

(38) 有毒藍藻 *Microcystis aeruginosa* と サクラ枯葉から調整した水溶性抽出液との 曝露時間が増殖阻害に及ぼす影響

島田 浩司^{1*}・吉田 征史²・松島 眸²・浅田 泰男³

¹ 日本大学大学院理工学研究科博士後期課程 (〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14)

² 日本大学理工学部土木工学科 (〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14)

³ 日本大学理工学部一般教育教室 (〒274-8501 千葉県船橋市習志野台 7-24-1)

* E-mail: shimadai@civil.cst.nihon-u.ac.jp

有毒藍藻 *Microcystis aeruginosa* (M.a.) の増殖抑制あるいは阻害に関して、M.a.細胞と落葉広葉樹サクラ枯葉を水に浸漬して調整した水溶性抽出液 (WSE 溶液) との曝露時間の関係について検討した。その結果、増殖阻害効果は M.a.細胞に対する初期縮合型タンニン負荷強度 (初期 CTLI, pg-CTch/細胞) と M.a.細胞と WSE 溶液との曝露時間 (T, hr) が関係していて、その積 (初期 CTLI×T) が概ね 20~30 pg-CTch・hr/細胞程度以下に設定する場合には増殖抑制効果が、それ以上の場合には増殖阻害効果が顕著となりかつその効果が持続する。効果的な増殖阻害には初期 CTLI 値が 10~15 pg-CTch/細胞以上が必要であるため、曝露時間が少なくとも 2~3 hr 程度必要である。

Key Words: dead leaves, water soluble extract (WSE), *Microcystis aeruginosa* (M.a.), condensed tannin, exposure time

1. 緒言

閉鎖性の強いダム湖や淡水系湖沼等において富栄養化が進行すると藍藻類が異常増殖し、その後死滅した藻類を好気性微生物が分解する際に多量の酸素を消費する。そのため水域の溶存酸素 (DO) 不足やそれに伴う動植物の斃死が生じる。他にも浄水場における砂ろ過障害、カビ臭や景観悪化など多くの問題を引き起こす。とくに、有毒藍藻 *Microcystis* 属や *Anabaena* 属は肝臓毒ミクロシスチンや神経毒アナトキシンを生成し、これらは細胞死により水域へ溶出する。また、これらの毒性が胃酸カリに比較して数十倍以上高い¹⁾ため、水道用水の水資源としての利用価値が消失する。したがって、淡水資源の確保や水質保全の観点からは有毒藍藻類の発生抑制もしくは増殖抑制の対策を講じる必要がある。

アオコと称される藻類の異常増殖に対しては下水道整備等により水域への流入栄養塩類を削減している。また、生活排水が流入するダム湖や淡水系湖沼等においては栄養塩類の溶出源となる堆積底泥を排除して底質環境を改善する方法もとられている。さらに、水面に浮遊する藻類を直接取り除く方法や、殺藻剤である硫酸銅を利用して藻類を死滅させる方法もある。しかしながら、これらの対策は技術的・経済的および水環境における生態系保全の観点からその実現性や持続性に課題が残されている。

こうした背景から、近年では自然環境に配慮し、植物由来成分を利用した藻類の増殖抑制対策について研究が行われていて、特にポリフェノールが増殖抑制に効果的に関与しているとする報告がある^{2~5)}。自然水環境への負荷を低減する藻類の増殖抑制対策として、筆者らは落葉広葉樹の枯葉に含有される植

物由来成分を利用した有毒藍藻の増殖抑制効果について検討した^{6, 7)}。サクラ枯葉には細菌に対する薬理・抗菌作用を有するポリフェノール (Polyphenol, PP) とくに縮合型タンニン (Condensed Tannin, CT) が含有されていて、これらは枯葉を水に浸漬することにより容易に可溶化できる特徴がある⁸⁾。以下に、サクラ枯葉から調整した水溶性抽出液成分が有毒藍藻 *Microcystis aeruginosa*, (*M.a.*) の増殖抑制あるいは増殖阻害に及ぼす効果について述べる。なお、増殖抑制に関する試験のうち *M.a.* 細胞にサクラ枯葉の水溶性抽出液成分が曝露されていない試験系を“Control”系試験と称する。また、増殖抑制試験における細胞密度が“Control”系試験のそれより低密度でありかつ初期細胞密度以上となるような場合を増殖抑制とし、一方、初期細胞密度以下の低密度となるような場合を増殖阻害と定義した。

2. 研究目的

落葉広葉樹のサクラ枯葉から調整した水溶性抽出液 (Water Soluble Extract, WSE) には植物由来の PP や CT が含有される。この WSE 溶液を *M.a.* 細胞に曝露させると、その後の増殖が抑制あるいは阻害される。筆者らは、この効果が試験開始時における *M.a.* 細胞に対する初期の縮合型タンニン負荷強度 (Condensed Tannin Loading Intensity, CTLI) 値に大きく左右され、初期 CTLI 値が約 10~15 pg-CTch/細胞以下の場合では増殖抑制効果を、それ以上の場合では増殖阻害効果をもたらす傾向を明らかにした。同時に、この結果は *M.a.* 細胞に対する WSE 溶液の曝露環境が増殖抑制あるいは増殖阻害効果に影響を及ぼすことを示唆している。そこで、本研究では *M.a.* 細胞が WSE 溶液に曝露される初期 CTLI 値と曝露時間 (T, hr) を曝露環境として整理し、これらが *M.a.* 細胞の増殖抑制あるいは阻害に及ぼす影響について検討を加えた。

3. 試験方法

(1) *M.a.* 培養株の作成

本研究で使用した *M.a.* 培養株は国立環境研究所から分譲された *M.a.* 株 (NIES102 株) を以下の手順で培養したものである。まず、M-11 培地 (表-1) を作成し、そこに *M.a.* 株を添加する。その後、30 (± 1) °C に設定したインキュベーター内で 7 日間にわたり培養を行った。その他培養条件として白色蛍光灯を明 16 時間、暗 8 時間のサイクルで光量 2,500~3,000 lx で照射し、スターラーにて常時攪拌した。7 日間の培養期間後には *M.a.* 株は対数増殖傾向を示すようになる。このものが *M.a.* 培養株である。なお、一連の試験に使用した器具および M-11 培地はすべて事前に高圧滅菌処理 (121 °C, 15 min) を施した。

(2) WSE 溶液の調整方法

本研究で使用した落葉広葉樹のサクラ枯葉は東京都内の公園や路傍にて、晩秋から初冬において数日間晴天が続いた後に形状が整っている乾燥した枯葉のみを選択収集した。実際に WSE 溶液の作成に用いた枯葉は実験室内にて数日間乾燥させてから使用した。枯葉をフードミキサーにて微粉碎 (7,000 rpm, 15 sec) し、その微粉碎枯葉試料 5.0 g を 100 mL の脱イオン (Deionized, DI) 水が入ったポリ容器に浸漬して密栓し、実験室内で 24 時間静置しサクラ枯葉の含有成分を DI 水へ溶出させた。その後、ガラス繊維ろ紙 GF/B (Whatman 社 (英国) 製)、次いで 0.45 μm のメンブレンフィルター (ミリポア株式会社 (日本) 製) にてろ過後、さらに高圧滅菌処理を施した 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過した。このろ液が WSE 溶液である。

表-1 M-11 培地中の栄養塩類

NaNO ₃	10.0mg	Na ₂ CO ₃	3.0mg
K ₂ HPO ₄	1.0mg	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5mg	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.0mg	脱イオン水	100mL

pH=8.0

(3) WSE 溶液中の CT 成分の定量

WSE 溶液に含有される CT 成分の定量分析はバニリン硫酸法⁹⁻¹⁰⁾に基づいて行った。また、CT の定量は Spectrum Chemical MFG 社（米国）製の高純度試薬（+）- カテキン水和物（catechin hydrate, ch）を使用した検量線に基づいた。そのため、CT 濃度の定量値はカテキン当量値である。なお、濃度表示は mg-CTch/L とした。

(4) 細胞密度の計測

本研究では Thoma 式血球計算盤に試料を採取し、顕微鏡を用いて血球計算盤上の *M.a.* 細胞個体数を直接計測してその結果を細胞密度（細胞/mL）に換算した。*M.a.* 細胞の生死の判断は正常細胞の形状を基準とした。すなわち、球状の *M.a.* 細胞を生細胞と判断して計測対象とし、膨潤および変形したものは死細胞として計測対象から除外した。また、*M.a.* 細胞はコロニーを形成するため Thoma 式血球計算盤に試料を採取する前にあらかじめ超音波処理を施しコロニーを分散させた。超音波処理装置は（株）カイジョー社（日本）製の SONO クリーナー-200DL（超音波周波数は 38 kHz）を使用し、超音波処理および非処理を 3 sec 間隔で合計 10 回（測定回数, n=10）繰り返した。

(5) *M.a.* 細胞と WSE 溶液との曝露試験

初期 CTLI 値および *M.a.* 細胞と WSE 溶液との曝露時間を様々に調整した試験が曝露試験である。曝露試験には *M.a.* 細胞が WSE 溶液に曝露される曝露系試験と、曝露されない“Control”系試験がある。これらの試験方法は以下の通りである。

まず、曝露系試験は上述した方法で作成した *M.a.* 培養株を新鮮な M-11 培地が入った試験容器に添加し、さらに WSE 溶液を添加する。このものを曝露試験混合溶液と称する。この時、*M.a.* 培養株と WSE 溶液それぞれの添加量を調整して試験容器内の初期 CTLI 値を様々に変化せしめた。その後、試験容器内の曝露試験混合溶液を 30 (±1) °C に設定したインキュベーター内で攪拌混合し、*M.a.* 細胞に WSE 溶液を曝露させた。そして所定の時間経過後に WSE 溶液

の除去を目的として後述の洗浄を行った。この WSE 溶液添加から洗浄までの時間が曝露時間である。本研究では *M.a.* 細胞に対する WSE 溶液の増殖抑制効果を明確に発現させるために、洗浄前の初期 CTLI 値は既往の研究成果に基づき 10 pg-CTch/細胞以上に設定した。初期 CTLI 値と曝露時間の試験条件一覧は表-2（低負荷条件）と表-3（高負荷条件）にまとめて示した。

洗浄の方法は以下の通りである。洗浄とは遠心分離と上澄み液の排除そして M-11 培地の添加による沈殿部の再懸濁操作を意味する。まず、曝露時間経過後の曝露試験混合溶液を事前に高圧滅菌処理を施した遠心管（有効容積約 35 mL）に分取し、このものを遠心分離処理（4,000 rpm, 10 min）した。遠心

表-2 曝露試験における初期 CTLI 値と
曝露時間の条件（低負荷条件）

初期 CTLI 値 (pg-CTch/細胞)	曝露時間 (T, hr)	初期 CTLI×T (pg-CTch・hr/細胞)
11.0	0.5	6
10.1	1.2	12
12.4	3.1	38
15.7	6.3	99
14.9	10.0	149
16.0	13.5	216

表-3 曝露試験における初期 CTLI 値と
曝露時間の条件（高負荷条件）

初期 CTLI 値 (pg-CTch/細胞)	曝露時間 (T, hr)	初期 CTLI×T (pg-CTch・hr/細胞)
61.2	0.25	15
76.7	0.3	23
69.8	0.7	49
63.8	1.0	64
81.0	1.7	138
73.9	2.5	185
75.5	3.2	242
86.8	3.3	286

分離処理後の遠心管内の沈殿部には *M.a.* 細胞が、上澄み液部には CT 成分を含む WSE 溶液が分離される。上澄み液部分をマイクロピペットで排除し、遠心管内を可能な限り沈殿部のみとした。この結果、遠心管内には沈殿部が約 2 mL 残存する。その後、遠心管内に新鮮な M-11 培地を添加して全量を約 35 mL にし、沈殿部を再懸濁させた。この操作により WSE 溶液を M-11 培地に移動せしめた。その後、再度洗浄を行った。以上の一連の洗浄操作を 3 回繰り返して WSE 溶液を除去し、曝露試験混合溶液中の CT 成分を排除した。その後、遠心管内の洗浄済み曝露試験混合溶液の適当量（約 10~30 mL）を、細胞密度が概ね 30 万細胞/mL 程度となるようにあらかじめ別に用意しておいた M-11 培地 300 mL 入り試験容器に分取した。このものを曝露試験溶液と称する。この場合、各試験系による液量差をなくすため曝露試験溶液の初期全液量を 300 mL となるように余剰分を排除した。

“Control”系試験の方法は以下の通りである。*M.a.* 培養株を新鮮な M-11 培地が入った試験容器に添加し、30 (±1) °C に設定したインキュベーター内で攪拌混合させる。攪拌混合を開始してから 20 分経過後、この混合液を高圧滅菌処理した遠心管に分取し、曝露系試験と同様の手順で洗浄操作を行った。その後、遠心管内の混合溶液の適当量を初期細胞密度が概ね 30 万細胞/mL 程度になるように M-11 培地 300 mL 入り試験容器に分取した。この場合、曝露系試験と同様、“Control”系試験においても初期全液量が 300 mL となるように余剰分を排除した。

(6) 曝露試験の評価方法

曝露試験における増殖抑制効果は *M.a.* 細胞と WSE 溶液との曝露環境が影響を及ぼすと考えられる。そこで本研究では *M.a.* 細胞の増殖抑制効果が曝露試験混合溶液の初期 CTLI (pg-CTch/細胞) 値および *M.a.* 細胞と WSE 溶液との曝露時間 (T, hr) の積 (初期 CTLI×T, pg-CTch・hr/細胞) の関数で表されると仮定して以下の式により評価することとした。

$$kx = \frac{\ln(X_t/X_0)}{t} = f(T, \text{初期CTLI} \times T) \quad (1)$$

ここに、 kx は増殖あるいは増殖抑制か阻害効果を意味する速度係数 (1/day), X_t は曝露試験開始から t 日後の曝露試験溶液中の細胞密度 (細胞/mL), X_0 は曝露試験開始直後の曝露試験溶液中の細胞密度 (細胞/mL), t は試験開始からの経過時間 (days), T は *M.a.* 細胞と WSE 溶液の曝露時間 (hr), 初期 CTLI は *M.a.* 細胞と WSE 溶液混合直後の曝露試験混合溶液の CTLI 値 (pg-CTch/細胞) とした。なお、この初期 CTLI 値は増殖抑制効果を評価する解析因子として用いている。 kX は t 日間における $\ln(X_t/X_0)$ の傾きより算出され、 $\ln(X_t/X_0)$ は初期細胞密度 (X_0) に対する t 日後の細胞密度 (X_t) の比の対数である。 $\ln(X_t/X_0)$ は増殖あるいは増殖抑制効果が発現した場合では正の値を、増殖阻害効果が発現した場合では負の値を示す。すなわち、 $\ln(X_t/X_0)$ はその正負によって増殖抑制効果あるいは阻害効果を表す指標となる。

“Control”系試験の細胞は対数増殖を示すため、 $\ln(X_t/X_0)$ の経時変化が直線的に増加する。この時の kx は比増殖速度を意味する。曝露系試験において、WSE 溶液曝露の影響により *M.a.* 細胞が増殖抑制効果を示し、 $\ln(X_t/X_0)$ の経時変化が直線的に増加した場合の kx は正の値を示すが、この kx は“Control”系試験時 (比増殖速度) よりも低い値を示す。一方、WSE 溶液曝露の影響により *M.a.* 細胞が増殖阻害効果を示し、 $\ln(X_t/X_0)$ の経時変化が直線的に減少した場合の kx は負の値を示す。また、WSE 溶液曝露の影響により細胞密度の経時変化が初期細胞密度を維持するような場合では $kx \approx 0$ となる。すなわち、*M.a.* 細胞の増殖が停止したか、もしくは見かけ上細胞増殖量と死滅量が同程度であった可能性を示唆している。なお、 kx の算出に用いる t は $\ln(X_t/X_0)$ と経過時間との関係において直線的な変化傾向が認められる領域の経過時間である。

4. 試験結果および考察

(1) サクラ枯葉から DI 水への CT の抽出

サクラ枯葉から DI 水に抽出される CT 量は WSE 溶液の CT 濃度と投入したサクラ枯葉重量に基づいて CT 抽出量として求めた。その結果の一例を表-4 に示す。この結果によればサクラ枯葉 5.0 g を DI 水 100 mL に 24 時間浸漬して作成した場合、WSE 溶液中の CT 濃度は平均 656.1 mg-CTch/L (614.6~740.6 mg-CTch/L, n (試料数) = 11, SD = 46.5 mg-CTch/L) であり、サクラ枯葉単位重量あたりの CT 抽出量は約 13.1 mg-CTch/g であった。サクラ枯葉を単に DI 水に浸漬する操作により容易に CT を回収することが出来る。

(2) *M.a.*細胞と WSE 溶液との曝露試験結果

WSE 溶液の添加は *M.a.*細胞の増殖抑制あるいは阻害効果を容易にもたらすことが明らかとなっている。既往の研究成果によれば、サクラ枯葉から調整した WSE 溶液を *M.a.*細胞に添加した場合の増殖抑制あるいは阻害効果、すなわち細胞密度の変化傾向は WSE 溶液添加後 4 日間においてとくに顕著であった。また、試験開始直後の細胞密度を基準とする増殖量と減少量が等しくなるような初期 CTLI 値を推定すると概ね 10~15 pg-CTch/細胞であり、この値以上の初期 CTLI 値を設定した場合では残存する細胞密度 (X_t) は初期細胞密度 (X_0) 以下のレベルにまで低下する増殖阻害傾向を示していた。このように *M.a.*細胞に対する WSE 溶液添加による増殖抑制効果は初期 CTLI 値が高いほど高くなることが確認されている。

増殖抑制あるいは阻害効果は初期 CTLI 値の他に *M.a.*細胞と WSE 溶液との曝露時間にも影響を受けることが推測される。そこで、*M.a.*細胞と WSE 溶液とを混合接触せしめ、所定の時間経過後に WSE 溶液の除去を目的として曝露試験混合溶液を洗浄し、その後の *M.a.*細胞の増殖傾向を観察する曝露試験を行った。その結果を図-1 と図-2 にまとめた。

図-1 は、初期 CTLI 値が 12.4~16.0 pg-CTch/細胞であり曝露時間が 3.1~13.5 hr と低負荷を長時間曝

表-4 WSE 溶液の CT 濃度および CT 抽出量

サクラ枯葉と DI 水の混合比	CT 濃度 (mg-CTch/L)	単位サクラ枯葉重量当りの CT 抽出量 (mg-CTch/g)
5.0 g : 100 mL	656.1	13.1

露させた試験結果である。図-2 は初期 CTLI 値が 61.2~81.0 pg-CTch/細胞であり曝露時間が 0.25~1.7 hr と高負荷を短時間曝露させた試験結果である。なお、図-2 における曝露試験は試験開始後 7 日目に *M.a.*細胞の再増殖が確認されたため計測を終了した。

低負荷長時間曝露試験および高負荷短時間曝露試験に伴って実施した“Control”系試験における *M.a.*細胞の増殖傾向は試験開始から 7~10 日間程度継続して対数増殖する傾向が認められた。例えば、図-1 と図-2 における“Control”系試験の結果は遠心分離による洗浄処理を受けた場合であり、それぞれの k_x は 0.44 および 0.35 (1/day) であった。また、遠心分離による洗浄操作を行わない場合の k_x が 0.37 (1/day) であり、遠心分離処理が *M.a.*細胞の増殖に及ぼす阻害効果ほとんど確認されなかった。なお、曝露系試験においては洗浄のため試験期間中の曝露試験溶液内には WSE 溶液が低濃度の状態かあるいはほとんど存在していない状態にあると推察される。しかしながら、低負荷 (12.4~16.0 pg-CTch/細胞) を長時間 (曝露時間 3.1~13.5 hr) 曝露させた曝露系試験では増殖阻害効果が試験開始から 6 日間程度持続する傾向を示した。一方、高負荷 (61.2~81.0 pg-CTch/細胞) であっても曝露時間が 0.25~0.3 hr と短い曝露系試験においては必ずしも明確な増殖抑制傾向が認められなかったが、曝露時間が 0.67~1.7 hr の場合では試験開始後 4 日間は増殖阻害傾向が持続したが、その後は再増殖する傾向が観察された。図-1 並びに図-2 の結果を考慮すれば、増殖阻害効果をもたらす影響因子は初期 CTLI 値のみならず曝露時間も関係していることが示唆された。また、低負荷であっても曝露時間が 3.1 hr 程度であれば曝露時間が 10.0 hr 以上の場合と同等の増殖阻害傾向が確認された。図-1 における低負荷長時間曝露の 38 pg-CTch・hr/細胞と図-2 における高負荷短時間曝露の 49

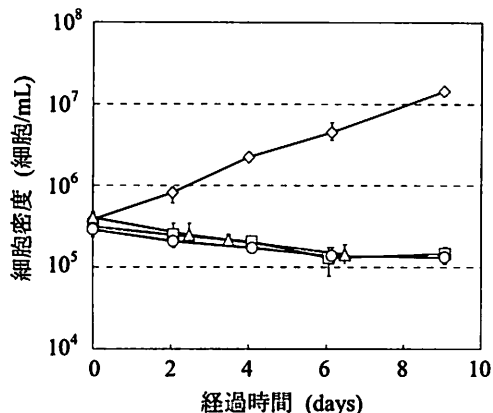


図-1 曝露試験における曝露試験溶液の細胞密度の経時変化（低負荷を長時間曝露させた場合、 $n = 10$ ）

- ◇: Control（遠心分離処理済み）
- △: 38（12.4 pg-CTch/細胞×3.1 hr）
- : 149（14.9 pg-CTch/細胞×10.0 hr）
- : 216（16.0 pg-CTch/細胞×13.5 hr）

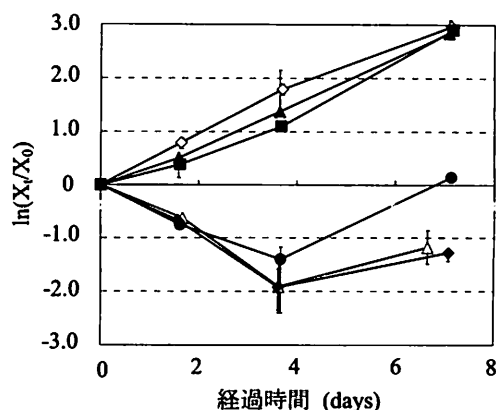


図-3 $\ln(X_t/X_0)$ の経時変化（ $n = 10$ ）

- ◇: Control（遠心分離処理済み）
- ▲: 15（61.2 pg-CTch/細胞×0.25 hr）
- : 23（76.7 pg-CTch/細胞×0.3 hr）
- : 49（69.8 pg-CTch/細胞×0.7 hr）
- ◆: 64（63.8 pg-CTch/細胞×1.0 hr）
- △: 138（81.0 pg-CTch/細胞×1.7 hr）

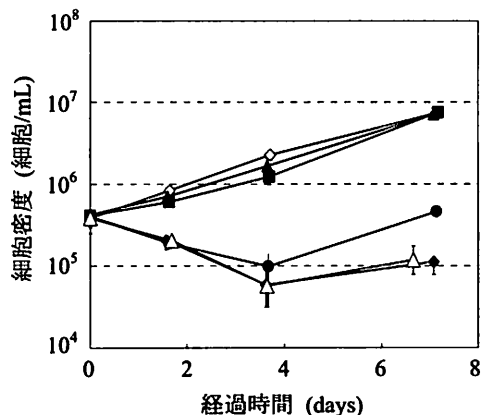


図-2 曝露試験における曝露試験溶液の細胞密度の経時変化（高負荷を短時間曝露させた場合、 $n = 10$ ）

- ◇: Control（遠心分離処理済み）
- ▲: 15（61.2 pg-CTch/細胞×0.25 hr）
- : 23（76.7 pg-CTch/細胞×0.3 hr）
- : 49（69.8 pg-CTch/細胞×0.67 hr）
- ◆: 64（63.8 pg-CTch/細胞×1.0 hr）
- △: 138（81.0 pg-CTch/細胞×1.7 hr）

pg-CTch・hr/細胞を比較すると、前者は緩やかな増殖阻害傾向が認められ、後者は急速な増殖阻害傾向とその後の再増殖傾向が認められる。こうした現象の原因は明確ではない。この現象と再増殖のメカニズムについては今後の検討課題である。

図-3 は $\ln(X_t/X_0)$ と経過時間との関係を表したものである。前述したように、 $\ln(X_t/X_0)$ はこの値が正で

あれば増殖あるいは増殖抑制効果を、負の値であれば増殖阻害効果を意味する。また、 $\ln(X_t/X_0)$ の直線的経時変化の値が増殖あるいは増殖抑制か阻害効果を意味する速度係数 k_x に相当し、この傾きが正であれば増殖あるいは増殖抑制を意味する速度係数を、負であれば増殖阻害を意味する速度係数を表す。速度係数 k_x と曝露時間の関係を図-4 に、速度係数 k_x と初期 CTLI 値×曝露時間の関係を図-5 にまとめて示した。

(3) *M.a.*細胞の増殖阻害に及ぼす曝露時間の影響

様々な曝露条件（表-2 および表-3）で行った曝露試験における *M.a.*細胞の増殖あるいは増殖抑制か阻害効果を意味する速度係数 k_x に及ぼす曝露時間 T の影響について検討した結果を図-4 に示す。

この結果によれば、初期 CTLI 値が 10.1～16.0 pg-CTch/細胞の低負荷条件とする場合にも、また初期 CTLI 値が 61.2～86.8 pg-CTch/細胞の高負荷条件とする場合にも $k_x \neq 0$ 、すなわち見かけ上 *M.a.*細胞の増殖が停止あるいは増殖量と死滅量が同程度となるのに必要な曝露時間は 1 hr 程度であると推測される。また、初期 CTLI 値の負荷条件は k_x に大きな影響をもたらしていて曝露時間が 2～3 hr 以上とした

場合では初期 CTLI 値が高負荷条件であるほど k_x の負の値が大きくなり、細胞密度が初期密度より低密度となる傾向が顕著で WSE 溶液曝露による増殖阻害効果が明確である。なお、曝露試験において実施した“Control”系試験の k_x は 0.34~0.45 (1/day) であった。

(4) 曝露試験における *M.a.*細胞の増殖阻害効果

*M.a.*細胞の増殖抑制効果あるいは阻害効果は初期 CTLI 値と曝露時間との影響を受ける傾向がある。そこで、増殖抑制効果が初期 CTLI 値と曝露時間との積の関数で表されると仮定して曝露試験の評価を式 (1)に基づいて行った。図-5 に曝露試験における細胞の増殖あるいは増殖抑制が阻害効果を意味する速度係数 k_x および初期 CTLI 値と曝露時間との積 (初期 CTLI $\times$ T) の関係をまとめた。図-5 に示された傾向線は k_x が (初期 CTLI $\times$ T) に逆比例した傾向を示していて、その傾向は (初期 CTLI $\times$ T) 値が 60 pg-CTch $\cdot$ hr/細胞程度までの範囲内で認められた。この傾向線に基づけば、(初期 CTLI $\times$ T) 値が 20~30 pg-CTch $\cdot$ hr/細胞程度の範囲である場合には $k_x \approx 0$ となり、見かけ上 *M.a.*細胞の増殖が停止あるいは増殖量と死滅量が同程度を示す。つまり、(初期 CTLI $\times$ T) 値が 20~30 pg-CTch $\cdot$ hr/細胞以下となる範囲においては増殖抑制傾向が認められ、それ以上の (初期 CTLI $\times$ T) 値においては増殖阻害傾向が認められる。既往の研究成果より効果的な *M.a.*細胞の増殖阻害効果をもたらす初期 CTLI 値は 10~15 pg-CTch/細胞程度以上であることが確認されているので、上記の (初期 CTLI $\times$ T) 値から必要な曝露時間を試算すると、少なくとも 2~3 hr 程度の曝露時間が必要であるといえる。当然のことながら、(初期 CTLI $\times$ T) 値が 20~30 pg-CTch $\cdot$ hr/細胞以上の場合にはより高い増殖阻害効果とその持続傾向が維持されると推察される。

CT が *M.a.*細胞の増殖阻害に及ぼす影響については研究報告から推測すると、タンニン類の一種である epigallocatechin gallate がグラム陰性細菌の細胞膜を破壊する報告¹¹⁾があり、*M.a.*細胞もグラム陰性細菌に分類されるため細胞膜破壊が進行していると推察される。また、ポリフェノールが光合成反応経

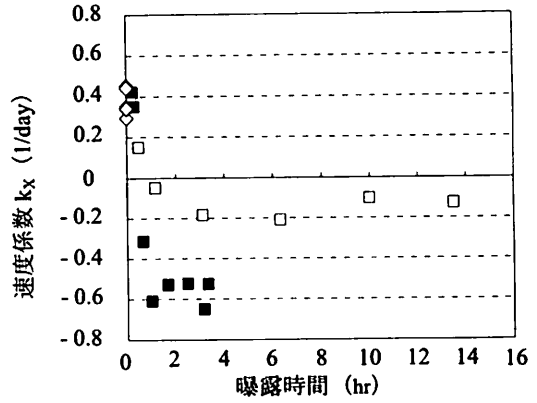


図-4 k_x に及ぼす曝露時間 T の影響

- ◇ : Control (遠心分離処理済み)
- : 高負荷条件 (61.2~86.8pg-CTch/細胞)
- : 低負荷条件 (10.1~16.0 pg-CTch/細胞)

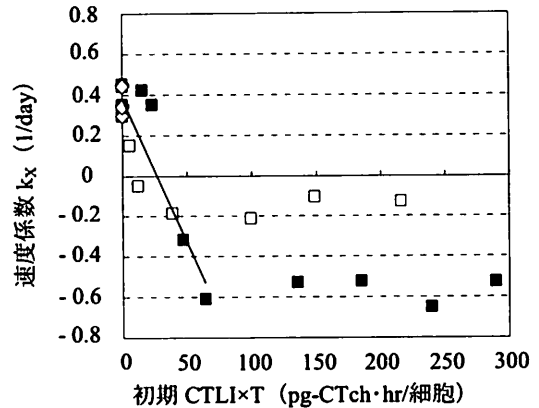


図-5 k_x に及ぼす初期 CTLI $\times$ 曝露時間 T の影響

- ◇ : Control (遠心分離処理済み)
- : 高負荷条件 (61.2~86.8pg-CTch/細胞)
- : 低負荷条件 (10.1~16.0 pg-CTch/細胞)

路を阻害する報告¹²⁾もあり、WSE 溶液曝露によって細胞膜周辺に存在する光化学系器官が損傷あるいは破壊作用を受けるような場合には酸素生成反応の機能が損傷し光合成反応の活性が低下することが推測される。そこで *M.a.*細胞の光合成活性について DO 濃度の増加速度を酸素電極による光合成呼吸測定法^{13, 14)}に基づいて評価した既往の試験結果によれば、WSE 溶液を *M.a.*細胞に曝露させた直後から DO 濃度の増加速度が低下したため WSE 溶液曝露により光合成反応が明らかに阻害されているものと考えられる。すなわち、WSE 溶液曝露における *M.a.*

細胞の増殖抑制メカニズムは細胞膜破壊や光合成反応阻害による可能性が推測される。この内容については光化学反応系における NADP (電子伝達体) が何らかの阻害影響を受けた結果であると推察される。これらに関する内容については研究継続中である。

5. 結語

淡水資源の水質保全を目的とする研究の一環として毒性物質を生成する有害な藍藻類の増殖を落葉広葉樹のサクラ枯葉に含有される水溶性成分である CT 成分を利用して抑制する手法について検討した。その結果、*M.a.*細胞の増殖抑制効果が水溶性成分を含有する WSE 溶液添加後における初期 CTLI 値に大きく影響されるため、初期 CTLI 値と WSE 溶液の曝露環境が増殖抑制効果とその持続性に影響を及ぼすことを示唆している。本研究では *M.a.*細胞と WSE 溶液の初期 CTLI 値と曝露時間との関係から細胞の増殖抑制あるいは阻害効果について検討した。以下に重要な結果を要約する。

1. 乾燥サクラ枯葉を DI 水に 24 時間浸漬した場合、サクラ枯葉単位重量あたりの CT 抽出量は約 13.1 mg-CTch/g であった。すなわち、サクラ枯葉から DI 水への CT 成分の抽出は枯葉を単に DI 水に浸漬する操作によって容易に回収することが出来る。

2. (初期 CTLI×T) 値が 20~30 pg-CTch・hr/細胞以下では増殖抑制傾向が、それ以上の場合では増殖阻害傾向が認められる。増殖阻害効果をもたらす初期 CTLI 値は 10~15 pg-CTch/細胞程度以上であるため、増殖阻害効果が認められるには少なくとも 2~3 hr 程度の曝露時間が必要である。

追記：淡水系水源でのアオコ発生抑制の目的に対して、落葉広葉樹枯葉を利用する自然界の環境修復技術について検討している。この研究に参画し、多くの分析作業に協力いただきました平成 22 年度卒業

研究の学生諸君に感謝の意を表します。

記号説明

CT : 縮合型タンニン

CTch : カテキン水と物換算した縮合型タンニン

CTLI : 縮合型タンニン負荷強度

DI 水 : 脱イオン水

M.a. : *Microcystis aeruginosa*

n : 試料数

PP : ポリフェノール

SD : 標準偏差

T : 曝露時間

WSE : 水溶性抽出液

参考文献

- 1) 渡辺真利代, 原田健一, 藤木博太: アオコ その出現と毒素, pp.55-73, 東京大学出版会, 1994.
- 2) Ridge I., Walters J. and Street M.: Algal growth control by terrestrial leaf litter: a realistic tool?, *Hydrobiologia*, Vol. 395-396, pp. 173-180, 1999.
- 3) Nakai S., INOUE Y. and HOSOMI M.: *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenol inhibition growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*, *Water Research*, Vol. 34, No. 11, pp. 3026-3032, 2000.
- 4) 笹尾敦子, 松尾宏, 田中義人: 茶抽出液によるアオコ増殖抑制への効果, 陸水学雑誌, Vol. 62, pp. 115-122, 2001.
- 5) Mulderij G., Mooij W.M., Smolders A.J.P. and Van Donk E.: Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from *Stratiotes aloides*, *Aquatic botany*, Vol. 82, pp. 284-296, 2005.
- 6) 喜多村延政, 長川時生, 吉田征史, 松島晔, 浅田泰男: 落葉広葉樹枯葉部抽出液を用いた有毒藍藻類の増殖抑制に関する基礎的研究, 環境工学研究論文集, Vol. 43, pp. 543-549, 2006.
- 7) Kitamura N., Shimada K., Yoshida Y., Matsushima H. and Asada Y.: Influence of the condensed tannin extracted from the dead leaves of deciduous trees on the growth control of toxic cyanobacteria like *Microcystis aeruginosa*, Proc. of EMECS 8th Conference, pp. 146, 2008.

- 8) Shimada K., Yoshida Y., Matsushima H. and Asada Y.: Effects of water soluble extract from the dead leaves of deciduous trees on the growth control of toxic cyanobacteria like *Microcystis aeruginosa*, Proc. Water Pollution 10th Conference, pp. 71-82, 2010.
 - 9) 真部孝明：フローチャートで見る食品分析の実際 - 植物性食品を中心に -, pp. 79-88, 三美印刷 (株), 2003.
 - 10) Broadhurst R.B. and William T.J.: Analysis of condensed tannins using acidified vanillin, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 29, pp. 788-794, 1978.
 - 11) 生貝初, 原征彦, 大鶴洋, 島村忠勝: Epigallocatechin gallate の膜障害作用に関する研究 - polymyxin B との比較 -, 日本化学療法学会雑誌, Vol. 46, pp. 179-183, 1998.
 - 12) Zhu J., Liu B., Wang J., Gao Y. and Wu Z.: Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion, *Aquatic Toxicology*, Vol. 98, No. 2, pp. 196-203, 2010.
 - 13) 坂斉, 千坂英雄: 酸素電極による光合成・呼吸測定法の検討とその除草剤作用検定への利用, 雑草研究, Vol. 26, pp. 34-40, 1981.
 - 14) 坂斉, 千坂英雄: 酸素電極法による除草剤光合成阻害力の検定, 雑草研究, Vol. 26, pp. 79-84, 1981.
- (2011.5.30 受付)

On the Growth Inhibition of the Toxic *Microcystis aeruginosa* Affected by the Exposure Time of Water Soluble Extract Solution from Cherry Tree Dead Leaves

Koji SHIMADA¹, Yukihiro YOSHIDA², Hitomi MATSUSHIMA² and Yasuo ASADA³

¹Doctoral Program student at Dept. of Civil Engrg. Coll. of Sci. & Tech, Nihon University

²Civil Engineering Department. College of Sci. & Tech, Nihon University

³General Education. College of Sci. & Tech, Nihon University

Relative to the growth control or inhibition of the toxic cyanobacteria like *Microcystis aeruginosa* (*M.a.*), the factors affecting were examined supposing the effects of the condensed tannin (CT) from the water soluble extract (WSE) solution that was obtained by immersing the cherry tree dead leaves into DI water. Accordingly, the growth inhibition effect would be affected by the initial condensed tannin loading intensity per *M.a.* cell (CTLI, pg-CTch/cell) and the exposure time of the *M.a.* cell with the WSE solution. And the product of the initial CTLI and the exposure time would affect the cell growth control. When the product is set at higher than 20~30 pg-CTch·hr/cell, then the cell growth inhibition would take place. Furthermore, an effective growth inhibition by the WSE solution addition would need an exposure time of at least 2 or 3 hours.