

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 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金森 肇

令和 6（2024）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の確立のための研究-----	1
金森 肇	

II. 分担研究報告

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価-----	9
金森 肇	
2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー-----	30
松永 展明	
3. 環境微生物ゲノム情報の取得-----	37
黒田 誠	
4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離-----	42
山口 進康	
5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価-----	48
楠本 正博	
6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価-----	53
渡部 徹	
7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響-----	58
東 剛志	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	66
--------------------------	----

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 准教授

研究要旨

国内外の河川・下水等の環境から薬剤耐性因子が検出され、環境中の薬剤耐性への関心が高まっている。環境水中の薬剤耐性がヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はなく、環境水中の薬剤耐性や残留抗菌薬のサーベイランス手法は確立されていない。環境水における薬剤耐性の調査法を確立し、日本の環境水中の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の実態調査を実施することで、環境水の薬剤耐性リスクを評価する必要がある。令和5年度の研究課題である 1)環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価、2)薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー、3)環境微生物ゲノム情報の取得、4)大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離、5)環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価、6)残留抗菌薬の調査方法の確立と評価、7)環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響に関する研究を継続した。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。下水処理場放流水の全国的なサーベイランスの継続、地域におけるメタゲノム解析および培養法による環境水中の薬剤耐性モニタリングは、薬剤耐性因子の全体像を理解し、薬剤耐性の実態把握に必要と考えられた。環境水の抗菌薬の測定法と抗菌薬濃度の推計法は環境水中の抗菌薬の調査方法を確立するための基礎データを提供した。本研究班の研究結果および文献レビューをもとに、日本における環境水中の薬剤耐性および抗菌薬の実態調査を継続し、薬剤耐性ワンヘルスの観点から薬剤耐性対策を推進していくことが重要である。

研究分担者

松永 展明	国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンター 臨床疫学室長
黒田 誠	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター センター長
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
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 人獣共通感染症研究領域 腸管病原菌グループ グループ長
渡部 徹	山形大学 農学部 教授
東 剛志	大阪医科薬科大学 大学院薬学研究科 助教

A. 研究目的

国内外の河川・下水等の環境から薬剤耐性因子が検出され、薬剤耐性ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性対策への関心が高まっている。環境水中の薬剤耐性がヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はなく、環境水中の薬剤耐性や残留抗菌薬のサーベイランス手法は確立されていない。環境水における薬剤耐性の調査法を確立し、日本の環境水

中の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の実態調査を実施することで、環境水の薬剤耐性リスクを評価する必要がある。

令和5年度においては、環境水中の薬剤耐性および抗菌薬の標準的な調査法を確立し、本邦の環境 AMR に関する動向調査を進めていく。本研究班では、1) 環境中の薬剤耐性菌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、文献レビューを実施する。2) 環境水の薬剤耐

性を評価するための方法を確立する。3) サーベイランスを継続し、本邦における環境水の薬剤耐性菌及び抗菌薬の実態を調査する。4) 環境中の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ワンヘルス・アプローチの完成を図る。5) 本研究結果を統合し、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ついてリスクアセスメントを行う。

B. 研究方法

令和 5 年度において、環境中の薬剤耐性及び抗菌薬の調査法の確立に向けた研究を行い、日本における環境水の薬剤耐性の実態調査を実施した。また、環境中の薬剤耐性がヒトに与える影響を検討するため、文献レビューとリスクアセスメントを行った（図 1）。

本研究班における研究代表者及び研究分担者は、各研究課題である 1) 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価（金森）、2) 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー（松永）、3) 環境微生物ゲノム情報の取得（黒田）、4) 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離（山口）、5) 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価（楠本）、6) 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価（渡部）、7) 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響（東）を担当した。研究方法と結果の詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

（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、環境由来のサンプルを解析対象とした。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、セキュリティ対策を実施し、データを公表する際に個別の施設名が特定できないように配慮した。

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

病院・市中下水からカルバペネム耐性菌を検出した。また、成人患者の病院下水の薬剤耐性遺伝子についてメタゲノム法及びマルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法 (xHYB) による評価を行い、薬剤耐性菌検出患者数との比較検討を行った。さらに、選択培地を用いて小児患者の病院下水から薬剤耐性菌の検出を試みた。

2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー

一般環境由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響に関する文献データベースを構築し、環境由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響について文献の情報収集および評価を行った。国内外の文献情報をもとにレビューを実施した。環境・ヒト・動物由来の薬剤耐性及び残留抗菌薬に関する本研究成果を解釈し、リスクアセスメントを実施した。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

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方法を検討した。解読リードを MePIC2 メタゲノム解析ツールで生物種を分類と検出数を算出し、サンプル毎の多様性を MEGAN ツールで評価した。RPKM (Reads Per Kilobase of gene per Million mapped reads) 法を採用して相対的な ARG 濃度を算出し、検体間の比較解析を実施した。

4. 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を行った。また、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て、国内各地の地方衛生研究所（地衛

研)に研究協力を依頼し、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を実施した。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

養豚場の原尿槽から収集した水試料より昨年度に分離した四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌について、四級アンモニウム耐性遺伝子(*qac*)およびサルファ剤耐性遺伝子(*sul*)の両方を保有する菌株群から代表株を選抜した。選抜株について、S1 スクレアーゼを用いたパルスフィールドゲル電気泳動(S1-PFGE)を行い、*qacE*および*sul1*をそれぞれプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により、両遺伝子の局在を確認した。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

(1) 残留抗菌薬検出手法が実河川での調査に適用可能か検討し、河川水中の残留抗菌薬の検出頻度や濃度に対する都市下水や畜産排水の影響を調べるための現地調査を実施した。山形県内の都市下水処理場からの放流水を受容する河川の3地点から河川水を採取した。採取した水試料中の10種類の抗菌薬について、固相抽出法を用いた前処理の後、高速クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)計で検出し、さらに簡易定量した。(2) 河川底質に蓄積している抗菌薬の存在にも着目し、(1)と同じ3地点から底質を採取し、その間隙水中の抗菌薬濃度を(1)と同じ手法で検出と簡易定量を行った。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

下水処理場の流入水を用いた環境水中の残留抗菌薬のハイスループット測定解析法を検討した。また、手作業によるマニュアル測定系での環境水中の残留抗菌薬の測定、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定条件を検討した。

C. 研究結果

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

(1) 病院・市中下水由来のカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 21 株およびカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌 16 株のゲノム解析を行った。

(2) xHYB AMR panel を用いて病院排水の薬剤耐性遺伝子を網羅的に探索し、研究分担者・黒田誠と連携し、従来のメタゲノム分析結果と比較検討した。xHYB によって検出された ARG の平均 RPKM 値は、mDNA-seq と比較し著明に高かった。

(3) 小児患者の病院下水から ESBL 産生腸内細菌目細菌 47 株を検出した。

2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー

(1) 海外渡航による ESBL 伝播リスクの Systematic Review を行い、アジアとアフリカ渡航がリスクであることを明らかにした。

また、ESBL 血流感染症に対するセファマイシン治療とカルバペネム治療の予後については、有意差を認めなかった(オッズ比 [OR] 1.87; 95%信頼区間 [CI] 0.98-3.56, p=0.10)。

(2) 環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスクの Scoping Review を行い、環境水からヒトへの直接リスクを明らかにした。

(3) 下水処理場放流水のメタゲノム解析と抗菌薬使用量などの関係性を、相関プロットやクラスタリング解析にて検討し、リスク評価を行った。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

(1) 2018 年夏から 2023 年夏まで年 2 回の計画で、44 自治体の水再生センター処理放流水をメタゲノム解析し(計 515 サンプル)、薬剤耐性遺伝子の年次・季節変動を定量的に評価した。

(2) 2020 年冬以降から新型コロナウイルス発生の影響と推定される ARG の増減が確認された。サルファ剤耐性遺伝子が 2020 年冬ま

では増加傾向であったところ、2020 年夏で顕著な減少を示し、2022 年夏までの 2 年間は低い水準を維持していた。マクロライド耐性遺伝子は 2020 年冬に減少傾向を示したが、2022 年冬では新型コロナウイルス発生以前の水準にまで増加した。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

- (1) 水環境中の耐性菌培養法の標準化に向けて、培養法を改良し、従来法との比較検討を行い、効率的に分離培養ができることを確認した。各種 β ラクターマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌目細菌を分離した。
- (2) 国内の全地方衛生研究所に対して「大都市圏の環境水調査」に関する研究協力を依頼し、計 42 機関との連携を構築した。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

- (1) 養豚場では原尿槽（豚の排泄物と農場の消毒液が流入し、処理開始まで保管する場所）において消毒剤（特に四級アンモニウムおよびサルファ剤）の耐性遺伝子が増加していることを見出した。
- (2) 原尿槽から分離した四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌（各菌種代表株）の多くで染色体上に耐性遺伝子が認められた。*Pseudomonas caeni* と *Brucella grignoneensis* では類似サイズのプラスミドに耐性遺伝子が局在したが、耐性遺伝子の大腸菌への伝達を確認できなかった。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

- (1) 昨年度まで河川水に対して適用可能性を確認した残留抗菌薬検出手法を用いて、河川水とともに河川底質に含まれる抗菌薬のデータを得た。
- (2) (1)のデータをもとに、河川水中と底質中の残留抗菌薬の関連や、両者に対する都市下水や畜産排水の影響、そして、同地点から分離された大腸菌の薬剤耐性との関わりについて検討を行った。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

- (1) 都市圏の河川と下水処理場を対象に、抗菌薬の実態調査を行った。調査を継続して、知見の収集に努めた。
- (2) 環境中に残留する抗菌薬濃度の推定方法について、調査方法の標準化に向けたハイスループット解析についての評価検討を試みた。手動によるマニュアル測定をもとに、自動分注装置を用いたハイスループット測定系の各種測定条件、LC-MS/MS 測定時における最終溶媒の溶媒組成における各抗菌薬のピーク強度の影響について検討を行った。

D. 考察

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

市中下水や、大学病院や小児病院における臨床と病院下水の ESBL-E や CPE 等臨床的に重要な薬剤耐性菌のゲノム解析を実施した。また、xHYB による病院排水中の ARG のモニタリングは、従来の mDNA-seq と比較し、*bla*_{CTX-M} や *bla*_{IMP} 等の感染対策上重要な ARG の検出に有用と考えられた。下水中の薬剤耐性の調査法を確立し、下水中の AMR モニタリングの実施により、市中や臨床における AMR の伝播拡散の状況を理解し、下水中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスクを明らかにする必要がある。

2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー

海外渡航による ESBL 伝播リスクについては、アジアへの渡航とアフリカへの渡航がリスク因子であり、海外渡航の際に薬剤耐性菌を持ち込まない注意喚起を行う上で、有用な文献データと考えられた。薬剤耐性菌の環境水からヒトへの感染を示すエビデンスとしては、疫学的リスク評価の分析が最も多かった。ESBL に対するセファマイシン系抗菌薬の有効性については、全体でセファマイシンがカ

ルバベネムに劣らない結果を認めたことは、薬剤耐性菌感染症の治療選択が増える観点から重要と考えられた。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

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データを提供している。下水処理場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が、汚染リスクに係る実態の報告が増えつつある。本邦でも定量的な環境調査をもってデータ収集し、環境負荷とそのリスクについて適正に評価できるよう体制を整備していく必要がある。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

フィルターを用いて前培養後、培養する方法がより効率的に目的とする菌を検出可能であった。分離培養で得られた株は CRE 株よりも ESBL 株が多く、医療機関での検出状況と一致していたことから、培養法を用いた薬剤耐性菌の分離は、地域の状況を把握するための指標となりうる。また、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おいて、計 42 機関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た。これらのデータ解析により、日本の環境中の薬剤耐性がヒトおよび動物へ与えるリスクの評価に寄与しうる。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

原尿槽において四級アンモニウム耐性遺伝子 *qac* やサルファ剤耐性遺伝子 *sul* が Proteobacteria 門や Actinobacteria 門の細菌に偏在していた。今年度の検討の結果、原尿槽由来株のうち *qac* および *sul* 陽性プラスミドを保有する菌株はブルセラ属 (Proteobacteria 門) の 2 株のみであり、両株において *qac* および *sul* 陽性プラスミドの

大腸菌への伝達性は確認できなかった。農場での消毒剤の使用などにより環境 (養豚場の原尿槽) で選択された *qac* や *sul* を保有する耐性菌が農場内での循環を介して動物 (豚) に影響を与えるリスクは低いと考えられた。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

河川水中の残留抗菌薬に関する調査結果は、過去 2 年間と同様であった。すなわち、下水処理場の放流口付近の河川では、放流水の影響を強く受けるために、放流水で安定的に検出される抗菌薬が検出された。一方、放流口付近以外では、抗菌薬が検出されることは稀であり、大腸菌の薬剤耐性との関連は明確でなかった。抗菌薬が長期に渡って蓄積される可能性がある底質からの残留抗菌薬の検出も試みたが、河川水よりもさらに抗菌薬の検出が困難であった。今後は、底質と吸着して存在する抗菌薬についても検出できるよう、前処理方法の高度化が必要と考えられる。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

国環境水中の残留抗菌薬濃度の評価測定について、迅速・大量解析を可能とする自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系が薬剤耐性菌と残留抗菌薬をあわせた全国規模でのモニタリング調査を検討する上で有効な手法となりうる可能性を示唆された。

E. 結論

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。下水処理場放流水の全国的なサーベイランスの継続、地域におけるメタゲノム解析および培養法による環境水中の薬剤耐性モニタリングは、薬剤耐性因子の全体像を理解し、薬剤耐性の実態把握に必要と考えられた。環境水の抗菌薬の測定法と抗菌薬濃度の推計法は環境水中の抗菌薬の調査方法を確立するための基礎データを提供した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 金森肇. シンポジウム 2「AMR 対策と新アクションプラン 2023-2027」AMR 対策とワンヘルス. 第 72 回日本感染症学会 東日本地方会学術集会 第 70 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会, 東京, 2023 年 10 月
2. 金森肇. 薬剤耐性ワンヘルス：環境からのアプローチ. 第 26 回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 横浜, 2023 年 9 月
3. 馬場啓聡, 黒田誠, 関塚剛史, 金森肇. マルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法による病院排水中の薬剤耐性遺伝子の検出. 第 38 回日本環境感染学会・学術集会, 横浜, 2023 年 7 月
4. Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H. Deep detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture method. IDWEEK 2023, October 11-15, 2023, Boston, MA, US.

論文発表

1. Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H. Highly sensitive detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture target enrichment. mSphere. 2023 Aug 24;8:e0010023.
2. Sekizuka T, Yamaguchi N, Kanamori H, Kuroda M. Multiplex Hybrid Capture Improves the Deep Detection of Antimicrobial Resistance Genes from Wastewater Treatment Plant Effluents to Assess Environmental Issues. Microb Drug Resist. 2023;29:510-515.

3. Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M. Performance of a pilot-scale continuous flow ozone-cased hospital wastewater treatment system. Antibiotics. 2023;12:2023.
4. Azuma T, Usui M, Hayashi T. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater by ozone-based advanced water treatment processes. Sci Total Environ. 2024;906:167432.
5. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 獣疫学雑誌. 2023;27:9-16.
6. 東 剛志, 林 哲也. 薬剤耐性とワンヘルスーオゾン処理の有効性についてー. 相愛大学研究論集. 2023;39:17-26.
7. 東 剛志. 大阪の水環境 淀川中下流・支川における抗菌薬および薬剤耐性菌による環境問題への取り組み. 水環境学会誌. 2023;46:240-244.

その他発表

1. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2023. (4)環境.
2. 安達史恵, 山口進康, 河原隆二. 環境水から分離されたカルバペネマーゼ産生菌の遺伝学的特徴. 第 58 日本水環境学会, 2024 年 3 月
3. 東 剛志, 関塚剛史, 黒田 誠, 片桐美和, 渡邊 学. 医療機関に由来する排水処理へのオゾンの応用. オゾンの利活用事例集 追補版. 日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会. 2023;36-40.
4. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 第 61 回獣疫学会学術集会 シンポジウム「薬剤耐性問題：ヒト・動物・環境のインターフェイス」, 日本獣医畜産大学, 2023 年 3 月 (招待講演)
5. 東 剛志, 臼井 優, 林 哲也. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 32 回年次研究講演会, 東京都立大学, 2023 年 6 月 (招待講演)

6. 東 剛志. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 40 回オゾン技術に関する講習会・見学会, 仙台, 2023 年 12 月 (招待講演)
 7. Saito S, Watanabe T, Nishiyama M. In vitro experiment to evaluate persistence of coliform bacteria producing extended-spectrum β -lactamase and conservation of relevant genes. Water and Environment Technology Conference 2023 (WET2023), Online, July 8-9, 2023.
 8. Nishiyama M, Mori M, Yoneda I, Watanabe T. Distribution and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a river basin in Yamagata prefecture, Japan. 9th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition 2023, Kaohsiung, Taiwan, October 22-26, 2023.
 9. 西山正晃, 劔持ひろ, 森祐哉, 米田一路, 渡部徹. 東北地方の一級河川から単離した ESBL 産生大腸菌の時空間分布. 第 26 回日本水環境学会シンポジウム, 大阪, 2023 年 9 月
 10. 齋藤静香, 渡部徹, 西山正晃. In vitro 実験における ESBL 産生腸内細菌科細菌の生残性と耐性遺伝子の保存性の評価. 日本水処理生物学会第 59 回大会 (山形大会), 鶴岡, 2023 年 11 月
 11. 齋藤静香, 渡部徹, 西山正晃. In vitro 実験による ESBL 産生腸内細菌科細菌の生残性と耐性遺伝子の保存性の評価. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 2024 年 3 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- なし

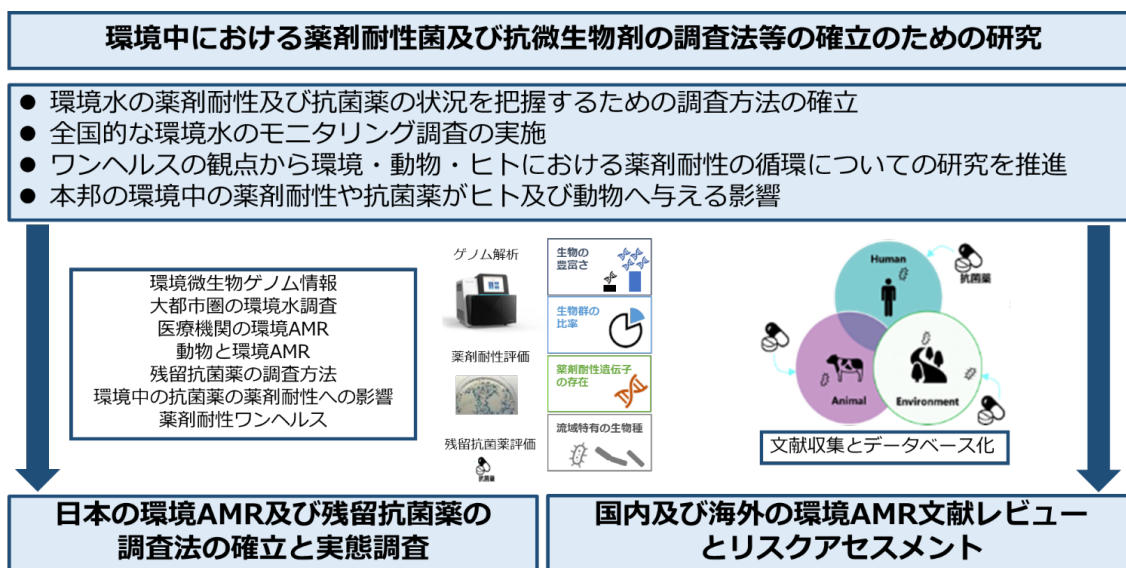


図1 環境中における薬剤耐性菌および抗微生物剤の調査法等の確立のための研究

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 「環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価」

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・准教授

研究要旨

薬剤耐性ワンヘルスの観点から下水中の薬剤耐性の実態調査を行い、ヒトの薬剤耐性への影響を理解する必要がある。令和 5 年度の本分担研究では、病院・市中下水から分離されたカルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* 属菌のゲノム解析を継続し、遺伝的多様性、潜在的な伝播メカニズムを明らかにした。市中排水や、大学病院や小児病院における臨床と病院下水の ESBL-E や CPE 等臨床的に重要な薬剤耐性菌のゲノム解析を実施した。また、マルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法による病院排水中の薬剤耐性遺伝子のモニタリングは、従来のメタゲノム法と比較し、*bla*_{CTX-M} や *bla*_{IMP} 等の感染対策上重要な薬剤耐性遺伝子の検出に有用と考えられた。日本の環境中の薬剤耐性に関するエビデンスが不十分なことから、下水中の薬剤耐性の調査法を確立し、下水中の薬剤耐性のヒト感染症のリスクを明らかにする必要がある。

研究協力者：

馬場 啓聡	東北大学病院 総合感染症科 助教
渡部 徹	山形大学 農学部 教授
西山 正晃	山形大学 農学部 准教授
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

A. 研究目的

病院における薬剤耐性対策は喫緊の課題であると同時に、排出される病院下水は環境中の薬剤耐性菌のリザーバーとなり、環境への薬剤耐性の拡散が懸念される。医療施設で問題となる薬剤耐性菌は成人と小児患者で異なっているが、日本の病院下水中の薬剤耐性調査は十分に行われていない。環境中の薬剤耐性の実態を把握するため、成人と小児患者由来の病院下水の薬剤耐性調査を実施していく必要がある。

本分担研究では、成人患者および病院下水から分離されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (*carbapenemase-producing Enterobacterales*; CPE) のゲノム解析を継続した。成人患者の病院下水中の薬剤耐性遺伝子 (ARG) について、メタゲノム法

(mDNA-seq) 及びマルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法 (xHYB) を用いた薬剤耐性の解析を継続した。また、小児患者および病院下水から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生腸内細菌目細菌 (*extended spectrum β lactamase-producing Enterobacterales*; ESBL-E) について調査した。さらに、日本の下水中の薬剤耐性の調査方法に関する文献レビューを実施した。令和 5 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マーゼ産生腸内細菌目細菌のゲノム解析
- 2) 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性グラム陰性桿菌のゲノム解析
- 3) 成人患者の病院下水における xHYB を用いた網羅的 ARG 検出
- 4) 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

B. 研究方法

1. 病院・市中下水由来のカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌のゲノム解析

次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を用いた病院・市中下水の CPE 分離株のうち、最も多く検出された *Enterobacter* 属菌のゲノム解析を AREScloud(Ares Genetics, Vienna, Austria)で実施した。

2. 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性グラム陰性桿菌のゲノム解析

大学病院の排水及び同地域の下水処理場流入水を隔月で採水し、サンプルを選択培地 CHROMagar mSuperCARBA 上で培養した。培地上に得られたコロニーについて MALDI-TOF MS で菌種同定を行い、検出された *Pseudomonas aeruginosa*、*Acinetobacter baumannii* complex 及び *Aeromonas hydrophila/caviae* に対し、PCR 法によるカルバペネマーゼ遺伝子 *blaIMP*、*blaGES*、*blaNDM*、*blaKPC*、*blaVIM*、*blaOXA-48* の検出を行った。カルバペネマーゼ陽性株について、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) で全ゲノム配列を決定し、Ridom SeqSphere+ソフトウェア (Ridom GmbH, Münster, Germany) を用いて、塩基配列情報に基づく菌種同定・薬剤耐性遺伝子検出を行った (Jünemann)。

3. 成人患者の病院下水における xHYB を用いた網羅的 ARG 検出

大学病院排水から、データベース上の ARG を対象に mDNA-seq (Strange) 及び xHYB (Beaudry) による検出を行い、それぞれの Reads per kilobase of gene per million (RPKM) を算出した。同期間の排水中の *blaCTX-M*、*blaIMP*、*mecA*、*vanA* 及び *vanB* の RPKM 値の月別推移と、ESBL 及びメタロβラクタマーゼ (MBL) 産生菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 及びバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 検出患者数

の月別推移を比較した。

4. 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

2023 年 6 月～12 月の 6 ヶ月間に、こども病院の 3 棟の病棟それぞれに由来する排水を月一回ずつ採水し、サンプルを薬剤耐性菌選択培地 (CHROMagar™ ESBL・mSuperCARBA・MDRP・MDRA・VRE) 上で培養した (Nishiyama)。培地上に得られたコロニーのうち、色や形状の異なるものを最大 6 個選択し、MALDI-TOF MS による菌種同定を行った。また、同期間にこども病院で臨床分離された ESBL 産生腸内細菌目細菌 (ESBL-E)、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) 及びバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を収集した。

検出された ESBL-E 及び CRE に対し、Cica genus® ESBL genotype detection kit 2 及び Carbapenemase genotype detection kit 2 (Kanto Chemical CO., Inc., Tokyo, Japan) を用いて、PCR による *blaCTX-M-1*、*blaCTX-M-2*、*blaCTX-M-8*、*blaCTX-M-9*、*blaCTX-M-25*、*blaCTX-M-64*、*blaTEM*、*blaSHV*、*blaIMP-1*、*blaIMP-6*、*blaKPC*、*blaNDM*、*blaVIM*、*blaOXA-48* 及び *blaGES* の各薬剤耐性遺伝子のスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究内容に関して東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で審査を受け、承認された。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マーゼ産生腸内細菌目細菌のゲノム解析

カルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* 属菌 21 株は、*E. asburiae* (n=2), *E. cloacae* (n=5), *E. hormaechei* (n=1), *E. kobei* (n=4), *E. ludwigii* (n=1), *E. roggenkampii* (n=2) and

Enterobacter sp. E20 (n=5)に分類された (図 1)。プラスミド解析により、*Enterobacter* 属菌 6 株において、IMP-cassette (*intI1* – *bla_{IMP-1}* – *aac(6')-IIc* – *sul1*) を認めた (図 2)。

2. 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性グラム陰性桿菌のゲノム解析

研究期間内に、病院排水及び市中排水中から、*P. aeruginosa* 12 株、*A. baumannii* complex 153 株及び *A. hydrophilal caviae* 38 株の計 203 株を検出した (表 1)。検出株数は、9 月が 34 株と最も多く、2 月が 3 株と最も少なかった。検出株の中で、*P. aeruginosa* 1 株、*A. baumannii* complex 1 株及び *A. hydrophilal caviae* 14 株の計 16 株が、PCR でカルバペネマーゼ遺伝子が陽性となった。

全ゲノム配列解析によって、*A. baumannii* complex 1 株は、*A. baumannii* と同定された。計 14 株の *A. hydrophilal caviae* のうち 10 株 (71%) が *A. taiwanensis*、2 株 (14%) が *A. caviae*、1 株 (7%) が *A. hydrophila*、1 株 (7%) が *A. veironii* と同定された (図 3)。また、計 16 株のカルバペネマーゼ遺伝子陽性株から、5 種類のカルバペネマーゼ遺伝子及び 2 種類のコリスチン耐性遺伝子を含む計 41 の薬剤耐性遺伝子が検出された (図 3)。*P. aeruginosa* 1 株はカルバペネマーゼ遺伝子 *bla_{IMP-1}* を、*A. baumannii* 1 株は *bla_{OXA-69}* をそれぞれ保有していた。*A. taiwanensis* は 10 株全てがカルバペネマーゼ遺伝子 *bla_{GES-24}* を保有し、*A. caviae* 2 株中 1 株は *bla_{GES-5}* を、1 株は *bla_{GES}* を保有していた。*A. hydrophila* 1 株及び *A. veironii* 1 株はそれぞれカルバペネマーゼ遺伝子 *cphA* を保有していた。また、*A. caviae* 1 株及び *A. veironii* 1 株はコリスチン耐性遺伝子 *mcr-5.1* 及び *mcr-3.3* を保有していた。

3. 成人患者の病院下水における xHYB を用いた網羅的 ARG 検出

xHYB によって検出された ARG の平均 RPKM 値は、mDNA-seq と比較し著明に高

かった (それぞれ 665,225 及び 328、 $p < 0.05$) (図 4)。検出された *bla_{CTX-M}*、*bla_{TEM}*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*mcr*、*qnrS*、*aac(6')-Ib*、*aph*、*ermB* 及び *ermF*、*tetM*、*sul1* 及び *sul2*、*mecA*、*vanA* 及び *vanB* の、mDNA-seq 及び xHYB による RPKM 値を表 2 に示す。ESBL 遺伝子としては *bla_{CTX-M}* 及び *bla_{TEM}* がそれぞれ xHYB では 1,330 及び 9,120 検出されたが、mDNAseq では 1 及び 1 のみ検出された。カルバペネマーゼ遺伝子としては *bla_{IMP}* 及び *bla_{VIM}* がそれぞれ 6,173 及び 224 検出されたが、mDNAseq では *bla_{IMP}* が 4 のみ検出され、*bla_{VIM}* は検出されなかった。xHYB で検出された *bla_{CTX-M}* の中では、本邦で臨床検体からの検出頻度の高い *bla_{CTX-M-1}* 及び *bla_{CTX-M-9}* グループ (Bevan、Masui) がそれぞれ 556 及び 765 と、5、3 及び 1 検出された *bla_{CTX-M-2}*、*bla_{CTX-M-8}* 及び *bla_{CTX-M-1/9}* グループに比べ有意に多く検出された ($p < 0.05$)。*bla_{IMP}* の中では、本邦で臨床検体からの検出頻度の高い *bla_{IMP-1}* グループ (Yamamoto) が 6,130 と、6、6、16 及び 15 検出された *bla_{IMP-2}*、*bla_{IMP-5}*、*bla_{IMP-11}* 及び *bla_{IMP-31}* グループに比べ有意に多く検出された ($p < 0.05$)。*mcr* 遺伝子は xHYB によってのみ検出され、*mcr-5* グループの平均 RPKM 値は、*mcr-3*、*mcr-7*、*mcr-9* 及び *mcr-10* グループの平均 RPKM 値よりも有意に高かった (660 対 62、6、26 及び 20、 $p < 0.05$)。

2020 年の ESBL 産生菌検出患者数及び *bla_{CTX-M-1}* の RPKM 値はそれぞれ月平均 17 例及び 921 で、2019 年の 13 例及び 232 からそれぞれ著明に増加していた ($p < 0.05$) (図 5)。MBL 産生菌検出患者数は月平均 1 例であり、月平均 17 例であった ESBL 産生菌検出患者数より有意に少なかった ($p < 0.05$)。一方、*bla_{IMP}* の RPKM 値は月平均 6,163 と、月平均 1,327 検出された *bla_{CTX-M}* と比較し有意に多かった ($p < 0.05$)。MRSA 検出患者は、ESBL 産生菌検出患者より有意に多かったが (月平均 28 患者対 14 患者、 $p < 0.05$)、排水中の *mecA* 遺伝子の RPKM 値は *bla_{CTX-M}* に比べ有意に少なかった (月平均 6 対 1,327、 $p < 0.05$)。研究期間内に VRE は入院患者から検出されなかったが、排水中からは *vanB*

遺伝子が RPKM 値で月平均 126 検出された。

4. 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

研究期間内に、こども病院排水中から、47 株の ESBL-E 及び 6 株の CRE を含む計 184 株を検出した (表 3)。検出した ESBL-E のうち、計 24 株の *Escherichia coli* 菌株中 *bla*CTX-M-1 保有株が 9 株、*bla*CTX-M-2 保有株が 1 株及び *bla*CTX-M-9 保有株が 12 株あり、計 14 株の *Klebsiella pneumoniae* 菌株全てが *bla*SHV を保有していた (表 3、図 6)。検出した CRE のうち、*Citrobacter freundii* 2 株が *bla*IMP-1 を保有していた。研究期間内に、こども病院の臨床検体から、*bla*CTX-M-1 保有株 3 株、*bla*CTX-M-9 保有株 5 株の計 8 株の ESBL 産生 *E. coli* が検出された。研究期間内に、こども病院排水及び臨床検体から MDRP・MDRA・VRE は検出されなかった。

D. 考察

1. 病院・市中下水由来のカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌のゲノム解析

病院・市中下水由来のカルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* 属菌のゲノム解析により、*Enterobacter* 属菌の遺伝的多様性、共有されている薬剤耐性遺伝子カセットの存在、潜在的な伝播メカニズムを明らかにした。今回の研究結果は、下水分離株の間で薬剤耐性遺伝子が *Enterobacter* 属菌間で伝播したことが示唆された。ゲノム疫学の視点で下水中の薬剤耐性モニタリングが重要と考えられた。

2. 病院・市中下水由来のカルバペネム耐性グラム陰性桿菌のゲノム解析

カルバペネマーゼ産生菌選択培地による病院・市中排水中のカルバペネマーゼ産生菌のスクリーニング及びゲノム解析によって、排水中における臨床的に重要なカルバペネマーゼ産生菌の存在が明らかになった。検出菌のうち *A. taiwanensis* は、2010 年に台湾において熱傷患者の創部より初めて検出されたが

(Alperi)、その後はメキシコ (Otero-Olarrá) やインド (Nanda) の土壌や環境水、イスラエルの胃腸炎患者の下痢便からの検出 (Senderovich) が散発的に報告されている程度であり、日本における検出は今回が初である。また、*bla*GES-24 保有 *A. taiwanensis* については今回が初の報告である。今回の研究によってカルバペネマーゼ産生菌の環境中への伝播拡散が示唆されたため、注意が必要である。

3. 成人患者の病院下水における xHYB を用いた網羅的 ARG 検出

大学病院排水からの ARG 検出において xHYB は、*bla*CTX-M や *bla*IMP、*mcr*、*mecA* 及び *vanB* を含む、従来の mDNA-seq ではほとんど検出できなかった、臨床的に重要な ARG を高感度に検出できた。排水中の *bla*CTX-M-1 の RPKM 値は、病院内における ESBL 産生菌検出患者数の増加に並行して増加していた。一方、研究期間中に MBL 産生菌検出患者数は月平均 1 例と少なかったが、排水中には *bla*CTX-M を大きく上回る RPKM 値の *bla*IMP が検出されていた。xHYB による病院排水中の ARG のモニタリングは、従来の mDNA-seq と比較し、*bla*CTX-M や *bla*IMP 等の感染対策上重要な ARG の検出に有用であるとともに、病院内における薬剤耐性菌の伝播拡散の理解と把握に重要であると考えられた。

4. 小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検出

こども病院排水中から、臨床的に重要な *bla*CTX-M-27 を保有する *E. coli* や、*bla*IMP-1 を保有する CRE を含む多様な薬剤耐性菌が検出されたことで、薬剤耐性菌の環境中への伝播拡散が示唆された。

E. 結論

令和 5 年度の本分担研究において、培養法を用いて市中排水や、大学病院や小児病院における臨床と病院下水の ESBL-E や CPE 等臨床的に重要な薬剤耐性菌のゲノム解析を実

施した。また、xHYB による病院排水中の ARG のモニタリングは、従来の mDNA-seq と比較し、*bla*_{CTX-M} や *bla*_{IMP} 等の感染対策上重要な ARG の検出に有用と考えられた。本研究班の研究結果から、下水中の AMR モニタリングの実施は、市中や臨床における AMR の伝播拡散の状況を把握することにつながる。今後、下水中の薬剤耐性の調査法を確立し、下水中の薬剤耐性のヒト感染症のリスクを明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 金森肇. シンポジウム 2「AMR 対策と新アクションプラン 2023-2027」AMR 対策とワンヘルス. 第 72 回日本感染症学会 東日本地方会学術集会 第 70 回日本化学療法学会 東日本支部総会 合同学会, 東京, 2023 年 10 月
2. 金森肇. 薬剤耐性ワンヘルス：環境からのアプローチ. 第 26 回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 横浜, 2023 年 9 月
3. 馬場啓聡, 黒田誠, 関塚剛史, 金森肇. マルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法による病院排水中の薬剤耐性遺伝子の検出. 第 38 回日本環境感染学会・学術集会, 横浜, 2023 年 7 月
4. Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H. Deep detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture method. IDWEEK 2023, October 11-15, 2023, Boston, MA, US.

論文発表

1. Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H. Highly sensitive detection of antimicrobial resistance

genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture target enrichment. mSphere. 2023 Aug 24;8(4):e0010023. doi: 10.1128/msphere.00100-23.

その他発表

1. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2023. (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】

Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, Mellmann A, Goesmann A, von Haeseler A, Stoye J, Harmsen D. Updating benchtop sequencing performance comparison. Nat Biotechnol 2013;31:294-6.

Strange JES, Leekitcharoenphon P, Møller FD, Aarestrup FM. Metagenomics analysis of bacteriophages and antimicrobial resistance from global urban sewage. Sci Rep 2021; 11:1600.

Beaudry MS, Wang J, Kieran TJ, Thomas J, Bayona-Vásquez NJ, Gao B, Devault A, Brunelle B, Lu K, Wang J-S, Rhodes OE, Glenn TC. Improved Microbial Community Characterization of 16S rRNA via Metagenome Hybridization Capture Enrichment. Front Microbiol 2021; 12:644662.

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 (Basel) 2021;10:495.

Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics 2010;11:595.

Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Ko WC, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. Int J Syst Evol Microbiol 2010;60:2048-2055.

Otero-Olarra JE, Curiel-Quesada E, Baltazar-Cruz J, Aguilera-Arreola MG, Pérez-Valdespino A. Low Cassette Variability in Class 2 and Class 1 Integrons of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental Samples. Microb Drug Resist 2020;26:794-801.

Nanda T, Sharma D. First report of isolation of *Aeromonas taiwanensis* from India. New Microbes New Infect 2020;36:100721.

Senderovich Y, Ken-Dror S, Vainblat I, Blau D, Izhaki I, Halpern M. A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients suffering from diarrhea in Israel. PLoS One 2012;7:e30070.

表 1. 病院・市中排水中のカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の月別検出数

		2019												2020		Total
		Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb		
<i>P. aeruginosa</i>	WWTP	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	5	0	11	
	HW	0	0	0	0	0	0	1 (1)	0	0	0	0	0	0	1 (1)	
<i>A. baumannii</i>	WWTP	1	9	19	12	13	12	13	18	11	15	13 (1)	9	4	149 (1)	
	HW	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	4	
<i>Aeromonas spp.</i>	WWTP	0	1 (1)	1	1	0	3	1	14 (4)	3 (1)	8 (6)	3 (2)	0	0	35 (14)	
	HW	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	

() 内の数字は、カルバペネマーゼ遺伝子検出株の数を表す。

WWTP：下水処理場流入水（市中排水）、HW：病院排水

表 2. 検出された *bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*mcr*、*qnrS*、*aac(6)-Ib*、*aph*、*ermB* 及び *ermF*、*tetM*、*sul1* 及び *sul2*、*mecA*、*vanA* 及び *vanB* の、mDNA-seq 及び xHYB による平均 RPKM 値

Gene	Group	AMROTU ID	Gene list	Average RPKM value	
				mDNA-Seq	xHYB
<i>bla</i> _{CTX-M}	Total			1	1,330
	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	AMROTU_507	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-10} , <i>bla</i> _{CTX-M-12} , <i>bla</i> _{CTX-M-22} , <i>bla</i> _{CTX-M-23} , <i>bla</i> _{CTX-M-28} , <i>bla</i> _{CTX-M-29} , <i>bla</i> _{CTX-M-30} , <i>bla</i> _{CTX-M-32} , <i>bla</i> _{CTX-M-33} , <i>bla</i> _{CTX-M-34} , <i>bla</i> _{CTX-M-36} , <i>bla</i> _{CTX-M-37} , <i>bla</i> _{CTX-M-42} , <i>bla</i> _{CTX-M-52} , <i>bla</i> _{CTX-M-53} , <i>bla</i> _{CTX-M-54} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{CTX-M-58} , <i>bla</i> _{CTX-M-60} , <i>bla</i> _{CTX-M-61} , <i>bla</i> _{CTX-M-62} , <i>bla</i> _{CTX-M-66} , <i>bla</i> _{CTX-M-68} , <i>bla</i> _{CTX-M-69} , <i>bla</i> _{CTX-M-71} , <i>bla</i> _{CTX-M-72} , <i>bla</i> _{CTX-M-79} , <i>bla</i> _{CTX-M-80} , <i>bla</i> _{CTX-M-82} , <i>bla</i> _{CTX-M-88} , <i>bla</i> _{CTX-M-96} , <i>bla</i> _{CTX-M-101} , <i>bla</i> _{CTX-M-103} , <i>bla</i> _{CTX-M-104} , <i>bla</i> _{CTX-M-114} , <i>bla</i> _{CTX-M-116} , <i>bla</i> _{CTX-M-117} , <i>bla</i> _{CTX-M-127} , <i>bla</i> _{CTX-M-136} , <i>bla</i> _{CTX-M-138} , <i>bla</i> _{CTX-M-139} , <i>bla</i> _{CTX-M-142} , <i>bla</i> _{CTX-M-143} , <i>bla</i> _{CTX-M-144} , <i>bla</i> _{CTX-M-146} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-150} , <i>bla</i> _{CTX-M-154} , <i>bla</i> _{CTX-M-155} , <i>bla</i> _{CTX-M-156} , <i>bla</i> _{CTX-M-157} , <i>bla</i> _{CTX-M-158} , <i>bla</i> _{CTX-M-162} , <i>bla</i> _{CTX-M-163} , <i>bla</i> _{CTX-M-164} , <i>bla</i> _{CTX-M-166} , <i>bla</i> _{CTX-M-167} , <i>bla</i> _{CTX-M-169} , <i>bla</i> _{CTX-M-170} , <i>bla</i> _{CTX-M-172} , <i>bla</i> _{CTX-M-173} , <i>bla</i> _{CTX-M-175} , <i>bla</i> _{CTX-M-176} , <i>bla</i> _{CTX-M-177} , <i>bla</i> _{CTX-M-178} , <i>bla</i> _{CTX-M-179} , <i>bla</i> _{CTX-M-180} , <i>bla</i> _{CTX-M-181} , <i>bla</i> _{CTX-M-182} , <i>bla</i> _{CTX-M-183} , <i>bla</i> _{CTX-M-184} , <i>bla</i> _{CTX-M-186} , <i>bla</i> _{CTX-M-187} , <i>bla</i> _{CTX-M-188} , <i>bla</i> _{CTX-M-189} , <i>bla</i> _{CTX-M-190} , <i>bla</i> _{CTX-M-193} , <i>bla</i> _{CTX-M-194} , <i>bla</i> _{CTX-M-197} , <i>bla</i> _{CTX-M-202} , <i>bla</i> _{CTX-M-203} , <i>bla</i> _{CTX-M-204} , <i>bla</i> _{CTX-M-206} , <i>bla</i> _{CTX-M-207} , <i>bla</i> _{CTX-M-208} , <i>bla</i> _{CTX-M-209} , <i>bla</i> _{CTX-M-210} , <i>bla</i> _{CTX-M-211} , <i>bla</i> _{CTX-M-212} , <i>bla</i> _{CTX-M-216} , <i>bla</i> _{CTX-M-218} , <i>bla</i> _{CTX-M-22} , <i>bla</i> _{CTX-M-220} , <i>bla</i> _{CTX-M-222} , <i>bla</i> _{CTX-M-224} , <i>bla</i> _{CTX-M-225} , <i>bla</i> _{CTX-M-226} , <i>bla</i> _{CTX-M-227} , <i>bla</i> _{CTX-M-228} , <i>bla</i> _{CTX-M-23} , <i>bla</i> _{CTX-M-230} , <i>bla</i> _{CTX-M-231} , <i>bla</i> _{CTX-M-232} , <i>bla</i> _{CTX-M-236} , <i>bla</i> _{CTX-M-}	0	556

			237, <i>bla</i> _{CTX-M-238} , <i>bla</i> _{CTX-M-244} , <i>bla</i> _{CTX-M-245} , <i>bla</i> _{CTX-M-246} , <i>bla</i> _{CTX-M-251}		
	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	AMROTU_539	<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-4} , <i>bla</i> _{CTX-M-5} , <i>bla</i> _{CTX-M-6} , <i>bla</i> _{CTX-M-7} , <i>bla</i> _{CTX-M-20} , <i>bla</i> _{CTX-M-31} , <i>bla</i> _{CTX-M-35} , <i>bla</i> _{CTX-M-43} , <i>bla</i> _{CTX-M-44} , <i>bla</i> _{CTX-M-56} , <i>bla</i> _{CTX-M-59} , <i>bla</i> _{CTX-M-76} , <i>bla</i> _{CTX-M-77} , <i>bla</i> _{CTX-M-92} , <i>bla</i> _{CTX-M-95} , <i>bla</i> _{CTX-M-97} , <i>bla</i> _{CTX-M-115} , <i>bla</i> _{CTX-M-124} , <i>bla</i> _{CTX-M-131} , <i>bla</i> _{CTX-M-141} , <i>bla</i> _{CTX-M-165} , <i>bla</i> _{CTX-M-171} , <i>bla</i> _{CTX-M-200} , <i>bla</i> _{CTX-M-229}	0	5
	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	AMROTU_542	<i>bla</i> _{CTX-M-8} , <i>bla</i> _{CTX-M-40} , <i>bla</i> _{CTX-M-23}	0	3

	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	AMROTU_531	<i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{CTX-M-13} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-14b} , <i>bla</i> _{CTX-M-16} , <i>bla</i> _{CTX-M-17} , <i>bla</i> _{CTX-M-19} , <i>bla</i> _{CTX-M-21} , <i>bla</i> _{CTX-M-24} , <i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>bla</i> _{CTX-M-38} , <i>bla</i> _{CTX-M-46} , <i>bla</i> _{CTX-M-47} , <i>bla</i> _{CTX-M-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-49} , <i>bla</i> _{CTX-M-50} , <i>bla</i> _{CTX-M-51} , <i>bla</i> _{CTX-M-65} , <i>bla</i> _{CTX-M-67} , <i>bla</i> _{CTX-M-73} , <i>bla</i> _{CTX-M-81} , <i>bla</i> _{CTX-M-83} , <i>bla</i> _{CTX-M-84} , <i>bla</i> _{CTX-M-85} , <i>bla</i> _{CTX-M-86} , <i>bla</i> _{CTX-M-87} , <i>bla</i> _{CTX-M-90} , <i>bla</i> _{CTX-M-93} , <i>bla</i> _{CTX-M-98} , <i>bla</i> _{CTX-M-99} , <i>bla</i> _{CTX-M-102} , <i>bla</i> _{CTX-M-104} , <i>bla</i> _{CTX-M-105} , <i>bla</i> _{CTX-M-110} , <i>bla</i> _{CTX-M-111} , <i>bla</i> _{CTX-M-112} , <i>bla</i> _{CTX-M-113} , <i>bla</i> _{CTX-M-121} , <i>bla</i> _{CTX-M-122} , <i>bla</i> _{CTX-M-125} , <i>bla</i> _{CTX-M-126} , <i>bla</i> _{CTX-M-129} , <i>bla</i> _{CTX-M-130} , <i>bla</i> _{CTX-M-134} , <i>bla</i> _{CTX-M-137} , <i>bla</i> _{CTX-M-140} , <i>bla</i> _{CTX-M-147} , <i>bla</i> _{CTX-M-148} , <i>bla</i> _{CTX-M-159} , <i>bla</i> _{CTX-M-161} , <i>bla</i> _{CTX-M-168} , <i>bla</i> _{CTX-M-174} , <i>bla</i> _{CTX-M-191} , <i>bla</i> _{CTX-M-192} , <i>bla</i> _{CTX-M-195} , <i>bla</i> _{CTX-M-196} , <i>bla</i> _{CTX-M-198} , <i>bla</i> _{CTX-M-201} , <i>bla</i> _{CTX-M-213} , <i>bla</i> _{CTX-M-214} , <i>bla</i> _{CTX-M-215} , <i>bla</i> _{CTX-M-219} , <i>bla</i> _{CTX-M-221} , <i>bla</i> _{CTX-M-223} , <i>bla</i> _{CTX-M-233} , <i>bla</i> _{CTX-M-235} , <i>bla</i> _{CTX-M-239} , <i>bla</i> _{CTX-M-240} , <i>bla</i> _{CTX-M-241} , <i>bla</i> _{CTX-M-242} , <i>bla</i> _{CTX-M-243} , <i>bla</i> _{CTX-M-252}	0	765
	<i>bla</i> _{CTX-M-1/9} hybrids	AMROTU_540	<i>bla</i> _{CTX-M-64} , <i>bla</i> _{CTX-M-123} , <i>bla</i> _{CTX-M-132} , <i>bla</i> _{CTX-M-153} , <i>bla</i> _{CTX-M-199} , <i>bla</i> _{CTX-M-234}	0	1
<i>bla</i> _{TEM}		AMROTU_584	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>bla</i> _{TEM-1C} , <i>bla</i> _{TEM-1D} , <i>bla</i> _{TEM-2} , <i>bla</i> _{TEM-3} , <i>bla</i> _{TEM-4} , <i>bla</i> _{TEM-5} , <i>bla</i> _{TEM-6} , <i>bla</i> _{TEM-7} , <i>bla</i> _{TEM-8} , <i>bla</i> _{TEM-9} , <i>bla</i> _{TEM-10} , <i>bla</i> _{TEM-11} , <i>bla</i> _{TEM-12} , <i>bla</i> _{TEM-15} , <i>bla</i> _{TEM-16} , <i>bla</i> _{TEM-17} , <i>bla</i> _{TEM-19} , <i>bla</i> _{TEM-20} , <i>bla</i> _{TEM-21} , <i>bla</i> _{TEM-22} , <i>bla</i> _{TEM-24} , <i>bla</i> _{TEM-26} , <i>bla</i> _{TEM-28} , <i>bla</i> _{TEM-29} , <i>bla</i> _{TEM-30} , <i>bla</i> _{TEM-31} , <i>bla</i> _{TEM-32} , <i>bla</i> _{TEM-33} , <i>bla</i> _{TEM-34} , <i>bla</i> _{TEM-35} , <i>bla</i> _{TEM-36} , <i>bla</i> _{TEM-37} , <i>bla</i> _{TEM-39} , <i>bla</i> _{TEM-40} , <i>bla</i> _{TEM-43} , <i>bla</i> _{TEM-45} , <i>bla</i> _{TEM-47} , <i>bla</i> _{TEM-48} , <i>bla</i> _{TEM-49} , <i>bla</i> _{TEM-52} , <i>bla</i> _{TEM-52B} , <i>bla</i> _{TEM-52C} , <i>bla</i> _{TEM-53} , <i>bla</i> _{TEM-54} , <i>bla</i> _{TEM-55} , <i>bla</i> _{TEM-57} , <i>bla</i> _{TEM-60} , <i>bla</i> _{TEM-61} , <i>bla</i> _{TEM-63} , <i>bla</i> _{TEM-67} , <i>bla</i> _{TEM-68} , <i>bla</i> _{TEM-70} , <i>bla</i> _{TEM-71} , <i>bla</i> _{TEM-72} , <i>bla</i> _{TEM-76} , <i>bla</i> _{TEM-77} , <i>bla</i> _{TEM-78} , <i>bla</i> _{TEM-79} , <i>bla</i> _{TEM-80} , <i>bla</i> _{TEM-81} , <i>bla</i> _{TEM-82} , <i>bla</i> _{TEM-83} , <i>bla</i> _{TEM-84} , <i>bla</i> _{TEM-85} , <i>bla</i> _{TEM-86} , <i>bla</i> _{TEM-87} , <i>bla</i> _{TEM-88} , <i>bla</i> _{TEM-90} , <i>bla</i> _{TEM-91} , <i>bla</i> _{TEM-92} , <i>bla</i> _{TEM-93} , <i>bla</i> _{TEM-94} , <i>bla</i> _{TEM-95} , <i>bla</i> _{TEM-96} , <i>bla</i> _{TEM-97} , <i>bla</i> _{TEM-98} , <i>bla</i> _{TEM-99} ,	1	9,120

			<i>bla</i> _{TEM-101} , <i>bla</i> _{TEM-102} , <i>bla</i> _{TEM-103} , <i>bla</i> _{TEM-104} , <i>bla</i> _{TEM-105} , <i>bla</i> _{TEM-106} , <i>bla</i> _{TEM-107} , <i>bla</i> _{TEM-108} , <i>bla</i> _{TEM-109} , <i>bla</i> _{TEM-110} , <i>bla</i> _{TEM-111} , <i>bla</i> _{TEM-112} , <i>bla</i> _{TEM-113} , <i>bla</i> _{TEM-114} , <i>bla</i> _{TEM-115} , <i>bla</i> _{TEM-116} , <i>bla</i> _{TEM-120} , <i>bla</i> _{TEM-121} , <i>bla</i> _{TEM-122} , <i>bla</i> _{TEM-123} , <i>bla</i> _{TEM-124} , <i>bla</i> _{TEM-125} , <i>bla</i> _{TEM-126} , <i>bla</i> _{TEM-127} , <i>bla</i> _{TEM-128} , <i>bla</i> _{TEM-129} , <i>bla</i> _{TEM-130} , <i>bla</i> _{TEM-131} , <i>bla</i> _{TEM-132} , <i>bla</i> _{TEM-133} , <i>bla</i> _{TEM-134} , <i>bla</i> _{TEM-135} , <i>bla</i> _{TEM-136} , <i>bla</i> _{TEM-137} , <i>bla</i> _{TEM-138} , <i>bla</i> _{TEM-139} , <i>bla</i> _{TEM-141} , <i>bla</i> _{TEM-142} , <i>bla</i> _{TEM-143} , <i>bla</i> _{TEM-144} , <i>bla</i> _{TEM-145} , <i>bla</i> _{TEM-146} , <i>bla</i> _{TEM-147} , <i>bla</i> _{TEM-148} , <i>bla</i> _{TEM-149} , <i>bla</i> _{TEM-150} , <i>bla</i> _{TEM-151} , <i>bla</i> _{TEM-152} , <i>bla</i> _{TEM-153} , <i>bla</i> _{TEM-154} , <i>bla</i> _{TEM-155} , <i>bla</i> _{TEM-156} , <i>bla</i> _{TEM-157} , <i>bla</i> _{TEM-158} , <i>bla</i> _{TEM-159} , <i>bla</i> _{TEM-160} , <i>bla</i> _{TEM-162} , <i>bla</i> _{TEM-163} , <i>bla</i> _{TEM-164} , <i>bla</i> _{TEM-166} , <i>bla</i> _{TEM-167} , <i>bla</i> _{TEM-168} , <i>bla</i> _{TEM-169} , <i>bla</i> _{TEM-171} , <i>bla</i> _{TEM-176} , <i>bla</i> _{TEM-177} , <i>bla</i> _{TEM-178} , <i>bla</i> _{TEM-181} , <i>bla</i> _{TEM-182} , <i>bla</i> _{TEM-183} , <i>bla</i> _{TEM-184} , <i>bla</i> _{TEM-185} , <i>bla</i> _{TEM-186} , <i>bla</i> _{TEM-187} , <i>bla</i> _{TEM-188} , <i>bla</i> _{TEM-189} , <i>bla</i> _{TEM-190} , <i>bla</i> _{TEM-191} , <i>bla</i> _{TEM-193} , <i>bla</i> _{TEM-194} , <i>bla</i> _{TEM-195} , <i>bla</i> _{TEM-196} , <i>bla</i> _{TEM-197} , <i>bla</i> _{TEM-198} , <i>bla</i> _{TEM-201} , <i>bla</i> _{TEM-205} , <i>bla</i> _{TEM-206} , <i>bla</i> _{TEM-207} , <i>bla</i> _{TEM-208} , <i>bla</i> _{TEM-209} , <i>bla</i> _{TEM-210} , <i>bla</i> _{TEM-211} , <i>bla</i> _{TEM-212} , <i>bla</i> _{TEM-213} , <i>bla</i> _{TEM-214} , <i>bla</i> _{TEM-215} , <i>bla</i> _{TEM-216} , <i>bla</i> _{TEM-217} , <i>bla</i> _{TEM-219} , <i>bla</i> _{TEM-220} , <i>bla</i> _{TEM-224} , <i>bla</i> _{TEM-225} , <i>bla</i> _{TEM-226} , <i>bla</i> _{TEM-227} , <i>bla</i> _{TEM-228} , <i>bla</i> _{TEM-229} , <i>bla</i> _{TEM-230} , <i>bla</i> _{TEM-231} , <i>bla</i> _{TEM-232} , <i>bla</i> _{TEM-233} , <i>bla</i> _{TEM-234} , <i>bla</i> _{TEM-235} , <i>bla</i> _{TEM-236} , <i>bla</i> _{TEM-237} , <i>bla</i> _{TEM-238} , <i>bla</i> _{TEM-239} , <i>bla</i> _{TEM-240} , <i>bla</i> _{TEM-241} , <i>bla</i> _{TEM-242} , <i>bla</i> _{TEM-243} , <i>bla</i> _{TEM-244} , <i>bla</i> _{TEM-245} , <i>bla</i> _{TEM-246}		
<i>bla</i> _{IMP}	Total			4	6,173
	<i>bla</i> _{IMP-1}	AMROTU_873	<i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{IMP-3} , <i>bla</i> _{IMP-6} , <i>bla</i> _{IMP-7} , <i>bla</i> _{IMP-10} , <i>bla</i> _{IMP-25} , <i>bla</i> _{IMP-26} , <i>bla</i> _{IMP-30} , <i>bla</i> _{IMP-34} , <i>bla</i> _{IMP-38} , <i>bla</i> _{IMP-40} , <i>bla</i> _{IMP-42} , <i>bla</i> _{IMP-43} , <i>bla</i> _{IMP-51} , <i>bla</i> _{IMP-52} , <i>bla</i> _{IMP-55} , <i>bla</i> _{IMP-59} , <i>bla</i> _{IMP-60} , <i>bla</i> _{IMP-61} , <i>bla</i> _{IMP-66} , <i>bla</i> _{IMP-70} , <i>bla</i> _{IMP-73} , <i>bla</i> _{IMP-76} , <i>bla</i> _{IMP-77} , <i>bla</i> _{IMP-78} , <i>bla</i> _{IMP-79} , <i>bla</i> _{IMP-80} , <i>bla</i> _{IMP-88} , <i>bla</i> _{IMP-89} , <i>bla</i> _{IMP-94}	4	6,130

	<i>bla</i> _{IMP-2}	AMROTU_864	<i>bla</i> _{IMP-2} , <i>bla</i> _{IMP-8} , <i>bla</i> _{IMP-13} , <i>bla</i> _{IMP-17} , <i>bla</i> _{IMP-19} , <i>bla</i> _{IMP-20} , <i>bla</i> _{IMP-23} , <i>bla</i> _{IMP-24} , <i>bla</i> _{IMP-33} , <i>bla</i> _{IMP-37} , <i>bla</i> _{IMP-39} , <i>bla</i> _{IMP-69} , <i>bla</i> _{IMP-84}	0	6
	<i>bla</i> _{IMP-5}	AMROTU_887	<i>bla</i> _{IMP-5} , <i>bla</i> _{IMP-9} , <i>bla</i> _{IMP-15} , <i>bla</i> _{IMP-28} , <i>bla</i> _{IMP-29} , <i>bla</i> _{IMP-45} , <i>bla</i> _{IMP-53} , <i>bla</i> _{IMP-62} , <i>bla</i> _{IMP-81} , <i>bla</i> _{IMP-82} , <i>bla</i> _{IMP-85}	0	6
	<i>bla</i> _{IMP-11}	AMROTU_876	<i>bla</i> _{IMP-11} , <i>bla</i> _{IMP-16} , <i>bla</i> _{IMP-21} , <i>bla</i> _{IMP-22} , <i>bla</i> _{IMP-41} , <i>bla</i> _{IMP-44} , <i>bla</i> _{IMP-58} , <i>bla</i> _{IMP-68} , <i>bla</i> _{IMP-74} , <i>bla</i> _{IMP-93}	0	16
	<i>bla</i> _{IMP-31}	AMROTU_878	<i>bla</i> _{IMP-31} , <i>bla</i> _{IMP-35} , <i>bla</i> _{IMP-92}	0	15
<i>bla</i> _{VIM}		AMROTU_735	<i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{VIM-3} , <i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{VIM-6} , <i>bla</i> _{VIM-8} , <i>bla</i> _{VIM-9} , <i>bla</i> _{VIM-10} , <i>bla</i> _{VIM-11} , <i>bla</i> _{VIM-12} , <i>bla</i> _{VIM-14} , <i>bla</i> _{VIM-15} , <i>bla</i> _{VIM-16} , <i>bla</i> _{VIM-17} , <i>bla</i> _{VIM-18} , <i>bla</i> _{VIM-19} , <i>bla</i> _{VIM-20} , <i>bla</i> _{VIM-23} , <i>bla</i> _{VIM-24} , <i>bla</i> _{VIM-25} , <i>bla</i> _{VIM-26} , <i>bla</i> _{VIM-27} , <i>bla</i> _{VIM-28} , <i>bla</i> _{VIM-29} , <i>bla</i> _{VIM-30} , <i>bla</i> _{VIM-31} , <i>bla</i> _{VIM-32} , <i>bla</i> _{VIM-33} , <i>bla</i> _{VIM-34} , <i>bla</i> _{VIM-35} , <i>bla</i> _{VIM-36} , <i>bla</i> _{VIM-37} , <i>bla</i> _{VIM-38} , <i>bla</i> _{VIM-39} , <i>bla</i> _{VIM-40} , <i>bla</i> _{VIM-41} , <i>bla</i> _{VIM-42} , <i>bla</i> _{VIM-43} , <i>bla</i> _{VIM-44} , <i>bla</i> _{VIM-45} , <i>bla</i> _{VIM-46} , <i>bla</i> _{VIM-48} , <i>bla</i> _{VIM-50} , <i>bla</i> _{VIM-51} , <i>bla</i> _{VIM-52} , <i>bla</i> _{VIM-53} , <i>bla</i> _{VIM-54} , <i>bla</i> _{VIM-55} , <i>bla</i> _{VIM-56} , <i>bla</i> _{VIM-57} , <i>bla</i> _{VIM-58} , <i>bla</i> _{VIM-59} , <i>bla</i> _{VIM-60} , <i>bla</i> _{VIM-62} , <i>bla</i> _{VIM-63} , <i>bla</i> _{VIM-64} , <i>bla</i> _{VIM-65} , <i>bla</i> _{VIM-66} , <i>bla</i> _{VIM-67} , <i>bla</i> _{VIM-68} , <i>bla</i> _{VIM-70} , <i>bla</i> _{VIM-72} , <i>bla</i> _{VIM-73} , <i>bla</i> _{VIM-74} , <i>bla</i> _{VIM-75} , <i>bla</i> _{VIM-76} , <i>bla</i> _{VIM-77} , <i>bla</i> _{VIM-78} , <i>bla</i> _{VIM-79} , <i>bla</i> _{VIM-80}	0	224
<i>mcr</i>	<i>mcr-3</i>	AMROTU_76	<i>mcr-3.1</i> , <i>mcr-3.10</i> , <i>mcr-3.11</i> , <i>mcr-3.12</i> , <i>mcr-3.13</i> , <i>mcr-3.14</i> , <i>mcr-3.15</i> , <i>mcr-3.16</i> , <i>mcr-3.18</i> , <i>mcr-3.19</i> , <i>mcr-3.2</i> , <i>mcr-3.20</i> , <i>mcr-3.21</i> , <i>mcr-3.22</i> , <i>mcr-3.23</i> , <i>mcr-3.24</i> , <i>mcr-3.25</i> , <i>mcr-3.26</i> , <i>mcr-3.27</i> , <i>mcr-3.28</i> , <i>mcr-3.29</i> , <i>mcr-3.3</i> , <i>mcr-3.31</i> , <i>mcr-3.32</i> , <i>mcr-3.33</i> , <i>mcr-3.34</i> , <i>mcr-3.35</i> , <i>mcr-3.36</i> , <i>mcr-3.37</i> , <i>mcr-3.38</i> , <i>mcr-3.39</i> , <i>mcr-3.4</i> , <i>mcr-3.40</i> , <i>mcr-3.41</i> , <i>mcr-3.5</i> , <i>mcr-3.6</i> , <i>mcr-3.7</i> , <i>mcr-3.8</i> , <i>mcr-3.9</i>	0	62
	<i>mcr-5</i>	AMROTU_72	<i>mcr-5.1</i> , <i>mcr-5.2</i> , <i>mcr-5.3</i> , <i>mcr-5.4</i>	0	660

	<i>mcr-7</i>	AMROTU_83	<i>mcr-7.1</i>	0	6
	<i>mcr-9</i>	AMROTU_84	<i>mcr-9</i>	0	26
	<i>mcr-10</i>	AMROTU_82	<i>mcr-10.1, mcr-10.2, mcr-10.3, mcr-10.4, mcr-10.5</i>	0	20
<i>qnrS</i>	Total			1	1,272
		AMROTU_955	<i>qnrS2, qnrS6</i>	0	704
		AMROTU_954	<i>qnrS1, qnrS3, qnrS4, qnrS5, qnrS7, qnrS8, qnrS9, qnrS10, qnrS11, qnrS12, qnrS13, qnrS14, qnrS15</i>	0	568
<i>aac(6')-Ib</i>		AMROTU_1012	<i>aac(6')-Ib, aac(6')-Ib', aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib4, aac(6')-Ib11, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr3, aac(6')-Ib-cr4, aac(6')-Ib-cr5, aac(6')-Ib-cr6, aac(6')-Ib-cr7, aac(6')-Ib-cr8, aac(6')-Ib-cr9, aac(6')-Ib-cr10, aac(6')-Ib-cr11, aac(6')Ib-cr, aac(6')-Ib- Hangzhou</i>	30	69,921
<i>aph</i>	Total			20	61,927
		AMROTU_714	<i>aph(3')-Ia</i>	1	20,569
		AMROTU_658	<i>aph(6)-Id</i>	9	19,310
		AMROTU_674	<i>aph(3'')-Ib</i>	9	18,272
		AMROTU_775	<i>aph(3')-IIIa</i>	1	2,692
		AMROTU_813	<i>aph(3')-VI, aph(3')-VIa, aph(3')-VIb</i>	0	577
		AMROTU_716	<i>aph(3')-Ib</i>	0	137

		AMROTU_776	<i>aph(3')-IIa</i>	0	94
		AMROTU_737	<i>aph(3')-IIb</i>	0	79
		AMROTU_739	<i>aph(3')-XV</i>	0	48
		AMROTU_638	<i>aph(6)-Ic</i>	0	37
		AMROTU_478	<i>aph(2'')-If</i>	0	37
		AMROTU_461	<i>aph(2'')-IIa</i>	0	33
		AMROTU_415	<i>aph(2'')-Ig</i>	0	27
		AMROTU_449	<i>aph(2'')-Ie, aph(2'')-IVa</i>	0	7
		AMROTU_414	<i>aph(2'')-IIIa</i>	0	4
		AMROTU_854	<i>aph(3')-VIIa</i>	0	2
		AMROTU_747	<i>aph(3')-IIc</i>	0	2
<i>ermB</i> and <i>ermF</i>	Total			16	18,854
	<i>ermB</i>	AMROTU_764	<i>ermB</i>	5	6,798
	<i>ermF</i>	AMROTU_844	<i>ermF</i>	10	12,056
<i>tetM</i>		AMROTU_44	<i>tetM, tetS/M</i>	1	1,885
<i>sulI</i> and	Total			22	51,788

<i>sul2</i>	<i>sul1</i>	AMROTU_525	<i>sul1</i>	17	42,156
	<i>sul2</i>	AMROTU_622	<i>sul2</i>	4	9,632
<i>mecA</i>		AMROTU_32	<i>mecA, mecA2</i>	0	6
<i>vanB</i>		AMROTU_328	<i>vanB</i>	0	125

表 3. こども病院排水中から検出された薬剤耐性菌

Selective media	Ward	Jun	July	Aug	Month			
					Sep	Oct	Nov	Dec
CHROMagar ESBL	A	<i>A. Nosocomialis</i> (1) <i>C. gleum</i> (1) <i>A. hydrophila</i> (1)	<i>E. coli</i> (1) <i>C. freundii</i> (1) <i>A. punctata (caviae)</i> (2)		<i>*E. coli [blaCTX-M-1]</i> (1) <i>A. punctata (caviae)</i> (3) <i>Bifidocatreium</i> sp. (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-1]</i> (2) <i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (1) <i>E. cloacae complex</i> (1) <i>A. baumannii</i> (1) <i>A. seifertii</i> (1)	<i>C. freundii</i> (1) <i>E. cloacae complex</i> (3) <i>P. agglomerans</i> (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (2) <i>E. cloacae complex</i> (1) <i>A. nosocomialis</i> (1) <i>S. maltophilia</i> (1)
	B	<i>E. coli</i> (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (1) <i>K. aerogenes</i> (2)	<i>*E. coli [blaCTX-M-1]</i> (1) <i>*K. pneumoniae [blaSHV]</i> (1) <i>A. nosocomialis</i> (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (1) <i>*K. pneumoniae [blaSHV]</i> (4) <i>A. hydrophila</i> (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-1]</i> (1) <i>*K. pneumoniae [blaSHV]</i> (4) <i>P. putida</i> (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-1]</i> (3) <i>*K. pneumoniae [blaSHV]</i> (2) <i>R. ornithinolytica</i> (2)	<i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (3) <i>*K. pneumoniae [blaSHV]</i> (3) <i>R. ornithinolytica</i> (1) <i>A. punctata (caviae)</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1)
	C		<i>A. punctata (caviae)</i>	<i>*E. coli [blaCTX-M-1]</i> (1)	<i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (1) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>A. punctata (caviae)</i> (2)	<i>*E. coli [blaCTX-M-2]</i> (1) <i>K. oxytoca</i> (3)	<i>*E. coli [blaCTX-M-9]</i> (3) <i>A. punctata (caviae)</i> (1)	
CHROMagar mSuperCARBA	A	<i>*K. pneumoniae [blaSHV]</i> (1) <i>A. nosocomialis</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)	<i>A. pittii</i> (1) <i>A. hydrophila</i> (1)		<i>A. hydrophila</i> (1) <i>V. disper</i> (1) <i>F. magna</i> (1)		<i>A. hydrophila</i> (1)	<i>C. gleum</i> (1) <i>A. hydrophila</i> (1)
	B	<i>E. coli</i> (1)	<i>A. hydrophila</i> (1)	<i>**C. freundii [blaSHV-1]</i> (2) <i>A. baumannii</i> (1)	<i>E. cloacae complex</i> (2) <i>A. hydrophila</i> (1)	<i>S. maltophilia</i> (1) <i>A. hydrophila</i> (2)	<i>P. putida</i> (1)	<i>A. hydrophila</i> (1) <i>A. punctata (caviae)</i> (1)
	C		<i>A. punctata (caviae)</i> (1)	<i>P. mosselii</i> (1)				
CHROMagar MDRP	A		<i>E. coli</i> (1)			<i>E. coli</i> (1)	<i>O. intermedium</i> (1)	
	B		<i>E. coli</i> (2)				<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)
	C		<i>C. aquatica</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)			<i>E. coli</i> (1)	
CHROMagar MDRA	A	<i>P. aeruginosa</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)	<i>C. gleum</i> (2)		<i>P. putida</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)	<i>P. putida</i> (1)	<i>C. gleum</i> (2)	<i>P. putida</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)
	B		<i>C. gleum</i> (2)	<i>P. putida</i> (1) <i>B. multivorans</i> (1)	<i>P. putida</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)	<i>P. putida</i> (1) <i>S. maltophilia</i> (1) <i>C. gleum</i> (2)	<i>S. maltophilia</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)	<i>P. putida</i> (1) <i>C. gleum</i> (1)
	C		<i>P. putida</i> (1) <i>E. anophelis</i> (1)	<i>P. putida</i> (1) <i>E. anophelis</i> (2)	<i>P. putida</i> (1)	<i>P. putida</i> (1) <i>C. gleum</i> (1) <i>E. anophelis</i> (1)	<i>C. gleum</i> (1)	<i>P. putida</i> (1) <i>E. anophelis</i> (1)
CHROMagar MRSA	A		<i>E. microcola</i> (1)	<i>B. cereus</i> group (1)	<i>B. cereus</i> group (2)	<i>B. cereus</i> group (2)	<i>B. cereus</i> group (1)	<i>B. cereus</i> group (1)
	B	<i>E. coli</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1)	<i>E. meningoseptica</i> (1)		<i>S. maltophilia</i> (1)		<i>B. cereus</i> group (1)	<i>B. cereus</i> group (1)
	C				<i>S. haemolyticus</i> (1) <i>B. cereus</i> group (1)	<i>S. aureus</i> (2)		<i>B. cereus</i> group (1)
CHROMagar VRE	A		<i>A. hydrophila</i> (2)		<i>B. contaminans</i> (1)	<i>A. hydrophila</i> (2)		
	B		<i>A. hydrophila</i> (2)	<i>A. hydrophila</i> (3)		<i>A. hydrophila</i> (1)	<i>A. hydrophila</i> (3)	

赤字の株に対し PCR を実施した。() 内の数字は検出数を、[] 内は PCR で検出された遺伝子を示す。**ESBL* 陽性株 ***カルバペネマーゼ* 陽性株

図 1. 病院・市中下水由来のカルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* 属菌の系統解析

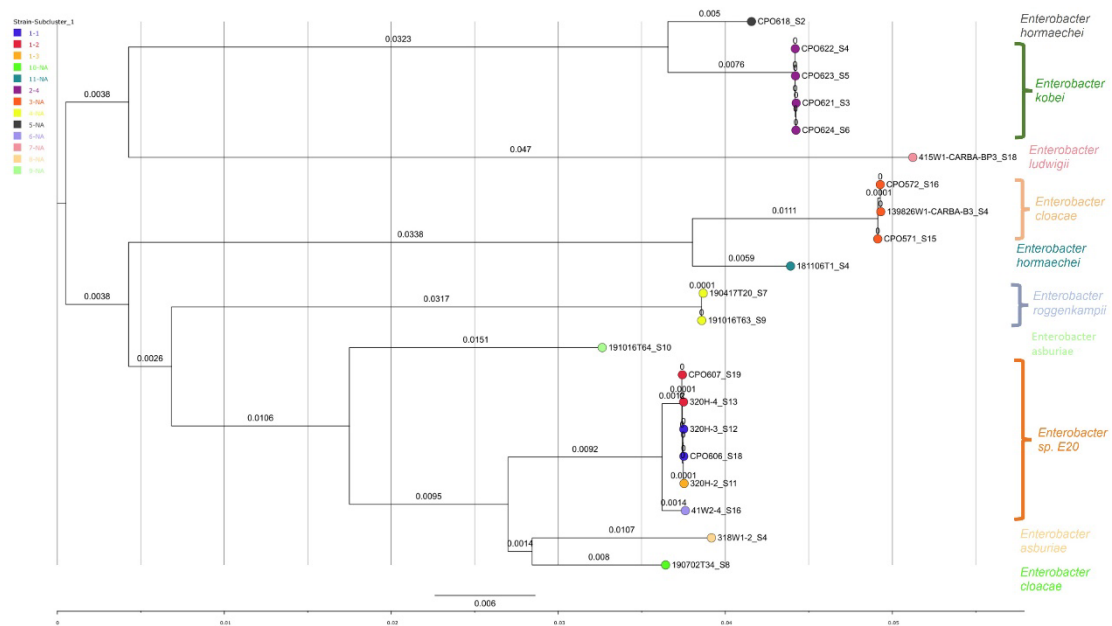


図 2. blaIMP コンティグのプラスミドマッピング

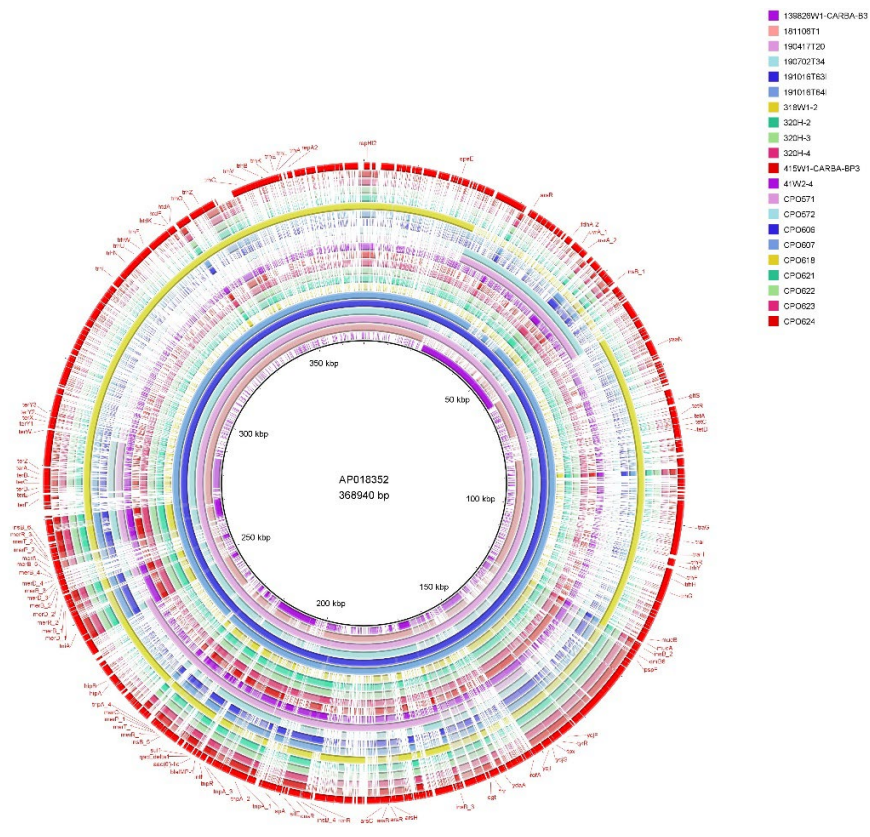


図 3. 病院排水及び市中排水より検出された *Aeromonas hydrophila caviae*、*Pseudomonas aeruginosa* 及び *Acinetobacter baumannii* complex の薬剤耐性遺伝子保有状況

ID	Source	Strain	PCR	Carbapenemase												ESBL		AmpC		Other β -lactamase				Quinolone		Aminoglycoside								Macrolide		Tetracycline		Sulfonamide		Trimethoprim		Fosfomycin		Rifamycin		Colistin		Phenicol	
				<i>cphA</i>	<i>bla</i> _{IMP-1}	<i>bla</i> _{GES-5}	<i>bla</i> _{GES-24}	<i>bla</i> _{OXA-49}	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{VEB-3}	<i>bla</i> _{ADC-123}	<i>bla</i> _{MOX-1}	<i>bla</i> _{MOX-3}	<i>bla</i> _{MOX-13}	<i>bla</i> _{PDC-35}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{OXA-10}	<i>bla</i> _{OXA-488}	<i>bla</i> _{OXA-724}	<i>cepH</i>	<i>qnrS2</i>	<i>aac</i> (6)-Ia	<i>aac</i> (6)-Iae	<i>aac</i> (6)-Ib	<i>aac</i> (6)-II	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>ant</i> (2'')-Ia	<i>ant</i> (3'')-Ia	<i>ant</i> (3'')-Iib	<i>aph</i> (3'')-Ib	<i>aph</i> (6)-Id	<i>mph</i> (4)	<i>zet</i> (4)	<i>sul1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>fosA</i>	<i>arr-2</i>	<i>mcr-3.3</i>	<i>mcr-5.1</i>	<i>catB3</i>	<i>catB7</i>	<i>cmlA1</i>					
144	HW	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{IMP}																																														
403	WWTP	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
120	WWTP	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
108	WWTP	<i>Aeromonas veironii</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
380	WWTP	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
399	WWTP	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
489	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
491	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
512	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
545	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
103	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
104	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
113	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
115	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
505	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														
515	WWTP	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	<i>bla</i> _{GES}																																														

黒抜きが各薬剤耐性遺伝子を保有していることを示す。HW：病院排水、WWTP：下水処理場流入水（市中排水）。

図 4.検出された薬剤耐性遺伝子それぞれの、mDNA-seq 法及び xHYB 法による RPKM 値の比較

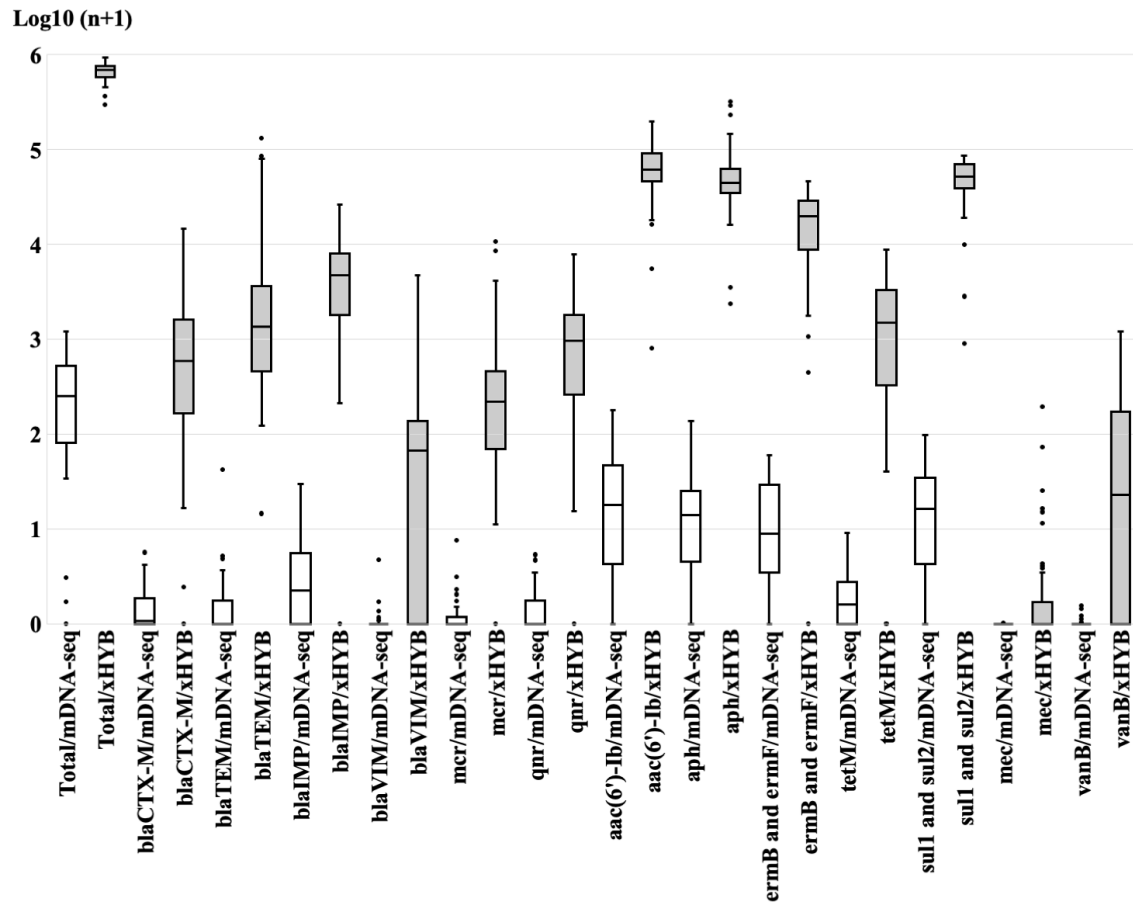


図 5. 病院排水中の *bla*_{CTX-M}、*bla*_{IMP} 及び *mecA* の RPKM 値の月別推移と、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 及びメタロ β ラクタマーゼ (MBL) 産生菌、及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 検出患者数の月別推移の比較

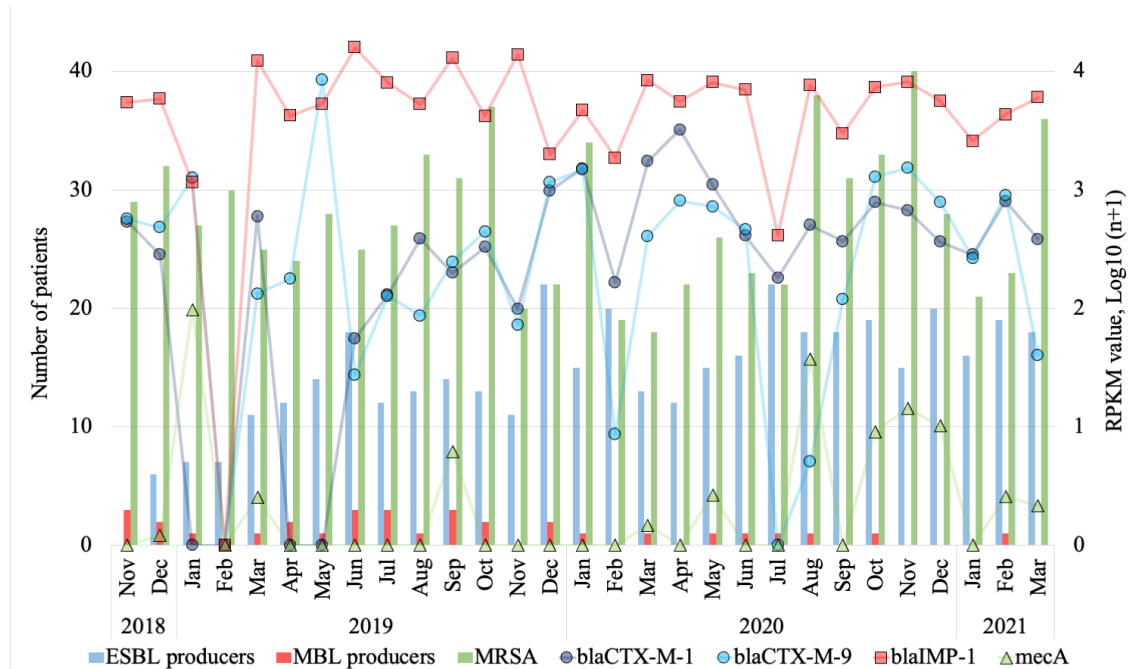
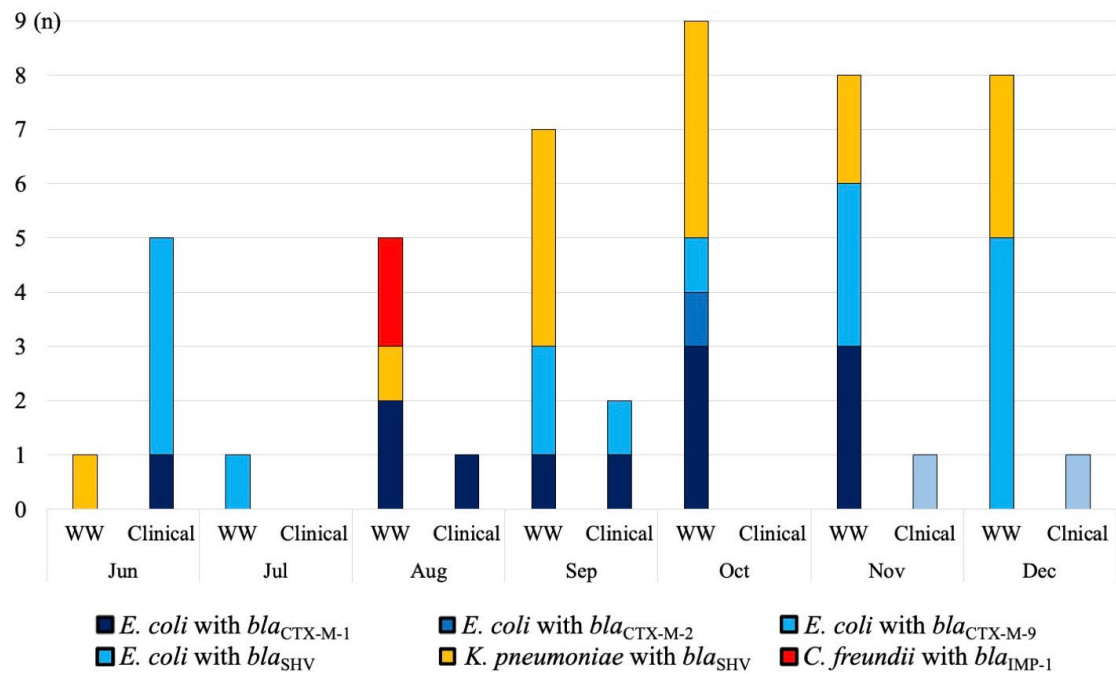


図 6. こども病院排水及び臨床検体由来の ESBL 産生・カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌の月別検出数



WW : 排水

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー」

研究分担者： 松永 展明 国立国際医療研究センター AMR 臨床リファレンスセンター

研究要旨

ヒト、医療、動物、家畜のみならず、国内外の河川、下水等の環境中からも薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性(AMR)対策が必要である。しかし、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事例はなく、ヒトおよび動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。そこで、本分担研究では、環境曝露によるヒト及び動物へのリスクに対して国内外の資料を収集しレビューを実施した。

3つのリサーチクエスション（海外渡航による ESBL 伝播リスク、環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスク、ESBL に対するセファマイシン系抗菌薬の有効性）に基づき、レビューを行った。海外渡航による ESBL 伝播リスクについては、アジアへの渡航(OR=2.38, 95% CI=1.88 to 3.02)とアフリカへの渡航(OR=2.45, 95% CI=1.90 to 3.16)がリスク因子であることが示された。環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスクについては、環境水中の ARB または ARG にさらされるヒトのリスクとして、環境水でのレクリエーション、廃水処理施設 (WWTP) での作業、飲料水、溺水、津波による傷害などが挙げられた。環境水からヒトへの ARB 伝播の証拠として最も多かったのは、疫学的リスク評価であった。ESBL に対するセファマイシン系抗菌薬の有効性については、カルバペネム治療群に対して有意差を認めなかった(OR=1.87, 95% C.I. =0.98, 3.56)。

環境水中の薬剤耐性菌がヒトに伝播することが示唆された。しかし、文献数および質は現時点では十分ではなく、より説得力のある形で証明する必要がある。ゲノムシークエンスがコストおよび技術的に、比較的簡便に利用できるようになった現在、ヒトの検体から検出された耐性遺伝子が環境水中に存在し、さらにヒトへ循環するリスクを同定していくことが有用と考えられた。

研究協力者：

石岡 春彦 国立国際医療研究センター AMR 臨床リファレンスセンター
自治医科大学付属病院 感染症科

A. 研究目的

近年、ヒト、医療、動物、家畜のみならず、国内外の河川、下水等の環境中からも薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性(AMR)対策に関心が高まっている。抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性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事例はなく、ヒト

および動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。そこで、環境がヒトおよび動物に与えるリスクの定量評価・推定、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立が急務である。

本研究では、環境由来の薬剤耐性菌や残留抗菌薬がヒト・動物にどんな影響があるか、環境、動物、ヒトの間で共通する特定の薬剤耐性は何か、環境曝露によるヒト及び動物へのリスクは存在するのか、曝露に対する介

入の有効性はどの程度なのかなどのリサーチクエスションに対して国内外の資料を収集し、レビューを実施する。最終的には、バイアスを評価し分析・統合を行うことを目的とする。

B. 研究方法

環境由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響について文献の情報収集および評価を行う。国内外の文献情報をもとにレビューを行った後、環境・ヒト・動物由来の薬剤耐性及び残留抗菌薬に関する本研究成果を解釈し、リスクアセスメントを実施する。具体的には以下の方法を用いて実施する。

1) 文献データベースの構築

一般環境由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響に関する研究論文を収集し、バイアスを評価し分析・統合の上、文献データベースを構築する。3つのリサーチクエスション（a. 海外渡航による ESBL 伝播リスク、b. 環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスク c. ESBL に対しするセファマイシン系抗菌薬の有効性）に基づき、以下の2通りの方法で文献検索を実施する。

【方法1：キーワードを設定する方法】

関連の強いと考えられる文献検索キーワードを5つほど選定し、研究論文検索サイト（PubMed/MEDLINE、The Cochrane Library、医中誌 Webをはじめ、google scholar、semantic scholarなど）により、本業務の目的と関連の深いと考えられる文献を探索的に抽出する。

【方法2：既存の関連報告書を起点とする方法】

既存の関連報告書の引用文献を調べ、本業務の目的と関連性の強い文献を抽出する。

2) 文献レビューの実施

1)で収集した文献について、関連部分の要

約を作成する。

3) リスクアセスメントの実施

令和4年度以降に、2)の文献レビューをもとに、一般環境（水圏・土壌）由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響について考察及び評価を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は特に個人情報を取り扱うものではなく、研究対象者に対する人権擁護や不利益性・危険性の排除は同意説明についての配慮は不要である。

C. 研究結果

a. 海外渡航による ESBL 伝播リスク

関連する検索式を用い、226文献を抽出し、ヒトへのリスク、海外渡航関連、便中の ESBL 産生菌保菌を対象とするとともに会議録などを1次スクリーニングにて除外し、34文献に対して論文を精読した結果、6文献が該当した。

アジアへの渡航(OR=2.38, 95% CI=1.88 to 3.02)とアフリカへの渡航(OR=2.45, 95% CI=1.90 to 3.16)がリスク因子であることが示された（図1、2）。

b. 環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスク

関連する検索式を用い、183文献を抽出し、薬剤耐性菌もしくは薬剤耐性遺伝子が含まれ、環境水に関連があり、環境水からヒトへの伝播に関する文献を対象とするとともに会議録などを1次スクリーニングにて除外し、新たに文献を加え精読した結果、8文献が該当した。

環境水中の ARB または ARG に暴露されるヒトのリスクには、環境水中でのレクリエーション、廃水処理施設での作業、溺水、津波による溺水が含まれた。環境水からヒトへの ARB 伝播の最も一般的なエビデンスは、疫学的リスク評価であった。8件の論文のうち、

ヒト試料から分離された同じ ARB または ARG が環境水からも検出されたことを示したのは 3 件のみであった (図 3)。

c. ESBL に対しするセファマイシン系抗菌薬の有効性

関連する検索式を用い、194 文献を抽出し、ESBL 血流感染症においてセファマイシンの効果を確認したもの、予後の記載があるもの、を対象とするとともに感受性のみ記載された文献については、スクリーニングにて除外し精読した結果、5 文献が該当し、台湾 (3 件) と日本 (2 件) の文献であった。

大腸菌は全体の 54.0% (409/757)、クレブシエラ属は 40.0% (303/757) であった。日本におけるセファマイシン投与群では 69.4% (59/85 例) にセフメタゾールが投与されていたが、台湾におけるセファマイシン投与群ではフロモキシセフのみが選択されていた。ESBL 血流感染症に対するセファマイシン治療とカルバペネム治療の予後については、有意差を認めなかった (オッズ比 [OR] 1.87 ; 95% 信頼区間 [CI] 0.98-3.56、 $p = 0.10$)。原因菌別の解析では、クレブシエラ属菌による BSI 患者では、大腸菌による BSI 患者よりも死亡率が高かった (OR 5.16、95%CI 3.03-8.78) (図 4)。

D. 考察

a. 海外渡航による ESBL 伝播リスク

対象論文数が少ないこと、当該地域の中でも国レベルでのリスク差異があることは、リミテーションとして残るが、本研究は 2020 年までの文献を対象としており、最も新しい報告である。海外渡航の際の安全管理の一つとして、薬剤耐性菌を持ち込まない注意喚起を行う上で、有用と考えられた。

b. 環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスク

薬剤耐性菌の環境水からヒトへの感染を示すエビデンスとしては、疫学的リスク評価の

分析が最も多かった。また、溺水や津波による感染症患者を対象とした研究では、環境水との直接接触によるエビデンスが示された。しかし、ヒトのサンプルから分離された同じ ARB または抗菌薬耐性遺伝子が環境水でも検出されたことを示したのは 3 件のみであった。環境水中の ARB がヒトに感染する可能性があることが示唆された。

c. ESBL に対しするセファマイシン系抗菌薬の有効性

セファマイシンの販売国の影響から、2 か国の文献が対象となった。全体でセファマイシンがカルバペネムに劣らない結果を認めたことは、薬剤耐性菌感染症の治療選択が増える観点から重要である。フロモキシセフについてはさらなる検討が必要である。遺伝子タイプや医療状況も鑑み、更なる調査が必要と考えられた。

E. 結論

環境水中の薬剤耐性菌がヒトに伝播することが示唆された。しかし、文献数および質は現時点では十分ではなく、より説得力のある形で証明する必要がある。

ゲノムシーケンスがコストおよび技術的に、比較的簡便に利用できるようになった現在、ヒトの検体から検出された耐性遺伝子が環境水中に存在し、さらにヒトへ循環するリスクについて、文献が著増していることから、改めて調査していく必要が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

その他発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

む)

なし

図 1. アジアへの渡航による ESBL 伝播リスク

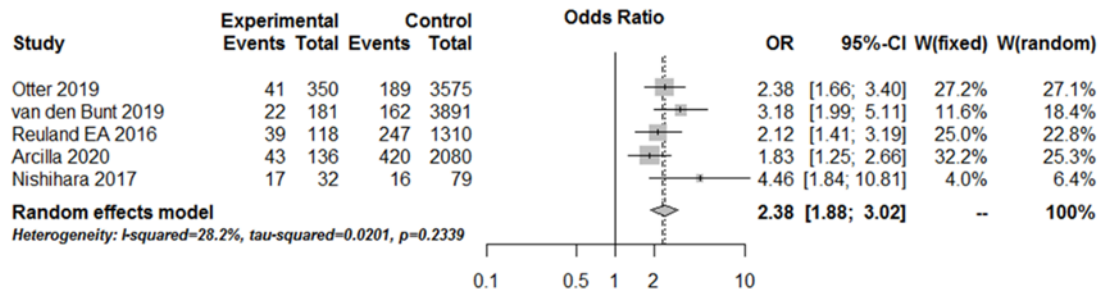


図 2. アフリカへの渡航による ESBL 伝播リスク

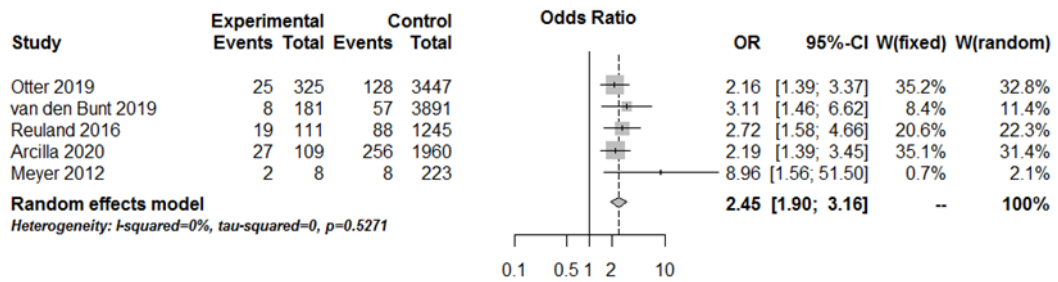


図 3. 文献選定フロー（環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスク）

Study	Risk for exposure to ARB	Evidence of ARB-transmission from environmental water to human	Detection of ARB or ARG in environmental water	Sampling of the environmental water
Engberg J 2004	Recreation	Swimming was associated with an increased risk for quinolone-resistant infections.	N	N/A
Søraas A 2013	Recreation	Swimming the past year was significantly associated with UTI.	N	N/A
van den Bunt G 2019	Recreation	Swimming in seawater was a significantly higher risk in patients with ESBL.	N	N/A
Leonard AFC 2018	Recreation	Surfers had significantly higher risk for acquiring ARB than non-surfers.	Y	Water samples were collected around the surfing area, more than 3years before sampling of fecal samples
Zieliński W 2021	WWTP	Higher concentration of ARGs was detected in samples from the wastewater treatment plant employees than those from the control.	Y	Untreated and treated wastewater samples were collected. The water samples were prepared at the same day as obtaining the human samples.
Rodríguez-Molina D 2021	WWTP	A sub-analysis demonstrated that WWTP workers or its nearby residents were at significantly higher risk of carrying ARB than distant residents.	N	N/A
Laurens C 2018	Drowning	<i>E. Asburiae</i> carrying a plasmidic blaIMI-2 gene caused bacteremia 5 days after drowning in a river. Clinical and river strains displayed identical PFGE profiles.	Y	Water sample was prepared 1 month later from the same river as occurring the drowning.
Maegele M 2005	Tsunami	Injured tissues were infected highly resistant bacteria.	N	N/A

図 4. 患者背景（ESBL に対するセファマイシン系抗菌薬の有効性）

First Author	Year	Country	Cephameycins	Carbapenems	Bacteria	Sample size	Mortality(N)	Mortality (%)
Matsumura Y [9]	2015	Japan	Cefmetazole or Flomoxef	Carbapenems	<i>E. coli</i>	113	8	7.1
Yang CC [10]	2014	Taiwan	Flomoxef	Ertapenem	<i>K. pneumoniae</i>	64	38	59.4
Fukuchi T [11]	2016	Japan	Cefmetazole	Carbapenems	<i>E. coli</i> (93 %) <i>K. pneumoniae</i> (3 %) <i>K. oxytoca</i> (3%)	69	6	8.6
Lee CH [12]	2015	Taiwan	Flomoxef	Carbapenems	<i>E. coli</i> (40.1 %) <i>K. pneumoniae</i> (59.9 %)	265	61	18.3
Lee CH [13]	2018	Taiwan	Flomoxef	Ertapenem	<i>E. coli</i> (52 %) <i>Klebsiella</i> species (30.1 %) <i>P. mirabilis</i> (8.9 %)	246	41	16.7

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 「環境微生物ゲノム情報の取得」

研究分担者： 黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・センター長

研究要旨

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説明することは、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、分担者・山口進康（大阪健康安全基盤研究所）と連携して、地方衛生研究所から水再生センター（下水処理場）の処理放流水をご提供いただき全国レベルの環境 AMR モニタリングを実施した（2018 年 7-8 月, 2019 年 1-3 月, 2019 年 8-9 月, 2020 年 2-3 月, 2020 年 7-9 月, 2021 年 2-3 月, 2021 年 7-8 月, 2022 年 1-3 月, 2022 年 7-9 月, 2023 年 1-3 月, 2023 年 7-8 月に渡る計 11 回のサンプル採取期間）。自治体から送付された放流水検体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）の存在比を明らかにすることができた。本成果のまとめを薬剤耐性（AMR）アクションプラン 2019, 2020, 2021, 2022, 2023 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>)

研究協力者：

堀場 千尋 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
石田 とも子 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
染野 里紗 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
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 36 自治体の地方衛生研究所・環境部門

A. 研究目的

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事例はなく、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

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 μ 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 ビーズ破碎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。2018 年以降、ARGs データベースの更新が頻繁に行われているため、全検体から得たメタゲノムデータを改めて ARGs_OAP v3.2.2 (PMID: 29408954) で再解析した。RPKM

(Reads Per Kilobase of gene per Million mapped reads) 法を採用して相対的な ARG 濃度を算出し、検体間の比較解析を実施した。

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 μ m 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/ μ l)。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。

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)、H31, R1, R2, R3, R4 そして R5 年度 (2018, 2019, 2020, 2021, 2022 そして 2023 年度) の水再生センター・放流水サンプルのメタゲノム解析データを取得した。2022 年度までの 5 年間 (夏・冬期の計 9 回) のメタゲノム解析データについて、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)。

5 年間 (2018~2022 年度) の成果として、44 自治体からご提供頂いた下水処理場・放流水サンプルの継続調査の結果、2020 年冬以降から新型コロナウイルス発生の影響と推定される ARG の増減が確認された。サルファ剤 (Sulphonamide) 耐性遺伝子が 2020 年冬までは増加傾向であったところ、2020 年夏で顕著な減少を示し、2022 年夏までの 2 年間は低い水準を維持していた。マクロライド耐性遺伝子は 2020 年冬に減少傾向を一旦示すものの、2022 年冬では新型コロナウイルス発生以前の水準にまで増加し戻っていることが確認された。

D. 考察

厚労科研研究班の編成により、H31 から R5 年度 (2018~2023 年度) の 6 年間 (夏・冬期の計 11 回) の水再生センターの処理放

流水を収集し、環境 AMR 調査の基盤を構築することができた。6 年間に渡り、44 自治体から毎回・計 48-68 箇所の水再生センターの処理放流水を計 656 検体ご提供いただいた。各自治体のご協力のもと環境 AMR 調査に資するチャレンジを継続できた。(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。「水再生センターの放流水に係る環境 AMR」を調査した国内外文献は少数ではあるものの、汚染リスクに係る実態の報告が増えつつある。欧米先進国であっても各種耐性菌が滅菌処理されずに放流されていることが明らかになり、今まさに環境リスク評価が進行中である。本邦でも定量的な環境調査をもってデータ収集し、環境負荷とそのリスクについて適正に評価できるよう体制を整備していくべきであろう。

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。全国自治体の排水処理施設を網羅するためにも、さらに費用対効果の優れたメタゲノム解析手法の開発も推進すべきであろう。

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。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。長期の全国調査(有志のみ)により本邦の環境 AMR レジストームの基盤を整備できたと考える。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にすぎず、環境 AMR をモニタリングのみに留めず、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よう期待し

ている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Sekizuka T, Yamaguchi N, Kanamori H, Kuroda M. Multiplex Hybrid Capture Improves the Deep Detection of Antimicrobial Resistance Genes from Wastewater Treatment Plant Effluents to Assess Environmental Issues. Microb Drug Resist. 2023;29:510-515.

その他発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

500 mL の放流水・表層を採水



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

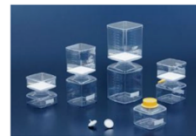
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/clc430282?lang=ja®ion=JP>

■ 27自治体から計46箇所の放流水

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

↓ その日のうちに

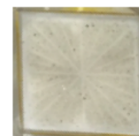
放流水を全部 Filter trap して、メンブレンをメスで剥離



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

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

■ 剥離メンブレンの写真



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

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

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



NextSeq 500 解読
150-mer, single-end

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

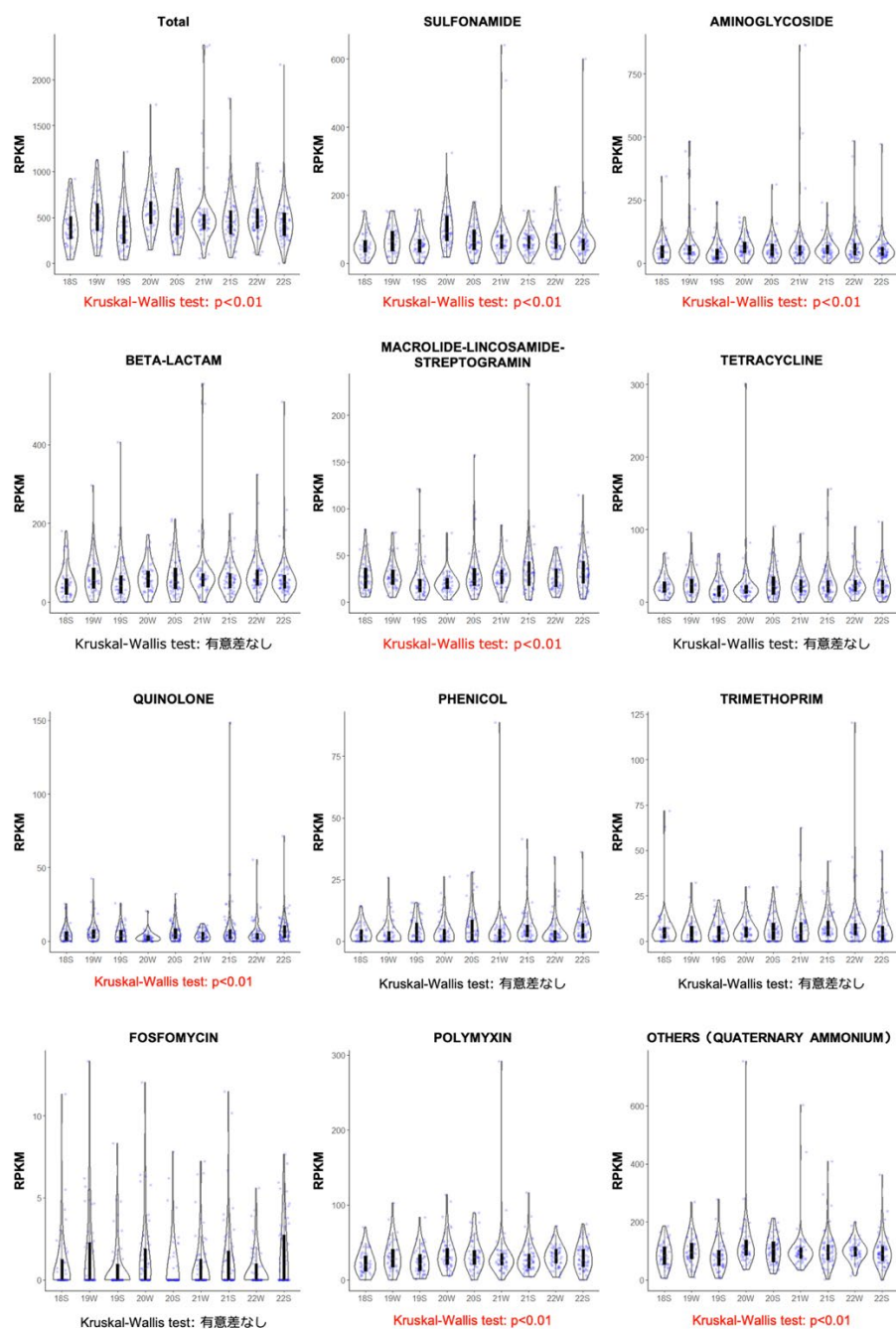


図2 本邦の水再生センター（下水処理場）放流水のメタゲノム解析（Metagenomic DNA-Seq）

2018年夏（18S）から年2回の調査にて2022年夏（22S）までの計9回の期間において自治体から提供された処理放流水から検出された各種カテゴリーの薬剤耐性因子（ARG）を RPKM（Reads Per Kilobase of gene per Million mapped reads）で標準化した。2018年以降、ARGs データベースの更新が頻繁に行われているため、全検体から得たメタゲノムデータを改めて ARGs_OAP v3.2.2 (PMID: 29408954)で ARGs の RPKM を算出した。

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解析」

研究分担者： 山口 進康 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部食品化学課 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、各種 β -ラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌科細菌を分離した。

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、42 地方衛生研究所から協力が得られ、2023 年 8 月～9 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。

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 42 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。

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、2023 年 7 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。

培養法における前処理方法は、2021 年度に検討した方法を用いて実施した。すなわち、試料水 400~500 mL を 0.45 μm 孔径のフィルターでろ過し、フィルターを CHROMagar ECC を用いて 36°C で 18 時間培養後、フィルター上のコロニーをかきとり、滅菌生理食塩水に懸濁させた。次に、培地上のコロニー数が約 30~300 となるようにマクファーランドスタンダードを用いて菌液を調製後、以下の 1)~2) の培地に塗抹した。

- 1) 0.25 $\mu\text{g/mL}$ の MEPM および 70 $\mu\text{g/mL}$ の ZnSO_4 を含有する CHROMagar ECC (M-ECC)
- 2) 1 $\mu\text{g/mL}$ の Cefotaxime (CTX) を含有する CHROMagar ECC (CTX-chromo)

分離したコロニーは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、34th ed.) に従い、微量液体希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (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、および、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。

また、これまでに分離した一部の株について、詳細を明らかにするため、NucleoBond HMW DNA (Takara Bio) で DNA 抽出後、全ゲノム解析をナノポアシーケンサー MinION (Oxford Nanopore technologies) により行い、耐性遺伝子の同定、その他薬剤遺伝子の検索およびプラスミド解析を実施した。

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。その結果、計 42 機関から研究協力を得ることができ (前年度よりも 3 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：2023 年 8 月~9 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ールを配布し、採水、前処理および試料調製が統一された方法で行われるよう依頼した。調製した試料は冷凍宅配便で国立感染症研究所に送付され、メタゲノム解析が行われ

た。なお、冷凍宅配便での発送までの間、試料は-80℃で保管するよう依頼した。

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

1. 菌の分離

培養法を用いて、環境水中の薬剤耐性菌調査を2023年7月に実施した結果、各種βラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌目細菌を分離した。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(CRE)はM-ECC培地から3株分離された。遺伝子のスクリーニングおよびシーケンスの結果、*bla*_{GES-24} 保有 *K. pneumoniae*、*bla*_{FRI-8} 保有 *E. roggenkampii*、*bla*_{GES-24} 保有 *Enterobacter* sp.であった。分離した株の概要を表1に示す。

ESBL産生株はCTX-chromo培地から8株分離され、その遺伝子型はCTX-M-1型、CTX-M-2、CTX-M-8型、CTX-M-9型、CTX-M-9+TEM型であった。

全4試料におけるESBL及び人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100%、25%となった。

2. ゲノム解析

分離した *bla*_{FRI-8} 保有 *E. roggenkampii* およびこれまでに我々が分離した2株の *bla*_{FRI-8} 保有株の計3株について、NGSデータによるプラスミド解析を実施したところ、すべてIncFIIに属していたが、その相溶性は低く、今回分離した株と最も相溶性が高かったのは、琵琶湖から分離された *E. asburiae* のプラスミド¹⁾であった(99.78%の一致度(coverage 94%))(図1-(a))。

2021-2022年に分離したNDM-5型CRE4株の内訳は、*E. coli*が2株、*K. pneumoniae*、*C. braakii*が各1株であり、4株とも調査地点2地点のうち1地点の下水処理場とその下流河川から分離された。プラスミド解析の結果、全ての株が *bla*_{NDM-5} の蔓延に寄与しているIncX3プラスミドを保有し、いずれの株も海外で分離されている株のプラスミドとの相溶性が高かった(99.99%の一致度

(coverage 99%以上))。また、4株の比較においても、相溶性が極めて高かった(図1-(b))。MLSTの結果、*E. coli*2株はST410、*K. pneumoniae*はST29、*C. braakii*がST110に分類された。

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

全国42の地方研究衛生研究所において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。

D. 考察

培養法における前処理方法として、2021年度より検討を開始した方法を用いて、分離培養を実施した。全4試料においてESBL及び人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100%、25%となり、現在の医療機関での検出状況と合致しているのではないかと考えられた。

これまでの調査で比較的多く分離している *bla*_{GES-24} 保有株は *K. pneumoniae*、*Enterobacter cloacae* complex、*R. ornithinolytica*の3菌種であるが、今年度の調査においても菌種は *K. pneumoniae* および *Enterobacter* sp.であった。国内の医療機関でGES-24陽性株が分離されることは稀であり、CRE病原体サーベイランスにおいても2018-2021年にかけて毎年1-2株分離されているのみである。しかし、他の報告において、病院排水中にGES-24陽性の病原性グラム陰性菌が存在し続けることで、耐性遺伝子あるいはプラスミドが拡散し、院内感染のリスクが高まる恐れを指摘されている²⁾。環境中から高頻度に *bla*_{GES-24} 保有株が多菌種から分離されることは、環境中の細菌が耐性遺伝子の拡散に寄与している可能性が示唆される。

プラスミド解析から *bla*_{FRI} 保有プラスミドは多様性を多く持つプラスミドであることがわかっているが、今回のFRI-8保有3株の比較においても、一部保存性を有する領域があ

るものの、高度に保存されているわけではないことが明らかとなった。FRI はこれまでに 12 のバリエーションが報告されており、FRI1-9 までは菌種が *Enterobacter* 属細菌であったため、*bla*_{FRI} 保有のプラスミドは *Enterobacter* 属細菌内でのみ保存されており、宿主域が狭いと考えていた。しかし、FRI-10 は *E. coli* が保有するプラスミド上に位置していたことから、今後は、菌種を超えた伝播も考えられる。また、FRI 型カルバペネマーゼ保有株は、臨床での報告例が少ないものの、大阪府内の環境水から我々はこれまでに 3 株分離しており、潜在的な拡散が示唆される。

今回分離された NDM-5 型カルバペネマーゼ産生 *E. coli*、*K. pneumoniae*、*C. braakii* の全ての株において、世界的な *bla*_{NDM-5} の蔓延に寄与している IncX3 プラスミド上に *bla*_{NDM-5} が検出された。国内で感染例が少ない NDM-5 型カルバペネマーゼ産生菌が、異なる菌種から高頻度に環境中から分離され、またそれらが保有するプラスミドの相同性が高いことから、これらは市中関連株ではなく、海外からの渡航者を介して、持ち込まれている可能性が高いと考えられた。

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 42 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。

薬剤耐性菌の分離において、2021 年度から検討している、フィルターを用いて前培養後、培養する方法がより効率的に目的とする菌を検出できる方法であることが示唆された。分離培養で得られる株は、CRE と比較すると ESBL 株が多く、全検体から検出されていた。これは、現在の医療機関での検出状況と一致しており、培養法を用いた薬剤耐性菌の分離は、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。一方、CRE の詳細な解析により、海外由来と考え

られる遺伝子を保有する株も分離されているため、放流水から分離される株が地域の感染状況の指標となり得るかについては、さらなるデータの蓄積が必要である。また、海外由来と考えられる遺伝子が今後定着及び拡散する可能性も否定できないことから、継続したモニタリングが重要と考えられた。

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. 安達史恵, 山口進康, 河原隆二. 環境水から分離されたカルバペネマーゼ産生菌の遺伝学的特徴. 第 58 日本水環境学会, 福岡, 2024 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

【参考文献】

- 1) Gomi R. et al. Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC and SFH-1) in Enterobacterales isolated from surface waters in Japan. J Antimicrob Chemother. 2022; 77:1237–1246.

- 2) Takizawa, S. et al. Genomic landscape of *bla*_{GES-5} and *bla*_{GES-24}-harboring Gram-negative bacteria from hospital wastewater: emergence of class 3 integron-associated *bla*_{GES-24} genes. J Glob Antimicrob Resist. 2022;31:196–206.

表 1 カルバペネム耐性株の概要

(a)

(b)

図 1

(a) *bla*_{FRI-8} を保有する 3 株のプラスミドと相同性が高いプラスミドとの比較

(b) *bla*_{NDM-5} を保有する 4 株のプラスミドの比較

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 「環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価」

研究分担者： 楠本 正博 農研機構動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域

研究要旨

本分担課題では、環境中の薬剤耐性が動物へ与える影響について評価することを目指し、農場環境水と家畜の間で伝達可能な耐性遺伝子および当該遺伝子を保有する細菌について解析する。

今年度は、養豚場の原尿槽（豚の排泄物や豚舎消毒後の廃水などを処理開始まで貯蔵するタンク）の水試料から分離した四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌 79 株より、四級アンモニウム耐性遺伝子（*qac*）とサルファ剤耐性遺伝子（*sul*）の両方を保有する菌株群から代表 13 株（コリネバクテリア属 4 株、ブルセラ属 3 株、フィロバクテリア属 1 株、アルカリゲネス属 1 株、コマモナス属 3 株、シュードモナス属 1 株）を選抜し、両耐性遺伝子の局在（染色体またはプラスミド）および伝達性を解析した。13 株のうちブルセラ属（菌種不明）の 2 株が 83.2 kb および 100.6 kb の *qac* および *sul* 陽性プラスミドを保有しており、特に 100.6 kb プラスミドでは一部の領域に薬剤耐性遺伝子が高度に集積されていたが、両ブルセラ属菌株から大腸菌への *qac* および *sul* 陽性プラスミドの伝達は確認できなかった。

以上のことから、農場での消毒剤の使用などにより環境（原尿槽）で選択された *qac* や *sul* を保有する耐性菌が農場内での循環を介して動物（豚）に影響を与えるリスクは低い、すなわち、これらの耐性遺伝子が他の菌に伝達し、新たに生じた耐性菌が問題となる可能性は低いと考えられる。

研究協力者：

村 雪乃	農研機構動物衛生研究部門	人獣共通感染症研究領域
渡部 真文	農研機構動物衛生研究部門	衛生管理研究領域
グルゲ・キールティ・シリ	農研機構動物衛生研究部門	衛生管理研究領域

A. 研究目的

近年では、ヒト（医療現場）や動物（畜産現場）の他に、国内外の河川や下水などの環境中からも薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性（AMR）対策への関心が高まっている。抗菌剤の環境汚染による薬剤耐性菌の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、ヒトおよび動物に及ぼす影響に関する定まった見解はない。本研究班では医学、獣医学、薬学、環境化学、ゲノム微生物学、医療情報学の専門家が結集して、環

境がヒトおよび動物に与えるリスクの評価・推定、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立、環境水中の薬剤耐性菌および抗菌薬の実態に関するサーベイランスや文献レビューを行うことを目的としている。

このうち本分担課題では、環境中の薬剤耐性が動物へ与える影響について評価することを目指し、環境水（特に農場排水）と家畜の間で伝達可能な耐性遺伝子および当該遺伝子を保有する細菌について解析する。昨年度までに、農場環境（原尿槽および放流水）の特徴として、四級アンモニウムやスルホンアミド（サルファ剤）などの消毒剤成分に関連する耐性遺伝子が多いことを明らかにし、原尿

槽（豚の排泄物や豚舎消毒後の廃水などを処理開始まで貯蔵するタンク）の水試料から四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌を分離した。

今年度は、養豚場の原尿槽から分離された四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌がそれぞれ保有する *qac* および *sul* について、耐性プラスミド保有株の全ゲノム配列および本プラスミドの大腸菌への伝達性を解析し、農場環境中の薬剤耐性が家畜へ与えるリスクを評価した。

B. 研究方法

養豚場の原尿槽から収集した水試料より昨年度に分離した 79 株の四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌（図 1）について、四級アンモニウム耐性遺伝子（*qac*）およびサルファ剤耐性遺伝子（*sul*）の両方を保有する菌株群（図 1：*qac*+/*sul*）から代表 13 株（コリネバクテリア属 4 株、ブルセラ属 3 株、フィロバクテリア属 1 株、アルカリゲネス属 1 株、コマモナス属 3 株、シュードモナス属 1 株）を選抜した。

選抜株について、S1 スクレアーゼを用いたパルスフィールドゲル電気泳動（S1-PFGE）を行い、*qacE* および *sul1* をそれぞれプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により、両遺伝子の局在を確認した。

200 kb 以下の位置に *qacE* および *sul1* 陽性のバンドを確認できた菌株について、ロングリード型次世代シーケンサー（PacBio Sequel II：HiFi リード）を利用を用いた全ゲノム解析および Microbial Genome Assembly を用いた *de novo* アセンブリを行い、四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性プラスミドを同定した。本プラスミドが保有する他の耐性遺伝子については、ResFinder を用いて解析した。

上記の耐性プラスミドを保有する菌株について、大腸菌 C600 をレシピエントとしたフィルター法により、四級アンモニウム耐性およびサルファ剤耐性を指標としてプラスミド伝達試験を行った。

C. 研究結果

S1-PFGE およびサザンハイブリダイゼーション解析により、13 株のうちブルセラ属の 2 株（ChrSMX30-14 株と ChrBC6-2 株）において 80～100 kb 付近の位置に *qacE* および *sul1* 陽性のバンドを確認し、残りの 11 株では電気泳動ゲルのウェル付近（染色体に相当する位置）に陽性バンドを確認した。*qacE* および *sul1* 陽性株の全ゲノム解析および *de novo* アセンブリにより各コンティグは環状配列となり、ChrSMX30-14 株は 3 個（138.6 kb、102.2 kb、83.2 kb）、ChrBC6-2 株も 3 個（246.6 kb、111.0 kb、100.6 kb）のプラスミドを保有しており、両株ともに *qacE* および *sul1* は同一プラスミド上（ChrSMX30-14 株は 83.2 kb、ChrBC6-2 株は 100.6 kb）に存在していた（表 1）。

ChrSMX30-14 株の 83.2 kb プラスミド（図 2）と ChrBC6-2 株の 100.6 kb プラスミド（図 3）の遺伝子構造を比較すると、83.2 kb プラスミドにおける塩基番号 32,400～42,500、49,600～65,200、67,400～80,000 の 3 領域が 100.6 kb プラスミドと高い相同性（それぞれ 95%、98%、99%）を示したが、プラスミド全体の構造は類似していなかった。また、両プラスミドには *qacE* および *sul1* の他にも複数の薬剤耐性遺伝子があり（表 1、図 2、3）、特に 100.6 kb プラスミドの塩基番号 26,000～49,000 の領域には薬剤耐性遺伝子が高度に集積されていた（図 3）。

フィルター法によるプラスミド伝達試験の結果、ChrSMX30-14 および ChrBC6-2 両株から大腸菌 C600 への *qacE* および *sul1* 陽性プラスミドの伝達は確認できなかった（検出限界：伝達頻度 10^{-9} ）。

D. 考察

養豚場において、原尿槽には豚の排泄物のほか、豚舎の消毒に使用した消毒剤などが流入している。豚の排泄物（主に液体成分）は希釈されながら原尿槽に到達するが、昨年度までの検討から、原尿槽では豚の腸管内とは異なる選択圧の下で異なる（細菌の増殖が起こり）細菌叢を形成していると考えられる。放流水（廃水処理後）における耐性遺伝子の

総量は原尿槽（廃水处理前）に比べて著しく少ないことが明らかになっていることから、豚で選択された耐性菌（耐性遺伝子）の農場外環境への放出リスクは極めて低いと考えられるが、養豚環境中（特に菌または遺伝子濃度の高い原尿槽）で選択された耐性菌や耐性遺伝子が農場内での循環を介して動物（豚）に影響を与える可能性については慎重に検討する必要がある。

平成30～令和2年度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」（研究代表：金森肇）では、原尿槽から収集した水試料の細菌叢で *Proteobacteria* 門の比率が最も高く、*Firmicutes* 門、*Actinobacteria* 門がそれに続くことを明らかにした。一方、昨年度までの検討では、原尿槽における主要な四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌は *Firmicutes* 門であり、*Proteobacteria* 門の耐性菌は大腸菌群選択培地を用いることで効率的に分離できるようになる程度の低含有量であることから、農場環境における消毒剤成分（四級アンモニウムやサルファ剤など）に関わる耐性菌として、大腸菌などの腸内細菌科細菌を含む *Proteobacteria* 門細菌は（存在量としては）それほど高リスクではない可能性がある。

耐性遺伝子の拡散の観点からは、昨年度までの検討から、原尿槽において四級アンモニウム耐性遺伝子 *qac* やサルファ剤耐性遺伝子 *sul* が *Proteobacteria* 門や *Actinobacteria* 門の細菌に偏在することが明らかになっている（図1）。今年度の検討の結果、原尿槽由来株のうち *qac* および *sul* 陽性プラスミドを保有する菌株はブルセラ属（*Proteobacteria* 門）の2株（共に菌種不明）のみであり、両株において *qac* および *sul* 陽性プラスミドの大腸菌への伝達性は確認できなかった。

以上のことから、農場での消毒剤の使用などにより環境（養豚場の原尿槽）で選択された *qac* や *sul* を保有する耐性菌が農場内での循環を介して動物（豚）に影響を与えるリスクは低い、すなわち、これらの耐性遺伝子が他の菌に伝達し、新たに生じた耐性菌が問題となる可能性は低いと考えられる。ただし、

原尿槽における四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌として量的に優勢な *Firmicutes* 門には、既知の伝達性耐性遺伝子によらない耐性メカニズムが存在する可能性があり、その動物へのリスクについては、さらなる検討が必要である。

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

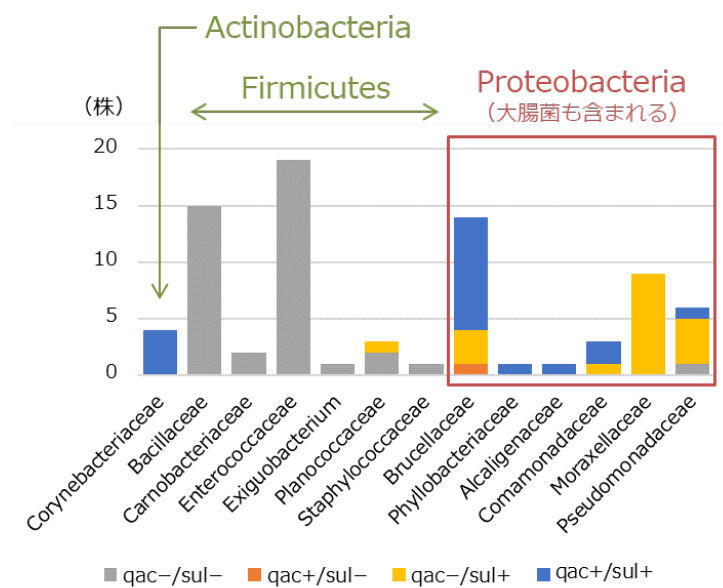


図 1 原尿槽から分離された四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性株における耐性遺伝子の分布

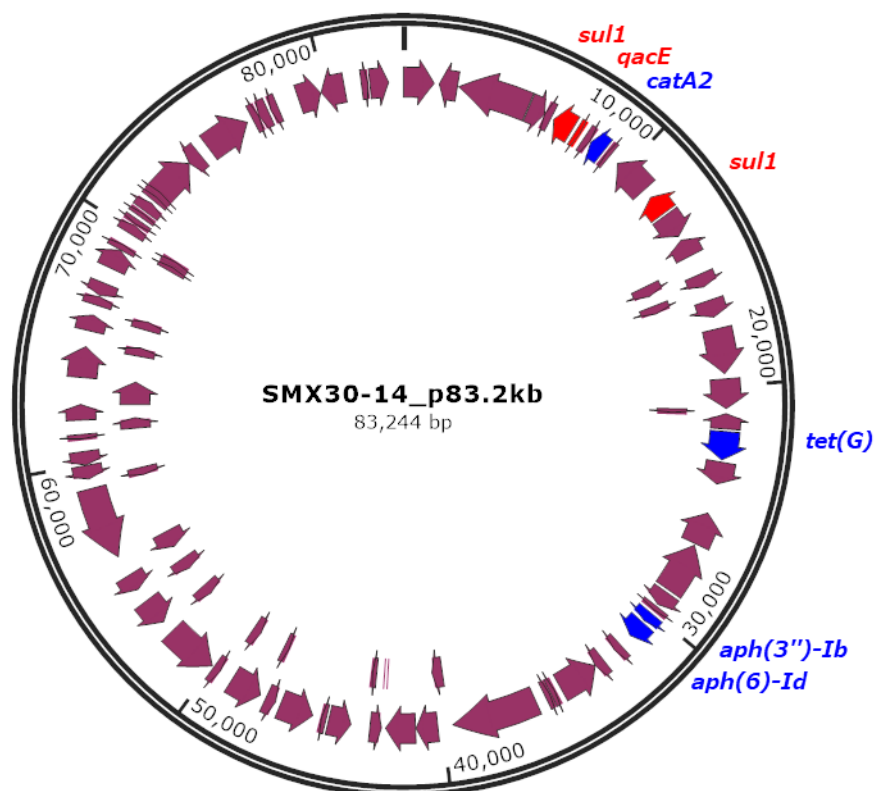


図 2 ChrSMX30-14 株の四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性プラスミド

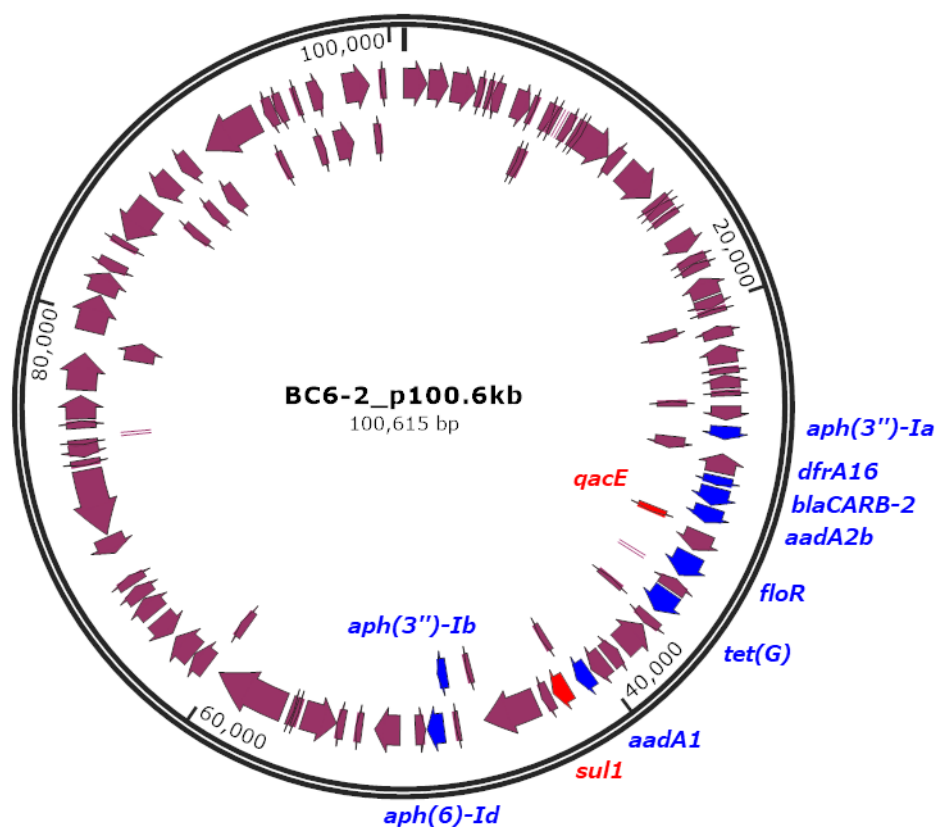


図3 ChrBC6-2株の四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性プラスミド

表1 四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性遺伝子を保有するプラスミドの概要

菌株名	細菌の分類	サイズ	<i>qac</i>	<i>sul</i>	他の耐性遺伝子
ChrSMX30-14	<i>Brucellaceae</i> (菌種不明)	83.2 kb	+	+	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>catA2</i> , <i>tet(G)</i>
ChrBC6-2	<i>Brucellaceae</i> (菌種不明)	100.6 kb	+	+	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>blaCARB-2</i> , <i>floR</i> , <i>tet(G)</i> , <i>dfrA16</i>

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 「残留抗菌薬の調査方法の確立と評価」

研究分担者： 渡部 徹 山形大学 農学部・教授

研究要旨

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、昨年度から引き続き、①これまでの成果である残留抗菌薬検出手法が、実河川での調査に適用可能か検討し、②河川水中の残留抗菌薬の検出頻度や濃度に対する都市下水や畜産排水の影響を調べるための現地調査を実施した。その結果は過去 2 年間と同様の傾向にあり、下水処理場の放流口付近の河川では、放流水の影響を強く受けるために、放流水で安定的に検出される抗菌薬が高頻度で検出された。このことから、放流水に向けて開発された方法は、河川水からの抗菌薬の検出にも適用できることが改めて確認された。また、この結果は、サ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、レボフロキサシン（特に、エリスロマイシン）を検出することで、都市下水を起源とする残留抗菌薬を調査できる可能性を示している。

一方で、河川水中からの抗菌薬の検出結果と大腸菌の耐性率との間の関係は、この 3 年間の調査でも明確にならなかった。残留抗菌薬の環境 AMR への影響を知るために、河川水に比べて抗菌薬が長期に渡って蓄積される可能性がある底質を対象にした調査も実施したが、河川水よりもさらに抗菌薬の検出が困難であった。今後は、底質と吸着して存在する抗菌薬についても検出できるよう、前処理方法の高度化が必要と考えられる。

研究協力者：

西山 正晃 山形大学 農学部・准教授

A. 研究目的

近年、ヒト、医療、動物、家畜はもとより、国内外の河川、下水等の環境中からも薬剤耐性菌が検出されており、ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性(AMR)対策に関心が高まっている。抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性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事例はなく、ヒトおよ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定量評価・推定、薬剤耐性機序や伝播経路解明に

つながる調査法の確立が急務であり、どの程度の薬剤耐性菌およびそれらに由来する薬剤耐性遺伝子が環境へと排泄され負荷を与え続けているのかについて、系統だった全国調査が必要である。

このような背景から厚生労働省科学研究費課題「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」の研究班が編成された。平成 30 年度～令和 2 年度において本研究班で環境 AMR モニタリングに資する手順書を作成し、環境水の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の調査方法の確立に向けた研究を実施してきた。放流処理水の環境 AMR モニタリング調査を全国展開するための体制を構築し、地方自治体の環境負荷の実態が遺伝子レベルで解明した。また、国内外の文献レビューを行い、環境中の薬剤耐性に

関する現状と課題を明らかにした。令和 3 年度からは、環境中の薬剤耐性および抗菌薬の標準的な調査法を確立し、本邦の環境 AMR に関する動向調査を進めている。

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、過去 2 年間に渡って、①これまでの成果である残留抗菌薬検出手法が、実河川での調査に適用可能か検討し、②河川水中の残留抗菌薬の検出頻度や濃度に対する都市下水や畜産排水の影響を調べるための現地調査を実施した。その結果、①について、先行研究で研究分担者が提案した下水処理水からの抗菌薬検出手法について、河川水からの検出にも適用可能であった。②については、下水処理場からの放流水(=下水処理水)から検出される抗菌薬が、その放流先の河川からも同様に検出される傾向がみられた。同じ河川内で調査地点を増やし広範囲での抗菌薬の検出を試みたところ、下水処理水の放流先での検出頻度が際立って高かった。

しかしながら、この地点で分離された大腸菌の薬剤感受性を調べたところ、よく検出された種類の抗菌薬に対する耐性率が高い状況ではなく、河川水に残留する抗菌薬の影響は見いだせなかった。そこで本年度は、同じ河川環境でも底質に存在する抗菌薬の検出を試み、下水処理水中の抗菌薬濃度の推定結果との関連を調べた。さらに、以上を総括して、環境中の抗菌薬のヒト及び動物への影響を調査するための評価指標(すなわち、調査対象とする環境試料と抗菌薬の種類、そして、その分析方法)をした。

B. 研究方法

昨年度までと同じ山形県内の都市下水処理場からの放流水を受容する河川を対象として、図 1 に示す 3 地点で、2024 年 2 月に底質と河川水を同時に採取した。この 3 地点は、昨年度までの調査で、河川水の抗菌薬濃度を測定した地点の中から、河川底質が採取できる条件で選んだ。

採取した底質試料については、現地で十分に水分を除いてから実験室に持ち帰り、遠心分離によって土壤間隙水を抽出した。この間

隙水をプレフィルターの後、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターで夾雑物を除去して、抗菌薬分析に供した。河川水試料についても、土壤間隙水と同様に、夾雑物を除去するための前処理を行った。

以上の間隙水試料および河川水試料からの抗菌薬の検出には、これまでの研究で下水処理水からの抗菌薬検出のために提案された検出手法を適用した。具体的には、固相抽出法を用いて水試料を前処理した後、高速クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)計で検出の有無を確認した後、簡易定量した。測定対象は 10 種類の抗菌薬(サ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、メロペネム、アンピシリン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリン、セフトキシチン)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。水試料 1500mL を 2 個のカードリッジに通液した後、カードリッジを乾燥させ、それぞれにつきメタノール 6mL を用いて対象成分を溶出した。この固相溶出液を 40℃に加温しながら窒素吹付によりわずかに乾固するまで濃縮した。これにアセトニトリル：水=5：95(0.1%ギ酸添加)溶液を 1mL 加えて再溶解させた後、上澄み液を分取して測定液とした。

MS 測定では、クロラムフェニコール及びアンピシリン以外は ESI-positive モードによりイオン化し、クロラムフェニコール及びアンピシリンは 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。保持時間の判定基準は、2 つのプロダクトイオン相対保持時間が 2.5%以内であることとした。イオン強度比に関する判定基準は、「2002/657/EC」(欧州委員会)を参考とし

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 200, 2000 もしくは 10000ng/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。

C. 研究結果

山形県内の下水処理場からの放流水を受容する河川での抗菌薬の測定結果を表 1 に示す。下水処理場の放流口の直下にある AK3 地点の河川水では、測定対象とした 10 種類の抗菌薬のうち、サ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、アンピシリン、レボフロキサシン、クロラムフェニコールが検出された。アンピシリンを除く 5 種類の抗菌薬は、昨年度までの調査でも同地点の河川水から年間を通じて検出されていた。先行研究で同じ下水処理場からの放流水を対象に行った調査では、サ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、レボフロキサシンが高頻度で検出されており、この放流水が起源であることは明らかであるが、クロラムフェニコールは放流水からは検出されないため、その起源は他にあるのかもしれない。

昨年度までの調査では、AK3 以外の地点でも、エリスロマイシンやクロラムフェニコールが散発的に検出され、下水処理場以外の排出源の存在を示していたが、今年度の 1 回のみの調査では、AK2 および AK4 とともにいずれの抗菌薬も検出されなかった。

底質間隙水中の抗菌薬についても、AK2 および AK4 では検出されず、AK3 地点でのみ、トリメトプリムとエリスロマイシンが検出された。これらは、上述した通り同じ地点の河川水からも常に検出される抗菌薬であり、その起源は下水処理場からの放流水であろう。AK3 地点の河川水から検出されたサルファメトキサゾール、アンピシリン、レボフロキサシン、クロラムフェニコールが、同地点の底質間隙水から検出されなかったことは、抗菌

薬の底質への吸着や底質中での分解が関与しているかもしれない。

D. 考察

昨年度までの調査結果と同様に、下水処理場の放流口付近の河川水からは、サ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、レボフロキサシン、クロラムフェニコールが検出された。その他の 2 地点では、分析対象とした 10 種類の抗菌薬はいずれも不検出であった。この傾向は、河川底質（実際には間隙水）でも同様であり、下水処理水の放流口付近でのみ、トリメトプリム、エリスロマイシンが検出され、その他の 2 地点の底質からはどの抗菌薬も検出されなかった。

研究協力者が、本研究と同じ地点の河川水から大腸菌を分離し、その薬剤耐性を調べた結果では、アンピシリン、クラブラン酸／アモキシシリン、テトラサイクリンに対する耐性率が他の地点よりも高く、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、クロラムフェニコールがやや高かった。本研究とは調査対象としている抗菌薬と異なる部分はあるものの、河川水からの検出結果との関連は明確ではなかった。この改善のために、河川底質（間隙水）中の抗菌薬に関する調査を今年度は実施したが、河川水よりもさらに抗菌薬の検出が困難であった。今後は、底質と吸着して存在する抗菌薬についても検出できるよう、前処理方法の高度化が必要と考えられる。

E. 結論

河川水中の抗菌薬の調査結果については、過去 2 年間と同様の傾向にあった。つまり、下水処理場の放流口付近の河川では、放流水の影響を強く受けるために、放流水で安定的に検出される抗菌薬が、河川水からも高頻度で検出された。このことから、放流水に向けて開発された方法（固相抽出法を用いて水試料を前処理した後、LC-MS/MS）計で測定する方法）は、河川水からの抗菌薬の検出にも適用できることが改めて確認された。この結果から、サ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、レボフロキサシ

ン（特に、エリスロマイシン）を検出することで、都市下水を起源とする残留抗菌薬を調査できる可能性を示した。

一方で、河川水中からの抗菌薬の検出結果と大腸菌の耐性率との間の関係は、この3年間の調査でも明確にならなかった。残留抗菌薬の環境 AMR への影響に関しては、河川水に比べて抗菌薬が長期に渡って蓄積される可能性がある底質を対象にした研究が推奨される。そして、その研究には、底質から効果的に抗菌薬を抽出するための前処理手法の開発が求められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. Yoneda I, Nishiyama M, Watanabe T. Comparative experiment to select water quality parameters for modeling the survival of *Escherichia coli*. 21st Symposium on Health-Related Water Microbiology (Watermicro23), Darwin, Australia, June 4-9, 2023.
2. Saito S, Watanabe T, Nishiyama M. In-vitro experiment to evaluate persistence of coliform bacteria producing extended-spectrum β -lactamase and conservation of relevant genes. Water and Environment Technology Conference 2023 (WET2023), Online, July 8-9, 2023.
3. Lu H, Yoneda I, Nishiyama M, Watanabe T. Effects of physico-chemical properties of sediment in water environment on the survival of *Escherichia coli*. 9th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition 2023, Kaohsiung, Taiwan, October 22-26, 2023.
4. Nishiyama M, Mori M, Yoneda I, Watanabe T. Distribution and characterization of extended-spectrum

beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a river basin in Yamagata prefecture, Japan. 9th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition 2023, Kaohsiung, Taiwan, October 22-26, 2023.

5. 西山正晃, 劔持ひろ, 森祐哉, 米田一路, 渡部徹. 東北地方の一級河川から単離した ESBL 産生大腸菌の時空間分布. 第26回日本水環境学会シンポジウム, 大阪, 2023年9月
6. 齋藤静香, 渡部徹, 西山正晃. In vitro 実験における ESBL 産生腸内細菌科細菌の生残性と耐性遺伝子の保存性の評価. 日本水処理生物学会第59回大会(山形大会), 鶴岡, 2023年11月
7. 米田一路, 西山正晃, 渡部徹. 湖沼における大腸菌の死滅速度の予測に最適なモデルの選定. 日本水処理生物学会第59回大会(山形大会), 鶴岡, 2023年11月
8. 米田一路, 西山正晃, 渡部徹. 湖沼の底泥における大腸菌の死滅速度を予測する最適モデルの選定. 令和5年度土木学会東北支部技術研究発表会, 盛岡, 2024年3月
9. 米田一路, 西山正晃, 渡部徹. 湖沼の底泥における大腸菌生存モデルに採用すべき環境因子の選定. 第58回日本水環境学会年会, 福岡, 2024年3月
10. 齋藤静香, 渡部徹, 西山正晃. In vitro 実験による ESBL 産生腸内細菌科細菌の生残性と耐性遺伝子の保存性の評価. 第58回日本水環境学会年会, 福岡, 2024年3月

論文発表

なし

その他発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

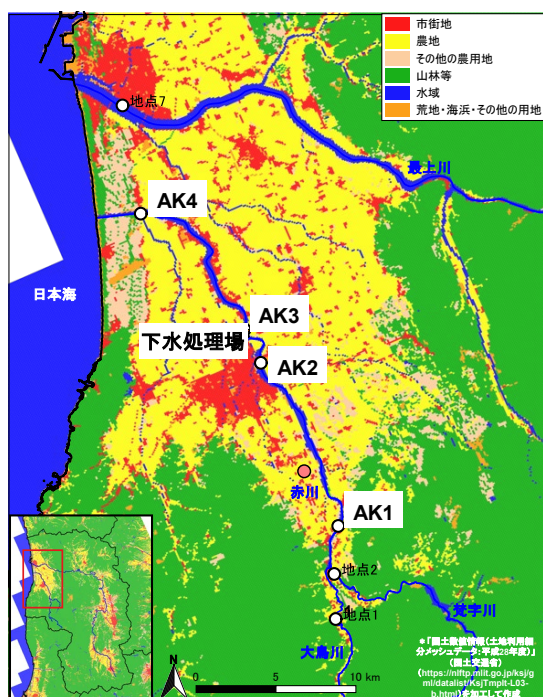


図1. 調査地点（本年度はこのうち、AK2～AK4 で調査を実施した）

表1. 山形県内の下水処理場からの放流水を受容する河川における
底質と河川水の残留抗菌薬の検出結果（単位：ng/L）

	河川水			底質間隙水		
	AK2	AK3	AK4	AK2	AK3	AK4
スルファメトキサゾール	<0.8	9	<0.8	<2	<8	<0.7
トリメトプリム	<0.4	10	<0.4	<0.8	8	<0.3
エリスロマイシン	<0.6	40	<0.6	<2	20	<0.4
メロペネム	<500	<500	<500	<1000	<5000	<400
アンピシリン	<500	2000	<500	<1000	<5000	<400
シプロフロキサシン	<50	<50	<50	<90	<500	<40
レボフロキサシン	<0.6	30	<0.6	<2	<6	<0.5
クロラムフェニコール	<0.3	3	<0.3	<0.5	<3	<0.2
オキシテトラサイクリン	<5	<5	<5	<9	<50	<4
セフォキシチン	<100	<100	<100	<200	<900	<80

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。

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 「環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響」

研究分担者： 東 剛志

大阪医科薬科大学 薬学部・助教

研究要旨

薬剤耐性（AMR）の出現と蔓延が、世界的に深刻な規模で進行しつつある。AMR アクションプランによる問題解決に向け、世界保健機関（WHO）は人－動物－環境によるワンヘルス（One Health）によるアプローチを提唱しており、各国で対策が進んでいる。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、環境における薬剤耐性への影響を解明することは、薬剤耐性に関する施策を推進していくために重要である。本分担研究では、国内の都市部の下水処理場と河川を対象に通年での残留抗菌薬の実態調査を継続して行うとともに、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）及び分担者・松永展明（国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンター）、大曲貴夫（国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター、AMR 臨床リファレンスセンター）と連携して、環境水中に残留する抗菌薬濃度のハイスループット解析についての検討を試みた。具体的には、これまで用いられている手作業での固相抽出による環境試料の前処理操作系をもとに、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系を開発する上で必要となる各種測定条件についての基礎検討を行った。

環境水中の残留抗菌薬のハイスループット測定系の開発に必要な因子として、固相の量、固相への環境水の通水量、ろ過操作の有無、溶出液量、最終溶媒の組成について各々検討を行った。その結果、手作業によるマニュアル測定と、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系の結果は概ね一致しており、高い精度を維持しつつ多地点における抗菌薬による環境汚染の実態を把握するうえで有効なアプローチとなりうると考えられる。今後環境水中の残留抗菌薬の調査方法の標準化に向けて検討を行うとともに、環境中の抗菌薬の全国的なモニタリングを実施してさらなる知見の収集を行うことで、薬剤耐性菌の諸問題について包括的な理解を行うことが可能である可能性が示唆された。

研究協力者：

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
松永 展明	国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンター・臨床疫学室長
大曲 貴夫	国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター・センター長 AMR 臨床リファレンスセンター・センター長

A. 研究目的

抗菌薬に耐性を有する薬剤耐性菌の出現と蔓延が、世界的な規模で進行しつつある。世

界保健機関（WHO）は、薬剤耐性菌に対する人－動物－環境による包括的な対策として、ワンヘルス（One Health）による取り組みを提唱するとともに、各国に国家行動計画の

策定を求めている。日本においても薬剤耐性（AMR）対策アクションプランが 2016 年に制定され、これまでの取り組みにより得られた知見をもとに 2023 年からさらなる発展を図るアクションプランが策定され、国を挙げた対策が進んでいる。

近年の研究により、これらの薬剤耐性菌が河川や湖沼、海域といった水環境中から検出されることが明らかにされつつある。ところで、これらの水環境中には薬剤耐性菌に加えて、抗菌薬も残留していることが報告されている。環境中へと流入する抗菌薬の現状と実態を把握することは、薬剤耐性菌及び抗菌薬の環境への影響を評価する上で有意義な知見となるのみにとどまらず、臨床領域において薬剤耐性菌の問題の評価と解決に向けた対策を考える上で重要であると考えられる。一方で、環境を対象とした薬剤耐性菌については世界的にみても知見が限られており、未だ不明なことが多いのが現状である。そのため、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、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知見を収集する目的で、1) 環境水の薬剤耐性を評価するためのモニタリング方法を確立することで、本邦における環境水の残留抗菌薬の実態を調査する。2) 全国規模でのモニタリング調査の実施に必要となる、ハイスループット化システムの開発検討を行い基礎的な知見の収集を行うことで、残留抗菌薬の観点からワンヘルス・アプローチの発展に繋げる。

B. 研究方法

1. 下水処理場の流入水を用いた環境水中の残留抗菌薬のハイスループット測定解析法の開発検討

都市部の下水処理場に流入する下水試料を用いて、これまで用いられている手作業によるマニュアル測定系の固相抽出による環境試料の前処理操作を基に、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使する

ハイスループット測定系を開発する上で必要となる分析条件の検討と最適化を試みた。測定対象とする抗菌薬は、国内の臨床現場で用いられている抗菌薬や使用量が多い抗菌薬と、国内外で水環境中からの検出報告事例がある主要な抗菌薬を対象に 15 成分の各種抗菌薬（ampicillin, cefazolin, cefdinir, cefpodoxime, cefpodoxime proxetil, ceftiofur, chlortetracycline, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, levofloxacin, minocycline, oxytetracycline, tetracycline, vancomycin）について検討を行った。

2. 手作業によるマニュアル測定系での環境水中の残留抗菌薬の測定系

手作業によるマニュアル測定系については、これまでの報告で主として用いられている測定条件を基にして、採取した下水処理場の流入水 10 mL をガラス繊維ろ紙（GF/B : 1 μ m）でろ過した後、メタノールと pH3 に調整した MilliQ でコンディショニングしたシリンジバレル型の OASIS HLB 固相抽出カートリッジに流速 1 mL/min で通水し固相抽出を行った。通水後、固相を pH3 MilliQ で洗浄した後真空ポンプで吸引脱水を行い、アセトン 3 mL 及びメタノール 3 mL で溶出し、37 $^{\circ}$ C の条件で窒素ガスで穏やかに濃縮乾固した。その後、0.1%ギ酸：メタノール（9：1）溶液 200 μ L で再溶解し、UPLC-MS/MS（Waters）による高感度な多成分同時分析法により抗菌薬の検出と定量を行った。

3. 自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定条件の検討

自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系による、環境水中の残留抗菌薬の測定解析系開発を試みるにあたり、迅速・大量解析を可能とする系として 96well 型の OASIS HLB 固相抽出プレートに着目し、固相の量、固相への環境水の通水量、ろ過操作の有無、溶出液量、最終溶媒の組成について各々検討を行

った。その他の操作については、2で述べた固相抽出の各操作を自動分注装置と自動固相抽出前処理装置により各々行い、溶出液を用いて固相から溶出させた溶液を 37 °C の条件で窒素ガスで穏やかに濃縮乾固した後、0.1%ギ酸：メタノール（9：1）溶液 100 µL で再溶解し、UPLC-MS/MS（Waters）による高感度多成分同時分析法で抗菌薬の検出と定量を行った。ここで得られた結果と、手作業によるマニュアル測定系で得られた結果を比較することにより、ハイスループット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定系としての有効性評価を行った。

C. 研究結果

1. 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討（添加回収試験における固相への試料負荷量の影響）

96well 型の固相抽出プレートを用いた環境水中の残留抗菌薬の測定系の開発として、現在市販されている 96well 固相抽出プレートの固相量の各規格（5 mg・10 mg・30 mg・60 mg）のうち、従来型の手作業によるマニュアル測定で主に用いられているシリンジパレル型の固相抽出カートリッジの固相量（200 mg）を参考に、固相量 30 mg 及び 60 mg を用いて固相への試料負荷量を変化させた際の添加回収試験の結果を図 1 に示す。

検討を行った各排水試料負荷量のうち、2.5 mL を負荷させた場合に回収率が高い成分が最も多くなり、70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg 及び 60 mg とともに 9 成分、40%～70%の回収率を示す成分については各々5 成分及び 4 成分であり、20%～40%の回収率を示す成分は各々1 成分及び 2 成分で、20%以下の回収率となる成分についてはみられなかった。固相に負荷する排水試料の体積量が増加するに伴い、固相量 30 mg 及び 60 mg いずれの場合においても回収率が低下する傾向がみられ、5 mL を負荷させた場合には 70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg 及び 60 mg とともに 6 成分に減少し、20%以下の回収率となる成分が各々1 成分及

び 2 成分となった。さらに、10 mL を負荷させた場合には 70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg 及び 60 mg で各々4 成分及び 2 成分、20%以下の回収率となる成分が各々3 成分及び 2 成分と、固相の保持量限界を超過して固相に保持されずに通水する破過現象が生じていると考えられた。

従来型の手作業によるマニュアル測定で主に用いられているシリンジパレル型の固相抽出カートリッジ（固相量（200 mg））を用いた測定では、試料負荷量は 10 mL 程度であり、LC-MS/MS による測定解析を行う際に、固相抽出後の溶液を最終的に 50 倍濃縮した溶液を測定している。96well 型の固相抽出プレートを用いた測定において、固相に負荷する排水試料の体積量を 2.5 mL 以下にすることで回収率が向上する可能性が考えられる。しかし一方で、LC-MS/MS による測定解析を行う際に必要な体積量を考慮すると濃縮倍率が最大で 25 倍となること、排水試料の負荷体積量が減少することにより検出下限濃度（LOD）や定量下限濃度（LOQ）が上昇し、環境試料中に ng/L の微量濃度で存在する抗菌薬の高感度検出に支障が生じる可能性が懸念されうると考えられる。そのため、迅速・大量解析を可能とする精度の高い測定系の開発する目的とバランスを考慮して、固相への試料負荷量 2.5 mL の条件で以後の検討を行った。

2. 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討（添加回収試験におけるろ過操作の影響）

次に、固相抽出を行う前段階でろ過処理を行うことによる添加回収試験への影響を、図 2 に示す。固相量 30 mg 及び 60 mg の 96well 型の固相抽出プレートとともに、ろ過処理を行うことによる回収率への影響は確認されず、ろ過を行わずに排液を直接固相に通水しても、精度を維持して測定を行うことが可能であると考えられた。これらの結果については、試料負荷量が多いシリンジパレル型の固相抽出カートリッジで同様の操作を行った場合、固相が目詰まりして通水が困難になることを考慮すると、操作の迅速・簡便化を図る上での

利点となりうる可能性があると考えられる。

3. 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討（添加回収試験における溶出液量の影響と従来法との比較）

固相量 30 mg 及び 60 mg の 96well 型の固相抽出プレートを用いて、固相抽出後の固相から測定対象抗菌薬を溶出させる際に用いる、溶出液の体積量を 50 μg ・100 μg ・500 μg ・1,000 μg と変化させた際の添加回収試験の結果を図 3 に示す。

溶出液の体積量 50 μL 及び 100 μL では、20%以下の回収率となる成分が固相量 30 mg 及び 60 mg について各々15成分及び2成分、15成分及び13成分となり、大部分の抗菌薬が溶出せずに固相に分配している状態であると考えられた。しかし、溶出液の体積量を 500 μL 及び 1,000 μL に増加させた場合には、70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg で 9~10 成分、60 mg の場合では 10~12 成分、40%~70%の回収率を示す成分については各々4~6 成分及び 2~3 成分と回収率が向上し、両者の分布は類似する傾向がみられた。

これらの結果から、96well 型の固相抽出プレートを用いた測定の際に、固相に通水する溶出液量を増加させることで十分な溶出操作を行うことができると考えられた。固相からの溶出液が集められるコレクションプレートのうち、LC-MS/MS による測定解析を行う際に適した微量体積のインジェクションに適したコレクションプレートは、現在 700 μL のタイプのみが市販されている。溶出液量が 1,000 μL の場合には、上記したコレクションプレートを 2 個を用いて各々濃縮した後、最終的に溶液を 1 つに集約する操作が必要となり実質的に煩雑な操作が生じるため、固相への溶出液量 500 μL の条件で検討を行った。

なお、抽出操作は一般的に抽出操作の回数を増加させることで回収率が向上する可能性があることが知られている。そのため、溶出液の全量（500 μL ）を 1 度に通水させる場合と、2 回（250 μL ×2）に分けて通水させる操作についてもあわせて検討を行ったところ、両者の間で回収率に違いがみられなかった（図 4）。ここから、十分な溶出液量を確保

することで操作性を高めることが可能であると考えられた。

4. LC-MS/MS 測定時における最終溶媒の溶媒組成における各抗菌薬のピーク強度の影響

最後に、LC-MS/MS による測定解析を行う際に、固相抽出後の溶液を窒素ガスで穏やかに濃縮乾固させて定容した最終溶媒に溶解する操作について、最適な最終溶媒の溶媒組成について検討を行った結果を図 5 に示す。

得られた結果より、0.1%ギ酸水溶液とメタノールの割合を各々 90 : 10、75 : 25、60 : 40、45 : 55、30 : 70、15 : 85、0 : 100 と変化させて回収率への影響について検討を行ったところ、0.1%ギ酸水溶液：メタノールが 90 : 10 の条件で最も回収率が高く、0.1%ギ酸水溶液：メタノールが 0 : 100 の有機溶媒 100%の条件で最も回収率が低くなる結果が得られた。これらの結果は、精度の良い測定を行うためには、固相抽出操作での溶出操作（溶出液：メタノールとアセトン 100%の有機溶媒）後に、有機溶媒の濃度調整と適した濃縮倍率を得るために、固相抽出後の溶液を窒素ガスにより濃縮乾固させたあとに、水系溶媒の割合が高い最終溶媒に置換する必要があること、精度を維持して測定を行うためには、窒素ガスにより濃縮乾固操作が不可欠であることを示唆していると考えられる。

今後さらなる詳細な検討を行い知見の収集を継続するとともに、本研究課題で検討を行った自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせて駆使するハイスループット測定系について、実際の環境水試料を用いたモニタリングへの適応と有効性の検証を行うとともに、全国規模でのモニタリング調査へと繋げる基盤の構築を行うことが重要であると考えられる。

D. 考察

本分担研究において、これまでに手作業によるマニュアル測定で実施されてきた、環境水中の残留抗菌薬濃度の評価測定について、

迅速・大量解析を可能とする自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系の有効性評価に資する成果が示唆されている。

今回検討を試みた、96well型の固相抽出プレートを用いた、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置による排水中の抗菌薬測定系は、従来型の手作業によるマニュアル測定で主に用いられている、1検体毎に個別に測定操作を行うシリンジパレル型の固相抽出カートリッジの固相量と比較して、迅速性に優れる利点がある。さらに、測定精度についても、手作業によるマニュアル測定と同等か若干良好となりうる結果が得られており、本測定系が薬剤耐性菌と残留抗菌薬をあわせた全国規模でのモニタリング調査を検討する上で有効な手法となりうる可能性を示唆していると考えられる。

今後継続して検討を行うことで、水環境における抗菌剤の影響に関する詳細なリスク評価・管理を行うために、地域特性を考慮し調査地点を拡張して、環境中の抗菌薬濃度推定手法について知見の収集と有効性の検証に努めていくことが重要であると考えられる。

E. 結論

本研究分担において、環境水中に存在する残留抗菌薬の調査方法の確立と、全国的なモニタリングに不可欠となる迅速・大量解析法の開発とその有効性評価に資する成果を得た。本研究で提唱している環境水中の残留抗菌薬濃度を高精度かつ高効率で測定する手法は、我が国だけでなく欧米諸国や、急速に発展を続けるアジア諸国においても同様の対策検討の発展についても寄与することが出来ると考える。さらに、WHOにより各国で対策を行うことが義務付けられている薬剤耐性アクションプランやワンヘルス・アプローチの一助となる可能性をも秘めていると考えられる。

今後調査を継続するとともに、各自治体の協力を得て、地方衛生研究所等による全国的な環境水モニタリング調査へと発展させるための基盤を整備していく予定である。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

について包括的な理解を行うことが可能であると考えている。

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、そしてこれらの調査を全国規模で実施可能とするハイスループット化システムの確立とその有効性の検証をもって、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

該当なし

G. 研究発表

書籍

1. 東 剛志, 関塚剛史, 黒田 誠, 片桐美和, 渡邊 学. 医療機関に由来する排水処理へのオゾンの応用. オゾンの利活用事例集 追補版, 日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会. 2023;36-40.

論文発表

1. Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M. Performance of a pilot-scale continuous flow ozone-cased hospital wastewater treatment system. *Antibiotics*. 2023;12:932.
2. Azuma T, Usui M, Hayashi T. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater by ozone-based advanced water treatment processes. *Sci Total Environ*. 2024;906:167432.
3. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. *獣医疫学雑誌*. 2023;27:9-16, 2023.
4. 東 剛志, 林 哲也. 薬剤耐性とワンヘルスーオゾン処理の有効性について－. *相愛大学研究論集*. 2023;39:17-26.
5. 東 剛志. 大阪の水環境 淀川中下流・支川における抗菌薬および薬剤耐性菌による環境問題への取り組み. *水環境学会誌*. 2023;46:240-244.

その他発表

1. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 第 61 回獣疫学会学術集会 シンポジウム「薬剤耐性問題：ヒト・動物・環境のインターフェイス」, 日本獣医畜産大学, 2023 年 3 月 (招待講演)
2. 東 剛志, 臼井 優, 林 哲也. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 32 回年次研究講演会, 東京都立大学, 2023 年 6 月 (招待講演)
3. 東 剛志. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 40 回オゾン技術に関する講習会・見学会, フォレスト仙台, 2023 年 12 月 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

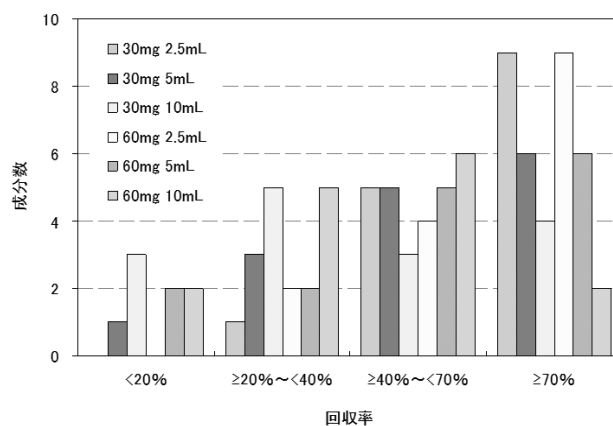


図 1 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討
(固相量 30 mg 及び 60 mg の条件での添加回収試験における固相への試料負荷量の影響)

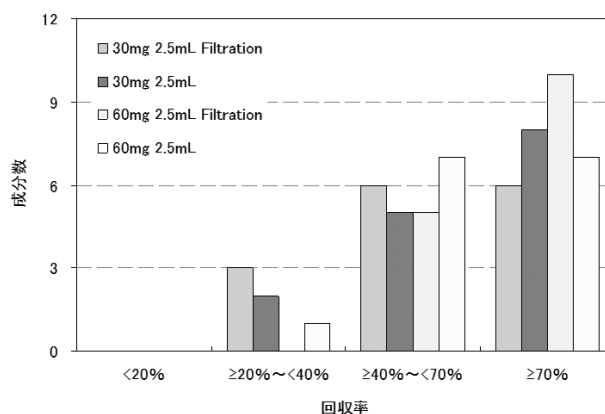


図 2 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討
(固相量 30 mg 及び 60 mg の条件での添加回収試験におけるろ過操作の影響)

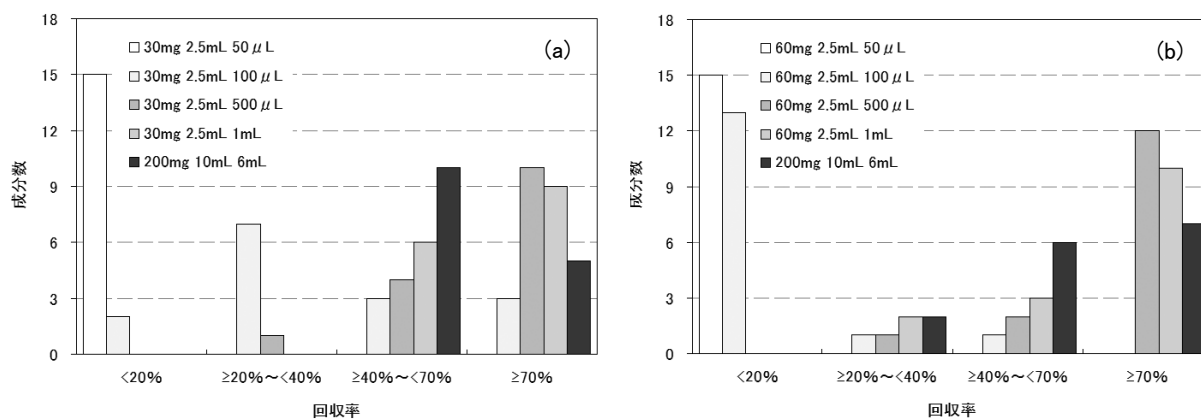


図 3 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討

((a)固相量 30 mg 及び(b)60 mg の条件での添加回収試験における溶出液量の影響と従来法との比

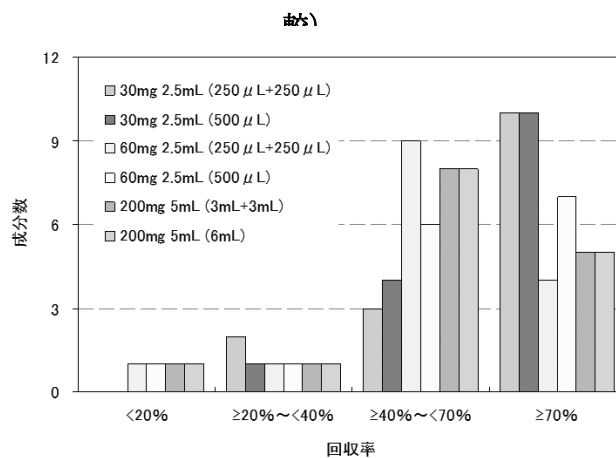


図 4 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討

(固相量 30 mg 及び 60 mg の条件での添加回収試験における複数回による溶出操作の影響と従来法との比較)

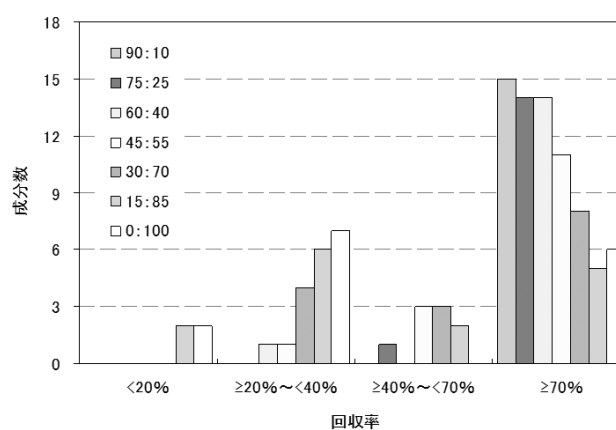


図 5 LC-MS/MS 測定時における最終溶媒の溶媒組成における各抗菌薬のピーク強度の影響

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
東 剛志, 関塚剛史, 黒田 誠, 片桐美和, 渡邊 学.	医療機関に由来する排水処理へのオゾンの応用	日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会	オゾンの活用事例集 追補版	日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会	大阪	2023	36-40

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H.	Highly sensitive detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture target enrichment	mSphere	8(4)	e0010023	2023
Sekizuka T, Yamaguchi N, Kanamori H, Kuroda M.	Multiplex Hybrid Capture Improves the Deep Detection of Antimicrobial Resistance Genes from Wastewater Treatment Plant Effluents to Assess Environmental Issues	Microb Drug Resist	29(11)	510-515	2023
Azuma T, Usui M, Hayashi T.	Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater by ozone-based advanced water treatment processes	Sci Total Environ	906	167432	2024

Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M.	Performance of a pilot-scale continuous flow ozone-based hospital wastewater treatment system	Antibiotics	12(5)	932	2023
東 剛志.	環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬 剤耐性菌の実態と不活化法の開発	獣医疫学雑誌	27(1)	9-16	2023
東 剛志, 林 哲也.	薬剤耐性とワンヘルスーオゾン処理 の有効性についてー	相愛大学研究 論集	39	17-26	2023
東 剛志.	大阪の水環境 淀川中下流・支川にお ける抗菌薬および薬剤耐性菌による 環境問題への取り組み	水環境学会誌	46(7)	240-244	2023

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東北大学
所属研究機関長 職 名 総長
氏 名 大野 英男

次の職員の令和5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 医学系研究科 ・ 講師
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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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□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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和 6 年 4 月 24 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
国立国際医療研究センター
所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 國土 典宏

次の職員の令和5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
(21HA1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) AMR 臨床リファレンスセンター・臨床疫学室長
(氏名・フリガナ) 松永 展明・マツナガ ノブアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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

次の職員の令和5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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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6年4月3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 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5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 （所属部署・職名） 衛生化学部食品化学課・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）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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： ）	☐	☐	☐		☐

（※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

年 月 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5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 (所属部署・職名) 動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域 腸管病原菌グループ長
(氏名・フリガナ) 楠本 正博 (クスモト 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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

2024年 5月 29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 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5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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (無の場合はその理由：利益相反に関わる内容を含まないため)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (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
—(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 大阪医科薬科大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 佐野 浩一

次の職員の令和5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 (所属部署・職名) 大阪医科薬科大学薬学部・助教
(氏名・フリガナ) 東 剛志・アズマ タカシ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

- ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。