

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： 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

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、厚労(ヒト)・農水(動物)各分野の取り組みが実施されている中、環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬のヒト・動物に与えるリスクを評価する手法を確立し、環境分野の薬剤耐性への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に関する施策を推進していくために非常に重要である。

そこで本分担研究にて以下の項目について整備した。1) 環境 AMR モニタリングに資する水再生センター(下水処理場)放流処理水のメタゲノム解析法の作業手順書を確立した。2) 全国レベルの環境 AMR モニタリングのため、分担者・山口進康(大阪健康安全基盤研究所)と連携して、今年度は34 地方衛生研究所から計 59 箇所の放流処理水を収集できた(2019 年 8-9 月、2020 年 2-3 月、2020 年 7-9 月および 2021 年 2-3 月)。地方から送付された 59 箇所の放流水検体と東京湾岸 1 検体の計 60 箇所のメタゲノム解析の結果、処理場管轄の地域事情に見合った細菌種を検出し、多様な薬剤耐性遺伝子(AMR gene: ARG)とカルバペネマーゼ遺伝子の存在が明らかになった。本成果のまとめを薬剤耐性(AMR)アクションプラン 2019 そして 2020 として厚労省 web サイトから公開されている。

(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>)

さらなる調査として処理場・放流水から薬剤耐性菌(AMR bacteria; ARB)の生存を調査した。東京湾岸の水再生センター・放流水からカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(KPC-2 産生肺炎桿菌)および KPC-2 産生 *Aeromonas* 属菌と NDM-5 産生大腸菌のゲノム情報を論文報告している。KPC-2 および NDM-5 保有腸内細菌科細菌は本邦の臨床現場においても分離頻度は非常に稀であり、放流水から容易く分離されたことについてはその原因をより詳細に検討すべき調査結果であると判断された。

研究班全体の達成目標である環境 AMR システマティック・レビューのため、国内外の文献情報 30 報を収集し、班員が情報共有できる閲覧サイトを構築し管理した。また、Wellcome Trust 財団から公開された「環境における薬剤耐性問題への取り組み ”Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment (2018 年版)”」の農業分野の項目の英文翻訳を担当した。

研究協力者

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
糸川 健太郎 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・主任研
金森 肇 東北大学 医学系研究科・講師
山口 進康 大阪健康安全基盤研究所
河原 隆二 大阪健康安全基盤研究所
安達 史恵 大阪健康安全基盤研究所
他 32 自治体の地方衛生研究所・環境部門

A. 研究目的

近年、医療施設・市中・家畜のみならず、世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性 (Antimicrobial Resistance: AMR) 因子が検出され、環境での薬剤耐性対策を含むワンヘルス・アプローチが注目されている。環境汚染の多くが工場および生活排水の下水処理工程に起因すると想定され、WHO 支援の元、世界の下水処理施設の薬剤耐性菌調査が日本を含む 70 カ国以上の参加国で進行中である (Global Sewage Surveillance Project: <https://www.compare-europe.eu/Library/Global-Sewage-Surveillance-Project>)。

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌拡大とヒトへのリスクが懸念される中、現状では、環境由来の薬剤耐性菌が生活環境へ循環し健康被害が認定された実例はなく、ヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。また、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態も不明である。したがって、環境がヒト及び動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立が急務である。

本研究では、1) 環境由来の薬剤耐性菌に曝露されることのヒト及び動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性についての国内外の資料を収集し、システマティックレビューを実施する。2) 環境水の薬剤耐性を評価するための方法を確立し、サーベイランスを実施することで、本邦における環境水の薬剤耐性菌と薬剤耐性遺伝子 (ARG) 及び残留抗菌薬の実態を調査する。3) 環境由来薬剤耐性菌のゲノム情報を解析し、本邦の臨床・家畜由来薬剤耐性菌のゲノム情報データベースと比較検討することで、薬剤耐性ゲノムの観点からワンヘルス・アプローチの完成を図る。これらの研究結果を統合し、環境中の薬剤耐性や抗微生物薬がヒト及び動物へ与える影響についてリスクアセスメントを行う。

B. 研究方法

1. 環境 AMR モニタリングに資するメタゲノム解析法作業手順書の作製

水再生センター (下水処理場) の放流地点から放流水原液を採水し、次世代シーケンサー (NGS) を用いたメタゲノム解析による生物種および薬剤耐性因子の配列同定までの作業手順を検討した。詳細は図 1 に示す。

500 mL 採水を 0.2 μm フィルターにより細菌以上の大きさを有す浮遊物を回収した。GenoGrinder 2010 ビーズ破砕法により回収フィルターから生物由来の 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、Illumina NextSeq 500 にて配列解読を実施した (図 1)。

解読リードを MePIC2 メタゲノム解析ツールで生物種を分類と検出数を算出し、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 を参照して、薬剤耐性因子の同定・検出数を算出し、RPKM (Reads Per Kilobase of gene per Million mapped reads) 法を採用し、相対的な ARG 濃度を算出して検体間の比較解析を実施した。

2. 水再生センター・放流水からのカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離とゲノム情報解析

東京近郊の水再生センター 8 箇所から採水した処理放流水からセフェム系薬剤耐性腸内細菌科細菌の分離を試みた。50 mL 放流水を遠心し、細菌沈渣を CHROMagar ESBL 選択培地に塗布し、36 度 18 時間で培養した。

分離株のうち、Carba NP test でカルバペネマーゼ活性を示す菌株をカルバペネマーゼ保有腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: CPE) として選別した。Illumina NextSeq 500 および PacBio Sequel SMRT sequencing にてゲノム解読を実施し、プラスミド配列を含む完全長ゲノム情報を取得した。

3. 環境 AMR に係る文献情報の情報共有サイトの構築

研究班員の専門分野で特筆すべき文献情報を収集し、各位のコメントを記載することで情報交換を円滑に行うサイトを構築した (<https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr>)

(図 8)。

文献レビューでは、環境 AMR の「水再生センター（下水処理場）に係る AMR 因子のゲノミクス」をテーマに PubMed で論文検索を行った。

C. 研究結果

1. メタゲノム解析法による環境 AMR モニタリング

500 mL 放流水から回収した 0.2 μm フィルターの 1/4 面積を用いるだけで十分な DNA 溶液を得た（平均 0.3 ng/μl）。東京都心を一つの指標にして比較検討したところ、有意に薬剤耐性因子の多い検体も含まれていた。

H31, R1 年度（2018, 2019 年度）の成果では、次世代シーケンサーによる環境水から ARG 等の網羅的配列解読法（メタゲノム解析）を構築し（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）、引き続き今年度は下水処理場・放流水サンプル（2019 年・夏および 2020 年・冬の計 111 サンプル）のメタゲノム解析を実施し評価した。臨床および家畜抗菌薬の ARG 配列データベースを元に、対象 ARG の解読リード数と相対的な ARG 濃度を算出して検体間の比較解析を実施した（図 2）。

昨年度報告では夏よりも冬期において ARG がやや多い傾向が見られたことを報告したが、2 年間（計 4 回）の継続調査により、ARG が継続的に増加傾向であるとともに、その主要因としてサルファ剤（Sulphonamide）およびテトラサイクリン耐性遺伝子が有意に高く検出された（ $p < 0.01$ ）。

一方、下水処理場・放流水中のマクロライド耐性遺伝子は顕著な減少を示し、ヒトに対するマクロライド系薬の使用が減少したことを反映する結果が得られたものと考えられた。

また、キノロン耐性遺伝子においても同様の減少傾向が見られ、ヒトに対するキノロン系薬の使用量が減少したこととの関連が示唆されるが、キノロン耐性大腸菌の分離状況とは乖離が見られた。

本研究班におけるメタゲノム解析では外来性獲得である *oqx* および *qnr* 遺伝子を検出対象としているため、キノロン剤阻害ターゲットである *gyrA* および *parC* 遺伝子上のキノロン耐性決定領域（quinolone resistance-

determining regions: QRDR）の変異は判定していない。

本研究班のメタゲノム解析法は世界的なメタゲノム解析法に準じたものであり、各国からの報告と比較する上においても重要な情報提供ができたと考えている。

引き続き、自治体のご協力を仰ぎながら年 2 回（夏および冬）の全国調査を実施し、本邦の環境 AMR レジストームの基盤を整備していく予定である。

2. 臨床で問題となるカルバペネム耐性菌の放流水由来分離状況とゲノム解読実績

多摩川及び東京湾岸に隣接する水再生センターの放流処理水から海外型カルバペネマーゼ（KPC-2, NDM-5）を保有する腸内細菌科細菌株を分離し、環境においても既に海外型の侵入を示唆するデータが得られた（図 3）。

放流水の耐性遺伝子に加え、環境で生存し増殖する可能性を有する薬剤耐性菌の存在の特定は重要である。

東京湾沿岸の水再生センターから、臨床分離すら希少な KPC-2 産生肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* が分離されたこと、創傷感染症で稀に分離されるアエロモナス属が KPC-2 を保有していたこと、NDM-1 よりも広域活性を獲得した NDM-5 カルバペネマーゼを保有する大腸菌が分離されたこと等を報告しており、国内事情が少しずつ明らかになりつつある。

海外の汚染実態と同様、本邦環境水においても少なからず耐性菌が分離されており、より広範な実態調査が望ましい。

4. 「水再生センター（下水処理場）に係る AMR 因子のゲノミクス」の文献レビュー

website に登録した「水再生センター（下水処理場）に係る AMR 因子のゲノミクス」の論文等を計 30 報（昨年度 14 報）について検討した（図 5）。

D. 考察

厚労科研究班の編成により、34 自治体から計 59 箇所の放流水から環境 AMR 調査に資するチャレンジを継続して実施できた。（関係各位のご協力に感謝申し上げます）。現在、各

自治体の放流水情報は守秘義務をもって運用している。今後も守秘義務を遵守しながらも、得られた情報を総合データとして公開し、環境 AMR 調査の全国展開へ向けさらに協力体制を各自治体へ要請することが肝要と考える。メタゲノム解析による 薬剤耐性因子の検出は十分な“感度”を得て評価できたとは言いがたいが、収集した放流水サンプルを同一作業手順書にて一度に実施した広域調査であるため、各位データの比較解析は良好に実施できた。

東京都心サンプルと比較して、都市圏以外であっても総じて汚染度の高い放流水が地方の処理場で散見し、処理能力等が影響している可能性が示唆された。放流水から比較的平易にセフェム系耐性菌(ESBL 等) およびカルバペネマーゼ産生細菌を分離できることが示された。ESBL 産生大腸菌の健常者キャリアーの増加が懸念されている現状、健常者キャリアーと環境 AMR との関連性について深く検討する余地があるものと考え。特に、健常者キャリアーの割合が増加すれば、水再生センター放流水由来の耐性菌は増加すると推定されるため、環境リスクを評価する上でも普段から耐性菌が環境へ放流されるその実態を定量的に観察していくことが必須であろう。

本邦臨床でも分離頻度が至極稀な KPC-2 およびNDM-5産生腸内細菌科細菌において、東京湾岸の水再生センター・放流水から比較的平易に分離された事例は貴重な実態を示唆するものと考えている。医療上、優先度の高い薬剤耐性菌を環境 AMR の観点から分離培養を継続し、その株固有のゲノム情報から検出に至った経緯(菌種・耐性因子・病原性・地域・国)を追跡調査することで、国・地域全般の AMR 対策を実施するための貴重な基盤情報源になりうると考える。

「水再生センターの放流水に係る環境 AMR」を調査した国内外文献は少数ではあるものの、汚染リスクに係る実態の報告が増えつつある。欧米先進国であっても各種耐性菌が滅菌処理されずに放流されていることが明らかになり、今まさに環境リスク評価が進行中である。本邦でも定量的な環境調査をもってデータ収集し、環境負荷とそのリスクについて適正に評価できるよう体制を整備してくべきであろう。

E. 結論

本研究分担にて、環境 AMR モニタリングに資する作業手順書を確立し、さらに全国展開するための体制が整備された。また、同一プロトコールによる環境モニタリングの比較解析であることから、自治体特有の放流水による環境負荷の実態が遺伝子レベルで明らかにできた。この環境モニタリングを継続的に実施することで、管轄地域で発生している薬剤耐性菌の諸問題を事前に探知することが可能であると考えている。さらに、国内外から発信される文献情報を迅速に収集し、環境 AMR を基盤にした総合的なリスク評価へと繋げていきたい。

本研究は環境負荷をもたらす根源を追求するための第一歩であり、更なる研究推進と実態解明をもって、省庁横断的な施策が提言できるものと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. *Environ Microbiol Rep.* 2019 Aug;11(4):589-597. doi: 10.1111/1758-2229.12772. Epub 2019 May 31. PubMed PMID: 31106978; PubMed Central PMCID: PMC6851574.
2. Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Kuroda M. Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-coproducing *Escherichia coli* GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay. *Infect Drug Resist.* 2019 Jul 23;12:2243-2249. doi: 10.2147/IDR.S215273. eCollection

2019. PubMed PMID: 31413601;
PubMed Central PMCID: PMC6662510.

む)
なし

その他発表

1. Characterization of a *bla*_{KPC-2}-positive *Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas* spp. isolated from the effluent of urban wastewater treatment plants in Japan
○黒田誠, 関塚剛史, 瀬川孝耶, 橋野正紀, 稲嶺由羽。第 92 回日本細菌学会、口頭、札幌市
2. Global Genome Epidemiology Database (gGENEPID) 第 16 回日本台湾合同シンポジウム The 16th Japan-Taiwan Symposium on Infectious Diseases Tokyo, 口頭、東京
3. Global Genome Epidemiology Database (gGENEPID), Makoto Kuroda, Regional JPIAMR Workshop in Asia: Fostering Knowledge on Clinical Epidemiology, AMR Policy, Therapeutics and Diagnostics to Combat AMR in Asia. Oral presentation. Suwon in South Korea.
4. 細菌ゲノミクスを支援する Global Genome Epidemiology Database (gGENEPID)の開発 関塚剛史、谷津弘仁、糸川健太郎、○黒田誠。第 93 回日本細菌学会、口頭、名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含

500 mL の放流水・表層を採水



Corning® Easy-Grip round, plastic, storage bottles
bottle capacity 500 mL

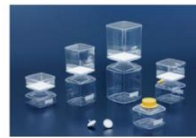
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/clis430282?lang=ja®ion=JP>

■ 27自治体から計46箇所の放流水

- 採水箇所の GPS (N, E)
- 日時
- 水温
- 気温
- 採取時の写真

↓ その日のうちに

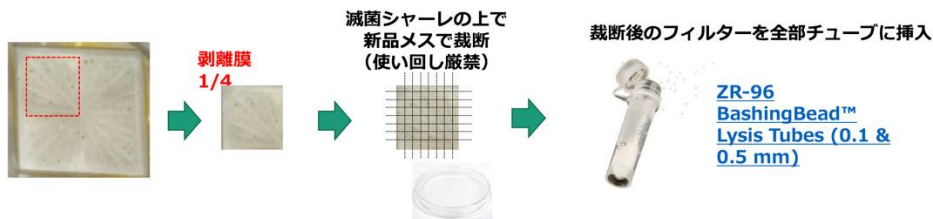
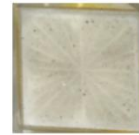
放流水を全部 Filter trap して、メンブレンをメスで剥離



TPP Rapid Filtermax Vacuum Filtration, 500 mL bottle
Large 49 sq. cm square PES 0.2µm membrane

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z760900?lang=ja®ion=JP>

■ 剥離メンブレンの写真



QIAseq Fx DNA library kit にて DNA-seqライブラリー作成 (4.0 ng/µl を2.5 µl 使用、8 cycle) 酵素による断片化処理とアダプターの付加電気泳動により目的の長さのDNAを入手する <https://www.qiagen.com>

次世代シーケンサー
Next Generation Sequencer | NGS

- 大量のDNA配列を解読可能
- インデックス付加による複数サンプルの同時解読



NextSeq 500 解読
150-mer, single-end

図 1. 水再生センター（下水処理場）放流水から次世代シーケンサーによるメタゲノム解析までの作業手順

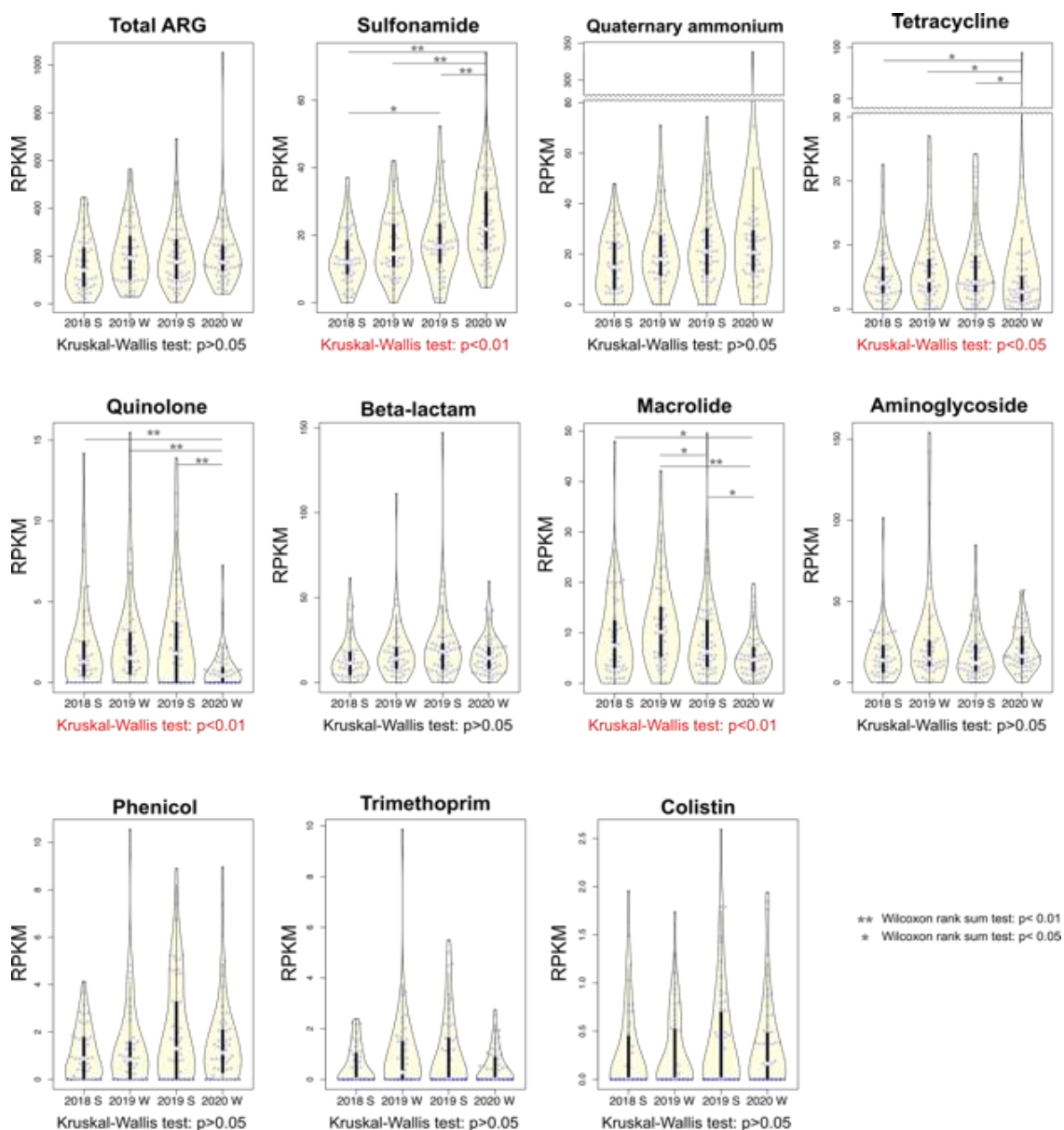


図2 2018年(夏・冬)、2019年(夏)および2020年(冬)の下水処理場・放流水47-60箇所から採取した主要なカテゴリーの薬剤耐性遺伝子(ARG)

RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads) 法によりメタゲノム解読リード総数で ARG 検出量を標準化した。本成果は、薬剤耐性 (AMR) アクションプラン 2019, 2020 として厚労省 web サイトから公開されている。

(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>)

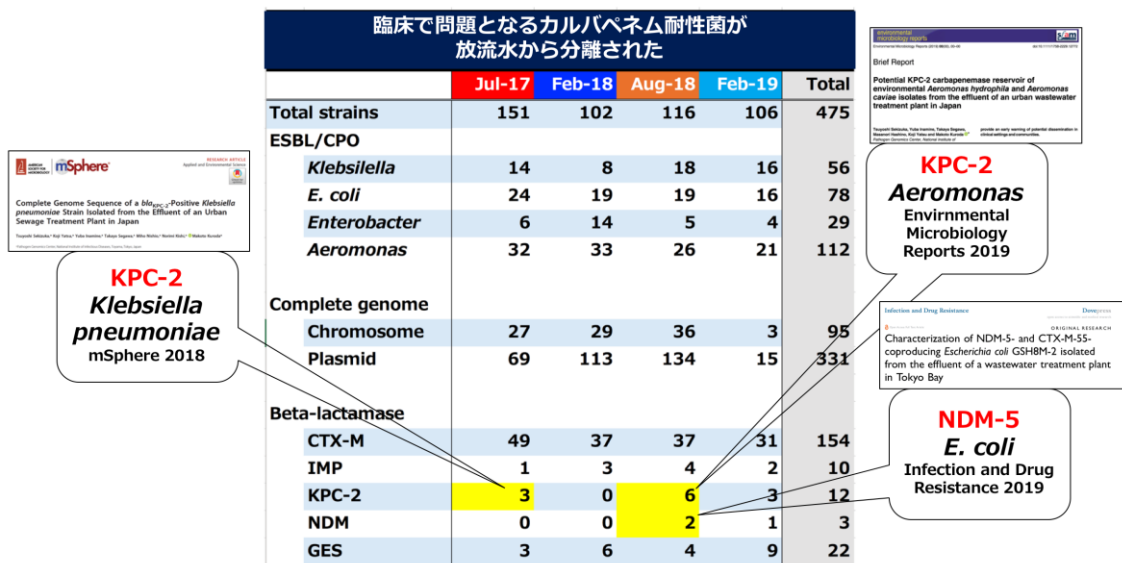
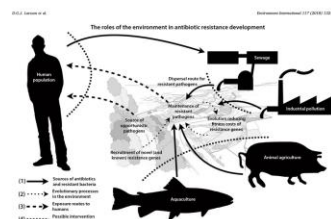


図3 臨床で問題となるカルバペネム耐性菌の放流水由来分離状況とゲノム解読実績

多摩川及び東京湾岸に隣接する水再生センターの放流処理水から海外型カルバペネマーゼ (KPC-2, NDM-5) を保有する腸内細菌科細菌株を分離し、環境においても既に海外型の侵入を示唆するデータが得られた。放流水の耐性遺伝子に加え、環境で生存し増殖する可能性を有する薬剤耐性菌の存在の特定は重要である。

Systematic Review 環境AMR



Create >	Project List >									
	秋庭	金森	黒田	山口	渡部	楠本	Total			
Paper	14	23	30	16	11	9	103			
Ranked	23	98	94	42	0	36				
Not Ranked	80	5	9	61	103	67				
CATEGORY	Clinical (Hospital)	Community (Healthy subject)	Farm animal	Wild animal	Food	River	Sea	Soil	Other environments	Total
Category	24	10	2	9	1	29	2	5	21	103

ecological study subject) 19:31:59)

Summary/Note: JANISサーベイランスシステムにより2015年から2016年、全国47都道府県におけるレボフロキサシン耐性大腸菌の事例に関する情報を収集した。また、医薬品販売データよりフルオロキノロン使用量に関する情報を得た。両者の関連を解析したところ全国的によく相関しており、西日本ではフルオロキノロンの使用量と耐性が共に高く、東日本では使用量と耐性が共に低かった。

Title: Fluoroquinolone consumption and Escherichia coli resistance in Japan: an ecological study.
Journal: BMC public health (2019-04-23)

PDF Link

From PMC (NCBI)

comment by 黒田 (2019/11/25 13:09:37)

本邦の地域差を詳細に調べた結果であり、Levofloxacin 使用量と耐性頻度が相関する貴重な報告。抗菌薬を減らしましょう。

comment by 山口 (2019/11/11 15:59:42)

抗菌薬の使用量と耐性菌の関連を考察するうえで、ユニークなアプローチです。

Comment / Rank

秋庭	★★★★★	未評価
金森	★★★★☆	4
黒田	★★★★☆	3
山口	★★★★☆	4
渡部	★★★★★	未評価
楠本	★★★★☆	4

図4 環境 AMR に係る文献情報の情報共有サイト

各専門分野から選抜した文献情報を班員同士で共有することが可能になり、環境 AMR における円滑な情報交換と Systematic Review に資する文献収集へ活用した。班員の作業工程や独自コメント等を自由に記載し、相互評価と進捗状況をインタラクティブにした。