

B-31 大腸菌の人工抗生物質への耐性パターンの多摩川流域での変化

○三宅英美¹・堀越才智²・寺田翔¹・浦瀬太郎^{2*}

¹東京工科大学大学院 バイオ・情報メディア研究科 (〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1)

²東京工科大学 応用生物学部 (〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1)

*E-mail:urase@stf.teu.ac.jp

1. はじめに

抗生物質に耐性を示す細菌が臨床問題となっている。抗生物質を投与された人や家畜の影響が少ないと思われる場所においても、アンピシリンのような古典的な抗生物質に対する耐性菌はありふれて存在することから、人為的な影響について議論をするためには、耐性菌の存在よりも耐性スペクトルを検討することが重要であると考えられる¹⁾。

そこで、本研究では、比較的新しい人工抗生物質に焦点を当て、多摩川の大規模下水処理水の流入前を含めた8地点で、抗生物質耐性大腸菌を調査した結果を報告する。

2. 実験方法

(1) 試料採取場所

図-1に示す多摩川流域の8カ所を試料採取場所とした。奥多摩駅付近2地点(以下、日原川及びダム水とする)、支流の秋川、高尾山の琵琶滝上流(以下、高尾山とする)は人為的な影響の少ない地点として選定した。多摩川で最上流の大規模下水処理場となる多摩川上流水再生センターからの処理水の流入前および流入後の地点、府中付近(中流)、田園調布堰直上(下流)は、代表的な都市河川での採水地点として選定した。

(2) 耐性試験方法

8カ所で採水し、各試料の適量(50～600mL)を孔径0.45μmのメンブレンフィルター上に捕集し、Chromagar ECC培地で37℃24時間培養し、プレート1枚当たり100個程度の青色の*Escherichia coli*と思われるコロニーを形成させた。さらに、合計200株を目標に釣菌したコロニーの純化を行う為、同培地上でコロニーを再形成させた。

次にこれらの株について抗生物質(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, セフトキシム:CTX, スルファメトキサゾール:ST)を添加したミューラーヒントンス寒天培地上でのコロニーの形成能を調べた。このうち1剤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試験(KBディスク試験)を行い、ABPC, TC, GM, MPM, LVX, CTX, ST, セフピロム(CPR), セフェピム(CFP), シタフロキサシン(STFX), シプロフロキサシン(CIP), イミペネム(IPM), ピペラシリン(PIP), アミカシン(AMK)の14の抗生物質に対する耐性パターンを調べた。

(3) 耐性菌比率と多剤耐性度

薬剤添加試験で使用した薬剤のいずれかに耐性を示した株の1株あたり、KBディスク試験で耐性を示した平均の薬剤数を多剤耐性度と定義する。また、耐性菌比率とは、薬剤添加試験で耐性を示した株数を全試験株数で割ったものである。

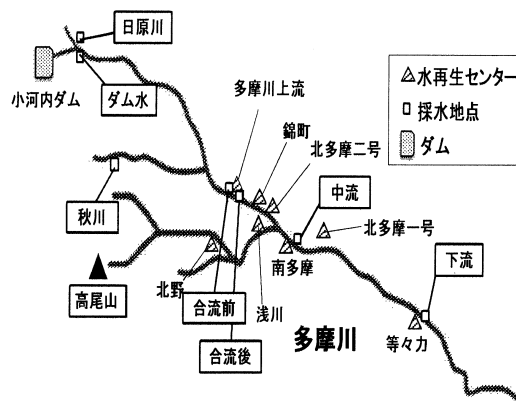


図-1 採水地点

3. 結果と考察

(1) 採水時の状況

各地点での採水時の状況を表-1に示す。大腸菌数は、この河川で最初の大规模下水処理水の流入となる多摩川上流水再生センター処理水の合流前では、0.29 CFU/mL以下であった。また高尾山、日原川、ダム水での大腸菌数は0.18 CFU/mL以下と低く、目標の200株の釣菌ができなかった試料もあった。日原川、ダム水の試料では、水温が8.8℃、9.3℃と低かった。

(2) 耐性菌比率及び多剤耐性度

各試料の耐性菌比率を図-2に示す。耐性菌比率は合流後で増え、そこから下流にいくにつれて減る傾向にあった。また、ダム水、日原川、高尾山では、耐性菌比率は6%以下と低かった。

図-3に各試料の多剤耐性度を示す。2012年4月9日に実施したダム水の試料については、薬剤添加試験では5株に耐性が見られたものの、KB-ディスク試験では耐性が見られなかった為、多剤耐性度は0であった。合流前から下流では、平均3剤の薬剤に耐性がみられたが、日原川、秋川では平均2剤程度、高尾山では多剤耐性はほとんど見られなかった。

(4) 多剤耐性菌の特徴

基本的な抗生物質に耐性を持つ細菌がディスク試験で耐性を示す薬剤の範囲を表-2に示す。ABPCもしくはCTXのβ-ラクタム剤に耐性を持つ菌のうち、第三世代セファロスポリン系の薬剤にまで耐性を示す株数は下水処理水が流入した後の試料で増え、さらに下流では減少する傾向にあった。また、第四世代セファロスポリン系にまで耐性を示す菌数は、中流域と下流域の試料で多く検出された。人用抗生物質に高度に耐性を持つパターン(GMとフルオロキノロン系、第三世代以降のセファロスポリン系全ての薬剤に耐性をもつ)の細菌は、合流前の試料で多くみられた。

秋川では、耐性菌の多くが第三・第四世代セファロスポリン系の薬剤を含まないβ-ラクタム系薬剤への耐性であり、人用抗生物質へまで及ぶ耐性パターンはほとんど見られなかった。

奥多摩の2試料と高尾山の試料では、耐性菌が少なく、耐性を示しても単純なパターンが多く、人用抗生物質である第三世代以降のセファロスポリン系、フルオロキノロン系、GM等への耐性はほとんど見られなかった。

また、薬剤添加試験でGM耐性を示した株が、同じアミノグリコシド系のAMKにも耐性を示す事は稀であり、合流前と合流後で数株見つかったのみである。また、MPM耐性菌は合流後の試料から1株見つかったのみで、

カルバペネム系の抗生物質への耐性菌はほとんど存在しなかった。

表-1 各地点での採水時の状況

採水日	採水場所	平均大腸菌数 [CFU/ml]	48時間降水量 [mm]	気温 [℃]	水温 [℃]	電気伝導度 [μS/cm]
2011	10/17 高尾山	8.4×10^{-2}	20.5	23.8	15.9	105.9
	11/7 合流前	2.9×10^{-1}	6.0	19.2	17.9	145.7
	11/7 合流後	7.2×10^0	6.0	19.2	24.6	420.0
	11/8 中流	2.6×10^0	2.0	20.0	19.5	333.0
	11/8 下流	9.5×10^{-1}	2.0	20.3	19.7	340.0
	11/14 高尾山	1.8×10^{-1}	0.0	17.9	13.0	108.0
	12/5 合流前	2.3×10^1	31.5	11.4	10.3	148.1
	12/5 合流後	4.0×10^0	31.5	15.5	20.4	370.0
	12/6 中流	4.0×10^0	0.0	12.8	13.8	365.0
	12/6 下流	1.8×10^1	0.0	8.0	12.3	330.0
	4/9 ダム水	2.0×10^{-2}	0.0	23.1	9.3	248.0
	4/9 日野原川	1.8×10^{-2}	0.0	22.5	8.8	118.9
2012	5/1 秋川	4.2×10^{-1}	0.0	21.6	15.4	111.9

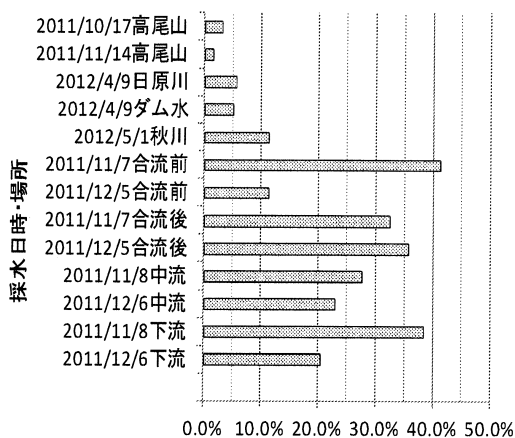


図-2 各試料の耐性菌比率

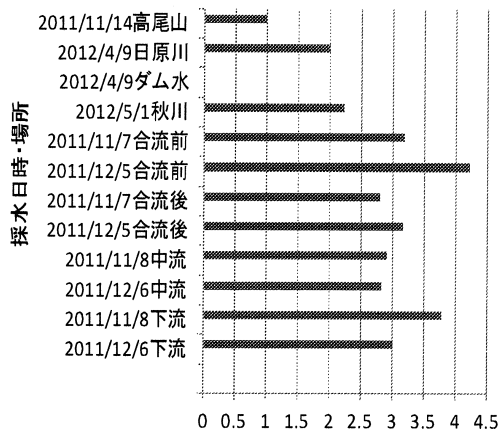


図-3 各試料の多剤耐性度

表-2 基本的な抗生物質に耐性を持つ細菌がディスク試験で耐性を示す薬剤の範囲

薬剤添加試験結果		KB-ディスク試験結果		合流前		合流後		中流		下流		高尾山		日原川	ダム水	秋川
		11/7	12/5	11/7	12/5	11/8	12/6	11/8	12/6	10/17	11/14	4/9	4/9	5/1		
全試験株[数](KBディスク試験株[数])		131(54)	177(20)	154(50)	157(56)	163(45)	192(44)	104(40)	176(36)	131(4)	207(3)	88(5)	98(5)	158(18)		
ABPCまたはCTXを含む株[数]	第三・第四世代セファロスポリン系以外のβ-ラクタム系	22	7	8	25	18	14	23	8	2	1	0	0	0	14	
	第三世代セファロスポリン系	16	8	28	9	6	3	2	1	0	0	1	0	0	0	
	第四世代セファロスポリン系	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	第三・第四世代セファロスポリン系	1	2	2	2	2	3	6	3	0	0	0	0	0	0	
LVX[数]	GMあるいは第三世代以降セファロスポリン系を含まないフルオロキノロン系	1	1	0	2	0	2	4	3	0	0	0	0	0	0	0
	[フルオロキノロン系]-GM-[第三世代以降セファロスポリン系]の3剤以上	3	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GM[数]	フルオロキノロン系あるいは第三世代以降セファロスポリン系を含まないGM	3	0	1	1	3	1	2	3	0	0	0	0	0	0	2
	AMKを含む	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MPM[数]	MPMまたはIPM	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表-3 薬剤添加試験で4剤以上に耐性を示した大腸菌の耐性パターン

試料	株数	薬剤添加試験結果		株数	KBディスク試験結果	
		耐性パターン			耐性パターン	
合流前	11/7	1	ABPC-LVX-GM-TC	1	ABPC-PIP-CIP-LVX-GM-TC-ST	
		2	ABPC-LVX-GM-ST	1	ABPC-PIP-CIP-LVX-GM-ST	
				1	ABPC-PIP-CIP-STFX-GM-ST	
		3	ABPC-GM-TC-ST	1	ABPC-GM-ST	
				2	ABPC-PIP-GM-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-LVX-TC-ST	1	ABPC-CTX-CIP-LVX-STFX-TC-ST	
	12/5	1	ABPC-LVX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-LVX-GM-TC-ST	
		2	ABPC-CTX-LVX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-LVX-GM-TC-ST	
		1	ABPC-LVX-GM-TC-ST	1	ABPC-CIP-LVX-STFX-GM-AMK-TC-ST (PIP)	
		2	ABPC-CTX-LVX-GM-TC-ST	2	ABPC-PIP-CTX-CFP-CPR-CIP-LVX-STFX-GM-AMK-TC-ST	
合流後	11/7	1	ABPC-CTX-MPM-TC	1	IPM-(CTX)-(GM)-(AMK)-(TC)	
		1	ABPC-CTX-MPM-ST	1	ABPC-CTX-ST	
		1	ABPC-CTX-TC-ST	1	ABPC-PIP-CIP-TC-ST	
	12/5	1	ABPC-LVX-TC-ST	1	ABPC-PIP-CIP-LVX-STFX-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-LVX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CFP-CPR-CIP-LVX-GM-AMK-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-TC-ST	1	ABPC-CTX-TC-ST	
		1	ABPC-GM-TC-ST	1	ABPC-GM-TC-ST	
	11/8	1	ABPC-CTX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CFP-CPR-GM-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-LVX-TC	1	ABPC-PIP-CTX-CIP-LVX-TC	
		1	ABPC-CTX-GM-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CFP-GM-ST	
		1	ABPC-CTX-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-TC-ST	
		2	ABPC-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-TC-ST	
				1	ABPC-TC-ST-(GM)	
中流	12/6	1	ABPC-LVX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CIP-LVX-GM-TC-ST	
				1	ABPC-PIP-CIP-LVX-STFX-GM-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-TC-ST	1	ABPC-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CPR-GM-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-LVX-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CIP-LVX-TC-ST	
		3	ABPC-PIP-CIP-LVX-STFX-TC-ST			
下流	11/8	1	ABPC-CTX-TC-ST	1	ABPC-TC-ST	
		1	ABPC-LVX-GM-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CPR-CIP-LVX-GM-ST	
		4	ABPC-LVX-TC-ST	1	ABPC-PIP-CIP-LVX-TC-ST	
				3	ABPC-PIP-CIP-LVX-STFX-TC-ST	
		1	ABPC-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-GM-TC-ST	
		1	ABPC-CTX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CPR-GM-TC-ST	
	12/6	1	ABPC-LVX-TC-ST	1	ABPC-CIP-LVX-TC-ST	
		1	CTX-GM-TC-ST	1	ABPC-PIP-CTX-CFP-CPR-GM-TC-ST	

表-3に薬剤添加試験で4剤以上に耐性を示した菌の耐性パターンを示す。4剤以上の多剤耐性菌は、大規模な下水処理水の合流前の試料からも多数検出されたが、そ

の上流にあたる秋川、日原川、ダム水の試料からは検出されず、高尾山の試料からも検出されなかった。多摩川合流前より下流に見られる耐性菌の中には、ABPC-TC-STなどの古い抗生物質への多剤耐性に加えて、LVX, CTX, GMなどの現在主に使用されている人用抗生物質への耐性を同時に持つパターンの耐性菌も多く存在し、注意が必要だと考えられる。2011年12月25日の合流前地点の試料では、12剤耐性の大腸菌も存在した。

4. まとめ

多摩川流域において大腸菌の抗生物質耐性菌について調査をしたところ、大規模な下水処理水流入前であっても、現在の治療の主役となっている人用抗生物質に高度に耐性を持つ多剤耐性菌が多く検出された。フルオロキノロン系-GM-第三世代以降のセファロスポリン系にまたがる高度な多剤耐性菌が処理水合流前地点で最も多く検出され、流下に伴いやや減少する傾向にあった。山間部の上流地点で採水した試料では、人用抗生物質に高度に耐性を持つ細菌は見つからず、耐性パターン単純なものが多く、ABPCやTCを中心とした古い抗生物質への耐性パターンがほとんどであった。カルバペネム系のIPMやMPMやアミノグリコシド系のAMKに耐性を持つ細菌はほとんど見られなかった。

5. 参考文献

1)寺田, 三宅, 浦瀬(2012): 異なる水環境から単離した大腸菌の抗生物質耐性プロファイル, 水環境学会誌, 35, (5), 73-80

謝辞: 本研究の一部は、科学研究費補助金(基盤研究(C), 課題番号23450652, 代表者: 浦瀬太郎)によって行われた。