

枯葉由来のタンニン類による有毒藍藻類ミクロキスティスの細胞膜破壊についての検証

日本大学大学院理工学研究科 学生会員・〇島田浩司

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

日本大学理工学部一般教育 非会員・浅田泰男

1. 研究背景および目的

近年、青酸カリの 60 倍以上の毒性物質を生産する有毒藍藻類ミクロキスティス(以下、*M.a.*)が、水道水源に利用されている淡水系湖沼などの富栄養化により大量に発生し、水資源価値の低下や家畜および人への被害などを引き起こし、世界的な問題となっている。したがって、有毒藍藻類の増殖抑制対策は水資源確保ならびに環境保全の観点から重要な課題であると言える。近年では、植物由来のポリフェノール成分が *M.a.* の増殖を抑制することが報告され¹⁾ 注目を浴びている。そこで我々は、植物学的にポリフェノールを多く含有している都市街路樹の枯葉に着目した。枯葉を水に浸漬させて成分を溶出させた溶液(以下、抽出液)を *M.a.* に添加し、その後の *M.a.* の細胞数の経日変化を観察して増殖抑制効果の検討を行った。その結果、抽出液に含有されるポリフェノールの一種である縮合型タンニンの単位細胞当りの負荷量の増大に伴い *M.a.* の増殖が抑制されることが明らかとなった²⁾。しかしながら、*M.a.* の増殖抑制メカニズムは未だ明らかではない。一方、縮合型タンニンの一種であるエピガロカテキンガレートがグラム陰性菌の細胞膜を破壊する³⁾との報告があり、*M.a.* もグラム陰性菌に分類されることから、抽出液に含有されている縮合型タンニンが *M.a.* の細胞膜を破壊する可能性が考えられる。もし、*M.a.* の細胞膜が破壊されるのであれば、*M.a.* 細胞内に含有している細胞内有機物質やミクロシスチン(以下、MC)が細胞外へ溶出するため、細胞減少量と細胞内物質の溶出量とに相関関係があると考えられる。そこで本報では、細胞減少量に伴う細胞内物質の溶出を MC 濃度の増加量として計測し、抽出液添加による *M.a.* の細胞膜破壊について検討を行った。

2. 試験方法

供試藻類は国立環境研究所から分譲された *M.a.* (NIES102 株)を、M-11 培地で十分生育させたものを使用した。枯葉は東京都内の住宅地近傍で採取し、風乾状態で保存したサクラの枯葉を食品用ミキサーで破碎して使用した。また、抽出液は破碎した枯葉と蒸留水が 5.0g:100mL の割合となるように混合し、室温で一晩静置した後 0.22 μ m のメンブレンフィルターで無菌ろ過して作成した。試験系は、抽出液成分が試験溶液中に含まれていると MC 分析の妨害となるため、抽出液添加 3 時間後に蒸留水にて洗浄し抽出液成分の除去を行った系(既往の試験結果より、*M.a.* と抽出液成分が 3 時間以上接触すれば、十分に増殖が抑制されることが確認されている⁴⁾)を抽出液添加系とし、一方は抽出液無添加系とした。また、両系は細胞死滅のみの評価を行うため、暗条件にて光合成を抑制、 N_2 ガスを注入して嫌気条件とし呼吸を抑制、更に蒸留水にて洗浄し無基質状態にした。また、試験期間中は 28°C に設定したインキュベーター内で緩やかに攪拌した。なお、Thoma 式血球計算盤を用いて細胞数の計測を行い、抽出液内の縮合型タンニン濃度はバニリン硫酸法によりカテキン換算量として定量した。

表.1 HPLC の分析条件

また、試験溶液中の MC 濃度は、試験溶液を回収し 0.45 μ m のメンブレンフィルターにてろ過したサンプルを高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)を用いて定量した。なお、表.1 に HPLC の分析条件を示した。また、今回用いた *M.a.* は MC-LR、YR、RR の三種類を生産する株であるが、これらの合計値を MC 濃度として定量した。

System	Ultimate 3000 (DIONEX)
Column	ODS-3d4.6mm $\times$ 150mm (GL science)
Column temp.	40°C
Eluent	50mM NaH ₂ PO ₄ (pH=3 [H ₂ PO ₄]) : MeOH=4:6
Flow rate	1.0mL/min
Wavelength	240nm
Injection Volume	20 μ L

3. 試験結果および考察

図.1 に抽出液無添加系、図.2 に抽出液添加系の細胞数と試験溶液中の MC 濃度の経日変化を示す。まず、両系

キーワード ミクロキスティス, 細胞膜破壊, 枯葉, タンニン, ポリフェノール

の 5 日目までの細胞数を見ると、無添加系では細胞数が緩やかに減少し、添加系では無添加系に比べて明らかに細胞数が減少した。これは抽出液添加によって細胞が死滅したためであると考えられる。一方、5 日目以降の無添加系の細胞数は著しく低下した。これは *M.a.* が暗条件、嫌気条件、無基質状態下に長期間置かれたことで活性が低下し、細胞死に至ったためであると考えられる。しかし、上記の条件(暗、嫌気、無基質)に加え、抽出液が添加された系(抽出液添加系)の5日目以降の細胞減少量は、同期間の無添加系の場合よりも少なくなったが、この要因は明らかではない。次に、MC 濃度の経日変化を見ると、抽出液添加系、無添加系ともに試験溶液中の MC 濃度が細胞数の低下に伴い増加する傾向が確認された。また、抽出液添加系および無添加系の細胞減少量当りの MC 溶出量を算出すると、抽出液無添加系は 0～5 日間で 55fg/cell、5～10 日間で 49 fg/cell、10～15 日間で 36fg/cell となり、抽出液添加系は 0～5 日間で 46fg/cell、5～10 日間で 18fg/cell、10～15 日間で 11fg/cell と算出され、両系で多少の差が見られた(表.2)。この差は本報で行った細胞数の計測方法が含む分析誤差や、試験溶液中の MC の分解、または、継続的な無基質状態による藻体中の MC 含有量が低下した可能性により、両系の細胞減少量当りの MC 溶出量の算出に影響を与えた可能性が考えられた。これらの点を考慮すると、抽出液添加系の 5 日目以降の細胞数の挙動は、試験溶液中の MC 濃度増加量から判断すると妥当な結果であると考えられる。以上より、抽出液添加の有無に関わらず細胞死によって MC が細胞外へ溶出した可能性が示唆された。今後は、MC が細胞死以外で細胞外へ溶出する可能性について検討するため、*M.a.* を増殖させた場合の試験溶液中の MC 濃度の経日変化を測定し、細胞死以外の MC の細胞外溶出についても検討する必要がある。

4.まとめ

M.a. を暗条件、嫌気条件、無基質状態に置き、抽出液添加の有無による細胞減少量と MC 濃度増加量を検討した結果、抽出液添加の有無に関わらず細胞減少量当りの MC 溶出量は概ね一致した。しかし、細胞減少量当りの MC 溶出量が経過日数に伴い低下する傾向を示した。よって、今後 MC が分解される可能性や、継続的な無基質状態による藻体中の MC 含有量が低下するかを検討する必要があるものの、細胞減少量当りの MC 溶出量や細胞減少量と試験溶液中の MC 濃度の増加傾向から評価すると、*M.a.* が死滅することで細胞内の MC が細胞外へ溶出。つまり、抽出液が *M.a.* の細胞膜を破壊している可能性が考えられる。

参考文献

1) Nakai S, et al., (2000). Water Research, 34 (11), pp.3026-3032. 2) 喜多村ら (2006)環境工学研究論文集 42, pp543-549 3) 生貝ら (1998)日本化学療法学会雑誌 46 (5), pp.179-183. 4) Shimada K, et al., (2009). The 3rd ASPIRE-IWA Conference and Exhibition CD-ROM, oral-STD8-0-2

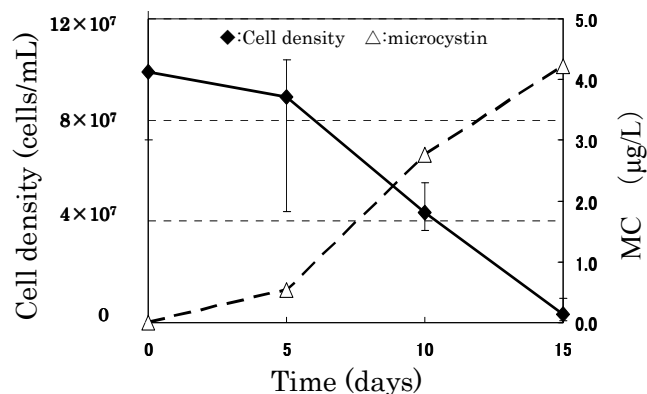


図.1 抽出液無添加系

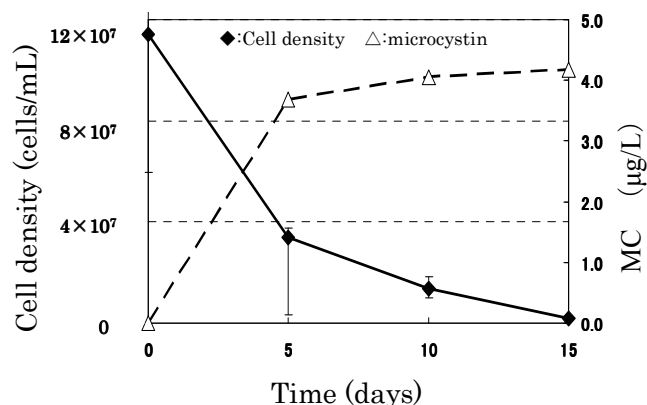


図.2 抽出液添加系

表.2 細胞減少量当りの MC 溶出量の経日変化

抽出液無添加系		抽出液添加系	
計測期間	MC含有量	計測期間	MC含有量
Day	fg/cell	Day	fg/cell
0~5	55	0~5	46
5~10	49	5~10	18
10~15	36	10~15	11