

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 「環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価」

研究分担者 金森 肇 金沢大学医薬保健研究域医学系感染症科学・臨床検査医学 教授

研究要旨

令和 6 年度の本分担研究では、病院下水中の薬剤耐性の調査研究および文献レビューを行い、ヒトの薬剤耐性への影響について検討した。小児の臨床と病院排水から薬剤耐性菌を分離し、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（extended spectrum β lactamase; ESBL）産生大腸菌を収集し、ゲノム解析を開始した。また、大学病院排水の薬剤耐性モニタリングを実施するための体制構築を進めた。さらに、環境中の薬剤耐性の調査方法に関する文献収集を行い、文献レビュー結果を整理することで、下水中の薬剤耐性の標準的な調査法を確立するための資料を作成した。日本の医療環境中の薬剤耐性に関するエビデンスが不十分なことから、病院下水中の薬剤耐性の調査法を確立し、環境中の薬剤耐性のヒトへのリスクを明らかにする必要がある。

研究協力者：

馬場 啓聡	東北大学大学院医学系研究科総合感染症学分野 講師
北谷 栞	金沢大学附属病院感染制御部 特任助教
本多 了	金沢大学地球社会基盤学系（環境都市コース） 教授
花本 征也	金沢大学環境保全センター 准教授

A. 研究目的

ワンヘルスの観点から医療機関において薬剤耐性対策の実施が求められている。病院下水は環境中の薬剤耐性菌のリザーバーとなり、薬剤耐性の拡散が懸念されるが、病院下水中の薬剤耐性調査は十分に行われていない。環境中の薬剤耐性の実態を把握するため、日本の病院下水の薬剤耐性調査を実施していく必要がある。

本分担研究では、医療施設における下水中の薬剤耐性の実態調査を行い、薬剤耐性の現状と課題を検討する。下水分離および臨床分離薬剤耐性菌のゲノム解析を行い、市中・院内感染症へのリスク評価を行う。また、病院下水中の薬剤耐性の調査方法に関する文献レビューを実施する。

令和 6 年度では、以下の研究を行った。

- 1) 小児患者と病院下水由来の ESBL（extended spectrum β lactamase）産生腸内細菌目細菌の検出
- 2) 大学病院下水の薬剤耐性モニタリング体

制構築

- 3) 病院排水中の薬剤耐性の調査方法に関する文献レビュー

B. 研究方法

1. 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

小児患者および病院下水から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生腸内細菌目細菌（extended spectrum β lactamase-producing *Enterobacterales*; ESBL-E）について検討した。2023 年 6 月～2024 年 5 月の 12 ヶ月間に、こども病院の 3 棟の病棟それぞれに由来する排水を月一回ずつ採水し、サンプルを薬剤耐性菌選択培地（CHROMagar™ ESBL・mSuperCARBA・MDRP・MDRA・VRE）上で培養した（Nishiyama）。培地上に得られたコロニーのうち、色や形状の異なるものを最大 6 個選択し、MALDI-TOF MS による菌種同定を行った。また、同期間にこども病院で臨床分離された ESBL 産生腸内細菌目細菌（ESBL-E）、カルバペネ

ム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) 及びバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を収集した。検出された ESBL-E 及び CRE に対し、Cica geneus® ESBL genotype detection kit 2 及び Carbapenemase genotype detection kit 2 (Kanto Chemical CO., Inc., Tokyo, Japan) を用いて、PCR による *bla*CTX-M-1、*bla*CTX-M-2、*bla*CTX-M-8、*bla*CTX-M-9、*bla*CTX-M-25、*bla*CTX-M-64、*bla*TEM、*bla*SHV、*bla*IMP-1、*bla*IMP-6、*bla*KPC、*bla*NDM、*bla*VIM、*bla*OXA-48 及び *bla*GES の各薬剤耐性遺伝子のスクリーニングを行った。更に、MALDI TOF-MS 及び PCR によって ESBL 産生 *Escherichia coli* と同定された菌株のうち、各下水サンプルから検出されたもののうちから選択した 1 株及び全ての臨床分離株に対し、Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA) による全ゲノムシーケンシング (WGS) を行い、得られた全ゲノム配列を用いて、SeqSphere+ (Ridom GmbH, Münster, Germany) による multi-locus sequence typing (MLST)、Core genome MLST (cgMLST) 及び cgMLST による分子系統解析と、The Center for Genomic Epidemiology ウェブサイト (<http://www.genomicepidemiology.org>) の ResFinder による薬剤耐性遺伝子の網羅的検出を行った。

2. 大学病院下水の薬剤耐性モニタリング体制構築

大学病院において、臨床検体および病院排水・環境由来検体における薬剤耐性菌と、病院排水中の残留医薬品・消毒薬との関連性について検討を行った。2014 年 1 月 1 日から 2029 年 3 月 31 日までの期間に診療目的で採取された各種臨床検体から分離された薬剤耐性菌に加え、病院排水を含む環境中から分離された薬剤耐性菌および病院排水中の残留医薬品・消毒薬の解析を実施した。臨床検体および環境から分離された薬剤耐性菌は主に ESBL-E、CRE、MDRP、MDRA を対象とし、薬剤感受性試験に加え、薬剤耐性遺伝子に着目した全ゲノム解析を行った。環境検体については、病院排水において月 1 回、西 C、

西 D、東 C、東 D の計 4 か所から採水を行い、選択培地による薬剤耐性菌の分離・培養に加えて、残留医薬品および消毒薬の濃度測定を実施した。濃度測定には高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による定量分析を用いた。対象とした残留医薬品は、抗菌薬 (クラリスロマイシン、アジスロマイシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾール、N-アセチルスルファメトキサゾール、レボフロキサシン)、解熱鎮痛薬 (ジクロフェナク、アセトアミノフェン)、抗てんかん薬 (カルバマゼピン)、気管支拡張薬 (テオフィリン)、鎮痒薬 (クロタミトン)、中枢刺激薬 (カフェイン)、およびサルファ剤 (スルファピリジン) とした。消毒薬については、塩化ベンザルコニウム (BAC)、BAC 様物質、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム (DDAC)、塩化アルキルトリメチルアンモニウム (ATAC)、クロロヘキシジンを対象とした。さらに、病棟を中心とする院内環境表面からスワブによるサンプリングを行った。得られた臨床株および環境株に対しては、全ゲノム解析に基づく系統解析および薬剤耐性遺伝子の比較解析を実施するとともに、病院排水および環境水に対してメタゲノム解析を行い、細菌群集構造および薬剤耐性遺伝子の分布状況について包括的な評価を行った。

3. 病院排水中の薬剤耐性の調査方法の文献レビュー

病院排水中の薬剤耐性の調査方法に関する文献レビューを行うために、PubMed で論文検索を行った。検索式として、「wastewater」[MeSH] AND ('Drug resistance, Microbial' [MeSH] OR 'antibiotic resistance' [Title/Abstract] OR 'antibiotic resistance gene' [Title/Abstract] OR 'antimicrobial resistance' [Title/Abstract] OR 'drug resistance' [Title/Abstract] OR 'multi-drug resistance' [Title/Abstract] OR 'resistome' [Title/Abstract]) AND ('hospital' [Title/Abstract] OR 'Hospitals' [MeSH] OR 'Hospital Units' [MeSH] OR 'Nursing Homes' [MeSH] OR 'Ambulatory Care' [MeSH] OR 'Ambulatory Care Facilities'

[MeSH] OR ‘Dental Facilities’ [MeSH] ‘Assisted Living Facilities’ [MeSH]]」を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究内容に関して東北大学大学院医学系研究科倫理委員会および金沢大学医学倫理審査委員会で審査を受け、承認された。微生物ゲノムデータの取り扱いに関しては、セキュリティ対策を実施して、研究を行った。

C. 研究結果

1. 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

研究期間内に、こども病院排水中から、85 株の ESBL-E 及び 9 株の CRE を含む計 273 株を検出した (表 1、図 1)。MALDI-TOF MS によって、検出した ESBL-E のうち 38 株 (45%) が *Escherichia coli*、18 株 (21%) が *Klebsiella pneumoniae*、10 株 (12%) が *Klebsiella oxytoca*、7 株 (8%) が *Raoultella ornithinolytica*、5 株 (6%) が *Enterobacter cloacae* complex、2 株 (2%) が *Citrobacter freundii*、2 株 (2%) が *Klebsiella aerogenes*、2 株 (2%) が *Pantoea agglomerans*、1 株 (1%) が *Rahnella aquatilis* と同定された。PCR によって、*E. coli* のうち 21 株 (55%) が *bla*_{CTX-M-9}、14 株 (37%) が *bla*_{CTX-M-1}、1 株 (3%) が *bla*_{CTX-M-2} 陽性となった。*R. ornithinolytica* は 7 株全てが *bla*_{CTX-M-9} 陽性であった。*K. pneumoniae* のうち 17 株 (94%) と、*K. oxytoca* のうち 4 株 (44%) が *bla*_{SHV} 陽性であった。MALDI-TOF MS によって、検出した CRE のうち 4 株 (44%) が *C. freundii*、3 株 (33%) が *E. cloacae* complex、1 株 (11%) が *E. coli*、1 株 (11%) が *K. pneumoniae* と同定された。PCR によって、*C. freundii* の 4 株全てが *bla*_{IMP-1} 陽性となった。研究期間内に、こども病院の臨床検体から、*bla*_{CTX-M-1} 保有株 6 株、*bla*_{CTX-M-9} 保有株 8 株、*bla*_{SHV} 保有株 3 株の計 17 株の ESBL 産生 *E. coli* が検出された。研究期間内に、こども病院排水及び臨床検体から MDRP・MDRA・VRE は検出されなかった。

WGS 解析により、排水および臨床検体か

ら検出された ESBL 産生 *E. coli* 39 株から 34 個の薬剤耐性遺伝子が同定された (図 2)。39 株のうち 22 株が ST131 型株と同定された。このうち臨床分離株 16 株と下水分離株 6 株は、日本において臨床分離される ESBL 産生 *E. coli* の中で多くを占める *bla*_{CTX-M-27} 保有株であった。2023 年 8 月と 10 月に排水中より検出された *bla*_{CTX-M-15} 保有 ST69 型株と、2024 年 3 月に排水中及び臨床検体から検出された *bla*_{CTX-M-14} 保有 ST38 型株はそれぞれ、2,513 個の標的遺伝子のうち異なる遺伝子が 0 個及び 2 個と、高い遺伝的相同性を示した。

2. 大学病院下水の薬剤耐性モニタリング体制構築

2025 年 1 月に第 1 回目の貯水槽からの採水および病棟における環境サンプリングを終了した。病院排水について、西 C・西 D・東 C・東 D の 4 か所の貯水槽から採水し、菌叢組成の解析を行った結果、3 か所 (西 C、西 D、東 C) は類似した菌叢構成を示したのに対し、東 D のみ異なる傾向が認められた (図 3)。西 C、西 D、東 C では、*Bacteroidales*、*Clostridiales*、*Aeromonadales* が多くを占めていた。一方、東 D では、*Rhodocyclales*、*Flavobacteriales*、*Pseudomonadales* が優勢であった。基本的に、西および東それぞれの排水 (C、D) は同一の病棟からの排水が流れ込んでいるため、今回観察された差異には、採水のタイミングや汚水の滞留状況などが影響している可能性が考えられた。

病院排水中の消毒剤成分濃度を測定したところ、4 か所の貯留槽の平均濃度の上位 3 物質は、BAC-C10 (Benzyl decyldimethylammonium chloride)、BAC-C12 (Benzyl dimethyltetradecylammonium chloride)、ATAC-C18 (Octadecyltrimethylammonium bromide) であり、DDAC 類は濃度が低かった (図 4)。また、採水場所によって消毒剤成分濃度に差がみられ、濃度が高かった、すなわち消毒剤負荷が大きかった排水タンクに接続する病棟では、消毒剤の使用頻度が高いことが推察された。

医薬品成分に関しては、カフェイン、テオフィリン、アセトアミノフェンといった生

活・医療両由来の成分が、ほぼすべてのラインにおいて高濃度で検出された（図 5）。一方、抗菌薬についてはライン間で濃度差が大きく、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシンは西 C で、トリメトプリム、スルファメトキサゾール、N-アセチルスルファメトキサゾールは東 D で、それぞれ高濃度で検出された。対照的に西 D では、全ての薬剤において濃度が低く、低薬剤負荷の状態が推定された。

病棟内の環境サンプリングでは、エレベーターフロアのボタン、エレベーター内のボタン、ナースステーション手洗い場の石鹸ディスペンサーの押しボタン、病棟浴室のドアノブ、患者大部屋トイレのドアノブ、ならびに患者大部屋トイレの床についてスワブ採取を実施した（図 6）。多くのサンプルにおいて、*Actinomycetales*、*Pseudomonadales*、*Lactobacillales* が共通して優勢であり、背景には多数のマイナー菌種が散在する高い多様性が確認された。一方、トイレ関連サンプル（ドアノブおよび床）では、他群と比較して *Enterobacteriales* の占有率が突出していた。これらのサンプルでは、*Lactobacillales*、*Pseudomonadales* を含む 3 菌群ではほぼ 100% を占めており、トイレという特定環境に特徴的な菌叢パターンが示唆された。

3. 薬剤耐性の調査方法の文献レビュー

上記検索ワードで検出された文献は全部で 474 報（1973～2024 年）あった（図 7）。レビュー論文 24 篇とメタ解析 1 篇及びアブストラクトのない 8 篇を除外し、残りの 441 篇について、タイトルとアブストラクトを元に文献のスクリーニングを行った。既検出の菌株の解析が中心で検出に主眼が置かれていないもの 54 編、病院排水以外の排水中の薬剤耐性を検討したもの 52 篇、SARS-CoV-2 などのウイルスやマイクロプラスチック・薬剤耐性と関係のないプラスミド等 *mobile gene element* やファージの解析を行なったもの 32 篇、排水の処理法に関するもの 30 篇、医療環境や給水や海岸水などの排水以外の水生環境・空气中及びヒトや動物、食品に由来する薬剤耐性について検証したもの 20 篇、排水中の抗菌薬の検討 19 篇、薬剤耐性と関係な

く排水中の細菌を検討したもの 14 篇、既存のデータ解析や実験的研究 14 篇、消毒剤や金属耐性を検討した 2 篇の計 227 篇を除外し、残りの 204 篇を解析対象とした。

204 篇中、85 篇（42%）が病院排水中の A 薬剤耐性の検出方法として培養依存法を用いていた。その他、メタゲノムが 29 篇（14%）、定量リアルタイム PCR 法が 20 篇（10%）、Mass spectrometry 及び膜濾過がそれぞれ 2 篇（1%）、デジタル PCR 法・metabolism-based biorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT) 法・自動検出機器がそれぞれ 1 篇（0.5%）で用いられていた。タイトルやアブストラクトに薬剤耐性の検出法についての記載のないものが 63 篇（31%）あった。

D. 考察

1. 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

こども病院排水中から、臨床的に重要な *bla*_{CTX-M-27} を保有する *E. coli* や、*bla*_{IMP-1} を保有する CRE を含む多様な薬剤耐性菌が検出されたことで、薬剤耐性菌の環境中への伝播拡散が示唆された。こども病院排水中の薬剤耐性モニタリングは、薬剤耐性の伝播とその小児への影響を把握する上で有益である可能性がある。今後はより長期且つ多施設を対象とした、臨床検体中の薬剤耐性サーベイランスデータとの比較研究が必要である。

2. 大学病院下水の薬剤耐性モニタリング体制構築

2025 年 1 月に実施した第 1 回採水・環境サンプリングでは、西 C・西 D・東 C の排水ラインで *Bacteroidales*、*Clostridiales*、*Aeromonadales* が優勢である一方、東 D では *Rhodocyclales*、*Flavobacteriales*、*Pseudomonadales* が卓越するなど菌叢組成に明瞭な乖離が確認され、東 D ラインへの抗菌薬・第四級アンモニウム塩の高負荷が微生物群集の選択圧として作用している可能性が示唆された。また、消毒剤では BAC-C10、BAC-C12、ATAC-C18 が高濃度で検出され、タンク間濃度差が病棟での使用頻度の違いを反映していると考えられた。医薬品成分では

カフェイン・テオフィリン・アセトアミノフェンがすべてのラインで高濃度だった一方、抗菌薬はライン間で濃度差が大きく、西 D は全成分が低値であった。さらに、病棟環境表面では *Actinomycetales*、*Pseudomonadales*、*Lactobacillales* が広範に優勢を占めた一方、トイレ関連表面のみ *Enterobacterales* が突出しており、環境別の菌叢特異性が示された。これらの結果から、病棟の機能特性や薬剤使用状況が、排水中における化学物質負荷および微生物群集構造に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

3. 病院排水中の薬剤耐性の調査方法の文献レビュー

病院排水中の薬剤耐性の調査方法に関する文献の検討では、従来法である培養依存法が最も多く用いられていたが、近年は遺伝子検出技術の進歩により、メタゲノム法や定量リアルタイム PCR 法を中心とした培養非依存法が用いられることが多くなっていた。

E. 結論

本研究班の研究結果から、病院下水中の薬剤耐性モニタリングの実施は、臨床における薬剤耐性の伝播拡散の状況を把握することにつながるものと考えられた。今後、小児の臨床と病院排水から分離された ESBL 産生大腸菌の全ゲノム解析を行い、遺伝的多様性、潜在的な伝播メカニズムの解明に向けた比較検討を行う。大学病院排水の薬剤耐性モニタリング体制を構築し、ヒト感染症へのリスクを評価する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

その他発表

1. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書
2024. (4)環境.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

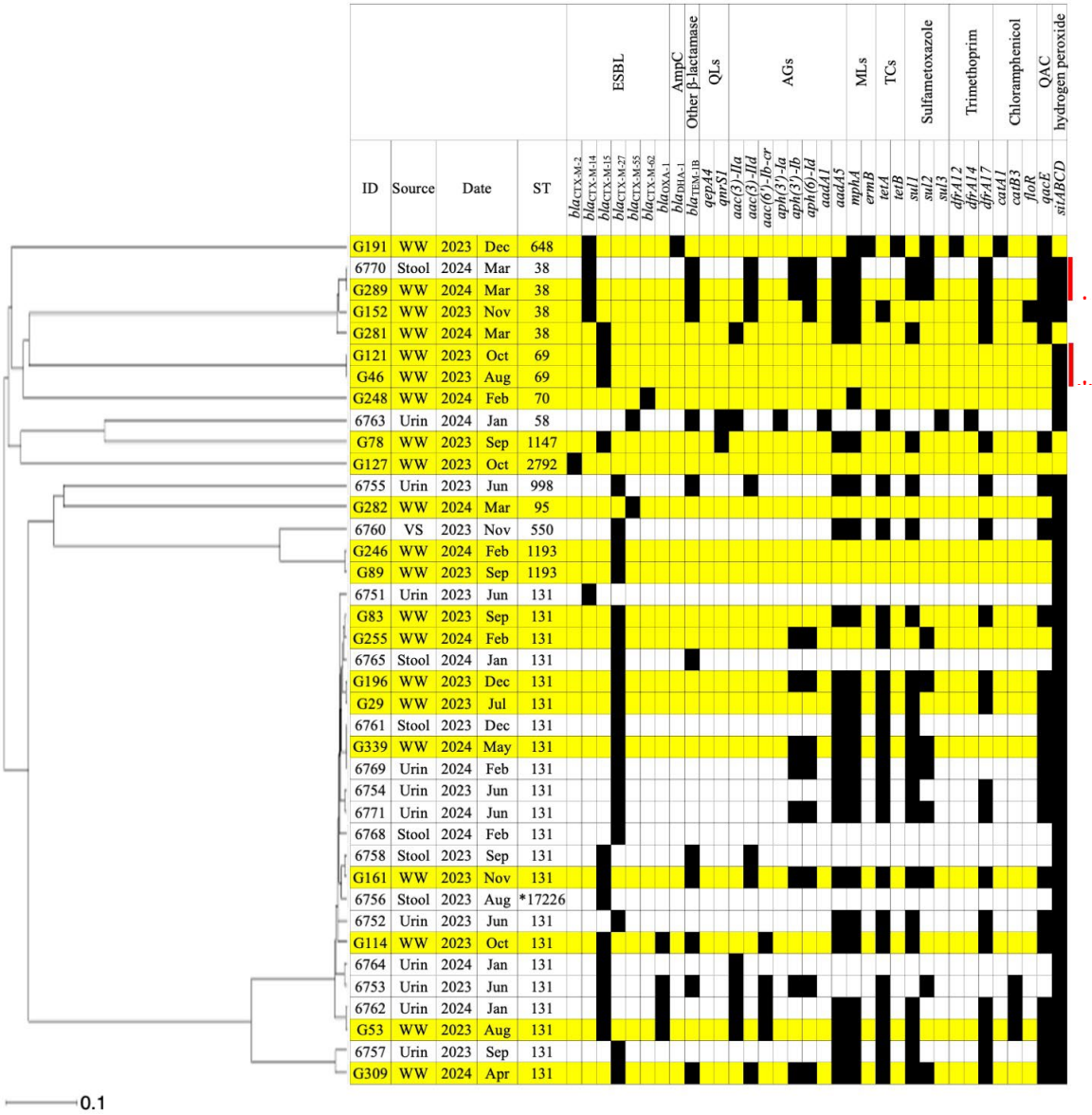
表 1. こども病院排水中から検出された薬剤耐性菌

赤字の株に対し PCR を実施した。() 内の数字は検出数を、[] 内は PCR で検出された遺伝子を示す。

図 1. こども病院の排水中および臨床検体から検出された、extended-spectrum β -lactamase 産生 *Enterobacterales* の月別検出数

WW : 排水由来株、Clin : 臨床分離株

図 2. こども病院の排水中および臨床検体から検出された extended-spectrum β -lactamase 産生 *Escherichia coli* 菌株の分子系統解析と薬剤耐性遺伝子プロファイル



スケールバーは 0.1 塩基置換を表す。

* 遺伝的相同性が高い。

WW : 排水由来株、VS : 膈分泌物

図 3. 病院排水中の微生物叢の構成

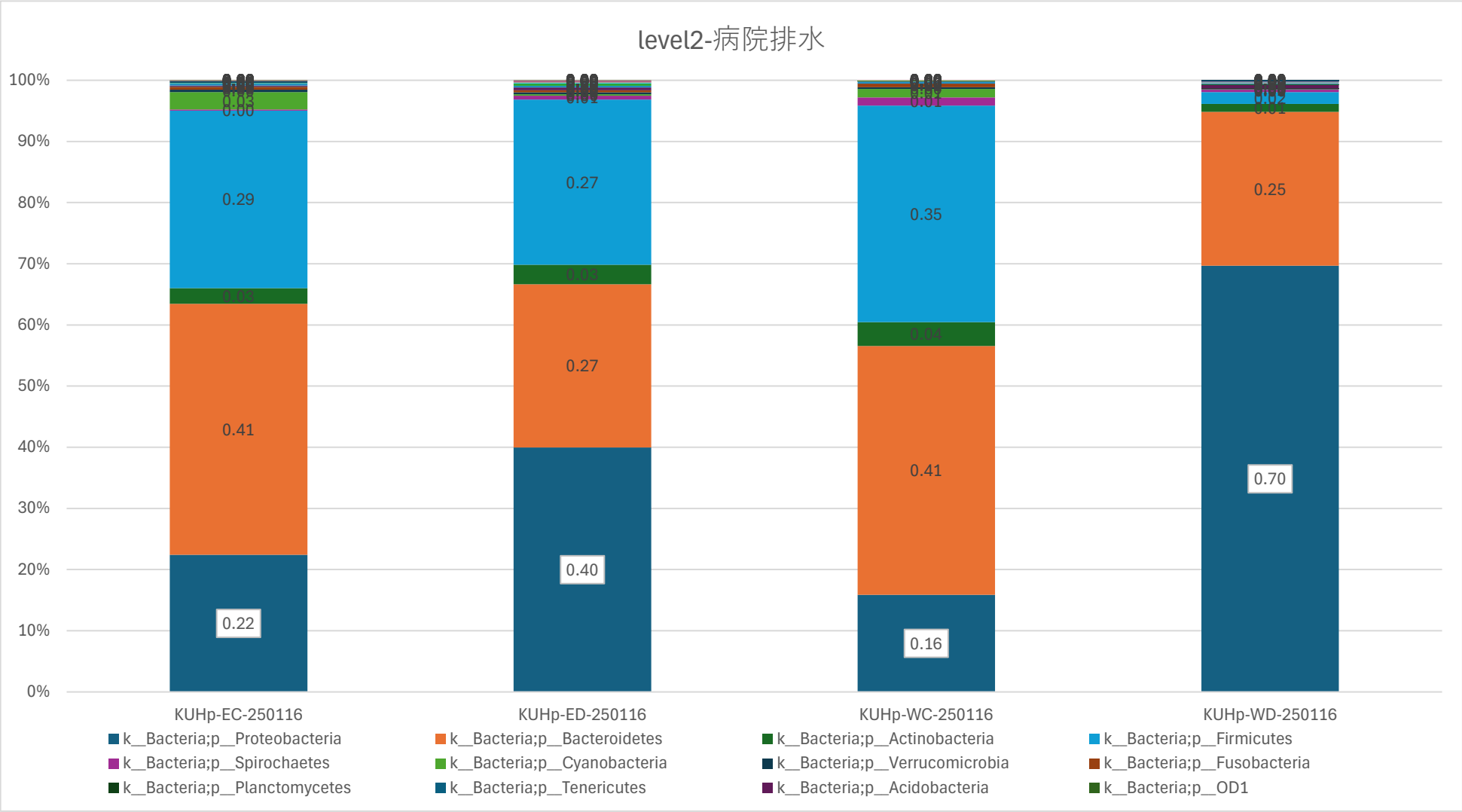
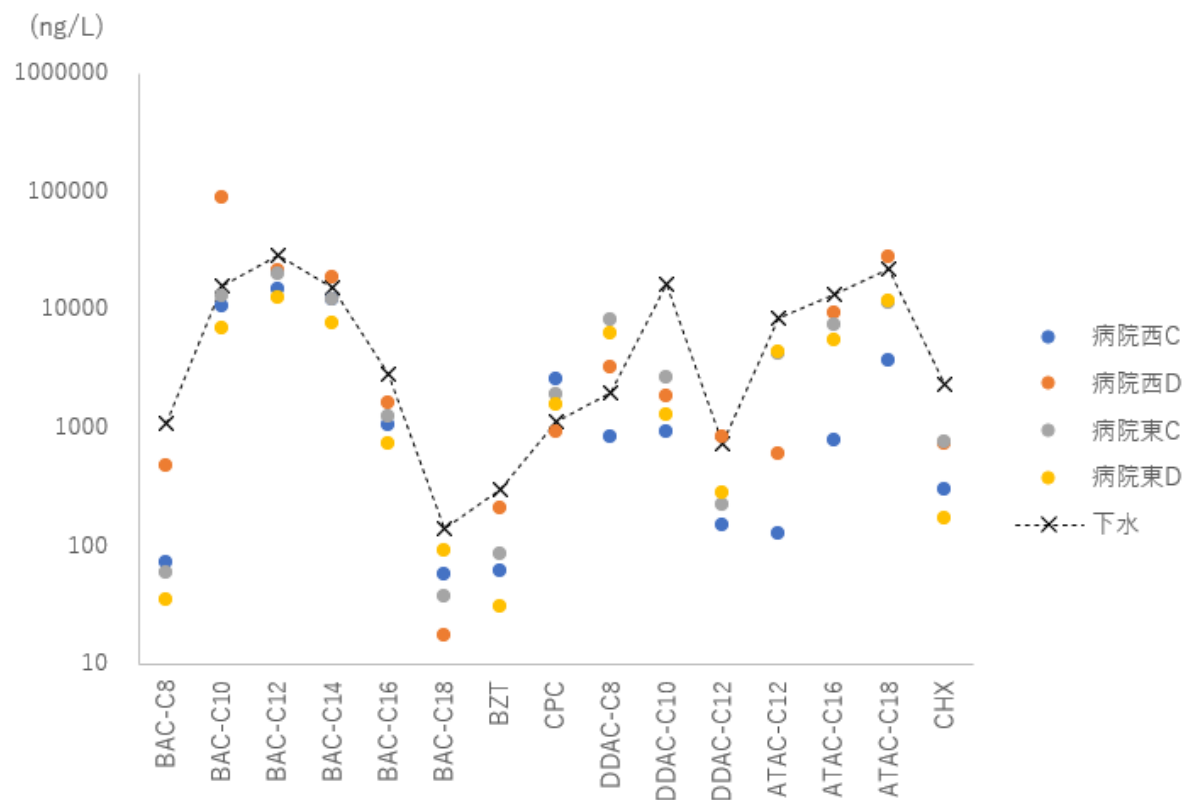


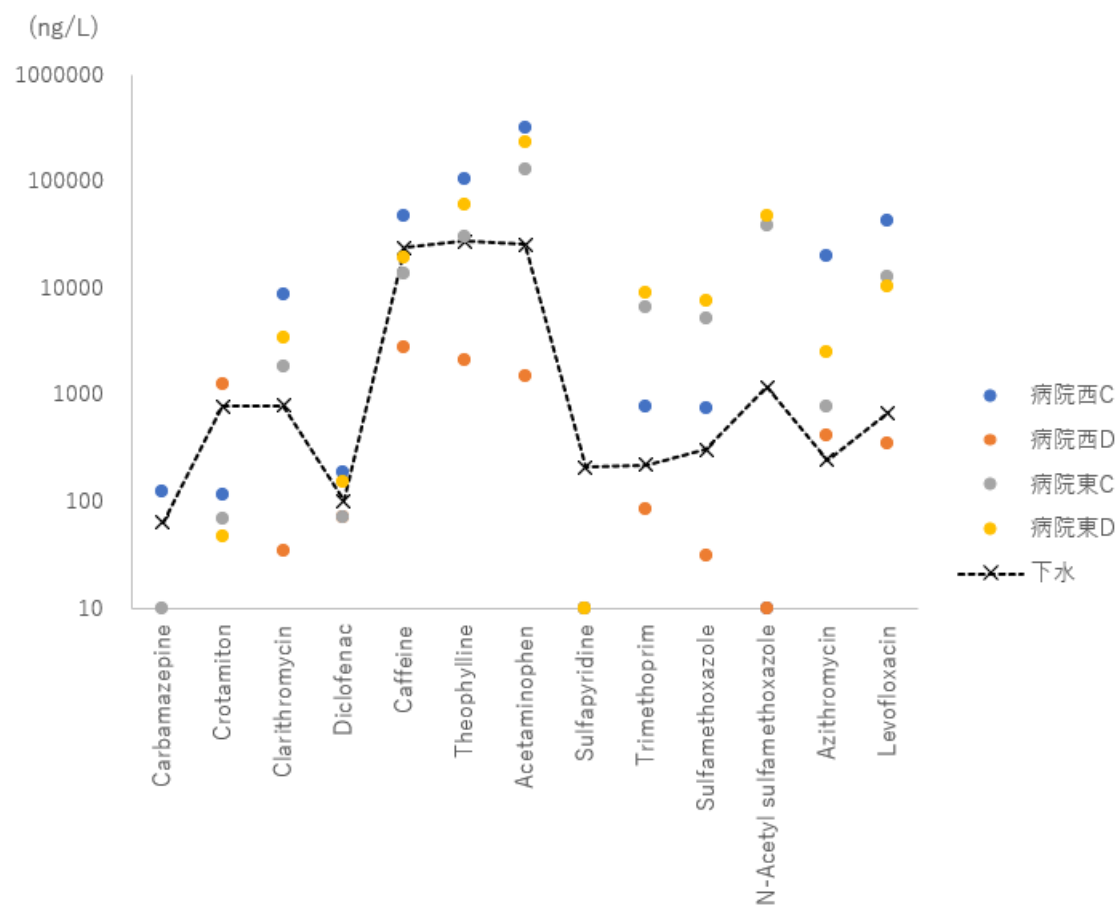
図 4. 病院排水中の消毒剤成分濃度



ATAC : 塩化アルキルトリメチルアンモニウム、BAC : 塩化ベンザルコニウム、BZT : 塩化ベンゼトニウム、CHX : クロルヘキシジン、CPC : 塩化セチルピリジニウム、DDAC : 塩化ジアルキルジメチルアンモニウム

病院西 C : 病院西 C タンク中の排水中の濃度、病院西 D : 病院西 D タンク中の排水中の濃度、病院東 C : 病院東 C タンク中の排水中の濃度、病院東 D : 病院東 D タンク中の排水中の濃度、下水 : 過年度に実施した金沢市の下水処理場における流入下水中濃度の平均値

図 5. 病院排水中の抗菌薬成分濃度



病院西 C：病院西 C タンク中の排水中の濃度、病院西 D：病院西 D タンク中の排水中の濃度、病院東 C：病院東 C タンク中の排水中の濃度、病院東 D：病院東 D タンク中の排水中の濃度、下水：過年度に実施した金沢市の下水処理場における流入下水中濃度の平均値

図 6. 病棟内の環境サンプリング結果

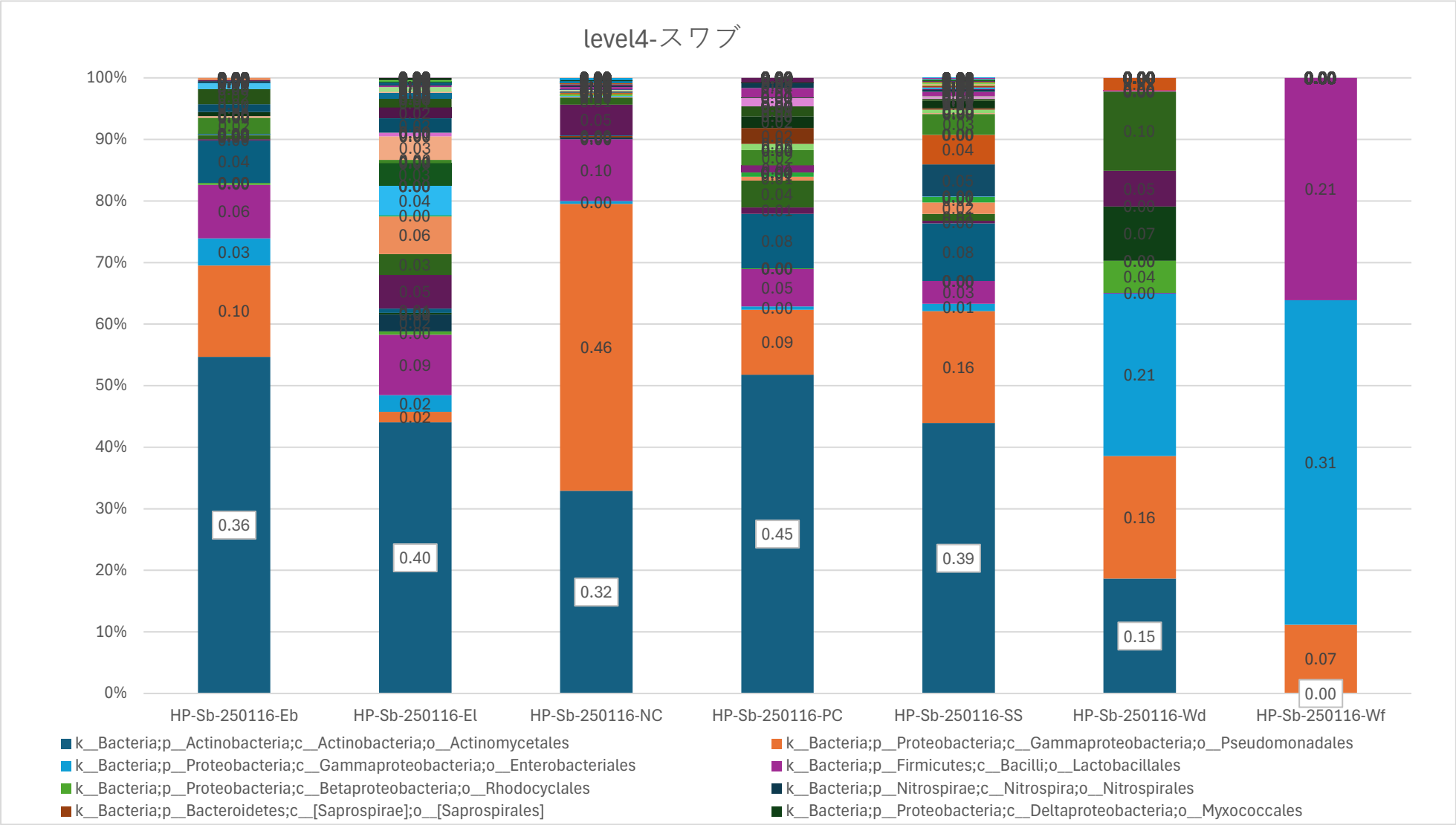
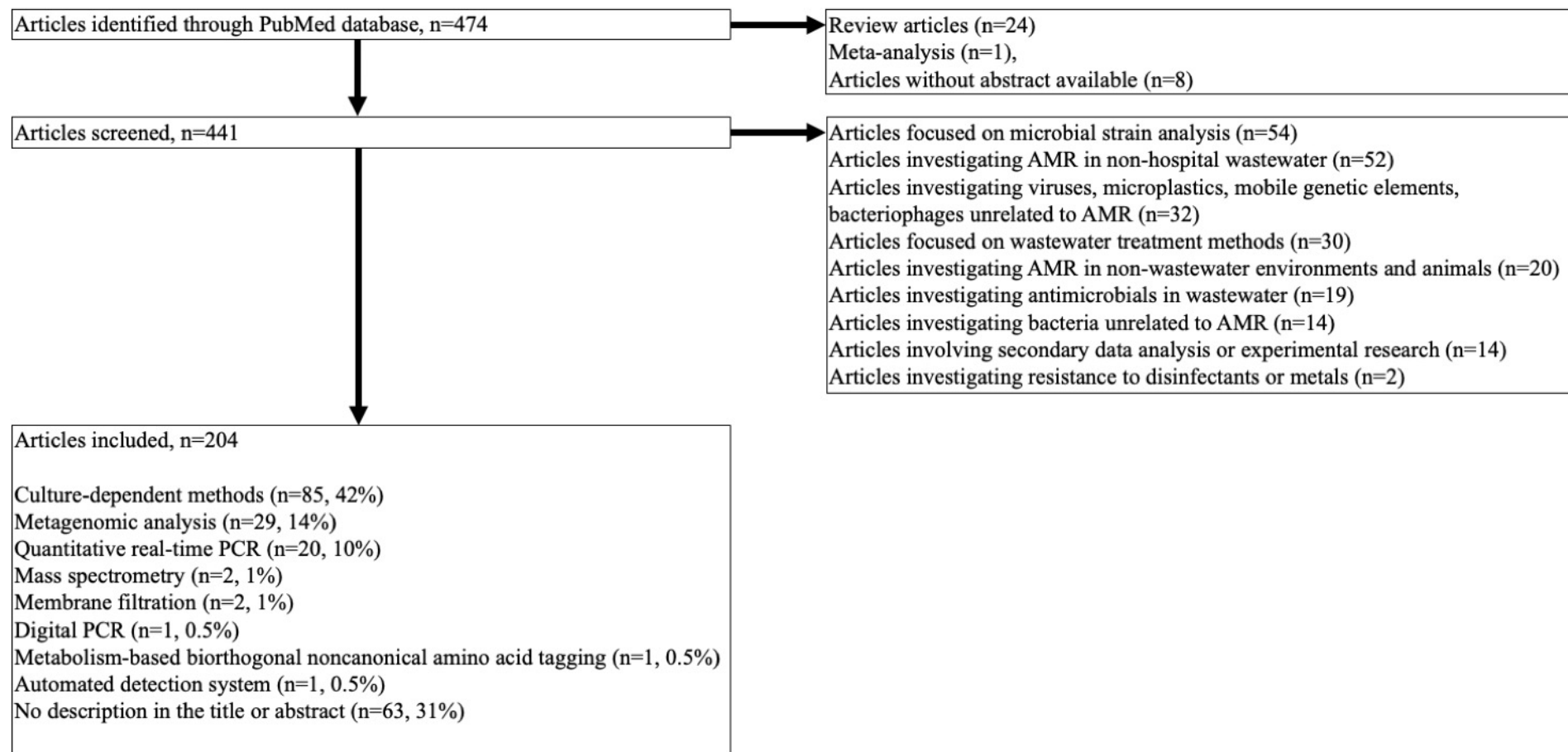


図 7. 文献レビューのフローチャート



AMR: 薬剤耐性 (Antimicrobial resistance)