

病原性菌を含むスーパー多剤耐性菌の多摩川に おける存在調査

2013年

浦野 直人

東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科 教授

共同研究者：石田 真巳 東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科 准教授

1. 調査・試験研究の目的

多摩川は東京都民の生活に密着した典型的な都市河川である。河川沿岸には一般住宅、製造工場、病院、その他公共施設が隣立しており、こうした施設からの生活廃水は、水再生センターで浄化された後に多摩川に流入している。図1に示すように、中流から下流の流域では、河川水の約5割が水再生センター由来の処理水であるとされている。

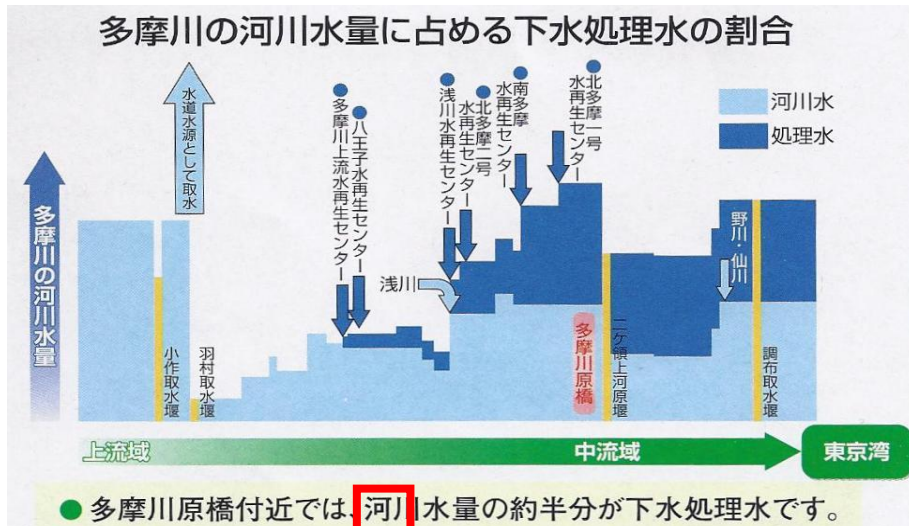


図1. 多摩川流域水における下水処理再生水が占める割合

多摩川への流入水には様々な化学物質が低濃度でも残存しているため、生息する魚類の腸内細菌にも化学物質の影響が及んでいると推定される。そこで本研究では、ヒトや家畜の生活に関わり深い抗生物質について取り上げて見る。日本国内での抗生物質の消費量は、年間に医薬品で 500t、農薬で 100t、畜水産で 1,100t にも及んでいる。ヒトや家畜に投与した抗生物質は、全てが体内で利用されずに、糞便とともに体外へ排泄される。そして水再生センターを経て、処理再生水に含まれて河川へ流出すると推定される。図2に日本の1級河川水中の抗生物質濃度の比較を示す。全国河川中でも多摩川が、庄内川、大和川と共に、河川水中の抗生物質濃度が飛び抜けて高いという報告がなされている。¹⁾

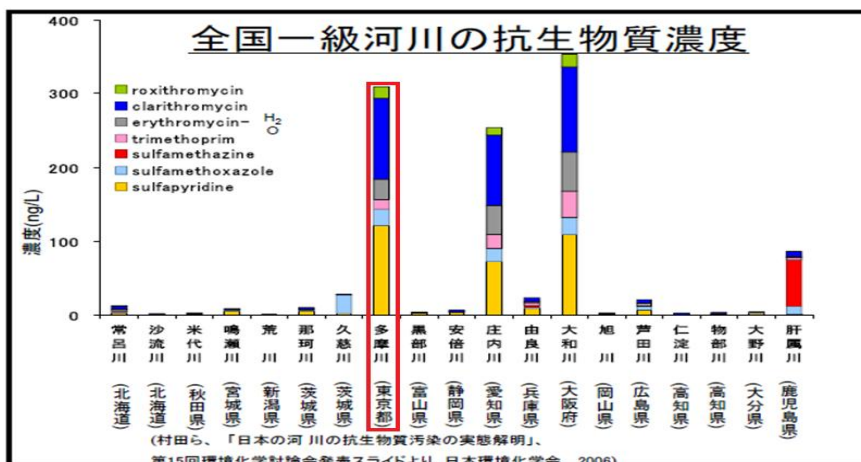


図2 多摩川水の抗生物質濃度

計測方法の詳細が明確でないため、各河川の汚染度比較を本データのみで判断するのは疑問が残るが、この報告から多摩川の環境水の抗生物質汚染度はかなり高いと判断して良いであろう。

さて、抗生物質を使用開始以来、その薬理作用が効力を及ぼさない細菌(抗生物質耐性菌)の出現と蔓延が観測されている。対応策として新たな抗生物質が開発され、その使用がさらなる耐性菌を出現させるという、イタチゴッコが繰り返されてきた。従って河川の生態系を調査する上で、耐性菌の蔓延度解析は極めて重要な研究課題である。図3、図4に自然環境中での多剤耐性菌の出現メカニズムを示す。

背景

■抗生物質■

微生物が産生する物質で、他の微生物の発育を阻害、または死滅させる

日本での使用用途 : 医薬品・農薬・家畜・水産養殖

日本での年間使用量: 医薬品 500 農薬 100t
蓄水産 1100t 計 1700 t

■耐性菌■

抗生物質の効かない菌。

主に突然変異やR-プラスミドの伝播により、耐性を得る。

(染色体DNAとは独立して存在し、その細胞に特定の遺伝的性状を与える遺伝体)

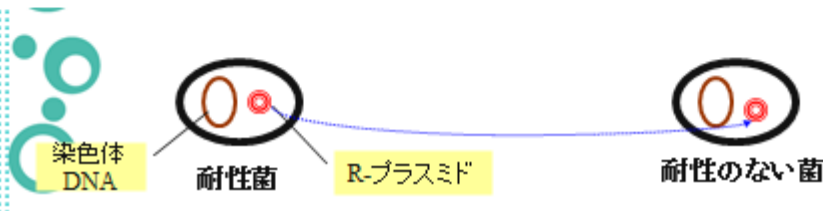


図3 日本における抗生物質使用量と耐性菌の出現

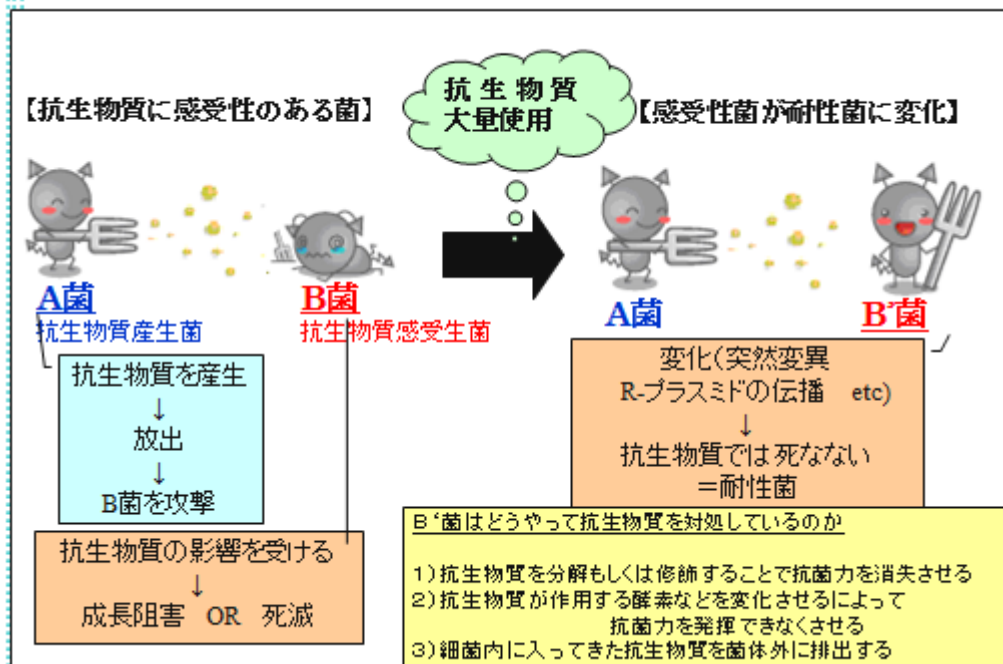


図 5 に耐性菌の発生に伴う問題点を示す。抗生物質の使用開始以来、その薬理作用が効力を及ぼさない細菌(抗生物質耐性菌)の出現と蔓延が観測されている。対応策として新たな抗生物質が開発され、その使用がさらなる耐性菌を出現させるという、イタチゴッコが繰り返されてきた。図 6 は耐性菌の蔓延状況に関する新聞記事である。従来、耐性菌の蔓延は主として医療施設を中心に広がるケースが多かった。例えば、ある病気で入院治療を受けていた患者が、別の病気を誘引する病原性の耐性菌に感染し、抗生物質による治療が効かず、極端な場合には死亡に至るケースがしばしば存在する。こうして院内感染での死亡者は年平均 5 万人以上にも至っている。近年に至り、医療施設でなく野外環境での耐性菌の蔓延度を調査する報告が出始めたが、未だに数少なく、ほとんどが陸上生物に関する報告である。

抗生物質と抗生物質耐性菌



閉鎖的環境での多剤耐性菌の調査が行われているが、自然環境中での調査は少ない。

図 7 自然環境中での多剤耐性菌の出現

以上により、野外水圏環境において、しかも図 7 に示すような多剤耐性菌の蔓延度を調べた研究報告は皆無である。

さて、2010 年秋頃から日本など世界各地で、バンコマイシンなど最新の抗生物質を含む、ほとんどの薬が効力を示さない細菌(スーパー多剤耐性菌と呼びニューデリーメタロ β -ラクタマーゼ(NDM-1)を生産する)の出現が報告された。医療施設内で当該細菌の検出が相次ぎ、大きな社会問題となり、厚生労働省では「我が国における多剤耐性菌の実態調査」を開始している。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、調査自体がほとんどなされていないのが実情である。

多摩川は市民生活に密着した典型的な都市河川である。多摩川の中流や下流水中の下水処理水比は 50~70%にも及んでおり、日本の都市河川でも多摩川水中の抗生物質濃度が高いという報告もある。多摩川が、安心して遊ぶことができ、採集した魚介類を飼育し食することができる水辺であることを保障するために、できればスーパー多剤耐性菌の生息を否定したい。本研究は「病原性菌を含むスーパー多剤耐性菌の多摩川における存在調査」を行うことを目的とする。

2. 調査・試験研究の方法および結果

サンプリング地点



図 8 多摩川流域における環境水および底泥の採集

実験方法

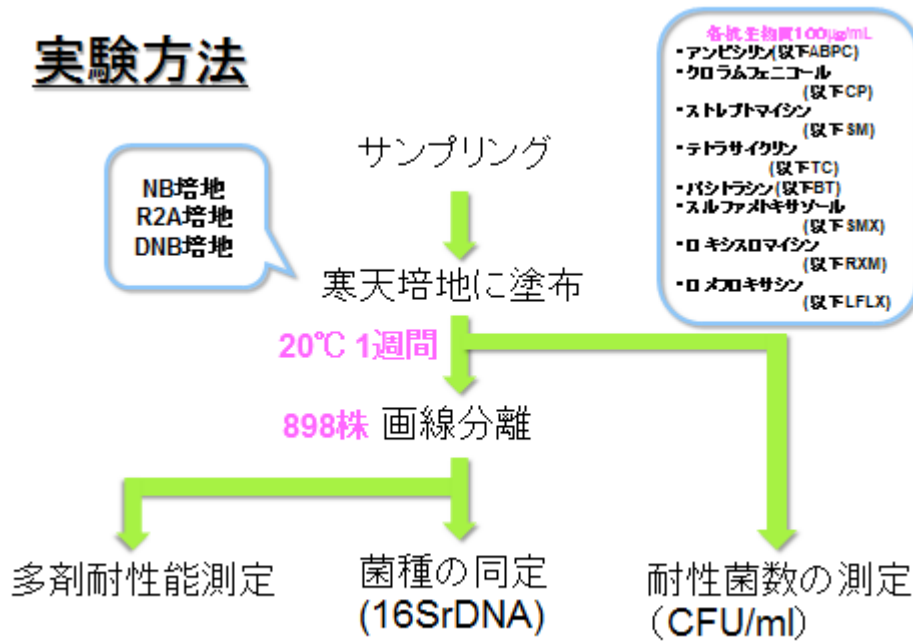


図 9 多摩川流域からの多剤耐性菌の分離方法

図 8 に多摩川流域における環境水及び底泥の採集を示す。

- ・ 2010年7月26日：多摩川上流域

- ・2011年5月20日：多摩川中流域
- ・2011年5月20日：多摩川下流域

において、環境水（表層水）及び底泥のサンプリング（採集）を行った。

採集サンプルは、ただちに冷蔵保存して、東京海洋大学の研究室へ輸送した。サンプルを研究室の冷蔵庫に保存した。

図9に示すように、サンプルはできる限り早期に各種の寒天平板培地に散布して、20℃で培養した。なお平板培地はNB, R2A, DNBの3種類を用いた。さらに各培地にはアンピシリン(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)、ロキシシロマイシン(RXM)、ロメフロキサシン(LFLX)の8種類の抗生物質を各々添加して、培養した。

20℃で1週間の培養により抗生物質添加平板培地上でコロニーを形成させた。コロニー数を計測して、各サンプル中の抗生物質耐性菌数を調べた。

さらに、各コロニーから単一菌種を単離して、抗生物質耐性菌を898株単離した。

各耐性菌株に関して、多剤耐性能と16S rDNA塩基配列解析により菌種同定を行った。

多剤耐性菌の分離株数

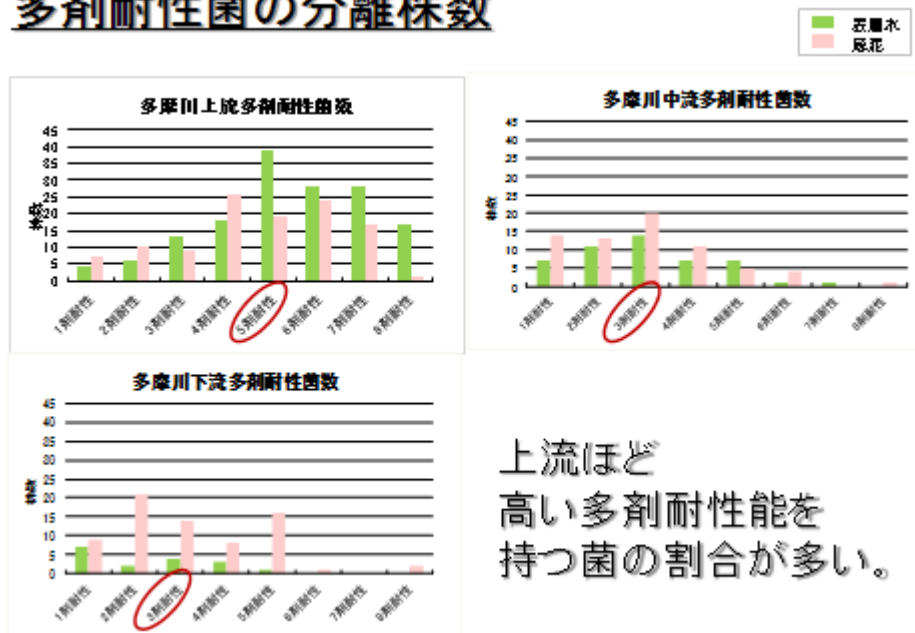


図10 多摩川における多剤耐性菌の単離株数

図10に多摩川流域における多剤耐性菌の単離株数を示す。単離株数全体が上流域において多かった。さらに、下流と中流では3剤耐性菌が多く、上流では5剤耐性菌が最も多かった。また、8剤耐性菌も上流で最も多く単離できた。

流域水中の再生水量は中流から下流から至るにつれて急激に増大するため、ヒトの生活圏の影響は中流から下流にかけて大きいと推定される。しかし、多剤耐性能が高い細菌が上流において最も多くなった現象は、非常に興味深い。詳しい原因は不明であるが、上流の水質汚染は見かけよりも進んでいる可能性が示唆された。例えば、上流域に存在する養殖場、家畜飼育場などの影響も考えられた。また、上流の環境水を煮沸せずに、そのまま飲料とすることは、多剤耐性菌を

飲みこむ結果となり、危険であることがわかった。

多剤耐性能ごとの菌相比較

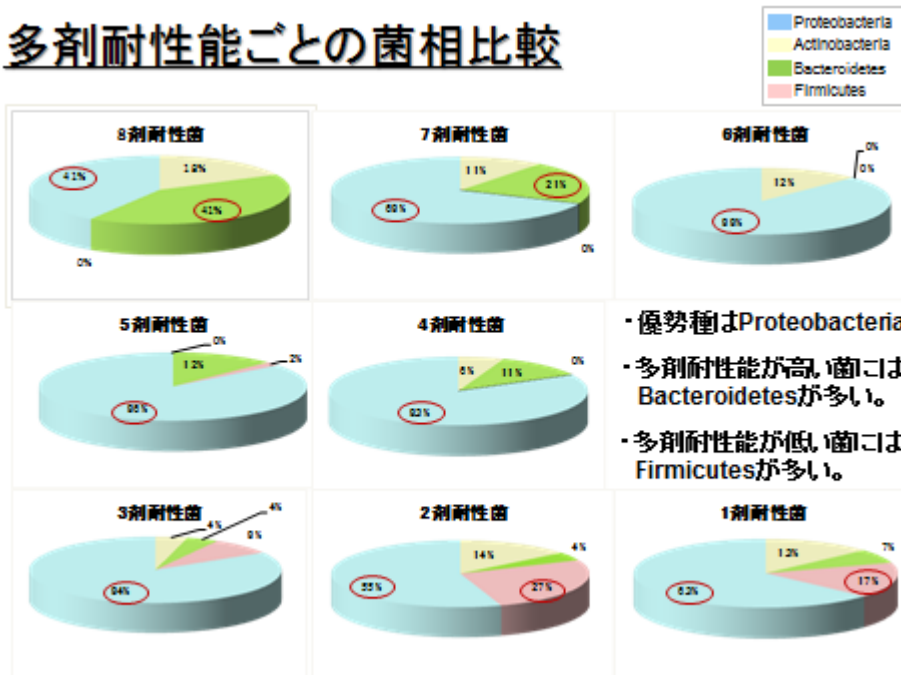


図 11 多摩川における多剤耐性菌の分類（門）

図 11 に多摩川から単離した多剤耐性菌の門別の分類を示す。1～8 剤耐性菌のいずれにおいても、Proteobacteria 門が最大多数を占めていた。また、多剤耐性能が高い細菌は Bacteroidetes 門が多く、8 剤耐性菌では全体の 42%にも及んだ。多剤耐性能が低い細菌には Firmicutes 門が多く、1～2 剤耐性菌では全体の 27～37%にも及んだ。

多摩川各地点における菌相の比較

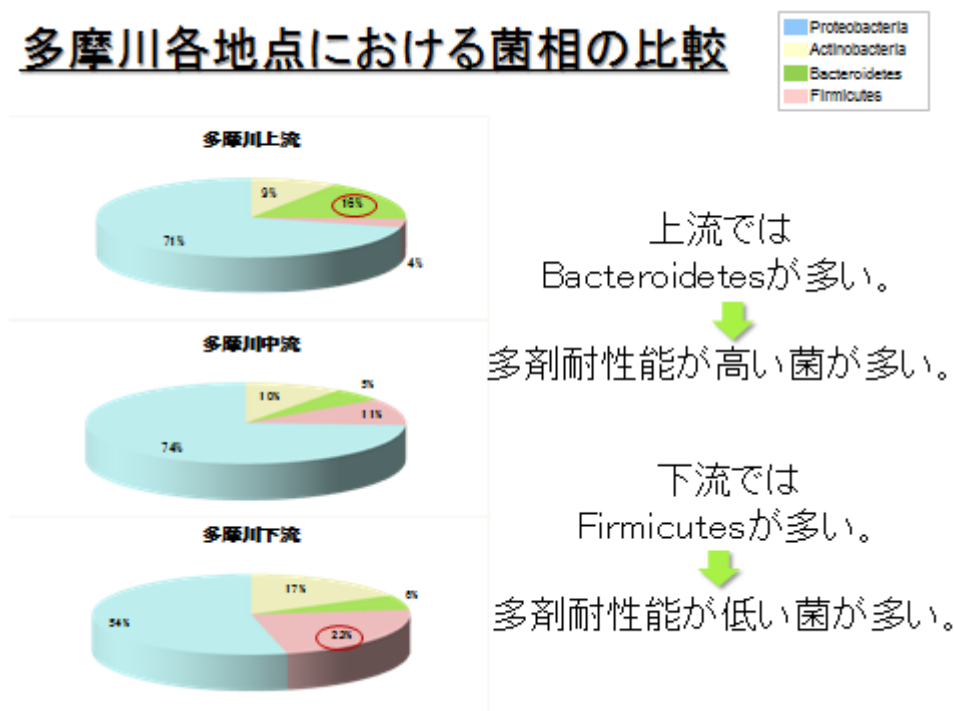


図 12 多摩川各流域から単離した多剤耐性菌の分類

図 12 に示すように、多摩川の各流域から単離した多剤耐性菌の分類を行った。いずれも流域でも、Proteobacteria が多かった。さらに、上流域では Bacteroidetes 門、下流域では Firmicutes 門が多かった。図 11 と図 12 を総合すると、上流域では多剤耐性能が高い菌が多く、それらは Bacteroidetes 細菌が多かった。一方、下流域では多剤耐性能が低い菌が多く、それらは Firmicutes 細菌が多かった。

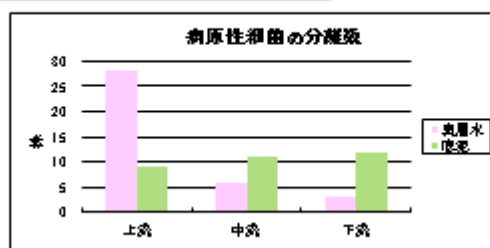
同定結果(一部)

上流(表層水)			上流(底泥)		
種名	株数	門	種名	株数	門
Microbacterium spp.	8	Actinobacteria	Aquamonas spp.	2	Proteobacteria
Sphingomonas spp.	28株	Proteobacteria	Exiguobacterium spp.	9株	Firmicutes
Pseudomonas spp.		Proteobacteria	Microbacterium spp.		Actinobacteria
Chryseobacterium spp.		Bacteroidetes	Pseudomonas spp.	5	Proteobacteria
Stenotrophomonas spp.	20	Proteobacteria	Aeromonas spp.	6	Proteobacteria
中流(表層水)			中流(底泥)		
種名	株数	門	種名	株数	門
Bacillus spp.	3	Firmicutes	Pandoraea spp.	5	Proteobacteria
Microbacterium spp.	6株	Actinobacteria	Pseudomonas spp.	11株	Proteobacteria
Mycobacterium spp.		Actinobacteria	Bosea spp.		Proteobacteria
Stenotrophomonas spp.		4	Proteobacteria	Bacillus spp.	7
Pseudomonas spp.	11	Proteobacteria	Aeromonas spp.	9	Proteobacteria
下流(表層水)			下流(底泥)		
種名	株数	門	種名	株数	門
Bacillus sp.	1	Firmicutes	Microbacterium spp.	4	Actinobacteria
Brevundimonas spp.	3株	Proteobacteria	Paenibacillus spp.	12株	Firmicutes
Erythrobacter spp.		Proteobacteria	Lysinibacillus spp.		Firmicutes
Erythromicrobium spp.		1	Proteobacteria	Bacillus spp.	1
Mycobacterium spp.	3	Actinobacteria	Pseudomonas spp.	19	Proteobacteria

病原性細菌が至るところで見つかった。

図 13 多摩川流域における細菌種の分類

病原性細菌の同定結果



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 hercynium</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>Enterobacter cloacae</i>	Proteobacteria	腸炎
<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

- 日和見感染菌が多数見つかった。
- 重篤な病原細菌は見つからなかった。

図 14 多摩川における多剤耐性菌の病原性

図 13 に多摩川各流域における多剤耐性菌の分類結果を示す。図 14 に多摩川のも剤耐性菌の病原性を示す。発見された病原性菌は肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、食中毒菌(*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*)、日和見感染菌(*Flavobacterium hercynium*, *Sterptomyces zaomyceticus*)、腸炎菌(*Enterobacter cloacae*)、敗血症菌(*Acinetobacter calcoacticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*)などであった。重篤な病原性菌こと発見されなかったが、いずれも経口内に侵入させることは、かなり危険であると考えられた。

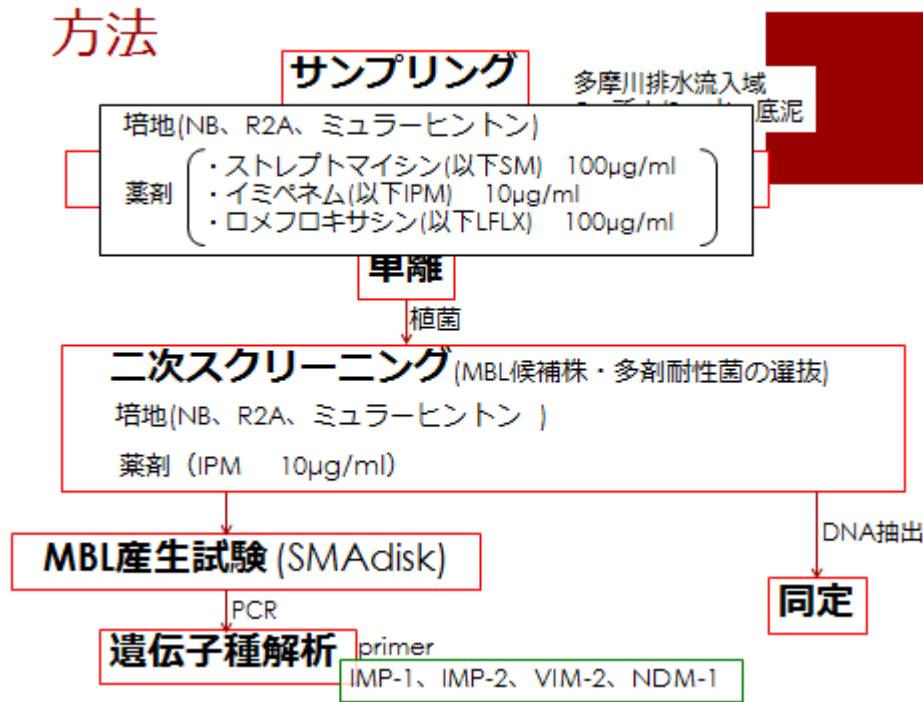


図 15 メタロβラクタマーゼ遺伝子の検出

インドのニューデリーを起源とする NDM-1 産生菌はほとんどの抗生物質が効かないため、世界中を震撼させた。インドでは、都市下水など日常生活と密接に関連する野外水圏で NDM-1 産生菌が発見されており、自然環境での広範囲の蔓延が推測されている。

日本ではインド帰りの患者から NDM-1 産生病原菌の院内感染が報告された。野外環境での発見報告例は無いが、むしろ調査自体が行われていなかった。私達はこの事態に危機感を持ち、多摩川における NDM-1 産生菌の生息調査を行った。

なお、NDM-1 遺伝子はメタロβラクタマーゼ(MBL)遺伝子群の 1 変異型と考えられる。MBL 遺伝子群は変異型が多数存在し、いずれも多剤耐性菌が R-プラスミド (染色体外 DNA) 上にその遺伝子を保持している。イミペノムを初めとする全てのβ-ラクタム系抗生物質を不活性化するとされ、かなり以前よりその危険性が叫ばれてきた。9, 10, 11) 今回の NDM-1 の発生は MBL 遺伝子群がさらに危険性の高い遺伝子として変異していると考えられる。

図 15 に示すように、本研究では日本国内にて検出頻度が高い MBL 遺伝子群 (IMP-1, IMP-2, VIM-2) に加えて、NDM-1 遺伝子の検出、さらに MBL 産生菌の単離を行った。

結果 -薬剤耐性菌単離株数-

一次スクリーニング

→ 抗生物質耐性菌 水 ; 134株
底泥 ; 140株

二次スクリーニング

→ 多剤耐性菌(MBL候補株) 水 ; 103株
底泥 ; 82株

多剤耐性菌185株 → 同定
→ MBL産生試験 → 遺伝子種解析

図 16 多剤耐性菌と MBL 産生菌の単離過程

結果 -MBL産生株-

細菌・16属26種

種名	相同性	種名	相同性
<i>Bosea thiooxidans</i>	99%	<i>Pedobacter terra</i>	99%
<i>Brevundimonas sp.</i>	100%	<i>Phenylbacterium koreense</i>	99%
<i>Caulobacter crescentus</i>	99%	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	98%
<i>Caulobacter vibrioides</i>	99%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%
<i>Chromobacterium aquaticum</i>	100%	<i>Pseudomonas grimontii</i>	98%
<i>Chromobacterium violaceum</i>	98%	<i>Pseudomonas putida</i>	99%
<i>Chryseobacterium cuticis</i>	98%	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99%	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	100%
<i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	99%	<i>Sphingomonas sp.</i>	100%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	99%	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	100%
<i>Microbacterium foliorum</i>	100%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98%
<i>Microbacterium oleivorans</i>	99%	<i>Sufflavibacter maritimus</i>	100%
<i>Microbacterium oxydans</i>	100%	<i>Xanthomonas retroflexus</i>	99%

図 17 MBL 産生菌の分類同定

図 16 に示すように、多摩川の表層水から 103 株、底泥から 82 株、合計 185 株の多剤耐性菌を単離した。それら 185 株に関して、MBL 産生能を検出したところ、45 株が MBL 産生菌であることがわかった。45 株に関して 16S rDNA 塩基配列解析により同定を行った結果を図 17 に示す。

MBL 産生菌は 16 属 26 種に分類することができた。これらの中に重篤な病原性菌は居なかったが、日和見菌は存在した。

結果-遺伝子種解析-

方法

- ・1回目
All mix primers (IMP-1、IMP-2、VIM-2、NDM-1)
MBL遺伝子スクリーニング
- ・2回目
Each primer (IMP-1、IMP-2、VIM-2、NDM-1)
MBL遺伝子検出

→ 45株中

IMP-1遺伝子2株検出

サンプル名	種名	相同性
ahw27	<i>Shingobacterium multivorum</i> *	98%
mhm2.26	<i>Brevibacterium</i> sp.	100%

*...ヒト日和見感染
43株は4 primer全てに陰性

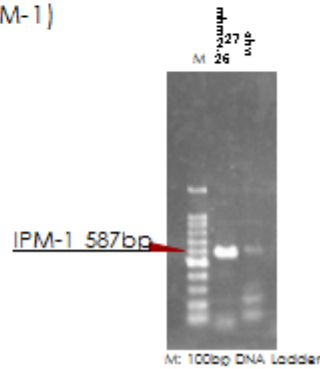


図 18 MBL 遺伝子の検出

MBL 産生菌に関して、日本国内で頻出の IMP-1, IMP-2, VIM-2 遺伝子のプライマー、さらに NDM-1 遺伝子のプライマーを用いて、MBL 遺伝子の検出を行った。図 18 に示すように、2 株細菌に IMP-1 遺伝子が検出された。

MBL 遺伝子は 40 種類以上の変異を持つため、検定した 4 種類以外の遺伝子の可能性が示唆された。これらには日本ではほとんど発見されていない遺伝子を含んでいる。従って、NDM-1 以外でも、こうした MBL 遺伝子を持つ病原性細菌がヒトに感染すれば、抗生物質治療が効力を発揮しない可能性が推測できる。

以上の結果から、多摩川では MBL 遺伝子の蔓延度に関して、今後も継続的なモニタリングが必要と考えられる。

総括

- ・多摩川表層では、上流から下流に行くにつれて生菌数が増加した。
- ・多摩川では多剤耐性能が高い菌に**Bacteroidetes**、多剤耐性能が低い菌に**Firmicutes**が多かった。
- ・多摩川上流では病原性細菌が数多く検出されたが、重篤な病原性細菌は検出されなかった。

総括

- 多剤耐性菌の中に病原菌を検出

しかし、特別危険な病原菌は未検出

- 培養法によるMBL産生菌が**45株**(日和見感染菌複数体)
- MBL遺伝子検出 **IPM-1 2株**

サンプル名	種名	相同性
ghw27	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	98%
mhm2.28	<i>Brevundimonas</i> sp.	100%

- 全てに陰性43株 → 他のMBL遺伝子の存在が示唆

→ 日本の野外環境からMBL産生菌遺伝子**初**検出
今後もモニタリングが必要である

文献

1. 村田ら、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、日本環境化学会(2006).
2. A. B. Sturtevant et al., Incidence of infections drug resistance among fecal colineforms isolated from raw sewage, Appl. Microbiol., 21, 487-491(1971).
3. J. B. Bell et al., Incidence of R factors in colineform, fecal colineform, *Salmonella* populations of the red river in Canada, Appl. Environ. Microbiol., 40, 486-491(1980).
4. J. B. Bell et al., R factors in colineform-fecal colineform sewage flora of the prairies and

- northwest territories of Canada, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 204-210(1981).
5. J. B. Bell et al., Influence of sewage treatment and utilization and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 227-232(1983).
 6. M. V. Walter et al., Occurrence of multiple-antibiotics-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 930-933(1985).
 7. M. Arvanitidou et al., Transferable antibiotics resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters, *Wat. Res.*, 5, 1112-1116(1997).
 8. T. Iwabe, T. Urase, and K. Yamamoto, Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water, *Wat. Sci. Tech.*, 43, 91-99(2001).
 9. H. Ito, Y. Arakawa, et al., Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene (*bla* IMP) among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 824-829(1997).
 10. 荒川宣親、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*, 12, 37-45(1996).
 11. D. M. Livermore, β -lactamase in laboratory and clinical resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 557-584(1995).

病原性菌を含むスーパー多剤耐性菌の多摩川における存在調査

(研究助成・学術研究VOL. 42—NO. 304)

著 者 浦野 直人

発行日 2013年12月1日

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>