

山形県庄内地方の湧水から分離された大腸菌の薬剤耐性

山形大学 学生会員 ○小澤耕平 正会員 渡部徹

鶴岡南高等学校 非会員 佐藤未菜, 安野さゆり, 阿部優花, 佐藤咲, 蛸井葉月

1. はじめに

抗生物質はヒトの病気の予防・治療だけでなく畜産、水産、農業など様々な用途で使用されており、我々の健康の増進や、安定した食料の供給に大きく貢献している。その一方で、このような多岐にわたる抗生物質の使用は薬剤耐性菌の発生を引き起こす。近年、発生した薬剤耐性菌が各種下排水とともに水環境へと放出、拡散することが懸念されている¹⁻³⁾。

本研究では、山形県庄内地方において、人間生活による汚染の可能性が少ない湧水と人間生活の影響が強い下水処理水から分離した大腸菌を対象に、12種類の抗生物質に対する感受性試験を行い、我々の生活が、水環境での薬剤耐性菌の発生にどの程度関与しているのかを明らかにすることを目的とする。

2. 材料と方法

庄内地方の湧水31地点(図1)で2011年4月から12月に分離された大腸菌89株と鶴岡市の下水処理水で2012年5月と7月に分離された大腸菌121株の計210株を使用した。これらの菌をトリプトソイブイヨン培地(栄研化学株式会社)で増殖させた後、ミューラーヒントンS寒天培地(栄研化学株式会社)に均一に塗布し、抗生物質が含まれたKBディスク(栄研化学株式会社)を置き、37℃で18時間培養する。培養している過程で、ディスクに含まれる抗生物質が寒天培地にしみ出しで拡散していき、ディスクの周りに高い濃度の薬剤が分布するため菌の発育が阻害される。そのため、培養後ディスクの周りに菌の発育がない円(阻止円)が現れる。製品のマニュアルにしたがって阻止円の直径を測定して、耐性か非耐性か判定した(小さいと耐性、大きいと非耐性)。実験で使用した抗生物質は、アンピシリン(ABP)、アモキシシリン(AMP)、セフトジジム(CAZ)、セフメタゾール(CMZ)、クロラムフェニコール(CP)、ゲンタマイシン(GM)、イミペネム(IPM)、カナマイシン(KM)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFX)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)、テトラサイクリン(TC)の計12種類である。抗生物質は系列ごとに性質が異なるため、系列に偏りがないように選定した。

3. 結果と考察

全ての薬剤に非耐性を示す大腸菌が存在する一方で、複数の薬剤に耐性を示す大腸菌も存在した。湧水分離株では最大9種の薬剤に

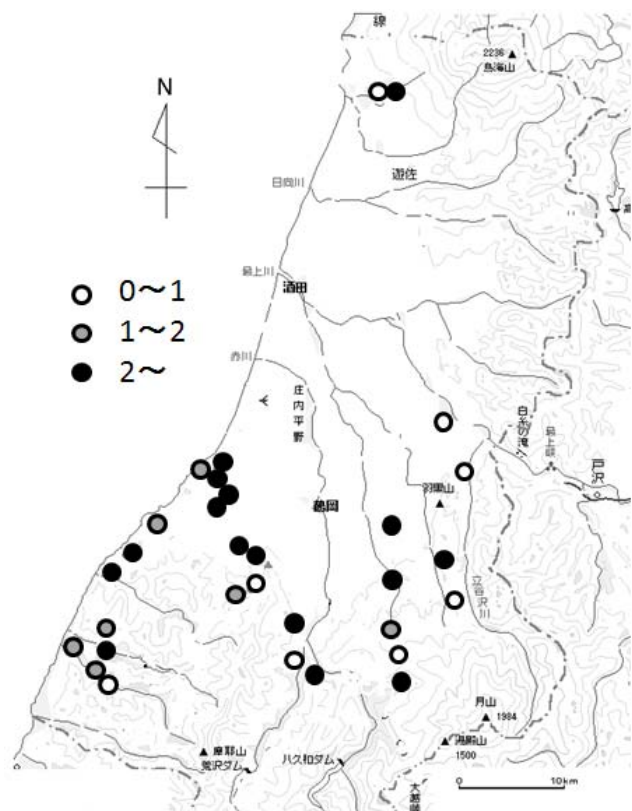


図1. 湧水が採取された地点とそこで分離された大腸菌が耐性を示した薬剤の数(全部で12種類を試験した)。各地点での分離株数は1~5であり、図にはその平均を示す。

キーワード：大腸菌、抗生物質、薬剤耐性菌、湧水、下水処理水

住所：山形県鶴岡市若葉町1-23, Tel: 0235-28-2907, Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

耐性を持っており、下水処理水分離株では 12 種全ての薬剤に耐性を持つ株もいた。図 1 には湧水から分離された大腸菌が耐性を示した薬剤の数を示す。人間生活の影響が少ない山間部で少なくなると考えていたが、地点による偏りは見られなかった。薬剤ごとに地域的偏りを見ると、CAZ と NA の耐性菌は庄内地方南部の海岸付近でより多く見られた(図 2)。後述するように NA は下水株で耐性率が高いので、この地域の湧水には生活排水の影響があったかもしれない。他の 10 種類の抗生物質耐性菌については、地点による偏りは見られなかった。図 3 には湧水および下水分離株の各抗生物質に対する耐性率を示す。ほとんどの薬剤で、下水処理水分離株における耐性率が、野生生物などの影響が大きい湧水分離株の耐性率よりも著しく高いことが示された(図 3)。このことから、我々人間の生活が薬剤耐性菌の発生に大きく関与していることが示唆される。また、NA や ABP は耐性率が高く、効きづらい環境であるといえる。

開発年が古く長年使用されてきた抗生物質の方が、耐性菌が多いと考えていたが、開発年による耐性率に差は見られなかった(図 3)。

4. おわりに

湧水分離株では、NA を除いて高い耐性率が見られなかった。湧水分離株に比較して下水処理水分離株の耐性率が高いことから、人間の生活が水環境に生息する薬剤耐性菌の発生に大きく関わっていると示された。湧水から分離された耐性菌の起源の 1 つとして野生動物等を考えているが、野生生物が生息している山間部で耐性率が高い傾向が見られなかった。発生源の推定には、耐性菌の遺伝子配列に基づく系統解析等が有効と考えられる。

謝辞：本研究は、文部科学省による平成 25 年度スーパーサイエンスハイスクール事業の一環で行われた。また、抗生物質耐性試験の準備や分析でお世話になりました、山形大学農学部の有坂知朗さん、益子拓磨さん、干双さんに感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 清野敦子、長谷川泰子、益永茂樹、2008、金目川、鶴見川、多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布、水環境学会誌、27, 693-698.
- 2) 大羽美香、奥正伸、小林信之、鈴木照之、長井雅人、阿部晋吾、斉藤卓弥、斉藤孝市、江成敬次郎、伊崎和夫、1999、仙台市の河川中の糞便性大腸菌群数と薬剤耐性大腸菌の存在について、水環境学会誌、22, 608-612,
- 3) Martinez JL, 2008, Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments, Science, 321,365-367

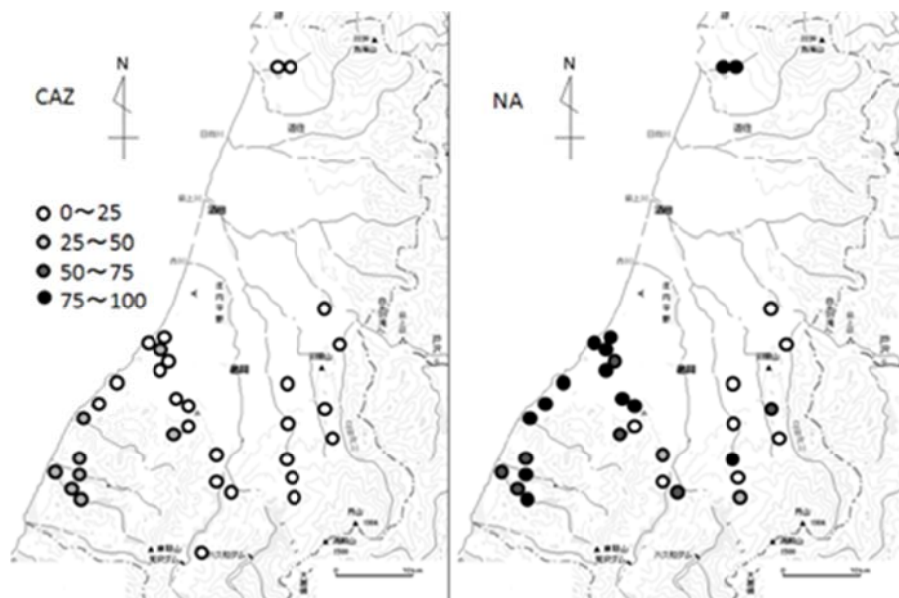


図 2.各湧水で分離された大腸菌が CAZ(左)および NA(右)に耐性を示した割合

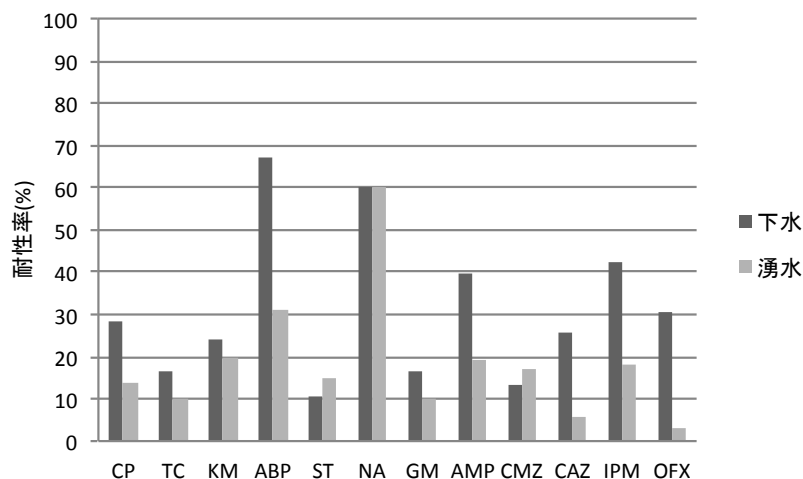


図 3.湧水および下水分離株の各抗生物質に対する耐性率
(抗生物質は開発年が古い順に左から並べている)