

アロエベラ による *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制効果

日本大学大学院 学生会員 ○平井 祐輔, 島田 浩司

日本大学理工学部土木工学科 正会員 喜多村 延政, 吉田 征史, 松島 眸

1. 背景・研究目的

近年, 内陸湖沼は富栄養化により, アオコは大量発生し, 景観破壊や有毒藍藻類が生成する毒性物質などの水資源利用上の様々な問題を抱えている. これまでに本研究室では, 落葉広葉樹の枯葉の水抽出液によるアオコの増殖抑制効果を確認し, その抑制因子としてポリフェノールの一種である縮合型タンニンの関連が示唆された. しかし, アオコの問題は落葉広葉樹の枯葉が入手しづらい熱帯や乾燥帯でも顕在である. そこで, 熱帯や乾燥帯で分布域が広い常緑植物や多肉植物の利用可能性を考え, 今回はその中でも地中海沿岸, 北米の一部から南米の一部にかけてと東南アジア周辺に多く分布するアロエベラに着目した. 落葉広葉樹の枯葉同様に縮合型タンニンを指標としてアオコの増殖抑制作用を示すか検討し, さらにその要因も落葉広葉樹の枯葉同様に縮合型タンニンの関連が示唆されるかについて検討することを目的とした.

2. 試験方法

2. 1 アオコの培養

国立環境研究所より分譲された *Microcystis aeruginosa* (NIES 102 株; 以下 *M.a.*と表記) を培養株として用いた. 培養は, 温度 28 °C に設定したインキュベーター内で行い, マグネチックスターラーで連続緩速攪拌しつつ, 白色蛍光灯にて照度 2500lux (明暗周期は明: 16h, 暗 8h で照射), 7 日間の条件で培養し, 試験に用いた.

2. 2 アロエベラ溶液の作成

市販のアロエベラの葉を外皮部と葉肉部に分割し, その外皮部に D. I. 水を 1:10~25 (w/v) の割合で混合し, ミキサーにて破碎 (21000rpm, 30~60sec) 後, ガラス繊維ろ紙, メンブレンフィルター (0.45 μm) の順でろ過したろ液をアロエベラ溶液とした.

2. 3 縮合型タンニン画分 (Condensed Tannin Fraction; CTF) の作成

2.2 項で作成したアロエベラ溶液には様々な成分が含まれるため, 縮合型タンニンが増殖抑制因子の主たる要因であるかを確認する目的で, CTF の作成を行った. CTF の作成は図 1 の手順 (丹野ら (1974) の方法) に従った. 得られた CTF は 100 (ml) にメスアップし, 残渣も CTF の効果の対照系として試験に用いた.

2. 4 バルバロイン水溶液の作成

縮合型タンニン以外の抑制因子を検討する目的で, アロエ類特有の成分の一種であるバルバロイン ((98%) HPLC: 和光純薬(株)製) について検証を行った. アロエ類特有の成分には抗菌作用があることが知られている. 水溶液の作成は, バルバロインが 0.2 (mg/ml) となるように純水で溶かし, 試験に用いた. なお, バルバロインの分析には HPLC を用いた.

2. 5 増殖抑制試験

滅菌した M-11 培地に, 前述の培養液を *M. a.* の初期細胞密度が 3.0×10^5 (cells/ml) となるように混合した後, アロエベラ溶液, CTF, バルバロイン水溶液を適宜試験目的に応じて各々添加した. 添加量は *M. a.* 単位細胞当りの負荷量変動するようにした. なお, 溶液中の縮合型タンニンの分析は食品分析法に基づくバニリン-硫酸法によってカテキン換算値として定量した. また, 抑制効果の比較対照系として植物由来成分を添加しない Control 系を用意し, 各々細胞密度の変化から抑制効果を評価した. 細胞密度の計測は Thoma 式血球計算盤を使用し, 直接顕微鏡下で経時的に細胞数を計測した.

3. 結果および考察

3. 1 アロエベラ溶液を用いた増殖抑制試験

キーワード: アオコ, アロエベラ, 縮合型タンニン

連絡先〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14 TEL 03-3259-0673

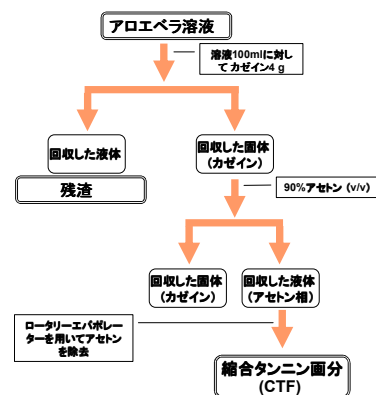


図 1 固相吸着法による CTF の作成

アロエベラ溶液を用いた試験から得られた増殖抑制効果の程度を増殖抑制率として以下の式から算出した。

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

試験中における増殖抑制率の最大値を最大増殖抑制率とし、100%を上限としてそれ以上も100%と同様に扱った。図2は最大抑制率と縮合型タンニン負荷量(Condensed Tannin Loading Intensity; CTLI: pg/cell)の関係を表しており、アロエベラ溶液と既往の研究結果であるサクラ枯葉の水抽出液から得られた結果である。アロエベラの抑制効果はサクラ枯葉より低いCTLIで強く発現する傾向がみられた。このことから、アロエベラによる抑制効果は、サクラ枯葉と組成が異なる縮合型タンニンや縮合型タンニン以外の影響が可能性として考えられる。そのため、アロエベラ溶液から縮合型タンニンの分離を試みた。

3. 2 CTFと残渣を用いた増殖抑制試験

2.3に述べた方法に従って分画を行い、CTFと残渣を得た。しかし、得られた残渣には、基となったアロエベラ溶液とほぼ同程度の縮合型タンニンが残存してしまったことからカゼインに吸着されなかった可能性が考えられ、その結果CTFは逆に縮合型タンニンをあまり含まないものとなってしまった。これらを用いた増殖抑制試験の結果を図3に示すが、やはりCTFの抑制効果は弱く、また、残渣ではアロエベラ溶液を上回る強い抑制効果が示された。なお、縮合型タンニンの分画をサクラ枯葉とアロエベラを用いて其々複数回行ったところ分画精度に異なる傾向が観察された。このため、サクラ枯葉と組成が異なる縮合型タンニンなのか、縮合型タンニン以外の抑制因子であるのか特定するには至らず、分画方法を含めて今後再検討が必要である。

3. 3 バルバロイン水溶液を用いた増殖抑制試験

バルバロインは、アロエベラ溶液を分析した際に0.01(mg/ml)程度が検出され(表1)、バニリン-硫酸法では反応が確認されない(縮合型タンニンではない)成分である。そのバルバロイン水溶液を用いて増殖抑制試験を行った結果、抑制効果を確認できた(図4)。この効果は、最大抑制率で77%となり、従来の縮合型タンニンを指標とした図2において1.5(pg/cell)程度の縮合型タンニン負荷量に相当する効果であった。このため、抑制効果の一因としてバルバロインの関与も考えられるが、図4の試験におけるバルバロイン添加量は、今まで試験に用いてきたアロエベラ溶液に含まれる量の試算結果と比較すると、約12倍の濃度、負荷であったため、アロエベラ溶液による抑制効果の主たる要因かどうかはさらなる検証を要する。

4. まとめ

アロエベラを用いた *M.a* の増殖抑制試験を検討した結果、縮合型タンニンを指標とした既往のサクラ枯葉より強い抑制効果が観察され、サクラ枯葉と組成が異なる縮合型タンニンや縮合型タンニン以外の抑制因子の可能性も示唆された。そこで、縮合型タンニンが抑制因子の主たる要因であるかを確認するためCTFと残渣を用いて抑制試験を行ったが、縮合型タンニンが十分に分離できず残渣に残存したことから、サクラ枯葉と組成が異なる縮合型タンニンなのか、縮合型タンニン以外の抑制因子なのかを特定することはできず、分画方法を含めて今後見直す必要がある。また、縮合型タンニン以外の抑制因子として、アロエ類特有の成分であるバルバロインを用いて抑制試験を行った結果、抑制効果は確認されたが、その際の添加量が従来のアロエベラを用いた試験系と比較して濃度、負荷が約12倍高かったため、アロエベラ溶液による抑制効果の主たる要因であるかどうかは、今後さらなる検証が必要である。

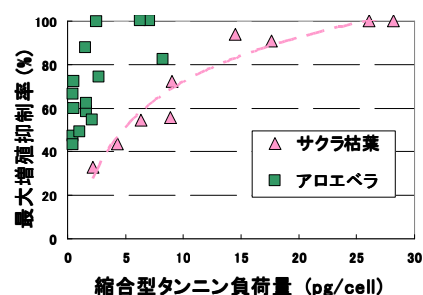


図2 最大増殖抑制率と縮合型タンニン負荷量

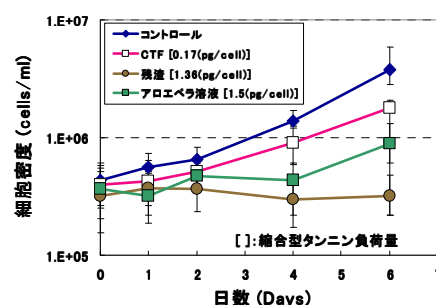


図3 CTFと残渣を用いた増殖抑制試験

表1 アロエベラ溶液中のバルバロイン濃度

アロエベラ溶液	
バルバロイン濃度 (mg/ml)	0.010

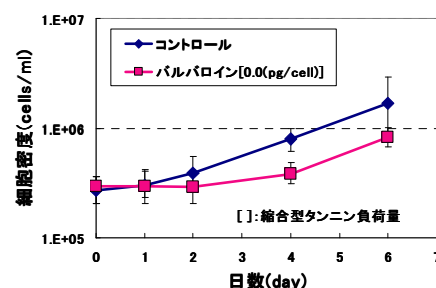


図4 バルバロイン水溶液を用いた増殖抑制試験