公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構 成果報告会
ー平成27年度 水質保全研究助成ー

河川環境中での医薬品成分の脱抱合性評価手法の開発

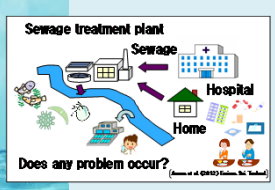
Development of Evaluation of De-conjugation Potential for PPCPs in the River water Environment

大阪薬科大学
東　剛志（Ph.D.）

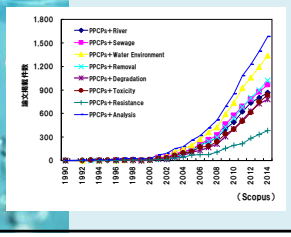
March 9, 2016

1/16

医薬品成分類による水環境汚染問題



・国内外の研究により、存在実態や挙動の把握、除去技術の開発、リスク評価に関する研究が進む。



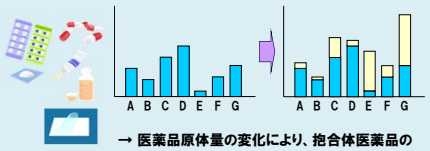
- 医薬品成分を対象にした環境リスク評価に関するガイドラインが策定途上。
- 薬理活性代謝物や抱合体に関する研究が次第に進みつつある。
- 研究を行う上で必須となる標準物質の入手が困難な場合も少なくない。
- 新たな成分を対象にする度に分析法の開発が必要。

2/15

研究の目的

～抱合体医薬品成分のアッセイ試験法の開発～

詳細な環境リスク評価を行う上での課題を克服する評価法の開発が望まれる。



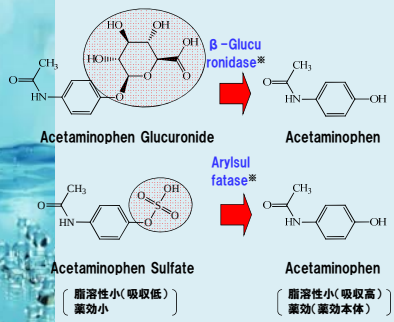
→ 医薬品原体量の変化により、抱合体医薬品の存在量を評価する。

①：河川環境中に存在する医薬品成分の脱抱合性を評価可能な手法を開発する。
②：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について解析を行い、環境へのインパクトについて考察する。

3/15

研究対象成分

※各脱抱合酵素は基質特異性を持ち、対応する基質とのみ酵素により反応が進行する。



①：詳細な検討を行うことが可能であった成分をモデル医薬品として、脱抱合アッセイ手法を開発する。

②：開発したアッセイ手法を用いて、実河川水を対象にして、多種薬効分類を含む合計46成分の医薬品成分類への適応・評価を行う。

4/15

実験フロー

～固相抽出とUPLC-MS/MSを組み合わせた多成分同時分析法～

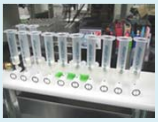
脱抱合反応条件の検討
（試薬・反応時間・反応温度・pH）

冷却・pHの調整（pH3）

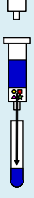
固相抽出：OASIS HLB

固相の洗浄：pH3 MilliQ

溶出：
①Acetone、MeOH
②10%HCOOH-Acetone/MeOH（v/v）、5%NH_3-MeOH（v/v）



濃縮乾固（N_2 gas）
最終溶媒に再溶解 0.1% Formic acid：MeOH = 9：1



UPLC ESI-MS/MS
（MRM）

5/15

酵素試薬

表 実験に用いた脱抱合酵素のまとめ

試薬販売会社	ID	分類	
ナカライテスク	Nacalai-Glu	β-Glucuronidase	純品販売
ロシュ アプライド サイエンス	Roche-Glu		
Sigma-Aldrich	Sigma-Glu		
和光純薬	Wako-Glu/Slu	β-Glucuronidase＋Arylsulfatase	混合酵素のみ販売
ロシュ アプライド サイエンス	Roche-Glu/Slu		
Sigma-Aldrich	Sigma-Glu/Slu (1)		
Sigma-Aldrich	Sigma-Glu/Slu (2)		

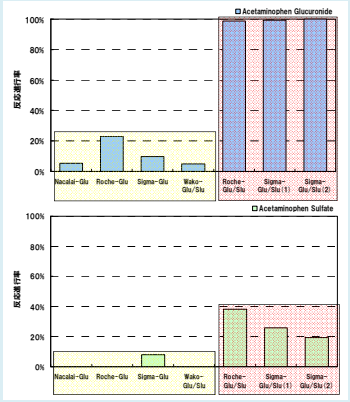
※複数の試薬会社について調査し、入手が可能であった試薬全てを対象に検討。

→ 酵素試薬の添加量、反応時間、pH、反応温度、安定性について検討を行った。

6/15

結果

－各種反応条件の検討－



Acetaminophen Glucuronide

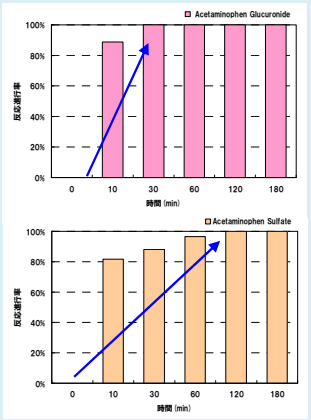
✓同じunit数のグルクロニダーゼでも、脱抱合の反応性が異なる傾向。

Acetaminophen Sulfate

酵素添加量1,000 unit（グルクロニダーゼ換算）
反応時間1時間、40℃

図 各試薬会社の酵素試薬を用いた脱抱合反応率の検討

7/15



Acetaminophen Glucuronide

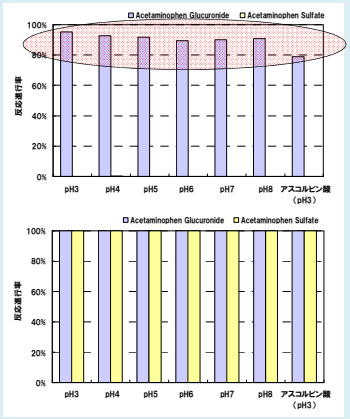
✓グルクロン酸抱合体・硫酸抱合体共に、速やかに脱抱合反応が進行する傾向。

Acetaminophen Sulfate

酵素添加量10,000 unit（グルクロニダーゼ換算）
40℃

図 反応時間の経過に伴う脱抱合反応率の推移

8/15



グルクロニダーゼ添加

✓弱酸性～中性付近の幅広いpH条件で脱抱合反応が進行する傾向。

グルクロニダーゼ＋スルファターゼ添加

酵素添加量10,000 unit（グルクロニダーゼ換算）
反応時間1時間、40℃

図 pH条件による脱抱合反応率の検討

9/15

表 反応温度条件による脱抱合反応率の検討

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

✓室温程度の幅広い条件でも十分な脱抱合反応が進行する傾向。

酵素添加量10,000 unit（グルクロニダーゼ換算）
反応時間1時間

※安定性の検討

Acetaminophen ・・・ 40℃で3時間／グルクロニダーゼ・スルファターゼ添加
Acetaminophen Glucuronide ・・・ 40℃で3時間
Acetaminophen Sulfate ・・・ 40℃で3時間／グルクロニダーゼ添加

→ いずれの条件でも抱合体・脱抱合体ともに減衰影響はみられず。対象としたモデル医薬品に関しては、意図しない減衰に伴う評価結果への影響は小さいと考えられる。

10/15

－種々の水試料への適応と有効性の検討－

淀川＋安威川・神崎川

- 対象河川流域のうち代表的な地点を対象にサンプリング
- 下水処理場の流入水・放流水も合わせて対象

開発したアッセイ手法を用いて、河川水及び下水試料を対象にして、多種薬効分類を含む合計48成分の医薬品成分類への適応・評価を検討。

11/15

表 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

脱抱合酵素の添加により、約1.5倍～最大10倍程度増加する傾向。

→ 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する傾向。

※今回対象にした成分：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医薬品成分。
→ 対象河川や成分を広げ、さらなる検討を試みていくことが重要。

12/15

まとめ

①：医薬品の抱合体のうち主要な割合を占めるグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体に着目し、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った。

②：グルクロニダーゼ及びスルファターゼの脱抱合反応により適した酵素試薬、反応温度、pH、反応時間や安定性等、種々の反応条件について最適化を行い、比較的幅広い条件で脱抱合反応が進行することを明らかにした。

③：実河川水試料に適応したところ、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する傾向がみられることを明らかにした。

13/15

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、採水にご協力下さいました河川及び下水処理場の関係者の方々、そして大阪薬科大学 薬品分析化学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、データ整理等のご協力を受けました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

14/15

Thank you very much for your kind attention !

Contact address: Takashi Azuma (Ph.D. in Engineering)
t.azuma@gly.oups.ac.jp

15/15