

B-7 市街地を流下する河川流域における 薬剤耐性サルモネラの実態調査

○牛島 理博¹・鈴木 祥広^{2*}

¹宮崎大学大学院工学研究科土木環境工学専攻（〒889-2192宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地）

²宮崎大学工学部社会環境システム工学科（〒889-2192宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地）

* E-mail: suzuki@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

サルモネラは、水系感染症や食中毒を引き起こす病原細菌の一つとして知られている。世界におけるサルモネラによる感染症は、年間9,380万件発生しており、死者は15.5万人に及ぶとされ、世界的な問題となっている¹⁾。サルモネラによる感染症は、免疫力の低い小児や高齢者においては意識障害や敗血症などを引き起こすため、一般的に抗菌薬を用いた治療が行われる。ところが近年、家畜の生産効率の拡大を目的とした抗菌薬の過剰投与や不適切な使用が要因となり、抗菌薬に対する耐性を獲得した薬剤耐性サルモネラが出現し、家畜のみならずヒトのふん便からも検出されている²⁾。

現在、我が国では、生活排水や畜産排水の大部分は、下水処理場や排水処理施設において処理され、水環境に放流されている。その一方で、ふん便を含む一部の排水は、不完全な処理のまま水環境に流入していることから、水環境中においても薬剤耐性サルモネラが存在している可能性がある。しかしながら、水環境を対象とした薬剤耐性サルモネラに関する調査例は極めて少ない。そこで本研究では、市街地を流下する河川の流域を対象とし、河川水中のサルモネラの菌数と主要な抗菌薬に対する感受性を調査した。

2. 実験方法

(1) 試料の採取

図1に、調査地点の概略図を示す。試料は、宮崎県宮崎市の市街地を経由する八重川の上流（St. 1）・中流（St. 2）・下流（St. 3）における表層の河川水とした。調査は、平水時に計2回（2014年5月31日と2014年7月25日）行った。なお、サルモネラが河川水中に均一に存在

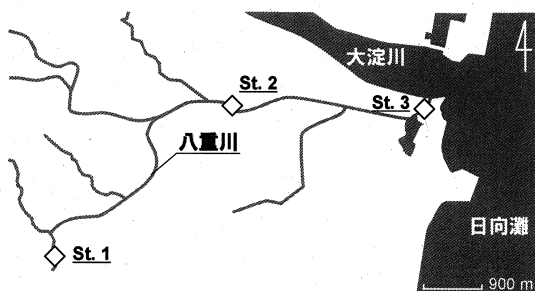


図1 調査地点の概略図

していない場合も考えられるため、各調査地点において流下してくる河川水を20試料ずつ採水し、個々の試料から1株を単離した。同時に、サルモネラとその他の細菌、ならびに水質を測定するための試料も採水した。

(2) 水質項目の測定と降雨量データの取得

採水時に各調査地点において水温と溶存酸素（DO）を測定した。また、採取した河川水を実験室に持ち帰ったのち、pH、電気伝導度（EC）、濁度、全有機炭素（TOC）、および全窒素（TN）を測定した。なお、調査日3日前の累計降水量は、気象庁のホームページ（<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>）から取得した。

(3) ふん便指標細菌、腸球菌、およびサルモネラの計数

大腸菌群数と大腸菌数（MPN/100 mL）は、特定酵素基質法にもとづくColilert[®]-18（IDEXX）を用いて計数した。腸球菌数（CFU/100 mL）は、腸球菌選択培地である membrane-Enterococcus Indoxy-β-D-Glucoside 寒天培地（mEI培地）を用いたメンブレンフィルター法³⁾によって計数した。また、サルモネラは、最確数法を用いて計数した。3段階まで10倍希釈した河川水をそれぞれ3試料ずつ用意し、それぞれ孔径0.45 μmメンブレンフィルタ

ー (ADVANTEC) に通水した。その後、フィルターをそれぞれ緩衝ペプトン水 (ニッスイ) 50 mL に入れ、37°C で 20 時間培養した。次に、培養液 100 μ L をそれぞれラバポート・バシリアディス液体培地 (ニッスイ) 10 mL に接種し、42°C で 24 時間培養した。その後、培養液 30 μ L を CHROMagar™ Salmonella 寒天培地 (CHROMagar) 上に塗布し、37°C で 24 時間培養した。そして、各培地からサルモネラが疑われる藤色コロニーを 1 コロニーずつ釣菌し、ポリメラーゼ連鎖反応法 (2. (5)) によってサルモネラを同定した。その後、サルモネラ陽性となった試料数を通水量別に計数し、最確数表を用いてサルモネラ数 (MPN/100 mL) を計数した。

(4) サルモネラの単離

各調査地点において採取した 20 試料をそれぞれ孔径 0.45 μ m メンブレンフィルターによってろ過した。その後は 2. (3) と同様に行い、各試料から 1 株ずつ単離した。

(5) サルモネラの同定

単離した菌株について、サルモネラに特異的な *invA* 遺伝子をターゲットとしたポリメラーゼ連鎖反応法⁹⁾を用いて同定を行った。また、サルモネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いて、O 抗原を同定した。

(6) 薬剤感受性試験

単離・同定した菌株について寒天平板希釈法を用いた薬剤感受性試験を行った。2 倍希釈系列で 11 段階の濃度に調製した抗菌薬含有 MH 寒天培地に菌株を接種し、37°C で 20 時間培養した。その後、菌株の発育を阻止する最小の抗菌薬濃度 (MIC) を測定した。測定した MIC をもとに、CLSI⁹⁾ と NARMS⁹⁾ の定める基準に従い、各抗菌薬に対する感受性、中度耐性、および耐性を判定した。なお、使用した抗菌薬は、アンピシリン (ABPC)、セフトリアキソン (CTR)、クロラムフェニコール (CP)、シプロフロキサシン (CPFX)、ゲンタマイシン (GM)、イミペネム (IMP)、ナリジクス酸 (NA)、ストレプトマイシン (SM)、スルファメトキサゾール (SMX)、テトラサイクリン (TC) の計 10 種類である。

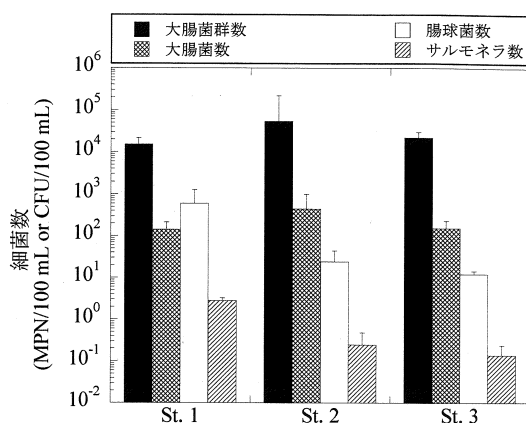


図2 各調査地点における細菌の計数結果
(腸球菌, n=6; その他の細菌, n=2, 平均 $\pm$ SD)

3. 結果と考察

(1) 水質項目

表1に、水質項目の測定結果を示す。pHは、各調査地点間で大きな違いは確認されなかった。St. 3では、海水が流入し、ECが急激に高くなった。他の調査地点と比較してSt. 1では、DOが最も低く、濁度とTOC濃度が最も高かった。その一方、TN濃度はSt. 1において最も低く、St. 2において最も高かった。TOCとTNの濃度は、各調査地点間で多少の違いは確認されたが、いずれの調査地点においても低い値を示した。

(2) 各調査地点における細菌数

図2に、各調査地点における大腸菌群数、大腸菌数、腸球菌数、およびサルモネラ数を示す。各調査地点における大腸菌群数、大腸菌数、腸球菌数、およびサルモネラ数はそれぞれ、 $1.5 \times 10^4 \sim 5.3 \times 10^4$ MPN/100 mL、 $1.4 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^2$ MPN/100 mL、 $1.2 \times 10^1 \sim 6.0 \times 10^2$ CFU/100 mL、 $0.14 \sim 2.8$ MPN/100 mLであった。大腸菌群数と大腸菌数は、調査地点間で大きな違いは認められなかった。これに対して、腸球菌数とサルモネラ数は、流下に伴って減少した。以上のことから、各種のふん便指標細菌においても流域によって濃度変化に違いが認められた。

表1 水質項目の測定結果

調査日	調査地点	降水量 ^a (mm)	水温 (°C)	pH (-)	EC (mS/cm)	濁度 (度, カオリン)	DO (mg/L)	Satu-DO (%)	TOC (mg/L)	TN (mg/L)
2014.5.31	St. 1	0	23.4	7.47	0.514	5.27	7.13	84.4	1.9	0.52
	St. 2	0	27.8	7.68	0.206	2.23	8.85	113	1.3	0.95
	St. 3	0	25.9	7.44	9.78	1.04	6.87	85.0	1.2	0.70
2014.7.25	St. 1	0	29.2	7.76	0.613	27.8	6.02	79.2	3.3	0.54
	St. 2	0	33.6	7.96	0.386	11.3	9.99	142	3.0	0.79
	St. 3	0	31.8	7.61	10.5	5.89	7.86	108	1.6	0.56

a; 調査前日3日間の累計

表2 各調査地点から単離・同定したサルモネラにおける薬剤感受性試験の結果

抗菌薬	耐性判定 基準値 ($\mu\text{g/mL}$)	St. 1				St. 2				St. 3			
		感受性	中度耐性	耐性	MIC90 ^{a)}	感受性	中度耐性	耐性	MIC90	感受性	中度耐性	耐性	MIC90
		株数 (割合)			($\mu\text{g/mL}$)	株数 (割合)			($\mu\text{g/mL}$)	株数 (割合)			($\mu\text{g/mL}$)
ABPC	≥ 32	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1
CTRX	≥ 4	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.125	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.125	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.125
CP	≥ 32	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4
CPFX	≥ 1	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.0313	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.0313	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.0313
GM	≥ 16	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1
IMP	≥ 4	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.25	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.25	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.25
NA	≥ 32	35 (100%)	-	0 (0%)	4	21 (100%)	-	0 (0%)	4	25 (100%)	-	0 (0%)	4
SM	≥ 64	25 (71%)	-	10 (29%)	64	20 (95%)	-	1 (5%)	32	24 (96%)	-	1 (4%)	16
SMX	≥ 512	35 (100%)	-	0 (0%)	256	21 (100%)	-	0 (0%)	128	25 (100%)	-	0 (0%)	256
TC	≥ 16	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4

a) MIC90: 単離・同定した全株数の90%の発育を阻止する最小の薬剤濃度

(3) サルモネラとふん便指標細菌の相関関係

図3に、サルモネラ数とふん便指標細菌数の相関関係を示す。サルモネラに対する大腸菌群、大腸菌、および腸球菌の相関係数 (r^2) はそれぞれ、0.062, 0.073, および0.48であり、高い相関関係は認められなかった。このことから、ふん便指標細菌数によってサルモネラの汚染度を評価することは困難であると考えられた。

(4) 単離・同定したサルモネラの薬剤感受性

表2に、St. 1, St. 2, およびSt. 3から単離・同定したサルモネラ35株, 21株, 25株における薬剤感受性試験の結果を示す。1種類以上の抗菌薬に耐性を示す薬剤耐性サルモネラは、各調査地点からそれぞれ10株 (29%), 1株 (5%), および1株 (4%) 検出され、St. 1において最も高い検出率となった。また、検出された薬剤耐性サルモネラは、全てSMに対してのみ耐性を示した。このことから、八重川にはSM耐性サルモネラが普遍的に存在していることが示唆された。

GM, SM, およびSMXを除く抗菌薬のMIC90は、各調査地点において同一であった。GMとSMのMIC90は、St. 1において最も高く、SMXではSt. 1とSt. 3において最も高かった。このことから、St. 2, St. 3と比較して、St. 1の河川水中に存在するサルモネラは、GM, SM, およびSMXに対する感受性が低下していることが示唆された。また、ABPC, CTRX, CPFXおよびIMPのMIC90は、耐性判定基準値の1/16倍以下と非常に低かった。これに対して、SMとSMXのMIC90は、最大で耐性判定基準値の1倍, 1/2倍の値であった。MIC90から評価すると、八重川に存在するサルモネラは、ABPC, CTRX, CPFXおよびIMPに対して高い感受性を示すが、SMとSMXに対しては感受性が低下していることが示唆された。

4. まとめ

1) サルモネラ数は八重川最上流域において最も高く

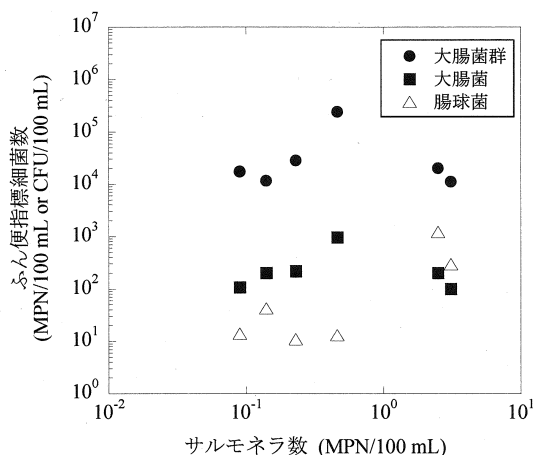


図3 サルモネラ数とふん便指標細菌数の相関関係

(2.8 MPN/100 mL), 流下に伴って減少した。

- 2) ふん便指標細菌の計数によってサルモネラの汚染度を評価することは困難であることが示唆された。
- 3) 各調査地点から検出された薬剤耐性サルモネラ22株は、SMに対してのみ耐性を示した。
- 4) 八重川に存在しているサルモネラは、SMとSMXに対する感受性が低下していることが示唆された。

参考文献

- 1) Majowicz S. E. et al.: The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis, *Clin. Infect. Dis.*, **50**(6), 882-889, 2010.
- 2) Izumi, H. et al.: Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in Japan, *Int. J. Clin. Microbiol.*, **26**(2), 126-132, 2005.
- 3) U. S. EPA: Method 1600; Enterococci in water by Membrane filtration using membrane-Enterococcus Indoxyl- β -D-Glucoside Agar (mEI), 2009.
- 4) Chiu, C. et al.: Rapid identification of *Salmonella* serovar in feces by specific detection of virulence gene, *invA*, *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay, *J. Clin. Microbiol.*, **34**(10), 2619-2622, 1996.
- 5) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement, M100-S23, 2013.
- 6) NARMS: Retail meet report, 2011.