

淀川下流域における抗インフルエンザ薬成分の 存在実態と挙動把握に関する研究

大阪薬科大学 東 剛志

1. はじめに

1.1 研究の背景

近年、河川環境中に医薬品成分（PPCPs）が残留する新たな環境問題が国内外で数多く報告されている（図 1）¹⁻³⁾。医薬品成分は元来、微量濃度であっても生体内で特異的な生理作用を発揮することを意図して設計されている⁴⁾ため、その環境リスク評価とリスク削減に向けた水質管理のあり方は社会的にも大きな関心を呼んでいる⁵⁾。この様な状況の中、2000 年後半からインフルエンザの治療を目的として用いられる抗インフルエンザ薬成分のタミフルの河川環境中への漏出问题がクローズアップされている⁶⁾。

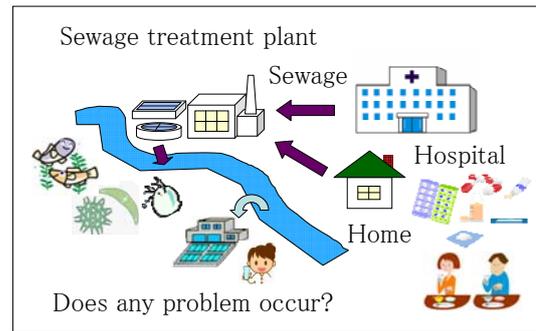


図 1：下水処理場を経由して医薬品成分の一部が河川環境中に流入する³⁾

1.2 河川環境中に残留する抗インフルエンザ薬による汚染の影響

水環境中に残留する PPCPs の問題の中でも、タミフルによる水環境汚染問題が特筆して取り上げられる理由としては、以下の背景と環境リスクが挙げられる⁶⁾。

まず、この問題の背景として、タミフルはもう一つの代表的な抗インフルエンザ薬成分であるリレンザとともに、感染力が非常に強い新型インフルエンザパンデミックが発生した際の被害軽減の切り札として、WHO をはじめ各国の新型インフルエンザ対策ガイドラインでも位置付けられており、世界各国でタミフル・リレンザの備蓄が進められている社会的な状況がある⁷⁾。日本はこれらの抗インフルエンザ薬の使用が多く、年間でのタミフル使用量は世界の使用量のうちの 7 割以上（2 割は米国）を占めており⁸⁾、タミフル備蓄量についても 2014 年現在で約 5,400 万人分、リレンザについては約 900 万人分と、日本人口の約 50%にも上っている⁹⁾。

次に、この問題に関する環境リスクについて、野生の水鳥（カモ）を介した薬剤耐性インフルエンザウイルス発生の問題が主たる問題として懸念されている。これは、野生のカモが全ての組み合わせの型のインフルエンザウイルスを不顕性感染の形で体内に常時保有しているためである。このことについては、飲み水としてマガモに $1\mu\text{g/L}$ という微量濃度のタミフル（活性代謝体として）の投与を行った場合、体内でタミフル耐性インフルエンザウイルスが発生し、糞中へと体外排泄されるという報告がなされている^{10,11)}。

このことから、水環境中に残留するタミフルに起因した薬剤耐性菌・ウイルスの問題は、主にヒトや家畜の体内に加えて水環境中からも潜在的に発生するという、

新たな社会的問題を提起している。従って、汚染実態・環境動態の解明とその環境リスクについての評価と対策に関する研究を行うことが望まれている。

1.3 本研究の目的

このような背景の中、2010年からは日本ではタミフル・リレンザに加えて、ペラミビルと呼ばれる新薬の抗インフルエンザ薬成分が開発され医薬品として承認され¹²⁾、臨床の現場での使用・普及が始まり、抗インフルエンザ薬を取り巻く状況も年々変化しつつあると考えられる。しかし、新薬成分について環境水試料を対象とした分析法や実河川環境中の検出例についての報告例は、未だ全くなされていない。

そこで、本研究では、我々の研究グループがこれまでに先駆けて環境動態の解明と環境リスク評価と削減対策の提案を行ってきたタミフル・リレンザ¹³⁻¹⁵⁾に、新薬成分のペラミビルを加えて調査対象とした。そして、河川水と下水試料を対象とした高感度な多成分同時分析法を開発し、琵琶湖・淀川流域の中でも人口が集中し、水鳥が多く集まる淀川下流域に位置する安威川・神崎川流域を中心として、その存在実態と環境動態について解明を試みる。そして、得られた結果に基づいて生態系への毒性影響や薬剤耐性ウイルス発生等の環境リスクについて考察を試みる。

2. 研究対象流域

2.1 対象流域の概要

本研究では、約1,600万人の水道水源であると同時に、1,000種を超える動植物の生息地ともなっており、飲料水源と生態系保全の両面で日本を代表する重要な水系の1つである琵琶湖・淀川流域¹⁶⁾の下流域に位置し、人口の集中する都市部を流れる安威川・神崎川流域^{17,18)} (図2)を主たる調査対象に設定した。また、淀川流域の代表地点として、淀川中流域に位置する枚方大橋地点においても合わせて調査を行った。

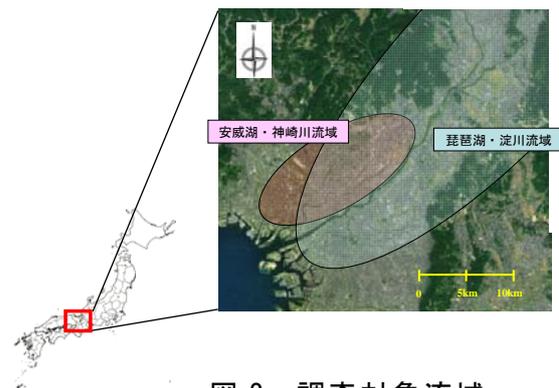


図2：調査対象流域

2.2 安威川・神崎川流域

2.2.1 河川の特徴

安威川・神崎川流域については、安威川が神崎川の上流域で合流する（合流後の名称は神崎川）河川である。各流域の特徴を以下に簡潔にまとめる。

安威川流域は、流路延長28.2 km、流域面積163 km²の北摂地域で最大の流域である^{17,19)}。河川の水利用については、安威川流域の上流域で主に田畑等への灌漑用水として利用されている¹⁷⁾。

神崎川流域は、流程が21 km、流域面積627 km²の流域である²⁰⁾。神崎川は、摂津市に位置する淀川右岸・一津屋樋門を通じて淀川から分派する一級河川である。なお、一津屋樋門からは河川浄化を目的として約10 m³/sの水が、淀川から神崎川に常時供給されている^{17,21)}。河川の水利用については、同じく淀川右岸・一津屋樋門に位置する一津屋取水口を通じて、上水の他工業用水として利用されている¹⁷⁾。

2.2.2 河川水質

河川水質に関しては、安威川では近年全ての地点で BOD の環境基準を達成しており 1.0～2.0 mg/L 前後で推移している。また、神崎川では昭和 50 年以前には BOD が環境基準を大きく越えていたが、平成以降は 3.0 mg/L 前後となっており、現在は概ね 5.0 mg/L 以下で推移しており、環境基準は超過していないものの、琵琶湖・淀川流域の中では BOD が若干高い（淀川中流域の枚方大橋では 1.0 mg/L 前後）傾向にある¹⁶⁾。

このように、安威川・神崎川流域は、BOD に代表される水質基準の問題は克服した状態にあるが、かつての汚染物質がヘドロとなって川底に堆積し、ダイオキシン類の底質環境基準を超過している地点がみられ、改善に向けて大阪府や国土交通省等が取り組みを続けている^{22,23)}。また、最近では医薬品類と合わせて近年新規環境汚染物質として着目されている有機フッ素化合物の問題についての研究も行われつつある²⁴⁾。

2.2.3 都市河川としての重要性

安威川・神崎川流域は、流域人口が 200 万人を超え、都市化が著しく進展した人口密集地域であること、国土軸に位置していることから大阪府下でも重要な流域であり、魚類・底生動物・付着藻類・鳥類など合計約 700 種以上の生物が生息している¹⁷⁾。また、安威川の上流域ではオオタカやオオサンショウウオ等の貴重種が多く生息している¹⁷⁾。さらに、安威川・神崎川流域は、京都市付近の淀川中流域の河川及び支川と比較して、野生の水鳥が約 5～10 倍多く生息¹⁸⁾している（図 3-1 及び図 3-2）。そのため、河川環境中に存在する抗インフルエンザ薬成分の問題についての研究を行う上でも、重要な水系のうちの 1 つであると考えられる。



図 3-1：（左），3-2（右）：冬期インフルエンザ流行ピーク時に安威川・神崎川流域に生息する水鳥（カモ類）

3. 調査・実験方法

3.1 調査地点

本調査では、安威川・神崎川の上中流域と、淀川の代表地点として淀川中流域に位置する枚方大橋を対象にした。調査地点は、本川（6 地点）と、これらの本川に流入する支川（4 地点）及び下水処理場放流水（3 地点）の合計 13 地点（図 4）を対象にした。なお、S2 の下水処理場については、流域下水道への編入に伴い 2013 年 10 に機能停止し、閉鎖後は河川流量が無くなったため、インフルエンザ流行期の調査地点からは除外した。また、4.2 で述べる流域における存在実態のモニタリング調査では、下水処理場と河川の代表点として各河川の本川を対象に、R2、R4、R5、R6 の 4 地点で詳細な調査を行った。

河川の採水地点の選定にあたっては、事前の複数の現地踏査と、大阪府や国土交通省がダイオキシンを対象に行っている各流域の採水地点^{22,23)}を参考に決定した。また、流域内に位置する下水処理場の放流水の他、流入水についても採水を行った。

サンプリング調査の日程は、大阪府の各都道府県の感染症情報センターが公表している感染症発生動向調査を参考に、インフルエンザ非流行期には1~3ヵ月ごとに、インフルエンザ流行期には毎週調査を行った。さらに、環境動態を把握する目的で、インフルエンザ流行ピーク時付近に流域規模での調査を2014年2月4日に行った。なお、いずれの調査日及び調査日の先行2日間に、1mmを超える降水は観測されなかった⁴⁾。また、安威川・神崎川では下流地点が感潮域に属する²⁾ため、干潮時に採水を行った。

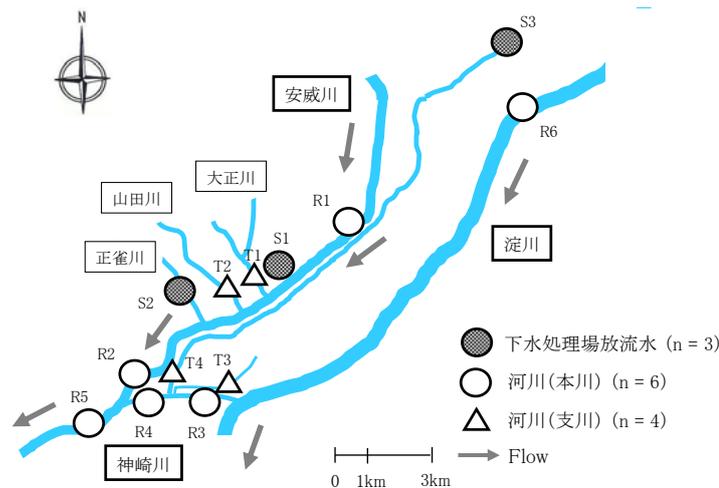


図4：採水地点のまとめ

3.2 分析対象成分

本研究では、日本国内で抗インフルエンザ薬として定められているタミフル（オセルタミビル (Oseltamivir : OS)）、体内で代謝されて生成するタミフルの薬理活性代謝物のオセルタミビルカルボキシレート (Oseltamivir carboxylate : OC)、リレンザ（ザナミビル (Zanamivir : ZAN)）、アマンタジン (Amantadine : AMN) に加えて、2010年臨床で使用が始まった新薬成分ラピアクタ（ペラミビル (Peramivir : PER)）の5成分を対象に研究を行った。なお、ペラミビルについては、分析に必要な標準物質を塩野義製薬よりご提供頂いた。本研究で対象にした抗インフルエンザ薬の物理化学的性質を表1にまとめている。

3.3 サンプリングの方法

調査を行った下水処理場では設備構造上、採水器を用いた水試料の汲み上げが出来ない場合があり、流入水・放流水・河川水のいずれの試料についても、ステンレス製のバケツを用いたスポット採水により採取を行った。河川水の採水では橋からロープを結んだバケツを下ろし、流心の水を採取した。採水風景を図5-1及び図5-2に示す。

水試料はガラス瓶に採取し、採取後 pH を下げることで微生物による生分解の活性を下げ、水試料中に残留する残留塩素による酸化の影響を軽減する目的で、抗酸化剤のアスコルビン酸を添加した。採取したサンプルは分析時まで遮光・冷蔵保存し、サンプリング後速やかに分析を行った。

表 1：本研究で対象にした抗インフルエンザ薬の物理化学的性質

| 成分名 | 分子量 (g/mol) | 構造式 | p <i>K</i> a | Log <i>P</i> |
|------------------------------------|----------------|-----|---------------------------|--------------|
| Oseltamivir (OS) | 312.4 | | 7.7 | 0.4 |
| Oseltamivir carboxylate (OC) | 284.4 | | 3.8 (acid) 7.8 (base) | -2.1 |
| Zanamivir (ZAN) | 332.3 | | 3.8 (acid) 11.3 (base) | -7.1 |
| Amantadine (AMN) | 151.2 | | 10.1 | 2.4 |
| Peramivir (PER) | 328.4 | | 4.1 (acid) 13.1 (base) | -1.4 |



図 5-1：(左)，5-2 (右) 安威川・神崎川水系における調査の様子

3.4 分析の方法

3.4.1 前処理

採取した水試料は、ガラス繊維ろ紙 (GF/B, Whatman) で吸引濾過して得た濾液 (溶存態試料) を固相抽出カートリッジ (Bond Elut SCX (Agilent Technologies)) に通水させて固相抽出した。固相はメタノールと1M HClのMilliQ-Waterでコンディショニング処理した。

通水後、固相をpH3のMilliQ-Water及びメタノールで夾雑物のクリーンアップ操作を行い吸引脱水した。その後、10%トリエチルアミン含有1:1 (v/v) アセトン-MilliQ Water 溶出液を用いて溶出を行い、溶出液を窒素ガスで穏やかに濃縮乾固した。その後、0.1%ギ酸：メタノール (9:1 (v/v)) の溶液に再溶解させUPLC-MS/MS分析に供した。分析のフローを図6にまとめている。

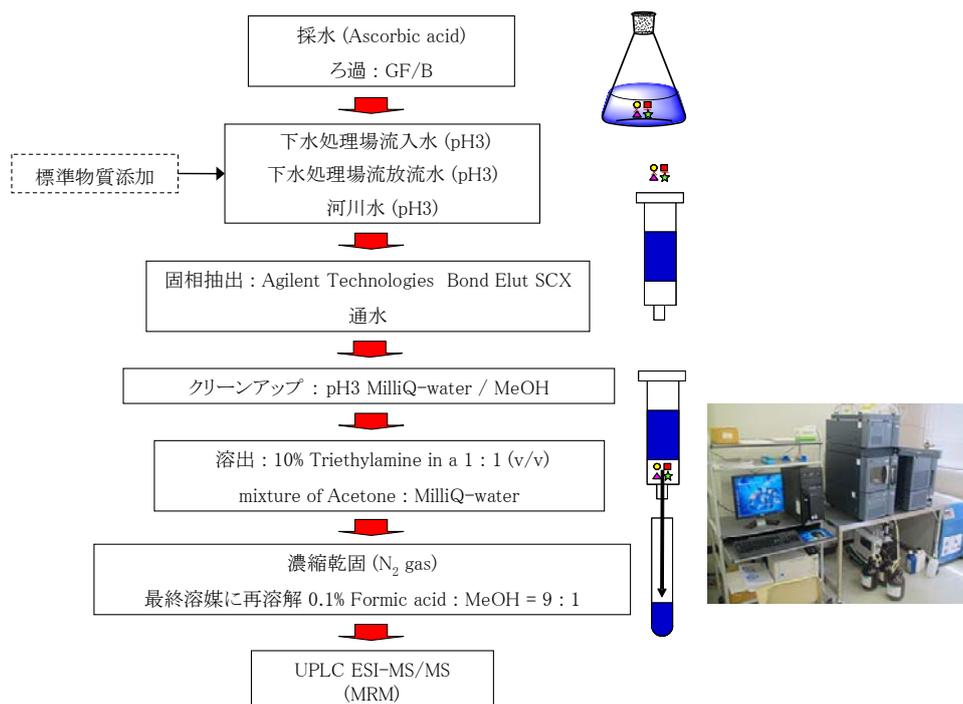


図 6：河川水及び下水試料を対象にした分析フロー

3.4.2 UPLC-MS/MS測定方法

OS・OC・ZAN・AMN・PER の分離・同定は UPLC-MS/MS (LC: Waters Acquity Ultra Performance™ liquid chromatography (UPLC™)、MS: Waters ACQUITY TQD mass spectrometer (イオン化法: ESI) (Waters company Ltd.)) を用いて行い、LC カラムに ODS カラム (BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters)、移動相には A 液: 0.1%ギ酸水溶液と B 液: アセトニトリルを用いたグラジエント溶離法により分離し、分析を行った。表 2 に UPLC-MS/MS の分析条件と定量下限 (Limit of quantitation: LOQ) をまとめている。

定量方法は既報^{3,25)}に従い、標準物質を添加せずに前処理を行う無添加系と、標準物質を添加して前処理を行う添加系の 2 系に分けて絶対検量線法により各々分析を行い、測定結果の濃度差より回収率を算出し、この回収率で無添加系の濃度補正を行ったものを実際の水試料中の濃度とした。

なお、本研究で対象としている OS・OC・ZNA・AMN・PER は、疎水性の指標であるオクタノール水分配係数 ($\text{Log}K_{ow}$ ($\text{Log}P$)) の値が OS: 0.4²⁶⁾、OC: -2.1²⁷⁾、ZNA: -7.1²⁸⁾、AMN: 2.4²⁹⁾、PER: -1.4³⁰⁾といずれも非常に低い。このように、 $\text{Log}P$ が低い ($\text{Log}P < 2.5$) 化学物質では、下水処理場の汚泥や SS への吸着影響は見込めないとされている報告³¹⁾を考慮し、ろ過を行った後の濾液 (溶存態) のみを分析対象とした。

表 2 : UPLC-MS/MS 測定条件のまとめ

| LC | Waters UPLC | | | | MS/MS | Waters Quattro Micro |
|--------------------|---|--------------------|-------|-------|------------|----------------------|
| Column | Waters AQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm | | | | Ionization | ESI - Positive ion |
| Column Temperature | 60°C | | | | MRM | m/z |
| Mobile Phase | A : 0.1% ギ酸 | | | | OS | 313.3 > 225.3 |
| | B : アセトニトリル | | | | OC | 285.3 > 197.2 |
| Gradient | Time (min) | Flow rate (mL/min) | A (%) | B (%) | ZAN | 333.4 > 60.2 |
| | 0 | 0.35 | 95 | 5 | AMN | 152.1 > 135.2 |
| | 4.0 | 0.35 | 75 | 25 | PER | 329.4 > 270.2 |
| | 4.3 | 0.35 | 20 | 80 | LOD | ng/L |
| | 5.8 | 0.35 | 20 | 80 | OS | 0.10 |
| | 6.0 | 0.35 | 95 | 5 | OC | 0.13 |
| | | | | | ZAN | 0.13 |
| Injection | 10 μL | | | | AMN | 0.07 |
| | | | | PER | 0.05 | |

4. 結果と考察

4.1 固相抽出と UPLC-MS/MS を組み合わせた高感度な多成分同時分析法の開発

4.1.1 OS・OC・ZAN・AMN の分析に適した固相抽出カートリッジについて検討

これまで、様々な種類の樹脂を用いた固相抽出カートリッジの検討を試み、OS・OC・ZAN・AMN を同時分析出来る系として、強陽イオン交換樹脂 (Bond Elute SCX : Agilent Technologies) を用いた高感度な分析系³²⁾を報告している。今回初めて本法を PER に適用した結果、PER についても分析可能であることが分かった。そのため、SCX カートリッジを用いた分析法の検討を行うことにした。

検討を行った固相抽出カートリッジは、Bond Elute SCX と同じ強陽イオン交換樹脂の Agilent Technologies の Bond Elute Plexa SCX (ポリマーベース)、SUPELCO の Discovery DSC SCX と Supelclean LC SCX (シリカベース)、Supel Select SCX (ポリマーベース)、Phenomenex の STRATA SCX (シリカベース)、Strata X-C (ポリマーベース)、Biotage の ISOLUTE SCX (シリカベース)と EVOLUTE CX(ポリマーベース)、ジューエルサイエンスの InertSep SCX と InertSep LSC SCX2 (シリカベース)、Thermo Fisher Scientific の HyperSep SCX (シリカベース)、HyperSep Retain CX (ポリマーベース)について、各々Bond Elute SCX と同じ固相抽出条件で検討を行った。表 3 にこれらの固相抽出カートリッジの特徴を、各カートリッジを用いて分析法の検討を行っている際の写真を図 7 に各々まとめている。

表3：各会社から販売されている SCX カートリッジのまとめ

| 販売会社 | 商品名 | 固相 |
|----------------------|---------------------|-------|
| Agilent Technologies | Bond Elut SCX | シリカ系 |
| | Bond Elut Plexa PCX | ポリマー系 |
| SUPELCO | Discovery DSC SCX | シリカ系 |
| | Supelclean LC SCX | シリカ系 |
| | Supel Slect SCX | ポリマー系 |
| 島津 | STRATA SCX | シリカ系 |
| | STRATA X-C | ポリマー系 |
| Biotage | ISOLUTE SCX | シリカ系 |
| | EVOLUTE CX | ポリマー系 |
| GLサイエンス | InertSep SCX | シリカ系 |
| | InertSep LSC SCX2 | シリカ系 |
| Thermo | HyperSep SCX | シリカ系 |
| | HyperSep Retain CX | ポリマー系 |

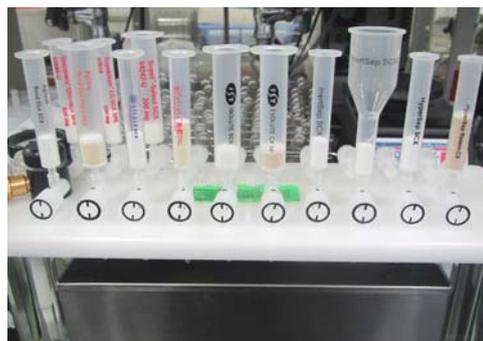


図7：各会社から販売されている SCX カートリッジを用いた分析条件の検討

得られた結果より、種々の会社より販売されている SCX カートリッジ間で回収率に幅があることが分かった（表4）。この原因として、保持のメカニズムや固相抽出操作は各社の SCX カートリッジ間で同じであるため、各社における商品製造工程による影響が考えられた。このため、分析に適した最適な固相抽出カートリッジを選択する際には、保持メカニズムの他に、複数の会社の同等商品を検討することが重要であると考えられた。

また、全体的な傾向として、シリカ系をベースにした SCX カートリッジよりも、ポリマー系をベースにした SCX カートリッジの方が、OS・OCについては良好な回収率が得られることが分かった。しかしながら、OCの一部やPERについては、ポリマー系をベースにした SCX カートリッジでは、詳細な原因は不明であるが回収率100%を大きく越える傾向がみられ、AMNについては回収が出来ないカートリッジが複数みられた。一方、ZANについては両者の間で大きな差はみられず、概ね同程度の回収率であった。

以上の結果を総合すると、OS・OC・ZAN・AMN・PERの同時分析に最も適した固相抽出カートリッジは、Agilent Technologies社のBond Elute SCXであることが分かった。

表4：各社 SCX カートリッジを用いた分析法の検討結果

| | Recovery rate (%) | | | | |
|---------------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|
| | OS | OC | ZAN | AMN | PER |
| Bond Elut SCX | 69 | 77 | 60 | 68 | 70 |
| Bond Elut Plexa PCX | 68 | 125 | 68 | 1 | 163 |
| Discovery DSC SCX | 29 | 47 | 29 | 15 | 71 |
| Supelclean LC SCX | 13 | 29 | 13 | 2 | 31 |
| Supel Slect SCX | 66 | 167 | 66 | 23 | 218 |
| STRATA SCX | 37 | 47 | 37 | 41 | 81 |
| STRATA X-C | 31 | 93 | 31 | 4 | 166 |
| ISOLUTE SCX | 19 | 41 | 19 | 11 | 78 |
| EVOLUTE CX | 32 | 121 | 32 | 29 | 169 |
| InertSep SCX | 27 | 123 | 27 | 5 | 150 |
| InertSep LSC SCX2 | 25 | 59 | 25 | 0 | 65 |
| HyperSep SCX | 54 | 92 | 54 | 23 | 125 |
| HyperSep Retain CX | 17 | 80 | 17 | 17 | 82 |

この固相抽出カートリッジについては、著者らが既に報告しているカートリッジであり、得られた結果からは、著明な分析条件の向上には至らなかった。しかし、今回検討を行った様に、同じメカニズムの固相抽出カートリッジで、種々の会社の商品について比較検討を行った報告例は PPCPs 関係の研究に留まらず極めて少ない傾向にあることから、興味深い知見が得られたと考えられる。

4.1.2 UPLC-MS/MS 測定条件の検討

次に、UPLC-MS/MS 側での測定条件について検討を行った。本研究で対象としている成分は、親水性が非常に高い化合物が含まれており、親水性の高い化合物から順に溶出する C₁₈ カラムとは対照的に、疎水性の高い化合物から順に溶出する HILIC カラムを用いた分析法の適応が、UPLC-MS/MS 測定条件の向上手段の一つとして考えられる。そのため、HILIC カラムを用いて測定条件の検討を行ったが、HILIC カラムの系では移動相の組成を変化させても AMN と OC のピークが完全に重なり分離が出来なかった。また、HILIC カラムを用いた場合の利点として、C₁₈ カラムで保持しにくい成分 (ZAN) についてのマトリックス効果による回収率の低減効果が期待されるが、本研究では顕著な低減効果は得られなかった。この傾向は、最近 ZAN を対象に、種々のカラムを用いて分析法の検討を行った論文報告の結果と良く類似していることから、C₁₈ カラムを用いることにした。

4.1.3 実環境試料を用いた検討

これまでに得られた結果を基に、OS・OC・ZAN・AMN・PER について、本研究で対象としている水試料 (河川水・下水処理場放流水・下水処理場流入水 (各 3 地点)) に適用し、回収率の分布について検討を行った結果を図 8 に示す。

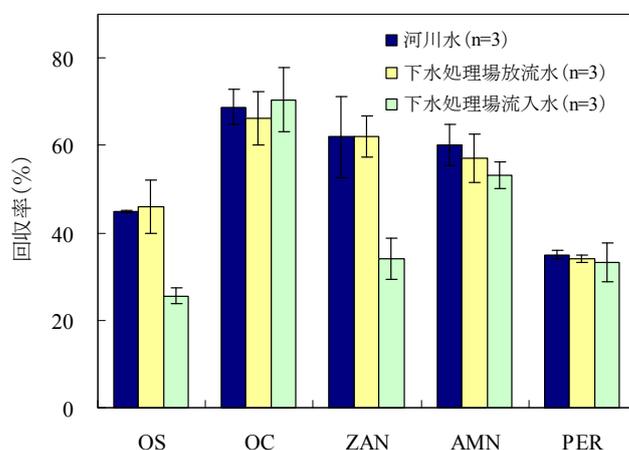


図 8：河川水、下水処理場放流水、流入水試料での回収率の分布

得られた結果より、河川、下水処理場放流水、流入水試料のいずれの水試料からも、OS・OC・ZAN・AMN・PER の全ての成分が分析可能であることが分かった。OS と ZAN については、河川水及び下水処理場放流水と比較して、回収率が 10~20% 減少する傾向がみられたが、その他の成分については河川、下水処理場放流水、流入水試料間で大きな回収率の差は認められなかった。回収率の分布については 30~70% とやや低めであるものの、既報³²⁾の結果よりは約 5~10% と若干ながら向上しており、概ね良好な分析が可能であることが分かった。PER については、回収率が 30% 前後と低めの値となっ

たが、サンプル間でのばらつきは低く、精度の良い分析が可能であると考えられた。

以上の結果より、本研究で開発した分析法が、河川水又は下水試料を対象にした OS・OC・ZAN・AMN・PER の同時分析法として適応可能であることが明らかになった。

4.2 流域における存在実態のモニタリング調査

4.2.1 検出濃度の推移

下水処理場流入水及び放流水中から検出される OS・OC・ZAN・AMN・PER 平均濃度の推移と、大阪府の感染症情報センターが公開している大阪府北部付近の医療定点当たりのインフルエンザ患者数発生の概要の推移を、図 9 (a, b, c, d, e) に示す。なお、グラフの横軸の週については、第 1 週が 2014 年 1 月の最初の週に該当している。

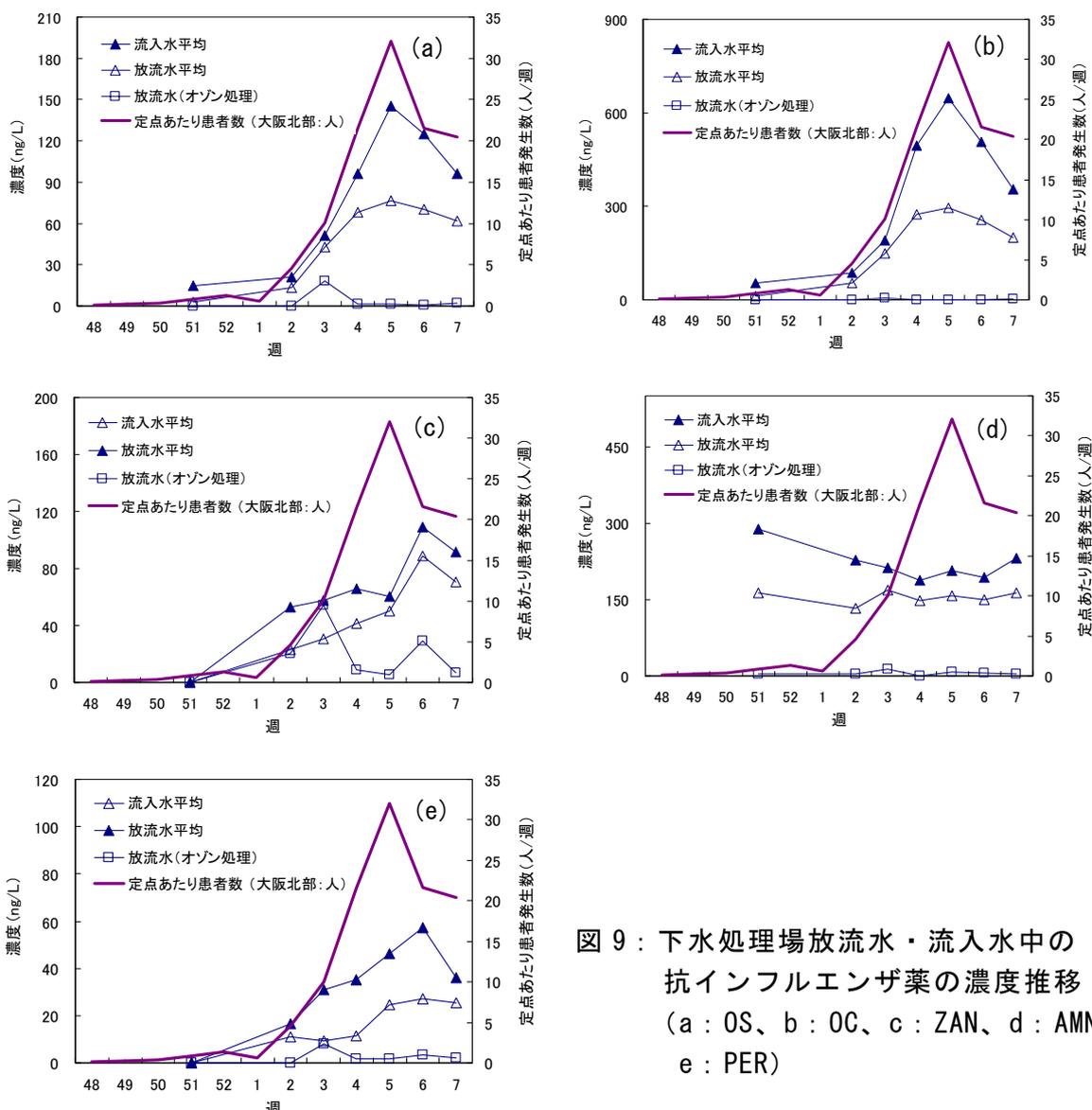


図 9 : 下水処理場放流水・流入水中の抗インフルエンザ薬の濃度推移 (a : OS、b : OC、c : ZAN、d : AMN、e : PER)

得られた結果より、OS・OC はインフルエンザ流行に伴い明瞭な山形の推移をし、インフルエンザ流行がピークとなった 1 月末に検出濃度ピークを形成した。また、下水中から検出されるタミフルがヒトによる服薬に由来しているかを考察する上で用いられている OS・OC の存在割合については約 0.2 と、ヒトによる服薬が由来して

いることが大部分であることが示唆された。

また、ZAN と PER についても、OS・OC ほどではないものの、概ね山形の推移傾向がみられた。AMN については概ね一定の濃度で推移しており、インフルエンザ流行との関連性はみられなかった。これは、AMN は現在ではインフルエンザの治療薬以外のパーキンソン病の治療薬として主に用いられていることが考えられた。OS・OC・AMN・ZAN についてはこれまでに下水流入水を対象にしたモニタリング結果が報告されているが、PER に関しては本研究が初めての検出報告となった。

また、本研究では採水試料は全てスポット採水で採取しているため、流入水と放流水の濃度を基に下水処理場の水処理工程における除去率の議論をすることは出来ないが、オゾン処理後の放流水については OS・OC・AMN・ZAN・PER はともに放流水中濃度と比較して1~2オーダー低い濃度で検出される傾向があり、オゾン処理による処理の有効性が示唆された。また、OS・OC・AMN と比較して、ZAN・PER は僅かながらオゾン処理に残存する傾向がみられた。このことについては、今後さらなる詳細な検討を行うことが重要であると考えられた。

次に、河川水中の OS・OC・ZNA・AMN・PER 平均濃度の推移と、大阪府の感染症情報センターが公開している大阪府北部付近の医療定点当たりのインフルエンザ患者数発生の概要の推移を図 10 (a, b, c, d, e) に示す。

得られた結果より、OS・OC・ZNA・AMN・PER のいずれの成分についても下水処理場流入水や放流水と概ね類似した増減傾向がみられた。淀川の枚方大橋 (R6) と比較した際に、安威川・神崎川流域で採水した地点では全ての地点で濃度が約 2~4 倍程度高濃度となる傾向が見られた。これは、各河川に占める下水処理水の割合と、河川による希釈の影響が異なることが主な原因と考えられた。

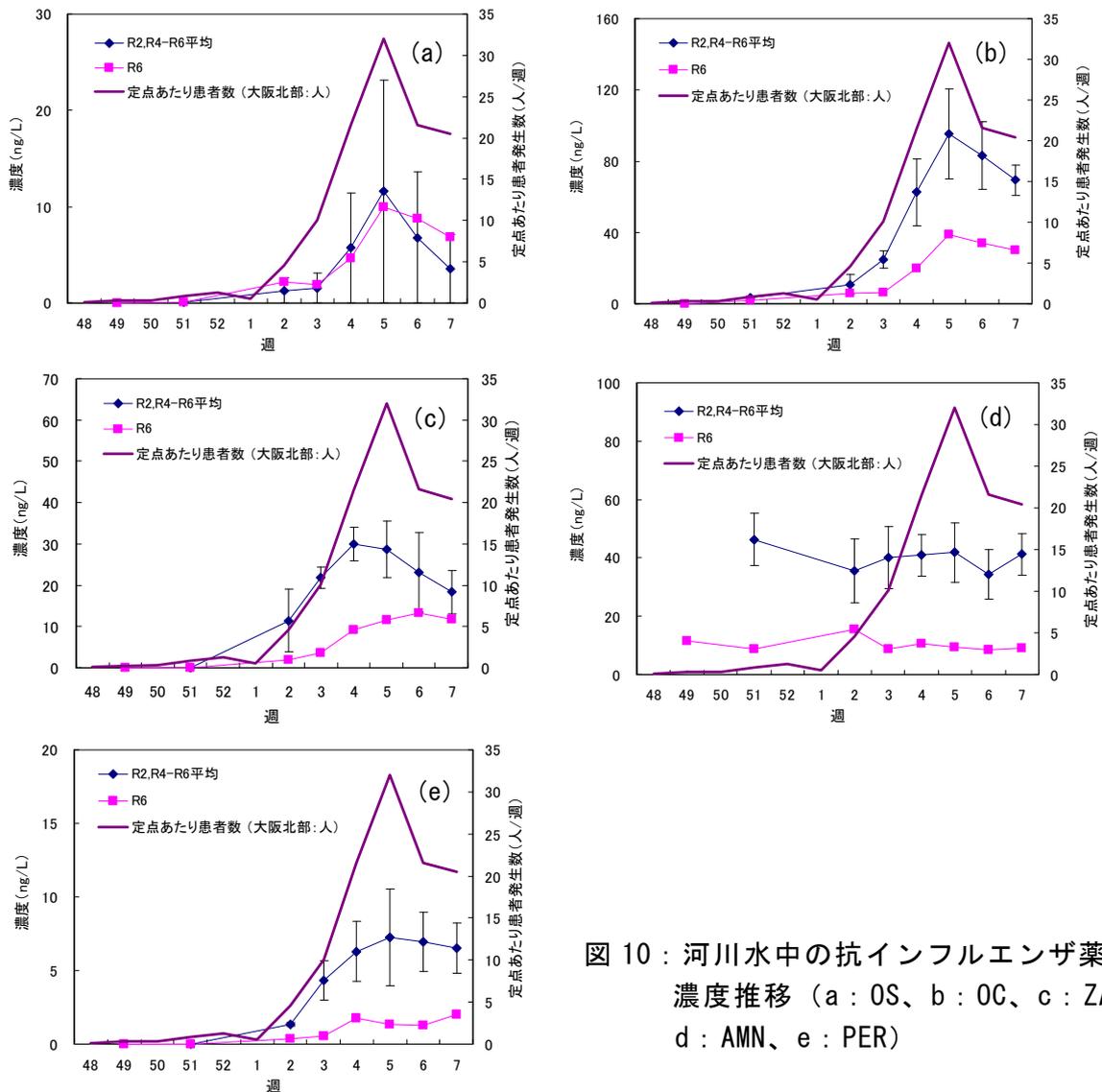


図 10：河川水中の抗インフルエンザ薬の濃度推移 (a : OS、b : OC、c : ZAN、d : AMN、e : PER)

4.3 河川環境中での流下に伴う減衰性の評価と主要な汚濁負荷源の推定

4.3.1 検出濃度の分布

サンプリングを行った地点について、図 11 に河川、支川、下水処理場放流水ごとの各成分の平均濃度を示す。

得られた結果より、本川より OS・OC・ZAN・AMN・PER が平均値で 4~53 ng/L、支川からは 13~48 ng/L、下水処理場放流水からは 39~172 ng/L の濃度で各々検出された。各分類の中では、下水処理場放流水の濃度が最も高く、これまでに報告されているように下水処理場からの負荷量が多いことが考えられた。また、PER については本研究で対象とした抗インフルエンザ薬成分の中で、最も低い濃度で検出される傾向にあることが分かった。

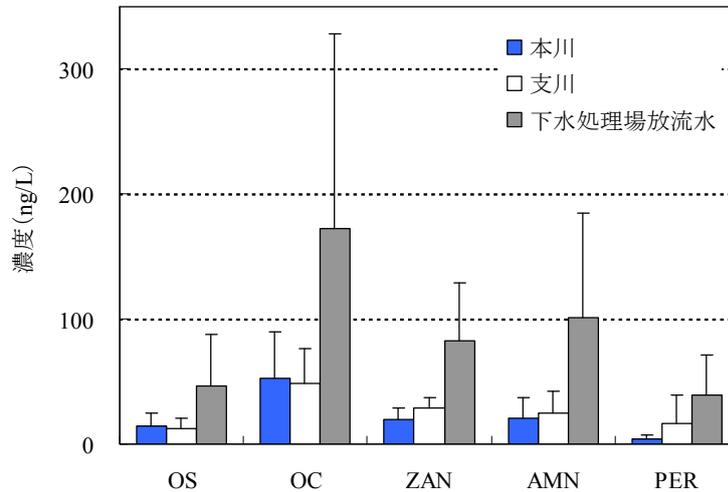


図 11：本川、支川、下水処理場放流水中の抗インフルエンザ検出濃度の分布

4.3.2 安威川・神崎川流域における抗インフルエンザ薬成分の挙動評価と負荷源の推定

次に、調査を行った安威川・神崎川流域における抗インフルエンザ薬成分の OS・OC・ZAN・AMN・PER の物質収支について考察を行った。物質収支を基にした、河川環境中での動態及び負荷源の推定を行うために用いる各地点の負荷量の算出は、各採水地点から検出された各物質の濃度に、河川流量又は下水処理場からの放流量を乗じることで算出した。河川の流量については、大阪府の流域調査の結果及び淀川河川事務所の報告値³³⁾を、下水処理場の流量については、下水処理場を管理している各自治体より得られた流入水量及び放流量を用いた。

本研究で調査を行った地点のうち、最下流採水地点に位置する吹田大橋 (R5) を通過する負荷量と、吹田大橋よりも上流域から流入する負荷量の総和の対応性 (流入負荷量/通過負荷量) については、OS・OC・ZAN・AMN・PER について各々70、71、122、75、122%と、河川の流下に伴う大きな増減影響はみられなかった。この値については、既報の研究で淀川中流域を対象に OS・OC・ZAN・AMN について行った調査結果では 90~110%²⁵⁾とされていることから、既報研究の結果と比較しても概ね妥当な値であると考えられた。ここから、今回初めて対象とした PER についても、水環境中での難分解性が報告されているタミフルやリレンザと同様に、河川環境中での減衰影響は小さく、環境中で殆ど分解されない傾向にあることが明らかになった。

次に、安威川・神崎川流域における各成分の主要な汚濁負荷源の推定を行うため、吹田大橋に流入する負荷量の内訳をまとめたものを図 12 に示す。

得られた結果より、下水処理場放流水からの負荷量が最も大きく、全体の 50~85% を占めており、支川からの負荷量は数%といずれの成分でも低いことが分かった。また、上流域からの負荷量が 20~50%と比較的大きな割合を占めていることについては、神崎川の起源となっている最上流域が、淀川右岸に位置する一津屋水門からの取水に由来していることが主に原因していると考えられた。

これらの結果より、安威川・神崎川流域において、河川環境中に存在する抗インフルエンザ薬成分の負荷量については、下水処理場放流水が占める割合が大きいことが分かった。この結果は、淀川流域において抗インフルエンザ薬成分²⁵⁾や、その他の多種医薬品成分³⁴⁾やエストロゲン等の内分泌かく乱物質³⁵⁾について調査を行った結果と良く一致していた。

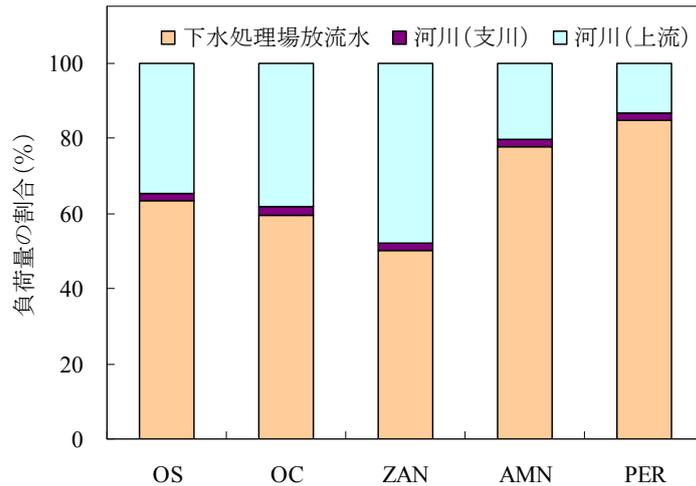


図 12 : 安威川・神埼川水系における負荷量の構成割合

今回調査対象とした安威川・神埼川流域の水試料は、飲料水として利用はされていないため、飲み水を通じたヒトへの健康影響は無視出来ると考えられる。しかし、河川環境中に生息する生態系への影響が懸念される。そのため、汚濁負荷の軽減を目的とした水質改善のため、医薬品類に限らず大腸菌等の水質指標や、ウイルス等の他の環境汚染物質と合わせて、今後下水処理場においてオゾン処理等の除去に有効な水処理技術の導入率の向上を行い、琵琶湖・淀川流域全体としての水質改善を図っていくことが重要であると考えられた。

4.4 本研究で得られた検出濃度を基にした環境リスクに関する考察

水環境中に抗インフルエンザ薬 (OS・OC・ZAN・AMN・PER) が存在することより、河川環境中に生息する生態系 (藻類、ミジンコ、魚類) への毒性影響や、飲料水に存在する場合のヒトへの健康影響、そして河川環境を発生源とする野生の水鳥を通じた薬剤耐性ウイルス発生の問題が考えられる。これらの悪影響の中で、これまでの研究で生態系への毒性影響や、ヒトへの影響は無視出来るほど小さいことが報告されている^{36,37)}ため、ここでは野生の水鳥を通じた潜在的な抗インフルエンザ薬耐性インフルエンザウイルス発生の可能性に関する評価について、文献を基にした考察を行った。

現在、野生のカモ (マガモ) を用いて、実際にこのような実験を行うことが困難であるため、2014 年現在僅かにスウェーデンとアメリカの学者から報告された 2 報告^{10,11)}のみである。これらの報告では、1 $\mu\text{g/L}$ の濃度でタミフル耐性ウイルスに特徴的な変異が見られ、それが糞を通じて体外に排泄されていることを報告している。

これらの報告を基に、安威川・神埼川流域を対象として本研究で検出された OC 濃度について比較をすると、OC の検出濃度はインフルエンザ流行ピーク時に 80~120 ng/L 程度であり、1 $\mu\text{g/L}$ を基準にした場合には影響は小さいと考えられるものの、著者らが京都市を中心として調査を行った結果²⁵⁾と比較して 3~4 倍適度全体的に高濃度であり、かつ野生の水鳥の生息数も 5~10 倍程度多い。このため、今後長期的な視点でみていく必要があると考えられる。最後に、今回検出された PER については、カモを用いた報告はなされておらず、便宜的に *in vitro* 系でのインフルエンザ増殖阻害濃度 IC_{50} での評価を行った際には、OC や ZAN の IC_{50} は中間値で 100~300 ng/L 程度³⁸⁻⁴²⁾であるのに対して、PER については 30~200 ng/L 程度^{39,40,43)}であった。この結果は、

実際に野生のカモを用いて実験を行った系ではなく、*in vitro* 系によるアッセイによる結果であるため、この結果を基に詳細な評価を試みることは出来ないが、PER についても OC や ZAN と類似して有効濃度は ng/L オーダーと低いため、タミフル・リレンザとあわせて、今後長期的な視野で薬剤耐性獲得に関する環境リスクについて一層の研究が進めていくことがなされていくことが望まれる。

5. まとめと今後の課題

本研究では、河川環境中に存在する抗インフルエンザ薬による新規環境汚染問題について、これまでに対象とされてきたタミフル・リレンザ・アマンタジンに、2010 年より新しく臨床で使用が始まった新薬成分のペラミビルを加えて、河川水及び下水試料を対象とした高感度な多成分同時分析法の開発を行った。また、開発した分析法を駆使して、淀川下流域に位置する安威川・神埼川流域を対象に、詳細な存在実態の把握と環境動態の解明を試みた。

その結果、これまでタミフル・リレンザを中心として報告されている既報研究と同様に、ラピアクタについても河川環境中に存在しており、河川への負荷源として下水処理場が占める割合が大きいこと、オゾン処理による水処理が有効であること、河川での減衰影響が小さいことを先駆的に明らかにすることが出来た。また、淀川の代表地点として合わせて調査を行った枚方大橋と比較して、安威川・神埼川流域では検出濃度が 2~4 倍程度高い傾向がみられ、医薬品類に限らず大腸菌等の水質指標や、ウイルス等の他の環境汚染物質の問題と合わせて、琵琶湖・淀川流域全体としての流域水質管理として、今後オゾン処理などの高度な下水処理技術の普及を図っていくことの重要性が示唆された。また、野生の水鳥を介した薬剤耐性ウイルス出現の環境リスクについて、長期的な視点で今後より詳細な検討を行っていくことの必要性が考えられた。

謝辞

本研究は、平成 25 年度 財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の「水質保全研究助成」による援助を受けて実施しました。また、本研究を遂行するにあたり、採水や流量情報について、下水処理場の関係者の方々、国土交通省 近畿地整備局 淀川河川事務所から協力を受けました。また、塩野義製薬よりラピアクタの標準物質（ペラミビル）の提供を受けました。最後に、大阪薬科大学 薬品分析化学研究室の石打浩隆さん、井ノ山智美さん、寺西裕亮さん及び山岡美里さんの各位に、調査、分析、データ整理等の協力を受けました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 36(6), 1202-1211.
- 2) Nakada, N., Kiri, K., Shinohara, H., Harada, A., Kuroda, K., Takizawa, S., Takada, H. (2008) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environ. Sci. Technol.*, 42(17), 6347-6353.
- 3) Azuma, T., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2012) Synchronous dynamics

of observed and predicted values of anti-influenza drugs in environmental waters during a seasonal influenza outbreak. *Environ. Sci. Technol.*, 46(23), 12873-12881.

- 4) 成宮 正倫, 奥田 隆, 中田 典秀, 山下 尚之, 田中 宏明, 佐藤 和志, 末岡 峯数, 大岩 俊雄 (2009) 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動. *環境工学研究論文集*, 46, 175-186.
- 5) 東 泰好 (2010) 医薬品の環境影響とリスク管理 必要な医薬品を安心して使うために. *ファルマシア*, 46(7), 669-673.
- 6) 東 剛志, 田中 宏明 (2012) 河川環境に流出する抗インフルエンザ薬成分の環境動態—下水処理場における高度処理の重要性—. *安全工学*, 51(5), 282-289.
- 7) Singer, A.C., Howard, B.M., Johnson, A.C., Knowles, C.J., Jackman, S., Accinelli, C., Caracciolo, A.B., Bernard, I., Bird, S., Boucard, T., Boxall, A., Brian, J.V., Cartmell, E., Chubb, C., Churchley, J., Costigan, S., Crane, M., Dempsey, M.J., Dorrington, B., Ellor, B., Fick, J., Holmes, J., Hutchinson, T., Karcher, F., Kelleher, S.L., Marsden, P., Noone, G., Nunn, M.A., Oxford, J., Rachwal, T., Roberts, N., Roberts, M., Sacca, M.L., Sanders, M., Straub, J.O., Terry, A., Thomas, D., Toovey, S., Townsend, R., Vouivoulis, N., Watts, C. (2008) Meeting report: Risk assessment of Tamiflu use under pandemic conditions. *Environ. Health Perspect.*, 116(11), 1563-1567.
- 8) Hoffmann-La Roche Inc. Nutley, N.J. (2005) Roche research report; Pediatric advisory committee executive summary for Tamiflu. 1-22.
- 9) Ministry of Health Labour and Welfare (Japan), (2011) Available from <<http://www.mhlw.go.jp/>>.
- 10) Järhult, J.D., Muradrasoli, S., Wahlgren, J., Söderström, H., Orozovic, G., Gunnarsson, G., Bröjer, C., Latorre-Margalef, N., Fick, J., Grabic, R., Lennerstrand, J., Waldenström, J., Lundkvist, Å., Olsen, B. (2011) Environmental levels of the antiviral oseltamivir induce development of resistance mutation H274Y in influenza A/H1N1 virus in mallards. *PLoS One*, 6(9), e24742.
- 11) Achenbach, J.E., Bowen, R.A. (2013) Effect of oseltamivir carboxylate consumption on emergence of drug-resistant H5N2 avian influenza virus in mallard ducks. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57(5), 2171-2181.
- 12) 河野 茂, 関 雅文 (2010) 新規抗インフルエンザ薬の開発 ペラミビル (特集 抗ウイルス薬物療法の現状と今後の展望) - (抗インフルエンザ薬). *医薬ジャーナル*, 46(2), 140-144.
- 13) 田中 宏明, (2011) 平成 23 年度 国土交通省 国土技術研究会 パンデミック発生に伴う流域水質管理に関する研究, Available from <<http://www.mlit.go.jp/chosahokoku/giken/program/kadai/pdf/innovation/inno2-10.pdf>>.
- 14) 田中 宏明 (2011) 国土交通省 建設技術研究開発費補助金総合研究報告書 「パンデミック発生に伴う流域水質管理に関する研究」(平成 20 年度～平成 22 年度). 1-44.
- 15) 東 剛志, 中田 典秀, 山下 尚之, 田中 宏明 (2011) 淀川水系における抗インフルエンザ薬タミフル及びその活性代謝物、リレンザ、アマンタジンの存在実態と環境動態の解明. 第 14 回日本水環境学会シンポジウム, 277-282.

- 16) 財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構 (2012) BYQ 水環境レポートー琵琶湖・淀川の水環境の現状ー平成 22 年度, 1-150.
- 17) 大阪府 (2012) 淀川水系神崎川ブロック河川整備計画. 1-52.
- 18) 環境省, 生物多様性情報システム ガンカモ類の生息調査, Available from <<http://www.biodic.go.jp/J-IBIS.html>>.
- 19) 大阪府 (2012) 安威川ダム事業の検証に関する報告書 (素案). 1-188.
- 20) 環境省, (2009) 水生生物の保全に係る水質環境基準の類型指定について (第 3 次報告), Available from <<http://www.env.go.jp/>>.
- 21) 国土交通省 近畿地方整備局 淀川河川事務所 (2007) 第 5 回 淀川下流域の河川環境上望ましい流量に関する検討会.
- 22) 大阪府環境農林水産総合研究所 (2012) 大阪府ダイオキシン類追跡調査結果報告書 (平成 12 年度～平成 22 年度). 1-207.
- 23) 国土交通省港湾局, 国土交通省河川局 (2007) 底質ダイオキシン類対策の基本的考え方. 1-40.
- 24) 田中 周平 (2011) 平成 24 年度 水質保全研究助成 成果報告書「琵琶湖・淀川流域の水・大気・土壌中の難分解性有機フッ素化合物類の挙動把握と発生源の推定」. 1-13.
- 25) Azuma, T., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Mass balance of anti-influenza drugs discharged into the Yodo River system, Japan, under an influenza outbreak. *Chemosphere*, 93(9), 1672-1677.
- 26) F. Hoffmann-La Roche Ltd. (2008) Product monograph Tamiflu. Mississauga, Ontario, Canada.
- 27) Widmer, N., Meylan, P., Ivanyuk, A., Aouri, M., Decosterd, L.A., Buclin, T. (2010) Oseltamivir in seasonal, avian H5N1 and pandemic 2009 A/H1N1 influenza: pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics. *Clin. Pharmacokinet*, 49(11), 741-765.
- 28) GlaxoSmithKline (2006) Zanamivir. Safety data sheet. Ver.13, 1-8.
- 29) Henkel, J.G., Hane, J.T., Gianutsos, G. (1982) Structure-anti-parkinson activity relationships in the aminoadamantanes. Influence of bridgehead substitution. *J. Med. Chem.*, 25(1), 51-56.
- 30) American Chemical Society. SciFinder online database (subscription database)
- 31) Rogers, H. R. (1996) Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci. Total Environ.*, 185(1-3), 3-26.
- 32) Azuma, T., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Optimization of the analysis of anti-influenza drugs in wastewater and surface water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, submitted.
- 33) 大阪府 水質測定計画に基づく調査結果.
- 34) 花本 征也, 中田 典秀, 山下 尚之, 田中 宏明 (2010) 淀川水系における医薬品類の存在実態. 環境工学研究論文集, 47, 423-432.
- 35) Kumar, V., Nakada, N., Yamashita, N., Johnson, A.C., Tanaka, H. (2011) How seasonality affects the flow of estrogens and their conjugates in one of Japan's most populous catchments. *Environ. Pollut.*, 159(10), 2906-2912.
- 36) Straub, J.O. (2009) An environmental risk assessment for oseltamivir (Tamiflu®) for sewage works and surface waters under seasonal-influenza- and

- pandemic-use conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72(6), 1625-1634.
- 37) WHO, (2011) Pharmaceuticals in Drinking-water, Available from <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals/en/index.html>.
 - 38) Escuret, V., Frobert, E., Bouscambert-Duchamp, M., Sabatier, M., Grog, I., Valette, M., Lina, B., Morfin, F., Ferraris, O. (2008) Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Clin. Virol.*, 41(1), 25-28.
 - 39) Okomo-Adhiambo, M., Sleeman, K., Ballenger, K., Nguyen, H.T., Mishin, V.P., Sheu, T.G., Smagala, J., Li, Y., Klimov, A.I., Gubareva, L.V. (2010) Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: A laboratory surveillance perspective. *Viruses*, 2(10), 2269-2289.
 - 40) Hurt, A.C., Selleck, P., Komadina, N., Shaw, R., Brown, L., Barr, I.G. (2007) Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res.*, 73(3), 228-231.
 - 41) Correia, V., de Andrade, H.R., Santos, L.A., Lackenby, A., Zambon, M. (2010) Antiviral drug profile of seasonal influenza viruses circulating in Portugal from 2004/2005 to 2008/2009 winter seasons. *Antiviral Res.*, 86(2), 128-136.
 - 42) Centers for Disease Control and Prevention (USA) (2009) Update: Drug susceptibility of swine-origin influenza A(H1N1) Viruses, April 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 58(16), 421-452.
 - 43) Kohno, S., Kida, H., Mizuguchi, M., Shimada, J., Group, f.t.S.-C.S. (2010) Efficacy and safety of intravenous peramivir for treatment of seasonal influenza virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(11), 4568-4574.