

都市下水と病院排水中の腸内細菌科細菌が保有する ESBL 産生遺伝子の特徴

山形大学農学部 正会員 ○西山正晃, 渡部徹
東北大学病院（または大学院医学系研究科） 非会員 馬場啓聡, 金森肇

1. はじめに

薬剤耐性菌とそれに関連する耐性遺伝子は、人類の公衆衛生を脅かす問題として広く認識されている。我が国では厚生労働省が主体となって「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」が策定され、2016 年から幾つかのヒトや動物の薬剤耐性率に関する調査が実施されている。2019 年の調査結果では、ヒト分野において世界各国で耐性率の増加が問題となっているカルバペネム耐性腸内細菌科細菌やバンコマイシン耐性腸球菌の耐性率は、1%未満と低い水準であった¹⁾。一方で、大腸菌の第三世代セフェム系薬やフルオロキノロン系薬への耐性率はいまだ増加傾向にある。

第三世代セフェム系抗菌薬に耐性を示す大腸菌は基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（Extended spectrum β -lactamase, ESBL）産生菌の代表である。この ESBL 産生菌とはペニシリナーゼを産生する細菌が突然変異し、複数の β ラクタム薬に耐性を示すようになった細菌のことである。大腸菌をはじめとする腸内細菌科細菌が ESBL 産生遺伝子を獲得した場合、それらによる感染症の治療は極めて困難となる。

本研究では宮城県仙台市の下水処理場とその集水域にある病院の排水から ESBL 産生腸内細菌科細菌を分離し、それらが保有する ESBL 産生遺伝子の特徴を調査した。

2. 実験方法

2.1 サンプルングと菌株の単離

調査は、宮城県仙台市内の都市下水処理場の流入下水と協力病院からの排水を 2019 年 2 月から 2020 年 2 月まで毎月 2 回のサンプルングを実施した。採取した試料を Chromagar™ ESBL（関東化学）に塗抹し、37°C で 24 時間培養した。培養後、腸内細菌科細菌と疑われる陽性コロニーを選択し、Brain-Heart Infusion（BHI, BD）寒天培地に単離した。単離した菌株の単一コロニーを再度 BHI 寒天培地に単離・培養し、単離株の純菌化を行った。純菌化した菌株はグリセロールストックとして -80°C で保存した。

2.2 DNA 抽出と腸内細菌科細菌の菌種同定

冷凍保存した菌株を BHI 寒天培地で培養した後、単一コロニーを BHI 液体培地に単離・培養した。培養後の検体に InstaGene Matrix（Biorad）を添加し、付属の説明書に準じて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型して、KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix（日本ジェネティクス）と Lane らのプライマーセットを使用した PCR によって 16S rRNA の増幅産物を得た³⁾。増幅産物は ExoSAP（Applied Biosystems）処理を行った後、シーケンス反応処理以降の解析を株式会社ファスマックに委託した。16S rRNA の配列は 3 つに分割してサンガーシーケンスで取得し、それらを統合することで全領域（約 1,400 bp）の配列データを得た。取得した配列データを BLAST 検索することによって菌種を同定した。

2.3 ESBL 産生遺伝子の検出

ESBL 産生遺伝子の検出は、PCR 法によって Dallenne らのプライマーセットを用いて実施した⁴⁾。このプライマーセットでは Ambler らの分類法に基づいて ESBL 産生機序（生産する酵素の違いが異なる 4 つのクラス、20 種の ESBL 産生に関わる遺伝子（*bla*））を検出することができる。各プライマーを用いたシングル PCR 法によって耐性遺伝子を検出し、2.2 で同定された菌種ごとに陽性数をまとめた。

キーワード 腸内細菌科細菌, ESBL 産生遺伝子, 都市下水, 病院排水

連絡先 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23, Tel.0235-28-2894, e-mail:m-nishiyama@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

3. 結果と考察

1年間のモニタリングの結果，流入下水と病院排水から ESBL 産生菌が合計 380 株単離された（流入下水：315 株，病院排水：65 株）。このうち，142 株が *Aeromonas* 属，134 株が *Klebsiella* 属，58 株が *Kluyvera* 属，15 株が *Enterobacter* 属，12 株が *Citrobacter* 属，8 株が *Serratia* 属，1 株が *Pseudomonas* 属，1 株が *Stenotrophomonas* 属，1 株が *Acinetobacter* 属，8 株が未分類株であった。*Aeromonas* 属，*Citrobacter* 属，*Serratia* 属は下水のみ検出されたことから流入下水特有の細菌であると考えられる。

表 1 に ESBL 産生に関連する遺伝子の検出結果を菌種ごとに示す。流入下水と病院排水からは全 16 種類の *bla* が検出され，*bla*_{CTX-M group-8/25}，*bla*_{ACC}，*bla*_{FOX}，*bla*_{OXA-48}，ならびに *bla*_{VIM} はいずれの下排水からも検出されなかった。検出された ESBL の Class で分類すると，Class A が最も多かった。Class A に属する *bla*_{CTX-M universal} は単離株の 60%（380 株中）が保有しており，その中でも *bla*_{CTX-M group-9} の保有率が高かった（39%）。このように都市下水と病院排水ともに，ペニシリナーゼ産生能を有する細菌が多いことが特徴であった。

注目すべきは，Class B から 4 種類の *bla* が検出された点である（*bla*_{VEB}：8.9%，*bla*_{GES}：3.4%，*bla*_{PER}：1.6%，*bla*_{IMP}：1.1%）。Class B に分類される *bla* はカルバペネマーゼ産生能を有することを示し，ESBL 産生菌の治療薬として使用されるカルバペネム系抗菌薬も分解できる。Class A と Class B の両遺伝子を有し，βラクタム薬への抗菌スペクトルが広がった *K. pneumoniae* も流入下水（7 株）と病院排水（2 株）から検出された。院内感染の原因菌として重要視されているこの菌種が，異なるクラスの *bla* を保有していたことは重要な発見である。

菌種別に整理すると，*Aeromonas* 属，*Klebsiella* 属，*Kluyvera* 属，*Enterobacter* 属，*Citrobacter* 属，*Acinetobacter* 属，および未分類株から複数の *bla* が検出された。その中でも，*Aeromonas* 属と *Klebsiella* 属の細菌からそれぞれ 13 種類と 11 種類の *bla* が検出され，腸内細菌科細菌の中でも多様な *bla* を保有していた。

以上の通り，流入下水と病院排水から ESBL 産生に関わる遺伝子を検出し，その特徴付けを行った結果，非常に多くの種類の *bla* が複数種の腸内細菌科細菌から検出された。このことから，医療機関だけでなく市中にも多様な ESBL 産生腸内細菌科細菌が拡散している状況が明らかとなった。

表 1 都市下水および病院排水に由来する腸内細菌科細菌からの ESBL 産生遺伝子（*bla*）の菌種別検出数（N.D.は不検出を意味し，括弧内には菌種別の全株数に対する各遺伝子の検出割合を示す）

	細菌属名	Aeromonas		Klebsiella		Kluyvera		Enterobacter		Citrobacter		Serratia		Pseudomonas		Stenotrophomonas		Acinetobacter		未分類株		合計
	単離起源	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	下水	病院排水	
	株数	142	0	89	45	52	6	4	11	12	0	8	0	1	0	0	1	1	0	8	2	
Class A (ペニシリン ナーゼ)	bla _{CTX-M universal}	76 (54%)		61 (69%)	30 (67%)	45 (86%)	6 (100%)	N.D.	N.D.	7 (58%)		1 (13%)		N.D.		N.D.	1 (100%)		1 (13%)	1 (50%)	229 (60%)	
	bla _{CTX-M group-1}	12 (8.5%)		30 (34%)	27 (60%)	8 (15%)	5 (83%)	N.D.	N.D.	5 (42%)		N.D.		N.D.		N.D.	1 (100%)		N.D.	1 (50%)	89 (23%)	
	bla _{CTX-M group-2}	N.D.		1 (1.1%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	1 (0.3%)	
	bla _{CTX-M group-9}	67 (47%)		26 (29%)	11 (24%)	38 (73%)	1 (17%)	1 (25%)	N.D.	2 (17%)		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		2 (25%)	N.D.	148 (39%)	
	bla _{CTX-M group-8/25}	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	
	bla _{TEM}	10 (7.0%)		19 (21%)	20 (44%)	3 (5.8%)	5 (83%)	N.D.	N.D.	5 (42%)		N.D.		N.D.		N.D.	1 (100%)		N.D.	1 (50%)	64 (17%)	
	bla _{SHV}	1 (0.7%)		29 (33%)	10 (22%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	40 (11%)	
Class C (セファロ スポリン ナーゼ)	bla _{KPC}	1 (0.7%)		1 (1.1%)	1 (2.2%)	N.D.	N.D.	2 (50%)	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	5 (1.3%)	
	bla _{ACC}	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	
	bla _{FOX}	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	
	bla _{MOX}	59 (42%)		2 (2.2%)	1 (2.2%)	N.D.	N.D.	1 (25%)	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	1 (100%)		N.D.	N.D.	64 (17%)	
	bla _{DHA}	1 (0.7%)		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	1 (0.3%)	
	bla _{CTT}	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		2 (25%)	N.D.	2 (0.6%)	
	bla _{EB}	1 (0.7%)		8 (9.0%)	9 (20%)	N.D.	N.D.	N.D.	11 (100%)	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	29 (7.6%)	
Class D (OXA型)	bla _{OXA-1}	1 (0.7%)		12 (14%)	10 (22%)	N.D.	1 (17%)	N.D.	6 (55%)	1 (8.3%)		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	1 (50%)	32 (8.4%)	
	bla _{OXA-48}	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	
Class B (カルバペ ネマーゼ)	bla _{VEB}	16 (11%)		8 (9.0%)	3 (6.7%)	6 (12%)	N.D.	1 (25%)	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	34 (8.9%)	
	bla _{PER}	5 (3.5%)		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	1 (100%)		N.D.	N.D.	6 (1.6%)	
	bla _{GES}	10 (7.0%)		2 (2.2%)	N.D.	1 (1.9%)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	13 (3.4%)	
	bla _{IMP}	N.D.		1 (1.1%)	2 (4.4%)	N.D.	1 (17%)	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	4 (1.1%)	
	bla _{VIM}	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	N.D.		N.D.	N.D.	N.D.	
検出されたblaの合計		260		200	124	101	19	5	17	20		1		0		0	5		5	4	761	
検出されたblaの種類		13		13	11	6	6	4	2	5		1		0		0	5		3	4	16	

参考文献

- (1) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会，薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書2019.
- (2) World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
- (3) Lane, *et al.*, *PNAS*, **82**, 6955-6959, 1985.
- (4) Dallenne, *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 490-495, 2010.