

タイと日本の活性汚泥からのバンコマイシン耐性腸球菌および ESBL 産生大腸菌の検出

山形大学農学部 正会員 ○西山正晃, 渡部徹

カセサート大学工学部 非会員 Chiemchaisri Chart, Chiemchaisri Wilai

1. 目的

抗菌薬は、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、および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、処方箋がなくても薬局で抗生物質を容易に購入できるため、不適切な抗菌薬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。

これまでに、薬剤耐性菌に関する情報は、医療機関と畜産場からの報告例が大部分であり、多くの情報が蓄積されている^{1,2)}。アメリカの CDC では、院内感染の原因となる重要な薬剤耐性菌として、細菌の頭文字をとった ESKAPE グループを提唱しており、注視すべき耐性菌としてサーベイランスが実施されている。ヒト腸管内で発生した耐性菌は、生活環境から排出される汚水とともに必然的に下水処理施設に集積しており、既往の研究では、活性汚泥処理過程で一部の耐性菌が増殖する可能性が指摘されている³⁾。本研究では、タイと日本における下水処理場の活性汚泥を対象として、ESKAPE グループ細菌であるバンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci, VRE) と ESBL (Extended-spectrum β -lactamase) 産生大腸菌の両細菌の調査を実施した。

2. 実験方法

2. 1 調査地点の概要

活性汚泥試料は、タイのバンコク市と、山形県鶴岡市の下水処理施設の反応槽から汚泥混合液として採取した。タイの下水処理施設は、2つの下水処理施設から採取した (BS と KU)。BS はバンコク市の都市下水処理であり、最大日処理能はそれぞれ 150,000 m³/day である。KU は大学構内に設置された処理施設である。鶴岡の下水処理場 (TSU) は標準活性汚泥法が採用されており、最大日処理能は 49,600 m³/day である。試料は、2018 年 9 月に採取し、採取後 6 時間以内に細菌の計数を実施した。

2. 2 細菌計数法

腸球菌数と大腸菌数は、メンブランフィルター法によって計数した。採取した各サンプルを適宜希釈した後、メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m, Advantec) で吸引ろ過した。そのフィルターを腸球菌の計数には選択培地である membrane- Enterococcus Indoxyl - β -D-Glucoside 寒天培地上に置き、41°C で 24 時間培養した。一方、大腸菌の計数には、CHROMagar™ ECC (関東化学) を用いた (培養条件: 37°C で 24 時間)。培養後、フィルター上に生育した陽性コロニーをそれぞれ腸球菌と大腸菌として計数した。試料水中の細菌数は、3 連のものを平均し、その平均値をそれぞれの細菌数 (CFU/mL) として表した。

VRE と ESBL 産生大腸菌は、試料を直接選択培地に塗抹する方法によって計数した。VRE と ESBL 産生大腸菌の選択培地には、それぞれ CHROMagar™ VRE と CHROMagar™ ESBL (共に関東化学) を使用した。試料水 100 μ L を両選択培地に塗抹し、37°C で 24 時間培養した。培養後陽性コロニーを計数し、上記と同様の方法で細菌数 (CFU/mL) を算出した。計数後、全腸球菌数に対する VRE の割合と、全大腸菌に対する ESBL 産生大腸菌の割合を算出し、タイと日本における両耐性菌の存在割合を比較した。

キーワード: 薬剤耐性菌, VRE, ESBL, 活性汚泥

連絡先: 山形県鶴岡市若葉町 1-23, Tel: 0235-28-2894, Email: m-nishiyama@tdsl.tr.yamagata-u.ac.jp

3. 結果と考察

表 1 に、タイと日本における VRE と ESBL 産生大腸菌の存在割合の結果を示す。タイの BS における腸球菌と大腸菌はそれぞれ、 $1.6 \pm 0.8 \times 10^3$ CFU/mL と $2.7 \pm 3.1 \times 10^3$ CFU/mL 検出された。KU における腸球菌と大腸菌数は、それぞれ $2.1 \pm 1.1 \times 10^3$ CFU/mL と $2.6 \pm 3.1 \times 10^3$ CFU/mL 検出されており、調査地点の違いによる全腸球菌数と全大腸菌数に大きな違いはみられなかった。日本の活性汚泥である TSU における腸球菌と大腸菌数は、それぞれ $3.7 \pm 1.4 \times 10^3$ CFU/mL と $1.9 \pm 1.2 \times 10^3$ CFU/mL あり、両細菌とも日本の方が 2 倍高かったが、オーダーが変化するほどではなかった。また、両細菌ともに活性汚泥中に 10^3 CFU/mL 程度存在していることが明らかとなった。CHROMagar™ VRE と CHROMagar™ ESBL 上に生育した陽性コロニーを計数した結果をみると、BS では $1.0 \pm 1.0 \times 10^2$ CFU/mL と $2.4 \pm 3.0 \times 10^2$ CFU/mL で検出された（表 1）。VRE と ESBL 産生大腸菌の陽性コロニーを全菌数と比較すると、約 1 オーダー減少していた。この傾向は、KU ならびに日本の TSU についても同様にみられた。

次に、VRE と ESBL 産生大腸菌の存在割合を、各陽性コロニー数の計数結果からそれぞれ見積もった。VRE 存在割合は BS と KU でそれぞれ 6.44% と 6.81% と推定され、両処理場で大きな違いはみられなかった。一方で、日本の TSU における VRE の存在割合は 4.98% と、タイと比較して低かった。ESBL 産生大腸菌の存在割合についてみたところ、BS と KU でそれぞれ 6.2% と 11.4% であり、BS と比較して KU で 1.8 倍高かった。日本の活性汚泥における ESBL 産生大腸菌の割合は 6.97% であり、タイと比較して低かった。VRE と ESBL 産生大腸菌のいずれの耐性菌も、日本と比較してタイの活性汚泥から高く検出された。

表 1 タイと日本における VRE と ESBL 産生大腸菌の存在割合

	陽性コロニー数 (CFU/mL)		
	BS	KU	TSU
腸球菌	$1.6 \pm 0.8 \times 10^3$	$2.2 \pm 1.1 \times 10^3$	$3.7 \pm 1.4 \times 10^3$
VRE	$1.0 \pm 1.0 \times 10^2$	$1.5 \pm 1.2 \times 10^2$	$1.9 \pm 1.2 \times 10^2$
VRE の割合 (%)	6.44	6.81	4.98
大腸菌	$2.7 \pm 3.1 \times 10^3$	$2.6 \pm 3.1 \times 10^3$	$5.5 \pm 0.2 \times 10^3$
ESBL 産生大腸菌	$2.4 \pm 3.0 \times 10^2$	$3.0 \pm 3.0 \times 10^2$	$3.8 \pm 3.7 \times 10^2$
ESBL 産生大腸菌の割合 (%)	8.87	11.4	6.97

4. まとめ

本研究では、タイと日本における下水処理場の活性汚泥を対象として、院内感染において重要な耐性菌である VRE と ESBL 産生大腸菌の存在割合を調査した。タイと日本の活性汚泥中には VRE と ESBL 産生大腸菌が存在しており、その割合はそれぞれ 5.0~6.8% と 7.0~11.4% であった。今後は検出された耐性菌株の薬剤感受性試験と耐性遺伝子型の決定を実施する予定である。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金課題番号 15H05223 および 18KK0114 と、JST 未来社会創造事業の支援を受けた。ここに記して謝辞を表します。

参考文献

- 1) Center for Disease Control and Prevention, (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. URL. <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> (accessed May, 2017)., 2) 厚生労働省, 2016. 院内感染対策サーベイランス事業. URL. <http://www.nih-janis.jp/report/kensa.html> (2016 年 9 月現在)., 3) Martins da Costa, P., *et al.* (2006) *Water Res.*, **40**, 1735-1740.