

河川水中および下水中におけるアンピシリン耐性大腸菌の分布ならびに大腸菌群および腸内細菌科細菌を対象とした測定結果との比較

岩根泰蔵¹・山本和夫²・川本尋義³・福士謙介⁴・島崎大⁵

¹正会員 工博 独立行政法人国立環境研究所 化学環境研究領域 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)

²正会員 工博 東京大学教授 環境安全研究センター (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

³医博 岐阜県生物産業技術研究所 部長研究員 (〒505-0004 岐阜県美濃加茂市蜂屋町上蜂屋 3481-2)

⁴正会員 Ph.D. 東京大学助教授 環境安全研究センター (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

⁵正会員 工博 国立保健医療科学院 水道工学部 (〒108-8638 東京都港区白金台 4-6-1)

多摩川河川水、全国 6 地域の下水処理場試料水、多摩川上流域世帯の単独処理浄化槽試料水におけるアンピシリン耐性大腸菌の分布を調査した。多摩川河川水では、流下に伴って下水処理場放流水の影響により全菌数は増えるものの、耐性割合には有意な増加が認められなかった。全菌濃度が高い底質においても耐性割合に有意な差が無かった。また、多摩川流域の下水処理場では、処理過程を通じた耐性割合の変化は認められなかった。全国 6 地域の下水処理場を比較すると、流入水中の全菌数には有意な差が認められたが耐性割合に有意差は無く、いずれの処理場でも処理過程を通じた耐性割合の有意な変化は認められなかった。さらに浄化槽については、耐性割合に世帯ごとの大きなばらつきが観察された。また、大腸菌群および腸内細菌科細菌では、構成菌種の変動が耐性割合に影響すると推察された。

Key Words: ampicillin-resistant *Escherichia coli*, river water, wastewater, coliform group, Enterobacteriaceae

1. はじめに

抗生素質に対して耐性を示す細菌、抗生素質耐性菌による感染症は、現在の医療における大きな課題のひとつである。疫学研究では従来、感染症原因細菌の耐性の有無による死亡リスクならびに入院リスクの差が調査されている。例えば、耐性菌による *Salmonella* および *Shigella* 由来市中感染症の入院リスクは、非耐性菌に比べ 2~200 倍、死亡リスクは同じく 1.5~15 倍^{1), 2)} であり、非常に高いと言える。また耐性菌感染そのものをリスクと見なし、そのリスク要因を調査する研究も行われている^{3), 4)}。

さらに、畜産衛生学では現在、家畜への抗生素質投与がもたらす耐性菌がヒトにもたらす影響に関するリスク評価が進められている。これはすなわち、家畜が保有する細菌に発生した耐性が食物・職業的接触・下水などを通じてヒト感染症細菌へと伝播する可能性について評価する試みである。米国 FDA(食品医薬品局)は、鶏肉消費による耐性菌感染に特化したリスク評価モデルを作成している。その最初の試みは、下痢症を起こすカンピロバクターのフルオロキノン系薬剤耐性菌を対象としたモデル⁵⁾であり、これによると、

1998 年および 1999 年ともに 1 年間で米国民の約 3 万人に 1 人が、鶏肉消費による食中毒の中でも、特に耐性菌感染の健康影響を受けた、と結論づけられている。

ところが、環境工学および衛生工学における水環境中の微生物リスク評価では、現在のところ細菌の抗生素質耐性については考慮されていない。現行の、或いは将来実現可能な広域都市水循環形態の総合的評価には、多面的な水環境質の評価が重要であり、その一つが潜在的なリスクに関する予見的な評価である。そして、細菌の抗生素質耐性はこの未認知リスクの一つと定めることができる。特に、伝達性の抗生素質耐性は、無害な細菌から病原細菌にその性質が伝わる可能性があり、その環境中の挙動に注目することはリスクの予見的な評価となる。

水環境における抗生素質耐性リスクに関する評価を行うためには、まず、耐性菌の水環境中の分布に関する知見を得る必要がある。しかし、国内の各種水環境を対象とした耐性菌の分布調査例は極めて少なく、また地理的な分布に関しての考察はなされていない。そこで我々は、河川水および下水中に存在する耐性菌について、対象薬剤をアンピシリン(ABPC)、



図-1 多摩川概略図。地点 A～K は図-2 および図-3 の水質データ地点。
本研究では A: 羽村堰, H: 多摩川原橋, K: 調布堰にて採水した。

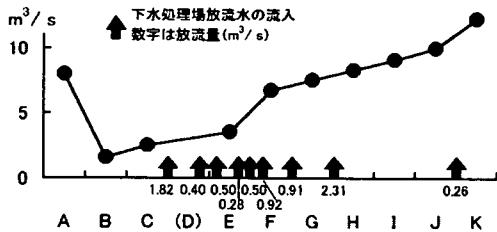


図-2 多摩川の平均流量^{8), 9)}と下水処理場平均放流水量^{10), 11)}(共に平成 10 年)。地点 A～K は図-1 参照。

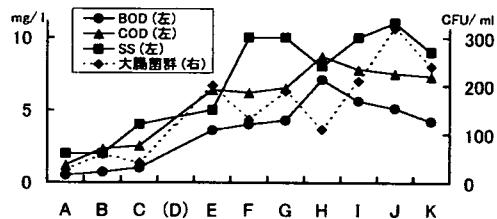


図-3 多摩川における BOD・COD・SS・大腸菌群数平均値^{10), 11)}(平成 10 年)。地点 A～K は図-1 参照。

対象菌種を大腸菌 (*Escherichia coli*) に限定して測定した。

薬剤 ABPC と同系統である β -ラクタム剤の新しい抗生物質に対する伝達性の耐性は、現在の臨床において最も重要な耐性の一つである。そして、その耐性遺伝子は多くの ABPC 耐性大腸菌が持つ遺伝子の変異によって生じ得る^{6), 7)}。よって、本研究で着目する大腸菌が持つ ABPC 耐性は、腸内細菌科細菌間における臨床上重要な伝達性の抗生物質耐性の、基礎的なタイプの一つと言える。また、大腸菌を対象とするアプローチは選択培地の普及の面から最も簡便である。

本研究は特に、これまで大腸菌を対象としては調査が行われていなかった、下水処理場放流水による

河川水中の耐性菌割合の変化、ならびに下水処理過程を通じた耐性菌割合の変化について明らかにする事を目的とした。また、国内の下水中の ABPC 耐性大腸菌分布についても統計的解析を試みるとともに、浄化槽を対象とした調査も行った。さらに、既往の水環境を対象とした調査研究においては、大腸菌群や腸内細菌科細菌、一般細菌という、より幅広い対象菌種群の測定がよく用いられている。しかし、これらの研究では、各細菌種が元来持つ耐性については考慮されていない。本研究では、これら大腸菌群ならびに腸内細菌科細菌 (Enterobacteriaceae) を対象とした測定も同様に行い、これらの手法の妥当性について検討した。

2. 実験方法

(1) 試料の採水

試料水の採取は 1999 年 10 月～2001 年 9 月に行つた。

a) 多摩川河川水の採水

東京都および神奈川県を流れる多摩川(図-1)において、羽村堰(A)、多摩川原橋(H)、調布堰(K)の 3 地点で表流水を採水した。また調布堰では、底質を 5 秒間巻き上げて濁らせた試料も同時に採取した。採水は各地点について 8 回ずつ行った。採取した試料水はその日のうちに実験に供した。羽村堰では、東京都水道局が上水取水を行っている。この地点より下流には 10 の下水処理場が立地しており、多摩川およびその支流には放流水が流れ込んでいる。羽村堰での水道取水によって大幅に減少した流量は、下水処理場放流水によって大きく回復している。河川流量^{8), 9)}および下水処理場放流水量^{10), 11)}のグラフを図-2 に示した。また、図-3 に示すように、各種水質項目も処理場放流水の影響を大きく受けている。

b) 多摩川流域下水処理場試料の採水

採水は 6ヶ所の処理場で計 8 回(1ヶ所で 3 回、残りは 1 回ずつ)行った。流入水、二次処理水、放流水をスポット採取した。放流水には、採取後すぐに 3% 漢方チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1/100 量加え、残留塩素の影響を取り除いた。試料は採取日に実験に供した。

c) 全国 5 地域下水処理場試料の採水

全国 5 地域、北海道(試料採取回数: 3 回)、秋田県(3 回・処理水は 1 回)、静岡県(1 回)、岐阜県(13 回)、沖縄県(6 回)に所在する下水処理場から試料水を採取した。いずれの処理場も、運転方式に標準活性汚泥法を採用している。流入水、二次処理水を

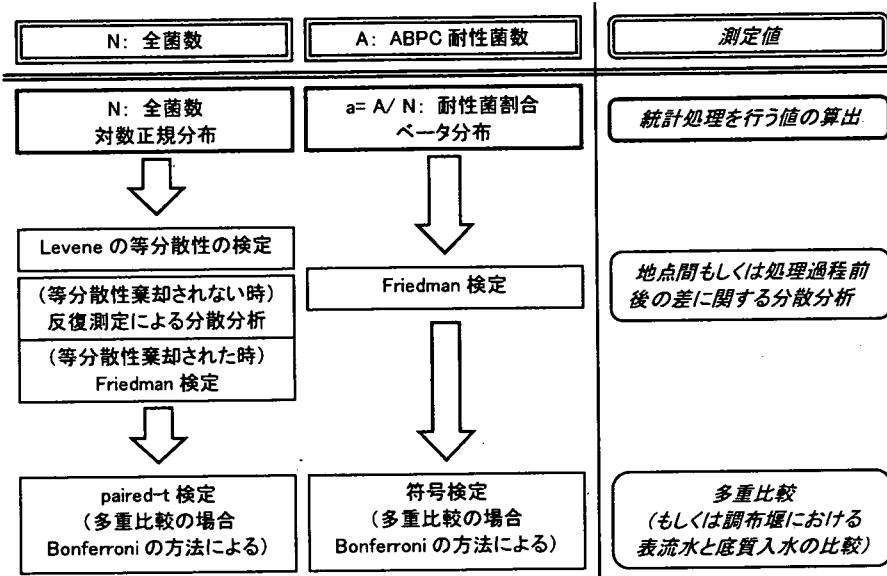


図-4 多摩川河川水と流域下水処理場の試料に対する統計処理の手順.

同日に採取した(放流水は採取していない)。採取した試料は冷蔵運搬され、採取後3日以内に実験に供した。なお、多摩川流域の下水処理場試料を用いて、採水当日と3日後の各測定値を比較したが、試料保存による各測定項目への影響は認められなかった。

d) 単独処理浄化槽試料の採取

羽村堰より上流の主な汚濁負荷源は、浄化槽放流水である(東京都、青梅市、奥多摩町への問い合わせに対する回答による)。そこで、青梅市および奥多摩町の5世帯(世帯アヘオ)の住宅に設置されている単独処理浄化槽から試料水を採取した(各1回ずつ)。いずれの浄化槽も5人用或いは7人用であり、運転方式に接触ばっ気式処理法を採用している。試料水は、接触ばっ気槽および放流口から同日に採取した。放流水には、採取後すぐに3%滅菌チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えた。試料は採取日に実験に供した。

(2) 菌数の測定

細菌の計数には、何れの項目についても寒天培養法(混釀法)を採用した。

多摩川河川水では大腸菌を測定した。下水処理場試料では大腸菌に加え、大腸菌群、さらには一部の試料について腸内細菌科細菌を測定した。浄化槽試料では、大腸菌と大腸菌群を測定した。大腸菌の測定には合成発色基質酵素培地(Merck社: Chromocult Coliform Agar)を用いた。大腸菌群の測定にはデソキシコロイド酸塩寒天培地(栄研化学社)、腸内細菌科細菌の測定にはVRBD寒天培地(Merck社)を使用した。

試料は適宜、滅菌リン酸緩衝液にて希釀するか、希釀しない場合には検水量を適宜 1~50mLとした。混釀培地は37°Cにて約1日培養した。

それぞれの培地に関して、通常法にて全菌数を測定すると共に、ABPC(和光純薬社:無水アンピシリン)を濃度 32mg/L^[12]となるように加えた培地でも細菌数を測定し、その計数値をABPC耐性菌数とした。

(3) 統計処理の手順

それぞれの試料について、全菌数(N)とABPC耐性菌割合(a)を求めた。すなわち、各培地ごとに、NおよびABPC耐性菌数(A)を計数し、 $a = A/N$ として算出した。Nは対数正規分布に従うと仮定した。また、aはベータ分布に従うと仮定した^[13]。平均値の点推定には最尤法を用いた。これらの値を用いて、以下の統計的検討を行った。有意水準は5%を採用した。

a) 多摩川河川水(大腸菌)

全菌数Nおよび耐性菌割合aについて、地点間の差を検定するために、図-4のような手順で統計処理を行った。羽村堰、多摩川原橋、調布堰の3地点間の比較では、全菌数については反復測定による分散分析を行い、Levene検定により等分散性が棄却された場合はFriedman検定を行った。差のある組み合わせを抽出する場合には、Bonferroniの方法によるpaired-t検定を用いて多重比較を行った。耐性菌割合については、Friedman検定とBonferroniの方法による符号検定を用いた多重比較を行った。

調布堰での表流水と底質入りの試料水の比較では、全菌数についてはpaired-t検定、耐性菌割合につい

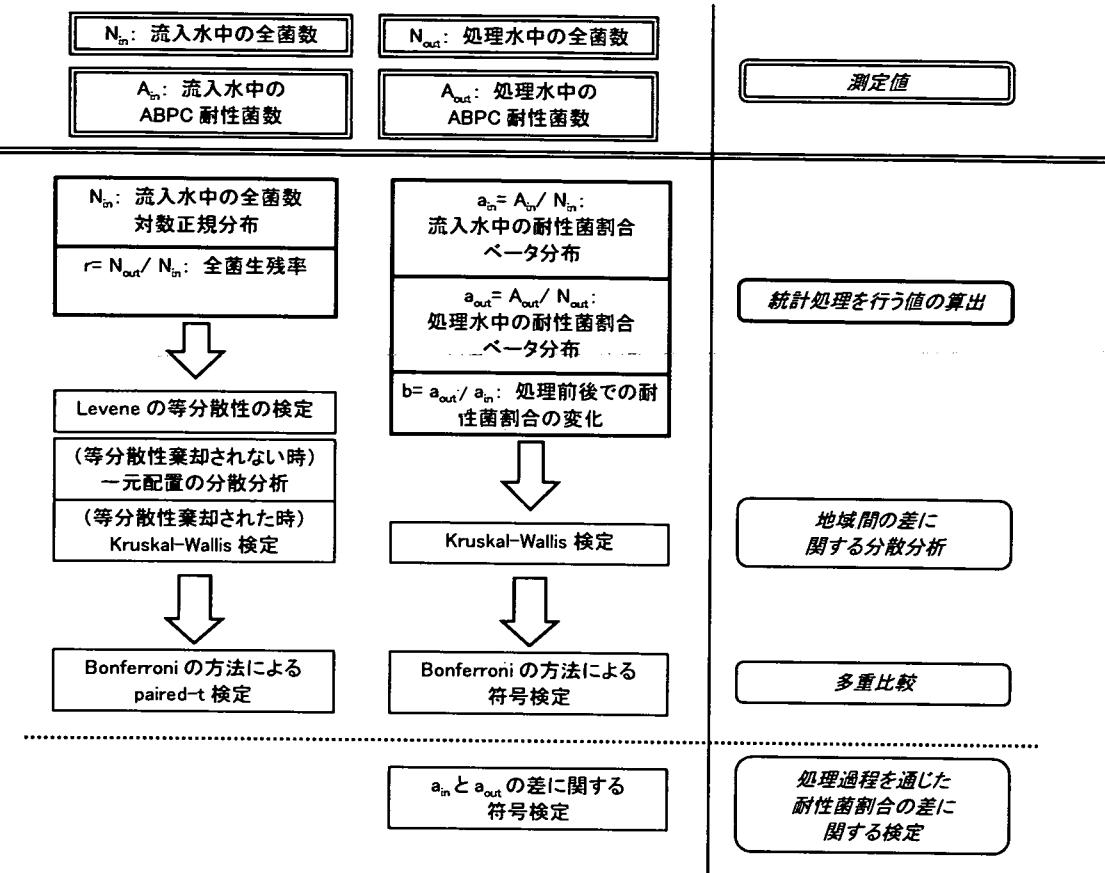


図-5 全国の下水処理場の試料に対する統計処理の手順.

ては符号検定を行った。

b) 多摩川流域下水処理場試料水(大腸菌)

全菌数 N および耐性菌割合 a について、処理過程前後の差を検定するために、河川水と同様に図-4 のような手順で統計処理を行った。

c) 全国下水処理場試料水(大腸菌・大腸菌群・腸内細菌科細菌)

流入水と処理水のデータセットについて以下の数値を算出し、図-5 のような手順で統計処理を行った。

流入中の全菌数: N_{in}

全菌の生残率(処理効率の指標として):

$$r = N_{out}/N_{in}$$

流入中の耐性菌割合: $a_{in} = A_{in}/N_{in}$

処理中の耐性菌割合: $a_{out} = A_{out}/N_{out}$

耐性菌割合について処理水中と流入水中の両者の比: $b = a_{out}/a_{in}$

以上の項目について 6 地域間の差を検定するためには分散分析を行った。 N_{in} に関しては一元配置の分散分析を行い、Levene 検定によって等分散性が棄却された場合は Kruskal-Wallis 検定を行った。 差のある組

み合わせの抽出のためには、Bonferroni の方法による paired-t 検定を用いた多重比較を行った。 r , a_{in} , a_{out} , b に関しては Kruskal-Wallis 検定を行い、差のある組み合わせの抽出のためには Bonferroni の方法による符号検定を用いた多重比較を行った。

さらに、二次処理までの処理過程を通じた耐性菌割合の差を検定するために、 a_{in} と a_{out} の差に関する符号検定を行った。

(4) ABPC 耐性大腸菌の血清群別試験

ABPC 含有大腸菌検出培地上で検出されたコロニーを無作為に単離して、O 血清群別試験を行った。 本研究では、混合 O 血清(デンカ生研社病原大腸菌免疫血清)を用いた。

3. 結果

(1) 大腸菌を対象とした測定

a) 多摩川河川水

全菌数(図-6)は、羽村堰から多摩川原橋の間で、

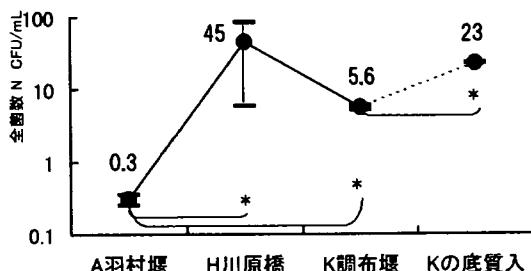


図-6 多摩川河川水における大腸菌数 N(平均土標準偏差). *は多重比較により地点間に 5% 水準にて有意差が認められた組み合わせ.

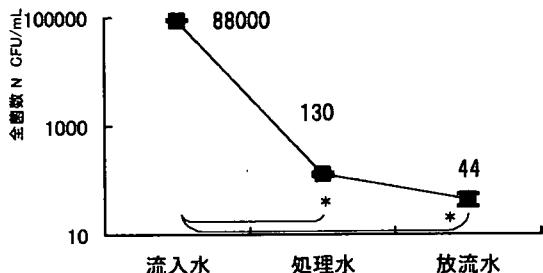


図-8 多摩川流域下水処理場における大腸菌数 N(平均土標準偏差). *は多重比較によりサンプル間に 5% 水準にて有意差が認められた組み合わせ.

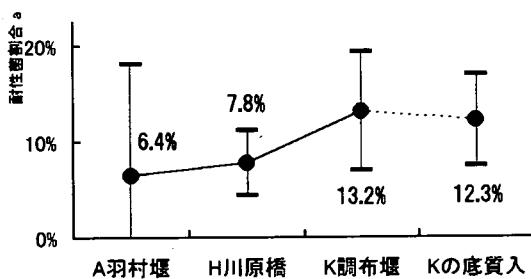


図-7 多摩川河川水における ABPC 耐性大腸菌割合 a(平均土標準偏差). 5% 水準にて有意差無し.

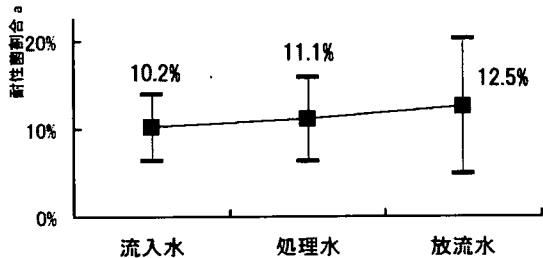


図-9 多摩川流域下水処理場における ABPC 耐性大腸菌割合 a(平均土標準偏差). 5% 水準にて有意差無し.

約 150 倍に有意に増加した. また調布堰において底質を巻き上げた場合も、約 4 倍に有意に増加した.

耐性菌割合(図-7)は、羽村堰で 6.4%, 川原橋で 7.8%, 調布堰で 13.2% であった. ただし、羽村堰での標準偏差が大きかったこともあり、地点間の有意な差は認められなかった. また、調布堰の底質入り試料水では 12.3% であり、巻き上げられた底質中と河川表流水中の耐性菌割合に有意な差は認められなかった.

b) 多摩川流域下水処理場

全大腸菌数(図-8)は二次処理までに削減率約 99.9% と大幅に減少した.

ABPC 耐性菌割合(図-9)は、流入水 10.2%, 二次処理水 11.1%, 放流水 12.5% であり、二次処理までの処理過程および塩素接触を通じた有意な変動は認められなかった.

c) 全国 6 地域下水処理場

図-10~14 に、地域ごとの流入水中の全菌数 N_{in} 、全菌生残率 r 、流入水中の耐性菌割合 a_{in} 、処理水中の耐性菌割合 a_{out} 、耐性菌割合についての処理水中と流入水中の比 b (対数値)を示した. $\log(b) < 0$ ならば $a_{in} > a_{out}$, $\log(b) > 0$ ならば $a_{in} < a_{out}$ である.

流入水中の全菌数(図-10)に関しては、地域間に有意な差が生じた. 多重比較により、「北海道 < 沖縄」「秋田 < 多摩」「秋田 < 沖縄」という有意差が検出された. しかし、処理過程を通じた全菌数の生残率(図-11)には地域間の有意差は認められなかった.

一方、耐性菌割合では、流入水中(図-12)および処理水中(図-13)、処理水中と流入水中の比(図-14)ともに地域間に有意な差が認められなかった. そこで、全地域をまとめて a_{in} と a_{out} の差を符号検定したところ、 a_{in} と a_{out} の有意差はなく、二次処理までの処理過程を通じた耐性菌割合の変動は認められなかった.

d) 多摩川上流域の単独処理浄化槽

全菌数(図-15)は、ばっ氣槽において世帯間の差が最大 16 倍であったのが、放流水ではその差が 1900 倍にまで広がった. すなわち、塩素接触による処理効率には、最大 99.96%(世帯ア)から最低 30%(世帯オ)まで消毒装置間のばらつきがあった.

そして、耐性菌割合(図-16)についても世帯間のばらつきは大きく、アおよびオの 2 世帯において耐性菌割合は非常に低く、オではばっ氣槽および放流水とも 0.1% 以下であった. その他の世帯では、最大 10.7% の耐性菌割合(世帯イ)を示した. なお、イおよびオの 2 世帯では、浄化槽内の水にトイレ用洗浄剤

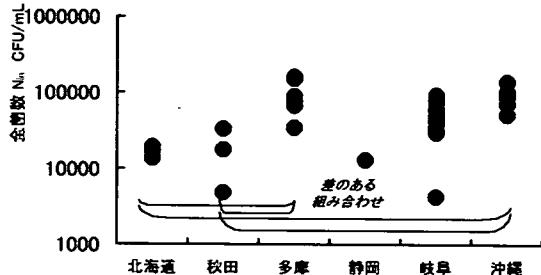


図-10 全国6地域下水処理場の流入水全大腸菌数 N_{in} の比較。多重比較により5%水準にて有意差が認められた組み合わせを示した。

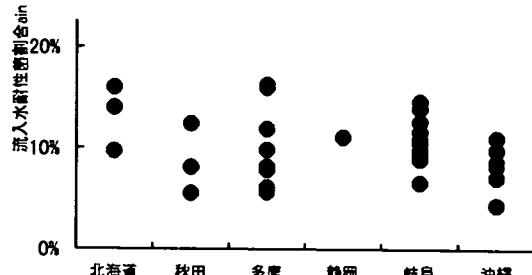


図-12 全国6地域下水処理場の流入水ABPC耐性大腸菌割合 a_{in} の比較。5%水準にて地域間の有意差無し。

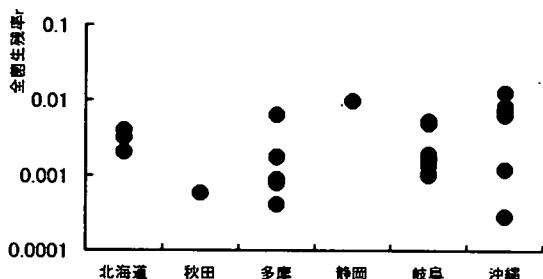


図-11 全国6地域下水処理場の全大腸菌生残率 r の比較。5%水準にて地域間の有意差無し。

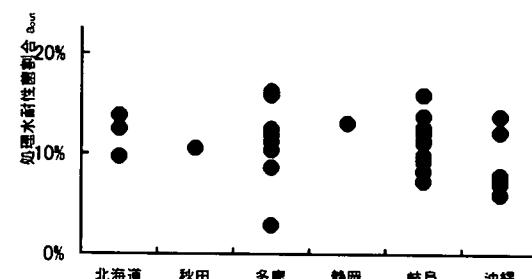


図-13 全国6地域下水処理場の処理水ABPC耐性大腸菌割合 a_{out} の比較。5%水準にて地域間の有意差無し。

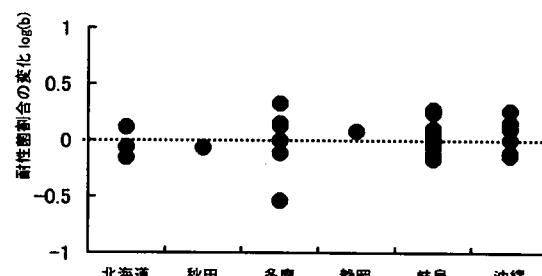


図-14 全国6地域下水処理場のABPC耐性大腸菌割合変化 b の比較(対数値)。5%水準にて地域間の有意差無し。

また、 a_{in} との a_{out} の差についても、符号検定により5%水準にて有意差無し。

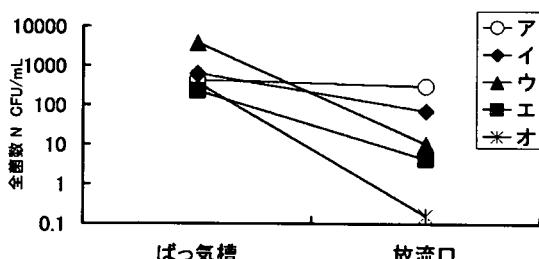


図-15 多摩川上流域にある5世帯(ア～オ)の単独処理浄化槽における大腸菌数

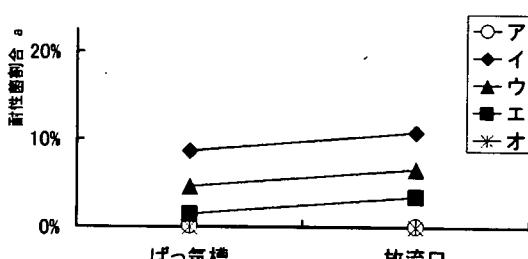


図-16 多摩川上流域にある5世帯(ア～オ)の単独処理浄化槽におけるABPC耐性大腸菌割合

香剤による緑色の着色が認められた。しかし、全菌数、ABPC耐性菌割合共に、その影響は認められなかつた。

e) 単離耐性株の血清群別試験

多摩川河川水および多摩川流域下水処理場由来

のABPC耐性大腸菌60株を単離した。これらについて混合O血清8種を用いて病原性が疑われる計43種の血清型に対応する抗体の有無を検査した結果、どの単離株も陰性と判定された。従って、これらのABPC耐性大腸菌は非病原性であると推察できる。

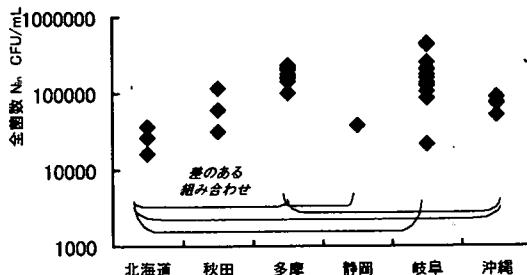


図-17 全国6地域下水処理場の流入水全大腸菌群数 N_{in} の比較. 多重比較により5%水準にて有意差が認められた組み合わせを示した.

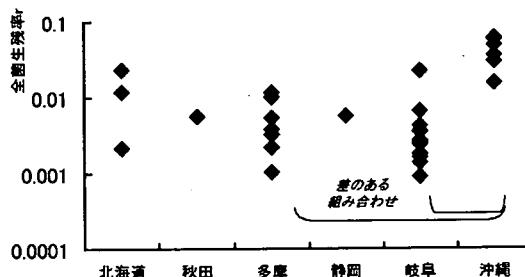


図-18 全国6地域下水処理場の全大腸菌群生残率 r の比較. 多重比較により5%水準にて有意差が認められた組み合わせを示した.

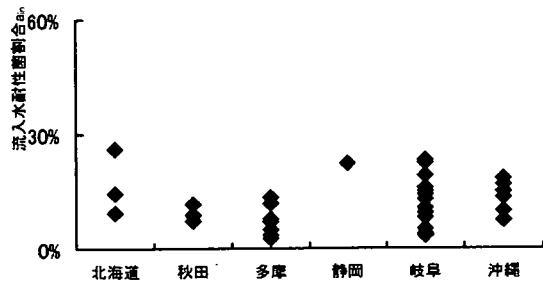


図-19 全国6地域下水処理場の流入水ABPC耐性大腸菌群割合 a_{in} の比較. 5%水準にて地域間の有意差無し.

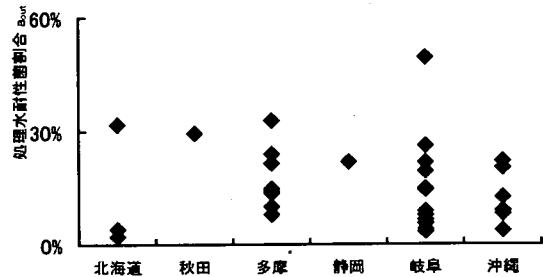


図-20 全国6地域下水処理場の処理水ABPC耐性大腸菌群割合 a_{out} の比較. 5%水準にて地域間の有意差無し.

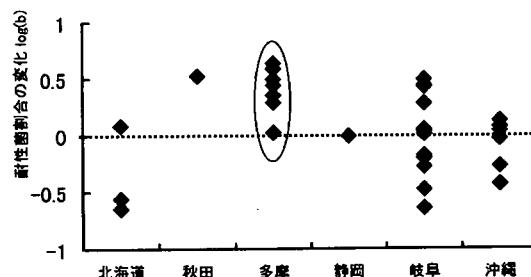


図-21 全国6地域下水処理場の処理水ABPC耐性大腸菌群割合変化 b の比較(対数値). 5%水準にて地域間に有意差あり.

また, a_{in} との a_{out} の差については, 多摩地域(丸囲み)において, 符号検定により5%水準にて有意に $a_{in} < a_{out}$.

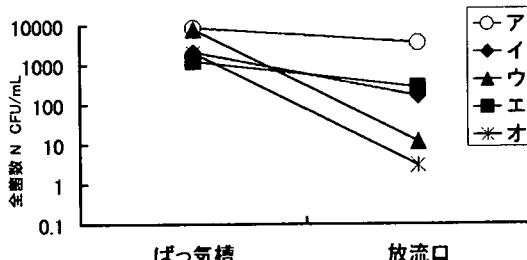


図-22 多摩川上流域にある5世帯(ア～オ)の単独処理浄化槽における大腸菌群数

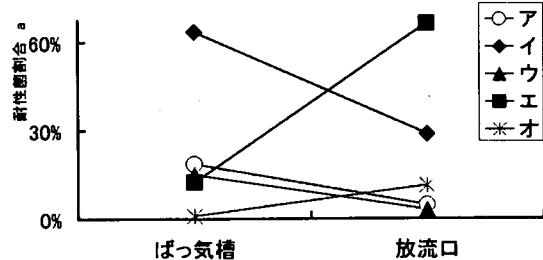


図-23 多摩川上流域にある5世帯(ア～オ)の単独処理浄化槽におけるABPC大腸菌群割合

(2) 大腸菌群を対象とした測定

a) 全国6地域下水処理場

図-17～21に、地域ごとの流入水中の全菌数 N_{in} ,

全菌生残率 r , 流入水中の耐性菌割合 a_{in} , 処理水中の耐性菌割合 a_{out} , 耐性菌割合についての処理水中と流入水中の比 b (対数値)を示した. $\log(b) < 0$ ならば

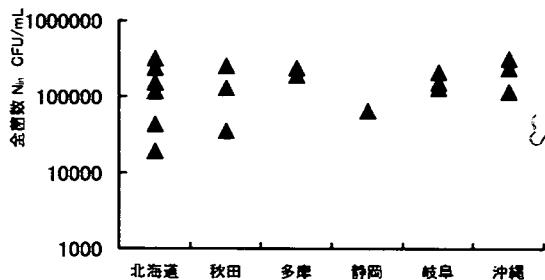


図-24 全国6地域下水処理場の流入水全腸内細菌科細菌数 N_{in} の比較. 5%水準にて地域間の有意差無し.

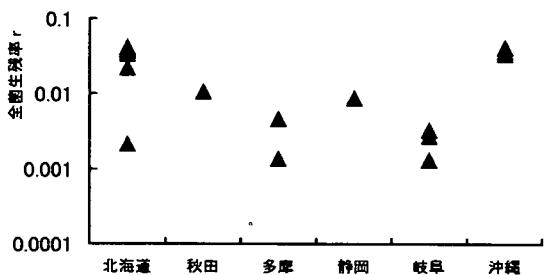
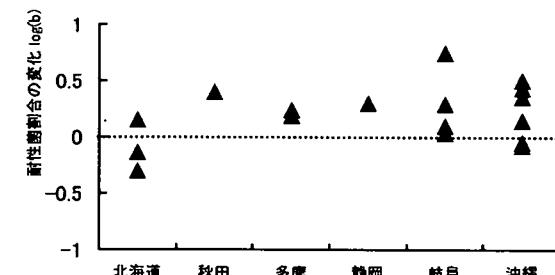


図-25 全国6地域下水処理場の全腸内細菌科細菌生残率 r の比較. 5%水準にて地域間の有意差無し.



$a_{in} > a_{out}$, $\log(b) > 0$ ならば $a_{in} < a_{out}$ である.

流入水中の全菌数(図-17)に関しては、地域間に有意な差が生じた。「北海道 < 岐阜」「北海道 < 沖縄」「静岡 < 多摩」「沖縄 < 多摩」という差が認められた。また生残率(図-18)についても、地域間の有意差が認められた。生残率で表すと「多摩 < 沖縄」「岐阜 < 沖縄」であり、すなわち処理効率では多摩および岐阜がそれぞれ沖縄より高かった。

耐性菌割合では、流入水中(図-19)、処理水中(図-20)には地域間に有意な差が認められなかった。一方、耐性菌割合についての処理水中と流入水中の比(図-21)には地域間に有意な差が認められた。そこで、地域別に a_{in} と a_{out} の差を符号検定したところ、多摩地域に関しては $a_{in} < a_{out}$ という有意な差が認められ、二次処理までの処理過程を通じて下水中の耐性菌

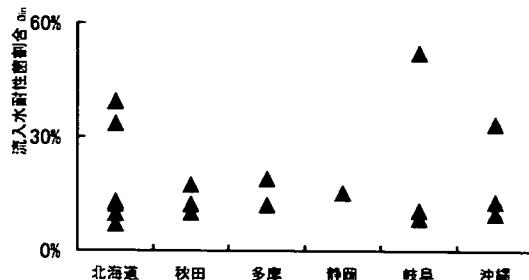


図-26 全国6地域下水処理場の流入水ABPC耐性腸内細菌科細菌割合 a_{in} の比較. 5%水準にて地域間の有意差無し.

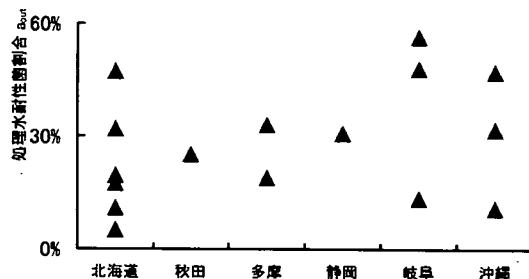


図-27 全国6地域下水処理場の流入水ABPC耐性腸内細菌科細菌割合 a_{out} の比較. 5%水準にて地域間の有意差無し.

図-28 全国6地域下水処理場の処理水ABPC耐性耐性腸内細菌科細菌割合変化 $b = a_{out}/a_{in}$ の比較(対数値). 5%水準にて地域間の有意差無し.
また、 a_{in} との a_{out} の差については、符号検定により5%水準にて有意に $a_{in} < a_{out}$.

割合が増加していることが示された。

b) 多摩川上流域の単独処理浄化槽

消毒装置間の処理効率のばらつきは、大腸菌群の測定についても認められた。全菌数の削減率では、図-22 のように、最大 99.9%(世帯ウおよびエ)から最低 60%(世帯ア)まで消毒装置間のばらつきがあり、大腸菌での削減率と同様の傾向を示した。すなわち、大腸菌について高削減率を示した世帯では、大腸菌群でも高削減率が観察された。

一方、図-23 に示した耐性菌割合にも世帯間の大きなばらつきが観察された。しかし、その世帯ごとの特徴は、大腸菌における耐性菌割合の場合と全く同じにはならなかった。例えば、大腸菌における耐性菌割合(図-16)がばっ気槽で 0.2%, 放流口で 0.1%であった世帯アでは、大腸菌群においては、ばっ気槽で

18.5%, 放流口で 4.6% であった。

(3) 腸内細菌科細菌を対象とした測定

図-24～28 に、地域ごとの流入水中の全菌数 N_{in} 、全菌生残率 r 、流入水中の耐性菌割合 a_{in} 、処理水中の耐性菌割合 a_{out} 、耐性菌割合について処理水中と流入水中の比 b (対数値) を示した。 $\log(b) < 0$ ならば $a_{in} > a_{out}$, $\log(b) > 0$ ならば $a_{in} < a_{out}$ である。

流入水中の全菌数 (図-24) よび生残率 (図-25) に関して、地域間に有意な差が認められなかつた。

一方、耐性菌割合では、流入水中 (図-26)、処理水中 (図-27)、処理水中と流入水中の比 (図-28) に地域間に有意な差が認められなかつた。そこで、全地域をまとめて a_{in} と a_{out} の差を符号検定したところ、 $a_{in} < a_{out}$ という有意な差が認められ、二次処理までの処理過程を通じて下水中的耐性菌割合が増加していることが示された。

4. 考察

(1) 大腸菌を対象とした測定

a) 多摩川河川水に対する下水処理放流水の影響

羽村堰以降の多摩川中流域では、下水処理場放流水などの人為汚染の影響を強く受けて全大腸菌数が大幅に増加することが示された。また、底質の巻き上げによって全菌数が増加することも示された。一方、ABPC 耐性大腸菌割合には下水処理水が流入する前後で変動があるとは言えず、おむね 10% 前後であることが示された。また、下水処理放流水における ABPC 耐性大腸菌割合も、河川水中と同じくおよそ 10% であることが示された。なお、地点ごとの耐性菌割合の平均値は下流に向かうに従って上昇したが、5% 水準にて有意差が認められるほどではなかつた。その理由の一つとしては、羽村堰における割合の標準偏差が、下流の 2 地点および下水処理場試料に比べて、大きかつたことが挙げられる。

羽村堰より上流域に位置する単独処理浄化槽では、消毒効果および耐性菌割合に世帯間の大きなばらつきが観察された。本研究の結果からは、羽村堰における耐性菌割合の変動の大きさは、これらの世帯間に認められる、放流水中の全菌数および耐性菌割合のばらつきに関連している可能性がある。ただし本研究では、1ヶ所の浄化槽における変動を明らかにしてはいないので、今後は1ヶ所に対して継続的な調査を行う必要がある。

一方、下水処理場に接続している区域でも、個々の世帯から排出される大腸菌における耐性菌割合に

ばらつきがあると予想される。本研究の結果からは、多くの世帯から排水を収集している下水処理場試料水では、各世帯間のばらつきが変動には結びつかず、処理場流入水で最低値 5.6%～最高値 16.2% であったように、常に 10% 前後の割合を示すと言える。

水環境を対象とした ABPC 耐性菌の分布について、大腸菌に菌種を限定して測定した調査例は多くない。その中で、環境水とその負荷源である下水処理場の両方の調査に関する報告としては、Jones らのイギリスでの調査 (1986 年)¹⁴⁾ と Sokari らのナイジェリアでの調査 (1988 年)¹⁵⁾ が挙げられる。前者では、Windermere 湖水単離の大腸菌の ABPC 耐性割合が 11%，湖の流域に位置する下水処理場放流水単離の大腸菌の耐性割合が 7% であり、両者に有意な差が認められないと結論づけられている。また、後者では Port Hartcourt 都市域の生下水、河川、入江を対象としており、大腸菌における ABPC 耐性割合はそれぞれ 36.1%, 31.8%, 39.4% と報告されている。この結果について、筆者らがカイ二乗検定を試みた結果 $p=0.81$ となり、5% 水準にて同等性は棄却されなかつた。環境水とその負荷源では ABPC 耐性大腸菌割合は同程度であるという傾向は、本研究の結果と一致する。

b) 全国 6 地域下水処理場の比較と下水処理過程を通じた耐性菌割合の変動

全国各地域の下水処理場における大腸菌について ABPC 耐性分布を比較すると、流入水中の全菌数に有意な地域差は認められるものの、耐性菌割合には有意差が認められなかつた。

前述の既往の調査研究結果と比較すると、耐性大腸菌割合の数値が本研究 (10% 前後) と Sokari らの調査 (30% 以上)¹⁵⁾ では異なる。この理由の一つとして、ヒト由来の耐性菌の分布が持つ地理的な差異ならびに時間的な変動が考えられる。本研究の結果からは、日本国内での分布の地理的な差異という点では、この 6 地域では下水中的 ABPC 耐性大腸菌割合に有意な差が無い、と判断できる。

耐性菌分布の地理的な差異、時間的な変動については既往の疫学調査からも見てとれる。例えば Lester らは、健康な子供達の直腸細菌叢を対象とした調査 (1990 年)¹⁶⁾ を 3ヶ国で行った。その結果、大腸菌における ABPC 耐性割合が、米国では 23.1%，中国では 47.2%，ベネズエラでは 85.4% であった。臨床以外のヒト糞便中の大腸菌を対象とした国内での調査例としては、食肉業者の耐性菌の保有について調査した、1985 年の佐藤の研究¹⁷⁾ が唯一挙げられる。食肉業者とそれ以外の 2 グループに分けたこの調査では、耐性割合はそれぞれ 37.1%, 31.0% であり、これらの耐性菌割合と本研究の下水流入水における値は異なる。本

研究における下水を対象とした調査との比較として、現在の国内各地域におけるヒト糞便を対象とした分布調査が必要である。

また、処理過程を通じた耐性大腸菌割合の変化については、どの地域においても認められなかつた。よって、二次処理までの処理過程および塩素接触における生残率という点では、ABPC 耐性大腸菌はそれ以外の大腸菌と大きな差が無いと推察できる。

(2) 大腸菌群および腸内細菌科細菌を対象とした測定

下水処理場における耐性菌分布を調査した既往の研究のほとんどが、大腸菌群を対象として処理過程を通じた耐性菌割合の変化を論じており、まちまちの結果を報告している。例えば、Bell ら¹⁸⁾はカナダの4ヶ所の下水処理場を調査しているが、うち 2ヶ所では ABPC 耐性菌割合が増加する一方、残りの2ヶ所では割合は減少している。Grabow らによる、南アフリカの2ヶ所の下水処理場を対象とした調査^{19), 20)}では、どちらも ABPC 耐性菌割合は余り変化していない。Murray ら²¹⁾は、下水処理場流入水に塩素を添加し、さらにその後の再増殖を観察した結果、ABPC 耐性大腸菌群割合に「流入水 < 塩素接触後 < 再増殖後」という有意な差を検出した。

本研究においては、処理過程を通じた耐性菌割合の変動が大腸菌では認められなかつたにもかかわらず、腸内細菌科細菌と大腸菌群(多摩地域)では割合の有意な増加が観察された。

ABPC 耐性の場合、大腸菌群の中でも大腸菌や *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* は伝達性プラスミドなどにより耐性を獲得する必要があるが、*Enterobacter cloacae* や *Klebsiella pneumoniae* などの一部は元来その染色体上に ABPC 耐性遺伝子を保有している²²⁾。よって、本研究も含めて、大腸菌群などを対象とした各調査結果が示す傾向は、それぞれの構成菌種とその変化を反映したものである可能性がある。すなわち本研究の場合は、ABPC 耐性を元来持っている菌種が処理過程を通じてより生残しやすいケースが多かつた、と推察できる。

また本研究で、下水試料において大腸菌で観察された耐性割合の最大値は 20% 以下であった一方で、その値が大腸菌群では 40% 近く、腸内細菌科では 60% 近くあつたことも、測定グループ内に元々耐性を持つ菌種が多く存在していたことが原因であると考えられる。さらに、単独処理浄化槽の調査において、世帯によつては、耐性菌割合のレベルが大腸菌で観察された場合と大腸菌群で観察された場合において異なつていたことも、元來耐性を示す菌種の存在

の可能性を示唆している。

伝達性の抗生物質耐性に関するリスク評価のためには、獲得耐性に着目しなければならない。菌種に特有な耐性パターンはその他にも多く知られている²³⁾。よって、分布調査を行う際には、薬剤の種類を選んだ上で、測定する菌種を限定する必要がある。その点から、過去の我々の取り組み²¹⁾においても、大腸菌群を対象にした調査に関しては、十分な考慮がなされていなかつたと言える。

5. まとめ

多摩川河川水および流域の下水処理場と単独処理浄化槽の試料水、さらにその他全国 5 地域の下水処理場試料水における ABPC 耐性菌の分布を調査した。

多摩川河川水では、流下に伴つて下水処理場放流水の影響により全大腸菌数は増えた。一方で、耐性大腸菌割合は羽村堰では 6.4%、多摩川原橋では 7.8%、調布堰では 13.2% であり、羽村堰では耐性大腸菌割合の値の標準偏差が大きく、3 地点の間に 5% 水準にて有意な差は認められなかつた。なお、全大腸菌数が高い底質を巻き上げた場合の耐性大腸菌割合は 12.3% であり、表流水と底質中の細菌との間に有意な差は無かつた。

上流域の単独処理浄化槽において、全大腸菌数および耐性大腸菌割合が世帯ごとに大きく異なつていて、耐性大腸菌割合は最低 0.1% 以下～最高 10.7% であった。この結果は、羽村堰における耐性大腸菌割合の標準偏差が大きかつた原因の一つと考えられる。

また、多摩川流域の下水処理場では、処理過程を通じた耐性割合の変化は認められなかつた。流入水では 10.2%、二次処理水では 11.1%、放流水では 12.5% であった。多摩川河川水および流域下水処理場より単離された ABPC 耐性大腸菌株 60 株には、病原性を疑われるような血清型を持つものは無かつた。

全国 6 地域の下水処理場を比較すると、流入水中の全大腸菌数には有意な差が認められたが、耐性割合は 2.8%～16.2% であり、地域間の有意差が認められず、いずれの処理場でも処理過程を通じた耐性割合の有意な変化は認められなかつた。よつて、耐性大腸菌と感受性大腸菌の間に生残率の違いはないと結論づけられた。

一方、大腸菌群および腸内細菌科細菌を対象とした調査では、処理過程を通じて耐性菌割合の有意な増加が観察された。しかしこの結果は、測定グループのうち元々耐性を持っている菌種の占める割合が、処

理過程を通じて増加したためであると推察された。

本研究では、水環境中の伝達性抗生物質耐性細菌に関するリスク評価の一環として、ABPC 耐性大腸菌を対象とした分布調査を国内の都市河川と下水処理場に適用した。今後は、畜産排水などその他の汚濁負荷を対象とした調査が求められると共に、これら水環境における耐性遺伝子の分布調査、さらに耐性遺伝子の環境条件における伝達可能性の定量が必要である。

参考文献

- 1) Bhutta, Z.A. : Impact of age and drug resistance on mortality in typhoid fever, *Arch. Dis. Childhood*, Vol.75, pp.214-217, 1996.
- 2) Holmberg, S.D., Solomon, S.L. and Blake, P.A. : Review articles: Health and economic impacts of antimicrobial resistance, *Rev. Inf. Dis.*, Vol.96, pp.1065-1078, 1987.
- 3) Lepelletier, D., Caroff, N., Reynaud, A. and Richet, H. : *Escherichia coli*. Epidemiology and analysis of risk factors for infections caused by resistant strains, *Clin. Infect. Dis.*, Vol.29, pp.548-552, 1999.
- 4) Kaye, K.S., Harris, A.D., Gold, H. and Carmeli, Y. : Risk factors for recovery of ampicillin-sulbactam-resistant *Escherichia coli* in hospitalized patients, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol.44, pp.1004-1009, 2000.
- 5) Anonymous : *The human health impact of fluoroquinolone resistant Campylobacter attributed to the consumption of chicken*, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, October 18, 2000.
- 6) Medeiros, A.A. : Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics, *Clin. Infect. Dis.*, Vol.24, pp.S19-45, 1997.
- 7) Nordmann, P. : Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*, *Clin. Infect. Dis.*, Vol.27, pp.S100-110, 1998.
- 8) 建設省河川局編 : 水質年表(第 37 回), 関東建設弘済会, pp.645-648, 1998.
- 9) 建設省河川局編 : 水質年表(第 37 回), 関東建設弘済会, pp.658-662, 1998.
- 10) 日本下水道協会編 : 下水道統計行政編(第 53 号の 1), 日本下水道協会, pp.750-751, 1998.
- 11) 日本下水道協会編 : 下水道統計行政編(第 53 号の 1), 日本下水道協会, pp.806-807, 1998.
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Eighth informational supplement; NCCLS document M100-S8, NCCLS, pp.51-53, 1998.
- 13) Teunis, P.F.M., Evers, E.G. and Slob, W. : Analysis of variable fractions resulting from microbial counts, *Quantitative Microbiol.*, Vol.1, pp.63-88, 1999.
- 14) Jones, J.G., Gardner, S., Simon, B.M. and Pickup, R.W. : Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake District, *J. Appl. Bacteriol.*, Vol.60, pp.443-453, 1986.
- 15) Sokari, T.G., Ibeiebele, D.D. and Ottih, R.M. : Antibiotic resistance among coliforms and *Pseudomonas spp.* from bodies of water around Port Harcourt, Nigeria, *J. Appl. Bacteriol.*, Vol.64, pp.355-359, 1988.
- 16) Lester, S.C., DelPilar, P.M., Wang, F., Schael, I.P., Jiang, H. and O'Brien T. : The carriage of *Escherichia coli* resistant to antimicrobial agents by healthy children in Boston, in Caracas, Venezuela and in Qin Pu, China, *N. Engl. J. Med.*, Vol.323, pp.285-289, 1990.
- 17) 佐藤昭子 : 食肉業従事者から分離した大腸菌の薬剤耐性と R プラスミド, 日本食品衛生学会誌, Vol.26, pp.273-278, 1985.
- 18) Bell, J.B., Macrae, W.R. and Elliott, G.E. : R factors in coliform-fecal coliform sewage flora of the prairies and Northwest Territories of Canada, *Appl. Env. Microbiol.*, Vol.42, pp.204-210, 1981.
- 19) Grabow, W.O.K., Middendorff, I.G. and Prozesky, O.W. : Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance, *Wat. Res.*, Vol.7, pp.1589-1597, 1973.
- 20) Grabow, W.O.K., Zyl, M.V.Z. and Prozesky, O.W. : Behavior in conventional sewage purification processes of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug-resistance, *Wat. Res.*, Vol.10, pp.717-723, 1976.
- 21) Murray, G.E., Tobin, R.S., Junkins, B. and Kushner, D.J. : Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria, *Appl. Env. Microbiol.*, Vol.48, pp.73-77, 1984.
- 22) Livermore, D.M. and Williams, J.D. : β -Lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance, *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed., Lorian, V. ed., Williams and Wilkins, p.502-578, 1996.
- 23) 小栗豊子 : 菌種名のチェックに役立つ薬剤感受性パターーン, 臨床と微生物, Vol.22, pp.590-592, 1995.
- 24) Iwane, T., Urase, T. and Yamamoto, K. : Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water, *Wat. Sci. Tech.*, Vol.43, pp.91-99, 2001.

(2001. 12. 10 受付)

DISTRIBUTION OF AMPICILLIN-RESISTANT ESCHERICHIA COLI IN RIVER
WATER AND WASTEWATER AND ITS COMPARISON WITH MEASUREMENT IN
COLIFORM GROUP AND ENTEROBACTERIACEAE

Taizo IWANE, Kazuo YAMAMOTO, Hiroyoshi KAWAMOTO,
Kensuke FUKUSHI and Dai SHIMAZAKI

Distribution of ampicillin-resistant *E.coli* was investigated in the Tama River, Tokyo, municipal wastewater treatment plants in the basin and in other five prefectures, and septic tanks at the upper reaches. Although the bacterial count in the Tama River significantly increased downstream, the percentage of resistance was not significantly different. The statistical test for all wastewater treatment plants showed that there was no regional difference in the percentage, while the bacterial count was significantly different. In these plants, no significant change in the percentage was observed through the treatment. From the septic tank study, the percentages were widely different among the households. The examinations on coliform group and Enterobacteriaceae revealed that the percentages of resistance increased through the treatment possibly due to change in composition of species.