

露地栽培のウメにおける各種抗生物質剤の残留性

柏本知晟¹・丸 章彦^{2, 3}・松浦聖子^{2, 4}・沼口孝司^{1, 5}

¹和歌山県果樹試験場うめ研究所

²日本曹達株式会社

Evaluation of in-the-field Durability of Antibiotics in Japanese Apricot (*Prunus mume*)

Tomoaki Kashiwamoto¹, Akihiko Maru^{2, 3}, Seiko Matsuura^{2, 4} and Koji Numaguchi^{1, 5}

¹Japanese Apricot Laboratory, Wakayama Fruit Tree Experiment Station

²Nippon Soda Co. Ltd.

緒 言

細菌性病害は防除が困難であり、これまでに多種多様な作物において深刻な被害を与えてきた。細菌性病害に対する化学的防除の手段は限られており、抗生物質の散布が主である (McManus et al., 2002)。しかし生産現場においては、抗生物質は単に定期的に散布されているに過ぎないことが多い。このような使用方法では、抗生物質の効果を十分に発揮できないだけでなく、細菌が抗生物質への抵抗性を発達させる要因にもなり得る。抗生物質の適切な散布タイミングについて議論するためには、散布後の抗生物質の露地栽培条件における動態に関する基礎的なデータが必要であるが、それを実験的に示した研究はほとんどない。そこで本研究ではウメを用いて、露地栽培における各種抗生物質の残留濃度の推移について調査を行うこととした。

ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) は年間 71,100 トンの収穫量を誇る果樹である (農林水産省, 2020)。重要な細菌性病害はウメかいよう病 (病原: *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*) であり、発病果実では暗赤色の穿孔により商品価値が著しく低下する (富永ら, 1983)。また、主感染期 (3~5 月) に強風雨が発生した年は多発し、防除が困難となることが知られる。本病害の防除は、主に抗生物質剤の散布により行われる。ウメでは当初ストレプトマイシン (以下, STM) が広く用いられてきたが、和歌山県では耐性菌が蔓延しており (島津ら, 1997)、効力の低下が認められたため、現在ではオキシテトラサイクリン (以下, OTC) が広く用いられている。OTC は 1999 年の登録以来、かいよう病菌の主感染期において 10~14 日の間隔で散布するよう指導されており、現場では連用されることも少なくない。そのため、OTC においても耐性菌の発生が懸念されるが、興味深いことに、OTC は STM と同様に耐性菌発生リスクが高い (FRAC, 2021) にも関わらず、本県のウメにおいて耐性菌が発生したという報告は現在のところない。この違いには STM と OTC との間に、作用機構以外の要因 (例えば、露地栽培における残留性) が関係する可能性が考えられるが、詳細は未だ明らかになっていない。

以上のことから本研究では、現在広く利用されている 5 種の抗生物質剤を露地栽培のウメに散布

³現在：株式会社ニッソーグリーン

⁴現在：BASF ジャパン株式会社

⁵現在：和歌山県日高振興局農林水産振興部農業水産振興課

し、果実の定期的なサンプリングおよび液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) により残留濃度の推移を調査し、その残留性について比較検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. ウメ果実サンプルの準備

調査はすべて和歌山県果樹試験場うめ研究所 (和歌山県日高郡みなべ町) で実施した。降雨量の測定には降雨計 WB0013 (横河電機) を使用した。

(2018 年試験)

5 月 14 日に OTC 水和剤 (マイコシールド, 日本曹達) 1,500 倍を 7 年生 '南高' 3 樹に動力噴霧器を用いて十分量 (1 樹あたり 10–15L) 散布した。樹上果実は散布当日, 1 日後, 2 日後, 3 日後, 4 日後, 7 日後, 11 日後および 14 日後に約 30 g ずつサンプリングした。果実は核を取り除き, 抗生物質の抽出に供するまで -30°C で保存した。

(2019 年試験)

5 月 13 日に OTC 水和剤 1,500 倍, STM 液剤 (アグレプト液剤, 明治製菓ファーマ) 1,000 倍, オキシニック酸 (以下, OA) 水和剤 (スターナ水和剤, 住友化学) 1,000 倍, カスガマイシン (以下, KSM) 液剤 (カスミン液剤, 北興化学工業) 500 倍, バリダマイシン (以下, VM) 液剤 (バリダシン液剤 5, 住友化学) をそれぞれ 8 年生 '南高' 3 樹に動力噴霧器を用いて十分量 (1 樹あたり 10–15L) 散布した。樹上果実は散布当日, 1 日後, 3 日後, 7 日後, 14 日後, 21 日後および 28 日後に約 30 g ずつサンプリングした。果実は核を取り除き, 抗生物質の抽出に供するまで -30°C で保存した。

2. 標準物質

分析における標準物質には, オキシテトラサイクリン標準品 (富士フィルム和光純薬), ストレプトマイシン標準品 (Dr. Ehrenstorfer GmbH), ジヒドロストレプトマイシンセスキ硫酸塩標準品 (林純薬工業), オキシニック酸標準品 (関東化学), カスガマイシン塩酸塩一水和物標準品 (富士フィルム和光純薬) およびバリダマイシン A 標準品 (富士フィルム和光純薬) を使用した。

3. サンプルの抽出および調製

果実からの抗生物質の抽出は厚生労働省の手順に則って以下の通り行った。

1) OTC

果実 20 g を EDTA 含有のクエン酸塩緩衝液中で磨砕し, 遠心分離した。水相を Sep-Pak PS2 カラム (Waters) を用いて精製した。

2) STM

果実 20 g を 1%リン酸とジクロロメタンを 2:1 の割合で含む混合液中で磨砕し, 遠心分離した。水相を Oasis WCX カラム (Waters) を用いて精製した。

3) OA

果実 20 g を 12 M 塩酸とメタノールを 1:9 の割合で含む混合液中で磨砕し, グラスファイバークラウド紙でろ過した。ろ液に 5%塩化ナトリウム水溶液 200 ml とジクロロメタン 100 ml を混合した。ジクロロメタン相を回収して濃縮し, Oasis HLB カラム (Waters) を用いて精製した。

4) KSM

果実 20 g をエタノールと 2%酢酸を 1:1 の割合で含む混合液中で磨砕し、ろ過した。ろ液を Sep-Pak C18 カラム (Waters) で精製し、続いて Oasis MCX カラム (Waters) を用いて精製した。

5) VM

果実 20 g を 90%メタノール中で磨砕し、ろ過した。ろ液を回収して濃縮し、Sep-Pak PS2 カラム (Waters) を用いて精製した。

4. LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS 分析には Xevo TQ-S マイクロトリプル四極子マススペクトメーター (Waters) を接続した ACQUITY UPLC H-class Plus system (Waters) を用いた。まず、以下に各抗生物質の分析における LC 条件の概要について述べる。

1) OTC

分析カラムには L-column2 ODS (50mm×2.0mm, 粒子径 3 μm, 化学物質評価研究機構) を用いた。移動相は 0.1% (v/v) ギ酸溶液 (A 液) およびアセトニトリル (B 液) とし、流速 0.2 ml/min で送液した。グラジエント条件は、B 液の割合: 5% (0 分) →42.5% (10 分) とした。カラム温度は 40°C とし、サンプル注入量は 40 μl とした。

2) STM

分析カラムには ACQUITY UPLC BEH HILIC (100mm×2.1mm, 粒子径 1.7 μm, Waters) を用いた。移動相は 0.1%アセトニトリル溶液 (A 液) と 0.1%ギ酸溶液 (B 液) とし、流速 0.3 ml/min で送液した。グラジエント条件は B 液の割合: 20% (0 分) →90% (10 分) とした。カラム温度は 40°C とし、サンプル注入量は 10 μl とした。

3) OA

分析カラムには ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 粒子径 1.8 μm, Waters) を用いた。流動相は 0.1%ギ酸溶液 (A 液) と 0.1%アセトニトリル含有の 10 mM ギ酸アンモニウム溶液 (B 液) とし、流速は 0.2 ml/min で送液した。グラジエント条件は B 液の割合: 5% (0 分) →95% (10 分) とした。カラム温度は 40°C とし、サンプル注入量は 10 μl とした。

4) KSM

分析カラムには ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 粒子径 1.7 μm, Waters) を用いた。移動相はアセトニトリル (A 液) と 0.1%ギ酸溶液 (B 液) とし、流速は 0.2 ml/min で送液した。グラジエント条件は B 液の割合が 10% (0 分) →80% (10 分) とした。カラム温度は 40°C とし、サンプル注入量は 10 μl とした。

5) VM

分析カラムには ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 粒子径 1.7 μm, Waters) を用いた。移動相はアセトニトリル (A 液) と 0.1%ギ酸溶液 (B 液) とし、流速 0.2 ml/min で送液した。溶出は B 液の割合 60% で 4 分間保持し、カラム温度を 40°C として行った。サンプル注入量は 10 μl とした。

次に、質量分析装置の条件について述べる。イオン化法エレクトロスプレーイオン化 (ESI+) を用い、ソース温度を 150°C, 脱溶媒温度を 450°C とした。各抗生物質の定量イオン (m/z) および定性イオン (m/z) は次の通りである。

1) OTC

461.22→426.06 (定量), 461.22→201.01 (定性)

2) STM

582.28→263.11 (定量および定性)

ジヒドロストレプトマイシン : 582.28→263.13 (定量および定性)

3) OA

262.00→244.00 (定量), 262.00→216.00 (定性)

4) KSM

380→112 (定量), 380.0→200.2 (定性)

5) VM

498.5→498.6 (定量), 498.5→178 (定性)

結果

ウメ果実に散布した抗生物質濃度の推移

2018年にウメ果実に散布した OTC 濃度の推移を図 1a に示す。散布直後の OTC の濃度は 2.9 ppm であったが、3 日後にはほぼ半減し、7 日後には 0.2 ppm まで減少した。2019 年にも同様の傾向が認められ (図 1c), OTC の初期濃度は 2.4 ppm であったが、散布 7 日後には 0.15 ppm と急激に減少した。一方、STM 濃度の減少は OTC よりも緩やかであり、初期濃度は 1.5 ppm と OTC よりも低かったものの、散布 7 日後でも 0.54 ppm 残留し、0.15 ppm まで減少したのは散布 28 日後であった (図 1c)。OA, KSM および VM は初期濃度が 0.4–0.6 ppm と非常に低く、散布 7 日後には OTC と同程度まで減少した (図 1c)。なお、両年とも調査期間中に降雨があったものの、降雨のタイミングでの残

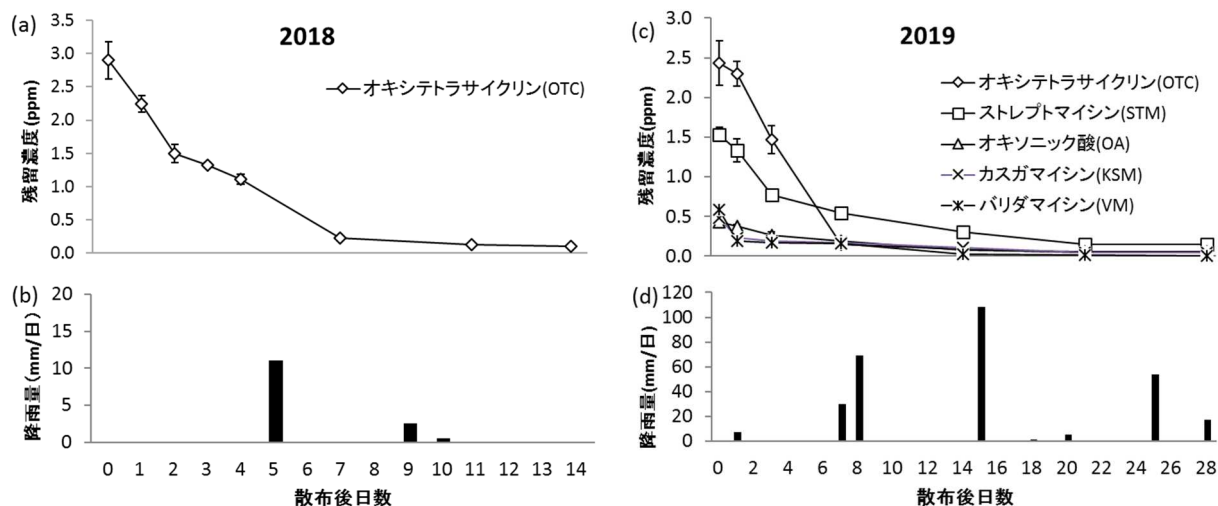


図 1 ウメ果実へ散布した時の各種抗生物質剤の残留濃度の推移 (2018(a)、2019(c))

散布後の降水量は 2018(b), 2019(d)に示す。

バーは標準誤差を示す (n = 3).

留濃度の急激な減少が確認できないことから、試験の実施に大きな影響を与えるものではなかった

ものと判断された (図 1b, d).

考 察

1. 5 種の抗生物質の露地における残留性

本研究では、5 種の抗生物質 (OTC, STM, OA, KSM および VM) の露地栽培のウメ果実における残留性について比較検討した。OTC 以外の抗生物質に関する試験結果は単年度のものであることに留意する必要があるが、STM と比較して、OTC は露地栽培条件では速やかに消失するものと考えられた。OA, KSM および VM は、OTC および STM と比較して散布後の初期濃度が非常に低く、本研究で得られたデータのみで残留性について議論することは困難であった。環境省が示す各抗生物質の水中光分解性のデータでは STM に比べ OTC の半減期は非常に短く (表 1)、本試験において観察された傾向とも矛盾しないものと考えられた。また、Khan et al. (2021) は実用濃度の OTC 溶液または STM 溶液を浸み込ませ、乾燥させた直径 7 mm のろ紙ディスクを準備し、それぞれ直射日光 (屋外, 7 日または 14 日間)、UV 照射 (385-400 nm, 48 時間) での処理または暗所 (7 日または 14 日間) での保管後、大腸菌 *Escherichia coli* または枯草菌 *Bacillus subtilis* の懸濁液を塗布した LB 培地上に置床し、それぞれの細菌に対する静菌効果を比較した。その結果、暗所で保管したディスクと比較して、OTC の静菌効果はどの試験区においても急激に低下した一方、STM の静菌効果の低下は緩やかであった。本結果からも、露地栽培条件における OTC および STM の残留性の違いに両者の太陽光 (UV) への分解性の違いが関係していることが強く示唆される。以上のような、露地における抗生物質の残留性について具体的に比較検討した例は他にほとんどなく、本研究で得られた知見はウメだけでなく、他の作物を栽培する農業者への技術指導でも有用であるものと思われる。

表 1 各種抗生物質の半減期

物質名	半減期 (25°C, 水中光分解性) ²	溶媒
オキシテトラサイクリン (OTC)	19.4 分	精製水
ストレプトマイシン (STM)	1.99-19.4 日	自然水, 滅菌精製水
オキシニック酸 (OA)	31.5 時間	滅菌蒸留水
カスガマイシン (KSM)	14 日	滅菌自然水
バリダマイシン (VM)	27 時間-4.0 日	自然水, 滅菌蒸留水

² 環境省ホームページを参照 (<http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/ki jun.html>).

2. 抗生物質の残留性と耐性菌の発生

Chow et al. (2021) は最小発育阻止濃度 (MIC) を超える抗生物質の存在下において、大半の環境細菌の生育は抑えられるが、抗生物質耐性に関して強力な選抜下にあると述べている。また、MIC 以下の濃度であっても遺伝子組み換えや変異、遺伝子の水平伝播の発生割合に重大な影響を与える可能性を示唆しており、抗生物質の残留性が高いほど耐性菌の発生リスクが高いと考えられる。本研究では、STM が露地栽培のウメにおいて比較的長期に渡って残留することが示唆された。STM はウメかいよう病防除に広く用いられてきたが、本県では実用濃度をはるかに超える MIC の耐性菌が大半を占め (島津ら, 1997)、効力低下が認められたため、現在は OTC が広く用いられている。一方で OTC は、1999 年の農薬登録以降、同病の主感染期 (3~5 月頃) に最大 4 回と頻繁に使用されている

にも関わらず、県内で耐性菌が発生したという報告は現在のところない。FRAC Code List 2021によると、STMとOTCの作用機構は、ともにリボソームにおけるタンパク質合成阻害であり、耐性菌発生リスクは高い(FRAC, 2021)。しかし、本県の生産現場において、両者の耐性菌発生状況が異なっていることは興味深い。本研究およびKhan et al. (2021)の結果から、STMとOTCのウメにおける残留性の違いが耐性菌の発生に影響を及ぼしている可能性が推察される。つまり、OTCはSTMと比較して、効力を発揮した後に急速に環境から消失するために、耐性菌が選抜されにくくなっている可能性がある。

しかし、OTCを含め、抗生物質の適切な使用を農業者に指導しなければならないことは今後も変わらない。例えば、強風雨の前日など、最大限の効果が見込まれるタイミングでの使用を心がけるとともに、作用機構の異なる殺菌剤との併用により抗生物質の使用回数を可能な限り減らし、農薬としての効力を維持する取り組みを継続していくことが重要である。

摘 要

本研究では、5種の抗生物質の露地栽培のウメにおける残留性について、果実への散布、継続的なサンプリングおよびLC-MS/MSを用いた分析により比較検討した。

1. オキシテトラサイクリン(OTC)の散布直後の果実付着濃度は2 ppm程度であったが、散布3日後にはほぼ半減し、7日後にはほぼ検出されなくなった。
2. ストレプトマイシン(STM)散布直後の付着濃度は1.5 ppmとOTCよりも低かったが、散布7日後でも0.54 ppm残留し、0.15 ppmにまで減少するまでに28日を要した。
3. オキシリニック酸、カスガマイシンおよびバリダマイシンの散布直後の付着濃度は0.4–0.6 ppmと非常に低く、その残留性は判然としなかった。
4. 以上のことから、OTCはSTMと比較して露地栽培のウメ果実からは速やかに消失することが示唆された。

本研究への協力並びに原稿執筆時に種々の助言をいただいた川原正見氏(日本曹達株式会社)並びに宮形 栞氏(日本曹達株式会社)に深く感謝の意を表す。

引用文献

- Chow, L. K. M., T. M. Ghaly and M. R. Gillings. 2021. A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. *J. Environ. Sci.* 99: 21-27.
- FRAC. 2021. FRAC Code List ©. 2021: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering).
URL: <https://www.frac.info/home>. (2021年12月20日アクセス)
- Khan, S., A. Osborn and P. J. Eswara. 2021. Effect of sunlight on the efficacy of commercial antibiotics used in agriculture. *Front. Microbiol.* 12: 645175.
- McManus, P. S., V. O. Stockwell, G. W. Sundin, and A. L. Jones. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 443-465.
- 島津 康・間佐古将則・家村浩海. 1997. ウメかいよう病に対する抗生物質剤の防除効果及び培

地上での感受性. 関西病虫害研究会報. 39: 41-42.

富永時任・高梨和雄・西山幸司・岸 国平. 1983. ウメかいよう病細菌の同定. 日本植物病理学会報. 49: 627-632.

農林水産省. 2020. 令和2年産びわ、おうとう、うめの結果樹面積、収穫量及び出荷量

URL:https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/sakumotu/sakkyou_kajyu/biwa_momo_ume/r2/index.html (2021年12月20日アクセス)

