

枯葉由来の抽出物が有毒藍藻の増殖に与える影響

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 大里 順一
 日本大学理工学部土木工学科 正会員 吉田 征史 松島 眸
 日本大学理工学部一般教育 非会員 浅田 泰男

1. 目的

内陸湖沼の富栄養化に伴って発生するアオコの問題は上水道施設内での濾過障害や水資源の異臭味¹⁾等のみならず、一部の有毒藍藻類が生産する毒性物質によって魚介類の斃死が報告されており、更には人畜への健康被害が懸念されている。従ってアオコ特に有毒藍藻類の発生対策は健全な水資源確保・環境保全の観点からも重要な問題である。現在行われているアオコ対策は物理的な直接除去や薬剤散布などが主であるが、これらの手法には経済面・安全面での問題が残る。一方、こうした問題点が少ない手法として、近年では植物を利用した有毒藍藻類の増殖抑制に関する研究例が報告されている^{2~3)}。筆者らはこれまでに都市街路樹の枯葉に着目し、枯葉から溶出した成分が一部の有毒藍藻に対して増殖抑制効果を有することを明らかにした^{4~6)}。このような増殖抑制効果をもたらした成分は、文献を参考に抗菌作用・殺菌作用をもつ縮合型タンニン^{7~9)}であると考えられた。しかしながら、実際に縮合型タンニンが増殖抑制に関与しているか、またどのような作用によって増殖抑制効果が発現したかは明らかではない。そこで本稿では枯葉から溶出した縮合型タンニンの分離を試み、得られた分離成分を用いて増殖抑制試験を行ないその効果を検討した。

2. 試験方法

試料は都市街路樹として植生需要が高いサクラの枯葉を用い、図-1に示す手順¹⁰⁾に従い縮合型タンニンの分離を試みた。得られた溶液を縮合型タンニン画分と称する。縮合型タンニン画分の分離精度は画分中の総ポリフェノールと縮合型タンニンの比率から求めた。各々の成分の定量は食品分析法¹¹⁾に従い、総ポリフェノールはFolin-Denis法、縮合型タンニンはバニリン-硫酸法によって測定した。

増殖抑制試験は国立環境研究所から購入した *Microcystis aeruginosa* (NIES102) を、オートクレーブにて滅菌したM-11培地内で対数増殖期となるまで前培養したものを試験株として用い、表-1に示す試験条件のもと回分式で行った。縮合型タンニン画分による増殖抑制効果を評価するために、既報^{4~6)}と同様に作成した抽出液(蒸留水:枯葉=100:1で混合後7日間静置した溶液のろ液)と、上記方法に従って得られた縮合型タンニン画分とを単位細胞当りの縮合型タンニン負荷量が等しくなるように添加し、試験容器内の細胞濃度の経日変化で比較した。また、対照系として抽出液及び縮合型タンニン画分を添加しないControlを作成した。

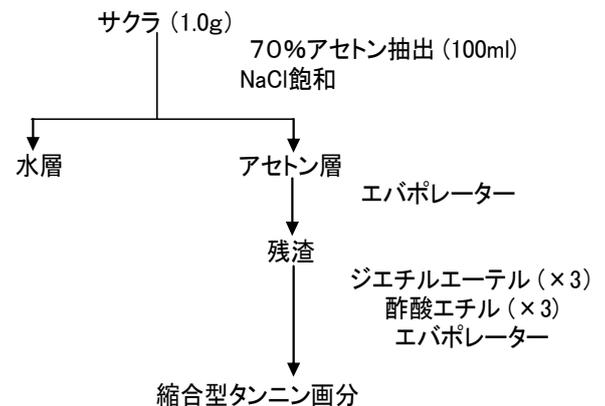


図-1 縮合型タンニンの分離手順

表-1 増殖抑制試験の試験条件

試験容器	500ml三角フラスコ(回分式)
試験株	<i>Microcystis aeruginosa</i> (NIES102)
培地	M-11
初期細胞濃度 (cells/ml)	3.0×10^5
単位細胞に掛かる縮合型タンニン負荷量 ($\times 10^9$ cells/ml)	抽出液系 14 縮合型タンニン画分系 14
照明	3000lux (明:16時間 暗:8時間)

キーワード アオコ, 増殖抑制, タンニン, 枯葉, ポリフェノール

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 TEL 03-3259-0673

3. 結果及び考察

表-2 に抽出液中及び縮合型タンニン画分中の縮合型タンニン濃度と総ポリフェノール濃度、及び縮合型タンニン/総ポリフェノール比 (%) を示す。その結果、抽出液中の総ポリフェノール濃度は 1.20 (mg/ml) であり、縮合型タンニン濃度は 0.132 (mg/ml) であった。一方、縮合型タンニン画分では総ポリフェノール濃度は 0.725 (mg/ml) であり、縮合型タンニン濃度は 0.391 (mg/ml) であった。縮合型タンニン/総ポリフェノール比はそれぞれ抽出液で約 11%、縮合型タンニン画分では約 54% となり、分離精度については今後検証が必要ではあるが分離作業によって総ポリフェノールに対する縮合型タンニンの比率が増加することが確認された。

図-2 には試験期間中の各系における細胞濃度の経日変化を示す。この結果によれば、Control では試験開始後 4 日目には対数増殖期が終了する傾向にあり、抽出液系及び縮合型タンニン画分系ではいずれも試験期間中増殖は抑制される傾向にあった。そこで、Control が対数増殖期であった試験開始 4 日間に着目し、抽出液系及び縮合型タンニン系における増殖抑制率を式-1 によって算出した結果を表-3 に示す。抽出液添加系及び縮合型タンニン画分系の増殖抑制率はどちらも Control の増殖量に対して 95% 程度であった。

4. まとめ

本検討で得られた知見を以下にまとめる。

- 1) 枯葉試料から増殖抑制因子であると考えられる縮合型タンニンの分離を試みた。その結果、分離精度については更なる検証が必要であるが、総ポリフェノールに対する縮合型タンニンの比率は 11% から 54% へ増加した。
- 2) 得られた縮合型タンニン画分を用いて増殖抑制試験を行ない増殖抑制効果の検討を行った結果、縮合型タンニン画分系は抽出液系と同程度の増殖抑制率を示した。

これらのことから、縮合型タンニンは有毒藍藻の増殖抑制因子の一つである可能性は高いと考えられた。

参考文献

1) 佐藤ら (1996) 上水道における藻類障害 pp.1-22 技報堂出版 2) 笹尾ら (2001) 陸水学雑誌 Vol.62 pp.115-122 3) NAKAI, et al (2000) *Water Research* Vol. 34 No. 11 pp.3026-3032 4) 喜多村ら (2006) 第61回土木学会年次学術講演会 CD-ROM 5) 喜多村ら (2005) 日本水処理生物学会誌別巻 Vol. 25 p. 106 6) 喜多村ら (2006) 環境工学研究論文集 vol43 pp543-549 7) 荒川ら (2001) 日本薬学会年会講演要旨集, pp. 150 8) 大久保ら (1998) 感染症学雑誌, Vol. 72, No. 3, pp. 211-217, 1998 9) 久保ら (1992) 富山薬研年報 No. 19 pp. 82-87 10) Richard ら (1978) *J.Sci.Fd Agric* Vol29 pp788-794 11) 真部孝明 (2003) フローチャートで見る食品分析の実際-植物性食品を中心に-, pp. 79-83

表-2 総ポリフェノール及び縮合型タンニンに関する分析結果

	総ポリフェノール (mg/ml)	縮合型タンニン (mg/ml)	縮合型タンニン/総 ポリフェノール比 (%)
抽出液	1.20	0.132	11
縮合型タンニン画分	0.725	0.391	54

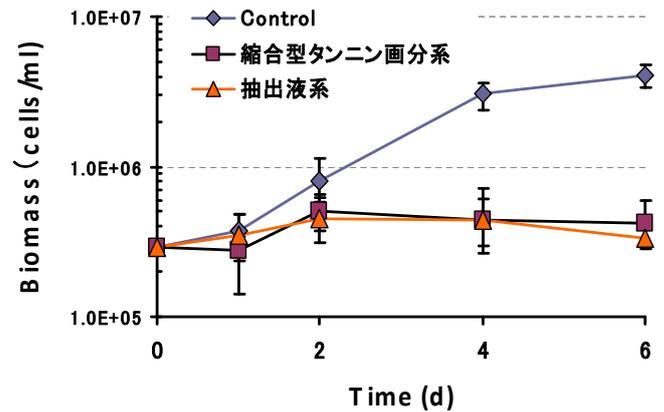


図-2 各試験系の細胞濃度の経日変化

式-1 増殖抑制率の算出式

$$\text{増殖抑制率} = \frac{\Delta \text{Control}_4 - \Delta \text{添加系}_4}{\Delta \text{Control}_4} \times 100(\%)$$

△Control₄ : Control の試験開始 4 日後の細胞増殖量 (mg/ml)

△添加系 : 抽出液および縮合型タンニン画分添加系の試験開始 4 日後の細胞増殖量 (mg/ml)

表-3 各系における 4 日目の細胞濃度と増殖抑制率

	試験系		
	Control	抽出液系	縮合型タンニン画分系
4日後細胞濃度 (cells/ml)	3107422	442188	440972
増殖抑制率 (%)		95	95