

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560830

研究課題名（和文） 船底防汚剤の長期的遺伝毒性の検証

研究課題名（英文） Verification of prolonged toxicity of tributyltin chloride toward marine bacteria in sediments of busy ports

研究代表者

三村 治夫（MIMURA HARUO）

神戸大学・大学院海事科学研究科・教授

研究者番号：90190727

研究成果の概要（和文）：塩化トリブチルスズ（TBTC1）は、国際条約で海洋中での使用が禁止されたが、鉱物等への吸着性と難分解性により、海底堆積物中に長期にわたり存在している。今回、主要港湾の堆積物から TBTC1（100 μM ）耐性菌が 10 株取得できた。東京湾検疫錨地から単離した *Photobacterium* sp. TKY1 株が、最も TBT 耐性が高く、1 個体あたり $10^{12.8}$ 個の TBTC1 分子と相互作用しても生存した。TBTC1 存在下、TBTC1 非耐性菌 *Vibrio* sp. の生菌数は、耐性菌 TKY1 株が共存すると、よりいっそう減少した。TBTC1 耐性菌が棲息している環境では、TBTC1 濃縮が細胞壁表層への TBT⁺吸着を介して起こる可能性があり、当該化合物の海洋微生物群集への長期的遺伝毒性が危惧される。

研究成果の概要（英文）：Tributyltin chloride (TBTC1) has still been existed in sediments by adsorption to minerals. We isolated 10 species of TBT-tolerant marine bacteria from busy pots of Japan. *Photobacterium* sp. TKY1, which was isolated from quarantine anchorage in Tokyo Bay, showed the most tolerant ability toward TBTC1. The isolate survived even when the number of $10^{12.8}$ molecules of TBT⁺ was associated with a single cell. Changes in the number of surviving cells of TBT-sensitive *Vibrio* sp. was examined in the presence of the isolate when 100 μM of TBTC1 was existed. Two order reduction of the number of surviving cells of *Vibrio* sp. was observed in comparison with that in the absence of the isolate, indicating that the TBT-tolerant marine bacteria might have contributed to the disruption of marine microbial diversity through accumulation of TBT⁺ onto cell surface.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2011 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 総計 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・船舶海洋工学

キーワード：海洋環境、船底防汚剤耐性菌、堆積物、有機スズ化合物

1. 研究開始当初の背景

(1) 塩化トリブチルスズ（TBTC1）やトリフ

エニルスズ等、有機スズ化合物は海洋生物に対する毒性が強く、かつて年間 1,400 トンも

の当該化合物が船底防汚剤として使用された。これらの化合物は船底から溶出し、主として海底の堆積物中に滞留している。

(2) 船舶出入港数の多い港湾ほど、当該化合物による海底汚染が深刻である。

(3) 堆積物中の海洋細菌群集は、海水に浮遊している海洋細菌と比べ、潮流等で移動や拡散が起こりにくい。

(4) TBTC1 は鉛物等の表面に吸着しやすい性質があるため、堆積物中の濃度は、海水中と比べ、より高い。このため、堆積物中で棲息する海洋細菌群集は、低濃度の TBTC1 に長期にわたり暴露されている。

(5) 堆積物中に長期間にわたり残留する TBTC1 は、堆積物中に棲息する海洋細菌群集へ、長期にわたり遺伝毒性を与え続ける可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、船舶が航行する海域から TBTC1 耐性菌を単離し、その耐性を長期的 TBTC1 暴露によって獲得された後天的形質か、それとも TBTC1 暴露に関係なく本来遺伝的に獲得していた先天的形質なのかを、類縁株の TBTC1 耐性と比較し検討する。

(2) TBTC1 耐性菌が、非耐性菌と TBTC1 存在下に共生している場合、海洋細菌群集への TBTC1 毒性が増幅される可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 堆積物試料の採取場所

研究開始当時、(独)航海訓練所の船舶機関士であった三輪 誠氏(連携研究者; (現)富山高等専門学校・准教授)の協力を得て、練習船が航海訓練中に寄港する港やふ頭、検疫錨地等から、堆積物を採取した。これらの試料から、TBTC1 耐性のある海洋細菌の単離を行った。堆積物試料の採取場所を図 1 に示す。東京湾内では晴海ふ頭、横浜港、及び検疫錨地から、伊勢湾内では名古屋港と検疫錨地から、阪神港内では神戸港から、それぞれ試料採取を行なった。清水港からも試料採取し、試料を採取した場所は計 8 か所であった。

(2) TBTC1 耐性菌の分類

TBTC1 100 μ M に耐性のある海洋細菌を 10 株単離できた。これら単離株の 16S rDNA 部分塩基配列に基づく分類を、テクノスルガ・ラボ(静岡)へ委託して実施した。該当する部分塩基配列および分類結果は、国立遺伝学研究所のデータベース「SAKURA」へ登録した。

(3) 単離株および単離株と同一性の最も高い類縁菌 2 株の TBTC1 耐性の比較

新たに単離した TBTC1 耐性菌 10 株(表 1 参照)に対して、各単離株ごとに、標準株として登録されている塩基配列を対象に相同

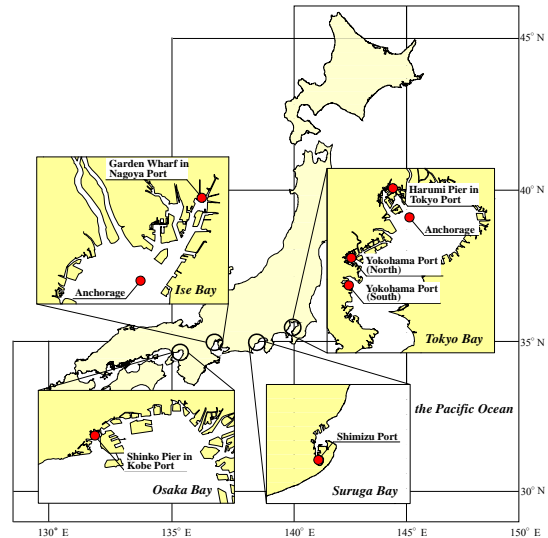


図 1 海底堆積物の試料採取場所

性検索を行い、16S rDNA 部分塩基配列の同一性が最も高かった類縁株 2 株を決定した。同一性検索は、アポロン DB-BA データベース Ver. 4.0 (2008 年 2 月)を利用した。

初期定常増殖期の菌体から休止細胞を調整し、TBTC1 耐性実験を行った。TBTC1 濃度を 100 μ M 一定とし、細胞浮遊液 1 ml あたりの休止細胞数を 10^3 から 10^9 オーダー程度まで変化させて、TBTC1 暴露から 1 時間後の生菌数を、コロニー計数法で計数した。TBTC1 溶液はエタノールに溶解して作成した。細胞浮遊液中の TBTC1 添加にともなうエタノール最終濃度は、0.5%以下であった。

(4) TBTC1 耐性菌 *Photobacterium* sp. TKY1 株の TBTC1 吸着量の定量

増殖細胞と休止細胞を用いて、菌体への TBTC1 吸着量を定量した。*Photobacterium* sp. TKY1 株を 100 μ M TBTC1 存在下、25°C で振とう培養し、初期定常増殖期まで増殖させた。その後、培養液 1 ml を遠心し、上清画分を回収した。菌体ペレットは 0.5 M NaCl を含む 50 mM リン酸カリウム(K-Pi)緩衝液、pH 7.5、で 2 回洗浄した。その後、菌体を 1 ml の K-Pi 緩衝液に浮遊させた。休止細胞への TBTC1 吸着実験は、細胞浮遊液に最終濃度 100 μ M とするように TBTC1 を添加し、1 時間後遠心分離し、菌体ペレット画分と上清画分を、それぞれ回収した。

菌体ペレット画分から 100 μ l を採取し、9 ml アセトニトリルを添加した。超音波抽出を 5 分間行った後、アセトニトリルで 10 ml に定量した。攪拌後、遠心分離し、上清を採取した。こうして得られた試料(10 μ l)を、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC: Waters 2695-MS: Waters Quattro

Micro) を用いて定量した。カラムは、TSKgel Octadecyl-2PW (TOSO 製) を使用した。0.1% HCOOH 水溶液とアセトニトリルの混合比が 60:40 となるように調整した溶液を移動相に使用した。

(5) TBTC1 耐性菌共存下に非耐性菌が TBTC1 に暴露された場合の、非耐性菌生菌数の変化

TBTC1 耐性の海洋細菌 *Photobacterium* sp. TKY1 株と TBTC1 非耐性の海洋細菌 *Vibrio natriegens* ATCC14048 株を、それぞれ 25°C で振とう培養し、初期定常増殖期の菌体から休止細胞を調整した。両休止細胞混在下に TBTC1 を最終濃度 100 μ M となるように添加し、1 時間後の各株ごとの生菌数をコロニーカウント法で計数した。使用した栄養寒天培地は、Bactopeptone 5 g、yeast extract 1 g、白糖 20 g、プロモチモールブルー 40 mg (海水 1 liter あたり) を含む。供試菌の *V. natriegens* ATCC14048 株は白糖を代謝できるが、*Photobacterium* sp. TKY1 株は白糖を代謝できない。用いた寒天培地上でのコロニー形成速度は、明らかに *V. natriegens* ATCC14048 株の方が、*Photobacterium* sp. TKY1 株と比べて速い。これらの生化学的・生理学的特徴の違いを利用して、各株が形成するコロニーを識別し計数した。

(6) TBTC1 暴露後の菌体の電子顕微鏡観察

TBTC1 存在下の *Photobacterium* sp. TKY1 株の増殖細胞と休止細胞の形態変化を、電子顕微鏡で観察した。TBTC1 非耐性の海洋細菌 *V. natriegens* ATCC14048 株から調整した休止細胞を、*Photobacterium* sp. TKY1 株休止細胞共存下に TBTC1 に暴露させ、その後の形態変化も観察した。

細胞の固定化には、グルタルアルデヒドを使用した。最終濃度が 1% になるようにグルタルアルデヒドを添加し、4°C で一昼夜保存、細胞を固定化した。固定化された細胞は、エタノール濃度を順次増加させながら脱水し、*t*-ブチルアルコール置換後、凍結乾燥、Pt-Pd 蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (XL30-SFEG, FEI Company, USA) で観察した。

4. 研究成果

(1) TBTC1 耐性菌の分類結果

船舶出入港数の多い港の堆積物から単離した TBTC1 耐性菌の分類結果を表 1 に示す。単離株 10 株には、*Photobacterium* 属が 2 株、*Halomonas* 属が 2 株、*Marinobacter* 属が 2 株含まれていた。*Photobacterium* 属と *Marinobacter* 属の各 2 株は、クラスターを形成する標準株が異なったが、*Halomonas* 属の 2 株は、*Halomonas venusta* DSM4743 標準株とクラスターを形成した。*Halomonas* sp. TKY2 株と *Halomonas* sp. YKS3 株の 16S rDNA

部分塩基配列を比較すると、1 塩基のみが違っていた。TKY2 株ではシトシンであったのが、YKS3 株ではシトシンまたはチミンの混合塩基であった。

表 1

港湾から単離した TBTC1 耐性の海洋細菌の 16S rDNA 部分塩基配列に基づく分類

| |
|---|
| <i>Vibrio</i> sp. HAM1 (AB501121) ^{a)} |
| <i>Photobacterium</i> sp. TKY1 (AB501122) |
| <i>Halomonas</i> sp. TKY2 (AB501213) |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. YKN1 (AB501214) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. YKS1 (AB504894) |
| <i>Marinobacter</i> sp. YKS2 (AB504895) |
| <i>Halomonas</i> sp. YKS3 (AB504896) |
| <i>Cobetia</i> sp. YKS4 (AB504897) |
| <i>Marinobacter</i> sp. YKS5 (AB504898) |
| <i>Photobacterium</i> sp. NGY1 (AB511030) |

^{a)} カッコ内は、16S rDNA 部分塩基配列を日本 DNA データバンクへ登録した際に付与されたアクセッション番号を示す。

(2) 単離株および単離株と 16S rDNA 相同性の高い標準株 2 株から調整した休止細胞の TBTC1 耐性の比較

各単離株、および単離株の 16S rDNA 部分塩基配列に対して相対率が高い標準株 2 株から休止細胞を調整した。休止細胞数を 1 ml あたり 10^9 から 10^3 オーダーまで減少させ、TBTC1 100 μ M に対する耐性を比較した結果、東京湾検疫錨地から単離した *Photobacterium* sp. TKY1 株のみが、標準株 2 株と比べ、顕著に高い耐性を示した (図 2)。

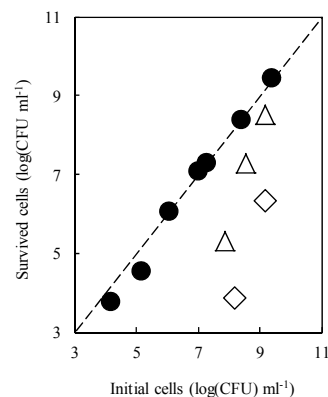


図 2 *Photobacterium* sp. TKY1 株および当該単離株と類縁性の高い標準株 2 株から調整した休止細胞の TBTC1 耐性の比較

Photobacterium sp. TKY1 (●);
Photobacterium ganghwense JCM12487 (△);
Photobacterium halotolerans LMG22194 (◇)。

最終濃度 100 μ M の TBTC1 を含む細胞浮遊液 1 ml 中には、 6.02×10^{16} 個の TBTC1 分子が存在する。細胞浮遊液 1 ml 中に 10^9 オーダー

一の休止細胞が存在した場合、相互作用できる TBTC1 分子数は、1 個体あたり 6.02×10^7 個である。この値は、細胞浮遊液 1 ml 中の菌体数が減少すると、増加する。*Photobacterium* sp. TKY1 株から調整した休止細胞は、生菌数の計数結果(図 2 参照)と合わせて考察すると、細胞浮遊液 1 ml 中で、1 個体あたり $10^{12.8}$ 個の TBT⁺分子と相互作用しても生存できる能力があると推定できる。一方、他の 9 株は、1 ml の細胞浮遊液中の生菌数を減少させ、これにともない一菌体あたりと相互作用する TBT⁺分子数が相対的に増加すると、生存数が顕著に減少した。標準株の方が、今回単離した TBTC1 耐性菌と比べ、より高い TBTC1 耐性を示す株もあった。堆積物中に棲息する細菌群集で、致死に至らない濃度の TBTC1 に長期暴露されることが原因となる耐性菌の出現頻度は、総じて低いと思われる。しかしながら、単離した 10 株中、最も高い TBTC1 耐性を示した *Photobacterium* sp. TKY1 株は、東京湾検疫錨地の堆積物試料から単離されている。船舶出入港数の多い港湾内の堆積物中には依然として TBTC1 が残留していると推定され、船舶出入港数の多い閉塞性沿岸域の堆積物中に形成される微生物生態系への TBTC1 毒性が危惧される。

(3) *Photobacterium* sp. TKY1 株の増殖

Photobacterium sp. TKY1 株の TBTC1 添加時および無添加時の増殖曲線を図 3A に示す。TBTC1 100 μ M 添加により、指数増殖期に至るまでの適応時間が 50 時間程度長くなった。定常増殖期の菌体の収量は、細胞ペレットのタンパク量を定量することで求めた(図 3B)。TBTC1 存在下に本株を培養すると、タンパク量が増加した。これは、TBTC1 に抗するために、ストレスタンパク質が生合成されたことを示唆している。

(4) *Photobacterium* sp. TKY1 を対象とした TBTC1 吸着量の定量

Photobacterium sp. TKY1 株休止細胞への TBTC1 (100 μ M) の吸着量および TBTC1 を添加した状態で定常増殖期まで増殖させた細胞を対象に、TBTC1 吸着量を定量した(表 2)。上清の TBTC1 濃度をコントロールと比較すると、休止細胞では、添加した TBTC1 量の 88% 以上が菌体と相互作用していることがわかった。以上の結果は、TBTC1 耐性には、TBTC1 の細胞内への侵入を防ぐ菌体表面の化学組成が重要な役割を果たしていることを示唆している。この実験を通して、港内堆積物中では、耐性菌が TBTC1 分子を吸着しながら棲息していると推定される。TBTC1 耐性菌の存在は、TBTC1 が残留する海洋環境下において、その濃度を局所的に増加させる役割になう可能性を示唆している。

コントロールとして、細胞浮遊液に用いた緩衝液 1 ml に TBTC1 を最終濃度 100 μ M となるように添加した試料を作成した。この試料中の TBTC1 定量値は 65 nmol ml⁻¹で、収率 65%であった。実験器具内壁への TBTC1 の吸着やパイペッティング操作時のチップへの吸着等が原因と思われる。

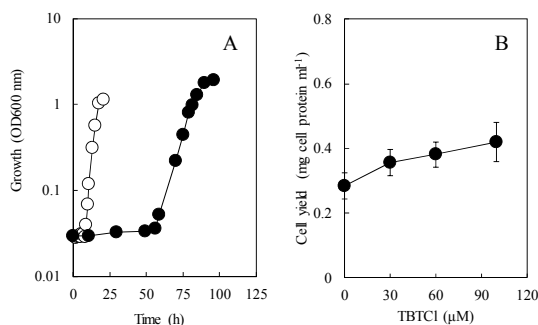


図 3 TBTC1 添加および無添加時の *Photobacterium* sp. TKY1 の増殖

最終濃度 100 μ M TBTC1 添加 (●) および無添加 (○) 時の増殖曲線を図 3A に示す。添加する TBTC1 濃度を 100 μ M まで変化させたときの菌体収量を、タンパク量 ml⁻¹で示す(図 3B)。

表 2

| | <i>Photobacterium</i> sp. TKY1 株への TBTC1 の吸着 | |
|--------------------|--|---|
| | TBTC1 (上清) (nmol ml ⁻¹) | TBTC1 (菌体ペレット) (nmol mg ⁻¹ タンパク量) |
| Control | 65.0 | - |
| 休止細胞 ^{a)} | 7.6 | 142.5 |
| 増殖細胞 ^{b)} | 7.2 | 187.4 |

^{a)} 休止細胞のタンパク量は、細胞浮遊液 1 ml あたり 0.29 mg であった。

^{b)} 本株を 100 μ M TBTC1 存在下に 4 日間、25°C で振とう培養した。遠心分離で集菌後、洗浄し、緩衝液 1 ml に浮遊させた。菌体タンパク量は、0.42 mg であった。

(5) *Photobacterium* sp. TKY1 株が TBTC1 非耐性 *Vibrio natriegens* ATCC14048 株休止細胞と混在した状態で、TBTC1 に暴露された場合の、*V. natriegens* ATCC14048 株休止細胞の生存数変化

TBTC1 耐性 *Photobacterium* sp. TKY1 株と TBTC1 感受性の *Vibrio* 属海洋細菌の混在下に TBTC1 (100 μ M) を添加し、生存数を選択培地を使用したコロニーカウント法で計数した(表 3)。感受性菌 *V. natriegens* ATCC14048 株が単独で存在している時の生存数は $10^{6.2}$ 個 ml⁻¹ であったが、*Photobacterium* sp. TKY1 株が共存すると、さらに 10^2 オーダー生存数が減少し、 $10^{4.4}$ 個 ml⁻¹ となった。これらの結果は、堆積物中の鉱物のみならず、耐性菌に吸着・濃縮された TBTC1 が海底に棲息する海洋細菌を含む生物多様性へ、依然として影響を与えていることを示唆している。

表 3

Photobacterium sp. TKY1株休止細胞共存下にTBTC1に暴露させたTBTC1非耐性菌*Vibrio natriegens* ATCC14048株休止細胞の生存数変化

| 休止細胞 ^{a)} | TBTC1 (100 μM) 存在下の生存数 ^{b)} | |
|---|--|--|
| | <i>Photobacterium</i> sp. TKY1 (CFU ml ⁻¹) | <i>Vibrio natriegens</i> ATCC14048 (CFU ml ⁻¹) |
| <i>Photobacterium</i> sp. TKY1株と <i>Vibrio natriegens</i> ATCC14048株 ^{c)} | 10 ^{9.1} | 10 ^{4.4} |
| <i>Vibrio natriegens</i> ATCC14048のみ | — | 10 ^{6.2} |

^{a)} 初期生菌数は、*Photobacterium* sp. TKY1株が10^{9.1} (CFU ml⁻¹)、*V. natriegens* ATCC14048株が10^{9.4} (CFU ml⁻¹)であった。

^{b)} TBTC1暴露1時間後に生存数をプレートカウント法で計数した。寒天培地は白糖とpH指示薬を含む。実験は3回実施し、得られた値は平均値で示した。標準偏差は±10^{0.3}以下であった。

^{c)} *Photobacterium* sp. TKY1株と*V. natriegens* ATCC14048株の休止細胞を混合後、1時間経過しても各株の生菌数の減少は確認できなかった。

(6) TBTC1 暴露による形態変化の電子顕微鏡観察

船舶出入港数の多い主要港湾から単離したTBTC1耐性菌10株の中で、最も耐性の高かった*Photobacterium* sp. TKY1株を対象に、TBTC1存在下に定常期まで培養した増殖細胞、

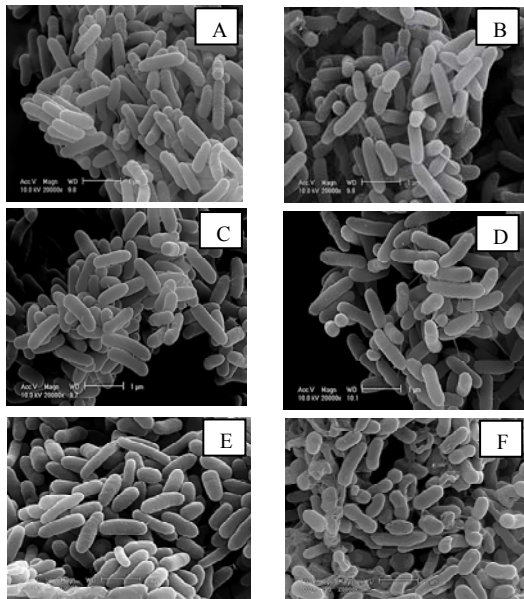


図4 TBTC1暴露後の*Photobacterium* sp. TKY1株および*V. natriegens* ATCC14048株の形態変化
Photobacterium sp. TKY1株をTBTC1無添加で初期定常期まで培養した増殖細胞 (A)、TBTC1 100 μM 存在下に初期定常期まで培養した増殖細胞 (B)、TBTC1無添加で初期定常増殖期まで培養した細胞から調整した休止細胞 (C)、TBTC1 (100 μM) に1時間暴露させた後の休止細胞 (D)、*Photobacterium* sp. TKY1株および*V. natriegens* ATCC14048株の増殖細胞から、それぞれ調整した休止細胞を混合後1時間経過した状態 (E)、および各休止細胞を混合し、TBTC1 (100 μM) を添加後、1時間経過した状態 (F) を、それぞれ示す。

休止細胞のTBTC1添加後の形態、および非耐性菌共存下にTBTC1に暴露された各休止細胞の形態変化を電子顕微鏡で観察した(図4)。

Photobacterium sp. TKY1株のTBTC1存在下での増殖細胞の形態は、TBTC1無添加の場合と比べ、明確な差異が認められなかった(図4AとB)。休止細胞でも、TBTC1暴露後の本株の形態に、顕著な変化は見られなかった(図4CとD)。*Photobacterium* sp. TKY1株と*V. natriegens*の各休止細胞を混合した直後の電子顕微鏡写真を図4Eに示す。細長い桿菌が*Photobacterium* sp. TKY1株、太短い桿菌が*V. natriegens*である。TBTC1添加1時間後に細胞を固定化して観察した結果を図4Fに示す。*V. natriegens*は、TBTC1暴露により、細胞壁の陥没や変形を起こしたことがわかった。TBTC1暴露により、浸透圧調整ができなくなったのが原因と思われる。

5. 総括

本研究では、船舶出入港数の多い東京湾や伊勢湾、大阪湾等を対象に、堆積物を船上から採取した。堆積物試料中から、塩化トリブチルスズ耐性の高い10株を取得し、各単離株および16S rDNA相同性の高い標準株2株との有機スズ耐性を比較した。さらに、TBTC1耐性菌が、TBTC1が残留していると思われる港内堆積物中に棲息している場合、TBTC1耐性菌が非耐性の海洋細菌群集へ与える負の影響を推定した。今回得られた結果は、次のとおりである。

1. 単離株10株中、最も有機スズ耐性の高かったのは、東京湾検疫錨地で採取した*Photobacterium* sp. TKY1株であった。
2. 本株と類縁性の高い*P. ganghwense* JCM12487と*P. halotolerans* LMG22194のTBTC1耐性は、*Photobacterium* sp. TKY1株の耐性と比べ、顕著に低かった。
3. TBTC1存在下、TBTC1非耐性の*V. natriegens* ATCC14048株の生存数は、単独での生存数と比べ、TBTC1耐性のある*Photobacterium* sp. TKY1株が共存することで、よりいっそう減少した。

海洋細菌が後天的にTBTC1耐性を獲得した頻度は総じて低いと思われるが、TBTC1耐性菌が棲息する環境下に当該化合物が存在すると、耐性菌を介した当該化合物の濃縮が起こり、周辺に棲息するTBTC1非耐性の海洋細菌群集への致死効果が増幅される可能性が示唆された。

6. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

- ① 三村 治夫、三輪 誠、吉田 和利、八木 正博、船舶出入港数の多い港湾の堆積物からの船底防汚剤耐性菌の獲得と類縁株を使用した船底防汚剤抵抗性の比較、

日本船舶海洋工学会講演会論文集 第 12 号、pp. 19-20、論文番号 2011S-OS1-7、福岡県中小企業振興センター（福岡市博多区）2011。

- ② Haruo Mimura, Masahiro Yagi, Takashi Miwa, Tributyltin tolerant ability of indigenous marine bacteria isolated from sediments in busy ports of Japan, 6TH International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Abstract single page, Hong Kong, China, 2010.
- ③ 三村 治夫、八木 正博、三輪 誠、有機スズ化合物の長期的遺伝毒性の検証、第 80 回日本マリンエンジニアリング学会学術講演会論文集、pp. 61-62、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）2010。

7. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 治夫 (MIMURA HARUO)
神戸大学・大学院海事科学研究科・教授
研究者番号：90190727

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

八木 正博 (YAGI MASAHIRO)
神戸市環境保健研究所環境化学部・副部長

三輪 誠 (MIWA TAKASHI)
富山高等専門学校・准教授