

機関番号：82602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760424

研究課題名（和文）水環境試料を対象とした医薬品代謝物の機器分析法の開発および適用

研究課題名（英文）Development and application of instrumental analysis method for detection of pharmaceuticals and metabolites in water environment

研究代表者

島崎 大 (SIMAZAKI Dai)

国立保健医療科学院・水道工学部・室長

研究者番号：60323046

研究成果の概要（和文）：

水環境試料中の医薬品 3 物質及び代謝物 5 物質を対象として、LC/MS/MS による同時分析法を開発し、下水処理および浄水処理過程の対象物質濃度の測定を行った。下水試料中の対象物質濃度を測定したところ、7 物質が数十 ng/L から  $\mu\text{g/L}$  の範囲で検出された。水道原水及び浄水からもカルバマゼピンとその代謝物が同程度で検出されたことより、医薬品原体だけでなく代謝物が水道原水に存在し、また、浄水中に残留する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Simultaneous instrumental analysis method for detection of three pharmaceuticals and five metabolites in water environment was successfully developed by using LC/MS/MS and served for an on-site investigation in the course of water purification and that of wastewater treatment. Seven pharmaceuticals and metabolites were found in the range of tens to thousands ng/L at a wastewater treatment plant. Both carbamazepine and its metabolite were found not only in raw water but also in finished water at a water purification plant, thus, they could possibly remain in drinking water.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	2,100,000	0	2,100,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：医薬品・代謝物・機器分析・水環境

## 1. 研究開始当初の背景

1990 年代以降の欧米諸国やわが国において、主に医療用や畜産用の医薬品やその代謝物、パーソナルケア製品を起源とする化学物質 (PPCPs: Pharmaceuticals and Personal Care Products) が水環境中から検出されている。医薬品類の環境中における存在濃度は極わずかである事が想定されるが、薬効としてヒトの神経系や代謝系など恒常性に影響を及ぼす物質が含まれるため、その挙動や影響について関心が寄せられている。また、これらの中には親水性や難分解性が高い物質

が存在することから、通常の浄水処理の過程では除去されずに水道水中に残留する可能性がある。実際に研究代表者らの先行研究においても、国内の水道水から検出された物質がある。このため、各地の水源水域をはじめとする水環境において、医薬品等の化学物質による汚染の全体像を把握し、また、有効かつ適切な処理方法を明確にすることが求められている。

このような水環境中に流出した医薬品類を対象として、河川水や各種排水、浄水場原水等における汚染状況の調査が国内でも進

みつつあり、また、下水処理や浄水処理における除去性についても数々の報告が見られている。しかしながら、各調査では医薬品成分の原体のみを対象としており、その点において、現時点での情報は依然として断片的かつ限定的であることに留意する必要がある。例として、下水処理場でのコンポジット採水による下水処理過程での除去性を調査した複数の事例において、生下水中よりも下水処理水中の医薬品原体の濃度が高くなる結果が示されており、医薬品抱合体が下水処理過程において脱抱合化する可能性が推察されている。

国外の研究事例においても、代謝物として体外に排泄される医薬品等の存在状況については限定的に報告されているに過ぎず、水環境への流出過程や水処理における医薬品等の代謝産物や分解産物の挙動に関する情報は、現時点ではほとんど得られていない状況である。

## 2. 研究の目的

当研究課題では、水環境中における医薬品成分の抱合体および代謝物を含めた挙動を解明する事を目的として、申請期間においては、水環境中で検出実績のある医薬品を対象とした原体および抱合体などの代謝物の同時分析法を開発し、水環境を対象とした高感度分析法としての適用可能性を明らかにすることを旨とする。

具体的には、水環境中で検出実績のある医薬品のうち、人体内における代謝経路や代謝物（抱合体等）、尿中排泄率、下水処理での原体の除去性、標準品および標準品の入手性について考慮した上、3~5種類の医薬品原体および対応する複数の代謝物を選定し、水環境中の試料を想定した機器分析法および前処理法を検討する。分析機器として液体クロマトグラフィータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用い、医薬品原体とその代謝物が同時に分析可能である手法とする。分析条件、純水系における検出下限、定量下限、および環境水（河川水、下水処理水、生下水等）を用いた添加回収率を明らかにする。

続いて、十分な検出感度が得られた医薬品原体および代謝物を対象として、当該分析法により下水処理場の処理工程水や下水処理水が流入する都市河川水等を対象とした実態調査を行い、水環境を対象とした分析法としての適用可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 3.1 機器分析法の開発

#### ①分析対象物質

まず、国内の水環境での検出事例、下水処理における原体の除去性等について考慮した上で、医薬品原体として解熱鎮痛剤のアセ

トアミノフェン（AAP）、抗てんかん剤のカルバマゼピン（CBM）、消炎鎮痛剤のジクロフェナク（DCF）の3物質を選択した。次に、ヒト体内における代謝経路や代謝産物、各々のヒト尿中排泄率及び標準品の入手性について考慮し、AAPの主要尿中排泄物としてアセトアミノフェン-グルクロン酸抱合体

（AAP-GuL）及びアセトアミノフェン-硫酸抱合体（AAP-SuL）、CBMの代謝産物の一種であり、薬理活性を有するカルバマゼピン-10,11-エポキシ体（CBM-EPO）、DCFの主要尿中排泄物としてジクロフェナク-4'水酸化体（4' OH-DCF）及びジクロフェナク-5水酸化体（5OH-DCF）の5物質を選択した。以上、計8物質を本研究の分析対象物質とし、水質試料分析においてはそれらの溶存態のみを対象とした。本研究で用いた標準物質は、アセトアミノフェン、カルバマゼピン及びジクロフェナクが和光純薬工業㈱製、各代謝物及び後述のサロゲート物質がToronto Research Chemicals（TRC）社製である。

#### ②分析条件の設定

対象物質の分析にLC/MS/MSを使用した。高速液体クロマトグラフ（LC）はAgilent社製の1100seriesを用いた。対象物質のうちAAP-SuL以外の物質の分析は、分離カラムにWaters社製のXBridge Shield RP18（2.1×150 mm、5 μm）を、移動相には移動相A1：0.1% ぎ酸水溶液（v/v）及び移動相B1：0.1% ぎ酸含有メタノール（v/v）を用い、流速0.2 mL/min、オープン温度40 °C、注入量10 μLで測定した。一方、AAP-SuLの分析は、分離カラムにWaters社製のAtlantis T3（2.1×150 mm、5 μm）を、移動相には移動相A2：10 mM 酢酸アンモニウム水溶液（w/v）及び移動相B2：10 mM 酢酸含有アセトニトリル（v/v）を用い、流速0.2 mL/min、オープン温度40 °C、注入量10 μLで測定した。また、両LC条件において各移動相によるグラジエント分析を行った。タンデム質量分析装置（MS/MS）はMicromass社製のQuattro Ultimaを使用した。イオン化法は、AAP-SuL以外の物質はエレクトロスプレーイオン化法のポジティブモード（ESI+）で、AAP-SuLはネガティブモード（ESI-）で行った。対象物質の検出はSelected Reaction Monitoring（SRM）モードで行った。

#### ③試料前処理方法

水質試料250 mLにサロゲート溶液10 μLを添加し（AAP-d<sub>4</sub>：50 ng、AAP-GuL-d<sub>3</sub>：10 ng、AAP-SuL-d<sub>3</sub>：50 ng、CBM-d<sub>10</sub>：20 ng、CBM-EPO-d<sub>2</sub>：50 ng、DCF-d<sub>4</sub>：50 ng、4' OH-DCF-d<sub>4</sub>：50 ng相当）、Oasis HLBカートリッジ（Waters社製：予めメタノール10 mL、純水10 mLでコンディショニング）とEnvi Carbカートリッジ（SUPELCO社製：予めトルエン5 mL、アセトン5 mL、メタノール5 mL、純水10 mLでコ

ンディショニング) を 2 連結したものに 10 mL/min で通水した。通水後、Oasis HLB カートリッジを純水 20 mL で洗浄し、遠心分離 (3500rpm, 5min) で脱水後、メタノール 10 mL で溶出した。溶出液を N<sub>2</sub> ガスで濃縮・乾固し、水/メタノール (85 : 15) 水溶液を 1 mL 加えて再溶解したものを水質試料中溶存態 AAP、CBM、CBM-EPO、4' OH-DCF、5OH-DCF の測定溶液とした。一方、通水後の Envi Carb カートリッジは、純水 10 mL 及びメタノール 10 mL によって洗浄した後、1% ぎ酸含有メタノール 20 mL によって溶出し、エバポレーター及び N<sub>2</sub> ガスで濃縮・乾固した。これに、水/メタノール (95 : 5 水溶液 10 mL を加え、超音波により溶解した。この水溶液を Oasis MAX カートリッジ (Waters 社製 : 予めメタノール 10 mL、純水 10 mL でコンディショニング) に負荷し、純水 10 mL、メタノール 10 mL/アンモニア含有メタノール 5 mL でカートリッジを洗浄した後、1% ぎ酸含有メタノール 5 mL で溶出した。これを N<sub>2</sub> ガスで濃縮・乾固したものに水/メタノール (85 : 15) 水溶液を 1 mL 加えて再溶解し、水質試料中溶存態 AAP-GuL の測定溶液とした。

3.2 下水処理場および浄水場における採水  
平成 21 年 2 月 9 日に多摩川水系に位置する A 下水処理場において下水試料の採取を行った。採取した試料は、①下水処理反応槽 (標準活性汚泥法) 前の「最初沈殿池後処理水」、②下水処理反応槽後の「最終沈殿池越流水」、③下水処理反応槽後、A<sub>2</sub>O 法系列の処理水と 6 : 4 の割合で混合し、さらに塩素処理を施した「放流水」の 3 試料とした。また、河川水等の試料については、同じ日に A 下水処理場の下流に位置する B 浄水場において④工業用水系原水 (河川水)、⑤上水系原水 (地下水) 及び⑥上水系浄水 (地下水) の 3 試料を採取した。各試料はスポット採水及び処理工程 1 試料採取とした。褐色ガロン瓶に採水後、冷蔵保存し、速やかに前処理作業を行った。また、得られた抽出液は測定時まで -20 °C で冷凍保存した。

#### 4. 研究成果

4.1 検出・定量下限値および回収率  
河川水を用いた低濃度添加回収試験の繰り返し分析 (7 回) を行い、得られた標準偏差と t 値より、本分析法の検出下限値 (MDL) と定量下限値 (MQL) を算出した。

各対象物質の MDL は、AAP が 0.96 ng/L、AAP-GuL が 4.2 ng/L、AAP-SuL が 1.7 ng/L、CBM が 0.24 ng/L、CBM-EPO が 0.43 ng/L、DCF が 0.92 ng/L、4' OH-DCF が 1.3 ng/L、5 OH-DCF が 1.8 ng/L であった。一方、各対象物質の MQL の範囲は 0.62 ng/L (CBM) から 11 ng/L (AAP-GuL) であった。また、MDL、MQL 算出

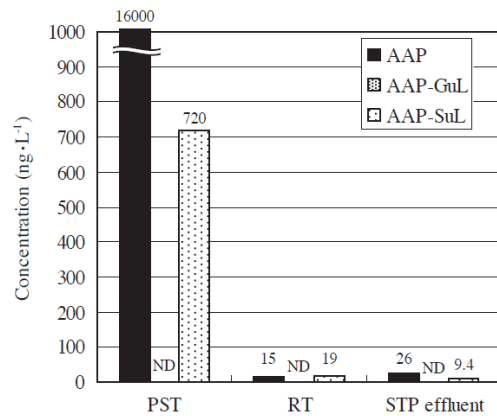


Fig. 1 Concentration of acetaminophen and conjugates in sewage water samples. PST: Primary sedimentation tank, RT: Reaction tank by conventional activated sludge process, STP effluent: Effluent of sewage treatment plant A.

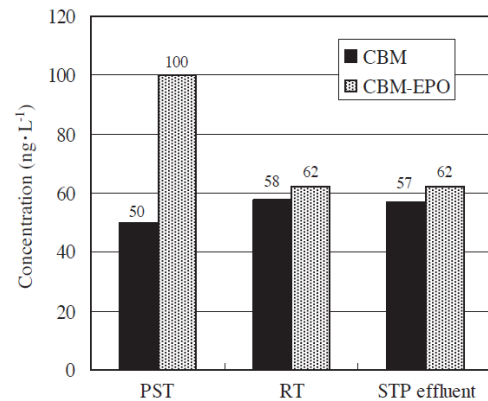


Fig. 2 Concentration of carbamazepine and epoxide in sewage water samples.

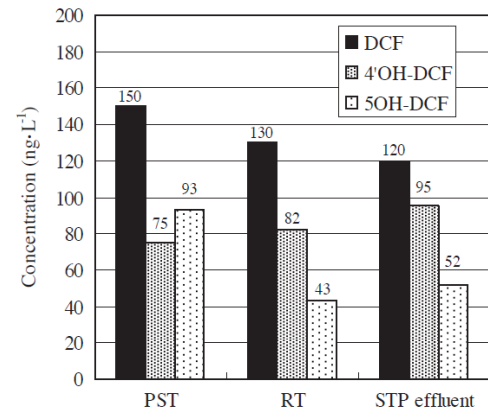


Fig. 3 Concentration of diclofenac and hydroxides in sewage water samples

時の CV は全対象物質において 10 % 以下となった。MDL、MQL 算出時に行った河川水を用いた低濃度添加回収試験の結果、各対象物質のサロゲートの絶対回収率は AAP-d<sub>4</sub> が 84 %、AAP-GuL-d<sub>3</sub> が 59 %、AAP-SuL-d<sub>3</sub> が 63 %、CBM-d<sub>10</sub> が 70 %、CBMEPO-d<sub>2</sub> が 73 %、DCF-d<sub>4</sub> が 79 %、4' OH-DCF-d<sub>4</sub> が 78 % であり、良好な結果が得られた。さらに、対象物質濃度をサロゲートで補正した場合の回収率は全物質において 89~105 % であり、環境水中の対象物質を精度良く定量することが可能となった。

#### 4.2 水環境試料中の医薬品原体および代謝物の存在状況

##### ① 下水試料中の対象物質濃度

A 下水処理場において採取した最初沈殿池後処理水、最終沈殿池越流水、放流水中の対象物質濃度を本法により分析した。得られた結果を Fig. 1~3 に示す。3 試料を分析した結果、AAP-GuL を除く 7 物質が全ての試料から数 ng/L から十数  $\mu$ g/L レベルで検出され、その中でも最初沈殿池後処理水中の AAP が 16,000 ng/L と最も高濃度であった。また、残り 6 物質のうち 4 物質において最初沈殿池後処理水中濃度が最も高く、AAP-SuL が 720 ng/L、CBM-EPO が 100 ng/L、DCF が 150 ng/L、5OH-DCF が 93 ng/L で検出された。また、CBM については最終沈殿池越流水、4' OH-DCF については放流水中濃度が 3 試料の中で最も高く、それぞれ 58 ng/L、95 ng/L であった。医薬品原体についての同様な報告事例として、久保田らによる多摩川水系の 6 箇所での下水処理場でのモニタリング調査では、CBM と DCF の流入水中濃度の中央値がそれぞれ約 100 ng/L と、本研究と同程度であることが示されている。Nakada らが行った都内水再生センターでの調査では流入水中 CBM が、また、奥田や田中らが行った国内下水処理場での調査から溶存態 AAP の流入水中濃度が本研究結果と同様であることが示されている。一方で、本研究結果により一部医薬品の代謝物も原体と同程度の濃度で下水中に存在していることが明らかとなった。

##### ② 河川及び地下水中の対象物質濃度

B 浄水場において採取した工業用水系原水（河川水）、上水系原水（地下水）及び上水系浄水（地下水）中の対象物質濃度を分析したところ、工業用水原水である河川水では 8 対象物質中 AAP-GuL 及び AAP-SuL を除く 6 物質が検出され、その検出濃度範囲は 13~38 ng/L であり、CBM-EPO が 38 ng/L と最も高濃度であった。多摩川水系の河川においては医薬品原体の汚染実態が報告されており、本研究の対象物質のうち医薬品原体である AAP、CBM、DCF の検出濃度はそれらの報告とほぼ同程度（数~数十 ng/L）であった。また、AAP-GuL 及び AAP-SuL は検出されなかった。一方、上水系原水では CBM が 21 ng/L、CBM-EPO が 14 ng/L で検出され、工業用水原水と比較すると共に低濃度であるものの、原水である地下水における CBM 及び CBM-EPO による汚染の存在が示された。また、浄水においても CBM 及び CBM-EPO がそれぞれ 13 ng/L、27 ng/L で検出されたことから、B 浄水場での浄水処理過程（凝集-急速ろ過-塩素処理）では各物質は除去されない可能性が考えられた。CBM については、高濃度の塩素処理やオゾン処理、粉末活性炭処理により高い除去率が得られるとの報告があることか

ら、高度処理を含めた浄水処理過程における CBM 及び CBM-EPO の除去可能性について、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究の結果より、下水及び水環境中に医薬品代謝物とその原体と同程度の濃度で存在する可能性が明らかとなり、その中には CBM-EPO のように原体と同様の薬理活性を有するものもあることから、今後、水環境における汚染の全体像や挙動を把握し、有効適切な処理方法を明確にすること、また、水環境中における水生生物等への影響の有無を評価することが必要である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ①小野田 優, 大久保 豊, 島崎 大, 秋葉 道宏: 水質試料中の医薬品と代謝物の同時分析法の開発と適用, 水環境学会誌, 査読有, **33**(7), 97-102.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ①島崎大, 国包章一: 水道水源および水道水中における医薬品の存在実態, 衛生薬学シンポジウム「水環境中の残留医薬品を考える - 生態系への影響は? -」, 日本薬学会第 130 回年会要旨集, S40-3 (岡山)
- ②T. Nishimura, R. Kubota, D. Simazaki, T. Suzuki, M. Akiba S. Kunikane: Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Raw Water Used for the Drinking Water Supply in Japan, AWWA 2009 Water Quality Technology Conference and Exposition (Nov. 15-19, 2009, Seattle, USA)
- ③D. Simazaki: Pharmaceuticals as possible contaminants in water environment - current situation in knowledge and gap, Seminar on environmental fate and impact of veterinary drugs (4 Nov. 2009, Korean National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang, Korea)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

（該当無し）

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 大 (SIMAZAKI Dai)

国立保健医療科学院・水道工学部・室長

研究者番号: 60322046