

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「医療と環境の薬剤耐性に関する研究」

研究分担者： 金森 肇 東北大学大学院医学系研究科 総合感染症学分野・講師

研究要旨

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、各分野の取り組みが実施されている中、ワンヘルス・アプローチの観点から環境中の薬剤耐性がヒトに与える影響を解明することは、本邦における薬剤耐性対策を推進していく上で重要である。このような背景から環境中の薬剤耐性に関する調査法を確立し、環境 AMR のヒトに対するリスク評価が求められている。令和元年度の本研究では、メタゲノム解析法と培養法を用いて病院排水の薬剤耐性の実態調査を行い、環境 AMR モニタリング体制の確立に向けた研究を実施した。病院排水由来の薬剤耐性因子のゲノム解析を行うことで、病院排水の薬剤耐性の特徴を明らかにした。病院排水の環境 AMR 調査を実施した研究はまだ限定的であることに加えて、環境 AMR に関する国内のエビデンスが不十分なことから、病院排水を含む環境中の薬剤耐性とヒトへのリスクに関する研究を継続していく必要がある。

研究協力者：

馬場 啓聡

東北大学大学院医学系研究科 感染制御
インテリジェンスネットワーク寄附講座
助教

勝見 真琴

東北大学病院 検査部
副臨床検査技師長

黒田 誠

国立感染症研究所
病原体ゲノム解析研究センター
センター長

関塚 剛史

国立感染症研究所
病原体ゲノム解析研究センター
第三室長

A．研究目的

本邦の医療機関からの病院排水は、市中の下水道に合流し、最終的には下水処理場に到達する。下水処理場への流入水における抗菌薬および耐性菌の主要な供給源は医療施設で

あり、廃棄物が耐性菌を運ぶ場合、環境中の

耐性菌への曝露によって感染リスクが高まる可能性が指摘されている(1)。環境への薬剤耐性の拡がりヒトへのリスクが懸念されているが、本邦の病院排水の環境 AMR 調査はいまだ限定的である。

本分担研究では、医療と環境の薬剤耐性の関係性を理解するために病院排水の薬剤耐性因子の特徴を明らかにし、病院排水の薬剤耐性の実態調査や文献レビューを行い、環境 AMR のヒトへのリスクを評価することを目的とした。令和元年度では、以下の研究を行った。

- 1) ゲノム解析による病院排水の薬剤耐性モニタリング体制の構築：大学病院含む医学部キャンパスの下水における環境 AMR 調査
- 2) 医療と環境 AMR に関する国内外の文献レビューとリスク評価

B．研究方法

1．ゲノム解析による病院排水の AMR 調査

次世代シーケンサーを用いた病院排水のメタゲノム解析を行い、病院排水由来の細菌種および薬剤耐性因子を同定した。また、分離された薬剤耐性菌の全ゲノム解析を行った。

大学病院 A と医学部 A キャンパスの下水における環境 AMR 調査 (2019 年 7 月 ~ 9 月、2020 年 1 月) を実施した。

2019 年 7 月 ~ 9 月に計 3 回にわたり大学病院 A と医学部 A キャンパスの 6 カ所から下水を 500 mL 採水し、0.2 μm フィルターを使用して浮遊物を回収した。原液 1 mL を 100 μl フェノ・クロ溶液とビーズチューブに混合し、GenoGrinder 2010 ビーズ破砕法により回収フィルターから微生物由来の DNA を調整した。QIAseq FX DNA library キットで DNA-Seq ライブラリーを作成した。Illumina NextSeq 500 を用いて、塩基配列を解読した。解読リードを MePIC2 メタゲノム解析ツールで微生物種を分類し検出数を算出した。下水サンプル毎の多様性を MEGAN ツールで評価した。ResFinder および NCBI AMR database を使用し、薬剤耐性因子を検索した。

2020 年 1 月に採水された病院排水の調査では、ヒトでの輸入症例および大規模な院内感染事例の原因となる多剤耐性菌を優先して環境から分離を試みた。選択培地 (mSuper CRABA, CHROMagar ESBL) を使用し、分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌、ESBL 産生菌を収集し、全ゲノム解析を行った。

2. 医療と環境 AMR に関する文献情報

環境 AMR の文献レビューを行うために、「医療と環境 AMR」をテーマに PubMed、Google で論文検索を行った。令和元年度においては、医療や病院排水を含む環境 AMR に関して本邦から報告された文献を中心に検索した。収集した文献情報を環境 AMR website (<https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr>) に登録し、環境 AMR の専門家である本研究班の班員と情報共有および意見交換を行った。

U.S. Centers for Disease Control and Prevention (米国疾病予防センター)、UK Science & Innovation Network (英国科学イノベーションネットワーク)、および Wellcome Trust (ウェルカムトラスト) から発表された、「環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ (Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the

Environment)」(1)を翻訳し、海外における環境 AMR の現状と課題を分析した。

(倫理面への配慮)

環境中における AMR 調査法と体制整備に関する研究であり、人を対象とする医学系研究に関する指針における研究には該当しないため、倫理委員会での審査は不要と判断された。微生物ゲノムデータの取り扱いに関しては、セキュリティー対策を実施して、研究を行った。

C. 研究結果

1. ゲノム解析による病院排水の AMR 調査

病院排水のメタゲノム解析結果では、総解読リード数を分母にして、病院排水、非病院排水ともに *Burkholderia* 属、*Bacteroides* 属の割合が高かった(図 1)。一方で、病院排水は非病院排水と比較して、*Staphylococcus* 属の割合が高く、特に *Staphylococcus epidermidis* において顕著であった。AMR 薬剤耐性因子の RPKM (reads per kilobase per million reads) 解析では、病院排水と非病院排水ともに主要な薬剤耐性遺伝子はアミノグリコシド系、βラクタム系、マクロライド系、テトラサイクリン系であった(図 2)。病院排水では βラクタム系の薬剤耐性遺伝子の割合が非病院排水と比較して高く、特に *blaZ*、*blaR1*、*cfxA*、*blaI* を多く認めた。

病院排水から分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌では、*bla_{AMP-1}* と *mcr-9* を同時に保有する *Klebsiella pneumoniae*、*bla_{GES-4}* と *mcr-9* を同時に保有する *Enterobacter kobei*、*bla_{AMP-1}* を保有する *Citrobacter freundii* が検出された。また、ESBL 遺伝子では *bla_{CTM-M-9}*、*bla_{CTM-M-14}*、*bla_{CTM-M-15}* が検出された。

2. 医療と環境 AMR に関する文献情報

医療や病院排水を含む環境 AMR に関する国内の文献は 10 報 (2003 年 ~ 2019 年) であり、限定的であった。病院排水の研究は世界的に見てもまだ限られており、国内での状況もほとんどわかっていない。過去に病棟内のシンクや汚染槽からカルバペネマーゼ産生菌

が検出された事例(2)や、病院の排水管に関連したカルバペネム耐性菌によるアウトブレイク(3)が報告されている。また、病院排水からは CRE をはじめとした薬剤耐性菌や各種抗菌薬の成分が検出され(4)、特に耐性菌の割合は家庭排水に比べ病院排水において多い(5)ことが報告されている。一方、病院排水から下水処理場流入水への負荷よりも、下水処理場から河川水への負荷の方が大きいとの報告(6)や、下水処理場の二次処理水は流入水に比べ耐性菌の割合が高い(5)などの報告があり、地表水に放出される前に下水処理施設で環境汚染負荷を減らしていくことの重要性が示唆されている。実際に、本邦における河川中の耐性菌の存在については、既に複数の県・地域から報告があった(7,8)。

環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ現状と課題(原文: **Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges. 2018**)は、2020年3月25日にAMR臨床リファレンスセンターの website で公開された(<http://amr.ncgm.go.jp/medics/2-8-1.html#sonota>)。環境中の耐性菌や抗菌薬が人の健康に及ぼす影響については未解明な部分が多いが、少なくとも環境中の耐性菌への感染リスクは存在する。人及び動物からの排泄物中には、薬剤耐性菌や抗菌薬が存在し、不適切な排泄物の処理はこれらによる環境汚染につながるため、基本的な衛生の維持がその予防に重要である。また、抗菌薬の製造過程で発生する廃棄物や、農薬に含まれる抗菌薬による環境汚染の可能性が以前から指摘されているが、これらに対するモニタリングや予防手段に関する検討は少なく、地域によってはその実態すら明らかでない。AMR 拡散阻止のため、これらに対する世界規模の取り組みが必要である。

D. 考察

今回、病院排水の薬剤耐性の調査法として、メタゲノム解析法と培養法を行い、病院排水由来の薬剤耐性菌を対象に薬剤耐性遺伝子を中心としたゲノム解析を行い、薬剤耐性の特

徴を明らかにした。

病院排水のメタゲノム解析法で検出された薬剤耐性遺伝子は臨床ではあまり問題とならないβラクタマーゼ遺伝子が多く検出され、環境菌由来と考えられた。また、診療や感染管理で問題となるESBL遺伝子やカルバペネマーゼ遺伝子などの薬剤耐性遺伝子も検出されたが、検出割合は比較的になかった。各薬剤耐性遺伝子の割合に一定の傾向はみられたものの、各薬剤耐性遺伝子の検出割合は異なっていた。病院排水の薬剤耐性遺伝子をメタゲノム解析法で定量的にモニタリングする際の課題として、下水の採水のタイミング、前処理方法、下水から抽出するサンプルDNA濃度の測定条件などが挙げられた。このような課題について検討した上で、メタゲノム解析法の各薬剤耐性遺伝子についてFPKM法を用いて国際比較検討を行う。

培養法では、CREやESBL産生菌を対象にし、国内で臨床上問題となるカルバペネマーゼ遺伝子やESBL遺伝子が病院排水から検出された。今後、臨床由来分離株と環境由来分離株のゲノム情報の比較検討を行う必要があると考えられた。また、カルバペネマーゼ遺伝子とコリスチン遺伝子を同時に保有する腸内細菌科細菌も分離された。最近、ヨーロッパでヒト由来のカルバペネマーゼ遺伝子(*bla_{VIM}*、*bla_{NDM}*、*bla_{OXA}*)と*mcr-9*を保有する*K. pneumoniae*、本邦でヒト由来の*bla_{AMP-1}*と*mcr-9*を保有する*E. cloacae*が検出されている(9,10)。病院排水をはじめとする環境水中の高度薬剤耐性菌の出現や、海外から国内への耐性菌の流入を早期に探知するために、環境水の薬剤耐性の監視が有用であるかもしれない。

病院排水のメタゲノム解析では、検出された薬剤耐性遺伝子がどの菌種に由来するか、染色体あるいはプラスミド上に存在するか、患者由来あるいは環境由来なのか、病院排水中の薬剤耐性遺伝子の伝達機序についても不明である。病院排水のAMRモニタリングを行う際には、メタゲノム解析法だけでなく、培養法で実際に分離された耐性菌のゲノム解析も併用して行うべきであると考えられた。メタゲノム解析法と培養法による病院排水の環境AMRリスクを評価する上で、さらなる

検討が必要である。今後、病院排水由来の薬剤耐性と使用される抗菌薬の消費量や臨床由来の薬剤耐性との関係は不明であるため、環境 AMR の観点から研究を行う。

医療と環境 AMR に関する国内の文献の検討では、病院環境や病院排水中の AMR による人に対する直接的なリスクを示した報告はなく、病院排水中の薬剤耐性因子を減少させる有効な介入策についても明らかではなかったが、病院排水中だけでなく家庭排水や下水処理場の流入水・処理水に対する AMR のモニタリングが重要であること、地表水に放出される前に下水中の環境汚染負荷を減らす努力が必要であることが示唆された。

E . 結論

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、各分野の取り組みが実施されている中、環境中の薬剤耐性がヒトに与える影響を解明することは、ワンヘルス・アプローチの観点から薬剤耐性対策を推進していく上で非常に重要である。令和元年度の本研究において、メタゲノム解析法と培養法を用いて病院排水の薬剤耐性を調査し、環境 AMR モニタリング体制の確立に向けた研究を継続した。病院排水のメタゲノム解析法と培養法により環境 AMR 調査を実施した研究はまだ少ない上に、環境 AMR に関する国内のエビデンスが不十分なことから、病院排水の調査法の確立や薬剤耐性の結果の解釈とリスク評価に関しては、今後の検討課題である。本研究班の研究結果および環境 AMR 文献レビューによる国内外の新たな知見を踏まえて、環境 AMR のヒトへのリスク評価を行い、薬剤耐性対策に役立てることが期待されており、病院排水の AMR モニタリングを継続し、病院排水を含む環境中の薬剤耐性とヒトへのリスクに関する研究をさらに推進していく必要があると考えられた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Ishikawa K, Hosaka T, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Hasegawa M, Kawazoe Y, Kushimoto S, Kaku M. *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia associated with drowning and river water as a source of infection, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2020 in press.

その他発表

金森肇. 溺水後に発症したクロモバクテリウム感染症と河川の環境調査. 救急感染症フォーラム、仙台、2019年4月

Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Kaku M. Genomic analysis of *Chromobacterium haemolyticum* causing near-drowning pneumonia and environmental investigation of river water as a source. 31stICC/4thGCCMID, Dubai, UAE November 2019.

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

【参考文献】

1. CDC. **Initiatives for addressing antimicrobial resistance in the environment: current situation and challenges2018; London, England. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/61374> (Last accessed April 21, 2020)**
2. 林 航, 他. 病院内シンクから検出されたカルバペネマーゼ産生菌: 薬剤耐性菌のリザーバーとしての病院内環境の重要性. *IASR.* 2019;40:28-9.
3. Yomoda S, et al. **Presence of *Pseudomonas putida* Strains Harboring Plasmids Bearing the Metallo- β -**

- Lactamase Gene blaIMP in a Hospital in Japan. J Clin Microbiol. 2003;41:4246-51.**
4. 東 剛士, 他. 医療機関を対象にした新規水処理技術の開発. 薬学雑誌. **2018;138:289-96.**
 5. 諏訪 守, 他. 生活用水のバイオセーフティ: 下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の実態. バムサジャーナル. **2015;27:7-11.**
 6. Azuma T, et al. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. *Sci Total Environ.* **2019;657:476-84.**
 7. 佐々木 美江, 他. 宮城県の河川等における薬剤耐性菌. 宮城県保健環境センター年報. **2008;26:31-4.**
 8. Nakamoto S, et al. Environmental Distribution and Drug Susceptibility of *Achromobacter Xylooxidans* Isolated from Outdoor and Indoor Environments. *Yonago Acta Meditica.* **2017;60:67-70.**
 9. Wang Y, et al. Detection of mobile colistin resistance gene *mcr-9* in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains of human origin in Europe. *J Infect.* **2020;80:578-606.**
 10. Kananizadeh P, et al. Emergence of carbapenem-resistant and colistin-susceptible *Enterobacter cloacae* complex co-harboring *bla_{IMP-1}* and *mcr-9* in Japan. *BMC Infect Dis.* **2020;20:282.**

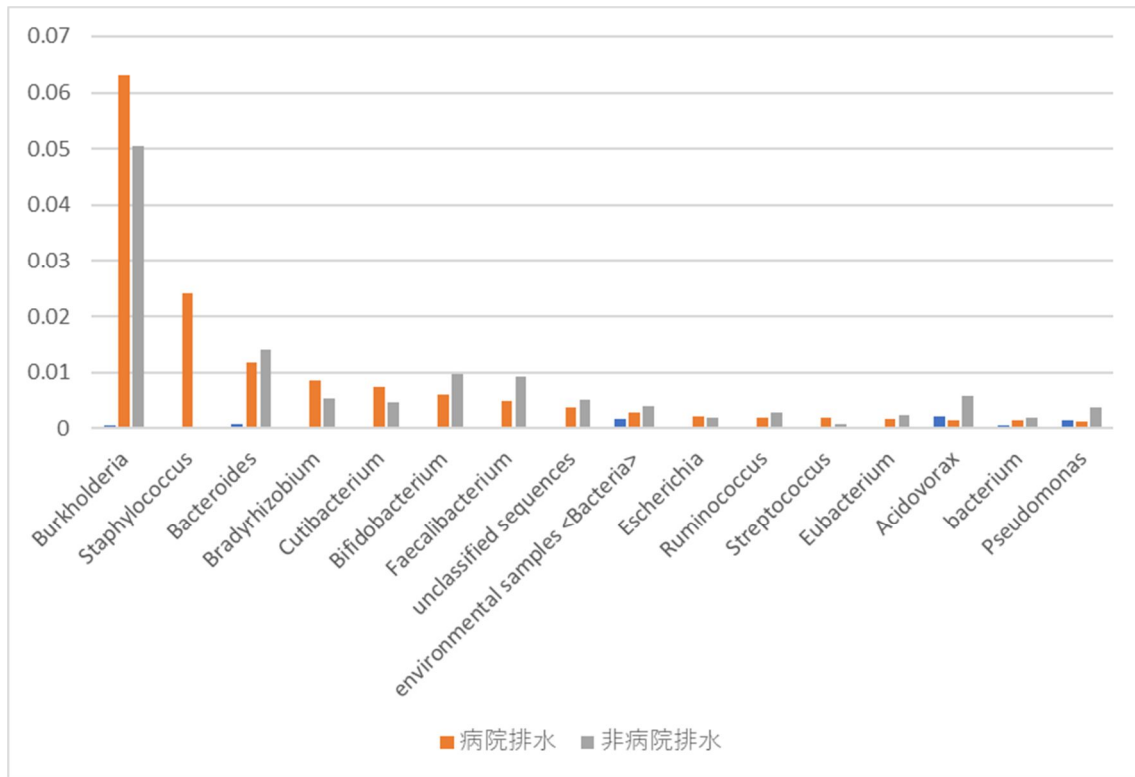


図1 メタゲノム解析による病院排水の細菌種

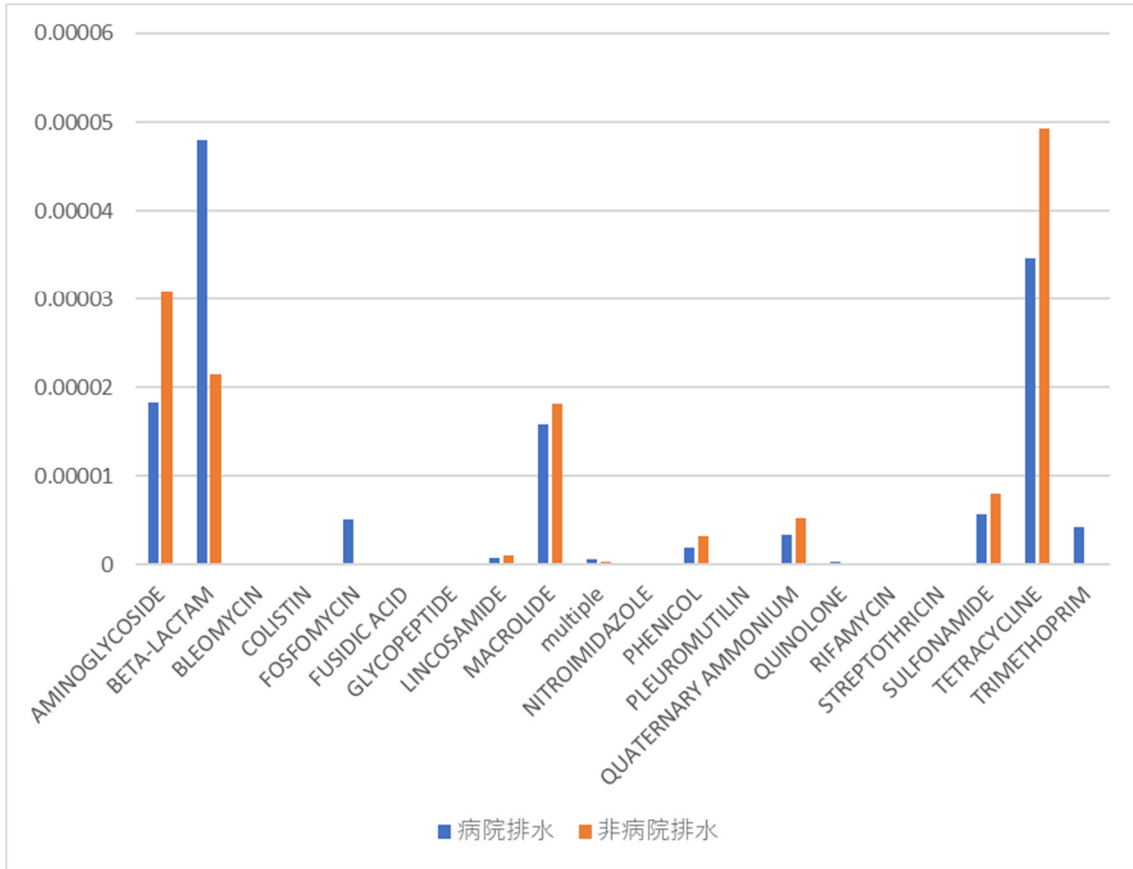


図2 メタゲノム解析による病院排水の薬剤耐性