

下水疫学調査を補完する河川水中の アセトアミノフェン代謝物分析法の検討

高浪 龍平[†]

Examination of Analytical Method for Acetaminophen Metabolites in
River Water to Complement Wastewater-based Epidemiology

TAKANAMI Ryohei[†]

Abstract

The outbreak of the novel coronavirus disease (COVID-19) is a global threat, and the introduction of sewage surveillance to detect viral genomes in sewage is being considered. However, there are challenges in the cost-effectiveness of this wastewater-based epidemiological study. In this study, we focused on antipyretic analgesics, which are frequently used during the onset of infectious diseases, and investigated methods for the analysis of acetaminophen and acetaminophen metabolites in environmental water. By optimizing the pre-treatment and analysis methods, it became possible to recover and measure target substances in river water, including impurities, and we found this to be a possible method to complement wastewater-based epidemiology.

Key Words: Acetaminophen, Paracetamol, Wastewater-based epidemiology, urban river, COVID-19, Solid-phase extraction, LC-MS/MS

キーワード：アセトアミノフェン、パラセタモール、下水疫学、都市河川、新型コロナウイルス感染症、固相抽出法、液体クロマトグラフ質量分析

[†] 大阪産業大学 デザイン工学部 環境理工学科 准教授

草稿提出日 11月7日

最終原稿提出日 11月22日

1. はじめに

2021年6月17日に変更された新型コロナウイルス感染症対策の基本的対処方針において、下水サーベイランス活用の検証を加速する、という方針が追加された¹⁾。新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は呼吸器疾患であるが、ウイルスが腸管で増殖し糞便に排出される場合があること²⁾、また発症を伴わない不顕性感染例も報告されていることから、下水中のウイルスゲノム検出により地域の感染状況を把握する下水サーベイランスの有用性が示唆され³⁾、導入に向けた検討が世界で急速に進んだ。これまでも下水をモニターするポリオウイルスを対象とした環境水サーベイランス⁴⁾が実施されてきたが、下水疫学という分野がこのように注目されることはなかった。世界的な取り組みにより、COVID-19の下水疫学調査手法は間もなく確立される⁵⁾と考えられるが、下水からのウイルスゲノム検出にかかるコストは1試料あたり5,000円程度かかると試算され⁶⁾、下水疫学調査の費用対効果については今後の課題である。

下水は生活排水としてウイルスだけでなく、違法薬物や医薬品、パーソナルケア製品などのヒトが排出した化学物質を多く含む。Fahrenfeldら⁷⁾は、下水道普及率の高い国や都市においては、下水をモニターすることが、その地域における住民の健康等の情報を得るうえで有用なツールになりうると報告している。一般的な疫学調査は、病院での診察や処方される医薬品の供給状況から住民の健康状態を把握する定点観測のため、標本調査に近い調査方法である。一方、下水疫学調査は下水を利用するすべての住民を対象とする非特定な観測のため、全数調査に近い情報が得られる調査方法である。筆者は、2009年に発生した新型インフルエンザ（AH1 pdm09）によるパンデミック（世界的流行）によって使用量が増加した、抗インフルエンザウイルス薬の環境中における動態を明らかにし、これらが下水処理施設で十分に処理されず、下水を放流した河川水中に比較的高い濃度で存在し、その地域におけるインフルエンザの

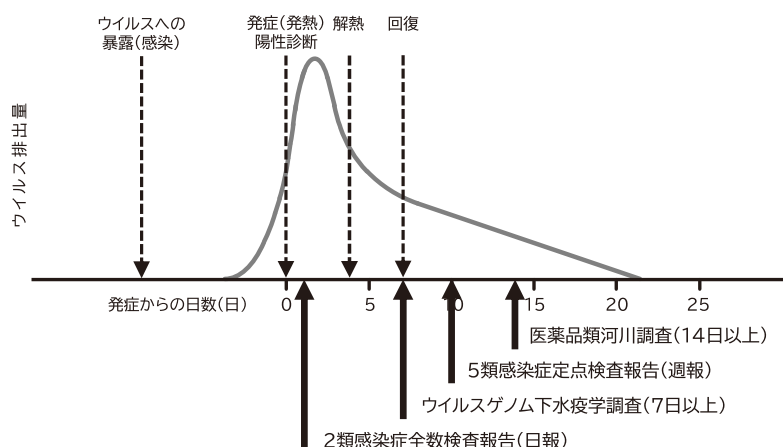


図1 時系列による感染症検知システムの比較

流行と河川水中の抗インフルエンザウイルス薬の濃度との間に時間的な関係があり、下水疫学的な利用が可能であることを示した⁸⁾。しかし、医療機関における定点観測による感染症流行の検知と河川水中の抗ウイルス薬の濃度上昇には、1週間程度の遅延が生じており、図1に示すように感染症流行の検知は、医療機関による全数および抽出報告に速報性があり、ウイルスゲノム下水疫学調査、関連医薬品河川水調査が続くことから、下水疫学調査による検知は補完的であるとの指摘がある⁶⁾。また筆者は、インフルエンザ流行時に河川水中からインフルエンザウイルスを検出しており⁹⁾、本ウイルスを対象とした下水疫学調査の可能性を明らかにした。これらが環境水中から検出され、図2に示すように、抗ウイルス薬などによる環境水中でのウイルスの耐性獲得のリスクを考慮し、下水処理施設における高度処理の必要性について提言してきた。

本研究は、以前に得られたインフルエンザウイルス感染症の下水疫学に関する知見から、新型コロナウイルス感染症の下水疫学調査に対して、下水および環境水中に含まれる関連医薬品とその代謝物質に着目し、感染症発症時に多用される解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェンおよびその代謝物の分析法を確立し、下水疫学調査を補完する情報を得る方法としての可能性を明らかにすることを目的とした。

本研究は、以前に得られたインフルエンザウイルス感染症の下水疫学に関する知見から、新型コロナウイルス感染症の下水疫学調査に対して、下水および環境水中に含まれる関連医薬品とその代謝物質に着目し、感染症発症時に多用される解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェンおよびその代謝物の分析法を確立し、下水疫学調査を補完する情報を得る方法としての可能性を明らかにすることを目的とした。

2. 対象物質および試料

対象物質は、新型コロナウイルス感染症発症時に一般的に処方されるカロナールの成分であるアセトアミノフェン（別名 パラセタモール 以後、APAP）とした。APAPは解熱鎮痛剤として、市販薬（以後、OTC）にも多く利用される医薬品であり、新型コロナウイルス感染症のワクチン接種の副反応による発熱時にAPAPが含まれるOTCの服用が推奨されるなど使用量が多い。経口摂取したAPAPは腸より吸収され、肝臓にて代謝される。吸収されたAPAPの90%以上が代謝され、そのうちおよそ60%がグルクロン酸（以後、APAP-glu）と、35%が硫酸塩（以後、APAP-sul）と抱合する。その後、これ以上に分解されることなく尿として排出される¹⁰⁾。実際に下水中よりこれらが検出されており、下水処理過程においてそれらのほとんどが汚泥への吸着等で処理されていることが明らかとなっている^{11, 12, 13)}。しかし、APAPは他の医薬品類と比べて濃度が高く、下水処理過程で処理しきれない一部が放出され、微量ではあるものの河川水中からこれらが検出されており¹⁴⁾、これらが環境中において加水分解や酸化等の

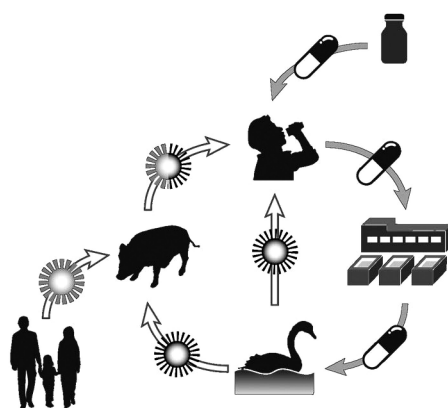
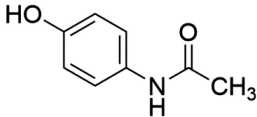
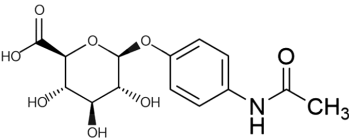
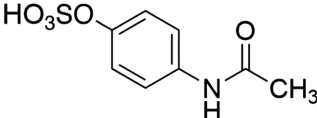


図2 環境中の耐性ウイルス獲得の概念

化学分解および紫外線などによる光分解を受けずに、主に生分解により分解が進むことが明らかとなっている¹⁵⁾。また、APAPは解熱鎮痛剤として、感染症以外にも広く用いられているため、環境水中の濃度は季節変動が小さく、感染症の検知として用いることは難しいと考えられてきた。しかし、Halwaturaら¹⁶⁾は、COVID-19の爆発的な流行が発生したニューヨークにおける調査で、流行の波と環境水中のAPAP濃度との間に関連が見られると報告している。本研究では、APAP、APAP-glu、APAP-sulの3種を対象物質とした。それぞれの物理化学的性質を表1に示す。なお、以下の分析方法の検討においては、標準試薬を用いた添加回収実験を実施し、APAPは富士フィルム和光純薬製を、APAP-gluとAPAP-sulはToronto Research Chemicals製を用いた。これらをメタノールに溶解し、濃度を1 g/Lに調整したものを標準溶液とした。

表1 対象物質の物理化学的性質¹⁷⁾

対象物質（略号）	構造式	化学式（分子量）	pKa	logP
Acetaminophen (APAP)		C ₈ H ₉ NO ₂ (151.16)	9.5	0.5
Acetaminophen Glucuronide (APAP-glu)		C ₁₄ H ₁₇ NO ₈ (327.29)	3.2	-0.7
Acetaminophen Sulfate (APAP-sul)		C ₈ H ₉ NO ₅ S (231.23)	-2.2	-1.0

対象物質の添加回収実験に供する試料として、下水処理水を含む河川水を選択した。採水は、2022年10月13日に図3に示す下水放流水との合流地点（以後、St.2）で行い、ロープ付きのバケツを用いて流心の表流水を採取するGrabサンプルとした。下水放流水との合流地点より約3 km上流の地点（以後、St.1）および約3 km下流の地点（以後、St.3）の河川流量(2021年度の年間平均)はそれぞれ、

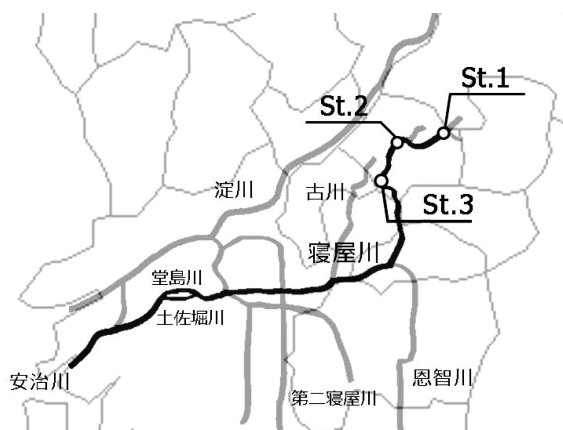


図3 試料採取地点

0.09m³/s、1.73m³/sであり¹⁸⁾、この差が下水処理水の放流量に相当するため、St.3における下水処理水混入率はおおよそ95%である。よって、St.2において採水した試料はおおよそ下水処理水であるといえ、試料に含まれる夾雑物質による影響を考慮するために適当であると判断した。本試料は採取後すぐに添加回収実験に用いたが、前処理に時間を要するため、一部は4℃で保管を行った。

3. 分析方法の最適化

分析は高感度かつ定量性に優れたLC-MS/MSを用いることとした。分析方法は、分析機器メーカー等^{19, 20)}の報告を参考に最適化を行った。LCはWaters製ACQUITY UPLCを用い、分析カラムはWaters製ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (2.1×100mm、1.8μm)を用いた。MS/MSはWaters製ACQUITY TQDを用い、ESI+モードによりイオン化し、MRMモードで測定を行った。LCの移動相条件を表2に、MSのMRM条件を表3に示す。本研究では、分離によるピーク形状の改善のため、移動相の最適化を行った。

表2 移動相の条件

時間 (min)	流量 (mL/min)	移動相混合比 (%)	
		a or b	c
0.00	0.20	95.0	5.0
0.50	0.20	95.0	5.0
3.50	0.20	5.0	95.0
4.50	0.20	5.0	95.0
(a) 蒸留水+0.1%ギ酸			
(b) 蒸留水+0.5%ギ酸			
(c) メタノール			

表3 MRMの条件

対象物質	モニターイオン (M/Z)
APAP	152.1 > 110.1
APAP-glu	328.1 > 152.1
APAP-sul	232.1 > 110.1

4. 固相抽出による前処理方法の最適化

4.1 イオン交換による対象物質の濃縮

対象物質の分析についてAPAPは、下水中に多く含まれるため、分析に関する知見が見られる一方、APAP-gluおよびAPAP-sulは代謝後の物質のため水溶性で測定が困難であり知見が

限られている。Santosら¹⁴⁾の検討を参考に、試料中で解離しているAPAP-gluを保持し濃縮する、ミックスモード固相抽出カラム（逆相＋イオン交換）を用いた対象物質の添加回収実験を行った。2章で述べた河川試料1,000mLをガラス繊維ろ紙（GF/F）を用いてろ過し、これを100mLずつ分注し、10個の同一試料について対象物質の標準溶液を用いてそれぞれが250ngになるように添加したものを供試液とした。さらに、供試液のpHが6から7になるようアンモニア水を添加した後に固相抽出を行った。固相抽出の方法を表4に示す。固相として弱陰イオン交換樹脂のPhenomenex製Strata-X-AW（充填剤量500mg）を用い、溶出時は固相を逆に接続したバックフラッシュにより溶出した。溶出液は40℃に加熱し、窒素気流下で濃縮後、メタノールで0.5mLに定容し分析試料とした。この前処理による濃縮は200倍である。なお、pHの調整はごく微量のアンモニア水添加で行われるため、この添加量による濃度の補正は行わなかった。

4.2 疎水性相互作用による対象物質の濃縮

Santosら¹⁴⁾の検討では、APAP-gluの酸解離定数（pKa）が3.2程度であり、pH 1でAPAP-gluがほぼ非解離の状態であることが示されており、APAPとAPAP-sulにおいても強酸性条件で非解離の状態であると推測された。これにより一般的な疎水性相互作用を利用した逆相系固相により試料中で非解離状態のAPAP-gluを保持し濃縮する前処理を検討した。4.1で述べた供試液にりん酸をpHが1になるまで加えたのち、表4に示す方法で固相抽出を行った。固相として逆相系のWaters製Oasis HLB plus（充填剤量225mg）を用い、溶出時は固相を逆に接続したバックフラッシュにより溶出した。溶出液は40℃に加熱し、窒素気流下で濃縮後、メタノールで0.5mLに定容し分析試料とした。この前処理による濃縮は200倍である。なお、りん酸添加による供試液の希釈は、濃度算出時にりん酸添加量より補正を行った。

表4 前処理方法（固相抽出）

	イオン交換	疎水性相互作用
コンディショニング	メタノール 5 mL（2 mL/min）	メタノール 5 mL（2 mL/min）
平衡化	精製水（pH 6-7） 5 mL（2 mL/min）	精製水（pH 6-7） 5 mL（2 mL/min）
通水	供試液（pH 6-7） 100mL（1 mL/min）	供試液（pH 1） 100mL（2 mL/min）
溶出①	メタノール 3 mL（1 mL/min）	メタノール 5 mL（1 mL/min）
溶出②	5%アンモニア水 含有メタノール溶液 3 mL（1 mL/min）	—

5. 結果および考察

5.1 分析方法の最適化

異なるギ酸添加の移動相によるクロマトグラムを図4に示し、これらの保持時間と半値幅を表5にまとめた。APAPおよびAPAP-sulは、ギ酸添加量に関係なく良好なピーク形状が得られており、図4ではAPAP-gluのクロマトグラムのみを示している。ギ酸添加量が0.1%と少ない移動相aのときに得られたクロマトaでは、ピークの半値幅が0.15minであり、ブロードかつテーリングが見られ、ピークの高さが低い形状であった。このような形状の場合、検出限界および定量下限値が大きくなり測定感度が低下するため、良好に分離できているとは言えない。一方、ギ酸添加量が0.5%と多い移動相bのときに得られたクロマトbではピークの半値幅が0.10minと値が低くなり、シャープでピークの高い形状となった。これにより、検出限界および定量下限値が低くなり測定感度が良いといえる。ギ酸を多く添加することで移動相のpHが低くなり、APAP-gluが非解離の状態に近づくことで、逆相系分離カラムによる分離能が向上したと考えられる。以上の結果から、移動相はギ酸を0.5%添加する条件が最適であり、これを分析方法とした。なお、この最適条件においてAPAP、APAP-glu、APAP-sulの検出限界（LOD）および定量下限（LOQ）は、それぞれ25ng/mL、75ng/mLであった。

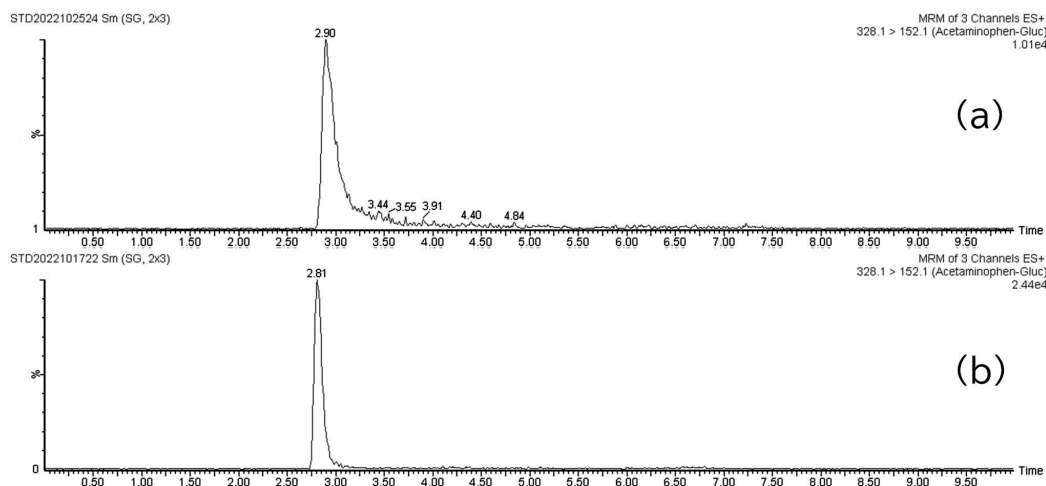


図4 異なる移動相におけるAPAP-gluのクロマトグラム

表5 各クロマトグラムの保持時間と半値幅

対象物質	保持時間 (min)		半値幅 (min)	
	a	b	a	b
APAP	3.21	3.19	0.10	0.10
APAP-glu	2.90	2.81	0.15	0.10
APAP-sul	2.88	2.85	0.09	0.09

5.2 前処理の最適化

イオン交換による固相抽出により対象物質の濃縮した場合の回収率を表6に示す。なお、APAPにおいては定量が可能な濃度で測定された試料6個分、APAP-gluとAPAP-sulは10個のすべての試料の回収率を平均したものである。APAPとAPAP-gluの回収率は低く、変動係数は高くなった。一方で、APAP-sulの回収率は、60%以上で変動係数が20%以内であるため、内分泌攪乱化学物質の添加回収試験で目標としている回収率50～120%、変動係数20%以内²¹⁾を満たす結果となった。イオン交換（固相は逆相+イオン交換のミックス）は解離状態の対象物質を捕捉する方法であるが、供試液中に含まれる下水由来の対象物質以外の成分も同様に解離しており、対象物質の保持を阻害する可能性があることや対象物質の解離状態が供試液のpHに依存するため、中性付近に供試液を維持することが容易ではなく、対象物質の解離・非解離の状態が変化しやすく、固相への保持に影響した可能性がある。試料を採取した河川におけるCOD（2021年度の年間平均）は、St.1で5.3mg/L、St.3で7.4mg/Lであり¹⁸⁾、本試料には下水処理水由来のCOD成分が多く含まれると考えられる。谷口²²⁾が行った同地点における17種類のPPCPsを対象とした調査では、総PPCPs濃度が、St.1でおおよそ220ng/L、St.3でおおよそ1,100ng/L検出されていた。このことから試料中には対象物質以外の夾雑物質が多く含まれ、対象物質の回収に影響を与えたと推測され、イオン交換容量を超過したときに保持できず固相を通過する、破過という現象が生じた可能性が高い。Santosら¹⁴⁾の検討では蒸留水に標準物質を添加した添加回収実験において十分な回収率が得られることが示されているが、環境水に添加した添加回収実験の検討はされていないため、環境水中の対象物質の前処理方法として適用が可能であるかについては本研究の結果からAPAP-sulのみ可能であるとの判断に至った。

疎水性相互作用による固相抽出により対象物質の濃縮した場合の回収率を表7に示す。APAP、APAP-glu、APAP-sulのすべてにおいて定量ができ、10個のすべての試料の回収率を平均したものを示している。すべての対象物質の回収率が50%以上であり、特に変動係数が4%以内と安定した前処理が可能であった。これは、供試液のpHを1まで下げ、対象物質を非解離状態に近づけることで逆相での保持が安定し、回収率が向上し回収率のばらつきを抑えることができたと考える。この結果より、河川水中の対象物質の前処理方法として、対象物質を非解離状態とし、逆相系固相で保持する方法が適切であると判断した。

表6 回収率と変動係数（イオン交換）

対象物質	回収率 (%)	変動係数 (%)
APAP	24.7	72.6
APAP-glu	15.8	26.3
APAP-sul	62.3	17.8

表7 回収率と変動係数（疎水性相互作用）

対象物質	回収率 (%)	変動係数 (%)
APAP	55.8	3.9
APAP-glu	65.7	3.8
APAP-sul	93.8	3.4

6. まとめ

対象物質としたアセトアミノフェン (APAP)、APAPの代謝物質であるAPAP-gluおよびAPAP-sulを同時に分析できる前処理方法および分析方法について、実河川水を用いた添加回収実験により検討を行った。前処理方法は既報のイオン交換による固相抽出から疎水性相互作用による固相抽出に変更することにより、回収率および回収率の変動が顕著に改善した。分析方法は既報の移動相条件より酸添加量を増加することによりピーク形状が改善し、検出限界および定量下限値を低くすることができた。今回の検討により夾雑物質を多く含む環境水中の対象物質を精度よく分析することが可能であり、分析法として適用できると考える。このことからアセトアミノフェンおよび2種のアセトアミノフェン代謝物の同時分析法を確立し、下水疫学調査を補完する情報としての有用性を明らかにした。

今後は、本分析法を用いた河川水中および流入下水中の対象物質の測定を行い、本分析法を検証し、環境水中のウイルスゲノム検出による下水疫学調査を本分析法により補完することができるかについて検討を行う。

参考文献

- 1) 新型コロナウイルス感染症対策本部：「新型コロナウイルス感染症対策の基本的対処方針（令和3年6月17日変更）」, https://www.kantei.go.jp/jp/singi/novel_coronavirus/taisaku_honbu.html (最終閲覧日：2022年10月31日)。
- 2) Lamers M., Beumer J., van der Vaart J., Knoops K., Puschhof J., Breugem T., Ravelli R., van Schayck J.P., Mykytyn A., Duimel H., van Donselaar E., Riesebosch S., Kuijpers H., Schipper D., van de Wetering W., de Graaf M., Koopmans M., Cuppen E., Peters P., Haagmans B., Clevers H.: SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes, *Science*, 369 (6499), 50-54 (2020)。
- 3) M. Kitajima, Warish A., Kyle B., Annalaura C., Charles P. G., Kerry A. H., E. Haramoto, Joan B. R.: SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs, *Science of The Total Environment*, 739 (15), 139076 (2020)。
- 4) Amanda L. W., Ousmane M. D., Jaume J., Tracie G., Cynthia J. S., Jamal A.: Surveillance to Track Progress Toward Polio Eradication-Worldwide, 2020-2021, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 71 (15), 538-544 (2022)。
- 5) 日本水環境学会 COVID-19 タスクフォース：下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル, https://www.jswe.or.jp/aboutus/pdf/SARS-CoV-2_RNA_Detection_Manual_for_Wastewater.pdf (最終閲覧日：2022年10月31日)。
- 6) 大石若菜, Zhu Yifan, 丸尾知佳子, 斉藤繭子, 北島正章, 佐野大輔：ウイルス感染症流行制御のための下水疫学調査のエッセンス, *水環境学会誌*, 44 (5), 125-133 (2021)。
- 7) Fahrenfeld N., Bisceglia K. J.: Emerging investigators series: sewer surveillance for monitoring antibiotic use and prevalence of antibiotic resistance: urban sewer epidemiology, *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2, 788-799 (2016)。
- 8) 高浪龍平：抗インフルエンザウイルス薬の水環境中挙動および患者数との関係, *環境技術*, 41 (6), 380-387 (2012)。

- 9) 高浪龍平：都市河川における抗インフルエンザウイルス薬の動態，大阪産業大学論集 自然科学編，130，51-59 (2020)。
- 10) あゆみ製薬株式会社：医薬品インタビューフォーム「カロナール錠」，<https://image.packageinsert.jp/pdf.php?mode=1&yjcode=1141007F1063> (最終閲覧日：2022年10月31日)。
- 11) Alistair K. B., Charles S. W.: Distribution and fate of pharmaceuticals and their metabolite conjugates in a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 144, 774-783 (2018)。
- 12) Asu Z., Nilsun H. I.: The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes, *Hazardous Materials*, 187 (1-3), 24-36 (2011)。
- 13) 奥田隆，小林義和，山下尚之，田中宏明：下水処理過程での溶存態・懸濁態PPCPsの挙動，環境工学研究論文集，44，291-298 (2007)。
- 14) L. H. Santos, Paula P., Alberto N. A., Angelina P., C. Delerue-Matos, M. C. Montenegro.: Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water, *Chromatography B*, 930, 75-81 (2013)。
- 15) 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，東京都健康安全研究センター研究年報，63，69-81 (2012)。
- 16) L. M. Halwatura, I. S. McLerran, D. L. Weglarski, Z. U. Ahmed, Y. Ye, I. M. Bradley, D. S. Aga.: Complementing RNA Detection with Pharmaceutical Monitoring for Early Warning of Viral Outbreaks through Wastewater-Based Epidemiology, *Environmental Science & Technology Letters*, 9 (6), 567-574 (2022)。
- 17) DrugBank Online: Online database, <https://go.drugbank.com/> (最終閲覧日：2022年10月31日)。
- 18) 大阪府：公共用水域の水質等調査結果，https://www.pref.osaka.lg.jp/kankyohozen/osaka-wan/river_sokuhou.html (最終閲覧日：2022年10月31日)。
- 19) Ahmed F., Tschärke B., O'Brien J. W., Thompson J., Zheng Q., Mueller J. F., Thomas K. V.: Quantification of selected analgesics and their metabolites in influent wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta*, 234, 122627 (2021)。
- 20) Ian D. W., Rebecca D., Isobelle G., Muireann C., Leanne N., Robert P.: A Quantitative UPLC-MS/MS Research Method for the Measurement of Acetaminophen and 5 Metabolites in Plasma, <https://www.waters.com/nextgen/jp/ja/library/application-notes/2017/quantitative-method-for-the-measurement-of-acetaminophen-and-5-metabolites-in-plasma.html> (最終閲覧日：2022年10月31日)。
- 21) 社団法人日本下水道協会：下水試験方法（追補暫定版）内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編 (2002)。
- 22) 谷口省吾：寝屋川流域における医薬品類および有機フッ素化合物の存在実態，大阪産業大学人間環境論集，9，193-199 (2010)。