

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、セフォキシチン)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℃に加熱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

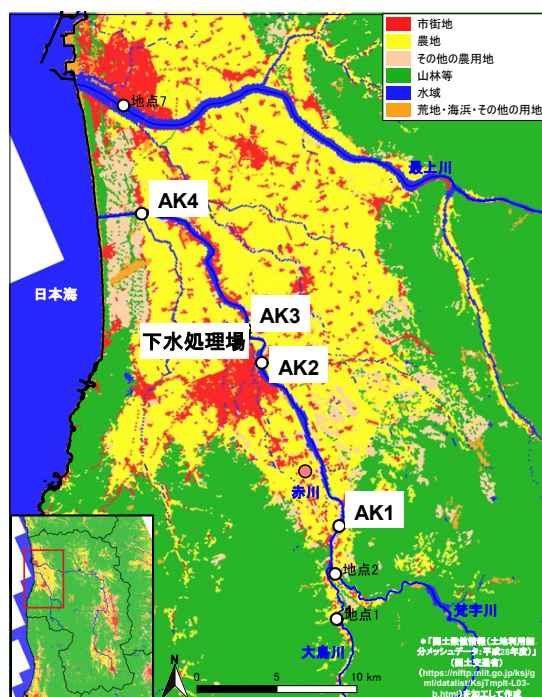


図1. 調査地点（本年度はこのうち、AK2～AK4 で調査を実施した）

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。