

2) 下水中の薬剤耐性菌調査

八尋俊輔 槐島翔一郎*1 原田誠也 松本一俊*2

要 旨

県内における環境水中の薬剤耐性菌の分布状況を把握することを目的とし、1 か所の下水処理施設を定点として、2019 年 8 月～2020 年 2 月の 7 か月間、流入水、一次処理水、放流水の各検体から薬剤耐性菌の検出を行った。

その結果、9 月、1 月、2 月の流入水から、carbapenemase 遺伝子である *bla*_{GES-5} を持つ *Enterobacter cloacae complex* を分離した。由来は不明であるが、複数の検体から carbapenemase 遺伝子を保有する菌が分離されたことから、県内環境中にもカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（CPE）が存在している可能性が示唆された。また、近年市中への拡散が報告され、注視されている基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生菌が多くの検体から検出されたことから、環境中に広く存在している可能性が示唆された。

キーワード：下水，CPE，ESBL

はじめに

カルバペネム耐性菌をはじめとする、様々な薬剤耐性菌の増加が世界的に問題となっている。WHO が各国に対してワンヘルスの観点から対応策を講じるよう検討を進める中、日本でも薬剤耐性（AMR）対策アクションプランが発表され、如何なるルートが薬剤耐性菌の根源になりうるのかモニタリングすることが求められており、環境中の薬剤耐性菌の分布についても、早急な現状把握が必要な状況となっている。

環境中の薬剤耐性菌の調査は、近年報告が少しずつ増加しているが、県内環境において、近年注視されているカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（Carbapenem-resistant *Enterobacteriales*、以下「CRE」という。）及び基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（Extended spectrum β -lactamases、以下「ESBL」という。）産生菌を詳細に調査した報告はなく、県内の現状把握はできていない状況にある。そこで我々は、県内のある A 下水処理施設の協力を得て、様々な使用水が混入している下水処理施設の流入水等から、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（Carbapenemase-producing *Enterobacteriales*、

以下「CPE」という。）及び ESBL 産生菌（主に腸内細菌目細菌）を検出することにより、県内環境の薬剤耐性菌の分布調査を行ったので報告する。

材料及び方法

1. 検査材料

県内 A 下水処理施設において、2019 年 8 月～2020 年 2 月の 7 か月間、毎月 1 回、流入水、一次処理水、放流水の 3 検体を対象とし、検査を実施した。

（A 下水処理施設の概要（2019 年度末））

平均処理流量：6,821m³/日

処理人口：20,794 人

水処理方式：標準活性汚泥法

2. 検査方法

2.1 薬剤耐性菌の分離及び同定

それぞれの検体 500mL を 0.45μm フィルター（millipore、以下「フィルター」という。）でろ過した。夾雑物が多く十分な量がろ過できなかった検体については、最低 50mL をろ過し、検査に供した。

*1 現健康福祉部健康危機管理課 *2 現食肉衛生検査所

CPE の検出は、Ambretti ら¹⁾ の CRE 分離方法を参考に実施した。すなわち、半分に切断したフィルターを、メロペネム 10 μg 含有ディスク (センシ・ディスク, 日本 BD) を 1 枚浸した mEC 培地 10mL に入れ、35°C, 18 時間増菌培養した。続いて、DHL 寒天培地 (栄研化学) に塗布し、1 晩培養後発育した赤色のコロニーについて、TSI 寒天培地 (Oxoid), LIM 培地 (日本製薬), CLIG 寒天培地 (極東製薬) 及びトリプチックソイ寒天培地 (Difco) 等 (一部は API20E (ピオメリー・ジャパン) を追加) に接種し、菌種を同定した。必要に応じ、分離した菌株の 16SrRNA 領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定後、BLAST database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により解析を行い、菌種の同定を行った。

また、ESBL 産生菌の検出は、上記で使用した残りのフィルター半分を mEC 培地 10mL で 35°C, 18 時間増菌培養し、セフォペラゾン (CPZ) 4 mg/L 及びアンホテリシン B 1.25mg/L を加えた DHL 寒天培地に塗抹し、1 晩培養することにより行った。発育したコロニーを、上記と同様に同定した。

2.2 マルチプレックス PCR 法による CPE, ESBL 遺伝子の検出

CPE 遺伝子の検出は、Watahiki ら²⁾ のマルチプレックス PCR 法 (KPC 型, IMP 型, NDM 型, VIM 型, OXA-48 型, GES 型を検出) を用いた。

ESBL 遺伝子の検出は、Le ら³⁾ のマルチプレックス PCR 法 (TEM 型, SHV 型, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8/25 group, CTX-M-9 group を検出) を用いた。

その結果、CTX-M-1 group, CTX-M-9 group 遺伝子が陽性であった場合、一部の代表株について Saladin ら⁴⁾ のプライマーによる PCR 法で得られた増幅 DNA のダイレクトシーケンスにより遺伝子型を決定した。また、検出された ESBL の一部について、パンデミック・クロン群 O25b-O131 に該当するかどうか、Clermont ら⁵⁾ の大腸菌 O25b-ST131 クロンのスクリーニング用 *pabB* PCR 法を用い判定した。

2.3 O 血清型別

分離された大腸菌の血清型別は、病原大腸菌免疫血清 O 群血清セット (デンカ生研) を用いた。

結 果

CPE の検出方法により、9 月、1 月及び 2 月の流入水から *Enterobacter cloacae* complex (以下「*E. cloacae*」という。) を分離した。結果を表 1 に示す。

分離した *E. cloacae* は、PCR により *bla*_{GES-5} の保有が確認され、得られた増幅産物をダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定したのち、NIH が提供するデータベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/>) を使用して型別を実施した結果、そのアミノ酸配列から、*bla*_{GES-5} と型別された。また、腸内細菌目細菌ではないが、*bla*_{GES} を持つ菌として、*Aeromonas* 属菌が頻繁に分離されたが、その *bla*_{GES} の型別は不能 (*bla*_{GES-5} と比較して 1 塩基異なる) であった。結果を表 2 に示す。*bla*_{GES} 以外の carbapenemase 遺伝子を持つ菌は検出されなかった。検出された菌株を用いて、mCIM テストを実施した結果は、*E. cloacae* は陰性、*Aeromonas* 属菌は陽性であった。

ESBL 産生菌は、流入水、一次処理水のいずれかからほぼ毎月検出され、放流水からは、8 月及び 1 月の検体から検出された。結果を表 3 に示す。流入水、一次処理水から検出できなかった月についても、雑菌が多く発育し、分離不能であったための結果であり、ESBL 産生菌が存在していないことを示すものではないと考えられた。検出された菌種は、すべて *E. coli* であり、PCR により、CTX-M-1 group, CTX-M-9 group, TEM 遺伝子の保有が確認された。CTX-M-1 group, CTX-M-9 group 陽性の菌について、一部をダイレクトシーケンスした結果、*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27} 等に型別された。また、O25b-O131 に該当するかどうかのスクリーニング PCR では、*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27} を保有する *E. coli* がスクリーニング陽性となり、陽性となった菌株の O 血清型を調べたところ、O25 または O 型別不能であった。

考 察

今回、9 月、1 月及び 2 月の流入水から、carbapenemase である *bla*_{GES-5} を保有する *E. cloacae* を検出した。*bla*_{GES-5} を保有する薬剤耐性菌については、国内の臨床検体から検出された報告は少ないが、大阪で *bla*_{GES-5} を保有する緑膿菌でアウトブレイクを起こす⁷⁾ など、注意を要する。今回検出された *bla*_{GES-5} が、プラスミド性であれば、他菌種へ伝達できる可能性も考えられ⁸⁾、より一層の注意が必要である。今後は、菌の詳細について検査していく予定である。

また、国内の臨床検体から頻繁に分離される IMP 型や、海外で問題となっている KPC 型, OXA-48 型, NDM 型の CPE は検出されなかった。このような CPE については、この下水道処理地域には定着していないと考えられた。

表 1 CPE の検出結果

種類/月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月
流入水	-	+	-	-	-	+	+
一次処理水	-	-	-	-	-	-	-
放流水	-	-	-	-	-	-	-

-: 不検出, +: 検出, 以下同じ

※検出された菌は, すべて *E. cloacae* (*bla*_{GES-5} 保有)

表 2 *bla*_{GES} 陽性の *Aeromonas* 属菌検出結果

種類/月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月
流入水	-	+	+	+	+	+	+
一次処理水	-	+	+	+	-	+	-
放流水	-	-	-	-	-	-	-

※*bla*_{GES} はすべて型別不能

表 3 ESBL 産生菌検出結果

種類/月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月
流入水	+	+*	-	+*	+	+*	-
一次処理水	+*	+*	-	+	+	-	+
放流水	+	-	-	-	-	+*	-

※検出された菌は, すべて CTX-M 型 ESBL 産生の *E. coli*

*O25:H4 ST131 PCR 陽性株が分離された検体

本県で医療機関から収集, 検査を実施している CRE の検査においても, carbapenemase 遺伝子を保有する菌は少なく, 多くは AmpC の過剰産生等による CRE と判定されることが多いことから, 県内には, carbapenemase を産生する菌が少ない状況にある可能性があるが, 今後も調査範囲を拡大し, 調査を実施する必要があると思われた。

また, 今回の調査では, *bla*_{GES} を持つ *Aeromonas* 属菌が多く分離され, その増殖が他の CPE の分離に影響を与える可能性があったことから, 途中から, 分離培地にクロモアガーECC (CHROMagar) を追加し, 調査を行った (データ未掲載)。DHL 培地では, *Aeromonas* 属菌と CPE の見分けが困難であったが, クロモアガーECC を使用することで, 分離が容易となった。クロモアガーECC のような酵素基質培地を使用した報告は多く, CPE のみの分離には, 酵素基質培地を使用するほうが, 調査が簡便になると考えられた。

ESBL 産生菌が多くの検体から分離された。当所での既報⁹⁾により, ESBL 産生菌は健康人等の便からも高頻度で分離されていたことから, 今回の結果は妥当な結果といえる。検出された ESBL 産生菌の一部は,

近年拡散され問題視されているパンデミック・クローン O25:H4 ST131¹⁰⁾ とみられる株であった。同様の報告は, 国内の都市圏での調査でも報告されていることから^{11), 12)}, パンデミック・クローンを含む ESBL 産生菌は, 環境中に広く存在している可能性が示唆された。

ま と め

今回の下水処理施設を定点とした調査では, CPE の検出は少なかったため, この下水処理施設区域内における CPE による汚染は拡大していないことが分かった。CPE については, 水処理施設の調査の報告が各国であり, 多くの CPE が分離される状況にある^{13), 14)}。今回は, 1 か所のみで調査を行ったため, 県内各地においても同様の調査を行う必要がある。

また, ESBL 産生菌は, ほとんどの月で分離された。このことから, 県内各地において, ESBL 産生菌が広く存在していることが予想された。

謝 辞

調査に御協力いただきました下水処理施設の関係者

の皆様へ深謝いたします。

文 献

- 1) Ambretti S, Bassetti M, Clerici P, Petrosillo N, Tumietto F, Viale P, Rossolini GM. : *Antimicrob Resist Infect Control*, 8, 136 (2019) .
- 2) Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, Kumagai Y, Noda M, Masuda K, Fukuda C, Harada S, Senba K, Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Shibayama K, Shinomiya H. : *Jpn J Infect Dis.*, 73 (2) , 166-172 (2020) .
- 3) Le QP, Ueda S, Nguyen TN, Dao TV, Van Hoang TA, Tran TT, Hirai I, Nakayama T, Kawahara R, Do TH, Vien QM, Yamamoto Y. : *Foodborne Pathog*, 12 (8) , 719-725 (2015) .
- 4) Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. : *FEMS Microbiol Lett.*, 209, 161-168 (2002) .
- 5) Clermont O , Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E. : *J. Antimicrob. Chemother.*, 64, 274-277 (2009) .
- 6) 松井真理：国立感染症研究所薬剤耐性研究センター：2015 年度研修資料（薬剤耐性菌検査法_研修用マニュアル_Ver2.2_2016 年 1 月修正版） .
- 7) 金山敦宏, 田淵文子, 山岸拓也ほか：高槻市保健所管内 X 病院における多剤耐性緑膿菌分離症例の集積について IASR, 35 (9) ,227-228 (2014) .
- 8) Poirel L, Carrër A, Pitout JD, Nordmann P. : *Antimicrob. Agents Chemother.* 53,2492–2498 (2009)
- 9) 八尋俊輔, 小原敦美, 原田誠也：熊本県保健環境科学研究所報, 48, 25-32 (2018) .
- 10) Pitout JD, DeVinney R. Escherichia coli ST131 : *FI000Res.* 2017.
- 11) Urano N, Okai M, Tashiro Y, Takeuchi A, Endo R, Ishida M, Takashio M. : *Advances in Microbiology*, 10, 318-330 (2020) .
- 12) Saito, R, Takahashi, R, Sawabe, E, et al. :First Report of KPC-2 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 2961–2963 (2014) .
- 13) J. Hoelle, J. R. Johnson, B. D. Johnston et al. : *Journal of Water and Health*, 17(2) , 219–226(2019) .
- 14) A.A. Adegoke, C.E. Madu, O.A. Aiyegoro, T.A. Stenström, A.I. Okoh : *Antimicrob Resist Infect Control*, 9,1-2 (2020) .