

代謝物を含めた河川環境中に残留する医薬品成分の 包括的な汚染実態評価

大阪薬科大学 東 剛志

1. はじめに

1.1 研究の背景

近年、医薬品成分による新たな河川環境汚染問題が世界的規模で報告されている^{1,2)}。この環境汚染問題に関して、日本では国内外で検出例が報告されている 100 成分程度の医薬品成分を網羅的にピックアップし、河川水及び下水中の汚染実態や環境動態の把握^{3,4)}をはじめ、下水処理場での水処理工程における挙動⁵⁾や除去に有効な水処理技術の開発^{6,7)}、水棲生物を対象とした生態毒性影響評価⁸⁾等、非常に多岐に渡る大規模な研究が、産官学連携により行われてきた。

この様な目覚ましい研究の発展により、医薬品成分による河川環境汚染問題の概要が次第に明らかになりつつある過程で、生態系への毒性影響や人への健康影響に関する環境リスクが懸念される医薬品成分が存在することが明らかになってきている。特に、抗菌剤による河川環境中からの薬剤耐性菌発生の助長の問題⁹⁾や、抗インフルエンザ剤による野生のカモ類を通じた薬剤耐性ウイルス発生の助長の問題¹⁰⁾、向精神剤による魚類の異常行動¹¹⁾、そして抗がん剤による毒性影響等の問題¹²⁾については、社会の関心も高く、医薬品と環境との繋がりや、環境リスク削減対策のあり方が社会問題化するケースも発生している。

ところで、これらの医薬品成分による環境汚染問題については、代謝物が主たる環境リスクとなりうる場合が存在する。例えば、抗インフルエンザ剤のタミフルの場合については、タミフルを服薬後、体内で代謝されて生成する薬理活性代謝物が主として環境に悪影響を及ぼしうるということが報告されている¹⁰⁾。現在臨床現場で用いられている医薬品成分の中には、タミフルのように代謝物が薬効本体となるものが存在している。しかしながら、タミフルや、畜産で用いられている抗菌剤のカルバドックスを対象とした研究例^{4,5)}を除き、医薬品成分の代謝物については世界的にみても研究例は極めて少なく、その存在実態について未だ不明なことが多い状態にある（図 1）。

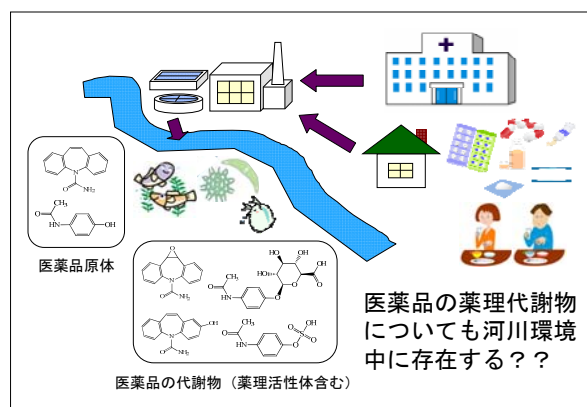


図 1：医薬品成分だけでなく、薬理活性体を含む医薬品の代謝物が河川環境中に存在している??

1.2 医薬品成分の代謝物を含めた河川環境中の存在実態調査を行うことの重要性

医薬品成分の代謝物を含めて河川環境中の存在実態調査を行うことには、2つの重要な理由がある。1つ目は、1.1の研究の背景でも述べたように、医薬品成分の中には抗インフルエンザ剤のタミフルの様に、服薬時には薬効を有さないが、服薬後に体内で薬効を発現する形態に代謝されるものが存在するからである。この様な成分については、代謝物についての調査を行うことが必須となるが、これまでの研究で対象とされているのは医薬品成分の原体が中心となっており、代謝物についても知見を収集していくことが課題になっている。2つ目は、医薬品成分が河川環境に存在する場合、様々な因子により減衰影響を受けるが、減衰後の化学構造が変化した物質（分解生成物）については定量評価を伴った存在実態評価を試みる 경우가多くの場合困難であり、詳細な環境動態の解明を試みる上で課題になっているためである。河川環境中での減衰影響因子としては、太陽光による光分解反応の他に、河川環境中に生息する微生物等による酸化・水酸化反応を伴う生分解反応が挙げられる¹³⁾ことから、一部は体内で行われる酸化・水酸化を伴う代謝反応と概ね類似した経路を辿ると考えられる。

そのため、これまで研究対象とされてきた医薬品成分に加えて、その代謝物についても研究を行うことは、河川環境中における医薬品成分の存在実態と、その環境リスク削減対策のあり方について考察を行う上でも、有用な知見となりうることが期待される。

1.3 本研究の目的

本研究では、河川環境中の存在実態や挙動について、未だ不明なことも多い医薬品成分とその代謝物について着目し、代謝前の医薬品原体と合わせて河川水及び下水試料を対象とした高感度な分析法を開発する。そして、開発した分析法を駆使して、約1,600万人の水道水源であるとともに、多くの生物の生息地ともなっている淀川流域¹⁴⁾を対象に、中下流域の人口密集地に位置する都市河川（安威川・神崎川・淀川）¹⁵⁾を中心とした調査を行い、その存在実態を先駆けて明らかにする。また、室内でのバッチ実験を行い、河川環境中での減衰に伴う医薬品成分の分解生成物と、医薬品代謝物との関係性についても検討を試み、より詳細で包括的な環境動態の解明に繋げる。そして、得られた結果に基づいて、河川環境中に存在する医薬品の代謝物が有する環境へのリスク影響について考察を試みる。

2. 実験方法

2.1 分析対象成分

本研究では、医薬品成分とその薬理活性代謝体を含む代謝物に着目して研究を行った。具体的には、下熱鎮痛剤のAcetaminophenとLoxoprofen、向精神剤のCarbamazepine、抗がん剤のTamoxifenの4成分について、これらの医薬品成分の代謝物（Acetaminophen：Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate）、（Loxoprofen：Loxoprofen Alcohol）、（Carbamazepine：2-Hydroxy Carbamazepine、3-Hydroxy Carbamazepine、10-Hydroxy Carbamazepine、10,11-Dihydroxy Carbamazepine、Carbamazepine 10,11-Epoxy、Acridine、Acridone）、（Tamoxifen：4-Hydroxy Tamoxifen、*N*-Desmethyl Tamoxifen）の合計16成分について研究を行った。本研究で対象にした医薬品成分及びその代謝物の物理化学的性質を、表1-1及び表1-2にまとめている。

表 1-1：本研究で対象にした医薬品成分及びその代謝物の物理化学的性質¹⁶⁾

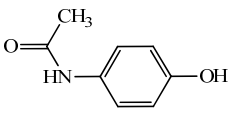
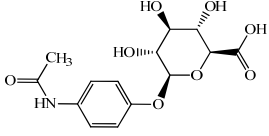
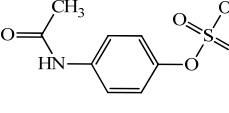
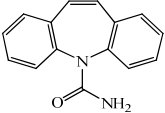
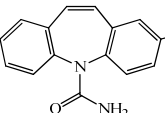
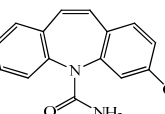
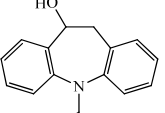
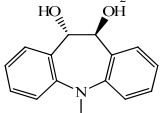
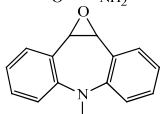
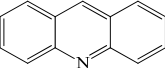
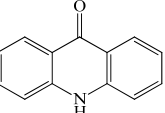
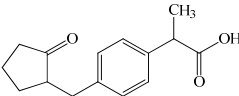
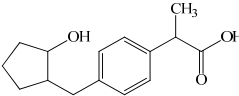
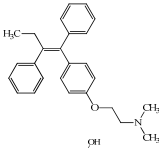
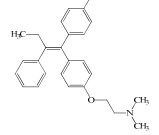
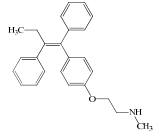
成分名	分子量	構造式	pK _a	LogP
Acetaminophen	151.2		9.9	0.3
Acetaminophen Glucuronide	327.3		2.8	-1.9
Acetaminophen Sulfate	231.2		-4.7	-0.2
Carbamazepine	236.3		13.9	2.7
2-OH Carbamazepine	252.3		10.3	0.5
3-OH Carbamazepine	252.3		10.0	1.8
10-OH Carbamazepine	254.3		13.8	0.6
10,11-DiOH Carbamazepine	270.3		12.9	-0.4
Carbamazepine 10,11-Epoxyde	252.3		13.9	0.2
Acridine	179.2		5.6	3.5
Acridone	195.2		5.6	3.2

表1-2：本研究で対象にした医薬品成分及びその代謝物の物理化学的性質¹⁶⁾

成分名	分子量	構造式	pK _a	LogP
Loxoprofen	246.3		4.4	1.7
Loxoprofen Alcohol	248.3		4.4	2.2
Tamoxifen	371.5		8.7	5.1
4-OH Tamoxifen	387.5		2.8 (Acid) 8.7 (Base)	2.2
N-Desmethyl Tamoxifen	357.5		9.4 (Base)	5.1

2.2 研究対象流域

2.2.1 対象流域の概要

本研究では、医薬品とその代謝物を含めて、河川環境中に存在する医薬品成分の汚染実態を明らかにするため、約 1,600 万人の水道水源であると同時に、1,000 種を超える動植物の生息地ともなっており、飲料水源と生態系保全の両面で日本を代表する重要な水系の 1 つである琵琶湖・淀川流域¹⁴⁾の中でも人口が集中する、中下流域に位置する都市部の河川（安威川・神崎川・淀川）¹⁵⁾を対象として調査を行った。また、これらの流域内に位置する主要な下水処理場についても合わせて対象にした。

2.2.2 サンプルングの方法

水試料のサンプルングは、ステンレス製のバケツを用いスポット採水により行った。河川水の採水では、橋からロープを結んだバケツを下ろし、流心の水を採取した。下水処理場については、塩素消毒後に公共水域に放流される放流水についても採水を行った。採水及び実験の様子を図2-1及び図2-2に示す。サンプルングは、2014年5月、7月、12月、2015年2月に通年での調査を行った。なお、いずれの調査日の先行2日間に、1 mmを超える降水は観測されなかった¹⁷⁾。また、安威川・神崎川では下流地点が感潮域に属する²⁾ため、干潮時に採水を行った。

水試料はガラス瓶に採取し、採取後 pH を下げることで微生物による生分解の活性を下げ、水試料中に残留する残留塩素による酸化の影響を軽減する目的で、抗酸化剤のアスコルビン酸を添加した。採取したサンプルは分析時まで遮光・冷蔵保存し、速やかに分析を行った。



図 2-1（左）：安威川・神崎川水系における調査の様子，2-2（右）：実験の様子

2.3 分析の方法

2.3.1 前処理

採取した水試料は、ガラス繊維ろ紙（GF/B（ $1.0\mu\text{m}$ ），Whatman）で吸引ろ過して得たる液を、各種固相抽出カートリッジに通水させて固相抽出した。なお、医薬品成分及びその代謝物の多くは、水酸基やカルボキシル基といった酸性官能基を有するものが多く、酸性条件下ではイオンに解離していない分子型として存在すると考えられる。実際、これまでの河川環境中の医薬品成分の分析例においても、pH3程度の酸性条件下で分析を行っている例が多く報告されている^{18,19)}。そのため、本研究においても、pH3付近の酸性条件下において固相抽出条件の検討を行った。

固相抽出の操作については、メタノールと1M HClでpHを3に調整したMilliQで固相のコンディショニングを行った後、サンプル試料を固相抽出カートリッジに通水させた。通水後、固相をpH3のMilliQで洗浄し、吸引脱水した。その後、各種溶出液を用いて溶出を行い、溶出液を窒素ガスで穏やかに濃縮乾固し、0.1%ギ酸：メタノール（9：1（v/v））の溶液に再溶解させUPLC-MS/MSで分析を行った。分析のフローを図3にまとめている。

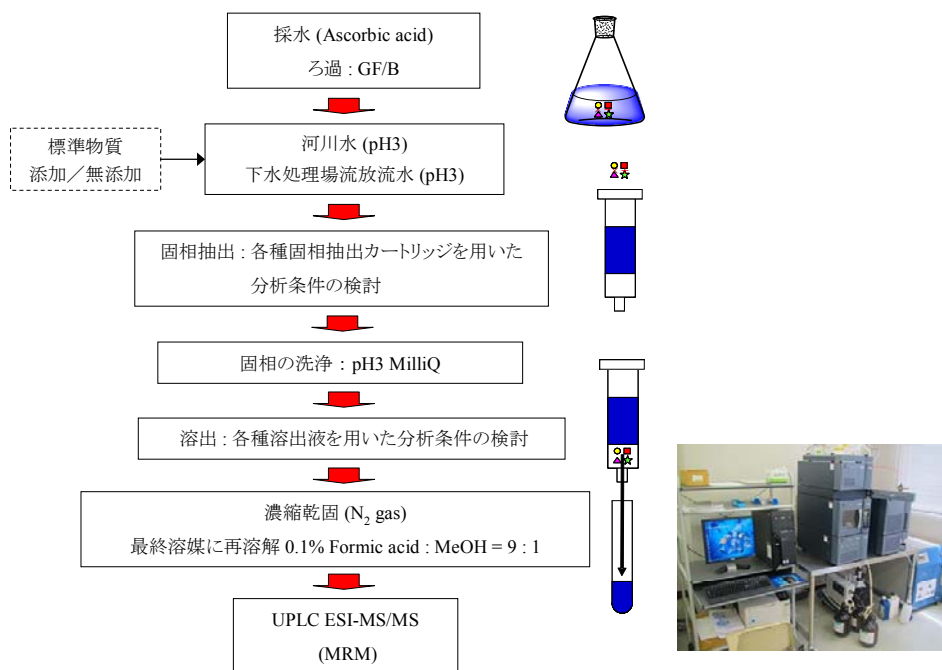


図 3：河川水及び下水試料を対象にした医薬品成分及びその代謝物の分析フロー

2.3.2 UPLC-MS/MS測定方法

分析対象成分の分離・同定は、UPLC-MS/MS (LC : Waters Acquity Ultra Performance™ liquid chromatography (UPLC™)、MS : Waters ACQUITY TQD mass spectrometer (イオン化法 : ESI) (Waters company Ltd.)) を用いて行い、LC カラムに ODS カラム (BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters)、移動相には A 液 : 0.1% ギ酸水溶液と B 液 : メタノールを用いたグラジエント溶離法により分離し、MRM 分析を行った。表 2 に UPLC-MS/MS の測定条件をまとめている。UPLC-MS/MS によるデータ解析、定量は Mass Lynx 4.1 software (Waters) を用いて行った。

定量方法は既報^{3,18)}に従い、標準物質を添加せずに前処理を行う無添加系と、標準物質を添加して前処理を行う添加系の 2 系に分けて絶対検量線法により各々分析を行い、添加系と無添加系の濃度差より回収率を算出し、この回収率で無添加系の濃度補正を行ったものを実水試料中の濃度とした。定量に用いる検量線については、1 mg/10 mL の濃度に調製した各成分の保存用標準液を用いて、メタノールで希釈して調整した 1 mg/L の混合標準液を、固相抽出で用いる最終溶媒と同じ 0.1% ギ酸 : メタノール = 9 : 1 (v/v) の溶液を用いて段階的に希釈した試料を用いて検量線を作成した。

UPLC-MS/MS の検出下限値 (Limit of Detection : LOD) 及び定量下限値 (Limit of Quantification : LOQ) の算出には、一般的な化学分析にも用いられており、河川環境中の医薬品成分類の分析^{4,5)}を始めとして、農薬²⁰⁾の分析や有機フッ素化合物 (PFOS・PFOA)²¹⁾等についても幅広い報告例のある、S/N=3 を検出下限値、S/N=10 を定量下限値とする方法を用いた。このため、本研究では S/N 比が 3 未満の場合は測定下限値未満として検出されず (Not Detected : N.D.)、ピークが検出はされているが S/N 比が 3 以上 10 未満の場合は定量下限値未満 (Not Quantified : N.Q.) とした。

表 2 : UPLC-MS/MS 測定条件のまとめ

LC	Waters UPLC			
Column	Waters AQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm			
Column Temperature	60°C			
Mobile Phase	A : 0.1% HCOOH aq.			
	B : MeOH			
Gradient	Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
	0	0.35	90	10
	2.0	0.35	90	10
	8.0	0.35	75	25
	14.0	0.35	45	55
	22.0	0.35	45	55
	24.0	0.35	10	90
	25.0	0.35	90	10
Injection	10 μL			
MS/MS	Waters Quattro Micro ^{TQD}			
Ionization	ESI - Positive ion, Negative ion			

3. 結果と考察

3.1 固相抽出と UPLC-MS/MS を組み合わせた河川水及び下水試料を対象とした高感度な同時分析法の開発

3.1.1 分析に適した固相抽出カートリッジについての検討

分析に適した固相抽出カートリッジについて、検討を行った固相抽出カートリッジ

は、これまでに河川環境中に存在する医薬品成分の分析をはじめ、農薬や PFOS・PFOA についても分析例の多い Divinylbenzene/*N*-vinyl pyrrolidone copolymer を固相とする親水性と疎水性をバランスよく組み合わせて重合させたポリマー系の充填剤である OASIS HLB (Waters)²²⁾ の他、種々の極性をもつ固相について検討を行うことを目的として、Sep-Pak tC₂、Sep-Pak C₈、Sep-Pak C₁₈、Sep-Pak tC₁₈、Sep-Pak PS2 (Waters) の 6 種類の固相抽出カートリッジについて検討を行った。なお、水試料は河川水を用いた。固相抽出で用いる溶出液については、まず初めにメタノール及びアセトンを用いた検討を行い、対象成分を幅広く分析可能な固相抽出カートリッジの選択を行った。次に、酢酸エチルやジクロロメタン、ヘキサンといった有機溶媒の他、酸や塩基を添加したメタノール溶液やアセトン溶液等の各種溶出液を用いて、分析に適した固相抽出条件について検討を行った。図 4 に各種固相抽出カートリッジを用いて分析法の検討を行っている際の写真を、得られた結果を表 3 に各々まとめている。

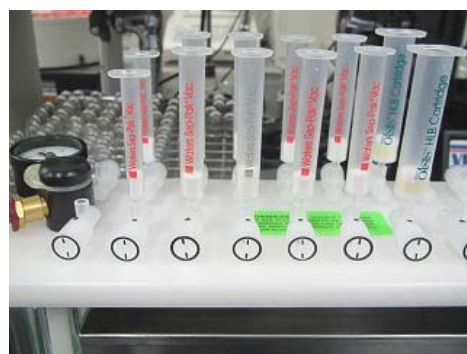


図 4: 各種固相抽出カートリッジを用いた分析条件の検討

	Recovery rate (%)					
	SepPak tC ₂	SepPak C ₈	SepPak C ₁₈	SepPak tC ₁₈	SepPak PS2	OASIS HLB
Acetaminophen	1	4	24	5	80	109
Acetaminophen Glucuronide	0	0	8	1	26	77
Acetaminophen Sulfate	1	17	29	4	28	54
Carbamazepine	88	120	114	114	57	85
2-OH Carbamazepine	54	82	51	73	84	67
3-OH Carbamazepine	50	84	88	64	105	60
10-OH Carbamazepine	326	313	963	385	255	121
10,11-DiOH Carbamazepine	149	249	266	233	189	86
Carbamazepine 10,11-Epoxyde	72	102	41	106	24	75
Acridine	16	26	26	29	45	106
Acridone	66	136	89	136	420	93
Loxoprofen	54	146	107	157	135	89
Loxoprofen Alcohol	43	90	65	109	81	70
Tamoxifen	0	0	0	0	0	42
4-OH Tamoxifen	0	0	0	0	0	138
<i>N</i> -Desmethyl Tamoxifen	0	0	0	0	0	79

得られた結果より、tC₂、C₈、C₁₈、tC₁₈ といったシリカ系の固相では、Acetaminophen や Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate は溶出液中に目的成分が溶出されず、分析を行うことが困難であった。一方で、Sep-Pak PS2 や OASIS HLB といったポリマー系の固相では、これらの成分の分析が可能であったが、Tamoxifen、4-Hydroxy Tamoxifen、*N*-Desmethyl Tamoxifen についてはメタノール及びアセトンを用いた溶出系では目的成分が溶出されなかった。この原因として、主にこれらの成分が固相に吸着されていない場合と、固相から溶出されていない場合が考えられる。このことについては、Tamoxifen、4-Hydroxy Tamoxifen、*N*-Desmethyl Tamoxifen の物理化学的性質

については、対象とした医薬品成分の中でも極性が低い成分であるため、固相には吸着されているが、固相からの溶出が困難となっている可能性が高いことが考えられた。そのため、Sep-Pak PS2 と OASIS HLB のうち、回収率がより良好であった OASIS HLB に着目して、溶出効率の改善を目的として各種溶出液の検討を行った。

その結果、10%ギ酸含有メタノール及びアセトンと、5%アンモニア含有メタノールの組み合わせの溶出液を用いた場合のみ、これらの成分の分析が可能であることが分かった。なお、本分析法を下水処理場の放流水試料に適用した場合、河川水と比較して回収率に±20%程度の差異はあるものの、河川水と同様に対象成分全てを同時分析可能であった。酸及び塩基を含むメタノール及びアセトン溶出液を用いた場合に、Tamoxifen を含む関連成分が分析可能となる原因について、詳細な理由は不明であるものの、通常の実験操作では分析が困難である成分群を含めて、医薬品及びその代謝物を一度の操作で同時分析可能な分析法を確立出来たことは、流域調査の際に多地点における大規模な調査を行うことを想定すると、実用性や効率性の面で良好な結果になったと考えられる。

3.1.2 UPLC-MS/MS 測定条件の検討

UPLC-MS/MS の測定条件の検討については、MS/MS 部での分析条件の最適化、次いで UPLC 部での分析条件の最適化を行った。

MS/MS 部の測定条件の検討では、MS Scan で親イオン (Parent Ion) の m/z と親イオンピーク強度が最も高くなるコーン電圧 (Cone voltage: CV) を決定し、次に Daughter Scan を行い、娘イオン (Daughter Ion) の m/z と娘イオンのピーク強度が最も高くなるコリジョンエネルギー (Collision Energy: CE) について最適化を行い、親イオンと娘イオンの強度が各々最も高くなる組み合わせを決定した。なお、本研究ではイオン化法に ESI-Positive 及び ESI-Negative モードを使用した。これらの最適化された MS/MS 条件を用いて、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 分析を行った。

UPLC 部の測定条件の検討では、河川環境中に存在する医薬品成分の分析例では、C₁₈ カラムを用いた多成分同時分析法が報告されている^{18,19)}。そのため、C₁₈ カラムを用い、グラジエントの条件について検討を行うことで、医薬品の原体と代謝物を同時分析可能な、汎用性と実用性が高い分析法の検討を試みた。その結果、グラジエントの条件を工夫することで、本研究で対象とした全ての成分の分離が可能であった。そのため、C₁₈ カラムを用いて実河川及び下水試料の分析を行った。

3.2 淀川流域に位置する都市河川を対象とした存在実態の把握調査

3.2.1 検出濃度の分布

サンプリングを行った地点について、図 5 に河川水中に存在する医薬品成分及びその代謝物の濃度の分布を、図 6 に下水処理場放流水中に存在する医薬品成分及びその代謝物の濃度の分布について、生物処理後に塩素消毒を行っている下水処理場の放流水と、生物処理後にオゾン処理を行っている下水処理場の放流水について分類してまとめたものを各々示す。

得られた結果より、対象とした 16 成分のうち、河川水からは 12 成分、下水処理場放流水中からは 14 成分が検出された。このうち、医薬品成分の代謝物については、河川水から Acetaminophen Glucuronide、2-Hydroxy Carbamazepine、3-Hydroxy Carbamazepine、Carbamazepine 10,11-Epoxy、Acridine、Acridone、4-Hydroxy

Tamoxifen、*N*-Desmethyl Tamoxifen が数 ng/L～最大 90 ng/L の濃度で、下水処理場放流水中からは Acetaminophen Glucuronide、2-Hydroxy Carbamazepine、3-Hydroxy Carbamazepine、10-Hydroxy Carbamazepine、Acridine、Acridone、Loxoprofen Alcohol、4-Hydroxy Tamoxifen が数十 ng/L～最大で 1,110 ng/L の濃度で検出された。

河川水と下水処理場放流中から検出される医薬品成分及びその代謝物については、概ね下水処理場放流水濃度が 10 倍程度高濃度で検出される傾向が見みられた。また、下水処理場放流水中から検出される成分の多くは、河川中からも検出される傾向にあるが、10-Hydroxy Carbamazepine、10, 11-Dihydroxy Carbamazepine、Loxoprofen Alcohol の様に、下水処理場放流水中からは検出されるが、河川水中からは検出されない成分や、Carbamazepine 10, 11-Epoide や *N*-Desmethyl Tamoxifen の様に、河川中からは検出されるが、水処理場放流水中からは検出されない成分が存在する特徴がみられた。これらの要因については、河川環境中での流下に伴う減衰影響が一部関係していることが考えられた。

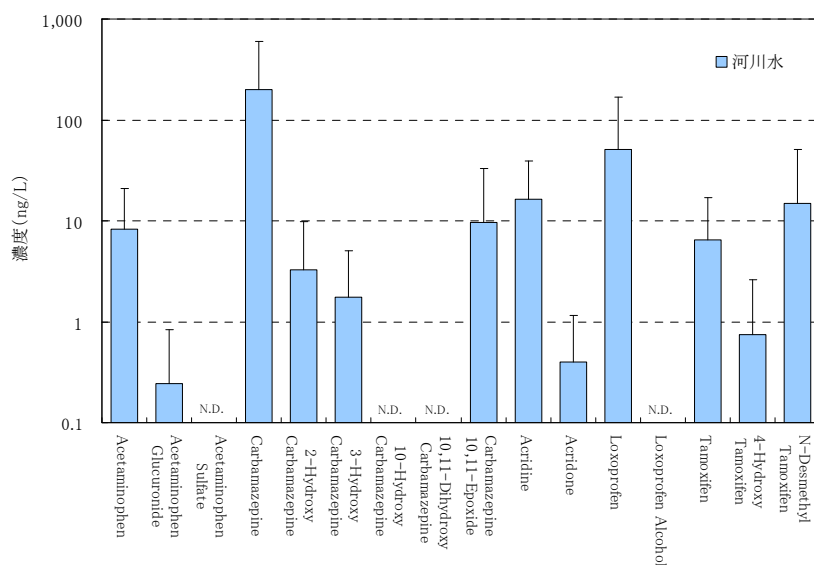


図 5：河川水中の医薬品成分及びその代謝物の検出濃度の分布

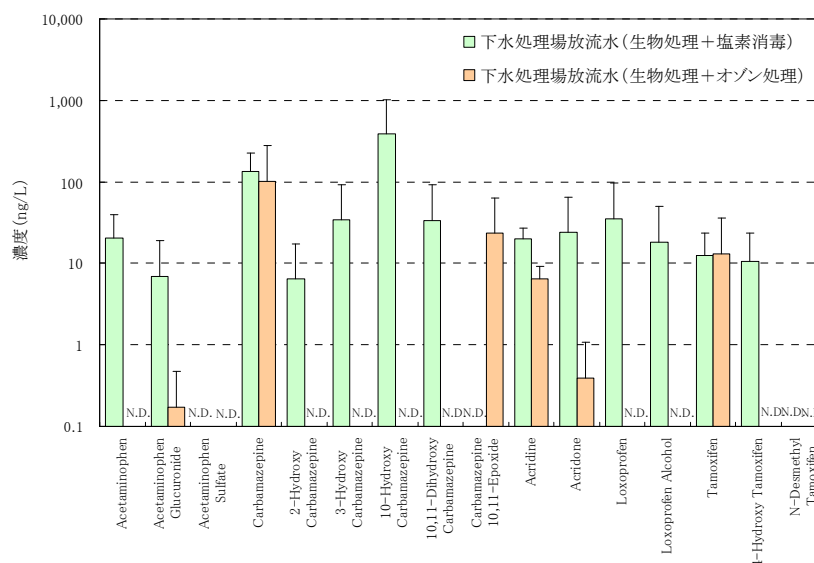


図 6：下水処理場放流水中の医薬品成分及びその代謝物の検出濃度の分布

一方で、生物処理後にオゾン処理を行ってから河川へと放流している放流水については、医薬品成分だけでなく、その代謝物についても概ねほぼ全量の除去が可能である傾向がみられ、オゾン処理による処理の有効性が示唆された。一方で、Carbamazepine 10,11-Epoxy、Acridine、Acridone といった一部の代謝物では、オゾン処理後も放流水中に残留している傾向がみられた。特に、Carbamazepine 10,11-Epoxy については、放流水中からは検出されないが、オゾン処理後の放流水中からは検出される傾向がみられた。これは、オゾンによる酸化処理により、Carbamazepine から Carbamazepine 10,11-Epoxy が一部生成している可能性があることを示唆しているものと考えられ、今後さらなる検討を試みていくことが重要であると考えられる。

これまでに、Acetaminophen や Carbamazepine については国内外で河川水及び下水中からの検出報告例は多数なされている^{4,5,23)}が、これらの成分の代謝物についての検出例については世界的にも未だ極めて少ないため、有益な知見が得られたと考えられる。また、Loxoprofen や Tamoxifen については、その代謝物を含めて、研究代表者らが知る限り本研究がはじめての検出報告となったと考えられる。

3.2.2 汚濁負荷量の算出及び主要な汚濁負荷源の推定

次に、研究対象とした医薬品成分及びその代謝物について、調査を行った安威川・神崎川流域における主要な汚濁負荷源の推定を行った。河川環境中での動態及び負荷源の推定を行うために用いる各地点の負荷量の算出は、各採水地点から検出された各物質の濃度に、河川流量又は下水処理場からの放流量を乗じることで算出した。河川の流量については、大阪府の流域調査の結果及び淀川河川事務所の報告値²⁴⁾を、下水処理場の流量については、下水処理場を管理している各自治体より得られた放流量を用いた。

本研究では、流域内に存在する全ての支川や下水処理場を含めた流域規模での大規模な存在実態の調査は行っていないため、詳細な負荷量の収支や汚濁負荷源の推定を行うことは出来ないが、本研究で調査を行った河川及び下水処理場放流水由来の負荷量を基に汚濁負荷源の推定を行った場合でも、下水処理場放流水由来の負荷量が全体の負荷量の 50%以上を占めているものが多いことが分かった。この結果については、これまでに淀川上中流域や安威川・神崎川流域で行っている医薬品成分^{4,25)}や内分泌かく乱物質²⁶⁾を対象とした調査結果と比較しても類似していることから、代謝物についても下水処理場が占める割合が大きいことが分かった。

今回調査対象とした安威川・神崎川流域の水試料は、飲料水としての利用はなされていないため、飲み水を通じた直接的なヒトへの健康影響は無視出来ると考えられる。しかし、安威川・神崎川流域における BOD の値は 3.0 mg/L 前後で概ね 5.0 mg/L 以下で保たれており²⁷⁾、環境基準は超過していないものの、淀川中流域の枚方大橋では 1.0 mg/L 前後である²⁷⁾ことを考慮すると比較的高い状態にある。そのため、河川環境中に生息する生態系への影響を軽減する目的でも、大腸菌等の水質指標や、ウイルス等の他の環境汚染物質と合わせて、汚濁負荷の軽減を目的とした技術として、下水処理場においてオゾン処理等の除去に有効な水処理技術の導入率の向上を行い、琵琶湖・淀川流域全体としての水質改善を図っていくことが重要であると考えられた。

3.3 バッチ実験による医薬品成分の減衰性と代謝物生成の評価試験

3.3.1 UVランプを用いた光分解に伴う生成物評価試験

太陽光による河川環境中に存在する化学物質への減衰影響には、医薬品成分に限らず一般的に多くの化学物質が吸収極大を有する低波長領域（紫外線）の光線の寄与が大きいことが知られている。ここで、地上に到達する紫外線は波長約300 nm以上の光線であることが知られている²⁸⁾。そのため、波長300～400 nm付近の紫外線領域において減衰影響の検討を行うため、波長365 nmを中心とした照射ピークを持つUVランプ(3UV Multi-Wavelength Lamp, 3UV-38、フナコシ)を用いて減衰性の評価を行った。

太陽光照射による減衰影響評価試験は、EPA^{29, 30)}やOECD³¹⁾によるガイドラインの他、既報^{4, 13)}に準じた方法により実施した。用いる水試料については、純水系や河川水を用いた系による報告例がなされている^{4, 13)}が、河川水を用いた評価の際には河川水中に存在する微生物の影響の他に、直接光分解による減衰に加えて共存物質による影響（間接光分解）を考慮する必要がある⁴⁾ため、本研究では初期評価として、直接光分解による光分解に伴う生成物のスクリーニング試験を行うことを目的として、MilliQを用いた純水系での評価を行った。

3.3.2 UV照射実験

UVランプを用いた減衰性評価試験に用いる水試料として、本研究で調査を行った実河川水や下水試料中からの検出濃度やUPLC-MS/MSの定量下限を考慮し、1M-酢酸アンモニウム MilliQ (pH7) に Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate、Loxoprofen、Carbamazepine、Tamoxifen の各種標準溶液を各々添加して 100 ppb 又は 1,000 ppb に調製した溶液を調製した。この溶液を、UV 照射サンプルと、アルミホイルで遮光したコントロールに分けて石英試験管に分け、UV を照射し



図 7：UV 照射による生成物評価実験

た（図 7）。この時、時間経過に伴う揮発による体積量の変化に伴う濃度の変化を防ぐため、試験管にシリコン栓を付けて実験を行った。実験は、1 年の平均的な河川水温に該当³²⁾する 20℃の恒温室（暗所）で行った。照射時間は照射開始時間を 0 時間とし、経時的な減衰の影響を評価する目的で、1・2・5・9・15 日後に各々試料を採取した。なお、採水時には試験管内を十分攪拌してから採取し、反応溶液を直接 UPLC-MS/MS で分析した。また、紫外線照射強度を、フナコシの UV-SD アドバンスで合わせて測定した。さらに、反応前後の pH についても測定を行った。

3.3.3 UV照射実験結果

評価を行った各成分のうち、本研究で対象とした Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate、Loxoprofen、Carbamazepine、Tamoxifenのうち、Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfateについては反応終了時の15日後で10%程度減衰する傾向がみられた。なお、Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate の減衰に伴う、Acetaminophen の生成はみられなかった。また、Loxoprofen、Carbamazepineについては、反応終了時の15日後においても減衰影響は確認されなかった。一方、TamoxifenについてはUV照射開始から1日目で完全に消失するが、Tamoxifen からメチル基が外れた *N*-Desmethyl Tamoxifen や 4-Hydroxy Tamoxifen については、反

応溶液中からは検出されなかった。なお、実験の前後でサンプル・コントロール試料ともにpHは変化しなかった。UV照射による医薬品成分の減衰と、関連する代謝物の生成についてまとめたものを表4に示す。

表 4：UV 照射による医薬品成分の減衰と関連する代謝物の生成

	関連代謝物	減衰に伴う関連代謝物の生成
Acetaminophen Glucuronide	Acetaminophen	減衰影響みられず
Acetaminophen Sulfate	Acetaminophen	減衰影響みられず
Carbamazepine	2-Hydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	3-Hydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	10-Hydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	10,11-Dihydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	Carbamazepine 10,11-Epoxy	減衰影響みられず
	Acridine	減衰影響みられず
	Acridone	減衰影響みられず
Loxoprofen	Loxoprofen Alcohol	減衰影響みられず
Tamoxifen	Tamoxifen	生成せず
	4-Hydroxy Tamoxifen	生成せず
	N-Desmethyl Tamoxifen	生成せず

本研究で実験を行った条件では、15日間のUV照射で概ね100日程度太陽光を照射したのと同程度のUV照射強度に相当する。日本の河川では海外と比較して土地の起伏が大きいこともあり、琵琶湖・淀川水系の場合では、桂川・宇治川・木津川の合流地点付近から淀川の下流域まで概ね9時間前後で到達すると推計する報告³³⁾がなされていることを考慮すると、今回研究対象とした医薬品成分及びその代謝物に関しては、一部の成分を除いては、河川流下に伴う光分解による減衰影響や、減衰に伴い医薬品成分から代謝物へと変化する影響は殆ど見込まれないことが分かった。これらの結果については、Carbamazepineについて河川環境中での難分解性を報告している研究例がある^{4, 13)}ことを考慮しても、妥当な結果であると考えられた。Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate、Loxoprofenについての光分解に対する難分解性や、Tamoxifenに対する光分解性を明らかにしたのは、当該研究者らが知る限り本研究が初めての研究例であると考えられる。

3.4 生分解に伴う生成物評価試験

3.4.1 試験水試料

生分解による減衰性評価試験では、OECD³⁴⁾によるガイドラインの他、既報^{13, 35)}に準じた方法により実施した。減衰性評価試験に用いる水試料について、河川ごとに構成する微生物の分布は異なるため、複数の地点での河川水試料を用いた検討を行うことが望ましいが、本研究では生分解に伴う生成物のスクリーニング試験を行うことを目的として、淀川河川の代表的な地点である枚方大橋の河川水試料を用いた。水試料の採水はステンレス製のバケツを用いて行い、採水後アスコルビン酸を添加せずにクーラーボックスに保管して持ち帰り、夾雑物を除きかつ微生物を取り除かないように、孔径 3.0 μm のメンブレンフィルターでろ過したろ液試料を用いて実験を行った。

3.4.2 生分解実験

生分解性評価試験では、UV 照射実験と同様に、実河川水や下水試料中での検出濃度や UPLC-MS/MS の定量下限を考慮し、河川水に標準溶液を添加して 100 ppb に調製した溶液を、コントロール試料として 1M-酢酸アンモニウム MilliQ (pH7) に Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate、Loxoprofen、Carbamazepine、Tamoxifen の各種標準溶液を各々添加して 100 ppb 又は 1,000 ppb に調製した溶液を調製した。この溶液を、生分解サンプルとコントロールに分けて三角フラスコに移し、シリコン栓をした後、20℃ の恒温槽（暗所）で振とう器（NR-80 TAITEC）を用いて約 100 rpm で回転振とうした（図 8）。反応時間は、反応開始時間を 0 日として、経時的な減衰の影響を評価する目的で 2・6・12・20・30 日後に各々試料を採取し、10 mL ガラスシリンジにシリンジフィルター（GF/B ガラス繊維ろ紙（Whatman：13 mm GD/X シリンジフィルター（1.0 μ m））を装着してろ過し、ろ液を UPLC-MS/MS で測定した。また、反応前後の pH についても測定を行った。



図 8: 生分解による生成物評価実験

3.4.3 生分解実験結果

評価を行った各成分のうち、Loxoprofen、Carbamazepine の 2 成分については、反応終了時の 30 日後においても減衰影響は確認されなかったが、Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate については、時間の経過に伴い減衰する傾向がみられた。また、実験の前後でコントロール試料の pH は変化しなかったが、河川水を用いたサンプルでは pH が 0.4～0.5 程度酸性に変化していた。これは、微生物が多く存在する実河川水を用いて、1 ヶ月程度の長期間実験を行っていることに原因していると考えられた。pH を同一条件に保ちながら長期間の実験を行うためには、河川水試料中に人工的に pH 調整試薬を別途添加する必要があるが、人工的な評価系になるという点で課題が残る。そのため、本研究では実験により得られた結果を直接用いて考察を行った。

Acetaminophen Sulfate については、反応開始後 30 日目で初期濃度の概ね 60% 程度に減衰する影響がみられた。これは、生分解により化学構造が変化していることに起因すると考えられるが、Acetaminophen Sulfate から硫酸抱合基が外れた Acetaminophen は、いずれの反応時間においても生成していなかった。しかしながら、Acetaminophen Glucuronide については、反応開始後 1 日で全量が消失し、変わりに Acetaminophen Glucuronide からグルクロン酸抱合基が外れた Acetaminophen が生成していた。その生成割合は、反応開始時に添加した Acetaminophen Glucuronide に対して物質質量 (mol) 換算で概ね 70% 程度であると考えられた。なお、Acetaminophen Glucuronide から生成したと考えられる Acetaminophen は、時間の経過に伴い減衰し、反応開始から 20 日で完全に消失した。また、Tamoxifen については反応開始後 1 日で全量が消失し、反応開始後 12 日から 20 日に掛けて UV 照射実験の際と同じ *N*-Desmethyl Tamoxifen が生成したが、30 日目には消失していた。生分解による医薬品成分の減衰と、関連する代謝物の生成についてまとめたものを表 5 に示す。

生分解反応による減衰に伴い生成する物質と、3.3.3 で述べた UV 照射による減衰に伴

い生成する物質の傾向が異なる原因については、生分解反応と光分解反応の反応機構の違いが影響していることが考えられる。そのため、河川環境中での流下に伴う減衰により生成する物質について検討を行う際には、生分解反応と光分解反応の両方の系で評価を行うことが重要であると考えられる。

表 5：生分解による医薬品成分の減衰と関連する代謝物の生成

	関連代謝物	減衰に伴う関連代謝物の生成
Acetaminophen Glucuronide	Acetaminophen	Acetaminophen
Acetaminophen Sulfate	Acetaminophen	生成せず
Carbamazepine	2-Hydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	3-Hydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	10-Hydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	10,11-Dihydroxy Carbamazepine	減衰影響みられず
	Carbamazepine 10,11-Epoxyde	減衰影響みられず
	Acridine	減衰影響みられず
	Acridone	減衰影響みられず
Loxoprofen	Loxoprofen Alcohol	減衰影響みられず
Tamoxifen	Tamoxifen	減衰影響みられず
	4-Hydroxy Tamoxifen	減衰影響みられず
	N-Desmethyl Tamoxifen	N-Desmethyl Tamoxifen

3.4.4 実河川における存在実態との比較

UV 照射と生分解による減衰影響評価試験により得られた結果を基に、実河川との比較を行った。3.2.1 で考察したように、河川中からは検出されるが、下水処理場放流水中からは検出されない傾向にある Carbamazepine 10,11-Epoxyde や N-Desmethyl Tamoxifen については、Carbamazepine についてはオゾンなどの高度な酸化技術を用いた水処理工程による酸化によるもの、N-Desmethyl Tamoxifen については河川環境中での Tamoxifen が生分解反応を受けて生成することによる可能性があることが明らかになった。また、Acetaminophen については、Acetaminophen Sulfate については河川環境中の減衰により Acetaminophen に変換される影響は少ないが、Acetaminophen Glucuronide については河川環境中の生分解反応により比較的短時間で脱抱合反応が起こり、Acetaminophen が生成する傾向にあることが明らかになった。一方で、UV 照射による光分解反応については、今回対象とした医薬品成分については光分解に対して難分解性のものが多く、減衰しても代謝物を經由せずに減衰する傾向にある傾向がみられた。これらの結果は、実河川環境における医薬品成分及びその代謝物の存在実態と、ラボスケールでのバッチ実験で得られた結果が概ね一致していることを示しており、河川環境での挙動を詳細に把握する上で興味深い結果が得られたと考えられる。

Carbamazepine 10,11-Epoxyde や N-Desmethyl Tamoxifen、Acetaminophen については、N-Desmethyl Tamoxifen については薬効が減弱する化合物であるが、Carbamazepine 10,11-Epoxyde や Acetaminophen については、前者は脱抱合反応に伴う薬効を有する医薬品原体³⁶⁾、後者は薬理活性体代謝物とされる成分³⁷⁾である。これらのことを総合すると、医薬品成分だけに留まらず、その代謝物についても包括的に含めて河川環境中での存在実態や挙動について研究を行うことは、河川環境中に存在する医薬品成分による環境汚染問題について、より詳細な汚染実態の把握と環境リスク評価及び環境リスク削減対策について検討を試みていく上で、重要な知見となることが考えられる。

今後現地での実態調査や減衰影響の評価試験を継続して行い知見の収集を図るとともに、検討を行う対象成分を広げてさらなる検討を試みていくことの重要であると考えられる。

4. まとめと今後の課題

本研究では、医薬品とその代謝物について着目し、代謝前の医薬品原体と合わせて河川水及び下水試料を対象とした高感度な分析法を開発した。そして、開発した分析法を駆使して、淀川中下流域に位置する安威川・神崎川流域を対象に、存在実態の把握調査を行った。さらに、室内でのバッチ実験を行い、河川環境中での減衰に伴う医薬品成分の分解生成物と医薬品代謝物との関係性についても検討を試みた。

その結果、医薬品成分だけでなく、その代謝物についても河川環境中に存在しており、河川への負荷源として下水処理場が占める割合が大きいことを明らかにした。また、医薬品だけでなく医薬品成分の代謝物についてもオゾン処理による水処理が有効であるが、一部の成分については酸化反応の生成物として薬理活性代謝物が生成し、河川環境中からも検出されるものが存在することを明らかにした。さらに、バッチ実験による光分解及び生分解試験により、本研究で対象とした医薬品成分については、UV 照射による光分解反応に伴い代謝物関連物質は生成しないが、生分解反応では脱抱合反応に伴い薬効を有する医薬品原体が生成するものが存在していることを明らかにした。今後、現地での実態調査や減衰影響の評価試験を継続して行い知見の収集を図るとともに、対象成分を広げてさらなる検討を試みていくことが重要であると考えられる。

謝辞

本研究は、平成 26 年度 財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の「水質保全研究助成」による援助を受けて実施しました。また、本研究を遂行するにあたり、採水や流量情報について、下水処理場の関係者の方々から協力を受けました。最後に、大阪薬科大学 薬品分析化学研究室の有馬夏美さん、塚田 愛さん、平見 悟さん、森分亮伍さん、松岡里枝さんの各位に、調査、分析、データ整理等の協力を受けました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

- 1) Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? Environ. Health Perspect., 107(Suppl 6), 907-938.
- 2) Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environ. Sci. Technol., 36(6), 1202-1211.
- 3) Azuma, T., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2012) Synchronous dynamics of observed and predicted values of anti-influenza drugs in environmental waters during a seasonal influenza outbreak. Environ. Sci. Technol., 46(23), 12873-12881.
- 4) Hanamoto, S., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Modeling the photochemical attenuation of down-the-drain chemicals during river transport by stochastic methods and field measurements of pharmaceuticals and personal

- care products. *Environ. Sci. Technol.*, 47(23), 13571-13577.
- 5) Narumiya, M., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion. *J. Hazard. Mater.*, 260, 305-312.
 - 6) Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H. (2009) Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments. *Chemosphere*, 77(4), 518-525.
 - 7) Kim, I.H., Yamashita, N., Kato, Y., Tanaka, H. (2009) Discussion on the application of UV/H₂O₂, O₃ and O₃/UV processes as technologies for sewage reuse considering the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Sci. Technol.*, 59(5), 945-955.
 - 8) 川上 都香彩, 山下 尚之, 中田 典秀, 田中 宏明 (2010) 栄養段階が異なる水生生物を用いた医薬品及び日用品由来化学物質の生態毒性評価. *環境衛生工学研究*, 24(3), 132-135.
 - 9) 田中 宏明, 山下 尚之, 陽平., 堅. (2013) 医薬品類による水環境汚染と薬剤耐性菌の発生. *化学療法*の領域, 29(6), 92-96.
 - 10) Järhult, J.D., Muradrasoli, S., Wahlgren, J., Söderström, H., Orozovic, G., Gunnarsson, G., Bröjer, C., Latorre-Margalef, N., Fick, J., Grabic, R., Lennerstrand, J., Waldenström, J., Lundkvist, Å., Olsen, B. (2011) Environmental levels of the antiviral oseltamivir induce development of resistance mutation H274Y in influenza A/H1N1 virus in mallards. *PLoS One*, 6(9), e24742.
 - 11) Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J. (2013) Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339(6121), 814-815.
 - 12) 東 剛志, 井ノ山 智美, 寺西 裕亮, 石打 浩隆, 山岡 美里, 三野 芳紀, 中田 典秀, 山下 尚之, 田中 宏明 (2013) 淀川水系における抗がん剤成分の挙動把握. *環境衛生工学研究*, 27(3), 83-86.
 - 13) Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J. (2009) Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.*, 43(2), 351-362.
 - 14) 公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構 (2014) BYQ 水環境レポートー琵琶湖・淀川の水環境の現状ー平成 24 年度, 1-94.
 - 15) 大阪府 (2012) 淀川水系神崎川ブロック河川整備計画. 1-52.
 - 16) American Chemical Society. SciFinder online database (subscription database)
 - 17) 気象庁, 気象統計情報, Available from <<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>>.
 - 18) Okuda, T., Yamashita, N., Tanaka, H., Matsukawa, H., Tanabe, K. (2009) Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants. *Environ. Int.*, 35(5), 815-820.
 - 19) 小西 千絵, 宝輪 勲, 中田 典秀, 小森 行也, 鈴木 穰, 田中 宏明 (2006) 水環境中医薬品の LC-MS/MS による一斉分析法の検討. *環境工学研究論文集*, 43, 73-82.
 - 20) Famigliini, G., Palma, P., Pierini, E., Trufelli, H., Cappiello, A. (2008) Organochlorine pesticides by LC-MS. *Anal. Chem.*, 80(9), 3445-3449.
 - 21) Jin, Y.H., Liu, W., Sato, I., Nakayama, S.F., Sasaki, K., Saito, N., Tsuda, S. (2009) PFOS and PFOA in environmental and tap water in China. *Chemosphere*,

- 77(5), 605-611.
- 22) Azuma, T., Mino, Y. (2015) Determination of pharmaceutical pollutants in river environment by the SPE-LC-MS/MS method: A mini review. *J. Environ. Anal. Chem.*, 2(1), 1-5.
 - 23) Nakada, N., Kiri, K., Shinohara, H., Harada, A., Kuroda, K., Takizawa, S., Takada, H. (2008) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environ. Sci. Technol.*, 42(17), 6347-6353.
 - 24) 大阪府 水質測定計画に基づく調査結果.
 - 25) Azuma, T., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Mass balance of anti-influenza drugs discharged into the Yodo River system, Japan, under an influenza outbreak. *Chemosphere*, 93(9), 1672-1677.
 - 26) Kumar, V., Nakada, N., Yamashita, N., Johnson, A.C., Tanaka, H. (2011) How seasonality affects the flow of estrogens and their conjugates in one of Japan's most populous catchments. *Environ. Pollut.*, 159(10), 2906-2912.
 - 27) 財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構 (2012) BYQ 水環境レポートー琵琶湖・淀川の水環境の現状ー平成 22 年度, 1-150.
 - 28) de Grujil, F.R. (2002) Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB Radiation. *Skin Pharm. Physiol.*, 15(5), 316-320.
 - 29) U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1998) Fate, transport and transformation: Test guidelines OPPTS 835.2210. Direct photolysis rate in water by sunlight. 1-35.
 - 30) U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1998) Fate, transport and transformation: Test guidelines OPPTS 835.2240. Photodegradation in water. 1-4.
 - 31) OECD, (2008) Phototransformation of Chemicals in Water-Direct Photolysis, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 316. Available from <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en>.
 - 32) 国土交通省 近畿地方整備局 淀川河川事務所, (2007) 公共用水域の水質データ, Available from <<http://www.yodogawa.kkr.mlit.go.jp/know/data/water/index.html>>.
 - 33) 中山 敬, 大槻 均, 宗宮 功 (2004) 流域全体を対象とした水環境統合管理システムの提言. *富士時報*, 77(3), 179-183.
 - 34) OECD, (1998) Ready biodegradability, DOC die-away test, OECD test guidelines for chemicals No. 301A., Available from <<http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264070349-en>>.
 - 35) 田村 生弥, 山本 裕史 (2012) 防菌防黴剤の河川環境中における生分解・光分解と底質への収着. *環境化学*, 22(3), 113-119.
 - 36) Forrest, J.A., Clements, J.A., Prescott, L.F. (1982) Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin. Pharmacokinet.*, 7(2), 93-107.
 - 37) Breton, H., Cociglio, M., Bressolle, F., Peyriere, H., Blayac, J.P., Hillaire-Buys, D. (2005) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 828(1-2), 80-90.