

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560652

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌や耐性遺伝子を含む医薬品関連リスクの低減の場としての自然環境

研究課題名(英文) Effect of difference in the environment on the reduction of risks caused by pharmaceuticals and antibiotic-resistance

研究代表者

浦瀬 太郎 (URASE, Taro)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60272366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：下水処理水の間接再利用の場合などを考慮して、自然環境場における医薬品および薬剤耐性菌のリスクに関連して、それらの挙動および影響を調査した。アンモニアの添加により硝化を促進することによって、一部の医薬品の分解が促進されることが見いだされた。比較的汚染の進んだ場所から採取した硝化細菌群集では、高濃度の抗生物質を添加しても、硝化が徐々に進行したが、清浄な河川から得られた硝化細菌群集では、低濃度で完全に硝化が阻害された。フルオロキノロン系薬剤は藻類の生長を著しく阻害した。多摩川釣菌大腸菌のうち、3.1%～4.5%がセフトキシム耐性を持ち、フルオロキノロン系との多剤耐性菌比率が流下とともに上昇した。

研究成果の概要(英文)：The fate of pharmaceuticals and antibiotic-resistant bacteria in the water environments was investigated considering the risks related with indirect use of treated wastewater. Nitrification promoted the degradation of a group of pharmaceuticals. The nitrifiers obtained from the nutrient-rich environments were generally less sensitive to the antibiotics than those obtained from the pristine environments. *Microcystis aeruginosa* was extremely sensitive to fluoroquinolone antimicrobials. The ratios of *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins were in the range of 3.1% - 4.5% in the case of the samples taken from the Tama river. The ratios of multiple-resistant *E. coli* to both fluoroquinolones and third-generation cephalosporins were increased along with flow direction in the river.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：薬剤耐性 大腸菌 ESBL 医薬品の環境影響 藍藻 硝化菌

1. 研究開始当初の背景

水環境中の医薬品についての研究は、欧州、米国、わが国において、近年、活発におこなわれている。研究の多くは、医薬品の環境中存在実態、浄水処理や下水処理での除去性、環境中の分解挙動などについて行われているが、薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子についての研究も見られる。さらに、従来考えていたよりも高頻度で、遺伝子の水平伝達により薬剤耐性が多くの細菌へ拡散する可能性が指摘されており、医薬品そのものによるリスクよりも耐性菌の問題は大きな脅威である可能性がある。

下水処理水の再利用において pipe-to-pipe の再利用には抵抗感があるが、自然場にいったん排出する間接再利用では、拒否反応が低減し、シンガポールの下水処理水の間接再利用 Newater プロジェクトにおいても、特に市民の反対はない。医薬品や薬剤耐性遺伝子などを含んだ水を滞水させることによって、医薬品そのものの分解に加えて、薬剤耐性遺伝子の低減も期待できる。環境中における医薬品、薬剤耐性菌などの消長を明らかにすることによって、医薬品関連リスク低減への自然環境場の役割の解明が必要である。アンピシリン耐性やテトラサイクリン耐性については、環境中や下水処理過程での挙動が、表現型レベルでも遺伝子レベルでも、よく研究されているが、現在の治療の主役であるフルオロキノロン系や第三世代セファロスポリン系の抗生物質への耐性菌についての環境中や下水処理過程での情報は極めて少ない。

2. 研究の目的

(1) 間接下水再利用を意識した医薬品リスク低減に対する環境の役割の調査

様々な環境における医薬品の存在量の把握や医薬品分解微生物の探索(植物、菌類、細菌)を行う。

(2) 医薬品の硝化細菌や藻類への影響

環境において物質変換に重要な役割を果たしている微生物のうち化学物質への影響を受けやすいと考えられる藻類と硝化菌をとりあげ、医薬品による影響を調べる。

(3) 現在の疾病治療の主役抗生物質に対する耐性菌の環境中の存在状況

現在の治療の主役であるフルオロキノロン系や第三世代セファロスポリン系の抗生物質に対する耐性菌の存在状況を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 現場調査

医薬品の存在状況や耐性菌の存在状況の調査を代表的な都市河川である多摩川で行った。多摩川に放流されている流域下水道および公共下水道の処理場、大学の排水を処理している排水処理施設の処理水についても調査を行った。さらに、ベトナムハノイにおいても簡単な調査を行った。

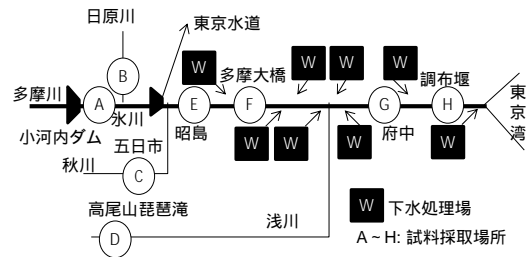


図-1 多摩川流域の試料採取地点

(2) 医薬品の硝化菌および藻類への影響

硝化抑制試験では、環境試料、純菌 (*Nitrovacter winogradskyi*)、あるいは、排水処理施設から採取した活性汚泥試料にアンモニア性窒素を 10 mgN/L の濃度になるように添加し、段階的に抗生物質を添加し、20 の恒温槽内で硝化の進行を観察した。また、藍藻に対する生長阻害試験では、国立環境研究所微生物保存施設より分譲された *Microcystis aeruginosa* (NIES -87) に対して、異なる濃度で抗生物質を添加し、経時的に顕微鏡下血球計算盤による細胞数計測とマイクロプレートリーダー(励起波長 360nm, 蛍光波長 670nm, 藍藻特有に含まれる色素蛋白質であるフィコシアニンを対象)測定を行い、生長阻害を測定した。

(3) 薬剤耐性菌の調査

試料の適量(大腸菌の想定される数に対して 0.1 mL ~ 600 mL)を滅菌した孔径 0.45 μm の膜でろ過し、膜ごとクロモアガー-ECC 培地上で培養した。*Escherichia coli* と考えられる青いコロニーの数を計測し、赤いコロニーを生じる大腸菌群を避けて、これらの青色コロニーを釣りだし、再度、ECC 培地上で培養した。このとき、青色コロニーを再度形成したものを薬剤感受性試験に供した。これらの菌の菌種を API-10 (BioMérieux Inc.) で簡易同定したところ、93%以上が *Escherichia coli* であり、他のものは、*Serratia* や *Klebsiella* であった。

各試料ごとに 200 株を目標に釣菌し、得られたコロニーに対して、抗生物質を含む Mueller-Hinton 培地によって、薬剤感受性試験を行った。用いた抗生物質とその濃度は、ampicillin (ABPC) 32 mg/L, gentamicin (GM) 8 mg/L, tetracycline (TC) 16 mg/L, cefotaxime (CTX) 64 mg/L, meropenem (MPM) 16 mg/L, levofloxacin (LVX) 8 mg/L, sulfamethoxazole / trimethoprim (ST/TMP) 152/8 mg/L とした。これらの薬剤のうち少なくとも 1 剤に対して、耐性もしくは中間と判断された株は、Kirby-Bauer 法によるディスク拡散試験により耐性パターンを確定した。腸内細菌に対する判断基準で耐性(中間は含まない)とされる阻止円の大きさで耐性パターンを決定した。ディスク試験で用いた抗生物質は、ペニシリン系 (ABPC, piperacillin (PIP)), 第三世代セファロスポリン系 (CTX),

第四世代セファロスポリン系 (cefpirome (CPR), cefepime (CFP)), カルバペネム系 (imipenem (IPM), MPM), アミノグリコシド系 (GM, amikacin (AMK)), テトラサイクリン系 (TC), フルオロキノロン系 (ciprofloxacin (CIP), LVX, sitafloxacin (STFX)), スルホンアミド系 (ST/TMP) とした。

4. 研究成果

(1) 医薬品の存在状況・分解微生物

分解試験において医薬品の初期濃度を 0.1, 1, 10 µg/L に変化させた場合、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセンは高濃度での分解試験では、低濃度での分解試験で得られるよりも高い分解率が得られる場合があり、10 µg/L 程度の初期濃度での試験は、分解に関わる微生物の当該環境での存在の有無を確認する試験として一定の役割が期待できた。また、汚水の生物処理では易分解とされるイブプロフェンは、汚濁の比較的進んだ河川水や清浄な河川水に活性汚泥を添加した河川水では濃度が大幅に減少したが、清浄な河川水では、分解が進まなかった。フェノプロフェンは、逆に、清浄な環境でより分解が進んだ。このことから、貧栄養の河川での微量物質の分解可能な医薬品は、活性汚泥系や汚染した河川で得られている分解可能な医薬品とは異なると考えられる。アンモニアの添加により硝化を促進することによって、一部の医薬品および医薬品に添加される人工甘味料 (CYC および SAC) では分解が促進された。しかし、もともと生物難分解性の成分は、分解が進まなかったが、特殊な分解菌が土壌抽出液では存在する可能性が示された。

シロイヌナズナ、および、カイワレダイコンをモデル植物とした医薬品の分解を試み、水からの摂取、植物体内での分解を測定し、独立栄養生物による医薬品除去の可能性について検討した。こうした植物が選択的に医薬品を吸収することはないが、いったん吸収した医薬品の植物体内での分解は、導入した遺伝子や種によって若干の差が見られた。

また、害虫忌避剤の N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) の *Trametes versicolor* 由来ラッカーゼによる分解を試みたが、ラッカーゼ単独での除去は難しくメディエーター存在下での若干の分解が示唆された。

ベトナムハノイの水環境における医薬品濃度の調査では、クロフィブリック酸、ゲンフィブロジル、フェノプロフェン、プロピフェナゾンは検出されなかったが、イブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナック、インドメタシン、カルバマゼピンは、0.1 µg/L 以上の濃度で検出された。

(2) 医薬品の硝化菌および藻類への影響

図-2 は、活性汚泥中硝化細菌へレボフロキサシン (LVX) を添加した時の硝化率の推移を

示した。LVFX による硝化阻害は、0.5 µg/mL の低濃度から生じ、高濃度では、より強い硝化活性が阻害された。しかし、8 µg/mL の LVFX 添加時でも測定日数が経過すると共に徐々に硝化が進んだ。

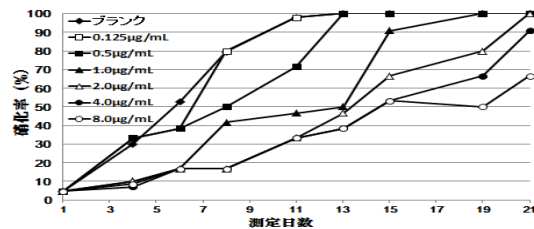


図-2 異なる濃度の LVX による活性汚泥中硝化細菌の硝化阻害試験

一方、純菌の場合は、4.0 µg/mL 以上の LVFX を添加すると、完全に硝化が抑制された。活性汚泥に比較して、群集に多様性がないため、ある濃度以上では硝化ができないものと考えられた。

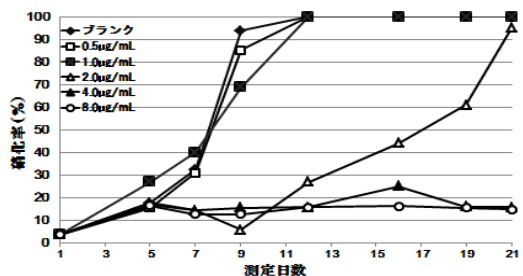


図-3 異なる濃度の LVX による Nitrovaacter winogradskyi に対する硝化阻害

また、谷地川、片倉城址公園の湧水など比較的汚染の進んだ場所から採取した硝化細菌群集では、8 µg/mL のレボフロキサシンを添加しても、硝化が徐々に進行したが、高尾山琵琶滝など清浄な河川から得られた硝化細菌群集では、0.5 µg/mL 以上の濃度では、完全に硝化が阻害された。このことから、下水処理施設や汚染の進んだ場所から採取した硝化細菌群集は様々な種で構成され、抗生物質に対する感受性の低い種が含まれていることが示唆された。

Microcystis aeruginosa に対する藻類生長抑制試験において、相対増殖率が 50% になる抗生物質濃度は、蛍光強度測定では LVX が 3.3 µg/L、CIP が 4.2 µg/L、細胞数計測では LVX が 1.9 µg/L、CIP が 2.0 µg/L となった (図-4)。細胞数計測の方が蛍光強度測定よりも低い濃度から影響が生じた。増殖阻害を大きく示す濃度より低い 1 µg/L ~ 4 µg/L の濃度範囲で藍藻細胞の膨張が観察され、キノロン系抗菌薬に共通の作用機序により、この濃度範囲で分裂が抑制されたものの、ひとつの細胞あたりの蛍光強度が大きくなったためと考えられ、薬剤の作用機序によっては、生長阻害の測定方法によって、結果に差が出るのが明らかになった。一方、アミノグリコシド系抗生物質 GM に対して、相対増殖率が 50% になる濃度は、蛍光強度測定では 150 µg/L、

細胞数計測では 120 µg/L となった。また、相対増殖率が 50%になる TC 濃度は、蛍光強度測定では 900 µg/L、細胞数計測では 1700 µg/L となった。LVX と CIP の場合とは逆に、GM、TC の低濃度暴露では、細胞の萎縮が観察され、細胞の分裂は抑制されなかったものの、代謝が抑制される濃度領域があることが考えられる。

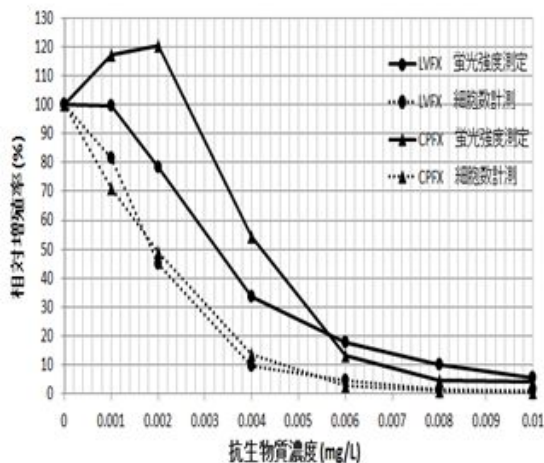


図-4 異なる濃度の LVX と CIP に暴露した *Microcystis aeruginosa* の相対増殖率

(3) 薬剤耐性菌の調査

図-5 にセフトキシム耐性菌の比率についての大腸菌 2,715 株の結果を示す。環境中から釣菌した大腸菌においては、セフトキシム耐性株と ESBL 産生株とは大きく重なるグループである。多摩川の昭島から下流の区間では、3.1%~4.5%がセフトキシム耐性を持っていた。昭島より上流地点には、大規模な下水処理場は存在せず、一部の下水道未接続家庭が浄化槽などを利用しているのみであるが、昭島地点で下水処理水が合流する前のサンプルを採取した場合においても、セフトキシム耐性大腸菌の比率が 3.4%あった。一方、小河内ダム水、日原川、秋川、高尾山などのサンプルでは、セフトキシム耐性菌はほとんど検出されず、これら上流で検出される大腸菌はヒト由来ではなく、野生の哺乳類もしくは鳥類に由来するのではないかと考えられる。

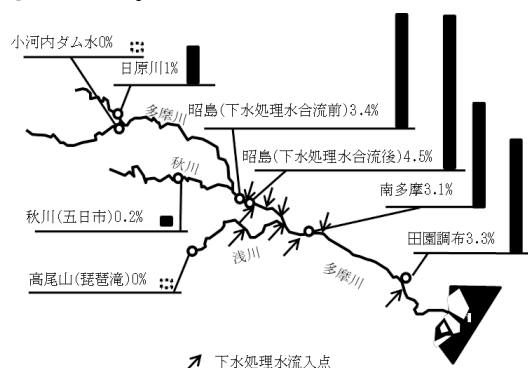


図-5 各地点の大腸菌での CTX 耐性比率

表-1 にセフトキシム耐性菌のうち、第四世代セフトロスポリン(セフトロム、または、セフトピム)、アミノグリコシド系(ゲンタマイシン、または、アミカシン)、フルオロキノロン系(レボフロキサシン、シプロフロキサシン、または、シタフロキサシン)にも耐性を持つ多剤耐性菌比率を昭島から田園調布の各地点について示す。山間部の調査地点では、秋川での 1 株を除いてこのタイプの耐性菌は存在しないため、表には示していない。セフトキシム耐性菌のうち、第四世代セフトロスポリンとの多剤耐性菌比率が、多摩川中流区間で流下とともに上昇していた。フルオロキノロン系の多剤耐性菌比率も同様に流下とともにやや上昇している可能性もある。セフトキシム耐性菌数がそれほど多くないことから、この傾向には、統計的に十分な証拠はないが、都市河川中で多剤耐性 ESBL 産生菌が選択されやすいとすると、その機構には興味もたれる。

表-1 CTX耐性菌の多剤耐性

地点	CTX 耐性株数	CPR or CFP との多剤耐性	GM or AMK との多剤耐性	LVX or CIP or STFX との多剤耐性
E	12	25%	33%	25%
F	18	33%	11%	22%
G	15	47%	13%	13%
H	16	75%	25%	31%

図-6 に今回釣菌した全大腸菌に占める代表的な薬剤に対する耐性菌比率を示す。多摩川から釣菌した 2,715 株のうち、ABPC 耐性株は 12.6%、CTX 耐性株は 2.3%、GM 耐性株は 2.0%、LVX 耐性株は 1.8%、MPM 耐性株は見られず、ST 耐性株は 7.2%、TC 耐性株は 7.3%であった。今回の研究と同時に実施した本学生活系排水の処理施設処理水(消毒前)から得られた 737 株の大腸菌における耐性率も同時に示すが、河川釣菌株と下水処理水釣菌株において、耐性菌比率は各薬剤ごとに類似していた。

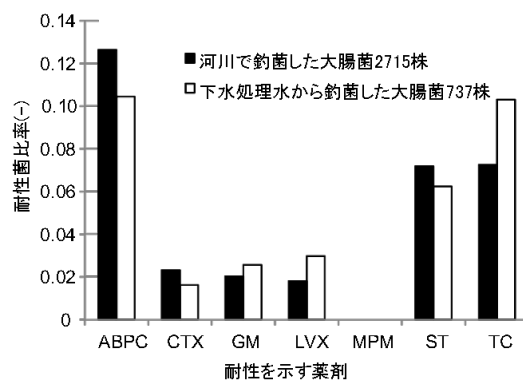


図-6 大腸菌における各薬剤への耐性菌比率

今回の結果からも明らかなように、上流の

清浄な区間を除いて、河川に存在する大腸菌は、ほとんどが下水処理水由来の大腸菌であり、その耐性菌比率は、ヒトの腸内の耐性菌比率を反映していることが推測される。水環境は、社会全体の状況を映す鏡のようなものであると考えられる。

また、耐性遺伝子の伝達の間として考えられる魚類の腸管に存在する抗生物質耐性菌について菌種同定を試みたところ、大腸菌よりも *Aeromonas* が多いことがわかった。また、菌種を限定せずに河川水中からカルバペネム耐性菌を検索すると、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Acinetobacter baumannii* などが見出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

N.H. Tran, V.T. Nguyen, T. Uruse, H.H. Ngo (2014) Role of nitrification in the biodegradation of selected artificial sweetening agents in biological wastewater treatment process, *Bioresource Technology*. Volume 161, Pages 40-46. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.116(査読あり)

Ngoc Han Tran, Taro Uruse, Thi Thao Ta (2014) A preliminary study on the occurrence of pharmaceutically active compounds in hospital wastewater and surface water in Hanoi, Vietnam, *Clean Soil, Air, Water*, Volume 42, Issue 3, 267-275. DOI: 10.1002/clen.201300021(査読あり)

浦瀬太郎(2013): 医薬品などの除去・分解に有効な処理技術, *環境システム計測学会誌*, 17, 4, 54-58. (査読なし)
<http://eica.jp/search/index.html>

Ngoc Han Tran, Jiangyong Hu, Taro Uruse (2013) Removal of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) by laccase-mediated systems. *Bioresource Technology*. 147, 667-671. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.113(査読あり)

Ngoc Han Tran, Taro Uruse, Huu Hao Ngo, Jiangyong Hu, Say Leong Ong (2013) Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresource Technology*. 146, 721-731. Review Article, DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.083(査読あり)

り)

Heekyong Oh, Taro Uruse, Dai Simazaki, Hyunook Kim (2013): Effect of natural organic matter on adsorption of ionic and nonionic pharmaceuticals to granular activated carbon, *Environment Protection Engineering*, Vol. 39, No. 4, 15-28. DOI: 10.5277/epe130402(査読あり)

寺田 翔, 三宅英美, 浦瀬太郎(2012): 異なる水環境から単離した大腸菌の抗生物質耐性プロファイル, *水環境学会誌*, 35, 5, 73-80. (査読あり)
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsw-e/-char/ja/>

[学会発表](計6件)

波多野順一, 浦瀬太郎(2013): キノロン系抗菌薬による藍藻の生長阻害, *環境工学研究フォーラム講演集*, 50, 166-168.(札幌 2013年11月20日)

太田昇吾, 浦瀬太郎(2013): 抗生物質による環境中硝化細菌に対する阻害, *環境工学研究フォーラム講演集*, 50, 169-171.(札幌 2013年11月20日)

浦瀬太郎, 三宅英美(2013): 多摩川河川水中の大腸菌のフルオロキノロン系およびセファロsporin系抗生物質への耐性, *環境工学研究フォーラム講演集*, 50, 179-181.(札幌 2013年11月20日)

三宅英美, 堀越才智, 寺田 翔, 浦瀬太郎(2012): 大腸菌の人間抗生物質への耐性パターンの多摩川流域での変化, *環境工学研究フォーラム講演集*, 49, 139-141.(京都 2012年11月29日)

三宅英美, 寺田 翔, 堀越才智, 浦瀬太郎(2012): 多摩川流域の抗生物質耐性菌の特徴, *水環境学会年会講演集*, 46, 33. (東京 2012年3月14日)

寺田 翔, 三宅英美, 浦瀬太郎 (2011): 環境中の大腸菌の抗生物質耐性率と耐性パターン, *環境工学研究フォーラム講演集*, 48, 232-234.(名古屋 2011年11月26日)

[その他]

ホームページ等
東京工科大学浦瀬研究室研究紹介ページ
<http://www2.teu.ac.jp/uruse/research/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦瀬 太郎 (URASE, Taro)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60272366

(2)研究分担者

多田 雄一 (TADA, Yuichi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80409789

西野 智彦 (NISHINO, Tomohiko)

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：10409790