

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06613

研究課題名(和文) 動物用医薬品の土壌-水域環境での挙動解明と影響評価

研究課題名(英文) Veterinary antibiotics behavior in soil-water environments and its impact assessment

研究代表者

石川 奈緒 (Ishikawa, Nao)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：10574121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：家畜に投与された抗菌性物質の一部は、家畜の体内で分解されず排せつ物として体外へ排出され、さらに堆肥とともに農耕地へ拡散し、薬剤耐性菌の発生に寄与する可能性がある。本研究では、黒ボク土、褐色森林土、灰色低地土の3種類の土壌を用い、抗菌性物質(タイロシン、スルファモノメトキシム、スルファメサジン)の土壌への収着、易動性および分解性を実験的に明らかにした。また、分解生成物の安全性を藻類に対する短期毒性試験から評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、土壌中の抗菌性物質の挙動を収着と分解について検討し、特に分解のメカニズムについて土壌微生物だけでなく、土壌中の鉱物の寄与も明らかにしたこと、さらに分解生成物の水域生態系の影響を評価した点である。土壌の理化学特性により抗菌性物質の土壌中の分解や分解生成物の特性について検討を進めることで、環境への負荷が低い抗菌性物質を選択して使用することが可能となると考える。この成果は薬剤耐性対策に寄与できる社会的意義を持っている。

研究成果の概要(英文)：A part of antibiotics administered to livestock excreted with excrements. The excrement is used to produce compost and spread to agricultural lands, which means antibiotics could be spread to soil and water environments. This study investigated sorption, mobility, and degradability of three types of antibiotics (tylosin, sulfamonomethoxine, and sulfamethazine) by three types of soil (andsol, brown forest soil, and gray lowland soil). In addition, acute toxic test was carried out to assess the toxicity of the degraded products to green algae.

研究分野：土壌科学、環境科学

キーワード：抗菌性物質 土壌 収着・分解 藻類への生態毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

畜産業では、安定的な生産のため、多種多様な抗菌性物質が大量に使用されている。家畜に投与された抗菌性物質の一部は、家畜の体内で分解されず排せつ物として体外へ排出される¹⁾。家畜が放牧されている場合には放牧地に、家畜排せつ物が堆肥として農耕地へ施用された場合には、農耕地に抗菌性物質は拡散し、さらに降雨などにより水域環境へ移行する可能性がある。既に、動物性の堆肥や河川水中から抗菌性物質が検出された事例が報告されている。これらの農耕地では、抗菌性物質は土壌への収着、脱離による地下への移動のほか、光や微生物等により分解することで副生成物を生じる可能性がある。これまで、比較的使用量が多いテトラサイクリン系やフルオロキノロン系の抗菌性物質の土壌への収着や分解に関しては研究が進められており、抗菌性物質の種類や土壌の種類によって収着挙動が異なることが明らかとなっている。さらに、土壌微生物によっていくつかの抗菌性物質が分解され、特に数種類の抗菌性物質においては、好氣的条件の方が嫌氣的条件よりも分解が生じやすいことが報告されている²⁾。しかしながら、土壌中での分解性や分解生成物に関する知見は、環境中の抗菌性物質の長期的な動態を評価する上で非常に重要であるにもかかわらず、分析の難しさから、国内外でもほとんど研究されていない。

また、水域環境中へ抗菌性物質が流入した場合には、水生生物への影響が懸念される。八木ら³⁾は 10 種類の抗菌性物質について緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* への短期毒性試験を行い、オキシテトラサイクリンやタイロシンは藻類の生長阻害を引き起し、特にスルファモノメトキシシンの半数影響濃度は 0.25 mg/L と比較的低いことを報告している³⁾。

上記のような様々な経路による抗菌性物質の土壌 - 水域環境への影響を評価するためには、抗菌性物質の土壌中での収着、脱離、分解挙動、および水域生物への抗菌性物質の毒性評価、の二方面からのアプローチが必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、日本で多く使用されている抗菌性物質を対象に、以下について明らかにすることを目的とする。

- 1) 土壌への収着、易動性および分解性を実験的に明らかにする。
- 2) 藻類への短期毒性試験により、水域環境での抗菌性物質の毒性評価を行う。

これらの成果から、家畜に投与した抗菌性物質の土壌 - 水環境中での移行挙動を包括的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 材料

供試土壌は、日本国内で一般的に存在している黒ボク土、褐色森林土および灰色低地土である。土壌の基本的な理化学特性を表-1 に示す。採取した土壌は風乾した後、孔径 2 mm のふるいにかけたものを使用した。対象とした抗菌性物質は比較的销售量が多いタイロシン (TYL) とスルファメサジン (SMZ) とした。タイロシンはマクロライド系、スルファメサジンはスルホンアミドの一種である。各抗菌性物質の構造式を図-1 に示す。

短期毒性試験には被験生物として緑藻 *R. subcapitata* を用いた。毒性試験に使用する藻類は継代培養を行っている。継代培養は室温 23 °C の恒温室内で、植物育成用ランプと蛍光灯により 4,000 lx の環境下で行っており、培地は C 培地を使用した。使用器具は 121 °C、20 分間のオートクレーブで滅菌し、無菌的に行った。

表-1 土壌の理化学特性

		黒ボク土	褐色森林土	灰色低地土
自然含水比	[%]	8.6	8.2	3.4
強熱減量	[%]	25.3	8.5	7.8
pH	[-]	6.2	6.3	6.1
電気伝導度	[μS/cm]	30	11	2.4
比表面積	[m ² /g]	32.4	108	11.7
砂	[%]	58	83	21
シルト	[%]	27	10	43
粘土	[%]	15	6.2	35
主要な鉱物種		石英	石英	石英、 伊利石または ハロサイト

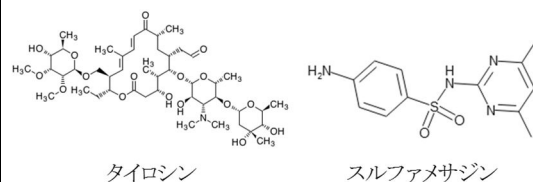


図-1 抗菌性物質の構造式

(2) バッチ法による収着動態実験

褐色沈殿管に 3 g の土壌試料を入れ 10 μg/L の抗菌剤溶液を 30 mL 添加し、10 分から 30 日間、4 または 25 °C で振とうした。遠心分離機で 5 分間 3,000 rpm で遠心分離し、上澄みを別の容器に移した。液を孔径 0.3 μm の濾紙でろ過したる液中の SMZ 濃度を LC-MS/MS で測定した。また、沈殿管に残った土壌は先に構築した分析方法を用いて抗菌剤濃度を測定した。各採取試料について、当初各沈殿管に入れた抗菌剤量に対して液相中に残留している SMZ の割合を液相への残留率、固相に収着した割合を収着率とし、残留率と収着率の合計を残存率として求めた。

(3) イライトと接触した TYL 溶液の藻類に対する生態毒性試験

粘土鉱物の一種であるイライトと TYL 溶液(1, 10, 100 mg/L)を、それぞれ固液比 1:100(5 g:500 mL)で混合した後、孔径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙を用いてろ過した。このろ液(イライト接触液)の TYL 濃度を LC-MS/MS で測定した。この結果から、各試験条件について以下の試験液を作成し、緑藻 *R. subcapitata* を用いた短期毒性試験を行った。

- ・滅菌水(コントロール(水))
- ・CaCl₂(0.01M)とイライトを固液比 1:100 で混合し、5 日間振とう後、孔径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙を用いてろ過した液(コントロール(イライト))
- ・イライト接触液
- ・イライト接触液と同じ TYL 濃度の CaCl₂ 溶液
- ・初期 TYL 濃度の CaCl₂ 溶液

4. 研究成果

(1) タイロシンの土壌中の挙動

黒ボク土の TYL 収着率と残留率の経時変化を図-2 および図-3 示す。4 °C では、収着率と残留率は経時的にわずかに減少するものの、振とう 30 日を経過しても大きな変化は見られなかった。それに対して、25 °C では、振とう 30 分後で残留率が 46%、収着率が 63%であり、土壌への迅速な収着が見られたが、その後、どちらも経時的に減少した。振とう 30 日後には残存率は 10%であり、90%の TYL が分解などにより他の形態へ変化したことが考えられる。低温条件である 4 °C では振とう 30 日後であっても残存率は 78%であり、多くは TYL の形態で残存していた。このことから、土壌中の微生物活動によりタイロシンが分解される可能性を示唆した。黒ボク土で見られたこれらの傾向は褐色森林土でも同様であった。

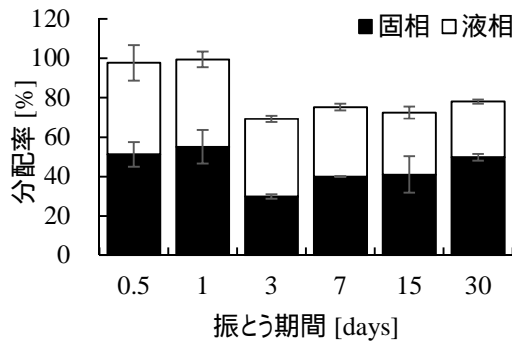


図-2 振とう期間による分配率の変化
(黒ボク土、4 °C)

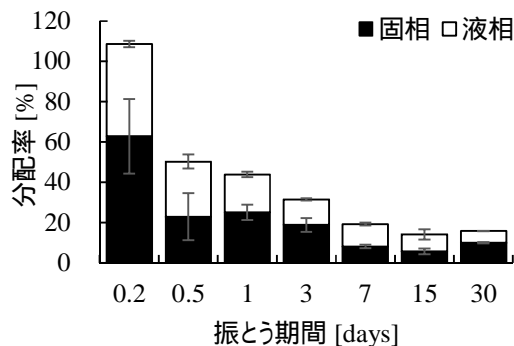


図-3 振とう期間による分配率の変化
(黒ボク土、25 °C)

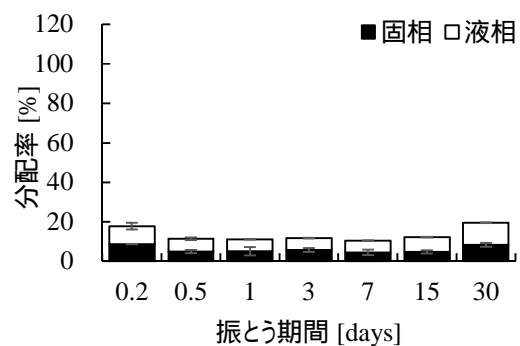


図-4 振とう期間による分配率の変化
(灰色低地土、4 °C)

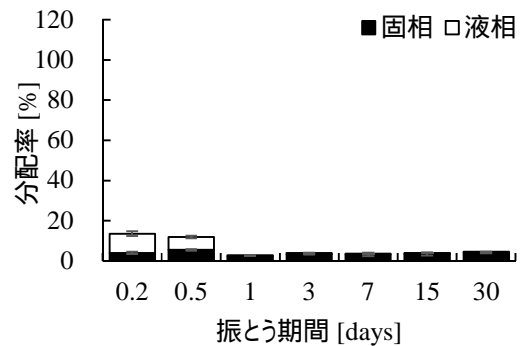


図-5 振とう期間による分配率の変化
(灰色低地土、25 °C)

一方灰色低地土では、4 °C (図-4) と 25 °C (図-5) の 2 条件とも、振とう 10 分後で 80% 以上が消失しており、他の 2 種類の土壌とは異なる傾向を示した。灰色低地土は他の 2 種類の土壌より有機物含有量が低く、粘土含有量が高い。さらに、粘土鉱物(イライトまたはハロイサイト)が主要鉱物であったことから、3 種類の土壌全てに多く含まれている石英砂とイライトを用いてバッチ試験を行ったところ、石英砂ではほとんどの TYL が残存したのに対し、イライトと接触した TYL は迅速に減少した。これらの結果は、灰色低地土での TYL の急速な分解はイライトが寄与している可能性を示唆している。

(2) スルファメサジンの土壌中の挙動

黒ボク土では 25 °C の方で SMZ の残存率が低く、分解が進んでいると考えられる。温度の差により残存率に違いが出たので、これは微生物による SMZ の分解の可能性があると考えられる。一方、灰色低地土では時間とともに残存率は減少するが、温度による差は小さく、微生物以外の分解の可能性がある。しかしながら TYL と同様にイライトでバッチ試験を行ったが、SMZ ではイライトと接触しても残存率はほぼ 100%であったため、SMZ の分解は粘土鉱物の寄与は無視できると考えられる。

(3) タイロシン分解生成物の藻類への生長阻害

各実験条件での短期毒性試験から、生長速度 μ を求め、それらのデータを用いて、次式から各条件での生長阻害率 I を求めた。

$$I = \frac{\mu_0 - \mu}{\mu_0} \times 100 (\%)$$

μ_0 : 対象区の平均生長速度
 μ' : 各濃度区の平均生長速度

表-2 にそれぞれの条件における生長阻害率を示す。TYL 濃度が同じであるイライト接触液と CaCl₂ 溶液では生長阻害率に差はなかった (t 検定、 $p > 0.05$) ことから、今回の実験では TYL とイライトが接触したことにより生じた分解生成物による藻類への生長阻害は見られなかった。したがって、TYL がイライトに接触し分解した場合、藻類に対して生長阻害を生じない物質になっている可能性を示唆している。

表 2 各条件での生長阻害率

		I (%)
条件 1	イライト接触液	4.0
	0.13 mg/L CaCl ₂ 溶液	4.5
	1 mg/L CaCl ₂ 溶液	11.1
条件 2	イライト接触液	40.9
	1.97 mg/L CaCl ₂ 溶液	46.9
	10 mg/L CaCl ₂ 溶液	74.8
条件 3	イライト接触液	76.4
	62.7 mg/L CaCl ₂ 溶液	78.6
	100 mg/L CaCl ₂ 溶液	88.5

< 引用文献 >

- 1) E. Martínez-Carballo et al., Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria, *Environ. Pollut.*, 148, 570-579, 2007.
- 2) M. Pan and L.M. Chu, Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil, *Sci. Total Environ.*, 545-546, 48-56, 2016.
- 3) 八木聡 他, 緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* への抗菌性物質の単独および複合毒性, 水環境学会誌, 39, 63-70, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小野寺弘展, 石関拓実, 石川奈緒, 伊藤歩, 海田輝之	4. 巻 75
2. 論文標題 土壌中でのタイロシンの動態とその影響因子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 土木学会論文集G(環境)	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2208/jscej.g.75.34	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野寺弘展, 石関拓実, 石川奈緒, 伊藤歩, 海田輝之
2. 発表標題 土壌への抗菌性物質の収着および分解挙動とその影響因子
3. 学会等名 第55 回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡 清佳, 小野寺弘展, 石川奈緒, 伊藤歩
2. 発表標題 3種類の土壌中におけるサルファ剤の挙動に関する研究
3. 学会等名 2018年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮫島陽太, 相馬美咲, 石川奈緒, 伊藤歩
2. 発表標題 抗菌性物質の緑藻Raphidocelis subcapitataへの毒性影響
3. 学会等名 会議名称 : 2018年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石関 拓実、小野寺 弘展、石川 奈緒、伊藤 歩、海田 輝之
2. 発表標題 3種類の土壌中におけるタイロシンの挙動について
3. 学会等名 2017年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦 健太郎、相馬 美咲、笹本 誠、石川奈緒、伊藤 歩、海田 輝之
2. 発表標題 抗生物質の単独毒性及び複合毒性が藻類に及ぼす影響について
3. 学会等名 2017年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	伊藤 歩 (Ito Ayumi) (90312511)	岩手大学・理工学部・教授 (11201)	