

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 「環境中の抗菌薬の検査・評価に関する方針策定」

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、環境中の抗菌薬の検査・評価に関する方針策定を目的としており、先行研究で提案した河川底質からの抗菌薬検出手法について改良を行った上で、実河川における底質中の抗菌薬残留に関する調査を実施する。そこで蓄積したデータをもとに、河川水と底質の間の抗菌薬の検出状況を比較するとともに、関連する耐性菌の存在状況との関連も評価することで、環境中の残留抗菌薬を考える際の河川底質の意義について検討を行う。本年度、山形県内の河川3か所から集めた底質試料を用いて実施した抗菌薬検出手法の改良では、底質からの抗菌薬の抽出行程を加えることで、その検出効率が向上することが確認された。特に、マッキルベイン緩衝液およびメタノール：EDTA 含有マッキルベイン緩衝液を抽出液に使用した際に、検出される抗菌薬の数が増えるとともに、その検出濃度も高まった。同じ地点で測定をした河川水での測定結果と比較すると、河川水の濃度が高い抗菌薬は底質でも検出される傾向があった。それでも、3か所の底質から検出できた抗菌薬は、試験した10種類中3種類（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）に過ぎず、河川水試料（同じ10種類のうち8種類が検出）に比べて、底質試料からの検出が難しいことが確認された。

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実例はなく、ヒト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を確立する必要がある。

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」の研究班では、令和3～5年度において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。令和6～8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。

そのために必要となる「環境水の薬剤耐性を評価するための方法の確立」と「サーベイランスの継続による、本邦における環境水の薬剤耐性菌及び抗菌薬の実態の調査」に役立

つように、環境中の抗菌薬の検査・評価に関する方針策定を本分担研究の目的とする。具体的には、先行研究で提案した河川底質からの抗菌薬検出手法について改良を行った上で、実河川における底質中の抗菌薬残留に関する調査を実施する。そこで蓄積したデータをもとに、河川水と底質の間の抗菌薬の検出状況を比較するとともに、関連する耐性菌の存在状況との関連も評価することで、環境中の残留抗菌薬を考える際の河川底質の意義について検討を行う。

さらに、上記の研究内容と関連して、人間生活からの各種排水の影響を受ける河川環境（河川底質も着目しながら）の薬剤耐性に関する文献を中心にレビューを行う。その結果は、研究班全体で、環境中の薬剤耐性や抗菌薬がヒトへ与える影響についてリスクアセスメントを行うための知見として提供される。

B. 研究方法

①サンプリング

採泥と採水は山形県庄内地方を流れる一級河川である赤川水系から3地点（AKU：下水処理場放流水流入後，AKD：赤川河口，OY：赤川水系大山川）で行った（図1）。採泥は平水時も水面下に存在する場所で行った。底泥は、シャベルもしくはエクマンバージ採泥器を用いて表層約10 cm から3回以上採取し、それらを混合した。混合後の底泥試料から余分な表層水を除去した後、底泥を清浄なポリエチレン製の袋に移し入れた。表層水は、メタノールでリンスした1Lの滅菌済みポリエチレン製容器とリンスしていない容器それぞれに保存した。メタノールリンスした容器に採取した表層水には、抗菌薬の分解を抑制するために、アスコルビン酸1 gを添加した。採取した底泥と表層水は、4℃のクーラーボックスに入れて実験室に持ち帰り、採水後6時間以内に微生物の分析を開始した。

②抗菌薬の分析

底泥中の間隙水を取り除くために、採取した底泥を4℃で3000 rpm，20分間遠心分離し、上清を除去した。間隙水を除去後の底泥1 gをポリプロピレン製の15 mLチューブに分注し、抽出試薬5 mLを添加した後、30秒間激しく混合した。本研究では、抽出試薬の違

いによる抗菌薬の抽出効率を評価するために、メタノール（富士フイルム和光純薬株式会社）、アセトニトリル（関東化学株式会社）、マッキルベイン緩衝液（pH4）、メタノール：EDTA（関東化学株式会社）含有マッキルベイン緩衝液（pH4，0.1 M，1：1）の4つを抽出試薬として使用した。抽出試薬を混合した試料を、超音波洗浄装置（PUC-0277，東京超音波技研株式会社）を用いて、水温約25℃で10分間超音波抽出した。その後、試料を3000 rpmで10分間遠心分離し、上清を底泥抽出液として回収した。この抽出試薬を用いたプロセスを計3回行い、約15 mLの底泥抽出液を取得し、その中の抗菌薬量を測定した。一方、水中の抗菌薬量の分析には、採水時にアスコルビン酸を添加した試料を利用した。試料から懸濁物質を除去するために、試料を孔径0.45 μmのメンブレンフィルター（Advantec）でろ過し、ろ過後の試料中の抗菌薬量を測定した。

以上の底泥抽出液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。

③大腸菌の単離

底泥および表層水の試料を、大腸菌選択培地である Chromocult Coliform 寒天培地 (Merck) を用いて 37℃ で 24 時間培養した後、培地上の青色コロニーを大腸菌として計数した。この計数は 3 反復で行い、それぞれの培地上に生育したコロニーの平均値 (CFU/g-wet もしくは CFU/100 mL) を結果として集計した。

計数後、地点ごとに最大 20 株の大腸菌陽性コロニーをランダムに選択し、再度 Chromocult Coliform 寒天培地で培養し、大腸菌の陽性判定を行った。その後、大腸菌陽性コロニーを Luria-Bertani (LB) 寒天培地に単離した。培養後の形成したコロニーについて、コンタミネーションを確認し、純菌化のために再度 LB 寒天培地に単離した。純菌化した菌株を、LB 液体培地で培養し、培養後の菌液を -80℃ で保存した。

C. 研究結果

山形県内の河川 3 地点での底質中の抗菌薬の測定結果を表 1 に示す。表には、同時に採取した河川水中の抗菌薬の測定結果も掲載し

ている。

まず、河川水中の抗菌薬の測定では、サルファメトキサゾール、トリメトプリム、レボフロキサシン、クロラムフェニコールが 3 地点で共通して検出され、エリスロマイシンは 2 地点で検出された。これらの抗菌薬は、昨年度までの調査でも、AKU 地点で継続的に観測されていた。AKU 地点では、これらが検出された濃度も高く、さらに、シプロフロキサシン、オキシテトラサイクリン、アンピシリンも検出されており、下水処理水放流の影響は明らかであった。

河川底質中の抗菌薬の測定では、エリスロマイシンが 3 地点とも検出された。AKU 地点では、この他にサルファメトキサゾールとトリメトプリムも検出されたが、他の 2 地点では、エリスロマイシンのみが検出された。この 2 地点では、前述の通り、河川水中の抗菌薬濃度も AKU 地点よりも明らかに低かったため、底質中での濃度も薄く、検出が難しかったのであろう。

河川底質からの抗菌薬の抽出方法を比較すると、マッキルベイン緩衝液およびメタノール：EDTA 含有マッキルベイン緩衝液を抽出液に使用したケースで、AKU 地点ではサルファメトキサゾールが検出された。また、エリスロマイシンの検出濃度も、3 地点で共通して、この 2 つの抽出方法を用いた場合に高かった。

D. 考察

昨年度の調査では、河川底質に残留する抗菌薬に着目して、試験的に間隙水を対象とした測定を実施した。その結果、下水処理場の放流地点に近い AKU 地点の底質でトリメトプリムとエリスロマイシンが検出され、AKD 地点の底質からはどの抗菌薬も検出されなかった。この検出効率を高める目的で、今回は前述の 4 種類の抽出液を用いて、底質からの抗菌薬の抽出行程を加える工夫を行った。その結果として、マッキルベイン緩衝液およびメタノール：EDTA 含有マッキルベイン緩衝液を抽出液に使用することで、昨年度は検出されなかったサルファメトキサゾールが検出されるようになった。AKD 地点においては、4 つの抽出方法のいずれでも、昨年度は非検

出であったエリスロマイシンが検出された。このように、底質からの抗菌薬の抽出行程を加えることで、検出効率が向上することが確認された。

昨年度の調査ではまた、底質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。その結果、AKU 地点で分離された大腸菌はアンピシリン、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に対する耐性がやや高かった。この結果は、河川水からの検出結果との関連は明確ではなく、それが河川底質に着目した理由の一つである。前述の通り、本年度の調査でも底質から大腸菌を分離しており、次年度からこの分離株の薬剤耐性を調べる予定である。

E. 結論

先行研究で提案した河川底質からの抗菌薬検出手法について、底質からの抗菌薬の抽出行程を加えることによって、その検出効率が向上することが確認された。特に、マッキルベイン緩衝液およびメタノール：EDTA 含有マッキルベイン緩衝液を抽出液に使用した際に、検出される抗菌薬の数が増えるとともに、検出濃度も高まった。次年度以降、この抽出手法を適用した調査を継続することで、底質に存在する抗菌薬の種類や濃度に関するデータを蓄積する。それと同時に、底質から分離した大腸菌の薬剤耐性を調べることで、底質に残留した抗菌薬の影響を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Ichiro Yoneda, Masateru Nishiyama, Toru Watanabe. Significant factors for modelling survival of *Escherichia coli* in lake sediments. *Microorganisms*, 12(6), 1192, 2024

Ichiro Yoneda, Masateru Nishiyama, Toru Watanabe. Comparative experiment to

select water quality parameters for modelling the survival of *Escherichia coli* in lakes. *Environmental Pollution*, 357, 124423, 2024

その他発表

Masateru Nishiyama, Masaya Mori, Ichiro Yoneda, Toru Watanabe. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from in a river basin in Yamagata prefecture, Japan. 7th Environmental Dimension of Antimicrobial Resistance conference (EDAR7), Montreal, Canada, May 26-31, 2024.

米田一路, 西山正晃, 渡部徹, 湖沼における重要な環境因子を採用した大腸菌生存モデルの開発, 第 27 回日本水環境学会シンポジウム, 令和 6 年 9 月 11 ~ 12 日, 岩手県盛岡市

米田一路, 西山正晃, 渡部徹, 機械学習を用いた湖沼における大腸菌生存モデルの開発, 第 61 回環境工学研究フォーラム, 令和 6 年 11 月 26 ~ 28 日, 新潟市

鹿内靖成, 米田一路, 盧歆, 西山正晃, 渡部徹, 水環境における大腸菌の生存に関する標準株と野生株の比較, 第 61 回環境工学研究フォーラム, 令和 6 年 11 月 26 ~ 28 日, 新潟市

倉持祥太, 釧持ひろ, 米田一路, 渡部徹, 西山正晃, 東北地方の一級河川から単離した ESBL 産生大腸菌の薬剤耐性感受性と遺伝子型の特徴, 第 61 回環境工学研究フォーラム, 令和 6 年 11 月 26 ~ 28 日, 新潟市

鹿内靖成, 米田一路, 西山正晃, 渡部徹, 河川から分離された大腸菌野生株と標準菌株の水中での生残性の違い, 第 30 回庄内・社会基盤技術フォーラム, 令和 7 年 1 月 29 日, 山形県酒田市

鹿内靖成, 米田一路, 西山正晃, 渡部徹, 河川から分離された大腸菌野生株と標準菌株の水中での生残性の比較, 令和 6 年度土木学会東

北支部技術研究発表会，令和7年2月28日
～3月1日，宮城県仙台市

和7年3月17～19日，北海道札幌市

米田一路，西山正晃，渡部徹，湖沼における複
数の環境因子の影響を考慮した大腸菌動態モ
デルの開発，第59回日本水環境学会年会，令

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む）

なし

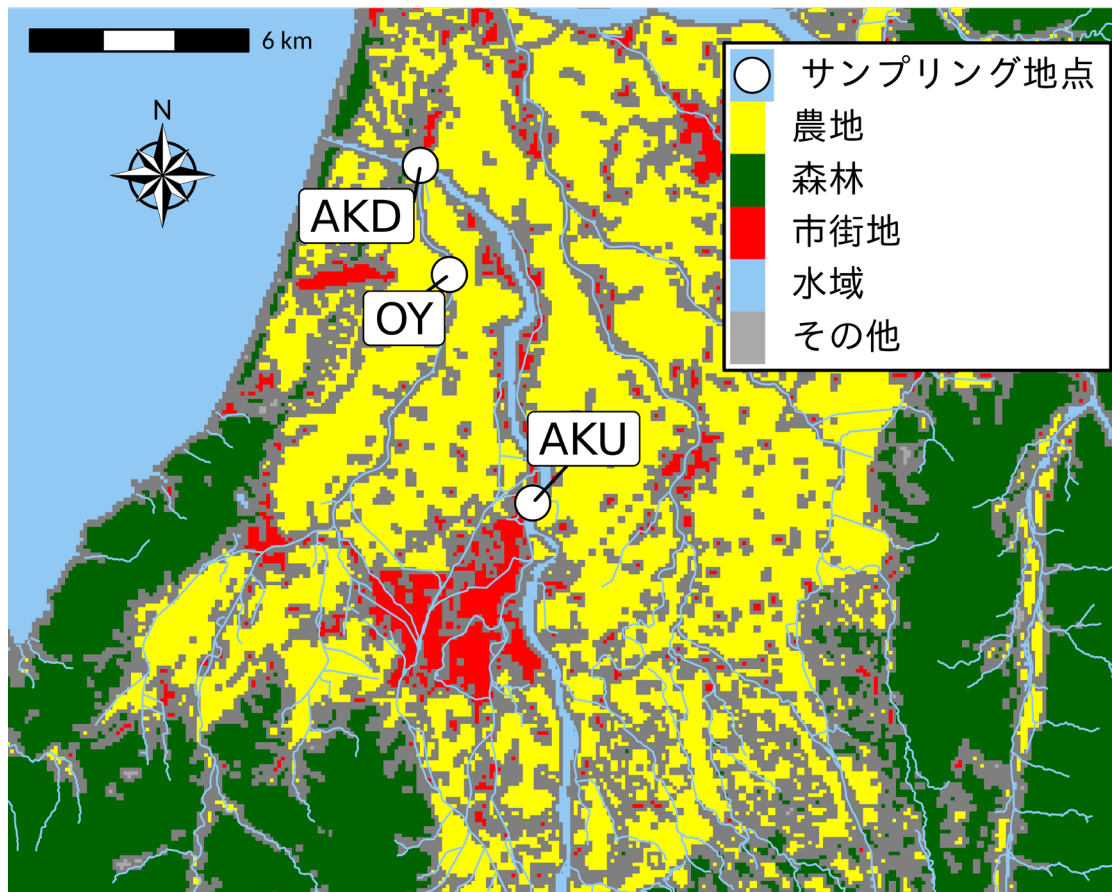


図1．調査地点

表1. 山形県内の河川で採取した底質試料（単位：ng/L）と水試料（単位：ng/g-wet）からの抗菌薬の検出結果（底質からの検出では4種類の抗菌薬抽出方法を試した）

(a) AKU地点	水試料	底泥試料			
		メタノール	アセト ニトリル	マッキルベ イン緩衝液 (MB)	メタノー ル：EDTA 含有MB
サルファメトキサゾール	90	<0.05	<0.05	0.05	0.08
トリメトプリム	20	1	0.08	0.3	0.9
エリスロマイシン	100	0.8	0.1	1	4
メロペネム	<200	<30	<30	<30	<20
シプロフロキサシン	5	<0.06	<0.06	<0.06	<0.05
レボフロキサシンおよび オフロキサシン	200	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
オキシテトラサイクリン	2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
セフォキシチン	<300	<60	<60	<60	<60
クロラムフェニコール	0.6	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
アンピシリン	10000	<200	<200	<200	<200

(b) AKD地点	水試料	底泥試料			
		メタノール	アセト ニトリル	マッキルベ イン緩衝液 (MB)	メタノー ル：EDTA 含有MB
サルファメトキサゾール	4	<0.05	<0.04	<0.05	<0.05
トリメトプリム	0.8	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
エリスロマイシン	5	0.06	0.04	0.04	0.2
メロペネム	<200	<30	<20	<30	<20
シプロフロキサシン	<0.3	<0.06	<0.05	<0.06	<0.06
レボフロキサシンおよび オフロキサシン	0.5	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
オキシテトラサイクリン	<0.7	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
セフォキシチン	<300	<60	<60	<60	<60
クロラムフェニコール	0.4	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
アンピシリン	<700	<200	<200	<200	<200

(c) OY地点	水試料	底泥試料			
		メタノール	アセト ニトリル	マッキルベ イン緩衝液 (MB)	メタノー ル：EDTA 含有MB
サルファメトキサゾール	0.6	<0.04	<0.04	<0.05	<0.04
トリメトプリム	<0.3	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
エリスロマイシン	0.7	0.006	<0.004	0.01	0.06
メロペネム	<200	<20	<20	<30	<20
シプロフロキサシン	<0.3	<0.05	<0.05	<0.06	<0.05
レボフロキサシンおよび オフロキサシン	1	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
オキシテトラサイクリン	<0.7	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
セフォキシチン	<300	<60	<60	<60	<60
クロラムフェニコール	0.4	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
アンピシリン	<700	<200	<200	<200	<200