

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010-2012

課題番号：22590552

研究課題名（和文）

利根川河川水と底泥中の薬剤耐性病原微生物の研究－災害時の感染症対策として－

研究課題名（英文）

The study of drug-resistant bacteria in the Tone River

研究代表者

藤谷 登 (FUJITANI NOBORU)

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号：30128673

研究成果の概要（和文）：利根川河川水から検出された腸内細菌科314株の各抗菌薬に対する耐性率は次の通りとなった：アンピシリン45.2%、セファロチン51.6%、セフトキシム12.1%、セフトジジム5.4%、イミペネム6.4%、ゲンタマイシン1.9%、アミカシン1.6%、クロラムフェニコール10.8%、テトラサイクリン4.5%、シプロフロキサシン1.3%。βラクタム系抗菌薬への耐性率が高い傾向がみられた。薬剤耐性には地域差があり都市部では耐性が獲得されている抗菌薬の種類が増える傾向にあった。

研究成果の概要（英文）：In our results, the rate of prevalence of drug-resistant strains was as follows: ampicillin, 45.2%; cephalothin, 51.6%; cefotaxime, 12.1%; ceftazidime, 5.4%; imipenem, 6.4%; gentamicin, 1.9%; amikacin, 1.6%; chloramphenicol, 10.8%; tetracycline, 4.5%; ciprofloxacin, 1.3%. There was a local difference in drug resistance, and the variation of resistant bacteria tended to increase in an urban area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	700,000	210,000	910,000
平成23年度	600,000	180,000	780,000
平成24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境微生物、災害医療

1. 研究開始当初の背景

本研究の着想に至った背景には以下の点が挙げられる。

①内閣府防災白書（平成18、19年版）において、今後大雨の頻度や熱帯低気圧の強度が

増すことが予測されている。また中央防災会議の試算では利根川が決壊した場合、広範囲に及ぶ被害が生じるとの試算がなされている。

②災害時には衛生状態の悪化や外傷等によ

る感染症の発生が予想され、その治療には環境中の耐性菌の存在を無視できない。その例として、スマトラ沖地震による津波の際、現地の環境水中に治療に用いられた抗菌薬に対する耐性菌が存在したことが報告されている。

③日本においても河川等の水環境中からの薬剤耐性菌の検出に関する報告が散見される。

以上のことから、水害時の感染症に対する危機管理として、利根川における薬剤耐性菌の分布と耐性傾向について調査を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

利根川における薬剤耐性菌の分布と薬剤耐性の傾向について知見を得ることを目的として調査研究を行った。対象とした細菌は、大腸菌等の水質汚染指標となる細菌を含む腸内細菌科とした。

3. 研究の方法

①河川水の採取

利根川の上流域から河口域までの5地点 (A:群馬県みなかみ町、B:埼玉県本庄市、C:埼玉県坂東市、D:千葉県佐原市、E:千葉県銚子市) を定め毎年5~8月に採水を実施した (図1)。また、E地点では河川水中の細菌数増減に影響する環境因子を探るため、2010年3~12月に定点調査を実施した。



図1 河川水サンプリング地点

②腸内細菌科の培養

分離培養にはデオキシコレート寒天培地を使用した。河川水をデオキシコレート寒天

培地に塗布し37°Cで24時間好気培養後、暗赤色コロニーを形成する細菌に対してグラム染色とオキシダーゼ試験を行った。グラム陰性桿菌かつ、オキシダーゼ陰性を示す細菌を選択し、これらに対して16SrDNA配列解析を行い腸内細菌科であることを確認した。

③薬剤感受性試験

CLSI M100-S20-U (2010) に基づき寒天平板希釈法で薬剤感受性試験を行った。抗菌薬は、アンピシリン (ABPC)、セファロチン (CET)、セフトキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ)、イミペネム (IPM)、ゲンタマイシン (GM)、アミカシン (AMK)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、シプロフロキサシン (CPFX) の計10種類を用いた。薬剤感受性試験の判定に用いた抗菌薬濃度は表1の通りである。

表1 抗菌薬の判定基準濃度

抗菌薬 略称	MIC Interpretive Susceptible ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	[S]	[I]	[R]
ABPC	≤ 8	16	≥ 32
CET	≤ 8	16	≥ 32
CTX	≤ 1	2	≥ 4
CAZ	≤ 4	8	≥ 16
IPM	≤ 1	2	≥ 4
GM	≤ 4	8	≥ 16
AMK	≤ 16	32	≥ 64
CP	≤ 8	16	≥ 32
TC	≤ 4	8	≥ 16
CPFX	≤ 1	2	≥ 4

CLSI M100-S20-U (2010) より

4. 研究成果

①利根川における腸内細菌科の分布

2010~2012年の調査で腸内細菌科細菌の検出数が多い傾向にあった場所は、B、C地点であった (表2)。同じ採水地点であっても調査時期により細菌数には変動がみられた。16SrDNA配列解析による属推定の結果、*Enterobacter* 属が全体の39%を占め、続いて *Klebsiella* 属が14%となった (図2)。

表2 腸内細菌科細菌の検出数

地点	腸内細菌科 検出数 中央値 (範囲)
A	8 (1-11)
B	38 (0-80)
C	22 (4-60)
D	4 (0-17)
E	0 (0-15)

単位 : cfu/0.2ml

■ Enterobacter sp. ■ Klebsiella sp. ■ Pantoea sp.
 ■ Citrobacter sp. ■ Serratia sp. ■ Escherichia sp.
 ■ Raoultella sp. ■ Buttiauxella sp. ■ others

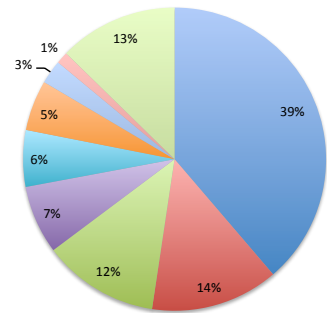


図2 検出された腸内細菌科の属

2010年3～12月にE地点にて約100回の定期的な採水を実施し、細菌数と気温、降水量、水温、河川水 pH 等との相関分析を行った。その結果、細菌数は河川水 pH と有意な負の相関 ($r = -0.399, p < 0.01$)、採水1～3日前の降水量と有意な正の相関 (採水2日前の銚子降水量との相関; $r = 0.213, p < 0.05$) がみられた。また河川水 pH は降水量と有意な負の相関 (採水2日前の銚子降水量との相関; $r = -0.289, p < 0.01$) がみられた。降雨は河川水 pH を低下させることが知られている。今回の調査にてE地点で観測された pH は7.2～9.1であった。そのうち、利根川流域において降雨が数日間観測されていない場合の pH は8.4～9.1であり、降雨により pH 7付近まで低下する傾向がみられた。腸内細菌科の生育至適 pH は中性付近であることから、降雨による pH 低下が細菌の生育を促している可能性もある。また降雨により土壌等から河川への細菌流入が生じた可能性もある。以上のことから、利根川河口域における細菌数変動の一因として降雨の影響が考えられた。図3にはE地点細菌数と銚子地域の降水量 (気象庁発表値) についてのグラフを示した。

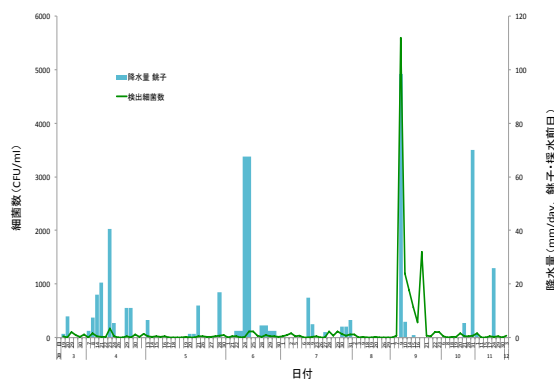


図3 細菌数と降水量 (E地点, 2010年)

②腸内細菌科の薬剤耐性傾向

2011、2012年にA～E地点で計4回の調査を行った。採取した河川水から検出された腸内細菌科314株の抗菌薬に対する耐性率は、ABPC 45.2%、CET 51.6%、CTX 12.1%、CAZ 5.4%、IPM 6.4%、GM 1.9%、AMK 1.6%、CP 10.8%、TC 4.5%、CPFX 1.3%となり、βラクタム系抗菌薬への耐性率が高い傾向がみられた。複数剤耐性菌は全体の42%で、そのうち2剤耐性菌が26%、3剤耐性菌が8%となり、最大で8剤耐性菌までみられた。複数剤耐性菌のうち約80%はABPCおよびCET耐性を示した。この要因としてEnterobacter属やCitrobacter属等は染色体上にAmpC βラクタマーゼ遺伝子を保有し、ペニシリン系や第1世代セフェム系抗菌薬に自然耐性を示すことが知られており、今回検出された株の約40%がEnterobacter属であったことが耐性率に影響していると考えられる。薬剤耐性には地域差があり、A地点から検出された細菌はABPCとCET以外の耐性はみられなかった。一方、これより下流の地域から検出された細菌では様々な抗菌薬への耐性がみられた。A地点は今回調査した5地点のうち最も上流に位置し、周辺人口が最も少ない地点である。このことから、薬剤耐性の地域差には流域の人口が関連している可能性が考えられる。今回検出された腸内細菌科細菌は、土壌や哺乳類の腸内など環境中に広く分布しているものであり通常病原性は示さないものであった。しかしながら、耐性菌の環境中への拡散は耐性遺伝子の環境中への拡散と蓄積に繋がる可能性があるため注意が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

①小濱 剛、畑 明寿、三村 邦裕、藤谷 登
利根川河口域における水質と細菌数
千葉科学大学紀要 vol.6, 2012, p7-11
査読有り

〔学会発表〕(計5件)

①関根 香桜里、棚成 知佳、小玉 菜々子、山宮 夢子、畑 明寿、三村 邦裕、藤谷 登
利根川水中の腸内細菌に有効な抗菌剤の検索
第47回関東甲信越地区医学検査学会
2010年11月27日 埼玉県

②小玉 菜々子、関根 香桜里、畑 明寿、三

村 邦裕、藤谷 登
利根川から検出される腸内細菌数に影響する環境要因の研究
第 18 回日本健康体力栄養学会大会
2011 年 3 月 12 日 東京都

③ 畑 明寿、関根 香桜里、小玉 菜々子、藤谷 登
利根川水中から検出された腸内細菌の薬剤耐性
第 81 回日本衛生学会学術総会
2011 年 3 月 25-28 日 東京都

④ 畑 明寿、関根 香桜里、小玉 菜々子、藤谷 登
利根川水中から検出された腸内細菌の薬剤耐性
第 23 回微生物シンポジウム
2011 年 9 月 2-3 日 千葉県

⑤ 畑 明寿、小濱 剛、藤谷 登
利根川河口域における水質と微生物について
第 83 回日本衛生学会学術総会
2013 年 3 月 24-26 日 石川県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷 登 (FUJITANI NOBORU)
千葉科学大学・危機管理学部・教授
研究者番号：30128673

(2) 研究分担者

畑 明寿 (HATA AKIHISA)
千葉科学大学・危機管理学部・助教
研究者番号：10433690