

B-25 緑藻を用いた抗生物質の生態影響に関する基礎的研究

○八木 聡^{1*}・川上 北斗¹・石川 奈緒¹・伊藤 歩¹・海田 輝之¹

¹岩手大学工学研究科社会環境工学専攻 (〒020-8551 岩手県盛岡市上田4丁目3-5)

* E-mail: yagishuukatsu@gmail.com

1. はじめに

近年、水環境における化学物質の研究が盛んになるにつれ、水環境中の化学物質の存在や生態影響への関心が高まっている。我が国では動物用医薬品として使用されている抗菌性物質(抗生物質、合成抗菌剤)の生産高は年間約 204 億円¹⁾であり、その多くの量が使用されている。これらの医薬品は家畜に投与され、その一部は代謝されず糞尿等を介して環境中に放出されるため、その存在が水環境中で確認されており、生態系への影響が懸念されている。しかし、これらの医薬品の環境中での挙動はまだ解明されておらず、水域生態系への影響も解明されていないのが現状である。そのためリスク管理の観点からその実態を明らかにする必要がある。

本研究では生産者として水域生態系を支える藻類に対する抗菌性物質 8 種の影響を調査するため、淡水産単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* を被験生物として用い、抗菌性物質の単独及び複合短期毒性試験を行い水環境中での生態影響について検討した。

2. 実験方法

(1) 対象抗菌性物質の選定

表-1 対象抗菌性物質

抗菌性物質名	分子式	販売量(t/年)
オキシテトラサイクリン	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	140.1
ドキシサイクリン塩酸塩	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₈	43.0
タイロシン	C ₁₆ H ₁₇ NO ₁₇	1.0
リンコマイシン塩酸塩	C ₁₈ H ₃₅ ClN ₂ O ₆ S	0.2
アモキシシリン	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	10.2
スルファモノメキシリン	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	19.1
トリメプリム	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	12.9
エンロフロキサシン	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	2.0

抗菌性物質は多種存在し、使用方法も異なることから使用量が多く、LC-MS/MS による濃度測定が容易に可能なものの 8 種を対象とした。使用した抗菌性物質を表-1 に

示す。販売量は平成 24 年に販売された抗菌性物質の原末換算量¹⁾である。

(2) 藻類を被験生物とした短期毒性試験

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 *Pseudokirchneriella subcapitata*(NIES-35) を被験生物として用い、*P. Subcapitata* は藻類培地 C(90)²⁾を用いて継代培養を行い、植え継ぎ 3 日後のものを短期毒性試験に用いた。短期毒性試験は OECD 化学テストガイドラインの「藻類成長阻害試験」³⁾に準拠した方法で行った。藻類細胞数の測定はシステム生物顕微鏡とプランクトン計数板を用いて行った。

表-2 単独短期毒性試験条件

生物種	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
初期細胞濃度	約 10 ⁴ cells/mL
試験期間	96h
濃度区数	5濃度+対照区
試験区数	3連区
濃度設定	10 μg/L, 50 μg/L, 100 μg/L, 1mg/L, 10mg/L
溶解助剤	不使用
使用培地	C(90)
条件	温度: 25 ± 2°C 照明: 4000lux
測定	細胞数を0, 12, 24, 48, 72, 96時間後
試験成立条件	対照区の細胞濃度が72hまでに16倍以上増加

表-3 複合短期毒性試験条件

抗菌性物質名	TU(Toxic Unit)						
オキシテトラサイクリン	0	1	0	0.5	2	0	1
リンコマイシン塩酸塩	0	0	1	0.5	0	2	1

表-2 に単独短期毒性試験の条件を示す。また、2 種の抗生物質の組み合わせについて継代培養や試験中の培養条件を変えず、複合短期毒性試験を行った。表-3 に複合短期毒性試験に用いた試験溶液の組み合わせを示す。後述する EC₅₀ 値を 1 Toxic Unit (=TU) とし、0.5 TU, 2 TU は 1 TU の濃度を 0.5 倍、2 倍と設定して試験を行った。

また、継代培養と短期毒性試験に使用した実験器具と

試験溶液はあらかじめ 121℃, 15 分間オートクレーブで滅菌し, 藻類の植種はクリーンベンチ内で無菌的に行った。試験溶液は LC-MS/MS (WATERS 社製) を用いて抗菌性物質濃度の確認試験を行った。表-4 に LC-MS/MS 装置および各移動相の条件を示す。

表-4 LC-MS/MS 条件

LC条件	
UPLC装置	ACQUITY UPLC H-CLASS
カラム	BEH C18 (2.1 * 50mm * 1.7 μm)
移動相	A:0.005%Formic acid;B:Methanol
流速	0.4mL/min
カラム温度	50℃
注入量	5 μL
MS/MS条件	
質量分析計	Xevo TQD
イオン化法	ES
測定モード	MRM Positive

3. 結果および考察

(1) 単独短期毒性試験結果

単独短期毒性試験に使用した試験溶液の抗菌性物質濃度の確認試験結果を表-5 に示す。試験溶液は設定した濃度に近い濃度の溶液であることが確認された。

表-5 抗菌性物質濃度の確認試験結果(単独)

抗菌性物質名	設定濃度(μg/L) (10 μg/L)	測定値 (μg/L)	設定濃度(μg/L) (50 μg/L-10mg/L)	測定値 (μg/L)
オキシテトラサイクリン	10	12.2	50	46.6±2.3
ドキシサイクリン塩酸塩	10	10.0	50	46.8±1.9
タイロシン	7.5	7.5	50	49.3±3.7
リンコマイシン塩酸塩	10	8.3	50	47.5±0.4
アモキシシリン	10	10.4	50	55.2±1.0
スルファモノメキシ	10	9.6	50	50.2±3.3
トリメトプリム	10	9.6	50	48.7±2.1
エンロフロキサシン	10	9.6	50	52.7±2.7

単独短期毒性試験の結果を図-1, 2, 3 に示す。図-1 に例としてオキシテトラサイクリンの各試験溶液における時間ごとの藻類細胞数の相対濃度を示す。

オキシテトラサイクリンの場合には 50 μg/L まで対照区とほとんど同様の生長を見せたが, 100 μg/L 以上の濃度で生長阻害が確認された。

図-2, 3 は各抗生物質, 合成抗菌剤による藻類の成長阻害率を示したものである。阻害率は, まず図-1 より各抗菌性物質濃度において藻類細胞が対数増殖を示す期間での細胞数の平均値から成長速度 μ を求め, μ から阻害率 I を求めた。式は以下に示すとおりである。

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad \begin{array}{l} t_2 - t_1 : \text{藻類細胞数が対数増殖を示す期間} \\ N_1 : t_1 \text{ 時の実測細胞数濃度 (cells/mL)} \\ N_2 : t_2 \text{ 時の実測細胞数濃度 (cells/mL)} \end{array}$$

$$I = \frac{\mu_0 - \mu}{\mu_0} \times 100 \quad \begin{array}{l} \mu_0 : \text{対照区の平均成長速度} \\ \mu : \text{各濃度区の平均成長速度} \end{array}$$

図-2, 3 より, アモキシシリンを除く 7 種で阻害が確認できる。アモキシシリンでは濃度が 10 mg/L においても生長阻害がほとんど見られず, 阻害率が 50% の半数影響濃度 EC_{50} 値は求められなかった。トリメトプリムにおいても成長阻害は小さく本実験条件では EC_{50} 値は求められなかった。

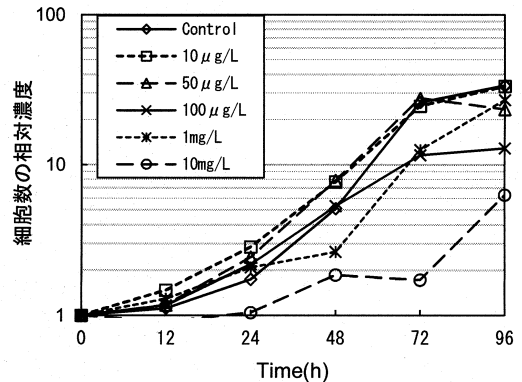


図-1 藻類細胞数の相対濃度の経時変化
(オキシテトラサイクリン)

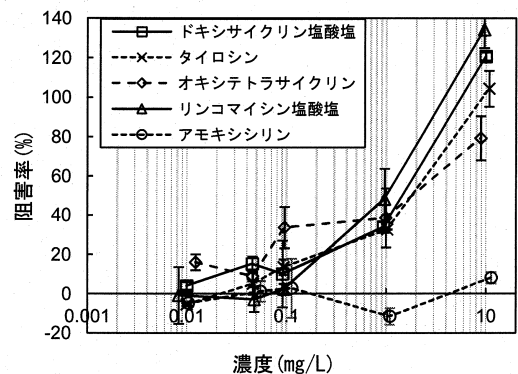


図-2 抗生物質による阻害率

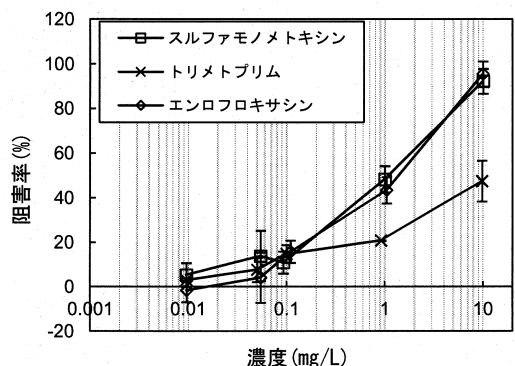


図-3 合成抗菌剤による阻害率

また, 表-6 に各抗菌性物質の作用機序及び EC_{50} 値を示す。表-6 より同じ葉酸合成阻害に分類されるスルファモノメキシとトリメトプリムではスルファモノメキシの EC_{50} 値が 1.10 mg/L に対し, トリメトプリムで

は、10 mg/L 以上であった。これはスルファモノメトキシが葉酸の合成を阻害する物質であるのに対しトリメトプリムが葉酸の活性を阻害する物質であることが原因であると考えられる。

表-6 各抗菌性物質の作用機序と EC₅₀ 値

種類	作用機序	抗菌性物質名	EC ₅₀ (mg/L)
抗菌物質	タンパク質合成阻害	オキシテトラサイクリン	1.80
		ドキシサイクリン塩酸塩	1.53
		タイロシン	1.80
		リンコマイシン塩酸塩	1.00
合成抗菌剤	細胞壁合成阻害	アモキシシリン	N.D.
	葉酸合成阻害	スルファモノメトキシ	1.10
	核酸合成阻害	エンロフロキサシン	1.36

以上の結果より *P. Subcapitata* に対する毒性影響はアモキシシリンが最も弱く、その次にトリメトプリムであった。他の6種については比較的近い毒性影響があり、EC₅₀ 値は 1~2 mg/L であった。さらに *P. Subcapitata* に対する抗菌性物質単体の毒性影響に関し、各物質の薬理作用が関与していることが分かった。

(2) 複合短期毒性試験結果

(1)の結果より、EC₅₀ の値が近いリンコマイシン塩酸塩、オキシテトラサイクリンの EC₅₀ 値 (=1 TU) をそれぞれ 1.0 mg/L, 1.8 mg/L と設定し、複合短期毒性試験を行った。

表-7 に複合短期毒性試験に使用した試験溶液の抗菌物質濃度の確認試験結果の例 (抗菌物質濃度 1 TU) を示す。試験溶液は単独試験のものと同様に設定した濃度に近い濃度の溶液であることが確認された。

表-7 試験溶液の濃度確認試験結果の例(複合)

抗菌物質名	設定濃度 (mg/L)	濃度 (mg/L)
オキシテトラサイクリン	1.80	1.94
リンコマイシン塩酸塩	1.00	1.06

図-4 は各試験溶液における時間ごとの藻類細胞数の相対濃度 (L: リンコマイシン塩酸塩, 0: オキシテトラサイクリン) を示しており、リンコマイシン塩酸塩単体で TU 値が 1 と 2 及びオキシテトラサイクリン単体で TU 値が 2 の場合では大きな成長阻害が見られた。図-5 は図-4 の対照区に対する各試験溶液の 72 時間後の藻類細胞数の割合を示したものである。各抗菌物質単体の条件 (1:0, 0:1, 2:0, 0:2) に比べ、2 種の抗菌物質を複合した条件 (0.5:0.5, 1:1) の方が 72 時間後の藻類細胞数が多いことが確認された。また、TU 値が 1 の各抗菌物質単体で条件 (1:0, 0:1) に比べ合計 TU 値を 2 とした複合条件 (1:1) で 72 時間後の藻類細胞数はオキシテトラサイクリン単体と差は見られなかった。

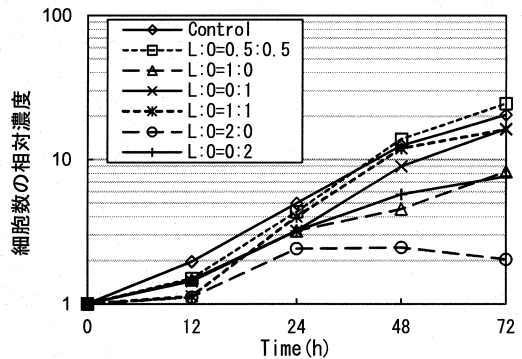


図-4 藻類細胞数の相対濃度の経時変化

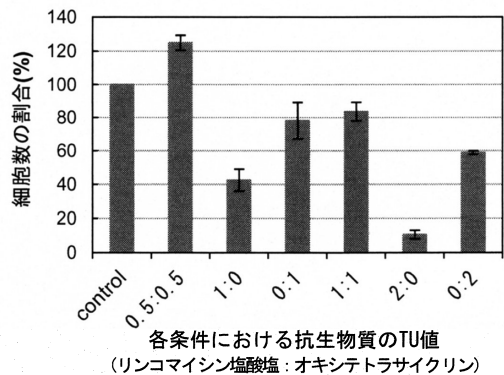


図-5 各試験溶液の 72h の藻類細胞数の割合

以上の結果より、オキシテトラサイクリンとリンコマイシン塩酸塩に関し、各抗菌物質単体の条件に比べそれぞれを複合させた場合 *P. Subcapitata* に対する毒性影響は緩和されると考えられる。

4. まとめ

短期毒性試験の結果より、抗菌性物質単体の毒性影響には各抗菌物質の薬理作用が関与していることが分かった。また、複合毒性影響に関してはリンコマイシン塩酸塩、オキシテトラサイクリンを混合することによって拮抗作用が生じることが分かった。今後これらの結果のメカニズムの解明及び異なる作用機序の抗菌物質を組み合わせた複合短期毒性試験等、さらなる研究が必要である。

参考文献

- 1) 農林水産省動物用医薬品検査所, 平成24年動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器販売高年報 (別冊), 2013.
- 2) NIES, LIST OF STRAINS Seventh Edition 2004 Microalgae and protozoa, 2004.
- 3) 日本環境毒性学会, 生態影響試験ハンドブック, 2003.