

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5RF-2005 環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルと
伝達機構の解明
(JPMEERF20205R05)

令和2年度～令和4年度

Antibiotic Resistance in Water Environments: Gene Transfer Potential and Mechanisms

〈研究代表機関〉
山形大学

〈研究分担機関〉

〈研究協力機関〉

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「0．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和5年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5－1. 成果の概要	
5－2. 環境政策等への貢献	
5－3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6－1. 査読付き論文	
6－2. 知的財産権	
6－3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	10
II－1 環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルと伝達機構の解明	
（山形大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	28
IV. 英文Abstract	30

I. 成果の概要

課題名 5F-2005 環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルと伝達機構の解明

課題代表者名 西山 正晃 (山形大学農学部 食料生命環境学科 エコサイエンスコース 准教授)

重点課題 主:【重点課題⑮】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副:【重点課題⑯】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ(行政ニーズ) 「非該当」

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

研究経費

15,291千円(合計額)

(令和2年度:5,097千円、令和3年度5,097千円、令和4年度:5,097千円)

研究体制

(サブテーマ1)環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルと伝達機構の解明(山形大学)

「他のサブテーマはない。」

研究協力機関

「研究協力機関はない。」

本研究のキーワード 薬剤耐性菌、耐性遺伝子、水環境、伝播ポテンシャル、ゲノムタイピング

1. はじめに(研究背景等)

薬剤耐性菌と耐性菌に関連する耐性遺伝子の存在は21世紀における人類の公衆衛生を脅かす問題である。WHO(世界保健機関)は2015年に「薬剤耐性に関するグローバルアクションプラン」を策定し、加盟国に自国の薬剤耐性菌への行動計画を求めている。現状のまま何も対策が講じられず、薬剤耐性菌が世界中で拡大すると想定した場合、2050年には薬剤耐性菌が原因となる死者数が1,000万人に、経済的な損失は1兆5000億ドルに達すると見積もられている(図-0.1)。我が国においても2016年から2020年にかけての厚生労働省が主体となって「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」が策定され、主要な細菌の薬剤耐性率の低減が成果目標として設定されている。したがって、拡大する薬剤耐性菌に関する正確な情報の蓄積とその情報に基づいた対策の考案は極めて重要な地球規

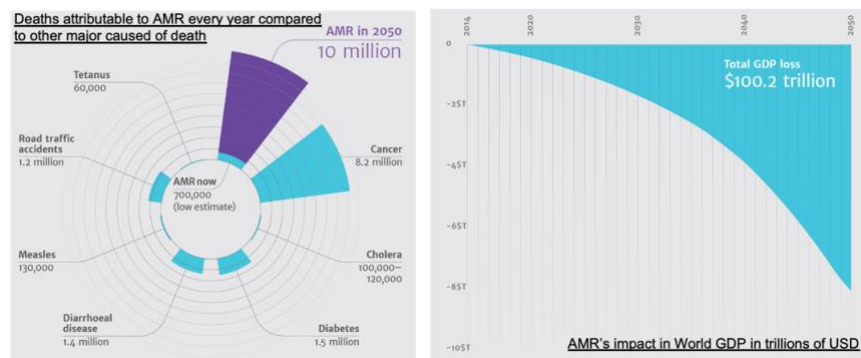
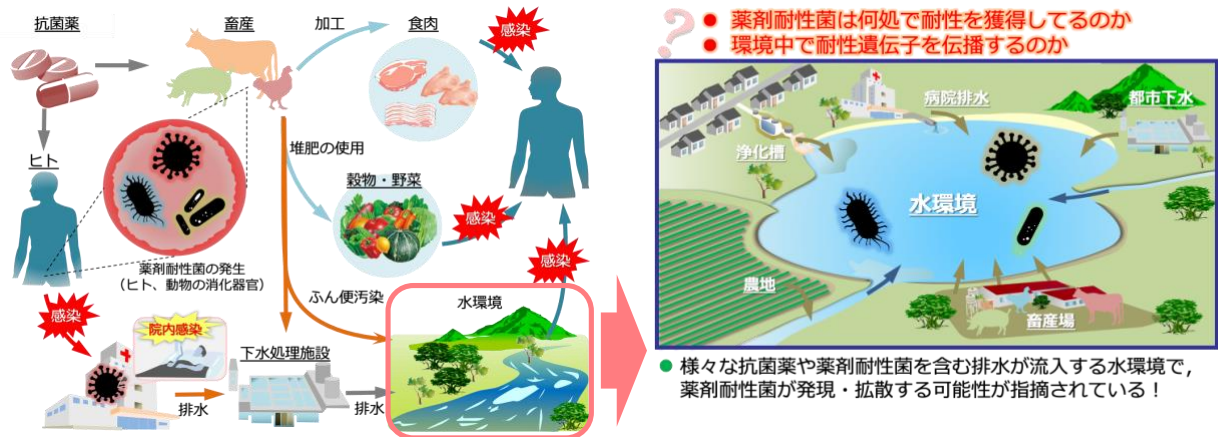


図-0.1 薬剤耐性菌による死者数と経済損失の予測
(The Review on Antimicrobial Resistance, Tackling drug-resistant infections globally, 2016.から抜粋)

模の課題である

薬剤耐性菌の発生事例は、病院、畜産場および養魚場といった抗菌薬を使用する施設で多数報告されている。特に病院では院内感染の発生によって度々問題となっているため、耐性菌に関する広域的なサーベイランスが世界各国で実施されており、その情報が蓄積されている。上述した我が国のAMRアクションプランでも、医療分野と畜産分野で抗菌剤の使用削減量や薬剤耐性菌率の成果目標値が定められているものの、環境分野を対象とした成果目標は存在していない。特に、様々な薬剤や耐性菌を含む排水が最終的に流入する水環境は、薬剤耐性菌が拡大するリザーバーとなっている可能性が指摘されており（図-0.2）、薬剤耐性菌の拡大を抑制するためにも、水環境における薬剤耐性遺伝子の伝播メカニズムを明らかにすることが重要である。



2. 研究開発目的

上述の通り、薬剤耐性菌への対策は喫緊の課題であるにもかかわらず、環境中の薬剤耐性菌に関する情報は乏しく、薬剤耐性菌の耐性遺伝子の伝播に関する情報は特に不足している。そこで上記に挙げた重要課題の解決に向けて、以下の3つの研究目的の遂行が必要であると考えた。

- ① 日本の主要河川を対象とした薬剤耐性菌の分布調査
- ② in vitro伝達実験を用いた耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価実験
- ③ 全ゲノム解析を利用した薬剤耐性菌の伝播機構の解明

3. 研究目標

全体目標	日本の水環境における薬剤耐性菌の分布を明らかにし、薬剤耐性遺伝子が環境中で伝播するポテンシャルとその伝達機構を解明する。
サブテーマ1	環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルと伝達機構の解明
実施機関	西山正晃/山形大学
目標	サブテーマ1を達成するために、以下の①から③の目標を達成する。 ① 日本の主要河川（3～5 地点）を対象に水環境中での薬剤耐性菌（大腸菌と腸球菌）の汚染・拡散状況を調査し、分子生物学的アプローチによって空間的な拡散ルートを明らかにする。 ② 環境を模擬した in vitro 伝達実験から測定した伝播率から、水環境中での耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを推定する。 ③ 耐性菌が発生すると認識されている哺乳類の腸管内とは全く異なる水環境中での薬剤耐性遺伝子の獲得・伝播メカニズムを解明する。

4. 研究開発内容

研究項目①：日本の主要河川を対象とした薬剤耐性菌の分布調査

薬剤耐性菌の分布調査は、水環境におけるふん便指標細菌である大腸菌と腸球菌を対象に、耐性菌の調査を実施した。大腸菌では基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（extended-spectrum β -lactamase, ESBL）産生大腸菌を、腸球菌ではバンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin-resistant enterococci, VRE）を対象とした。調査は、山形県内の一級河川である赤川とその対象河川である最上川を選定した毎月のモニタリング（図-1.1）と、東北地方を流下する8つの一級河川（阿武隈川：AB、名取川：NT、北上川：KK、馬淵川：MB、岩木川：IW、雄物川：OM、最上川：MG、赤川：AK）を対象とした広域調査を行った。

両細菌の耐性菌であるESBL産生大腸菌とVREはスクリーニング培地を用いて水試料から分離した。併せて、ふん便汚染の指標細菌である大腸菌と腸球菌の計数を行った。ふん便指標細菌と耐性菌の計数は、メンブランフィルター法によって測定した。単離した菌株については両者の特異遺伝子の検出と16S rRNA遺伝子の配列情報に基づき細菌種を同定した。大腸菌と腸球菌に対して使用される有効な抗菌薬をCLSIのからそれぞれ18種類と12種類選定し、薬剤感受性試験によって薬剤耐性を評価した。また、ESBL産生大腸菌に関しては、ダブルディスク法を採用し、ESBL確定試験を行った。

単離・同定された菌株に対して、主要な薬剤耐性遺伝子をPCR法によって検出した。ESBL産生大腸菌と確定できた株は、ESBL産生遺伝子である β ラクタマーゼ（*bla*）計21遺伝子を選択した。VREではバンコマイシン耐性遺伝子である*vanA*、*vanB*、*vanC1*、ならびに*vanC2/C3*の4種類とした。

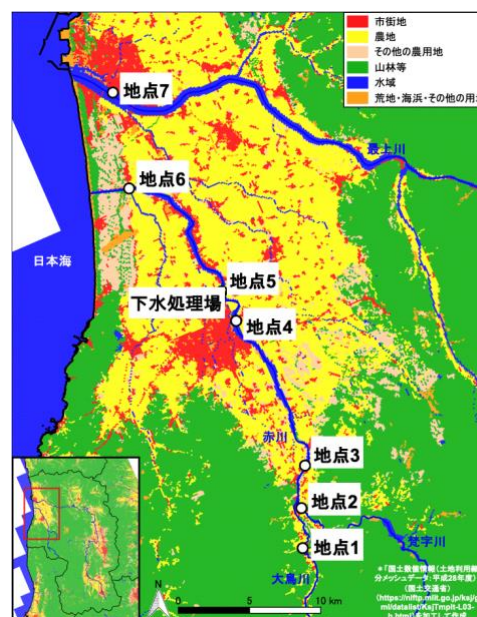


図-1.1 山形県内の赤川と最上川における調査地点とその周辺の土地利用図
（赤：市街地，黄色：農地，緑：森林，青：水域）

研究項目②：in vitro伝達実験を用いた耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価実験

本研究項目では、環境中でVREとESBL産生大腸菌がグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌へ耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを定量的に評価した。伝播ポテンシャルは様々な条件下におけるin vitro 伝達実験によって受容菌株の菌数に対する耐性遺伝子が伝播した菌株（接合完了体）の菌数を測定して伝播率を求め、そこから伝播ポテンシャルを推定した。伝播率の測定には細菌学分野で採用されているFilter mating法とBroth mating法を応用し、寒天培地上と液体培地中で実施する。環境条件として、菌体が分散している状態として都市河川水、菌体が集密する環境として河川底質と活性汚泥において実施する。また、モデル細菌には腸球菌（グラム陽性菌）と大腸菌（グラム陰性菌）を使用する。環境中を模擬したin vitro伝達実験を行い、耐性株から感受性株（耐性を持たない菌株）に薬剤耐性能が伝達するか否かを評価する。伝達する場合は、環境中での伝播率を定量評価する。

グラム陽性細菌には腸球菌種を使用し、供与菌には、異なる4種類のバンコマイシン耐性遺伝子を保有したVREを8株用意した（*vanA*：4株、*vanB*：2株、*vanC*：2株）。受容菌には、以前の研究で作成した*E. faecalis*、*E. faecium*の2種に、2種類の耐性遺伝子マーカーを導入した菌株を作成した。加えて、標準株として*E. faecalis* OG1RF株を合わせた3種類を採用した（表-1.2）。グラム陰性細菌には、腸内細菌科細菌を使用し、供与菌には、研究項目①で最も検出頻度が高かったESBLのCTX-M型を採用し、異なる3つのサブタイプ（*bla*_{CTX-M-15} (group 1)、*bla*_{CTX-M} group 2、*bla*_{CTX-M} group 9）を使用した。受容菌には標準株としてNBRC3301に2種類の耐性遺伝子マーカーを導入した菌株を作成した（表-1.3）。

各条件で培養した後、受容菌、供与菌、および耐性遺伝子が伝播した接合完了体のコロニー数を計数

することによって、伝播ポテンシャルを評価した。計数には、受容菌、供与菌、および接合完了体のそれぞれに対応した抗菌薬含有BHI培地を作製し、計数した。各条件の培地に段階希釈した試料100 μLを滴下し、コンラージ棒を用いて塗抹した後、37℃で48時間培養した。培養後、生育したコロニーを計数した。薬剤耐性遺伝子の伝播率は、受容菌に対する接合完了体の比によって評価した。

表-1.2 バンコマイシン耐性遺伝子の伝播ポテンシャルに用いた菌株情報

	耐性遺伝子	菌株名	腸球菌種	単離起源
供与菌 (Donor)	vanA	NCTC12201	<i>E. faecalis</i>	標準株
		NCTC12202	<i>E. faecium</i>	標準株
		HC-1	<i>E. faecium</i>	外国産鶏肉
		507W2-VRE-R3	<i>E. faecium</i>	下水
	vanB	ATCC51299	<i>E. faecalis</i>	標準株
		ATCC51858	<i>E. faecium</i>	標準株
	vanC1	ATCC49753	<i>E. gallinarum</i>	標準株
	vanC2/C3	ATCC700327	<i>E. casseliflavus</i>	標準株
受容菌 (Recipient) *	なし		<i>E. faecalis</i> **	河川
	なし		<i>E. faecium</i> **	下水
	なし	ATCC47077	<i>E. faecalis</i>	標準株

* 耐性遺伝子マーカーとして、フシジン酸とリファンピシンを導入

**環境から分離した腸球菌の中で抗菌薬に耐性を持たなかった菌株を使用

表-1.3 βラクタマーゼ産生遺伝子の伝播ポテンシャルに用いた菌株情報

	耐性遺伝子	菌株名	腸内細菌種	単離起源
供与菌 (Donor)	<i>bla</i> _{CTX-M-15 (group 1)}	NCTC13353	<i>Escherichia coli</i>	標準株
	<i>bla</i> _{CTX-M group 2}	NCTC13462	<i>Escherichia coli</i>	標準株
	<i>bla</i> _{CTX-M group 9}	NCTC13464	<i>Enterobacter cloacae</i>	標準株
受容菌 (Recipient) *	なし		<i>Escherichia coli</i>	標準株

* 耐性遺伝子マーカーとして、フシジン酸とリファンピシンを導入

研究項目③：全ゲノム解析を利用した薬剤耐性菌の伝播機構の解明

VREとESBL産生大腸菌を対象とした環境単離株と臨床分離株とのゲノム構造比較解析を実施した。研究項目①で分離された耐性菌株の全ゲノムデータも随時取得する。環境分離株において薬剤耐性遺伝子伝播に関わる遺伝子領域に関する情報を解析し、臨床由来株との比較を実施する。

細菌のゲノムタイピング手法には、Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法とMulti-Locus Sequence Typing (MLST) 法を使用した。PFGE法は菌株の染色体DNAを断片化し、そのバンドパターンを比較することで細菌間の相同性を評価する手法である。同一のバンドパターンは、断片化される前の遺伝子配列が等しい、つまり、同じ個体が起源であることを意味している。一方で、バンドパターンが不同であった場合、断片化される前の遺伝子配列が異なり、別々の個体が起源と判定できる⁶⁾。MLST法は、大腸菌の生存に必要な7種のハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *purA*, *recA*, *icd*, *mdh*) の配列に基づいて、菌株の流行型を推定する手法である⁷⁾。各ハウスキーピング遺伝子についてPCRを行い、サン

ガーシーケンス解析により塩基配列を決定した。得られた塩基配列のパターンを、データベースである PubMLST (<https://pubmlst.org/>) で照合することで、菌株の遺伝子型である Sequence Typing (ST型) を同定する。ST型が同じ菌株は起源が同じであると推定でき、また、菌株のST型をもとに世界で流行している株を比較することができる。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

拡大する薬剤耐性菌への対策は全人類が直面している喫緊の課題であるにもかかわらず、環境中における薬剤耐性菌ならびに関連する耐性遺伝子の伝播に関する情報は不足している。そこで本研究では、(1) 環境中における薬剤耐性菌の調査を行い、水環境中で薬剤耐性菌の実態と空間的分布状況を調査する、(2) 環境中に排出された耐性菌が新しく耐性菌を生む（遺伝子の水平伝播）かの可能性を定量的に評価することを目的として研究を行った。

東北地方の河川を対象とした調査によって、大腸菌汚染の低い日本の一級河川（採水日でA類型の環境基準を満たす）から、WHOにより危険性が高いと位置づけられるESBL産生大腸菌が検出された。また、山形県の赤川と最上川から1年間の河川モニタリングにより、ESBL産生大腸菌108株が分離された。その分離株からは、21種類のESBL産生遺伝子 (*bla*) のうち17種類が検出され、*bla*_{CTX-M-group-1} (65株) が最も多く検出された。注目すべき点は、国内型カルバペネマーゼである*bla*_{IMP} (9株) だけでなく、国内での検出事例が少ないために海外型とされる*bla*_{KPC} (7株) や*bla*_{OXA-48} (3株)、*bla*_{VIM} (9株)、*bla*_{NDM} (5株) も検出された点である。地点ごとに*bla*の検出数を比較すると、下水処理場の直下で分離された株(40株)から最も多い15種類の*bla*が検出された。臨床に加えて市中で生活する健常者もまた、河川に生息する耐性菌の排出源になっていることを示す結果が得られた。同期間に、単離した653株の大腸菌のうち、薬剤耐性大腸菌(1薬剤以上に耐性を示す)は、28.6%であり、うち10%が異なる3薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。

腸球菌と大腸菌をモデル細菌として、環境を模擬した*in vitro*伝達実験を行った結果、腸球菌では*vanA*のみ伝播が確認され、供与菌と受容菌の組み合わせによって伝播ポテンシャルが 10^{-3} ~ 10^{-7} での範囲であった。また、河川水などの液相中では伝播が確認されず菌体が集積する環境である活性汚泥中で低確率であるが伝播が確認された(10^{-7})。その一方で、*bla*_{CTX-M}を保有する腸内細菌科細菌を用いた場合は、いずれの環境を模擬した条件でも伝播が確認された(10^{-4} ~ 10^{-8})。グラム陰性細菌は、グラム陽性細菌と比較して、耐性遺伝子を伝播する場(伝場)のポテンシャルが高いことが示された。環境中で耐性遺伝子の伝播も十分に考えられ、特に細菌密度が高いと想定される箇所には重点的な処理が必要であると考えられる。

東北地方から単離したESBL産生大腸菌を対象としたゲノムタイピングとしてPFGE解析を実施した結果、庄内地方の河川における当該耐性菌の発生源は多様で、上流の発生源から下流へ拡散していることが明らかとなった。分子疫学解析であるMLST解析では、世界の臨床現場で流行しているST131型のESBL産生大腸菌が分離株の中で優占していた。ST131型のESBL産生大腸菌株は、東北地方で対象とした8つの一級河川のうち6つから検出され、空間的に離れている場所から分離されたことは、環境中へ臨床で問題となる耐性菌が拡散していたことを示す結果であった。本モニタリングによって、水環境中に生息する耐性菌の拡散の深刻さが浮き彫りになり、WHOが主導するワンヘルスの調査に役立つ重要なデータが得られた。

5－2．環境政策等への貢献

<行政等が活用することが見込まれる成果>

我が国において、主要河川等の水環境に存在する腸球菌と大腸菌の何%が重要な薬剤に対して耐性を保有しているのか、どの環境条件で薬剤耐性を獲得するのか、あるいは耐性遺伝子を伝播する可能性はどの程度であるかなどの重要課題に対して、本研究成果に基づいて定量的な解答を得ることが期待できる。本研究課題は行政ニーズに記載されていないが、これからの環境政策を策定する重要な項目になると考えられる。分布調査に基づく情報は、日本国内の薬剤耐性対策アクションプランを作成する際に、環境分野の成果目標値としても利用できることが期待される。また、水環境における耐性菌の薬剤耐性獲得・伝播機構が解明できれば、薬剤耐性菌の拡散防止対策の考案（該当する施設の消毒・衛生管理等の改善策）にも繋がり、我々の生活環境における公衆衛生の向上に大きく貢献できる。

5－3．研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
日本の水環境における薬剤耐性菌の分布を明らかにし、薬剤耐性遺伝子が環境中で伝播するポテンシャルとその伝達機構を解明する。	<u>目標どおりの成果をあげた。</u> 水環境を対象とした耐性菌のモニタリング調査を行い、東北地方における耐性菌のまん延状況を明らかにした。環境中で薬剤耐性遺伝子の伝播可能性をin-vitro伝達実験で評価した結果、細菌濃度の高い集積する環境では、耐性遺伝子が伝播するポテンシャルがあることを示した。
サブテーマ1 目標	目標の達成状況
サブテーマ1を達成するために、以下の①から③の目標を達成する。 ① 日本の主要河川（3～5 地点）を対象に水環境中での薬剤耐性菌（大腸菌と腸球菌）の汚染・拡散状況を調査し、分子生物学的アプローチによって空間的な拡散ルートを明らかにする。 ② 環境を模擬した <i>in vitro</i> 伝達実験から測定した伝播率から、水環境中での耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを推定する。 ③ 耐性菌が発生すると認識されている哺乳類の腸管内とは全く異なる水環境中での薬剤耐性遺伝子の獲得・伝播メカニズムを解明する。	① <u>目標を上回る成果をあげた。</u> 季節変動を考慮した調査と、東北6県を対象とした広域調査を実施したことにより、耐性菌の汚染状況が明らかとなった。大腸菌汚染の低い東北の一級河川（採水日でA類型の環境基準を満たす）から、WHOにより危険性が高いと位置づけられるESBL産生大腸菌が検出された。山形県の庄内地方を流れる赤川と最上川から単離した653株の大腸菌のうち、薬剤耐性大腸菌（1薬剤以上に耐性を示す）は、28.6%であり、うち10%が異なる3薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。ESBL産生大腸菌を対象としたゲノムタイピングを実施した結果、庄内地方を河川における耐性菌の発生源は多様であり、流域に拡散していることが明らかとなった。確立された本モニタリング手法によって、WHOが主導する調査に役立つ重要なデータが得られた。

	② <u>目標通りの成果をあげた。</u> 腸球菌と大腸菌をモデル細菌として、環境を模擬したin vitro伝達実験を行った結果、腸球菌ではvanAのみ伝播が確認され、供与菌と受容菌の組み合わせによって伝播ポテンシャルが$10^{-3} \sim 10^{-7}$での範囲であった。また、河川水などの液相中では伝播が確認されず菌体が集積する環境である活性汚泥中で低確率であるが伝播が確認された (10^{-7})。その一方で、<i>bla</i>_{CTX-M}を保有する腸内細菌科細菌を用いた場合は、いずれの環境を模擬した条件でも伝播が確認された ($10^{-4} \sim 10^{-8}$)。グラム陰性細菌は、グラム陽性細菌と比較して、耐性遺伝子を伝播する場（伝場）のポテンシャルが高いことが示された。環境中で耐性遺伝子の伝播も十分に考えられ、特に細菌密度が高いと想定される箇所には重点的な処理が必要であると考えられる。 ③ <u>目標にはやや及ばないが、一定の成果をあげた</u> ESBL産生大腸菌を対象としたゲノムタイピングを実施した結果、庄内地方の河川における耐性菌の発生源は多様で、季節を通して流域に点在しており、水環境中に生息する耐性菌の拡散の深刻さが浮き彫りになった。また、河川の上流で発生したESBL産生大腸菌は、河川の流下に伴って下流へ流下し拡散する事が分かった。MLSTの解析では、世界で流行しているST131型のESBL産生大腸菌が、空間的に離れている東北の河川から検出された。この事実は、同タイプの耐性菌が環境中の広範囲に拡散していることを表している。また、ST131株のような臨床で主要な流行型でない菌株やデータベースに登録されていないESBL産生大腸菌が環境から検出されたことは、環境中で<i>bla</i>が大腸菌への伝播を示唆する発見かもしれない。
--	---

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

1件

<主な査読付き論文>

- 1) 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹, 山形県の赤川水系から単離した大腸菌の系統発生群とその薬剤感受性, 土木学会論文集G (環境), 78(7), III_307-III_316, 2022.

6－2．知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6－3．その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0 件
その他誌上発表（査読なし）	0 件
口頭発表（学会等）	9 件
「国民との科学・技術対話」の実施	3 件
マスコミ等への公表・報道等	1 件
本研究費の研究成果による受賞	0 件
その他の成果発表	0 件

7．国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8．研究者略歴

研究代表者

西山 正晃

宮崎大学大学院農学工学総合研究科修了（H29.3）、工学博士、日本学術振興会特別研究員（H27.4～H29.3）、現在、山形大学農学部 エコサイエンスコース 准教授

II. 成果の詳細

II-1 環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの伝達機構の解明

山形大学農学部 食料生命環境学科 西山 正晃

〔要旨〕

拡大する薬剤耐性菌への対策は全人類が直面している喫緊の課題であるにもかかわらず、環境中における薬剤耐性菌ならびに関連する耐性遺伝子の伝播に関する情報は不足している。そこで本研究では、(1) 環境中における薬剤耐性菌の調査を行い、水環境中で薬剤耐性菌の実態と空間的分布状況を調査する、(2) 環境中に排出された耐性菌が新しく耐性菌を生む（遺伝子の水平伝播）かの可能性を定量的に評価することを目的として研究を行った。

東北地方の河川を対象とした調査によって、大腸菌汚染の低い日本の一級河川（採水日でA類型の環境基準を満たす）から、WHOにより危険性が高いと位置づけられるESBL産生大腸菌が検出された。また、山形県の赤川と最上川から1年間の河川モニタリングにより、ESBL産生大腸菌108株が分離された。その分離株からは、21種類のESBL産生遺伝子（*bla*）のうち17種類が検出され、*bla*_{CTX-M-group-1}（65株）が最も多く検出された。注目すべき点は、国内型カルバペネマーゼである*bla*_{IMP}（9株）だけでなく、国内での検出事例が少ないために海外型とされる*bla*_{KPC}（7株）や*bla*_{OXA-48}（3株）、*bla*_{VIM}（9株）、*bla*_{NDM}（5株）も検出された点である。地点ごとに*bla*の検出数を比較すると、下水処理場の直下で分離された株（40株）から最も多い15種類の*bla*が検出された。臨床に加えて市中で生活する健常者もまた、河川に生息する耐性菌の排出源になっていることを示す結果が得られた。同期間に、単離した653株の大腸菌のうち、薬剤耐性大腸菌（1薬剤以上に耐性を示す）は、28.6%であり、うち10%が異なる3薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。ESBL産生大腸菌を対象としたゲノムタイピングを実施した結果、庄内地方を河川における耐性菌の発生源は多様で、水環境中に生息する耐性菌の拡散の深刻さが浮き彫りになった。MLST解析の結果では、世界で流行しているST131型のESBL産生大腸菌が分離株の中で優占しており、東北地方の空間的に離れている河川からも検出された。本モニタリングによって、WHOが主導するワンヘルスの調査に役立つ重要なデータが得られた。

腸球菌と大腸菌をモデル細菌として、環境を模擬した*in vitro*伝達実験を行った結果、腸球菌では*vanA*のみ伝播が確認され、供与菌と受容菌の組み合わせによって伝播ポテンシャルが 10^{-3} ～ 10^{-7} での範囲であった。また、河川水などの液相中では伝播が確認されず菌体が集積する環境である活性汚泥中で低確率であるが伝播が確認された（ 10^{-7} ）。その一方で、*bla*_{CTX-M}を保有する腸内細菌科細菌を用いた場合は、いずれの環境を模擬した条件でも伝播が確認された（ 10^{-4} ～ 10^{-8} ）。グラム陰性細菌は、グラム陽性細菌と比較して、耐性遺伝子を伝播する場（伝場）のポテンシャルが高いことが示された。環境中で耐性遺伝子の伝播も十分に考えられ、特に細菌密度が高いと想定される箇所には重点的な処理が必要であると考えられた。

1. 研究開発目的

薬剤耐性菌への対策は地球規模における喫緊の課題であるにもかかわらず、環境中の薬剤耐性菌に関する情報は乏しく、薬剤耐性菌の耐性遺伝子の伝播に関する情報は特に不足している。そこで上記に挙げた重要課題の解決に向けて、以下の3つの研究目的の遂行が必要であると考えた。①日本の主要河川を対象とした薬剤耐性菌の分布調査、②*in vitro*伝達実験を用いた耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価実験、全ゲノム解析を利用した薬剤耐性菌の伝播機構の解明。

2. 研究目標

サブテーマ1	環境中における薬剤耐性遺伝子の伝播ポテンシャルと伝達機構の解明
実施機関	山形大学
全体目標	日本の水環境における薬剤耐性菌の分布を明らかにし、薬剤耐性遺伝子が環境中で伝播するポテンシャルとその伝達機構を解明する。
目標	サブテーマ1を達成するために、以下の①から③の目標を達成する。 ① 日本の主要河川（3～5地点）を対象に水環境中での薬剤耐性菌（大腸菌と腸球菌）の汚染・拡散状況を調査し、分子生物学的アプローチによって空間的な拡散ルートを明らかにする。 ② 環境を模擬した <i>in vitro</i> 伝達実験から測定した伝播率から、水環境中での耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを推定する。 ③ 耐性菌が発生すると認識されている哺乳類の腸管内とは全く異なる水環境中での薬剤耐性遺伝子の獲得・伝播メカニズムを解明する。

3. 研究開発内容

研究項目①：日本の主要河川を対象とした薬剤耐性菌の分布調査

薬剤耐性菌の分布調査は、水環境におけるふん便指標細菌である大腸菌と腸球菌を対象に、耐性菌の調査を実施した。両細菌は、Centers for Disease Control and Prevention (CDC) が定める院内感染原因菌の中でも重要な薬剤耐性菌として知られるESKAPEグループの細菌種に該当する¹⁾。大腸菌では基質特異性拡張型βラクタマーゼ（extended-spectrum β-lactamase, ESBL）産生大腸菌を、腸球菌ではバンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin-resistant enterococci, VRE）を対象とした。推進費への申請時は日本の全国の主要な都市河川3～5地点（最上川、多摩川、大淀川などを予定）を選定し、季節性を考慮した調査の実施（計4回実施：2020年7月と10月、2021年1月と4月を予定）を予定していたが、新型コロナウイルスの影響によって当初の予定を大幅に変更した。当初のモニタリングの目的として、①耐性菌の季節性を考慮したモニタリング、②遺伝子解析を用いて全国での耐性菌の空間的分布の評価であることから、以下のモニタリングによって目的を達成することとした。①の調査目的に関しては、山形県内の一級河川である赤川とその対象河川である最上川を選定したモニタリング調査を実施すること、②は、東北地方に限定し、東北地方を流れる主要な都市河川（5地点程度）を対象とすることで、調査を行った。

①の調査は、山形県庄内地方を流れる一級河川である赤川（幹川流路延長：70.4km、流域面積：856 km²）と最上川（幹川流路延長：229 km、流域面積：7,040 km²）で行った。採水は赤川水系から6地点（地点1：赤川水系大鳥川、地点2：赤川水系梵字川、地点3：大鳥川と梵字川合流地点後、地点4：下水処理場放流前、地点5：下水処理場放流水流入後、地点6：赤川河口）と最上川河口の計7地点で行った（図-1.1）。赤川上流の地点1と地点2の周辺の土地利用は主に山林であり、周囲に集落が形成されている。地点3と地点6は主に畑地で、地点4、地点5、ならびに地点7は市街地に位置している。両河川が流れる鶴岡市と酒田市の人口はそれぞれ、約130,000人と約110,000人であり、流域の排水処理施設として、下水処理

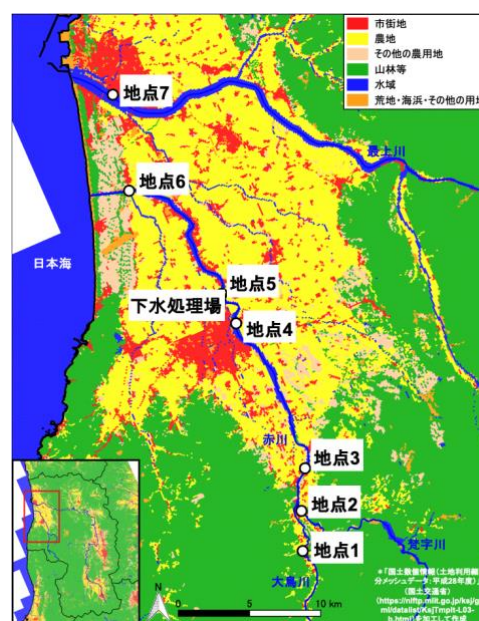


図-1.1 山形県内の赤川と最上川における調査地点とその周辺の土地利用図
(赤：市街地，黄色：農地，緑：森林，青：水域)

施設や、農業集落排水処理施設、浄化槽が整備されている。そのうち、最も大きいA下水処理場地点5の直前に位置しており、約75,000人を対象とした処理能力を有し、汚水の平均日処理量は約27,000 m³/日である。処理には標準活性汚泥法が採用されており、塩素消毒後の処理水が赤川に放流されている。下水処理水放流量に対する河川流量の割合は、約0.77%（赤川の平水流量40.57 m³/sから計算）である。地点5は、赤川の左岸側にある下水処理水放流口と同じ岸で、放流水と河川水が十分に混合したと判断できる地点から採水した。地点7である最上川河口は感潮域であり、海水の影響を受ける地点である。この地点7は、下水処理場の直下ではなく、河川流量に対して流域の処理水量の割合は小さいため、赤川の地点5と比較して下水処理場の影響は明らかに小さいと考えられる。

②の調査は、東北地方を流下する8つの一級河川（阿武隈川：AB、名取川：NT、北上川：KK、馬淵川：MB、岩木川：IW、雄物川：OM、最上川：MG、赤川：AK）で実施した（図-1.2）。期間は2021年9月から2022年9月の間で3ヶ月に1回（計4回）行った。流域面積は、阿武隈川5,276.3km²、名取川778.7km²、北上川8,184.2km²、馬淵川2,009.6km²、岩木川1,712.3km²、雄物川4,437.5km²、最上川6,818.6km²、赤川846.3km²である。採水は、各河川の河口から5-10km上流地点の海水による影響のない地点を選定した。

いずれの調査も、1Lのポリエチレン瓶に河川水を採取した後、クーラーボックスに入れて研究室まで持ち帰り、8時間以内に微生物の分析を開始した。水質分析は現地で多項目水質計（WQC-24、東亜DKK）を使用してpH、溶存酸素量、電気伝導度、水温、塩分濃度を測定した。

なお、河川流域内の土地利用面積とその割合については、国土数値情報（土地利用細分メッシュデータ：平成28年度）（国土交通省）（<https://nlftp.mlit.go.jp/ksj/gml/datalist/KsjTmplt-L03-b.html>）と基盤地図情報、数値標高モデル（10 mメッシュ）（国土地理院）（<https://fgd.gsi.go.jp/download/mapGis.php?tab=dem>）のデータを使用した。

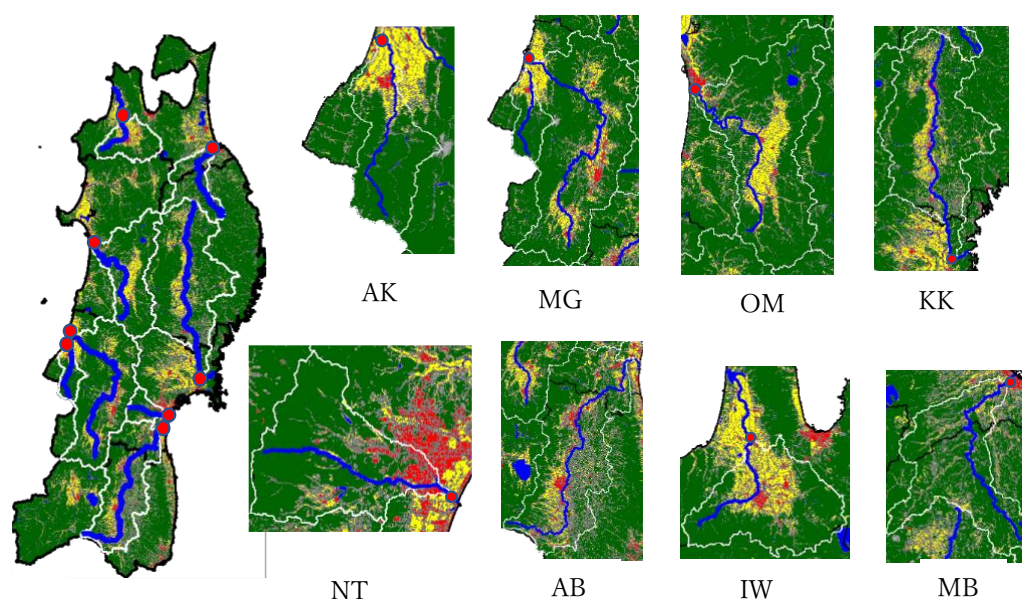


図-1.2 東北地方の各河川河川における採水地点とその周辺の土地利用図
（赤：市街地，黄色：農地，緑：森林，青：水域，灰色：その他）

両細菌の耐性菌であるESBL産生大腸菌とVREはスクリーニング培地（CHROMagarTMESBL、CHROMagarTMVRE）を用いて水試料から分離した。併せて、ふん便汚染の指標細菌である大腸菌と腸球菌の計数をそれぞれChromocult coliform agarとmEI agarを使用して行った。ふん便指標細菌と耐性菌の計数は、メンブランフィルター法によって測定した。単離した菌株については両者の特異遺伝子の検出と16S rRNA遺伝子の配列情報に基づき細菌種を同定した。大腸菌と腸球菌に対して使用される有効な抗菌薬をCLSIのからそれぞれ18種類と12種類選定し（表-1.1）、薬剤感受性試験（寒天平板希釈法、Kirby-Bauerディスク法）によって薬剤耐性を評価した。また、ESBL産生大腸菌に関しては、ダブルディスク法を採用し、ESBL確定試験を行った²⁾。

表-1.1 薬剤感受性試験に使用した抗菌薬のリスト（○で示した箇所は使用した抗菌薬を示す）

抗菌薬グループ	抗菌薬名	略称	大腸菌	腸球菌
ペニシリン系	アンピシリン	ABP	○	○
セファロスポリン系 ^a	セフトキシム（第三世代）	CFX	○	
	セフトジジム（第三世代）	CAZ	○	
	セフェピム（第四世代）	CFP	○	
セファロスポリン系 ^b	セフロキシム	CXM	○	
セファマイシン系	セフォキシチン	CFX	○	
カルバペネム系	イミペネム	IPM	○	○
モノバクタム系	アズトレオナム	AZT	○	
βラクタム系合剤	クラブラン酸+アモキシシリン	ACV	○	
	タゾバクタム+ピペラシリン	T/P	○	
合剤	スルファメトキサゾール+トリメトプリム	ST	○	
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	GM	○	○
	アミカシン	AMK	○	
	ストレプトマイシン	SM		○
キノロン系	シプロフロキサシン	CIP	○	○
	レボフロキサシン	LVFX		○
テトラサイクリン系	テトラサイクリン	TC	○	○
	ドキシサイクリン	DOXY		○
	ミノサイクリン	MINO		○
グリシルサイクリン系	チゲサイクリン	TGC	○	○
ホスホマイシン系	ホスホマイシン	FOM	○	
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	CP	○	
マクロライド系	エリスロマイシン	EM		○
グリコペプチド系	バンコマイシン	VCM		○

単離・同定された菌株に対して、主要な薬剤耐性遺伝子をPCR法によって検出した。ESBL産生大腸菌と確定できた株は、ESBL産生遺伝子であるβラクタマーゼ（bla）計21遺伝子を選択した³⁾。VREではバンコマイシン耐性遺伝子である*vanA*、*vanB*、*vanC1*、ならびに*vanC2/C3*の4種類とした⁴⁾。また、PCR法によって大腸菌の発生源の特徴づけとして、系統発生群解析もあわせて行った⁵⁾。

日本の東北地方を流れる河川を対象として、広域な薬剤耐性菌の調査を実施することで、各都市に存在する耐性菌の蔓延実態を明らかにする。高度耐性を示す菌株やユニークな耐性菌株が分離された場合、サブテーマ②の伝播ポテンシャルの評価実験での使用やサブテーマ③での全ゲノム解析に用いる。

研究項目②：in vitro伝達実験を用いた耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価実験

本研究項目では、環境中でVREとESBL産生大腸菌がグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌へ耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを定量的に評価した。伝播ポテンシャルの評価には申請者がこれまでの研究で確立した手法を用いる。伝播ポテンシャルは様々な条件下におけるin vitro 伝達実験によって受容菌株の菌数に対する耐性遺伝子が伝播した菌株（接合完了体）の菌数を測定して伝播率を求め、そこから伝播ポテンシャルを推定した。伝播率の測定には細菌学分野で採用されているFilter mating法とBroth mating法を応用し、寒天培地上と液体培地中で実施する。環境条件として、菌体が分散している状態として都市河川水、菌体が集密する環境として河川底質と活性汚泥において実施する。また、モデル細菌には腸球菌（グラム陽性菌）と大腸菌（グラム陰性菌）を使用する。環境中を模擬したin vitro伝達実験を行い、耐性株から感受性株（耐性を持たない菌株）に薬剤耐性能が伝達するか否かを評価する。伝達する場合は、環境中での伝播率を定量評価する。サブテーマ①の調査で得られる環境中での耐性菌の存在割合のデータに、伝達実験の結果を反映することで耐性菌の環境中での伝播の可能性を考察が可能となる。

申請時当初は1年目に研究項目①を実施し、そこで分離されたVRE株とESBL産生大腸菌株を使用する予定であったが、研究項目①を後ろ倒しにしたことにより、本実験を1年目に行った。グラム陽性細菌には腸球菌種を使用し、供与菌には、異なる4種類のバンコマイシン耐性遺伝子を保有したVREを8株用意した（*vanA*：4株、*vanB*：2株、*vanC*：2株）。受容菌には、以前の研究で作成した*E. faecalis*、*E. faecium*

の2種に、2種類の耐性遺伝子マーカーを導入した菌株を作成した。加えて、標準株として *E. faecalis* OG1RF株を合わせた3種類を採用した（表-1.2）。グラム陰性細菌には、腸内細菌科細菌を使用し、供与菌には、研究項目①で最も検出頻度が高かったESBLのCTX-M型を採用し、異なる3つのサブタイプ（*bla*_{CTX-M-15 (group 1)}、*bla*_{CTX-M group 2}、*bla*_{CTX-M group 9}）を使用した。受容菌には標準株としてNBRC3301に2種類の耐性遺伝子マーカーを導入した菌株を作成した（表-1.3）。

供与菌と受容菌をBrain Heart Infusion（BHI）液体培地にて培養し、両菌株の培養液を遠心分離後に上澄みを捨てた後、滅菌生理食塩水にて菌体をウォッシュした。上記の作業を2回繰り返して、液体培地を完全に除去した後、滅菌生理食塩水にて菌体濃度を 10^8 CFU/mLに調整した。薬剤耐性遺伝子の伝播実験は、混合比を1:1で実施した。伝播実験は、以下の6条件で実施した：Filter mating法、Broth mating法、河川水、リン酸緩衝液（PBS）、河川底質、および活性汚泥。Filter mating法は、供与菌と受容菌の混合液をセルロース混合エステルメンブランフィルター（直径47 mm、孔径0.45 μ m、Advantec）で吸引濾過し、BHI培地上で24時間培養した。Broth mating法、河川水、およびPBSは、供与菌と受容菌を5 mLのBHI液体培地に接種し、24時間培養した。河川底質は、山形県鶴岡市の赤川下流から採取した。滅菌した河川底質の試料を5 gに供与菌と受容菌を摂取し、24時間培養した。活性汚泥は、山形県鶴岡市のA下水処理場の活性汚泥を採取し、滅菌したものを使用した。供与菌と受容菌を滅菌した活性汚泥5 mLに接種し、24時間培養した。

各条件で培養した後、滅菌生理食塩水を使用して段階希釈し、受容菌、供与菌、および耐性遺伝子が伝播した接合完了体のコロニー数を計数することによって、伝播ポテンシャルを評価した。計数には、受容菌、供与菌、および接合完了体のそれぞれに対応した抗菌薬含有BHI培地を作製し、計数した。各条件の培地に段階希釈した試料100 μ Lを滴下し、コンラージ棒を用いて塗抹した後、37°Cで48時間培養した。培養後、生育したコロニーを計数した。薬剤耐性遺伝子の伝播率は、受容菌に対する接合完了体の比によって評価した。

表-1.2 バンコマイシン耐性遺伝子の伝播ポテンシャルに用いた菌株情報

	耐性遺伝子	菌株名	腸球菌種	単離起源
供与菌 (Donor)	<i>vanA</i>	NCTC12201	<i>E. faecalis</i>	標準株
		NCTC12202	<i>E. faecium</i>	標準株
		HC-1	<i>E. faecium</i>	外国産鶏肉
		507W2-VRE-R3	<i>E. faecium</i>	下水
	<i>vanB</i>	ATCC51299	<i>E. faecalis</i>	標準株
		ATCC51858	<i>E. faecium</i>	標準株
	<i>vanC1</i>	ATCC49753	<i>E. gallinarum</i>	標準株
	<i>vanC2/C3</i>	ATCC700327	<i>E. casseliflavus</i>	標準株
受容菌 (Recipient) *	なし		<i>E. faecalis</i> **	河川
	なし		<i>E. faecium</i> **	下水
	なし	ATCC47077	<i>E. faecalis</i>	標準株

* 耐性遺伝子マーカーとして、フシジン酸とリファンピシンを導入

**環境から分離した腸球菌の中で抗菌薬に耐性を持たなかった菌株を使用

表-1.3 β ラクタマーゼ産生遺伝子の伝播ポテンシャルに用いた菌株情報

	耐性遺伝子	菌株名	腸内細菌種	単離起源
供与菌 (Donor)	<i>bla</i> _{CTX-M-15 (group 1)}	NCTC13353	<i>Escherichia coli</i>	標準株
	<i>bla</i> _{CTX-M group 2}	NCTC13462	<i>Escherichia coli</i>	標準株
	<i>bla</i> _{CTX-M group 9}	NCTC13464	<i>Enterobacter cloacae</i>	標準株
受容菌 (Recipient) *	なし		<i>Escherichia coli</i>	標準株

* 耐性遺伝子マーカーとして、フシジン酸とリファンピシンを導入

研究項目③：全ゲノム解析を利用した薬剤耐性菌の伝播機構の解明

VREとESBL産生大腸菌を対象とした環境分離株と臨床分離株とのゲノム構造比較解析を実施した。研究項目①で分離された耐性菌株の全ゲノムデータも随時取得する。環境分離株において薬剤耐性遺伝子伝播に関わる遺伝子領域に関する情報を解析し、臨床由来株との比較を実施する。

新型コロナウイルスの蔓延状況から研究項目①の実施を後ろ倒しにしたことが原因で、耐性菌株の特徴づけの作業が遅れた。また、2株全ゲノム解析を実施したところ、上手く結果が得られないこと、1株あたりのコストが高いことから、全ゲノムを用いた解析ではなく、ゲノムタイピングを使用して伝播機構と耐性菌の発生源の解析を行うこととした。

細菌のゲノムタイピング手法には、Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法とMulti-Locus Sequence Typing (MLST) 法を使用した。PFGE法は菌株の染色体DNAを断片化し、そのバンドパターンを比較することで細菌間の相同性を評価する手法である。同一のバンドパターンは、断片化される前の遺伝子配列が等しい、つまり、同じ個体が起源であることを意味している。一方で、バンドパターンが不同であった場合、断片化される前の遺伝子配列が異なり、別々の個体が起源と判定できる⁶⁾。MLST法は、大腸菌の生存に必要な7種のハウスキーピング遺伝子 (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *purA*, *recA*, *icd*, *mdh*) の配列に基づいて、菌株の流行型を推定する手法である⁷⁾。各ハウスキーピング遺伝子についてPCRを行い、サンガーシーケンス解析により塩基配列を決定した。得られた塩基配列のパターンを、データベースであるPubMLST (<https://pubmlst.org/>) で照合することで、菌株の遺伝子型であるSequence Typing (ST型) を同定する。ST型が同じ菌株は起源が同じであると推定でき、また、菌株のST型をもとに世界で流行している株を比較することができる。

4. 結果及び考察

研究項目①：日本の主要河川を対象とした薬剤耐性菌の分布調査

①-1 赤川と最上川におけるふん便指標細菌の推移

図-1.3 左図に、調査期間における地点ごとの大腸菌の計数結果を示す。各地点における月ごとの大腸菌の幾何平均値は、 $<1\sim280$ CFU/100 mLの間で推移した。公共水域に係る環境基準と比較すると、全ての調査地点、採水日の大腸菌数はA類型河川 (300 CFU/100 mL以下) の条件を満たしており、赤川と最上川の両河川のふん便汚染度は高くなかった⁸⁾。月別のデータを比較すると、4月の大腸菌の平均値が、6月～12月と比較して有意に低かった ($p<0.05$)。4月の赤川の水位 (0.80m) が6月～12月の水位 (-0.01～0.46m) よりも高いことから、この原因は融雪水による希釈であろう。季節変化を見ると、夏 (7月～9月) から秋 (10月～12月) にかけて大腸菌数が増加し、冬にかけて減少する傾向が見られた。大腸菌は哺乳類、鳥類の腸管に生息するため、河川における大腸菌汚染は、ヒトだけでなく、野生動物も原因となる⁹⁾。

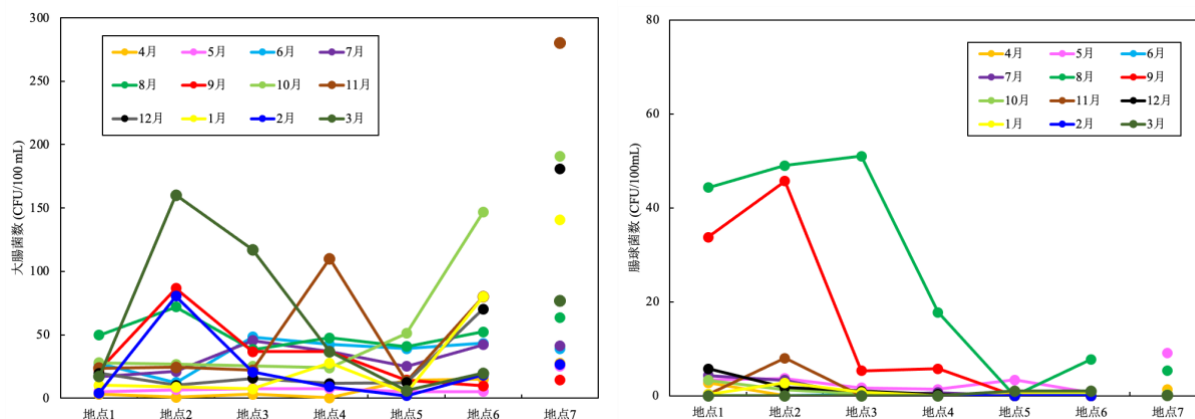


図-1.3 赤川と最上川の各調査地点におけるふん便指標細菌数の推移 (左図：大腸菌、右図：腸球菌)

本研究の調査地点である庄内地域は豪雪地帯であり、冬季は積雪によって野生動物の水辺への行動が制限されるため、河川の大腸菌数が減少したのかもしれない。サンプリング地点ごとに大腸菌の計数結果を比較すると、赤川水系の地点間（地点1~6）に有意な差はみられなかった（ $p > 0.05$ ）。地点6と7では、10月から1月までの大腸菌数が、他の月と比較して5~7倍大きかった。水質項目の測定結果で考察したように、これらは越冬するために飛来した渡り鳥の影響と考えられる。渡り鳥に10月頃から飛来が始まり、1月に飛来数がピークとなる傾向と、大腸菌数の変化が一致していた。

図-1.3 右図に、調査期間における地点ごとの腸球菌の計数結果を示す。腸球菌は、年間を通してほとんど検出されず、下水処理水の影響のある地点5では最大3.3CFU/100mLだった。8月と9月に地点1から3で5~45CFU/100mLの範囲で検出された一方で、6月や2月のように全く検出されない月もあった。例えば、4月の調査では、AK3での腸球菌を除き調査地点から大腸菌と腸球菌が検出され、大腸菌は全ての調査地点から検出された（図-1.3）。腸球菌と大腸菌ともに環境水中から検出されることは、人畜によるふん便汚染を強く受けていると考えられる。

上述した通り、調査期間を通じて腸球菌の分離数が少なく、VREに至っては検出されなかった。これらのことから、各地点の耐性菌の検出数や季節的な変動を評価するため大腸菌を用いて薬剤耐性試験を実施した。

①-2 庄内地方の河川から単離したESBL産生大腸菌の薬剤耐性とその特徴

CHROMagarTMESBL培地で分離された合計596株に対して大腸菌の菌種同定を行った結果、220株（37%）が大腸菌と同定された。それら220株に対してESBL確定試験を行い、108株（49%）がESBL産生大腸菌として確定された。すなわち、CHROMagarESBLを用いたESBL産生大腸菌の検出の制度は、18%（108株/596株）と低かった。先行研究でも、この培地で環境水サンプルを試験すると、大腸菌コロニーと形状の類似した*Proteus*属や*Aeromonas*属が培養されることが知られており¹⁰⁾、菌種同定とESBL確定試験は不可欠なプロセスと言える。

表-1.4に赤川、最上川から分離されたESBL産生大腸菌株の各抗菌薬に対する耐性を示す。108株の全ての分離株がABPと

表-1.4 各調査地点から単離した大腸菌の各抗菌薬に対する薬剤感受性の菌株数とその割合

	菌株数			耐性菌の割合 (%)
	感受性	中度耐性	耐性	中度耐性+耐性
ABPC	495	54	104	24.2
GM	647	0	6	0.9
CTX	630	2	21	3.5
CAZ	652	1	0	0.2
CPFX	640	2	11	2.0
LVFX	641	1	11	1.8
IPM	643	6	4	1.5
C/A	589	21	43	9.8
AZT	651	0	2	0.3
CP	631	8	14	3.4
FOM	633	3	17	3.1
TC	616	1	36	5.7

CMXに耐性を示した。APBはペニシリン系抗菌薬、CMXは第二世代セフェム系抗菌薬であり、どちらもESBL産生菌がよく分解する抗菌薬として知られている。一方、TGCに対しては全ての分離株が感受性だった。第三世代セフェム系抗菌薬であるCTX、CPX、CAZの中では、CTX耐性率（85.2%）が最も高く（CPF耐性率：52.8%、CAZ耐性率：70.4%）、この傾向は、これまでの日本の河川や下水処理場での調査の結果と整合していた¹¹⁾。注目すべき点としては、ESBL産生菌の治療薬として用いられるカルバペネム系抗菌薬であるIPMに対して21株（19.4%）が耐性を示した点である。ESBL産生菌がカルバペネム系抗菌薬に耐性を示した場合、使用できる抗菌薬が非常に限られ、感染症治療が困難になる。また、ESBL産生菌が通常分解することのできないACVに対して耐性を示す株が19株（17.6%）検出された。ACVに含まれるクラブラン酸は、ESBL産生を阻害することができる。上記の19株がそのACVを分解できた要因として、クラブラン酸による阻害が起こりにくいAmpC遺伝子を保有していたためと考えられる。108株のうち78株（72%）が異なる3グループ以上の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌であった。最多で9グループの抗菌薬に耐性を示すESBL産生大腸菌が、9月の最上川（地点7）から検出された。この株はIPMを含むβラクタム系抗菌薬8種とその他抗菌薬5種の計13薬剤（ABP-CXM-CTX-CPX-CFX-IPM-AZT-ACV-T/P-

GM-AMK-TC-FOM) に耐性を示した。

図-1.4 左図に、地点ごとの分離株の各抗菌薬に対する耐性率を示す。ABP、CMX、CTX、CAZに対する耐性株が全ての地点で検出された。地点ごとに比較すると、赤川上流（地点1・2）の分離株ではペニシリン系やセフェム系抗菌薬のみに耐性を示し、耐性スペクトルが狭かった。下流に向かい、汚染源が増加するにつれて、耐性スペクトルが広がる傾向が見られた。その中でも、下水処理場直下の地点5の分離株は最多の16薬剤に耐性を示した。この地点におけるCIP耐性ESBL産生菌の検出率（65.0%）は他の地点と比較して大幅に高かった。キノロン系抗菌薬は、感染症治療に世界で最も使用されている抗菌薬のひとつであり、下水処理水にはCIP耐性株が多く存在する事が知られている。赤川河口（地点6）と最上川河口（地点7）を比較すると、地点6の分離株が13薬剤に耐性を示したのに対し、地点7の分離株では15薬剤の抗菌薬に耐性を示しており、両河川河口における耐性スペクトルは類似していた。

図-1.4 右図に、月ごとの分離株の各抗菌薬に対する耐性率を示す。ABP、CMX、CTXに対する耐性株は年間通して検出された。月ごとに比較すると、9月の分離株が最多の17薬剤に耐性を示した。耐性を示す抗菌薬の種類は、夏から秋にかけて増加し、冬に減少する傾向が見られた。例えば、IPM耐性株は5月から10月でのみ検出されている。この傾向は、夏から秋にかけて盛んになるヒトや野生動物の川沿いでの活動に関連があるのかもしれない。

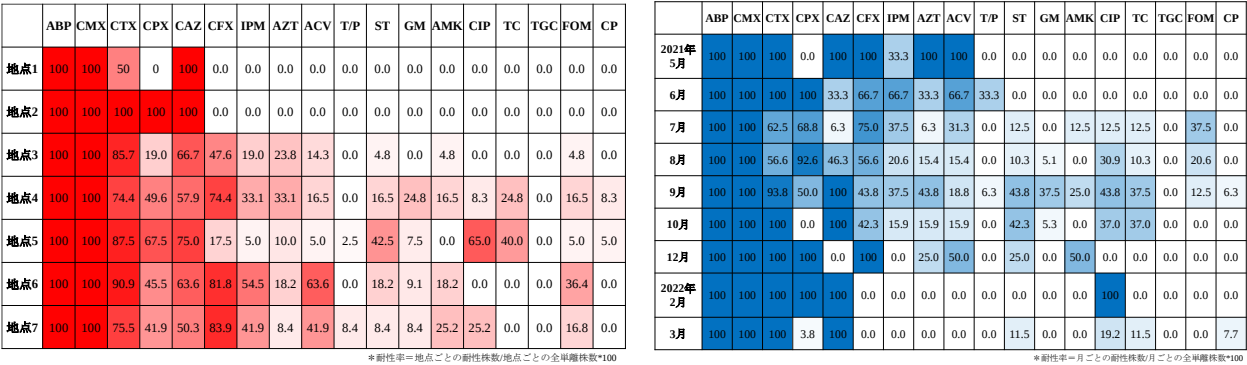


図-1.4 庄内地方の河川から単離したESBL産生大腸菌の各抗菌薬に対する耐性率(%)

(左図：調査地点毎、右図：調査月毎)

表-1.4に庄内地方の各地点から単離・同定された菌株におけるESBL産生遺伝子（*bla*）の検出数とその割合を示す。検出対象とした21遺伝子のうち、17遺伝子（ClassA：9種類、ClassC：4種類、ClassD：1種類、ClassB：3種類）が検出された。ClassAに分類される10種の*bla*のうち、*bla*_{VEB}を除く9種類が検出され、*bla*_{CTX-M group-1} が65株（60.2%）と最も多く、次いで*bla*_{CTX-M group-9}の検出数が60株（55.6%）と多かった。一方、*bla*_{TEM}（8株、7.4%）や*bla*_{SHV}（4株、3.7%）の検出数は低かった。ClassAはペニシリン系薬を分解できるペニシリナーゼであり、耐性遺伝子がプラスミド上にコードされているため他細菌に水平伝播が可能である。ESBL産生菌が保有するペニシリナーゼ産生遺伝子にはCTX-M型、TEM型、SHV型の3種類が知られている。欧州では1990年代まではTEM型、SHV型の検出事例が多かったが、現在では世界中でCTX-M型が主流になっている。日本では、TEM型とSHV型の検出率は欧州と比べて低く、CTX-M型の検出率が高いことが特徴で、その中でもCTX-M group-1、9型の割合が高いことが知られている。この日本の臨床で報告されている遺伝子型別の特徴が、本研究でも確認された。

注目すべき点は、Class Aの中でもカルバペネム系抗菌薬を分解できるカルバペネマーゼの*bla*_{KPC}（7株、6.5%）と*bla*_{GES}（2株、1.9%）が検出されたことである。GES型はClass Bに分類されるIMP型とともに国内型カルバペネマーゼ産生遺伝子として知られている。対照的に、KPC型やNDM型は海外型カルバペネマーゼ産生遺伝子と臨床では認識されており、日本での報告例は多くない。本研究で得られた結果は、臨床での分離報告の少ない*bla*_{KPC}を保有するESBL産生大腸菌が、臨床や市中を超えて環境中にまで拡散していることを示す重要なデータである。

ClassCは10種の*bla*のうち、*bla*_{ACC}と*bla*_{DHA}を除く4種類が検出された。その中でも*bla*_{MOX}の検出数が非

常に多かった（62株、57.4%）。日本の河川における bla_{MOX} の検出事例は存在しないが、宮城県の処理場を対象とした調査で bla_{MOX} 保有ESBL産生菌が検出されており¹²⁾、日本で流行しているClassCの bla の特徴なのかもしれない。ClassDは bla_{OXA-48} を保有するESBL産生大腸菌が3株（2.8%）検出されたのに対して、 bla_{OXA-1} を保有する株は検出されなかった。ClassDは他の bla と比較して、オキサシリン系抗菌薬をよく分解することが知られている。日本ではオキサシリンの使用が認められておらず、OXA型に関連する耐性遺伝子の臨床からの限られた報告例でも、主に海外からの持ち込みが原因とみられている。今回検出された bla_{OXA-48} も、海外から持ち込まれ、環境中に拡散したと考えるのが自然である。

ClassBは対象とした3種類の bla すべてが検出された。 bla_{IMP} と bla_{NDM} は9株（8.3%）が保有しており、 bla_{VIM} は5株（4.6%）が保有していた。Class Bカルバペネマーゼ産生遺伝子を保有する細菌は、ESBL産生菌の治療薬として使用するカルバペネム系抗菌薬に対して耐性を示すことから世界中で注意すべき耐性菌として認識されている。 bla_{IMP} は他のClass Bの遺伝子に比べて、カルバペネム系抗菌薬を分解する活性が高い特徴があり、日本で最も多く検出されているカルバペネマーゼ産生遺伝子である。一方、 bla_{NDM} は2009年にインドを旅行したスウェーデン人から分離されたMBLである。日本での分離報告のほとんどが緑膿菌である bla_{NDM} が、大腸菌株から検出されたという結果は、菌種を超えた水平伝播が発生していることを示す重要なデータである。

表-1.4 庄内地方の河川から単離したESBL産生大腸菌が保有する bla

		地点1	地点2	地点3	地点4	地点5	地点6	地点7	合計
Class A	$bla_{CTX-M \text{ group-1}}$	1 (100%)	10 (100%)	14 (66.7%)	7 (53.8%)	21 (52.5%)	7 (63.6%)	5 (41.7%)	65 (60.2%)
	$bla_{CTX-M \text{ group-2}}$	ND	10 (100%)	12 (57.1%)	2 (15.4%)	18 (45.0%)	2 (18.2%)	4 (33.3%)	48 (44.4%)
	$bla_{CTX-M \text{ group-9}}$	ND	10 (100%)	11 (52.9%)	2 (15.4%)	30 (75.0%)	2 (18.2%)	5 (41.7%)	60 (55.6%)
	$bla_{CTX-M \text{ group-8/25}}$	ND	ND	ND	1 (7.7%)	1 (2.5%)	3 (27.3%)	2 (16.7%)	7 (6.5%)
	bla_{TEM}	ND	ND	1 (4.8%)	1	6 (15.0%)	ND	ND	8 (7.4%)
	bla_{SHV}	ND	ND	ND	ND	4 (10.0%)	ND	ND	4 (3.7%)
	bla_{KPC}	ND	ND	2 (9.5%)	ND	4 (10.0%)	ND	1 (8.3%)	7 (6.5%)
	bla_{VEB}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	bla_{GES}	ND	ND	1 (4.8%)	1 (7.7%)	ND	ND	ND	2 (1.9%)
	bla_{PER}	ND	ND	ND	ND	1 (2.5%)	ND	ND	1 (0.92%)
Class C	bla_{ACC}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	bla_{FOX}	ND	ND	2 (9.5%)	5 (38.5%)	8 (20.0%)	1 (9.1%)	ND	16 (14.8%)
	bla_{MOX}	ND	10 (100%)	16 (76.2%)	7 (53.8%)	23 (57.5%)	2 (18.2%)	4 (33.3%)	62 (57.4%)
	bla_{DHA}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	bla_{CIT}	ND	ND	1 (4.8%)	1 (7.7%)	2 (5.0%)	2 (18.2%)	ND	6 (5.6%)
	bla_{EBC}	ND	ND	1 (4.8%)	ND	2 (5.0%)	ND	2 (16.7%)	5 (4.6%)
Class D	bla_{OXA-1}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	bla_{OXA-48}	ND	ND	ND	ND	1 (2.5%)	ND	2 (16.7%)	3 (2.8%)
Class B	bla_{IMP}	ND	ND	1 (4.8%)	4 (30.8%)	1 (2.5%)	1 (9.1%)	2 (16.7%)	9 (8.3%)
	bla_{VIM}	ND	ND	2 (9.5%)	ND	2 (5.0%)	3 (27.3%)	2 (16.7%)	9 (8.3%)
	bla_{NDM}	ND	ND	1 (4.8%)	ND	ND	1 (9.1%)	3 (25.0%)	5 (4.6%)

①-3 庄内地方の河川から単離した大腸菌の薬剤耐性

モニタリングを通じて赤川と最上川からChromocult coliform寒天培地上から単離した全813株のうち、653株（80.3%）が大腸菌と同定された。それら菌株に対して薬剤感受性試験を実施した結果を表-1.5に示す。今回試験に供した抗菌薬のうち、ABPCに対して最多の178株（24.2%）が耐性を示した。ABPCは古典的な抗菌薬であり、環境中から単離される大腸菌でも耐性度が高いことが知られている¹³⁾。また、ABPCに耐性を示した菌株のうち、CTXとCAZに耐性を示す株がそれぞれ23株（3.5%）と1株（0.2%）検出された。これら第三世代セフェム系抗菌薬、かつペニシリン系抗菌薬に耐性を示す24株は、ESBL産生菌である可能性が考えられる。日本の河川からESBL産生菌が検出された事例²⁸⁾も報告されていることから、既に日本の市中や環境中へも拡散していると推察される。注目すべき点としては、ESBL産生菌の治療薬として用いられるIPMに対して10株（1.5%）が耐性を示した点である。上述した①-2の結果と

同様に、IPM耐性を示す大腸菌が庄内地方の河川に拡散していることが明らかとなった。

全大腸菌分離株のうち、1薬剤以上に耐性を示した株は175株（26.8%、表-1.5）であり、そのうち66株（10.1%）が異なるクラスの3薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。最多で7薬剤（ABPC-GM-CTX-CAZ-IPM-C/A-AZT）に耐性を示す多剤耐性菌が地点4から検出された。この株は通常ESBL産生菌が通常分解できないIPMやC/Aにまでも耐性を示しており、感染者の治療のために有効な抗菌薬に限られる点で注目すべき菌株であった。

表-1.5に、調査地点における各抗菌薬に対する薬剤耐性大腸菌数とその耐性率を示す。地点ごとの耐性菌の耐性率（いずれかの抗菌薬に耐性を示す株数/各地点における単離株数）は、地点4で最大（42.5%）となり、この地点では試験に供した全ての抗菌薬にいずれかの単離株が耐性を示した。赤川（地点1~6）では下流へ流下するにつれて、耐性菌検出率が上昇する傾向が見られるが、下水処理場直下の地点5では検出率が26.4%と大幅に下がった。これは、下水処理水に含まれる残留塩素の影響で耐性菌の検出率が減少したと考えられる。

耐性を示した抗菌薬と調査地点に着目すると、CPやFOM、ならびにTCに対する耐性菌は、上流ではほとんど検出されず、下流に進むに連れて検出数が多くなった（表-1.5）。一方で、ABPCやC/Aに対する耐性菌は全ての地点で共通して、同程度検出された。地点6（赤川河口）と地点7（最上川河口）で耐性菌の耐性率は同程度（地点6：31.0%、地点7：35.6%）であったが、多剤耐性菌の割合は地点7（10.3%）よりも地点6（13.8%）でわずかに高かった。また、セフェム系抗菌薬に耐性を示す株は赤川からのみ検出されるなど、両河川で特徴の異なる耐性菌が検出されていると考えられる。両河川の流域の土地利用や、汚染の起源となる施設の存在などが影響していると考えられる。

表-1.5 調査地点における各抗菌薬に対する薬剤耐性大腸菌の株数とその耐性率

	大腸菌 株数	耐性菌 株数*	耐性率 (%)	ABPC	GM	CTX	CFX	CPFX	LVFX	IPM	C/A	AZT	CP	FOM	TC
地点 1	98	14	14.3	14	0	1	0	3	3	0	2	0	0	1	4
地点 2	106	21	19.8	20	0	9	0	0	0	0	9	0	0	2	0
地点 3	97	21	21.6	21	0	10	0	0	0	2	11	1	1	1	1
地点 4	87	37	42.5	31	2	1	1	2	2	2	15	1	9	4	15
地点 5	91	24	26.4	20	2	1	0	5	4	0	5	0	2	1	5
地点 6	87	27	31.0	23	1	1	0	1	1	4	10	0	4	6	7
地点 7	87	31	35.6	30	1	0	0	2	2	2	12	0	6	5	5
合計	653	175	26.8	158	6	23	1	13	12	10	64	2	22	20	37

* 薬剤感受性試験に供した抗菌薬のうち、1薬剤以上の抗菌薬に対して耐性を示した菌株

表-1.6 大腸菌の系統発生群ごとの耐性株数と各抗菌薬に対する耐性率

系統 発生群	同定 株数	耐性 菌数	耐性 率 (%)	各系統群における抗菌薬に対する耐性率 (%)											
				ABPC	GM	CTX	CAZ	CPFX	LVFX	IPM	C/A	AZT	CP	FOM	TC
A	75	22	29.3	24.0	0.0	2.7	0.0	2.7	2.7	0.0	12.0	0.0	6.7	1.3	13.3
B1	111	25	22.5	18.0	2.7	0.0	0.0	3.6	2.7	0.0	6.3	0.0	7.2	0.9	7.2
B2	217	32	14.7	14.3	0.0	0.5	0.0	2.3	2.3	0.0	1.4	0.0	0.0	0.5	1.8
C	29	13	44.8	34.5	0.0	6.9	0.0	6.9	6.9	0.0	31.0	0.0	17.2	3.4	34.5
D	16	4	25.0	18.8	6.3	12.5	0.0	6.3	6.3	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0
E	82	18	22.0	20.7	1.2	12.2	0.0	1.2	1.2	0.0	13.4	0.0	3.7	0.0	3.7
F	42	16	38.1	38.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	9.5	0.0	0.0	4.8	0.0
Other	81	45	55.6	53.1	1.2	9.9	1.2	0.0	0.0	11.1	29.6	2.5	2.5	18.5	3.7

表-1.6に、大腸菌の系統発生群ごとの耐性株数と各抗菌薬に対する耐性率を示す。大腸同定された653株の大腸菌株について、系統発生群の解析を行った結果、単離した大腸菌は以下の系統群に分類された；グループA：75株（11.5%）、グループB1：111株（17%）、グループB2：217株（33.2%）、グループC：29株（4.4%）、グループD：16株（2.5%）、グループE：81株（12.6%）、グループF：42株（6.4%）、その他の系統群：81株（12.4%）。本調査で単離した菌株のうち、217株（33.2%）が系統発生グループB2に属しており、このグループが最多であった。特に、地点2と地点3では単離株の約4割が、地点1に関しては7割がB2グループであった（表-1.6）。日本の臨床や畜産を対象とした調査でも系統発生グループB2の検出率は高く19)、しばしば人畜由来株として整理される。今回の河川水から単離した大腸菌の3割がB2グループであったことは、ふん便由来の影響を大きく受けていることを示唆している。また、B2に分類される大腸菌は、他の系統と比較して病原性が高く、腸管出血性大腸菌（EHEC）である可能性も考えられる。一方で、最も検出率が低かった系統発生グループはD群（2.5%）であった。B2群と同様に病原性が高いことが知られているD群は、世界中で臨床での分離報告事例が増加しているグループであるため、環境中ではまだ少数なのかもしれない。また、野鳥が保有する大腸菌の80%以上がA群であったことが報告されており、野鳥の飛来する秋から冬季にかけてA群の上昇が確認された。

分類された系統発生群の中で、主要であったB2群の耐性率は最も低く（14.7%）、少数であったC群（44.8%）やF群（38.1%）が高かった。B2群には人畜由来の大腸菌が高い割合で含まれるが、それらの大部分が薬剤耐性を持っていないことが分かる。

全ての系統発生群からABPCとC/Aに対する耐性株が検出された。ニューキノロン系抗菌薬であるCPFXとLVFXに対する各系統群の割合は、非常に類似していた（CPFX：1.2～6.9%、LVFX：1.2～6.9%）。これはCPFXとLVFXに対して、同時に薬剤耐性を示す株が検出されたことを表している。GMに耐性を示す系統群は、B1（2.7%）、D（6.3%）、E（1.3%）からのみ検出された。ヒト起源だと推定されるF群は、ABPC、IPM、C/A、FOMに対して耐性を示す一方で、セフェム系抗菌薬に対する耐性菌が検出されなかった。臨床において高頻度で用いられ、耐性菌が生じやすいと考えられるセフェム系抗菌薬に対して耐性を示さなかった点は、予想と反した結果であった。

②-1 東北地方の一級河川におけるESBL産生大腸菌の薬剤耐性とその特徴

図-1.5に大腸菌の計数結果を示す。北上川、雄物川、赤川は調査期間を通してA類型（300CFU/100mL、R3環境基準値）以下であり、年間を通して大腸菌の汚染が低い河川であった。一方で、阿武隈川、岩木川の大腸菌数は、B類型（1,000CFU/100mL）以上の月があった。これは採水日前日の降雨が原因だと考えられ、採水時の濁度や電気伝導度は、調査期間の中で高い傾向が確認できた。

全4回の調査でCHROMagar™ESBL から171株のESBL産生大腸菌陽性株を単離した。

171株のうち、菌種同定とESBL確定試験で陽性となった株は94株であった。94株のESBL産性大腸菌全てがCPXに耐性を示したが、TGCに

は感受性があった（表-1.7）。全河川から分離したESBL産性大腸菌はABP、CTX、CPX、CXMにそれぞれ99.5%、92.25%、100%、98.5%の株が耐性を示した。このことから感受性試験を行った第3世代セフェム系の抗菌薬であるCTX、CAZ、CPXのうちCAZ（8.9%）への耐性は低かった。阿武隈川、名取川、馬淵川及び岩木川ではESBL産性大腸菌の単離株数が多かった。これらの河川は、大腸菌濃度が高く、その一部はESBL産性大腸菌であると考えられる。北上川、雄物川では耐性を示す薬剤が少なく、それぞれ5薬剤、7薬剤に耐性を示し、名取川では最多の15薬剤に耐性を示した。馬淵川と赤川ではカルバペネム系抗菌薬であるIPMに耐性を示す株があった。このうちカルバペネマーゼ遺伝子を産生する*bla*_{IMP}を保

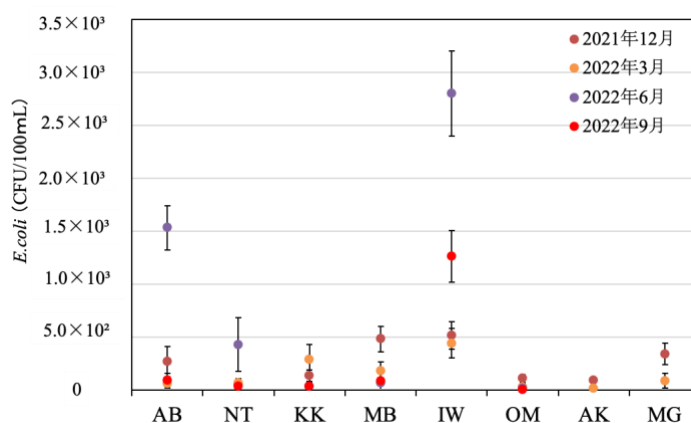


図-1.5 東北地方の一級河川の調査地点におけるふん便指標細菌（大腸菌）の推移

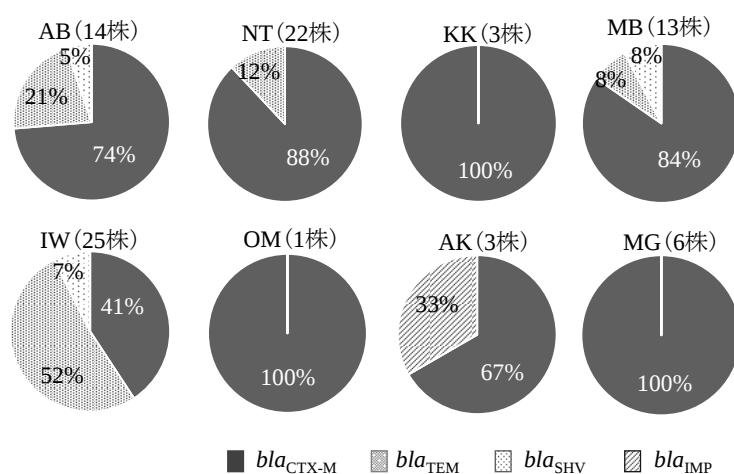
表-1.7 東北地方の各河川から単離したESBL産生大腸菌の薬剤感受性の菌株数とその割合

	ABP	CTX	CAZ	CPX	CXM	CFX	IPM	AZT	ACV	T/P	ST	GM	AMK	CIP	TC	TGC	FOM	CP
AB (17株)	17 (100%)	17 (100%)	1 (6%)	17 (100%)	17 (100%)	2 (12%)	1 (6%)	2 (12%)	0 (0%)	1 (6%)	4 (24%)	4 (24%)	1 (6%)	8 (47%)	3 (18%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
NT (26株)	25 (96%)	25 (96%)	4 (15%)	26 (100%)	26 (100%)	5 (24%)	1 (4%)	3 (12%)	3 (12%)	1 (4%)	6 (24%)	4 (15%)	1 (4%)	19 (73%)	4 (15%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
KK (3株)	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
MB (13株)	13 (100%)	12 (100%)	5 (38%)	13 (100%)	12 (92%)	6 (46%)	0 (0%)	3 (23%)	1 (8%)	0 (0%)	8 (62%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (54%)	6 (46%)	0 (0%)	3 (23%)	3 (23%)
IW (25株)	25 (100%)	19 (76%)	3 (12%)	25 (100%)	24 (96%)	8 (32%)	0 (0%)	4 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (52%)	9 (36%)	0 (0%)	8 (32%)	13 (52%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (36%)
OM (1株)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
AK (3株)	3 (100%)	2 (67%)	0 (0%)	3 (100%)	3 (100%)	2 (67%)	1 (33%)	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)	0 (0%)
MG (6株)	6 (100%)	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (33%)	1 (17%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (33%)	2 (33%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

有していたのは赤川で分離された1株のみであり、他の3株は保有していなかったため他のカルバペネマーゼ遺伝子を保有していると考えた。そこでカルバペネマーゼの鑑別試験を行った結果、メタロβラクタマーゼであると判定された。月ごとに比較すると、2021年9月には名取川と最上川で1株ずつ、2022年3月に岩木川で2株最多の12株に耐性を示した。

図-1.6に各河川で検出されたESBL産生遺伝子の割合を示す。ESBL産性大腸菌94株のうち69株(73%)がPCRにより bla_{CTX-M} 陽性であり最多だった。日本の河川で分離報告されるESBLの多くはCTX-M型であり、赤川や最上川と同様に他の東北の河川でも同じ傾向がみられた。CTX-M型はすべての調査期間において、単離株の50%を超えて検出され、全ての河川から検出された。 bla_{TEM} を保有していたのは22株(23%)であり、 bla_{CTX-M} に次いで高い検出率で、 bla_{TEM} は阿武隈川、名取川、馬淵川および岩木川の4つの河川から検出された。特に岩木川ではTEM型が占有しており、他の7つの河川とは傾向が異なった。 bla_{SHV} と bla_{IMP} の検出率はそれぞれ4%と1%であり、 bla_{CTX-M} と bla_{TEM} に比べて低かった。 bla_{SHV} は阿武隈川、馬淵川および岩木川で検出された。 bla_{IMP} は赤川でのみ1株検出された。 bla_{IMP} はカルバペネマーゼ産生遺伝子であり、基本的にβラクタム系抗菌薬はほとんど全てに耐性を示すため感染すると治療がかなり困難な状況になることから問題となっている。

今回分離したIMP型の株は11薬剤に耐性を示した。2つの遺伝子を同時に保有する株も見られたが、より多くの種類のESBL産生遺伝子を保有している場合に必ずしも多くの抗菌薬に耐性を示すといった傾向は見られなかった。CTX-M型は3から12薬剤に耐性を示し、平均で6.1薬剤に耐性を示した。TEM型は3から11薬剤に耐性を示し、平均で5.9薬剤に、SHV型は3から7薬剤に耐性を示し、平均で5.9薬剤に耐性を示したことから、保有する遺伝子のタイプによって耐性の割合は変わらなかった。

図-1.6 東北地方の各河川から単離したESBL産生大腸菌が保有する bla の割合

研究項目②： *in vitro*伝達実験を用いた耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価実験

*In vitro*伝達実験を用いた耐性遺伝子の伝播ポテンシャルの評価実験では、グラム陽性細菌ではVREのバンコマイシン耐性遺伝子を、グラム陰性細菌では β ラクタマーゼ産生遺伝子を対象として実験を行った。バンコマイシン耐性遺伝子として*vanA*、*vanB*、*vanC1*、*vanC2/C3*を選定し、それら遺伝子を個々にコードするVREの供与菌株8種類（*vanA*：4株、*vanB*：2株、*vanC1*：1株、*vanC2/C3*：2株）を用いて6つの環境を模擬した条件に対して耐性遺伝子の伝播ポテンシャル（=伝播率）を評価した。

4株の*vanA*を保有する供与菌と受容菌3株の組み合わせによる伝播率を評価した結果、*vanA*の伝播率は受容菌株に対して伝播が $10^{-3} \sim 10^{-7}$ であり、供与菌と受容菌の組み合わせによって伝達率が大きく異なった（表-1.8）。供与菌にNCTC12201株とNCTC12202株を用いた場合、受容菌に*E. faecium*株を用いなかった場合以外は伝播が確認され、*E. faecalis*株とOG1RF株は同じ腸球菌種（*E. faecalis*）であるのにも関わらず、OG1RF株を用いた場合に高頻度での伝達を確認された（ $10^{-2} \sim 10^{-4}$ ）。供与菌にHC-1株（日本で外国産食肉から分離）を用いた場合では、OG1RF株を受容菌に用いた場合のみ 10^{-6} と低確率で伝播が確認された。受容菌にOG1RF株を用いた場合は、すべての供与菌から遺伝子の伝播を確認できた。注目すべきは、供与菌に507W2-VRE-R3株（日本の下水から分離）を用いた場合は、全ての受容菌に対して $10^{-4} \sim 10^{-5}$ で伝播が確認された。このことは、環境に存在していたVREが広宿主領域の腸球菌種に*vanA*を伝達するポテンシャルを有することを意味している。

表-1.8 *In vitro*伝播実験による腸球菌のバンコマイシン耐性遺伝子（*vanA*、*vanB*、*vanC1*、*vanC2/C3*）が腸球菌種に伝播するポテンシャル（n=3、N.D.：no detection、-：データなし）

Mating condition		Transfer rate ave. (Transconjugant/Recipient)					
		Filter mating	Broth mating	PBS	河川水	河川底質	活性汚泥
<i>vanA</i>	NCTC12201 :: <i>E. faecalis</i>	7.8.E-07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	NCTC12201 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	NCTC12201 :: OG1RF	3.3.E-03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.8E-07
	NCTC12202 :: <i>E. faecalis</i>	7.7.E-07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	NCTC12202 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	NCTC12202 :: OG1RF	3.8.E-05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	HC-1 :: <i>E. faecalis</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	HC-1 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	HC-1 :: OG1RF	3.3.E-07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	507W2-VRE-R3 :: <i>E. faecalis</i>	2.2.E-05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	507W2-VRE-R3 :: <i>E. faecium</i>	2.5.E-04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	507W2-VRE-R3 :: OG1RF	2.1.E-05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>vanB</i>	ATCC51299 :: <i>E. faecalis</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC51299 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC51299 :: OG1RF	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC51858 :: <i>E. faecalis</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC51858 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC51858 :: OG1RF	N.D.	-	-	-	-	-
<i>vanC1</i>	ATCC49753 :: <i>E. faecalis</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC49753 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC49753 :: OG1RF	N.D.	-	-	-	-	-
<i>vanC2/C3</i>	ATCC70032 :: <i>E. faecalis</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC70032 :: <i>E. faecium</i>	N.D.	-	-	-	-	-
	ATCC70032 :: OG1RF	N.D.	-	-	-	-	-

Filter mating法によって供与菌に*vanB*、*vanC1*、および*vanC2/C3*のいずれかのバンコマイシン耐性遺伝子を用いた場合、どの受容菌に対しても伝播は確認されなかった（表-1.8）。これらのバンコマイシン耐性遺伝子の中で、*vanC1*と*vanC2/C3*は染色体上に耐性遺伝子がコードされており、Filter mating法で想

定する接合伝達では*vanC*は伝達しないと考えていた。その一方で、*vanB*の局在位置はプラスミドあるいは染色体上とされており、今回使用した*vanB*はFilter mating法で伝播が確認されなかったことから、接合による伝播は発生しないと考えられた。

伝播が確認された*vanA*について液体培地（Broth mating法）、PBS、ならびに河川水で培養して伝達性を評価した（表-1.8）。その結果、いずれの交配条件においても伝播が確認されなかった。*vanA*はプラスミド上にコードされており、菌と菌が接合する条件で耐性遺伝子が伝達するといわれている。液体培地のような液相では菌体同士が接着する機会がないため、接合伝達による伝播が発生しなかったと考えられる。そこで、菌体間が密接する、すなわち高濃度で密集する環境として、下水処理場の活性汚泥や河川底質を想定した条件で伝播実験を行った。河川底質では*vanA*の伝播が確認されなかったのに対し、活性汚泥ではNCTC12201 :: OG1RFの条件のみ伝播が確認された。この条件はFilter mating法において最も伝播率が高かった条件であり、高頻度で伝達するポテンシャルを有する組み合わせでは、条件次第で環境中で伝播する可能性が考えられた。なお、バンコマイシン耐性遺伝子である*vanB*、*vanC1*、*vanC2/C3*はFilter mating法での伝達を確認されなかったため、その他の条件においては実施しなかった。

3種類の供与菌（*bla*_{CTX-M group 1}、*bla*_{CTX-M group 2}、*bla*_{CTX-M group 9}）と1種類の受容菌に対して、5つの環境を模擬した条件に対して伝播ポテンシャルを評価した（表-1.9）。Filter mating法とBroth mating法において受容菌に対して*bla*_{CTX-M group 1}、*bla*_{CTX-M group 2}、および*bla*_{CTX-M group 9}の全ての供与菌から耐性遺伝子の伝播が確認された。Filter mating法とBroth mating法とで伝播率が最も高かった*bla*_{CTX-M group 2}（ 10^{-5} ）は、Broth mating法では伝播率が100倍低下した。Filter mating法とBroth mating法とで*bla*_{CTX-M group 1}と*bla*_{CTX-M group 9}の伝播率はそれぞれ 10^{-6} と 10^{-8} であり、差がみられなかったが、*bla*_{CTX-M group 2}では、Broth mating法では伝播率が100倍低下した（ 10^{-5} ）。バンコマイシン耐性遺伝子（*vanA*）の場合と比較して、伝播ポテンシャルの範囲は同程度であったものの、 β ラクタマーゼの場合は液体中での伝播することが確認された。液相条件であるPBSと河川水を基質として伝播ポテンシャルと評価したところ、PBSの条件では*bla*_{CTX-M group 9}が、河川水では*bla*_{CTX-M group 1}と*bla*_{CTX-M group 9}の伝播が確認された。Broth mating法で使用した栄養培地の栄養条件より、基質がない条件でも*bla*_{CTX-M}は伝播できると考えられる。また、河川水の振とうと静置の条件の違いによる伝播ポテンシャルの差はみられなかった。したがって、液相条件でも腸内細菌科細菌が保有する*bla*_{CTX-M group 1}と*bla*_{CTX-M group 9}は、大腸菌に対して、 10^{-6} ～ 10^{-7} の範囲で伝播すると考えられた。

表-1.9 In vitro伝播実験による腸内細菌科細菌の β ラクタマーゼ産生遺伝子（*bla*_{CTX-M group 1}、*bla*_{CTX-M group 2}、*bla*_{CTX-M group 9}）が大腸菌に伝播するポテンシャル（n=3、N.D.：no detection）

	Mating condition	<i>bla</i>	Transfer rate ave.(Transconjugant/Recipient)	標準偏差
Filter mating	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	4.5.E-06	2.7.E-06
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	1.8.E-05	8.8.E-05
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	1.4.E-08	2.8.E-08
Broth mating	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	5.2.E-06	2.1.E-06
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	1.3.E-08	1.1.E-08
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	3.8.E-08	2.1.E-08
PBS	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	N.D	N.D
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	N.D	N.D
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	8.3.E-06	4.8.E-06
河川水（静置）	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	9.3.E-07	5.4.E-07
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	N.D	N.D
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	1.4.E-06	8.1.E-07
河川水（振とう）	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	1.1.E-06	6.1.E-07
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	N.D	N.D
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	9.9.E-07	5.7.E-07
河川底質	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	4.1.E-07	2.4.E-07
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	4.3.E-07	1.7.E-07
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	1.6.E-07	9.5.E-08
活性汚泥	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	N.D	N.D
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	9.8.E-08	3.5.E-08
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	2.5.E-06	1.5.E-06
返送汚泥	NCTC13353 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-1}	3.1.E-06	2.4.E-06
	NCTC13462 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-2}	1.1.E-05	1.6.E-05
	NCTC13464 :: NBRC3301	<i>bla</i> _{CTX-M gp-9}	1.8.E-04	8.9.E-06

水環境中で細菌が集積する場と想定している河川底質と下水処理場の汚泥（活性汚泥と返送汚泥）における伝播ポテンシャルを評価したところ、活性汚泥の*bla*_{CTX-M group 1}を除いて、全ての条件で伝播が確認され、その範囲は 10^{-4} ～ 10^{-8} であった。河川底質を用いた場合でも、いずれの*bla*も 10^{-7} で伝播が確認され、環境中で一定の細菌数と耐性遺伝子を有した場合に伝播する可能性が考えられる。特に、返送汚泥中の伝播率は最も高く、*bla*_{CTX-M group 9}では高頻度で伝播が確認された。*bla*_{CTX-M group 9}は世界的に流行している遺伝子であり、環境試料からも多数検出されることは、他のESBL産生遺伝子と比較して容易に伝播する特徴があるかもしれない。

モデル細菌としてVREとESBL産生大腸菌を使用したin vitro伝達実験を行い、環境中での伝播ポテンシャルを推定した。その結果、グラム陽性細菌と比較して、グラム陰性細菌でその伝播ポテンシャルは高いことが示された。これは、世界中で問題となっている耐性菌の大部分がグラム陰性であることは、その伝播ポテンシャルがグラム陽性菌と比較して高いことが一つの要因かもしれない。環境中での伝播も十分に考えられ、特に細菌密度が高いと想定される箇所には重点的な処理が必要であると考えられる。

研究項目③：全ゲノム解析を利用した薬剤耐性菌の伝播機構の解明

③-1 庄内地方の河川から単離したESBL産生大腸菌の起源解析

赤川、最上川から分離されたESBL産生大腸菌の起源を明らかにするために実施し得られた画像についてCLIOS v1.5（スクラム）でクラスター解析を行い、菌株間の類似度を分析した。類似度は距離法により求め、遺伝距離が0.2以下（類似度80%以上）の株を同一起源と判定した。

図-1.7から図-1.9に1年間のモニタリングで分離されたESBL産生大腸菌株のPFGEの結果を示す。108株のESBL産生大腸菌から、105株のPFGEのバンドパターンが得られたことから、庄内地方におけるESBL産生大腸菌の発生源は多様化していると推察される。

図-1.7に春季・夏季に分離されたESBL産生大腸菌42株のPFGEパターンを示す。起源が同一とされるグループが6つ検出されたが、大きなクラスターは確認されず、多様なPFGE型が得られた（ $n=2\sim4$ ）。このことから、春季・夏季に2河川で分離されたESBL産生大腸菌の発生源が多様であることが推測される。また、6グループのうち4グループで異なる地点間で同一起源とされる株が検出された。このことから、赤川上流で発生したESBL産生大腸菌は、下流へ流下し拡散することが分かった。1つの河川の流域で分離されたESBL産生大腸菌のPFGE型を比較した研究は国内外を問わずほとんどなく、この結果は、河川における耐性菌の拡散経路解明のための重要なデータとなりうる。一方、赤川、最上川の分離株同士で同一起源と分類される株は存在しなかった。図-1.8に秋季に分離されたESBL産生大腸菌31株のPFGEパターンを示す。秋季では起源が同一とされるグループが4つ検出され、うち3つは下水処理場直下のAK5（地点5）で分離された株であった（ $n=2\sim5$ ）。図-1.9に冬季に分離されたESBL産生大腸菌32株のPFGEパターンを示す。冬季では、 $n=10$ の大きなクラスターが2つ見つかり、ESBL産生大腸菌のPFGEパターンは他の季節と比較して少なかった。このことから、赤川、最上川では冬季におけるESBL産生大腸菌の発生源が限定されていると推測できる。これは、冬季の積雪によりヒトや動物の行動が抑えられ、汚染源が減少したと考えられる。

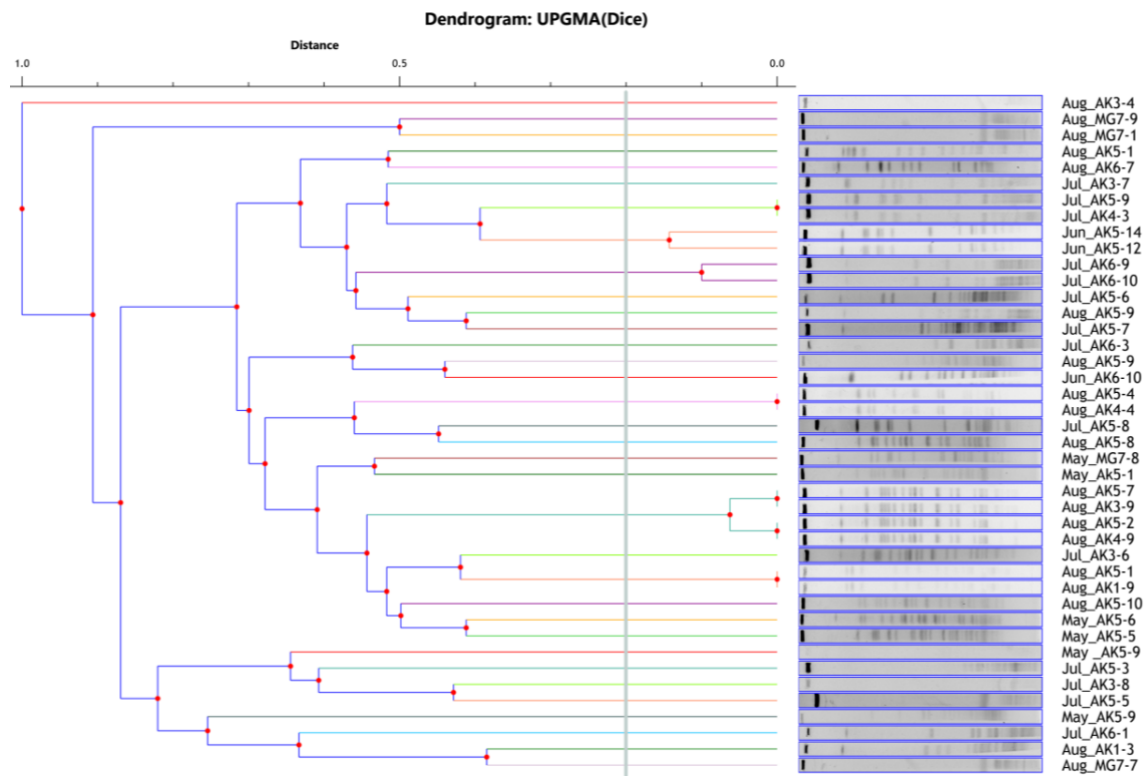


図-1.7 春季・夏季に分離されたESBL産生大腸菌のPFGEパターン

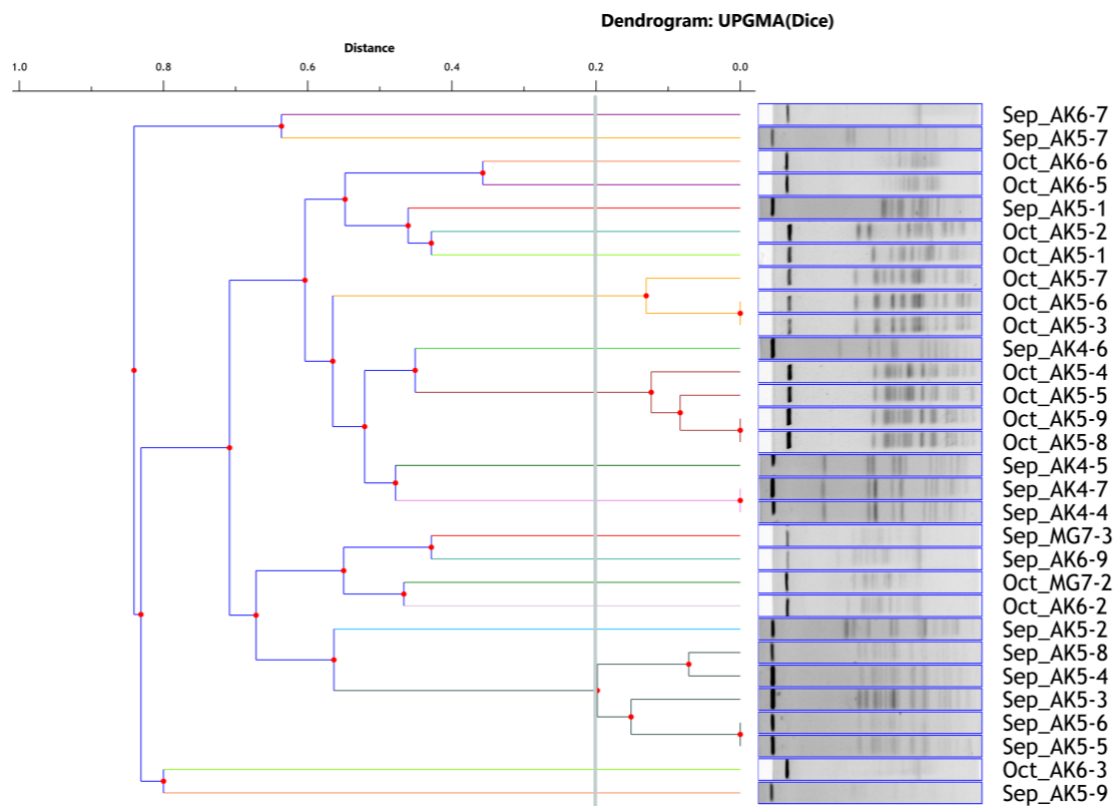


図-1.8 秋季に分離されたESBL産生大腸菌のPFGEパターン

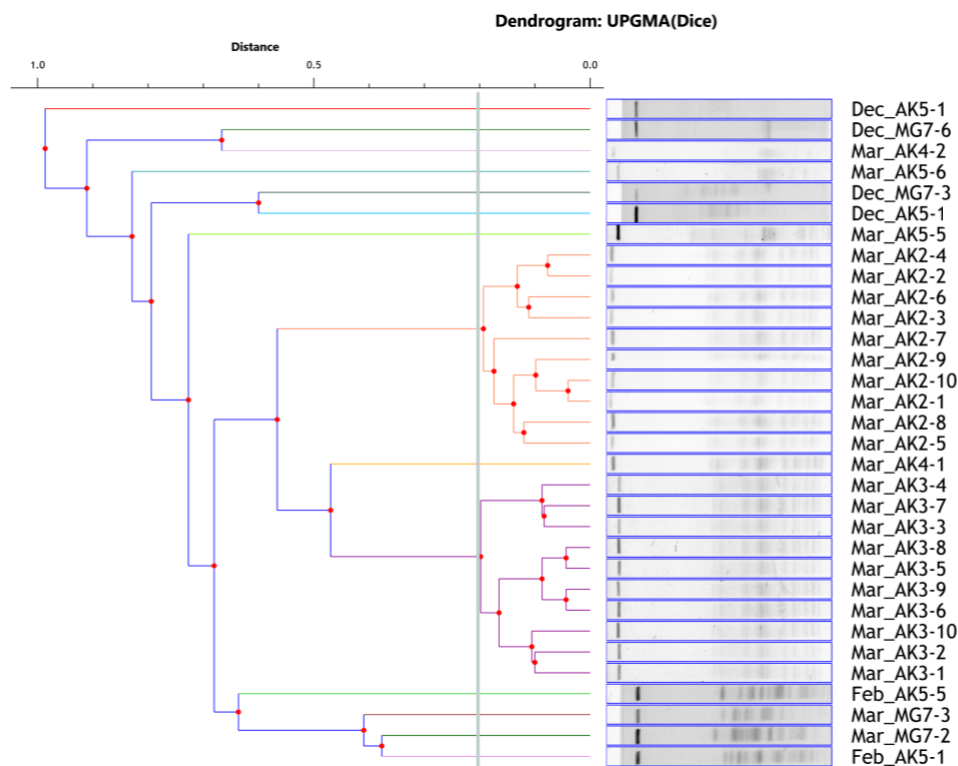


図-1.9 冬季に分離されたESBL産生大腸菌のPFGEパターン

③-2 東北地方の一級河川におけるESBL産生大腸菌の分子疫学解析

図-1.10に各河川におけるST型の検出数を示す。ST38、ST131、ST405などは世界的に分布を広げている¹⁴⁾。本研究では、ST131が阿武隈川、名取川、馬淵川、岩木川、雄物川、最上川の6河川から検出され最多であり、東北地方にST131が蔓延していることが明らかとなった。ST131は都市下水や河口などの水環境や鶏、臨床からも分離報告がある。2つ以上の河川で検出されたST型はST131、ST38、ST405であり、世界的に分布を広げている型は東北地方でも蔓延し始めていると考えられる。また、検出事例の少ないST1722、ST1716、ST2001、ST224およびST398が検出され、分離報告があまりないST型が

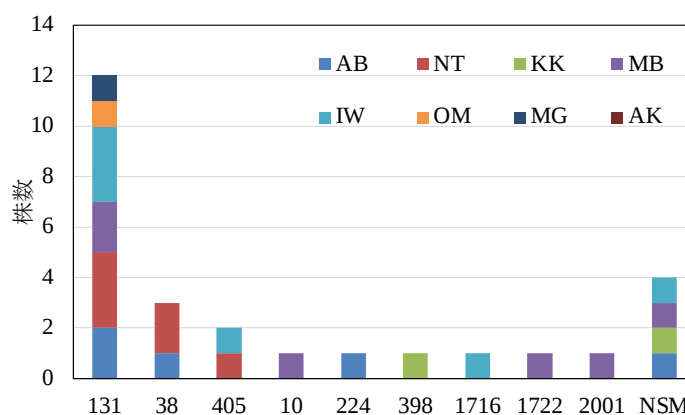


図-1.10 東北地方の河川から分離したESBL産生大腸菌株のS T型 (NSM : No Strain Matched)

ESBL産生能を獲得していることが明らかとなった。そのうちST1716、ST2001、ST224およびST398はPubMLST上で、環境からの分離報告がなかった。また、今回PubMLSTにおいてST型が定まらなかった株 (No strain matched : NSM) が4株 (阿武隈川、馬淵川、岩木川、北上川でそれぞれ1株) あった。

以上の結果から、東北地方の河川にはCTX-M型のESBL産生大腸菌が広範囲に分布していたが、その汚染状況は諸外国と比較して低いことが明らかとなった。しかしながら、その中に世界中の臨床現場で問題視されているST38が含まれていた事実から、河川に生息する耐性菌には引き続き注視していく必要がある。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ1

目標①：日本の主要河川（3～5 地点）を対象に水環境中での薬剤耐性菌（大腸菌と腸球菌）の汚染・拡散状況を調査し、分子生物学的アプローチによって空間的な拡散ルートを明らかにする。

目標を上回る成果をあげた。

東北地方の河川を対象とした調査によって、大腸菌汚染の低い日本の一級河川（採水日でA類型の環境基準を満たす）から、WHOにより危険性が高いと位置づけられるESBL産生大腸菌が検出された。また、山形県の赤川と最上川から単離した653株の大腸菌のうち、薬剤耐性大腸菌（1薬剤以上に耐性を示す）は、28.6%であり、うち10%が異なる3薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。確立された本モニタリング手法によって、WHOが主導する調査に役立つ重要なデータが得られた。

目標②：環境を模擬した *in vitro* 伝達実験から測定した伝播率から、水環境中での耐性遺伝子の伝播ポテンシャルを推定する。

目標通りの成果をあげた。

腸球菌と大腸菌をモデル細菌として、環境を模擬した *in vitro* 伝達実験を行った結果、腸球菌では *vanA* のみ伝播が確認され、供与菌と受容菌の組み合わせによって伝播ポテンシャルが 10^{-3} ～ 10^{-7} の範囲であった。また、河川水などの液相中では伝播が確認されず菌体が集積する環境である活性汚泥中で低確率であるが伝播が確認された (10^{-7})。その一方で、*bla*_{CTX-M} を保有する腸内細菌科細菌を用いた場合は、いずれの環境を模擬した条件でも伝播が確認された (10^{-4} ～ 10^{-8})。グラム陰性細菌は、グラム陽性細菌と比較して、耐性遺伝子を伝播する場合（伝場）のポテンシャルが高いことが示された。環境中で耐性遺伝子の伝播も十分に考えられ、特に細菌密度が高いと想定される箇所には重点的な処理が必要であると考えられる。

目標③：耐性菌が発生すると認識されている哺乳類の腸管内とは全く異なる水環境中での薬剤耐性遺伝子の獲得・伝播メカニズムを解明する。

目標にはやや及ばないが、一定の成果をあげた

ESBL産生大腸菌を対象としたゲノムタイピングを実施した結果、庄内地方を河川における耐性菌の発生源は多様で、季節を通して流域に点在しており、水環境中に生息する耐性菌の拡散の深刻さが浮き彫りになった。また、河川の上流で発生したESBL産生大腸菌は、河川の流下に伴って下流へ流下し拡散する事が分かった。MLSTの解析では、世界で流行しているST131型のESBL産生大腸菌が、空間的に離れている東北の河川から検出された。この事実は、同タイプの耐性菌が環境中の広範囲に拡散していることを表している。また、ST131株のような臨床で主要な流行型でない菌株やデータベースに登録されていないESBL産生大腸菌が環境から検出されたことは、環境中で *bla* が大腸菌への伝播を示唆する発見かもしれない。

6. 引用文献

- 1) WHO Publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017.
- 2) Clinical Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition, M100-ED29, 2018.
- 3) Dallenne Caroline, Anaëlle da Costa, Dominique Decré, Christine Favier, and Guillaume Arlet. 2010. “Development of a Set of Multiplex PCR Assays for the Detection of Genes Encoding Important β -Lactamases in Enterobacteriaceae.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(3):490–95.
- 4) Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Chow, J.W., Clewell, D.B. and Kumon, H. (2000) Simple and reliable

multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol, 38, 3092-3095.

- 5) Clermont, O., Jalia, K. C., Erick, D., David, M. G.: The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ. Microbiol. Rep., Vol. 5, No. 1, 2012.
- 6) Centers for Disease Control and Prevention. 2017. “Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia Coli Non-O157 (STEC), Salmonella Serotypes, Shigella Sonnei and Shigella Flexneri.” CDC PulseNet. PNL05 Last Updated December 2017 157(December):1–16.
- 7) Windra Prayoga, Masateru Nishiyama, Susan Praise, Dung Vier Pham, Hieu Van Duong, Lieu Khac Pham, Loc Thanh Thi Dang, and Tory Watanabe. Tracking fecal bacterial dispersion from municipal wastewater to peri-urban farms during monsoon rains in Hue city, Vietnam. International Journal of Environmental Research and Public Health, Vol.18, pp.9580-9580, 2021.
- 8) 環境省, 水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準の見直しについて, 2021.
- 9) Frick Christina, and Andreas H. Farnleitner Julia Vierheilig, Rita Linke, Domenico Savio, Horst Zornig, Roswitha Antensteiner, Christian Baumgartner, Christian Bucher Alfred P. Blaschke, Julia Derx, Alexander K. T. Kirschner, Gabriela Ryzinska-Paier, René Mayer, Dagmar Seidl, Theodossia Nadiotis-Ts. 2018. “Poikilothermic Animals as a Previously Unrecognized Source of Fecal Indicator Bacteria in a Backwater Ecosystem of a Large River Christina.” Applied and Environmental Microbiology Received 84(16):1–15.
- 10) Amirat Linda, Dirk Wildeboer, Ramadan A. Abuknesha, and Robert G. Price. 2012. “Escherichia Coli Contamination of the River Thames in Different Seasons and Weather Conditions.” Water and Environment Journal 26(4):482–89. doi: 10.1111/j.1747-6593.2012.00308.
- 11) Tsutsui Hirofumi, and Taro Urase. 2019. “Characterization of Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia Coli in the Environment Isolated with Different Concentrations of Cefotaxime.” Journal of Water and Environment Technology 17(4):262–72. doi: 10.2965/jwet.18-091.
- 12) 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹, 山形県の赤川水系から単離した大腸菌の系統発生群とその薬剤感受性, 土木学会論文集G (環境), 78(7), III_307-III_316, 2022.
- 13) 阿波野祥司, 山田亨, 岩切章, 大浦裕子: 食品, 水環境由来大腸菌の薬剤感受性, 宮崎県衛生環境研究所年報, pp58-60, 2013.
- 14) Center for Disease Control and Prevention. Evidence of Evolving Extraintestinal Enteropathogenic Escherichia coli ST38 Clone. Emerging Infectious Diseases. Vol, 20, 2014.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹, 山形県の赤川水系から単離した大腸菌の系統発生群とその薬剤感受性, 土木学会論文集G (環境), 78(7), III_307-III_316, 2022.

<査読付き論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

【サブテーマ 1】

- 1) 西山正晃, 甲高綾乃, 馬場啓聡, 金森肇, 渡部徹, 都市下水から単離したバンコマイシン耐性腸球菌の特徴, 第24回 日本水環境学会シンポジウム, 2021年9月14日～15日,
- 2) 森祐哉, 西山正晃, 渡部徹, 河川から単離した ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子の特徴とその薬剤感受性, 令和3年度土木学会東北支部技術研究発表会, 2022年3月5日,
- 3) 西山正晃, 渡部徹, *in vitro* 伝達実験を用いたバンコマイシン耐性遺伝子の グラム陽性細菌に対する伝播ポテンシャルの評価, 第56回日本水環境学会年会, 2022年3月16日～18日
- 4) 森祐哉, 西山正晃, 渡部徹, 山形県の河川から単離した ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子とその薬剤感受性, 第56回日本水環境学会年会, 2022年3月16日～18日
- 5) 西山正晃, 水の分析から読み解く環境評価手法, 超異分野学会 山形フォーラム2022, 2022年8月20日
- 6) 釧持ひろ, 森祐哉, 米田一路, 渡部徹, 西山正晃, 東北地方の一級河川におけるESBL産生大腸菌の薬剤感受性と地理的・空間的分布, 令和4年度土木学会東北支部技術研究発表会, 2023年3月4日
- 7) 西山正晃, 日本の水環境における薬剤耐性菌の調査とその発生源, ソフトパス理工学総合研究センター 環境科学・研究グループ 講演会・研究会, 2023年3月10日, 盛岡, 岩手 (招待公演)
- 8) 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹, 山形県の河川から単離した ESBL産生大腸菌の薬剤耐性プロファイルとジェノタイピング, 第57回日本水環境学会年会, 2023年3月15日～17日
- 9) M. Nishiyama, M. Mori, I. Yoneda, T. Watanabe, Distribution and Characterization of Extended-Spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a River Basin in Yamagata Prefecture, Japan. 9th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2023, Oct 22-26, 2023, Taiwan, (Oral presentation, accepted)

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ 1】

- 1) 山形大学公開講座「農学のタベ」にて講演 (「クスリの効かない細菌が身の周りに!?-水環境を対象とした国内外の事例の紹介」, 2021年11月18日, 聴講者約50名)
- 2) 第27回庄内・社会基盤技術フォーラムにて講演 (「赤川および最上川に生育する薬剤耐性菌が保有する耐性遺伝子」 2022年2月28日, 参加者約100名)
- 3) 山形県立酒田東高等学校 スーパーサイエンスハイスクール課題研究において概要説明と研究支援 (「魚の腸管内における薬剤耐性菌の調査」 2022年4月～)

(4) マスコミ等への公表・報道等

【サブテーマ 1】

- 1) 山形新聞 (2020年5月15日、地方紙、「環境省の公募研究に山形大学助教採択」)

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

(6) その他の成果発表

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文 Abstract

Antibiotic Resistance in Water Environments: Gene Transfer Potential and Mechanisms

Principal Investigator: Masateru NISHIYAMA

Institution: 1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka City, Yamagata Prefecture 997-8555, Japan

Tel: +81-235-28-2894

E-mail: m-nishiyama@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Antibiotic resistance, Antibiotic resistance gene, Water environment, Gene transfer, Genotyping

The increasing use of antibiotics has led to the emergence of antibiotic-resistant bacteria (ARB), posing a global health threat. However, there is little information on the presence of this indicator ARB in the water environments, especially river water. The present study aimed to (1) investigate the antibiotic-resistant bacteria isolated from river flowing in a Tohoku area in Japan by detecting antibiotic resistance genes (ARGs) as well as antibiotic susceptibility tests. The isolates of ESBL-producing *E. coli* from river water were further analyzed for source tracking using molecular typing analysis, (2) Quantify the potential for horizontal gene transfer of antibiotic-resistant bacteria released into the environment.

For the 108 isolates of ESBL-producing *E. coli*, the possession of the β -lactamase genes (21 genes) was examined using mono-plex PCR analysis. Seventeen of 21 β -lactamase genes were detected in the isolates and the most frequently detected gene was *bla*_{CTX-M group-1} possessed by 65 isolates. It is noteworthy that the detected β -lactamase genes included not only *bla*_{IMP} (9 isolates), an endemic carbapenemase in Japan, but also *bla*_{KPC} (7 isolates), *bla*_{OXA-48} (3 isolates), *bla*_{VIM} (9 isolates), and *bla*_{NDM} (5 isolates) which are considered epidemic carbapenemase in foreign countries because of few reports at clinical facilities in Japan. Among seven sampling stations in the two rivers, the highest number (n=15) of β -lactamase genes were detected in the isolates from the station receiving treated wastewater from a municipal wastewater treatment plant. This result implies that healthy people living in the city and patients clinically reported must harbour ESBL-producing *E. coli*. The results of MLST analysis showed that ESBL-producing *E. coli* type ST131, which is prevalent worldwide, was dominant among the isolates and was detected in spatially distant rivers in the Tohoku region.

The conjugative transfer of antibiotic resistance ARGs from a model bacteria, enterococci and *E. coli* in water environment were evaluated by in-vitro experiment. The transfer frequency of *vanA* by filter mating were 10^{-3} to 10^{-7} per recipient to three different enterococcus strains. In the activated sludge condition, the vancomycin resistance was transferred to OG1RF only and its frequency was about 10^{-7} . On the other hand, when Enterobacteriaceae harboring *bla*_{CTX-M} were used, conjugative transfer was confirmed under any simulating environments (10^{-4} to 10^{-8}). Gram-negative bacteria were shown to have a higher potential for the transmission of ARGs compared to Gram-positive bacteria. Transmission of resistance genes in the environment was also considered sufficient, suggesting that intensive treatment is necessary, especially in areas where bacterial density is assumed to be high.