

12. 下水処理場流入水中から検出される カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の実態調査

○野田 万希子 (岐阜県保健環境研究所)

【研究目的】

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）は世界的に拡散が危惧されている耐性菌である。本研究では、岐阜県内の下水処理場流入水中の CPE を定期的にモニタリングし、県内に存在している CPE の菌種やカルバペネマーゼの種類を把握することとした。

【研究の必要性】

「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016-2020」の中で、ヒト・動物・環境中の耐性菌の動向把握が重要課題として挙げられている。ヒトからの薬剤耐性菌検出状況は、厚生労働省が実施している院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業と、感染症法を根拠とする感染症発生動向調査（NESID）とで把握されている。JANIS では、本事業に参加している医療機関で検出された耐性菌の数が保菌例も含めて報告されており、都道府県ごとの耐性菌の検出状況を把握できることが特徴である。しかしながら、このサーベイランスではカルバペネマーゼ産生の有無（CPE であるか否か）は把握されておらず、地域における CPE の実態把握としては不十分である。一方、NESID では 2017 年に通知¹⁾が発出されて以降、全国の地方衛生研究所で全数把握疾患であるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症の菌株が収集されており、菌種、カルバペネマーゼ産生の有無、カルバペネマーゼの種類の同定検査などが実施されている。しかしながら、NESID では感染症を起こした症例のみの把握であるため、存在する CPE の一部分のみの把握に留まっている。

本研究では下水処理場流入水を検査対象とした。腸内細菌科細菌の特徴として、腸管内常在細菌叢の中に容易にかつ長期間にわたって潜在する²⁾ため、下水処理場流入水はヒト腸管に常在する CPE を調べる上で非常に有用な材料であると考える。流入水中の CPE をモニタリングすることにより、地域に存在する CPE の傾向の把握が可能か検討を行った。

【研究方法】

1) 下水流入水からのスクリーニング

岐阜県内の下水処理場 1 か所から 2017 年 4 月～2019 年 3 月の期間に月 1 回の頻度で流入下水を採水した。流入下水 250 mL を 4°C、3,000 rpm、30 分間遠心して得られた沈渣にリン酸緩衝液（PBS）を加え 2.5 mL の試料原液とした。この試料原液から PBS にて 10 倍希釈系列を作製し、10⁻²～10⁻⁴ 希釈液 0.1 mL を CHROMagar KPC（関東化学）にコンラージ棒で塗

布した。なお、一部の検体では CHROMagar KPC に加え CHROMagar mSuper CARBA (関東化学) も使用した。赤紫色 (*Escherichia coli* 疑い) または青色 (*Klebsiella* 属菌、*Enterobacter* 属菌、*Citrobacter* 属菌疑い) のコロニーを釣菌し、グラム染色、オキシダーゼ試験、ブドウ糖発酵能の確認を行った。ブドウ糖発酵能は、アンドレードペプトン水 (OXOID) にグルコース (1%) と寒天 (0.3%) を添加した半流動高層培地に被検菌を穿刺して培地の赤変と高層部の発育により判定した³⁾。腸内細菌科細菌の特徴であるオキシダーゼ陰性、ブドウ糖発酵性、グラム陰性通性嫌気性菌を選抜し CPE 候補株とした。カルバペネマーゼ産生を確認する方法として modified Carbenemase Inactivation Method (mCIM) と CarbaNP テストを実施し、少なくとも一方が陽性 (+) または中間判定 (±) であった株を CPE と判定した。

2) CPE の菌種同定とカルバペネマーゼ遺伝子の検索

得られた CPE 菌株は、Rapid ID32E api または api 20E (ビオメリュー) を用いて菌種同定を行った。カルバペネマーゼ遺伝子の検索は病原体検出マニュアル⁴⁾または既報⁵⁾に従い、IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、VIM 型、GES 型、SMB 型、KHM 型、IMI 型検出用 PCR にて行った。カルバペネマーゼ遺伝子が検出された株についてはシーケンス解析を行いタイプの推定を行った。

3) CRE 感染症起因株の解析

岐阜県内で 2015 年 9 月～2019 年 8 月の期間に CRE 感染症として届出された起因株 64 株について、2) と同様の方法で解析を行った。

【結果】

1) 下水流入水からのスクリーニング

2 年間の合計 24 検体より 739 株を釣菌した。そのうち、CPE 候補株は 392 株 (53.0%) であった。腸内細菌科細菌を否定した 347 株の内訳は、オキシダーゼ陽性グラム陰性通性嫌気性菌が 321 株、その他（偏性好気性細菌、生育せず等）が 26 株であった。CPE 候補株 392 株のうち 219 株 (55.9%) を CPE と判定した。月ごとの CPE 検出数は 3～24 株であり、すべての検体から CPE が検出された。

2) CPE の菌種同定とカルバペネマーゼ遺伝子の検索

菌種とカルバペネマーゼ遺伝子タイプの検出状況を表 1 に、採取月別カルバペネマーゼ遺伝子陽性株数検出割合を図 1 に、CPE 菌株のカルバペネマーゼ遺伝子型と mCIM 及び CarbaNP テストの判定結果を表 2 に示した。

菌種は腸内細菌科に属する 12 種と同定された（表 1）。そのうち、*Enterobacter cloacae* が最も多く 23 検体 105 株、次いで *Klebsiella pneumoniae* が 22 検体 58 株分離された。カルバペネマーゼ遺伝子型では、IMP 型のみ陽性だった株が 21 検体 73 株と最も多く検出された。IMP 型のタイプは IMP-1 であった株が 70 株、IMP-6 が 3 株であった。その他に、GES 型のみ陽性株が 19 検体 57 株分離され、そのタイプは GES-4、GES-5、GES-6、GES-24 であった。さらに、IMP 型と GES 型の両方が陽性だった株が 19 検体 72 株検出され、IMP 型は

すべて IMP-1、GES 型は GES-4、GES-5、GES-24 に加え新規タイプ (GES-4 の variant) が 1 株存在した。また、NDM 型 (タイプはすべて NDM-5) 陽性株が 2018 年 5, 6, 11, 12 月採取の合計 4 検体から 7 株、IMI 型 (タイプは IMI-2) 陽性株が 2019 年 1 月採取の 1 検体から 2 株分離された (図 1)。KPC 型、OXA-48 型、VIM 型、KHM 型、SMB 型カルバペネマーゼ遺伝子が検出された株はなかった。カルバペネマーゼ遺伝子型と mCIM 及び CarbaNP テストの判定結果を比較したところ、少なくともどちらかの試験が陽性 (+) 判定であった株が IMP 型陽性株では 73 株全株 (100%)、IMP 型と GES 型の両方が陽性だった株では 72 株中 71 株 (98.6%)、GES 型陽性株では 57 株中 25 株 (43.9%) であった (表 2)。

3) CRE 感染症起因株の解析

CRE 感染症起因株 64 株のうち、CPE は 13 株 (20.3%) であった。カルバペネマーゼ遺伝子型は、IMP 型陽性株が 10 株であり、そのうち *bla*_{IMP-1} 保有株が 9 株、*bla*_{IMP-6} 保有株が 1 株であった。その他に、*bla*_{NDM-5} 保有株が 2 株 (2018 年 11 月と 2019 年 7 月に採取された検体より検出)、IMI 型陽性株は 1 株 (2019 年 7 月に採取された検体より検出) であった。最も多く検出されたのは *bla*_{IMP-1} 産生性 *E. cloacae* (6 株) であり、*bla*_{IMP-6} 保有株と *bla*_{NDM-5} 保有株合計 3 株はいずれも *E. coli* であった。

【考察と今後の課題】

本研究の結果、下水処理場流入水中から 39 種類の菌種とカルバペネマーゼタイプの組み合わせの CPE が検出され、流入水中の CPE の多様性が示された。IMP 型陽性の株が 24 検体すべてから検出され、本邦では IMP 型カルバペネマーゼ産生株が優勢であることが改めて示された。IMP 型のうち *bla*_{IMP-1} と *bla*_{IMP-6} 保有株の比率は検出検体数で 20:3、株数で 70:3 であり、県内の CRE 感染症の原因となった CPE での比率 (9:1) と大きな差はなかった。他にも、最も多い菌種とカルバペネマーゼ遺伝子型の組み合わせは *bla*_{IMP-1} 保有 *E. cloacae* であったこと、海外型カルバペネマーゼと呼ばれる遺伝子型のうち NDM 型は検出されたが KPC 型と OXA-48 型は検出されなかつたこと、本邦では報告が稀な IMI 型陽性株が検出されたことなど、下水処理場流入水中と CRE 感染症起因株中の CPE の特徴が一致している点があった。さらに、NDM 型や IMI 型の CPE の分離時期を比較すると、CRE 感染症届出に先立って下水処理場流入水から検出されており、県内にこれらの遺伝子型の CPE が存在していることが示された。

一方、GES 型陽性の株が IMP 型と両方検出された株も含めて 24 検体中 22 検体から 129 株と高い頻度で分離された。GES 型は一部のタイプのみカルバペネマーゼである⁶⁾が、シーケンス解析の結果、全株がカルバペネマーゼ活性を保有すると報告されているタイプであった。GES 型カルバペネマーゼ産生 CPE は岐阜県の CRE 感染症起因株からは検出されたことはなく、全国的にも報告は限られている^{7,8)}。ヒトでの検出例が少ない GES 型の CPE が下水処理場流入水から高い頻度で検出された理由は明らかではないが、GES 型は表現型では判定できず遺伝子検査を実施しなければ見つかることや、本検討で GES 型のみ陽性

の株では他の遺伝子型の CPE と比較して mCIM や CarbaNP テストで陽性（+）となる株の割合が少なかったことから、GES 型が CPE として発見されにくく検出数が過少評価されている可能性がある。今後、今回検出された CPE の遺伝子型によるカルバペネム系薬剤の最小発育阻止濃度の違いなどについても検討が必要である。

本研究により、下水処理場流入水中と CRE 感染症起因株中の CPE では多くの共通する特徴があった。下水流入水をモニタリングすることにより、県下に存在する CPE の傾向を把握できる可能性が示された。

【参考文献】

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長：平成 29 年 3 月 28 日付け健感発 0328 第 4 号, 2017.
- 2) 日本化学療法学会ら：四学会連携提案「カルバペネムに耐性化傾向を示す腸内細菌科細菌の問題（2017）—カルバペネマーゼ産生菌を対象とした感染対策の重要性—」
(http://www.kankyokansen.org/uploads/uploads/files/jsipc/yongakkai_CRE-CPE.pdf) .
- 3) 下島優香子ら：東京都健康安全研究センタ一年報, 63, 151-157, 2012.
- 4) 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, 2016.
- 5) 綿引正則ら：第 46 回薬剤耐性研究会要旨, 2017.
- 6) Bontron Séverine *et al.* : Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59, 1664-1670, 2015.
- 7) 福田千恵美ら：香川県環境保健研究センター所報, 第 15 号, 47-52, 2016.
- 8) 福田千恵美ら：香川県環境保健研究センター所報, 第 16 号, 40-43, 2017.

【経費使途明細】

| 使　　途 | 金　額 |
|---|-----------|
| 消耗品費 | |
| 培地 (CHROMagar KPC、CHROMagar mSuper CARBA) | 80,676 円 |
| オリゴ DNA (プライマー34 本) | 36,720 円 |
| 同定キット (ラピッド ID32E アピ、ミネラルオイル) | 77,695 円 |
| PCR 産物精製キット (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) | 40,824 円 |
| 感受性試験用試薬 (イミペネム一水和物、E-test、BD セシン・ディスク) | 63,763 円 |
| 消耗品 (つま楊枝) | 322 円 |
| 合　　計 | 300,000 円 |
| 大同生命厚生事業団助成金 | 300,000 円 |

表1 菌種とカルバペネマーゼ遺伝子タイプの検出検体数および株数

| | 数字は検体数、株数はカッコで示した | | | | | | | | | | | | 合計 |
|--|-------------------|-------|-----------------------|-----------------|------------------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|----------|
| | IMP型 | | IMP型+GES型 | | | GES型 | | | NDM型 | | IMI型 | 不検出 | |
| | IMP-1 | IMP-6 | IMP 1+ GES-4 | IMP 1+ GES-5 | IMP 1+ GES-24 | GES-4 | GES-5 | GES-6 | GES-24 | NDM-5 | IMI-2 | — | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 20 (47) | 2 (2) | 3 (5) | 6 (7) | 5 (11) | 3 (3) | 3 (6) | 3 (3) | 8 (11) | 1 (3) | 1 (2) | 4 (5) | 23 (105) |
| <i>Enterobacter</i> spp. ^{*1} | 3 (5) | 1 (1) | 1 (2) | 5 (6) | 3 (3) | 1 (1) | 2 (3) | 0 | 2 (2) | 0 | 0 | 0 | 12 (23) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 8 (13) | 0 | 11 (27) ^{*3} | 2 (3) | 0 | 2 (3) | 0 | 7 (12) | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 (58) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 3 (5) | 0 | 2 (3) | 0 | 3 (3) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (11) |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (2) | 0 | 1 (2) | 4 (4) |
| その他 ^{*2} | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (2) | 1 (1) | 1 (1) | 1 (4) | 4 (7) | 2 (2) | 0 | 1 (1) | 10 (18) |
| 合計 | 20 (70) | 3 (3) | 12 (37) | 9 (16) | 10 (19) | 6 (8) | 5 (10) | 8 (19) | 11 (20) | 4 (7) | 1 (2) | 5 (8) | 21 (219) |

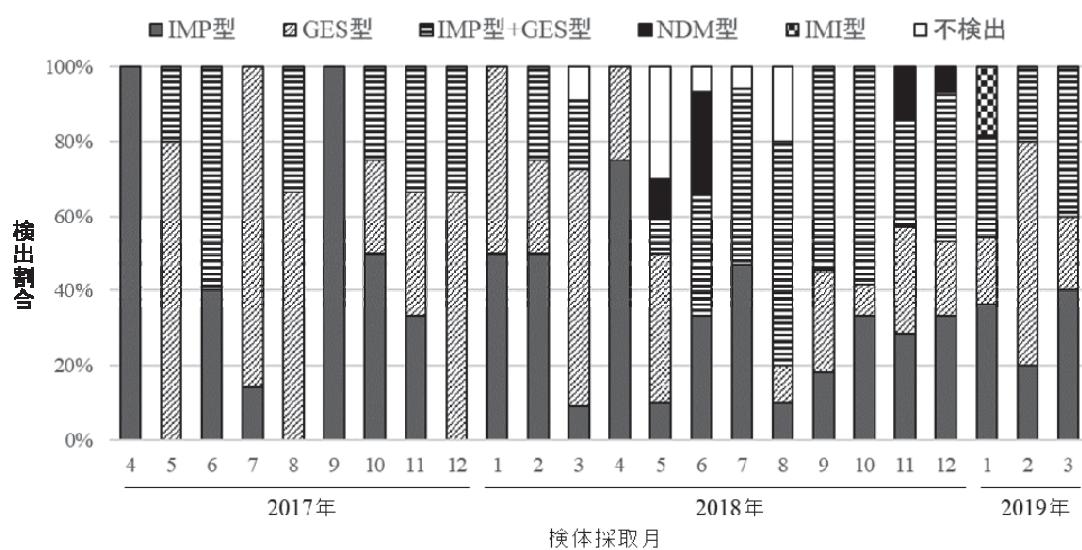
^{*1} *E. cloaca*以外：*E. annigenus*、*E. intermedis*、*E. sakazakii*^{*2} *K oxytoca*、*C. koseri*、*Raoultella ornithinolytica*、*Kluyvera ascorbata*、*Pantoea* spp.^{*3} GES-4 variant 1検体1株を含む

図1 採取月別カルバペネマーゼ遺伝子陽性株検出割合

表2 CPE菌株の遺伝子型とmCLM及びCarbaNPテストの判定結果

| CarbaNP | mCLM | | | + | | | ± | | | - | | | 合計 |
|----------------------|------|---|---|----|---|----|----|----|---|-----|---|---|-----|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | |
| IMP型 | 72 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 73 | 0 | 0 | 73 |
| IMP型+GES型 | 54 | 2 | 2 | 11 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 72 |
| カルバペ ネマーゼ 遺伝子型 | GES型 | 8 | 1 | 5 | 1 | 0 | 24 | 10 | 8 | 57 | 0 | 0 | 57 |
| | NDM型 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 7 |
| | IMI型 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 不検出 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 1 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 合計 | 143 | 4 | 7 | 13 | 1 | 26 | 16 | 9 | 0 | 219 | 0 | 0 | 219 |