

令和元年6月6日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05004

研究課題名(和文) 畜産環境における耐性菌出現防止のための抗生物質の磁気分離

研究課題名(英文) Magnetic separation of antibiotics for the prevention of antibiotic resistant bacteria in the livestock environment

研究代表者

井原 一高 (IHARA, IKKO)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50396256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌の環境への拡散を防止するため、畜産廃水に含有する抗生物質のオンサイト処理技術として永久磁石を用いた磁気分離法の開発と、耐性菌出現を避けるために耐性遺伝子変異と抗生物質濃度との関係を調べ、耐性菌の出現リスクを評価した。永久磁石磁気分離モジュールを試作し、磁性付与においてpHを制御することにより、抗生物質の除去率が大幅に改善されることを見出した。また、畜産で用いられる抗生物質による耐性菌の出現リスクを評価した。抗菌薬を用いたモデル系において曝露による微生物群集構造変化を調べた。抗菌薬の環境リスクは一過的であるものの、抗菌薬を適切に低減することで、リスクを低減できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質耐性菌による社会的損失は世界的な懸案事項とされていることから、抗生物質の消費量が医療現場よりも多い畜産分野・特に当該施設からの排出削減は急務であると考えられる。得られた研究成果は、畜産施設由来の廃水に残留する抗生物質の選択的除去を実現するものであり、抗生物質除去によるエミッション削減が耐性菌リスクを低減することを示すことから、学術的・社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent the diffusion of antibiotic-resistant bacteria to the environment, we developed a magnetic separation method as an on-site treatment technology of antibiotics contained in livestock wastewater, and examined the relationship between resistance gene mutations and antibiotic concentration to avoid the appearance of resistant bacteria, and evaluated the appearance risk of resistant bacteria.

We developed a magnetic separator with permanent magnets. It was found that the removal rate of antibiotics was drastically improved by controlling pH in the magnet seeding. The risk of appearance of resistant bacteria caused by antibiotics used in the livestock industry was evaluated. First of all, microbial community structure changes by their exposures were investigated in a model system using an antibiotic. Though the environmental risk by the antibiotic was transient, it was clarified that the risk could be reduced by appropriately reducing the antibiotics.

研究分野：農業環境工学

キーワード：磁気分離 抗生物質 薬剤耐性 畜産廃水 耐性遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

畜産業において抗生物質は、感染症の予防・治療や成長促進を目的として広く用いられている。我が国における抗生物質（合成抗菌薬を含む）の年間使用量は2,200 tを越え、ヒトよりも家畜や家禽に多く使用されている。投与された抗生物質の大部分は、殆ど処理されることなく畜産施設から家畜糞尿とともに環境に放出されていると推定される。近年、畜産業由来と考えられる抗生物質が、我が国の河川水から検出され、数十 $\mu\text{g/L}$ のオキシテトラサイクリン抗生物質の検出報告もある。これは都市部河川の濃度と比較すると数オーダー高い値である。排出源とされる牛舎や豚舎といった畜産施設では、数十 $\text{mg/L}$ を超える濃度で畜産廃水から排出されていると推定される。抗生物質の環境拡散によって懸念されるのは、耐性菌の問題である。米国疾病予防センター（CDC）によれば、抗生物質耐性病原菌による死者は米国内で毎年23,000人に達し、耐性遺伝子の伝播が畜産廃棄物から環境経由でヒトへ伝播することを強く警鐘している。環境に拡散された抗菌剤が微生物と接触し新たに耐性菌を産出することは明らかになっており、抗生物質関連リスクの低減のためには、畜産施設から排出される抗生物質の除去技術を早急に確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

畜産廃水からの抗生物質の磁気分離法を確立するために、電気化学磁気シーディング法の確立と畜産施設での設置が可能な小型永久磁石磁気分離モジュールを開発し、耐性遺伝子変異と抗生物質濃度との関係を調べ、処理目標値を明確にする、さらに、抗生物質の連続分離試験を実施し、耐性菌出現を抑止するために畜産施設由来の廃水からの抗生物質のエミッション削減技術を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 畜産廃水中の抗生物質に適用可能な磁気シーディング法の確立

動物用抗菌剤の磁化率は小さく、磁気力で分離させるためには強磁性物質と結合させる必要がある。リガンド（配位子）の性質を持つ抗生物質に対し電気化学反応によって金属イオンと選択的にキレート結合させ、さらに強磁性物質を添加することによって、磁気力による抗菌剤の選択分離が実現する。しかし、畜産廃水に共存する成分の影響を顕著に受ける。そこで、畜産廃水でも適用可能な電気化学磁気シーディング法の確立を目標とした。

#### 2) 畜産施設に設置可能な小型磁気分離モジュールの開発

Nd-Fe-B系永久磁石と球状磁気フィルタで構成される磁気分離モジュールの開発を行った。抗生物質のようなハイリスク物質を磁気力で選択的に磁気フィルタ上に捕捉できる循環分離法の検討を行った。

#### 3) 畜産業等で用いられる抗生物質等による耐性菌の出現リスク評価

模擬的に曝露環境を再現するために、人工排水を原水として用いて実験室内で廃水処理装置を稼働させ、連続的に抗生物質に曝露させた。曝露は、曝露期間と無曝露期間を設け、曝露による微生物群集構造の変化について次世代シーケンサーを用いて解析した。

### 4. 研究成果

薬剤耐性菌の環境への拡散を防止するため、畜産廃水に含有する抗生物質のオンサイト処理技術として、永久磁石を用いた磁気分離法の開発と、畜産廃水由来の耐性菌出現を避けるために耐性遺伝子変異と抗生物質濃度との関係を調べ、耐性菌の出現リスクについて明らかにすることを試みた。

抗生物質の除去率向上のために、抗生物質の磁性付与（磁気シーディング）と磁性付与した抗生物質に作用する磁気力増大の2点について研究を行った。前者の改善法として、pH制御型電気化学磁気シーディングについて検討した。磁気シーディング時に特定のpHに溶液を制御することによって、酪農廃水からのオキシテトラサイクリンの除去率が大幅に改善されることを見出した。後者については、循環濃縮式による分離法を検討し、安定的な分離除去が可能であることを明らかにした。

また、畜産業等で用いられる抗生物質等による耐性菌の出現リスクについて検討を重ねた。抗菌薬に曝露されるモデル系を作成し、抗菌薬レボフロキサシンを用いたモデル系では、曝露前のリアクター内微生物群全体を対象とした最小生育阻止濃度（MIC）が32 $\text{mg/L}$ 、最小殺菌濃度（MBC）が512 $\text{mg/L}$ であったことを基に、曝露濃度を4 $\text{mg/L}$ 、16 $\text{mg/L}$ 、128 $\text{mg/L}$ として実験を行った。曝露濃度4 $\text{mg/L}$ においては、微生物群集構造に優位な変化は与えなかった。また、どの曝露濃度においても、曝露中に多剤耐性菌が生じていたと示される結果を得た。しかし、どの系においても抗菌薬を排除した環境に曝露し直すことにより、耐性菌の数が激減し、もとの感受性菌の分布に戻されることが明らかになり、本モデル系においては、抗菌薬の環境へのリスクは一過的であるものの、抗菌薬を適切に低減することで、そのリスクさえも除去できることが明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

Liting Hao, Kunihiro Okano, Chi Zhang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Chuanping Feng, Motoo Utsumi, Ikko Ihara, Hideaki Maseda, Kazuya Shimizu, Effects of levofloxacin exposure on sequencing batch reactor (SBR) behavior and microbial community changes, Science of The Total Environment, 672(4), 2019, 227-238, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.272

岩崎光一郎, 井原一高, 吉田弦, 豊田浄彦, 梅津一孝, 畜産廃水からの動物用抗菌剤の磁気分離 - 磁気シーティングにおける pH 制御 -, 農業食料工学会関西支部報, 124, 2018, p.3.

石堂一樹, 井原一高, 豊田浄彦, 立嶋正勝, 梅津一孝, 畜産廃水に含有する動物用抗菌剤の磁気濃縮分離の基礎検討, 農業食料工学会関西支部報, 122, 2017, p.1.

辻陽平, 井原一高, 間世田英明, 清水和哉, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 乳牛糞尿の嫌気性消化における薬剤耐性菌の消長 - テトラサイクリン系抗生物質の影響 -, 農業食料工学会関西支部報, 122, 2017, p.2.

〔学会発表〕(計 26 件)

清水和哉, Hao Liting, 岡野邦宏, Zhang Chi, 張振亜, 雷中方, Feng Chuanping, 内海真生, 井原一高, 間世田英明, 抗菌剤曝露からの排水処理の回復と微生物群集構造の変動, 第 53 回日本水環境学会年会, 2019

間世田英明, バクテリアの耐性獲得機構に見られる自己ゲノム編集機構の解析と育種への応用, 公益社団法人 新化学技術推進協会 (JACI) (招待講演), 2019

間世田英明, 緑膿菌の多剤耐性獲得機構をゲノム編集技術に応用する, 第 53 回緑膿菌感染症研究会 (特別講演), 2019 年

間世田英明, バクテリアの耐性獲得機構に見られる自己ゲノム編集機構の解析と育種への応用, 第 36 回日本植物細胞分子生物学会 (招待講演), 2018

岩崎光一郎, 井原一高, 吉田弦, 梅津一孝, pH 制御型電気化学シーティングを用いた畜産廃水からの動物用抗菌剤の磁気分離, 第 140 回農業食料工学会関西支部例会, 2018

石堂一樹, 井原一高, 吉田弦, 酒井保蔵, 梅津一孝, 畜産廃水に残留するテトラサイクリン系抗生物質の磁気濃縮分離, 農業環境工学関連学会 2018 年合同大会, 2018

辻陽平, 井原一高, 間世田英明, 清水和哉, 岩崎匡洋, 梅津一孝, テトラサイクリン系抗生物質が残留する家畜糞尿の嫌気性消化における薬剤耐性菌の消長, 農業環境工学関連学会 2018 年合同大会, 2018 年

岩崎光一郎, 井原一高, 吉田弦, 豊田浄彦, 梅津一孝, pH 制御電気化学磁気シーティングによる畜産廃水からの抗生物質の磁気分離, 2018 年農業施設学会学生・若手研究発表会, 2018

石堂一樹, 井原一高, 吉田弦, 豊田浄彦, 酒井保蔵, 梅津一孝, 永久磁石を用いた畜産廃水からのテトラサイクリン系抗生物質の磁気濃縮分離, 2018 年農業施設学会学生・若手研究発表会, 2018

岩崎光一郎, 井原一高, 吉田弦, 豊田浄彦, 梅津一孝, 畜産廃水からの動物用抗菌剤の磁気分離 - 磁気シーティングにおける pH 制御 -, 農業食料工学会関西支部第 139 回例会, 2018

井原一高, 石堂一樹, 豊田浄彦, 酒井保蔵, 梅津一孝, 永久磁石を用いた酪農廃水からの動物用抗菌剤の磁気濃縮分離, 第 52 回日本水環境学会年会, 2018

辻陽平, 井原一高, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 間世田英明, 清水和哉, テトラサイクリン系抗生物質が残留する乳牛糞尿の嫌気性消化における薬剤耐性菌の消長, 2017 年度農業施設学会大会, 2017

松野李奈, 井原一高, 豊田浄彦, 梅津一孝, 立嶋正勝, 磁気力制御によるハイリスク物質の高勾配磁気分離と回収に関する検討, 日本磁気科学会第 12 回年会, 2017

石堂一樹, 井原一高, 豊田浄彦, 酒井保蔵, 立嶋正勝, 梅津一孝, 畜産廃水からの抗生物質の磁気濃縮分離に関する研究 - 球形磁気フィルタの影響 -, 日本磁気科学会第 12 回年会, 2017

井原一高, 高取恵里, 豊田浄彦, 酒井保蔵, 立嶋正勝, 梅津一孝, 酪農廃水からの抗生物質の磁気分離: 磁性粒子と磁気フィルタの影響, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017

清水和哉, 岡野邦宏, 鈴木眞菜, 天野(佐藤)千恵, Hao Liting, 張振亜, 井原一高, 間世田英明, ニューキノロン系抗菌剤曝露による排水処理過程における多剤耐性菌の出現リスク評価, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017

王韶瑜, 井原一高, 豊田浄彦, 梅津一孝, 電気化学凝集法による牛乳中の抗生物質除去に関する基礎検討, 第 75 回農業食料工学会年次大会, 2016

高取恵里, 井原一高, 豊田浄彦, 立嶋正勝, 酒井保蔵, 梅津一孝(2016): 畜産廃水からの抗生物質除去のための永久磁石を用いた磁気分離装置の開発, 2016 年度農業施設学会大会, 2016

(国際学会)

Ikko Ihara, Kazuki Ishido, Gen Yoshida, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu and Yasuzo Sakai, Magnetic Concentration of Tetracycline Antibiotic from Livestock Wastewater Using a Permanent Magnetic Separator, The International Workshop on Material Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP8), 2018.

Ikko Ihara, Kazuki Ishido, Gen Yoshida, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu and Yasuzo Sakai, Magnetic Concentration of Veterinary Antibiotics from Livestock Wastewater Using a Permanent Magnetic Separator, The 9th International Forum on Magnetic Force Control, 2018.

Kazuya Shimizu, Liting Hao, Kunihiro Okano, Chi Zhang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Chuanping Feng, Motoo Utsumi, Ikko Ihara, Hideaki Maseda, Nitrogen Removal Restoration by Bacterial Community Change on Antibiotics exposure, 17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME), 2018.

Momona Matsuno, Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Fundamental Research on High-Gradient Magnetic Separation and Recovery of Veterinary Antibiotics from Livestock Wastewater, The 10th China-Japan-Korea Graduate Student Forum, 2017.

Ikko Ihara, Eri Takatori, Yumika Kitazono, Kiyohiko Toyoda, Yasuzo Sakai and Kazutaka Umetsu, Magnetic removal of veterinary antibiotics from dairy wastewater using a high-gradient permanent magnetic separator, 7th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2017.

Mari Seko, Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Hideaki Maseda, Kazuya Shimizu, Masahiro Iwasaki, Kazutaka Umetsu, Effect of Cefazolin Residue in Dairy Cattle Manure on Survival of Antibiotic-Resistant Bacteria during Anaerobic Digestion, 7th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2017.

Ikko Ihara, Eri Takatori, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Masakatsu Tateshima, Yasuzo Sakai, Selective Removal of a Veterinary Antibiotic from Livestock Wastewater Using a High-Gradient Permanent Magnetic Separator, 7th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields, 2016.

Ikko Ihara, Eri Takatori, Kiyohiko Toyoda, Yasuzo Sakai, Kazutaka Umetsu, Selective Removal of Tetracycline Antibiotic Residues from Dairy Wastewater Using a Permanent Magnetic Separator, The 7th International Forum on Magnetic Force Control in Kanazawa, 2016.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名： 間世田 英明

ローマ字氏名： MASEDA, Hideaki

所属研究機関名： 国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名： 生命工学領域

職名： 上級主任研究員

研究者番号 (8桁): 10372343

研究分担者氏名： 清水 和哉

ローマ字氏名： SHIMIZU, Kazuya

所属研究機関名： 筑波大学

部局名： 生命環境系

職名： 准教授

研究者番号 (8桁): 10581613

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。