

# 41. 新型インフルエンザ治療薬タミフルの 水道水源における実態及び除去対策に関する研究

○ 前田絵理・山本研三・川元達彦・三橋隆夫・山村博平（兵庫県立健康生活科学研究所）

## 【 目 的 】

タミフル（オセルタミビル、以下 OT）は、A 型及び B 型インフルエンザウイルスに有効な代表的な抗インフルエンザ薬である。OT はプロドラッグであり、経口投与後、消化管から吸収され、肝臓のエステラーゼにより活性体（オセルタミビルカルボキシレート、以下 OC）へと変換される。これが、インフルエンザウイルスの増殖サイクルに必須の酵素であるノイラミニダーゼに結合し、その機能を抑制することによりウイルス増殖を阻止して抗ウイルス作用を示す<sup>1)</sup>。

2009 年には、新型インフルエンザが大流行し、インフルエンザ治療薬として OT の使用量が増大し、水系への放出量の増加が推測された。また、OT 及び OC は下水処理施設でも十分に分解処理されないとの報告がある<sup>2)</sup> とともに、最近では、経口摂取による意識障害リスクも指摘されており、飲料水汚染を介した健康への影響が懸念されるため、早期に実態把握や除去対策を講ずる必要性のある医薬品と考えられる。

本研究では、OT 及び OC の高感度分析法を確立し、兵庫県下の都市部で水道原水として用いられている河川水等における OT 及び OC の検出実態を詳細に把握するため、およそ一年に亘って調査を行った。さらに、高度浄水処理施設の工程水を用いて、その除去挙動について調査するとともに、万一、OT 及び OC が浄水処理で取り除けない場合、健康へのリスク評価についても検討したので報告する。

## 【 方 法 】

### 1. 試料

水試料は、高度浄水処理を行っている兵庫県の X 浄水場において採水した。X 浄水場は給水人口約 20 万人、原水は都市部の一級河川（A）、二級河川（B）の河川水と湖沼水（C）の混合水である。試料の種類は、A 河川水、B 河川水、C 湖沼水の各原水と、それらを混合した混合原水及び浄水で、採水期間は 2010 年 8 月～2011 年 6 月とした。8 月から 11 月については、月 1 回の採水、インフルエンザシーズンを迎える 12 月からは週 1 回の採水とした。また、浄水処理による除去挙動を確認するため、月に 1 回は凝集沈殿処理水、オゾン処理水、活性炭処理水及び急速ろ過水の工程水を採取した。試料は褐色ガラス瓶にて採水し、冷蔵輸送後 4℃の冷蔵庫にて保存し、できるだけ速やかに測定に供した。なお、浄水については、L(+)-アスコルビン酸を添加（10mg/L）して残留塩素を除去した。

### 2. 前処理

前処理は川元ら<sup>3)</sup>の方法を参考に行った。水試料 500mL に食塩 0.5g、ギ酸 0.5mL を加

えて酸性(pH2.5)とし、予めメタノール 10mL、精製水 5mL の順でコンディショニングしておいた固相カートリッジを Sep-Pak Plus PS-2 (Waters 社)、Oasis HLB Plus(Waters 社)の順に流速 10mL/min 以下で通水した。通水後 PS-2 カートリッジの上端に Sep-Pak Plus AC-2 (Waters 社)を接続し 60 分間の通気乾燥を行った。通気乾燥後は AC-2 カートリッジを取り外し、PS-2 及び HLB カートリッジ各々について通水の逆方向から 2%アンモニア含有メタノール 5mL で溶出した。各カートリッジの溶出液を合わせ、窒素気流下 1.0mL まで濃縮後、MillexFH 0.45 $\mu$ m(Millipore 社)でろ過し、さらに窒素気流下 0.5mL まで濃縮した。0.05%ギ酸水溶液により 1.0mL にメスアップし、このうち 0.8mL をバイアル瓶に分注し、内部標準物質としてカルバマゼピン-d<sub>10</sub>(5mg/L のアセトン溶液)を 10 $\mu$ L 加えて試験液とした。

### 3. 分析方法

分析方法は LC/MS/MS 法<sup>3)</sup>を用いた。LC は Acquity UPLC(Waters 社)を用い、分析カラムは Acquity UPLC BEH C18 (2.1mm x 100mm, 1.7 $\mu$ m, Waters 社)を用いた。移動相には A 液 0.05%ギ酸水溶液、B 液メタノールを用い、濃度勾配条件：0→0.5 分 (B:20%) , 0.5→4.5 分 (B:20→65%) , 4.5→4.6 分 (B:65→95%) , 4.6→5.1 分 (B:95%) , 5.1→7.0 分 (B:20%) で行った。流量は 0.4mL/min で、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、注入量は 10 $\mu$ L とした。MS/MS は Acquity TQD(Waters 社)を用い、ESI+モードにてイオン化させ、MRM 法による測定を行った。定量イオンは OT : m/z313.2→m/z166.1、OC : m/z285.2→m/z138 を選択し、カルバマゼピン-d<sub>10</sub>(m/z247.077→m/z204.141)で MS 感度を補正した。

### 4. OT 及び OC の除去方法に関する検討

#### (1) 標準原液の調製

OT 及び OC 粉末品をメタノールで溶解し、各々 200mg/L の標準原液を調製した。

#### (2) 塩素処理による分解実験

有効塩素濃度が 0.4ppm の水に、OT 及び OC 濃度がそれぞれ 1 $\mu$ g/L となるように添加し、直ちに攪拌 (3,000rpm) を開始した。0、0.5、1、1.5、2、4 時間後に水試料をそれぞれ分取し、フィルターろ過後、OT、OC の濃度を測定した。

#### (3) オゾン処理による分解実験

オゾン濃度が 0.04ppm の水に、OT 及び OC 濃度がそれぞれ 1 $\mu$ g/L となるように添加し、直ちに攪拌 (3,000rpm) を開始した。0、0.5、1.5 時間後に水試料をそれぞれ分取し、窒素パージにてオゾンを除去し、フィルターろ過後、OT、OC の濃度を測定した。

#### (4) 活性炭処理による吸着実験

OT 及び OC 各標準原液を用い、それぞれ 100 $\mu$ g/L の水溶液を精製水で調製した。この水溶液に粉末活性炭を 10mg/L となるように添加した後、直ちに攪拌 (3,000rpm) を開始した。0、0.5、1、2、4、5 時間後に水試料を分取し、フィルターろ過後、OT、OC の濃度を測定した。

## 【 結果及び考察 】

### 1. 高感度迅速分析法の確立

#### (1) 固相抽出・溶出条件の検討

水試料に食塩を添加することにより、OC の回収率(n=3)は約 50%から 70%以上に改善した。なお、OT は食塩の有無とは無関係で良好な回収率(80%以上)を示した。溶出溶媒は 2%アンモニア含有メタノール 5mL とした結果、OT、OC とともに 80%以上の回収率を得た。

#### (2) UPLC と MS/MS 条件の検討

UPLC 条件として、高耐圧性のカラムの適用、ギ酸水溶液とメタノールによるグラジエント溶出を行った。また、MS/MS 条件として、最適なイオン化条件の確立を行った結果、OT は 4.0 分、OC は 2.7 分と短時間かつ高感度で検出<sup>3)</sup>された。

#### (3) 実試料への適用の検討

精製水、脱塩素した水道水及び河川水の水試料 500mL に OT または OC を 25ng/L となるように添加した。それぞれの試料の添加回収率と変動係数(n=3)は、OT で 102.7~117.3%、3.1~7.2%、OC で 85.2%~106.7%、0.7~3.4%と良好であった。本分析条件による OT、OC の定量下限値 (S/N=10) はそれぞれ 0.1ng/L、0.2ng/L と高感度であった。

### 2. 河川水等における OT 及び OC の検出濃度と定点あたり患者数の関連性

X 浄水場で採水した 3 原水の OT 濃度の測定結果を定点あたり患者数の推移と合わせて図 1 に示した。同様に、図 2 には OC 濃度について示した。兵庫県では、インフルエンザの定点あたり患者数が 2011 年第 1 週 (1 月 3 日~9 日) に流行開始の指標である 1.0 人を上回る 2.33 人となり、インフルエンザの流行入りを示した。その後、急速に拡大し第 4 週 (1 月 24 日~30 日) にピークを迎えた (兵庫県感染症情報センター)。河川水である A 河川水と B 河川水の OT 濃度はインフルエンザの流行の立ち上がりと同時期に増加し始め、定点あたり患者数のピークから 2 週遅れて、第 6 週 (2 月 10 日採水) に最大値 8.3ng/L、21.5ng/L が検出された。OC についても A 河川水、B 河川水ともに OT とほぼ同様の推移を示したが、最大値がそれぞれ 71.6ng/L、216.0ng/L と OT よりも概ね 10 倍高い値を示した。定点あたり患者数がピークを越えた後に再度微増して減少しているが、この増減についても 2 週間遅れで、A 河川水と B 河川水の OT、OC 濃度の推移として現れた。

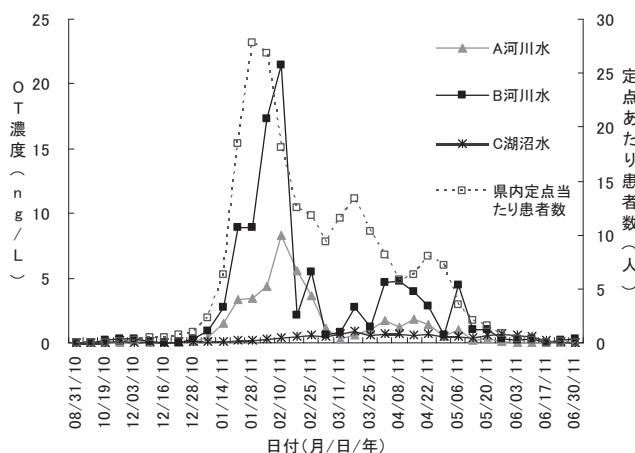


図1 原水中OT濃度とインフルエンザ定点あたり患者数の推移

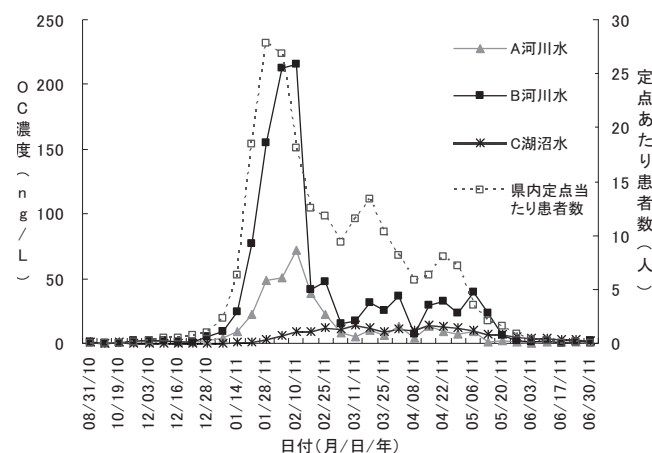


図2 原水中OC濃度とインフルエンザ定点あたり患者数の推移

C湖沼水については、OT、OCともに定点あたり患者数に関連した傾向はA及びB河川と比較して、小さいものと考えられた。患者数がピークを迎えていた時期も、図1及び図2に示したとおり、A河川水やB河川水と比べて低濃度で推移していた。その原因として、C湖沼水には別の河川水が流入しており、その河川水の濃度がもともと低濃度であったことや、河川水中のOTやOCが湖沼水により希釈されたことなどが考えられた。

### 3. 浄水処理工程におけるOT及びOCの除去挙動

2011年1月から5月に採水した試料について、各浄水処理工程水におけるOT濃度の測定結果を図3に、OC濃度の測定結果を図4に示した。OT、OCともに凝集沈殿処理の工程では除去されなかったが、オゾン処理以降の工程水では、OTの4月28日の急速ろ過水を除き、OT及びOCともに定量下限値未満であり、オゾンの酸化分解により除去されていることが明らかとなった。このことから、高度浄水処理におけるオゾン処理は、水道原水中のOT及びOCを取り除くのに非常に有効な処理方法であると考えられた。

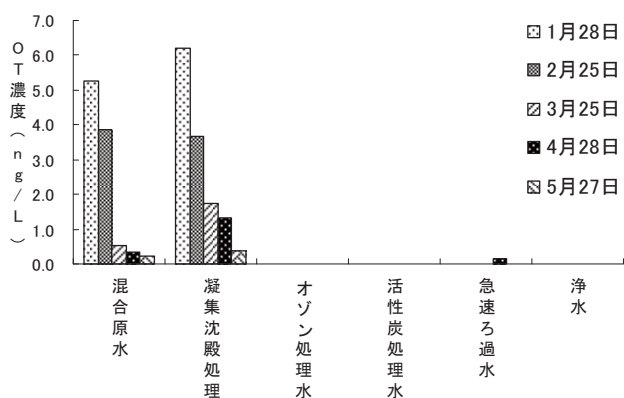


図3 浄水処理工程におけるOT濃度

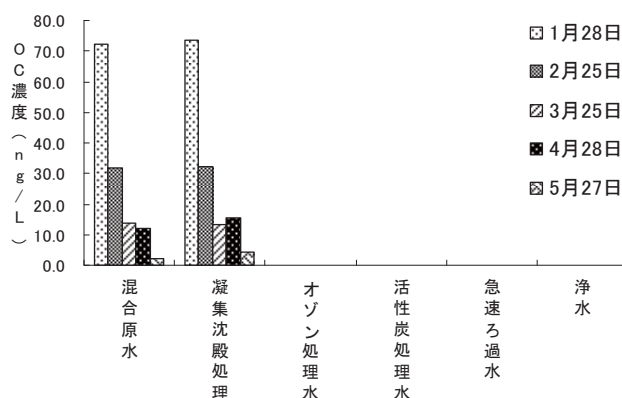


図4 浄水処理工程におけるOC濃度

### 4. 浄水処理（塩素、オゾン、活性炭）によるOT及びOCの除去性と対策法

前項で、オゾン処理工程でOT及びOCは除去されることが確認できたが、オゾン処理を含めその他の浄水処理工程での除去性についても確認するために、塩素、オゾン及び活性炭による除去性についての実験を行った。塩素処理の結果を図5に示した。OCは殆ど変化しなかったが、OTはわずかな分解が認められた。また、オゾン処理の結果を図6に示した。0.04ppmのオゾン濃度では、OCはほとんど分解されたが、OTの除去率は40%程度に止まった。これは、オゾンの供給が停止した状態での実験系であり、オゾンが供給され続ける状況（図3、4）であれば、OT、OCともに高い分解率と考えられた。さらに、活性炭処理の結果を図7に示した。活性炭処理では、接触時間5時間でOT、OCともに70%以上の吸着除去率であった。

このように室内検証実験から、OT及びOCは塩素処理ではほとんど分解除去できないこと、オゾン処理では分解除去が可能であること、さらには活性炭処理で吸着除去が可能であることを確認することができた。浄水場には、高度処理を導入していない通常の浄水処理の施設もあるが、活性炭の投入を行えば、OT及びOCの除去の可能性が極めて高いものと考えられた。

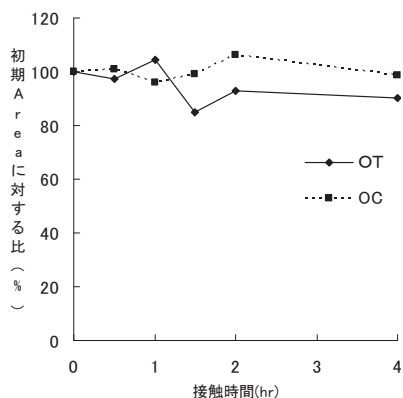


図5 塩素処理によるOT及びOCの除去性

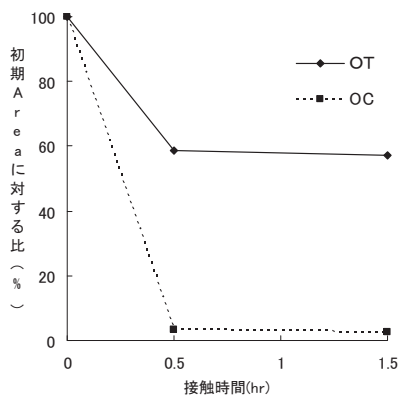


図6 オゾン処理によるOT及びOCの除去性

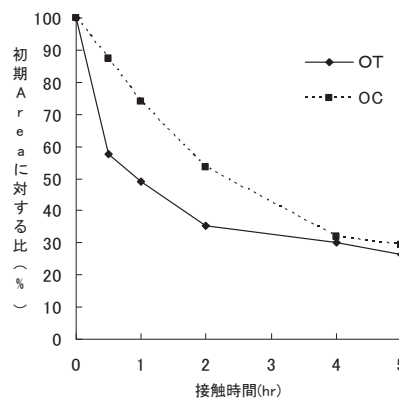


図7 活性炭処理によるOT及びOCの除去性

## 5. OT 及び OC のヒトに対する健康影響の推定

3 及び 4 項で浄水処理による OT や OC の除去法について検討したが、万一、水道原水に含まれている OT や OC が水道水を介してヒトに摂取された場合の影響について評価を行った。水道水の飲用量として、体重 50kg のヒトが 1 日 2L の水道水を飲用すると想定した。また、OT 及び OC 濃度は、今回最も高濃度であった B 河川水の濃度を用いて、浄水処理過程で別の物質に変換されず、かつ全く除去できないと仮定して、1 日あたり最大推定摂取量を求めた。OT 及び OC の急性毒性の指標として、7 日齢ラットにおいてオセルタミビルリン酸塩に関連した死亡が初めて認められた単回経口投与用量  $657\text{mg/kg}^1$  を用いた。この指標値に種差、個体差などに係る安全係数 1,000 を考慮した値に対する、OT 及び OC の 1 日あたり最大推定摂取量の割合を算出した結果、OT は  $1.31 \times 10^{-6}$ 、OC は  $1.32 \times 10^{-5}$  と非常に低レベルであり、ヒトに対する影響は十分に小さいと推定された。

### 【 参考文献 】

- 1)中外製薬(株), 医薬品インタビューフォーム「タミフル」, 2010 年 7 月 (改定第 24 版) .
- 2)Ghosh, G. C. et al, Environ. Health Perspec., 118(1), 103-107, 2010.
- 3)川元達彦ら, 日本分析化学会第 60 年会講演要旨集, p299, 2011.

### 【 経費使用明細 】

試料採水瓶	89,775 円
試料採水作業着	12,180 円
固相抽出カートリッジ	39,690 円
有機溶媒 (メタノール)	1,533 円
実験器具	13,555 円
調査結果作図のためのソフト (ILLUSTRATOR)	89,250 円
参考書籍	8,690 円
文献調査	16,485 円
報告書作成用紙	812 円
光熱水費	30,825 円
合 計	302,795 円