

東北地方の一級河川における ESBL 産生大腸菌の 薬剤感受性と地理的・空間的分布

山形大学農学部	非会員	○釘持ひろ
岩手大学大学院連合農学研究科	学生会員	米田一路
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	渡部徹、西山正晃

1. はじめに

Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) 産生菌は複数の β ラクタム系抗菌薬に耐性を示す細菌であり、第三世代セフェム系抗菌薬まで分解する特徴を有する。国内外で実施されている薬剤耐性菌のモニタリング調査では、下水処理排水やそれらの影響を受ける河川から ESBL 産生遺伝子が検出されている^{1),2)}。しかしながら、日本の東北地方の河川を対象とした薬剤耐性菌の調査に関する情報は少なく^{3),4)}、環境中から検出される ESBL 産生遺伝子の傾向やそれらを保有する大腸菌の流行株の分布については知られていない。本研究では、東北地方の一級河川を対象とした ESBL 産生大腸菌のモニタリングを実施し、各河川における薬剤感受性と ESBL 産生遺伝子 (*bla*) の型別を行った。また、各河川で検出された ESBL 産生大腸菌株について分子疫学解析を実施して、東北地域における耐性菌の空間的な分布状況の把握を試みた。

2. 実験方法

2.1 試料採取

調査は、東北県内を流下する 8 つの一級河川（阿武隈川：AB、名取川：NT、北上川：KK、馬淵川：MB、岩木川：IW、雄物川：OM、最上川：MG、赤川：AK）で実施し、期間は 2021 年 9 月から 2022 年 9 月の間で 3 ヶ月に 1 回行った。採水は、各河川の河口から 5-10km 上流地点の海水による影響のない地点を選定した。1L ポリ瓶で採水後、クーラーボックスに入れ研究室まで持ち帰り、8 時間以内に微生物の分析を開始した。

2.2 細菌計数と単離

大腸菌と ESBL 産生大腸菌の計数は、メンブレンフィルター法によって実施した。採取したサンプルをメンブレンフィルター（孔径 0.45 μm , ADVANTECH）で吸引ろ過した。そのフィルターを大腸菌の選択培地である Chromocult Coliform 寒天培地（Merck）と ESBL 産生大腸菌の選択培地である CHROMagar™ ESBL（関東化学）上に置き、37°C で 24 時間培養した。培養した後にそれぞれの選択培地のフィルター上に生育した大腸菌陽性コロニーを計数した。計数後、ESBL 産生大腸菌と疑われる陽性コロニーを 1 河川で最大 10 株選択し、Chromocult Coliform 寒天培地に単離した。単離培養した菌株の単一コロニーを LB 寒天培地に単離・培養し、単離株の純菌化を行った。純菌化した菌株は以下の試験まで -80°C で保存した。

2.3 ESBL 産生大腸菌の同定

単離株の大腸菌の菌種同定には、大腸菌の特異遺伝子である *uidA* を PCR 法で検出した。大腸菌同定株は、ESBL 産生菌の確定試験であるダブルディスク法を実施し、陽性検体を ESBL 産生大腸菌と同定した。

2.4 薬剤感受性試験

薬剤感受性は Kirby-Bauer 法によるディスク法を採用した。使用した抗菌薬は以下の通りである；ABP、CTX、CAZ、CPX、CXM、CFX、IPM、AZT、ACV、T/P、ST、GM、AMK、CIP、TC、TGC、FOM、CP。試験菌株における各抗菌薬に対する感受性の判定は CLSI に準じた⁵⁾。また、各河川における耐性菌の蔓延状況を指標化するために MAR index を採用した⁶⁾。

キーワード：大腸菌、河川、MLST、ESBL 産生遺伝子

連絡先：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

2.5 blaの型別

ESBL 産生遺伝子である *bla* の型別には、mono-plex PCR 法を採用した⁷⁾。対象とした *bla* は、日本や世界中の臨床現場で流行している遺伝子型である *bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、ならびに *bla*_{IMP} との4種類とした。

2.6 Multi-locus Sequence Typing (MLST)

ESBL 産生大腸菌株の東北地方における地理的・空間的分布を評価するために、MLST 法を用いた分子疫学解析を行った。7種のハウスキーピング遺伝子 (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) の配列情報を取得し、データベースである PubMLST (<https://pubmlst.org/>) と照合して Sequence Typing (ST 型) を同定した。

3. 結果と考察

大腸菌の菌種同定と ESBL 確定試験の結果、8つの河川から94株のESBL産生大腸菌が同定された；AB：17株、NT：26株、KK：3株、MB：13株、IW：25株、OM：1株、MG：6株、AK：3株。各河川から同定されたESBL産生菌についてESBL産生遺伝子の型別を行った結果、73%（69株/94株）がCTX-M型と分類された。CTX-M型のESBL産生大腸菌は全ての河川から検出され（図1）、東北地方の河川に広範囲で分布していると考えられた。*bla*_{TEM}の検出率は*bla*_{CTX-M}に次いで高く（23%）、4つの河川（AB、NT、MB、IW）から検出された。特に、IWではTEM型が占有しており、他の7つの河川とは傾向が異なった。これは、河川流域の土地利用の違いによって薬剤耐性菌の出現状況が異なったのかもしれない。*bla*_{SHV}と*bla*_{IMP}の検出率は、それぞれ4%と1%であり、*bla*_{CTX-M}と*bla*_{TEM}と比較して低かった。

ESBL産生菌株の薬剤感受性を評価したところ、CPXに対して全ての菌株が耐性を示した一方で、TGCへの耐性度は低かった。薬剤感受性試験の結果に基づきMAR indexを算出した結果、8つの河川の平均は0.34であり、インドや中国といった他国の数値と比較しても低かった⁸⁾（図2）。KKのMAR indexは、他の東北の河川と比較して0.26と低く、採水地点における耐性菌の汚染が比較的低いと考えられた。なお、同一河川におけるMAR indexの季節的な変動はみられなかった。

各河川から分離したESBL産生大腸菌についてMLST解析を行った結果、世界で流行しているST38がNTから検出された。また、空間的に離れているNTとIWからST405が検出されたことは、ESBL産生大腸菌が広範囲に拡散していることを表している。MBからは検出事例の少ないST1722とST2001が検出され、分離報告があまりないST型がESBL産生能を獲得していたことが明らかとなった。

以上の結果から、東北地方の河川にはCTX-M型のESBL産生大腸菌が広範囲に分布していたが、その汚染状況は諸外国と比較して低いことが明らかとなった。しかしながら、その中に世界中の臨床現場で問題視されているST38が含まれていた事実から、河川に生息する耐性菌には引き続き注視していく必要がある。

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

参考文献

- 1) Dmartak, et al., *Clin. Microbiol. Infect.*, **28**, 447, 2022. 2) Azuma, et al., *Sci. Total Environ.*, **839**, 2022. 3) Nishiyama, et al., *antibiotics*, **10**, 495, 2021. 4) 森ら. 土木学会論文集 G (環境), **77**, 2021. 5) CLSI, M100-S29, 2018. 6) Krumperman, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 165-170, 1983. 7) Dallenne, et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 490-495, 2010. 8) Fadare, et al., *PLoS ONE*, **15**, 2020.

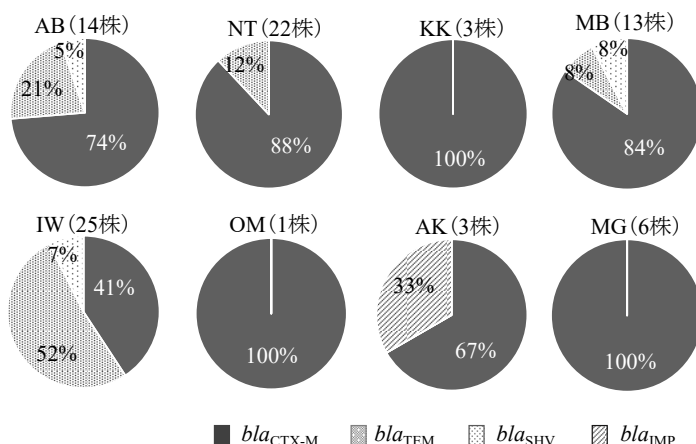


図1 東北地方の河川から単離したESBL産生大腸菌が保有する*bla*の構成割合

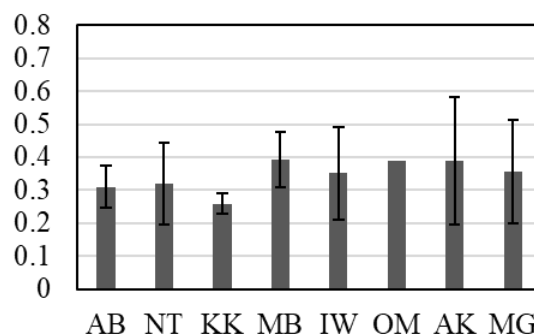


図2 東北の各河川におけるMAR index