〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
27 (6) 388—390 (1981)

チメロサル耐性菌による廃棄ワクチン中水銀の
処理・実用化のための検討

渡辺邦子, 小林広茂
千葉県血清研究所

Biodegradation of Thimerosal in Discarded Vaccines by
Thimerosal-Resistant Bacteria

KUNIKO WATANABE and HIROSHIGE KOBAYASHI
Chiba Serum Institute, 2-6-1, Kōnodai,
Ichikawa-shi, Chiba

(Received July 9, 1981)

The vaccines expired a term of validity were incubated with thimerosal (ThM)-resistant bacteria and about 95 % of ThM content could be eliminated from the suspension. The conditions were as follows; vaccines 9 l, bacterial suspension 0.5 l, and normal broth 0.5 l were incubated at 27°C at air bubbling rate of 0.8—1.2 l/min. ThM was decomposed to vaporize mercury which was trapped by activated carbon.

Safety of the air after passing through the tube packed with activated carbon was tested by using mice; survival numbers and mercury levels accumulated in the organs were compared to the mice inhaling treated or non-treated air. All mice exposed to the air through the carbon tube were alive (10/10) and showed body weight gain (+0.95 g) after 4 d incubation.

The mercury levels accumulated in organs of mice were the highest in the kidneys, when the carbon trap was used, but with the carbon trap, only 0.2—0.3 μg mercury per wet g was detected in the kidney and lungs. It is very effective way for the protection of environmental pollution to pass through the carbon tube, although a long exposure experiment of mice has not been done.

After treatment by this method, residual mercury was detected at a concentration of 2.46 ± 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\pm$ S. D. of 18 runs) in the solution.

Keywords——thimerosal resistant *Pseudomonas*; mercury removal method; inhaling air; activated carbon; accumulated in mouse organs; discarded vaccine

緒 言

ワクチン廃棄液上清より分離したチメロサル(ThM)耐性菌, *Pseudomonas* sp. は ThM を取り込み, 無機水銀化し, 更に揮発性水銀として気化し, 溶液中の水銀を減少させる. この菌を用いてワクチン廃棄液中の水銀除去について, 実用上の利用を指向し, 検討を行ったので報告する.

実 験 の 部

1. 試薬 (1) 市販特級 (2) マウス: ddy 系 4 週

齢雌 (体重 20—22 g) (3) 使用菌: *Pseudomonas* sp. (ThM 耐性菌) 前報¹⁾ 分離菌.

2. 試料 インフルエンザ HA ワクチン原液.

3. 装置 処理槽 (15 l), 冷却器 (ジムロート冷却器), 活性炭吸着筒 (直径 4 cm, 長さ 30 cm, 粒状活性炭 100 g), 恒温槽 (太洋, ミンダー), エアコンプレッサー (日立), 流量計 (東洋理化, TM-3) (Fig. 1).

4. 処理方法 処理槽にワクチン廃棄液 9 l, 普通ブイヨン 0.5 l, 菌植種液 0.5 l (約 $5 \times 10^9/\text{ml}$) シリコ

ン3滴を入れ、27℃の恒温槽中で空気流入量0.8—1.2 l/min で曝気しながら一定時間インキュベートする。シリコンは泡立ちを防ぐため、また、冷却器は処理槽からの空気を冷却し水分を除去し、活性炭の劣化を防ぐため挿入した。活性炭筒の中には活性炭層の外側にヨウ化第一銅粉末を入れ、その赤化を活性炭劣化の指標とした。

Fig. 1. Apparatus for Biodegradation of Thimerosal by Bacteria (*Pseudomonas* sp.)

Conditions: air flow: 0.8—1.2 l/min, incubation temperature: 27°C, treating chamber: vaccine solution 9 l, normal broth 0.5 l, bacterial solution 0.5 l, silicone 3 drops.

5. 分析方法 5.1. ワクチン中水銀量定量——前

報¹⁾ 記載通り。原子吸光々度法による。

5.2. 臓器中水銀量——充分脱血した後、マウス臓器を取り出し、生理食塩水で洗滌後、ろ紙で軽く脱水し重量を測定する。各実験群の臓器をそれぞれ細切し 5.1. の方法により測定した。

実験結果及び考察

1. 菌植種液継続使用の可能性検討

約 5×10^9 /ml の菌液 0.5 l を菌液を菌植種液とし、処理方法に従ってワクチン廃棄液とインキュベーションする。4日目又は7日目にその 0.5 l をとり、それを菌液として新たなワクチン廃棄液に加え、更に普通ブイヨン 0.5 l を加え再び曝気する。この操作を数回繰り返す。

行ったところ、4日目毎に新しい廃棄液に植種し処理を行ったものは、Fig. 2 に示すように 94—96 % の ThM が常に除去されており、12回連続継代処理後も除去率に変化はなかった。一方、7日目毎に処理を行った場合は1回目90%、2回目80%、3回目50%と除去率が低下していき、生菌数量および処理能力からインキュベーション後3—4日目毎に継続処理するのが良いと考えた。

Fig. 2. Effect of Circulating Use of Bacterial Suspension for Removing Mercury

●: 4 d intervals.
○: 7 d intervals.

2. 活性炭による気化水銀吸着能の検討

^{203}Hg を用い菌体により気化された水銀は、ほぼ 100 %活性炭により捕集されることはすでに報告した。²⁾ ThM 耐性菌を用いてワクチン廃棄液処理を行うこの方法では、気化した水銀が一定濃度で平均して出てくるのではなく、化学的に測定を行うには連続して試料を採取しなければならず難しい。しかし、この方法を実用化するには、活性炭の吸着能を安全性の点から検討しておく必要があり、マウスを用いてその生存率、臓器中水銀蓄積量の比較を行った。方法はマウスケージをビニール袋で包み、処理槽から冷却管、活性炭層を通過した空気をケージ内に流入させ、ケージ内マウスの生存および4日

TABLE I. Survival Test of Mice Inhaling Air with or without Passage of the Tube packaged with Activated Carbon

Treatment	Survival rate $\left(\frac{\text{Survival animal}}{\text{Used animal}}\right)$				Increased weight (g) ^{c)}
	Aeration days				
	1	2	3	4	
Pre carbon	10/10	0/10			
Post carbon	10/10	10/10	10/10	10/10	+0.95
Control 1 ^{a)}	10/10	10/10	10/10	10/10	+0.09
Control 2 ^{b)}	10/10	10/10	10/10	10/10	+1.17

a) Control 1: air bubbling into discarded vaccine.

b) Control 2: normal breeding mice.

c) These values are mean values and are not significant each other.

間インキュベーション後の体重増減, 臓器中水銀量を測定した. 活性炭通過前の空気を吸入したマウスの臓器中水銀量は, 8割以上が死亡した時点で曝気を止め, 方法に従い測定した. なお, ケージ全体を密閉したことによる酸素欠乏, ストレス等のマウスに与える影響をみるため, ワクチン廃棄液のみを曝気し, その空気をケージ内に流入させたもの (control 1), 正常飼育マウス (control 2) も併せておいた. Table I は活性炭層通過後の空気を吸入したマウスの生存および体重増減を示すものであるが, 活性炭通過前のマウスは2日目にすべてが死亡したのに対し, 通過後のマウスは control 1, 2 と同様, 1匹も死亡せず, また, 体重増加も平均+0.95 g で control 1 の +0.09 g, control 2 の +1.17 g と有意差はみられなかった. 臓器中の水銀量を比較してみると (Table II), 肝, 腎, 肺臓いずれの臓器中の水銀量も活性炭通過前のマウスでは多量に検出され, 特に腎臓では 67.7 $\mu\text{g/g}$ とかなり高い値が認められた. 活性炭通過後のマウスの臓器中の水銀量は, 正常飼育マウスとほとんど変りなく有意差はみられなかった. しかし, これは短期間の観察結果であり, 更に長時間飼育し, 慢性毒性を調べ安全性を確認する予定である.

3. ワクチン廃棄液処理および残存水銀量

上記のように, 活性炭を用い, 4日目毎の継続処理が可能であることが判ったため, Fig. 1 の装置を用いワクチン廃棄液を処理し, 残存水銀量を測定した (Table III). 処理後の残存水銀量は, いずれも 1—5 $\mu\text{g/ml}$ に低下していた.

ま と め

ThM 耐性菌 *Pseudomonas* sp. を用いてワクチン廃棄液よりの水銀の除去方法を検討した.

1. 処理に必要な植種菌量は約 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ (最終濃度) であるが, 4日目毎に曝気を止め, 新しい処理廃液 9 l に処理液 0.5 l 及び普通ブイヨン 0.5 l を添加していくことで, 長時間同一レベルの水銀除去率が得られた (94—96%).

2. 菌体により取り込まれ, 気化された水銀は, 粒状活性炭層によりほぼ完全に吸着され, 活性炭通過後の空気を吸入させたマウスは, 体重増加量および臓器中に蓄

TABLE II. Detection of Mercury in Mice Organs

Organs	Mercury ($\mu\text{g/g}$)			n^b
	Liver	Kidney	Lung	
Pre carbon	9.8	67.7	20.7	10
Post carbon	0.04	0.2	0.3	10
Control ^{a)}	0.04	0.3	0.3	10

a) Control: normal mice.

b) n: numbers of mice.

TABLE III. Residual Mercury in Discarded Vaccines after Treating by *Pseudomonas* sp.

Sample	Thimerosal contents ($\mu\text{g/ml}$)	Residual mercury ($\mu\text{g/ml}$)
1	78	2.2
2	72	1.4
3	80	1.8
4	85	2.5
5	84	3.5
6	128	1.0
7	92	1.0
8	96	2.0
9	96	0.8
10	93	5.3
11	91	4.5
12	92	1.5
13	92	1.8
14	92	4.5
15	92	1.8
16	86	3.3
17	82	2.5
18	82	2.8
Average		2.46
Standard deviation		0.62

積された水銀量どちらも正常飼育マウスに近い値を示し, 有意差は認められなかった.

3. 実際にワクチン廃棄液を処理したところ, 残存水銀量は平均 $2.46 \pm 1.30 \mu\text{g/ml}$ ($n=18$) であった.

謝辞 御校閲を戴きました国立衛生試験所医化学部 山羽 力部長, 田中 彰室長に感謝いたします.

引用文献および注

- 1) 渡辺邦子, 小林広茂, 衛生化学, **27**, 156-162 (1981).
- 2) 渡辺邦子, 小林広茂, 田中 彰, 衛生化学, **27**, 179-183 (1981).