

都市下水および病院排水に存在する ESBL 産生大腸菌の薬剤耐性

山形大学大学院農学研究科	学生員	○澁木理央
山形大学農学部	正会員	西山正晃
山形大学農学部	非会員	鶴巻啓一
東北大学大学院医学系研究科	非会員	金森 肇
山形大学農学部	正会員	渡部 徹

1. はじめに

抗菌薬は、人間や家畜の細菌感染症の治療や予防のほか、養殖業や農業などでも使用されているが、その使用量の増加に伴い、抗菌薬に耐性を持つ薬剤耐性菌の発生が世界的な問題となっている。薬剤耐性菌は、以前は院内感染において問題視されていたが、現在では我々の生活環境（市中）にも拡散しており、例えば日本の愛知県岡崎市で健常人を対象に行われた調査では、15%の人が基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（Extended-spectrum β-lactamase : ESBL）産生大腸菌を保有していた¹⁾。

市中で蔓延する薬剤耐性菌を調査するために、我々の研究グループでは、東北地方の A 市の下水処理場の流入下水と、同集水域内の病院からの排水を対象に、医療現場で注視すべき耐性菌のモニタリング調査を実施している。本研究では、このモニタリング調査で得られた ESBL 産生菌の中で大腸菌に注目し、異なる排出起源の ESBL 産生大腸菌の薬剤感受性と、それらが保有する ESBL 産生遺伝子の遺伝子型を比較する。

2. 方法

2. 1 サンプルングの概要および ESBL 産生大腸菌のスクリーニング方法

サンプルングは、東北地方の A 市の都市下水処理場の流入下水を対象とした。同下水処理場は、A 市の約 7 割の汚水（433,000 m³/day）を処理している。併せて、同一の集水域にある病院からの病院排水を採取した。どちらの試料とも、2019 年 2 月～7 月の間に月 2 回の頻度で採取した。

採取したサンプルを、CHROMagar™ ESBL（関東化学、日本）に 0.1 mL 塗抹し、37℃で 18～24 時間培養した。赤色のコロニーとなって生育した大腸菌を、サンプルごとに最大 10 株選択し、LB 培地を用いて分離した。分離した菌株について、PCR 法により *uidA* 遺伝子²⁾が検出された株を大腸菌と同定した。

2. 2 ESBL 産生遺伝子の検出

2. 1 で分離された ESBL 産生大腸菌の耐性遺伝子型について、PCR 法により決定した。現在 ESBL 産生遺伝子として報告されている数は 100 種類以上ある³⁾が、世界中に広く流行している遺伝子型は CTX-M 型、TEM 型、SHV 型である。日本で分離される遺伝子型の 90%以上が CTX-M 型であるとの報告もある⁴⁾。CTX-M 型 ESBL については、遺伝的に CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8 group, CTX-M-9 group および CTX-M-25 group の 5 つのグループにさらに分類することができ、日本で最も頻繁に分離されるのは CTX-M-9 group である⁵⁾。本研究では、CTX-M 型⁶⁾、TEM 型⁷⁾および SHV 型⁷⁾の 3 種類の遺伝子を PCR により大まかに型別したのちに、CTX-M 型についてはさらにグループ（CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8/25 group, CTX-M-9 group）に分類⁷⁾した。

2. 3 薬剤感受性試験

2. 1 で単離・同定された大腸菌株への薬剤感受性試験は、Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準に従い、Kirby-Bauer 法によるディスク拡散法で行った。抗菌薬は、CLSI の多剤耐性腸内細菌を決定するためのガイドライン⁸⁾に基づき、β-ラクタム系から 9 薬剤（ABP, CXM, CTX, CFP, CFX, IPM, AZT, ACV および T/P）、β-ラクタム系でない抗菌薬を 9 薬剤（ST, GM, AMK, CIP, TC, TGC, CL, FOM および CP）の合計 18 薬剤を選択した。

3. 結果及び考察

3. 1 都市下水および病院排水サンプル中の ESBL 産生大腸菌がもつ ESBL 産生遺伝子型の分布

表 1 に都市下水および病院排水から分離された ESBL 産生大腸菌株からの各遺伝子の検出結果を示す。148 株のうち 146 株（98.6%）が *bla*_{CTX-M universal} 陽性だった。前述の通り、日本の臨床で分離報告がされる ESBL 産生遺伝子型の大部分は CTX-M 型であり、本研究でも同様の傾向が見られた。その内訳は、CTX-M-1 group が 38 株（25.7%）、

キーワード：都市下水，病院排水，薬剤耐性菌，基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ，PCR

住所：山形県鶴岡市若葉町 1-23, Tel: 0235-28-2907, Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

CTX-M-2 group が 4 株（2.7%）、CTX-M-8/25 group が 4 株（2.7%）、CTX-M-9 group が 103 株（69.6%）であった。都市下水、病院排水どちらも *bla*_{CTX-M-9 group} が最も多く検出されたが、病院排水では特に *bla*_{CTX-M-9 group} の検出率が高かった。都市下水では *bla*_{CTX-M-1 group} が、病院排水では *bla*_{CTX-M-2 group} が 2 番目に多く検出された。複数の CTX-M 型遺伝子が陽性となった株は 6 株（都市下水由来 5 株、病院排水由来 1 株）あった。

*bla*_{TEM_universal} 陽性株は 29 株（19.6%）であり、*bla*_{TEM_universal} 陽性だった全ての株から同時に *bla*_{CTX-M_universal} が検出された。このように、CTX-M 型と TEM 型を同時に併せ持つ大腸菌については、TEM 型酵素の大部分が TEM-1 などの ESBL に関係のない酵素であったという報告もある⁹⁾。

一方で、試験したすべての株から *bla*_{SHV_universal} は検出されなかった。日本における SHV 型遺伝子の検出報告は少なく、本研究の結果も同様の傾向であったといえる。

表 1 各遺伝子の検出結果

サンプルの種類	<i>bla</i> _{CTX-M_universal}	<i>bla</i> _{TEM_universal}	<i>bla</i> _{SHV_universal}	<i>bla</i> _{CTX-M -1 group}	<i>bla</i> _{CTX-M -2 group}	<i>bla</i> _{CTX-M -8/25 group}	<i>bla</i> _{CTX-M -9 group}
都市下水 (n=126)	124 (98.4%)	27 (21.4%)	0 (0%)	37 (29.4%)	2 (1.6%)	4 (3.2%)	83 (65.9%)
病院排水 (n=22)	22 (100%)	2 (9.1%)	0 (0%)	1 (4.5%)	2 (9.1%)	0 (0%)	20 (90.9%)
計	146 (98.6%)	29 (19.6%)	0 (0%)	38 (25.7%)	4 (2.7%)	4 (2.7%)	103 (69.6%)

3. 2 都市下水および病院排水サンプル中の ESBL 産生大腸菌の薬剤感受性

図 1 に抗菌薬ごとの耐性率を示す。今回試験した ESBL 産生大腸菌 148 株全てが、ABP、CTX および CXM に耐性を示した。一方で、IPM、AMK および TGC には全株が感受性であった。第四世代セフェムである CFP への耐性率は 60.1%と高く、ESBL の分解スペクトルが広がっている可能性がある。β-ラクタム系抗菌薬と作用機序の異なる CIP、ST および TC についても、それぞれ 73.0、44.6、47.3%と高い耐性率を示した。GM、FOM および CP には都市下水由来株のみ耐性があった。CFX、AZT、T/P、ST、CIP、TC および CL は、都市下水由来株よりも病院排水由来株の方が耐性率が高かった。

個々の菌株が耐性を示す抗菌薬の数に着目すると、都市下水由来株では最小 3 薬剤、最大 12 薬剤であった。一方で、病院排水由来株では最小 4 薬剤、最大 10 薬剤であり、都市下水中（市中）にも病院排水と同程度に重要な ESBL 産生大腸菌が存在することが示された。

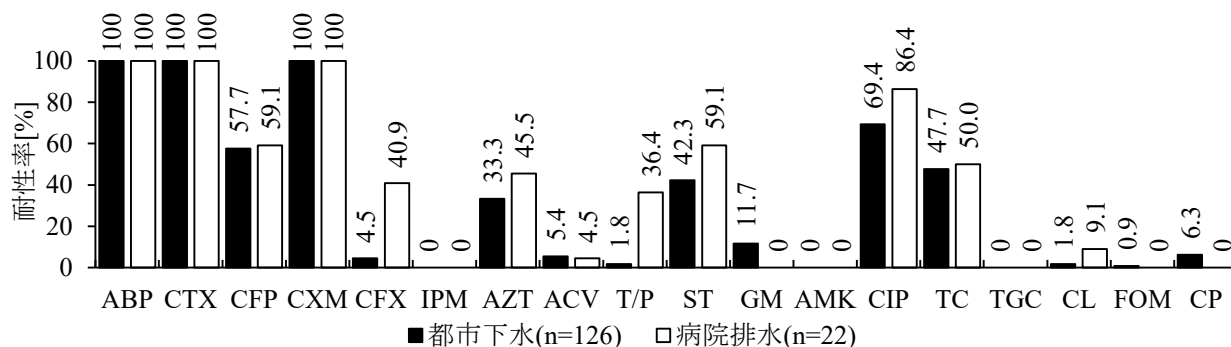


図 1 抗菌薬ごとの耐性率

参考文献

- 1) K. Nakane et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(6), 1818-1827, 2016.
- 2) A. K. Bej et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(2), 307-314, 1990.
- 3) T. Naas et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32(1), 917-919, 2017.
- 4) 除村萌ら，日本臨床微生物学会，29(1)，21-27，2019.
- 5) S. Suzuki et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(1), 72-79, 2009.
- 6) M. Edelstein et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(12), 3724-3732, 2003.
- 7) C. Dallenne et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 65(3), 490-495, 2010.
- 8) Clinical Laboratory Standards Institute, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition, M100-S29.
- 9) 村谷哲郎ら，日本化学療法学会雑誌，52(10)，556-567，2004.