

病原微生物リスクから市民の健康を守る下水道

諏訪 守* 岡本誠一郎** 内田 勉***

1. はじめに

下水道の大きな役割の1つに、安全で健康な暮らしを支えるための衛生環境の確保、水系感染症や化学物質によるリスク除去が挙げられる。具体的には都市活動によって排出された汚水を収集、浄化、放流することで公共用水域の水質向上に寄与している。汚水にはヒトから排出されるふん便が含まれることから、大腸菌群を含む様々な病原微生物が存在する。

一方、院内感染を主とする抗生物質耐性菌による感染事例についての報告も多く見受けられるようになった。複数の抗生物質に耐性を有する多剤耐性菌の発生は、抗生物質の消費量が多いとされる我が国にとっても大きな問題となる。ヒトに投与された抗生物質や耐性菌保持者から排出されると考えられる抗生物質耐性菌などは、下水処理場などを経て最終的には公共用水域へ放流される。これら抗生物質耐性菌については、下水・環境水中の存在実態を含めその消長に関し調査研究例は少ない。

本報では、対象菌種として大腸菌を選定し、下水処理過程での微生物混在系における多剤耐性大腸菌の消長を把握することを目的に、耐性遺伝子の存在や抗生物質耐性大腸菌の下水処理水中での実態を明らかにするとともに、下水処理場で多用されている塩素消毒の有効性について考察した。

2. 研究方法

2.1 下水や下水処理水における多剤耐性大腸菌の存在割合

微生物混在系における多剤耐性大腸菌株（2剤以上の抗生物質に耐性）の存在割合の調査を関東圏内にあるA、B、C下水処理場において行った。処理区域は全て異なっており、A、B処理場は家庭排水、C処理場は病院排水の負荷が主である。これらの処理場における流入下水、二次処理水（塩素消毒前）の抗生物質耐性大腸菌の割合を各々比較することで評価を行った。抗生物質への耐性を評価するための

感受性試験*では、アンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、レボフロキサシン(LVFX)、セフジニル(CFDN)、カナマイシン(KM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)、ゲンタマイシン(GM)、イミペネム(IPM)の8種類の抗生物質を対象とした。これらの抗生物質の選定理由は、我が国における出荷量・額および尿排泄率から推定した体外排出量などの報告例¹⁾から下水道への排出量が多いと考えられること、および、過去の調査・研究事例での報告があり、腸内細菌科の大腸菌に対して抗菌作用を有することである。抗生物質耐性大腸菌の選択に用いる抗生物質含有ディスクはKBディスク(栄研化学)を利用し、感受性試験の判定基準などはKBディスクの手引きを参照した²⁾。

さらに、“切り札”と称される抗生物質に耐性を有するスーパー耐性菌の存在も近年において大きな社会問題となっていることから、病院排水の負荷が主であるC処理場へ排出されていた流入下水について改めて調査を行った。

2.2 抗生物質耐性大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性

大腸菌を含めたグラム陰性桿菌では、ABPCなどの耐性遺伝子のほとんどがRプラスミド*上にあるとされることから³⁾、多剤耐性大腸菌の消長には、Rプラスミドによる耐性遺伝子の伝達が大きな一因であると推定される。このため、耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的に、上記2.1で検出された大腸菌を対象に、耐性遺伝子の定性分析を行った。

分析では、大腸菌株を400 μ Lの遺伝子分解酵素を除去した水に懸濁させ100 $^{\circ}$ C、15分間煮沸することで遺伝子の抽出を行った。4 $^{\circ}$ C、3分間冷却させた後13,000rpm・5分間遠心処理し、その上澄液中の耐性遺伝子を検出した。検出のためのプライマーやプローブは既存の報告例^{4), 5), 6), 7)}を各々参照するとともに、遺伝子検出のためのリアルタイムPCR装置(DNAの特定の領域を増幅させ、その過程をリアルタイムでモニタリングする装置)はLightCycler(ロシェ・ダ・イグノスティックス社)を使用した。

2.3 抗生物質耐性大腸菌の下水処理水中での消長把握

環境水中に放出された抗生物質耐性大腸菌の存在

Sewerages for the citizen's healthy protection from pathogenic risk.

*土木用語解説：感受性試験、Rプラスミド

状況については、環境条件や細菌が保有する耐性遺伝子などの有無により、その消長に影響を及ぼしている可能性が推測される。このため、その消長に及ぼす影響の把握を目的に、抗生物質に対する感受性が異なる大腸菌を利用し、下水処理水中での耐性能力の変化を室内実験により把握した。

実験には上記2.1の感受性試験から検出された大腸菌株を利用した。8種類の抗生物質に対して耐性の無い株、ABPC耐性株、またABPCを含め3剤の抗生物質に耐性を示した多剤耐性株である。0.22 μmのフィルターでろ過を行った二次処理水中に各々の大腸菌株を添加、20℃の恒温室内に放置し1、7日間後に採水した試料中の大腸菌株の感受性試験結果を基に、抗生物質の耐性能力の変化について把握した。

2.4 抗生物質耐性大腸菌の塩素消毒耐性

本節では、抗生物質耐性大腸菌の消毒耐性の評価を目的に、下水処理場において採用例の多い塩素消毒による不活化効果を明らかにした。塩素消毒実験では、感受性試験などから得られた0～6剤の抗生物質に耐性を示した大腸菌株を利用した。利用した大腸菌株には、抗生物質感受性試験での精度管理用の大腸菌株ATCC25922、35218株（純粋株）も含め、各々の塩素消毒耐性を明らかにすることで、下水処理場における対応の可能性を評価した。各大腸菌株の塩素消毒耐性の比較を行うことから消毒条件の統一を図るため、各大腸菌株を培養増殖させ一定量とした後、遠心分離を行い上澄液を除去し沈渣として回収した菌株を生理食塩水に懸濁させ塩素消毒実験に供した。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は0～0.35mg/L、接触時間を15分間とした。

3. 研究結果

3.1 下水や下水処理水における多剤耐性大腸菌の存在割合

下水や下水処理水における多剤耐性大腸菌株の割合の変化について図-1に示す。処理場毎に耐性菌に占める多剤耐性株の割合は若干異なるが、A、B、C処理場とも流入下水に比較して処理水の多剤耐性株の割合が上昇していた。特に、C処理場の処理水については、耐性菌に占める多剤耐性株の割合は60%以上であり、病院系排水を処理する処理場は、多剤耐性株の生成に大きな影響を及ぼす可能性があると考えられた。活性汚泥処理による大腸菌の平均

除去率は99.5～99.9%であったが、抗生物質耐性大腸菌に占める多剤耐性大腸菌の割合は上昇することから、その要因の1つには微生物混在系における耐性遺伝子による耐性能力の伝播が推定された。

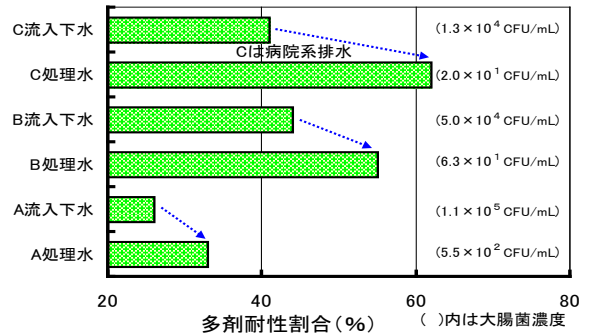


図-1 多剤耐性大腸菌割合の変化

さらに、スーパー耐性菌を含めた多剤耐性菌の実態把握を目的に、C処理場へ排出されていた病院排水を対象に、その存在状況について改めて評価を行った。特に、下水処理場へスーパー耐性菌の流入がある場合には、微生物混在系としての活性汚泥中において、ニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ1 (NDM-1：カルバペネムを含む広域β-ラクタム薬を分解する酵素) に代表される耐性遺伝子の伝播により他の細菌に対し多剤耐性能力を付与することが危惧される。海外においてNDM-1の遺伝子を保持した細菌の実態について、水道を含む環境水での検出事例⁸⁾があるためである。評価結果を図-2に示すが、ABPCやTCに耐性を示す株が多くを占めていた。ABPC、TCは発売されてから長期間使用されており⁹⁾、時間の経過が耐性株の増加に繋がったと考えられる。現状において比較的販売量が多いとされるLVFXに関しては¹⁾、上記2つの抗生物質に比較して耐性株の割合は高くないため、抗生物質販売量と耐性株の存在実態との関係はないようである。カルバペネム系の代表的な抗生物質の1つであるIPMに対しては、耐性を示した大腸菌株は検出されなかった。大腸菌などの腸内細菌科でカルバペネム系の抗生物質に耐性を示す株が分離された場合には、NDM-1産生の可能性を考慮する必要があるとされているが⁹⁾、今回の実態調査では検出されなかったため、現状においてはスーパー耐性菌と称される細菌の存在レベルは未だ低いと推定された。しかしながら限られたデータであることから、今後、他の下水や環境水などを含め調査対象を拡げ実態把握を行う必要がある。

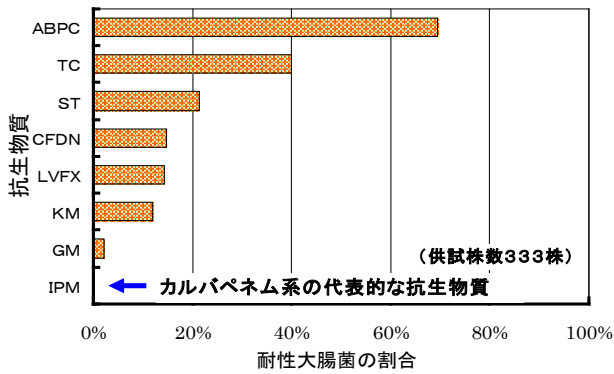


図-2 各抗生物質に対する耐性大腸菌株の割合

3.2 抗生物質耐性大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性

下水試料から採取した大腸菌株は上記8種類の抗生物質に対する耐性の有無に関わらず、全ての株でプラスミド性の耐性遺伝子 (bla TEMなど)、また染色体上の耐性遺伝子 (Amp C) が検出された。ABPCはβ-ラクタム系抗菌薬の一種であるため、βラクタマーゼ (β-ラクタム系抗菌薬(ABPCを含む)を加水分解する酵素) 関連の耐性遺伝子 (表-1) が検出されることは、ABPCに対して耐性を示す大腸菌が下水試料に多く存在していることを裏付

表-1 耐性遺伝子の保有状況

| | 流入下水 0剤耐性 | 流入下水 4剤耐性 | 二次処 1剤耐性 | 二次処 4剤耐性 | 二次処 6剤耐性 |
|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| bla SHV | - | - | - | - | - |
| bla TEM | + | + | + | + | + |
| bla CTX | - | - | - | - | + |
| bla CMY | + | - | - | - | - |
| Amp C | + | + | + | + | + |

陽性+ 陰性-

けた結果となった。また、8種類の抗生物質を対象とした感受性試験で耐性を示さなかった大腸菌株でも耐性遺伝子を保有していることから、これらの株は8種類以外の他の抗生物質に対して耐性を示す可能性があるものと考えられた。今回、耐性遺伝子の定性に供した大腸菌株は限られたものではあるが、全ての株で耐性遺伝子を保有していたことから、水環境中での抗生物質耐性菌の汚染やその拡大を防止するには、各種排水処理施設において適切な消毒の実施を図る必要があるものと考えられた。

3.3 抗生物質耐性大腸菌の下水処理水中での消長把握

下水処理水中における各種耐性大腸菌株の耐性能力の変化について表-2に示す。8種類の抗生物質に対する感受性試験結果から得られた各種耐性大腸菌株として、無耐性株は4株 (16~18コロニー)、ABPC耐性株は3株 (12~15コロニー)、3剤耐性株は2株 (6~7コロニー)、を用いて各々評価を行っ

た。8種類の抗生物質に対して耐性を示さない無耐性株については、その耐性能力に変化はなかった。しかし、ABPCのみに耐性を示した株では、二次処理水に添加してから1、7日後とも耐性を示さなくなった。これに対し、ABPC、TC、STあるいは、ABPC、TC、KMの3剤に耐性を示した多剤耐性大腸菌株は1、7日後とも耐性を維持しており、多剤耐性株であるか否かの違いにより抗生物質に対する耐性能力に変化が見られた。

表-2 各種耐性大腸菌株の感受性の変化

| | | 感受性試験結果 | 1日目 | 7日目 |
|---------|-------|--------------|-------|-------|
| 無耐性株 | No. 1 | - | (0/5) | (0/5) |
| | No. 2 | - | (0/3) | (0/5) |
| | No. 3 | - | (0/5) | (0/3) |
| | No. 4 | - | (0/5) | (0/3) |
| ABPC耐性株 | No. 1 | ABPC耐性 | (0/5) | (0/5) |
| | No. 2 | ABPC耐性 | (0/5) | (0/4) |
| | No. 3 | ABPC耐性 | (0/5) | (0/3) |
| 3剤耐性株 | No. 1 | ABPC、TC、ST耐性 | (2/2) | (4/4) |
| | No. 2 | ABPC、TC、KM耐性 | (4/4) | (3/3) |

() 内上段：耐性コロニー数、下段：供試コロニー数

3.4 抗生物質耐性大腸菌の塩素消毒耐性

塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌株の不活化結果について図-3に示す。下水試料から採取した大腸菌株と抗生物質感受性試験の精度管理に利用している大腸菌株 (純粋株) を用いた結果である。図-3はCt値 (次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度と接触時間の積) と各大腸菌株の生残率の関係から回帰式を求め、99.9%不活化のために必要なCt値を算出したものである。99.9%不活化のためのCt値は0剤耐性株では4.0、5.2mg・min/L、6剤耐性株では5.7mg・min/L必要であり、6剤耐性株は0剤耐性株に比較して若干ではあるが塩素消毒耐性が大きい傾向が見られた。0剤耐性株 (純粋株と下水試料中の大腸菌株) を基準とすると、6剤耐性株を99.9%不活化させるために必要なCt値は1.1~1.4倍量が必要であると見込まれた。

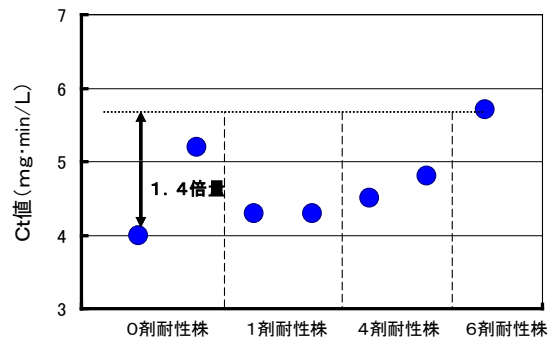


図-3 塩素消毒により99.9%不活化のためのCt値

この値は、塩素の添加濃度や接触時間を若干量増加させることで、下水処理場において対応が可能なレベルであることから、塩素消毒によるCt値を高めることで二次処理水中の多剤耐性大腸菌株を不活化させられることが示された。

4. おわりに

以上の結果から、流入下水中には抗生物質耐性大腸菌が存在し、活性汚泥処理により菌数の大幅な減少は見込まれるが、抗生物質耐性大腸菌に占める多剤耐性大腸菌の割合は増加するものの、適切な塩素消毒の実施により、それらを不活化させられると考えられた。言い換えれば、下水処理場における適切な運転管理の実施により、公共用水域への抗生物質耐性菌の流出を大幅に抑えることができる。

一方、腸内細菌科の大腸菌でカルバペネム系の抗生物質であるIPMに耐性を示す株は、現状においては不検出であったが、抗生物質の利用量が多いとされる我が国にとっても今後大きな問題となり得る。 β ラクタマーゼ関連の耐性遺伝子が検出され、活性汚泥処理による多剤耐性大腸菌の割合が上昇することから、NDM-1に代表される耐性遺伝子の微生物混在系における抗生物質耐性能力の伝播などが危惧される。

このため、下水処理場を含めた各種排水処理施設や環境水中について調査対象を拡げ、継続した調査・監視が重要である。また、抗生物質耐性菌や病原微生物による感染症の流行状況の把握を行う上で、下水処理場は必要不可欠である重要な社会資本の1つである。

参考文献

- 1) 八十島誠ら：下水処理水中に含まれるレボフロキサシン、クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響、水環境学会誌、(27)11、pp.707~714、2004.
- 2) 細菌感受性試験用、KBディスク‘栄研’手引き.
- 3) 橋本一、井上松久編：病原菌の薬剤耐性—機構の解明とその対策—、学会出版センター、1993.
- 4) Y.Messai, T.Benhassine, M.Naim, G.Paul and R.bakour (2006)Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* Clinical isolates from a hospital in Algiers, *Rev Esp Quimioterap*, 19(2),144-151.
- 5) S.Corvec, N.Caroff, E.Espaze, J.Marraillac, H.Druegeon, A.Reynaud (2003) Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains, *FEMS Microbiology Letters*, 228, 187-191.
- 6) C.RANDEGGER, H.HACHLER (2001) Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 1730-1736.
- 7) S.zhao, et al. (2003) Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 5366-5371.
- 8) T.R.Walsh, J.Weeks, D.M. Livermore and M.A. Toleman (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study, *Lancet Infect Dis.*, 11, 355-362.
- 9) 日本感染症学会、多剤耐性菌情報-NDM-1およびNDM-1産生菌の特徴、<http://www.kansensho.or.jp/mrsa/100908ndm-2.html>.

諏訪 守*



独立行政法人土木研究所つくば中央研究所材料資源研究グループリサイクルチーム 主任研究員、博士(工学)
Dr. Mamoru SUWA

岡本誠一郎**



京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター特定准教授(前 独立行政法人土木研究所つくば中央研究所材料資源研究グループリサイクルチーム上席研究員)、博士(工学)
Dr. Seiichiro OKAMOTO

内田 勉***



独立行政法人土木研究所つくば中央研究所材料資源研究グループリサイクルチーム 上席研究員
Tsutomu UCHIDA