公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構 令和3年度水質保全研究助成 成果報告会

# 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 徳野 治

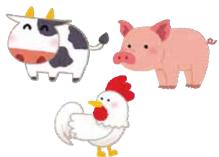
2022年3月4日

#### 抗菌薬(抗生物質)を使う事業所



医療機関





畜産業

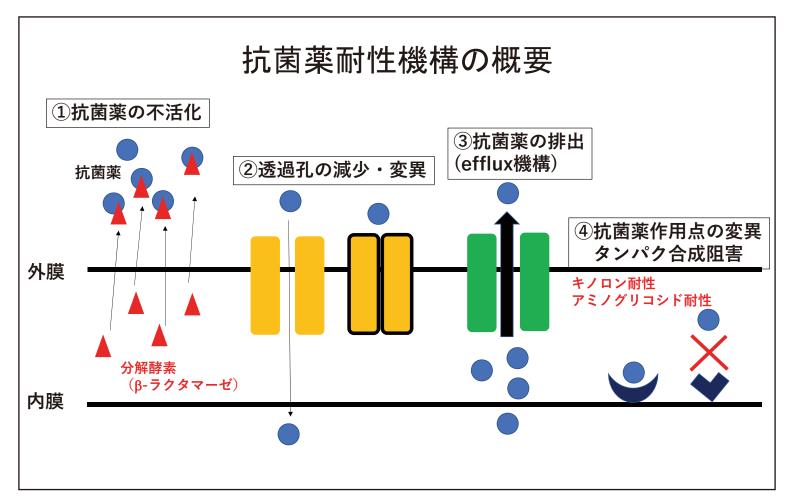
「耐性菌」が発生しやすい場所でもある

写真:日経ビジネス「抗菌薬がない」なぜ医療現場は苦慮するのか https://business.nikkei.com/atcl/gen/19/00002/092000702/

#### 臨床分野で重視されている耐性菌

- •メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)
- •ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)
- •バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)
- 基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ産生菌 (ESBL)
- カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)
- 多剤耐性アシネトバクター (MDRA)
- 多剤耐性緑膿菌(MDRP)
- •フルオロキノロン耐性大腸菌(FQREC)

グラム陰性菌が席捲



## 耐性菌が産生する $\beta$ - ラクタマーゼと その基質

セフェム系

ペニシリン系

セファロスポリン

カルバペネム系

1st 2nd 3rd 4th セファマイシン オキサセフェム

βラクタマーゼ

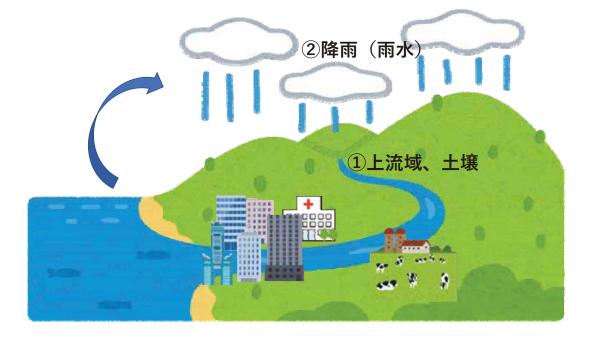
**ESBL** 

CTX-M, TEM, SHV, など

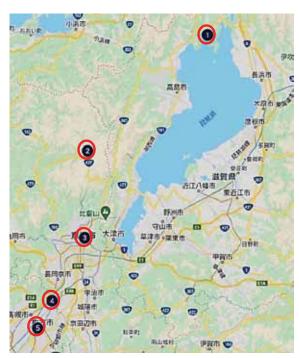
カルバペネマーゼ

IMP, KPC, NDM, VIM, など

### 耐性菌・耐性遺伝子の環境への拡散 - 水循環関与の可能性



#### 河川湖沼水と雨水のサンプリング



- ①琵琶湖北部(滋賀県長浜市西浅井町 赤崎丸子舟パーキング)
- ②桂川上流(京都市左京区花脊 山村都市交流の森付近)
- ③鴨川(京都市左京区 荒神橋付近)
- ④桂川・宇治川・木津川合流域(京都府八幡市橋本)
- ⑤淀川中流(大阪府枚方市 淀川河川公園枚方地区)



雨水 京都大学医学部構内で 随時採取(7月~10月)

図:Googleマップ



琵琶湖北部



左の採取地点近隣斜面



3 河川合流域



ろ過器

#### 実験フローチャート



- ・PCRとシークエンス解析による耐性遺伝子(ESBL、カルバペネマーゼ)の検出
- ・ディスク拡散法による抗菌薬耐性(表現型)の確認 シカベータテスト (関東化学)による β ラクタマーゼ産生性の確認
- ・16S rRNA遺伝子シークエンスによる菌種同定

#### 琵琶湖北部 (2021年6月17日採取)

同定はBDクリスタル(キット)による

川にはりし	12	ル(キット	) による			
	G染色	カタラーゼ	オキシダーゼ	コロニー色	菌種	同定確率
MDRA1	P/R	_	+	赤		
MDRA2	N/R	_	+	赤	Pseudomonas fluorescens	0.81618
MDRA3	P/R	_	+	赤		
MDRA4	N/R	+	+ (弱)	赤	Stenotrophomonas maltophilia	0.99919
MDRA5	N/R	-	+	赤		
MDRA6	N/R	-	+	赤		
MDRA7	N/R	-	+ (弱)	赤		
MDRA8	N/R	+	-	赤	Stenotrophomonas maltophilia	>0.99999
ESBL1	N/R	+	+	白	Pseudomonas aeruginosa	0.83834
ESBL2	N/R	+	+	自	Pseudomonas fluorescens	0.49565
ESBL3	N/R	+	+	白	Pseudomonas fluorescens	0.59093
ESBL4	N/R	+	_	白	Stenotrophomonas maltophilia	>0.99999
ESBL5	N/R	-	+	青		
ESBL6	N/R	+	-	紫	Hafnia alvei	0.99989
ESBL7	N/R			青		
CARBA1	N/R	+	+	白	Stenotrophomonas maltophilia	0.99569
CARBA2	N/R	+	+	白	Pseudomonas aeruginosa	0.9206
CARBA3	N/R	+	+	白	Pseudomonas fluorescens	0.62874
CARBA4	N/R	+	+	自	Pseudomonas fluorescens	0.40723
CARBA5	N/R	+	+	白	Pseudomonas fluorescens	0.58522
CARBA6	N/R	+	+	白		
CARBA7	P/R	+	+	白		
CARBA8	N/R	+	+	白	Pseudomonas fluorescens	0.63134
CARBA9	N/R	+	+	白	Brevudimonas diminuta	0.71121
CARBA10	N/R	+	+	白	Pseudomonas fluorescens	0.59093

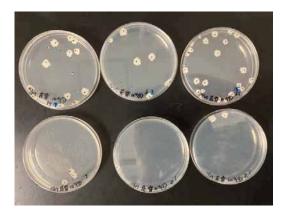
日和見感染菌がほとんどであった

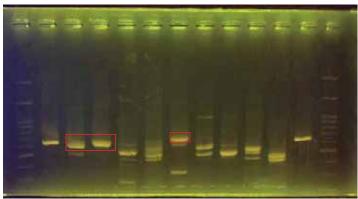
#### MDRA No. 4



S. maltophiliaはイミペネムに 自然耐性

#### 桂川 (大堰川) 上流 (2021年11月27日採取)





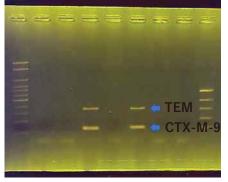
IMP group 1 PCR

- 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

#### 鴨川 (2021年5月31日採取)



	スクリーニング培地	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	E.coli	0.9939
6	MDRA	水	赤	Pseudomonas aeruginosa	0.95648
7	ESBL	水	紫	E.coli	0.85433
8	ESBL	水	白	Acinetobacter baumannii	0.95055
9	CPE	水	紫	判定不可	
10	CPE	水	白	Acinetobacter baumannii	>0.9999





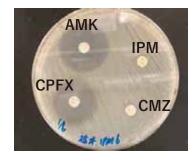
**ESBL 産生園** シカベータテスト説明書より



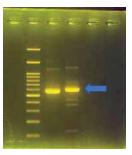
CTX-MとTEMをもつESBL産生大腸菌を検出

#### 3河川合流域・淀川中流 (2021年10月26日採取)

合流域





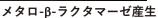


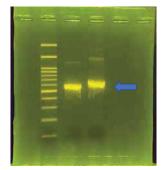
耐性遺伝子:IMP-7

菌種: Stenotrophomonas sp.

淀川中流







耐性遺伝子:IMP-7

菌種: Acinetobacter sp.

#### 雨水 (2021年7月14日採取)

同定はBDクリスタル(キット)による

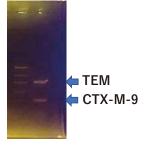
	培地	コロニー色	カタラーゼ	オキシダーゼ	G染色	菌種	同定確率
1	MRSA	紫	+	+	P/R		
2	MDRP	紫	+	-	N/R	Escherichia coli	0.99561
3	MDRA	赤	+	-	N/R	Stenotrophomonas maltophilia	>0.99999
4	ESBL	白	+	-	N/R	Acinetobacter baumannii	0.99955
5	ESBL	白	+	-	N/R	Acinetobacter baumannii	>0.99999
6	ESBL	紫	+	_	N/R	Citrobacter freundii	0.85048
7	CPE	白	+	-	N/R	Stenotrophomonas maltophilia	0.99986
8	CPE	白もや	+	+	N/R	Pseudomonas fluorescens	0.65222

No. 2



シプロフロキサシン耐性大腸菌

No. 6

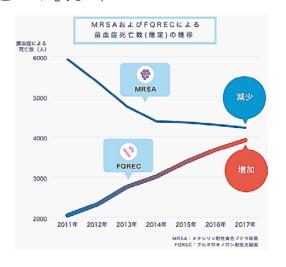


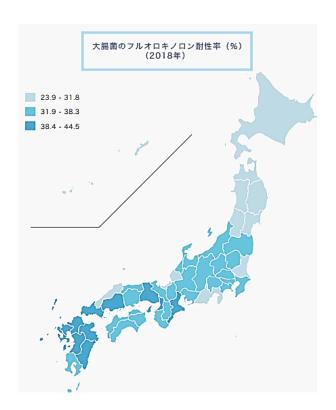
ESBL遺伝子を検出



表現型(耐性)は陰性

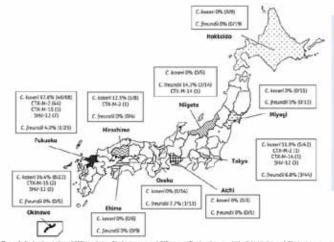
#### 地理的分布について





データで振り返る薬剤耐性の現状2019 AMR臨床リファレンスセンター (2020年3月)

#### 地理的分布について



ticlated by	tane	Fatient.	Age, years! Sex	Organism	Admission 1	Uncerlying discuse	Date	Source	B.orts bact	ESBL.				AmoC 6t
										TEM.	CTXM1	CTX M.2	CDVW4	07
Cincal	1	P.	85W	C Frundi	CU	Burn	x	Absenta	+	ş.	9 1	4	8	(4)
specimen	2	1	7956	C hounds	HCU.	Acute subdural hematoma	X+1	Souturn	A			-		(+)
	3	28	8314	C hound?	HCU	Traumatic pancrestic mury	X+2	Abscess	-	-	4	-	-	(4)
ACTIVE	4	W	55W	C. houndi	HCU	Menrgiona	X+5	SxI	-	2	2	43	-	(4)
samellance	3.	H	80W	C handi	HCU	Traumatic parcretic injury	X+5	Spatum	8	(a)	9 1	4	[al-	-
	6	11	MCB	C. inundi	HCD	Troumatic parcreage musy	X+5	Stool	B	Del .	2 1	-	14	-
	7	T.	79W	C. Hrundi	HCU	Acute subdurel hematoma	X+5	Souturn	A:	-	9	-	-	(+)
	1	1	79M	C. frounds	HCU	Acute subdural hematoma	X+5	Stati	A	2	2 1	2	-	(+)
	9.	V	821	E. coi	HCU	Sick smus syndrome	X+5	Urine	-	-	- 1	770.0	(4)	-
	10	11	649	E.coli	HCU	Meningiona	X+5	Stool	2	-	2	(6)	0.0	-

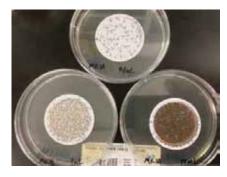
Lane numbers taken from the pulsed field get diestrephonesis (PTGE) analysis. All the solares were reveiled to be resisted to the digeneration contributions. The present study revealed that valuus kinds of highly resisted Enterophonesis (i.e. Positive result - not present. X, date when C. Provide with the same antibiotic sustreptible pattern.

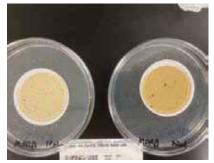
H Hagiya et al. Acute Medicine & Surgery 2014; 1: 256–258

H Kanamori et al.

J Antimicrob Chemother 2011; 66: 2255 –2262

#### 土壌(琵琶湖北部)





微粒子の除去が困難であった

スクリーニング培地	G染色	オキシダー ゼ	カタラーゼ	菌種	同定確率
MDRA1	P/R	+	+	Corynebacterium pseudodiphthesitioum	0.97495
MDRA2	P/R	+	+	Corynebacterium genitalium	0.99033
ESBL1	P/R	-	-	判定不可	
ESBL2	P/R	+	+	Corynebacterium renalegroup	0.98612
CARBA1	P/R	+	+	Corynebacterium pseudogenitalium	0.99693
CARBA2	P/R	+	+	Bacillus badius	0.49294

土壌については方法の再検討が必要

#### まとめと今後の課題

- ・鴨川でESBL産生大腸菌、合流域と淀川でIMP型カルバペネマーゼ遺伝子 保有菌が検出された
- ・雨水からキノロン耐性大腸菌ならびにESBL遺伝子保有シトロバクター属 が検出された ⇒降雨(雨水)を介した拡散の可能性
- 耐性菌/耐性遺伝子の捕獲・解析方法の改良が必要
- 分子疫学的解析:「いつどこで発生したものか?」という起源の問題
- ・継続的な調査研究が必要

#### 謝辞

本研究は、公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の「令和3年度水質保全研究助成」を受け、行いました。

ここに記し、感謝の意を表します。