

14. 下水及び放流水から検出されるカルバペネマーゼ遺伝子

保有グラム陰性桿菌の実態調査

○塩本 高之 （石川県保健環境センター）

【研究の必要性と目的】

カルバペネム系抗菌薬はグラム陰性菌感染症の治療に重要な抗菌薬である¹⁾。カルバペネマーゼ産生菌（CPO）はカルバペネム系抗菌薬に耐性を示しうること、また、カルバペネマーゼ遺伝子は菌種を越えて伝播しうることから、その広がりが世界的に危惧されている²⁾。

わが国では、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）において 3 つの薬剤耐性グラム陰性菌感染症（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症、薬剤耐性アシネトバクター（MDRA）感染症、薬剤耐性緑膿菌（MDRP）感染症）が届出対象疾患として指定されており、それぞれの起因菌である CRE、MDRA 及び MDRP のうち、一部の株に CPO が含まれる³⁾。上記 3 疾患は患者についてのみ届出が義務付けられており、無症状病原体保有者は届出の対象に含まれておらず、届出状況から地域における侵淫状況を類推するのは難しい。

地域から排出された下水は、下水処理場での処理を経て、河川等の環境へ放流されている。したがって、下水処理場へ流入する下水中の CPO は「地域に潜在する CPO」を、放流水中の CPO は「地域から自然環境へ漏出する CPO」を反映しているものと考えられる。臨床現場における CPO についてはこれまで様々な検討がなされているが、自然環境を含む地域に潜在する CPO の実態調査は未だ十分とは言えない⁴⁾。多くの人にとって生活の場は地域であることから、地域における実態を把握することは公衆衛生学上重要である。

本研究では、地域における侵淫状況の把握を目的に、下水及び放流水中の CPO の検出を試み、それらの菌種や保有するカルバペネマーゼ遺伝子等についての調査を行った。

【方法】

1) 下水処理場流入水（下水）及び放流水からの菌株分離

2019 年 8 月と 2020 年 2 月の計 2 回、石川県内の下水処理場 3 か所から下水及び放流水計 12 検体をそれぞれ 500mL 採取した。下水 50mL 及び放流水 100mL を 8000rpm で 3 分間遠心し上清をデカンテーションで除去した。得られた沈渣の 1 白金耳量をクロモアガー-ESBL 培地（関東化学）に塗抹し、37℃にて 24 時間培養後、発育したコロニーのうち、肉眼的所見が異なるコロニーを全て釣菌した。それらについてグラム染色を実施し、グラム陰性桿菌であることが確認されたものを被検菌株とした。

2) カルバペネマーゼ産生性の確認

カルバペネマーゼ産生性の確認は modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) を用いて行った。カルバペネマーゼ産生性の確認に際し、事前に、各菌株のブドウ糖発酵能について TSI 培地（日水製薬）を用いて確認した。mCIM で陽性を示した株を CP0 と判定した。なお、CP0 と判定された株について、Carba NP test (CNPt) を用いたカルバペネマーゼ産生性の確認を行った。mCIM は CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) M100-ED29⁵⁾に、CNPt は Segawa らの報告⁶⁾に従い実施した。

3) カルバペネマーゼ遺伝子の検出

カルバペネマーゼ遺伝子（KPC 型、IMP 型、NDM 型、VIM 型、OXA-48 型、GES 型）の検出は、全ての被検菌株について、Watahiki らの報告⁷⁾又は国立感染症研究所病原体検出マニュアル³⁾に記載の PCR 法にて実施した。カルバペネマーゼ遺伝子が検出された菌株については、シーケンス解析を用いて亜型の推定を行った。

4) 菌種同定

CP0 と判定された株について、rapid ID 32E（バイオメリュー）を用いて菌種を同定した。同定に必要なチトクローム・オキシダーゼ試験には、チトクローム・オキシダーゼ試験用紙（日水製薬）を用いた。

5) 薬剤感受性試験

CP0 と判定された株のうち、菌種が腸内細菌科細菌であった株について、メロペネム（MEM）、イミペネム（IPM）及びセフメタゾール（CMZ）の最小発育阻止濃度（MIC）を、CLSI M100-ED29⁵⁾に従い、寒天希釈平板法にて測定した。

【結果】

1) 下水及び放流水からの CP0 分離

12 検体から分離したグラム陰性桿菌 97 株について、mCIM の結果を表 1 に示す。

97 株の分離時期についての内訳は、2019 年 8 月が 66 株（ブドウ糖発酵菌：41 株、ブドウ糖非発酵菌：25 株）、2020 年 2 月が 31 株（ブドウ糖発酵菌：24 株、ブドウ糖非発酵菌：7 株）であった。mCIM によるカルバペネマーゼ産生性の確認試験の結果、陽性を示した 11 株（2019 年 8 月分離：4 株、2020 年 2 月分離：7 株）を CP0 と判定した。CP0 11 株は全て下水由来のブドウ糖発酵菌であった。

分離時期	ブドウ糖分解様式	mCIM	
		+	-
2019年8月 (66)	発酵菌 (41)	4	37
	非発酵菌 (25)	0	25
2020年2月 (31)	発酵菌 (24)	7	17
	非発酵菌 (7)	0	7

2) CP0 の CNPt、カルバペネマーゼ遺伝子検索、菌種同定及び薬剤感受性試験結果

分離された CP0 の分離時期、分離材料、採水した下水処理場、各試験（mCIM、CNPt、検

出したカルバペネマーゼ遺伝子、亜型の推定、菌種同定、薬剤感受性試験)の結果を表 2 に示す。

CNPt の結果は全て陰性であった。また、カルバペネマーゼ遺伝子の検索を実施したところ、GES 型陽性株が 2 株あり、シーケンス解析により亜型の推定を試みたところ、2 株とも GES-24 と推定された。残り 9 株については実施したカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。同定された菌種の内訳は、*Aeromonas* sp. : 9 株、*Klebsiella pneumoniae* : 1 株、*Klebsiella oxytoca* : 1 株で、GES 型陽性株は 2 株とも *Aeromonas* sp. であった。

Klebsiella pneumoniae 及び *Klebsiella oxytoca* と同定された CPO 2 株についての薬剤感受性試験の結果は表 2 のとおりで、2 株とも MEM、IPM 及び CMZ の 3 剤全てに感性を示した。

表2 CPO 11株の分離時期、分離材料、採水した下水処理場及び各試験結果

菌株No.	分離時期	分離材料	採水した下水処理場	mCIM	CNPt	カルバペネマーゼ遺伝子	推定亜型	推定菌種	MIC (µg/mL)		
									MEM	IPM	CMZ
13	2019年8月	下水	B	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
19	2019年8月	下水	A	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
20	2019年8月	下水	A	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
41	2019年8月	下水	C	+	-	検出なし	n. t.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.25	0.5	2.0
69	2020年2月	下水	A	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
71	2020年2月	下水	A	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
79	2020年2月	下水	B	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
86	2020年2月	下水	C	+	-	GES型	GES-24	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
89	2020年2月	下水	C	+	-	検出なし	n. t.	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.
91	2020年2月	下水	C	+	-	検出なし	n. t.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.25	0.25	4.0
95	2020年2月	下水	C	+	-	GES型	GES-24	<i>Aeromonas</i> sp.	n. t.	n. t.	n. t.

n. t. : 実施なし

【考察と今後の課題】

本研究の結果、下水から CPO 11 株が分離された一方、放流水から CPO は検出されなかった。

CPO 11 株のうち *Aeromonas* sp. 9 株について、2 株から GES 型 β -ラクタマーゼ遺伝子が検出され、シーケンス解析の結果、*bla*_{GES-24} 保有株と推定された。GES 型 β -ラクタマーゼは、GES-4、GES-5、GES-24 等、一部の亜型のみがカルバペネマーゼ活性を有するとされている^{8,9)}。残り 7 株は mCIM で陽性を示したものの、試験を実施したカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。*Aeromonas* 属菌の中には、元来、メタロ- β -ラクタマーゼである CphA を産生するものが存在し¹⁰⁾、mCIM の結果はこのことに起因するものと推察された。しかし、CNPt の結果は陰性であったことから、明確な原因は不明である。また、CPO 11 株のうち腸内細菌科細菌である 2 株 (*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca* 各 1 株) は、興味深いことに、mCIM で陽性を示したにも関わらず薬剤感受性試験で MEM/IPM/CMZ の 3 剤全てに感性を示し、感染症法における CRE の定義を満たさなかった。CNPt で陰性を示し、カルバペネマーゼ遺伝子検索では実施したカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかったことから、mCIM の結果は非特異反応によるものと推察されたが、明確な理由は不明である。カルバペネマーゼ産生性の有無は臨床的に重要な情報であり、

その安価で簡便な検査法として mCIM は広く普及している。今回の薬剤感受性試験の結果から、これら 2 株が CRE と判定されることは考えにくい、検査の精度や結果解釈にも関わりうることから、更なる詳細解析により原因を追究することが肝要と思われた。

今回、GES 型 β -ラクタマーゼ遺伝子が検出されたのは *Aeromonas* 属菌からのみで、腸内細菌科細菌からの検出はなく、本県では未だ GES 型 β -ラクタマーゼ保有株による CRE 感染症の事例がないことと矛盾しなかった。しかし、GES 型 β -ラクタマーゼ保有株による CRE 感染症の事例がないにも関わらず下水処理場流入水から GES 型 CPE が高い頻度で検出されたとの報告もあること¹¹⁾、CRE 感染症を含む薬剤耐性菌感染症は薬剤耐性菌に感染してから発症に至るまで時間的乖離があることが少なくないことから、同じ下水処理場内でも採水箇所を複数設ける、もしくは採水頻度を増やす等、検出感度を高めるべく採水方法等を改善し、継続して調査を実施する必要があると思われる。また、採水時期の影響や各下水処理場が管理する区域内の人口等の特徴と併せた解析が実態解明に寄与しうると考えたが、今回の調査は単年のみの実施であったこともあり解析には至らず、今後の課題である。

Aeromonas 属菌は腸内細菌科に属さないため感染症法における CRE 感染症の起原菌には該当しないが、環境中では薬剤耐性遺伝子のリザーバーとして、菌種間の薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与しうるとの報告がある¹²⁾。地域における薬剤耐性遺伝子の侵淫状況を把握するには、腸内細菌科細菌だけではなく *Aeromonas* 属菌等の他菌種も対象に含めた調査が必要であると示唆された。

【参考文献】

- 1) 国立感染症研究所：病原体微生物検出情報, 40, 17-18, 2019
- 2) Pranita D. Tamma, Patricia J. Simner : Journal of Clinical Microbiology, 56, e01140-18, 2018
- 3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌, H28.12月改訂版 Ver1.1
- 4) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会：薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2018, 平成 30 年 11 月 29 日
- 5) CLSI : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-ED29, 2019
- 6) Takaya Segawa *et al.* : Journal of Microbiological Methods, 133, 35-39, 2017.
- 7) Masanori Watahiki *et al.* : Japanese Journal of Infectious Diseases, 73, 166-172, 2020.
- 8) Bontron *et al.* : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59, 1664-1670, 2015.
- 9) Kohei Uechi *et al.* : Journal of Medical Microbiology, 67, 1535-1537, 2018.
- 10) G M Rossolini *et al.* : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 346-349, 1995.
- 11) 野田万希子:公益財団法人大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成研究報告書, 平成

30 年度

12) Tsuyoshi Sekizuka *et al.*: Environmental Microbiology Reports, 11, 589-597, 2019.

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費	
菌分離及び性状確認（クロモアガーアシネトバクター、NAC 寒天培地、ディスポニードル）	61,524 円
グラム染色液	9,999 円
カルバペネマーゼ産生性確認試験（B-PER II、イミペネム一水和物、フェノールレッド、1.5ml チューブ、ディスポーザブルループ）	105,423 円
カルバペネマーゼ遺伝子の検出（8 連チューブ）	36,960 円
菌種同定（rapid ID 32 E）	19,542 円
検体の保管（マイクロバンク、フリーザーボックス）	66,002 円
振込手数料	550 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円