

## 2. 都市下水の生物処理過程における生残大腸菌の系統群と薬剤耐性率の変化

謝 暉<sup>1\*</sup>・小椋 義俊<sup>2</sup>・糠澤 桂<sup>1</sup>・鈴木 祥広<sup>1</sup>

<sup>1</sup>宮崎大学工学部社会環境システム工学科 (〒889-2192宮崎学園木花台西1-1)

<sup>2</sup>久留米大学 医学部 感染医学講座 基礎感染医学部門 (〒830-0011 福岡県久留米市旭町67)

\* E-mail: z370702@student.miyazaki-u.ac.jp

薬剤耐性大腸菌の水系を経由した感染・拡大が世界中で危惧されている。大腸菌は、4つの主要な系統群(A, B1, B2およびD)に分けられ、水環境に広く存在する。しかし、水環境における系統群と薬剤耐性大腸菌の関係に関する情報は極めて乏しい。そこで本研究では、都市下水の生物処理過程における大腸菌の系統群と薬剤耐性の関係について、好気性条件のバッチ式攪拌実験によって検討した。そして、時系列的(0~2週間)に、下水中に生残する大腸菌の系統群と薬剤耐性を調べた。大腸菌のB2群は生残性が高く、薬剤耐性率が生物処理が進行するに伴って増加する傾向を示した。以上のことから、下水処理過程において、好気条件での生残性が高く、薬剤耐性を保有・獲得する大腸菌B2群が残留する可能性が示唆された。

**Key Words :** *Escherichia coli, municipal wastewater, phylogroups, antibiotic resistant*

### 1. はじめに

国際社会において、薬剤耐性菌の出現は、ヒトと動物の健康に影響を与える深刻な問題である。日本では、2017年に代表的なメチシリン耐性黄色ブドウ球菌血症とフルオロキノロン耐性大腸菌血症が原因で、年間8,000人の死亡が確認されている<sup>1)</sup>。また、EUでは薬剤耐性菌を原因とする感染症によって、毎年33,000人が死亡しているとされる<sup>2)</sup>。米国疾病対策センター (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) の2019年の報告によると、薬剤耐性を保有した細菌および真菌による感染症で35,000人を超える死亡が確認されている。現在、世界中において薬剤耐性菌による死者数は年間70万人と報告されており<sup>3)</sup>、2050年までに1,000万人に達すると推測されている。薬剤耐性菌は、今日における世界の最も深刻な問題であり、耐性菌によろしのリスクの予防と低減は取り組むべき最重要な課題である。これらの深刻な状況をふまえて、World Health Organization (WHO) は、2017年に世界中に深刻な脅威を与える薬剤耐性菌として、腸内細菌科に属する大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌などを選定し、それらに関する調査データを公表して問題の深刻さを警告している。腸内細菌科は、胃腸感染症、尿路感染症および他の様々な腸内感染症に関連する病原体であ

り<sup>4,5)</sup>、なかでも大腸菌は、ヒトおよび動物の最重要な細菌である。一般的に、ほとんどの大腸菌は病原体を保有していないが、中には病原体を含む大腸菌が存在する。多くの食中毒、下痢や腹痛の主な原因は、病原大腸菌である<sup>6)</sup>。また、大腸菌は下水処理水中に一部が残留し、下水処理場を経由して河川等の水環境に拡散している可能性が高い。実際に、河川などの水環境において薬剤耐性大腸菌が検出されている<sup>7,8)</sup>。

大腸菌は、遺伝子構造に基づいて、4つの主要な系統群 (A, B1, B2およびD) に分類され<sup>9)</sup>、各系統群によって、異なる生態的性質を示す。宿主の起源および環境因子は、大腸菌の多様性と存在量に影響を与える可能性があり、宿主の起源、病原性、および一般的な大腸菌株の有用な情報は、遺伝子構造およびコーディング情報によって区別できる<sup>10,12)</sup>。一般に、ヒトおよび動物の腸内に存在する大腸菌は、A群やB1群の可能性が高い。Escobar-Páramo, et al. らの研究報告によると、ヒトから分離された大腸菌共生菌株は主にA群に属している<sup>13)</sup>。動物から分離された菌株のほとんどはB1群に属している<sup>14)</sup>。また、下水から単離された大腸菌は、D群とB2群が主要な部分を占めている<sup>15)</sup>。しかしながら、流入下水や下水処理水中の大腸菌における系統群と薬剤耐性率の関係に関する情報や知識は極めて乏しい。そこで本研究では、

下水処理場の流入下水を用いてバッチ式攪拌混合実験を行い、好気条件での下水の生物処理過程における大腸菌の系統群と薬剤耐性プロファイルの時系列的变化を調査した。

## 2. 実験方法

### (1) 試料採取

A処理場（2018年1月24日）とB処理場（2019年1月15日）から流入下水を採取した。下水は採取後、5 Lの滅菌済みポリエチレン容器に保管し、実験室に持ち帰った。菌数計測とバッチ実験は、下水の採取後、4時間以内に開始した。

### (2) バッチ式攪拌混合実験

バッチ式の好気性条件（暗所、20°C）において、下水を2週間にわたって攪拌混合（200 rpm）し、1週間ごとに試料を分取した。試料は、メンブランフィルター（孔径0.45 μm, Advantec）でろ過し、CHROMagar™ ECC培地（関東化学）上に貼付後、37 ± 0.5°Cで24時間培養した。生育した青色コロニーを大腸菌陽性株として計数した。そして、各試料（0 day, 7 days, 14 days）から大腸菌の陽性株をそれぞれ100株単離した（AとBの下水処理場：各300株）。全ての陽性株について、MALDI-TOF MS（microflexLT/SH, BRUKER）を用いて菌種を同定した。

その他の測定項目は以下の通りである。pH、電気伝導率（EC）、濁度（カオリン、積算球式濁度計、三菱化学）、TOC濃度（全有機炭素計TOC-V、島津製作所）。

### (3) 大腸菌の系統群分類

大腸菌と同定された株について、アルカリ熱抽出法によってDNAを抽出した。大腸菌の系統群（A, B1, B2およびD）は、Mutiplex-PCR法に従って解析した<sup>9)</sup>。PCR反応試薬は、KAPA Taq Extra PCR kit（KAPA BIOSYSTEMS製）を使用し、プライマーは、3つの遺伝子（*arpA*, *chuA*, *yjaA*）と1つのDNA断片（TspE4.C2）を使用した。また、PCR反応のポジティブコントロールとして、標準株ATCC25922（*Escherichia coli*）を使用した。

### (4) 最小発育阻止濃度試験

本研究では、寒天平板希釈法を用いて、11種類の抗菌薬に対する最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration, MIC）試験を実施した。MIC試験には、Clinical Laboratory Standard Institute（CLSI）の情報を参照し、次の11種類の抗菌薬を使用した：ペニシリン系抗菌薬であるアンピシリン（ABPC）（和光純薬工業株式会社）、

セファロsporin系抗菌薬であるセフトジジム（CAZ）（和光純薬）、セファゾリン（CFZ）（和光純薬）、セフェピム（CPM）（和光純薬）、セフォタキシム（CTX）（和光純薬）、アミノグリコシド系抗菌薬であるゲンタマイシン（GM）（和光純薬）、カルバペネム系抗菌薬であるイミペネム（IPM）（和光純薬）、フルオロキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン（CIP）（和光純薬）、モノバクタム系抗生物質であるアズトレオナム（AZT）（和光純薬）、テトラサイクリン系抗生物質であるテトラサイクリン（TC）（和光純薬）、フェニコール系抗生物質であるクロラムフェニコール（CHL）（和光純薬）。MIC値の判定には、CLSIの基準値を参照した。なお、品質管理株として大腸菌の標準株ATCC25922（*Escherichia coli*）を使用し、そのMIC値は実施したすべての試験において範囲内であることを確認した。

## 3. 実験結果および考察

### (1) TOCと大腸菌数の変化

図-1に、バッチ式攪拌実験を用いた下水の好気性処理過程におけるTOC濃度と大腸菌数の変化を示す。TOC濃度は、AとBのいずれの処理場の下水においても、1週間で60～70%除去され、2週間後には、10 mg-C/L程度に低下した。また、濁度も102.4度から59.1度に減少した。一方の大腸菌数についても、2週間後には、AとBの下水でそれぞれ $2.6 \times 10^4$  CFU/100 mlと $9.3 \times 10^4$  CFU/100 mlとなり、

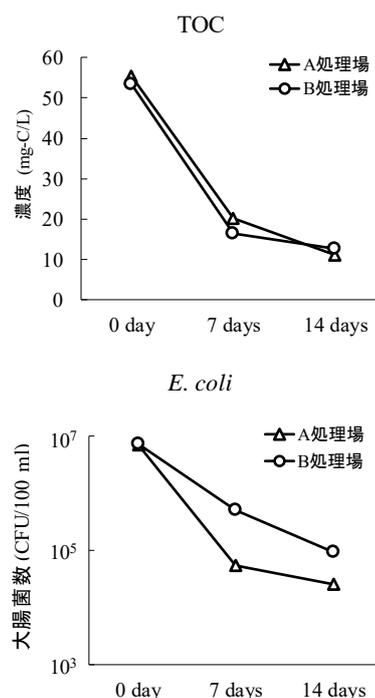


図-1 TOC濃度と大腸菌数の変化

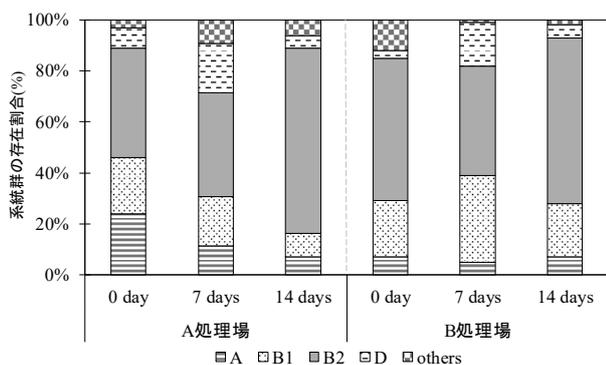


図-2 A下水処理場から単離した株の系統群

1.9 log<sub>10</sub>から2.4 log<sub>10</sub>減少した。このことから、下水の好気性処理は進行したことが確認された。

### (2) 大腸菌陽性株における大腸菌の同定率

バッチ式攪拌実験において各試料の時系列で単離した全600株（AとBの処理場の下水 × 300株）について菌種同定した。A処理場の下水では、300株のうちの297株*E. coli*として同定された。残る3株は、*Citrobacter braakii*と同定された。また、B処理場の下水では、300株のうちの298株が*E. coli*として同定された。残る2株は、*Escherichia fergusonii*と同定された。各試料から、大腸菌の認識率は99%であった。主な偽陽性株は、*Citrobacter braakii*と*Escherichia fergusonii*であった。

### (3) 大腸菌の系統群分類と存在割合の変化

A処理場の下水から単離した株の系統群は、B2群が最も多く、その割合は0日の43%（43/100株）から2週間後には73%（72/99株）に大幅に増加した（図-2）。同様に、B処理場の下水の場合においても、B2群が0日の56%（56/100株）から2週間後には65%（65/99株）に増加した。これらの結果から、AとBのいずれの処理場においても下水の大腸菌の主要な系統群はB2群であり、生物処理過程においてB2群の生残性は、他の系統群と比較して極めて高いことが示唆された。

### (4) 大腸菌の薬剤耐性試験

同定された595株大腸菌について薬剤耐性試験を実施した。図-3に、AとBの処理場の下水における薬剤耐性大腸菌の検出率を示す。A処理場の下水では、時系列的に単離した大腸菌の薬剤耐性率（耐性株数/同定株数）は、0日の場合で38%（38/100株）、1週間後の場合で55.1%（54/98株）、2週間後の場合で57.6%（57/99株）となり、生残した大腸菌の耐性率が大幅に高くなった。また、B下水処理場においても薬剤耐性率は、0日の場合で46.5%（46/99株）、1週間後の場合で48%（48/100株）、

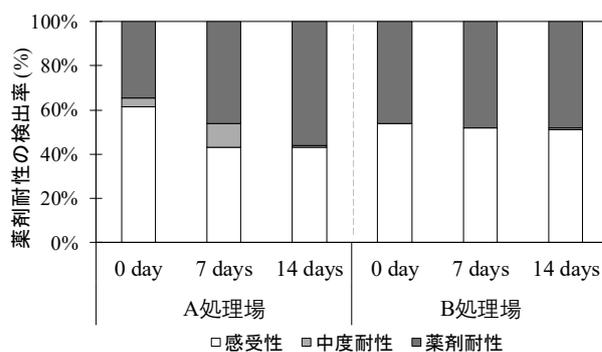


図-3 薬剤耐性大腸菌の検出率

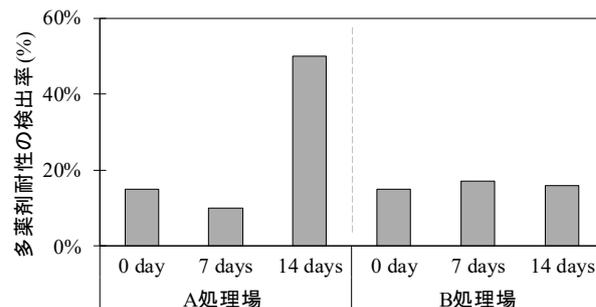


図-4 多剤耐性大腸菌の検出率

2週間後の場合で49.5%（49/99株）となり、耐性率が高くなった。大腸菌の薬剤耐性率は、下水の生物処理過程において増加することが示唆された。

薬剤耐性菌の調査において、多剤耐性菌株の検出は重要な情報である。図-4に、AとBの処理場の下水における多剤耐性菌株の検出率を示す。A処理場で検出された149株の耐性大腸菌のうち、3剤以上の抗菌薬に耐性を示した多剤耐性大腸菌が76株（51%）検出された。その内訳は、0日が15株、1週間後が11株、2週間後が50株であり、2週間後において最も多く検出された。B処理場の下水では、149株の耐性大腸菌のうち、0日、1週間後、2週間後に検出された多剤耐性大腸菌株は15～17株であり、多剤耐性大腸菌の増加は認められなかった。下水処理場、あるいは下水の違いによって、処理水中の多剤耐性菌の検出率が大きく異なり、処理水において高くなる可能性がある。

### (5) 系統群と薬剤耐性の関係

生残大腸菌における系統群と薬剤耐性の関係を整理した。A処理場の各試料について、系統群ごとに耐性率を比較すると、最も高く、0日の場合で37.2%（16/43株）、1週間後の場合で62.5%（25/40株）、2週間後の場合で63.8%（46/72株）となり、耐性率は2週間後に大幅に増加した（図-5）。同様に、B処理場の各試料について系統群ごとに耐性率を比較すると、各系統群の中でB2群の耐性率が最も高く、0日の場合で48.2%（27/56株）、

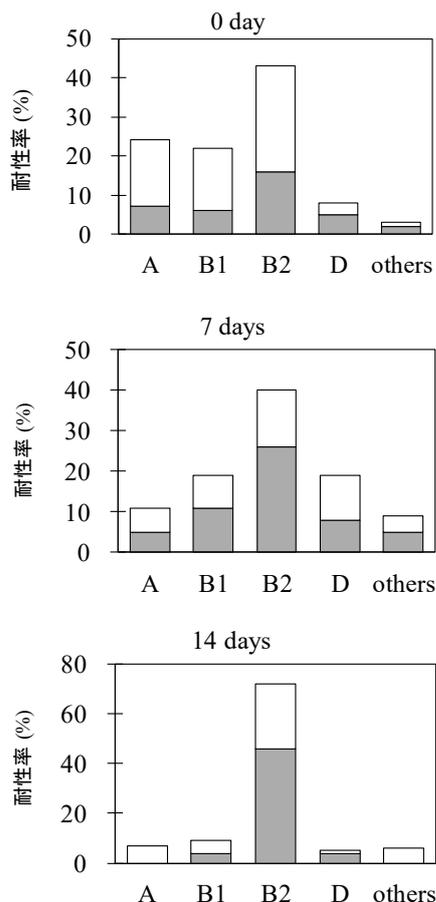


図5 A下水処理場系統群B2の薬剤耐性の割合

1週間後の場合で55.8% (22/43株) , 2週間後の場合で63.1% (41/65株) となった。AとBの処理場のいずれの下水を用いた実験においても、2週間後の処理水には、大腸菌のB2群が生残り、高い薬剤耐性を示した。下水処理場から検出された薬剤耐性大腸菌の主要な系統群はB2群であり、好気性条件下の生物処理過程で生残り、薬剤耐性率も増加することが示唆された。

#### 4. 結論

バッチ式攪拌混合実験によって、好気条件下での下水の生物処理過程における大腸菌の系統群と薬剤耐性プロファイルの時系列的変化を検討した。好気性処理した下水中においてB2群の大腸菌の生残性が最も高く、約70%を占めた。また、生残大腸菌の主要な系統群であるB2群の薬剤耐性率が大幅に増加した。下水の好気性生物処理過程において、系統群によって生残性が著しく異なること、生残大腸菌の薬剤耐性率が増加する可能性が示唆された。特に、大腸菌の系統群であるB2群の挙動に注目すべきである。

#### 参考文献

- 1) Tsuzuki, S., Matsunaga, N., Yahara, K., Gu, Y., Hayakawa, K., Hirabayashi, A., Kajihara, T., Sugai, M., Shibayama, K., Ohmagari, N. : National trend of blood-stream infection attributable deaths caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Japan, *Journal of Infection and Chemotherapy*, Vol 26, pp. 367-371, 2019.
- 2) Cassini, A., Högberg, D. L., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, S. G., Cotinat, M. M., Kretzschmar, E., M., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, A., D., Oliveira, C., T., Struelens, J. M., Suetens, C., Monnet, L. D. and the Burden of AMR Collaborative Group : Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a 2019.
- 3) Neill, O. J. : Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, *The Review on Antimicrobial Resistance Chaired*, pp. 1-20, 2014.
- 4) Anderson, A. D., Garrett, V. D., Sobel, J., Monroe, S. S., Fan-khauser, R. L., Schwab, K. J., Bresee, L. S., Mead, P. S., Higgins, C., Campana, J. and Glass, R. L. : Multistate Outbreak of Nor-walk-like Virus Gastroenteritis Associated with a Common Caterer, *Journal. of Epidemiology.*, Vol. 154, No. 11, pp. 1013-1019, 2001.
- 5) Walters, S. P., Thebo, A. L. and Boehm, A. B. : Impact of urbanization and agriculture on the occurrence of bacterial pathogens and stx genes in coastal waterbodies of central California, *Water Research.*, Vol. 45, pp. 1752-1762, 2011.
- 6) Chan, Y. M., Thoe, W., Lee, J. H. W. : Field and laboratory studies of *Escherichia coli* decay rate in subtropical coastal water, *Journal of Hydro-environment Research*, Vol. 9, pp. 1-14, 2015.
- 7) Müller, A., Stephan, R. and Nüesch-Inderbinen, M. : Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans., *Science of the Total Environment*, Vol. 541, pp. 667-672, 2016.
- 8) Akebe, L. K. A., Eunice, U. J., and Maggy, N. B. M.: Occurrence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulence genes in water and bed sediments of a river used by communities in Gauteng, South Africa, *Environmental Science and Pollution Research*, No.23, pp. 15665-15674, 2016.
- 9) Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E.: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, pp. 4555-4558, 2000.
- 10) Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J. : Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations, *Microbiology*, Vol 147, pp. 1671-1676, 2001.
- 11) Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Menac'h, A. L., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C.: Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 70, pp. 5698-5700, 2004.

- 12) Orsi, R. H., Stoppe, N. C., Sato, M. I., Gomes, T. A., Prado, P. I., Manfio, G. P.: Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs, *Research Microbiology*, Vol 158, pp. 420–427, 2007.
- 13) Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., LeGall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B.: Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates, *Environmental Microbiology*, Vol 8, pp. 1975–1984, 2006.
- 14) Higgins, J., Hohn, C., Homor, S., Frana, M., Denver, M., and Joerger, R.: Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *Microbiology Methods*, Vol 70, pp. 227–235, 2007.
- 15) Anastasi, E. M., Matthews, B., Gundogdu, A., Vollmerhausen, T. L., Ramos, N. L., Stratton, H.: Prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 76, pp. 5788–5786, 2010.