

B-46 多摩川河川水中の大腸菌のフルオロキノロン系およびセファロスポリン系抗生物質への耐性

○浦瀬 太郎^{1*}・三宅 英美¹

¹東京工科大学・大学院・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@sf.teu.ac.jp

1. はじめに

抗生物質は、感染症治療に大きな効果を有しているが、抗生物質の使用にともない抗生物質や抗菌剤に耐性を持つ細菌(薬剤耐性菌)の増加が感染症治療の上での障害となっている。耐性菌の問題は、抗生物質が開発された当初よりの問題であり、これまでも新しい抗生物質の開発と耐性菌の発生とが繰り返されてきた。近年、世界的なヒトやモノの動きが活発になり、耐性菌の拡散が速くなる一方で、広い抗菌スペクトルを持つ有効な抗生物質の開発が鈍化していることが危惧されている。

薬剤耐性の問題は、これまで、院内感染の問題が重視されてきたが、院内感染とは無縁のはずの外来患者から基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌などが検出される例が近年増加している¹⁾。自然環境中で検出される耐性菌は、基本的には、疾病の「結果」であると理解してよく、環境中の耐性菌が疾病の「原因」になっている例がどの程度あるのかは、明らかではないが、環境中の耐性菌の存在状況の継続的なモニタリングは耐性菌の拡散メカニズムを知るうえでも必要である。

アンピシリンやテトラサイクリンといった古くからある抗生物質についての耐性菌は、すでに、環境中にありふれて存在し、環境中や下水処理場から単離される大腸菌中にこれらの抗生物質が効かない耐性菌は、10%から60%程度存在する²⁾。しかし、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌(第三世代セファロスポリンへの耐性菌におおまかに対応)やフルオロキノロン系抗生物質への耐性菌がどの程度環境中に存在するのかは、報告例が少ない。

本研究では、こうした比較的新しい抗生物質に対する耐性菌の存在状況を代表的な都市河川である多摩川において調査した。

2. 実験方法

(1) 調査地点と調査時期

調査地点は図-1に示すように、多摩川の氷川(奥多摩駅付近、図のA, B)から田園調布堰(図のH)に至る約65 kmの区間とそこに流入する秋川(武蔵五日市駅付近、図のC)、および、支流の高尾山琵琶滝(図のD)である。流域の下水道普及率は、約99%であり、ほぼ整備が完了している。多摩川の流域にはいくつかの下水処理場があるが、大規模なものとして最上流になる多摩川上流水再生センターの放流水が図のEとFの間で合流する。Hは田園調布の取水堰の直上であり、塩水の影響を受けない最下流点となり、この場所での流水の過半は下水処理水に由来するとされる。調査時期は、2011年10月～2012年12月で各地点1～3回実施した。一部のデータは昨年³⁾と重複している。

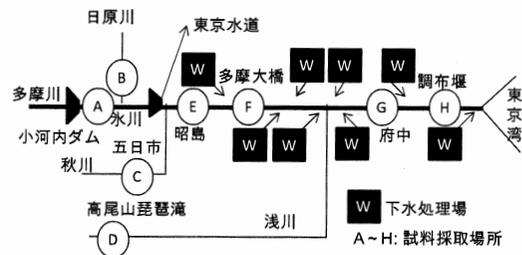


図-1 多摩川流域の試料採取地点の概略

(2) 大腸菌の釣菌と計数

試料の適量(大腸菌の想定される数に対応して0.1 mL～600 mL)を滅菌した孔径0.45 μmの膜でろ過し、膜ごとをクロモアガー-ECC培地上で培養した。*Escherichia coli*と考えられる青いコロニーの数を計測し、赤いコロニーを生じる大腸菌群を避けて、これらの青色コロニーを釣りだし、再度、ECC培地上で培養した。このとき、青色コロニーを再度形成したものを薬剤感受性試験に供した。これらの菌の菌種をAPI-10(BioMérieux Inc.)で簡易同定したところ、93%以上が*Escherichia coli*であり、他のものは、*Serratia*や*Klebsiella*の可能性が示唆された。

(3) 薬剤感受性試験

各試料に対して200株を目標に釣菌したコロニーに対して、抗生物質を含むMueller-Hinton培地によって、薬剤感受性試験を行った。用いた抗生物質とその濃度は、ampicillin (ABPC) 32 mg/L, gentamicin (GM) 8 mg/L, tetracycline (TC) 16 mg/L, cefotaxime (CTX) 64 mg/L, meropenem (MPM) 16 mg/L, levofloxacin (LVX) 8 mg/L, sulfamethoxazole / trimethoprim (ST/TMP) 152/8 mg/Lとした。これらの薬剤のうち少なくとも1剤に対して、耐性もしくは中間と判断された株は、さらに、Kirby-Bauer法によるディスク拡散試験により耐性パターンを確定した。腸内細菌に対する判断基準で耐性(中間は含まない)とされる阻止円の大きさで耐性パターンを決定した。ディスク試験で用いた抗生物質は、ペニシリン系 (ABPC, piperacillin (PIP)), 第三世代セファロスポリン系 (CTX), 第四世代セファロスポリン系 (cefpirome (CPR), cefepime (CFP)), カルバペネム系 (imipenem (IPM), MPM), アミノグリコシド系 (GM, amikacin (AMK)), テトラサイクリン系 (TC), フルオロキノロン系 (ciprofloxacin (CIP), LVX, sitafloxacin (STFX)), スルホンアミド系 (ST/TMP)とした。

3. 結果と考察

(1) 大腸菌数

図-2に薬剤感受性試験を行った試料に含まれる大腸菌 (*Escherichia coli*)数を示す。大規模な下水処理場の流入のあるE地点以前では、1 CFU/mL以下であった。多摩川中流域には、B類型環境基準が設定されている(大腸菌群として5000 MPN/100mL)。この環境基準に配慮した下水処理水の消毒が行われていることから、F地点以降でも、極端に高い大腸菌数は見られなかった。

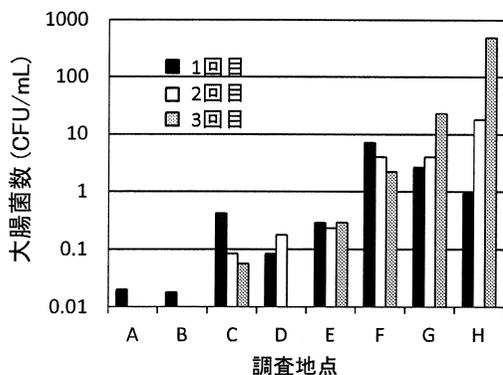


図-2 調査時の大腸菌数

(2) 各薬剤への耐性大腸菌の割合

全地点を合算すると、調査した大腸菌2,715株のうち、

ABPC耐性株は12.6%、CTX耐性株は2.3%、GM耐性株は2.0%、LVX耐性株は1.8%、MPM耐性株は見られず、ST/TMP耐性株は7.2%、TC耐性株は7.3%であった。ABPCとTCに対する耐性菌比率は、同河川に対して、我々が2000年代初頭に行った調査とほぼ同じ値であった⁹⁾。今回の研究と同時に実施した本学下水処理水(消毒前)から得られた737株における耐性率は、10.4%(ABPC)、1.6%(CTX)、2.6%(GM)、3.0%(LVX)、0%(MPM)、6.2%(ST/TMP)、10.3%(TC)であったことから、下水処理水における耐性菌比率と下水処理水における耐性菌比率はほぼ同じであった。

(3) 各地点ごとの大腸菌の薬剤感受性

図-3に地点ごとでの耐性率の集計を示す。A～D地点の山間部においては、耐性率がどの抗生物質も低く、特に、フルオロキノロン耐性は全く見られなかった。これらの地点で見いだされる大腸菌は必ずしもヒト起源ではなく、他の哺乳類や鳥類が起源となっている可能性があり、これらの動物の腸管内の大腸菌は、ABPCやTCなどの古い抗生物質に対する耐性はまれにはもっているが、新しい抗生物質に対する耐性をほとんど持っていないことが考えられた。地点Eは大規模下水処理場の放流水を

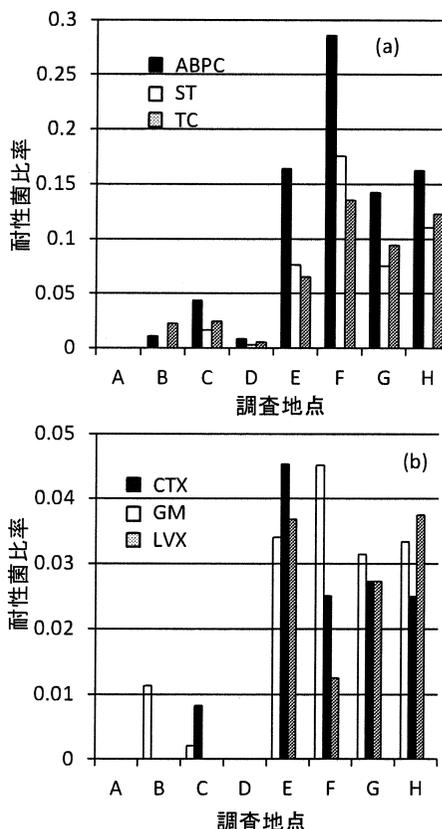


図-3 各地点の大腸菌の耐性率。

(a) : 比較的古い抗生物質, (b) : 比較的新しい抗生物質

含まない試料であるが、すでに耐性菌の比率は、F地点以降に近く、図-2に示した大腸菌数から見ても、ヒト由来の大腸菌が占める割合がすでにこの地点で高くなっていることが示唆される。

本研究においては、究極のβラクタム剤といわれるカルバペネム系抗生物質であるMPMへの耐性は発見されなかったが、これは、最初の耐性菌スクリーニングをMPMで行ったことが影響しており、ディスク試験では、Eで採取された1株(ABPC-IPM-STの多剤耐性菌)、Fで採取されたABPC-IPMおよびABPC-CTX-CFP-IPM-TCの2株、Cで採取された1株(ABPC-CTX-IPM-GM-AMK-TC)がカルバペネム耐性大腸菌と推定された。もし、最初の薬剤添加試験をIMPで行っていたとすると、より多くのカルバペネム耐性菌を見いだせた可能性がある。

地点ごとの耐性率のうち、LVX耐性は、F、G、Hと流下に伴い、耐性率が高くなった。このF、G、Hの間で耐性率が上昇することは、他の薬剤に対する耐性では顕著でなく、他の薬剤に対する耐性では、この区間の河川試料中に圧倒的に多いヒト由来の大腸菌の耐性菌比率がそのまま河川での耐性菌比率に反映していると考えられる。一方、LVX耐性が流下に伴い増加することは、都市環境において、LVX耐性が選択されやすい耐性であることを示唆している。また、LVX耐性菌は9割以上が、他のフルオロキノロン系薬剤(本研究ではCIPまたはSTFX)にも耐性であったことから、フルオロキノロン系薬剤一般への耐性菌が都市環境において選択されやすい可能性と言い換えることもできる。

(4) 注目される多剤耐性パターン

一方、表-1に ESBL産生菌の考えられるCTX耐性菌のうち、第四世代セファロスポリン(CPRまたはCFP)、アミノグリコシド系(GMまたはAMK)、フルオロキノロン系(LVX、CIPまたはSTFX)にも耐性を持つ多剤耐性菌比率をEからHの各地点について示した。A~Dの各地点では、Cの1株を除いてこのタイプの耐性菌は存在しないため、表には示していない。特に第四世代セファロスポリンとの多剤耐性菌比率が、この区間で流下とともに上昇していた。CTX耐性菌自体がそれほど多くないことから、この傾向が常に成り立つのかについて、統計的に十分な証拠はないが、LVX耐性菌と同じく、都市環境中で第四世代セファロスポリンにまで耐性を持つCTX耐性菌が選択されやすいことを本研究は示している。

表-1 CTX耐性菌の多剤耐性

地点	CTX 耐性株数	CPR or CFP との多剤耐性	GM or AMK との多剤耐性	LVX or CIP or STFX との多剤耐性
E	12	25%	33%	25%
F	18	33%	11%	22%
G	15	47%	13%	13%
H	16	75%	25%	31%

4. まとめ

多摩川流域から釣菌した大腸菌2,715株に対して抗生物質に対する感受性試験を行った。

(1) 比較的古い抗生物質に対する耐性菌比率は高く、調査大腸菌のうち、ABPC耐性株は12.6%、ST/TMP耐性株は7.2%、TC耐性株は7.3%であった。一方、現在もヒトの疾病治療に用いられることの多い比較的新しい抗生物質に対しては、耐性菌比率は低く、CTX耐性株は2.3%、GM耐性株は2.0%、LVX耐性株は1.8%であり、MPM耐性株は見られなかった。これらの比率は、同時に実施した大学下水処理水における比率と類似していた。

(2) 山間部の試料では、耐性菌比率は小さく、ヒト由来でない他の哺乳類や鳥類に由来する大腸菌が多いことが示唆された。

(3) 都市河川環境でフルオロキノロン耐性やESBL産生菌のうち第四世代セファロスポリンにまで耐性を持つ菌が選択されやすい可能性がある。

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23560652、浦瀬太郎代表)によって行われた。

参考文献

- 1) Ho, P. et al. (2007) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates from women: emerging multidrug resistance phenotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 59, 439-445.
- 2) Rizzo, L. et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. of the Total Environ*. 447, 345-360.
- 3) 三宅英美ら(2012) 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. 環境工学研究フォーラム講演集. 49, 139-141.
- 4) Iwane, T. et al. (2001) Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Wat. Sci. and Technol*. 43(2), 91-99.