

都市河川における薬剤耐性菌の存在実態調査

大分高専専攻科 学生員 ○軸丸淳史
大分高専 正会員 古川隼士
宮崎大学大学院農学工学総合研究科 学生員 西山正晃
宮崎大学工学部 正会員 鈴木祥広

1. はじめに

近年、感染症の治療薬として利用されている抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌（Antibiotic Resistant Bacteria : ARB）の発生が問題となっている。ARB は、院内感染の原因菌と危険視されていたが、今日までに日本や欧米諸国などにおいて河川等の水環境における検出・感染事例も報告され始めており、水環境での ARB による汚染が深刻となっている。ARB は通常、流域で発生し排水中に含まれる可能性があり、それを介して河川や沿岸域等の水環境に流入すると考えられる。ARB の中でもバンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin resistant enterococci : VRE）は、現存するすべての抗生物質に耐性を示すことが指摘されていることから、重大な感染症を引き起こす原因菌として問題視されている。腸球菌は古くからふん便汚染の指標細菌として広く採用されており、我が国の水環境においても検出されることが報告されている¹⁾。すなわち、水環境中に存在する腸球菌の中にも VRE のような薬剤耐性菌が含まれている可能性も否定できない。しかしながら、我が国の水環境における薬剤耐性腸球菌に関しては西山ら²⁾の報告にとどまっており、調査事例が極めて少ないのが現状である。そこで本研究では、我が国の水環境における ARB の存在実態に関する知見・情報を蓄積することを目的として、大分県別府市内を流下する都市河川を対象に VRE の存在実態調査を実施した。

2. 実験方法と材料

2. 1 調査概要

調査は、国内外から多くの観光客が訪れ、地方観光都市に位置づけられる大分県別府市において実施した。河川水試料は別府市内を流下する都市河川（春木川、境川、冷川、朝見川、新川）から採取し、ポリエチレン瓶に保存して実験室に持ち帰り、直ちに実験に供し

た。調査は 2015 年 5 月～10 月の間に複数回実施した。

2. 2 腸球菌の計数および単離・回収

腸球菌を培養するための培地は m Enterococcus 寒天培地（mE 培地, Difco）を用いた。また、バンコマイシン（VCM）に耐性を有する腸球菌を選択的に培養させるために、mE 培地にあらかじめ VCM を添加した mE-VCM 培地（VCM 濃度：128 $\mu\text{g/mL}$ ）を用意した。腸球菌の分析はメンブランフィルター法に従って実施した。100 mL および 10 mL の水試料をメンブランフィルター（孔径 0.45 μL , Advantec）を用いてろ過し、ろ過後のフィルターを mE 培地あるいは mE-VCM 培地上に置き、 $35\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ で 48 時間培養した。培養後、各培地のフィルター上に形成された赤色のコロニーを計数した。計数後、mE-VCM 上に形成されたコロニーを腸球菌株としてランダムに Todd Hewitte 寒天培地（Difco）に単離し、 $37\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ で 48 時間培養した。この腸球菌単離株について、PCR 法によるバンコマイシン耐性遺伝子の有無を確認した。

2. 3 PCR 法による *vanA*, *vanB* 遺伝子の検出

PCR によるバンコマイシン耐性遺伝子の有無の確認は、GoTaq[®] Green Master Mix（Promega）を用いて、付属の説明書に従って実施した。バンコマイシン耐性遺伝子は複数の型が報告されているが、その中でも比較的高濃度の VCM に対して抵抗を示し、プラスミド上に所在していることから菌体間で遺伝子が伝達することが知られている *vanA* および *vanB* 遺伝子を対象とした。*vanA* および *vanB* を特異的に検出することができるプライマーは、Dutka-Malen et al.³⁾の報告を参考にした。PCR 反応条件は、 94°C で 5 分間の初期熱変性処理後、 94°C で 1 分間、アニーリングを 54°C で 1 分間、および 72°C で 1 分間を 30 サイクル行った。その後、最終伸長反応を 72°C で 10 分間行い、反応後の PCR 増幅産物の有無を確認した。

3. 結果と考察

3. 1 腸球菌数の計数

図 - 1 に各河川の腸球菌数を示す。各河川の腸球菌数は、 $2.1 \times 10^2 \sim 6.8 \times 10^2$ CFU/100 mL の範囲であった。また、mE-VCM 培地からは、 $4.4 \times 10^1 \sim 3.4 \times 10^2$ CFU/100 mL の範囲で計数された。VCM に耐性を示した腸球菌は、平均で約 40% であった。特に冷川 (10/8) では、VCM に耐性を示した腸球菌が約 14% と最も低い割合で検出された。その一方、境川では、VCM に耐性を示した腸球菌が約 84% と他の地点に比べて高い割合で検出された。

3. 2 *vanA*, *vanB* 遺伝子の検出

各河川から単離した腸球菌株について PCR によりバンコマイシン耐性遺伝子の有無を確認した (表 - 1)。冷川および朝見川から *vanA* 遺伝子保有の腸球菌株がそれぞれ 1 株と 13 株確認された。特に朝見川では、単離した腸球菌株の約 16% が *vanA* 遺伝子を保有しており、比較的高い割合で *vanA* 遺伝子を保有していた。境川から *vanB* 遺伝子保有の腸球菌株が 1 株確認された。*vanA* および *vanB* 遺伝子の両方を保有した腸球菌株は検出されなかった。また、培地上で VCM に耐性を示した腸球菌が最も多く計数された新川からは、*vanA* および *vanB* 遺伝子を保有する腸球菌株は確認されなかった。したがって、VCM に耐性を示す腸球菌株が必ずしも耐性遺伝子を有することはないことがわかった。mE-VCM 培地上で生育できたにもかかわらず、耐性遺伝子が検出されなかった腸球菌株は生体内の他の機構によって VCM に耐性を示したことが推察される。大分県別府市を流れる河川を対象に VRE の実態調査を実施した結果、院内感染で問題となる *vanA* および *vanB* 遺伝子がいくつかの河川から検出された。特に朝見川からは、他の河川と比較して多くの *vanA* 遺伝子保有の腸球菌株が検出されたことから、河川によって違いはあるものの、我が国の河川においても VRE が潜在していることが示唆された。今後も継続して水環境における ARB の存在実態調査を実施する必要がある。

4. まとめ

- 1) 各河川における腸球菌数は、 $2.1 \times 10^2 \sim 6.8 \times 10^2$ CFU/100 mL の範囲で検出された。また、mE-VCM 培地で培養したところ、VCM 濃度 128 $\mu\text{g/mL}$ に耐性を示す腸球菌は、各河川において $4.4 \times 10^1 \sim$

3.4×10^2 CFU/100 mL の範囲で検出された。

- 2) 冷川および朝見川流域から *vanA* 遺伝子、境川流域から *vanB* 遺伝子を保有する VRE が検出された。
- 3) VCM に対して耐性を有する腸球菌株が、必ずしも耐性遺伝子を有しているとは限らないことがわかった。

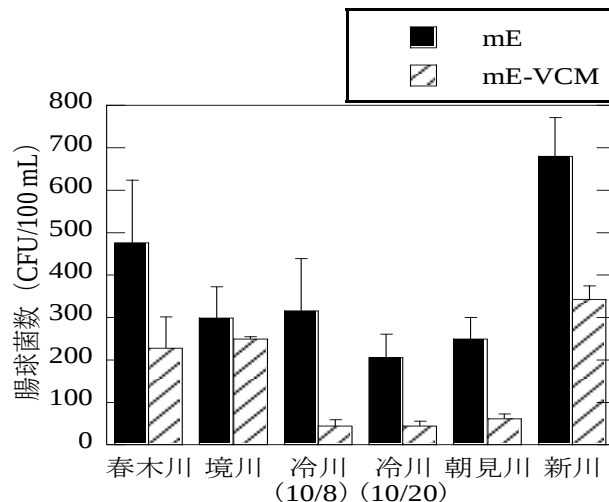


図 - 1 各河川における腸球菌数

日付	地点	単離株数 [株]	耐性遺伝子保有株 [株]	
			<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
2015.5.10	春木川	100	0	0
	境川	100	0	1
2015.10.8	冷川	45	0	0
		50	1	0
2015.10.20	朝見川	81	13	0
	新川	72	0	0

表 - 1 PCR によるバンコマイシン耐性遺伝子の有無

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (若手研究 (B)、研究代表者: 古川隼士、課題番号: 15K21596) によって行われた。

参考文献

- 1) Furukawa, T., and Suzuki, Y.: A proposal for source tracking of fecal pollution in recreational waters by pulsed-field gel electrophoresis, *Microbes and Environ.*, 28(4), 444-449, 2013.
- 2) 西山正晃, 竹下友作, 鈴木祥広.: 下水と河川水における薬剤耐性腸球菌の存在実態とその比較, *水環境学会誌*, 38(2), 57-65, 2015.
- 3) Dutka-Malen, S., Evers, S. and Courvalin, P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 33, 24-27, 1995.