

下水処理場での第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の動態と薬剤感受性パターン

愛媛大学大学院農学研究科 正会員 ○山下 尚之
愛媛大学大学院農学研究科 正会員 泉 智揮

1. 研究の背景と目的

近年、水環境中における薬剤耐性菌の存在が問題となっているが、特に医療分野における重要性から、第3世代セファロスポリン抗菌薬に耐性を持つ腸内細菌科細菌の存在は重要である。一方、下水処理場はヒトから排出された薬剤耐性菌を含む腸内細菌科細菌を受け入れ、下水処理を行った後に水環境中へ放出しており、下水処理場における薬剤耐性菌の動態や下水中に存在する薬剤耐性菌の特徴に関する基礎データを収集することは重要である。

そこで、本研究では、第3世代セファロスポリン抗菌薬に耐性を持つ大腸菌を研究対象として、下水処理場における存在実態を調べるとともに、下水処理場の各処理プロセスにおける除去効果を明らかにすることを研究の目的とした。また、下水から単離した第3世代セファロスポリン耐性大腸菌について、その薬剤感受性パターンに関する基礎データの収集を行った。

2. 実験方法

下水処理場での採水は、愛媛県内にあるA下水処理場において2022年1月～12月にかけて計12回実施した。A下水処理場では、標準活性汚泥法による生物処理が行われている。流入下水、最初沈殿池越流水（初沈越流水）、最終沈殿池越流水（終沈越流水）、放流水からスポット試料を採取した。第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の培養は、下水試料1mLをシャーレに分注し、セフトキシム（CTX）を添加したXM-G寒天培地（日水製薬）を用いて35℃で20時間培養した。また、低濃度の試料については、試料を滅菌済みMF膜（Millipore）に通水した後にシャーレに移し、XM-G寒天培地を用いて培養した。それぞれ得られた青色コロニー数をもとに大腸菌濃度を算出した。また、培養後、培地上に生育した大腸菌と考えられる青色コロニーを釣菌し、寒天培地上に画線培養した後、大腸菌株の単離を行った。単離を行った大腸菌株について、クラブラン酸（CVA）およびボロン酸（APB）を利用したディスク法により、ESBL（基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ）産生およびAmpCβ-ラクタマーゼ産生の確認試験を実施した。また、KBディスク（栄研化学）を用いたディスク拡散法により薬剤感受性試験を実施し、CTX耐性大腸菌の薬剤感受性パターンを調べた。

3. 結果と考察

(1) 下水処理場における第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の存在実態と除去効果

下水処理場におけるCTX耐性大腸菌の存在実態を図1に示す。CTX耐性大腸菌について、流入下水および初沈越流水では、 3.6×10^3 CFU/mL程度の濃度であり、最初沈殿池前後では、あまり濃度変化は見られなかったが、終沈越流水では 1.3×10^1 CFU/mLまで濃度が低下し、大きな減少が見られた。また、塩素処理後の放流水では、 4×10^{-2} CFU/mL以下まで濃度低下が見られた。一方、全大腸菌に対するCTX耐性大腸菌の割合は、流入下水では7.6%となった。下水処理場でのCTX耐性大腸菌の除去効果について、最初沈殿池では、ほぼ除去されなかったが、活性汚泥による生物処理では2.7-logの除去率となった（図2）。また、消毒プロセスである塩素処理では2.7-logの除去率となり、活性汚泥と塩素処理によって、合計5.4-logの除去率となった。

(2) 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌によるβ-ラクタマーゼ産生と薬剤感受性パターン

流入下水から単離したCTX耐性大腸菌株について、ESBL（基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ）産生を調べたところ、単離株の69%についてESBLの産生が確認された。一方、AmpCβ-ラクタマーゼについては、単離

キーワード 第3世代セファロスポリン, ESBL, AmpCβ-ラクタマーゼ, 薬剤耐性菌, 下水処理場
連絡先 〒790-8566 愛媛県松山市榑味3-5-7
愛媛大学大学院農学研究科生物環境学専攻 TEL 089-946-9205

株の 30%から産生が確認された。従って、下水中に存在する第3世代セファロスポリン耐性大腸菌について、ESBL 産生大腸菌が主なものであるが、3割程度は AmpC β -ラクタマーゼ産生大腸菌が存在していることが確認された。また、ESBL と AmpC β -ラクタマーゼを同時生産する大腸菌株も、僅かながら確認された。AmpC β -ラクタマーゼ産生大腸菌は、ESBL 産生大腸菌とは抗菌薬に対する薬剤感受性が異なり、また感染症治療に対して用いられる β -ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸等の影響を受けないため、その存在に対しては注意が必要であると考えられる。

流入下水から単離した CTX 耐性大腸菌について薬剤感受性パターンを調べた。 β -ラクタム系抗菌薬に関する薬剤感受性パターンを図3に示す。ABPC、CEZ、CPDX および CTX に対する耐性率は、ほぼ 100%であった。しかし、CTX と同じ第3世代セファロスポリン抗菌薬である CAZ に対する耐性率は 45%であった。一方、セファマイシン系 CMZ やオキサセフェム系 FMOX、カルバペネム系抗菌薬 (IPM, MEPM) に対する耐性率は非常に低いという結果になった。ESBL 産生大腸菌による感染症に対しては、カルバペネム系抗菌薬が治療の中心となっているが、医療分野ではセファマイシン系抗菌薬である CMZ の適用性について検討がなされており、第3世代セファロスポリン耐性大腸菌に対する CMZ の有効性が示唆される結果となった。

β -ラクタム系以外の抗菌薬に対する薬剤感受性パターンについて、フルオロキノロン系抗菌薬の CPFX および LVFX への耐性率は、70%程度と高い値が示された。医療分野における ESBL 産生大腸菌の世界的な拡散については、ST131 O25:H30R といった特定の大腸菌クローンの拡散が影響していることが示唆されている。この大腸菌クローンはフルオロキノロン耐性を持つという特徴を有しており、下水中に存在する第3世代セファロスポリン耐性大腸菌についても、上記大腸菌クローンの存在とフルオロキノロン耐性遺伝子の拡散が懸念される。

4. まとめ

本研究では、第3世代セファロスポリン耐性大腸菌を研究対象として、下水処理場における動態を明らかにした。その結果、下水処理プロセスによって、流入下水に含有される第3世代セファロスポリン耐性大腸菌は大きく低減されることが確認された。また、下水から単離した第3世代セファロスポリン耐性大腸菌について、ESBL 産生大腸菌が主なものであるが、3割程度は AmpC β -ラクタマーゼ産生大腸菌が存在していることが確認された。

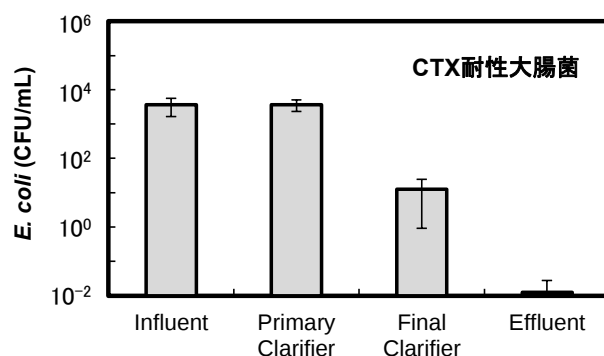


図1 下水処理場における CTX 耐性大腸菌の存在実態

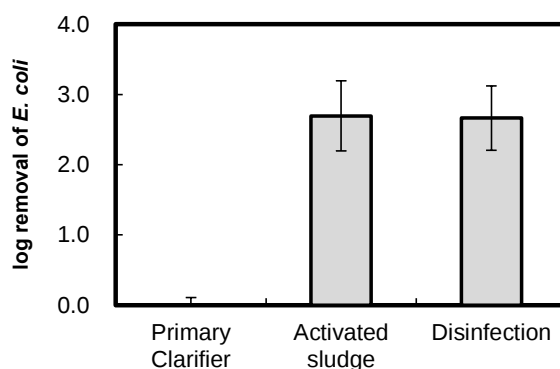


図2 下水処理場における CTX 耐性大腸菌の除去率

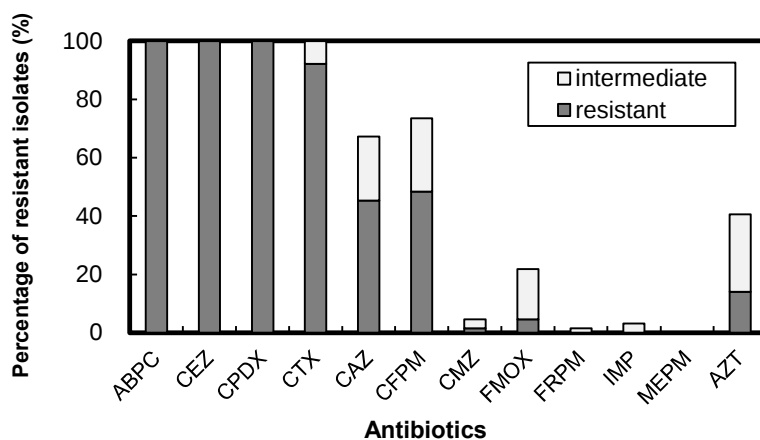


図3 CTX 耐性大腸菌の薬剤感受性パターン(β -ラクタム系抗菌薬)