

6. 水環境中における薬剤耐性菌の実態に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 尾崎正明
主任研究員 諏訪 守

1. はじめに

我が国でも抗生物質の多量使用により薬剤耐性菌が発生し、病院内などを中心に感染事例が多く報告されており社会問題となっている。またヒトが服用した抗生物質は最終的には体外へ排出されることから、下水処理場などを経て環境水中に放流される。現在、下水処理場や環境水中において、これら抗生物質や薬剤耐性菌などの調査、研究が徐々に行われてきている^{1) 2) 3)}。

一方、下水道の普及率も向上し環境水中に占める下水処理水の割合も向上しているため、下水処理場はこれらの薬剤耐性菌や抗生物質の新たな汚染源となりうる可能性があることから、その詳細な実態解明を求められることが今後予想される。また、下水処理過程において耐性遺伝子の伝達の可能性を指摘する報告⁴⁾もあるが、調査・研究事例は現在のところ少ない。

本研究では、環境水中における薬剤耐性菌の汚染実態を明らかにするとともに、環境水に大きな影響を及ぼすと考えられる下水処理場を含めた各種排水処理施設などからの耐性菌排出量を把握し、環境水への影響の大きさを検討する。さらに、河川環境を含めた微生物の混在系における耐性遺伝子の伝達特性や、薬剤耐性菌の消長と消毒耐性の解明を目的としている。

16 年度は、下水処理水とその流入下水、さらに病院排水とその活性汚泥処理施設の処理水について、大腸菌を対象とした薬剤耐性試験、薬剤感受性試験を行い、実態を調査した。

2. 研究方法

2. 1 大腸菌の検出法の評価

下水処理場へ排出される細菌群の汚染源はヒト由来のものが大部分を占めることから、腸内細菌科に属する細菌が優占すると考えられる。その中でも大腸菌は、ヒト腸管内の常在菌の一種でかつふん便汚染指標の代表種として位置づけられ、また、下水を含めた環境水における既存の薬剤耐性菌の調査・研究では大腸菌を対象とした事例が多く見受けられる。さらに、今後他の菌種を対象に調査を行った場合でも、基礎的データとして大腸菌との関連性を把握することは重要となることが予想される。このため、16 年度においては薬剤耐性菌の対象を大腸菌として実験・調査を行った。

まず、下水中より大腸菌を検出するための測定法を評価した。現在、大腸菌（大腸菌群）を水試料から検出するために様々な方法が提示されている。ここでの検出法の評価では、数種類の異なる培地を用いた平板培養法あるいはフィルター法により、検出された典型コロニーの菌種を同定し、その陽性割合から大腸菌検出のための最適な測定法を選定した。評価対象とした培地はクロモカルト培地、デソキシコール酸塩培地（37℃、44.5℃）の平板培養法、MF-エンドウ培地、M-FC 培地のフィルター法であり、各培地により検出された典型コロニー

を 20 ～ 30 株釣菌し、ID テスト（ニッセイ EB-20）を用いて菌種の同定を行った。

2. 2 薬剤耐性試験

薬剤耐性試験では、対象抗生物質をレボフロキサシン（LVFX）、アンピシリン（ABPC）の 2 種類とし LVFX の場合は最終濃度が 8mg/L になるようクロモカルト培地に添加、ABPC では 32mg/L とし、添加系と無添加系における大腸菌の検出濃度の違いにより耐性割合を把握した。LVFX は我が国における出荷量・額および尿排泄率から推定した体外排出量の多い抗生物質の一種であり¹⁾、また、ABPC は既存の調査・研究事例で比較的多く報告されているとともに、腸内細菌科の大腸菌に対してともに抗菌作用を有することから薬剤耐性試験の対象抗生物質として選定した。

試料の採取は下水試料で 3 回、病院試料で 2 回行い、各々薬剤耐性試験を実施した。下水試料は関東圏内の流域下水道の流入下水と活性汚泥処理後の処理水、病院試料は関東圏内にある比較的大規模な病院の下水とその活性汚泥処理施設から排出される処理水の計 4 種類とした。なお、流域下水道の流域内に今回調査対象とした病院試料は含まれていない。

2. 3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、上記 2.2 の抗生物質無添加培地によって検出された大腸菌の典型コロニーを釣菌、トリプトソイブイオン培地に接種の後 35℃で 3 時間程度培養を行い、培養液を平板に固めたミュラーヒントン S 寒天培地に塗布し、平板上に抗生物質の含有されたディスクを置いた。この平板を 35℃で 16 ～ 18 時間培養した後、平板上に形成された阻止円の直径を測定し耐性、中間、感受性の判定を行い、各抗生物質に対する感受性を調査した。対象抗生物質はレボフロキサシン（LVFX：キノロン系）、アンピシリン（ABPC：ペニシリン系）、セフジニル（CFDN：経口セフェム系）、テトラサイクリン（TC：テトラサイクリン系）、カナマイシン（KM：アミノグリコシド系）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム（ST：合成抗菌薬）、ゲンタマイシン（GM：アミノグリコシド系）、イミペネム（IPM：カルバペネム系）の 8 種類とした。これら抗生物質の選定理由は、我が国における出荷量・額および尿排泄率から推定した体外排出量などの報告例¹⁾を参考とし、併せて過去の調査・研究事例での報告が多く、腸内細菌科の大腸菌に対して抗菌作用を有するためである。薬剤感受性試験における抗生物質含有ディスクは KB ディスク（栄研化学）を利用した。感受性試験の判定基準などは、KB ディスクの手引き⁵⁾を参照したが、これらの基準は WHO や米国臨床検査基準委員会などの指針を参考に作成されている。

3. 研究結果および考察

3. 1 大腸菌の検出法の評価結果

大腸菌を検出するための測定法の評価結果を表 1 に示す。流入下水において典型コロニー中の大腸菌の割合が高い培地はクロモカルト培地、デソキシコール酸塩培地（44.5℃）の 2 種類であり、各々その割合は 90 % 程度であった。下水処理水で典型コロニー中の大腸菌の割合が比較的高い培地は、クロモカルト培地の 70 % 程度、次いで M-FC 培地の 65 % であり、流入下水、下水処理水ともクロモカルト培地で検出される典型コロニー中の大腸菌の割合は、他の培地と比較して若干高かった。このため、クロモカルト培地によって検出されるコロニーの大部分は大腸菌であると考えられることから、薬剤耐性試験、薬剤感受性試験による大腸菌の検出では、クロモカルト培地を利用した。

表 - 1 大腸菌(E.coli)の検出法の評価結果

試料 培地	流入下水		下水処理水	
	E.coli/釣菌	E.coli(%)	E.coli/釣菌	E.coli(%)
クロモカルト培地	26 / 30	87	22 / 30	73
デシホルム酸塩培地	24 / 30	80	7 / 20	35
デシホルム(高温培養)	28 / 30	93	18 / 30	60
MF-エンドウ培地	13 / 30	43	7 / 20	35
M - F C 培地	18 / 30	60	13 / 20	65

3.2 薬剤耐性試験結果

薬剤耐性試験結果を表 - 2 に示す。下水試料における流入下水の LVFX 耐性大腸菌の割合は平均 1.3 %、ABPC では 11.3 %、活性汚泥処理を経た処理水では LVFX0.9 %、ABPC8.5 % となっており、各々 ABPC に耐性を示す大腸菌の割合は高い。活性汚泥処理を経ることで、各々耐性を示す菌数割合は若干ではあるが減少する傾向が見られた。多摩川流域の下水処理場で行った調査結果⁶⁾でも、ABPC の耐性割合は 10.2 ~ 12.5 % を示し、下水処理過程において耐性割合の変化は認められていない。

病院試料の流入下水では LVFX の耐性割合は平均で 10.2 %、ABPC で 40.5 %、活性汚泥処理を経た処理水では LVFX1.7 %、ABPC13.4 % となっており、下水試料と同様に各々 ABPC

表 - 2 薬剤耐性試験結果

試料 培地等		流入下水		下水処理水	
		検出濃度範囲 (cfu/mL)	平均	検出濃度範囲 (cfu/mL)	平均
下水試料	抗生物質無添加培地	$2.7 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^4$	39×10^4	$1.3 \times 10^1 \sim 2.0 \times 10^2$	7.8×10^1
	LVFX 添加培地	$4.2 \times 10^2 \sim 6.2 \times 10^2$	49×10^2	$8.0 \times 10^{-2} \sim 2.6 \times 10^0$	0.9×10^0
	LVFX 耐性割合(%)	1.0 ~ 1.6	1.3	0.3 ~ 1.3	0.9
	ABPC 添加培地	$2.0 \times 10^3 \sim 4.4 \times 10^3$	32×10^3	$1.7 \times 10^0 \sim 7.8 \times 10^0$	4.8×10^0
	ABPC 耐性割合(%)	6.3 ~ 16.3	11.3	3.9 ~ 13.1	8.5
病院試料	抗生物質無添加培地	$1.0 \times 10^3 \sim 7.3 \times 10^3$	42×10^3	$3.2 \times 10^0 \sim 4.0 \times 10^1$	2.2×10^1
	LVFX 添加培地	$4.0 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^3$	62×10^2	1.0×10^{-1}	1.0×10^{-1}
	LVFX 耐性割合(%)	4 ~ 16.4	10.2	0.3 ~ 3.1	1.7
	ABPC 添加培地	$4.4 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^3$	1.6×10^3	$6.8 \times 10^{-1} \sim 2.3 \times 10^0$	1.5×10^0
	ABPC 耐性割合(%)	37.0 ~ 44.0	40.5	5.7 ~ 21.1	13.4

に耐性を示す大腸菌の割合は高かった。下水試料と病院試料で耐性大腸菌の割合を比較すると、LVFX では流入下水で 8 倍、下水処理水で 2 倍、同様に ABPC で 4 倍、2 倍程度、病院試料は高かった。この要因は、病院試料は抗生物質の投与を受けている入院患者の排泄物由来の負荷が一般の下水試料と比較して高いなど、排水性状の特異性に起因するものと推定さ

れる。今回の調査結果では、下水・病院試料とも活性汚泥処理を経ることで、各々耐性を示す菌数割合は減少する傾向が見られたが、活性汚泥処理により耐性菌の選択や耐性遺伝子の伝達などの可能性を指摘する報告^{4) 7)}や大腸菌群を含めた腸内細菌科細菌では、耐性割合が増加するという報告⁶⁾もある。また、下水中の抗生物質濃度と耐性遺伝子伝達との関連についての調査例⁸⁾もあり、今後他の菌種を含めデータの蓄積を図る必要があると考えられる。

3. 3 薬剤感受性試験結果

薬剤感受性試験結果を表－3に示す。各々の採水毎に整理を行ったものを記載した。下水試料の流入下水から検出された株の耐性割合はABPCで40～70％程度、TCで10～60％程度、次いでCFDNが0～30％程度であり採水毎にその割合は異なるものの、この3種類の抗生物質に対して耐性を示す株の割合は高かった。また、やや耐性があると考えられる中

表－3 薬剤感受性試験結果

試料 採水 No. 抗生物質		流入下水 (72株)			下水処理水 (86株)		
		感受性(割合%)	中間(割合%)	耐性(割合%)	感受性(割合%)	中間(割合%)	耐性(割合%)
		I, II, III	I, II, III	I, II, III	I, II, III	I, II, III	I, II, III
下水試料	ABPC	36, 54, 25	23, 8, 4	41, 38, 71	36, 33, 20	21, 29, 16	43, 38, 65
	CFDN	91, 50, 75	9, 19, 0	0, 31, 25	100, 48, 45	0, 14, 24	0, 38, 31
	LVFX	82, 88, 100	5, 0, 0	14, 12, 0	100, 81, 69	0, 14, 4	0, 5, 27
	TC	45, 38, 13	41, 35, 29	14, 27, 58	29, 43, 12	21, 29, 18	50, 29, 71
	KM	86, 88, 92	0, 8, 4	14, 4, 4	86, 86, 76	14, 10, 12	0, 5, 12
	ST	82, 96, 100	14, 0, 0	5, 4, 0	93, 86, 84	7, 10, 12	0, 5, 4
	GM	100, 88, 96	0, 0, 0	0, 12, 4	100, 90, 84	0, 0, 0	0, 10, 16
	IPM	100, 100, 100	0, 0, 0	0, 0, 0	100, 100, 100	0, 0, 0	0, 0, 0
試料 採水 No. 抗生物質		流入下水 (88株)			下水処理水 (88株)		
		感受性(割合%)	中間(割合%)	耐性(割合%)	感受性(割合%)	中間(割合%)	耐性(割合%)
		I, II	I, II	I, II	I, II	I, II	I, II
病院試料	ABPC	53, 48	25, 20	22, 32	55, 22	11, 0	34, 78
	CFDN	87, 55	0, 25	13, 20	100, 39	0, 10	0, 51
	LVFX	97, 95	0, 0	3, 5	100, 71	0, 7	0, 22
	TC	56, 20	35, 32	9, 48	72, 17	15, 27	13, 56
	KM	75, 77	16, 18	9, 5	81, 98	15, 0	4, 2
	ST	94, 88	0, 5	6, 7	100, 98	0, 2	0, 0
	GM	100, 100	0, 0	0, 0	100, 98	0, 0	0, 2
	IPM	100, 100	0, 0	0, 0	100, 95	0, 0	0, 5

間を示した株の割合でも、ABPCやTCは他の抗生物質と比較するとその割合は高かった。下水処理水に関しても若干割合は異なるものの、同様な傾向が見られた。しかし、出荷量・額および体外排出量の比較的多いと推定される抗生物質のLVFX、IPMに耐性を示す株の割

合は、ABPC、TC に耐性を示す株の割合と比較してかならずしも高いものではない。特に全ての株に対して IPM は感受性を示した。

病院試料でも ABPC、TC、CFDN に対して耐性を示す株の割合は、下水試料と同様に高いものとなっている。GM、IPM に関しては流入下水、下水処理水ともほとんどの株で感受性を示した。金目川、多摩川、鶴見川を対象とした河川水の調査結果²⁾でも ABPC、TC に対して耐性を示す株の割合は高く、LVFX に関しても感受性試験を行っているが、その割合は ABPC や TC と比較すると低い。都内の下水処理場における調査結果⁴⁾でも処理水中の耐性株は TC や ABPC に耐性を示すものが多い。今回の調査結果を含め流域・調査箇所、時期が異なっても同様な結果が得られるということは、広範囲かつ恒常的に ABPC、TC に対して耐性を持つ大腸菌が存在していることが示唆された。

一方、今回の試験結果では、抗生物質出荷量などと下水中の耐性大腸菌の割合は比例関係ではない可能性が伺えたことから今後、他の菌種を含め耐性菌の消長に影響を及ぼす条件を解明する必要があると考えられる。

2 種類以上の抗生物質に対し耐性を示す株を多剤耐性株と定義し、整理したものを表 4 に示す。下水試料の流入下水から得られた 72 株の内 25 株、下水処理水で 86 株の内 47 株、同様に病院試料では流入下水 88 株の内 23 株、下水処理水 88 株の内 33 株が 2 種類以上の抗生物質に対し耐性を示した。その割合は下水試料で 35 ～ 54 %、病院試料で 26 ～ 37 %であったが、その内 2 種類の抗生物質に対して耐性がある株の割合が最も多かった BPC と TC また、この 2 種類の抗生物質と他の抗生物質に対し耐性のある株は下水試料で 2 株の内 45 株、病院試料で 56 株の内 35 株であり、ABPC と TC に対してともに耐性のある株は多剤耐性株の中で両試料とも 60 %以上を占めていた。最大では 6 剤に対して耐性のある株が下水試料の流入下水、処理水から、病院試料では 5 剤耐性株が処理水から検出された。下水・病院試料とも活性汚泥処理を経ることで、多剤耐性の割合は若干ではあるが上昇している。多剤耐性の定義は異なるものの都内の下水処理場で行った調査結果でも流入水と処理水との間に増加傾向が見られたため、下水処理過程で耐性遺伝子の伝達や耐性菌の選択の可能性を指摘する報告⁴⁾もある。今後、他の菌種、下水処理場で行われている消毒による不活化効果、環境水も含めその消長に関しデータを蓄積する予定である。

表 4 多剤耐性株の割合

試料 \ 多剤		2 剤	3 剤	4 剤	5 剤	6 剤	7 剤	計 (割合%)
下水	流入下水	17 (24)	5 (7)	2 (3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	25 (35)
	処理水	26 (30)	14 (16)	4 (5)	2 (2)	1 (1)	0 (0)	47 (54)
病院	流入下水	12 (14)	10 (11)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (26)
	処理水	16 (18)	10 (11)	6 (7)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	33 (37)

()内数値 (%) : (耐性株数 / 被検株数) × 100

4. まとめ

16 年度は、環境水へ大きな影響を及ぼすと考えられる下水処理水とその流入下水、さらに病院排水とその活性汚泥処理水について大腸菌を対象とした薬剤耐性試験、薬剤感受性試験を行い、実態を調査した。調査から得られた結果を以下に示す。

- 1) クロモカルト培地による検出法で検出される典型コロニー中の大腸菌の割合は、他の培地による検出法と比較して最も高かった。
- 2) 下水試料における流入下水の LVFX 耐性大腸菌の割合は、平均 1.3 %、処理水では 0.9 %、ABPC では流入下水 11.3 %、処理水 8.5 %であった。
- 3) 病院試料における流入下水の LVFX 耐性大腸菌の割合は、平均 10.2 %、処理水では 1.7 %、ABPC では流入下水 40.5 %、処理水 13.4 %であり、下水試料と同様に ABPC に耐性を示す大腸菌の割合は高かった。また、下水・病院試料とも活性汚泥処理を経ることで、各々耐性を示す菌数割合は減少する傾向が見られた。
- 4) 8 種類の抗生物質を対象とした薬剤耐性試験結果では、下水・病院試料とも ABPC、TC、CFDN に対して耐性を示す株の割合は特に高かったが、IPM に対して耐性を示す株はほとんど存在しなかった。
- 5) 2 種類以上の抗生物質に対し耐性のある株を多剤耐性株と定義し整理を行った結果、下水・病院試料とも下水処理水の多剤耐性株の割合は、流入下水と比較して若干上昇した。

参考文献

- 1) 八十島誠ら(2004)、下水処理水中に含まれるレボフロキサシン、クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響、水環境学会誌(27)11,707-714.
- 2) 清野敦子ら(2004)、金目川、鶴見川、多摩川における薬剤耐性菌大腸菌の分布、水環境学会誌(27)11,693-698.
- 3) 浦瀬太郎、山本和夫、岩根泰蔵(1999)、多摩川を例とした抗生物質耐性と河川の人為汚染指標の比較、土木学会第 54 回年次学術講演会講演集.
- 4) 岩根泰蔵、浦瀬太郎、山本和夫(1998)、下水中および河川水中の大腸菌における抗生物質耐性の分布、第 35 回環境工学研究フォーラム講演集,144-146.
- 5) 細菌感受性試験用、K B ディスク ‘栄研’ 手引き.
- 6) 岩根泰蔵ら(2003)、河川水中および下水中におけるアンピシリン耐性大腸菌の分布ならびに大腸菌群および腸内細菌科細菌を対象とした測定結果との比較、土木学会論文集(727) VII-26,1-12.
- 7) Reinthaler,F.F. et al.(2003) Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge, *Water Research* (37) 1685-1690.
- 8) Ohlsen,K. et al. (2003) Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage, *Environmental Microbiology*(5) 8,711-716.