

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04925

研究課題名（和文）下水中医薬品の連続観測による流域内発熱性疾患の流行検知手法の開発

研究課題名（英文）Wastewater-based epidemiology based on consecutive monitoring of ingredients of over-the-counter drug by LC-MS/MS and retrospective analysis by LC-QToF/MS during COVID-19 pandemic.

研究代表者

中田 典秀（Nakada, Norihide）

神奈川大学・化学生命学部・准教授

研究者番号：00391615

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：流行性疾病の感染拡大を、下水道や河川流末における化学物質の観測により予測する監視体制の確立に向け、COVID-19の感染拡大時に下水を連続採水し、市販薬のターゲット分析と、高分解能質量分析計によるノンターゲット分析を行い、指標となりえる化学物質（マーカー）の探索と、精密質量分析の長期観測データの解析方法について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分析対象を決めたターゲット分析だけでなく、高分解能質量分析計を用いたノンターゲット分析による環境モニタリングの可能性を、結果の解析・評価方法とともに示した。また、下水疫学については微生物のモニタリングが先行しているが、本研究は研究事例の少ない化学物質を指標とした手法の発展に資するものであり、今後のさらなる発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to establish a monitoring system to predict the spread of epidemic diseases by observing chemical substances in sewage systems named chemical wastewater-based epidemiology. We collected sewage from a municipal wastewater treatment plant continuously during COVID-19 pandemic and conducted targeted analysis of commercial drugs and non-targeted analysis (NTA) using a high-resolution mass spectrometer to explore the chemical substances (markers) that could be used as indicators. Chemical substances (markers) that could be used as indicators were evaluated from the results of NTA, as well as the examined methods for analyzing long-term, accurate mass spectrometry data.

研究分野：環境化学

キーワード：環境鑑識 ターゲット分析 ノンターゲット分析 下水疫学 COVID-19

1. 研究開始当初の背景

新規感染症だけでなく、既知の多くの感染症が発熱を伴い流行する。その際、使用された薬の成分や原因となる病原微生物は下水道や河川流域の流末へ集まる。過去の日本国内の河川調査より、いくつかの医薬品成分の河川への負荷量と流域人口との間に高い正の相関が確認¹⁾され、またタミフルのような特定疾病対策薬は、下水処理場の処理区や河川の流域内の当該疾病(インフルエンザ)患者数の推移と連動することが確認²⁾されている。解熱鎮痛剤や咳止め薬などの総合感冒薬は、発熱性疾患の初期治療に使われ、ドラッグストアなどで処方箋なしでも入手可能である。そのため、発熱性疾患の発生時に頻繁に使われる薬成分は、その患者数と連動した排出がなされる可能性がある。2019年末に確認された新型コロナウイルス SARS-CoV-2による疾病(COVID-19)が世界へと広がり始めた2020年1月頃、サーモグラフィーなどによる発熱を指標とした空港・港湾での水際対策では解熱鎮痛剤の服用などにより検査をすり抜けてしまう事例が報道されている。COVID-19患者のうち、無症状者や医療機関を利用しない軽症者の存在を把握するため、総合感冒薬などの成分の下水や河川水中濃度を継続的に観測(ターゲット分析)することで、調査対象の下水処理区内または河川流域における発熱性疾患の流行の兆候を捉えることができると考えた。これらの薬剤は単独の疾病だけではなく、複数の疾病に使われることが多いため、排出の要因となった疾病やその病原微生物を即時に特定することは困難だが、新規発熱性疾患の流行を検知できる可能性がある。さらに、発熱性疾患の発生時にヒト体内で特異的に生成される、あるいは代謝される量に変化する成分があり、それら成分も発熱性疾患の患者数と連動する可能性がある。下水の成分は医療機関を利用しない軽症者の尿尿を含むため、医療機関での定点観測によって患者数を把握することに比べて、発熱性疾患の流行を早期発見できる可能性がある。また、個人が特定されないことから、プライバシーを侵害しない。

これまでインフルエンザウイルスの市中感染拡大の予測検討(biological wastewater based epidemiology: Bio-WBE)が日本国内でも実施されている。しかし、前述のSARS-CoV-2と同様、原因となる病原微生物が同定されてからでないと適用できない。また、下水処理の塩素処理により不活化されることにより、河川流域規模の監視には拡大できない。化学物質をマーカーとしたWBE(Chem-WBE)についても、特定の疾病対象薬のみの観測では、新たな流行の発生には気づけない、もしくは対象薬が開発され分析用標準物質が市販されてからでないと適用できない。

2. 研究の目的

本研究では、総合感冒薬として発熱性疾患の初期治療に用いられ、ドラッグストアなどで処方箋なしでも入手できる解熱鎮痛剤や咳止め薬成分の下水や河川水中濃度を継続的に測定(ターゲット分析)することにより、排出の要因となった疾病やその病原微生物は分からないまでも、ある下水処理区内における新規もしくは既知の発熱性疾患の流行の兆しを検知することを目的としている。また、総合感冒薬成分以外にも、COVID-19などの流行性疾患のマーカーとなり得る成分が下水中に含まれる可能性があることから、連続観測試料の精密質量分析(ノンターゲット分析)により、主にCOVID-19を対象とした発熱性疾患のマーカーとなりうる化学物質の探索を目的としている。さらに、蓄積した精密質量分析結果より、発熱性疾患発生時に下水道や環境へ流入する化学物質の適及的解析も目的としている。

3. 研究の方法

(1) 試料採取および前処理

2020年9月から2022年3月まで、近畿圏のA市の下水を一カ所の下水処理場にて1~3日間隔で合計130日採取した。調査を行った下水処理場の処理人口は、約10万人であり、規模は小さいが日本国内の下水処理場の多くはこの規模である。採水には自動採水器(3700C、ISCO社製)を用い、1時間に1回の採取・混合による24時間等量混合試料を得た。得られた下水試料(2連)と操作ブランクの超純水(MQ、Merck Millipore社製)を、極力その日のうちにガラス繊維フィルター(GF/B、孔径1.0 µm、Whatman社製)にてろ過し、ろ液へターゲット分析対象成分(表1)の重水素化体もしくは¹³C置換体などをサロゲートとして添加し、固相抽出を行った。固相抽出には、Oasis HLBカートリッジ(200 mg/6 cc、日本ウォーターズ社製)を用いた。カートリッジの洗浄・平衡化は、5 mLのメタノール(MeOH、農薬分析用、富士フィルム和光純薬製)と5 mLのMQを通水して行い、各試料を10 mLずつ、別々のカートリッジに自然落下にて通液させた。保持された分析対象成分を6 mLのMeOHで溶出した。溶出液をN₂パージにより濃縮・乾固後、分析装置の移動相の初期溶媒水溶液1 mLで再溶解・定容した。下水2試料と操作ブランク1試料の合計3試料を1日分の試料とし、ターゲット分析、ついでノンターゲット分析に供した。

(2) ターゲット分析

処方箋なしで入手でき、COVID-19 等の流行時に使用量が多くなる可能性があるとして予測した解熱鎮痛剤と抗炎症剤、処方箋薬の抗生物質製剤などの成分を選出した (表 1)。ほぼ全ての成分についてサロゲート物質を用意し、内部標準法により定量を行った。前項の前処理を終えた試料の分析は、即日に液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS; LC:Acuity UPLC H-Class、MS/MS : Xevo TQ-s micro、日本ウォーターズ社製) で行った。

(3) ノンターゲット分析

ターゲット分析終了後の試料は、 -30°C の冷凍庫で保存し、1~2 カ月分をまとめて LC-四重極飛行時間型 (QToF)/MS (LC:Acuity UPLC H-Class、QToF/MS : Xevo G2-XS、日本ウォーターズ社製) によるノンターゲット分析に供した。LC による分離はターゲット分析と同じ条件で行い、positive および negative の 2 種類のモードでそれぞれ精密質量分析を行った。測定した m/z は 50~1250 の範囲、コリジョンセルの電圧をオフと 12~30 V で連続的に変化 (ランプ) させたデータ非依存的測定で分析を行った。

LC-QToF/MS による分析結果には、LC カラムから溶出した分子がイオン化したイオンと、それがフラグメンテーションにより分解した複数のフラグメントイオンの精密質量データが含まれており、例えば下水サンプルの分析結果からは数万ピークが検出され、1 つのデータサイズはおおよそ 1 GB である。これが各採水日にあり、さらに、positive モードおよび negative モードそれぞれの分析結果があるため、合計約 1 TB に達するビックデータとなる。これらのデータを分割して解析することによりアサインに不具合が生じたため、様々な検討の結果、高性能のワークステーションを整備するとともに、理化学研究所が開発した Mass Spectrometry Data Independent Analysis (MS-DIAL) (version4.9.0) (3.3.2) を利用し、QToF/MS で得られたデータの整理 (デコンボリューション) と精密質量データ等を有するライブラリーとの照合 (同定) を行った。また、照合結果の整理は R 言語 (Version4.2.1) (3.6.3) を用いて行った。本研究では、理化学研究所が提供しているライブラリー (約 33 千成分のスペクトル、無償)、MassBank of North America (MoNA) が提供しているライブラリー (約 33 千成分のスペクトル、無償)、National Institute of Standards and Technology (NIST) から購入したライブラリー (約 236 千成分のスペクトル) などを使用し、ライブラリー照合を行った。照合においてライブラリー掲載の保持時間は本研究における保持時間と異なることが予想されるため、保持時間は照合条件に含めず、プリカーサーとプロダクトイオンとの一致度の許容値 (それぞれ 0.01 m/z 、0.025 m/z) の範囲内で、応答値が 3,000 以上のピークについて照合を行った。他のパラメーターについては個別に検討を行い決定した。

4. 研究成果

(1) ターゲット分析結果

分析対象成分のいずれも高頻度で検出され、caffeine (中央値 : 22.7 $\mu\text{g/L}$ 、以下同様)、acetaminophen (8.4 $\mu\text{g/L}$)、fexofenadine (2.7 $\mu\text{g/L}$)、theophylline (2.0 $\mu\text{g/L}$)、loxoprofen alcohol (1.6 $\mu\text{g/L}$)、crotamiton (1.1 $\mu\text{g/L}$) は、中央値で 1 $\mu\text{g/L}$ 以上を示した (図 1)。これらの成分の中では、抗アレルギー剤の fexofenadine を除くと、調査期間における濃度の相対標準偏差 (RSD) は 20%程度であり、一定の濃度で下水道に流入していることが示された。そのため、LC-QToF/MS によるノンターゲット分析で検出されるこれらの成分のピーク面積で他の成分のピーク面積を割ることにより、LC-QToF/MS の感度変動を補正できることが示唆された。一方で、変動が小さいということは、COVID-19 などの疾病の患者数と連動していないことも示唆していると考えられる。

抗アレルギー剤の fexofenadine と epinastine の濃度は、2~3 月頃に上昇する傾向が 2 年連続で確認された (図 2)。花粉症治療薬として使用されるこれらの成分は、花粉の飛散量が増加する時期に合わせて下水道への流入量が増加したものと考えられる。また、市販薬成分の使用状況が下水中濃度として観測可能であることを示していると考えられる。一方、他の検出成分については、季節変動は確認されなかった。発熱時に一般的に服用が推奨される acetaminophen については、調査期間を通じて 3.7~15.3 $\mu\text{g/L}$ で変動したが、調査対象下水処理場がある市の入院患者数の推移との間には明瞭な連動は確認されなかった (図 3)。ここでは、平時からの超過濃度を強調するため、全検出濃度値の 25%以上を強調している。アメリカのニューヨーク州で行われた先行研究では、acetaminophen が COVID-19 の流行を捉えるマーカーとして非常に有用であ

表1 ターゲット分析対象成分

Compound	Category
Acetaminophen	Anti-inflammatory
Ethenzamide	Anti-inflammatory
Isopropylantipyrine	Anti-inflammatory
Loxoprofen	Anti-inflammatory
LoxoprofenAlcohol	(metabolite)
Salicylamide	Anti-inflammatory
Diphenhydramine	Antihistamine
Epinastine	Antihistamine
Fexofenadine	Antihistamine
Clarithromycin	# Antibiotic
Levofloxacin	# Antibiotic
Dextromethorphan	Antitussives
Dextrorphan	(metabolite)
Theophylline	Anti-asthmatic
Crotamiton	Antipruritic
Carbamazepine	# Anticonvulsant
Sulpiride	Antipsychotic
Caffeine	Stimulant

#: 処方箋薬

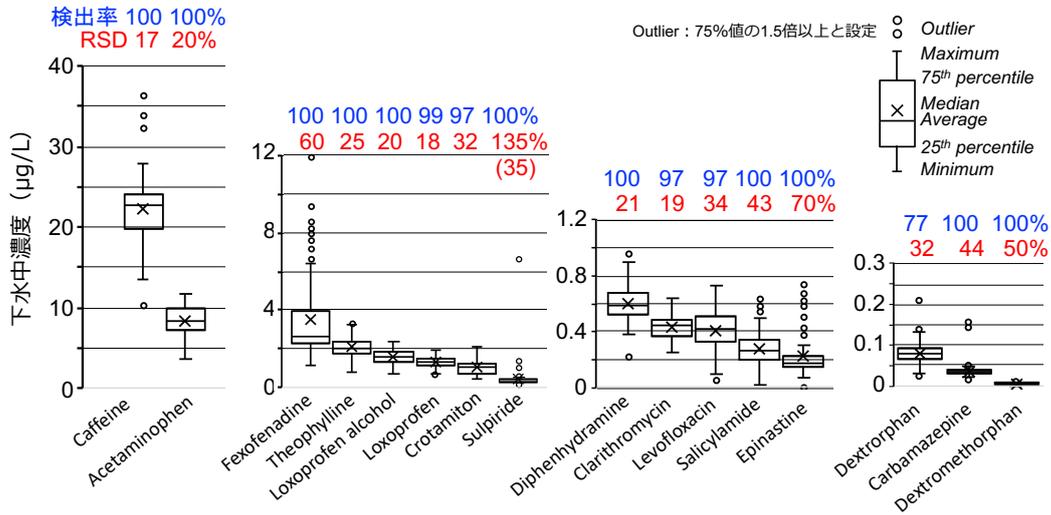


図1 ターゲット分析対象成分の下水中濃度分布 (n =128)
RSRの()内の数値は、外れ値を外した際の値

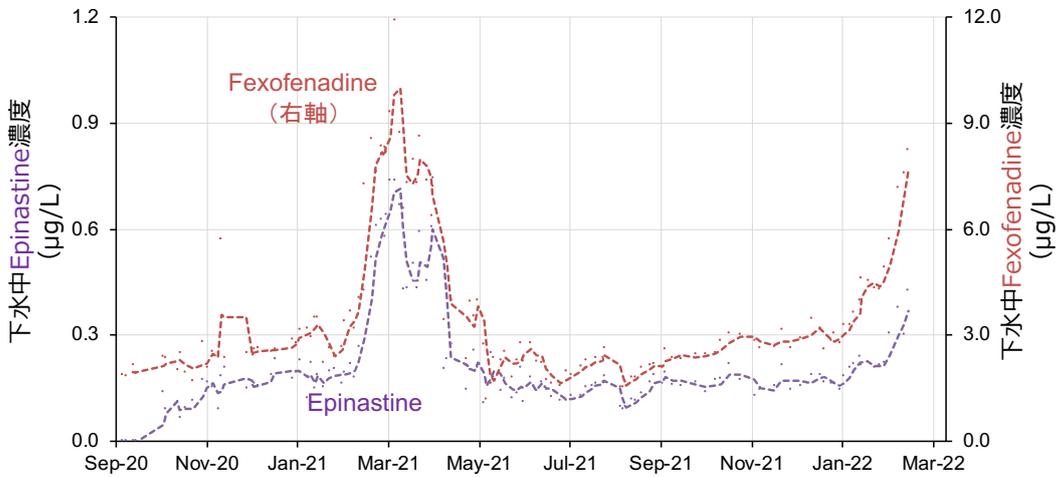


図2 抗アレルギー薬成分 (fexofenadineとepinastine) の濃度推移

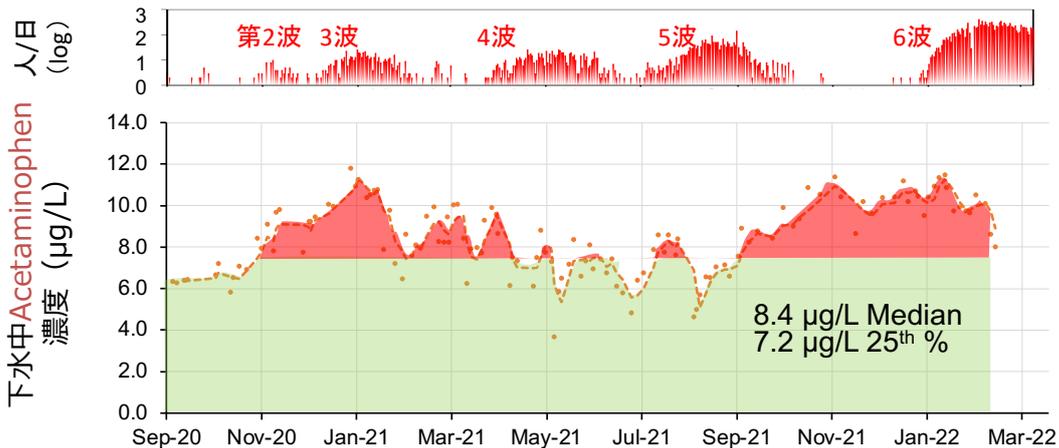


図3 調査地市内のCOVID-19患者数 (上段) と解熱鎮痛剤成分 (acetaminophen) の濃度推移 (下段)

ると報告³⁾されているが、これは調査期間が6ヶ月と短く、かつCOVID-19の患者密度が高い地域での調査だったため、本研究とは異なる結果が得られた可能性がある。Acetaminophenは、新型コロナウイルス等の感染に伴う発熱症状や、ワクチン接種後の副反応による発熱症状の緩和、他の発熱性疾患にも使われているため、各使用用途からの負荷が積算して下水中濃度として検出されたものと考えられる。

(2) ノンターゲット分析

ライブラリーとの照合において、保持時間を照合条件に加えなかったため、同一成分であっても保持時間の異なる複数のピークにアサインされることがあった。また、同一成分であっても複

数の分析条件の結果がライブラリーに掲載されていることから、同一保持時間であっても異なるライブラリー掲載名でアサインされることがあった。ターゲット分析で存在が確認されている成分(表1)のLC-QToF/MSによる分析結果において、調査期間(18ヶ月)内の保持時間の変動幅が1分以内であったことから、試料間で異なる保持時間となったピークや、(同一成分にも拘わらず)異なるライブラリー掲載名でアサインされたピークについては、Rにて保持時間の変動が1分以内の範囲で統合するデータクリーニングを行った。ターゲット分析対象成分以外については、保持時間が不明な成分もあることから、保持時間が1分以上離れているピークが複数検出されている場合は、アサイン成分名に保持時間情報を付記して記録した。また、同一試料内で同一成分名または分析条件が異なる同一成分名でアサインされている場合は、相対的に小さいピークをアサインしている場合が多かったことから、Rにて最大ピークのみを残した。

ターゲット分析対象成分について、定量濃度とLC-QToF/MSによる分析結果(応答値:ピーク面積)とを比較した結果、両者の変動に相関関係が確認されなかった。調査期間(18ヶ月)において、定量濃度についてはLC-MS/MSの感度変動はサロゲート物質により補正されているが、LC-QToF/MSの感度変動は補正されない。そこで、LC-QToF/MSのpositiveモードによる分析結果で、調査期間内の定量濃度の変動が小さかったcaffeineのピーク面積により各成分のデータクリーニング後のピーク面積を割り、補正することとした。その結果、fexofenadineの両分析結果において類似の推移(図4)が確認されたため、LC-QToF/MSのpositiveモードによる他の成分のピーク面積についてもcaffeineのピーク面積で割ることにより補正した。同様の検討をもとに、LC-QToF/MSのnegativeモードによる分析結果については、diphenhydramineにより補正することとした。

解析を行った結果、positive分析結果では1,747成分、negative分析結果では967成分がアサインされた。これらの成分の感度補正用成分に対するピーク面積比の相対比の経時変化をCOVID-19患者数の推移と比較した。その結果、positive分析結果では26成分、negative分析結果では10成分がCOVID-19患者数の推移と連動している化学物質として確認された。COVID-19患者数の推移とピーク面積比の経時変化が連動していた化学物質とCOVID-19との因果関係を把握するため、各化学物質の性質や用途を調べた。その結果、医薬品に含まれる化学物質、医薬品に関する化学物質および鎮痛作用などを有する化学物質、または疾病発生時に変動する代謝産物などが含まれ、positive分析結果では4成分、negative分析結果では3成分がCOVID-19と関係がある可能性のある化学物質として抽出された。今後、これらの成分の標準物質との照合による同定を行い、保存試料の再分析による定量を実施する必要がある。

研究遂行途中の2022年に、SARS-CoV-2がヒト細胞に感染すると特異的に増加する修飾ヌクレオシド(N6-threonylcarbamoyladenine と 2-Methylthio-N6-threonylcarbamoyladenine)がCOVID-19の患者の尿中に排出される特異的なマーカーとして報告された⁴⁾。本研究で用いたライブラリーにはこれらの成分の情報は含まれていなかったため、標準物質を入手し、オリジナルのライブラリーを作成した。作成したライブラリーによりLC-QToF/MSの分析結果を解析したところ、両成分ともに比較的高頻度でアサインされたものの、調査対象地域のCOVID-19患者数の推移との連動は確認されなかった。このことより、これらのマーカーはChem-WBEではCOVID-19のマーカーとして利用できないことが示唆された。

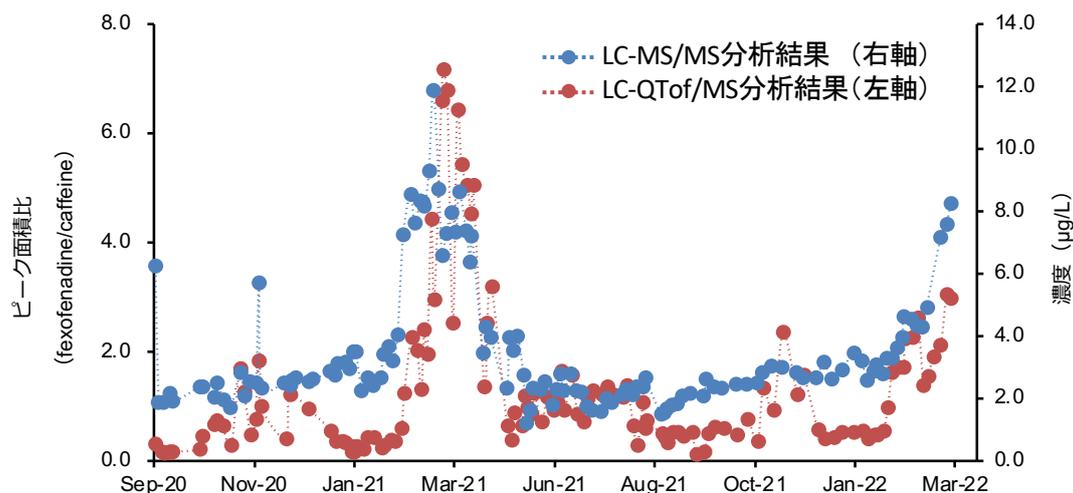


図4 LC-MS/MSにより定量したfexofenadineの濃度推移とLC-QToF/MSにより検出したfexofenadineとcaffeineのピーク面積比

参考文献

- 1) Nakada, N. *et al.*, *Env. Sci. Technol.*, 42, pp.6347, 2008.
- 2) Ghosh, G. *et al.*, *Env. Health Perspect.*, 118, pp.103, 2010.
- 3) Halwatura, L.M. *et al.*, *Env. Sci. Technol. Letters* 9(6), pp.567, 2022.
- 4) Nagayoshi, Y. *et al.*, *Biomolecules*, 12(9), pp.1233, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田典秀、阿部圭汰、福田航平、岩田桃子、江口哲史、竹内悠
2. 発表標題 COVID-19流行期に下水道へ流入する市販医薬品成分の濃度変動
3. 学会等名 環境化学物質 3 学会合同大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹内 悠 (Takeuchi Haruka) (70835272)	京都大学・工学研究科・助教 (14301)	2022年度まで

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------