

## 動物用抗菌剤の土壌への吸着とその抗菌活性

武 田 信 幸\*

### Absorption of Antimicrobials to Soils and their Bioavailability

Nobuyuki TAKEDA\*

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health  
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Three groups of 11 antimicrobials (2 tetracyclines [TCs], 5 quinolones [QLs], 4 sulfa drugs [SDs]) were determined their sorption coefficients  $K_d$  (the ratio of the antimicrobial concentrations in the soil phase and in the water) from a batch experiment using a rapid and selective HPLC method developed for this purpose. QLs (oxolinic acid, ciprofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin, enrofloxacin) displayed the highest  $K_d$  values (range: 26–3385), followed by TCs (oxytetracycline, chlortetracycline. range: 57–729). SDs (sulfadimidine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline. range: 0.4–5.4.) appeared to have little sorption affinity to soil particles. These results show that QLs and TCs can be considered to be immobile, conversely SDs highly mobile in the environment.

Capacity of the soil to absorb the antimicrobials was estimated to be 8 mg/g, suggesting the soil possibly plays as an environmental "reservoir" for antimicrobials. Also the soil/antimicrobial complex was examined on its bioavailability in terms of microbial growing inhibition test with a tester stain *Bacillus subtilis*. A linear relationship has found between the amount of absorbed antimicrobial and the inhibition zone diameter, showing that they are still biologically active and possibly plays as an ecological "reservoir" for antimicrobial resistant bacteria in the environment.

#### I はじめに

わが国における抗菌剤（抗生物質および合成抗菌剤）の年間生産量は約2000トンと推定され、人用に500トン、動物用に1200トンおよび農業用に300トンと、きわめて大量の抗菌剤が広範囲に使われている<sup>1)</sup>。人および動物に経口投与された抗菌剤の30–90%は未変化体のまま糞尿として排泄される<sup>2)</sup>。人用の場合は大部分が下水処理施設で除去されて最終的には河川に放流される。また、

牛、豚、鶏など食用動物に治療又は成長促進の目的で用いられたものは、養豚場などに貯留あるいは肥料に転用されるか、もしくは産業廃棄物などとして処理される。一方、鰻などの養殖場では、抗菌剤を含む残余の飼料も魚介類の排泄物もすべてが直接水系へと放出され、農業用では、直接田畑に散布される場合が多い<sup>3)</sup>。いずれにせよ、使用された抗菌剤は環境（水圏・土壌・大気）中に放出される。

サルファ剤など土壌成分との相互作用が少ない抗菌剤は雨水、河川水、湖沼水などの水系を通じて環境を移動すると考えられる。テトラサイクリン類など特有の物理化学的性質を有するものは発生源である家畜場やその周辺土壌あるいは河川流入後では水系底質土壌などに強く保持され、蓄積・残留する可能性がある<sup>4-7)</sup>。

健康科学部

\* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29  
兵庫県立健康環境科学研究センター  
健康科学部 武 田 信 幸

抗菌剤に関して危惧すべき公衆衛生上の問題は、食品に残留することにより引き起こされる人への直接的脅威だけでなく、河川水など環境を通じての間接的な摂取である。さらに、もっとも懸念しなければならないのは抗生物質耐性菌産生との関連性である。例えばバンコマイシン耐性腸球菌などによる院内感染に見られるように、耐性菌産生の一義的原因は人感染症治療における不適切な抗生物質使用といわれる。しかし、いわば“開放系”である農畜水産分野においても、人用の数倍量の抗菌剤が使用されており、食肉からも抗菌剤そのものだけでなく耐性菌も検出されているのが現状である<sup>1)</sup>。しかし、農畜産分野における抗菌剤使用が、人耐性菌産生にどの程度寄与しているのかは不明なことが多く、またすでに河川水や土壌など環境中に放出されてしまった抗菌剤が、新たな耐性菌産生の原因となるのかなど解明されるべき問題が山積している。

土壌は種々の無機物・有機物を含み、生物作用と化学作用が共生する動的環境である。また、一旦環境中に放出された抗菌剤の移動・蓄積・分解などの挙動を大きく支配すると考えられる。本報では環境中抗菌剤が耐性菌産生におよぼす影響を評価するための基礎資料を得る目的で、食品や河川水などから比較的高頻度で検出されているサルファ剤やテトラサイクリン類、キノロン剤などと土壌との相互作用、およびそれら抗菌剤・土壌複合体の抗菌活性を調べたので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 試料

原土は、平成18年度に神戸市内2ヶ所で表層土（表面～約1cm）を採取し、直射日光の当たらない場所で風乾した。大きな土塊は軽く押しつぶして原土全体をふるい分けして礫を除き、粒径2mm以下の細土のみを試料土壌として用いた。生物活性測定用土壌は、オートクレーブ

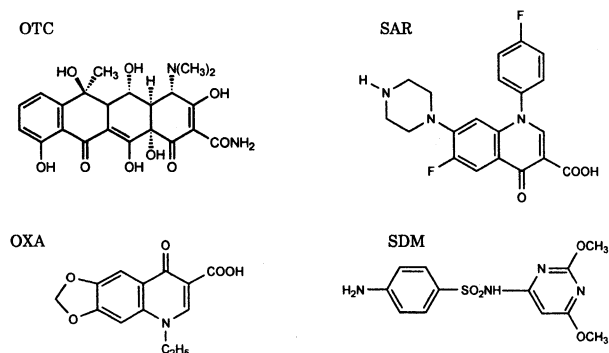


Fig. 1 Structures of the representative antimicrobials investigated.

で滅菌後使用した。

### 2. 試薬および試液

用いた抗菌剤はテトラサイクリン類 (TCs) 2種類 (オキシテトラサイクリンOTC, クロルテトラサイクリンCTC), キノロン剤 (QLs) 5種類 (フルオロキノロン剤 (FQs): シプロフロキサシンCIP, サラフロキサシンSAR, ダノフロキサシンDAN, エンロフロキサシンENR, 酸性キノロン剤 (AQs): オキシリン酸OXA) およびサルファ剤 (SDs) 4種類 (スルファジミジンSDD, スルファメトキサゾールSMZ, スルファジメトキシシンSDM, スルファキノキサリンSQX) の計11種類で、その分析用標準品は和光純薬工業 (OTC, TC, CIP, OXA), 林純薬 (SAR, DAN) および関東化学 (OFL, ENR) より購入した。標準品はメタノールに溶解して250 $\mu$ g/mL溶液とし、適宜混合・希釈して用いた。TCsは不安定なため冷凍庫に、他は冷蔵庫で保存した。

TCs, FQs およびOXAのHPLC移動相に用いるマグネシウムイオン含有緩衝液 (Mg Buff, pH6.0) は、無水酢酸ナトリウム 8.2g, 酢酸マグネシウム 10.7gおよびEDTA・2Na 0.4gを精製水 1 Lに溶解した後、酢酸でpHを6.0として調製した。SDsの蛍光誘導体試薬はフルオレスカミン(和光純薬工業社製)を0.001%となるようにアセトンに溶解した。

メタノール (MeOH), アセトニトリル (AcCN) は

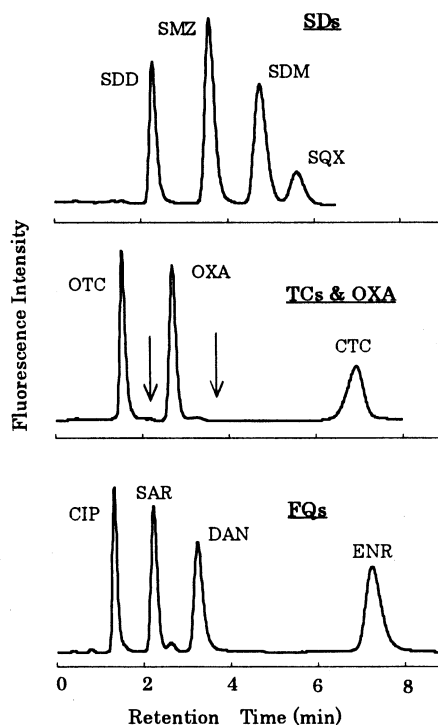


Fig. 2 Separation of the antimicrobials investigated. Arrows indicate times of wavelength and sensitivity changes.

HPLC用(和光純薬社製)を, その他の試薬は市販特級品を用い, 精製水はMilli-Q純水製造装置(ミリポア社製)で調製した。

抗菌剤検出キット・LAST(Live Animal Swab Test)はチッソ(株)から購入した。試験菌芽胞液(*Bacillus subtilis*), 寒天培地(直径6 cm)および菌液塗布用滅菌綿棒などが同梱されている。

### 3. HPLC装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ(HPLC)は(株)島津製作所製LC-10Aシステムを用いた。土壌と抗菌剤の相互作用の検討対象としたのはTCs(OTC, CTC), QLS(FQ: CIP, SAR, DAN, ENR, AQs: OXA)およびSDs(SDD, SMZ, SDM, SQX)の3グループ11抗菌剤である。Fig. 1に各グループ代表例の化学構造を示した。

分析には従来カラム(15cm, 5  $\mu$ g)に比較して極めて短く(2 cm)小さな粒子(3  $\mu$ m)を充填したAtlantis dC18(内径4.6mm, Waters社製。カラム温度: 40°C)を導入した。その結果, Fig. 2に示したように高流速でも高い分離能を示し, 各抗菌剤が8分以内でベースライン分離し, 効果的に分析時間の短縮ができた。

土壌抽出液は種々の有機物を含んでいるため紫外外部吸収検出法では妨害物の影響が考えられ, 近年よく使用される質量分析(LC/MS)法ではマトリックス効果有無の評価が困難である。そこで, 特異性と感度が高い蛍光検出法を適用した。蛍光を有しないSDsはフルオレスカミンで蛍光化した後, 移動相ACN-MeOH-0.1Mクエン酸(1.5:2.5:6)を用い, 測定波長(励起/蛍光)400nm/495nmで定量した<sup>8)</sup>。蛍光強度が小さいTCsは移動相にMg<sup>2+</sup>を添加して蛍光強度を増大させて検出した<sup>9)</sup>。また, 測定を迅速に行うためOXAとTCsを同時測定することとしたが, OXAは酸性化合物, TCsは両性化合物であり, OXAの蛍光強度はTCsより10倍程度大きい。そこで, 移動相のパラメーター(pHおよび有機溶媒の種類とその含量)とLCメソッドのタイムプログラムを検討し, 移動相をMg Buff (pH6.0) - MeOH (1:9)とし, 分析途中で波長変更(TCs: 380nm/520nm, OXA: 320nm/365nm)と感度変更を行った。この移動相はFQs(CIP, SAR, DAN, ENR)も良好に分離した。FQsは各ピークがクロマトグラム上で類似の高さとなるように295nm/455nmで測定した。DANのみはなお感度が高いため低濃度の標準溶液を用いた。土壌と反応溶液(CaCl<sub>2</sub>)との接触時間が長くなるほど, 注入溶媒の溶出位置に試料由来のピークが大きく認められるようになったが(TCs/OXAグループ), 各抗菌剤の保持時間付近には分析を妨害するピークはなかった。

目的とした11抗菌剤を個別イソクラティックあるいはグラジエント方式で分析する場合, 移動相の交換や再平衡化などに手間と時間を要し, 抗菌剤と土壌の相互作用を検討する目的には適さない。本LC条件を用いた場合, 8分以内にすべての抗菌剤が溶出し, 相互の検出を妨害しない(Fig. 2)。同一移動相がTCs/OXAおよびFQs測定に使用可能であり簡便である。しかも分析用検液は, 一部をSDs誘導体化用, 残余をTCs/AQs/FQs測定用とするため, 1試料溶液だけを調製するだけでよい。その結果, 本LC法で, 土壌と抗菌剤の相互作用を個別ではなく混合状態で検討できる新しい手法を提示することができた。

### 4. 土壌吸着実験および抗菌活性測定

土壌吸着実験は「OECD Test Guideline 106」<sup>8)</sup>に従い, 10mM CaCl<sub>2</sub>溶液を用いるバッチ法で行った。3グループ11抗菌剤標準溶液をCaCl<sub>2</sub>溶液で希釈して各1  $\mu$ g/mLの混合溶液とした。試料土壌100mgを栓付プラスチック製遠沈管(2 mL)に秤取し, 抗菌剤CaCl<sub>2</sub>溶液1 mLを加え, 初期濃度が10  $\mu$ g/g Soilとなるよう調製した。ただし, HPLC測定が容易になるように, CTCおよびDANはそれぞれ20  $\mu$ g/g Soilおよび3  $\mu$ g/g Soilとした。遠沈管は栓をしたのち約100回/minの速度で水平方向に一定時間振とうし, 抗菌剤を土壌に吸着させた。10,000 rpmで1分間遠心分離し, 上清をHPLC用検液とした。この操作の前後のピーク高の差から土壌に吸着された抗菌剤の量を算出した。

土壌への最大結合量を求める実験では試料土壌20mgを用い, テトラサイクリン類およびキノロン剤混合溶液(各20  $\mu$ g/mL) 1 mLを加えて各々1mg/g Soil(但し, CTCおよびDANは10, 1.5mg/g)とし, 50分振とうした。上清をHPLC用検液として採取した後, 新たに抗菌剤混合溶液1 mLを加えて同様に反応させた。これを計5回繰り返す, その都度土壌への吸着量をLCで測定し, 合算して結合量を求めた。

抗菌剤・土壌複合体の生物活性検定は, 抗菌剤の代表例としてOTCを用い, 試験菌を*Bacillus subtilis*とした阻止円形成法で行った。土壌20mgにOTC標準を6段階希釈したCaCl<sub>2</sub>溶液1 mLを加えて0.08-3.1mg/g Soilとなるように調製し, 50分振とうしてOTCを土壌に吸着させた。遠心分離して上清を除去した後, 2 mLの10 mM CaCl<sub>2</sub>で2回洗浄した。遠沈管器壁や土壌中の残余水分は, 細く切った濾紙を表面に軽く付着させて吸い取り, 吸着されなかった抗菌剤を完全に除去した。次に, 前もって試験菌を塗布した培地にアルミニウム製カップ(内径6.5mm x 高さ5.2mm)を置き, そのカップ内にスパー

テルで試料土壌を移し、寒天培地と十分接触するように軽く押し付けた。さらに、10 $\mu$ Lの10mM CaCl<sub>2</sub>を加えて冷蔵庫に30分放置し、浸潤させた。30 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、阻止円の直径を測定した。陽性対照には同梱のネオマイシン・ディスクを用いた。

### III 結果および考察

#### 1. 抗菌剤の土壌への吸着

##### 1.1 土壌吸着係数(Kd)の測定

農薬やPCBなど種々の有害化学物質は、発生源の違いとそれぞれの物理化学的特質に規定されて環境中に分布する。気化を通じて大気中へ散逸し、河川や湖沼などの水系内で希釈・分解する一方、魚介類などの生物や浮遊粒子状物質・底質土壌などに取り込まれて濃縮・蓄積される。この際、土壌は物質の吸着・脱着が行われる“貯蔵庫”として機能し、化学物質の環境内移動で重要な役割をする。有機化合物がどの程度土壌に吸着されるのかを示す指標として、一般に土壌吸着係数(Kd)が用いられる。この値は、有機化合物の水溶液と土壌とを一定時間接触させた後のそれぞれの化合物濃度比として表される( $K_d = C_{soil} / C_{aq}$ )。小さな値を示す化合物ほど土壌に吸着されにくく、したがって雨水などの作用により土壌表面から地中へ浸透しやすい。逆に大きなKd値を有する物質は土壌中に貯留もしくは濃縮される場合がある。Kd値は、同じ化合物でも土壌の種類によってかなり変動する。有機質や粘土質含量の高い土壌は一般的に大きなKd値を与えると考えられるが、化合物自体の化学構造でさらに大きく影響される<sup>7, 10)</sup>。

今回用いた試料土壌は、畑地や家畜場土ではなく都市部における通常の表層土から採取した粒径2mm以下の細土である。粘土・シルトおよび砂含量の差による土性の分類は行わなかったが、土壌Aは砂の感触が強く、粘り気はわずかしかなことから、粘土含量の低い砂壤土に分類できると思われる。土壌Bも類似の土性であったが外観はやや黒色であることから軽度の腐植質を含んでいると考えられた。化学物質の土壌吸着実験では単独物質で行われることが多いが<sup>7)</sup>、現実的には複数(群)の化合物が同時に存在していると思われる。そこで、本報告では3群・11抗菌剤を混合添加して吸着実験を行った。

各抗菌剤群代表例の土壌吸着率の時間変化をFig. 3に示した。酸性キノロン剤(OXA)の土壌Aへの吸着率は60%とやや低いものの、テトラサイクリン類(OTC)およびフルオロキノロン剤(SAR)では共に反応10分で反応溶液の95%に相当する量が土壌に吸着した。一方、サルファ剤は殆ど吸着されず、反応を22時間に延長した後

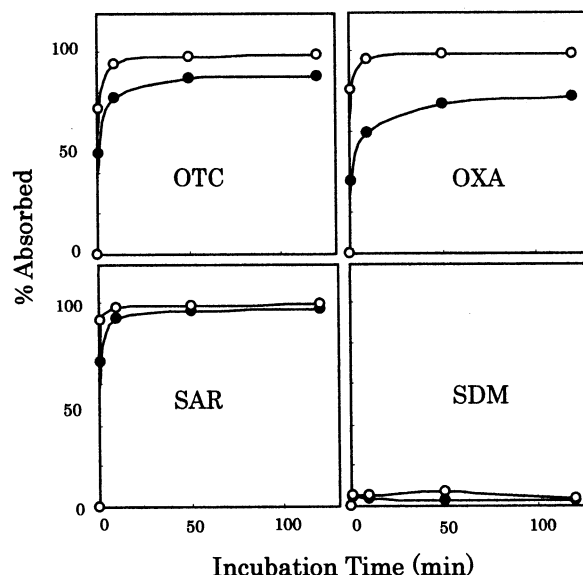


Fig. 3 Antimicrobial sorption on different soils as a function of time Closed circle : Soil A, open circle : Soil B.

も同様であった。このことを他の抗菌剤と共に土壌吸着係数(Kd値)としてTable 1に示した。抗菌剤の土壌への移行がほぼ平衡に達したと考えられる120分でのKd値と比較すると、テトラサイクリン類および酸性・フルオロキノロン剤がそれぞれ57-729 L/kgおよび26-3385 L/kgという値であったが、サルファ剤は0.2-4.1 L/kgという極めて小さな値であった。これは既報値(テトラサイクリン類: 490-1620 L/kg, 酸性キノロン剤: 70-116 L/kg, フルオロキノロン剤: 310-5610 L/kg, サルファ剤: 0.6-4.9 L/kg)とほぼ同様であった<sup>7)</sup>。すなわち、サルファ剤はこれら4群の抗菌剤ではもっとも土壌に吸着されにくく、逆にフルオロキノロン剤はもっとも吸着能が大きい。ついで、酸性キノロン剤およびテトラサイクリン類という順序であった。このことから、SDsは環境中で土壌よりもむしろ水系に存在する確率が高く、逆にテトラサイクリン類などは表流水よりもむしろ底質や浮遊粒子状物質に吸着して存在しているのではないかと推察された。Kolpinらによるアメリカ139河川での調査では、表流水中のテトラサイクリン類(OTC)およびフルオロキノロン剤(CIP)検出率は各々1.2%および2.6%であったのに対し、サルファ剤(SMZ)は19%と高い検出率であった<sup>5)</sup>。アメリカでの動物用抗菌剤の使用実態調査によると、全抗菌剤に占めるテトラサイクリン類の割合は15.8%であるのに対しサルファ剤は2.3%である<sup>2)</sup>。環境からの検出率と環境への放出量(使用量)が逆転している。抗菌剤の環境内挙動は土壌の影響を大きく受けている可能性が示唆される。

一般的にKd値は化合物の脂溶性と正の相関が、水溶

Table 1. Distribution coefficients, Kd (L kg<sup>-1</sup>), of antimicrobials for two soils.

Incubation (min)		Soil A					Soil B				
TCs		OTC		CTC			OTC		CTC		
	1	8		32			23		38		
	10	26		88			138		181		
	50	51		153			368		359		
	120	57		336			613		729		
QLs		OXA	CIP	SAR	DAN	ENR	OXA	CIP	SAR	DAN	ENR
	1	4	33	19	57	36	36	213	94	287	180
	10	12	169	91	277	224	208	697	376	857	715
	50	21	371	185	667	560	496	1612	870	2160	1610
	120	26	527	235	867	772	817	2794	1348	3385	2906
SDs		SDD	SMZ	SDM	SQX		SDD	SMZ	SDM	SQX	
	1	0	0.4	0.2	0.4		0.6	0.4	0.9	1.7	
	10	0.3	0.3	0.4	0.7		0.7	0.5	1.1	2.9	
	50	0.3	0.2	0.4	0.6		0.8	0.4	1.3	4.1	
	120	0.3	0.2	0.4	0.7		1	0.7	1.5	4.1	
	22hrs	0.5	0.4	0.6	1.1		1	0.4	1.7	5.4	

Antimicrobial and soil (10 $\mu$ g/g except for CTC (20 $\mu$ g/g) and DAN (3 $\mu$ g/g) were incubated in 10mM CaCl<sub>2</sub> for various length of time. Values are mean of two replicates.

解度（極性の高さ）と負の相関があるとされている<sup>11)</sup>。分子量が大きく脂溶性の高いマクロライド系医薬品のアバメクチンやタイロシン（マクロライド系抗生物質）のKd値は7-130の範囲であり、ジクロロベンゼンでは100-800である<sup>7, 12)</sup>。テトラサイクリン類およびキノロン剤はその化学構造（Fig. 1）から類推される極性の高さに反して、Kd値は極めて大きい（Table 1）。また、土壤への移行は極めて迅速である（Fig. 3）。これらのことから、両抗菌剤群の土壤への吸着機構は従来考えられていたような化合物の脂溶性に応じた土壤表面の有機質への穏やかな分配ではなく、土壤中の金属成分とのイオン結合やキレート形成による特異的吸着現象と理解すべきであろう。テトラサイクリン類は強いキレート形成能を有していることや<sup>13)</sup>、キノロン剤が静電作用により土壤粘土の層間隙へ侵入し成分鉱物と結合することなどが報告されている<sup>14)</sup>。

土壤の違いで見ると、土壤Bが土壤Aよりすべての抗菌剤において大きなKd値を有している（Table 1）。OTCでは10倍、OXAでは30倍、フルオロキノロン剤では1.5-5倍程度大きい。土壤Bが目視的に有機質をより多く含んでいること以外はこれら大きな差の要因は不明であった。

クロラムフェニコール、オラキンドックス（キノキサリン系抗菌剤）、サルファ剤などは土壤の差異を反映せず、いずれも小さなKd値を示すが、OTC、OXAやENRなどでは本報と同様に、土壤の採取場所によって100倍以上もKd値が異なることが報告されている<sup>7, 12)</sup>。既述し

たように土壤成分は抗菌剤の環境内移動を規定する大きな要素である。鰻などの養殖池や河川の底質土、畑地や水田土壤、牛・豚・鶏などの家畜場土などではそれぞれ土性も違い、使用されている動物用医薬品の種類も異なる。環境中抗菌剤のリスク評価には、これら要因の詳細な検討が必要である。

## 1.2 土壤の抗菌剤最大吸着能の測定

では、土壤はどの程度の量の抗菌剤を保持できるのだろうか。Kd値測定や吸着メカニズムの報告は多いが最大結合量についての報告は見当たらない<sup>2)</sup>。そこで、吸着能が大きかった土壤Bを用い、テトラサイクリン類とキノロン剤について結合飽和量を測定した。Fig. 4に示したように、土壤1gは約0.4mgのOTCを吸着し、CTCおよびOXAではそれぞれ約1.2mgが結合飽和量であった。フルオロキノロン剤ではテトラサイクリン類のような飽和に至ることはなかったが、最大結合量はDANが0.7mg/g、ENRとSARが各々1.5mg/g、CIPは最大では2.2mg/g以上に達した。その結果、最大結合した場合を考えると土壤1g当たり約8mgもの抗菌剤が保持されることとなる。この値を、1m四方で深さ10cm（100kg）の仮想の土壤（土性は本報と同一、密度は1g/cm<sup>3</sup>）が存在すると考えると、約800gの抗菌剤がそこに存在することになる。“貯蔵庫”としての土壤の容量はかなり大きいといえる。

2. 抗菌剤・土壌複合体の生物活性

土壌に保持された抗菌剤がなお生物学的に活性か否かは、環境中での耐性菌産生を考える上で最も重要な課題であるが、このことに関してはChanderらが報告しているのみである<sup>10)</sup>。彼らは、テトラサイクリンまたはタイロシンと土壌の混合物を*Salmonella sp.*または*E. coli*の液体培養液と反応させ、コロニー形成能を指標として抗菌活性を測定し、それらの複合体が活性であることを示した。本報では試験菌・*B. subtilis*を塗布した平板上のカップ内に、6段階の濃度のOTCを吸着させた土壌(0.06–1.4mg OTC/g Soil)を装置し、阻止円が形成されるか否かを検討した。その結果、Fig. 5に示したように、本条件においても土壌に吸着した状態の抗菌剤が生物活性を示しうることが明らかになった。0.06および0.12mg/g Soilでは阻止円は形成されなかったが、0.25mg/g Soilからは吸着したOTC量に比例した大きさの阻止円が形成された。直径10mmの阻止円(アルミカップ外径 + 左右1mm)を検出限界とした場合、Fig. 5の直線回帰式から求めたOTC・土壌複合体の検出限界値は0.15mg/g Soilであった。用いた土壌は20mgであるから、この値はOTC 3 μg/cupに相当する。既報<sup>10)</sup>から計算した本法のOTC検出限界は0.2μg/cupである。土壌に吸着されていたOTCの約1/15が試験菌に利用されたことになる。

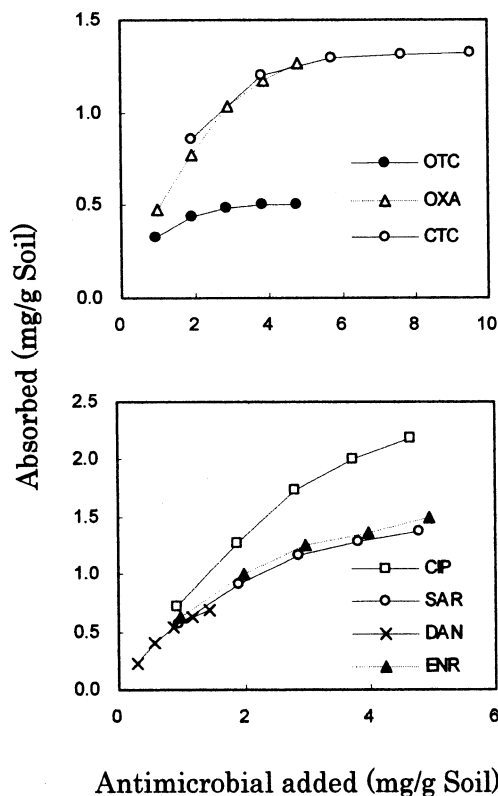


Fig. 4 Maximum sorption capacity of Soil B for TCs, OXA and FQs

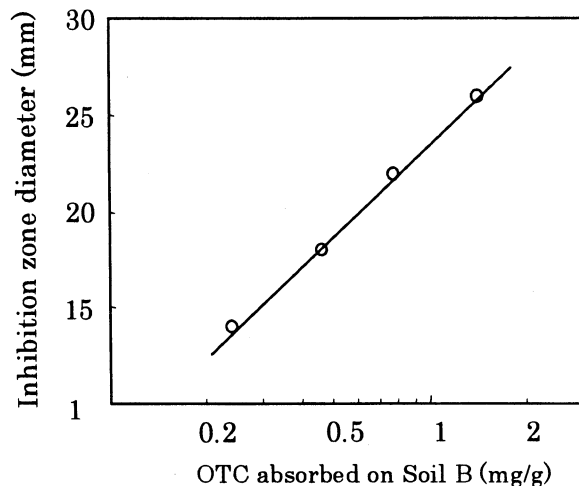


Fig. 5 Antimicrobial activity of OTC/Soil complex.

本法では、試験菌は寒天平板上に、抗菌剤・土壌複合体はアルミカップ内に固定されていて移動できない。従って、阻止円が形成されたのは試験菌が抗菌剤・土壌複合体を体内に取り込んだ結果ではなく、土壌中の抗菌剤が寒天平板内に浸潤・拡散して試験菌に到達したと考えるのが自然である。実際の農土から検出されるレベルはテトラサイクリンで0.1–0.9μg/g Soilであり<sup>2)</sup>、実験濃度(mg/gレベル)より極めて低い。しかし、前述のように土壌の抗菌剤吸着容量は非常に大きいので、動物糞尿と直接接触する家畜飼育場や農業用抗菌剤が直接散布される農地などには高濃度蓄積部位があると予想される。そこから降雨や冠水などある種の条件変化により、生物活性を示す程度の量の抗菌剤が溶出してくる可能性は高い。一方、環境中で細菌類が食作用(ファゴサイトーシス)によって抗菌剤・土壌複合体を直接取り込む可能性は、細菌類の大きさが~4 μm、土壌粘土の粒径は2 μm以下であることを考えると、それほど高くはないであろう。しかし、土壌にはミミズなどの生物種が数多く生息しており、それらが複合体を直接摂取した後抗菌剤を土壌から遊離させ、細菌に取り込み易くしていることも考えられる。

抗菌剤・土壌複合体は阻止円を形成し得たが、このことが意味しているのは抗菌剤が土壌に吸着されても間接的に微生物体内に進入可能であるという事実だけである。耐性菌産生に必要な条件がひとつ満足させられただけであり、耐性菌産生を意味しているのではない。耐性菌産生には、一定濃度・一定時間以上の抗菌剤との接触、いわば「選択圧」が必要である。1 μg/L以下程度の低濃度の表流水<sup>5)</sup>ではその「圧」は低く、数百μg/kg程度が存在する土壌はその「圧」を保持しているものと思われる。「貯蔵庫」としてかなり大きな容量を有している土

壤は、吸着している抗菌剤が直接的に細菌類に取り込まれるならば強大な「耐性菌工場」となるであろうが、間接的にしか摂取されないのであれば巨大な「倉庫」となるだけである。

人体内で産生される耐性菌は疾病の治療という明確な目的の元に副次的に出現しており、適正な使用がなされれば制御可能となろう。また、成長促進などの目的で投与された結果生み出されている食用動物由来耐性菌も統制可能な範囲かもしれない。しかし、環境中に「選択圧」となる量の抗菌剤が存在するならば、耐性菌産生に関する統御は不可能となろう。土壌・抗菌剤複合体の生物活性は、本報告を含めTC/OTC/タイロシンの3種類しか検討されていない。他の抗菌剤についても同様の検討が必要であり、種々のフィールド土壌の抗菌剤残留調査も必要である。人の健康と環境の保全を考える上で、環境中に放逸された抗菌剤の消長と生物に対する影響の研究が不可欠であると考ええる。

#### IV 要 旨

環境中での耐性菌産生の可能性を考察するため、簡便で選択性の高いHPLC分析法を開発し、3グループ11種の動物用抗菌剤（テトラサイクリン類[TCs]、キノロン剤[QLs]、サルファ剤[SDs]）について、土壌吸着係数(Kd)を測定した。SDsのKd値は最も小さく(〜5)、次いでTCs(57〜729)、QLs(26〜3385)であった。このことから、SDsは土壌より水系に存在しやすいこと、TCsは土壌に吸着されやすいこと、QLsは土壌に残留されやすいことを明らかにした。また、土壌が結合できる抗菌剤の最大量はおおよそ8 mg/gと試算し、土壌の“貯蔵庫”としての容量がかなり大きいことを示した。さらに、阻止円を測定する微生物試験法を用いて、抗菌剤は土壌に吸着されていてもなお生物学的に活性であることをしめし、土壌に残留したTCsやQLsが環境内で耐性菌を産生する可能性を示唆した。

#### 謝 辞

抗菌剤の生物活性測定法の御指導を頂いた当研究センター感染症部西海弘城主任研究員に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 田村豊：動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策。日獣会誌, **56**, 685-691(2003)
- 2) Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. : A

- global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65**, 725-759 (2006)
- 3) 日本植物防疫協会：農薬要覧2005, p92-93, 東京(2005)
  - 4) 清野敦子, 益永茂樹, 中西準子, 古荘早苗：水環境中における医薬品の検出。第37回日本水環境学会講演要旨集, P. 344 (2003), 熊本
  - 5) Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Buxtom, H.T., Barber, L.B. and : Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Tech.*, **36**, 1202-1211 (2002)
  - 6) Thiele-Bruhn, S. : Pharmaceutical antibiotics in soil: A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **166**, 145-167 (2003)
  - 7) Tolls, J. : Sorption of veterinary pharmaceutical in soils: a review. *Environ. Sci. Tech.*, **35**, 3397-3406 (2001)
  - 8) Takeda, N. and Akiyama, Y. : Pre-column derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products. *J. Chromatogr.*, **558**, 175-180 (1991)
  - 9) 武田信幸, 西海弘城：金属キレート樹脂を用いた前処理法による畜水産食品中のオキシテトラサイクリンの分析, 食衛誌, **41**, 364-367 (2000)
  - 10) OECD, 1997 : OECD guidelines for testing chemicals, test guide line 106: absorption/desorption using a batch equilibrium method. Revised Draft Document OECD, Paris, pp. 1-26
  - 11) 金澤純：農薬の環境科学, p.103-123, 合同出版, 東京(1994)
  - 12) Kile, D.E., Chiou, C.T. Zhou, H., Li, H. and Xu, O. : Partition of nonpolar pollutants from water to soil and sediment organic matter. *Environ. Sci. Tech.*, **29**, 1401-1406 (1995)
  - 13) 山辺茂：医薬品分子論, p.9-12, 朝倉書店, 東京(1968)
  - 14) Nowara, A., Burhenne, J. and Spittler, M. : Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1459-1463 (1997)

15) Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S.M. and Gupta, S.C. : Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. J. Environ. Qual., **34**, 1952-1957 (2005)

16) 神保勝彦 : 畜水産食品中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法, 食衛誌, 40, J-195-J-202 (1999)