

多摩川流域における多剤耐性菌の蔓延度解析

浦野 直人 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, urano@kaiyodai.ac.jp)

岡井 公彦 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, mokai00@kaiyodai.ac.jp)

相川 和也 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科)

田中 陽一郎 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科)

石田 真巳 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, ishida@kaiyodai.ac.jp)

An investigation on the inhabit of multiple-drug resistant bacteria in the Tama River in Tokyo

Naoto Urano (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masahiko Okai (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Kazuya Aikawa (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Yoichiro Tanaka (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masami Ishida (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

要約

多摩川は日本の代表的な都市河川である。近郊の生活廃水や産業排水は、水再生センターを経て再生水として流れ込んでおり、河川水の抗生物質濃度は日本の都市河川中でも高レベルにある。本研究は、多摩川流域における多剤耐性菌の蔓延度の解析を行った報告である。2010年7月に上流(青梅市)、2011年5月に中流(立川市)と下流(川崎市)から、多摩川の表層水と底泥を採集した。1~8種類の抗生物質を含む培地を用いて、採集サンプルから一般細菌および抗生物質耐性菌をスクリーニングした。多摩川の表層水中の一般細菌数と抗生物質耐性菌数は上流から中流・下流へと下るにつれて増大したが、底泥中の一般細菌数と耐性菌数は中流が最も多かった。細菌数は環境中の有機物濃度と相関があると考えられた。多剤耐性菌は、下流では2剤耐性菌が多く、中流では3剤耐性菌、上流では5~8剤耐性菌と川を遡るにつれて、多剤耐性能が高くなった。5-8剤耐性菌群にはBacteroidetes門、2~3剤耐性菌群にはFirmicutes門が多かった。また、上流の一般細菌中にBacteroidetes門、下流のそれにFirmicutes門が多かった。従って、上流に多く生息しているBacteroidetes門は多剤耐性能が高くなり易いと考えられた。各流域において、多剤耐性菌中に重篤な病原性細菌は発見されなかったが、肺炎桿菌、食中毒菌、敗血症菌、腸炎菌の存在が見とめられ、上流に多く発見された。

キーワード

多摩川, 抗生物質, 多剤耐性菌, 病原性細菌, 伝達性遺伝子

1. 目的

ヒトと病原菌との戦いの歴史は古いが、ペニシリンに始まる抗生物質の開発は感染症の克服に画期的な貢献を成した。ところが、抗生物質の使用に伴い、薬剤効果を示さない耐性菌が蔓延し、新しい抗生物質の開発を必要とした。そのことが、更なる耐性菌の出現に繋がるなど、ヒトと病原菌の戦いはイタチゴッコが続いている。2010年に、世界各地で最新の抗生物質を含むほとんどの薬が効力を示さないスーパー多剤耐性菌—ニューデリーメタロβ-ラクタマーゼ1 (NDM-1) を生産する細菌—の出現が報告された(Deshpande et al., 2010)。日本の医療施設内でも当該細菌の検出が相次ぎ、大きな社会問題となった。それ以前にも、病院内で検出された食中毒菌からメタロβ-ラクタマーゼ生産が認められ、遺伝子が伝達性プラスミド上にコードされていることが報告(Livemore, 1995, 荒川, 1996, Ito et al., 1997) されており、NDM-1 産生遺伝子も伝達性を保持していることが懸念された。厚生労働省では病院を中心に平成22年に「我が国における多剤耐性菌の実態調査」を行い、埼玉県の実験施設で2件のNDM-1 検出が報告された(厚生労働省, 2010)。現在までに、日本の野外における病原性スーパー多剤耐性菌の検出報告例は無いが、多剤耐性菌の野外調査自体がほとんどなされていないのが実情である。

なお、多摩川流域水は日本の都市河川でも抗生物質濃度が高いという報告(村田他, 2006)があり、その理由の一つは、流域水の約50%が水再生センターからの流出水であることに起因していると考えられる。多摩川流域の住民の生活廃水や産業排水は、下水道を通過して水再生センターへ流入する。廃排水はセンターの活性汚泥槽により浄化処理され、BODが東京都基準値以下になった再生水(東京都下水道局, 2013)が、中流より下側の多摩川へ流出され自然水と共に河川を形成して行く。ところで、多摩川以外に目を移すと、日本および諸外国では、生活廃水や糞便が混入する下水道や河川中の抗生物質耐性菌の生息と、その伝達性を調査した研究報告が多数存在する(Arvanitidou et al., 1997; Bell et al., 1980; 1981; 1983; Iwabe et al., 2001; Sturtevant et al., 1971; Walter and Vennes, 1985)。一方、多摩川での多剤耐性菌に関する報告はほとんどなされていないが、多摩川は市民生活に密着した大都市河川であり、安心して憩うことができる水辺であることの保障が求められる。本研究では、病原性菌を含む多剤耐性菌に焦点を当てて、これらの細菌の多摩川における蔓延度解析を行うことにした。

2. 方法

2.1 実験試料のサンプリング(採集)

図1に多摩川流域の各地点における水試料のサンプリング状況を示す。2010年7月26日に上流(青梅市)、2011年5月20日に中流(立川市)と下流(川崎市)、河川の表層水と底泥を

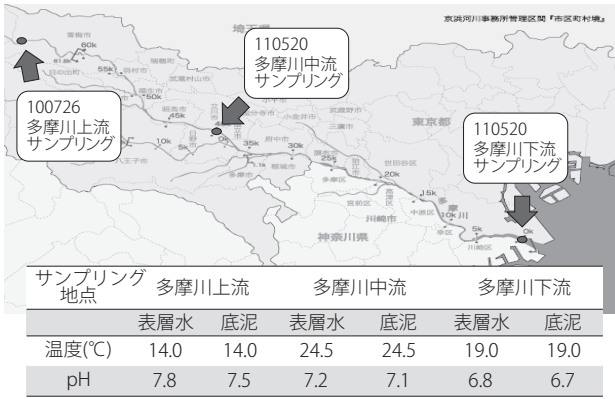


図1：多摩川の各地点における水試料のサンプリング

採集した。各サンプリング地点の温度とpHを図1に示す。サンプリング地点の温度は中流が最も高かった。pHはほぼ中性であったが、上流・中流・下流と下るに連れて、やや酸性に傾いて行くことがわかった。各地点の温度とpHを参考にして、試料中の微生物の培養は20°C、pH7.0に統一して行った。

2.2 耐性菌の数測定・分離・種同定

図2に各試料中の微生物の培養・単離・解析のフローチャートを示す。寒天培地の成分はNB (Nutrient Broth) 培地、R2A 培地、DNB (Diluted Nutrient Broth) 培地を使用した。一般細菌の解析には抗生物質無添加の培地を用いて培養し、コロニー形成数 (CFU/mL) を計測した。

耐性菌の解析には培地中に各々 100 µg/mLの抗生物質を含有させた。抗生物質は、アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、バシトラシン (BT)、スルファメトキサゾール (SMX)、ロキシスロマイシン (RXM)、ロメフロキサシン (LFLX) の8種類を使用し、用途に応じ培地中に1～8種を含有させた。培地上で形成したコロニー数 (CFU/mL) から耐性菌数を測定した。特に、複数の抗生物質を含有した培地上のコロニー形成数から、耐性菌の多剤耐性能を測定した。

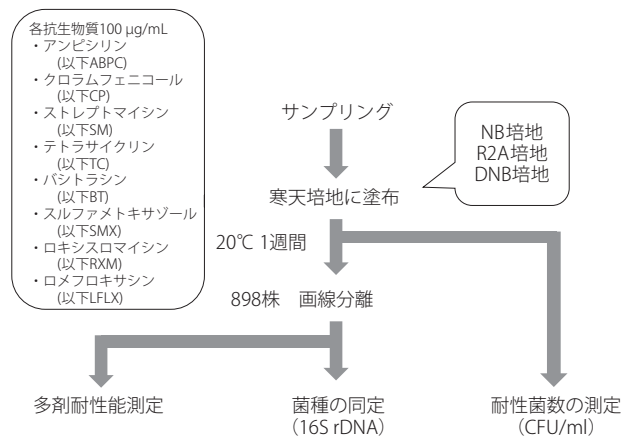


図2：耐性菌解析フローチャート

ン(TC)、バシトラシン(BT)、スルファメトキサゾール(SMX)、ロキシスロマイシン (RXM)、ロメフロキサシン (LFLX) の8種類を使用し、用途に応じ培地中に1～8種を含有させた。培地上で形成したコロニー数 (CFU/mL) から耐性菌数を測定した。特に、複数の抗生物質を含有した培地上のコロニー形成数から、耐性菌の多剤耐性能を測定した。

コロニーから単一菌を分離して、菌株として保存した。各菌株の16S rDNA塩基配列解析により、菌種を分類同定した。

3. 結果および考察

3.1 多摩川流域の一般細菌数と耐性菌数

図3に多摩川の細菌数 (CFU/mL) の各流域 (上中下流) による違いを示す。表層水の一般細菌数 (CFU/mL) は、上流では 10^1/mL、中流では 2.0×10^5 /mL、下流では 1.2×10^6 /mLと河

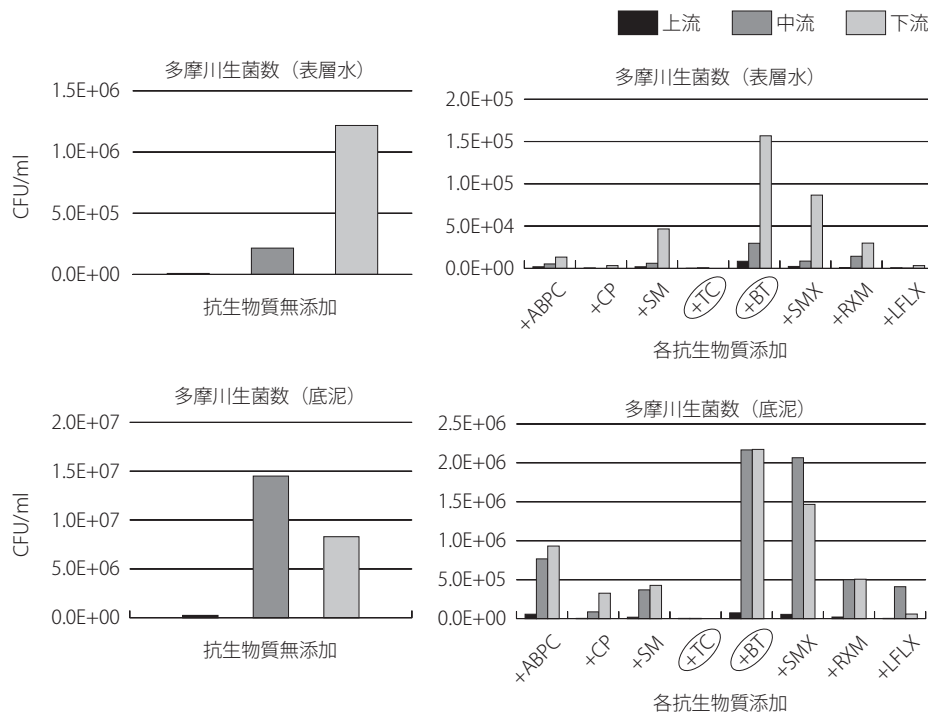


図3：多摩川細菌数の流域(上中下流)による違い

川を下るに連れて、細菌数が増大した。これは水中のBODとの相関が示唆された。一方、底泥の一般細菌数は、中流が $1.4 \times 10^7/\text{ml}$ と最も多かった。中流域では河川水中の水再生センターからの再生水比率が最大70%にも及び、有機物が底泥に堆積しBODが高くなっているため、細菌濃度が高いと推定された。

耐性菌コロニーの計測結果は、TC耐性菌がほとんど検出されず、BT耐性菌が最も多く出現した。また、耐性菌数は一般細菌数と相関があり、表層水では下流の耐性菌数が最大で、底泥では中流で耐性菌数が最大であった。上流では一般細菌数、耐性菌数のいずれもが中流や下流のそれらと比べて顕著に低かった。これは上流域のBODがかなり低く、細菌の栄養源が少ないことを示唆していた。

図4に多摩川の上・中・下流の表層水と底泥における多剤耐性菌の分離株数を示す。表層水と底泥のいずれにおいても、上流の耐性菌は5剤耐性能を持つ菌の分離株数が最大で、6～8剤耐性能を持つ菌も多く分離することができた。一方、中流から分離された耐性菌は3剤耐性能を持つ菌数が最大で、4～8剤耐性能を持つ菌の分離数は少なかった。下流では表層で1剤耐性菌数、底泥で2剤耐性菌数が最大であった。このことから、上流は一般細菌濃度および耐性菌濃度は低いが、多剤耐性能が高い菌が多いことがわかった。この原因は特定できていないが、上流域の近郊で抗生物質を使用している施設一例えば病院、養魚場、家畜飼育場などが存在し、抗生物質が含有されている排水が流出している可能性も示唆された。

図5に多剤耐性能を持つ多摩川細菌相を分類（門）した結

果を示す。1～8剤耐性菌のいずれの菌相においてもProteobacteria門が多く、全細菌相の41～88%を占めていたが、7～8剤耐性能を持つ細菌相では41～68%に減少していた。また、Bacteroidetes門は多剤耐性能が高くなると菌相中の比率が増大し、7剤耐性菌の21%、8剤耐性菌の41%を占めていた。さらに、Firmicutes門は多剤耐性能が低いと、菌相中の比率が増大し、1～2剤耐性菌の17～27%を占めていることが特徴的であった。

図6に多摩川各流域の一般細菌相を比較した結果を示す。上流、中流、下流ともにProteobacteria門が全菌相の54～74%を占めていた。Bacteroidetes門の菌相比率は、下流と中流で5～6%、上流で16%であり、上流でBacteroidetes門の優勢が認められた。一方、Firmicutes門の菌相比率は上流4%、中流11%、下流23%と川を下るに連れて優勢になっていった。図4～図6の結果を総括すると、上流ではBacteroides門が多く生息し、多剤耐性能が高い耐性菌へと変異し易く、下流ではFirmicutes門が多く生息し、多剤耐性能の低い耐性菌へ変異し易いと考えられた。

表1に多摩川各地点における表層水と底泥の多剤耐性菌の分類同定結果（属）を示す。各地点から採集して分離した細菌に関して、Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutesの4門から、計198株の細菌を選抜して属の同定を行った。6か所の採集地点でいずれも5属の細菌の生息が認められ、全17属の細菌の生息が発見された。採集地点により大きな細菌相の変化は観測されなかった。多くの地点で、*Micobacterium*属、*Pseudomonas*属、*Bacillus*属が分離された。この結果から、多摩川に生息する多剤耐性菌の属数はそれほ

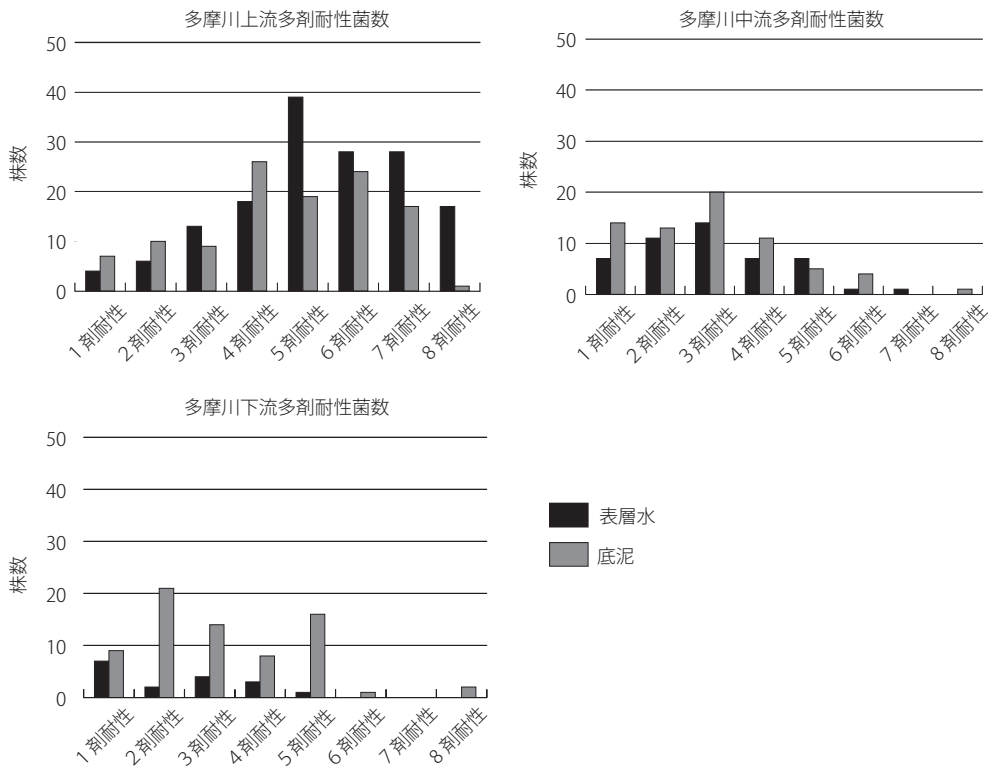


図4：多摩川各流域(上中下流)における多剤耐性菌の分離株数

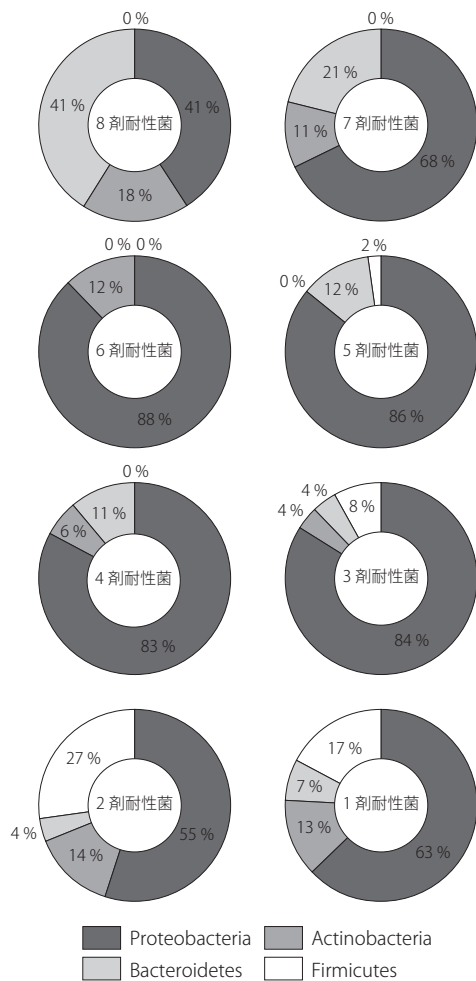


図5：多剤耐性能ごとの多摩川細菌相(門)比較

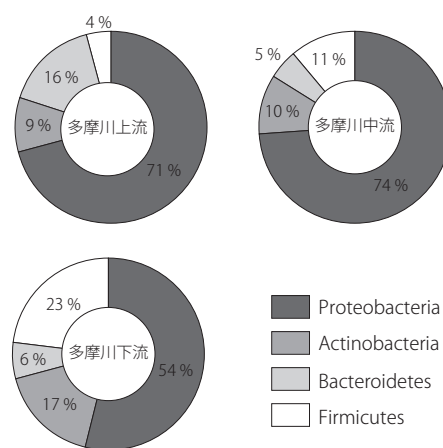


図6：多摩川の各流域における細菌相の比較

ど多く無いため、耐性能の伝播はかなり限定された属内で行われている可能性が高いと推定された。今後は、分離した多剤耐性菌が保持する伝達性プラスミドの検出、プラスミド上の耐性遺伝子の解析、多剤耐性能の同種・異種細菌への接合伝達などに関する研究を計画している。

図7に多摩川流域から発見された病原性多剤耐性菌を示す。

肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、食中毒菌 (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*)、日和見感染菌 (*Flavobacterium hercynium*, *Streptomyces zoomyceticus*)、腸炎菌 (*Enterobacter cloacae*)、敗血症菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*)などの病原性菌が発見された。こうした病原性菌が多剤耐性能を保持していることは、ヒトが発病しても抗生物質投与による治療が効果を発揮しない可能性が示唆される。本研究では、病原性多剤耐性菌が上流表層水で多く発見された。また、図5に示すように、上流には多剤耐性能が高い細菌が多く生息していることもわかった。

本研究では多摩川全流域を通じて、急性毒性を持つ重篤な病原性細菌は発見されなかったが、免疫力や抵抗力が弱まっている人にとっては危険と判断される多剤耐性菌が発見された。こうした細菌に感染して発病すると、抗生物質投与による薬効が働かない可能性も高い。特に、多摩川上流の表層水はBODが低く、一見すると清浄性が高いため、人々が安全な水と判断することが多いであろう。人々が上流の河原で遊んだり、調理したりするケースも多く、上流の表層水が口に入ることも想定されるが、非加熱水を口にすることには十分な注意が必要と思われる。

図8は2006年における多摩川各流域の河川水中の抗生物質濃度を示す(村田他, 2006)。検定した8種類の抗生物質に関しては、下流～中流の抗生物質濃度300～600 ng/Lであったのに対して、上流の羽村堰では濃度0 ng/Lであり、この結果は、抗生物質に関して上流域での安全性を示しているものと思われる。本研究結果と異なるデータを示している。村田の報告と本研究ではアセスメントの年度が異なる上、使用した抗生物質は共通なものがないため、データ間の客観的な比較は困難である。

上記の結果を踏まえて、上流における病原性多剤耐性菌の蔓延度に関しては、今後もモニタリングを継続する必要があると判断される。

引用文献

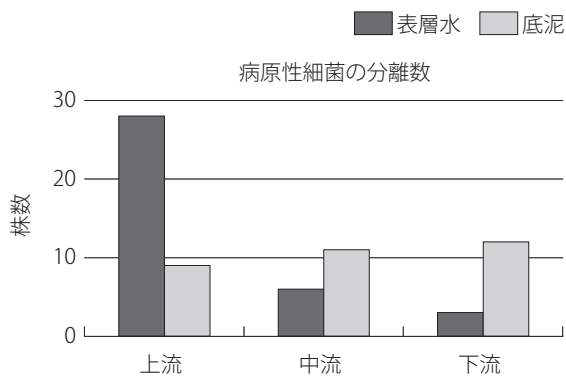
- Arvanitidou, M., Tsakris, A., Constantinidis, T. C. and Katsouyanopoulos, V. C. (1997). Transferable antibiotics resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters. *Water Research*, Vol. 31, No. 5, 1112-1116.
- 荒川宣親 (1996). 拡張型基質特異性を示す β -ラクタマーゼの出現. *化学療法の領域*, Vol. 12, 37-45.
- Bell, J. B., Macrae, W. R. and Elliott, G. E. (1980). Incidence of R factors in colineform, fecal colineform, *Salmonella* populations of the red river in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 40, No. 3, 486-491.
- Bell, J. B., Macrae, W. R. and Elliott, G. E. (1981). R factors in colineform-fecal colineform sewage flora of the prairies and northwest territories of Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 42, No. 2, 204-210.
- Bell, J. B., Elliott, G. E. and Smith, D. W. (1983). Influence of sewage treatment and utilization and urbanization on selection of multiple residence in fecal colineform populations. *Ap-*

表1：多摩川各地点における表層水と底泥の多剤耐性菌の分類同定(属)

上流(表層水)			上流(底泥)		
属	株数	門	属	株数	門
<i>Microbacterium</i> spp.	8	Actinobacteria	<i>Aquamonas</i> spp.	2	Proteobacteria
<i>Sphingomonas</i> spp.	8	Proteobacteria	<i>Exiguobacterium</i> spp.	2	Firmicutes
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	Proteobacteria	<i>Microbacterium</i> spp.	2	Actinobacteria
<i>Chryseobacterium</i> spp.	11	Bacteroidetes	<i>Pseudomonas</i> spp.	5	Proteobacteria
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	20	Proteobacteria	<i>Aeromonas</i> spp.	6	Proteobacteria

中流(表層水)			中流(底泥)		
属	株数	門	属	株数	門
<i>Bacillus</i> spp.	3	Firmicutes	<i>Pandoraea</i> spp.	5	Proteobacteria
<i>Microbacterium</i> spp.	4	Actinobacteria	<i>Pseudomonas</i> spp.	5	Proteobacteria
<i>Mycobacterium</i> spp.	4	Actinobacteria	<i>Bosea</i> spp.	6	Proteobacteria
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	4	Proteobacteria	<i>Bacillus</i> spp.	7	Firmicutes
<i>Pseudomonas</i> spp.	11	Proteobacteria	<i>Aeromonas</i> spp.	9	Proteobacteria

下流(表層水)			下流(底泥)		
属	株数	門	属	株数	門
<i>Bacillus</i> sp.	1	Firmicutes	<i>Microbacterium</i> spp.	4	Actinobacteria
<i>Brevundimonas</i> spp.	3	Proteobacteria	<i>Paenibacillus</i> spp.	5	Firmicutes
<i>Erythrobacter</i> spp.	3	Proteobacteria	<i>Lysinibacillus</i> spp.	6	Firmicutes
<i>Erythromicrobium</i> spp.	3	Proteobacteria	<i>Bacillus</i> spp.	19	Firmicutes
<i>Mycobacterium</i> spp.	3	Actinobacteria	<i>Pseudomonas</i> spp.	19	Proteobacteria



種名	門	代表的疾病
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proteobacteria	肺炎桿菌
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Proteobacteria	食中毒
<i>Flavobacterium heycynium</i>	Bacteroidetes	日和見感染菌
<i>Enterobacter cloacae</i>	Proteobacteria	腸炎
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Proteobacteria	敗血症
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Proteobacteria	敗血症
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Proteobacteria	食中毒
<i>Streptomyces zaomyceticus</i>	Actinobacteria	日和見感染菌
<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	食中毒

図7：多摩川の病原性多剤耐性菌

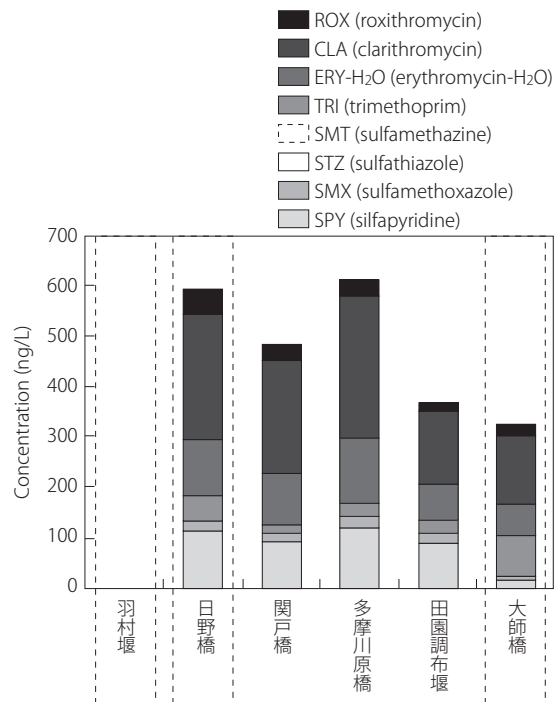


図8：多摩川河川水中の抗生物質濃度

plied and Environmental Microbiology, Vol. 46, No. 1, 227-232.

Deshpande, P., Rodrigues, C., Shetty, A., Kapadia, F., Hedge, A. and Soman, R. (2010). New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: Treatment options with carbapenems compromised. *Journal of the Association of Physicians of India*, Vol. 58, 147-149.

厚生労働省 (2011). 「我が国における新たな多剤耐性菌の実態調査」の結果について. http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou19/cyousa_kekka_110121.html.

Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N. and Ohta, M. (1995). Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene (*bla* IMP) among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 39, 824-829.

Iwabe, T., Uruse, T. and Yamamoto, K. (2001). Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Science and Technology*, Vol. 43, 91-99.

東京都下水道局 (2012). 水質規制情報. <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/osigoto/kisei/3kijyun.htm>.

Livermore, D. M. (1995). β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 8, 557-584.

村田綾子・真名垣聡・高田秀重・村上和雄・田中宏明・原田新・中田典秀・鈴木穰 (2006). 日本の河川の抗生物質汚染の実態解明. 第15回環境化学討論会講演要旨集, 190-191.

Sturtevant, A. B., Cassell, G. H. and Feary, T. W. (1971). Incidence of infections drug resistance among fecal coliforms isolated from raw sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 21, 487-491.

Walter, M. V. and Vennes, J. W. (1985). Occurrence of multiple-antibiotics-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 50, 930-933.

(受稿：2013年11月11日 受理：2013年11月30日)