

資料

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

増田 加奈子, 平塚 貴大, 秋田 裕子, 木村 淳子, 槇本 佳奈

Survey of Antimicrobial Resistant Bacteria in the Aquatic Environment Based on the One Health Approach.

MASUDA Kanako, HIRATSUKA Takahiro, AKITA Hiroko,
KIMURA Junko and MAKIMOTO Yoshiyasu

(Received : October 8, 2021)

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌およびカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の水環境中の存在実態を明らかにするとともに, 薬剤耐性菌の遺伝子型解析および多剤耐性の評価を行った. ESBL産生菌は*Escherichia coli*が最も多く分離され, CTX-M-9groupが77.4%, CTX-M-1groupが22.6%であった. ST131の割合は41.9%であり, フルオロキノロン系薬剤耐性率はnon-ST131が38.9%であるのに対し, ST131は69.2%であった. 水環境中においても人から検出されるESBL産生菌と同様の薬剤耐性遺伝子や薬剤感受性パターンを示す株が検出されることが明らかとなった. CPEはGES-24の*Klebsiella pneumoniae*と*Enterobacter cloacae*, IMP-11とNDM-1を同時に保有する*K. pneumoniae*が分離された. GES-24は一部のセフェム系薬剤とカルバペネム系薬剤に感性を示したが, IMP-11, NDM-1同時保有株は全てのセフェム系薬剤とカルバペネム系薬剤に耐性を示した. 同時保有株が元々存在していたのか, 環境水からの菌分離における培養過程でプラスミドの伝達があったのか定かではないが, ほとんどの薬剤に耐性を示すNDM型が水環境中に存在していたことが明らかとなった.

Key words : 薬剤耐性菌, 水環境, ESBL, CPE

緒 言

ワンヘルスとは, 人, 動物, 環境 (生態系) の健康は相互に関連して一つであり, 地球規模で一括して捉え, 維持していくという考え方である. 薬剤耐性菌については, 抗菌薬の使用対象となる人や動物だけでなく, 人および動物由来の薬剤耐性菌の環境への流出や過剰抗菌薬投与による環境汚染の観点から, 環境中の薬剤耐性菌の動向を把握することも重要である. 薬剤耐性菌の中でも基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌による感染症は院内のみならず, 市中でも増加し深刻な問題となっている [1-2]. ESBL産生大腸菌の拡散の要因の一つとして, ST131クローンの世界規模での拡がり指摘されているが [3-5], このクローンの水環境中における実態把握はほとんど行われていない. また, 高度な薬剤耐性を示すカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) も世界的な広がりを見せており, 治療困難な状況に陥ることが懸念されている. 今回, ESBL産生菌とCPEの河川水および海水における存在実態を明らかにす

るとともに, 水環境中に存在する薬剤耐性菌の遺伝子型解析および多剤耐性の評価を行ったので報告する.

材料および方法

1 検査材料および菌分離

河川水 (黒瀬川, 瀬野川), 下水処理水, 海水を採水した9地点は図1のとおりである. 2020年5月~2021年2月の間に, 地点B~E, Gは4回, 地点H, Iは3回, 地点A, Fは2回採水し, 採水時に水温を測定した. 河川水および下水処理水は1L, 海水は5Lを0.45 μ mメンブレンフィルター (メルク) でろ過し, ノボビオシン加mEC培地 (栄研化学) 50mL中で42 $^{\circ}$ C一晚培養した. 培養液をクロモアガーESBL (関東化学) およびクロモアガーmSuperCARBA (関東化学) に画線塗抹し, 37 $^{\circ}$ C一晚培養した. それぞれの培地上に発育した赤色コロニーと青色コロニーを釣菌後, TSA (BD) で純培養を行った.

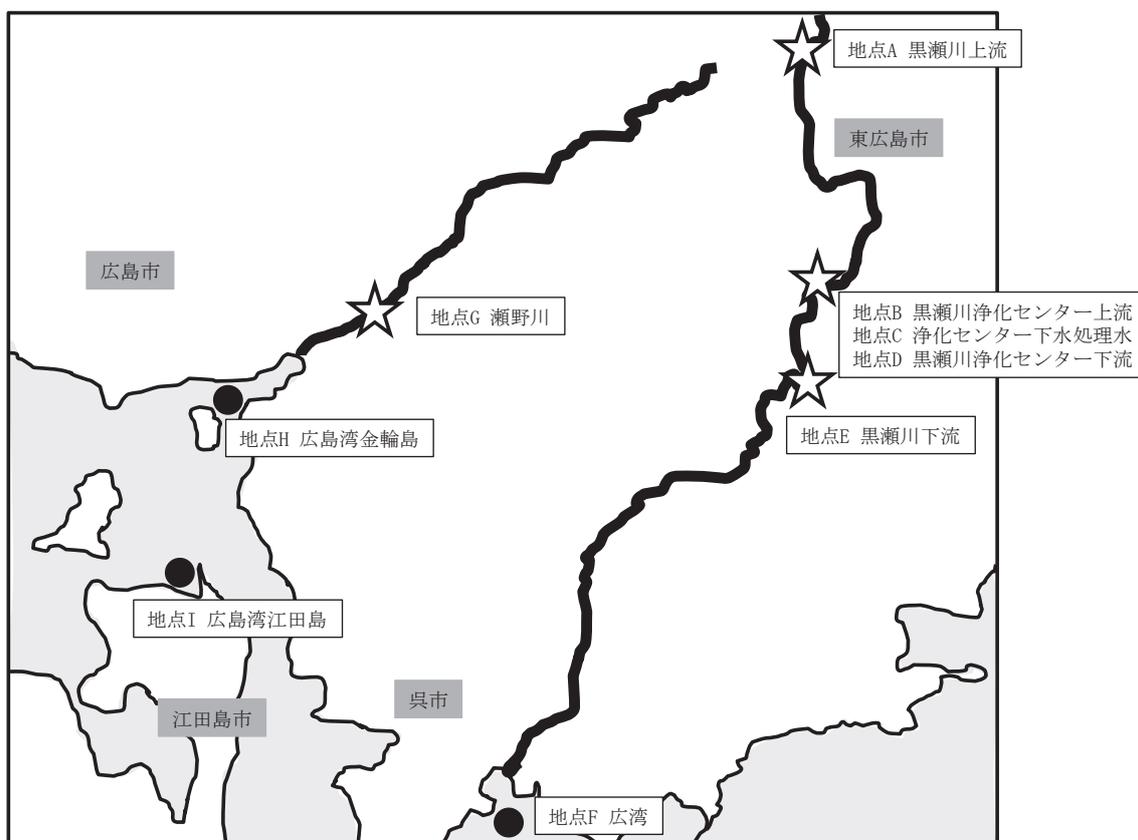


図1 河川水、下水処理水、海水の採水地点

2 分離株の同定および薬剤感受性試験

自動細菌同定感受性検査装置VITEK2 Compact (ビオメリュー) のGN同定カードを用いて菌種を同定し、グラム陰性菌感受性カードAST-N268を用いてアンピシリン (ABPC), アモキシシリン/クラバン酸 (CVA/AMPC), ピペラシリン (PIPC), セファゾリン (CEZ), セフトリアム (CTM), セフメタゾール (CMZ), セフトロキシム (CPDX), セフトキサシム (CTX), セフトジジム (CAZ), セフェピム (CFPM), イミペネム (IPM), メロベネム (MEPM), アミカシン (AMK), ゲンタマイシン (GM), シプロフロキサシン (CPFX), レボフロキサシン (LVFX), ミノサイクリン (MINO), ホスホマイシン (FOM), トリメトプリム/スルファメトキサゾール (ST) の19薬剤のMICを測定した。

3 マルチプレックスPCR法によるESBLおよびカルバペネマーゼ遺伝子の検出

綿引らが開発した方法により, ESBL遺伝子 (未公表) はTEM型, SHV型, CTX-M-1group, CTX-M-2group, CTX-M-9group, CTX-M-8/25group, カルバペネマーゼ遺伝子 [6] はKPC型, IMP型, NDM型, VIM型, OXA-48型, GES型の検出を行った。カルバペネマーゼ遺伝子が検出された場合は, シークエンス解析による重

型の決定を行った。

4 POT法による分子疫学解析

Cica Geneus[®] *E. coli* POT KIT (関東化学) により, ST131の検索と菌株間の比較を行った。POT1の値が49になる株をST131と判定した。

5 O血清型別およびH血清型別

病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用い, OおよびHの血清型別を行った。

6 環境水中のLVFX濃度の測定

12月に採水した河川水および下水処理水に含まれるLVFXの濃度を測定した。前処理および分析は既存の方法 [7] を参考にした。LVFXと光学異性体である(R)-オフロキサシンは順相カラムで分離される [7-8] が, 国内の河川水中には(R)-オフロキサシンはほとんど存在しないとの情報 (未公表) を得たため, 逆相カラムを用いて異性体を分離せず分析した。

結 果

1 ESBL産生菌およびCPEの検出状況

ESBL産生菌は地点 I を除く 8 地点から検出され、CPEは地点 C～E, G の 4 地点から検出された (表 1)。ESBL産生菌は*Escherichia coli*が31株、*Klebsiella pneumoniae*が7株、*Kluyvera cryocrescens*が1株分離された (図 2)。*E. coli*のうち、CTX-M-9group陽性が77.4% (24/31)、CTX-M-1group陽性が22.6% (7/31)であった。*K. pneumoniae*のうち、CTX-M-9group陽性とCTX-M-1group陽性が各3株、CTX-M-8/25group陽性が1株であった。*K. cryocrescens*はCTX-M-9group陽性であった。CPEは*K. pneumoniae*が5株、*Enterobacter cloacae*が1株分離された (図 2)。*K. pneumoniae*は

GES型陽性が4株、IMP型とNDM型がいずれも陽性であった株が1株存在した。*E. cloacae*はGES型が陽性であった。シーケンス解析によりGES型は全てGES-24、IMP型はIMP-11、NDM型はNDM-1であることが判明した (図 2)。

2 ST131 ESBL産生大腸菌の検出状況

POT1の値が49になる株がST131に該当し、分離された*E. coli*のうち、ST131は41.9% (13/31)であり、non-ST131は58.1% (18/31)であった。ST131のうち、CTX-M-9groupは76.9% (10/13)、CTX-M-1groupは23.1% (3/13)であった。世界的に問題となるST131クローンの血清型はO25:H4であるが、今回検出された13株のST131のうち、O25:H4は1株のみであり、他は型別不能であった。

表1 採水地点、採水月における水温、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の検出状況の比較

採水月		採水地点								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
5月	水温 (°C)		18.8	25.9	21.0	19.8		19.3		
	ESBL		+	+	+	+		-		
	CPE		-	-	-	-		-		
8月	水温 (°C)		28.4	30.1	30.3	29.1		32.5	28.4	27.4
	ESBL		+	+	+	+		+	+	-
	CPE		-	-	-	-		+	-	-
11月	水温 (°C)	11.1	8.1	24.0	17.8	12.1	18.4	14.8	19.7	20.2
	ESBL	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	CPE	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2月	水温 (°C)	9.7	8.9	21.6	14.1	9.4	11.5	11.2	9.4	9.9
	ESBL	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	CPE	-	-	-	+	+	-	-	-	-

+ : 薬剤耐性遺伝子を保有する腸内細菌科細菌が分離された
 - : 薬剤耐性遺伝子を保有する腸内細菌科細菌が分離されなかった

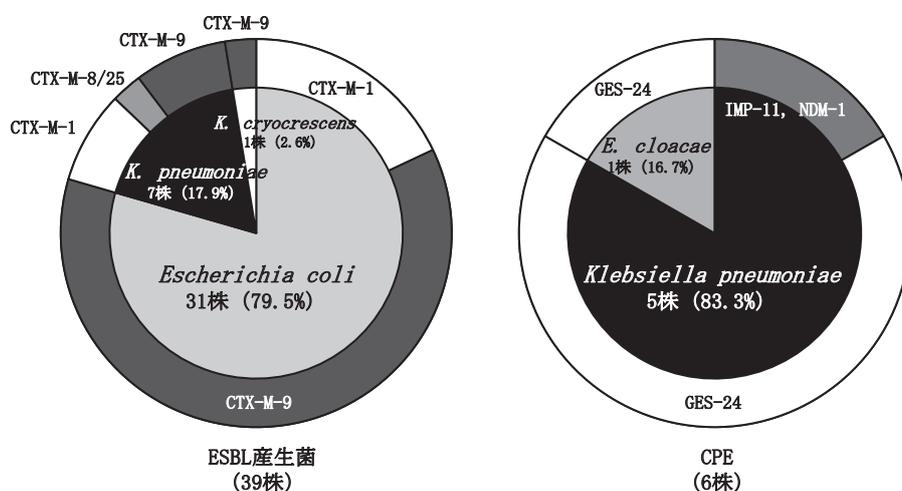


図2 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の菌種と遺伝子型

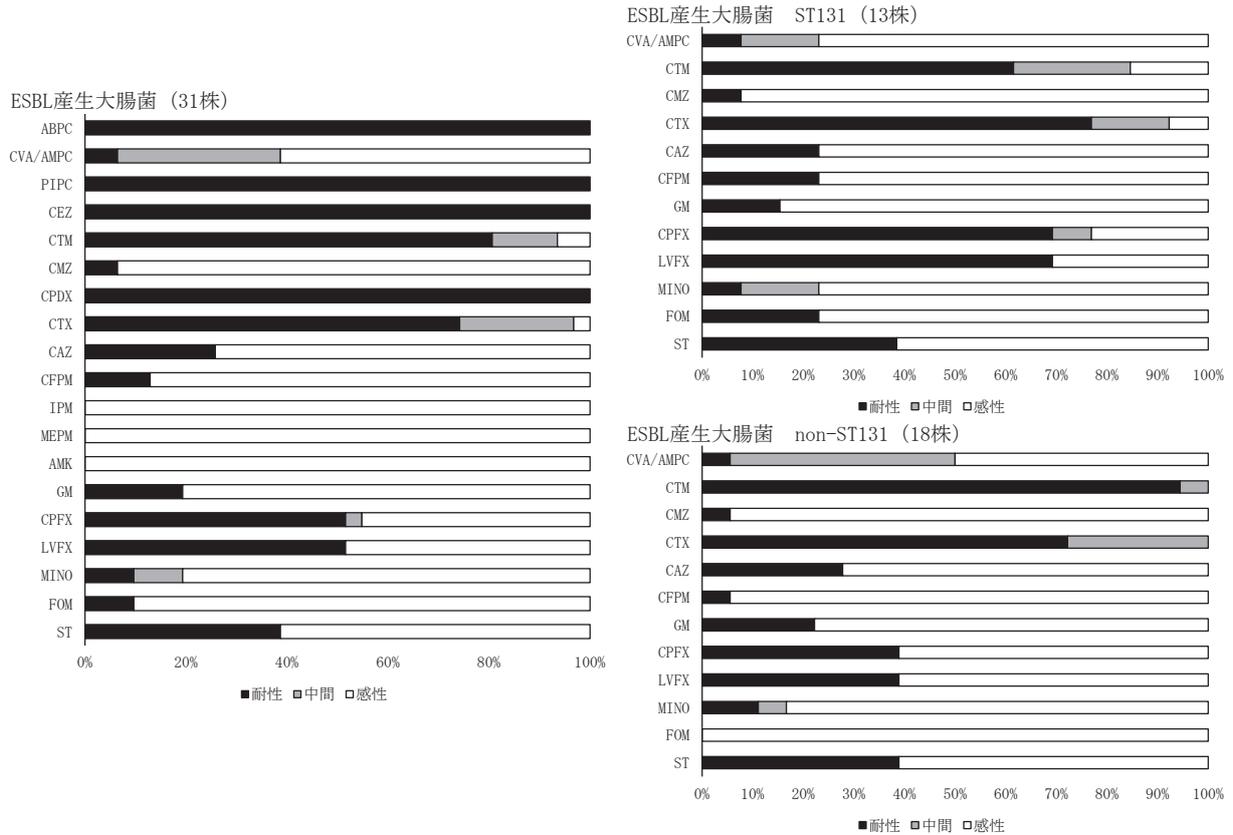


図3 ST131とnon-ST131基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の薬剤感受性パターンと比較

ABPC: アンピシリン, CVA/AMPC: アモキシシリン/クラブラン, PIPC: ピペラシリン, CEZ: セファゾリン, CTM: セフォチアム, CMZ: セフメタゾール, CPDX: セフポドキシム, CTX: セフォタキシム, CAZ: セフトアジジム, CFPM: セフェピム, IPM: イミペネム, MEPM: メロベネム, AMK: アミカシン, GM: ゲンタマイシン, CPFX: シプロフロキサシン, LVFX: レボフロキサシン, MINO: ミノサイクリン, FOM: ホスホマイシン, ST: トリメトプリムスル/ファメトキサゾール

3 ESBL産生大腸菌のPOT値の比較

ST131で同一POT値を示す株は検出されなかった。

4 EBSL産生大腸菌の薬剤感受性試験

フルオロキノロン系薬剤であるCPFXとLVFXの耐性率はnon-ST131が38.9% (7/18) であるのに対し、ST131は69.2% (9/13) であった (図3)。アミノグリコシド系薬剤であるGMの耐性率はST131が15.4% (2/13), non-ST131が22.2% (4/18) でありいずれも高くはなかった (図3)。ESBL産生大腸菌はセフェム系薬剤の中でもCEZ, CTM, CPDX, CTXには耐性を示す一方、CMZ, CAZ, CFPMには感性を示す傾向にあった (図3)。ESBL遺伝子型によって薬剤感受性パターンに大きな差は見られなかった。

5 CPEの薬剤感受性試験

CPEの薬剤感受性はカルバペネム系遺伝子の違いにより薬剤感受性パターンが異なった。つまり、IMP-11, NDM-1同時保有株は全てのセフェム系薬剤とカルバペネム系薬剤に耐性であるのに対し、GES-24は一部のセ

表3 河川水, 下水処理水中におけるレボフロキサシン (LVFX) 濃度 (2020年12月採水)

採水地点	LVFX濃度 (ng/L)
A 黒瀬川上流	3.1
B 黒瀬川浄化センター上流	4.5
C 浄化センター下水処理水	141.2
D 黒瀬川浄化センター下流	74.3
E 黒瀬川下流	22.9
G 瀬野川	1.0

フェム系薬剤とカルバペネム系薬剤に感性を示した (表2)。

6 環境水中のLVFX濃度

浄化センターより上流の黒瀬川や瀬野川におけるLVFX濃度は5 ng/L以下であったが、浄化センターの下水処理では141.2ng/L検出され、そのすぐ下流では74.3ng/L、5 km先の下流でも22.9ng/L検出された (表3)。

表2 カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の薬剤感受性パターン

薬剤耐性遺伝子	菌種	MIC (µg/mL)																ST		
		ABPC	CVA/ AMPC	PIP	CEZ	CTM	CMZ	CPDX	CTX	CAZ	CFPM	IPM	MEPM	AMK	GM	CPFX	LVPX		MINO	FOM
IMP-11, NDM-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>=32	>=32	>=128	>=64	>=64	>=64	>=8	>=64	>=64	>=32	>=16	>=16	16	>=16	1	2	2	32	>=320
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>=32	>=32	>=128	>=64	>=64	>=64	>=8	4	4	<=1	2	4	16	<=1	2	4	>=16	128	<=20
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>=32	>=32	>=128	>=64	<=8	16	>=8	4	4	2	0.5	0.5	32	>=16	1	1	>=16	64	>=320
GES-24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>=32	>=32	>=128	>=64	<=8	16	2	<=1	<=1	<=1	1	0.5	16	>=16	1	1	>=16	64	>=320
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>=32	>=32	>=128	>=64	<=8	16	2	2	2	<=1	1	0.5	16	>=16	1	1	>=16	64	>=320
	<i>Enterobacter cloacae</i>	>=32	>=32	>=128	>=64	>=64	>=8	8	4	4	1	1	>=64	2	1	1	4	<=16	<=20	

考 察

河川流域および海域におけるESBL産生菌とCPEの存在実態について調査を実施した。下水処理水が流入する黒瀬川と下水処理水の流入がない瀬野川、それぞれの河川が流れ着く河口付近の海域と河口から離れた海域を対象としたところ、河口から離れた海域を除きESBL産生菌が検出された。このことは、下水処理水の流入に関わらず河川水中にESBL産生菌が存在することが明らかとなった。健康人におけるESBL産生大腸菌の腸管内長期保菌に関する研究では、ST131 O25:H4とST648 O1:H6に属する一定のクローンが主流であること、ESBL遺伝子型はCTX-M-9groupに属するCTX-M-14とCTX-M-27が主流であること、検出菌株の85%がフルオロキノロン系薬剤に耐性を示すことが長期保菌株の特徴として報告されている [9]。今回の調査においても、ST131かつCTX-M-9group陽性のESBL産生大腸菌が多く検出され、ST131の7割がフルオロキノロン系薬剤に耐性であったことから、環境水中でもヒト由来株と同様のSTが優勢であることが示された。しかし、臨床的に問題となっているST131の血清型はO25:H4であり、フルオロキノロン系だけでなくアミノグリコシド系薬剤にも耐性を示すことが多いが、今回検出された株の大半が血清型別不能であり、アミノグリコシド系薬剤にもほとんど感性であったことから、環境水中のST131株と臨床におけるST131株は系統学的な分布が異なっている可能性が示唆された。いずれにしても、尿路感染症の際に経口薬として投与されることが多いフルオロキノロン系薬剤に対して耐性を示す株が上流を除く様々な地点で検出されたことは留意すべきである。また、フルオロキノロン系薬剤が経口薬として多く使用されていることから、下水処理水におけるLVFX濃度が高くなったと思われる。

CPEに関してはGES-24が多く検出された。香川県や愛媛県で臨床分離株からGES-24が検出されたとの報告があり [10-11]、今後の拡がり警戒されているGES型である。GES型β-ラクタマーゼはG170SまたはG170Nのアミノ酸変異によりカルバペネマーゼ活性を有するとの報告があり [12]、今回検出したGES-24はG170Sのアミノ酸変異があり、CPEと判定した。しかし、カルバペネム系薬剤のIPMとMEPMのMICは1株を除き2 µg/mL以下であり、このような株はCPEであってもカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症の届出基準に当てはまらない。よって、GES-24のCPEが感染症の起原菌となった際に、薬剤感受性試験結果のみではCREとして判定されない可能性があることから、医療現場にお

いてもカルバペネム感性のCPEが存在することを念頭に置いて検査する必要がある。一方, IMP-11, NDM-1同時保有株は全てのセフェム系薬剤とカルバペネム系薬剤に耐性を示した。NDM-1はカルバペネム系を含むほぼ全ての β -ラクタム系薬剤を分解できる一方で, IMP-11はカルバペネマーゼであるにも関わらず, 薬剤感受性検査でカルバペネム感性と判定されてしまうステルス型CPEであるとの報告があるため [13], 同時保有株がカルバペネム系薬剤に耐性を示した要因はNDM型にあると考えられた。さらに, 当該菌株のゲノム解析を国立感染症研究所薬剤耐性研究センターに依頼した結果, それぞれの遺伝子は別々のプラスミド上に存在することが明らかとなった。増菌培養を経て菌分離を行っているため, 河川水中に同時保有株が元々存在していたのか, 培養過程でプラスミドの伝達があったのか定かではないが, ほとんどの薬剤に高度耐性を示すNDM型が水環境中に存在していたことは確かである。今後も水環境中におけるESBL産生菌やCPEの動態を注視していく必要がある。

文 献

- [1] Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. (2004): Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 163-167.
- [2] Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. (2008): Population-Based Laboratory Surveillance for *Escherichia coli*-Producing Extended-Spectrum β -Lactamases: Importance of Community Isolates with *bla*_{CTX-M} Genes *Clin Infect Dis.* 38: 1736-1741.
- [3] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Jhonson JR. (2008): Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 61: 273-281.
- [4] Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. (2010): *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States. *Clin Infect.* 51: 286-294.
- [5] Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. (2020): *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clin Microbiol Rev.* 27: 543-574.
- [6] Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, Kumagai Y, Noda M, Masuda K, Fukuda C, et al. (2020): Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase. *Jpn J Infect Dis.* 73: 166-172.
- [7] 環境省大臣官房 環境保健部環境安全課. 平成30年度 化学と環境 化学物質分析法開発報告書. 令和2年1月: 820-881.
- [8] 折原智明. (2020): 順相LC/MS/MSによる環境水中のレボフロキサシンと(R)-オフフロキサシンの分離定量. *分析化学.* 69: 105-113.
- [9] Nakane K, Kawamura K, Goto K, Arakawa Y. (2016): Long-Term Colonization by *bla*_{CTX-M}-Harboring *Escherichia coli* in Healthy Japanese People Engaged in Food Handling. *Appl Environ Microbiol.* 82: 1818-1827.
- [10] 福田千恵美, 安藤友美, 岩下陽子, 内田順子. (2016): 香川県内のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子の検出状況. 香川県環境保健研究センター所報. 15: 47-52.
- [11] 仙波敬子, 園部祥代, 木村俊也, 井上 智, 四宮博人, 松井真理, 鈴木里和. (2016): 愛媛県の医療機関で分離された薬剤耐性菌株の遺伝子解析. 愛媛衛環研年報. 19: 1-7.
- [12] Bontron S, Poirel L, Nordmann P. (2015): In vitro prediction of the evolution of GES-1 β -lactamase hydrolytic activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 59: 1664-1670.
- [13] 鹿山鎮男, 桑原隆一, 繁本憲文, 木場由美子, 久恒順三, 大毛宏喜, 菅井基行. (2016): 薬剤耐性菌の基礎知識「ESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌」. *ケミカルタイムス.* 239: 3-9.