

食品及び環境中の抗微生物薬残留実態と薬剤耐性微生物に関する研究

齋藤 育江^a, 大場 由実^b, 木下 輝昭^c, 小杉 有希^c, 井田 美樹^d, 林 洋^b, 松島 陽子^b, 吉川 聡一^b, 小池 裕^b, 林 もも香^b, 永野 智恵子^b, 関村 光太郎^e, 神田 真軌^f, 橋本 常生^g, 角田 徳子^c, 飯田 春香^c, 山崎 貴子^h, 渡邊 喜美代^c, 小田 智子^c, 田部井 由紀子^{ak}, 武藤 千恵子^c, 梅津 萌子^c, 田中 和良^c, 鈴木 滯^c, 小西 浩之^{al}, 村上 昂^d, 鈴木 康規^f, 小林 真紀子^d, 加藤 玲^d, 山梨 敬子^d, 下島 優香子^f, 西野 由香里^d, 福井 理恵^d, 河村 真保^d, 平井 昭彦^f, 長島 真美^g, 熊谷 遼太^g, 根岸 あかね^g, 河上 麻美代^g, 林 真輝^g, 藤原 卓士^g, 千葉 隆司^k, 有吉 司ⁱ, 久保田 寛顕ⁱ, 小林 甲斐ⁱ, 内谷 友美ⁱ, 奥野 ルミⁱ, 大塚 健治^b, 横山 敬子^{md}, 鈴木 淳^e, 新開 敬行^l, 笹本 剛生ⁿ, 貞升 健志^o, 猪又 明子^p, 守安 貴子^p

2018～2020年度に実施された重点研究「食品及び環境中の抗微生物薬残留実態と薬剤耐性微生物に関する研究」の概要について報告する。目的は、近年、世界的に問題となっている薬剤耐性について、食品及び環境分野における基礎的データを収集することであり、理化学的及び微生物学的側面から取組みを行った。本研究は4つの個別課題から成り、畜産食品中の抗微生物薬に関する研究では、 β -ラクタム系薬剤、サルファ剤及びキノロン系薬剤の高感度測定法を開発し、畜産食品中の残留実態について情報を得た。環境水を対象とした研究では、カルバペネム系薬剤の測定法を開発し、河川水、井戸水及び下水処理場の流入水・放流水について、各種抗微生物薬を調査した。また、同時に、河川水についてはカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（以下CREと略す）の存在を確認した。抗微生物薬の水環境中における挙動に関する基礎的検討では、各種抗微生物薬について、加水分解、生分解及び光分解による半減期を求め、次亜塩素酸処理、オゾン処理、活性炭処理及び活性汚泥処理等を実施して、分解性に関する情報を収集した。環境中の病原微生物に関する研究では、下水処理場の流入水について、CRE及びエンテロウイルス（ポリオウイルスを含む）の効率的分離法を確立し、調査を行った。分離されたCREについては、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行い、カルバペネマーゼ遺伝子について詳細な解析を行った。

キーワード：抗微生物薬、薬剤耐性菌、畜産食品、河川水、半減期、下水処理場、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌、エンテロウイルス、LC-MS/MS、次世代シーケンサー

はじめに

東京都健康安全研究センターの重点研究として、2018年度から2020年度までの3か年で「食品及び環境中の抗微生物薬残留実態と薬剤耐性微生物に関する研究」を実施した。目的は、薬剤耐性が問題となっている抗微生物薬を中心に、食品中及び環境中の抗微生物薬の残留実態調査を行うと

もに、耐性微生物の分布状況など、薬剤耐性に関する基礎的データを収集することである。

本研究は4つの個別課題から構成されており、それぞれの課題名及び研究担当者は以下のとおりである。

1. 畜産食品中抗微生物薬の分析法開発と残留実態の把握、大場由実

^a 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

^c 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

^d 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^e 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

^f 当時：東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^g 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^h 現所属：東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

ⁱ 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^j 当時：東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^k 現所属：東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

^l 現所属：東京都健康安全研究センター精度管理室

^m 当時：東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

ⁿ 東京都健康安全研究センター食品化学部

^o 東京都健康安全研究センター微生物部

^p 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

2. 東京都の環境水中における抗微生物薬の存在実態調査, 木下輝昭
3. 抗微生物薬の水環境中における挙動に関する基礎的検討, 小杉有希
4. 環境からのカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 等の病原微生物の検出と分子疫学解析, 井田美樹
 なお, 各個別課題においては, カルバペネム系抗微生物薬及びCREを共通テーマとし, 理化学的及び微生物学的側面の両方から研究を進めた.

個別課題ごとの研究内容と成果の概要

1. 畜産食品中抗微生物薬の分析法開発と残留実態の把握

畜産食品中に残留している抗微生物薬の検査は, 細菌学的試験法でスクリーニングを行い, 抗菌活性を有する物質が検出された場合, 理化学的試験法で薬剤の定性及び定量を行う。しかし, 近年, 耐性菌が問題となっているβ-ラクタム系薬剤²⁾の一部については, 高極性であること等, 他の抗微生物薬とは物性が異なるため, これまでに構築した試験法では十分な分析精度が得られていない。また, 細菌学的試験法と理化学的試験法では前処理が異なるため, スクリーニングで薬剤が検出された場合, 改めて理化学的試験法の前処理から始める必要があり, 薬剤の特定までに時間がかかる等の課題がある。そこで, 本研究ではβ-ラクタム系薬剤等を簡便かつ効率的に分析できるように試験法を改良し, より汎用性, 頑健性に優れた手法を開発すること, また, 今後の行政検査に導入して, 畜産食品中の残留実態を把握することを目的とした。

1) β-ラクタム系薬剤の分析法開発

β-ラクタム系薬剤のうち, ペニシリン系9剤, セフェム系9剤及びカルバペネム系4剤の3系統の薬剤, 計22種について検討を行った (表1, 1)。

(1) 細菌学的測定条件の検討

試験菌には*Geobacillus stearothermophilus* を用いた。高感度化のため, ディスクに負荷する試験溶液の量を増やし, 培地への薬剤の拡散を促進するTween80によるディスク処理を行った。また, 食品由来成分による擬陽性を無くすため, 前処理で使用する

抽出液及び固相カラム溶出液の組成を検討して改良法を確立した。更に培地量についても検討した。その結果, 確実に擬陽性を示さず, ペニシリン系及びセフェム系薬剤を十分に検出可能な条件を確立した (検出限界: 0.001~0.25 µg/mL)。カルバペネム系薬剤についても, 改良した測定条件で他の薬剤と同等の感度が得られた (検出限界: 0.0025~0.05 µg/mL)。

(2) 分析機器条件の検討

高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (以下LC-MS/MSと略す) の分析条件を検討した。MS条件については, 脱溶媒温度等を最適化した。LC条件については最初に分析カラムを検討した。高極性薬剤への適用を標榜している25種のカラムについて, 特に保持が困難なカルバペネム系薬剤の感度とピーク形状を比較したと

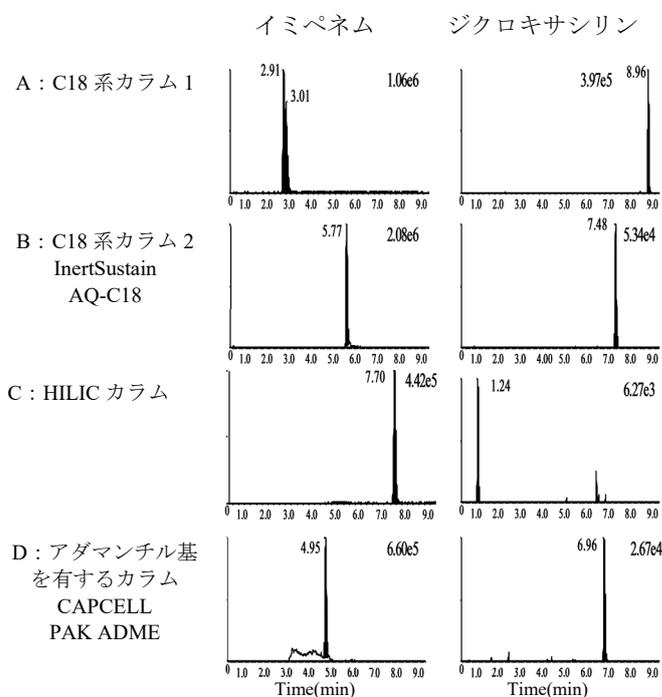


図1. 各種分析カラムによる2薬剤のクロマトグラム比較
標準溶液 0.01 µg/mL in 50% アセトニトリル

表1. 分析対象薬剤

系統名	薬剤名	系統名	薬剤名
1) β-ラクタム系薬剤			
ペニシリン系	アスポキシシリン, アモキシシリン, アンピシリン, オキサシリン, クロキサシリン, ジクロキサシリン, ナフシリン, ペニシリンV, ベンジルペニシリン	2) サルファ剤	スルファキノキサリン, スルファジアジン, スルファジミジン, スルファジメトキシ, スルファチアゾール, スルファドキシ, スルファメトキサゾール, スルファメラジン, スルファモノメトキシ, スルフィソゾール
セファロスポリン系	セファゾリン, セファピリン, セファレキシン, セファロニウム, セフォペラゾン, セフキノム, セフチオフル, セフロキシム, デスフロイルセフチオフルアミド	3) キノロン系薬剤	エンフロキサシン, オキサリニック酸, オフロキサシン, オルビフロキサシン, サラフロキサシン, ジフロキサシン, シプロフロキサシン, ダノフロキサシン, ノルフロキサシン, フルメキン, マルボフロキサシン
カルバペネム系	イミペネム, ドリペネム, ビアペネム, メロペネム		

ころ、高極性化合物に特化したカラム (図1, B) あるいは特殊な官能基アダマンチル基を有するカラム (図1, D) の2種類で良好な結果が得られた。次にこの2種のカラムを用いて各々の移動相, グラジエント条件, 標準溶液の溶媒種及び注入量を最適化したところ, すべての薬剤で 0.001 µg/mLまで検出可能な条件を確立することができた。最終的に, 試料からの夾雑物の影響や感度を総合的に判断し, アダマンチル基を有するカラムを選択した。

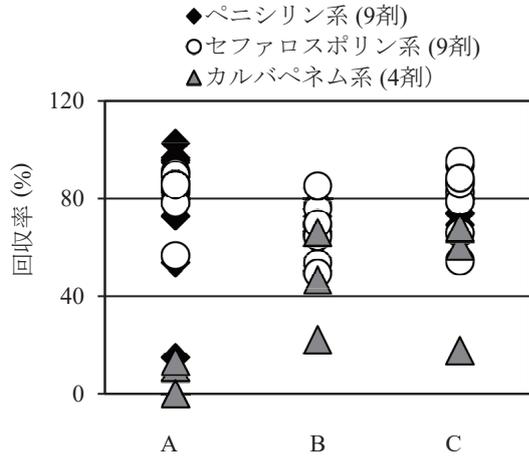


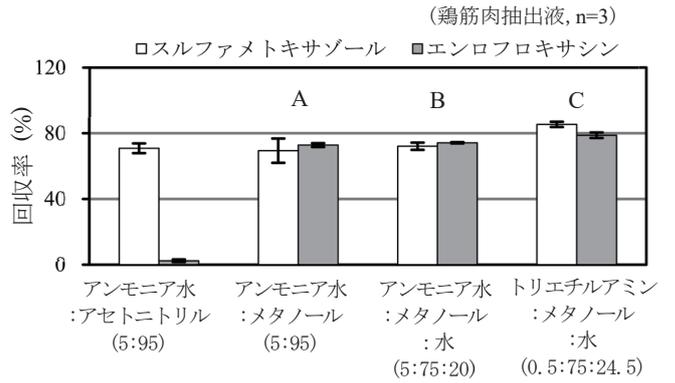
図2. β-ラクタム系薬剤の添加回収試験結果

豚筋肉, n=3, 添加濃度 0.05 µg/g

A: ポリマー系逆相カラム (HLB), B: HLB+グラファイトカーボンカラム (GC), C: HLB+GC 及び条件最適化

(3)前処理法の検討 豚筋肉に22剤を添加し, 細菌学的測定条件の検討で確立した改良法を用いて前処理を行い, 試験溶液を調製した。LC-MS/MSを用い, 開発した分析機器条件で測定したところ, セフェム系及びペニシリン系薬剤は十分回収されていたが, カルバペネム系4剤の回収率は20%以下であった (図2, A)。この原因として, 固相

a) 薬剤回収率の違い



b) 細菌学的試験における鶏筋肉抽出時の阻止円形成 (擬陽性)の有無

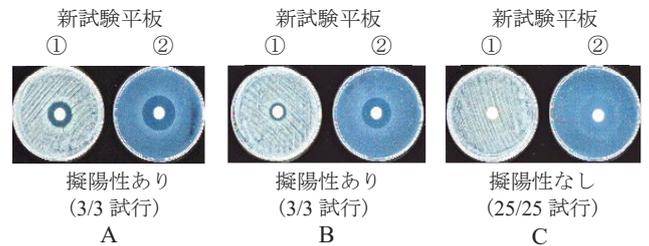


図3. 前処理での逆相-強陽イオン交換ミックスマードカラム (MCX) からの溶出に用いる溶媒組成による影響

として用いたポリマー系逆相カラム (以下HLBと略す) にカルバペネム系薬剤が保持されず, 回収率が低いこと等が判明した。そこで, グラファイトカーボンカラム (以下GCと略す) を併用したところ, カルバペネム系薬剤については改善がみられた (図2, B)。次に, 当該カラムの充填量, カラムへの抽出溶液負荷量, 溶出溶媒等を検討し, 食品からの抽出法にも改良を加えた結果, 回収率が向上し

表2. サルファ剤及びキノロン系薬剤の新規スクリーニング平板の概要

	現行法	サルファ剤用 新試験平板①	キノロン系薬剤用 新試験平板②
試験菌名	<i>Bacillus subtilis</i> BGA	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i> BGA
培地の特徴	抗生物質検査用	トリメトプリム含有	精製寒天使用
平板作製法	混釈	画線	混釈
検出	サルファ剤 スルファメトキサゾール 0.5 µg/g	感度× 阻止円 (-)	感度× (100倍↑) 阻止円 20 mm
	キノロン系薬剤 エンロフロキサシン 0.5 µg/g	感度○ 阻止円 17 mm	感度○ (2-5倍↑) 阻止円 28 mm

た(図2, C)。牛乳に22剤を添加し, 妥当性評価を行ったところ, 回収率38~93%, 併行精度9%以下, 室内精度22%以下で, 畜産現場で使用頻度の高いセフゾリン等の薬剤については, ガイドラインの基準に適合する方法を確立した。カルバペネム系薬剤については, ピアペネムを除き, 定量下限値は1 µg/gで, スクリーニングとして使用可能であった。また, 同一前処理で得た試験溶液が, 細菌学的試験法にも適用可能か検証した。その結果, イミペネム, デスフロイルセフチオフルアセトアミド, ドリペネム及びピアペネムを除く18剤については, 既報より高感度に基準値相当を検出可能となり, 細菌学的試験法でより迅速かつ簡便にスクリーニングできる方法を確立した。

2) サルファ剤及びキノロン系薬剤の分析法開発

既存の細菌学的試験法では検出が難しかったサルファ剤10剤及びキノロン系薬剤11剤について検討を行った(表1, 2)及び3)。

(1) 細菌学的測定条件の検討 サルファ剤については, 従来, 使用していなかった細菌*Bacillus megaterium*を用い, 混釈ではなく培地に試験菌を塗布する画線法を用いたところ, 検出限界は0.25~0.5 µg/mLであり, 現行法より感度が約100倍向上した(表2, 新試験平板①)。また, キノロン系薬剤については, 金属量の少ない培地に*Bacillus subtilis* BGAを混釈して試験平板を作製したところ, 現行法に比べて検出感度を2~5倍高めることができた(表2, 新試験平板②)。また, これら2種の新試験平板の品質を確認したところ, 検出感度は統計学上の管理限界値内(n=50)と精度が担保されていることを示した。

(2) 前処理法の検討 サルファ剤及びキノロン系薬剤が同時に測定可能な同一前処理法を検討した。固相カラムには, 逆相-強陽イオン交換ミックスマードカラム(以下MCXと略す)を用い, 溶出溶媒の組成による薬剤の回収率と擬陽性への影響を確認した(図3)。その結果, トリエチルアミン:メタノール:水=0.5:75:24.5とすることにより, サルファ剤及びキノロン系薬剤の同時精製が可能で, かつ細菌学的試験法で擬陽性を示さない同一前処理が可能となった(図3, C)。新たに開発した試験法について, 鶏筋肉, 鶏卵及びエビの3試料を用いて21剤を評価したところ, 十分なスクリーニング性能を有することが判明し, このうちスルファキノキサリン, スルファジメトキシン及びフルメキンを除く18剤が妥当性ガイドラインに適合した。また, 内部品質管理を実施した結果, 試行数40回のうちZスコアが2を超えたのは1回のみで, 持続的に安定した頑健性の高い検査が実施可能なことを確認した。更に, 技能試験試料を用いて評価を行ったところ, 他機関の平均と比較してZスコアが2以内であり, 他法と同等の分析能があることも確認した。

3) 畜産食品中の残留実態調査

検討したβ-ラクタム系3系統, サルファ剤及びキノロン系薬剤については, 検証薬剤の約8割が定性, 定量能における国際規格の水準を担保する試験法を開発することがで

きた。新たに開発した試験法を用い, 畜産食品中の抗微生物薬について実態調査を行った。牛乳23検体を調査したところ, 1検体から, セフチオフル及びセフォペラゾンが検出された(それぞれ0.0031及び0.0038 µg/g)。また, 畜産食品76検体について調査したところ, 鶏筋肉2検体から, エンフロキサシン及びシプロフロキサシンが検出された(0.0007~0.0175 µg/g)。本実態調査で検出された各薬剤の濃度は, 既法では分析困難な濃度の範囲であり, 本試験法により正確な残留実態を把握できるようになったことは, 耐性菌対策の一助となる。

文 献

- 1) 厚生労働省生活衛生局肉肉衛生課長:衛乳第94号, 畜産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について(通知), 平成3年10月11日。
- 2) 荒川宜親:日臨微誌, **13**, 150-161, 2003。

発 表 実 績

- 1) 関村光太郎, 神田真軌, 林 洋, 他:バイオアッセイによる食肉中残留サルファ剤のスクリーニング, 第115回食品衛生学会学術講演会(東京), 2019年10月。
- 2) 関村光太郎, 神田真軌, 林 洋, 他:豚筋肉中残留動物用抗菌剤の微生物学的スクリーニングおよびLC-MS/MS同時測定法の開発, 食衛生雑誌, **61**, 109-118, 2020。
- 3) 神田真軌, 関村光太郎, 林 洋, 他:残留合成抗菌剤検査への新規バイオアッセイ法導入に向けた取組, 全国衛生化学協議会(Web開催), 2020年11月。
- 4) Koike H., Kanda M., Hayashi H., et al: Monitoring of residual antibacterial agents in animal and fishery products in Tokyo, 2003-2019: Application and verification of a screening strategy based on microbiological methods, *Food Additive Contamination B Surveill.*, **14**(1), 66-73, 2021。

2. 東京都の環境水における抗微生物薬の存在実態調査

抗微生物薬は畜産業などヒト以外にも使用されており, ヒトや畜産動物を介して環境中に排出される。環境中に排出された薬剤は, 薬剤耐性菌を出現させ, その遺伝子が環境中の他の細菌に伝達され, 広がっていく可能性が指摘されている¹⁾。本研究では, 抗微生物薬の環境水中での存在実態を把握することを目的として, 都内の河川水や井戸水, 下水処理水等の環境水中における抗微生物薬の分析法を確立し, 調査を行った。調査対象薬剤は, これまでに分析法を確立したセフェム系, キノロン系, マクロライド系及びテトラサイクリン系等の薬剤, 計25種に, 新たにカルバペネム系4種及びポリペプチド系の薬剤1種を加えた。また, 河川水については, 薬剤の調査と同時に, カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, 以下CREと略す)の有無を確認した。

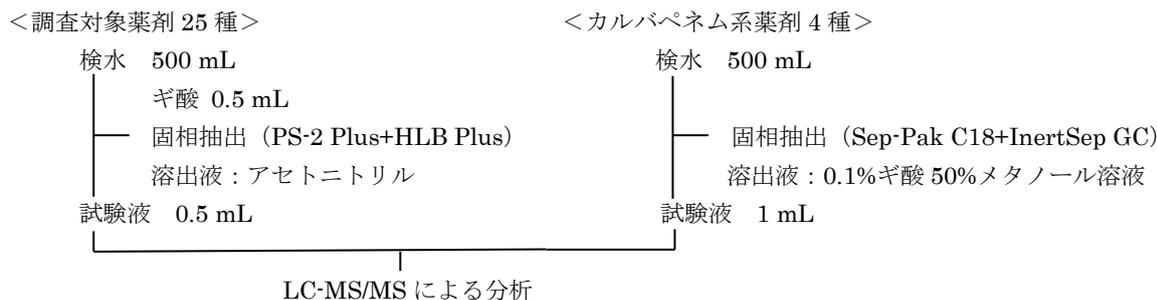


図4. 環境水中の抗微生物薬分析フロー

1) カルバペネム系及びポリペプチド系薬剤の分析法の検討

カルバペネム系薬剤 (イミペネム, ドリペネム, ピアペネム及びメロペネム) 及びポリペプチド系薬剤 (コリスチン) の分析法の検討を行った. 固相抽出を用いた前処理では, 試料のpH調整は行わず, 疎水性カラムにC18, 親水性カラムに活性炭またはグラファイトカーボンを用い, 疎水性カラムと親水性カラムを二連にして使用し, 回収率を比較した. LC-MS/MSによる測定の結果, カルバペネム系薬剤の回収率は, C18と活性炭の組合せでは24%未満であったが, C18とグラファイトカーボンの組合せでは41~62%であり, 値のバラツキも小さかった. 回収率に改善の余地はあるが, スクリーニング法として有用な測定方法を確立することができた. なお, コリスチンは, 両方法ともに回収率が低かったため, 調査対象外とした. コリスチンを除く29種の分析フローを図4に示す. 詳細は既報²⁾による.

2) 環境水中の抗微生物薬調査

(1) 多摩川河川水 都内を流れる多摩川 (支川を含む) で, 2019年度及び2020年度の5月, 8月, 11月及び2月に, それぞれ11か所 (合計44検体) で調査を行った. 調査地点を図5に示す. 調査対象29種中16種が検出され, 川の中・下流域で検出頻度が高かった. カルバペネム系薬剤は検出されなかった. 2019年度に実施した4回分の調査結果を表3に示す. 薬剤別では, クラリスロマイシン, アジスロマイシン及びレボフロキサシンの検出率が57~73%と高く, 濃度範囲はそれぞれ0.0009~0.22 µg/L, 0.004~0.22 µg/L及び0.003~0.11 µg/Lであった. この3物質は体外排泄量が多く^{3,4)}, 下水処理工程での除去率が低い⁵⁾ため, 河川水での検出は下水処理場の放流水からの影響を受けていることが考えられる²⁾. なお, 2020年度の調査においてもほぼ同様の結果が得られた.

(2) 多摩地区井戸水 2019年11月に, 57地点の井戸水について調査を行った. 調査対象29種中7種が検出され, カルバペネム系薬剤は不検出であった. 調査した全地点のうち抗微生物薬が検出されたのは14地点で, 薬剤別では, サルファ剤であるスルファメトキサゾールの検出率が23%と最も高く, 濃度範囲は0.002~0.016 µg/Lであった (表4). この物質は, 動物用抗生物質として使用されること

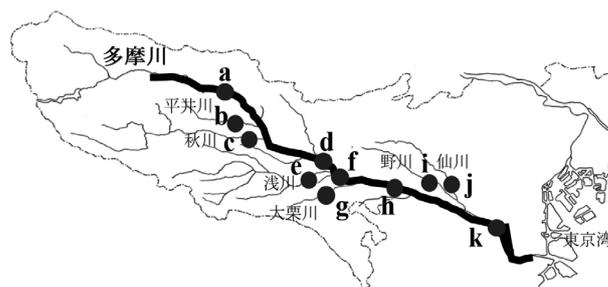


図5. 多摩川及び支川における調査地点

表3. 河川水から検出された薬剤の検出数, 検出率及び検出濃度 (2019年度調査)

薬剤名	検出数	検出率 (%)	検出濃度 (µg/L)
クラリスロマイシン	32	73	0.0009~0.22
スレクナム	1	2.3	0.016
アンピシリン	1	2.3	0.010
セフカニヒボキシム	1	2.3	0.010
セフメタゾール	16	36	0.020~0.080
スルファメトキサゾール	19	43	0.002~0.22
トリメトプリム	22	50	0.002~0.069
レボフロキサシン	25	57	0.003~0.11
テルヒサフィン	8	18	0.0005~0.019
ロキシスロマイシン	22	50	0.002~0.039
リンコマイシン	13	30	0.001~0.003
アジスロマイシン	26	59	0.004~0.22
トキシサイクリン	1	2.3	0.002
ベンジレペニシリン	1	2.3	0.003
フルファモノメトキシム	3	6.8	0.010~0.026
エリスロマイシン	18	41	0.0016~0.11

が多く⁶⁾, 井戸水から検出された原因として, 畜産農場からの排水による影響や, 豚や鶏等の排泄物の堆肥化により土壌経由の浸入等が挙げられる²⁾.

3) 多摩川河川水中のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌調査

多摩川河川水中におけるCREの有無を確認するため, 抗微生物薬の調査と同一試料を用いて試験を行った. 方法は, 後述の「4. 環境からのカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 等の病原微生物の検出と分子疫学解析」に記載し

表4. 井戸水からの検出薬剤, 検出濃度 (µg/L) 及び検出率 (%)

	クラリスロ マイシン	スルファメト キサゾール	トリメト プリーム	テルビ ナフィン	リンコ マイシン	アジスロ マイシン	タイロシ ン
A地点		0.012					
B地点	0.0050		0.004	0.12	0.009	0.006	0.046
C地点		0.007					
D地点		0.003					
E地点		0.005					
F地点		0.002		0.0010			
G地点		0.008					
H地点		0.003					
I地点		0.002					
J地点		0.016					
K地点		0.002					
L地点		0.004					
M地点		0.008					
N地点		0.002		0.0004			
検出率	1.8	23	1.8	5.3	1.8	1.8	1.8

空欄は定量下限値²⁾未滿

た. 2019年度は8月に多摩川中流域2か所でCREの存在が認められ, 菌種は, エンテロバクター属菌及びクレブシエラ属菌であった. しかし, 同地点におけるカルバペネム系薬剤は不検出であったことから, 検出されたCREは, 他の箇所でも生成したものが流入してきたと推察された. そこで, CREの発生源を調査するために, CREが検出された地点付近で, 支川を含めた新たな地点を選定し, 9月及び10月に調査を行った. その結果, 多摩川本流の複数か所でCREが検出されたが, 発生場所を特定することはできなかった. 11月, 2月及び追加で12月に行った調査では, CREは検出されなかった²⁾. 2020年度には6月に多摩川中流域1か所, 8月には多摩川中・下流域3か所及び支流1か所, 11月には多摩川下流域2か所, 2月には多摩川下流域1か所でCREが

検出された. 菌種はエンテロバクター属菌が大部分を占めていた. CREの発生源を調査するために, 8月にCREが検出された地点の上流側で, 9月に調査を行ったが, 発生場所を特定することはできなかった.

4) 下水処理場の流入水及び放流水中の抗微生物薬調査

下水処理場における流入水及び放流水中の抗微生物薬を調査するため, 2019年8月, 11月及び2020年2月に各月1回, 下水処理場(1か所)で採水を行った. アジスロマイシンを除く28種の抗微生物薬を調査したところ, 流入水から18種, 放流水から13種が検出された. カルバペネム系薬剤4種については, 流入水及び放流水のいずれからも検出されなかった. 流入水から検出された主な抗微生物薬(最大値)は, レボフロキサシン(1.7 µg/L), クラリスロマイシン(1.1 µg/L), スルファメトキサゾール(0.30 µg/L), エリスロマイシン(0.19 µg/L), トリメトプリーム(0.17 µg/L)であった. また, これらの薬剤の放流水中濃度(最大値)は, レボフロキサシン(0.18 µg/L), クラリスロマイシン(0.36 µg/L), スルファメトキサゾール(0.25 µg/L), エリスロマイシン(0.078 µg/L), トリメトプリーム(0.13 µg/L)であった. 流入水及び放流水から, 全調査月に検出された物質を図6に示す. いずれも, 流入水よりも放流水の方が濃度が低く, 下水処理により一部が除去されていることが確認できた.

文 献

- 1) 渡部 徹: 水環境学会誌, 43A, 99-102, 2020.
- 2) 木下輝昭, 小田智子, 渡邊喜美代, 他: 東京健安研七
年報, 71, 225-232, 2020.
- 3) 八十島 誠, 小林義和, 中田典秀, 他: 環境工学研究
論文集, 42, 357-368, 2005.
- 4) 医薬品インタビューフォーム: 15員環マクロライド系
抗生物質製剤.
<http://image.packageinsert.jp/pdf.php?mode=1&yjcode=6149>

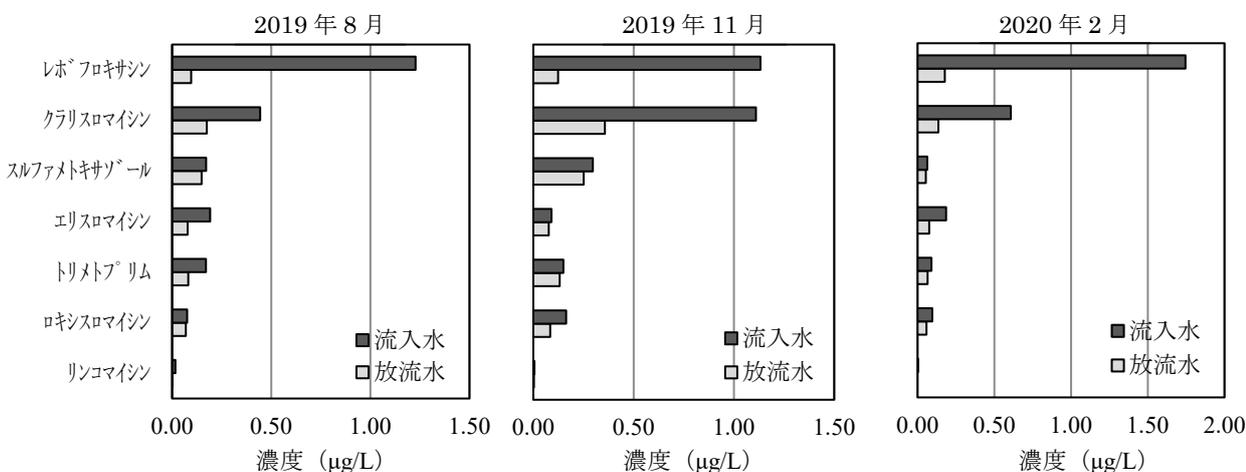


図6. 下水処理場の流入水及び放流水から検出された主な抗微生物薬

004F1125 (2021年7月16日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)

- 5) 酒井真美: 平成30年度環境創造局業務研究・改善事例発表会, 2018.
https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/machizukuri-kankyokasen-gesuido/gesuido/shori/sokutei/chosa/report.files/0077_20190329.pdf (2021年7月16日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)
- 6) 農林水産省 動物医薬品検査所: 動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器製造販売高年報(別冊), 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量, 2018.
https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/h30_hanbaidaka.pdf (2021年7月16日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)

発 表 実 績

- 1) 飯田春香, 小杉有希, 渡邊喜美代, 他: 国内の下水処理場を対象とした生活由来医薬品の実態調査, 第28回環境化学討論会(埼玉), 2019年6月.
- 2) Iida, H., Kosugi, Y., Watanabe, K., *et al.*: Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals in the water environment in Japan, Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America 40th Annual Meeting, Toronto, Canada, November, 2019.
- 3) 木下輝昭, 小田智子, 渡邊喜美代, 他: 東京都における環境水中抗生物質の存在実態調査及び河川水中カルバペネム耐性菌の検出状況, 東京健安研七 年 報, 71, 225-232, 2020.

3. 抗生物質の水環境中における挙動に関する基礎的検討

水環境中に排出されたヒト及び動物用抗生物質の, 水環境中における挙動について情報を得ることは, 抗生物質の環境への影響を知る上で重要である.

医薬品については, 環境中での動態を予測する手法が, EU, 米国, 日本で提示されている. 日本では, 平成28年3月末に厚生労働省医薬・生活衛生局より「新医薬品開発における環境影響評価(Environmental Risk Assessment, 以下ERAと略す)に関するガイダンス」¹⁾が通知され, ヒト用の抗生物質も他の医薬品と同様に, ERAを検討する必要があることが明記された. そこで, 本研究では, 既存の手法である, 生分解試験や光分解試験等の室内実験を利用して, 分解に関連する各ファクターを求め, 抗生物質の水環境中における挙動を予測するための基礎的データを得ることを目的とした.

1) 河川を想定した抗生物質の挙動

河川を想定した抗生物質の挙動の検討では, 加水分解

試験, 生分解試験及び光分解試験を実施した. 対象の抗生物質は, カルバペネム系薬剤であるメロペネム及びピアペネム等を含む β -ラクタム系13種, マクロライド系6種, テトラサイクリン系3種, サルファ剤等5種の計27種とした.

(1) **加水分解試験** 精製水に抗生物質の混合標準液を添加した後(最終濃度100 $\mu\text{g/L}$)暗所に静置し, 24時間後まで経時的に抗生物質の濃度を測定して半減期を算出した. その結果, 多くの抗生物質の半減期は24時間以上と長かったが, セフトリアキソン, タイロシン及びロキシシロマイシンについては, 20時間未満と短かった(図7).

(2) **生分解性試験** 多摩川中流域で採取した河川水をろ過後2つに分け, 一方は熱処理なし, 他方はオートクレーブで滅菌処理した(120 $^{\circ}\text{C}$, 15分). それぞれに抗生物質の混合標準液を添加し(最終濃度100 $\mu\text{g/L}$), 暗所, 20 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションし, 28日後まで経時的に抗生物質の濃度を測定して半減期を算出した. 熱処理なしで, 半減期が特に短かったのは, ベンジルペニシリン及びピペラシリンで1日未満であった. 抗生物質の分類で分けると, 半減期が長かった(28日以上)のは, 主にサルファ剤, キノロン系(レボフロキサシン)及びマクロライド系で, ペニシリン系, カルバペネム系及びセフェム系は半減期が短い傾向にあった(図7).

(3) **光分解試験** 精製水及びろ過した河川水をそれぞれ2つに分け, 抗生物質の混合標準液を添加した(最終濃度100 $\mu\text{g/L}$). その後, 一方は人工太陽光用光源により光照射をし, 他は暗所に静置して, 24時間後まで経時的に抗生物質の濃度を測定し, 半減期を算出した. 光照射で半減期が短かった薬剤は, 精製水を用いた試験ではセフジニル, ピアペネム, メロペネム, スルファメトキサゾール, 河川水を用いた試験ではセフメタゾール, メロペネム, テルビナフィンであった. 抗生物質の分類で比較すると, 主にペニシリン系, サルファ剤及びマクロライド系薬剤は半減期が長く, セフェム系, カルバペネム系及びテトラサイクリン系薬剤は半減期が短い傾向があった. また, 精製水よりも河川水での半減期が短いものが多かった(図7). 詳細は既報²⁾を参照.

2) 浄水工程を想定した抗生物質の挙動

浄水処理を想定した抗生物質の挙動の検討では, 次亜塩素酸処理, オゾン処理及び活性炭処理の試験を実施した. 対象の抗生物質は, カルバペネム系薬剤であるピアペネム及びメロペネム等を含む β -ラクタム系9種, マクロライド系4種, サルファ剤等3種の計16種とした.

(1) **次亜塩素酸処理** 抗生物質を溶解した精製水(最終濃度100 $\mu\text{g/L}$)に, 次亜塩素酸ナトリウムを0.5, 1.0, 1.5 mg/Lとなるように添加して室温で4時間静置し, 経時的に抗生物質の残存率を調査した. その結果, 多くの薬剤は2~10分で定常の濃度に達し, その後は大きな変化はなかった. 2分程度でほぼ検出されなくなった薬剤は, イミペネム, ドリペネム, メロペネム, コリスチン, セフメ

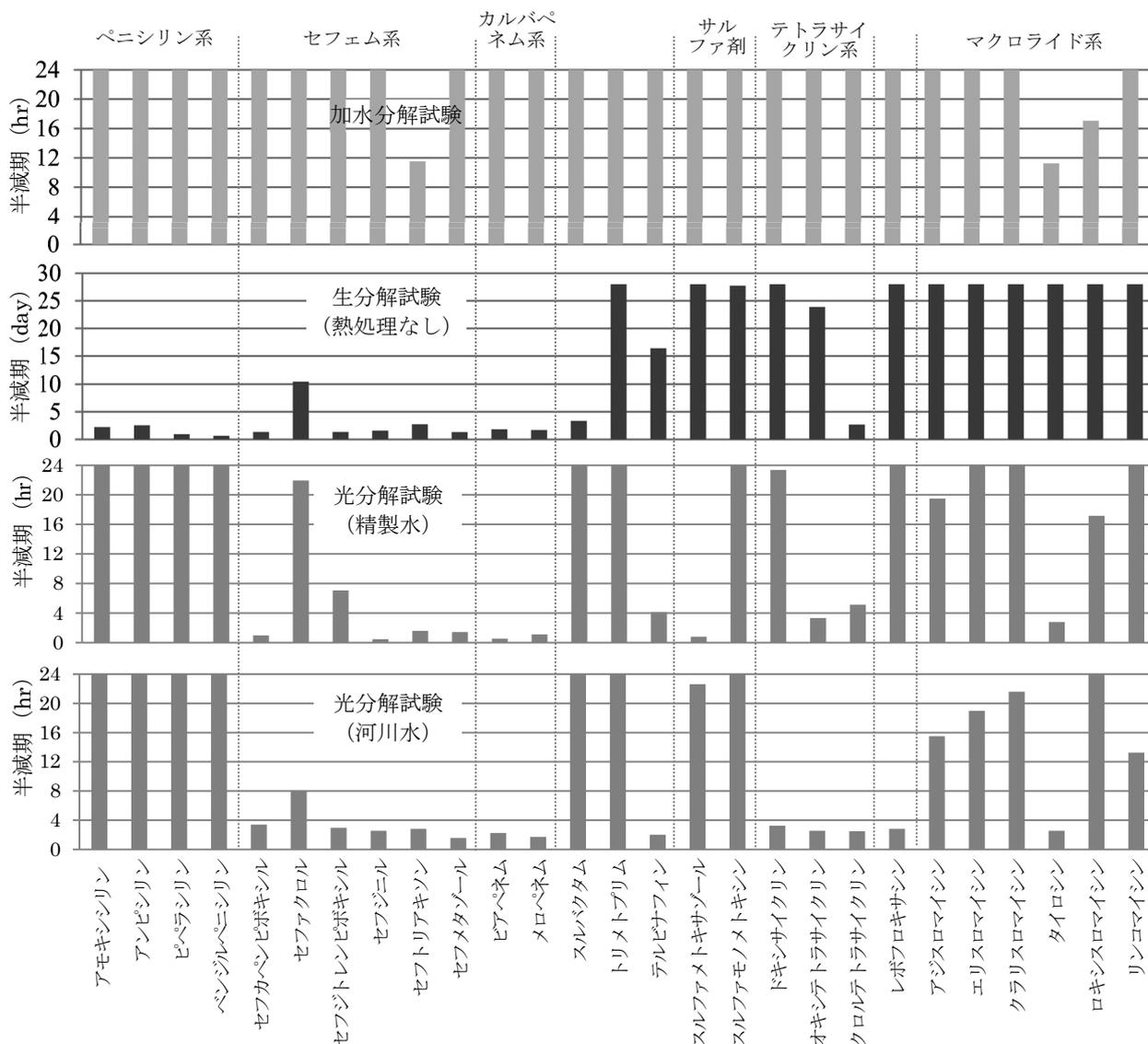


図7. 加水分解試験，生分解試験及び光分解試験による各種抗微生物薬の半減期

タゾール，アモキシシリン，ピペラシリン及びアンピシリンであり，ほとんど減少が見られなかった薬剤はクラリスロマイシン，アジスロマイシン，ロキシスロマイシン及びエリスロマイシンであった．次亜塩素酸ナトリウムの濃度別では，0.5 mg/Lでは8種が，1.0 mg/Lでは11種が，10分以内にほとんど検出されなくなった．一方，マクロライド系薬剤は，1.5 mg/L程度の次亜塩素酸濃度では除去が難しいことが推察された．

(2) オゾン処理 抗微生物薬を溶解した精製水（最終濃度100 µg/L）500 mLにオゾン暴露し，抗微生物薬の残存率を調査した．1分あたりのオゾン注入量を2 mg/Lとし，暴露時間を1分から60分まで変化させて各種の残存率を調査した．その結果，カルバペネム系薬剤及びコリスチンは暴露時間5分で初期濃度の1%未満となった．セフメタゾール，スルファメトキサゾール，トリメトプリム及びアモキシシリンは暴露時間10分で，その他の薬剤は30分で初期濃度の1%未満に減少した．また，オゾン注入量を2倍（毎分

4 mg/L）にすると，暴露時間10分ですべての薬剤が初期濃度の1%未満に減少した．

(3) 活性炭処理 抗微生物薬を溶解した精製水（最終濃度100 µg/L）に，活性炭スラリーを添加後混和し，1時間静置後に孔径0.2 µmのフィルターでろ過して，残存する抗微生物薬濃度を測定した．なお，浄水場における粉末活性炭の接触時間は20～60分である³⁾．活性炭濃度を10 mg/L，50 mg/L及び100 mg/Lとした場合，各抗微生物薬の濃度減少割合は，平均で12%，60%及び87%であった（図8）．次亜塩素酸処理で除去が難しかったマクロライド系薬剤については，活性炭濃度50 mg/L及び100 mg/Lで，平均68%及び95%減少していた．したがって，河川水中の実態レベルである0.1～1 µg/L程度であれば，マクロライド系薬剤についても，浄水処理場での一般的な活性炭添加濃度である10 mg/Lで除去されると推察された．

3) 下水処理工程を想定した抗微生物薬の挙動

下水処理を想定した抗微生物薬の挙動の検討では，活性

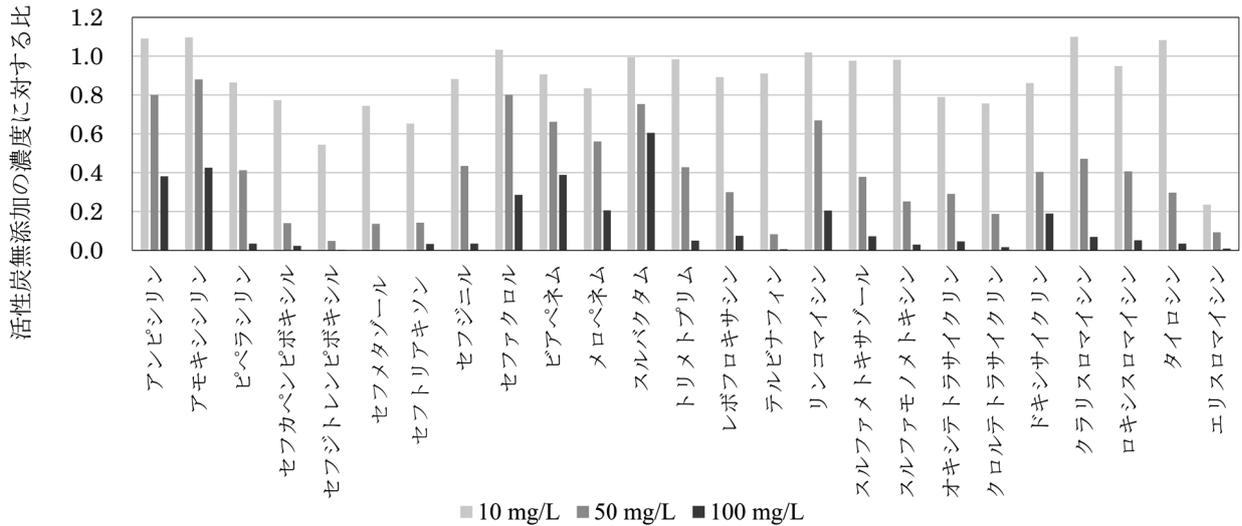


図 8. 活性炭処理における抗微生物薬の挙動

汚泥処理の試験を実施した。実験に先立ち、活性汚泥上清を用いた添加回収試験を実施し、回収率の変動が5%未満であった抗微生物薬21種を対象とした。また、一般的な下水処理の滞留時間は6～8時間であることから、試験時間を7時間とした。

(1) 活性汚泥処理 活性汚泥の入った試験溶液に、抗微生物薬を添加し（最終濃度1 μg/L）、ばっ気及び攪拌をしながら経時的に抗微生物薬濃度を調査した。すべての薬剤で減衰が認められ、減衰率は29～100%であった（図9）。活性汚泥をオートクレーブ処理した試験溶液では13種の抗微生物薬で減衰が認められ、その減衰率は6～86%であった。オートクレーブ処理の有無で比較すると、トリメトプリム、セフメタゾール及びスルバクタムは、オートクレーブ処理無しでは減衰が見られたのに対し、オートクレーブ処理有りでは減衰がほとんど見られなかったことから、活

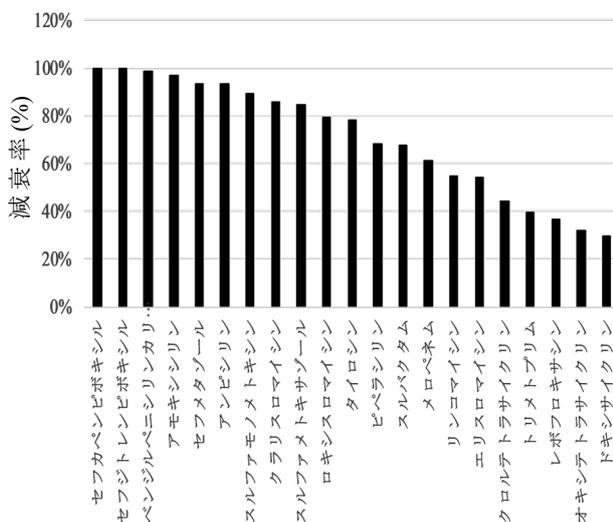


図 9. 活性汚泥処理による抗微生物薬の減衰率

性汚泥中の微生物による分解が主な減衰機構と推察された。その他の抗微生物薬については、オートクレーブ処理の有無にかかわらず減衰が見られたことから、微生物分解及び活性汚泥への吸着の両方により減衰していると予想された。また、実際の下水処理場における流入水及び放流水の調査から、下水処理での除去率が得られた11種の抗微生物薬について、本実験の結果と比較した。8種では下水処理場除去率平均値及び室内実験減衰率の比が0.7～1.3と類似した傾向を示したことから、本実験はおおむね下水処理を模していると考えられた（図10）。

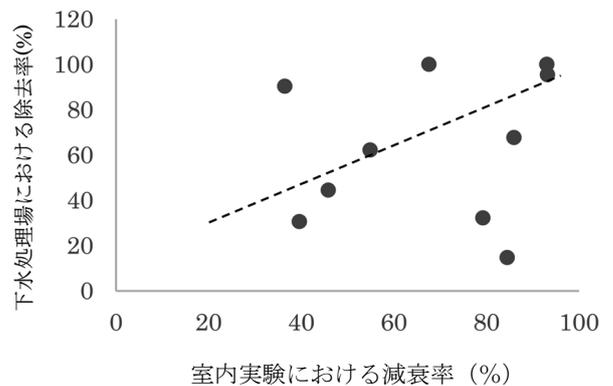


図 10. 下水処理場における抗微生物薬除去率と室内実験における減衰率との関連

文 献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課：薬生審査発 0330第1号，「新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンスについて」（通知），平成28年3月30日。
- 2) 小杉有希，飯田春香，渡辺喜美代，他：東京健安研七 年報，71, 233-239, 2020。
- 3) 社団法人 日本水道協会：水道施設設計指針2012, 294

-297, 2012, ヨシダ印刷株式会社, 東京.

発表実績

- 1) 飯田春香, 小杉有希, 渡辺喜美代, 他: 人口太陽光を用いた水中抗生物質の光分解性試験, 第56回全国衛生化学技術協議会年会(広島), 2019年12月.
- 2) 小杉有希, 飯田春香, 渡辺喜美代, 他: 人工太陽光を用いた水中抗微生物薬の光分解試験, 東京健安研7年報, 71, 233-239, 2020.
- 3) 小杉有希, 渡辺喜美代, 飯田春香, 他: 次亜塩素酸処理及びオゾン処理による抗生物質の分解挙動, 第55回日本水環境学会年会(Web開催), 2021年3月.
- 4) 飯田春香, 小杉有希, 渡辺喜美代, 他: 人工太陽光を用いた水中抗生物質の光分解性試験: pHによる影響, 第55回日本水環境学会年会(Web開催), 2021年3月.

4. 環境からのカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)等の病原微生物の検出と分子疫学解析

カルバペネム系抗微生物薬は, グラム陰性菌による感染症の治療において重要な薬剤であるが, 近年では, これらの薬剤に耐性を示すCREの増加が国際的に警戒されている¹⁾. 我が国では, 2014年にCRE感染症が感染症法に基づく全数把握の5類感染症に追加された²⁾が, 環境中におけるCREの分布状況は明らかでない. 一方, ポリオウイルス(Poliavirus, 以下PVと略す)は, 全数把握の2類感染症である急性灰白髄炎の原因であり, 稀にワクチン由来の強毒化したPVがヒトから排泄され, ポリオ様の疾患を起こすことが知られている³⁾. 海外ではそのようなPVが流行, またはポリオ輸入症例となった事例が報告されている⁴⁾. そこで本研究では, 環境試料として下水処理場の流入水(以下流入下水と略す)を用いて, CRE及びPVを分離すると

もに, 詳細なゲノム解析や機能解析を試みた. これにより, ヒトに対して危害性の高い病原微生物の環境中への拡散状況を把握し, 病原性に関する研究や検査法の開発に応用することを目的とした.

1) 流入下水からのCREの効率的な分離方法の検討

流入下水から, 効率的にCREを分離する方法を確立するため, 以下の3つの方法を検討した. ①ブレインハートインフュージョン(以下BHIと略す)液体培地で増菌後, メロペネム添加寒天培地で分離する方法, ②メロペネム添加BHI液体培地で増菌後, メロペネム添加寒天培地で分離あるいは大腸菌群検出用酵素基質培地を用いたディスク拡散法により, 阻止円内に形成された集落から分離する方法, ③ブリリアント・グリーン乳糖ブイヨン(以下BGLBと略す)液体培地で増菌後, 大腸菌群検出用酵素基質培地を用いたディスク拡散法により阻止円内に形成された集落から分離する方法. 検討の結果, ③の方法での分離が最も良好であった. ③の方法の概要は, 2倍濃度のBGLB培地10 mLに流入下水10 mLを添加して培養後, 乳糖分解とガス産生が認められた試料について, 大腸菌群検出用酵素基質培地を用いたディスク拡散法(イミペネム, メロペネムを含む4種の β -ラクタム剤)による薬剤感受性試験を実施し, 阻止円内に形成された大腸菌及び大腸菌群のコロニーを釣菌して, 菌種を同定するというものである. なお, 前述の「2. 東京都の環境水における抗微生物薬の存在実態調査」の河川水中CRE調査では, 河川水400 mLをろ過したメンブランフィルターをBGLB培地に入れて培養後, ③のディスク拡散法により試験を行った.

2) 流入下水からのCRE分離

2018~2019年度に, 4か所の流入下水を調査し, 46株のCREを分離した. このうち, *Escherichia coli* は20株で, 調査したすべての下水処理場から分離された. 分離されたCREについて, 次世代シーケンサーを用いて薬剤耐性遺伝

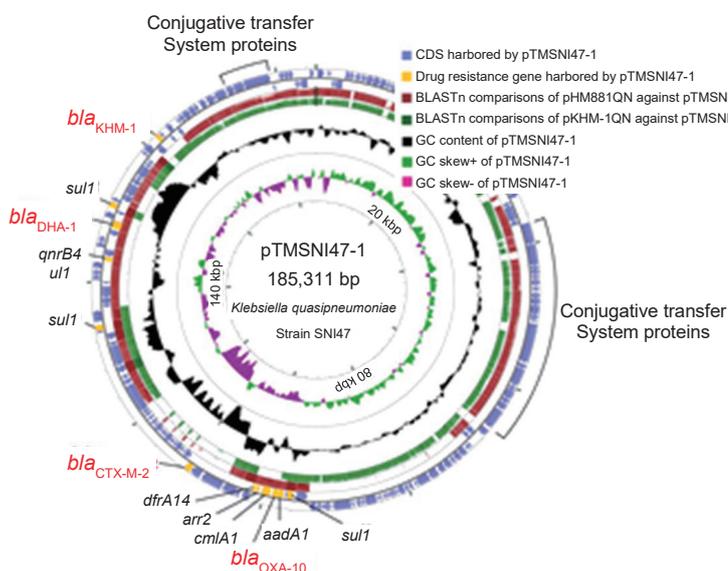


図 11. pTMSNI47-1 プラスミドの構造

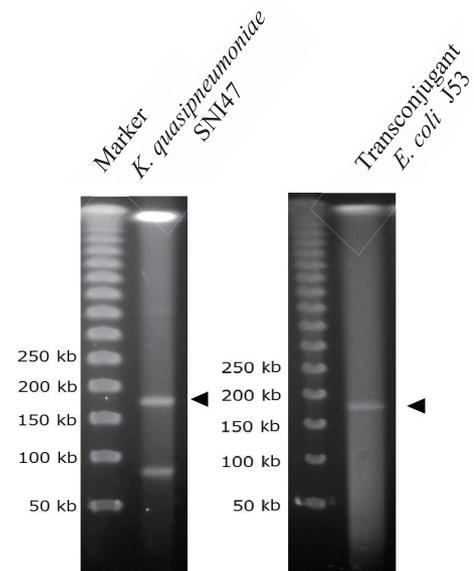


図 12. 接合伝達による pTMSNI47-1 の伝達⁵⁾

表 5. 各下水処理場の流入下水から検出されたエンテロウイルスの概要

検出方法	2018 年			2019 年
	A 処理場	B 処理場	C 処理場	D 処理場
遺伝子 検 査	エコーウイルス 11 型	(—)	コクサッキーウイルス A 群 9 型	コクサッキーウイルス A 群 16 型
	コクサッキーウイルス B 群		コクサッキーウイルス B 群 4 型	コクサッキーウイルス B 群 3 型
ウイルス 分離試験			コクサッキーウイルス B 群 5 型	エコーウイルス 3 型
	エコーウイルス 3 型			エコーウイルス 6 型
	エコーウイルス 6 型		エコーウイルス 3 型	エコーウイルス 7 型
	エコーウイルス 11 型	(—)	エコーウイルス 11 型	エコーウイルス 11 型
	エコーウイルス 20 型			エコーウイルス 25 型
				コクサッキーウイルス B 群 3 型
				コクサッキーウイルス B 群 5 型

子の同定を試みたところ、カルバペネム耐性 *Escherichia coli* では、20株中17株がNDM型カルバペネマーゼ遺伝子を保有していた。*Klebsiella* 属菌4株、*Enterobacter* 属菌 1株においても、NDM型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有しており、流入下水中で複数の菌種が同一型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有していることが明らかとなった。また、カルバペネム耐性*Escherichia coli* では、新規FRI型カルバペネマーゼ遺伝子保有株が3株確認され、本遺伝子の塩基配列を公的データバンクに登録した。

3) 環境から分離されたCREの特性

2018年に流入下水から分離したカルバペネマーゼ産生 *Klebsiella quasipneumoniae* について、その耐性に関与する遺伝子を解析したところ、*bla_{KHM-1}* という珍しいタイプのメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を含む4種類のβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。さらに、詳細な解析を行ったところ、4種類の遺伝子は全て1つのプラスミドpTMSNI47-1上に存在することが明らかとなった(図11)。また、pTMSNI47-1は接合伝達に関与する遺伝子群を保有しており、水平伝達によって他菌種(大腸菌)にカルバペネムを含むβ-ラクタム剤耐性を付与することを接合伝達試験により確認した(図12)。

4) 流入下水からの効果的なエンテロウイルス (PV含む) 分離法の検討

流入下水から、効率的にエンテロウイルスを分離する方法を検討した。試料の前処理として、①低速遠心(3,000 rpm)後、pH調整、②低速遠心(3,000 rpm)後、グラスファイバーフィルターでろ過し、pH調整、③高速遠心(10,000 rpm)後、グラスファイバーフィルターでろ過し、pH調整の3つの方法を検討した。その結果、③の方法で前処理を行い、陰電荷膜で加圧ろ過することにより、効率よくエンテロウイルスを分離することができた。開発した方法を用いて、2018~2019年度に4か所の流入下水24検体について、エンテロウイルスの検出を行った。その結果、遺伝子検査、ウイルス分離試験ともにPVは検出されなかったが、エコーウイルス(3型、6型、7型、11型、20型、25

型)、コクサッキーウイルス(A群、B群)等が検出された(表5)。

文 献

- 1) 荒川宜親：日化療会誌, **63**, 187-197, 2015.
- 2) 厚生労働省健康局長：健発0909第1号、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令の施行等について(施行通知)、平成26年9月9日。
- 3) 清水博之：ウイルス, **60**, 49-58, 2010.
- 4) 清水博之：モダンメディア, **59**, 85-92, 2013.
- 5) Suzuki Y., Ida M., Kubota H., et al. : *mSphere*, **4**, e00391-19, 2019.

発 表 実 績

- 1) Suzuki Y., Ida M., Kubota H., et al. : Multiple β-Lactam Resistance Gene-Carrying Plasmid Harbored by *Klebsiella quasipneumoniae* Isolated from Urban Sewage in Japan, *mSphere*, **4**, e00391-19, 2019.
- 2) 鈴木康規, 井田美樹, 久保田寛顕, 他：下水処理施設から分離された*Klebsiella quasipneumoniae*が保有する広域β-ラクタム剤耐性プラスミドの特性, 第162回日本獣医学会学術集会(つくば), 2019年9月。
- 3) 村上 昂, 鈴木康規, 久保田寛顕, 他：野菜から分離された多剤耐性の*Klebsiella quasipneumoniae*の特性, 第31回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会(千葉), 2019年2月。
- 4) 熊谷遼太, 長島真美, 根岸あかね, 他：東京都におけるポリオウイルス環境水サーベイランス(2019年度), 東京健安研七 年 報, **71**, 79-83, 2020.

総 括

ヒトや畜産動物等から排出された耐性菌は、下水を経由して下水処理場に移動していると考えられ、本研究で注目したCREは、調査した4か所すべての下水処理場の流入水

から分離された。分離されたCREのうち、*Escherichia coli* については、各処理場でNDM型のカルバペネマーゼ遺伝子を保有する株が確認されており、耐性遺伝子の広がりが見られた。また、*Klebsiella quasipneumoniae* 1株については、4種のβ-ラクタマーゼ及び接合伝達に関与する遺伝子群を保有していることが判明し、水平伝達によって他菌種に耐性を付与することを接合伝達試験により確認した。また、河川水の調査では、主に多摩川の中・下流域でCREが検出された。河川中の耐性菌は、やがて海に到達し、海水あるいは底質からの薬剤耐性遺伝子の検出について報告がある。こうした薬剤耐性遺伝子が、環境を介してヒトにどのような影響を及ぼすかについては、現段階では未解明であり、今後のデータの蓄積が必要と考える。

抗微生物薬の実態調査では、畜産食品、河川水、井戸水、下水処理場の流入水及び放流水から、各種の抗微生物薬が検出され、その濃度最大値（薬剤名）は、濃度が高いものから順に、畜産食品（鶏筋肉）：17.5 µg/kg（エンロフロキサシン）、下水処理場の流入水：1.7 µg/L（レボフロキ

サシン）、下水処理場の放流水：0.36 µg/L（クラリスロマイシン）、河川水：0.22 µg/L（クラリスロマイシン、スルファメトキサゾール、アジスロマイシン）、井戸水：0.12 µg/L（テルビナフィン）であった。なお、今回、新たに測定法を開発したカルバペネム系薬剤については、いずれの試料からも検出されなかった。環境水中におけるカルバペネム系薬剤の分解性については、半減期が短く、分解しやすいことが判明しており、環境中でカルバペネム系薬剤が高濃度に存在する可能性は低いと考えられる。

環境中に存在する微生物が、薬剤耐性を獲得する主な要因としては、耐性遺伝子の伝播及び薬剤の影響による耐性獲得の2つが考えられる。本研究の調査結果では、環境中の薬剤濃度は低かったことから、環境中の微生物が薬剤耐性を獲得する要因としては、薬剤の影響よりも耐性遺伝子伝播の寄与の方が大きい可能性が推察された。

文 献

- 1) 鈴木 聡：水環境学会誌，43A, 95-98, 2020.

Survey of Antimicrobial Residues and Drug-Resistant Bacterium in Food and the Environment

Ikue SAITO^a, Yumi OHBA^b, Teruaki KINOSHITA^b, Yuki KOSUGI^b, Miki IDA^b, Hiroshi HAYASHI^b,
Yoko MATSUSHIMA^b, Souichi YOSHIKAWA^b, Hiroshi KOIKE^b, Momoka HAYASHI^b, Chieko NAGANO^b,
Kotaro SEKIMURA^a, Maki KANDA^b, Tsuneo HASHIMOTO^a, Tokuko TSUNODA^b, Haruka IIDA^b,
Takako YAMAZAKI^b, Kimiyo WATANABE^b, Tomoko ODA^b, Yukiko TABEL^b, Chieko MUTO^b, Moeko UMETSU^b,
Kazuyoshi TANAKA^b, Mio SUZUKI^b, Hiroyuki KONISHI^b, Ko MURAKAMI^b, Yasunori SUZUKI^a, Makiko KOBAYASHI^b,
Rei KATOU^b, Keiko YAMANASHI^b, Yukako SHIMOJIMA^a, Yukari NISHINO^b, Rie FUKUI^b,
Maho KAWAMURA^b, Akihiko HIRAI^a, Mami NAGASHIMA^b, Ryota KUMAGAI^b, Akane NEGISHI^b, Mamiyo KAWAKAMI^b,
Masaki HAYASHI^b, Takushi FUJIWARA, Takashi CHIBA^b,
Tsukasa ARIYOSHI^b, Hiroaki KUBOTA^b, Kai KOBAYASHI^b, Yumi UCHITANI^a, Rumi OKUNO^b,
Kenji OTSUKA^b, Keiko YOKOYAMA^b, Jun SUZUKI^b, Takayuki SHINKAI^b,
Takeo SASAMOTO^b, Kenji SADAMASU^b, Akiko INOMATA^b and Takako MORIYASU^b

This study was conducted as a priority research project of the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health from 2018 to 2020. This study aimed to obtain basic data on antimicrobial resistance in food and the environment in terms of physicochemical and microbiological aspects. This research project comprised four individual tasks. In the first task, which involved research on antimicrobial agents in livestock foods, high-sensitivity measurement methods for β -lactams, sulfa drugs and quinolone drugs were developed, and the concentration of residual antimicrobial agents in livestock foods was surveyed. In the second task, which involved research on environmental water, antimicrobial agents in river water, well water and inflow/outflow water from a sewage treatment plant were measured. In addition, the occurrence of Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae* (CRE) in river water was surveyed. In the third task, which involved a basic study on the behavior of antimicrobial agents in an aquatic environment, the half-life of antimicrobial agents due to hydrolysis, biodegradation and photodegradation was measured. Furthermore the degradability of antimicrobial agents through hypochlorous acid treatment, ozone treatment, and activated carbon and activated sludge treatment was tested. In the fourth task, which involved research on pathogenic microorganisms in the environment, an efficient separation method for CRE and enteroviruses (including poliovirus) in inflow water from sewage treatment plants was developed and a survey was conducted. The isolated CRE was subjected to whole-genome analysis using a next-generation sequencer, and the carbapenemase gene was analyzed in detail.

Keywords: antimicrobial agents, antimicrobial resistance, livestock foods, river water, half-life, sewage treatment plant, Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae*, enterovirus, liquid chromatography-mass spectrometry, next-generation sequencing

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakuninn-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan