

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）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離」

研究分担者： 山口 進康 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部生活環境課 課長

研究要旨

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌の分布拡大とヒトへのリスクが懸念される中、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態は不明である。したがって、環境がヒトおよび動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路の解明につながるデータの収集が急務である。

そこで本分担研究では、以下の項目について調査研究を行った：

- 1) 大阪府内において、下水処理場からの放流水およびその放流水が流入する河川水を計 4 地点から採取し、環境 AMR モニタリング用の試料調製および薬剤耐性菌の分離を試みるとともに、薬剤耐性遺伝子の検索を行った。その結果、下水処理場からの放流水およびその流入後の河川から、*bla*_{GES-24} を保有する *Enterobacter* sp.、*Raoultella ornithinolytica* および *Klebsiella pneumoniae*、*bla*_{NDM-5} を保有する *K. pneumoniae* を分離した。検出される株は少ないが、環境水の分離培養法は潜在的な AMR の実態を把握する上で、有効な手法の 1 つであると考えられた。
- 2) 全国レベルの環境 AMR モニタリングのため、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に対して研究協力を依頼した。その結果、34 地方衛生研究所から協力が得られ、2020 年 8～9 月および 2021 年 1～3 月に下水処理場からの放流水を収集できた。各試料水は各地衛研において前処理を行い、国立感染症研究所（分担・黒田）によってメタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出が行われた。
- 3) 全研究班で進めている環境 AMR システマティック・レビューのため、環境中の耐性菌および耐性遺伝子に関する国内外の文献情報を検索した。

研究協力者：

安達 史恵
大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部生活環境課 主任研究員

河原 隆二
大阪健康安全基盤研究所
微生物部細菌課 主幹研究員

地方衛生研究所 34 機関の研究員

A. 研究目的

近年、医療施設・市中・家畜のみならず、世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性（Antimicrobial Resistance: AMR）因子が検出され、環境での対策を含めたワンヘルス・アプローチが注目されている。

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌の分布拡大とヒトへのリスクが懸念される中、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態も不明である。したがって、環境がヒトおよび動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路の解明につながるデータの収集が急務である。

そこで、以下の研究を計画した；

- 1) 大阪府内において、下水処理場からの放流水およびその放流水が流入する河川水を夏期と冬期に採取し、メタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出を行うとともに、薬剤耐性菌の分離および分離株の薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性パターンを決定する。
- 2) 地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に対して研究協力を依頼し、全国レベルの環境AMRモニタリングを行う。
- 3) 環境中の耐性菌および耐性遺伝子に関する国内外の文献情報を検索・収集する。

B. 研究方法

1. 大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握および薬剤耐性菌の分離

本研究班で実施している「メタゲノム解析による薬剤耐性因子検出」のプロトコールに従い、サンプリングおよび試料の調製を行った。

大阪府内の下水処理場2地点およびその下流河川2地点において、2020年8月および2021年2月に採水を行った。なお、河川でのサンプリングにおいては、それぞれの下流処理場からの放流水が流入した地点より下流をサンプリングポイントとした。

サンプリングした試料水500 mLを0.2 μm孔径のフィルターを用いてろ過し、細菌以上の大きさの浮遊物を回収した。このフィルターを滅菌したメスで1/4に裁断した後、マイクロチューブに入れて、国立感染症研究所に冷凍宅配便で送付した。

上記フィルターの残り1/4ずつを1 μg/mLのMeropenem (MEPM)を含有するLB BrothおよびUniversal Pre-enrichment Broth (UPB)で前培養後、0.25 μg/mLのMEPMおよび70 μg/mLのZnSO₄を含有するCHROMagar ECC (m-ECC)、1 μg/mLのCefotaxime (CTX)を含有するCHROMagar ECC (CTX-chromo)に塗抹後、36°Cで18時間培養し、腸内細菌科細菌の分離を試みた。また、CHROMagar COL-APSE (COL)および0.03 μg/mLのCiprofloxacin (CPFX)添加CHROMagar ECC (CPFX-chromo)も追加し分離を試みた。さらに、前処理の検討のため、残りのフィルターを用いて、前培養なしの条

件でも分離を試みた。

分離したコロニーは生化学的性状試験およびマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて同定を行った。その後、ドライプレート (栄研化学) を用いて、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の標準法 (M100, 28th ed.) に従い、微量液体希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) を決定した。また、ディスク拡散法を用いたメタロ-β-ラクタマーゼや基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase ; ESBL) 等の産生鑑別試験、カルバペネマーゼ産生確認試験 (Modified Carapenem Inactivation Method; mCIM) を行った。

得られた株については、PCRによる耐性遺伝子のスクリーニングおよびシーケンスによるサブタイプの検索を行った。

2. 環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施

環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の全国的なサーベイランスを行うために、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所 (地衛研) に研究協力を呼び掛けた。新型コロナウイルス感染症が拡大し、各地衛研も関連業務に多忙を極める中、計34機関から研究協力を得ることができ (前年度よりも2機関増加)、環境水のサンプリングおよびメタゲノム解析のための試料調製を依頼した。

環境水のサンプリングに先立ち、サンプリングおよび前処理に必要な物品として、採水用ボトル、フィルター付きろ過容器、フィルター裁断用のメス、凍結送付用のマイクロチューブを各研究協力機関に送付した。

環境水のサンプリングは夏期: 2020年8月~9月初旬および冬期: 2021年1月~3月にかけて行われ、「下水処理場の放流水」あるいは「処理水の放流口にできる限り近い地点の河川水 (表層水)」が採取された。なお、水量の増える雨天時や雨天後の採水を避けた。

サンプリングにあたっては、採水箇所の位置情報、日時、水温、気温等の記録とともに、採水地点および周辺の写真撮影を依頼した。

また、下水処理場に関する情報として、1日平均の処理能力、処理方法、管理する区域の人口、処理区の範囲等について、調査・情報提供を依頼した。

試料調製にあたっては、前項で述べたプロトコルを配布し、採水、前処理および試料調製が統一された方法で行われるよう依頼した。調製した試料は冷凍宅配便で国立感染症研究所に送付され、メタゲノム解析が行われた。なお、冷凍宅配便での発送までの間、試料は -80°C で保管するよう依頼した。

3. 環境 AMR に係る文献の検索・収集

環境 AMR に関して「環境と薬剤耐性」をキーワードとして、文献の検索を行った。今年度はこれまでの2年間の成果をふまえ、日本語で書かれた論文の検索を行った。

C. 研究結果

1. 大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握および薬剤耐性菌の分離

メタゲノム解析法による環境 AMR の解析の結果、アミノグリコシド、 β -ラクタム剤、サルファ剤、マクロライドおよび第4級アンモニウム耐性に係る薬剤耐性因子の検出割合が多く、全体の約80%以上を占めていた。対象とした2箇所の下水処理場のうち、1地点の下水処理場の放流水およびその下流河川の結果を図1に示した。放流水と下流河川における検出割合は類似しており、下流河川においては放流水の影響を大きく受けていると考えられた。他の1地点においても同様の結果であった。この傾向は、2018、2019年度の結果とも類似しており(図2)、全国のモニタリング結果とも一致していた。また、大阪においては全国と比較して検出率が突出している薬剤耐性因子はなく、地域特異性等は見られなかった。

培養法を用いた調査においては、2020年8月および2021年2月に分離した株について、スクリーニングおよびシーケンス解析を行った結果、*bla*_{GES-24} 保有 *Enterobacter* sp.、*R. ornithinolytica* および *Klebsiella pneumoniae*、*bla*_{NDM-5} 保有 *K. pneumoniae* の計4株が同定された。*Enterobacter* sp.、*R. ornithinolytica* は CFPX-chromo 培地から、

K. pneumoniae の2株は m-ECC 培地から分離された。さらに IPM および MEPM に対し MIC が $4\ \mu\text{g/L}$ で耐性を示し、mCIM の結果カルバペネマーゼ陽性となった *Enterobacter* sp. が分離され、耐性遺伝子の同定を進めている。

その他にも、ESBL 産生株が CTX-chromo および CFPX-chromo から分離され、その遺伝子型は CTX-M-1 型、CTX-M-2 型、CTX-M-9 型、CTX-M-1+TEM 型、CTX-M-1+SHV 型、CTX-M-1+TEM+SHV 型、CTX-M-9+TEM 型、CTX-M-1+CTX-M-9 型であった。一方、COL 培地から分離株は得られなかった。

前述のカルバペネマーゼ産生株の概要を表1に示す。*bla*_{GES-24} 保有 *Enterobacter* sp. は、IPM に対し MIC が $2\ \mu\text{g/mL}$ と感受性で、MEPM に対し MIC が $>4\ \mu\text{g/L}$ と耐性を示した。第3世代セファロsporin (Ceftazidime; CAZ、Cefotaxime; CTX) に対して耐性を示したが、ESBL の産生は確認されなかった。*R. ornithinolytica* は汽水域の環境中や虫、魚等に存在する細菌であるが、臨床においてカルバペネム耐性菌として分離された例もある。我々の調査において、今回初めて環境中から分離された。このように、これまで分離されていない薬剤耐性菌を培養法を用いて分離し、詳細に解析することで、地域における潜在的な AMR の実態の把握にもつながると考えられる。

2. 環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施

全国34の地方研究衛生研究所において、夏期と冬期にサンプリングが実施され、得られた試料の解析は国立感染症研究所(黒田、関塚ら)で実施した。解析結果は採水地点等が判明しないよう、匿名で処理され、総括したデータについて考察がなされた。

3. 環境 AMR に係る文献の検索・収集

薬剤耐性に関して日本語で書かれた文献をデータベースやwebサイトで検索したが、水環境を対象とした文献は、黒田誠博士らによって作成された文献情報共有サイトに既に登録した文献以外には、新たに見つけることが

できなかった。

D. 考察

3年間の6回の調査において、カルバペネマーゼ産生株は、調査毎に1~3株、計11株分離された(表1)。分離された株の培地は、2018および2019年度の調査では6株中5株がLB-mECC培地あるいはUPB-mECC培地であったが、2020年度の調査では5株中3株がCPFX-chromoで、4株が前培養なしの条件で分離された。したがって、前培養なしでも分離可能であることが明らかとなった。

本調査結果から、環境水からの薬剤耐性菌の分離には、前培養を用いた方法も一定有効であると考えられるが、前培養を行うと対象としている菌以外も増殖されるため、最も効率的な検出方法とはいえ、今後、前処理方法についてはさらなる検討が必要と考えられた。

メタゲノム解析により検出された薬剤耐性因子のうち、 β -ラクタマーゼ関連遺伝子はGES、IMP、OXA、VEB型等が多数を占め、この傾向は地点、季節および年度による違いは見られなかった。したがって大阪の状況をいずれの試料の結果も反映していると考えられた。一方、環境水中から分離した株が保有していた耐性遺伝子のvariantはほとんど検出されず、また、対象地域の医療機関から報告されるものとも異なっていた。メタゲノムで検出された耐性遺伝子の由来については、さらなる調査が必要であると考えられた。

一方で、培養法においては、全24試料に対するESBL株、ヒト由来と想定されるカルバペネマーゼ産生株の陽性率は、それぞれ79%および13%となり、現在の医療機関での検出状況と合致していると考えられた。したがって、培養法で得られる結果は地域の状況を把握するための指標となりうるのではないかと考えられた。

以上より、メタゲノム解析によるAMRの環境水中のモニタリングは、薬剤耐性遺伝子の全体像の把握、あるいは他地域との比較による地域特有の耐性遺伝子の検出には有用であると考えられた。さらに、分離培養法はさらなる検討は必要であるが、検出感度には優れていると考えられ、これらを同時に行う

ことで、より詳細に環境中のAMRに関する情報が取得できるものと考えられた。

環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施にあたっては、大阪を含めた計35機関により国内広範囲のデータを収集することができた。

E. 結論

本分担研究では、大阪府内の環境水を対象として、薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する情報を収集した。また、環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関して、全国的なサーベイランスに取り組んだ。

これらのサーベイランスにより、環境中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の現状を把握するためのデータが得られ、その実態を明らかにするためのデータを蓄積できた。これらのデータは、本邦の環境中の薬剤耐性因子や抗微生物薬がヒトおよび動物へ与える影響についてリスク評価を行うための基盤となるものであり、薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に貢献できるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

その他発表

1. 河原隆二、山口貴弘、安達史恵、安楽正輝、川津健太郎：大阪府内で分離されたmCIM陽性Enterobacter cloacae complex株の解析。第49回薬剤耐性菌研究会, 埼玉(2020)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表1 カルバペネマーゼ保有株の概要

年度	菌種	遺伝子型	由来	培地	MIC (µg/mL)							
					PIPC	CAZ	CTX	AZT	IPM	MEPM	AMK	CPFX
2018	<i>E. Coli</i>	NDM-1	河川	LB-mECC	>64	>16	>16	<0.5	>8	>8	<2	0.25
	<i>Enterobacter</i> sp.	FRI-8	河川	LB-CTX-chromo	4	<0.5	<0.5	<0.5	4	4	<2	<0.03
	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24, OXA-181	河川	LB-mECC	16	2	1	<0.5	>8	>8	32	0.06
2019	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	LB-mECC	32	4	1	<0.5	>8	8	32	1
	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	河川	UPB-mECC	>64	>16	>16	4	<0.25	4	<2	<0.03
	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	LB-mECC	>64	16	>16	>16	4	4	16	1
2020	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	CPFX	64	>16	16	>16	2	4	<2	0.06
	<i>R. ornithinolytica</i>	GES-24	河川	CPFX	>64	8	1	<0.5	2	2	32	1
	<i>K. pneumoniae</i>	GES-24	河川	mECC	>64	4	<0.5	1	4	4	<2	0.5
	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5	放流水	LB-mECC	>64	>16	>16	<0.5	>8	>8	<2	0.06
	<i>Enterobacter</i> sp.	-*	河川	CPFX	4	<0.5	<0.5	<0.5	4	1	<2	0.06

PIPC, piperacillin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; AZT, aztreonam; IPM, imipenem; MEPM, meropenem; AMK, amikacin; CPFX, ciprofloxacin

* 未同定

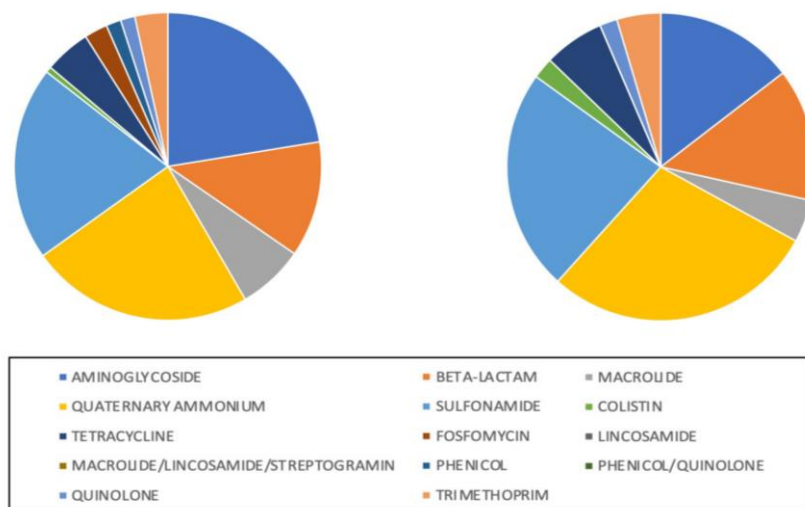


図1. メタゲノムでヒットした耐性遺伝子割合 (2020年度)

(左図: 下水処理放流水、右図: 下流河川)

