

畜産施設排水における薬剤耐性菌の動向

Environmental Dynamics of Drug Resistance Bacteria in the Stock Raising Drainage

畠山 敬 矢崎 知子 佐々木美江*¹
渡邊 節

Takashi HATAKEYAMA, Tomoko YAZAKI, Mie SASAKI
Setsu WATANABE

家畜生産の場における薬剤耐性菌の存在実態と一般環境への拡散可能性について考察することを目的に、施設排水中の薬剤耐性菌の調査を行った。その結果、畜産施設排水には使用薬剤に対する高度耐性菌が多く存在することを確認した。同時に、排水等の適正な処理を行うことにより、薬剤耐性菌の一般環境への拡散を最低限に防ぐことができる可能性を示した。

キーワード：畜産排水；薬剤耐性菌

Key words : stock raising drainage ; drug resistance bacteria

1 はじめに

抗生剤の発見とその応用は感染症対策に多大な貢献をもたらした一方で、薬剤耐性菌の出現という新たな問題を提起した。医療現場ではバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、Extended Spectrum β -Lactamase（ESBL）産生大腸菌等の蔓延例が既に多く報告されており、近年では、環境水や下水処理場放流水中からも同様の菌の検出報告が後を絶たない¹⁾。現に、2007年度に我々は県内の2河川においてアンピシリン（ABPC）、クロラムフェニコール（CP）、カナマイシン（KM）及びオキシテトラサイクリン（OTC）に対する薬剤耐性菌の分布調査を行ったが、河川には既に多くの薬剤耐性菌が存在し、一部からは薬剤耐性遺伝子（Toho1）が検出されることを明らかにした。また、畜産地帯の河川や大河川の下流域では薬剤耐性菌の出現率が高くなることを報告した²⁾。家畜用抗生剤の国内使用量はヒト用抗生剤の約2倍といわれており、畜産県である宮城県も、家畜伝染病予防の観点から継続的かつ大量に抗生剤を使用しているものと考え

られる。我々の調査結果は、このような地域にある河川環境下での実態を反映している可能性が高い。

そこで、本研究では抗生剤使用施設におけるこれらの実態を把握するため2養豚場をモデルとして選び、施設で使用している抗生物質と施設排水中に存在する菌の薬剤耐性化の状況、および薬剤耐性菌の公共用水域への拡散の可能性を明らかにすることを目的とした。

2 材料と方法

2.1 材料

施設（AおよびB）は、それぞれ異なる水処理工程を持っており、A施設は曝気処理、B施設は凝集沈殿およびラグーン処理を採用している。さらに、両排水は共用で使用している酸化池等（以下、野外共用施設とする。）を経た後に公共用河川に放出される。このことから、図1に示すように場所を設定し採水を行った。また、気温・気候等の環境変化による影響を把握するため、季節ごとに調査を実施した。

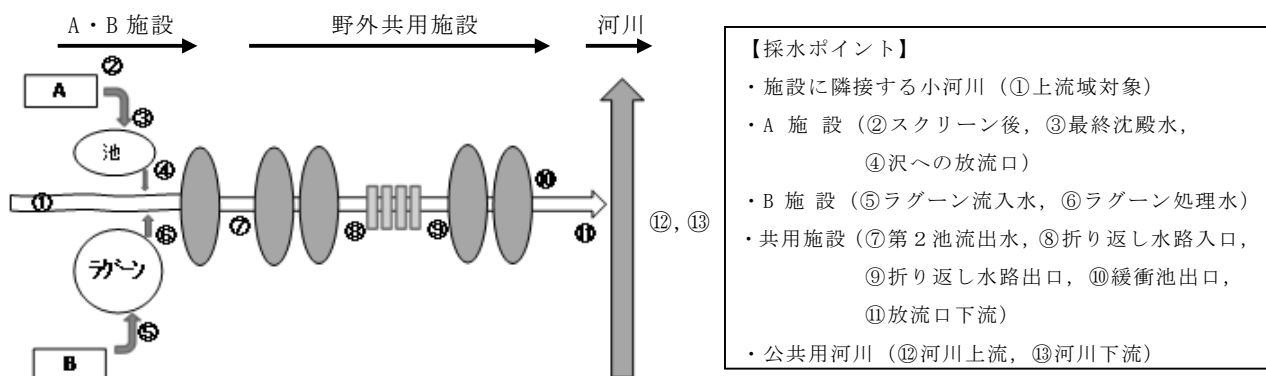


図1 畜舎排水処理施設の概要と採水地点

* 1 現 仙南・仙塩広域水道事務所

2.2 方法

2.2.1 一般細菌の測定

一般細菌数の測定はミューラーヒントン寒天培地（栄研）を用い、定法に従って細菌数を測定した。

2.2.2 対象菌の選別と薬剤感受性試験

事前のアンケート調査では、両施設ともに LCM（リンコマイシン）、TS（タイロシン）、OTC（オキシテトラサイクリン）を常時使用しており、NFLX（ノルフロキサシン）を冬季間だけ使用していた。

TSと LCM は主にグラム陽性球菌（以下、球菌とした。）、OTCと NFLX はグラム陰性・陽性菌双方に有効な薬剤であることから、薬剤感受性調査の対象を球菌と腸内細菌とし、供試する抗菌剤は球菌では TS、LCM、OTCと NFLX、腸内細菌では OTCと NFLX とした。

菌の分離は、材料 600ml を 6000rpm で 20 分間遠心して 6ml に濃縮後、XSA 寒天培地（日水製薬）に接種して球菌の分離を行い、腸内細菌は DHL 寒天培地（栄研化学）を用いて同様に分離を行った。分離した菌は、グラム染色性およびカタラーゼ、オキシダーゼ等の基本的性状を確認して薬剤感受性試験の被検菌とした。

薬剤感受性試験は、NCCLS³⁾の方法に従って微量液体希釈法で実施した。すなわち、被検菌の菌数を定法に従い調整後、各薬剤に 2 倍希釈系列の濃度勾配を加えて作成した自家製 96 穴プレートに 100 μ l ずつ接種し、菌の最小発育阻止濃度（MIC）を求めた。

薬剤耐性菌の判定は NCCLS³⁾ および関連文献等^{4, 5)}に従って行い、TS 8 μ g/ml、LCM 4 μ g/ml、OTC 16 μ g/ml 以上の濃度に発育を認めたものを各薬剤の耐性菌とし、NFLX では球菌で 0.5 μ g/ml、腸内細菌で 0.06 μ g/ml 以上を耐性菌とした。

3 結果

3.1 各採水ポイントでの一般細菌数の推移

一般細菌数は施設内を流れる小河川①（図1採水ポイントを参照）を施設の上流域対象とした（10³～10⁴CFU/ml）。

A 施設スクリーン後②では菌数が 10⁷～10⁸CFU/ml を示したが、最終沈殿水③では 10⁴～10⁵CFU/ml と最大で 1/1000 程度に菌数が減少した。B 施設でも、ラグーン流入水⑤では 10⁶～10⁷CFU/ml であったものがラグーン処理水⑥では 10³～10⁵CFU/ml と減少した。季節的には、両施設とも 1 月の調査時に除菌効率が低下したが、B 施設での能力の低下が顕著であった。

さらに、両施設が共有する第 2 池流出水⑦以降では 8 月に折り返し水路入口⑧で菌数が若干増加したものの、菌数が徐々に減少し、施設最末端である放流口下流⑪では一般細菌数 1700～8400CFU/ml、大腸菌群数も MPN 法で 548～6200/100ml と施設排水基準の 3000/ml を大きく下回った（図 2）。

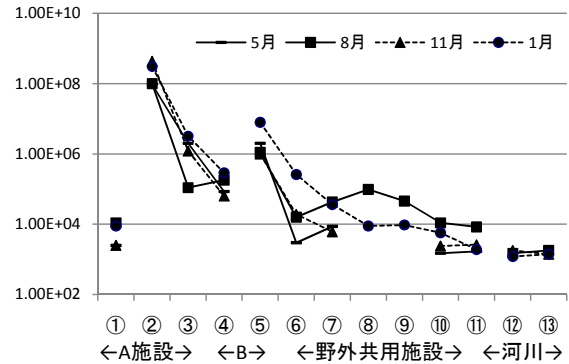


図 2 各採水ポイントにおける一般細菌数 (CFU/ml)

3.2 球菌、腸内細菌の分離状況

被検菌の分離に関して、A 施設②、③では菌を分離することが容易であったが、B 施設⑤、⑥はともに菌の分離が比較的困難であった。第 2 池流出水⑦以降は菌がさらに減少し、特に球菌の減少が顕著であった。緩衝池出口⑩や放流口下流⑪では球菌はほとんど分離できなかった半面、腸内細菌の分離数がやや増加した。

3.3 薬剤感受性試験の結果

各薬剤に対する球菌および腸内細菌の感受性を表 1 に示した。

球菌では、TS、LCM 及び OTC \geq 32 μ g/ml を示す株が最も多く検出され、その全分離菌株中の割合は TS 63.5%、LCM 80.2%、OTC 73.4% であった。NFLX では 1 μ g/ml が最も多く 40.9% であった。腸内細菌では、OTC \geq 32 μ g/ml が 53.0% で、NFLX 0.06 μ g/ml が 42.2% を占めた。そこで、先の基準濃度を参考に球菌全体に占める薬剤耐性菌の割合を調べると TS が 69.2%、LCM 97.3%、OTC 74.6%、NFLX 91.0% で、腸内細菌では、OTC 54.5%、NFLX 65.9% であった。

具体的には、A 施設の球菌では TS 87.9%、LCM 98.9%、OTC 95.4%、NFLX 91.5% で、腸内細菌が OTC 90.7%、NFLX 63.3% であり、B 施設では球菌が TS 47.8%、LCM 97.8%、OTC 71.7%、NFLX 84.8%、腸内細菌が OTC 72.1%、NFLX 64.4% であった。さらに、2 施設での菌の分離状況を比較すると、A 施設では 447 株の球菌が分離されたのに対し、B 施設では 46 株と、B 施設排水からの球菌の分離は困難であった。

表 1 球菌および腸内細菌の薬剤感受性

【球菌】												
薬剤	≤ 0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	≥ 32	計	
TS	117	nt	95	22	18	438	690					
(%)	17.0		13.8	3.2	2.6	63.5	100					
LCM	19	nt	17	49	55	566	706					
	2.7		2.4	6.9	7.8	80.2	100					
OTC	132	nt	14	5	7	436	594					
	22.2		2.4	0.8	1.2	73.4	100					
NFLX	3	8	43	56	245	183	62				600	
	0.5	1.3	7.2	9.3	40.8	30.5	10.3				100	
※:ntは未実施を示す												
【腸内細菌】												
薬剤	≤ 0.015	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	4	8	16	≥ 32	計
OTC							249	129	71	15	523	987
							25.2	13.1	7.2	1.5	53.0	100
NFLX	69	249	394	132	52	12	26					934
	7.4	26.7	42.2	14.1	5.6	1.3	2.8					100
※:各薬剤で色付きの部分に含まれる菌は耐性菌を示す												

一方、野外共用施設では、第2池流出水⑦での球菌はTS 56.4%, LCM 97.5%, OTC 71.8%, NFLXで100%が耐性であり、腸内細菌ではOTC 46.6%, NFLX 42.9%であった。折り返し水路出口⑨では、球菌でTS 21.0%, LCM 100%, OTC 21.1%, NFLX 100%, 腸内細菌はOTC 11.1%, NFLX 100%であった。施設最末端の放流口下流⑩では、球菌がTS 6.6%, LCM 83.3%, OTC 20.7%, NFLX 90%, 腸内細菌でOTC 30.1%, NFLX 58.4%であった。

以上の結果から、この施設排水には特にLCMとNFLXに耐性化した球菌の割合が高いことが明らかとなった。そこで、例として各採水ポイントにおけるLCMとOTCに対するMICの変化を比較してみると、LCMでは下流(⑦以降)の採水ポイントでも比較的MICの高い耐性菌(8~16 $\mu\text{g}/\text{ml}$)が残存するのに対し、OTC耐性菌は急激に減少し、ほとんどの菌がMIC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の薬剤感受性菌に置き換わっていることが判明した(図3)。

3.4 球菌の多剤耐性化

球菌の多剤耐性化を調べた結果を表2に示した。分離菌の58.0%が4薬剤に対し耐性を持つ株であった。3剤耐性菌が合計で16.7%, 2剤耐性菌が23.1%であり、特にLCM耐性菌が98.9%, NFLX耐性菌が91.9%を占めた。施設では冬場に限りNFLXを使用しているが、季節的な感受性の変動は認められなかった。

表2 分離された全球菌の多剤耐性化傾向

薬剤耐性数	耐性型	株数	割合(%)
4	TS・LCM・OTC・NFLX	338	58.0
	LCM・OTC・NFLX	56	9.7
3	TS・LCM・OTC	32	5.6
	TS・LCM・NFLX	8	1.4
	LCM・NFLX	127	21.8
2	LCM・OTC	4	0.8
	TS・LCM	4	0.8
	OTC・NFLX	1	0.1
	OTC	1	0.1
1	NFLX	5	0.9
	LCM	4	0.8
合計		580	100

TS:8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LCM:4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OTC:8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NFLX:0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の薬剤濃度で発育したものを耐性菌とした。

4 考察

抗生剤は人の治療用以外にも畜水産業用として大量に使用されている。人用としての使用が約520トン(1998年度)であるのに対し、農林水産省のデータ(2001年度)では、約1060トンが動物医薬品として使われており、その他にも飼料添加用として約230トンが生産されている。特にテトラサイクリン系(455トン)やマクロライド系(160トン)の販売量が多く、この2つで全体量の50%を超える。動物における抗生剤の必要性は言うまでもないが、このような状況の継続は畜水産に医療現場と同じ事態を招くことは必至であり、結果的には人の治療に影響を及ぼしかねない。現に、アボパルシンがバンコマイシン類似の化学構造を持つため、鶏に使用されなくなったこと^{6,7)}は既知の事実である。そこで、本研究では家畜生産の場における薬剤耐性菌の存在実態と一般環境への拡散可能性について考察することを目的に、施設排水中の薬剤耐性菌の調査を行った。

その結果、分離した全球菌の約7割がTS, LCM及びOTCともに $\geq 32\mu\text{g}/\text{ml}$ に耐性で、NFLXも7割以上が1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の耐性を示した。また、全腸内細菌では、OTC $\geq 32\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上が約5割、NFLXでは約6割が0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の耐性であった。そこで、32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の耐性を示した球菌の最終発育濃度を調べたところ、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を超えたものがTSで92%以上、LCMでは100%と、当該施設内の菌がこれらの薬剤に高度耐性化を引き起こしていることが明らかになった。さらに、複数の抗生剤に対する耐性化率を調べた結果、球菌では58%がTS, LCM, OTC, NFLXの4剤に耐性を示すことが判明した。

一方、排水処理の側から考察すると、対象2施設の污水処理方法は連続式活性汚泥方式(A施設)と複合ラグーン方式(B施設)であったが、Aの処理排水とBの処理排水中の一般細菌数には差が見られた。B施設では污水原水に凝集剤を添加して脱水・プレスを行っており、この工程で固形物に菌が付着する結果、排水中の菌数が減少したものと推察された。さらに、2施設の排水が合流する野外共用施設以降ではゆるやかに菌数が減少し、場外排水では大腸菌群数も基準値以下であった。これは、一次処理された污水中の菌が野外の緩衝池等を経由していく過程で、他の環境微生物との競合や紫外線等により

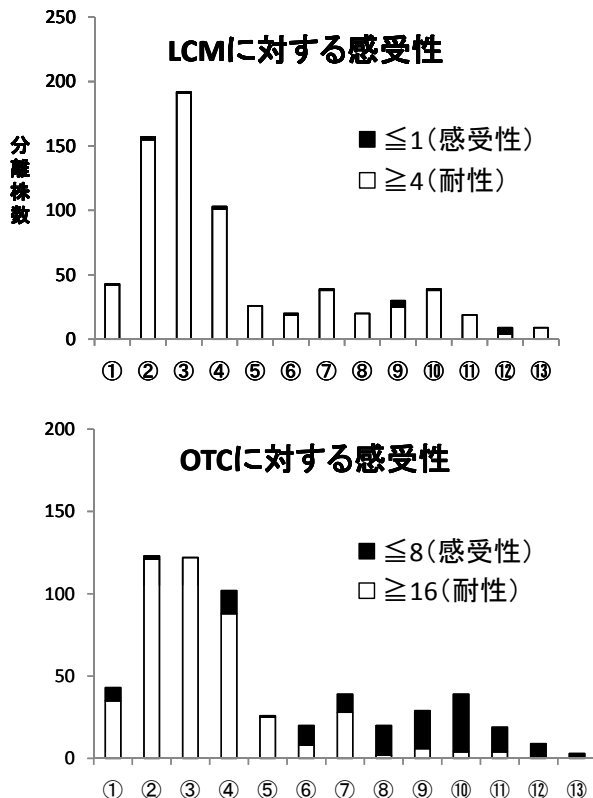


図3 球菌の分離数とLCMおよびOTCに対する薬剤感受性

さらに処理されたためと思われる。球菌や腸内細菌なども一般細菌と同様で、汚水処理が進むに従い分離可能な菌数が激減した。また、野外共用施設以降は分離された菌の各薬剤に対する感受性も変化した。球菌では特にOTC耐性菌の分離率の減少が顕著であったが、LCMとNFLX耐性菌の割合はほとんど変化せず、共用河川への放流口でも80%以上が耐性菌であった。季節的に使用されるNFLXの耐性菌が通年高い割合で分離される理由は不明であるが、LCMは環境中での分解性が低く、比較的高濃度のまま維持するため⁸⁾、下流の耐性菌の残存に何らかの影響を及ぼしている可能性が推察された。

本研究では、畜産施設排水に使用薬剤に対する高度耐性菌が多く存在することを確認した。それと同時に、畜舎排水等の適正な処理を行うことにより、薬剤耐性菌の一般環境への拡散を最低限に防げる可能性を明らかにした。

参考文献

- 1) 清野敦子, 古荘早苗, 益永茂樹: 我が国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, Vol. 27, No. 11, 685-691 (2004)
- 2) 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: 宮城県の河川等における薬剤耐性菌, 宮城県保健環境センター年報, 第26号 (2008)
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993), 五島嵯智子監修: 好気性菌の薬剤感受性測定のための希釈試験法, 第3版, 日本語版, NCCLS Document M7-A3 Vol. 13, No. 25. NCCLS, Villanova, Pennsylvania.
- 4) 杏林製薬株式会社学術情報部, Chemotherapy, 38 (S-2), (1990)を中心に社内集計, 杏林製薬株式会社社内資料
- 5) McGuire, J. M., Boniece, W. S., Higgins, C. E., Hoehn, M. M., Stark, W. M., Westhead, J. Tylosin a NEW Antibiotic: I. Microbiological Studies. Antibiot. Chemother., 11, 320-324 (1961).
- 6) Wegener, H. C. Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and Enterococcus faecium Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe. Emerging Infectious Diseases, 5, 329-335 (1999).
- 7) McDonald, L. C. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications. Emerging Infectious Diseases, 3, 311-317 (1997).
- 8) 遠藤美砂子, 畠山敬, 中村朋之, 川向和雄: 畜舎汚水中の抗菌剤の分析, 宮城県保健環境センター年報, 第27号 (2009掲載予定)