

## 有毒藍藻類の増殖に与えるカテキン類の影響 ～分子構造の相違による抑制効果の評価・検討～

日本大学大学院理工学研究科 学生会員 ○喜多村 延政 島田 浩司  
 日本大学大学院理工学研究科 非会員 野元 翔太  
 日本大学理工学部土木工学科 正会員 吉田 征史  
 日本大学理工学部土木工学科 正会員 松島 眸  
 日本大学理工学部一般教育 非会員 浅田 泰男

### 1. 背景および目的

近年のアオコの発生抑制に関する研究結果によると、植物由来のポリフェノールにアオコの増殖抑制を示唆する可能性が報告<sup>1~3)</sup>されており、筆者らはこれまでに広葉樹の落葉部に着目し、アオコの発生抑制の可能性について検討した結果、*Microcystis aeruginosa* (以下 *M.aeruginosa* と示す) の増殖抑制傾向が観察され、増殖抑制因子にはポリフェノールの中でも縮合型タンニンが関与している可能性が考えられた<sup>4,5)</sup>。また、用いる植物種により、単位細胞当りの縮合型タンニン負荷が同量であっても増殖抑制効果に違いが生じたことから、各々の植物に含まれる縮合型タンニンの組成もしくは構造が影響していることが示唆された。そこで本報では、縮合型タンニンの基本骨格であるカテキン類の標準物質を用いて増殖抑制試験を行い、それぞれの分子構造の違いと増殖抑制効果の関係を調べ、増殖抑制に効果的な縮合型タンニンの推定を試みた。

### 2. 試験方法

増殖抑制試験には国立環境研究所より購入した *M. aeruginosa* (NIES102) を、M-11 培地を用いて照度 3000lux (明:暗=16:8 (h))、27°C±1°Cで7日間前培養したものをを用いた。カテキン類の標準品はエピカテキン (以下 EC)、エピカテキンガレート (以下 ECg)、ガロカテキン (以下 GC)、ガロカテキンガレート (以下 GCg)、エピガロカテキンガレート (以下 EGCg) を和光純薬より購入し試験に供した。これらのカテキン類の構造式を図-1 に示す。EC が最も単純な構造をしており、EC と GC では B 環の立体構造と水酸基の数が異なる。EC と ECg 及び GC と GCg の違いは C 環にガロイル基が結合している。EGCg は ECg と GCg の両方の特徴を有している。各々のカテキン類を 0.1 (mg/ml) となるよう滅菌した蒸留水にて溶解・希釈したものを、有効容積 500ml の三角フラスコを用いて初期細胞濃度が  $3.0 \times 10^5$  (cells/ml) となるように調整した *M. aeruginosa* 培養液に単位細胞当りにかかるカテキン負荷量が  $14 \times 10^{-9}$  (mg/cell) となるよう添加した。増殖抑制効果は顕微鏡下 Thoma 式血球計算盤を用いて細胞数を求め、細胞濃度の経日変化より評価した。

### 3. 試験結果

図-2 に5種のカテキン類を用いた増殖抑制試験の結果を示す。この結果によれば、Control は試験期間中増殖傾向にあり、GC では Control と同様の増殖傾向にあることから、GC には増殖抑制効果が確認されず、EC では試験開始後 6 日目にわずかな増殖抑制効果が見られたが、その効果は弱かった。GCg、ECg、EGCg を添加した系では既往の枯葉抽出

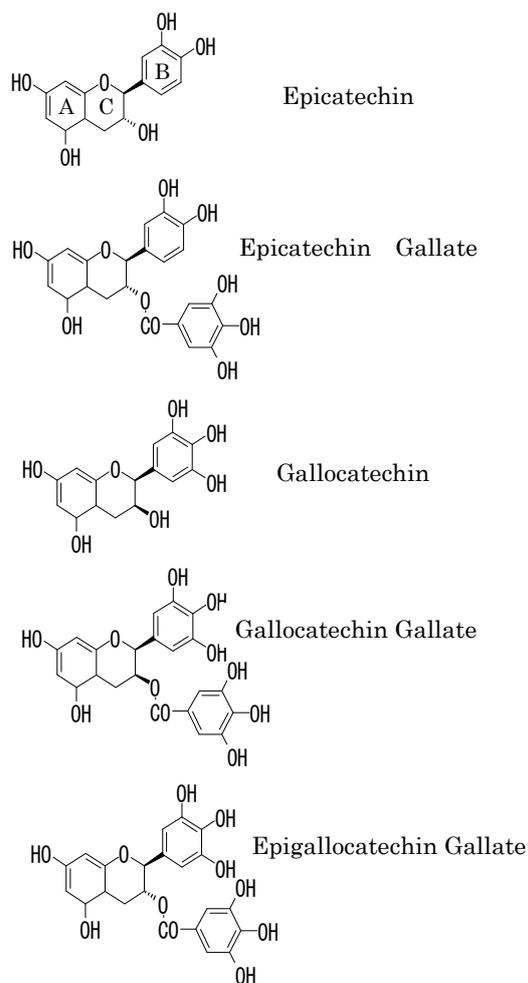


図-1 カテキン類の構造式

キーワード 縮合型タンニン, アオコ, 増殖抑制, カテキン類

連絡先

〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14 日本大学理工学部土木工学科 TEL 03-3259-0673

液による増殖抑制試験の結果と同様に、増殖抑制効果が確認された。そこで、各カテキン類の増殖抑制効果を以下に示す増殖抑制率として算出し評価を行った。

$$\text{増殖抑制率} = \left(1 - \frac{\text{添加系の細胞増殖量}}{\text{Control系の細胞増殖量}}\right) \times 100(\%)$$

(但し、添加系及び Control 系の細胞増殖量は試験開始日と試験 6 日目の細胞濃度の増加量から定義した)

算出した増殖抑制率を図-3にまとめる。また、既往の検討において本試験のタンニン負荷量と同程度であった場合の抽出液添加系の増殖抑制率は概ね 90%であった。各カテキン類の増殖抑制率は、抑制効果が確認されなかった GC では 0%、以下 GC g、EC、EC g、EGC g はそれぞれ、77、27、84、82%となり、増殖抑制効果は EC g > EGC g > GC g > EC > GC の順に強く発現した。この結果は更に「ECg>EC」と「GCg>GC」及び両者の中間的な EGCg とに分けることができ、「ECg>EC」及び「GCg>GC」の分類から、ガロイル基を有するカテキン類の方が強い増殖抑制効果を示していると考えられ、ガロイル基の存在が *M. aeruginosa* の増殖抑制に関連する可能性が示唆された。EGCg については ECg と GCg の分子構造の中間的な構造を有することから EC g > EGC g > GC g の順に増殖抑制効果が発現したものと解釈できた。また、分子内のフェノール性水酸基の数、特に B 環のフェノール性水酸基数によって増殖抑制効果が異なる可能性が考えられたが、水酸基の数による増殖抑制効果の違いは今回の試験結果では見られなかった。

*M. aeruginosa* ではないものの、大腸菌や球菌・桿菌などに対するカテキン類の殺菌・抗菌作用を検討した結果を報告している文献<sup>6,8)</sup>では、分子内の水酸基の数や分子の立体構造、ガロイル基を有する構造のカテキン類にその効果が顕著に現れる傾向にあることが報告されており、ガロイル基の有無の観点では本検討と同様の結果であった。しかし、本検討では水酸基の数による差異は今回確認されなかったため、今後再検証する必要があると考えられる。

#### 4. まとめ

これまでに、枯葉抽出液に含まれる縮合型タンニンによる *M. aeruginosa* の増殖抑制効果は用いる植物種によって差異が生じた。そこで、縮合型タンニンの基本骨格であるカテキン類のうち構造の異なる EC、EC g、GC、GC g、EGC g の 5 種類を用いて増殖抑制試験を行い、増殖抑制に効果的な縮合型タンニンの推定を行った。その結果、分子構造中のガロイル基を有する EC g、EGC g、GC g には増殖抑制効果が発現したが、ガロイル基を有さない EC、GC では増殖抑制効果が微弱であるもしくは発現しなかった。これらのことから、ガロイル基を有するカテキン類が重合した縮合型タンニンが *M. aeruginosa* の増殖抑制に効果的である可能性が示唆された。

- 参考文献** 1) 中井ら (1998) 水環境学会誌、第 21 巻、pp.663-669 2) 笹尾ら (2001) 陸水学雑誌 Vol.621 pp.115-122  
3) NAKAI, et al(2000) *Water Research* Vol. 34 No. 11pp.3026-3032 4) 喜多村ら(2006)環境工学研究論文集 vol43 pp543-549  
5) 喜多村ら (2008) 第 35 回土木学会関東支部技術研究会 CD-ROM 6) 生貝ら (1998) 日本化学療法学会雑誌 Vol.46 No.5 pp179-183  
7) 戸田ら (1990) 日本細菌学雑誌 45 (2) pp561-566 8) 熊沢 (2003) コロイド・界面実用講座 Vol.17<sup>th</sup> pp42-49

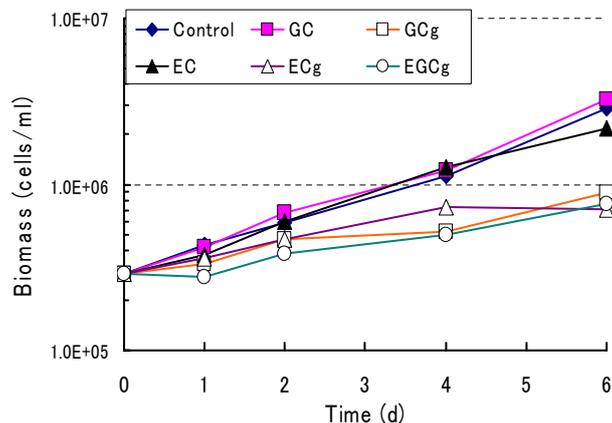


図-2 カテキン類標準品による増殖抑制試験の結果

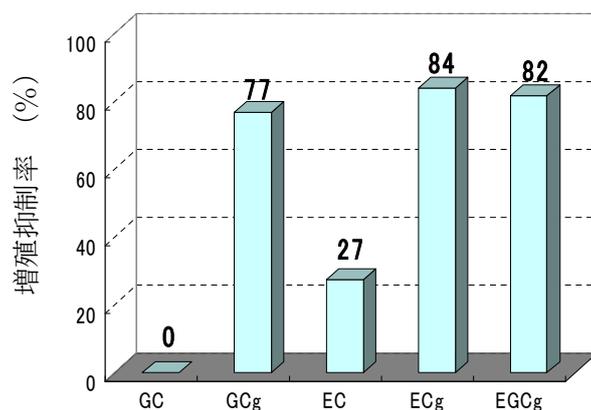


図-3 カテキン類標準品による増殖抑制率