

## B-68 環境中での大腸菌の抗生物質耐性率と耐性パターン

○寺田 翔<sup>1</sup>・三宅 英美<sup>1</sup>・浦瀬 太郎<sup>1\*</sup><sup>1</sup>東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻

(〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1)

\* E-mail: urase@bs.teu.ac.jp

## 1. はじめに

細菌が抗生物質に耐性を持つことによって、手術後に抗生物質を投与されている場合など、耐性菌が体内で選択され易い患者や日和見感染をおこし易い高齢者が、薬剤耐性菌に罹患し、治療が困難となる例が多く報告されている。臨床上的の問題となっている細菌には、黄色ブドウ球菌、腸球菌、肺炎球菌などのグラム陽性菌、緑膿菌、アシネトバクター、肺炎桿菌などのグラム陰性菌が挙げられる。2008年にインド、パキスタン、イギリスではNDM-1と名付けられた広範囲の抗生物質に対する耐性遺伝子が確認された<sup>1,2)</sup>。こうした薬剤耐性の細菌によって生じる問題は、基本的には病院内での問題であるが、自然環境が耐性遺伝子のプールとなっている可能性も指摘されている<sup>3,4)</sup>。

これまでの研究で抗生物質に耐性を持つ細菌や耐性遺伝子が多く環境に見出されているが、第三世代や第四世代セファロスポリン抗生物質などの新しい抗生物質にまで耐性を十分な数の耐性菌について調査した事例は多くない。そこで、本研究では、大腸菌の薬剤耐性について、水道水源となっている大河川と大学の廃水処理施設の処理水とを比較し、耐性菌の比率に関する情報を蓄積すると同時に、基本的な抗生物質に対して耐性を持っている大腸菌の比較的新しい抗生物質に対する耐性菌のパターンから、環境の質と耐性となる抗生物質の範囲との関連を調査した。

## 2. 実験方法

本研究では2010-2011年に大規模な下水処理場放流水の合流直前の河川水(以下、多摩川)、2010年に東京工科大学廃水処理施設塩素消毒前の処理水(以下、大学廃水処理水)の2種類の試料を調査した。

大学廃水処理水はそのまま、多摩川試料水は約200ml

を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルター上に捕集したのちに、Chromagar ECCで24時間培養し、寒天上から青色の*Escherichia coli*と思われるコロニーを釣り、さらに同培地上で再度コロニーを形成させた。

ここから約200株をランダムに選択し、抗生物質を添加したミューラーヒントンS寒天培地でコロニーの形成能を調べた。薬品添加試験ではアンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、ゲンタマイシン(GM)、レボフロキサシン(LVX)、メロペネム(MPM)を用い、1つ以上に耐性を示した株についてKirby-Bauer法によるディスク拡散(KBディスク法)試験を行いABPC、TC、GM、LVX、シタフロキサシン(STFX)、イミペネム(IPM)、ピペラシリン(PIP)、セフォタキシム(CTX)、セフピロム(CPR)、MPM、シプロフロキサシン(CIP)、アミカシン(AMK)の12種類の抗生物質に対する耐性を調べた。表1に使用した抗生物質の名称、略称、系統を示す。

KBディスク試験では腸内細菌に対する判定基準と照合し、中間耐性と判定されたものは耐性ありと判定した。

多剤耐性度とは、本研究では、薬品添加試験でいずれかに耐性を示した株1株あたりKBディスク試験で耐性を示す平均の薬剤数を示す。

表1 実験に使用した抗生物質一覧

抗生物質名	略称	系統	添加試験	KBディスク
アンピシリン	ABPC	$\beta$ -ラクタム(ペニシリン系)	○	○
ピペラシリン	PIP	$\beta$ -ラクタム(ペニシリン系)	×	○
セフォタキシム	CTX	$\beta$ -ラクタム(第三世代セファロスポリン系)	×	○
セフピロム	CPR	$\beta$ -ラクタム(第四世代セファロスポリン系)	×	○
イミペネム	IPM	$\beta$ -ラクタム(カルバペネム系)	×	○
メロペネム	MPM	$\beta$ -ラクタム(カルバペネム系)	○	○
レボフロキサシン	LVX	フルオロキノロン系(ニューキノロン系)	○	○
シプロフロキサシン	CIP	フルオロキノロン系(ニューキノロン系)	×	○
シタフロキサシン	STFX	フルオロキノロン系(ニューキノロン系)	×	○
テトラサイクリン	TC	テトラサイクリン系	○	○
アミカシン	AMK	アミノグリコシド系	×	○
ゲンタマイシン	GM	アミノグリコシド系	○	○

### 3. 結果と考察

#### (1) 試料水の性状

表2に各試験の試料を採水した時の状況及び1mlあたりの Chromagar ECC 培地で青色コロニーを作った全細菌の数から求めた大腸菌数を示した。多摩川では、 $7.2 \times 10^2$  個/ml $\sim 3.1 \times 10^0$  個/ml、大学廃水処理水は塩素添加前の試料のため多く存在し、 $1.5 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^3$  個/ml の範囲であった。採水日とその前2日間の計3日間の降水量の和も表に示すが、多摩川の2011年5月31日の試料は雨水の流入を多く受けたと考えられる。

表2 各試料の採水状況と大腸菌濃度 (個/ml)

実験年	採水日	採水場所	平均大腸菌数(CFU/ml)	降水量(mm)	気温(°C)	水温(°C)	電気伝導度[μS/cm]
2010	7月12日	大学廃水処理水	$1.5 \times 10^3$	1.5	27.4	27.7	713.0
	7月27日	多摩川	$1.7 \times 10^0$	1.5	39.5	29.4	125.8
	8月23日	大学廃水処理水	$1.1 \times 10^3$	0.0	28.2	29.2	377.0
	9月6日	多摩川	$7.2 \times 10^2$	0.0	36.7	31.4	143.7
	11月29日	多摩川	$6.3 \times 10^1$	0.0	12.3	13.1	123.3
2011	5月31日	多摩川	$3.1 \times 10^0$	100.0	24.3	18.2	186.5

#### (2) 薬品添加試験とKBディスク試験の整合性

表3は薬品添加試験でABPC, GM, TC, LVX, MPM, のうち少なくとも一つに耐性を持った株がKBディスク試験でも同じ抗生物質に対して耐性を持つかについて検討を行った結果である。表3の各行に抗生物質の薬品添加試験の判定結果、各列にKBディスク試験の判定結果を記した。ABPCやTCは薬品添加試験で耐性とされた株のうちいくつかの株がKBディスク試験で感受性と判断され、両者の結果に若干の差が見られたが、両試験での耐性判断の結果はABPCでは85.6%、TCでは91.0%、GMでは98.5%、LVXでは97.4%、MPMでは98.9%の精度で一致しており、二つの試験で高い整合性が得られた。

表3 薬品添加試験とKBディスク試験の整合性

ABPC(267株のうち有効な試験257株)				LVX(267株のうち有効な試験267株)			
薬品添加\KBディスク	耐性	中間耐性	感受性	薬品添加\KBディスク	耐性	中間耐性	感受性
耐性	79	2	14	耐性	8	0	0
中間耐性	1	0	0	中間耐性	1	0	0
感受性	14	6	141	感受性	4	2	252

  

TC(267株のうち有効な試験266株)				MPM(267株のうち有効な試験267株)			
薬品添加\KBディスク	耐性	中間耐性	感受性	薬品添加\KBディスク	耐性	中間耐性	感受性
耐性	158	2	11	耐性	0	0	2
中間耐性	0	0	3	中間耐性	0	0	1
感受性	1	7	84	感受性	0	0	264

  

GM(267株のうち有効な試験266株)			
薬品添加\KBディスク	耐性	中間耐性	感受性
耐性	7	1	0
中間耐性	0	0	0
感受性	1	2	255

#### (3) 抗生物質耐性菌の特徴

表4は各調査日ごとの耐性菌存在率と多剤耐性度である。耐性菌存在率は多摩川では14.3~78.5%であり2010年9月と2011年5月の調査での耐性菌存在率が非常に高かったが、大学廃水処理水の試料では10.7~22.7%であった。

また、多剤耐性度は2011年5月の多摩川で1.47と低

い値を示したが、この回の実験では採水日と前2日の降水量の和が100mmと非常に多くなっており、TC1耐性菌がほかの回よりも非常に多く存在したため、多剤耐性度が低くなった。それ以外は1.89-2.34の範囲であり、どちらの場所でも抗生物質耐性大腸菌は平均して2剤近い抗生物質に耐性を獲得していた。

表4 各回の耐性菌存在率と多剤耐性度

サンプル	耐性菌株数	実験年	耐性菌存在率	多剤耐性度
大学廃水処理水(7月12日)[n=175]	40	2010	22.7%	2.34
大学廃水処理水(8月23日)[n=178]	19		10.7%	2.12
多摩川(7月27日)[n=28]	5		17.9%	2.00
多摩川(9月6日)[n=36]	19		63.3%	1.89
多摩川(11月29日)[n=182]	26		14.3%	2.03
多摩川(5月31日)[n=144]	113	2011	78.5%	1.47

表5は2010年に大学の廃水処理水で行った抗生物質耐性試験の結果を示したものである。人に使われているフルオロキノロン系のLVXやSTFX、第三世代、第四世代セファロスポリンのCTX, CPR, アミノグリコシド系のGMに耐性を持っている大腸菌が多く存在していた。また、7剤や8剤耐性菌も数は少ないが存在していた。

表5 2010年大学廃水処理水の抗生物質耐性パターン

薬品添加試験結果		KBディスク試験結果	
株数	耐性パターン	株数	耐性パターン
294	感受性	294	—
16	ABPC	1	—
		2	ABPC
		1	ABPC-TC
		8	ABPC-PIP
		1	ABPC-PIP-CTX
		1	ABPC-PIP-CIP-AMK
		1	ABPC-PIP-CTX-CPR-CIP-LVX
		1	ABPC-PIP-CTX-CPR-CIP-LVX-STFX
		3	コンタミネーション
		13	TC
19	TC	1	PIP
		1	AMK
		1	TC-AMK
		1	—
3	LVX	2	CIP-LVX
		1	CIP-LVX-STFX
11	ABPC-TC	1	ABPC
		4	ABPC-TC
		1	ABPC-PIP
		4	ABPC-PIP-TC
		1	ABPC-PIP-CTX-CPR-TC
3	ABPC-GM	2	ABPC-PIP-GM
		1	ABPC-CIP-LVX-GM
2	ABPC-LVX	1	ABPC-CIP-LVX
		1	ABPC-CIP-LVX-STFX
5	ABPC-TC-GM	2	ABPC-PIP-TC-GM
		1	ABPC-PIP-CTX-CPR-TC-GM
		1	ABPC-PIP-CTX-CPR-TC-GM-AMK
		1	ABPC-PIP-CTX-CPR-CIP-LVX-TC-GM

表6に2010-2011年5月の多摩川で行った抗生物質耐性試験の結果を示したものである。薬品添加試験でTC1剤に耐性を示した株が98株と多いのは、2011年5月に行った実験の際に降雨の影響により畜産由来の大腸菌が多く河川に流入したためと考えられる。また、大学廃水処理水に比べて7剤や8剤耐性菌は存在せず、多くても5剤耐性菌しか存在しなかった。人由来と考えられるLVX, STFX, CTX, CPR, GMに耐性を持つ大腸菌の比率も低かった。

表6 2010-2011年5月多摩川の抗生物質耐性パターン

薬品添加試験結果		KBディスク試験結果	
株数	耐性パターン	株数	耐性パターン
211	感受性	213	—
		4	コンタミネーション
		1	ABPC
		1	TC
		1	ABPC-TC
		1	ABPC-PIP
20	ABPC	3	—
		1	コンタミネーション
		4	ABPC
		3	ABPC-TC
		4	ABPC-PIP
		2	ABPC-AMK
		1	ABPC-TC-AMK
		1	ABPC-PIP-AMK
		1	ABPC-TC-GM-AMK
		1	—
98	TC	4	コンタミネーション
		67	TC
		14	ABPC-TC
		1	CTX-TC
		1	TC-AMK
		1	CIP-TC
		1	ABPC-PIP-TC
		2	ABPC-CTX-TC
		1	CPR-CIP-STFX-TC
		3	CIP-LVX
		5	コンタミネーション
		9	TC
		10	ABPC-TC
38	ABPC-TC	1	ABPC-CTX
		1	CTX-TC
		1	ABPC-TC-GM
		4	ABPC-PIP-TC
		2	ABPC-CTX-TC
		1	ABPC-TC-AMK
		1	ABPC-TC-GM-AMK
		1	ABPC-PIP-TC-AMK
		1	ABPC-CTX-LVX-TC-AMK
		1	ABPC-CTX-CIP-LVX-TC
		1	ABPC-PIP-CIP-LVX-TC
		1	ABPC-LVX-TC
		3	ABPC-MPM-TC
3	ABPC-TC		

#### (4) 抗生物質耐性大腸菌の起源

抗生物質は感染症予防や飼料効率向上のために家畜に与えられており、畜産由来の抗生物質耐性菌による環境汚染も考えられる。豚由来の抗生物質耐性菌を調査した Teshager らの研究ではペニシリン系と第一世代セファロスポリンの両方(広いβ-ラクタム剤)に耐性をもっている大腸菌は15.6%、TCの耐性率は33.2%であった<sup>5)</sup>。また、牛由来の抗生物質耐性菌を調査した You らの研究ではペニシリン系と第一世代セファロスポリン系に耐性をもっている大腸菌は53.1%、TC耐性率は87.3%であった<sup>6)</sup>。家畜から検出される大腸菌には、ペニシリン系の抗生物質への耐性菌が多く見られるが、それらは同じβ-ラクタム剤であるセフェム系の抗生物質にもある程度耐性を示すことが多く、また、テトラサイクリン系の抗生物質の耐性率が33.2%から87.3%と大きいことが特徴である。

本研究で畜産由来の大腸菌が考えられるのは多摩川である。多摩川に流入する地域にある畜産農家数は酪農14件、肉牛2件、養豚4件、養鶏2件、その他畜産1件ある<sup>7)</sup>。本研究の多摩川での調査における薬品添加試験

においてABPCで選択した耐性菌のうち、ペニシリン系と第三世代セファロスポリン系に耐性をもっている大腸菌は8.1%であった。一方、大学廃水処理水では18.9%であり、より人の糞便を起源とする耐性菌が多摩川よりも多いと考えられる。また、畜産由来耐性菌の特徴とされるTC耐性菌は晴天時の多摩川では、全大腸菌の13.8%であるのに対し、降雨後の2011年5月31日の際には特に増加し74.3%となり、農場付近の土壌から耐性菌が多摩川に流れ込んだ可能性が考えられる。畜産の影響のない大学廃水処理水でのTC耐性菌比率は9.9%であり、多摩川の晴天時と比べて、あまり差は見られなかった。

また、大学廃水処理水では数は少ないものの第四世代セファロスポリン系のCPRや現在、最も汎用的に用いられているLVXに耐性を持つ多剤耐性菌も多摩川に比べて多く確認されており、糞便が混入する廃水には人由来の抗生物質耐性細菌が検出されやすいといえる。

#### 参考文献

- 1) Kumarasamy K.K. et al., Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study, *Lancet Infect Dis.* 10(9): 597-602.(2010)
- 2) Nordmann P. et al., Does broad-spectrum β-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria?, *J Antimicrob Chemother.* 66(4):689-692..(2011)
- 3) Allen H.K., Donato J. et al., Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments, *Nature reviews microbiology* 8 (4), 251-259.(2010)
- 4) 鈴木聡:海洋における遺伝子伝播,海と生命—「海の生命観」を求めて,東海大学出版会,365-385. 2009.
- 5) Teshager T. et al., Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses,*International Journal of Antimicrobial Agents*, 15: 137-142.(2000)
- 6) You J.Y. et al., Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 from cattle in Korea,*International Journal of Food Microbiology*, 106: 74-78.(2006)
- 7) 2010年世界農林業センサス 東京都調査結果報告 <http://www.toukei.metro.tokyo.jp/nourin/2010/ng10s00000.htm>