

抗生物質の単独毒性及び複合毒性が藻類に及ぼす影響について

岩手大学 学生会員      ○松浦健太郎 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)、スルファモノメトキシシン(以下 SMM)、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、SMM 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を表-3 に示す。

表-1 前培養条件

|        |             |
|--------|-------------|
| 培地     | C90培地       |
| 培養温度   | 25℃の恒温室内    |
| 光源     | 蛍光灯(4000lx) |
| 明暗サイクル | 12時間毎に明暗    |
| 培養期間   | 3～4日間       |

表-2 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                          |                                                       |  |
| 溶解助剤   | 不使用                           |                                                       |  |
| 使用培地   | C90培地                         |                                                       |  |
| 条件     | 温度：25℃±2℃                     |                                                       |  |
|        | 照度：4000lx                     |                                                       |  |
| 測定     | 0,24,48,72時間後                 |                                                       |  |
| 試験濃度区数 | SMZ・SMM                       | 5濃度+対照区                                               |  |
|        | TYL                           | 4濃度+対照区                                               |  |
|        | 複合                            | 7濃度                                                   |  |
| 濃度設定   | SMZ・SMM                       | 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0mg/L+対照区                      |  |
|        | TYL                           | 0.5, 1.0, 5.0, 10mg/L+対照区                             |  |
|        | 複合(TU)                        | 1:0, 0.8:0.2, 0.6:0.4, 0.5:0.5, 0.4:0.6, 0.2:0.8, 0:1 |  |

表-3 使用した抗生物質の作用機序

|      |           |
|------|-----------|
| 抗生物質 | 作用機序      |
| SMZ  | 葉酸合成阻害    |
| SMM  |           |
| TYL  | タンパク質合成阻害 |

今回の実験では SMZ、TYL、SMM の単独、TYL と SMZ の複合について実験を行った。単独毒性試験の濃度設定は SMZ と SMM の EC<sub>50</sub> 値を求めるため、0

mg/L(図の凡例: BL)から 5.0 mg/L までの 6 段階、TYL は 0 mg/L から 10 mg/L までの 5 段階で濃度を設定した。また、複合毒性試験の濃度設定については、各抗生物質の EC<sub>50</sub> 値を 1 Toxic Unit (TU) とし、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 SMZ と TYL の比率を SMZ : TYL = 1:0, 0.8:0.2, 0.6:0.4, 0.5:0.5, 0.4:0.6, 0.2:0.8, 0:1 とし、試験を行った。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、前培養と毒性試験に使用した実験器具、培地、試験溶液は 121℃、15 分間オートクレーブで滅菌し、試験に用いたサンプル中の抗生物質は LC-MS/MS (Water 社製)で濃度確認を行った。

3. 結果及び考察

SMZ、SMM、TYL の単独毒性試験での相対細胞濃度の経時変化を図-1～3 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求めた。

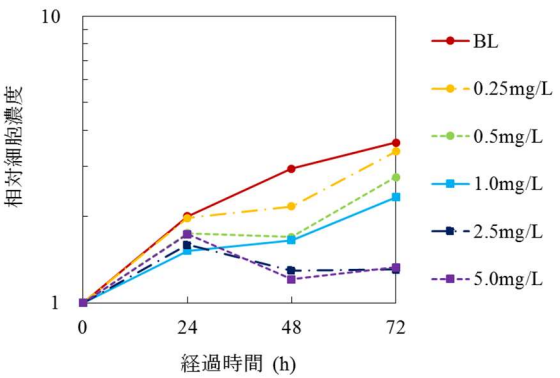


図-1 SMZ 単独毒性試験の相対細胞濃度の経時変化

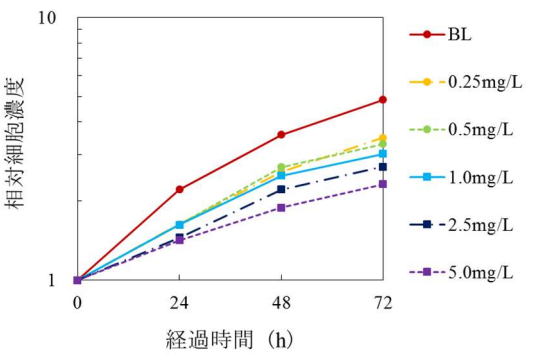


図-2 SMM 単独毒性試験の相対細胞濃度の経時変化

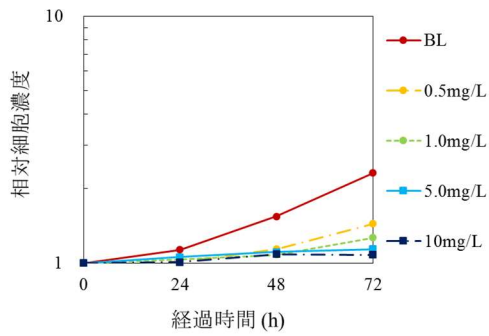


図-3 TYL 単独毒性試験の相対細胞濃度の経時変化  
図-1～3 より SMZ、SMM、TYL を添加することで藻類の生長阻害が生じることがわかる。また投与する濃度が高ければ阻害も大きくなっている。各物質の  $EC_{50}$  は以下に示すロジット法により生長阻害率の近似式から求めた。まず、比増殖速度  $\mu$  は

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

$\mu$  : 各濃度での比増殖速度(1/day)

$t_1$  : 藻類細胞濃度が対数増殖を始めた時間(day)

$t_2$  : 藻類細胞濃度が対数増殖を示している任意の時間(day)

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

式(1)より求めた比増殖速度  $\mu$  を元に生長阻害率  $i$  を算出する。

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

$\mu_0$  : 対照区での平均生長速度(1/day)

$i$  : 生長阻害率

生長阻害率  $i$  と抗生物質の濃度との関係を式(3)のロジスティック曲線で近似した。

$$i = 1 / (1 + C'e^{rx}) \quad (3)$$

$x$  :  $\log C$  ( $C$ :抗生物質の濃度)

$C'$ 、 $r$  : 定数

$\ln(\frac{1-i}{i})$  を  $I$ ,  $\ln C'$  を  $b$  とし、式(3)を変形すると

$$I = rx + b \quad (4)$$

この式(4)に最小二乗法を用い近似曲線を引き  $r$  と  $b$  を求めた(図-4)。この場合、阻害率 50%、つまり  $i = 0.5$ 、 $I = 0$  の際の濃度が  $EC_{50}$  となる(表-4)。

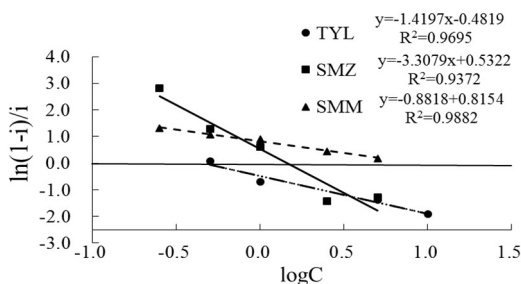


図-4 生長阻害率と濃度の関係

表-4 各抗生物質の定数及び  $EC_{50}$

|                 | SMZ     | SMM     | TYL     |
|-----------------|---------|---------|---------|
| $b$             | 0.5322  | 0.8154  | -0.4819 |
| $C'$            | 1.7027  | 2.2601  | 0.6176  |
| $r$             | -3.3079 | -0.8818 | -1.4197 |
| $EC_{50}(mg/L)$ | 1.4     | 8.24    | 0.46    |

複合毒性に関しては式(2)を用いて比増殖速度  $\mu$  を算出し、各設定濃度と比較した。結果は図-5、6 に示した。図-6 より SMZ と TYL を複合した際、SMZ と TYL を各々単独で 1:0 加えた時より 0.8:0.2、0.6:0.4、0.5:0.5、0.4:0.6 の比増殖速度が大きいので拮抗作用があると言える。DNA 合成が行われ、その遺伝情報を元にタンパク質が合成される細胞形成の流れで DNA 合成に必要な葉酸の合成阻害をする SMZ とタンパク質の合成を阻害する TYL がどのように作用し、拮抗作用を引き起こすのかについては今後、検討する必要がある。

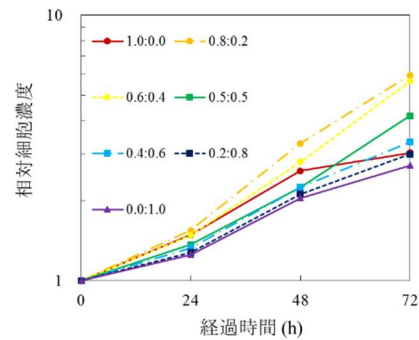


図-5 SMZ-TYL 複合毒性試験の相対細胞濃度の経時変化

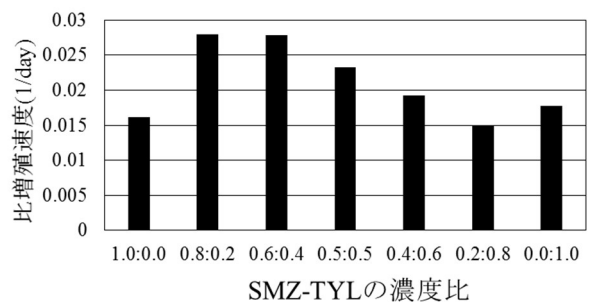


図-6 濃度比別の比増殖速度

#### 4. まとめ

作用機序が異なる抗生物質での複合毒性試験の結果、今回は拮抗作用が見られた。今後は類似している作用機序を持つ抗生物質の組合せや他の異なる作用機序を持つ抗生物質について検討する必要がある。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP17K06613 助成を受けた。

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)