

B-3 河川水から単離した基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の特徴

○佐藤 昂哉・中山 達仁・佐々木 康・筒井 裕文*・浦瀬 太郎

東京工科大学大学院・バイオニクス専攻（〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1）

* E-mail: tsutsuihf@stf.teu.ac.jp

1. 背景および目的

近年、ヒトをはじめとする動物の感染症治療や予防を目的とした抗生物質や合成抗菌剤の使用にともなう薬剤耐性細菌の発生が問題となっている。特に、日和見感染の原因となる細菌群による薬剤耐性の獲得において、病院内のみならず自然環境が耐性遺伝子のプールとして機能している可能性も指摘されている¹⁾。一方、現在の感染症治療で重要な位置を占める第三世代や第四世代のセファロスポリン薬剤などの比較的新しい抗生物質に着目した国内での検討は限られている。セファロスポリン薬剤に対する抗生物質耐性は基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)の産生によることが知られており²⁾、近年はCTX-M型遺伝子による耐性菌が世界中で増加傾向にあり、これら遺伝子はプラスミドを介して水平世代の他種細菌にも伝播するため、耐性菌の蔓延が危惧されている。

そこで本研究では、河川水から基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌を単離し、単離に用いる培地の種類による釣菌株の抗菌スペクトルのちがいを調べ、さらに河川水中から釣菌したESBL産生大腸菌が保有するCTX-M型の耐性遺伝子(*bla*CTX)について調査した。

2. 実験材料および方法

(1) 供試河川試料

試料水の採水は121°C15分間オートクレーブ滅菌した1リットルプラスチックボトルを用いて行った。選択培地の違いによる影響を、2015年2月16日に合流式下水道の越流水の影響を受ける大岡川(神奈川県横浜市南区弘明寺付近)の試料を用いて調査した。また、*bla*CTX遺伝子に関する検討を、2015年5月27日に分流排除域と合流排除域の混在した多摩川(南多摩水再生センター下流)の試料を用いて調査した。試料採取後は速やかに氷冷下で研究室に持ち帰った。

(2) 河川水試料からの大腸菌の単離

採取した河川水の適量を、S-Pakメンブレンフィルター(孔径0.45 μ m, MILLIPORE)を用いて吸引ろ過することでメンブレンフィルター上に細菌を捕捉し、その後そのフィルターを平板培地上で暗所にて24時間培養した。なお、供試試料が1 mlを下回る場合には、直接平板培地上に塗布して培養した。全大腸菌数の計数のための培地としてCHROMagar™ ECC培地(CHROMagar)を用いた。大岡川の試料からのESBL産生大腸菌単離のためにCHROMagar™ ESBLE培地(CHROMagar)およびセフトキシム(CTX, 64 μ g/mL)を添加したECC培地の2種類を用いた。また、多摩川の試料ではCTXを添加したECC培地を用いた。ECC培地において青色を呈色するコロニー、およびESBLE培地において濃いピンクを呈色するコロニーをそれぞれ大腸菌として計数した。

ESBLE培地およびCTX添加ECC培地上に生育したESBLE産生が疑われる大腸菌は、薬剤耐性の擬陽性の排除と耐性菌の純化を目的として、同じ培地で再度コロニーを形成させ、単離菌株を取得した。

(3) ディスク拡散法による薬剤耐性プロファイルの確認

単離された細菌の薬剤耐性プロファイルは、KBディスク‘栄研’(栄研化学株式会社)を用い、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M 100-S19³⁾に従って確認した。

具体的には、単離菌株を滅菌済みの綿棒にてパールコアミューラーヒントンス寒天培地上にまんべんなく塗布し、その培地の上に24 mm以上の間隔をあけてKBディスクを置き、暗所、37°Cで24時間培養を行った。その後、各KBディスクの周囲に形成された発育阻止円の直径を測定することでその薬剤に対する耐性を評価した。本研究では、CTXのほかにセフトジジム(CAZ)、セフピロム(CPR)、レボフロキサシン(LVFX)、イミペネム(IMP)を使用した。ここで、感受性、中間耐性、耐性の判断は、

CLSI Document M 100-S24⁹⁾およびKBディスクに付属の説明書に従って実施した。今回は、中間耐性を示す株も耐性株として計数した。また、CTXにおいて形成された発育阻止円の直径に対して、クラブラン酸が添加されたディスクでの発育阻止円の直径が5 mm以上大きい場合に、その供試株をESBL産生大腸菌と判定した。

(4) PCRによる*bla*CTX遺伝子の検出

多摩川より釣菌されたESBL産生大腸菌を対象とし、近年重要視されているCTX-M型の耐性遺伝子に特に着目してEdelsteinらの方法⁹⁾に一部改変を行ったcolony-PCRにより*bla*CTX遺伝子の保有率を調査した。

プライマーは既知の*bla*CTX遺伝子をもとに作成された[CTX-M/F, CTXM/R]を使用した⁹⁾。CTX添加ECC培地上で一晩培養したコロニーを用い、50 µlの反応系で実施した。PCR反応は94℃、5分間の初期変性ののち、94℃、20秒の変性と62℃、30秒のアニーリング、72℃、30秒の伸長を35サイクル繰り返し、72℃、10分間の最終伸長により実施した。PCR産物を3%のアガロースゲルを用いた電気泳動に供し、予想された断片長(544 bp)のバンドが確認されたものを、*bla*CTX遺伝子保持細菌とした。さらに、その増幅産物を*pst* Iおよび*pvu* IIによるDouble digestionに供し、その断片長を3%アガロースゲルを用いた電気泳動にて確認し、*bla*CTX遺伝子をさらにCTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、および、CTX-M-9グループに細分した。

3. 実験結果および考察

(1) 異なる選択培地で釣菌した大腸菌の薬剤耐性の違い

大岡川より採取した水試料に含まれる大腸菌をECC培地、CTXを添加したECC培地、およびESBL培地を用いて培養した結果、ECC培地にて全大腸菌が11.6 CFU/ml検出された。一方、CTXを添加したECC培地では 4.6×10^2 CFU/ml、ESBL培地では0.68 CFU/mlの大腸菌がそれぞれ検出され、ESBL培地を用いた場合に比較的多くの耐性株が検出された。また、CTX添加ECC培地から釣菌した大腸菌のうちの89%と、ESBL培地から釣菌した大腸菌のすべてがESBL産生株と判定された。この率を検出された大腸菌数に当てはめると、CTX添加ECC培地およびESBL培地によって釣菌されたESBL産生大腸菌は全大腸菌数のそれぞれ0.35%および5.9%であると推定された。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業の2013年度報告書によると第三世代セファロスポリン耐性大腸菌は参加医療機関の10.1%で検出され、検査株のうち17.8%がCTX耐性、1.5%が中間耐性を示したとされており、臨床現場に比較すると水環境でのCTX耐性の大腸菌検出割合は低かった。

ECC培地上から20菌株、CTXを添加したECC培地上か

ら18菌株、そしてESBL培地上から12菌株をそれぞれ無作為に選出し、薬剤耐性プロファイルを調査した。その結果をTable 1に示す。ECC培地から釣菌した大腸菌ではすべての株が、今回用いたCTX、CAZ、IPM、LVFX、CPRのいずれの抗生物質に対しても感受性であった。一方、CTXを添加したECC培地から釣菌した大腸菌はすべてがCTXに対して耐性で、さらに、CAZやLVFX、CPRに耐性を示す菌株が高い割合で認められた。それに対し、ESBL培地から釣菌した大腸菌はCTX以外にLVFXに耐性を示す菌株が高い割合で認められた一方でCAZ、CPRに対する耐性を示す菌株の割合が低いことがあきらかとなった。

Table 1. Profiles of resistance in *E. coli* isolated from Ooka river.

Medium for isolation	Number of isolates	Resistant profile
ECC	20	-
ECC+CTX	13	CTX-CAZ-LVFX-CPR
	1	CTX-CAZ-LVFX-IPM
	1	CTX-CAZ-LVFX
	1	CTX-LVFX-CPR
	1	CTX-CAZ-CPR
	1	CTX-CPR
ESBL	2	CTX-CAZ-LVFX-CPR
	7	CTX-LVFX
	1	CTX-CPR
	2	CTX

KBディスク試験において、CTXを添加したECC培地から釣菌した大腸菌の阻止円の直径が7-13 mmと小さいのに比べて、ESBL培地から釣菌した大腸菌では、阻止円の直径が17-24 mmの比較的大きいものが多く含まれたことから、CTXを添加したECC培地ではセファロスポリンに対する強い耐性を示す細菌のみを検出することができたものと考えられた。これはCTXの添加濃度を現在のCLSIによるMIC値(4µg/mL)ではなく2010年度基準におけるMIC濃度(64µg/mL)に設定したことも理由のひとつであると考えられる。一方で、ESBL培地ではセファロスポリンのうちCTXに対する弱い耐性を示す大腸菌や耐性スペクトルの狭い大腸菌も多く検出することができたと考えられる。

(2) 多摩川から釣菌したESBL産生大腸菌からの*bla*CTX遺伝子の検出

多摩川より採取した水試料に含まれる大腸菌をECC培地およびCTXを添加したECC培地を用いて培養した結果、ECC培地にて大腸菌が20.9 CFU/ml検出され、CTXを添加

したECC培地では0.11 CFU/mlの大腸菌が検出された。また、CTX添加ECC培地から無作為に釣菌した28株の大腸菌はいずれもESBL産生大腸菌であったため、今回使用した試料においてCTX添加ECC培地によって釣菌されたESBL産生大腸菌は全大腸菌数の0.53%であり、大岡川における結果と同水準の値を示した。

つぎに、釣菌した大腸菌を*blaCTX*遺伝子をターゲットとしたPCRに供したところ、28菌株中22菌株において標的とするバンドが確認され、およそ82%の菌株がCTX-M型のESBLを産生しているものと考えられた。また、CTX-M型ESBL産生遺伝子を保持する22株のうち、21株がCTX-M-1グループに属するESBL産生遺伝子を保持しており、この1株がCTX-M-8グループに属するESBL産生遺伝子を保持していた。このことから、今回調査した地点においては主にCTX-M-1型のESBL産生大腸菌が存在すると考えられた。

これら28株の薬剤耐性プロファイル进行调查した結果をTable 2に示す。CTXを添加したECC培地を用いて釣菌した大腸菌のうち、すべての菌株がCPRに中間耐性以上の耐性を示し、大部分がCAZに対する中間以上の耐性を示した。また、半分以上の菌株がLVFXに耐性を示すことが明らかとなった。さらに、カルバペネム系のIMPに対する中間耐性を示す菌株が2株認められた。また、CTX-M型ESBLのグループ分けの結果と耐性プロファイルとの間に明確な関係性が認められなかった。この原因として、今回調査した28株では傾向を見出すには十分な数ではなかった可能性が考えられ、今後検討を重ねることで知見を集積していくことが必要である。共通のグループの*blaCTX*遺伝子を保持するESBL産生細菌であったとしても、水環境には多様な耐性菌のソースがあると考えられ、ESBL産生能の獲得メカニズムの解明のためには更なる調査が必要であると考えられた。

4. まとめ

河川水中に存在するESBL産生大腸菌について、使用する選択培地の種類により、検出される生菌数や耐性プロファイルに違いが生じることが確認された。ESBL検出用培地ではCTX添加大腸菌検出用培地と比較し、より弱い耐性や狭い耐性スペクトルを持つ大腸菌までESBL産生菌として検出する傾向を示し、全大腸菌の5.9%がESBL産生大腸菌として検出された。一方で、CTX添加大腸菌検出培地ではCTXに対する強い耐性を示すもののみが検出でき、大岡川と多摩川の試料において全大腸菌の0.35%と0.53%がESBL産生大腸菌として検出された。多摩川河川水よりCTX添加ECC培地で釣菌されたESBL産生大腸菌の多くがCTX-M-1型の遺伝子を有していた。しかし、薬剤耐性プロファイルとCTX-M遺伝子の有無や型との関係は明確に示されなかった。

Table 2. Profiles of resistance in *E. coli* isolated from Tama river.

ID	Resistant profile ^a	<i>blaCTX</i> genes
1	CTX-CPR-IMP	-
2	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-1 group
3	CTX-CPR-CAZ-LVFX-IMP	CTX-M-1 group
4	CTX-CPR	CTX-M-1 group
5	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-8 group
6	CTX-CPR-CAZ-LVFX	-
7	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
8	CTX-CPR	CTX-M-1 group
9	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
10	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
11	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-1 group
12	CTX-CPR-LVFX	CTX-M-1 group
13	CTX-CPR	CTX-M-1 group
14	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-1 group
15	CTX-CPR-LVFX	CTX-M-1 group
16	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-1 group
17	CTX-CPR-LVFX	-
18	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-1 group
19	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
20	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
21	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
22	CTX-CPR-CAZ-LVFX	-
23	CTX-CPR-LVFX	-
24	CTX-CPR-CAZ	-
25	CTX-CPR-CAZ	CTX-M-1 group
26	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group
27	CTX-CPR-LVFX	CTX-M-1 group
28	CTX-CPR-CAZ-LVFX	CTX-M-1 group

参考文献

- 1) Allen et al. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments, *Nature rev. microbial.*, **8**(4), 251-259.
- 2) Paterson and Bonomo (2005) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update, *Clin. Microbiol. Rev.*, **18**(4), 657-686.
- 3) CLSI (2009) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement M100-S19. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 4) CLSI (2014) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 5) Edelstein et al. (2003) Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**(12), 3724-32.