

テトラサイクリン水溶液へのパルス大強度相対論的電子ビームの照射の影響

IRRADIATION EFFECT TO TETRACYCLINE SOLUTION WITH PULSED INTENSE RELATIVISTIC ELECTRON BEAM

古澤雅史^{#,A)}, 皆川勇^{A)}, 林直也^{A)}, 高橋一匡^{A)}, 佐々木徹^{A)}, 菊池崇志^{A)}, 原田信弘^{A)},

大沼清^{A)}, 今田剛^{B)}, 森脇洋^{C)}

Masafumi Furusawa^{#,A)}, Isamu Minagawa^{A)}, Naoya Hyashi^{A)}, Kazumasa Takahashi^{A)}, Toru Sasaki^{A)},

Takashi Kikuchi^{A)}, Nob. Harada^{A)}, Kiyoshi Ohnuma^{A)}, Go Imada^{B)}, Hiroshi Moriwaki^{C)}

^{A)} Nagaoka University of Technology

^{B)} Niigata Institute of Technology

^{C)} Shinshu University

Abstract

Effect of pulsed intense relativistic electron beam (PIREB) irradiation for tetracycline (TC) was considered. Maximum acceleration voltage of PIREB was 6MV, and beam current was 1kA. The PIREB was irradiated to TC solution in an atmosphere. The irradiation effects were measured by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS) and for *E. coli*. To determine the concentration of irradiation TC solution, growth rate of *E. coli* was investigated each concentration. In the result, it was decided to adopt 1.0mg/L TC solution. The PIREB was irradiated to the 1.0mg/L solution. The reaction rate was obtained approximately as 90% by the result of LC/MS. Furthermore, the PIREB was irradiated to 0.2 ~ 1.0mg/L TC solution. It was confirmed that, the reaction rate decreased with decreasing the concentration. Moreover, the irradiated solution was administered to *E. coli* for several concentrations. In the result, growth of *E. coli* was suppressed in comparison to the cases without irradiation TC solution.

1. はじめに

現在、世界的に環境汚染が問題となっており、水質汚染も問題の一つである。水質汚染は、私達の生活排水や工場からの工業排水、畜産業における排水、及び医療現場からの排水などが大きな要因となっている。これらの排水には難分解性の有機化合物が含まれており、既存の水処理方法では処理が困難で、処理場の下流において、それらの有機化合物が含まれるという調査結果もある^{[1][2]}。その中でも、抗生物質の流出による薬剤耐性菌の発生は、大きな問題である。薬剤耐性菌は抗生物質に対して抵抗力を持つ菌であり、これら耐性菌に感染した場合、抗生物質が効きにくいため治療が困難となる^[3]。抗生物質の使用量は年々増加しており、薬剤耐性菌は、様々な抗生物質において発生している^{[4][5]}。

本研究では、パルス大強度相対論的電子ビーム (pulsed intense relativistic electron beam : PIREB) による抗生物質の処理を検討した。PIREB 照射は電子線、X 線、活性種等による複合処理効果が期待でき、溶液処理が不要等の特徴を持つ。これまでに PIREB 照射によって、有機化合物の処理^{[6][7]}や NO_x 処理^{[8][9]}が実証されている。テトラサイクリン(tetracycline : TC) は多くの耐性菌の発生によって有効性の低下が生じており、本研究で用いる試料として選定した。これまでに、TC 水溶液への PIREB 照射による、TC の反応を確認した。しかし、反応後の TC が抗生物質として作用しなくなったかは明らかではない。本研究では、反応後の TC を大腸菌へ投与することで、TC

の PIREB 照射による影響を検討する。

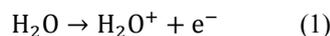
2. PIREB 照射による処理の原理

PIREB 照射による有機化合物の分解には、直接作用と間接作用がある。

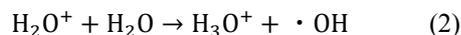
直接作用は、PIREB や PIREB によって発生した制動 X 線がターゲットの分子に直接エネルギーを付与することで、反応を起こす。

間接作用では、PIREB や制動 X 線が水分子にエネルギーを付与することで活性種等を生成し、それらがターゲットの分子と反応を起こす。

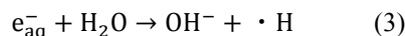
水が放射線分解を起こし、活性種が生成される過程を以下に示す^[10]。水に PIREB が照射され、水分子にエネルギーが付与されると、イオン化や励起が引き起こされる。イオン化では、



生成した H₂O⁺ が周りの水分子と反応して H₃O⁺ と・OH (ヒドロキシラジカル) を生む。

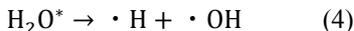


さらに、イオン化で生じた電子は、水分子をイオン化したりしてエネルギーを失い、水和電子となる。水和電子は水分子と反応し、OH⁻ や・H(水素ラジカル)を生成する。



励起された水分子(H₂O*)は、分解されて・Hと

・OHを生じる。



電子線やX線等の低Liner Energy Transfer (LET)放射線では生成物は疎らに出来るため、再結合の確率は小さいことが分かっている。そのため、上記の反応で生成された・OHや・H、水和電子が有機化合物と反応する。・OHは酸化剤として、・Hと水和電子は還元剤として作用するが、これらは非常に反応性が高いため、難分解性の有機化合物の分解も期待される。

3. 実験方法

3.1 テトラサイクリンへのPIREB照射

Figure 1 はテトラサイクリン処理の概念図である。PIREB 発生装置には、長岡技術科学大学・極限エネルギー密度工学研究センターに設置されている”ETIGO-III”^[11]を用いた。電子ビームは真空中で加速され、厚さ 40 μm のチタン箔を通して大気中に設置されている照射容器へと照射される。加速電圧は最大で 6MV、ビーム電流は約 1kA である。Figure 2 に典型的な加速電圧波形、Figure 3 にビーム電流波形を示す。照射容器はアクリル製で、内径 120mm、深さ 5mm の円筒形で、中に TC 水溶液を封入する。TC 水溶液は粉末を水に溶かして作製し、照射する濃度に薄めて使用した。照射した TC 水溶液は、液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography Mass Spectrometry : LC/MS)によって分析を行い、反応率を算出した。反応率は

$$\text{反応率} = \frac{\text{照射後のピーク面積}}{\text{照射前のピーク面積}} \times 100(\%) \quad (5)$$

とした。ピーク面積とは、LC により得られたクロマトグラムにおけるピークの面積である。

3.2 大腸菌投与による薬剤性評価

TC は抗菌スペクトルが広く様々な菌に対して効果を発揮するが、その中の一つに大腸菌がある。そこで、PIREB 照射によって反応が起きた TC の薬剤性を評価するために、大腸菌への投与を行った。大腸菌は、培養が簡単で、遺伝子操作実験などでよく使用される K-12 株(NBRC 3301、独立行政法人製品評価技術基盤機構)を用いた。TC 水溶液 10mL に対して、大腸菌懸濁液 5mL を投与し、さらに 4 時間培養した。その間 1 時間毎に混合液の濁度を測定した。濁度は分光光度計を用いて測定し、結果は最小二乗法でフィッティングを行い、傾きを算出した。算出した傾きをコントロールと比較することで、薬剤性の増減を評価した。

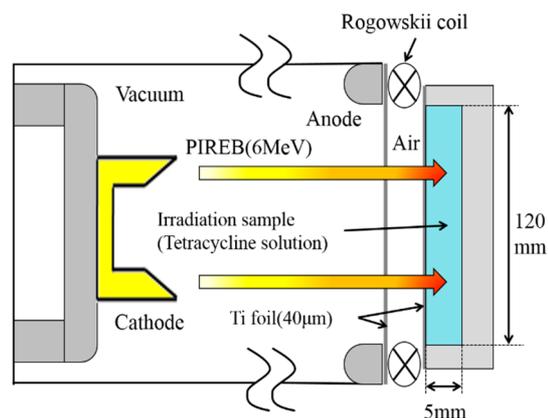


Figure 1: Experimental setup for PIREB irradiation to solution.

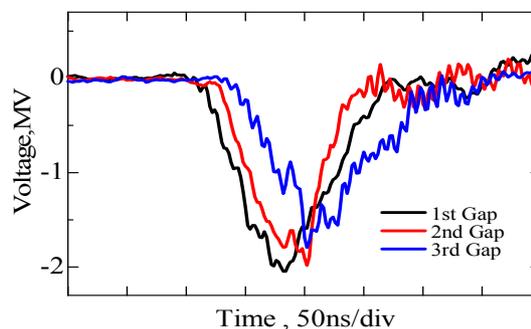


Figure 2: Typical waveforms of acceleration voltages.

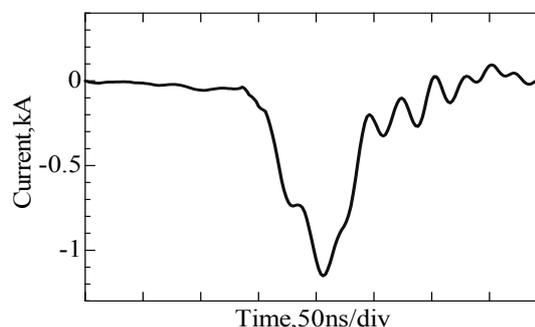


Figure 3: Typical waveform of PIREB current.

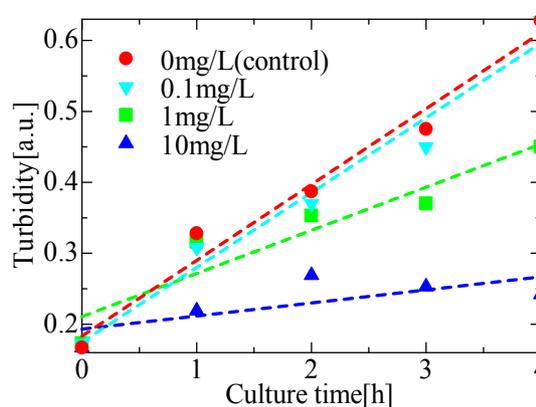


Figure 4: Relationship of tetracycline concentration and *E. coli* growth rate.

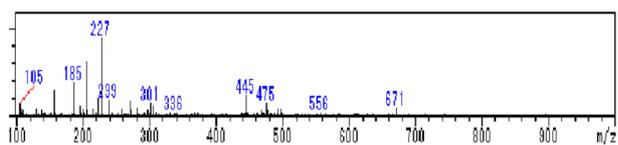


Figure 5: Mass spectrum without irradiation TC solution.

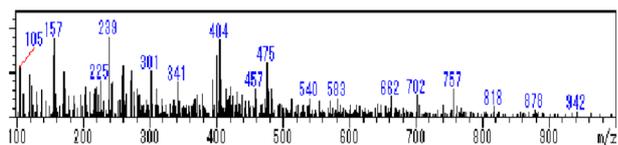


Figure 6: Mass spectrum with 3 times irradiation to TC solution.

4. 実験結果

照射後の TC の薬剤性を評価するために、照射による大腸菌の増殖率の変化を観察する必要がある。そこで、TC の濃度を変化させて大腸菌に投与し、増殖率を調査した。その結果を Figure 4 に示す。0.1mg/L では水を投与した場合とほぼ同じ傾き、10mg/L 以上では、小さい傾きとなった。そこで、PIREB 照射前後の薬剤性の変化を見るために 1.0mg/L の TC 水溶液に照射を行うことに決定した。

1.0mg/L のテトラサイクリン水溶液への照射で反応が得られるかを確かめるために、3 つのサンプルに対して PIREB 照射を行った。100mg/L のテトラサイクリン水溶液へ PIREB を照射した際は、3 回照射で 90%の反応率が得られたため、照射回数は全て 3 回とした。Figure 5 に未照射 TC 水溶液の、Figure 6 に 3 回照射 TC 水溶液の内 1 つの質量分析結果を示す。PIREB を照射することによって、未照射では確認できないピークが形成されており、TC が反応を起こしていることが分かる。定量分析から反応率を求めると、約 90%の反応率であった。

次に、0.2mg/L~1.0mg/L まで、0.2mg/L 刻みで TC 水溶液を作製し、同様に 3 回照射を行った。Figure 7 に、設定濃度毎の反応率を示す。ある濃度までは一定の反応率を示しているが、濃度が低くなると反応率が下がった。次に、薬剤性を評価するために、未照射の TC 水溶液と、照射した TC 水溶液を大腸菌へ投与した。Figure 8 に未照射の、Figure 9 に 3 回照射した TC 水溶液を大腸菌へ投与した結果を示し、濁度上昇の傾きのまとめを Table 1 に示す。すべての濃度において、照射後 TC 水溶液の大腸菌増殖率は下がっていることが分かる。大腸菌が増殖しづらくなったということは、大腸菌に対する薬剤性が強くなったということである。これは、TC 水溶液への PIREB 照射による生成物が、大腸菌に対して元の TC よりも強い薬剤性を持っていることを示している。

以上の結果から、TC は 1mg/L 程度の濃度でも PIREB 照射によって反応を起こし、別の物質に変化するが、その生成物は、大腸菌に対してより強い薬剤性を持つことが示唆された。

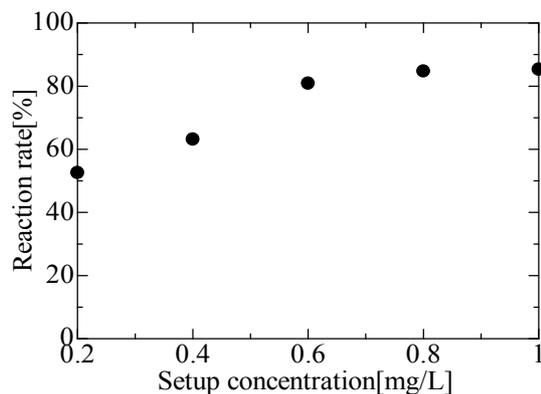


Figure 7: Reaction rate for each setup concentration.

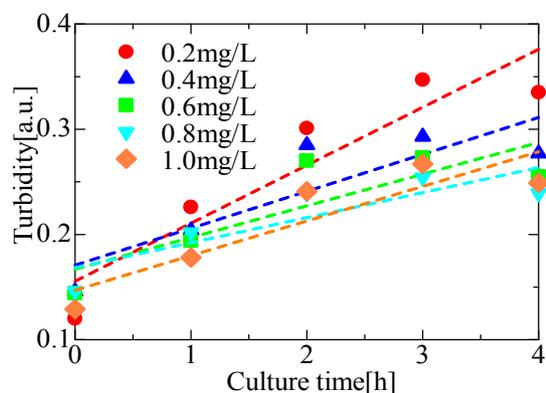


Figure 8: *E. coli* growth rate without irradiation to TC solution.

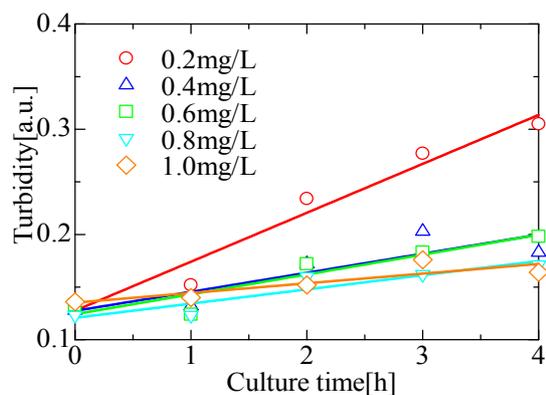


Figure 9: *E. coli* growth rate with 3 times irradiation to TC solution.

Table 1: Slope of Growth Rate With and Without PIREB Irradiation to Sample

Setup concentration [mg/L]	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Slope without irradiation	0.055	0.035	0.030	0.024	0.033
Slope with 3 times irradiation	0.047	0.018	0.019	0.014	0.009

5. まとめ

TC 水溶液への PIREB 照射を行い大腸菌へ投与することで、PIREB 照射が TC に与える影響について検討した。1mg/L の TC 水溶液に PIREB を 3 回照射し、マススペクトルの結果から、PIREB 照射によって反応が起きることを確認した。

0.2mg/L~1.0mg/L の TC 水溶液に PIREB を 3 回照射し、定量分析の結果から、濃度が低くなると反応率が下がっていくことが分かった。照射した TC と未照射の TC を大腸菌へ投与し増殖率を比較することで、PIREB を照射した TC は大腸菌に対する薬剤性が增加することが分かった。このことから、TC への PIREB 照射による生成物は、より強い薬剤性を持つ可能性が示唆された。

参考文献

- [1] 河川整備基金助成事業：「医薬品の河川と下水道における存在実態とその水生生物影響に関する研究」報告書, 17-1211-4 号, (2006).
- [2] Silvia Gonzalez Alonso, et al., Environment International, 36 (2010) 195-201.
- [3] 農林水産省：薬剤耐性菌についての Q&A, 第二版, (2010).
- [4] Thomas P Van Boeckel, et al., THE LANCET Infectious Diseases, 14 (2014) 742-750.
- [5] Stuart B Levy and Bonnie Marshall, nature medicine, 10 (2004) s122-s129.
- [6] T. Kikuchi, et al., Plasma and Fusion Research, 6 (2011) 1206021.
- [7] G. Imada, IEEJ Trans. on Electrical and Electronic Engineering, 6 (2011) 88-90.
- [8] G. Imada and K. Yatsui, IEEE Trans. on Plasma Science, 34 (2006) 88-94.
- [9] G. Imada and K. Yasui, IEEE Trans. on Plasma Science, 31 (2003) 295-296.
- [10] 工藤久明：放射線利用, pp36-40, オーム社, (2011).
- [11] A. Tokuchi, et al., Proc. of the 12th Int'l Conf. on High Power Particle Beams, 1 (1998) 175-178.