

令和元年9月10日現在

機関番号：34407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21513

研究課題名(和文)水環境中のインフルエンザウイルスおよび抗インフルエンザウイルス薬の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive search for virus and antiviral drugs of influenza in treated sewage effluent and river water.

研究代表者

高浪 龍平 (Takanami, Ryohei)

大阪産業大学・デザイン工学部・講師

研究者番号：00440933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、インフルエンザ流行時に水環境中より検出される抗インフルエンザウイルス薬に着目し、関連ウイルスの探索を同時に行いこれらに関する知見を得ることを目的としている。河川水中インフルエンザウイルスの継続的探索では、確立したウイルスの高感度測定法を用いることによりごく微量のインフルエンザウイルスが河川水中から検出され、これらは同シーズンにおける流行株と一致した。抗インフルエンザウイルス薬の水環境中濃度の把握では、インフルエンザ患者が過去最多と報告された2017/18年および2018/19年シーズンにおいて河川水中のこれらの濃度も非常に高くなり、タミフルの環境負荷が高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下水道が発達した都市部では、あらゆる物質が処理施設に集約されるため、抗インフルエンザウイルス薬を大量に使用している日本において、これらの挙動は注目されている。またインフルエンザウイルスは、塩素消毒により不活化するため、水環境中において知見がなく、検出例もない。よって、これらを対象とした網羅的探索による知見は、環境リスクの検討に寄与し、社会的意義が大きく、社会へのインパクトも大きい。さらに本研究は、今日の下・排水処理の現状と課題を明らかにし、処理方法を再検討するための有益な資料となるだけでなく、下・排水分析による疫学的検討に関する基礎的な知見を与える重要な成果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively searched for virus and antiviral drugs of influenza in treated sewage effluent and river water.

It was possible to detect very small amount of influenza virus from river water by using the newly established high sensitivity measurement method of virus. High levels of anti-influenza virus drugs were detected in river water during the 2017/18 and 2018/19 seasons when influenza patients were reported to have the highest number ever.

This research has made it clarify the current status and problems of sewage treatment for virus and antiviral drugs of influenza.

研究分野：環境学

キーワード：インフルエンザ ウイルス タミフル リレンザ イナビル ラピアクタ 下水処理 モニタリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2009年に発生した新型インフルエンザ(AH1N1亜型)はパンデミック(世界的流行)となり世界を震撼させたが、症状が重篤となりにくいことから現在は一般的なインフルエンザと同等の扱いとなっている。しかし、2013年には中国で新たなウイルス(AH7N9亜型)による発症が確認され、警戒を強めている。日本においても、患者の体内より耐性ウイルスが毎年検出されており、拡大防止には抗インフルエンザウイルス薬使用の把握および管理が重要である。

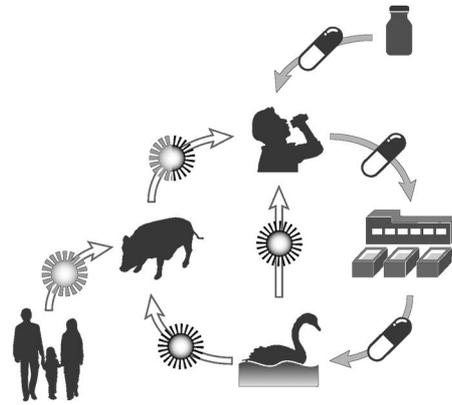


図1 水環境中の耐性ウイルス発生の概念

抗インフルエンザウイルス薬は体内で代謝されるものの、分解されることなく体外に排出される。これらが下水処理過程によって十分に処理されずに環境水中に排出され、高濃度に存在していることが明らかとなっている

(R. Takanami, et al. Journal of Water and Environment Technology, Vol.10, No.1, pp.57-68,2012)。これらが環境中に存在する場合の環境影響のリスクについては、濃度が微量であれば、これらの毒性による直接的な生物への影響は大きくないと予想されるものの、濃度が1µg/Lを超えるとウイルスの耐性化リスクが増大すると報告されている(Jarhult JD, et al. Infection Ecology and Epidemiology, 2: 18385,2012)。図1に示すように、環境中に残留した抗ウイルス薬が水辺に生息する水鳥等が接種することにより、耐性ウイルスの発生を助長し、さらに交配が起こった場合、新たな耐性ウイルスとなって人類に多大な影響を及ぼす可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景より、水環境中における耐性ウイルスの発生リスクを明らかにするため、新薬を含めた抗インフルエンザウイルス薬の河川水中の動態に関するモニタリングおよびインフルエンザウイルスおよび関連する遺伝子を探索することにより、これらの対象物とインフルエンザの流行との関係について知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗インフルエンザウイルス薬の河川水中の動態に関するモニタリング

これまでの研究で分析が可能となっているタミフル(OP)、タミフル代謝物(OC)、リレンザ(ZN)に加え、新薬であるイナビル(LO)、イナビル代謝物(LN)、ラピアクタ(PH)を対象物質とした一斉分析方法を確立した。これらの測定は、分離・濃縮する前処理としてイオン交換による固相抽出を選択し、分析には定量性に優れたLC/MS/MSを用いることとした。

固相抽出による前処理方法について一斉分析を行う前の方法とともに示したものを表1に示す。固相としてWaters製Oasis MCX plusを2個直列に接続したもの(充填剤総量450mg)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。分析の条件としてLCの測定条件を表2に、MSの測定条件を表3に示す。

表1 前処理方法(固相抽出)

項目	旧方法	新方法
試料 pH	3.5(アスコルビン酸)	3.0(アスコルビン酸)
コンディショニング	メタノール	メタノール
平衡化	1%酢酸含有精製水	2%酢酸含有精製水
通水量(速度)	100mL(1mL/min)	100mL(1mL/min)
洗浄	1%酢酸含有精製水	2%酢酸含有精製水
洗浄	メタノール	メタノール
溶出	16%アンモニア水	5%アンモニア水
	含有メタノール溶液	含有メタノール溶液
溶出		5%アンモニア水含有メタノール水溶液

表2 LCの測定条件

注入量	1.0µL			
移動相	(A) 10mM 酢酸アンモニウム +5%アセトニトリル水溶液			
	(B) 10mM 酢酸アンモニウム +95%アセトニトリル水溶液			
移動相条件	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	A (%)	B (%)
	0	0.5	0	100
	0.5	0.5	0	100
	3.5	0.5	30	70
	6.5	0.5	30	70
カラム	Waters製 CORTECS UPLC HILIC			

表3 MSの測定条件

イオン化法		ESI positive
測定方法		MRM
モニターイオン(M/Z)	OP	313.1 > 225.1
	OC	285.1 > 197.1
	ZN	333.0 > 60.0
	LO	473.1 > 60.0
	LN	347.0 > 60.0
	PH	329.1 > 100.1

(2) インフルエンザウイルスおよび関連する遺伝子の探索

水環境中におけるインフルエンザウイルスおよび関連する遺伝子は非常に微量であると考えられるため、濃縮方法の最適化を行った。試料 500mL をセルロースろ紙で粗ろ過したろ液を凍結乾燥する。これを 500 μL のリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、糖鎖固定化金ナノ粒子を添加してさらに濃縮を行った。これにより得られる濃縮画分、捕捉濃縮されなかった画分および未処理画分のそれぞれ 1 μL をテンプレートに用いて、RT-PCR 法で A 型および B 型インフルエンザウイルスの RNA を測定した。この際、PCR のプライマーは A 型のユニバーサルタイプだけではなく、A の亜型である AH1 と AH3、および B 型のユニバーサルタイプを使用し、Triplet で測定した。なお、本測定方法におけるインフルエンザウイルスの定量限界は 10⁶copy/L であった。

4. 研究成果

(1) 抗インフルエンザウイルス薬の河川水中の動態に関するモニタリング

インフルエンザの流行は、医療機関あたりのインフルエンザ患者発生数より算出した流行指数で判断されている。本研究期間である 2015 年から 2019 年のインフルエンザが流行する冬季シーズン（以降、シーズン）における大阪府下のインフルエンザ流行指数を図 2 に示している。インフルエンザの流行は、1 月中旬から 2 月中旬をピークとして山型の時間的変化を示しており、2018/19 年シーズンにおいて本研究期間中で最も流行指数が高くなり、48.0 となった。また、インフルエンザ患者は 2017/18 年シーズンにおいて最多と推定されている。図 3 は全国における抗インフルエンザウイルス薬の供給量とそれらの割合を示している。全国的には 2017/18 年シーズンにおいて最もインフルエンザ患者が発生し、それに伴って多くの抗インフルエンザウイルス薬が供給された。供給割合としては、タミフルおよびイナビルが多く供給され、2018/19 年シーズンからは新薬であるゾフルーザも供給されている。

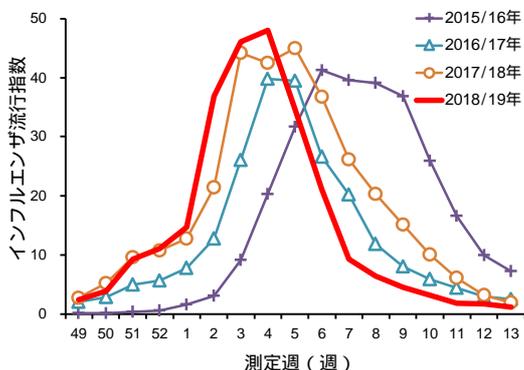


図 2 大阪府下におけるインフルエンザ流行指数
(大阪府感染症情報センター：感染症発生動向調査報告)

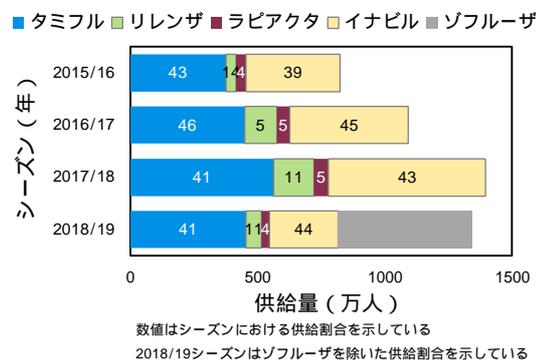


図 3 抗ウイルス薬の供給量と供給割合
(厚生労働省：通知「通常流通用抗インフルエンザウイルス薬の供給状況について」2015-2019 年)

抗インフルエンザウイルス薬の河川水中のモニタリングとして、シーズン中の 1 週おきに下水処理水（放流水）、下水処理水が流入する河川の上流部および中流部より試料を採取し、測定を行った。測定対象としたタミフル(OP)、タミフル代謝物(OC)、リレンザ(ZN)、イナビル(L0)、イナビル代謝物(LN)、ラピアクタ(PH)の内、L0、LN、PH の 3 種類については調査の全期間において定量下限を下回る値であったため、以降の結果については、OP、OC、ZH の 3 種について示す。

表 4 は河川流量と抗インフルエンザウイルス薬の濃度と負荷量を示している。OP、OC、ZH の濃度は上流部から中流部へ減少しているものの、負荷量は大きな変化はなく、これらは河川上流部より流入する下水処理水に由来するものと考えられ、支川の合流によって濃度は低くなるものの河川内での分解等は確認できず、下流まで移行しているものと推測される。

表 4 河川流量 と抗インフルエンザウイルス薬濃度 ・ 負荷量(濃度：ng/L、負荷量：g/日)

測定地点	流量 (m ³ /日)	OP		OC		ZH	
		濃度	負荷量	濃度	負荷量	濃度	負荷量
上流部	92,664	270	25.0	710	65.8	67	6.2
中流部	122,256	223	27.2	505	61.8	52	6.4

河川の流量は 2016 年 3 月 1 日の測定値（大阪府：平成 27 年度大阪府域河川等水質調査結果報告書）
OP、OC、ZN は 2016 年 2 月 19 日の採水試料

各シーズンにおける OP、OC、ZH の濃度とインフルエンザ流行指数の時間的変化についてまとめたものを図 4、図 5、図 6、図 7 に示す。なお、OP、OC、ZH の濃度は下水処理水試料とした。

インフルエンザの流行に伴って OP および OC が検出され、流行指数の時間的変化に 2 週間程度の遅れを伴って OP、OC 濃度の時間的変化も同様の挙動を示した。これにより下水処理水および河川水中のこれらはヒト由来であり、環境への負荷がインフルエンザ流行と密接に關係していることが確認された。また、流行のピーク時に ZH が微量に検出された。LO、LN、PH についても定量下限値であるものの流行のピーク時にのみ検出されており、これらは下水処理水および河川水中にごく微量に存在していると言える。これは抗インフルエンザウイルス薬の用量(服用量と服用期間)としてタミフルが最も多く、他の医薬品は少ないことが要因であると考えられる。このことから抗インフルエンザウイルス薬全体におけるタミフルの使用割合を低くすることで環境負荷の低減が可能であると言える。また、各シーズンの OC 濃度に着目すると 2017/18 年シーズンに本研究期間で最高濃度を検出した。この結果はインフルエンザの流行と一致していることから、環境水中濃度のモニタリング対象をタミフルとすることで周辺地域におけるインフルエンザの流行を間接的に知ることができ、疫学的な解析に用いることが可能であると言える。

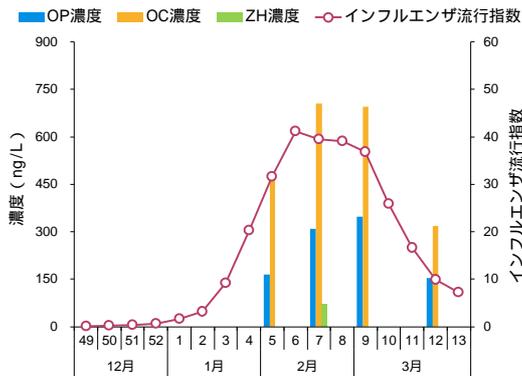


図4 2015/16年シーズンにおけるOP、OC、ZHの濃度とインフルエンザ流行指数の時間的変化

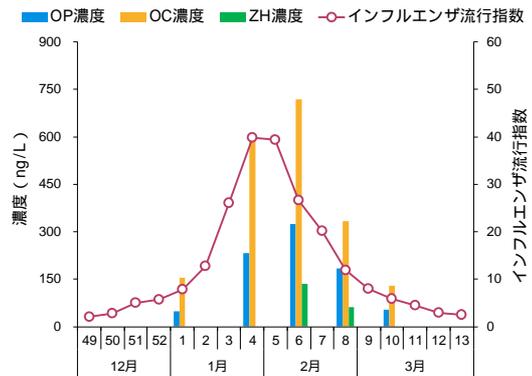


図5 2016/17年シーズンにおけるOP、OC、ZHの濃度とインフルエンザ流行指数の時間的変化

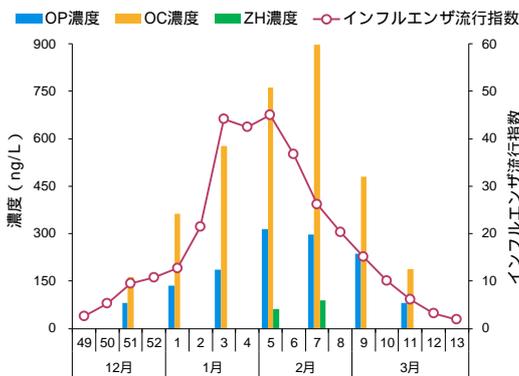


図6 2017/18年シーズンにおけるOP、OC、ZHの濃度とインフルエンザ流行指数の時間的変化

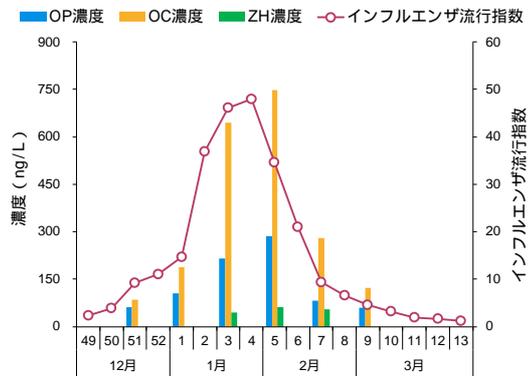


図7 2018/19年シーズンにおけるOP、OC、ZHの濃度とインフルエンザ流行指数の時間的変化

(2) インフルエンザウイルスおよび関連する遺伝子の探索

最適化した濃縮方法によるインフルエンザウイルスおよび関連する遺伝子の測定を 2016/17 年シーズンより開始した。これらの検出結果を表 5 に示す。下水流入水からは対象 RNA が検出されなかった。微量に存在するウイルス等が下水試料中の夾雑物に付着し、測定が困難であったと考えられる。2017/18 年シーズンからは、河川水を試料とした測定を行い、分取した同一試料および異なる採取日の試料の一部より陽性となるものが見られた。2017/18 年シーズンにおいては AH1 型および B 型を主なウイルスとする流行であり、検出されたウイルスも B 型であった。2018/19 年シーズンにおいても同様に流行株と検出株が一致し、河川水中に微量に存在するインフルエンザウイルスはヒト由来であるといえる。

表 5 インフルエンザウイルスの検出結果

測定シーズン	対象	検出株	流行株
2016/17	下水	検出されず	AH3、B、AH1
2017/18	下水	検出されず	AH1、B
	河川水	B(陽性 2/6)	
2018/19	河川水	AH1(陽性 3/12)、AH3(陽性 1/12)	AH1、AH3

(大阪府感染症情報センター：感染症発生動向調査報告)

以上のことから本研究期間のインフルエンザシーズンにおいて抗インフルエンザウイルス薬であるタミフル(OP)、タミフル代謝物(OC)、リレンザ(ZN)が河川水中より検出され、下水処理施設において十分に処理されずに環境中に排出されており、これらの挙動はインフルエンザの流行と一致していることが明らかとなった。このことから環境水中の抗インフルエンザウイルス薬を指標とした疫学的検討の可能性が示唆された。耐性ウイルスの発生などの抗インフルエンザウイルス薬の環境リスクは、環境負荷の高いタミフルの使用割合を低くすることや下水処理施設において高度処理を行うなどにより低減できると考える。また、塩素消毒により容易に不活化が可能なインフルエンザウイルスが河川水中より微量に検出されたことから、下水の誤接続などにより下水が直接河川に流入している可能性が示唆された。これらの結果から間接的ではあるものの、下・排水処理の現状について把握することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

高浪龍平、パーソナルケア製品による水環境汚染 寝屋川における抗インフルエンザウイルス薬を例に、日本の科学者、査読有、Vol.52、No.4、2017、206-211

〔学会発表〕(計 11 件)

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、抗インフルエンザウイルス薬 4 種の河川水中濃度について、日本水環境学会年会、2019

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、2017/18 年インフルエンザシーズンにおける河川中のタミフルおよびタミフル代謝物濃度について、土木学会年次学術講演会、2018

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、河川水中における抗インフルエンザウイルス薬と同ウイルスについて、環境技術学会年次大会、2018

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、河川水および下水処理水における抗インフルエンザウイルス薬濃度について、日本水環境学会年会、2018

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、2016/17 年インフルエンザシーズンにおける河川中のタミフルおよびタミフル代謝物濃度について、土木学会年次学術講演会、2017

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、下水処理過程における抗インフルエンザウイルス薬と同ウイルスについて、環境技術学会年次大会、2017

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、寝屋川における抗インフルエンザウイルス薬濃度と供給割合について、日本水環境学会年会、2017

高浪龍平、谷口省吾、林新太郎、尾崎博明、2015/16 年インフルエンザシーズンにおける河川中のタミフルおよびタミフル代謝物濃度について、土木学会年次学術講演会、2016

高浪龍平、濱崎竜英、谷口省吾、尾崎博明、寝屋川における抗インフルエンザウイルス薬と同ウイルスについて、環境技術学会年次大会、2016

高浪龍平、谷口省吾、林新太郎、尾崎博明、河川水中の抗インフルエンザウイルス薬と同ウイルスのモニタリングについて、日本水環境学会年会、2016

高浪龍平、谷口省吾、林新太郎、尾崎博明、2014/15 年インフルエンザシーズンにおける河川中のタミフルおよびタミフル代謝物濃度について、土木学会年次学術講演会、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

大阪産業大学研究者情報データベース

<http://kenkyu.osaka-sandai.ac.jp/Profiles/14/0001346/profile.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。