

## 畜舎汚水中の抗菌剤の分析

### Analysis of Antibiotic Residues in Swine Wastewater

遠藤美砂子\*<sup>1</sup> 島山 敬 中村 朋之\*<sup>2</sup>  
川向 和雄\*<sup>3</sup>

Misako TAGIRI-ENDO, Takashi HATAKEYAMA, Tomoyuki NAKAMURA  
Kazuo KAWAMUKAI

畜舎の排水処理設備における抗菌剤の消長を把握するための調査を行った。畜舎汚水をオンライン固相抽出-LC/MS/MSにより迅速簡便に分析する方法により、畜舎汚水の季節毎の抗菌剤濃度を測定した。使用量の多い抗菌剤は畜舎場内水で高濃度に検出される傾向が認められたが、最終放流水の濃度は抗菌剤の種類により異なっていた。抗菌剤の分解性が放流水中の残留量に関係していると考えられる。

キーワード：抗菌剤；豚舎汚水；LC/MS/MS；オンライン固相抽出

**Key words**：Antibiotics；Swine wastewater；LC/MS/MS；Online solid-phase extraction

#### 1 はじめに

国内外の水環境中からさまざまな医薬品の検出が報告されている。一級河川の全国調査では人口密度と人用医薬品検出量には正の相関があるとされ、動物用医薬品では畜産由来と思われる特定の医薬品が局所的に検出される事例が報告されている<sup>1)</sup>。医薬品の中でも抗菌剤は薬剤耐性菌の増加を引き起こすことが懸念されており、可能な限り環境中に放出しないことが望ましい。抗菌剤の使用量は動物用が人用の2倍程度であり、畜産業が盛んな本県においては、畜舎から排出される抗菌剤の量を把握しておくことが重要である。

本県では平成19年度に、下水処理水、河川水、畜舎汚水について動物用抗菌剤を中心とした医薬品類の分析方法を検討するとともに、それら医薬品の分布状況について調査した。下水処理水からは、人用の抗菌剤であるクラリスロマイシン、レボフロキサシン、スルファピリジンが200ng/L以上検出され、他県で報告されている例と同様な結果であった<sup>1, 2)</sup>。また、畜舎や水産養殖場が密集する地域の河川水をスクリーニング分析したところ、特に高濃度に検出される医薬品を見つけることはできなかった。一方、畜舎の放流水からは100ng/L以上検出された抗菌剤が存在した。

そこで平成20年度は、畜舎の排水処理設備における抗菌剤の消長を把握するための調査を行った。先に畜舎汚水をオンライン固相抽出-LC/MS/MSにより迅速簡便に分析する方法を確立し報告<sup>3)</sup>した。本報では本分析法により、畜舎場内水の季節毎の抗菌剤濃度を測定した結果および土壌中の抗菌剤の分析方法を検討した結果について報告する。

#### 2 方法

##### 2.1 水試料および分析対象物質

県内の畜舎(2カ所)が共同利用している排水処理施設(図1および表1)を流れる水を季節毎(5月, 8月, 10月, 1月)に採水し試料とした。測定対象物質は、畜舎で使用されているフロルフェニコール, リンコマイシン, オキシテトラサイクリン, タイロシン, バルネムリンとした。

##### 2.2 分析条件

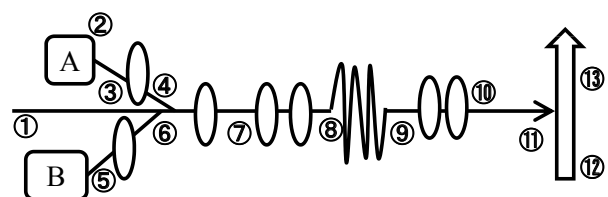
LCはAgilent1100シリーズを用い、精製カラムはOasis HLB(2.1×20mm, 25 $\mu$ m)、分析カラムはAgilent ZORBAX SB-Aq(2.1×100mm, 1.8 $\mu$ m)、移動相は0.2%ギ酸とアセトニトリルのグラジェント溶出とし、試料注入量は100 $\mu$ Lとした。MS/MSはApplied Biosystems API 3000を用いた。各物質のMS/MS条件は表2に示した。

##### 2.3 水試料の調製

試料水は、遠心分離後、ディスクフィルターでろ過し、オンライン固相抽出-LC/MS/MSに供した。試料中濃度が1000ng/Lを超える場合は、試料を10倍希釈して再度分析した。添加試料は試料水に2000, 1000, 500, 100ng/Lとなるように標準溶液を加えて同様に操作し、試料中濃度は標準添加法で算出した。

##### 2.4 土壌試料の調製方法

堆肥試料の分析法検討のために、抗菌剤汚染のない土壌試料を用いて添加回収試験を行った。検討対象物質は、



①~⑬：採水場所、□：畜舎、○：ラグーン、≡：河川

図1 畜舎における採水場所

\* 1 現 仙南保健所

\* 2 現 環境生活部原子力安全対策室

\* 3 現 宮城調理製菓専門学校

表1 採水場所における季節毎の抗菌剤濃度

採取月	医薬品	検出下限	沢上流域			A畜舎			B畜舎		緩衝池	折り返し水路		緩衝液	沢下流域	河川			
			①上流域対象	②スクリーン後	③最終沈殿水	④沢への放流口	⑤ラグーン流入水	⑥ラグーン処理水	⑦2池流出水	⑧折り返し水路入口	⑨折り返し水路出口	⑩緩衝池出口	⑪放流口下流	⑫下流	⑬上流				
5月	フロルフェニコール	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-		
8月			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10月			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1月			ND	3,100	250	ND	ND	110	120	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5月	リンコマイシン	10	140	400,000	2,200	4,000	23,000	120	1,400	2,800	2,600	3,200	1,000	-	-	-	-	-	
8月			650	93,000	230	2,200	30,000	160	530	650	750	610	700	83	ND	ND	ND	ND	
10月			69	190,000	350	990	54,000	140	390	470	460	420	360	31	ND	ND	ND	ND	
1月			110	210,000	64,000	9,500	150,000	54,000	7,000	4,300	6,300	4,700	4,700	170	ND	ND	ND	ND	
5月	オキシテトラサイクリン	100	ND	160,000	3,900	280	18,000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-		
8月			ND	200,000	10,000	310	20,000	180	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10月			ND	760,000	34,000	700	15,000	240	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
1月			ND	420,000	46,000	1,200	3,600	1,200	350	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
5月	タイロシン	50	ND	1,400	560	ND	42,000	19,000	620	430	360	340	150	-	-	-	-		
8月			ND	830	940	90	11,000	3,600	680	680	420	300	180	ND	ND	ND	ND		
10月			ND	1,700	520	83	13,000	490	89	69	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
1月			ND	5,700	900	61	970	940	930	50	170	220	120	ND	ND	ND	ND	ND	
5月	バルネムリン	100	ND	ND	ND	ND	120	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-		
8月			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
10月			ND	ND	ND	ND	2,000	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
1月			ND	ND	ND	ND	250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

単位:ng/L, ND:検出限界以下

水試料からの検出量が少なかったフロルフェニコールを除く4物質とした。分析方法は、水試料に準じた。

### 3 結果と考察

#### 3.1 水試料の分析

畜舎汚水は試料毎のマトリックスが異なり、MS/MSでの絶対検量線法による測定では、正確な定量値を得ることができない。一方、抗菌剤毎の残留濃度が大きく異なる(1,000,000~10ng/L未満)ため、標準添加法によるオフライン固相抽出は操作が煩雑になる。そこで、オンライン固相抽出法-LC/MS/MSにより分析する方法を開発した<sup>3)</sup>。本法の検出下限値は100~10ng/Lであり、絶対検量線法による真度は87~100%、日内再現性2.1~12%、日差再現性6~17%であった。本法により畜舎で使用されている5種の抗菌剤の排水中の残留濃度を調査した。また、試料中から検出されたオキシテトラサイクリンおよびタイロシンは、標準品とは保持時間の異なる異性体が検出され、標準添加法ではこれらの異性体の確認が容易であった。

年間使用量の多い抗菌剤(リンコマイシン、オキシテトラサイクリン)は排水処理の上流側で高濃度に検出された。また、複数のラグーンおよび折り返し水路を通るうちに排水中の残存濃度が減少する傾向が認められた。季節毎の排出量は大幅に変動することはなかった。畜舎Aと畜舎Bで使用している抗菌剤が異なること、両畜舎の排水処理方式の違いから抗菌剤の排出濃度に違いが

みられた。排水処理が抗菌剤の分解・希釈に影響していることが示唆された。

抗菌剤のうち、リンコマイシン、タイロシンが放流水(採水場所⑩)でそれぞれ1,000および100ng/L程度検出された。リンコマイシンは、畜舎の上流域(採水場所①)からも検出されることや排水路中(採水場所⑦~⑩)でも減少しにくいこと(表1)から、この排水処理により減衰させることが難しい物質と思われる。また、リンコマイシンは汚泥・堆肥中に蓄積し、周辺環境への汚染源となる可能性も考えられる。オキシテトラサイクリンは使用量および排出量が多いにもかかわらず放流水の濃度は100ng/L未満であった。抗菌剤の分解性が放流水中の残留量に関係していると考えられる。

#### 3.2 土壌試料の分析条件の検討

土壌試料の添加回収試験において、有機溶媒のみで抽出した場合リンコマイシンの、緩衝液のみで抽出した場合はオキシテトラサイクリンの回収率が低かったため、緩衝液と有機溶媒の混合液で抽出する方法を検討した。至適条件を図3に示す。土壌試料抽出液を標準添加法で分析する方法を用いた。土壌試料に50ng/g添加した場合の回収率を、表3に示す。回収率は108~132%であった。実際の堆肥や汚泥を分析する場合は、それぞれ試料マトリックスの状態が異なるため、試料への標準添加による分析を行わなければ、誤差が大きくなることが予想される。

表2 MS/MS 測定条件

医薬品名	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
フロルフェニコール	356.02	184.96
	356.02	336.00
リンコマイシン	407.20	126.30
	407.20	82.27
オキシテトラサイクリン	461.16	426.10
	461.16	201.10
タイロシン	916.52	174.20
	916.52	101.00
バルネムリン	565.37	263.10
	565.37	72.10

上段: 定量イオン、下段: 確認イオン

表3 土壌試料における抗菌剤の添加回収率

抗菌剤	回収率(%)	RSD(%)
リンコマイシン	120	17
オキシテトラサイクリン	108	0.18
タイロシン	132	5.0
バルネムリン	114	4.1

n=3; 50ng/g添加

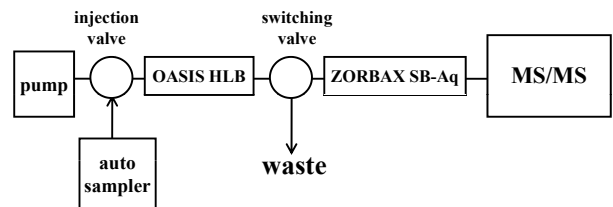


図2 オンライン固相抽出-LC/MS/MSの構成

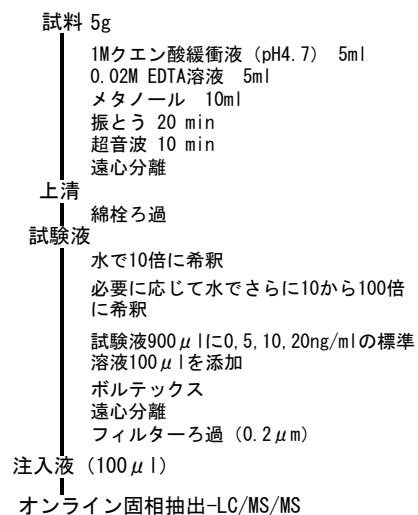


図3 堆肥試料の調製法

#### 4 まとめ

平成19年度の調査で畜舎からの放流水は、検出可能な濃度で抗菌剤が残留している可能性が高いことがわかった。本年度は、畜舎の排水処理設備における抗菌剤の消長を把握するための調査を行った。畜舎汚水をオンライン固相抽出-LC/MS/MSにより迅速簡便に分析する方法により、畜舎汚水の季節毎の抗菌剤量を測定した。年間使用量の多い抗菌剤（リンコマイシン、オキシテトラサイクリン）は排水処理の上流側で高濃度に検出されたが、最終放流水の濃度は抗菌剤の種類により異なっていた。抗菌剤の分解性が放流水中の残留量に関係していると考えられる。特にリンコマイシンは畜舎外の上流付

近からも検出されることから、汚泥・堆肥中に蓄積し、周辺環境への汚染源となる可能性も考えられる。今後は周辺土壌や堆肥への抗菌剤の残留状況についても調査する必要がある。

#### 参考文献

- 1) 清野敦子, 益永茂樹: 水環境学会誌, 29, 186 (2006).
- 2) 八十島誠, 山下尚之, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 水環境学会誌, 27, 707 (2004).
- 3) M. Tagiri-Endo, T. Hatakeyama, T. Nakamura, K. Kawamukai: *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 1367 (2009).