研究成果報告書

1．研究課題名：環境水由来および水系環境に生息する魚類における薬剤耐性菌の分子遺伝学的解析

2．研究代表者氏名：水野友貴

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

学会発表や論文化を検討中。

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

（1）研究目的

本研究は、水系環境およびそこに生息する魚類を対象として薬剤耐性菌の分離を試み、菌種、抗菌薬に対する表現型および ESBL 遺伝子を検討することを目的とした。魚類の腸管由来のサンプルに加え、河川水由来のサンプルについても ESBL 遺伝子を保有する腸内細菌目細菌の分離解析を実施した。

（2）対象と方法

①分離培養条件の予備検討

河川水由来の薬剤耐性腸内細菌目細菌の分離にあたり、セフォタキシム（CTX）添加 MacConkey 寒天培地を用いた既報の分離方法を参考に、培地の種類、増菌の有無および抗菌薬濃度について予備検討を行った。[1–3]

初期検討では、河川水原水および 5000g、30 分間の遠心により得られた沈渣を Luria-Bertani（LB）液体培地で増菌する方法と、原水および沈渣を生理食塩水（または LB 液体培地）で懸濁した懸濁液を直接培地へ接種する方法を試みた。接種する培地については、Mueller–Hinton 寒天培地および MacConkey 寒天培地を比較検討した。培地へ添加する CTX 濃度については 0.5、1、2、4 μg/mL とし、コロニーの発育状況を比較した。

これらの検討で得られた所見を踏まえ、以降の河川水由来菌株の分離では、河川水を 5,000 × g で 30 分間遠心した後、沈渣を生理食塩水 1 mL に再懸濁し、十分に撹拌した。得られた懸濁液 100 μL を、抗菌薬非添加、CTX 1 μg/mL 添加、シプロフロキサシン（CPFX）1 μg/mL 添加 MacConkey 寒天培地にそれぞれ接種した。

②魚類に関するサンプル採取

図 1 に示す海域において、1 月 21 日・5 月 13 日・8 月 5 日にサンプリングを実施した。採取した魚類について、フロックスワブを用いて肛門部の排泄物を採取し、サンプルとした。[4] サンプルは生理食塩水 1 mL に懸濁し、以降の実験に使用した。

③河川水に関するサンプル採取

図 1 に示す採取地点（北上川、旧北上川、鳴瀬川、砂押川、七北田川、名取川、阿武隈川の 7 ヶ所）においてサンプリングを実施し、採取後速やかに 4℃で冷蔵保存し、24 時間以内に前処理を行った。[5]5,000×g・30 分遠心し、沈渣を生理食塩水 1 mL に再懸濁し、以降の実験に使用した。



図 1. 魚類ならびに河川水の採取地点と主要河川の流路・宮城県内の急性期医療機関の位置関係

魚類および河川水の採取地点と主要河川の流路、宮城県内の主要な急性期医療機関の位置を示す。主要な急性期医療機関は、高度急性期病床と急性期病床の合計が 150 床以上の病院 21 施設とした。[6] 背景地図：地理院タイル（国土地理院）を加工して作成。河川データ：© OpenStreetMap contributors。

④菌株の分離

懸濁したサンプル 100 µL を MacConkey 寒天培地（抗菌薬非含有、CTX 1 µg/mL 含有、CPFX 1 µg/mL 含有）へ播種した。主たる検出対象は、CTX 1 µg/mL に発育（CTX 低感受性と定義）し、かつ乳糖発酵性を示すコロニーとした。発育したコロニーは抗菌薬含有 LB 寒天培地（それぞれ CTX 1 µg/mL、CPFX 1 µg/mL、ゲンタマイシン［GM］4µg/mL、テトラサイクリン［TC］16 µg/mL を含有）へ播種し発育性を観察した。性状や耐性パターンが異なるコロニーを選択し、質量分析（MALDI-TOF MS）で同定を行った。腸内細菌目に分類され、CTX 1 µg/mL での発育が確認できた菌株を解析対象とした。

⑤菌株の解析

既報に基づき ESBL 遺伝子を Multiplex PCR で検出し、遺伝子の型別はシークエンス解析にて行った。ESBL 遺伝子が確認された菌株については、液体培養法（マイクロスキャン WalkAway™）により薬剤感受性試験を行った。[7]

（3）結果

① 分離培養条件の予備検討

LB 液体培地を用いた増菌培養では、多数の細菌が発育し、単一コロニーの分離が困難であった。一方、原水または遠心後の沈渣懸濁液を直接接種する方法ではコロニーの単離が可能であったものの、Mueller–Hinton 寒天培地では *Bacillus* 属や *Enterococcus* 属など、グラム陽性菌が多く分離され、グラム陰性菌の検出は困難であった。このことから、選択培地としては、グラム陽性菌の発育を抑制し、乳糖発酵性の可視化により腸内細菌目細菌とブドウ糖非発酵菌を容易に識別することが可能な MacConkey 寒天培地を選択培地として採用した。

MacConkey 寒天培地を用いた高砂橋由来河川水の予備検討では、CTX 濃度 0.5～4 μg/mL の範囲で典型的な乳糖発酵性コロニーはほとんど認められなかった。以上の結果を踏まえ、増菌培養を行わず、遠心濃縮した検体を MacConkey 寒天培地に直接接種する方法を採用した。

② 魚類由来検体

1 月 21 日に *Gadus macrocephalus*（真鱈） 3 匹、5 月 13 日に *Pennahia argentata*（イシモチ） 1 匹および *Sebastes*（ソイ） 1 匹、8 月 5 日に *Pennahia argentata* 1 匹および *Sebastes* 1 匹から総排泄腔スワブを採取し、計 7 検体の培養検討を行った。

魚類計 7 検体では、CTX 低感受性と乳糖発酵性の両条件を満たすコロニーは確認できず、Pseudomonas 属、Shewanella 属、Aeromonas 属などのブドウ糖非発酵菌や腸内細菌目以外の細菌が検出された。（表 1）

表 1. 魚類由来総排泄腔スワブの採取と対象コロニーの確認状況

採取月日	魚種	検体数	対象コロニー
1 月 21 日	*Gadus macrocephalus*	3	検出できず
5 月 13 日	*Pennahia argentata*・*Sebastes*	各 1（計 2）	検出できず
8 月 5 日	*Pennahia argentata*・*Sebastes*	各 1（計 2）	検出できず
合計		7	検出できず

③ 河川水由来菌株の分離と抗菌薬含有条件での発育

7 地点から計 55 株（TH29～TH83）を分離した。CTX 1 μg/mL 含有培地で 28 株、CPFX 1 μg/mL で 1 株、TC 16 μg/mL で 7 株が発育し、GM 4 μg/mL で発育した株は認められなかった。地点別の内訳を表 2 に示す。

表 2. 河川水由来保存株の採水地点別内訳と抗菌薬含有培地での発育株数

採水地点	保存株	CTX 1	CPFX 1	TC 16
北上川	8	5	0	0
旧北上川	9	7	0	0
鳴瀬川	9	5	1	1
砂押川	2	0	0	0
七北田川	9	5	0	0
名取川	10	5	0	2
阿武隈川	8	1	0	4
合計	55	28	1	7

注：各薬剤濃度は μg/mL。GM 4 μg/mL では 55 株すべて発育なし。

④ MALDI TOF-MS による菌種同定

分離した 55 株について、MALDI TOF-MS により菌種同定を行ったところ、腸内細菌目 33 株、*Aeromonas* 属 21 株、*A. soli* 1 株が同定された。同定された腸内細菌目 33 株には、*Klebsiella* 属、*Citrobacter* 属、*Enterobacter* 属、*Kluyvera* 属など多様な菌種を含んでいた（表 3）。

表 3. 河川水から分離・保存した腸内細菌目 33 株の菌種構成

属	株数	菌種（株数）
Klebsiella	9	*K. variicola* (4), *K. oxytoca* (4), *K. pneumoniae* (1)
Citrobacter	6	*C. freundii* (5), *C. braakii* (1)
Enterobacter	4	*E. asburiae* (3), *E. roggenkampii* (1)
Kluyvera	4	*K. ascorbata* (2), *K. cryocrescens* (2)
Raoultella	4	*R. ornithinolytica* (4)
Kosakonia	3	*K. cowanii* (3)
Serratia	2	*S. fonticola* (2)
Cronobacter	1	*Cronobacter* sp. (1)
合計	33	

⑤ ESBL 遺伝子および詳細薬剤感受性

CTX 1 μg/mL 含有培地で発育した腸内細菌目 18 株について Multiplex PCR による ESBL 遺伝子の検出を行った所、阿武隈川のサンプルより分離された *K. ascorbata*（TH82）より $bla_{\text{CTX-M-2 group}}$ が検出され、シークエンス解析の結果、$bla_{\text{CTX-M-270}}$ と同定された。TH82 の最小発育阻止濃度（MIC）を表 4 に示す。

表 4. TH82（K. ascorbata）の MIC

薬剤	MIC
ABPC	>16
ABPC/SBT	<8/4
PIPC/TAZ	<8
CEZ	>16
CMZ	<16
CAZ	<1
CPDX	<1
CPDX/CVA	<1
LMOX	<8
FMOX	<8
CTRX	>2
CFPM	<2
AZT	<4
MEPM	<0.12
FRPM	<0.12
FOM	>16

（4）考察

今回、水系環境およびそこに生息する魚類を対象として ESBL 産生腸内細菌目細菌の分離を試みた。魚類の総排泄腔スワブから目的とする細菌は検出されなかったが、河川水からは *bla*$_{CTX-M-207}$ を保有する *K. ascorbata* が検出された。

魚類由来サンプル 7 検体からは目的菌を検出できなかったが、対象とした菌群の生態学的な分布が関係している可能性がある。海産魚の消化管細菌叢は周囲の環境水の細菌群集とは必ずしも一致せず、宿主の種類、食性、採取地点などに依存して変化することが報告されている。[8] また、野生海産魚の体表・鰓・腸管などの細菌叢は相互に異なり、季節・環境要因の影響も受ける。[9] このような周囲の環境と魚類の体内（総排泄腔サンプル）では分離される菌種が異なるため、ESBL 産生腸内細菌目細菌を対象とした今回の検討では魚類由来サンプルから目的菌が検出されなかった可能性がある。

また、今回の検討では魚類由来サンプルより *Pseudomonas* 属、*Shewanella* 属、*Aeromonas* 属が検出された。先行研究では、*Shewanella algae* が *qnrA* 様遺伝子や OXA-55 β-ラクタマーゼ遺伝子を保有すると報告されており、[10,11] 環境水より分離された Aeromonas 属がインテグロンやトランスポゾンを保有するという報告もある。[12] このような報告からは、今回分離された非腸内細菌目細菌が ESBL を含む耐性遺伝子を保有・プールとして振る舞う可能性はあると考えられる。

河川水サンプルからは 33 株の腸内細菌目が分離され、その菌種は *Klebsiella*、*Citrobacter*、*Enterobacter*、*Kluyvera*、*Raoultella*、*Kosakonia*、*Serratia*、*Cronobacter* 属と多様であった。先行研究では、ドイツの環境水から *Escherichia coli*、*Enterobacter cloacae* complex、*Citrobacter* 属、*Klebsiella pneumoniae* などの多剤耐性菌が分離され、CTX-M 型 ESBL に加えて KPC 型、VIM 型などのカルバペネマーゼ遺伝子が検出されたと報告されている。[13] 今回の検討でも、共通する複数の属が分離されており、河川環境における薬剤耐性菌の評価においては大腸菌のみならず他の菌種も評価対象とすることが有用な可能性があると考えられた。

河川水中における耐性菌の分布を考えるうえでは、菌種の多様性に加え、それぞれの菌株が保有する耐性遺伝子の伝達性が重要となる。先行研究では、ポルトガルの河川から *Klebsiella*、*Enterobacter*、*Raoultella* に属するカルバペネム耐性腸内細菌目細菌を分離し、*Klebsiella* および *Raoultella* では *bla*$_{KPC}$、*Enterobacter* では *bla*$_{NDM}$ が検出され、一部の *Klebsiella* 分離株で接合伝達が成立したと報告されている。同様に、灌漑用水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌を対象とした接合伝達実験で、*E. coli* 11 株中 5 株において ESBL 遺伝子の伝達性が確認されており、[14,15] 水環境においても耐性遺伝子の水平伝播が生じうると考えられ、今回の検討で検出された菌種の一部も水平伝播による耐性遺伝子を収受する可能性があると考えられた。

河川には生活排水や農業排水などを介して多様な細菌が流入するため、薬剤耐性菌の移動経路としての役割に加え、異なる宿主に保持された耐性遺伝子が同一の水環境に持ち込まれる場としての側面も考えられる。本研究で分離された菌種には、臨床感染症の原因菌として重要な菌種に加えて、環境中にも広く分布する菌種が含まれていた。こうした菌種構成を踏まえると、河川環境における耐性遺伝子の拡散を評価するには、個々の菌株の耐性表現型のみならず、保有するプラスミドや可動性遺伝因子の特徴を明らかにし、菌種間での共有や伝達の可能性を検討することが重要と考えられた。

本研究では、阿武隈川由来の *K. ascorbata*（TH82）から *bla*$_{CTX-M-270}$ が検出された。*K. ascorbata* は一部の CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子の起源と考えられており、[16] 先行研究でもヒト喀痰由来の *bla*$_{CTX-M-270}$ を内在する *K. ascorbata* や国内の河川サンプルに由来する染色体性 CTX-M-5 変異型遺伝子保有 *K. ascorbata* が確認されている。[17,18] 今回の TH82 についても、同菌種が染色体性に保有する CTX-M 関連遺伝子を検出した可能性が高いと考えられた。

Kluyvera 属の内在性遺伝子と、臨床的に広く分布するプラスミド性 CTX-M 遺伝子との関連については、遺伝子周辺の可動性遺伝因子が重要な役割を果たしてきたと考えられている。*K. ascorbata* の染色体性 *bla*$_{CTX-M-2}$ は ISEcp1B によってプラスミド上へ移動する可能性が示唆されており、[19] 今回の検討で分離された *bla*$_{CTX-M-207}$ 保有 *K. ascorbata* についても周辺領域の解析が可動性や水平伝播の可能性の評価に有用と考えられた。

本研究で確認された CTX-M-270 は、河川環境に存在する CTX-M 関連遺伝子の多様性を示す結果と位置付けられる。一方、薬剤耐性菌の環境中での拡散という観点からは、むしろ獲得型耐性遺伝子を保有する菌株の分布や、それらを媒介するプラスミドの伝達性が重要である。河川水由来の多様な腸内細菌目細菌について、耐性遺伝子の保有状況とその遺伝的背景を解析することは、河川環境が耐性菌および耐性遺伝子の維持・拡散に果たす役割を明らかにするうえで有用と考えられた。

（5）Limitations

第一に、魚類由来試料については 7 検体を対象とした検討であり、CTX 低感受性かつ乳糖発酵性を示すコロニーは確認されなかった。一方、培養過程では *Pseudomonas*、*Shewanella*、*Aeromonas* などの細菌が分離された。これらの菌種については今回の解析対象としなかったが、*Shewanella* 属は OXA 型 β-ラクタマーゼ、*Aeromonas* 属は多様な β-ラクタマーゼの保有が報告されており、水系環境における耐性遺伝子の分布を検討するうえで興味深い対象である。今後は、魚類由来の腸内細菌目細菌に加えて、これらの環境細菌についても薬剤感受性および耐性遺伝子の解析対象を広げることで、魚類が保有する細菌叢と耐性遺伝子の関係をより包括的に評価できると考えられる。

第二に、今回の河川水由来 55 株は、選択的培養およびコロニー選択によって得られた菌株であり、河川水中における薬剤耐性菌の分布や菌種の多様性を探索することを目的とした検討である。そのため、今回の結果から河川水中の耐性菌の存在量や保有割合を評価することはできない。今後は、定量的な培養方法を導入するとともに、同一地点での経時的な採水や、河川の上流・下流における複数地点での調査を行うことで、耐性菌の分布とその変動を検討することが望まれる。さらに、魚類と周辺環境水を同一地域・時期に採取して分離菌株の菌種構成や耐性遺伝子を比較することで、水系環境と魚類の間における耐性菌の分布の関連性を検討できると考えられる。

（6）総括

魚類由来の総排泄腔スワブ 7 検体では、CTX 低感受性かつ乳糖発酵性のコロニーを確認できなかったが、非標的の水系環境関連細菌が得られた。一方、河川水由来の保存 55 株では、腸内細菌目 33 株を含む多様な菌種と抗菌薬含有培地下での発育を確認し、$bla_{\text{CTX-M-207}}$ を保有する *K. ascorbata* を検出した。本結果は、水系環境に存在する細菌が臨床的に重要な耐性遺伝子の遺伝学的供給源となり得るという既報と整合する。ただし、今回の菌株における遺伝子の所在および伝達性、頻度や経時的変化は未確定であり、今後の検討課題である。

（7）参考文献

1. Jacob ME, Keelara S, Aidara-Kane A, Matheu Alvarez JR, Fedorka-Cray PJ. Optimizing a screening protocol for potential extended-spectrum β-lactamase Escherichia coli on MacConkey agar for use in a global surveillance program. J Clin Microbiol 2020;58(9):e01039-19.
2. Assawatheptawee K, Tansawai U, Kiddee A, et al. Occurrence of extended-spectrum and AmpC-type β-lactamase genes in Escherichia coli isolated from water environments in Northern Thailand. Microbes Environ 2017;32(3):293–6.
3. AbuAlshaar A, Piazza A, Mercato A, et al. OXA-244-producing ST131 Escherichia coli from surface and groundwaters of Pavia urban area (Po Plain, Northern Italy). Front Microbiol 2022;13:920319.
4. Ruiz A, Torrecillas S, Kashinskaya E, Andree KB, Solovyev M, Gisbert E. Comparative study of the gut microbial communities collected by scraping and swabbing in a fish model: a comprehensive guide to promote non-lethal procedures for gut microbial studies. Front Vet Sci

2024;11:1374803.
5. Nobili G, Cocomazzi A, Basanisi MG, et al. Occurrence and genomic characterization of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from surface water in Southern Italy, 2023-2024. Microorganisms 2026;14(2):508.
6.宮城県．令和 7 年度病床機能報告の結果について．2026 年 4 月 20 日公表．Available from: https://www.pref.miyagi.jp/soshiki/iryou/r7byousyoukinouhoukokukekka.html
7. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2010;65(3):490–5.
8. Soh M, Tay YC, Lee CS, et al. The intestinal digesta microbiota of tropical marine fish is largely uncultured and distinct from surrounding water microbiota. NPJ Biofilms Microbiomes 2024;10(1):11.
9. Minich JJ, Petrus S, Michael JD, Michael TP, Knight R, Allen EE. Temporal, environmental, and biological drivers of the mucosal microbiome in a wild marine fish, Scomber japonicus. mSphere 2020;5(3):e00401-20.
10. Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(8):3523–5.
11. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from Shewanella algae. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(5):1670–5.
12. Carnelli A, Mauri F, Demarta A. Characterization of genetic determinants involved in antibiotic resistance in Aeromonas spp. and fecal coliforms isolated from different aquatic environments. Res Microbiol 2017;168(5):461–71.
13. Cimen C, Noster J, Stelzer Y, et al. Surface water in Lower Saxony: A reservoir for multidrug-resistant Enterobacterales. One Health 2023;17(100606):100606.
14. Teixeira P, Tacão M, Henriques I. Occurrence and distribution of Carbapenem-resistant Enterobacterales and carbapenemase genes along a highly polluted hydrographic basin. Environ Pollut 2022;300(118958):118958.
15. Gekenidis M-T, Kläui A, Smalla K, Drissner D. Transferable extended-spectrum β-lactamase (ESBL) plasmids in Enterobacteriaceae from irrigation water. Microorganisms 2020;8(7):E978.
16.β-Lactamases of Kluyvera ascorbata, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types.
17. Liu L, Feng Y, Wen H, Zong Z. The draft genome sequence of blaCTX-M-270-carrying Kluyvera ascorbata isolated from human sputum. Microbiol Resour Announc 2024;13(4):e0001124.
18. Yamamoto T, Shitada C, Kawaguchi T, Narahara S, Kuroda M. Draft genome sequence of CTX-M-5 variant-carrying Kluyvera ascorbata isolated from river water in Kumamoto, Japan. Microbiol Resour Announc 2026;15(4):e0151125.
19. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring β-lactamase gene blaCTX-M of Kluyvera ascorbata.