ベトナムにおける抗菌性物質の環境水中残留実態

原 田 和 生

Antibiotic Residue in Environmental Water in Vietnam

Kazuo Harada

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received July 21, 2017)

The increasing prevalence of antimicrobial resistance (AMR) has caused intractable infections worldwide. Nearly 50% of the healthy population of Southeast Asia carries extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. The overuse of antimicrobial agents in the agriculture, aquaculture, and medical care sectors causes environmental pollution, facilitating the spread of AMR. However, there is a lack of data pertaining to antimicrobial residues in environmental water in such regions. We investigated a total of 49 chemicals, including β -lactams, sulfonamides, quinolones, and tetracyclines. Water samples were collected from rivers in city centers, and ponds in livestock and aquaculture farms, in Ha Noi, Thai Binh, and Can Tho in Vietnam. We detected antimicrobial agents at 87 of 111 sampling sites (78.4%). Among the target analytes, sulfamethoxazole, sulfamethazine, trimethoprim, cephalexin, and ofloxacin were detected frequently. The residual levels of each antimicrobial agent ranged from 0.1 to 10000 ng/L. Moreover, we detected multi-drug resistant *E. coli* in fishes sampled from these rivers, suggesting unwanted effects of antimicrobial residues in the environment.

Key words—antimicrobial agent; antimicrobial resistance; environmental pollution; Vietnam

1. はじめに

近年、抗菌性物質が効かない薬剤耐性菌の発生・蔓延が問題となっている。WHOは2011年4月7日をWorld Health Dayとして“antimicrobial resistance”のキャンペーンを掲げ、国際社会が協調し対策に取り組む必要性を説き、¹⁾2015年には“Global Action Plan”を示し、加盟各国にアクションプラン策定を要請した。²⁾2016年のG7伊勢志摩サミット首脳宣言の中にもこの問題が盛り込まれたことは記憶に新しい。³⁾

従来、薬剤耐性菌について問題の中心となっていたのは、抗菌性物質の使用頻度が高く、かつ、免疫機能が低下した患者が多く存在している病院内での発生・蔓延、いわゆる、院内感染である。1980年代、代表的な薬剤耐性菌メチシリン黄色ブドウ球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)

が社会問題化した際には、各地の病院でMRSAが検出され、多くの施設で院内感染対策に取り組み始めた。⁴⁾一方、畜産、養殖においても抗菌性物質の使用量は多く、特に畜産場から薬剤耐性菌が分離される頻度は極めて高い。このような耐性菌が環境あるいは食品を介して、市中健常人に伝播していることを示唆する報告も増えている。したがって、薬剤耐性菌は病院のみならず、ヒトが生活する環境にありふれた存在となっていると言える。

薬剤耐性菌の蔓延は世界中で問題となっているが、特にアジア諸国では深刻化している。中山らは、タイ、ラオス、ベトナムの市中健常人のextended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生大腸菌保菌率は47.5–64.1%と極めて高いことを示しており、⁵⁾また、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌が市中から検出されている事例も報告されている。これらの菌が直接、重篤な感染症を惹起するわけではないが、薬剤耐性遺伝子が病原菌に伝播し、より重篤な難治性感染症が発生するリスクも十分考えられる。アジア諸国で薬剤耐性菌が蔓延している原因として、医療・畜水産業における抗菌性物質の過剰使用に伴う

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

e-mail: harada6@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第137年会シンポジウムS46で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Overall Map of Vietnam (A) and Photographs of Typical Sampling Sites (B-D)
(B) Farmer pond (Ha Noi), (C) River in city center (Thai Binh), (D) Aquaculture cage in river (Can Tho).

環境汚染により耐性菌が発生・維持される可能性が考えられるが、その詳細な実態は不明な点が多い。

筆者は2011年から2017年3月まで、科学技術振興機構 (Japan Science and Technology Agency; JST), 日本医療研究開発機構 (Japan Agency for Medical Research and Development; AMED), と国際協力機構 (Japan International Cooperation Agency; JICA) が共同で実施する地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (Science and Technology, Research Partnership for Sustainable Development; SATREPS) に採択された「薬剤耐性細菌発生機構の解明と食品管理における耐性菌モニタリングシステムの開発」(代表 山本容正 大阪大学招へい教授) のプロジェクトに参画し、ベトナムにおける食品、環境中における抗菌性物質残留実態の調査を行った。本稿ではその結果を概説し、今後の課題について私見を述べる。

2. ベトナムの3地域における調査結果

筆者は、畜産業の盛んな Ha Noi 市の Chu Minh 村 Ba Vi 地区、紅河デルタ地域の中心都市 Thai Binh 市市街地、及び郊外 Nguyen Xa 地区、キャットフィッシュやティラピアなどの水産養殖業が盛んで、海外への輸出量も多いメコンデルタ地域の中心

都市 Can Tho 市及びその周辺の An Giang 市、Dong Thap 市、Vinh Long 市を調査対象とした (Fig. 1)。採取した水に含まれる抗菌性物質を固相抽出により精製、濃縮後、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いて測定した。解析対象としたのは、 β -lactam, cephalosporin, sulfonamide, quinolone, tetracycline など計 49 化合物である。^{6,7)}

全 111 地点中なんらかの抗菌性物質が検出されたのは 87 カ所 (78.4%) であった。その内訳を Table 1 に示す。高頻度で検出された化合物はサルファ系の sulfamethoxazole (SMX), sulfamethazine (SMT, sulfadimidine と呼ばれる), 葉酸代謝拮抗剤の trimethoprim (TMP), セフェム系の cephalexin, キノロン系の ofloxacin であった。TMP はサルファ剤との合剤 ST 剤として使用されることが多いことから、同程度の検出頻度となったと考えられる。上述の化合物はほぼすべてのサイトで共通して高頻度で検出されたが、検出化合物にはいくぶんか地域差がみられた。また、SMT の代謝物である *N*-acetylsulfamethazine (AceSMT) も高頻度に検出されており、特に家畜の糞尿の混入の頻度が極めて高いことが窺えた。例えば、Ha Noi 市 Chu Minh 村

Table 1. Detection Ratios and Detection Ranges at Sampling Sites

Site	Location	Detection ratio (%) and detection range (minimum–maximum, ng/L)								
		SMX	SMT	AceSMT	SDZ	OFLX	NLDX	FLMQ	CEX	TMP
Ha Noi	Farm pond (25) [†]	84% 7.3–2017	92% 6.3–6621	96% 0.7–3005	56% 0.9–474	16% 0.2–0.9	20% 4.3–17.4	100% 1.7–245	24% 0.4–24	48% 0.8–78
Thai Binh	Farm pond (33)	24% 1.5–189	9% 1.8–5.5	6% 0.3–26	0%	9% 1.0–2.7	0%	6% 1.5–2.5	21% 1.9–17	12% 4.7–56
	City river (10)	100% 3.0–781	70% 3.1–34	30% 1.2–2.7	0%	50% 1.3–58	30% 5.4–18	10% 19	60% 3.4–11	50% 4.8–70
Can Tho ^{6,7)}	Farm pond (4)	50% 1.9–14	50% 10–165	50% 3.8–49	75% 6.6–113	0%	0%	0%	50% 14–127.2	25% 2.0
	River (16)	94% 0.2–47	25% 0.5–15	25% 1.3–2.3	13% 0.3–2.8	0%	0%	0%	31% 1.7–19	31% 1.0–3.2
	Aquaculture pond (10)	90% 0.9–642	60% 2.0–14.3	50% 1.3–5.3	0%	0%	0%	0%	40% 1.7–16	40% 1.5–3.3

[†] Numbers in parentheses show sample numbers. Abbreviation; SMX: sulfamethoxazole, SMT: sulfamethazine, AceSMT: *N*-acetylsulfamethazine, SDZ: sulfadiazine, OFLX: ofloxacin, NLDX: nalidixic acid, FLQ: flumequine, CEX: cephalexin, TMP: trimethoprim.

Ba Vi 地区ではオールドキノロンである flumequine が 100% で検出されたのに対し、他のサイトではほぼ検出されなかった。

人畜共通感染症及びその起因菌の薬剤耐性化を防ぐ観点から、一般的に使用する抗菌性物質はヒトと家畜とで使い分けがなされている。一方、魚介類については、ヒトと密接に接触することがないため、家畜ほど厳密な使い分けがなされていないのが現状である。実際、サルファ剤に関しては世界中で、SMX がヒト、魚介類、SMT が牛や豚などの家畜に対して、区別して使用されている。これらのことから多くのサイトでヒト、家畜に使用された抗菌性物質がともに環境中に放出されていることが窺える。

高頻度に検出された SMX, SMT, AceSMT の検出濃度は Ha Noi 農村の池、Thai Binh 中心部の河川では 10^2 – 10^3 ng/L の範囲に及び、特に Ha Noi 農村の池では検出された抗菌性物質の濃度を積算すると 10^3 – 10^4 ng/L に及ぶケースも多く見受けられた。一方、Thai Binh 郊外の農家の池、メコンデルタ地域では 10^0 – 10^2 ng/L の範囲が多く、上述のサイトに比較して低濃度となる傾向がみられた。類似の研究で、Hoa らはベトナム北部の農家の養豚場付近の池から SMT を 475–6662 ng/L、市街地の水路から SMX を 612–4330 ng/L で検出している。⁸⁾ また、Nguyen らはメコンデルタ周辺の環境水から、SMX, TMP をそれぞれ 1–239, 1–330 ng/L で検出している。⁹⁾ これらの結果は、筆者の調査結果と概ね一致している。

多くの抗菌性物質の臨床分離株に対する最小増殖阻止濃度は数 $\mu\text{g/mL}$ であり、これに比べ、上述の環境中残留濃度は、少なくとも 10^2 倍の開きがある。したがって、環境中において、薬剤感受性菌が残留抗菌性物質により殺菌、あるいは増殖が抑制され、自然界に元来存在していた薬剤耐性菌が選択されるといった事象が生じている可能性は考え難い。しかし、近年、実験室レベルでの検証ではあるが、抗菌性物質の低濃度長期暴露により突然変異頻度が増加し、薬剤耐性も獲得し易くなるという報告も増えており、^{10,11)} 環境中でも、低濃度の抗菌性物質でもなんらかの機構により、薬剤耐性菌の発生が促進されていることが推測される。実際、筆者の調査対象の中では検出濃度が低かったメコンデルタ地域で養殖魚の腸管から分離された ESBL 産生大腸菌の薬剤感受性を調べたところ、最も耐性化率が高かったのは ST 合剤に対するものであった。⁶⁾ これは、当該地域でほぼすべての試料から検出された薬剤が SMX であったことから、環境中の残留抗菌性物質の影響は皆無とは言えないことが推察される。さらに様々な作用機序の抗菌性物質が同時に混在するような環境での薬剤耐性化については十分な検証がなされておらず、今後の研究の課題と言える。

3. 抗菌性物質分解物の残留

上記のような調査と同時に、サンプリング地点周辺の診療所、農家に対し、抗菌性物質使用についてインタビュー調査も実施した。使用記録を残している診療所、農家が極めて少なく、信憑性に欠ける点

も多かったが、薬剤のパッケージから見い出される頻度が高い成分には ampicillin (ABPC) や amoxicillin (AMPC) といった β -lactam 系抗生物質が含まれていた。しかしながら、環境水の測定でこれらの物質が検出された事例は極めて少なかった。そこで、ABPC や AMPC が環境中に排出された後、分解されて得られる物質^{12,13)}を測定したところ、ABPC の分解産物である 2-hydroxy-3-phenylpyrazine (HPP) が高頻度に検出された。¹⁴⁾ 当該物質は ABPC だけでなく、同一の部分骨格を持つ cephalexin からも生成し、また、ABPC のプロドラックも数多く存在するため、HPP が ABPC 特異的な分解産物とは言えない。しかし、少なくとも HPP はヒトや家畜の体内で ABPC が代謝され排出されるものとしては報告されておらず、当該物質が環境中から検出されたことは、未変化体の ABPC 若しくはそれと同一の部分骨格を持つ抗菌性物質が環境中に排出されたことを示していると考えられる。このことは、測定結果以上に、多種類、高濃度の抗菌性物質が環境中に放出されていることを示唆している。

4. ベトナム国内で流通する生鮮食品の残留抗菌性物質

プロジェクトではベトナム国内で流通する肉、魚介類、鶏卵などの生鮮食品の抗菌性物質の残留実態も調査してきた。総計約 1400 検体を分析し、12% 程度からなんらかの抗菌性物質が検出された。¹⁵⁻¹⁷⁾ 世界各国、最大残留濃度 (maximum residual level; MRL) が規制値として設定されており、ベトナムにおいても食品と抗菌性物質の組み合わせによっていくつか設定されている。これらの規制値は日本や欧米に倣っているが、その規制値を大きく上回る検体もいくつかみられた。ベトナムは世界有数の農水産物の輸出国であり、海外に輸出される食品は非常に厳しく検査がなされているが、国内で流通する食品については、検査体制も緩く、高頻度で残留抗菌性物質が検出されているのが現状である。MRL は人体に対する直接的な毒性を鑑みた規制値であるため、薬剤耐性菌の発生・蔓延のリスクを評価できるものではないが、少なくとも MRL を超過する生鮮食品が流通する状況というのは、休業期間が遵守されていないなど、生産体制、品質管理体制が不適切であることを示しており、管理、監視体制の強

化が重要である。

5. おわりに

筆者が参画したプロジェクトでベトナムの環境及び食品は広く抗菌性物質に汚染されており、そこからは薬剤耐性菌も高頻度に分離されることが明らかになった。これらが薬剤耐性菌のリザーバーとなっていることはほぼ間違いないと思われる。また、ベトナムに限らず、アジア諸国の多くが同様の状況にあると推測される。

近年はヒト及び動物の健康、農業、食品、環境など分野横断で対策に取り組む「ワン・ヘルス・アプローチ」という言葉が盛んに用いられるようになってきている。これを着実に推進するために、抗菌性物質の残留実態のモニタリング、及び抗菌性物質の分解経路、分解産物の環境影響などの基礎的・科学的知見の集積の必要性はより高まっている。

謝辞 本稿で示した筆者の研究の一部は、地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (Science and Technology, Research Partnership for Sustainable Development; SATREPS) 「薬剤耐性細菌発生機構の解明と食品管理における耐性菌モニタリングシステムの開発」(代表 山本容正 大阪大学招へい教授)、及びクリタ水・環境科学振興財団助成金 (15B011) の助成を受けて実施されたものである。また、本研究をともに実施した Nguyen Van Sy 氏、浅山 恵氏、割鞘美苗氏、さらに、研究をサポート頂いた大阪大学大学院薬学研究科 平田收正教授、山本容正招へい教授、中山達哉博士 (現、国立医薬品食品衛生研究所)、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 日根野谷 淳博士を始め、大阪健康安全基盤研究所、ベトナム国立栄養院、タイビン医科薬科大学、カントー大学の共同研究者に厚く御礼を申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Leung E., Weil D. E., Raviglione M., Nakatani H., *Bull. World Health Organ.*, **89**, 390–392 (2011).
- 2) World Health Organization, Draft Global action plan on antimicrobial resistance

- WHA68.7, 2015.
- 3) Ministry of Foreign Affairs of Japan, G7 Ise-Shima Vision for Global Health, Annexes 2 of G7 Ise-Shima Leaders' Declaration, 2016.
 - 4) Shiba K., *Jpn. J. Environ. Infect.*, **31**, 1–9 (2016).
 - 5) Nakayama T., Ueda S., Huong B. T. M., Tuyen L. D., Komalamisra C., Kusolsuk T., Hirai I., Yamamoto Y., *Infect. Drug Resist.*, **8**, 1–5 (2015).
 - 6) Hon N. T. N., Hoa T. T. T., Thinh N. Q., Hinenoya A., Nakayama T., Harada K., Asayama M., Warisaya M., Hirata K., Phuong N. T., Yamamoto Y., *Fish Pathol.*, **51**, S75–S82 (2016).
 - 7) Nakayama T., Hoa T. T. T., Harada K., Warisaya M., Asayama M., Hinenoya A., Lee J. W., Phu T. M., Ueda S., Sumimura Y., Hirata K., Phuong N. T., Yamamoto Y., *Environ. Pollut.*, **222**, 294–306 (2017).
 - 8) Hoa P. T. P., Managaki S., Nakada N., Takada H., Shimizu A., Anh D. H., Viet P. H., Suzuki S., *Sci. Total Environ.*, **409**, 2894–2901 (2011).
 - 9) Nguyen Dang Giang C., Sebesvari Z., Renaud F., Rosendahl I., Hoang Minh Q., Amelung W., *PLoS One*, **10**, e0131855 (2015).
 - 10) Kohanski M. A., DePristo M. A., Collins J. J., *Mol. Cell*, **37**, 311–320 (2010).
 - 11) Andersson D. I., Hughes D., *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 465–478 (2014).
 - 12) Gozlan I., Rotstein A., Avisar D., *Chemosphere*, **91**, 985–992 (2013).
 - 13) Mitchell S. M., Ullman J. L., Teel A. L., Watts R. J., *Sci. Total Environ.*, **466–467**, 547–555 (2014).
 - 14) Sy N. V., Harada K., Asayama M., Warisaya M., Dung L. H., Sumimura Y., Diep K. T., Ha L. V., Thang N. N., Hoa T. T. T., Phu T. M., Khai P. N., Phuong N. T., Tuyen L. D., Yamamoto Y., Hirata K., *Chemosphere*, **172**, 355–362 (2017).
 - 15) Yamaguchi T., Okihashi M., Harada K., Konishi Y., Uchida K., Do M. H. N., Bui H. D. T., Nguyen T. D., Nguyen P. D., Chau V. V., Dao K. T. V., Nguyen H. T. N., Kajimura K., Kumeda Y., Bui C. T., Vien M. Q., Le N. H., Hirata K., Yamamoto Y., *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 5141–5145 (2015).
 - 16) Uchida K., Konishi Y., Harada K., Okihashi M., Yamaguchi T., Do M. H. N., Bui L. T., Nguyen T. D., Nguyen P. D., Khong D. T., Tran H. T., Nguyen T. N., Le H. V., Chau V. V., Dao K. T. V., Nguyen H. T. N., Kajimura K., Kumeda Y., Pham K. T., Pham K. N., Bui C. T., Vien M. Q., Le N. H., Dang C. V., Hirata K., Yamamoto Y., *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 6133–6138 (2016).
 - 17) Yamaguchi T., Okihashi M., Harada K., Konishi Y., Uchida K., Do M. H. N., Bui L. T., Nguyen T. D., Phan H. B., Bui H. D. T., Nguyen P. D., Kajimura K., Kumeda Y., Dang C. V., Hirata K., Yamamoto Y., *J. Environ. Sci. Health, B*, **52**, 430–433 (2017).