

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07836

研究課題名(和文) 水域領域プラスチックバイオフィームを介した薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の拡散挙動

研究課題名(英文) Fate of drug-resistant bacteria/drug-resistant genes through plastic biofilm in aquatic area

研究代表者

岡崎 充宏 (OKAZAKI, Mitsuhiro)

東京工科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：40734869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラスチック(以下PL)による海洋汚染は地球規模で広がり、生態系を含めた海洋環境への影響とヒトへの健康被害が懸念されている。本研究では環境汚染PLが薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子のベクターの可能性及び海水常在菌の薬剤耐性遺伝子の伝達試験を行った。薬剤耐性菌によるバイオフィーム形成の高いPLの粗材はPETであることがわかった。また、海水浴等のエリアで採集したPL断片の一部からST131/CTX-M-9群の遺伝子性状をもつ薬剤耐性E. coliが検出されたが、本薬剤耐性Vibrio属は検出されなかった。さらに、ESBL非産生Vibrio株へのESBL関連遺伝子の接合伝達は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の拡散経路のひとつが水域であることは間違いない。本菌は医療関連施設や住民からの下水処理場を介して常時、河川に流入し続けており、海域へと拡散する。その海域領域での薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の挙動は不明な点が多いが、薬剤耐性遺伝子は、地球規模で拡散していることは明確である。プラスチックごみは、バイオフィームを介した細菌集団のコミュニティの場でありベクターとして、薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の拡散に深く寄与している可能性がある。その影響のひとつとして、薬剤耐性菌が再びヒトへ暴露される可能性がある。このPL環境汚染は、感染症領域における公衆衛生学的な社会的意義が十分に大きい。

研究成果の概要(英文)：Marine pollution by plastics (PL) is spreading on a global scale, and there is concern about the impact on the marine environment, including ecosystems, and human health hazards. In this study, we investigated the possibility of environmental pollution PL as a vector of drug-resistant bacteria/drug-resistant genes and the transmission of drug-resistant genes in indigenous seawater bacteria. PET was the crude PL material with the highest biofilm formation by drug-resistant bacteria. Drug-resistant E. coli with the genetic characteristics of the ST131/CTX-M-9 group were detected in some of the PL fragments collected in areas seawater bathing, but not in this drug-resistant Vibrio genus. Furthermore, a conjugative transfer test of ESBL-related genes to ESBL-nonproducing Vibrio strains was attempted, but the transfer was not confirmed.

研究分野：臨床微生物学、感染制御学

キーワード：プラスチック 環境 薬剤耐性 薬剤耐性遺伝子 Vibrio ESBL

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）の最新の集計（<https://janis.mhlw.go.jp/about/index.html>）では、ESBL産生やCREなど多剤耐性腸内細菌は、その減少の見通しが立っていないのが現状である。このことは、多剤耐性腸内細菌によるヒトへの曝露リスクは広範囲にわたる因子に曝されており、本菌の拡散経路の制圧に向けた対策が急務であることに変わりない。この薬剤耐性菌の拡散のみならず、本菌が保持する薬剤耐性遺伝子（プラスミドなどの可動性遺伝子）の拡散も重要な因子である。本プラスミドの特徴は、同属菌種に限らず、異なる菌種へ伝達されるためその拡散の拡大が危惧されている。

薬剤耐性菌は、医療関連施設や住民からの下水処理場を介して常時、河川に流入し続けており、海域へと拡散する。その海域領域での薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の挙動は不明な点が多いが、薬剤耐性遺伝子は、地球規模で拡散していることは明確である。

一般的に、多くの細菌は、環境の様々な物質の表面にバイオフィルム（BF）を形成し付着しており、漂流プラスチック（PL）もそのひとつであることが知られている。農地、住宅地や企業などから排出したPLごみは、BFを介した細菌集団のコミュニティの場であり運び屋（ベクター）として、薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の拡散に深く寄与している可能性がある。その影響のひとつとして、薬剤耐性菌が再びヒトへ曝露される可能性は否定されていない。以上のことから、PL表面上に付着したBFの分析は、薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の拡散挙動を追跡するひとつのツールになり得ると考える。

## 2. 研究の目的

PLは、バイオフィルムコミュニティにおける遺伝子交換を高める場所およびベクターとして、薬剤耐性遺伝子の伝達・拡散を引き起こすホットスポットとなり得るものと捉え、水域領域におけるPLに付着したバイオフィルムコミュニティを分析し、薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の拡散挙動を明らかにし、ヒトへの曝露リスク評価に役立つ知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究方法

### （1）実験的なPL表面上におけるBFの定量

供試する薬剤耐性菌は、本Lab保存（腸内細菌目細菌）のESBL産生株（CTX-M群およびSHV型）を用いた。供試するPLの種類は、PS、PE、PET、PVCおよびPPの5種類を用いた。BF形成法は、5mmに細断した各PLを供試菌株と培養液を添加した24穴マイクロプレートに入れ、数日間の培養を行なった。PL表面上に形成されたBFの定量は、PLを洗浄後、クリスタルバイオレット染色法により行った。

### （2）BFからの薬剤耐性関連遺伝子の検出

事前に中試験管にミクロスパーテルを用いてガラスビーズ（直径：1mm、不二製作所）5杯分を分注し、高圧蒸気滅菌したものを準備した。このガラスビーズ入り中試験管にBF形成をさせたPLおよび200μlの滅菌蒸留水を入れ、1分間のボルテックスを行い、BFをPLから剥がした。次に、この剥がしたBFからシカジーニラス® DNA抽出試薬キット（関東化学）を用いて供試菌株の遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子は、シカジーニラス® ESBL遺伝子型検出キット（関東化学）を用いてPCR法によりESBL産生遺伝子を増幅し、電気泳動法により目的の遺伝子の確認を行った。

(3) 海水域における浮遊 PL 表面上のBFからのESBL産生菌の分離

神奈川県横浜市金沢区海の公園内のビーチにおいて海水に浮遊する PL の断片を収集した。収集した PL サンプルの表面を滅菌生理食塩水で2回洗浄し、一過性に付着した細菌を洗い落とした。洗浄後の PL サンプルは、滅菌綿棒を用いて PL 表面を拭き、その綿棒に付着した BF を含む付着物を滅菌生理食塩水に再浮遊させ、その一部をセフトキシム(CTX; 終濃度 0.12 µg/mL)含有 7 mL の LB ブロス(日本ベクトン・ディッキンソン)を用いて、37、48時間の好気培養を行った。各培養液をESBL クロモアガー培地(関東化学)に塗布し、37、24時間の好気培養後、ESBL 産生大腸菌の疑いのある集落(赤色)をBTB寒天培地に純培養した。また、そのほかの集落(白色)もランダムに同様に純培養した。ESBL 関連遺伝子の検出は、分離培養した集落に対してシカジーニクス® ESBL 遺伝子型検出キット2を用いて検出した。

(4) 接合伝達実験

接合伝達試験は LB ブロス法に2%塩化ナトリウムを添加して行った。供試菌株は、ドナーとしてESBL 産生 *E. coli*(ST131/CTX-M-9群)株を、レシピエントは海水由来の *Vibrio alginolyticus* 7 菌株(非ESBL産生株)を使用した。これらの菌液を2%塩化ナトリウム含有 LB ブロスに、ドナーとレシピエントを1:1の割合で混和し、37、160 rpmで2時間、恒温振盪水槽で接合伝達試験を実施した。接合伝達試験後の菌液からCTX 32 µg/mL 含有 TCBS 寒天培地(栄研化学)に100 µL 接種後、コンラージを行い、37、24時間、好気培養を行った。トランスコンジュガントの判定は、その培地に発育した集落をランダムに釣菌し、ディスク法を用いたESBLスクリーニング判定を行った。

4. 研究成果

(1) 実験的な PL 表面上のBFの定量

各 PL に形成された BF の吸光度を図1に示す。3菌種に共通して PET 上でのBF形成量が高い傾向があり、次いで、PE および PP であった。菌株間では、PET においてESBL産生 *K. pneumoniae* のBF形成量は、ESBL産生 *E. coli* と *E. coli* に比して、それぞれ、約1.7倍および約1.5倍と有意に高かった( $p < 0.05$ )。これらのことから、PLの種類および菌種間におけるBF形成量に差異があることがわかり、環境に流出したPLの組成の分析は、重要であることが示唆された。

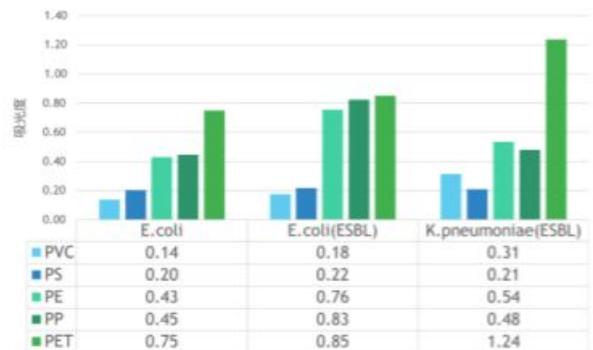


図1 菌種とプラスチックによる吸光度の比較

(2) 各種の PL に形成した BF からのESBL産生 *E. coli* およびESBL産生 *K. pneumoniae* 由来のESBL 関連遺伝子の検出結果を図2に示す。ESBL産生 *E. coli* においてESBL 関連遺伝子(CTX-M型)は、PLのPVCを除く、4つのPLから検出された。PVCは、再検したが2回とも検出されなかった。ESBL産生 *K. pneumoniae* のSHV遺伝子は、すべてのPLから検出された。これらの結果は、PL表面上に形成されたBFをPCR法を用いて検出できることが示唆され、培養困難な細菌にも応用可能であると考えら

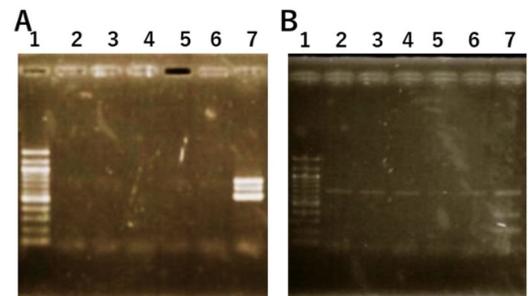


図2. 各種PL表面上のバイオフィルムからのPCR法によるESBL関連遺伝子の検出  
A: ESBL産生 *E. coli* B: ESBL産生 *K. pneumoniae*  
1レーン: DNA分子量マーカー(100bp), 2レーン: PS, 3レーン: PE, 4レーン: PVC, 5レーン: PP, 6レーン: PET, 7レーン: ポジティブコントロール

れた。

### (3) 環境汚染した PL からの ESBL 産生菌株の検出

神奈川県横浜市金沢区海の公園内のビーチの水際に浮遊または着票した PL を図3に示す。本研究では様々な PL の断片を収集したが、それらの素材を分析するには至らなかった。

PL-11 の PL より ST131/CTX-M-9 群の遺伝子を有する ESBL 産生 *E. coli* が検出された。この遺伝子型は、病院内で問題となっている遺伝子型であり、本公園内のビーチの海水に生存していることが確認された。このことは、このビーチを利用する人に対して暴露される可能性があり、公衆衛生学的に監視する必要性があると考えられた。

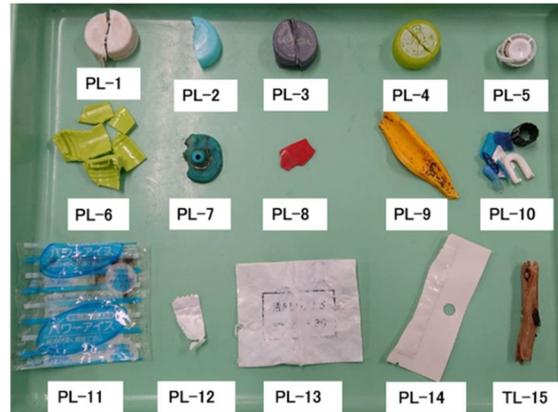


図3. 収集したPLサンプル  
公園内におけるビーチの水際に浮遊または着票したPL

### (4) ESBL 産生 *E. coli* 株からの *Vibrio* へのプラスミドの伝達

実験的に ESBL 産生 *E. coli* から本ビーチ海水由来の *Vibrio alginolyticus* 株への接合伝達試験を試みたが、供試したすべてのレシピエントに対して接合伝達を認めなかった(データは示していない)。このことは、海水由来の *Vibrio* における ESBL 産生株の報告例がないことと一致する。一部の報告例としては、養殖されたエビや貝類からの検出であり、極めて稀である。プラスミドの接合伝達には海水の塩分濃度と関連性があると考えられるが、さらなる研究が必要であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 笠井亮佑, 岡崎充宏, 田中裕香子, 安藤ゆうき, 島峰徹也, 上條史記, 川田尚規, 村田綾, 井上将, 川野宏明, 篠原一彦, 田仲浩平	4. 巻 50(1)
2. 論文標題 ECMO回路30日間保管後の無菌性および人工肺性能維持の評価	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本体外循環技術医学会論文誌	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7130/jject.50.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Mikami, Kazunari Sonobe, Keiko Ishino, Takumi Noda, Mami Kato, Mami Hanao, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Mitsuhiro Okazaki	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 Evaluation of pathogenicity and therapeutic effectiveness of antibiotics using silkworm Nocardia infection model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 73-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2021.01035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uruse T, Okazaki M, Tsutsui H	4. 巻 18 (6)
2. 論文標題 Prevalence of ESBL-producing Escherichia coli and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in treated wastewater: a comparison with nosocomial infection surveillance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Water Health	6. 最初と最後の頁 899-910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2166/wh.2020.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 啓斗, 千葉 友人, 花尾 麻美, 岡崎 充宏
2. 発表標題 カイコSalmonella感染モデルを用いた病原性と抗菌薬治療効果の評価
3. 学会等名 第17回 東京都医学検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉 友人、鈴木 啓斗、花尾 麻美、岡崎 充宏
2. 発表標題 河川水中における抗菌薬濃度が薬剤耐性遺伝子の伝達に与える影響についての検討
3. 学会等名 第17回 東京都医学検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野塚大夢、奥橋佑基、花尾麻美、岡崎充宏
2. 発表標題 Clostridioides difficile毒素はヒト白血病細胞の細胞周期障害を起こす
3. 学会等名 第16回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 時田拓実、奥橋佑基、花尾麻美、岡崎充宏
2. 発表標題 ヒト由来白血病細胞に対するC.difficile培養濾過液による細胞障害の検討
3. 学会等名 第17回東京都医学検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎野弘晃、山県友紀、雷 真梨恵、小松優大1、岡崎充宏
2. 発表標題 ヒト細胞において表皮ブドウ球菌はIFN- 受容体もmRNAの発現を下方調節する
3. 学会等名 第18回 東京都医学検査学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	花尾 麻美  (Hanao Mami)  (40756920)	東京工科大学・医療保健学部・講師   (32692)	
研究分担者	和田 裕雄  (Wada Hiroo)  (50407053)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授   (32620)	
研究分担者	筒井 裕文  (Tsutsui Hirofumi)  (70620649)	東京電機大学・理工学部・助教   (32657)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------