

河川環境中での医薬品成分の脱抱合性評価手法の開発

大阪薬科大学 東 剛志

1. はじめに

1.1 研究の背景

近年、医薬品の服薬に伴い、体外排泄を通じて医薬品成分の一部が河川環境中に流入する新たな環境汚染問題が、世界的規模で報告されている（図 1）¹⁻⁴⁾。

河川環境中から検出される医薬品成分の検出濃度のオーダーは $\text{ng/L} \sim \mu\text{g/L}$ 程度と微量な濃度であるものの、医薬品成分は元来、微量濃度であっても生体内で特異的な生理作用を発揮することを意図して設計されている⁵⁾ため、河川環境中に医薬品成分が存在することにより、生態系への毒性影響をはじめとして、飲料水を通じたヒトへの健康影響が懸念されている^{2,3)}。また、近年の研究の進展により、薬剤耐性菌や薬剤耐性ウイルスの発生助長の問題を懸念する報告についてもなされつつある⁶⁻⁸⁾。そのため、医薬品成分による河川環境汚染問題の実態を把握するとともに環境リスク評価を行い、リスク削減に向けた今後の水質管理のあり方を模索していくことは、社会的にも重要な課題となっている。

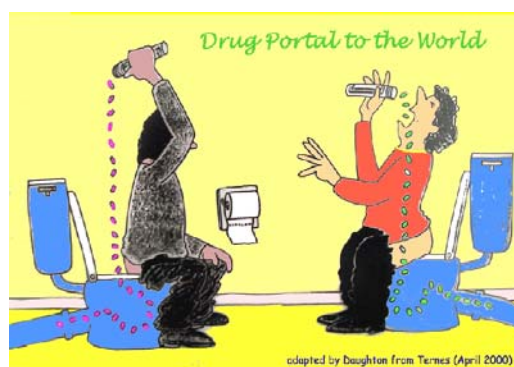


図 1：医薬品を服薬後、体外排泄を経由して一部が河川環境中に流入する³⁾

1.1 医薬品の抱合体に関する知見の不足

医薬品は服薬後、医薬品原体の未変化体の形態で体外排泄されるものだけでなく、薬理活性が増大／又は薬理活性が減弱した形態で体外排泄されるものが存在する⁹⁾。この中で後者に属する抱合体は、医薬品成分の極性官能基にグルクロン酸や硫酸やアミノ酸などの水溶性物質が結合した化合物である。抱合体化された医薬品成分は、薬効作用が減弱するとともに、極性が上昇することで体外代謝されやすくなる。ところで、脱抱合反応については不可逆的な反応ではなく、脱抱合酵素の共存下で脱抱合反応により、医薬品原体の形態に変換されることが報告されている^{10,11)}。

このため、抱合体の状態で医薬品が河川環境に存在する場合、河川流下に伴う脱抱合により薬効を有する医薬品原体に変換され、河川環境中で新たな汚染物質の発生因子になりうることが考えられる。実際、環境ホルモン物質であるエストロゲン類については、抱合体を含めた研究事例も報告されている^{10,12)}。しかしながら、医薬品成分についての抱合体に関する研究事例は、世界的にみてもごく限られた事例しか報告されていない^{13,14)}。これは、現在日本国内だけでも約 3 万成分（医薬品成分：約 2 万成分⁹⁾、一版医薬品成分：約 1 万成分¹⁵⁾）の医薬品が流通しており、どの医薬品成分に

着目して評価を行うかというプライオリティーの面¹⁶⁾もあるものの、河川水や下水試料中に存在する医薬品成分の同定と定量に必要な標準物質の入手自体が困難である成分も少なくないことに加え、新たに対象成分を追加する毎に新規に分析法を開発する必要があること¹⁷⁾等、実際面で評価を困難とする課題も多く残されていることに起因している。

1.3 本研究の目的

1.2 で述べた様に、医薬品の抱合体を対象にした研究は、医薬品の抱合体の分析・定量を行う上で必須となる標準物質試薬の入手が多くの場合困難であり、評価を行うことが不可能であることも多い。

そこで、本研究ではこれらの課題を克服する評価法の1つとして、河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性を評価出来る新規な評価手法を開発し、抱合体として存在する医薬品成分が有する環境へのインパクトについて考察する。具体的には、河川水に脱抱合酵素を添加して反応させ、反応前後での医薬品原体濃度の変化を測定することで、河川水中

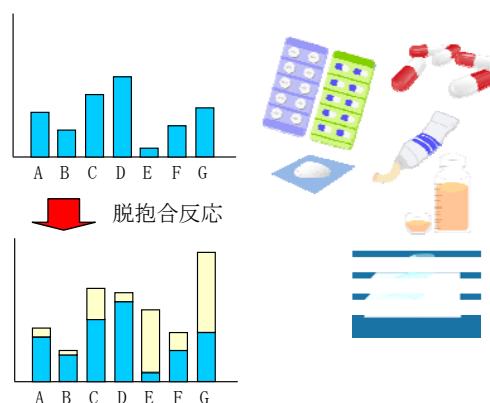


図2：河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性アッセイ試験

に抱合体として存在している医薬品の種類と量进行评估することが可能な手法の開発を試みる（図2）。そして、河川環境中に抱合体として存在する医薬品成分が有する環境へのインパクトについて考察を試み、より詳細で包括的な環境動態の解明に継ぐことで、これからの河川水質保全システムのあり方について情報提供を行い、当該事業の運用に資する。本評価手法の開発を行うことにより、河川の流下に伴う脱抱合反応に伴い形態が医薬品成分に変換されることによる汚染の発生影響を評価することが可能となり、抱合体医薬品成分が有する環境へのインパクトと、これからの河川水質保全システムのあり方について考察を行うことが可能になることが期待される。

2. 実験方法

2.1 分析対象成分

本研究では、河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性を評価するアッセイ試験手法の開発を行うため、医薬品の抱合体のうち主要な割合を占めるとされているグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体¹⁸⁾に着目した。そして、グルクロン酸抱合体のモデル化合物として Acetaminophen Glucuronide を、硫酸抱合体のモデル化合物として Acetaminophen Sulfate を用い、各脱抱合試薬を添加した際の Acetaminophen の生成能を評価することで脱抱合条件の検討を行い、河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性アッセイ試験系の開発を行った。本研究でモデル化合物とした Acetaminophen 及びその抱合体の物理化学的性質を表1にまとめている。

2.2 脱抱合反応試薬

本研究で用いた脱抱合酵素（グルクロニダーゼ及びスルファターゼ）については、複数の試薬会社について調査し、入手が可能であった試薬全てを対象に検討を行った

(表2)。なお、グルクロニダーゼについては純粋な試薬が入手可能であるが、スルファターゼについてはスルファターゼ活性のみの試薬は存在せず、スルファターゼとグルクロニダーゼの両方の活性を有する試薬のみが販売されている。そのため、スルファターゼとグルクロニダーゼの混合試薬を実験に用いて検討を行った。

表1：本研究で対象にした医薬品成分及びその抱合体の物理化学的性質¹⁹⁾

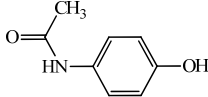
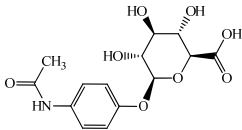
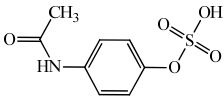
成分名	分子量	構造式	pK_a	$\log P$
Acetaminophen	151.2		9.9	0.3
Acetaminophen Glucuronide	327.3		2.8	-1.9
Acetaminophen Sulfate	231.2		-4.7	-0.2

表2：各社脱抱合試薬のまとめ

試薬販売会社	ID	分類
ナカライテスク	Nacalai-Glu	β -Glucuronidase
ロシュ アブライド サイエンス	Roche-Glu	
Sigma-Aldrich	Sigma-Glu	
和光純薬	Wako-Glu/Slu	β -Glucuronidase + Arylsulfatase
ロシュ アブライド サイエンス	Roche-Glu/Slu	
Sigma-Aldrich	Sigma-Glu/Slu(1)	
Sigma-Aldrich	Sigma-Glu/Slu(2)	

2.3 実験の方法

2.3.1 脱反応条件の検討

グルクロニダーゼ及びスルファターゼを用いた医薬品成分の脱抱合反応条件の検討を行うため、MilliQを用いた純水系で脱抱合試薬の他、反応時間、反応温度、pH、安定性等、種々の反応条件について検討を行った。

2.3.2 前処理

脱抱合反応を行った水試料は氷で速やかに冷却し、pHを3に調整した後、OASIS HLB 固相抽出カートリッジ(Waters)に通水させて固相抽出を行った。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4にまとめている。

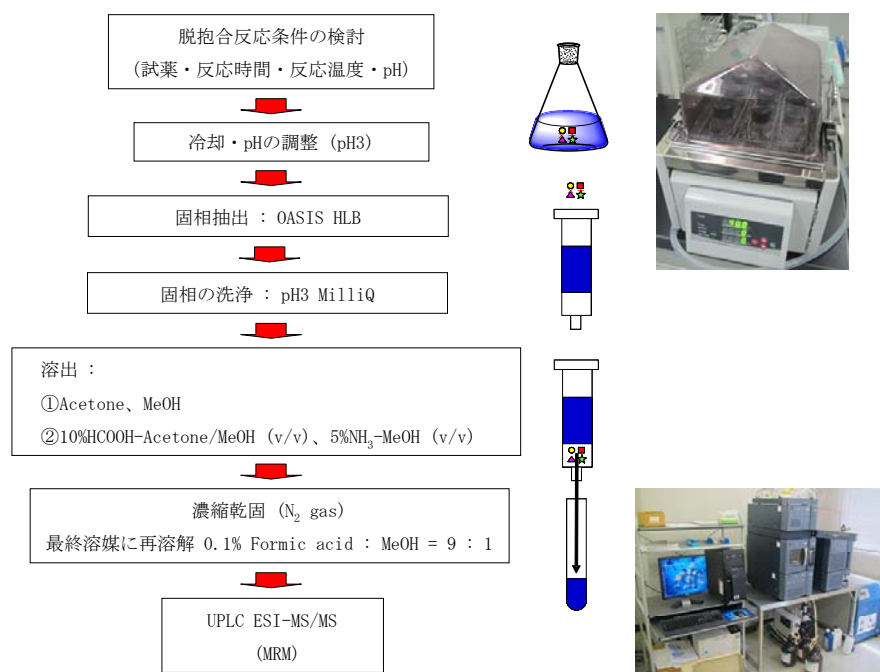


図 4 : 環境水試料中に存在する医薬品成分及びその代謝物の分析フロー

2.3.3 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 (Tandem Quadrupole Detector) Mass Spectrometer (イオン化方法 : 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分離法により分離し、MRM 分析を行った。表 3 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。

表 2 : UPLC-MS/MS 測定条件のまとめ

LC	Waters ACQUITY UPLC™			
Column	Waters ACQUITY 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	0.35	90	10
	2.0	0.35	90	10
	2.5	0.35	20	80
	3.0	0.35	20	80
	3.2	0.35	90	10
	6.0	0.35	90	10
Injection	10 μL			
MS/MS	Waters ACQUITY TQD			
Ionization	ESI - Positive ion			

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^{20, 21)}をはじめとして、農薬²²⁾や有機フッ素化合物 (PFOS・PFOA)²³⁾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。

2.4.1 対象流域の概要

本研究では、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²⁴⁾に着目した。そして、この流域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）²⁵⁾を対象とした。

2.4.2 サンプリングの方法

水試料のサンプリングはステンレス製のバケツを用いて行った。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。採水及び実験の様子を図5に示す。なお、サンプリング調査日の先行2日間に1 mmを超える降水は観測されなかった²⁶⁾。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た。水試料中の医薬品を対象にした調査で保存剤として用いられるアスコルビン酸^{27, 28)}については、本研究で行う脱抱合実験のアッセイ試験の性質を考慮して本研究では添加せず、採水後は速やかに研究室に持ち帰り実験を行った。



図 5：河川における調査の様子(左)，実験の様子(右)

2.4.3 脱抱合性の評価対象成分

本研究で開発した、河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性アッセイ手法の有効性の評価と実環境水試料への適応について検討を行う目的で、2.4.2 で述べた各種水試料を対象に評価試験を行った。

対象とする成分については、これまでに河川水及び下水中からの検出例が国内外で多く報告されている医薬品成分^{20, 29)}に加えて、国内で使用量が多く、未変化体での体外排泄率が高いと考えられる成分や、医薬品成分の代謝物についても合わせて対象とし、抗菌剤・抗ウイルス剤・抗がん剤・中枢神経作用剤・解熱鎮痛剤・漢方方剤・抗炎症剤・鎮痒剤・気管支拡張剤・フィトエストロゲンといった、多種多様な医薬品成分 48 成分を対象に評価を行った。本研究で対象にした医薬品成分の成分名と薬効・用途をまとめたものを表 3 に示す。

表 4：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

ID	成分名	薬効・用途	ID	成分名	薬効・用途
1	Acetaminophen	解熱・鎮痛剤	25	Doxifluridine	抗がん剤
2	Acetaminophen glucuronide	解熱・鎮痛剤	26	Ethenzamide	解熱・鎮痛剤
3	Acetaminophen sulfate	解熱・鎮痛剤	27	Famciclovir	抗ウイルス剤
4	Aciclovir	抗ウイルス剤	28	Ganciclovir	抗ウイルス剤
5	Azithromycin	抗菌剤	29	Genistein	フィトエストロゲン
6	Berberine	漢方方剤	30	Genistin	フィトエストロゲン
7	Bicalutamide	抗がん剤	31	Glycitein	フィトエストロゲン
8	Caffeine	中枢神経作用剤	32	Glycitin	フィトエストロゲン
9	Capecitabine	抗がん剤	33	Ibuprofen	解熱・鎮痛剤
10	Carbamazepine	中枢神経作用剤	34	Indomethacin	抗炎症剤
11	Carbamazepine 10,11-epoxide	Carbamazepineの代謝物	35	Levofloxacin	抗菌剤
12	2-Hydroxy carbamazepine	Carbamazepineの代謝物	36	Loxoprofen	解熱・鎮痛剤
13	3-Hydroxy carbamazepine	Carbamazepineの代謝物	37	Loxoprofen alcohol	解熱・鎮痛剤
14	10-Hydroxy carbamazepine	Carbamazepineの代謝物	38	Penciclovir	抗ウイルス剤
15	10,11-Dihydroxy carbamazepine	Carbamazepineの代謝物	39	Puerarin	漢方方剤
16	Acridine	Carbamazepineの代謝物	40	Sulpiride	中枢神経作用剤・抗潰瘍剤
17	Acridone	Carbamazepineの代謝物	41	Tamoxifen	抗がん剤
18	Cefdinir	抗菌剤	42	4-Hydroxy tamoxifen	Carbamazepineの代謝物
19	Ciprofloxacin	抗菌剤	43	N-Desmethyl tamoxifen	Carbamazepineの代謝物
20	Clarithromycin	抗菌剤	44	4-Hydroxy-N-desmethyl tamoxifen	Carbamazepineの代謝物
21	Crotamiton	鎮痒剤	45	Tegafur	Carbamazepineの代謝物
22	Cyclophosphamide	抗がん剤	46	Theophylline	気管支拡張剤
23	Daidzein	フィトエストロゲン	47	Valaciclovir	抗ウイルス剤
24	Daidzin	フィトエストロゲン	48	Valganciclovir	抗ウイルス剤

3. 結果と考察

3.1 水試料中に存在する医薬品成分の脱抱合性アッセイ試験系の開発

3.1.1 脱抱合酵素試薬の検討

グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体医薬品成分の脱抱合反応に適した試薬について検討を行うため、MilliQ に Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate を添加し、グルクロニダーゼ又はグルクロニダーゼとスルファターゼの混合酵素を各々加え、40℃で1時間反応させた結果を図6（(1)及び(2)）に各々示す。

得られた結果より、グルクロニダーゼを加えた試料では、脱抱合反応進行率は5～23%と低いものの、対象とした3試薬のいずれについても Acetaminophen Glucuronide の脱抱合反応が進行し、Acetaminophen Sulfate については反応が進行しない傾向がみられた。このことについては、基質と特異的に反応する酵素の性質³⁰⁾から考えても、妥当な結果が得られていると考えられた。

一方で、グルクロニダーゼとスルファターゼの混合酵素を加えた試料では、Wako-Glu/Sluを除いて Acetaminophen Glucuronide のほぼ全量の反応が進行していた。また、これらの酵素試薬を加えたサンプルでは Acetaminophen Sulfate の脱抱合反応についても進行し、脱抱合反応進行率は20～40%程度であった。

本研究で用いた脱抱合酵素の添加量は、グルクロニダーゼ又はグルクロニダーゼとスルファターゼの混合酵素ともに、グルクロニダーゼ活性が1,000 unit になるように添加している。このことを考慮すると、同じ unit の酵素を添加した場合でも、試薬会社により反応性が異なることを示唆していると考えられる。また、グルクロニダーゼの活性について、グルクロニダーゼ酵素純品よりもグルクロニダーゼとスルファターゼの混合酵素の方が高い結果が得られていた。このことに関しては、詳細な原因は不明であるものの、酵素の基になっている生物種が大腸菌由来とカタツムリ由来と異なることで、遺伝子多型となっている³⁰⁾ことが影響していると考えられた。

これらの結果を基に、Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate の脱抱合反応が最も良く進行した酵素試薬に着目し、グルクロニダーゼ酵素に Roche-Glu を、スルファターゼ酵素として Roche-Glu/Slu を使用した。また、完全に脱抱合反応を完了させるため、添加する酵素量を10,000 unit に増加させて以後の実験を行った。

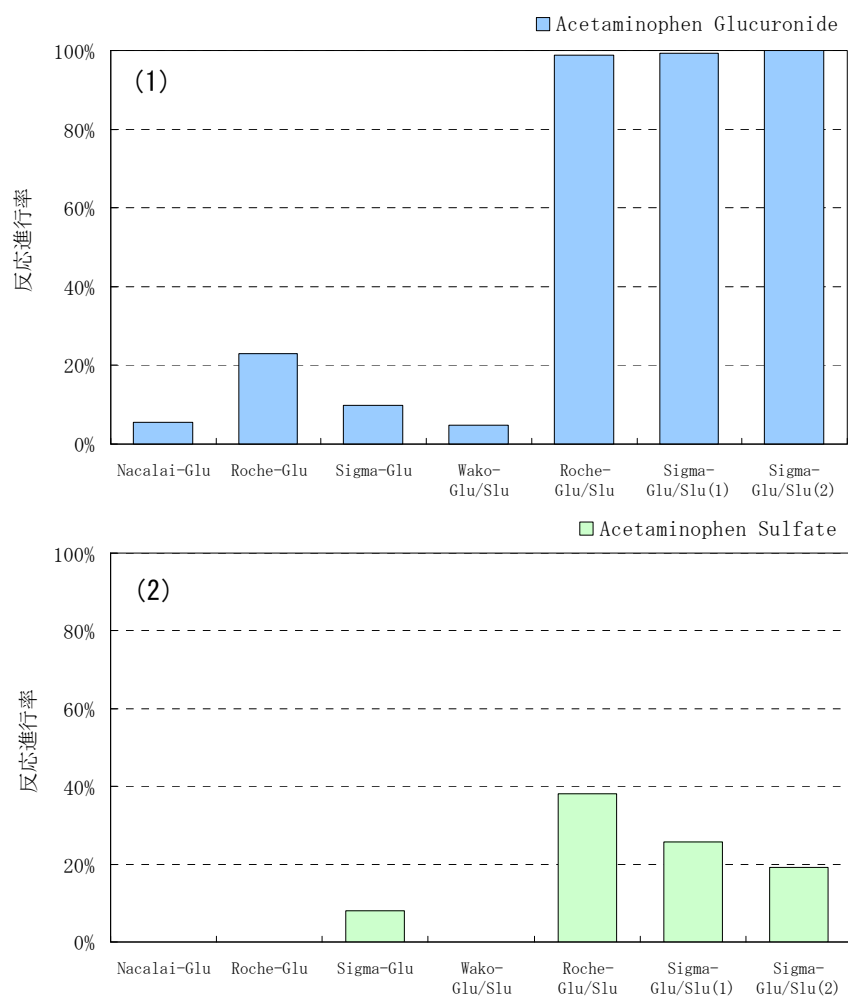


図 6：各社より販売されている脱抱合酵素添加時の脱抱合反応率
 ((1)Acetaminophen Glucuronide, (2)Acetaminophen Sulfate)

3.1.2 反応温度の検討

酵素の反応は一般的に体温程度の条件で進行するものも多いが、酵素により反応に適した温度条件は異なる。本研究で用いているグルクロニダーゼ及びスルファターゼは酵素であるため、反応の進行に適した温度が存在すると考えられる。そこで、脱抱合に適した反応温度について検討を行う目的で、20℃、30℃、40℃の各条件で10分間反応させた。また、実河川中での脱抱合の影響についても合わせて検討を行うため、河川の年間水温³¹⁾を想定し、5℃、10℃の条件についても合わせて検討を行った。この実験により得られた結果を表5にまとめている。

得られた結果より、5℃の条件においても Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate の大部分について脱抱合反応が進行していた。また、反応温度が上昇するにつれて Acetaminophen Sulfate の脱抱合反応率は増加する傾向にあるが、Acetaminophen Glucuronide については反応温度が上昇しても脱抱合反応率の増加傾向はみられず、概ね同等の反応率となることが分かった。

これらの結果から、グルクロニダーゼ及びスルファターゼの反応条件については温度依存性は小さく、厳密に温度を一定に保たなくとも比較的広い温度範囲で良好に反応が進むことが明らかになった。このことは、実河川において水温が低下する冬季においても、脱抱合酵素が存在する場合には脱抱合反応が進行する可能性があることを示差していると考えられる。

表 5：各反応温度条件における脱抱合反応率

温度	Acetaminophen Glucuronide	Acetaminophen Sulfate
5℃	86%	74%
10℃	82%	73%
20℃	84%	82%
30℃	83%	96%
40℃	86%	96%

3.1.3 抱合体化合物の安定性の検討

本研究では、脱抱合酵素を添加した上で反応温度を変化させて脱抱合反応を行っているが、脱抱合酵素の存在が無い場合でも脱抱合反応が起こる可能性について検討を行うこと、そして脱抱合した生成物が脱抱合酵素によりさらなる化学構造の変化を受ける可能性について検討を行うことは、アッセイ手法を行うことで得られる結果の正確性を確保する上で重要である。

そのため、グルクロニダーゼ及びスルファターゼを添加せずに Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate の安定性を評価する系と、Acetaminophen にグルクロニダーゼ、又はグルクロニダーゼとスルファターゼの混合酵素を添加して安定性を評価する系に分け、20℃、30℃、40℃の温浴で 1・2・3 時間反応させて安定性の検討を行った。その結果、Acetaminophen Glucuronide、Acetaminophen Sulfate、Acetaminophen のいずれの成分においても反応影響はみられず、化学構造が変化しないままの状態に残存していた。これらの結果については、酵素の基質特異性³⁰⁾を考慮しても妥当な結果であると考えられた。

3.1.4 pH 条件の検討

酵素の反応に関係する因子として、反応温度に加えて pH の条件は重要な因子である。そこで、脱抱合に適した pH について検討を行う目的で、HCl 又は NaOH を用いて pH を 3・4・5・6・7・8 と変化させて、脱抱合反応の進行の評価を行った。なお、河川水中に存在する医薬品成分を対象にした調査では、保存剤として採水時にアスコルビン酸を 1 g/L 程度の濃度になるように添加することが多く報告^{27, 28)}されている。この場合、水試料の pH は概ね 3~4 付近になるが、実験室で各試料毎に pH を調整した後に実験を行う場合、脱抱合反応後に行う固相抽出操作で再度 pH を 3 付近の酸性条件とする操作が生じるため、アッセイ試験の利便性を考慮して、アスコルビン酸で pH を 3 に調整した試料についても合わせて評価を行った。なお、反応温度は 40℃で 10 分間反応させた。この実験により得られた結果を図 7 ((1)及び(2)) に各々まとめている。

得られた結果より、Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate にグルクロニダーゼを添加した系では、pH3~8 のいずれの条件においても Acetaminophen Glucuronide の脱抱合反応が 90%以上進行していた。一方で、HCl で pH3 に調整した試料と、アスコルビン酸を添加して調整した試料では、興味深いことに HCl で pH3 に調整した試料と比較して、アスコルビン酸を添加して pH3 に調整した系では反応進行率が 20%程度減少する傾向がみられた。アスコルビン酸添加試料で反応進行率が減弱する原因についての詳細な理由は不明であるが、pH の影響だけでなく、アスコルビン酸

が有する化学的性質の影響が関係していることが推測された。

一方で、Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate にグルクロニダーゼ+スルファターゼの混合酵素を添加した系では、pH3~8 及びアスコルビン酸を添加した系においても、Acetaminophen Glucuronide 及び Acetaminophen Sulfate の脱抱合反応が完全に進行していた。なお、グルクロニダーゼ純品よりもグルクロニダーゼとスルファターゼの混合酵素の方が高い結果が得られたことについては、3.1 で述べた結果ともよく一致しており、実験結果の再現性は良好であると考えられた。ここから、グルクロニダーゼ及びスルファターゼの反応条件についての pH 依存性は、比較的広い範囲で良好であり、反応条件について厳密に温度を一定に保たなくてもアッセイ試験を行うことが可能であることが明らかになった。

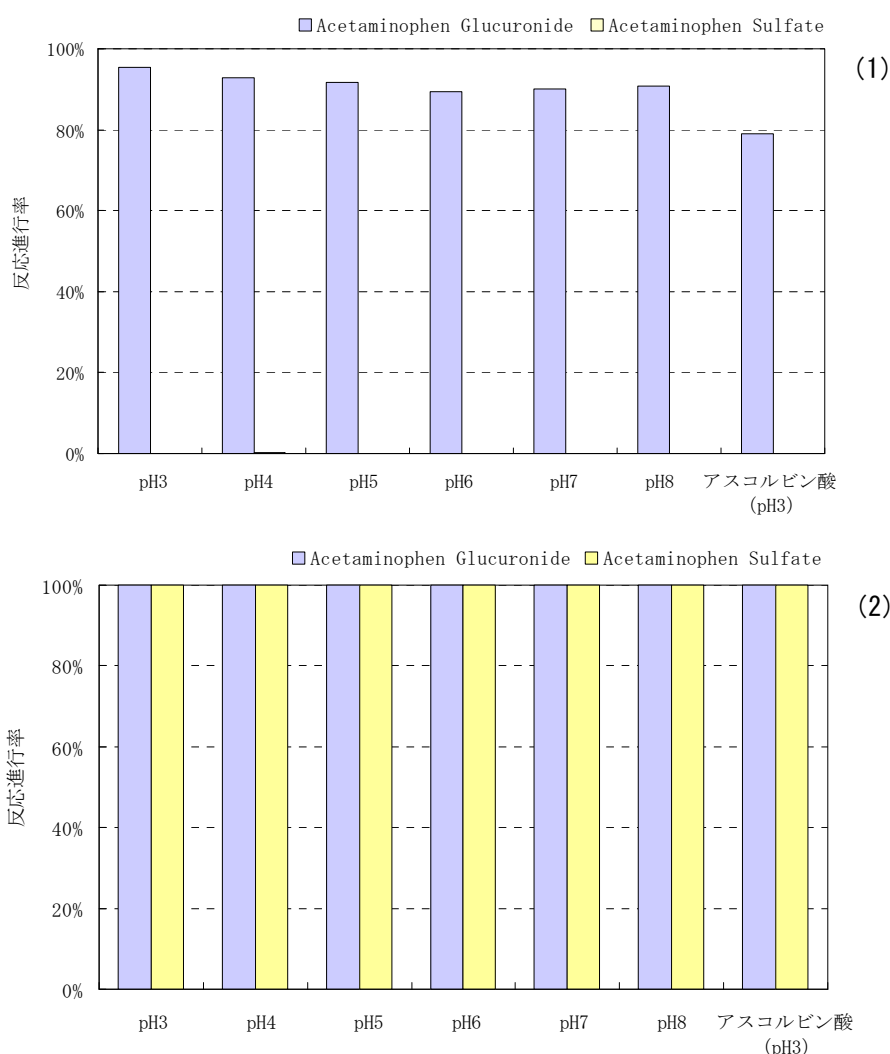


図 7：各 pH 条件における脱抱合反応率

(1) グルクロニダーゼ添加, (2) グルクロニダーゼ+スルファターゼ添加)

3.1.5 反応時間の検討

3.1.1~3.1.4 で得られた結果を基にして、全量の脱抱合反応を完了させるのに必要な反応時間の検討を行うため、0・10・30・60・120・180 分間反応させた結果を図 8 (1) 及び(2)) 各々示す。

得られた結果より、Acetaminophen Glucuronide は反応開始後速やかな減衰影響がみ

られ、10 分後には約 90%の反応が進行し、30 分後には全量の脱抱合反応が完了していた。一方、Acetaminophen Sulfate についても反応開始後速やかな減衰がみられ、10 分後に約 80%の反応が完了するが、その後の反応速度は緩やかであり、30 分後に約 90%、60 分後に約 95%と徐々に反応が進行し、120 分後には全量の脱抱合反応が完了していた。なお、得られた結果を基に反応速度の解析を行ったところ、2 次反応型の反応に従って進行している可能性が示唆された。

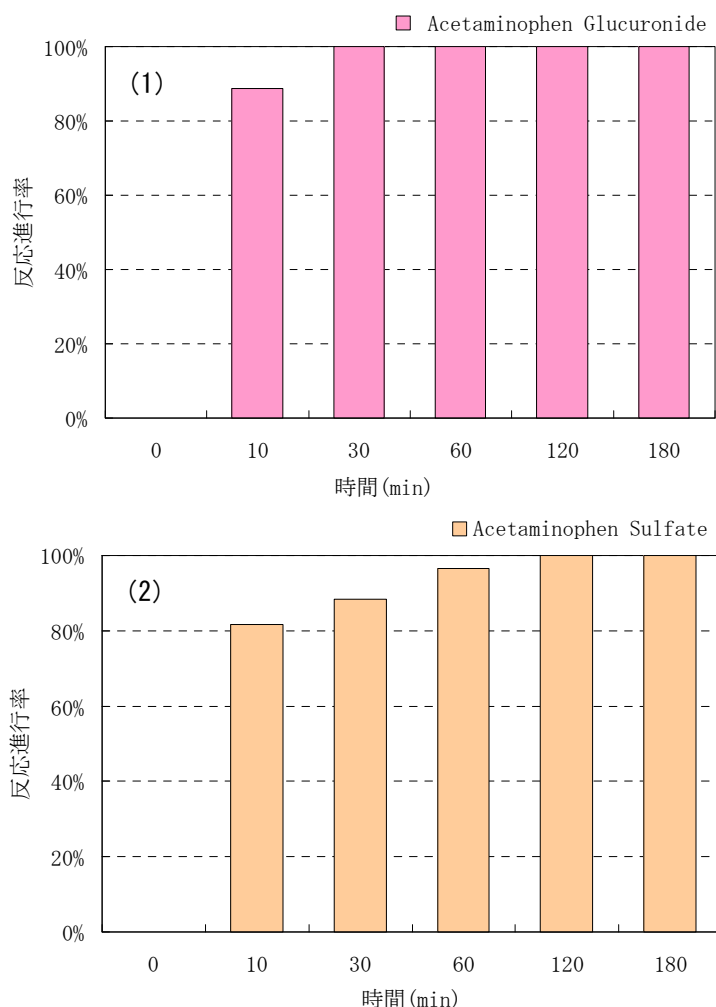


図 8：脱抱合反応率の経時的な変化の推移

((1) Acetaminophen Glucuronide, (2) Acetaminophen Sulfate)

3.2 実河川水試料への脱抱合アッセイ手法の適応

最後に、本研究で開発した医薬品成分の脱抱合性を評価するアッセイ手法を、琵琶湖・淀川流域の中下流域を流れる実河川水試料に適応し、有効性の評価と河川環境中に存在する抱合体医薬品成分の存在について検討を試みた。また、河川に合流する下水処理場の放流水についても対象とし、研究対象流域内に位置する主要な下水処理場の放流水についても合わせて対象にした。アッセイを行う分析対象成分については、2.4.3 で述べた医薬品及びその関連代謝物の合計 48 成分を対象とした。グルクロン酸抱合体脱抱合酵素、又はグルクロニダーゼ＋スルファターゼ添加による変化がみられた成分を表 6 にまとめている。

表 6：河川水にグルクロニダーゼ、又はグルクロニダーゼ＋スルファターゼを添加した際の医薬品成分濃度の変化のまとめ

	グルクロニダーゼ添加	グルクロニダーゼ＋スルファターゼ添加
Acetaminophen	増加影響みられず	増加
Aciclovir	増加影響みられず	増加
Carbamazepine	増加影響みられず	増加
Clarithromycin	増加	増加
Crotamiton	増加影響みられず	増加
Sulpiride	増加影響みられず	増加

得られた結果より、対象とした 48 成分のうち、多くの成分については濃度の増加はみられなかったが、6 成分について酵素の添加により濃度が上昇する傾向がみられた。酵素の添加により濃度が上昇する傾向がみられた成分について、Acetaminophen についてはグルクロニダーゼのみの添加では濃度は変化しないが、グルクロニダーゼ＋スルファターゼを添加した場合にのみ、濃度が約 2～15 倍程度増加する傾向がみられた。また、Aciclovir、Carbamazepine、Clarithromycin、Crotamiton、Sulpiride についても各々約 3～4 倍、1.5 倍、2～6 倍、2 倍、2 倍程度と、Acetaminophen と同様の増加傾向がみられた。一方で、Clarithromycin については、グルクロニダーゼのみの添加でも濃度が増加し、グルクロニダーゼ＋スルファターゼを添加した場合にさらに濃度が増加する傾向がみられた。

ここから、一部の医薬品成分については河川環境中にグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体の形態として存在していることが考えられた。また、グルクロニダーゼ＋スルファターゼを添加した場合にのみ濃度が増加する成分が存在する結果は、グルクロン酸抱合体と比較して硫酸抱合体の方が河川環境中に多く存在していることを示唆していると考えられた。

これらの結果については、3.1 で行った脱抱合条件についての条件検討結果と良く類似した傾向になっていることから、得られた結果は概ね妥当な結果であると考えられた。なお、本実験と平行して行った経時的な濃度増加現象についての反応速度の解析を行った結果、十分な量の酵素量が存在する場合、グルクロン酸抱合体については 10 分以内に全て脱抱合反応が完了するが、硫酸抱合体の場合ではその速度は緩やかで 1～2 時間の反応時間を要することが分かった。

河川環境中に存在するグルクロニダーゼ又はスルファターゼの存在量を定量的に評価する手法については未だ報告例がなされていないため、本研究で調査対象とした河川の結果を基に、他の河川に適応した場合のアッセイに必要な反応時間について考察を行うことは困難であるため、この点については課題となると考えられる。しかしながら、反応条件について複雑な制御を必要とせず、比較的簡便な系で医薬品成分の脱抱合性を評価可能であることは、評価手法の堅牢性と拡張性の面で利点となると考えられる。

本研究で対象とした成分数は 48 成分と、成分数や薬効分類面では幅広い医薬品成分を対象にしている。これらの医薬品成分については国内の臨床現場で使用量が多く、未変化体での体外排泄率が高いと考えられる医薬品成分を優先的に対象としている。そのため、脱抱合反応性アッセイ試験により得られる結果は、対象とする医薬品成分の種類や性

質により影響を受けることが予想される。そのため、今後、調査する河川地点を増やしてさらなる検討を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。

4. まとめと今後の課題

本研究では、河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性を評価するアッセイ試験手法の開発を行うため、医薬品の抱合体のうち主要な割合を占めるとされているグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体に着目し、脱抱合酵素（グルクロニダーゼ及びスルファターゼ）を添加して反応させ、反応前後での医薬品原体濃度の変化を測定することで、河川水中に抱合体として存在している医薬品の種類と量を評価することが可能な手法の開発を試みた。

その結果、グルクロニダーゼ及びスルファターゼの脱抱合反応性は各試薬会社により異なるため、より反応が進みやすい試薬を用いること、両酵素とも温度依存性は大きくなく、20℃～40℃の条件であれば厳密に反応温度を制御する必要は生じないこと、pH についても 3～8 の幅広い範囲で良好な脱抱合活性がみられること、脱抱合に必要な反応時間は、グルクロン酸抱合体については 30 分、硫酸抱合体については約 120 分程度の反応時間でほぼ全量の脱抱合反応が完了することを明らかにした。

これらの結果は、本研究で開発した河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性を評価するアッセイ試験手法が、厳密に反応条件を一定に保たなくても評価可能な簡便で利便性の高い手法となりうることを示唆している。また、一般的な河川水質の範囲内では、水温が低下する冬季においても、脱抱合酵素が存在する場合には脱抱合反応が進行する可能性があることを示差しており、河川環境中に抱合体として存在する医薬品成分が有する環境へのインパクトについて考察を試みる上でも興味深い知見が得られたと考えられる。

今後、アッセイ試験を行う河川流域を拡張し、本試験法の有効性について詳細な知見の収集を図るとともに、本研究で対象とした医薬品成分以外の医薬品成分についても対象成分を広げ、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 27 年度 公益財団法人琵琶湖・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、河川及び下水処理場の関係者の方々から採水のご協力を頂きました。関係各位に厚く御礼を申し上げます。最後に、大阪薬科大学 薬品分析化学研究室の石田真麻さん、久松佳苗さん、柚木彩実さんの各位に、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) 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.
- 2) 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.
- 3) Kümmerer, K. (2008) *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks* : 3rd Enlarged edition.
 - 4) 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.
 - 5) 成宮 正倫, 奥田 隆, 中田 典秀, 山下 尚之, 田中 宏明, 佐藤 和志, 末岡 峯数, 大岩 俊雄 (2009) 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動. *環境工学研究論文集*, 46, 175-186.
 - 6) 田中 宏明, 山下 尚之, 堅川 陽平 (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.
 - 7) 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.
 - 8) Kümmerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere*, 75(4), 435-441.
 - 9) じほう (2013) *日本医薬品集 医療薬* 2014 年版.
 - 10) Kumar, V., Johnson, A.C., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2012) De-conjugation behavior of conjugated estrogens in the raw sewage, activated sludge and river water. *Journal of Hazardous Materials*, 227-228, 49-54.
 - 11) Gauderat, G., Picard-Hagen, N., Toutain, P.-L., Corbel, T., Viguié, C., Puel, S., Lacroix, M.Z., Mindeguia, P., Bousquet-Melou, A., Gayrard, V. (2016) Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A. *Environment International*, 86, 52-59.
 - 12) D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R. (2003) Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.*, 302(1-3), 199-209.
 - 13) Santos, L.H.M.L.M., Paíga, P., Araújo, A.N., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. (2013) Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water. *Journal of Chromatography B*, 930, 75-81.
 - 14) Azuma, T., Arima, N., Tsukada, A., Hirami, S., Matsuoka, R., Moriwake, R., Ishiuchi, H., Inoyama, T., Teranishi, Y., Yamaoka, M., Mino, Y., Hayashi, T., Fujita, Y., Masada, M. (2015) Detection of pharmaceuticals and personal care products and their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Sci. Total Environ.*, *in press*.

- 15) じほう (2014) 日本医薬品集 一般薬 2015-2016 年版
- 16) 山本 裕史 (2010) 環境中の PPCPs の生態リスク評価－その現状と課題・展望について. 第 13 回日本水環境学会シンポジウム, 91-92.
- 17) 山本 裕史 (2013) 微量化学物質による水環境問題の最新動向－微量多成分複合影響の評価方法としての全排水毒性 (WET) 試験－. 水環境学会誌, 36(A) (9), 327-330.
- 18) Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., Peterkin, V., Koup, J. R., Ball, S. E. (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(11), 1201-1208.
- 19) American Chemical Society SciFinder American Chemical Society. SciFinder online database (subscription database).
- 20) Narumiya, M., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 305-312.
- 21) 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.
- 22) Famigliani, G., Palma, P., Pierini, E., Trufelli, H., Cappiello, A. (2008) Organochlorine pesticides by LC-MS. *Analytical Chemistry*, 80(9), 3445-3449.
- 23) 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.
- 24) 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－琵琶湖・淀川の水環境の現状－平成 24 年度, 1-94.
- 25) 大阪府 (2015) 淀川水系神崎川下流ブロック河川整備計画. 1-30.
- 26) 気 象 庁 , 気 象 統 計 情 報 , Available from <<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>>.
- 27) Komori, K., Tanaka, H., Okayasu, Y., Yasojima, M., Sato, C. (2004) Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan. *Water Sci Technol*, 50(5), 93-100.
- 28) Kumar, V., Nakada, N., Yasojima, M., Yamashita, N., Johnson, A. C., Tanaka, H. (2009) Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 77(10), 1440-1446.
- 29) López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., Barceló, D. (2013) Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution*, 174, 305-315.
- 30) Ohno, S., Nakajin, S. (2009) Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various

human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.
Drug Metabolism and Disposition, 37(1), 32-40.

- 31) 国土交通省, 国土交通省 水文水質データベース, Available from
<<http://www1.river.go.jp/>>.