

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2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金森 肇

令和3（2021）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) 令和2年度 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-----30  
金森 肇
2. 環境微生物ゲノム情報の取得-----39  
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-----48  
山口 進康
4. 動物からの薬剤耐性菌の分離と解析-----54  
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-----64  
渡部 徹

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----73

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）対策が注目されている。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。本研究班では環境中の薬剤耐性および残留抗菌薬の調査法の確立に向けた研究を行い、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。環境 AMR モニタリングに資する作業手順書を作成し、全国展開するための体制が整備された。メタゲノム解析法と培養法による調査法を用いて、下水処理場の放流水、都市下水、河川水、病院排水、養豚場の下水における薬剤耐性菌および耐性遺伝子の検出、さらに下水処理水および病院排水の抗菌薬分析を行うことで、対象地域の環境水の薬剤耐性の実態を明らかにした。本研究班で実施した全国的なサーベイランスにより環境中の薬剤耐性の現状を把握するためのデータが得られ、日本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を作ることができた。本研究結果と国内外の文献情報をもとに、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方法を確立し、日本における環境中の薬剤耐性および抗菌薬の実態調査を充実させ、薬剤耐性ワンヘルス・アプローチを推進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 腸管病原菌ユニット・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  
ゲルグ・キルティール 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

世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性因子が検出され、ワンヘルス（人・動物・環境）の観点から環境の薬剤耐性（AMR）対策が注目されている。抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性の拡がり与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、日本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、環境中の薬剤耐性の調査法を確立し、人および動物に与えるリスク評価を行うことが重要課題である。

本研究班の研究目的は、次の通りである。

- 1) 環境中の薬剤耐性及び抗菌薬の状況を把握するための調査方法の確立
- 2) 本研究班の大都市圏の成果を踏まえ、全国的な環境水のモニタリング調査へ発展
- 3) ワンヘルスの観点から環境・動物・ヒト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
- 4) 環境（特に下水排水）の薬剤耐性菌の調査及び文献レビューにより、本邦の環境中の薬剤耐性や抗菌薬がヒト及び動物へ与える影響に関するリスク評価

## B. 研究方法

令和2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に向けた研究を実施し、環境水の全国的なサーベイランスおよび地域の実態調査を継続した（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、環境中の薬剤耐性に関する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評価（全班員）に関する研究活動を行った。

（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

大学病院の下水、及びその病院下水が流入する下水処理場から採水し、薬剤耐性の状況を調査した。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カルバペネム耐性菌の分離を試みた。各種カルバペネマーゼ遺伝子のPCRを行い、次世代シーケンサーを用いて病院・市中下水から分離されたカルバペネマーゼ産生菌の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を示した。解読リードを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評価した。薬剤耐性データベースを参照して薬剤耐性因子の同定・検出数の算出を行った。RPKM法を用いて相対的なARG濃度を算出し、比較解析を実施した。さらに、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、プラスミド配列を含む完全長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およびその下流河川で採水を行い、薬剤耐性菌を分離した。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。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、

国内各地の地方衛生研究所から協力を得て、環境水の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

北海道内で採取した野生シカの糞便検体から分離した薬剤耐性大腸菌のゲノム解析を行い、sequence type、薬剤耐性遺伝子、プラスミドレプリコン型、病原遺伝子を検索した。また、養豚場の周辺環境水（放流水および用水路水）を採取するとともに、農場内の豚の糞便および原尿槽の水試料を収集し、メタゲノム解析を行った。

#### 5. 残留抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言

残留抗菌薬濃度の経年変化を調べるために、昨年度と同じ山形県内の都市下水処理場からの放流水を採取した。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）計で測定した。また、国内（北海道から九州までの各地域を含む）の下水処理場12カ所での流入下水と下水処理放流水のサンプリングを行い、残留抗菌薬のLC-MS分析を行った。病院排水中の残留抗菌薬を調べるために、昨年引き続き宮城県内の病院において病院排水および地域の下水処理場の流入下水を採取し、抗菌薬の検出を行った。

#### 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。令和2年度においては、昨年度までの環境AMR文献レビューにおいて不十分と思われた、「日本の下水・排水中の薬剤耐性」「水再生センター（下水処理場）に係る薬剤耐性因子のゲノミクス」「環境と薬剤耐性」「下水処理過程での抗菌薬の除去」をテーマに文献を収集し、検討した。

### C. 研究結果

#### 1. 医療と環境の薬剤耐性に関する研究

- (1) 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性菌のゲノム解析を行い、薬剤耐性因子を明らかにした。
- (2) 病院・市中下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の

*Enterobacter cloacae* および *Klebsiella pneumoniae* は、*bla*<sub>IMP</sub> または *bla*<sub>GES</sub> を保有していた。また、*bla*<sub>IMP-1</sub> と *mcr-9* を同時に保有する *K. pneumoniae* ST-985、*bla*<sub>GES-4</sub> と *mcr-9* を同時に保有する *E. cloacae* ST-27 が検出された。

#### 2. 環境微生物ゲノム情報の取得

- (1) 全国レベルの環境水AMRモニタリングを実施するため、34自治体から計59箇所の放流水を収集し、次世代シーケンサーによる網羅的配列解読法（メタゲノム解析）を構築するとともに、日本の環境水中のAMR評価基準について検討した。
- (2) 多摩川及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) 大阪府内における環境水中のメタゲノム解析では、アミノグリコシド、β-ラクタム剤、サルファ剤、マクロライドおよび第4級アンモニウム耐性に係る薬剤耐性因子の検出割合が多く、全体の約80%以上を占めていた。
- (2) 培養法では、環境水よりカルバペネマーゼ産生株が分離され、*bla*<sub>GES-24</sub> 保有 *Enterobacter* sp.、*R. ornithinolytica* および *Klebsiella pneumoniae*、*bla*<sub>NDM-5</sub> 保有 *K. pneumoniae* が同定された。

#### 4. 動物からの薬剤耐性菌の分離と解析

- (1) 野生シカ由来薬剤耐性大腸菌は *bla*<sub>TEM-1A</sub>、*aadA2*、*strA*、*strB*、*tetA*、*tetB*、*floR*、*sul1*、*sul2*、*dfrA12* など、ヒトや動物に広く分布する薬剤耐性遺伝子を保有していた。ヒトや動物に広く分布し、薬剤耐性遺伝子の伝達に係る IncF 型レプリコン（IncFIB、IncFII）を認めた。
- (2) 豚糞便の検体を採取した農場や発育ステージが異なっても耐性遺伝子の組成は同様であった。農場周辺環境水の耐性遺伝子組成は同様であり、これが豚糞便の組成と大きく異なっていた。原尿槽の耐性遺伝子も全体

的に豚糞便に近い組成であったが、中には豚糞便より農場周辺環境水に近い組成の遺伝子 (*qac* や *sul* など) も認めた。農場Ⅲと農場Ⅶの水試料において四級アンモニウムおよびスルホンアミドに対する耐性遺伝子を多く検出した。

## 5. 抗菌薬の検査・評価にかかる方針策定と提言

(1) 山形県内の下水処理場における下水処理水中の抗菌薬の測定では、昨年度と同様にスルファメトキサゾール、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が、今年度ではリンコマイシンは検出されなかった。全国 12 カ所の下水処理場で調査を行った流入下水と下水処理水（放流水）中の抗菌薬の分析では、下水処理水からはいずれの抗菌薬もほとんど検出されなかったが、流入水からはエリスロマイシン、ノフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリムが多くの処理場で検出された。

(2) 病院排水で検出頻度が高かった抗菌薬は、エリスロマイシン、ノフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールであった。レボフロキサシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールについては昨年度も高頻度で検出され、都市下水からも同様に検出された。

## 6. 文献レビューとリスクアセスメント

2020 年度に収集された論文は、「日本の下水・排水中の薬剤耐性」に関する文献が 39 報、「水再生センター（下水処理場）に係る薬剤耐性因子のゲノミクス」に関する文献が 16 報、「下水処理過程での抗菌薬の除去」に関する文献が 5 報の計 60 報あり、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。既に登録された文献の他に、「環境と薬剤耐性」に関する新たな文献は見つからなかった。

「日本の下水・排水中の薬剤耐性」に関する文献の検討では、国内の下水・排水中には相当量の耐性菌・耐性遺伝子及び抗菌薬が残存しており、これらによる環境汚染が懸念された。また、「水再生センターの放流水に係る

薬剤耐性」に関する文献の検討では、国外での水再生センターの放流水中の薬剤耐性汚染の実態と環境汚染リスクが相次いで報告された。「下水処理過程での抗菌薬の除去」に関する文献の検討では、生物学的な下水処理によって抗菌薬を完全に除去することは現状では困難であった。一方で、「日本の下水・排水中の薬剤耐性」に関する文献の検討で、下水・排水中における薬剤耐性や残留医薬品の測定技術及び下水処理施設における薬剤耐性因子や残留医薬品の処理技術の開発が進んでいることが明らかとなった。

## D. 考察

環境中の薬剤耐性の調査法として培養法を用いて、病院・市中下水由来のカルバペネム耐性菌を対象にゲノム解析を行い、薬剤耐性の特徴を明らかにした。下水中に臨床上問題となるカルバペネマーゼ遺伝子およびコリスチン耐性遺伝子を同時に保有する腸内細菌科細菌の出現が確認され、高度薬剤耐性菌の出現を探知するために、環境水の薬剤耐性のモニタリングが有用であることが示唆された。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行い、その株固有のゲノム情報から追跡調査し、人や動物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もあるが、同一の作業手順書を使用して実施した放流水の AMR 調査により、薬剤耐性遺伝子が継続的に増加傾向であることが明らかになった。その主要因としてサルファ剤およびテトラサイクリン耐性遺伝子が有意に高く検出された。一方で、下水処理場・放流水中のマクロライド耐性遺伝子は顕著な減少を示し、ヒトに対するマクロライド系薬の使用が減少したことを反映する結果が得られたものと考えられた。また、キノロン耐性遺伝子においても同様の減少傾向が見られ、ヒトに対するキノロン系薬の使用量が減少したこととの関連が示唆されるが、キノロン耐性大腸菌の分離状況とは乖離が見られた。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ことが可能である。今後、臨床・動物由来分離株と環境由来分離株のゲノム情報や抗菌薬の消費量と薬剤耐性との関係について比較検討を行う必要がある。

大阪府内の環境水のメタゲノム解析により検出された薬剤耐性因子のうち、 $\beta$ -ラクタマーゼ関連遺伝子は GES、IMP、OXA、VEB 型等が多数を占めており、地域の状況を反映していると考えられた。一方で、耐性遺伝子のバリエーションはほとんど検出されず、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ため、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。培養法においては、ESBL 株、カルバペネマーゼ産生株の検出率は、地域の医療機関での検出状況と概ね一致していた。培養法による薬剤耐性菌の検出率は、地域の状況を把握するための指標となりうると考えられた。

動物の薬剤耐性調査では、野生シカ由来薬剤耐性菌はヒト、動物、環境由来の薬剤耐性大腸菌と比較的類似した特徴を有していることが示唆された。また、養豚場におけるメタゲノム解析結果では、農場によらず豚糞便と周辺環境水で細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なることから、豚で選択された薬剤耐性の環境放出リスクは極めて低いと考えられた。原尿槽の水試料中に豚糞便より農場周辺環境水に近い組成の遺伝子 (*qac* や *sul* など消毒剤に含まれる四級アンモニウムやスルホンアミドに対する耐性遺伝子) も認められたことから、豚の排泄物や消毒剤などが流入した原尿槽中で消毒剤の成分が選択圧となり、豚糞便とは異なる細菌叢が形成された可能性がある。環境 AMR の観点では、豚の腸管内で選択された薬剤耐性よりも養豚環境中 (汚水の流れ、原尿槽などの貯蔵施設、処理過程など) で選択された薬剤耐性の影響が大きいと考えられた。

環境水中の残留抗菌薬の調査では、下水処理場の下水処理放流水からスルファメトキサゾール、トリメトプリム、エリスロマイシンが LC-MS/MS で高頻度に検出されており、これらの抗菌薬は下水処理による除去が困難であることから、環境中への流出が懸念された。また、国内の他の下水処理場 12 カ所で同様に

下水処理放流水の残留抗菌薬の LC-MS 分析を行ったところ、いずれの抗菌薬もほとんど検出されなかった。下水処理水からの抗菌薬の検出には LC-MS では不十分な可能性があり、LC-MS/MS による測定が有用と考えられた。病院排水から検出されたエリスロマイシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールは都市下水からも同様に高頻度で検出されており、病院での抗菌薬使用と関連は不明であった。

令和 2 年度の「日本の下水・排水中の AMR」「水再生センター (下水処理場) に係る AMR 因子のゲノミクス」「環境と薬剤耐性」「下水処理過程での抗菌薬の除去」をテーマとした環境 AMR 文献レビューでは、病院排水や下水処理場の流入水・処理水、及び河川中の AMR や抗菌薬の汚染リスクに関する報告は近年増えつつあるものの未だ少数であった。また、環境中の薬剤耐性や抗菌薬の処理法の新規開発が進んでいるが、未だ決定的な介入策が存在しない実態が明らかとなった。さらに、昨年までの文献レビュー結果と同様に、下水を経て河川に放出される薬剤耐性や抗菌薬の人に対する直接的なリスクを示した報告はなかった。今後も引き続き排水および河川・下水処理場における薬剤耐性および残留抗菌薬のモニタリングを継続し、環境中の薬剤耐性もたらす人・動物へのリスク評価が必要であると考えられた。

## E. 結論

薬剤耐性 (AMR) アクションプランの目標達成に向け、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、日本における環境中の薬剤耐性および抗菌薬の実態調査を充実させることが重要である。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、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。培養法は環境水の前処理法の検討は必要であるが、検出感度には優れており、これまで分離されていない薬剤耐性菌を同定し、詳細に解析することで、地域における薬剤耐性の実態把握に

有用と考えられた。

全国的なサーベイランスにより環境中の薬剤耐性の現状を把握するためのデータが得られ、日本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を作ることができた。本研究結果と国内外の文献情報をもとに人や動物へのリスク評価を行い、薬剤耐性ワンヘルス・アプローチを推進していく必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Kanamori H, Baba H, Weber DJ. Rethinking One Health approach in the challenging era of COVID-19 pandemic and natural disasters. *Infect Ecol Epidemiol.* 2020;11:1852681.
2. 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.
3. 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.

4. Tamamura-Andoh Y, Tanaka N, Sato K, Mizuno Y, Arai N, Watanabe-Yanai A, Akiba M, Kusumoto M. A survey of the antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from wild sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2021, 83(5) doi: 10.1292/jvms.21-0005.
5. Ryo Honda, Chihiro Tachi, Mana Noguchi, Ryoko Yamamoto-Ikemoto, Toru Watanabe. Fate and seasonal change of *Escherichia coli* resistant to different antibiotic classes at each stage of conventional activated sludge process. *Journal of Water and Health*, doi: 10.2166/wh.2020.013
6. Masateru Nishiyama, Susan Praise, Keiichi Tsurumaki, Hiroaki Baba, Hajime Kanamori, Toru Watanabe. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria ESKAPE among healthy people estimated by monitoring of municipal wastewater. *Antibiotics*, accepted

##### その他発表

1. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2020. (4)環境.
2. Characterization of a *bla*<sub>KPC-2</sub>-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
3. 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
4. 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.
5. 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
  6. 河原隆二、山口貴弘、安達史恵、安楽正輝、川津健太郎：大阪府内で分離された mCIM 陽性 *Enterobacter cloacae* complex 株の解析。第49回薬剤耐性菌研究会、埼玉（2020）
  7. 渡部徹、西山正晃、森祐哉、渋谷理央、金森肇、馬場啓聡、都市下水と病院排水のモニタリングによる薬剤耐性菌のまん延調査、第23回日本水環境学会シンポジウム、令和2年9月9～10日、オンライン開催
  8. 渡部徹、病院排水中の耐性菌のモニタリングー都市下水との比較で分かることー、第69回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、令和2年10月21～23日、オンライン開催【招待講演】
  9. 森祐哉、西山正晃、渡部徹、日本とタイの都市下水から分離されたコリスチン耐性菌の薬剤感受性、令和2年度土木学会東北支部技術研究発表会、令和3年3月6日、オンライン開催
  10. 甲高綾乃、西山正晃、渡部徹、都市下水から単離したバンコマイシン耐性腸球菌の薬剤感受性と遺伝子型別、令和2年度土木学会東北支部技術研究発表会、令和3年3月6日、オンライン開催
  11. 西山正晃、馬場啓聡、金森肇、渡部徹、都市下水と病院排水中の腸内細菌科細菌が保有するESBL産生遺伝子の特徴、令和2年度土木学会東北支部技術研究発表会、令和3年3月6日、オンライン開催
  12. 森祐哉、西山正晃、渡部徹、日本とタイの都市下水からのコリスチン耐性菌の検出、第55回日本水環境学会年会、令和3年3月10～12日、オンライン開催
  13. 西山正晃、馬場啓聡、金森肇、渡部徹、都市下水と病院排水から単離したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学調査、第55回日本水環境学会年会、令和3年3月10～12日、オンライン開催
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
- なし

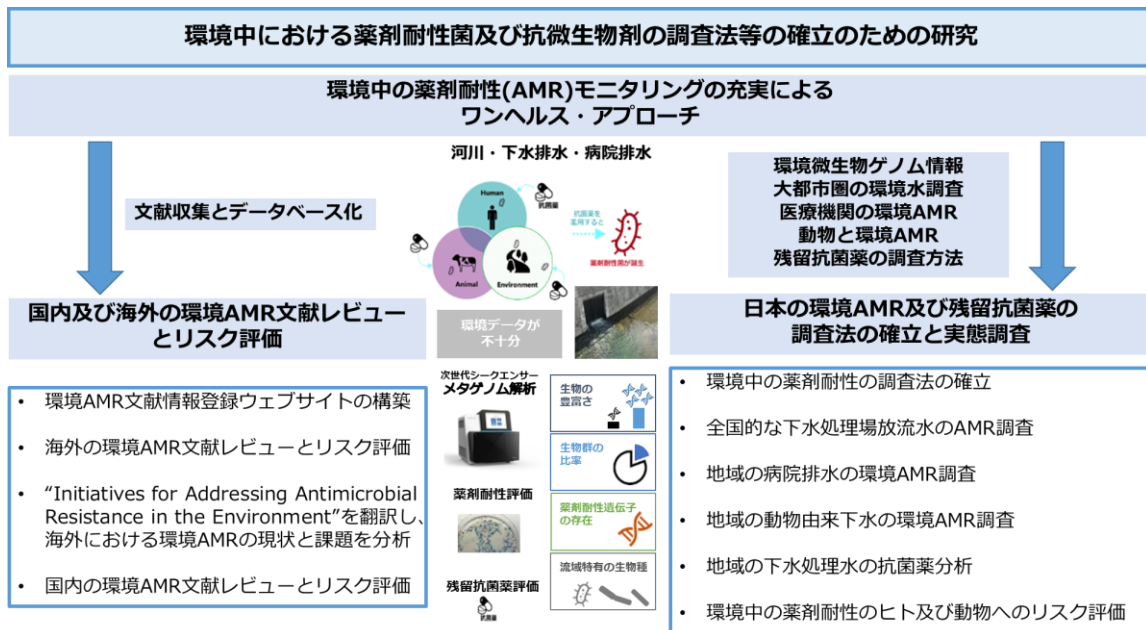


図1 環境中における薬剤耐性菌および抗微生物剤の調査法等の確立のための研究（令和2年度）

## 環境水の薬剤耐性の調査方法

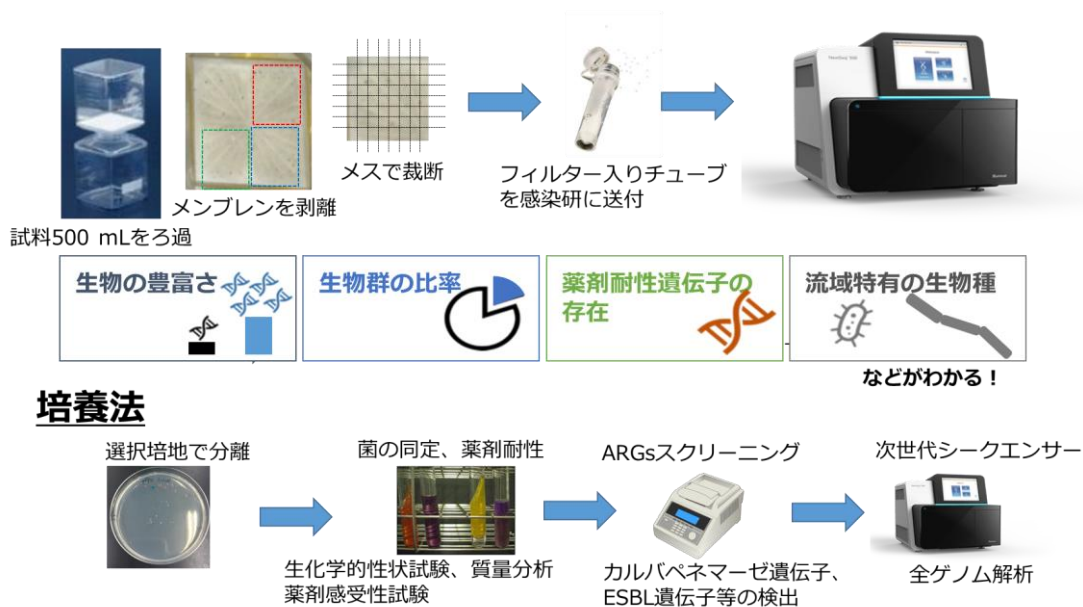


図2 メタゲノム解析法と培養法を用いた環境水の薬剤耐性の調査方法

# 環境AMR文献レビューとリスク評価

## 1. (海外) 環境中の薬剤耐性に対するイニシアチブ：現状と課題

- 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
- 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
- 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、プラクティスを標準化する

## 2. (日本) 環境AMR文献レビュー

- 薬剤耐性菌は下水処理場の流入水で多く流出水では比較的少ない
- 処理後の流出水中や、それを受ける河川水中には相当量の耐性菌・耐性遺伝子が残存しており、環境汚染が懸念される
- 本邦における臨床分離頻度が稀な耐性菌（KPC-2やNDM-5産生菌等）が下水中から検出された

図3 国内外の環境 AMR 文献レビューとリスク評価

資料 1 令和 2 年度環境 AMR 文献一覧

①「日本の下水・排水中の AMR」に関する文献

論文名	概要
<p>Azuma T, Hayashi T. Effects of natural sunlight on antimicrobial-resistant bacteria (AMRB) and antimicrobial-susceptible bacteria (AMSB) in wastewater and river water. <i>Sci Total Environ</i> 2020; 142568.</p>	<p>水中の薬剤耐性菌・非耐性菌に対する太陽光の殺菌効果を、下水処理場の流入・流出水及び河川水を用いて検証した論文。薬剤耐性菌・非耐性菌はともに下水処理場の流出水及び河川水に比べ下水処理場の流入水中に多く存在し、いずれも太陽光への暴露によって著明に減少し、5 時間後にその殺菌効果はほぼ 100%に達した。太陽光は環境水中の耐性菌低減に重要な役割を果たしている。</p>
<p>Azuma T, Otomo K, Kunitou M, 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. <i>Sci Total Environ</i> 2019; 657: 476-84.</p>	<p>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。</p>
<p>Furukawa T, Hashimoto R, Mekata T. Quantification of vancomycin-resistant enterococci and corresponding resistance genes in a sewage treatment plant. <i>J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng</i> 2015; 50: 989-95.</p>	<p>下水処理システム中のバンコマイシン耐性腸球菌と、その耐性遺伝子である vanA/vanB の分布について調査した論文。下水処理システムにより処理水中の腸球菌濃度の著明な低下を認めた。検出された腸球菌の中で、実際にバンコマイシンに耐性を示した株はごくわずかであったが、vanA/vanB は下水処理後の水中からも相当量が検出され、これらの河川や海岸など環境への流出が懸念された。</p>

<p>Hayashi W, Tanaka H, Taniguchi Y, et al. Acquisition of <i>mcr-1</i> and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. <i>Appl Environ Microbiol</i> 2019; 85.</p>	<p>下水処理施設で検出された大腸菌における、プラスミド媒介性コリスチン耐性遺伝子、<i>mcr</i> の分布を調査した論文。それぞれ遺伝的系統の異なる、合計 7 株の <i>mcr-1</i> 陽性コリスチン耐性大腸菌菌株が 3 か所の下水処理場の流入水から検出された。5 株は <i>IncX4</i> プラスミド、2 株は <i>Incl2</i> プラスミド上に <i>mcr-1</i> を保有し、このうち 4 株の <i>IncX4</i> プラスミドと 2 株の <i>Incl2</i> はそれぞれ遺伝的相同性が非常に高かった。また、<i>IncX4</i> プラスミド保有株と <i>Incl2</i> プラスミド保有株それぞれ 2 株は鶏病原性大腸菌の病原遺伝子を保有した <i>CoIV</i> プラスミドも同時に保有し、その他一株も同様の病原遺伝子を染色体に保有していた。家禽は <i>mcr-1</i> の重要なリザーバーであり、下水はその増幅に関与している可能性がある。</p>
<p>Liu M, Hata A, Katayama H, Kasuga I. Consecutive ultrafiltration and silica adsorption for recovery of extracellular antibiotic resistance genes from an urban river. <i>Environ Pollut</i> 2020; 260: 114062.</p>	<p>連続限外ろ過法による、細胞内 DNA (inDNA)、水中に溶解した細胞外 DNA (Dis_exDNA) 及び浮遊粒子表面に吸着した細胞外 DNA (Ads_exDNA) の分離法を用いて、下水処理場の処理水からの薬剤耐性遺伝子の検出を試みた論文。中空繊維を用いたろ過によって全ての DNA 断片を濃縮した後、遠心分離により Dis_exDNA とその他を分け、更に inDNA と Ads_exDNA を遠心限外ろ過とシリカ吸着を組み合わせて分離した。inDNA、Dis_exDNA および Ads_exDNA の全てが、下水処理場の上流から下流に向かって濃度が増加した。全 DNA のうち Ads_exDNA と Dis_exDNA がそれぞれ 1.8-26.7% 及び 0.03-20.9% を占めた。Ads_exDNA と Dis_exDNA は薬剤耐性遺伝子の水平伝播に重要である可能性が示された。</p>

<p>Nishiyama M, Iguchi A, Suzuki Y. Identification of <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> as vanC-type Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. <i>J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng</i> 2015; 50: 16-25.</p>	<p>バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) による水環境の汚染を評価するため、宮崎県の下水及び河川水のスクリーニング調査を行った。下水及び河川水から検出された腸球菌のうち VRE の割合はそれぞれ 12%及び 24%であった。VRE のうち 92%がバンコマイシン耐性遺伝子である vanC1 保有の <i>Enterococcus caerliffavus/gallinarum</i> であったが、ヒトから主に検出される <i>E. faecium</i> 及び <i>E. faecalis</i> の vanC2/3 保有株がそれぞれ 4%ずつ検出された。</p>
<p>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. <i>Environ Microbiol Rep</i> 2019; 11(4): 589-97.</p>	<p>東京湾の下水処理場流出水中から検出された、blaKPC-2 遺伝子陽性 <i>Aeromonas hydrophila</i> 株 (GSH8-2) 及び <i>A. caviae</i> 株 (GSH8M-1) それぞれの全ゲノム配列を決定した。GSH8-2 と GSH8M-1 は、過去に米国の病院排水から検出された <i>Aeromonas</i> 属菌や中国の下水から検出された <i>A. hydrophila</i>、そして臨床分離された <i>Klebsiella</i>、<i>Enterobacter</i> 属菌や <i>Escherichia coli</i>、下水から分離された <i>Citrobacter</i> や <i>Pseudomonas</i> 属菌が保有していたプラスミドと共通の骨格を持つ、blaKPC-2 遺伝子保有 IncP-6 群プラスミドを保有していた。<i>Aeromonas</i> 属菌は日和見病原体であるが、環境中の薬剤耐性電子のリザーバーとなり得る。下水流出水中の薬剤耐性モニタリングは、環境中、そして臨床現場やコミュニティにおける薬剤耐性伝播拡散の早期探知に有用である。</p>
<p>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</p>	<p>東京湾の下水処理場流出水中から検出された、NDM-5 産生 <i>Escherichia coli</i> 菌株 GSH8M-2 について、プラスミドを含めた全ゲノム配列の決定と解析を行った。GSH8M-2 は ST542 に属</p>

<p>treatment plant in Tokyo Bay. Infect Drug Resist 2019; 12: 2243-9.</p>	<p>し、blaNDM-5 遺伝子の他、キノロンやテトラサイクリン、ST 合剤等複数種類の抗菌薬に対する耐性遺伝子を保有していた。blaNDM-5 遺伝子は IncX3 プラスミド、qGSH8M-2-4 を持ち、142 の IncX3 プラスミドの解析の結果、qGSH8M-2-4 は東アジアで臨床分離された E. coli 及び <i>Klebsiella</i> 属菌と関連していた。GSH8M-2 は blaCTX-M-55 遺伝子を有する IncX1 プラスミド、pGSH8M-2-3 を保有していた。下水処理場流出水の NDM 産生菌による汚染は環境汚染へとつながる恐れがあり、公衆衛生上の脅威である。下水処理場流出水中の薬剤耐性菌モニタリングが重要である。</p>
<p>Sekizuka T, Yatsu K, Inamine Y, et al. Complete Genome Sequence of a bla (KPC-2)-Positive <i>Klebsiella pneumoniae</i> Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japan. mSphere 2018; 3.</p>	<p>東京湾の下水処理場流出水中から検出された、KPC-2 陽性 <i>Klebsiella pneumoniae</i>、GSU10-3 株について全ゲノム配列の決定と解析を行った。日本では 2012 年にブラジルの病院で治療歴のある患者から分離されて以来、KPC-2 陽性 <i>K. pneumoniae</i> 株は報告されていない。GSU10-3 株は ST11 型で、コアゲノム分子系統解析では 2011-2017 年に中国で臨床分離された KPC-2 陽性 <i>K. pneumoniae</i> と遺伝的関連性が強かった。GSU10-3 株の保有する 4 つのプラスミドのうち、blaKPC-2 を保有するプラスミド pGSU10-3-3 は他の blaKPC-2 を保有するプラスミドよりサイズが小さく、2 つのレプリコンを持ち、より複製及び宿主への適合に有利な条件を持っていた。その他のプラスミドはアミノグリコシド耐性遺伝子など多くの薬剤耐性遺伝子を保有し、他の腸内細菌科細菌に広く広がるものと高い相同性を示すものであった。下水流出水中の薬剤耐性モニタリングは、環境</p>

	中、そして臨床現場やコミュニティにおける薬剤耐性伝播拡散の早期探知に有用である。
11. Suzuki Y, Ida M, Kubota H, et al. Multiple $\beta$ -Lactam Resistance Gene-Carrying Plasmid Harbored by <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Isolated from Urban Sewage in Japan. <i>mSphere</i> 2019; 4.	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。
Tanaka H, Hayashi W, Iimura M, et al. Wastewater as a Probable Environmental Reservoir of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Genes: Detection of Chimeric $\beta$ -Lactamases CTX-M-64 and CTX-M-123. <i>Appl Environ Microbiol</i> 2019; 85.	下水処理場の流入水中の blaCTX-M 遺伝子保有 <i>Escherichia coli</i> について調査・解析した論文。31 の ST 型に属する 73 株の E. coli が検出され、このうち blaCTX-M-14 保有株が 14 株と最も多く、次いで blaCTX-M-15 保有株が 12 株、blaCTX-M-27 保有株が 10 株であった。7 株中 5 株の B2-ST131 株が blaCTX-M-27 を保有していた。本邦ではこれまで臨床分離されたことのない、blaCTX-M-64 と blaCTX-M-123 のキメラ遺伝子を保有する株も 1 株検出された。下水は薬剤耐性遺伝子を保有する、臨床的に重要な菌株のリザーバーである。
Yamashita N, Katakawa Y, Tanaka H. Occurrence of antimicrobial resistance bacteria in the Yodo River basin, Japan and determination of beta-lactamases producing bacteria. <i>Ecotoxicol Environ Saf</i> 2017; 143: 38-45.	淀川流域において、下水処理場からの排水及び排水の合流前後の河川水、更に病院からの排水をサンプリングし、各水中の大腸菌の薬剤耐性を調査した論文。下水処理場及び病院からの排水中の大腸菌は他に比べ優位に薬剤耐性傾向が強く、特に病院排水中の大腸菌はほとんどが多剤耐性で、メタロ $\beta$ ラクタマーゼ産生株も検出された。下水処理場及び病院の排水が、河川の薬剤耐性菌による汚染に密接に関わっていることが示された。
Yasojima M, Nakada N, Komori K, Suzuki Y, Tanaka H. Occurrence of levofloxacin,	下水処理場において、活性汚泥法の各過程におけるレボフロキサシン、クラリスロマイシン、



<p>clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research 2006; 53: 227-33.</p>	<p>アジスロマイシンの各抗菌薬濃度を、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法によって測定した論文。この方法により、1.2~29 ng/L以上の範囲で各抗菌薬を定量でき、その平均検出率は 35~93%であった。下水処理場への流入水中にレボフロキサシン、クラリスロマイシン、アジスマイシンはそれぞれ 552ng/L、647ng/L、260ng/L 検出され、それぞれは 42%、43%、49%除去された。活性汚泥中のクラリスロマイシン・アジスロマイシン濃度は処理過程が進むとともに減少したが、レボフロキサシン濃度は上昇した。それぞれの抗菌薬の除去率に差はみられなかった。抗菌薬が除去される過程は、活性汚泥による吸収以外の機序が関わっていることが示唆された。</p>
<p>Ghosh GC, Okuda T, Yamashita N, Tanaka H. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in Japan and their effects on bacterial ammonia oxidation. Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research 2009; 59(4): 779-86.</p>	<p>日本の大規模下水処理場におけるマクロライド系、キノロン系等、17種類の抗菌薬の検出と除去について調査した論文。流入水中の濃度はクラリスロマイシンが最も高く、次いでアジスロマイシン、レボフロキサシン、ノルフロキサシンが高かった。除去率はナリジクス酸が最も高く、ついでノルフロキサシン、レボフロキサシン、シプロフロキサシン、エンロフロキサシンが高かった。マクロライド系薬の中では、クラリスロマイシン及びアジスロマイシンが、ロキシスロマイシンに比べ比較的高い除去率を示した。ほとんどの抗菌薬について、CAS過程より A2O や AO をベースとした処理法の方が除去率が高かった。細菌のアンモニア酸化に対する抗菌薬の影響は、それぞれ 0.05mg/L 以下の濃度では検出されなかった。それぞれの抗菌薬は、別個に存在する場合より混合して存在す</p>

	<p>る方がより高い細菌の抑制効果を示した。</p>
<p>Gomi R, Matsuda T, Matsumura Y, et al. Occurrence of Clinically Important Lineages, Including the Sequence Type 131 C1-M27 Subclone, among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing <i>Escherichia coli</i> in Wastewater. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 2017; 61(9).</p>	<p>日本（関西地区）の下水処理場と病院排水由来の ESBL 産生(CTX-M 型)大腸菌の全ゲノム解析を行った論文。下水処理場および病院排水中に臨床的に重要なクローン(Sequence Type 131 C1-M27)の存在が明らかになった。ESBL 産生大腸菌が排水を介して環境中に拡散する可能性があるため、排水中の AMR を監視する必要がある。</p>
<p>Gomi R, Matsuda T, Yamamoto M, et al. Characteristics of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Wastewater Revealed by Genomic Analysis. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 2018; 62.</p>	<p>日本(関西地区)および台湾の排水処理場および病院排水から排水サンプルを収集し、排水中のカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)の全ゲノム解析を行った論文。日本の病院排水では CPE は検出されなかったが、その他の排水からカルバペネマーゼ遺伝子の GES 型が多く検出された。日本と台湾の排水分離株ではインテグロン構造が異なっていたが、排水分離株由来のインテグロンは同じ地域の臨床分離株からも検出されていた。処理された排水中に種々の CPE が存在しており、排水中の AMR をモニターすることの重要性を示唆している。</p>
<p>Iwane T, Urase T, Yamamoto K. Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. <i>Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research</i> 2001; 43: 91-9.</p>	<p>多摩川及び多摩川流域の下水処理場における、抗菌薬耐性を持つ大腸菌群細菌について調査した論文。下水処理場からの流出水中の耐性菌は河川水中より多く、下流に向かうにしたがって増加した。下水処理過程において薬剤耐性菌濃度は減少するが、処理しきれなかった薬剤耐性菌によって河川水が汚染されている可能性が示された。</p>
<p>Kim I, Yamashita N, Tanaka H. Performance of UV and UV/H2O2 processes for the removal of pharmaceuticals detected</p>	<p>下水中の薬物除去に対する、紫外線を用いた処理法の有効性について、ベンチスケール実験を用いて評価した論文。紫外線単独による処理法</p>

<p>in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. J Hazard Mater 2009; 166: 1134-40.</p>	<p>によってケトプロフェン等の薬剤は効率よく除去された一方、マクロライド系抗菌薬はほとんど除去されなかった。紫外線とオゾン/過酸化水素を用いた方法では多くの薬物が効率よく除去された。紫外線による下水中の薬物除去を効率的に行うためには、オゾン/過酸化水素と組み合わせが有効である。</p>
<p>Matsuo H, Sakamoto H, Arizono K, Shinohara R. Behavior of pharmaceuticals in waste water treatment plant in Japan. Bull Environ Contam Toxicol 2011; 87: 31-5.</p>	<p>下水中の薬物成分が活性汚泥によりどのように処理されるかを評価した論文。アモキシシリンやアンピシリン、アセトアミノフェン等の薬物は 90%以上が除去された一方、オセルタミビルやケトプロフェン等の薬物の除去率は 50%以下に留まった。消化過程では、トリメトプリムやインドメタシン等の薬物は 70%以上除去された一方、カルバマゼピン等の薬物は 50%以下しか除去されなかった。</p>
<p>Miura T, Kusada H, Kamagata Y, Hanada S, Kimura N. Genome Sequence of the Multiple-β-Lactam-Antibiotic-Resistant Bacterium Acidovorax sp. Strain MR-S7. Genome announcements 2013; 1.</p>	<p>βラクタム系薬によって汚染された、下水処理場の活性汚泥中から検出された <i>Acidovorax</i> 属菌 MR-S7 株について全ゲノム配列解析を行った。MR-S7 株はアンピシリン・アモキシシリン及びセファドロキシルに対し高い MIC を示し、多数の βラクタム系薬に対する耐性遺伝性を保有していた。</p>
<p>Miyata M, Ihara I, Yoshid G, Toyod K, Umetsu K. Electrochemical oxidation of tetracycline antibiotics using a Ti/IrO<sub>2</sub> anode for wastewater treatment of animal husbandry. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research 2011; 63: 456-61.</p>	<p>畜産排水中のテトラサイクリンの電気化学的酸化を試みた論文。酸化イリジウム被覆チタン電極と硫酸ナトリウムを用いた電気化学的酸化によって、畜産排水中に 100mg/L 存在したテトラサイクリンは、6 時間で 0.7mg/L 以下の濃度まで低下した。電気化学的酸化は畜産排水中のテトラサイクリン除去に有用である。</p>
<p>Mori T, Mizuta S, Suenaga H, Miyazaki K. Metagenomic screening for bleomycin</p>	<p>活性化汚泥中のブレオマイシン耐性遺伝子をメタゲノム解析によって調査した論文。互いに</p>

<p>resistance genes. <i>Appl Environ Microbiol</i> 2008; 74: 6803-5.</p>	<p>異なる二種類のブレオマイシンが検出されたが、これらはブレオマイシンを産生するアクチノマイセス属菌の持つ遺伝子や、臨床分離株から検出される遺伝子とは異なるものであった。環境は新規薬剤耐性遺伝子のリザーバーであり、これを検出するためにメタゲノム解析が有用である。</p>
<p>Motoyama M, Nakagawa S, Tanoue R, Sato Y, Nomiyama K, Shinohara R. Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. <i>Chemosphere</i> 2011; 84: 432-8.</p>	<p>ヒト尿尿汚泥、下水汚泥、牛糞堆肥、家禽堆肥、豚糞堆肥及び馬糞堆肥それぞれに由来する再利用有機堆肥中の、医薬品の残余濃度を調査した論文。フルオロキノロンはヒト尿尿汚泥及び下水汚泥に、サルファ剤は家禽堆肥及び豚糞堆肥中に、テトラサイクリンは豚糞堆肥中にそれぞれ高濃度で存在していた。医薬品の残余濃度と堆肥の熟成度は正の相関を示した。回転式発酵槽では、テトラサイクリンやフルオロキノロン、エリスロマイシン、トリメトプリムなどの残余濃度は著明な低下を示した。発酵の過程において分解される医薬品が、環境に与える影響は小さい。</p>
<p>Murata A, Takada H, Mutoh K, Hosoda H, Harada A, Nakada N. Nationwide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers. <i>Sci Total Environ</i> 2011; 409: 5305-12.</p>	<p>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。</p>
<p>Nakada N, Shinohara H, Murata A, et al.</p>	<p>下水処理場の砂ろ過及びオゾン処理の、スルフ</p>

<p>Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. <i>Water research</i> 2007; 41: 4373-82.</p>	<p>アメトキサゾール、トリメトプリム、マクロライド系抗菌薬等の抗菌薬をはじめとした、24の医薬品に対する除去効果について評価した論文。砂ろ過は医薬品除去に不十分であったが、オゾン処理は抗菌薬をはじめとした多くの医薬品を80%以上除去した。下水中の医薬品除去には、砂ろ過にオゾン処理を組み合わせる方法が効果的である。</p>
<p>Nakada N, Yasojima M, Okayasu Y, Komori K, Suzuki Y. Mass balance analysis of triclosan, diethyltoluamide, crotamiton and carbamazepine in sewage treatment plants. <i>Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research</i> 2010; 61: 1739-47.</p>	<p>下水処理場における抗菌物質トリクロサン、昆虫忌避薬 DEET、抗てんかん薬カルバマゼピン、鎮痛薬クロタミトンの動態をガスクロマトグラフ質量分析器によって調査した論文。トリクロサンは主に活性汚泥によって効率的に除去された一方、DEET の除去率は限定的であり、カルバマゼピン・クロタミトンはほとんど除去されなかった。下水処理場の一般的な処理過程において、DEET やカルバマゼピン・クロタミトン等水溶性薬剤の除去は困難である。</p>
<p>Narumiya M, Nakada N, Yamashita N, Tanaka H. Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion. <i>J Hazard Mater</i> 2013; 260: 305-12.</p>	<p>下水処理場における嫌気性処理による下水汚泥中の医薬品やパーソナルケア製品の除去について評価した論文。スルファメトキサゾールとトリメトプリムはほぼ全てが、トリクロサン・トリクロカーバン及びオフロキサシンは30～50%が分解されたが、カルバマゼピンは除去されなかった。</p>
<p>Ogura Y, Ueda T, Nukazawa K, et al. The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different <i>Escherichia coli</i> lineages. <i>Sci Rep</i> 2020; 10: 17880.</p>	<p>河川水及び下水中の大腸菌の薬剤耐性について、表現型及び全ゲノム解析による遺伝子型両面から解析した論文。河川水・下水中の大腸菌は分子系統解析上区別ができず、薬剤耐性株も系統樹上に偏りなく分布していた。薬剤耐性株の割合及び薬剤耐性の種類、薬剤耐性遺伝子の保有頻度はいずれも河川水由来株と比較し下</p>

	水由来株が多かった。大腸菌の薬剤耐性は、その遺伝学的系統によらず、下水中において選択されやすいことが示された。
Okubo T, Hasegawa T, Fukuda A, et al. Screening of hospital-manhole sewage using MacConkey agar with cefotaxime reveals extended-spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing <i>Escherichia coli</i> . <i>Int J Antimicrob Agents</i> 2019; 54: 831-3.	病院排水による院内の多剤耐性菌モニタリングの有用性を、大学病院の排水と、病院以外の大学の排水中の多剤耐性菌濃度を比較することで検証した。セフトラックス添加マッコキー培地を用いたスクリーニングによって ESBL 産生大腸菌が検出され、同菌の病院内環境への定着が示唆された。病院排水は病院内の薬剤耐性菌モニタリングに有用である可能性がある。
Okuda T, Kobayashi Y, Nagao R, et al. Removal efficiency of 66 pharmaceuticals during wastewater treatment process in Japan. <i>Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research</i> 2008; 57: 65-71.	古典的な活性化汚泥法や生物学的栄養塩除去法、及びオゾン処理を含む物理化学的処理法、更にこれらの化学的方法に凝集・沈殿・濾過に続く UV や塩素による消毒を加えた Title 22 の各方法による医薬品成分の除去効率について評価した論文。全過程において、対象とした抗菌薬を含む 66 の医薬品成分のうちほとんどは 80%以上除去されたが、カルバマゼピン及びクロタミトンは 30%以下に留まった。活性化汚泥法後の処理水中の医薬品濃度は生物学的栄養塩除去法後の濃度の 1.5 倍高かった。活性化汚泥法後の処理水にオゾン処理を加えた場合、医薬品濃度は流入水の 20%以下まで低下した。活性化汚泥法後に Title 22 処理を行った場合、医薬品成分の除去は不十分であったが、活性化汚泥法後にオゾン処理を加えた場合、医薬品成分は規定値以下まで除去された。
Sugimoto Y, Suzuki S, Nonaka L, et al. The novel <i>mef(C)</i> - <i>mph(G)</i> macrolide resistance genes are conveyed in the environment on various vectors. <i>J Glob Antimicrob Resist</i>	日本、台湾及びタイの水産養殖場における新規 <i>mef(C)</i> - <i>mph(G)</i> タンデム遺伝子の広がりを調査した論文。 <i>mef(C)</i> - <i>mph(G)</i> は、計 29 種の菌株の、大小様々なベクター上に保有されていた

<p>2017; 10: 47-53.</p>	<p>が、このうち 13 株は <i>tral(pAQU-IncA/C-SRI)</i> を保有しており、保有していない株と比較し高い転移性を示した。<i>mef(C)-mph(G)</i> タンデム遺伝子はアジア諸国の海洋細菌や下水中の細菌に広く分布しており、この遺伝子の伝播拡散にはベクターとして <i>tral(pAQU-IncA/C-SRI)</i> が関与している。</p>
<p>Suzuki Y, Hashimoto R, Xie H, et al. Growth and antibiotic resistance acquisition of <i>Escherichia coli</i> in a river that receives treated sewage effluent. <i>Sci Total Environ</i> 2019; 690: 696-704.</p>	<p>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、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>Tagiri-Endo M, Suzuki S, Nakamura T, Hatakeyama T, Kawamukai K. Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. <i>Anal Bioanal Chem</i> 2009; 393: 1367-75.</p>	<p>オンライン固層抽出法と液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法の組み合わせによって、養豚排水中の抗菌薬（フロルフェニコール、リンコマイシン、オキシテトラサイクリン、チロシン及びバルネムリン）を試み、成功させた論文。</p>
<p>諏訪 守. 生活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. <i>バムサジャーナル</i> 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及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</p>

	<p>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>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. 感染症学雑誌 2005;79:270-275.</p>	<p>2003 年に福井県内の下痢症患者及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 <i>bla</i><sub>CMY</sub> 陽性多剤耐性 <i>S. Newport</i> 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及び PFGE パターンが患者由来株と一致した。多剤耐性 <i>S. Newport</i> 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>中村 宗一郎, 野村 男次. 地下水の薬剤耐性糞便性大腸菌群および R プラスミド汚染. 日本食品工業学会誌 1990; 37:83-90.</p>	<p>井戸水として採取した地下水中の薬剤耐性糞便性大腸菌群と R プラスミドの汚染状況を調査した論文。22 の地下水サンプルのうち 13 サンプルから 1,066 の糞便性大腸菌群が検出され、そのうち 39.8%がテトラサイクリン・アミノグリコシド・クロラムフェニコール・アンピシリン・ナリジクス酸・リファンピシン・スルフイソキサゾールのいずれかに耐性を示した。また、全耐性株の 9.7%が R プラスミド保有株</p>



	<p>であり、Rプラスミド保有株はテトラサイクリン・クロラムフェニコール・ストレプトマイシン及びスルフィソキサゾール耐性パターンを示すことが多かった。</p>
<p>医療機関を対象にした新規水処理技術の開発. YAKUGAKU ZASSHI 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>メタゲノムから読み解くヒト・ほ乳類と自然界の薬剤耐性遺伝子の多様性. ファルマシア 2017; 53:66.</p>	<p>ヒト・動物・植物・環境試料中のメタゲノムデータの解析から、ヒトの消化管には30~80の耐性遺伝子が検出され高い多様性がみられ、病院廃水処理施設では同様の多様性を認める一方、病院以外の廃水処理施設で検出される耐性遺伝子は6~17種と少ないことが報告されている。各試料中ではβラクタマーゼ耐性遺伝子、特に <i>bla</i><sub>TEM</sub> 遺伝子が最も高頻度に検出され、自然界に存在しないトリメトプリムの耐性遺伝子はヒトや哺乳類の消化管、及び農場土壌資料から検出された。Martinezらの提唱するヒト・</p>

	<p>動物・水・下水・土壌の間の耐性遺伝子の伝搬に対する3つのボトルネック、①試料間の物理的接触可能性 (ecological connectivity)、②ある耐性遺伝子が既に優占している場合に類似の耐性遺伝子が定着しにくくなる新規参入障害 (founder effect)、③新しい遺伝子の保有に伴い微生物にかかる適応コスト (fitness cost) を考慮した場合、<i>bla<sub>TEM</sub></i> 遺伝子には①のヒト・水・土壌試料の間を耐性遺伝子が行き来できるような物理的なつながりが存在し、③による障害も小さかったと考えられる。</p>
<p>医薬品による環境汚染. 医学のあゆみ 2003; 205:159-60.</p>	<p>医薬品が水環境中に放出されることにより、そこに生息する生物への影響や、地下水や上水が汚染されることによる人間への影響が懸念される。内服・外用された医薬品は下水処理場での処理を経て放出されるが、下水処理による完全な除去は困難であり、除去されなかった医薬品が河川・海岸などの水環境中に放出されている。また、家畜に投与される医薬品は、時に肥料として、処理施設を経由せず直接河川に流入することもあり得る。医薬品の水生生物に対する毒性データは不足しており、複合汚染による毒性の増大や、薬剤耐性菌の発生なども懸念されている。医薬品による環境汚染の実態把握が急務である。</p>

②「水再生センター（下水処理場）に係る AMR 因子のゲノミクス」に関する文献

論文名	概要
<p>Marcelino VR, Wille M, Hurt AC, González-Acuña D, Klaassen M, Schlub TE, Eden JS, Shi M, Iredell JR, Sorrell TC, Holmes EC. Meta-transcriptomics reveals a diverse</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 は薬剤耐性遺伝子が保有していることが多く、南極のペンギンたちは少ない。</p>

antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes. BMC Biol. 2019;17:31.	
Antão EM, Vincze S, Hanke R, Klimmek L, Suchecka K, Lübke-Becker A, Wieler LH. Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead. Gut Pathog. 2018;10:52.	AMR に関する 3As, Awareness ・ Availability ・ Alternatives のレビュー。
Joseph SM, Battaglia T, Maritz JM, Carlton JM, Blaser MJ. Longitudinal Comparison of Bacterial Diversity and Antibiotic Resistance Genes in New York City Sewage. mSystems. 2019;4:e00327-19.	2015 年の 2・5・8 月の 3 回、New York City 地域 14 箇所の下水処理場の流入水を 16S-metagenome および薬剤耐性遺伝子の qPCR で評価した論文。
Qu J, Huang Y, Lv X. Crisis of Antimicrobial Resistance in China: Now and the Future. Front Microbiol. 2019;10:2240.	中国の AMR 問題の包括的なレビュー。中国での報告内容、環境 AMR のことも盛り込まれている。
Whitmer GR, Moorthy G, Arshad M. The pandemic Escherichia coli sequence type 131 strain is acquired even in the absence of antibiotic exposure. PLoS Pathog. 2019;15:e1008162.	市中に蔓延する E. coli ST131 clone の特徴（伝播、病原性、遺伝型、プラスミド）についてまとめた論文。健常者キャリアーの増加傾向が止まらず、数多くの薬剤耐性因子を伝達する基盤となってしまっている。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。
Paulus GK, Hornstra LM, Alygizakis N, Slobodnik J, Thomaidis N, Medema G. The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream communal wastewater system in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. Int J Hyg Environ Health. 2019;222:635-644.	PharmaFilter ・ Membrane Bioreactor (Microfiltration) (MBR) ・ Ozonation (Ozon.) ・ Granulated Activated Carbon (GAC) ・ UV Treatment (UV)を組み合わせた下水の処理能力を評価した論文。抗菌薬および薬剤耐性遺伝子も評価している。
Liu X, Zhang G, Liu Y, Lu S, Qin P, Guo X, Bi B, Wang L, Xi B, Wu F, Wang W, Zhang T. Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban	北京近郊の病院と河川の抗菌薬と薬剤耐性遺伝子を評価した論文。病院排水中が特に多い。多くの薬剤耐性遺伝子は浄化されているが、sul1 ・ sul2 ・ tetC の相対量は増加している。下

<p>water of Beijing, China. <i>Environ Pollut.</i> 2019;246:163-173.</p>	<p>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>Kelly KR, Brooks BW. Global Aquatic Hazard Assessment of Ciprofloxacin: Exceedances of Antibiotic Resistance Development and Ecotoxicological Thresholds. <i>Prog Mol Biol Transl Sci.</i> 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た論文。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>Lamba M, Gupta S, Shukla R, Graham DW, Sreekrishnan TR, Ahammad SZ. Carbapenem resistance exposures via wastewaters across New Delhi. <i>Environ Int.</i> 2018;119:302-308.</p>	<p>インド・ニューデリーの CRE 調査。ニューデリーでは NDM-1 汚染が激しく、その主体は <i>Pseudomonas</i> 属菌である。</p>
<p>Buelow E, Bayjanov JR, Majoor E, Willems RJ, Bonten MJ, Schmitt H, van Schaik W. Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. <i>FEMS Microbiol Ecol.</i> 2018;94.</p>	<p>オランダにおける病院排水中の AMR 調査。病院排水中の細菌叢は WWTP 流入水のそれと大きな違いなく、薬剤耐性遺伝子は病院排水に多い。</p>
<p>Arora VK, Chandra K, Chandra M. Occupational tuberculosis in sewage workers: A neglected domain. <i>Indian J Tuberc.</i> 2019;66:3-5.</p>	<p>インドの下水処理場職員は結核感染症 (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 として露見した可能性。</p>
<p>Fresia P, Antelo V, Salazar C, Giménez M, D'Alessandro B, Afshinnekoo E, Mason C, Gonnet GH, Iraola G. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters.</p>	<p>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。サルファ剤および beta-lactam 耐性が顕著な違いを見せている。</p>

Microbiome. 2019;7:35.	
Dinh Q, Moreau-Guigon E, Labadie P, Alliot F, Teil MJ, Blanchard M, Eurin J, Chevreuil M. Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. Sci Total Environ. 2017;575:758-766.	病院排水中の抗菌薬濃度は郊外の下水中の抗菌薬濃度の 10 倍高く、排水処理場へ流入する抗菌薬の 90%を占めている。
Hutinel M, Huijbers PMC, Fick J, Åhrén C, Larsson DGJ, Flach CF. Population-level surveillance of antibiotic resistance in Escherichia coli through sewage analysis. Euro Surveill. 2019;24:1800497.	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。
東京都水道局。流域下水道における主要施策。 <a href="https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr/readupload/235/%E6%B5%81%E5%9F%9F%E4%B8%8B%E6%B0%B4%E9%81%93%E3%81%AB%E3%81%8A%E3%81%91%E3%82%8B%E4%B8%BB%E8%A6%81%E6%96%BD%E7%AD%962_%E6%9D%B1%E4%BA%AC%E9%83%BD%E4%B8%8B%E6%B0%B4%E9%81%93%E5%B1%80.pdf">https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr/readupload/235/%E6%B5%81%E5%9F%9F%E4%B8%8B%E6%B0%B4%E9%81%93%E3%81%AB%E3%81%8A%E3%81%91%E3%82%8B%E4%B8%BB%E8%A6%81%E6%96%BD%E7%AD%962_%E6%9D%B1%E4%BA%AC%E9%83%BD%E4%B8%8B%E6%B0%B4%E9%81%93%E5%B1%80.pdf</a>	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る。平成 28 年には、約 463 万尾のアユが多摩川を遡上している。
多摩川流域の水流の現状把握。 <a href="https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr/readupload/234/%E5%A4%9A%E6%91%A9%E5%B7%9D%E3%81%AE%E6%B0%B4%E8%B3%AA%E8%AA%BF%E6%9F%BB.pdf">https://gph.niid.go.jp/paper/env-amr/readupload/234/%E5%A4%9A%E6%91%A9%E5%B7%9D%E3%81%AE%E6%B0%B4%E8%B3%AA%E8%AA%BF%E6%9F%BB.pdf</a>	多摩川の水質調査。

③「下水処理過程での抗菌薬の除去」に関する論文

論文名	概要
Plósz BG, Leknes H, Liltved H, Thomas KV. Diurnal variations in the occurrence and the fate of hormones and antibiotics in activated	ノルウェーのオスロの下水処理場で、流入水のトリメトプリム、スルファメトキサゾール、テトラサイクリン、シプロフロキサシンの濃度の

<p>sludge wastewater treatment in Oslo, Norway. <i>Sci Total Environ.</i> 2010;408:1915-24.</p>	<p>ダイナミクスを調べたところ、服用のタイミングとの関連が見られた。処理の過程では、抗菌薬の生物学的な除去は限定的であり、処理水中のトリメトプリム、スルファメトキサゾール、シプロフロキサシンの濃度は、流入水よりも高かった。シプロフロキサシンは、その低い除去率のために、処理水中で卓越しており、他の抗菌薬のおおよそ 10 倍量で存在していた。</p>
<p>Li B, Zhang T. Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants. <i>Chemosphere.</i> 2011;83:1284-9.</p>	<p>香港の 2 つの下水処理場で、7 クラス 20 種類の抗菌薬を調査した。アンピシリン、セファレキシム、スルファメトキサゾール、スルファジアジン、スルファメトキサゾール、クロルテトラサイクリン、バンコマイシンは活性汚泥プロセスで 52~100%が、アンピシリンとセファレキシムは消毒で 91~99%が除去されていた。</p>
<p>Gulkowska A, Leung HW, So MK, Taniyasu S, Yamashita N, Yeung LW, Richardson BJ, Lei AP, Giesy JP, Lam PK. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. <i>Water Res.</i> 2008;42:395-403.</p>	<p>香港と深センの 4 カ所の下水処理場において、流入水と放流水中の抗菌薬 9 種類を測定した。香港の処理場ではセファレキシムの濃度が最も高かったが、深センの処理場では検出されなかった。深センの処理場の流入水では、セフトキシムが卓越していたが、香港の処理場のその濃度は低かった。これは両都市における抗菌薬の使用パターンが反映されているのであろう。処理過程では、ノルフロキサシンとテトラサイクリンの除去率が高く、エリスロマイシンの除去率は低かった。</p>
<p>Tran NH, Chen H, Reinhard M, Mao F, Gin KY. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. <i>Water Res.</i> 2016;104:461-472.</p>	<p>シンガポールの都市下水について、10 種類の異なるクラスの抗菌薬を調査した。ベータラクタム、グリコペプチド、フルオロキノロン系の抗菌薬は、生物学的な下水処理プロセスで大部分が除去されたのに対して、トリメトプリムやバンコマイシン系の抗菌薬は除去されづらいよ</p>

	うに見えた。
Chen Y, Shen W, Wang B, Zhao X, Su L, Kong M, Li H, Zhang S, Li J. Occurrence and fate of antibiotics, antimicrobial resistance determinants and potential human pathogens in a wastewater treatment plant and their effects on receiving waters in Nanjing, China. <i>Ecotoxicol Environ Saf.</i> 2020;206:111371.	中国の貴州の下水処理場において、18種類の抗菌薬を調査した。その中でスルファメトキサゾールが最も高頻度で検出され、その濃度も最も高かった。抗菌薬の除去の主たるメカニズムは、生物学的または非生物学的な分解であった。ただし、キノロンの除去は汚泥への吸着が第一の要因であった。

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 「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**

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、薬剤耐性ワンヘルス・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、日本における薬剤耐性対策を推進していく上で重要である。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 2 年度の本研究では、培養法を用いて病院・市中下水のカルバペネム耐性の実態調査を行い、分離されたカルバペネム耐性菌のゲノム解析を行った。また、国内の環境 AMR に関する文献レビューを実施し、ワンヘルスの観点から日本の環境 AMR の現状と今後の課題を明らかにした。日本の病院・市中下水の環境 AMR の実態調査は限られており、国内の環境 AMR に関するエビデンスが不十分なことから、環境水の薬剤耐性のヒトや動物へのリスクに関する研究を推進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

渡部 徹  
山形大学 農学部  
教授

西山 正晃  
山形大学 農学部  
助教

高まる可能性が指摘されている(CDC)。下水は環境中の薬剤耐性のリザーバーになりうるため、環境への薬剤耐性の拡がりヒトへのリスクが懸念されるが、本邦の病院・市中下水の薬剤耐性調査は十分に行われていない。ヒト・動物・環境での薬剤耐性に対するワンヘルス・アプローチが必要である。

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・市中下水の薬剤耐性因子の特徴を明らかにすることを目的とした。また、環境中の薬剤耐性に関する実態調査や文献レビューを行った上で、ヒトへのリスク評価を行った。令和 2 年度では、以下の研究を行った。

- 1) 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性菌のゲノム解析
- 2) 日本における環境の薬剤耐性に関する文献レビューとリスク評価

**B. 研究方法**

**1. 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性菌のゲノム解析**

2019 年 2 月～2020 年 2 月に東北地方の大学病院の下水、及びその病院下水が流入する下水処理場から同日・同じ場所で採水した。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カルバペネム耐性菌を優先し、

**A. 研究目的**

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、環境中の耐性菌への曝露によって感染リスクが



下水からの分離を試みた。各下水サンプル 100  $\mu$  L をクロモアガームSuperCARBA 培地で培養した。培地上のコロニーを最大 3 株まで収集し、菌株を保存した。保存した菌株全てについて Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (VITEK-MS)による菌種同定を行った。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) について各種カルバペネマーゼ遺伝子 (*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>GES</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>) の PCR を行い、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) を同定した。次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を用いた病院・市中下水の CPE 分離株のゲノム配列を決定した。また、腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌 (Non-Enterobacteriaceae) のうち、臨床的に分離頻度の高い *Pseudomonas aeruginosa*、*Acinetobacter baumannii* complex、及び *Aeromonas hydrophila/punctata (caviae)* の各株について同様に各種カルバペネマーゼ遺伝子の PCR を行った。*bla*<sub>GES</sub> 陽性株については multiplex PCR 法を用いて ESBL 型の *bla*<sub>GES</sub> とカルバペネマーゼ型の *bla*<sub>GES</sub> との判別を行った (Kayama)。

## 2. 日本における環境中の薬剤耐性に関する文献情報

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、医学中央雑誌で論文検索を行った。令和 2 年度においては、日本の下水・排水中の AMR に関する文献を中心に検索した。検索キーワードとして、PubMed では「Japan」「antimicrobial resistance」「wastewater」「sewage」を、医学中央雑誌では「下水」「排水」「耐性」「抗菌薬」を用いた。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。

(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. 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性菌のゲノム解析

CRE 分離株 53 株のうち、25 株(47%)が CPE と判定され、その内訳は市中下水由来 20 株、病院下水由来 5 株であった(表 1)。*Enterobacter cloacae* および *Klebsiella pneumoniae* の CPE 分離株は *bla*<sub>IMP</sub> または *bla*<sub>GES</sub> のいずれかを保有しており、MLST により複数の ST 型に分類された。*Klebsiella oxytoca* および *Raoultella ornithinolytica* 分離株は *bla*<sub>GES</sub> を保有していた。CPE 分離株 25 株のうち、9 株(36%)がコリスチン耐性遺伝子、*mcr-9* を保有していた。*bla*<sub>IMP-1</sub> と *mcr-9* を同時に保有する *K. pneumoniae* ST-985、*bla*<sub>GES-4</sub> と *mcr-9* を同時に保有する *E. cloacae* ST-27 が検出された。

Non-Enterobacteriaceae は計 17 菌種 336 株検出され、*P. aeruginosa* 12 株中 1 株 (8%) が *bla*<sub>IMP</sub> を、*A. baumannii* complex 153 株中 1 株 (0.7%) 及び *A. hydrophila/punctata (caviae)* 38 株中 4 株 (11%) がカルバペネマーゼ型の *bla*<sub>GES</sub> を保有していた (表 2)。

### 2. 日本における環境中の薬剤耐性に関する文献情報

上記検索ワードで検出された文献は全部で 46 報(英文 38 報、和文 8 報、1990~2020 年)あり、このうち日本の下水・排水中の AMR に該当しない 7 報 (国外の検討や総説が 5 報、AMR に関係のない微生物学的検討が 2 報) あったため、これを除外した 39 報についてレビューを行った。39 報のうち河川・下水処理場の耐性菌・耐性遺伝子に関するものが 23 報 (59%) と過半数を占め、次いで河川・下水処理場の残留医薬品に関するものと、残留医薬品の処理法に関するものがそれぞれ 6 報 (15%) と多く、残りは耐性菌の処理法の検討が 1 報 (3%) と、その他遺伝子検出法や総説が 3 報 (8%) であった (表 3)。

下水処理場の薬剤耐性菌は流入水中と比較

し流出水中では少なく、下水処理場における処理（オゾン処理や太陽光による処理等）は環境 AMR 低減へ一定の効果がある（Azuma, Furukawa）。一方で処理後の流出水中及びそれを受ける河川水中には相当量の耐性菌・耐性遺伝子が残存しており、これによる環境汚染が懸念されている（Hayashi, Yamashita, Iwane, Miura, Ogura, Suzuki）。また、下水中から本邦における臨床分離頻度が極めて稀な耐性菌（KPC-2 産生 *K. pneumoniae* や NDM-5 産生大腸菌、VRE 等）が検出されたとの報告があり、下水処理場の流入水をモニタリングすることで、市中における薬剤耐性菌の拡散を早期に探知できる可能性がある（Nishiyama, Sekizuka, Suzuki, Tanaka, Gomi）。

下水中に排出された抗菌薬の下水処理による完全な除去は困難であり、除去されなかった抗菌薬は河川・海岸などの水環境中に放出されている（Yasojima, Ghosh, Matsuo, Narumiya）。医療機関の排水中における、抗菌薬を含む医薬品濃度は特に高度であり、下水処理場ひいては環境への負荷が大きい（Murata, Suwa）。また、家畜に投与される医薬品は、時に肥料として、処理施設を経由せず直接河川に流入する可能性がある（Murata）。このように下水・排水中の残留抗菌薬によって環境が汚染される可能性があり、環境中での薬剤耐性の選択が懸念されている。近年、環境水中の薬剤耐性遺伝子や医薬品濃度の測定技術（液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法等）や、残留医薬品の処理技術（オゾンや紫外線による処理法等）が次々に開発されている（Liu, Kim, Miyata, Nakada, Okuda, Tagiri-Endo, Azuma）。

#### D. 考察

今回、下水の薬剤耐性の調査法として、培養法を行い、病院・市中由来のカルバペネム耐性菌を対象にゲノム解析を行い、薬剤耐性の特徴を明らかにした。本研究のゲノム解析結果により、下水中に臨床問題となるカルバペネマーゼ遺伝子およびコロリスチン耐性遺伝子を同時に保有する腸内細菌科細菌の出現が確認された。近年、ヨーロッパでヒト由来のカルバペネマーゼ遺伝子(*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>、

*bla*<sub>OXA</sub>)と *mcr-9* を保有する *K. pneumoniae*、本邦でヒト由来の *bla*<sub>IMP-1</sub> と *mcr-9* を保有する *E. cloacae* が検出されており（Wang, Kananizadeh）、下水中の薬剤耐性モニタリングを継続していく必要がある。また、今回の調査で下水中から検出されたカルバペネム耐性 Non-Enterobacteriaceae の中で、*P. aeruginosa*、*A. baumannii* complex 及び *A. hydrophila/punctata* (*caviae*) のほとんどはカルバペネマーゼ非産生株であったが、*A. baumannii* 及び *A. hydrophila/punctata* (*caviae*) の一部はカルバペネマーゼ型の *bla*<sub>GES</sub> を、*P. aeruginosa* の一部は *bla*<sub>IMP</sub> を保有していた。*Aeromonas* 属菌の *bla*<sub>GES</sub> 保有株についてはこれまで 2018 年に沖縄で臨床分離されたものが世界で唯一の報告である（Uechi）。国内ではこれまで *bla*<sub>GES</sub> 保有株による医療関連感染も報告されているが（Kanayama, Yamasaki）。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く、薬剤感受性試験のみで評価を行うことの多い臨床現場では見逃されている可能性がある。以上から、本研究では病院・市中下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モニタリングが有用であることが示唆された。今後、臨床由来分離株と環境由来分離株のゲノム情報や、病院・市中下水由来の薬剤耐性と使用される抗菌薬の消費量と臨床由来の薬剤耐性との関係について比較検討を行う必要があると考えられた。

下水を中心とした、日本における環境中の薬剤耐性に関する文献の検討では、病院排水や下水処理場の流入水・処理水に対する薬剤耐性や抗菌薬のモニタリングが重要であることが示されたが、下水を経て河川に放出される薬剤耐性や抗菌薬の人に対する直接的なリスクを示した報告はなかった。下水中の薬剤耐性の測定法・処理法が開発されつつあるが、薬剤耐性の実態及び周囲環境への影響、有効な介入策を明らかにするために、今後更なる研究が必要と思われた。

令和 2 年度は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が問題となり、直接的あるいは間接的な薬剤耐性ワンヘルスへの影響を考えていく必要がある。薬剤耐性を増加させる可

能性のある要因としては、介護施設や長期療養施設での抗菌薬使用の増加、一部の国や地域で抗菌薬によるセルフメディケーションの増加、消毒薬使用の増加と環境中での放出、新興ウイルスへの政策転換、AMR アクションプランの遅延などが挙げられる(Monnet)。一方で、薬剤耐性を低下させる可能性のある要因としては、患者の受診減少に伴う抗菌薬消費量の減少、ウイルスと細菌の違いに対する認識の高まり、地域社会での手指衛生の増加、身体的距離の増加とフェイスマスクの使用、環境消毒の増加、国境を越えた重症患者の移動が少なくなり耐性菌の拡散頻度低下、国際旅行・移動が大幅に減少し、高流行地域からの耐性菌の拡散リスクが減少、AMR を含む感染症全般の脅威に対して国民および政治的な関心が集まる、家畜群の規模の縮小と抗菌薬の入手困難による動物への抗菌薬消費量の減少などが挙げられる。COVID-19 パンデミックにおいて、3次元ワンヘルス・アプローチが提唱されている(Amuasi)。COVID-19 パンデミックでは、薬剤耐性を含む感染症へのヒト・動物・環境インターフェイスでのワンヘルス・アプローチが必要である。各インターフェイスにおいて、共有された環境、安全な食品システム、共有された医薬品/介入の具体例を表4に示す(Kanamori)。新興感染症や自然災害がもたらすヒトの健康への脅威は、世界的な旅行、人口増加、都市化、気候変動により大幅に増加しており、環境中の薬剤耐性のヒト・動物へのリスクを評価するために、多分野にわたるワンヘルス・アプローチが不可欠である。

#### E. 結論

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や動物に与える影響を明らかにする必要がある。令和2年度の本研究において、培養法を用いて病院・市中下水のカルバペネム耐性の調査法と監視体制に関する研究を実施した。本研究班の研究結果および環境 AMR 文献レビューによる新たな知見を踏まえて、環境中の薬剤耐性のヒトや動物へのリスク評価を行い、COVID-19 パンデミックにおける薬剤耐性ワンヘルス・アプロー

チを推進していくことが重要である。環境 AMR に関する国内のエビデンスが不十分なことから、環境水の薬剤耐性の調査法を確立し、環境中の薬剤耐性のヒトや動物へのリスクを解明することが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Kanamori H, Baba H, Weber DJ. Rethinking One Health approach in the challenging era of COVID-19 pandemic and natural disasters. *Infect Ecol Epidemiol.* 2020;11(1):1852681.

##### その他発表

2. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2020. (4)環境.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

#### 【参考文献】

Amuasi JH, Lucas T, Horton R, Winkler AS. Reconnecting for our future: The Lancet One Health Commission. *Lancet.* 2020;395:1469-1471.

Azuma T, Hayashi T. Effects of natural sunlight on antimicrobial-resistant bacteria (AMRB) and antimicrobial-susceptible bacteria (AMSB) in wastewater and river water. *Sci Total Environ* 2020: 142568.

Azuma T, Otomo K, Kunitou M, 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.

Furukawa T, Hashimoto R, Mekata T.

- Quantification of vancomycin-resistant enterococci and corresponding resistance genes in a sewage treatment plant. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **2015**; 50(10): 989-95.
- Ghosh GC, Okuda T, Yamashita N, Tanaka H. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in Japan and their effects on bacterial ammonia oxidation. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2009**; 59(4): 779-86.
- Gomi R, Matsuda T, Matsumura Y, et al. Occurrence of Clinically Important Lineages, Including the Sequence Type 131 C1-M27 Subclone, among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Wastewater. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61(9).
- Gomi R, Matsuda T, Yamamoto M, et al. Characteristics of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Wastewater Revealed by Genomic Analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; 62(5).
- Hayashi W, Tanaka H, Taniguchi Y, et al. Acquisition of *mcr-1* and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. *Appl Environ Microbiol* **2019**; 85(22).
- Iwane T, Urase T, Yamamoto K. Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2001**; 43(2): 91-9.
- Kanamori H, Baba H, Weber DJ. Rethinking One Health approach in the challenging era of COVID-19 pandemic and natural disasters. *Infect Ecol Epidemiol.* **2020**;11:1852681.
- Kananizadeh P, et al. Emergence of carbapenem-resistant and colistin-susceptible *Enterobacter cloacae* complex co-harboring *blaIMP-1* and *mcr-9* in Japan. *BMC Infect Dis.* **2020**;20:282.
- Kanayama A, Kawahara R, Yamagishi T, Goto K, Kobaru Y, Takano M, Morisada K, Ukimura A, Kawanishi F, Tabuchi A, Matsui T, Oishi K. Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp Infect.* **2016 May**;93(1):35-41. doi: 10.1016/j.jhin.2015.12.017. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26897557.
- Kayama S, Yano R, Yamasaki K, Fukuda C, Nishimura K, Miyamoto H, Ohge H, Sugai M. Rapid identification of carbapenemase-type *blaGES* and ESBL-type *blaGES* using multiplex PCR. *J Microbiol Methods.* **2018 May**;148:117-119. doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.016. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29605523.
- Narumiya M, Nakada N, Yamashita N, Tanaka H. Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion. *J Hazard Mater* **2013**; 260: 305-12.
- Nishiyama M, Iguchi A, Suzuki Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus 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* **2015**; 50(1): 16-25.
- Matsuo H, Sakamoto H, Arizono K, Shinohara R. Behavior of pharmaceuticals

- in waste water treatment plant in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol* **2011**; 87(1): 31-5.
- Miura T, Kusada H, Kamagata Y, Hanada S, Kimura N. Genome Sequence of the Multiple- $\beta$ -Lactam-Antibiotic-Resistant Bacterium *Acidovorax* sp. Strain MR-S7. *Genome announcements* **2013**; 1(4).
- Monnet DL, Harbarth S. Will coronavirus disease (COVID-19) have an impact on antimicrobial resistance? *Euro Surveill.* 2020;25:2001886.
- Murata A, Takada H, Mutoh K, Hosoda H, Harada A, Nakada N. Nationwide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers. *Sci Total Environ* 2011; 409(24): 5305-12.
- Ogura Y, Ueda T, Nukazawa K, et al. The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different *Escherichia coli* lineages. *Sci Rep* **2020**; 10(1): 17880.
- 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**; 11(4): 589-97.
- 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**; 12: 2243-9.
- Suzuki Y, Hashimoto R, Xie H, et al. Growth and antibiotic resistance acquisition of *Escherichia coli* in a river that receives treated sewage effluent. *Sci Total Environ* **2019**; 690: 696-704.
- Tanaka H, Hayashi W, Iimura M, et al. Wastewater as a Probable Environmental Reservoir of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Genes: Detection of Chimeric  $\beta$ -Lactamases CTX-M-64 and CTX-M-123. *Appl Environ Microbiol* **2019**; 85(22).
- Uechi K, Tada T, Sawachi Y, Hishinuma T, Takaesu R, Nakama M, Nakasone I, Kirikae T, Fujita J. A carbapenem-resistant clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* in Japan harbouring an acquired gene encoding GES-24  $\beta$ -lactamase. *J Med Microbiol.* 2018 Nov;67(11):1535-1537. doi: 10.1099/jmm.0.000842. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30289383.
- US Centers for Disease Control and Prevention, UK Science & Innovation Network, Wellcome Trust. Initiatives for Addressing Antimicrobial Resistance in the Environment: Current Situation and Challenges. 2018. <https://wellcome.ac.uk/sites/default/files/antimicrobial-resistance-environment-report.pdf>
- 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.
- Yamasaki K, Komatsu M, Ono T, Nishio H, Sueyoshi N, Kida K, Satoh K, Toda H, Nishi I, Akagi M, Mizutani T, Nakai I, Kofuku T, Orita T, Zikimoto T, Nakamura T, Wada Y. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing bla<sub>GES-4</sub> carbapenemase at a Japanese hospital. *J Infect Chemother.* 2017 Jan;23(1):40-44. doi: 10.1016/j.jiac.2016.09.006. Epub 2016

Oct 18. PMID: 27769645.

Yamashita N, Katakawa Y, Tanaka H. Occurrence of antimicrobial resistance bacteria in the Yodo River basin, Japan and determination of beta-lactamases producing bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 2017; 143: 38-45.

Yasojima M, Nakada N, Komori K, Suzuki Y, Tanaka H. Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2006**; 53(11): 227-33.

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.

表 1. 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌のゲノム解析 (2019 年 2 月～2020 年 2 月)

Bacterial species	CRE/CPE, n	Carbapenemase gene (n)	Colistin resistance gene (n)
<i>Escherichia coli</i>	6/0		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/4	IMP-1 (3), GES-4 (1)	mcr-9 (2)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9/2	GES-4 (1), GES-5 (1)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	19/7	IMP-1 (2), GES-4 (4), GES-5 (1)	mcr-9 (4)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1/0		
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	13/12	GES-4 (2), GES-5 (10)	mcr-9 (3)

表 2. 病院・市中下水由来の腸内細菌科細菌以外のカルバペネム耐性グラム陰性桿菌のゲノム解析 (2019 年 2 月～2020 年 2 月)

Bacterial species	Carbapenem-resistant (n)	Carbapenemase-producing (n)	Carbapenemase gene (n)
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	153	1	GES (1)
<i>Acinetobacter ursingii</i>	16		
<i>Aeromonas hydrophila/punctata(caviae)</i>	38	4	GES (4)
<i>Aeromonas media</i>	15		
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	1		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2		
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	2		
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	5		
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2		
<i>Pandoraea apista</i>	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	1	IMP (1)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1		
<i>Pseudomonas putida</i>	40		
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	13		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21		

表 3. 日本の下水・排水中の AMR に関する文献の内訳

テーマ	n(%)
河川・下水処理場の耐性菌・耐性遺伝子	23(59)
河川・下水処理場の残留医薬品	6(15)
残留医薬品の処理法の検討	6(15)
耐性菌の処理法の検討	1(3)
その他(遺伝子検出法や総説)	3(8)

表 4. COVID-19 パンデミックにおける 3次元ワンヘルス・アプローチ

動物-環境-ヒト	ワンヘルス・アプローチの例
環境の共有	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ SARS-CoV-2の中間宿主、種を越えた伝播、動物由来感染の同定</li> <li>・ 伴侶動物(イヌ、ネコ)、商業目的で飼育されている動物(ミンク、牛、豚)、野生動物(トラ)へのSARS-CoV-2のヒトから動物への伝播の影響</li> <li>・ SARS-CoV-2の伴侶動物からヒトへの伝播が可能かどうか</li> <li>・ 環境表面、下水、空気におけるSARS-CoV-2の持続性を評価し、生態系におけるSARS-CoV-2との関連性をモデル化</li> </ul>
安全な食品システム	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ COVID-19パンデミックが現在の食品システムに及ぼす影響</li> <li>・ 生物活性成分、食品の安全性と安全性、持続可能性の観点から代替食品システムの確立</li> </ul>
医薬品/介入の共有	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 動植物に由来するCOVID-19を治療するための医薬品の調査</li> <li>・ SARS-CoV-2の抗ウイルス薬やワクチン開発における動物モデル</li> <li>・ ヒト、動物、環境に関するSARS-CoV-2のサーベイランスシステムの開発</li> </ul>



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： 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を確立した。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34 地方衛生研究所から計 59 箇所の放流処理水を収集できた(2019 年 8-9 月、2020 年 2-3 月、2020 年 7-9 月および 2021 年 2-3 月)。地方から送付された 59 箇所の放流水検体と東京湾岸 1 検体の計 60 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 そして 2020 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。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)および KPC-2 産生 *Aeromonas* 属菌と NDM-5 産生大腸菌のゲノム情報を論文報告している。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**

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  
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  
金森 肇 東北大学 医学系研究科・講師  
山口 進康 大阪健康安全基盤研究所  
河原 隆二 大阪健康安全基盤研究所  
安達 史恵 大阪健康安全基盤研究所  
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  $\mu\text{m}$  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 (図 1)。

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、RPKM (Reads Per Kilobase of gene per Million mapped reads) 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。

H31, R1 年度（2018, 2019 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（2019 年・夏および 2020 年・冬の計 111 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（図 2）。

昨年度報告では夏よりも冬期において ARG がやや多い傾向が見られたことを報告したが、2 年間（計 4 回）の継続調査により、ARG が継続的に増加傾向であるとともに、その主要因としてサルファ剤（Sulphonamide）およびテトラサイクリン耐性遺伝子が有意に高く検出された（ $p < 0.01$ ）。

一方、下水処理場・放流水中のマクロライド耐性遺伝子は顕著な減少を示し、ヒトに対するマクロライド系薬の使用が減少したことを反映する結果が得られたものと考えられた。

また、キノロン耐性遺伝子においても同様の減少傾向が見られ、ヒトに対するキノロン系薬の使用量が減少したこととの関連が示唆されるが、キノロン耐性大腸菌の分離状況とは乖離が見られた。

本研究班におけるメタゲノム解析では外来性獲得である *oqx* および *qnr* 遺伝子を検出対象としているため、キノロン剤阻害ターゲットである *gyrA* および *parC* 遺伝子上のキノロン耐性決定領域（quinolone resistance-

determining regions: QRDR）の変異は判定していない。

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。

引き続き、自治体のご協力を仰ぎながら年 2 回（夏および冬）の全国調査を実施し、本邦の環境 AMR レジストームの基盤を整備していく予定である。

### 2. 臨床で問題となるカルバペネム耐性菌の放流水由来分離状況とゲノム解読実績

多摩川及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（図 3）。

放流水の耐性遺伝子に加え、環境で生存し増殖する可能性を有する薬剤耐性菌の存在の特定は重要である。

東京湾沿岸の水再生センターから、臨床分離すら希少な KPC-2 産生肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* が分離されたこと、創傷感染症で稀に分離されるアエロモナス属が KPC-2 を保有していたこと、NDM-1 よりも広域活性を獲得した NDM-5 カルバペネマーゼを保有する大腸菌が分離されたこと等を報告しており、国内事情が少しずつ明らかになりつつある。

海外の汚染実態と同様、本邦環境水においても少なからず耐性菌が分離されており、より広範な実態調査が望ましい。

### 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、34 自治体から計 59 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十分な“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考える。

「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.

む)  
なし

#### その他発表

1. Characterization of a *bla*<sub>KPC-2</sub>-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

500 mL の放流水・表層を採水



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

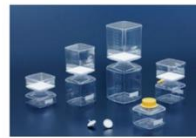
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/clis430282?lang=ja&region=JP>

■ 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

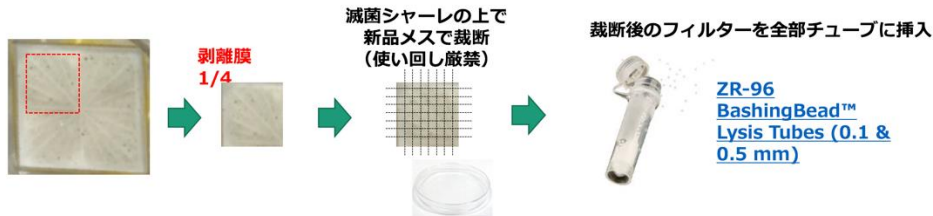
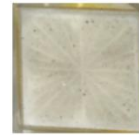
放流水を全部 Filter trap して、メンブレンをメスで剥離



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&region=JP>

■ 剥離メンブレンの写真



→ -20~80°C保存  
感染研・ゲノムセンターへ送付

800 µl Roche Bacterial lysis buffer  
Freeze at -25°C

2010  
Geno/Grinder



Bead-beating  
(1,500 rpm, 10 min)



INSTRUCTION MANUAL

ZR-96 ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit  
Catalog Nos. D4021 & D4022

Highlights

- Quick, high-throughput 96-well plate recovery of pure DNA from agarose gels.
- Unique Zymo-Gel™ plate facilitates loading of up to 1 µg DNA/gel and elution with 3 µl eluate.
- Eluted DNA is well suited for use in DNA ligations, sequencing, library prep, etc.

<https://www.funakoshi.co.jp/contents/2558#movie>



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

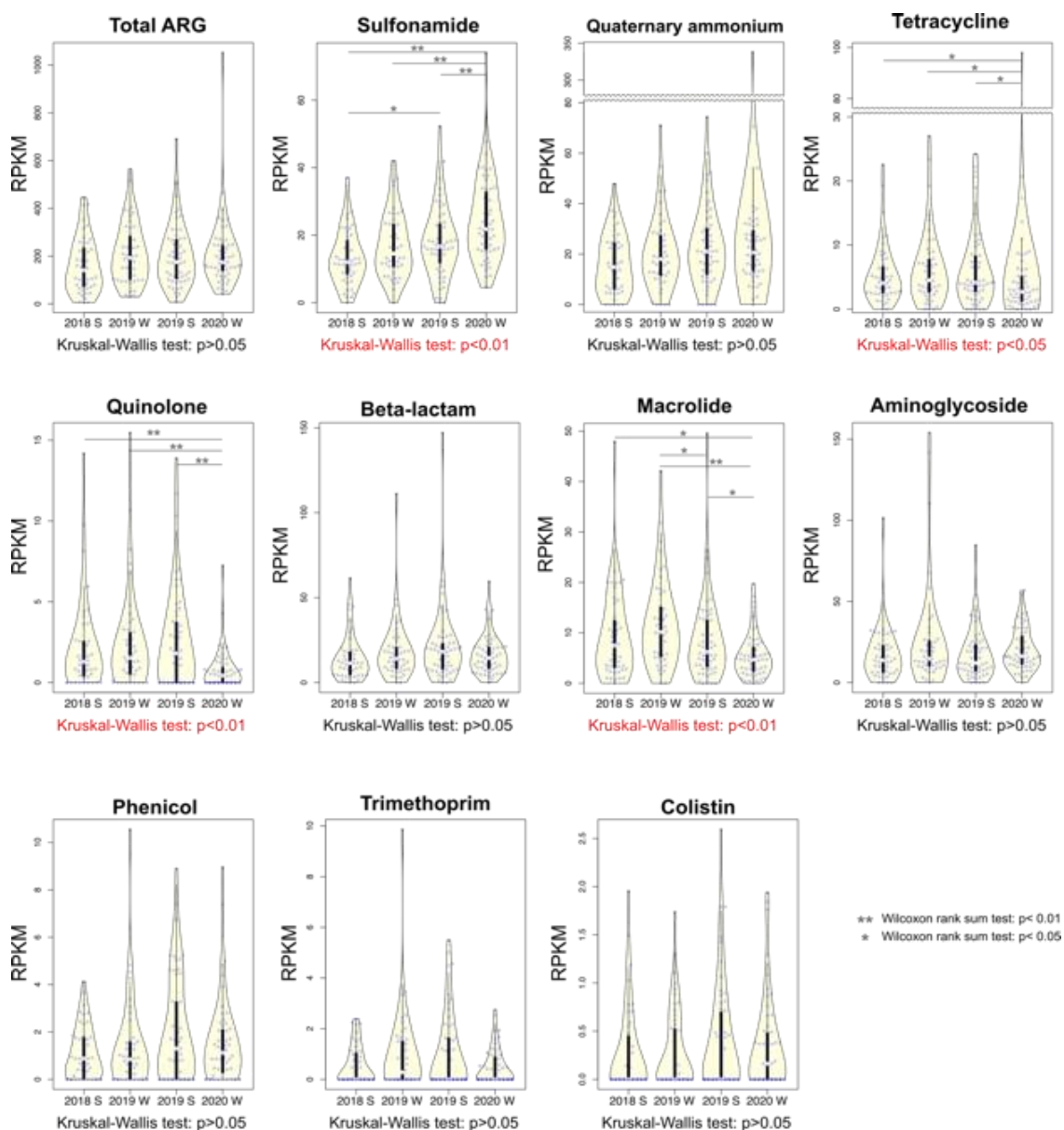


図2 2018年（夏・冬）、2019年（夏）および2020年（冬）の下水処理場・放流水47-60箇所から採取した主要なカテゴリーの薬剤耐性遺伝子（ARG）

RPKM（Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads）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, 2020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>

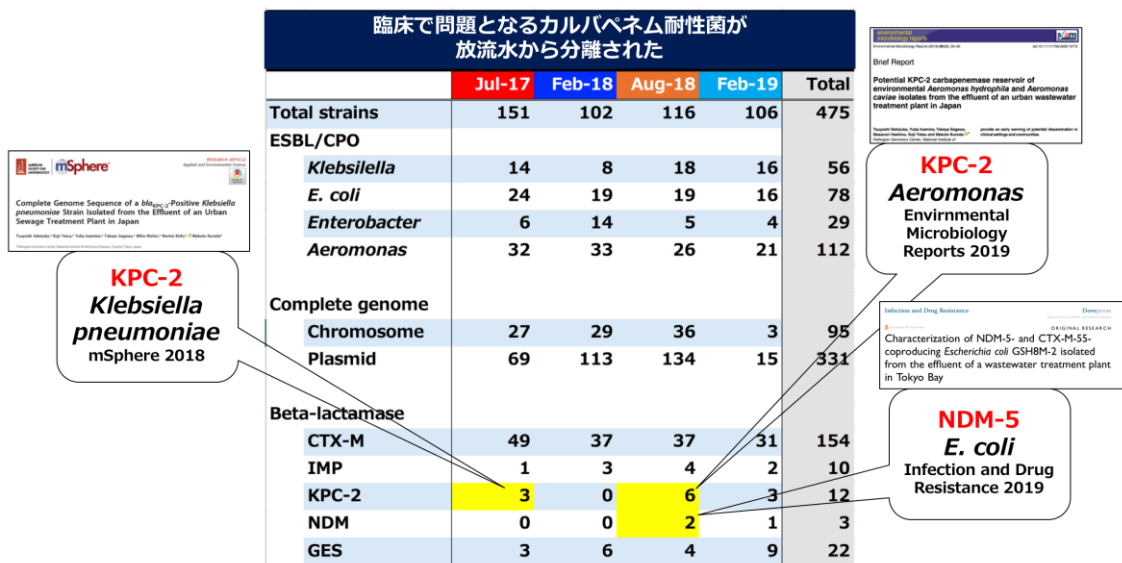
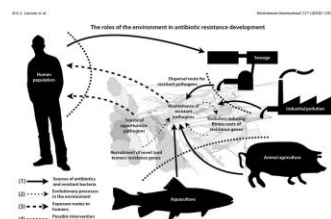


図3 臨床で問題となるカルバペネム耐性菌の放流水由来分離状況とゲノム解読実績

多摩川及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。放流水の耐性遺伝子に加え、環境で生存し増殖する可能性を有する薬剤耐性菌の存在の特定は重要である。



# Systematic Review 環境AMR



Buttons: 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。

Comment / Rank

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

図4 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*<sub>GES-24</sub> を保有する *Enterobacter* sp.、*Raoultella ornithinolytica* および *Klebsiella pneumoniae*、*bla*<sub>NDM-5</sub> を保有する *K. pneumoniae* を分離した。検出される株は少ないが、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、34 地方衛生研究所から協力が得られ、2020 年 8～9 月および 2021 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) 全研究班で進めている環境 AMR システマティック・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検索した。

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 主幹研究員

地方衛生研究所 34 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検索・収集する。

## 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地点およびその下流河川2地点において、2020年8月および2021年2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を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 μg/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 μg/mLのMEPMおよび70 μg/mLのZnSO<sub>4</sub>を含有するCHROMagar ECC (m-ECC)、1 μg/mLのCefotaxime (CTX)を含有するCHROMagar ECC (CTX-chromo)に塗抹後、36°Cで18時間培養し、腸内細菌科細菌の分離を試みた。また、CHROMagar COL-APSE (COL)および0.03 μg/mLのCiprofloxacin (CPFX)添加CHROMagar ECC (CPFX-chromo)も追加し分離を試みた。さらに、前処理の検討のため、残りのフィルターを用いて、前培養なしの条

件でも分離を試みた。

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, 28<sup>th</sup> 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 (地衛研) に研究協力を呼び掛けた。新型コロナウイルス感染症が拡大し、各地衛研も関連業務に多忙を極める中、計34機関から研究協力を得ることができ (前年度よりも2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: 2020年8月~9月初旬および冬期: 2021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、採水箇所の位置情報、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 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管するよう依頼した。

### 3. 環境 AMR に係る文献の検索・収集

環境 AMR に関して「環境と薬剤耐性」をキーワードとして、文献の検索を行った。今年度はこれまでの2年間の成果をふまえ、日本語で書かれた論文の検索を行った。

## 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、アミノグリコシド、 $\beta$ -ラクタム剤、サルファ剤、マクロライドおよび第4級アンモニウム耐性に係る薬剤耐性因子の検出割合が多く、全体の約80%以上を占めていた。対象とした2箇所の下水処理場のうち、1地点の下水処理場の放流水およびその下流河川の結果を図1に示した。放流水と下流河川における検出割合は類似しており、下流河川においては放流水の影響を大きく受けていると考えられた。他の1地点においても同様の結果であった。この傾向は、2018、2019年度の結果とも類似しており(図2)、全国のモニタリング結果とも一致していた。また、大阪においては全国と比較して検出率が突出している薬剤耐性因子はなく、地域特異性等は見られなかった。

培養法を用いた調査においては、2020年8月および2021年2月に分離した株について、スクリーニングおよびシーケンス解析を行った結果、*bla*<sub>GES-24</sub> 保有 *Enterobacter* sp.、*R. ornithinolytica* および *Klebsiella pneumoniae*、*bla*<sub>NDM-5</sub> 保有 *K. pneumoniae* の計4株が同定された。*Enterobacter* sp.、*R. ornithinolytica* は CFPX-chromo 培地から、

*K. pneumoniae* の2株は m-ECC 培地から分離された。さらに IPM および MEPM に対し MIC が  $4\ \mu\text{g/L}$  で耐性を示し、mCIM の結果カルバペネマーゼ陽性となった *Enterobacter* sp. が分離され、耐性遺伝子の同定を進めている。

その他にも、ESBL 産生株が CTX-chromo および CFPX-chromo から分離され、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-1+SHV 型、CTX-M-1+TEM+SHV 型、CTX-M-9+TEM 型、CTX-M-1+CTX-M-9 型であった。一方、COL 培地から分離株は得られなかった。

前述のカルバペネマーゼ産生株の概要を表1に示す。*bla*<sub>GES-24</sub> 保有 *Enterobacter* sp. は、IPM に対し MIC が  $2\ \mu\text{g/mL}$  と感受性で、MEPM に対し MIC が  $>4\ \mu\text{g/L}$  と耐性を示した。第3世代セファロsporin (Ceftazidime; CAZ、Cefotaxime; CTX) に対して耐性を示したが、ESBL の産生は確認されなかった。*R. ornithinolytica* は汽水域の環境中や虫、魚等に存在する細菌であるが、臨床においてカルバペネム耐性菌として分離された例もある。我々の調査において、今回初めて環境中から分離された。このように、これまで分離されていない薬剤耐性菌を培養法を用いて分離し、詳細に解析することで、地域における潜在的な AMR の実態の把握にもつながると考えられる。

### 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34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 に係る文献の検索・収集

薬剤耐性に関して日本語で書かれた文献をデータベースやwebサイトで検索したが、水環境を対象とした文献は、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既に登録した文献以外には、新たに見つけることが

できなかった。

#### D. 考察

3年間の6回の調査において、カルバペネマーゼ産生株は、調査毎に1~3株、計11株分離された(表1)。分離された株の培地は、2018および2019年度の調査では6株中5株がLB-mECC培地あるいはUPB-mECC培地であったが、2020年度の調査では5株中3株がCPFX-chromoで、4株が前培養なしの条件で分離された。したがって、前培養なしでも分離可能であることが明らかとなった。

本調査結果から、環境水からの薬剤耐性菌の分離には、前培養を用いた方法も一定有効であると考えられるが、前培養を行うと対象としている菌以外も増殖されるため、最も効率的な検出方法とはいえ、今後、前処理方法についてはさらなる検討が必要と考えられた。

メタゲノム解析により検出された薬剤耐性因子のうち、 $\beta$ -ラクタマーゼ関連遺伝子はGES、IMP、OXA、VEB型等が多数を占め、この傾向は地点、季節および年度による違いは見られなかった。したがって大阪の状況をいずれの試料の結果も反映していると考えられた。一方、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、さらなる調査が必要であると考えられた。

一方で、培養法においては、全24試料に対するESBL株、ヒト由来と想定されるカルバペネマーゼ産生株の陽性率は、それぞれ79%および13%となり、現在の医療機関での検出状況と合致していると考えられた。したがって、培養法で得られる結果は地域の状況を把握するための指標となりうるのではないかと考えられた。

以上より、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、分離培養法はさらなる検討は必要であるが、検出感度には優れていると考えられ、これらを同時に行う

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35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。

#### 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、その実態を明らかにするためのデータを蓄積できた。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

1. 河原隆二、山口貴弘、安達史恵、安楽正輝、川津健太郎：大阪府内で分離されたmCIM陽性Enterobacter cloacae complex株の解析。第49回薬剤耐性菌研究会, 埼玉(2020)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表 1 カルバペネマーゼ保有株の概要

年度	菌種	遺伝子型	由来	培地	MIC (µg/mL)							
					PIPC	CAZ	CTX	AZT	IPM	MEPM	AMK	CPFX
2018	<i>E. Coli</i>	NDM-1	河川	LB-mECC	>64	>16	>16	<0.5	>8	>8	<2	0.25
	<i>Enterobacter</i> sp.	FRI-8	河川	LB-CTX-chromo	4	<0.5	<0.5	<0.5	4	4	<2	<0.03
	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24, OXA-181	河川	LB-mECC	16	2	1	<0.5	>8	>8	32	0.06
2019	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	LB-mECC	32	4	1	<0.5	>8	8	32	1
	<i>K. pneumoniae</i>	IMP-6	河川	UPB-mECC	>64	>16	>16	4	<0.25	4	<2	<0.03
	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	LB-mECC	>64	16	>16	>16	4	4	16	1
2020	<i>Enterobacter</i> sp.	GES-24	放流水	CPFX	64	>16	16	>16	2	4	<2	0.06
	<i>R. ornithinolytica</i>	GES-24	河川	CPFX	>64	8	1	<0.5	2	2	32	1
	<i>K. pneumoniae</i>	GES-24	河川	mECC	>64	4	<0.5	1	4	4	<2	0.5
	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5	放流水	LB-mECC	>64	>16	>16	<0.5	>8	>8	<2	0.06
	<i>Enterobacter</i> sp.	-*	河川	CPFX	4	<0.5	<0.5	<0.5	4	1	<2	0.06

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

\* 未同定

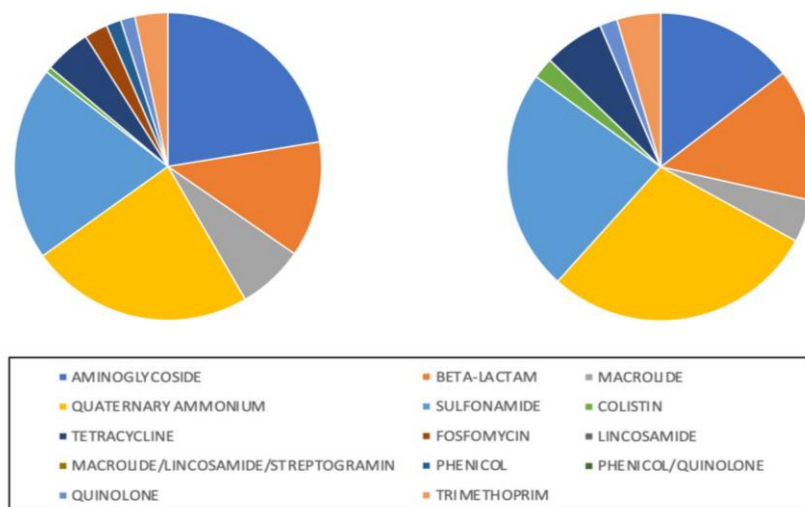


図 1. メタゲノムでヒットした耐性遺伝子割合 (2020年度)

(左図：下水処理放流水、右図：下流河川)

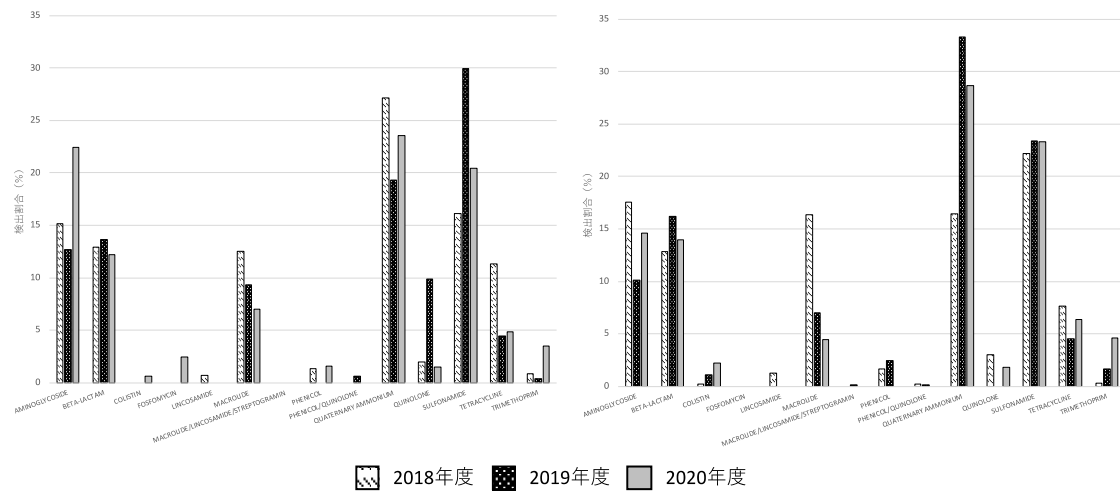


図 2. 年度毎のメタゲノムでヒットした耐性遺伝子の検出割合  
(左図：下水処理放流水、右図：下流河川)

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から分離された薬剤耐性菌の遺伝学的性状を明らかにすること、養豚場および周辺環境水の微生物群や薬剤耐性遺伝子群の組成を比較解析し、薬剤耐性の伝播における相互の影響を明らかにすることを目的とした。

昨年度までに野生シカの糞便 237 検体から分離した大腸菌 848 株のうち、同一クローンを除いた 5 株の薬剤耐性株についてゲノム解析を行い、MLST 遺伝型、薬剤耐性遺伝子、プラスミドレプリコン型、病原遺伝子などを検索した。それらの組み合わせから、野生シカ由来薬剤耐性大腸菌はヒト、動物、環境由来の薬剤耐性大腸菌と比較的類似した特徴を持つことが判明した。

養豚場内の豚の糞便、原尿槽（豚の排泄物や消毒剤などを処理開始まで貯蔵するタンク）、周辺環境水（放流水および放流水が流入する用水路の上流側と下流側）についてメタゲノム解析を行った。豚糞便と周辺環境水では細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なり、放流水（廃水処理後）の遺伝子量が原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少ないことから、豚で選択された耐性菌（耐性遺伝子）の環境放出リスクは極めて低いことが示された。また、原尿槽では消毒剤の成分が選択圧として働いたと考えられる、豚糞便とは異なる細菌叢が形成されていたことから、環境放出リスクとしては豚の腸管内で選択された耐性遺伝子より養豚環境中で選択された耐性遺伝子の方が重要であることが示唆された。

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

グルゲ・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一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) 国内の野生シカから分離された薬剤耐性菌の遺伝学的性状を明らかにすること、2) 養豚場および周辺環境水の微生物群や薬剤耐性遺伝子群の組成を比較解析し、薬剤耐性の伝播における相互の影響を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 野生シカ由来薬剤耐性大腸菌の遺伝学的解析

昨年度までに野生シカの糞便 237 検体から分離した大腸菌 848 株のうち、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) のいずれかに耐性を示す 9 株の O genotype (Og) を PCR により決定した。次に、分離元の糞便検体、Og、薬剤感受性プロファイルがすべて同一の株を除いた 5 株について、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行った。得られたドラフト配列を Center for Genomic Epidemiology (<http://genomicepidemiology.org/>) の公開ウェブツール (MLST、ResFinder、PlasmidFinder、VirulenceFinder) を用いて sequence type (ST)、薬剤耐性遺伝子、プラスミドレプリコン型、病原遺伝子をそれぞれ検索した。

### 2. 養豚場および周辺環境水のメタゲノム解析

昨年度に引き続き、同様の手法で養豚場 3 農場 (Ⅲ、Ⅶ、Ⅷ) の周辺環境水 (放流水および用水路水) を採取し、メタゲノム解析を行った。すなわち、養豚場の放流水が流入する用水路の上流側および下流側 (放流点から上

下約 3m の地点) で水試料を採取し、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 照射およ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、ただちにメンブランフィルター (0.22 $\mu$ 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、総シーケンスリード数を 100 万とした場合の各遺伝子のリード数 (RPM) または総シーケンスリード数を 100 万とし各遺伝子の長さを 1,000 塩基とした場合の各遺伝子のリード数 (RPKM) で表した。

今年度はさらに、昨年度より農場周辺環境水と同時に採材していた農場内の豚 (発育ステージごと: 母豚、分娩房母豚、哺乳豚、離乳豚、肥育前期豚、肥育後期豚) の糞便および原尿槽 (豚の排泄物や消毒剤などを処理開始まで貯蔵するタンク) の水試料についてもメタゲノム解析を行った。糞便からの DNA 抽出には NucleoSpin Soil (タカラバイオ) を使用し、原尿槽の水については農場周辺環境水と同様の処理を行った。

## C. 研究結果

### 1. 野生シカ由来薬剤耐性大腸菌の遺伝学的解析

解析した 9 株の遺伝学的性状を、昨年度に検討した薬剤感受性試験結果と合わせて表 1 に示す。D1133、D1205、D1399、D1477、D2028 がゲノム解析を行った 5 株であり、他の 4 株は分離元の糞便検体 (B22) および各種性状が一致する D1399 と同一のクローンと判断した。野生シカ由来薬剤耐性大腸菌は *bla*<sub>TEM-1A</sub>、*aadA2*、*strA*、*strB*、*tetA*、*tetB*、*floR*、*sul1*、*sul2*、*dfrA12* など、ヒトや動物に広く分布する薬剤耐性遺伝子を保有していた (表 1)。全 5 株に見られた IncF 型レプリコン (IncFIB、IncFII) もヒトや動物に広く分布しており、薬剤耐性遺伝子の伝達に関与することが知られている。また、ゲノム解析した 5 株の大腸菌には、30 種類の病原遺伝子が存在していた (表 1)。

## 2. 養豚場および周辺環境水のメタゲノム解析

豚の糞便 75 検体、原尿槽の水 14 検体、農場周辺環境水 34 検体について属レベルでの細菌叢解析を行い、RPM 単位でクラスター分析（ヒートマップ分析）した結果を図 1 に示す。豚糞便については検体を採取した農場や発育ステージが異なっても細菌叢の組成は同様であった。また、農場周辺環境水（放流水および用水路の上流側と下流側）の細菌叢組成は同様であり、これらは豚糞便や原尿槽の組成とは大きく異なっていた。原尿槽の細菌叢は農場により組成が異なるが、全体的に豚糞便に近い組成であった。

耐性遺伝子（RPKM 単位）について、細菌叢と同様にクラスター分析した結果を図 2 に示す。細菌叢と同様に、豚糞便については検体を採取した農場や発育ステージが異なっても耐性遺伝子の組成は同様であった。農場周辺環境水の耐性遺伝子組成は同様であり、これが豚糞便の組成と大きく異なることも細菌叢と同様であった。原尿槽の耐性遺伝子も全体的に豚糞便に近い組成であったが、中には豚糞便より農場周辺環境水に近い組成の遺伝子（*qac* や *sul* など）も認められた。なお、放流水（廃水処理後）の遺伝子（リード）量は、原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少なかった。

検体採取回数の多い農場Ⅲ（図 3）および農場Ⅶ（図 4）について耐性遺伝子の組成を詳細に比較したところ、豚糞便と水試料（原尿および放流水）で組成が大きく異なっており、両農場ともに水試料において四級アンモニウムおよびスルホンアミドに対する耐性遺伝子を多く含む点が特徴的であった。なお、農場Ⅲは分娩から肥育までを同一の農場で一貫して行うが、農場Ⅶは分娩と離乳～肥育を異なる農場で実施する形態（ツーサイトシステム）のため、農場Ⅶには原尿と放流水が 2 検体ずつ存在する。

図 5 には、農場Ⅲおよび農場Ⅶにおける放流水、放流水が流入する用水路の下流側、用水路の上流側の主要な耐性遺伝子について、それぞれ含有量の多い順に示す。両農場ともに、用水路上流の組成が放流水および用水路下流と若干異なるものの基本的には採水地点

によらず同様の耐性遺伝子が含まれていた。

## D. 考察

ゲノム解析した 5 株の野生シカ由来薬剤耐性大腸菌のうち、D1133 株はその病原遺伝子プロファイルより非定型（atypical）腸管病原性大腸菌（aEPEC）であることが示唆された。aEPEC では、ヒト、家畜、野生動物で遺伝的関連性の高いクローンが分離された報告がある。また、大腸菌における ST137、血清型 O145（遺伝型 Og145）、IncFIB の組み合わせはヒト臨床事例でも分離報告がある。さらに、血清型やプラスミドレプリコン型の情報は乏しいが、ST154、ST711、ST6488 も家畜や環境水から分離されている。ヒトや動物に広く分布する薬剤耐性遺伝子を保有することからも、野生シカ由来薬剤耐性菌はヒト、動物、環境由来の薬剤耐性大腸菌と比較的類似した特徴を持つことが示唆された。なお、上記 5 株の薬剤耐性大腸菌が分離された野生シカは、病院、農場、河川から 10km 以内の地点で捕獲されており、過去にヒトや家畜との何らかのコンタクトがあった可能性も考えられる。

昨年度までの研究により、養豚で使用した抗菌薬の環境放出リスクは一定程度存在することが示唆されている。一方、メタゲノム解析の結果、農場によらず豚糞便と周辺環境水で細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なることから、豚で選択された耐性菌（耐性遺伝子）の環境放出リスクは極めて低いと考えられる。また、放流水（廃水処理後）の遺伝子（リード）量が原尿槽（廃水処理前）に比べて著しく少ないことも、上記の考察を支持する。なお、図 1 において *Pseudomonas*、*Burkholderia*、*Streptomyces* が全検体にわたって検出されているが、これらは多菌種で構成され環境中に広く分布する細菌属であること、今回のメタゲノム解析の解像度では菌種までは同定できないことなどから、同一の菌種が農場および周辺環境水に存在するかの情報は本データからは得られていない。

原尿槽の水試料中に豚糞便より農場周辺環境水に近い組成の遺伝子（*qac* や *sul* など）も認められたことから、原尿槽において特異的な細菌叢が形成されている可能性が高い。*qac* や *sul* は消毒剤に含まれる四級アンモニウム

やスルホンアミドに対する耐性遺伝子であることから、豚の排泄物や消毒剤などが流入した原尿槽中で消毒剤の成分が選択圧となり、豚糞便とは異なる細菌叢が形成された可能性が示唆される。したがって、放流水を経由した耐性遺伝子の環境放出という観点からは、豚の腸管内で選択された耐性遺伝子より養豚環境中(汚水の流れ、原尿槽などの貯蔵施設、処理過程など)で選択された耐性遺伝子の方が重要と考えられる。

排水の接続水域では採水地点によらず同様の耐性遺伝子が含まれていたことから、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。図5において各採水地点で含有量の多い *sul1*、*sul2*、*tetA*、*floR*などは野生シカから分離された薬剤耐性大腸菌でも確認されている。このことから、農場周辺環境水(特に用水路上流)の耐性遺伝子組成に野生動物が関与している可能性が考えられ、その動態には引き続き注意する必要がある。

#### 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と考えられる。しかし、野生シカ由来薬剤耐性菌には薬剤耐性遺伝子や遺伝学的性状の組み合わせにヒト由来株や家畜由来株との共通点も見られることから、ヒト、動物、環境における薬剤耐性の循環に野生シカが関与する可能性も残されており、野生動物の動態には引き続き注意する必要がある。

メタゲノム解析により養豚場の放流水経路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、豚糞便と周辺環境水では細菌叢および耐性遺伝子の組成が大きく異なり、放流水(廃水処理後)の遺伝子量が原尿槽(廃水処理前)に比べて著しく少ないことから、豚で選択された耐性菌(耐性遺伝子)の環境放出リスクは極めて低いと考えられる。また、豚の排泄物や消毒剤などが流入した原尿槽中で消毒剤の成分が選択圧となり、豚糞便とは異なる細菌叢が形成された

可能性があることから、環境放出リスクとしては豚の腸管内で選択された耐性遺伝子より養豚環境中で選択された耐性遺伝子の方が重要と考えられる。さらに、農場からの放流水が流入する用水路の上流側からも野生シカ由来薬剤耐性大腸菌と同様の耐性遺伝子が検出されることから、ヒト、家畜、環境における薬剤耐性の循環を考える際には、引き続き野生動物の動態にも注意する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Tamamura-Andoh Y, Tanaka N, Sato K, Hashiguchi Y, Arai N, Watanabe-Yanai A, Akiba M, Kusumoto M. A survey of the antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from wild sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2021, 83(5) doi: 10.1292/jvms.21-0005.

##### 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

表 1. 薬剤耐性大腸菌分離株の特性

Isolate No.	Sampling place	Sample No.	O-genotype <sup>a)</sup>	Sequence type <sup>b)</sup>	Resistance profile	Resistance gene <sup>c)</sup>	Plasmid replicon <sup>d)</sup>	MIC (μg/ml)							Virulence factor gene
								AMP	CFZ	CHL	STR	TET	SXT (TMP/SMX)		
D1133	Hokkaido	A40	Og145	ST137	AMP-CFZ-CHL-TET	<i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Inc.FIB, Inc.R	512	2	256	32	128	0.03/0.59	<i>astA</i> , <i>chuA</i> , <i>cif</i> , <i>eae</i> , <i>eflA</i> , <i>ehxA</i> , <i>espA</i> , <i>espB</i> , <i>espJ</i> , <i>etpD</i> , <i>gad</i> , <i>iha</i> , <i>iutA</i> , <i>neuC</i> , <i>nleA</i> , <i>nleB</i> , <i>nleC</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>tir</i> , <i>traT</i>	
D1205	Hokkaido	A61	UT	ST6488	TET	<i>tetA</i>	Inc.FIB	4	2	8	4	64	0.13/2.38	<i>lpfA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	
D1399	Hokkaido	B22	Og120	ST711	TET-SXT	<i>sul1</i> , <i>dftrA12</i> , <i>tetA</i> , <i>aadA2</i>	Inc.FIB, Inc. FII, Inc.II	4	2	2	16	64	>16/304	<i>cib</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	
D1400	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	8	64	>16/304		
D1401	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	16	64	>16/304		
D1402	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	16	64	>16/304		
D1403	Hokkaido	B22	Og120	NT	TET-SXT	NT	NT	4	2	4	16	64	>16/304		
D1477	Hokkaido	B57	Og142	ST154	STR-TET	<i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Inc.FIB, Inc. FII	4	2	8	32	128	0.5/9.5	<i>astA</i> , <i>gad</i> , <i>hra</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>papC</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	
D2028	Shikoku	H28-10	UT	NA	STR-TET	<i>tetA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Inc.FII	4	1	8	64	128	0.13/2.38	<i>chuA</i> , <i>gad</i> , <i>iss</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i> , <i>usp</i>	

<sup>a)</sup>UT, untypable. <sup>b)</sup>NT, not tested; NA, not assigned. <sup>c)</sup>NT, not tested. <sup>d)</sup>NT, not tested; ND, not detected. AMP, ampicillin; CFZ, cefazolin; CHL, chloramphenicol; STR, streptomycin; TET, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim.

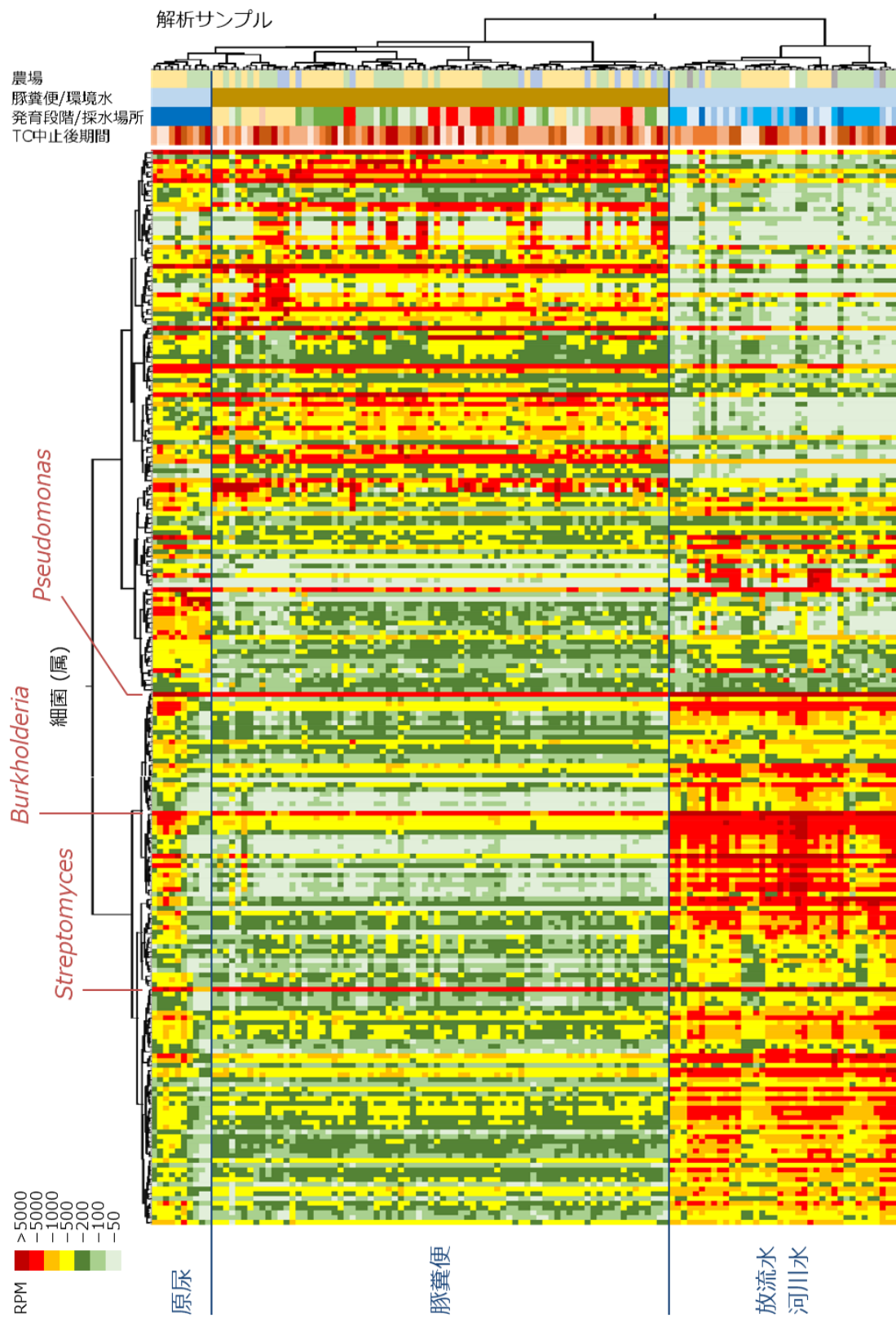


図1. メタゲノム解析サンプルにおける細菌叢の組成

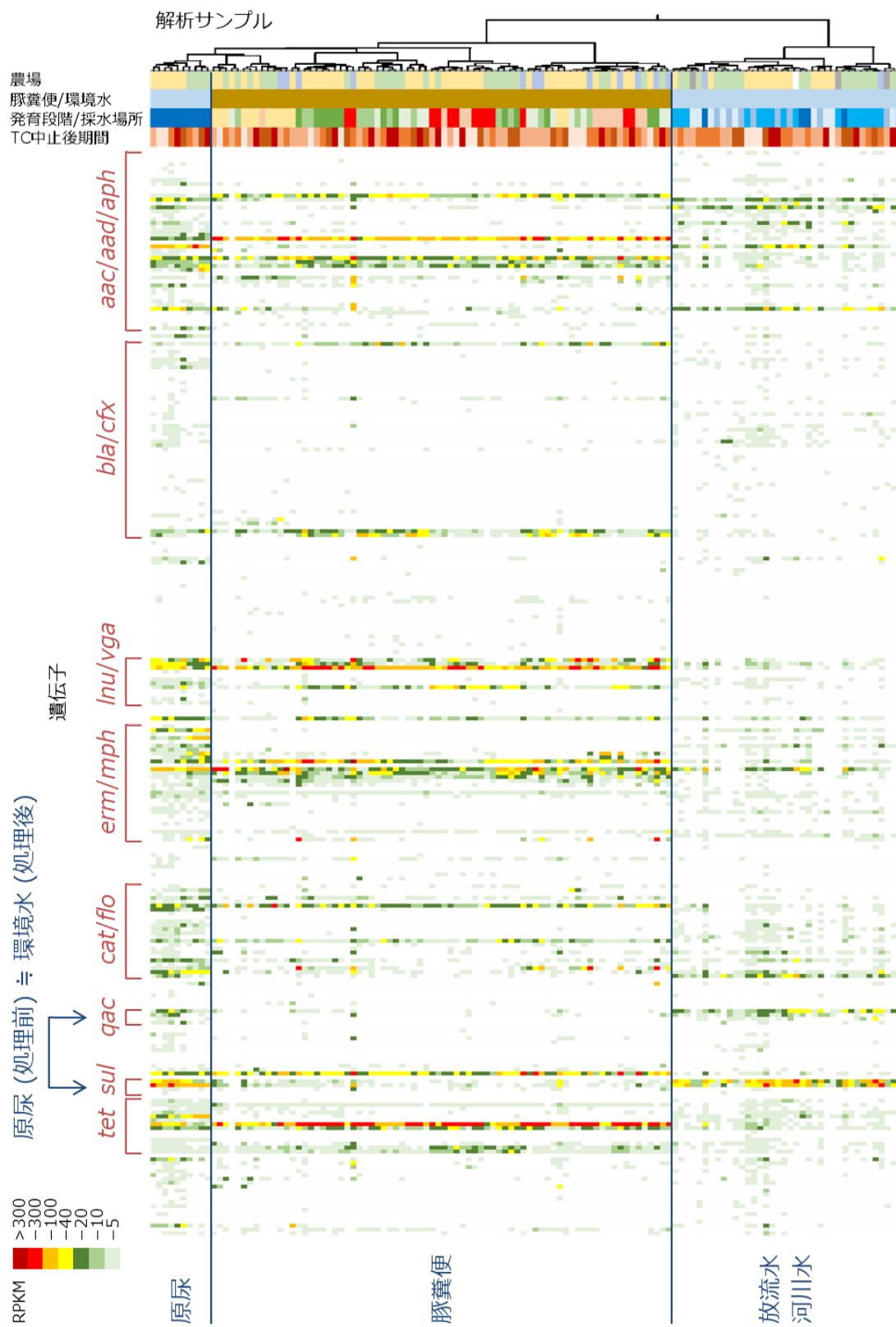


図 2. メタゲノム解析サンプルにおける耐性遺伝子の組成

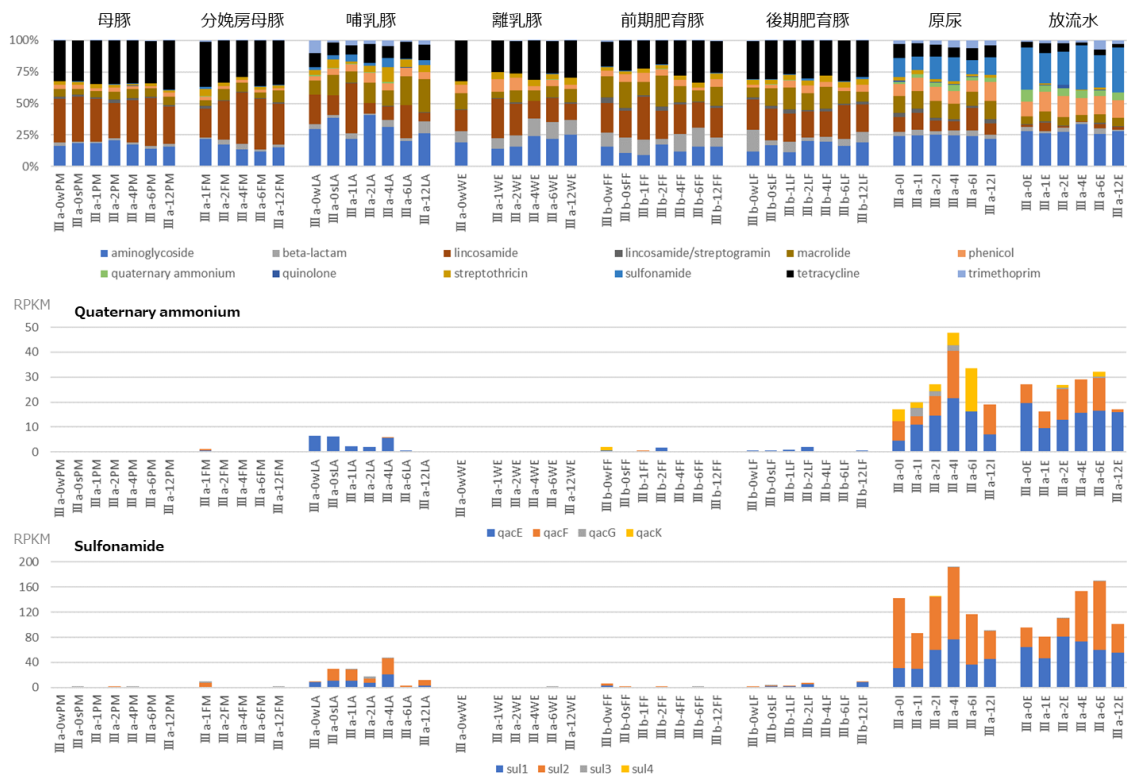


図 3. 農場Ⅲにおける耐性遺伝子の組成

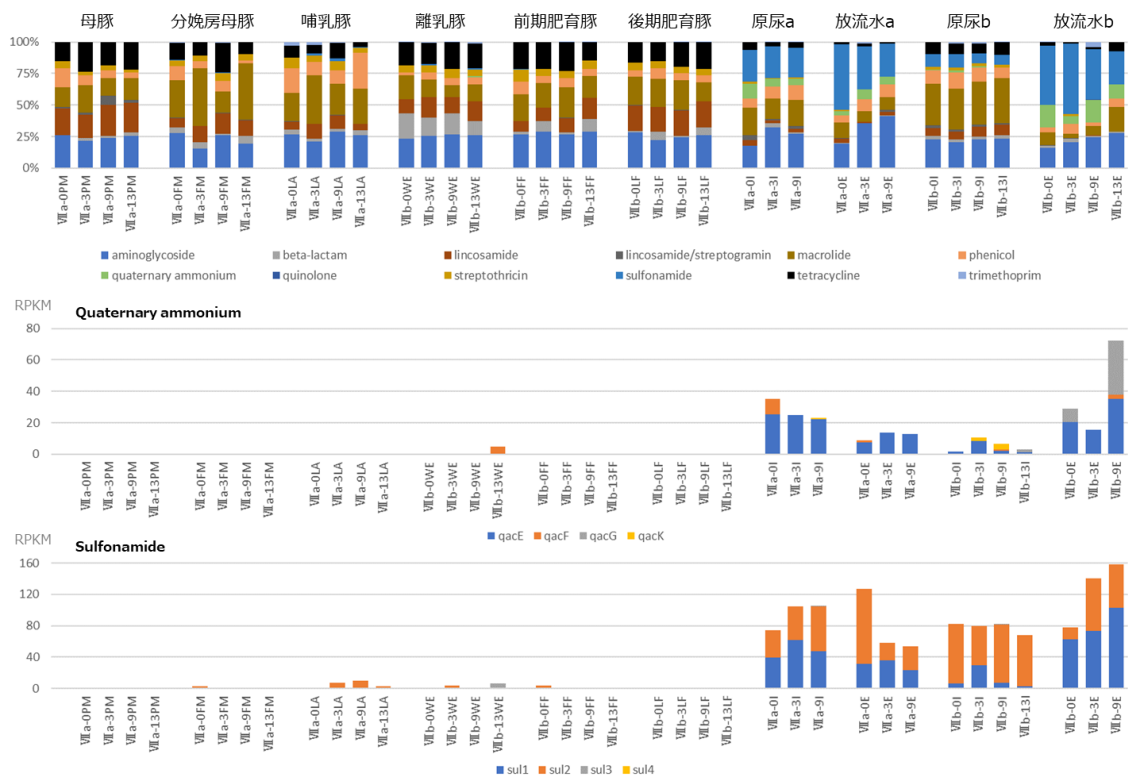


図 4. 農場VIIにおける耐性遺伝子の組成



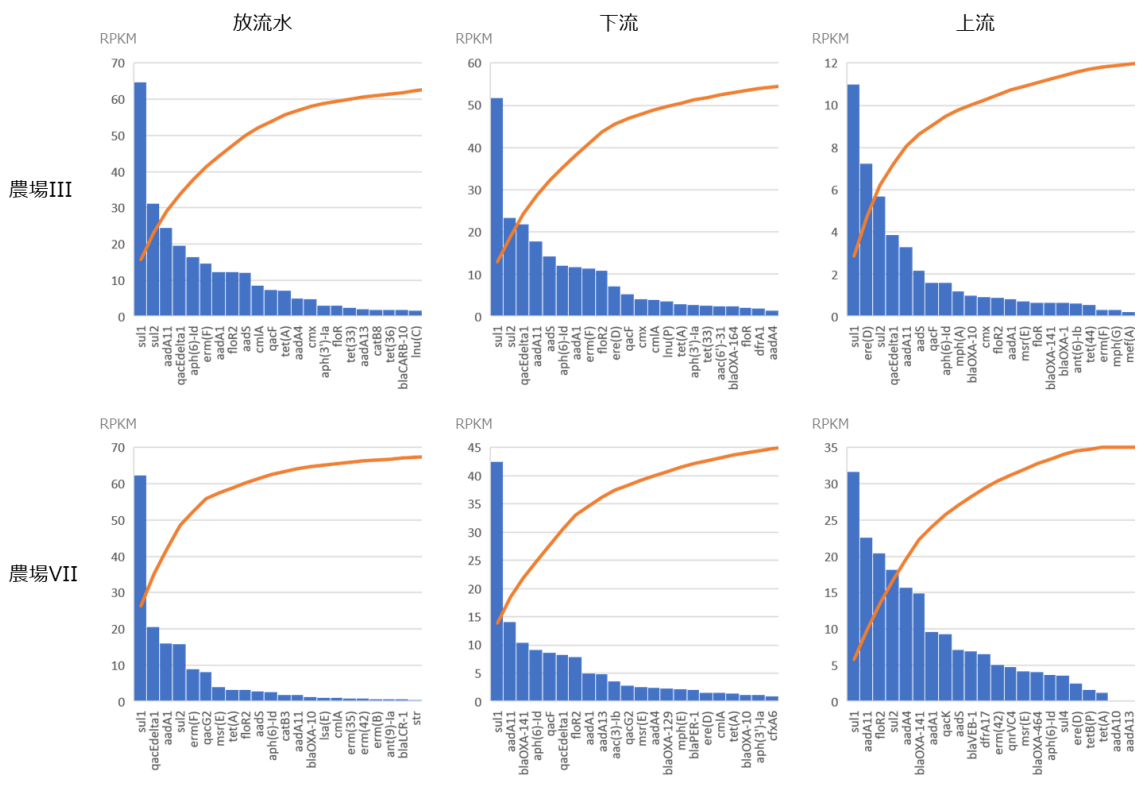


図 5. 農場IIIの接続水域における主要な耐性遺伝子

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) 国内の複数都市でスポット的に流入下水と下水処理放流水の残留抗菌薬を調べた。2) その結果について同地域の抗菌薬使用量データとの関連を調べた。3) 昨年度に引き続き病院排水の残留抗菌薬を調査し、都市下水との比較を行った。4) 下水処理過程での抗菌薬の除去について、文献レビューを行う。

その成果として、1) 国内の下水処理場 12 カ所の調査では、下水処理放流水から抗菌薬がほとんど検出されず、処理水からの抗菌薬の検出には、LC-MSでは不十分で、LC-MS/MSの精度まで要求されることが分かった。2) 同処理場に流入する都市下水からは、エリスロマイシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリムが多く処理場で検出された。これらの排出源が地域の居住者であることは自明であるが、AMR ワンヘルスプラットフォームが公表する抗菌薬使用量データとの相関は見られなかった。3) 宮城県内の総合病院における病院排水から検出される抗菌薬は、都市下水のそれと共通しており、病院での抗菌薬使用と関係づけることが難しかった。

3年間の成果をまとめると、環境水中の残留抗菌薬の検査では、その放出源となる下水処理放流水を対象に、固相抽出の後に LC-MS/MS による定量を行い、放流後の希釈率をもとに残留濃度を推定することが推奨される。今後の研究では、いくつかの抗菌薬（下水処理水から検出されやすい抗菌薬）を対象として、この推定方法の妥当性を確認することが望まれる。

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

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、①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、②実際の環境水を対象とした抗菌薬濃度の測定、そして、それらの結果にもとづいて③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。昨年度までに実施した研究成果の概要は以下の通りである。

・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での定期(月例)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分かった。

・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。環境水(都市下水)と比べると、クロタミトンやイミペネム、スルファメトキサゾールで検出率が低かった。また、検出された際の抗菌薬の濃度は、環境水と比べて変動が大きかった。

・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では、両者を明確に関連付けることは難しかった。

これらの成果を踏まえて、令和2年度には、以下の項目について研究を行う。

・国内の複数都市でスポット的に流入下水と下水処理放流水のサンプリングを行い、残留抗菌薬の分析を行う。その結果についてAMRワンヘルスプラットフォーム(<https://amr-onehealth-platform.ncgm.go.jp/home>)の抗

菌薬使用量データとの関連を調べる。

・昨年度と同じ病院で、病院排水で検出される抗菌薬と、病院での薬の使用量の関係を調べる。

・病院排水と都市下水の関係について、昨年度までのデータも用いつつ、他の抗菌薬も含めて継続して調べる。

・下水処理過程での抗菌薬の除去について、文献レビューを行う。

ここで得られたデータをもとに、抗菌薬の検出方法の確定につなげる。

## B. 研究方法

### 1. 下水処理水中の残留抗菌薬の実態調査

まず、残留抗菌薬濃度の経年変化を調べるために、昨年度と同じ山形県内の都市下水処理場からの放流水を計5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(ベンジルペニシリン、クロルテトラサイクリン、ダノフロキサシン、オキシテトラサイクリン、サルファジメトキシ、サルファメトキサゾール、サルファモノメトキシ、ノルフロキサシン、アモキシシリン、トリメトプリム、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、チアンフェニコール、クロラムフェニコール、エンロフロキサシン、リンコマイシン、チアムリン、タイロシン、メロペネム)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 点検量で簡易定量を行った。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。

次に、国内（北海道から九州までの各地域を含む）の下水処理場 12カ所で流入下水と下水処理放流水のサンプリングを行い、残留抗菌薬の分析を行った。サンプリングは 2020 年 11 月～2021 年 1 月に各 1 回行い、分析対象の抗菌薬は、ミノサイクリン、エリスロマイシン、シプロフロキサシン、アモキシシリン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、レボフロキサシン、トリメトプリム、ペニシリン G、スルファメトキサゾールの 10 種類とした。抽出方法は上記と同様に固相抽出としたが、検出には LCMS-8045（島津）を用いた。

## 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パターンを特徴づけるために、昨年に引き続き宮城県内の総合病院において病院排水を 2020 年 4 月と 7 月に 2 回ずつ採取して、10 種の抗菌薬（ミノサイクリン、エリスロマイシン、シプロフロキサシン、アモキシシリン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、レボフロキサシン、トリメトプリム、ペニシリン G、スルファメトキサゾール）の検出を行った。比較のために、病院が位置する地域の下水が集まる下水処理場において流入下水を採取して、同じ種類の抗菌薬の検出も行った。なお、この下水処理場の流入下水は 2 系統から集まっており、一方は雨水と混ざる合流式、他方は雨水が混入しない分流式となっている。

抗菌薬の分析方法は以下の通りである。

- ①病院排水と流入下水の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
- ②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 100  $\mu$  L ずつ添加
- ③吸引マニホールドを用いて OASIS HLB（Waters）上に固相抽出
- ④メタノール溶出後、窒素吹付け&加温下で乾固し、500  $\mu$  L メタノールに再溶解

④LCMS-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

「下水処理過程での抗菌薬の除去」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

山形県内の下水処理場における下水処理水（放流水）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、スルファメトキサゾール、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。これは昨年度と同様であった。一方、昨年度は時折検出されたリンコマイシンは検出されなかった。その他の種類の抗菌薬についてはすべての測定回で非検出であった。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。これも前年度の調査結果と一致していた。

次に、全国 12カ所の下水処理場で調査を行った流入下水と下水処理水（放流水）中の抗菌薬の分析結果を表 2 に示す。まず、下水処理水からは、いずれの抗菌薬もほとんど検出されなかった。東北地方の下水処理場は、前述の山形県の処理場と同一であるが、スルファメトキサゾール、トリメトプリム、エリスロマイシンは検出されず、表 1 に示す結果と一致しなかった。最終的な検出を LCMS で行ったことで、MS/MS まで実施した表 1 のデータに比べて検出感度が低下した結果と思われる。

一方で、流入水からは、エリスロマイシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリムがそれぞれ多くの処理場で検出された。抗菌薬の検出濃度について、それぞれの地域（都道府県別）における抗菌薬使用量（AMR ワンヘルスプラットフォームから入手）との関係を調べた。その結果を図 1 に示すが、4 種類の抗菌薬のいずれについても、その地域での使用量と流入水中の濃度とは相関がみられなかった。今回のデータが 1 回だ

表1 山形県内の下水処理場における下水処理水からの残留抗菌薬の検出結果

分析対象項目	5月27日	6月25日	7月29日	8月24日	9月30日
ベンジルペニシリン	<500	<500	<500	<500	<500
クロルテトラサイクリン	<300	<300	<300	<300	<300
ダノフロキサシン	<100	<100	<100	<100	<100
オキシテトラサイクリン	<40	<40	<40	<40	<40
サルファジメトキシシン	<7	<7	<7	<7	<7
サルファメトキサゾール	100	80	80	<70	100
サルファモノメトキシシン	<4	<4	<4	<4	<4
ノルフロキサシン	<60	<60	<60	<60	<60
アモキシシリン	<500	<500	<500	<500	<500
トリメトプリム	90	<70	50	50	20
シプロフロキサシン	<200	<200	<200	<200	<200
エリスロマイシン	500	400	300	500	400
チアンフェニコール	<30	<30	<30	<30	<30
クロラムフェニコール	<90	<90	<90	<90	<90
エンロフロキサシン	<50	<50	<50	<50	<50
リンコマイシン	<4	<7	<4	<6	<4
チアムリン	<2	<2	<2	<2	<2
タイロシン	<40	<40	<40	<40	<40
メロペネム	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000

注：表中の数値は各抗菌薬の検出濃度（単位：ng/L）を示すが、1点定量による一斉分析による結果であり、その精度には限界がある。

けのサンプリングによるものであったことや、簡易な定量方法を用いたこと、さらに、入手できた抗菌薬使用量のデータが5年前と古かったこともあるが、医療機関から報告されている使用量から、流入下水中の抗菌薬濃度を推定することは難しいかもしれない。

## 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結果と図2に示す。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。

病院排水で検出頻度が高かった抗菌薬は、エリスロマイシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールであった。レボフロキサシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールについては、昨年度（1年間を通じて調査を実施）も高頻度で検出されていた。これらの抗菌薬は、都市下水からも同様に高頻度で検出されており、病院排水の特長とは言えない。前年度までの調査結果でも、病院排水で都市

下水よりも明らかに高頻度（または高濃度）で検出される抗菌薬はなく、調査対象とする病院での抗菌薬使用量との比較は行わなかった。

なお、7月1回目のサンプルに関しては、都市下水（分流式）の抗菌薬濃度が合流式のそれに比べて顕著に高く、雨水の混入によって都市下水が希釈されていたのであろう。

## 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「下水処理過程での抗菌薬の除去」に関する論文5報について検討した。

Diurnal variations in the occurrence and the fate of hormones and antibiotics in activated sludge wastewater treatment in Oslo, Norway.

PubMed ID: 20156636

ノルウェーのオスロの下水処理場で、流入水のトリメトプリム、スルファメトキサゾール、テトラサイクリン、シプロフロキサシンの濃

表 2 全国 12 カ所の下水処理場における流入下水と処理水からの残留抗菌薬の検出結果

地方	都道府県	ミノサイクリン		エリスロマイシン		シプロフロキサシン		アモキシシリン		ノルフロキサシン	
		流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水
北海道	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	58	ND
東北	B	ND	ND	ND	ND	ND	466	ND	ND	202	ND
関東	C	ND	ND	70	ND	ND	ND	ND	ND	746	ND
関東	C	ND	ND	252	ND	ND	ND	ND	ND	4,710	ND
関東	D	ND	ND	123	ND	ND	ND	ND	ND	1,188	ND
関東	D	ND	ND	169	ND	ND	ND	ND	ND	141	ND
北陸	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22	ND
中部	F	ND	ND	88	ND	ND	ND	ND	ND	821	ND
近畿	G	ND	ND	144	ND	ND	ND	ND	ND	1,176	ND
近畿	G	ND	ND	149	ND	ND	ND	ND	ND	735	ND
中国	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
九州	I	ND	2	105	ND	ND	ND	ND	ND	752	ND

地方	都道府県	テトラサイクリン		レボフロキサシン		トリメトプリム		ペニシリンG		スルファメトキサゾール	
		流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水
北海道	A	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND
東北	B	ND	ND	ND	142	ND	ND	ND	ND	ND	ND
関東	C	ND	ND	3,039	ND	319	ND	ND	ND	ND	ND
関東	C	ND	ND	1,858	ND	508	ND	ND	ND	ND	ND
関東	D	ND	ND	9,131	ND	279	ND	ND	ND	ND	ND
関東	D	ND	ND	604	ND	259	ND	ND	ND	ND	ND
北陸	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
中部	F	ND	ND	1,607	ND	286	ND	ND	ND	ND	ND
近畿	G	ND	ND	1,604	ND	635	ND	ND	ND	ND	ND
近畿	G	ND	ND	671	ND	293	ND	ND	ND	ND	ND
中国	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
九州	I	ND	ND	1,200	ND	309	4	ND	ND	ND	ND

注：表中の数値は各抗菌薬の検出濃度（単位：ng/L）を示すが、1点定量による一斉分析による結果であり、その精度には限界がある。

度のダイナミクスを調べたところ、服用のタイミングとの関連が見られた。処理の過程では、抗菌薬の生物学的な除去は限定的であり、処理水中のトリメトプリム、スルファメトキサゾール、シプロフロキサシンの濃度は、流入水よりも高かった。シプロフロキサシンは、その低い除去率のために、処理水中で卓越しており、他の抗菌薬のおおよそ 10 倍量で存在していた。

Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants.

PubMed ID: 21439606

香港の 2 つの下水処理場で、7 クラス 20 種類の抗菌薬を調査した。アンピシリン、セファ

レキシン、スルファメトキサゾール、スルファジアジン、スルファメトキサゾール、クロルテトラサイクリン、バンコマイシンは活性汚泥プロセスで 52~100%が、アンピシリンとセファレキシンは消毒で 91~99%が除去されていた。

Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China.

PubMed ID: 17706267

香港と深センの 4 カ所の下水処理場において、流入水と放流水中の抗菌薬 9 種類を測定した。香港の処理場ではセファレキシンの濃度が最も高かったが、深センの処理場では検出され

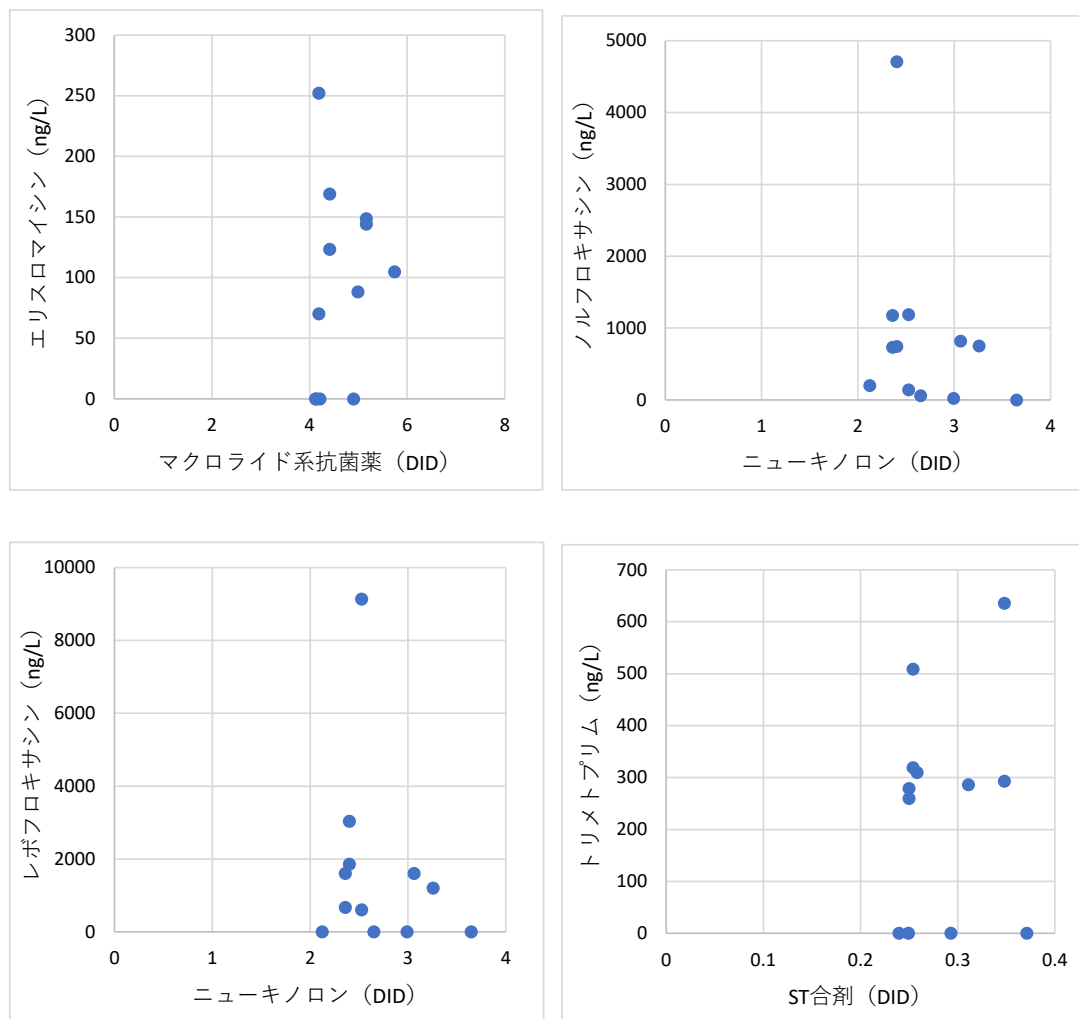


図1 都道府県別の抗菌薬使用量（2016年）と流入下水中の残留抗菌薬濃度の関係

なかった。深センの処理場の流入水では、セフトキシムが卓越していたが、香港の処理場のその濃度は低かった。これは両都市における抗菌薬の使用パターンが反映されているのであろう。処理過程では、ノルフロキサシンとテトラサイクリンの除去率が高く、エリスロマイシンの除去率は低かった。

Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes.

PubMed ID: 27585426

シンガポールの都市下水について、10種類の異なるクラスの抗菌薬を調査した。ベータラクタム、グリコペプチド、フルオロキノロン

系の抗菌薬は、生物学的な下水処理プロセスで大部分が除去されたのに対して、トリメトプリムやリンコマイシン系の抗菌薬は除去されづらいように見えた。

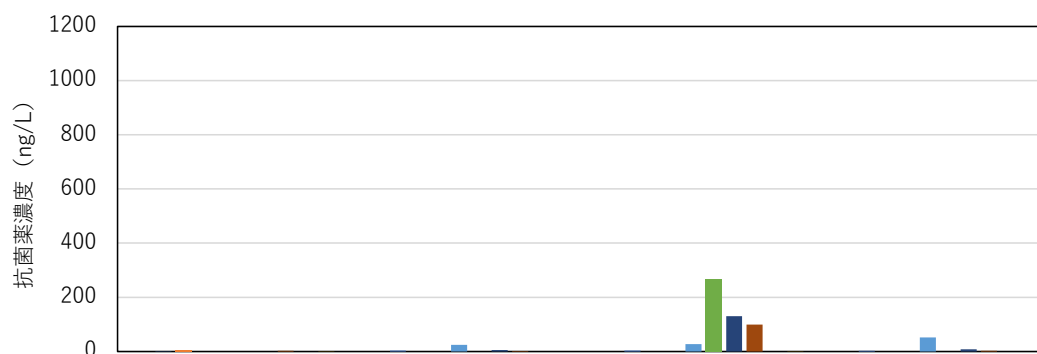
Occurrence and fate of antibiotics in a wastewater treatment plant and their biological effects on receiving waters in Guizhou.

PubMed ID: 32979719

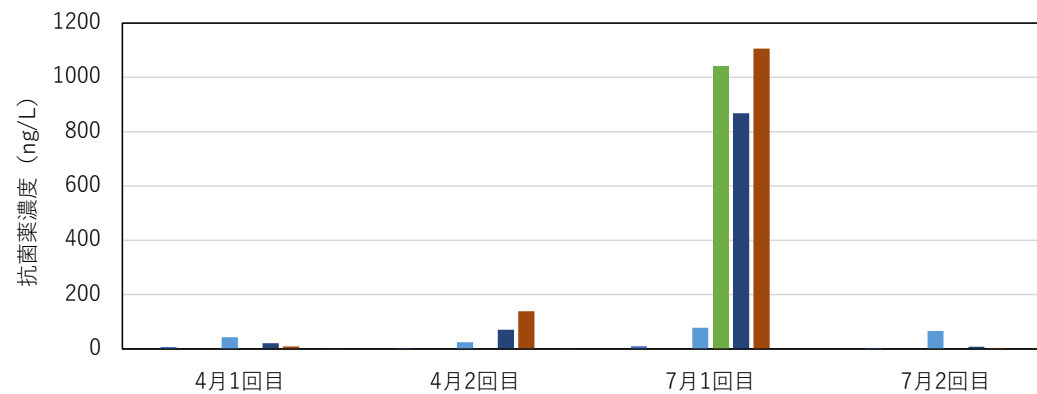
中国の貴州の下水処理場において、18種類の抗菌薬を調査した。その中でスルファメトキサゾールが最も高頻度で検出され、その濃度も最も高かった。抗菌薬の除去の主たるメカニズムは、生物学的または非生物学的な分解



(a) 病院排水



(b) 都市下水 (合流式)



(c) 都市下水 (分流式)

図 2 病院排水および都市下水からの抗菌薬の検出結果

であった。ただし、キノロンの除去は汚泥への吸着が第一の要因であった。

#### D. 考察

山形県内の下水処理場の下水処理放流水からは、昨年度に引き続き、スルファメトキサゾール、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。これらの抗菌薬につ

いては、文献レビューで調べた論文で生物学的な下水処理による除去が難しいことが指摘されており、環境中への流出が懸念される。

国内の他の下水処理場 12 カ所で同様に下水処理放流水の残留抗菌薬の分析を行ったところ、いずれの抗菌薬もほとんど検出されなかった。処理水からの抗菌薬の検出には、LC-MS では不十分で、LC-MS/MS の精度まで要



求されることが分かった。

同じ 12 カ所の処理場の流入水(未処理の都市下水)からは、エリスロマイシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリムが多くの処理場で検出された。これらの排出源は、その地域の居住者であることは自明であるが、AMR ワンヘルスプラットフォームが公表する抗菌薬使用量データとの相関は見られなかった。

宮城県内の総合病院における病院排水からは、エリスロマイシン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールが検出された。これらの抗菌薬は、都市下水からも同様に高頻度で検出されており、病院での使用と関係づけることが難しかった。

## E. 結論

昨年度までの成果もあわせて本研究の結論を整理する。環境水中で最も抗菌薬濃度が高いと思われる都市下水の処理水からの抗菌薬の検出では、固相抽出の後に LC-MS/MS による定量が有効であることが確認できた。ただし、放流後の河川環境においては、この処理水が河川水によって希釈されるために、多くの抗菌薬は検出できない濃度レベルとなるだろう。

代替の方策として、地域での抗菌薬使用量から都市下水中の抗菌薬の濃度を推定し、さらに、下水処理による除去率や河川による希釈率を考慮して、河川水中の濃度を計算する方法も検討した。都市下水からは幾つかの抗菌薬が高頻度で検出されたものの、その使用量との相関が見られず、この方策の限界が示された。

以上より、環境水中の残留抗菌薬の検査では、その放出源となる下水処理放流水を対象に、固相抽出の後に LC-MS/MS による定量を行い、放流後の希釈率をもとに残留濃度を推定することが推奨される。今後の研究では、いくつかの抗菌薬(下水処理水から検出されやすい抗菌薬)を対象として、この推定方法の妥当性を確認することが望まれる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Honda R, Tachi C, Noguchi M, Yamamoto-Ikemoto R, Watanabe T. Fate and seasonal change of *Escherichia coli* resistant to different antibiotic classes at each stage of conventional activated sludge process. *J Water Health*. 2020;18(6):879-889.
2. Nishiyama M, Praise S, Tsurumaki K, Baba H, Kanamori H, Watanabe T. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria ESKAPE among healthy people estimated by monitoring of municipal wastewater. *Antibiotics*. 2021;10(5):495.

### その他発表

1. 渡部徹, 西山正晃, 森祐哉, 渋谷理央, 金森肇, 馬場啓聡, 都市下水と病院排水のモニタリングによる薬剤耐性菌のまん延調査, 第 23 回日本水環境学会シンポジウム, 令和 2 年 9 月 9~10 日, オンライン開催
2. 渡部徹, 病院排水中の耐性菌のモニタリングー都市下水との比較で分かることー, 第 69 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 67 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 令和 2 年 10 月 21~23 日, オンライン開催【招待講演】
3. 森祐哉, 西山正晃, 渡部徹, 日本とタイの都市下水から分離されたコリスチン耐性菌の薬剤感受性, 令和 2 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 令和 3 年 3 月 6 日, オンライン開催
4. 甲高綾乃, 西山正晃, 渡部徹, 都市下水から単離したバンコマイシン耐性腸球菌の薬剤感受性と遺伝子型別, 令和 2 年度土木学会東北支部技術研究発表会, 令和 3 年 3 月 6 日, オンライン開催
5. 西山正晃, 馬場啓聡, 金森肇, 渡部徹, 都市下水と病院排水中の腸内細菌科細菌

が保有する ESBL 産生遺伝子の特徴，令和 2 年度土木学会東北支部技術研究発表会，令和 3 年 3 月 6 日，オンライン開催

6. 森祐哉，西山正晃，渡部徹，日本とタイの都市下水からのコリスチン耐性菌の検出，第 55 回日本水環境学会年会，令和 3 年 3 月 10～12 日，オンライン開催
7. 西山正晃，馬場啓聡，金森肇，渡部徹，都市下水と病院排水から単離したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学調査，第 55 回日本水環境学会年会，令和 3 年 3 月 10～12 日，オンライン開催

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

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
Kanamori H, Baba H, Weber DJ	Rethinking One Health approach in the challenging era of COVID-19 pandemic and natural disasters	Infect Ecol Epidemiol	11(1)	1852681	2020
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	12	2243-2249	2019
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	11(4)	589-597	2019

Tamamura-Andoh Y, Tanaka N, Sato K, Hashiguchi Y, Arai N, Watanabe-Yanai A, Akiba M, Kusumoto M	A survey of the antimicrobial resistance in <i>Escherichia coli</i> isolated from wild sika deer ( <i>Cervus nippon</i> ) in Japan	J Vet Med Sci	83(5)	754-758	2021
Honda R, Tachi C, Noguchi M, Yamamoto-Ikemoto R, Watanabe T	Fate and seasonal change of <i>Escherichia coli</i> resistant to different antibiotic classes at each stage of conventional activated sludge process	J Water Health	18(6)	879-889	2020
Nishiyama M, Praise S, Tsurumaki K, Baba H, Kanamori H, Watanabe T	Prevalence of antibiotic-resistant bacteria ESKAPE among healthy people estimated by monitoring of municipal wastewater	Antibiotics	10(5)	495	2021

厚生労働大臣 殿

機関名 東北大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 大野 英男 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科・講師  
(氏名・フリガナ) 金森 肇 (カナモリ ハジメ)

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: 研究実施の際の留意点を示した )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 4月 22日

厚生労働大臣  
-(国立医薬品食品衛生研究所長)- 殿  
-(国立保健医療科学院長)-

機関名 国立研究開発法人  
農業・食品産業技術総合研究機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 久間 和生

次の職員の令和 2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 腸管病原菌ユニット長  
(氏名・フリガナ) 楠本 正博 (クスマト マサヒロ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 3年 4月 9日

厚生労働大臣 殿

機関名 大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 朝野 和典

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 衛生化学部生活環境課・課長  
(氏名・フリガナ) 山口 進康 (ヤマグチ ノブヤス)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 3年 4月 30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人山形大学  
所属研究機関長 職名 学長  
氏名 玉手 英利

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 農学部・教授  
(氏名・フリガナ) 渡部 徹 (ワタナベ トオル)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部・職名) 病原体ゲノム解析研究センター・センター長  
(氏名・フリガナ) 黒田 誠 (クロダ マコト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口チェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。