

ワンヘルスアプローチに基づく抗微生物薬と薬剤耐性微生物の実態把握に関する研究

神田 真軌^a, 小林 甲斐^b, 西野 由香里^c, 大場 由実^d, 中島 崇行^d, 栗田 翔^e,
久保田 寛顕^b, 有吉 司^b, 神門 幸大^b, 吉田 勲^b, 安中 めぐみ^b, 水戸部 森歌^b, 長谷川 乃映瑠^b,
尾畑 浩魅^c, 畠山 薫^f, 福井 理恵^c, 市川 めぐみ^c, 三橋 華子^c, 黒田 寿美代^c, 山崎 華恵子^c,
井田 美樹^c, 小林 真紀子^c, 上原 さとみ^c, 高橋 由美^c, 高林 晃子^c, 浅山 睦子^c,
吉川 聡一^d, 林 洋^d, 松島 陽子^g, 小池 裕^d, 林 もも香^d, 永野 智恵子^d,
富澤 早苗^d, 八巻 ゆみこ^h, 上條 恭子^d, 山本 和興^d, 高田 朋美^d, 小鍛冶 好恵^d,
渡邊 趣衣^h, 志良堂 裕子^d, 大澤 佳浩^d, 小山 彩音ⁱ, 野口 舞子^d,
大貫 文^j, 岡 優香^j, 山崎 貴子^k, 相原 三菜子^j, 渡邊 喜美代^j, 鈴木 淳也^j, 小田 智子^c,
鈴木 淳^b, 横山 敬子^l, 大塚 健治^h, 横山 知子^a, 新藤 哲也^a, 中嶋 順一^c, 木下 輝昭^j,
貞升 健志^l, 笹本 剛生^m, 猪又 明子ⁿ

令和3-5年度に実施した重点研究「ワンヘルスアプローチに基づく抗微生物薬と薬剤耐性微生物の実態把握に関する研究」の概要を報告する。本研究は、世界的に人類の健康への大きな脅威となっている薬剤耐性（AMR）の対策への一環として、コンパニオンアニマル、食品、農産、畜産及び環境における抗微生物薬と薬剤耐性微生物の存在実態の両面からアプローチすることを目的とした。5つの個別課題を進めたところ、次の成果を得た。薬剤耐性菌の存在実態に関しては、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌株の分子疫学的解析より、ヒト流行株と近縁の株がイヌ、ネコ、河川水よりを検出することを示した。これにより、ヒトから排出された耐性菌が、ペットや河川へ伝播するといった関連性が窺えた。一方、食品由来株は、遺伝子型が異なっていた。また、耐性獲得や伝播の仕方について一考察を得た。抗微生物薬の実態については、AMRを獲得するよりも低い濃度の残留の有無を判定し、かつ精確にその量を測定出来るようにすることを試みた。畜産食品中の高極性抗微生物薬、農産食品及び環境水中農業用殺菌剤に対し、各々の試料に適した高感度かつ高精度な分析法開発を行った。開発法の応用として、食品分野では日常検査への導入を試み、環境分野では浄水処理の挙動の解明を行った。成果の発信により、WHOが提唱するワンヘルスアプローチに基づく薬剤耐性対策の強化の一助となった。

キーワード：薬剤耐性，ワンヘルスアプローチ，ESBL産生大腸菌，高極性抗微生物薬，農業用殺菌剤，コンパニオンアニマル，畜産食品，農産食品，環境水，浄水処理，ゲノム解析，LC-MS/MS

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部

169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^d 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

^e 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

^f 芝浦食肉衛生検査所

108-0075 東京都港区港南2-7-19

^g 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

^h 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科

ⁱ 市場衛生検査所

135-6601 東京都江東区豊洲6-6-1

^j 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

^k 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科

^l 東京都健康安全研究センター微生物部

^m 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部

ⁿ 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

はじめに

1980年代以降、医療や獣医療における抗微生物薬の不適切な使用のため、薬剤耐性菌が出現し、人類の健康への大きな脅威となっている。2015年5月に世界保健機関総会で薬剤耐性に関するグローバルアクションプランが採択され、人と動物等の保健衛生の一体的な推進（ワンヘルスアプローチ）の強化が求められた。わが国では、2016年4月5日、初めての薬剤耐性対策アクションプランが決定され、2020年までの5年間に協働して集中的に取り組むべき対策がまとめられた。これについてヒト医療において対策が先行してきたが、抗微生物薬の使用量は畜産・農産現場で約6割を占めるため、畜産・畜産分野での対策も注目されている。

センターでは、これまでに畜産食品中や環境水中の抗微生物薬や薬剤耐性微生物の存在実態について、検出法を確立して実態調査に取り組み一定の成果を上げた¹⁾。しかし、畜産物中抗微生物薬の残留検査法についてはさらなる改良が必要であった。加えて近年、果実や野菜生産等の農業分野やコンパニオンアニマルへの抗微生物薬の使用等、規制が及びにくい分野への抗微生物薬の使用量が増加している。しかし、これらの分野においては、薬剤耐性菌や抗微生物薬の存在実態に関する知見は著しく不足しており、その把握と効果的な対策が強く求められている。そこで、抗微生物薬が使用される分野を「臨床分野」、「畜産分野」及び「農産分野」としてそれぞれの分野における薬剤耐性微生物の存在実態を解明すること、「畜産分野」と「農産分野」においては生産品である畜産物及び農産物中の抗微生物薬の残留実態を把握し、薬剤の適正使用が実践されているかを調査することとした。また、環境汚染の観点から環境水中の残留薬剤の実態把握を進めた。以下の5名の担当者が各個別研究課題について取り組んだ。

1. 小林甲斐：ヒト及びコンパニオンアニマルにおける薬剤耐性菌の実態把握及びゲノム解析
2. 西野由香里：食品及び環境由来薬剤耐性菌の分離状況と疫学解析に関する研究
3. 大場由実：畜産食品中における高極性抗微生物薬の新規試験法開発と残留実態調査
4. 中島崇行：農産食品中抗微生物薬の分析法開発と残留実態の把握
5. 栗田 翔：環境水中における農業用殺菌剤等の存在実態及び浄水処理等による挙動解明

最終的に、我々を取り巻く生活環境における総体的な薬剤耐性微生物と抗微生物薬の存在実態の解明により、ワンヘルスアプローチの一助となることを目標とした。

文 献

- 1) 斎藤育江，大場由実，木下輝昭，他：東京健安研7年報，72, 43-55, 2021.

個別研究課題の内容と成果の概要

1. ヒト及びコンパニオンアニマルにおける薬剤耐性菌の実態把握及びゲノム解析

1) 背景と目的

ヒト臨床分野において、病原菌の薬剤耐性化は重要な問題であり、原因となる耐性遺伝子の種類や検出数の分布も年々変化している。中でも、基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌はWHO及び日本版の「対策の優先度が高い病原菌リスト」の中で、最も重要なランクに位置付けられている¹⁾。さらに、ヒトと密接な関係にあるイヌ・ネコをはじめとするコンパニオンアニマルにおいても、薬剤耐性対策アクションプランではヒトと動物の垣根を越えて動向を把握する体制の強化が必要とされている²⁾。しかし、コンパニオンアニマルにおける菌の耐性化の状況や系統関係については不明な点が多い。本研究では、ヒト及びイヌ・ネコから分離された菌株の薬剤感受性試験及び遺伝子解析を実施することによって薬剤耐性の実態を把握し、特にイヌ・ネコ由来ESBL産生大腸菌の分子疫学的な特徴を理解することを目的とした。

2) 内容

(1) ヒト由来耐性菌株の遺伝子型の分布 積極的疫学調査において令和3年4月から令和5年11月までの間にカルバペネマーゼ耐性腸内細菌目細菌（CRE）、薬剤耐性アシネトバクター（MDRA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）として搬入された各170, 5, 35株の薬剤耐性遺伝子の検出を行った。CREで検出数が20回以上であった耐性遺伝子型は、多い順にSHV型、TEM型、CTX-M-1 group、IMP-1型であった。CREの内の大腸菌において、ESBL遺伝子として重要なCTX-M型では、CTX-M-1 groupとCTX-M-9 groupを認めた。MDRAからはOXA-51-likeが、VREからは*vanB*を最も多く検出した。こうした傾向は当センターにおける過去の調査結果と同様であった。

(2) イヌ・ネコ由来耐性菌株の耐性傾向 動物由来感染症調査事業の動物病院サンプリング調査において、令和3年4月から令和5年12月までの間に分離された大腸菌368株に対して16薬剤（ピペラシリン、アズトレオナム、セファゾリン、イミペネム、メロペネム、セフトキシム、ゲンタマイシン、セフトジウム、アミカシン、セフェピム、ミノサイクリン、ホスホマイシン、スルファメトキサゾール・トリメトプリム、セフトキシム、スルパクタム・アンピシリン、レボフロキサシン）の耐性状況を調査した。その結果、耐性率が上位の薬剤は順に、ピペラシリン（29.1%）、レボフロキサシン（16.0%）、セファゾリン（15.8%）、セフトキシム（14.4%）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム（11.1%）及びセフトキシム（9.8%）であった。本調査においてはイミペネム、メロペネム耐性の株は検出されなかった。各薬剤の耐性率をイヌとネコの間で比較したところ、ほとんど差は認められなかった。また、耐性率の高い病院ではESBL産生大腸菌の

割合が高く、本菌による耐性化への影響が大きい傾向が見られた。

(3) イヌ・ネコ由来ESBL産生大腸菌のゲノム解析 都内動物病院及びペットショップの調査において得られたESBL産生大腸菌82株を供試し、次世代シーケンサーから取得したデータより全ゲノム解析を行った。βラクタマーゼ遺伝子はCTX-M-1 group (CTX-M-15:12株)とCTX-M-9 group (CTX-M-14:38株, CTX-M-27:11株)が多く認められた。ヒトの臨床上重要な遺伝子型 (Sequence Type: ST) とされるST131は18株 (動物病院由来17株, ペットショップ由来1株), ST38は7株 (全て動物病院由来株) 検出し, その他のSTは57株 (動物病院由来16株, ペットショップ由来41株) であった。ST131及びST38のSNPs系統解析の結果, ほとんどがヒト臨床株と近縁であった (図1)。また, ペットショップ由来株はヒト臨床株との関連性は低かったものの, 一定数が分離されており, ペットの流通段階で本菌が常在化している可能性が示唆された。

ST131はβラクタマーゼ遺伝子を染色体ゲノム上において1つのみ保有し, 挿入箇所が株によって異なっていたのに対し, ST38は同遺伝子を1-3コピー保有し全ての株に共通する挿入箇所が存在した。これらの結果から, ヒトとイヌ・ネコ間でESBL産生大腸菌が伝播している可能性, 及び株の遺伝子型によって耐性遺伝子の伝播や獲得メカニズムに違いがあることが示唆された。

3) 成果と活用

本結果の一部について, 当センターの微生物検査情報, 東京都動物由来感染症検討会及び学会発表等を通じて都民や獣医師等に情報提供を行った。

文 献

- 1) AMED感染症創薬産学官連絡会: AMR創薬研究で標的とする病原菌リスト (2021年版), <https://id3catalyst.jp/apid/list.html> (2024年7月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 2) 厚生労働省: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン, <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html> (2024年7月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)

発 表 実 績

- 1) 山崎翔子, 小林甲斐, 久保田寛顕, 他: 東京都小笠原村におけるサルモネラによる感染症及び食中毒予防のための取組, 令和3年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会 (Web), 2021.
- 2) 小林甲斐, 久保田寛顕, 神門幸大, 他: 都内のイヌ及びネコから分離された基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生大腸菌のゲノム解析, 第165回日本獣医学学会学術集会 (Web), 2022.
- 3) 小林甲斐, 久保田寛顕, 神門幸大, 他: 都内のイヌ及びネコから分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌のゲノム解析, 第34回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会 (神奈川), 2022.
- 4) 鈴木康規, 久保田寛顕, 小林甲斐, 他: 野生鳥獣糞便からの黄色ブドウ球菌及び β ラクタム系抗菌薬耐性腸内細菌目細菌の分離とゲノム解析, 第43回日本食品微生物学会学術総会 (東京), 2022.
- 5) 小林甲斐, 久保田寛顕, 神門幸大, 他: 都内のイヌ・ネコ由来 CTX-M 型 β ラクタマーゼ産生大腸菌のゲノム解析, 第166回日本獣医学学会学術集会 (Web), 2023.
- 6) 鈴木康規, 久保田寛顕, 小林甲斐, 他: 野生獣糞便並びに市場流通シカ肉からの β ラクタム系抗菌薬耐性腸内細菌目細菌の分離とその特性, 第44回日本食品微生物学会学術総会 (大阪), 2023.
- 7) 石塚桃子, 久保田寛顕, 小林甲斐, 他: 野生獣糞便並びに市場流通シカ肉からの黄色ブドウ球菌の分離と分離菌株の特性, 第44回日本食品微生物学会学術総会 (大阪), 2023.
- 8) 神門幸大, 畠山 薫, 小林甲斐, 他: 都内のと畜場に搬入されたブタの*Escherichia albertii*検出状況と遺伝子解析, 東京健安研セ年報, 73, 45-50, 2022.
- 9) Suzuki, Y., Kobayashi, K., Kubota, H., et al.: Isolation and genetic characterization of *Staphylococcus aureus* from wild animal feces and game meats, *Folia Microbiol.*, 69, 347-360, 2024. doi: 10.1007/s12223-023-01071 (2024年7月30日現在)

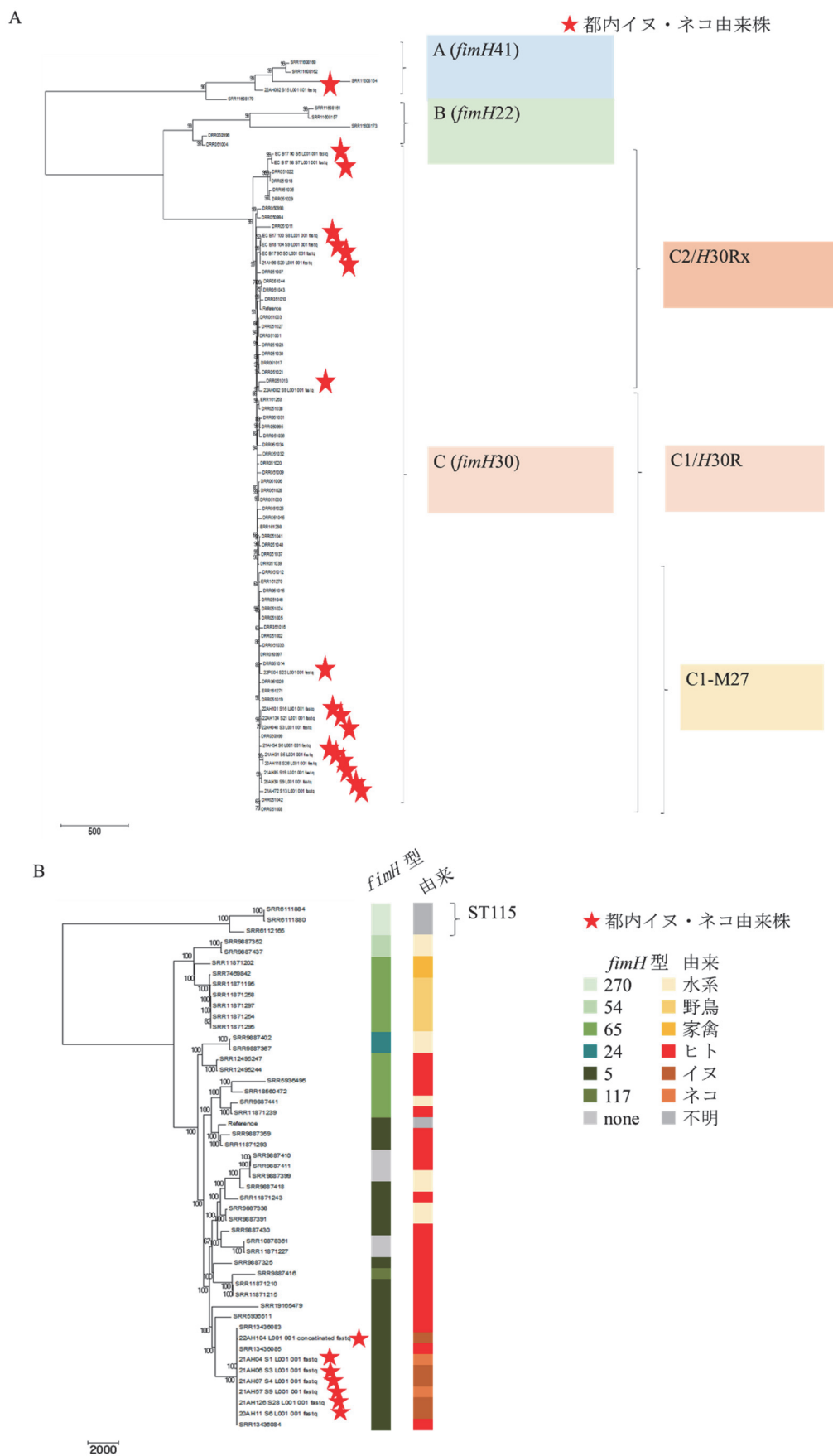


図1. 都内イヌ・ネコ由来ESBL産生大腸菌における全ゲノムSNPs系統樹

A : ST131 (供試株18株+データベース株64株より作成)

B : ST38 (供試株7株+データベース株39株+外群ST115 3株より作成)

2. 食品及び環境由来薬剤耐性菌の分離状況と疫学解析に関する研究

1) 背景と目的

近年、薬剤耐性菌の増加が国際的な課題となっている。ヒト、動物、食品及び環境に由来する薬剤耐性菌の問題について、分野横断的な取組が必要とされているが、食品や環境分野における薬剤耐性菌の実態の把握は不十分である。

そこで本研究では、食品及び環境における薬剤耐性菌の汚染実態調査と、分離された薬剤耐性菌の解析を行うことにより、薬剤耐性菌対策の基礎資料とすることを目的とした。

2) 食品及び環境における薬剤耐性微生物の汚染実態調査

食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす可能性のある薬剤耐性菌（細菌及び真菌）について、都内流通食品、河川水及びチューリップ球根における汚染実態調査を行った。

(1) 細菌 2021年に都内に流通した食品（鶏肉：56検体、牛肉：34検体、豚肉：58検体、その他食肉：4検体、魚介類：51検体、野菜：55検体）及び、都内を流れる多摩川（支流を含む）で2021年の5月、8月及び11月にそれぞれ11カ所で採水した河川水（33検体）を用いて、薬剤耐性菌の汚染実態調査を行った。検体を緩衝ペプトン水で増菌培養後、選択分離培地を用いて、基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌、コリスチン（CL）耐性菌、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の分離を行った。その結果、ESBL産生菌は、食品では鶏肉34検体（60.7%）、牛肉3検体（8.8%）、豚肉2検体（3.4%）から、環境（河川水）では21検体（63.6%）から分離された（表1）。CL耐性菌は、食品では鶏肉12検体（21.4%）、豚肉1検体（1.7%）、その他食肉1検体（25.0%）から、環境（河川水）では13検体（39.4%）から分離された。CREは、野菜1検体（1.8%）から分離された。MRSAは鶏肉6検体

（10.7%）、豚肉5検体（8.6%）、野菜1検体（1.8%）から分離された。

(2) 真菌 食品（かんきつ類：28検体、その他の果物：2検体、雑穀：48検体、野菜：73検体、食肉：18検体、加工食品：459検体）におけるアゾール系抗真菌剤耐性 *Aspergillus* 属菌の汚染実態調査を行った。その結果、かんきつ類1検体（3.6%）からボリコナゾール耐性 *Aspergillus tubingensis* が分離されたのみであった。よって、食品はアゾール耐性 *Aspergillus* の汚染率が低いことが明らかとなった。そこで、環境からアゾール耐性 *Aspergillus fumigatus*（ARAF）が最も多く分離されているチューリップ球根の国内の汚染状況を調査した。2021年に購入したチューリップ球根134個（オランダ産42個、国産92個）から *A. fumigatus* が38株分離された。そのうちオランダ産は15株中4株、国産は23株中6株がARAFであり、アゾール耐性株の分離率はオランダ産及び国産ともに約26%であった。これらのアゾール系薬剤に対する Minimum Inhibitory Concentration（MIC）値は、イトラコナゾールが0.5–4 µg/mL、ボリコナゾールが8 µg/mL以上、ポサコナゾールが2–4 µg/mLであり、薬剤感受性の傾向はオランダ産と国産で同じであった。

3) 食品由来薬剤耐性菌の解析

(1) 食肉由来カンピロバクターの薬剤感受性及びマクロライド耐性株の解析 2010–2019年に食肉から分離された *Campylobacter jejuni* 631株及び *Campylobacter coli* 152株について、エリスロマイシン（EM）及びシプロフロキサシン（CPFX）の薬剤感受性試験を行った。その結果、*C. jejuni* 6株（1.0%）株及び *C. coli* 55株（36.2%）がEM耐性、*C. jejuni* 262株（41.5%）及び *C. coli* 99株（65.1%）がCPFX耐性であった（表2）。また、EMに耐性を示した61株の耐性機序の解析を行ったところ、すべての株で23S rRNA 遺伝子のA2075G変異が確認された。

表1. 食品及び河川水における薬剤耐性菌（細菌）の分離状況

由 来		検体数	陽性検体数 (%)			
			基質特異性拡張型 βラクタマーゼ 産生菌	コリスチン 耐性菌	カルバペネム 耐性腸内細菌目 細菌	メチシリン耐性 黄色ブドウ球菌
食 品	鶏肉	56	34 (60.7)	12 (21.4)	0 (0)	6 (10.7)
	牛肉	34	3 (8.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	豚肉	58	2 (3.4)	1 (1.7)	0 (0)	5 (8.6)
	その他食肉	4	0 (0)	1 (25.0)	0 (0)	0 (0)
	魚介類	51	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	野菜	55	0 (0)	0 (0)	1 (1.8)	1 (1.8)
環 境 （河川水）		33	21 (63.6)	13 (39.4)	0 (0)	0 (0)

表 2. 食肉由来カンピロバクターの薬剤感受性

菌種	由来	株数	耐性株数 (%)	
			エリスロマイシン	シプロフロキサシン
<i>Campylobacter jejuni</i>	鶏肉	国産	528	0 (0)
		輸入	42	6 (14.3)
	牛肉	国産	57	0 (0)
		輸入	2	0 (0)
	豚肉	国産	2	0 (0)
	合計	631	6 (1.0)	262 (41.5)
<i>Campylobacter coli</i>	鶏肉	国産	40	6 (15.0)
		輸入	18	9 (50.0)
	牛肉	国産	22	3 (13.6)
		輸入	1	0 (0)
	豚肉	国産	71	37 (52.1)
	合計	152	55 (36.2)	99 (65.1)

(2) 食品由来 MRSA の解析 2018–2021 年に食肉及び魚介類から分離された MRSA 47 株（国産鶏肉由来；10 株，輸入鶏肉由来；1 株，輸入牛肉由来；3 株，国産豚肉由来；5 株，輸入豚肉由来；21 株，国産魚介類由来；2 株，輸入魚介類由来；4 株，国産野菜由来；1 株）について，Multi-Locus Sequence Typing (MLST)，SCCmec 型別等の解析を実施した。

その結果，国産鶏肉由来株は Clonal Complex (CC) 1-SCCmecIV または CC8-SCCmecIV で，すべての株が市中感染型 (CA) -MRSA で認められる遺伝子型であった。国産鶏肉，国産豚肉，国産魚介類及び輸入牛肉由来の 9 株は，CC8-SCCmecIV であり，病原因子である Toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) が陽性，薬剤感受性試験でゲンタマイシン耐性を示し，国内流行株である CA-MRSA/J の特徴と一致した。一方，輸入豚肉由来株では多くの株が CC398-SCCmecV で，家畜関連型 (LA) -MRSA として知られる遺伝子型と一致した。また，輸入魚介類由来株では多様な遺伝子型を示した。本調査の結果から，食品の種類及び原産国で異なる遺伝子型の MRSA が分離されることが示された。

4) 食品及び環境由来 ESB� 産生大腸菌の解析

ヒトでの ESB� 産生大腸菌による感染症では，フルオロキノロン耐性・系統発生群 B2-血清型 O25-ST131 (B2-O25-ST131) 株の流行が報告されている。一方，食品や環境中の ESB� 産生大腸菌の特徴については不明である。そこで，食品及び河川水から分離された ESB� 産生大腸菌を対象に調査し，その特徴について比較を行った。

(1) B2-O25-ST131 株の検出状況 2019–2020 年に分離された ESB� 産生大腸菌（食品由来 188 株及び河川水由来 150 株）について，PCR による B2-O25-ST131 株の検出法を用いて¹⁾解析を行った。

その結果，B2-O25-ST131 株は，食品（国産鶏肉）由来 1 株 (0.5%) と河川水由来 44 株 (29.3%) を検出した。B2-O25-ST131 株が保有する ESB� 遺伝子は，食品由来株は *bla*CTX-M-1g (1 株)，河川由来株では *bla*CTX-M-1g (17 株)，*bla*CTX-M-9g (24 株)，*bla*CTX-M-1g/9g (2 株) 及び *bla*CTX-M-8g (1 株) であった。また，CPFX の薬剤感受性試験を行った結果，食品由来 B2-O25-ST131 株は CPFX 感受性であったが，河川水由来 B2-O25-ST131 株では 43/44 株 (97.7%) が CPFX 耐性であった。

(2) ESB� 産生大腸菌株の遺伝子解析 ヒト由来 B2-O25-ST131 株が保有する主な ESB� 遺伝子として，*bla*CTX-M-15 (*bla*CTX-M-1g) や *bla*CTX-M-27 (*bla*CTX-M-9g) が報告されている。そこで，食品と河川水から分離された *bla*CTX-M-1g 保有株及び *bla*CTX-M-9g 保有株について，ESBL 遺伝子の解析を行った。

ESBL 遺伝子型は，*bla*CTX-M-1g 保有株においては，食品由来株では CTX-M-55 が 56% (28/50 株) と最も多かった。また，食品由来 B2-O25-ST131 株は CTX-M-1 であった。一方，河川水由来株では，CTX-M-15 が 62.8% (27/43 株) と多く，特に B2-O25-ST131 株は 80% (12/15 株) であった。*bla*CTX-M-9g 保有株においては，食品由来株では CTX-M-14 が 65.5% (19/29 株) と多かった。河川由来株では CTX-M-14 (49.0%；25/51 株) と CTX-M-27 (45.1%；23/51 株) が多く，そのうち B2-O25-ST131 株では CTX-M-27 が 82.4% (14/17 株) であった。S1-PFGE-Southern blotting により解析を行ったところ，*bla*CTX-M-1g 保有株では，食品由来株では ESB� 遺伝子をプラスミド上に保有する株が，河川由来株では染色体上に保有する株が多かった。*bla*CTX-M-9g 保有株では，食品由来株では ESB� 遺伝子を染色体上に保有する株が，河川由来株ではプラスミド上に保有する株が多かった。

本調査の結果から，食品由来株と河川水由来株では，ESBL 遺伝子の特徴に違いがみられることが確認された。また，河川由来 B2-O25-ST131 株は，ヒト流行株と関連している可能性が示唆された。

5) 成果の活用と今後の課題

都内流通食品と河川水における薬剤耐性菌の汚染実態調査により，鶏肉及び河川水での ESB� 産生菌の陽性率が高いことが明らかとなった。また，食品由来 MRSA や河川水由来 ESB� 産生大腸菌の一部の株で，ヒトにおける流行株との関連が示唆されたが，実態の解明には至っていない。食品及び環境から分離される薬剤耐性菌については明らかになっていないことが多いため，今後も継続したデータ収集や詳細な解析が必要と考えられる。

文 献

1) Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., et al.: *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 274–277, 2009.

発 表 実 績

1) 西野由香里, 下島優香子, 福井理恵, 他: 東京都で流通した食肉におけるカンピロバクターの分離状況と薬剤感受性及びマクロライド耐性株の解析, 第42回日本食品微生物学会学術総会 (Web), 2021.

2) 西野由香里, 下島優香子, 福井理恵, 他: 都内流通食品におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分離状況及び分離株の解析, 第43回日本食品微生物学会学術総会 (東京), 2022.

3) 上原さとみ, 萩原大祐: 国産チューリップ球根のアゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* 分離状況, 第66回日本医真菌学会総会・学術集会 (岐阜), 2022.

4) 西野由香里, 福井理恵, 市川めぐみ, 他: 食品及び河川水から分離された基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の解析, 第44回日本食品微生物学会学術総会 (大阪), 2023.

5) 西野由香里, 下島優香子, 福井理恵, 他: 東京都で流通する食肉における *Campylobacter jejuni/coli* の分離状況と薬剤感受性及びマクロライド耐性株の解析 (2010–2019), 食衛誌, **64**, 185–190, 2023.

6) 西野由香里, 福井理恵, 黒田寿美代, 他: 都内流通食肉における基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 及び AmpC 型 β ラクターマーゼ産生大腸菌の検出状況, 東京健安研七 年 報, **74**, 35–41, 2023.

7) Uehara, S., Takahashi, Y., Iwakoshi, K., et al.: Isolation of azole-resistant *Aspergillus* spp. from food products, *Medical Mycology*, **62**, myae026, 2024.

doi: 10.1093/mmy/myae026 (2024 年 7 月 30 日現在)

3. 畜産食品中における高極性抗微生物薬の新規試験法開発と残留実態調査

1) 背景と目的

畜産分野では、抗微生物薬の使用量はヒト医療の約2倍で、販売量の6割を占め、乱用も問題になっている。しかし実際、どのような薬剤が使用されているかは不明である。それを把握し、薬剤耐性対策に活用するワンヘルスアプローチの一助とするためには、畜産食品中に残留する抗微生物薬の調査が有用である。センターでは、テトラサイクリン系抗生物質等の抗微生物薬について試験法開発と都内に流通する畜水産食品の検査を行っている。平成30年度から3年間は、 β ラクタム系抗生物質、サルファ剤、キノロン剤について、細菌学的測定とLC-MS/MS測定を併用する試験法を開発したり。しかしながら、 β ラクタム系のうちカルバペネム (CP) 系抗生物質は、非常に高極性のため、妥当性ガイドライン上必要な真度や分析精度が十分に得られなかった。そこで本研究では、精確に定量可能な試験法への改良を行った。併せて、同様に高極性で試験法確立が困難なアミノグリコシド (AG) 系抗生物質等についても検討を行った。最終的に、汎用性、頑健性に優れた手法として行政検査に導入し、持続的なモニタリングを可能とすることを目的とした。

2) CP系抗生物質の新規分析法開発

分析対象薬剤として、前重点研究¹⁾では分析が困難であったCP系に環境・ヒト血漿中で分析事例のあるエルタペネムを追加し²⁾、5薬剤を選定した (表3, 1))。CP系抗生物質は非常に高極性かつ溶液の液性や熱に不安定であることから、分析条件及び前処理条件の各工程における最適化を行い、新規分析法 (CP法) を構築した。さらに、開発した試験法を用いて、汎用性を高めるために他系統の薬剤への適用拡大を目指し、改良を加えた。

表 3. 畜産食品中における新規試験法開発の分析対象薬剤

系統名	薬剤名	系統名	薬剤名
1) β ラクタム系薬剤		2) アミノグリコシド系薬剤	
ペニシリン系	アモキシシリン, アンピシリン, オキサシリン, クロキサシリン, ジクロキサシリン, ナフシリン, ペニシリンV, ベンジルペニシリン	アミカシン, アプラマイシン, カナマイシン, ゲンタマシリン (C1, C1a, C2), シソマイシン,	
セファロスポリン系	セファゾリン, セファピリン, セファレキシン, セファロニウム, セフォペラゾン, セフキノム, セフチオフル, セフロキシム	ジヒドロストレプトマイシン, ストレプトマイシン, スペクチノマイシン, トブラマイシン, ネオマイシン, ネチルマイシン, ハイグロマイシン,	
カルバペネム系	イミペネム, エルタペネム, ドリペネム, ピアペネム, メロペネム	パロモマイシン, リボスタマイシン	
ペネム系	ファロペネム		

(1) CP法の分析条件及び前処理条件の検討 CP系抗生物質は汎用されている逆相系カラムには保持が弱いことから、分析カラム、移動相、グラジエント等のHPLC条件を検討した。14種類の分析カラムによる保持及び分離について比較した。良好な結果が得られた6種類で全ての薬剤が相互に分離でき、保持されることを確認した。移動相条件の検討では、添加試薬の種類及びその濃度、有機溶媒の組み合わせを比較し、各カラムに最適な移動相条件を設定した。各薬剤の相互分離が可能となり、全薬剤を高感度かつ5回連続注入による感度の再現性がCV 2%以下の高精度なHPLC条件を構築することができた。最終的にLC-MS/MS測定時に特有の課題となる最終試験溶液のマトリクス効果を鑑みて、InertSustain AQ-C18を用いることとした(図2)。

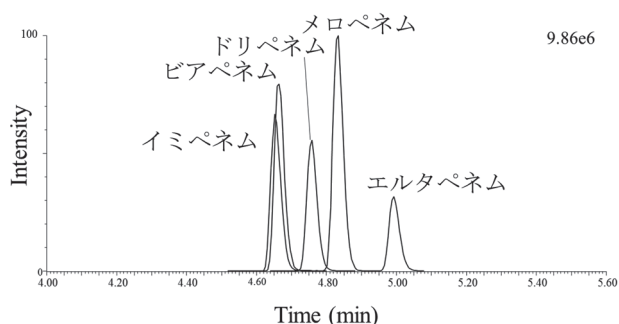


図2. カルバペネム系抗生物質の標準溶液のMRMクロマトグラム
(0.01 µg/mL 3 µL 注入)

次に、前処理条件の検討を行った。第一に、9種類の抽出溶媒を比較し、加温による薬剤の分解を防ぐため、溶媒置換が不要で直接LC-MS/MS測定が可能な20%アセトニトリルを採用した。第二に、抽出溶媒に添加する酸の種類及び最終試験溶液中の濃度を検証した。酸性による薬剤の分解を最小限に抑えることができるが、タンパクと最終試験溶液の白濁の除去も可能な酢酸の濃度 0.05%を選択した(図3)。第三に、7種類の固相カラムを用いて精製を検討した。脂質等は除去し、CP系抗生物質は保持されず全量溶出する逆相系固相カラムのうち、操作が簡便なOasis PRiME HLBを採用した。第四に、高感度機種での測定である利点を生かし、測定上のMRMトランジションの再選択を行い、定性・定量の精度を高めた。

開発試験法を用いて、2試料(牛乳及び生乳)、2濃度において、妥当性評価を実施した。全5薬剤で、ガイドラインの基準を満たしていた。定量下限値は0.001 µg/gと設定した。一律基準値の1/10濃度まで分析が可能な信頼性の高い試験法を開発した。

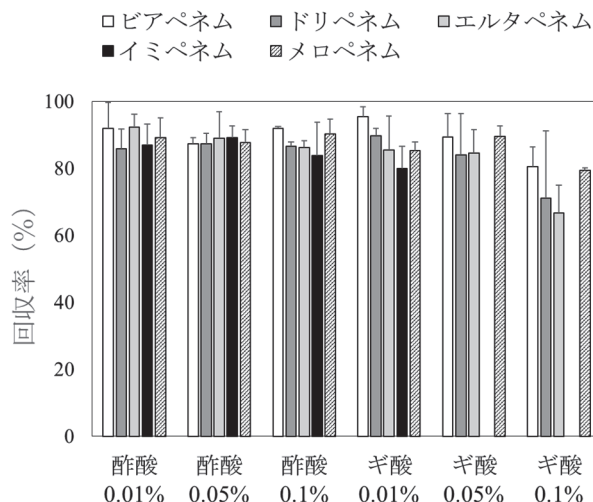


図3. カルバペネム系抗生物質の前処理における徐タンパクに用いる酸の種類と濃度の最適化

(2) 他系統のβラクタム系抗生物質への適用拡大 より多くの薬剤を同時分析できるように、CP法の改良を行った。対象薬剤は、牛の乳房炎等の治療に使用される同じβラクタム系であるペニシリン系、セファロsporin系抗生物質及びペネム系であるファロペネムの計22薬剤とした(表3, 1)。

改良点として、LC-MS/MSへの注入量を変更することで、クロキサシリン、ファロペネム等についても十分な測定感度が得られ、測定値のばらつきを抑えた。次に、ベンジルペニシリン等の低回収率の要因である精製用固相カラムの最適化を行った。InertSep 20Hを採用することで、全薬剤で良好な回収率が得られた。改良したCP法を用い、2試料(牛乳及び生乳)において妥当性評価試験を実施したところ、全22薬剤でガイドラインの基準を満たした。定量下限値は0.001 µg/gと設定し、高感度かつ高精度な分析を実現できた。

改良したCP法を薬剤の同定・定量が困難であった検査検体(生乳)に適用した。供した検体は、細菌学的試験法³⁾でβラクタム系抗生物質の残留が推定されたものの、ペニシリナーゼ試験及びβラクタム系を検出するイムノクロマト法では陰性を示した薬剤の同定が困難な検体であった。改良したCP法を適用した結果、セファゾリンを検出し、その残留量が残留基準値未満であることを判定できた。今までは数日かかっていた同定・定量を、改良したCP法では約半日で判定でき、イムノクロマト法では検出できない濃度までを高精度に検出可能であった。さらに、残留実態調査を継続し、生乳16検体、牛乳19検体に適用し、いずれの薬剤も検出しなかった。

3) AG系抗生物質の新規分析法開発

分析対象薬剤として、家畜への適用や使用履歴を考慮し、14薬剤を選定した(表3, 2)。AG系抗生物質は、その分子構造中の含有窒素数により化学的性質が大きく異なるという特徴があるため、細菌学的測定法及び理化学的測定法ともに、多剤を同時に測定することが困難である。さらに従来法⁴⁾では、本研究における分析対象薬剤を網羅できない、前処理工程においてpH調整や固相カラム精製に時間を要し操作が煩雑である、検出感度が低い、食品によっては擬陽性を呈する等の課題がある。そこで、基準値レベルを十分に検出可能でかつ複数のAG系抗生物質に適用可能とするために分析法の構築を行った。

(1) 細菌学的測定条件の検討 試験菌には *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus megaterium* を用いた。金属イオンと栄養の少ない培地に菌を混釈して、試験平板を作成した。また、最終試験溶液のpHを従来法の7.5から8.5に変更した。以上により、対象14薬剤中12薬剤で、従来の20-50倍の高感度化を図ることができた。また、はちみつ試料由来成分による、擬陽性を呈さない方法となった。

(2) 前処理法の検討 課題であった結果判定の誤認を解決するため、スクリーニング検査で陽性を示した物質を迅速にAG系抗生物質と同定できる方法となるよう工夫した。すなわち、1回の前処理工程で調製した試験溶液を、原理の異なる細菌学的測定とLC-MS/MS測定の2つに適用可能となるよう検討を進めた。

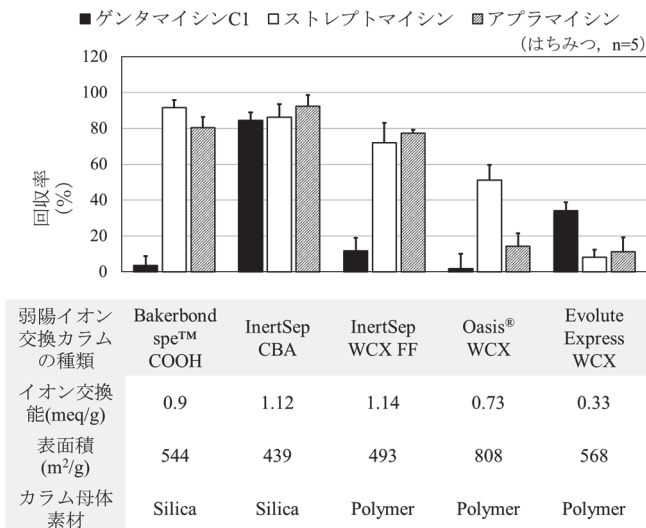


図4. アミノグリコシド系抗生物質の前処理における弱陽イオン交換カラムの最適化

第一に、従来法⁴⁾のBakerbond spe™ COOHを用い、薬剤の高回収率が得られる溶出液の種類を検討した。LC-MS/MS測定を可能とするために不溶性塩を含まず、細菌学的測定では試薬による擬陽性を示さない、1%ギ酸含有0.2 mol/Lギ酸アンモニウム溶液を採用した。第二に、5種類の弱陽

イオン交換カラムを検討した(図4)。溶出液の種類と溶出量を変えずに、同系統でも物性が異なり同時分析が難しいゲンタマイシン等の十分な回収率が得られたInertSep CBAを選択した。第三に、抽出溶液を検証した。はちみつに加えて他の畜産、農産食品からも抽出率が十分な2%トリクロロ酢酸溶液(pH 1)とした。分析精度を高める上で重要なpH調整には、微小電極のpHメーターを用いた。さらに、細菌学的測定に用いる試験溶液の最終pH調整に1 mol/Lトリス水溶液を用いることで、調整が容易となるとともに、明瞭な阻止円を得られるようになった。

4) 成果の活用と今後の課題

本研究では、これまで畜産分野で使用されていた薬剤に加えて、今後使用される可能性がある高極性がゆえに分析が困難な2系統の抗微生物薬について多剤一斉分析法を開発した。薬剤耐性菌の動向は日々変化するため、開発法の性能評価を実施したうえで、日常検査に導入し、2系統の抗微生物薬の残留検査を継続して、基礎データを集積し、AMR対策に活用していくことが重要である。また、固相カラムの種類や洗浄液、溶出液等の検討を進め、試料由来の夾雑成分を分離し、よりマトリクス成分の多い食肉及び水産食品等対象試料の拡大を図る。

文 献

- 1) 斎藤育江, 大場由実, 木下輝昭, 他: 東京健安研七 年報, **72**, 43–55, 2021.
- 2) Rehm, S., Rentsch, K.M.: *Clin. Chim. Act.*, **511**, 360–367, 2020.
- 3) 草野友子, 神田真軌, 鎌田国広, 他: 食衛誌, **45**, 191–196, 2004.
- 4) 草野友子, 神田真軌, 八巻ゆみこ, 他: 東京健安研七 年報, **54**, 142–145, 2003.

発 表 実 績

- 1) 大場由実, 林 洋, 永野智恵子, 他: LC-MS/MSによる乳中カルバペネム系抗生物質の分析条件の検討, (公社) 日本食品衛生学会第118回学術講演会(長崎), 2022.
- 2) 神田真軌, 林 洋, 小池 裕, 他: 残留アミノグリコシド系抗生物質検査へのバイオアッセイ改良法の導入に向けた取組, (公社) 日本食品衛生学会第118回学術講演会(長崎), 2022.
- 3) 大場由実, 永野智恵子, 吉川聡一, 他: LC-MS/MSを用いた乳中βラクタム系抗生物質の一斉分析法及び残留実態調査, 令和5年度第36回理化学研究部会総会・研究会(静岡), 2024.
- 4) Ohba, Y., Hayashi, H., Kanda, M., *et al.*: Simultaneous determination of five carbapenems, highly polar antibiotics, in milk by LC-MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A*, **41**, 151–161, 2024.

4. 農産食品中抗微生物薬の分析法開発と残留実態の把握

1) 背景と目的

農薬として出荷されている抗微生物薬は、ヒト用あるいは動物用を含めた国内全出荷量の約10%を占めている。ヒト用あるいは動物用医薬品として使用された抗微生物薬については、使用量の把握あるいは畜水産食品中への残留・移行量のモニタリングという形で管理されており、ワンヘルスアプローチの基、抗微生物薬の汚染・残留実態の把握に貢献している。その一方で、農薬として農産物に使用された抗微生物薬に関しては、使用量が追跡されておらず、かつ農産食品中の残留調査も行われていないことから使用における管理がなされていない。

その要因として、i) 農薬として使用される抗微生物薬は、化学的性状や構造の異なる複数の系統の薬剤が使用されており、他の農薬と同時に分析することが困難である点、ii) 農薬として適用のある農産食品が非常に多岐にわたっており、ひとつの食品に適した分析法を開発しても、異なる農産物に適用できない例が多い点、iii) 農業分野においても、ヒトや動物に使用される抗微生物あるいはその類似薬が使用されているという、認知そのものが低い点、等が挙げられる。

そこで本研究では、汚染・残留実態の把握されていない農産食品について、大規模な調査が可能となるような多系統同時分析法の開発を行ったので報告する。

2) 分析対象

AG系抗生物質として、ストレプトマイシン (SM)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、カスガマイシン (KM)、バリダマイシン (VM) を選定した。キノロン系として、オキシロニク酸、テトラサイクリン系抗生物質としてオキシテトラサイクリン (OTC) を選定した。

3) 測定条件の検討

すでに測定条件が確立しているオキシロニク酸とOTCについては、既報の条件¹⁾を採用し、本研究ではAG系抗生物質の測定条件の構築を行った。

第一に、LCカラムの検討を行った。ODS系のカラムとしてACQUITY UPLC HSS T3 (Waters)、極性の高い化合物の分析に向いている両性イオン系カラムとしてZIC-HILIC (Merck)、同じくアミド系カラムのInertSustain Amide (GLサイエンス) を用い、ピーク形状及び薬剤の保持について比較検討した。その結果、ACQUITY UPLC HSS T3では、水系移動相を100%にして薬剤の保持を最大にしても、ほとんど保持せずに1分未満で溶出した。両性イオンカラムのZIC-HILICでは、ギ酸-アセトニトリル系の移動相において、いずれの薬剤もピークを検出しなかった。一方、InertSustain Amideでは、SM及びDSMは、4分から5分にかけてのピーク幅約1分の、形状の悪いピークであったものの、いずれの薬剤も保持時間5分前後にピークを検出することが出来た。

第二に、薬剤の保持と溶出が可能なInertSustain Amideを用い、移動相に加える添加剤について検討を行った。水系移動相への添加剤として、0.1%ギ酸、0.5%ギ酸、10 mmol/L酢酸アンモニウム及び0.5%ギ酸含有10 mmol/L酢酸アンモニウムを比較し、それぞれの移動相使用時におけるピーク形状を評価した。その結果、KM及びVMについては、いずれの移動相でも対称でシャープなピークを得ることができたが、SM及びDSMはギ酸のみもしくは酢酸アンモニウムのみではLCカラムからの溶出が十分ではなく、ブロードなピークとなるもしくはピークが検出できず、0.5%ギ酸含有10 mmol/L酢酸アンモニウムを用いるとシャープなピークを得ることが出来た。そこで本研究では、水系移動相に0.5%ギ酸含有10 mmol/L酢酸アンモニウム、溶媒系移動相のアセトニトリルにも同じ濃度のギ酸を添加することとした。本結果は、1級アミンを複数持つSM等のLCカラムからの溶出が、ギ酸による薬剤の陽イオン化だけでは十分でなかったものの、アンモニウム塩を入れることで、カラムの固定相に保持された薬剤の置換が進み溶出が促進され、安定して測定できることとなった。

第三に、AG系抗生物質を高感度に測定するためのMSパラメータの検証を行った。検討は、最も感度に影響を与えるキャピラリー電圧と脱溶媒温度について行った。キャピラリー電圧については、0.5, 1, 2, 及び3 kVで各薬剤の相対感度を比較したところ、いずれの薬剤も電圧の上昇とともに感度が低下したため、0.5 kVを採用した。脱溶媒温度は、メーカーが推奨する600°C以内の4つの温度：300, 400, 500及び600°Cで比較し、いずれの薬剤においても温度の上昇とともに感度が上昇したため、600°Cを採用した。

さらに本検討の条件と既報の条件¹⁾を、カラムスイッチング機能を用いることで、1つのパイアル（標準溶液及び試験溶液）から2系統の測定が可能となった。これにより系統ごとに機器の準備を行う必要がなく、より簡便な測定条件を整備することができた。以上の検討を踏まえ、測定した標準溶液20 ng/mLのクロマトグラムを図5に示した。

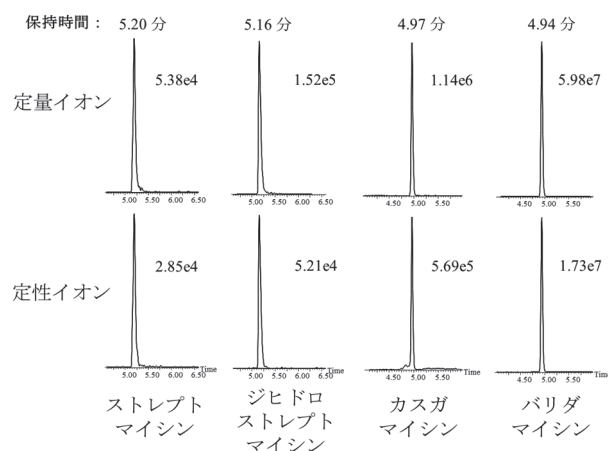


図 5. アミノグリコシド系抗生物質の標準溶液の MRM クロマトグラム (0.02 µg/mL 3 µL 注入)

4) 前処理条件の検討

今回対象とする薬剤は、高極性薬剤が多いことから、抽出液はマキルベン緩衝液 (pH 7, 0.1 mol/L EDTA含有) を用いることとし、本検討では主にAG系抗生物質を保持・溶出させつつ、オキシリニック酸やOTCを同時分析できる固相抽出法に焦点を当てた。

(1) 対象薬剤の保持・溶出 対象薬剤について、逆相系固相InertSep PLS-3 (GLサイエンス)、強陽イオン交換系固相InertSep MCX-FF (GLサイエンス)、弱陽イオン交換系固相InertSep MC-2及びInertSep WCX-FF (GLサイエンス) への保持・溶出効率について比較検討した。検討は、グレープフルーツを用いマキルベン緩衝液20 mLで抽出した溶液に、標準溶液を加えた溶液を負荷液とし、それぞれの固相からの溶出が最大となる溶液を用いた。

その結果、InertSep PLS-3ではAG系抗生物質の保持が全くできず、オキシリニック酸とOTCの保持・溶出のみしか確認することができなかった。一方、InertSep MCXでは、1級アミンを複数持つAG系抗生物質を強固に保持してしまい、それら薬剤が全く溶出しなかった。InertSep WCX-FFでは、AG系抗生物質であるSM及びDSMの保持・溶出効率が高く、かつオキシリニック酸やOTCも同時に93%以上の保持・溶出率が得られ、4薬剤の精製が可能となったため、採用することとした。

次に、InertSep WCX-FFからの溶出液の最適化を図ったところ、移動相である0.5%ギ酸含有10 mmol/L酢酸アンモニウムと0.5%ギ酸含有アセトニトリルを1:1で混合した溶出液よりも、塩を含まずギ酸濃度を上昇させた水・アセトニトリル混液である1%ギ酸含有50%アセトニトリル水で溶出効率が安定かつ最大となったため、溶出液は1%ギ酸含有50%アセトニトリル水とした。

一方、検討した4種の固相に保持されないKM及びVMについては、別の固相を検討することとした。

(2) KM, VMの保持・溶出 InertSep WCX-FFに保持できなかった2薬剤を保持する固相を検討するため、抽出液の一部 (5 mL) について以下の検討を行った。①強陽イオン交換系固相への保持の検証；負荷液に塩酸を加えて酸性化したものをInertSep SCX及びInertSep MCX-FF (GLサイエンス) に負荷したものを、②平面構造の保持に有効な固相への保持の検証；負荷液をグラファイトカーボン系固相のInertSep GCに負荷したものを、③InertSep WCX-FFからの溶出液を②と同じ条件で保持を検証；負荷液をInertSep WCX-FFに通液させた後にInertSep GCに負荷したものを、で検討した。両薬剤とも強陽イオン交換系固相では、十分酸性化してもほとんど保持されず、InertSep GCを用いたときにVMの保持が100%となった。KMは30%未満であったが、WCXに通液した後ではInertSep GCへの保持が70%以上と良好となった。

(3) InertSep GCへの負荷量と充填剤量のバランス及び溶出液の検討 (2)では、抽出液のうちの4分の1の液量で

の検討結果であり、前処理工程での希釈、つまり分析法としての検出感度を確保するためには、希釈倍率をさらに抑える必要がある。そこで負荷液量を増やしても、同様の結果となるかの検証を行った。このとき、負荷液量を増やすことから、固相の充填剤量を500 mgと2 g、負荷液量を10 mLと20 mL、溶出液をメタノールと1%ギ酸含有50%アセトニトリル水にした時の組合せについて、KMとVMの保持・溶出効率を検討した。

その結果、同じ充填量及び溶出液のとき、負荷量の増加に伴いKMの保持ができなくなった。一方、同じ負荷量のときは、充填剤量を増やすことでKMの保持が改善するものの、VMが溶出しなくなる傾向が見られた。そこで、溶出液をメタノールからWCXと同じ1%ギ酸含有50%アセトニトリル水にしたところ、両薬剤の溶出力が上がり、保持・溶出効率がともに98%以上と良好であった。以上の結果から、KMとVMの保持・溶出には、InertSep WCX-FFを通過させた溶液の全量20 mLをInertSep GC (2 g) に負荷し、溶出液に1%ギ酸含有50%アセトニトリルを採用することで、すべての対象薬剤6薬剤を同時に精製、濃縮及び溶媒置換することができた。

(4) 前処理系の希釈倍率と2種類の固相の使い方 抽出した対象薬剤のうち、KMとVMを除く4薬剤はInertSep WCX-FFへ、2薬剤はInertSep GCへ保持させていることから、それぞれの固相から別々に溶出し試験溶液を2つにすると、1つの検体を分析する際AG系抗生物質を2回注入・測定し、かつオキシリニック酸とOTCの測定に1回注入、計3回の測定が必要となる。また、この2つの試験溶液を等量混合して1つの試験溶液とすると、そのときに2倍の希釈がかかることになり、前処理で確保した分析対象薬剤の検出感度が確保できなくなる。そこで、1つの試験溶液に集約する別の方法として2つの固相を連結させる方法；上にInertSep WCX-FF、下にInertSep GCを連結することとし、抽出液を負荷し順に通液して、水1 mLで洗浄した後、両カラムからの溶出を同時に試みた。しかし、InertSep WCX-FFから溶出したオキシリニック酸とOTCがInertSep GCに強固に保持され、溶出することができなかった。

そこで溶出時に、2つの固相を入れ替えて上にInertSep GC、下にInertSep WCX-FFとなるよう連結し直し、両カラムからの溶出を同時に試みた。その結果、6薬剤とも別々に負荷したときと同じ保持・溶出率が得られ、すべての薬剤で70%以上の回収率を得ることができた。これにより、6薬剤の対象薬剤を1つの試験溶液に集約することが可能となり、かつ農産食品一対象薬剤で最も基準値の低いグレープフルーツのSMにおける0.02 µg/g相当の残留濃度が分析可能な感度を確保することができた。

5) 開発した分析法の性能評価

今回開発した分析法の性能評価を添加回収試験によって実施した。試料は、過去に検疫所においてSMの規格基準違反があったグレープフルーツを用い、SMの基準値相当

である0.02 µg/g (ppm) 添加とした。5併行での添加回収試験の結果、マトリクス検量線による定量で真度74-99%, RSD 4-14%の回収率を得ることができた。

6) 成果の活用と今後の課題

本研究では、機器分析が困難な薬剤群の測定条件の確立と、化学的性状の異なる3系統6薬剤の同時抽出法の構築を行った。本結果から、これまで未整備であった農産食品中の抗微生物薬の一斉分析方法を構築し、それを活用した大規模な残留実態調査が可能となったと考えられる。

しかし、農産食品は、それぞれの食品ごとに成分や性状が大きく異なるため、対象薬剤の挙動；回収率やマトリクス効果が大きく変化することが予想される。そのため、今後は食品ごとの変動抑えて定量できる条件を探索していく。

文 献

- 1) Kanda, M., Nakajima, T., Hayashi, H., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **98**, 230-247, 2015.

発 表 実 績

- 1) 中島崇行, 野口舞子, 渡邊趣衣, 他：農産物中に残留する抗微生物薬3系統6薬剤の一斉分析法の検討, (公社) 日本食品衛生学会第119回学術講演会(東京), 2023.

5. 環境水中における農業用殺菌剤等の存在実態及び浄水処理等による挙動解明

1) 背景と目的

近年, AMRを持つ細菌(薬剤耐性菌)の増加が世界的に問題になっており, 2016年には我が国として初めてAMR対策アクションプランが決定された。そして, ヒト・動物・環境を含めたワンヘルスアプローチの下, 産官学が連携して取り組むことが宣言された。その中で, 「環境」は, 水圏及び土壌環境等における薬剤耐性微生物, 抗微生物剤残留濃度等に関する動向調査・監視に関する調査研究の実施が戦略として掲げられている。ヒト・動物等で使用された抗菌薬や医療環境で発生した薬剤耐性菌の環境への流出は大きな問題である。そこで, 本研究では, グラム陰性細菌等による重篤な細菌感染症の治療に使用されるAG

系抗生物質や都内で出荷量が多い²⁾ものの当研究室で検査対象としていない農業用殺菌剤等に着目し, 分析方法の検討や河川水等の環境水中における存在実態の把握を目的とした。また, 対象薬剤が河川水中に高濃度で検出された場合に水道水へ影響を及ぼすか否かを把握するため, 浄水処理³⁾等による挙動解明も行った。

2) 調査対象薬剤及び検査法検討

農業用殺菌剤23薬剤；クレソキシムメチル, トリフロキシストロビン, ピコキシストロビン, マンデストロビン, チフルザミド, フルトラニル, フルキサピロキサミド, ペンフルフェン, ボスカリド, メプロニル, アミスルブロン, フルジオキシニル, イプロジオン, シプロコナゾール, トリフルミゾール, メトコナゾール, ヘキサコナゾール, イソプロチオラン, シフルフェナミド, トルクロホスメチル, ピロキロン, フェリムゾン及びトリホリンは, 固相にスチレンジビニルベンゼン共重合体を充填した逆相カラム(InertSep PLS-2)を用いた固相抽出-GC/MSによる一斉分析法を確立した。

農業用殺菌剤8薬剤；シアゾファミド, ピリベンカルブ, プロパモカルブ, ホセチル, アゾキシストロビン, ジフェノコナゾール, フルスルファミド及びピカルブトラゾクスは, 直接注入-LC/MS/MSによる一斉分析法を確立した。

AG系抗生物質を含む抗菌性抗微生物薬6薬剤；SM, DSM, VM, KM, OTC及びオキシリニック酸の分析条件について検討した。その結果, SM, DSM, VM及びKMは, アミド基結合型分析カラム(InertSustain Amide)を用いて定量レベル1 µg/Lを水道水に添加し評価を行ったところ, 水道水の妥当性評価ガイドライン⁴⁾の評価基準である真度70-130%及び併行精度20%以下を満たした。OTC及びオキシリニック酸は, 高極性薬剤の保持に優れた逆相分析カラム(ACQUITY UPLC HSS T3)を用いて同様の測定を行ったところ, 妥当性評価ガイドラインの評価基準を満たした。SM, DSM, VM及びKMは他の薬剤よりも測定感度が低く, 環境水中の濃度として測定装置の定量レベルの1/100程度を定量するのに必要な操作として, 固相抽出による前処理の検討を行った。同じAG系抗生物質でもSMとDSM, VMとKMでは物性が大きく異なるため, 別々の固相カラムでの抽出を試み, 図6に示す前処理フローとした。

<ストレプトマイシン・ジヒドロストレプトマイシン>

<バリダマイシン・カスガマイシン>

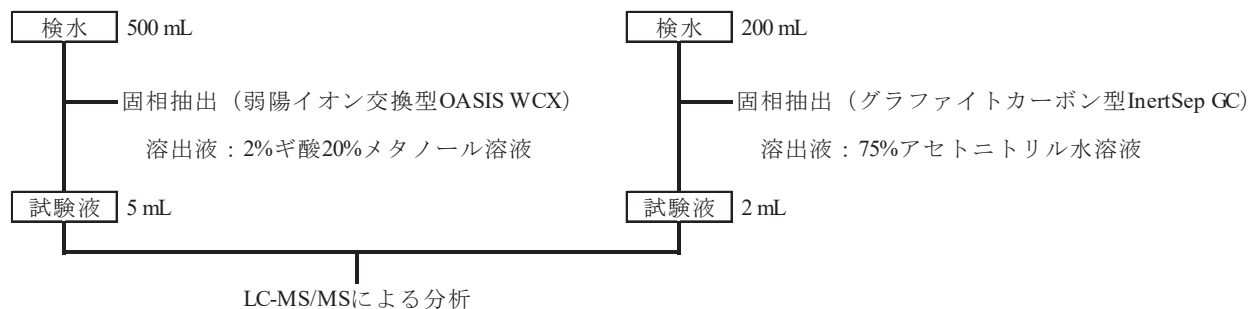


図6. アミノグリコシド系抗生物質4薬剤の前処理フロー

SM及びDSMは、固相カラムに弱陽イオン交換型（OASIS WCX），溶出液に2%ギ酸含有20%メタノール水溶液を用いたところ、真度はSMで69%，DSMで170%と妥当性評価ガイドラインの評価基準を満たさなかったものの、併行精度は5.1–8.4%と20%以下であったことから、スクリーニング法として採用することとした。VM及びKMは、固相カラムにグラファイトカーボン型（InertSep GC），溶出液に75%アセトニトリル水溶液を用いたところ、真度はVMで101%，KMで69%，併行精度は2.2–14.3%となり、妥当性評価ガイドラインの評価基準をほぼ満たした。

3) 環境水中対象薬剤の実態調査

(1) 河川水 都内を流れる多摩川（支川を含む）で、2022年及び2023年の5–9月及び11月にそれぞれ11地点（図7）で調査を行った。調査時期の選定として、農薬の散布時期である5–9月に合わせ、毎月試料を1回採水し、農薬の使用量が減少すると推察される11月に試料を1回採水した。



図7. 多摩川及び支川における調査地点（A-K）

調査対象薬剤の検出状況を表4に示す。調査対象37薬剤のうちカルベンダジム（MBC）は、各年で調査時期に関わらずほぼ全地点で検出が認められた。検出レベルは2022年及び2023年において0.5–250 ng/Lであった。2023年8月に調査地点I及びJで210及び150 ng/L、11月に調査地点Gで250 ng/Lと高濃度で検出したが原因は不明である。MBCは、紙、木材等の防カビ材として利用されており、殺菌剤であるベノミル又はチオファネートメチルの共通の分解物⁵⁾であることが知られている。環境省の環境リスク初期評価⁶⁾によると、環境水中濃度が100 ng/L以上となった場合、「生体リスク評価について、詳細な評価を行う候補と考えられる」に判定される⁷⁾ため、注視していく必要があると考えられる。アゾキシストロビンは、2023年にはほぼ全域で認められているものの濃度は0.2–11 ng/Lであり、水質汚濁に係る農薬登録基準0.47 mg/Lと比較すると、約1/40,000以下という極微量の検出であった。チフルザミドは、2022年及び2023年の5–7月（灌漑期）に調査地点B, C, D, F, G及びHで1.5–30 ng/L検出し、水質汚濁に係る農薬登録基準0.037 mg/Lに比べて約1/1,000以下であった。適用作物は水稻であり灌漑期に検出したことから、調査地点周辺の水田等から流入した可能性が高いと考えられる。その他、2022年にはペンフルフェン及びボスカリドが灌漑期に多摩川中流域（調査地点D, F及びH）、支川（調査地点I及びJ）で18–27 ng/L及び65–72 ng/Lを検出した。また、AG系抗生物質のSM, DSMについて、2022年及び2023年の5–8月に多摩川中流域（調査地点D, F及びH）で痕跡程度の検出が認められた。

表4. 河川水中調査対象成分の検出状況（2022年及び2023年）

調査地点	アゾキシストロビン				カルベンダジム（MBC）				チフルザミド			
	2022年度		2023年度		2022年度		2023年度		2022年度		2023年度	
	検出濃度 (ng/L)	検出率* (%)	検出濃度 (ng/L)	検出率* (%)	検出濃度 (ng/L)	検出率* (%)	検出濃度 (ng/L)	検出率* (%)	検出濃度 (ng/L)	検出率* (%)	検出濃度 (ng/L)	検出率* (%)
A			0.2	17	1.7–2.2	33	1.2–9.0	83				
B	2.8–11	100	1.6–29	100	1.5–5.4	100	1.5–40	100	3.6–7.2	50	19–23	33
C			0.2–0.8	50	1.5–2.9	50	0.5–8.0	100	2.1–5.9	50	19	17
D	1.3–2.8	67	0.7–5.0	67	6.3–43	100	2.5–19	100	1.5–4.0	33	18–24	33
E			0.3–0.7	50	4.9–48	100	4.3–11	100	1.7–4.2	33		
F	1.2–2.2	67	0.8–4.6	67	7.9–20	100	4.3–36	100	3.7	17	22	17
G	1.0–4.0	100	0.8–2.5	67	15–70	100	25–250	100	4.3–7.7	33	19	17
H	0.9–2.4	100	0.5–5.0	100	9.7–22	100	9.3–37	100	2.3–4.1	33	30	17
I			0.4–11	50	1.9–12	100	29–210	100			22	17
J	1.1–110	50	1.1–2.5	33	13–25	100	11–150	100				
K	1.0–75	83	0.3–4.0	100	11–37	100	10–55	100				

* 検出率：定量下限値以上の検出回数／全調査回数（6回）

(2) 下水処理場の流入水及び放流水 下水処理場における流入水及び放流水中の対象薬剤の実態を把握するため、2022年9、11月及び2023年6、9、11月の各月1回、多摩川中流域にある下水処理場（1か所）において定時試料（1サンプル）と24時間コンボジット試料（1サンプル）の採水を行った。コンボジット試料とは、一定時間毎に採水した24時間分の試料を混合したものである。全ての調査時期において、定時試料又はコンボジット試料に関わらず、流入水からアゾキシストロビン、MBC及びチオファネートメチルが1-3、25-179及び2-124 ng/Lを検出し、放流水からアゾキシストロビン及びMBCが2-5 ng/L及び14-167 ng/Lを検出した。アゾキシストロビン及びMBCは、流入水と放流水の濃度レベルがほぼ同レベルであることから、下水処理による除去性は低いと推察される。流入水のチオファネートメチルは、下水処理により除去されたかMBCに加水分解したため、放流水では不検出となった可能性が高い。また、放流水が流入する多摩川中流では河川水量のうち下水処理水が約半分を占めると言われており、多摩川河川水中流域で検出したアゾキシストロビン及びMBCは、灌漑用水や土壌からの流出に加えて放流水による影響等も考えられる。

(3) 飲用井戸水 2022年及び2023年の11-12月に多摩地区井戸水55地点及び58地点で調査対象薬剤の実態調査を行った。ちなみに、2022年と2023年において同一地点での調査は行っていない。調査対象のうち検出した薬剤はMBCのみで、2022年は55地点中6地点、2023年は58地点中3地点で認められた。検出濃度は1-12 ng/Lであり、原因として散布されたベノミルやチオファネートメチルの地下水への浸透や多摩川河川水による影響が考えられる。

4) 浄水処理による挙動解明

環境水中の実態調査において検出が認められたアゾキシストロビン、MBC、ペンフルフェン、チフルザミド及びボスカリドの5薬剤、AG系抗生物質を含む抗菌性抗微生物薬6薬剤（SM、DSM、KM、VM、OTC及びオキシソリニック酸）の計11薬剤について、河川水（濁度2.2度、pH7.8、アルカリ度43 mg/L）を用いて浄水処理による挙動解明を検討した。各薬剤の添加濃度は100 µg/Lとした。

(1) 凝集沈殿処理 浄水処理装置（ジャーテスター）を用いて、凝集剤であるポリ塩化アルミニウム（PAC）の注入量を0、10、20、30及び50 ppmに変えて検討を行った。攪拌条件は、急速攪拌が150 rpmで2分、緩速攪拌が50 rpmで10分とし、30分静置後、上澄み水をろ過して測定した。その結果（図8a））、OTC及びオキシソリニック酸は、凝集剤注入量が20 ppmで除去率が90%以上であったものの、その他の薬剤はほとんど除去されなかった。これは、調査薬剤と凝集剤との親和性において、凝集剤由来のアルミニウムイオンとOTC及びオキシソリニック酸のヒドロキシル基が化学吸着することにより、沈殿物として除去されたものと考えられる。しかし、ヒドロキシル基を持つAG系抗生物質（SM、DSM、KM及びVM）についてはpKaが6.1-7.8と高いため、化学吸着が進まず除去されなかった可能性が高い。

(2) 次亜塩素酸ナトリウムによる消毒処理 次亜塩素酸ナトリウムを用いて、残留塩素が1 mg/Lになるように添加し、添加後0、1、2、3、5、10、15、20、30及び60分経過した時のサンプルを採取し、残留塩素の除去剤であるアスコルビン酸ナトリウムを添加して測定した。

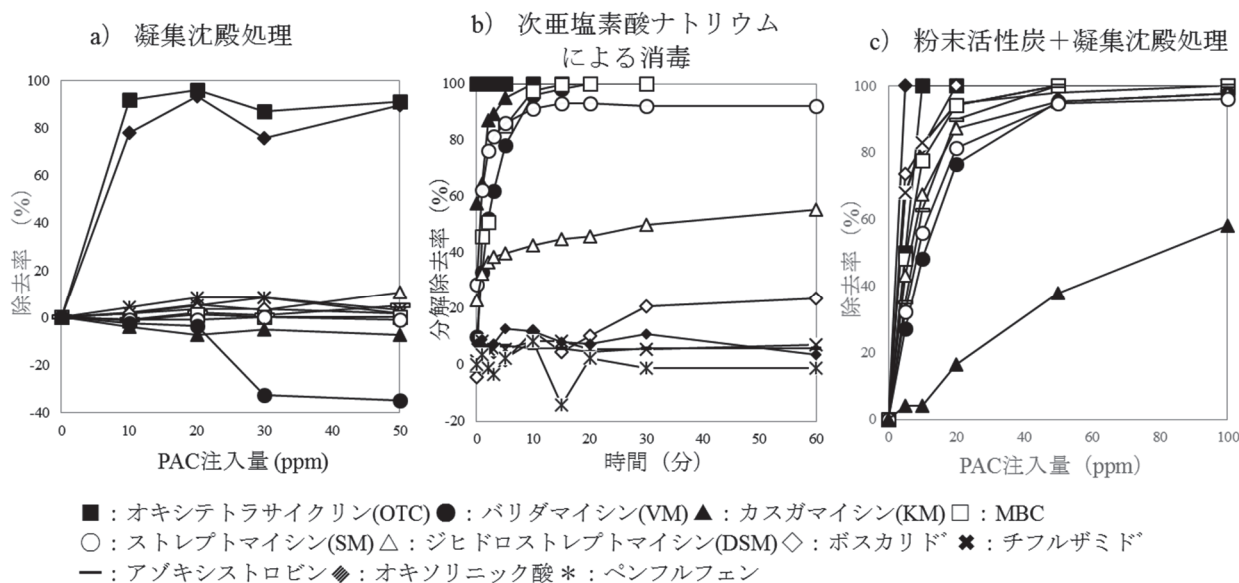


図 8. 浄水処理による調査対象薬剤の除去性

その結果 (図 8 b)), OTC, VM, KM, MBC 及び SM が次亜塩素酸ナトリウム添加後 10 分で分解反応が進み, 除去率が 90%以上となった。また, DSM 及びボスカリドは, 添加後 60 分でも分解除去率が 55 及び 23%で, その他の薬剤はほとんど分解除去されなかった。

(3) 粉末活性炭+凝集沈殿処理 ジャーテストを用いて, 粉末活性炭の注入量を 0, 5, 10, 20, 50 及び 100 ppm に変えて, 攪拌条件 150 rpm, 30 分で検討を行った。その後, PAC の注入量を 20 ppm として凝集沈殿処理を行い, 上澄み水をろ過して測定した。その結果 (図 8 c)), KM を除く 10 薬剤について, 粉末活性炭 50 ppm で除去率が全て 90%以上となった。KM は粉末活性炭 100 ppm でも除去率は 60%程度であり, 除去率が低い原因は不明である。

5) 成果と活用

AG 系抗生物質や農薬用殺菌剤等 37 薬剤について, 環境水 (河川水, 下水処理場の流入水及び放流水, 多摩地区地下水) における実態調査を 2022 及び 2023 年に行ったところ, アゾキシストロビンや MBC 等を検出したものの濃度は非常に低く, 環境水に汚染影響を及ぼす程のレベルでは無かった。また, 調査対象薬剤が河川水中に高濃度で検出された場合, 水道水への影響を考慮して 3 パターン (凝集沈殿処理, 次亜塩素酸ナトリウムによる消毒処理及び粉末活性炭+凝集沈殿処理) の浄水処理の検討を行った。今回対象とした薬剤については, 3 パターンの処理を全て組み合わせることで 90%以上を除去できることが分かった。また, 検出された薬剤の種類によっては, 除去するための浄水処理を選択することができ, 各水道事業者等が浄水処理を行う際の有用な情報になると考えられる。

文 献

- 1) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016–2020, <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/0000120769.pdf> (2024 年 7 月 30 日現在。なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 2) 日本植物防疫協会: 農薬要覧, 2018, 日本植物防疫協会, 東京
- 3) 日本水道協会: 水道維持管理指針, 2012, 日本水道協会, 東京
- 4) 厚生労働省: 薬生水発 1018 第 1 号, 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン, 平成 29 年 10 月 18 日
- 5) 中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第 62 回: ベノミルとチオファネートメチルの共通代謝・分解物 MBC とベノミルの代謝・分解物 STB の取扱いについて (案)), https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-67/mat_05.pdf (2024 年 7 月 30 日現在。なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 6) 環境省: メチル=ベンゾイミダゾール-2-イルカル

バマート,

<https://www.env.go.jp/content/900411199.pdf> (2024 年 7 月 30 日現在。なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)

- 7) 環境省: 化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン, <https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/02.pdf> (2024 年 7 月 30 日現在。なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)

発 表 実 績

- 1) 栗田 翔, 木下輝昭, 中嶋順一, 他: 環境水中における農薬用殺菌剤等の分析方法確立及び存在実態調査, 第 57 回日本水環境学会年会 (愛媛), 2023.
- 2) 木下輝昭, 山崎貴子, 栗田 翔, 他: 環境水中農薬類における GC/MS スクリーニングメソッドの作成及び解析, 第 57 回日本水環境学会年会 (愛媛), 2023.

ま と め

本重点研究では, ワンヘルスアプローチに基づく抗微生物薬と薬剤耐性微生物の実態を把握することを目的として, 5 題の個別課題について 3 年間にわたる研究を実施し, 多くの成果が得られた。

ヒトとコンパニオンアニマル間の薬剤耐性菌の伝播に関する重要な知見を得た。イヌ, ネコにおいて ESBL 産生大腸菌の分布が耐性率に大きく寄与している傾向であった。加えてその大腸菌の動物病院由来株は, ヒトの臨床上の遺伝子型と近縁であった。このことから, 両者間の伝播の可能性を示唆した。染色体上の特徴の違いも明らかになってきており, より解析することでメカニズムの解明も可能である。

さらに, 畜産, 農産食品, 環境水中の薬剤耐性菌の汚染状況を調査し, 特に鶏肉や河川水からの ESBL 産生大腸菌が高い陽性率であることを報告した。流行株フルオロキノロン耐性血清型 O25—ST131 株は, 食品では 0.5%, 環境水では 29%をしめており, ヒトでの流行株が保有する主な ESBL 遺伝子を保有していた。このことから, 薬剤耐性が主に環境を通じて広がっていることを示した。

畜産の分野では, 薬剤耐性菌対策の観点から別の薬剤が使用されることも鑑み, 新規あるいはこれまで分析が困難だった薬剤について分析法を開発した。これにより, より幅広い薬剤の検出が可能になった。この新しい方法は, 乳, はちみつ等の食品中の抗菌活性物質の残留を把握するのに用いることができる。実際に, 行政検体においてこれまで検出していない薬剤の早期解明に役立った。

農産の分野でも, 抗菌剤として使用されていたものの, 残留分析への注目は低かったが, 使用方法からも残留モニタリングは重要であるという観点から, 流通量の多い 3 系統 6 薬剤について分析法を開発した。全く物性の異なる薬剤を測定あるいは前処理でこれまでと異なる工夫を行うこ

とで、効率よく検査可能とするだけでなく、検出可能な感度を担保でき、効果的なモニタリングを行える体制となった。

環境の分野では、調査実績が希薄な農業用殺菌剤等 37 薬剤について、試験法を確立した。それを用いて、多摩川水系河川水及び流域下水処理場、多摩地区井戸水の存在実態を調査したところ、特定の殺菌剤を検出することが明らかになった。これらの殺菌剤は、浄水処理における凝集沈殿法、塩素消毒法、粉末活性炭＋凝集沈殿法の組み合わせにより 90%以上除去することが可能であることを示し、環境水からの農業用殺菌剤の除去に対処することができると考えられる。

以上のヒトやコンパニオンアニマル及び畜水産食品中の薬剤耐性菌株の解析結果、抗微生物薬の分析法開発、それを活用した残留実態の把握、環境水中の抗微生物薬の除去について、学会、論文発表等で国内外の行政機関及び研究

機関等へ情報提供を行った。薬剤耐性菌の実態については、当センターの HP や検討会を通して都民や獣医師へ公表した。畜水産分野の抗微生物薬の分析法は、行政検体における抗菌活性物質の早期解明に役立った。農産分野の抗微生物薬の分析は、国内外で研究が少なく、科研費を取得するに至った。

しかしながら解明された部分がある一方、継続が必要な案件や課題も明確となり、今後も引き続き調査を行い、薬剤耐性菌の汚染実態調査や遺伝子解析、ESBL 産生大腸菌耐性遺伝子の伝播のしくみの解明を進める。食品中残留抗微生物薬の分析法は、対象食品の拡充を図り、食品衛生法による適否を行えるレベルの精度を確保に努める。

これらの得られた研究成果についても、より一層情報発信を進め、ワンヘルスアプローチに基づいた薬剤耐性菌対策の一助を担う。

Survey of Antimicrobial Residues and Drug-Resistant Bacterium Based on the One Health Approach Perspective

Maki KANDA^a, Kai KOBAYASHI^a, Yukari NISHINO^a, Yumi OHBA^a, Takayuki NAKAJIMA^a, Shou KURITA^b, Hiroaki KUBOTA^a, Tsukasa ARIYOSHI^a, Yukihiro KODO^a, Isao YOSHIDA^a, Megumi ANNAKA^a, Morika MITOBE^a, Noeru HASEGAWA^a, Hiromi OBATA^a, Kaoru HATAKEYAMA^c, Rie FUKUI^a, Megumi ICHIKAWA^a, Hanako MITSUHASHI^a, Sumiyo KURODA^a, Kaeko YAMAZAKI^a, Miki IDA^a, Makiko KOBAYASHI^a, Satomi UEHARA^a, Yumi TAKAHASHI^a, Akiko TAKABAYASHI^a, Mutsuko ASAYAMA^a, Souichi YOSHIKAWA^a, Hiroshi HAYASHI^a, Yoko MATSUSHIMA^a, Hiroshi KOIKE^a, Momoka HAYASHI^a, Chieko NAGANO^a, Sanae TOMIZAWA^a, Yumiko YAMAKI^a, Kyoko KAMIJO^a, Kazuoki YAMAMOTO^a, Tomomi TAKADA^a, Yoshie KOKAJI^a, Shui WATANABE^a, Hiroko SHIRADO^a, Yoshihiro OHSAWA^a, Ayane KOYAMA^d, Maiko NOGUUCHI^a, Aya ONUKI^a, Yuka OKA^a, Takako YAMAZAKI^a, Minako AIHARA^a, Kimiyo WATANABE^a, Jun'ya SUZUKI^a, Tomoko ODA^b, Jun SUZUKI^a, Keiko YOKOYAMA^a, Kenji OTSUKA^a, Tomoko YOKOYAMA^a, Tetsuya SHINDO^a, Jun'ichi NAKAJIMA^b, Teruaki KINOSHITA^a, Kenji SADAMASU^a, Takeo SASAMOTO^b, and Akiko INOMATA^a

The priority study was conducted from 2020 to 2022 to address antimicrobial resistance (AMR), a significant threat to human health worldwide, by examining the presence of antimicrobial drugs and antimicrobial-resistant microorganisms in companion animals, food, agriculture, livestock, and the environment. The following results were obtained by working on five individual projects. The existence of drug-resistant bacteria was determined through the molecular epidemiological analysis of extended-spectrum beta-lactamase - producing *Escherichia coli* strains, which revealed that strains closely related to human epidemic strains were detected in dogs, cats, and river water. This finding indicated a relationship between the transmission of resistant bacteria from humans to pets and rivers. Conversely, food-derived strains possessed different genotypes. We also gained insights into the acquisition and spread of resistance by strains. Regarding the antimicrobial drugs, this study attempted to determine whether residual concentrations were lower than the level at which AMR occurs and to accurately measure their levels. Analytical methods were developed for highly polar antimicrobial agents in livestock and fishery products or agricultural fungicides in agricultural products and environmental water. We attempted to introduce our developed methods into routine food inspections. Then, their behaviors during water purification treatment in an environmental field were observed. Our results help strengthen measures against AMR based on the One Health approach advocated by the World Health Organization.

Keywords: antibacterial-resistance, one health approach, ESBL-producing *Escherichia coli*, highly polar antimicrobial agent, agricultural fungicide, companion animal, livestock product, agricultural product, environmental water, water purification treatment, genome analysis, LC-MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^c Shibaura Meat Sanitary Inspection Station
2-7-19, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-0075, Japan

^d Wholesale Market Sanitary Inspection Station
6-6-1, Toyosu, Koto-ku, Tokyo 135-6601, Japan