

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22510091
研究課題名（和文）	電気分解法を用いた医療廃液処理技術の開発と評価
研究課題名（英文）	Development and evaluation of a novel method for inactivation of clinical wastewater based on electrolysis
研究代表者	
	中野 隆史 (Nakano Takashi)
	大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：	00257867

研究成果の概要（和文）：電気分解の原理を応用した医療廃液の不活化技術を確立するため、対象薬剤として抗菌薬、抗ウイルス薬を選択し、その不活化能について評価した。その結果、ほぼすべての系統の抗菌薬、抗インフルエンザウイルス薬オセルタミビル（タミフル®）を電解によって不活化できることを明らかにした。さらに抗癌剤含有モデル尿を用い、電解によって抗癌剤を不活化できる条件を明らかにし、本法が人体由来排泄物に含まれる医薬品の不活化に適応できる可能性について検討した。

研究成果の概要（英文）：We developed and evaluated a new method for inactivation of clinical wastewater based on electrolysis. We electrolyzed solutions of 10 groups of individual antibacterials, mixtures of them, and an antiviral drug, oseltamivir (Tamiflu™). Almost all samples were able to inactivate by electrolysis. Furthermore, to develop a method for the detoxification of medicines in excreta, an antineoplastic solution in the presence of human urine was electrolyzed and evaluated. We found that the method can inactivate chemicals in urine, and succeeded to expand the application of this method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学，環境技術・環境材料

キーワード：環境負荷低減技術，水質汚濁・土壌汚染防止・浄化，抗菌薬・抗生物質，医療廃液，電気分解，抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

医療廃液には抗癌剤，抗生物質，消毒剤など様々な薬剤が含まれている。International Agency for Research on Cancer は抗癌剤がヒトの悪性腫瘍の原因になる可能性がある

物質として分類しているほか，米国 National Institute for Health は抗癌剤の変異原性を指摘しており，遺伝的な影響をも念頭におくべきであるとしている。さらに一部の研究者はこのような影響はヒトのみならず自然環

境にも影響を及ぼし、直接的・間接的に人の健康を害する可能性があるとしている。

現状では多くの医療機関において、医療廃液は水による希釈によって毒性を軽減し、活性汚泥法によって処理されて自然界に放流されている。この毒性の軽減には廃液の数千～万倍の上水道水を必要とし、水道水を製造するに必要なエネルギーは莫大なものである。このエネルギーの製造に際しては、大量の炭酸ガスを排出しており、環境を守るために環境を破壊するというジレンマに陥っているのが現状である。

医薬品の一例として抗癌剤は少量でも細胞毒性、変異原性を持つことが知られている。われわれは電気分解を応用した医療廃液処理法を開発し、抗癌剤の不活化に有効であることを見出した。さらに医療現場に設置可能な実証試作機を開発し、外来化学療法センターより出る抗癌剤含有医療廃液の処理に有効であることを証明した。

一方、抗菌薬が環境中に排出された場合、環境常在微生物に耐性誘導を来し、その形質が病原細菌に導入される可能性がある。また新型インフルエンザは鳥インフルエンザが変異してヒトに感染性を持って出現する可能性が議論されているが、抗インフルエンザウイルス薬が環境中に排出された場合、鳥インフルエンザウイルスに対する耐性誘導の選択圧を高め、結果的に薬剤耐性新型インフルエンザウイルスが発生する懸念がある。いずれの薬剤に対しても、不活化処理して排出することが望ましいと考えられる。さらに抗インフルエンザ薬であるオセルタミビル（タミフル®）は尿中排泄型薬剤であるため、尿に含まれる医薬品に適応可能な不活化法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、出来る限り少ないエネルギーで医療廃液中の医薬品の毒性などの作用を低減する電気分解技術を開発し評価することを大きな目的としているが、とくに本研究期間内においては以下の目標を挙げる。

- (1) これまで抗癌剤の不活化効果を明らかにしたが、それ以外で環境負荷を来すおそれのある医薬品、とくに抗菌薬、抗ウイルス薬について本法による不活化効果を明らかにする。
- (2) 尿中に排泄される医薬品の不活化の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 電解の方法

生理食塩水（0.9%食塩水）に溶解した薬剤にチタンベースの白金イリジウム電極を挿入し、定電流条件で電解した。電極の大きさ、電極間距離、電流については各薬剤によって

異なるので以下に特記した。また電解によって産生される遊離塩素によって後続する生物学的測定法（bioassay）が影響を受けることを避けるため、10 mL の電解サンプル当たり 0.5 mL の 1%チオ硫酸ナトリウム水溶液で遊離塩素を中和した。この量で遊離塩素を確実に中和できること、かつ bioassay に影響がないことを確認している。

(2) 抗菌薬含有医療廃液の不活化について

各系抗菌薬より代表的な 1 剤を選択した。ペニシリン系としてペニシリンGカリウム（PCG）、セフェム系としてセファゾリンナトリウム（CEZ）、カルバペネム系としてイミペネム・シラスタチンナトリウム（IPM/CS）、アミノグリコシド系としてアミカシン硫酸塩（AMK）、ホスホマイシン系としてホスホマイシンナトリウム（FOM）、グリコペプチド系としてバンコマイシン塩酸塩、テトラサイクリン系としてミノサイクリン塩酸塩（MINO）、クロラムフェニコール系としてクロラムフェニコール（CP）、マクロライド系としてエリスロマイシンラクトビオン酸塩（EM）、ニューキノロン系としてシプロフロキサシン（CPFX）を選択した。また上記抗菌薬の混合液を抗菌薬含有モデル医療廃液として使用した。各抗菌薬ないし混合物は生理食塩水（0.9%食塩水）にて溶解あるいは希釈し、電解処理に供した。電極は 50 x 35 mm、電極間距離 5 mm のものを使用し、700 mA の定電流条件で規定時間電解した（電流密度 4 A/dm²）。電解前後の溶液の抗菌活性は、日本化学療法学会が定義した微量液体希釈法による最小増殖阻止濃度（MIC: minimum inhibitory concentration）に準拠して測定した。細菌として黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, FDA209P 株、大腸菌 *Escherichia coli*, NIHJ JC-2 株を用いた。細胞毒性試験は Molt-4 細胞を用いた。また高速液体クロマトグラム（HPLC）、イオンクロマトグラム、全窒素計を用い、電解によって薬剤がどのように分解されるか調べた。

(3) 抗ウイルス薬含有医療廃液の不活化について

抗インフルエンザウイルス薬であるオセルタミビル（リン酸塩；OP, タミフル）および活性代謝物であるオセルタミビルカルボン酸塩（OC）は F. Hoffman-La Roche 社から分与を受けた。電解は(1)の条件に従い、電極は 115 x 35 mm、電極間距離 5 mm のものを使用し、1 A の定電流条件で規定時間電解した（電流密度 2.48 A/dm²）。電解前後の OP, OC の定量は HPLC を用い、ソタロール内標準法で定量した（検出限界 1 µg/mL）。ノイラミニダーゼ（NA）阻害活性は大阪府公衛研より分与を受けたヒトインフルエンザウイルス A/Wyoming/3/2003（H3N2）（OP 感受性株）を用い、NA-Star®キット（Life Technologies）

で測定した。細胞毒性試験は Molt-4 細胞を用いた。

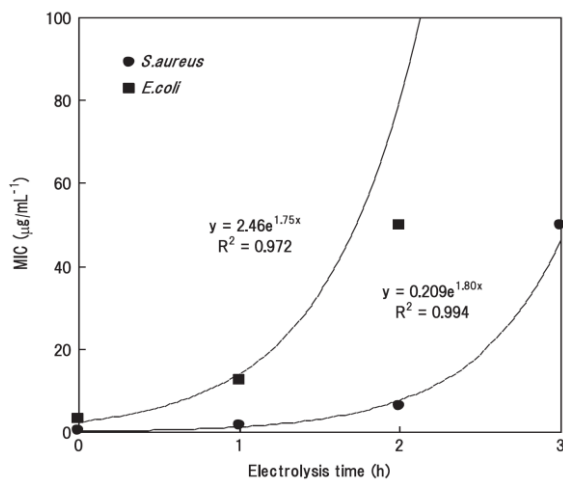
(4) 尿中抗癌剤の不活化について

人体に投与された場合、未代謝体のまま尿中に排泄される抗癌剤であるメトトレキサート (MTX) を対象とした。尿は健常成人の尿を用い、それに MTX を規定量混入したものを抗癌剤含有モデル尿とした。電解法は (3) と同様とした。MTX の定量には免疫学的手法である fluorescence polarization immunoassay (FPIA) 法を、細胞毒性測定には Molt-4 細胞を用いた。

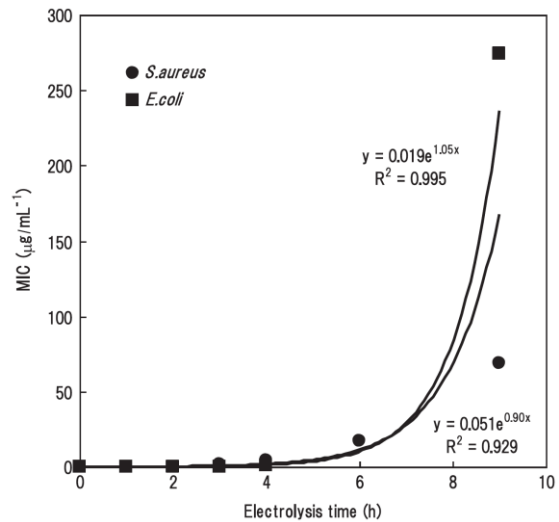
4. 研究成果

(1) 抗菌薬含有医療廃液の不活化について

アミノ配糖体系抗菌薬である AMK を用いてまず電解条件を検討した。電解を進めるに従って抗菌活性が低下し、電解 3 時間で黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は約 1/250 に、大腸菌に対する抗菌活性は検出限界以下となった (図 1)。その他の抗菌薬の場合、程度の差はあるものの、いずれも 3~6 時間の電解で抗菌活性は低下した。抗菌薬含有医療廃液のモデルとして抗菌薬混合物を電解したところ、電解 9 時間で抗菌活性はほぼ検出限界以下となった (図 2)。いずれの電解産物においてもヒト細胞に対する毒性は見られなかった。

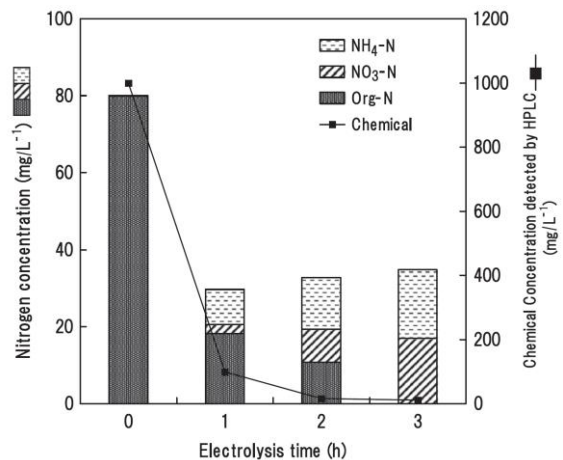


(図 1) アミカシン硫酸塩 (AMK) 電解による抗菌活性 (最小増殖阻止濃度 MIC) の変化 (文献①より)



(図 2) 抗菌薬混合物溶液電解による抗菌活性 (MIC) の変化 (文献①より)

AMK の分解過程を明らかにするため、電解中の窒素原子の挙動を解析した (図 3)。電解経時的に有機性窒素 (Org-N) が減少し、硝酸性窒素 (NO₃-N)・アンモニア性窒素 (NH₄-N) が増加し、全窒素量は減少したことから、電解によって AMK はより低分子の化合物に分解され、一部は窒素ガスの形にまで分解されることが示唆された。



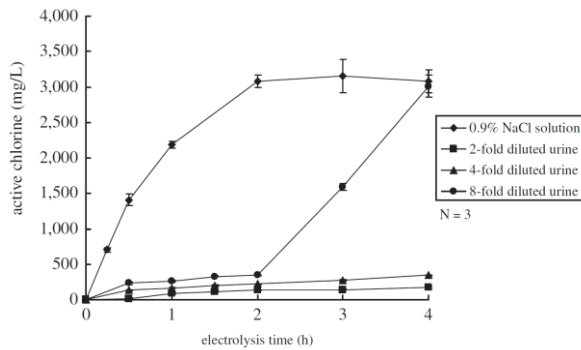
(図 3) アミカシン硫酸塩 (AMK) 電解時の窒素原子の挙動 (文献①より)

本研究において、抗菌薬含有医療廃液の不活化に電解法が応用できることが明らかになった。従来、医療廃液処理には焼却法、希釈法などが用いられているが、エネルギー消費や地球温暖化ガス排出の問題、安全面などにおいて電解法は従来法より優れている。われわれは電解法を応用し医療廃液を医療施設で処理できる実用試作機を開発しており、

抗菌薬含有医療廃液の医療現場レベルでの不活化にも応用できるものと考えた。

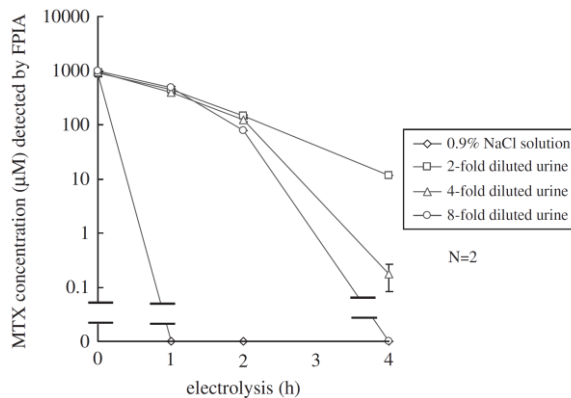
(2)尿に含まれる医薬品の不活化について

尿に 0.9%相当量の食塩を添加して電解した際の遊離塩素濃度を(図4)に示す。尿を8倍程度希釈すると遊離塩素が生理食塩水の電解と同程度発生することが明らかとなったため、希釈によって尿に含まれる薬剤を分解できる可能性が示唆された。



(図4)尿を電解した際発生する遊離塩素濃度の尿希釈による効果

つぎに、2, 4, 8倍希釈した尿に 1 mM相当量の MTX を溶解させたものを電解し、分解されずに残留する MTX の量を FPIA 法で測定した(図5)。その結果、尿を希釈するほど MTX の分解効率がよくなることが明らかとなった。



(図5)健常者尿およびその希釈液に MTX を混じ電解した際の MTX 濃度の変化

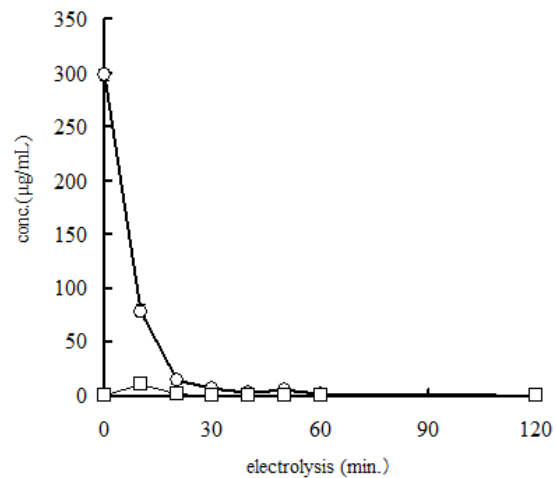
さらに電解前後の溶液の細胞毒性について比較した。MTX を添加した検体を電気分解した場合、生理食塩水で溶解した場合、4時間の電解で細胞毒性は検出限界以下となった。2倍希釈尿で溶解した検体の場合、50%

細胞毒性濃度が $1.993 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 、4倍希釈尿では $11.173 \pm 8.44 \mu\text{M}$ 、8倍希釈尿では検出限界以下となった。薬剤無添加の検体で細胞毒性を検討したが、新たな毒性は認められなかった。

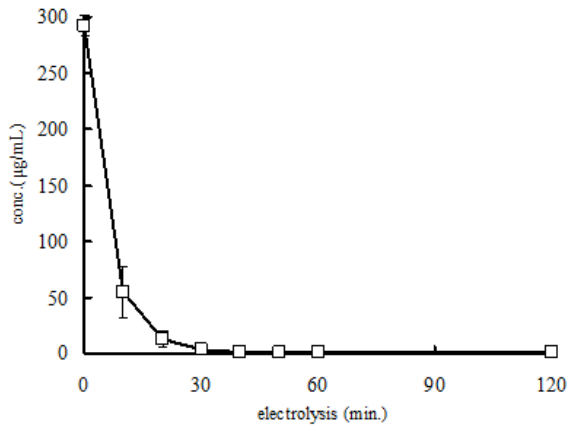
以上より、尿中に MTX を添加した場合には、尿成分と MTX が同時に分解されることが明らかになった。尿に含まれる抗癌剤の不活化において、電気分解時間を延長すること、あるいは検体を希釈することによって抗癌剤の不活化能の向上が可能であった。電気分解法によって排泄物に含まれる医薬品が不活化できる可能性が示された。

(3)抗ウイルス薬の不活化について

オセルタミビル(リン酸塩:OP)を生理食塩水に溶解し電解した場合、HPLCを用いた電解前後の OP 濃度解析で、OP は電解が進むにつれて減少し、電解1時間で検出限界以下となった。電解の途中で活性型であるオセルタミビルカルボン酸塩(OC)が一時的に検出されたが電解30分以内に検出限界以下まで分解された(図6)。OCの電解では電解1時間以内にOCは検出限界以下となった。両者の分解率は2時間の電解で99.6%以上であった(図7)。

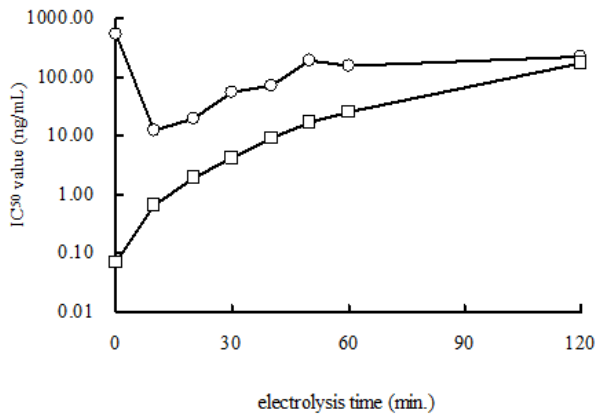


(図6)オセルタミビル(OP)電解におけるOPおよびOC量の変化(HPLCによる検出)



(図7) オセルタミビルカルボン酸塩 (OC) におけるOC量の変化 (HPLCによる検出)

つぎにOCの本来の薬理活性である「ウイルスノイラミニダーゼ (NA) 阻害活性」を指標として、電解によるOPおよびOCの不活化を評価した。OPはプロドラッグであるのでNA阻害活性は電解前のOPでは検出されず、電解10分後に活性型OC産生によると思われる阻害活性がわずかに検出されたが電解2時間でその活性は94.4%減弱した。OCの電解ではNA阻害活性は経時的に不活化され、電解2時間で99.96%減弱した(図8)。また、電解前後のOP、OC溶液いずれも細胞毒性、変異原性は検出されなかった。



(図8) OP (—○—), OC (—□—) 電解におけるインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ (NA) 阻害活性の不活化

経口投与されたOPはおよそ8割が代謝されてOCとなり尿中に排泄され、残り2割のOPはそのまま糞便中に排泄される。また現在新型インフルエンザ対策として備蓄中のOPは有効期限が過ぎると廃棄しなければなら

なくなる。これらOPやOCを不活化する方法として現状では燃焼法があるが、できる限り小さなエネルギーで不活化する方法が望ましい。電解法はOPとOCを効率的に不活化することから、OP、OCの不活化処理に利用可能であると考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Nakano, T., Hirose, J., Kobayashi, T., Hiro, N., Kondo, F., Tamai, K., Tanaka, K., and Sano, K.: Application of electrolysis to inactivation of antibacterials in clinical use. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90: 98-102, 2013. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.ecoenv.212.12.017
- ② Matsushita Yamamoto, T., Nakano, T., Yamaguchi, M., Shimizu, M., Wu, H., Aoki, H., Ota, R., Kobayashi, T., and Sano, K.: Disinfective process of strongly acidic electrolyzed product of sodium chloride solution against *Mycobacteria*. *Medical Molecular Morphology*, 45: 199-205, 2012. (査読あり)
DOI: 10.1007/s00795-011-0560-5
- ③ Kobayashi, T., Hirose, J., Sano, K., Kato, R., Ijiri, Y., Takiuchi, H., Tanaka, K., Goto, E., Tamai, H., and Nakano, T.: Application of electrolysis for detoxification of an antineoplastic in urine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 123-127, 2012. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.028
- ④ 中野隆史. 電気分解の医療応用 ～医療と環境～. 大阪医科大学雑誌 69 巻, 125-138, 2010. (査読なし)
http://www.osaka-med.ac.jp/deps/igaku_iga/magazine.html (雑誌情報のみ)

[学会発表] (計3件)

- ① 中野隆史, 小林豊英, 廣瀬潤, 佐野浩一: 電気分解によるオセルタミビル (タミフル®) の不活化. 第65回日本細菌学会関西支部総会. 2012年11月17日, 兵庫県神戸市.
- ② Nakano, T., Hirose, J., Kobayashi, T., Ijiri, Y., Kato, R., Hiro, N., Kondo, F., Ooi, Y., Yamamoto, T., Tanaka, K., and Sano, K.: Inactivation of antibiotics in

clinical wastewater by electrolysis.
International Union of Microbiological
Societies 2011 Congress (IUMS 2011: 国
際微生物学会議 2011). 2011年9月8日,
北海道札幌市.

- ③中野隆史, 廣瀬潤, 小林豊英, 井尻好雄,
加藤隆児, 廣直樹, 近藤文剛, 大井幸昌,
山本とも代, 田中一彦, 佐野浩一: 電気分
解法を応用した抗菌薬含有医療廃液の不
活化. 第63回日本細菌学会関西支部総会.
2010年11月20日. 大阪府枚方市.

[その他]

- 大阪医科大学微生物学教室公式ホームペ
ージ

<http://www.osaka-med.ac.jp/~micro/>

<http://www.omc-m.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 隆史 (Nakano Takashi)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00257867

(2) 研究分担者

河野 武弘 (Takehiro Kohno)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00319534

(3) 連携研究者

呉 紅 (Wu Hong)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80340553