

藻類 *P.subcapitata* に対する抗生物質の成長阻害について

岩手大学 学生会員 ○相馬美咲  
 岩手大学 笹本誠  
 岩手大学 正会員 石川奈緒 伊藤歩 海田輝之

## 1. 背景

近年、抗生物質の使用が増大し、水環境中にその存在が確認されている。しかし、これらの抗生物質が水生生物に与える影響についての情報が少なく、抗生物質が複数で存在する場合は、単独で存在する場合に比べ、相乗・相加・拮抗作用のいずれかを示すことが予想されている。本研究では緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* を指標として用い、抗生物質(スルファメトキサゾール(以下 SMZ), タイロシン(以下 TYL))の緑藻に対する生長阻害についての単独、複合影響について検討した。SMZ は豚に対する使用量が多く、TYL は肉用牛、乳用牛に対する使用量が多いことが分かっている<sup>1)</sup>

## 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、緑藻 *P. subcapitata*(NIES-35)を用いた。複合短期毒性試験を始める前に対数増殖期の藻類を得るために前培養を行った。表-1、表-2 に前培養の条件および複合短期毒性試験の条件を各々示した。使用した抗生物質の作用機序、EC<sub>50</sub> 値を表-3 に示す。

表-1 前培養条件

培地	C90培地
培養温度	25°C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 複合短期毒性試験条件

初期細胞濃度	約1.0×10 <sup>4</sup> cells/mL
試験期間	96時間
試験濃度区数	6濃度+対照区
濃度設定(TU)	0:0, 0.5:0.5, 1:1, 1:0, 0:1, 2:0, 0:2
溶解助剤	不使用
使用培地	C90培地
条件	温度：25°C±2°C
	照明：4000lx
測定	0, 24, 48, 72, 96時間後
成立条件	対照区が72時間後に16倍以上増加

表-3 使用した抗生物質の作用機序および EC<sub>50</sub> 値

抗生物質名	作用機序	EC <sub>50</sub> 値(mg/L)
スルファメトキサゾール	葉酸合成阻害	2.2(本研究)
タイロシン	タンパク質合成阻害	2.3

今回の実験では SMZ 単独, TYL と SMZ の 2 種類の組み合わせについて実験を行った。SMZ の EC<sub>50</sub> 値を求めるために、0 μg/L(図の凡例: bl), 500 μg/L, 1,000 μg/L, 5,000 μg/L, 10,000 μg/L で濃度を設定した。また、複合短期毒性試験の濃度設定については、それぞれの抗生物質の EC<sub>50</sub> 値を 1 Toxic Unit(TU)として、各抗生物質が単独で 1 TU 存在する場合と、2 種類の抗生物質の合計 TU が 1 となるように 0.5 ずつ存在する場合に分けて行った。さらに、合計 TU 値が 2 の場合も同様にした。各々6つの濃度設定に対象区を含めた計7条件で4連で行った。細胞濃度は、プランクトン計数板と顕微鏡を用いて計測した。また、前培養、毒性試験に使用した実験器具、培地、試験溶液は 121 °C, 15 分間オートクレーブで滅菌した。試験に用いたサンプルは LC-MS/MS(Waters 社製)で濃度確認を行った。また、統計処理には、統計解析ソフト JMP(SAS 社)を用い、一元配置の分散分析を行った後、ポスト・ホックテストとして Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。

## 3. 結果及び考察

SMZ の単独毒性試験での相対細胞濃度の経時変化を図-1 に示す(縦軸は対数目盛で表示)。相対細胞濃度は 0 h の細胞濃度で各時間の細胞濃度を除して求めた。また、図-2 は以下の式(1)を用いて比生長速度  $\mu(\text{min}^{-1})$  と対照区での  $\mu_0$  を求め、添加した抗生物質濃度と  $\mu/\mu_0$  との関係を示した。

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$t_1$ : 藻類細胞濃度が対数増殖を示した時間(min)

$t_2$ : 藻類細胞濃度が対数増殖を示している任意の時間(min)

$N_1, N_2$ :  $t_1, t_2$  時の細胞濃度 (cells/mL)

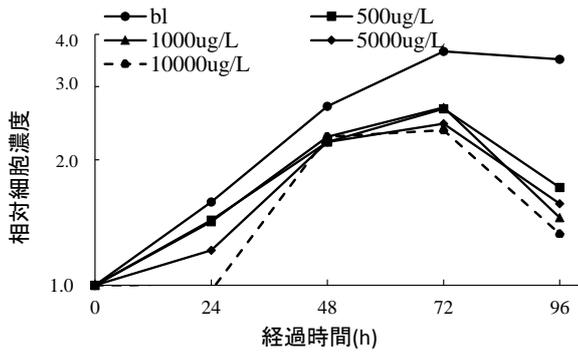


図-1 SMZ 単独試験の相対細胞濃度の経時変化

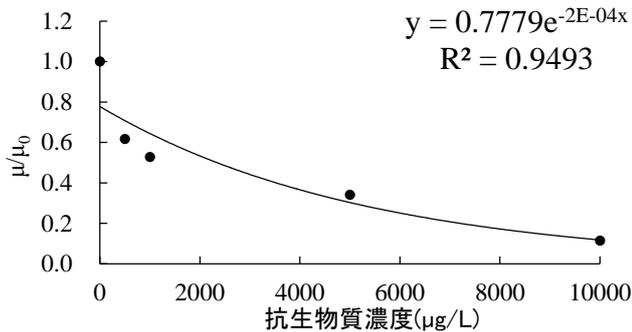


図-2 相対平均生長速度と抗生物質濃度の関係

図-1 より, SMZ を添加することで藻類の生長阻害が生じていることがわかる. 濃度が高ければ阻害も大きくなっている. 次に図-2 の生長速度と抗生物質の濃度の関係から SMZ の EC<sub>50</sub> 値は 2.2 mg/L であった.

次に, この EC<sub>50</sub> 値を用いて, SMZ と既に EC<sub>50</sub> 値が求められている TYL<sup>2)</sup> の複合毒性試験を行った結果を図-3 および図-4 に示す. 図中の 1:0 は SMZ と TYL の TU 値が各々 1 および 0 であることを示す. また以下の(2)式を用いて阻害率 I(%)を算出した.

$$I = \frac{\mu_0 - \mu}{\mu_0} \times 100 \quad (2)$$

$\mu_0$ : 対照区での平均生長速度( $\text{min}^{-1}$ )

$\mu$ : 各濃度での平均生長速度( $\text{min}^{-1}$ )

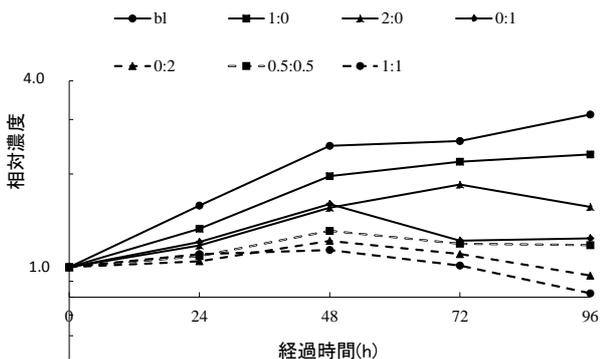


図-3 SMZ-TYL での相対細胞濃度の経時変化

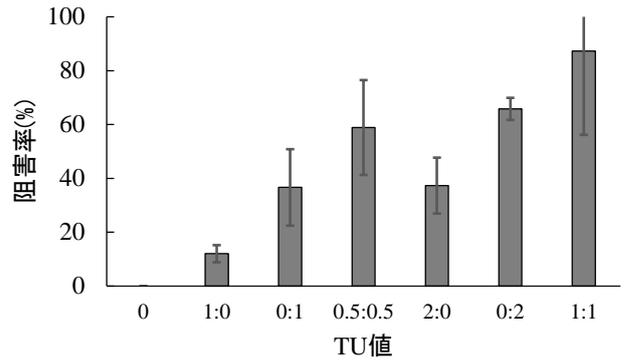


図-4 TU 値と阻害率の関係

TU=1 として EC<sub>50</sub> 値を用いているため, 1:0, 0:1 の場合では阻害率が 50% となることが予想されたが, 特に SMZ においては本実験では 50% に満たない阻害率となった. また, HDS 検定では p 値が 0.05 以下では阻害率に差があるとされ, 1:0 と 0.5:0.5, 2:0 と 1:1 では阻害率に差が表れた.

以上より, SMZ と TYL の組み合わせでは合計 TU 値が 1 および 2 の双方において, 各抗生物質の単独の場合よりも複合の場合の方が阻害率が高くなっていることから, これらの抗生物質は相乗的に作用しているといえる. 細胞は葉酸を自ら作り出して細胞分裂を行うため<sup>3)</sup>, SMZ により葉酸の合成が阻害され, さらに TYL によりタンパク質の合成も出来なかったことで相乗的に増殖が阻害されたと考えられる. このことより, 葉酸合成阻害とタンパク質合成阻害の作用機序を持つ抗生物質は複合で存在すると相乗作用を示す可能性があることが考えられるが今後さらに作用機序について検討する必要がある.

#### 4. まとめ

作用機序が異なる複合毒性試験を行った結果, 今回は相乗作用が見られたが, 異なる抗生物質の組み合わせや, 他の作用機序の組み合わせ, また同じ作用機序の組み合わせなどの複合毒性試験を検討していく必要がある.

#### 参考文献

- 1) 農林水産省 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量(2016)
- 2) 八木 聡ら, 緑藻 *P. subcapitata* への抗菌性物質の単独および複合毒性 水環境学会誌(2015)
- 3) 田中信男・中村昭四朗 著 抗生物質大要 化学と生物活性 (第4版)(1992)