生 *E. coli* の比率は0~95%と広範囲に及んでいました。
- ESBL 産生 *E. coli* である *bla*_{CTX-M-14} 保有ヒト腸管外病原性パンデミッククローン B2-O25b:H4-ST131-H30R/non-Rx を主体とする *bla*_{CTX-M} 保有 *E. coli* の割合が、1月、3月、5月に比べて7月に顕著に増加していました。
- 一方、9月と11月にはこれらのESBL産生 *E. coli* が検出されず、代わりに AmpC 型β-ラクタマーゼの *bla*_{DHA-1} を保有する *E. coli* が出現する劇的な疫学的変化が見られました。
- 病院下水中に検出されたカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌 (CPO)が保有するカルバペネマーゼ遺伝子としては、国内のヒト臨床分離株で高頻度に検出されている *bla*_{IMP-1} が最も多く、*bla*_{GES-24} と *bla*_{GES-4} がこれに次いでいました。
- *bla*_{IMP-1} 保有 *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ST860 が繰り返し検出されたことにより、最も多い総菌数を示し、また下水環境中で持続的に存在し得ることが示唆されます。

【概要】

信州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 長野則之特任教授の研究グループは国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 菅井基行センター長の研究グループとの共同研究により、病院下水を対象に、临床上重要な薬剤耐性菌である基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生 *Escherichia coli* 及びカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌 (CPO)の長期・定量的実態調査を実施し、これらの薬剤耐性菌の遺伝学的集団構造及び経時的ダイナミクスを明らかにしました。本研究の知見から、ESBL 産生 *E. coli* や CPO、及びこれらの耐性菌が保有する耐性遺伝子/プラスミドが汚染された配管システムを通じて病院環境中に拡散し、院内伝播のリスクを高める可能性が懸念されます。さらにこれらの耐性菌や耐性遺伝子/プラスミドが環境水路を通じて地域社会に拡散する可能性も考えられます。特に近年の地球温暖化による異常気象がもたらす豪雨により、地上への下水の溢水が頻繁化している現状にあって、われわれの知見は市中における薬剤耐性菌の拡散リスクの観点から公衆衛生上の注意を喚起するものです。

本研究は、世界保健機関 (World Health Organization: WHO)が実施する薬剤耐性 (antimicrobial Resistance: AMR)サーベイランスである三輪車プロジェクト (Tricycle project)のサテライトプロジェクトとして実施され、研究の成果が学術誌 *Science of the Total Environment* 誌 (impact factor 8.2)

に 2024 年 10 月 21 日付でオンライン掲載 ([https://authors.elsevier.com/sd/article/S0048-9697\(24\)07058-X](https://authors.elsevier.com/sd/article/S0048-9697(24)07058-X) [first online publication])されました。

【背景】

新規抗菌薬の開発が遅滞する中、ESBL 産生菌、CPO 等の薬剤耐性グラム陰性桿菌の世界的な蔓延は治療抗菌薬の選択肢が著しく狭められることや転帰不良に繋がることから今や地球環境問題へと進展し深刻な脅威となっています。経済学者 Jim O'Neill によれば、このまま AMR 対策を講じない場合、2050 年には薬剤耐性菌による死亡者数が世界で 1000 万人にまで達し、がんによる死亡者数を上回ると推定されています。そこで、WHO が提唱するワンヘルスの理念のもとヒトのみならずヒトを取り巻く生活圏と密接に関わる要因を包括したヒト-動物-環境インターフェースにおける薬剤耐性菌の広がりヒトへの影響を明らかにすることが喫緊の課題となります。

下水環境は薬剤耐性菌や耐性遺伝子の主要なリザーバーであり、耐性遺伝子の水平伝播及び多様化の潜在的なホットスポットとして認識されつつあります。特に病院から市中下水システムへと排出される病院下水は、ESBL 産生菌や CPO を高濃度に含む可能性があります。そのため病院下水中における臨床上重要な薬剤耐性菌の分布や動態等を監視し、AMR 対策に資する必要がありますが、いまだ疫学的調査は不十分です。

本研究では病院下水が ESBL 産生菌や CPO、さらには未認識の薬剤耐性菌、耐性遺伝子及びこれを担うプラスミドなどの可動性遺伝因子 (MGE)の潜在的な供給源であるかどうかをよりよく理解するために、定量解析による病院下水の 1 年間のモニタリングを実施しました。特に我々は、*E. coli* 総菌数に占める ESBL 産生 *E. coli* の割合、ESBL 遺伝子およびカルバペネマーゼ遺伝子ならびにこれらの耐性遺伝子を保有する宿主の菌種およびクローン系統の経時的動態の解析にフォーカスをあてています。

【研究手法・成果】

2021 年 1 月から 11 月の間に隔月 6 回採取した千葉県医療施設の病院下水試料を対象とし、*E. coli* 及び ESBL 産生 *E. coli* の定量的検出にはそれぞれ TBX 寒天培地及びセフトキシム 4 µg/mL 含有 TBX 寒天培地を用いました。また、CPO の定量的検出には mSuper CARBA およびイミペネム 1 µg/mL 含有マッコンキー培地を用いました。さらに検出された ESBL 産生 *E. coli* 140 株、DHA-1 産生 *E. coli* 31 株及び CPO 26 株全株の全ゲノム解析を実施しました。

病院下水の 1 年間のモニタリングから *bla*_{CTX-M} 保有 ESBL 産生 *E. coli* の経時的動態に 2 つの変化が認められました。1 つは *E. coli* 総菌数に占める *bla*_{CTX-M} 保有 *E. coli* の割合が、1 月 (25%)、3 月 (1%)、5 月 (19%)に比べて 7 月 (95%)に顕著に増加していたことです (図 1)。しかしながらこれらの割合と、同施設のヒト臨床材料由来株で算出された ESBL 産生 *E. coli*/*E. coli* 総菌数の割合との間に関連性は認められませんでした。もう 1 つの注目される変化として、9 月と 11 月にはこれらの *bla*_{CTX-M} 保有 *E. coli* が検出されず、代わりに AmpC 産生菌の *bla*_{DHA-1} 保有 *E. coli* がそれぞれ 28%と 3%の割合で出現する劇的な変化が見られました。

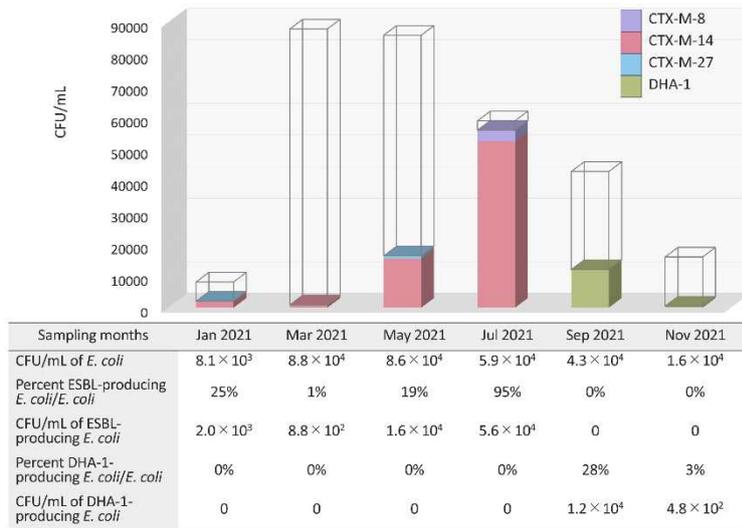


図 1. 2021 年 1 月から 11 月採取の病院下水試料における *Escherichia coli* 総菌数 (CFU/mL) 及び ESBL 産生 *E. coli*/DHA-1 産生 *E. coli* の検出率の経時的推移

*bla*_{CTX-M} 保有 ESBL 産生 *E. coli* 140 株の中では *bla*_{CTX-M-14} 保有株 (132 株, 94.3%) が最も多く検出され、主にヒト腸管外病原性クローン B2-O25b:H4-ST131-H30R/non-Rx 系統株 127 株と関連していました。また、*bla*_{DHA-1} 保有 *E. coli* 31 株は主に clade I-O8:H33-ST3910-H1074 系統株と関連していました。*bla*_{CTX-M-14} 保有 *E. coli* B2-O25b:H4-ST131-H30R/non-Rx はゲノム配列の相同性解析により 2 つのクレードに大別されることを明らかにしました。20 株で形成されるクレードはキノロン耐性因子に加えアミノグリコシド耐性遺伝子を保有し、107 株のクレードはこれらに加え、複数の耐性遺伝子を保有し多剤耐性菌と推定されました (図 2)。さらにこれらの 2 つのクレードの間で保有プラスミドのレプリコンプロファイルが異なっていました。これらの知見から、*bla*_{CTX-M-14} 保有 *E. coli* B2-O25b:H4-ST131-H30R/non-Rx 系統株の 2 つの異なるクレード株のクローン性拡散と継続的検出の結果として病院下水中に *bla*_{CTX-M-14} 保有株が優位に検出された可能性が示唆されます。

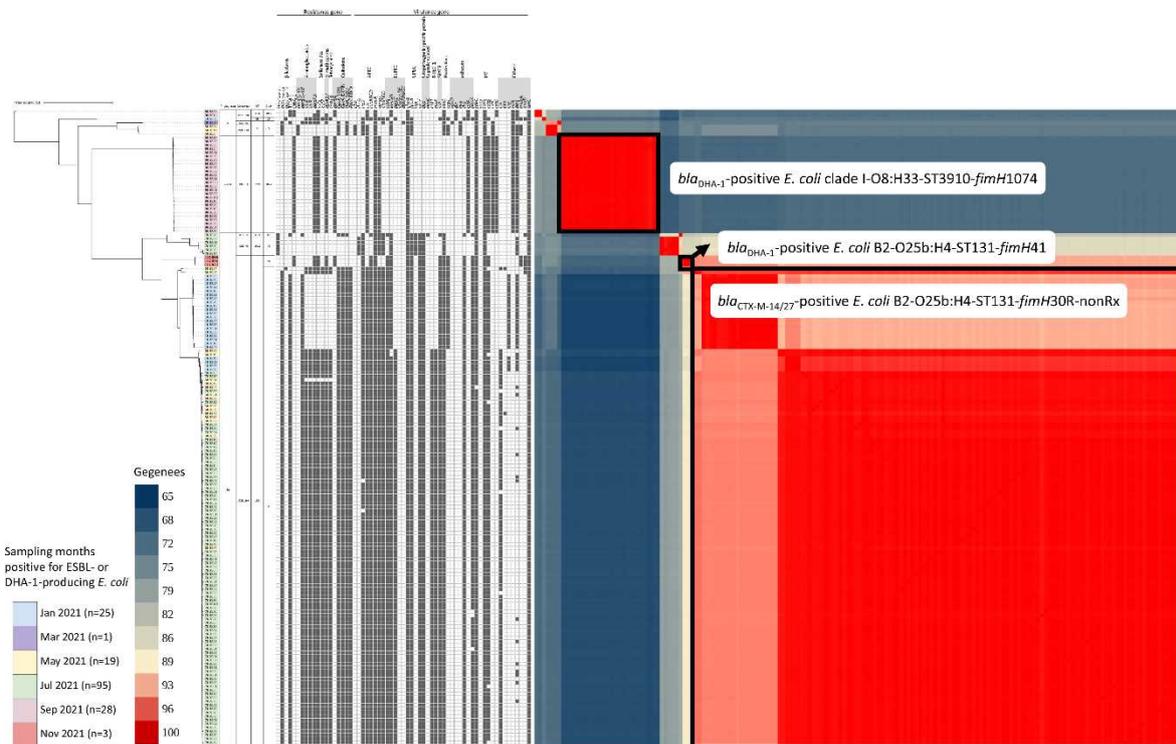


図 2. 病院下水由来 ESBL 産生 *E. coli*/DHA-1 産生 *E. coli* 171 株のゲノム系統解析

CPO の検出菌数は $4.0 \times 10^{-1} \sim 4.7 \times 10^3$ CFU/mL の範囲となり、7月に比べて11月で有意に多い結果となりました。CPO 代表株 26 株の菌種の内訳は、*Aeromonas* 属 4 菌種が 20 株 (76.9%)と優位で、次いで *Enterobacter* 属 2 菌種 3 株、*Klebsiella michiganensis* 2 株、*Pseudomonas* sp. 1 株となりましたが、これらと疫学的関連性のある CPO は研究期間中に臨床材料由来株からは検出されませんでした。保有カルバペネマーゼ遺伝子は *bla*_{IMP-1} が最も多く (57.7%)、*bla*_{GES-24} (34.6%)、*bla*_{GES-4} (7.7%)がこれに次いでおり、全て class 1 integron に担われていました。特に *bla*_{IMP-1} 保有 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ST860、*bla*_{IMP-1} 保有 *A. caviae* ST1067、*bla*_{GES-24} 保有 *A. caviae* ST1066 など同一カルバペネマーゼ遺伝子を保有する同一遺伝系統の細菌種が継続して検出されていることが明らかとなりました (図 3)。さらに *A. caviae* ST1067 株と *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ST1068 株 (1KHC2)が同じ *bla*_{IMP-1} の周辺構造を共有していたことや、*E. asburiae* ST24 株と *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* ST133 株が、同じ *bla*_{IMP-1} の周辺構造を共有していたことも注目すべき知見でした。これらの知見から、プラスミドやトランスポゾンなどの MGE による *bla*_{IMP-1} 遺伝子の *Aeromonas* 属菌や *Enterobacter* 属菌の間での種間伝播が示唆されます (図 3)。サンキーダイアグラム (図 4)に示すように *bla*_{IMP-1} 保有 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ST860 が 6 試料中 5 試料から繰り返し検出された結果、総菌数が CPO 全体の 79%を占めるに至り、病院下水中に本クローンが定常的に存在することが示されました。

我々の知見から、薬剤耐性菌および耐性遺伝子/プラスミドが、汚染された配管システムを通じて病院環境中に拡散し、院内感染のリスクを高める可能性が懸念されます。さらにこれらの薬剤耐性菌や耐性遺伝子/プラスミドが環境水路を通じて地域社会に拡散し、公衆衛生上のリスクを増大させる可能性も考えられます。従って、種々抗菌薬残存下・富栄養下にある病院下水環境における薬剤耐性菌、耐性遺伝子の定着・拡散に対する監視の必要性を強調するものです。

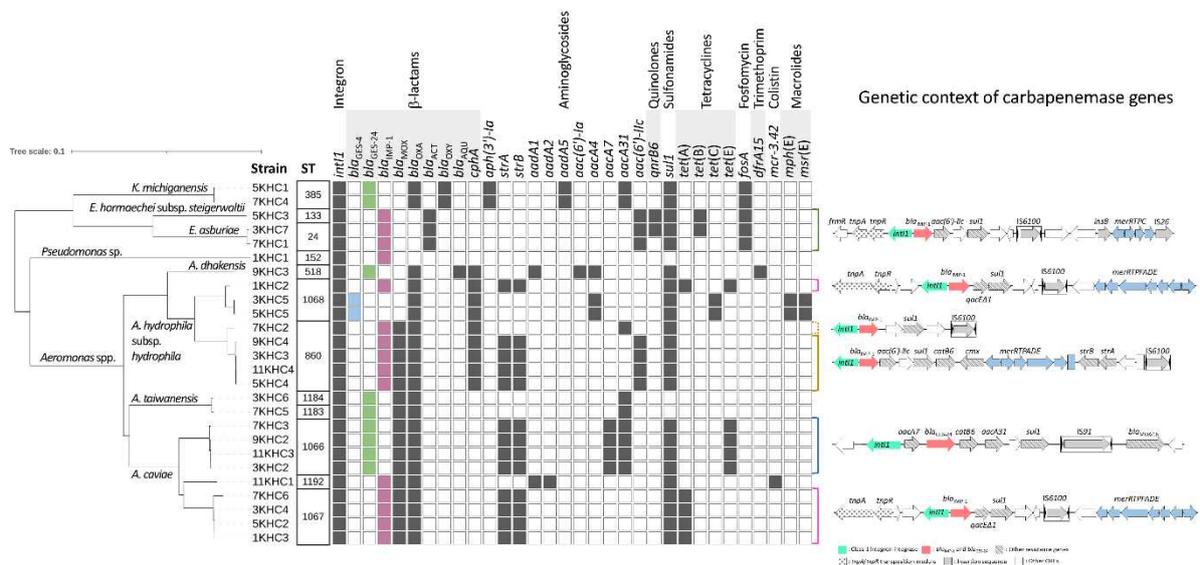


図 3. 病院下水由来 CPO 26 株の系統解析、保有薬剤耐性遺伝子プロファイル及びカルバペネマーゼ遺伝子の周辺構造

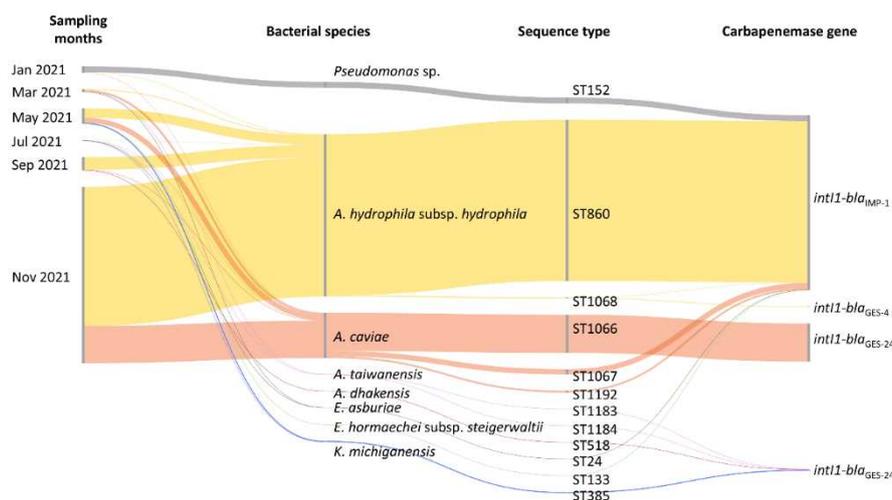


図 4. 病院下水 6 試料由来 CPO の菌種、 sequence types、 保有カルバペネマーゼ遺伝子とインテグラーゼ遺伝子の分布を示すサンキーダイアグラム

【波及効果・今後の予定】

我々はこれまでに動物や環境 (医療環境を含む)、鳥類などを対象に AMR の研究を行い、解析知見を蓄積してきています。その結果、AMR 問題はヒトを対象とする医療機関における対策のみでは解決できない複雑な問題であり、今後も医療・環境・食品・動物を跨いだ分野横断的なアプローチに主軸をおいた俯瞰的な研究を展開していく必要があると考えています。

【論文タイトルと著者】

タイトル : Temporal dynamics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in hospital wastewater

著者 : Mizuki Tanabe, Tomohiro Denda, Yo Sugawara, Daiki Kaji, Kanae Sakaguchi, Shino Takizawa, Shota Koide, Wataru Hayashi, Liansheng Yu, Shizuo Kayama, Motoyuki Sugai, Yukiko Nagano, Noriyuki Nagano*
Tanabe M and Denda T contributed equally to this work.

*Corresponding author

掲載誌 : Science of the Total Environment 2024; 955: 176901

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176901>

URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896972407058X>

【研究助成】

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「WHO サーベイランスと協調したワンヘルス薬剤耐性菌動向調査に係る研究」(代表: 菅井基行)の支援を受け、分担研究(分担者: 長野則之)として実施されました。

【問い合わせ先】

〈研究内容に関する問い合わせ先〉

信州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 特任教授 長野則之

メールアドレス : naganon@shinshu-u.ac.jp

〈報道に関する問い合わせ先〉

国立大学法人信州大学 総務部総務課広報室

Tel: 0263-37-3056 Fax:0263-37-2182

メールアドレス : shinhp@shinshu-u.ac.jp