

千葉市内公共用水域における薬剤耐性大腸菌の検出状況

若岡 未記、本宮 恵子、野本さとみ、吉原 純子、長埜 朗夫

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 近年、国内外の河川等から薬剤耐性菌が検出されており、薬剤耐性（AMR）に係るワンヘルス（One Health）の観点から環境の薬剤耐性対策に関心が高まっている。本研究では、2020～2022年度の3年間に本市の河川および海域で採水された公共用水 419 検体について、薬剤耐性大腸菌の検出状況を調査した。増菌培養等を行い発育した大腸菌様コロニーのうち O 血清型が判明した 109 株について薬剤耐性の確認試験を実施した。その結果、河川から分離された 6 株（5.5%）が薬剤耐性を示し、全て *Escherichia coli* であった。薬剤耐性遺伝子は、3 株から CTX-M 型が、1 株から DHA 型が、2 株から TEM 型と DHA 型が検出された。市内公共用水域に薬剤耐性遺伝子を保有する大腸菌が存在することが判明し、水環境を通して広域に薬剤耐性大腸菌が存在している可能性が示唆された。

Key Words : 薬剤耐性菌、ワンヘルス、公共用水

1. はじめに

国内外の河川等の環境中から薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルス（人、動物、環境（生態系）の健康は相互に関連してひとつであり、地球規模で一括して捉え維持していくという考え方）の観点から環境の薬剤耐性対策に関心が高まっている。

薬剤耐性菌とは、抗菌薬に対する薬剤感受性が低下し、比較的高い濃度の薬剤存在下でも増殖可能となった細菌である。

抗菌薬は、細菌感染症の治療において大きな効果を発揮しており、現代の医療において必要不可欠なものである。また、人以外にも、畜産や水産業等において、家畜や養殖魚等への感染症の予防薬、疾病の治療薬や成長促進等を目的とした飼料の添加物としても使用されている。¹⁾

しかしながら、抗菌薬の不適正な使用により、薬剤耐性菌の増加および蔓延が懸念されている。そのため、WHO が、薬剤耐性菌に対するワンヘルスによる取り組みを提唱するとともに、²⁾ 各国に行動計画の策定を求めたことから、³⁾ 日本においても薬剤耐性アクションプランが制定され、国を挙げた対策が進められている。⁴⁾

そこで、環境中の薬剤耐性菌の動向を把握することを目的として、市内の河川および海域環境中に存在する薬剤耐性大腸菌の検出状況を調査したので報告する。

2. 材料と方法

2. 1 検体

2020 年 4 月から 2023 年 3 月までの 3 年間に、市内の 3 つの河川（花見川、都・葭川、鹿島川）および海域の計 17 地点で採水された公共用水 419 検体を試料とした（表 1、図 1 のとおり）。

検体は 0.45μm メンブレンフィルター（アドバンテック）でろ過を行い、NB 加 mEC 培地（OXOID）および mEC 培地（OXOID）で 42℃、一晚培養し、各培養液を DHL 培地（栄研化学）に塗布し、37℃で一晩培養した。DHL 培地に発育した大腸菌様コロニーを 1 コロニーずつ釣菌し、各コロニーについて、確認試験等を実施した。

表 1 採水地点および検体数

水域名		花見川	都・葭川	鹿島川	海域	合計
採水地点		1地点 ①	2地点 ②～③	6地点 ④～⑨	8地点 ⑩～⑬×2	
検 体 数	2020	4	8	72	48	132
	2021	4	8	72	48	132
	2022	11	24	72	48	155
合計		19	40	216	144	419

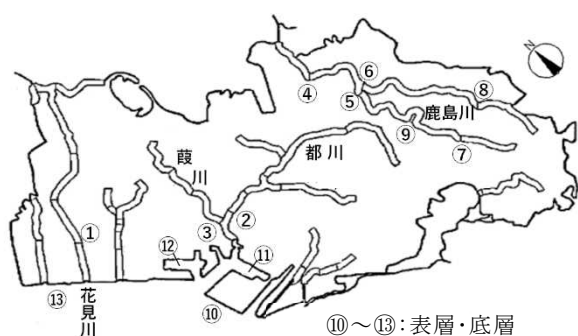


図1 採水地点

2.2 生化学的性状試験

TSI 寒天培地（栄研化学）、LIM 培地（栄研化学）、VP 培地（栄研化学）、シモンズ・クエン酸ナトリウム（Cit）培地（栄研化学）を用いて、菌株の生化学的性状の確認を行った。

2.3 O群型別試験

大腸菌様の性状を示す菌株について、病原体検出マニュアル⁵⁾に基づき、主要な病原性大腸菌のO群（50種）を判別できる病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ）を用いてO群を特定した。

2.4 菌種の同定

API 20E（バイオメリュー・ジャパン）を用いて、菌種の同定を実施した。

2.5 β-ラクタマーゼ産生性スクリーニング試験（ディスク拡散法）

病原体検出マニュアルの薬剤耐性菌検査法⁶⁾に基づき、純培養した菌を滅菌生理食塩水に懸濁し、McFarland 0.5 の菌液とした後、ミューラー・ヒント（MH）寒天培地（OXOID）に均一に塗抹し、以下に示す抗菌薬および阻害剤ディスク（栄研化学）を配置した。

IMP 型およびNDM 型等のメタロ-β-ラクタマーゼ産生性の確認はメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスクを阻害剤として、セフトジジム（CAZ）とメロペネム（MPM）ディスク間に配置し、KPC 型カルバペネマーゼ（CPE）産生性およびAmpC β-ラクタマーゼ産生性の確認は3-アミノフェニルボロン酸（APB）をMPMディスクとセフトメタゾール（CMZ）ディスクに添加したディスク、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生性の確認は、クラブラン酸・アモキシシリン（ACV）ディスクまたはスルバクタム・アンピシリン（S/A）ディスクを阻害剤としてセフトタキシム（CTX）とCAZの間に配置し、35.0±2.0℃で一晩（16～18時間）培養し、阻止円形成の有無を調べ、その表現型について確認した。

2.6 薬剤耐性遺伝子の検出（PCR法）

菌株からDNAをアルカリ熱抽出し、遠心分離後の上清を鋳型DNAとして、以下のマルチプレックスPCR⁷⁾を実施した。

カルバペネマーゼ遺伝子については、IMP 型、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、GES 型、VIM 型およびSMB 型の検出を実施した。ESBL 遺伝子については、SHV 型、TEM 型およびCTX-M-1/2/9 型、AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子については、MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型およびFOX 型の検出を実施した。

3. 結果

3.1 公共用水の大腸菌検出状況

419 検体を増菌培養した結果、全てにおいてNB 加mEC 培地およびmEC 培地で菌の増殖が認められ、それぞれDHL 培地に培養した。DHL 培地上の大腸菌様のコロニーを1コロニーずつ釣菌し、生化学的性状試験、O群型別試験を実施した結果、109 株でO群が判明した。

O群まで判明した大腸菌の水域別の検出状況を図2に、採水地点別の検出状況を表2に示す。大腸菌の検出率は全体では13.0%（109/838）、水域別では、花見川で21.1%（8/38）、都・霞川で32.5%（26/80）、鹿島川が14.8%（64/432）、海域で3.8%（11/288）であった。

採水地点別の大腸菌の検出率は、河川で9.7～35.0%、海域では、0～8.3%で、海域よりも河川で高く、最も高い採水地点は、霞川の日本橋で、35.0%であった。

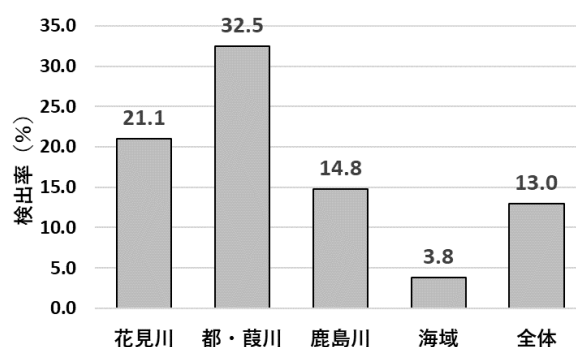


図2 水域別O群判明大腸菌検出状況

表 2 採水地点別検出状況

水域名	番号	採水地点名	検体数	釣菌数	O群判明	検出率
花見川	①	新花見川橋	19	38	8	21.1
都・葭川	②	都橋	20	40	12	30.0
	③	日本橋	20	40	14	35.0
鹿島川	④	下泉橋	36	72	12	16.7
	⑤	中田橋	36	72	10	13.9
	⑥	富田橋	36	72	9	12.5
	⑦	平川橋	36	72	9	12.5
	⑧	下大和田	36	72	17	23.6
	⑨	上下谷津	36	72	7	9.7
	⑩	千葉港外（表層）	18	36	3	8.3
海域		千葉港外（底層）	18	36	1	2.8
	⑪	千葉港南（表層）	18	36	2	5.6
		千葉港南（底層）	18	36	1	2.8
	⑫	千葉港北（表層）	18	36	2	5.6
		千葉港北（底層）	18	36	1	2.8
	⑬	幕張の浜沖（表層）	18	36	1	2.8
		幕張の浜沖（底層）	18	36	0	0.0
		全体	419	838	109	13.0

3. 2 O 群型別検出状況

O 群が判明した 109 株についての型別は、図 3 のとおりで、計 29 種類の O 群が検出された。O8 が 21 株（19.2%）、O25 が 12 株（11.0%）、O1 および O166 が 9 株（8.3%）、O18 が 6 株（5.5%）であった。臨床検体から高い頻度で分離される腸管出血性大腸菌である O157 および O26 もそれぞれ 1 株（0.9%）検出された。

3. 3 菌種の同定

O 群が判明した 109 株のうち、同一検体で同じ O 群の 1 株を除いた 108 株について、菌種の同定を行ったところ、107 株（99.1%）が *E. coli* であり、鹿島川の上下谷津地点から分離された 1 株（0.9%）は *Pantoea* spp. であった。

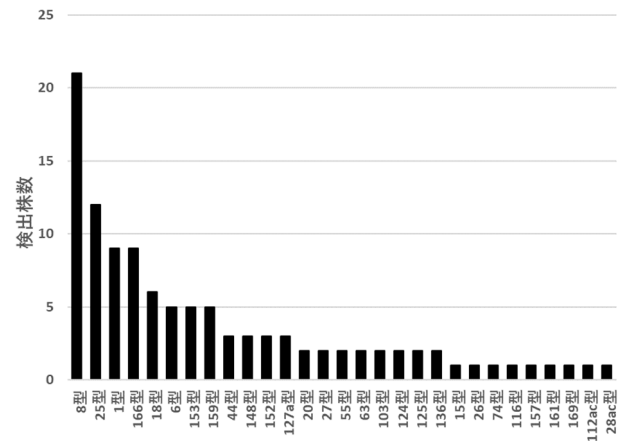


図 3 O 群血清型別検出状況

3. 4 薬剤耐性菌の検出

O 群が判明した 109 株について、β-ラクタマーゼ産生性スクリーニング試験を行った結果、いずれかの薬剤に耐性を示した株は、花見川、都・葭川、鹿島川の採水地点各 1 地点から 6 株（5.5%）分離され、全て *E. coli* であった（表 3）。

採水地点別に鹿島川の中田橋で 3 株（4.2%）、都・葭川の日本橋で 2 株（5.0%）、花見川の新花見川橋で 1 株（2.6%）が分離された。中田橋の 3 株は、別日に採水された検体であったが、日本橋の 2 株は、同一日の検体から分離された株であった。

O 群は、O25 が 4 株（66.7%）、O44 が 2 株（33.3%）であった。

薬剤耐性遺伝子の保有状況は、ESBL である CTX-M-9 型が 3 株（50%）いずれも O25、AmpC の DHA が 1 株（16.7%）O25、ESBL である TEM と AmpC の DHA の同時保有が 2 株（33.3%）いずれも O44 であった。カルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。

表 3 薬剤耐性菌分離結果

検体			増菌	TSI				LIM			VP	Cit	O群	API	薬剤耐性遺伝子			阻害剤効果			
河川等	採水地点	採水日	培地	斜面	高層	ガス	H ₂ S	L	I	M	培地	培地	型	20E	CPE	プラスミド性 AmpC	ESBL	SMA	APB	ACV	S/A
花見川	①	2021/6/16	mEC	+	+	+	－	+	+	+	－	－	25	<i>E.coli</i>	－	－	CTX-M-9	－	－	+	－
都・葭川	③	2023/1/18	NB加	+	+	+	－	－	+	+	－	－	44	<i>E.coli</i>	－	DHA	TEM	－	+	－	－
都・葭川	③	2023/1/18	mEC	+	+	+	－	－	+	+	－	－	44	<i>E.coli</i>	－	DHA	TEM	－	+	－	－
鹿島川	⑤	2020/8/6	mEC	+	+	+	－	－	+	+	－	－	25	<i>E.coli</i>	－	－	CTX-M-9	－	－	+	－
鹿島川	⑤	2021/9/3	mEC	+	+	+	－	+	+	+	－	－	25	<i>E.coli</i>	－	DHA	－	－	+	－	－
鹿島川	⑤	2022/3/4	NB加	+	+	+	－	+	+	+	－	－	25	<i>E.coli</i>	－	－	CTX-M-9	－	－	+	－

4. 考察

市内の河川流域および海域における薬剤耐性大腸菌の検出状況について、2020～2022年度の3年間に市内の主要3河川および海域で採水された公共用水を調査した結果、3つの河川の3地点から薬剤耐性大腸菌6株が分離され、市内河川における薬剤耐性菌の分布が明らかになった。

本研究で、臨床的にも注目されているCTX-M-9型のESBL産生大腸菌O25株が、採水時期や採水地点の異なる試料から複数分離されたことは興味深い。

医療分野においては、ESBLやカルバペネマーゼを産生する多剤耐性大腸菌が、世界的に蔓延傾向にあり、なかでも多剤耐性のCTX-M型ESBL産生大腸菌による感染症は、院内のみならず、市中でも広がっていることが報告されており、深刻な問題となっている。⁸⁾ さらに国内の健康人における薬剤耐性大腸菌の研究では、CTX-M-9型のESBL産生大腸菌O25株が健康人から分離され、その多くがフルオロキノロン系薬剤に耐性を示すことが報告されている。^{9) 10)}

今回の調査では、β-ラクタム系以外の抗菌薬に対する耐性や薬剤耐性遺伝子の分子疫学的解析を行っていないことから、今後、分離されたCTX-M-9型のESBL産生大腸菌O25株が、フルオロキノロン系薬剤に耐性を示すのか、世界的に流行しているクローンSequence Type (ST) 131であるかについての調査や他の分離株についても分子疫学的解析を行い多様性等について検討したい。

環境中におけるCTX-M-9型ESBL産生大腸菌は、国内の地理的に離れた大阪府¹¹⁾や広島県¹²⁾、福井県¹³⁾等の複数の河川から分離されており、国内に広範囲に存在しているものと思われた。

これらの報告から、環境中へ薬剤耐性菌の拡散の原因としては、薬剤耐性大腸菌を保有するヒトから排泄された薬剤耐性菌が、し尿処理施設等から河川に拡散した可能性が示唆されるため、今回分離された地点の地域的特徴を基に薬剤耐性菌の起源について考察した。

まず、薬剤耐性菌の起源については、現在のところ以下の3点が考えられる。

- ①ヒトの体内で耐性を獲得し、し尿処理施設や浄化槽から排出されたもの。
- ②家畜(牛、豚、鶏)の体内で耐性を獲得し、畜産施設や農地の堆肥から流出したもの。
- ③環境中の菌が医療機関や下水処理場などからの排水や汚泥中に残留した抗菌薬による曝露によって耐性を獲得したもの。

今回、薬剤耐性大腸菌が検出された3河川の3地点

はそれぞれ異なった水環境的特徴がみられた。

花見川(一級河川)は、印旛沼の水位の調整のために整備された放水路で、県内最大の湖沼である印旛沼を源流としている。1株分離された新花見川橋は、河口近くの最下流地点であり、市内の住宅地や市街地を流域として、医療機関を含む処理排水が流れ込んでいる。さらに源流である印旛沼は、下水処理場や畜産施設からの排水、農地の堆肥からの流出等があり、ヒトまたは家畜が薬剤耐性大腸菌の起源となっている可能性が考えられた。

都・葭川水域の葭川は、市街化が進んだ地域を流れており、2株分離された日本橋は、葭川の最下流地点で、葭川が都川に合流する手前にあり、上流には、し尿処理施設や浄化槽の処理排水が流れ込んでいることから、ヒトが起源である可能性が考えられた。また、検出された2株は、同一日に同じ検体から分離されており、O群型、保有している薬物耐性遺伝子、薬物耐性の表現型が一致することから、由来は同じ株であるものと考えられた。

鹿島川(一級河川)の流域には田畑が広がり、その周辺には畜産施設や樹林地がみられる。さらに、この流域の特徴として、農業集落排水施設が点在していることから、薬剤耐性大腸菌の起源としては、ヒトまたは家畜あるいはその両方の可能性が考えられた。今回、鹿島川は6地点で採水を行ったが、3株はすべて中田橋の検体から分離されており、採水日が違うこと、薬剤耐性遺伝子が異なることから、多様性がみられた。薬剤耐性大腸菌の多様性を解明するため、中田橋の水環境について、公表データの調査を行ったところ、大腸菌群数(2020～2021年)および大腸菌数(2022年)は、2020年、2022年で鹿島川の観測地点中最も多かった。¹⁴⁾ 中田橋で大腸菌が多い要因としては、流域中接続人口が最も多い農業集落排水施設が直近の上流にあること、¹⁵⁾ 周辺には田畑などの農地や牧場などの畜産施設が分布しているためと考えられた。全国の河川、湖における薬剤耐性菌を調査した研究では、人為起源の汚染が激しい地点においては、ESBL産生大腸菌の濃度や割合が高くなる傾向があるとの報告¹⁶⁾もあり、今回の結果からもその傾向がみられた。

薬剤耐性大腸菌の由来を知る手法として、特定の遺伝子の保有状況を調べることにより、動物種を判別する方法が報告されており、¹⁷⁾ 今後、研究課題として検討したい。

今回、市内河川から薬剤耐性遺伝子を保有する大腸菌が存在することが判明し、水環境を通して広域に存在している可能性が示唆されたことから、引き続き今

後も水環境における薬剤耐性菌の動向を注視していく必要があると思われた。

参考文献

- 1) 厚生労働省 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会：薬剤耐性ワンヘルス同行調査年次報告書 2023, 2024
- 2) Harbarth, S., et al.: Antimicrobial resistance: One world, one fight!. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 4, 49, 2015
- 3) World Health Organization (WHO): Global action plan on antimicrobial resistance., 2015, pp1-19
- 4) 内閣官房国際感染症対策調整室：薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン（2023-2027）, 2023, pp1- 93.
- 5) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル 2019 年 9 月改訂版」, 2019
- 6) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「薬剤耐性菌 H28.12 月改定版 V1.1」, 2016, pp30-42
- 7) Watahiki M. et al.: Single-Tube Multiplex polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase, *jpn. J. Infect. Dis.*, 73(2), 2020, pp166-172
- 8) Castanheira M, et al.: Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology, and detection. *JAC Antimicrob Resist.*, 3(3), 2021, pp1-21
- 9) Nakane K, et al.: Long-Term Colonization by blaCTX-M Harboring *Escherichia coli* in Healthy Japanese People Engaged in Food Handling. *Appl Environ Microbiol.*, 82, 2016, pp1818-1827.
- 10) 宮城県保健環境センター年報：市中における薬剤耐性腸内細菌科細菌の保菌状況調査., 宮城県保健環境センター 編, 37, 2018, pp38-42,
- 11) 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」, 2021
- 12) 増田 加奈子、平塚 貴大、秋田 裕子他, ワンヘルスアプローチによる水環境中の薬剤耐性菌の存在実態調査：広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, No. 29, 2021, pp1-6
- 13) 福井県衛生環境研究センター, 福井県のペットおよび河川水等における薬剤耐性大腸菌に関する研究
<https://www.erc.pref.fukui.jp/center/research/pet/pet.html> (2025.2.25 アクセス)
- 14) 千葉市, 水質汚濁・地下水調査結果, 令和 3,4 年度
https://www.city.chiba.jp/kankyo/kankyohozen/kankyokisei/water_tyousakekka.html (2025.2.25 アクセス)
- 15) 千葉市経済農政局農政部, 千葉市農業概要 令和 5 (2023) 年度版, 2024
- 16) 環境研究総合推進費：中間研究成果報告書 5RF-2301 環境水中の薬剤耐性菌の網羅的ゲノム解析 (JPMEERF20235R01) 令和 5～7 年度, 2024
- 17) Gomi, R., Matsuda, T., Matsui, Y., et al.: Fecal source tracking in water by next-generation sequencing technologies using host-specific *Escherichia coli* genetic markers. *Environmental science & technology*, Vol. 48, No. 16, 2014. pp 9616-9623