

B-31 山科川におけるテトラサイクリン耐性緑膿菌の実態調査

○濱口 直^{1*}・山下 尚之¹・田中 宏明¹

¹京都大学大学院 工学研究科附属 流域圏総合環境質研究センター (〒520-0811滋賀県大津市由美浜1-2)

* E-mail: masugu@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

1. 背景, 目的

抗生物質は結核, 赤痢, 腸チフス等による死亡率を低下させ, 公衆衛生の向上に大きく貢献した. 抗生物質の用途もヒト用医薬品としてのみだけでなく, 動物用医薬品や家畜の感染症予防, 成長促進目的, 水産業, 農業など, 幅広い分野で用いられるようになった.

しかし, 抗生物質の使用量が増加するに伴い, 抗生物質に耐性を持つ細菌が発見されるようになった. その例として, 近年メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE: Vancomycin Resistant *Enterococci*)など, 抗生物質の効かない病原菌による院内感染や日和見感染が発生し, 社会問題となっている. また, 抗生物質に耐性を持つ細菌や耐性遺伝子も水環境中から実際に検出されている¹⁾.

そこで, 本研究では京都市山科川とその支流, 及び山科川に流れ込む下水処理場の放流水を対象とし, 緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を用いて抗生物質(テトラサイクリン)耐性試験を行った. また, 各採水地点の表流水中と底質表層における抗生物質耐性緑膿菌の耐性割合を比較することと, 耐性緑膿菌と感受性緑膿菌の増殖速度を比較することによって, 水環境中における耐性緑膿菌の生存優位性を推測した.

2. テトラサイクリン耐性細菌の実態調査

(1) 調査対象地点

本研究の調査地点として, 山科川とその支流である安祥寺川, 下水処理場の放流水2点, 及びその下流を調査対象に選んだ. 河川と調査地点を示した地図を図1に示す. 本論文では下水処理場であることを明確に表示するため, 『石田水環境保全センター』を『石田下水処理場』と, 『東宇治浄化センター』を『東宇治下水処理場』と呼んでいる.

場』と呼ぶ. 調査地点の1つである安祥寺川上流地点は, 居住区の上流側に存在しており, この地点より上流には住居がほとんど存在しない. また, 石田下水処理場より上流には下水処理場の放流水は混入していない. 採水は2006年1月12日(木)の午前11時から午後4時の間に行った. また, 採水日前日と当日共に天候は晴れであった.

(2) 対象抗生物質と対象生物

抗生物質耐性試験の試験菌種として緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を用いた. 緑膿菌は*Pseudomonas*属細菌の一種であり, 好気性グラム陰性菌である. 日和見感染症を起こすことがあり, ヒトの尿管や気道の感染症としばしば関係する. 他の細菌と比較して多くの抗生物質に対し自然耐性を持っているため, 抗生物質に対して新たな耐性を持った緑膿菌が現れると化学療法が困難

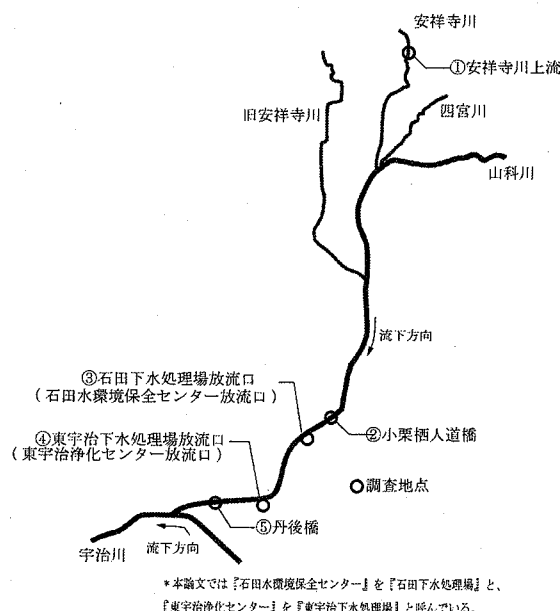
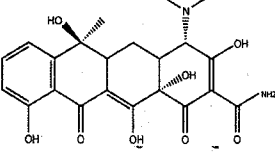


図1 調査地点図

になることがある²⁾。临床上重要な細菌であると同時に、本来土壌微生物であり自然中からの検出も容易であるため、本研究における対象菌種として選定した。

試験に用いる抗生物質はテトラサイクリンとした。これは、野生型の緑膿菌に効果があり、テトラサイクリンに耐性能をもつ細菌は他系統の抗生物質にも耐性を持っている可能性が高いことが報告されていることから対象菌種として選択した³⁾。テトラサイクリンの性状を表1に示す。

表1 テトラサイクリンの性状

一般名称	テトラサイクリン
英語名	Tetracycline
略号	TC
分類	テトラサイクリン系
構造式	
分子式	$C_{22}H_{24}N_2O_8$
分子量	444.44
CAS-RN	60-54-8
耐性と判断される濃度 (寒天平板希釈法、 <i>P. aeruginosa</i>)	16 μ g/mL
作用機序	リボソーム30Sの阻害

(3) サンプリング

サンプルの採取は河川の流下にあわせて上流から行った。表流水サンプルの採水は縄をつけたステンレス製のバケツを投下して表流水を汲み上げ、ポリエチレン製ビンに3回共洗いで入れた。底質の採取は、川底の石や藻を採取し、滅菌した蒸留水で3回軽く表面を洗い流し、滅菌済みのポリエチレン製ビンに入れた。サンプル採取後、ビンは冷却材を入れたクーラーボックスに入れて運搬した。

(4) 緑膿菌の培養

表流水中の緑膿菌は吸引濾過し、メンブレンフィルタ上に濃縮した。これをCetrimide寒天培地にのせて35℃の条件で24時間培養した。底質表層に存在する緑膿菌の培養採取した石や藻などを滅菌したピンセットで取り出した後、滅菌した爪楊枝を用いて表層の付着物を剥ぎ取り、チューブに入れた約1mLの滅菌蒸留水にこの爪楊枝を浸して付着物をはがした。このチューブをボルテックスミキサーで30分間攪拌した後、マイクロピペットを用いて適量をCetrimide 寒天培地にまき、ガラス製コンラージ棒で塗抹した。乾燥後、蓋をして培養機にいれ、35℃の

条件で24時間培養した。

(5) 緑膿菌の抗生物質耐性試験

緑膿菌の抗生物質に対する感受性試験として寒天平板希釈法を用いた。National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)の基準に基づき⁹⁾、Mueller-Hinton 寒天培地を培地として用いた。同基準に基づき、テトラサイクリン濃度8 μ g/mL中の培地上でもコロニー形成する株を中程度耐性緑膿菌、16 μ g/mL中の培地上でもコロニー形成する株を耐性緑膿菌と定義した。

3. 緑膿菌の増殖速度測定試験

テトラサイクリン耐性緑膿菌と感受性緑膿菌とで増殖速度を比較した。試験株は水環境中(滋賀県・大津湖畔なぎさ公園の湖岸より採取)から単離されたものを用いた。テトラサイクリンに耐性を持っているとして、テトラサイクリン濃度が16 μ g/mLでも死滅しない緑膿菌を2株、感受性細菌としてテトラサイクリンの添加最低濃度である0.50 μ g/mLで死滅した緑膿菌を2株用いた。

Mueller-Hinton 液体培地を200 μ Lずつ入れた96穴マイクロプレートの各ウェルに単コロニー分離により単離された緑膿菌を爪楊枝を用いて移植し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。測定波長は450 nmとして、定量可能なOD₄₅₀を0.06以上0.6以下とした。

4. 実験結果

単離された全緑膿菌数に占める、中程度以上の耐性を示す緑膿菌の割合を百分率で表2に示す。表中のH-Rは中程度以上の耐性(テトラサイクリン濃度8 μ g/mL以上で増殖)を示す緑膿菌を意味し、Rは耐性を示す緑膿菌を意味する(16 μ g/mL以上で増殖)。

小栗栖入道橋においてのみ、底質の中程度耐性緑膿菌と耐性緑膿菌の割合が表流水における割合を上回る結果となったが、それ以外の地点すべてで、表流水における中程度耐性、耐性緑膿菌の割合が底質における割合より高い結果となった。

増殖速度測定試験の結果を図2に示す。縦軸にOD₄₅₀の値を、横軸に各緑膿菌株が定量下限値を超えてからの時間をとった。

5. 考察

細菌の増殖速度や死滅速度は同一種内でも必ずしも一定ではないため、生息する環境に適した形質を持つ細菌株が他の細菌株に比べて優位となる。逆に、生息する環境において不利な形質を持つ細菌株は他の細菌株に比べて劣位となり、淘汰されて死滅していく。

表 2 山科川におけるテトラサイクリン体制緑膿菌の割合

	①安祥寺川上流		②小栗栖入道橋		③石田処理場放流水		④東宇治処理場放流水		⑤丹後橋	
	I+R	R	I+R	R	I+R	R	I+R	R	I+R	R
表流水	28.3%	0	5.36%	0	3.45%	3.45%	26.3%	21.1%	12.2%	0
底質	0	0	2.00%	2.00%	0	0	0	0	10.9%	0

I+R: 中程度耐性もしくは耐性緑膿菌, R: 耐性緑膿菌

表 2 山科川におけるテトラサイクリン体制緑膿菌の割合

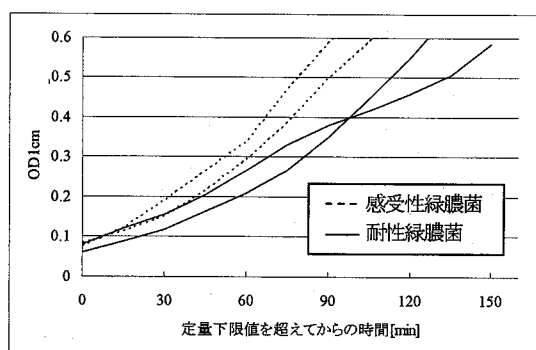


図 2 緑膿菌の増殖試験結果

そこで本研究では、淘汰の起こる前の細菌群として表流水中の細菌を、排出源から排出されて淘汰が起こった後の細菌群として底質表層の細菌を仮定した。排出源から排出された細菌の一部が底質表層に付着し、その環境に適した形質を持つ細菌株が時間をかけて他の細菌株を淘汰すると思われることからこの仮定を設定した。そして、本研究では抗生物質耐性能という形質に着目し、その形質が環境に適したものであるかを評価する。たとえば、表流水中における細菌に占める抗生物質耐性細菌の割合が、底質表層における細菌に占める耐性細菌の割合より小さかったとすれば、細菌が底質に付着した後、抗生物質耐性能という形質を持つ細菌が優位となり、この形質を持たない細菌が劣位となって淘汰されたと考えられる。

その上で実験結果の表 2 を見ると、小栗栖入道橋以外において、表流水側の耐性緑膿菌の割合が高いことがわかる。これは、緑膿菌が表流水から底質に付着後、耐性能を持つ緑膿菌が感受性細菌より増殖に不利であったため、淘汰されて死滅したことを示唆している。つまり、この 4 地点の表流水の条件では耐性能を持つ緑膿菌を選択する条件とはなっていないことを示唆している。

抗生物質が水環境中から検出されているが、その濃度は高い場合でも ng/mL オーダーで検出される⁵⁾。一方、抗生物質が薬剤活性を示すのは通常 $\mu\text{g/mL}$ のオーダーであるため、下水処理場放流水の抗生物質濃度では抗生物質耐性細菌が耐性能を維持して、抗生物質耐性をもたない野生株よりも有利に増殖することのできる濃度では

ないことを示唆している。

ただし、下水処理場の放流水から最大 21.1 % の耐性緑膿菌が検出されているため、下水処理場内で抗生物質耐性能が獲得されている可能性が示唆された。

図 2 の緑膿菌の増殖試験結果では、感受性緑膿菌の増殖速度が耐性緑膿菌の増殖速度より大きいことが示されている。この結果は前述の結果と矛盾せず、環境中におけるテトラサイクリンの濃度が感受性緑膿菌に影響を与えない濃度以下の状況では、感受性緑膿菌の方が増殖に有利になることが示された。

6. 結論

下水道の放流水から最大 21.1 % のテトラサイクリン耐性緑膿菌が見つかった。ただ、山科川の河川水と下水処理場放流水の抗生物質濃度では、抗生物質耐性細菌が耐性能を維持することができず、抗生物質耐性能を持たない野生株に淘汰されることが示唆された。

参考文献

1. K Kummerer. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother, Vol. 54, pp. 311-320, 2004.
2. 橋本一, 井上松久. 病原菌の薬剤耐性-機構の解明とその対策. 学会出版センター, 1993.
3. I Chopra and M Roberts. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev, Vol. 65, pp. 232-60, 2001.
4. Standards National Committee for Clinical Laboratory. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Fifteenth informational supplement. NCCLS document M100-S15, 2005.
5. KD Brown, J Kulis, B Thomson, TH Chapman, and DB Mawhinney. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the rio grande in new mexico. Sci Total Environ 2005 Nov, p. 24:, 2005.