

琵琶湖・瀬田川流域における 抗菌薬による水環境汚染の実態解明

立命館大学総合科学技術研究機構 澤田 和子

1. はじめに

抗生物質は、細菌や真菌の産生物質であり、他の微生物の細胞壁の合成やリボソームの機能、DNAの合成を阻害し、静菌・殺菌作用を示す。微生物感染症の予防や治療のため、医療や畜産、水産など様々な分野において使用されている。抗菌薬は動物や人体に投与された後、吸収されなかったものは体外へ排出される(下田, 2014)。一方、抗菌薬の大量使用を背景として、修飾・分解酵素の生産、作用部位の変化、外膜変化による低浸透性、細胞外への排出などによって、抗菌薬へ耐性を有する微生物が出現し、その耐性遺伝子を保持するプラスミドが他の微生物に伝達され(牧野と品川, 2000; 和知野, 2020)、以前の抗菌薬が効かなくなる薬剤耐性感染症が世界的に拡大し始めた。1990年代後半から2000年代にかけて、欧米の下水処理場の放流水や河川水中から抗菌薬の検出が相次いで報告された(Hirsch *et al.*, 1999; Kolpin *et al.*, 2002; Calamari *et al.*, 2003)。国内においても、下水処理水や河川水中から抗菌薬やそれら耐性菌の存在が確認されてきた(八十島ら, 2004; 清野ら, 2004; 越川ら, 2008)。水環境中における存在が低濃度であっても、長期的な曝露による微生物や水生生物、ヒトへの影響が懸念されている(Hirsch *et al.*, 1999)。このような状況から、抗菌薬の放出先の環境における生態リスクが懸念されているが、水環境中における抗菌薬の実態は、十分に明らかとなっていない。我々の既報から、リンコマイシン(LCM)は光分解、土壌吸着、水生植物への吸着もほとんどなかったことから、水環境中に残存し易いことが示唆された(澤田ら, 2023)。本研究は、環境省の環境リスク評価一覧に記載されているエリスロマイシン(EM)、LCM、および水環境中からの検出事例も高く、薬剤耐性対策アクションプラン(2016-2020)に選ばれたレボフロキサシン(LVFX)の3物質を対象として、琵琶湖・瀬田川流域における、これら3物質の実態を明らかにすることを目的とした。2023年度はEM、LCMは主に夏季、LVFXは冬季に検出されたことから、2024年度は季節依存的な挙動を示すのか明らかにするため毎月の調査を実施した。

2. 実験材料および方法

2.1 供試試料

琵琶湖南東部を対象流域として、図1に示す河川3地点および琵琶湖3地点を選定した。2024年4月~2025年2月に6地点または2地点(琵琶湖2、瀬田川)から試料を採取した。野洲川、葉山川においては、橋の上からバケツを投入し、表層水試料を採取した。瀬田川および琵琶湖3地点においては、岸からバケツを投入し、表層水試料を採取した。各試料の水質を表1に示す。褐色ガラス瓶を用いて各地点から試料を採取し、氷冷下に保存した状態で

実験室まで運搬した。なお、瓶は予め純水とメタノールで洗浄し、現場で共洗いして使用した。また、本調査において、試料採取日は降雨のないことを確認している。

2.2 試料の前処理

採取した試料は、ガラス繊維ろ紙 (GF/B; Whatman) を用いて、浮遊粒子状物質 (SS) を除去した。ろ過後の水試料は、メタノール 6 mL および超純水 6 mL でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジに通水した後、カートリッジを十分乾燥させて、メタノール 6 mL でカートリッジに捕捉された物質を溶出した。溶出液は、窒素気流化で濃縮・乾固させ、元試料の 1,000 倍濃縮になるようにメタノールに転溶し、濃度測定まで -20°C で保存した。SS 試料は、環境科学ガイドブック (日本分析化学会編) のろ紙からの化学物質の溶媒抽出方法を参考に、SS が付着したろ紙をメタノールに浸けて -20°C で保存した後、元試料の 4,000 倍となるように濃縮し、濃度測定まで -20°C で保存した。SS 濃度はろ過重量法を用いて測定した。

2.3 LC/MS/MS 分析

各試料中の抗菌薬の濃度を測定するため、UFLC Prominence と LCMS-8030 (Shimadzu) を組み合わせた分析に供した。分析条件は、溶離液: 0.2%ギ酸/アセトニトリル、アセトニトリル濃度: 0-3分; 5%, 3-13分; 5-90%, 13-16分; 90%, 16-18分; 5%、流速: 0.2 mL/分、カラム: InertSustain C18 (150×2.1 mm [i. d.]、粒子径 5 μm ; GL サイエンス)、カラム温度: 40°C 、イオン化モード: ESI+ポジティブの条件で分析を行った。水試料における EM、LCM、LVFX の定量下限値はそれぞれ 0.05 ng/L、0.05 ng/L、5 ng/L となった。SS 試料における EM、LCM、LVFX の定量下限値はそれぞれ 0.0125 ng/L、0.0125 ng/L、1.25 ng/L となった。検量線は 0.0001~1 mg/L の濃度で作成し、絶対検量線法によって定量した。



図1 調査水域と採取地点

表1 試料の水質

採取日	地点	水温 (°C)	pH	DO (mg/L)	ORP (mV)	EC (μ S/cm)	DOC (mg-C/L)
2024年4月16日	琵琶湖2	18.6	5.99	8.18	190.2	115.8	1.6
	瀬田川	18.3	5.95	7.36	196.0	125.7	1.6
2024年5月20日	野洲川	20.9	7.09	6.44	185.0	156.2	1.7
	琵琶湖1	22.6	7.18	6.14	162.3	124.6	1.5
	葉山川	23.2	6.98	6.26	78.8	143.0	1.7
	琵琶湖2	22.2	7.20	5.88	166.2	116.7	1.3
	琵琶湖3	22.5	6.96	7.66	120.9	166.9	1.2
	瀬田川	22.2	6.82	5.88	219.0	125.1	1.3
2024年6月13日	琵琶湖2	24.8	7.04	6.04	163.0	114.2	1.3
	瀬田川	24.9	7.14	7.39	166.8	125.8	1.3
2024年7月25日	琵琶湖2	30.0	6.36	5.95	166.9	101.1	1.9
	瀬田川	29.6	7.10	5.72	158.2	114.0	1.6
2024年8月27日	野洲川	28.2	7.74	5.92	122.5	132.4	2.4
	琵琶湖1	31.5	9.12	8.49	53.8	106.8	3.1
	葉山川	29.7	7.38	4.09	143.5	139.3	2.2
	琵琶湖2	31.4	8.75	6.31	65.5	109.5	3.0
	琵琶湖3	31.7	8.82	5.37	60.6	102.6	3.8
	瀬田川	31.1	7.41	5.72	90.6	115.1	3.1
2024年9月17日	琵琶湖2	30.8	7.82	6.18	175.2	106.8	2.1
	瀬田川	31.2	8.25	6.73	128.0	121.9	2.2
2024年10月10日	野洲川	23.9	7.21	7.26	143.8	168.5	1.5
	琵琶湖1	28.3	9.77	9.21	27.4	132.7	3.4
	葉山川	24.0	7.62	6.12	153.5	156.0	2.1
	琵琶湖2	24.5	8.20	6.29	112.2	108.5	2.1
	琵琶湖3	24.9	7.28	5.47	139.6	132.5	1.9
	瀬田川	24.7	7.37	5.25	172.6	131.2	1.6
2024年11月12日	琵琶湖2	17.8	7.28	6.56	173.7	125.1	1.6
	瀬田川	18.6	7.20	7.08	184.1	139.9	0.9
2024年12月10日	琵琶湖2	9.0	7.02	8.72	227.0	128.5	2.4
	瀬田川	9.9	6.89	6.90	221.7	128.4	1.4
2025年1月23日	野洲川	8.9	7.37	9.04	NA	193.7	4.5
	琵琶湖1	8.8	7.37	10.41	184.0	152.1	2.9
	葉山川	8.6	7.17	10.45	186.4	167.7	1.6
	琵琶湖2	8.0	7.38	8.78	195.3	117.9	2.5
	琵琶湖3	7.9	7.27	11.01	189.2	142.6	1.8

	瀬田川	8.0	7.26	10.41	217.1	138.3	2.6
2025年2月17日	琵琶湖2	8.0	6.17	12.32	194.1	126.8	2.4
	瀬田川	7.0	6.43	12.24	223.7	141.5	1.8

NA：未測定

2.4 耐性菌の測定

従属栄養細菌の計測にはR2A寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン）、耐性菌の計測にはEM、LCMまたはLVFX（富士フイルム和光純薬）が50 mg/Lとなるように添加したR2A寒天培地を用いた。採取した試料を段階希釈した試料を培地に塗布し、25℃、7日間培養した後、生菌数を計測した。さらに、従属栄養細菌に対する各耐性菌の割合を算出した。

3. 実験結果および考察

3.1 抗菌薬の季節変動

2024年5月、8月、10月、2025年1月の6地点におけるSS濃度、水試料およびSS試料中の抗菌薬の検出濃度を図2に示す。

EMにおいて、水試料は10月、1月、SS試料は8月、10月、1月で検出され、それぞれ0.07～18.9 ng/L（8試料）、0.014～0.58 ng/L（7試料）となった。LCMにおいて、水試料とSS試料は8月、10月、1月で検出され、それぞれ0.02～9.2 ng/L（11試料）、0.039～2.6 ng/L（7試料）となった。LVFXにおいて、水試料は5月、8月で検出され、11.1～28.5 ng/L（6試料）となったが、SS試料中からは検出されなかった。既往研究におけるEM、LCM、LVFXの検出濃度は、それぞれ$0.02\sim 138\text{ ng/L}$（Murata *et al.*, 2011）、280～1145 ng/L（Hanamoto *et al.*, 2023）、2～476 ng/L（越川ら、2008；Azuma *et al.*, 2015）となっており、本調査では他の検出事例よりも低濃度であった。

2023年度の水試料において、EMとLCMは、夏季（8月）に検出され、LVFXは冬季（1月）に検出される傾向を示した。2024年度は、EMは10月、1月、LCMは8月、10月、1月、LVFXは5月、8月となったことから、抗菌薬の検出は季節依存性があるのではなく、使用された時期・エリアで検出されることが示唆された。EMおよびLCMにおいて、水試料からは検出されなかったがSS試料から検出された試料は、それぞれ3試料、3試料であった。また、SS濃度とSS試料から検出された抗菌薬濃度に相関はみられなかった。SSは土壌粒子やプラスチック、プランクトン、微生物などで構成されており、LCMは土壌や水生植物、プラスチックへの吸着がほとんどないことから（澤田ら、2023）、微生物への吸着によりSS試料から検出されたと考えられる。8月の試料をろ過したろ紙を図3に示しており、野洲川と葉山川、琵琶湖と瀬田川でろ紙の色が異なり、ろ紙の色から藻類などの微生物の存在も示された。

EMは主に動物用医薬品として、牛、馬、豚、犬・猫の肺炎、気管支炎、咽喉頭炎などに使用されている。LCMは動物用医薬品として豚の豚赤痢、豚マイコプラズマ肺炎、犬・猫の呼吸器感染症、消化器感染症などへの使用や、人用医薬品として使用されている。滋賀県における令和3年度の家畜飼養状況は、乳用牛2794頭、肉用牛20634頭、豚3550頭、排卵鶏253908羽、肉用鶏71062羽となっており、乳用牛と肉用鶏以外は減少傾向にある（滋賀県農政水産

畜産課、2022)。また、琵琶湖南東部の東近江管内の飼養頭数が滋賀県内で一番多く、調査流域の甲賀管内は乳・肉用牛、鶏の飼養頭数が他のエリアよりも比較的多く、大津・南部管内は鶏の飼養頭数が多い（滋賀県農政水産畜産課、2022）。LVFXは人用医薬品として使用されており、水環境中で検出されるLVFXは下水処理場の寄与が高いと推定されている（八十島ら、2005；越川ら、2008）。野洲川、草津川、瀬田川の流域に含まれる甲賀市（野洲川）、湖南市（野洲川）、野洲市（野洲川）、栗東市（野洲川、葉山川）、守山市（野洲川）、草津市（葉山川、瀬田川）、大津市（瀬田川）の下水道処理人口普及率は、それぞれ81.2%、98.6%、99.0%、99.7%、99.7%、99.8%、98.5%となっている（滋賀県、2022）。本調査においては、EM、LCM、LVFX濃度は下水処理場が位置する周辺および下流域（琵琶湖2より南側）が北側（野洲川から葉山川）より高くなる傾向は確認されなかったことから、下水処理場が主な排出源ではない可能性が推察される。

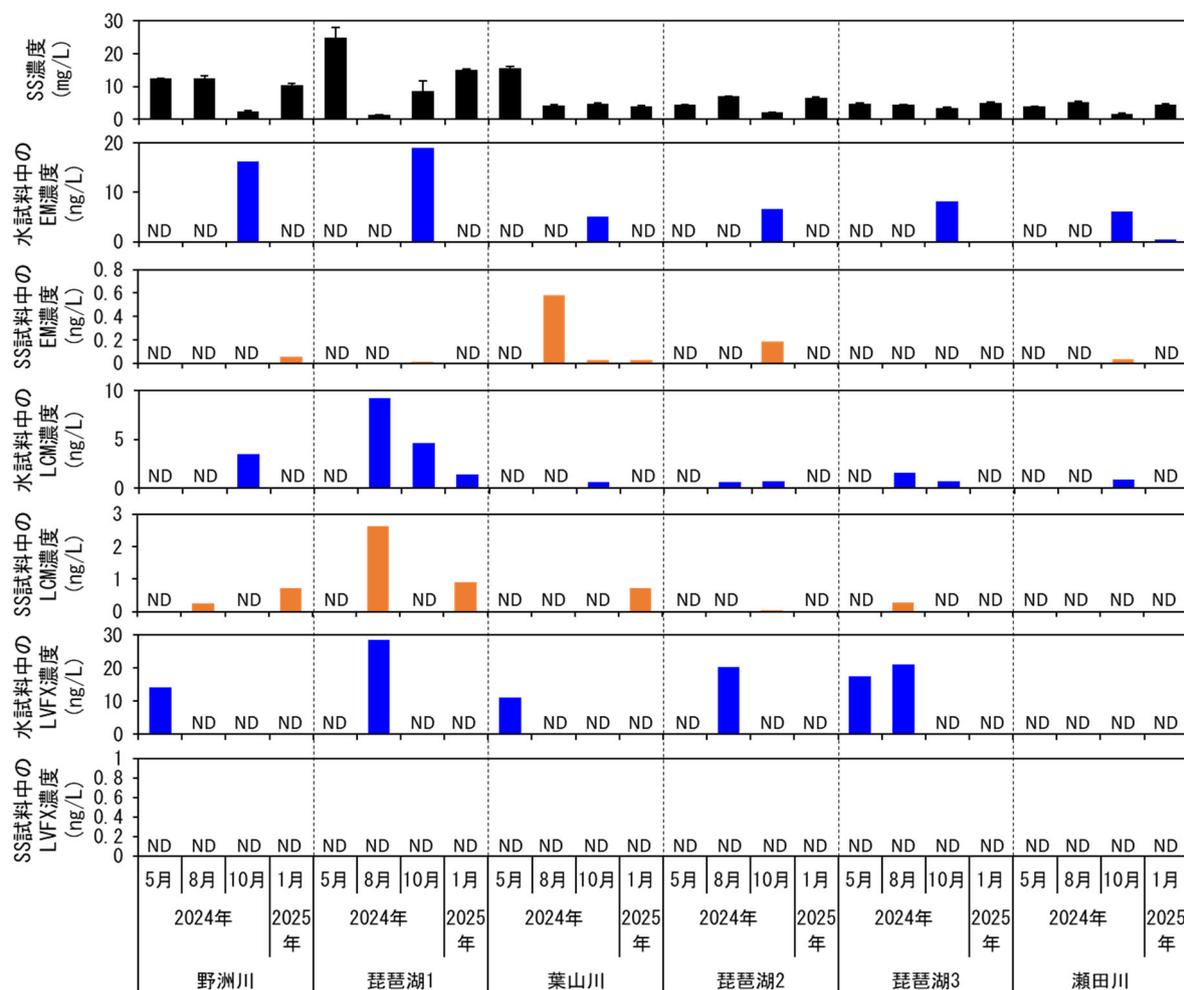


図2 調査水域における各抗菌薬の季節変動 (ND:未検出)

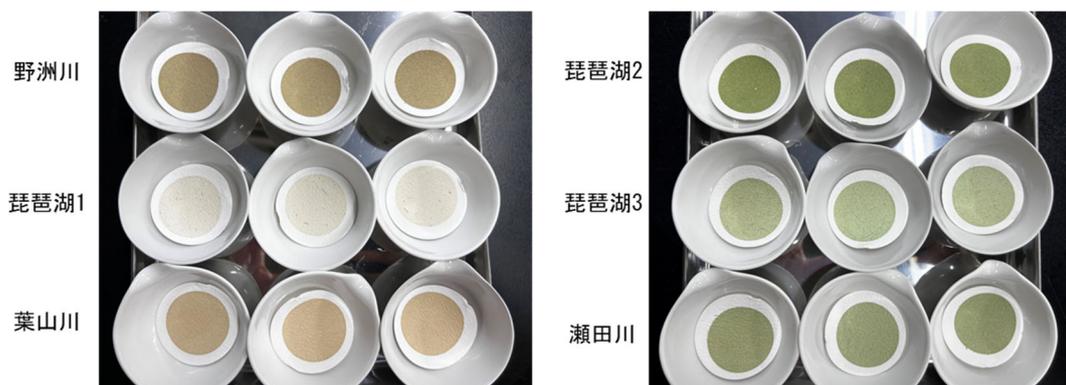


図3 2024年8月の試料をろ過したろ紙

3.2 抗菌薬の長期的な変動

2023年7月～2025年2月における琵琶湖2および瀬田川のSS濃度、水試料およびSS試料中の抗菌薬の検出濃度を図4に示す。2023年7月～2025年1月はSS濃度およびSS試料中の抗菌薬は測定していないためNAとした。

琵琶湖2において、水試料とSS試料のEMは、それぞれ0.4～9.4 ng/L (5試料)、0.19～0.65 ng/L (2試料)となった。LCMは、それぞれ0.07～2.0 ng/L (6試料)、0.02～1.1 ng/L (3試料)となった。LVFXは水試料のみで検出され、4.6～22.9 ng/L (3試料)となった。瀬田川において、水試料とSS試料のEMは、それぞれ0.15～8.5 ng/L (9試料)、0.03～1.1 ng/L (2試料)となった。LCMは、それぞれ0.04～2.0 ng/L (6試料)、1.2 ng/L (1試料)となった。LVFXは水試料のみで検出され、4.3～52.6 ng/L (3試料)となった。

琵琶湖2と瀬田川の水試料において、抗菌薬は同じ時期に検出される傾向にあることから、琵琶湖南東部で同時期に発生した病気の治療薬または予防として使用され、流域の水環境で検出されたと考えられる。SS試料において、3.1と同様に検出試料の半数は水試料からは検出されなかった。2024年4月のLCM、2024年9月のEMは特に水試料から検出されていない時期からの検出であり、SS試料中の微生物や底質などの土壌粒子に吸着した抗菌薬が下流域に流下していることが推察される。しかしながら、3.1でも述べたように、SS濃度との関連も確認できないことから、SS試料中の抗菌薬の挙動については未解明な部分も多い。

3.3 瀬田川下流への抗菌薬の負荷量

瀬田川の各抗菌薬濃度値と瀬田川下流の瀬田川南郷洗堰の放流量値を用いて、瀬田川下流域への負荷量を算出した。洗堰の水位、放流量、各抗菌薬の負荷量を図5に示す。

水試料とSS試料のEMは、それぞれ0.00053～0.077 kg/day (9試料)、0.000044～0.00076 kg/day (2試料)となった。LCMは、それぞれ0.000057～0.0026 kg/day (6試料)、0.0050 kg/day (1試料)となった。LVFXは水試料から0.0056～0.21 kg/day (6試料)となった。放流量が多い時期に低濃度でも抗菌薬が検出されると、他の時期よりも負荷量が大きくなった(2023年7月のEM)。また、水試料中の抗菌薬が低濃度で、SS濃度も高くない試料において、SS試料中から抗菌薬が検出されることにより、他の時期よりも負荷量が大きくなる場合もあった(2024年4月のLCM)。

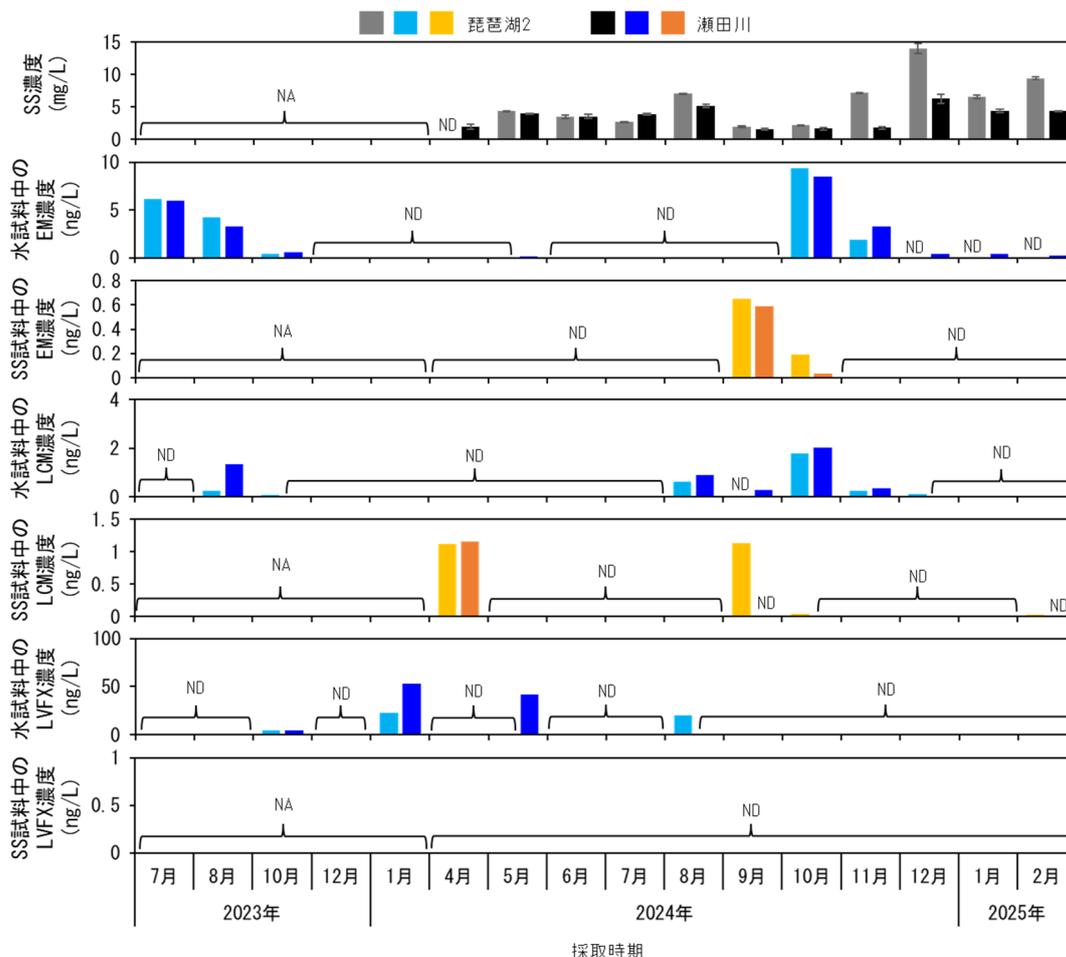


図4 琵琶湖2および瀬田川における各抗菌薬の長期的な変動 (NA:未測定、ND:未検出)

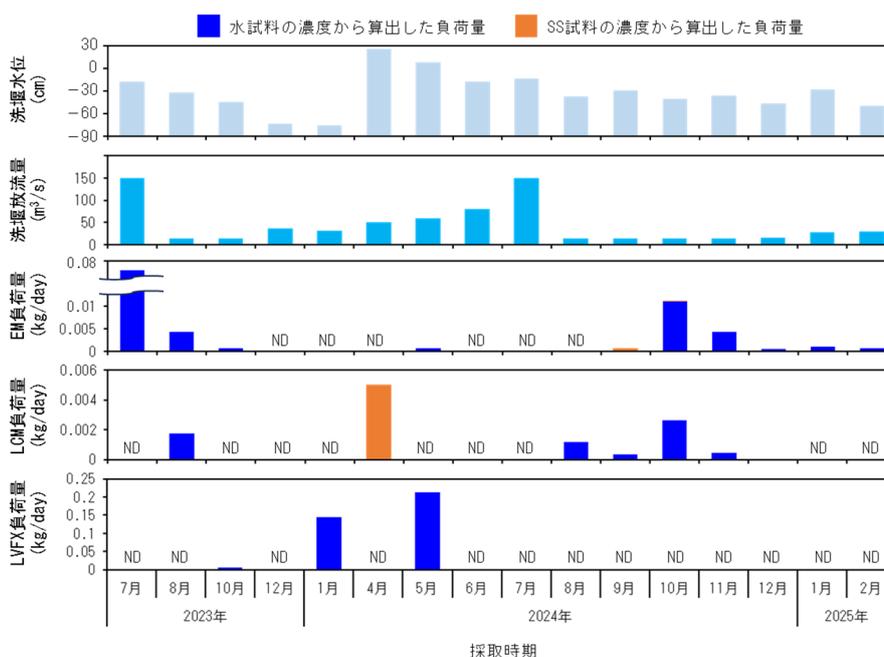


図5 瀬田川南郷洗濯の水位と放流量および下流への各抗菌薬の負荷量 (ND:未検出)

3.4 耐性菌の分布

従属栄養細菌(R2A 培地)の生菌数、および EM、LCM、LVFX 耐性菌の生菌数を図6に示す。

従属栄養細菌は $3.6 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^5$ CFU/mL (中央値 2.4×10^4 CFU/mL) となった。EM、LCM、LVFX 耐性菌はそれぞれ $2.7 \times 10 \sim 1.3 \times 10^4$ CFU/mL (中央値 1.6×10^2 CFU/mL) (24 試料)、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^5$ CFU/mL (中央値 7.3×10^3 CFU/mL) (24 試料)、 $4.0 \times 10 \sim 9.7 \times 10$ CFU/mL (中央値 5.7×10 CFU/mL) (7 試料) となった。2023 年度と同程度で、EM、LCM 耐性菌は時期や場所によらず、広範に一定数存在することが明らかとなった。LVFX 耐性菌は、野洲川、琵琶湖1、葉山川の3地点のみで検出され、2023 年度も同様の傾向を示した。

従属栄養細菌に対する EM、LCM、LVFX 耐性菌の割合はそれぞれ、0.1~9.0% (中央値 1.0%)、2.7~100% (中央値 46.9%)、0.02~0.05% (中央値 0.04%) となった。2023 年度と同程度の割合となった。EM および LCM は主にグラム陽性菌に抗菌力を示す。特に、LCM は EM、LVFX と比べても耐性菌割合が高かったことから、抗菌薬を含む R2A 寒天培地に生育したコロニーは、LCM が作用しない微生物が優先している可能性もある。また、自然耐性を持つ微生物や抗菌薬が作用しない微生物の存在も考えられる。LVFX はグラム陽性菌およびグラム陰性菌のどちらにも抗菌力を示すことから、EM、LCM よりも 1~3 オーダー低い耐性菌割合になったと推察される。

従属栄養細菌に対する抗菌薬の耐性菌の生菌数や割合に関する既報は乏しく、琵琶湖水の EM、LCM 耐性菌割合がそれぞれ 0.70%、88.2% (澤田ら、2023)、琵琶湖底質の EM 耐性菌割合が 0.8~3.2% (Miyake *et al.*, 2003)、桂川、宇治川、木津川および下水処理場放流水の LVFX 耐性菌が 1.04×10^2 CFU/mL (越川ら、2008) である。本調査において、既報の生菌数、割合と比べても高くはなかったことから、著しく耐性菌が増えているとは言えない。しかしながら、抗菌薬が長期間に及び琵琶湖流域の水環境中へ流入・存在することで、耐性を持つ微生物が今後増えてくる可能性もあり、長期的なモニタリングが必要である。

4. まとめ

本年度に実施した調査において、以下のことが明らかとなった。

- 琵琶湖南東部の調査水域において、水試料中の EM、LCM、LVFX は季節依存的ではなく、使用時期に流域で検出される。
- SS 試料で検出される EM、LCM は、SS 濃度とは関係なく、水試料中の EM、LCM と異なる挙動を示す。
- EM、LCM 耐性菌の生菌数は時期や場所によらず広範囲に分布しており、LVFX 耐性菌は調査水域の北側で検出される傾向がある。

水環境中における抗菌薬の実態を解明するためには、水試料と SS 試料の両方の挙動を長期的に調査することが課題である。また、既に下水道処理人口普及率が 98% を超える高い地域もあるが、まだ普及していないエリアの下水道整備を進めるとともに、抗菌薬の適切な使用期間、使用量を守るなどの対策を講じて、水環境中への流入を少しでも減らす必要がある。

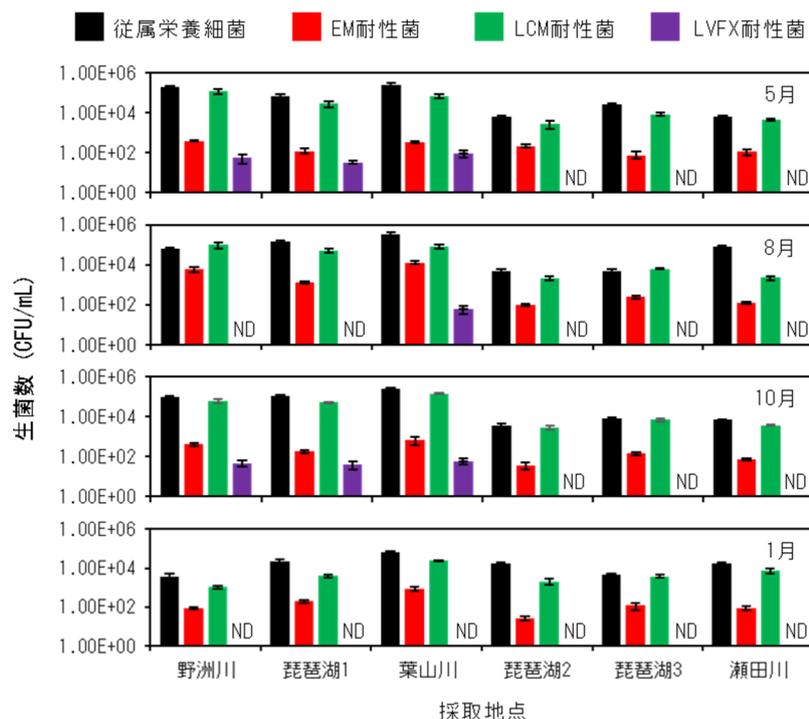


図6 従属栄養細菌および各抗菌薬耐性菌の生菌数 (ND:未検出)

5. 参考文献

- Azuma, T., Ishiuchi, H., Inoyama, T., Teranishi, Y., Yamaoka, M., Sato, T., Mino, Y. (2015) Occurrence and fate of selected anticancer, antimicrobial, and psychotropic pharmaceuticals in an urban river in a subcatchment of Yodo River basin, Japan. *Environmental Science and Pollutant Research* 22, 18676–18686.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science and Technology* 37, 1241–1248.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buzton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A Nautical reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202–1211.
- Hanamoto, S., Minami, Y., Hnin, S.S. Yao, D. (2023) Localized pollution of veterinary antibiotics in watersheds receiving treated effluents from swine farms, *Science of the Total Environment*, 902, 166211.
- Hirsch, R., Ternes, T., Harberer, K., Keatz, K.L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 255, 109–118.
- Miyake, D., Kasahara, Y., Morisaki, H. (2003) Distribution and characterization of antibiotics resistant bacteria in the sediment of southern basin of Lake Biwa. *Microbes and Environments* 18(1), 24–31.
- Murata, A., Takada, H., Mutoh, K., Hosoda, H., Harada, A., Nakada, N. (2011) Nationwide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in

Japanese river, Science of the Total Environment, 409, 5305-5312.

越川博元, 滝さやか, 井口彩, 小幡倫大, 田中宏明 (2008) 淀川水系における抗生物質, 溶存態 DNA の挙動と抗生物質耐性菌の特性, 水環境学会誌, 31(11), 651-657.

澤田和子, 北條雄大, 清水聡行, 惣田訓 (2023) 水中の抗菌薬の土壌吸着, 光分解, ウキクサによる除去—エリスロマイシンやリンコマイシン等を例として—, 環境技術, 52(6), 296-304.

滋賀県農政水産畜産課 (2022) 滋賀の畜産 2022, <https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/5339029.pdf>

滋賀県 (2022) 下水道の普及状況, <https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/5211376.pdf>

下田実 (2014) 薬物動態学の基礎IV—薬物排泄, 新薬研究, 70, 1-62.

杉江由規, 井原賢, 馬織宇, 田中宏明 (2020) 琵琶湖南東部の河川における薬剤耐性大腸菌の存在実態と降雨の影響, 土木学会論文集 G, 76(7), III_431-III_440.

杉下寛樹, 山下尚之, 田中宏明, 田中周平, 藤井滋穂, 宝輪勲, 小西千絵 (2007) 淀川流域の下水処理場放流水と支川における医薬品の存在実態, 環境工学研究論文集, 44, 307-312.

清野敦子, 長谷川泰子, 益永茂樹 (2004) 金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布, 水環境学会誌, 27(11), 693-698.

牧野耕三, 品川日出夫 (2000) 遺伝子の再編成と水平伝播による最近の病原性獲得, 化学と生物 38, 83-92.

八十島誠, 山下尚之, 田中典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明 (2004) 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン, クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響, 水環境学会誌 27(11), 707-714.

八十島誠, 小林義和, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明 (2005) 下水処理場における人用抗生物質の挙動, 環境工学研究論文集, 42, 357-368.

和知野純一 (2020) 薬剤耐性獲得機構—グラム陰性菌を中心に—, 日本臨床微生物学会, 30 (1), 1-12.