

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H00786

研究課題名(和文) 水環境中に残留医薬品類の多面的評価と薬理活性の除去性能評価

研究課題名(英文) Comprehensive evaluation of residual pharmaceuticals in the aquatic environment and their removal efficiency in wastewater treatment plant

研究代表者

中田 典秀 (Nakada, Norihide)

京都大学・工学研究科・講師

研究者番号：00391615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：水環境中に残留する医薬品に起因する問題の解決と今後の影響評価に向け、対象を決めた機器分析(ターゲット分析)、水試料から直接薬理活性が検出できるバイオアッセイ、未同定の薬理活性物質の同定(予測スクリーニング)手法を組み合わせ、代謝もしくは分解産物4種を含む計36種のGタンパク質共役型受容体(GPCR)拮抗薬成分と5種のGPCR拮抗活性の下水処理場における処理実態と水環境への放流実態について評価を行った。その結果、現行の下水処理における分析対象とした医薬品成分の低い除去率と、代謝もしくは分解産物が比較的高濃度かつ高頻度で存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水環境中に残留する医薬品の定量は、これまでは分析用標準物質が販売されている比較的古い薬剤に対するターゲット分析が主流であったが、それでは残留医薬品の評価に漏れが生じている可能性がある。また、今後の残留医薬品の評価においては、化学物質としてではなく、薬効成分として評価する必要がある。このような背景から、水試料からの薬理活性の直接の検出と予測スクリーニングを組み合わせ、残留医薬品を評価した点は革新的であると言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to gain a further understanding of residual pharmaceuticals in the aquatic environment and to assess their impact on the aquatic organisms in the future. Targeted instrumental analysis and a bioassay that can detect physiological activity directly from water samples were applied to wastewater samples together with suspect screening based on the approaches to qualify untargeted or unknown active substances. A total of 36 types of G-protein-conjugated receptor antagonists, including 4 metabolites or degradation products were quantified in the wastewater samples from 5 wastewater treatment plants (WWTPs). The results revealed that low removal efficiencies of them and their activities by the conventional wastewater treatment and the occurrence of metabolites or degradation products at a relatively high concentrations and frequency of detection in the effluent of WWTPs.

研究分野：環境化学

キーワード：薬理活性 環境医薬品 予測スクリーニング バイオアッセイ 精密質量分析 下水処理

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々が日常生活で使用する医薬品類の中には、下水処理場 (STP) でも十分に除去されず薬理活性を有したまま水環境中へ流出しているものがある。医薬品類はもともと薬理活性を有し、生分解性が低く分子設計されていることから、水生生態系への影響が懸念されている。水環境中に排出された医薬品による生物の影響としては、水循環における残留抗生物質による薬剤耐性菌の発生・伝播に対する国際的な懸念のほか、経口避妊薬成分による魚類の雌性化や、向精神薬成分による野生の魚の行動や摂食の異常、抗炎症薬の食物連鎖を通じたハゲタカの絶滅危機などが確認されている。

このように、我々が使用する医薬品成分による水生生物への影響が観測または懸念されているにも関わらず、水環境中に排出されている医薬品による水生生物への影響評価や、排出実態が把握できていない。このように水環境中の残留医薬品に関する研究が停滞しているのは、現在の研究アプローチの限界に起因している。現行の研究アプローチは、分析用標準物質が販売されている比較的古い薬剤に対する分析 (ターゲット分析) であり、量的な使用状況はいずれ把握できるが、標準物質が販売されていない、または特許が有効な比較的新しい薬剤に対する分析や分解産物に対する分析 (サスペクトスクリーニング) ができていない。

近年、医薬品の大半が G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に作用して薬効を発揮するという性質を利用し、GPCR 遺伝子とアルカリホスファターゼ融合 TGF $\alpha$  遺伝子を導入したヒト細胞を用いた特定の薬理活性を包括的に検出する手法 (以下、バイオアッセイ) が開発された。国内外の下水処理放流水に適用された結果<sup>1)</sup>、バイオアッセイで検出された薬理活性と、ターゲット分析で検出された理論活性値には乖離が見られ、バイオアッセイで検出された薬理活性値の方が高く、未同定の医薬品が下水中に存在し、かつ水環境中へと排出されていることが実測された。

以上のことから、水環境中に現在実際に排出されている医薬品を多面的に評価するためには、ターゲット分析だけでなく、薬理活性 (拮抗活性) を直接検出し分析対象物質に漏れが無いことを確認しつつ、さらにこれらの結果をもとにサスペクトスクリーニングを行い、未同定の残留医薬品を同定・定量していくことが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、水環境中残留医薬品に起因する問題の解決と今後の影響評価に向け、多面的に残留医薬品の汚染実態を評価することにある。以下に具体的な目的を示す。

- (1) これまでの主研究アプローチである対象を決めた機器分析 (ターゲット分析) に加え、培養細胞を用いた試験 (バイオアッセイ) により水試料から直接薬理活性を検出する。
- (2) バイオアッセイにより残留医薬品の薬効分類を絞り込み、高感度分析機器を用いて未同定の医薬品を同定 (サスペクトスクリーニング) する。
- (3) 同定された医薬品または薬理活性物質の現行の STP における除去性能を実態調査から把握する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ターゲット分析成分の選出と分析法の検討 (1 次)

既報<sup>1)</sup>において水環境中から検出された、Angiotensin (AT1)、Dopamine (D2)、 $\beta$ -Adrenoceptor (B1)、Muscarine (M1)、Histamine (H1 および H2) 受容体への拮抗活性に注目し、既報における水環境中からの検出事例をもとにこれらの受容体への拮抗活性薬を約 20 種選出した。

対象とした成分の下水処理放流水中濃度レベルは、ng $\sim$  $\mu$ g/L と予想されたため、固相抽出 (SPE)、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS、TQD、Waters) での同定・定量を試みた。質量分析部での検出条件の検討のうち、LC 部での分離条件を検討した。その後、SPE での濃縮および溶出条件の検討を行った。LC-MS/MS では目的成分のイオン化阻害や抑制、SPE では目的成分の損失が予想されたため、目的成分の重水素化物または <sup>13</sup>C ラベル化物 (サロゲート) をほぼ全ての成分について入手した。SPE については、単一の SPE カートリッジでは破過が確認されたため、性質の異なる 2 つのカートリッジ (Oasis HLB と Oasis MCX、Waters) を連結することにより実施した。

#### (2) 下水処理放流水の機器分析とバイオアッセイ (1 次)

下水処理放流水は近畿圏の 4 ヶ所の STP より 2017 年 11、12 月に採取した。得られた下水処理水 (機器分析用: 200 mL、バイオアッセイ用: 2,500 mL) は、ガラス繊維ろ紙 (孔径 1.0  $\mu$ m、Whatman) でろ過し、ターゲット分析およびサスペクトスクリーニング (機器分析) 用の試料へはサロゲートを添加し、前述の 2 連カートリッジを用いて固相抽出した。サスペクトスクリーニングは、LC-MS/MS による定量後、同じ試料を LC-四重極飛行時間型質量分析計 (QTOF-MS、Xevo G2-XS、Waters) へ供して実施した。その際の測定範囲は、 $m/z$  50 $\sim$ 1250 として行った。バイオアッセイは、同一試料を同様にろ過し、サロゲートを添加していないろ液試料を SPE により濃縮し、既報<sup>1)</sup>に従って実施した。

### (3) 下水処理放流水中の薬理活性と理論活性との比較 (1次)

各拮抗薬グループの代表成分に対するターゲット分析成分の比活性値<sup>1)</sup>と、下水放流水中の定量濃度より、理論活性を算出し、両者を比較した。

### (4) ターゲット分析成分の選出 (2次) と分析法検討 (2次)

厚生労働省が公開しているレセプト・特定健康等情報データベース (NDB)<sup>2)</sup>をもとに、本研究課題の対象薬効薬の日本国内での生産量、各医薬品の代謝・排泄率、日本の全人口と、1人あたりの平均水使用量から、各対象薬効薬の下水中濃度<sup>3)</sup>が推算されている。予測下水中濃度が高く、本研究課題でターゲット分析の対象となっていない成分について、実際に下水放流水中に存在するかどうかを、LC-QToF/MSによる分析結果より確認し、対象成分に加えた。また、代謝もしくは下水処理過程での分解産物についても同様に確認し、存在が確認された成分のうち、分析用の標準物質が入手できた成分については、対象成分に加えた。新規追加成分についてもサロゲートを用意し、前述の2連結のSPEでの回収、LC-MS/MSでの分析が可能であることを確認した。

### (5) ターゲット分析成分のSTPにおける存在実態把握調査

近畿圏の1ヶ所のSTPにて、2020年6月に2次処理水と放流水をスポット採水した。また、2020年の12月に、1時間に1回、24時間採水し、等量混合した流入水と放流水を6回採水し、前項で確立した一斉分析法によりターゲット分析対象成分の同定・定量を行なった。放流水試料については、同様に前処理(ただしサロゲートは未添加)し、バイオアッセイに供した。

2020年12月には、別途近畿圏の5ヶ所のSTPの6放流口にて、放流水をスポット採水し、同様に同定・定量を行なった。得られた試料は、同様にろ過、SPEを行い、ターゲット分析とバイオアッセイに供した。

## 4. 研究成果

### (1) ターゲット分析対象成分の選出と分析法の確立

2次検討までに追加した代謝もしくは分解産物4種を含む合計36成分について、質量分析部での検出条件、LC部での分離条件、SPE(Oasis HLBとOasis MCXの2連結)での濃縮および溶出条件を決定した。超純水、STP流入水および放流水への標準物質混合溶液添加による添加回収実験の結果、添加回収率は95~126%、定量下限値は数~数十ng/Lの範囲であった。

### (2) 下水処理放流水の機器分析とバイオアッセイ (1次) の結果

2017年11、12月に採取した近畿圏の4ヶ所のSTPの放流水に対するバイオアッセイの結果と、機器分析により算出した理論活性値を比較した(図1)。その結果、AT1(~2.5 μg-valsartan-EQ/L)が比較的高濃度で検出され、D2、M1、β1受容体活性も当量濃度として数ng/Lで検出された。試料を採取した4ヶ所のSTPのうち、オゾン処理を行っているSTPの放流水中では、いずれの活性も低値で検出された。

機器分析により検出された濃度と比活性値から算出された理論活性値は、AT1やH1受容体拮抗活性については概ね同程度の値となったが、活性値が低いM1、β1受容体拮抗活性については、両者に10倍以上の乖離が確認された。このことは、ターゲット分析の対象成分が不十分、試料中に含まれる類似拮抗活性物質間の相互作用、同じく試料中に含まれる非活性の共存物質との相互作用などがある可能性を示唆している。類似拮抗活性物質間の相互作用は相加的であること、非活性の共存物質との相互作用は天然有機物については無い事が確認されている<sup>4)</sup>。そこで、前述の各対象拮抗薬の下水中予測濃度<sup>3)</sup>と、予測スクリーニングにより存在が示唆(質量誤差2 mDa未滿)された成分のうち、分析用標準試薬が市販されているものをターゲット分析対象成分として加え、分析法を検討・確立(2次)し、以降の調査に適用した。

### (3) ターゲット分析対象成分のSTPにおける存在実態把握調査結果

近畿圏の1ヶ所STPにて2020年の12月に6回、24時間等量混合流入水と放流水として採水した試料中のターゲット分析対象成分(36成分)の同定・定量を行なった。その結果、高血圧治療薬のtelmisartan、消化管運動改善薬または抗精神病薬のsulpiride、アレルギー治療薬fexofenadineが流入水中で高濃度で検出された(図2左)。放流水中では、これらに加え、代謝もしくは分解産物であるvalsartan acidやatenolol acidが親物質よりも比較的高濃度かつ高頻度で検出された。予測下水中濃度との比較では、比較的排泄率が高い(>80%、例えば

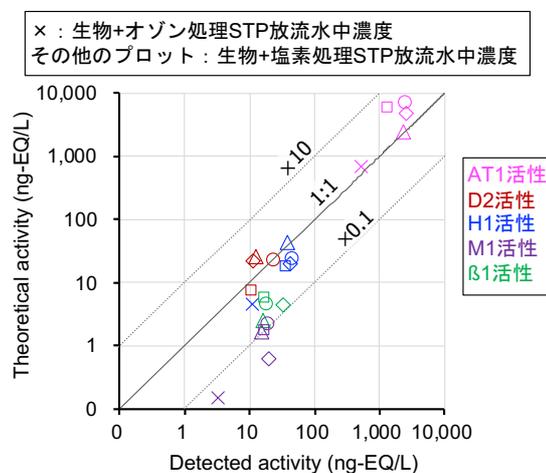


図1 STP放流水(2017年11、12月採取)中のGPCR拮抗活性の実測値(横軸)と機器分析結果から算出した理論活性値(縦軸)

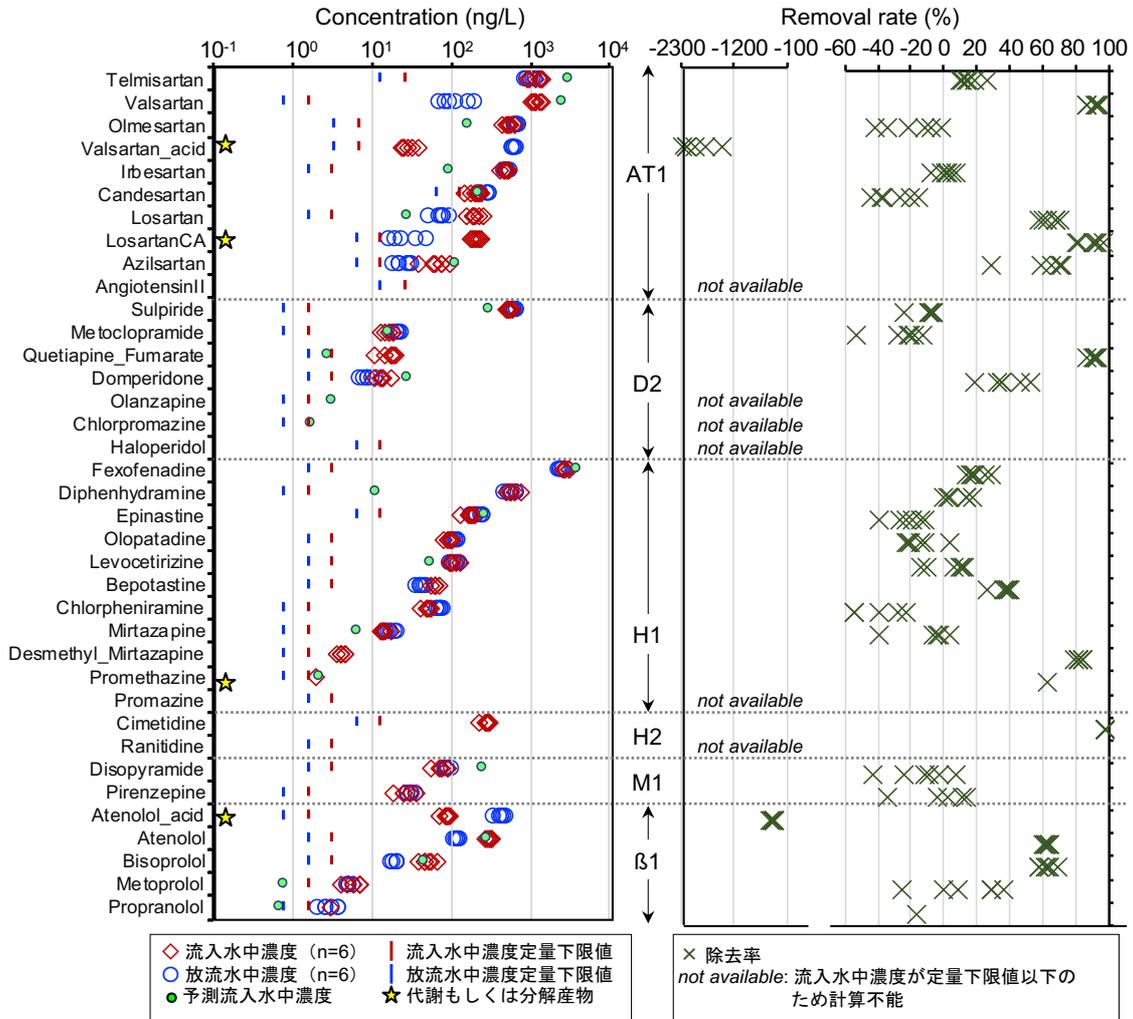


図2 日本国内下水（流入水）中のGPCR拮抗薬の予測濃度（2018年度）とSTP流入水および放流水中濃度（左）と除去率（右）（2020年12月採取）

telmisartan、valsartan、fexofenadine) 成分について、同程度で実測されたが、排泄率が低い成分 (<5%、例えば irbesartan、mirtazapine、metoprolol) については、予測値との乖離が大きくなった。これは、排泄率がある一定の幅を有しており、その寄与が低排泄率成分ほど大きいことを示唆しているものと思われる。また、NDBには含まれないドラッグストアでの販売量が多い医薬品成分 (diphenhydramine : 予測濃度 10 ng/L、pirenzepine : 同 0.001 ng/L) については、さらに乖離が大きかった。現時点ではドラッグストアを含む国内販売量の情報は公開されていないが、今後、流入水中濃度の評価においては、販売量も考慮する必要があることを示唆している。

Valsartan、losartan carboxylic acid (CA)、quetiapine fumarate、cimetidine はほぼ 100%、losartan、azilsartan、desmethyl mirtazapine、atenolol、bisoprolol は 60~80%程度の除去率を示した (図 2 右)。他の成分については流入水中と放流水中濃度はほぼ同程度であり、概して除去率は低い値となった。特に valsartan acid や atenolol acid は放流水中濃度が流入水中濃度に対し 10 倍以上の濃度で検出されており、処理過程での生成が示唆された。

試料中夾雑物の影響により、流入水試料のバイオアッセイは実施できなかった。そこで、前述の流入水と放流水中のターゲット分析対象成分の濃度と、比活性値<sup>1)</sup>とから、それぞれの受容体の拮抗活性としての除去率を算出した (図 3)。その結果、β1 受容体拮抗活性は、安定的に 50%程度の除去率と算出されたが、他の活性についてはほぼ 0%と算出された。H1 受容体拮抗活性の除去率が最終調査日に低下したが、これはこの活性への寄与が高い mirtazapine が、試料中夾雑物の影響により流入水中濃度が定量下限値

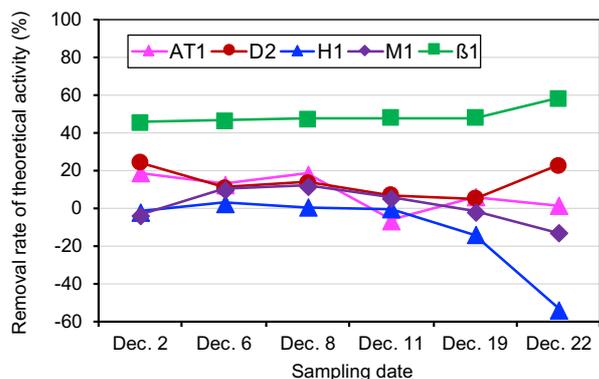


図3 STPにおけるGPCR拮抗活性の除去率（2020年12月調査）

以下となったことに起因している。

続いて、近畿圏の5ヶ所のSTPの6放流口にて、2020年の12月に放流水をスポット採水し、同様に同定・定量を行なった。その結果、5ヶ所のSTPのうち、生物処理とオゾン処理を行っているSTPの放流水中濃度が、他の生物処理と塩素処理を行っているSTPの放流水中濃度より明らかに低濃度であり、オゾン処理の有効性が示唆された(図4)。しかし、valsartanについては例外であり、オゾン処理前の2次処理水中濃度が他のSTPより高いか、オゾンに対する耐性を有している可能性が示唆された。

(4) STP放流水中の薬理活性と理論活性との比較、乖離要因の検討(2次)

近畿圏の1ヶ所STPにて2020年の6月に採取した2次処理水と放流水について、ターゲット分析とバイオアッセイを行った。その結果、2017年度調査結果(図1)同様、AT1受容体(〜5.4 µg-valsartan-EQ/L)やH1受容体拮抗活性(〜46 ng-mirtazapine-EQ/L)が比較的高濃度で検出され、D2、M1、β1受容体拮抗活性も当量濃度として数ng/Lで検出された(図5)。H1、M1、β1受容体拮抗活性は、2次処理水に比べ塩素処理後の放流水中で1.4〜1.7倍高値を示した。今後さらにデータ数を増やす必要があるが、塩素処理による活性の増強の可能性が示唆された。本課題における調査において、検出濃度や頻度は高くないが、H2受容体拮抗活性を有するranitidineについては、塩素処理において塩化物イオンとの高い反応性を確認している<sup>5)</sup>。

機器分析により検出された濃度と比活性値から算出された理論活性値は、AT1、H1、D2受容体拮抗活性については概ね同定度の値となったが、理論活性値が低いM1、β1受容体拮抗活性については、未だ両者に10倍以上の乖離が確認された。今後、現時点ではまだターゲット分析の対象成分に含まれていない比較的使用量が多い成分(それぞれflavoxateとsotalol)を追加し再評価する必要がある。さらに、予測スクリーニングによる塩素化成分も含む代謝もしくは分解産物についてのスクリーニング、バイオアッセイにおいて拮抗活性が増強される要因や成分の存在の確認が必要である。

<引用文献>

1. Ihara, M. *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 49, 1903-1911, 2015.
2. 厚生労働省、NDB オープンデータ, <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000177182.html> (2021年5月アクセス)
3. Zhang, H. *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 49, 1720-1729, 2020.
4. Zhang, H. *et al.*, *Environmental Science Technology*, 52, 11848-11856, 2018.
5. Zhao, B. *et al.*, *Chemosphere*, 267, 2021.

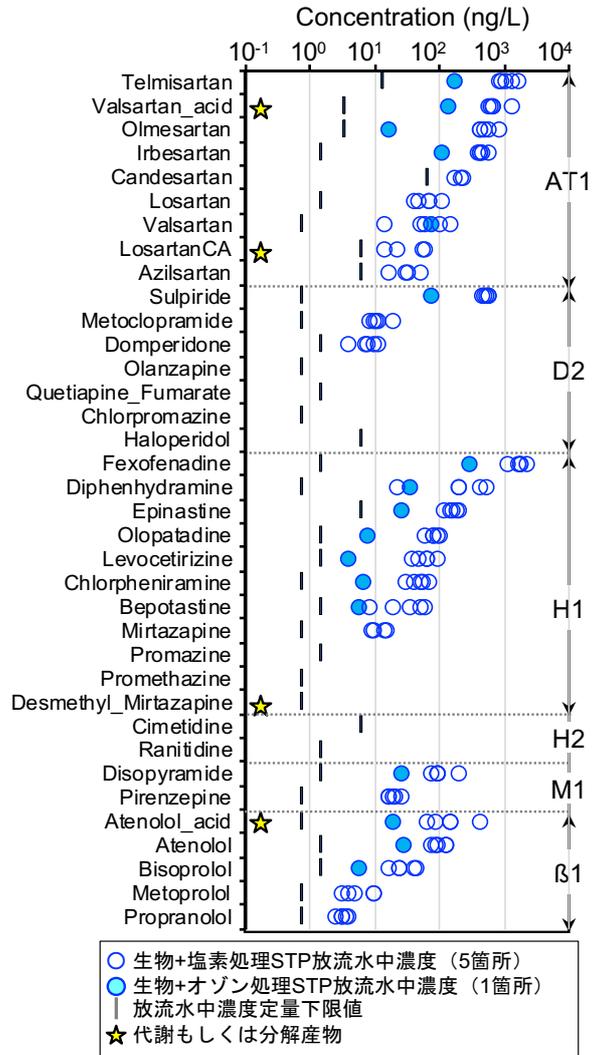


図4 STP放流水(2020年12月採取)中のGPCR拮抗薬の濃度

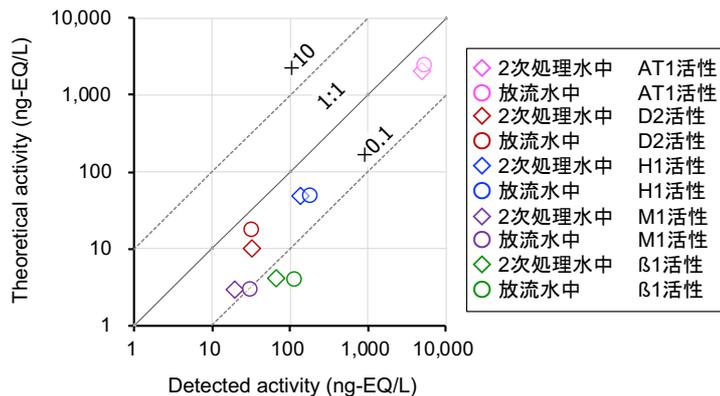


図5 STP2次処理水と放流水(2020年12月)中のGPCR拮抗活性の実測値(横軸)と機器分析結果から算出した理論活性値(縦軸)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhang Han, Ihara Mariko O., Nakada Norihide, Tanaka Hiroaki, Ihara Masaru	4. 巻 54
2. 論文標題 Biological Activity-Based Prioritization of Pharmaceuticals in Wastewater for Environmental Monitoring: G Protein-Coupled Receptor Inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 1720 ~ 1729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.est.9b05768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhao Bo, Zhou Jiajun, Nakada Norihide	4. 巻 267
2. 論文標題 N-nitrosodimethylamine formation potential (NDMA-FP) of ranitidine remains after chlorination and/or photo-irradiation: Identification of transformation products in combination with NDMA-FP test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 129200 ~ 129200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2020.129200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中田典秀	4. 巻 161
2. 論文標題 水環境中の医薬品の存在状況	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学物質と環境	6. 最初と最後の頁 4 ~ 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Johnson Andrew C., Jin Xiaowei, Nakada Norihide, Sumpter John P.	4. 巻 367
2. 論文標題 Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 384 ~ 387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aay6637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中田典秀、張晗、井原賢
2. 発表標題 生理活性に基づく下水処理水中のアンジオテンシンII 受容体拮抗作用（薬）のターゲット分析および予測スクリーニング
3. 学会等名 日本環境化学会 第27回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田典秀、張晗、井原賢
2. 発表標題 バイオアッセイ、ターゲット分析、予測スクリーニングによる下水処理水中の各種受容体拮抗作用物質の探索
3. 学会等名 日本水環境学会 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田典秀、長谷川英資、井原賢
2. 発表標題 アンジオテンシンII 受容体拮抗薬の都市水環境における存在実態
3. 学会等名 第52回に本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田典秀、張晗、井原賢
2. 発表標題 生理活性に基づく下水処理水中のアンジオテンシンII 受容体拮抗作用（薬）のターゲット分析および予測スクリーニング
3. 学会等名 第27回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Han Zhang, Norihide Nakada, Masaru Ihara, Hiroaki Tanaka
2. 発表標題 Biological activity-based prioritization of pharmaceuticals in wastewater of England and Japan
3. 学会等名 The 5th Asian Symposium on Water Reuse -Technology Renovation and Risk Management (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jiajun Zhou, Bo Zhao, Hiroaki Tanaka, Norihide Nakada
2. 発表標題 NDMA Formation from Ranitidine Affected by Chlorination and/or Photo-irradiation
3. 学会等名 11th Micropol & Ecohazard Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihide Nakada, Han Zhang, Masaru Ihara
2. 発表標題 Screening of Physiological Activity in Wastewater Effluents by Combination of in vitro Bioassay, Target Analysis and Suspect Screening
3. 学会等名 11th Micropol & Ecohazard Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田典秀
2. 発表標題 PPCPsの環境中での存在状況
3. 学会等名 第33回環境ホルモン学会講演会、水環境中における医薬品及びパーソナルケア製品(PPCPs)に関する最近の動向について (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田典秀
2. 発表標題 都市水循環における新興有機汚染物質
3. 学会等名 環境省環境調査研修所H30年度水質分析研修（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 6-3-136.Jiajun ZHOU, Bo ZHAO, Norihide NAKADA, Hiroaki TANAKA
2. 発表標題 Characterization of NDMA formation and transformation products from ranitidine during chlorination and/or photo-irradiation
3. 学会等名 第41回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム、環境衛生工学研究
4. 発表年 2019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	井原 賢 (Ihara Masaru) (70450202)	京都大学・工学研究科・特定助教  (14301)	

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
---------	---------