

## 27. 尼崎市の河川 11 地点における薬剤耐性大腸菌の分布

○村山 隆太郎 (尼崎市立衛生研究所)

吉本 伸二 (尼崎市立衛生研究所)

### 【研究目的】

1980 年以降、薬剤耐性を持つ細菌が世界中で増えてきており、今後も抗菌薬の効かない感染症が増加することが予測される中で、環境における耐性菌の広がりが指摘されている。

また、ワンヘルスの観点から河川の耐性菌の分布を把握することは、公衆衛生上非常に重要であると考えられている。そこで尼崎市の河川において、環境基本法で衛生微生物指標として調査されている大腸菌の薬剤耐性分布の把握を目的とする。

### 【研究の必要性】

環境基本法（平成 5 年法律第 91 号）第 16 条に基づき定められている水質汚濁に係る環境基準のうち、人の健康の保護に関する環境基準については、公共用水域について 27 項目、地下水について 28 項目が、生活環境の保全に関する環境基準については、公共用水域において 13 項目が定められており、生活環境の保全に関する環境基準において、大腸菌数が衛生微生物指標として定められている。

一方、1980 年以降、従来の抗菌薬が効かない薬剤耐性を持つ細菌が世界中で増えてきており、すでに、抗菌薬への耐性を持つ様々な細菌が確認されている。このため、感染症の予防や治療が困難になるケースが増えており、今後も抗菌薬の効かない感染症が増加することが予測される。そういった中で、薬剤耐性菌や抗菌薬によって環境が汚染されることがあり、日本の都市河川の中下流でヒトに由来した薬剤耐性大腸菌が検出されたとの報告<sup>1)2)</sup>や、同じく河川水から一部の抗菌薬が検出されたとの報告<sup>3)4)</sup>もあり、環境における薬剤耐性菌や抗菌薬の広がりが指摘されている。薬剤耐性菌対策はまさにワンヘルスの観点から取り組むべき課題であり、地方の河川であっても耐性菌の分布を把握することは、公衆衛生上非常に重要なことであると考え、尼崎市の河川における薬剤耐性菌の分布を調査する。

## 【研究計画】

尼崎市の河川 11 地点から年間 6 回の計 66 試料を採取し、薬剤耐性菌の探索を行う。2 か月に 1 回の年間 6 回の採取により、季節ごとの差異も調べる。

薬剤耐性菌の探索は、試料を培養した検体から PCR 法により耐性遺伝子のスクリーニングを行い、陽性であった場合に菌の同定を行う。大腸菌を主な対象とするが、その他の耐性遺伝子を持つ菌も対象とする。

また、大腸菌においては、検体から検出後、ディスク拡散法による薬剤耐性試験（以下「ディスク法」という。）を実施し、必要に応じて PCR 法による遺伝子検査を行う。

## 【実施内容・結果】

### 1 探索対象の薬剤耐性菌

カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（以下「CPE」という。）を原因菌とする感染症は、 $\beta$ -ラクタム系薬以外の抗菌薬にも耐性を示す機序を併せもち、治療に難渋する場合が多いことから、近年、世界的にも拡大に傾向にあり、重要な薬剤耐性菌として位置付けられている<sup>5)6)</sup>。そこで、本研究では薬剤耐性菌を考える上で非常に重要となる CPE を探索の対象とし、カルバペネマーゼ遺伝子のスクリーニングを行い、そこから菌を単離することを試みた。

### 2 試料

尼崎市の河川 11 地点において、2023 年 9 月、11 月、2024 年 1 月、3 月、5 月、7 月の計 6 回河川水を採取し、試料とした。

### 3 方法

試料を BGLB 培地（栄研化学）にて培養後、培養液を検体として、アルカリ抽出法にて DNA を抽出し PCR 法を用いた遺伝子検出検査を実施した。また、試料を直径 47 mm、孔径 0.45  $\mu$ m の円形のメンブランフィルター（ADVANTEC）でろ過し、クロモアガーECC 寒天培地（関東化学）及び M-ECC 寒天培地<sup>7)</sup>上で培養後、コロニーを検体として、熱抽出法にて DNA を抽出し PCR 法を用いた遺伝子検出検査を実施した。PCR 法は、カルバペネマーゼ遺伝子を検出する異なる 2 つの検査系を用いた<sup>8)9)</sup>。遺伝子の増幅が確認された場合、対象遺伝子を標的としたモノプレックス PCR 法を用い再度確認した。

遺伝子の増幅が確認された検体において、CPE のスクリーニングのためクロモアガー mSuper CARBA（関東化学）又は M-ECC 寒天培地を用いて培養を行った。疑わしいコロニーが生えた場合、ディスク法<sup>8)</sup>を用い表現型と遺伝子型との整合性を確認するとともに、生化学性状を確認した。

#### 4 結果

PCR 法による遺伝子検出検査の結果、計 39 試料から、カルバペネマーゼ遺伝子を保有する菌（以下「カルバペネマーゼ遺伝子保有菌」という。）が検出された。検出されたカルバペネマーゼ遺伝子の種類と件数は、重複して確認された検体も含め、OXA-48 遺伝子 36 件、KPC 遺伝子 10 件、NDM 遺伝子 8 件、IMP 遺伝子 6 件であった（各試料のカルバペネマーゼ遺伝子保有菌の検出状況は表 1 のとおり）。

カルバペネマーゼ遺伝子の増幅が確認された検体について、CPE スクリーニングのためにクロモアガームSuper CARBA（関東化学）又は M-ECC 寒天培地にて培養を行った結果、IMP 遺伝子が検出された 2 検体から IMP 遺伝子を保有する菌（以下「IMP 遺伝子保有菌」という。）が 4 株単離されたが、いずれもディスク法ではカルバペネム系薬剤に感受性を示した（薬剤感受性検査と生化学性状検査の結果は表 2 のとおり）。

表 1 尼崎市の河川 11 地点におけるカルバペネマーゼ遺伝子保有菌の検出状況

採水年月	河川名	検体ID	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子	検出遺伝子
2023年9月	庄下川A-1	023A-01	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2023年11月	庄下川A-1	023A-02	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2023年1月	庄下川A-1	023A-03	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2023年3月	庄下川A-1	023A-04	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2023年5月	庄下川A-1	023A-05	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2023年7月	庄下川A-1	023A-06	---	---	---	---	---	---	---	---	---

表 2 IMP 遺伝子保有菌 4 株の薬剤感受性検査及び生化学性状検査の結果

採水年月	2024年1月	庄下川A-1	庄下川A-2	庄下川A-3	庄下川C-1
ディスク法	ポロン酸	---	---	---	---
	メルカプト酢酸ナトリウム (SMA)	---	---	---	---
TSI寒天培地	斜面	+	+	+	+
	高層	+	+	+	+
	H <sub>2</sub> S	---	---	---	---
	ガス	+	+	+	+
LIM寒天培地	リジン	+	+	+	+
	インドール	+	+	+	+
	運動性	+	+	+	+
VP半流動培地		---	---	---	---

#### 【考察と今後の課題】

尼崎市の河川 11 地点計 66 試料を培養した検体から、のべ 60 件のカルバペネマーゼ遺伝子が検出され、IMP 遺伝子保有菌が 4 株単離されたが、ディスク法の結果、単離されたい

ずれの株もカルバペネム系薬剤に感受性を示し、今回の探索では CPE が単離されなかった。

この結果から、CPE が尼崎市の河川 11 地点に存在しないことも考えられるが、カルバペネマーゼ遺伝子保有菌については全地点で検出されていることから、CPE は存在するが、今回用いた培養方法やスクリーニング方法では単離に至らなかったことも考えられる。自然環境由来のほとんどの細菌は実験室で培養することができず、多くの細菌は環境ストレス下において、生きているが増殖しない状態に移行し、また、培養可能な細菌であっても、長時間の培養や複数の培養工程、生育状況の確認分析作業が必要となるといわれている<sup>10)</sup>。そのため、環境試料から CPE を単離するためには、今回用いたクロモアガームSuper CARBA などの選択性の強い培地での培養前に、前培養や選択増菌培養の工程を検討する必要があると考えられる。

今回、単離された IMP 遺伝子保有菌 4 株については、生化学性状から大腸菌であることが示唆されたが、菌の同定には至らなかった。16S リボソーム RNA の遺伝子解析を行うことで同定を行うことが可能と考えられる。また、同株において DNA シーケンスによる IMP 遺伝子の型別解析を行うためのプライマーでは IMP 遺伝子が増幅されなかったため、詳細な解析はできなかった。

今回、年間を通じて調査を行ったが、カルバペネマーゼ遺伝子保有菌の検出について、季節における差異は見られなかった。なお、2023 年 11 月のみカルバペネマーゼ遺伝子保有菌は検出されなかったが、その原因については不明である。また、カルバペネマーゼ遺伝子保有菌の検出と同時期に測定していた河川の環境汚染指標である BOD の値及び大腸菌数との間に相関は見られなかった。

尼崎市の河川 11 地点計 66 試料を対象に CPE の探索を行ったが、CPE だけでなくカルバペネム系薬剤耐性菌についても単離されなかった。薬剤耐性菌の検出を目的とした寒天培地は多数販売されているが、臨床試料からの検出が主である。環境中には多種多様な菌が存在し、環境試料中に含まれる薬剤耐性菌の絶対量は臨床検体よりも少なくなることから、臨床検体と同様の培養方法では環境試料から薬剤耐性菌を単離することは困難であることが考えられ、先述したように前培養や選択増菌培養の工程が重要な要素になると考えられる。

薬剤耐性菌の探索において、培養検査や PCR 検出検査等、検査方法の選択が非常に重要であるが、人員と予算等に限りがある研究所においては、どの程度時間と労力をかけて検査を実施するかは大きな課題となっている。近年、次世代シーケンサーを用いた環境中の薬剤耐性菌の網羅的探索も確立されてきている<sup>11)</sup>が、薬剤耐性菌の探索の拡大に向けては、費用面から、次世代シーケンサーを用いない手法を検討していくことは重要である。

#### 【参考文献】

- 1) Taro U., Takaya S. : Quantitative Monitoring of Resistance in Escherichia coli to Clinically Important Antimicrobials in an Urban Watershed. Journal of Water and

Environment Technology, 2016, Vol 14 No.5, p.341-349

2) 清野 敦子ら：金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布, 水環境学会誌, 2004, Vol 27 No.11, p.693-698

3) 木下 輝昭ら：東京都における環境水中抗微生物薬の存在実態及び河川水中カルバペネム耐性菌の検出状況, 東京都健康安全研究センター研究年報, 2020, 71, p.225-232

4) 増田 加奈子：ワンヘルスアプローチによる水環境中の薬剤耐性菌の存在実態調査, 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, 2021, No.29, p.1-6

5) 内閣感染症危機管理統括庁：薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2023-2027, 2023, p.89

6) 荒川 宣親：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 等新型多剤耐性菌のグローバル化と臨床的留意点, 日本化学療法学会雑誌, 2015, 63, p.187-197

7) 河原 隆二ら：IMP 型 CPE 用スクリーニング培地の開発およびパフォーマンスの検討, 感染症学雑誌, 2017, 91(3), p.462-463

8) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌, 2024, p.30-51

9) Masanori W. et al.: Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2020, 73(2), p.166-172

10) Current Situation and Challenges: Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment, 2018, p.17-18

11) 黒田 誠：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 環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究 分担研究報告 環境微生物ゲノム情報の取得, 2021, p.39-47

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
PCR 関連試薬	134,640 円
電気泳動関連試薬	17,600 円
マイクロチップ、マイクロチューブ等	45,980 円
培地、ディスク等	101,780 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円