# 短報

# 相模川水系河川における抗微生物剤の 存在実態調査

仲野 富美, 佐藤 学, 上村 仁

# Monitoring of antimicrobial agents in water of Sagami River

Fumi NAKANO, Manabu SATO and Hitoshi UEMURA

#### はじめに

河川における医薬品類の汚染が社会的問題となっている.これらの薬剤は生理活性を有するため、環境中へ流入した場合のヒトや生態系への影響が懸念されている. 医薬品類のうち、抗微生物剤(抗生物質、合成抗菌剤、抗ウイルス剤等)は医療、畜水産業など広い分野で使用され、全国の河川においても検出が報告されている<sup>1-3)</sup>. また、薬剤耐性微生物の出現や蔓延<sup>4)</sup>も世界的な問題となっており、水源河川中の抗微生物剤濃度の監視は重要な課題である.そこで、河川における存在実態を把握するため、河川水中の抗微生物剤の一斉分析法を検討するとともに、神奈川県の主要な水道水源である相模川において実態調査を実施したので報告する.

#### 方法

## 1. 試料

試料は神奈川県の県央を流れる相模川において、図1 及び表1に示した18地点(本川6地点、支川12地点) で採水した。また、寒川浄水場の浄水が供給されている 寒川町内公園の水道水も併せて採水した。水道水は採水 時にアスコルビン酸ナトリウムを加えて残留塩素を除去 した。採水は季節変動を把握するため、季節ごとに各1 回(2018年3月28,29日(春),8月21,22日(夏), 11月19,20日(秋),2019年2月20,21日(冬)),計 4回行った。

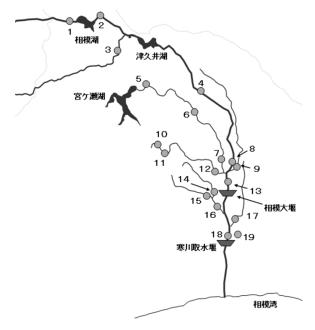


図1 採水地点 各採水地点の詳細は表1に示した.

表 1 採水地点一覧

地点No.	地点名	河川名
1	藤野弁天橋	相模川本川
2	弁天橋	相模川本川
3	青山	道志川
4	高田橋	相模川本川
5	田代運動公園	中津川
6	才戸橋	中津川
7	鮎津橋	中津川
8	三川公園	相模川本川
9	さくら橋	鳩川
10	清川村役場下	小鮎川
11	片原橋	小鮎川
12	第二鮎津橋	小鮎川
13	旭町スポーツ広場	相模川本川
14	新八木間橋	恩曽川
15	八木間橋	玉川
16	酒井橋	玉川
17	平泉橋	永池川
18	寒川取水堰上	相模川本川
19*	寒川町内公園	寒川系浄水(水道水)

<sup>\*</sup> 地点19は寒川浄水場から給水される地点の水道水

## 2. 測定対象物質

測定対象物質は、畜産や医療分野における使用実態や薬剤耐性菌の存在実態等を考慮して、表3に示した24物質(サルファ剤、マクロライド系、テトラサイクリン系、セフェム系、キノロン系抗生物質、抗インフルエンザ薬及びその代謝物等)を選定した.

表 2 LC/MS/MS分析条件

LC装置	ACQUITY UPLC H-class(Waters製)
分析カラム	Inertsustain C18 PEEK 2μm,2.1*100mm
	(GLサイエンス製)
カラム温度	30°C
注入量	3μL
移動相	A:0.1%ギ酸水溶液
	B:0.1%ギ酸添加アセトニトリル
グラジェント条件	B 15%(0-3min)- 25%(5min)-35%(9min)
	-100%(12-15min)- 15%(15.5-20min)
	(直線グラジエント)
流量	0.3mL/min
MS装置	XEVO TQ MS(Waters製)
イオン化法	ESI(+)
イオン源温度	150°C
脱溶媒温度	500°C
キャピラリー電圧	0.6kV
測定モード	MRMモード

#### 3. 標準物質, 標準液, 試薬, 器材

標準物質は富士フイルム和光純薬工業(株)製の高速液体クロマトグラフィー用,薬理研究用及び生化学用試薬,東京化成(株)製試薬及びケムシーン製の試薬を用いた.混合標準液は24種の標準物質をメタノールに溶解して調製し,メタノールを用いて適宜希釈し使用した.メタノールは富士フイルム和光純薬(株)製残留農薬用(5000倍濃縮)試薬を,アセトニトリルは富士フイルム和光純薬(株)LC/MS用試薬を用いた.ギ酸は,富士

フイルム和光純薬(株)特級試薬を抽出用に用い,LC/MS用試薬を測定用に使用した.アスコルビン酸ナトリウムは富士フイルム和光純薬(株)特級試薬を使用した.固相カートリッジはSep-pak PS2 plusカートリッジ(充填量265mg, Waters製,以下PS-2とする)及びOASIS HLB plusカートリッジ(充填量225mg, Waters製,以下HLBとする)を用いた.

#### 4. 分析法及び妥当性評価

分析法は固相抽出一液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS/MS) 法を用いた. 固相カートリッジPS-2及び HLBは直列に連結し、メタノール10mL、超純水5mL の順に通液してコンディショニングした. 試料1Lにギ酸1mLを加え混和した後、PS-2、HLBの順に流速20m L/minで通水した. 通水後、固相カートリッジは窒素ガスで40分以上通気乾燥した後、通水方向から逆方向にメタノール5mLで抽出物を溶出させた. 溶出液は遠心エバポレーターを用いて1mL以下になるまで濃縮した後、メタノールを加えて1mLとしたものを試験溶液とした. 試験溶液及び標準溶液は0.2%ギ酸水溶液で2倍希釈したものを用いて、LC/MS/MS測定を行った. LC/MS/MS条件は表2及び表3に示した.

定量は原則,溶媒検量線を用いた絶対検量線法で行った.溶媒検量線用標準溶液は,標準溶液をメタノールで 段階的に希釈して調製した.エリスロマイシンの検量線

表3 測定対象物質の保持時間及びMRM条件

		/D ++ n+ 88	MRM条件				
分類	測定対象物質	保持時間 (min)	プリカーサ イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	CV(V)	CE(eV)	
	スルファジメトキシン	9.2	311	156	34	22	
···	スルファモノメトキシン	6.2	281	156	30	18	
± u ¬ − ★u	スルファジミジン	4.1	279	186	30	16	
サルファ剤	スルファメトキサゾール	7.3	254	92	26	26	
***	スルファジアジン	2.4	251	156	34	16	
	スルファピリジン	2.7	250	156	28	16	
	エリスロマイシン	9.9	734	158	26	28	
マクロライド系	クラリスロマイシン	11.1	749	158	30	30	
	タイロシン	10.6	917	174	52	36	
セフェム系	セフジトレンピボキシル	11.5	621	241	32	22	
	クロルテトラサイクリン	7.2	479	444	26	22	
テトラサイクリ゜	オキシテトラサイクリン	3.3	461	426	24	18	
ン系	ドキシサイクリン	7.9	445	428	26	18	
****	テトラサイクリン	4.5	445	154	26	32	
	トシル酸トスフロキサシン	7.3	405	387	56	20	
***	オフロキサシン	3.7	362	205	30	40	
+ 1027	エンロフロキサシン	5.6	360	316	32	20	
キノロン系	メシル酸ダノフロキサシン	5.2	358	340	32	24	
***	シプロフロキサシン	4.2	332	314	30	20	
***	ノルフロキサシン	3.7	320	276	30	18	
ペニシリン系	アンピシリン	2.4	350	160	20	18	
抗インフルエンザ薬	オセルタミビルリン酸塩	3.6	313	166	18	20	
• 代謝物	オセルタミビルカルボン酸	7.8	285	138	16	20	
殺菌剤	トリクロカルバン	12.9	315	127	32	34	

CV: Corn voltage, CE: Collision energy

表 4 妥当性評価結果

	超純水添加		水道	水添加	河川	定量	
測定対象物質	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	下限值
	(%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(%)	(RSD%)	(ng/L)
スルファジメトキシン	106	3.8	102	4.5	93	4.9	1
スルファモノメトキシン	104	4.0	97	4.6	89	4.8	1
スルファジミジン	104	4.1	102	3.5	76	1.9	1
スルファメトキサゾール	101	3.3	70	2.8	65	3.9	1
スルファジアジン	96	4.9	79	1.5	74	4.4	1
スルファピリジン	97	6.1	88	3.5	72	2.4	1
エリスロマイシン	95	13.8	80	14.6	88	8.8	3
クラリスロマイシン	97	12.5	100	4.0	100	4.9	1
タイロシン	87	12.3	93	1.7	86	5.0	1
セフジトレンピボキシル	95	5.1	93	3.0	123	3.7	1
クロルテトラサイクリン	93	8.2	59	3.1	144	6.1	3
オキシテトラサイクリン	104	10.9	88	5.7	149	5.5	1
ドキシサイクリン	105	5.8	73	5.1	127	5.9	3
テトラサイクリン	93	6.8	95	5.7	145	5.7	3
トシル酸トスフロキサシン	102	7.0	196	5.7	213	4.5	10
オフロキサシン	95	13.0	96	2.7	97	6.6	10
エンロフロキサシン	76	15.9	88	7.0	89	4.7	10
メシル酸ダノフロキサシン	95	7.8	122	8.4	122	3.4	10
シプロフロキサシン	89	3.6	149	6.4	156	2.1	10
ノルフロキサシン	98	7.8	86	7.2	90	1.9	10
アンピシリン	86	8.6	74	2.9	89	3.2	3
オセルタミビルリン酸塩	108	3.6	102	3.3	103	4.6	1
オセルタミビルカルボン酸	72	6.9	81	3.6	83	2.5	1
トリクロカルバン	88	4.5	85	5.7	83	9.8	1

添加濃度は10ng/L とし、5併行で添加回収試験を実施した.

用標準溶液は、超純水1Lに標準溶液を段階的に添加して試料と同様に抽出操作したものを用いた. 作成した検量線を用いて定量を行った.

作成した分析法を用いて妥当性評価を行った. 超純水,水道水及び河川水1Lに混合標準液を10ng/Lとなるように添加した試料を5併行で分析し,真度(%)及び併行精度(RSD%)を評価した.

# 結果及び考察

## 1. 分析法及び妥当性評価

試験溶液及び標準液はメタノール溶液のままLC/MS/MS測定するとピーク形状が悪い物質があった. 0.2%ギ酸水溶液で2倍希釈してから測定したところ,ピーク形状の改善が見られたため,測定直前に希釈操作を行うこととした.

本分析法の妥当性評価の結果を表 4 に示した。超純水添加試料(添加濃度10ng/L,n=5)を測定した結果,エリスロマイシン以外の23物質では真度 $72\sim108$ %,併行精度 $3.3\sim15.9$ %で,全て水道水質検査の妥当性評価ガイドライン50 の農薬類の目標値(真度 $70\sim130$ %,併行精度 $\leq30$ %)を満たした。エリスロマイシンは溶媒検量

線で定量したところ、真度が22%となり、この抽出法では回収率が悪いことが明らかとなった。そこで回収率を補正するため、検量線用標準溶液についても試料と同様に抽出操作を行い、定量を試みた。その結果、添加試料の真度は95%、併行精度は13.8%で良好な結果が得られたため、エリスロマイシンについてはこの定量法を採用することとした。

実試料(水道水及び河川水)への添加試料の真度は、水道水添加試料では21物質が、河川水添加試料では18物質が目標値を満たした。併行精度は全ての物質で目標値を満たした。トシル酸トスフロキサシンの真度は河川水添加で213%と最も高く、マトリックスによる影響と推察された。内部標準法を用いることでマトリックスによる影響を濃度補正できる可能性が考えられたが、適切な内部標準物質を入手できなかったため検討は行わなかった

本分析法は超純水添加ではすべて目標値を満たし、実 試料添加でも併行精度は良好な結果が得られ、真度も概 ね50~200%程度の範囲内であった。河川水中の濃度レ ベルの把握には十分な精度の分析法であると考えられた。

表5 季節ごとの河川水18地点中の抗微生物剤を検出した地点数及び検出濃度(検出された11物質のみ)

101 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1	春 2018.3		夏 2018.8		秋 2018.11		冬 2019.2		定量
測定対象物質	検出数 <sup>*</sup>	検出濃度**	検出数*	検出濃度**	検出数 <sup>*</sup>	検出濃度**	検出数 <sup>*</sup>	検出濃度**	下限値
スルファモノメトキシン	3/18	1.0~19	2/18	3.1 <b>~</b> 5.6	2/18	11~48	2/18	11~45	1
スルファメトキサゾール	10/18	1.4~7.4	1/18	1.2	11/18	1.0~8.2	10/18	1.0~11	1
スルファピリジン	6/18	1.2~11	0/18	_	5/18	1.0~7.3	5/18	1.1~3.5	1
エリスロマイシン	0/18	_	0/18	_	1/18	5.3	1/18	3.2	3
クラリスロマイシン	10/18	1.0~16	4/18	1.4~1.6	12/18	1.0~12	12/18	1.0~16	1
タイロシン	0/18	_	0/18	_	0/18	_	2/18	1.0~9.9	1
オキシテトラサイクリン	3/18	1.7~19	2/18	1.0~6.5	6/18	1.0~300	10/18	1.0~880	1
テトラサイクリン	0/18	_	0/18	_	1/18	3.5	1/18	12	1
オセルタミビルリン酸塩	1/18	1.0	0/18	_	0/18	_	8/18	1.1~3.6	1
オセルタミビルカルボン酸	9/18	1.0~3.1	0/18	_	0/18	_	12/18	1.4~12	1
トリクロカルバン	0/18	_	0/18	_	1/18	1.1	0/18	_	1

<sup>\* 18</sup>地点中の検出地点数

表6 冬季(2月)の各採水地点における抗微生物剤検出濃度(検出された10物質のみ)

(濃度単位: ng/L)

									(1)201	文十位 : 11g/11/	
地点	サルファ剤			マクロライド系			テトラサイ	クリン系	抗インフルエンザ薬、代謝物		
No.	スルファモノ	スルファ	スルファ	エリスロ	クラリスロ	タイロシ	オキシテトラ	テトラ	オセルタミビル	オセルタミビル	
	メトキシン	メトキサゾール	ピリジン	マイシン	マイシン	ン	サイクリン	サイクリン	リン酸塩	カルボン酸	
1	ND	3.7	2.5	ND	6.7	ND	1.0	ND	1.6	5.1	
2	ND	4.0	1.8	ND	6.9	ND	1.1	ND	3.0	12	
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	ND	ND	ND	
4	ND	2.1	ND	ND	2.0	ND	1.0	ND	ND	4.3	
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	ND	ND	ND	
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8	ND	1.7	ND	ND	3.1	ND	ND	ND	ND	4.4	
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.4	
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.5	ND	ND	ND	
11	45	ND	ND	ND	1.6	9.9	880	12	ND	ND	
12	11	2.5	ND	ND	3.5	ND	59	ND	1.4	6.1	
13	ND	ND	ND	ND	1.0	ND	1.9	ND	ND	2.0	
14	ND	1.0	ND	ND	16	ND	ND	ND	1.3	3.4	
15	ND	2.7	ND	3.2	9.4	ND	1.2	ND	2.4	6.4	
16	ND	3.6	1.6	ND	11	1.0	ND	ND	1.8	2.1	
17	ND	11	3.5	ND	11	ND	ND	ND	3.6	2.1	
18	ND	2.6	1.1	ND	3.2	ND	ND	ND	1.1	4.0	
19*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
定量 下限値	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1	

ND:定量下限値未満 \*:地点19は水道水試料

#### 2. 存在実態調査

河川水試料 (18地点×4回) の季節ごとの検出結果を表5に示した.河川水では11物質が検出された. 18地点中半数以上の地点で検出され,検出率が高かった物質は,クラリスロマイシン(春,秋,冬),スルファメトキサゾール(春,秋,冬),オキシテトラサイクリン(冬),オセルタミビルカルボン酸(春,冬)であった.季節ごとの結果を比較すると,夏は春,秋,冬に比べて検出数が少なかった.夏季は水温が高く雨量が多いため,水中微生物等による生分解や増水による希釈等の要因により水中濃度が低くなることが推察された.冬季は一般

的に風邪など呼吸器系感染症が多く発生することも季節差に影響したと考えられた. オセルタミビルリン酸塩及びその代謝物であるオセルタミビルカルボン酸は冬または春に多く検出され, 抗インフルエンザ薬の一般的な服用時期と一致した. 検出濃度が比較的高かった物質はオキシテトラサイクリンで最大値880ng/L(冬), スルファモノメトキシンで最大値48ng/L(秋)であった. 水道水からはいずれの物質も検出されなかった. 水道原水中に残存した物質は浄水場における浄水処理の過程において分解・除去されたと考えられた.

冬季(2月)の採水地点別の検出濃度結果を表6に示

<sup>\*\*</sup> 検出された濃度範囲 (ng/L)

した. 小鮎川の採水地点 (10, 11及び12) において, 地点11及び12ではオキシテトラサイクリン及びスルファモノメトキシンの 2 物質の検出濃度が高かった. 地点11の検出濃度は, その上流に位置する地点10に比べて高いことから, 地点10と地点11の間で汚染が生じたことが示唆された. テトラサイクリン系抗生物質やサルファ剤は畜産動物でも多く使用される薬剤である<sup>4)</sup>. 小鮎川では, 採水地点11の付近からその下流に畜産施設が存在するため, 動物に投与された薬剤が河川へ流出した可能性が推察された. 当所で過去に行った相模川水系河川における医薬品類の調査"においても, 同地点ではオキシテトラサイクリンが比較的高濃度で検出された (2007年1月調査). 前回の調査から12年経過したが, この地点においては, 河川への抗微生物剤の流出が継続している実態が明らかとなった.

冬季の調査では、オセルタミビルリン酸塩は河川の調査地点18地点中8地点で、オセルタミビルカルボン酸は12地点で検出された。相模川本川では全地点で、支川では比較的下流域に位置する鳩川、小鮎川の地点12、恩曽川、玉川及び永池川の地点において、これら2物質の両方またはいずれか一方が検出された。検出された地点でのオセルタミビルリン酸塩の検出濃度は1.1~3.6ng/L、オセルタミビルカルボン酸の検出濃度は1.4~12ng/Lで、同一地点での検出濃度はオセルタミビルカルボン酸の方がリン酸塩に比べ高濃度に検出された地点が多かった。今回調査を行った相模川水系河川では、オセルタミビル原体に加え、服用した薬剤が生体内で代謝物と

なり、河川へ流出している実態が明らかとなった。また、今回の調査ではオセルタミビル以外の薬剤の代謝物は測定対象ではなかったが、他の薬剤においても河川水中で原体が検出されない場合であっても、その代謝物や分解物が水中に残存する可能性が推察された。医薬品類の代謝物や分解物については、その毒性や生理活性等に未解明な点が多く、ヒトや生態系への悪影響が懸念される。今後は代謝・分解物も含めてモニタリングが可能な分析法の確立や河川水を汚染する化学物質の毒性評価等も重要な課題と考える。

#### 女献

- 1)上村仁:相模川水系河川水中の医薬品類の分布,神 奈川衛研報告、37、60-64 (2007)
- 2) 鈴木俊也:水環境中のヒト用医薬品の存在実態及び 環境中濃度の予測,東京健安研セ年報,63,69-81 (2012)
- 3) 井原賢,張晗,花本征也,田中宏明:下水,河川水からの医薬品生理活性の検出,薬学会雑誌,138,281-287 (2018)
- 4) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会:薬剤耐性ワン ヘルス動向調査年次報告書(2020),令和3年1月 8日
- 5) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインの一部 改正について、健水発0906第1~4号、平成24年 9月6日〔最終改正平成29年10月18日薬生水発10 18第1~4号〕