

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03608

研究課題名（和文）水圏環境中の抗生物質に対する自然細菌群集の脆弱性とその物質循環に対する影響

研究課題名（英文）Vulnerability of bacterial community to antibiotics in aquatic environments and its effect on biogeochemical processes

研究代表者

濱 健夫（Hama, Takeo）

筑波大学・生命環境系・名誉教授

研究者番号：30156385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：湖沼や河川などに流出した抗生物質が、自然細菌群集に対して与える影響について、実験的解析を実施した。その結果、用いた抗生物質（テトラサイクリン）の濃度が1 mg/Lを超えると、細菌群集の多様性が有意に低下することが確認された。また、10 µg/L程度で感受性の高い細菌に影響が及ぶことも示唆された。日本の自然水における抗生物質の濃度（最大100 ng/L程度）では、細菌自然群集に影響が及ぶことは考えにくい。しかし、海外の下水処理場の排水口などでは、25 µg/Lの濃度も報告されており、このような水域では、影響が及ぶ可能性もある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中に流出した抗生物質が、細菌の自然群集に対してどの程度の影響を与えるかについては、重要な問題として指摘はされているが、実際に研究が行われた例はほとんど無い。本研究は、実験的解析を通して、自然群集が影響を受ける濃度を実験的に特定することができた。また、その群集組成の変化が、有機物の分解など細菌が果たしている物質循環にも影響を与えることが確認された。抗生物質などの医療薬品が自然環境に流出に関しては、今後十分な対策を講じることが必要であるが、本研究は、その影響の評価に関して、重要な知見を与える。

研究成果の概要（英文）：Experimental analyses were performed to elucidate the effects of contaminated antibiotics on natural bacterial communities in lake and river environments. Diversity of the bacterial community decreased under the concentration of tetracycline higher than 1 mg/L. This indicates that the sensitive bacterial groups likely be affected in the concentration of 10 µg/L of antibiotics. In Japan, it is not conceivable that natural bacterial community affected by the contaminated antibiotics, because the maximum concentration of antibiotics is about 100 ng/L. On the contrary, high concentrations up to 25 µg/L were reported in the discharge area of sewage-treatment plant, and this strongly suggests that the natural bacterial community is affected by the contaminated antibiotics.

研究分野：生物地球化学

キーワード：抗生物質 自然細菌群集 多様性 物質循環

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗生物質は、ヒトに対する医療用に加えて、家畜や水産資源の傷病予防・治療および成長促進など、広範な目的のために使用されている。その使用量は、世界全体で 146,699 トン(2017 年)に達しており、現在も年々増加し続けている。ヒトに対して使用された抗生物質は、下水を経て下水処理場へと送られるが、そこで全ては分解されず、一部は効力を有したままで排水とともに河川や湖沼へと排出される。また、家畜に使用された場合は、肥料などに用いられる排泄物とともに環境中に流出する。これらの環境中に流出した抗生物質が、自然細菌群集へ与える影響に関しては、薬剤耐性菌の発生について注目が集まっている。その一方で、自然に生息し、物質循環を駆動している細菌群集への影響について、その重要性は指摘されてきているものの、研究はほとんど実施されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、下記の 3 点を明らかにすることを目的とし、河川、湖沼から採取した微生物群集を、抗生物質の濃度を変えた条件下で培養実験を実施した。

- (1) 自然細菌群集に影響を与える抗生物質濃度の特定
- (2) 抗生物質に対する細菌分類群の応答の違い
- (3) 物質循環への影響

### 3. 研究の方法

#### (1) 水域における抗生物質濃度

利根川水系を中心に、人間活動の影響の大小を考慮し、埼玉県、茨城県および東京都の 10 地点から河川水、湖沼水および地下水を採取した。採取した試水について、固相抽出用カートリッジを用いて抗生物質を濃縮・抽出した後、液体クロマトグラフ質量分析計を用いて分析した。分析は島津テクノロジーに依頼し、アンピシリン、セフジニル、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリンおよびエリスロマイシンの 5 種類について定量を行った。

#### (2) 細菌培養実験

上述した測定により抗生物質の存在が確認された、綾瀬川の「中の橋」(東京都葛飾区)および霞ヶ浦「行方」(茨城県行方市)から、表面水を採取した。試水は 3.5L 容の滅菌済み培養器(それぞれ 18 本)に分注した。両実験とも、テトラサイクリン濃度を 0 (コントロール)、1、100 ng/L、10 µg/L、1、10 mg/L の 6 濃度となるように添加した。各濃度ともに 3 本の培養瓶を設定し、暗所、20 °C で培養し、実験開始直後(1 日目)、3 日目および 10 日目に培養試料の一部を回収した。

回収試料は、孔径 3.0 µm および 0.2 µm のメンブレンフィルターで連続的にろ過し、粒子付着性(Particle-Attached, PA)細菌( $> 3 \mu\text{m}$ )と、浮遊性(Free-Living, FL)細菌( $0.2 < < 3 \mu\text{m}$ )に分画した。各フィルターから DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を PCR 法により増幅した後、次世代シーケンサー MiSeq シリーズ(イルミナ)により群集組成の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗生物質濃度

河川水、湖沼水および地下水の 5 測点について抗生物質濃度を測定した結果、アンピシリンは中川の「中川橋」(1.4 ng/L)と綾瀬川の「中の橋」(1.1 ng/L)において、また、テトラサイクリン(TC)は中川の「八条橋」(1.3 ng/L)、綾瀬川の「中の橋」(1.3 ng/L)および霞ヶ浦の「行方」(1.1 ng/L)において検出された。尚、これらの値については、固相抽出における回収率は未補正である。これらの結果から、自然細菌群集を用いた培養実験では、綾瀬川の「中の橋」(東京都葛飾区)と霞ヶ浦の「行方」(茨城県行方市)を対象とし、抗生物質としてテトラサイクリンを用いることとした。

#### (2) 綾瀬川「中の橋」試料の培養実験

##### 多様性への影響

自然細菌群集の多様性として評価した Shannon 指数は、FL および PA 細菌共に TC 濃度の増加に伴い低下した。10 日目に得られた指数は、コントロールから 10 µg/L の TC 濃度までは大きな変化は認められなかったが、1 および 10 mg/L の条件下で有意に低下した(図 1)。高濃度下での Shannon 指数の低下は、細菌の種に相当する OTUs (Operational Taxonomic Units) の数に加えて、群集の均一性も低下したことを示している。

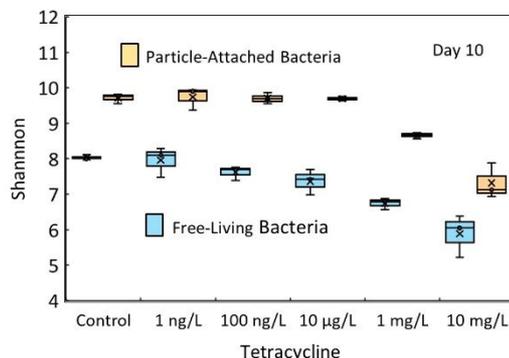


図 1 綾瀬川「中の橋」試料の培養 10 日目における細菌群集の Shannon 指数

### 群集間の類似性

群集間の類似性を評価するため、主座標分析を実施した(図2)。この分析では、群集組成の類似性がプロット間の距離として反映される。培養期間を通して、FL と PL 細菌の位置は大きく二分され、また培養が進むにつれて変化した。TC 濃度との関係を見ると、3 日目において、1 および 10 mg/L の TC 濃度で得られたプロットは、100 µg/L 以下のプロットから離れることが確認された。これは Shannon 指数で示唆されたように、1 mg/L において群集組成の変化が生じていることを示している。10 日目では、TC 濃度の影響は更に顕著となった。全体に、0-100 µg/L のプロット群は、培養が経過するにつれて 1 日目から離れる方向に変化しており、細菌群集が培養期間の経過につれて遷移していることが確認される。一方、高濃度の TC 条件下では、1 日目からの変化は小さくなく、細菌群集の遷移が抑制されていたと考えられる。

### 分類群の変化

実験開始時においては、*Pseudomonadota* 門が全体の 70%程度を占め、続いて *Bacteroidota* 門が 16%であった。これら 2 門は実験終了時まで、FL および PA の両細菌において主要な分類群であった。他の門としては、*Actinomycetota* および *Armatimonadota* 門が 5%程度を占めたが、*Armatimonadota* 門は 3 日目以降には数%以下に低下し、変わって *Nitrospirota* 門が増加した。このうち、*Actinomycetota* 門は FL 細菌での割合が多く、*Nitrospirota* 門は PA 細菌での寄与が大きかった。

培養 10 日目における主要な 4 門 (*Pseudomonadota*、*Bacteroidota*、*Actinomycetota* および *Nitrospirota*) の TC 濃度との関係は、それぞれ特徴的であった(図3)。*Pseudomonadota* 門の割合は、FL および PA 細菌共に、コントロールから 10 µg/L までは 60-65%程度であったが、1 mg/L から増加する傾向を示し、10 mg/L の条件下では 70-80%と高い割合を占めた。*Bacteroidota* 門も同様に 1 mg/L から増加し、10 mg/L においては、両門を合わせて 95%の高い寄与となった。逆に *Actinomycetota* および *Nitrospirota* 門は、TC 濃度の増加につれて減少する傾向が顕著であった。FL 細菌における *Actinomycetota* 門の割合は、コントロールの 18%から 10 mg/L の 5%まで低下した。一方、*Nitrospirota* 門は PA 細菌において 1 mg/L より低濃度の条件下では、8%程度を占めていたが、10 mg/L では 2%まで大きく低下した。また、10 mg/L の FL 細菌における同門の寄与は極めて低くなった。このように、TC 濃度に対する応答は門レベルで異なり、*Pseudomonadota* と *Bacteroidota* の両門の高い耐性が示唆される一方で、*Actinomycetota* と *Nitrospirota* 門の感受性が高いことが確認された。

### 物質循環への影響

細菌群集の変化が物質循環に対して与える影響を評価するため、高い微生物分解性を有するクロロフィル a 濃度の変化を明らかにした(図4)。全ての条件下において、クロロフィル a 濃度は、培養の経過と共に微生物分解により低下した。10 日目に残存した割合は TC 濃度に依存して異なっており、コントロールから 10 µg/L の TC 濃度では 26-37%であったのに対し、1 および 10 mg/L の条件下では、それぞれ 50 および 73%と高い値であった。この結果は、1 mg/L 以上の濃度ではクロロフィル a の分解が抑制されたことを示唆する。すなわち、TC による細菌群集の変化が、有機物の分解過程に対して影響を与えることが確認された。

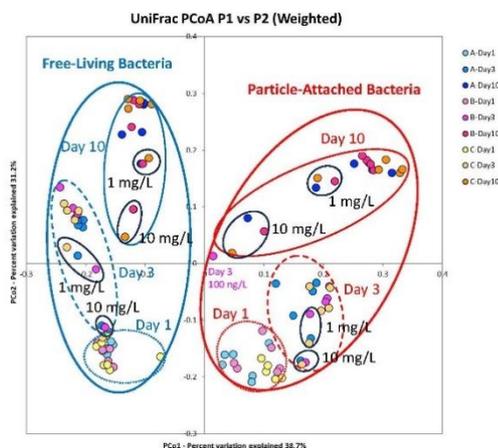


図2 綾瀬川「中の橋」試料の細菌群集の主座標分析

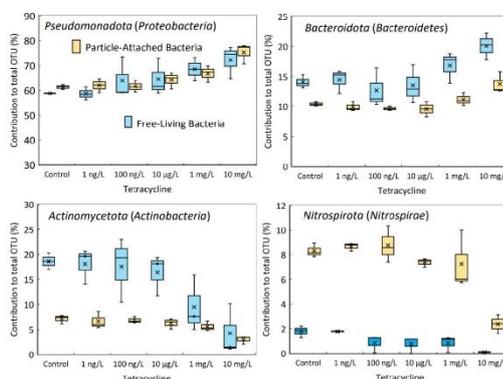


図3 綾瀬川「中の橋」試料の培養 10 日目における *Pseudomonadota*、*Bacteroidota*、*Actinomycetota* および *Nitrospirota* 門の全 OTU に対する割合

*Bacteroidota* 門も同様に 1 mg/L から増加し、10 mg/L においては、両門を合わせて 95%の高い寄与となった。逆に *Actinomycetota* および *Nitrospirota* 門は、TC 濃度の増加につれて減少する傾向が顕著であった。FL 細菌における *Actinomycetota* 門の割合は、コントロールの 18%から 10 mg/L の 5%まで低下した。一方、*Nitrospirota* 門は PA 細菌において 1 mg/L より低濃度の条件下では、8%程度を占めていたが、10 mg/L では 2%まで大きく低下した。また、10 mg/L の FL 細菌における同門の寄与は極めて低くなった。このように、TC 濃度に対する応答は門レベルで異なり、*Pseudomonadota* と *Bacteroidota* の両門の高い耐性が示唆される一方で、*Actinomycetota* と *Nitrospirota* 門の感受性が高いことが確認された。

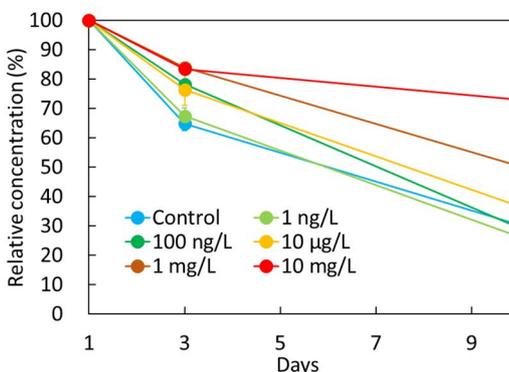


図4 綾瀬川「中の橋」試料の培養期間を通じたクロロフィル a 濃度の変化

### (3) 霞ヶ浦「行方」試料の培養実験 多様性への影響

霞ヶ浦「行方」から得た試料の培養 10 日目における Shannon 指数は、綾瀬川の試料と同様に PA 細菌が FA 細菌より高い値を示した。しかしながら、10 mg/L の TC 濃度において、PA 細菌の低下は顕著であり、FA 細菌の値を下回った。本研究の実験を通して PA 細菌の多様性が FA 細菌より低くなったのは、この例のみであり、TC の影響が PA 細菌に大きな影響を与えたことが明らかとなった。

#### 群集間の類似性

霞ヶ浦試料においても綾瀬川と同様に FA 細菌と PA 細菌とは組成の違いが明確であった。特に、培養 1 日および 3 日目は、両者のプロットは大きく離れていた。綾瀬川に比較すると、両細菌群ともに 1 日目から 3 日目へのプロットの移動は小さく、群集組成の変化が少なかったことが示唆される。また、3 日目までは TC 濃度の影響は明確では無く、細菌組成は全ての条件下で、大きな変化を生じていなかった。一方、10 日目には条件による差が大きくなり、10 mg/L の試料は他の条件のプロットとは離れていた。特に、PA 細菌ではその距離は大きく、細菌組成が大きく変化したことが確認された。また、10 日目の高濃度の TC 条件下では、1 日目、3 日目のプロット群からの距離が離れて位置していた。これは、綾瀬川において高濃度の TC により細菌群集の遷移が抑制された結果とは異なり、霞ヶ浦では 10 mg/L の濃度下において、新たな群集組成が構築されたことを示唆している。

#### 分類群の変化

霞ヶ浦から採取した細菌群集は、*Pseudomonadota* 門が FL および PA 細菌ともに全体の 40% 程度を占めていた。FL 細菌では *Actinomycetota* 門が *Pseudomonadota* 門とほぼ同程度の割合を占めたのに対し、PA での寄与は 10% に満たなかった。PA 細菌では *Cyanobacteridota* 門が主要な分類群の一つであった。また、*Bacteroidota* 門は両細菌群で 15-20% の割合を占めた。綾瀬川で主要なグループの一つであった *Nitrospirota* 門の割合は非常に低く、全細菌 OTUs の 1% であった。

培養 10 日目において、*Pseudomonadota* 門が FL および PA 細菌の主要なグループであった (図 7)。FL 細菌では TC 濃度による変化は認められなかったが、PA 細菌では 10 mg/L 濃度下で増加が認められ約 80% を占めた。FL 細菌では霞ヶ浦においても綾瀬川と同様に *Actinomycetota* 門の寄与が比較的大きく、高濃度の TC 条件下でやや減少する傾向が認められた。*Bacteroidota* 門はコントロールから 10 μg/L では FL 細菌における寄与は PA 細菌の半分以下であったが、1 mg/L では FL 細菌での寄与が急増し、10 mg/L の条件下では全体の 40% 近くを占めた。また、PA 細菌では本門の寄与は全 TC 濃度を通して、大きい変化は認められなかった。

#### 物質循環への影響

霞ヶ浦試料の培養期間中においても、綾瀬川で認められた様に、クロロフィル a 濃度の低下が確認された (図 8)。コントロール、1、100 ng/L、および 10 μg/L の条件下では濃度の減少は同程度であったが、1 および 10 mg/L では、クロロフィル a 濃度の減少量が低下した。最終的に、10 日目において 1 および 10 mg/L において、それぞれ実験開始時の濃度の 44 および 58% と、他の条件で得られた 31-35% より高い残存率を示した。

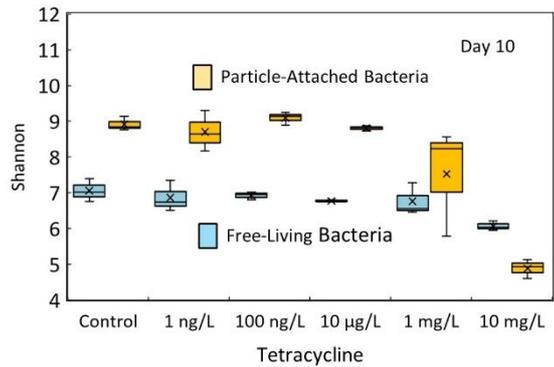


図 5 霞ヶ浦「行方」試料の培養 10 日目における細菌群集の Shannon 指数

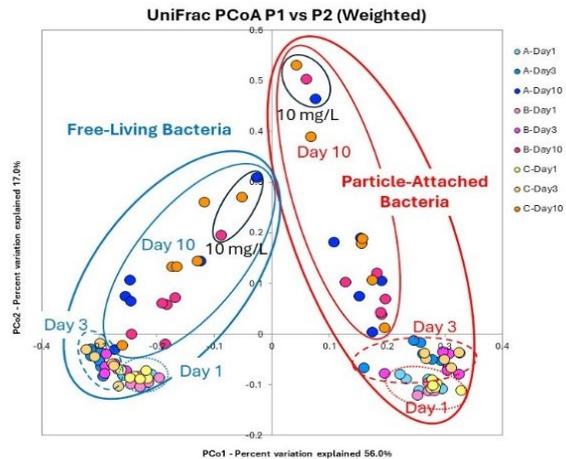


図 6 霞ヶ浦「行方」試料の細菌群集の主座標分析

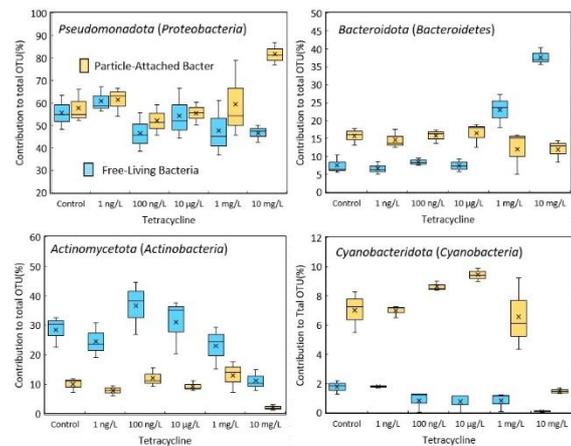


図 7 霞ヶ浦「行方」試料の培養 10 日目における *Pseudomonadota*、*Bacteroidota*、*Actinomycetota* および *Cyanobacteridota* 門の全 OTU に対する割合

10 μg/L では FL 細菌における寄与は PA 細菌の半分以下であったが、1 mg/L では FL 細菌での寄与が急増し、10 mg/L の条件下では全体の 40% 近くを占めた。また、PA 細菌では本門の寄与は全 TC 濃度を通して、大きい変化は認められなかった。

#### (4) まとめ

##### 河川の抗生物質濃度と細菌への影響

本研究を通して、自然細菌群集に明確な影響を及ぼす TC の濃度は 1-10 mg/L 程度であることが明らかとなった。細菌に対して抗生物質が影響を發揮する濃度に関しては、病原菌を中心に多くの情報が集まっている。一方、自然に生息する生物については、最大効果の 50% を示す時の濃度 (EC<sub>50</sub>) の推定が行われてきているが、その情報は病原菌に比較すると少ない。特に、自然環境に生息する細菌に関しては、海洋細菌の *Vibrio fischeri* について報告されているのみである。TC の *V. fischeri* について得られている EC<sub>50</sub> の値は 100 µg/L から 100 mg/L と大きな差があるが、多くの報告は数 10 mg/L 程度と推定している (Kovalakova et al., 2020)。EC<sub>50</sub> を評価する方法と本研究で実施した方法とは大きく異なるため、数値の単純な比較は困難であるが、本研究で得られた 1-10 mg/L の値は、従来の EC<sub>50</sub> と大きく矛盾していなかった。

自然環境下での抗生物質の影響を考える場合、EC<sub>50</sub> の様な細菌群集が明確な影響を受ける濃度ではなく、影響が生じ始める最低の濃度を評価する必要がある。このような観点から、NOEC (no observed effect concentration) が提唱され、その濃度は EC<sub>50</sub> の 1/100 程度とされている (Page et al., 2017)。これらを考慮すると、本研究で得られた結果から、10-100 µg/L の抗生物質濃度により、感受性の高い細菌が影響を受ける可能性が示唆される。

我が国の河川、湖沼等の自然水域において抗生物質濃度を測定した研究例は多くないが、0-数 100 ng/L の値が報告されている (Murata et al., 2011)。この濃度は、本研究で推定した NOEC の 10-100 µg/L を大きく下回っている。すなわち、我が国の一般的河川、湖沼においては自然細菌群集に対する抗生物質の影響は少ないと考えられる。一方、海外では下水処理場の排出口付近の河川水などで、25 µg/L に達する濃度も報告されており (Kovalakova et al., 2020)、このような水域では細菌群集に影響が生じている可能性が高い。

##### 分類群による応答の違い

TC 濃度の群集組成の影響は、培養 10 日目に顕著となり、高濃度の TC 条件下で増加する傾向をもつグループ (*Pseudomonadota* と *Bacteroidota* 門) と低下するグループ (*Actinomycetota*, *Nitrospirota* および *Cyanobacteridota* 門) に大別された。*Pseudomonadota* および *Bacteroidota* 門は全体として TC に対する耐性が高いものと推定できる。しかし、これらの門に属する、より下位の分類群においては、高濃度の TC 条件下で低下するグループも存在しており、科あるいは属のレベルで応答が異なっていた。一方、綾瀬川試料で TC 濃度の増加に伴い顕著に低下した *Actinomycetota* および *Nitrospirota* 門では、構成する下位の分類群すべてが同様の傾向を示した。これは、両門を構成する細菌群の TC への感受性の高さを示唆している。

##### 物質循環への影響

クロロフィル a 濃度で評価した微生物による有機物分解量は、TC 濃度に依存して変化しており、綾瀬川および霞ヶ浦共に TC 濃度が 1 および 10 mg/L の条件下ではクロロフィル a 濃度の低下が抑制された。これらの結果から、抗生物質により高度に汚染された水域では、細菌による有機物の分解能が低下する可能性が示唆された。また、綾瀬川の高濃度の TC 濃度条件において顕著な低下が確認された *Nitrospira* は、亜硝酸酸化細菌として物質循環における特有の役割を担っている。抗生物質の汚染による細菌群集への影響は、有機物分解過程のみではなく、物質循環全体に及ぶ可能性が示唆された。

##### 今後の展望

自然水域に流出した抗生物質を含む医薬品が微生物に対して与える影響については、その問題の重要性は広く認識されているものの、実際の研究は国内外を通してほとんど行われていない。本研究では、TC について、自然細菌に対してどの程度の濃度から影響を与えるかを明らかにすることができた。その濃度は医薬品の種類によっても異なることから、多種類について検討を行うことが必要であろう。更に、物質循環への影響を含めた総合的な評価が、今後重要になると思われる。

#### (5) 謝辞

本研究の実施に当たっては、佐藤允晟氏 (筑波大学大学院・理工情報生命学術院・生命地球科学研究群・環境科学学位プログラム) の協力を得た。

#### (6) 参考文献

- Kovalakova, P. L. Cizmas, T. J. McDonald, B. Marsalek, M. Feng and V. K. Sharma (2020) *Chemosphere*, 251, 126351.
- Murata, A. H. Takeda, K. Mutoh, H. Hosoda, A. Harada, and N. Nakada (2011) *Science of the Total Environment*, 409, 5305-5312.
- Page, G. L., L. Gunnarsson, J. Snape, and C. R. Tyler (2017) *Environment International*, 109, 155-169.

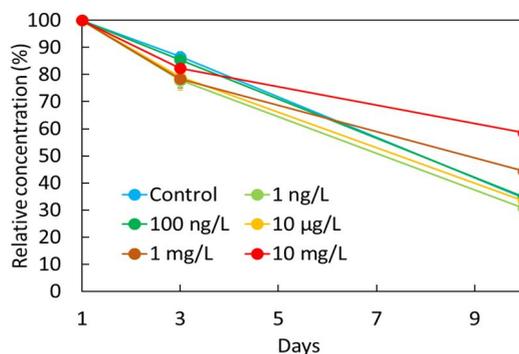


図 8 霞ヶ浦「行方」試料の細菌群集の培養期間を通じたクロロフィル a 濃度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeo Hama, Yuko Omori, Shigeki Wada
2. 発表標題 Experimental analysis of the effect of antibiotics on coastal bacterial community
3. 学会等名 59th Conference of Estuarine, Coastal and Shelf Science Association (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeo Hama, Mitsuaki Sato, Yuko Omori, Keiji Watanabe, Wataru Tsuda, Maki Tsujimura
2. 発表標題 The effect of tetracycline on the river bacterial community and their activities
3. 学会等名 10th IWA Microbial Ecology and Water Engineering (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱 健夫・佐藤允晟・渡邊圭司・須田 亘・大森裕子
2. 発表標題 自然細菌群集に対するテトラサイクリンの影響
3. 学会等名 第59回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024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	辻村 真貴  (Tsujimura Maki)  (10273301)	筑波大学・生命環境系・教授    (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	須田 互  (Suda Wataru)  (20590847)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー    (82401)	
研究分担者	渡邊 圭司  (Watanabe Keiji)  (50575230)	埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・専門研究員    (82405)	
研究分担者	大森 裕子  (Omori Yuko)  (80613497)	筑波大学・生命環境系・助教    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関