

氏名	ウインドラ プラヨガ WINDRA PRAYOGA
本籍（国籍）	インドネシア共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第813号
学位授与年月日	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 地域環境創生学専攻
学位論文題目	Multidrug-resistant <i>Escherichia coli</i> in municipal wastewater as an indicator of its prevalence and a source of farm contamination in Southeast Asia (東南アジアにおけるその流行指標および農地汚染の起源としての都市下水中の多剤耐性大腸菌)
学位審査委員	主査 山形大学教授 渡部 徹 副査 山形大学准教授 渡邊 一哉 副査 弘前大学准教授 坂元 君年 副査 岩手大学准教授 濱上 邦彦

## 論文の内容の要旨

With the wide use of antibiotics for human medical treatment, livestock farming, aquaculture and agriculture, increasing antibiotic resistance is a major public health threat that has raised global concerns. Although a variety of antibiotics to kill pathogenic bacteria in different mechanisms have been developed from penicillin in 1920s, we have repeatedly experienced occurrence of bacteria resistant to the newly developed antibiotics. Bacteria with resistance to a wide range of antibiotics, which are called multidrug-resistant (MDR) bacteria, can cause a serious problem since we have limited number of antibiotics effective for them. Actually, nosocomial infections with MDR bacteria, such as MDR *Pseudomonas aeruginosa*, MDR *Acinetobacter* sp., extended beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase (CP) producing *Enterobacteriaceae*, have been frequently reported in recent years. Due to their low pathogenicity, these bacteria are suspected to circulate among healthy population with asymptomatic infections. Nevertheless, less attentions have been paid to such community-acquired infections associated with MDR strains.

Monitoring MDR bacteria in municipal wastewater is a powerful tool to detect the community-acquired infections, especially for ESBL and CP producing *Enterobacteriaceae*, since it should contain all enteric bacteria excreted from the whole population regardless of their health status. The main objective of this study was to apply the wastewater monitoring to Bangkok, Thailand, with the aim to investigate the prevalence, pathogenicity and resistance mechanisms of ESBL and CP producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec and CP-Ec, respectively) as the representative of *Enterobacteriaceae* which are circulating there. Raw wastewater samples were collected from Bangsue and Jatujak wastewater treatment plants

located in Bangkok, Thailand bimonthly for four months and assessed for the of ESBL-Ec and CP-Ec abundance. The isolates were then processed and examined to determine their antibiotic resistance profiles, antibiotic resistance genes, and the pathotypes followed by multi-locus sequence typing (MLST) and whole-genome sequencing of the pathogenic isolates and isolate harboring both ESBL and CP producing genes, respectively. MLST was used to determine clone diversity while WGS explored the genetic material to provide detailed genetic information. From the results, in wastewater samples, ESBL-Ec were more abundant than CP-Ec isolates accounting for 54% and 10%, respectively of the 139 *E. coli* isolates recovered during the study. ESBL-Ec were recovered from the two sites while CP-Ec were only recovered from the Jatujak wastewater treatment plant. The relatively high abundance of ESBL-Ec results from its high prevalence and carriage among the general population; CP-Ec is associated with clinical care usually resulting from its use in treatments. The isolates had an extensive antibiotic resistance profile with 80% of ESBL-Ec and all the CP-Ec conforming to MDR traits. The CP-Ec isolates were highly resistant (>60% resistance) to fifteen antibiotic agents but were susceptible to amikacin and fosfomycin. The ESBL-Ec isolates were also highly resistant exhibiting more than 50% resistance to 10 antibiotics including 100% resistance to ampicillin, cefuroxime and cefotaxime. Low-level resistance (<10%) to seven antibiotics was observed in ESBL-Ec including fosfomycin but no amikacin. Antibiotic resistance of ESBL-Ec isolates from Bangkok was higher than isolates recovered from a wastewater treatment plant in Japan, specifically, in the antibiotics with low resistance rates (<60%). Both ESBL-Ec and CP-Ec isolates harbored *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-4</sub>, *bla*<sub>OXA-30</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub>like, and the *bla*<sub>CTX-M</sub> was the most detected gene. In addition, other ESBL genes (*bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>) were detected in ESBL-Ec. Pathogenicity was low in both isolates at 13% and 20% for ESBL-Ec and CP-Ec respectively, and CP-Ec exhibited enteropathogenic *E. coli* (EPEC) virulence while ESBL-Ec did both EPEC and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) virulence. The clone diversity of isolates from Jatujak accounting for 92.3% of the pathogenic isolates consisted of 10 clones and clone sequence type (ST) 4450 encoded both ESBL and CP productions. WGS revealed three plasmids harboring more genes associated with antibiotic resistance and virulence.

Wastewater treatment plants are important routes through which antibiotic resistance bacteria are disseminated from humans to the environment. The wastewater is mainly treated with a biological process based on the high bacterial abundance and nutrient rich environments which allow the development and growth of antibiotic resistant bacteria. During raw wastewater sampling, samples were also collected from the activated sludge process to assess the dynamic changes in antibiotic resistance and pathogenicity. 52.4% and 4.8% of the isolates from the sludge samples (n=84) were ESBL-Ec and CP-Ec, respectively, showing a slight decrease compared to the isolates from raw wastewater. The CP-Ec were still highly resistant but susceptible to tigecycline and gained resistance to amikacin. The ESBL-Ec isolates, however, had reduced resistance to the antibiotics with low-level resistance in the influent. But the isolates still presented high resistance (60%) to more than six antibiotics. Regardless of the lower abundance compared to the influent isolates,

the sludge isolates were highly pathogenic with 86% carrying enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohaemorrhagic and enteroaggregative *E. coli* pathotypes. The extensive antibiotic resistance, the diverse genes encoding both ESBLs and CP, and widespread pathogenic isolates found in urban wastewater reflect its high prevalence and the underlying potential health risk from ESBL-Ec and CR-Ec. Bangkok has a high antibiotic consumption rate which is believed to fuel increasing antibiotic resistance. The current level of ESBL-Ec circulating in the community as revealed by the raw wastewater results, and observations in activated sludge characterized by the acquisition of resistance and pathogenic genes by bacteria call for stringent measures to tackle bacterial spread in communities and through wastewater treatment plants.

ESBL-Ec and CR-Ec frequently detected in municipal wastewater raises a serious concern about the contamination of downstream environment since wastewater treatment plants (WWTPs) are still unavailable in Southeast Asia except big cities. For this concern, the study further examined the spread of *E. coli* from urban areas to downstream agricultural fields in Hue city, Vietnam lacking in WWTP. After *E. coli* concentration was determined in irrigation water (IRW), MWW, soil, vegetables (VEG), and manure, its dispersion from MWW was tracked using MLST and phylogenetic analyses during the wet and dry seasons. IRW was severely contaminated; 94% of the samples were positive with *E. coli* exceeding the stipulated standards, while VEG contamination was very low in both seasons. The confirmed total number of isolates was comparable between the seasons; however, results from MLST and phylogenetic clustering revealed more links between the sites and samples to MWW during the wet season. The wet season had four mixed clusters of *E. coli* isolates from multiple locations and samples linked to MWW, while only one mixed cluster also linking MWW to IRW was observed during the dry season. The most prevalent ST complex 10 and two others (40 and 155) have been associated with disease outbreaks, while other STs have links to major pathotypes. Irrigation canals are significant routes for *E. coli* dispersion through direct links to the urban drainage-infested river. The numerous links between the samples and sites revealed MWW discharge as the source of *E. coli* contamination in the downstream environment that was enhanced by flooding, although MDR *E. coli* was not detected.

In summary, this study successfully detected and characterized ESBL-Ec and CP-Ec, which are clinically important MDR bacteria, circulating in Bangkok, Thailand by monitoring them in municipal wastewater. Monitoring of pathogens in municipal wastewater for surveillance of infectious diseases, called wastewater-based epidemiology (WBE), is now intensively studied for COVID-19 worldwide to detect asymptomatic cases. On the other hand, the WBE has been rarely applied to antibiotic-resistant bacteria (ARB) with no reports from developing countries which are believed as the hot spots. Therefore, the findings of this study, such as high prevalence of ESBL-Ec and CP-Ec in Thailand, can support both local and global efforts to fight ARB. And in the one health approach frequently used for those efforts, proper treatment of municipal wastewater is highly recommended for reducing MDR bacteria dispersed from urban areas to the downstream environment, as

revealed in Hue city, Vietnam.

### 【和訳】

ヒトの医療、畜産、水産養殖、農業のために抗菌薬が広く使われるにつれて、増え続ける薬剤耐性が公衆衛生上の大きな脅威となっており、それは世界的な懸念を呼び起こしている。1920年代のペニシリンを始まりとして異なるメカニズムで病原菌を殺すために様々な抗菌薬が開発されてきたが、新たに開発された抗菌薬に耐性を示す細菌の出現を繰り返し経験してきた。多剤耐性菌と呼ばれる広い範囲の抗菌薬に耐性を有する細菌は、それらに対して有効な抗菌薬が限定されることから、深刻な問題を引き起こすことができる。実際に、多剤耐性緑膿菌、多剤耐性アシネトバクター、基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生およびカルバペネマーゼ (CP) 産生腸内細菌科細菌のような多剤耐性菌による院内感染が、近年頻繁に報告されている。その低い病原性のために、これらの細菌は、無症候性の感染によって健康な人間集団の中に広まっていることが疑われている。それにも関わらず、多剤耐性菌による市中感染にはほとんど注目されてこなかった。

都市下水中の多剤耐性菌をモニタリングすることは、その下水が健康状態に関わらず集団全体から排出されたすべての腸内細菌を含んでいるために、特に ESBL や CP を産生する腸内細菌科細菌による市中感染を検出するための有効なツールである。この研究の主たる目的は、下水のモニタリングをタイ王国のバンコク市に適用することによって、そこで広まっている ESBL 産生大腸菌 (ESBL-Ec) と CP 産生大腸菌 (CP-Ec) の流行、病原性、そして、耐性メカニズムを調べることであった。ここで、大腸菌は腸内細菌科細菌の代表として選ばれた。流入下水のサンプルが、バンコク市に位置する Bangsue 下水処理場と Jatujak 下水処理場から、月2回の頻度で4カ月に渡って採取され、ESBL-Ec と CP-Ec の存在数が調べられた。その後、それらの菌株が分離され、薬剤耐性プロファイル、薬剤耐性遺伝子、そして、病原性が調べられた。さらに、病原性が確認された菌株、ESBL 産生遺伝子と CP 産生遺伝子の両方を保有する菌株のそれぞれについて、クローンの多様性を調べるための多座配列タイピング (MLST) と、詳細な遺伝情報を得るための全ゲノム解析を実施した。それらの結果から、下水サンプルの中には、ESBL-Ec (139 の分離大腸菌株のうち 54%) が CP-Ec (同じく 10%) よりも多く存在した。ESBL-Ec は2つの処理場から検出されたが、CP-Ec は Jatujak 下水処理場からのみ検出された。ESBL-Ec の相対的に多い存在量は、一般の人間集団での高い有病率や保菌率の結果である。一方、CP-Ec は通常、カルバペネム系抗菌薬がそこでの治療に使用されることから、臨床診療と関連付けられる。下水からの分離株は広い薬剤耐性プロファイルを示し、ESBL-Ec の 80% と CP-Ec のすべての株は多剤耐性であることが確認された。CP-Ec 分離株は 15 種類の抗菌薬に高い耐性 (単離株の 60% 以上) を示したものの、アミカシンとホスホマイシンには感受性を示した。ESBL-Ec 分離株もまた 10 種類の抗生物質に 50% 以上の高い耐性を示し、そのうち、アンピシリン、セフロキシム、そして、セフォタキシムに対しては 100% の耐性を示した。ESBL-Ec 分離株は、ホスホマイシンを含む 7 種類の抗菌薬に低い耐性率 (<10%) を示した。バンコクの都市下水から分離された ESBL-Ec 株の薬剤耐性は、特に低い耐性率 (<60%) が観測された抗菌薬について、日本のある下水処理場で分離された株に比べて高かった。ESBL-Ec 分離株と CP-Ec 分離株はともに、*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>OXA-4</sub>、*bla*<sub>OXA-30</sub>、そして、*bla*<sub>OXA-48 like</sub> を保有しており、その中で *bla*<sub>CTX-M</sub> が最も高い頻度で検出された遺伝子であった。加えて、他の ESBL 産生遺伝子 (*bla*<sub>TEM</sub> および *bla*<sub>SHV</sub>) も ESBL-Ec 分離株から検

出された。病原性は両分離株ともに低く、ESBL-Ec 分離株で 13%（腸管病原性大腸菌（EPEC）のみ）、CP-Ec 分離株で 20%（EPEC および腸管毒素原性大腸菌（ETEC））であった。病原性を有する分離株の 92.3% を占める Jatujak 下水処理場からの分離株のクローン多様性は、10 個のクローンで構成されていた。そのうち、ST4450 の菌株は ESBL と CP の両方を産生することができることを確認した。さらに、全ゲノム解析は、薬剤耐性と病原性に関連したより多くの遺伝子を運ぶ 3 つのプラスミドを明らかにした。

下水処理場は、人間から環境に薬剤耐性菌が広がる重要な経路である。下水は主に、多数の細菌と栄養に富んだ環境にもとづく生物学的プロセスで処理され、そのプロセスは薬剤耐性菌の出現と成長を許す。薬剤耐性と病原性の動的変化を評価するために、流入下水を採取する際には、活性汚泥のサンプルも採取した。その結果、汚泥分離株（n=84）のうち ESBL-Ec と CP-Ec の割合はそれぞれ 52.4%、4.8% であり、流入下水分離株に比べてやや減少した。CP-Ec 分離株は依然として高い耐性を示したが、チゲサイクリンに感受性を示し、アミカシンへの耐性を獲得していた。一方、ESBL-Ec 分離株では、流入下水で耐性レベルが低かった抗菌薬に対する耐性が低下していた。それでも、汚泥分離株は 6 種類以上の抗菌薬に依然としても高い耐性率 (>60%) を示した。流入下水分離株に比べて低い存在量であるけれども、汚泥分離株は高い病原性を示し、86% が ETEC、EPEC、腸管出血性大腸菌（EHEC）、そして、腸管凝集付着性大腸菌（EAEC）のいずれかの病原型に分類された。都市下水で見つかった広い薬剤耐性、ESBL と CP をコードする多様な遺伝子、そして、広がった病原性株は、高い有病率とそこに横たわる ESBL-Ec や CP-Ec による潜在的な健康リスクを反映している。バンコクにおける抗菌薬消費率は高く、それは増加し続ける薬剤耐性を加速すると信じられている。流入下水の結果で明らかとなった市中で広がる ESBL-Ec の現在のレベルと、細菌による耐性と病原遺伝子の獲得で特徴づけられる活性汚泥での観測は、市中で流行し、下水処理場を通して広がる耐性菌に取り組むための切迫した対策を要求している。

東南アジアでは、大都市を除き、下水処理場がいまだに存在しないため、都市下水で頻りに検出された ESBL-Ec および CP-Ec は、下流の環境の汚染に関する深刻な懸念を呼び起こす。この懸念のために、この研究ではさらに、都市域から下流の農地への大腸菌の拡散について、下水処理場がないベトナムのフエ市で調べた。灌漑用水、都市下水、農地土壌、野菜、そして、たい肥における大腸菌濃度を決定した後で、MLST と系統発生解析を用いて、雨季と乾季における都市下水からの大腸菌の拡散を追跡した。灌漑用水は著しく汚染されており、94% のサンプルが大腸菌陽性で、法律で規定された基準を超過していた。一方、野菜の汚染は両方の季節とも非常に低かった。確認された分離株の総数は両季節で同等であったが、MLST と系統発生的なクラスタリングの結果は、雨季において、異なる地点と異なる種類のサンプル間のリンクがより多いことを明らかにした。雨季には、複数の場所とサンプルから分離された大腸菌分離株が混在し、都市下水とリンクされたクラスターが 4 つあった。一方、乾季には、都市下水と灌漑用水を結ぶクラスターが一つだけ観測された。もっとも多く見られた配列型（ST）であった complex 10 と他の 2 つ（40 と 155）は疾病の流行と関連付けられ、他の配列型は主要な病原型と関係があった。灌漑用水路は、都市下水で汚染された河川に直接的なリンクを通して、大腸菌が拡散する重要な経路であった。サンプルと地点の間の数多くのリンクは、多剤耐性大腸菌は検出されていないものに、都市下水の放流が下流の環境における大腸菌汚染の起源であり、それは洪水によって促進されることを明らかにした。

総括として、この研究は、都市下水のモニタリングによって、タイ王国のバンコク市で流行

している臨床で重要な多剤耐性菌 ESBL-Ec および CP-Ec を検出し、特徴づけることに成功した。感染症のサーベイランスのために都市下水中の病原体をモニタリングすることは、下水疫学 (WBE) と呼ばれ、現在、COVID-19 対策で無症候性の感染者を検出するために世界中で盛んに研究されている。一方で、この WBE が薬剤耐性菌に適用されることはほとんどなく、ホットスポットと信じられている途上国からの報告はない。したがって、タイ王国における ESBL-Ec や CP-Ec の高い有病率のような本研究での知見は、薬剤耐性菌と戦うための地域や世界の取組をサポートすることができる。そして、それらの取組で頻繁に用いられるワンヘルスアプローチでは、ベトナムのフエ市で明らかにされたように、都市域から下流の環境に広がる多剤耐性菌を減らすために、都市下水の適切な処理が強く推奨される。

## 論文審査の結果の要旨

ヒトの医療、畜産、水産養殖、農業のために抗菌薬が広く使われる中で、多種類の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌が大きな脅威となっている。多剤耐性菌は一般に病原性が低いため、無症候性の感染によって市中で流行している懸念がある。都市下水には健康状態に関わらず住民が排出した腸内細菌が集まるため、そのモニタリングによって、基質特異性拡張型ベータラクタマーゼ (ESBL) やカルバペネマーゼ (CP) を産生して多剤耐性を示す腸内細菌の流行を検出できる。本研究では、下水モニタリングをタイのバンコク市の都市下水処理場に適用することで、ESBL 産生大腸菌 (ESBL-Ec) と CP 産生大腸菌 (CP-Ec) の流行を調査し、さらに、流行菌株の特徴づけを行った。本研究で得られた結果を以下にまとめる。

1. ESBL-Ec (大腸菌 139 株の 54%) は CP-Ec (同 10%) よりも高頻度で都市下水から検出された。ここで分離された ESBL-Ec 株の 80% と CP-Ec 株のすべては多剤耐性であった。ESBL-Ec 分離株は、日本での分離株と比較して、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールに対する耐性率が明らかに高かった。ESBL-Ec 分離株と CP-Ec 分離株は共通して *bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>OXA-4</sub>、*bla*<sub>OXA-30</sub>、*bla*<sub>OXA-48 like</sub> を保有しており、*bla*<sub>CTX-M</sub> が最も頻繁に検出された。ESBL-Ec 分離株からは、*bla*<sub>TEM</sub> と *bla*<sub>SHV</sub> も検出された。ESBL-Ec 分離株 (13%)、CP-Ec 分離株 (20%) はともに病原性が低かった。病原性を有する分離株のうち、MLST 解析で ST4450 に分類された株は、ESBL と CP の両方を産生する遺伝子を保有していた。この菌株の全ゲノム解析は、薬剤耐性と病原性に関連したより多くの遺伝子を運ぶ3つのプラスミドを明らかにした。
2. バンコク市の下水処理場では、活性汚泥のモニタリングも行った。汚泥から分離された大腸菌株のうち ESBL-Ec (52.4%) と CP-Ec (4.8%) の割合は下水分離株よりも若干低かったが、それらの病原性は著しく高かった (86%)。
3. 東南アジアの多くの都市には下水処理場がなく、下水で頻繁に検出された ESBL-Ec や CP-Ec は、放流先の環境を汚染する可能性がある。ベトナムのフエ市で、都市下水の他、その下流に位置する農地の灌漑用水、土壌、野菜、堆肥の各試料から大腸菌を分離し、MLST 解析と系統発生解析を行った。その結果、乾季には都市下水と灌漑用水を結ぶクラスターが1つだけ観測された一方、雨季には都市下水を含む複数の場所と種類の試料からの分離株が混在したクラスターが4つも存在した。このことは農地を汚染する大腸菌の起源が都市下水であることを立証するとともに、その拡散が雨季に促進されることを示している。

以上のように、本論文は、都市下水のモニタリングによって、バンコク市で流行する多剤耐性大腸菌（ESBL-Ec と CP-Ec）を検出し、その特徴づけに成功した。下水モニタリングは現在、COVID-19 対策のために世界中で盛んに研究されているが、多剤耐性菌を対象にした適用事例はほとんどなく、本研究の成果は、地域や世界の薬剤耐性菌対策に役立てられるだろう。また、フエ市で立証した都市域から下流の農地への大腸菌の拡散は、都市と農村が連携した薬剤耐性菌対策の重要性を強調している。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

Windra Prayoga, Masateru Nishiyama, Susan Praise, Dung Viet Pham, Hieu Van Duong, Lieu Khac Pham, Loc Thi Thanh Dang, Toru Watanabe (2021)

Tracking fecal bacterial dispersion from municipal wastewater to peri-urban farms during monsoon rains in Hue city, Vietnam

International Journal of Environmental Research and Public Health 18: 9580