

活性汚泥処理による抗生物質クラリスロマイシンの代謝物探索

森田匡一* 小森行也** 南山瑞彦***

1. はじめに

河川や湖沼などの公共用水域や下水道で、医薬品による潜在的な水質汚染の可能性が指摘されている。日本国内においては2000年以降から調査・研究の報告^{1)~4)}が増加している。日本国内の公共用水域に存在する医薬品の多くはng/L程度の濃度ではあるが^{1), 2)}、ステロイドホルモンの一種であるエストラジオールのように、極めて低濃度においても生物に影響を及ぼす可能性がある。下水中においてはμg/Lの濃度で存在する医薬品も報告^{3), 4)}されている。

人に投与された医薬品は、その一部は代謝され体外に排出⁵⁾されるが、代謝されずに未変化体のまま排出されるものもある。人から排出される医薬品は、多くは下水道を通じて下水処理場に集まってくることになる。下水処理場は、処理を行った下水を、最終的に公共用水域に放流するため、医薬品についても水環境への拡散防止に寄与している重要な施設であると考えられる。そのため、下水処理プロセスにおいて、その除去の程度の確認^{3), 4)}が進められている。これらの調査・研究の結果、医薬品の中には下水処理プロセスで低減するものがあることがしだいに明らかになってきている。しかし、下水処理プロセスでの低減が分解によるのか、吸着によるのか等の機構に関する知見、また、代謝生成物の生物影響等に関する情報は少なく、処理水に残存する毒性の原因の解明や水環境中で生物に与える影響の評価、その効率的な処理方法の開発にあたって不明な点が多い(図-1参照)。

そこで本研究では、我が国において代表的な下水処理法である活性汚泥処理における医薬品代謝物の探索を目的としてクラリスロマイシン(以下、CAMと記す。図-2)を例とした室内実験を行った。本研究で対象としたCAMは、数多くある医薬品のなかから売上高⁶⁾、下水中存在量^{3), 4)}が多

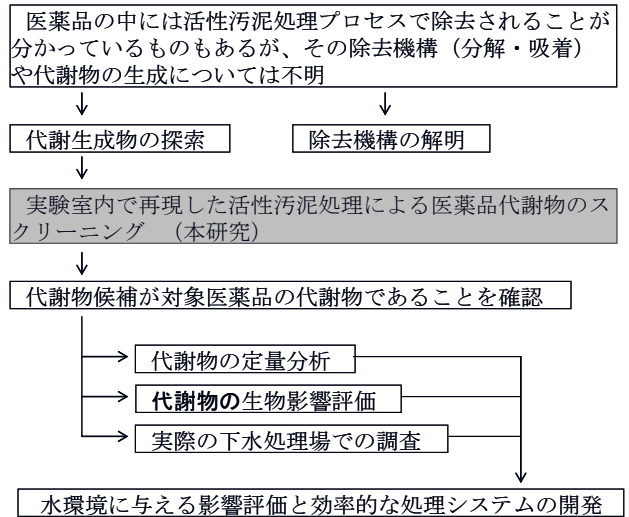


図-1 研究の位置づけ

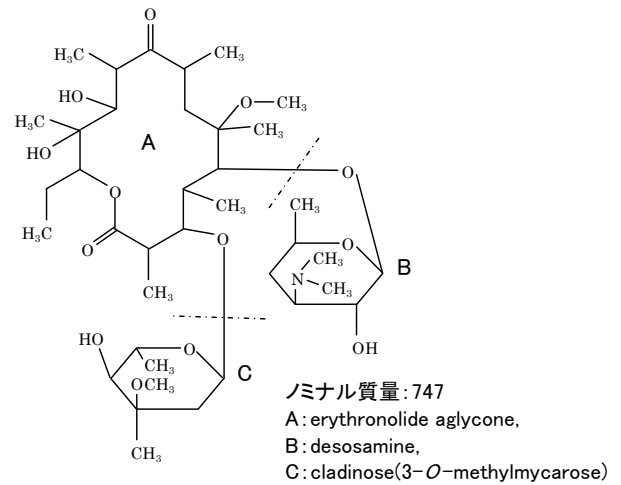


図-2 CAMの化学構造

く、生態毒性に注意するべきと考えられる抗生物質である。

2. 方法

2.1 活性汚泥処理実験

流域下水道の下水処理場内に設置された下水処理実験プラントから採取した活性汚泥を種汚泥として人工下水を用いて馴致培養^{*1}(馴致期間: 2ヶ月)を行い、質の安定化を図った(表-1, 2)。この馴致活性汚泥を用いて実験を行った。処理実験は、馴致培養と同様の条件設定とし容量を4Lとした(写真-1)。

*土木用語解説: 馴致培養

表-1 人工下水の組成

基質	mg/L	基質	mg/L
デキストリン	61	肉エキス	131
酵母エキス	149	ペプトン	131
NaCl	13	MgSO ₄	8
KH ₂ PO ₄	37	KCl	27
NaHCO ₃	50	CaCO ₃	100
脱気水道水	1000 mL		

BOD値が400mg/Lに相当

表-2 馴致培養条件

方式	回分式活性汚泥法
流入水	高濃度人工下水(BOD : 200g/L)×120mL + 脱気水道水60L
流入水量	60L/回
容量	100L
水温	15~16℃
pH	6.6~7.0
MLSS	3,000mg/L(300g/培養槽)
F/M	0.08kgBOD/(kgSS・day)
HRT	23hr
ASRT	8day

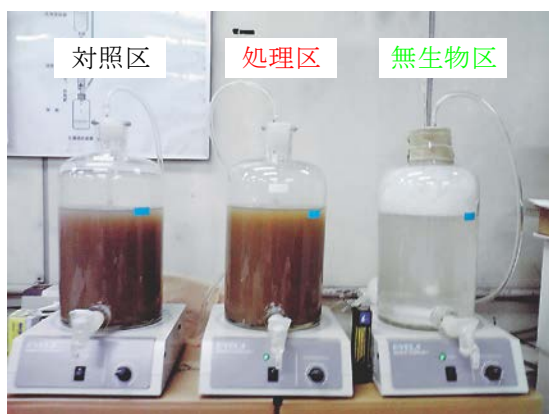


写真-1 活性汚泥処理実験

処理実験は下記の3区で並行実施した。

- ① 対照区（活性汚泥+人工下水）
- ② 処理区（活性汚泥+人工下水+CAM）
- ③ 無生物区（人工下水+CAM）

CAMの添加濃度は20μg/Lとした。実験開始時と終了時（23時間後）に温度、pH、DOC、NO₃-N、PO₄-Pを分析し、処理状況を確認した。分析方法は下水試験方法⁷⁾を参照して行い、DOC、NO₃-N、PO₄-Pは溶存態を分析対象とした。

2.2 代謝物の探索

代謝物の探索は、溶解性の物質を対象としGF/Fろ紙（0.7μm）によりろ過した溶存態試料を用いて行った。まず、固相カラム^{*2}抽出法による抽出前処理を行った。固相カラムには逆相ーイオン交換ミックスカラムのOASIS^R MCX、MAX

(Nihon Waters K.K.) を用いた。

前処理した検液を精製した後、液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いて分析した。液体クロマトグラフィー（LC）^{*3}の分離カラムにはODS（オクタデシルシリカ）カラムを用いた。LCに注入された検液は、分離カラム内で分離された後イオン化室に導入され、エレクトロスプレー（静電噴霧）によるイオン化（ESI）^{*4}が行われる。その後、質量分析（MS）^{*5}計でイオン化されたイオンを測定する。イオン化室では、プラス（+）イオン又はマイナス（-）イオンが生成することからMSではポジティブ（+）およびネガティブ（-）モードで測定を行う。検出されたピークには、プロダクトイオンスキャン^{*6}を行い、プロダクトイオンパターンの解析に用いた。

それぞれの実験区（対照区、処理区、無生物区）のデータを比較し、活性汚泥処理での代謝物の検討を行った。対照区では活性汚泥と人工下水に起因する物質が検出され、無生物区では人工下水に起因する物質とCAMが検出されると考えられるが、処理区では活性汚泥と人工下水に起因する物質とCAMに加え、CAMの代謝物が検出される可能性があることから、処理区に特異的に検出される物質の探索を行った。

3. 結果および考察

3.1 活性汚泥処理

活性汚泥処理実験における温度、pH、DOC、NO₃-N、PO₄-Pの測定・分析結果を表-3に示す。対照区および処理区の実験開始、終了時の温度、pHに大きな変化はなかったが、実験終了時にDOCは低下し、NO₃-Nは増加していた。好氣的エネルギー代謝に伴う基質消費が生じたと考えられる。一方、無生物区では、実験開始、終了時の温度、pH、DOC、NO₃-N、PO₄-Pに大きな変化はなく、基質間での化学反応を考慮する必要はな

表-3 活性汚泥処理実験の状況

項目	開始時			終了時		
	対照区	処理区	無生物区	対照区	処理区	無生物区
温度(℃)	18	18	18	19	19	19
pH	6.9	6.9	7.4	6.9	6.9	7.6
DOC(mg/L)	59.1	67.0	122.6	3.5	3.5	120.5
NO ₃ -N(mg/L)	2.0	0.8	< 0.1	37.0	38.2	< 0.1
PO ₄ -P(mg/L)	9.5	9.8	5.9	7.9	7.7	5.1

*土木用語解説：固相カラム、液体クロマトグラフィー（LC）、エレクトロスプレー（静電噴霧）によるイオン化（ESI）、質量分析（MS）、プロダクトイオンスキャン

いと思われる。なお、この結果のみからはCAMと基質との間での化学反応の可否は判断できない。また、無生物区のpHは対照区および処理区と比べ少し高かった。活性汚泥が存在しないことによる培養反応液の状態の違いが原因と考えられる。

3.2 活性汚泥処理代謝物の探索

(1) ポジティブモード測定での結果の解析

対照区、処理区のクロマトグラムを図-3に示す。処理区では対象区に見られないピークが時間15.35min（ピーク①）と時間15.70min（ピーク②）に確認された。ピーク①はマススペクトルより、 m/z で748が最大値であった。CAMのノミナル質量*7747に比べ m/z の値で1大きいことから、CAMにプロトンが付加した分子イオン*⁸であると考えられる。ピーク②は m/z で828が最大値であった。また、図-3では示していないが、無生物区ではピーク①は検出されたが、ピーク②は検出されなかった。これらの結果より、ピーク①はCAMの分子イオンであり、ピーク②は、ピーク①のCAMに比べ m/z 80大きいCAMの代謝物の分子イオンであると考えられる。

m/z 80の増加をもたらす変化としてはdesosamine（図-2のB）での5酸化、硫酸抱合などが考えられる（図4）。仮に5酸化が生じたとすると、新たに5つのヒドロキシル基が導入されたことになる。一方、硫酸抱合が生じたとすると、desosamineのヒドロキシル基において代謝反応が生じたことになる。

(2) ネガティブモード測定での結果の解析

ネガティブモードでは処理区においてのみ m/z 826のイオンが検出された。ESIにおいては、プロトンが脱離することによりネガティブイオン化が生じると考えられているため、 m/z 826はピーク②と同一分子である可能性がある。ネガティブイオン化は酸性基（カルボキシル基など）におけるプロトン脱離によって生じることが多いことが知られている。したがって、ピーク②はピーク①にはない酸性基を有していると考えられることから、ピーク①（CAM）の硫酸抱合による硫酸エステル部位においてプロトン脱離⁹が起こっている可能性が高いと考えられる。

硫酸抱合は哺乳類の抱合代謝反応*⁹として知られている。微生物における知見は少ないが、Da-Fang et al.⁹は、クスダマカビ（Cunninghamella

blakesleana）を用いてナプロキセン（解熱鎮痛剤）の代謝物の同定を試み、硫酸抱合が生じたと考えられる代謝物（Desmethylnaproxen-6-*O*-sulfate）を検出したと報告している。本報告の活性汚泥処理においても硫酸抱合が生じる可能性があり、ピーク②は、CAMに硫酸抱合が生じた代謝物であると考えられる（図-5）。

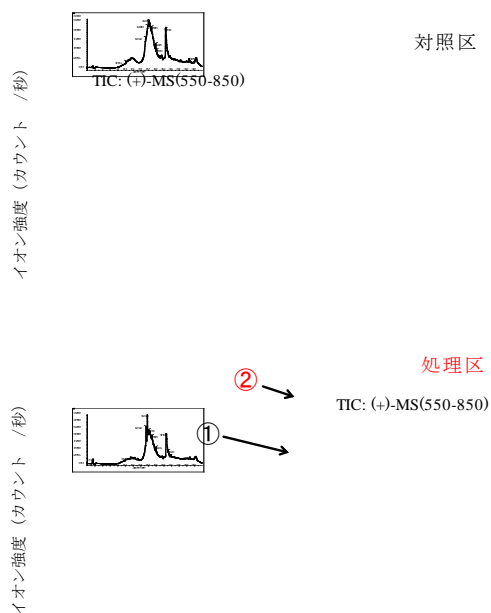


図-3 対照区、処理区におけるLC/(+)ESI-MSのクロマトグラム

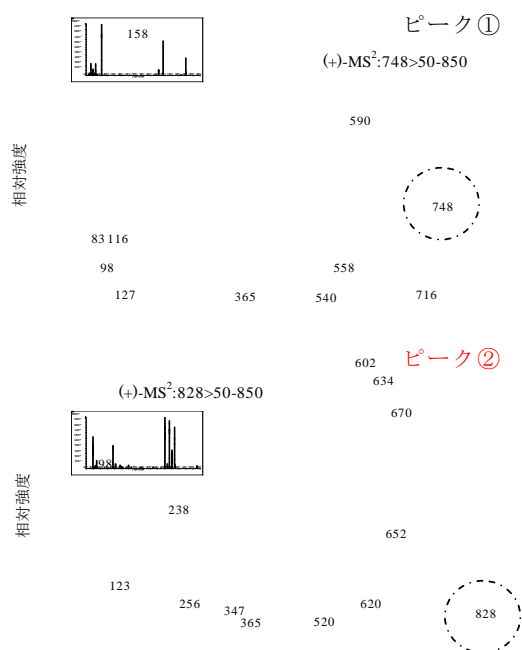


図-4 ピーク①、ピーク②のLC/(+)ESI-MS/MSのマススペクトル

*土木用語解説：ノミナル質量、分子イオン、抱合代謝反応

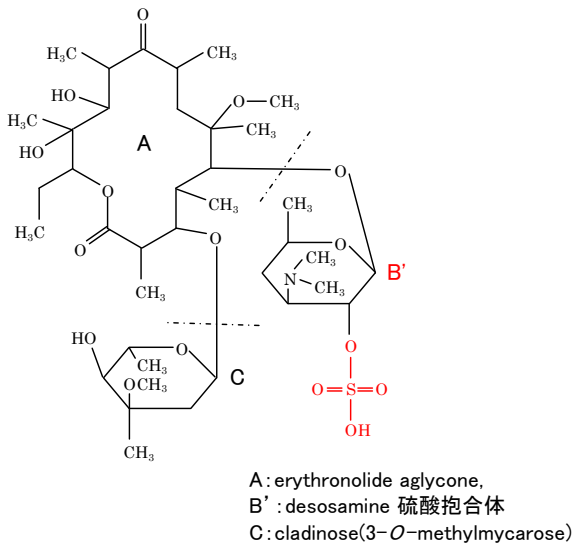


図-5 CAMの活性汚泥処理における代謝物の推定化学構造

4. まとめ

活性汚泥処理における医薬品代謝物の探索を目的としてCAMを用いて代謝物の探索を行ったところ以下の知見が得られた。

LC-MS/MSを用いた質量分析の結果、CAM代謝物候補として m/z 828の分子イオンが検出された。このイオンはCAM代謝物の分子イオンと考えられ、哺乳類の抱合代謝反応の一つである硫酸抱合と同様の反応によって生じたと考えることができる。

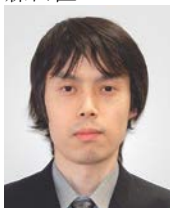
生物処理において代謝物の存在可能性が示唆されたことから、医薬品が水環境中で生物に与える影響を評価するためには、医薬品そのものの影響のみならず、代謝物の影響についても考える必要がある。今後は、代謝物の定量分析、生物影響について研究するとともに、実際の下水処理においてもこのような代謝反応が生じているのかという

視点での調査を行い、処理水に残存する毒性の原因の解明や水環境中で生物に与える影響の評価、その効率的な処理方法の開発のための知見を増やしていく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 清野敦子、古荘早苗、益永茂樹：わが国の水環境における人・動物用医薬品の存在、水環境学会誌、27、pp.385～691、2004
- 2) 小森行也、鈴木穰：生活排水の状況が異なる都市域小河川における医薬品の存在実態と生態リスク初期評価、水環境学会誌、32、pp.133～138、2009
- 3) Okuda, T., Kobayashi, Y., Nagao, R., Yamashita, N., Tanaka, H., Tanaka, S., Fujii, S., Konishi, C. and Houwa, I.: Removal efficiency of 66 pharmaceuticals during wastewater treatment process in Japan, Water Science and Technology, 57, pp.65-71, 2008
- 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：下水処理過程における医薬品の存在実態と挙動、環境工学研究論文集、46、pp.175～185、2009
- 5) 平田睦子、齋藤充生、三宅真二、長谷川隆一：医薬品の環境リスク評価に関する研究：環境中への排泄形態、国立医薬品食品衛生研究所報告書、124、pp.83～86、2006
- 6) エルゼビア・ジャパン：医薬品ランキング2010年版、Monthlyミクス、38、pp.50～54、2010
- 7) (社)日本下水道協会：下水試験方法 上巻、812p、(社)日本下水道協会、1997
- 8) Mitamura, K., Sakai, T., Nakai, R., Wakamiya, T., Iida, T., Hofmann, A. F. and Ikegawa, S.: Synthesis of the 3-sulfates of N-acetylcysteine conjugated bile acids (BA-NACs) and their transient formation from BA-NACs and hydrolysis by a rat liver cytosolic fraction as shown by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400, pp.2061-2072, 2011
- 9) Da-Fang, Z., Lu, S., Lei, L. and Hai-Hua, H.: Microbial transformation of naproxen by Cunninghamella species, Acta Pharmacol Sinica, 24, pp.442-447, 2003

森田匡一*



エヌエス環境株式会社 (前独立行政法人土木研究所つくば中央研究所水環境研究グループ水質チーム交流研究員)
 Masakazu MORITA

小森行也**



独立行政法人土木研究所つくば中央研究所水環境研究グループ水質チーム 総括主任研究員
 Koya KOMORI

南山瑞彦***



独立行政法人土木研究所つくば中央研究所水環境研究グループ水質チーム 上席研究員
 Mizuhiko MINAMIYAMA