

琵琶湖淀川水系上流域と周辺地域土壌ならびに雨水 における抗菌薬耐性菌・耐性遺伝子の検出調査

京都大学大学院医学研究科
人間健康科学系専攻
准教授 徳野 治

1. はじめに

抗菌薬耐性菌については、多剤耐性の場合は臨床使用できる薬剤が限られており、敗血症などを引き起こした場合には致命的ともなるため、保健医療分野では早急に対処すべき大きな問題となっている。

抗菌薬耐性菌が発生しやすい事業場として、陸上では医療機関や医薬品工場、畜産農場がよく知られている。このような場所は、水質汚濁の観点からは特定汚濁源として位置づけられる¹⁾。ここから排水とともに放出された耐性菌あるいは耐性遺伝子は、下水処理場で完全に分解除去されるわけではなく、やがて河川そして海洋へ流出する。琵琶湖淀川水系においては最近、下流域の都市河川における抗菌薬耐性菌の実態把握調査が行われている²⁾。これによると、特に下水処理場放流水と医療排水の2事業からの耐性菌排出濃度が顕著に高く、これらが河川水に流入することにより希釈されているものと考えられる。

特定源から水圏に流出した後の、耐性菌や耐性遺伝子の動態は不明な部分が多い。耐性菌自体は水圏中の食物連鎖により捕食分解される可能性はある。しかし耐性遺伝子は水圏中の溶存分子として残存し、事実、湖沼や河川、海洋水にも耐性遺伝子が分布していることが報告されている³⁾。また、人間活動の波及が小さい、あるいはほとんどない極圏や山岳氷河などからも耐性菌や耐性遺伝子が見つかる⁴⁾ことから、これらの地球環境への拡散機構は興味深い。

最近、降水中に微小粒子状物質(PM_{2.5})とともに抗菌薬耐性遺伝子が検出されるという興味深い実態が報告された⁵⁾。PM_{2.5}は、その粒径も細菌とほぼ同等である。このことは、水圏に拡散あるいは大気中に浮遊している耐性遺伝子や耐性菌も蒸発水と行動を共にし、降雨とともに再び地上に舞い降りる可能性を容易に想起させるものである。したがって、特定源の存在する河川流域以外にも、たとえばその更に上流域や山地などからも耐性菌や耐性遺伝子が検出される可能性が考えられる。

そこで、本研究は琵琶湖淀川水系の広範な上流域を調査対象とした。都市部に限定せず、特定源が存在しない水域の①水、②周辺地域土壌、および③雨水(図1)、を研究試料とし、細菌学的手法ならびに遺伝子解析にて、非特定源における抗菌薬耐性菌および耐性遺伝子の存在実態を明らかにすることを目的とした。

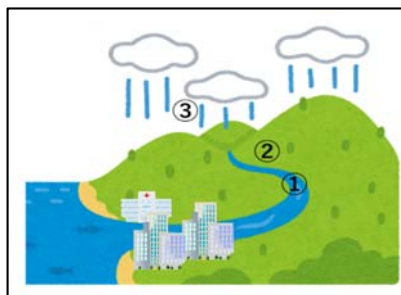


図1 非特定源としての環境水

2. 調査・検出方法

2-1 現地試料採取

琵琶湖北部（①滋賀県長浜市西浅井町 赤崎丸子舟パーキング）、上桂川（大堰川）上流（②京都市左京区花脊 山村都市交流の森付近）、鴨川（③京都市左京区 荒神橋付近）、桂川・宇治川・木津川（3 河川）合流域（④京都府八幡市橋本）、そして淀川中流（⑤大阪府枚方市 淀川河川公園枚方地区）の5か所を採取点とした（図2）。

2-2 試料採取法

湖沼水試料については、1採取点あたり、オートクレーブ滅菌した1,000mL 採水瓶を用いて、安全を考慮しボート等は使用せず、岸边近くの水を採取した。河川については、これも安全を考慮し、流れのある河川数での採取を可とし、オートクレーブ滅菌した1,000mL 採水瓶を用いて満杯採取した。

土壌については、表面土壌を除いたあと、スコップを用いて20センチほど差し込み採取し、径2mm メッシュのふるいにかけたものを滅菌50mL チューブに入れ、試料とした。

採取したこれらの試料は低温クーラーボックスに入れて、その当日のうちに研究室へ持ち帰り、水試料についてはただちに実験に供した。また、土壌の残余分は無菌的に小分けして2～4℃で冷蔵保存し、後々の実験に供するものとした。

雨水については、直前まで実際の降水予測が難しいこともあり、研究室屋外での随時採取とした。まとまった降水が期待できる時点でオートクレーブ済み採水筒を開放し50～100mLの採取を目標とした。



図2 採取地点



琵琶湖北部



左の採取地点近隣斜面



3 河川合流域

図3 試料採取点

2-3 細菌学的解析

2-3-1 メンブレンフィルター（MF）法による水試料からの集菌

採取した河川湖沼水または雨水をろ過装置にて吸引ろ過し、孔径0.2μm メンブレンフィルターに集菌し、R2A 培地にて36℃でコロニー形成させた。

2-3-2 特殊酵素基質培地による耐性菌の選択

本研究で検出対象とする抗菌薬耐性菌は主に次の4種類とした
カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*）
基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生グラム陰性菌（ESBL: Extended-spectrum β-lactamase）
多剤耐性緑膿菌（MDRP: multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*）
多剤耐性アシネトバクター（MDRA: Multidrug-resistant *Acinetobacter*）。
上記 R2A 培地に発育したコロニーに対してグラム染色を行い、その染色性に応じて、それぞれを特殊酵素基質培地（クロモアガー、関東化学）に播種し、各耐性菌をスクリーニング的に分離した。

2-3-3 生化学的手法による細菌同定

生化学的同定には日本 BD 社の同定検査試薬「BD クリスタル 環境微生物検査用」を用い、マニュアルに従って実施した。

2-3-4 抗菌薬含有培地による耐性菌の選択

上記クロモアガー培地は耐性菌のスクリーニングにある程度は有効ではあるが、実際には目的外の菌種も発育してくる場合も多く特異性は高くないと考えられた。そのため、とくに ESBL や CPE 産生グラム陰性菌を目標として、抗菌薬（セフトキシム（CTX）、イミペネム（IPM）含有ミューラー・ヒントンス寒天培地を調製し、そこで発育したコロニーに対しての同定・薬剤感受性試験を併用することとした。

2-3-5 薬剤感受性試験

まずディスク拡散法により表現型（抗菌薬耐性）の確認を行った。ディスクは全て KB ディスク「栄研」（栄研化学）を使用した。菌液を MacFarland0.5 に調整し、ミューラー・ヒントンス寒天培地に播種し、イミペネム（IPM）、アミカシン（AMK）、シプロフロキサシン（CIP）、セフトメタゾール（CMZ）ディスクを置き 36℃で一晩培養した。
ESBL 産生の確認には、同様の手順で播種し、セフトジジム（CAZ）ディスク、CAZ/クラブラン酸（CVA）ディスク、CTX ディスク、CTX/CVA ディスクを置き、36℃で一晩培養した。MBL 産生の確認には、同様の手順で播種し、CAZ ディスクとメロペネム（MPM）ディスクに隣接してメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスクを置き、36℃で一晩培養した。βラクタマーゼ産生菌の鑑別法を表1に示す。

表 1 薬剤耐性（菌）判定基準

	阻止円直径
IPM 耐性	IPM ≤ 13 mm
AMK 耐性	AMK ≤ 14 mm
CIP 耐性	CIP ≤ 15 mm
ESBL 産生	CAZ/CVA – CAZ ≥ 5 mm 拡大または CTX/CVA – CTX ≥ 5 mm 拡大
MBL 産生	抗菌薬ディスクと SMA ディスクを結ぶ線に対して 垂直方向に阻止円が拡張

微量液体希釈法には、栄研化学から販売されている「ドライプレート“栄研”」を用いた。これは各種抗菌薬が濃度勾配をもって96穴プレートに固相化されており、一定量の菌液を加えて一夜培養することで各抗菌薬での最小発育阻止濃度（MIC: Minimum Inhibitory Concentration）を測定できるものである。

2-4 遺伝子解析

2-4-1 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

ESBL や CPE 産生グラム陰性菌については、国立感染症研究所策定の「病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 令和2年6月改訂版 Ver2.0」に記載のPCRプライマー、ならびに「シカジーニアス ESBL 遺伝子型検出キット」「シカジーニアス カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット」（いずれも関東化学）付属のプライマーを用いて β -ラクタマーゼ遺伝子（CTX-M型、OXA型、IMP型、KPC型、NDM型）の検出を試みた。目的サイズのバンドが得られたものについては上記プライマーにてシーケンス解析を行い、BLAST 検索にて概ね90%以上の相同性をもって当該耐性遺伝子と同定した。シーケンス解析は京都大学医学研究支援センター（Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer 保有）に依頼した。

2-4-2 16S rRNA 遺伝子解析による菌種同定

対象菌については「シカジーニアス DNA 抽出試薬」（関東化学）を用いて核酸抽出し、「Bacterial 16S rDNA PCR Kit」（タカラバイオ）付属のプライマーにて全長1.5 Kbの16S rDNAを増幅した。増幅産物については上記プライマーにて5'末端側からと3'末端側からの両方向シーケンスを行い、BLAST 検索にて概ね90%以上の相同性をもって当該菌種と同定した。

実験フローチャートを図4に示す。

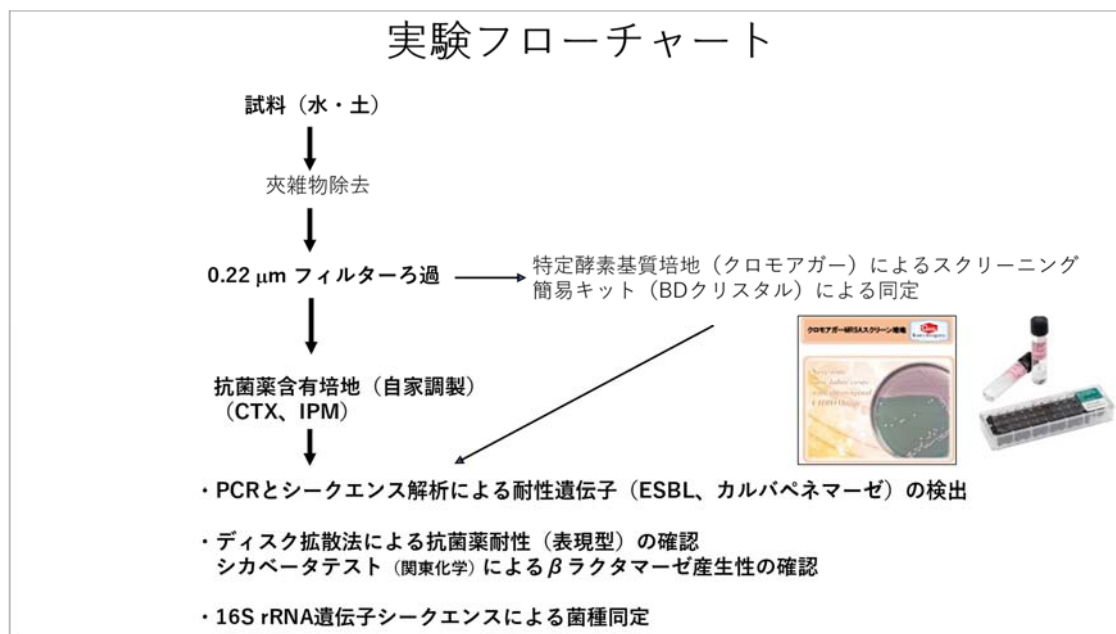


図4 本研究の実験フローチャート

3. 結果と考察

3-1 河川湖沼水について

まず、今回の結果を表2にまとめた。

表2 採取点および検出された耐性遺伝子・耐性菌

場所	耐性遺伝子	菌種
④ 合流域	IMP-7	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
⑤ 淀川	IMP-7	<i>Acinetobacter sp.</i>
① 琵琶湖北部	検出されず	
② 桂川上流	検出されず	
③ 鴨川	検出されず	

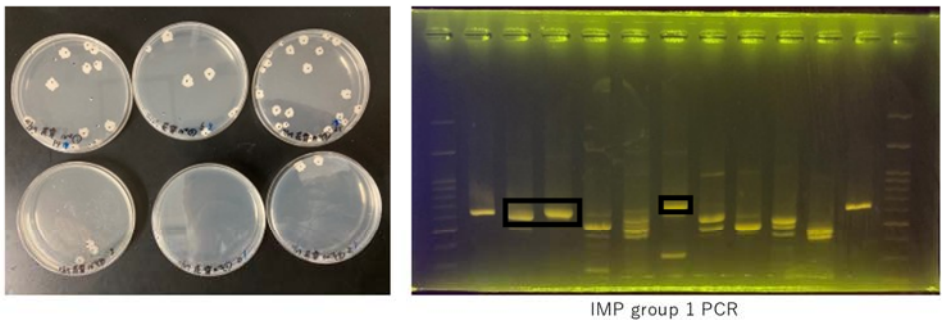
図5に示すように、今回は琵琶湖北部では *Stenotrophomonas sp.* など日和見感染菌であった。採取点①から1キロ弱北に、琵琶湖へ流れ込む大浦川の河口があるが、その流域には特定源と考えられる医療機関や農畜産業は存在しない。



図5 琵琶湖北部

ここで検出された *Stenotrophomonas sp.* は図5に示すとおり IMP に耐性を示したため IMP などメタロ-βラクタマーゼを産生すると考えられるが遺伝子検出は行っていない。*Stenotrophomonas sp.* はカルバペネム系抗菌薬に自然耐性を示すことが知られているので、今回の調査では臨床分野で顕著に問題となる耐性菌としてはカウントしなかった。

②桂川上流（大堰川）（2021年11月27日採取）

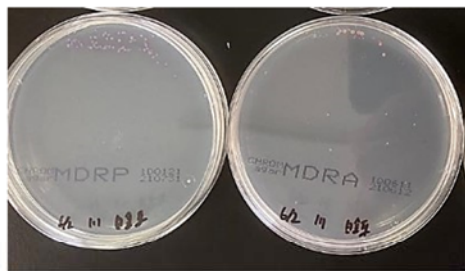


- ・ シークエンス解析では耐性遺伝子は確認できなかった
- ・ *Stenotrophomonas sp.* *Serratia sp.* *Hafnia alvei* *Bacillus cereus* *Pseudomonas sp.* など

図6 桂川上流

桂川上流（大堰川）での結果を図6に示す。採取点②の上流には飲食店一軒と宿泊施設数軒がみられる。付近住民の話によるとこのあたりのトイレは汲み取り式とのことであったが、今回の調査では大腸菌 *Escherichia coli* など糞便由来の菌種は検出されなかった。CTX または IMP 含有培地に発育したものについて耐性遺伝子 PCR を行ったところ、わずかに長さは異なるが IMP-1 と目されるバンドが検出されたものの（図6黒枠）、シークエンス解析と BLAST 検索では耐性遺伝子の該当は無かった。16S rDNA シークエンス解析では *Stenotrophomonas sp.* など日和見感染菌が同定された。

③鴨川（2021年5月31日採取）



	スクリーニング場	サンプル	コロニー色（スクリーニング培地）	菌種	同定確率
5	MDRP	水	紫	<i>E.coli</i>	0.9939
6	MDRA	水	赤	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.95648
7	ESBL	水	紫	<i>E.coli</i>	0.85433
8	ESBL	水	白	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.95055
9	CPE	水	紫	判定不可	
10	CPE	水	白	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>0.9999



ESBL産生菌
シカベータテスト説明書より



CTX-MとTEMをもつESBL産生大腸菌を検出

図7 鴨川 荒神橋付近

鴨川（荒神橋）での結果を図7に示す。クロモアガー培地に発育したものについて BD クリスタルで同定したところ、*Pseudomonas aeruginosa* や *Acinetobacter baumannii* に加え、*Escherichia coli* が検出された。これらのうち *E. coli* については ESBL 遺伝子 PCR 陽性となり、シーケンス解析により TEM と CTX-M-9 が同定された。さらに、実際に ESBL が産生されているかどうかを確認するためシカペータテスト（関東化学）を行ったところ、コントロールと同様の発色パターンを示したため、ESBL 産生大腸菌と同定された。

3 河川合流域での結果を図8に示す。IPM 含有培地に発育したコロニーのうち、2 つから IMP-7 遺伝子が検出され、16S rDNA 解析により *Stenotrophomonas sp.* と同定された。しかしディスク拡散法を行ったところ、IPM、CMZ の阻止円は形成せず、AMK の阻止円直径が 30 mm、CIP の阻止円直径が 21 mm であり、耐性が認められなかった。また、CAZ および MPM の阻止円には SMA による拡張が見られなかった。

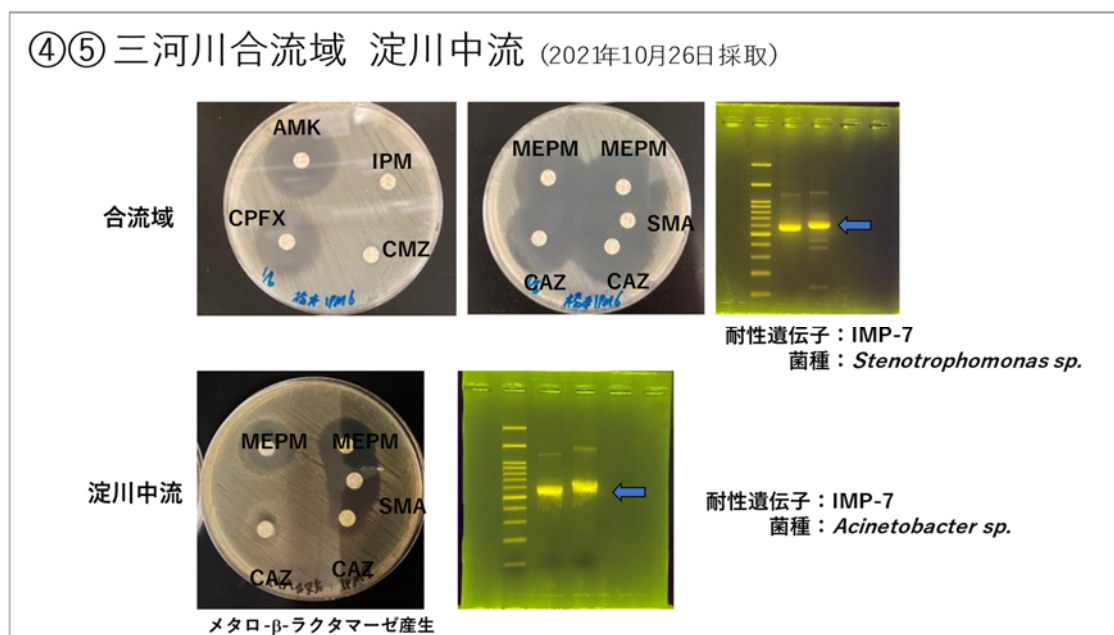


図8 三河川合流域と淀川中流域

一方、淀川中流域からは IMP-7 遺伝子保有の *Acinetobacter sp.* が検出された。ディスク拡散法では、IPM、CMZ、AMK、CIP の阻止円直径がそれぞれ 31mm、12 mm、25 mm、21 mm であり、IPM、AMK、CIP 耐性は認められなかったものの、CAZ の阻止円には SMA による拡張が見られたため、メタロ-βラクタマーゼ産生 *Acinetobacter* と判断した。

3 河川合流域④、さらに下流の淀川中流域⑤では水の混濁は顕著であり、いうまでもなく滋賀県、京都府、三重県、奈良県からの排水も多量に混入している。そのため、なんらかの耐性菌を検出することは予想された。今回 IMP-7 が検出された *Stenotrophomonas sp.* は IPM および CMZ には耐性を示したが、MPM および CAZ に耐性を示さなかった。IMP-7 発現プラスミドを有する緑膿菌が IPM

耐性・MPM 感性を示すことが報告されている⁶⁾。ただし検出菌がカルバペネム系に元来耐性をもつ *Stenotrophomonas sp.* であることを考えると、IPM および CMZ 耐性は *Stenotrophomonas sp.* が本来的に保持している形質を見ている可能性も考えられた。採取点⑤は淀川に流入する天野川河口にも近く、その近隣には大小の医療機関も点在する。何らかの理由により環境中に漏出した IMP-7 保有 *Acinetobacter sp.* をたまたま検出した可能性と同時に、排水に含まれる抗菌薬に曝露されたことで IMP-7 が誘導発現した可能性も考えられた。いずれにせよ、IMP-7 はカナダで検出同定されたのが初発⁷⁾であり、これまでに日本も含め諸国で検出されていることから、その環境への拡散・伝播が示唆される。

3-2 雨水について

今回の結果を表3にまとめた。

表3 雨水から検出された耐性遺伝子・耐性菌

試料	耐性遺伝子	菌種
□) 7/14 採取分	CTXM-9 group、 TEM	<i>Citrobacter freundii</i>
□) 9/17 採取分	検出されず	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
□) 10/25 採取分	検出されず	

このうち、2021年7月14日採取分について図9に示す。

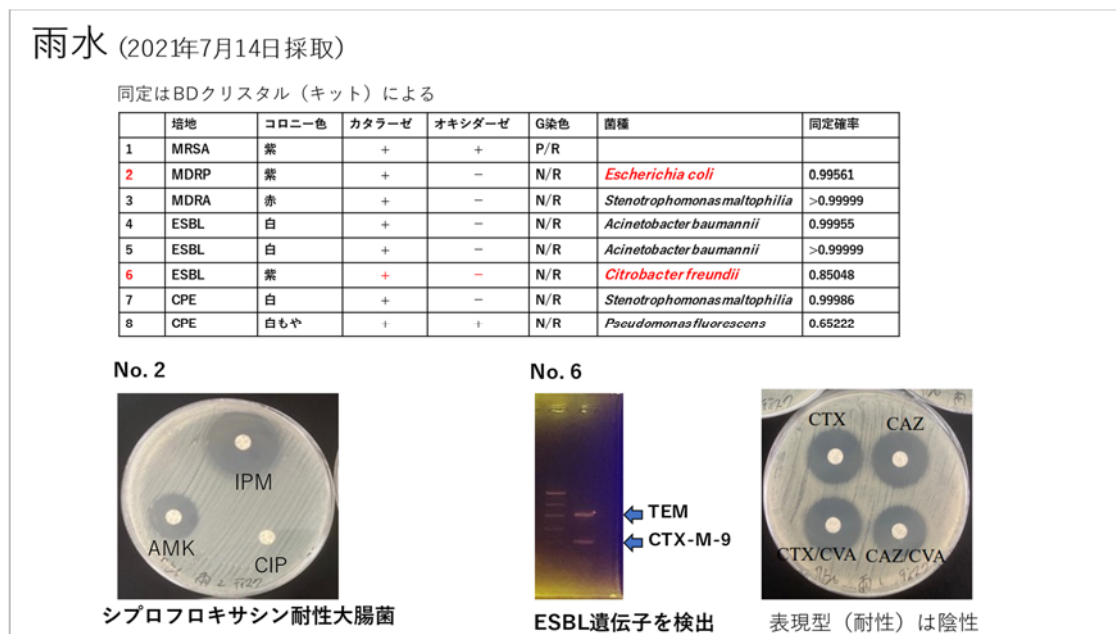


図9 雨水における耐性遺伝子・耐性菌

ここからは *Stenotrophomonas* や *Acinetobacter* に加え、*Escherichia coli* も検出され、ディスク拡散法によりフルオロキノロン耐性大腸菌 (FQREC) と判定された。キノロン耐性には、抗菌薬の標的部位である DNA ジャイレーズおよびトポイソメラーゼ IV の変異が関与する。キノロン耐性を付与する領域は QRDR

(Quinolone Resistance Determinant Region) と呼ばれ、その変異解析には QRDR 領域のシーケンスが必要であるが、本研究では行っていない。

さらには *Citrobacter freundii* も検出され、耐性遺伝子 PCR により CTX-M-9 および TEM 遺伝子を検出した。ただしディスク拡散法では耐性（表現型）は確認できなかった。いまのところ推測の域を出ないが、これら ESBL 遺伝子は保有しているものの、抗菌薬がほとんど存在しない環境下ではその耐性遺伝子の発現をオフにする仕組みが働いている可能性が考えられた。

3-3 土壌について

今回の調査では試料土壌からは有意な耐性菌や耐性遺伝子は検出されなかった（図10）。もとより、土壌は細かな粒子や夾雑物が水試料に比べて圧倒的に多く、単位体積あたりの微生物数も莫大である。培養に頼らないメタゲノム解析など、研究方法の検討・改良が必須と考えられた。

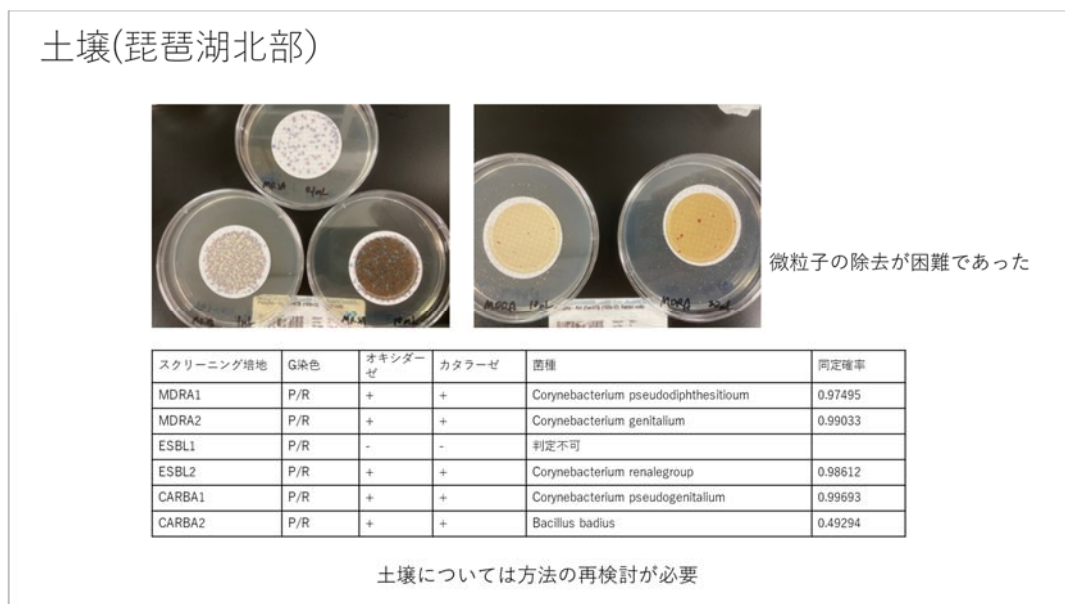


図10 土壌

4. 今後の課題

本研究は限られた人員と予算の範囲で実施可能なことを前提とし、主に培養法で検出できる菌種を目標とした。ただしこの方法は一度に解析できる数が限られてくるうえに、選択薬剤の種類によるバイアスがかかりやすい欠点もある。今後は、ハイスループットな定量的 PCR あるいは培養に頼らないメタゲノム解析なども検討し、同様の探索を継続していく予定である。

河川や湖沼、海洋など大きな環境へいったん流出した抗菌薬耐性菌や耐性遺伝子を完全に不活化あるいは殲滅することは不可能である。抗菌薬の適正使用あるいは可能なかぎりの使用量削減を従来以上に徹底していく意識づけと行動は、保健医療や産業界にとって今後も不可欠である。

なお本研究期間の終盤、2021年12月に、OXAやAmpCといった抗菌薬耐性遺伝子が降水を介して土壌へ伝播することを示唆する報告⁸⁾が中国の研究者より発表された。雨水中から臨床的にも重要な耐性遺伝子や耐性菌が検出されたことから、

それらがいつどこで発生し飛来したものなのか、その起源をたどることも興味深く、大気/水循環を介した耐性遺伝子・耐性菌の地球規模的拡散の可能性を裏付けていく要素と考えている。

5. 謝辞

本研究は、令和3年度 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構「水質保全研究助成」により行いました。また本研究の遂行にあたり、趣旨をよく理解し懸命に実験・調査に取り組んだ竹田 翔梧氏（京都大学医学部人間健康科学科4年生）の協力がありました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構 琵琶湖・淀川水質浄化研究所.
琵琶湖・淀川流域における非特定源汚濁を対象としたとりまとめ（案）【概要版】
2019年
- 2) 東 剛志. 臨床領域で対策が求められている薬剤耐性菌の河川環境中における
動態. 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構「水質保全研究助成」研究報告書
2019年
- 3) S Su, et al. Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Three
Different Natural Water Bodies-A Lake, River and Sea. Int. J. Environ.
Res. Public Health 2020; 17(2), 552.
- 4) LC Scott, et al. Antibiotic Resistance in Minimally Human-Impacted
Environments. Int J Environ. Res. Public Health 2020; 17, 3939.
- 5) W Ouyang, et al. Airborne bacterial communities, and antibiotic
resistance gene dynamics in PM2.5 during rainfall. Environ Int 2020; 134,
1-11.
- 6) T Tada, et al. IMP-43 and IMP-44 Metallo- β -Lactamases with Increased
Carbapenemase Activities in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2013; 57, 4427-4432.
- 7) Gibb AP, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas*
aeruginosa with a new blaIMP allele, bla(IMP-7). Antimicrob. Agents
Chemother. 2002; 46, 255-258.
- 8) Q Wang, et al. Rainfall facilitates the transmission and proliferation
of antibiotic resistance genes from ambient air to soil. Science Total
Environment 2021; 799, 149260.