

〔報 文〕

## 石川県における下水中の薬剤耐性菌の実態調査

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部

緩 詰 沙 耶・城 座 美 夏・吉 川 美 彩  
中 村 幸 子・倉 本 早 苗・北 川 恵 美 子

### 〔和文要旨〕

市中における薬剤耐性菌の実態を把握するため、県内の下水処理場（5 処理区）における下水中の ESBL 産生菌、CRE 及び VRE の調査を行った。CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌は、5 処理区から継続して検出され、保有遺伝子の割合が先行研究の患者由来株と同様の傾向であったことから、本菌は市中に広がっていることが示唆された。CPE は、NDM 型を保有する株が 1 処理区から、GES 型を保有する株が 4 処理区から検出された。また、VRE は *vanB* 保有株が 2 処理区から検出された。NDM 型 CPE は、近年、病原体サーベイランスにおいて県内で複数検出されているが、GES 型 CPE と VRE は、県内での検出がないことから、今後も市中における薬剤耐性菌の監視を行う必要がある。

キーワード：下水、薬剤耐性菌、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）

基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）産生菌、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）

### 1 はじめに

近年、薬剤耐性菌の増加は国際的に大きな問題となっており、ヒトや動物を含む包括的な対策が求められている。こうした認識のもと、2015 年の世界保健総会で「薬剤耐性に関するグローバルアクションプラン」が採択され、日本でも 2016 年に「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」が策定された。耐性菌は院内感染にとどまらず、市中感染にも広がっており、医療機関だけでなく地域全体での総合的な感染対策が必要とされている。

そうした背景から当センターでは、既報<sup>1)</sup>のとおり平成 30 年度から令和 3 年度に県内の医療機関の患者、健康者及び食品（鶏肉）から分離された基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）産生菌及びカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）を対象に薬剤耐性遺伝子の保有状況について調査した（以下「先行研究」という）。その結果、医療機関の患者と食品における薬剤耐性遺伝

子の保有状況やその関係性は概ね把握できた。しかしながら、健康者については検体数が少なく、市中における潜在的な耐性菌の実態把握は十分に行えなかった。

そこで、市中における薬剤耐性菌の実態を把握するため、県内の下水処理場の流入水（以下「下水」という。）を用いて、先行研究の対象である ESBL 産生菌及び CRE に加え、国内外で増加傾向にあるバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について調査を行ったので報告する。

### 2 材料と方法

#### 2・1 供試試料

県内 3 つの地区（A、B、C 地区）から選定した下水処理場（5 処理区：A-1、B-1、B-2、C-1、C-2）にて、令和 4 年 6 月から 6 年 4 月の間、概ね 3 ヶ月に 1 回の頻度で採取した下水 38 試料（B-1、B-2 は令和 6 年 4 月欠測）を検査に供した。なお、処理区ごとの定住人口及び試料数は表 1 に示す。

Survey on the Prevalence of Antimicrobial Resistant Bacteria in Sewage in Ishikawa Prefecture. by YURUZUME Saya, SHIROZA Mika, YOSHIKAWA Misa, NAKAMURA Sachiko, KURAMOTO Sanae and KITAGAWA Emiko (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Sewage, Antimicrobial Resistant Bacteria, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Extended-Spectrum  $\beta$  Lactamase Producing Bacteria, Vancomycin-Resistant Enterococci

表 1 対象下水処理区と試料数

処理区	定住人口 (千人)	試料数
A-1	151	8
B-1	7	7
B-2	19	7
C-1	11	8
C-2	67	8

2・2 試料の前処理及び希釈倍率の決定

(1) 試料の前処理

試料200mLを4℃, 3000rpm, 30分間遠心分離した後、上清を除去し得られた沈査にリン酸緩衝液を加え2mLの試料原液とした。

(2) 試料原液の希釈倍率の決定

第1回目の調査で採取した試料を用いて作製した試料原液をリン酸緩衝液で段階的に希釈し10倍希釈系列(10<sup>-1</sup>~10<sup>-4</sup>)を作製し、それぞれ後述の各選択培地に塗布、培養した。各希釈系列での培地上のコロニーの発育状況の確認及び薬剤耐性菌の検索を行い、対象とする薬剤耐性菌の検出効率のよい希釈倍率を決定し、以後の調査における使用希釈液とした。

2・3 対象とする薬剤耐性菌

(1) ESBL 産生菌

ESBL 産生菌は、2000年以降、急激に増加しているが、その理由として CTX-M型遺伝子を保有する大腸菌の関与が示唆されている<sup>2)</sup>。このことから、CTX-M型遺伝子を保有するESBL 産生大腸菌(以下「CTX-M型ESBL 産生菌大腸菌」という。)に着目して調査を実施した。

(2) CRE

CREの中でも、カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌(CPE)は、カルバペネマーゼ遺伝子をプラスミドなどの可動性遺伝子上に保有するため、菌種を越えて薬剤耐性を伝播させることから、院内感染対策上も区別し、注意を要することとされている<sup>3)</sup>。このことから、CPEに着目して調査を実施した。

(3) VRE

VREのバンコマイシン耐性遺伝子のうち、*vanA*と*vanB*は接合等で異なる菌種間に伝播しうるため、臨床問題にされている<sup>4)</sup>。このことから*vanA*、*vanB*を保有するVREに着目して調査を実施した。

2・4 CTX-M型ESBL 産生大腸菌の検出

(1) 分離方法

2・2で作製した10<sup>-3</sup>及び10<sup>-4</sup>希釈液0.1mLをクロモアガー-ESBL培地(関東化学社製)及びクロモアガーマSuper CARBA培地(関東化学社製)にそれぞれコンラージ棒で塗布し、37℃で24時間培養した。各培地に発育したコロニーのうち、青色及び藤色のコロニーをす

べて釣菌し、それらについて、グラム染色、オキシダーゼ試験、ブドウ糖発酵能を確認し、腸内細菌目細菌の性状(グラム陰性桿菌、オキシダーゼ陰性、ブドウ糖発酵性)を示すコロニーをESBL 産生菌疑い株とした。

(2) CTX-M型遺伝子の検出

ESBL 産生菌疑い株について、既報<sup>5)</sup>に従い、PCRによりCTX-M型遺伝子(CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group, CTX-M-8/25 group)を検出した。

(3) 大腸菌の同定

CTX-M型遺伝子保有株について、大腸菌の同定を、PCRにて大腸菌に特異的な遺伝子である*uspA* 遺伝子の検出<sup>6)</sup>により行った。

2・5 CPEの検出

(1) 分離方法

2・4(1)で腸内細菌目細菌の性状を示したコロニーをCPE疑い株とした。

(2) カルバペネマーゼ遺伝子の検出及び型別

CPE疑い株について、既報<sup>7)</sup>及び国立感染症研究所病原体検出マニュアル<sup>8)</sup>(以下「マニュアル」という。)に従い、PCRによりカルバペネマーゼ遺伝子(IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型、VIM型、GES型)を検出した。なお、GES型β-ラクタマーゼは一部の亜型がカルバペネマーゼであり<sup>9)</sup>、カルバペネマーゼか否かの判定には塩基配列の確認が必要である。GES型を含む遺伝子については、マニュアルに従い、シーケンズ解析により塩基配列を確認し、型別を行った。

(3) 菌種の同定

検出されたCPEについてrapid ID 32E(バイオメリュー・ジャパン社製)を用いて菌種を同定した。なお、GES型遺伝子を保有するCPE(以下「GES型CPE」という。)においては多数分離されたことから、処理区ごとに、上記(1)の分離培地上のコロニーの色調や形状をもとに菌種等が偏らないように選定した10~11株、計41株について同定した。

(4) カルバペネマーゼ産生性確認試験

GES型CPEのうち(3)で菌種を同定した41株について、マニュアルに従い、modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) 及びCarbaNPテストによるカルバペネマーゼ産生性確認試験を実施した。

(5) 薬剤感受性試験

(4)同様に41株について、米国臨床検査標準化協会(Clinical and Laboratory Standard Institute: CLSI)の実施基準<sup>10)</sup>に従い、ディスク拡散法により、センシディスク(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性試験の供試薬剤はCRE感染症届出基準(令和7年4月6日までの旧届出基準、以下同じ)の指標薬剤であるメロベネム、イミベ

ネム, セフメタゾールとした。

### 2・6 VREの検出

#### (1) 分離方法

2・2で作製した $10^{-1}$ 及び $10^{-2}$ 希釈液0.1mLをクロモアガー VRE培地(関東化学社製)に、 $10^{-2}$ 及び $10^{-3}$ 希釈液0.1mLをVRES寒天培地(極東製薬社製)にそれぞれコンラージ棒で塗布し、35~37℃で24~48時間培養した。クロモアガー VRE培地に発育したコロニーのうち藤色のコロニー、VRES寒天培地に発育したコロニーのうち周囲が黒変したコロニーすべてを釣菌し、それらについて、グラム染色、カタラーゼ試験を実施し、腸球菌の性状(グラム陽性球菌、カタラーゼ陰性)を示すコロニーをVRE疑い株とした。

#### (2) バンコマイシン耐性遺伝子の検出

VRE疑い株について、マニュアルに従い、PCRによりバンコマイシン耐性遺伝子(*vanA*, *vanB*)を検出した。

#### (3) 菌種の同定

バンコマイシン耐性遺伝子保有株について、マニュアルに従い、PCRにて*Enterococcus faecium*(以下、*E. faecium*)と*Enterococcus faecalis*の同定を行った。

## 3 成 績

### 3・1 CTX-M型ESBL産生大腸菌の検出状況

CTX-M型ESBL産生大腸菌は各処理区ですべての試料から検出された(図1)。処理区ごとのCTX-M型ESBL産生菌のうち、大腸菌の割合は、処理区A-1で91.6%(155株中142株)、B-1で88%(92株中81株)、B-2で38.2%(395株中151株)、C-1で89.7%(116株中104株)、C-2で69.2%(146株中101株)であり、処理区B-2を除いてCTX-M型ESBL産生菌の多くは大腸菌であった。

また、CTX-M型ESBL産生大腸菌の保有する遺伝子の割合は、いずれの処理区でもCTX-M-9 groupが最も高く、次いでCTX-M-1 groupであった(図1)。

### 3・2 CPEの検出状況

NDM型遺伝子を保有するCPE(以下「NDM型CPE」という。)及びGES型CPEが以下のとおり検出された。

#### (1) NDM型CPE

処理区A-1において、令和4年9月に採取した試料からNDM型CPEが1株検出された。菌種は大腸菌であり、保有する遺伝子の型別は $bla_{NDM-5}$ であった。

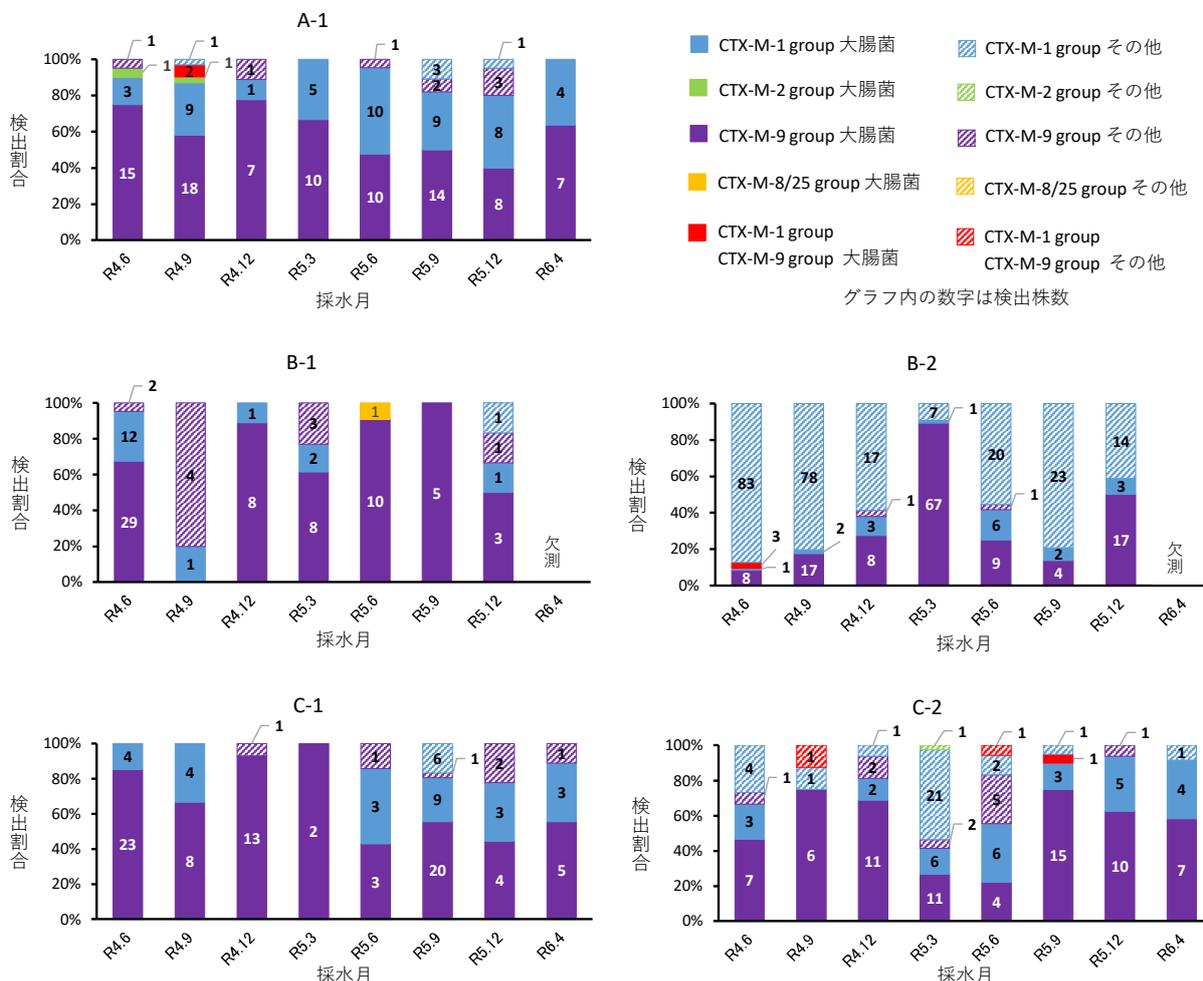


図1 CTX-M型ESBL産生菌の検出状況

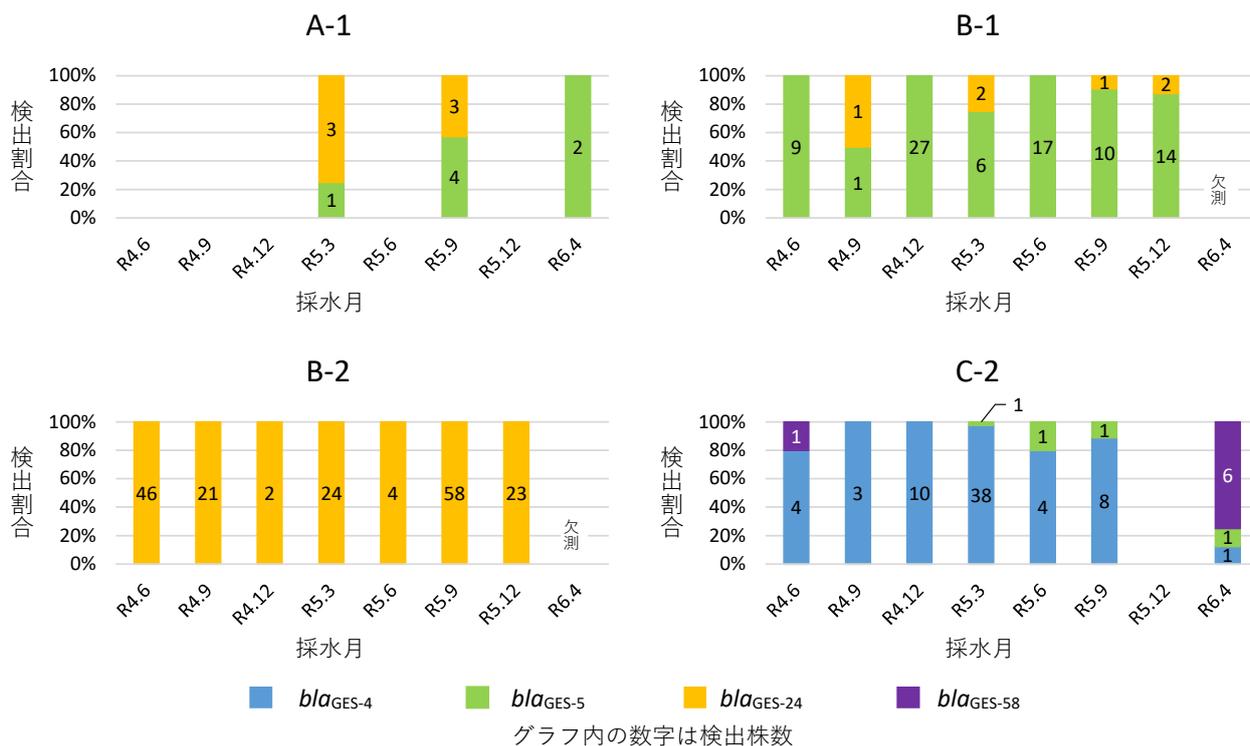


図2 GES型CPEの検出状況

(2) GES型CPE

GES型CPEの検出状況を図2に示す。

処理区C-1を除く4処理区でGES型CPEが検出された。処理区B-1及びB-2では全ての試料から、C-2は8試料中7試料から、A-1は8試料中3試料から検出された。遺伝子の型別は*bla*<sub>GES-4</sub>、*bla*<sub>GES-5</sub>、*bla*<sub>GES-24</sub>、*bla*<sub>GES-58</sub>であり、いずれもカルバペナーゼであった。

型別割合は処理区によって偏りがみられ、B-2は全て*bla*<sub>GES-24</sub>、B-1では*bla*<sub>GES-5</sub>、C-2では*bla*<sub>GES-4</sub>の割合が高かった。

GES型CPEの一部(41株)について菌種の同定を行った結果、*Klebsiella pneumoniae* (25株)、*Klebsiella oxytoca* (12株)、*Citrobacter freundii* (2株)、*Raoultella ornithinolytica* (1株)、*Raoultella terrigena* (1株)であった(表2)。加えて、カルバペナーゼ産生性確認試験を実施した結果、mCIMでは41株中25株が陽性、CarbaNPテストでは陽性を示した株はなく、10株が判定保留、31株が陰性であった(表3)。また、薬剤感受性試験においてはメロペネム耐性が41株中10株、イミペネム耐性が41株中7株であり、感染症法におけるCRE感染症届出基準(メロペネムの感受性ディスクの阻止円直径が22mm以下、またはイミペネムの感受性ディスクの阻止円直径が22mm以下かつセフメタゾールの感受性ディスクの阻止円直径が12mm以下)と照合した結果、41株中15株(36.6%)が届出基準を満たしていなかった(表4)。なお、上記の菌種、カル

バペネマーゼ産生性、薬剤感受性とGES型の種類について比較したところ、特徴的な関連性は認められなかった(表2~4)。

3・3 VREの検出状況

処理区A-1において令和5年3月採水の試料から、C-2において令和5年6月採水の試料から*vanB*保有株が検出され、B-1、B-2、C-1からは検出されなかった(表

表2 GES型CPEの菌種

菌種	<i>bla</i> <sub>GES-4</sub>	<i>bla</i> <sub>GES-5</sub>	<i>bla</i> <sub>GES-24</sub>	<i>bla</i> <sub>GES-58</sub>	合計
<i>K.pneumoniae</i>	5	6	12	2	25
<i>K.oxytoca</i>	1	8	1	2	12
<i>C.frendii</i>			2		2
<i>R.ornithinolytica</i>			1		1
<i>R.terrigona</i>			1		1
合計	6	14	17	4	41

表3 GES型CPEのmCIM及びCarbaNPテストの判定結果

GES型	mCIM			CarbaNP		
	+	±	-	+	±	-
<i>bla</i> <sub>GES-4</sub>	5	1			1	5
<i>bla</i> <sub>GES-5</sub>	10	3	1		4	10
<i>bla</i> <sub>GES-24</sub>	10	2	5		5	12
<i>bla</i> <sub>GES-58</sub>		3	1			4
合計	25	9	7	0	10	31

数字は菌株数

表 4 GES型CPEの薬剤感受性

GES型	メロペネム			イミペネム			セフトラゾール			CRE感染症届出基準	
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	届出基準を満たす	届出基準を満たさない
<i>bla</i> <sub>GES-4</sub>		5	1		4	2	5	1		5	1
<i>bla</i> <sub>GES-5</sub>	3	4	7	1	4	9	6	7	1	9	5
<i>bla</i> <sub>GES-24</sub>	7	3	7	6	6	5	9	3	5	11	6
<i>bla</i> <sub>GES-58</sub>			4		1	3	4			1	3
合計	10	12	19	7	15	19	24	11	6	26	15

R：耐性、I：中間、S：感性 数字は菌株数

表 5 VREの検出状況

処理区	採水月							
	R4.6	R4.9	R4.12	R5.3	R5.6	R5.9	R5.12	R6.4
A-1	-	-	-	<i>vanB</i> (1)	-	-	-	-
B-1	-	-	-	-	-	-	-	欠測
B-2	-	-	-	-	-	-	-	欠測
C-1	-	-	-	-	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	<i>vanB</i> (5)	-	-	-

-：不検出、( )：検出株数

5)。なお、*vanB* 保有株が検出されたA-1及びC-2は対象処理区のうち定住人口の多い2処理区であった。また、2試料から検出された*vanB* 保有の6株について、菌種の同定を行ったところいずれも*E. feacium*であった。

## 4 考 察

### (1) CTX-M型ESBL産生大腸菌の検出状況

先行研究で実施した、医療機関の患者から分離されたESBL産生菌の調査結果<sup>1)</sup>では、CTX-M型ESBL産生大腸菌の保有する遺伝子はCTX-M-9 groupが最も多く、次いでCTX-M-1 groupが多く検出された。

本研究では、すべての処理区においてCTX-M型ESBL産生大腸菌の保有する遺伝子はCTX-M-9 group, CTX-M-1 groupの順に多く検出されており、医療機関の患者由来株の結果と同様であった。また、すべての処理区で継続して検出されたことから、CTX-M型ESBL産生大腸菌が既に市中に広がっていることが示唆された。

### (2) CPEの検出状況

国内のCRE病原体サーベイランスにおいて検出されたカルバペネマーゼ遺伝子の大部分を占めるのはIMP型であるが、年々NDM型等の海外型カルバペネマーゼ遺伝子の検出が増加している<sup>3)</sup>。特に、NDM型CPEは分離患者に明確な海外渡航歴のない国内例の増加が顕著であり、国内伝播の拡大の可能性が指摘されている<sup>3)</sup>。また、県内のCRE病原体サーベイランスにおいても複数株の検出がみられている<sup>11)</sup>。本研究でも定住人口の多い処理区A-1でNDM型CPE (*bla*<sub>NDM-5</sub>) が1株検出さ

れた。

一方、C-1を除く4処理区で多数の検出がみられたGES型CPEは、CRE病原体サーベイランスにおいて、これまでに県内での検出はなく<sup>11)</sup>、臨床分離株とは異なる結果であった。下水からのGES型CPEの検出は他県の調査でも報告<sup>12)13)</sup>されており、下水調査としては共通した結果であった。GES型カルバペネマーゼはカルバペネマーゼ活性が弱く、GES型CPEではmCIMやCarbaNPテスト陽性率が低かったとの報告<sup>14)</sup>があり、本研究で解析した41株では、CarbaNPテストは陽性を示す株はなく、mCIMも陰性となる株があり、本県でも同様の傾向がみられた。薬剤感受性試験においても約4割がCRE感染症届出基準を満たしていなかったことから、薬剤感受性試験やカルバペネマーゼ産生性確認試験のみではGES型CPEは検出が困難な可能性が考えられる。しかしながら、このことだけでは、臨床分離株から検出の少ないGES型CPEが下水から高頻度に検出されたことは説明がつかず、詳細は不明であった。よって、今後も下水を用いた調査を継続して市中におけるCPEの監視を行うとともに、患者の発生動向も注視する必要があると考える。

### (3) VREの検出状況

VREの多くはバンコマイシンのみならず、ペニシリンやアミノグリコシド系抗生物質にも高度耐性であり、重大な感染症を引き起こす原因菌として問題視されている薬剤耐性菌の1つである。我が国においては、欧米諸国に比べVREの分離頻度は低いものの、現在は全国的

に増加傾向にある<sup>4)</sup>。本県において、VRE感染症の届出は令和元年に1件の届出があったのを最後に、以降の届出はない(令和7年8月現在)が、本研究では調査対象のうち、定住人口の多い処理区A-1、C-2から*vanB*保有株が検出されたことから、CPE同様、VREについても市中における監視及び患者の発生動向に注視が必要である。

## 5 ま と め

- (1) CTX-M型ESBL産生大腸菌の保有する遺伝子の割合は、いずれの処理区でもCTX-M-9 groupが最も多く、次いでCTX-M-1 groupであり、先行研究の医療機関の患者から分離された株と同様の傾向であった。また、すべての処理区から継続して検出されたことから、CTX-M型ESBL産生大腸菌が市中に広がっていることが示唆された。
- (2) CPEは、近年全国及び県内で検出が増加している海外型カルバペネマーゼ遺伝子のNDM型を保有する株が検出された。また、GES型を保有するCPEが4処理区で検出され、臨床分離株と異なる傾向がみられたことから、今後も調査を継続し監視していく必要がある。
- (3) VREは、2処理区から*vanB*保有*E. faecium*が検出された。近年、県内でのVRE感染症の届出はないが、全国では増加傾向にあり、今後も調査を継続し監視していく必要がある。

本研究の実施にあたり、下水試料の採取にご協力いただいた関係機関の皆様へ深謝いたします。

## 文 献

- 1) 北川恵美子, 城座美夏, 木村恵梨子, 児玉洋江, 谷村陸美, 塩本高之: 石川県における薬剤耐性菌の保有状況の把握, 石川県保健環境センター研究報告書, **59**, 1-7 (2022)
- 2) Olesen, B., Frimodt-Moller, J., Leihof, R., Struve, C., Johnston, B., Hansen, D.S., Scheutz, F., Krogh, K. A., Kuskowski, M.A., Clabots, C., Johnson, J.R. : Temporal Trends in Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Traits within the *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clonal Group and Its H30 and H30-Rx Subclones, 1968 to 2012, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**, 6886-6895 (2014)
- 3) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報(月報), **46**, 23-24 (2025)
- 4) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報(月報), **42**, 156-167 (2021)
- 5) Le, Q.P., Ueda, S., Nguyen, T.N.H., Dao, T.

- V.K., Hoang, T.A.V., Tran, T.T.N., Hirai, I., Nakayama, T., Kawahara, R., Do, T.H., Vien, Q.M., Yamamoto, Y.: Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam, *Foodborne Pathogens and Disease* **12** (8), 719-725 (2015)
- 6) 鈴木祥広, 西山正晃, 糠澤桂, 石井聡: 下水処理水が流入する小河川における大腸菌の調査, 水環境学会誌 *Journal of Japan Society on Water Environment*, **41** (2), 19-26 (2018)
- 7) 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.: Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **73** (2), 166-172 (2020)
- 8) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌, R2.6月改訂版 Ver2.0
- 9) Bontron, S., Poirel, L., Nordmann, P. : In Vitro Prediction of the Evolution of GES-1  $\beta$ -Lactamase Hydrolytic Activity, *Antimicrob Agents Chemother*, **59**, 1664-1670 (2015).
- 10) 日本臨床微生物学会国際委員会: 日本語版「抗菌薬感受性検査のための標準法-第26版(M100-S26)», 41-47 (2016)
- 11) 石川県感染症情報センター: カルバペネム耐性腸内細菌目細菌の薬剤耐性遺伝子保有状況, <https://www.pref.ishikawa.lg.jp/hokan/kansenjoho/documents/carbapenem.html>, 2025年7月31日
- 12) 野田万希子: 下水処理場流入水中から検出されるカルバペネマーゼ産生性腸内細菌科細菌の実態調査, 公益財団法人大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成研究報告書, 平成30年度
- 13) 山口友美, 水戸愛, 工藤剛, 矢崎知子, 山本紀彦: 下水等に流入する腸内細菌科細菌の薬剤耐性化に関する研究, 宮崎県保健環境センター年報, **41**, 40-45 (2023)
- 14) Kim, H.S., Kim, J.O., Lee, J.E., Park, K.G., Lee, H. K., Kim, S.-Y., Min, S.-J., Kim, J., Park, Y.-J. : Performance of a novel fluorogenic assay for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from bacterial colonies and directly from positive blood cultures, *Journal of Clinical Microbiology*, **58**(1), e01026-19 (2020)