

## B-21 下水処理場における レチノイン酸とその代謝物の挙動の解析

○井上 大介<sup>1\*</sup>・澤田 和子<sup>1</sup>・和田 祐一郎<sup>1</sup>・清 和成<sup>1</sup>・池 道彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

\* E-mail: inoue@wb.see.eng.osaka-u.ac.jp

### 1. はじめに

レチノイン酸 (RA) 受容体 (RAR) は、ビタミンAの代謝物であるall-trans RA (atRA) をリガンドとする核内受容体であり、脊椎動物の視覚や形態形成、発生、細胞分化、組織の恒常性維持など、多様な機能の制御を司っている。一方、RARシグナルの過剰発現は、様々な脊椎動物種に対して骨格形成異常や眼球異常などの催奇形作用をもたらすことから、RARアゴニスト様作用をもつ化学物質による環境汚染はヒトや野生動物に対して重篤な健康影響をもたらす可能性がある。

近年、北米<sup>1)</sup>や中国<sup>2)</sup>において、RARアゴニストによる水環境汚染が報告され、北米ではRARアゴニスト汚染が湖沼で大発生したカエルの形態異常の原因であると推定されている<sup>1)</sup>。また、我々の既往研究から、日本の水環境でもRARアゴニスト汚染が生じていることが明らかになった<sup>3,4)</sup>。これらの汚染の原因物質については、中国・北京の下水処理場およびその放流河川で調査を行ったZhenらの検討により、下水中の主要なRARアゴニストが、RAの酸化代謝物である4-oxo-atRAと4-oxo-13-cis RA (4-oxo-13cRA) であることが初めて明らかにされた<sup>2)</sup>。また、我々の日本における調査から、下水中には4-oxo-atRAと4-oxo-13cRAの他に、それらの親物質であるatRAと13cRAも含まれていることが明らかになった<sup>5)</sup>。

本研究では、RA類、4-oxo-RA類の下水処理プロセスにおける挙動・除去特性を明らかにするため、実下水処理場における挙動調査と回分リアクターを用いた処理実験を実施した。

### 2. 実験方法

#### (1) 実処理場における挙動調査

実処理場内におけるRA類および4-oxo-RA類の挙動を

明らかにするため、2010年3月に大阪府下の6ヶ所の実下水処理場 (A~F) において調査を実施した。生物処理方式として、処理場A, Bでは標準活性汚泥法 (CAS)、処理場CではCASおよび凝集剤併用型嫌気無酸素好気法 (C-A2O)、処理場DではCASおよびステップ流入式硝化脱窒法 (S-硝化脱窒)、処理場Eでは嫌気好気法 (AO)、処理場FではCASおよび嫌気無酸素好気法 (A2O) を採用している。各処理場において、最初沈殿池および最終沈殿池の越流水を採取し、RARアゴニスト活性の測定とRA類、4-oxo-RA類の定量分析に供した。

#### (2) 回分試験による除去メカニズムの調査

活性汚泥処理におけるRA類および4-oxo-RA類の除去メカニズムを明らかにするため、回分試験を実施した。試験には、ペプトン、酵母エキス、尿素を主成分とする合成下水で長期間馴養した活性汚泥を用いた。1 L容ビーカーに滅菌した合成下水を入れ、そこに活性汚泥あるいはホルムアルデヒドで不活性化させた汚泥 (それぞれ1000 mg-SSL) を添加し、それぞれ実験系 I, IIとした。ここに、RA類、4-oxo-RA類 (それぞれ10 µg/L) を添加した後、25°Cに保ったインキュベーター内に入れ、散気球で空気を送りこむと共に、500 rpmで攪拌して試験を行った。試験中は、経時的に試料を採取し、酵母two-hybrid法とLCMS分析に供した。

#### (3) 試料の前処理

各試料は、ガラス繊維濾紙 (GF/B, Whatman製) で濾過した後、Oasis HLBカートリッジ (Waters製) を用いた固相抽出に供し、極性物質を濃縮した。酵母two-hybrid法に供する場合はH<sub>2</sub>O、LCMS分析に供する場合は40% アセトニトリルでカートリッジを洗浄した後、捕捉されている物質をメタノールで溶出し、N<sub>2</sub>ガス気流下で乾燥後、ジメチルスルホキシド (酵母two-hybrid法) あるいはメタノール (LCMS分析) に転溶した。

#### (4) 酵母two-hybrid法

RARアゴニスト活性の測定は、ヒトRAR $\alpha$ を対象とした酵母two-hybrid法により実施した<sup>4)</sup>。複数の試料濃度で得られたRARアゴニスト活性から用量反応曲線を作成して半影響濃度 (EC50) を求め、atRA当量値 (atRA-EQ<sub>50</sub>) を算出した。

#### (5) LCMS分析

RA類、4-oxo-RA類の定量分析は、LCMS-2010EV (島津製作所製) を用いて行った<sup>9)</sup>。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (ネガティブモード) で行い、*m/z* 299 (RA類)、313 (4-oxo-RA類) をモニターした。LCMS分析で得られた各物質の定量値と、各物質のRAR $\alpha$ アゴニスト活性のatRA等価係数 (atRA : 1, 13cRA : 0.0066, 4-oxo-atRA : 2.7, 4-oxo-13cRA)<sup>9)</sup> を乗じた総和により、atRA当量値 (atRA-EQ<sub>chem</sub>) を求めた。

### 3. 実験結果と考察

#### (1) 下水処理場におけるRA類と4-oxo-RA類の挙動

6ヶ所の実下水処理場の流入水および処理水におけるRA類と4-oxo-RA類の定量分析結果およびatRA-EQ<sub>chem</sub>、atRA-EQ<sub>50</sub>の算出結果を表1に示す。流入水中のRA類、4-oxo-RA類の濃度は、atRAが<1.0~5.0 ng/L、13cRAが<5.0 ng/L、4-oxo-atRAが<0.5~5.3 ng/L、4-oxo-13cRAが1.7~70.2 ng/Lであり、4-oxo-13cRAが最も高濃度であった。これら

の定量結果と各物質のatRA等価係数から算出したatRA-EQ<sub>chem</sub>は3.0~42.7 ng/Lであり、酵母two-hybrid法で測定されたRARアゴニスト活性に基づくatRA-EQ<sub>50</sub> (12.0~38.7 ng/L) の16~270% (平均86%) を占めた。このことから、本研究で調査したRA類および4-oxo-RA類が下水中の主要なRARアゴニストであることが示唆された。

処理水中のRA類、4-oxo-RA類は、処理場DのCASで4-oxo-13cRAが0.6 ng/Lであったことを除き、定量下限値 (atRA : 0.5 ng/L, 13cRA : 2.5 ng/L, 4-oxo-atRA : 0.25 ng/L, 4-oxo-13cRA : 0.5 ng/L) 以下であった (表1)。このことから、RA類、4-oxo-RA類は活性汚泥処理によって除去されやすい物質であることが示唆された。また、概してRA類、4-oxo-RA類の減少に伴い、atRA-EQ<sub>50</sub>も低下する傾向が観察された。しかし、処理場DのCASの処理水においては、atRA-EQ<sub>chem</sub>は0.8 ng/Lであったが、atRA-EQ<sub>50</sub>は19.5 ng/Lであり、atRA-EQ<sub>chem</sub>に比べて非常に高い値を示した。この傾向は別の日に採取した試料においても確認されたことから (データ不掲載)、処理場DのCASでは、活性汚泥処理の過程でatRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRAとは異なる新たなRARアゴニストが生成していることが示唆された。

#### (2) RA類、4-oxo-RA類の除去メカニズム

実験系 I (活性汚泥を添加)、II (不活性化した汚泥を添加) におけるRA類、4-oxo-RA類の残存率の経時変化を図1に示す。atRAと13cRAは、実験系 I、IIともに、0.5時間後までに70%程度が除去された。0.5時間以降は、

表1 実下水、処理水中のRA類、4-oxo-RA類の濃度とatRA-EQ<sub>chem</sub>およびatRA-EQ<sub>50</sub>

処理場	処理方式 <sup>a</sup>	試料	濃度 (ng/L)				atRA-EQ <sub>chem</sub> (ng/L) <sup>b</sup>	atRA-EQ <sub>50</sub> (ng/L)
			atRA	13cRA	4-oxo-atRA	4-oxo-13cRA		
A	CAS	流入水	1.7	<5.0	<0.5	1.7	3.0	19.2
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	1.6
B	CAS	流入水	2.1	<5.0	2.5	70.2	34.8	12.9
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	0.5
C	CAS	流入水	5.0	<5.0	<0.5	8.6	8.9	29.0
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	1.4
	C-A2O	流入水	4.3	<5.0	<0.5	5.0	6.8	24.0
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	1.4
D	CAS	流入水	<1.0	<5.0	1.6	32.0	16.7	17.8
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	0.6	0.8	19.5
	S-硝化脱窒	流入水	<1.0	<5.0	2.4	17.7	13.5	12.0
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	1.4
E	AO	流入水	2.6	<5.0	<0.5	12.0	7.7	13.9
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	0.2
F	CAS	流入水	<1.0	<5.0	5.3	7.9	17.7	30.4
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	0.45
	A2O	流入水	2.5	<5.0	5.3	70.0	42.7	38.7
		処理水	<0.5	<2.5	<0.25	<0.5	0.7	0.5

<sup>a</sup> CAS : 標準活性汚泥法, AO : 嫌気好気法, A2O : 嫌気無酸素好気法, C-A2O : 凝集剤併用型 A2O 法, S-硝化脱窒 : ステップ流入式硝化脱窒法。

<sup>b</sup> 定量下限値以下のものは、定量下限値の 1/2 の濃度として算出。

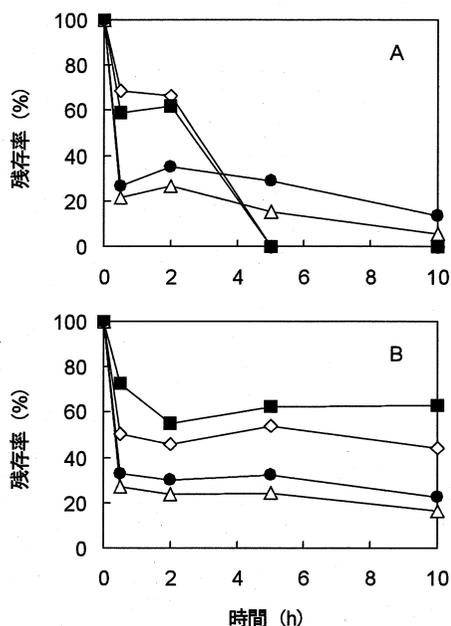


図1 実験系 I (A) および実験系 II (B) における atRA (●), 13cRA (△), 4-oxo-atRA (■), 4-oxo-13cRA (◇) の残存率の変化

atRA, 13cRAともに、実験系 II ではほとんど減少しなかったが、実験系 I では徐々に減少し、10時間後の残存率はそれぞれ14%, 5.4%となった。他方、4-oxo-atRAと4-oxo-13cRAは、実験系 II では、2時間後までに50%程度が除去され、それ以降はほとんど変化しなかった。実験系 I においては、0.5時間後までに、4-oxo-atRAは41%、4-oxo-13cRAは31%が除去された後、2時間後までは変化しなかった。しかし、その後除去がさらに進行し、両物質とも5時間後までに検出下限値以下に達した。以上のことから、RA類は主に汚泥への吸着によって水中から除去されるが、4-oxo-RA類は汚泥吸着によって部分的に除去された後、活性汚泥微生物による生分解によって完全に除去されることが示唆された。

図2に実験系 I, II における atRA-EQ<sub>rem</sub> と atRA-EQ<sub>to</sub> の残存率の経時変化を示している。実験系 II においては、atRA-EQ<sub>to</sub> と atRA-EQ<sub>rem</sub> は同様の経時変化を示し、試験開始直後に RA 類、4-oxo-RA 類の汚泥吸着とともに低下した後、ほぼ低下せず、50-60%の残存率で推移した。一方、実験系 I においては、atRA-EQ<sub>rem</sub> は RA 類、4-oxo-RA 類の減少に伴い低下し、5時間後には残存率が0.6%に達した。しかし、atRA-EQ<sub>to</sub> の低下は atRA-EQ<sub>rem</sub> の低下に比べて非常に緩やかであり、10時間後でも50%以上が残存した。このことから、活性汚泥微生物による4-oxo-RA類の生分解によって新たなRARアゴニストが生成した可能性が考えられた。

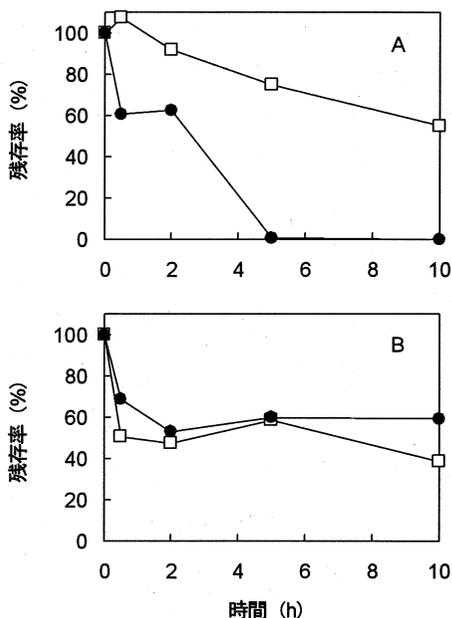


図2 実験系 I (A) および実験系 II (B) における atRA-EQ<sub>rem</sub> (●) と atRA-EQ<sub>to</sub> (□) の残存率の変化

#### 4. まとめ

本研究で得られた結果から、下水中の主要なRARアゴニストであるRA類、4-oxo-RA類は活性汚泥処理によって除去されやすい物質であり、RA類は汚泥への吸着、4-oxo-RA類は汚泥への吸着および微生物による生分解によって除去されることが明らかになった。また、4-oxo-RA類の生分解に伴い、新たなRARアゴニストが生成する可能性のあることも明らかになった。今後は、この未知のRARアゴニストを特定し、RARアゴニストの下水処理プロセスにおける挙動の全容を明らかにし、下水処理場由来のRARアゴニストによるヒトや野生生物への悪影響の可能性について検討していくことが重要である。

謝辞：本研究の一部は、環境省環境研究総合推進費 (C-0802) の支援により実施された。ここに記して謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) Gardiner et al. (2003) *Pure Appl. Chem.* 75, 2263-2273.
- 2) Zhen et al. (2009) *Environ. Sci. Technol.* 43, 6611-6616.
- 3) Inoue et al. (2009) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 399-404.
- 4) Inoue et al. (2010) *Water Res.* 44, 2409-2418.
- 5) 井上ら (2010) 第44回日本水環境学会年会講演集 p. 215.