

微生物研究と環境バイオ産業・産業界への技術応用の視点から

その他（別言語等） のタイトル	Application of Microbiology Research on Environmental Biotechnology Industry
著者	藤井 克彦, 武者 一宏, 菊池 慎太郎
雑誌名	室蘭工業大学紀要
巻	53
ページ	41-46
発行年	2003-11
URL	http://hdl.handle.net/10258/84

微生物研究と環境バイオ産業・産業界への技術応用の視点から

その他（別言語等）のタイトル	Application of Microbiology Research on Environmental Biotechnology Industry
著者	藤井 克彦, 武者 一宏, 菊池 慎太郎
雑誌名	室蘭工業大学紀要
巻	53
ページ	41-46
発行年	2003-11
URL	http://hdl.handle.net/10258/84

微生物研究と環境バイオ産業・産業界への 技術応用の視点から

藤井 克彦*1、武者 一宏*1、菊池 慎太郎*1

Application of Microbiology Research on Environmental Biotechnology Industry

Katsuhiko Fujii, Kazuhiro Musha, Shintaro Kikuchi

(論文受理日 平成 15 年 8 月 29 日)

Abstract

There has been increasing concern recently over the potential of estrogens and their mimics to cause estrogenic effects on aquatic fauna. Recently, we found *Sphingomonas cloacae*, the nonylphenol-degrading bacterium, and *Novosphingobium tardaugenes*, the estradiol-degrading bacterium, from sewage treatment plants. Nonylphenol was biodegraded to nonanol, while estradiol was suggested to be degraded to CO₂ or volatile compounds. Subsequently, *S. cloacae* was evaluated for its utility in remediation of NP-contaminated wastewater. We next constructed and evaluated a lab-scale wastewater treatment system with a 3 L column which was filled with *S. cloacae*-immobilizing carriers. The system worked properly and removed several hundreds of ppb of NP to ecologically safe concentrations of less than 10 ppb in wastewater. The wastewater samples with pH values of 6 or 8 were also treated efficiently without pH adjustment. These results suggested that the biotreatment system could efficiently remediate industrial wastewater and contribute to the preservation of aquatic environments.

Keywords: Estrogen mimics, nonylphenol, estradiol, bacteria, microbial degradation, bioreactor

1. はじめに

長引く不況の中、我国ではこれまでにないくらいに新規産業の創出が各方面から望まれている。例えば北海道は経済産業省のリーダーシップの下、バイオテクノロジー産業の一大拠点となることを目指しており、本学の位置する室蘭市(およびその周辺エリア)は鉄と並ぶ主要産業として環境産業の発展を推進しているところである。

一方で、文科系および理科系の違いを問わず、学問の究極の目標は、言うまでもなく、それが最終的

には何らかの形で社会の役に立つ(研究成果の社会還元)ことにある。従って、本学で地域の施策に合致する『環境』および『バイオ』の研究が本学の新しい看板研究系のひとつとなることは大学の新しいカラーを作り出すという点ではもちろん、地域産業への貢献という点でも極めて有意義である。

本稿では、学術研究の成果が技術移転という形で社会還元されるまでの過程の一例として、筆者らの研究テーマである環境ホルモン分解菌についての話題から室蘭工業大学発ベンチャー企業の設立に至るまでを紹介し、最後に室蘭エリアの環境バイオ産業の拠点化は可能かどうかについて考察する。

*1 応用化学科

2. 環境ホルモン分解菌

2.1 深刻化する環境ホルモン問題

最近では「内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）」に関する話題がテレビ、新聞、あるいは雑誌のテーマとして挙がらない日はほとんどない。一般向けの書籍も相次いで出版されており、環境ホルモンというキーワードは書籍分類における1つの大きなカテゴリーとなりつつある。1996年10月に米国環境保護局（EPA）が発表したリストには約70種類の化合物が環境ホルモンとして掲載されており、日本の関係省庁もこのリストに従ってリスク評価を行っているところである。

今日環境ホルモンと呼ばれている物質自体は、実は数十年も前から工業国の土壌や水圏で環境汚染物質として検出されていたのであるが、これらが急激に注目され始めた理由は、我々の生活において身近に存在し微量で作用を発揮すること、そして野生動物だけでなくヒトでも体内蓄積が明らかになってきたことが挙げられる。

筆者らは以前より、我国でも都市部河川の魚で見られる「メス化現象」の原因物質ノニルフェノールと人畜由来エストロゲン・エストラジオールに焦点を絞り、分解微生物の探索と環境浄化への応用可能性についての検討を行ってきた。

2.2 ノニルフェノール分解菌⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾

Fig.1 は筆者らが分離した NP 分解細菌

Sphingomonas cloacae S-3 株の電子顕微鏡写真である。S-3 株はグラム陰性の好気性桿菌であり、検鏡下では運動性が見られなかった。

純粋培養における NP 分解活性を検討するため、NP を唯一の炭素源とする無機塩類培地にこの株を接種し、培地中の NP 濃度を経時的に HPLC で測定した。測定の結果、S-3 株は河川等で検出される濃度の 100 万倍に相当する 1.0 g/L の NP を約 1 週間で完全に分解できることがわかった。NP はノニル基について数多くの異性体が存在し、一般には 10 種類程度の異性体の混合物として流通している。従って、NP が完全に分解されたという結果はこの菌が異性体構造の差違に関わらず NP を分解できることを示している。また、分解後の菌体バイオマスも有意に増加しており、S-3 株が NP を炭素源として資化していることも明らかになった。

排水処理や環境保全への S-3 株の応用を目指す場合、NP 分解によってどのような代謝産物が生成するのかを解析しておく必要がある。HPLC で分解後の培養液を測定したところ、代謝産物と推定されるようなピークは見出されなかった。この測定では芳香環による UV 吸収(210 nm)を検出していることから、NP は芳香環を持たない代謝産物にまで変換されたことが示唆された。そこで培養液をヘキサソクロロホルムで抽出しガスクロマトグラフィー質量分析計 (GCMS) で測定した。強極性の polyethylene glycol キャピラリーカラムと微極性の phenyl - polysilphenylene siloxane カラムを用いて GC クロマト上に出現するピークを解析した。その結果、ノナノールを主とするアルコールのピークが検出された (Fig.2)。ノナノールについては 10 種類程度の異性体が検出されたことから、これらは NP のノニル基に由来することが強く示唆された。

さらに、NP の芳香環の代謝運命についても明らかにするため、核磁気共鳴分光器 (¹H-NMR) による解析も行った。¹H-NMR を用いることで、試料中に存在する芳香環からのプロトンシグナル (aromatic proton signals) を測定することができる。GCMS 解析に用いた試料を濃縮乾固し、重クロロホルム (CDCl₃) に再溶解したものを測定したところ、分解後の培養液では aromatic proton signals が痕跡程度にまで減少していた (Fig.3)。培地中では NP が唯一の芳香族化合物であることから、NP の芳香環が分解を受けていることが明らかとなった。

このように GCMS と NMR による解析から、NP 分解による新たな毒性物質の生成がないことが強く示唆された。

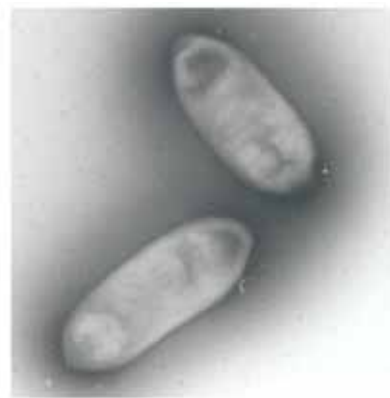


Fig.1 NP 分解細菌 *Sphingomonas cloacae* S-3 株の電子顕微鏡写真。

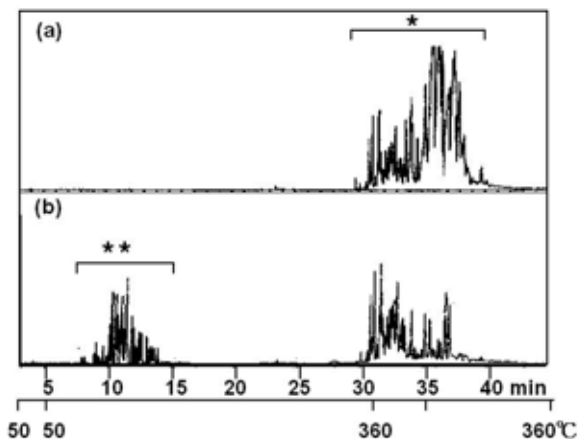


Fig.2 GCMSによる分解産物の解析。(a)は培養開始時、(b)は培養7日目のS-3株培養液の解析結果。
*印は培養液中のNP、**印はNP分解の結果発生した分解産物ノナノール。

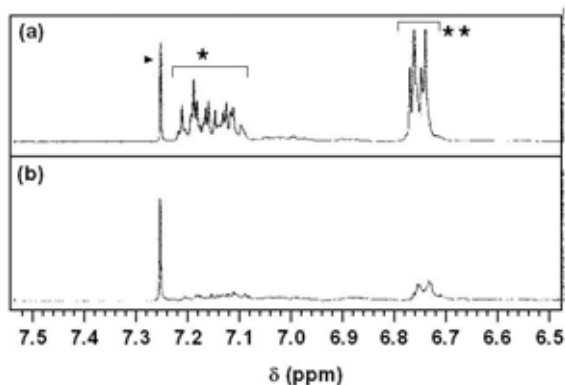


Fig.3 ¹H-NMRによるNP分解産物の解析。(a)は培養開始時、(b)は培養7日目のS-3株培養液の解析結果。
*印および**印は培養液中のNPのベンゼン環に由来するシグナル。

2.3 エストラジオール分解菌⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾

NPのような産業由来のEDCsと同等またはそれ以上に水生生物に対して内分泌攪乱作用を示す人畜由来エストロゲン(エストラジオール(E2)、エストロン(E1)、エストリオール(E3)など)の存在も知られている。その中で最も強力な作用を持つものはE2である。E2はヒトおよび家畜のし尿から抱合体(不活性型)として排出されるが、下水中の微生物によって脱抱合を受けて活性型に戻る事がわかっている。都市部での人口増加および畜産の規模拡大により最近では全国の河川から高頻度に検出されており、環境省も産業由来EDCsとともにその環境動態を詳しく調査すべき「要監視物質」として取り扱っている。E2はその排出源がヒトを含めた動物であることから、法的規制が極めて困難である。筆者らは平成13年よりE2分解微生物の探索も行い、下水処理場の活性汚泥から分解活性

を持つ細菌株を見出した。Fig.4は分離したE2分解細菌 *Novosphingobium tardaugenes* ARI-1株の電子顕微鏡写真である。この株はNP分解菌 *S. cloacae* と同じくグラム陰性の好気性桿菌であるが、一般細菌と比較してサイズが極めて小さい。ARI-1株の純粋培養におけるE2分解活性を検討したところ、1.0 g/LのE2を50日間で、0.3 g/Lを25日間で分解できることが分かった(一般河川で検出されるE2濃度は10~100ng/L程度である)。さらに、E2以外に水環境で検出されている天然エストロゲン(エストロン(E1)とエストリオール(E3))に対してARI-1株が分解能を持つかどうか検討したところ、この菌はいずれのエストロゲンも分解することができ、E2のみならず他のエストロゲンも含めた総合的なし尿排水処理への適用が可能であると考えられる。E2、E1およびE3の分解で生成した代謝産物を同定するためにGCMSを用いて分解後の培養液を測定した。ヘキササン、クロロホルムおよびジクロロメタンで抽出し25で濃縮した試料をphenyl-polysilphenylene siloxaneキャピラリーカラムを接続したGCMSに注入し、50から370までの温度勾配により出現するピークを解析した。その結果、いずれの試料でも基質エストロゲンのみが検出され、代謝産物と考えられるピークは一切見出されなかった。そこで¹H-NMRを用いて各基質の代謝運命を検討した。GCMSに用いた試料を25で濃縮乾固し、重メタノール(CD₃OD)に再溶解したものを測定した。測定の結果、分子内のほとんどの構造部位が分解され、二酸化炭素や有機酸などの低分子量化合物にまで代謝されていることが強く示唆された(Fig.5)。



Fig.4 E2分解細菌 *Novosphingobium tardaugenes* ARI-1株の電子顕微鏡写真。

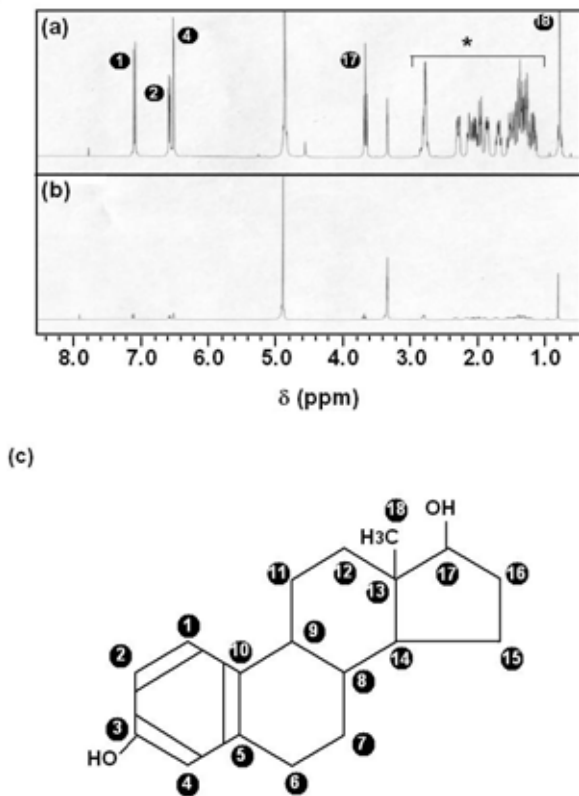


Fig.5 ¹H-NMRによるE2分解産物の解析。(a)は培養開始時、(b)は培養30日目のARI-1株培養液の解析結果。*印は培養液中のE2 (c)の ~ , ~ , ~ に由来するシグナル総和。

3. 研究成果の社会還元

3.1 環境ホルモン分解菌の実用研究⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾

このように、筆者らによって得られた分解菌は環境ホルモンを栄養源として好んで摂取・分解し、有害な分解産物も検出されなかったことから、環境浄化分野への応用が可能かどうかについて応用研究を行った。環境ホルモン問題の特徴として、従来の環境汚染問題では『ゼロ』とみなして差し支えなかった ppb (μg/L) や ppt (ng/L) の濃度で生物毒性を発揮するという点がある。NP を例に挙げると、10 ppb が生態学的に安全な濃度として認識されているが、我国の一般河川等では数 ppb ~ 数十 ppb、産業排水では数十 ppb ~ 数百 ppb 程度の濃度値で検出されている。そこで、このような極微量濃度の NP に対して菌が分解能を発揮できるかどうか、NP 分解菌 *S. cloacae* をモデルにして研究を開始した。

フラスコに 200 ppb または 1 ppm (mg/L) の NP を含む最少培地 (NP 以外に炭素源のない培養液) を入れ、そこに *S. cloacae* を摂取し、振とう培養を行った。培養後に高速液体クロマトグラフで分析し

た結果、このような微量濃度でも NP が着実に分解されていることがわかった。そこで今度は最少培地の代わりに産業排水を用いて同様の実験を行なった。繊維工場から入手した産業排水 (この工場の排水からは NP は検出されなかった) に同じ濃度の NP を加えて実験した。その結果、*S. cloacae* は実際の産業排水中に添加した NP でも効率良く分解できることがわかった。

次に、より実用を目指した研究を行うため実験機に配置できる小型の産業排水浄化装置を試作し、性能評価を行った。Fig.6 に試作した排水浄化装置の写真を示した。本装置は *S. cloacae* を固定化したプラスチック担体を充填したアクリル樹脂製リアクター (容量 3L) 、リアクターに空気を送るエアポンプ、産業排水を導入する送液ポンプから構成される大変シンプルなものである。担体には岩尾磁器 (佐賀県) のポリプロピレン製発泡担体 (直径 10mm、長さ 10mm) を用い、3L 容リアクターの中に 2L 充填した。発泡担体表面には m オーダーの孔が多数開いており、この孔に微生物が棲みつくといい形式で固定化がなされる。この担体を加えて滅菌した新鮮なブイヨン培地をリアクターに注ぎいれ、これに *S. cloacae* の種菌を摂取し、24 時間曝気しつつ培養することで担体への微生物の固定化を行った。培養後、培養液をドレインから排水し、リアクター内に残っている余分な培養液成分を生理食塩水で洗浄した後に、送液ポンプで産業排水を導入していった。将来的に製品化という形で研究成果を産業応用したいという意図から、温度調節、排水 pH 調整、栄養塩類添加等を一切行わずに性能評価を行った。

Fig.7 は試作装置の性能評価の結果をまとめたものである。排水処理速度が 270 mL / h までは、試作機は産業排水に含まれる NP (ロットによりバラツキはあるが、平均 200 ppb 前後の NP が含まれている) を 10ppb 前後にまで分解した。しかし、排水処理速度を徐々に上げていったところ、360 mL / h 以上では処理後排水中の NP 濃度は 20ppb 程度にまで達した。そこで今度は担体の充填量を 3L に増量し処理速度を 360 mL / h に維持して稼働させたところ、処理後排水中の NP 濃度を 10ppb 以下に抑えることができた (Fig.8) 。一方で、今回用いた産業排水は pH7 程度であったことから、排水を酸性 (pH6) およびアルカリ性 (pH8 , 9) にしての性能評価も行った。実験の結果、装置内の分解菌は pH6 や pH8 の場合でも排水中 NP を効率良く分解除去している

ことが認められたが、pH9 の場合は分解活性が消失し、極端な pH の排水を取り扱わない限りはある程度の排水 pH の変動には耐え得ることがわかった (Fig.8)。

エストロゲン分解菌 ARI-1 株については最近ようやく基礎研究が終わり、これから浄化装置の試作を含めた実用研究に着手していく予定であるが、上述の試作装置で得られた成果やノウハウを活用しつつ、下水処理分野に応用可能な装置の開発、性能評価を行なっていきたいと考えている。

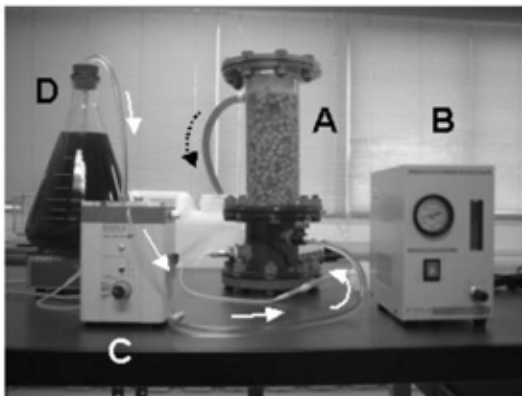


Fig.6 試作した排水浄化装置

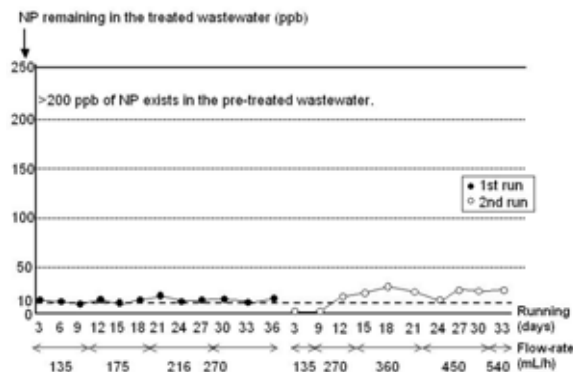


Fig.7 試作装置の性能評価結果。

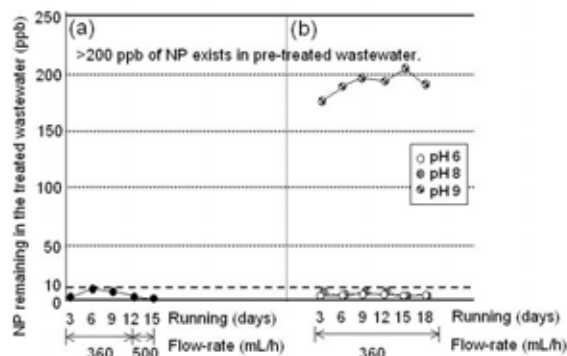


Fig.8 試作装置の性能評価結果。(a) 担体充填量を 3L にした場合。(b) 排水 pH の装置性能への影響。

3.2 大学発ベンチャー企業

環境行政の急激な変化により、欧米同様に我国の製造業や農林水産業事業者(農薬にも今後規制対象となり得るものが数多く含まれている)も高い環境意識を持つことが要求されているが、環境ホルモンを含めて『有害』というレッテルを貼られた物質の多くは産業上有用なものが多く、これらにより今日の豊かで便利な社会が構築、維持されていることも紛れも無い事実である。従って、『有害であることが判明したから明日から使用中止』というわけにはいかず、企業は今後もこれら化学物質を使用すると同時に、業績の良し悪しに関わらず常日頃から自社工場の廃棄物・排水管理に一定の人材とコストを費やさねばならない時代となってきた。しかし BOD や油脂分解など『易生分解性物質』については浄化装置が各メーカーから市販され市場もある程度構築されつつあるものの(1997 年市場規模：9800 億円) 難生分解性物質については装置の製品化例はなく、リーズナブルな価格で優れた性能を持つ装置の開発に期待が寄せられている。そこで筆者らは良好な成績を修めた試作機をスケールアップし、これをベースに製品化のための性能適正化を行なったものを販売する大学発ベンチャー企業を今年 3 月に設立した。本装置は試作機同様にシンプルな構造であることから低価格化の実現を見込める。また、装置販売には 2 通りの方法を想定している。1 つ目は、顧客工場の排水路に直接接続して使用する『浄化機器』としての販売法であり、もう 1 つは、環境メーカー等に『環境ホルモン除去のための部品』として供給し、環境メーカーは自社で構築している複合型水処理プラントの中に組み込むことで環境ホルモン問題にも対処可能な総合的排水処理プラントとして新たに発売するという方法である。

エストロゲンについては排出量に関する法的規制は直にはかからないと思われるが、これまで自治体が行ってきた下水道事業の民間委託が今後進んでいくことから、下水処理事業に参入する企業の間ではエストロゲン処理は必要不可欠なサービスとなる。何故ならば、自社が受託管理している河川区域で万一カエルの奇形や魚のメス化が発見されれば自社の下水処理能力に疑問符をつけられたり企業イメージが失墜する恐れがあるからである。このような理由から、ARI-1 株を用いた装置は下水道事業の分野でその能力を発揮できると期待される。

以上のように、筆者らが設立する大学ベンチャー

は当初は環境ホルモン分解除去装置等の開発と販売を業務とするが、会社の規模が大きくなった時には装置販売だけでなく、顧客企業の日頃の排水分析から適切な処理方法の提案と自社製品を用いた処理までを一手に引き受ける排水管理請負サービスを開始する計画である。『環境技術』『微生物バイオ』というキーワードを軸に、大学研究室で得られた研究成果の産業応用、ビジネス化を目指して今後も情報発信していこうと考えている。

4. おわりに・室蘭は環境バイオ産業のメッカたり得るか

4.1 微生物学研究者から見た室蘭

微生物研究者の目から見ると、室蘭は微生物探索に好都合な条件を備えている。それは『山・森・海・川と自然豊かであると同時に幾分の都市的要素も併せ持ち、なおかつ寒い所も熱い所もある』という点である。即ち、様々な生理学的特徴の微生物(ひいては、その有用酵素)を見つけることができる。具体例を挙げると、山や森林はダイオキシンやPCB分解能で注目されている担子菌類のスクリーニングに適している。海や川の微生物は陸の微生物に比べて研究が進んでいないことから今後興味深い性質を持つものが相次いで発見されていくと期待される。本稿で取り上げた環境ホルモン分解菌はいずれも下水処理場から分離されたが、室蘭エリア(登別～伊達)には下水処理場が5箇所もある。また産業廃棄物処理場も分解菌の探索に適した場所であろう。そして、年間を通して冷涼な山々の頂上には低温微生物(低温高活性の酵素を持っている)温泉など火山帯には好熱微生物(耐熱性に優れた酵素を持っている)が生息している。このように、本学のみならず他大学の研究者から見ても室蘭エリアはまさに垂涎的であろう。

4.2 環境産業都市・室蘭

平成13年3月下旬、本学着任のために初めて北海道の地を踏んだ筆者・藤井は室蘭に向かう汽車の中で衝撃的な事実を目のあたりにした。広大な大地のあちこちに野積みされた産業廃棄物の光景が目飛び込んできたのである。その後幾度も産業廃棄物の不法投棄を山林等で見かけ、それまで抱いていた本州人的北海道観(北海道は綺麗な自然が豊富でありゴミひとつ落ちていない)は木端微塵に吹き飛んだのである。旅行パンフレットにおいて酪農王国や

自然の楽園等と謳われる北海道は実は産廃王国、産廃の楽園でもあり、北海道こそ環境保全・浄化に関する研究拠点となり、環境ビジネスにおいても大きな市場性を持った地なのである。

一方で、室蘭市は鉄に代わる新しい看板産業として環境ビジネスの発展を目指しているところである。環境保全・浄化の研究は学際領域であり、筆者らのように微生物を扱うバイオ研究者以外にも建設、機械、情報、電気、材料科学など様々な分野の研究者が参入し、学科の垣根を越えた学術共同研究も多いことが特徴である。従って、環境産業都市に位置する本学で様々なバックグラウンドを持った研究者による多彩な環境研究が花開いていくことは独法化後の本学のカラーを確立する点ではもちろん、地域への学術・技術的貢献という点でも極めて重要な意味を持つと考えられる。

参考文献

- (1) Fujii, K., Urano, N., Kimura, S., Nomura, Y., and Karube, I.: *Fisheries Science* 66 (2000), p.44-48.
- (2) Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., Iida, H., Ushio, N., and Kimura, S.: *Journal of Biochemistry* 128 (2000), p.909-916.
- (3) Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., and Kimura, S.: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (2001), p.603-610.
- (4) 藤井克彦 & 浦野直人: *化学と生物* 39(2001), p.63-70.
- (5) Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Sata, N., and Morita, N.: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002), p. 2057-2060.
- (6) Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T. and Kikuchi, S.: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (2003), 47-52.
- (7) Fujii, K., Yamamoto, R., Tanaka, T., Hirakawa, T. and Kikuchi, S.: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (in press)
- (8) 藤井克彦、武者一宏 & 菊池慎太郎: *環境技術* (2002) 31, p. 740-747.
- (9) 藤井克彦、武者一宏 & 菊池慎太郎: *水処理技術* (2002) 43, 515-519.
- (10) 藤井克彦、山本良平、田中忠治、安居光國 & 菊池慎太郎: *化学工業* (2003) 54, p. 202-208.