

B-36 下水中および河川水中の大腸菌における抗生物質耐性の分布

東京大学大学院 工学系研究科 都市工学専攻 ○岩根 泰蔵
 東京大学 環境安全研究センター 浦瀬 太郎
 東京大学 環境安全研究センター 山本 和夫

1. はじめに

抗生物質に耐性を持つ細菌は現代の感染症における一つの問題ではあるものの、環境中の耐性菌の挙動については明らかにされていない。しかし水環境に関しては、都市に存在する耐性菌が下水・排水によって環境中へ放出され、表流水等により運搬・保持されることで広まるのではないかと、という懸念が存在する。そこで本研究では、多摩川・下水処理場・病院排水を対象に耐性菌の分布に関する調査を行なっている。今回は、腸内細菌における特徴を比較するために、被検菌を大腸菌に限定して更に詳細に調査した。

2. 実験方法

2.1 対象サンプル

都内 A 下水処理場の流入水(以下:流入水)及び塩素接触前処理水(処理水)・多摩川の羽村堰河川水(羽村堰)及び 30Km 下流の多摩水道橋河川水(水道橋)・都内 B 病院の排水(病院排水)から計 5 種類の試料水を複数回採取した。採水は、流入水について 3 回・処理水 4 回・羽村堰 2 回・水道橋 3 回・病院排水 2 回、行なった。また、大腸菌群数をデソキシコーレイト寒天培地による混釈法(37.0℃・一夜培養)で測定した。

2.2 被検菌の単離

一回の採水毎に 50 株を単離して薬剤耐性試験に供した。合成発色酵素基質培地法(メルク社コリフォーム寒天培地)に基づき、44.5℃下で一夜培養後に紫色のコロニーを選択した。また、得られた全 700 株のうち 294 株に対して、細菌種同定試験(バイオメリュー社アピ 20)を行なった。

2.3 薬剤耐性試験

耐性試験には、Mueller-Hinton 寒天培地上の 3 濃度ディスク法(栄研社トリディスク)を用いた。被検菌液を寒天培地上に塗抹し、高・中・低濃度の 3 枚の薬剤含有ディスクを置いて培養した。ディスクの周りに発育阻止円が現われれば、その濃度条件下では感受性、

阻止円が現われなければ抵抗性とした。3 枚のディスクにより判定は 4 段階に分かれ、高濃度にまで抵抗性を示した株を「耐性」と判定した。用いた薬の種類は、WHO¹⁾や米国臨床検査基準委員会²⁾等の指針を参考に表 1 のように選定した。最初の試験において 7 種のうち 1 種以上の薬に対して耐性を持つと判定された「耐性株」については、再度試験して耐性株であることを確認すると共に、追試験を行なった。また、耐性株に対して病原大腸菌 0 群別試験(デンカ生研社病原大腸菌免疫血清)を行なった。

表 1 耐性試験に用いた薬の種類

(最初の試験)

(略号)	ABPC	CET	KM
(名前)	アンピシリン	セファロチン	カナマイシン
(系統)	ペニシリン系	(第一世代) セフェム系	アミノ グリコシド系
GM	TC	CP	NA
ゲンタマイシン	テトラ サイクリン	クロラム フェニコール	ナリジクス酸
アミノ グリコシド系	テトラ サイクリン系	クロラム フェニコール系	キノロン系

(追試験)

CBPC	CEZ	CXM	CPFX
カルペニシリン	セファゾリン	セフロキシム	シプロ フロキサシン
ペニシリン系	(第一世代) セフェム系	(第二世代) セフェム系	(ニュー) キノロン系
ABPC 耐性株に	CET 耐性株に	CET 耐性株に	全耐性株に

3. 結果および考察

3.1 大腸菌群数と細菌種同定試験

各試料中の大腸菌群数は表 2 の通りとなった。また、合成発色酵素基質培地上で紫色のコロニーを生じた株の 97%(耐性試験の被検菌から選んだ 294 株中 285 株)が大腸菌と同定された(他 4 株は同定不能)。従って、薬剤耐性試験の被検菌の殆どは大腸菌であると言える。

表2 試料中の大腸菌群数
(最低値～最高値)(CFU/ml)

流入水	処理水
$2.0 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^5$	$2.2 \times 10^2 \sim 4.3 \times 10^3$
羽村堰	水道橋
$2.2 \times 10^1 \sim 8.8 \times 10^1$	$1.1 \times 10^3 \sim 5.5 \times 10^3$
病院排水	
$2.7 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$	

3.2 流入水・処理水・羽村堰・水道橋についての薬剤耐性試験

3 濃度ディスク法により、各薬剤に対する耐性/感受性は「-」(全てのディスクに抵抗性、即ち本調査における「耐性」)から「+++」(全てのディスクに感受性)までの 4 段階で判定された。図 1 は処理水(200 株)についての 4 段階判定の結果である。下水処理場・多摩川水系の全試料について TC 耐性が最も多く、処理水におけるその割合は 13.5%に上った。

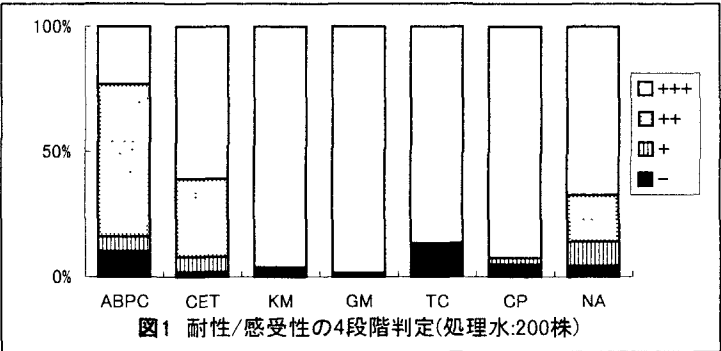


図1 耐性/感受性の4段階判定(処理水:200株)

表 3 は処理水中の耐性株(200 株中 38 株検出)の耐性パターン(1 剤耐性から 6 剤耐性まで 15 通り)である。また、他試料においても様々なパターンが観察された(流入水:150 株中 31 株/16 通り)(羽村堰:100 株中 9 株/5 通り)(水道橋:150 株中 20 株/11 通り)。

ここで、耐性株数を被検菌数で割った値を「耐性株存在率」と名づける。また、1 耐性株が耐性を示した薬の平均数を「多剤耐性度」と呼ぶことにする。この数値は、7 種の各薬剤に「-」であった株数(表 3 の最下段の数値)を合計(同右下隅)した値を耐性株数で割ったものである。

表 4 は、各試料における「耐性株存在率」「多剤耐性度」の比較である。

「耐性株存在率」に関しては、流入水・処理水の下水処理場の試料と羽村堰の間に統計的に有意な差が見られ($P < 0.05$)、羽村堰～水道橋間では 1.6 倍の開きがあった。「多剤耐性度」に関しては、流入水から処理水の間に 1.2 倍の増加が見られた。

表3 耐性パターン(処理水:200株)(×は耐性があったことを示す)

	ABPC	CET	KM	GM	TC	CP	NA	パターン別株数
6剤	×		×	×	×	×	×	1
5剤	×		×		×	×	×	2
〃	×			×	×	×	×	1
4剤	×				×	×	×	1
3剤	×	×			×			2
〃	×				×	×		2
〃			×		×		×	1
〃				×	×		×	1
2剤	×	×						3
〃	×				×			3
〃			×		×			2
〃					×	×		3
1剤	×							6
〃					×			8
〃							×	2
耐性株数→								38
薬剤別「-」株数	21	4	7	3	27	10	9	81

表4 試料における耐性に関する指標

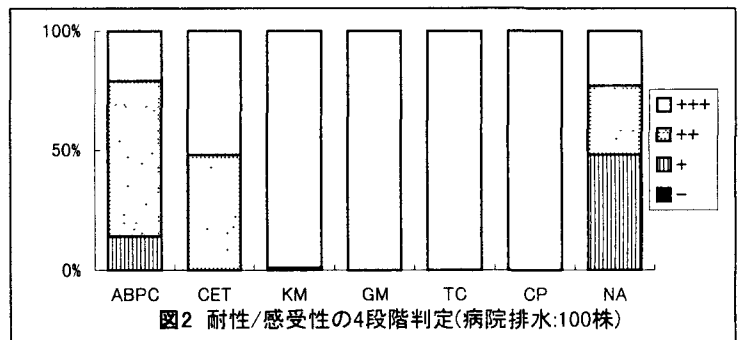
	流入水	処理水	羽村堰	水道橋
被検菌数(株)	150	200	100	150
耐性株存在率	0.207	0.190	0.090	0.133
多剤耐性度(薬剤/耐性株)	1.77	2.13	1.67	1.75

流入水・処理水に比べて羽村堰の「耐性株存在率」が低かった理由としては、細菌の由来に関する仮定によって二つの可能性が考えられる。細菌の由来が異なるとすると、即ち羽村堰の河川水には(下水とは異なり)人の糞便由来以外の大腸菌が存在している場合、人の糞便由来の細菌は耐性株の存在率がより高いということが示唆される。一方、細菌の由来が同じであるとなると、下水の発生から処理場への流入までの間、若しくは羽村堰より上流で、耐性株の存在率が変化しているという可能性がある。また、羽村堰とその下流の水道橋の比較からは、各種下水・排水の河川への流入によって「耐性株存在率」が上昇する可能性があることが推察される。「多剤耐性度」に関しては、流入水と処理水の間に増加が見られたことにより、下水処理工程において耐性遺伝子の伝達や耐性菌の選択等が起こっている可能性があると考えられる。

追試験では、ABPC 耐性株の 88%(50 株中 44 株)が CBPC 耐性を示し、CET 耐性株の 27%(11 株中 3 株)が CEZ 耐性を、9%(1 株)が CXM 耐性を示した。これより、水環境中で同系統の薬剤に対して異なる耐性パターンが存在することが分かった。また、最初の試験における全耐性株のうち処理水中の 2 株が CPFX 耐性を示した。CPFX が属するニューキノロンは現在「切り札」的抗菌薬の一つとして用いられている³⁾ことから、耐性の増加傾向は(高度な多剤耐性の場合には特に)問題となる。CPFX 耐性を示した 2 株は非病原性大腸菌であり、検出試料も未消毒処理水ではあるが、下水中におけるその存在には注意を払う必要がある。なお、0 群別試験によって病原大腸菌と判定された耐性株は存在しなかった。

3.3 病院排水についての薬剤耐性試験

図 2 は、病院排水(100 株)についての 4 段階判定の結果である。本調査では耐性株が検出されなかった。下水処理場流入水には約 20%存在した耐性株が、病院排水には存在しなかった理由は不明である。採水が適当ではなかった可能性も考えられ、再度の調査が要される。なお、排水に特別な処理は施されていないとのことである。



<文献>

- 1) World Health Organization (1996): Guidelines for Antimicrobial Resistance Surveillance; WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series 15. WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean, Alexandria.
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards (1998): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eighth Informational Supplement; NCCLS Document M100-S8 Vol.18 No.1. NCCLS, Villanova.
- 3) 荒川宜親 (1997): 薬剤耐性獲得のメカニズムと耐性菌対策, 感染症の診療へのアプローチその 1. *Medical Practice* 14, 1534-1549.