

河川から単離した ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子の特徴とその薬剤感受性

山形大学大学院農学研究科 非会員 ○森 祐哉
山形大学農学部 正会員 西山正晃, 渡部 徹

1. はじめに

抗菌薬は細菌感染症治療や予防、家畜の成長促進剤など幅広く使われているが、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が出現してきた。薬剤耐性菌の中でも、ペニシリン系抗菌薬から第三世代セファロスポリン系抗菌薬やモノバクタム系抗菌薬にまで広く耐性を示すようになった「基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌」は、世界的な問題となっている¹⁾。水環境には臨床や畜産だけでなく、身近な生活環境からの排水が流れ込んでいることから、諸外国では耐性菌の調査が行われている。日本の河川も同様にヒトの生活圏の影響を強く受けているが、調査事例はまだ少ない。感染対策の重要課題である感染ルートの解明のためにも、河川の流下過程における耐性菌の出現や増減について詳細な解析が必要である。本研究では、山形県内の河川から ESBL 産生大腸菌を単離し、それらが保有する耐性遺伝子の型別と薬剤感受性を評価した。

2. 方法

2. 1 サンプルング及び推定 ESBL 大腸菌の分離

サンプルングは山形県を流れる一級河川の赤川と最上川を対象とし、2021 年 4 月から 8 月にかけて毎月 1 回行った。試料採取地点は赤川の 6 地点（地点 1：赤川水系大鳥川，地点 2：赤川水系梵字川，地点 3：大鳥川，梵字川合流地点後，地点 4：下水処理場放流水流入前，地点 5：下水処理場放流水流入後，地点 6：赤川河口）と最上川河口（地点 7）であった。各地点の表層から採取した河川水を、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、そのフィルターを CHROMagar™ ESBL（関東化学）の上で 37°C で 24 時間培養した。培養後に ESBL 産生大腸菌と疑われる赤色コロニーを各サンプルで最大 10 コロニー選択し、BHI 培地を用いて単離培養した。

2. 2 大腸菌の同定・ESBL 確定試験

2. 1 で単離した菌株について、PCR 法により大腸菌の特異遺伝子である *uidA*²⁾を検出することで、大腸菌と同定した。大腸菌と同定された株について、Clinacal & Laboratory Standards Institute (CLSI) の試験法に則り、ESBL 産生菌の確定試験を行った。ESBL 産生株と確定された菌株について、以下の試験を行った。

2. 3 耐性遺伝子の検出

ESBL 産生大腸菌と確定された株について、保有する ESBL 産生遺伝子の型別を PCR 法にて行った。具体的には Dallennel らの手法を採用し、20 種の ESBL 産生遺伝子 (*bla*_{CTX-M-group1,2,9,8/25}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{ACC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CIT}, *bla*_{EBC}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}) を Monoplex PCR によって増幅した。PCR 反応後、電気泳動により増幅産物のサイズを確認し、ポジティブコントロールと比較することで陽性判定を行った。

2. 4 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Kirby-Bauer法によるディスク拡散法で行った。抗菌薬には、CLSIの多剤耐性腸内細菌を決定するためのガイドライン³⁾に基づき、 β ラクタム系抗菌薬10種類 (ABP, CXM, CFX, CTX, CAZ, CFP, IPM, AZT, ACVおよびT/P), その他の抗菌薬8種類 (ST, GM, AMK, CIP, TC, TGC, FOMおよびCP) の合計18種類を選択した。各薬剤への感受性の判定は、CLSIの基準に従った。

3. 結果及び考察

3. 1 河川水サンプル中の ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子の特徴

河川水から単離されたESBL産生大腸菌39株が保有する耐性遺伝子数を表1に示す。20種類のESBL産生遺伝子のうち、13種類の遺伝子が検出された。すべての株から少なくとも1つ以上の*bla*が検出され、その中でも*bla*_{CTX-M}-

キーワード 薬剤耐性菌 庄内地方 河川 ESBL 産生菌 耐性遺伝子 薬剤感受性

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

group-1（26 株，61.5%）と *bla*_{CTX-M-group-9} が（8 株，20.5%）が多く株から検出された。国内の臨床や畜産においても *bla*_{CTX-M-group-1,9} が頻繁に検出されており³⁾，河川からの単離株でも類似した傾向が見られた。注目すべき点は，海外で流行しているカルバペネマーゼである *bla*_{KPC}（4 株）や *bla*_{VIM}（7 株）の検出数が，国内で流行しているカルバペネマーゼである *bla*_{IMP}（3 株）の検出数を上回った点である。このように国内の臨床での検出事例の少ない *bla* が水環境から検出されたことは重要な発見である。

地点ごとに *bla* の検出数を比較すると，下水処理水放流直後（地点 5）から最も多い 10 種類の *bla* が検出された。臨床だけでなく市中で生活する健康者もまた，河川に生息する耐性菌の排出源になっているのであろう。

3. 2 河川水サンプル中の ESBL 産生大腸菌の薬剤感受性

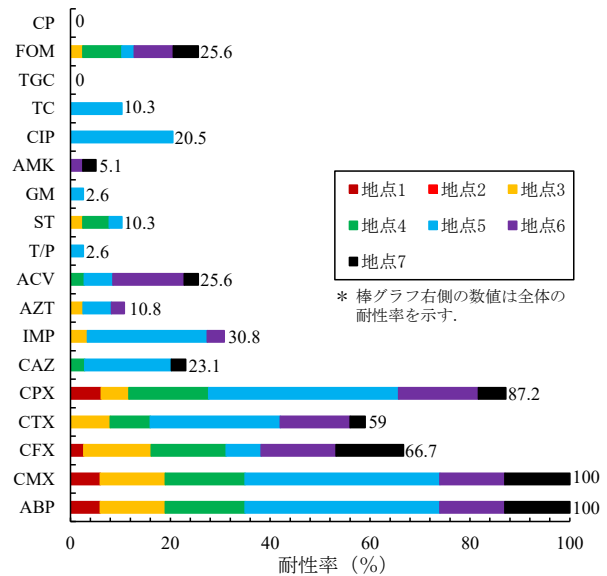
図 1 に各地点で単離された ESBL 産生大腸菌の抗菌薬に対する耐性率を示す。今回試験した ESBL 産生大腸菌 39 株全てが ABP と CMX に耐性を示した。一方で TGC と CP には全株が感受性であった。カルバペネム系抗菌薬である IMP には 12 株が耐性を示し，うち 9 株がカルバペネマーゼ（*bla*_{IMP} 3 株，*bla*_{KPC} 2 株，*bla*_{VIM} 4 株）を保有していた。残りの 3 株については，今回検出対象としていない種類のカルバペネマーゼに着目したさらなる調査が必要である。βラクタム系抗菌薬ではない薬剤への耐性については，CIP（20.5%）と FOM（25.6%）の耐性率が高かった。大腸菌が CIP に対して高度な耐性を示すことは先行研究でも知られているが⁴⁾，FOM に対する耐性率は，日本の臨床における先行研究の 3.6%⁵⁾と比較して著しく高かった。

個々の菌株が耐性を示した抗菌薬の数に着目すると，最大で 10 種類の薬剤（すべて βラクタム系）に耐性を示す菌株が，下水放流水の影響を受ける地点 5 で単離された。地点ごとに比較すると，地点 5 から検出された ESBL 産生大腸菌株は，15 種類（うち 10 種類が βラクタム系）のいずれかの抗菌薬に対して耐性を示し，*bla* の検出状況と同様に薬剤耐性も多様化していた。これは，排出する人間が多様であるとともに，下水処理過程での耐性菌の遺伝子の伝播や抗菌薬の暴露による影響かもしれない。今後もモニタリングを継続し，単離した ESBL 産生株の耐性遺伝子構造やゲノム解析を行うことで，山形県内の河川における耐性菌の拡散状況の解明につなげたい。

表1 各地点で単離されたESBL産生大腸菌からの耐性遺伝子の検出数

	合計	地点1	地点2	地点3	地点4	地点5	地点6	地点7
<i>bla</i> _{CTX-M group-1}	24	2	N.D	2	4	8	3	5
<i>bla</i> _{CTX-M group-2}	3	N.D	N.D	N.D	N.D	3	N.D	N.D
<i>bla</i> _{CTX-M group-9}	8	N.D	N.D	N.D	N.D	7	1	N.D
<i>bla</i> _{CTX-M group-8/25}	1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1	N.D
<i>bla</i> _{TEM}	1	N.D	N.D	1	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{SHV}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{KPC}	4	N.D	N.D	1	N.D	2	N.D	1
<i>bla</i> _{VEB}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{GES}	1	N.D	N.D	N.D	1	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{PER}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{ACC}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{FOX}	4	N.D	N.D	1	1	2	N.D	N.D
<i>bla</i> _{MOX}	2	N.D	N.D	N.D	N.D	2	N.D	N.D
<i>bla</i> _{DHA}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{CIT}	3	N.D	N.D	1	1	1	N.D	N.D
<i>bla</i> _{EBC}	3	N.D	N.D	1	N.D	1	N.D	1
<i>bla</i> _{OXA-1}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{OXA-48}	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>bla</i> _{IMP}	3	N.D	N.D	N.D	N.D	1	1	1
<i>bla</i> _{VIM}	7	N.D	N.D	N.D	N.D	2	4	1

*数値は検出数，N.Dは不検出を示す。



* 棒グラフ右側の数値は全体の耐性率を示す。

図1 各地点で単離されたESBL産生大腸菌の抗菌薬に対する耐性率

謝辞 本研究は，（独）環境再生保全機構の環境研究総合推進費（JPMEERF20205R05）により実施した。

参考文献

- 1) D. L. Paterson *et al.* (2005), *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(4), 657-686.
- 2) CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition, M100-S29.
- 3) 小野寺ら(2006) 感染症学雑誌, 90(2), 105-112.
- 4) 黒田ら(2019), KANSEN Journal, No. 72.
- 5) J. Wachino *et al.* (2010) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(7), 3061-3064.