

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤
の調査法等の確立のための研究

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金森 肇

令和2(2020)年5月

目 次

I . 総括研究報告

- 環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究-----1
金森 肇
(資料1)環境AMR文献レビュー 全文献リスト

II . 分担研究報告

- 1 . 医療と環境の薬剤耐性に関する研究-----29
金森 肇
- 2 . 環境微生物ゲノム情報の取得-----36
黒田 誠
- 3 . 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離-----46
山口 進康
- 4 . 動物からの薬剤耐性菌の分離と解析-----52
楠本 正博
- 5 . 残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言-----60
渡部 徹

III . 研究成果の刊行に関する一覧表-----65

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
（総括）研究報告書
「環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究」

研究代表者 金森 肇 東北大学大学院医学系研究科 総合感染症学分野 講師

研究要旨

国内外の河川、下水等の環境中から薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルス（人・動物・環境）の観点から環境の薬剤耐性（AMR）対策に関心が高まっている。環境中における薬剤耐性や抗菌薬の調査法が確立されておらず、本邦の環境中の薬剤耐性菌および抗菌薬の実態は明らかではない。本研究では薬剤耐性菌および抗菌薬の調査方法を確立することを目的とし、本邦における環境 AMR および残留抗菌薬の調査法の確立に向けた研究と実態調査を行った。環境 AMR モニタリングに資する下水処理場の放流水のメタゲノム解析法の標準作業手順書を確立し、各地方衛生研究所の協力を得て、全国的な環境水 AMR 調査を実施した。また、地域の病院排水の環境 AMR 調査、養豚場の下水の環境 AMR 調査、下水処理水および病院排水の抗菌薬分析を実施するとともに、国内および海外の環境 AMR 文献レビューとリスク評価を行った。人での医療関連感染やアウトブレイク事例、輸入感染症の原因となるカルバペネマーゼ遺伝子やコリスチン耐性遺伝子を保有する薬剤耐性菌が本邦の環境水から検出されていることから、さらに環境 AMR モニタリングを充実させ、ワンヘルスの観点から特定の薬剤耐性菌や耐性遺伝子が環境・動物・人の中で循環している可能性について理解していくことが重要である。環境中における薬剤耐性および残留抗菌薬の調査法を確立し、ワンヘルスの観点から環境 AMR に関する研究を継続していく必要がある。

研究分担者

黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター センター長
楠本 正博 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
細菌・寄生虫研究領域 ユニット長
渡部 徹 山形大学 農学部 教授
山口 進康 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部生活環境課 課長

研究協力者

馬場 啓聡 東北大学大学院医学系研究科感染制御インテリジェンスネットワーク寄附講座
勝見 真琴 東北大学病院 検査部
関塚 剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
糸川 健太郎 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
玉村 雪乃 農研機構動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域
渡部 真文 農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域
上垣 隆一 農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域
グリア・キルティ・シ 農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域
西山 正晃 山形大学 農学部
本多 了 金沢大学 理工研究域
原 宏江 金沢大学 理工研究域
河原 隆二 大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課
安達 史恵 大阪健康安全基盤研究所衛生化学部生活環境課

A．研究目的

人、医療、動物、家畜はもとより、国内外の河川、下水等の環境中からも薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルス(人・動物・環境)の観点から環境の薬剤耐性(AMR)対策に関心が高まっている。抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性の拡がりや人へのリスクが懸念されるが、人および動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。環境中における薬剤耐性や抗菌薬の調査法が確立されておらず、本邦の環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態は不明である。したがって、環境が人および動物に与えるリスクの定量評価・推定、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立が喫緊の課題である。

本研究班の研究目的は、以下の通りである。

1) 環境 AMR についての国内外の資料を収集し、文献レビューを実施する。2) 環境水の薬剤耐性を評価するための方法を確立し、本邦における環境水の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態を調査する。3) 環境由来薬剤耐性菌のゲノム情報を解析し、本邦の臨床・家畜由来薬剤耐性菌のゲノム情報データベースと比較検討することで、薬剤耐性ゲノムの観点からワンヘルス・アプローチの完成を図る。4) 環境中の薬剤耐性や抗微生物薬が人および動物へ与える影響についてリスクアセスメントを行う。

B．研究方法

令和元年度においては、本邦における環境 AMR および残留抗菌薬の調査法の確立と実態調査を実施した(図 1、図 2)。また、国内外における環境中の薬剤耐性に関する現状と課題を明らかにするため、昨年度に引き続き、国内および海外の環境 AMR 文献レビューとリスク評価を行った(図 3)。

本研究班における研究代表者および研究分担者は、各研究課題である 1) 医療と環境の薬剤耐性に関する研究(金森) 2) 環境微生物ゲノム情報の取得(黒田) 3) 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離(山口) 4) 動物からの薬剤耐性菌の分離と解析(楠本) 5) 残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言(渡部) 6) 国内外の文献レビューとリスク

アセスメント(全班員)への取り組みを継続した。

(倫理面への配慮)

本研究は環境中における薬剤耐性の調査法を確立するための研究であり、個人が識別可能なデータは取り扱わなかった。個人情報を取り扱う一部の研究においては、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づき、当該研究を実施する施設の倫理委員会での審査・承認を得てから実施した。微生物ゲノムデータの取り扱いに関しては、セキュリティー対策を実施し、データを公表する際には個別の施設名が特定できないように配慮した。

1．医療と環境の薬剤耐性に関する研究

医療施設からの病院排水は下水処理場へ流入し薬剤耐性の供給源となりうるため、引き続き大学病院の下水における環境 AMR モニタリングを行い、薬剤耐性の状況を調査した。病院排水のメタゲノム解析により、病院排水由来の細菌種および薬剤耐性因子を検索し、分離された薬剤耐性菌の全ゲノム解析を行った。

2．環境微生物ゲノム情報の取得

水再生センター(下水処理場)の放流地点から放流水原液を採水し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析による生物種および薬剤耐性因子の配列同定までの作業手順書を作成した。また、東京近郊の水再生センター 8 箇所から採水した処理放流水からセフェム系薬剤耐性腸内細菌科細菌の分離を行い、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌のゲノム情報を解析した。

3．大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

大阪府内の下水処理場 2 地点および河川 2 地点において、2019 年の 3 月と 8 月に採水を行い、薬剤耐性菌を分離し薬剤耐性遺伝子を検索した。環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の全国的なサーベイランスを行うために、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かし、国内 32 ヶ所の地方衛生研究所から協力を得て、環境水のサンプリングおよび

メタゲノム解析を行った。

4. 動物からの薬剤耐性菌の分離と解析

2018～2019年に北海道内170地点で採取した野生シカ糞便170検体から大腸菌を分離し、薬剤耐性を調査した。また、養豚場3農場で放流水が流入する用水路の上流側および下流側で採水し、メタゲノム解析法を用いて環境AMR調査を実施した。

5. 残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言

山形県内の都市下水処理場からの放流水を計8回採水した。採取された水試料を固相抽出法により前処理した後、液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)で測定した。また、病院排水で検出される抗菌薬の分析も行い、環境水中の残留抗菌薬との比較(種類や濃度レベル)を行った。宮城県内の病院排水中のカルバペネム系などの残留抗菌薬の検出頻度と濃度をモニタリングし、実態調査を行った。

6. 文献レビューとリスクアセスメント

国内外の環境AMR文献レビューとリスク評価を行った。1)環境由来の薬剤耐性菌や残留抗菌薬が人・動物にどんな影響があるのか、2)環境、動物、人の中で共通する特定の薬剤耐性は何か、3)環境由来の薬剤耐性菌に曝露されることの人および動物へのリスクや曝露に対する介入策はあるのか等の問題点について文献を収集した。昨年度は国内の環境AMR文献レビューが不十分であったため、令和元年度においては本邦の環境中の薬剤耐性が人や動物に及ぼす影響について文献やデータベースを用いて検討した。また、海外の環境AMRに関するエビデンスを整理するために、U.S. Centers for Disease Control and Prevention(米国疾病予防センター)、UK Science & Innovation Network(英国科学イノベーションネットワーク)、およびWellcome Trust(ウェルカムトラスト)から発表された、「環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ(Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment)」を翻訳し、海外における環境

AMRの現状と課題を分析した。

C. 研究結果

1. 医療と環境の薬剤耐性に関する研究

(1) 大学病院Aにおける病院排水のメタゲノム解析および分離された薬剤耐性菌の全ゲノム解析を用いて病院排水のAMRモニタリング体制を構築し、病院排水の薬剤耐性因子を明らかにした。

(2) 病院排水からカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌を分離したとともに、全ゲノム解析により *bla_{IMP-1}* と *mcr-9* を同時に保有する株を同定した。

2. 環境微生物ゲノム情報の取得

(1) 環境AMRモニタリングに資する水再生センター(下水処理場)放流処理水のメタゲノム解析法の標準作業手順書SOPを確立した。

(2) 全国レベルの環境AMRモニタリングを実施するため、32カ所の地方衛生研究所から計54箇所の水再生センターの放流水を収集し、メタゲノム解析を行うとともに本邦の環境AMRの基準について検討した。

(3) 多摩川および東京湾岸に隣接する水再生センターの放流処理水から海外型カルバペネマーゼ(KPC-2, NDM-5)を保有する腸内細菌科細菌株を分離し、環境においても既に海外型の侵入を示唆するデータが得られた。

3. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

(1) メタゲノム解析法では試料により検出率に差が見られたものの、アミノグリコシド、β-ラクタム剤、サルファ剤、テトラサイクリン耐性に係る薬剤耐性因子の検出が多かった。また、下水処理場放流水と下流河川における薬剤耐性因子の検出割合は同様であった。

(2) 3回の調査研究においてカルバペネマーゼ産生株が分離され、都市河川における定着の可能性が示された。また、都市河川水中にコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* を保有する腸内細菌が存在することを確認した。

4. 動物からの薬剤耐性菌の分離と解析

(1) 2018年10月～2019年2月に北海道内128地点で捕獲した野生シカの糞便128検体から大腸菌を分離し、薬剤感受性試験を実施した。合計521株の大腸菌のうち、15株(2.9%)が薬剤耐性を示した。

(2) 処理水の放流状況が異なる3養豚場について、放流水と放流先の農業用水路の上流および下流側で試料を採取し、メタゲノム解析を行った。環境水中の薬剤耐性遺伝子の分布には養豚場からの放流水が強く影響している事例が確認された。特に、テトラサイクリン系およびスルホンアミド系抗菌剤や第四級アンモニウム塩は、すべての農場および調査時期で、放流水からの耐性遺伝子の負荷がみられた。

5. 抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言

(1) 環境水の中でももっとも高い濃度で抗菌薬が残留していると思われる下水処理水での実態調査を開始した。山形県内の下水処理場の調査では、毎月検出される抗菌薬の種類が類似していることが明らかになり、サルファメトキサゾール、オフロキサシンおよびレボフロキサシン、トリメトプリム、エリスロマイシンが高頻度で検出された。

(2) 病院排水・都市下水ともに、レボフロキサシンが高濃度かつ高頻度(>75%)で検出された。メロペネムとイミペネムは、検出頻度は7～27%と低く、濃度はそれぞれ0.013～1.138 $\mu\text{g/L}$ 、0.017～0.060 $\mu\text{g/L}$ であった。病院排水は都市下水に比べて検出濃度のばらつきが大きかった。

6. 文献レビューとリスクアセスメント

2018年度に収集した国内外の環境AMR文献計59報に続き、2019年度は国内の文献を中心に計59報を収集し、2018年度に構築した環境AMRの文献情報閲覧サイト(<https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr>)に登録した。収集された論文は、医療や病院排水におけるAMRについての論文が13報、河川や下水処理場に係るAMRについての論文が25報、環境水中の残留抗菌薬に関する論文が12報、家畜や畜産場におけるAMRに関する論文が5報、その他に関する論文が4報あり、

そのうち少なくとも医療や病院排水におけるAMRについての論文7報、河川や下水処理場に係るAMRについての論文15報、家畜や畜産場におけるAMRに関する論文4報、その他に関する論文1報が国内からの報告であった。人・家畜および病院や畜産場からの排水、そして河川や下水処理場におけるAMRや残留抗菌薬の分布については、国内でも広く検討されていたが、排水や排水が流入する河川や下水処理場のAMRや残留抗菌薬が人や動物に与える直接的なリスクを明らかにした報告は見られなかった。

環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ現状と課題(原文: Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges. 2018)は2020年3月25日にAMR臨床リファレンスセンターwebsite(<http://amr.ncgm.go.jp/medics/2-8-1.html#sonota>)で公開された。環境中の耐性菌や抗微生物薬が人の健康に及ぼす影響については未解明な部分が多いが、少なくとも環境中の耐性菌への感染リスクは存在する。人および動物からの排泄物中には、薬剤耐性菌や抗菌薬が存在し、不適切な排泄物の処理はこれらによる環境汚染につながるため、基本的な衛生の維持がその予防に重要である。また、抗菌薬の製造過程で発生する廃棄物や、農薬に含まれる抗菌薬による環境汚染の可能性が以前から指摘されているが、これらに対するモニタリングや予防手段に関する検討は少なく、地域によってはその実態すら明らかでない。AMR拡散阻止のため、これらに対する世界規模の取り組みが必要である。

D. 考察

病院排水の薬剤耐性の調査法として、メタゲノム解析法と培養法を行い、病院排水由来の薬剤耐性菌のゲノム解析を行い、薬剤耐性の特徴を明らかにした。病院排水のメタゲノム解析では各薬剤耐性遺伝子の割合に一定の傾向はみられたものの、各薬剤耐性遺伝子の検出割合は異なっていた。培養法では国内で臨床上問題となるカルバペネマーゼ遺伝子やESBL遺伝子を同定した。病院排水のAMR

モニタリングを行う際には、メタゲノム解析法だけでなく、培養法を用いて臨床上問題となる薬剤耐性菌のゲノム解析も併用して行うことが有用であると考えられた。病院排水の人への薬剤耐性リスクに関する研究を継続していく必要がある。

環境 AMR モニタリングに資する作業手順書を作成し、さらに全国展開するための体制が整備された。メタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出には課題があるが、収集した放流水を同一の作業手順書を使用して実施した広域の環境 AMR 調査であるため、ゲノム情報の比較解析により自治体特有の放流水による環境負荷の実態を薬剤耐性遺伝子レベルで明らかにすることができた。放流水からセフェム系耐性菌およびカルバペネマーゼ産生細菌を分離できることが示され、ESBL 産生大腸菌の健常者キャリアーの増加が懸念されている現状で健常者キャリアーと環境 AMR との関連性について検討する必要がある。このような環境 AMR モニタリングを継続的に実施することは、管轄地域で発生している薬剤耐性の状況を事前に探知するために有用であると考えられた。

大阪府内の下水処理場放流水と下流河川のメタゲノム解析によって検出された β -ラクタマーゼ関連遺伝子は GES、IMP、OXA 等が多数を占めたが、対象地域の医療機関から報告されるものとも異なっていた。メタゲノムで検出された耐性遺伝子の由来については、さらなる調査が必要である。メタゲノム解析による AMR の環境水中のモニタリングは、薬剤耐性遺伝子の全体像の把握や他地域との比較による地域特有の耐性遺伝子の検出に有用であると考えられた。また、培養法ではカルバペネマーゼおよび ESBL 産生腸内細菌科細菌が検出されたことから、検出感度に優れた独自の分離培養を同時に行い、大都市圏で問題となる環境中の薬剤耐性の状況を理解していくことが重要である。

動物の薬剤耐性調査では、昨年度に実施した国内 40 道府県の野生シカ糞便由来大腸菌における結果と同様に、北海道内においても野生シカにおける薬剤耐性菌の分布率が低いことが明らかになり、家畜との接触および薬剤耐性菌の伝達の機会は同程度であると考え

られた。また、養豚場の放流水による周辺の環境水への薬剤耐性負荷は農場によって異なっていた。放流水から検出された耐性遺伝子の種類や量は、概ね養豚場で使用される抗菌剤に類似していたが、共選択などの影響によって異なる例も認められた。環境調査を実施する際に、特定の耐性遺伝子が養豚場放流水由来の指標として活用できる可能性が示唆された。

環境水中の残留抗菌薬の調査では、比較的抗菌薬の濃度が高いと想像される下水処理水と病院排水の残留抗菌薬を測定した。下水処理水と病院排水で高頻度に検出される抗菌薬の種類が類似していることが明らかになった。このことは病院排水が合流する都市下水でも共通しており、環境水の残留抗菌薬の調査で対象となる抗菌薬を選択する上で重要なデータと考えられた。また、今回用いた分析方法によって環境水中の残留抗菌薬の実態調査が可能であることが示された。

環境 AMR に関する文献のレビューでは、国内における病院や畜産場の排水、および河川や下水処理場に分布する AMR や残留抗菌薬の実態の一部が明らかとなったが、排水中や、排水が流入する河川・下水処理場における AMR や残留抗菌薬の、人に対する直接的なリスクを示した報告はなく、排水や河川・下水処理場の AMR や残留抗菌薬を減少させる有効な介入策についても明らかではなかった。排水および河川・下水処理場における AMR および残留抗菌薬の継続的なモニタリングと、それらがもたらす人・環境への実際のリスク評価が今後必要と思われた。

環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブより得られた海外のエビデンスを整理すると、以下の点が環境 AMR 対策として重要と考えられた。1) 廃棄物が適切に処理されていない場合、環境は抗菌薬および耐性菌で汚染される。2) 環境中の廃棄物、抗菌薬、耐性菌との関係および人間の健康への影響はよく理解されていない。3) 科学的根拠として抗菌薬や薬剤耐性因子は環境に拡散し、環境水中の耐性菌の曝露によって感染リスクが高まる。4) 耐性菌の人の健康へのリスクを理解するため、環境水のどこに、どれだけの耐性菌が存在しているか評価する。5) 環境水の耐性菌を測定するためにサンプリングと試験方法を評価し、

ブラクティスを標準化する。

E . 結論

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、厚労(人)・農水(動物)各分野の取り組みが実施されている中、環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の人・動物に与える影響を評価する手法を確立し、環境分野の薬剤耐性への影響を解明することは、ワンヘルス・アプローチの観点から薬剤耐性に関する施策を推進していくために非常に重要である。

平成 30 年度および令和元年度の研究成果を踏まえて、本研究班で次のような取り組みを継続していく。

(1) ワンヘルスの観点から環境・動物・人における特定の薬剤耐性菌や耐性遺伝子の循環についての研究を推進する。

(2) 本研究班の大都市圏の成果を踏まえ、環境 AMR モニタリングの全国展開へ向け、さらに協力体制を各自治体へ要請する。

(3) 環境(特に下水排水)の薬剤耐性および抗菌薬の状況を把握するための調査方法を確立する。

(4) 国内および海外の文献情報収集および評価を継続し、文献レビューを実施するとともに、環境中の薬剤耐性および抗菌薬の人および動物へ影響に対するリスク評価、介入の必要性に関する提言を行う。

本邦の薬剤耐性および抗菌薬の実態調査を充実させ、本研究結果と国内外の文献情報をもとにリスク評価を行い、環境中の薬剤耐性に必要な対策を明らかにしていく。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas*

caviae isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. *Environ Microbiol Rep.* 2019 Aug;11(4):589-597. doi: 10.1111/1758-2229.12772. Epub 2019 May 31. PubMed PMID: 31106978; PubMed Central PMCID: PMC6851574.

Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Kuroda M. Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-coproducing *Escherichia coli* GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay. *Infect Drug Resist.* 2019 Jul 23;12:2243-2249. doi: 10.2147/IDR.S215273. eCollection 2019. PubMed PMID: 31413601; PubMed Central PMCID: PMC6662510.

澁木理央, 西山正晃, Chiemchaisri Chart, Chiemchaisri Wilai, 渡部徹, 抗菌薬存在下での培養による活性汚泥中の ESBL 産生遺伝子の濃度変化, 土木学会論文集 G (環境), 75(7), III_309-III_320, 2019

渡部徹, 水中の薬剤耐性菌による健康リスク評価, 水環境学会誌, 43(A)(3), 99-102, 2020

Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Ishikawa K, Hosaka T, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Hasegawa M, Kawazoe Y, Kushimoto S, Kaku M. *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia associated with drowning and river water as a source of infection, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2020 in press.

その他発表

黒田誠, 関塚剛史, 瀬川孝耶, 橋野正紀, 稲嶺由羽. Characterization of a *bla*_{KPC-2}-positive *Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas* spp. isolated from the effluent of urban wastewater treatment plants in Japan. 第 92 回日本細菌学会、口頭、札幌市

Global Genome Epidemiology Database (gGENEPID) 第 16 回日本台湾合同シンポ

ジ ウ ム The 16th Japan-Taiwan
Symposium on Infectious Diseases Tokyo,
口頭、東京

Global Genome Epidemiology Database
(gGENEPID), Makoto Kuroda, Regional
JPIAMR Workshop in Asia: Fostering
Knowledge on Clinical Epidemiology, AMR
Policy, Therapeutics and Diagnostics to
Combat AMR in Asia. Oral presentation.
Suwon in South Korea.

細菌ゲノミクスを支援する Global Genome
Epidemiology Database (gGENEPID)の開発
関塚剛史、谷津弘仁、糸川健太郎、黒田誠。
第 93 回日本細菌学会、口頭、名古屋市

金森肇. 溺水後に発症したクロモバクテリウ
ム感染症と河川の環境調査. 救急感染症フォー
ラム、仙台、2019 年 4 月

Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka
T, Katsumi M, Baba H, Oshima K, Tokuda
K, Kaku M. Genomic analysis of
Chromobacterium haemolyticum causing
near-drowning pneumonia and
environmental investigation of river water
as a source. 31stICC/4thGCCMID, Dubai,
UAE November 2019.

安達史恵、関塚剛史、山口進康、倭正也、福
岡京子、黒田誠、河原隆二. 大阪府内で分離
された FRI 型カルバペネマーゼ産生
Enterobacter 属菌のゲノム解析. 第 31 回日
本臨床微生物学会, 金沢, 2020 年 2 月

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

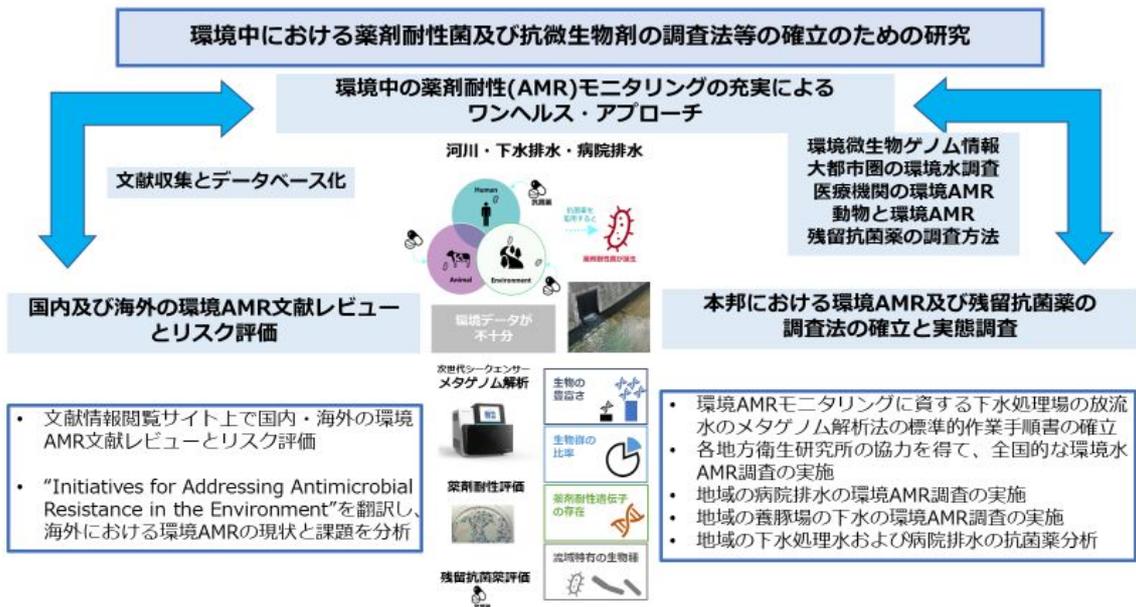


図1 環境中における薬剤耐性菌および抗微生物剤の調査法等の確立のための研究（令和元年度）



図2 環境水の薬剤耐性の調査法

環境AMR文献レビューとリスク評価

1. 海外および日本の環境AMR文献レビュー

- 国内外の現状を知る上で、環境AMR文献を収集し、環境水由来の薬剤耐性菌に曝露されることのヒト及び動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性に関して評価する
- 論文要旨とともに環境AMR websiteで文献を共有する
- 日本の現状を知る上での環境AMR文献評価は行われていないため、日本の文献レビューとリスク評価を行う必要がある

2. US CDC & UK Wellcome Trust. Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges, 2018.

環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ：現状と課題

- 海外の現状を知る上で、US CDC & UK Wellcome Trust 2018のレポートを翻訳し、情報公開する
- Human and Animal Contamination 人と動物の汚染
- Antimicrobial Manufacturing Waste 抗微生物薬の産業廃棄物
- Antimicrobials Used as Crop Pesticides 農薬として使用される抗微生物薬

図3 環境 AMR 文献レビューとリスク評価

資料 1 令和元年度環境 AMR 文献一覧

論文名	概要
<p>石畝 史、京田 芳人、望月 典郎、布施田 哲也、重屋志 啓盛、泉谷 秀昌、渡辺 治雄. 多剤耐性 <i>Salmonella enterica</i> Serovar Newport における患者由来株と下水由来株との比較検討. 感染症誌. 2005;79:270-5.</p>	<p>2003 年に福井県内の下痢症患者および下水流入水から検出された多剤耐性 <i>Salmonella enterica</i> Serovar Newport について比較検討を行った論文。3 か所の浄化センターから採取された計 5 検体から計 9 株の blaCMY 陽性多剤耐性 S. Newport が検出され、このうち患者の住所地とは別の地域の浄化センター2 施設から検出の 3 株は薬剤感受性パターンおよび PFGE パターンが患者由来株と一致した。多剤耐性 S. Newport は広範囲に分布している可能性があり注意が必要である。</p>
<p>諏訪 守. 下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の実態. バムサジャーナル. 2015;27:7-11.</p>	<p>関東圏内の下水処理施設 3 か所における流入下水および二次処理水中の抗菌薬耐性大腸菌を検出・測定し、その耐性遺伝子の保有状況について調査した論文。検出された大腸菌は多くがアンピシリン・テトラサイクリンに耐性を示すもので、レボフロキサシン耐性の大腸菌はそれらに比較し少なかった。家庭排水が主に流入する処理施設に比べ、病院排水の負荷の強い施設では多剤耐性大腸菌の存在割合が多かった。流入水に比べ二次処理水では多剤耐性大腸菌の存在割合が増加していた。また、多剤耐性大腸菌は、薬剤耐性のない大腸菌に比べ塩素消毒耐性が大きい傾向にあった。各種排水施設における薬剤耐性菌の、継続した調査・監視が重要である。</p>
<p>佐々木 美江、矢崎 知子、後藤 郁男、畠山 敬、渡邊 節、谷津 壽郎、齋藤 紀行. 宮城県の河川等における薬剤耐性菌. 宮城県保健環境センター年報. 2008;26:31-34.</p>	<p>宮城県の鳴瀬川水系および白石川水系を対象に、河川水中の薬剤耐性菌の分布を調査した論文。アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、テトラサイクリン耐性の腸内細菌</p>

	<p>科細菌、緑膿菌および腸球菌が、養魚場や農地・畜産団地の下流域水中を中心に検出された。畜水産現場における薬剤耐性菌の出現状況および河川水中の薬剤耐性菌に対し今後更なる調査・検討が必要である。</p>
<p>Sachiko Nakamoto, Misaki Sakamoto, Kana Sugimura, Yuki Honmura, Yuki Yamamoto, Natsumi Goda, Hiroo Tamaki and Naoto Burioka. Environmental Distribution and Drug Susceptibility of <i>Achromobacter Xylosoxidans</i> Isolated from Outdoor and Indoor Environments. <i>Yonago Acta Medica</i>. 2017;60:67-70.</p>	<p>鳥取県西部の一地域における河川・池等の環境、および住居内の流し台や浴槽・下水からサンプリングされた水中より分離された <i>Achromobacter xylosoxidans</i> について、薬剤感受性の検討を行った論文。全 89 サンプル中、環境水中から 6 種、住宅環境から 3 種の <i>A. xylosoxidans</i> 株が分離され、このうち環境水中の 3 種、住宅環境中の 2 種は種々のアミノグリコシド系抗菌薬に対し耐性を示した。薬剤耐性傾向が強く、<i>A. xylosoxidans</i> は住環境および屋外に広く分布しており注意が必要である。</p>
<p>Ryota Gomi, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto, Michio Tanaka, Satoshi Ichiyama, Minoru Yoneda, Yasufumi Matsumura. Molecular Characterization of a Multidrug-Resistance IncF Plasmid Carrying mcr-3.1 in an <i>Escherichia coli</i> Sequence Type 393 Strain of Wastewater Origin. <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i>. 2019;54:524-6.</p>	<p>関西地区の下水から検出された ESBL 産生大腸菌 ST393(JSWP006)の IncF プラスミドについて解析した論文。コリスチン耐性遺伝子 <i>mcr-3.1</i> と他 15 種類(<i>qnrS1</i>, <i>floR</i>, <i>bla_{CTX-M-55}</i>, および <i>catA2</i> など)の耐性遺伝子を保有していた。<i>mcr-3.1</i> は中国で最初に発見されたが、日本の下水にもすでに存在していることが明らかになった。下水をはじめとする環境の薬剤耐性因子をモニタリングする必要がある。</p>
<p>Sachie Yomoda, Toyoji Okubo, Ayako Takahashi, Masami Murakami, Shizuko Iyobe. Presence of <i>Pseudomonas putida</i> Strains Harboring Plasmids Bearing the Metallo-β-Lactamase Gene <i>bla_{IMP}</i> in a Hospital in Japan. <i>Journal of Clinical Microbiology</i>. 2003;41:4246-51.</p>	<p>病院の排水管関連のカルバペネム耐性菌(IMP 産生 <i>Pseudomonas</i>)によるアウトブレイクを世界で初めて報告した論文。群馬大学医学部附属病院で 1997 年 1 月から 2001 年 12 月までの期間に <i>Pseudomonas putida</i> 83 株を分離した。27 株がカルバペネム耐性を示し、すべてが <i>bla_{IMP}</i> 陽性であった。排水管の拭き取りによ</p>

	<p>って <i>P. putida</i> 5 株を得られた。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で入院患者由来株と病院環境由来株で同一のパターンを示した。blaIMP 遺伝子は、接合伝達あるいは形質転換によって <i>Pseudomonas aeruginosa</i> のレシピエント株に全て移入可能で、カルバペネム耐性を付与した。</p>
<p>林 航、田中 隼斗、飯村 将樹、長野 則之、春日 恵理子、名取 達矢、松本 剛、磯田 達也、長野 由紀子. 病院内シンクから検出されたカルバペネマーゼ産生菌:薬剤耐性菌のリザーバーとしての病院内環境の重要性. 病原微生物検出情報. 2019;40:12-13.</p>	<p>国内の2つの医療施設で病棟洗浄用シンクや病棟汚水槽からカルバペネマーゼ産生菌が検出された事例について報告している。1. NDM 型産生菌の患者臨床材料からの検出履歴のない施設の病棟洗浄用シンクより検出された NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ産生 <i>Acinetobacter pittii</i> (国内の医療環境から NDM-1 産生菌が検出された初めての事例)。2. High Care Unit (HCU) での1例の IMP-1 産生 <i>Enterobacter cloacae</i> 検出事例に基づき実施された病棟環境調査で汚水槽より検出された GES-24 カルバペネマーゼ産生 <i>Citrobacter freundii</i> (GES 型カルバペネマーゼはカルバペネム系薬の分解活性が低いため、薬剤感受性試験のみでは見逃されることがあり、病棟汚水槽から医療環境へ拡散する可能性あり)</p>
<p>Kazuyumi Miyagi, Itaru Hirai. A survey of extended-spectrum β-lactamase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> in environmental water in Okinawa Prefecture of Japan and relationship with indicator organisms. <i>Environmental Science and Pollution Research</i>. 2019;26:7697-710.</p>	<p>沖縄県で河川水および未処理下水の ESBL 産生腸内細菌科細菌の調査を実施した論文。沖縄県の18の河川から36サンプル、4つの排水処理施設 (WWTP) に流れ込む10サンプルを収集し、分離株の菌種同定、ESBL 表現型および遺伝子型、PFGE 型を決定した。ESBL 産生菌141株のうち、14.9%が <i>bla</i>_{CTX-M-15}、54.6%が <i>bla</i>_{CTX-M-14} 型であった。これらは沖縄の病院分離株においても検出された。河川水と下水から</p>

	<p>分離した株 2 対において PFGE で関係する可能性のパターンを認め、環境から分離された ESBL 産生菌は人由来であることが示唆された。また、ESBL 産生菌は総生菌数 6.0×10^3 CFU/ml および糞便性大腸菌群 4.3×10^2 MPN/100ml で有意に検出されたため、これらが衛生指標として有用であるかもしれない。</p>
<p>Takashi Azuma, Kana Otomo, Mari Kunitou, Mai Shimizu, Kaori Hosomaru, Shiori Mikata, Mao Ishida, Kanae Hisatmatsu, Ayumi Yunoki, Yoshiki Mino, Tetsuya Hayashi. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. Science of the total environment. 2019;657:476-84.</p>	<p>病院排水から地表水への薬剤耐性菌の分布と寄与について研究した論文。病院排水、下水処理場、河川水における 58 の医薬品成分および 6 種類の薬剤耐性菌 (CRE、ESBL、MRSA、VRE、MDRA、MDRP) の分布を調査した。病院排水から下水処理場流入水への医薬品成分の負荷は 0.1% ~ 15%であったが、抗菌薬では下水処理場放流水から河川水への負荷は高く 60%と推定された。病院排水中に検出された薬剤耐性菌は 29 CFU / mL ~ 1,805 CFU / mL であり、病院排水から下水処理場流入水への薬剤耐性負荷は 0.1% ~ 5.1%と推定された。地表水中の医薬品成分や薬剤耐性菌の負荷として下水処理場の寄与は高かったが、高度な下水処理システムとしてのオゾン処理法は、広範囲の医薬品成分や薬剤耐性菌を効果的に除去した。水環境を安全に保つためには、地表水に放出される前に下水処理場および医療施設で環境汚染負荷を減らしていくことの重要性を示唆している。</p>
<p>東 剛志. 医療機関を対象にした新規水処理技術の開発. 薬学雑誌. 2018;138:289-96.</p>	<p>医療機関に由来する排水として公共下水道に放流される病院排水の現状、医薬品の存在実態、環境へのリスク評価、除去技術についての総説。病院排水の研究は世界的に見てもまだ限られており、国内での状況もほとんどわかって</p>

	<p>いない。病院排水中に存在する抗菌薬では、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、クラリスロマイシンが病院排水から高濃度で検出される。下水処理場の流入水に含まれる抗菌薬の成分は病院排水由来の負荷割合が高いため、河川に放流される医薬品成分の負荷を軽減するために、下水処理場における処理技術の向上だけでなく、医療機関でも公共下水道に放流する前に処理を行う必要性を示唆している。病院排水の処理技術として、生物処理、UV、過酸化水素、オゾン、およびそれらの組み合わせを用いた方法が期待されている。</p>
<p>Vanessa R. Marcelino, Michelle Wille, Aeron C. Hurt, Daniel González-Acuña, Marcel Klaassen, Timothy E. Schlub, John-Sebastian Eden, Mang Shi, Jonathan R. Iredell, Tania C. Sorrell, Edward C. Holmes. Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. BMC Biology. 2019;17:31.</p>	<p>オーストラリアの野鳥の Gut microbiota。下水処理場近くの水を嗜む Ducks は ARGs が多く、南極のペンギンたちは少ない。</p>
<p>Esther-Maria Antão, Szilvia Vincze, Regina Hanke, Lukas Klimmek, Katarzyna Suchecka, Antina Lübke-Becker, Lothar H. Wieler. Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead. Gut Pathogens. 2018;10:52.</p>	<p>AMR に関する 3As, Awareness, Availability, Alternatives のレビュー。例えば、静菌抗菌薬の Amphenicols と Macrolides の組み合わせは農業と臨床のなかで考慮すべき課題かもしれない。</p>
<p>Susan M. Joseph, Thomas Battaglia, Julia M. Maritz, Jane M. Carlton, Martin J. Blaser. Longitudinal Comparison of Bacterial Diversity and Antibiotic Resistance Genes in New York City Sewage. mSystems. 2019;4:e00327-19.</p>	<p>2015 年の 2,5,8 月の 3 回、New York City 地域 14 箇所の下処理場の流入水 (raw sewage) を使用して、16S-metagenome, および ARGs の qPCR で評価している。もともと人口の多い地域なので、地域差は少なく、採取時期で多少変動あり。ARGs も <i>ermB</i>, <i>sul1</i>, <i>mecA</i></p>

	等一部限定なので、包括的な ARG 検出ができていないが、NYC のバックグラウンドが理解できる。
Junyan Qu, Yimei Huang, Xiaoju Lv. Crisis of Antimicrobial Resistance in China: Now and the Future. <i>Frontiers in Microbiology</i> . 2019;10:2240.	中国の AMR 問題を包括的にレビューされている。中国での報告内容、環境 AMR のことも盛り込まれている。
Grant R. Whitmer, Ganga Moorthy, Mehreen Arshad. The pandemic <i>Escherichia coli</i> sequence type 131 strain is acquired even in the absence of antibiotic exposure. <i>Plos Pathogens</i> . 2019;15:e1008162.	市中に蔓延する <i>E. coli</i> ST131 clone の特徴 (伝播、病原性、遺伝型、プラスミド) について簡潔にまとめられている。健常者キャリアーの増加傾向が全く止まらず、それが故に数多くの薬剤耐性因子を伝達しうる基盤となってしまう。このクローンを指標にすれば、伝播抑制・減少に貢献できる介入法を見つけることができるだろう。
Gabriela K. Paulus, Luc M. Hornstra, Nikiforos Alygizakisc, Jaroslav Slobodnik, Nikolaos Thomaidis, Gertjan Medema. The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream communal wastewater system in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. <i>International Journal of Hygiene and Environmental Health</i> . 2019;222:635-44.	PharmaFilter・Membrane Bioreactor (Microfiltration) (MBR)・Ozonation (Ozon.)・Granulated Activated Carbon (GAC)・UV Treatment (UV) の組み合わせ等の処理能力を評価した論文。廃水処理法の論文は他にも沢山あるが、そのうちの 1 つ。抗菌薬および ARGs も評価している。
Xiaohui Liu, Guodong Zhang, Ying Liu, Shaoyong Lu, Pan Qin, Xiaochun Guo, Bin Bi, Lei Wang, Beidou Xi, Fengchang Wu, Weiliang Wang, Tingting Zhang. Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. <i>Environmental Pollution</i> . 2019;246:163-73.	北京近郊の病院と河川の抗菌薬と ARGs の判定。The concentrations of the 11 detected antibiotics ranged from not detected (ND)-16800 ng L ⁻¹ in diverse water samples from Beijing, and fluoroquinolones were detected at the highest concentration, especially in the hospital samples. と、病院排水が特に濃い。The relative abundance of most ARGs in

	<p>STPs exhibited a declining trend in the order of influent > secondary effluents > effluent. However, the relative abundance of sul 1, sul 2 and tetC in the effluent was higher than those in the influent. と、排水浄化でキレイになっているように見えるが、sul1 sul2 tetC の相対量は増加している。 Good removal efficiencies by treatment processes were observed for tetracyclines and quinolones, and low removal efficiencies were observed for sulfonamides and macrolides. 下水処理でテトラサイクリンとキノロンは減量しているが、サルファ剤とマクロライドの除去は不十分のようだ。</p>
<p>Kaitlyn R Kelly, Bryan W Brooks. Global Aquatic Hazard Assessment of Ciprofloxacin: Exceedances of Antibiotic Resistance Development and Ecotoxicological Thresholds. Progress in molecular biology and translational science. 2018;159:59-77.</p>	<p>世界各地の fresh surface water, groundwater, saltwater, treated municipal effluent, raw municipal sewage, treated hospital effluent, and raw hospital sewage のシプロフロキサシンの濃度測定を実施している。 ecotoxicological predicted no effect concentrations (PNEC) for ciprofloxacin in water として (100 ng/L つまり 0.0001 µg/mL) を設定している。</p>
<p>Manisha Lamba, Sonia Gupta, Rishabh Shukla, David W. Graham, T.R. Sreekrishnan, S.Z. Ahammada. Carbapenem resistance exposures via wastewaters across New Delhi. Environment International. 2018;119:302-8.</p>	<p>インド・ニューデリーの CRE 調査。 Among CRE isolates (n = 4077), 82%, 75%, 71% and 43% of the strains from hospitals, sewer drains, river samples, and STPs, respectively, contained <i>bla</i>_{NDM-1}, implying STPs have relatively fewer <i>bla</i>_{NDM-1} positive CRE in their effluents. The most common CRE isolates in the drains were <i>Pseudomonas putida</i> (39%) followed by <i>Acinetobacter baumannii</i> (20%) and <i>Pseudomonas montelli</i> (19%). とあり、</p>

	NDM-1 汚染が激しいことと、 <i>Pseudomonas</i> 属が主体となる CRE のよう。
Elena Buelow, Jumamurat R. Bayjanov, Eline Majoor, Rob J.L. Willems, Marc J.M. Bonten, Heike Schmitt, Willem van Schaik. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. <i>FEMS microbiology ecology</i> . 2018;94:fiy087.	オランダの調査。病院排水は WWTP 流入水 Influent と細菌叢に大きな違いなく (16S-メタゲノム)、ARGs (qPCR 定量) は多少 病院排水が多め。Fig. 2b の縦軸が log10 で騙されそうだが、病院排水が明らかに高い。sul1, qacE の class 1 integron が多く、blaGES も多い。病院排水と WWTP 放流水との違いがみられない ARGs は自然界に広く存在するバックグラウンドだと思われる。
V.K. Arora, Kalpana Chandra, Mina Chandra. Occupational tuberculosis in sewage workers: A neglected domain. <i>Indian Journal of Tuberculosis</i> . 2019;55:3-5.	インドの下水処理場職員が 結核感染症 (TB) リスクが高いとの報告。抗酸菌は塩素耐性が強く、次亜塩素酸では殺菌できないため、インドのような排水汚染が高い地域では TB として露見したのではないか? では、日本の下水処理場の職員にどのようなリスクが考えられるのか? 調べるべきだろう。
Pablo Fresia, Verónica Antelo, Cecilia Salazar, Matías Giménez, Bruno D'Alessandro, Ebrahim Afshinnekoo, Christopher Mason, Gastón H. Gonnet, Gregorio Iraola. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. <i>Microbiome</i> . 2019;7:35.	ウルグアイの首都モンテビデオでのビーチおよび下水処理場サンプルの比較ゲノミクス。当たり前のような相違が検出されている。サルファ剤および beta-lactam 耐性が顕著な違いを見せている。
QuocTuc Dinh, Elodie Moreau-Guigon, Pierre Labadie, Fabrice Alliot, Marie-Jeanne Teil, Martine Blanchard, Joelle Eurin, Marc Chevreuil. Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. <i>Science of Total Environment</i> . 2017;575:758-	Antibiotic concentrations in the hospital effluent (from 0.04 to 17.9µg/L) were ten times higher than those measured in the domestic effluent (from 0.03 to 1.75µg/L), contributing to 90% of the antibiotic inputs to the WWTP.

66.	
<p>Marion Hutinel, Patricia Maria Catharina Huijbers, Jerker Fick, Christina Åhrén, Dan Göran Joakim Larsson, Carl-Fredrik Flach. Population-level surveillance of antibiotic resistance in <i>Escherichia coli</i> through sewage analysis. Euro Surveillance. 2019;24:pii=1800497.</p>	<p>スウェーデン・イエーテボリの 8 箇所の病院排水・大腸菌臨床株 (721 株) と 6 箇所の市中下水処理場・大腸菌株 (531 株) の薬剤感受性比較。病院の臨床分離株との感受性結果とも比較している。</p>
<p>東京都下水道局. 流域下水道における主要施策 2. https://www.gesui.metro.tokyo.lg.jp/business/kanko/kankou/2019tokyo/index.html</p>	<p>多摩川の水質調査。多摩川や柳瀬川では、河川水量の約 5 割を下水処理水が占めており、良好な水環境の形成には下水道の役割は重要となっています。平成 28 年には、約 463 万尾のアユが多摩川を遡上しています。多摩川の下流域では、河川水の半分が下水処理水で成り立っています。その 50 mL で ESBL が多く分離されます。</p>
<p>Sawako Ishibashi, Daisuke Sumiyama, Tomoko Kanazawa, Koichi Murata. Prevalence of antimicrobial-resistant <i>Escherichia coli</i> in endangered Okinawa rail (<i>Gallirallus okinawae</i>) inhabiting areas around a livestock farm. Veterinary medicine and science. 2019;00:1-6.</p>	<p>AMR の供給源として畜産場が考えられているが、畜産場からの AMR の拡散には、畜産場近辺に住む野生動物が関与していることが考えられる。そこで、畜産場近辺および森林地域で採取したヤンバルクイナの糞 (48 試料) から大腸菌を分離し、薬剤耐性について調査した。畜産場近辺で採取した糞 16 試料に大腸菌が存在し、そのうち 11 試料で薬剤耐性が認められ、5 試料では多剤耐性であった。一方、森林地域で採取した糞では 15 試料に大腸菌が存在し、そのうち 3 試料で薬剤耐性が認められ、3 試料で多剤耐性であった。これらの結果から、ヤンバルクイナは自然環境中において AMR を運んでいることが示された。ヤンバルクイナは絶滅危惧種であるが、その保護のための移送にあたっては AMR の拡散について留意すべきである。</p>

<p>畠山 敬, 矢崎 知子, 佐々木 美江, 渡邊 節. 畜産施設排水における薬剤耐性菌の動向. 宮城県保健環境センター年報. 2009;27:40-3.</p>	<p>抗菌剤の使用施設である養豚場において、使用している抗菌剤に対する耐性菌の存在実態と一般環境への拡散の可能性について検討するため、施設内の水処理の各工程、排水処理の各過程および公共用河川（上流、下流）で採水し、薬剤感受性試験を実施した。対象の菌は薬剤（LCM, TS, OTC, NFLX）に有効な菌（グラム陽性球菌と腸内細菌）を選定した。施設内では、高度耐性化を引き起こしていることが明らかとなった。さらに多剤耐性化した菌も多かった。一方、排水処理過程においては、処理が進むにつれて、菌数は減少し、感受性も変化していたが、LCM と NFLX 耐性菌の割合は変化していなかった。結果として、排水処理において、耐性菌に対する一定の除去効果を確認できた。</p>
<p>Satoru Suzuki, Naoki Makihara, Aya Kadoya. Tetracycline resistance gene <i>tet(M)</i> of a marine bacterial strain is not accumulated in bivalves from seawater in clam tank experiment and mussel monitoring. Science of the Total Environment. 2018;634:181-7.</p>	<p>二枚貝は大量の水をろ過する能力があり、消化管に食病原性細菌やウイルスを蓄積するが、遺伝子や DNA の蓄積に関しては定量化できていない。本論文では、海水から分離した多剤耐性株 04Ya311 株の伝達可能なプラスミド pAQU1 で運ばれる <i>tet(M)</i> を二枚貝が蓄積または分解するか、調べた。その結果、二枚貝が <i>tet(M)</i> を消化し、<i>tet(M)</i> が連続的に供給されても、二枚貝の腸内の残留 <i>tet(M)</i> は一定のままであった。また、<i>tet(M)</i> は年間を通して検出されるものの、ムラサキガイが蓄積する <i>tet(M)</i> は 4 月～10 月までは低濃度であった。これにより耐性遺伝子をもつ海洋細菌は二枚貝により消化される一方、その一部は残存していると示唆された。二枚貝の腸内の微生物群集は安定した状態を保っている可能性がある。</p>
<p>Yoshihiro Suzuki, Reina Hashimoto, Hui Xie,</p>	<p>河川環境における大腸菌の増殖と抗生物質耐</p>

<p>Emi Nishimura, Masateru Nishiyama, Kei Nukazawa, Satoshi Ishii. Growth and antibiotic resistance acquisition of <i>Escherichia coli</i> in a river that receives treated sewage effluent. <i>Science of the Total Environment</i>. 2019;690:696-704.</p>	<p>性獲得の可能性を明らかにするために、宮崎県で調査を実施した。下水放流水の上流および下流で、河川水、付着生物および堆積物を採取した。下水放流水中の大腸菌濃度は低かったが、その下流および付着生物では増加した。クロロフィル a の濃度も下流で増加していた。下水処理放流水は、大腸菌を河川へ直接的には供給していないものの、付着生物の成長を促進する栄養素を供給している。また、付着生物に存在するバイオフィルムにいる細菌が、耐性獲得のホットスポットになっている可能性がある。これにより河川中の大腸菌のレベルが上昇し、抗生物質耐性大腸菌が出現する可能性が考えられる。</p>
<p>蜂谷 真基, 金子 直樹, 西川 可穂子. 東京都内の表層水に含まれる薬剤耐性菌に関する調査～薬剤耐性の傾向と分布から見えてくる現状～. <i>環境情報科学 学術研究論文集</i> 2018;32:313-6.</p>	<p>2016～2017年にかけて、東京都内の都市河川や湖沼の計20か所で薬剤耐性菌の有無を調査した。全ての調査地点で薬剤耐性菌が検出され、分離株86株のうち64%が ampicillin with sulbactam (SAM20)に、54%が clarithromycin (CLR15)に耐性を示した。</p>
<p>Masahiko Okai, Hanako Aoki, Masami Ishida, Naoto Urano. Antibiotic-resistance of Fecal Coliforms at the Bottom of the Tama River, Tokyo. <i>Biocontrol Science</i>. 2019;24:173-8.</p>	<p>東京・多摩川中流の底泥(水)の抗生物質耐性糞便性大腸菌の分布と耐性レベルを調査した。<i>Klebsiella sp.</i>と <i>E. coli</i> が主要な分離株で、多剤耐性の <i>E. coli</i> (ESBL 産生株) が1株検出された。多摩川での結果と下水を対象に行った同様の調査結果とを比較すると、<i>E. coli</i> においてカナマイシンを除く5剤 (AMP, AMX-CVA, TET, CHL, CIP) で薬剤耐性パターンが類似していた。カナマイシンの耐性割合が本調査でのみ高かったのは、近くに動物公園があることが原因と考えられた。また表流水と中流の底泥水とを比較すると、中流の底泥水において糞便</p>

	<p>性大腸菌が多かった。他の調査では大腸菌数と耐性大腸菌数に相関が見られることから、河川調査においては、表流水と底泥水も調査することが推奨される。</p>
<p>Fumitaka Terahara, Hiroshi Nishiura. Fluoroquinolone consumption and <i>Escherichia coli</i> resistance in Japan: an ecological study. BMC Public Health. 2019;19:426.</p>	<p>JANIS サーベイランスシステムにより 2015 年から 2016 年、全国 47 都道府県におけるレボフロキサシン耐性大腸菌の事例に関する情報を収集した。また、医薬品販売データよりフルオロキノロン使用量に関する情報を得た。両者の関連を解析したところ全国的によく相関しており、西日本ではフルオロキノロンの使用量と耐性が共に高く、東日本では使用量と耐性が共に低かった。</p>
<p>田村 豊. 食用動物に由来する薬剤耐性菌の現状と対策. 環境感染誌. 2017;32:322-9.</p>	<p>農水省動物医薬品検査所で JVARM (国内の家畜衛生分野における耐性菌のモニタリング体制) を立ち上げた著者による、家畜由来耐性菌に関する総説。</p>
<p>菊地 利紀,菅原 ゆかり,植木 洋, 後藤 郁男. 宮城県内の大規模食鳥処理場における基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の分離状況. 日本獣医師会雑誌. 2018;71:655-9.</p>	<p>宮城県内の大規模食鳥処理場において、プロイラーと体 120 検体中 78 検体 (65%) から ESBL 産生大腸菌が分離された。検出された ESBL 遺伝子は blaCTX-M-1 group および blaCTX-M-2 group であり、CTX-M 型が主であった。また、菌の O 群血清型はロットによって異なり、分離された ESBL 産生大腸菌は各農場に由来し、生体搬入から内臓摘出までの処理工程で交差汚染は認められなかった。宮城県内の養鶏には ESBL 産生大腸菌が高率に浸潤しており、農場ごとの耐性菌対策や処理場での汚染拡大防止が重要である。</p>
<p>三浦 逸実, 西山 正晃, 浦 剣, Prayoga Windra, Chiemchaisri Chart, Chiemchaisri Wilai, 渡部 徹. 活性汚泥に存在するシプロフ</p>	<p>日本とタイの下水処理施設から採取した活性汚泥について、次世代シーケンサーを用いて細菌群集解析を行い、抗菌薬選択圧の下で生残す</p>

<p>ロキサシンと テトラサイクリンに耐性を示す細菌群集の探索. Journal of Japan Society on Water Environment. 2019;42:43-52.</p>	<p>る耐性菌の細菌群集を探索した。日本とタイでは汚泥細菌群集の組成がまったく異なっていた。タイの細菌群集にシプロフロキサシンを添加して培養すると（非添加に比べて）Enterobacteriaceae の割合が増加し、シプロフロキサシン耐性菌の存在が示唆された。また、テトラサイクリンを添加して培養すると増加した上位 10 種のうち 7 種が共通であり、多くの汚泥細菌にテトラサイクリン耐性が広がっていた。</p>
<p>浦野 直人, 石田 真巳, 岡井 公彦, 高塩 仁愛, 武井 俊憲. 水圏環境における多剤耐性菌の繁殖度調査. 科学・技術研究. 2019;8:13-22.</p>	<p>多摩川（水中）における多剤耐性菌の繁殖度調査に関する総説。耐性菌の生息は中流から下流にかけて高濃度、上流では急激に低濃度であったが、上流の方が高次の多剤耐性菌が検出された。中流における多剤耐性菌の大部分が大腸菌またはクレブシエラ属菌で、blaCTX-M-1 を持つ ESBL 産生大腸菌も分離された。また、水再生センター内の水路中の多剤耐性大腸菌群を調査したところ、菌群数は下水道からの流入水で高く、曝気槽水、浄化水、次亜塩素酸処理水と徐々に減少したが、最終的な流出水中でも生菌が存在していた。</p>
<p>Ayako Murata, Hideshige Takada, Kunihiro Mutoh, Hiroshi Hosoda, Arata Harada, Norihide Nakada. Nationwide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers. Science of the Total Environment. 2011;409:5305-12.</p>	<p>国内の主要な 37 河川において人および家畜で使用される抗菌剤（12 種類）の濃度を調べた。抗菌剤濃度は郊外より都市部が高く（主にマクロライド系抗菌剤）、畜産が盛んな地域のいくつかの河川では動物に使用されるスルホンアミド系抗菌剤が主に検出された。ほとんどの河川の下流域では人用抗菌剤の濃度が動物用抗菌剤を大きく上回っており、国内の河川の抗菌剤は主に都市部の下水処理場に由来する（家畜の排泄物由来の抗菌剤はそれほど河川に流入</p>

	しない)と考えられる。
Takashi Azuma, Natsumi Arima, Ai Tsukada, Satoru Hiramami, Rie Matsuoka, Ryogo Moriwake, Hirotaka Ishiuchi, Tomomi Inoyama, Yusuke Teranishi, Misato Yamaoka, Yoshiki Mino, Tetsuya Hayashi, Yoshikazu Fujita, Mikio Masada. Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. Science of the Total Environment. 2016;548-9:189-97.	国内都市部の病院排水、その病院を処理区域に含む下水処理場の流入水、放流水、河川について、医療現場で使用される医薬品やその代謝物を調査した。調査した 41 成分中 38 成分が病院排水中に幅広い濃度で検出され、それらは下水処理場の流入水からも同程度から 1/10 程度の濃度で検出される傾向がみられた。下水処理場における処理前後で医薬品類の一部は除去されるが、抗菌剤を含む多くの成分は十分に除去されず、放流先の河川でも(概ね類似の)濃度で検出される傾向がみられた。一方、高度処理としてオゾンを用いている下水処理場の放流水では医薬品が検出されないか、検出されても極低濃度であった。
Takashi Azuma, Kana Otomo, Mari Kunitou, Mai Shimizu, Kaori Hosomaru, Shiori Mikata, Mao Ishida, Kanae Hisamatsu, Ayami Yunoki, Yoshiki Mino, Tetsuya Hayashi. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. Science of the Total Environment. 2019;657:476-84.	病院排水、下水処理場流入水、放流水、河川水中の医薬品混入量に関する 2016 年の論文 (PubMed: 26802347) の続報で、同環境中の耐性菌として CRE、ESBL 産生菌、MDR アシネトバクター、MDR 緑膿菌、MRSA、VRE について調べている。これらの生菌数は病院排水と下水処理場流入水で最も多く、下水処理場放流水と河川水では 1/10 ~ 1/100 程度に減少していた。抗菌剤と同様に、通常の下水処理では耐性菌を完全に除去できない一方で、オゾン処理では検出限界以下にできていた。
Yasunori Suzuki, Miki Ida, Hiroaki Kubota, Tsukasa Ariyoshi, Ko Murakami, Makiko Kobayashi, Rei Kato, Akihiko Hirai, Jun Suzuki, Kenji Sadamasu. Multiple -Lactam Resistance Gene-Carrying Plasmid Harbored by <i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	国内の下水処理場流入水より分離されたクレブシエラが、IncA/C2 プラスミド上にカルバペネマーゼ遺伝子 (blaKHM-1) を保有していた。本プラスミドは 185 kb で、blaKHM-1 の他、blaOXA-1、blaCTX-M-2、blaDHA-1 も保有しており、大腸菌への伝達性も認められた。

<p>Isolated from Urban Sewage in Japan. <i>mSphere</i>. 2019;4:e00391-19.</p>	
<p>Xuelian Zhang, Yanxia Li, Bei Liu, Jing Wang, Chenghong Feng, Min Gao, Lina Wang. Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant <i>Escherichia coli</i> in the surface water of a livestock production region in northern China. <i>PLoS One</i>. 2014;9:e111026.</p>	<p>中国北部の農村河川において、12種類の獣医学に関連する抗菌薬とそれに対する大腸菌の感受性を調べた。耐性大腸菌の頻度と対応する抗菌薬の濃度の間には明確な関係はなく、水環境中の大腸菌の耐性は抗菌薬以外の因子に影響されているのであろう。</p>
<p>Jia Jia, Yongjing Guan, Mengqian Cheng, Hong Chen, Jiafa He, Song Wang, Zaizhao Wang. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. <i>The Science of the total environment</i>. 2018;642:1136-44.</p>	<p>中国・西安の河川において、7系列14種類の抗菌薬と23の関連耐性遺伝子を調べた。テトラサイクリン濃度はtet遺伝子と正の相関が見られたが、他の抗菌薬と耐性遺伝子の組み合わせにはいずれも有意な相関がなかった。</p>
<p>Xin Yu, Mengyu Zhang, Jiane Zuo, Xuchuan Shi, Xinyao Tang, Lei Chen, Zaixing Li. Evaluation of Antibiotic Resistant Lactose Fermentative Opportunistic Pathogenic Enterobacteriaceae Bacteria and <i>bla</i>_{TEM-2} Gene in Cephalosporin Wastewater and Its Discharge Receiving River. <i>Journal of environmental management</i>. 2018;228:458-465.</p>	<p>セファロスポリン排水の処理場とその処理水が放流される河川で、セファロスポリンの濃度とラクトース発酵性で日和見感染する腸内細菌(LFOPEB)の7つの抗菌薬への耐性と1つの耐性遺伝子を調べた。処理場流入水、処理水、河川からの分離株の耐性表現型は、残留セファロスポリンの影響を受けていた。</p>
<p>Tingting Fang, Hui Wang, Qijia Cui, Matt Rogers, Peiyan Dong. Diversity of Potential Antibiotic-Resistant Bacterial Pathogens and the Effect of Suspended Particles on the Spread of Antibiotic Resistance in Urban Recreational Water. <i>Water research</i>. 2018;145:541-51.</p>	<p>中国・北京の3か所の湖で耐性病原菌を培養法と分子生物学的手法の組み合わせで調べた。その結果を薬剤耐性因子(ARI)で整理することで、懸濁物質が耐性菌を保護して湖水中での長期生存を助けることを示した。</p>
<p>Belinda Huerta, Elisabet Marti, Meritxell</p>	<p>スペインの3か所の貯水池において、5種類の</p>

<p>Gros, Pilar López, Marcelo Pompêo, Joan Armengol, Damià Barceló, Jose Luis Balcázar, Sara Rodríguez-Mozaz, Rafael Marcé. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. <i>The Science of the total environment</i>. 2013;456-57:161-70.</p>	<p>抗菌薬と関連する耐性遺伝子を調べ、その遺伝子が細菌群集の形成に果たす役割を評価した。その結果、マクロライド耐性に関わる遺伝子の存在と細菌群集構成に有意な相関があり、また、Actinobacteria と Firmicutes が耐性遺伝子を運搬し拡散している可能性が高いことが示された。</p>
<p>N.A. Sabri, H. Schmitt, B. Van der Zaan, H.W. Gerritsen, T. Zuidema, H.H.M. Rijnaarts, A.A.M. Langenhoff. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. <i>Journal of Environmental Chemical Engineering</i>. 2020;8:102245.</p>	<p>オランダの下水処理水が放流される河川において抗菌薬（マクロライド、スルホンアミド、テトラサイクリン）と耐性遺伝子(<i>ermB</i> ,<i>sul1</i> ,<i>sul2</i> ,<i>tetW</i>) ,そして Class1 インテグロンを調べた。下水処理場から放流された耐性遺伝子は、河川水や底質で保存性があり、いくつかの栄養塩と正の相関が、溶存酸素と負の相関が見られた。</p>
<p>Nadine Czekalski, Radhika Sigdel, Julia Birtel, Blake Matthews, Helmut Bürgmann. Does Human Activity Impact the Natural Antibiotic Resistance Background? Abundance of Antibiotic Resistance Genes in 21 Swiss Lakes. <i>Environment international</i>. 2015;81:45-55.</p>	<p>スイスの21の湖において明確な汚染源のない地点で耐性遺伝子を調査した。<i>sul1</i> 遺伝子の存在量は流域にある下水処理水の処理水量と相関があり、<i>sul2</i> 遺伝子の存在量は富栄養化の状態と相関があった。一方で、微生物群集とは関連がなかった。</p>
<p>Julin Yuan, Meng Ni, Mei Liu, Yao Zheng, Zhimin Gu. Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in a Typical Estuary Aquaculture Region of Hangzhou Bay, China. <i>Marine pollution bulletin</i>. 2019;138:376-84.</p>	<p>中国杭州の養殖池で池の水と底質、さらにその水源から8種類の抗菌薬と11種類の耐性遺伝子を調査した。底質中では抗菌薬の濃度と耐性遺伝子の存在量は相関があったが、池の水やその水源では相関が見られなかった。</p>
<p>Qiang Wang, Panliang Wang, Qingxiang Yang. Occurrence and Diversity of Antibiotic Resistance in Untreated Hospital</p>	<p>中国の病院排水から抗菌薬、耐性菌、耐性遺伝子、そして可動遺伝因子を調査した。いくつかの耐性遺伝子と可動遺伝因子の組み合わせ</p>

<p>Wastewater. The Science of the total environment. 2018;621:990-9.</p>	<p>(<i>intI1</i> と <i>qnrD</i> , <i>intI2</i> と <i>sul3</i> , <i>intI3</i> と <i>tetX</i> , Tn916/Tn1545 と <i>sul2</i> , ISCR1 と <i>sul3</i>) で相関が見られた。</p>
<p>Edina Szekeres, Andreea Baricz, Cecilia Maria Chiriac, Anca Farkas, Ocsana Opris, Maria-Loredana Soran, Adrian-Stefan Andrei, Knut Rudi, Jose Luis Balcázar, Nicolae Dragos, Cristian Coman. Abundance of Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in Wastewater Effluents From Different Romanian Hospitals. Environmental pollution. 2017;225:304-15.</p>	<p>ルーマニアの Cluj 県で病院排水から 12 種類の抗菌薬と耐性遺伝子を調査した。抗菌薬ではベータラクタム系, グリコペプチド, トリメトプリムが, 耐性遺伝子では <i>sulI</i> 遺伝子と <i>qacE</i> 1 遺伝子の濃度が高かった。</p>
<p>Wenhui Qiu, Jing Sun, Meijuan Fang, Shusheng Luo, Yiqun Tian, Peiyao Dong, Bentuo Xu, Chunmiao Zheng. Occurrence of Antibiotics in the Main Rivers of Shenzhen, China: Association With Antibiotic Resistance Genes and Microbial Community. The Science of the total environment. 2019;653:334-41.</p>	<p>中国の深圳において河川水と底質の 20 種類の抗菌薬と関連する耐性遺伝子を調べた。底質中のスルファメトキサゾールの存在は, <i>Fusobacteria</i> が有する <i>bla_d</i> 遺伝子の増加を引き起こした。同様の正の相関がノルフロキサシンと <i>eye</i> 遺伝子の間にも見られた。</p>
<p>Haiwei Huang, Siyu Zeng, Xin Dong, Dan Li, Ye Zhang, Miao He, Pengfei Du. Diverse and Abundant Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in an Urban Water System. Journal of environmental management. 2019;231-494-503.</p>	<p>中国の昆明において下水, 河川水, そして水道水から 17 種類の抗菌薬と関連する耐性遺伝子を調査した。いずれの抗菌薬についても, その濃度と関連する耐性遺伝子の存在量の間に関係は見られなかった。</p>
<p>F Hernández, N Calisto-Ulloa, C Gómez-Fuentes, M Gómez, J Ferrer, G González-Rocha, H Bello-Toledo, A M Botero-Coy, C Boix, M Ibáñez, M Montory. Occurrence of Antibiotics and Bacterial Resistance in</p>	<p>南極圏の King George 島における下水と海水のサンプルについて 20 種類の抗菌薬とそれに対する耐性大腸菌を調査した。そのうち, トリメトプリムへの耐性率のみがその濃度と線形関係が見られた。</p>

<p>Wastewater and Sea Water From the Antarctic. 2019;363:447-56.</p>	
<p>Phan Thi Phuong Hoa, Satoshi Managaki, Norihide Nakada, Hideshige Takada, Akiko Shimizu, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet, Satoru Suzuki. Antibiotic Contamination and Occurrence of Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquatic Environments of Northern Vietnam. The Science of the total environment. 2011;409:2894-901.</p>	<p>ベトナムの河川、運河および池の水で調べた 12 種類の抗菌薬を調べた結果、スルファメトキサゾール濃度とそれに対する耐性率の間には有意な相関が見られた。一方、エリスロマイシン濃度とそれに対する耐性率の間には相関はなかった。</p>
<p>Sara Rodriguez-Mozaz, Sara Chamorro, Elisabet Marti, Belinda Huerta, Meritxell Gros, Alexandre Sànchez-Melsió, Carles M Borrego, Damià Barceló, Jose Luis Balcázar. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. Water research. 2015;69:234-42.</p>	<p>スペインの病院排水や都市下水が放流される河川において、シプロフラキサシンおよびオフロキサシンと <i>gnrs</i> 遺伝子、セファゾリンおよびセファタキシムと <i>bla_{TEM}</i> 遺伝子、クラリスロマイシンと <i>ermB</i> 遺伝子、スルファメトキサゾールと <i>sulI</i> 遺伝子のそれぞれの間で有意な相関が見られた。アジスロマイシンと <i>ermB</i> 遺伝子の間には相関がなかった。</p>
<p>Vishal Diwan, Ashok J Tamhankar, Rakesh K Khandal, Shanta Sen, Manjeet Aggarwal, Yogyata Marothi, Rama V Iyer, Karin Sundblad-Tonderski, Cecilia Stålsby-Lundborg. Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria in Waters Associated With a Hospital in Ujjain, India. BMC public health. 2010;10:414.</p>	<p>インドの病院排水や都市下水で調べた 7 種類の抗菌薬の濃度は、同じ下排水から分離された大腸菌のそれらの抗菌薬への耐性率と相関がなかった。</p>
<p>Edina Szekeres, Cecilia Maria Chiriac, Andreea Baricz, Tiberiu Szóke-Nagy, Ildiko Lung, Maria-Loredana Soran, Knut Rudi, Nicolae Dragos, Cristian Coman. Investigating Antibiotics, Antibiotic</p>	<p>ルーマニアの都市の影響を受けている地下水で調べた 14 種類の耐性遺伝子の濃度は、それらと関連する抗菌薬の濃度とは相関がなかった。</p>

<p>Resistance Genes, and Microbial Contaminants in Groundwater in Relation to the Proximity of Urban Areas. Environmental pollution. 2018;236:734-44.</p>	
<p>Jian Xu, Yan Xu, Hongmei Wang, Changsheng Guo, Huiyun Qiu, Yan He, Yuan Zhang, Xiaochen Li, Wei Meng. Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in a Sewage Treatment Plant and Its Effluent-Receiving River. Chemosphere. 2015;119:1379-85.</p>	<p>中国の下水処理場からの放流水の tetB 遺伝子および tetW 遺伝子の濃度は、テトラサイクリンおよびオキシテトラサイクリンの濃度と有意な正の相関があった。一方で、キノロン耐性遺伝子とエンロフロキサシン濃度に負の相関があった。</p>

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「医療と環境の薬剤耐性に関する研究」

研究分担者： 金森 肇 東北大学大学院医学系研究科 総合感染症学分野・講師

研究要旨

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、各分野の取り組みが実施されている中、ワンヘルス・アプローチの観点から環境中の薬剤耐性がヒトに与える影響を解明することは、本邦における薬剤耐性対策を推進していく上で重要である。このような背景から環境中の薬剤耐性に関する調査法を確立し、環境 AMR のヒトに対するリスク評価が求められている。令和元年度の本研究では、メタゲノム解析法と培養法を用いて病院排水の薬剤耐性の実態調査を行い、環境 AMR モニタリング体制の確立に向けた研究を実施した。病院排水由来の薬剤耐性因子のゲノム解析を行うことで、病院排水の薬剤耐性の特徴を明らかにした。病院排水の環境 AMR 調査を実施した研究はまだ限定的であることに加えて、環境 AMR に関する国内のエビデンスが不十分なことから、病院排水を含む環境中の薬剤耐性とヒトへのリスクに関する研究を継続していく必要がある。

研究協力者：

馬場 啓聡

東北大学大学院医学系研究科 感染制御
インテリジェンスネットワーク寄附講座
助教

勝見 真琴

東北大学病院 検査部
副臨床検査技師長

黒田 誠

国立感染症研究所
病原体ゲノム解析研究センター
センター長

関塚 剛史

国立感染症研究所
病原体ゲノム解析研究センター
第三室長

A．研究目的

本邦の医療機関からの病院排水は、市中の下水道に合流し、最終的には下水処理場に到達する。下水処理場への流入水における抗菌薬および耐性菌の主要な供給源は医療施設で

あり、廃棄物が耐性菌を運ぶ場合、環境中の

耐性菌への曝露によって感染リスクが高まる可能性が指摘されている(1)。環境への薬剤耐性の拡がりヒトへのリスクが懸念されているが、本邦の病院排水の環境 AMR 調査はいまだ限定的である。

本分担研究では、医療と環境の薬剤耐性の関係性を理解するために病院排水の薬剤耐性因子の特徴を明らかにし、病院排水の薬剤耐性の実態調査や文献レビューを行い、環境 AMR のヒトへのリスクを評価することを目的とした。令和元年度では、以下の研究を行った。

- 1) ゲノム解析による病院排水の薬剤耐性モニタリング体制の構築：大学病院含む医学部キャンパスの下水における環境 AMR 調査
- 2) 医療と環境 AMR に関する国内外の文献レビューとリスク評価

B．研究方法

1．ゲノム解析による病院排水の AMR 調査

次世代シーケンサーを用いた病院排水のメタゲノム解析を行い、病院排水由来の細菌種および薬剤耐性因子を同定した。また、分離された薬剤耐性菌の全ゲノム解析を行った。

大学病院 A と医学部 A キャンパスの下水における環境 AMR 調査 (2019 年 7 月 ~ 9 月、2020 年 1 月) を実施した。

2019 年 7 月 ~ 9 月に計 3 回にわたり大学病院 A と医学部 A キャンパスの 6 カ所から下水を 500 mL 採水し、0.2 μm フィルターを使用して浮遊物を回収した。原液 1 mL を 100 μl フェノ・クロ溶液とビーズチューブに混合し、GenoGrinder 2010 ビーズ破砕法により回収フィルターから微生物由来の DNA を調整した。QIAseq FX DNA library キットで DNA-Seq ライブラリーを作成した。Illumina NextSeq 500 を用いて、塩基配列を解読した。解読リードを MePIC2 メタゲノム解析ツールで微生物種を分類し検出数を算出した。下水サンプル毎の多様性を MEGAN ツールで評価した。ResFinder および NCBI AMR database を使用し、薬剤耐性因子を検索した。

2020 年 1 月に採水された病院排水の調査では、ヒトでの輸入症例および大規模な院内感染事例の原因となる多剤耐性菌を優先して環境から分離を試みた。選択培地 (mSuper CRABA, CHROMagar ESBL) を使用し、分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌、ESBL 産生菌を収集し、全ゲノム解析を行った。

2. 医療と環境 AMR に関する文献情報

環境 AMR の文献レビューを行うために、「医療と環境 AMR」をテーマに PubMed、Google で論文検索を行った。令和元年度においては、医療や病院排水を含む環境 AMR に関して本邦から報告された文献を中心に検索した。収集した文献情報を環境 AMR website (<https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr>) に登録し、環境 AMR の専門家である本研究班の班員と情報共有および意見交換を行った。

U.S. Centers for Disease Control and Prevention (米国疾病予防センター)、UK Science & Innovation Network (英国科学イノベーションネットワーク)、および Wellcome Trust (ウェルカムトラスト) から発表された、「環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ (Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the

Environment)」(1)を翻訳し、海外における環境 AMR の現状と課題を分析した。

(倫理面への配慮)

環境中における AMR 調査法と体制整備に関する研究であり、人を対象とする医学系研究に関する指針における研究には該当しないため、倫理委員会での審査は不要と判断された。微生物ゲノムデータの取り扱いに関しては、セキュリティー対策を実施して、研究を行った。

C. 研究結果

1. ゲノム解析による病院排水の AMR 調査

病院排水のメタゲノム解析結果では、総解読リード数を分母にして、病院排水、非病院排水ともに *Burkholderia* 属、*Bacteroides* 属の割合が高かった(図 1)。一方で、病院排水は非病院排水と比較して、*Staphylococcus* 属の割合が高く、特に *Staphylococcus epidermidis* において顕著であった。AMR 薬剤耐性因子の RPKM (reads per kilobase per million reads) 解析では、病院排水と非病院排水ともに主要な薬剤耐性遺伝子はアミノグリコシド系、βラクタム系、マクロライド系、テトラサイクリン系であった(図 2)。病院排水では βラクタム系の薬剤耐性遺伝子の割合が非病院排水と比較して高く、特に *blaZ*、*blaR1*、*cfxA*、*blaI* を多く認めた。

病院排水から分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌では、*bla_{AMP-1}* と *mcr-9* を同時に保有する *Klebsiella pneumoniae*、*bla_{GES-4}* と *mcr-9* を同時に保有する *Enterobacter kobei*、*bla_{AMP-1}* を保有する *Citrobacter freundii* が検出された。また、ESBL 遺伝子では *bla_{CTM-M-9}*、*bla_{CTM-M-14}*、*bla_{CTM-M-15}* が検出された。

2. 医療と環境 AMR に関する文献情報

医療や病院排水を含む環境 AMR に関する国内の文献は 10 報 (2003 年 ~ 2019 年) であり、限定的であった。病院排水の研究は世界的に見てもまだ限られており、国内での状況もほとんどわかっていない。過去に病棟内のシンクや汚染槽からカルバペネマーゼ産生菌

が検出された事例(2)や、病院の排水管に関連したカルバペネム耐性菌によるアウトブレイク(3)が報告されている。また、病院排水からは CRE をはじめとした薬剤耐性菌や各種抗菌薬の成分が検出され(4)、特に耐性菌の割合は家庭排水に比べ病院排水において多い(5)ことが報告されている。一方、病院排水から下水処理場流入水への負荷よりも、下水処理場から河川水への負荷の方が大きいとの報告(6)や、下水処理場の二次処理水は流入水に比べ耐性菌の割合が高い(5)などの報告があり、地表水に放出される前に下水処理施設で環境汚染負荷を減らしていくことの重要性が示唆されている。実際に、本邦における河川中の耐性菌の存在については、既に複数の県・地域から報告があった(7,8)。

環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ現状と課題(原文: **Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges. 2018**)は、2020年3月25日に AMR 臨床リファレンスセンターの website で 公 開 さ れ た (<http://amr.ncgm.go.jp/medics/2-8-1.html#sonota>)。環境中の耐性菌や抗微生物薬が人の健康に及ぼす影響については未解明な部分が多いが、少なくとも環境中の耐性菌への感染リスクは存在する。人及び動物からの排泄物中には、薬剤耐性菌や抗菌薬が存在し、不適切な排泄物の処理はこれらによる環境汚染につながるため、基本的な衛生の維持がその予防に重要である。また、抗菌薬の製造過程で発生する廃棄物や、農薬に含まれる抗菌薬による環境汚染の可能性が以前から指摘されているが、これらに対するモニタリングや予防手段に関する検討は少なく、地域によってはその実態すら明らかでない。AMR 拡散阻止のため、これらに対する世界規模の取り組みが必要である。

D . 考 察

今回、病院排水の薬剤耐性の調査法として、メタゲノム解析法と培養法を行い、病院排水由来の薬剤耐性菌を対象に薬剤耐性遺伝子を中心としたゲノム解析を行い、薬剤耐性の特

徴を明らかにした。

病院排水のメタゲノム解析法で検出された薬剤耐性遺伝子は臨床ではあまり問題とならないβラクタマーゼ遺伝子が多く検出され、環境菌由来と考えられた。また、診療や感染管理で問題となる ESBL 遺伝子やカルバペネマーゼ遺伝子などの薬剤耐性遺伝子も検出されたが、検出割合は比較的になかった。各薬剤耐性遺伝子の割合に一定の傾向はみられたものの、各薬剤耐性遺伝子の検出割合は異なっていた。病院排水の薬剤耐性遺伝子をメタゲノム解析法で定量的にモニタリングする際の課題として、下水の採水のタイミング、前処理方法、下水から抽出するサンプル DNA 濃度の測定条件などが挙げられた。このような課題について検討した上で、メタゲノム解析法の各薬剤耐性遺伝子について FPKM 法を用いて国際比較検討を行う。

培養法では、CRE や ESBL 産生菌を対象にし、国内で臨床上問題となるカルバペネマーゼ遺伝子や ESBL 遺伝子が病院排水から検出された。今後、臨床由来分離株と環境由来分離株のゲノム情報の比較検討を行う必要があると考えられた。また、カルバペネマーゼ遺伝子とコリスチン遺伝子を同時に保有する腸内細菌科細菌も分離された。最近、ヨーロッパでヒト由来のカルバペネマーゼ遺伝子 (*bla_{VIM}*、*bla_{NDM}*、*bla_{OXA}*)と *mcr-9* を保有する *K. pneumoniae*、本邦でヒト由来の *bla_{AMP-1}* と *mcr-9* を保有する *E. cloacae* が検出されている(9,10)。病院排水をはじめとする環境水中の高度薬剤耐性菌の出現や、海外から国内への耐性菌の流入を早期に探知するために、環境水の薬剤耐性の監視が有用であるかもしれない。

病院排水のメタゲノム解析では、検出された薬剤耐性遺伝子がどの菌種に由来するか、染色体あるいはプラスミド上に存在するか、患者由来あるいは環境由来なのか、病院排水中の薬剤耐性遺伝子の伝達機序についても不明である。病院排水の AMR モニタリングを行う際には、メタゲノム解析法だけでなく、培養法で実際に分離された耐性菌のゲノム解析も併用して行うべきであると考えられた。メタゲノム解析法と培養法による病院排水の環境 AMR リスクを評価する上で、さらなる

検討が必要である。今後、病院排水由来の薬剤耐性と使用される抗菌薬の消費量や臨床由来の薬剤耐性との関係は不明であるため、環境 AMR の観点から研究を行う。

医療と環境 AMR に関する国内の文献の検討では、病院環境や病院排水中の AMR による人に対する直接的なリスクを示した報告はなく、病院排水中の薬剤耐性因子を減少させる有効な介入策についても明らかではなかったが、病院排水中だけでなく家庭排水や下水処理場の流入水・処理水に対する AMR のモニタリングが重要であること、地表水に放出される前に下水中の環境汚染負荷を減らす努力が必要であることが示唆された。

E . 結論

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、各分野の取り組みが実施されている中、環境中の薬剤耐性がヒトに与える影響を解明することは、ワンヘルス・アプローチの観点から薬剤耐性対策を推進していく上で非常に重要である。令和元年度の本研究において、メタゲノム解析法と培養法を用いて病院排水の薬剤耐性を調査し、環境 AMR モニタリング体制の確立に向けた研究を継続した。病院排水のメタゲノム解析法と培養法により環境 AMR 調査を実施した研究はまだ少ない上に、環境 AMR に関する国内のエビデンスが不十分なことから、病院排水の調査法の確立や薬剤耐性の結果の解釈とリスク評価に関しては、今後の検討課題である。本研究班の研究結果および環境 AMR 文献レビューによる国内外の新たな知見を踏まえて、環境 AMR のヒトへのリスク評価を行い、薬剤耐性対策に役立てることが期待されており、病院排水の AMR モニタリングを継続し、病院排水を含む環境中の薬剤耐性とヒトへのリスクに関する研究をさらに推進していく必要があると考えられた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Ishikawa K, Hosaka T, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Hasegawa M, Kawazoe Y, Kushimoto S, Kaku M. *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia associated with drowning and river water as a source of infection, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2020 in press.

その他発表

金森肇. 溺水後に発症したクロモバクテリウム感染症と河川の環境調査. 救急感染症フォーラム、仙台、2019年4月

Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Kaku M. Genomic analysis of *Chromobacterium haemolyticum* causing near-drowning pneumonia and environmental investigation of river water as a source. 31stICC/4thGCCMID, Dubai, UAE November 2019.

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

【参考文献】

1. CDC. **Initiatives for addressing antimicrobial resistance in the environment: current situation and challenges2018; London, England. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/61374> (Last accessed April 21, 2020)**
2. 林 航, 他. 病院内シンクから検出されたカルバペネマーゼ産生菌: 薬剤耐性菌のリザーバーとしての病院内環境の重要性. *IASR.* 2019;40:28-9.
3. Yomoda S, et al. **Presence of *Pseudomonas putida* Strains Harboring Plasmids Bearing the Metallo- β -**

- Lactamase Gene blaIMP in a Hospital in Japan. J Clin Microbiol. 2003;41:4246-51.**
4. 東 剛士, 他. 医療機関を対象にした新規水処理技術の開発. 薬学雑誌. **2018;138:289-96.**
 5. 諏訪 守, 他. 生活用水のバイオセーフティ: 下水処理場における抗生物質耐性大腸菌の実態. バムサジャーナル. **2015;27:7-11.**
 6. Azuma T, et al. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. *Sci Total Environ.* **2019;657:476-84.**
 7. 佐々木 美江, 他. 宮城県の河川等における薬剤耐性菌. 宮城県保健環境センター年報. **2008;26:31-4.**
 8. Nakamoto S, et al. Environmental Distribution and Drug Susceptibility of *Achromobacter Xylooxidans* Isolated from Outdoor and Indoor Environments. *Yonago Acta Meditica.* **2017;60:67-70.**
 9. Wang Y, et al. Detection of mobile colistin resistance gene *mcr-9* in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains of human origin in Europe. *J Infect.* **2020;80:578-606.**
 10. Kananizadeh P, et al. Emergence of carbapenem-resistant and colistin-susceptible *Enterobacter cloacae* complex co-harboring *bla_{IMP-1}* and *mcr-9* in Japan. *BMC Infect Dis.* **2020;20:282.**

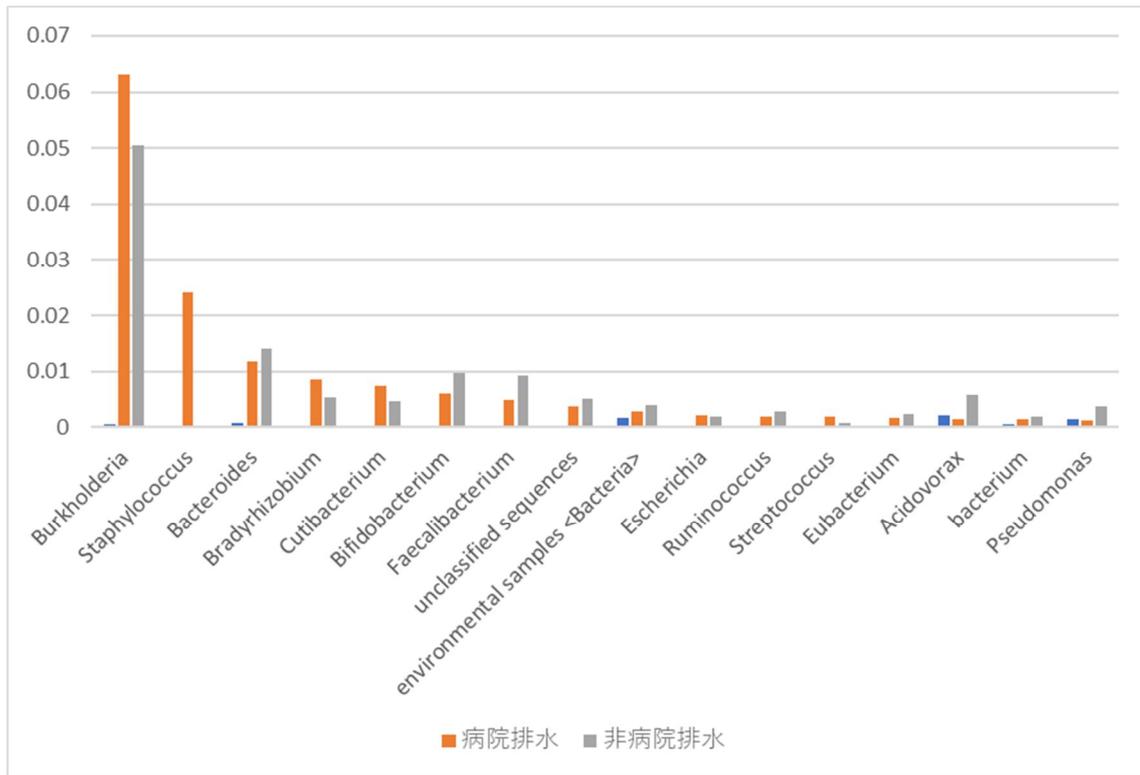


図1 メタゲノム解析による病院排水の細菌種

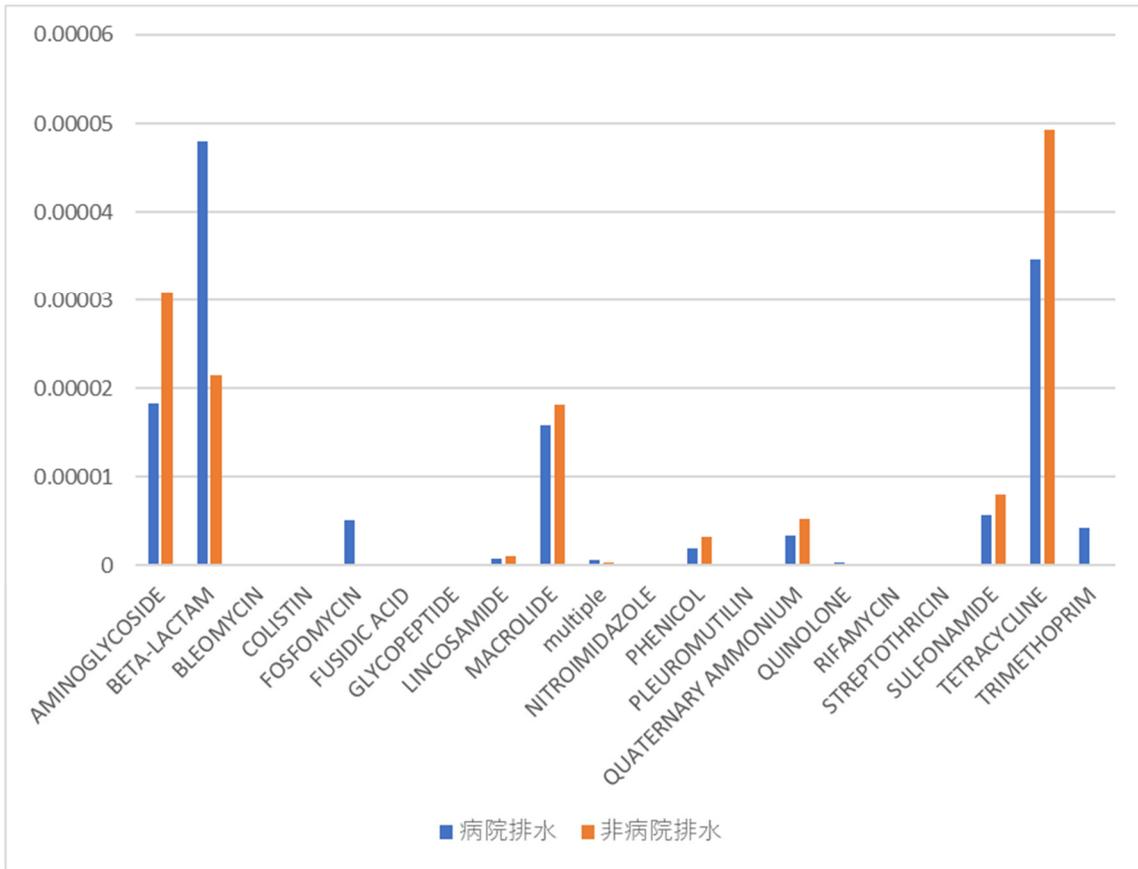


図2 メタゲノム解析による病院排水の薬剤耐性

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「環境微生物ゲノム情報の取得」

研究分担者： 黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・センター長
研究協力者： 関塚 剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・第三室長
研究協力者： 糸川 健太郎 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・主任研
研究協力者： 金森 肇 東北大学 医学系研究科・講師
研究協力者： 山口 進康 大阪健康安全基盤研究所
研究協力者： 河原 隆二 大阪健康安全基盤研究所
研究協力者： 安達 史恵 大阪健康安全基盤研究所

研究要旨

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、厚労（ヒト）・農水（動物）各分野の取り組みが実施されている中、環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬のヒト・動物に与えるリスクを評価する手法を確立し、環境分野の薬剤耐性への影響を解明することは、ワンヘルス・アプローチの観点から薬剤耐性に関する施策を推進していくために非常に重要である。

そこで本分担研究にて以下の項目について整備した。1) 環境 AMR モニタリングに資する水再生センター（下水処理場）放流処理水のメタゲノム解析法の作業手順書確立した。2) 全国レベルの環境 AMR モニタリングのため、分担者・山口進康（大阪健康安全基盤研究所）と連携して、今年度は 32 地方衛生研究所から計 54 箇所の放流処理水を収集できた（2019 年 8-9 月および 2020 年 2-3 月）。地方から送付された 54 箇所の放流水検体と東京湾岸 1 検体の計 55 箇所のメタゲノム解析の結果、処理場管轄の地域事情に見合った細菌種を検出し、多様な薬剤耐性遺伝子(AMR gene: ARG) とカルバペネマーゼ遺伝子の存在が明らかになった。本成果のまとめを薬剤耐性(AMR)アクションプラン 2019 として厚労省 web サイトから公開されている。

(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>)

さらなる調査として処理場・放流水から薬剤耐性菌(AMR bacteria; ARB)の生存を調査した。昨年度は東京湾岸の水再生センター・放流水からカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（KPC-2 産生肺炎桿菌）の分離とゲノム情報の論文報告を行い、今年度も引き続き KPC-2 産生 Aeromonas 属菌と NDM-5 産生大腸菌を分離しゲノム情報の論文報告を行った。KPC-2 および NDM-5 保有腸内細菌科細菌は本邦の臨床現場においても分離頻度は非常に稀であり、放流水から容易く分離されたことについてはその原因をより詳細に検討すべき調査結果であると判断された。

研究班全体の達成目標である環境 AMR システマティック・レビューのため、国内外の文献情報 30 報を収集し、班員が情報共有できる閲覧サイトを構築し管理した。また、Wellcome Trust 財団から公開された「環境における薬剤耐性問題への取り組み ” Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment (2018 年版) ” 」の農業分野の項目の英文翻訳を担当した。

研究協力者：研究協力者：
他 32 自治体の地方衛生研究所・環境部門

A . 研究目的

近年、医療施設・市中・家畜のみならず、世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性 (Antimicrobial Resistance: AMR) 因子が検

出され、環境での薬剤耐性対策を含むワンヘルス・アプローチが注目されている。環境汚染の多くが工場および生活排水の下水処理工程に起因すると想定され、WHO 支援の元、世界の下水処理施設の薬剤耐性菌調査が日本を含む 70 カ国以上の参加国で進行中である (Global Sewage Surveillance Project: <https://www.compare-europe.eu/Library/Global-Sewage-Surveillance-Project>)。

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌拡大とヒトへのリスクが懸念される中、現状では、環境由来の薬剤耐性菌が生活環境へ循環し健康被害が認定された実例はなく、ヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。また、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態も不明である。したがって、環境がヒト及び動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立が急務である。

本研究では、1) 環境由来の薬剤耐性菌に曝露されることのヒト及び動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性についての国内外の資料を収集し、システマティックレビューを実施する。2) 環境水の薬剤耐性を評価するための方法を確立し、サーベイランスを実施することで、本邦における環境水の薬剤耐性菌と薬剤耐性遺伝子 (ARG) 及び残留抗菌薬の実態を調査する。3) 環境由来薬剤耐性菌のゲノム情報を解析し、本邦の臨床・家畜由来薬剤耐性菌のゲノム情報データベースと比較検討することで、薬剤耐性ゲノムの観点からワンヘルス・アプローチの完成を図る。

これらの研究結果を統合し、環境中の薬剤耐性や抗微生物薬がヒト及び動物へ与える影響についてリスクアセスメントを行う。

B . 研究方法

1 . 環境 AMR モニタリングに資するメタゲノム解析法作業手順書の作製

水再生センター (下水処理場) の放流地点から放流水原液を採水し、次世代シーケンサー (NGS) を用いたメタゲノム解析による

生物種および薬剤耐性因子の配列同定までの作業手順を検討した。詳細は図 1 に示す。

500 mL 採水を 0.2 μm フィルターにより細菌以上の大きさを有す浮遊物を回収した。GenoGrinder 2010 ビーズ破砕法により回収フィルターから生物由来の DNA を調整した。QIAseq FX DNA library キットで DNA-Seq ライブラリーを作成し、Illumina NextSeq 500 にて配列解読を実施した。

解読リードを MePIC2 メタゲノム解析ツールで生物種を分類と検出数を算出し、サンプル毎の多様性を MEGAN ツールで評価した。ResFinder および NCBI AMR database を参照して、薬剤耐性因子の同定・検出数を算出し、FPKM: Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments 法を採用し、相対的な ARG 濃度を算出して検体間の比較解析を実施した。

2 . 水再生センター・放流水からのカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離とゲノム情報解析

東京近郊の水再生センター 8 箇所から採水した処理放流水からセフェム系薬剤耐性腸内細菌科細菌の分離を試みた。50 mL 放流水を遠心し、細菌沈渣を CHROMagar ESBL 選択培地に塗布し、36 度 18 時間で培養した。

分離株のうち、Carba NP test でカルバペネマーゼ活性を示す菌株をカルバペネマーゼ保有腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: CPE) として選別した。Illumina NextSeq 500 および PacBio Sequel SMRT sequencing にてゲノム解読を実施し、プラスミド配列を含む完全長ゲノム情報を取得した。

3 . 環境 AMR に係る文献情報の情報共有サイトの構築

研究班員の専門分野で特筆すべき文献情報を収集し、各位のコメントを記載することで情報交換を円滑に行うサイトを構築した (<https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr>)

(図 8)

文献レビューでは、環境 AMR の「水再生センター (下水処理場) に係る AMR 因子の

ゲノミクス」をテーマに PubMed で論文検索を行った。

C . 研究結果

1 . メタゲノム解析法による環境 AMR モニタリング

500 mL 放流水から回収した 0.2 μm フィルターの 1/4 面積を用いるだけで十分な DNA 溶液を得た(平均 0.3 ng/μl)。東京都心を一つの指標にして比較検討したところ、有意に薬剤耐性因子の多い検体も含まれていた。

昨年度(2018 年度)の成果では、次世代シーケンサーによる環境水から ARG 等の網羅的配列解読法(メタゲノム解析)を構築し(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)引き続き今年度は下水処理場・放流水サンプル(2018 年・夏および 2019 年・冬の計 108 サンプル)のメタゲノム解析を実施し評価した。臨床および家畜抗菌薬の ARG 配列データベースを元に、対象 ARG の解読リード数と相対的な ARG 濃度を算出して検体間の比較解析を実施した。夏および冬においても同程度の ARG が検出され、冬期においてやや多い傾向が見られた(図 2)。サルファ剤(Sulphonamide)耐性遺伝子が冬期において有意に高く検出され($p=0.03166$)、腸内細菌科細菌で広範に伝播獲得が知られている Class 1 インテグロンのサルファ剤耐性遺伝子(*sulI*)が要因と考えられた。本研究班のメタゲノム解析法は世界的なメタゲノム解析法に準じたものであり、各国からの報告と比較する上においても重要な情報提供ができたと考えている。

2 . 東京湾岸の水再生センター・放流水から分離された KPC-2 カルバペネマーゼ産生 *Aeromonas* 属菌のゲノム情報

下水処理場の放流水(2018 年 8 月採水)からカルバペネム耐性菌である KPC-2 産生アエロモナス属(*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*)を分離し、全ゲノム情報の確定から IncP-6 レプリコンを基本とした KPC-2 プラスミドを保有することが明らかにした(文献 1)。プラスミド配列の比較解析から、各国の下水処理場・環境株(*Aeromonas*

属)や、アメリカ、スペイン、中国、ベトナム等の臨床分離株(*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*)が同一の KPC-2/IncP-6 プラスミドを保有していた(図 3)。異なる宿主細菌であっても同一の KPC-2/IncP-6 プラスミドを保有していたことから、環境や臨床の現場で頻りに IncP-6 プラスミドの水平伝達が生じ、KPC-2 カルバペネマーゼの拡散に大きな役割を担っていることが示唆された。

アエロモナス属は河川や湖沼など水環境の常在性の高い細菌であるが、稀に腸管・創傷感染症の報告がある。環境と臨床を繋ぐ橋渡しの役割から、アエロモナス属が薬剤耐性因子を保管する環境リザーバーの役割にも注意を払うべきだと考えている。

今後、環境、特に人的活動の集約物である下水放流水を継続的にモニタリングすることにより、病院はじめ一般市民(健常者)が抱える薬剤耐性因子の特定が可能になり、さらに正確な定量法の開発によって、環境から循環しうるリスクについて評価する基盤情報が得られるだろう。

3 . 東京湾岸の水再生センター・放流水から分離された NDM-5 カルバペネマーゼ産生大腸菌のゲノム情報

下水処理場の放流水(2018 年 8 月採水)からカルバペネム耐性菌である NDM-5 産生大腸菌を分離し、全ゲノム情報確定から IncX3 レプリコンを基本とした NDM-5 プラスミドを保有することが明らかにした(文献 2、図 4)。

NDM-5 は New Delhi metallo-beta-lactamase NDM-1 のバリエーションであり、最初に発見された NDM-1 よりも更にカルバペネム分解活性が増強し広域活性を示すため、その保有耐性菌の拡散伝播が世界的に懸念されている最重要対象である。

日本においては 2014 年に NDM-5 保有大腸菌の輸入症例が報告されているが、現在、国内で NDM-5 保有株の拡散伝播に関する明確な報告は無い。しかしながら、本研究により初めて環境(下水処理場・放流水)から NDM-5 産生大腸菌を分離できたことから、院内・市中における健常者キャリアー等の潜在的な拡散伝播が懸念される。大腸菌等の腸内

細菌科細菌は腸内常在菌であり、健常者は何ら発症しないままキャリアーとして耐性菌を宿し、様々な環境へ拡散する媒体になりうる。

4 「水再生センター(下水処理場)に係る AMR 因子のゲノミクス」の文献レビュー

website に登録した「水再生センター(下水処理場)に係る AMR 因子のゲノミクス」の論文等を計 30 報(昨年度 14 報)について検討した(図 5)。

D . 考察

厚労科研究班の編成により、32 自治体から計 54 箇所の放流水から環境 AMR 調査に資するチャレンジを継続して実施できた。(関係各位のご協力に感謝申し上げます)。現在、各自治体の放流水情報は守秘義務をもって運用している。今後も守秘義務を遵守しながらも、得られた情報を総合データとして公開し、環境 AMR 調査の全国展開へ向けさらに協力体制を各自治体へ要請することが肝要と考える。メタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出は充分な“感度”を得て評価できたとは言いがたいが、収集した放流水サンプルを同一作業手順書にて一度に実施した広域調査であるため、各位データの比較解析は良好に実施できた。

東京都心サンプルと比較して、都市圏以外であっても総じて汚染度の高い放流水が地方の処理場で散見し、処理能力等が影響している可能性が示唆された。放流水から比較的平易にセフェム系耐性菌(ESBL 等)およびカルバペネマーゼ産生細菌を分離できることが示された。ESBL 産生大腸菌の健常者キャリアーの増加が懸念されている現状、健常者キャリアーと環境 AMR との関連性について深く検討する余地があるものと考え。特に、健常者キャリアーの割合が増加すれば、水再生センター放流水由来の耐性菌は増加すると推定されるため、環境リスクを評価する上でも普段から耐性菌が環境へ放流されるその実態を定量的に観察していくことが必須であろう。

本邦臨床でも分離頻度が至極稀な KPC-2 および NDM-5 産生腸内細菌科細菌において、東京湾岸の水再生センター・放流水から比較

的平易に分離された事例は貴重な実態を示唆するものと考えている。医療上、優先度の高い薬剤耐性菌を環境 AMR の観点から分離培養を継続し、その株固有のゲノム情報から検出に至った経緯(菌種・耐性因子・病原性・地域・国)を追跡調査することで、国・地域全般の AMR 対策を実施するための貴重な基盤情報源になりうると思う。

「水再生センターの放流水に係る環境 AMR」を調査した国内外文献は少数ではあるものの、汚染リスクに係る実態の報告が増えつつある。欧米先進国であっても各種耐性菌が滅菌処理されずに放流されていることが明らかになり、今まさに環境リスク評価が進行中である。本邦でも定量的な環境調査をもってデータ収集し、環境負荷とそのリスクについて適正に評価できるよう体制を整備していくべきであろう。

E . 結論

本研究分担にて、環境 AMR モニタリングに資する作業手順書を確立し、さらに全国展開するための体制が整備された。また、同一プロトコールによる環境モニタリングの比較解析であることから、自治体特有の放流水による環境負荷の実態が遺伝子レベルで明らかにできた。この環境モニタリングを継続的に実施することで、管轄地域で発生している薬剤耐性菌の諸問題を事前に探知することが可能であると考えている。さらに、国内外から発信される文献情報を迅速に収集し、環境 AMR を基盤にした総合的なリスク評価へと繋げていきたい。

本研究は環境負荷をもたらす根源を追求するための第一歩であり、更なる研究推進と実態解明をもって、省庁横断的な施策が提言できるものと考えている。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

(1) Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan. *Environ Microbiol Rep.* 2019 Aug;11(4):589-597. doi: 10.1111/1758-2229.12772. Epub 2019 May 31. PubMed PMID: 31106978; PubMed Central PMCID: PMC6851574.

(2) Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Kuroda M. Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-coproducing *Escherichia coli* GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay. *Infect Drug Resist.* 2019 Jul 23;12:2243-2249. doi: 10.2147/IDR.S215273. eCollection 2019. PubMed PMID: 31413601; PubMed Central PMCID: PMC6662510.

その他発表

- (1) Characterization of a *bla*_{KPC-2}-positive *Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas* spp. isolated from the effluent of urban wastewater treatment plants in Japan
○黒田誠, 関塚剛史, 瀬川孝耶, 橋野正紀, 稲嶺由羽。第 92 回日本細菌学会、口頭、札幌市
- (2) Global Genome Epidemiology Database (gGENEPID) 第 16 回日本台湾合同シンポジウム The 16th Japan-Taiwan Symposium on Infectious Diseases Tokyo, 口頭、東京
- (3) Global Genome Epidemiology Database (gGENEPID), Makoto Kuroda, Regional JPIAMR Workshop in Asia: Fostering Knowledge on Clinical Epidemiology, AMR Policy, Therapeutics and Diagnostics to Combat AMR in Asia. Oral presentation. Suwon in South Korea.
- (4) 細菌ゲノミクスを支援する Global

Genome Epidemiology Database (gGENEPID)の開発 関塚剛史、谷津弘仁、糸川健太郎、○黒田誠。第 93 回日本細菌学会、口頭、名古屋市

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

500 mL の放流水・表層を採水



Corning® Easy-Grip round, plastic, storage bottles
bottle capacity 500 mL

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cl5430282?lang=ja®ion=JP>

■ 27自治体から計46箇所の放流水

- 採水箇所の GPS (N, E)
- 日時
- 水温
- 気温
- 採取時の写真

↓ その日のうちに

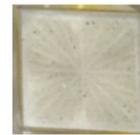
放流水を全部 Filter trap して、メンブレンをメスで剥離



TPP Rapid Filtermax Vacuum Filtration, 500 mL bottle
Large 49 sq. cm square PES 0.2µm membrane

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z760900?lang=ja®ion=JP>

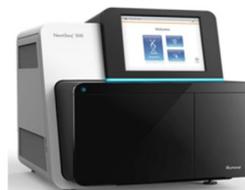
■ 剥離メンブレンの写真



QIAseq Fx DNA library kit にて DNA-seqライブラリー作成 (4.0 ng/µl を 2.5 µl 使用、8 cycle) 酵素による断片化処理とアダプターの付加 電気泳動により目的の長さのDNAを入手する <https://www.qiagen.com>

次世代シーケンサー
Next Generation Sequencer | NGS

- 大量のDNA配列を解読可能
- インデックス付加による複数サンプルの同時解読



NextSeq 500 解読
150-mer, single-end

図 1. 水再生センター（下水処理場）放流水から次世代シーケンサーによるメタゲノム解析までの作業手順

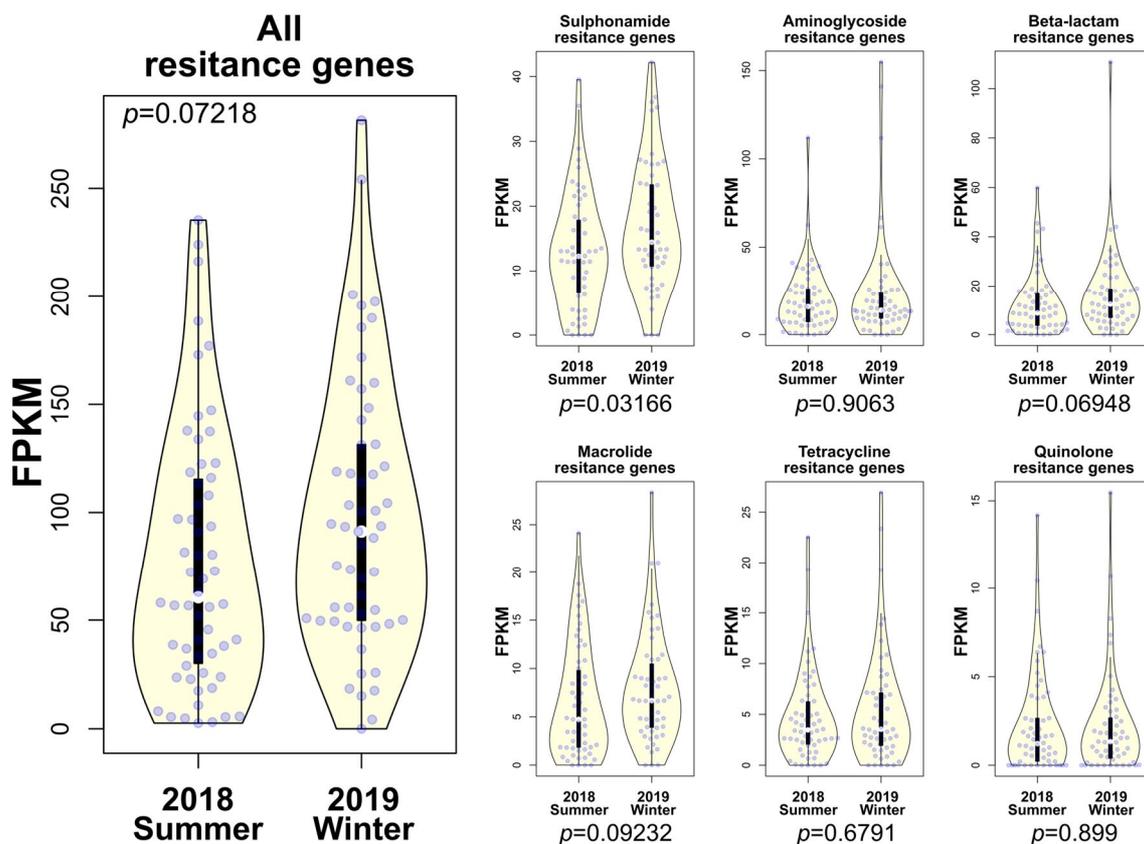


図2 2018年(夏・冬)および2019年(夏)の下水処理場・放流水47-54箇所から採取した主要なカテゴリーの薬剤耐性遺伝子(ARG)

FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) 法によりメタゲノム解読リード総数で ARG 検出量を標準化した。本成果は、薬剤耐性 (AMR) アクションプラン 2019 として厚労省 web サイトから公開されている。

(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>)

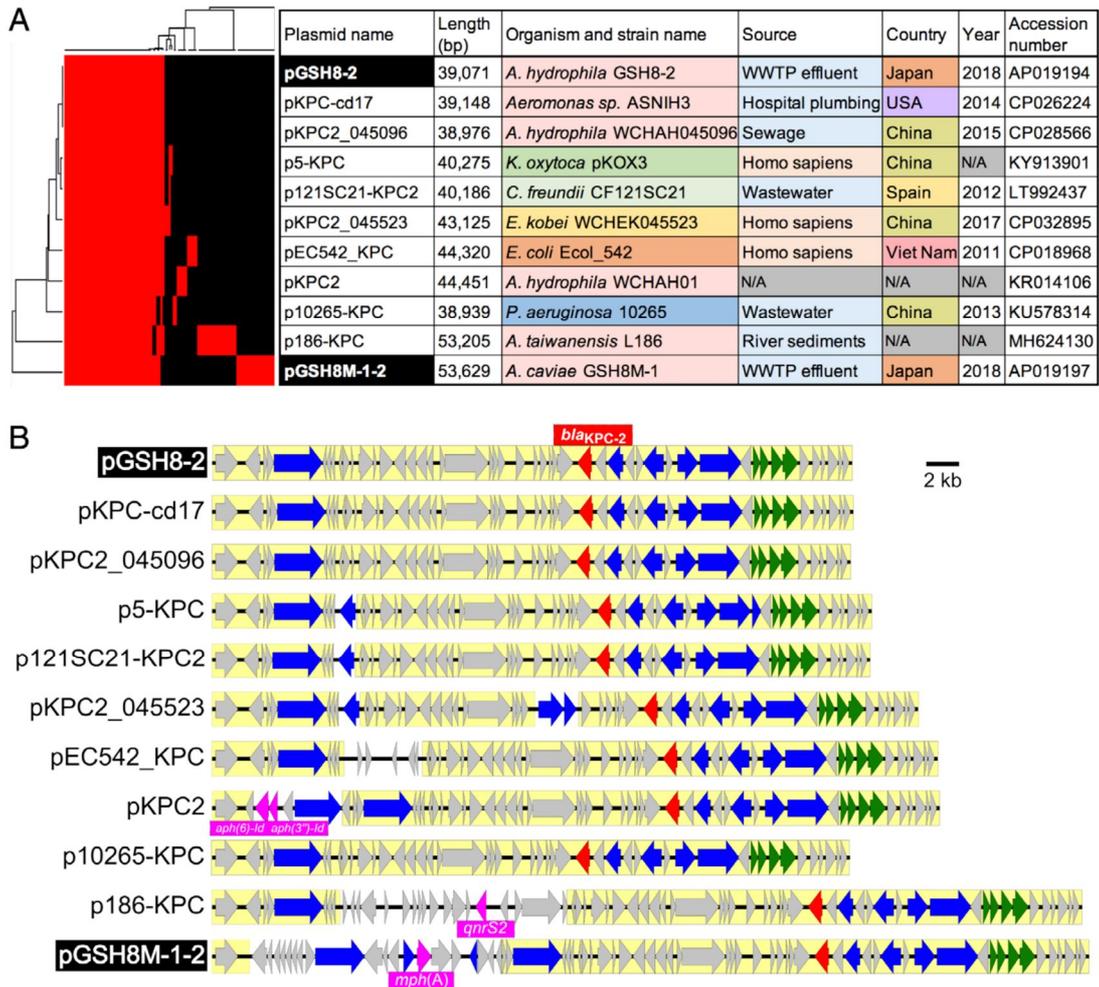


図3 東京湾岸の水再生センター・放流水から分離された KPC-2 カルバペネマーゼ産生 *Aeromonas* 属菌の IncP-6 プラスミド比較解析

KPC-2 産生 *Aeromonas* 属 (*Aeromonas hydrophila* GSH8-2, *Aeromonas caviae* GSH8M-1-2) を分離し、全ゲノム情報の確定から IncP-6 レプリコンを基本とした KPC-2 プラスミド (pGSH8-2 および pGSH8M-1-2) の構造を明らかにした。

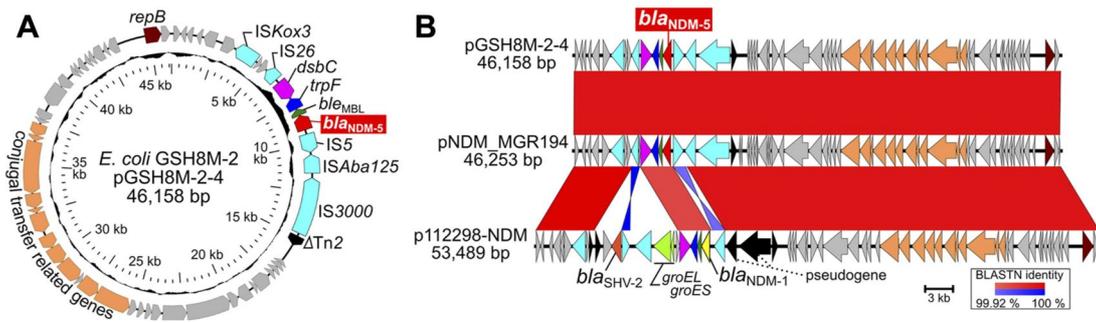
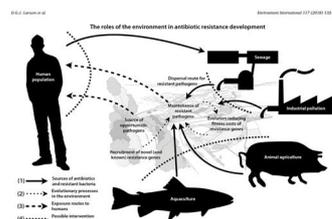


図4 東京湾岸の水再生センター・放流水から分離された NDM-5 カルバペネマーゼ産生大腸菌の IncX3 プラスミド比較解析

NDM-5 産生 大腸菌 GSH8M-2 を分離し、全ゲノム情報の確定から IncX3 レプリコンを基本とした NDM-5 プラスミド(pGSH8N-2-4)の構造を明らかにした。プラスミド比較解析の結果、インドで分離された *Klebsiella pneumoniae* 肺炎桿菌 MGR194 株が保有するプラスミド pNDM_MGR194 と同等の遺伝子構造を有することがわかった。

Systematic Review 環境AMR



Create >	Project List >									
	秋庭	金森	黒田	山口	渡部	楠本	Total			
Paper	14	23	30	16	11	9	103			
Ranked	23	98	94	42	0	36				
Not Ranked	80	5	9	61	103	67				
CATEGORY	Clinical (Hospital)	Community (Healthy subject)	Farm animal	Wild animal	Food	River	Sea	Soil	Other environments	Total
Category	24	10	2	9	1	29	2	5	21	103

ecological study subject) 19:31:59)

Summary/Note: JANISサーベイランスシステムにより2015年から2016年、全国47都道府県におけるレボフロキサシン耐性大腸菌の事例に関する情報を収集した。また、医薬品販売データよりフルオロキノロン使用量に関する情報を得た。両者の関連を解析したところ全国的によく相関しており、西日本ではフルオロキノロンの使用量と耐性が共に高く、東日本では使用量と耐性が共に低かった。

Title: Fluoroquinolone consumption and Escherichia coli resistance in Japan: an ecological study.
Journal: BMC public health (2019-04-23)

PDF Link
PDF From PMC (NCBI)

comment by 黒田 (2019/11/25 13:09:37)
本邦の地域差を詳細に調べた結果であり、Levofloxacin 使用量と耐性頻度が相関する貴重な報告。抗菌薬を減らしましょう。

comment by 山口 (2019/11/11 15:59:42)
抗菌薬の使用量と耐性菌の関連を考察するうえで、ユニークなアプローチです。

秋庭 ★★★★★ 未評価
金森 ★★★★★ 4
黒田 ★★★★★ 3
山口 ★★★★★ 4
渡部 ★★★★★ 未評価
楠本 ★★★★★ 4

図5 環境 AMR に係る文献情報の情報共有サイト

各専門分野から選抜した文献情報を班員同士で共有することが可能になり、環境 AMR における円滑な情報交換と Systematic Review に資する文献収集へ活用した。班員の作業工程や独自コメント等を自由に記載し、相互評価と進捗状況をインタラクティブにした。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離」

研究分担者： 山口 進康 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部生活環境課 課長

研究要旨

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌の分布拡大とヒトへのリスクが懸念される中、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態は不明である。したがって、環境がヒトおよび動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路の解明につながるデータの収集が急務である。

そこで本分担研究では、以下の項目について調査研究を行った：

- 1) 大阪府内において、下水処理場からの放流水およびその放流水が流入する河川水を計4地点から採取し、環境 AMR モニタリング用の試料調製および薬剤耐性菌の分離を試みるとともに、薬剤耐性遺伝子の検索を行った。その結果、下水処理場からの放流水およびその流入後の河川から、*bla*_{GES-24} および *bla*_{OXA-181} 保有 *Enterobacter*、*bla*_{IMP-6} 保有 *K. pneumoniae* を分離した。GES-24 および OXA-181 の国内検出例の報告は少なく、環境水の分離培養法は潜在的な AMR の実態を把握する上で、有効な手法の1つであると考えられた。
- 2) 全国レベルの環境 AMR モニタリングのため、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に対して研究協力を依頼した。その結果、32 地方衛生研究所から協力が得られ、2019 年 8～9 月および 2020 年 1～3 月に下水処理場からの放流水を収集できた。各試料水は各地衛研において前処理を行い、国立感染症研究所（分担・黒田）によってメタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出が行われた。
- 3) 研究班全体の達成目標である環境 AMR システムティック・レビューのため、環境中の耐性菌および耐性遺伝子に関する国内外の文献情報を収集した。

研究協力者：

安達 史恵
大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部生活環境課 主任研究員

河原 隆二
大阪健康安全基盤研究所
微生物部細菌課 主任研究員

地方衛生研究所 32 機関の研究員

A . 研究目的

近年、医療施設・市中・家畜のみならず、世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性（Antimicrobial Resistance: AMR）因子が検出され、環境での対策を含めたワンヘルス・アプローチが注目されている。

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌の分布拡大とヒトへのリスクが懸念される中、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態も不明である。したがって、環境がヒトおよび動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路の解明につながるデータの収集が急務である。

そこで、以下の研究を計画した；

- 1) 大阪府内において、下水処理場からの放流水およびその放流水が流入する河川水を夏期と冬期に採取し、メタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出を行うとともに、薬剤耐性菌の分離および分離株の薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性パターンを決定する。
- 2) 地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に対して研究協力を依頼し、全国レベルの環境 AMR モニタリングを行う。
- 3) 環境中の耐性菌および耐性遺伝子に関する国内外の文献情報を収集し、システムティック・レビューを実施する。

B . 研究方法

1 . 大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握および薬剤耐性菌の分離

本研究班で実施している「メタゲノム解析による薬剤耐性因子検出」のプロトコールに従い、サンプリングおよび試料の調製を行った。

大阪府内の下水処理場 2 地点および河川 2 地点において、2019 年の 3 月と 8 月に採水を行った。なお、河川でのサンプリングにおいては、それぞれの下水処理場からの放流水が流入した地点より下流をサンプリングポイントとした。

サンプリングした試料水 500 mL は 0.2 μm 孔径のフィルターを用いてろ過し、細菌以上の大きさの浮遊物を回収した。このフィルターを滅菌したメスで 1/4 に裁断した後、マイクロチューブに入れて、国立感染症研究所に冷凍宅配便で送付した。

上記フィルターの残り 1/4 ずつを 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Meropenem (MEPM) を含有する LB Broth および Universal Pre-enrichment Broth (UPB) で前培養後、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MEPM および 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ZnSO_4 を含有する CHROMagar ECC (m-ECC)、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Cefotaxime (CTX) を含有する CHROMagar ECC (CTX-chromo) に塗抹後、36 で 18 時間培養し、腸内細菌科細菌の分離を試みた。また、2019 年 3 月より、コリスチン耐性菌分離培地である CHROMagar COL-APSE

(COL) を追加し、同様に分離を試みた。

分離したコロニーは生化学的性状試験およびマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて同定を行った。その後、ドライプレート (栄研化学) を用いて、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の標準法 (M100, 28th ed.) に従い、微量液体希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) を決定した。また、ディスク拡散法を用いたメタロ- β -ラクタマーゼや基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase; ESBL) 等の産生鑑別試験、カルバペネマーゼ産生確認試験 (Modified Carbapenem Inactivation Method; mCIM) を行った。

得られた株については、PCR による耐性遺伝子のスクリーニングおよびシーケンスによるサブタイプの検索を行った。

2 . 環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施

環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の全国的なサーベイランスを行うために、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に研究協力を呼び掛けた。結果として計 32 機関から研究協力を得ることができ (前年度よりも 6 機関増加) 環境水のサンプリングおよびメタゲノム解析のための試料調製を依頼した。

環境水のサンプリングに先立ち、サンプリングおよび前処理に必要な物品として、採水用ボトル、フィルター付きろ過容器、フィルター裁断用のメス、凍結送付用のマイクロチューブを各研究協力機関に送付した。

環境水のサンプリングは夏期: 2019 年 8 月 ~ 9 月初旬および冬期: 2020 年 1 月 ~ 3 月にかけて行われ、「下水処理場の放流水」あるいは「処理水の放流口にできる限り近い地点の河川水 (表層水)」が採取された。なお、水量の増える雨天時や雨天後の採水を避けた。

サンプリングにあたっては、採水箇所的位置情報、日時、水温、気温等の記録とともに、採水地点および周辺の写真撮影を依頼した。また、下水処理場に関する情報として、1 日平均の処理能力、処理方法、管理する区域の

人口、処理区の範囲等について、調査・情報提供を依頼した。

試料調製にあたっては、前項で述べたプロトコルを配布し、採水、前処理および試料調製が統一された方法で行われるよう依頼した。調製した試料は冷凍宅配便で国立感染症研究所に送付され、メタゲノム解析が行われた。なお、冷凍宅配便での発送までの間、試料は - 80 で保管するよう、依頼した。

3 . 環境 AMR に係るシステムティック・レビューの実施

環境 AMR に対して「環境と薬剤耐性」をキーワードとして、論文検索を行った。収集した論文について、内容を再確認した後、黒田誠博士らによって作成された文献情報共有サイトにアップロードした。

アップロードにあたっては、論文の要旨およびコメントを記載した後、重要度のランク付けを行った。

C . 研究結果

1 . 大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握および薬剤耐性菌の分離

メタゲノム解析法による環境 AMR の解析の結果、試料により検出率に差が見られたものの、アミノグリコシド、β-ラクタム剤、サルファ剤、テトラサイクリン耐性に係る薬剤耐性因子の検出が多かった。この傾向は、前回の2018年8月の結果と同様で、また全国のモニタリング結果とも一致していた。さらに、下水処理場放流水と下流河川における薬剤耐性因子の検出割合は同様であった(図1)。一方、検出されたβ-ラクタマーゼ関連遺伝子はGES、IMP、OXA等が多数を占め、これも昨年の夏と同様の傾向であった。

各培地から分離した菌種およびその数を表1に示した。スクリーニングおよびシーケンスの結果、2019年3月にLB broth および m-ECC 培地の組み合わせ (LB-mECC) から分離した *Enterobacter* sp. 2 株がそれぞれ *bla*_{GES-24}、*bla*_{GES-24} および *bla*_{OXA-181} を保有していた。また2019年8月において、*bla*_{GES-24} 保有 *Enterobacter* sp. が LB-mECC から、*bla*_{IMP-6} 保有 *K. pneumoniae* が UPB および

m-ECC 培地の組み合わせから分離された。その他にも、UPB および CTX-chromo 培地の組み合わせから ESBL 産生株が計 13 株分離され、その遺伝子型は CTX-M-1 型、CTX-M-2 型、CTX-M-9 型、CTX-M-1+TEM 型、CTX-M-8+ TEM 型、CTX-M-9+ TEM 型であった。また、UPB および COL 培地の組み合わせからは計 5 株が分離されたが、そのうち 2 株が *mcr-1* 保有 *E. coli* であった。

前述のカルバペネマーゼ産生 4 株の MIC を表 2 に示す。*bla*_{GES-24}、*bla*_{GES-24} および *bla*_{OXA-181} 保有 *Enterobacter* sp. は、IPM および MEPM に対し MIC が > 8 μg/L で耐性を示したが、第 3 世代セファロsporin (Ceftazidime; CAZ, Cefotaxime; CTX) には感受性であった。*bla*_{IMP-6} 保有 *K. pneumoniae* は MIC が 4 μg/mL で耐性を示したが、IPM に対し MIC が < 0.25 μg/mL で感受性であった。また CAZ, CTX に対して耐性を示し (MIC > 16 μg/mL) CTX-M-2 型を保有する ESBL 産生株でもあった。

一方で、*mcr-1* 保有 *E. coli* のコリスチンに対する MIC は 1 μg/mL でコリスチン耐性と判定されなかった。

2 . 環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施

全国 32 の地方研究衛生研究所において、夏期と冬期にサンプリングが実施され、得られた試料の解析は国立感染症研究所 (黒田、関塚ら) で実施した。解析結果は採水地点等が判明しないよう、匿名で処理され、総括したデータについて考察がなされた。

3 . 環境 AMR に係るシステムティック・レビューの実施

文献情報共有サイトに「環境と薬剤耐性」に関する論文を登録し、研究班メンバー全員で重要性等を評価した。

Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in endangered Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*) inhabiting areas around a livestock farm

PubMed ID: 31452343

畜産場からの AMR の拡散には、畜産場近

辺に住む野生動物が関与していることが考えられる。そこで、畜産場近辺および森林地域で採取したヤンバルクイナの糞から大腸菌を分離し、薬剤耐性について調査した結果、ヤンバルクイナは自然環境中において AMR を運んでいることが示された。ヤンバルクイナは絶滅危惧種であるが、その保護のための移送にあたっては AMR の拡散について留意すべきである。

Tetracycline resistance gene *tet(M)* of a marine bacterial strain is not accumulated in bivalves from seawater in clam tank experiment and mussel monitoring
PubMed ID: 29627540

二枚貝は消化管に病原性細菌やウイルスを蓄積するが、遺伝子や DNA の蓄積に関しては定量化できていない。本論文では、海水から分離した多剤耐性株の伝達可能なプラスミドで運ばれるテトラサイクリン耐性遺伝子を二枚貝が蓄積または分解するかを調べた。その結果、耐性遺伝子をもつ海洋細菌は二枚貝により消化される一方、その一部は残存していることが示唆された。二枚貝の腸内の微生物群集は安定した状態を保っている可能性がある。

Antibiotic-resistance of fecal coliforms at the bottom of the Tama River, Tokyo
PubMed ID: 31527349

東京・多摩川中流の底泥(水)の抗生物質耐性糞便性大腸菌の分布と耐性レベルを調査した。*Klebsiella* sp.と *E. coli* が主要な分離株で、多剤耐性の *E. coli* が 1 株検出された。多摩川での結果と下水を対象に行った同様の調査結果とを比較すると、*E. coli* においてカナマイシンを除く 5 剤で薬剤耐性パターンが類似していた。

Growth and antibiotic resistance acquisition of *Escherichia coli* in a river that receives treated sewage effluent
PubMed ID: 31301509

河川環境における大腸菌の増殖と抗生物質耐性獲得の可能性を明らかにするために、下水処理場からの処理水が放流される地点の上

流および下流で、河川水、付着生物および堆積物を採取した。その結果、下水処理場からの放流水は、大腸菌を河川へ直接的には供給していないものの、付着生物の成長を促進する栄養素を供給していた。また、付着生物に存在するバイオフィルム中の細菌が、耐性獲得のホットスポットになっている可能性が見られた。

畜産施設排水における薬剤耐性菌の動向

養豚場内の水処理の各工程、排水処理の各過程および公共用河川(上流、下流)で採水し、薬剤感受性試験を実施した。結果として、排水処理において、耐性菌に対する一定の除去効果を確認できた。

東京都内の表層水に含まれる薬剤耐性菌に関する調査～薬剤耐性の傾向と分布から見えてくる現状～

2016～2017年にかけて、東京都内の都市河川や湖沼の計 20 か所で薬剤耐性菌の有無を調査した。全ての調査地点で薬剤耐性菌が検出され、分離株 86 株のうち 64%が ampicillin with sulbactam に、54%が clarithromycin に耐性を示した。

D. 考察

本調査においては、LB broth および UPB を用いて前培養後、MEPM および CTX を含有する培地を用いて腸内細菌科の分離を試み、カルバペネマーゼおよび ESBL 産生株を得た。カルバペネマーゼ産生株は、2019年3月、8月の計2回の採水で計3株と、数は少ないが、主に LB broth および m-ECC 培地の組み合わせから得られた。2018年の8月にも、LB broth および m-ECC 培地の組み合わせから NDM-1 産生 *E. coli* を分離していることから、環境水からのカルバペネマーゼ産生株の分離には、今回用いたプロトコールが有効であると考えられた。

メタゲノム解析により検出された β-ラクタマーゼ関連遺伝子は GES、IMP、OXA 等が多数を占め、この傾向は 2018年8月の結果と同様の傾向であった。しかし、環境水中から分離した株が保有していた耐性遺伝子の

variant はほとんど検出されず、また、対象地域の医療機関から報告されるものとも異なっていた。メタゲノムで検出された耐性遺伝子の由来については、それらの由来となる菌を特定する等、さらなる調査が必要であると考えられた。

したがって、メタゲノム解析による AMR の環境水中のモニタリングは、薬剤耐性遺伝子の全体像の把握、あるいは他地域との比較による地域特有の耐性遺伝子の検出には有用であると考えられた。さらに、検討した分離培養法は検出感度に優れていると考えられ、これを同時に行うことで、より詳細に環境中の AMR に関する情報が取得できるものと考えられた。

環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施にあたっては、大阪を含めた計 33 機関により国内広範囲のデータを収集することができた。今後も地方衛生研究所全国協議会や衛生微生物技術協議会などを通じて研究協力機関を募り、全国的な実施計画を継続して進める。

E . 結論

本分担研究では、大阪府内の環境水を対象として、薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する情報を収集した。また、環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関して、全国的なサーベイランスに取り組んだ。

これらのサーベイランスを継続することにより、環境中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の現状を把握するためのデータが得られ、その実態が明らかになる。これらのデータは、本邦の環境中の薬剤耐性因子や抗微生物薬がヒトおよび動物へ与える影響についてリスク評価を行うための基盤となるものであり、薬剤耐性 (AMR) アクションプランの目標達成に貢献できるものである。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

なし

その他発表

安達史恵、関塚剛史、山口進康、倭正也、福岡京子、黒田誠、河原隆二 . 大阪府内で分離された FRI 型カルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* 属菌のゲノム解析 . 第 31 回日本臨床微生物学会, 金沢, 2020 年 2 月

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表1 培地別の菌種およびその数（上表：2019年3月、下表：2019年8月）

菌種	LB		UPB	
	m-ECC	CTX-chromo	m-ECC	CTX-chromo
<i>Escherichia coli</i>				4
<i>Enterobacter</i> spp.	2			1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				1
<i>Pseudomonas</i> spp.	4		4	

菌種	LB		UPB	
	m-ECC	CTX-chromo	m-ECC	CTX-chromo
<i>Escherichia coli</i>				5
<i>Enterobacter</i> spp.	1			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			1	
<i>Shigella dysenteriae</i>				2
<i>Pseudomonas</i> spp.	3			

表2 カルバペネマーゼ保有株の MIC

菌種	遺伝子型	由来	MIC (μ/mL)							
			PIPC	CAZ	CTX	AZT	IPM	MEPM	AMK	CPFX
<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24, OXA-181	河川	16	2	1	< 0.5	> 8	> 8	32	0.06
<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	河川	16	2	1	< 0.5	> 8	> 8	32	0.25
<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	32	4	1	< 0.5	> 8	8	32	1
<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	河川	> 64	> 16	> 16	4	< 0.25	4	< 2	< 0.03

PIPC, piperacillin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; AZT, aztreonam; IPM, imipenem; MEPM, meropenem; AMK, amikacin; CPFX, ciprofloxacin

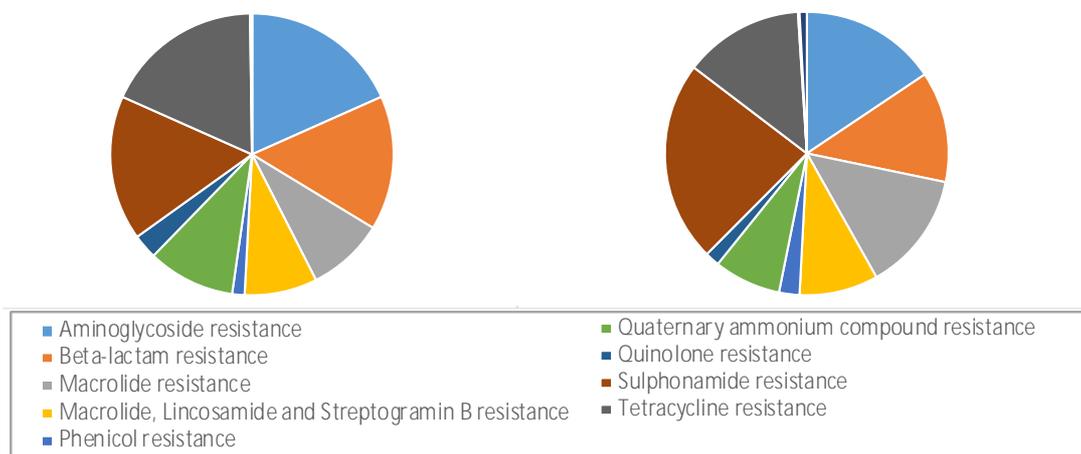


図1 メタゲノムでヒットした耐性遺伝子の割合（左図：下水処理場放流水、右図：河川水）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
（分担）研究報告書
分担研究課題 「動物からの薬剤耐性菌の分離と解析」

研究分担者： 楠本 正博 農研機構動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域

研究要旨

本分担課題では野生動物を含めた環境面から薬剤耐性菌対策にアプローチしている。今年度は国内の野生シカの薬剤耐性菌汚染状況を明らかにすること、養豚場の放流水が流れ込む用水路の薬剤耐性遺伝子汚染の現状を明らかにすること、環境水由来の残留抗菌剤および薬剤耐性菌への暴露がヒトおよび動物に及ぼすリスクや暴露に対する介入の有効性に関する文献情報の収集を目的とした。

2018～2019年に北海道内170地点で採取した野生シカの糞便170検体に由来する共生的な大腸菌521株の薬剤感受性を調べたところ、供試した薬剤のいずれかに耐性を示したのは15株（2.9%）であり、耐性を示した薬剤数は4以下であった。国内の野生シカにおける薬剤耐性菌の分布率はシカの種類や生息域により異なるが極めて低く、家畜との薬剤耐性菌または耐性遺伝子の往来が常時行われる状況にはないことを示す成績と考えられた。また、養豚場の放流水が流入する用水路に含まれる薬剤耐性遺伝子を解析したところ、放流に伴う負荷は農場によって異なっていた。放流水から検出された耐性遺伝子の種類や量は、概ね養豚場で使用される抗菌剤等に対応していたが、共選択などに起因すると考えられる不一致も認められた。また、用水路の上流側および下流側における耐性遺伝子の組成は、放流水の他に養豚場の環境（放流システムや外界とのアクセスなど）の影響も大きいことが示された。このほか、研究班全体の達成目標である環境AMRシステムティック・レビューのため、国内9報の文献情報を収集し、閲覧サイトに登録した。

研究協力者：

玉村 雪乃
農研機構動物衛生研究部門
細菌・寄生虫研究領域

渡部 真文
農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域

上垣 隆一
農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域

ゲルゲ・キールティ・シリ
農研機構動物衛生研究部門 病態研究領域

A. 研究目的

近年、医療機関や市中における薬剤耐性菌の蔓延に対し、人、動物、環境の健康保全を統合的に扱おうとするワンヘルスアプローチによる対策が望まれている。本研究班では医学、獣医学、環境化学、ゲノム微生物学の専門家が結集して環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査方法を確立することを目的としている。このうち本分担課題では野生動物や畜舎付近で採取した用水路の水の薬剤耐性菌および抗菌剤汚染の現状を明らかにするとともに、文献調査（系統的レビュー）によって環境由来の薬剤耐性菌に曝露されることの動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性について一定の見解を得ることを目的としている。

畜産農場から環境中への薬剤耐性菌の汚染を考えた場合、汚水の放流は重要な排出経路

の一つと考えられており、その実態を把握することが求められている。また、近年、通常は薬剤耐性の選択が起こらないような極めて低濃度の抗菌剤の残留でも、環境中の微生物において薬剤耐性の選択や維持が起こる可能性が指摘されており、抗菌剤そのものの汚染実態や環境挙動を把握することが必要とされている。

今年度は 1) 国内の野生シカの薬剤耐性菌汚染状況を明らかにすること、2) 養豚場の放流水が流れ込む用水路の薬剤耐性遺伝子汚染の現状を明らかにすること、3) 環境水由来の残留抗菌剤および薬剤耐性菌への暴露がヒトおよび動物に及ぼすリスクや暴露に対する介入の有効性に関する文献情報の収集を目的とした。

B．研究方法

1．野生シカの薬剤耐性菌汚染状況

2018～2019年に北海道内170地点で採取した野生シカ糞便170検体の希釈液をクロモカルトコリフォーム寒天培地に塗布培養後、大腸菌様コロニーを1検体あたり5個まで釣菌し、大腸菌を分離した。分離株についてディスク拡散法により薬剤感受性試験を実施した。供試した抗菌剤とその略号は以下の通りである：アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、テトラサイクリン(TC)、ST合剤(SXT)、セファゾリン(CEZ)、セフォタキシム(CTX)、セフォキシチン(CFX)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)。

2．養豚場からの放流水及び周辺用水路水の解析

養豚場3農場(、)で調査を実施した。いずれの農場も、スクリーンによる粒子除去、凝集剤による可溶物の不溶化、標準活性汚泥法または好気性ラグーン法による分解処理、沈澱又は膜分離処理を行い、排水を放流していた。農場の放流水は養豚場内を流れる用水路に流入しており、本農場では夏期に2回(夏1、夏2)、秋期に1回(秋)試料を採取した。このうち、夏1およ

び夏2は、それぞれ昨年度報告書の「農場(夏期)」および「農場(夏期2回目)」と同じ試料である。農場では、放流口から流入用水路まで10m程度の距離があった(開渠)。農場の試料()は、昨年度報告書の「農場」と同じである。農場はバッチ式の放流システムであり、用水路水採取時は放流されていなかった(放流停止12時間後に試料を採取した)。農場の試料は夏期(夏)と冬期(冬)に採取し、そのうち夏は昨年度報告書の「農場」と同じ試料である。

本研究の水試料は、養豚場の放流水が流入する用水路の上流側及び下流側(放流点から上下約3mの地点)で採取した。また、同時に養豚場からの放流水も採取した。採取した水試料は、UV照射及びメタノール洗浄したポリプロピレン容器に保存し、氷冷しながら研究室に持ち帰った。

持ち帰った水試料は、直ちにメンブランフィルター(0.22 μ m、セルロースアセテート、Corning, NY, USA)を用いた吸引ろ過により浮遊粒子を捕集し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行った。薬剤耐性遺伝子量は、総シーケンス100万リードに対する各耐性遺伝子リードの割合で示した。

3．環境AMRに関する文献情報の収集

国内の調査研究を中心に、野生動物を含む環境中における残留抗菌剤および薬剤耐性菌の分布に関する論文をPubMedを用いて検索し、閲覧サイトに登録した。

C．研究結果

1．野生シカの薬剤耐性菌汚染状況

野生シカの糞便170検体中、128検体から大腸菌を分離できた。大腸菌は1検体あたり5株まで分離して保存し、全521株を薬剤感受性試験に供した。521株中15株(2.9%)が何らかの薬剤に耐性を示し、薬剤耐性パターンはTC、SXT耐性株が5株、ABPC耐性株が2株、ABPC、SM、NA耐性株が1株、ABPC、CP、TC、CEZ耐性株が1株、SM、TC耐性株が1株、SM、CP、TC、NA、KMのいずれかに耐性の株がそれぞれ1株ずつであった。

2. 養豚場からの放流水及び周辺用水路水の解析

図 1 に、養豚場からの放流水および周辺用水路水（上流側と下流側）における薬剤耐性遺伝子の総量を示した。放流される薬剤耐性遺伝子量は農場で多く、次いで農場、農場の順であった。

農場は放流水中の薬剤耐性遺伝子の負荷が大きく、結果として用水路上流側に比べ下流側で薬剤耐性遺伝子量が多かった（図 1）。一方、農場では、上流側に比べ放流水で薬剤耐性遺伝子量が多いケースもあったが、上流側と下流側で遺伝子量に大きな変化はみられなかった。また、農場では、放流水および用水路水の薬剤耐性遺伝子量がほぼ同じであった。

図 2 に、各抗菌剤等に対する耐性遺伝子量を示した。放流水ではテトラサイクリン系、スルホンアミド系、アミノグリコシド系、フェニコール系抗菌剤に対する耐性遺伝子の量が多かった。また、β-ラクタム系、リンコマイシン系、マクロライド系抗菌剤やトリメトプリム、第四級アンモニウム塩（殺菌洗淨剤）に対する耐性遺伝子も検出された。用水路上流側水でも放流水と同様の耐性遺伝子が検出された。耐性遺伝子量について、各農場および調査時期における放流水、用水路上流側、同下流側の関係は、遺伝子総量（図 1）と同じ傾向であった。すなわち、農場では放流水からの負荷が大きく、上流側に比べ下流側で遺伝子量が明らかに多い。農場では上流側に比べ放流水で多い時期もあるが、上流側と下流側の遺伝子量に大きな変化はみられなかった。農場では、放流水と用水路水の遺伝子量がほぼ同じであった。

放流水からの耐性遺伝子の負荷を確認するため、放流水および上流側の耐性遺伝子量比をプロットした（図 2：放流水/上流）。なお、上流側で耐性遺伝子が検出されていない場合は、その遺伝子のリード量の検出下限が 1 とした場合の遺伝子量（シーケンス 100 万リード当りの検出下限）から計算した。この比率が高いほど、放流水を放流した場合の環境（用水路水）への負荷が相対的に大きい遺伝子といえる。結果として、すべての農場および調

査時期で放流水からの負荷がみられたのは、テトラサイクリン系およびスルホンアミド系抗菌剤、第四級アンモニウム塩に対する耐性遺伝子であった。農場や農場冬は全体的に負荷が大きく、特に農場夏 2 では上記の抗菌剤等に加え、アミノグリコシド系、β-ラクタム系、リンコマイシン系、マクロライド系、フェニコール系抗菌剤やトリメトプリムに対する耐性遺伝子の負荷も大きい。一方、農場夏と農場について、放流水および上流側の遺伝子量比は 3 未満であった。

すべての農場および調査時期で放流水からの負荷が大きく、耐性遺伝子の種類が多いテトラサイクリン系抗菌剤について、各耐性遺伝子量と放流水および上流側の遺伝子量比を確認した（図 3）。放流水で含有量が多い遺伝子は、tet(C)、tet(G)、tet(M)、tet(X)であった。また、これらの耐性遺伝子は、放流水および上流側の遺伝子量比も高くなっていた。

3. 環境 AMR に関する文献情報の収集

国内の調査研究を中心に、ウェブサイトに登録した環境中の残留抗菌剤および薬剤耐性菌に関する論文 9 報について検討した。主な論文の概要を以下に示す。

Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents.

PubMed ID : 26802347

国内都市部の病院排水、その病院を処理区域に含む下水処理場の流入水、放流水、河川水について、医療現場で使用される医薬品やその代謝物を調査した。調査した 41 成分中 38 成分が病院排水中に幅広い濃度で検出され、それらは下水処理場の流入水からも同程度から 1/10 程度の濃度で検出される傾向がみられた。下水処理場における処理前後で医薬品類の一部は除去されるが、抗菌剤を含む多くの成分は十分に除去されず、放流先の河川水でも（概ね類似の）濃度で検出される傾向がみられた。一方、高度処理としてオゾンを用いている下水処理場の放流水では医薬品が検出されないか、検出されても極低濃度であっ

た。本論文の続報として、同じサンプルで薬剤耐性菌に関する検討が行われておりオゾン処理の有効性が示されている (PubMed ID : 26802347)。

Nationwide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers.

PubMed ID : 21975006

国内の主要な 37 河川においてヒトおよび家畜で使用される抗菌剤 (12 種類) の濃度を調べた。抗菌剤濃度は郊外より都市部が高く (主にマクロライド系抗菌剤) 畜産が盛んな地域のいくつかの河川では動物に使用されるスルホンアミド系抗菌剤が主に検出された。ほとんどの河川の下流域ではヒト用抗菌剤の濃度が動物用抗菌剤を大きく上回っており、国内の河川の抗菌剤は主に都市部の下水処理場に由来する (家畜の排泄物由来の抗菌剤はそれほど河川に流入しない) と考えられる。

Fluoroquinolone consumption and Escherichia coli resistance in Japan: an ecological study.

PubMed ID : 31014305

JANIS サーベイランスシステムにより 2015 年から 2016 年、全国 47 都道府県におけるレボフロキサシン耐性大腸菌の事例に関する情報を収集した。また、医薬品販売データよりフルオロキノロン使用量に関する情報を得た。両者の関連を解析したところ全国的によく相関しており、西日本ではフルオロキノロンの使用量と耐性が共に高く、東日本では使用量と耐性が共に低かった。本論文は国内における地域差を詳細に調べた結果として、またフルオロキノロン使用量と耐性頻度が相関することを示すデータとして貴重な報告と考えられる。

他 6 報を検討。

D . 考察

北海道内 170 地点で収集した野生シカ糞便に由来する 521 株の共生的な大腸菌のうち、

供試した薬剤のいずれかに耐性を示した株は 15 株 (2.9%) であり、耐性を示した薬剤数は 4 以下であった。昨年度に実施した国内 40 道府県の野生シカ糞便由来大腸菌における結果 (1.3%) と同様に、北海道内においても野生シカにおける薬剤耐性菌の分布率が低いことが示された。北海道内の野生シカ (エゾシカ) は本州の野生シカ (ホンシュウジカ) と比較して行動範囲が広いことが知られているが、家畜との接触及び薬剤耐性菌の伝達の機会は同程度であると考えられた。分離数は少ないが、複数の抗菌剤に耐性を示す株が存在するため、次年度はこれらの株について薬剤耐性機構や薬剤耐性遺伝子の伝達性を解析する予定である。

養豚場の放流水経由での薬剤耐性遺伝子の放出が周辺の環境水に及ぼす影響を調査したところ、放流に伴う負荷は農場によって異なっていた。農場は用水路の放流口上流側に比べ下流側で薬剤耐性遺伝子量が多く、放流水とほぼ同レベルであった (図 1)。この用水路の水量は放流量に比べてかなり少なく、昨年度の検討により抗菌剤残留濃度についても薬剤耐性遺伝子量と同様の傾向が得られている。一方、農場およびでは、放流口の上流側と下流側で薬剤耐性遺伝子量に大きな違いがみられなかった。その要因としては、農場では放流水中の耐性遺伝子量が少なく用水路上流側とほぼ同レベルであったこと、農場では用水路水採取時に農場からの放流がなかったことが、それぞれ考えられた。

放流水から検出された耐性遺伝子の種類や量は、概ね養豚場で使用される抗菌剤等に対応していた (図 2)。しかしながら、農場ではアミノグリコシド系、マクロライド系、フェニコール系抗菌剤が使用されていないにも関わらず、これらの耐性遺伝子が検出されている。昨年度の研究成果でもこれらの抗菌剤に対する耐性大腸菌が分離されていることから、養豚場で使用される抗菌剤等と耐性遺伝子の不一致は共選択などの影響によると思われる。

放流水からの環境負荷を理解するため、放流水および用水路上流側の耐性遺伝子量比を計算した (図 2)。テトラサイクリン系およびスルホンアミド系抗菌剤や第四級アンモニウ

ム塩は、すべての農場および調査時期で、放流水からの耐性遺伝子の負荷がみられた。また、リンコマイシン系、マクロライド系、フェニコール系抗菌剤など、特定の農場および調査時期で負荷が高くなるケースもあった。以上の結果は、環境調査を実施する際に、これらの耐性遺伝子が養豚場放流水由来の指標として活用できる可能性を示している。また、耐性遺伝子の負荷がほとんどない農場および調査時期も確認された(図2:農場 夏および)

このことは、養豚場内の耐性遺伝子を除去する排水処理技術または運転方法などを開発する余地が残されていることを示唆している。テトラサイクリン系抗菌剤に対する耐性遺伝子を確認したところ、放流水では tet(C)、tet(G)、tet(M)、tet(X)など特定の遺伝子の量が多く、負荷も大きかった(図3)。一方、他の多くの耐性遺伝子では負荷が小さい、あるいは確認されない(放流水/上流比が1以下)状況であった。これらのことは、上記のテトラサイクリン耐性遺伝子が環境負荷の指標として利用できることを意味している。

E . 結論

国内の野生シカにおける薬剤耐性菌の分布率はシカの種類や生息域により異なるが極めて低く、家畜との薬剤耐性菌または耐性遺伝子の往来が常時行われる状況にはないことが示唆された。

養豚場の放流水経由での薬剤耐性遺伝子の放出が周辺環境水に及ぼす影響を調査したところ、放流に伴う負荷は農場によって異なっていた。放流水から検出された耐性遺伝子の種類や量は、概ね養豚場で使用される抗菌剤等に対応していたが、共選択などの影響による使用抗菌剤と耐性遺伝子の不一致も認められた。また、用水路の上流側および下流側における耐性遺伝子の組成は、放流水の他に養豚場の環境(放流システムや外界とのアクセスなど)の影響も大きいことが示された。一方で、耐性遺伝子の負荷がほとんどない農場や調査時期も確認されたことから、農場および環境における耐性伝播の実態をさらに詳細に把握する必要がある。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

なし

その他発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

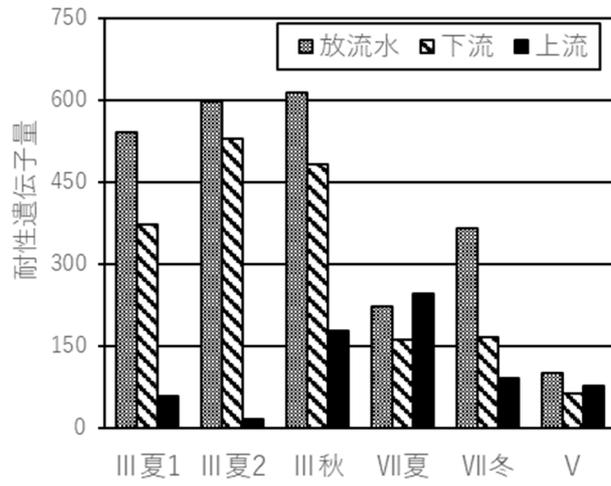


図 1. 放流水および用水路水における薬剤耐性遺伝子の総量

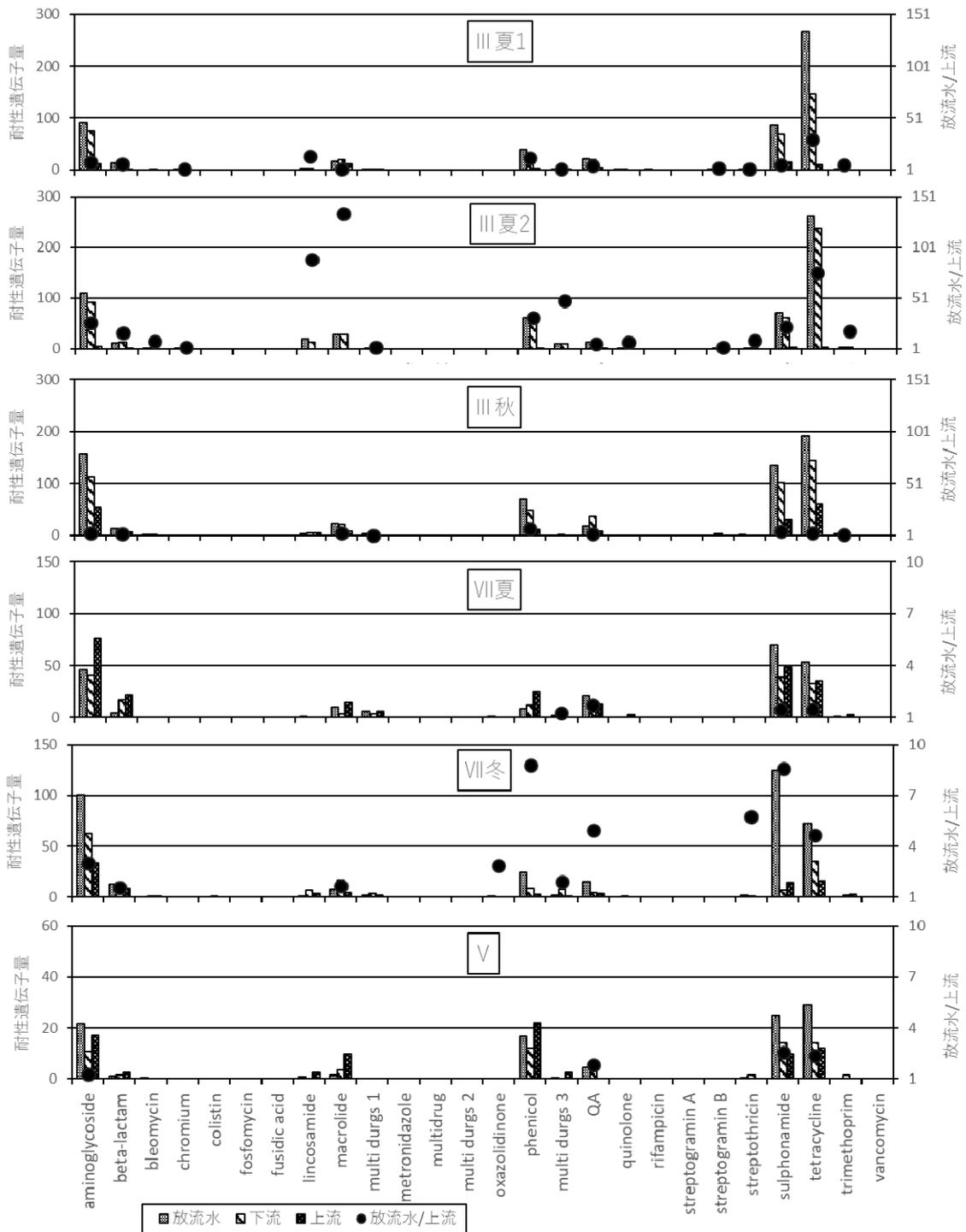


図 2. 放流水および用水路水における薬剤耐性遺伝子量と放流水/上流の遺伝子量比

Multi drugs 1, macrolide, lincosamide and streptogramin B; Multi drugs 2, oxazolidinone and phenicol; Multi drugs 3, phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins and streptogramin A; QA, quaternary ammonium compounds.

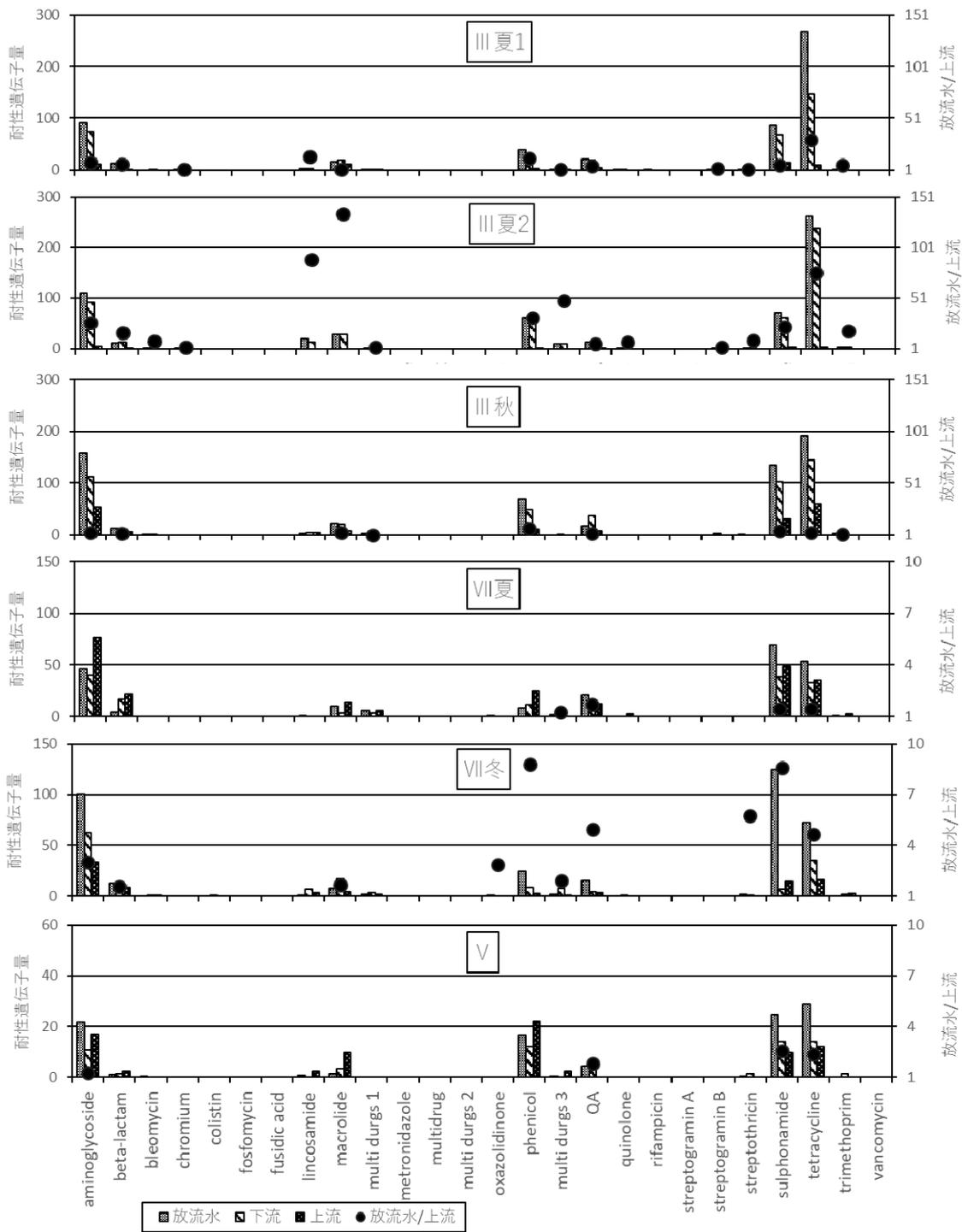


図3. 放流水および用水路水におけるテトラサイクリン耐性遺伝子量と放流水/上流の遺伝子量比

Multi drugs 1, macrolide, lincosamide and streptogramin B; Multi drugs 2, oxazolidinone and phenicol; Multi drugs 3, phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins and streptogramin A; QA, quaternary ammonium compounds.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
（分担）研究報告書
分担研究課題 「残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言」

研究分担者： 渡部 徹 山形大学 農学部・教授

研究要旨

薬剤耐性(AMR)アクションプランの目標達成に向け、厚労（ヒト）・農水（動物）各分野の取り組みが実施されている中、環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬のヒト・動物に与えるリスクを評価する手法を確立し、環境分野の薬剤耐性への影響を解明することは、ワンヘルス・アプローチの観点から薬剤耐性に関する施策を推進していくために非常に重要である。

本分担研究では残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言を目的として、本年度は以下の通り研究を実施した。1) 環境水の中でももっとも高い濃度で抗菌薬が残留していると思われる下水処理水での実態調査を開始した。2) 病院排水で検出される抗菌薬の分析も行い、環境水中の残留抗菌薬との比較（種類や濃度レベル）を行った。3) 環境水で検出される残留抗菌薬の濃度レベルとそこでの耐性菌発生の可能性に関するレビューを行った。

そこで得られた成果としては、1) 山形県内の下水処理場からの処理水からはサルファメトキサゾール、オフロキサシン及びレボフロキサシン、トリメトプリム、エリスロマイシンが年間を通じて高頻度で検出された。2) 宮城県内の総合病院の排水からはレボフロキサシンやトリメトプリムが比較的高濃度で検出され、上述の処理水からの検出結果と共通していた。

研究協力者：

西山 正晃
山形大学 農学部・助教

本多 了
金沢大学 理工研究域・准教授

原 宏江
金沢大学 理工研究域・助教

(Global Sewage Surveillance Project: <https://www.compare-europe.eu/Library/Global-Sewage-Surveillance-Project>)

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌拡大とヒトへのリスクが懸念される中、現状では、環境由来の薬剤耐性菌が生活環境へ循環し健康被害が認定された実例はなく、ヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。また、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態も不明である。したがって、環境がヒト及び動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立が急務である。

本分担研究では残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言を目的として、薬剤使用量、下水道での1人当たりの水使用量と処理場での除去率、河川での希釈などの報告値にもとづく環境水中の抗菌薬濃度の推定、実際の環境水を対象とした抗菌薬濃度の測

A. 研究目的

近年、医療施設・市中・家畜のみならず、世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性(Antimicrobial Resistance: AMR) 因子が検出され、環境での薬剤耐性対策を含むワンヘルス・アプローチが注目されている。環境汚染の多くが工場および生活排水の下水処理工程に起因すると想定され、WHO 支援の元、世界の下水処理施設の薬剤耐性菌調査が日本を含む 70 カ国以上の参加国で進行中である

定、そして、それらの結果にもとづいて 検査・評価していくべき抗菌薬の種類およびその検出手法の検討を行う。

本年度は、主に項目 および に関連して、以下の通り研究を実施した。1) 環境水の中でももっとも高い濃度で抗菌薬が残留していると思われる下水処理水での実態調査を開始した。2) 病院排水で検出される抗菌薬の分析も行い、環境水中の残留抗菌薬との比較（種類や濃度レベル）を行った。3) 環境水で検出される残留抗菌薬の濃度レベルとそこでの耐性菌発生の可能性に関するレビューを行った。

B．研究方法

1．下水処理水中の残留抗菌薬の実態調査

山形県内の都市下水処理場からの放流水を計 8 回に渡って採取した。採取された水試料を固相抽出法により前処理した後、高速クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）計で測定して、検出の有無を確認し、簡易定量した。測定対象は 19 種類の抗菌薬（クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、サルファメトキサゾール、テトラサイクリン、オフロキサシン及びレボフロキサシン、ノルフロキサシン、アモキシシリン、ナリジクス酸、トリメトプリム、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、リンコマイシン、ロキシスロマイシン、サルファメラジン、サルファチアゾール、タイロシン、ロメフロキサシン（レモフロキサシン）、メロペネム、クロラムフェニコール）である。

HPLC システムには Thermo Fisher Scientific 社製 Ultimate 3000 を用い、タンデム質量分析計には Thermo Fisher Scientific 社製 TSQ Quantum Discovery MAX を用いた。前処理には固相カードリッジ（Oasis HLB plus, waters 社製）を用いた。

MS 測定では、クロラムフェニコール以外は ESI-positive モードによりイオン化し、クロラムフェニコールは ESI-negative モードによりイオン化して測定した。

MS/MS 測定では、同一のプレカーサーイオンから得られる 2 つのプロダクトイオンのピークから得られる保持時間及びイオン強度の比率により検出/不検出の判定をした。定性

分析において「検出」となった場合には、およその濃度を確認するために、標準液 200ng/mL を用いた 1 点検量で定量を行った。また「不検出」となった場合には、どの程度まで検出可能かを確認するために、標準液を 5 回繰り返し測定して得られる標準偏差の 3 倍を検出下限値として算出した。

2．病院排水中の残留抗菌薬の実態調査

宮城県内の病院排水中のカルバペネム系抗菌薬及びその他の汎用医薬品の濃度を 1 年間に渡って月 2 回の頻度でモニタリングした。

対象物質は、カルバペネム系抗菌薬（イミペネム、メロペネム、ドリペネム、ピアペネム；ドリペネムとピアペネムは途中まで）、その他の抗菌薬（クロタミトン、クラリスロマイシン、レボフロキサシン、テトラサイクリン、スルファメトキサゾール、トリメトプリム）そして、汎用医薬品（アセトアミノフェン、エテンザミド、カフェイン）とした。

以上の対象物質の分析方法は以下の通りである。

下水試料及びネガティブコントロールとして超純水各 200 mL×2 を GB-140 フィルター（アドバンテック）にてろ過

標準添加法を使用のため、片方の系列に対象医薬品の 1 mg/L を 100µL ずつ添加

吸引マニホールドを用いて OASIS HLB（Waters）上に固相抽出

メタノール溶出後、窒素吹付け & 加温下で乾固し、500µL メタノールに再溶解

LCMS-8045（島津）を用いてポジティブイオン化モードにて測定

3．環境 AMR に関する文献情報の収集

「環境水で検出される残留抗菌薬の濃度レベルとそこでの耐性菌発生の可能性」に関する論文検索を行い、文献情報共有サイトに登録した。

C．研究結果

1．下水処理水中の残留抗菌薬の実態調査

下水処理水中の抗菌薬の測定結果を表 1 に示す。測定対象とした 19 種類の抗菌薬のうち、サルファメトキサゾール、オフロキサシ

表 1 下水処理水中の抗菌薬濃度（単位：ng/L）

分析対象項目	5月30日	6月25日	7月25日	8月29日	10月1日	12月26日	2月20日	3月5日
クロルテトラサイクリン	<300	<300	<300	<300	<300	<200	<200	<200
オキシテトラサイクリン	<40	<40	<40	<40	<40	<30	<30	<30
サルファメトキサゾール	100	100	100	90	<30	100	200	80
テトラサイクリン	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200
オフロキサシン 及びレボフロキサシン	500	400	600	700	300	300	300	200
ノルフロキサシン	<100	<100	<100	<100	<100	<40	<40	<40
アモキシシリン	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200
ナリジクス酸	<40	<40	<40	<40	<40	<70	<70	<70
トリメトプリム	70	70	60	50	<20	100	90	50
シプロフロキサシン	<60	<60	<60	<60	<60	<90	<90	<90
エリスロマイシン	800	600	600	600	500	500	500	500
リンコマイシン	<7	<4	10	<8	<4	30	60	30
ロキシスロマイシン	30	<30	<30	<30	<30	<40	<40	<40
サルファメラジン	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
サルファチアゾール	<40	<40	<40	<40	<40	<70	<70	<70
タイロシン	<30	<30	<30	<30	<30	<20	<20	<20
ロメフロキサシン (レモフロキサシン)	<50	<50	<50	<50	<50	<40	<40	<40
メロペネム	<300	<300	<300	<300	<300	<500	<500	<500
クロラムフェニコール	<20	<10	<10	<10	<10	<60	<60	<60

ン及びレボフロキサシン、トリメトプリム、エリスロマイシンが高頻度で検出され、リンコマイシンが時折検出された。ほぼ1年間に渡って継続的に測定を行ったが、検出される抗菌薬の種類は年間を通じてほぼ変わらなかった。

参考のために、調査対象とした処理場の近隣の農業用水路から採取した表流水（特定の汚染源がない）についても同様の分析を行ったが、いずれの抗菌薬も検出されなかった。

2. 病院排水中の残留抗菌薬の実態調査

病院排水中の残留抗菌薬の検出頻度とその濃度を、それぞれ表2と図1に示す。これらの図表には比較のために、同じ地域の下水処理場に流入する都市下水での検出結果も示している。

測定対象とした11種類の医薬品のうち、病院排水・都市下水ともに、アセトアミノフェンが最も高い濃度（最大濃度：病院 144.7µg/L、下水合流 43.4µg/L、下水分流 68.3µg/L）で検出され、レボフロキサシン及びカフェインがこれに続いた。これら3つの医薬品が高濃度かつ高頻度（>75%）で検出された点は、既往

研究と同様であった。この調査の第一の関心事であったメロペネムとイミペネムは、検出頻度は7~27%と低く、濃度はそれぞれ0.013~1.138µg/L、0.017~0.060µg/Lであった。概して、病院排水は都市下水に比べて検出濃度のばらつきが大きかった。また、メロペネムやクラリスロマイシンのように、検出頻度は低いものの（<25%）検出された場合には0.1~1µg/Lの中程度の濃度になる場合もあった。いずれの結果も、病院排水では処理人口が少ないゆえに水質変動が大きかった。

クロタミトンにおける検出頻度の乖離（病院排水 38%、都市下水 100%）は、病院排水での比較的大きな水質変動に加えて、当該医薬品で唯一の外用薬であり、家庭での使用が圧倒的に多いことによる結果かもしれない。

3. 環境 AMR に関する文献情報の収集

文献情報共有サイトに登録した「環境水で検出される残留抗菌薬の濃度レベルとそこの耐性菌発生の可能性」に関する論文18報について検討した。

Occurrence of antibiotics and antibiotic

表 2 病院排水からの抗菌薬等の検出頻度 (単位: %)

	AAP	CAF	LVX	TMP	MRP	CRM	CTM	ETZ	SMZ	TTC	IMP
病院排水	100	100	100	63	13	38	38	25	38	38	7
下水合流	100	100	75	50	20	25	100	25	63	13	27
下水分流	100	100	75	50	20	13	100	25	63	13	27

注) AAP: アセトアミノフェン, CAF: カフェイン, LVX: レボフロキサシン, TMP: トリメトプリム, CRM: クラリスロマイシン, CTM: クロタミトン, ETZ: エテンザミド, SMZ: スルファメトキサゾール, TTC: テトラサイクリン, MRP: メロペネム, IMP: イミペネム

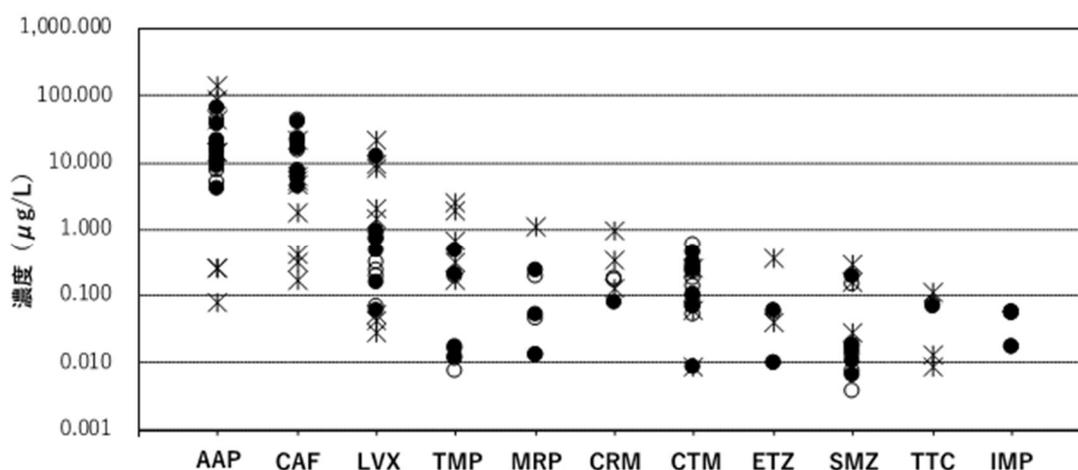


図 1 病院排水 (*) および都市下水 (, ○) からの抗菌薬等の検出濃度

resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river.

PubMed ID: 24630248

中国の下水処理場からの放流水の tetB 遺伝子および tetW 遺伝子の濃度は、テトラサイクリンおよびオキシテトラサイクリンの濃度と有意な正の相関があった。一方で、キノロン耐性遺伝子とエンロフロキサシン濃度に負の相関があった。

Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas.

PubMed ID: 29454283

ルーマニアの都市の影響を受けている地下水で調べた 14 種類の耐性遺伝子の濃度は、それらと関連する抗菌薬の濃度とは相関がなかった。

Research article Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India

PubMed ID: 20626873

インドの病院排水や都市下水で調べた 8 種類の抗菌薬の濃度は、同じ下排水から分離された大腸菌のそれらの抗菌薬への耐性率と相関がなかった。

Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river.

PubMed ID: 25482914

スペインの病院排水や都市下水が放流される河川において、シプロフラキサシン及びオフロキサシンと gnrS 遺伝子,セファゾリン及びセファタキシムと blaTEM 遺伝子,クラリスロマイシンと ermB 遺伝子,スルファメトキサゾールと sull 遺伝子のそれぞれの間で有意

な相関が見られた。アジスロマイシンと ermB 遺伝子の間には相関がなかった。

Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam.

PubMed ID: 21669325

ベトナムの河川，運河および池の水で調べた 12 種類の抗菌薬を調べた結果，スルファメトキサゾール濃度とそれに対する耐性率の間には有意な相関が見られた。一方，エリスロマイシン濃度とそれに対する耐性率の間には相関はなかった。

他 13 報について検討を行った。

D．考察

昨年度には環境水からのカルバペネム系抗菌薬の分析手法の検討を行った上で，環境水の残留抗菌薬の実態調査のための体制を整えた。本年度はその体制のもとで，環境水の中でも比較的抗菌薬の濃度が高いと想像される下水処理水と病院排水の残留抗菌薬を調査した。

本年度は山形県内の下水処理場と宮城県内の病院を対象として実態調査を行ったが，その結果から，下水処理水と病院排水の双方で頻度高く検出される抗菌薬の種類が類似していることが分かった。これは病院排水が合流する都市下水でも共通しており，環境水において検査すべき残留抗菌薬を選択する上で重要な情報が得られた。

文献調査に関しては，環境水で検出される残留抗菌薬の濃度レベルとそこでの耐性菌発生の可能性を関連付けることを目指したが，研究報告例に限られるのに対して，抗菌薬と細菌の種類がともに多く，システマティックに整理することは困難であった。この点については，類似した研究事例が今後増えることを期待している。

E．結論

本研究の成果より，現在の体制と分析方法によって下水処理水を含む環境水からの抗菌薬の実態調査が可能であることが示された。残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言の目的のためには，次年度も引き続き下水やその処理水，河川水等の抗菌薬濃度の実測が必要であり，そこで得られたデータにもとづいて，最終的に抗菌薬の検出方法の確定につなげる。

文献調査については，上記の最終目標を踏まえて，抗菌薬の使用量や下水処理場での除去率，河川での希釈などをテーマとした文献を中心に収集していく予定である。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

論文発表

渡部徹，水中の薬剤耐性菌による健康リスク評価，水環境学会誌，43(A)(3)，99-102，2020

澁木理央，西山正晃，Chiemchaisri Chart，Chiemchaisri Wilai，渡部徹，抗菌薬存在下での培養による活性汚泥中の ESBL 産生遺伝子の濃度変化，土木学会論文集 G（環境），75(7)，III_309-III_320，2019

その他発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M.	Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental <i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Aeromonas caviae</i> isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan.	Environ Microbiol Rep	11(4)	589-597	2019
Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T, Kuroda M.	Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-coproducing <i>Escherichia coli</i> GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay.	Infect Drug Resist	12	2243-2249	2019
渡部 徹.	水中の薬剤耐性菌による健康リスク評価.	水環境学会誌	43(3)	99-102	2020
澁木理央, 西山正晃.	抗菌薬存在下での培養による活性汚泥中の ESBL 産生遺伝子の濃度変化.	土木学会論文集 G (環境)	75(7)	III_309-III_320	2019

<p>Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Ishikawa K, Hosaka T, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Hasegawa M, Kawazoe Y, Kushimoto S, Kaku M.</p>	<p><i>Chromobacterium haemolyticum</i> pneumonia associated with drowning and river water as a source of infection, Japan.</p>	<p>Emerg Infect Dis</p>			<p>2020 印刷中</p>
---	--	-------------------------	--	--	---------------------



Acrobat X または Adobe Reader X 以降でこの PDF
ポートフォリオを開いてこれまでにない便利さを体験してください。

Adobe Reader を今すぐダウンロード!