下水処理水中に含まれるレボフロキサシン，クラリスロマイシンの 分析と藻類生長への影響

八 十 島 誠* 山 下 尚 之** 中 田 典 秀**
小 森 行 也** 鈴 木 穰** 田 中 宏 明***

Development of Analytical Method for Levofloxacin and Clarithromycin in Secondary Effluent and Their Adverse Effects on Algal Growth

Makoto YASOJIMA*, Naoyuki YAMASHITA**, Norihide NAKADA**
Koya KOMORI**, Yutaka SUZUKI** and Hiroaki TANAKA***

* Towakagaku Corporation, 6-5 Funairimachi Naka-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima-ken 730-0841, Japan

** Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute, 1-6 Minamihara, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8516, Japan

*** Kyoto University Graduate School of Engineering Research Center for Environmental Quality Control, 1-2 Yumihama, Otsu-shi, Shiga-ken 520-0811, Japan

Abstract

In recent years, antibiotics resident in sewage and in the water environment have become an emerging public concern in many developed countries. However, limited knowledge is available on the occurrence of antibiotics in sewage and discharge from wastewater treatment plants (WWTPs) in Japan. Moreover, little is known on the significance of their occurrence in the water environment from the viewpoints of biological adverse effects. The objectives of this research were, therefore, to determine the occurrence of selected antibiotics, namely levofloxacin (LVFX) and clarithromycin (CAM). That are commonly used in Japan, in discharge from WWTPs and then to evaluate their possible effects on algal growth. Therefore, we developed a novel analysis method for LVFX and CAM in wastewater by LC/MS/MS whose detection limits and recovery ratios are $2\text{-}3\text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ and 53-87%, respectively. We also conducted algal growth inhibition tests using *Pseudokirchneriella subcapitata*, and results showed that the EC_{50} s of LVFX and CAM are $1200\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $11\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, LOECs are $630\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $6.3\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, and NOECs are $310\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $3.1\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, respectively. LVFX and CAM concentrations in secondary effluent of five WWTPs that use the activated sludge process ranged from $152\text{-}323\text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ and $303\text{-}567\text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$, respectively, which indicates that the PEC/PNEC ratio of LVFX is less than one but that of CAM exceeds two at the maximum secondary effluents if a safety factor of ten is considered. This suggests a possibility of algal growth inhibition due to CAM in WWTP discharge in the case of insufficient dilution of the receiving waters.

Key words : levofloxacin, clarithromycin, antibiotics, wastewater, algal growth inhibition

1. はじめに

河川等の水域や下水道において、近年、Pharmaceuticals and Personal Care Product (PPCP) の問題がクローズアップされている。PPCPには、化粧品等の日用品や医薬品などが含まれるが、このうち医薬品については、「低濃度」かつ「特異的」に作用することから、極低濃度の長期的暴露による水生生物や人間への影響が懸念されはじめている^{1~3)}。海外では、下水処理場放流水、河川表流水中から、32種類の医薬品が概ね $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ のオーダー⁴⁾で、下水処理場放流水、河川水中からヒト用・動物用の抗生物質などが検出下限値から $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ のオーダー^{1, 5, 6)}で検出されたとの報告があり、医薬品による水環境の汚染について、我が国に比べ先進的な調査・研究が行われている。一方、

国内では、解熱・鎮痛剤や動物用の抗生物質について、下水処理場放流水^{7~9)}、流入下水・二次処理水¹⁰⁾、河川水^{8, 9, 11~13)}を対象に調査が行われている。しかし、国内外を問わず、医薬品の下水道や水環境における実態は、未だ十分に明らかになっていない。

医薬品のうち抗生物質は、主として細菌などによる感染症治療のために日常的に処方されている。抗生物質は、1945年にWaksmanによって「微生物によって生産される化学物質で、細菌や他の微生物を殺したり、生育を阻害する能力を有するもの」と定義¹⁴⁾されている。1960年以降には抗生物質を化学的に合成する方法が確立されてきたことを受け、現在は、Waksmanの定義に加えて、合成抗菌剤も抗生物質に含まれている¹⁴⁾。

抗生物質は、服用後、主として尿排水として下水道

* 東和科学株式会社 〒730-0841 広島市中区舟入町6-5

** 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ 〒305-8516 つくば市南原1-6

*** 京都大学大学院工学研究科附属環境質制御研究センター 〒520-0811 大津市由美浜1-2

に排除されていることから、下水道においても抗生物質の実態を把握することが重要と考えられる。また抗生物質は、治療の効果が出るまでの間、その化学構造を維持するようにデザインされているため、抗生物質が下水道でどの程度処理されるのかが心配される。

一方、下水処理水が水道水源に循環する場合、水道での処理がどの程度可能なのかも懸念される。このため海外でも「抗生物質」に着目し、下水道や水環境での実態調査^{15~18)}、排出を抑制する水処理法の研究^{17, 18)}などが進められている。しかし、物質によっては上水道施設での高度な浄水処理を行っても除去されにくい物質があるとの報告¹⁹⁾もあり、水道や下水道での処理が不十分な場合、水道利用者は水道水に残留した抗生物質に長期的に暴露される可能性がある。だが、抗生物質を低濃度で長期的に摂取した場合のリスク評価は、現時点ではなされていない。さらに、薬剤耐性をもつ感染微生物の増加が心配される²⁰⁾とともに、体内においても正常な微生物生態系が乱され、感染性微生物の選択的増殖を誘導しやすい環境を作り出すことになり、抗生物質療法の効果の低下などの影響¹⁴⁾が懸念され、ヒトへの影響の有無が今後議論を呼ぶことが考えられる。

また、抗生物質は、その定義¹⁴⁾どおり細菌を殺す働きも有するため、下水処理場の活性汚泥に対して殺菌的に働き、下水処理そのものを妨害する可能性があり、適切な下水処理の面からも抗生物質は注目すべき物質である。さらに、下水処理水は、河川などの水域に最終的に放流されるため、放流水域に生息する水生生物に下水処理水に残留する可能性のある抗生物質が及ぼす影響が懸念される²¹⁾。しかしながら、抗生物質の生態系への影響はほとんど研究されておらず、わずかに限られた研究^{15, 16)}が行われているのみである。

日本では、近年急速に水洗化が進められてきたため、下水道や浄化槽を介して、し尿に含まれる抗生物質がどの程度、水環境に流出しているのかは極めて重要な関心事項になる可能性が高い。下水処理場が医薬品の水環境

への負荷源になっている可能性を指摘した報告^{10, 22)}もあることから、早急に下水道での実態を把握する必要性がある。しかし、下水に含まれるヒト用の抗生物質を検出する技術についての報告^{1, 23, 24, 25)}は、極めて少ない状況にある。また、ヒト用の抗生物質が生物に与える影響についての報告^{26, 27)}も、極めて少ない状況にある。

そこで本研究では、数多くあるヒト用の抗生物質の中から使用量の視点から環境負荷の高いものを選定し、選定された抗生物質について下水を対象とした分析法を確立し、二次処理水中の濃度を明らかにすることを第1の目的とした。また、抗生物質の生態影響を明らかにするための第一歩として、一次生産を担う藻類の増殖性への影響がどの程度で生じるのか *Pseudokirchneriella subcapitata* (以下 *P.subcapitata*) を用いた生長阻害試験により、把握することを第2の目的とした。さらに、複数の下水処理場での実態調査を実施し、二次処理水中で検出された抗生物質の濃度を藻類生長阻害試験の結果から評価することを最終的な目的とした。

2. 方 法

2.1 対象物質の選定

本研究では、調査対象とする抗生物質を選定した。まず、既存のデータ^{28~30)}より、年間売上高が100億円以上、かつ抗生物質を含有する医薬品（以下、抗菌剤）をリストアップした。その結果、11種類の抗菌剤が選出された（Table 1）。リストアップされた抗菌剤は錠剤、細粒、シロップ等様々な形態で処方されるため、各抗菌剤の薬価³¹⁾、形態毎の抗生物質含有割合から、各抗生物質の年間の販売量を算出した（Table 1）。なお、各抗菌剤の売上高の内訳情報は入手できなかったため、販売量については最低および最高の薬価を用いて、最小・最大見積もり販売量として算出した。服用された抗生物質は、体外に排泄される際、未変化体として、あるいは代謝物として排泄されるが、代謝物の情報は乏しく、また、複数の代謝物が存在すると考えられることから、本研究では未

Table 1 Amounts of shipments in year 2002 and predicted excretion of human antibiotics in Japan

Substance	Sales of antibiotics (2002)	Amounts of sold antibiotics		Excretion rates of antibiotics	Amounts of excreted antibiotics	
	Billion yen·year ⁻¹	Ton·year ⁻¹		In urine (%)	Ton·year ⁻¹	
Levofloxacin	47.6	17	- 20	80	14	- 16
Clarithromycin	46.5	14	- 30	38	5.4	- 11
Flomoxef sodium	21.5	11		80	8.8	
Cefdinir	24.5	14	- 25	33	4.6	- 8.3
Cefotiam hydrochloride	16.5	9.6		47	4.5	
Vancomycin hydrochloride	19.4	4.5		90	4.1	
Cefoperazone sodium :	15.0	7.4		25	0.9	
Sulbactam sodium (1:1)				72	2.7	
Imipenem :	13.1	6.2		70	2.2	
Cilastatin sodium (1:1)				*	*	
Cefcapen pivoxil hydrochloride	34.3	1.2	- 4.1	40	0.5	- 1.6
Cefditoren pivoxil	17.2	1.9	- 5	20	0.4	- 1.0
Azithromycin	15.0	3.7	- 10	9.0	0.3	- 0.9

*: not available

変化体を調査対象とした。先に算出した販売量に、医薬品添付文書に記載された未変化体の尿排泄率を乗じることによって体外排出量を推定した (Table 1)。なお、尿排泄率に関する情報が得られなかったシラスタチンナトリウムについては、体外排泄量を not available とした。以上の整理の結果、年間の体外排出量が10tを超えると推定された物質はニューキノロン系抗生物質のレボフロキサシン (最大16t, LVFX)、マクロライド系抗生物質のクラリスロマイシン (最大11t, CAM) の2物質であった。そこで本研究では、リストアップされた11物質のうち、体外排出量が多く、また、分析上必要な標準品が比較的容易に入手できたLVFXおよびCAMを対象物質として選定した。LVFXおよびCAMの化学構造は、Fig.1に示すとおりである。

2.2 分析方法

2.2.1 試薬等

本試験では、標準試薬としてLVFX (Laboratories INC, 純度90.2%), CAM (和光純薬, 純度90%以上) を0.5% 酢酸水溶液: アセトニトリル=3:7に溶解して使用した (以下, STD)。その他の試薬類は、すべて和光純薬製または、関東化学製の試薬特級以上のものを用いた。1,000mg・l⁻¹のLVFXおよびCAMのSTDは、冷蔵 (約5℃) 保存により少なくとも2週間は安定であった。

ガラス繊維濾紙 (Whatman GF/B, 粒子保持能1μm) は、アセトン洗浄後使用した。固相抽出にはOasisHLB固相抽出カートリッジ (Waters製, 充填剤量: 200mg) を用いた。使用したすべてのガラス器具類は、洗剤および水道水による洗浄後、純水、アセトンの順に洗浄して使用した。

Fig.1 Chemical structure of LVFX(a) and CAM(b)

2.2.1 前処理方法

試料100mlをGF/Bでろ過した。ろ紙上に残った浮遊物質 (SS) は、アセトン10mlを加えた後、超音波により2回抽出し、抽出液をロータリーエバポレータで0.5ml/程度まで濃縮後、濃縮液をろ液に合わせた。固相抽出は、予めメタノールと精製水 (各3ml) でコンディショニングしたOasisHLBに試料を10ml・min⁻¹の流速で通水し、CAM, LVFXを保持させた。通水後、OasisHLBカートリッジを強制吸引により脱水 (約1時間) した。次に、酢酸エチル6mlでCAMを、次いでメタノール6mlでLVFXを溶出させた。溶出液は、窒素気流により濃縮乾固し、0.5%酢酸水溶液: アセトニトリル=3:7を1ml添加し再溶解させた。この溶解液を測定用試料とした。

2.2.2 測定条件

抗生物質の同定、定量は、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 法を用いて行った。高速液体クロマトグラフは、Agilent製1100, タンデム型質量分析計はApplied Biosystems製API4000を用いた。カラムは、逆相カラムであるphenomenex製LUNA C8 (2.0mmφ×50mm) を使用した。移動相は、0.5%酢酸水溶液: アセトニトリル=3:7とした。カラム温度は40℃, 流速は0.1ml・min⁻¹, 注入量は5μlとした。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) 法 (ポジティブ) とし、コリジョンエネルギーはLVFXでは27eV, CAMでは41eVとした。

2.3 藻類生長阻害試験

単細胞藻類は、各種塩類の摂取と光合成により生長し、自然界に酸素を供給する役割を持つ。このため、生態系における第一次生産者、即ち、食物連鎖の基盤を形成していると言える。従って、化学物質により藻類の生長が阻害されると、生態系の構造に何らかの影響を与える可能性がある。また、藻類生長阻害試験は、短期の試験ではあるものの、世代交代が速いことから慢性影響の評価も行える³²⁾というメリットがある。そこで本研究では、藻類生長阻害試験を行い、抗生物質による影響を評価することとした。

藻類生長阻害試験は、一般に三角フラスコを用いて行われるが、マイクロプレートを用いることで、操作性の向上³³⁾, 採取試料量の減少, 多検体一斉試験などが期待されるため、今後、対象物質を増やした場合にも比較的容易に対応できると考えられる。従って、本研究では96穴マイクロプレート³⁴⁾ (Falcon, MICROTIST Tissue Culture Plate 96 well) を用いて藻類試験を実施した。

供試藻類としては、*P.subcapitata* (NIES-35) を用いた。*P.subcapitata*は、経済協力開発機構テストガイドライン201 (OECD, TG201) などで化学物質の影響評価の対象種として推奨されている種である。*P.subcapitata*は、藻類培養用のAAP培地³⁵⁾を用いて継代培養を行い、植え継ぎ後3~5日の対数増殖期のものを用いた。

ジメチルスルホキシド (和光純薬製生化学用, DMSO) および精製水に溶かしたLVFX, CAMについて、2倍希釈の希釈系列を作成した。この溶液を、マイクロプレートウェルに200μlずつ注入するとともに、AAP培地20μlおよび*P.subcapitata*の細胞懸濁液20μlを添加して培養を行った。*P.subcapitata*の初期細胞濃度は、1×10⁴ cells・ml⁻¹とした。培養条件は、温度24℃, 照度4,000lux, 120rpmの振とう培養とした。培養時間は96時間とし、培養期間中

マイクロプレートリーダー（Wallac, ARVO SX-1420）を用いて吸光度（波長450nm）を測定し、藻類の増殖量をモニタリングした。試験終了後、藻類生長曲線下の面積から、LVFXおよびCAMによる生長阻害率を（1）式により計算した。また、LVFXおよびCAM濃度と藻類の生長阻害率の関係をプロットし、両者の関係から、生長が50%阻害される濃度、即ち、半数影響濃度（median effective concentration: EC₅₀）を算出した。また、無影響濃度（No Observed Effect Concentration: NOEC）および最小影響濃度（Lowest Observed Effect Concentration: LOEC）については、Ecotox-Statics（日本環境毒性学会）を用いて解析した。

生長阻害率(%)= $\frac{Ac - At}{Ac} \times 100$ (1)

ここで、
Ac：対照区の生長曲線下の面積
At：各試験濃度区の生長曲線下の面積

3. 結果および考察

3.1 分析方法検討結果

3.1.1 LC/MS/MS測定と検量線

測定時のモニターイオンを決定するために、LVFX、CAMのSTD各100μg・l⁻¹を用いてスキャン測定を行った。その結果、1段目の取り込み（parent）イオンを[M+H]とし、2段目の取り込み（product）イオンをLVFXではm/z=318.0、CAMではm/z=158.2とした時に強いピークが認められた。LVFX、CAMの保持時間は、それぞれRT=1.5min、1.4minであった。また、LVFX、CAMのSTDを用いて検量線を作成したところ、LVFXでは1~100μg・l⁻¹、CAMでは5~100μg・l⁻¹の範囲で良好な直線性（r²>0.998）が認められた。

3.1.2 検出下限値と定量下限値

装置の検出下限値（Limit of Detection, LOD）および定量下限値（Limit of Quantification, LOQ）の算出には、S/N比で算出する方法、繰り返し測定の結果の標準偏差を用いて算出する方法があり³⁶⁾、どちらを用いるかについての明確な決まりはない。溶媒（アセトニトリル）を測定した場合のS/N比の10倍（S/N=10）を装置の検出下限値、操作ブランクのS/N比の10倍（S/N=10）を定量下限値と定義した場合、検出下限値は、0.18μg・l⁻¹（LVFX）、0.28μg・l⁻¹（CAM）、定量下限値は、0.88μg・l⁻¹（LVFX）、1.1μg・l⁻¹（CAM）であった。なお、操作ブランクにおける目的物質のピークはS/N≒1であった。一方、繰り返し測定結果の変動係数（Coefficient of Variation：CV）、つまり標準偏差/平均値が20%以内となる最低濃度（CAM：1μg・l⁻¹、LVFX：5μg・l⁻¹）での測定濃度（n=5）の標準偏差（S）の3倍（3S）を装置の検出下限値、10倍（10S）を定量下限値と定義すると検出下限値は、0.21μg・l⁻¹（LVFX）、0.30μg・l⁻¹（CAM）、定量下限値は、0.7μg・l⁻¹（LVFX）、1.0μg・l⁻¹（CAM）であった。本研究では、2通りの方法で装置の下限値を算出したが、どちらの場合でもほぼ同じ下限値となった。本研究における装置の下限値は、既報の下限値1.5μg・l⁻¹（LVFX²³⁾）、10~20ng・l⁻¹（CAM^{1, 25)}）と比較しても低いレベルにあり、高感度測定が可能であると判断された。下水試料は夾雑

物が多く、その影響で分析精度を低下させることが考えられることから、下水試料での下限値を確認した。本研究で対象としたLVFX、CAMは、二次処理水中に定量下限値以上の濃度で存在しており、サロゲート物質もないことから、下水試験法³⁷⁾に従って二次処理水における検出下限値、定量下限値を求めた。つまり、採取した二次処理水の繰り返し測定結果の標準偏差（S）の3倍（3S）を検出下限値、10倍（10S）を定量下限値と定義³⁷⁾した。測定の結果、二次処理水での繰り返し測定結果の標準偏差（S）は、13.8ng・l⁻¹（LVFX）、14.5ng・l⁻¹（CAM）であった。したがって、二次処理水での検出下限値および定量下限値は3S、10Sとして41.4ng・l⁻¹、138ng・l⁻¹（LVFX）、43.5ng・l⁻¹、145ng・l⁻¹であった。また、この時の測定値の変動係数は、LVFXでは4.3%、CAMでは3.6%であった。本法における機器の検出下限値、定量下限値はTable 2に、二次処理水の検出下限値、定量下限値はTable 3に示すとおりである。

3.1.3 添加回収試験

一般に、分析法の妥当性を評価するためには、測定しようとする試料を用いて添加回収試験を行うことが必要である。本試験では、二次処理水を対象に、試料にSTDを添加（ろ過前の試料に添加）した標準添加試料（Sa）と試料（S）の測定値の差（Sa-S）と添加濃度の関係から回収率を求め、方法の妥当性を評価した。なお、差を用いているのは、二次処理水中に対象物質が含まれているためである。

二次処理水を用いた添加回収試験（添加濃度：500ng・l⁻¹）の平均回収率（n=5）は、LVFXでは82%、CAMでは55%であった（Table 4）。また、回収率の標準偏差は、

Table 2 Instrumental LOD and LOQ for the determination of LVFX and CAM

Substance	LOD	LOQ
	(μg・l ⁻¹)	
LVFX	0.21	0.7
CAM	0.30	1.0

Table 3 LOQ and LOD for the determination of LVFX and CAM in secondary effluent samples

Substance	LOD	LOQ
	(ng・l ⁻¹)	
LVFX	41.4	138
CAM	43.5	145

Table 4 Recoveries of CAM and LVFX from secondary effluent

Substance	Recovery (%)					Ave. (%)	S (%)
	1	2	3	4	5		
LVFX	80	84	79	79	87	82	4.5
CAM	55	55	53	56	54	55	1.2

Ave: Average, S: Standard deviation

LVFXでは4.5%, CAMでは1.2%であった (Table 4)。CAMの回収率が低かった理由としては、二次処理水に含まれる夾雑成分が測定時に目的物質のイオン化を阻害したことなどが考えられる。そのため、今後は、測定時の夾雑成分の影響を低減させるため、前処理において精製工程を加える必要があると考えられる。しかし、本法でのCAMの回収率の標準偏差は小さく、安定していたことから、本法はLVFX, CAMともに下水への適用可能と判断された。二次処理水を測定した際のクロマトグラムは、Fig.2に示すとおりである。二次処理水のクロマトグラムのピーク形状は、明瞭なシングルピークであることから、本法では、下水試料中のLVFX, CAMを良好に分離できると判断された。

3.2 藻類生長阻害試験結果

LVFXおよびCAMの標準物質を精製水もしくはDMSOに溶かし、マイクロプレートを用いて藻類生長阻害試験を実施した。LVFXは水に比較的良好に溶けるため、標準物質を精製水に溶かして試験を実施した。一方、CAMを精製水に溶かしたところ、ほとんど溶解しなかったため、標準物質をDMSO水溶液に溶解させて試験を実施した。

LVFXについては、 $630 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の濃度で阻害が観察され、 $2,500 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の濃度ではほぼ100%の阻害率となった (Fig.3)。一方、CAMでは $6.3 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の濃度で阻害が見られ、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の濃度ではほぼ100%の阻害率となり、藻類の増殖が観察されなかった (Fig.3)。LVFXの EC_{50} 、LOECおよびNOECは、それぞれ $1,200 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $630 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $310 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であった (Table 5)。同様にCAMの EC_{50} 、LOECおよびNOECは、それぞれ $11 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $6.3 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $3.1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であった (Table 5)。両者の EC_{50} を比較するとCAMはLVFXの100倍以上であり、CAMはLVFXに比べて毒性が高かった。

ウキクサ毒性試験によるLVFXの湿重量から見た生長阻害およびChl.aから見た光合成阻害の EC_{50} は、それぞれ $185 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $942 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と報告²⁷⁾されている。これらの EC_{50} は、本研究の藻類生長阻害の EC_{50} と比較して低濃度で毒性が認められているが、その原因としては、藻類とウキクサの感受性の違いなどが考えられる。また、両者の EC_{50} に差があることは、異なった種での生態影響試験の必要性を示唆している。

また、オクタノール-水分配係数と EC_{50} の間には関連があり、両者の間には負の相関がある³⁸⁾ことが知られて

いる。即ち、オクタノール-水分配係数の値が大きいものほど、その毒性が高くなる傾向がある。LVFX, CAMのオクタノール-水分配係数はそれぞれ0.553, 7.18³⁹⁾であり、この違いから、両者の毒性に大きな差が出たものと考えられる。

3.3 二次処理水における実態と評価

下水処理場では、処理対象物質については排水を受け入れ適切に処理した後、また、処理対象ではないが規制を受けている有害物質については特定事業場からの受け入れ基準を定めて、下水処理水が基準を満足することを確認したうえで放流しているが、抗生物質の除去特性は十分に把握されていない状況にある。このため抗生物質が下水道で十分に処理できずに河川等に放流された場合、水環境で検出される抗生物質の一因となる可能性がある。そこで、二次処理水中の抗生物質の実態を明らかにするため、開発した分析方法を用いて二次処理水を

Fig. 2 Chromatogram of LVFX and CAM in secondary effluent

Table 5 EC_{50} s, LOECs and NOECs for LVFX and CAM using algal growth inhibition test

Substance	EC_{50}	LOEC	NOEC
	$(\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1})$		
LVFX	1,200	630	310
CAM	11	6.3	3.1

Fig.3 Effect of different exposure concentrations of LVFX and CAM on algal growth (96h exposure period)

Table 6 Characteristics of five wastewater treatment plants (WWTPs)⁴⁰⁾

WWTP	Service area (ha)	Population served	Capacity (m ³ · day ⁻¹)	Type of treatment system
A	1,049	65,449	28,000	activated sludge process
B	830	78,336	33,600	activated sludge process
C	3,167	235,731	124,052	activated sludge process
D	1,461	93,200	68,700	activated sludge process
E	3,506	678,000*	450,000	activated sludge process + rapid filtration

*: Design population

Fig.4 Concentration of CAM and LVFX in secondary effluents from five WWTPs

対象としたLVFX, CAMの分析を行った。

本研究では、日本国内の下水処理場の代表的な処理方式である標準活性汚泥法による処理を行っており、抗生物質の流入が見込まれる、即ち、主として生活排水を受け入れている5箇所の下水処理場を対象とした。対象とした下水処理場の概要は、Table 6に示すとおりである。試料は二次処理水とし、洗浄済みのガラス瓶に採水し、保冷して持ち帰り、直ちに前処理を開始した。

対象とした下水処理場の二次処理水中のLVFXは152～323ng · l⁻¹、CAMは303～567ng · l⁻¹の濃度範囲で検出された (Fig.4)。海外では、LVFX²³⁾が133ng · l⁻¹ (三次処理水)、CAM^{1, 25)}が57～328ng · l⁻¹で検出されたと報告されている。本研究で検出された二次処理水中のLVFX, CAMの濃度は、海外の報告値と比較して高い傾向にあった。

LVFX, CAMのオクタノールー水分配係数は、それぞれ0.553, 7.18³⁹⁾であるが、下水処理での化学物質の除去は、生分解性や揮発性が同じ場合、活性汚泥への吸着性に大きく影響を受ける⁴¹⁾ため、CAMはLVFXに比べて下水処理での除去効果が期待される。一方、LVFX, CAMの体外排出量 (Table 1) は大きな差はないことからLVFX, CAM濃度は、下水処理を受けることでLVFX>CAMとな

ることが予想される。しかし、対象とした5処理場のうち4処理場での二次処理水では、LVFX<CAMとなっており、下水処理場でのCAMの除去がLVFXより大きくない可能性が示唆された。これらのことから、LVFX, CAMの下水処理での除去要因としては、オクタノールー水分配係数¹⁰⁾だけではなく、生分解性、pH⁴²⁾などが複雑に関係していると考えられる。本報では、下水および下水処理工程毎の調査をしていないため、下水処理場での除去特性を把握するには至らなかったが、今後、これらの知見を得る必要があると考えられる。

健全な水環境の保全の観点からは、本研究で検出された濃度が放流先河川等の生態系に影響を与えるレベルにあるか、という視点からの評価が重要である。そこで、二次処理水で検出された濃度を藻類生長阻害試験の結果から評価した。まず、*P.subcapitata*に対する二次処理水で検出されたLVFX, CAMの影響を把握するために、NOECとLOECの幾何平均により求めた無影響濃度 (No-Effect Concentration: NEC) と検出濃度を比較した。LVFX, CAMのNECは440μg · l⁻¹, 4.4μg · l⁻¹であり、検出濃度に比べて十分に高いことからLVFX, CAMともに影響無しと判断される。また、NOECを藻類の種間の安全係数10で除して藻類への影響を評価すると、LVFXは影

響無し、CAMでは希釈倍率2倍以下で影響有りとは判断される。

さらに、生態リスクの初期評価³²⁾を行った。予測無影響濃度 (Predicted No-Effect Concentration: PNEC) については、藻類、甲殻類、魚類のうち1~2種の生物群の結果しか得られていないため、安全係数は100^{32, 43)}を用いた。LVFXは藻類の他2つのデータが示されていたが、本研究では藻類の結果のみが得られていることから、安全係数100でNOECを除するとLVFX, CAMのPNECはそれぞれ3,100ng・l⁻¹, 31ng・l⁻¹となる。予測環境中濃度 (Predicted Environmental Concentration: PEC) については、本研究では、水環境を調査対象としなかったことから実測値をあてはめることができないため、調査した下水処理場の放流先での希釈倍率を考慮したPECを求めた。算出にあたっては、放流先河川では下水放流水合流前の調査対象物質濃度は十分に低いと仮定した。その結果、最大濃度のLVFXについては希釈倍率に関わらずPECはPNECより小さくなった。また、最大濃度のCAMについては、希釈倍率20倍以上でなければPECがPNECより大きくなることから分かる。ハザード比、即ちPEC/PNECを判定すると、LVFXについてはリスク無し、CAMについては放流先河川での希釈倍率によってはリスク有りとは判定^{44, 45)}される。従って、CAMは「詳細な調査を行う候補」³²⁾と考えられる。また、CAMのオクタノール-水分配係数は7.18³⁹⁾であり、生物濃縮の可能性もあることから注目すべき物質であると考えられる。しかし、現時点ではまだ実測データが少ないこと、生態試験結果として藻類のデータしかないことから、今後は、下水処理場や水環境における実態の把握や生態リスクについて再評価する必要があると考えられる。また、PECはスポットデータであり濃度の時間的、空間的ばらつき環境での動態を考える必要がある。

4. まとめ

本研究では、以下の知見を得た。

1) 対象とする抗生物質を選定した。年間売上高、薬価、未変化体の尿排泄率を考慮した抗生物質の体外排出量を推定した結果、体外排出量が多く、標準品が比較的容易に入手できたLVFXおよびCAMを対象物質として選定した。

2) 下水処理水を対象にLC/MS/MSを用いたLVFX, CAMの分析法を確立した。二次処理水での定量下限値は、LVFXでは138ng・l⁻¹, CAMでは145ng・l⁻¹であった。二次処理水を用いた添加回収試験における回収率は、LVFXで82%, CAMで55%であり、本法は下水に適用可能と判断した。

3) 抗生物質の生態影響を評価するために、藻類生長阻害試験を実施した。試験の結果、LVFXのEC₅₀, LOEC, NOECは、1,200 μg・l⁻¹, 630 μg・l⁻¹, 310 μg・l⁻¹であった。同様にCAMのEC₅₀, LOEC, NOECは、11 μg・l⁻¹, 6.3 μg・l⁻¹, 3.1 μg・l⁻¹であった。両者のEC₅₀を比較するとCAMはLVFXの100倍以上であり、CAMはLVFXに比べて毒性が高かった。

4) 開発した分析法を用いて、二次処理水を対象としたLVFX, CAMの実態調査を行った結果、LVFXは152~323ng・l⁻¹, CAMは303~567ng・l⁻¹の濃度範囲で検出され

た。検出された二次処理水中のLVFX, CAMの濃度は、海外の報告値と比較して高い傾向にあった。

5) *P.subcapitata*に対する二次処理水中のLVFX, CAMの影響を把握するために、NECと検出濃度を比較したところ、LVFX, CAMのNECは440μg・l⁻¹, 4.4μg・l⁻¹であり、検出濃度に比べて十分に高く、LVFX, CAMともに影響無しと判断された。また、藻類への影響を評価すると、LVFXは影響無し、CAMでは希釈倍率2倍以下で影響有りとは判断された。さらに、放流先河川での希釈率を考慮したPECとPNECを比較したところ、LVFXについてはリスク無し、CAMについては放流先河川での希釈倍率によってはリスク有りとは判定^{44, 45)}され、「詳細な調査を行う候補」³²⁾と考えられた。しかし、現時点では実測データが少ないこと、生態試験結果として藻類のデータしかないことから、今後は、下水処理場や水環境における実態の把握や生態リスクの評価を行う必要があると考えられる。

処方される抗生物質の種類は多く、今回対象とした物質以外にもリスクのある物質が存在する可能性は否定できない。しかし、例えば体外排出量を算出するための基礎的情報が入手しにくい状況にあるなど、情報の提供体制が十分に整備されていないことから、これを整備する必要があると考えられる。また、実際の水環境における抗生物質の毒性は相加的あるいは相乗的に発現するのか、他の薬物との相加・相殺作用等の複合影響については不明であり、解明には相当の時間を要すると推測される。その意味からも、生態影響については、藻類に留まらずさらに食物連鎖の上位に位置する生物を使った系での評価も重要である。

(原稿受付 2004年5月20日)

(原稿受理 2004年8月16日)

参 考 文 献

- 1) Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. and Kratz, K. L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of Total Environment*, **225**, 109-118.
- 2) 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.
- 3) 田中宏明, 岡安祐司, 中田典秀, 八十島誠 (2004) 新たに登場してきた下水道の微量汚染物質問題, 下水道協会誌, **41** (499), 27-30.
- 4) Ternes, T. A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, **32**, 3245-3260.
- 5) Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. and Buxton, H. T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance, *Environmental Science and Technology*, **36**, 1202-1211.
- 6) Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. and Fanelli, R. (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environmental Science and Technology*, **37**, 1241-1248.
- 7) 谷島利勝, 高田秀重 (2002) 下水処理放流水中の医薬品起源化学物質の分析, 第11回環境化学討論会講演要旨集, 130-131.
- 8) 清野敦子, 益永茂樹, 古荘早苗 (2004) 下水処理場放流水・河川水からの人用・動物用医薬品の検出, 第38回日本水環境学会年会講演集, 583.
- 9) 石井善昭, 王寧, 尹順子 (2004) 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による環境水中医薬品の分析, 環境化学, **14**, 127-134.

- 10) 谷島利勝, 高田秀重 (2003) 医薬品起源化学物質の下水処理過程における挙動, 第37回日本水環境学会年会講演集, 343.
- 11) 清野敦子, 益永茂樹, 中西準子, 古荘早苗 (2003) 水環境中における医薬品の検出, 第37回日本水環境学会年会講演集, 344.
- 12) 山岸貴行, 井上隆信, 松井佳彦, 松下拓 (2004) 環境水中の抗生物質の分析手法の開発と河川水からの検出, 第38回日本水環境学会年会講演集, 287.
- 13) 鈴木俊也, 宇佐美穂子, 安田和夫 (2004) 河川水中の解熱鎮痛消炎剤のモニタリング, 第38回日本水環境学会年会講演集, 288.
- 14) Kurylowicz, W (1978) クリロピッツ抗生物質論, 238pp., 学会出版センター, 東京.
- 15) ERAVMIS, <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk/ecochemistry/eravmis/>.
- 16) ENVIRPHARMA, <http://www.envirpharma.org/>.
- 17) REMPHARMAWATER, <http://www.unina.it/>.
- 18) EU-Project Poseidon, <http://www.eu-poseidon.com/>.
- 19) Snyder, S. A., Westerhoff, P., Yoon, Y. and Sedlak, D. L. (2003) Pharmaceuticals, Personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry, *Environmental Engineering Science*, **20**, 449-469.
- 20) 岩根泰蔵, 浦瀬太郎, 山本和夫 (1998) 下水中および河川水中の大腸菌における抗生物質耐性の分布, 第35回環境工学研究フォーラム講演集, 144-146.
- 21) Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Sørensen, B. H. and Tolls, J. (2003) Are veterinary medicines causing environmental risks ?, *Environmental Science and Technology*, **28**, 279A-294A.
- 22) Göbel, A., McArdell, C. S., Alder, C. A. and Giger, W. (2003) Occurrence and fate of macrolide and sulfonamide antibiotics in wastewater treatment, *Proceedings of The 4th IWA specialized conference on assessment and control of hazardous substances in water -ECOHazard 2003-*, **20**/1.
- 23) Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A. and Giger, W. (2001) Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Analytical Chemistry*, **73**, 3632-3638.
- 24) Golet, E. M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A. C., and Giger, W. (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil, *Environmental Science and Technology*, **37**, 3243-3249.
- 25) McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J. F., and Giger, W. (2003) Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environmental Science and Technology*, **37**, 5479-5486.
- 26) Andreozzi, R., Campanella, L., Frayse, B., Garric, J., Gonnella, A., Lo, G. R., Marotta, R., Pinto, G. and Pollio, A. (2003) Effects of advanced oxidation processes (AOP) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals, *Proceedings of The 4th IWA specialized conference on assessment and control of hazardous substances in water -ECOHazard 2003-*, **70**/1-70/6.
- 27) Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., and Solomon, K. R. (2004) Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 371-382.
- 28) 設楽幸雄 (2003) Monthlyミクス2003年増刊号, **31**, 48-49.
- 29) 安達さやか, 井上淳, 大河内史子 (2003) 薬事ハンドブック (2003年版), 455pp., じほう, 東京.
- 30) 厚生労働省医政局 (2003) 薬事工業生産動態統計年報平成14年, pp.210-359, じほう, 東京.
- 31) 水島裕 (2003) 今日の治療薬 (2003年版) 解説と便覧, 1001pp., 南江堂, 東京.
- 32) 日本環境毒性学会 (2003) 生態影響試験ハンドブック—化学物質の環境リスク評価—, 318pp, 朝倉書店, 東京.
- 33) 岡村美美, 豊田智子, 市川大介, 吉本祥子, 岡村秀雄, 井上雄三, 毛利紫乃, 山田正人, 国本学 (2003) 薬類増殖阻害試験の簡易化と埋立処分場浸出水の有害性評価への適用, 水環境学会誌, **26**, 765-768.
- 34) Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., Van Coillie, R. and Vasseur, P. (1986) A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, *Toxicity Assessment*, **1**, 261-281.
- 35) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局下水道環境部 (1997) 下水試験方法上巻, pp.554-562, 日本下水道協会, 東京.
- 36) 尾関徹 (2001) 検出限界と定量限界, ぶんせき, **2**, 56-61.
- 37) 日本下水道協会 (2002) 下水試験法 (追補暫定版) —内分泌攪乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編—, pp.307-310, 日本下水道協会, 東京.
- 38) 松尾昌季 (1999) QSAR (定量的構造活性相関) 手法を用いた化学物質の手計算による生態毒性予測, pp.184-187, エル・アイ・シー, 東京.
- 39) 医薬薬学研究会 (2003) 2004年版薬剤師のための常用医薬品情報集, 1253pp, 廣川書店, 東京.
- 40) 日本下水道協会 (2003) 下水道統計-行政編-平成13年度版, pp.750-1117, 日本下水道協会, 東京.
- 41) 岡安祐司, 小森行也, 竹歳健治, 田中宏明 (2001) 数理モデルを用いたPRTR指定化学物質の活性汚泥処理における挙動の推定, 第38回下水道研究発表会講演集, 163-165.
- 42) 香川千絵, 浦瀬太郎, 菊田友弥 (2004) 活性汚泥中での医薬品の除去に影響を及ぼす因子, 第38回日本水環境学会年会講演集, 361.
- 43) 藤田正一 (1999) 毒性学—生体・環境・生態系—, pp.263-276, 朝倉書店, 東京.
- 44) 中西準子, 蒲生昌志, 岸本充生, 宮本健一 (2003) 環境リスクマネジメントハンドブック, pp.269-347, 朝倉書店, 東京.
- 45) 中西準子, 益永茂樹, 松田裕之 (2003) 演習環境リスクを計算する, 230pp, 岩波書店, 東京.