

MLST を用いたチャオプラヤ川流域における薬剤耐性大腸菌の遺伝学的特徴の解析

山形大学農学部 正会員 ○西山正晃, 渡部徹, ガジャマダ大学食品工学科 非会員 Prayoga Windra
金沢大学理学工学域 正会員 本多了, カセサート大学工学部 非会員 Chiemchaisri Chart, Chiemchaisri Wilai

1. はじめに

抗生物質は、細菌感染症の予防・治療のための医療目的だけでなく、畜産業、水産業、農業でも使用される。多岐にわたる薬剤の使用に伴って、環境中への薬剤耐性菌の拡散が問題となっている。東南アジア諸国では、社会基盤整備の遅れによって、下水が十分に処理をされず、未処理のまま水環境に放流されることは少なくない。上記の国々では、処方箋がなくとも薬局で抗生物質を容易に購入できるため、不適切な抗生物質の使用に伴って患者の体内で薬剤耐性菌が発生し、それらが水環境に排出される危険性がある。我々の研究グループでは、タイの首都バンコクを流れるチャオプラヤ川流域を対象として、薬剤耐性大腸菌の実態調査を行ってきた。これまでに、河川流域から単離した大腸菌の 52% (206 株/396 株) がテトラサイクリンに耐性を獲得していること¹⁾、テトラサイクリン耐性遺伝子の中でも *tet(A)* と *tet(B)* の検出割合が多いこと²⁾などを明らかにしている。本研究では、チャオプラヤ川流域から単離した薬剤耐性大腸菌について遺伝子学的特徴を解析し、薬剤耐性の有無との関連性を調査した。

2. 実験方法

2. 1 調査地点と対象菌株の選定

試料は、2011 年 1 月にチャオプラヤ川およびその支流の 34 地点から採取した。各サンプリング地点から選択培地を使用して単離した大腸菌について、16S rRNA 遺伝子の配列情報に基づいて大腸菌を同定した。同定された大腸菌株について、KB ディスクを用いた薬剤感受性試験を実施した。調査地点、大腸菌の分離培養、薬剤感受性試験、耐性遺伝子の検出方法に関する詳細は、以前に報告した文献を参考されたい¹⁾。本研究は、この際に薬剤耐性や耐性遺伝子をプロファイリングした大腸菌 316 株のうち、5 つ以上の耐性遺伝子を保有し、かつ 4 薬剤以上の抗菌薬に耐性を示した多剤耐性大腸菌 10 株を用いて、以下の解析を実施した。

2. 2 MLST 解析の実験

図 1 に示す多剤耐性大腸菌 10 株について、Multilocus Sequence Typing (MLST) を実施した。MLST は、細菌が生存するための必須遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）をタイピングして、既存のデータベースと比較する分子疫学解析の手法である。各ハウスキーピング遺伝子の決定は以下のように行った。単離・同定された大腸菌株の DNA を、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて付属のプロトコルに準じ抽出した。抽出した DNA について、7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) を対象とした PCR 反応を行った。反応液には、11.5 μ L のヌクレアーゼフリー水、2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 1.5 μ L の 25 mM MgSO₄, 2.5 μ L の 2 mM dNTPs, 0.75 μ L の各プライマー, 0.5 μ L の KOD-Plus-Neo (1.0U/ μ L), 5 μ L のテンプレート DNA を加え、全量を 25 μ L とした。反応条件は 95 $^{\circ}$ C で 2 分間の変性処理後、90 $^{\circ}$ C で 1 分間、各条件のアニーリングで 1 分間、および伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 2 分間とし、30 サイクル行い、最終伸長反応を 5 分間行った。反応後、2.0%アガロースゲルで電気泳動を行い、PCR 産物を切り出した。切り出したゲルは、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて生成を行い、シーケンス反応を行った。シーケンスは、PCR 産物に対応するプライマーを使用して、各ハウスキーピング遺伝子の配列データを取得した。

得られた 7 つのハウスキーピング遺伝子の配列情報は、The University of Warwick の大腸菌の MLST データベース (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>) にアクセスして照合することによって、それぞれの菌株の Sequence Type (ST) と ST complex を同定した³⁾。

キーワード：薬剤耐性菌、大腸菌、ジェノタイピング、MLST、河川水

住所：山形県鶴岡市若葉町 1-23、Tel: 0235-28-2894, Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

菌株名	薬剤耐性パターン							検出された耐性遺伝子	MLST		
	OFX	NFX	LVX	AMX	TC	DOT	ST	数	種類	Sequence Type	ST Complex
CH24-18								10	<i>qnrS, ampC, bla TEM, dfr A12, dfr A17, sul I, sul II, tet(A), tet(B), tet(M)</i>	ST359	None
CH31-4								9	<i>ampC, bla TEM, dfr A1, sul I, sul II, oqx A, oqx B, bla SHV, tet(A)</i>	ST156	ST156 Complex
CH28-18								8	<i>bla TEM, dfr A1, dfr A12, sul I, sul II, oqx A, tet(A), tet(B)</i>	ST215	ST10 Complex
CH18-10								7	<i>ampC, bla TEM, dfr A12, sul I, sul II, bla SHV, tet(D)</i>	ST38	ST38 Complex
CH10-11								6	<i>qepA, ampC, bla TEM, dfr A12, sul I, tet(B)</i>	ST295	None
CH10-8								6	<i>ampC, bla TEM, dfr A17, sul I, sul II, tet(D)</i>	ST38	ST38 Complex
CH24-10								6	<i>qnrS, ampC, bla TEM, dfr A12, sul II, tet(A)</i>	ST7463	None
CH28-17								6	<i>ampC, bla TEM, dfr A12, sul I, tet(A), tet(B)</i>	ST201	ST469 Complex
NA02-4								6	<i>ampC, bla TEM, dfr A12, sul I, sul II, tet(B)</i>	ST1121	None
CH24-1								5	<i>qnrS, ampC, bla TEM, dfr A12, tet(B)</i>	ST34	ST10 Complex

図1 チャオプラヤ川流域から単離した薬剤耐性大腸菌の特徴と MLST の解析結果; OFX: Ofloxacin, NFX: Norfloxacin, LVX: Levofloxacin, AMX: Amoxicilline, TC: Tetracycline, DOT: Doxycycline, ST: Sulfamethozazole/Trimethoprim, ■: 耐性 □: 感受性

3. 結果と考察

図1に、MLST 解析によって得られた ST を示す。図1に示す薬剤耐性大腸菌の薬剤耐性パターンは、2種類あり、一方はキノロン系（OFX, NFX, LVX）、βラクタム系（AMX）、テトラサイクリン系（TC, DOT）、スルホンアミド系（ST）、他方はβラクタム系、テトラサイクリン系、スルホンアミド系のパターンであった。10株の薬剤耐性大腸菌についてMLSTを実施したところ、9つのSTに同定された。キノロン系、βラクタム系、テトラサイクリン系、スルホンアミド系の耐性パターンを持つ6株についてみると、最も多く耐性遺伝子を保有していたCH24-18株は、ST359に分類された。ST359は、2000年以降に欧米や東南アジアのヒトや動物から分離報告があり、それらの大部分がESBL産生病原大腸菌として報告されている。タイのチャオプラヤ川から、臨床で問題となるSTの薬剤耐性大腸菌の存在が明らかとなった。CH28-18株とCH24-1株は同じST10 Complexに分類されたものの、それぞれST215とST34と異なるSTに分類された。両菌株は同じ薬剤耐性パターンを有しているものの、キノロン系の耐性遺伝子の種類から、機構が異なる耐性機構を有している。その他の3株は、それぞれ異なるSTと判定され、全6株は同一の薬剤耐性を示しても、STはそれぞれ異なった。

次に、βラクタム系、テトラサイクリン系、スルホンアミド系の耐性パターンについてみると、CH18-10とCH10-8はST38に同定された。両菌株の薬剤耐性パターンと保有する耐性遺伝子のグループも同じであることから、同一のクローンであることが推察される。ST38は、ヒト、家禽、水環境からの分離報告があり、環境中にも分布する大腸菌である。CH18-10株は、チャオプラヤ川上流から、CH10-8株は下流から単離している。このことから、上流の地点であるCH18より上流に汚染源があり、下流に流下していると考えられる。

4. まとめ

チャオプラヤ川流域から単離した多剤耐性大腸菌についてMLST解析を実施した結果、臨床から分離報告があるST359が同定された。また、異なる調査地点から単離した菌株は、同一のSTに同定され、薬剤耐性パターンや耐性遺伝子も類似していることから、同一のクローンであると考えられた。今回の解析では多剤耐性大腸菌に注目して分析を進めたが、今後は調査地点ごとの薬剤耐性大腸菌についてMLSTを実施し、流域に分布する大腸菌の遺伝学的特徴と薬剤耐性との関連性を明らかにする予定である

謝辞：本研究は、科学研究費補助金課題番号 16H01782, 15H05223, および 2440417 と JST-SATREPS 課題番号 FAI38B004 の支援を受けた。ここに記して謝辞を表します。

参考文献

- 1) Honda, *et al.* Water Science & Technology, 73(2), 362-364, 2016.
- 2) Ozawa, *et al.* The 5th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, 8-12, 2013.
- 3) Wirth, *et al.* Molecular Microbiology, 60(5), 1136-1151, 2006.