

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響」

研究分担者： 東 剛志

大阪医科薬科大学 薬学部・助教

研究要旨

薬剤耐性（AMR）の出現と蔓延が、世界的に深刻な規模で進行しつつある。AMR アクションプランによる問題解決に向け、世界保健機関（WHO）は人－動物－環境によるワンヘルス（One Health）によるアプローチを提唱しており、各国で対策が進んでいる。環境中の薬剤耐性菌および残留抗菌薬のヒト・動物に与えるリスクを評価する手法を確立し、環境における薬剤耐性への影響を解明することは、薬剤耐性に関する施策を推進していくために重要である。本分担研究では、国内の都市部の下水処理場と河川を対象に通年での残留抗菌薬の実態調査を継続して行うとともに、分担者・黒田 誠（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）及び分担者・松永展明（国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンター）、大曲貴夫（国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター、AMR 臨床リファレンスセンター）と連携して、環境水中に残留する抗菌薬濃度のハイスループット解析についての検討を試みた。具体的には、これまで用いられている手作業での固相抽出による環境試料の前処理操作系をもとに、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系を開発する上で必要となる各種測定条件についての基礎検討を行った。

環境水中の残留抗菌薬のハイスループット測定系の開発に必要な因子として、固相の量、固相への環境水の通水量、ろ過操作の有無、溶出液量、最終溶媒の組成について各々検討を行った。その結果、手作業によるマニュアル測定と、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系の結果は概ね一致しており、高い精度を維持しつつ多地点における抗菌薬による環境汚染の実態を把握するうえで有効なアプローチとなりうると考えられる。今後環境水中の残留抗菌薬の調査方法の標準化に向けて検討を行うとともに、環境中の抗菌薬の全国的なモニタリングを実施してさらなる知見の収集を行うことで、薬剤耐性菌の諸問題について包括的な理解を行うことが可能である可能性が示唆された。

研究協力者：

黒田 誠	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・センター長
松永 展明	国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンター・臨床疫学室長
大曲 貴夫	国立国際医療研究センター病院 国際感染症センター・センター長 AMR 臨床リファレンスセンター・センター長

A. 研究目的

抗菌薬に耐性を有する薬剤耐性菌の出現と蔓延が、世界的な規模で進行しつつある。世

界保健機関（WHO）は、薬剤耐性菌に対する人－動物－環境による包括的な対策として、ワンヘルス（One Health）による取り組みを提唱するとともに、各国に国家行動計画の

策定を求めている。日本においても薬剤耐性（AMR）対策アクションプランが 2016 年に制定され、これまでの取り組みにより得られた知見をもとに 2023 年からさらなる発展を図るアクションプランが策定され、国を挙げた対策が進んでいる。

近年の研究により、これらの薬剤耐性菌が河川や湖沼、海域といった水環境中から検出されることが明らかにされつつある。ところで、これらの水環境中には薬剤耐性菌に加えて、抗菌薬も残留していることが報告されている。環境中へと流入する抗菌薬の現状と実態を把握することは、薬剤耐性菌及び抗菌薬の環境への影響を評価する上で有意義な知見となるのみにとどまらず、臨床領域において薬剤耐性菌の問題の評価と解決に向けた対策を考える上で重要であると考えられる。一方で、環境を対象とした薬剤耐性菌については世界的にみても知見が限られており、未だ不明なことが多いのが現状である。そのため、環境がヒト及び動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路解明につながる調査法の確立が急務である。

本分担研究では、環境由来の薬剤耐性菌に曝露されることのヒト及び動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性についての知見を収集する目的で、1) 環境水の薬剤耐性を評価するためのモニタリング方法を確立することで、本邦における環境水の残留抗菌薬の実態を調査する。2) 全国規模でのモニタリング調査の実施に必要となる、ハイスループット化システムの開発検討を行い基礎的な知見の収集を行うことで、残留抗菌薬の観点からワンヘルス・アプローチの発展に繋げる。

B. 研究方法

1. 下水処理場の流入水を用いた環境水中の残留抗菌薬のハイスループット測定解析法の開発検討

都市部の下水処理場に流入する下水試料を用いて、これまで用いられている手作業によるマニュアル測定系の固相抽出による環境試料の前処理操作を基に、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使する

ハイスループット測定系を開発する上で必要となる分析条件の検討と最適化を試みた。測定対象とする抗菌薬は、国内の臨床現場で用いられている抗菌薬や使用量が多い抗菌薬と、国内外で水環境中からの検出報告事例がある主要な抗菌薬を対象に 15 成分の各種抗菌薬（ampicillin, cefazolin, cefdinir, cefpodoxime, cefpodoxime proxetil, ceftiofur, chlortetracycline, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, levofloxacin, minocycline, oxytetracycline, tetracycline, vancomycin）について検討を行った。

2. 手作業によるマニュアル測定系での環境水中の残留抗菌薬の測定系

手作業によるマニュアル測定系については、これまでの報告で主として用いられている測定条件を基にして、採取した下水処理場の流入水 10 mL をガラス繊維ろ紙（GF/B : 1 μ m）でろ過した後、メタノールと pH3 に調整した MilliQ でコンディショニングしたシリンジバレル型の OASIS HLB 固相抽出カートリッジに流速 1 mL/min で通水し固相抽出を行った。通水後、固相を pH3 MilliQ で洗浄した後真空ポンプで吸引脱水を行い、アセトン 3 mL 及びメタノール 3 mL で溶出し、37 $^{\circ}$ C の条件で窒素ガスで穏やかに濃縮乾固した。その後、0.1%ギ酸：メタノール（9：1）溶液 200 μ L で再溶解し、UPLC-MS/MS（Waters）による高感度な多成分同時分析法により抗菌薬の検出と定量を行った。

3. 自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定条件の検討

自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系による、環境水中の残留抗菌薬の測定解析系開発を試みるにあたり、迅速・大量解析を可能とする系として 96well 型の OASIS HLB 固相抽出プレートに着目し、固相の量、固相への環境水の通水量、ろ過操作の有無、溶出液量、最終溶媒の組成について各々検討を行

った。その他の操作については、2で述べた固相抽出の各操作を自動分注装置と自動固相抽出前処理装置により各々行い、溶出液を用いて固相から溶出させた溶液を 37 °C の条件で窒素ガスで穏やかに濃縮乾固した後、0.1%ギ酸：メタノール（9：1）溶液 100 µL で再溶解し、UPLC-MS/MS（Waters）による高感度多成分同時分析法で抗菌薬の検出と定量を行った。ここで得られた結果と、手作業によるマニュアル測定系で得られた結果を比較することにより、ハイスループット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定系としての有効性評価を行った。

C. 研究結果

1. 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討（添加回収試験における固相への試料負荷量の影響）

96well 型の固相抽出プレートを用いた環境水中の残留抗菌薬の測定系の開発として、現在市販されている 96well 固相抽出プレートの固相量の各規格（5 mg・10 mg・30 mg・60 mg）のうち、従来型の手作業によるマニュアル測定で主に用いられているシリンジバレル型の固相抽出カートリッジの固相量（200 mg）を参考に、固相量 30 mg 及び 60 mg を用いて固相への試料負荷量を変化させた際の添加回収試験の結果を図 1 に示す。

検討を行った各排水試料負荷量のうち、2.5 mL を負荷させた場合に回収率が高い成分が最も多くなり、70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg 及び 60 mg とともに 9 成分、40%～70%の回収率を示す成分については各々5 成分及び 4 成分であり、20%～40%の回収率を示す成分は各々1 成分及び 2 成分で、20%以下の回収率となる成分についてはみられなかった。固相に負荷する排水試料の体積量が増加するに伴い、固相量 30 mg 及び 60 mg いずれの場合においても回収率が低下する傾向がみられ、5 mL を負荷させた場合には 70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg 及び 60 mg とともに 6 成分に減少し、20%以下の回収率となる成分が各々1 成分及

び 2 成分となった。さらに、10 mL を負荷させた場合には 70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg 及び 60 mg で各々4 成分及び 2 成分、20%以下の回収率となる成分が各々3 成分及び 2 成分と、固相の保持量限界を超過して固相に保持されずに通水する破過現象が生じていると考えられた。

従来型の手作業によるマニュアル測定で主に用いられているシリンジバレル型の固相抽出カートリッジ（固相量（200 mg））を用いた測定では、試料負荷量は 10 mL 程度であり、LC-MS/MS による測定解析を行う際に、固相抽出後の溶液を最終的に 50 倍濃縮した溶液を測定している。96well 型の固相抽出プレートを用いた測定において、固相に負荷する排水試料の体積量を 2.5 mL 以下にすることで回収率が向上する可能性が考えられる。しかし一方で、LC-MS/MS による測定解析を行う際に必要な体積量を考慮すると濃縮倍率が最大で 25 倍となること、排水試料の負荷体積量が減少することにより検出下限濃度（LOD）や定量下限濃度（LOQ）が上昇し、環境試料中に ng/L の微量濃度で存在する抗菌薬の高感度検出に支障が生じる可能性が懸念されうると考えられる。そのため、迅速・大量解析を可能とする精度の高い測定系の開発する目的とバランスを考慮して、固相への試料負荷量 2.5 mL の条件で以後の検討を行った。

2. 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討（添加回収試験におけるろ過操作の影響）

次に、固相抽出を行う前段階でろ過処理を行うことによる添加回収試験への影響を、図 2 に示す。固相量 30 mg 及び 60 mg の 96well 型の固相抽出プレートとともに、ろ過処理を行うことによる回収率への影響は確認されず、ろ過を行わずに排液を直接固相に通水しても、精度を維持して測定を行うことが可能であると考えられた。これらの結果については、試料負荷量が多いシリンジバレル型の固相抽出カートリッジで同様の操作を行った場合、固相が目詰まりして通水が困難になることを考慮すると、操作の迅速・簡便化を図る上での

利点となりうる可能性があると考えられる。

3. 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討（添加回収試験における溶出液量の影響と従来法との比較）

固相量 30 mg 及び 60 mg の 96well 型の固相抽出プレートを用いて、固相抽出後の固相から測定対象抗菌薬を溶出させる際に用いる、溶出液の体積量を 50 μg ・100 μg ・500 μg ・1,000 μg と変化させた際の添加回収試験の結果を図 3 に示す。

溶出液の体積量 50 μL 及び 100 μL では、20%以下の回収率となる成分が固相量 30 mg 及び 60 mg について各々15成分及び2成分、15成分及び13成分となり、大部分の抗菌薬が溶出せずに固相に分配している状態であると考えられた。しかし、溶出液の体積量を 500 μL 及び 1,000 μL に増加させた場合には、70%以上の回収率を示す成分が固相量 30 mg で 9~10 成分、60 mg の場合では 10~12 成分、40%~70%の回収率を示す成分については各々4~6 成分及び 2~3 成分と回収率が向上し、両者の分布は類似する傾向がみられた。

これらの結果から、96well 型の固相抽出プレートを用いた測定の際に、固相に通水する溶出液量を増加させることで十分な溶出操作を行うことができると考えられた。固相からの溶出液が集められるコレクションプレートのうち、LC-MS/MS による測定解析を行う際に適した微量体積のインジェクションに適したコレクションプレートは、現在 700 μL のタイプのみが市販されている。溶出液量が 1,000 μL の場合には、上記したコレクションプレートを 2 個を用いて各々濃縮した後、最終的に溶液を 1 つに集約する操作が必要となり実質的に煩雑な操作が生じるため、固相への溶出液量 500 μL の条件で検討を行った。

なお、抽出操作は一般的に抽出操作の回数を増加させることで回収率が向上する可能性があることが知られている。そのため、溶出液の全量（500 μL ）を 1 度に通水させる場合と、2 回（250 μL ×2）に分けて通水させる操作についてもあわせて検討を行ったところ、両者の間で回収率に違いがみられなかった（図 4）。ここから、十分な溶出液量を確保

することで操作性を高めることが可能であると考えられた。

4. LC-MS/MS 測定時における最終溶媒の溶媒組成における各抗菌薬のピーク強度の影響

最後に、LC-MS/MS による測定解析を行う際に、固相抽出後の溶液を窒素ガスで穏やかに濃縮乾固させて定容した最終溶媒に溶解する操作について、最適な最終溶媒の溶媒組成について検討を行った結果を図 5 に示す。

得られた結果より、0.1%ギ酸水溶液とメタノールの割合を各々 90 : 10、75 : 25、60 : 40、45 : 55、30 : 70、15 : 85、0 : 100 と変化させて回収率への影響について検討を行ったところ、0.1%ギ酸水溶液：メタノールが 90 : 10 の条件で最も回収率が高く、0.1%ギ酸水溶液：メタノールが 0 : 100 の有機溶媒 100%の条件で最も回収率が低くなる結果が得られた。これらの結果は、精度の良い測定を行うためには、固相抽出操作での溶出操作（溶出液：メタノールとアセトン 100%の有機溶媒）後に、有機溶媒の濃度調整と適した濃縮倍率を得るために、固相抽出後の溶液を窒素ガスにより濃縮乾固させたあとに、水系溶媒の割合が高い最終溶媒に置換する必要があること、精度を維持して測定を行うためには、窒素ガスにより濃縮乾固操作が不可欠であることを示唆していると考えられる。

今後さらなる詳細な検討を行い知見の収集を継続するとともに、本研究課題で検討を行った自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせて駆使するハイスループット測定系について、実際の環境水試料を用いたモニタリングへの適応と有効性の検証を行うとともに、全国規模でのモニタリング調査へと繋げる基盤の構築を行うことが重要であると考えられる。

D. 考察

本分担研究において、これまでに手作業によるマニュアル測定で実施されてきた、環境水中の残留抗菌薬濃度の評価測定について、

迅速・大量解析を可能とする自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系の有効性評価に資する成果が示唆されている。

今回検討を試みた、96well型の固相抽出プレートを用いた、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置による排水中の抗菌薬測定系は、従来型の手作業によるマニュアル測定で主に用いられている、1検体毎に個別に測定操作を行うシリンジパレル型の固相抽出カートリッジの固相量と比較して、迅速性に優れる利点がある。さらに、測定精度についても、手作業によるマニュアル測定と同等か若干良好となりうる結果が得られており、本測定系が薬剤耐性菌と残留抗菌薬をあわせた全国規模でのモニタリング調査を検討する上で有効な手法となりうる可能性を示唆していると考えられる。

今後継続して検討を行うことで、水環境における抗菌剤の影響に関する詳細なリスク評価・管理を行うために、地域特性を考慮し調査地点を拡張して、環境中の抗菌薬濃度推定手法について知見の収集と有効性の検証に努めていくことが重要であると考えられる。

E. 結論

本研究分担において、環境水中に存在する残留抗菌薬の調査方法の確立と、全国的なモニタリングに不可欠となる迅速・大量解析法の開発とその有効性評価に資する成果を得た。本研究で提唱している環境水中の残留抗菌薬濃度を高精度かつ高効率で測定する手法は、我が国だけでなく欧米諸国や、急速に発展を続けるアジア諸国においても同様の対策検討の発展についても寄与することが出来ると考える。さらに、WHOにより各国で対策を行うことが義務付けられている薬剤耐性アクションプランやワンヘルス・アプローチの一助となる可能性をも秘めていると考えられる。

今後調査を継続するとともに、各自治体の協力を得て、地方衛生研究所等による全国的な環境水モニタリング調査へと発展させるための基盤を整備していく予定である。この環境モニタリングを継続的に実施することで、管轄地域で発生している薬剤耐性菌の諸問題

について包括的な理解を行うことが可能であると考えている。

本研究は環境負荷をもたらす根源を追求するための第一歩であり、更なる研究推進と実態解明、そしてこれらの調査を全国規模で実施可能とするハイスループット化システムの確立とその有効性の検証をもって、省庁横断的な施策が提言できるものと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

書籍

1. 東 剛志, 関塚剛史, 黒田 誠, 片桐美和, 渡邊 学. 医療機関に由来する排水処理へのオゾンの応用. オゾンの利活用事例集 追補版, 日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会. 2023;36-40.

論文発表

1. Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M. Performance of a pilot-scale continuous flow ozone-cased hospital wastewater treatment system. *Antibiotics*. 2023;12:932.
2. Azuma T, Usui M, Hayashi T. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater by ozone-based advanced water treatment processes. *Sci Total Environ*. 2024;906:167432.
3. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. *獣医疫学雑誌*. 2023;27:9-16, 2023.
4. 東 剛志, 林 哲也. 薬剤耐性とワンヘルスーオゾン処理の有効性についてー. *相愛大学研究論集*. 2023;39:17-26.
5. 東 剛志. 大阪の水環境 淀川中下流・支川における抗菌薬および薬剤耐性菌による環境問題への取り組み. *水環境学会誌*. 2023;46:240-244.

その他発表

1. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 第 61 回獣疫学会学術集会 シンポジウム「薬剤耐性問題：ヒト・動物・環境のインターフェイス」, 日本獣医畜産大学, 2023 年 3 月 (招待講演)
2. 東 剛志, 臼井 優, 林 哲也. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 32 回年次研究講演会, 東京都立大学, 2023 年 6 月 (招待講演)
3. 東 剛志. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 40 回オゾン技術に関する講習会・見学会, フォレスト仙台, 2023 年 12 月 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

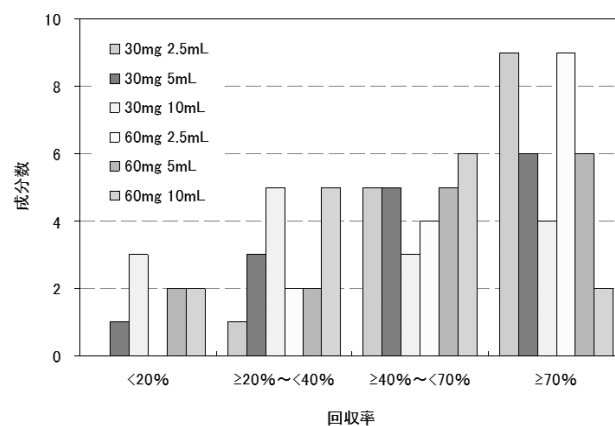


図 1 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討
(固相量 30 mg 及び 60 mg の条件での添加回収試験における固相への試料負荷量の影響)

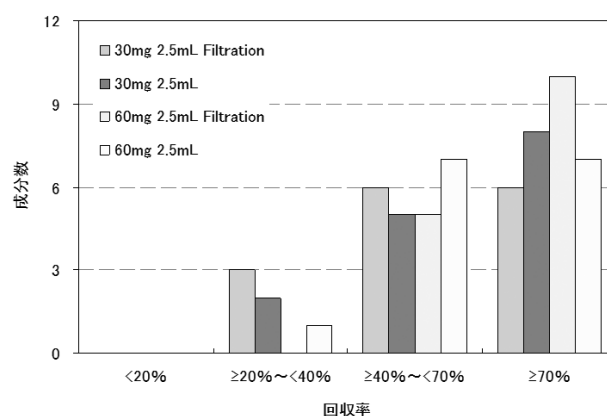


図 2 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討
(固相量 30 mg 及び 60 mg の条件での添加回収試験におけるろ過操作の影響)

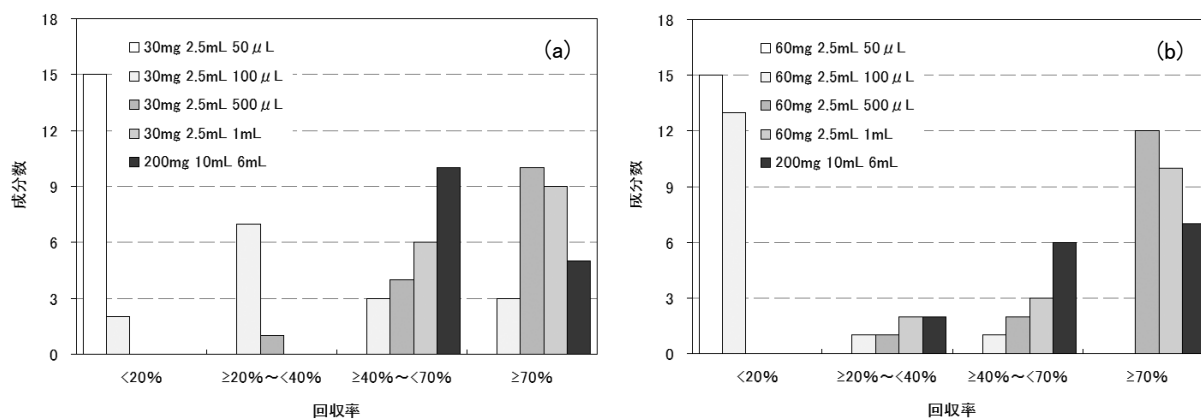


図 3 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討

((a)固相量 30 mg 及び(b)60 mg の条件での添加回収試験における溶出液量の影響と従来法との比

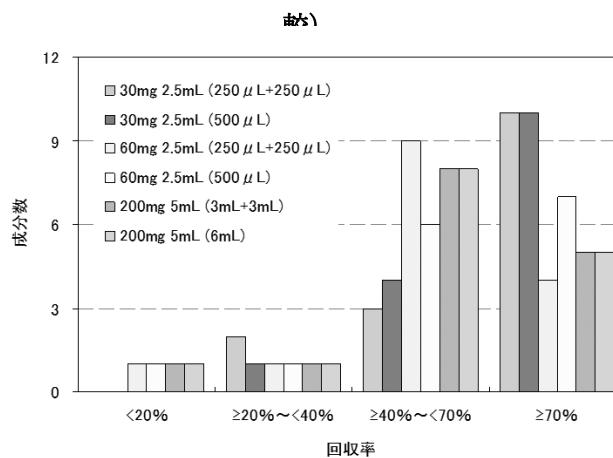


図 4 96well 型の固相抽出プレートを用いた排水中の抗菌薬測定条件の検討

(固相量 30 mg 及び 60 mg の条件での添加回収試験における複数回による溶出操作の影響と従来法との比較)

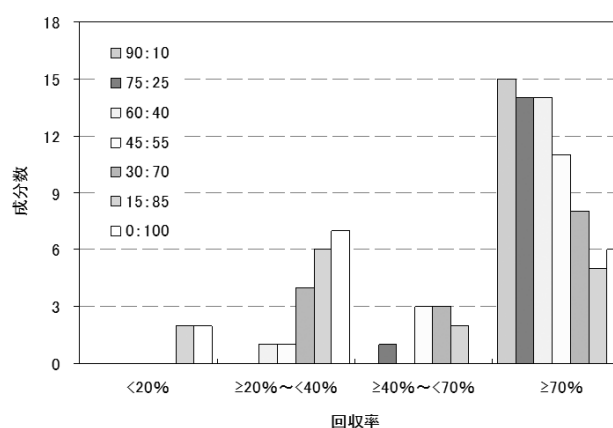


図 5 LC-MS/MS 測定時における最終溶媒の溶媒組成における各抗菌薬のピーク強度の影響