

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・講師

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において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・金森 肇（金沢大学）及び分担者・山口進康、河原隆二、安達史恵（大阪健康安全基盤研究所）と連携して、地方衛生研究所から水再生センター（下水処理場）の放流水をご提供頂き、全国的な規模での環境 AMR モニタリングに向けた基礎検討を試みた。

手作業によるマニュアル測定系と、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせて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検出濃度には相関関係が（相関係数 1.00、 R^2 値 0.87）あり、マニュアル測定系による検出濃度／ハイスループット測定系による検出濃度の値は 0.91～1.64 と最大で 2 倍程度の誤差がみられるものの良好な対応性がみられ、抗菌薬による国内の環境汚染問題の概要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、下水処理場の放流水を対象にした環境水中の抗菌薬の全国的なモニタリングを実施して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：

金森 肇	金沢大学医薬保健研究域医学系感染症科学・臨床検査医学 教授
山口 進康	大阪健康安全基盤研究所
河原 隆二	大阪健康安全基盤研究所
安達 史恵	大阪健康安全基盤研究所
他 29	自治体の地方衛生研究所・環境部門

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。国際的に著名な学術雑誌 Lancet によると、米ワシントン大学を中心とする国際研究チームが 204 の国と地域を対象に行った調査で、薬剤耐性菌に起因する死

亡者は 2019 年で 127 万人に増加しており、2024 年に掲載された同チームの論文では今後 25 年間で 3,900 万人を超える見通しであるとされており、国境を越えて地球規模での問題となっている。

これらの薬剤耐性菌問題への対策計画の中で、環境中における薬剤耐性菌の実態解明と健康リスクを削減又は低減可能な対策について研究を行うことの重要性が挙げられている。人や動物の活動と環境は複雑な相互関係を有しており、薬剤耐性菌が直接的に人に感染する健康リスクにとどまらず、環境を経由して最終的に人に感染する間接的な環境リスクが国内外の研究者により指摘されている。

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。これらを踏まえると、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有効な対策の 1 つとなると考えられる。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) 本邦における環境水中の残留抗菌薬の実態を評価するためのモニタリング方法として、ハイスループット解析システムの有効性について評価を行う。2) 水再生センター（下水処理場）の放流水を対象にした全国規模での調査に向けた基礎検討を行うことで、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. 下水処理場の排水及び河川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の排水及び河川水を用いて、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の有効性の検証を試みた。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 17 成分の各種抗菌薬（ampicillin, azithromycin, benzylpenicillin, cefdinir, cefpodoxime, cefpodoxime proxetil, ceftiofur, chlortetracycline, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, enrofloxacin, 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

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排水（流入水：10 mL、二次処理水：30 mL、放流水：30 mL）又は河川水（30 mL）をガラス繊維ろ紙（GF/B：1 µm）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 °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 µL 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

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は、採取した下水処理場の排水（流入水：5 mL、二次処理水：5 mL、放流水：5 mL）又は河川水（5 mL）をガラス繊維ろ紙（GF/B：1 µm）でろ過した後、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った。具体的には、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 96well 型の OASIS HLB 固相抽出プレートに流速 1 mL/min で通水し固相抽出を行い、固相を pH3 MilliQ で洗浄した後吸引脱水を行い、アセトン 250 µL 及びメタノール 250 µL で溶出し、37 °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 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、ハイスルーブ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. 手作業によるマニュアル測定系とハイスルーブット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定結果の比較

下水処理場の流入水中から、測定対象とした抗菌薬のうち azithromycin, cefpodoxime, clarithromycin, doxycycline, levofloxacin, minocycline, oxytetracycline, vancomycin が 70 ng/L～3,418 ng/L（マニュアル測定系）、85 ng/L～1,441 ng/L（ハイスルーブット測定系）の濃度で検出された。また、二次処理水中からは azithromycin, clarithromycin, levofloxacin が 117 ng/L～395 ng/L（マニュアル測定系）、137 ng/L～291 ng/L（ハイスルーブット測定系）、放流水中からは azithromycin, clarithromycin, levofloxacin が 239 ng/L～1,304 ng/L（マニュアル測定系）、270 ng/L～481 ng/L（ハイスルーブット測定系）、河川水からは azithromycin, clarithromycin, levofloxacin が 16 ng/L～58 ng/L（マニュアル測定系）、14 ng/L～86 ng/L（ハイスルーブット測定系）の濃度で各々検出された（図 1）。

下水処理場の流入水から検出される抗菌薬濃度について、cefpodoxime, doxycycline, minocycline, oxytetracycline, vancomycin については放流水中から検出されず、これらの抗菌薬については排水処理により除去されやすい成分であると考えられた。一方で、levofloxacin については放流水中から 323 ng/L～425 ng/L と流入水に比べて 10 分の 1 程度の濃度で検出され、azithromycin, clarithromycin については除去効果はみられなかった。これらの結果は、下水処理場で一部の抗菌薬は処理可能であるが、十分な処理効果が得られず水環境中に流入する成分があることを示唆していると考えられた。また、二次処理水と放流水中の濃度を比較した際に除去効果がみられないことから、本研究で対象とした抗菌薬については、下水処理場における生物処理による排水処理で主に除去されていると考えられた。

河川水中から検出される抗菌薬については、排水中から検出される抗菌薬と概ね類似しており、水環境に対する排水の流入影響が考えられる。また、検出濃度が 10 分の 1 程度であることについては、処理水が放流先の河川で希釈されることに関係していると考えられる。

次に、環境水試料から検出される抗菌薬の実測値との対応性が評価可能である成分について解析を行ったところ、両者の間に良好な相関関係（相関係数 1.00、R² 値 0.87）がみられることが明らかになった。誤差については、マニュアル測定系／ハイスルーブット測定系の値は流入水で平均値 1.11±0.55、二次処理水 1.20±0.31、放流水 1.64±0.96、河川水 0.91±0.34 と最大で 2 倍程度の誤差がみられるものの、良好な対応性がみられることが明らかになった（図 2）。これらの結果は、抗菌薬による国内の環境汚染問題の概要を把握するうえでハイスルーブット測定系が有効なアプローチとなりうる可能性を示唆していると考えられる。今後調査を継続するとともに、環境中の抗菌薬濃度推定手法と環境リスク評価について知見の収集を行うことが重要であると考えられる。

2. 下水処理場の放流水を対象とした全国規模レベルでの環境 AMR モニタリングに向け

た基礎検討

地方衛生研究所等との連携により、29自治体の協力を得て水再生センター（下水処理場）の放流水を対象にした全国的な規模での抗菌薬の実態調査に向けたプロトコルの作成と、関係各位との調整検討を行った。

採水から解析操作の流れについては、雨水の影響が少ないと考えられる日に放流水の採水を行い、各処理場の施設でその日のうちにメタゲノム解析に用いる TPP Rapid Filtermax を用いてろ過し、ろ液を遠沈管に移した後冷凍する。その後、各処理場から研究協力者の山口らが所属する大阪健康安全基盤研究所にろ液試料を冷凍便で送付し、研究分担者が所属する大阪医科薬科大学にまとめて冷凍便で送付または持ち込みを行い、1で述べたハイスループット測定系により固相抽出を行い、UPLC-MS/MS による高感度多成分同時分析法で放流水中の抗菌薬の検出と定量を行った。

今後全国的な規模での下水処理場の放流水に内在する残留抗菌薬の実態調査を行い、環境中の抗菌薬濃度推定手法についてさらなる知見の収集と有効性の検証を行うことが重要であると考えられる。

D. 考察

本分担研究により、これまでに手作業によるマニュアル測定により実施されてきた環境水中の残留抗菌薬濃度の解析について、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解析系の有効性評価に資する成果が示唆されている。

手作業により1検体毎に操作を行う従来型のシリンジバレル型の固相抽出カートリッジと比較して、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解析系は、迅速性と多検体の測定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の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的な規模での下水処理場の放流水の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い、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、環境水中の抗菌薬の実態について全国的な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のハイスループット解析系は、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、地方衛生研究所等との連携により各自治体の協力を得て、下水処理場の放流水を対象にした環境水中の残留抗菌薬の調査を試みる予定である。この全国規模での調査を実施することで、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。

本研究は薬剤耐性菌に起因する環境負荷をもたらず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

論文発表

(1) Azuma T, Usui M, Hasei T, Hayashi T. Occurrence and environmental fate of anti-influenza drugs in an urban river in a subcatchment of the Yodo River Basin, Japan, Sci. Total Environ., 953, 176086, 2024.

- (2) Azuma T, Usui M, Hasei T, Hayashi T. On-site inactivation for disinfection of antibiotic-resistant bacteria in hospital effluent by UV and UV-LED, *Antibiotics*, 13(8), 711, 2024.
- (3) Azuma T, Matsunaga N, Ohmagari N, Kuroda M. Development of a high-throughput analytical method for antimicrobials in wastewater using an automated pipetting and solid-phase extraction system, *Antibiotics*, 13(4), 335, 2024.
- (4) Azuma T, Usui M, Hayashi T. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater by ozone-based advanced water treatment processes, *Sci. Total Environ.*, 906, 167432, 2024.
- (5) 東 剛志. ワンヘルス・アプローチ～AMRの現状と今後の課題 水環境と病院の排水を中心とした環境分野における AMR の現状と対策, *モダンメディア*, 71(1), 1-30, 2025.
- (6) 東 剛志. 薬剤耐性菌による新たな環境汚染問題－医療と環境との繋がり－, *インフェクションコントロール*, 34(1), 76-81, 2025.

その他発表

- 1) 東 剛志. ワンヘルス・アプローチ～AMRの現状と今後の課題 水環境と病院の排水を中心とした環境分野における AMR の現状と対策, 栄研化学株式会社 モダンメディア 新春放談（東京ステーションホテル）, 2024 年 11 月 11 日.（招待講演）
- 2) 東 剛志, 臼井 優, 内藤博敬, 林 哲也, 中室克彦. オゾン水を用いた医療排水処理への応用の試み, 日本機能水学会 第 22 回学術大会（日本薬学会 長井記念ホール）, 2024 年 10 月 5～6 日.（招待講演）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

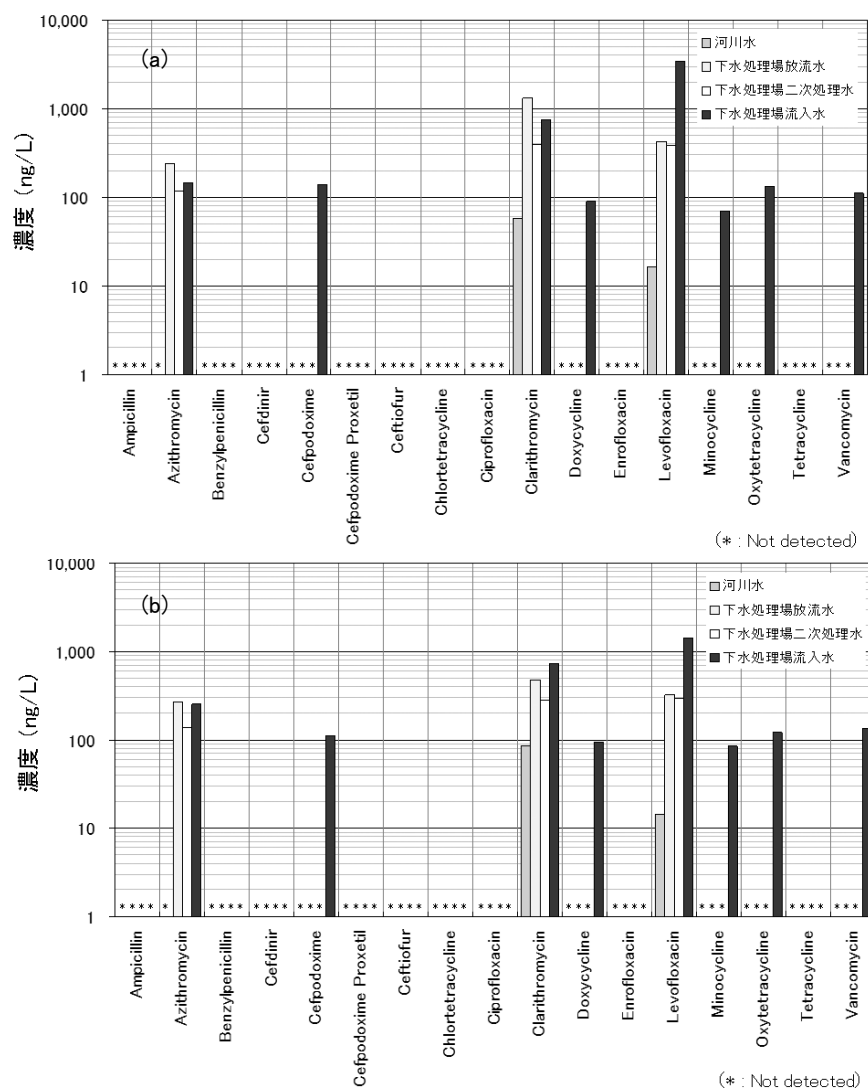


図1 各種環境水を対象とした抗菌薬の存在実態の調査
 ((a)手作業によるマニュアル測定系, (b)ハイスループット測定系)

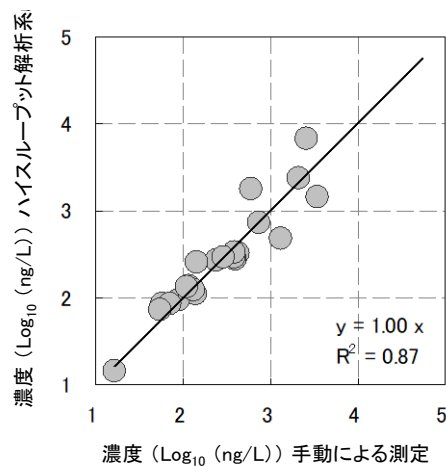


図2 手作業によるマニュアル測定系とハイスループット測定系による環境水中の
 残留抗菌薬の測定結果の対応性の評価

放流水のフィルターろ過後のろ液の冷凍・輸送

1. 500 mL の放流水・表層を採水



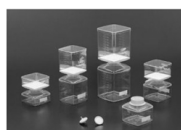
Coming® Easy-Grip round, plastic, storage bottles
bottle capacity 500 mL

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cle430282?lang=ja®ion=JP>



その日のうちに

2. 放流水を全量Filterろ過*



TPP Rapid Filtermax Vacuum Filtration, 500 mL bottle
Large 49 sq. cm square PES 0.2µm membrane

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z760900?lang=ja®ion=JP>

*フィルターの1/4は細断し、感染研へ送付



大阪医科薬科大学・薬学部衛生化学研究室へ
各水試料をまとめて送付(冷凍便)or持込み



大阪健康安全基盤研究所にて
遠沈管を-18℃保存(冷凍)



3. ろ液の送付

ろ過後のろ液40 mL程度(目盛)を
50 mL遠沈管に移す
冷凍保存(-18℃)
名称等を遠沈管に記入
大阪健康安全基盤研究所へ送付



遠沈管 50 mL 2345-050-MYP

<https://axelaser1.co.jp/asone/d/61-9715-33/>

抗菌薬解析

大阪医科薬科大学・薬学部衛生化学研究室にて

固相抽出による前処理

濃縮乾固・定容

UPLC-MS/MSによる
多成分同時解析

冷蔵庫で解凍

Waters Andrew+ ピペティングロボット
Extraction+ 自動固相抽出装置

EYELA MG-3100・MGS-HEAT2
システム・インストルメンツ
MODEL 05BL

Waters UPLC-MS/MS Acquity TQD

Waters OASIS HLB

国内外で環境水中からの検出報告例がある代表的な抗菌薬と、医療現場で使用されている代表的な成分、獣医・畜産領域でも共通して用いられている成分をあわせて対象とする予定。

- | | | |
|------------------------|----------------------|-------------------|
| ● Ampicillin | ● Ceftriaxone | ● Levofloxacin |
| ● Azithromycin | ● Chlorotetracycline | ● Minocycline |
| ● Benzylpenicillin | ● Ciprofloxacin | ● Oxytetracycline |
| ● Cefdinir | ● Clarithromycin | ● Tetracycline |
| ● Cefpodoxime | ● Doxycycline | ● Vancomycin |
| ● Cefpodoxime proxetil | ● Enrofloxacin | |

地方衛生研究所より提供された、国内29自治体の下水処理場(45採取場所)の放流水中に内在する抗菌薬濃度の解析を予定

図3 自治体の下水処理場放流水中に内在する抗菌薬の全国的な規模での調査