河川水中の薬剤耐性大腸菌群について

Studies on Drug Resistant Coliform Organisms in River Water

大阪市立衛生研究所

細 川 守

Mamoru Hosokawa

Osaka City Institute of Hygiene, Osaka

Coliform organisms have been isolated from polluted river water by using single drugs. The resistant coliform organisms isolated by Streptomycin, Tetracycline, Kanamycine and Chloramphenicol were 20%, 10%, 5% and 1% of coliform organisms in the river water, respectively.

Of these resistant organisms, 73-83% were identified as *E. coli*. Most of the *E. coli* strains showed the multiple drug resistance (95%). Among the *E. coli* strains isolated by Chloramphenicol, 77% transferred their resistance to *Salmonella typhimurium*.

薬剤使用量の増加は急速に耐性菌を増加させてきた。また、R因子¹⁾の発見以来細菌の多剤耐性化が容易であることが示されたが、わが国において分離された赤痢菌の耐性型の推移も、薬剤の開発とともに多剤耐性化に一方的に推移したことが示されている²⁾。また、最近の薬剤の広範囲な使用は下水や汚濁した河川水中にも耐性大腸菌を多量に放出している^{3), 4)}。

ここでは大阪市内河川水中から分離した大腸菌について、Streptomycin (Sm), Tetracycline (Tc), Chloramphenicol (Cp), Kanamycine (Km) 耐性菌の分布とその耐性型、およびChloramphenicolで分離した*Esh-erichia coli* (以下*E. coli*と略)については*Salmonella typhimurium*への耐性伝達について試験した。その結果、耐性大腸菌が多量に存在し、しかも耐性*E. coli*のほとんどが多剤耐性と耐性伝達を示したので報告する。

I. 実 験 方 法

1) 試料採取：大阪市内河川5地点で滅菌ビン(50ml)を用いて採取した。

2) 耐性大腸菌群の分離：試料を必要に応じ滅菌した生理食塩水で適度に稀釈し、その0.1mlをマッコンキー寒天培地に接種、37℃、18時間培養後ラクトーズの分解を認める*E. coli*型の集落を形成したものを大腸菌群としてかぞえた。薬剤耐性大腸菌群数はSm50μg/ml, Tc25μg/ml, Cp25μg/ml または Km10μg/ml をおの

おの含むマッコンキー寒天培地を用いて同様に行なった。このうち3地点についてはおのおの薬剤添加培地より10集落づつをとり、薬剤添加培地を用いて再分離した。この分離菌はEC培地を用いて44.5℃、24時間培養後、ガス発生をしたものを*E. coli*とし、耐性型および耐性伝達(R因子)の試験に用いた。

3) 耐性型の試験：上記により分離した*E. coli*を、BTB・イノシトール(1%)・ペプトン水で培養し、対数増殖期に上記のおのおの薬剤を添加したマッコンキー寒天培地に1白金耳接種、37℃、18時間培養、耐性型を判定した。なお、イノシトールを分解したものは*E. coli*から除外した。

4) 耐性の伝達：Cp培地で分離した*E. coli*については前記BTB・イノシトール・ペプトン水培養24時間後R因子の供与菌株として用いた。受容菌株としてはイノシトールを分解する*Salmonella typhimurium* 4066を用いた。この菌株はSm, Tc, Cp, Km4剤共に感受性であった。受容菌株はペプトン水で37℃、24時間培養後、10倍に遠心濃縮した。上記のように調整した供与菌株および受容菌株のおのおの0.1mlを滅菌した試験管中に混合し、ペプトン水1mlを加えて37℃、18時間培養した。耐性化した受容菌の分離はCp25μg/mlを含むBTB・イノシトール(1%)を含む普通寒天培地を用い、上記混合培養液1白金耳を接種し、37℃、48時間培養後イノシトールを分解し、ラフ集落を形成したものを上記

Table 1. Selection of drug-resistant coliform organisms from river water on MacConkey agar containing single drugs

Sampling point	No. of coliform organisms/ml				
	no drugs	Sm	Tc	Km	Cp
Kema-bashi	6.5×10^3	1.4×10^3	3.0×10	1.0×10	3.0×10
Tenjin-bashi	7.0×10^2	7.3×10	< 10	1.0×10	3.0×10
Tennoden-ohashi	1.1×10^6	2.1×10^5	1.3×10^5	5.7×10^4	1.4×10^4
Kyo-bashi	9.0×10^4	1.6×10^4	1.2×10^4	1.1×10^4	3.5×10^3
Daikoku-bashi	1.3×10^5	2.4×10^4	1.9×10^4	1.5×10^4	1.7×10^3

イノシトール・普通寒天培地（48時間培養）および SS 寒天培地（18時間培養）を用いて再分離した。この耐性受容菌株の耐性型、すなわち R 因子の耐性型の判定は薬剤添加マッコンキー寒天培地（18時間培養）を用いた。

II. 実験結果

1) 薬剤耐性大腸菌群の分布

市内河川 5 地点について Sm, Tc, Cp, Km おおの単剤により分離した大腸菌群数は表 1 のようである。毛馬橋は淀川からの流入直後の点であり、天神橋はその下流でこの間の汚染は比較的少ない。天王田大橋は寝屋川水系に属し、年間平均 BOD 値が 100ppm を越える汚濁した河川⁹⁾で、京橋はその下流にあたり淀川からの浄化用水により多少稀釈されている。大黒橋は道頓堀川にあり、汚濁源は主として寝屋川水系と考えられる。表 1 からわかるように毛馬橋、天神橋においても耐性菌の検出割合は低くない。汚濁の激しい他の 3 地点については、Sm 耐性大腸菌群は約 20%, Tc 耐性は約 10%, Km 耐性は約 5%, Cp 耐性は約 1% の割合で検出された。

2) 耐性 *E. coli* の耐性型および R 因子

耐性型および R 因子の試験には汚濁の激しい 3 地点より分離した耐性 *E. coli* を用いた。耐性大腸菌群数としてかぞえたものに対する耐性 *E. coli* の割合はおおのの薬剤に対して 73~83% であった。耐性 *E. coli* において 2 剤以上の多剤耐性を示したものは約 95% で、単剤耐性は Sm, Tc のみでみられた。2 剤耐性は Sm, Tc および Sm, Km 耐性型の 2 種類が分離されたが、3, 4 剤耐性のうち Tc, Km, Cp 型の 1 例を除いて全てがこれらの 2 剤耐性型を交叉していた。なお、Sm 耐性が交叉した多剤耐性はおおの単剤分離 *E. coli* で 92~100%, Tc 耐性の交叉は 86~91%, Km では 55~82%, Cp では 8~13% であった。

Salmonella typhimurium への薬剤耐性伝達は Cp 分離 *E. coli* についてのみ試験を行なったが、22 株中 17 株

Table 2. Drug resistance patterns of *E. coli* strains isolated by single drugs

Resistance pattern		No. of resistance patterns Drug used for selection			
		Sm	Tc	Km	Cp
Single	Sm	3	—	—	—
	Tc	—	2	—	—
Double	Sm, Tc	6	3	—	—
	Sm, Km	0	—	3	—
Triple	Sm, Tc, Km	11	16	20	—
	Sm, Tc, Cp	1	1	—	10
	Sm, Km, Cp	0	—	0	2
	Tc, Km, Cp	—	0	1	0
Quadruple	Sm, Tc, Km, Cp	1	2	1	10
Total		22	24	25	22

Table 3. Distribution of R factors among *E. coli* strains isolated by chloramphenicol

Resistance pattern of donors	No. of strains examined	No. of strains carrying R factor	Pattern of R factors
Sm, Tc, Cp	10	7	Sm, Tc, Cp
Sm, Km, Cp	2	2	Sm, Km, Cp
Sm, Tc, Km, Cp	10	8(6)*	Sm, Km, Cp Sm, Tc, Km, Cp
Total	22	17(6)*	

* Numbers given in parentheses indicate that Tc-resistance was not transferred.

(77%) が耐性を伝達した。この結果は *Salmonella* への伝達のみを試験したことを考慮すれば、河川水中から Cp を用いて分離される *E. coli* のほとんどが R 因子により耐性化していると考えられる。なお、このうち 4 剤耐性 *E. coli* で 10 株中 6 株が Tc 耐性の伝達を欠いていた。

Ⅲ. 考察とまとめ

以上の結果は汚濁した河川水中から分離される大腸菌群の約5%は多剤耐性であることを示しており、しかもCp分離 *E. coli* でみられるように多剤耐性のほとんどは伝達性のあるR因子によるものであろう。3, 4剤の多剤耐性ではSm, Tcの2剤を同時に交叉したものが約96%あり、Sm, Tc 2剤耐性型にCp, Km耐性に加わったように考えられるが、さらに新しく開発された薬剤に対する耐性についても検討が必要であろう。

毛馬橋などの比較的汚濁の少ない河川では、耐性 *E. coli* の検討はできなかったが、量的に少ない点を除けば汚濁河川とあまり相異のない傾向を示すものと思われる。米国での下水中³⁾および英国における河川水中⁴⁾での耐性大腸菌群についての報告と比較して大きな相異はなかった。しかし採取源により耐性型には相異があるようであり、本報では4剤中Cp耐性が最も少なくなっているが、Km耐性が少なくなり、Cp耐性が10%を超える例もある。

なお、豚舎排水について調べたものでは活性汚泥処理槽への流入水で $2.4 \times 10^6/\text{ml}$ の大腸菌群が検出され、Cp $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ で $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ が耐性であった。処理放流水についても同様に $2.6 \times 10^5/\text{ml}$ 中 $1.9 \times 10^5/\text{ml}$ が耐

性を示した。このように畜産をはじめ広範に薬剤が使用されている現在、汚濁した河川水中で耐性菌が多量に検出されるのは当然であろうが、薬剤の無制限な使用は汚濁河川水中において耐性菌汚染を示すにとどまらず、安定した耐性菌相を形成しないとはいえないのではなかろうか。

文 献

- 1) Watanabe, T.: Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria, *Bacteriol. Rev.*, 27, 87-115 (1963).
- 2) Mitsuhashi, S.: Transferable Drug Resistance Factor R, 7-16, University Park Press (1971).
- 3) Sturtevant, A. B. and Feary, T. W.: Incidence of Infectious Drug Resistance Among Lactose-Fermenting Bacteria Isolated from Raw and Treated Sewage, *Appl. Microbiol.*, 18, 918-924 (1969).
- 4) Smith, H. W.: Incidence in River Water of *Escherichia coli* containing R. Factors, *Nature*, 228, 1286-1288 (1970).
- 5) 大阪市立衛生研究所研究報告, 33, 44-51 (1970).

(受付1972年 6月26日)