

水環境における薬剤耐性緑膿菌の実態調査

宮崎大学大学院	学生員	○梶井	翔太
宮崎大学大学院	学生員	古川	隼士
宮崎大学農学部	非会員	吉田	照豊
宮崎大学工学部	正会員	鈴木	祥広

1. はじめに

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は自然環境における順応性に優れていることから、河川水、沿岸水、および土壌等の環境中において広く分布している細菌である。疫学分野においては、日和見性の病原体としてよく知られており、人間だけでなく動物や植物にも感染する¹⁾。また、緑膿菌は、各種抗生物質に対して自然耐性を示すことが多く、さらに、緑膿菌に対して抗菌作用を有する薬剤に対しても耐性を獲得することが報告されている。抗緑膿菌作用を有する薬剤としてキノロン系、カルバペネム系、およびアミノグルコシド系の3系統が挙げられるが、特に、これらの薬剤に対して同時に耐性を示す緑膿菌を多剤耐性緑膿菌と呼ばれている。

薬剤耐性緑膿菌に関する研究は、主に疫学分野において積極的に行われており、知見・情報が蓄積されている²⁾。しかしながら、水環境中における緑膿菌の存在実態に関する報告はほとんどないのが現状である。前述の通り、緑膿菌は水環境中に常在する細菌であり、環境中から単離された緑膿菌株が薬剤耐性を有した場合、人間の健康に対してリスクを及ぼす危険性も否定できない。そこで本研究では、宮崎県内の河川を対象として、緑膿菌の実態調査を行った。さらに、河川水試料から単離した緑膿菌株について最小発育阻止濃度 (MIC) 試験を行い、薬剤耐性緑膿菌の存在について明らかにすることを目的にした。

2. 実験材料と方法

2. 1 試料採取

河川水試料は、宮崎県内の大淀川 (一級河川)、八重川 (一級河川)、清武川 (二級河川)、および加江田川 (二級河川) から採取した。河川の表層から採取した試料は、ポリエチレン瓶に保存し実験室に持ち帰った後、ただちに実験に用いた。なお、大淀川においては試料採取を2回実施した。

2. 2 緑膿菌の判定および計数

採取した河川水試料は、メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m, Advantec) を用いて吸引ろ過した。ろ過後のフィルターを緑膿菌選択培地である NAC 寒天培地 (日水製薬) 上に置き、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後、フィルター上に形成されたコロニーのうち、紫外線下において黄緑・蛍光色を示したすべてのコロニーを Todd Hewitt 培地 (寒天 1.5%, TH 培地, Difco) に単離した。TH 培地において 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後、再度、NAC 培地に釣菌し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後、黄緑・蛍光色を示した菌株についてのみ緑膿菌と判定し、緑膿菌数としてカウントした。

2. 3 緑膿菌の同定試験

NAC 寒天培地上に形成されたコロニーのうち、紫外線下において黄緑・蛍光色を示すコロニーは緑膿菌と判定される。そこで、NAC 寒天培地上で緑膿菌として判定されたコロニーについて、TaqMan[®] *Pseudomonas aeruginosa* Detection Kit (Applied Biosystems) を用いて同定試験を行った。実験方法および手順はキットの使用説明書に従った。

2. 4 最小発育阻止濃度 (MIC) 試験

最小発育阻止濃度 (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³⁾。対象薬剤は、抗緑膿菌作用を有するシプロフロキサシン (キノロン系薬剤, CPFX), アミカシン (アミノグルコシド系薬剤, AMK), およびピペラシリン (PIPC) と、抗生物質として一般的に使用されているテトラサイクリン (TC), セフトキシム (CTX), アンピシリン (ABPC), およびバンコマイシン (VCM) とした (以上、すべて和光純薬)。MIC 測定範囲は、CPFX, AMK, PIPC, TC, ABPC, CTX, および VCM は 0.25-256 μ g/mL, ならびに CPFX は 0.0625-128 μ g/mL とした。

キーワード：緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 多剤耐性緑膿菌, 最小発育阻止濃度 (MIC) 試験, 河川水
連絡先：〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1, TEL.0985-58-7339, FAX.0985-58-7344

3. 結果と考察

3. 1 実験方法

表 1 に各河川における緑膿菌数を示す。緑膿菌数は、八重川において最も高く 2.2×10^2 CFU/100mL であり、次いで、清武川で 50 CFU/100mL を示した。八重川の試料を採取した地点は、下水道未整備地区であり、また、河川流量に対して家庭排水を多く含む都市河川である。したがって、八重川の緑膿菌数は生活排水の流入による影響を受けていることが示唆された。

表1 各河川における緑膿菌数

試料	緑膿菌数 (CFU/100mL)
大淀川①	3.0
大淀川②	3.0
八重川	2.2×10^2
清武川	50
加江田川	3.0

3. 2 緑膿菌の同定

NAC 寒天培地によって緑膿菌として判定されたコロニーについて、各河川から合計 36 株を単離し、緑膿菌同定キットを用いて緑膿菌の同定試験を行った。36 株のうち、緑膿菌として同定された菌株は 25 株 (69%) であった。このことから、各河川の緑膿菌数を正確に把握するためには、NAC 培地による判定に加えて、緑膿菌同定キットを用いた同定試験が重要であることがわかった。

3. 3 MIC 試験

NAC 寒天培地による判定とキットによる同定試験によって緑膿菌として同定された菌株 (25 株) について、MIC 試験を行った (図 1)。抗緑膿菌作用を有する CPFX, AMK, および PIPC の MIC 値は、それぞれ $0.125 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$, $0.5 \sim 4.0 \mu\text{g/mL}$, および $4.0 \sim 16 \mu\text{g/mL}$ であった。これら 3 種の薬剤の CPFX, AMK, および PIPC について、耐性があると判断される MIC 値の基準は、それぞれ $4.0 \mu\text{g/mL}$, $32 \mu\text{g/mL}$, および $128 \mu\text{g/mL}$ であり、今回の調査において、抗緑膿菌作用を有する薬剤に耐性を示す菌株は存在しなかった。TC および CTX の MIC 値は、それぞれ $32 \sim 64 \mu\text{g/mL}$ および $8.0 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ であった。また、抗緑膿菌作用を有しないとされる ABPC および VCM については、25 株すべてが最大濃度 ($256 \mu\text{g/mL}$) においても耐性を示した。

4. まとめ

(1) 宮崎県内の各河川において、緑膿菌は $3.0 \sim 2.2 \times 10^2$ CFU/100mL の範囲で検出され、家庭排水による影響を受けている都市河川において高濃度で検出された。

(2) NAC 寒天培地において緑膿菌と判定された 36 株のうち、緑膿菌同定キットによって 25 株 (69%) が同一菌種として同定された。正確な緑膿菌の同定には、選択培地上での判定に加え、遺伝子識別を利用した同定キットを用いた試験を併用することが適当である。

(3) 抗緑膿菌作用を有する CPFX, AMK, および PIPC に耐性を示す菌株は存在しなかったが、いくつかの緑膿菌菌株は TC および CTX に耐性を示した。ABPC と VCM については、すべての菌株が最大濃度でも耐性を示した。

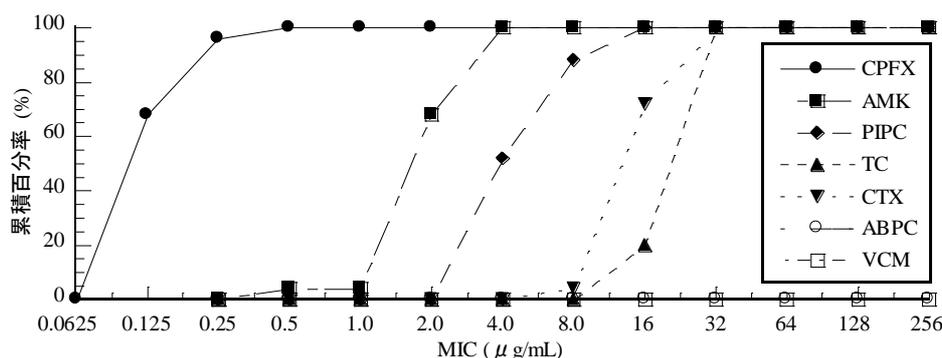


図 1 各薬剤の MIC 累積曲線

参考文献

- 1) Khan, N. H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, M. and Kogure, K. (2007) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb. Ecol.*, **53**, 173-186.
- 2) 藤上良寛, 桑原正雄, 児玉有里, 清水里美, 渡部八重子, 山根博行, 土井正男 (2004) 県立広島病院で分離された喀痰由来緑膿菌の薬剤感受性, *日本化学療法学会雑誌*, **52**, 214-218.
- 3) 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**, 49-56.