下水と河川水における薬剤耐性腸球菌の存在実態とその比較

西山正晃¹⁾ 竹下友作²⁾ 鈴木祥広^{2), 1)}

Investigation and Comparison of Antibiotic-Resistant Enterococci Isolated from Sewage and River Water

Masateru NISHIYAMA¹⁾, Yusaku TAKESHITA²⁾ and Yoshihiro SUZUKI^{2), 1)}

¹⁾ Department of Environment and Resource Sciences, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-kibanadainishi, Miyazaki-shi 889-2154, Japan

²⁾ Department of Civil and Environmental Engineering, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-kibanadainishi, Miyazaki-shi 889-2154, Japan

Abstract

Enterococci are fecal indicator bacteria that are widely distributed in water environments such as sewage, urban rivers, and coastal areas. In addition, nosocomial infectious diseases caused by vancomycin-resistant enterococci (VRE) have arisen in medical institutions. VRE have the potential to exist not only in hospital facilities but also in environmental water sources. In this study, VRE and other antibiotic-resistant enterococci isolated from sewage and rivers in the provincial city of Miyazaki, Japan, were investigated. There were no VRE in sewage and river water samples. However, vancomycin-intermediate-resistant enterococci were observed in both samples. The percentages of vancomycin-intermediate-resistant isolates from sewage and river water were 8.4% (20/239 isolates) and 1.9% (5/261 isolates), respectively. More than 60% of isolates from sewage and river water were resistant to erythromycin and tetracycline, which are universally applicable antibiotics. The monitoring performed monthly between June 2011 and July 2012 indicated that the percentages of antibiotic-resistant enterococci fluctuated every month. Enterococci resistant to various antibiotics exist ubiquitously in the water environment.

Keywords: VRE; Enterococci; Antibiotic resistance; Sewage; River water

1. はじめに

腸球菌 (*Enterococcus*) は、グラム陽性球菌であり、ヒトを含む哺乳類の腸管内に存在する常在菌である。また、アルカリ、pH、温度増加、および塩化ナトリウム濃度など多様な環境因子に対して耐性を有するため、その他の腸内細菌と比較しても、環境中における生残性は極めて高い¹⁾。腸球菌は、温血動物のふん便中に多量に存在し、環境中において生残性が高いことから、下水や河川、沿岸域などの水環境におけるふん便汚染の指標細菌として広く用いられている^{2,3)}。したがって、腸球菌は、発展途上国のみならず、先進国においても、河川、湖沼、沿岸域で普遍的に検出されている。米国では、レクリエーションビーチにおけるふん便汚染が深刻化しており、腸球菌数が水浴基準値を超過して利用が制限される場合も生じている⁴⁾。ヨーロッパ諸国でも主要河川から腸球菌が $10^1 \sim 10^3$ CFU・100 mL⁻¹ で検出されている⁵⁾。高度な社会基盤の整備が完了している日本においても、都市河川や沿岸域からは腸球菌が比較的高濃度 ($10^1 \sim 10^2$ CFU・100 mL⁻¹) で検出されている^{6,7)}。すなわち、腸

球菌は、我々の生活環境のなかで身近にかつ普遍的に存在している細菌である。

その一方で、腸球菌の中には病原性を有する菌種が存在し、乳幼児や入院患者、あるいは高齢者などの免疫力が低下したヒトに対して、日和見感染症を引き起こすことが知られている⁸⁾。腸球菌は、もともと各種の抗生物質に自然耐性を有する細菌であるが、新規の抗生物質の開発とそれらの投与による治療件数の増大に伴って、多剤耐性腸球菌が発現し、院内感染症の治療をさらに困難にしている^{9,10)}。さらに、この多剤耐性腸球菌による感染症に有効な抗生物質であるバンコマイシンに対しても耐性を示すバンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci, VRE) が出現し、最も注意を要する薬剤耐性菌の一つに挙げられる^{11,12)}。近年、VREによる院内感染症は世界中に広がっており、中でもアメリカ、ヨーロッパ、および南アジアなどでは発症件数が増加している¹³⁻¹⁵⁾。日本の臨床現場においても、欧米諸国と比較してVREの分離報告数は少ないものの、VREが原因菌となる院内感染の広がりが危惧されている^{16,17)}。

腸球菌は、水環境に広範囲で分布していることから、

1) 宮崎大学大学院農学工学総合研究科 〒 889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

2) 宮崎大学工学部社会環境システム工学科 〒 889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

1) 連絡先: suzuki@civil.miyazaki-u.ac.jp

VRE も臨床現場に限らず、人々の生活と密接に関わる水環境においても存在している可能性は否定できない。我が国の水環境を対象とした薬剤耐性菌の調査事例では、大腸菌や緑膿菌の耐性菌の存在が確認されている¹⁸⁻²⁰⁾。しかしながら、水環境における VRE の調査事例は見当たらず、バンコマイシンを含むその他の抗生物質に対する腸球菌の薬剤耐性に関する情報や知見は極めて少ない。薬剤耐性腸球菌が身近な水環境中に存在した場合、水辺レクリエーション域のみならず、日常生活において日和見感染症のリスクが存在する。このリスクを軽減するにあたって、水環境における VRE やその他の薬剤耐性腸球菌の存否ならびに薬剤耐性に関する情報を蓄積することが重要である。

そこで本研究では、地方都市である宮崎市を対象として、薬剤耐性腸球菌の実態調査を実施した。調査は、下水処理施設の流入下水と宮崎市内を流れる河川の定点において、2011 年 6 月から 2012 年 7 月までの約 1 年間実施した。

2. 材料と方法

2.1 調査概要

Fig. 1 に試料採取地点を示す。試料は、宮崎県内の A 下水処理施設の流入下水と宮崎市内を流れる一級河川の八重川（流路延長 8.4 km、流域面積 17.6 km²）から採取した。宮崎市の人口は約 400,000 人であり、流域の排水処理施設として、下水処理施設または浄化槽が整備されている。A 下水処理施設は、約 14,000 人の人口を対象とした処理能を有し、平均処理流量は 6,300 m³・day⁻¹である。八重川の上流域に位置する清武町（人口：約 29,000 人）は、下水道未整備地区が一部存在しているため、八重川は河川流量に対して生活雑排水の割合が高い都市河川である。調査は、2011 年 6 月から 2012 年 7 月までの月 1 回（計 10 回）実施した。下水と河川水ともに、採水時間は午前 10 時頃とし、調査前日と当日に降雨がなく、降雨による影響はない。また、A 下水処理施設の放流先である河川は、河川水を採取した八重川とは異なる水系であり、下水放流水の影響はない。

2.2 試料採取と測定項目

下水と河川水は、水面から約 30 cm 以内から採取し、1 L の滅菌済みポリエチレン容器に保存した。採取した試料は実験室に持ち帰り、直ちに細菌の計数を実施した。

Fig. 1 The location of sampling points in Miyazaki city, Japan.

また、一般水質項目として、pH、電気伝導度（EC）（堀場製作所、pH・水質分析計、LAQUA F-74）、濁度（カオリン、三菱化学、積分球式濁度計、SEP-PT-706D）、全有機炭素濃度（TOC）、および全窒素（TN）（島津製作所、全有機炭素計、TOC-V 型）を測定した。

2.3 細菌計数法

2.3.1 大腸菌群と大腸菌

大腸菌群数と大腸菌数は、特定酵素基質法である Colilert®-18（IDEXX 社）を用いて測定した。試料水を、滅菌蒸留水で 100 mL とした検水に試薬を加え、十分混合した後、37 ± 0.5° C で 18 時間培養した。培養後、黄色に変化したウェルを大腸菌群陽性、黄色に変化し、かつ 365 nm 波長の UV ランプを使用して、青白く発光したウェルを大腸菌陽性と判定した。陽性と判定されたウェル数から大腸菌群数、大腸菌数を最確数（MPN・100 mL⁻¹）にて算出した。

2.3.2 腸球菌

腸球菌の計数は、メンブランフィルター法によって実施した²¹⁾。試料は、セルロース混合エステルメンブランフィルター（直径 47 mm、孔径 0.45 μm、Advantec）で吸引ろ過した。そのフィルターを腸球菌選択培地である membrane-Enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside 寒天培地（mEI 培地）上に置き、41 ± 0.5° C で 24 時間培養した。加えて、試料中に存在する腸球菌の中からバンコマイシンに耐性を有する菌株をスクリーニングするため、バンコマイシンが 2 μg・mL⁻¹ となるように調整したバンコマイシン添加 mEI 培地を作成し²²⁾、上記の方法と同様に培養した。培養後にフィルター上で生育した青色コロニーを計数した。3 つのプレート上に生育したコロニーを計数し、その平均値を腸球菌数（CFU・100 mL⁻¹）とした。計数後、バンコマイシン添加 mEI 培地のフィルター上に形成した青色コロニーを、27 個ランダムに選択し、Todd-Hewitt 寒天培地（寒天 1.5 %、Difco）に画線塗抹し、37 ± 0.5° C で 24 時間培養した。培養後、生育した単一コロニーを以下の試験に用いた。

2.4 抗生物質

本研究で使用した抗生物質は、ペニシリン系抗生物質であるアンピシリン（和光純薬）とペンシリン（和光純薬）、テトラサイクリン系抗生物質であるテトラサイクリン（和光純薬）、カルバペネム系抗生物質であるイミペネム（LKT Laboratories 社）、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン（和光純薬）、およびグリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシン（和光純薬）を用いた。これら 6 種の抗生物質は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）の推奨する MIC 試験法の中で、腸球菌に対して試験が必要な抗生物質を選択した。

2.5 最小発育阻止濃度（MIC）試験

各抗生物質の最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration, MIC）は日本化学療法学会が定める寒天平板希釈法によって測定した²³⁾。単離した菌株は Mueller-Hinton 液体培地（Becton Dickinson）で 24 時間培養した後、最終濃度が 0.5 McFarland となるように希釈し、接種材料とした。菌株の接種は各抗生物質を 10 から 11 段階に希釈（0.25-256 μg・mL⁻¹）した薬剤含有 Mueller-Hinton 寒天培地（1.5 %、Becton Dickinson）にて実施し

た。接種後、 $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$ で 24 時間培養した後、MIC 値を計測した。各抗生物質における中度耐性や耐性といった MIC 値の判定基準は、CLSI に従った²⁴⁾。各抗生物質における耐性判定濃度は以下の通りである：アンピシリン、 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；ペンシジルペニシリン、 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；イミペネム、 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；エリスロマイシン、 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；テトラサイクリン、 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；バンコマイシン、 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。なお、MIC 測定範囲は、アンピシリン、ペンシジルペニシリン、イミペネム、およびエリスロマイシンは $0.25\text{--}128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、テトラサイクリンとバンコマイシンは $0.25\text{--}256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ とした。

2.6 単離菌株の菌種同定法

MIC 試験によってバンコマイシンに中度耐性 ($8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以上または 2 剤耐性以上を示した菌株に対して菌種同定試験を実施した。菌種同定試験には、レンサ球菌、腸球菌、および関連菌の同定キットである Api 20 Strep (BIOMERIEUX 社) を用いた。本キットは、検体の基質利用による酵素活性、および糖発酵能を検出する生化学性状試験である。実験方法および実験手順はキットの使用説明書に従った。

3. 結果と考察

3.1 下水と河川水に存在する細菌数

Table 1 に調査期間における水質項目の測定結果を、

Fig. 2 に大腸菌群、大腸菌、および腸球菌の計数結果を示す。下水の大腸菌群、および大腸菌はそれぞれ、 $2.4 \times 10^6 \sim 2.4 \times 10^8 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 、 $9.7 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^7 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ で推移した。これは、日本における流入下水の一般的な濃度と同程度であった²⁵⁾。一方、河川水の大腸菌群、および大腸菌はそれぞれ、 $9.2 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^5 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 、 $1.3 \times 10^3 \sim 6.9 \times 10^4 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ で推移した。社会基盤の整備されている日本の地方都市河川において、流入下水の約 1/100 に相当する大腸菌が $10^4 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ のレベルで検出された。2012 年 1 月の調査において、下水と河川水における大腸菌の菌数は最大となり、それぞれ $8.6 \times 10^6 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ と $6.5 \times 10^4 \text{ MPN} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ であった。調査日における TOC と TN は、下水で $58.9 \text{ mgC} \cdot \text{mL}^{-1}$ と $33.9 \text{ mgN} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、河川水で $6.14 \text{ mgC} \cdot \text{mL}^{-1}$ と $9.52 \text{ mgN} \cdot \text{mL}^{-1}$ と検出され、調査期間内でも高い値を示した。調査期間を通して、大腸菌群、および大腸菌は約 2 オーダー内で推移しており、下水と河川水ではいずれも季節的な変動は見られなかった。下水と河川水における腸球菌はそれぞれ、 $3.8 \times 10^5 \sim 4.8 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 、 $1.8 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ で推移した。バンコマイシン添加 mEI 培地における腸球菌は、下水と河川水でそれぞれ、 $3.2 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 、 $5.3 \times 10^1 \sim 7.7 \times 10^2 \text{ CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ で推移した。いずれの

Table 1 Water quality of samples collected from the survey points.

Sampling point	Water quality	2011						2012			
		9-Jun	25-Jul	8-Sep	18-Oct	16-Nov	22-Dec	26-Jan	8-May	29-Jun	25-Jul
Sewage	pH (-)	7.28	7.71	7.49	7.45	7.48	8.25	7.72	7.35	7.66	7.57
	Water temp ($^\circ\text{C}$)	26.1	26.8	25.9	22.6	20.2	15.3	15.8	26.8	21.0	25.5
	Turbidity (kaolin unit)	119.8	139.3	108.5	106.2	81.3	153.5	75.2	54.9	146.3	69.8
	EC ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	787	1629	1913	1040	834	1816	1779	1421	1678	1760
	TOC ($\text{mgC} \cdot \text{L}^{-1}$)	47.0				39.0	55.0	58.9	49.0	28.7	43.2
	T-N ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)	25.0				25.5	33.7	33.9	38.8	24.6	25.0
River water	pH	7.67	7.82	7.93	7.93	7.60	7.76	7.76	7.71	7.44	7.66
	Water temp ($^\circ\text{C}$)	25.6	25.2	26.3	24.2	19.9	15.3	15.8	26.6	20.9	26.9
	Turbidity (kaolin unit)	27.3	13.3	8.0	10.3	5.7	8.1	1.9	10.8	12.5	3.1
	EC ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	272	398	501	386	423	515	490	355	441	341
	TOC ($\text{mgC} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.88			3.19	3.67	6.41	6.14	3.37	2.53	3.38
	T-N ($\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.32			2.15	5.52	13.2	9.52	3.16	1.66	1.99

Fig. 2 Bacterial counts in sewage (:S) and river water (:R) during study period. Error bar indicate 95% confidence lines.

Table 2 Antibiotic susceptibility of presumptive enterococci 239 isolates from sewage using vancomycin-supplemented mEI agar.

Group	Antimicrobial agent	MIC test range ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Sewage (239 isolates)			MIC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC90 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
			Susceptible No. isolates (%)	Intermediate (% isolates)	Resistant		
Penicillins	Ampicillin	0.25-128	239 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	2
Penicillins	penicillin G	0.25-128	239 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2	4
Tetracyclines	Tetracycline	0.25-256	131 (54.8%)	27 (11%)	81 (34%)	4	64
Carbapenems	Imipenem	0.25-128	239 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	2
Macrolides	Erythromycin	0.25-128	95 (40%)	85 (36%)	59 (25%)	2	128
Glycopeptides	Vancomycin	0.25-256	215 (90.0%)	24 (10%)	0 (0%)	2	4

MIC: minimum inhibitory concentration

MIC50: Minimum concentration at which growth of 50% the isolates is inhibited

MIC90: Minimum concentration at which growth of 90% the isolates is inhibited

ふん便細菌の項目においても季節的な変動は認められなかった。また、バンコマイシン含有 mEI 培地における腸球菌数は、バンコマイシン無添加である通常の mEI 培地の腸球菌数と比較して、平均で約 20% に低下した。これは、水環境に存在する腸球菌の 80% は、バンコマイシンに対して感受性 (MIC: $< 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) であることを示唆している。本研究では、多くの腸球菌の中からバンコマイシンに耐性株 ($> 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) をスクリーニングし、単離菌株について VRE や薬剤耐性腸球菌の存在実態を調査した。そこで、バンコマイシン添加 mEI 培地上に生育した 27 株の陽性コロニーをランダムに選択し、MIC 試験を実施することによって、バンコマイシンの耐性 ($> 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) を判定した。

3.2 下水から単離した腸球菌の薬剤感受性

Table 2 に、バンコマイシン添加 mEI 培地を使用して下水から単離した菌株の薬剤感受性試験の結果を示す。調査期間を通じて単離した全 239 株から、バンコマイシン耐性の判定濃度である $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上を示した菌株は検出されなかった。しかしながら、バンコマイシンに対して、中度耐性 ($8-16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) を示した菌株が 10% (24 株) 検出された。バンコマイシン添加 mEI 培地を用いて下水から単離した菌株のうち、90% はバンコマイシンに対して感受性 ($< 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) を示した。海外の研究事例では、病院排水²⁶⁾や放流水を含めた下水処理施設^{27, 28)}から VRE は検出されている。VRE による院内感染が深刻化しているアメリカでは、都市下水処理施設から検出される腸球菌の最大 3% が VRE であると報告されている²⁹⁾。ポルトガルやスウェーデンといったヨーロッパ諸国における下水処理施設の流入下水も、0.6 ~ 60% の範囲で VRE は検出されている³⁰⁾。本研究で対象とした下水処理施設の流入下水から、年間を通じて VRE は検出されず、諸外国における VRE の検出率と比較しても、極めて低いことが明らかとなった。

また、調査期間を通じて単離した全 239 株の菌株はアンピシリン、ベンジルペニシリン、およびイミペネムに対して、感受性を示した。その一方で、単離菌株の一部はテトラサイクリンとエリスロマイシンのいずれかに対して、中度耐性または耐性を示した。テトラサイクリンに中度耐性と耐性を示した菌株は、それぞれ 11% (27 株) と 34% (81 株) であり、中度耐性以上を示した菌株は 45% と感受性を示す菌株と同程度存在した。テトラサイクリンの MIC50 と MIC90 は、それぞれ $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ と $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、MIC90 は耐性の判

定基準 ($16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) の 4 倍高かった (**Table 2**)。下水に存在する腸球菌は、テトラサイクリンに対して 50% は感受性であり、10% は高度耐性 (MIC: $> 64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) を有していた。同様に、エリスロマイシンに中度耐性と耐性を示した菌株は、それぞれ、36% (85 株) と 25% (59 株) であり、耐性を示した菌株の割合は感受性を示す割合 (39.7%) と比較して高い傾向を示した。エリスロマイシンの MIC50 と MIC90 はそれぞれ、 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ と $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、MIC50 は判定基準の中度耐性 ($1 \sim 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) と同等であった。エリスロマイシンの MIC90 は、エリスロマイシンの MIC50 と比較して、64 倍高かった。エリスロマイシンに対して、下水に存在する菌株の 50% は中度耐性であり、10% は高度耐性 (MIC: $> 128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) であった。このことから、流入下水からスクリーニング培地を用いて単離した菌株は、テトラサイクリンとエリスロマイシンに対して、それぞれ、45% (108 株) と 61% (144 株) が耐性を獲得していた。ポルトガルの下水処理施設を対象とした薬剤耐性腸球菌の調査において、テトラサイクリン、あるいはエリスロマイシンの一方に耐性を示した腸球菌は、それぞれ 34.6% と 24.8% であり³¹⁾、本調査結果に近い耐性率であった。バンコマイシンに中度耐性を示した 24 株のうち、全ての菌株はエリスロマイシンに対して感受性を示し、2 株はテトラサイクリンに対して耐性を示した。バンコマイシンとエリスロマイシンに対して、同時に耐性を示す菌株は検出されず、これらの抗生物質に対する耐性には関連性が認められなかった。

3.3 河川水から単離した腸球菌の薬剤感受性

Table 3 に、バンコマイシン添加 mEI 培地を使用して、河川水から単離した全 261 株の菌株の薬剤感受性試験の結果を示す。MIC 試験の結果、バンコマイシン耐性の判定濃度である $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上を示した菌株は、下水と同様に調査期間を通じて検出されなかった。しかしながら、下水の場合と同様に、河川水からも中度耐性を示した菌株が 5.7% (15 株) 検出された。海外の河川や沿岸環境を対象とした調査事例では、北アメリカの沿岸域から単離した腸球菌の中から VRE の存在が確認されている³¹⁾。韓国の 3 つの主要な河川を対象とした調査では、VRE が最大 $23 \text{CFU}\cdot 100 \text{mL}^{-1}$ で検出されている³²⁾。本研究の調査では、河川水から VRE は確認されなかったことから、我が国の水環境における VRE の拡散の程度は、諸外国と比較して低いことが示唆された。

その他の抗生物質について見てみると、河川水から単

Table 3 Antibiotic susceptibility of presumptive enterococci 261 isolates from river water using vancomycin-supplemented mEI agar.

Group	Antimicrobial agent	MIC test range ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	River water (261 isolates)			MIC50 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC90 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
			Susceptible	Intermediate	Resistant		
			No. isolates (% isolates)				
Penicillins	Ampicillin	0.25-128	261 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	1
Penicillins	penicillin G	0.25-128	260 (99.6%)	0 (0%)	1 (0.4%)	2	2
Tetracyclines	Tetracycline	0.25-256	149 (57.0%)	29 (11%)	83 (32%)	4	64
Carbapenems	Imipenem	0.25-128	261 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1	2
Macrolides	Erythromycin	0.25-128	102 (39.1%)	138 (52.9%)	21 (8.0%)	1	4
Glycopeptides	Vancomycin	0.25-256	246 (94.3%)	15 (5.7%)	0 (0%)	2	4

MIC: minimum inhibitory concentration

MIC50: Minimum concentration at which growth of 50% the isolates is inhibited

MIC90: Minimum concentration at which growth of 90% the isolates is inhibited

離された全ての菌株は、アンピシリンとイミペネムに対して感受性を示した。アンピシリンの MIC50 と MIC90 は $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ と同一であったことから、河川水に存在する腸球菌の多くがアンピシリンに感受性を示すと考えられた。その一方で、ベンジルペニシリン、テトラサイクリン、およびエリスロマイシンのいずれかの抗生物質に対して、中度耐性または耐性を示す菌株が存在した。ベンジルペニシリンに対して、単離した菌株の多くが感受性を示したが、耐性を示した菌株が 1 株 (0.4%) 存在した。テトラサイクリンに中度耐性と耐性を示した菌株は、それぞれ 11% (29 株) と 32% (83 株) であり、中度耐性以上を示した菌株は感受性を示す菌株と同程度存在した。テトラサイクリンの MIC90 は $64\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ と耐性の判定基準 ($16\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) の 4 倍高く、下水の MIC90 と一致した。本研究と同一の対象河川である宮崎市八重川河川流域を対象とした薬剤耐性緑膿菌の調査において、単離株のすべてがテトラサイクリンに対して耐性を示し、テトラサイクリンへの耐性株は既に広範囲で拡散していることを示唆する報告がある²⁰⁾。河川水から単離した菌株のテトラサイクリン耐性割合は 32% であり、緑膿菌と比較して低いが、河川においてもテトラサイクリンへの耐性株が水環境中に存在していることがわかった。また、エリスロマイシンに中度耐性と耐性を示した菌株は、それぞれ、52.9% (138 株) と 8.0% (21 株) であり、河川中に存在する腸球菌の 60.9% はエリスロマイシンに耐性を示した。エリスロマイシンの MIC50 と MIC90 はそれぞれ、 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ と $4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、MIC50 と MIC90 は判定基準の中度耐性 ($1\sim 4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) と同等であった。河川水中に存在する腸球菌の大部分は、テトラサイクリンとエリスロマイシンに対して耐性を有しており、下水から単離した菌株と類似した耐性を有していた。バンコマイシンに中度耐性を示した 15 株は、エリスロマイシンとテトラサイクリンに対して感受性を示し、バンコマイシンへの耐性を同時に有する菌株は検出されなかった。下水における結果と同様に、河川水から単離した菌株においても、バンコマイシン中度耐性を示す菌株と、エリスロマイシンやテトラサイクリンに耐性を示す菌株との間に、関連性は認められなかった。

3.4 下水と河川水から単離した菌株間の薬剤感受性の比較

下水から単離した 239 株と河川水から単離した 261 株の各抗生物質に対する薬剤感受性を表した累積分布図を

Fig. 3 に示す。腸球菌に最も有効であるバンコマイシンに対する MIC50 と MIC90 は、下水と河川水で同一となり、それぞれ $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ であった。バンコマイシンにおける MIC 値の累積率は、下水と比較して、河川水が高い傾向を示し、河川水には下水よりも感受性を示す腸球菌が多く存在した (**Fig. 3 a**)。そこで、下水と河川水から単離した腸球菌の各抗生物質に対する感受性について、有意差検定 (Z 検定) によって比較した。その結果、バンコマイシンにおいて有意な差が見られた (**Table 4**)。このことから、下水と河川水から単離した菌株間では、バンコマイシンに対する感受性が異なると考えられる。

その他の抗生物質についてみると、下水と河川水から単離した菌株間で有意な差は見られなかった (**Table 4**)。そこで、累積感受性率についてみると、河川水におけるアンピシリンの累積感受性率 ($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) は、下水と比較して高い傾向を示した (**Fig. 3a**)。これは、河川水から単離した菌株が下水から単離した菌株と比較して、アンピシリンに対して感受性があることを示している。また、バンコマイシンと同様に、エリスロマイシン (**Fig. 3b**) とテトラサイクリン (**Fig. 3c**) も MIC 値の累積率は、河川水が高い傾向を示した。一方、イミペネムにおいては、MIC 値の累積率は下水と比較して河川水が低い傾向を示した (**Fig. 3d**)。このことから、下水と河川水に存在する腸球菌は、抗生物質の種類によって感受性が異なる傾向を示すことがわかった。

ペニシリン系の抗生物質に注目すると、アンピシリンとベンジルペニシリンに対して、MIC 値が $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上ではほとんどの菌株が感受性を示したが、ベンジルペニシリンに対して耐性を示した菌株は河川水で 1 株存在した。また、アンピシリンとベンジルペニシリンの両薬剤の MIC50 と MIC90 を比較すると、アンピシリンはベンジルペニシリンの 1/2 の MIC 値であった。したがって、ペニシリン系の抗生物質の中では、ベンジルペニシリンと比較して、アンピシリンが単離した菌株に対して効果的であった。本研究で使用した抗生物質の中で、アンピシリンに対して耐性を示す菌株は単離されず、MIC 値が $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ と低濃度 (耐性判定基準の 1/8) においても、ほとんどの菌株が感受性を示した。マクロライド系のエリスロマイシンは、下水と河川ともに単離した菌株の 50% が中度耐性 (MIC: $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 以上を示し、多くの菌株が耐性を獲得していることがわかった。また、エリスロマイシンの MIC90 は下水で $128\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、

Fig. 3 Susceptibility distribution of enterococci isolated from sewage (:S) and river water (:R).

Table 4 Comparison of antibiotic susceptibility of isolates using vancomycin-supplemented mEI agar between sewage and river water.

Group	Antimicrobial agent	Sewage (total 239 isolates)		Significance*	River water (total 261 isolates)	
		Susceptible			Suceptible	
		No. isolates	% isolates		(p<0.05)	No. isolates
Penicillins	Ampicillin	239	100	=	261	100
Penicillins	penicillin G	239	100	=	260	99.6
Tetracyclines	Tetracycline	131	54.8	=	149	57.1
Carbapenems	Imipenem	239	100	=	260	99.6
Macrolides	Erythromycin	95	40	=	102	39.1
Glycopeptides	Vancomycin	215	90.0	<	246	94.3

*Significance in the difference of population proportion (susceptible isolates) between sewage and river water.

河川水で $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、下水の方が 32 倍も高かった。腸球菌のエリスロマイシンに対する高い耐性割合は、治療に使用するマクロライド系抗生物質の使用量と密接に関係があると報告されている³³⁾。エリスロマイシンは、広い抗菌スペクトルを有し、グラム陽性細菌やマイコプラズマなど様々な感染症の治療を目的として服用される。ヒト腸管内では抗生物質の選択圧による影響を強く受けるため、下水での耐性株の割合が河川水と比較して増加したと考えられる。テトラサイクリンは、下水と河川水から単離した菌株の約 40% が中度耐性 (MIC : $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 以上を示し、MIC50 と MIC90 は、下水と河川水で同一であった。テトラサイクリンは、ヒトのみならず畜産や養魚場の治療にも使用される汎用性の高い抗生物質である³⁴⁾。テトラサイクリンは腸球菌感染症の治療では使用されないが、病院³⁵⁾や下水³⁶⁾から単離される多くの腸球菌は既に耐性を獲得していることが報告されている。我が国の水環境に存在する腸球菌も、既にテトラサイクリンに対して耐性を獲得していると考えられる。

3.5 菌種同定

MIC 試験によってバンコマイシンに中度耐性 ($8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 以上もしくは 2 薬剤耐性以上を示した菌株に対して、菌種同定試験を実施した。2011 年 6 月から 2012 年 7 月まで実施した 10 回のサンプリングにおいて、下水では、バンコマイシンに中度耐性以上を示した菌株

と 2 剤耐性以上を示した菌株はそれぞれ、24 株と 97 株であった。一方の河川水では、バンコマイシン中度耐性株と 2 薬剤耐性以上の株は、それぞれ 15 株と 44 株であり、下水と比較して薬剤耐性を示す菌株が少なかった。菌種同定試験には下水と河川水でそれぞれ、113 株と 59 株を用いた。

Fig. 4a に下水から単離した全 113 株の菌種同定試験の結果を示す。下水から単離した全 113 株のうち、*Enterococcus faecalis* が 55 株 (49 %), *Enterococcus faecium* が 27 株 (24%), および *Enterococcus* 属以外が 31 株 (27%) と同定された。耐性を示した菌株の約 50% は *E. faecalis* であり、下水に存在する耐性菌の主要な腸球菌種であった。ヒトのふん便から単離される腸球菌の大部分は *E. faecalis* と *E. faecium* であることが報告されており^{37, 38)}、下水から単離した腸球菌の優占種が *E. faecalis* であったと考えられる。Fig. 4b に河川水から単離した全 59 株の菌種同定試験の結果を示す。河川水から単離した全 59 株のうち、*E. faecalis* が 11 株 (19 %), *E. faecium* が 26 株 (44 %), *Enterococcus avium* が 3 株 (5 %), *Enterococcus durans* が 1 株 (2 %), および *Enterococcus* 属以外が 17 株 (29%) と同定された。河川水における耐性を示した主要な腸球菌種は *E. faecium* であり、下水では確認されなかった *E. avium* や *E. durans* も検出され、下水と河川水における主要な腸球菌種は異なる傾向となった。河川や沿岸域か

ら単離された腸球菌の多くが、*E. faecium* であると報告されている^{6), 7)}。したがって、河川環境では *E. faecium* の生残性が、*E. faecalis* と比較して高いことから、下水と河川水における優占種が異なると考えられる。

3.6 薬剤耐性腸球菌の通年変化

Fig. 5a にバンコマイシンに中度耐性以上を示した腸球菌株の通年変化を示す。バンコマイシンに中度耐性以上を示した菌株のうち、腸球菌と同定された菌株は、下水と河川水でそれぞれ、20 株と 5 株であった。全腸球菌株に対するバンコマイシンに中度耐性腸球菌の割合は、下水と河川水でそれぞれ、8.4% (20 株/239 株) と 2% (5 株/261 株) であった。今回、下水と河川水から単離した腸球菌のうち、バンコマイシンに耐性を示す菌株は検出されなかったが、中度耐性を示す菌株が検出され、水環境中においてもバンコマイシン耐性腸球菌の存在が示唆された。バンコマイシンに中度耐性以上を示した腸球菌は、下水では、2011 年 12 月と、2012 年 1 月、5 月、6 月、および 7 月で検出され、2012 年 5 月においては単離した腸球菌のうち、30% (7 株) の割合で存在した。その一方で、河川水では、2011 年 6 月、7 月、9 月、および 10 月と、2012 年 6 月で検出され、単離した腸球菌のうち 4% (1 株) の割合で存在した。このことから、バンコマイシンに中度耐性を示す腸球菌は季節変化と関係なく、普遍的に存在することが示唆された。

Fig. 5b に 2 薬剤耐性以上を示した腸球菌株の通年変化を示す。調査期間における 2 剤耐性以上を示した腸

球菌株の割合は、下水と河川水でそれぞれ、28% (66 株) と 18% (46 株) であった。2011 年 11 月に採取した下水試料は、単離した腸球菌のうち 96% (26 株/27 株) がテトラサイクリンとエリスロマイシンに耐性を示す *E. faecalis* であり、多剤耐性腸球菌の割合が調査期間を通じて最も高かった。2012 年 1 月と 7 月に採取した河川水には、単離した腸球菌のうちの 40% が多剤耐性腸球菌であった。2011 年 10 月の試料から、バンコマイシンとテトラサイクリンの耐性株が検出されたが、菌種同定の結果、バンコマイシンに自然耐性を示す *Lactococcus* spp であった。全腸球菌数 (バンコマイシン無添加の mEI 培地) に対する多剤耐性腸球菌の割合を算出すると、水環境中に存在する腸球菌の約 2~3% が多剤耐性腸球菌であり、比較的高濃度で存在していることが明らかとなった。また、約 1 年間のモニタリング調査において、多剤耐性腸球菌の検出率は各月で変化するものの、季節変化は関係なく、水環境中に普遍的に存在することがわかった。

4. まとめ

本研究では、日本の地方都市である宮崎市の流入下水と河川水を対象として、薬剤耐性腸球菌の通年のモニタリング調査を実施した。得られた知見をまとめる。

(1) 下水と河川水からそれぞれ 239 株と 261 株単離した菌株のうち、VRE は確認されなかった。しかしながら、バンコマイシンに中度耐性を示す腸球菌は下水と河川水から、それぞれ 8.4% と 2% 検出された。

(2) 水環境に分布する腸球菌の 60% は、ヒトのみならず畜産や養魚場で使用される汎用性の高い抗生物質であるエリスロマイシン、あるいはテトラサイクリンのいずれかに耐性を示した。

(3) 下水から単離した腸球菌の主要種は *E. faecalis* が (48.7%, 55 株/113 株) であったのに対し、河川水からの腸球菌単離株の主要種は *E. faecium* が (44.1%, 26 株/59 株) であり、下水と河川水では腸球菌の主要種が異なった。

(4) 2 薬剤耐性以上を示す多剤耐性腸球菌は、下水と河川水でそれぞれ 28% (66 株) と 18% (46 株) であった。また、全腸球菌数に対する多剤耐性腸球菌の割合は、約 3% と決して低くない割合で存在していた。

Fig. 4 Identification and frequency of *Enterococcus* species isolated from sewage (a) and river water (b). These figures showed total amount of sampling month from June 2011 to July 2012.

Fig. 5 Antibiotic-resistant enterococci in sewage and river water during study period. (a) vancomycin-intermediate-resistant, (b) resistant to two or more antibiotics.

(5) バンコマイシン中度耐性腸球菌と多剤耐性腸球菌の検出率は、各月で変動するものの、季節的な変動は見られず、普遍的に水環境中に存在した。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（基盤研究（C））、研究代表者：鈴木祥広、課題名：都市を經由する河川流域における薬剤耐性菌の実態調査とその対策、課題番号23510101、平成23～25年度）によって行われた。

（原稿受付 2014年10月7日）

（原稿受理 2014年12月26日）

参 考 文 献

- 1) Lleó, M. M., Bonato, B., Benedetti, D. and Canepari, P. (2005) Survival of enterococcal species in aquatic environments, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **54**, 189-196.
- 2) U. S. Environmental Protection Agency (1986) Ambient Water-Quality Criteria for Bacteria-1986, EPA A440/5-84-002, U. S. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- 3) Bergeron, P., Oujati, H., Catalán Cuenca, V., Huguet Mestre, J. M. and Courtois, S. (2011) Rapid monitoring of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in bathing water using Reverse Transcription-quantitative PCR, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **214**, 478-484.
- 4) Nevers, M. B. and Whitman, R. L. (2011) Efficacy of monitoring and empirical predictive modeling at improving public health protection at Chicago beaches, *Water Res.*, **45**, 1659-1668.
- 5) Kirschner, A. K., Kavka, G. G., Velimirov, B., Mach, R. L., Sommer, R. and Famleither, A. H. (2009) Microbiological water quality along the Danube River: integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network, *Water Res.*, **43**, 3673-3684.
- 6) Furukawa, T., Yoshida, T. and Suzuki, Y. (2011) Application of PFGE to source tracking of faecal pollution in coastal recreation area: a case study in Aoshima Beach, Japan, *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 688-696.
- 7) Suzuki, Y., Kanda, N. and Furukawa, T. (2012) Abundance of *Enterococcus* species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, essential indicators of fecal pollution, in river water, *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **47**, 1500-1505.
- 8) Denkinger, C. M., Grant, A. D., Denkinger, M., Gautam, S. and D'Agata, E. M. C. (2012) Increased multi-drug resistance among the elderly on admission to the hospital—a 12-year surveillance study, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **56**, 227-230.
- 9) Huycke, M. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. S. (1998) Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future, *Emerg. Infect. Dis.*, **4**, 239-249.
- 10) Udo, E. E., Al-Sweih, N., Phillips, O. A. and Chugh, T. D. (2003) Species prevalence and antibacterial resistance of enterococci isolated in Kuwait hospitals, *J. Med. Microbiol.*, **52**, 163-168.
- 11) Cetinkaya, Y., Falk, P. and Mayhall, C. C. (2000) Vancomycin-Resistant Enterococci, *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 686-707.
- 12) Moscoso, M., Domenech, M. and Garcia, E. (2011) Vancomycin tolerance in Gram-positive cocci, *Environ. Microbiol. Rep.*, **3**, 640-650.
- 13) Deshpande, L. M., Fritsche, T. R., Moet, G. J., Biedenbach, D. J. and Jones, R. N. (2007) Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North American and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**, 838-839.
- 14) Hsueh, P. R., Chen, M. L., Sun, C. C., Chen, W. H., Pan, H. J., Yang, L. S., Chang, S. C., Ho, S. W., Lee, C. Y., Hsieh, W. C. and Luh, K. T. (2002) Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999, *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 63-68.
- 15) Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K. G., Leclercq, R., Lester, C. H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L. V., Sadowy, E., Simonsen, G. S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R. J., Witte, W. and Woodford, N. (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe, *Euro. Surveill.*, **13**, pii:19046.
- 16) Matsushima, A., Takakura, S., Yamamoto, M., Matsumura, Y., Shirano, M., Nagano, M., Ito, Y., Iinuma, Y., Shimizu, T., Fujita, N. and Ichihara, S. (2012) Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 1095-1100.
- 17) Oana, K., Kawakami, Y., Ohnishi, M., Ishikawa, M., Hirota, M., Tozuka, M., Atarashi, K., Baba, K., Fujiki, K., Okazaki, M., Honda, T. and Hayashi, T. (2001) Molecular and epidemiological study of the first outbreak of *vanB* type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **54**, 17-22.
- 18) 清野敦子, 長谷川泰子, 益永茂樹 (2004) 金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布, 水環境学会誌, **27** (11), 693-698.
- 19) 越川博元, 滝さやか, 井口彩, 小幡倫大, 田中宏明 (2008) 淀川水系における抗生物質, 溶存DNAの挙動と抗生物質耐性菌の特性, 水環境学会誌, **31** (11), 651-657.
- 20) Suzuki, Y., Kajii, S., Nishiyama, M. and Iguchi, A. (2013) Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents, *Sci. Total. Environ.*, **450-451**, 148-154.
- 21) U. S. Environmental Protection Agency (2002) Method 1600: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl- β -D-Glucoside Agar (mEI), EPA-821-R-02-022, U. S. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- 22) Nishiyama, M., Iguchi, A. and Suzuki, Y. (2015) Identification of *Enterococcus faecium* and *faecalis* as *vanC*-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan, *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **50**, 16-25.
- 23) Nagayama, A., Yamaguchi, K., Watanabe, K., Tanaka, M., Kobayashi, I. and Nagasawa, Z. (2008) Final report from the committee on antimicrobial susceptibility testing, Japanese Society of Chemotherapy, on the agar dilution method (2007), *J. Infect. Chemother.*, **14**, 383-392.
- 24) Clinical Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second Informational Supplement, M100-S22., **27** (1), 90-92.
- 25) Miyazaki, K., Hijikata, T., Furukawa, C., Unno, H. and Tanji, Y. (2006) Detection of *Escherichia coli* in the sewage influent by fluorescent labeled T4 phage, *Biochem. Eng. J.*, **29**, 119-124.
- 26) Varela, A. R., Ferro, G., Vredenburg, J., Yanik, M., Vieira, L., Rizzo, L., Lameiras, C. and Manaia C. M. (2013) Vancomycin resistant enterococci: from the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant, *Sci. Total. Environ.*, **450-451**, 155-161.
- 27) Nagulapally, S. R., Ahmad, A., Henry, A., Marchin, G. L., Zurek, L. and Bhandari, A. (2009) Occurrence of ciprofloxacin-, trimethoprim-sulfamethoxazole-, and vancomycin-resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant, *Water. Environ. Res.*, **81**, 82-90.
- 28) Morris, D., Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Mulligan, M. and Cormican, M. (2012) *Enterococcus faecium* of the *vanA* genotype in rural drinking water, effluent, and the aqueous environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 596-598.
- 29) Rosenberg Goldstein, R. E., Micallef, S. A., Gibbs, S. G., George, A., Claye, E., Sapkota, A., Joseph, S. W. and Sapkota, A. R. (2014) Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U. S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse, *Sci. Total. Environ.*, **466-467**, 404-411.
- 30) Iversen, A., Kuhn, I., Franklin, A. and Mollby, R. (2002) High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2838-2842.
- 31) Roberts, M. C., Soge, O. O., Giardino, M. A., Mazengia, E., Ma, G. and Meschke, J. S. (2009) Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in marine environments from the West Coast of the USA, *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 300-307.

- 32) Nam, S., Kim, M. J., Park, C., Maeng, P. J. and Lee, G. C. (2013) Detection and genotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. by multiplex polymerase chain reaction in Korean aquatic environmental samples, *Int. J. Environ. Health*, **216**, 421-427.
- 33) Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P. and Bernardo, F. (2006) Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants, *Water Res.*, **40**, 1735-1740.
- 34) Łuczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S. and Olańczuk-Neyman, K. (2010) Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant, *Water Res.*, **44**, 5089-5097.
- 35) Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T. and Ohta, M. (2003) Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5336-5342.
- 36) Kawalec, M., Pietras, Z., Daniłowicz, E., Jakubczak, A., Gniadkowski, M., Waleria, H. and Willems, R. J. (2007) Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 147-153.
- 37) Layton, B. A., Walters, S. P., Lam, L. H. and Boehm, A. B. (2010) *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR, *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 539-547.
- 38) Kühn, I., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M. A., Dominguez, L., Herrero, I. A. and Möllby, R. (2003) Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment- a European study, *Int. J. Food Microbiol.*, **88**, 133-145.

【論文要旨】

水環境における腸球菌を対象として、バンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin-resistant enterococci, VRE）やその他の薬剤耐性腸球菌の存在実態を調査した。調査は、宮崎市内の下水と河川水の定点において、2011年6月から2012年7月の期間で10回実施した。調査期間中に単離した全ての腸球菌から、VREは検出されなかった。しかしながら、バンコマイシンに中度耐性を示す腸球菌が、下水から8.4%（20株/239株）、河川水から1.9%（5株/261株）検出された。また、下水と河川水における腸球菌の60%は、汎用性の高い抗生物質であるエリスロマイシン、あるいはテトラサイクリンの一方に耐性を示した。約1年間実施した調査では、薬剤耐性腸球菌の検出率は月ごとに変動した。各種抗生物質に耐性を有する腸球菌は普遍的に水環境中に存在する。

キーワード：VRE, 腸球菌, 薬剤耐性, 下水, 河川水