

## 宮城県の河川等における薬剤耐性菌

Detection of drug resistance bacteria in environmental water such as rivers in Miyagi.

佐々木美江 矢崎 知子 後藤 郁男  
 畠山 敬 渡邊 節 谷津 壽郎  
 齋藤 紀行\*<sup>1</sup>

Mie SASAKI, Tomoko YAZAKI, Ikuo GOTO  
 Takashi HATAKEYAMA, Setsu WATANABE, Juro YATSU  
 Noriyuki SAITO

県内の河川から薬剤耐性菌の検出を試みたところ、アンピシリン（ABPC）、クロラムフェニコール（CP）、カナマイシン（KM）、オキシテトラサイクリン（OTC）耐性菌がそれぞれ検出された。検出された菌はABPC耐性菌が最も多く、採水地点によっては耐性菌出現率が100%に達した。CP、KM、OTC耐性菌も検出されたが、いずれも15%未満であった。また、腸内細菌ではABPC耐性菌、腸球菌ではKM耐性菌の出現率が高いことを確認した。緑膿菌は河川ごとに耐性を示す薬剤の種類が異なり、河川流域の影響を受けたものと推察された。

キーワード：薬剤耐性菌；抗菌剤；河川

**Key words** : drug resistance bacteria ; antibacterial agent ; river

### 1 はじめに

薬剤耐性菌とは、抗菌剤などの化学療法剤に対する薬剤感受性が低下し、比較的高い濃度の薬剤存在下でも増殖可能となった細菌である。これら薬剤耐性菌は、感染症の治療薬としては不可欠な抗菌剤を継続的に使用することより選択されるため、医療現場においては難治性の感染症を引き起こし大きな問題となっている。また、抗菌剤は、畜産・水産業などの生物生産の場において家畜・養殖魚の感染症予防あるいは成長促進を目的として大量投与され、その年間使用量は医療用の約2.5倍（約1,300トン）にも及ぶとされている<sup>1)</sup>。

2007年12月、河川から生活排水・畜産・医療・下水由来の医薬品類を検出したとの報告<sup>2)</sup>があり、社会問題として大きく報じられた。しかし、ヨーロッパなどの諸外国に比べ、国内河川における知見は乏しい。

そこで、生活排水、畜産等の影響があると思われる大規模河川を対象として、河川環境中に存在する薬剤耐性菌の分布と高濃度薬剤に対する耐性化の実態を調査したので報告する。

### 2 方法

#### 2.1 採水時期と採水地点

2007年10月から12月にかけて県北部の鳴瀬川水系と県南部の白石川水系を対象にそれぞれ2回の調査を実施した。初回調査は河川全域の実態を把握し、2回目の調査は耐性菌が比較的多く検出された地点を絞って詳しく調べた。

鳴瀬川水系では、初回調査（11月16日）に上流N1、

3から下流N2、4、5の5カ所、2回目調査（12月16日）ではN6-N9の4カ所から採水した（図1）。

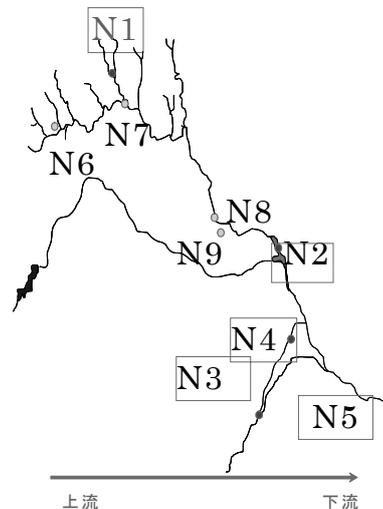


図1 鳴瀬川水系の採水地点

白石川水系では、初回調査（10月9日）に白石川の起点となるS1、ダム上流S3から下流S4、S6、S8と支流S2、S5、S7の8ヶ所、2回目調査（12月4日）にS9-S12の4カ所から採水した（図2）。

#### 2.2 対象菌と供試薬剤

薬剤耐性菌の分布では、ミュラー-ヒントン寒天培地を用いて一般細菌数を求めた。また、病原性の腸内細菌、緑膿菌、腸球菌を対象として、それぞれマッコンキー寒天培地、EF培地、セトリミド培地を用い薬剤耐性菌の分離を試みた。なお、腸内細菌とはグラム陰性桿菌、オ

\* 1 現 東北生活文化大学

キシダーゼ陰性の乳糖分解菌とした。

供試薬剤には、残留抗生物質簡易検査法<sup>3)</sup>で対象としている ABPC, CP, KM, OTC の4 薬剤を用いた。

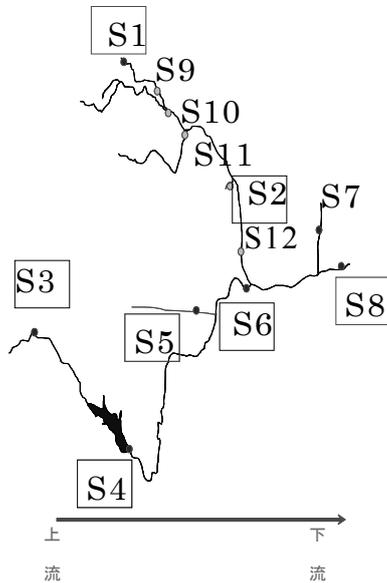


図2 白石川水系の採水地点

### 2.3 培地の作成

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) に基づき中間耐性濃度を ABPC 16 $\mu$ g/ml, CP 16 $\mu$ g/ml, KM 32 $\mu$ g/ml, OTC 8 $\mu$ g/ml とし, ABPC 含有培地, CP 含有培地, KM 含有培地, OTC 含有培地の4 種類の培地 (含薬培地) と薬剤を含まない培地 (対照平板) を作成した。

### 2.4 薬剤耐性菌の検出と耐性菌出現率

河川水は, 100・10 倍濃縮液, 原液, 10・100 希釈系列を試料とし, 含薬平板と対照平板に接種後 35 $^{\circ}$ C, 48 時間培養した。耐性菌出現率は含薬平板で発育したコロニー数を対照平板の発育コロニー数で除して求めた。更に, 河川の状況を確認するために, コリラート「アスカ」QT トレイを用いて河川の大腸菌群, 大腸菌の MPN 値を測定した。

### 2.5 分離菌株の耐性頻度

分離した菌株は, 寒天平板希釈法に準じて ABPC, CP では 16-512 $\mu$ g/ml, KM では 32-1,024 $\mu$ g/ml, OTC では 8-256 $\mu$ g/ml の2 倍希釈系列を作成し, 薬剤ごとに6 濃度の含薬培地を用いた。分離菌株は BHI 培地で増菌後, その培養液 3 $\mu$ l をそれぞれの含薬培地に滴下し 37 $^{\circ}$ C, 18-20 時間培養し, 最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。また, 得られた菌株は簡易キットを用いて同定した。

## 3 結果

### 3.1 河川の薬剤耐性菌生息状況

河川, 採水地点別の一般細菌数, 薬剤別の耐性菌出現率を示した (表1)。

表1 各河川の薬剤耐性菌生息状況

採水河川	採水日	採水地点	一般菌数 (CFU/ml)	耐性菌出現率 (%)			
				ABPC	CP	KM	OTC
鳴瀬川	2007/11/16	N1	230	26.1	4.3	2.2	2.6
		N2	2,380	7.2	0.9	13.9	0.8
		N3	107	26.2	8.4	1.9	7.5
		N4	306	31.7	2.3	3.3	2.0
		N5	1,360	22.1	0.4	7.6	1.8
	2007/12/16	N6	211	100.0	4.7	2.4	0.0
		N7	400	100.0	3.8	8.0	0.0
		N8	2,360	100.0	4.5	4.2	0.5
		N9	15,450	88.3	9.1	2.7	0.4
白石川	2007/10/9	S1	23	4.3	4.3	0.0	0.0
		S2	1,080	3.1	1.9	6.8	1.9
		S3	1,500	18.7	0.5	0.7	6.6
		S4	208	59.1	4.3	9.1	0.5
		S5	680	36.8	3.7	12.4	1.2
		S6	1,090	24.8	1.3	14.7	1.9
		S7	5,400	26.9	0.2	8.0	0.5
		S8	2,470	32.4	0.8	12.6	0.7
	2007/12/4	S9	5	40.0	0.0	0.0	0.0
		S10	109	21.1	0.9	1.8	0.0
		S11	715	21.5	0.8	3.5	0.7
		S12	590	40.7	2.0	4.7	1.0

#### 3.1.1 鳴瀬川水系

初回調査で最上流 N1 から 230CFU/ml の菌を検出し, 河川全域としては上流 N1, N3 から下流 N2, N4 に向かって菌数が増える傾向がみられ, 最下流 N5 では 1,360CFU/ml と N1 より 5 倍多い菌数が検出された。N1 での耐性菌出現率は ABPC が最も高く 26.1%, 次いで CP が 4.3%, OTC が 2.6%, KM が 2.2% であった。N3, N4, N5 も N1 と同様に ABPC の出現率が高く, いずれも 20% 程度であったが, N2 は他の採水地点とは異なり KM 13.9% と高く, 次いで ABPC 7.2%, CP, OTC 1% 未満となった。更に, 2 回目調査では上流 N6 の 211CFU/ml と下流 N9 の 15,450CFU/ml とは約 7 倍の差があった。この地点での耐性菌出現率も ABPC 耐性が高く N6, N7, N8 では 100%, N9 でも約 90%, 他の 3 薬剤 CP, KM, OTC 耐性菌では 10% 未満であった。

#### 3.1.2 白石川水系

初回調査では上流 S1 S3 から下流 S8 にかけて菌数は増加した。この間, 流入している支流 S2 から 1,080 CFU/ml, S5 から 680CFU/ml, S7 から 5,400CFU/ml の菌が検出された。耐性菌出現率は鳴瀬川と同様に ABPC 耐性菌が高くなった。また, 2 回目調査で S9-S12 間では S11 が 705CFU/ml, S12 が 590CFU/ml と S11 が多くなった。耐性菌出現率は, 4 薬剤中 ABPC 耐性が最も高く, CP, KM, OTC 耐性菌出現率では 15% 未満であった。

### 3.2 薬剤耐性の病原性細菌

#### 3.2.1 鳴瀬川水系

腸内細菌は N1-N9 までの全ての採水地点で分離された。ABPC 耐性菌出現率は, 下流の N5, N8, N9 で最も高く 40% 以上であった。緑膿菌は N8 と N9, 腸球菌は N7 から N9 で分離された。緑膿菌は N8 で KM 耐性菌が 41.8%, N9 で CP 耐性菌が 98.6%, ABPC 耐性菌が 76.7% と高い割合で分離された。腸球菌は N8 で KM 耐

表2 鳴瀬川の薬剤耐性菌

対象菌	採水日	採水地点	菌数 (CFU/ml)	耐性菌出現率 (%)			
				APBC	CP	KM	OTC
腸内細菌	2007/11/16	N1	24	12.5	0.0	0.0	4.2
		N2	96	21.9	0.0	2.1	1.0
		N3	11	27.3	0.0	0.0	0.0
		N4	23	13.0	0.0	0.0	4.3
		N5	164	39.8	0.0	0.6	3.0
	2007/12/16	N6	370	23.8	0.0	0.0	0.3
		N7	620	24.8	0.0	0.3	0.6
		N8	2,600	51.9	5.8	1.9	0.6
		N9	27,300	40.7	0.4	0.6	0.0
緑膿菌	2007/12/16	N8	474	19.2	7.4	41.8	5.3
		N9	365	76.7	98.6	10.7	5.8
腸球菌	2007/12/16	N7	12	0.0	0.0	8.3	0.0
		N8	18	1.0	0.0	83.3	16.7
		N9	62	1.6	1.6	1.6	4.8

表3 白石川の薬剤耐性菌

対象菌	採水日	採水地点	菌数 (CFU/ml)	耐性菌出現率 (%)			
				APBC	CP	KM	OTC
腸内細菌	2007/10/9	S1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
		S2	660	38.6	0.0	1.2	0.6
		S3	0	0.0	0.0	0.0	0.0
		S4	0	0.0	0.0	0.0	0.0
		S5	266	48.1	0.0	0.0	0.0
		S6	0	0.0	0.0	0.0	0.0
		S7	2,210	53.4	0.0	2.7	2.3
		S8	0	0.0	0.0	0.0	0.0
緑膿菌	2007/12/4	S9	0	0.0	0.0	0.0	0.0
		S10	85	43.5	0.0	0.0	0.0
		S11	2,280	50.4	0.0	0.1	0.9
		S12	3,850	4.2	0.5	0.3	0.9
腸球菌	2007/10/9	S7	23	87.0	0.0	0.0	69.6
		S11	15	40.0	0.0	13.3	53.3
腸球菌	2007/12/4	S12	135	53.3	2.2	25.2	100.0
		S12	10	0.0	0.0	40.0	10.0

性菌出現率が83%を示した(表2)。

3.2.2 白石川水系

腸内細菌は12ヶ所の採水地点のうち半数の6ヶ所(S2, S5, S7, S10, S11, S12)から分離され、ABPC耐性菌出現率の低いS12では4.2%、高いS7, S11では53.4%、50.4%であった。緑膿菌はABPC、OTC耐性菌ともに高い出現率を示しS7ではABPC耐性菌87.0%、OTC耐性菌69.6%、S11では40.0%、53.3%、S12では53.3%、100%となった。腸球菌はKM耐性菌が高く40%であった(表3)。

3.3 分離菌株の耐性頻度

寒天平板希釈法に準じて求めた結果を耐性頻度として示した。

MIC値の高いところでの耐性頻度は、腸内細菌では、ABPC 512μg/mlで44.0% (111株)、CP 512μg/mlで14.0% (6株)、KM 1024μg/mlで21.2% (14株)、OTC 256μg/mlで11.0% (33株)であった(図3)。緑膿菌も腸内細菌と同様にABPC 512μg/mlでの頻度が多く77.0% (114株)、他の薬剤ではCP 256μg/mlで3.4% (2株)、KM 128μg/mlで57.0% (4株)、OTC 128μg/ml

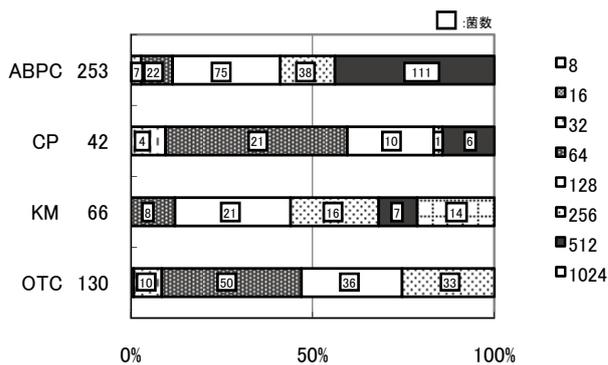


図3 腸内細菌の耐性頻度

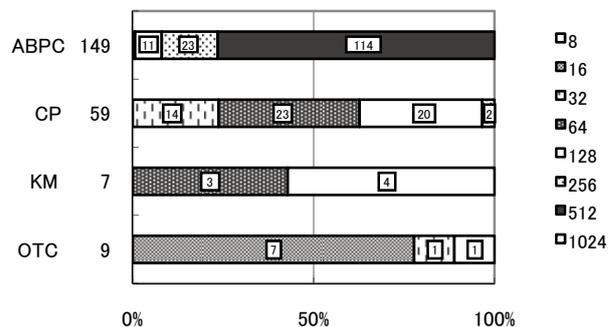


図4 緑膿菌の耐性頻度

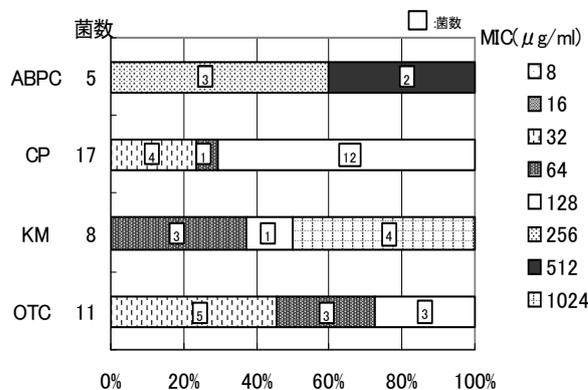


図5 腸球菌の耐性頻度

mlで25.0% (1株)となった(図4)。また、腸球菌ではABPC 512μg/mlで40.0% (2株)、CP 128μg/mlで71.0% (12株)、KM 1,024μg/mlで50.0% (4株)、OTC 128μg/mlで27.0% (3株)であった(図5)。

4 考察

鳴瀬川水系では初回の調査では、最上流N1-N5までのすべての採水地点から薬剤耐性菌が分離され、ABPC耐性菌の出現率が高い傾向が見られた。N1の上流では牧草の肥料として鶏糞を使用しており、N3の上流には畜産団地が存在していた。鶏糞等から薬剤耐性菌が検出

されたとの報告<sup>4) 5)</sup>もあることから、この採水地点が汚染された一因として、これらの農地から耐性菌が河川に流入した可能性が推察された。更に2回目調査の結果でも下流に向かって菌が増加したことから、N6, N8付近の畜産団地が影響したものと考えられた。また、N1ではABPC耐性菌、N2ではKM耐性菌の出現率が高い傾向を示したが、N2についてはダムから流れこむ支流との合流地点であることから、ダム支流の影響を受けたものと推察された。以上のことから、鳴瀬川水系は畜産団地からの排水と支流の影響により薬剤耐性菌が広範囲に散在していたものと考えられた。

一方、白石川水系の最上流S1では、KMとOTC耐性菌は検出されなかったが、ABPCとCP耐性菌が約4%認められた。本論文では示していないが、S1は大腸菌・大腸菌群は不検出であったことから、人家や家畜ふん等の影響はなかったものと思われた。このS1から検出されたABPCとCP耐性菌は、河川流域から流入したのではなく、周辺の土壤中に生息している抗菌物質耐性能を獲得した細菌<sup>1)</sup>を検出したものと考えられ、自然界での存在率を示すものと思われた。白石川水系は初回、2回目調査とも鳴瀬川水系と同様に上流から下流にかけて菌が増加傾向にあったが、白石川水系の特徴としてS2, S5, S7, S11を境に一般細菌数が増加し、腸内細菌、緑膿菌、腸球菌の出現率が高くなった。菌数の増加したこれらの地点は白石川の支流であり、流域に点在する養魚場や畜産団地の排水が流入した可能性が示唆された。

両河川から分離した菌はABPC 512 $\mu$ g/ml, CP 512 $\mu$ g/ml, KM 1,024 $\mu$ g/ml, OTC 256 $\mu$ g/mlなど、高濃度でも発育可能であったが、腸内細菌はABPCに、緑膿菌はCP, ABPCに、腸球菌はKMに自然抵抗性を持つ菌の存在が知られている<sup>6)</sup>。そのため今回検出した菌の高度耐性化はこのような機序による可能性が否めない。しかし、これら高度耐性菌の多くは、選択のために用いられた薬剤以外にも抵抗性を持つことから、多剤耐性化の傾向を示していることも明らかとなった。一般に細菌の薬剤耐性能の獲得には、薬剤が使用される環境に対する細菌の順応、あるいは同種・異種間での薬剤耐性

遺伝子の伝播<sup>7)</sup>などが考えられるが、今回は高度耐性菌の出現の機序を明らかにすることはできなかった。しかし、耐性菌が多く検出された河川からはABPC耐性に関連するToho-1遺伝子が検出されていること<sup>8)</sup>からも、高度耐性化に遺伝子が関与していると思われた。

今後は、耐性菌の発生源と思われる畜産団地等の排水の抗菌剤濃度と薬剤耐性菌出現との関連性および薬剤耐性化と遺伝子の関与について明らかにする必要があると思われる。

## 5 まとめ

薬剤耐性菌による鳴瀬川水系および白石川水系の汚染は、流域の汚染および汚染支流の流入によって起こることが明らかとなり、高度耐性菌も認められた。

今後は畜水産現場における薬剤耐性菌の出現状況を調査するとともに耐性獲得機序、伝達因子等の解明を行い、環境中の薬剤耐性菌の低減にむけた検討が必要である。

## 参考文献

- 1) 西尾道徳：環境保全型農業レポート，16（2005）。
- 2) 厚生労働省健康局水道課：“水道水源等における生理活性物質の測定と制御に関する研究・平成18年度環境保全成果集”，6（2007）。
- 3) 厚生省生活衛生局長通知：“畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法（改定）”平成6年7月1日，衛乳第107号（1994）
- 4) 農林水産省：平成19年抗菌剤感受性調査，[http://www.maff.go.jp/nval/tyosa\\_kenkyu/taiseiki/kanjyu\\_tyousa\\_19/index.html](http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/kanjyu_tyousa_19/index.html)。
- 5) 齋藤紀行，伊藤友美，御代田恭子，白石廣行：宮城県保健環境センター年報，17，p56（1999）
- 6) 小栗豊子：“臨床微生物検査ハンドブック”，p213（2000）。
- 7) 平松啓一：“耐性菌感染症の理論と実践”，第4版，（2006），（医薬ジャーナル社）
- 8) 宮城県保健環境センター：プロジェクト研究中間報告（2008）未発表資料