

B-30 下水中に存在する腸球菌のバンコマイシンに対する感受性評価

○西山 正晃¹・井口 純²・鈴木 祥広^{3*}

¹宮崎大学大学院工学研究科土木環境工学専攻 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

²宮崎大学IR推進機構 (〒889-1692 宮崎市清武町木原5200番地)

³宮崎大学工学部社会環境システム工学科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

* E-mail:suzuki@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

腸球菌 (*Enterococcus*) は、ヒトを含むほ乳類の腸管内に存在する常在菌であり、下水や河川、沿岸域といった水環境でのふん便汚染の指標細菌として広く用いられている。一方で、高齢者などの細菌感染に対する抵抗力が低下したヒトに対しては、日和見感染症を引き起こすことが知られている¹⁾。腸球菌はもともと各種の抗菌薬に対して自然耐性を示すが、獲得耐性により高度耐性化する場合もある。バンコマイシンに対して耐性を示すバンコマイシン耐性腸球菌 (*vancomycin resistant Enterococci*, VRE) は、現存するほぼ全ての抗菌薬に耐性を示し、有効な抗菌薬が存在しないことから、注意が必要な薬剤耐性菌の1つとして挙げられる。日本の臨床現場においてVREの分離報告数は少ないものの、海外の臨床現場では多数報告されており、VREが原因菌となる院内感染の広がりや危惧されている²⁾。

腸球菌は上述したように、水環境にも広く分布しており、VREも医療現場に限らず、人々の生活と密接に関わる水環境において存在している可能性がある。しかしながら、水環境に由来する腸球菌を対象とした薬剤耐性試験の報告例は一部に限られている³⁾。薬剤耐性腸球菌が身近な水環境中に存在した場合、水辺レクリエーション域のみならず、日常生活において日和見感染症のリスクが存在する可能性がある。このリスク軽減にあたって、水環境における薬剤耐性腸球菌の存否ならびに薬剤耐性に関する情報が喫緊の課題である。

本研究では、流入下水から腸球菌を単離し、バンコマイシンに対する感受性について最小発育阻止濃度 (MIC) 試験によって評価した。また、バンコマイシンを含む7種類の抗生物質に対する感受性についても評価し、バンコマイシン耐性と関連性を検討した。

2. 実験方法

(1) 試料採取

試料は2012年1月26日に宮崎県内にあるA下水処理場から流入下水を採取した。採取した試料はポリエチレン瓶に保存し実験室に持ち帰った後、直ちに実験を行った。

(2) 腸球菌の計数および単離

腸球菌の計数は、メンブランフィルター法によって実施した。試料は、メンブランフィルター (孔径 0.45 μm , Advantec) で吸引ろ過した。そのフィルターを腸球菌選択培地である *membrane-Enterococcus Indoxy- β -D-Glucoside* 寒天培地 (mEI 培地) 上に置き、41 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。加えて、下水中に存在する腸球菌の中からバンコマイシンに耐性を有する菌株をスクリーニングするため、バンコマイシンが各濃度 (2, 4, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) となるように調整したバンコマイシン含有 mEI 培地を作成し、上記の方法と同様に培養した。なお、培地のバンコマイシン濃度設定は、バンコマイシン耐性判定濃度 (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に基づいて設定した。培養後にフィルター上で生育した青色コロニーを腸球菌として計数した。各バンコマイシン濃度において、3つのプレート上に生育したコロニーを計数し、その平均値を腸球菌数とした。計数後、フィルター上に形成した青色コロニーを、各濃度について 11~27 個ランダムに選択し、Todd Hewitt 寒天培地 (寒天 1.5%, Difco) に画線塗抹し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。培養後、生育した単一コロニーを以下の試験に用いた。

(3) 最小発育阻止濃度 (MIC) 試験

MIC 試験は、日本化学療法学会が定めた寒天平板希釈法に従って行った⁴⁾。各対象薬剤は、アンピシリン (ABPC)、ピペラシリン (PIPC)、ペンジルペニシリン

ン (PCG), テトラサイクリン (TC), イミペネム (IPM), エリスロマイシン (EM), およびバンコマイシン (VCM) を用いた (和光純薬). MIC 測定範囲は, ABPC, PIPC, PCG, IPM, EM は 0.25-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TC と VCM は 0.25-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした. なお, 各抗生物質の判定基準は Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ⁹ に従った.

(4) 単離菌株の菌種同定法

単離菌株の同定は, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報を基に行った. 各種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定は以下のように行った. 単離菌株の DNA 抽出は, InstaGene Matrix (BIO RAD) を用いて, 付属の使用説明書に従って実施した. 抽出 DNA をテンプレートとして, 16S rRNA を増幅するユニバーサルプライマー 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 16S-1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3') を用いて, PCR 反応を行った. 反応液には, KAPA Taq Extra (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて, 7.48 μL の滅菌蒸留水, 3.0 μL の 5 \times KAPA Extra Buffer, 1.5 μL の MgCl_2 , 0.45 μL の dNTP Mix (最終濃度: 各 0.3 mM), 各 0.75 μL のプライマー (0.5 μM), 0.08 μL の KAPA Taq Extra DNA ポリメラーゼ (1.25U), 1.0 μL のテンプレート DNA を加え, 全量を 15 μL とした. 反応条件は変性処理を 94 $^{\circ}\text{C}$ で 20 秒間, アニーリングを 62 $^{\circ}\text{C}$ で 20 秒間, および伸長反応を 72 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間とし, 25 サイクル行った. 反応後, 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色して PCR 産物 (約 1500bp) の確認を行った.

次に, BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) を用いて反応を行った. 配列決定には, 16S-27F, 16S-1525R, Ent-16S-2ndF (5'-ATGGACGAAAGTCTGACCGA-3'), Ent-16S-3rdF (5'-TAGATACCC TGGTAGTCCAC-3') の計 4 種類のプライマーを用いた. 反応液は, 6.43 μL の滅菌蒸留水, 0.25 μL の Reaction Mix, 2.0 μL の 5 \times Buffer, 0.32 μL のプライマー (0.5 μM), 1.0 μL の ExoSAP-IT[®] (USB) で前処理した PCR 産物を加え, 全量を 10 μL とした. 反応条件は, 96 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間の変性処理後, 96 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒間, アニーリングを 50 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒間, および伸長反応を 60 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間とし, 25 サイクル行った. 得られた反応液を Sephadex G-50 (GH Healthcare) により精製し, 塩基配列決定を ABI3170, または ABI3130 により行

った.

アセンブルした各株の配列情報を, BLAST 解析とともに, すでに報告されている *Enterococcus* 属標準株の配列情報との比較を行い, 菌種同定を行った. さらに, MEGA 5 を用いて, Clustal W によるアライメントおよび系統樹作成を行った.

3. 結果と考察

(1) 腸球菌数と菌種同定

表 1 に各 VCM 濃度の mEI 培地で生育した腸球菌数, およびランダムに選択した菌株の同定結果を示す. VCM 濃度が 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である通常の mEI 培地では, 腸球菌数は 7.0×10^5 CFU/100mL であった. 一方, VCM を添加した 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地では 1.1×10^5 CFU/100mL, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地では 3.5×10^4 CFU/100mL と腸球菌の増殖が制限され, VCM 濃度の増加とともに, 腸球菌数が低下した. VCM 濃度が 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地の場合, 2.8×10^3 CFU/100mL となり, 通常の mEI 培地と比較して, 腸球菌数は 100 オーダーも減少した.

各 VCM 濃度の mEI 培地上に生育した菌株について, 16S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅し, DNA の塩基配列から菌種同定を行った. 各 VCM 濃度に調整した mEI 培地から単離した全 86 株のうち, *E. faecium* 14 株, *E. faecalis* 14 株, *E. casseliflavus* / *gallinarum* 29 株, その他の細菌として 29 株が同定された. VCM 濃度が 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地からの単離株では, *E. faecium* (67%) と *E. faecalis* (33%) が単離された. VCM 濃度が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地からの単離株では, *E. faecalis* (55%) と *E. casseliflavus* / *gallinarum* (45%), VCM 濃度が 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地からの単離株では, *E. faecalis* (4%), *E. casseliflavus* / *gallinarum* (89%), *Enterococcus* 属以外 (7%) の菌種が単離された. ヒト起源の腸球菌は, *E. faecium* と *E. faecalis* が主要菌種であるとされるが, 今回採取した下水中には, その他の腸球菌も混在していることがわかった. 一方, VCM を判定基準濃度よりもさらに強化した 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の mEI 培地から単離した株は, 腸球菌の陽性コロニーと判断された青色コロニーを釣菌したにも関わらず, 単離した 27 株全てが腸球菌以外の菌種 (*Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*) であった.

表 1 各 VCM 濃度における mEI 培地から単離した腸球菌数および菌株の同定結果

VCM 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	mEI 培地上の腸球菌数 (CFU/100mL)	単離総株 (株)	<i>E. faecium</i> (株)	<i>E. faecalis</i> (株)	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. gallinarum</i> (株)	<i>Enterococcus</i> 属以外 (株)
0	7.0×10^5	21	14	7	0	0
2	1.1×10^5	11	0	6	5	0
4	3.5×10^4	27	0	1	24	2
32	2.8×10^3	27	0	0	0	27

(2) MIC試験

MIC試験の結果を表2に、MIC試験に用いた抗生物質のCLSI判定基準を表3に示す。0 µg/mLのmEI培地から単離した27株のうち、全ての株がVCMに対して感受性を示した。また、VCMには感受性を示したものの、それ以外の6薬剤に全て耐性を示す菌株が2株発見された。2 µg/mLのmEI培地から単離した11株のうち、VCMに対して4株 (36%) が中度耐性を示した。4 µg/mLのmEI培地から単離した27株のうち、VCMに対して6株 (22%) が中度耐性、3株 (11%) が耐性を示した。これに対して、32 µg/mLのmEI培地から単離した全27株がVCMに対して極めて高い耐性を示した。ここで耐性を示した菌株の菌種は、VCMに対して自然耐性を有する*Pediococcus*や*Leuconostoc*であった。

下水中には、バンコマイシンに中度耐性・耐性を示す腸球菌が存在することがわかった。下水やその他の環境水中からバンコマイシン耐性腸球菌を単離することは、その発生源、耐性発現機構、あるいは水環境中での動態などの解明には不可欠なプロセスである。本実験では、下水に存在するVCM耐性腸球菌 (VCM 32 µg/mL) は、全単離株数の3.5 % (3株 / 86株) であり、スクリーニングをしないと単離することは極めて困難であることが示唆された。しかしながら、VCM濃度を4 µg/mLにしたmEI培地を作成することで、バンコマイシン耐性腸球菌のスクリーニングが可能となった。ただし、VCM濃度を強化しすぎると、腸球菌以外のVCMに対して自然耐性を有する*Pediococcus*や*Leuconostoc*が擬似陽性コロニーとして出現するため、mEI培地のVCM濃度は正しく設定する必要がある。一方で、通常のmEI培地の単離株において、VCMに対しては感受性を示したものの、その他の6薬剤の全てに耐性を有する株が検出されており、全菌数に占める割合 (7.4 %, 2株 / 27株) からみても非常に高く、留意すべきである。現在、感染症の治療に利用されている薬剤に対して広く耐性を有する腸球菌が水環境中に分布している可能性がある。

4. まとめ

- (1) MIC 試験の結果、下水においてバンコマイシン中度耐性・耐性腸球菌が確認された。
- (2) 通常の mEI 培地から単離した菌株の中には、VCM を除く 6 薬剤に対して耐性を示す菌株が検出された。
- (3) 通常の mEI 培地から単離した菌株は、*E. faecium*、*E. faecalis* といった腸球菌であった。一方、VCM 濃度が 32 µg/mL の mEI 培地からは、*Pediococcus* や *Leuconostoc* といった VCM に自然耐性を有する菌株が占有した。
- (4) 薬剤耐性腸球菌を単離するには 4 µg/mL 以下の VCM 濃度を mEI 培地に添加すれば良いことが示唆された。

参考文献

- 1) 岡慎一, 島田かおる, 稲松孝思, 浦山京子 (1985) 腸球菌敗血症に関する研究Ⅱ腸球菌敗血症 46 例の臨床的検討, 感染症学雑誌, **59**, pp.545-550.
- 2) 山口敬治, 池田徹也, 森本洋 (2009) 北海道で分離されたバンコマイシン耐性腸球菌の分子疫学解析, 道衛研所報 Rep.Hokkaido Inst.Pub.Health, **59**, pp.57-60.
- 3) Zdragas, A., et al.: Molecular characterization of low-level vancomycin-resistant enterococci found in coastal water of Thermaikos Gulf, Northern Greece, *Water Research*, **42**, 1274-1280, 2008.
- 4) Luczkiewicz, A., et al.: Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, **44**, 5089-5097, 2010.
- 5) 抗菌薬感受性測定法検討委員会最終報告 (2007) 日本化学療法学会誌, **56**, pp49-56.
- 6) Clinical Laboratory Standards Institute, **27(1)**, M100-S17, 2007.

表2 各VCM濃度添加mEI培地から単離した菌株におけるMIC試験結果

VCM濃度 (µg/mL)	種	総数 (株)	菌株数 (株)	ABPC	PIPC	PCG	TC	IMP	EM	VCM
0	<i>E. faecium</i>	14 (67%)	2							
			3							
			2							
			5							
			2							
2	<i>E. faecalis</i>	7 (33%)	5							
			2							
			6							
			5							
			1							
4	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. gallinarum</i>	5 (45%)	2							
			1							
			1							
			1							
			1							
32	<i>E. faecalis</i>	1 (4%)	3							
			1							
			5							
			4							
			1							
			2							
			1							
			1							
			1							
			3							
			1							
32	<i>Pediococcus</i>	2 (7%)	2							
			4 (15%)							
			18 (67%)							
			5 (18%)							

□ … 感受性 ■ … 中度耐性 ■ … 耐性

表3 MIC試験に用いた抗生物質のCLSI判定基準[®]

	感受性 (µg/mL)	中度耐性 (µg/mL)	耐性 (µg/mL)
アンピシリン (ABPC)	≤8	-	≥16
ピペラシリン (PIPC)	≤8	-	≥16
ベンジルペニシリン (PCG)	≤8	-	≥16
テトラサイクリン (TC)	≤4	8	≥16
イミペネム (IMP)	≤4	-	≥16
エリスロマイシン (EM)	≤0.5	1~4	≥8
バンコマイシン (VCM)	≤4	8~16	≥32