

緑藻を指標とした抗菌性物質の生態影響に関する基礎的研究

岩手大学 学生会員 ○藤原拓真, 八木聡
岩手大学 正会員 石川奈緒, 伊藤歩, 海田輝之

1. はじめに

日本では畜産において多量の医薬品が使用されている。家畜に投与した医薬品の一部は完全に代謝されず、糞尿を介して水環境中に放出されてしまうため、水域生態系への悪影響が懸念されている。しかし、医薬品の水域生態系への影響について未だ解明されていないのが現状である。

以上の背景から、本研究では水域生態系を生産者として支えている藻類に対する医薬品の影響を検討した。淡水産単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* を被験生物として用いて、医薬品の系統別に使用量が多い 6 種類の抗菌性物質¹⁾について、それぞれ単独短期毒性試験と 2 種類の抗菌性物質を組み合わせた複合短期毒性試験を行い、水環境中での藻類に対する医薬品の影響を検討した。

2. 実験方法

本研究では被験生物として *Pseudokirchneriella subcapitata*(国立環境研究所微生物系統保存施設、NIES-35)を用いた。表-1 に使用した抗菌性物質を示す。短期毒性試験の前に藻類の前培養を行った。短期毒性試験は OECD 化学テストガイドラインの藻類成長阻害試験²⁾に準拠した方法で行った。

表-1 使用した抗菌性物質

抗菌性物質名	分子式	作用機序
タイロシン	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	タンパク質合成阻害
セファゾリン	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S	細胞壁合成阻害
エンロフロキサシン	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	核酸合成阻害
オキソリン酸	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	DNA複製阻害
トリメトプリム	C ₁₄ H ₅ N ₄ O ₃	葉酸合成阻害
リンコマイシン塩酸塩	C ₁₈ H ₃₅ ClN ₂ O ₆	タンパク質合成阻害

表-2 に単独短期毒性試験の試験条件を示す。また、前培養および毒性試験中の藻類の培養条件を変えずに 2 種類の抗菌性物質(リンコマイシン塩酸塩、エンロフロキサシン)を組み合わせた複合短期毒性試験の試験条件を表-3 に示す。

複合短期毒性試験では EC₅₀ を 1 Toxic unit(=TU)とし、1 TU の濃度を 0.5 倍、2 倍した 0.5 TU、2 TU を組み合わせて設定濃度とし、試験を行った。

表-2 単独短期毒性試験条件

初期細胞濃度	約 10 ⁴ cells/mL
試験期間	96時間
試験連数	3連
溶解助剤	オキソリン酸のみ NaOH 50mg/L
設定濃度	対照区, 10μg/L, 50μg/L, 100μg/L, 1mg/L, 10mg/L
温度	25°C
照明	4000lux
試験成立条件	対照区の濃度が72時間で16倍以上増加

表-3 複合短期毒性試験条件

リンコマイシン塩酸塩(TU)	0	0.5	1	0	1	2	0	2
エンロフロキサシン(TU)	0	0.5	0	1	1	0	2	2
合計TU値	0	1	1	1	2	2	2	4

前培養、短期毒性試験に用いる培地、実験器具、試験溶液は 121°C、15 分間オートクレープで滅菌し、藻類の植種はクリーンベンチ内で無菌的に行った。試験溶液中の抗菌性物質の濃度は、LC-MS/MS (Waters 社製) によって測定し濃度の確認を行った。表-4 に LC-MS/MS の装置および移動相の条件を示す。

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
カラム温度	50°C
移動相A	0.005% ギ酸水溶液
移動相B	メタノール

3. 結果及び考察

(1)短期毒性試験結果

設定濃度に対して測定した抗菌性物質の濃度の誤差は-9.8%から+9.0%であった。

図-1 に例としてエンロフロキサシンの短期毒性試験結果を示す。100 μg/L までは対照区と同様の成長を示した。1 mg/L 以上で阻害作用が見られ、10 mg/L で特に強い阻害作用が見られた。

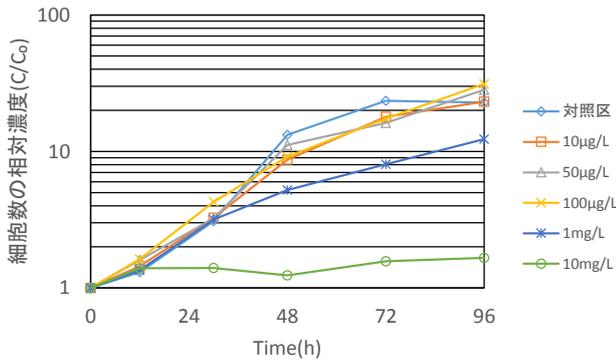


図-1 エンロフロキサシンにおける細胞数の経時変化

平均成長速度 μ 、阻害率 I は以下の方法で求めた。図-1 より細胞数が直線的に増加する期間(t_2-t_1)を定め、その期間内の藻類細胞数を用いて最少二乗法により直線式を求め、直線式の傾きを平均成長速度 μ とした。平均成長速度 μ を用いて阻害率 I を以下の式より求めた。

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

t_2-t_1 : 藻類細胞数が対数増殖を示す期間
 N_1 : t_1 時の実測細胞数濃度 (cells/mL)
 N_2 : t_2 時の実測細胞数濃度 (cells/mL)

$$I = \frac{\mu_0 - \mu}{\mu_0} \times 100$$

μ_0 : 対照区の平均成長速度
 μ : 各濃度区の平均成長速度

図-2 に各抗菌性物質の濃度ごとの阻害率を示す。図-2 より阻害率 50%に当たる濃度を EC_{50} とした。表-5 に各抗菌性物質の EC_{50} を示す。セファゾリン、オキシリン酸、トリメトプリムは、本実験条件の 10 mg/L 以下では EC_{50} は求められなかったため、他の物質に比べ毒性が低いと考えられる。

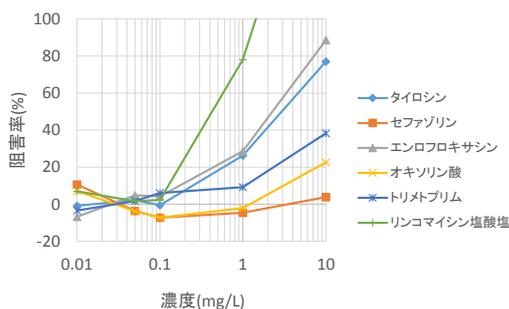


図-2 各抗菌性物質の濃度ごとの阻害率

表-5 各抗菌性物質の EC_{50}

抗菌性物質名	EC_{50} (mg/L)
タイロシン	2.9
セファゾリン	>10
エンロフロキサシン	2.1
オキシリン酸	>10
トリメトプリム	>10
リンコマイシン塩酸塩	0.42

(2) 複合短期毒性試験結果

(1)の結果からリンコマイシン塩酸塩、エンロフロキサシンの EC_{50} (=1TU)をそれぞれ 0.42mg/L、2.1mg/L とし複合短期毒性試験を行った。

リンコマイシン塩酸塩、エンロフロキサシン 1TU の設定濃度に対して測定した濃度の誤差は+15.7%、-1.6%であった。単独短期毒性試験と同様に平均成長速度 μ 、阻害率 I を求めたのち、成長率 $G=100-I(\%)$ を算出した。図-3 に各試験条件の成長率を示す。

図-3 より合計抗菌性物質の TU 値が高くなるほど成長率が低くなることが確認された。また、合計 TU 値が 1 の場合、各抗菌性物質の複合および単体での成長率に差はほとんど見られなかった。合計 TU 値が 2 の場合、各抗菌性物質の単体に比べ、複合した場合は成長率がわずかに大きくなり、阻害作用の緩和が見られた。

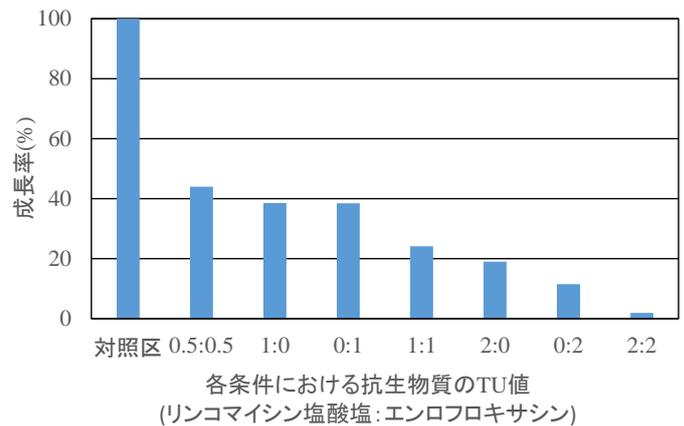


図-3 各試験条件の成長率

4. まとめ

単独短期毒性試験よりタイロシン、エンロフロキサシン、リンコマイシン塩酸塩の EC_{50} はそれぞれ 2.9 mg/L、2.1 mg/L、0.42 mg/L となった。セファゾリン、オキシリン酸、トリメトプリムの EC_{50} は 10 mg/L 以上となった。複合短期毒性試験より合計 TU 値が 2 の場合に抗菌性物質単体に比べ、複合した場合に阻害作用の緩和が見られた。抗菌性物質の組み合わせは多様にあるのでさらなる研究が必要である。

参考文献

- 1) 農林水産省動物医薬品検査所, 動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器製造販売高年報(別冊)平成 24 年,2012.
- 2) 日本環境毒性学会, 生態影響ハンドブック,2003.