

機関番号：13801
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580173
 研究課題名（和文） 白色腐朽菌およびその酵素による医薬品・身体ケア製品起源物質の分解と無毒化
 研究課題名（英文） Degradation and detoxification of pharmaceuticals and personal care products by white rot fungi and their ligninolytic enzymes
 研究代表者
 西田 友昭 (NISHIDA TOMOAKI)
 静岡大学・農学部・教授
 研究者番号：10252165

研究成果の概要（和文）：白色腐朽菌および白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素は、ブチルパラベン類（防腐剤）、ジクロフェナク（抗炎症剤）、メフェナム酸（抗炎症剤）およびトリクロサン（抗菌剤）の分解と毒性除去に有効であることを明らかにした。さらに、リグニン分解酵素は、現行の下水処理における除去効率が10%以下である難分解性のカルバマゼピン（抗てんかん剤）をも分解しうることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that white rot fungi and their ligninolytic enzymes are effective in degrading and detoxifying pharmaceuticals and personal care products, such as butylparabens (preservatives), diclofenac and mefenamic acid (antiinflammatory drugs), and triclosan (antimicrobial agent). Furthermore, it was confirmed that ligninolytic enzymes are also effective in degrading carbamazepine (antiepileptic drug) which is highly persistent and removed by less than 10% after conventional wastewater treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：木質生化学

科研費の分科・細目：森林学・木質化学

キーワード：白色腐朽菌、リグニン分解酵素、医薬品、身体ケア製品

1. 研究開始当初の背景

現代社会においては、医療や畜産あるいは生活の場で、医薬品やシャンプー・消毒剤・化粧品などの身体ケア製品（Pharmaceuticals and Personal Care Products; PPCPs）が多量に使用されている。これまで、PPCPsが使用された後の環境動態については注意が払われてこなかったが、近年、水環境中や下水中での存在実態や、低濃度での慢性的な暴露による生態系への影響や細菌叢の薬剤耐性化などが明らかとなり、水環境中に存在する新たな汚染物質として PPCPs が注目されるに至っ

ている。

現在、水環境中より多くのPPCPsが検出されており、世界的に普及している現行の生物的下水処理（活性汚泥処理）では顕著な除去が認められていない。この事実は、これらのPPCPsが活性汚泥中に存在する複合微生物では生分解を受けにくいことを強く示唆しており、PPCPs起源の化学物質を高度に分解・無毒化する新規な生物的処理法を開発することは、環境保全を図る上で大きな意義を有するものと考えられる。

2. 研究の目的

近年、PPCPsは水環境中に存在する新たな汚染物質として注目されており、国内外の水環境における実態調査、水処理プロセスにおける除去挙動、生態毒性に関する影響評価などに関する研究が活発に行われている。しかしながら、これらの取り組みの中で、活性汚泥処理では分解・除去されにくいことが明らかにされているにもかかわらず、活性汚泥中に生育する複合微生物（主として細菌類）以外の微生物を用いてPPCPsを生分解しようとする研究はほとんどなされていない。

そこで本研究では、木材主要成分の一つであり、芳香族性の高分子であるために難分解性を示すリグニンを、白色腐朽菌（リグニン分解菌）が特異的に分解しうる点に着目し、白色腐朽菌および白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素を用いて、芳香族性PPCPsの生分解と毒性（水生生物への生育阻害、内分泌攪乱作用）除去が可能なバイオレメディエーション（生物的環境修復）技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生菌処理

10^{-4} M の iso-Butylparaben (iso-BP) あるいは n-Butylparaben (n-BP) を含有する低窒素-高炭素含有 (LN-HC) 培地にカワラタケ (*Trametes versicolor* IFO 6482) を接種し、所定期間培養した。また、 10^{-4} M の Diclofenac (DCF) あるいは Mefenamic acid (MFA) を *Phanerochaete sordida* YK-624 株 (ATCC 90872) を用いて同様に処理した。

経時的に培養液を採取してリグニン分解酵素の活性を測定するとともに、HPLC 分析により残存率を求めた。さらに、iso-BP および n-BP についてはエストロゲン様活性の除去挙動を、DCF および MFA については甲殻類に対する毒性の除去挙動を追跡した。また、MS 分析および $^1\text{H-NMR}$ 分析によって、DCF および MFA 代謝物の構造決定を行った。

(2) リグニン分解酵素処理

iso-BP (10^{-4} M)、n-BP (10^{-4} M)、DCF (10^{-4} M)、MFA (10^{-4} M)、Triclosan (TCS; 10^{-4} M)、あるいは Carbamazepine (CBZP; 2×10^{-5} M) を、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) あるいはラッカーゼ (Lac) を用いて処理した。なお、Lac 処理については、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) を共存させた系でも処理を行った。次いで、経時的に反応液を採取し、HPLC 分析により残存率を求めた。また、iso-BP および n-BP についてはエストロゲン様活性の除去挙動を、TCS については藻類および細菌類に対する毒性の除去挙動を追跡した。さらに、DI-MS 分析によって CBZP 分解産物の構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) iso-Butylparaben および n-Butylparaben

パラベン類は医薬品や化粧品などの防腐剤として幅広く使用されており、組換え体酵母を用いる Two-hybrid 法や ELISA、ラットを使った子宮肥大試験などから、女性ホルモン（エストロゲン）様活性を有することが示されている。また、下水中から検出される濃度（数 $\mu\text{g/l}$ レベル）でも生殖異常をもたらすことが報告されている。

既知の代表的な白色腐朽菌であるカワラタケを用いてパラベン類を処理したところ、iso-BP および n-BP は 2 日間の処理で約 99% 減少し、エストロゲン様活性も同様に除去された。また、その際に産生されるリグニン分解酵素の活性を測定した結果、主としてラッカーゼ (Lac) の産生が認められ、パラベン類分解への Lac の関与が示唆された。

次いで、Lac を用いてパラベン類の処理を試みた結果、Lac 単独処理ではパラベン類の減少はわずかであった。Lac はフェノール性化合物あるいは酸化還元電位の低い化合物しか酸化分解できないとされてきたが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) のようなメディエータを共存させると、Lac の基質特異性を拡大しうることが知られている。そこで、HBT を共存させる系 (Lac-HBT) によってもパラベン類を処理した。その結果、HBT 2 mM を共存させた Lac-HBT 処理では、処理 4 時間でほぼ完全にパラベン類が減少し、エストロゲン様活性も完全に除去された (図 1 および 2)。また、Lac-HBT 処理における「パラベン類の減少率」と「エストロゲン様活性除去率」との間に直線関係があり、iso-BP については 0.945、n-BP については 0.970 という高い相関係数が得られた (図 3 および 4)。このことより、全処理期間を通じて認められた Lac-HBT 処理によるパラベンの減少は、エストロゲン様物質として作用し得ない化学構造への変化を伴っていることが判明した。

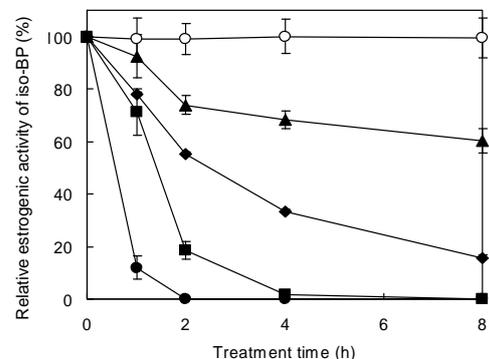


図 1 Lac 処理による iso-BP のエストロゲン様活性除去に及ぼす HBT 濃度の影響 (○), HBT 0 mM; (▲), 0.2 mM; (◆), 0.4 mM; (■), 1.0 mM; (●), 2.0 mM

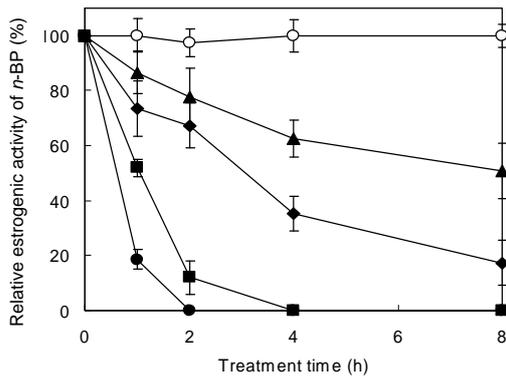


図2 Lac 処理による n-BP のエストロゲン様活性除去に及ぼす HBT 濃度の影響 (○), HBT 0 mM; (▲), 0.2 mM; (◆), 0.4 mM; (■), 1.0 mM, (●), 2.0 mM

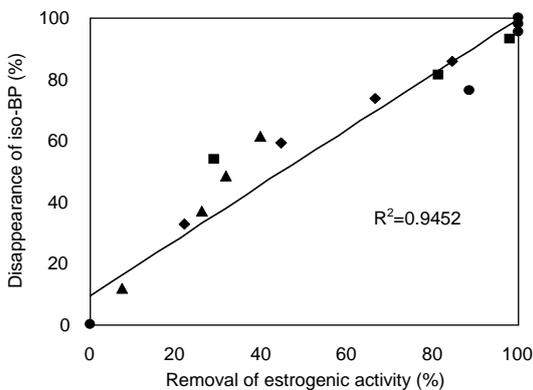


図3 Lac-HBT 処理による iso-BP の濃度減少とエストロゲン様活性除去の関係 (○), HBT 0 mM; (▲), 0.2 mM; (◆), 0.4 mM; (■), 1.0 mM, (●), 2.0 mM

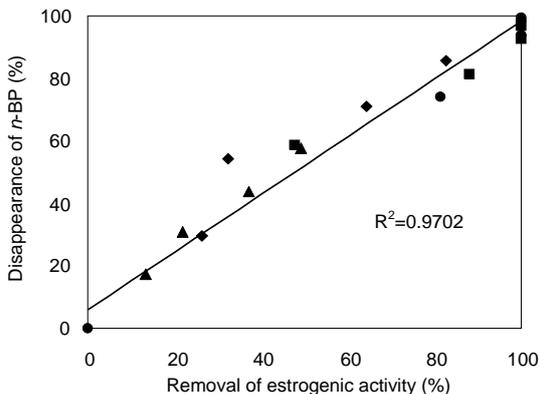


図3 Lac-HBT 処理による n-BP の濃度減少とエストロゲン様活性除去の関係 (○), HBT 0 mM; (▲), 0.2 mM; (◆), 0.4 mM; (■), 1.0 mM, (●), 2.0 mM

(2) Diclofenac および Mefenamic acid

Diclofenac (DCF) および Mefenamic acid (MFA) は、一般医薬品として日常的に多用されている非ステロイド系抗炎症剤であり、下水処理での除去率が低いため、世界各地の

下水処理排水中から高頻度で検出されており、甲殻類および藻類に対して毒性を有している。

そこで、DCF および MFA を白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株で処理した結果、DCF については処理 2 日目以降から急激な減少を示し、6 日目には完全に消失した。一方、MFA についても処理 3 日目で約 60%、6 日目で約 90% の減少が認められた (図 5 および 6)。

次いで、*P. sordida* YK-624 株処理によって、DCF と MFA の甲殻類に対する毒性 (急性致死毒性) も除去されているのかを確認した。その結果、DCF および MFA 濃度の減少に伴って甲殻類に対する毒性も除去されており、処理 6 日目では両物質の毒性がほぼ完全に除去された (図 5 および 6)。

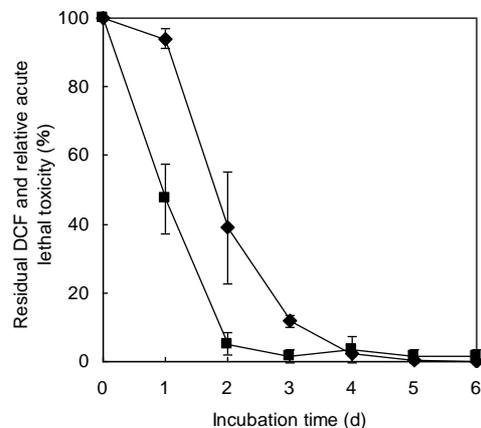


図5 *P. sordida* YK-624 株による DCF 処理 (◆), 残留 DCF; (■), 急性致死毒性

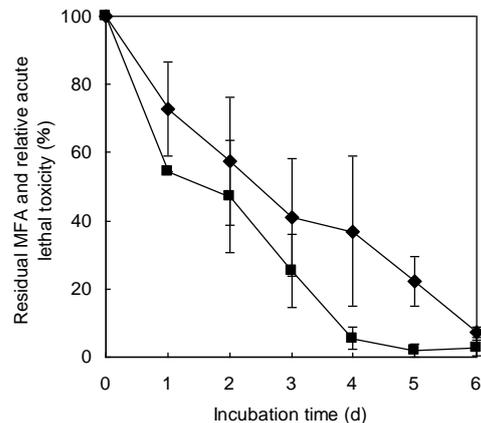


図6 *P. sordida* YK-624 株による MFA 処理 (◆), 残留 MFA; (■), 急性致死毒性

なお、DCF を *P. sordida* YK-624 株で処理した際に生成する代謝物の構造決定を試みたところ、DCF 代謝物のいずれもが、親化合物の DCF が水酸化された 4',5'-dihydroxydiclofenac (D1)、4'-hydroxydiclofenac (D2) お

よび5-hydroxydiclofenac (D3)であった。一方、MFAについても *P. sordida* YK-624 株処理による代謝物の生成が認められ、それらは、MFA が水酸化された 3'-hydroxymethyl-5-hydroxymefenamic acid (M1)、3'-hydroxymethyl-6'-hydroxymefenamic acid (M2)、3'-hydroxymethylmefenamic acid (M3)、および MFA の 3' 位が COOH 基に変換された 3'-carboxymefenamic acid (M4) であった。

ヒトにおいては、肝臓中で産生されるシトクロム P450(酵素)によって DCF および MFA の水酸化が生じ、これによって無毒化されることが知られている。さらに、ヒトにおける DCF の主代謝物は D2 と D3 であり、MFA の主代謝物は M3 と M4 であるとされている。このことから、*P. sordida* YK-624 株処理による DCF および MFA の代謝にもシトクロム P450 の関与が示唆された。そこで、シトクロム P450 の産生を阻害する 1-アミノベンゾトリアゾールを添加した条件下で、DCF および MFA の *P. sordida* YK-624 株処理を行った結果、DCF および MFA 濃度の減少が著しく阻害された。以上のことから、*P. sordida* YK-624 株処理による DCF および MFA の代謝は、同菌株の産生するシトクロム P450 による水酸化反応が主体であり、この水酸化反応によって DCF および MFA の甲殻類に対する毒性が除去されると結論された。

上述したように、*P. sordida* YK-624 株で DCF および MFA を処理すると、同菌株はヒトの場合と同様に、菌体内酵素であるシトクロム P450 によって DCF および MFA を水酸化し、両物質から自分の身を守っていた。このことは、白色腐朽菌が菌体外に産生するリグニン分解酵素が DCF および MFA の無毒化に関与しないことを強く示唆するものであるが、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) やラッカーゼ (Lac) といったリグニン分解酵素が DCF および MFA を分解できないということを通じて支持するものではない。そこで、部分精製した MnP および Lac を用いて DCF および MFA を処理した。なお、Lac 処理においては HBT を共存させる系 (Lac-HBT) によっても DCF および MFA を処理した。

その結果、MnP、Lac および Lac-HBT のいずれの酵素処理でも DCF の除去が認められたが、Lac-HBT 処理が DCF 除去に最も優れており、処理 1 時間で約 95% の減少が認められた (図 7)。一方、MFA については、いずれの酵素処理でも処理 0.5 時間で 90% 以上が減少し、DCF よりも除去効率が高かった。これらの結果より、リグニン分解酵素処理は DCF および MFA の除去に有効であることが明らかとなった (図 8)。

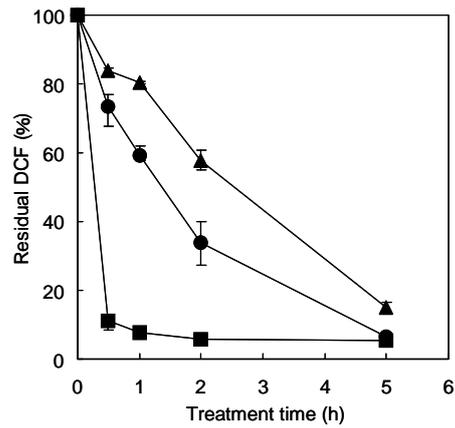


図 7 リグニン分解酵素による DCF の分解 (●), MnP; (▲), Lac; (■), Lac-HBT

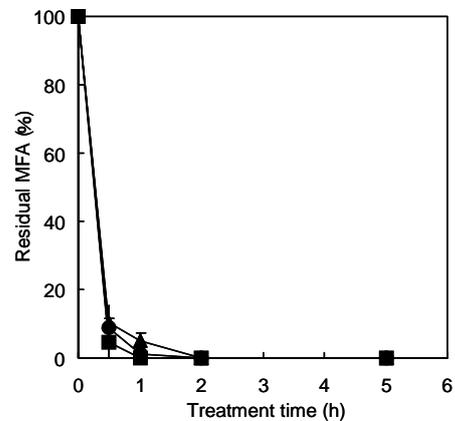


図 8 リグニン分解酵素による MFA の分解 (●), MnP; (▲), Lac; (■), Lac-HBT

(3) Triclosan

Triclosan (TCS) は、身体ケア製品である薬用石鹸やシャンプーなどの抗菌剤として多用されているが、現行の下水処理による除去率が低いこと、さらには、多くの水生生物に対して毒性を有しており、中でも藻類に対して最も高い毒性を発現することが報告されている。

そこで、TCS のリグニン分解酵素処理を試みた結果、Lac 単独処理では処理 90 分後においても約 10% の TCS 減少を示すにとどまった。また、Lac-HBT 処理においては Lac 単独処理よりも TCS 減少に若干優れていたが、処理 90 分後でも約 30% の減少であった。これに対し、MnP 処理では処理 30 分後に 94% の減少が認められ、処理 90 分後には完全に消失した。このことから、MnP 処理が TCS 減少に最も有効と判断された (図 9)。

次に、TCS は抗菌剤として多用されることから、MnP 処理によって大腸菌 (*Escherichia coli*) および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に対する増殖阻害 (毒性) が除去されているのかを

確認した。その結果、2種類の細菌に対する増殖阻害は MnP 処理 30 分間で完全な除去が認められた (図 10)。また、緑藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) の増殖阻害を指標として、MnP 処理による TCS の毒性除去効果をも評価したところ、30 および 60 分間の MnP 処理で藻類増殖阻害も各々 75 および 90% 減少した (図 11)。よって、MnP 処理は細菌および藻類に対する TCS の毒性を効率的に除去しうると判断された。

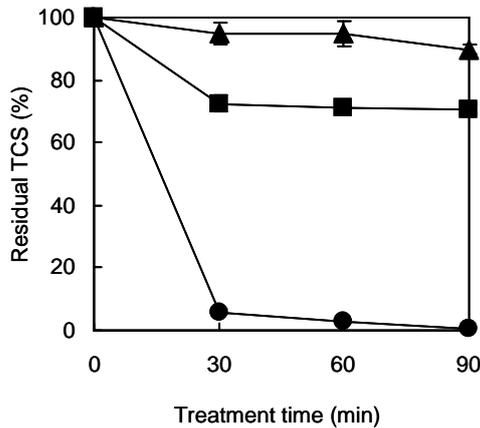


図 9 リグニン分解酵素による TCS の分解 (●, MnP; (▲), Lac; (■), Lac-HBT

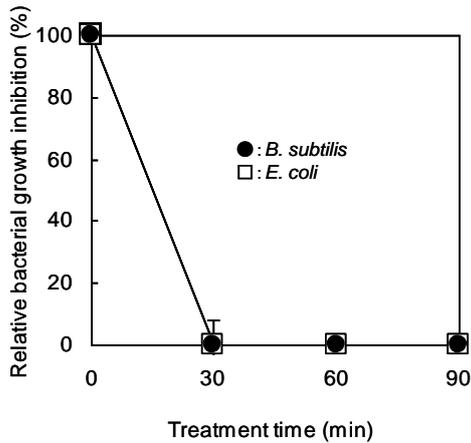


図 10 MnP 処理による細菌類への毒性除去

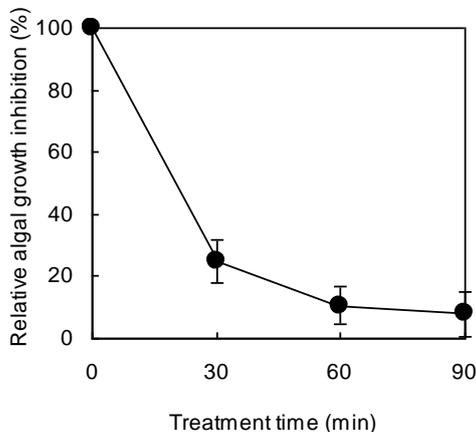


図 11 MnP 処理による藻類への毒性除去

(4) Carbamazepin

Carbamazepin (CBZP) は、抗てんかん薬として使用されているが、現行の下水処理による除去率は 10% 以下であり、極めて生分解を受けにくいとされている。

CBZP をリグニン分解酵素で処理した結果、Lac 単独処理での分解は認められなかったが、Lac-HBT 処理においては 24 時間後に約 22% の減少が確認され、MnP 処理においても約 14% の減少が認められた (図 12)。なお、Lac-HBT 処理時における Lac 活性の減少挙動を追跡したところ、処理 8 時間後に残存する Lac 活性は 10% 以下であり、Lac の失活が認められた。そこで、処理 8 時間毎に Lac および HBT を新たに添加する繰り返し処理を試みた結果、処理 48 時間で約 60% の CBZP 除去率が得られた (図 13)。

以上のように、Lac-HBT 処理による CBZP の分解が確認されたが、処理過程において分解産物と推定される物質の蓄積が認められ、それらは 9(10H)-acridone と 10,11-dihydro-10,11-epoxycarbamazepine であった。

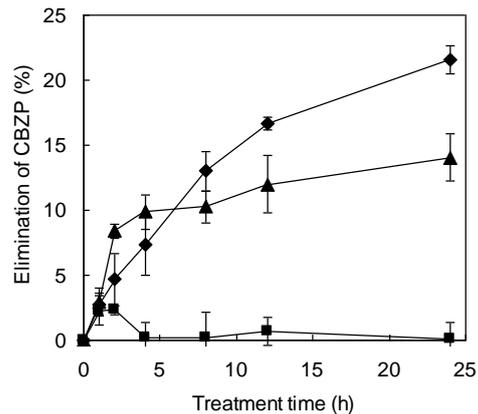


図 12 リグニン分解酵素による CBZP の分解 (▲), MnP; (■), Lac; (◆), Lac-HBT

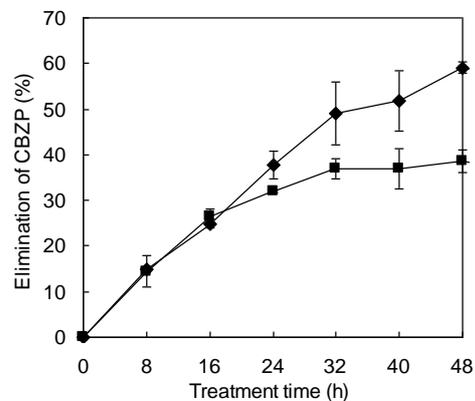


図 13 Lac-HBT 繰り返し処理による CBZP の分解 (◆), Lac および HBT の添加; (■), Lac のみ添加

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 Hata, T., Shintate, H., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T., Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. Journal of Hazardous Materials, 査読有, 181 巻, 2010, 1175-1178
- ② Inoue, Y., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T., Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. Journal of Hazardous Materials, 査読有, 180 巻, 2010, 764-767
- ③ Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T., Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. Biodegradation. 査読有, 21 巻, 2010, 681-689
- ④ Mizuno, H., Hirai, H., Kawai, S., Nishida, T., Removal of estrogenic activity of iso-butylparaben and *n*-butylparaben by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. Biodegradation, 査読有, 20 巻, 2009, 533-539

[学会発表] (計6件)

- ① 新館秀章, 畑 貴之, 河合真吾, 西田友昭, リグニン分解酵素による医薬品類の除去, 第55回リグニン討論会, 2010年10月20日, 京都大学(京都市)
- ② 井上由起子, 河合真吾, 西田友昭, リグニン分解酵素によるトリクロサンの分解と毒性除去, 第60回日本木材学会大会, 2010年3月19日, 宮崎大学(宮崎市)
- ③ 畑 貴之, 河合真吾, 西田友昭, 岡村秀雄, リグニン分解酵素によるカルバマゼピンの除去, 第44回日本水環境学会年会, 2010年3月16日, 福岡大学(福岡市)
- ④ 畑 貴之, 河合真吾, 西田友昭, 岡村秀雄, 白色腐朽菌によるジクロフェナクおよびメフェナム酸の毒性除去と代謝物, 第43回日本水環境学会年会, 2009年3月17日, 山口大学(山口市)
- ⑤ 水野裕仁, 河合真吾, 西田友昭, カワラタケによる iso-ブチルパラベンのエストロゲン様活性除去とその代謝物, 第59回日本木材学会大会, 2009年3月15日, 松本大学(松本市)
- ⑥ 畑 貴之, 河合真吾, 西田友昭, 岡村秀雄, 抗炎症剤であるジクロフェナクおよびメフェナム酸の白色腐朽菌による毒性除去, 第53回リグニン討論会, 2008年10

月30日, 東京大学(東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/f/mokubake/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 友昭 (NISHIDA TOMOAKI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 10252165

(2) 研究分担者

河合 真吾 (KAWAI SHINGO)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 70192549