

## 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 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590684

研究課題名（和文） 河川等に排出される抗生剤濃度と薬剤耐性菌に関する研究

研究課題名（英文） Study on discharged antimicrobials into aquatic environment and presence of antimicrobial-resistant organisms

研究代表者

奥村 順子 (OKUMURA JUNKO)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：40323604

研究成果の概要（和文）：

結果から次の四点が明らかになった。第一に、我々の環境はすでに抗生剤に汚染されており、その濃度は LC-MS/MS による検出限界未満である。第二に、これらの薬剤が水再処理施設において適切に排除されていない可能性がある。第三に、環境水中のグラム陰性桿菌は、LC-MS/MS 検出限界未満の濃度の抗生剤に対しても耐性を獲得する。第四に、環境水中の細菌の多くはキノロン系およびカルバペネム系薬剤にも耐性を獲得しており、これらの MDROs はヒトの健康を脅かす状況にある。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed the following four points. Firstly, the environment where we live has been polluted with antimicrobials and the concentrations were less than detection limit by LC-MS/MS. Secondly, there was possibility that antimicrobials could not appropriately removed at water-treatment plants. Thirdly, the isolated gram-negative bacilli showed resistance to antimicrobials whose concentrations were undetectable by LC-MS/MS. Fourthly, quite a few bacilli were not sensitive to Quinolones and Carbapenems, and these MDROs might threaten human health.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード： 薬剤耐性, 抗生剤, 環境水

## 1. 研究開始当初の背景

2004年12月26日に発生したインド洋大津波による最大の被災地であるバンダ・アチェ（インドネシア）において、津波による受傷者の創部感染治療を目的として抗生剤が使用された。筆者も医療チームの一員としてこの活動にかかわり、感染部位の度重なる debridement にも関わらず、抗生剤の効果が得られない多数のケースに遭遇した。

上記の原因が津波の水に含まれていた細菌の種類とそれらの薬剤耐性レベルに起因するのではないかと仮説を立て、2006年7月から8月末にかけて、被災地の海、河川、下水路、井戸、湖沼などの49箇所から水を採取し、細菌の分離・同定ならびに薬剤感受性試験（15薬剤）を実施した。その結果、73株の細菌を分離した。その主なものは、*Aeromonas spp.* (24株), *Vibrio spp.* (16株), *Klebsiella spp.* (15株), *Escherichia coli* (7株), *Proteus spp.* (6株)であった。これらのほとんどが Ciprofloxacin と Gentamicin 以外の薬剤には感受性を示さなかった [1]。

バンダ・アチェは政治的理由から、インドネシアの中でも抗生剤などの医薬品不足が長年懸案となっていた地域であり、抗生剤の乱用により各種抗生剤に対する薬剤耐性が発現したとは考え難い。また、魚類等の養殖池や家畜飼育施設もバンダ・アチェ周辺部にはなく、その影響は排除される。

日本では、河川等での事故による外傷や洪水時に受傷した患者の empirical therapy において、*Aeromonas spp.* が起因菌の一つとして考慮されることはほとんどない。*Aeromonas spp.* を起因菌とする創部感染は、*S. aureus* によるものと症状による区別が付きにくく、 $\beta$ -ラクタム系ペニシリンに耐性のものが多いため治療が困難であることから、日本における empirical therapy の起因菌の一つに加えるべきか否かを検討することは重要な意味を持つと考えられる。

## 【参考文献】

- [1] Okumura J, Kai T, Zinatul H, Fadrial K, Kimura K, Yamamoto Y. Antimicrobial therapy for water-associated wound infections in a disaster setting: Gram-negative bacilli in an aquatic environment and lessons from Banda Aceh. *Prehospital and Disaster Medicine*. (in Press, Received in May, 2008 and Accepted August, 2008), 2008.

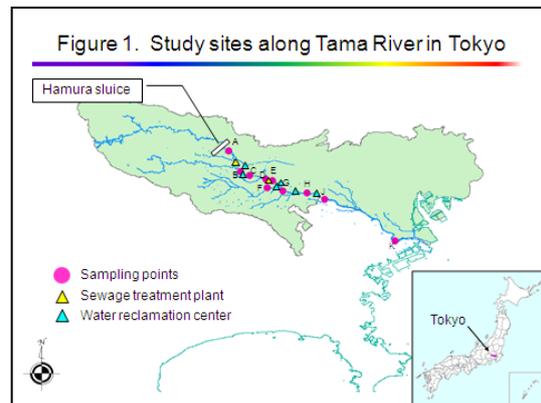
## 2. 研究の目的

河川等の環境水中に存在する細菌とその薬剤耐性レベルを明らかにするとともに、その薬剤耐性発現促進要因をつきとめ、

適切な排水管理にかかる提言をすることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

サンプル収集場所の選定にあたっては、人口動態ならびに関連施設等の情報のほか、下水処理場などについても考慮した。当初の予定では都市部と郊外の二つの地域に分けてそれぞれ1年目と2年目にサンプルを採取する予定であった。研究準備を進めていく段階において1本の河川の上流から下流域に沿ってサンプルを採取し、水再処理施設等との関連を探る方がより意義があるとの考えに至り、2009年11月に多摩川の上流から下流にいたる10地点で河川水サンプルを採取した。本研究の最上流地点は、羽村堰直後のA地点である。水再処理施設はB地点の前後に合計3カ所、D地点とE地点の間に1カ所、G地点の前後に3カ所、H地点とJ地点の間に1カ所であった (Figure 1)。



それぞれのサンプルを培養し、合計162株の細菌を単離した。API Staph と API 20E (BIOMERIEUX 社)並びに16SrRNA系統解析により菌を同定した (Figure 2)。菌の種類、薬剤耐性、採取場所の3点が同一であったものを除いた144株を分析対象とした。

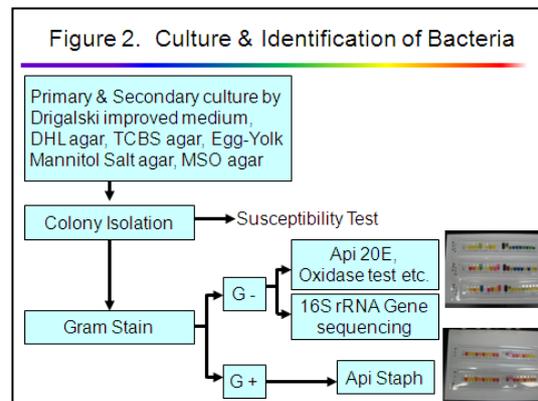


Figure 3. Susceptibility Test

Checked susceptibility to 16 kinds of Antimicrobials by Antimicrobial Susceptibility Disk (KB disc®, Eiken) on Muller-Hinton agar media



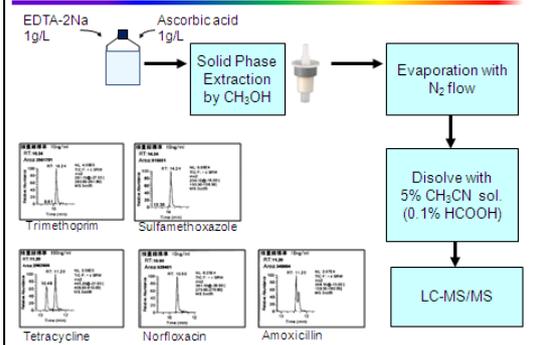
Antimicrobials:

- 1) Oxacillin (MPI), 2) Ampicillin (ABPC), 3) Ampicillin+Clavulonic acid (AMPC/CV), 4) Erythromycin (EM), 5) Doxycycline (DOXY), 6) Tetracycline (TC), 7) Gentamicin (GM), 8) Cefarotin (CET), 9) Cefotaxime (CTX), 10) Ceftriaxone (CRX), 11) Cefuroxime (CXM), 12) Imipenem (IPM), 13) Tazobactam+Piperacillin (TAZ/PIPC), 14) Ciprofloxacin (CPFX), 15) Levofloxacin (LVFX), 16) Co-trimoxazole (SXT)

オキサシリン(MPI), アンピシリン(ABPC), アンピシリン+クラブラン酸(AMPC/CV), エリスロマイシン(EM), ドキシサイクリン(DOXY), テトラサイクリン(TC), ゲンタマイシン(GM), セファロチン(CET), セフォタキシム(CTX), セフトリアキソン(CRX), セフロキシム(CXM), イミペネム(IPM), タゾバクタム+ピペラシリン(TAZ/PIPC), シプロキサシン(CPFX), レボフロキサシン(LVFX), コトリモキサゾール(SXT)の 16 種類の抗生剤に対する耐性試験を KB disc® (栄研) を用いて実施した (Figure 3).

結果の判定にあたっては, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; 19<sup>th</sup> Informational Supplement (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute)を参照した. なお, 本報告書では, 中程度の感受性を示した(CLSIによるIntermediate) ものは感受性菌として解析した.

Figure 4. Measuring Antimicrobial Concentration



菌の採取地点における抗生剤濃度については, LC-MS/MS による定量分析により実施した (Figure 4). 検出限界等の制約から測定が可能であったのはテトラサイクリン, アモキシシリン, ノルフロキサシン, コトリモキサゾールを構成するトリメトプリムとスルファメトキサゾールの 5 種類のみであった.

4. 研究成果

(1) 抗生剤濃度

最上流域から最下流域までの 10 地点における抗生剤濃度を測定したが, 上流域にある A から C までの 3 地点ではいずれの抗生剤も検出限界未満であった. D 地点以降の下流域ではトリメトプリム, スルファメトキサゾール, アモキシシリンの濃度測定が可能であった. 総合的にこれらの薬剤濃度が高かった地点は D 地点であった.

下流域ほど薬剤濃度が上がると想定していたが, 採取地点と濃度との間には有意な相関はみとめられなかった. 水再処理施設との距離などは影響のあるものもあれば, そうでないものもあり, 水再処理施設で抗生剤がどの程度排除できているのかは疑問である (Table 1). なお, 下水路等を経ない魚類の養殖場などにおける抗生剤の使用実態とその影響を究明することはできなかった.

Table 1. Antimicrobial Concentration at Sampling Points

Substance Name	Concentration (ng/L)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K
Trimethoprim	<0.9	<0.9	<0.9	8.1	8.3	<0.9	1.2	3.8	5.6	3.9
Sulfamethoxazole	<1.0	<1.0	<1.0	26.0	25.0	14.0	21.0	23.0	29.0	25.0
Tetracycline	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0	<6.0
Norfloxacin	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
Amoxicillin	<1.7	<1.7	<1.7	9.5	7.4	2.3	<1.7	4.8	10.0	13.0

↑ Sluice    ↑ STP    ↑ WRC    ↑ STP    ↑ 2 WRCs    ↑ WRC    ↑ WRC  
 STP: Sewage Treatment Plant    WRC: Water Reclamation Center

Table 2. Bacteria Genera by Sampling Points

	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	Total
<i>E. coli</i>	3	0	0	1	2	1	0	0	1	2	10
<i>Klebsiella sp.</i>	1	0	2	3	1	4	1	1	4	1	18
<i>Aeromonas sp.</i>	3	9	6	7	6	5	8	8	5	7	64
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0	1	1	0	3	0	0	5
<i>Vibrio sp.</i>	1	0	1	0	0	0	2	1	1	2	8
Others	1	0	3	0	2	1	4	2	1	1	15
Total	9	9	12	11	12	12	15	15	12	13	120

N.B. 22 colonies of *Staphylococcus sp.* were excluded from this table.

(2) 検出菌

144 株の細菌の内訳は, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Staphylococcus spp.*, でそれぞれ 10, 18, 64, 5, 8, 22 検体であった. これらの菌以外 (Others) は 15 検体であった (Table 2). 抗生剤への感受性などが異なり, 比較が困難であることからグラム陽性球菌 (本研究ではすべて *Staphylococcus spp.*) を除く 120 検体のグラム陰性桿菌について薬剤耐性と収

集地点の関連等につき解析を実施した。

### (3) 耐性発現状況

**Table 3** に採取地点毎の 16 種類の薬剤に対する耐性発現状況を記す。全ての地点で IPM 耐性菌が、また C 地点を除く全ての地点で TAZ/PIPC 耐性菌が確認されたことは、想定外であった。全地点における TC 濃度は、LC-MS/MS による測定での検出限界未満 (6 ng/L 未満) であったが、このような低濃度の TC に対しても耐性が発現していることが 7 地点において確認された。最下流の K 地点における耐性発現状況は A 地点と大差はなかったが、K 地点で採取した水は異臭を放つなど他の天然および化学物質等による汚染レベルが高いと推測され、これらの物質のグラム陰性桿菌に対する影響は不明である。

本研究を実施するきっかけとなったインドネシアのバンダ・アチェにおける環境水に含まれたグラム陰性桿菌はいずれもキノロン系抗生剤に感受性を示していたが、本研究の検体は CPFIX および LVFX に耐性を示したものが合計 16% 程度あり、日本の河川中の細菌の耐性獲得レベルがインドネシアに比して進行していることが示唆された。

Antimicrobials	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	Total
MPI	8	9	11	11	12	12	14	15	12	13	117
ABPC	6	9	11	11	11	12	12	14	12	9	107
AMPC /CV	5	7	10	9	8	10	10	11	7	2	79
EM	8	6	6	7	6	10	7	12	9	5	76
DOXY	0	0	0	3	1	0	0	1	2	0	7
TC	0	0	2	4	3	3	1	3	2	0	18
GM	0	0	0	1	1	0	1	3	1	0	7
CET	5	5	6	6	7	10	6	6	7	7	65
CTX	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0	6
CRX	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4
CXM	0	1	2	3	4	6	1	4	4	1	26
IPM	3	5	1	3	1	3	3	1	4	1	25
TAZ/PIPC	2	4	0	5	4	4	3	4	6	4	36
CPFX	0	0	1	3	0	0	3	1	3	0	11
LVFX	0	0	1	2	1	0	1	1	0	0	6
SXT	2	1	3	0	2	3	1	3	2	0	17

Antimicrobials	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	Total
Penicillins Both	5	7	10	9	8	10	10	11	7	2	79
Tetracyclines Both	0	0	0	3	1	0	0	0	1	0	5
Cephalosporins											
Two	0	1	2	3	3	5	1	1	2	1	19
Three	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	3
Four	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3
Carbapenems Both	2	3	0	2	1	3	3	1	4	1	20
New Quinolones Both	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	3
9 of 16	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	5
10 of 16	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	4
11 of 16	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	3
12 of 16	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
13 of 16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

**Table 4** に採取地点別の多剤耐性状況を記した。2 剤のキノロン系薬剤の両方に耐性を有したものは 120 検体中 3 検体であった。セ

ファロスポリン系薬剤 (CET, CTX, CRX, CXM) のうちいずれか 2 剤に耐性を有するものは 19 検体あり、3 剤および 4 剤に耐性のもはそれぞれ 3 検体ずつであった。カルバペネム系薬剤 (IPM, TAZ/PIPC) の両者ともに耐性を有するものが 20 検体もあり、河川等における事故や、洪水、津波等による受傷者に化膿創が見られる場合、その治療が困難となることが予想される。

15 検体が、耐性試験に用いた 16 種類の薬剤のうち 9 剤以上に耐性を有していた。これら 15 検体を採取点毎に見てみると、A, B, および K 地点では認められず、C から J 地点までの 7 地点における内訳はそれぞれ 1, 2, 1, 3, 2, 2, 4 検体であった。少なくともこの間においては下流域ほど耐性獲得が進んでいる傾向がみられた。耐性獲得のメカニズムにはいくつかのルートがあるが、菌の抗生剤への曝露により耐性が発現するのは明らかであることから、多摩川の抗生剤による汚染は否定できない。

菌の属別 (*E.coli* のみ種) に耐性獲得状況を比較すると、*E. coli* では IPM 耐性が 30% (3/10), TAZ/PIPC 耐性が 60% (6/10) とカルバペネム系薬剤への耐性が顕著であった。*Klebsiella spp.* や *Aeromonas spp.* でも IPM 耐性がそれぞれ 17% (3/18), 25% (16/64), また、TAZ/PIPC 耐性がそれぞれ 39% (7/18), 27% (17/64) と多かった。一方、キノロン系の CPFIX や LVFX に対する耐性においても、*Aeromonas spp.* が *E. coli* や *Klebsiella spp.* に比し、その割合が少ないものの、これらのいずれの種もしくは属において耐性が発現していた (**Table 5**)。

Antimicrobials	<i>E. Coli</i> N=10	<i>Klebsiella sp.</i> N=18	<i>Aeromonas sp.</i> N=64	<i>Pseudomonas sp.</i> N=5	<i>Vibrio sp.</i> N=8	Others N=15	Total N=120
MPI	10	18 (NR)	64		5	8	117
ABPC	7	18	62		5	3	107
AMPC /CV	3	8	54		5	2	79
EM	10	18	29		5	3	76
DOXY	1	5	1		0	0	7
TC	2	5	7		2	0	18
GM	2	1	4		0	0	7
CET	8	13	29		4	1	65
CTX	1	2	0		2	0	5
CRX	1	1	0		2	0	4
CXM	5	8	3		5	0	26
IPM	3	3	16		0	0	25
TAZ/PIPC	6	7	17		1	0	36
CPFX	1	3	4		0	0	11
LVFX	2	2	1		1	0	6
SXT	2	3	6		5	1	17

NR: Natural Resistant

**Table 6** に属もしくは種別の薬剤耐性を記した。120 検体中 106 検体 (88%) が 3 剤以上の薬剤に耐性であり、*Pseudomonas spp.* では 5 検体すべてが 6 剤以上に耐性であった。

他の属もしくは種においても 6 剤以上に耐性を示したものは少なくはなく、想定以上に憂慮すべき状況であった。

本研究の対象は多摩川であるが、このような環境水に存在する細菌が LC-MS/MS 検出限界未満 (ng/L) の抗生剤濃度の薬剤に対して耐性を獲得していることに加えて、IPM のような強い抗菌力と広域抗菌スペクトラムを持つ薬剤に耐性を示すことは、薬剤耐性菌による環境汚染が危機的状況に達しつつあることを示している。

Table 6. Multi-Antimicrobial Resistance by Bacteria Genus

# of Antimicrobials	E. Coli N=10	Klebsiella sp. N=18	Aeromonas sp. N=64	Pseudomonas sp. N=5	Vibrio sp. N=8	Others N=15	Total N=120	
0 of 16	0	0	0	0	0	3	3	
1 of 16	0	0	0	0	3	0	3	
2 of 16	2	0	3	0	3	0	8	
3 of 16	1	4	22	0	1	0	28	
4 of 16	0	1	12	0	0	2	15	
5 of 16	1	4	9	0	0	5	19	
6 of 16	1	2	7	1	1	2	14	
7 of 16	1	1	7	1	0	1	11	
8 of 16	1	1	1	1	0	0	4	
9 of 16	0	2	0	0	1	0	2	5
10 of 16	2	1	1	0	0	0	4	
11 of 16	1	1	1	0	0	0	3	
12 of 16	0	0	1	1	0	0	2	
13 of 16	0	1	0	0	0	0	1	

Table 7. Imipenem (IPM) resistant strain (N=25) and resistance to the other antimicrobials

# of Antimicrobials	E. Coli N=3	Klebsiella sp. N=3	Aeromonas sp. N=16	Others N=3	Total N=25
IPM only	1	1	3	0	5
IPM + TAZ/PIPC	2	2	13	3	20
IPM + CPFEX	0	1	2	2	5
IPM + LVFX	0	0	1	0	1
IPM + GM	0	0	2	0	0
IPM + at least one Cephalosporins	3	3	8	3	17

Table 7 に、25 検体の IPM 耐性株が同時にどのような薬剤に耐性を示しているのかについてまとめた。25 検体中 20 検体が同時に TAZ/PIPC にも耐性であり、17 検体が少なくとも 1 剤のセファロスポリン系薬剤に耐性であった。

*Aeromonas spp.* では、IPM とともに GM 耐性が 16 検体中 2 検体に見られた。*Aeromonas spp.* は、両生類や魚類に感染を起こすことはよく知られているが、ヒトに対する感染例が報告されることは少ない。しかしながら、筆者がスマトラにおけるインド洋大津波による受傷者の例で示したように (1. 研究開始当初の背景を参照)、津波や洪水あるいは、河川や湖沼等における事故の受傷者に *Aeromonas spp.* 感染例が少なくはないことを考慮すると、無視できない問題である。

Table 8 は耐性試験におけるそれぞれの薬剤に対する発育阻止円の直径の薬剤間での相関をみたものである。ほとんどの薬剤間で

有意な相関が見られた。交叉耐性の可能性は否定できないが、我々が抗生剤に汚染された環境に住んでいるというのは明らかである。

Table 8. Correlation Matrix of Inhibition Zone Diameter among Tested Antimicrobials N=120

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 CET	1.00	.430	.513	.161	.329	.189	.222	.536	.458	.379	.430
2 CTX	-	1.00	.772	.089	.075	.301	.485	.506	.609	.635	.485
3 CXM	-	-	1.00	.077	.211	.298	.465	.622	.656	.634	.568
4 IPM	-	-	-	1.00	.610	.748	.401	.263	.340	.254	.301
5 AMPC/CV	-	-	-	-	1.00	.488	.279	.310	.380	.132	.337
6 TAZ/PIPC	-	-	-	-	-	1.00	.614	.376	.461	.468	.400
7 GM	-	-	-	-	-	-	1.00	.514	.616	.623	.447
8 EM	-	-	-	-	-	-	-	1.00	.740	.662	.386
9 DOXY	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	.686	.444
10 LVFX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	.467
11 SXT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00

Figures indicates Correlation coefficient  
■ p<0.01, ■ p<0.05

#### (4) まとめ

結果から明らかになったことは、次にあげる四点である。

- ① 我々の環境はすでに抗生剤に汚染されており、その濃度は LC-MS/MS による検出限界未満である。
- ② 水再処理施設からの距離と抗生剤濃度との間に有意な相関はなく、同施設でこれらの薬剤が適切に排除されていない可能性がある。
- ③ 環境水中のグラム陰性桿菌は、LC-MS/MS 検出限界未満の濃度の抗生剤に対しても耐性を獲得する。
- ④ 環境水中の細菌の多くはキノロン系およびカルバペネム系薬剤にも耐性を獲得しており、これらの多剤耐性菌 (MDROs: multidrug-resistant organisms) はヒトの健康を脅かす状況にある。

環境中の MDROs にヒトが暴露する主な機会、恐らく、水辺でのレクリエーションなどで、不顕性感染を含む感染者を通して市中に蔓延するのであろう。ことに *Aeromonas spp.* などについては、事故などで受傷しない限りは暴露しても健康人では感染する確率は低く、仮に感染しても症状を呈することはほとんどない。このようなリスクを生む要因の一つは、抗生剤による環境汚染である。特記すべきはキノロン系およびカルバペネム系薬剤に対する耐性菌であるが、これらの薬剤が家畜飼育や養殖等で使用されたという報告は日本のみならず海外でもほとんどなく、キノロン系薬剤の多くが未代謝で排泄されることなどを考慮すると、環境水中の抗生剤の一部は医療施設や患者の自宅等から下水中へ排泄されたと考えるのが妥当であろう。

問題の本質は、抗生剤による環境汚染であるが、その濃度測定は LC-MS/MS を以てして

も目下のところ困難が多いことから、*Aeromonas sp.*, あるいは *E. coli* などにおける耐性発現状況を指標とするモニタリング体制を構築することをその代替として提言する。

#### 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)

[学会発表] (計2件)

① 奥村順子 (シンポジスト, 招待), インド洋大津波後の環境水中の耐性菌について (内容には本研究成果を含む), 第14回日本水環境学会シンポジウム「震災後の対応における水中病原微生物対策」. 2011年9月10日於: 仙台, 東北工業大学.

② Junko Okumura, Satoshi Nakamura, Taro Yamamoto. Presence of multidrug-resistant organisms in aquatic environment: What is its implication on human health? IV International Conference on Medical Geology. 23 September, 2011, Sheraton Nicolaus Hotel & Conference Centre in Bari, Italy.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

奥村 順子 (OKUMURA JUNKO)  
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授  
研究者番号: 40323604

##### (2)研究分担者

中村 哲 (NAKAMURA SATOSHI)  
国立国際医療センター・熱帯医学・マラリア研究部・室長  
研究者番号: 40207874  
(H22→H23: 研究協力者)

##### (3)連携研究者

該当無