

都市下水と病院排水から単離した ESBL 産生腸内細菌科細菌が保有する プラスミドの特徴

山形大学農学部 非会員 ○盧歆

山形大学農学部 正会員 西山正晃、渡部徹

1. はじめに

薬剤耐性菌（Antimicrobial Resistance Bacteria；ARB）による感染症は、21 世紀における公衆衛生上の重要な問題として認識されている¹⁾。拡大する ARB の問題を解決するには、薬剤耐性遺伝子（Antimicrobial Resistance Gene：ARG）の伝播メカニズムを解明することが鍵となる。ARG の伝達は、細菌の親から子への伝播（垂直伝播）と、同一世代間の伝播（水平伝播）に分けられる²⁾。さらに、水平伝播は、ARG の授受の方法によって接合伝達、形質転換、形質導入に分けられ、細菌種を超えて薬剤耐性を伝達できることから、新規の耐性菌が発生する要因として知られている³⁾。この中で接合伝達は、プラスミドを介して ARG を同一種間あるいは異種間で授受することができる。プラスミドは、染色体の複製と関係なく自己複製でき、細胞分裂時は娘細胞に分配される特徴がある。これまでプラスミドの分類として、不和合成群（Incompatibility）が知られており、グラム陰性細菌については、大腸菌を宿主とした際の 26 種（IncA～IncZ）のプラスミドグループが細菌学の分野では既に知られている³⁾。

我々の研究グループでは、宮城県仙台市の都市下水処理場の流入下水と同集水域内にある病院排水を対象として、ARB のモニタリングを実施した。その結果、両排水起源から分離した ESBL 腸内細菌科細菌から 16 種類の *bla* が検出され、そのうち ClassA である *bla*_{CTX-M group-9} が両排水から最も高く検出された（都市下水：51.9%，病院排水：35.6%）⁴⁾。様々な *bla* を有する複数種の腸内細菌科細菌が両排水源から確認されているものの、*bla* がコードされるプラスミドの種類や、それを保有する宿主菌種までは不明である。

本研究では、都市下水と病院排水から単離した ESBL 腸内細菌科細菌が保有するプラスミドを IncGroup に型別し、その *bla* や宿主菌との関係を調査した。

2. 実験方法

2. 1 供試菌株とプラスミドの抽出

供試菌株には、上記のモニタリングにより分離・同定された ESBL 産生腸内細菌科細菌 227 株（*Klebsiella*：134 株、*Kluyvera*：58 株、*Serratia*：8 株、*Citrobacter*：12 株、*Enterobacter*：15 株）を使用した。

プラスミドの抽出には、NucleoSpin®Plasmid EasyPure キット（タカラバイオ社）を使用した。菌株を LB 寒天培地（1.5%，BD Difco）に塗布し、37℃で 18±2 時間培養した。その後、形成された単一コロニーを 5 mL の LB 液体培地（Ampicillin：50 mg/L）に接種し、37℃で 18±2 時間 160 rpm で振とう培養した。培養後、1 mL の培養液を上記キットに供し、付属の説明書に準じて抽出操作を行った。抽出後のプラスミドの濃度は、Nanodrop 2000c（Thermo Fisher Scientific）を使用して測定した。

2. 2 PCR-based Replicon Typing

プラスミドの Inc グループの分類を行うために、PCR-based Replicon Typing（PBRT）を行った。PBRT とは、PCR によって各 Inc グループに特徴的なプラスミド上の遺伝子領域を増幅することで、プラスミドを分類する手法である。2.1 で抽出したプラスミドの分類は、PBRT 2.0 kit（DIATHEVA S.R.L）を使用し、付属の説明書に準じて行った。本キットは、8 つの Multiplex PCR を実施して 30 種類の Inc 型に分類できる。各 PCR 反応後、2.5%アガロースゲルにて 100V で 30 分間の電気泳動を行い、EtBr 染色後にゲルドックにて増幅産物を確認した。増幅産物を付属の各陽性区と比較して、同じ位置にバンドがあるものを陽性とした。

キーワード 腸内細菌，プラスミド，PCR-based Replicon Typing，不和合性

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. 結果および考察

PBRT による分類の結果、合計 23 種類の Inc 型が検出された。227 株の腸内細菌科細菌のうち 172 株はいずれかの Inc 型に分類され、残りの 55 株からはいずれの Inc 型も検出されなかった。検出された 172 株のうち、IncF に分類される IncFIIK (35.4%) と IncFIB KN (61.6%) の検出率が高かった（表 1）。イタリアで行われた臨床での ESBL 産生菌の疫学調査でも両 Inc グループの検出率が高い傾向がみられ、*bla*_{CTX-M-group-9} は IncF グループと関連があることが報告されている⁹⁾。この傾向は、図 1 に示す菌種ごとの Inc 型と耐性遺伝子との関係からもわかる。また、IncFIIK と IncFIB KN は異なる 4 種類の腸内細菌科細菌から検出されおり、広範囲の宿主にこの Inc 型のプラスミドが伝播していると考えられる。*Klebsiella* からは 19 種類の Inc 型が検出され、プラスミドを授受しやすい特徴があると示唆され、接合伝達による ARG の伝播に寄与すると考えられる。なお、都市下水の流入下水と病院排水との間に、検出された Inc 型の違いはみられなかった。今後は、プラスミドの伝達性に貢献する可動性遺伝子群の特徴を併せて分析することで、環境中でのプラスミドを介した ARG の伝播の評価につなげる予定である。

表 1 単離した腸内細菌科細菌における各 Inc 型の検出数

	株数	IncA/C	IncBO	IncK	IncFIA	IncFIB	IncFIBKN	IncFIBKQ	IncFIB-M	IncFII	IncFIIS	IncFIIK	IncFIII	IncFII2	IncFIB-M	IncFIIa	IncFIIγ	IncFII2	IncL	IncM	IncN	IncN2	IncP1	IncR	IncT	IncU	IncW	IncX	IncX1	IncX2	IncX4
<i>Klebsiella</i>	134	3			5	1	57	10	1	8	1	38		3			2	1				2		8	6	10	1	7	2	2	
<i>Kluyvera</i>	58	2			10		38	5		17		14					4				3			10	7	1		1	3	1	
<i>Serratia</i>	8					1						2									1	1		2	1		2				
<i>Citrobacter</i>	12	1					3			1		4		1			1		1			1		1							
<i>Enterobacter</i>	15						8			5	6	3		7												1		2			

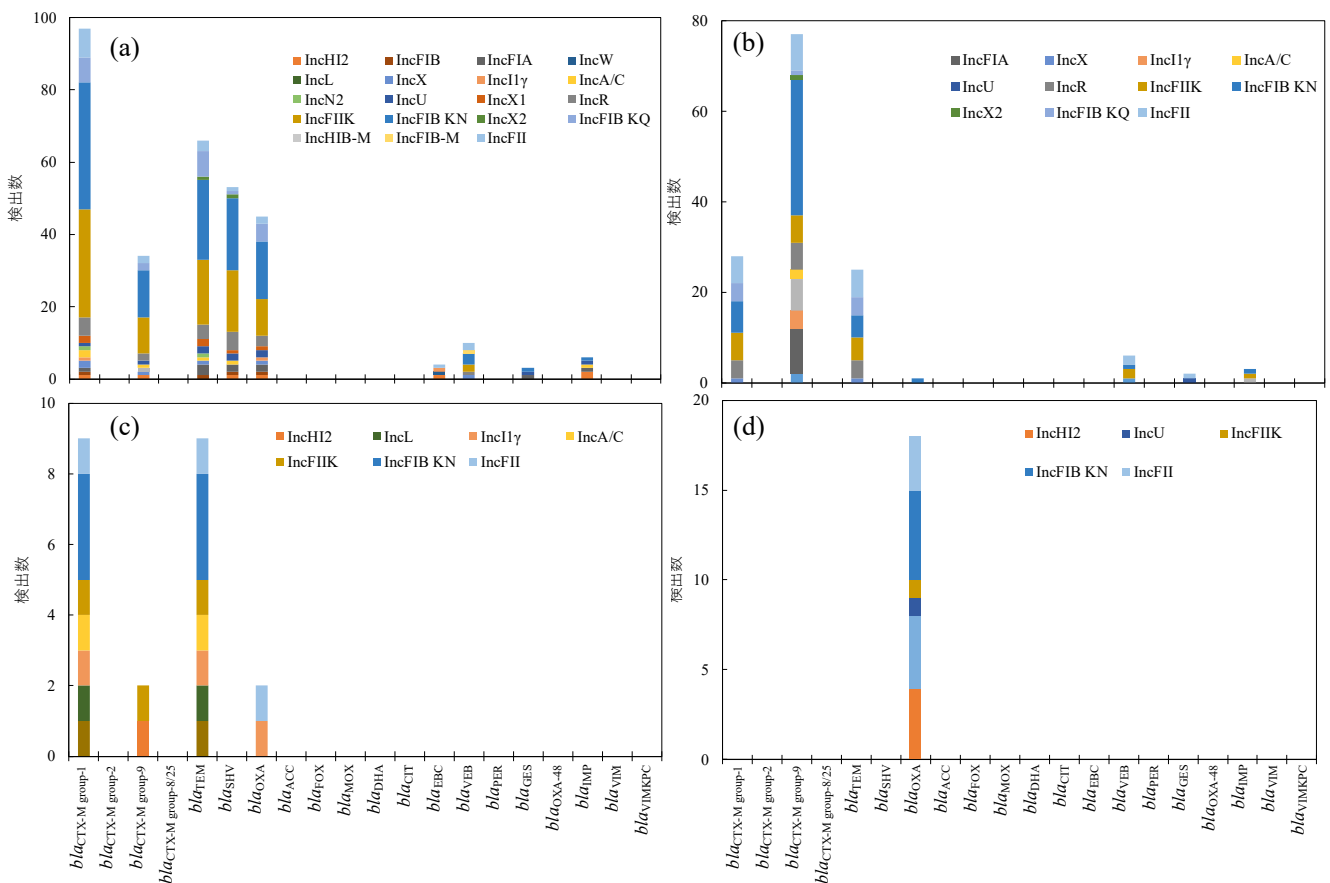


図 1 菌種ごとの Inc 型と耐性遺伝子との関係 ((a)*Klebsiella*、(b)*Kluyvera*、(c)*Citrobacter*、(d)*Enterobacter*)

謝辞 本研究は、科研費（21K14274）の助成を受けて実施された。

参考文献 1) Jim O'Neill, Review on AMR, 2014. 2) 国立感染研究所, 2019. 3) Sota. and Top., Caister Academic Press, 2008. 4) 森ら, 土木学会論文集 G(環境), 2021. 5) Pamela, et. *Antibiotics* 2021.