

電気分解法を用いた医薬品廃液の分解処理に関する研究

2013 年

小林 豊英

目次

序論	1
第1章 電気分解法を用いた医療廃液処理装置の評価	3
第1節 緒言	3
第2節 実験材料および方法	4
2.1. モデル廃液	4
2.2. 医療廃液	5
2.3. 医療廃液処理装置の設計	6
2.4. 電気分解手順	7
2.5. 細胞毒性の測定	8
2.6. 装置から放出されるガスの測定	9
2.7. 環境負荷および不活性化コストの試算	9
第3節 結果	10
3.1. 医療廃液処理装置の性能評価	10
3.2. 細胞毒性の測定	11
3.3. 装置から放出されるガスの測定	14
3.4. 環境負荷および不活性化コストの試算	15
第4節 考察	15
第5節 結論	17
第2章 電気分解法による尿中抗がん剤の不活性化に関する研究	18
第1節 緒言	18
第2節 実験材料および方法	19
2.1. 試薬および試料の調製	19
2.2. 有効塩素の測定	20
2.3. 電気分解の手順および有効塩素の中和	20
2.4. 希釈した尿の吸収スペクトル	20
2.5. メソトレキセートの濃度測定	20
2.6. 細胞毒性の測定	21
第3節 結果	21
3.1. 有効塩素の測定	21
3.2. 尿によるメソトレキセートの分解阻害	24
3.3. メソトレキセートを含む尿の電気分解による細胞毒性の変化の測定	26
第4節 考察	27
第5節 結論	28
第3章 電気分解法による抗菌剤の不活性化に関する研究	29
第1節 緒言	29

第2節	実験材料および方法	30
2.1.	抗菌剤	30
2.2.	薬剤の電気分解と有効塩素の中和	30
2.3.	抗菌活性の測定	31
2.4.	ヒト細胞に対する細胞毒性の測定	31
2.5.	抗菌剤とその分解の分析	32
第3節	結果	33
3.1.	アミカシン硫酸塩の電気分解	33
3.2.	他の抗菌剤の電気分解	36
3.3.	ヒト細胞に対する細胞毒性の測定	38
第4節	考察	39
第5節	結論	40
第4章	プロドラッグとしての抗ウイルス薬の電気分解による不活性化に関する研究	42
第1節	緒言	42
第2節	実験材料および方法	44
2.1.	試薬	44
2.2.	測定機器と分析条件	44
2.3.	検量線の作成	45
2.4.	電気分解の手順と有効塩素の中和	45
2.5.	ノイラミニダーゼ阻害活性の測定	46
2.6.	ヒト細胞に対する細胞毒性の測定	46
2.7.	遺伝毒性の測定	47
第3節	結果	47
3.1.	HPLC分析	47
3.2.	ノイラミニダーゼ阻害活性の測定	52
3.3.	ヒト細胞に対する細胞毒性の評価	53
3.4.	遺伝毒性の測定	54
第4節	考察	56
第5節	結論	58
総括		60
引用文献		61
論文目録		71
	<関連論文>	
	<参考論文>	
謝辞		72

序論

1977年のアメリカでの最初の報告以来 [1]、抗生物質、抗てんかん剤、脂質調節剤、非ステロイド性抗炎症剤、 β 受容体遮断剤、ヨウ素系 X 線造影剤、エストロゲン等の多くの医薬品およびその活性代謝物が河川や湖沼などの表層水や水道水に混入している報告が数多くなされている [2 - 8]。本邦においても、2003年に高田らがこの問題に言及して以来 [9]、この分野の調査・研究が進み、科学的な知見が蓄積されつつある [10, 11]。表層水や水道水から検出される医薬品は、使用されずに廃棄される医薬品、投与後に排泄される医薬品、農水畜産等で使用されたものがその起源であると報告されている [12, 13]。

近年にこの種の研究が多く見られるのは、医薬品の使用量の増大と測定技術の向上によるためと考えられている [14]。また、現在の下水処理施設は生物学的酸素要求量 (BOD : Biochemical oxygen demand) を低下させることを主目的とした活性汚泥法を利用した処理システムであり [15]、医薬品の除去には十分に対応できていないため医薬品が表層水や水道水に混入するものと考えられる。表層水から検出されている医薬品の濃度範囲の多くは ng/L 以下で概して低いものの、表層水に混入した医薬品がヒトの健康や生態系に影響をおよぼす可能性が否定できないことから [16 - 20]、規制に基づいた環境影響評価の実施が望まれている [21, 22]。一方、医薬品の医学的・社会的な便益性の大きさから見ると、評価結果に基づくリスク管理のあり方にも慎重が必要であるとされている [14]。この中で、新技術による医薬品の分解と除去が現実的な環境リスクの軽減策であると期待されており、新しい方法による医薬品の除去効率および代替リスク評価を含めて研究が進ん

でいる [23 - 26]。新しい方法による医薬品の分解と除去の研究では、除去率の向上が水生生物の成長、分化および生殖等への影響の環境リスク [17] の軽減にどれだけ意味をもつか、医薬品の除去・分解によって生成する代替リスクの評価、費用対効果の観点から社会に受容されるかどうかが課題とされている [14]。

筆者らは電気分解法で生成する有効塩素の酸化力で抗がん性抗生物質のエピルビシン塩酸塩が分解されて、細胞毒性および遺伝毒性が減弱されること、また各系統の抗がん剤の混液の細胞毒性が不活性化できることを報告している [27]。さらに、試験管実験で電気分解法が塩化ナトリウム水溶液から簡便に有効塩素を生成して抗がん剤を不活性化したことから、小型化した医療廃液処理装置を作製して病院内に設置できる可能性が示された [27]。

今回の研究では病院内に設置可能なように小型化した医療廃液処理装置を作製して、そこで生成する抗がん剤廃液が低環境負荷かつ低コストで不活性化できるか検証した。さらに、電気分解法が病院内から発生する医療廃液の不活性化に利用可能かを示すためには、排泄物に含まれる医薬品の分解が可能かどうか、抗がん剤以外の医薬品の分解が可能かどうか、医薬品の電気分解によって新たな毒性物質が生じないかどうかを、検討する必要がある。そこで、尿中の抗がん剤、抗菌剤、抗ウイルス薬の電気分解を行った。一方、入院で行われていた薬物療法が医療費抑制の国策に基づき外来治療に移行してきている。医薬品廃液の表層水への混入を減らすためには、在宅で発生する医薬品廃液が不活性化できるかどうかを検討する必要があり、抗ウイルス薬の電気分解を行って不活性化が可能か検討した。

第1章 電気分解法を用いた医療廃液処理装置の評価

第1節 緒言

病院内で発生する医療廃液の中には多くの種類の医薬品が含まれており、この廃液が表層水へ放出されて混入することによってヒトおよび水生生物への影響が懸念されている [28]。抗がん剤も他の多くの医薬品と同様に、下水処理場で除去されないことが報告されている [29]。さらに、表層水に混入した抗がん剤は、生物分解の効率が悪いことも指摘されている [30 - 33]。抗がん剤の毒性である変異原性、催奇形性および発がん性の発現には閾値がないとされており [34]、ヒトや水生生物に対する潜在的な危険性が懸念されている [30 - 33]。このため、抗がん剤の表層水への混入を想定して予測環境中濃度 (PEC : predicted environmental concentration) が試算され、表層水に混入する抗がん剤の濃度を低下させる方法の開発が期待されている [29]。抗がん剤が表層水に混入する前に不活性化する方法として、アメリカ国立衛生研究所 (NIH : National Institutes of Health, USA) ではそのガイドラインで、抗がん剤廃棄物の焼却を推奨しており [35]、多くの先進国は抗がん剤の廃液を焼却処理している [36]。一方、焼却処理は高価な焼却炉が必要であり、膨大なエネルギーを消費して CO₂ の大量発生などの新たな環境負荷を引き起こす可能性がある。このため、IARC (International Agency for Research on Cancer) では、強酸、強アルカリを使用した化学処理を推奨しているが [37]、病院で強酸や強アルカリの取り扱いと保管は推奨されない。その他に、化学処理として次亜塩素酸を初めとした有効塩素による処理が推奨されているが [38, 39]、次亜塩素酸は経時的に分解するこ

とが知られており精度管理が問題となる。筆者らは、塩化ナトリウム水溶液を白金イリジウム複合
体電極で電気分解を行って生成する有効塩素が抗がん剤を分解すること、および細胞毒性ならびに
遺伝毒性を不活性化することを報告した [27]。そこで、本研究ではこの原理を応用した医療廃液処
理装置を作製して、この機器が低環境負荷、低コストで抗がん剤を含む医療廃液を不活性化できる
か否かについて検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1. モデル廃液

医療廃液処理装置の有用性を評価するために、種々の抗がん剤を用いてモデル廃液を調製した。
シクロホスファミド (塩野義製薬)、メソレキセート (ワイス)、5-フルオロウラシル (協和発酵)、
シタラビン (日本新薬)、マイトマイシン C (協和発酵)、ブレオマイシン塩酸塩 (日本化薬)、エピル
ビシン塩酸塩 (ファルマシア・ジャパン)、エトポシド (ブリストル・マイヤーズ)、ビンクリスチン
硫酸塩 (日本イーライリリー)、イリノテカン塩酸塩 (第一製薬)、パクリタキセル (ブリストル・マ
イヤーズ)、およびシスプラチン (日本化薬) を購入した。モデル廃液の組成を Table 1 に記載する。

Table 1 Composition of a model wastewater.

Category	General name	Concentration (mg/L)
Alkylating agents	Cyclophosphamide	100
Antimetabolites	Methotrexate	20
	Cytarabine	100
	Fluorouracil	125
	Mitomycin C	1
Antitumor antibiotics	Bleomycine HCl	1
	Epirubicin HCl	5
	Etoposide	10
Plant pharmaceuticals	Vincristine sulfate	0.5
	Irinotecan HCl	10
	Paclitaxel	3
Platinum pharmaceuticals	Cisplatin	10

2.2. 医療廃液

抗がん剤を含む廃液は、2005年1月から2007年3月まで大阪医科大学附属病院の外来化学療法センターより回収された。粉末の抗がん剤は、添付文書に従って5%ブドウ糖液、0.9%塩化ナトリウム水溶液または注射用水で溶解した残液を回収して内容を記録した。抗がん剤を含む廃液の量は、毎回、2L未満であった。回収された抗がん剤は電気分解するまで、瓶の中で保管された。回収された抗がん剤は、アルキル化剤（シクロホスファミド、イホスファミド）、代謝拮抗剤（メソトレキセート、シタラビン、5-フルオロウラシル、テガフルおよびゲムシタビン塩酸塩）、抗がん性抗生物質（マイトマイシンC、ブレオマイシン塩酸塩、ペプロマイシン硫酸塩、エピルビシン塩酸塩、ドキソルビシン塩酸塩、ダウノルビシン塩酸塩、ミトキサントロン塩酸塩、ピラルビシン）、植物由来医薬品（エトポシド、ビンクリスチン硫酸塩、ビンブラスチン硫酸塩、ビノレルビン、イリノテカン塩酸塩、パクリタキセル、ドセタキセル水和物）、白金製剤（シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン）、および抗体製剤（リツキシマブ、トラスツズマブ）であつ

た。回収された廃液には、抗がん剤が 5 ～ 18 種類含まれていた。

2.3. 医療廃液処理装置の設計

電気分解法を応用した医療廃液処理装置の概略図を Fig. 1 に示した。装置には、耐久性と有効塩素生成能で優れる白金イリジウム複合体電極 (200 x 80 mm) [40] が使用された。装置は直流電源で作動し、廃液プール、電気分解槽から構成され、操作パネルで電気分解と廃液の循環を制御するシステムになっている。電気分解槽と廃液循環チューブには、医薬品や有効塩素に対して耐久性に優れるポリ塩化ビニルが使用された。電気分解は、4.5 V の定電圧、75 A の定電流で行われた。廃液タンク内に注入された廃液は、電気分解槽に流入させて電気分解が行われる。医療廃液は、電気分解槽内で配管チューブを介してポンプ駆動力で循環するシステムとした。電気分解が終了した抗がん剤を含む医療廃液は、電気分解槽内からドレーンを通じて排液される。また、安全システムは、生成した水素ガスを水素ガスセンサーで監視して一定濃度以上であれば、作動して停止する装置を採用した。

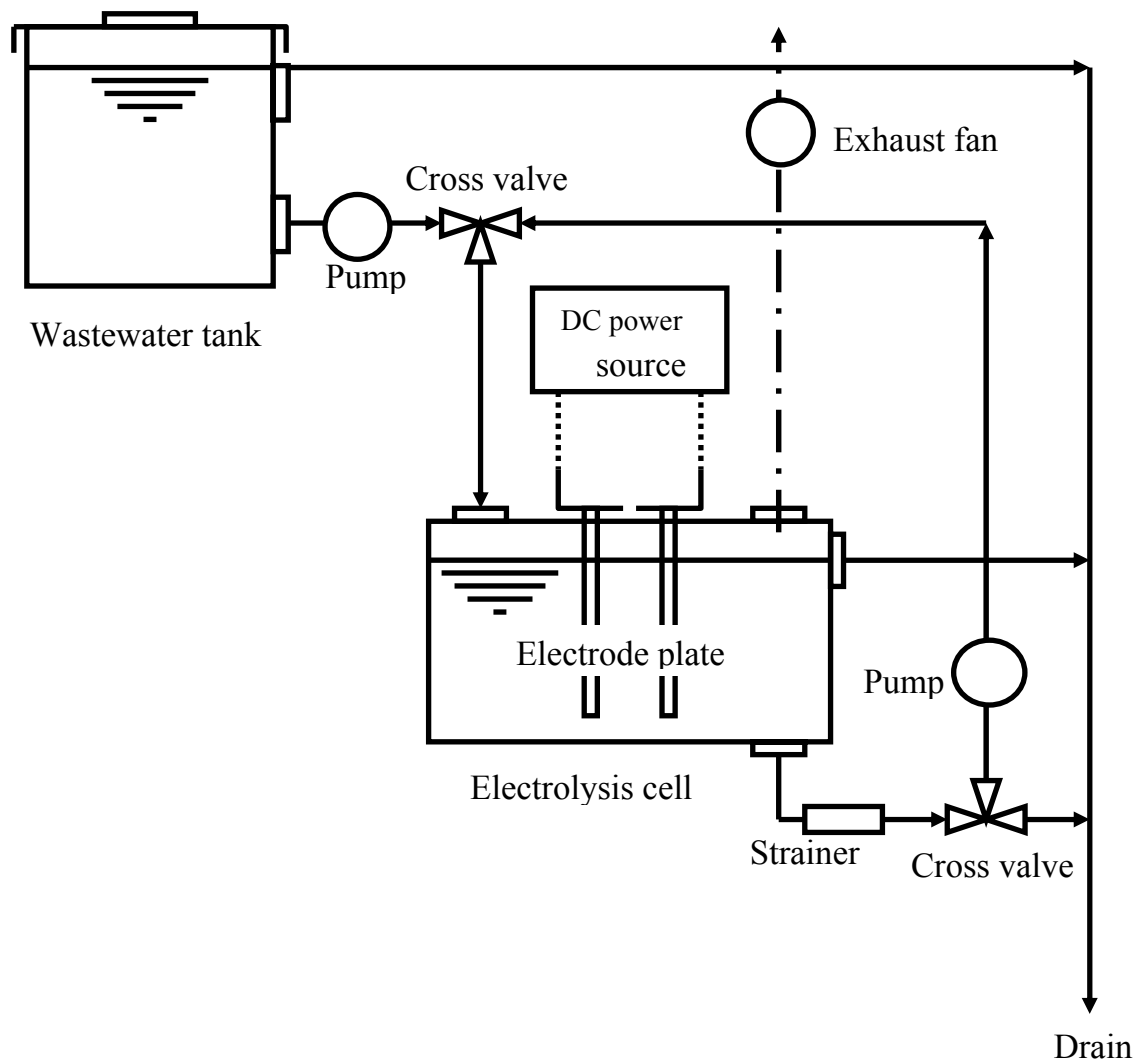


Fig. 1. Design of electrolysis apparatus.

The apparatus consists of an electrolysis cell with platinum-based iridium oxide composite electrode, a pool tank, a circulating system for wastewater, a safety system for explosive gas and overflow, and an exhaust duct.

2.4. 電気分解手順

抗がん剤を含有する 2L 未満の医療廃液を水道水により 13L で希釈した後、塩化ナトリウム 117g を添加して、塩化ナトリウム濃度を 0.9%とした。試料は電気分解前、電気分解 30 分後、60 分後、120 分後に採取された。抗がん剤には界面活性剤等を含んでいるものがあり、廃液の循環に

よって気泡が生成して水位センサーが作動して動作が停止する場合があった。機器の停止時は、消泡剤 (Mushugen AF 800、MUSHUGEN 工業) を適量添加して再稼働させた。

2.5. 細胞毒性の測定

電気分解によって抗がん剤を含む医療廃液が不活性化されるかどうかを検証するため、電気分解前後での細胞毒性を測定した。市販の抗がん剤を購入して調製されたモデル廃液では、Molt-4 細胞および Hela 細胞を用いて細胞毒性試験を実施した。また、医療廃液では Molt-4 細胞を使用した。

Molt-4 細胞を使用した場合には、10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地 (Sigma Aldrich Inc.) で 4 倍に希釈した薬液 50 μ L、 5×10^5 個/mL の細胞浮遊液 50 μ L、および培養液 100 μ L を U 底マイクロプレートで混和して、5% CO₂ インキュベーターで 37 °C、3 日間培養した。3 日後に細胞培養液 100 μ L を平底マイクロプレートに移し、WST-8 細胞計数キット (同仁化学) を 10 μ L 添加して、37 °C、1 時間インキュベートした。Hela 細胞はイーグル MEM 培地 (日水製薬) を使用し、培養液で 4 倍に希釈した薬液 50 μ L、 1×10^5 個/mL の細胞懸濁液 50 μ L、および培養液 100 μ L を平底マイクロプレートで混和して、5% CO₂ インキュベーターで 37 °C、3 日間培養した。培養液 200 μ L に WST-8 細胞計数キット 20 μ L を混合し、37 °C で 1 時間インキュベートした。参照波長 620 nm および測定波長 450 nm におけるプレートの吸光度を光学濃度計 (ImmunoMini NJ-2300、コスモ・バイオ) で測定した。抗がん剤廃液が添加されていないウエルの吸光度の平均値と標準偏差を求めて、これらのウエルの吸光度の “平均値 (Mean) - 2 x 標準偏差 (S.D.)” を計算した。この値 (mean - 2S.D.) 以

上の吸光度であれば「細胞毒性が消失した」と定義した。「細胞毒性が消失した」吸光度に達する希釈倍数の逆数を電気分解前後で比較した。細胞毒性の不活性化率は、「(電気分解前の希釈倍数の逆数) - (電気分解後の希釈倍数の逆数) / (電気分解前の希釈倍数の逆数) x 100 (%)」で示した。

2.6. 電気分解槽から放出されるガスの測定

電気分解槽から放出される塩素、塩酸、水素、硫化水素、フッ化水素、アンモニア、二酸化窒素、窒素酸化物、二酸化塩素、およびシアン化水素の濃度は、ガス検知管 (光明理化学) を用いて測定された。ガスの採取は電気分解前、電気分解開始後 30 分、60 分、90 分、120 分、および電気分解の終了後に実施された。塩素ガスについては 100 mL、その他のガスについては 50 mL が採取された。放出されたガスの安全性は、安全基準 [41, 42] にしたがって評価された。

2.7. 環境負荷および不活性化コストの推定

医療廃液処理装置は、薬剤を不活性化するときの環境負荷を軽減することを目的に作製されており、従来から不活性化法として利用されている希釈法とで環境負荷を比較した。環境負荷の指標は CO₂ の生成量とした。CO₂ の生成量は電力で 1kw/h あたり 0.36 kg、水道水は 1m³ あたり 0.58 kg の換算値 [43, 44] を使用した。コストは実験当時の東京都の公共料金と為替レートを基に、1 kw/h あたり 0.22 USD (United States Dollar)、水道料金は 1 m³ あたり 1.85 USD とした。

第3節 結果

3.1. 医療廃液処理装置の性能評価

筆者らは電気分解の主な作用機序として、白金イリジウム複合体電極の陽極酸化反応で塩素イオンから生成する有効塩素が抗がん剤を酸化分解することと考えている (Fig. 2)。そこで、医療廃液処理装置で有効塩素が十分に生成することを確認するために、0.9% 塩化ナトリウム水溶液の電気分解を行って、有効塩素濃度、pH および水温を測定した。0.9% 塩化ナトリウム水溶液の電気分解によって、3 時間以内に有効塩素は 6,500 mg/L まで増加し、pH は 9.0 ~ 10.0 に上昇した。電気分解槽内の水温は 42.9 ± 1.2 °C に上昇した (Fig. 3)。今回の実験により、電気分解の原理を応用した医療廃液処理装置は、抗がん剤を含む医療廃液を分解できる可能性があることが示された。

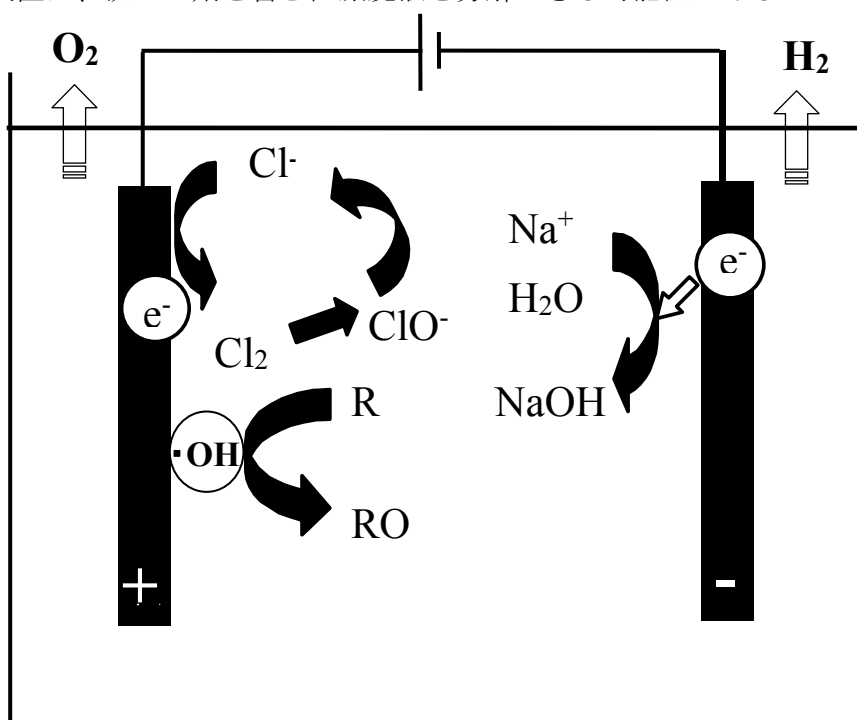


Fig. 2. The hypothetical reactions in the electrolysis apparatus.
Chemical reactions occurred in the apparatus were shown.

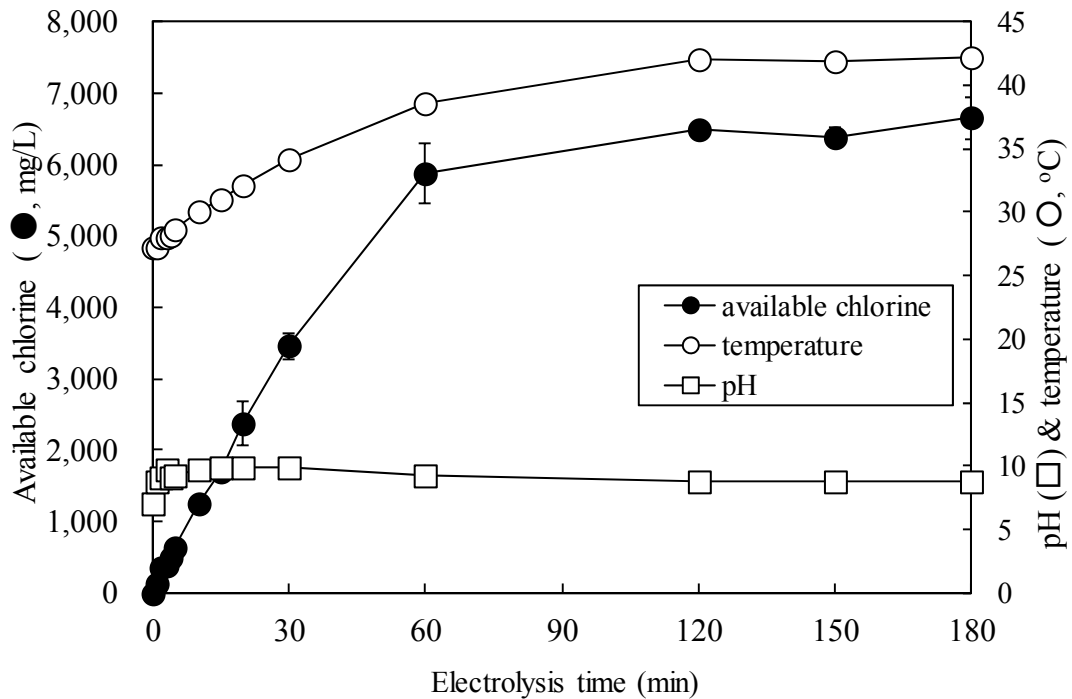


Fig. 3. Concentration of available chlorine, change of water temperature and pH of electrolysis solution.

When 0.9% sodium chloride solution was electrolyzed for 3 h, the generated available chlorine, water temperature and pH were measured.

3.2. 細胞毒性の測定

抗がん剤の毒性には細胞毒性の他、変異原性、催奇形性、発がん性などを関連毒性として挙げる事ができる。筆者らは抗がん剤の化学構造の分解は、変異原性および細胞毒性の不活性化と相関することをエピルビシン塩酸塩を用いて報告しており [27]、医療廃液処理装置の有効性を細胞毒性の不活性化を指標に評価した。

市販の抗がん剤を用いたモデル廃液では、Molt-4 細胞の細胞毒性の消失に対する希釈度の逆数は電気分解前が 9.10×10^4 、電気分解 2 時間後は 3.56×10^2 であり、電気分解によって細胞毒性が 99.6% 減少された。また、Hela 細胞では電気分解前の希釈度の逆数が 2.28×10^4 、電気分解 2 時間

後は 3.56×10^2 となり、電気分解によって細胞毒性が 98.4% 減少された (Fig. 4)。

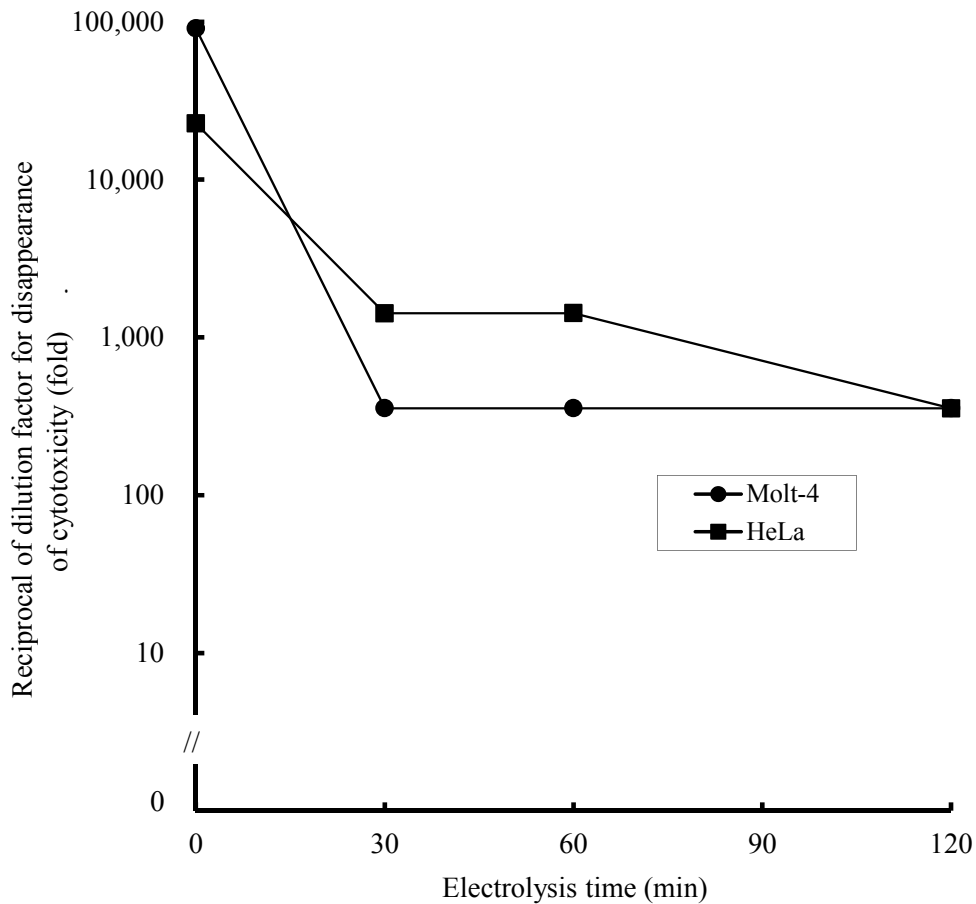


Fig. 4. Relationships between cytotoxicity and electrolysis time in model wastewater.

Model wastewater, whose composition is shown in Table 1, was electrolyzed for 2 h and sampled before electrolysis, and after 30, 60, and 120 min. of electrolysis, and then, reciprocal of dilution factor for disappearance of cytotoxicity was compared.

一方、大阪医科大学附属病院から回収された医療廃液 (N=26) では、細胞毒性の消失に対する希釈度の逆数の分布は、電気分解前に $6.90 \times 10^3 \sim 1.02 \times 10^6$ であり、電気分解 2 時間後は $1.08 \times 10^2 \sim 1.45 \times 10^4$ であった (Table 2)。このことから、抗がん剤を含む廃液の細胞毒性は $94.9 \pm 7.7\%$ が不活性化された。今回、筆者が用いた医療廃液処理装置は、抗がん剤を含む医療廃液の細胞毒性を不活性化できることを明らかにした。

Table 2 Cytotoxicity of clinical wastewater samples using molt -4 cell lines before and after electrolysis

sample No.	Cytotoxicity (the reciprocal of dilution factor for disappearance of cytotoxicity)		Inactivation rate (%)
	before electrolysis	after 2 h of electrolysis	
1	1.02 x 10 ⁶	9.99 x 10 ²	99.9
2	8.66 x 10 ⁵	3.38 x 10 ³	99.6
3	5.38 x 10 ⁵	2.10 x 10 ³	99.6
4	3.94 x 10 ⁵	1.54 x 10 ³	99.6
5	2.30 x 10 ⁵	3.59 x 10 ³	98.4
6	2.08 x 10 ⁵	3.25 x 10 ³	98.4
7	2.07 x 10 ⁵	3.23 x 10 ³	98.4
8	1.80 x 10 ⁵	1.12 x 10 ⁴	93.8
9	1.39 x 10 ⁵	5.43 x 10 ²	99.6
10	1.24 x 10 ⁵	7.74 x 10 ³	93.8
11	1.24 x 10 ⁵	1.93 x 10 ³	98.4
12	1.06 x 10 ⁵	1.66 x 10 ³	98.4
13	7.97 x 10 ⁴	1.25 x 10 ³	98.4
14	6.09 x 10 ⁴	9.51 x 10 ²	98.4
15	5.93 x 10 ⁴	9.27 x 10 ²	98.4
16	5.92 x 10 ⁴	3.70 x 10 ³	93.8
17	5.81 x 10 ⁴	1.45 x 10 ⁴	75.0
18	5.32 x 10 ⁴	2.08 x 10 ²	99.6
19	4.39 x 10 ⁴	2.75 x 10 ³	93.8
20	4.08 x 10 ⁴	2.55 x 10 ³	93.8
21	3.92 x 10 ⁴	9.79 x 10 ³	75.0
22	3.80 x 10 ⁴	5.94 x 10 ²	98.4
23	3.03 x 10 ⁴	4.73 x 10 ²	98.4
24	2.81 x 10 ⁴	7.04 x 10 ³	75.0
25	1.47 x 10 ⁴	9.21 x 10 ²	93.8
26	6.90 x 10 ³	1.08 x 10 ²	98.4
			94.9 ± 7.7

3.3. 装置から放出されるガスの測定

医療廃液処理装置が病院内に設置可能か否かを検証するため、電気分解によって生成される有毒ガス、爆発性ガスを測定した。抗がん剤を18種類（イホスファミド、5-フルオロウラシル、テガフル、メソトレキセート、ゲムシタビン塩酸塩、ピラルビシン、ドキソルビシン塩酸塩、マイトマイシンC、ペプロマイシン硫酸塩、エトポシド、イリノテカン塩酸塩、ビノレルビン、パクリタキセル、ドセタキセル水和物、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン）を含む医療廃液を電気分解した。発生するガスの濃度を測定するために、電気分解前、および電気分解後30分～60分、60分～90分、90～120分で排気口より放出されるガスを採取して測定した。塩素ガス濃度が2.5～3.4 mg/L、二酸化塩素ガス濃度が4.0～4.4 mg/Lであり、基準値を超えていた (Table 3)。一方、他のガスは検出されなかったか、または基準値よりも低いレベルであった。基準値を超えた塩素ガスと二酸化塩素ガスは、医療廃液処理装置に排気ダクトを装着して大気中に放出することで除去可能であった。このことより、筆者が用いた医療廃液処理装置は病院内で安全に稼働できるものと考えられた。

Table 3 Toxic gases generated from electrolysis cell.

Gases	Unit	Before electrolysis	30~60 min	60~90 min	90~120 min	Occupational exposure limits*
Cl ₂	mg/L	N.D.	2.5 ± 0.4	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.1	0.5
HCl	mg/L	N.D.	4.5 ± 0.3	4.0 ± 0.2	1.7 ± 0.2	5
H ₂	%	N.D.	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.04	-
H ₂ S	%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5
HF	mg/L	N.D.	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	3
NH ₃	%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	25
NO ₂	mg/L	N.D.	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	3
Nox	mg/L	N.D.	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.1	25
ClO ₂	mg/L	N.D.	4.4 ± 0.8	4.3 ± 0.5	4.0 ± 0.3	0.1
HCN	mg/L	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5

N.D. : Not detectable

*The occupational exposure limits (J. Occup. Health, 2004), except those of NO₂, NO_x and ClO₂ TLV (ACGIH, 2002) was used as safety standards.

3.4. 環境負荷および不活性化コストの試算

電気分解法を用いて抗がん剤を含む医療廃液の毒性を不活性化する場合と水道水で希釈して電気分解時と同じレベルまで毒性を減弱させる場合で、モデル廃液を対象としてCO₂の産生量を指標に環境負荷を評価した。同時に、その時の処理経費も試算した。電気分解法では、モデル廃液を処理するときに電力消費が0.675 kWh、水道水は0.16 m³が必要であり、CO₂は0.34 kg 産生される試算となった。一方、希釈法では水道水が40.95 m³ 必要で、CO₂は23.75 kg 産生される試算となった。電気分解法と希釈法の処理経費の比較では、電気分解法で0.44 USD、希釈法が75.85 USDであった。電気分解法を利用した医療廃液処理装置は、抗がん剤を含む廃液の処理において、環境負荷と経済面で優れていることが明らかとなった。

第4節 考察

医療廃液処理装置は Hirose らの報告 [27]に基づいて設計され、抗がん剤を含む医療廃液を不活性化する場合には希釈法と比較して、環境負荷が少なく経済面においても優れていることが明らかになった。医療廃液処理装置はpH 9.0 ~ 10.0 で安定して有効塩素を生成させた。白金イリジウム複合体電極を使用した電気分解では、塩素イオンが陽極での酸化反応により塩素分子 (有効塩素) となり、塩素分子が水と反応して次亜塩素酸が生成され、この次亜塩素酸が抗がん剤を酸化分解する。この反応に伴い次亜塩素酸は、塩素イオンに還元される。還元された塩素イオンが連続的に陽極で再酸化されて抗がん剤を酸化分解することが、電気分解法による不活性化の主要なメカニズム

であると推定している (Fig. 2)。

抗がん剤を次亜塩素酸で分解することに対して、Castegnaro らは 5.25% 次亜塩素酸ナトリウムで抗がん剤を効率的に不活性化できると報告している [38]。一方、Hansel らは医療廃液中に含まれるデキストロースなどが次亜塩素酸による不活性化を妨害すると指摘している [39]。また、次亜塩素酸ナトリウムは経時的に分解する不安定な物質であるために、抗がん剤を安定的に不活性化することは困難であると考えられる。電気分解法では、装置内の塩化ナトリウム水溶液の塩素イオンの継続的な酸化によって高濃度の有効塩素を生成するため (Fig. 3)、抗がん剤を含む廃液を安定に不活性化することが可能であった。

抗がん剤を含む医療廃液の毒性を減少させる別の方法としては、大量の水道水で希釈した後に下水道に廃棄する方法がある。希釈法は、電気分解法と比較して約 70 倍以上の CO₂ を発生させ、170 倍の処理経費を必要とした。このため、電気分解法は希釈法と比較して環境負荷と費用対効果の面で有利であると考えられた。また、焼却処理では大量の CO₂ の産生が予測され、環境負荷の点から電気分解法に劣るものと考えられた。

抗がん剤の投与が外来で実施されており、抗がん剤を含む医療廃液の回収が容易な状況となっている。電気分解法を応用した医療廃液処理装置は、環境負荷軽減と費用対効果の観点から病院内で発生した調製後の抗がん剤の処理に有用な方法になるものと考えられた。

第5節 結論

電気分解法を応用した医療廃液処理装置は、病院内で発生する抗がん剤を含む廃液を不活性化する場合、希釈法や焼却法と比較して環境負荷と経費の面で優越性があった。表層水に混入する抗がん剤の発生源には調製後の廃液だけではなく、患者に投与後に糞尿中から活性体として排泄される薬剤がある。“電気分解法が抗がん剤を含む廃液を不活性化して環境リスクを低減させる可能性がある”ことを検証するために、排泄物に含まれる抗がん剤を不活性化できるか否かについて検討する必要がある。

第2章 電気分解法による尿中抗がん剤の不活性化に関する研究

第1節 緒言

表層水で検出されている医薬品は、使用されずに廃棄される医薬品、投与後に患者から排泄される医薬品、および農水畜産等で使用されたものがその起源であると考えられている [12, 13]。一方、抗がん剤では、使用されずに廃棄される医薬品、および患者に投与後に排泄される医薬品が主となる。使用されずに廃棄される抗がん剤は、アメリカ国立衛生研究所 (NIH : National Institutes of Health, USA) のガイドライン [35] にしたがって、多くの国で焼却処理が実施されている [36]。一方、ヒトに投与された後に活性体として排泄される抗がん剤は、外来化学療法が中心となった現在では発生源が分散し、体内からの排泄時間にも個人差があり、回収が困難なために焼却処理で不活性化することは不可能である。

筆者らは白金イリジウム複合体電極を用いた電気分解法で、抗がん剤を含む医療廃液の不活性化が可能であることを報告した [27]。さらに、筆者らのこれまでの研究に基づいて作製した医療廃液処理装置が、医療廃液中の抗がん剤を不活性化できることを第1章で示したが [45]、電気分解法が排泄物に含まれる抗がん剤を不活性化できるかどうかについては明らかにしていない。そこで、電気分解法が、尿中の抗がん剤の細胞毒性の減弱と濃度を低下させることが可能か否かについて検討した。

第 2 節 実験材料および方法

2.1. 試薬および試料の調製

抗がん剤は、メソトレキセート (以下 : MTX) (Calbiochem Co.) を購入して使用した。MTX の構造を Fig. 5 に示した。

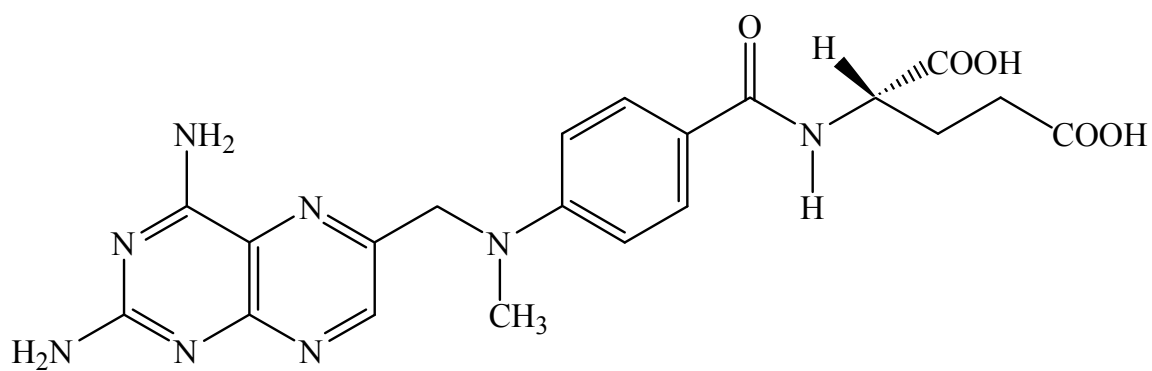


Fig. 5. Structure of methotrexate.

実験に使用した尿は、健常成人男性から提供された。尿を超純水で希釈し、MTX の濃度が 880.2 μM となるように調製した。有効塩素の生成能を高めて細胞毒性試験において浸透圧の影響を最小限に抑えるために、各 250 mL の検体に 2.25 g の塩化ナトリウムを加えて 0.9% 濃度として実験試料に用いた。MTX 添加検体については、電気分解後に MTX の濃度と細胞毒性を測定した。MTX を加えていない希釈した尿は、電気分解によって生成する有効塩素濃度と尿に含まれる有機化合物の含量の測定に使用された。

2.2. 有効塩素の測定

有効塩素濃度は、吸光光度法を原理とした機器 (RC-2Z、笠原理化工業) で測定された。

2.3. 電気分解の手順および有効塩素の中和

300 mL のガラス製ビーカーに試料 250 mL を入れ、白金イリジウム複合体電極 (115 x 35 mm、電極間距離 : 5 mm) を用い、1 A の定電流、3.5 V ~ 4.0 V の定電圧で電気分解を行った。細胞傷害性のある有効塩素を中和するために 20% (w/v) チオ硫酸ナトリウム 30 μ L を電気分解検体 210 μ L に添加した。電気分解後、検体は測定まで -20 $^{\circ}$ C で保管された。

2.4. 希釈した尿の吸収スペクトル

電気分解前後の尿検体を超純水で 50 倍に希釈した。希釈した試料の 200 ~ 800 nm の極大吸収は、UV-VIS Spectrophotometer (UV-160A、島津製作所) により測定された。

2.5. メソトレキセートの濃度測定

MTX の濃度は、蛍光偏光免疫測定 (FPIA) 法の原理を用いた TDX-メソトレキセート Dynapack II (アボットジャパン) により測定された。最小測定濃度は、0.02 μ M であった [47]。

2.6. 細胞毒性の測定

Molt-4 細胞は、10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地 (Sigma Aldrich Inc.) で 4 倍に希釈された薬液 50 μL 、 5×10^5 個/mL の Molt-4 細胞浮遊液 50 μL 、および培養液 100 μL を U 底マイクロプレートで混和して、5% CO_2 インキュベーターで 37 $^\circ\text{C}$ 、3 日間培養された。3 日後に細胞培養液 100 μL を平底マイクロプレートに移し、WST-8 細胞計数キット 10 μL (同仁化学) を添加して、37 $^\circ\text{C}$ 、1 時間インキュベートした。参照波長 620 nm および測定波長 450 nm におけるプレートの吸光度を、光学濃度計 (ImmunoMini NJ-2300、コスモ・バイオ) によって測定された。Molt-4 細胞の 50% 生存率である 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) は、電気分解液の入っているウエルの吸光度を電気分解液の入っていないウエルの吸光度で割って求めた。 CC_{50} 値の変化を電気分解による細胞毒性の活性化の指標とした。

第 3 節 結果

3.1. 有効塩素生成量の測定

尿存在下において、電気分解法によって有効塩素が生成するかどうかを調べるため、超純水で 2 倍、4 倍、8 倍に希釈し、塩化ナトリウムを添加して 0.9% 濃度とした尿を電気分解して、有効塩素の濃度を測定した。また、0.9% 塩化ナトリウム水溶液で生成する有効塩素を測定した。0.9% 塩化ナトリウム水溶液では、有効塩素濃度は電気分解開始から 2 時間まで増加し、その後は約 3,000

mg/L で定常化した。超純水で希釈した尿を電気分解した場合、有効塩素の濃度は2倍希釈尿では電気分解4時間後に、 168 ± 18.9 mg/L であり、4倍希釈尿では 345 ± 5.00 mg/L であった。8倍希釈した尿検体では、有効塩素濃度は電気分解2時間以降に急激に増加し、電気分解4時間後には 3010 ± 156.0 mg/L まで上昇した (Fig. 6)。これらの結果から、生成した有効塩素は直ちに尿中の化学物質と反応して還元されたものと考えられた。そこで、電気分解によって尿中の物質が分解されたことを確認するために、尿検体の吸収スペクトルを測定した。200 ~ 800 nm における吸収スペクトルを測定し、200 ~ 300nm に極大吸収が検出された。この中では、230 ~ 300 nm の化学物質が電気分解の影響を受けることが明らかとなり、230 ~ 300 nm の吸収スペクトル曲線下面積 (area under the spectrum curve) を測定した。電気分解前には、2倍、4倍、8倍に希釈した尿中物質の含量を示す吸収スペクトル曲線下面積は、それぞれ、45.82、22.84、12.48 であった。電気分解によってこの値は時間依存的に低下して電気分解の4時間後に、それぞれ29.89、8.81、1.13 に減少した (Fig. 7)。この結果から、8倍希釈の尿では230 ~ 300nm の極大吸収を有する尿成分も電気分解でほぼ完全に分解されたことが明らかとなった。また、2倍希釈尿および4倍希釈尿では尿成分が残存しており、残存量は2倍希釈尿の方が多かった。有効塩素の残存量が多くなると (Fig. 6)、尿成分の残存量が減少した (Fig. 7)。この現象は生成した有効塩素が残存している尿成分を酸化分解して塩素イオンになり、酸化対象の尿成分が消失すると有効塩素として蓄積していくと考えると説明可能である。

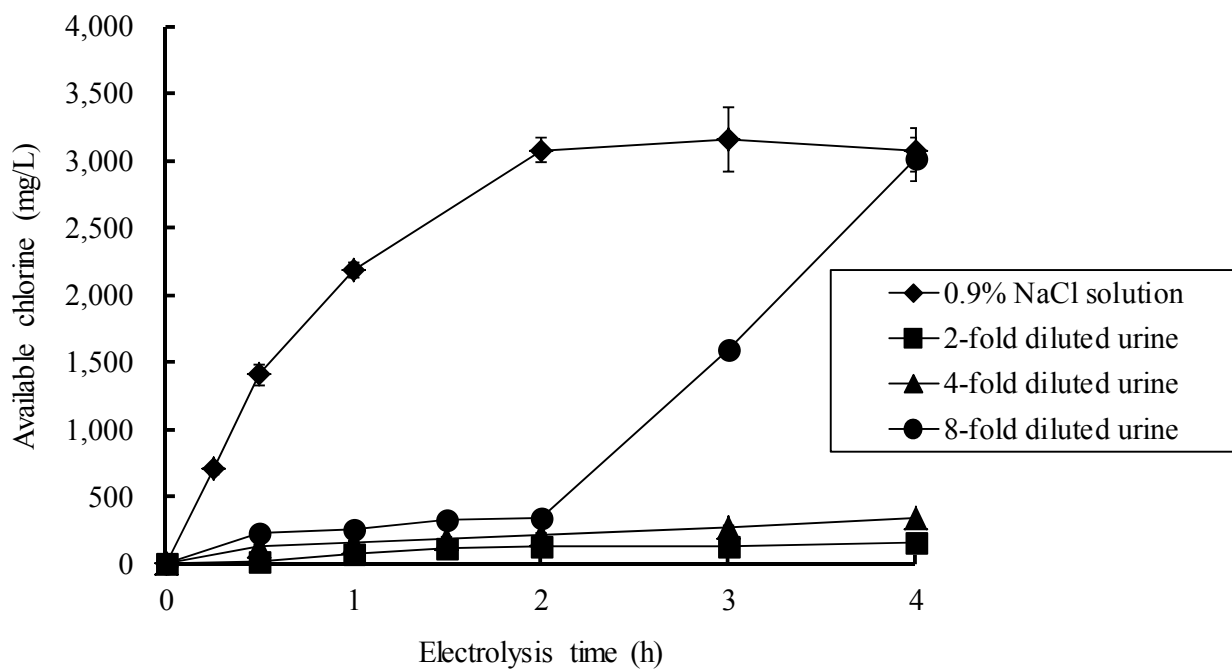


Fig. 6. Generation of available chlorine in the presence of urine.

Concentrations of available chlorine after electrolysis in the presence of one-half, one-fourth and one-eighth part volumes of urine were compared with that after electrolysis of saline. Data from three independent experiments are shown.

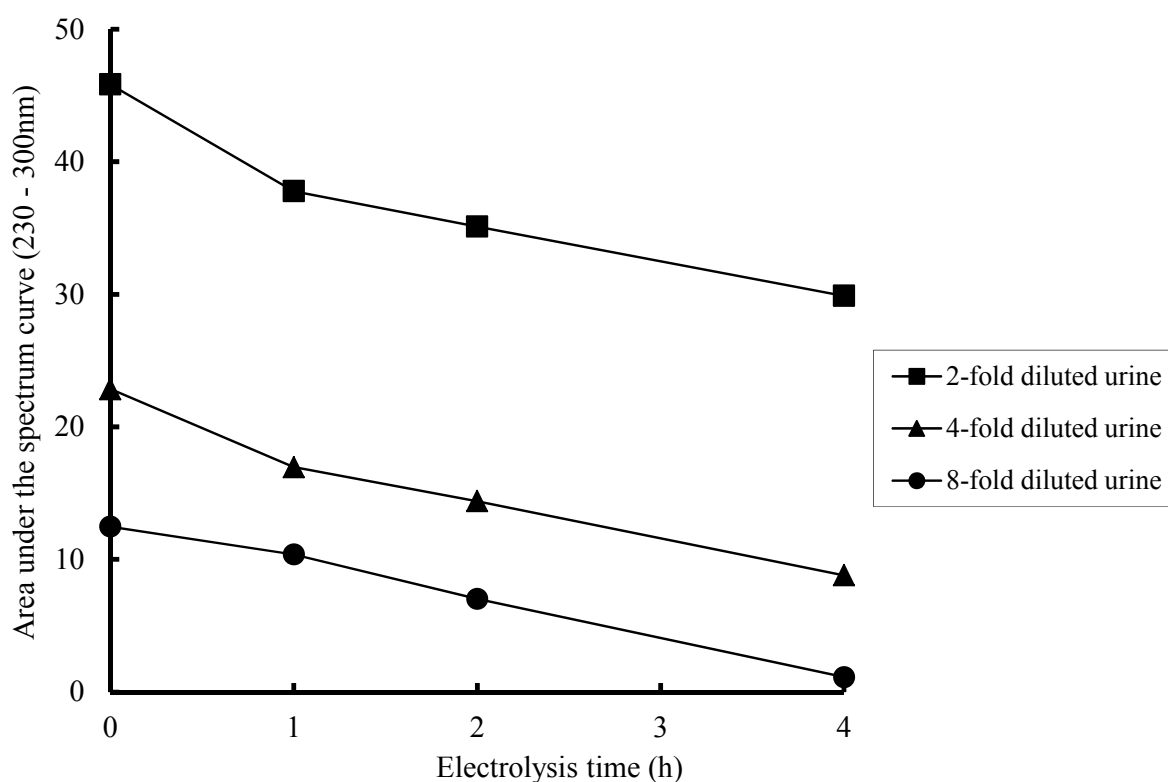


Fig. 7. The area under the spectrum curve between 230 and 300 nm of diluted urine.

The absorbance of each diluted urine was measured before electrolysis and 1 h, 2 h and 4 h of electrolysis, respectively. The area under spectrum curve between 230 and 300 nm was calculated, and the amount of urinary content was represented as the index.

3.2. 尿によるメソトレキサートの分解阻害

MTX 濃度は、TDX-メソトレキサート Dynapack II (アボットジャパン) で測定された。キットは血漿または血清中の MTX 濃度を測定するために設計されているので、尿中の MTX の濃度を正確に測定できるか否かについて、880.2 μM の MTX を 10 倍ごとに希釈し、0.0880 μM までの範囲で検量線を作成して検討した。希釈溶媒は、超純水に塩化ナトリウムを添加して 0.9% 濃度とした溶液、その電気分解中和液、超純水で 2 倍希釈した尿に塩化ナトリウムを添加して 0.9% 濃度とした

溶液および、その電気分解中和液が使用された (Fig. 8)。相関係数 (R) は、全ての溶液に対して 0.999 以上であった。したがって、FPIA キットを用いることにより、今回用いた検体の MTX 濃度を正確に測定できることが示された。さらに、尿成分が MTX の分解を阻害するかどうかを調べるために、880.2 μM の MTX を含む尿希釈液の電気分解を行った。電気分解によって各溶液中の MTX 濃度は時間依存的に減少した。0.9% 塩化ナトリウム水溶液では、MTX 濃度は電気分解 1 時間後に測定限界以下となった。2 倍希釈尿および 4 倍希釈尿では、4 時間の電気分解後に、MTX 濃度はそれぞれ 11.8 μM および $0.18 \pm 0.09 \mu\text{M}$ に低下した。8 倍希釈尿では、MTX 濃度は電気分解 4 時間後に測定限界以下に減少した (Fig. 9)。

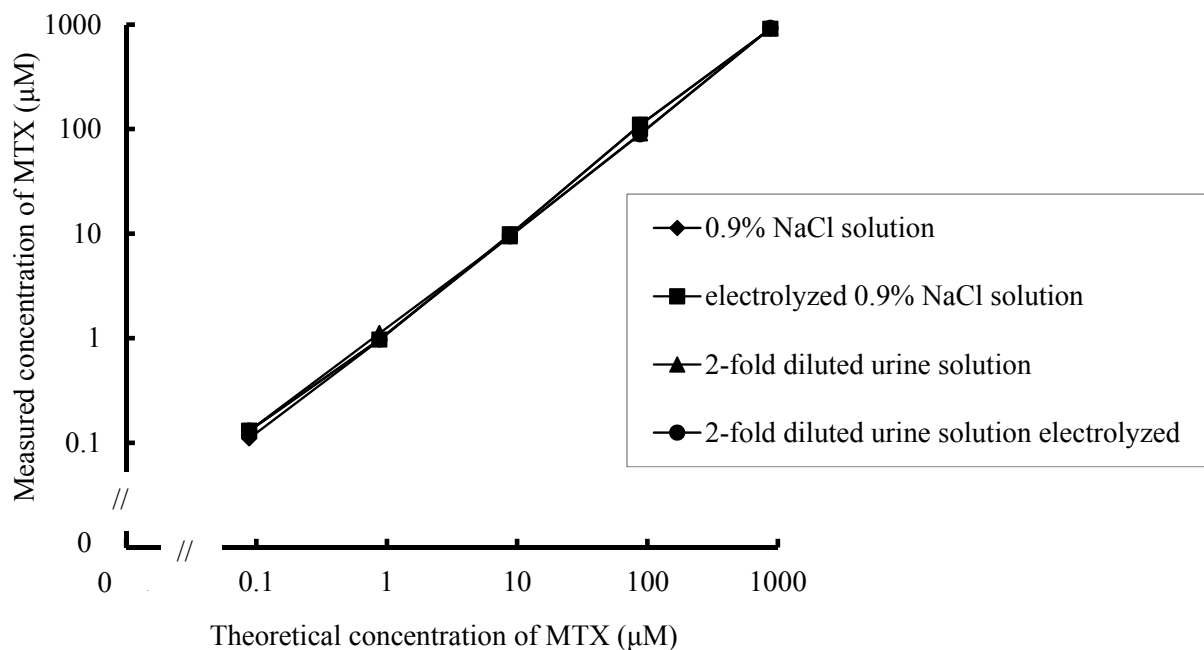


Fig. 8. Generation of calibration curves for MTX concentration determined by FPIA method.

MTX (880.2 μM) was diluted with 0.9% NaCl solution, electrolyzed 0.9%NaCl solution, 2-fold-diluted urine, and 2-fold-diluted urine electrolyzed 10-fold, and each of the calibration curves was shown.

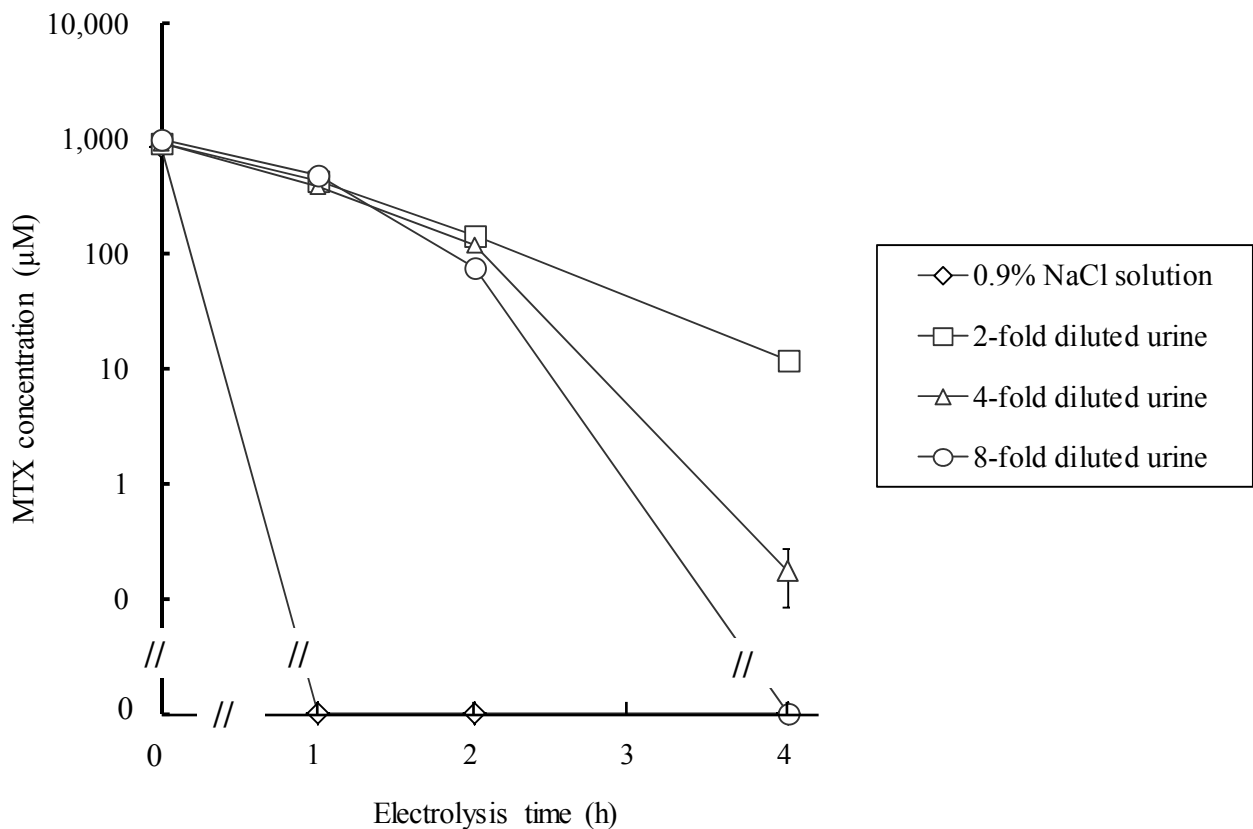


Fig. 9. The destruction of MTX by electrolysis in the presence of urine.

MTX concentrations after electrolysis in the presence of half, quarter, or one-eighth part volume urine were measured by the FPIA method, and compared with those in the absence of urine and with unelectrolyzed sample. Data from two independent experiments are shown.

3.3. メソトレキセートを含む尿の電気分解による細胞毒性の変化の測定

尿の存在下で MTX が不活性化されるかどうかを確認するために、MTX を含む尿希釈液を電気分解した。2 倍希釈尿および 4 倍希釈尿の MTX の CC_{50} 値は、電気分解 4 時間後にそれぞれ $1.993 \pm 0.042 \mu\text{M}$ および $11.173 \pm 8.442 \mu\text{M}$ であった。8 倍希釈尿液に混和された MTX の CC_{50} 値は、0.9% 塩化ナトリウム水溶液の場合と同様に、電気分解 4 時間後に測定限界に達した (Table 4)。

Table 4 CC₅₀ values of MTX before and after electrolysis.

conditions	Solvent/CC ₅₀ (μM)			
	0.9% NaCl solution	2-fold-diluted urine	4-fold-diluted urine	8-fold-diluted urine
Before electrolysis	0.104 ± 0.009	0.079 ± 0.007	0.085 ± 0.014	0.034 ± 0.001
4 h of electrolysis	106.3 ± 7.724	1.993 ± 0.042	11.173 ± 8.442	142.3 ± 24.56

Data from three independent experiments are shown. CC₅₀, 50% cytotoxic concentration.

第 4 節 考察

電気分解法で尿中の抗がん剤を不活性化できるかどうかを明らかにするために、本研究を実施した。電気分解法は塩素イオンから有効塩素を生成させて、尿存在下でも MTX を分解して細胞毒性を減弱することが示された。また、尿成分は有効塩素を消費して MTX の分解反応を阻害したが、尿を希釈することによってこの問題は解決された。

抗がん剤には投与後に活性体として患者から排泄される薬剤があり、MTX は約 90%が 24 時間以内に尿中から未変化体で排泄されることが報告されている [46]。このため、MTX が尿中から排泄される抗がん剤のモデル薬剤として使用された。薬理活性のある抗がん剤が表層水に混入している危険に対して、混入を防止する適切な方法の開発が必要とされている [29]。下水処理場の排水中に含まれる医薬品が表層水に混入するのを防止するために、活性汚泥法以外の様々な機序の装置の有用性が検討されている [22 - 25]。Hirose らは、電気分解法が抗がん性抗生物質のエピルビシン塩

酸塩を分解してその毒性を不活性化できること、および様々な範疇の抗がん剤の混合液の毒性が不活性化されることを *in vitro* で証明し [27]、筆者らはこの技術を応用した医療廃液処理装置を作製して、抗がん剤廃液を低環境負荷かつ低コストで毒性が不活性化できることを示した [45]。電気分解法は、排泄物に含まれる抗がん剤も分解できる可能性が示された。

第 5 節 結論

電気分解法では尿が混入すると尿成分も同時に分解されるため、MTX の分解が遅延するが尿成分を希釈することで MTX を分解することができた。また、連続的に有効塩素を生成する電気分解法の作用機序から考えて、電気分解時間を延長することでも高含量の排泄物に含まれる抗がん剤を分解することが期待できる。また、尿成分で分解される化合物は 230 ~ 300 nm に極大吸収を有する物質であり、電気分解は化学物質の構造に依存して分解反応を行っているものと考えられた。したがって、電気分解で抗がん剤以外にも分解される医薬品があるものと考えられた。そこで、主に病院内で使用され表層水に混入することで水生生物への影響や薬剤耐性細菌の出現が懸念されている抗菌剤注射剤の電気分解を行うこととした。

第3章 電気分解法による抗菌剤の不活性化に関する研究

第1節 緒言

近年の化学物質の測定技術の向上にともなって、抗菌剤が表層水から検出されている [2 - 11]。抗菌剤も抗がん剤と同様に表層水中で安定であり、強い薬理活性を保持して生態系に影響をおよぼす可能性が指摘されている [48 - 50]。抗菌剤の水生生物へのリスクとして、水生細菌叢に影響をおよぼす可能性 [51, 52]、水生環境中に生息する細菌が抗菌剤に曝露されることで耐性化して病原性のある細菌に耐性遺伝子を獲得させることが懸念されている [53]。実際に、抗菌剤耐性菌が河川水や湖沼水の中から分離されている [54]。下水処理場でも低濃度の抗菌剤を含む廃液が流入することにより、そこで生息する多くの細菌が死滅して [55 - 57]、細菌の選択が生じて薬剤耐性菌が誘導されることが懸念されている [58 - 60]。筆者らはすでに、抗がん剤を電気分解することにより抗がん剤の分解と不活性化が可能であることを示した [27]。さらに、医療廃液処理装置を作製して抗がん剤を含む医療廃液の不活性化を行ない、この処理装置は低環境負荷および低コストであることも示した [45]。また、電気分解法は尿中の抗がん剤の不活性化にも利用できる可能性があることを報告した [61]。近年、電気分解法では BDD (Boron Doped Diamond) 等の多くの材質の電極の比較・検討がなされ、非ステロイド性抗炎症剤、脂質代謝改善剤等の医薬品の分解にも有用であることが報告されている [62 - 64]。電気分解法の原理は陽極酸化反応であり、白金イリジウム複合体電極を使用した電気分解法においても、抗がん剤以外の薬剤の分解が可能であると考え、抗菌剤の電気分解

を行った。

第2節 実験材料および方法

2.1. 抗菌剤

実験には、医療用として使用されるベンジルペニシリンカリウム (PCG、明治製菓)、セファゾリンナトリウム水和物 (CEZ、アステラス)、イミペネム水和物/シラスタチンナトリウム (IPM/CS、万有製菓)、アミカシン硫酸塩 (AMK、萬有製菓)、ホスホマイシンナトリウム塩 (FOM、明治製菓)、バンコマイシン塩酸塩 (VCM、塩野義製菓)、ミノサイクリン塩酸塩 (MINO、ワイス)、クロラムフェニコールコハク酸ナトリウム塩 (CP、第一三共)、エリスロマイシンラクトビオン酸 (EM、アボットジャパン)、およびシプロフロキサシン (CPFX、バイエル薬品) が選択された。各薬剤は 0.9% 塩化ナトリウム水溶液で溶解および希釈されて電気分解が行われた。

2.2. 薬剤の電気分解と有効塩素の中和

300 mL のガラス製ビーカーに 200 mL の試料を入れて、白金イリジウム複合体電極 (50 x 35 mm、電極間距離 : 5 mm) で電気分解を実施した。電気分解は 700 mA の定電流、4 A/dm² の電流密度の条件下で行った。電気分解で生成した有効塩素を除去するために、電気分解サンプル 10 mL に 20% チオ硫酸ナトリウム 500 μL (w/v) を添加した。添加されたチオ硫酸ナトリウム溶液の濃度は、残

留した有効塩素が抗菌活性および細胞毒性に影響を与えないように決定された。

2.3. 抗菌活性の測定

日本化学療法学会が規定した微量液体希釈法 [65] に準じ、最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration) を測定した。MIC 測定には、*Staphylococcus aureus* FDA209P (*S. aureus*) および *Escherichia coli* NIHJ JC-2 (*E. coli*) を被検菌として使用した。Mueller-Hinton broth (栄研化学) で連続希釈した薬液 100 μ L、細菌懸濁液 5 μ L、および McFarland #0.5 5 μ L を U 底プレートに加え、35 $^{\circ}$ C、18 ~ 24 時間インキュベートした。肉眼的に濁りや沈殿物が観察できなかった場合、または 1 個の沈殿物が直径 1 mm 未満であった場合は、“増殖なし” と判定した。混濁または直径 1 mm 以上の沈殿物が観察された場合、または直径 1mm 未満でも複数の沈殿物が観察された場合は、“増殖あり” と判定した。

2.4. ヒト細胞に対する細胞毒性の測定

Molt-4 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地 (Sigma Aldrich Inc.) で 4 倍に希釈された薬液 50 μ L、 5×10^5 個/mL の Molt-4 細胞遊液 50 μ L、および培養液 100 μ L を U 底マイクロプレートに加えて、5% CO₂ インキュベーターで、37 $^{\circ}$ C、3 日間培養された。3 日後に細胞培養液 100 μ L を平底マイクロプレートに移し、WST-8 細胞計数キット (同仁化学) 10 μ L を添加して、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。参照波長 620 nm および測定波長 450 nm におけるプレートの吸光度を、

光学濃度計 (ImmunoMini NJ-2300、コスモ・バイオ) で測定した。Molt-4 細胞の 50% 生存率である 50% cytotoxic concentration (CC₅₀)は、電気分解液の入っているウエルの吸光度を電気分解液の入っていないウエルの吸光度で割って求めた。CC₅₀の変化を電気分解による細胞毒性の不活性化の指標とした。

2.5. 抗菌剤とその分解の分析

AMK の分解過程を追跡する目的で、電気分解された AMK 溶液をイオンクロマトグラフィー (IC)、全窒素分析 (TN)、および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。電気分解された AMK に、Na₂CO₃ および NaHCO₃ がそれぞれ 1.8 mM、1.7 mM になるように加えて IC を行った。分離カラム (IonPac AS4A-SC、ダイオネクス)、およびガードカラム (IonPac AG4A-SC、ダイオネクス)を用い、流速 1.2 mL/min の条件下で行った。HPLC 分析は、10 μL の検体を Wakopak Navi C22-5 column (4.6 x 250 mm、島津製作所) を装着した LC-VP (島津製作所) を用いて行った。なお、50mM NH₄PF₆ 溶液を移動相として用い、40 °C、1.0 mL/min の流速で分離し、210 nm で検出した。有機窒素含有量は、全窒素分析 (TN-30 型、三菱化学) によって得られた全窒素含有量から、IC によって求められた NO₂、NO₃ および NH₄⁺由来の窒素を差し引いて算出された。PCG、CEZ、IPM/CS、VCM、MINO、CP、EM、および CPFX の含量は、分光光度計 (V-570、日本分光) を用い、それぞれ 222 nm、270 nm、300 nm、280 nm、352 nm、275 nm、210 nm および 276 nm の波長で測定された。FOM は可視・紫外光を吸収しないことから、日本薬局方第 15 改訂に準拠してモリブデンブルー法によるカラー

化を行い [66]、分光光度計を用いて 740 nm で含量を測定した。すべての測定は検量線法に基づいて実施した。

第 3 節 結果

3.1. アミカシン硫酸塩の電気分解

電気分解によってアミカシン硫酸塩 (AMK) が不活性化および分解されているかどうかを明らかにするため、MIC 測定によって抗菌活性の測定を行い、HPLC により濃度測定を行った。電気分解されていない AMK の MIC は、*S. aureus* に対して 0.195 $\mu\text{g/mL}$ 、*E. coli* に対して 3.125 $\mu\text{g/mL}$ であった。電気分解 3 時間後の MIC は、*S. aureus* に対して 50 $\mu\text{g/mL}$ 、*E. coli* に対しては >100 $\mu\text{g/mL}$ であった。したがって、AMK の抗菌活性は、電気分解 3 時間後に 99% 以上消失したことが明らかとなった (Fig. 10)。

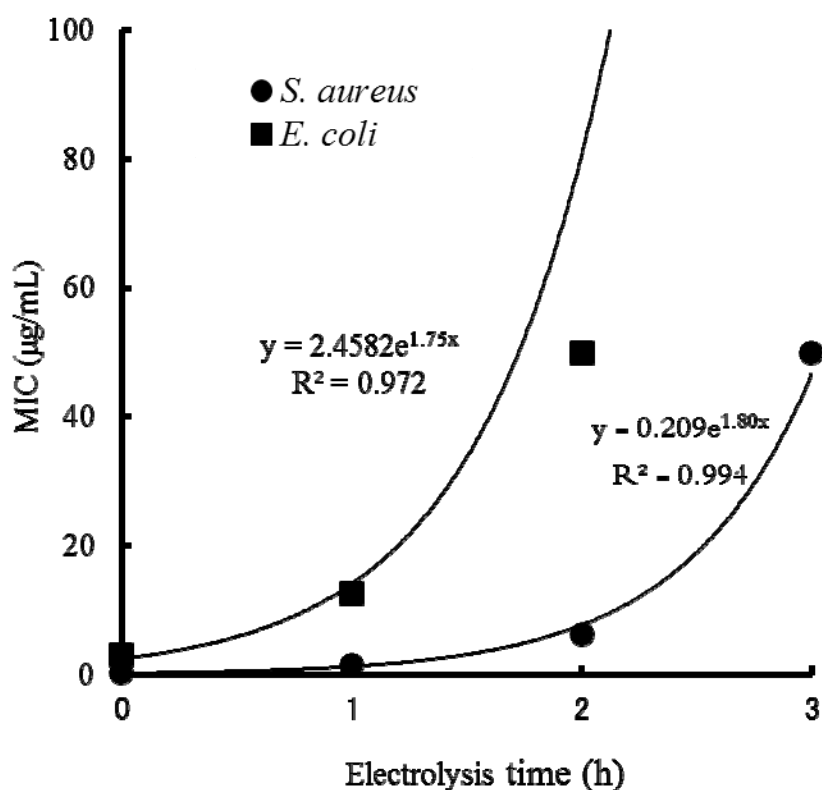


Fig. 10. Relationship between electrolysis time and MIC of AMK.

AMK (amikacin sulfate) solution was electrolyzed, and the MIC (minimum inhibitory concentration) for *S. aureus* and *E. coli* was measured. R^2 : coefficient of determination.

電気分解によって、1時間後に約90%のAMKが分解され、電気分解3時間後に99%が消失したことがHPLC分析で明らかとなった (Fig. 11)。さらに、AMK濃度の減少は、抗菌活性の不活性化と良く相関していた (Fig. 10 と Fig. 11)。AMKは炭素と結合した窒素を含有しており、全窒素分析とイオンクロマトグラフィーによって分解過程を推定することができる。AMKが電気分解により低分子の無機窒素に分解されることを確認するために、無機窒素である NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ をイオンクロマトグラフィーで測定した。電気分解前のAMK溶液は全窒素分析で80 mg/Lの有機

窒素を含有していることが示され、無機窒素は検出されなかった (Fig. 11)。AMK 電気分解液では、有機窒素含有量は電気分解によって減少し、電気分解 1 時間後に 18.2 mg/L、2 時間後に 10.7 mg/L、3 時間後に 0 mg/L であった。無機窒素の NO_3 は、電気分解 1 時間、2 時間、3 時間後にそれぞれ 2.4 mg/L、8.6 mg/L、および 17.0 mg/L であり時間依存的に増加した。 NH_4^+ はそれぞれ電気分解 1 時間、2 時間、3 時間後に 9.1 mg/L、13.4 mg/L、および 17.8 mg/L で時間依存的に増加した。各試料中の NO_2 の無機窒素含量は、測定限界以下であった。電気分解は AMK を有機分子から無機分子、高分子から低分子に分解することが、全窒素分析およびイオンクロマトグラフィーで明らかになった。

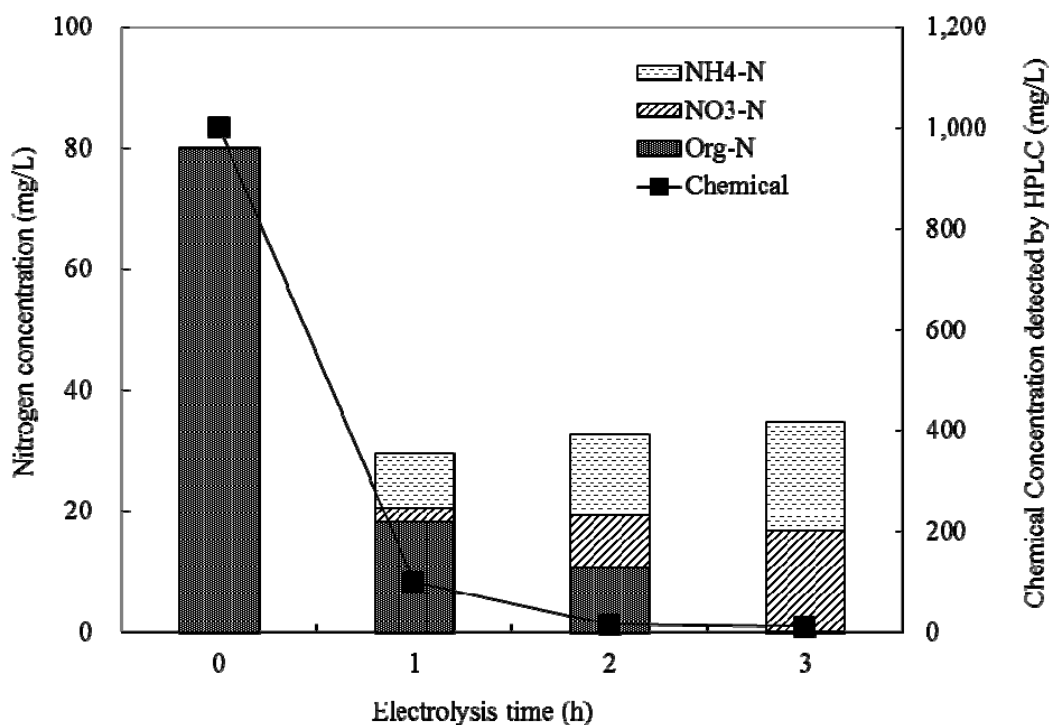


Fig. 11. Relationship between electrolysis time and nitrogen concentration in AMK.

AMK (amikacin sulfate) solution was electrolyzed, and the amount of AMK was measured by HPLC (-■-). Nitrogen amount (shown in bars) was also measured by ion chromatography and total nitrogen analysis. $\text{NH}_4\text{-N}$: inorganic nitrogen contents of NH_4 . $\text{NO}_3\text{-N}$: inorganic nitrogen contents of NO_3 . Org-N : organic nitrogen contents. Inorganic nitrogen contents of NO_2 is not shown in the figure, because it was below the detection limit in all of the samples.

3.2. 他の抗菌剤の電気分解

PCG、CEZ、IPM/CS、FOM、VCM、MINO、CP、EM および CPFX が、電気分解によって不活性化されるかどうかを抗菌活性の変化で検討した。これらの抗菌剤の電気分解前および電気分解 3 時間後の MIC を Table 5 に示した。抗菌剤には、*S. aureus* あるいは *E. coli* に対して活性を示さないものもあるが、各抗菌剤の MIC を測定した。FOM と CP を除いた抗菌剤は、電気分解 3 時間後に抗菌活性が消失した。CP については電気分解時間を 6 時間に延長することによって、MIC が測定限界を超えた。一方、FOM の MIC は、*E. coli* に対して変化が無く、*S. aureus* に対しては 2 倍に増加しており、FOM は電気分解で不活性化ができなかったものと考えられた。FOM を除く抗菌剤については、84.0 ~ 99.9% 分解されたことが分光光度計による含量測定で明らかになった。FOM を除く抗菌剤の濃度と MIC の増加は良く相関していた ($R^2=0.853$, coefficient of determination)。医療廃液のモデルとして抗菌剤の混合物を電気分解したとき、MIC は指数関数的に増加して、*E. coli* では $y = 0.019e^{1.05x}$ 、 $R^2 = 0.995$ 、*S. aureus* では $y = 0.051e^{0.90x}$ 、 $R^2 = 0.929$ であり、9 時間以内に混合液も効率良く分解することができた (Fig. 12)。このように電気分解法は、10 種類の抗菌剤混合液を不活性化することが可能であった。

Table 5 MIC and rate of inactivation by electrolysis.

Abbreviation	Chemical name	Concentration (mg/L)		Concentration (mM)		MIC for <i>E. coli</i> ($\mu\text{g/mL}$)		MIC for <i>S. aureus</i> ($\mu\text{g/mL}$)		Chemical* ratio(%)
		Unelectrolyzed	Electrolyzed	Unelectrolyzed	Electrolyzed	Unelectrolyzed	Electrolyzed	Unelectrolyzed	Electrolyzed	
PCG	Benzylpenicillin potassium	3135	8.42	9.8	156	93.7	0.038	0.612	93.8	92.1
CEZ	Cefazolin sodium hydrate	5000	8.83	1.95	15.6	87.5	0.061	0.977	93.8	84.0
IPM/CS	Imipenem/Cilastatin sodium	2500	-	0.0977	1.56	93.7	0.0061	0.0977	93.8	96.1
AMK	Amikacin sulfate	1000	1.28	1.56	> 100	> 98.4	0.195	50	99.6	98.9
FOM	Fosfomicin sodium	5000	27.47	31.3	31.3	0.0	0.977	1.95	49.9	56.0
VCM	Vancomycin hydrochloride	2500	1.68	> 62.5	> 62.5	N.C.***	0.122	> 62.5	> 99.8	99.9
MINO	Minocycline hydrochloride	500	1.01	0.391	> 50	> 99.2	0.0488	> 50	> 99.9	99.9
CP	Chloramphenicol sodium succinat	5000	15.47	31.3	> 500	> 93.7	125	> 500	> 75.0	80.0
EM	Erythromycin lactobionate	2500	2.29	15.6	> 250	> 93.8	0.122	7.81	98.4	98.4
CPFX	Ciprofloxacin	300	0.91	0.0244	100	> 99.9	0.0488	100	> 99.9	99.9
MIX				0.0268	439	> 99.9	0.0268	110	> 99.9	N.D.****

* Electrolysis time: CP, 6 h; others, 3 h.

** N.C.: Not calculable

*** N.D.: Not detectable

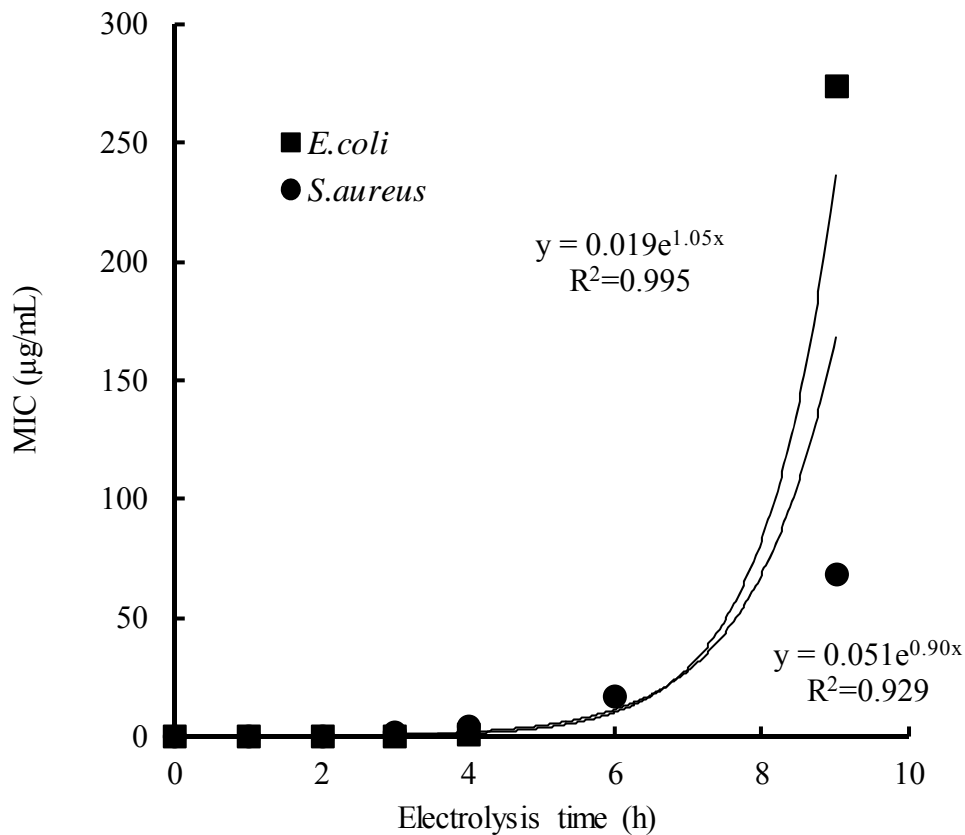


Fig. 12. Relationship between electrolysis time and MIC of MIX.

The mixture of antibiotics in several groups (MIX) was electrolyzed, and the MICs for *S. aureus* and *E. coli* were measured. R^2 : coefficient of determination.

3.3. ヒト細胞に対する細胞毒性の測定

電気分解によって抗菌剤から有毒物質が生成されるかどうかを調べるために、Molt-4 細胞を使用して細胞毒性試験を行い、50% 細胞毒性濃度 (CC_{50}) を求めた。PCG、CEZ、IPM/CS、AMK、FOM、VCM、MINO、CP、EM、CPFEX の細胞毒性の測定限界は、それぞれ 49.0 $\mu\text{g/mL}$ 、78.1 $\mu\text{g/mL}$ 、39.1 $\mu\text{g/mL}$ 、15.6 $\mu\text{g/mL}$ 、78.1 $\mu\text{g/mL}$ 、39.1 $\mu\text{g/mL}$ 、19.8 $\mu\text{g/mL}$ 、78.1 $\mu\text{g/mL}$ 、39.1 $\mu\text{g/mL}$ 、および 4.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。このことから、抗菌剤の電気分解液はヒトリンパ球細胞に細胞毒性を示さないことが明らかになった。

第4節 考察

白金イリジウム複合体電極を用いた電気分解メカニズムは、電気分解槽内での連続的な陽極酸化によって生成される有効塩素による有機化合物の酸化分解と考えられている [61]。このため、酸化分解可能な有機化合物は、高濃度よりも低濃度の方がより効率的に電気分解されることを報告した [61]。今回の実験において CP 溶液は他の抗菌剤と比較して高濃度であり、3 時間の電気分解では十分に分解されなかったが 6 時間後には分解されており、筆者らのこれまでの研究結果と一致していた。一方、CP と同様に高濃度の FOM は、6 時間の電気分解でも効率的に分解されなかった。FOM は、炭化水素とリン酸との結合体であり、構造の単純さが有効塩素による酸化を受けにくくしているものと推定している。FOM の低い分解効率は、抗がん剤であるシスプラチンの電気分解で報告した現象 [27] と同様の原理によるものと考えられた。このことから化合物の濃度だけでなく、酸化を受ける化合物の構造も電気分解可能かどうかの判断材料になると思われる。

医療用抗菌剤は、下水処理場の排水中でも表層水と同様に頻繁に検出されている [48, 67 - 69]。これらの抗菌剤によって、薬剤耐性菌の誘導 [53, 56, 57]や、水生生物に対して環境リスクをもたらすことが懸念されている [52]。したがって、電気分解によって抗菌剤の薬理活性を不活性化することは、水生細菌の薬剤耐性遺伝子の誘導を防ぐこと、および水生生物に対する環境リスクを低減することが期待できる。Homen らが 1 種類の抗菌剤を除去する方法は報告しているが [70]、本研究では 9 系統の医療用抗菌剤を電気分解法により不活性化できることを示した。この結果は、病院や下水処理場など多くの種類の抗菌剤を含む廃液が集まる場所で、電気分解法が利用可能であること

を示している。

抗菌剤は 1998 年から 2000 年までの期間で、医薬品のうち降圧剤に次いで世界で 2 番目に消費された薬剤群であり [7]、その多くが活性体として尿中から排泄される。近年、医薬品の環境リスク評価のための指標として、予測環境中濃度 (PECs : Predicted Environmental Concentration) が欧州連合 (EU) において採用されている [21]。この基準に基づいて、ヒトに投与された抗菌剤の環境リスク評価がトルコで実施され、水生生物への環境リスクを低下させるために表層水での抗菌剤の濃度を低下させる必要性が報告された [71]。本研究で用いた抗菌剤の濃度は表層水から検出されたものよりも高いが [49, 50]、病院内で発生する廃液は希釈を受ける前の試料であるため、検討濃度としては妥当と考えている。さらに、筆者らはモデル試料を用いて、尿中の抗がん剤が電気分解により分解されることを報告した [45]。したがって、同じ原理で尿中から排泄される抗菌剤が分解できることが期待できる。今回の結果と筆者らのこれまでの研究結果 [27, 45, 61] を併せて考えると、電気分解法は病院のような医療廃液の発生源で抗菌剤を分解して、表層水中での抗菌剤の濃度を下げることが期待できる。

第 5 節 結論

今回の結果と筆者らのこれまでの研究結果 [27, 45, 61] を併せると、電気分解法は発生源として比較的高濃度で廃液が発生する病院内において、抗菌剤の分解に利用可能な技術になるものと考えられた。一方で、入院で行われていた薬物療法が、医療費抑制の国策に基づき外来治療に移行し

てきている。医薬品廃液の表層水への混入を減らすためには、在宅で発生する医薬品廃液の不活性化の可能性を検討する必要がある。そこで、発症後に主に在宅で使用される抗インフルエンザ薬の電気分解を行って不活性化可能か検討した。

第4章 プロドラッグとしての抗ウイルス薬の電気分解による不活性化に関する研究

第1節 緒言

オセルタミビルリン酸 (oseltamivir phosphate ; タミフル®) は、季節性インフルエンザの治療薬として使用されている [72, 73]。また、タミフルは鳥インフルエンザウイルス (H5N1) に対して、ヒトからヒトへの伝染を低減するのに有効であることが報告されている [74]。これらの特長のため、タミフルはインフルエンザの世界的大流行時に抗インフルエンザ薬の中で予防薬としても推奨されており [75]、多くの国家が備蓄している [76]。

経口投与されたタミフルは、腸管から吸収されて活性代謝物のオセルタミビルカルボン酸塩に加水分解されて、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼの選択的な阻害剤に変換される [77]。オセルタミビルからオセルタミビルカルボン酸塩への生体内変化を Fig. 13 に示す。タミフル 150mg を経口投与した場合のオセルタミビルの生物学的利用率は約 80% である [78, 79]。オセルタミビルカルボン酸塩は腎排泄によって除去され、吸収されなかったオセルタミビルは糞便中から排泄される [78, 79]。さらに、いくつかの動物種でもオセルタミビルからオセルタミビルカルボン酸塩に変換されて尿路から排泄されることが報告されている [80]。一方、オセルタミビルカルボン酸塩は生物分解等を受けにくく、下水処理施設で除去することが困難で、かつ表層水中でも安定であることが報告されている [81]。これらの性質のために、表層水に混入したオセルタミビルカルボン酸塩が水鳥の飲水行動によって腸管に到達して、腸管内に常在する鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の

耐性化が誘導され、さらにヒトへの伝播性を獲得して世界的大流行に至ることが懸念されている [82 - 84]。実際に、野鳥からオセルタミビル耐性ウイルスが単離されている [85]。

オセルタミビル耐性の鳥インフルエンザウイルス (H5N1) が発生した場合には、備蓄された膨大な量のタミフルは治療および予防には有用でなくなる。したがって、表層水中でオセルタミビルカルボン酸塩の歷程調査が継続されている [82, 86 - 90]。さらに、オセルタミビルカルボン酸塩が表層水に流入する前に除去する方法も検討されている [87, 91 - 93]。

筆者らは医療廃液中の医薬品を不活性化する方法として、電気分解法の応用を検討して抗がん剤と抗菌剤が効果的に不活性化できることを報告した [27, 94]。また、この原理を応用した医療廃液処理装置は、希釈法に比べて低環境負荷かつ低コストで医療廃液に含まれる抗がん剤を不活性化することも報告した [45]。さらに、電気分解法により尿中の抗がん剤が不活性化されることも報告した [61]。筆者らのこれまでの研究では電気分解の対象として、病院で廃液が生じる前提で mg/L ~ g/L の高濃度範囲の医薬品を用いて検討を行った。一方、タミフルはインフルエンザ感染拡大の予防を目的に自宅で内服することが推奨されている [95]。このために発生源が分散して表層水中で検出されたオセルタミビルカルボン酸塩の濃度範囲は $\mu\text{g/L}$ 以下であり、病院で生じる廃液中の医薬品よりも低濃度である [82, 86 - 89]。今回は、病院外で発生した医薬品を不活性化する可能性を検討するために、低濃度域まで電気分解対象薬剤の濃度を拡大して、抗ウイルス薬が分解できるかどうかを検討した。

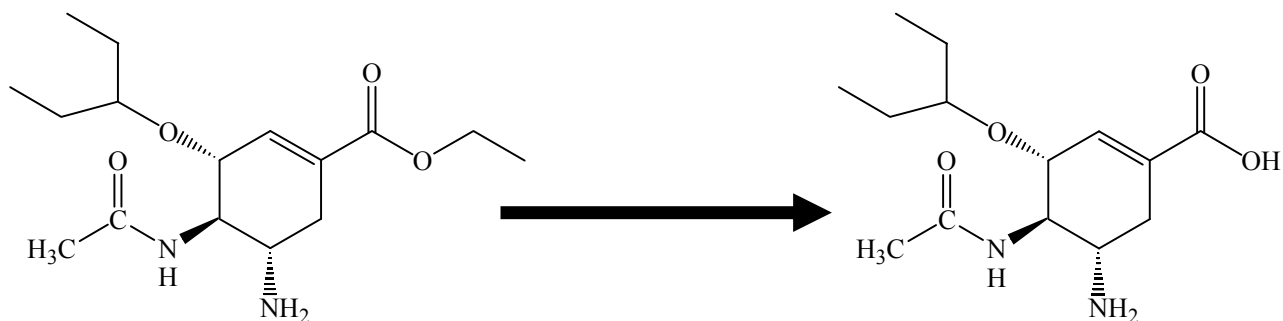


Fig. 13. Biotransformation of oseltamivir carboxylate from oseltamivir.

Oseltamivir is catalyzed to the active metabolite, oseltamivir

第 2 節 実験材料および方法

2.1. 試薬

オセルタミビルリン酸塩 (Ro 64-0796) およびオセルタミビルカルボン酸塩 (Ro 64-0802) は、F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland) から提供された。ソタロール塩酸塩は、Tocris Bioscience 製のものを使用した。超純水は、ヤマトミリポア WQ 500 (ヤマト科学) を用いて調製されたものを使用した。

2.2. 測定機器と分析条件

電気分解前後のオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩の濃度は、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を用いて測定された。HPLC (島津製作所) の分析条件は以下のとおりである。

検出波長：220 nm、カラム：SUMIPAX ODS L-05-4615 (4.6 mm x 150 mm、5 μ m) (住化分析センター)、カラム温度：40 °C、移動相：10% 100 mM リン酸緩衝液から 90% アセトニトリルへのリニアグラジエント (20 分)、流速：1 mL/min。なお、ソタロール塩酸塩を内部標準として使用した [96]。

2.3. 検量線の作成

オセルタミビルリン酸塩 (320 μ g/mL) およびオセルタミビルカルボン酸塩 (303.2 μ g/mL) 溶液を調製し、各標準液の 2 倍希釈液系列を調製した。オセルタミビルリン酸塩は 0 から 320 μ g/mL、オセルタミビルカルボン酸塩は 0 から 303.2 μ g/mL の範囲で、それぞれ 13 点の面積を測定した。オセルタミビルリン酸塩は、溶解後にオセルタミビルに変換される。内部標準溶液として、ソタロール塩酸塩 10 μ g/mL を用いた。検量線は検体のピーク面積を内標準物質の面積で割った数値と、検体の理論濃度から作成した。

2.4. 電気分解の手順と有効塩素の中和

電気分解の検体として、オセルタミビルリン酸塩およびオセルタミビルカルボン酸塩を 0.9% 塩化ナトリウム水溶液に溶解し、それぞれ 410.40 μ g/mL、386.44 μ g/mL になるように調製した。調製したオセルタミビルリン酸塩およびオセルタミビルカルボン酸塩の濃度は、それぞれ 1 mM に相当する。250 mL の試料を 300 mL のガラス製ビーカーに入れ、白金イリジウム複合体電極 (115 x 35 mm、電極間距離：5mm) を用い、1 A の定電流、3.5 V ~ 4.0 V 定電圧で 2 時間攪拌しながら電気

分解を行った。電流密度は 2.48 A/dm^2 であった。検体は、電気分解前と電気分解中に採取した。20% (w/v) チオ硫酸ナトリウムは、生成された有効塩素を中和するために使用された。なお、20% (w/v) チオ硫酸ナトリウムは、測定結果に影響をおよぼさなかったことを確認した。また、HPLC による定量のために使用された検体は $20 \mu\text{L}$ であった。

2.5. ノイラミニダーゼ阻害活性の測定

電気分解によるオセルタミビルまたはオセルタミビルカルボン酸塩のノイラミニダーゼ阻害活性の変化は、市販の chemiluminescence assay (NA-Star, Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit, Life Technologies Japan) を用いて測定された。大阪府立公衆衛生研究所から提供されたヒトインフルエンザウイルス A/W yoming/3/2003 (H3N2) を用いて、ノイラミニダーゼ阻害活性を測定した。

2.6. ヒト細胞に対する細胞毒性の測定

Molt-4 細胞を使用して細胞毒性試験を行った。Molt-4 細胞は、10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地 (Sigma Aldrich Inc.) で4倍に希釈した薬液 $50 \mu\text{L}$ 、 5×10^5 個/mL の Molt-4 細胞浮遊液 $50 \mu\text{L}$ および培養液 $100 \mu\text{L}$ を U 底マイクロプレートで混和して、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーターで3日間培養された。3日後に細胞培養液 $100 \mu\text{L}$ を平底マイクロプレートに移し、WST-8 細胞計数キット (同仁化学) を $10 \mu\text{L}$ 添加下して、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした。参照波長 620

nm および測定波長 450 nm におけるプレートの吸光度を、光学濃度計 (ImmunoMini NJ-2300、コスモ・バイオ) で測定した。電気分解液が添加されていないウエルの吸光度の平均値と標準偏差を求めた。このウエルの “平均値 (Mean) - 2 x 標準偏差 (S.D.)” 以上の吸光度を「細胞毒性無し」と定義した。このときの濃度を電気分解前と電気分解後で比較した。

2.7. 遺伝毒性の測定

オセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩の電気分解によって、遺伝毒性が発現するかどうかを *umu*-test (Protein Purify Ltd.) で検討した [97]。キットは *umu* 遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性として測定している。*umu* 遺伝子は SOS 遺伝子の一つで、DNA 損傷の結果として発現する。この結果は、Ames 試験の結果と一致している [98]。また、 β -ガラクトシダーゼ活性は SOS 遺伝子の発現強度と相関する。そこで、オセルタミビルとオセルタミビルカルボン酸塩の電気分解によって遺伝毒性が発現するかどうかを *umu*-test で評価した。

第3節 結果

3.1. HPLC分析

電気分解によってオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩が分解されるかどうかを評価するため、HPLC による定性分析を行った。電気分解前と電気分解中のオセルタミビルの典型的なクロマトグラムを Fig. 14 (Panel : A) に示す。電気分解前の内部標準物質およびオセルタミビ

ルの保持時間は、それぞれ 3.79 分および 10.23 分であった。2 時間の電気分解でオセルタミビルのピークは完全に消失した。一方、オセルタミビルカルボン酸塩のクロマトグラムでは、内部標準物質およびオセルタミビルカルボン酸塩の保持時間は、それぞれ、3.79 分および 7.73 分であった (Fig. 14、Panel : B)。オセルタミビルカルボン酸塩のピークも 2 時間の電気分解で消失した。電気分解後にオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩は、保持時間が約 2.5 分の親水性物質に変換された。内部標準物質を用いて作成されたオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩の検量線を示す (Fig. 15)。相関係数(R)は、オセルタミビルとオセルタミビルカルボン酸塩ともに 0.999 であった。HPLC によるオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩の測定下限は、マニュアルで規定された方法に従って決定し [99]、1 μ g/mL とした。一方、測定上限はオセルタミビルが 243.59 μ g/mL、オセルタミビルカルボン酸塩が 223.14 μ g/mL とした。電気分解によるオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩の分解を評価するために、3 回電気分解を行ない定量分析した。オセルタミビルの濃度は、電気分解前に 297.60 ± 4.62 μ g/mL であった。オセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩の濃度が測定上限を超えた場合には、2 倍希釈して測定を行った。電気分解 60 分後に、オセルタミビルの濃度は測定限界以下となった。電気分解開始 10 分前後にオセルタミビルからオセルタミビルカルボン酸塩が生成しているが、そのオセルタミビルカルボン酸塩は 30 分以内に測定限界以下になった (Fig. 16)。オセルタミビルカルボン酸塩では、電気分解前には 291.80 ± 8.99 μ g/mL であったが、電気分解 50 分後に測定限界以下となった (Fig. 17)。

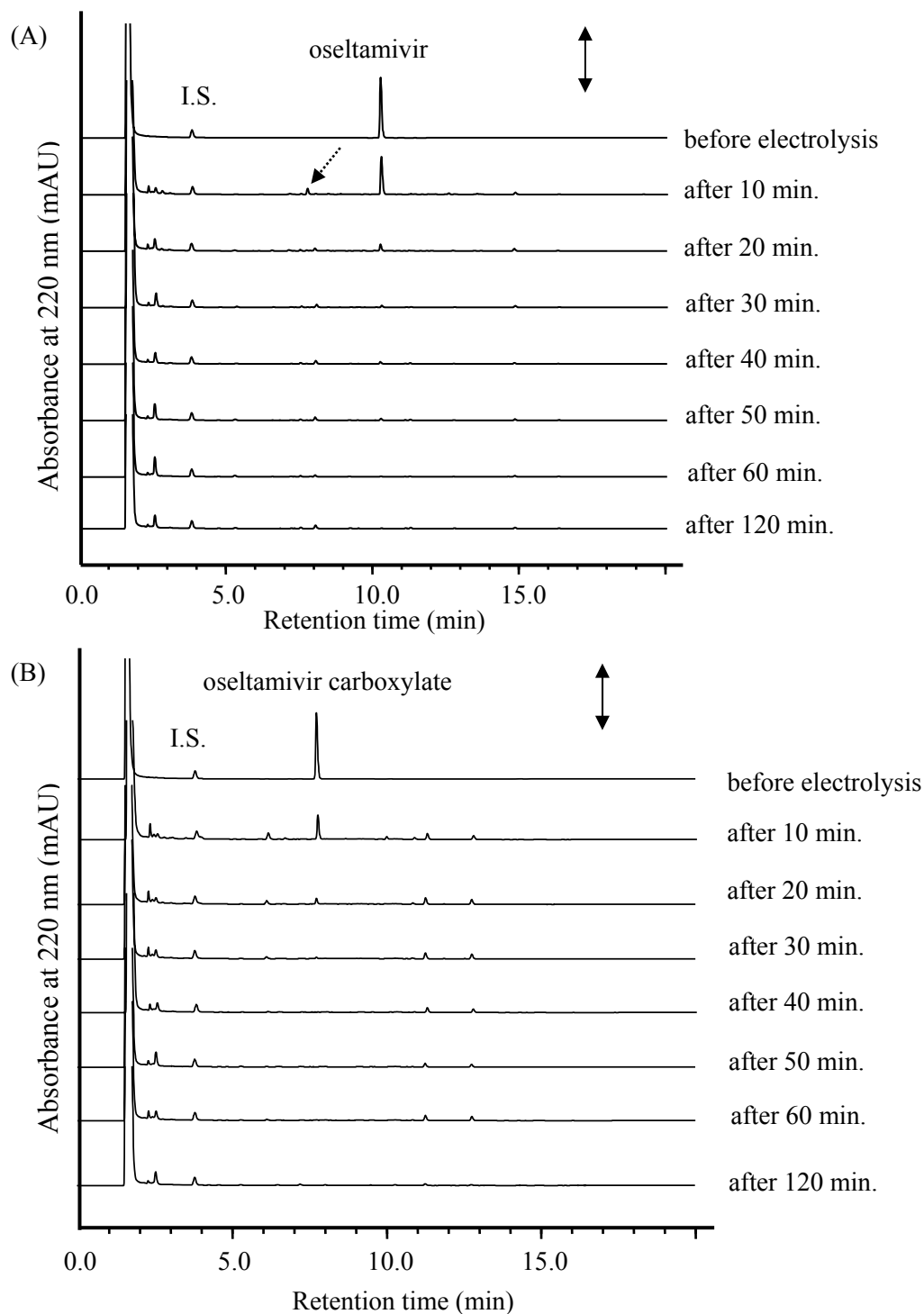


Fig. 14. The typical chromatogram of oseltamivir (Panel : A) and oseltamivir carboxylate (Panel : B) before and during electrolysis.

< Panel : A> Time-dependent degradation of oseltamivir and passing appearance of oseltamivir carboxylate (break arrow) were demonstrated.

< Panel : B> Time-dependent degradation of oseltamivir carboxylate was demonstrated.

I.S. = internal standard. Arrows indicate 500 mAU.

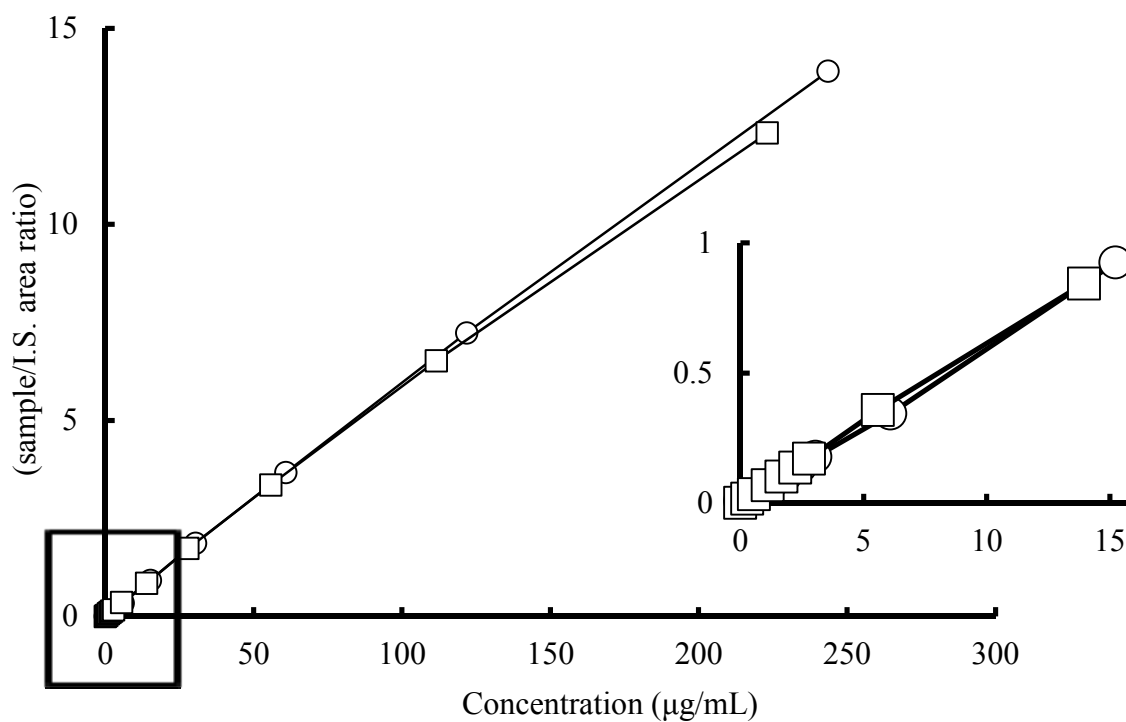


Fig. 15. Calibration curves of oseltamivir and oseltamivir carboxylate.

The relationship between the concentrations of oseltamivir or oseltamivir carboxylate and the relative peak area of samples compared with internal standard (I.S.) are shown. Open circles (O) represent oseltamivir, and open squares (□) represent oseltamivir carboxylate.

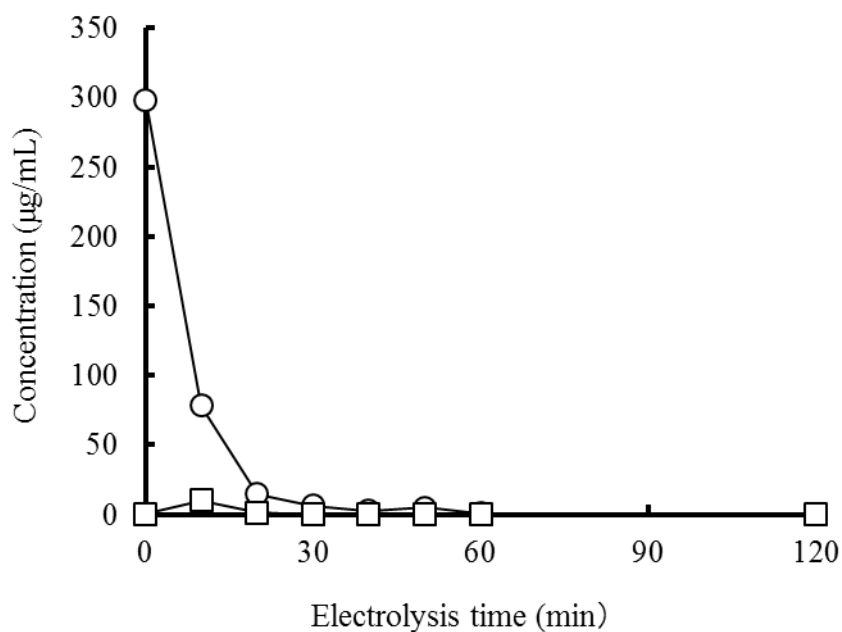


Fig. 16. Electrolysis of oseltamivir solution and concentrations of oseltamivir and oseltamivir carboxylate. Open circles (○) represent oseltamivir, and open squares (□) represent oseltamivir carboxylate. Measurements were made three times; and results shown are the mean \pm standard deviation.

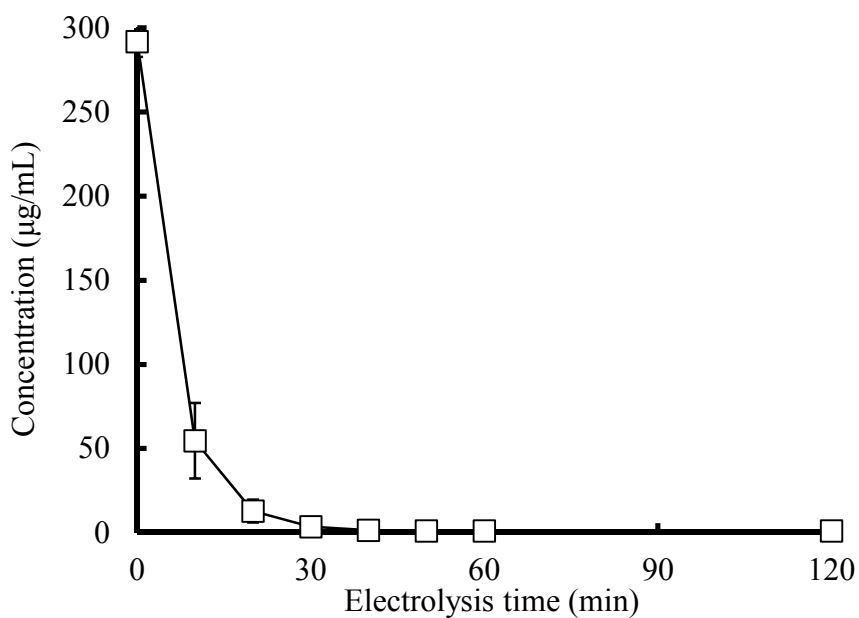


Fig. 17. Electrolysis of oseltamivir carboxylate solution and concentration of oseltamivir carboxylate. Open squares (□) represent oseltamivir carboxylate. Measurements were made three times; the results shown are the mean \pm standard deviation.

3.2. ノイラミニダーゼ阻害活性の測定

電気分解前後におけるオセルタミビルカルボン酸塩のノイラミニダーゼ阻害活性を測定した。また、オセルタミビルの一部が加水分解されてオセルタミビルカルボン酸塩を生成することが HPLC 分析で示唆されたため、オセルタミビルのノイラミニダーゼ阻害活性も測定した。50% 阻害活性 (IC_{50}) 値は、chemiluminescence assay で測定した。Chemiluminescence assay は、インフルエンザウイルス分離株のノイラミニダーゼ阻害剤の阻害活性測定に十分な再現性および高い感受性を有すると報告されている [100]。Wetherall らは、この中でオセルタミビル感受性株のインフルエンザウイルスに対する IC_{50} 値は 0.30 ~ 0.54 nM (0.085 ~ 0.154 ng/mL) であり、耐性化したインフルエンザ株の IC_{50} 値は 76 倍高かったと報告している [100]。この結果より、 IC_{50} 値の中央値の 0.42 nM の 76 倍の 9.1 ng/mL を超えた場合、オセルタミビルカルボン酸塩はノイラミニダーゼに対して阻害作用がないと規定して、 IC_{50} 値が 9.1 ng/mL を超えるまでの時間を測定した。その結果を Fig. 18 に示した。オセルタミビルでは、電気分解 10 分後に阻害活性が獲得されたように見えるが 20 分後には IC_{50} 値が増加に転じた (Fig. 18)。これはオセルタミビルが電気分解によって、一部がオセルタミビルカルボン酸塩に加水分解される HPLC 分析の結果と一致している。1 mM のオセルタミビルカルボン酸塩の IC_{50} 値は電気分解の前に 0.073 ng/mL であったが、電気分解 50 分後には 9.1 ng/mL を超えた。これらのデータは、オセルタミビルまたはオセルタミビルカルボン酸塩の 1 mM の電気分解の結果である。オセルタミビルカルボン酸塩は、表層水中では $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲以下で検出されており、さらに低濃度の分解が可能か検証する必要がある。そこで、1 μM (284.4 ng/mL) および 1 nM

(284.4 pg/mL) のオセルタミビルカルボン酸塩の電気分解を行った。1 μM のオセルタミビルカルボン酸塩を電気分解したときの IC_{50} 値は、電気分解前に 0.148 ng/mL であったが、電気分解 60 分後に測定限界以下になった。さらに低濃度の 1 nM のオセルタミビルカルボン酸塩では、電気分解前から測定限界以下であった。今回の結果より、電気分解法は表層水で検出されている濃度範囲のオセルタミビルカルボン酸塩も不活性化できることが明らかとなった。

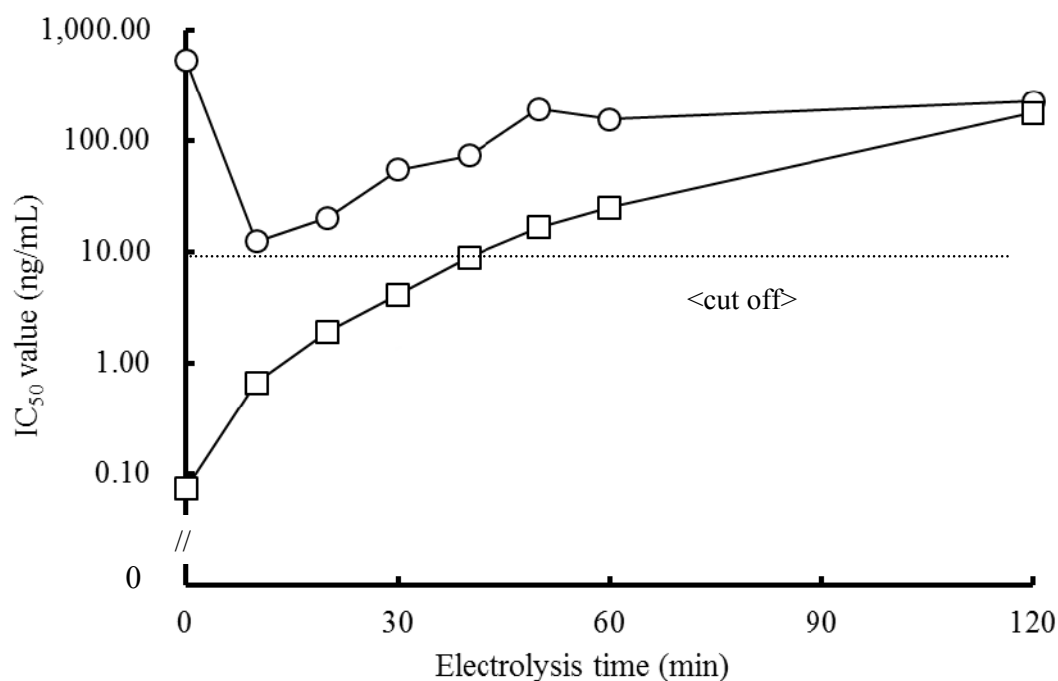


Fig. 18. Change of inhibitory activity of neuraminidase with electrolysis.

Oseltamivir or oseltamivir carboxylate solutions were electrolyzed, and the neuraminidase inhibitory activities of electrolyzed products were shown. Open circles (\circ) represent oseltamivir, and open squares (\square) represent oseltamivir carboxylate. Break line shows the cut-off value (9.1 ng/mL) of virtually no pharmacological activities against viral neuraminidases.

3. 3. ヒト細胞に対する細胞毒性の測定

電気分解によって、オセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩から新たに毒性物質が

生成したかどうかを確認するために、Molt-4 細胞に対する細胞毒性試験を行った。オセルタミビルでは電気分解前の測定限界は 18.22 $\mu\text{g/mL}$ であり、電気分解 2 時間後も 18.22 $\mu\text{g/mL}$ であった。オセルタミビルカルボン酸塩の細胞毒性の測定限界は 16.58 $\mu\text{g/mL}$ であり、電気分解 2 時間後も 16.58 $\mu\text{g/mL}$ であった。このことから、オセルタミビルとオセルタミビルカルボン酸塩は電気分解によって新たに毒性物質が生成しなかったことが示された。

3.4. 遺伝毒性の測定

オセルタミビルとオセルタミビルカルボン酸塩の電気分解によって遺伝性の毒性物質が生成したかどうかを検証するため、1 mM のオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩を電気分解した。結果は Fig. 19 と Fig. 20 に示した。今回の「遺伝毒性なし」と評価するカットオフの吸光度は 0.231 であった。0.3 $\mu\text{g/mL}$ の AF-2 (S-9 mix 非存在下の positive control) の吸光度は 0.256、0.3 $\mu\text{g/mL}$ の 2-AA (S-9 mix 存在下の positive control) の吸光度は 0.247 であった。0.3 $\mu\text{g/mL}$ の AF-2 および 2-AA はカットオフレベルを越え、遺伝毒性を示した。S-9 mix 非存在下で、312.4 $\mu\text{g/mL}$ ~ 312.4 fg/mL のオセルタミビル、および電気分解されたオセルタミビル溶液の吸光度は、いずれもカットオフレベル以下であった。284.4 $\mu\text{g/mL}$ ~ 284.4 fg/mL のオセルタミビルカルボン酸塩溶液およびオセルタミビルカルボン酸塩の電気分解液もカットオフレベル以下であった。S-9 mix 存在下で、先の S-9 mix 非存在下と同じ濃度範囲のオセルタミビル、オセルタミビルカルボン酸塩、電気分解されたオセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩溶液の遺伝毒性を評価した。この

条件下においても、いずれの検体もカットオフレベル以下であった。これらの結果から、オセルタミビル、オセルタミビルカルボン酸塩、電気分解されたオセルタミビルとオセルタミビルカルボン酸塩は新たに遺伝性の毒性物質を生成しなかったことが示された。

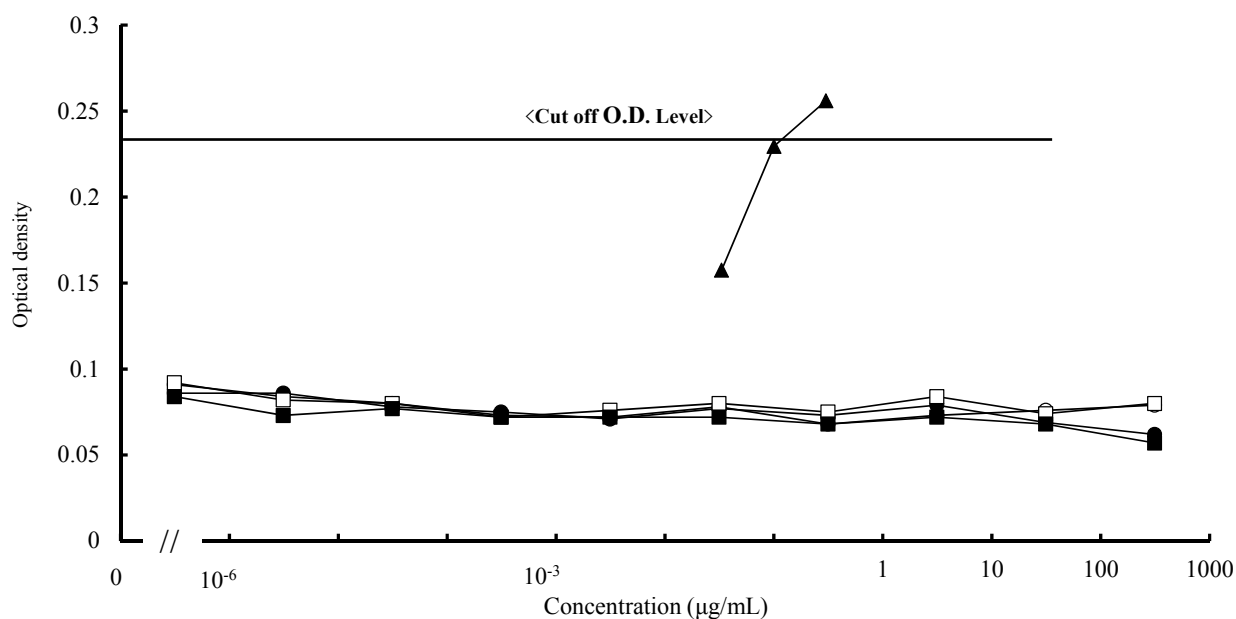


Fig. 19. Evaluation of mutagenicity with *umu*-test in absence of S-9 mixture.

Open and closed circles (○, ●) represent oseltamivir before and after electrolysis, respectively. Open and closed squares (□, ■) represent oseltamivir carboxylate before and after electrolysis, respectively. Closed triangles (▲) represent AF-2, which was used as a control.

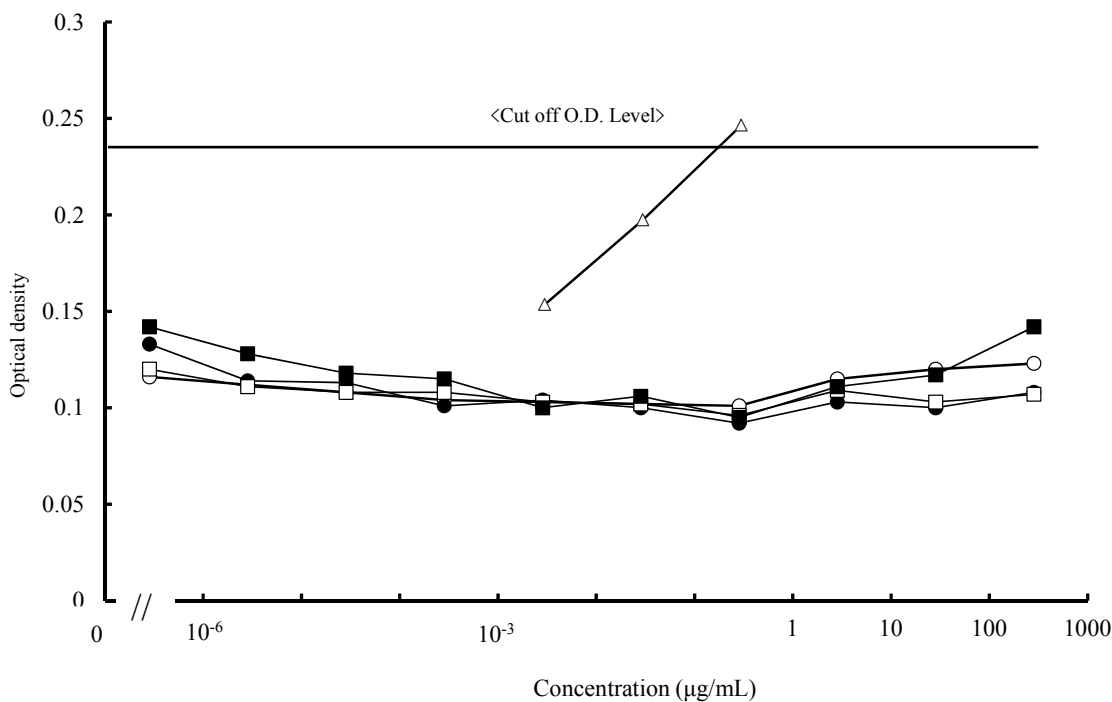


Fig. 20. Evaluation of mutagenicity with umu-test in presence of S-9 mixture.

Open and closed circles (○, ●) represent oseltamivir before and after electrolysis, respectively. Open and closed squares (□, ■) represent oseltamivir carboxylate before and after electrolysis, respectively. Open triangles (△) represent 2-AA, which was used as a control.

第4節 考察

オセルタミビルおよびオセルタミビルカルボン酸塩を電気分解して、生じた分解産物の HPLC 分析を行うとともに、ノイラミニダーゼ阻害活性を測定した。電気分解法はこれらの化学物質を分解し、1 時間以内にその阻害活性を消失させた。また、検討した条件下では、新たな細胞毒性と遺伝毒性が認められなかった。

排泄されたオセルタミビルカルボン酸塩は、従来の下水処理施設では除去されないことが報告されており [81]、さらに表層水中で光分解等を受けないことからオセルタミビルカルボン酸塩が検出されている [85 - 90]。都市部で多くの市民がインフルエンザに感染してタミフルが投与されたと

きには、オセルタミビルカルボン酸塩の水生生物への環境リスクと薬剤耐性ウイルスの発生を考慮しなければならない [88]。季節性または世界的な大流行時に予測される表層水中のオセルタミビルカルボン酸塩の濃度では、水生生物の環境リスクの指標である成長、分化および生殖等への影響 [17]がないことが報告されている [88]。さらに今回の検討において、オセルタミビル、オセルタミビルカルボン酸塩およびその電気分解液は、*in vitro* で細胞毒性や遺伝毒性を示さないことが明らかとなった。

季節性インフルエンザ流行時および世界的な大流行時にタミフルが投与された場合には、表層水のオセルタミビルカルボン酸塩は $\mu\text{g/L}$ ~ ng/L の濃度範囲が予測されている [82, 85 - 90]。筆者らは、 $\mu\text{g/L}$ ~ mg/L の濃度範囲において、電気分解によってオセルタミビルカルボン酸塩のノイラミダーゼ阻害活性が不活性化されることを証明した。マガモに $1 \mu\text{g/L}$ 以上のオセルタミビルを投与したときに、インフルエンザウイルスがオセルタミビルに耐性化を起こす変異であるノイラミニダーゼの 274 番目のアミノ酸残基がヒスチジンからチロシンへ置換にされることが報告されている [101]。オセルタミビルカルボン酸塩のノイラミダーゼ阻害活性が電気分解法で不活性化されることを示した今回の結果は、水鳥の腸管でのタミフル耐性ウイルスの発生を抑制できる可能性を示唆している。

タミフルが大量に使用された場合には、インフルエンザウイルスにタミフル耐性遺伝子およびヒトに伝染性高い遺伝子の再集合または組換えが生じて、タミフル耐性・ヒトに伝播性の高病原性トリインフルエンザウイルスの世界的な大流行が懸念されている [83, 84]。このため、水鳥の腸管を

培養槽としたタミフル耐性ウイルスの発生を回避するために、表層水に到達する前にオセルタミビルカルボン酸塩の濃度を低下させることは極めて重要である。

オセルタミビルカルボン酸塩によるノイラミダーゼ阻害活性の検討では、オセルタミビルカルボン酸塩は ng/L の範囲では阻害活性を持たず、阻害活性を持つ $\mu\text{g/L} \sim \text{mg/L}$ の濃度範囲において電気分解法はノイラミダーゼ阻害活性を不活性化できることを示した。また、インフルエンザ流行時に都市部の表層水ではオセルタミビルカルボン酸塩が $\text{ng/L} \sim \mu\text{g/L}$ が存在すると推定されており、今回の結果より表層水よりも高濃度の場所においても電気分解法では対応可能である。

近年、表層水のオセルタミビルカルボン酸塩の濃度を低下させるさまざまな方法が提案されているが [91 - 93]、オセルタミビルカルボン酸塩の分解のための最適な方法は、現在まで報告されていない。筆者らは、電気分解法がオセルタミビルカルボン酸塩の濃度を低下させて、オセルタミビルカルボン酸塩の阻害活性を不活性化することを、世界で最初に報告した。オセルタミビルカルボン酸塩の阻害活性を不活性化しているため、オセルタミビル耐性遺伝子の選択圧もかからないと考えられる。筆者らは、電気分解法が尿中の抗がん剤を分解することも報告した [61]。このことから、尿中から排泄されるオセルタミビルカルボン酸塩も電気分解法で分解できるものと考えている。

第5節 結論

今回の研究で、電気分解法は濃度範囲が mg/L でのオセルタミビルカルボン酸塩の阻害活性の

不活性化と薬剤分解を同時に行うことが可能であることを証明した。さらに、表層水でも検出されている $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲においてもオセルタミビルカルボン酸塩を不活性化できることがノイラミニダーゼ阻害試験から確認できた。電気分解法は今回の結果、および筆者らのこれまでの研究から病院で生成する高濃度の医薬品を含む廃液だけではなく、病院外で検出される低濃度の医薬品を含む廃液についても分解できるものと思われる。

総括

今回の研究は、電気分解法が病院内から発生する医薬品廃液の不活性化に利用可能か検証するために実施された。電気分解法を応用して作成した医療廃液処理装置は、小型化されて病院内で設置可能であり、病院内から発生する抗がん剤廃液を低環境負荷、低コストで不活性化した。また、電気分解法により医薬品の表層水へのもう一つの流入経路である排泄物中の活性体の抗がん剤も分解された。また、抗菌剤を分解して、その抗菌活性を不活性化した。白金イリジウム複合体電極を使用した電気分解法は、有効塩素を生成させて酸化対象となる有機化合物を分解する反応であり、230 ～ 300 nm に極大吸収を有する尿成分も分解したことより、今回検討した医薬品以外にも分解できる可能性が高い。電気分解によって、アミカシン硫酸塩とオセルタミビルは低分子化合物に分解された。電気分解法は筆者らが検討した医薬品の濃度を低下させると同時に薬理活性を不活性化しており、病院内で発生した医薬品廃液が表層水に混入することで生じる水生生物の成長、分化、生殖等への影響の環境リスクを低減する可能性が示された。さらに、抗菌剤とオセルタミビルの分解では、筆者らが使用した実験系では新たな毒性物質（代替リスク）の生成は認められなかった。このことから電気分解法は、発生源として高濃度の医薬品を含む廃液が発生する病院内で利用可能であると考えられた。さらに、病院内で発生する医薬品廃液よりも低濃度の抗インフルエンザ薬を不活性化できたことから、医薬品廃液が低濃度で発生する在宅薬物療法でも利用可能な技術になる可能性を示した。電気分解法は合理的に社会に受容される方法として、検討を進めていく価値のある方法と考えられた。

引用文献

1. Hignite, C., Azarnoff, D.L., 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci.* 20, 337-341.
2. Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drug in german sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245-3260.
3. Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.
4. 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, 1202-1211.
5. Boxall A.B., 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO Rep.* 5, 1110-1116.
6. Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76, 122-159.
7. Jjemba, P.K., 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 63, 113-130.
8. Kümmerer, K., 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90, 2354-2366.
9. 高田 秀重, 谷島 利勝, 2003. 医薬品による環境汚染, *医学のあゆみ* 205, 159-160.
10. 清野 敦子, 古荘 早苗, 益永 茂樹, 2004. わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, *水環境学会誌* 127, 685-691.
11. 小森 行也, 鈴木 穰, 2009. 新たな水質汚染物質とその実態 -下水由来の医薬品の存在実態-, *水と水技術* 3, 26-31.
12. Jørgensen, S.E., Halling-Sørensen, B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691-699.

13. Heberer T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett.* 131, 5-17.
14. 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* 7, 669-673.
15. 伊藤 雅喜, 2011. 水循環システムのしくみ ナツメ社.
16. Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Lützhøft, H.C., Halling-Sørensen, B., 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40, 783-793.
17. Längea, R. and Dietrichb, D., 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances - conceptual considerations. *Toxicol. Lett.* 131, 97-104.
18. Cleuvers M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185-94.
19. Bound, J.P., Voulvoulis, N., 2004. Pharmaceuticals in the aquatic environment - a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* 56, 1143-1155.
20. Kostich, M.S., Lazorchak, J.M., 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Sci. Total Environ.* 389, 329-339.
21. Straub J.O., 2002. Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001, *Toxicol. Lett.* 135, 231-237.
22. Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 71, 328-340.
23. Andreozzi, R., Caprio, V., Marotta, R., Radovnikovic, A., 2003. Ozonation and H₂O₂/UV treatment of clofibric acid in water: a kinetic investigation. *J. Hazard. Mater.* B103, 233-246.
24. Ternes, T.A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B., 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from

wastewater ? Water Res. 37, 1976-1982.

25. 田中 宏明, 山下 尚之, 中田 典秀, 2008. 医薬品の環境負荷と環境汚染 -水環境の医薬品類の汚染とその削減技術の開発-, 環境技術 37, 834-839.
26. Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J., 2011. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. Water Res. 45, 1015-1024.
27. Hirose, J., Kondo, F., Nakano, T., Kobayashi, T., Hiro, N., Ando, Y., Takenaka, H., Sano, K., 2005. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis, Chemosphere 60, 1018-1024.
28. Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment; emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - A review. Chemosphere 45, 957-969.
29. Kümmerer K, Al-Ahmad A., 2010, Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. Environ Sci Pollut Res Int. 17, 486-496.
30. Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., 1997. Biodegradability of the anti-tumour agents 5-fluorouracil, cytarabine, and gemcitabine: impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluent. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 25, 166-172.
31. Kümmerer, K., Steger-Hartmann, T., Meyer, M., 1997. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. Water Res. 31, 2705-2710.
32. Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K., Hartmann, A., 1997. Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. Ecotoxicol. and Environ. Saf. 36, 174-179.
33. Al-Ahmad, A., Kümmerer, K., 2001. Biodegradation of the antineoplastics vindesine, vincristine, and vinblastine and their toxicity against bacteria in the aquatic environment. Cancer Detect. Prev. 25, 102-107.
34. Skov, T., Lyngø, E., Maarup, B., Olsen, J., Roth, M., Withereik, H., 1990. Risks for physicians handling antineoplastic drugs. The Lancet 336, 1446.
35. Vaccari, P.L., Tonat, K., DeChristoforo, R., Gallelli, J.F., Zimmerman P.J., 1984. Disposal of antineoplastic waste at the National Institutes of Health. Am. J. Hosp. Pharm. 41, 87-93.

36. Eitel, A., Scherrer, M., Kümmerer, K., 2000. Handling Cytostatic Drugs. A Practical Guide, second ed. Freiburg.
37. International Agency for Research on Cancer, 1996. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: List of IARC Evaluations. IARC, Lyon, France.
38. Castegnaro, M., De Mëo, M., Laget, M., Michelon, J., Garren, L., Sportouch, M.H., Hansel, S., 1997. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents 2: six anthracyclines: idarubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin, aclarubicin, and daunorubicin. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 70, 378-384
39. Hansel, S., Castegnaro, M., Sportouch, M.H., De Mëo, M., Milhavet, J.C., Laget, M., Dumënil, G., 1997. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 69, 109-114.
40. Panizza, M., Cerisola, G., 2009. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chem. Rev.* 109, 6541-6569.
41. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2002. Time Weighted Average (TWA) in The Threshold Limit Value (TLV), Ohio, USA.
42. The Japan Society for Occupational Health, 2004. Recommendation of occupational exposure limits (2004–2005). *J. Occup. Health* 46, 329–344.
43. 二酸化炭素排出係数, 1999, 環境庁地球環境部環境保全課.
44. 温室ガス算定に関する検討結果総括報告書 2002 年度版, 環境省.
45. Kobayashi, T., Hirose, J., Sano, K., Hiro, N., Ijiri, Y., Takiuchi, H., Tamai, H., Takenaka, H., Tanaka, K., Nakano, T., 2008. Evaluation of electrolysis apparatus for inactivating antineoplastics in clinical wastewater. *Chemosphere* 72, 659-665.
46. Zurek, W.Z., Wisconsin M., Ojima, Y., Anderson, L.L., Collins, G.J., Oberfield, R.A., Sullivan, R.D., 1968. Pharmacologic studies of methotrexate in man. *Surg. Gynec. Obstet.* 126, 331-338.
47. メトトレキサート-II・ダイナパック添付文書.

48. Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Klatz, K.L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225, 109-118.
49. Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
50. Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere* 75, 435-441.
51. Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Sørensen, B.H., Tolls, J., 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks ? *Environ. Sci. Technol.* 287A-294A.
52. Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 371-382.
53. Young, H-K., 1993. Review: Antimicrobial spread in aquatic environments. *J. Antimicrob. Chemoth.* 31, 627-635.
54. Ash, R.J., Mauck, B., and Morgan, M., 2002. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 713-716.
55. Holm, J.V., Kirsten Rügge, P., Bjerg, P.L., Christensen, T.H., 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 29, 1415-1420.
56. Mezrooui, N., Baleux, B., 1994. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Res.* 28, 2399-2406.
57. Reinthaler, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruuckebauer, G., Mascher, F. Marth, E., 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37, 1685-1690.
58. Holzel, C.S., Schwaiger, K., Harms, K., Kuchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., Muller, C., Bauer, J., 2010. Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ. Res.* 110, 318-326.

59. Munir, M., Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* 45, 681-693.
60. Gao, T., Munir, M., Xagorarakis, I., 2012. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.*, 421-422, 173-183.
61. Kobayashi, T., Hirose, J., Sano, K., Kato, R., Ijiri, Y., Takiuchi, H., Tanaka, K., Goto, E., Tamai, H., Nakano, T., 2012. Application of electrolysis for detoxification of an antineoplastic in urine. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 78, 123-127.
62. Murugananthan, M., Latha, S.S., Bhaskar Raju, G., Yoshihara, S., 2010. Anodic oxidation of ketoprofen-An anti-inflammatory drug using boron doped diamond and platinum electrodes. *J. Hazard. Mater.* 180, 753-758.
63. Sirés, I., Cabot, P.L., Centellas, F., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Arias, C., Brillas, E., 2006. Electrochemical degradation of clofibric acid in water by anodic oxidation. Comparative study with platinum and boron-doped diamond electrodes. *Electrochim. Acta* 52, 75-85.
64. Zhao, X., Hou, Y., Liu, H., Qiang, Z., Qu, J., 2009. Electro-oxidation of diclofenac at boron doped diamond: kinetics and mechanism. *Electrochim. Acta* 54, 4172-4179.
65. The Japanese Society of Chemotherapy, 1990. The standard protocol for determining MIC by microdilution method. *Jpn. J. Chemother.* 38, 103-105.
66. The Japanese Pharmacopeia, 15th ed., C-4103, Hirokawa, Tokyo, 2006.
67. Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355, 1789-1790.
68. Farre, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barcelo, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A.*, 938, 187-197.
69. Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1241-1248.

70. Homen, V., and Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *J. Environ. Manage.* 92, 2304-2347.
71. Turkdogan, F.I., Yetilmezsoy, K., 2009. Appraisal of potential environmental risks associated with human antibiotic consumption in Turkey. *J. Hazard. Mater.* 166, 297-308.
72. WHO (World Health Organization). 2003. Influenza (Seasonal). Fact Sheet No. 211. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> [accessed 30 October, 2012].
73. Ward, P., Small, I., Smith, J., Suter, P., Dutkowski, R., 2005. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, Suppl 1, i5-i21.
74. Schünemann, H.J., Hill, S.R., Kakad, M., Bellamy, R., Uyeki, T.M., Hayden, F.G., Yazdanpanah, Y., Beigel, J., Chotpitayasunondh, T., Del Mar C, Farrar, J., Tran, T.H., Ozbay, B., Sugaya, N., Fukuda, K., Shindo, N., Stockman, L., Vist, G.E., Croisier, A., Nagjdaliyev, A., Roth, C., Thomson, G., Zucker, H., Oxman A.D., 2007. WHO rapid advise Guidelines. for pharmacological management of sporadic human infection with avian influenza A (H5N1) virus. *Lancet infect. Dis.* 7, 21- 31.
75. von Itzstein M., 2007. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 967-974.
76. Harrod, M.E., Emery, S., Dwyer, D.E., 2006. Antivirals in the management of an influenza pandemic. *Med. J. Aust.*, Nov 20,185, S58-S61.
77. Hill, G., Cihlar, T., Oo, C., Ho, E.S., Prior, K., Wiltshire, H., Barrett, J., Liu, B., Ward, P., 2002. The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion-correlation of in vivo and in vitro studies. *Drug Metab. Dispos.* 30, 13-19.
78. Li, W., Escarpe, P.A., Eisenberg, E.J., Cundy, K.C., Sweet, C., Jakeman, K.J., Merson, J., Lew, W., Williams, M., Zhang, L., Kim, C.U., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel., D.B., 1998. Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 647-653.
79. He, G., Massarella, J., Ward, P., 1999. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin. Pharmacokinet.* Dec;37(6), 471-484.

80. タミフルインタビューフォーム, 2009. 中外製薬.
81. Fick, J., Lindberg, R.H., Tysklind, M., Haemig, P.D., Waldenström, J., Wallensten, A., Olsen, B., 2007. Antiviral oseltamivir is not removed or degraded in normal sewage water treatment: implications for development of resistance by influenza A virus. *PLoS ONE* 2 (10): e986.
82. Singer, A.C., Nunn, M.A., Gould, E.A., Johnson, A.C., 2007. Potential risks associated with the proposed widespread use of Tamiflu. *Environ. Health. Perspect.* 115, 102-106.
83. Olsen, B., Munster V.J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2006. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* 312, 384-388.
84. Järhult J.D., 2012. Oseltamivir (Tamiflu®) in the environment, resistance development in influenza A viruses of dabbling ducks and the risk of transmission of an oseltamivir-resistant virus to humans - a review. *Infect. Ecol. Epidemiol.*, <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v2i0.18385>.
85. Orozovic, G., Orozovic, K., Lennerstrand, J., Olsen, B., 2011. Detection of resistance mutations to Antivirals oseltamivir and zanamivir in avian influenza a viruses isolated from wild birds. *PLoS ONE* 6 (1) : e16028.
86. Bartels, P., von Tümpling, W.Jr., 2008. The environmental fate of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in different waters. *Sci. Total. Environ.* 405, 215-225.
87. Saccà, M.L., Accinelli, C., Fick, J., Lindberg, R., Olsen, B., 2009. Environmental fate of the antiviral drug Tamiflu in two aquatic ecosystems. *Chemosphere* 75, 28-33.
88. 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. and Saf.* 72, 1625-1634.
89. Ghosh, G.C., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H., 2010. Occurrence and fate of oseltamivir carboxylate (Tamiflu) and amantadine in sewage treatment plants. *Chemosphere* 81, 13-17.
90. Söderström, H., Järhult J.D., Olsen, B., Lindberg, R.H., Tanaka, H., Fick. J., 2009. Detection of the antiviral drug oseltamivir in aquatic environments. *PLoS ONE* 4 (6) : e6064.

91. Accinelli, C., Saccà, M.L., Fick, J., Mencarelli, M., Lindberg, R., Olsen, B., 2010. Dissipation and removal of oseltamivir (Tamiflu) in different aquatic environments. *Chemosphere* 79, 891-897.
92. Accinelli, C., Saccà, M.L., Batisson, I., Fick, J., Mencarelli, M., Grabic, R., 2010. Removal of oseltamivir (Tamiflu) and other selected pharmaceuticals from wastewater using a granular bioplastic formulation entrapping propagules of phanerochaete chrysosporium. *Chemosphere* 81, 436-443.
93. Gonçalves, C., Pérez, S., Osorio, V., Petrovic, M., Alpendurada, M.F., Barceló, D., 2011. Photofate of oseltamivir (Tamiflu) and oseltamivir carboxylate under natural and simulated solar irradiation: kinetics, identification of the transformation products, and environmental occurrence. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4307-4314.
94. Nakano, T., Hirose, J., Kobayashi, T., Hiro, N., Kondo, F., Tamai, H., Tanaka, K., and Sano, K., 2013. Application of electrolysis inactivation to antibacterials in clinical use. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 98-102.
95. Moscona, A., 2005. Oseltamivir Resistance - Disabling Our Influenza Defenses. *N. Engl. J. Med.* december 22, 2633-2636.
96. Joseph-Charles, J., Geneste, C., Laborde-Kummer, E., Gheyouche, R., Boudis, H., Dubost, J.P., 2007. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu and genetic versions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 1008-1013.
97. Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Sinagawa, H., 1985. Evaluation of the new system (*Umu*-test) for the detection of environmental mutagenicity and carcinogens. *Mutat. Res.* 147, 219-229.
98. Seino, Y., Nagano, M., Yahagi, T., Hoshi, A., Kawachi, T., Sugimura T., 1978. Mutagenicity of several classes of antitumor agents to *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100 and TA92. *Cancer Res.* 38, 2148-2156.
99. 要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物), 2008, 環境省.
100. Wetherall, N.T., Trivedi, T., Zeller, J., Hodges-Savola, C., McKimm-Breschkin, J.L., Zambon, M., Hayden, F.G., 2003. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J. Clin. Microbiol.* 41, 742-750.

101. 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, A., 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.

論文目録

[関係文献]

1. Kobayashi, T., Hirose, J., Sano, K., Hiro, N., Ijiri, Y., Takiuchi, H., Tamai, H., Takenaka, H., Tanaka, K., Nakano, T., 2008. Evaluation of an electrolysis apparatus for inactivating antineoplastics in clinical wastewater. *Chemosphere* 72, 659-665.
2. Kobayashi, T., Hirose, J., Sano, K., Kato, R., Ijiri, Y., Takiuchi, H., Tanaka, K., Goto, E., Tamai, H., Nakano, T., 2012. Application of electrolysis for detoxification of an antineoplastic in urine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 123-127.
3. Nakano, T., Hirose, J., Kobayashi, T., Hiro, N., Kondo, F., Tamai, H., Tanaka, K., and Sano, K., 2013. Application of electrolysis to inactivation of antibacterials in clinical use. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90, 98-102.
4. Kobayashi, T., Hirose, J., Wu, H., Sano, K., Katsumata, T., Tsujibo, H., Nakano, T., 2013. Application of electrolysis for inactivation of an antiviral drug that is one of possible selection pressure to drug-resistant influenza viruses. *Journal of Virological Methods* 194, 154-160.

[参考文献]

1. Hirose, J., Kondo, F., Nakano, T., Kobayashi, T., Hiro, N., Ando, Y., Takenaka, H., Sano, K., 2005. Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis, *Chemosphere* 60, 1018-1024.

謝辞

本研究の遂行にあたり、直接ご指導・ご鞭撻賜りました大阪医科大学微生物学教室 佐野 浩一教授、中野 隆史准教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、ご指導と親切なご助言を賜りました大阪薬科大学微生物学研究室 辻坊 裕教授、宮本 勝城准教授、土屋 孝弘講師に謹んで感謝の意を表します。また、研究を温かくご指導頂きました大阪薬科大学臨床薬剤学研究室 田中 一彦元教授に感謝致します。

今回の研究のきっかけを与えてくださいました大阪医科大学 竹中 洋学長 (当時：薬剤部長) に深謝いたします。研究活動を支援し研究に助言を頂きました玉井 浩 元薬剤部長 (小児科学教室教授)、勝間田 敬弘薬剤部長に深謝致します。また、瀧内 比呂也 前薬剤部長に衷心より感謝します。

業務と研究活動をご支援頂きました、大阪医科大学附属病院薬剤部 西原 雅美課長、鈴木 薫先生、鈴木 典子先生に深謝いたします。