

B-41 キノロン系抗菌薬による藍藻の生長阻害

○波多野 順一¹・浦瀬 太郎^{1*}

¹東京工科大学大学院バイオ情報メディア研究科バイオニクス専攻
(〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1)

* E-mail: urase@bs.teu.ac.jp

1. はじめに

排水に含まれる化学物質の安全性は、これまでヒトへの安全性を中心に評価されてきたが、生態系への影響も考慮されはじめている。近年、水環境中での Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) の挙動が注目されている。PPCPs は医薬品や化粧品などに由来する多様な化学物質を指し、家庭や医療機関などで使用され、継続的に水環境中に排出されている。このうちの医薬品については、その多くが難分解性であり下水処理場や浄化槽では処理しきれず、環境中に放出後も残留する可能性がある。実際に国外では、 $\mu\text{g/L} \sim \text{ng/L}$ のオーダーで抗生物質が検出されている¹⁾。これらの抗生物質は低濃度で生体に対し特異的に作用するため、水生生物に何らかの影響を与える可能性が懸念されている。

化学物質の有機物生産者に対する生態毒性評価には、主に緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* が用いられる。しかし、下水処理水および河川中から検出される抗生物質に対する毒性を評価する場合、緑藻よりも藍藻が化学物質に敏感であることが報告されている²⁾。OECD テストガイドライン No201 でも推奨種として藍藻 2 種が追加されるなど藍藻の試験生物としての有用性が高まっている。

そこで国の淡水域によく見られる浮遊性藍藻種、*Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験を行い、抗生物質が藍藻に与える影響を検討した。

2. 試験方法

(1) 対象抗菌薬

藍藻への毒性試験に用いる対象医薬品として、キノロン系抗菌薬であるレボフロキサシン (以下, LVFX) とシプロフロキサシン (以下, CFX) を選択した。キノロン系は合成抗菌薬の一つであり、抗菌活性や抗菌スペクトラムが高いことが特徴である。LVFX に関しては、その強い活性に対し、比較的ヒトへの安全性が高いことから国内外で頻用されており、年間の体外排出量が多いと推計されている³⁾。さらに、比較のためにアミノグリコシ

ド系抗生物質のゲンタマイシン (以下, GM) およびテトラサイクリン系抗生物質のテトラサイクリン (以下, TC) についても試験を実施した。

LVFX (Laboratories, Inc) は純水に、CPFX (Laboratories, Inc) は酢酸 (和光純薬工業: 特級) により溶解し任意の濃度に調製して用いた。GM および TC はともに和光純薬工業製を用い、純水により調製した。

(2) 藍藻による藻類生長阻害試験

本研究では、被験生物種として、国立環境研究所微生物保存施設より分譲された *Microcystis aeruginosa* (NIES-87) を用いた。この種に推奨される MA 培地 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg, KNO_3 10mg, NaNO_3 5mg, Na_2SO_4 4mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\beta\text{-Na}_2\text{glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, ZnCl_2 0.05mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.08mg, H_3BO_3 2mg, Bicine 50mg, Distilled water 100mL) を用いて 25°C, 2000 lux (明暗サイクル) 及び 5000 lux (連続照射), 145 rpm 振とうにより前培養を行った。

藻類生長阻害試験は、一般的に三角フラスコが用いられるが、必要試料量が少なく多検体一斉試験が可能である利点からマイクロプレートも用いられる。しかし、マイクロプレートを用了場合、検液の蒸散及び菌体の付着の問題があるため、本試験では前培養及び毒性試験時にはシリコン栓をした試験管 (A-18 短) を用いて行った。

a) 初期細胞濃度と照度

藍藻への毒性が試験条件により変化する可能性を明らかにするため、初期細胞濃度と照度の差異による藍藻への毒性影響の変化を検討した。

MA 培地のみが入った試験管と MA 培地で希釈を行った抗菌薬入りのサンプルを用意した。初期細胞濃度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ になるよう接種し、25°C, 2000 lux (明暗サイクル), 145 rpm 往復振とうにより培養を行ったケースと初期細胞濃度が $2.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ となるよう接種し、25°C, 5000 lux (連続照射), 145 rpm 往復振とうで培養を行ったケースとを設定した。試験期間とはともに 120 時間と

した。

b) 分析方法

藍藻の生長測定は、顕微鏡下血球計算盤 (倍率400倍) による細胞数計測で行うと同時に培養後にマイクロプレートリーダーにサンプルを移し蛍光強度測定 (励起波長 360nm, 蛍光波長 670nm, 藍藻特有に含まれる色素蛋白質であるフィコシアニンを対象) も行い二つの方法を比較した。

藻類生長阻害試験の培養開始時に初期の細胞密度および蛍光強度の測定をした。試験期間の終了時である120時間後にも同様の測定操作を行い、初期値との差から増殖率 (倍) を算出した。抗生物質曝露なしの場合の増殖率を100%として、抗生物質を曝露したサンプルの相対増殖率で藍藻への影響を示した。以下の式より算出した。

$$\text{相対増殖率} = \frac{\frac{\text{抗生物質ありの120時間後の濃度}}{\text{抗生物質ありの0時間の濃度}}}{\frac{\text{抗生物質なしの120時間後の濃度}}{\text{抗生物質なしの0時間の濃度}}}$$

3. 結果及び考察

(1) キノロン系抗菌薬による藍藻への生長阻害

図-1に初期細胞濃度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、明暗サイクルの実験条件で得られた生長阻害結果を、図-2には初期細胞濃度 $2.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、連続照明の実験条件で得られた生長阻害試験結果を示した。

初期細胞濃度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、2000 lux、明暗サイクルによる *Microcystis aeruginosa* を用いたLVFXおよびCPFXの毒性試験において、得られた相対増殖率が50%になる抗生物質濃度は、蛍光強度測定ではLVFXが $33 \mu\text{g/L}$ 、CPFXが $42 \mu\text{g/L}$ 、細胞数計測ではLVFXが $19 \mu\text{g/L}$ 、CPFXが $20 \mu\text{g/L}$ となった。LVFXがCPFXより藍藻に対してやや低い濃度まで毒性を示した。

LVFX、CPFXともに細胞数計測の方が蛍光強度測定よりも低い濃度から影響が生じた。すなわち、光強度測定では、 $1 \mu\text{g/L}$ の抗生物質曝露に対しても、抗生物質曝露なしと同程度か、むしろ、それ以上の増殖率を示したが、細胞数計測では $1 \mu\text{g/L}$ の濃度曝露で増殖率の低下が見られた。また、増殖阻害を大きく示す濃度より低い $1 \mu\text{g/L} \sim 4 \mu\text{g/L}$ の濃度範囲で藍藻細胞の膨張が観察された。この現象はLVFX、CPFXともに見られ、キノロン系抗菌薬に共通の作用機序により、ひとつの細胞あたりの蛍光強度が大きくなったためと考えられる。

一方、初期細胞濃度 $2.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、5000 luxの条件での相対増殖率が50%になる抗生物質濃度は、蛍光強度測定では、LVFXが $20 \mu\text{g/L}$ 、CPFXが $21 \mu\text{g/L}$ となり、細胞

数計測ではLVFXが $15 \mu\text{g/L}$ 、CPFXが $16 \mu\text{g/L}$ となった。LVFXとCPFXとで藍藻に対する毒性値に差異はなかった。初期細胞濃度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、明暗サイクル時と同様に、低濃度の曝露による細胞の膨張も観察された。一方、高濃度の抗生物質を曝露した場合、細胞数は0に近いにもかかわらず、蛍光強度は一定の値を持つため、 $5 \mu\text{g/L}$ 以上の曝露濃度の領域においても20%程の相対増殖率となった。

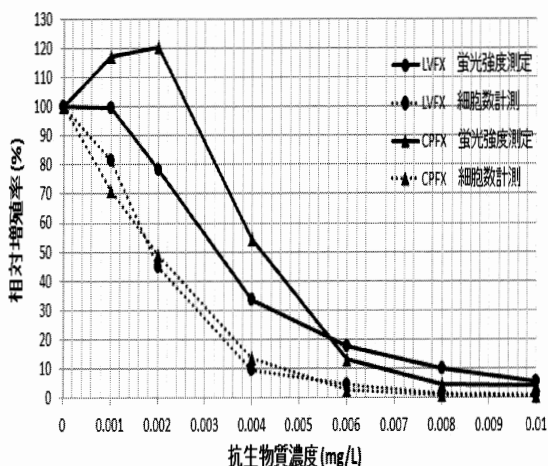


図-1 初期細胞濃度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、明暗サイクル時のLVFX、CPFXを用いた生長阻害結果

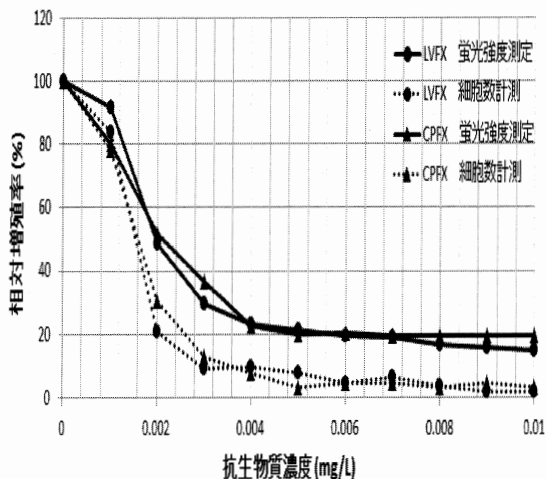


図-2 初期細胞濃度 $2.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、連続照明条件でのLVFX、CPFXを用いた生長阻害試験結果

(2) 照度と生物量

初期細胞濃度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、2000 lux、明暗サイクルによる試験条件時の生物量は初期値と比べて120時間後には抗生物質を加えない条件で約22倍に増殖していた。また、初期細胞濃度 $2.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 、5000 lux、連続照明条件時の生物量は同様に約16倍に増殖した。こうした

増殖率の差が抗生物質による藍藻への影響の程度にも差をもたらすと予想したが、すでに述べたようにLVFX, CPFXともに1 $\mu\text{g/L}$ ~3 $\mu\text{g/L}$ の範囲に相対増殖率が急減する濃度があり、大きな差はみられなかった。 *Microcystis aeruginosa*を用いた生長阻害試験では、明暗サイクルによる自然環境の再現の必要性はなく、連続照明による生育環境で同等の結果が得られると考えられる。

日本国内における下水処理水中に含有されるLVFXは0.15~0.32 $\mu\text{g/L}$ と報告されている¹⁾。本研究で推定された増殖に影響の生じる濃度を下回るため、LVFX単体での藍藻への影響は大きくないと考えられるが、同じ作用機序の抗生物質は多く存在するため、キノロン系抗菌薬の合計濃度として評価する場合には必ずしも余裕のある値ではないと考えられる。

(3) GM及びTCによる藍藻への生長阻害

図-3にGM曝露による藍藻の生長阻害試験結果を、図-4にTC曝露による藍藻の生長阻害試験結果を示した。GM曝露による毒性試験において得られた相対増殖率が50%になる濃度は、蛍光強度測定では150 $\mu\text{g/L}$ 、細胞数計測では120 $\mu\text{g/L}$ となった。相対増殖率が急減する濃度より低い範囲で、LVFX, CPFXの場合とは逆に、細胞の萎縮が観察された。細胞数はこの低濃度範囲でむしろ増加しており、GMへの低濃度暴露では、細胞の分裂は抑制されなかったものの、代謝は抑制されたことが考えられる。

TC曝露の場合の相対増殖率が50%になる濃度は、蛍光強度測定では900 $\mu\text{g/L}$ 、細胞数計測では1700 $\mu\text{g/L}$ となった。GM同様に細胞の萎縮が低濃度領域で観察され、LVFX, CPFXとは逆の影響があった。また、相対増殖率が急減する濃度は、GM及びTCの場合にはLVFX及びCPFXに対してよりも数百~数千倍高い濃度であることがわかった。

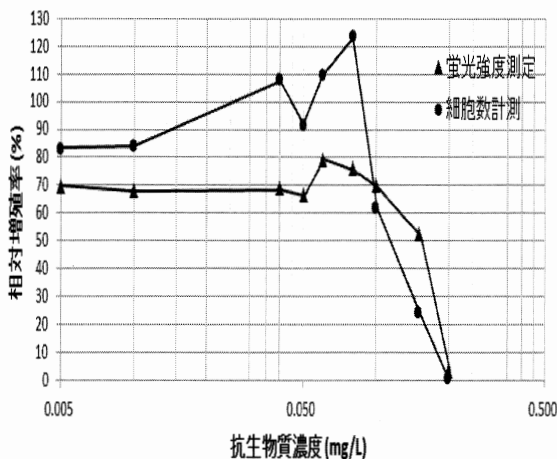


図-3 GMを用いた藍藻の生長阻害結果

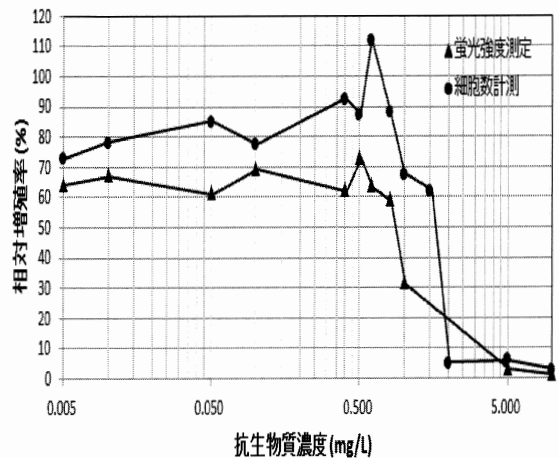


図-4 TCを用いた藍藻の生長阻害結果

4. まとめ

キノロン系抗菌薬であるレボフロキサシン及びシプロフロキサシンに対する毒性を藍藻 *Microcystis aeruginosa*を用いて検討した。初期細胞濃度及び照度(連続照明/間欠照明)の実験条件にかかわらず、相対増殖率が50%となる濃度は1 $\mu\text{g/L}$ ~3 $\mu\text{g/L}$ であった。異なる作用機序を持つゲンタマイシンとテトラサイクリンでは、レボフロキサシンとシプロフロキサシンに比べ数百倍高い濃度で相対増殖率が50%となり、キノロン系抗菌薬は藍藻に対し顕著に毒性を示すことが示唆された。

参考文献

- 1) 八十島誠, 山下尚之, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 水環境学会誌, Vol.27, No.11, pp707-714, (2004).
- 2) P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello: *Science of The Total Environment*, Vol.429, pp 123-155, (2012).
- 3) April A. Robinson: *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.24, No.2, pp423-430, (2005).