

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3年度～令和5年度 総合研究報告書

研究代表者 金森 肇

令和6(2024)年5月

目 次

I. 総合研究報告

環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究-----1
金森 肇

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----19

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）
（総合）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、環境の薬剤耐性対策への関心が高まっている。環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されておらず、日本の環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の実態は不明であり、環境中の薬剤耐性が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。環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬のヒト・動物に与えるリスクを評価する手法を確立し、環境分野の薬剤耐性への影響を解明することは、薬剤耐性ワンヘルスの観点からから薬剤耐性対策を推進していくために非常に重要である。本研究班では環境中の薬剤耐性および残留抗菌薬の調査法の確立に向けた研究を行い、下水のメタゲノム解析法による薬剤耐性モニタリングに資する作業手順書を作成し、さらに全国展開するための体制が整備された。下水処理場の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の存在比を明らかにした。対象地域の都市下水、病院排水、養豚場の下水における薬剤耐性菌および耐性遺伝子の検出、下水処理水および病院排水の抗菌薬分析を行い、環境水の薬剤耐性の実態を明らかにした。環境水の薬剤耐性菌および抗菌薬の調査方法の確立に向けた研究を実施し、下水処理場放流水の全国的なサーベイランスの実施、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有用である。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となる。文献レビュー結果に基づくリスクアセスメントは、日本の下水 AMR の現状と課題を知る上で有用な資料となる。

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

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。

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3年度～5年度において、環境中の薬剤耐性および残留抗菌薬の調査法の確立に向けた研究を実施した(図1)。本研究班における研究代表者および研究分担者は、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に基づくリスクアセスメント(松永)、3) 環境中の薬剤耐性の調査方法と薬剤耐性菌ゲノム情報解析(黒田)、4) 大都市圏の環境水調査(山口)、5) 環境中の薬剤耐性の家畜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方法と薬剤耐性へのリスク評価(東)を担当する。方法の詳細は令和3年度～5年度の各研究報告書に記載されている。

(倫理面への配慮)

本研究は環境中における薬剤耐性の調査法を確立するための研究であり、個人が識別可能なデータは取り扱わなかった。個人情報

取り扱う一部の研究においては、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づき、当該研究を実施する施設の倫理委員会で審査・承認を得てから実施した。微生物ゲノムデータの取り扱いに関しては、セキュリティー対策を実施し、データを公表する際には個別の施設名が特定できないように配慮した。

1. 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、カルバペネマーゼ産生菌のゲノム解析を行った。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、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

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し、データベースを構築した。国内外の文献情報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した。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

(1) 環境 AMR モニタリングに資するメタゲノム解析

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。

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

500 にて配列解読を実施した。

解読リードを MePIC2 メタゲノム解析ツールで生物種を分類と検出数を算出し、サンプル毎の多様性を MEGAN ツールで評価した。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。

(2) 環境 AMR モニタリングに資するハイブリッドキャプチャー法を活用したメタゲノム解析技術の改良

上述の方法 1 で調整したメタゲノム NGS 混合ライブラリー (全自治体サンプルの混合物) から、QIAGEN xHYB AMR panel を利用して、対象とする ARGs のみ濃縮した。通常のメタゲノム法では検出できない ARGs も包括的に検出でき、感度上昇を確認した。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の全国的なサーベイランスを行うために、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に研究協力を呼び掛けた。結果として、延べ 118 機関から研究協力を得ることができ、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。

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のために、大阪府内の下水処理場 2 地点および河川 2 地点において夏期および冬期に採水を行い、選択培地を用いて耐性菌を分離した。得られた株について、生化学的性状試験およびマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて同定を行った後、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、全

ゲノム解析をナノポアシーケンサー MinION により行い、耐性遺伝子の同定、その他薬剤耐性遺伝子の検索およびプラスミド解析を実施した。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

養豚場の豚および環境試料の細菌叢解析を行い、各試料のメタゲノムデータより養豚場で飼育されている豚の発育ステージごと (母豚、分娩房母豚、哺乳豚、離乳豚、肥育前期豚、肥育後期豚) の糞便、本養豚場の原尿槽および放流水における耐性遺伝子の組成を比較解析した。また、原尿槽の水試料から四級アンモニウムまたはサルファ剤に耐性を示す細菌を分離し、16S リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列を解析し菌種を同定した。PCR により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*) の分布状況を確認し、両遺伝子陽性株について S1 ヌクレアーゼを用いたパルスフィールドゲル電気泳動およびサザンハイブリダイゼーション解析を行い、200 kb 以下の位置に *qac* および *sul* 陽性のバンドを確認できた菌株について、全ゲノム解析により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。耐性プラスミドを保有する菌株について、大腸菌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。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

(1) 先行研究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で、放流口付近の地点の河川水を採取し、先行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用いて、その河川水からの抗菌薬の分析を試みた。この調査を 1 年間通じて実施することで、季節変動に関する情報も得た。

(2) 同じ河川の上流で放流水の影響をまったく受けない地点でも河川水を採取し、(1)と同じ手法により抗菌薬を分析し、比較を行った。この調査も 1 年間を通じて実施した。

(3) 残留抗菌薬の環境 AMR への影響を知るために、同じ河川環境でも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。底質から間隙水を抽出し、そこに存在する抗菌薬を(1)と同じ手法で分析し、河川水や下水処理水からの抗菌薬の検出結果との関連を調べた。

(4) 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）について検討した。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

(1) 都市部の下水処理場及び河川を対象にした残留抗菌薬の実態調査

都市部の下水処理場及び河川を対象として季節毎に通年でのフィールド調査を実施し、各水試料中の残留抗菌薬の検出と定量を行った。測定対象とする抗菌薬は、国内の臨床現場で主に用いられている抗菌薬や、国内外で検出報告事例がある抗菌薬を対象に 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。

採取した下水処理場の流入水 10 mL、河川水 30 mL をガラス繊維ろ紙 (GF/B : 1 μm) 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 OASIS HLB 固相抽出カートリッジに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 °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 μL で再溶解し、UPLC-MS/MS (Waters) による高感度な多成分同時分析法で抗菌薬の検出と定量を行った。

(2) 環境水中の残留抗菌薬濃度を推定する手法の開発と実測濃度との対応解析

対象とした下水処理場又は河川中の残留抗菌薬の濃度推定は、国内における医薬品の年間の販売高がまとめられているじほうの薬事ハンドブック、出荷量がまとめられている厚生労働省の薬事工業生産動態統計、処方薬に関する情報がまとめられている厚生労働省のレセプト情報・特定健診等情報データベース (NDB) を基に行い、これらの使用統計に掲載されている抗菌薬のうち、体外への排泄率が高く環境への負荷影響が大きいと考えられる成分について行った。

環境水中の抗菌薬濃度の推計は、抗菌薬の販売高については薬価と薬効成分の規格 (含有量)、出荷量については出荷量と規格、処方量については処方量と規格を考慮して、国内における 1 日あたりの抗菌薬使用量の推計を行った。次に、これらの推計量に日本の人口に占める対象下水処理場の処理人口を考慮することで、ある区域における抗菌薬の使用量を算出し、服薬後の体外排泄率、対象下水処理場の処理水量を考慮することで下水処理場における排水中の残留抗菌薬の予測濃度の推定を行った。河川中の下水処理場における排水中の残留抗菌薬の濃度については、ここで得られた排水予測濃度に放流先河川での希釈を考慮することで推定を行った。

(3) 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。

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。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. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

病院・市中下水由来のカルバペネム耐性菌の検討では、カルバペネマーゼ産生 *Enterobacter* 属菌 21 株のゲノム解析を行い、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* - *sulI*) を認めた。*A. hydrophilal/caviae* 14 株のうち 10 株 (71%) が *A. taiwanensis* と同定され、*bla_{GES-24}* 保有していた。

成人患者の病院下水における xHYB を用いた網羅的 ARG 検出では、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、 $p < 0.05$) *bla_{CTX-M}* がそれぞれ xHYB では 1,330 検出されたが、mDNAseq では 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}* が 6,173 検出されたが、mDNAseq では *bla_{IMP}* が 4 のみ検出された。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 ($p < 0.05$)。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 ($p < 0.05$)。

小児患者と病院下水由来の ESBL 産生腸内細菌目細菌の検討では、こども病院排水中から ESBL 産生菌 47 株を検出した。検出した ESBL 産生菌のうち、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。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。

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 伝播リスクの Systematic Review を行い、アジアへの渡航 (OR=2.38) とアフリカへの渡航 (OR=2.45) 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。環境水中の ARB または ARG に暴露されるヒトのリスクは、レクリエーション、廃水処理施設での作業、溺水、津波による溺水であった。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。

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 (OR1.87)。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)。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

(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。2023 年度までの 6 年間 (夏・冬期の計 11 回のサンプル採取期間) 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。

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。

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>)

(2) 環境 AMR モニタリングに資するハイブリッドキャプチャー法を活用したメタゲノム解析技術の改良

メタゲノム解析法（mDNA-Seq）では平均して RPKM が 104 reads しか得られなかったところ、xHYB AMR panel による濃縮効果により RPKM が 601,576 reads となり、平均 5805 倍まで濃縮できることが示された。例として、*sulI* は 15 から 114,229 RPKM まで濃縮されており、従来の mDNA-Seq では検出できなかった *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *mcr* 遺伝子も xHYB ではそれぞれ 67, 20, 1010 RPKM と十分な量を検出することが可能になった。濃縮効果によるバイアスは低く、AMR panel にリストされている 2786 ARGs に対して効率よく濃縮できていることがわかった。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌

の分離

(1) 各地方研究衛生研究所において、夏期と冬期にサンプリングが実施され、得られた試料の解析は国立感染症研究所の黒田らが実施した。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。

(2) メタゲノム解析による環境 AMR の解析の結果、試料により検出率に差が見られたものの、サルファ剤、β-ラクタム剤、アミノグリコシド、マクロライド耐性に係る薬剤耐性因子が多く検出された。この傾向はこれまでの調査結果と同様であった。

(3) 培養法を用いて、環境水中から各種βラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌目細菌を分離した。全 20 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%、30%であった。カルバペネマーゼ保有株は 19 株分離された。これまでの調査で比較的多く分離している *bla_{GES-24}* 保有株が、今回の調査でも 11 株と最も多く分離され、菌種は *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *R. ornithinolytica* であった。次に、*bla_{NDM-5}* 保有株が 4 株分離され、その内訳は *E. coli* が 2 株、*K. pneumoniae* が 1 株、*C. braakii* が 1 株であった。その他、*bla_{KPC-2}*, *bla_{GES-5}*, *bla_{GES-51}*, *bla_{FRI-8}* を保有する株が 1 株ずつ分離された。

(4) *bla_{FRI-8}* 保有株及び *bla_{NDM-5}* 保有株について、NGS データによる解析を行ったところ、*bla_{FRI-8}* 株保有株のプラスミドは全て *IncFII* に属していたが、プラスミドの相同性は低かった。一方、*bla_{NDM-5}* 保有株については複数菌種から分離されたものの、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、その相同性は極めて高かった。

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) 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が明らかになった。

(2) 原尿槽の水試料より微好気環境で生育する四級アンモニウム(塩化ベンザルコニウム)耐性菌 23 株およびサルファ剤(スルファメトキサゾール)耐性菌 56 株を分離した。全 79 株のうち 41 株(52%)が Firmicutes 門、34 株(43%)が Proteobacteria 門の細菌であった。

(3) 大腸菌などが保有する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*)は全 79 株のうち 38 株(48%)が保有しており、保有株の 87%が大腸菌と同じ Proteobacteria 門、非保有株の 98%が Firmicutes 門の細菌であった。

(4) *qac* および *sul* 陽性株から選抜した 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)のうち、ブルセラ属の 2 株において 80~100 kb 付近の位置に *qac* および *sul* 陽性のバンドを確認し、残りの 11 株では染色体に相当する位置に陽性バンドを確認した。

(5) *qac* および *sul* 陽性の 2 株はともに両遺伝子を同一プラスミド上(83.2 kb および 100.6 kb)に保有しており、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。

(6) 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(検出限界:伝達頻度 10^{-9})。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

(1) 山形県内の下水処理場からの放流水を受容する河川では、下水処理場の放流口付近の河川水で、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、レボフロキサシン、クロラムフェニコールが、放流口付近の河川水から年間を通じて検出された。それ以外の

抗菌薬は検出されることがなかった。この検出状況には季節的な変動は見られなかった。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。

(2) 同じ河川の上流地点では、エリスロマイシンが 2 回、クロラムフェニコールが 4 回だけ検出された。他の抗菌薬は一度も検出されなかった。この地点の河川水には、下水処理場の影響がないことが明らかであり、それ以外の排出源の存在を示している。

(3) 河川底質の間隙水中の抗菌薬についても、下水処理場の放流口付近でのみ、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。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

(1) 下水処理場及び河川中の残留抗菌薬の存在実態

下水処理場の流入水中から、測定対象とした抗菌薬のうち ampicillin, cefpodoxime, cefpodoxime proxetil, ceftiofur, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, levofloxacin, minocycline, oxytetracycline, tetracycline, vancomycin が平均値で 10 ng/L~1,311 ng/L の幅広い濃度で検出された。

下水処理場の流入水中から検出される抗菌薬については、採水を行った季節毎による顕著な変動傾向はみられなかった。これらの結果は、今回対象とした抗菌薬については季節による使用量の変動は少ないことを示唆していると考えられた。実際に、この傾向は各種医薬品の処方傾向を 1 日単位で集計している、厚生労働省の薬局サーベイランスの結果を考慮しても概ね妥当なものであると考えられた。

河川水中からは、排水中から検出される抗菌薬と概ね類似した成分が検出され、ampicillin, cefpodoxime, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, levofloxacin, vancomycin が平均値で 0.1 ng/L~40 ng/L の濃度で検出された。下水処理場の排水と同じ成分が河川水中から検出されることは、水環境に対する排水の流入影響が考えられた。また、下水処理場から検出される排水中の抗菌薬濃度に比べて、河川水中から検出される抗菌薬の濃度が 10~100 分の 1 程度であることについては、処理場内の排水処理工程による除去や、処理水が放流先の河川で希釈されることに起因していると考えられた。

(2) 環境水中に残留する抗菌薬の濃度推定手法の有効性評価

抗菌薬の販売高、出荷量、処方量をもとに各々推計を行った下水処理場の流入水中の濃度と、環境水中から検出される抗菌薬の実測値との対応性が評価可能である成分について解析を行った。抗菌薬の各使用統計毎の予測濃度/実測濃度の値は、下水処理場流入水について販売量 0.02~0.4 (平均値 0.2 ± 0.2)、出荷量 0.1~2.9 (平均値 1.4 ± 1.1)、処方量 0.1~3.7 (平均値 1.3 ± 1.2) となる結果が得られた。また、河川水では濃度/実測濃度の値は販売量 0.03~0.3 (平均値 0.2 ± 0.1)、出荷量 0.1~4.4 (平均値 1.7 ± 2.0)、処方量では 0.2~5.8 (平均値 2.2 ± 2.6) となり、数倍~数十倍程度の誤差がみられるものの、濃度のオーダーは概ね一致する傾向がみられた。

このことは、抗菌薬による国内の環境汚染問題の概要を把握するうえで本事業で検討を行っている手法が有効なアプローチとなりうる可能性を示唆していると考えられる。今後調査を継続するとともに、環境中の抗菌薬濃度推定手法についてさらなる知見の収集を行うことが重要であると考えられる。

(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バ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を行った。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。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。

(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 (添加回収試験におけるろ過操作の影響)

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評価した。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。

(5) 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 μ g・100 μ g・500 μ g・1,000 μ g と変化させた際の添加回収試験を行った。溶出液の体積量 50 μ L 及び 100 μ L では、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 μ L 及び 1,000 μ L 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する傾向がみられた。

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 μ L のタイプのみが市販されている。このことと本研究で得られた結果を踏まえ、固相への溶出液量 500 μ L の条件で以後検討を行った。

(6) 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

LC-MS/MS による測定解析を行う際の最適な最終溶媒の溶媒組成について検討を行ったところ、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を示唆していると考えられる。

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

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。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。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、下水中にお

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。*bla*_{GES-24} 保有 *A. taiwanensis* など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、注意する必要がある。

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。

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。

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、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差異があるものの、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。特に、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。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と考えられた。さらに、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、ヒトへ循環するリスクについて、文献レビューを行っていく必要がある。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

厚労科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る。つまり、メタゲノム解析法による包括性を維持しながらも、ハイスループット化とともに感度上昇が必要である。本分担研究にて実施したAMR panelによる濃縮実験は効果的に感度上昇を提供できる作業手順であり、今後の標準作業手順書への改良にも貢献できる技術であると考えている。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

2021年度より検討した方法、すなわち、フィルター法を用いて前培養を行い、菌液濃度を調製後培地に塗抹し培養することにより、カルバペネマーゼ産生株を3年間・5回の調査において、計19株分離した。本方法では、目的外の細菌の増殖が顕著とはならず、目的とする腸内細菌目細菌を容易に分離することができるメリットがあった。さらに分離した菌株数も、2018～2020年の計6回の調査の11株から19株と増え、また検体陽性率も17%から30%に増加した。ESBL産生株においても、検体陽性率は79%から100%に増加した。したがって、本方法は環境水から効率的に目

的とする耐性菌を分離できる方法であると考えられた。環境水から分離される株がESBL産生株が多く、カルバペネマーゼ産生株が少ないという検出状況は、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。しかし、分離されたカルバペネマーゼ産生株は、我が国のCRE病原体サーベイランスで、毎年1～2株しか検出されていない bla_{GES-24} 保有株が最も多く、続いて bla_{NDM-5} 保有株であった。 bla_{NDM-5} 保有株も日本国内での感染例は少ない。一方、国内で感染例の多いIMP陽性株は前回の調査と合わせた6年間の調査のうちで1株であった。したがって、日本での感染例が少ないにも関わらず、環境水から分離されているNDM-1,5陽性株やKPC-2陽性株は海外からの渡航者を介して、持ち込まれていることが示唆された。環境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と、分離された株を詳細に解析し、市中関連株及び海外関連株との関連性を明らかにすることが必要である。また、海外由来と考えられる耐性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、モニタリングが重要と考えられる。

メタゲノム解析により検出された薬剤耐性因子のうち、 β -ラクタマーゼ関連遺伝子はOXA、GES、IMP型等が多数を占め、この傾向は地点、季節および年度による大きな違いは見られなかった。したがって大阪の状況をいずれの試料の結果も反映していると考えられた。一方、環境水中から培養法で分離した株が多く保有していた bla_{GES-24} はメタゲノム解析では検出されておらず、結果に違いが見られた。したがって、メタゲノム解析により検出された耐性遺伝子の解釈については、さらなる検討が必要であると考えられた。

以上より、メタゲノム解析によるAMRの環境水中のモニタリングは、薬剤耐性遺伝子の全体像の把握、あるいは他地域との比較による地域特有の耐性遺伝子の検出に有用であると考えられた。さらに、分離培養法は更なる検討は必要であるものの、検出感度では優れていると考えられ、これらを同時に行うこ

とで、より詳細に環境中の AMR に関する情報が取得できるものと考えられた。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

養豚場において原尿槽には豚の排泄物の他に消毒剤なども流入し、豚腸管由来細菌は希釈されながら原尿槽に到達するが、糞便と原尿槽で菌量（濃度）は同等であることから、原尿槽では消毒剤の成分が選択圧となり、豚腸管とは異なる細菌叢を形成していると考えられた。また、原尿槽における耐性遺伝子として *qac* や *sul* が顕著に増加していることから、消毒剤の成分が選択圧となった可能性が示唆された。実際に原尿槽より四級アンモニウム（塩化ベンザルコニウム）やサルファ剤（スルファメトキサゾール）に耐性を示す細菌が分離され、主要な耐性菌は Firmicutes 門の細菌であった。一方、大腸菌などの腸内細菌科細菌を含む 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、Proteobacteria 門細菌は（存在量としては）リスクが低い可能性がある。耐性遺伝子の拡散の観点からは、伝達性耐性遺伝子として知られる *qac* や *sul* は Proteobacteria 門の分離株に偏在するが、*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の 2 株（ともに菌種不明）のみであり、さらに両株において *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。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

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、処理場からの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確認された。この手法を用いた分析結果は、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が示した。

河川水から検出される抗菌薬と、同じ河川水から分離された大腸菌の薬剤耐性率（研究協力者が実施した別の研究結果）との関連は明確ではなかった。この改善のために、河川水に比べて抗菌薬がより長期に渡って存在するであろう河川底質（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。当初目標としていた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を定めるためには、今後、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推奨される。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

本分担研究により、国内の都市部における下水処理場及び河川中に存在する残留抗菌薬の実態と抗菌薬の使用状況との繋がりが示唆されている。

今回対象としている抗菌薬のうち、下水処理場の流入水中で調査期間中に全て不検出となる成分について、ampicillin, cefazolin, cefdinir, cefpodoxime proxetil, ceftiofur, cefuroxime については構造式に共通の β -ラクタム構造を持つ抗菌薬であり、環境中で分解されやすく数時間から数日で減衰するという報告があることから、下水処理場に流入する過程で分解されていると考えられた。また、chlortetracycline, oxytetracycline についてはテトラサイクリン系抗菌薬であり、環境中で数ヶ月から数年間残留する性質があり、ヒトに加え畜産等の動物領域で用いられている

とされていることから、調査を行った地域特性を反映していると考えられる。

出荷量又は処方量を用いた際に、使用実態を考慮したより精度の高い環境水中の残留抗菌薬濃度を行うことが可能である結果が得られたことは、環境水中の残留抗菌薬濃度の推定を行う上で興味深く、有意義な知見であると考えられる。販売量に基づく予測を行う際に、出荷量又は処方量よりも誤差が大きくなる傾向がみられることについては、販売量の統計が特許を有する医薬品を掲載しており、ジェネリックとして多くの製薬会社から販売されている抗菌薬が複数存在することに関係している可能性が考えられる。

また、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を組み合わせて駆使する排水中抗菌薬のハイスループット測定系は、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バ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、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、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ことが重要であると考えられる。

E. 結論

薬剤耐性ワンヘルスの観点から環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬の人・動物に与え

る影響を評価する手法を確立し、日本における環境中の薬剤耐性および抗菌薬の実態調査を推進していく必要がある。本研究班で環境中の薬剤耐性モニタリングに資するメタゲノム解析法の作業手順書を作成し、さらに全国展開するための体制を構築した。下水中の薬剤耐性遺伝子及び耐性菌に関する全国的なサーベイランスにより、環境 AMR の現状を知る上で基盤となるデータが得られた。全国調査により自治体特有の放流水による環境負荷の実態を遺伝子レベルで明らかにし、本邦の環境 AMR レジストームの基盤を整備した。

環境水の薬剤耐性菌および抗菌薬の調査方法の確立に向けた研究を実施し、下水処理場放流水の全国的なサーベイランスの実施、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有用である。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となる。文献レビュー結果に基づくリスクアセスメントは、日本の下水 AMR の現状と課題を知る上で有用な資料となる。

今後考えられる課題として、(1)日本の医療・高齢者施設における環境 AMR の実態調査を行い、AMR 汚染の改善策を検討する、(2)ワンヘルスプラットフォームからデータを取得し、AMR における環境分野とヒト分野のリスク評価を継続する、(3)下水処理場流入水の薬剤耐性と残留抗菌薬を評価する、(4)調査を継続して知見の収集に努めるとともに、環境中の抗菌薬濃度推定の有効性と調査方法の標準化及びハイスループット解析の評価を検討することが挙げられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

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;8:e0010023.
2. Baba H, Nishiyama M, Watanabe T, Kanamori H. Review of Antimicrobial Resistance in Wastewater in Japan: Current Challenges and Future Perspectives. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11:849.
 3. Sekizuka T, Tanaka R, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M. Comprehensive Genome and Plasmidome Analysis of Antimicrobial Resistant Bacteria in Wastewater Treatment Plant Effluent of Tokyo. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11:1283.
 4. Sekizuka T, Itokawa K, Tanaka R, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M. Metagenomic Analysis of Urban Wastewater Treatment Plant Effluents in Tokyo. *Infect Drug Resist*. 2022;15:4763-4777.
 5. 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.
 6. Adachi F, Sekizuka T, Yamato M, Fukuoka K, Yamaguchi N, Kuroda M, Kawahara R. Characterization of FRI carbapenemase-producing *Enterobacter* spp. isolated from a hospital and the environment in Osaka, Japan. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76:3061-3062.
 7. Azuma T, Hayashi T. Effects of natural sunlight on antimicrobial-resistant bacteria (AMRB) and antimicrobial-susceptible bacteria (AMSB) in wastewater and river water. *Sci Total Environ*. 2021;766:142568.
 8. Azuma T, Hayashi T. On-site chlorination responsible for effective disinfection of wastewater from hospital. *Sci Total Environ*. 2021;776:145951.
 9. 東 剛志, 林 哲也. 医療排水を対象にしたオゾン処理の有効性評価. *医療・環境オゾン研究*. 2021;28:91-100.
 10. Azuma T, Hayashi T. Disinfection of antibiotic-resistant bacteria in sewage and hospital effluent by ozonation. *Ozone Sci Eng*. 2021;43:413-426.
 11. Azuma T, Usui M, Hayashi T. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in wastewater by ozone-based advanced water treatment processes. *Antibiotics*. 2022;11:210.
 12. Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M. Inactivation of bacteria and residual antimicrobials in hospital wastewater by ozone treatment. *Antibiotics*. 2022;11:862.
 13. 東 剛志. オゾンを用いた病院排水中の残留抗菌薬及び薬剤耐性菌の処理法の開発研究. *オゾンニュース・イン・ジャパン*. 2022;123:3-8.
 14. Azuma T, Uchiyama T, Zhang D, Usui M, Hayashi T. Distribution and characteristics of carbapenem-resistant and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in hospital effluents, sewage treatment plants, and river water in an urban area of Japan. *Sci Total Environ*. 2022;839:156232.
 15. Azuma T, Murakami M, Sonoda Y, Ozaki A, Hayashi T. Occurrence and quantitative microbial risk assessment of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a sub-catchment of the Yodo River Basin, Japan. *Antibiotics*. 2022;11:1355.
 16. 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.
 17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹. 山形県の赤川水系から単離した大腸菌の系統発生群とその薬剤感受性. 土木学会論文集 G (環境) . 2022;78:III_307-III_316.
23. Shibuki R, Nishiyama M, Mori M, Baba H, Kanamori H, Watanabe T. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from municipal and hospital wastewaters in Japan. J Glob Antimicrob Resist. 2023;32:145-151.
4. 馬場啓聡. 下水由来のカルバペネマーゼ産生グラム陰性菌のゲノム解析. 第 71 回日本感染症学会/第 69 回日本化学療法学会合同学会, 札幌, 2022 年 10 月
5. 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
6. 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.
7. 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
8. 東 剛志. 病院排水中における抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 2021 年度 動物用抗菌剤研究会 第 48 回シンポジウム, オンライン, 2021 年 4 月 (招待講演)
9. 東 剛志. 河川環境中に存在する薬剤耐性菌の実態と不活化技術の有効性評価. ミヤリサン製薬 産業動物学術 WEB セミナー ワンヘルス アプローチ 薬剤耐性問題を考える, オンライン, 2021 年 7 月 (招待講演)

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. 金森肇. シンポジウム 11 コロナ後の AMR 対策の行方 S11-4 環境中の薬剤耐性の動向. 第 70 回日本化学療法学会総会, 岐阜 (オンライン) 、2022 年 6 月
10. 内山智晴, 福田 昭, 東 剛志, 白井 優. 水系環境における ESBL 産生大腸菌・カルバペネム耐性大腸菌の実態調査. 第 164 回日本獣医学会学術集会, 酪農学園大学 (オンライン) , 2021 年 9 月
11. 東 剛志. 医療排水中における抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 第 14 回日本医師会・日本獣医師会による連携シンポジウム “One Health” アプローチで取り組む薬剤耐性菌対策～薬剤耐性 (AMR) アクションプランの成果と次期展望, オンライン, 2021 年 11 月 (招待講演)
12. 東 剛志. 医療と環境の関わりー医療排水中における抗菌薬及び薬剤耐性菌の

- 実態と不活化法の開発ー. 第 5 回京都大学京都生体質量分析研究会～環境汚染と感染症対策のための質量分析～, 京都大学 (オンライン), 2022 年 1 月 (招待講演)
13. 片桐美和, 黒田 誠, 関塚剛史, 東 剛志, 渡邊 学. オゾンマイクロバブル処理による病院汚水の薬剤耐性菌、残留抗菌薬の低減. 第 70 回日本化学療法学会総会, 長良川国際会議場・都ホテル岐阜長良川, 2022 年 6 月
 14. 東 剛志. 医療排水中における医薬品の存在及び処理法に関する研究. フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム「フォーラムⅢ：疾病予防と健康増進に貢献する衛生薬学の最新研究」, 熊本城ホール, 2022 年 8 月 (招待講演)
 15. 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 回獣医疫学会学術集会 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)
 16. 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 回獣医疫学会学術集会 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)
 17. 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)
 18. 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)
 19. 渡部徹, 澁木理央, 西山正晃, 馬場啓聡, 金森肇. 都市下水と病院排水から単離した ESBL 産生大腸菌の遺伝学的特徴. 第 24 回日本水環境学会シンポジウム, オンライン, 2021 年 9 月
 20. 西山正晃, 甲高綾乃, 馬場啓聡, 金森肇, 渡部徹. 都市下水処理場から単離したバンコマイシン耐性菌の特徴. 第 24 回日本水環境学会シンポジウム, オンライン, 2021 年 9 月
 21. 渡部徹, 都市下水から見た一般環境中の薬剤耐性菌. 下水道研究集会「下水と薬剤耐性菌」, 日本水処理生物学会第 57 回 (神奈川) 大会, オンライン, 2021 年 10 月 (招待講演)
 22. 森祐哉, 西山正晃, 渡部徹. 河川から単離した ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子の特徴とその薬剤感受性. 令和 3 年度土木学会東北支部技術研究発表会, オンライン, 2022 年 3 月
 23. 盧歆, 西山正晃, 渡部徹. 都市下水と病院排水から単離した ESBL 産生腸内細菌科細菌が保有するプラスミドの特徴. 令和 3 年度土木学会東北支部技術研究発表会, オンライン, 2022 年 3 月
 24. 森祐哉, 西山正晃, 渡部徹. 山形県の河川から単離した ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子とその薬剤感受性. 第 56 回日本水環境学会年会, オンライン, 2022 年 3 月
 25. 西山正晃, 森祐哉, 米田一路, 渡部徹. 山形県の河川におけるふん便指標細菌の薬剤感受性. 第 25 回日本水環境学会シンポジウム, 東京, 2022 年 9 月
 26. 剣持ひろ, 森祐哉, 米田一路, 渡部徹, 西山正晃. 東北地方の一級河川における ESBL 産性大腸菌の薬剤感受性と地理的・空間的分布. 令和 4 年度土木学会東北支部技術研究発表会, オンライン, 2023 年 3 月
 27. 森祐哉, 西山正晃, 渡部徹. 山形県の河川から単離した ESBL 産生大腸菌の薬剤耐性とその起源解析. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023 年 3 月
 28. 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.

29. 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.
30. 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
31. 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
32. 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

その他発表

1. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2021. (4)環境.
2. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2022. (4)環境.
3. 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

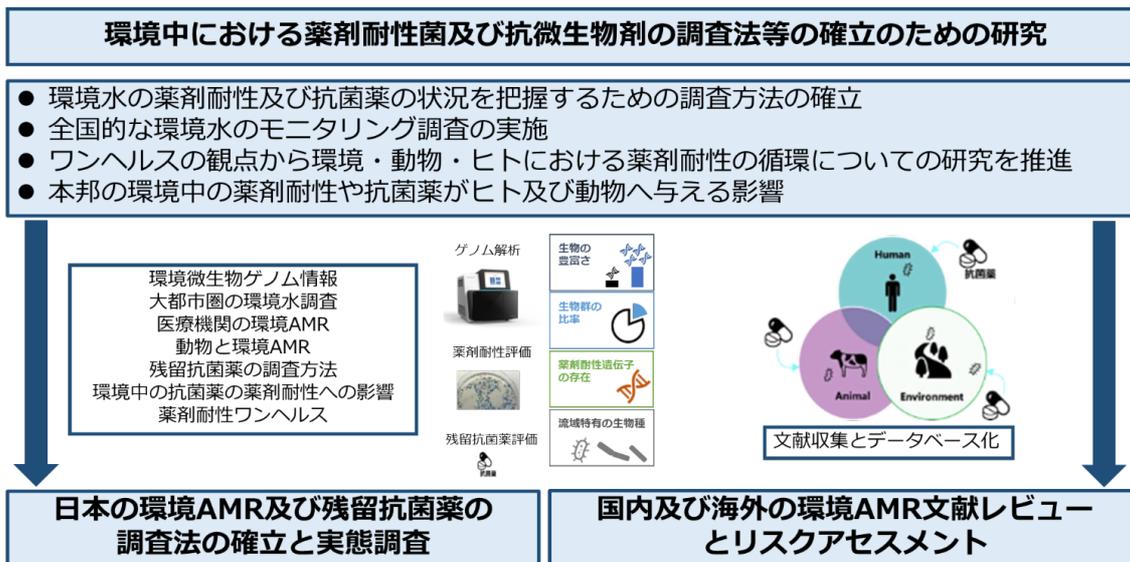


図1 環境中における薬剤耐性菌および抗微生物剤の調査法等の確立のための研究

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 刊行者名	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,	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	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	e0010023	2023
Baba H, Nishiyama M, Watanabe T, Kanamori H.	Review of Antimicrobial Resistance in Wastewater in Japan: Current Challenges and Future Perspectives	Antibiotics	11	849	2022
Matsunaga N, Ishioka H, Tanaka Y, Ando K, Kanamori H.	Transmission of antimicrobial-resistant bacteria from environmental water to humans: A scoping review	投稿中			

Sekizuka T, Tanaka R, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M.	Comprehensive Genome and Plasmidome Analysis of Antimicrobial Resistant Bacteria in Wastewater Treatment Plant Effluent of Tokyo	Antibiotics	11	1283	2022
Sekizuka T, Itokawa K, Tanaka R, Hashino M, Yatsu K, Kuroda M.	Metagenomic Analysis of Urban Wastewater Treatment Plant Effluents in Tokyo	Infect Drug Resist	15	4763-4777	2022
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	510-515	2023
Adachi F, Sekizuka T, Yamato M, Fukuoka K, Yamaguchi N, Kuroda M, Kawahara R.	Characterization of FRI carbapenemase-producing <i>Enterobacter</i> spp. isolated from a hospital and the environment in Osaka, Japan	J Antimicrob Chemother	76	3061-3062	2021
Azuma T, Hayashi T.	Effects of natural sunlight on antimicrobial-resistant bacteria (AMRB) and antimicrobial-susceptible bacteria (AMSB) in wastewater and river water	Sci Total Environ.	766	142568	2021

Azuma T, Hayashi T.	On-site chlorination responsible for effective disinfection of wastewater from hospital	Sci Total Environ	776	145951	2021
東 剛志, 林 哲也.	医療排水を対象にしたオゾン処理の有効性評価	医療・環境オゾン研究	28	91-100	2021
Azuma T, Hayashi T.	Disinfection of antibiotic-resistant bacteria in sewage and hospital effluent by ozonation	Ozone Sci Eng	43	413-426	2021
Azuma T, Usui M. Hayashi T.	Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in wastewater by ozone-based advanced water treatment processes	Antibiotics	11	210	2022
Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M.	Inactivation of bacteria and residual antimicrobials in hospital wastewater by ozone treatment	Antibiotics	11	862	2022
東 剛志.	オゾンを用いた病院排水中の残留抗菌薬及び薬剤耐性菌の処理法の開発研究	オゾンニュース・イン・ジャパン	123	3-8	2022

Azuma T, Uchiyama T, Zhang D, Usui M, Hayashi T.	Distribution and characteristics of carbapenem-resistant and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing <i>Escherichia coli</i> in hospital effluents, sewage treatment plants, and river water in an urban area of Japan	Sci Total Environ	839	156232	2022
Azuma T, Murakami M, Sonoda Y, Ozaki A, Hayashi T.	Occurrence and quantitative microbial risk assessment of methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) in a sub-catchment of the Yodo River Basin, Japan	Antibiotics	11	1355	2022
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	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	獣医学雑誌	27	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	240-244	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
森祐哉, 西山正晃, 米田一路, 渡部徹.	山形県の赤川水系から単離した大腸菌の系統発生群とその薬剤感受性	土木学会論文集 G (環境)	78	III_307-III_316	2022
Shibuki R, Nishiyama M, Mori M, Baba H, Kanamori H, Watanabe T.	Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> isolated from municipal and hospital wastewaters in Japan	J Glob Antimicrob Resist	32	145-151	2023