

沿岸海水中の微量化学物質 (ABPC, OTC) の分布と 消失に関する研究

宗景志浩* · Le Xuan Tuan** · 足立伸也***
蒲生啓司**** · 岩崎 望*****

1. はじめに

近年東南アジア各国や中南米 (エクアドル) では, マングローブを切り開いた浅海を利用してエビの養殖が, 日本では内湾を利用したハマチやタイの養殖が盛んに行われている。養殖魚に与える餌には病気を予防する目的で抗生物質が多量に添加されている。それらは大半が養殖魚に摂取されるが, 一部は海水に溶出し, 一部は残餌となって海底に沈降する。また, 閉鎖性の強い場所に養殖域があるため海水交換が悪く (宗景ら, 1996), 広範囲に広がらずに留まってしまう。それに加え, 抗生物質は次々と投与されるため, 容易に分解されず一定濃度で溶存するようになり, やがて耐性菌を生み出す環境ができてしまう。耐性菌が出現すると今まで以上に抗生物質を使用し, さらに耐性菌を生み出しやすい環境を形成するという悪循環が起きる (平松, 2000)。

マングローブを切り開いて作った養殖池が 4~5 年で使用不能になる原因は, このような抗生物質の過度な使用が一因とも考えられている。

本研究では, 海水と懸濁物中の微量物質として抗生物質を取り上げ, 特にアンピシリンとテラマイシンの分布特性, 紫外線や海水による消失特性並びにプランクトンによる吸収特性を解明しようとした。

2. 方 法

分析に使用した抗生物質は以下の 2 種を選んだ (日本公定書協会, 1976)。また, 分析法, 濃縮・抽出法は文献 (Hoshino ら (1984); Bobbit ら (1992); 厚生省生活衛生局 (1994)) を参考にした。

アンピシリン (ABPC) $\cdots C_{16}H_{19}O_4S$ 分子量: 349.40

テラマイシン (オキシテトラサイクリン: OTC)

$\cdots C_{22}H_{24}N_2O_5HCL$ 分子量: 496.90

2.1 紫外線による消失実験

アンピシリンとテラマイシンを人工海水に溶かして作

成した 10 μM 溶液 200 ml をビーカーに移し, 水温 27°C の恒温水槽に浸して上部から紫外線 (4 W/s/cm²) を照射した。この時, 紫外線を照射する試料と紫外線を照射しない試料 (コントロール) を作成する。この実験と同時に直射日光下での消失実験も行った。アンピシリンとテラマイシンを人工海水に溶かした試料をビーカーに作成し, 直射日光下に置いた。この時の紫外線量は 10~12 W/s/cm² で, 紫外線ランプより多かった。これらの試料から数時間ごとにマイクロピペットで数 ml 採水し, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて濃度変化を調べた。

2.2 海水による消失実験

アンピシリン及びテラマイシンをそれぞれ湾外海水と超純水に溶かし, 水温 27°C で放置したときの試料の濃度変化を調べた。

2.3 プランクトンによる吸収実験

テラマイシン 100 μM (OTC 100), 500 μM (OTC 500), 1000 μM (OTC 1000), 2000 μM (OTC 2000) の海水培地にプランクトン (珪藻 *Skeletonema costatum*) を入れたもの, テラマイシンを含まない海水培地に珪藻を入れたもの (コントロール 1), テラマイシン 100 μM の海水培地に珪藻を入れないもの (コントロール 2) をそれぞれ 1 l 作成した。これらを明暗サイクル 12 時間, 温度 20°C のインキュベーター内で培養した。そして初日から 6 日おきに珪藻個体数, テラマイシン濃度を紫外線分光器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC/UV) 及び質量分析計付き高速液体クロマトグラフ (LC/MS) を用いて調べた。さらに, 培養開始 18 日目には培地を濾過してプランクトンを回収し, 体内に吸収されたテラマイシンを 2.5 項で示す方法に従って固相抽出を行った。濃度を分析して 18 日間における各培地の珪藻 1 個体中のテラマイシン含有量を求めた。

2.4 分析条件

分析用カラムは, ODS-AQ (YMC-Pac) をカラム温度 30°C で使用した。移動相には 15% アセトニトリル水溶液に 20 mM 燐酸二水素アンモニウムを加え, pH を 2 に調整した。移動相を流量 1 ml/min で流し, UV 波長 250 nm で測定した。

* 正会員 農博 高知大学教授 農学部生産環境工学科

** 愛媛大学連合農学研究科

*** 高知大学農学部生産環境工学科

**** 理博 高知大学助教授 教育学部化学科

***** 農博 高知大学助教授 海洋生物教育研究センター

2.5 内湾養殖域での分布調査

(1) 海水中の濃度分析

1999～2000年、いずれも8～10月にかけて定期的に内湾養殖場で海水を採取し、海水中の濃度を測定した。採取した海水はその日のうちに1.0 μm のフィルターで濾過し、濾液を100 mlのサンプル瓶3～4本にわけて冷凍保存した。

<濃縮処理>

- ① 冷凍保存した海水を冷蔵庫で解凍し、等量の超純水を加え塩分濃度を1/2に薄める。
- ② ①の溶液をWaters社製Sep Pack C18に通し、吸引濃縮する(固相抽出)。吸引流量(1 ml/min)が変動せぬように注意する。①の処理を含め濃縮率は50倍となる。
- ③ 超純水1 mlを通し内部を洗浄する。
- ④ シリンジで空気を送り内部の溶液を完全に排出する。
- ⑤ リン酸を用いてpHを2に下げた後、60%アセトリル水溶液1 mlをバックフラッシュ法でC18に通し、内部に保持された成分を回収する。
- ⑥ 検量線を作成する。
- ⑦ ⑤の溶液をHPLCにかけ、濃度を測定する。

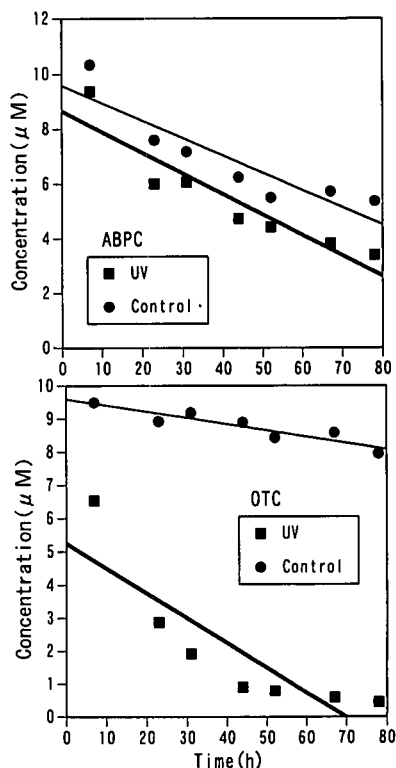
(2) 懸濁物中の濃度分析

海水採取と同時にセディメントトラップを養殖場の上、中、下層に1日設置して沈降懸濁物を採取した。セディメントトラップは、下端を閉じた内径60 mm、高さ20 cmの円筒4本を一組としたものである。海水の場合と同様、採取した日のうちに1.0 μm フィルターで濾過した。フィルターは湿重量を量りトラップした面を内側にして2つ折りでケースに入れ冷凍保存した。

<抽出処理>

- ① 冷凍保存したフィルターを超純水3 mlを入れた乳鉢内で開き、乳棒でフィルターと懸濁物を分離する。
- ② 分離したフィルターは表裏を超純水で洗浄する。
- ③ この作業をすべてのフィルターで行い、20分間すりつぶす。
- ④ これを遠心分離管に移し、よく混合する。
- ⑤ 遠心分離(3000 rpm×10分間)を行い、その上澄み液を0.2 μm フィルターで吸引濾過する。
- ⑥ ⑤の濾液をWaters社製Sep Pack C18に通し、流量1 ml/minで吸引濃縮する。
- ⑦ (1)項③～⑦と同じ操作を行う。

分析は、同一条件下(移動相、カラム温度、波長、流量)で、アンピシリンとテラマイシンの標準試料と上記の処理で得たサンプルを高速液体クロマトグラフ(HPLC/UV)にかけ、クロマトグラフを作成する。そして2つのグラフを比較して、保持時間の一致から試水中に存在するアンピシリンとテラマイシンを同定した。



図一 紫外線照射による消失

3. 消失要因とその特性

3.1 紫外線による消失

図一は紫外線を照射した試料と照射しない試料を比較したものである。紫外線を照射した試料はしない試料に比べ濃度の減少が大きい。これによりアンピシリンとテラマイシンは紫外線により破壊され消失することが分かった。試料に照射した紫外線量は4 W/s/cm²(冬の曇り時の紫外線量とほぼ同じ)で、夏の紫外線量(約20 W/s/cm²)と比較するとかなり少ない。実験開始6時間後の濃度減少率は、直射日光下のほうが室内実験よりも大きかった。このことから、抗生物質は紫外線量の違いにより消失速度に差がでるものと考えられる。しかし、透明度の低い養殖域では紫外線は深層までは届かないため、これによる影響を受けるのは表層のみであると考えられる。

今回の実験条件での消失速度は1時間当たりアンピシリン0.073 μM 、テラマイシン0.079 μM 程度であった。抗生物質は紫外線量だけでなく、種類や濃度によっても消失速度に差が見られた。

3.2 海水による消失

図二には湾外海水及び超純水に溶解したアンピシリンとテラマイシンの消失結果を示した。超純水溶解試料

はほとんど消失しないのに対し、海水溶解試料は濃度の減少が大きい。これより抗生物質は海水そのものによっても消失し、消失速度は1時間当たりアンピシリンで $0.123 \mu\text{M}$ 、テラマイシンで $0.152 \mu\text{M}$ 程度であった。

3.3 プランクトンによる消失

図-3 はプランクトン吸収実験における各培地のテラマイシン濃度の時間変化を示したものである。テラマイシン濃度は、いずれの培地でも珪藻が入っていない培地

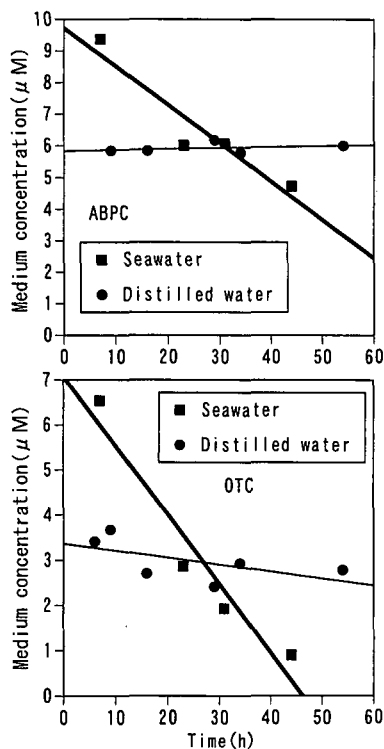


図-2 海水による消失

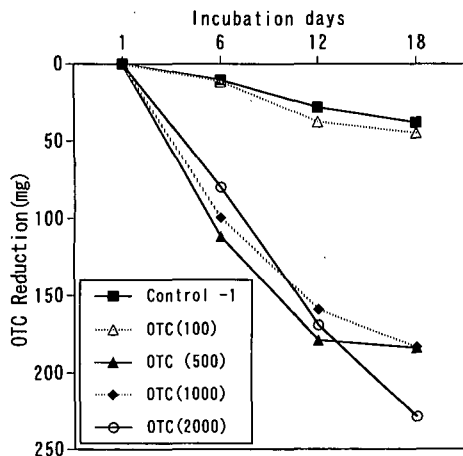


図-3 珪藻培養培地の OTC 濃度変化

(コントロール1)に比較し、減少していることが分かる。これは珪藻がテラマイシンを吸収したことによるもので、濃度が低い培地より高い培地のほうで減少量が多い。

各培地のテラマイシン濃度を測定する際に、珪藻個体数を測定した。その結果を図-4 に示した。本実験の濃度条件では、濃度が低い培地に比べ、高い培地で珪藻の数が増加している結果となった。このことから抗生物質がプランクトンの増殖に影響を及ぼしていることも考えられる。図-3 及び 4 の結果から珪藻個体数が増加するのに伴って、テラマイシン吸収量も増加していると言える。しかし、プランクトンは光合成が盛んに行われる表層に多く存在するため、プランクトンの吸収による消失は表層ほど大きく、深層ほど小さくなると思われる。

培養 18 日間における各培地の珪藻 1 個体中のテラマイシン含有量を図-5 に示した。培地濃度 $100 \mu\text{M}$ 溶液中で 1.3 fg/cell , $500 \mu\text{M}$ 中で 3.5 fg/cell , $1000 \mu\text{M}$ 中では 23.2 fg/cell , $2000 \mu\text{M}$ 中では 115 fg/cell であった。培地中の濃度が高いほどプランクトン増殖率が大きいだけでなく、1 個体当たりのテラマイシン吸収量も大きくなる。

さらに、一個体の細胞を球形とみなすと、珪藻 1 個体

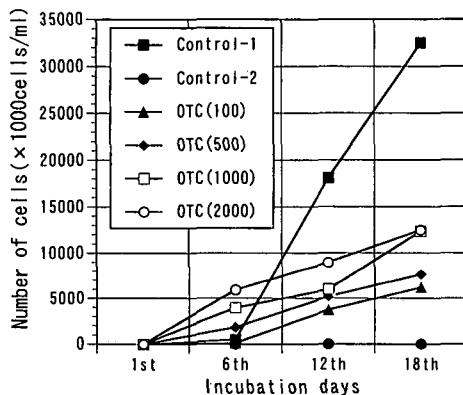


図-4 培地中の珪藻個体数の変化

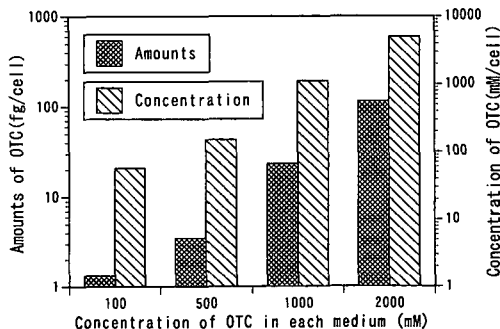


図-5 珪藻 1 個体に吸収されたテラマイシン量及び濃度

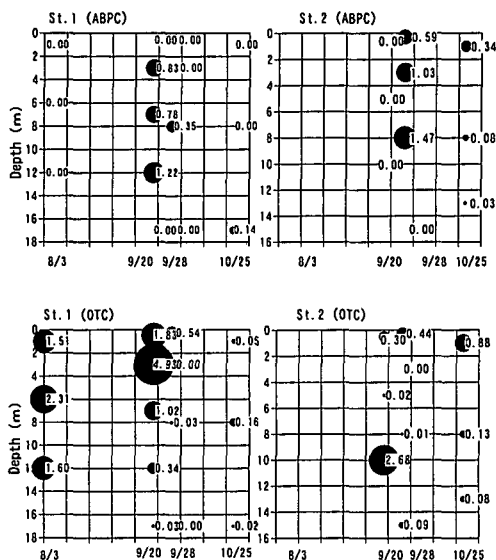


図-6 海水中のアmpiシリン (上) 及びテラマイシリン (下) 濃度分布 (ppb)

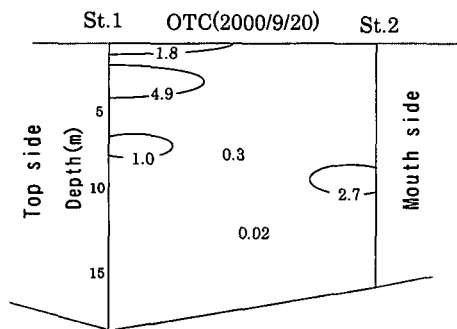


図-7 テラマイシリン濃度縦断分布 (ppb)

の平均体積は $49.15 (\mu\text{m}^3)$ となる。この値から、珪藻体内のテラマイシリン濃度(図-5)を見積もることができる。珪藻 1 個体当たりの体内濃度は、OTC (100) で $57 \mu\text{M}$ 、OTC (500) で $152 \mu\text{M}$ 、OTC (1000) で $1120 \mu\text{M}$ 、OTC (2000) で $5000 \mu\text{M}$ となる。培地濃度が高くなれば、生体濃縮がより進むことを意味している。

4. 浅海域における分布

4.1 海水中の分布特性

図-6 は St. 1, St. 2 におけるアンピシリン (上図) とテラマイシリン (下図) の濃度を海水採取日、水深ごとにグラフにしたもので、図-7 は 9 月 20 日の縦断分布を示したものである。

養殖域直下の海水からアンピシリンとテラマイシリンが検出されている。アンピシリンは 1999 年のデータ(山口ら, 2000)と比較すると、採水日や水深によって検出さ

れる濃度に差があるが、全体的に見ると養殖場付近の濃度差はあまりないと思われる。テラマイシリンは毎回ある程度の濃度が検出された。なかでも 9 月 20 日の St. 1 の水深 3 m では 4.9 ppb と高い濃度が検出された。これは餌を与えた数時間後に採水したため、このような高い濃度が検出されたと思われる。

また 9 月 20 日の鉛直濃度分布を見ると、上層にいくほど濃度は高いが、表層ではむしろ低いことが分かる。これは、表層では紫外線照射量が多く、かつプランクトン濃度が高いことなど、下層よりも消失原因が多いことによる。紫外線の激減する表層より少し下層の 3 m で濃度が最も高い。しかし、さらに底層にいけば残餌などの懸濁物が分散したり、他の魚やプランクトンに吸収されたり、海水そのものによっても消失して濃度が低くなっていくと思われる。

本来、抗生物質の投薬期間は長くても 10 日間とされており、それ以上の投与は耐性菌出現の原因となる。だが閉鎖性が高く汚れがひどい海域では、病気が発生しやすく予防のために頻繁に与えている。そのため養殖域直下では破壊・吸収により消失しても次々に投与されるので、ある程度の濃度で存在するものと思われる。しかし、差し込み(宗景ら, 1996)や降雨(高知気象台, 2000)の直後には、養殖域の濃度は激減した。

4.2 懸濁物中の分布特性

図-8 は、単位面積当たりの沈降懸濁物量を上中下層に分けて積み上げグラフにしたもので、図-9 は懸濁物 1 g_{wet} に含まれる抗生物質量を積み上げグラフにしたものである。図-8 では、いずれの観測日でも沈降懸濁物量は水深 3 m 及び 5 m の上層部で少なく、中層で多く、下層でやや減少している。

一方、図-9 では水深 3 及び 5 m に沈降した懸濁物には抗生物質を多く含んでいることが分かる。しかし、水深 8 m では沈降懸濁物が多いにもかかわらず、抗生物質

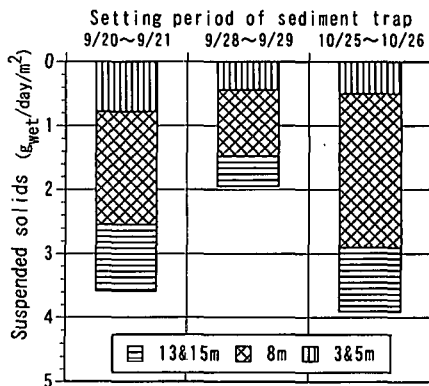


図-8 水深別沈降懸濁物量

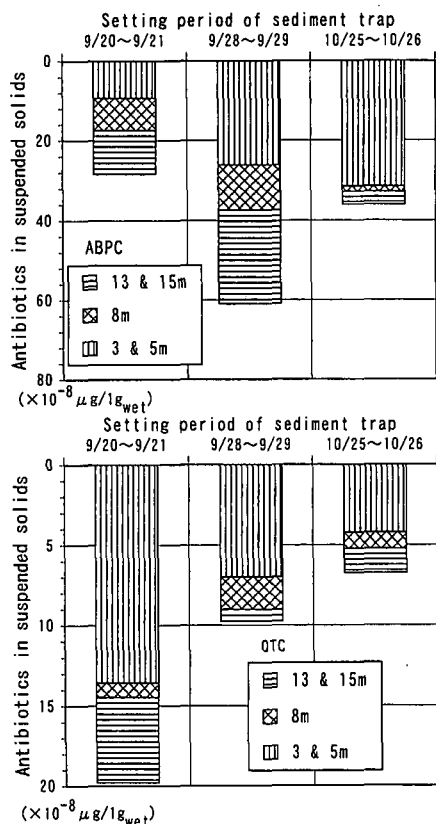


図-9 懸濁物に含まれる抗生物質(上図:アンピシリン, 下図:テラマイシン)

はあまり含まれていない。これは水深3, 5mより8mの方が長い間海水を沈降していくため、分散による逸散、海水による消失、プランクトンによる吸収を長く受けた結果、減少したものと思われる。上層の3, 5mでは表層に比べ紫外線は激減していること、懸濁物の逸散も少なく未だ海水中に溶けだしていないため、懸濁物中の濃度が高いものと思われる。

また、懸濁物1g_{wet}中の抗生物質量は、9月から10月にかけて水深3及び5mでアンピシリンは増加、テラマイシンは減少していることが分かる。内湾養殖域では10月後半から水温低下により、病気の発生が少なくなる。そのため抗生物質の投与量は減少し、海水と懸濁物内の濃度は徐々に減少すると思われる。図-6でも、海水中の濃度はあまり検出されていない。しかし、アンピシリンは10月後半になって逆に増加している。原因として、高価なテラマイシンに代わって魚病予防として安価なアンピシリンが投与されたと思われる。

5. 結 論

養殖域に使用されている抗生物質のうち、アンピシリンとテラマイシンの海水及び懸濁物中の分布を調査し、

あわせて紫外線や海水による消失特性及びプランクトンによる吸収特性を明らかにしようとした。結果は以下の通りである。

(1) 抗生物質は紫外線や海水により消失する。また、消失速度は紫外線量や抗生物質の種類・濃度の違いにより差があると思われる。

(2) プランクトン(珪藻: *Skeletonema Costatum*)は抗生物質をよく吸収する。本実験範囲では培地中の濃度が高いほど増殖率がよく、1個体当たりの含有量も高くなり、生体濃縮の生じることが分かった。

(3) 海水中のアンピシリンとテラマイシンは養殖場直下に分布しており、観測日や水深によって濃度に差が見られた。

(4) 湾内での抗生物質の分布は上層ほど濃度が高い傾向にあるが、表層は消失原因が多いため濃度が低くなっていると思われる。

(5) 懸濁物量は中層でもっとも多く、上層では少ない。一方、懸濁物中の抗生物質量は中層でむしろ少なく、上層で多かった。これは、沈降する間に散逸したり、溶け出すためと思われる。

以上の結果から、抗生物質は紫外線や海水に破壊され、プランクトンに吸収されるが、多量の抗生物質を連続して投与すれば、分解されながらも一定濃度で溶存するものと思われる。また、プランクトンの増殖に影響し、生物濃縮が行われている可能性がある。

最後に、本研究は文部省科学研究費の研究成果の一部であることを付記する。

参 考 文 献

- 厚生省生活衛生局 (1994): 畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改訂), 平成6年度畜水産食品中の残留有害物質モニタリング検査の実施について, pp. 1024-1028.
- 高知気象台 (2000): 高知気象月報8, 9, 10月号.
- 財団法人日本公定書協会 (1976): 日本薬局方解説書, p. E-26, p. E-36.37.
- 平松啓一 (2000): 抗生物質が効かない, 集英社, 270 p.
- 宗景志浩・中川倫寿・長谷川 浩・井関哲也 (1996): 浦ノ内湾における差し込みの直後の水質悪化と物質輸送について, 海岸工学論文集, No. 43, p. 1106-1110.
- 山口創一・安里加奈子・宗景志浩・蒲生啓司 (2000): 閉鎖性内湾における抗生物質の挙動に関する研究, 日本分析化学会年会第49年会講演要旨集, pp. 56.
- Bobbitt, D. and K. Ng (1992): Chromatographic analysis of antibiotic materials in food, J. Chrom., Vol. 624, pp. 153-170.
- Hoshino, Y., M. Horie, N. Nose and H. Iwasaki (1984): Studies on analysis of feed additives by HPLC. II; Determination of tetracyclines and macrolide residues in meats by HPLC, Shokuhin Eiseigaku Zasshi, Vol. 25(5), pp. 430-435.