

日本とタイの都市下水から分離されたコリスチン耐性菌の薬剤感受性

山形大学農学部	非会員	○森 祐哉
山形大学農学部	正会員	西山正晃
山形大学農学部	正会員	渡部 徹

1. はじめに

コリスチン (CL) は、1950 年に日本で発見されたポリペプチド系の抗生物質である。CL はグラム陰性菌に対して優れた抗菌作用を示す反面、ヒトに対しては腎毒性や神経毒性などの副作用があることから、臨床での使用は制限されていた。1990 年代にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) や多剤耐性グラム陰性桿菌が出現し、有効な抗生物質の選択肢が少なくなったことから、再び CL が注目されるようになり、日本国内では、2015 年に臨床での CL の使用が再承認された。この承認から、現在に至る 5 年間での国内使用報告はわずか 14 例と、CL は耐性菌治療薬の「最後の砦」として慎重に用いられている²⁾。

2015 年にプラスミド媒介コリスチン耐性遺伝子 (*mcr*) を保有する CL 耐性菌が中国のブタから発見されたことを皮切りに³⁾、アメリカやドイツなどの欧州を中心に世界各国で *mcr* の検出事例が報告されるようになった。*mcr* はプラスミドにコードされているため、細菌間での伝達が可能であり、CL 耐性が急速に広がるのが危惧される。日本国内では、2016 年に牛ふん便から単離した大腸菌株から、2017 年に臨床材料から単離した大腸菌株からそれぞれ *mcr-1* が初めて検出されている⁴⁾。CL 耐性菌の調査はこれまで臨床や畜産では多数行われているが、健康者が保有するコリスチン耐性菌の存在実態を調べた例は国内外を見渡してもほとんどない。

本研究では、生活排水が集まる都市下水処理場を対象として、日本とタイの市中における CL 耐性菌のまん延状況を調査した。

2. 実験方法

2.1 サンプルング

サンプルングは 2020 年 1 月から 3 都市 (鶴岡, 仙台, バンコク) の都市下水処理場で実施した。鶴岡と仙台では 1 月から 3 月の計 3 回行い、鶴岡では流入下水と活性汚泥を、仙台では流入下水と病院排水を採取した。タイのバンコクでは 2 つの都市下水処理場の流入下水と活性汚泥を、2 月に 1 回だけ採取した。

2.2 CL 耐性株の分離

採取した試料を CHROMagar COL-APSE 培地 (関東化学) に塗抹して 37°C で 24 時間培養した。その後、培地に形成されたコロニーを BHI 寒天培地 (DB) を用いて単離した。

2.3 コリスチン耐性の確定

単離した菌株から DNA を抽出し、PCR と増幅産物の配列情報 (約 300bp) の確認によって *mcr-1* の検出を試みた²⁾。*mcr-1* 陽性株は、微量液体希釈法 (BMD) によって CL に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を評価した。CLSI と EUCAST の判定基準に基づき、MIC 値が 4 mg/L 以上の菌株を CL 耐性と確定した。BMD の Quality Control には ATCC25922 株を使用した。

2.4 CL 耐性株の特徴付け

CL 耐性が確定された株について、菌種同定と薬剤感受性試験を実施した。確定株について、16S rRNA の全長配列 (1,400bp) を対象とした PCR を行った後、サンガーシーケンスによってその配列情報を取得し、BLAST 検索で菌種を同定した。薬剤感受性試験には BMD 法を採用し、ドライプレート (栄研化学) を用いて 21 剤に対する感受性を評価した。

キーワード 薬剤耐性, 都市下水, コリスチン, コリスチン耐性, タイ, *mcr*

住所: 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23, Tel: 0235-28-2907, Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

3. 実験結果

表1に示す通り、選択培地によって計1,039株が単離され、そのうち35株（3.4%）から *mcr-1* が検出された。3都市の全ての都市下水処理場で *mcr-1* が検出され、市中には既に *mcr-1* を保有するCL耐性菌がまん延していると考えられる。鶴岡とタイの下水処理場での結果を見ると、活性汚泥からの単離株の *mcr-1* 陽性率は、流入下水からの単離株よりも高かった。活性汚泥処理プロセスでは耐性遺伝子の水平伝播が頻繁に生じる可能性が指摘されているため、割合が高くなったと考えられる。また、臨床や家畜において日本よりも多くのコリスチンを使用しているタイでは、*mcr-1* 陽性率も日本より高かった。一方で、仙台市の病院排水からは *mcr-1* 陽性株は検出されなかった。

表2にCL耐性菌の菌種と薬剤感受性試験の結果をまとめた。表1に示す株の中において、現在分析の終わっている鶴岡と仙台の株のうち13株がCL耐性菌と確定された。そのうちCLへの自然耐性を示すことが知られている菌種を除く8株には、グラム陰性桿菌である *Cedecea neteri*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter junji*, *Klebsiella pneumoniae* が含まれていた。このうち *E. cloacae*, *K. pneumoniae* は臨床的に重要な耐性菌であり、その中にはCLだけでなく、ペニシリンや第3世代セファロスポリン（Ceftriaxone, Ceftazidime）に耐性を示す菌株も発見された。一方、これらの株の中にカルバペネム系抗菌薬にまで耐性を示す株はなかった。

表1. 各試料から分離されたCL耐性菌の株数と *mcr-1* 陽性率

	鶴岡		仙台			タイA処理場		タイB処理場	
	IF	AS	IF1系	IF2系	HW	IF	AS	IF	AS
全単離株数	321	321	105	102	40	26	87	23	14
陽性株数	6	13	1	2	0	1	7	2	3
陽性率 (%)	1.9	4	0.95	2	0	4	8	9	21.4

IF：流入下水, AS:活性汚泥, HW:病院排水

表2. CL耐性確定株の菌種と薬剤耐性パターン

地点	菌種	MIC(mg/L)	薬剤耐性パターン
鶴岡	<i>C. neteri</i>	64<	ABPC-S/A-CEZ-CMZ-CTM-FMOX
	<i>E. cloacae</i>	16	ABPC-FOM-S/A-CEZ-CMZ
	<i>K. pneumoniae</i>	8	ABPC-S/A-CEZ-CMZ
	<i>A. junji</i>	4	CEZ-CTR-CAZ-CMZ-CPDX-CTM-FMOR
	<i>K. pneumoniae</i>	4	ABPC-FOM-S/A
仙台	<i>E. cloacae</i>	64<	ABPC-S/A-CEZ-CMZ
	<i>E. cloacae</i>	32	ABPC-S/A-CEZ
	<i>E. cloacae</i>	4	PIPC-ABPC-FOM-CEZ-CMZ-CTM-FMOX

ABPC: Ampicillin, S/A: Sulbactam/Ampicillin, CEZ: Cefazolin, CMZ: Cefmetazole, CTM: Cefotiam, FMOX: Flomoxef, FOM: Fosfomicin, CTRX: Ceftriaxone, CAZ: Ceftazidime, CPDX: Cefpodoxime, AZT: Aztreonam, PIPC: Piperacillin

参考文献

- 1) 農林水産省動物医薬品検査所検査第二部, 薬剤耐性政策について, 56-68, 2017.
- 2) 二木芳人ら, コリスチンの適正使用に関する指針, 日本化学療法学会雑誌, 453-457, 2015.
- 3) Liu et al., THE LANCET Infection Diseases, 161-168, 2016.