

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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/ $\mu$ 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&region=JP>

■ 27自治体から計46箇所の放流水

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

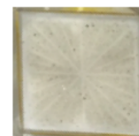
↓ その日のうちに

放流水を全部 Filter trap して、メンブレンをメスで剥離



TPP Rapid Filtermax Vacuum Filtration, 500 mL bottle  
Large 49 sq. cm square PES 0.2µm membrane  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z760900?lang=ja&region=JP>

■ 剥離メンブレンの写真



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

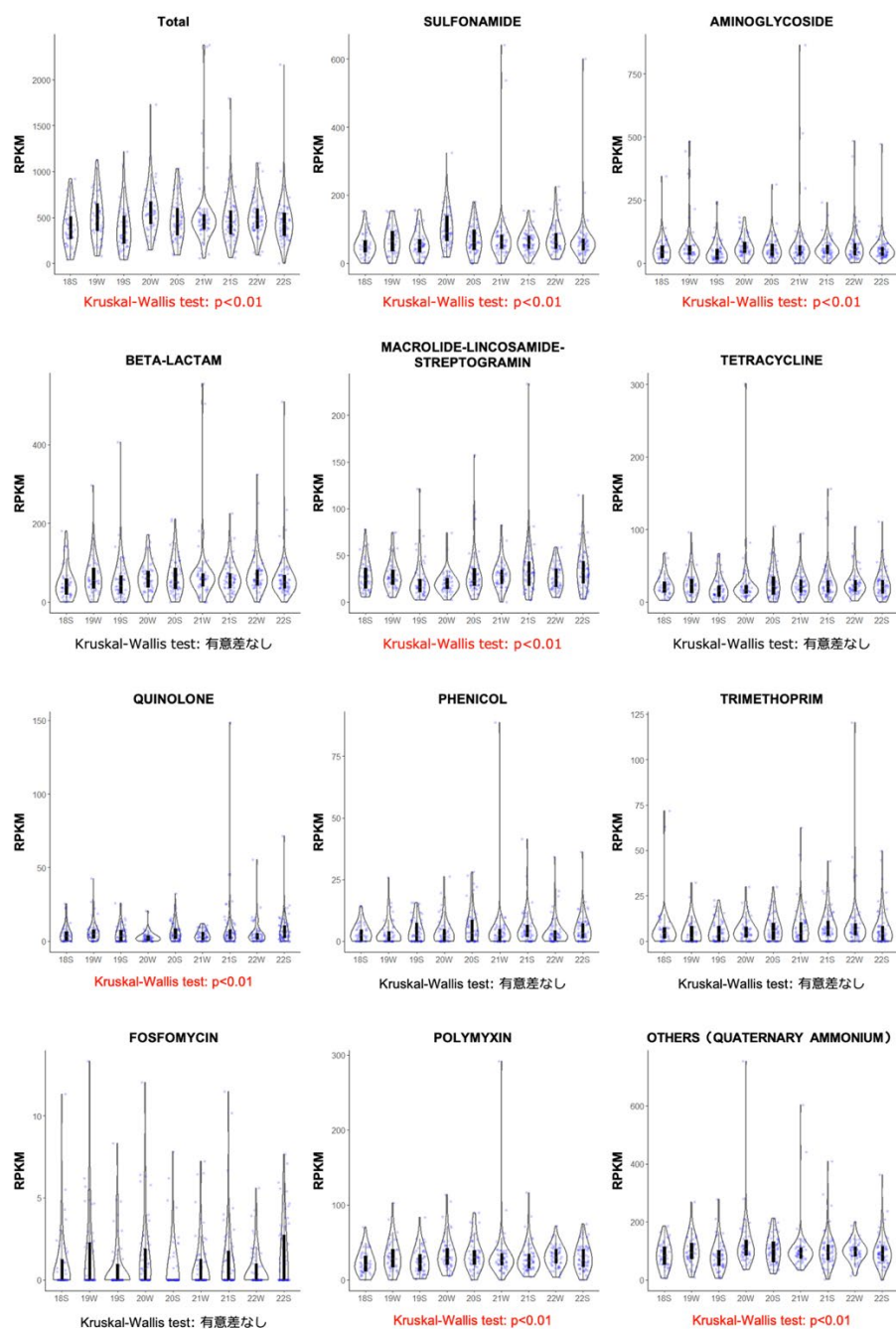


図2 本邦の水再生センター（下水処理場）放流水のメタゲノム解析（Metagenomic DNA-Seq）

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。