

水圏環境における多剤耐性菌の繁殖度調査

浦野 直人 (東京海洋大学 学術研究院海洋環境科学部門, urano@kaiyodai.ac.jp)

石田 真巳 (東京海洋大学 学術研究院海洋環境科学部門, ishida@kaiyodai.ac.jp)

岡井 公彦 (東京海洋大学 学術研究院海洋環境科学部門, mokai01@kaiyodai.ac.jp)

高塩 仁愛 (ゼンショーホールディングス 基盤技術研究所, masachika.takashio@zensho.com)

武井 俊憲 (ゼンショーホールディングス 基盤技術研究所, toshinori.takei@zensho.com)

Research on multi-drug resistant bacteria in aquatic environments

Naoto Urano (Department of Ocean Science, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masami Ishida (Department of Ocean Science, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masahiko Okai (Department of Ocean Science, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masachika Takasio (Zensho Laboratories of Food Technology, Zensho Holdings Co., Ltd., Japan)

Toshinori Takei (Zensho Laboratories of Food Technology, Zensho Holdings Co., Ltd., Japan)

要約

日本の都市を縦断する第一級河川はヒトの生活圏の影響を強く受け、環境水中に残存する抗菌薬濃度がかなり高いとの報告がある。筆者らは東京都と神奈川県を流れる多摩川を例に取り、水中の多剤耐性菌の繁殖度を調査した。一般細菌および薬剤耐性菌は中流～下流にかけて高濃度に生息していたが、上流では急激に低濃度となった。一方で8種類の抗菌薬を用いて多剤耐性菌の検査を行ったところ、中流～下流では3剤耐性菌が、上流では5剤耐性菌が最も多く検出された。このことから、上流域において高次の多剤耐性菌の繁殖要因が存在する可能性が示唆された。都市河川の上流域にはしばしば養魚場や養鶏場・養豚場等が点在し、抗菌薬を配合した餌料を養魚や家畜に、日常的に給餌している。養魚水等はそのまま環境中へ放水されるケースも多い。そこで筆者らはモデル実験として、飼育魚糞中の耐性菌増殖に及ぼす配合餌料の影響を調べた。魚に抗菌薬非配合餌料を日々給餌している間は糞中の耐性菌数がほぼ0であったが、抗菌薬配合餌料の給餌に換えると糞中の耐性菌数が急上昇した。約1ヶ月経て糞中の耐性菌数がほぼ最大値を示した後、抗菌薬非配合餌料での給餌を再開すると、20日間前後で耐性菌数がほぼ0となった。さらに1種類の抗菌薬を給餌しただけで、魚糞中に多剤耐性菌が高頻度で出現することも観測された。よって河川上流域に多剤耐性菌が多い原因の1つに、養魚場等の施設における抗菌薬の使用が推測される。多摩川では中流域で一般細菌や薬剤耐性菌が多数出現し、抗菌薬の汚染度が高いと考えられたため、中流における多剤耐性糞便系大腸菌群の繁殖度を調査した。単離した糞便系大腸菌群のうち63株を分類同定したところ、大部分が*Escherichia coli*か*Klebsiella* spp.であった。それらの中に1剤～6剤耐性菌が25株存在し、6剤耐性を持つ*E. coli* hfa7はセファロスポリン系薬剤に耐性を持ち、CTX-M-1遺伝子を持つ基質特異性拡張性β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌であることがわかった。都市河川の中流域～下流域では、河川水の5割以上を水再生センターからの放出再生水が占めているため、再生水が多剤耐性菌繁殖の一因と成っている可能性が高いと推測される。そこで筆者らは、水再生センター内の水流路中の糞便系多剤耐性大腸菌群を調査した。菌群数は下水道からの流入水で高く、曝気槽水、浄化水、次亜塩素酸処理水と徐々に減少したものの、最終的な流出水中でも生菌が存在することがわかった。この結果は筆者らの仮説を支持していた。

キーワード

都市河川, 多摩川, 抗菌薬, 多剤耐性菌, 基質特異性拡張性β-ラクタマーゼ産生菌

1. はじめに

ヒトによる病原菌との戦いの歴史は古いが、ペニシリン等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、抗生物質を長期間使用すると薬効を示さない耐性菌が発生し、新しい抗生物質の開発を必要とした。そして新薬が更なる耐性菌の出現に繋がるなど、ヒトと病原菌はイタチゴッコさながらの生存競争を行って来た。また当初は、微生物が生合成した薬を抗生物質と呼んで使用したが、後に化学合成もなされるようになり、「抗菌薬」と総称するようになった。なお昨今は、世界各地の医療施設内で、複数種の抗菌薬が同時に効力を示さない多剤耐性菌の検出が報告されている。例えば、β-ラクタム系抗菌薬が効かない多剤耐性

菌として、ESBL (extended-spectrum β-lactamase: 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ)、MBL (metallo-β-lactamase: メタロβ-ラクタマーゼ)、KPC型カルバペネマーゼ、OXA型カルバペネマーゼなどの産生菌が出現し、日本の医療施設でも当該細菌の検出が相次ぎ大きな社会問題となった。特に1980年代以後、世界的に広まったESBL産生菌は、ペニシリンから始まりセフトキシムやセフトジジムへと、基質特異性が次々と拡張した分解酵素を産生する菌である。そのため*Klebsiella pneumoniae*による重症院内肺炎などのESBL産生菌感染症には、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬、モノバクタム系薬などが薬効を示さなくなり、使用可能な抗菌薬が極めて限定的になった (Yagi et al., 2000)。更にESBL遺伝子は伝達性プラスミドを介して菌種を超えて伝播することも原因となり、世界各地へ拡散したとされている (Ito et al., 1997; 荒川, 2011)。厚生労働省では平成22年に病院を中心に「我が国における多剤耐性菌の実態調査」を行った (厚生労働省,

2011)。それ以後も日本感染症学会が多剤耐性菌院内感染対策ワーキンググループを結成して、院内感染の防御対策を検討している（日本感染症学会, 2019）。一方、日本では現在までに、医療施設以外では鶏等の食肉が薬剤耐性菌に汚染されている事が報告されている（江藤・石井, 2009）。しかし、特に野外環境における多剤耐性菌の実態調査事例が少ないため、感染症対策の重要課題である感染ルートの解明には、未だブラックボックスが存在すると考えて良いであろう。

なお、東京都と神奈川県の間を流れる多摩川の流域水は日本の都市河川でも抗菌薬濃度が高いという報告（村田他, 2006）があり、その主原因の一つは、流域水の5割を占める水再生センターからの放出再生水にあると考えられる。多摩川流域の住民の生活排水や産業排水は、下水道を通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、CODや有害物質濃度が東京都基準値以下になった再生水（東京都下水道局, 2019a）が多摩川中流～下流域に流入して、自然水と混ざり河川水を形成する。その際、再生水中に残存する抗菌薬や耐性菌自体が河川へ流出すれば、水圏における薬剤耐性菌の繁殖が懸念される。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、生活排水や糞便が混入する下水道や河川中の耐性菌の生息と、その伝達性を調査した研究報告が以前より多数存在する（Arvanitidou et al., 1997; Bell et al., 1980; 1981; 1983; Iwabe et al., 2001; Sturtevant et al., 1971; Walter et al., 1985）。一方、多摩川での薬剤耐性菌の生態に関する報告は数少ない（Kobori, 2012; 浦野他, 2013）が、多摩川は都民や県民生活に密着した都市河川であり、安心して憩うことができる水辺であることの保障が期待される。ここでは、筆者らが水圏環境における多剤耐性菌の繁殖度調査を行った結果を総論する。

2. 多摩川流域の多剤耐性菌

図1に示すように、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水を採集した（浦野他, 2013）。図2に各試料中の微生物の培養・単離・解析の流れを示す。

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、上流ではく

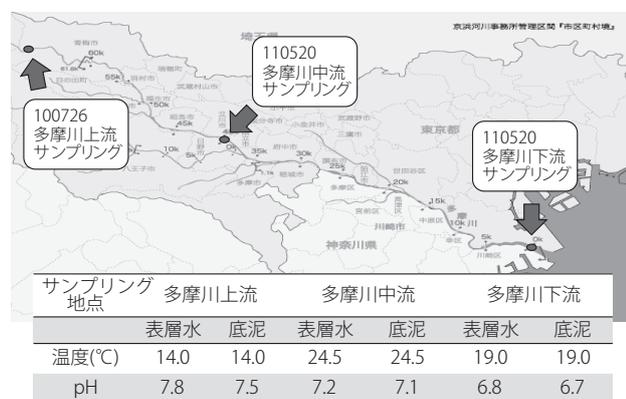


図1：多摩川の各地点における水試料のサンプリング
出典：科学・技術研究, 2 (2), 131～136より。

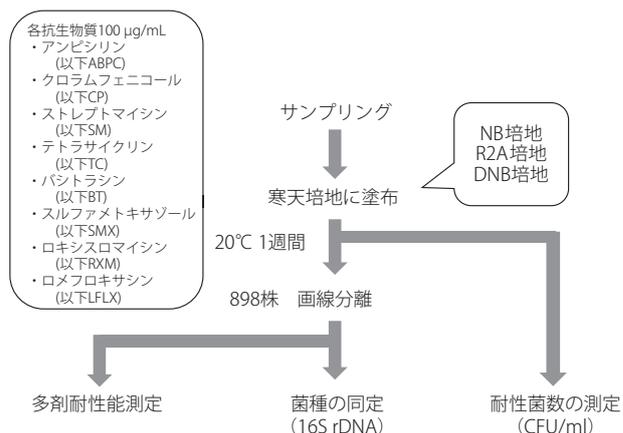


図2：耐性菌解析フローチャート
出典：科学・技術研究, 2 (2), 131～136より。

10/mL、中流では 2.0×10^5 /mL、下流では 1.2×10^6 /mLと河川を下るに連れて、細菌数が増大した。一方、底泥水の一般細菌数は、中流が 1.4×10^7 /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、上流では5剤耐性菌の単離株数が最大で、6-8剤耐性を持つ菌も多く単離された。一方、中流では3剤耐性菌数、下流では2剤耐性菌が最大で、4-8剤耐性を持つ菌の単離数は少なかった。上流では耐性菌濃度は著しく低いが、多剤耐性が高い菌が多いことがわかった。

図5に多剤耐性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5と図6の結果を総括すると、上流ではBacteroides門が多

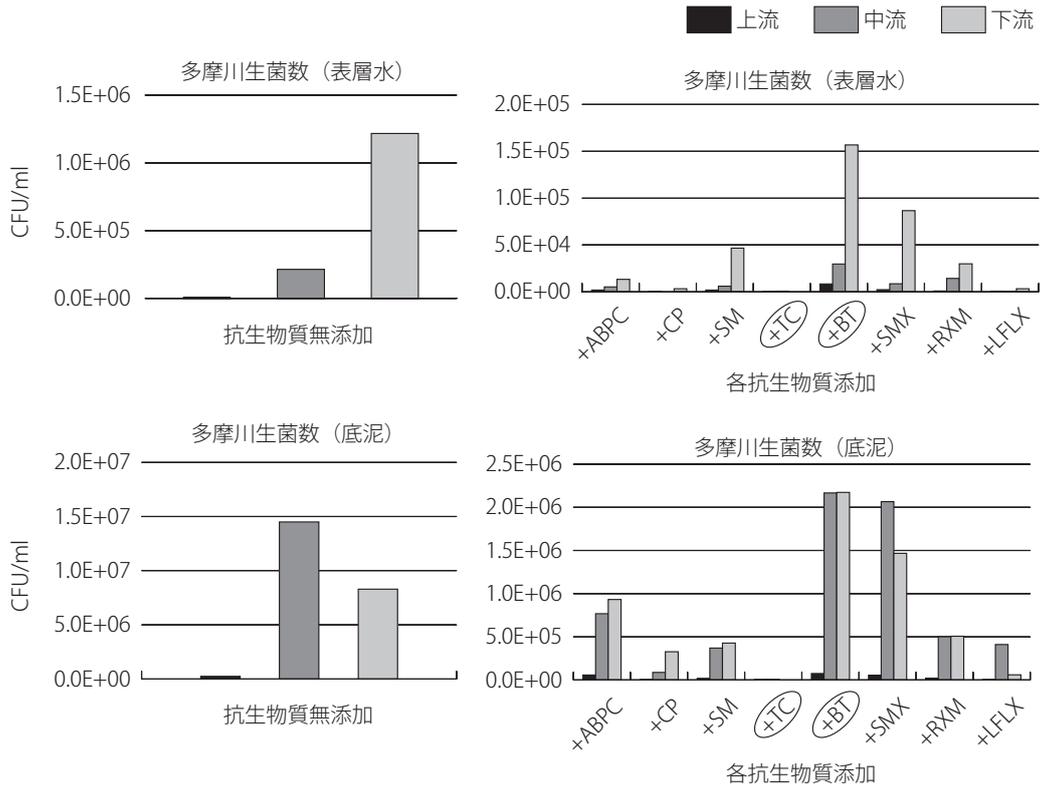


図3：多摩川細菌数の流域(上中下流)による違い
出典：科学・技術研究, 2 (2), 131 ~ 136より。

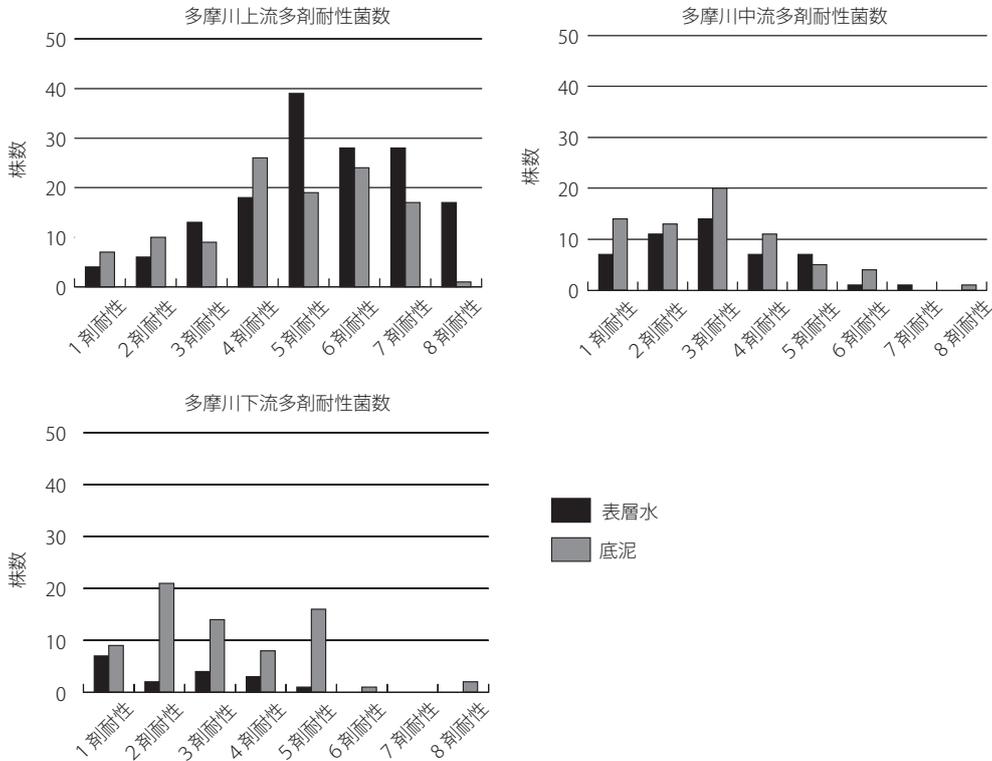


図4：多摩川各流域における多剤耐性菌の分離株数
出典：科学・技術研究, 2 (2), 131 ~ 136より。

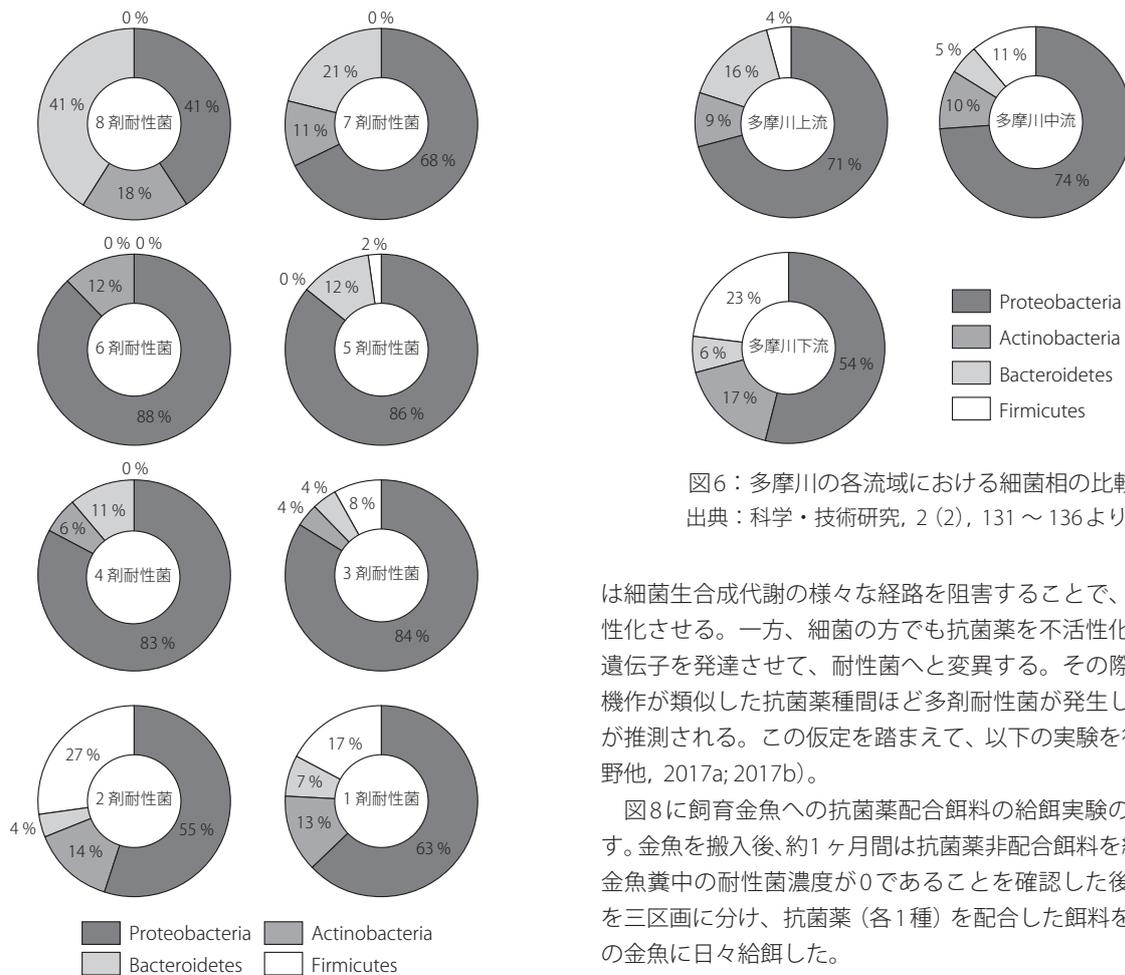


図5：多摩川の多剤耐性能ごとの細菌相(門)比較
出典：科学・技術研究, 2 (2), 131 ~ 136より。

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。

3. 飼育魚の糞中の耐性菌数の変移

図7に主な抗菌薬の細菌に対する作用機作を示す。抗菌薬

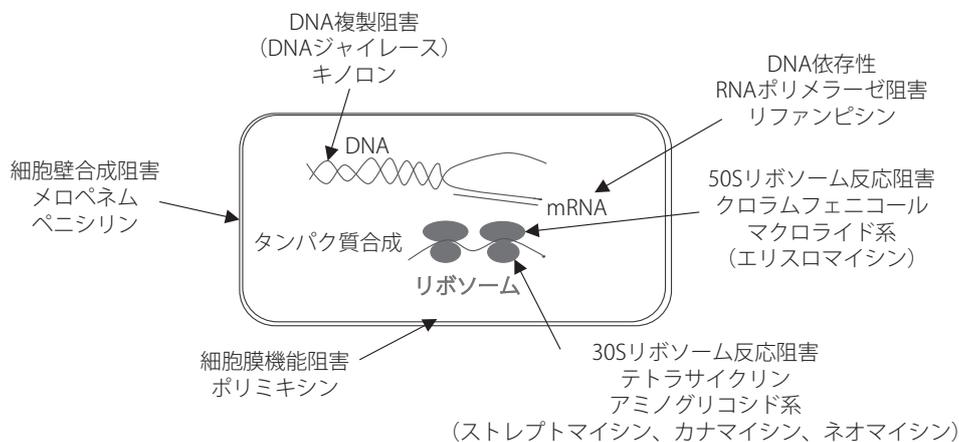


図7：抗菌薬の細菌への作用機作

図6：多摩川の各流域における細菌相の比較
出典：科学・技術研究, 2 (2), 131 ~ 136より。

は細菌生合成代謝の様々な経路を阻害することで、菌を不活性化させる。一方、細菌の方でも抗菌薬を不活性化する酵素遺伝子を発達させて、耐性菌へと変異する。その際に、作用機作が類似した抗菌薬種間ほど多剤耐性菌が発生し易いことが推測される。この仮定を踏まえて、以下の実験を行った(浦野他, 2017a; 2017b)。

図8に飼育金魚への抗菌薬配合餌料の給餌実験の流れを示す。金魚を搬入後、約1ヶ月間は抗菌薬非配合餌料を給餌した。金魚糞中の耐性菌濃度が0であることを確認した後に、金魚を三区画に分け、抗菌薬(各1種)を配合した餌料を、各区画の金魚に日々給餌した。

図9に金魚糞中の耐性菌数の変移を示す。カナマイシンKM配合餌料を日々給餌したところ、金魚糞中のKM耐性菌数が上昇したが、同時にネオマイシンNMとストレプトマイシンSM耐性菌も増殖を示した。同様にNM配合餌料を給餌したところ、金魚糞中にNM耐性菌と同時にKM, SM耐性菌の増殖が計測された。またSM配合餌料でも同様の結果を得た(データ記載せず)。NM, KM, SMは細菌に対する作用機作が類似しているため、投与抗菌薬以外の耐性菌が発生し易い可能性が示唆された。

いずれの抗菌薬による給餌でも、約1ヶ月で金魚糞中の耐

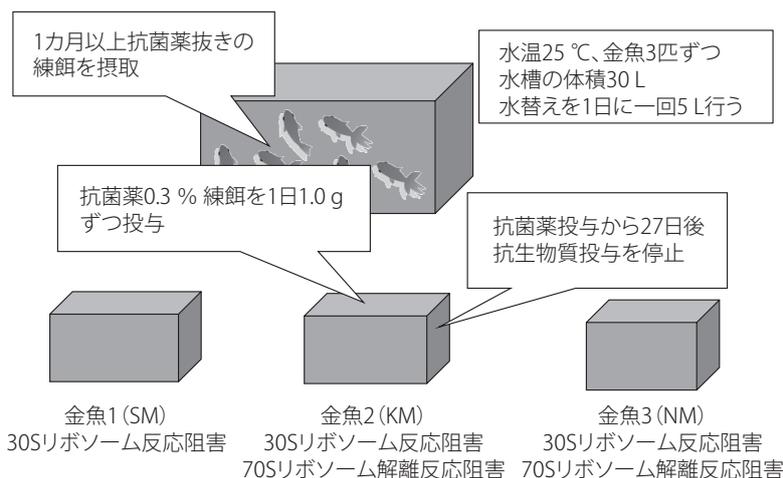


図8：飼育金魚への抗菌薬含有餌料の給餌

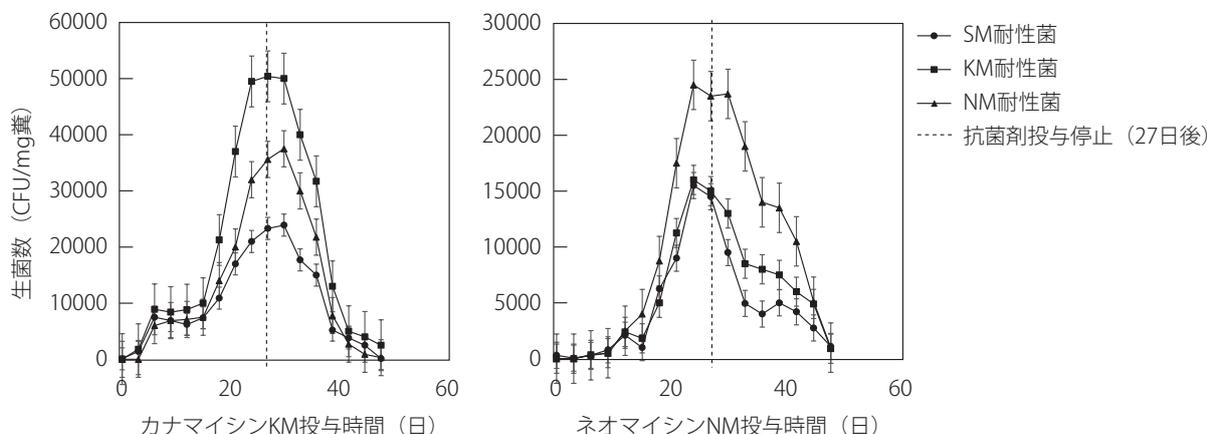


図9：金魚糞中の耐性菌数の変移

性菌数がほぼ最大になった。その時点で再び抗菌薬非配合餌料に換えて日々給餌したところ、糞中の耐性菌数が激減し、約20日後に糞中の耐性菌数がほぼ0になった。

次ぎにテトラサイクリンTS、メロペネムMP、SMと作用機作が異なる抗菌薬の配合餌料を給餌したところ、配合した抗菌薬の耐性菌のみでなく、他抗菌薬の耐性菌も出現した(データ掲載せず)。この結果から、1種類の抗菌薬を投与すると、作用機作が類似している薬に留まらず、機作が異なっている抗菌薬の耐性菌も金魚腸内で増殖することがわかった。但し、これらが多剤耐性菌であるか否かは不明であったため、金魚糞中からTS耐性菌を単離して、それらの多剤耐性能を解明した結果を表1に示す。

金魚への抗菌薬配合餌料を日々給餌した際、糞中の最大耐性菌数に及ぼす給餌量の影響を図10に示す。1回の給餌量1.0g/尾(金魚が食べ残す量)を与え続けた場合と、1回の給餌量0.6g/尾(金魚が食べ切れる量)を与え続けた場合を比較すると、前者における糞中の最大耐性菌数と比べて、後者のそれは激減した。

表1にTCを給餌した金魚糞中から単離したTC耐性菌の分類同定と多剤耐性能の解析結果を示す。TC耐性菌の多くが *Citrobacter* sp.、*Shewanella* sp.、*Aeromonas* sp. などの水中

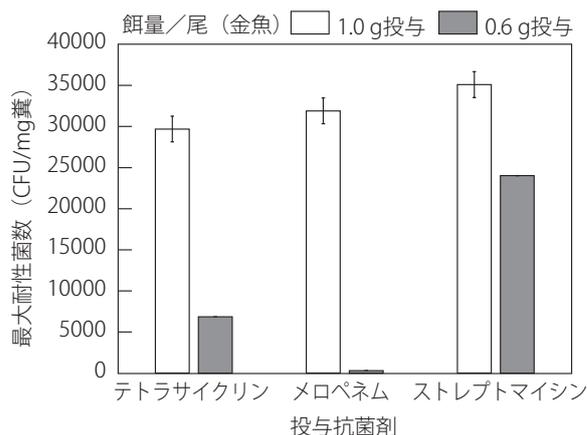


図10：給餌量が金魚糞中の耐性菌数に及ぼす影響

や腸内常在菌であり、しかもほとんどの株が多剤耐性能を持つことがわかった。この結果から1種類の抗菌剤を給餌しただけで、多剤耐性菌が出現することが明らかになった。また同様に、SM、NM、KM、またはMP耐性菌として単離した株も、多くが多剤耐性能を持つことが判明した(データは掲載せず)。

表1：TC給餌金魚糞中のTC耐性菌の分類同定

菌番号	菌種	相同性	耐性
TC6	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99%	TC
TC7	<i>Citrobacter freundii</i>	98%	TC, SM, KM
TC9	<i>Citrobacter freundii</i>	98%	TC, CP, SM, KM, NM
TC10	<i>Citrobacter freundii</i>	98%	TC, SM, KM
TC13	<i>Citrobacter freundii</i>	98%	TC, SM, KM
TC14	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	TC, CP, SM, KM, NM
TC17	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	TC, SM, KM, NM
TC18	<i>Citrobacter braakii</i>	99%	TC, CP, SM, KM, NM
TC19	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	TC, SM, KM
TC21	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99%	TC, MP
TC23	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	TC, CP, SM, KM, NM
TC26	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	TC, KM
TC27	<i>Shewanella xiamenensis</i>	99%	TC, MP, CP
TC28	<i>Citrobacter freundii</i>	100%	TC, CP, SM, KM, NM
TC29	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99%	TC
TC30	<i>Aeromonas veronii</i>	99%	TC, MP
TC31	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	TC, SM, KM
TC32	<i>Shewanella xiamenensis</i>	99%	TC, MP, CP, SM
TC33	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99%	TC, MP
TC35	<i>Shewanella putrefaciens</i>	98%	TC, MP, SM
TC2	<i>Citrobacter sp</i>	99%	TC, SM, KM
TC4	<i>Shewanella sp</i>	99%	TC, SM, KM
TC5	<i>Citrobacter sp</i>	99%	TC, SM, KM
TC12	<i>Citrobacter sp</i>	99%	TC, CP, SM, KM, NM
TC37	<i>Aeromonas sp</i>	99%	TC, MP, CP, SM, KM, NM

以上の結果から、1種類の抗菌薬の投与により金魚糞中に多剤耐性菌が発生するが、給餌量を調整することで耐性菌数を減少させることができることがわかった。養魚場では抗菌

剤配合飼料を日常的に給餌しているケースが一般的であるため、都市河川上流域において多剤耐性菌が多く生息する原因の1つになっている可能性が示唆された。しかし、魚への給餌を適切量に調整することで、養魚場外に漏れ出る耐性菌数を大幅に抑制できると考えられる。

4. 多摩川における多剤耐性糞便系大腸菌群

糞便系大腸菌群の説明を図11に示す。グラム陰性・乳糖発酵性・37℃で発育する細菌を大腸菌群と称する。その中でも44.5℃で発育可能な菌は糞便系大腸菌群であり、動物の腸内に生息した菌が体外に出たと考えられ、水圏の糞便汚染の指標となる。特に分類上*Escherichia coli*は大腸菌と称され、当該菌種が検出される環境は糞便汚染ありと判定され、例えば腸管出血性大腸菌や赤痢菌の様な他の重篤な病原菌汚染の危険性も懸念されるため、水質改善の必要性が求められる。

図12、図13に多摩川中流域の底泥水採集場所と糞便系大腸菌群の単離結果を示す(Okai et al., 2019; 青木他, 2018; 田中他, 2015)。いずれのStationにおいても糞便系大腸菌群が検出され、特にSt. 3では菌群濃度が高かった。下水道普及率は平成29年度末時点で、東京都が99.5%と神奈川県は96.7%(日本下水道協会, 2019)であり、周辺施設からの廃排水が多摩川中流へ直接的に流出することはほとんど無いと考えられる。にも拘わらず、各St.で糞便系大腸菌群が検出されたことは、近隣の水再生センターからの流入水中に当該菌群が存在している可能性が示唆された。またSt. 3近隣に大規模な動物公園が存在するため、動物飼育水が雨水と共に地面を流れて河川にたどり着き、St. 3において菌濃度が高く出た可能性も推測された(Okai et al., 2019)。

糞便系大腸菌群63株の菌種同定結果を図12に示す。46%が*Klebsiella* spp.、43%が*Escherichia coli*であり、多摩川中流の底泥水は弱毒性の病原性細菌がかなり生息していることが判明したため、水質には改善の必要性が求められる。

ヒトが病原性細菌に感染した際に、投与した抗菌薬が効果

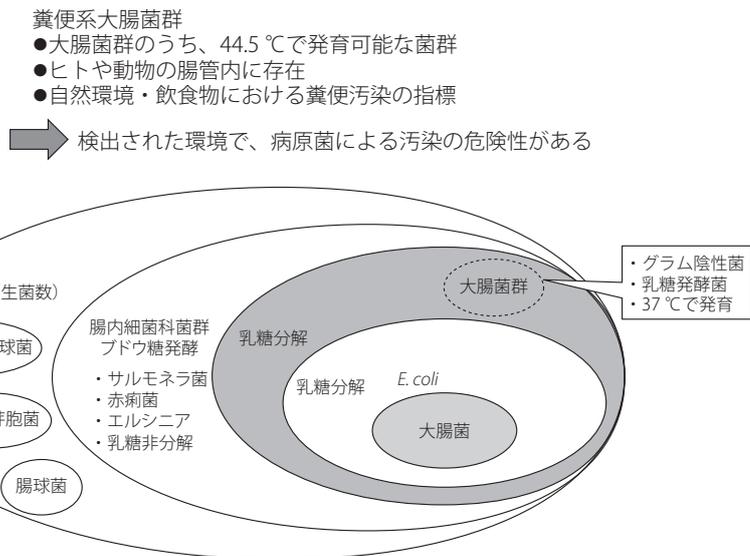
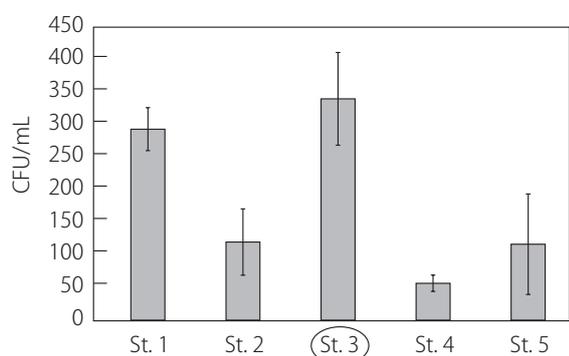


図11：糞便系大腸菌群とは
出典：日本食品微生物学会より。



図12：多摩川中流域での底泥水採集
注：サンプリング/多摩川中流域 2017.7.12。



サンプリング地点	単離株数 (株)
St. 1	88
St. 2	36
St. 3	102
St. 4	17
St. 5	35
計	278

図13：多摩川中流域における糞便系大腸菌群

注：5地点全ての底泥から計278株の糞便系大腸菌群を単離した。St.3 (程久保川)に最も多くの糞便系大腸菌群が生息していた。

を示さない場合には、患者の治療が困難を呈する可能性が高くなり、特に細菌が多剤耐性能を持つとなると、患者はより一層危険な状況に陥るであろう。多剤耐性菌の中でも危険度

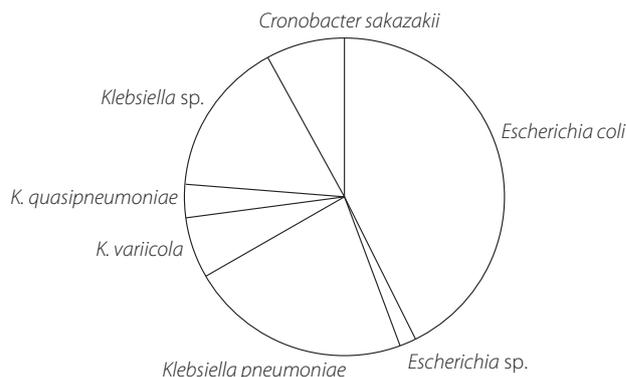


図14：多摩川から単離した糞便系大腸菌群の分類

が高い基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の説明を図15に示す。細菌が発達させたペニシリナーゼに始まる薬剤耐性酵素は、基質特異性を次々と拡張させ、ほとんどのβ-ラクタム系抗菌剤が効かないESBLを産生する多剤耐性菌が誕生した (荒川, 1996)。しかもこうした多剤耐性菌は未だ変異途上であり、ヒトは常にその対抗薬を開発していく必要がある。

次に多摩川から単離・分類同定した糞便系大腸菌群63株について、13種の薬剤ディスク (そのうちβ-ラクタム系は8種) を用いて薬剤耐性試験を行った。図16に示すように、1剤耐性菌19株、2剤耐性菌3株、3,5,6剤耐性菌は各1株存在した。調査した糞便系大腸菌群の38%が薬剤耐性菌であり、その中の24%が多剤耐性菌であった。

6剤耐性菌である*E. coli* hfa7について、ESBL産生遺伝子の解析を行ったところ、CTX-M-型の遺伝子を保持していた。CTX-M-型遺伝子を持つ耐性菌はセフトアキシム (CTX)、セフトリアキソン (CFX) を効率よく分解し、TEM型遺伝子を持つ細菌はCTX、CFX、セフトアジジム (CAZ) をいずれも分解可能との報告がある (荒川, 2003)。よって、hfa7はCTXとCAZに対して耐性を示したため、両薬剤の分解酵素を発現していると考えられたが、遺伝子解析からCTX-M-1遺伝子を持つことがわかった。本調査において1株だけでもESBL産生糞便系*E. coli*が単離されたことは、多摩川中流域の水質汚染に関して、今後も継続調査が必要であると判断される。

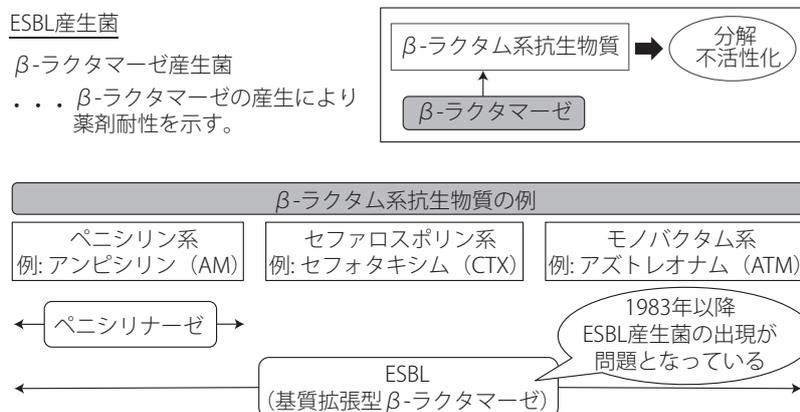


図15：基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌とは

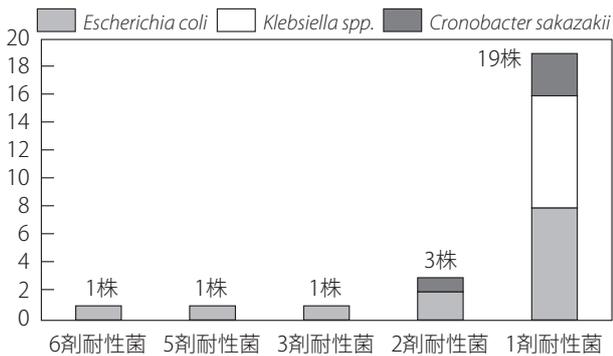


図16: 糞便系大腸菌群中の耐性菌

注: 6, 5, 3剤耐性菌を1株ずつ、2剤耐性菌を3株、1剤耐性菌を19株検出した。1~3, 5, 6剤耐性菌いずれの菌相においても *E. coli* が含まれていた。

5. 水再生センターの多剤耐性菌

多摩川等の都市河川では、中流~下流における環境水の5割以上を水再生センター由来の再生水が占めているため、中流~下流にかけてのCOD・BODや微生物相に及ぼす再生水の影響は大きいと考えられる。そこで、筆者らは都内の某水再生センター内の流水経路における糞便系大腸菌群の生息状態を調査した。

水再生センターの水処理工程における採水地点を図18に示す。すなわち、下水道からの流入下水を貯留する沈砂池水、微生物群による曝気反応槽水、浄化処理水、次亜塩素酸による殺菌処理水の4地点から採水して、微生物検査を行った。

る殺菌処理水の4地点から採水して、微生物検査を行った。

水再生センター内において、下水道からの流入下水、曝気槽内の反応水、浄化処理水、放流水の糞便系大腸菌群のコロニー形成数CFU/mlを調査した。図19に示すように、センター内で処理が進行するにつれて、CFU/mlは減少の一途を示した。しかしながら、次亜塩素酸殺菌後の放流水中でも70 CFU/mlと、糞便系大腸菌群濃度はかなり高いことがわかった。すなわち、多摩川等の大都市河川における糞便系大腸菌群汚染には、水再生センターの放流水が原因の1つであることが判明した。

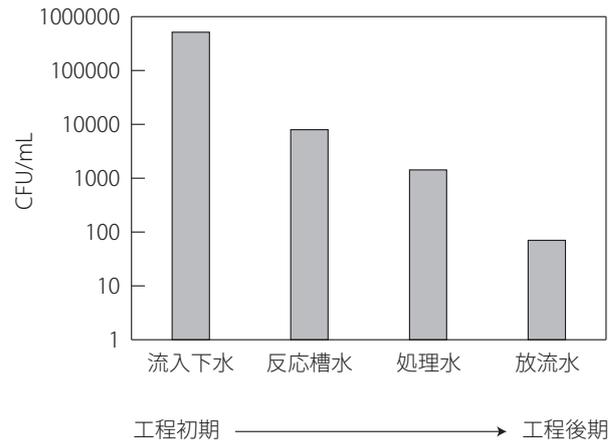


図19: 水再生センターの処理工程における糞便系大腸菌群濃度

ESBL産生遺伝子の遺伝子型解析 (*E. coli* hfa7株)

検出された遺伝子型・・・ [CTX-M-型: CTX-M-1]

検出された発現活性

		セファロスポリン系薬の例		
		セフトキシム (CTX)	セフトリアキソン (CFX)	セフトジジム (CAZ)
酵素の特徴	CTX-M-型	◎	◎	×
	TEM型	○	○	○
薬剤感受性試験の結果		hfa7株	R	—

◎: 効率よく分解
○: 分解可能
×: 分解できない
R: 耐性
—: 使用せず

図17: ESBL産生糞便系 *Escherichia coli*

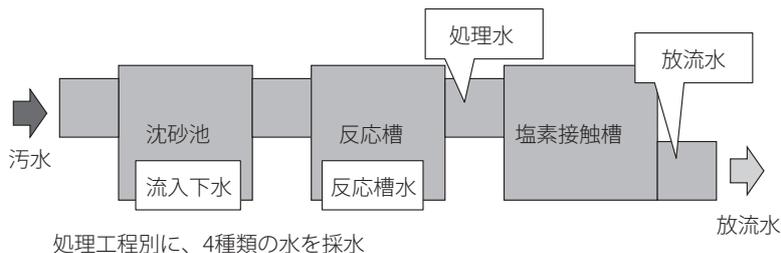


図18: 水再生センターの水処理工程からの採水

注: 採水日2018/7/17。

次に、単離した糞便系大腸菌群の耐性能を解析したところ、多剤耐性菌の比率は流入下水中で高く、反応槽水中では大きく減少した。ところが、浄化処理水中で再び増加して、放流水中에서도残存していた。これらの結果から、多剤耐性菌を含む一部の細菌は次亜塩素酸に曝露されても、完全に死滅せずに残存することがわかった。この原因に関しては現在解析中である（データ記載せず）。なお2018年度から厚生労働省を中心に、水再生センターの放流水が内在する薬剤耐性（細菌種・耐性因子）の研究調査が開始された（感染症研究所感染症情報センター，2019）。都市の環境薬剤モニタリングとして、水再生センター放流水が注目を集めている。

6. 終わりに

筆者の記憶を辿ると、昭和30年代前半頃まで、東京や神奈川の河川水は澄んでいて泳ぐことができた。魚介類の宝庫であり採集して飼育や食材とするなど、子供や大人にとって河川は都市近郊にある憩いの場であった。ところが昭和30年代後半に至り、高度成長が著しい時代になると、都市河川の水質は急速に悪化して行った。昭和40年代頃の下水道普及率は東京でも35%程度（東京都下水道局，2019b）で、周辺住民の生活廃水や工業用排水が大量に河川へ直接流入していた。河川は洗剤による泡や汚泥・ゴミ・悪臭が満ちて近寄れず、水棲生物が住めなくなり、さながら大きなドブと化して行った。日本から遊び場としての都市河川が失われた時代であった。

昭和50年代に至ると、日本の環境基準が厳しくなり、同時に下水道普及率が高まり、都市河川の水質は再び向上の一途を辿った。洗剤の泡や悪臭は消えて、水棲生物が回帰して来た（和波，2010）。更に平成へと時代が移り変わるにつれて、東京は下水道普及率がほぼ100%となり、都市河川の環境水は益々浄化され、休日になると大勢の子供や大人が、河岸での飲食や川の中に入って遊ぶ姿を目撃できるようになった。人々は憩いの場としての都市河川を取り戻すことができたのである。

しかしこうした都市河川に潜む新たな危険を認知しておくことは必要であり、その1つが本報で述べた多剤耐性菌の繁殖である。都市河川の上流域では人々が岸辺でキャンプやバーベキュー等をして楽しんでいる。上流水は清浄なため、川辺で調理器具を洗ったりすることも多い。しかし、上流水中に高次の多剤耐性菌が繁殖していることを知っているヒトは少ないであろう。耐性菌中には弱毒性の病原菌も含まれるため、免疫力が落ちているヒトには感染→抗菌薬が効きにくい→重症化、という事態が発生する危険性もある。

河川の中流～下流でも人々は水に入り、魚介類を採集、飼育や食材の一部にすることがしばしば行われている。ボートやヨットでのクルージングも日常的に目に入る。ところが河川中流水中には多剤耐性糞便系大腸菌群が生息しており、その中にはESBL産生菌が存在することがわかった。また多剤耐性糞便系 *Escherichia coli* は、上流では単離されなかったが、中流や下流では単離された。*E. coli* の中には腸管出血性大腸菌O157の様な強毒性細菌が混在している可能性も否定できないだろう。1990年に埼玉県の子供園で使用している井戸水から、O157による集団感染があった事件（感染症研究所感

染情報センター，1992）もまだ記憶に新しく、O157が野外環境で十分に繁殖し得ることを示している。また、リオオリンピックのセーリング会場の海水からカルバペノム耐性大腸菌群が検出され問題化したことも報告されている（Montezzi, et al., 2015）。よって、上記に示した様な問題点に対する安全性の確保のために、今後も継続的なモニタリングが必須である。

以上、人々による都市河川の利活用が増大するほど、新しい脅威を免れるために、多剤耐性菌の繁殖度調査を行い、それらの迅速かつ簡便なる検出法の開発、そして防御システムの開発が必須であると考えられる。例えば、石井（2011）はMBL産生菌等の表現形質を利用したプレートアッセイによる早期検出キットの開発を行った。より迅速な検出のためには、耐性菌の遺伝子検出法（中村，2017）も期待されるが、石井は耐性遺伝子の保持と薬剤耐性菌の発現が必ずしもイコールで無いため、プレートアッセイなどの細菌表現型での検査を提唱している。これは検査に必ず微生物増殖時間を必要とすることを意味する。多剤耐性菌検出における表現形質法と遺伝子法の差異に関する問題点は、今後も明らかにして行き、より正確で迅速な検出方法の開発が期待される。

謝辞

本総論は、東京海洋大学・海洋生化学研究室に在籍した学生達が遂行した研究成果を中心にまとめたものである。特に相川和也氏、田中陽一郎氏、伊藤藤希氏、池尻織風氏（いずれも大学院海洋科学技術研究科）、青木はな子氏、竹内梓氏、田代悠介氏（いずれも海洋環境学科）には大変にお世話になったことを感謝する。

総論をまとめるにあたり、田代悠介氏（大学院海洋科学技術研究科）には図表作成に関して大変にお世話になったことを感謝する。

引用文献

- 青木はな子・岡井公彦・石田真巳・浦野直人（2018）. 多摩川流域に生息するESBL産生菌に関する研究—多剤耐性能を持つ糞便性大腸菌の蔓延度解析—. 平成30年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 147.
- 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. 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. 化学療法領域, Vol. 12, 37-45.
- 荒川宣親（2003）. 広域β-ラクタム薬耐性に関与するβ-ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関. 日本臨床微生物学雑誌, Vol. 13, 150-161.
- 荒川宣親（2011）. 講演1. 多剤耐性菌の現状. 医学情報誌 *Animus*, No. 69, 3-10.
- 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, 486-491.
- Bell, J. B., Macrae, W. R., and Elliott, G. E. (1981). R factors in

- coliform-fecal coliform sewage flora of the prairies and northwest territories of Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 42, 204-210.
- Bell, J. B., Elliott, G. E., Smith, D. W. (1983). Influence of sewage treatment and utilization and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 46, 227-232.
- 江藤麻希・石井良和 (2009). 食肉を汚染する抗菌薬耐性菌. *モダンメディア*, Vol. 55, No. 7, 179-183.
- Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S. and Wacharotayankun, R. (1997). 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.
- 石井良和 (2011). 講演2. 早期 (迅速) 検出について. *医学情報誌 Animus*, No. 69, 11-18.
- Iwabe, T., Urase, T., and Yamamoto, K. (2001). Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Science & Technology*, Vol. 43, 91-99
- 感染症研究所感染症情報センター (2019). ワンヘルスアプローチに資する環境薬剤モニタリング. *病原微生物検出情報*, Vol. 40, 29-30.
- 感染症研究所感染症情報センター (1992). 1990年10月埼玉県浦和市のS幼稚園に発生した腸管出血性大腸菌O157:H7による集団下痢症. Vol. 13, 152.
- 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. https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou19/cyousa_kekka_110121.html.
- Kobori, H., Ham, Y. S., and Nomura, H. (2012) Identification of the source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in an urban river basin. *The Journal of Environmental and Information Studies*, Vol. 13, 90-97.
- Montezzi, L. F., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Justo, L. H., Paschoal, R. P., da Silva, I. L., Souza, M. C., Drolshagen, M., and Picão, R. C. (2015). Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 45, 174-177.
- 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.
- 中村竜也 (2017). 薬剤耐性菌の遺伝子検査. *臨床病理*, Vol. 65 (suppl), 14.
- 日本感染症学会 (2019). 多剤耐性菌と院内感染症対策. http://www.kansensho.or.jp/modules/topics/index.php?content_id=15.
- 日本下水道協会 (2019). 都道府県別の下水処理人口普及率. <https://www.jswa.jp/sewage/qa/rate/>.
- Okai, M., Aoki, H., Ishida, M., and Urano, N. (2019). Antibiotic resistance of fecal coliforms at the bottom of the Tama River, Tokyo. *Biocontrol Science*, in press.
- Sturtevant, A. B., Cassell, G. H., and Feary, T. W. (1971). Incidence of infections drug resistance among fecal coliforms isolated from raw sewage. *Applied Microbiology*, Vol. 21, 487-491.
- 田中陽一郎・池尻織風・岡井公彦・石田真巳・浦野直人 (2015). 多摩川流域におけるESBL型薬剤耐性菌の分布と伝播能解析. 平成27年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 109.
- 東京都下水道局 (2019a). 下水排除基準 (東京23区内). <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/contractor/regulation/information/3kijyun/>.
- 東京都下水道局 (2019b). 数字でみる東京の下水道. <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/business/kanko/kankou/2014tokyo/05/>.
- 浦野直人・岡井公彦・相川和也・田中陽一郎・石田真巳 (2013). 多摩川における多剤耐性菌の蔓延度解析. *科学・技術研究*, Vol. 2, No. 2, 131-136.
- 浦野直人・伊藤瑞希・池尻織風・岡井公彦・石田真巳 (2017a). 魚腸内の抗生物質耐性菌に関する研究2—多剤耐性菌の腸内増殖に及ぼす薬剤添加餌料の影響—. 平成29年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 85.
- 浦野直人・伊藤瑞希・岡井公彦・石田真巳 (2017b). 多摩川流域に生息するESBL産生菌に関する研究2—中流域から単離したESBL産生能を持つ腸内細菌群の解析—. 平成29年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 85.
- 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.
- 和波一夫 (2010). 多摩川の水质改善. 平成22年度公開研究発表会要旨集, 4-1-4-3.
- Yagi, T., Kurosawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., and Arakawa, Y. (2000). A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 184, 53-56.

(受稿：2019年5月10日 受理：2019年5月27日)