

(63) *Microcystis aeruginosa*に対する 紫外線の増殖抑制効果及び 細胞からのミクロキスティン放出量の評価

酒井 宏治^{1*}・片山 浩之¹・小熊 久美子¹・大垣 眞一郎¹

¹東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1)

* E-mail: h_sakai@env.t.u-tokyo.ac.jp

有毒藍藻類である*Microcystis aeruginosa*は、固形培地上におけるコロニー形成を行うことが難しく、紫外線による不活化を適切に評価できなかった。本研究では、細胞壁合成阻害剤Cephalosporinを用いた培養法により、増殖能を持つ細胞数を消失させることで、その数を算出する手法を確立した。この手法を用い、紫外線による不活化効果、その際に消失する細胞1個当たりから放出されるミクロキスティン量を評価した。紫外線を120-180 mJ/cm²照射した試料は、2 log程度の不活化効果を示した。消失細胞1個当たりのミクロキスティン放出量は、紫外線照射前の細胞内ミクロキスティン量と同程度であった。600mJ/cm²以上の照射量では、不活化効果は顕著に増大しなかったが、紫外線分解によってミクロキスティン放出量が減少した。

Key Words : UV, Growth Inhibition, Cephalosporin, Microcystin

1. はじめに

紫外線処理は、ダム湖、貯水池などに異常増殖する有毒藍藻類に対する新たな処理方法として期待されている。紫外線は、対象となる微生物の遺伝子にピリミジン二量体等を生成させることで増殖を抑制する^{1,2)}。光を照射する処理であるため、副生成物が生成しにくい、水中へ効果が残留しにくいという特徴を持つ。生態系への影響が少ないと考えられることから、これまで、ダム湖で異常増殖する有毒藍藻類への適用が検討されてきた^{3,4)}。

有毒藍藻類に対して、紫外線による処理効果を評価する手法が、十分に確立されているとは言えない。病原微生物に対して紫外線処理を行う場合、固形培地上における細菌のコロニー形成能力、あるいはウイルスのプラーク形成能力を測定することで、紫外線の処理効果を生残率から判定する⁵⁾。有毒藍藻類の代表格である*Microcystis aeruginosa*は、固形培地上でコロニーを形成させることで、生残率を算出することが困難である。他の手法として、液体培養試料中の細胞数を計数する手法では、増殖能力を持つ細胞と持たない細胞が混在し、生残率の算出が困難であった。

*Microcystis aeruginosa*の異常増殖は、毒性物質の産生だ

けでなく、深刻な利水障害、景観障害を引き起こす。後者の観点からすれば、細胞数変化も一つの指標となりうる。一方、有毒藍藻類の処理では、増殖能を失った細胞が分解して内部の毒性物質が放出される現象が、懸念されている^{8,11)}。従って紫外線による有毒藍藻類の処理を評価するには、増殖能を持つ細胞数、増殖能を失って消失する細胞数、さらには消失する細胞からの毒性物質放出量を全て含めた評価が必要である。この点を明確にするため、増殖能を持つ細胞数を測定できる新たな手法の確立が望まれていた。

*Microcystis aeruginosa*に対して紫外線処理を行った場合、処理後の細胞数の変化は、増殖能を持つ細胞が増殖する現象と、増殖能を失った細胞が消失する現象の、2つの現象の和として観察される。増殖能を持つ細胞数を測定できれば、全体の細胞数は顕微鏡観察によって測定できるため、増殖能を失った細胞の数も算出できる。しかし、紫外線処理では、遺伝子損傷が増殖抑制の主要因であり¹²⁾、細胞壁等への物理的な損傷は少ないと考えられる。このため、増殖能を失った細胞が消失するまでには時間を要し、増殖能を失った細胞の数を測定することも困難であった。

増殖能を失った細胞は、その形状を保持できなくなっ

た時点で消失し、このときに、細胞内部に保持していたミクロキスティンを水中へ放出する。また、その量は、紫外線処理によって増加する可能性が指摘されている¹²⁾。この可能性を検討するには、消失する細胞1個当りのミクロキスティン量の評価が必要だが、増殖能を失って消失する細胞数が明確でなく、これまで適切な評価がなされていなかった。

本研究では、増殖能を持つ細胞数を計数する新たな手法として、Cephalosporin¹³⁾を用いた培養法を確立し、紫外線処理後の*Microcystis*細胞へ適用した。増殖抑制効果、細胞1個当りのミクロキスティン放出量を算出し、双方の点から最適な紫外線照射量を提案することを目的とした。

2. 実験方法

(1) 増殖能を持つ細胞数の計数手法の確立

a) 実験条件

細胞壁合成を阻害する抗生物質 Cephalosporin C Zinc Salt (以下Cephalosporin, Sigma) を用い、培養液中に添加した。Cephalosporinは0.1 N HCl溶液に10 g/lの濃度で溶解して保存溶液とした。使用時には、これを100倍希釈した100 mg/lの溶液を作成し、適量を添加した。

細胞壁合成を阻害した場合の消失機構は、細胞壁を合成できないまま分裂しようとするためである¹⁴⁾。これがCephalosporinを添加した*Microcystis aeruginosa*にも適用できるかを確認するために、細胞分裂を阻害するNalidixic Acid (Sigma) を添加した条件でも培養を行った。Nalidixic Acidは、DNAが複製する際に二重螺旋の巻き戻しを行う酵素であるDNA gyraseの作用を阻害する¹⁵⁾。従って、Nalidixic Acid投与下では、DNAが複製されないために細胞の分裂も起こらず、Cephalosporin投与下でも細胞は消失しないと考えられた。これを確認するため、Nalidixic Acidをさらに添加した系で実験を行った。なお、固形培地上で培養できない微生物の増殖能を計測する手法として、Nalidixic Acidと酵母エキスをを用いて培養し、その際

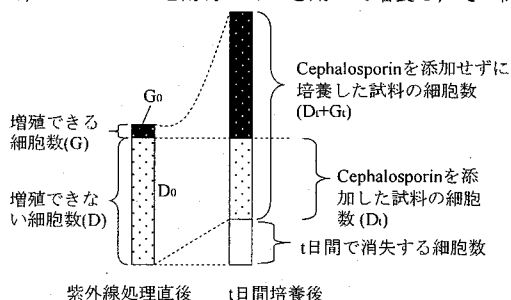


図1 増殖能を持つ細胞数の算出方法の概念図

の体長の変化を観察する手法がある¹⁶⁾。本研究で検討した範囲内では、Nalidixic Acidの添加が*Microcystis aeruginosa*の体長の変化をもたらさないことを別途確認し、Cephalosporinを用いた培養法における増殖能判定の確認へ用いた。

b) 解析手法

紫外線照射直後に増殖能を持っていた細胞数を、以下の手順に従い、算出した。また、図1に概念図としてまとめた。

紫外線照射直後の細胞は、増殖できる細胞と増殖できずに消失する細胞の2通りに分類できる。紫外線照射直後に増殖できる細胞の数を G 、増殖できずに消失する細胞の数を D とおく。

増殖可能な細胞は、 t 日後には $G_t = G \cdot e^{\mu t}$ まで増殖する。なお、 μ は、増殖可能な細胞の比増殖速度である。また、 t 日後には、増殖できずに消失する細胞 D のうち、一部が消失している。なお、Cephalosporinは細胞の消失には影響しないと仮定した。この時点で消失せずに残っている細胞のうち、増殖できない細胞数を D_t とする。

すると、Cephalosporinを添加せずに培養した試料の t 日後の細胞数は、 $D_t + G_t$ となる。一方、Cephalosporinを添加した試料では、増殖できる細胞は全て消失するから、 t 日後の細胞数は D_t となる。従って、 t を変化させた場合、Cephalosporin添加試料とCephalosporinを添加しない試料の細胞数の差 G_t は、紫外線照射で不活化されずに増殖できる細胞の増殖曲線となる。これを元に、紫外線照射直後に増殖を行える細胞数 G_0 を推定した。算出に当たっては、増殖できる細胞は、一定の速度で対数増殖することを仮定した。また、増殖できる細胞がその後増殖能を失って消失することはないものと仮定した。

t は、対数増殖を行っていると考えられる3から14の間のデータを用いた。図3のControl試料の細胞数を見ると、3日間で細胞数が2倍に増加している。増殖できる細胞が

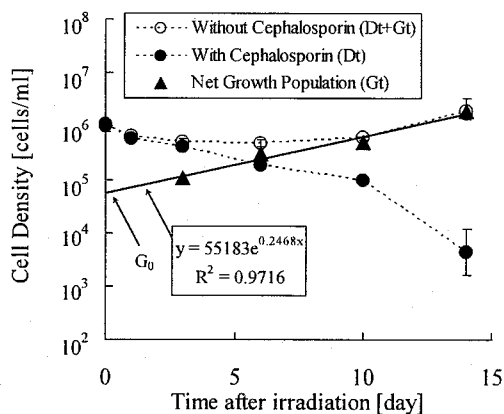


図2 増殖抑制効果の算出過程の一例

実際に分裂するための時間として3日程度を要すると考えられることから、1日目のデータは省いて算出した。一部の試料では、3, 6日目の G_1 の値が10, 14日目よりも大きくなるものがあった。これは、当該試料において、光回復の影響等から、増殖できる細胞が実際に分裂するための時間として3日以上を要したためと考えられる。この場合には10, 14日目のデータのみから推定した。図2に、低圧ランプ20 mJ/cm²照射試料を黄色光で培養した場合のグラフを、算出例として示した。なお、解析に当たっては、3回の実験の平均値同士を差し引き、1つの結果として算出した。

(2) 紫外線処理後の*Microcystis aeruginosa*への適用

a) 供試藻類

Microcystis aeruginosa (PCC 7806) を Pasteur Culture Collection (Institute Pasteur, Paris France) より入手し、BG-11培地 (Sigma) で培養した。実験に供する際には、BG-11培地中で3日間前培養し、対数増殖期にあるものを用いた。初期細胞濃度は、 10^6 程度に設定した。これは、諏訪湖において*Microcystis*の大増殖が見られた場合の濃度として最大で 8×10^5 程度の細胞数が報告されている¹⁷⁾ことを参考にした。光強度は、1500 lux、温度は25°C、明暗サイクルは12 h (明) / 12 h (暗) に設定し、恒温培養器 (BITEC-400L, Shimadzu) にて白色蛍光灯 (FL20SW-B, 20W, GE/Hitachi) もしくは光回復の起こらない黄色蛍光灯 (FL20S Y-F, 20W, National) 照射下で行った。*Microcystis*は紫外線によって生じた遺伝子損傷であるピリミジン二量体を、光回復する能力を持っている⁴⁾。光回復の影響を検討するため、通常の白色光培養に加えて、光回復の影響を排除できる黄色光培養を行い、その結果を比較した。

b) 紫外線照射

紫外線光源として、低圧紫外線ランプ (GL-15, 15W×2本, National), 中圧紫外線ランプ (330W×1本, B410MW, Ebara) を用いた。この2種類のランプは出力波長が異なる。試料に対する平均紫外線線量率はF特異RNA大腸菌ファージQ β を用いた生物線量計¹⁸⁾によって測定し、低圧ランプ、中圧ランプ共に0.9 mW/cm²であった。生物線量計では、異なる波長を出力する2つのランプの効果を、指標微生物の不活化率という統一尺度で評価している。本研究では、2つのランプ間で平均紫外線線量率がほぼ同等になるように調整を行った。紫外線照射量は、照射時間を変化させることにより、10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 600, 1800 mJ/cm²とした。具体的には、0.9 mW/cm²の出力を持つ紫外線ランプを11~2000秒照射することで、上記の照射量を得た。紫外線を照射した藻類は、100 ml三角フラスコに移し、a) に示した培養条件に従い、培養を行った。一部の試料では、細胞壁合成阻害剤である

Cephalosporin, DNA合成阻害剤であるNalidixic Acidを添加して培養した。Cephalosporinは、終濃度0.3 mg/l, Nalidixic Acidは、終濃度20 mg/lになるように添加した。Cephalosporinの終濃度は本研究で検討し、Nalidixic Acidの終濃度は既存の手法¹⁹⁾に従った。

c) 細胞数測定

紫外線照射直後、1, 3, 6, 10, 14日後に試料を採取し、そのときの細胞を、蛍光顕微鏡 (BH2, Olympus) にてG励起を用いて計数した。細胞計数にはプランクトン計数板 (MPC-200, 松浪硝子) を用いて、200倍で検鏡を行い、10視野の算術平均を一試料の細胞濃度とした。細胞が明らかに破損している場合は計数せず、形状が顕微鏡で明らかに確認できる細胞のみ計数した。上述の通り、紫外線処理では、遺伝子への損傷が主であり、細胞膜、細胞壁等への直接的な損傷は少ないと推定される。このため、明らかに細胞が破損している場合を除き、顕微鏡観察では、細胞の生死を半別することができない。従って、本研究では、細胞が一定の時間をかけて消失した場合に増殖抑制効果があったとみなした。

d) ミクロキスティン測定

紫外線照射直後、1, 3, 6, 10日後に試料を採取し、そのときの細胞外のミクロキスティン濃度をELISA法にて測定した。ミクロキスティンは、紫外線を照射すると分解することが知られている^{19,21)}。紫外線照射による分解を検討するため、紫外線照射直後のみ、細胞内濃度も測定した。測定には、Microcystin ELISA Kit (Wako) を用いた。各試料の濃度は、96穴プレートの2穴の結果を平均して求めた。本キットの検出下限はミクロキスティンLR等量で50 ng/lである。本研究で用いた*Microcystis aeruginosa* PCC 7806 株はミクロキスティンLRのみを産生するため、本キットによる測定結果は、ミクロキスティンLRの濃度であると考えられる。細胞外濃度 (水中濃度) の測定には、試料を0.45 μ mのPTFEフィルターでろ過した後、測定した。細胞内濃度の測定には、試料を凍結融解して細胞内ミクロキスティンを放出させた後、PTFEフィルターでろ過した後測定を行い、細胞外濃度を差し引いて算出した。なお、この手法による細胞内ミクロキスティンの回収率は98%以上とされている²²⁾。

紫外線照射により消失した細胞からはミクロキスティンが放出される。消失した細胞から放出される量へ紫外線処理が及ぼす影響を把握するため、消失細胞1個当りの放出量 (fg/cell) を算出した。具体的には、培養期間中10日目までのミクロキスティン放出量を10日までに消失した細胞数で除することで算出した。ミクロキスティンは化学的に安定²³⁾であるため、10日間に放出された量は消失細胞からの放出量と等しいと考えられる。消失した細胞数は、Cephalosporinを用いた培養法により算出した。

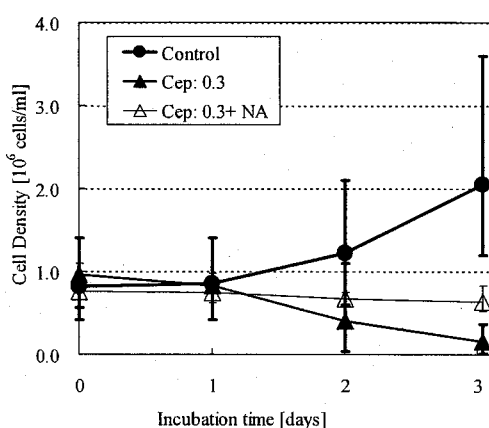
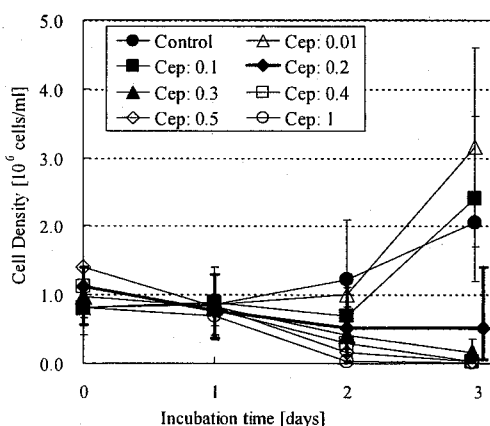


図3 Cephalosporin 及び Nalidixic Acid 添加条件における細胞数の変化
(Cep: Cephalosporin 添加試料, NA: Nalidixic Acid 添加試料, 数字: Cephalosporin 濃度(mg/l)を表す。
図中のプロットは3回以上の実験の平均値, エラーバーは最大値と最小値を示す)

3. 実験結果

(1) 増殖能を持つ細胞の計数手法の確立

実験において添加するCephalosporin濃度の決定を行った。図3に、Cephalosporin濃度を変化させて培養を行った結果を示す。Controlの細胞数は3日間で2倍に増加した。紫外線照射をせずにCephalosporinを添加した試料では、この間に細胞数が減少している必要がある。まず、0.01 mg/l 及び0.1 mg/l の濃度の試料では、3日間の培養中に細胞数が増加した。これは、Cephalosporin濃度が低く、細胞壁合成阻害効果が十分に働かなかったためと考えられる。0.2 mg/lの濃度では、細胞数のばらつきが大きく、Cephalosporinによる細胞壁合成阻害効果が働く境界の濃度であると判断した。0.3 mg/l以上の濃度では、3日目の細胞数が0日目の細胞数より有意に低く($p<0.01$), 阻害効果を持つことが分かった。従って、本実験では、0.3 mg/lの濃度のCephalosporinを添加することとした。

Nalidixic Acidをさらに添加した系で培養を行った。

Nalidixic Acid濃度は20 mg/lとした。この濃度のNalidixic Acidで*Microcystis aeruginosa* PCC7806株の増殖が抑制されることは前もって確認した。培養0日目と3日目において、Cephalosporinのみ添加した試料では細胞数が有意に減少したのに対し($p<0.01$), Nalidixic Acidをさらに添加した試料では、細胞数が有意な変化を示さなかった($p=0.51$)。Nalidixic Acidによって増殖しない試料では細胞数の変化が見られないことから、Cephalosporin添加条件下における細胞数の減少は、増殖によるものであるといえる。

(2) 増殖可能な細胞数の評価

a) 増殖抑制効果の算出結果

増殖抑制効果を生残率として算出した結果を図4に示した。紫外線ランプ光源として、低圧ランプと中圧ランプの2つの光源を用い、培養条件として光回復を起こさない黄色光、光回復が起こる白色光の2つの培養条件を設定した。

光回復を起こさない黄色光培養では、紫外線照射量30 mJ/cm^2 までは、生残率が減少した。30 mJ/cm^2 では2 logの

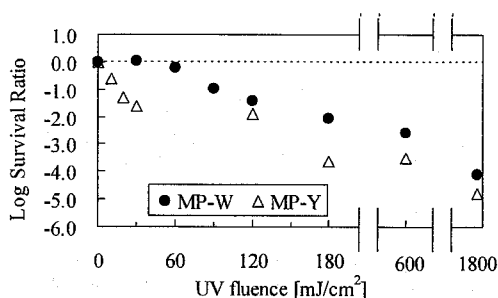
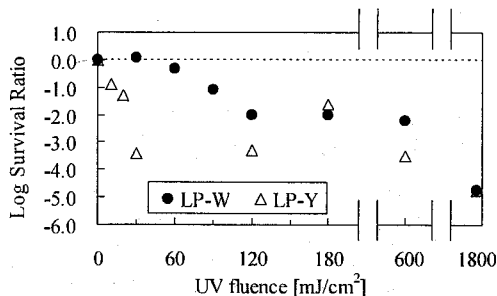


図4 紫外線照射による*Microcystis aeruginosa*の増殖抑制効果
(LP: 低圧ランプ照射試料, MP: 中圧ランプ照射試料, W: 白色光培養試料, Y: 黄色光培養試料)

不活化効果を示した。一方、 30 mJ/cm^2 以上の照射量では、生残率の減少速度は小さくなり、 1800 mJ/cm^2 の紫外線照射量でも不活化効果は4 log程度にとどまった。ある一定以上の紫外線照射量を超えると、不活化効果が線形的に増加しない現象は"Tailing"として知られている²⁹⁾。

*Microcystis aeruginosa*の不活化においても生残率が2 log以上の場合に、この現象が観察されたと考えられる。なお、低圧ランプを 180 mJ/cm^2 照射した試料で生残率が高いのは、Cephalosporinを用いた培養法に従った解析における仮定の一部が誤差要因として働いているものと考えられる。

光回復が起こる白色光培養では、黄色光と比べて生残率の減少速度が小さかった。 30 mJ/cm^2 程度では増殖抑制効果がほぼなかった。これは、紫外線処理による効果が出るまでに遅滞期が生ずる"Shoulder"現象²⁹⁾であると考えられる。その後生残率は直線的に減少し、紫外線照射量 120 mJ/cm^2 付近にて2 log程度の不活化効果を得た。黄色光の場合と同様、 120 mJ/cm^2 の紫外線照射量を超えた場合にはTailingが見られた。黄色光の結果では、 30 mJ/cm^2 の紫外線照射量2 logの不活化効果を得ており、白色光で 120 mJ/cm^2 を要するのは光回復現象によるものと考えられる。

紫外線ランプ光源として、低圧ランプと中圧ランプを比較した。両者の効果は、白色光培養においてはほぼ同程度であった。光回復を起こさない黄色光培養においては、紫外線照射量が $30\text{--}180 \text{ mJ/cm}^2$ の範囲では、最大で2 log程度の違いが確認されたが、その他の範囲では、効果はほぼ同程度であった。

b) 従来の評価方法との比較

本研究で採用したCephalosporin法によって算出した増殖抑制効果を、既存の評価手法⁹⁾と比較した。既存の評価手法としては、6日目の対照試料との細胞数の差を用いた。両者を比較した結果を図5に示した。Cephalosporin

法による増殖抑制効果が2 log程度の辺りでは特に、既存の手法で算出した増殖抑制効果が小さくなっている。これは、増殖能を失って消失する細胞が、6日目において残存したことを反映している。

(3) 放出されるミクロキスティン量の評価

紫外線照射により消失した細胞からはミクロキスティンが放出される。消失した細胞から放出されるミクロキスティン量へ紫外線処理が及ぼす影響を把握するため、消失した細胞1個当たりの放出量 (fg/cell) を評価した。その結果を図6に示した。比較のため、紫外線照射前に細胞1個中に含まれていたミクロキスティン量 21.8 fg/cell を点線で示した。

紫外線照射量が 600 mJ/cm^2 以上の場合、細胞からの放出量は、紫外線照射前に細胞1個中に含まれていたミクロキスティン量よりも減少した。これは紫外線処理中に

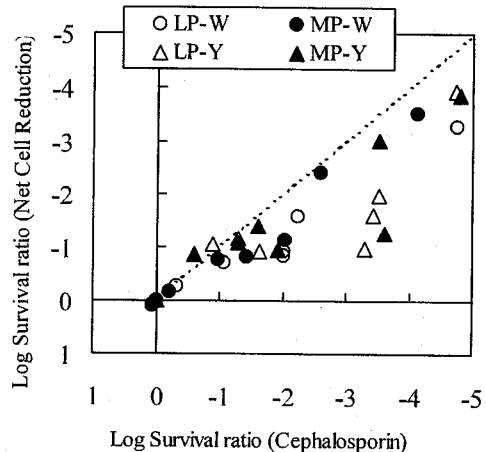


図5 従来の評価手法との比較

(LP: 低圧ランプ照射試料, MP: 中圧ランプ照射試料, W: 白色光培養試料, Y: 黄色光培養試料)

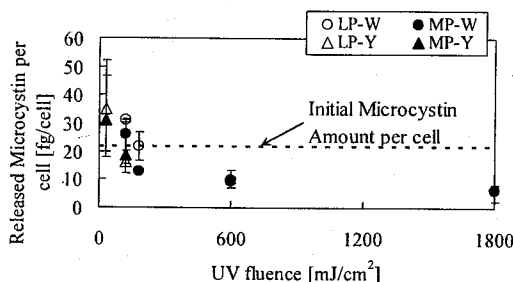


図6 消失する細胞1個当たりのミクロキスティン放出量

(LP: 低圧ランプ照射試料, MP: 中圧ランプ照射試料)

W: 白色光培養試料, Y: 黄色光培養試料

図中のプロットは3回の実験の平均値、

エラーバーは最大値と最小値を示す)

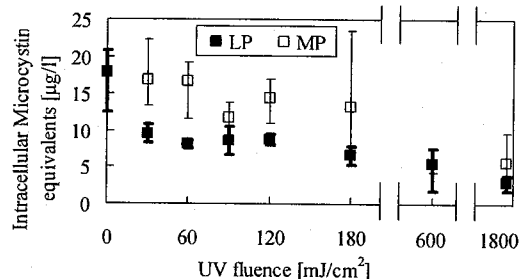


図7 紫外線による細胞内ミクロキスティンの分解

(LP: 低圧ランプ照射試料, MP: 中圧ランプ照射試料)

図中のプロットは3回の実験の平均値、

エラーバーは最大値と最小値を示す)

細胞内のマイクロキシティンも同時に分解されたためと考えられた。紫外線照射量が 30 mJ/cm^2 の場合、細胞からの放出量が紫外線照射前に細胞1個中に含まれていたマイクロキシティン量と比較して有意に増大したかについてt検定を行ったところ、有意な増加ではないことが分かった(低圧ランプ照射試料: $p=0.56$, 中圧ランプ照射試料: $p=0.27$)。

(4) 紫外線照射による細胞内マイクロキシティンの分解

紫外線処理の前後で細胞内マイクロキシティン量を計測した結果を図7に示した。紫外線照射試料では、照射前後で、細胞内マイクロキシティン量が減少した。この間、細胞数及び水中のマイクロキシティン濃度共に大きな変化はなかった。従って、細胞内マイクロキシティン量の減少は、消失細胞からの放出が原因ではなく、細胞内でマイクロキシティンが分解されたためと考えられる。

低圧ランプの場合、紫外線照射量が 30 mJ/cm^2 で既に細胞内マイクロキシティン量は半分近くにまで減少した一方、その後は顕著な減少が見られなかった。この傾向は、マイクロキシティン溶液に紫外線を照射してその分解特性を調べた既存の研究と一致する^{19,20}。中圧ランプを照射した試料では、低圧ランプ照射試料と比較して、統計的に有意な差は見られなかった。

4. 考察

(1) Cephalosporinを用いた培養法の評価

本研究では、Cephalosporinを用いた培養法によって、紫外線による増殖抑制効果を評価した。Cephalosporinを用いた培養法は、細胞の分裂現象に直接焦点を当てており、紫外線による増殖抑制の原理と対応する。従って、Cephalosporinを用いた培養法は、紫外線の不活化効果を評価するのに適していると考えられる。

Cephalosporinを用いた培養法によって増殖抑制効果を算出する際には、①Cephalosporinが増殖できない細胞の消失に影響を及ぼさない、②増殖できる細胞は一定速度で増殖を続ける、という仮定をおいた。①について、紫外線照射による増殖抑制は、遺伝子損傷が主であり、細胞壁への影響は少ないと考えられる。従って、増殖できない細胞に対するCephalosporinの作用機構は、増殖できる細胞に対する作用機構と同じとみなすことができ、Cephalosporinの添加によって、増殖できない細胞の消失が早まる可能性は少ないと考えられた。②について、より正確な議論を行うためには、遺伝子損傷が修復される速度、損傷を修復された細胞が分裂を起こすまでの準備期間をそれぞれ測定し、かつ評価へ組み込むことを検討

することが望ましい。

Cephalosporinを用いた培養法による評価を、既存の評価手法と比較した。図5に示したデータがほぼ全て $y < x$ の範囲に存在することから分かるように、Cephalosporinを用いた培養法によって評価した場合、既存の評価手法よりも大きい増殖抑制効果が観察された。既存の評価手法では、増殖能を持たない細胞であっても顕微鏡観察下にその形態が存在すれば計数するため、真に増殖する細胞を過大評価していることになる。

(2) *Microcystis aeruginosa*の増殖抑制効果

本研究では、新たに確立したCephalosporinを用いた培養法によって、紫外線による増殖抑制効果を評価した。本研究では、出力波長の異なる低圧ランプと中圧ランプの2種類の紫外線光源を用いた。低圧ランプでは、 254 nm の単一の波長を出力するのに対し、中圧ランプでは、 $200\text{--}600 \text{ nm}$ の波長域の光を出力する。中圧ランプでは、 254 nm より長波長側の紫外線が、ラジカル等による酸化的損傷を与える可能性が考えられた。*Escherichia coli*に対する既存の検討結果⁹では、両ランプの不活化効果は同程度であるが、中圧ランプでは光回復を抑制するとしている。本研究の検討範囲では、光回復が起こる場合においても、低圧ランプと中圧ランプで明確な差が観察されなかった。光回復に対する感受性が*Escherichia coli*と異なった点については、今後の検討課題である。

紫外線照射によって、 $2 \log$ の不活化を達成するための紫外線照射量は、光回復しない条件(図4の黄色光培養条件)で 30 mJ/cm^2 、光回復が起こる条件(図4の白色光培養条件)では 120 mJ/cm^2 であった。光回復が起こる条件では、 $2 \log$ の不活化に4倍の照射量を必要とすることが分かり、光回復が紫外線の処理効果へ大きく影響していることが分かった。

(3) 消失する細胞からのマイクロキシティン放出量の評価

紫外線照射を受けて増殖能を失った細胞は、いずれ形状を維持できなくなり、消失する。消失する細胞からの細胞1個当りのマイクロキシティン放出量を算定した(図6)。一般的に、紫外線照射の影響として、細胞内のマイクロキシティンを分解する効果が期待できる一方、マイクロキシティン合成遺伝子の発現が促進されるという報告¹²もあり、減少と増大の双方が想定される。

細胞1個当りの放出量を紫外線照射前に細胞1個中に含まれていたマイクロキシティン量と比較すると、紫外線照射量が 600 mJ/cm^2 以上の場合減少し、 30 mJ/cm^2 の場合、増大した。 $120\text{--}180 \text{ mJ/cm}^2$ の試料ではほぼ同程度であった。 600 mJ/cm^2 以上の試料において、減少したのは、紫外線照射による分解と考えられる。図7で紫外線による

分解を検討した結果、低圧ランプの場合、30-180 mJ/cm²の照射量でも細胞内マイクロシスティン量が減少した。しかし、図6における実際の放出量は、紫外線照射直後に観察される減少分を反映しなかった。また、紫外線照射量が30 mJ/cm²の試料を光回復が想定されない黄色光で培養した場合、細胞1個当りの放出量は、紫外線照射前に細胞1個中に含まれていたマイクロシスティン量と比較して有意に増大しなかった。マイクロシスティン量を増大させる可能性については、その機構も含めて今後の課題である。増殖抑制に効率的であると考えられる、紫外線照射量が120-180 mJ/cm²の試料では、細胞1個当りの放出量は紫外線照射前に細胞1個中に含まれていたマイクロシスティン総量とほぼ同程度であり、増殖抑制とマイクロシスティン放出の2つの点で、この実験結果の限りでは、120-180 mJ/cm²の照射量が効率的であるといえる。

5. 結論

本研究では、紫外線照射が*Microcystis*の増殖抑制ならびにマイクロシスティン放出抑制に及ぼす効果を検討した。

- (i) 固形培地上で培養が難しい*Microcystis*の増殖能を判定するため、Cephalosporinを用いた新たな培養法を確立し、増殖抑制効果の評価に用いることができた。
- (ii) Cephalosporinを用いた新たな培養法で、増殖抑制効果とマイクロシスティン放出量抑制効果を検討した結果、低圧紫外線ランプおよび中圧紫外線ランプのいずれを用いる場合でも、120-180 mJ/cm²の照射量が、増殖抑制及びマイクロシスティン放出抑制の双方の点で効率的である可能性が示された。
- (iii) 低圧ランプおよび中圧ランプの別によらず、600 mJ/cm²以上の照射量では、紫外線照射による細胞内マイクロシスティン量の減少が生じ、消失する細胞1個あたりのマイクロシスティン放出量が減少した。

謝辞：本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員奨励費)によって実施された。

参考文献

- 1) Setlow, J. K. and R. B. Setlow: Nature of the photoreactivable Ultra-Violet lesion in deoxyribonucleic acid, *Nature*, Vol. 197, pp. 560-562, 1963.
- 2) Setlow R. B. and J. K. Setlow: Evidence That Ultraviolet-Induced Thymine Dimers In DNA Cause Biological Damage, *PNAS*, Vol. 48, pp. 1251-1257, 1962.
- 3) Alam, M.Z.B., Otaki, M., Furumai, H., Ohgaki, S.: Direct and indirect inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation, *Water Res.*, Vol. 35, pp. 1008-1014, 2001.
- 4) Sakai, H., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S.: Effects of low- or medium-pressure ultraviolet lamp irradiation on *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena variabilis*, *Water Res.*, Vol. 41, pp. 11-18, 2007.
- 5) Chang, J. C. H., S. F. Ossoff, D. C. Lobe, M. H. Dorfman, C. M. Dumais, R. G. Qualls, and J. D. Johnson: UV Inactivation of pathogenic and indicator microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 49, pp. 1361-1365, 1985.
- 6) Oguma, K., H. Katayama and S. Ohgaki: Photoreactivation of *Escherichia coli* after Low- or Medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, pp. 6029-6035, 2002.
- 7) Abbaszadegan, M., M. N. Hasan, C. P. Gerba, P. F. Roessler, B. R. Wilson, R. Kuennen, and E. V. Dellen: The Disinfection Efficacy of a Point-of-Use Water Treatment System Against Bacterial, Viral and Protozoan Waterborne Pathogens, *Water Res.*, Vol. 31, pp. 574-582, 1997.
- 8) Jones, G. J., and P. T. Orr: Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay, *Water Res.*, Vol. 28, pp. 871-876, 1994.
- 9) Lam, Angeline K. -Y., E. E. Prepas, D. Spink, and S. E. Hruddy: Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: Implications for human health, *Water Res.*, Vol. 29, pp. 1845-1854, 1995.
- 10) Chow, C. W. K., M. Drikas, J. House, M. D. Burch, and R. M. A. Velzeboer: The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Water Res.*, Vol. 33, pp. 3253-3262, 1999.
- 11) Chow, C. W. K., J. House, R. M. A. Velzeboer, M. Drikas, M. D. Burch, and D. A. Steffensen: The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells, *Water Res.*, Vol. 32, pp. 808-814, 1998.
- 12) Kim, H.-R., C.-K. Kim, T.-S. Ahn, S.-A. Yoo, and D.-H. Lee: Effects of Temperature and Light on Microcystin Synthetase Gene Transcription in *Microcystis aeruginosa*, *Key Eng. Material*, Vol. 277-279, pp. 606-611, 2005.
- 13) Newton, G. G. F., and E. P. Abraham: Isolation of Cephalosporin C, a Penicillin-like Antibiotic Containing D- α -Aminoadipic Acid, *Biochem. J.*, Vol. 62, pp. 651-658, 1956.
- 14) Weil J., J. Miramonti, M. R. Ladisch: Cephalosporin C: Mode of Action and biosynthetic pathway, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 17, pp. 85-87, 1995.
- 15) Sugino A., C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, and N. R. Cozzarelli: Mechanism of Action of Nalidixic Acid: Purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme, *PNAS*, Vol. 74, pp. 4767-4771, 1977.
- 16) Kogure, K., U. Simidu, N. Taga: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, *Can. J. Microbiol.*, Vol. 25, pp. 415-420, 1979.
- 17) Park, H.-D., C. Iwami, M. F. Watanabe, K. Harada, T. Okino, H. Hayashi: Temporal Variabilities of the Concentrations of Intra- and Extracellular

- Microcystin and Toxic Microcystis Species in a Hypertrophic Lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994), *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, Vol. 13, pp. 61-72, 1998.
- 18) Kamiko, N., and S. Ohgaki: RNA coliphage Q β as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency, *Water: Sci. Technol.*, Vol. 21, pp. 227-231, 1989.
- 19) Tsuji, K., T. Watanuki, F. Kondo, M. F. Watanabe, S. Suzuki, H. Nakazawa, M. Suzuki, H. Uchida, and K. Harada: Stability of microcystins from cyanobacteria: 2 Effects of UV light on decomposition and isomerization, *Toxicon*, Vol. 33, pp. 11719-11731, 1995.
- 20) Wei, C., G. Qin, and S. Rong: Photodegradation dynamics of pure microcystin variants with illumination of fixed wavelength UV-lights, *Acta Chimica Sinica*, Vol. 62, pp. 142-147, 2004.
- 21) Kaya, K., and T. Sano: A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin Microcystin-LR by ultraviolet irradiation, *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 11, pp. 159-163, 1998.
- 22) Nagata, S., T. Tsutsumi, A. Hasegawa, F. Yoshida, Y. Ueno: Enzyme Immunoassay for Direct Determination of Microcystins in Environmental Water, *Journal of AOAC International*, Vol. 80, pp. 408-417, 1997.
- 23) Harada K-I., K. Tsuji, M. F. Watanabe, F. Kondo, Stability of microcystins from cyanobacteria - III Effect of pH and temperature, *Phycologia*, Vol. 35, pp. 83-88, 1996.
- 24) Hijnen W. A., E. F. Beerendonk, G. J. Medema: Inactivation Credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review, *Water Res.*, Vol. 40, pp. 3-22, 2006.

(2007. 5. 25 受付)

Growth Inhibition of *Microcystis aeruginosa* and Associated Release of Intracellular Microcystin by UV irradiation

Hiroshi SAKAI¹, Hiroyuki KATAYAMA¹, Kumiko OGUMA¹ and Shinichiro OHGAKI¹

¹Dept. of Urban Engineering, The University of Tokyo

Microcystis aeruginosa, a toxic cyanobacteria, hardly grows on solidified media. Therefore, it was difficult to evaluate the growth inhibitory effect by UV irradiation on *Microcystis aeruginosa* appropriately. This study developed a new incubation method to determine the number of cells with reproduction ability. About 2 log of growth inhibition was observed after UV irradiation at the fluence of 120-180 mJ/cm². No increase of growth inhibitory effect was observed with UV irradiation at the fluence of more than 180 mJ/cm². Released microcystin per dead cell at the UV fluence of 120-180 mJ/cm² was almost same as the intracellular microcystin amount per cell before UV irradiation. The released microcystin amount was reduced by UV irradiation at the fluence of over 600 mJ/cm², which was probably due to the decomposition of intracellular microcystin by UV.