

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解析」

研究分担者： 山口 進康 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部食品化学課 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、各種  $\beta$ -ラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌科細菌を分離した。

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、42 地方衛生研究所から協力が得られ、2023 年 8 月～9 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。

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 42 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。

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、2023 年 7 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、それぞれの下水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  $\mu\text{m}$  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。

培養法における前処理方法は、2021 年度に検討した方法を用いて実施した。すなわち、試料水 400~500 mL を 0.45  $\mu\text{m}$  孔径のフィルターでろ過し、フィルターを CHROMagar ECC を用いて 36°C で 18 時間培養後、フィルター上のコロニーをかきとり、滅菌生理食塩水に懸濁させた。次に、培地上のコロニー数が約 30~300 となるようにマクファーランドスタンダードを用いて菌液を調製後、以下の 1)~2) の培地に塗抹した。

- 1) 0.25  $\mu\text{g/mL}$  の MEPM および 70  $\mu\text{g/mL}$  の  $\text{ZnSO}_4$  を含有する CHROMagar ECC (M-ECC)
- 2) 1  $\mu\text{g/mL}$  の Cefotaxime (CTX) を含有する CHROMagar ECC (CTX-chromo)

分離したコロニーは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, 34<sup>th</sup> ed.) に従い、微量液体希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) を決定した。また、ディスク拡散法を用いたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼや基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase ; ESBL) 等の産生鑑別試験、および、カルバペネマーゼ産生確認試験 (Modified Carbapenem 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。

また、これまでに分離した一部の株について、詳細を明らかにするため、NucleoBond HMW DNA (Takara Bio) で DNA 抽出後、全ゲノム解析をナノポアシーケンサー MinION (Oxford Nanopore technologies) により行い、耐性遺伝子の同定、その他薬剤遺伝子の検索およびプラスミド解析を実施した。

## 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。その結果、計 42 機関から研究協力を得ることができ (前年度よりも 3 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：2023 年 8 月~9 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ールを配布し、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℃で保管するよう依頼した。

## 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

#### 1. 菌の分離

培養法を用いて、環境水中の薬剤耐性菌調査を2023年7月に実施した結果、各種βラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌目細菌を分離した。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(CRE)はM-ECC培地から3株分離された。遺伝子のスクリーニングおよびシーケンスの結果、*bla*<sub>GES-24</sub> 保有 *K. pneumoniae*、*bla*<sub>FRI-8</sub> 保有 *E. roggenkampii*、*bla*<sub>GES-24</sub> 保有 *Enterobacter* sp.であった。分離した株の概要を表1に示す。

ESBL産生株はCTX-chromo培地から8株分離され、その遺伝子型はCTX-M-1型、CTX-M-2、CTX-M-8型、CTX-M-9型、CTX-M-9+TEM型であった。

全4試料におけるESBL及び人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100%、25%となった。

#### 2. ゲノム解析

分離した *bla*<sub>FRI-8</sub> 保有 *E. roggenkampii* およびこれまでに我々が分離した2株の *bla*<sub>FRI-8</sub> 保有株の計3株について、NGSデータによるプラスミド解析を実施したところ、すべてIncFIIに属していたが、その相同性は低く、今回分離した株と最も相同性が高かったのは、琵琶湖から分離された *E. asburiae* のプラスミド<sup>1)</sup>であった(99.78%の一致度(coverage 94%))(図1-(a))。

2021-2022年に分離したNDM-5型CRE4株の内訳は、*E. coli*が2株、*K. pneumoniae*、*C. braakii*が各1株であり、4株とも調査地点2地点のうち1地点の下水処理場とその下流河川から分離された。プラスミド解析の結果、全ての株が *bla*<sub>NDM-5</sub> の蔓延に寄与しているIncX3プラスミドを保有し、いずれの株も海外で分離されている株のプラスミドとの相同性が高かった(99.99%の一致度

(coverage 99%以上))。また、4株の比較においても、相同性が極めて高かった(図1-(b))。MLSTの結果、*E. coli*2株はST410、*K. pneumoniae*はST29、*C. braakii*がST110に分類された。

### 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

全国42の地方研究衛生研究所において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。

## D. 考察

培養法における前処理方法として、2021年度より検討を開始した方法を用いて、分離培養を実施した。全4試料においてESBL及び人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100%、25%となり、現在の医療機関での検出状況と合致しているのではないかと考えられた。

これまでの調査で比較的多く分離している *bla*<sub>GES-24</sub> 保有株は *K. pneumoniae*、*Enterobacter cloacae* complex、*R. ornithinolytica*の3菌種であるが、今年度の調査においても菌種は *K. pneumoniae* および *Enterobacter* sp.であった。国内の医療機関でGES-24陽性株が分離されることは稀であり、CRE病原体サーベイランスにおいても2018-2021年にかけて毎年1-2株分離されているのみである。しかし、他の報告において、病院排水中にGES-24陽性の病原性グラム陰性菌が存在し続けることで、耐性遺伝子あるいはプラスミドが拡散し、院内感染のリスクが高まる恐れを指摘されている<sup>2)</sup>。環境中から高頻度に *bla*<sub>GES-24</sub> 保有株が多菌種から分離されることは、環境中の細菌が耐性遺伝子の拡散に寄与している可能性が示唆される。

プラスミド解析から *bla*<sub>FRI</sub> 保有プラスミドは多様性を多く持つプラスミドであることがわかっているが、今回のFRI-8保有3株の比較においても、一部保存性を有する領域があ

るものの、高度に保存されているわけではないことが明らかとなった。FRI はこれまでに 12 のバリエーションが報告されており、FRI1-9 までは菌種が *Enterobacter* 属細菌であったため、*bla*<sub>FRI</sub> 保有のプラスミドは *Enterobacter* 属細菌内でのみ保存されており、宿主域が狭いと考えていた。しかし、FRI-10 は *E. coli* が保有するプラスミド上に位置していたことから、今後は、菌種を超えた伝播も考えられる。また、FRI 型カルバペネマーゼ保有株は、臨床での報告例が少ないものの、大阪府内の環境水から我々はこれまでに 3 株分離しており、潜在的な拡散が示唆される。

今回分離された NDM-5 型カルバペネマーゼ産生 *E. coli*、*K. pneumoniae*、*C. braakii* の全ての株において、世界的な *bla*<sub>NDM-5</sub> の蔓延に寄与している IncX3 プラスミド上に *bla*<sub>NDM-5</sub> が検出された。国内で感染例が少ない NDM-5 型カルバペネマーゼ産生菌が、異なる菌種から高頻度に環境中から分離され、またそれらが保有するプラスミドの相同性が高いことから、これらは市中関連株ではなく、海外からの渡航者を介して、持ち込まれている可能性が高いと考えられた。

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 42 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。

薬剤耐性菌の分離において、2021 年度から検討している、フィルターを用いて前培養後、培養する方法がより効率的に目的とする菌を検出できる方法であることが示唆された。分離培養で得られる株は、CRE と比較すると ESBL 株が多く、全検体から検出されていた。これは、現在の医療機関での検出状況と一致しており、培養法を用いた薬剤耐性菌の分離は、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。一方、CRE の詳細な解析により、海外由来と考え

られる遺伝子を保有する株も分離されているため、放流水から分離される株が地域の感染状況の指標となり得るかについては、さらなるデータの蓄積が必要である。また、海外由来と考えられる遺伝子が今後定着及び拡散する可能性も否定できないことから、継続したモニタリングが重要と考えられた。

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. 安達史恵, 山口進康, 河原隆二. 環境水から分離されたカルバペネマーゼ産生菌の遺伝学的特徴. 第 58 日本水環境学会, 福岡, 2024 年 3 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

### 【参考文献】

- 1) Gomi R. et al. Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in Enterobacterales isolated from surface waters in Japan. J Antimicrob Chemother. 2022; 77:1237–1246.

- 2) Takizawa, S. et al. Genomic landscape of *bla*<sub>GES-5</sub> and *bla*<sub>GES-24</sub>-harboring Gram-negative bacteria from hospital wastewater: emergence of class 3 integron-associated *bla*<sub>GES-24</sub> genes. J Glob Antimicrob Resist. 2022;31:196–206.

表 1 カルバペネム耐性株の概要

(a)

(b)

図 1

(a) *bla*<sub>FRI-8</sub> を保有する 3 株のプラスミドと相同性が高いプラスミドとの比較

(b) *bla*<sub>NDM-5</sub> を保有する 4 株のプラスミドの比較