資　料

岐阜県内における河川水中の基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子保有大腸菌の検出状況

古田綾子，野田万希子，桐井久美子*，足立知香，水野卓也，鈴木崇稔**，越 勝男***，亀山芳彦****，今尾幸穂

要　旨

岐阜県内の河川 13 地点にて 2021～2023 年の 2 年間に月 1 回（各地点 24 回）採水した合計 312 検体の河川水を用い、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子保有大腸菌の検出状況を調査した．その結果，312 検体中 75 検体（全地点で 1～18 回）より ESBL 遺伝子保有大腸菌が検出された．保有 ESBL 遺伝子別では CTX-M-1 group（52.2%）と CTX-M-9 group（42.4%），O 群別では O25（Og25）（36.0%）が多かった．検出率の季節による差は認められなかったが．上流域よりも下流域で高い結果となった．またパンデミッククローンを示唆させる B2-O25b-ST131-*fimH30* の特徴を示す株が 7 地点より 1～12 回，合計 25 検体から検出された．さらに 6 地点において同一プロファイル（O 群・ESBL 遺伝子タイプ）を示した O25，O20，O8，Og9，Og16 及び Og4 の合計 39 株の類似性を確認したところ，95%以上の高い遺伝的類似性を O25 で 2 株，O20 で 4 株，Og9 で 3 株，Og16 で 2 株及び Og4 で 2 株認めたことから ESBL 遺伝子保有大腸菌の定着も考えられた．

キーワード：ESBL 遺伝子保有大腸菌，薬剤耐性菌，パンデミッククローン，PFGE

1　はじめに

現在，基質特異性拡張型β－ラクタマーゼ（ESBL）産生菌やカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌（CPE）などの薬剤耐性菌の拡散が注目されており，感染症治療を脅かす問題となっている．ESBL 産生菌はセフェム系第 2 世代以降のセファロスポリン系やモノバクタム系の薬剤を分解できるβ-ラクタマーゼを産生しており，CPE はカルバペネマーゼを産生しカルバペネム系薬剤だけでなく，ペニシリン系及びセフェム系薬剤にも耐性を示し基本的にほとんどのβ－ラクタム系薬剤に耐性である[1]．これらは ESBL 遺伝子やカルバペネマーゼ遺伝子などの薬剤耐性遺伝子が，プラスミドを介して伝達されその細菌を耐性化させ得ることから，菌種を超えて薬剤耐性が拡散することが危惧されている．

2015 年に「One Health Approach」が提唱され，薬剤耐性（AMR）対策アクションプランに基づき，ヒトだけでなく家畜・環境において包括的な対策が必要とされている．何も対策を講じない場合，2050 年には世界で 1000 万人の AMR による死亡が想定され、がんによる死亡者数を超えるという報告がある[2]．AMR 対策アクションプランでは AMR に関する「啓発・教育」，「抗菌薬の適正利用」，「AMR や抗菌薬の動向調査・監視」，「感染予防管理や研究開発・創薬」などが掲げられている．

近年，ヒトや動物だけでなく水環境中においても薬剤耐性菌の検出が報告[3]され，早急な対策が必要とされている．当所では 2017 年度より下水中の CPE について調査を行っている[4]が，その他の環境検体での検討は行ったことがなかった．そこで今回は岐阜県内での薬剤耐性菌の侵淫状況の把握のため，河川水中の ESBL 遺伝子保有大腸菌の検出を行った．

2　材料と方法

2.1　供試検体

2021 年 8 月～2023 年 8 月の 2 年間に木曽川水系 7 地点（図 1, A～G），長良川水系 6 地点（図 1, H～M）において月 1 回各 24 回採水した 312 検体を供試した．

2.2　分離培養と ESBL 遺伝子の PCR スクリーニング

岐阜県保健環境研究所：504-0838　岐阜県各務原市那加不動丘 1-1
* 現　岐阜県飛騨保健所：506-0055　岐阜県高山市上岡本町 7-468
** 現　岐阜県東部広域水道事務所：509-6472　岐阜県瑞浪市釜戸町 2190-12
*** 現　岐阜県飛騨食肉衛生検査所：506-0048　岐阜県高山市前原町 17 番地 1
**** 現　岐阜県岐阜保健所本巣・山県センター：500-8384　岐阜県岐阜市薮田南 5-14-53

図1 各水系の採水地点

採水検体 100 mL をフィルター（ADVANTEC，孔径 0.45 μm，セルロース混合エステル製 45 mm）濃縮し，そのフィルターを mEC 培地（島津ダイアグノステックス）（50 mL）に浸し 42℃で 22±2 時間培養した．培養液をクロモアガーESBL 培地（関東化学）に塗布し 37℃で一晩培養後，発育した赤紫コロニーを 1 検体あたり最大 10 コロニー釣菌し，生化学性状（CLIG 培地，極東製薬）で乳糖分解，セロビオース非分解株を大腸菌とし，ESBL 遺伝子スクリーニングを行った．

ESBL 遺伝子スクリーニングは純培養の菌株から単純ボイル法で DNA を抽出し，四宮らによる渡邉班地研グループ耐性遺伝子検査プロトコル[5]に従って，TEM 型，SHV 型，CTX-M-1 group，CTX-M-2 group，CTX-M-9 group，CTX-M-8/25 group のβ-ラクタマーゼ遺伝子を対象としたマルチプレックス PCR を実施し，目的サイズのバンドが検出されるかを判定した．

2.3　O 群別（Og タイピング）

「病原大腸菌免疫血清」（デンカ生研）を用い O 群を決定した．また免疫血清にて O 群別不能（OUT）と判定された株については，O 抗原合成遺伝子を標的とした PCR（MP1～MP20）[6]を行い，対応する O 抗原遺伝子型（Og タイプ）を決定した．

2.4　薬剤感受性試験

O 群別（Og タイピング）と ESBL 遺伝子スクリーニングの結果でプロファイルごとに分け，1 検体あたり最大 5 株の薬剤感受性試験を実施した．

ドライプレート'栄研'（192 プレート）（栄研化学）を用いて，微量液体希釈法により MIC を測定した．供試薬剤はアンピシリン（ABPC），ピペラシリン（PIPC），セファゾリン（CEZ），セフォチアム（CTM），セフォタキシム（CTX），CTX/クラブラン酸（CVA），セフタジジム（CAZ），CAZ/CVA，セフトリアキソン（CTRX），セフピロム（CPR），CPR/CVA，セフェピム（CFPM），セフジニル（CFDN），セフポドキシム（CPDX），CPDX/CVA，セフメタゾール（CMZ），ラタモキセフ（LMOX），フロモキセフ（FMOX），ファロペネム（FRPM），イミペネム（IPM），メロペネム（MEPM），アズトレオナム（AZT），クラブラン酸アモキシシリン（ACV），スルバクタム/セフォペラゾン（S/C），スルバクタム/アンピシリン（S/A），タゾバクタム（TAZ）/PIPC，ゲンタマイシン（GM），アミカシン（AMK），シプロフロキサシン（CPFX），レボフロキサシン（LVFX），ミノサイクリン（MINO），コリスチン（CL），ホスホマイシン（FOM），スルファメトキサゾール/トリメトプリム（ST）の 34 薬剤である．このうち 26 薬剤において CLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute）M100-S22 に準拠し，感性（S）または耐性（R）を判定した．FOM については MIC が≧256 μg/ml の株を耐性（R）と判定した[6]．CVA 添加の第 3 世代セフェム系薬剤の CTX または CAZ については CVA 添加なしのウェルと比べ 3 管以上発育阻害を認めたものを ESBL 産生株と判定した．

2.5　ESBL 遺伝子のタイプ決定

上記の O 群別（Og タイピング），ESBL 遺伝子のスクリーニング及び薬剤感受性試験の結果を考慮し，1 検体あたり同一プロファイルを示す株の最大 2 株について，既報に従い CTX-M-1 group[7]，CTX-M-2 group[8]，CTX-M-8 group[8]，CTX-M-9 group[9]，CTX-M-25 group[10]，SHV 型[11]，及び TEM 型[8, 12]のダイレクトシーケンスを実施し，β-ラクタマーゼ遺伝子のタイプを決定した．

2.6　025（Og25）の追加解析

O25（Og25）であった株は，B2-O25b-ST131-*fimH30*（パンデミッククローン）であるか否かの判定のため追加検討を行った．

系統発生分類 PCR，O25b PCR，*fimH30* specific PCR は既報[13-15]に従って実施した．

Multilocus sequence typing（MLST）解析は，既報[16]に従い 7 遺伝子（*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*）の塩基配列を決定後，MLST データベース（https://pubmlst.org/）に照合し，シークエンス型（ST）を決定した．既知のタイプに該当しない等 ST タイプを決定できなかった株は，ST131 specific PCR[17]を行い，目的サイズのバンドが検出されたものを ST131 系統と判定した．

2.7　パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）

同一地点にて同一プロファイル（O 群・ESBL 遺伝子タイプ）の株を複数回検出した O25（Og25）21 株と、O25 以外の O 群 18 株（Og4 : 2 株，O8 : 4 株，Og9 : 5 株，Og16 : 3 株，O20 : 4 株）について PFGE を実施し類似性を確認した．対照株として O25（Og25）にはカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）3 株，腸管出血性大腸菌（EHEC）1 株を加え，O25 以外の O 群 18 株には EHEC 1 株，病原大腸菌 2 株を対照に加えた 21 株を既報[18]に従って，菌株をアガロース包埋し，Proteinase K（富士フィルム和光純薬）と Lysozyme（富士フィルム和光純薬）処理後，制限酵素 *Xba*I（TaKaRa）による消化を行い，CHEF-DRII（Bio-Rad）にて電気泳動（6 V/cm，2.2-54.2sec，19hr）しバンドパターンを撮影した．系統樹解析は BioNumercis v6.7（Applied Maths）を用い，Dice 法による類似係数を算出して UPGMA 法（トレランス設定 : 1.0%）によってデンドログラムを作成した．

3　結　　果

3.1　ESBL 遺伝子保有大腸菌のスクリーニング

本研究では検体ごとに釣菌した菌株数が異なるため，結果を検体数ベースで示すこととする．

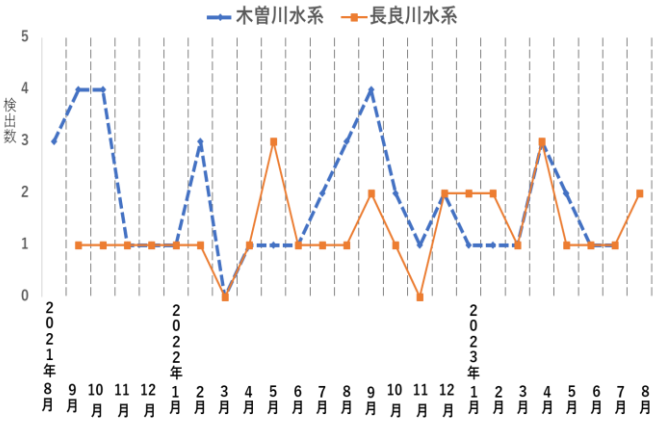


図2　採水月別ESBL大腸菌検出検体数

河川水から ESBL 遺伝子保有大腸菌のスクリーニングを行った結果，全体で 312 検体中 75 検体（24.0%）から ESBL 遺伝子保有大腸菌が検出された．水系ごとでは，木曽川水系で 168 検体中 44 検体（26.2%），長良川水系で 144 検体中 31 検体（21.5%）であり，水系による検出率の違いは認められなかった．採水月別に検出数を比較すると（図 2），木曽川水系では 0～4 地点/月，長良川水系では 0～3 地点/月で継続的に検出されており季節による差は認められなかった．また採水地点別で 24 検体中の検出数を比較すると（表 1），木曽川水系では E 地点で 17 検体（70.8%），D 地点で 13 検体（54.2%）及び C 地点で 8 地点（33.3%），長良川水系では M 地点で 18 検体（75.0%）と検出数が多い結果となった．

75 検体より釣菌した株の ESBL 遺伝子のスクリーニング結果を表 1 に示す．1 つの検体より複数種類の ESBL 遺伝子が検出された場合があるため検体数が重複しているが，312 検体中で最も検出検体数が多かったのは CTX-M-9 group の 31 検体（9.9%）で，

表1　ESBL遺伝子のPCRスクリーニングの結果

採水場所		検体数	ESBL遺伝子検出検体数(%)	CTX-M-1 group	CTX-M-1 group +TEM型	CTX-M-2 group +TEM型	CTX-M-8/25 group	CTX-M-9 group	CTX-M-9 group +TEM型	SHV型
木曽川	A	24	2(8.3)					2		
	B	24	2(8.3)			1		1		
	C	24	8(33.3)	4	3			2	2	2
	D	24	13(54.2)	5	5			5		
	E	24	17(70.8)	5	4		2	10	4	
	F	24	1(4.2)	1						
	G	24	1(4.2)		1					
木曽川小計		168	44(26.2)	15	13	1	2	20	6	2
長良川	H	24	1(4.2)	1						
	I	24	4(16.7)	1	2			1	1	
	J	24	2(8.3)	2	1					
	K	24	3(12.5)	1				2		
	L	24	3(12.5)					3		
	M	24	18(75.0)	8	8			5	4	
長良川小計		144	31(21.5)	13	11	0	0	11	5	0
計		312	75(24.0)	28	24	1	2	31	11	2

表2　O群（Ogタイプ）別検体数

O血清群 Og typing	O25 *NT	OUT Og25	小計	OUT OgUT	O1 NT	O20 NT	O8 NT	O86a NT	OUT Og9	OUT OgGp7	OUT Og102	O15 NT	OUT Og16	OUT Og4	その他
木曽川水系	13	4	16	4	4	3	3	3	4	3	2	1	1	2	**8
長良川水系	7	3	10	3	2	3	3	3	1	0	1	2	2	0	***7
計	20	7	26	7	6	6	6	6	5	3	3	3	3	2	15

*未実施　**その他　O6, O15, Og21, O44, Og75, Og140, Og149, OgGp9 各1検体 ***その他　O18, O78, O114, Og7, Og61, OgGp8, OgGp15　各1検体

CTX-M-1 group の 28 検体（9.0%），CTX-M-1 group＋TEM 型の 24 検体（7.7%）の順に多い結果となった．

水系別で比較すると，木曽川水系で 168 検体中 CTX-M-1 group が 15 検体（8.9%），CTX-M-1 group＋TEM 型が 13 検体（7.7%），CTX-M-9 group が 20 検体（11.9%）で検出された．長良川水系では 144 検体中 CTX-M-1 group が 13 検体（9.2%），CTX-M-1 group＋TEM 型と CTX-M-9 group が 11 検体（7.6%）で検出された．単独の地点でのみ検出された ESBL 遺伝子は C 地点の SHV 型（2 検体），E 地点の CTX-M-8/25 group（2 検体），B 地点の CTX-M-2＋TEM 型（1 検体）であった．

3. 2　0 群別（0g タイピング）

75 検体より釣菌した株（1 検体あたり 1～10 株）の O 群別（Og タイピング）の結果を表 2 に示す．複数の O 群（Og タイプ）を検出した検体があるため数の重複があるが，木曽川水系，長良川水系の両

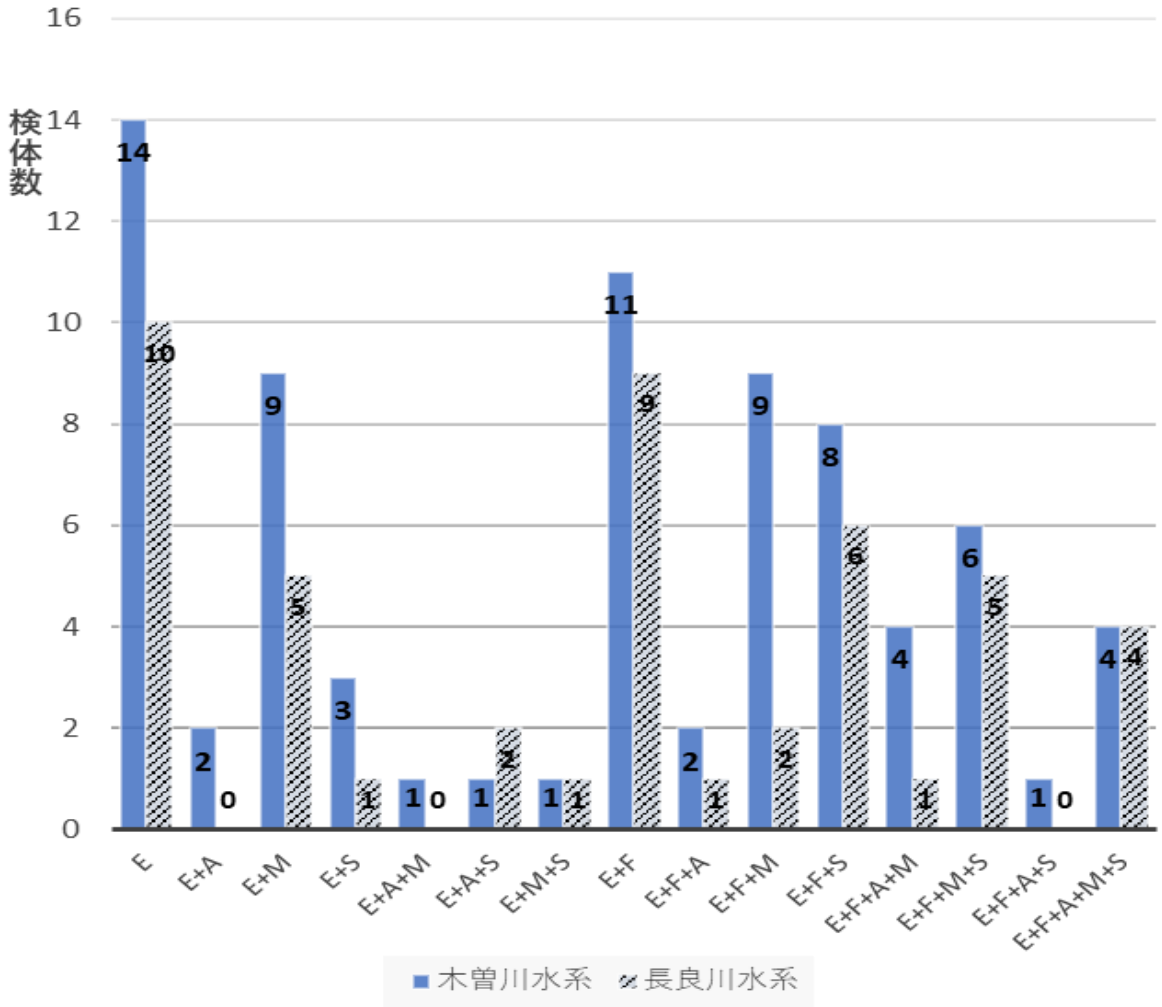


図3　薬剤感受性試験結果

75 検体の薬剤感受性試験を実施した，薬剤耐性パターンごとの株が検出された検体数を示す．
（1 検体より複数の薬剤耐性パターンを示した株があるため，検体数に重複あり）
ESBL：ESBL 産生株　F：フルオロキノロン系薬剤耐性株　A：アミノグリコシド系薬剤耐性株
M：モノバクタム系薬剤耐性株　S：ST 合剤耐性株

表3　採水地点別ESBL遺伝子タイプ

採水場所		ESBL遺伝子タイプ
木曽川	A	CTX-M-27 (2)
	B	CTX-M-2 (1), CTX-M-14 (1)
	C	CTX-M-15 (3), CTX-M-55 (1), CTX-M-156 (1) CTX-M-14 (1), CTX-M-24 (1) SHV-12 (2)
	D	CTX-M-15 (6), CTX-M-55 (5), CTX-M-79 (1), CTX-M-156 (1) CTX-M-14 (1), CTX-M-24 (1), CTX-M-27 (3), CTX-M-65 (1)
	E	CTX-M-15 (4), CTX-M-55 (3), CTX-M-88 (1) CTX-M-27 (10), CTX-M-14 (2), CTX-M-24 (2) CTX-M-8 (2)
	F	CTX-M-15 (1)
	G	CTX-M-3 (1)
長良川	H	CTX-M-15 (1)
	I	CTX-M-55 (2), CTX-M-15 (1), CTX-M-156 (1) CTX-M-27 (1), CTX-M-14 (1)
	J	CTX-M-88 (1) CTX-M-101 (1)
	K	CTX-M-15 (1) CTX-M-27 (2)
	L	CTX-M-14 (2), CTX-M-27 (1)
	M	CTX-M-15 (9), CTX-M-55 (6) CTX-M-27 (6), CTX-M-14 (3)

（）内は検出検体数

方でO25（Og25）が最も多く，木曽川水系では7地点中2地点で検出され，長良川水系では6地点中5地点で検出された．木曽川水系ではESBL遺伝子保有大腸菌が検出された44検体中16検体（36.4%），長良川水系では31検体中10検体（32.2%）だった．その他，O1，O8，O15，O20，O86a，Og9及びOg102が共通して両水系から検出された．

3.3　薬剤感受性試験

結果を図3に示す．薬剤への耐性の組み合わせにより15種類のパターンに分けられた．全株がESBL産生菌であり，さらにフルオロキノロン系薬剤にも耐性を示した株が多く，木曽川水系では44検体中31検体（70.4%），長良川水系では31検体中19検体（61.3%）であった．今回の調査でカルバペネム系薬剤に耐性を示す株は認められなかった．

3.4　ESBL遺伝子のタイプ決定

結果を表3に示す．スクリーニングPCRでTEM型と判定された株はダイレクトシーケンスの結果ESBLではなくペニシリナーゼだった．CTX-M-1group ではCTX-M-15（26検体）が，CTX-M-9 groupではCTX-M-27（25検体）が両水系にて最も多い結果となった．CTX-M-1 groupではCTX-M-15，CTX-M-55及びCTX-M-88，CTX-M-9 groupではCTX-M-27とCTX-M-14を両水系から共通して検出された．またCTX-M-2 groupの1株はCTX-M-2，CTX-M-8/25groupの2株はいずれもCTX-M-8，SHV型の2株はいずれもSHV-12にタイピングされた．

3.5　O25(Og25)の追加解析

O25（Og25）の株の追加解析の結果を表4示す．

B2-O25b-ST131-*fimH30*（パンデミッククローン）の株が8地点26検体中7地点の25検体で検出された．4地点の26検体中6検体からは上記のパンデミッククローンの特徴を示さない株（non-B2-O25b-ST131-*fimH30*）も検出された．B2-O25b-ST131-*fimH30* の株ではすべてフルオロキノロン系薬剤に耐性，non-B2-O25b-ST131-*fimH30* では6検体中1検体のみがフルオロキノロン系薬剤に耐性の株であった．ESBLタイプ別では，B2-O25b-ST131-*fimH30* では5種類のESBL遺伝子が検出されCTX-M-27が最も多かった．non-B2-O25b-ST131-*fimH30* では4種類のESBL遺伝子が検出された．CTX-M-27保有株はすべてB2-O25b-ST131-*fimH30* と判定され，逆にCTX-M-55保有株では non-B2-O25b-ST131-*fimH30* のみであった．

3.6　PFGEによる系統解析

O25（Og25）25株の結果を図4，O25以外のO群18株の結果を図5に示す．O25（Og25）株は類似度59.5%～97.1%の範囲で，最も高い類似度はE地点の2022年10月と12月採取株の97.1%だった．またO25以外の菌株ではOg4株の2株中2株，Og16株の3株中2株（2022年4月と5月採取株）は類似度100%，Og9株の5株中2株（D地点2022年9月と10月採取株）は類似度100%，この2株と同地点で2022年11月採取株は類似度97.1%，O20株の4株中3株（M地点2022年1月，6月及び7月採取株）は類似度100%，この3株と採取地点の異なるD地点1株（2023年7月採取株）は類似度96.8%と高い類似度を示した．

4　考　察

2021年8月～2023年8月の2年間，岐阜県内の河川水にてESBL遺伝子保有大腸菌の調査を行ったところ，312検体中75検体（24.0%）よりESBL遺伝子保有大腸菌を検出した．2019年の浦野ら[19]（多摩川流域で1株）や，2021年の増田ら[3]（広島県内31株）の報告においても河川水よりESBL遺伝子保有大腸菌の検出が報告されており，他県の河川水だけでなく岐阜県内の河川水にも薬剤耐性菌が拡散していることが明らかになった．採水地点別に比較すると，市街地近くの河川下流域（地点D，E，M）での検出率が高く，上流域での検出率が低かった．

またO群別の結果では世界的に拡散し問題になって

表4　O25(Og25)の追加解析結果

採水場所	採水年月	B2-O25b-ST131-*fimH30*	フルオロキノロン感受性	ESBL遺伝子
A	2021年9月	**Y**	**R**	CTX-M-27
D	2021年9月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2022年2月	**Y**	**R**	CTX-M-15
				CTX-M-27
	2023年5月	**N**	**S**	CTX-M-55
E	2021年10月	**Y**	**R**	CTX-M-24
	2022年1月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2022年2月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2022年8月	**N**	**R**	CTX-M-55
		Y	**R**	CTX-M-24
	2022年10月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2022年12月	**N**	**S**	CTX-M-14
		Y	**R**	CTX-M-27
	2023年1月	**Y**	**R**	CTX-M-88
	2023年2月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2023年3月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2023年4月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2023年5月	**Y**	**R**	CTX-M-15
				CTX-M-27
	2023年4月	**Y**	**R**	CTX-M-27
I	2021年11月	**Y**	**R**	CTX-M-14
	2022年12月	**Y**	**R**	CTX-M-27
J	2023年2月	**N**	**S**	CTX-M-88
K	2021年11月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2022年2月	**Y**	**R**	CTX-M-27
L	2023年4月	**Y**	**R**	CTX-M-27
M	2022年12月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2023年5月	**Y**	**R**	CTX-M-27
	2023年7月	**N**	**S**	CTX-M-15
		Y	**R**	CTX-M-27
	2023年8月	**Y**	**R**	CTX-M-27
		N	**S**	CTX-M-14

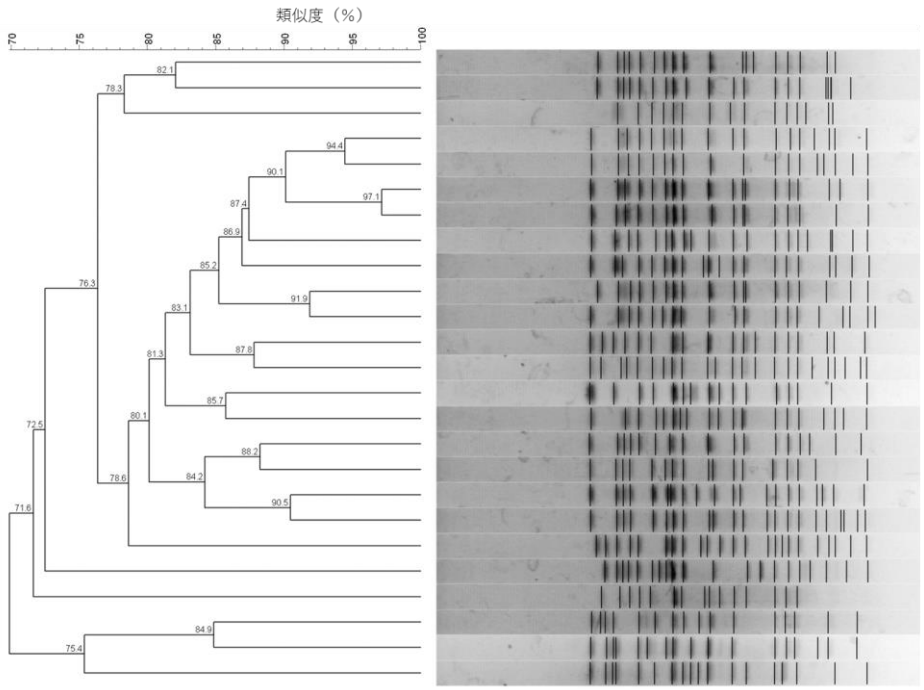
N : non-B2-O25b-ST131-fimH30　Y : B2-O25b-ST131-*fimH30*
S : 感性　R : 耐性

いる ST131 の，ESBL 産生大腸菌の優勢 O 血清群である O25（Og25）が最も多く，その他に臨床検体からの分離報告[20, 21]のある O1，O20 及び O8 などの菌株が今回の調査でも分離された．このように，市街地近くの河川下流域からの検出率が高かったこと，ヒトの臨床検体で分離報告のある O 血清群が多かったことから，河川水から検出された ESBL 産生大腸菌はヒト由来の大腸菌を反映していると考えられた．

さらに，O25 ST131 の菌株のうち，多剤耐性化し世界中に拡散している特定のクローンはパンデミッククローンと呼ばれ，詳細に特定するためには O25（Og25）株のゲノム解析が必要であるが，簡易的には PCR によって B2 系統に該当するか，血清群 O25b か，ST131 または類縁の ST に属するか，鞭毛遺伝子（*fimH*）型が *fimH30* であるかを確認することで特定ができる．今回，これらの解析を 26 検体由来の O25（Og25）の菌株に実施したところ，パンデミッククローンが示唆される B2-O25b-ST131-*fimH30* の菌株が 25 検体から検出された．さらに，保有している ESBL 遺伝子のタイプは，世界中で拡散している CTX-M-15 に代表される CTX-M-1 group が検出される検体よりも日本で優勢に検出される CTX-M-27 に代表される CTX-M-9 group が検出される検体の方が多かった[22]．これは既報[23, 24]で報告されているものと相違なく，またパンデミッククローンはフルオロキノロン系薬剤に耐性率が高い特徴も一致した．

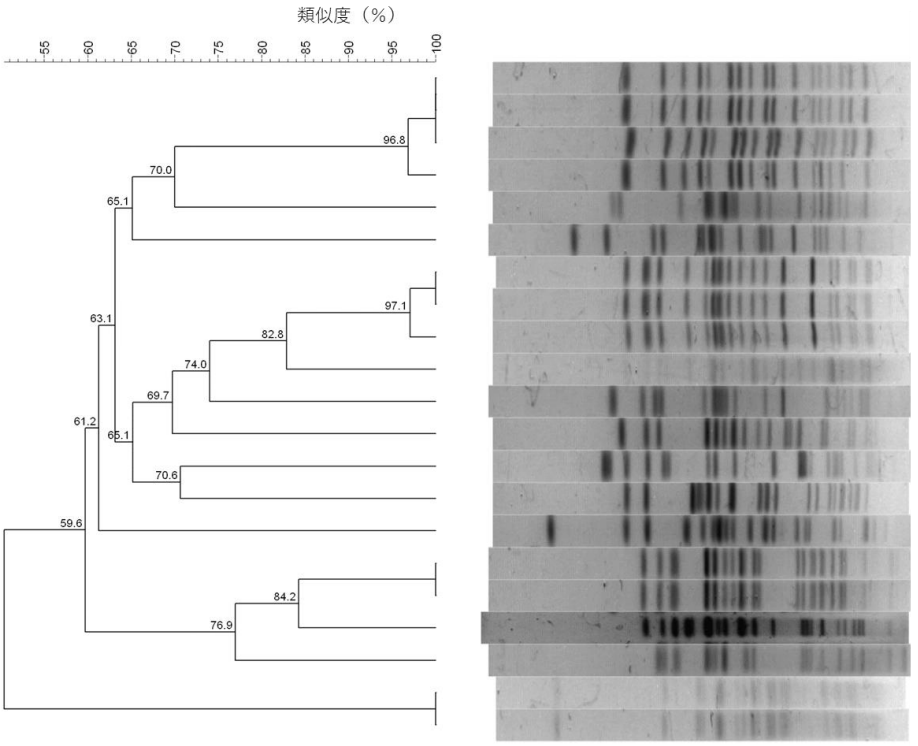
また複数の O 群について，同一プロファイルの ESBL 遺伝子保有大腸菌が同一地点にて複数回検出され，PFGE パターンの類似度が 95%以上を示す菌株も認められたことから，特定の ESBL 保有大腸菌の定着も疑われた．O25（Og25）株の PFGE パターンの類似度は Nakane ら[25]や，八尋ら[26]の報告と同様に高くなく，多様であった．パンデミッククローンが世界中に拡散する中で変異をし多様なパターンを認めたのではないかと推察したが，拡散のメカニズムはまだ解明されていないため，さらなる調査が必要である．

ESBL 遺伝子保有大腸菌は NESID や JANIS 等のサーベランスにおいて全数を把握している耐性菌ではなく，また詳細な解析がされることも少ないため，医療現場や市中での拡散状況の全体像を把握しきれていないと思われる．また野生動物から ESBL 遺伝子保有大腸菌が検出されているという報告[27]もある．今回の調査では岐阜県内の河川水より検出された ESBL 遺伝子保有大腸菌の由来までは解明できておらず，今後ヒトや野生動物由来株との比較検討が必要である．「One Health Approach」で提唱されてい



O群	採取年月	採取地点	ESBLタイプ
O25	2023年3月	E	CTX-M-27
O25	2023年5月	E	CTX-M-27
O25	対象株1 (CRE)		
O25	対象株2 (CRE)		
Og25	2022年1月	E	CTX-M-27
Og25	2022年10月	E	CTX-M-27
O25	2022年12月	E	CTX-M-27
O25	2021年 10月	E	CTX-M-24
O25	2023年8月	M	CTX-M-27
O25	2023年2月	E	CTX-M-27
Og25	2021年12月	K	CTX-M-27
O25	2022年2月	D	CTX-M-27
O25	対象株3 (CRE)		
O25	対象株4 (EHEC)		
Og25	2022年2月	K	CTX-M-27
O25	2023年4月	E	CTX-M-27
O25	2023月5月	M	CTX-M-27
Og25	2022年2月	E	CTX-M-27
O25	2022年12月	M	CTX-M-27
O25	2021年9月	D	CTX-M-27
O25	2022年12月	I	CTX-M-27
Og25	2021年11月	I	CTX-M-14
O25	2023年6月	E	CTX-M-27
O25	2023年5月	E	CTX-M-15
O25	2023年1月	E	CTX-M-88

図4　O25(Og25)の25株の解析結果



O群	採取年月	採取地点	ESBLタイプ
O20	2022年1月	M	CTX-M-15
O20	2022年6月	M	CTX-M-15
O20	2022年7月	M	CTX-M-15
O20	2023年7月	D	CTX-M-15
O8	2022年5月	J	CTX-M-101
O20	対象株5 (病原大腸菌)		
Og9	2022年9月	D	CTX-M-55
Og9	2022年10月	D	CTX-M-55
Og9	2022年11月	D	CTX-M-55
Og9	2022年6月	D	CTX-M-65
O8	2022年10月	M	CTX-M-55
O8	2022年7月	E	CTX-M-55
Og9	2023年4月	K	CTX-M-15
O8	対象株6 (EHEC)		
O8	2023年7月	M	CTX-M-55
Og16	2022年4月	M	CTX-M-27
Og16	2022月5月	M	CTX-M-27
Og16	対象株7 (病原大腸菌)		
Og16	2022年9月	A	CTX-M-27
Og4	2021年9月	C	SHV-12
Og4	2022年2月	C	SHV-12

図5　O25以外(O20,O8,Og9,Og16,Og4)の21株の解析結果

るようにヒト，家畜，環境における包括的な薬剤耐性菌の対策の一つとして，環境中の ESBL 遺伝子保有大腸菌の拡散防止・侵淫状況の把握のため継続的な調査が必要と考えられる.

文　献

1) 石井良和：β-ラクタマーゼの機能分類，日本臨床微生物学会，24（3）171-179，2014

2) Jim O'Neill : Antimicrobial Resistance，Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance，Chaired December，2014.

3) 増田加奈子，平塚貴大，秋田裕子ら：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.29，1-6，2021.

4) 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 2018 年度報告書

5） 四宮博人：食品由来薬剤耐性菌のサーベランスのための研究 分担課題「地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離されるサルモレラ，大腸菌，カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査」，厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）平成 31 年～令和元年度分担研究報告書，9-37，2020.

6） Iguchi A，Iyoda S，Seto K，et al. : *Escherichia coli* O-genotyping PCR，a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping，Journal of Clinical Microbiology，53，2427-2432，2015.

7） 検査法ガイド等作成委員会・耐性菌検査法ガイド作成作業部会：耐性菌検査法ガイド，日本臨床微生物学雑誌，27（Supplement 3），131-132，2017.

8） Souhir B, Paola C, Mohamed Salah A，et al. : Antibiotic resistance phenotype and virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolated from animals and animal food products in Tunisia, FEMS Microbiology Letters，365，1-6，2018.

9） Kim Yong Hoon，Joo In Sun，Kim Yoon Jeong，et al. : Detection of CTX-M type ESBL producing *Salmonella* in retail meat in Korea, Journal of Food Hygiene and Safety，29（1），47-52，2014.

10） Magdalena R，Ilona S，Magdalena K，et al. : Charasterization of expended-spectrum-β-lactamases produced by *Escherichia coli* strains isolated from dogs in Poland, Polish Journal of Microbiology，64（3），285-288，2015.

11） Yagi T，Kurokawa H，Shibata N，Shibayama K，Arakawa Y : A preliminary survey of extended -spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan，FEMS microbial Lett，184，53-56，2000.

12） Lathamani K，Subbannayya K : Virulence deter rminant and extended spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital，South India，Journal of Laboratory Physicians，10（2），155-161，2018.

13） Momtaz H，Rahimi E，Moshkelani S : Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran，Veterinarni Medicina，57，193-197，2012.

14） Olivier C，Stephane B，Edouard B : Rapid and determinetion of the *Escherichia coli* phylogenetic group，Applied And Enviromental Microbiology，4555-4558，2000.

15） Aylin C, Brian J, Stephan P, et al. : Escherichia coli sequence type 131（ST131）subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans : Clinical Infections Diseases，57（9），1256-1265，2013.

16） EnteroBase : Protocols used for MLST of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. , http://enterobase.Readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html

17） James R. J，Megan M，Brian J，et al. : Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinarytract infections in Canada，2002 to 2004 : Antimicrobail Agents And Chemotherapy，53（7）2733-2739，2009.

18） 勢戸和子，石川和彦，藤原恵子，竹上修平，小笠原準，横田正春ら：近畿ブロックにおけるパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）型別法の施設間変動について－感染研新プロトコールの試用，新興・再興感染症研究事業平成 15 年度総括・分担研究報告，95-104，2003.

19） 浦野直人，石田真巳，岡井公彦ら：水圏環境における多剤耐性菌の繁殖度調査，科学・技術研究，8（1），13-22，2019.

20） 宮澤廣文，太田美智男，山本優美子ら：尿路感染症における大腸菌の病態，感染症学雑誌，65（3），255-261，1991.

21） 磯崎将博，小林治，星子文香ら：下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌の各種病原因子 26（1），24-29，2016.

22） 荒川宜親：多剤耐性菌の現状，Animus，69，3-10，2011.

23） 前田莉花，原田誠也，小原敦美ら：熊本県の市中における薬剤耐性菌の腸管内保菌調査（第 2 報），熊本県保健環境科学研究所所報，第 52 号，20-25，2022

24） 横田伸一：抗菌薬耐性菌の驚くべき進化と脅威，耳鼻感染症・エアロゾル，4（1），7-13，2016

25） Nakane K，Kawamura K，Goto K，Arakawa Y : Long-Term Colonization by bla_{CTX-M}-Hoboring *Escherichia coli* in Healthy Japanese People Engaged in Food Handing，Applied and Environmental Microbiology, 82（6）, 1818-1827，2016.

26） 八尋俊輔，原田誠也，小原敦美，藺牟田直子ら：熊本県におけるβ－ラクタム系薬耐性腸内細

菌目細菌の保菌状況調査（2015 年 4 月～2020 年 3 月）, 感染症学雑誌, 97 (5), 153-161, 2023.
27) 浅井鉄夫 : ゲノム解析と数理解析を用いた動物の社会生活による薬剤耐性菌の環境汚染の解析，科学研究費助成事業　研究成果報告書.

Detection status of ESBL gene-possession *Escherichia coli* in river water in Gifu Prefecture

Ayako FURUTA，Makiko NODA，Kumiko KIRII*，Chika ADACHI，Takuya MIZUNO，
Takatoshi SUZUKI**，Katsuo KOSHI***，Yoshihiko KAMEYAMA**** and Yukio IMAO

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan
** Hida Region Branch Office, Gifu Prefectural Government : 7-468,Kamioka-motomati,Takayama,Gifu,506-0055,Jpan*
*** Eastern Regional Waterworks Office :2190-12, Kamado, Mizunami, Gifu, 509-6472, Japan*
**** Hida Meat Inspection Office :17-1, Maebaramati, Takayama, Gifu, 506-0048, Japan*
***** Gifu Region Public Health Center Motosu Yamagata Center :5-14-53 Yabuta-minami,Gifu,Gifu,500-8384,Japan*