Pseudokirchneriella subcapitata を用いた抗生物質の生態影響に関する基礎的研究

岩手大学　学生会員　○川上 北斗, 八木 聡
岩手大学　正会員　伊藤 歩, 石川 奈緒, 海田 輝之

１．序論

近年，環境水中において医薬品の存在が確認されており，水域生態系への悪影響が懸念されている．しかし，これらの医薬品の水生生物に与える影響に関する情報は未だ少なく，医薬品による水域生態系への影響は解明されていないのが現状である．

以上の背景から，本研究では生産者として水域生態系を支える藻類に対する医薬品の影響を調査するため，淡水産単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* を被験生物として用い，岩手県で家畜への使用量が多い 5 種類の抗生物質 [1]について，それぞれの単独短期毒性試験と抗生物質の組み合わせによる複合短期毒性試験を行うことにより水環境中の医薬品の藻類に対する影響を調査した．

２．実験方法

本研究では国立環境研究所微生物系統保存施設から入手した *Pseudokirchneriella subcapitata*(NIES-35)を被験生物として使用し，短期毒性試験に使用する対数増殖期の藻類を得るため，事前に前培養を行った．表-1，2 に前培養および単独短期毒性試験の方法を示す [2]．また，2 種の抗生物質の組み合わせについて前培養や試験中の培養条件を変えず，複合短期毒性試験を行った．表-3 に複合短期毒性試験の方法を示す．後述する EC_{50}=1Toxic Unit(=TU)とし，濃度を 1TU の 0.5 倍，2 倍と設定して試験を行った．

表-1 前培養条件

培地	C90培地
培養温度	25℃の恒温室内
光源	照度4000lxの蛍光灯
明暗サイクル	12時間：12時間
培養期間	3～4日間

表-2 単独短期毒性試験

初期細胞数	1.0×10^4cells/mL
測定時間	0h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h後
試験濃度	対照区，10μg/L，50μg/L，100μg/L，1mg/L，10mg/L
試験区	3連区
試験成立条件	対照区の細胞数が72時間時点で16倍以上増加
培養温度	前培養と同様
光源	
明暗サイクル	サイクルなしの連続照射

表-3 複合短期毒性試験条件

抗生物質	TU(=Toxic Unit)						
オキシテトラサイクリン	0	1	0	0.5	2	0	1
リンコマイシン塩酸塩	0	0	1	0.5	0	2	1

表-4 LC-MS/MS 条件

LCシステム	ACQUITY UPLC H-Class
MSシステム	Xevo TQD
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18
移動相A	0.005%ギ酸水溶液
移動相B	メタノール

また，前培養と短期毒性試験に使用した実験器具と培地，試験溶液はあらかじめ 121℃，15 分間オートクレーブで滅菌し，藻類の植種はクリーンベンチ内で無菌的に行った．試験溶液は LC-MS/MS（WATERS 社製）を用いて抗生物質濃度の確認試験を行った．表-4 に LC-MS/MS 装置および各移動相の条件を示す．設定濃度と測定値との誤差は 0.28%から 18.9%であった．

３．結果および考察

(1)単独短期毒性試験の結果

単独短期毒性試験の結果を図-1 と 2，本研究で用いた 5 種の抗生物質の薬理作用 [3]を表-5 に示す．図-1 に例としてオキシテトラサイクリン暴露時における時間ごとの藻類細胞数の相対濃度を示す．

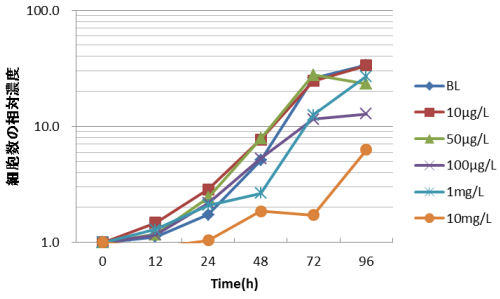

図-1 オキシテトラサイクリンにおける時間ごとの藻類細胞数の相対濃度

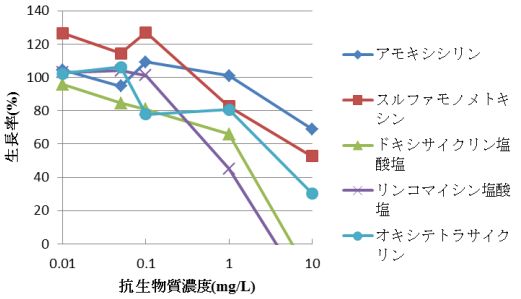

図-2 各抗生物質の濃度ごとの生長率

キーワード　抗生物質，毒性影響，EC50，Toxic Unit　連絡先：岩手大学(盛岡市上田 4-3-5 TEL:019-621-6449)

オキシテトラサイクリンは50μg/Lまで対照区とほとんど同様の生長を見せたが，100μg/L以上の濃度で生長阻害が確認された．

表-5 使用した5種の抗生物質の薬理作用

医薬品名	菌への阻害作用機序	殺菌的/静菌的
アモキシシリン	細胞壁合成阻害	殺菌的
オキシテトラサイクリン	タンパク質合成阻害	静菌的
ドキシサイクリン塩酸塩	タンパク質合成阻害	静菌的
リンコマイシン塩酸塩	タンパク質合成阻害	静菌的
スルファモノメトキシン	葉酸合成過程抑制	静菌的

図-2は各抗生物質における対照区の生長率を100%としたときの各抗生物質濃度の生長率の割合を示したものである．生長率は以下に示す方法で求めた．図-1より各抗生物質濃度において藻類細胞数が直線的な増加を示す期間をΔt, Δt中の各抗生物質濃度における細胞数の対数増加量をΔNとし，$\Delta N/\Delta t$より増殖速度rを求める．各抗生物質の対照区の増殖速度r_1を同様に求め，r/r_1より各抗生物質濃度における生長率を算出した．図-2より，全抗生物質において濃度の増加に伴う生長阻害があることが確認された．しかし，アモキシシリンのみ抗生物質濃度が1mg/Lの時点で生長阻害がほとんど見られず，生長率が対照区と比較し50%になる半数影響濃度EC_{50}は10mg/Lを大きく超える濃度であった．また，アモキシシリンより濃度は低いが，スルファモノメトキシンのEC_{50}も10mg/L以内では確認されなかった．

以上の結果より*P.Subcapitata*に対する毒性影響はアモキシシリンが最も弱く，次点がスルファモノメトキシンであり，他の3種の抗生物質は比較的毒性影響が強いと考えられる．表-5より各抗生物質の薬理作用を考慮すると，*P. Subcapitata*に対する抗生物質単体の毒性影響に関し，菌に対して静菌的に作用するものに比べ殺菌的に作用するものの毒性影響は弱いと考えられる．さらに静菌的に作用する抗生物質の中でもタンパク質合成を阻害するものに比べ葉酸合成を抑制するものの毒性影響は弱いと考えられる．

(2)複合短期毒性試験の結果

(1)の結果より，リンコマイシン塩酸塩とオキシテトラサイクリンのEC_{50}(=1TU)をそれぞれ1mg/L，1.8mg/Lと設定し，複合短期毒性試験を行った．図-3，4に複合短期毒性試験の結果を示す．図-3は各試験溶液における時間ごとの藻類細胞数の相対濃度，図-4は72時間後の対照区の藻類細胞数を100%としたとき，各試験溶液における72時間後の藻類細胞数の割合を示したものである．図-4より，2種の抗生物質の合計TU値が等しい場合，1TU，2TUともに各抗生物質単体の条件に比べ2種の抗生物質を複合した条件の72時間後の藻類細胞数が多いことが確認された．また，TU値が1である各抗生物質単体の条件に比べ各抗生物質のTU値を1とし，合計TU値が2となるように複合した条件の72時間後の藻類細胞数が多いことが確認された．以上の結果より，オキシテトラサイクリンとリンコマイシン塩酸塩に関し，各抗生物質単体の条件に比べそれぞれを複合させた場合*P.Subcapitata*に対する毒性影響は緩和される傾向があると考えられる．

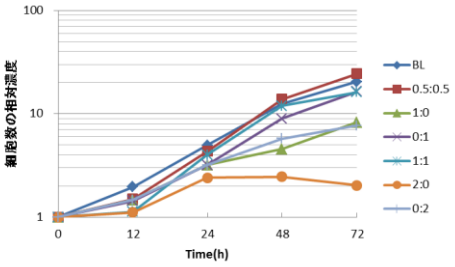

図-3 各TU値における時間ごとの細胞数の相対濃度

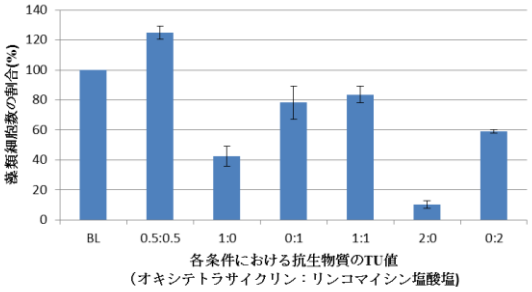

図-4 各TU値における72時間後の藻類細胞数

4．まとめ

短期毒性試験の結果より，抗生物質単体の毒性影響には各抗生物質の薬理作用が関与していることが考えられた．また，複合毒性影響に関してはメカニズムの解明等，今後さらなる研究が必要である．

参考文献

1)社団法人日本動物用医薬品協会　動物用医薬品，医薬部外品及び医療機器製造販売高年報　(2012年)
2)日本環境毒性学会/畠山成久ら著　生態影響試験ハンドブック　朝倉書店　(2003年)
3)田中信男著　抗生物質の作用メカニズム　東京大学出版会　(1981年)