

(37) 淀川流域の下水処理場放流水と支川における 医薬品の存在実態

杉下 寛樹^{1*}・山下 尚之¹・田中 宏明¹・田中 周平¹・藤井 滋穂¹
宝輪 勲²・小西 千絵²

¹京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター(〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2)

²ムラタ計測器サービス(〒245-0052 神奈川県横浜市戸塚区秋葉町15)

* E-mail: sugishita@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

淀川水系中流域での7つの下水処理場の放流水と14の支川の水を対象として、93物質の医薬品をLC-MS/MSまたはGC-MSを用いて測定した。その結果、63物質が最大2,000 ng/Lの濃度で検出され、うち10物質については国内で初めての検出例となった。下水処理場の放流水において支川よりも多くの物質が高濃度で検出され、下水処理場の寄与が大きいことが示唆された。一方、支川において7物質が下水処理場放流水よりも高濃度で検出された。一部の医薬品については、CODやアンモニア性窒素濃度が高い支川において高濃度で検出される傾向にあり、下水道の普及が遅れている支流域では、生活排水の不十分な処理が原因で、高濃度の医薬品が河川中に排出されている可能性が示唆された。

Key Words : pharmaceuticals, PPCPs, river water, Yodo River, tributaries

1. はじめに

水環境中における医薬品の存在と生態への影響が注目を集めている¹⁾。医薬品は人や動物に日常的に使用されているが、多くは水溶性が高く、下水処理場で十分に処理されずに放流されているという報告がある²⁾³⁾。また、本来の使用目的から、生物に対して活性を有することも予想され、生態系への影響が懸念されている⁴⁾。ヨーロッパでは、ERAVMIS⁵⁾やPOSEIDON⁶⁾といったプロジェクトにより、下水処理場における動態、環境中での実態、リスク評価を行った。アメリカも、EPAを中心とした大規模な河川調査を行うなど、積極的に医薬品の問題に取り組んでいる。その結果として、EUでは、医薬品の新規販売許可申請時に環境影響評価が義務付けられ、アメリカにおいても、新規に開発される医薬品についてリスクアセスメントガイドラインが制定されるなど、規制に向けた機運が高まっている。

医薬品は使用状況が国によって異なるため、日本国内においても環境中における医薬品の存在実態を明らかにする必要がある。関東圏の河川や淀川水系において多くの調査が行われているが^{7)~10)}、対象物質数は最大でも50

程度である。

小西ら¹¹⁾は、水環境中医薬品のLC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析法)を用いた一斉分析法を開発しており、本研究では国内で初めてこの方法を用いて調査を行い、より多くの医薬品の存在実態を把握することとした。また、crotamitonなど一部の物質は、GC-MS (ガスクロマトグラフィー質量分析法)での測定で良好な定量結果が得られている¹²⁾¹³⁾。GCは分離能に優れるが、難揮発性物質や熱に対して不安定なものには用いることができない。一方LCは、これらの物質も含めた幅広い物質に用いることができる。これらの特徴を踏まえ、本研究ではLC-MS/MSとGC-MSを併用し測定を行った。

また、中田ら⁷⁾は、下水処理場が大きな負荷源となっている一方で、物質によっては支川からの負荷が大きく、下水処理場以外の負荷源が存在することを示唆している。下水処理場以外の負荷源については、あまり多くのことは分かっておらず、そのため本研究では、淀川水系の主に支川を対象として医薬品の存在実態を明らかにし、処理場以外の負荷源についての特徴を把握することを目的とした。

2. 方法

(1) 調査の概要

a) 対象物質の選定と標準物質の入手

国内外で検出が報告されている物質の中から、標準物質が入手可能かどうか、河川水中での定量が可能かどうかを考慮し、表-1に示す93物質を選定した。定量の際に用いた標準物質は、和光純薬工業、LKT Laboratories, Inc. などから主に生化学用、HPLC用を入手した。

b) 採水地点

2府4県にまたがる淀川流域の中流域に位置する、京都市内から淀川大堰を中心に、図-1と表-2、表-3に示す7つの下水処理場の放流口(8箇所)と14支川を選定した。

c) 採水日時

採水は2006年9月6日の午前6時から午後3時の間に実施した。気象庁の気象統計情報¹⁹⁾によると、滋賀県の大津(北緯34度59.5分経度、東経135度54.7分)、京都府の京都(北緯35度00.9分、東経135度43.9分)、大阪府の枚方(北緯34度48.5分、東経135度40.3分)における先行晴天日数は4日、採水期間中はいずれの地点でも毎時0.5 mm以上の降雨は記録されなかった。

d) 採水方法

ステンレスバケツを対象地点の水で共洗いした後、そのバケツに水を汲み、茶褐色のガラス瓶に注いだ。運搬途中の生分解を防ぐためにアスコルビン酸を、分析精度の向上のためにEDTA-2Naをそれぞれ1 g/Lとなるように加えた。

(2) 定量方法

定量にはLC-MS/MS ESI-Positive法、同Negative法、ならびにGC-MS法を用いた。それぞれの方法について、純水を試料とした5回の添加回収試験における定量値の標準偏差を求め、その3倍を検出下限値と定義した。各物質について検出下限値が最も小さかった測定法の定量値を測定値とした。

a) LC-MS/MSによる定量の前処理方法

試料 200 mL を、ガラス繊維ろ紙(Whatman GF/F, 粒子保持能 0.7 μm)でろ過したろ液を分析試料とし、Oasis HLB (Waters)による固相抽出を行った。カートリッジのコンディショニングはメタノール 5 mL、希塩酸(pH=4) 5 mLで行った。試料を減圧で通水し、希塩酸 4 mL で洗浄、吸引脱水(5 分間)と遠心脱水(3000 rpm, 30 分間)を行った後、メタノール 5 mL の自然流下により目的物質を溶出した。この溶出液を窒素ガスで乾固した後、アセトニトリルと 0.1 % 蟻酸含有水の体積混合比 7 : 93 の溶液 1 mL を溶媒とし、超音波再溶解(1 分間)させた。さらにこの再溶解液を遠心分離(3000 rpm, 10 分間)にかけ、上澄みをHPLCに注入した。

b) LC-MS/MSの測定条件

ESI-Positive, Negative法の測定条件をそれぞれ表-4、表-5に示す。

c) LC-MS/MSによる定量値の算出方法

定量値の算出には、一点標準添加法ならびに同位体希釈法を用いた。

表-1 測定対象物質と測定方法。

βラクタム系抗菌剤	amoxycillin ^{**} , benzylpenicillin
ST剤	sulfamethoxazole, trimethoprim
マクロライド系抗菌剤	azithromycin, clarithromycin, erythromycin ^{**} , josamycin [*] , kitasamycin [*] , oleandomycin [*] , spiramycin [*] , tilmicin [*]
テトラサイクリン系抗菌剤	oxytetracycline, tetracycline
サルファ系抗菌剤	sulfadimethoxine, sulfadimezine, sulfamonomethoxine
キノロン系抗菌剤	norfloxacin [*] , sarafloxacin [*] , ofloxacin
その他の抗菌剤	danofoxacin, diclazuril ^[L-] , novobiocin [*] , neospiramycin [*] , griseofulvin, chloramphenicol [L-], thiamphenicol [L-]
抗てんかん剤	carbamazepine, phenobarbital ^{**[L-]} , phenytoin ^{**[L-]} , primidone, ifenprodil
不整脈用剤	atenolol, disopyramide, pindolol ^{**} , propranolol, sotalol, verapamil, metoprolol
高脂血症用剤	bezafibrate [L-], clofibrate ^[GC] , clofibric acid [L-], gemfibrozil [GC]
解熱鎮痛消炎剤	acetaminophen, antipyrine, fenoprofen [L-], flufenamic acid ^[L-] , ibuprofen [L-], indometacin [L-], isopropylantipyrine, ketoprofen [L-], mefenamic acid [L-], mepirizole, naproxen [L-], phenacetin ^{**}
精神神経用剤	amitriptyline, chlorpromazine, haloperidol, imipramine
気管支拡張剤	salbutamol, terbutaline, theophylline [L-]
その他の医薬品類	2-quinoline carboxylic acid, acetazolamide ^{**} , bromovalerylurea [*] , caffeine [GC], carbazochrome, chlormadinone, chlormadinone acetate [*] , clenbuterol [GC], crotamiton [GC], cyclophosphamide, N,N-diethyl-m-toluamide(DEET) [GC], dextromethorphan, diclofenac, diltiazem, diphenidol, dipyrindamole, furosemide [L-], methoxsalen, metoclopramide ^{**} , nalidixic acid, pentoxifylline, pirenzepine, p-phenylphenol ^{**[GC]} , prednisolone, promethazine, scopolamine, thymol ^{**[GC]} , tolbutamide [L-], tolperisone, triclosan [GC]

*: これまで国内未検出で、今回も検出されなかった物質。 **: 今回、国内で初めて検出された物質。

[GC]: GC-MS法, [L-]: LC-MS/MS ESI-Negative法, それ以外: LC-MS/MS ESI-Positive法で測定したことを示す。

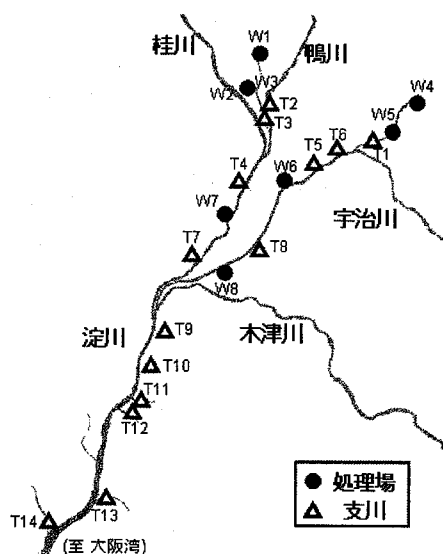


図-1 採水地点位置図

一点標準添加法については小西ら¹⁰⁾が述べているが、原試料、および原試料に測定対象物質の混合標準物質を 5 ng、50 ng、500 ng 添加したものそれぞれについて LC-MS/MS でピーク面積を測定し、ピーク面積が原試料のその 2～10 倍のとなった添加試料について、その標準物質添加量とピーク面積、そして原試料のピーク面積との関係から、原試料の濃度を算出する方法である。

同位体希釈法は、定量対象物質の安定同位体を内標準物質として、一定量(25 ng/mL)含む標準液(測定対象物質の濃度は 0～100 ng/mL の範囲で 5 段階設定)を LC-MS/MS に導入し、内標準物質と定量対象物質の濃度の比とピーク時面積値の比から検量線を作成して、定量する方法である¹⁵⁾。

d) GC-MS による定量の前処理方法

試料 200mL を、ガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/F, 粒子保持能 0.7 μm) でろ過したろ液を分析試料とし、Oasis HLB (Waters) による固相抽出を行った。カートリッジのコンディショニングはジクロロメタン 5 mL、メタノール 5mL、純水 10mL で行った。試料を減圧で通水し、純水 10mL で洗浄、吸引脱水 (5 分間) と遠心脱水 (3000 rpm, 30 分間) 及び窒素ガスで 15 分間乾燥させ、ジクロロメタン 5mL の自然流下により目的物質を溶出した。この溶出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、窒素ガスで 0.8 mL まで濃縮した後、誘導体化試薬として BSTFA 100 μL を加え、2 時間放置した。その後、ジクロロメタンで 1 mL までメスアップし、この試料に内部標準物質を加え、GC-MS に注入した。

e) GC-MS の測定条件

GC-MS の測定条件を表-6 に示す。

f) GC-MS による定量値の算出方法

表-2 採水対象下水処理場一覧

記号	下水処理場
W1	吉祥院
W2	鳥羽(西高瀬川)
W3	鳥羽(桂川)
W4	石田
W5	東宇治
W6	伏見
W7	洛西
W8	洛南

※W2, W3 は同一処理場の異なる放流口

表-3 採水対象支流一覧

記号	支流	記号	支流
T1	山科川	T8	古川
T2	鴨川	T9	大谷川
T3	西高瀬川	T10	利根川
T4	西羽束師川	T11	船橋川
T5	新高瀬川	T12	穂谷川
T6	濠川	T13	天野川
T7	小畑川	T14	芥川

定量値の算出は内標準法(シリジスパイク)で行った。定量対象物質の安定同位体を内標準物質として一定量(500 pg/μL)含む標準液(測定対象物質の濃度は 0～500 pg/μL の範囲で 5 段階設定)を GC-MS へ導入し、内標準物質と定量対象物質の濃度の比とピーク面積値の比から検量線を作成した。

(3) その他の測定項目

同時刻、同地点で同様に採水を行い、アンモニア性窒素濃度と COD を測定した。アンモニア性窒素の測定はインドフェノール青吸光度法(吸光度計は Shimadzu UV-2500PC を使用)で、COD の測定は JIS K0102.17 (COD_{Mn} 法)に準拠して行った。

3 測定結果

今回の測定対象 93 物質のうち、63 物質が検出された。そのうち 10 物質(表-1 で**が付けられている物質)については、国内で初めての検出例と考えられる。

(1) 下水処理場放流水における存在実態の概要

地点別に見ると、東宇治処理場での 52 物質を筆頭に、下水処理場の放流水から多くの物質(一地点あたり 22～52 物質)が検出された。最大検出濃度は、東宇治処理場における sulpiride の 2,000 ng/L であった。図-2 に、処理場ごとの検出濃度の総和を示す。吉祥院処理場、伏見処理場において検出濃度が低いが、両処理場はオゾン処理を導入しており、オゾン処理が医薬品の除去に有効であることが示唆された。全般的に下水処理場放流水では、

表-4 LC-MS/MS ESI-Positive 法の測定条件.

HPLC	:Agilent1100														
移動相A	超純水(0.1%酢酸含有)														
移動相B	アセトニトリル(0.1%酢酸含有)														
グラジエント	<table> <tr> <th>時間</th><th>Bch. %</th></tr> <tr> <td>initial</td><td>7</td></tr> <tr> <td>8</td><td>35</td></tr> <tr> <td>12</td><td>95</td></tr> <tr> <td>18</td><td>95</td></tr> <tr> <td>18</td><td>7</td></tr> <tr> <td>30</td><td>7</td></tr> </table>	時間	Bch. %	initial	7	8	35	12	95	18	95	18	7	30	7
時間	Bch. %														
initial	7														
8	35														
12	95														
18	95														
18	7														
30	7														
カラム	Hypersil GOLD 2.1*150, 5um (Thermo社製)														
カラム温度	40℃														
ニードル洗浄溶媒	メタノール/水=1/4 (フラッシュポート)														
	①DMF, ②水, ③IPA (バキューム洗浄)														
注入量	5ul														
MSMS	:thermo Quantum Discovery MAX														
Spray Voltage	4500														
Sheath gas	30														
Aux gas	5														
Capillary temperature	320														
Probe position	D /0.5														
Tube lens	use tuning file														
Q1 resolution	0.7														
Q3 resolution	0.7														
Scan time	0.1/0.03														

表-5 LC-MS/MS ESI-Negative 法の測定条件.

HPLC	:Agilent1100														
移動相A	超純水(1mM酢酸アンモニウム)														
移動相B	アセトニトリル														
グラジエント	<table> <tr> <th>時間</th><th>Bch. %</th></tr> <tr> <td>initial</td><td>7</td></tr> <tr> <td>15</td><td>39</td></tr> <tr> <td>8</td><td>55</td></tr> <tr> <td>13</td><td>95</td></tr> <tr> <td>131</td><td>7</td></tr> <tr> <td>21</td><td>7</td></tr> </table>	時間	Bch. %	initial	7	15	39	8	55	13	95	131	7	21	7
時間	Bch. %														
initial	7														
15	39														
8	55														
13	95														
131	7														
21	7														
カラム	Hypersil GOLD 2.1*100, 3um / lot.7592(Thermo社製)														
カラム温度	40℃														
ニードル洗浄溶媒	メタノール/水=1/4 (フラッシュポート)														
	①DMF, ②水, ③IPA (バキューム洗浄)														
注入量	5ul														
MSMS	:thermo Quantum Discovery MAX														
Spray Voltage	4000														
Sheath gas	20														
Aux gas	10														
Capillary temperature	320														
Probe position	D /0.5														
Tube lens	use tuning file														
Q1 resolution	0.7														
Q3 resolution	0.7														
Scan time	0.05 / 0.04														

表-6 GC-MS の測定条件.

CG	Agilent6890
分離カラム	Rtx-50 (50% phenyl — 50% methylsiloxane)
	内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25um
昇温条件	50℃(1min)→1℃/min→280度(0min) →20℃/min→320℃(4min)
注入方法	スプリットレス(高圧注入)
注入口温度	250℃
注入量	1μl
キャリア	ヘリウム
キャリア流量	1ml/min (constant flow)
バーン開始時間	1min
インターフェース温度	270℃
MS	Agilent5973N
イオン化電圧	70eV
イオン源温度	230℃
検出方法	SIM

sulpiride, crotamiton, bezafibrate など共通に見られる物質が数多く検出されていることがわかる。

(2) 支川における存在実態の概要

西高瀬川と山科川で多くの物質が検出された(それぞれ49,46物質が、両地点ではその上流にある下水処理場からの放流水が流量の多くを占めている(採水と同時にを行った流量観測の結果と処理場に問い合わせた放流量から、処理水の割合はそれぞれ85%,40%と概算された)。即ち、下水処理場の放流水を多く含む支川においては、多種類の医薬品が高濃度で含まれていることが示唆された。また、古川における caffeine の2,000 ng/Lを筆頭に、acetaminophen, DEET, sulfadimethoxine, pentoxifylline, phenacetin, methoxalen, thymol が下水処理場放流水よりも高濃度で検出された。

図-3 に、支川ごとの検出濃度の総和を示す。下水処理場放流水と同様に、比較的高濃度で検出されているものは、sulpiride, crotamiton, bezafibrate である。一方、支川に特異的に高濃度に見られる物質は、caffeine, DEET である。

さらに、地点ごとの存在実態をより詳細に検討するために、地点ごとに濃度の相関行列を求め、平均法によって算出した地点間の距離によりデンドログラムを描いた(図-4)。この図から、まず以下のことがわかる。

- (1)古川が特異的である
- (2)西高瀬川と山科川も他の地点とは異なる傾向を示

した

古川ではcaffeine, acetaminophen, sulfadimethoxineが全地点中最大濃度で検出された(それぞれ2,000 ng/L, 64 ng/L, 15 ng/L)。②については、両地点とも前述の通り下水処理場放流水の影響を強く受けていることが理由と考えられる。また、その他の支流について、類似の傾向を示すと思われるものを図-4に示す通り「クラスター1」と「クラスター2」と定義し、医薬品の濃度を比較したところ、クラスター1においてcrotamiton, DEET, sulpiride, thymol, erythromycin, sulfadimethoxine, diltiazem, nalidixic acidが高濃度で存在していることがわかる。そして、クラスター1, 2, それと古川における一部の医薬品濃度およびCODとアンモニア性窒素濃度を比較すると(図-5, 図-6)、古川とクラスター1が類似の傾向を示していることがわかる。ここで、クラスター2または古川の流域となっている市町村(宇治市, 久御山町, 枚方市)と、クラスター1流域(京都市, 向日市, 長岡京市)の下水道普及率を比較すると(表-7)、前者における普及率が低いことが分かる。このことから、生活排水の不十分な処理が、これらの医薬品の高濃度での検出に関連していることが推察される。なお、大谷川は比較的クラスター1に近い傾向を示しているが、diltiazemやnalidixic acidは検出されず、アンモニア性窒素濃度もクラスター2と同程度であった。これは大谷川の流域(八幡市, 京田辺市, 枚方市)では下水道の普及している地域とそうでない地域が混在しているためだ

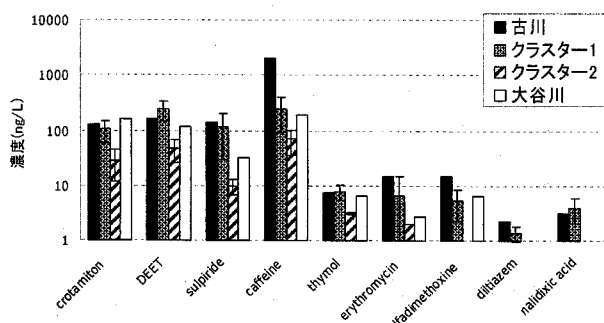


図-5 古川とクラスター1, 2 との一部の医薬品濃度の比較。
エラーバーは±標準偏差を示す。

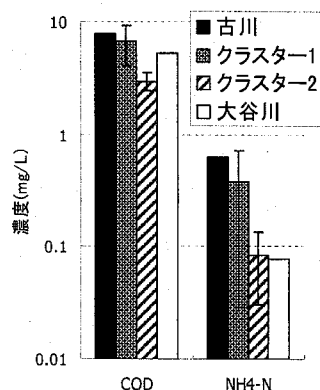


図-6 クラスター1, 2 と古川との COD, アンモニア性窒素濃度の比較。
エラーバーは±標準偏差を示す。

- 4) Virginia, L. et al, Effects of human pharmaceuticals on aquaticLife: next steps, *Environmental Science & Technology* Vol.40, Issue 11, pp.3457-3462, 2006
- 5) ERAVMIS Webサイト : <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk/ecochemistry/eravmis/>
- 6) EU-Project Poseidon Final Report : <http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2884/>
- 7) 中田典秀ら, 河川流域における医薬品存在実態調査, 第 43 回環境工学研究フォーラム講演集, pp.110-112, 2006
- 8) 清野敦子ら, 下水処理場放流水・河川水からの人用・動物用医薬品の検出, 第 38 回水環境学会講演集, p.583, 2004
- 9) 鈴木俊成ら, 都市河川水中の高血圧症および糖尿病治療薬の実態調査, 第 41 回日本水環境学会年会講演集, p.394, 2007
- 10) 長尾亮治ら, 淀川水系における抗生物質およびエストロゲンの検出, 第 8 回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.67-68,

2005

- 11) 小西千絵ら, 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, Vol.43, pp.73-82, 2006
- 12) 谷島利勝ら, 医薬品起源化学物質の下水処理過程における挙動, 第 37 回日本水環境学会年会講演集, p.343, 2003
- 13) 鈴木俊也ら, 河川水から検出される医薬品の下水処理場における実態, 第 40 回日本水環境学会年会講演集, p.647, 2006
- 14) 気象庁, 気象統計情報: <http://www.jma.go.jp/jma/menu/report.html>
- 15) 社団法人日本下水道協会, 下水道試験法 (追補暫定版) 内分泌攪乱化学物質及びクリプトสปリジウム編 2002 年版, p.132, 2002

(2007.5.25受付)

Occurrence of pharmaceuticals in the effluent of wastewater treatment plants and tributaries at Yodo River Basin

Hiroki SUGISHITA¹, Naoyuki YAMASHITA¹, Hiroaki TANAKA¹,
Shuhei TANAKA¹, Shigeo FUJII¹, Isao HOWA² and Chie KONISHI²

¹Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University

²Murata Keisokuki Service CO., Ltd.

The concentrations of pharmaceutical compounds were surveyed in the effluent of wastewater treatment plants (WWTPs) and tributaries at Yodo River Basin by using LC-MS/MS and GC-MS for the quantification. 63 compounds out of 93 were detected at the maximum concentration of 2,000 ng/L. The detection of the 10 compounds among them is unprecedented in Japan. Many compounds were detected in high concentrations in the effluent of the WWTPs. In tributaries, however, 7 compounds were detected in higher concentrations than in the effluent of the WWTPs. In the tributaries where the concentrations of COD and ammonium nitrogen were high, some pharmaceutical compounds were detected also in high concentrations. This result suggests that pharmaceutical compounds are discharged into the river in high concentrations because of inadequate treatment of sewage at the areas with lower sewerage coverage.