

(51) コンポスト型トイレにおける抗生物質の分解に 及ぼすリン酸、アンモニア、pHの影響

柿本 貴志^{1*}・船水 尚行¹

¹北海道大学大学院工学研究科 (〒060-8628札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: kakimoto@eng.hokudai.ac.jp

本研究ではし尿中に排泄される医薬品を発生源において処理する装置としてコンポスト型トイレに着目し、コンポスト型トイレにおける抗生物質(Tetracycline(TC), Azithromycin(AZI), Levofloxacin(LEV))の挙動と分解に関与する因子(生物分解とトイレ担体内に存在する無機塩類)について検討を行なった。その結果コンポスト型トイレ内でLEVは安定して存在したが、TCとAZIの濃度低下が認められた。TCとAZIの濃度低下に及ぼす要因として生物分解とリン酸・アンモニア・pHによる無機化学的分解反応の2つについて検討した結果、生物分解ではなく、主に無機化学的な反応によってTCとAZIは分解されていると考えられた。

Key Words : Azithromycin, コンポスト型トイレ, 挙動, Levofloxacin, Tetracycline

1. はじめに

環境中における医薬品の存在や水棲生物などへ対する影響に関心が集まっている。医薬品は生体内で代謝され、し尿中に排泄されたのち、下水管を経て下水処理場に導かれるものの、下水処理場他での処理性が低いために水環境中に放出されているものも報告されている¹⁾。下水処理場において医薬品の除去が困難であるのは、医薬品が難分解性である上に尿中で mg/L レベルで存在している医薬品が他の排水や雨水、地下水などと混ざり希釈されてしまうことが大きな要因として挙げられる²⁾。また排水の輸送過程における医薬品の暗渠からの漏出も指摘されており³⁾、環境中に排出される医薬品の管理をするためには様々な課題が残されている。

著者らは家庭排水を発生源で分離してそれぞれを処理する排水分離分散型処理システム⁴⁾(図1)について開発・研究している。本システムで家庭排水はし尿からなるBlackwater、洗濯排水や台所排水からなるHigher load graywater、その他の有機物負荷の低いLower load graywaterの3種類に分離・処理される。Blackwaterは高濃度の易分解性有機物や栄養塩類を含んでいるため、生物学的処理による安定化や栄養塩の再利用を念頭に入れ、コンポスト型トイレを処理装置として想定している。この装置を用いて発生源においてし尿を含む排水の分離と処理を行なえば、輸送過程における医薬品の漏出や、

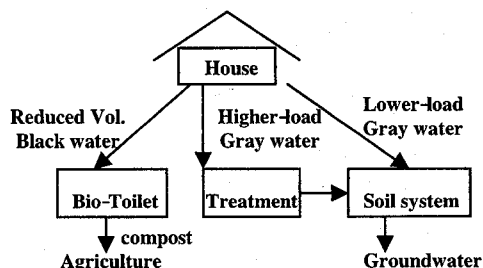
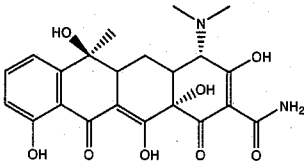
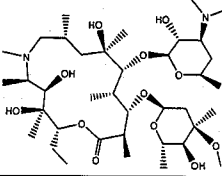
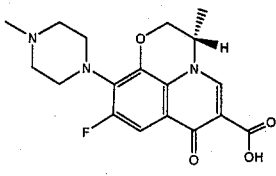


図1 排水分離分散型処理システム⁴⁾

他の排水による希釈がなくなり、効果的な医薬品の処理が行なえると考えられる²⁵⁾。

これまでコンポスト型トイレによる医薬品の処理性能について評価を行なってきた⁶⁾、抗生物質はβ-lactam系のAmoxicillin(AMO)を対象として検討を行ってきた。抗生物質の分解反応モデルを作成し、それを用いた検討を行った結果、コンポスト型トイレの微生物担体中に蓄積しているリン酸、アンモニア、OH⁻イオンのレベルから予測される分解速度と実験値が一致したため、AMOはこれらの成分により分解されていることが推定された⁸⁾。AMOは迅速にコンポスト型トイレにおいて分解されるが、他の種類の抗生物質の挙動に関する知見は得られておらず、他の種類の抗生物質のコンポスト型トイレにおける挙動とその影響因子を把握することは抗生物質の担体内での残留性を知る上で重要

表1 対象抗生物質の構造式と測定法

	Tetracycline	Azithromycin	Levofloxacin
構造式			
測定法	(9), (10)	(11)	(12), (13)
回収率	98±1.3%	95±4.1%	72±3.3%

である。通常一般家庭においては、抗生物質の服用期間は短いので本研究では主に使用されるとされている系統の抗生物質を選び、それらのコンポスト型トイレ内での短期的な処理性とその因子、特にリン酸、アンモニア、pHによる影響を把握することを目的とした。

2. 研究方法

(1) 検討対象抗生物質と測定法

表1に本研究で検討対象にした抗生物質を示す。測定は文献^{9,13}を参考にしTC、LEV、AZIそれぞれをEDTA含有クエン酸緩衝溶液、ジクロロメタン/メタノール、メタノールで抽出後、LCMSにより定量をおこなった。これらのグループの抗生物質は副作用が現れる可能性が低いことやその他臨床的な理由により、頻繁に利用されている¹⁴。

(2) 生物分解の影響評価

コンポスト型トイレ担体内に存在する微生物による抗生物質の分解影響を評価するために、まずコンポスト型トイレから採取してきたトイレの担体と、それを γ 線滅菌(25kGy)したものの2種類の担体を準備した。これら2種類の担体中における抗生物質の濃度変化を調べ、濃度変化パターンの違いから抗生物質の分解に及ぼす生物的影響を評価した。

(3) アンモニア、リン酸溶液内での抗生物質濃度変化の測定

アンモニア、リン酸、pHが抗生物質の分解に与える影響を評価するために、本実験ではアンモニア濃度0.1、0.5、1.0 mol/L、かつ、それぞれpH 7.0、pH 8.0、pH 9.0となるように調整した溶液9種類、リン酸についてもその濃度0.1、0.5、1.0 mol/Lの3段階、pHレベル3段階(pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0)の9種類の溶液を用意し、水温50℃の条件下で、溶液中における抗生物質の分解速度を調べた。溶液の調整法は次の通りである。

まず、濃度が0.1、0.5、1.0 mol/Lのリン酸二水素ナト

リウム、リン酸三ナトリウム、酢酸アンモニウム、炭酸アンモニウムの水溶液をそれぞれ調整した。次に、リン酸バッファはリン酸二水素ナトリウムとリン酸三ナトリウムの混合比率を、アンモニア水は酢酸アンモニウム、炭酸アンモニウムの混合比率を変え、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0の3段階のpHになるように調整した。上記溶液中からOASIS HLBを用いて抗生物質を抽出し、抗生物質濃度を測定した。

(4) 計算モデル

後述の通り、トイレ担体内における抗生物質濃度の変化や上記18種類の溶液内での抗生物質濃度変化は一次反応的な減衰を見せたため、抗生物質の分解予測モデルは一次反応として設定した(式2a)。抗生物質の包括的な分解速度定数(k_{obs})は各種イオンによる分解速度定数とそのイオンの濃度の積の和である(式2b)と仮定した。 k_N 、 k_p は式2c、2dの通り k_{NH_3} と NH_3 のモル分率の積、 $k_{HPO_4^{2-}}$ と HPO_4^{2-} のモル分率の積によって決まるものとした。これは NH_3 と HPO_4^{2-} が NH_4^+ や $H_2PO_4^-$ イオンよりも分解に与える影響が大きいと考えられるためである^{15,16}。式中の反応速度定数は(3)の水溶液中の抗生物質の分解実験より得られたデータを用いて決定した。

$$\frac{dC}{dt} = -k_{obs} C \quad (2a)$$

$$k_{obs} = k_o + k_N [A] + k_p [P] + k_{OH^-} [OH^-] \quad (2b)$$

$$k_N = k_{NH_3} f_{NH_3} \quad (2c)$$

$$k_p = k_{HPO_4^{2-}} f_{HPO_4^{2-}} \quad (2d)$$

ここで、

C: 各種抗生物質の濃度

A: アンモニア濃度

P: リン酸濃度

k_{obs} : 総括反応速度定数

k_o : 50℃の水中における分解速度定数

k_N : アンモニアによる分解の速度定数

k_p : リン酸による分解の速度定数

k_{OH} : ヒドロキシルイオンによる分解の速度定数

f_{NH_3} : NH_3 のモル分率 $f_{NH_3} = \frac{[NH_3]}{[NH_3] + [NH_4^+]}$

$f_{HPO_4^{2-}}$: HPO_4^{2-} のモル分率 $f_{HPO_4^{2-}} = \frac{[HPO_4^{2-}]}{[total\ phosphate]}$

(5) トイレ担体内における抗生物質の分解と計算結果の比較

計算モデルによる TC、AZI の分解パターンの予測値と実験値の比較を行なうために、リン酸とアンモニア濃度、pH の異なるトイレの担体を 2 種類(SD1、SD2)用意した。リン酸、アンモニアの濃度の推定のために 1N 硫酸を用いた抽出を 3 回 (おがくず乾燥重量 1g に対して 10ml、20ml、20ml) 行い、リン酸とアンモニアの抽出・定量を行なった。おがくず内におけるリン酸、アンモニアの濃度は、抗生物質分解実験のときのおがくず(含水率 50%)に含まれる水分量でリン酸、アンモニア抽出量を除いた値とし、pH は担体の含水率が 80% になるように水を加えて採取された抽出水の pH とした。これらの値から予測される抗生物質の分解パターンと含水率 50% に調整したおがくず内での抗生物質の分解の実測値を比較することにより、リン酸、アンモニア、pH の影響について評価した。

3. 結果・考察

(1) 生物分解の影響評価

図 2 に滅菌処理していない担体と滅菌済みの担体内における TC、AZI、LEV の分解パターンを示す。図 2 の通り TC と AZI について、生物の存在は検討対象抗生物質の濃度減衰に対して有意な影響を及ぼすことはなく、生物分解の影響は無視可能であると考えられる。一方 LEV の濃度は実験期間中にほぼ変化が見られなかったため、し尿のコンポスト化過程において LEV は安定して存在すると考えられた。ここにデータは示さないが、コンポスト化反応を担う微生物に対する LEV の呼吸活性の阻害効果は弱いと、LEV の残留が耐性菌の選択をすすめることは考え難い。これは LEV をはじめとするフルオロキノロン系の抗生物質が有機物やマグネシウム、カルシウムなどの金属イオンと強固な結合を形成するために、抗生物質の影響が弱められたものと考えられるが^{17,18)}、詳細な検討は今後の課題とする。

(2) アンモニア、リン酸溶液内での TC、AZI 濃度変化の測定

テトラサイクリン系抗生物質はリン酸、アンモニア、

pH の影響を受けて、濃度の減少または抗菌活性の不活化が引き起こされることが報告されている^{19,20)}。AZI が分類されるマクロライド系抗生物質は酸性条件下での安定性が低かったために、酸性条件下での安定性について調べた報告²⁰⁾は多数あるものの、本コンポスト型トイレ担体中のようなアルカリ条件下や高濃度の無機塩類が存在する系での安定性についての報告は少ない。

し尿中にはリン酸や尿素などが存在するため、コンポスト型トイレの担体内にはリン酸、アンモニア、OH イオンが高濃度で存在している。TC の分解に関与する因子は上述 3 種類のイオン以外にも多数存在すると考えられるが、コンポスト型トイレ内でのそれらのイオンの濃度が他のものに比べて非常に高いために、TC 分解の主要因になることが予想される。AZI の分解に対するリン酸、アンモニア、OH イオンの影響は不明であるが、AMO や TC の分解に影響を及ぼすイオンであるので、同様に検討を行なった。

a) Tetracycline の各種反応速度定数の測定

リン酸、アンモニア両水溶液中において TC の濃度減少が観察された。図 3 に示す通り、両溶液中での TC の減衰はばらつきがあるものの、ここでは一次反応と仮定した。アンモニア水、リン酸水溶液各々について式 2b は 3a、3b のように書き換えられる。

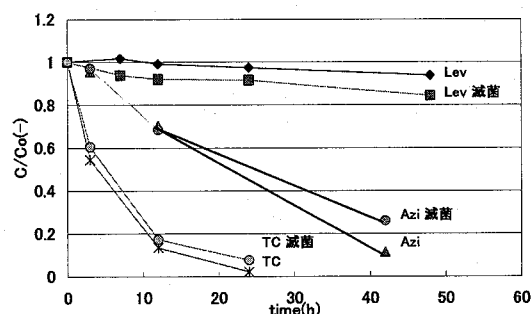


図2 滅菌・未滅菌担体中における抗生物質濃度の変化

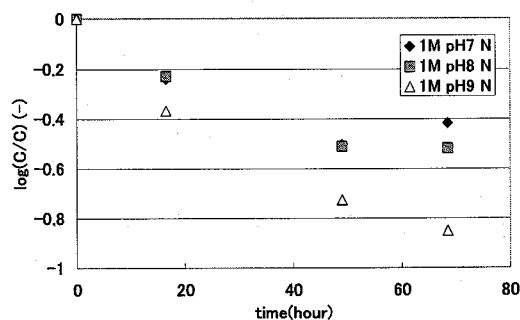


図 3a アンモニア水中におけるテトラサイクリンの分解

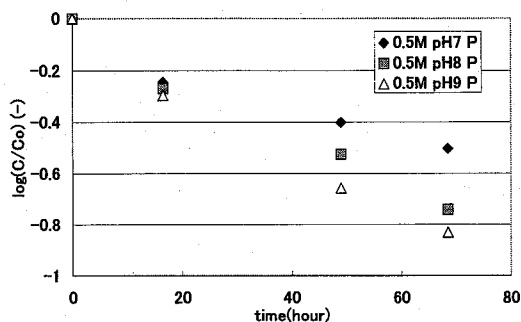


図 3b リン酸水溶液中におけるテトラサイクリンの分解

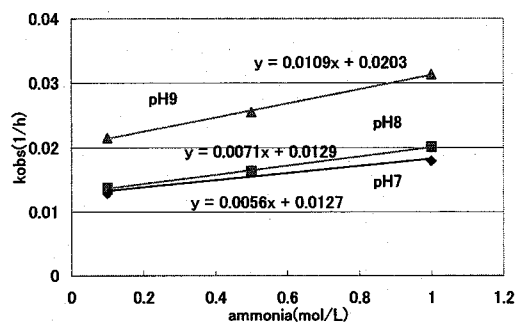


図 4a アンモニア濃度と k_{obs} の関係

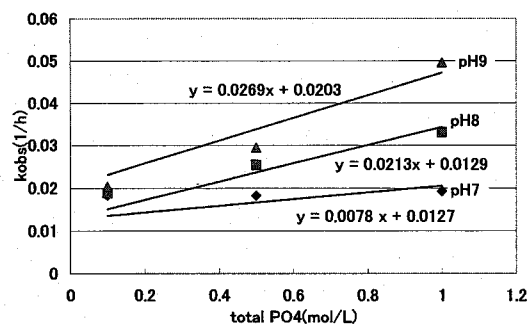


図 4b リン酸濃度と k_{obs} の関係

$$k_{obs} = k_o + k_N[A] + k_{OH^-}[OH^-] \quad (3a)$$

$$k_{obs} = k_o + k_P[P] + k_{OH^-}[OH^-] \quad (3b)$$

式 3a, 3b はアンモニア、リン酸濃度を変数と考えると、同一 pH 条件下においてはアンモニア、リン酸濃度に対して k_{obs} は直線関係になることを示している。そこでリン酸、アンモニア濃度に対する TC の分解速度定数(k_{obs})を図示すると(図 4)、モデルから考えられた通りに直線関係が得られた。図 4a, 4b の y 切片、つまりアンモニアやリン酸濃度がゼロの条件では、式 3a, 3b は式 3c のようになる。

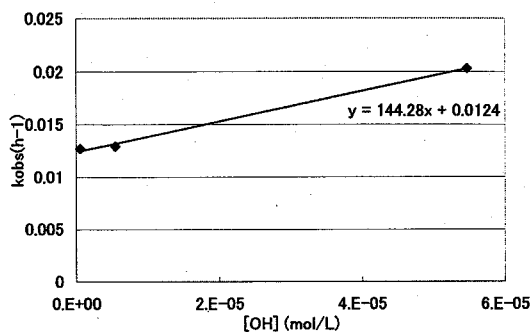


図 5 OH^- イオンと k_{obs} の関係

表 2 各 pH における k_N , k_P の値とリン酸、アンモニアの各種イオンの存在割合

		pH7	pH8	pH9
TC	$k_N (h^{-1} \cdot mol/L^{-1})$	0.0056	0.0071	0.011
	$k_P (h^{-1} \cdot mol/L^{-1})$	0.0078	0.021	0.027
AZI	$k_N (h^{-1} \cdot mol/L^{-1})$	-	-	-
	$k_P (h^{-1} \cdot mol/L^{-1})$	0.0061	0.011	0.018
	$f_{NH_3} (-)$	0.028	0.225	0.743
	$f_{HPO_4} (-)$	0.392	0.866	0.983

$$k_{obs} = k_o + k_{OH^-}[OH^-] \quad (3c)$$

アンモニア、リン酸濃度がゼロのときの k_{obs} 、すなわち y 切片は OH^- 濃度の一次式で表されることを式 3c は意味している。図 5 に k_{obs} (y 切片)と OH^- イオン濃度の関係を示す。 OH^- イオンと k_{obs} の間には直線関係が観察され、図 5 の勾配と切片から k_{OH^-} と k_o は各々 144 ($mol/L^{-1} \cdot h^{-1}$)、0.012 ($mol/L^{-1} \cdot h^{-1}$)とできる。表 2 に図 4 の直線の傾きより得られる各 pH における k_N , k_P の値と各 pH におけるリン酸、アンモニアのモル分率を示す。 k_{NH_3} , k_{HPO_4} 値は表 2 の pH8 と pH9 の時の値を用いて式 2c, 2d を k_{NH_3} , k_{HPO_4} について解けばよく、それぞれ 0.023 ($mol/L^{-1} \cdot h^{-1}$)、0.024 ($mol/L^{-1} \cdot h^{-1}$)となる。ここで、pH 7 のときのデータを使用しなかったのは、pH 7 のときは特に f_{NH_3} の値が小さく誤差が大きくなるためである。以上の検討から得られた反応速度定数を表 3 にまとめる。

b) Azithromycin の各種反応速度定数の測定

AZI の分解速度の解析は TC と同様の方法で行なった。リン酸、アンモニア水溶液中で AZI の濃度減少が確認されたため、リン酸、アンモニアの濃度に対する AZI の分解速度定数(k_{obs})を調べた(図 6)。図 6 よりアンモニア水中における AZI の分解はアンモニアの影響ではなく pH の影響であることがわかる。一方、リン酸バッファ中ではリン酸濃度が高くなるにつれて AZI の分解速度は上昇していることから、リン酸は AZI の分解に影響を及ぼしていることが分かった。式 3c より、図 6b の y 切片の値を OH^- イオン濃度に対して図示すれば OH^-

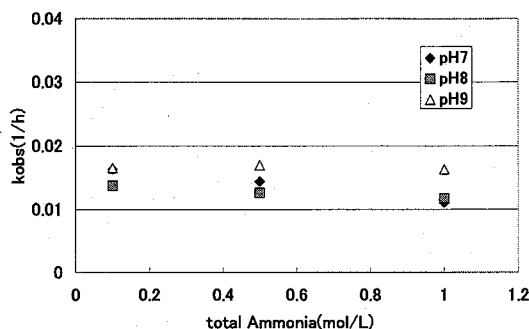


図 6a アンモニア濃度と k_{obs} の関係

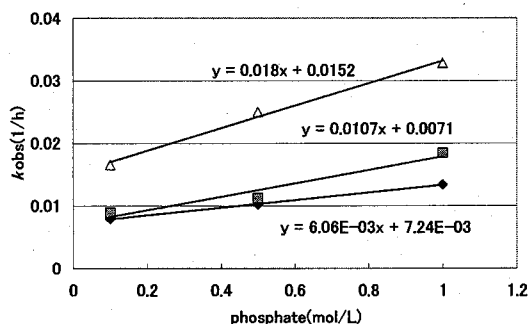


図 6b リン酸濃度と k_{obs} の関係

オンの影響を評価でき(図 7)、図 7 より k_0 と k_{OH} としてそれぞれ $0.0075 \text{ (h}^{-1} \cdot \text{mol/L}^{-1})$ 、 $109 \text{ (h}^{-1} \cdot \text{mol/L}^{-1})$ が得られる。

表 2 に図 6b の直線の傾きより得られる各 pH における AZI の k_p の値と各 pH におけるリン酸イオンのモル分率を示す。 k_{HPO_4} を求めるためには表 2 の値を用いて式 2d を k_{HPO_4} について解けばよく、3 段階の pH より求まる値の平均をとって k_{HPO_4} として $0.015 \text{ (h}^{-1} \cdot \text{mol/L}^{-1})$ となる。以上の検討から得られた反応速度定数を同様に表 3 にまとめる。

(3) 実測値とシミュレーションの予測値の比較

含水率 50% に調整した 2 種類のおがくず SD1、SD2 内におけるリン酸、アンモニア、pH の濃度の測定値を表 4 に、これらの値を用いて計算した結果と実測値の比較を TC については図 8 に、AZI については図 9 に示す。TC は実験値と計算による予測値が概ね一致しているため、おがくず内でのテトラサイクリンの分解はリン酸、アンモニア、pH によっていると推定できる。また AZI の場合は SD1 の場合にはほぼ実験値の再現が可能であったが、SD2 の実験値と計算値には若干のずれがあるため、おがくず内の他の物質が高 pH 条件下で AZI の分解を促進するなど、他の分解要因が存在していることが示唆された。

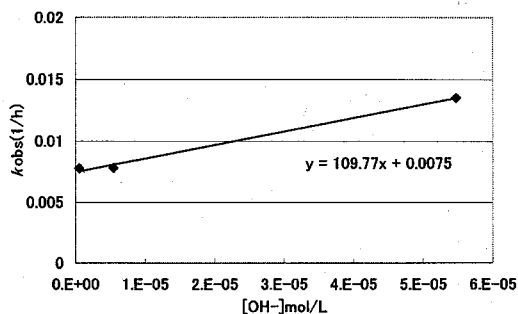


図 7 OH イオンと k_{obs} の関係

表 3 計算に用いる反応速度定数と各種濃度

	Tetracycline	Azithromycin
k_0	0.012	0.0075
k_{OH}	144	109
k_{NH_3}	0.023	-
k_{HPO_4}	0.024	0.015

表 4 計算に用いた各種濃度

	SD1	SD2
リン酸 (M)	0.42	0.33
アンモニア (M)	0.34	0.62
pH	7.4	8.6

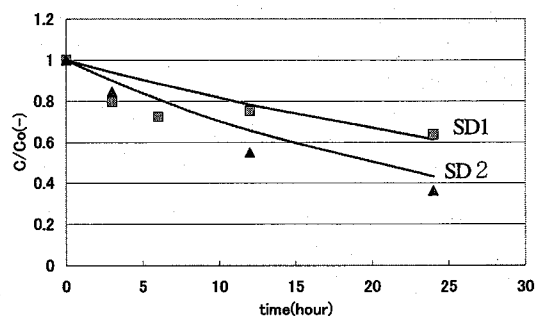


図 8 TC の実験値と計算による予測値の比較

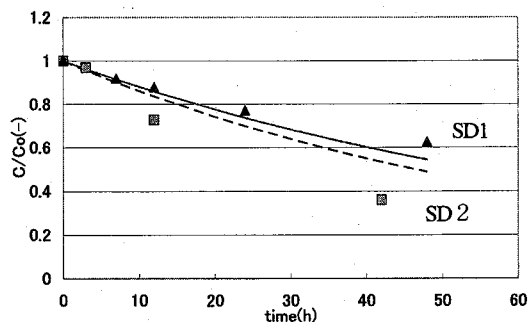


図 9 AZI の実験値と計算による予測値の比較

4. 結論

本研究では、使用頻度の高い系統の抗生物質のコンポスト型トイレにおける挙動と分解機構について検討を行い、以下の知見を得た。

1. コンポスト型トイレにおいてフルオロキノロン系の Levofloxacin は安定して存在しており、分解が困難であった。しかしテトラサイクリン系の Tetracycline、マクロライド系の Azithromycin の濃度は濃度は時間とともに低下した。
2. コンポスト型トイレにおける Tetracycline、Azithromycin の濃度の減少は生物学的な分解によるものではない。
3. Tetracycline の分解はトイレ担体中のリン酸、アンモニア、pH のレベルで説明が可能であり、分解は主にこれらの成分によって行なわれていると考えられた。
4. Azithromycin の分解はリン酸、pH のレベルで概ね評価可能であったが、特に高 pH 条件下では計算による予測値と実験値の間に解離があり、トイレ担体内の他の成分が分解に寄与している可能性が示唆された。

謝辞: 本研究は(独)科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業(CREST)の支援と財団法人昭和シェル石油環境研究助成財団の研究助成を受けて実施されました。ここに記して感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 清野敦子, 古荘早苗, 益永茂樹: 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, Vol.27, No.11, pp.685-691, 2004
- 2) Pronk W, Biebow M, Boller M: Treatment of source-separated urine by a combination of bipolar electrodialysis and a gas transfer membrane, Water Sci. Technol., Vol.53, No.3, pp.139-146, 2006
- 3) O.A.H.Jones, N.Voulvoulis, and J.N.Lester: Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment A Review, Environmental Engineering, Vol.22, pp.1383-1394, 2001
- 4) Lopez Zavala M. A., Funamizu N., Takakuwa, T.: Onsite Wastewater Differentiable Treatment System: Modeling Approach, Water Sci. Technol. Vol.46, pp.317-324, 2002
- 5) Larsen A. T., Lienert J., Joss J. and Siegrist H.: How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment, Journal of Biotechnology, Vol.133, pp.295-304, 2004
- 6) 柿本貴志, 大澤輝真, 船水尚行: し尿中に排泄された抗生物質が糞便のコンポスト化反応に与える影響, 環境工学研究論文集, 第 42 巻, pp.315-323, 2005
- 7) 柿本貴志, 船水尚行: コンポスト型トイレにおける循環器系医薬品の分解, 第 40 回日本水環境学会年会講演集, p.229, 2006
- 8) Takashi Kakimoto, Naoyuki Funamizu: Factors affecting the degradation of amoxicillin in composting toilet using sawdust as a matrix, Chemosphere (Accepted)
- 9) 厚生労働省、食品、添加物等の規格基準、厚生労働省告示第三百七十七号
- 10) Cinquina A.L., Longo F., Anastasi G., Giannetti L. and Cozzani R.: Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, Journal of Chromatography A, Vol.987, pp.227-233, 2003
- 11) Löffler D. and Ternes T.A.: Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Volume 1021, No.1-2, pp.133-144, 2003
- 12) Waters: Waters 技術資料, <http://www.waters.co.jp/>
- 13) 八十島誠、小林義和、中田典秀、小森行也、鈴木穰、田中宏明: 下水処理場における人用抗生物質の挙動、環境工学研究論文集, 第 42 巻, pp.357-368, 2005
- 14) 八木澤守正: 我が国における施設内感染等のあり方に関する研究、平成 11 年度厚生科学研究費補助金【新興・再興感染症研究事業】、1999
- 15) 大木道則、大沢利昭、田中元治、千原秀昭、化学大辞典第 6 版、東京化学同人、2001
- 16) 長倉三郎、井口洋夫、江沢洋、岩村秀、佐藤文隆、久保亮五、岩波理化学辞典、第 5 版、岩波書店、1998
- 17) Wetzstein H.G., Schmeer N. and Karl W.: Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus Gloeophyllum striatum: identification of metabolites, Appl. Environ. Microbiol., Vol.63, pp.4272-4281, 1997
- 18) Ross D. L. and Riley C. M.: Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. III. Complexation of lomefloxacin with various metal ions and the effect of metal ion complexation on aqueous solubility, International Journal of Pharmaceutics, Vol.87, pp.203-213, 1992
- 19) Kawabata T., Sakaguchi G., Nakamura Y. and Akano T.: Factors affecting the decomposition of oxytetracycline and chlortetracycline, The Journal of Antibiotics, Ser.A, Vol.13, No.3, pp.180-185, 1960
- 20) 田中信男、中村昭四郎、抗生物質大要第 4 版、p.120、東京大学出版会、1995

- 21) 残留動物用医薬品試験法検討委員会: 畜水産食品中に残留する動物用医薬品の試験法(その 7), 食品衛生研究, Vol.50, No.10, 2000
- 22) Fiese E.F. and Steffen S.H.: Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin A, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol.25, Suppl.A, pp.39-47, 1990

(2006. 5. 26 受付)

Effect of phosphate, ammonia and pH on the degradation of antibiotics in the composting toilet

Takashi KAKIMOTO¹, Naoyuki FUNAMIZU¹

¹Div. Built Environment, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

In this study, the fate of three kinds of antibiotics (Tetracycline, Azithromycin, Levofloxacin) and factors affecting their degradation in the composting toilet were investigated. The result indicated that the concentration of Tetracycline and Azithromycin declined, but Levofloxacin was not degraded in the composting process. To know the factors affecting the degradation of these antibiotics in the composting process, effect of bacterial consumption of antibiotics was evaluated by comparing the ordinary toilet matrix with the sterilized one, and it was found that biological effect can be negligible. Then we evaluated the effect of HPO_4^{2-} , NH_3 and OH^- ions by determining each ionic degradation rate constant, by comparing the experimental degradation profiles and simulated ones. This revealed that the degradation of Tetracycline and Azithromycin were affected by the concentration of HPO_4^{2-} and OH^- ions in the composting toilet.