

5) 2世代目ラットの臓器湿重量:

出産後、離乳期を経て交配、受胎・妊娠・出産まで都市ゴミ焼却灰の1%混合飼料を摂取し、6ヶ月後から3ヶ月間再び灰混合飼料を摂取した2世代目雌雄ラットをエーテル麻酔下、採血後、脱血死させて各種臓器を摘出、湿重量を測

定した結果を、各個体の体重差を補正するために、各個体の体重に対する各臓器湿重量の比で表5に示した。なお、今回は飼料別の雄ラット6匹ずつの結果を示した。

表5 2世代目雄ラットの各種臓器湿重量

飼料	体重 (g)	肝臓/体重 (g/g)	腎臓/体重 (g/g)	脾臓/体重 (g/g)	辜丸/体重 (g/g)	副辜丸/体重 (g/g)
通常食 (n=6)	530 ±49	0.0276 ±0.0027	0.0057 ±0.0003	0.0015 ±0.0001	0.0062 ±0.0006	0.0014 ±0.0001
灰混合食 (n=6)	530 ±35	0.0315 ±0.0032	0.0060 ±0.0006	0.0016 ±0.0002	0.0030** ±0.0012	0.0015 ±0.0002

**：P<0.001

2世代目ラットの摂取飼料の違いで顕著な臓器湿重量の変動が示されたのは、辜丸のみであった。都市ゴミ焼却灰を摂取することにより辜丸湿重量は約半分に萎縮していることがわかる。1世代目では、実験開始後4ヶ月目の雄の肝臓のみに灰混合食群の有意な低下(P<0.01、対照群0.0337±0.0019、FA群0.0312±0.0012)が見られたが、辜丸その他の臓器には変動がなかった。離乳後3ヶ月後に交配し、雌の妊娠期間20日間と出産を含めて約4ヶ月間、6ヶ月後に再摂取期間3ヶ月間を加えると約7ヶ月間1%焼却灰を摂取することによりこの辜丸湿重量の減少がみられたのか、または1世代目の約4ヶ月間の摂取期間も加算した影響が出ているのかなど多くの検討課題があるので、実験動物数を増やす必要性や精子数測定、更に組織学的変化の観察などを考え併せて、再度詳細に実験を繰り返す必要があると思われる。

D. 結論

都市ゴミ焼却灰に含まれる複数の有害化合物の生体に対する複合的リスクアセスメント手法の一つとして生殖機能影響検索法の実験的研究を行った。即ち、2世代にわたって1%焼却灰混合飼料をラットに摂取させ、交配による受胎率、新生児の数と雌雄比率、血液中のホルモン濃度、血液と肝臓のポルフィリン代謝関連酵素活性および各種臓器湿重量などの変動を観察した。

結果として、①1世代目雌ラットの血液中エストラジオールとプロゲステロンの濃度が灰混

合飼料の摂取により減少傾向を示した。これは受胎率低下や受胎成立までの必要日数増加との関連性が推測される。②2世代目でも灰混合飼料摂取により受胎の率低下とその成立必要日数増加がみられた。③2世代目ラットから出産した新生児の数が雄親の灰混合飼料摂取により減少し、また雄新生児の数が母親の灰混合飼料の摂取により減少していた。④2世代目雄ラット各種臓器のうち、灰混合飼料摂取により辜丸湿重量が約半分に減少していた。

以上の様に、都市ゴミ焼却灰の中にはラット

の生殖機能に変動を与える物質（内分泌攪乱作用物質）が存在していることが推測された。従って、これまで行ってきた実験手法は、都市ゴミ焼却灰中の複数化合物の複合的リスクアセスメント手法の一つとして有効な手段であることが証明された。ただ、これは早期評価法としては不適切であるが、他の評価法の総合的確認の方法として動物実験が位置付けされると考えれば、今後出来るだけ早期に評価出来る手法との関連性を見いだすことが必要となる。

この実験的研究で見いだされた生体での変動がどのような物質であるのかは、先ず無機化合物と有機化合物とを分離して確かめ、次いでカラムクロマトグラフィなどで詳細な分析を行い、影響物質の同定を進める必要がある。

E. 参考文献

- 1) 市川勇、田中勝、井上雄三、山田正人、今岡浩一、大村実、田中昭代、都市ゴミ焼却灰の長期間摂取による雄ラットの体重等に対する影響、第9回廃棄物学会講演論文集I、p423-425, 1998.
- 2) 市川勇、井上雄三、山田正人、田中勝、大村実、田中昭代、村上和雄、磯部藍、河村菜穂、都市ゴミ焼却灰の生体影響をラットの生殖機能に関して評価する方法の実験的研究、第10回廃棄物学会講演論文集II、p 1150-1152, 1999.
- 3) 近藤雅雄、市川勇、網中雅仁、中村磐男、ポルフィリン代謝系諸酵素活性に及ぼす希土類元素化合物の試験管内での影響、ポルフィリン、6:85-92, 1997.
- 4) 市川勇、田中勝、都市ゴミ焼却飛灰の急性および亜急性投与・吸入暴露によるラット肺組織残存金属の量的変動について、第11回全国都市清掃研究発表会講演論文集、p 187-189, 1990.
- 5) 市川勇、大迫政浩、田中勝、都市ゴミ焼却飛灰抽出液の生体影響(1)1ヶ月間経口投与によるラットの生物学的・生化学的影響、第3回廃棄物学会研究発表会講演論文集、635-638, 1992.
- 6) 市川勇、伊藤智彦、大迫政浩、田中勝、町田直美、都市ゴミ焼却飛灰抽出液の生体影響、(3)6ヶ月間経口投与ラット臓器中残存金属元素量の変動、第5回廃棄物学会講演論文集、p513-515, 1994.
- 7) 市川勇、東みちる、伊藤智彦、田中勝、大迫政浩、町田直美、都市ゴミ焼却飛灰抽出液の生体影響(4)18ヶ月間経口投与ラット臓器中残存金属元素量の変動、第6回廃棄物学会論文集、p723-725, 1995.

廃棄物試験用の高感受性細菌の開発

分担研究者 小田美光 大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部主任研究員

研究要旨

ラットのグルタチオン転移酵素（GST）を高産生する *umu* 試験菌株 *Salmonella typhimurium* NM5004 は、ジハロアルカン類に対して高感受性を示すことがわかっている。そこで、この試験菌株が、発がん性有機塩素系化合物の遺伝子毒性を検出できるかどうかを親株（*S. typhimurium* TA1535/pSK1002）と比較することにより検討した。その結果、S9 非存在下で 1,4-Dichlorobenzene、2,4,6-Trichloro-phenol の遺伝子毒性が親株で検出できることがわかった。しかしながら、GST 高産生株は、今回用いた有機塩素系化合物の遺伝子毒性を検出できなかったことから、有機塩素系化合物の遺伝子毒性の検出に適用できないことがわかった。

A. 研究目的

グルタチオン S-転移酵素（GST）は、化学発がん物質や変異原物質の代謝産物を解毒することに関与していることが知られていたが、最近では、ハロゲン化炭化水素類の代謝的活性化にも重要であることが知られている。GST は α 、 π 、 μ 、 θ の 4 つのクラスに分類されており、このうち θ クラスの GST はジハロメタンとグルタチオンとの抱合反応によって変異原性を示すことがわかっている。事実、我々は環境中のハロゲン化合物の遺伝子毒性を検出できる系を開発するため、ラットの GST 5-5 の cDNA と *umuDC* 遺伝子を連結させて構築したプラスミド pYO100 を *Salmonella typhimurium* TA1535 に導入して樹立した試験菌株 NM5004 は、ジハロアルカン類の遺伝子毒性を検出できることがわかった。そこで、今回、グルタチオン転移酵素遺伝子を導入した *umu* 試験菌株が塩素系有機化合物に適用が可能かどうかを *umuC* 遺伝子発現を指標にして、従来の親株と比較することにより検討した。

B. 研究方法

1. 化学物質

実験には発がん性を示すと報告されている有機塩素系化学物質である Chlorobenzene（和光特級）、1,4-Dichlorobenzene（和光一級）、Pentachlorophenol（シグマ製）、2,4,6-Trichlorophenol（和光一級）、Hexachlorobenzene（東京化成製）を用いた。

2. *umu* 試験の原理と方法

2-1. *umu* 試験の原理

umu 試験は、大腸菌の SOS 反応を利用した原理に基づいている。すなわち、*umu* 遺伝子は、プロモーター、オペレーター、*umuD,C* 遺伝子の構造からなるオペロンを形成している。この遺伝子の働きは、傷となったギャップを緊急に修復するためポリメラーゼ V により、DNA 合成を促進して傷を修繕するのである（SOS 修復）。*umuC* 遺伝子発現の原理は、紫外線や化学変異原物質によって DNA が損傷を受けると、SOS シグナルが出て、これが RecA 蛋白質を活性化して、活性化 RecA 蛋白質がプロモーターにある SOS Box に結合して SOS 遺伝子を抑制している LexA 蛋白質を分断して、*umuD,C* 遺伝子が発現するようになる。*umuC* 遺伝子の発現は、*umuC* 遺伝子の

下流にレポーター遺伝子として β -ガラクトシダーゼをコードした *lacZ* 遺伝子が繋いであり、この活性を定量することにより化学物質の DNA 損傷性の有無を調べることができる。

umu 試験に用いている試験菌株は、化学物質が細胞内に取り込みやすいエームス試験菌株であるネズミチフス菌を宿主として用いている。

2-2. 試験菌株の特徴

親株の *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 は、プラスミド上に *umu* オペロンと *lacZ* 遺伝子を融合させた遺伝子が導入されており、そのプラスミドは細胞内で自己複製ができる。一方、グルタチオン転移酵素高産生株 *Salmonella typhimurium* NM5004 は、プラスミド上に *umu* オペロンと *lacZ* 遺伝子との融合遺伝子とさらに GST 遺伝子を持ち、そのプラスミドが導入してある。この GST 酵素は、細胞内で定常的に産生されている。

2-3. *umu* 試験法

-80℃から菌液の入ったチューブから滅菌ピペットでかき取り、20cm の長さの試験管に入った 50 μ g/ml の ampicillin を含む L-B 培地 (Bacto tryptone 1g, Bacto yeast extract 0.5g, NaCl 0.5g, 蒸留水 100ml) 2ml に植菌して、37℃で一夜、恒温振盪培養機 (タイテック株) で 150 rpm で振盪培養する。翌日、その菌液を TGA 培地 (Bactotryptone 1g, NaCl 0.5g, 蒸留水 100ml を高圧滅菌後、別滅菌した 20% グルコースを 1ml と 100mg/ml ampicillin (明治製菓製) を 160 μ l を加える。) で 100 倍希釈した菌液を 37℃で 1 時間 (A_{600} で 0.3 まで) 150 rpm で振盪培養した。S9 (オリエンタル製) の無添加の場合は、その菌液 2ml に被験物質 20 μ l を加えて、37℃で 5 時間まで培養した。一方、S9 の添加場合は、菌液 1.7ml に 0.3ml の S9 Mix (S9 の Cofactor はオリエンタル製) と被験物質 20 μ l を加えて、3 時間培養した。

2-4. 菌液中の β -galactosidase 活性の測定

上記のようにして培養した菌液の一部 0.2ml は、 β -galactosidase 活性の反応のため、残り 1.8ml は菌液の濃度 (A_{600}) を見るために用いた。菌液

0.2ml を Z-buffer (0.06MNaH₂PO₄ · 2H₂O、0.06MNa₂HPO₄ · 12H₂O、0.01MKCl、0.001MMgSO₄ · 7H₂O を蒸留水 1L で溶かし、2-mercaptoethanol (ナカライ製) 2.7ml を加える。) 1.8ml の入った小試験管に加える。さらに、0.1% sodium dodecyl sulfate 0.1ml と chloroform 1 滴を加えて、ボルテックスミキサーで混合して細胞膜を変性させる。この液に 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (和光純薬製) 0.2ml を添加混合し、28℃で 20 分間反応させた後、1MNaCO₃ 1ml を加えて混合して反応を停止させる。その後分光光度計 (日立株) で A_{420} と A_{550} を測定する。酵素活性の計算式は、次式のような Miller の方法で行った。

$$\beta\text{-galactosidase (units)} = 1,000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / (t \times v \times A_{600})$$

A_{420} : 420nm での吸光度 (2-nitrophenol の黄色の波長)

A_{550} : 550nm の吸光度 (持ち込まれた細胞の蛋白質)

A_{600} : 600nm の吸光度 (菌液の濃度)

t: 菌液の酵素と基質との反応時間

v: 菌液の希釈倍率

2-5. 結果判定

umu 試験では、化学物質の細胞毒性を細胞増殖の影響を吸光度の A_{600} で見ることにより調べることができる。細胞毒性の場合、陰性対照の A_{600} の値を 100%として、それぞれの化学物質を処理した時の A_{600} の値を求めて、その百分率を計算することにより細胞毒性の抑制率が解る。また、同時に化学物質の遺伝子毒性を β -galactosidase 活性を定量することで調べることができる。化学物質の遺伝毒性の判定の有無は、濃度に依存して β -galactosidase 活性が増加し、かつ陰性対照 (溶媒) の 2 倍以上の β -galactosidase 活性を示した場合を陽性と判定している。

C 研究結果

3. 有機塩素系化学物質の *umu* 試験での結果

3-1. 5 種類の有機塩素系化学物質の細胞増殖への

影響

3-1-1. Chlorobenzene による細胞増殖への影響

GST 産生株 NM5004 と親株 TA1535/pSK1002 を用いて、Chlorobenzene の細胞増殖に対する影響を調べた (図 1)。その結果、S9 非存在下では、Chlorobenzene は親株に対して高濃度(5 μ M)で強い細胞毒性を示した。一方、NM5004 株に対しては僅かに細胞毒性を示すことがわかった。S9 存在下では、両株共に細胞毒性を示さなかった。

3-1-2. Pentachlorophenol による細胞増殖への影響

NM5004 株と親株を用いて、Pentachlorophenol による細胞増殖への影響を検討した (図 2)。Pentachlorophenol は、S9 存在下、非存在下で、いずれの濃度で細胞増殖に対して影響を及ぼさ

なかった。一方、親株では、Pentachlorophenol が、S9 非存在下で濃度に依存して細胞増殖を抑制することがわかった。しかしながら、S9 存在下では抑制を見られなくなった。

3-1-3. Hexachlorobenzene による細胞増殖への影響

図 3 に示すように、両菌株での Hexachlorobenzene による細胞増殖への影響を検討した結果、Hexachlorobenzene は、S9 存在下、非存在下で、両菌株に対して細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

3-1-4. 1,4-Dichlorobenzene による細胞増殖への影響

1,4-Dichlorobenzene による NM5004 株と親株の細胞増殖に対する感受性を調べた (図 4)。1,4-

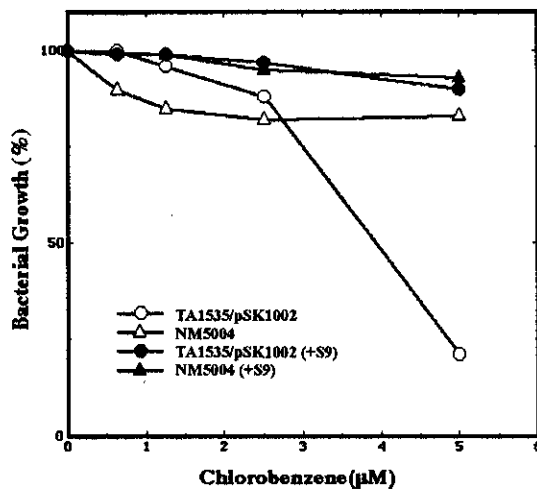


図 1 Chlorobenzene による細胞増殖への影響

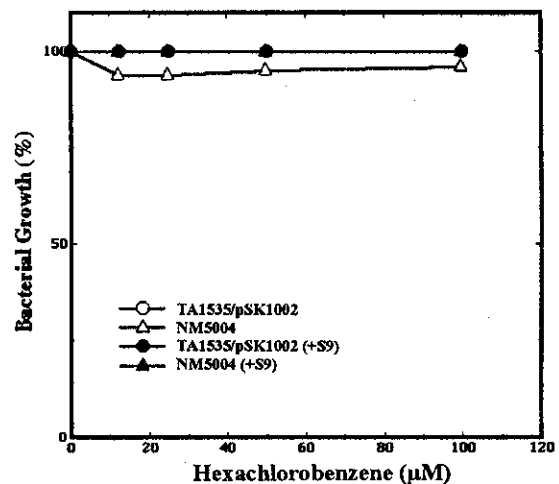


図 3 Hexachlorobenzene による細胞増殖への影響

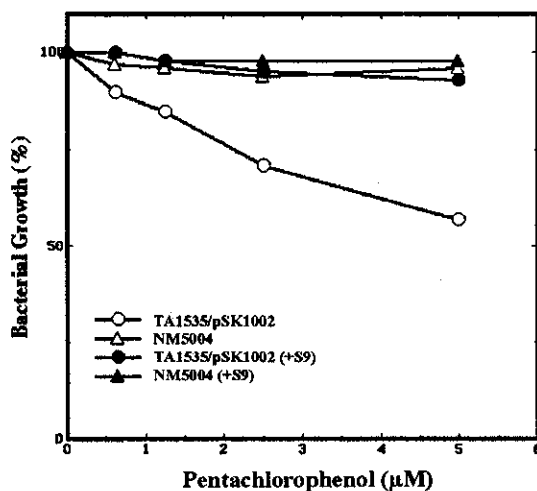


図 2 Pentachlorophenol による細胞増殖への影響

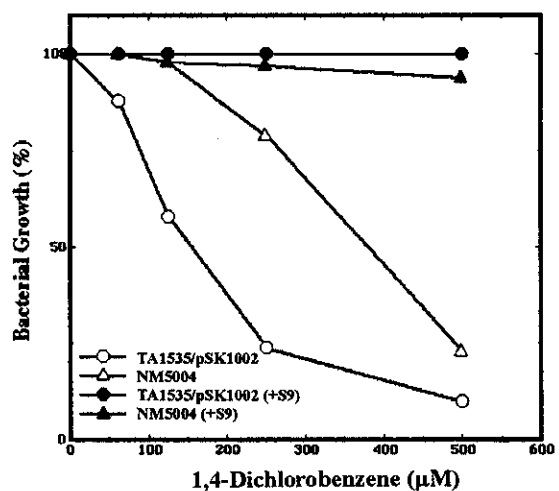


図 4 1,4-Dichlorobenzene による細胞増殖への影響

Dichlorobenzene は、S9 非存在下で親株と NM5004 株の 500 μ M の濃度で強く細胞増殖を抑制 (80~85%) することがわかった。一方、S9 存在下では、使用した濃度では、細胞増殖には影響しなかった。

3-1-5. 2, 4, 6-Trichlorophenol による細胞増殖への影響

図 5 に結果を示したように、2, 4, 6-Trichlorophenol の場合、S9 非存在下で親株が細胞毒性を示すが S9 存在下では、その毒性が軽減される。一方、NM5004 株では S9 存在下、非存在下で 2, 4, 6-Trichlorophenol が、細胞毒性を示さなかった。

3-2. *umuC* 遺伝子誘導性

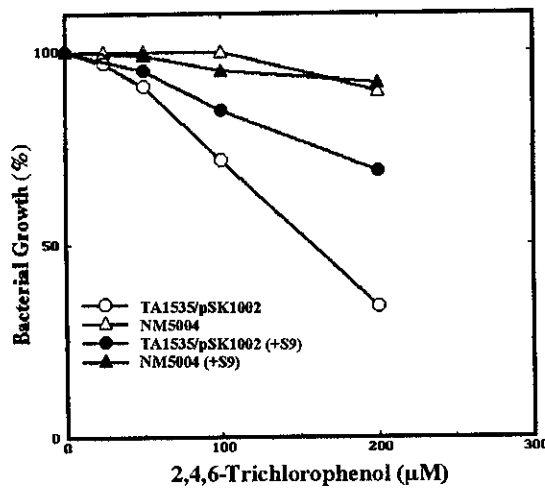


図 5 2,4,6-Trichlorophenol による細胞増殖への影響

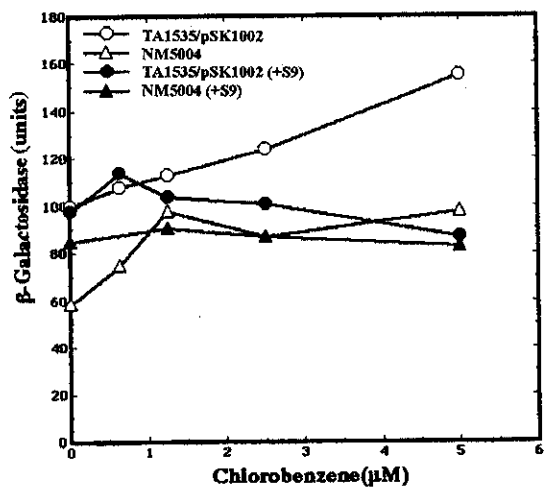


図 6 Chlorobenzene による *umuC* 遺伝子誘導の効果

3-2-1. Chlorobenzene による *umuC* 遺伝子誘導の影響

図 6 に Chlorobenzene による *umuC* 遺伝子発現 (β -galactosidase 活性で測定する。) の影響を親株と NM5004 株を用いて検討した結果を示した。

Chlorobenzene は、NM5004 株で S9 存在下、非存在下で有意な *umuC* 遺伝子誘導を示さなかった。一方、親株では、S9 非存在下で Chlorobenzene が非常に弱いながらも濃度に依存して *umuC* 遺伝子誘導を示したが、この結果は有意な結果ではないことがわかった。また、Chlorobenzene は S9 存在下で有意な増加が認められなかった。

3-2-2. Pentachlorophenol による *umuC* 遺伝子誘導

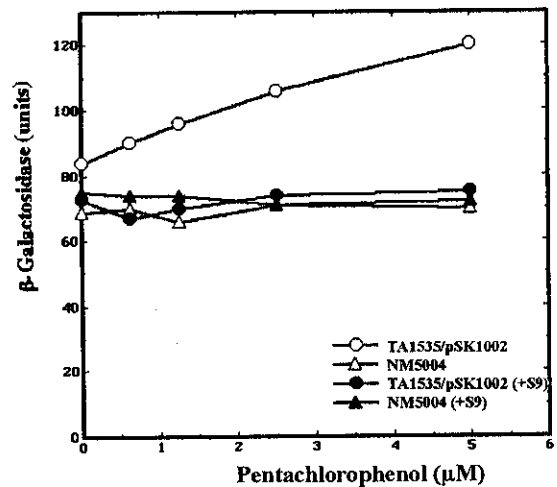


図 7 Pentachlorophenol による *umuC* 遺伝子誘導の効果

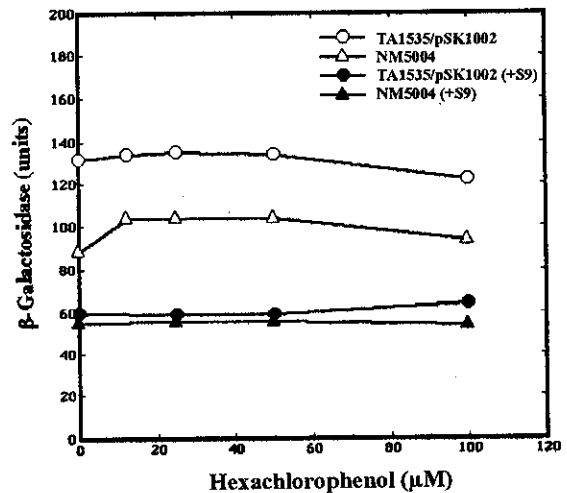


図 6 Hexachlorobenzene による *umuC* 遺伝子誘導の効果

の影響

Pentachlorophenol による *umuC* 遺伝子発現の影響を検討した (図 7)。

S9 非存在下で Pentachlorophenol は、親株に対して濃度に依存して *umuC* 遺伝子を誘導しているが、その誘導は非常に弱いものであった。一方、NM5004 の S9 存在下、非存在下あるいは、親株での S9 存在下で、いずれも *umuC* 遺伝子を誘導しなかった。

3-2-3. Hexachlorobenzene による *umuC* 遺伝子誘導の影響

図 8 に Hexachlorobenzene による *umuC* 遺伝子発現について検討した結果を示した。Hexachlorobenzene は、S9 存在下、非存在下で NM5004 株及び親株に対して影響を及ぼさなかった。

3-2-4. 1,4-Dichlorobenzene による *umuC* 遺伝子誘導の影響

1,4-Dichlorobenzene による *umuC* 遺伝子発現を検討した (図 9)。その結果、1,4-Dichlorobenzene は、親株で 62.5~250 μ g/ml の濃度で用量に依存して *umuC* 遺伝子発現を誘導させた。一方、S9 存在下では、逆に *umuC* 遺伝子発現が抑制された。NM5004 株では、1,4-Dichlorobenzene が S9 存在下、非存在下で *umuC* 遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。

3-2-5. 2, 4, 6-Trichlorophenol による *umuC* 遺伝子

誘導の影響

2, 4, 6-Trichlorophenol による *umuC* 遺伝子発現を検討した結果 (図 10)、親株は、S9 非存在下で用量に依存して *umuC* 遺伝子発現を誘導させることがわかった。しかしながら、NM5004 株が、S9 存在下、非存在下で、親株では S9 存在下でいづれの濃度でも *umuC* 遺伝子誘導を認めなかった。

D. 考察

グルタチオン転移酵素を高めた試験菌株 NM5004 は、動物実験で発がん性を有する 5 種類の有機塩素系化学物質に対して適用が可能かどうかについて、従来の *umu* 試験に汎用されているの親株 TA1535/pSK1002 と比較することにより検討した。

5) Chlorobenzene の細胞毒性は、親株に対して強い細胞毒性を示したが、S9 存在下では細胞毒性を示さなかった (図 1)。このことは、S9 に存在する酵素類によって解毒されたことにより、その毒性が軽減されたことが考えられる。一方、GST 高産生株では、Chlorobenzene は細胞増殖に対して影響が見られたが、僅かにであった。このことは、GST によって、Chlorobenzene が解毒されていることが示唆される。

Chlorobenzene による遺伝子毒性は、S9 非存在下の親株で非常に弱い遺伝子作用 (溶媒対照の 2 倍以下の活性) が見られた (図 6)。

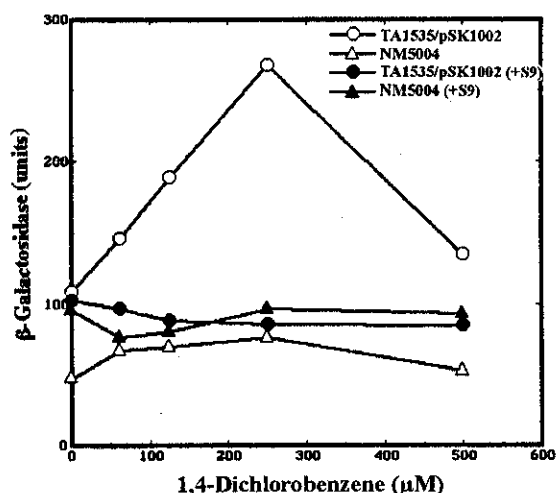


図 9 1,4-Dichlorobenzene による *umuC* 遺伝子誘導の効果

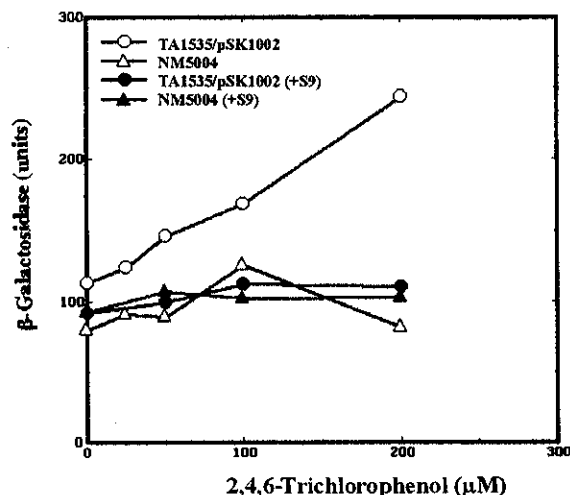


図 10 2,4,6-Trichlorophenol による *umuC* 遺伝子誘導の効果

しかしながら、この結果は、有意ではないので陰性とした。一方、GST 高産生株では、S9 存在、非存在下でも遺伝子毒性作用を示さなかった。この結果から、Chlorobenzene は、GST によって、代謝的活性化できなく、むしろ、不活性化（解毒）されているように思われる。

2) Pentachlorophenol による細胞毒性は、S9 非存在下で親株のみで認められた（図 2）。しかしながら、親株では S9 存在下、GST 高産生株では S9 存在下、非存在下で細胞毒性が見られなかったことから、S9 分画に存在する酵素類によって不活性化されているものと思われる。事実、S9 非存在下の GST 高産生株では、Pentachlorophenol による細胞毒性が認められていないことからうらやけられる。

Pentachlorophenol の遺伝子毒性は、Chlorobenzene と同様に親株で非常に弱い作用を示した（図 7）。しかしながら、この結果は陰性対照の 2 倍以上でなかったため陰性の結果と判定した。

3) Hexachlorobenzene による細胞毒性は、S9 存在下、非存在下で GST 高産生株、親株ともに用いた濃度でいづれも細胞毒性を示さなかった（図 3）。また、Hexachlorobenzene は、両菌株で遺伝子毒性を示さなかった（図 8）。この Hexachlorobenzene は難水性の性質を持っているので、最高濃度として、 $100\mu\text{M}$ で行い、それ以上の濃度で実験が行えなかった。

4) 1,4-Dichlorobenzene による細胞毒性は、S9 非存在下で親株の方が GST 高産生株よりも感受性が高いことがわかった（図 4）。一方、S9 存在下では、両菌株は細胞毒性が認められなかった。このことは、S9 に存在する酵素類によって解毒されたものと考えられる。

1,4-Dichlorobenzene による遺伝子毒性は、S9 非存在下で親株に対して $62.5\sim 250\mu\text{M}$ まで用量に依存して遺伝子毒性を示したが、 $500\mu\text{M}$ では、細胞毒性のため、その誘導が減少した（図 9）。S9 存在下では、1,4-Dichlorobenzene が遺伝子毒性作用を示さなかった。このことは、S9 に存在する酵素によって解毒されたことが推察さ

れる。S9 非存在下、GST 高産生株では、1,4-Dichlorobenzene が遺伝子毒性を示さなかった。このことは、細胞内の GST が 1,4-Dichlorobenzene と GSH の抱合体を形成して解毒されたものと推察される。

5) 2,4,6-Trichlorophenol による細胞毒性は、S9 非存在下で親株が細胞毒性が強いことがわかった（図 5）。一方、GST 高産生株では細胞毒性を示さなかった。このことは、細胞内の GST によって 2,4,6-Trichlorophenol による細胞毒性が不活性化されていることを示唆している。また、S9 存在下の親株でその細胞毒性が軽減されていることから、S9 に含まれる解毒酵素の関与によることが考えられる。

2,4,6-Trichlorophenol による遺伝子毒性は、S9 非存在下の親株で認められた（図 10）。しかしながら、GST 高産生株ではその遺伝子毒性が認められなかった。この結果は、2,4,6-Trichlorophenol による遺伝子毒性に GST が関与していないことを示唆しており、逆に不活性化に関与していることが推察される。

E. 結論

(1) Chlorobenzene、Pentachlorophenol、1,4-Dichlorobenzene および 2,4,6-Trichlorophenol による細胞毒性は、親株に対して強い感受性を示した。一方、GST 高産生株は、1,4-Dichlorobenzene 以外の化学物質は、細胞毒性を示さなかった。

(2) 1,4-Dichlorobenzene と 2,4,6-Trichlorophenol は、親株で、有意に遺伝子毒性を示した。Chlorobenzene と Pentachlorophenol は、非常に弱いながらも遺伝子毒性を示したが、有意ではなかった。GST 高産生株は、今回検討した化学物質に対して有意な遺伝子毒性を示さなかった。

(3) 今回 GST を高めた試験菌株 NM5004 は、有機塩素系化学物質の遺伝子毒性に適用できないことがわかった。従来 *umu* 試験に汎用されている親株 TA1535/pSK1002 の方が、より有機塩素系の化学物質の遺伝子毒性に適用が可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(なし)

2. 学会発表

(なし)

G. 知的所有権の取得状況

(なし)

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

動物細胞を用いた毒性評価手法の確立

研究分担者 酒井康行 東京大学生産技術研究所人間・社会部門講師

研究要旨

ヒト急性致死影響との相関が確認されている培養ヒト細胞を用いる 48 時間の生存率および LDL 取込み活性の阻害試験について、環境試料評価への適用を想定したプロトコールを作成した。確立したプロトコールにそって、化学分析が一部行なわれた国内河川水を評価し、バイオアッセイ 300 プロジェクトのバックグラウンドデータを用いて解析したところ、毒性支配物質の候補を挙げる事が出来た。

国内埋立地浸出水についてオゾン処理による毒性削減効果を評価したところ、残存毒性は原水よりも高くなる一方であり、活性炭処理による毒性低減もわずかであった。この毒性はこの処理過程で生じる親水性の低分子有機物質に主に由来すると推察された。

A. 研究目的

動物細胞の短期生存率試験は一般細胞毒性試験に分類される。これら一群のバイオアッセイ手法は、ほ乳類以外を用いた各種手法と比較して、ヒト急性致死血中濃度と良好な相関が見られる (Clemenson, 1996)。よって、ヒトを対象とした環境評価・管理のための化学物質や実環境試料のスクリーニングにおいて、発ガン性予測試験（変異原性試験、プロモーター活性試験）や内分泌攪乱活性試験などと共に用いることが望ましいと考えられる。しかしながら、実環境試料の評価のための手法が適性化されているとは言えない。

そこで本研究は、培養ヒト細胞を用いた試験のうち、比較的簡便に実施しやすいと思われる 96 穴マイクロプレートを用いた 48 時間生存率試験、及び同じくプレートを用いた Low Density Lipoprotein (LDL) 取込み活性を指標とした肝障害性試験（臓器機能障害性試験に分類される）の 2 種について、環境試料評価のためのプロト

コールを作成することを第 2 の目的とした。さらに、この生存率試験による環境水評価結果から、管理に必要な情報を抽出するいくつかの試みについて、それらの妥当性を予備的に検討することを第 2 の目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞活性試験

ヒト肝細胞由来細胞株 Hep G2 を用いた生存率試験および LDL 活性障害試験の 2 種の原理を図 1, 2 にそれぞれ示す。前者は、細胞内酸性フォスファターゼ (AP) 活性が生細胞数に比例することを利用した手法である。後者は特に肝細胞が持つ高い LDL 取込み能に着目した試験である (Suzuki, 1997; Shoji, 1998)。96 穴マイクロプレートを簡便法で、標準暴露時間は 48 時間である。詳細なプロトコールは別項に示す。

AP 法では、暴露後に、同酵素の基質となるパラ-ニトロフェノールと細胞膜を破壊して同酵素

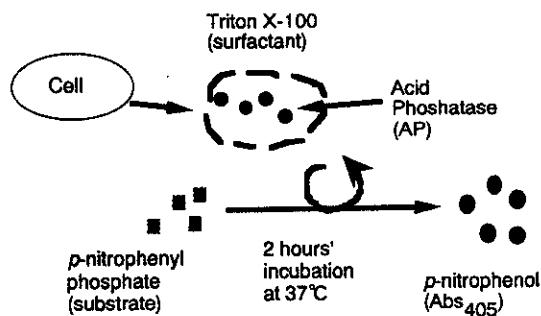


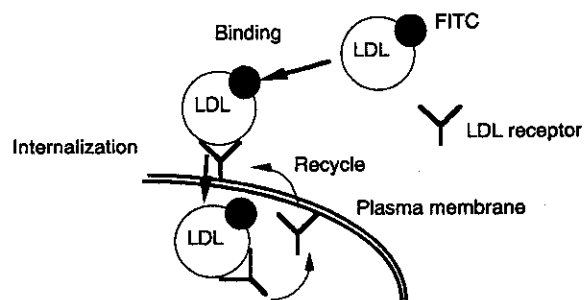
図1 細胞内 acid phosphatase (AP) 活性に基づいた生存率阻害試験

を液中に遊離させるための界面活性剤を含む酢酸緩衝液を添加して、通常2時間後の405 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。発色は反応時間と最終反応液のpHに依存する。これらの反応条件を最適化することで、広いレンジの細胞数を測定することができる。

LDL 取込み阻害試験では、FITC でラベルした LDL を含む試料を調製し、曝露終了後 1N-NaOH で細胞を処理・融解し、LDL レセプターと結合した LDL と細胞内に取り込まれた LDL の量を一括して蛍光マイクロプレートリーダー (Cambridge Technology, Inc., UK) により定量する。通常の試験では、暴露と活性測定は別であるが、本 LDL 試験では同時に行う。本研究の目的とは異なるが、この利点を利用して、4 時間程度の短時間評価を行うことが可能である。

2. 河川水サンプリングおよび化学分析

環境庁調査の一環として行なわれた国内2つの河川水とそれらの化学分析データを入手した。化学分析項目は、phenol, hexachlorobenzene, aniline, trans-chlorudene, cis-chlorudene, toruene, benzo(a)pyrene, benzene, pyridine, n-butylphthalate, 1,2-dichloroethane, m-xylene, o-xylene, dimethylformamide, monoethanolamine, trichloroethylene, tertachloroethylene, trichloroethylene, acetnitrile, noramine, acrylamide, p-xylene, 1,1,1-chloroethane, 1,2,4-chlorobenzene の24項目であった。



FITC-LDL uptaken (Ex 490 and Em 520)

図2 細胞内 LDL 取込み活性に基づいた肝障害性試験

3. 浸出水の酸化・吸着処理

関東のある総合埋立処分場（一般廃棄物・産業廃棄物・焼却残灰と都市廃棄物を対象）からの未処理浸出水を事業所の許可を得て採水した。オゾン処理は、オゾン発生器に純酸素を用いて発生させたオゾンを、容量 200 mL のガラス製カラムに導入して行った。活性炭吸着処理は、迅速な吸脱着報告されている活性炭素繊維 A-15 を用いて回分で行った。予め DOC 及び毒性の低減を指標として必要な添加濃度を評価したところ、いずれの指標でも除去率は 2 g/L 以上でほぼ一定となったので、標準添加量を 4 g/L とした。

ゲルクロマトグラフィーシステムは、分離用担体として Sephadex G-15 と G-75 の混合ゲルを充填した XK26/40 カラムを用いた。分子量分画は、5 mL の試料水またはその処理水を導入し、蒸留水を溶出液として 0.75 mL/min の溶出速度で行った。カラムからの溶出液は、フラクションコレクターで 5 mL ずつ計 26 本に回収した。本検討においては、Hep G2 のかわりに、ヒト正常細胞である TIG-1 を用いた AP 法にて細胞生存率試験を行った。Hep G2 と比較して本細胞の化学物質に対する感度にはさほど差がないことを確かめている。TIG-1 細胞は、AP 含有量が小さいため、2 時間の反応後に 10 mM の NaOH を反応液に等量添加して液 pH をアルカリ領域とし、生成物であるパラ-ニトロフェノールの発色を増強してから、マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した。

C. 研究結果と考察

1. プロトコール作成

化学物質や河川水・埋立地浸出水を用いた広範な評価実験に基づいて、付録のような詳細なプロトコールを作成した。

2. バイオアッセイデータからの管理のための情報抽出

2.1 河川水毒性の化学分析データによる予備解析 (TRI 的検討)

バイオアッセイによって実際に汚染された環境がヒトや生態系に及ぼす影響をある程度評価できたとしても、それらの悪影響を具体的にどのように低減できるかに答えるためには、測定された毒性を支配している物質群を同定することが第一に考えられる。US-EPA は Toxicity Reduction Identification (TRI) (フォード, 1996) と呼ばれる一連の削減マニュアルを作成した。しかしながら単物質のバイオアッセイデータを背景としてはいない。これに対して、我が国では、環境庁・未来環境創造型・基礎研究推進制度・研究プロジェクト「化学物質による生物・環境負荷の総合的評価手法の開発」(バイオアッセイ 300; 代表, 九州大学大学院・内海英雄) による 300 物質の各種バイオアッセイによる系統的な評価が行なわれており (Utsumi, 1999), それらのバックグラウンドデータと化学分析データ, さらに実環境水のバイオアッセイによる測定結果を照合することで, 毒性支配物質の候補を挙げるができると思われた。

そこで, 別途入手した分析データ既知の国内河川水について, 我々の生存率試験による評価結果と 300 プロジェクトへ我々から提出したデータとを元にして, 検討を行った (庄司, 2000)。結果を表 1 に示す。これらの河川水においては, 分析したほとんどの化学物質の濃度が検出限界以下であった。バイオアッセイ 300 プロジェクトの一環として我々が検討した化学物質の容量作用曲線領域内に検出値が含まれるものは, わずかにフェノール, アニリン, トルエン, テト

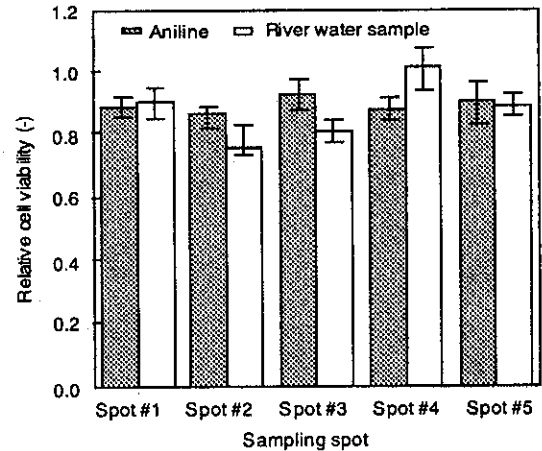


図3 河川水細胞毒性とアニリン検出濃度から予想される細胞毒性 (48h-AP assay)

ラクロロエチレンの4種であった。これらのうち, 検出濃度が毒性に有意な影響を及ぼすと考えられたものは, アニリンのみであった。アニリンの検出濃度における相対生存率をアニリン単成分容量作用曲線から求め, 当該河川水サンプルの包括的毒性と比較を行った (図3)。河川試料水とアニリンの細胞毒性はほとんど等しいため, 河川試料水の細胞毒性をアニリンの毒性だけで説明する場合, 総括的な毒性に対する毒性寄与はほぼ 100 % となる。実際にアニリンがこの河川水試料の毒性を支配していることを確かめるためには, 原理的にはアニリンを主として除去する処理操作によって毒性が低減されることを示す必要がある。

以上で述べた毒性支配物質の推定手法は, 工場廃水など含有が予想される化学物質がある程度予測でき, かつそれらの物質 (群) が毒性を実際に支配している場合には有効と思われる。

2.2 埋立地浸出水の酸化吸着処理における毒性削減 (TRE 的検討)

評価対象環境水について広範な化学分析を行うことは多大の費用を要する。また国内の埋立地浸出水についての精力的な化学分析によると, 測定されえない物質由来の TOC が総 TOC に占める割合が予想外に大きいことが報告されている (Yasuhara, 1999)。これら未同定の物質は, それら浸出水の総括的な毒性においても大きく寄

表1 S川とA川の化学分析、48時間生存率及びLDL取込み活性阻害に基づく毒性評価

Chemical concentration (µg/L)		Phenol	Hexachloro benzene	Antifine	trans-Chlorodene	cis-Chlorodene	Toluene	Benzo(a)pyrene	Benzene	Pyridine	n-butyl phthalate	1,2-dichloroethane	m-xylene
River	Spot No.												
S	1	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	2	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	3	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	4	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	0.03	<0.01	0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	5	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	6	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	7	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	8	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	9	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
S	10	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	<0.01
A	1	<0.04	<0.01	0.3	<0.01	<0.01	1.6	<0.01	<0.01	0.2	<0.3	<0.01	<0.01
A	2	<0.04	<0.01	0.3	<0.01	<0.01	1.6	<0.01	<0.01	0.3	0.7	<0.01	0.11
A	3	<0.04	<0.01	0.5	<0.01	<0.01	0.87	<0.01	0.04	0.7	0.8	0.04	0.18
A	4	0.26	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.2	<0.3	<0.01	<0.01
A	5	0.07	<0.01	2.1	<0.01	<0.01	3.4	<0.01	0.4	0.3	1.3	<0.01	0.14
A	6	0.17	<0.01	0.8	<0.01	<0.01	0.63	<0.01	0.06	9.3	<0.3	0.01	2.0
A	7	<0.04	<0.01	1.4	<0.01	<0.01	1.9	<0.01	0.01	0.6	<0.3	<0.01	0.08
A	8	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.4	<0.3	<0.01	0.05
A	9	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.1	<0.3	<0.01	0.03
A	10	<0.04	<0.01	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.1	<0.3	<0.01	<0.01

River	Spot No.	o-xylene	Dimethyl folmamid	Monoethanol amine	Trichloro ethylene	Tetrachloro ethylene	Aceto Nitric	Noramine	Acrylamid	p-xylene	1,1-tri Chloroethane	1,2,4-tri Chlorobenzene	Cytotoxicit AP assay	LDL assay
S	1	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	1.000	0.935
S	2	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.925	0.953
S	3	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.798	0.712
S	4	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.704	0.622
S	5	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.796	0.821
S	6	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.594	0.555
S	7	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.756	0.657
S	8	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.948	0.945
S	9	<0.01	<5	<10	<0.01	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	0.870	0.832
S	10	<0.01	<5	<10	0.08	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	<0.01	<0.01	1.002	0.947
A	1	<0.01	5	<10	0.08	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	0.02	<0.01	0.996	0.957
A	2	0.10	5	<10	0.92	1.1	<50	<5	<5	0.05	0.01	<0.01	0.903	0.911
A	3	0.13	12	<10	6.1	0.13	<50	<5	<5	0.08	0.50	<0.01	0.764	0.732
A	4	<0.01	<5	<10	0.29	0.02	<50	<5	<5	<0.01	0.01	<0.01	0.838	0.740
A	5	0.11	12	<10	0.15	0.01	<50	<5	<5	0.06	<0.01	<0.01	0.815	0.736
A	6	0.68	16	<10	0.19	0.02	<50	7	<5	0.62	0.06	<0.01	1.010	0.949
A	7	0.06	29	<10	<0.01	<0.01	<50	6	<5	0.03	0.02	<0.01	0.885	0.715
A	8	0.01	14	<10	<0.01	<0.01	<50	11	<5	0.02	<0.01	<0.01	0.832	0.800
A	9	0.01	<5	<10	0.22	<0.01	<50	<5	<5	<0.01	0.02	<0.01	1.000	0.985
A	10	<0.01	5	<10	0.01	0.01	<50	<5	<5	<0.01	0.07	<0.01	0.836	0.778

与していることは間違いないであろう。従って、3. 2. 1のようなアプローチで毒性支配物質を見出すことにはかなりの困難が予想される。

これに対して、US-EPA は Toxicity Reduction Evaluation (TRE) (フォード, 1996) と呼ばれる一連の削減マニュアルを作成した。州によってその具体的な運用は異なるようであるが、事業所についてバイオアッセイによる排水毒性評価結果に基づいて、毒性の削減が求められる。排水の毒性を支配している可能性のある物質(群)についての情報を得るべくあらゆる努力がなされるが、その核心は、種々の排水処理単位操作をラボスケールで対象排水に試み、その毒性削減効果を同じバイオアッセイで評価することにある。この過程を通じて、毒性支配物質を必ずしも同定せずとも、処理プロセスのフローや操作条件をある程度改善しうることである。さら

に各種処理単位操作での毒性削減効果から、毒性支配物質の特定に結びつく情報も得られると期待される。

そこで、国内のある埋立地の浸出水(未処理)を対象として、一般的な参加・吸着処理プロセスと考えられるオゾン処理・活性炭処理を試み、その毒性削減効果をヒト細胞(ここでは Hep G2 の代わりに TIG-1 細胞)を用いた生存率試験で評価した。

浸出水のオゾン処理では、処理の経過に伴い DOC は低減されたが、毒性(原水は 0.5)は 30 min 処理で増加しそのまま処理終了(300 min)まで 0.8 以上で低減されることはなかった(図4)。各時間のオゾン処理水について、引き続き活性炭吸着を行ったところ、DOC 濃度・細胞毒性共にオゾン処理時間の経過に伴って削減率は低くなった。浸出水が種々の処理の後ではあるが結果的

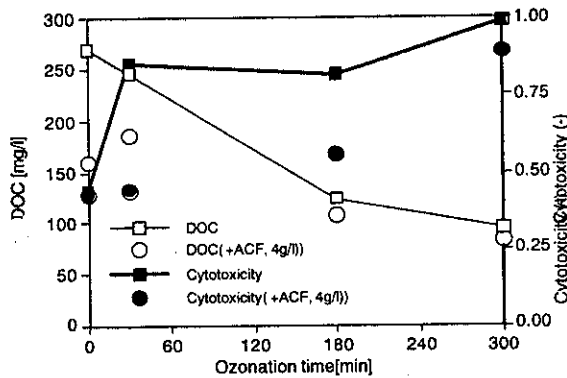


図4 浸出水のオゾン活性炭処理における DOC と細胞毒性の変化

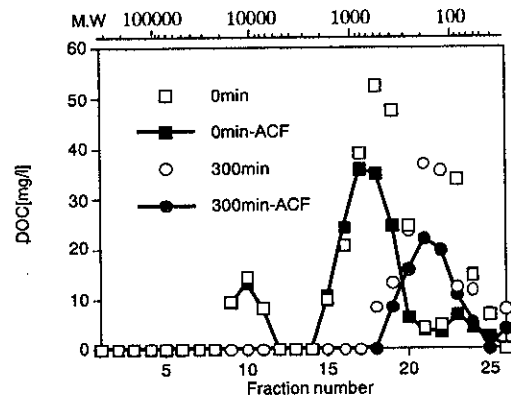


図6 オゾン処理水各分画毎の活性炭吸着性 (ACF, 4g/l)

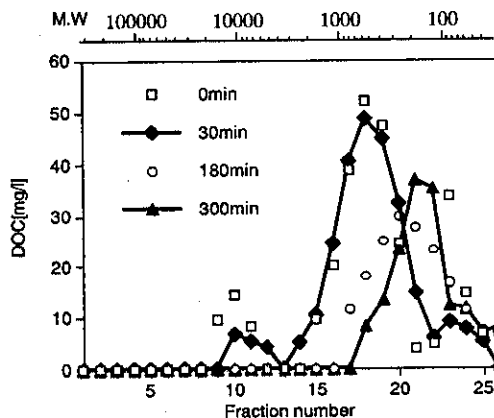


図5 各オゾン処理時間サンプルの分子重量分画

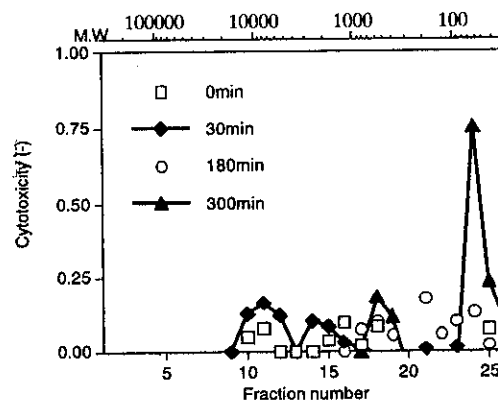


図7 各オゾン処理各分画毎の毒性(生存率阻害)

の結果は、DOC などの指標に加えて、何らかのバイオアッセイ指標を排水処理に導入することの必要性を示している。これらの処理水について分子量分画を行い、細胞毒性を評価したところ、原水では高分子・中分子そして低分子の3分画に毒性が検出された(図5)。これらの毒性は、オゾン処理により低分子分画へ移動し、オゾン処理 300 min では最終的に分子量 100 程度の分画に大きい毒性を示す成分が生成された。分子量分画ごとの活性炭吸着による DOC 除去率をみると、原水については中分子と低分子分画ではある程度の除去がみられたが、高分子分画ではほとんど除去されなかった(図6)。300 min オゾン処理水では、中分子分画についてはある程度除去が見られたが、毒性への寄与の大きい低分子分画における除去率は低かった(図7)。このオゾン処理後により生成する低分子分画についての結果は、オゾン処理時間の増加に伴い浸出水の活性炭吸着性が低下し、毒性が増加することと符号する。

以上の結果は、バイオアッセイによる毒性削減効率から得られる情報は、より環境に配慮した適切な浸出水排出管理手段を決定する上で、極めて有効であることを示している。この観点からオゾン吸着処理を評価すると、上水への塩素添加における変異原前駆物質からの変異原性がプロセス内で生成することと同じように、オゾン処理においても処理プロセス内部で物質が変換され、その結果毒性が増す場合があることを示している。今後、プロセス内での新たな毒性物質生成を防止したり、生成された物質を除去する処理操作を加えるなど、バイオアッセイを一種のツールとして、プロセスおよびその操作条件を改善していく必要があることが強く示唆された。

E. 結論

汚染された環境のヒトへのリスク評価の一重要手法となると考えられる培養ヒト細胞生存率

試験および LDL 取込み活性阻害を指標とした肝機能障害性試験について、環境試料を対象とした評価プロトコールを作成した。確立したプロトコールにそって、化学分析が一部行なわれた河川水を評価し、300 プロジェクトのデータを用いて解析したところ、毒性支配物質の候補を挙げる事が出来た。埋立地浸出水についてオゾン処理・活性炭吸着処理における毒性削減効果を評価したところ、残存毒性は原水よりも高くなる一方であった。この毒性はこの処理過程で生じる親水性の低分子有機物質に主に由来した。

参考文献

- Clemedson *et al.*, MEIC evaluation of acute systemic toxicity, Part II. In vitro results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *ATLA*, 24, 273-311 (1996).
- Ford, D. L.編, 松井三郎, 井出慎司監訳: 環境毒性削減, 評価と制御 - 生物多様性のための地球環境技術, 環境技術研究協会, 大阪 (1996).
- H. Utsumi, O. Nakasugi, T. Nishikura, A. Sakoda, K. Oguri, and R. Higuchi, Development of bioassays to evaluate human and ecological impacts of pollutants. *Proc. Asian Waterqual. '99 (7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference)*, pp. 275-280, Taipei (1999).
- Yasuhara, A., Shiraiishi, H., Nishikawa, M., Yamamoto, T., Nakasugi, O., Okumura, T., Kenmotsu, K., Fukui, H., Nagase, M., Kowagoshi, Y.: Organic components in leachates from hazardous waste disposal sites, *Waste Manage. Res.*, 17, 186-197 (1999).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 庄司良: 東京大学大学院博士論文, pp.154-157 (2000).
- 低密度リポタンパク質の取り込みを指標とした迅速簡便な細胞毒性評価手法: 鈴木基之, 庄司良, 酒井康行, 迫田章義: *水環境学会誌*, 20, 746-751 (1997).
- Rapid bioassay of toxicity in environmental water by LDL-uptaking activity of human cells: R. Shoji, A. Sakoda, Y. Sakai and M. Suzuki: *Water. Sci. Technol.*, 38, 271-278 (1998).

2. 学会発表

- 鈴木基之, 金範洙, 藤井隆夫, 酒井康行, 迫

田章義：細胞毒性試験による酸化・吸着処理における毒性削減，第 34 回日本水環境学会年会，1-H-15-2，(2000).

- ヒト細胞を用いる環境水複合毒性評価：庄司良，酒井康行，迫田章義，鈴木基之，内海英雄：第 5 回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 (1999).
- 酸化・吸着処理における細胞毒性削減とその予測：鈴木基之，金範洙，藤井隆夫，酒井康行，迫田章義，鈴木基之：第 5 回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会 (1999).

- 化学物質複合毒性のバイオアッセイによる定量的評価：庄司良，大村佳子，酒井康行，迫田章義，鈴木基之：第 33 回日本水環境学会年会，1-G-10-3 (1999).

G. 知的所有権の取得状況

発明の名称：「ヒト細胞を用いたバイオアッセイ装置」：発明者：東京大学生産技術研究所，酒井康行，鈴木基之，迫田章義，庄司良（特許出願中）

トランスジェニック魚を用いた毒性評価法の開発

研究分担者 天沼喜美子 国立環境研究所環境健康部 重点研究支援協力員

研究要旨

水環境中の変異原物質を、個体レベルで、定量的に検出できる新しい実験魚類として確立されたトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用い、廃棄物浸出水などの環境水の毒性試験に適用可能か、標準物質を用いて、検討を行った。本トランスジェニック魚の胚を、benzo[a]pyrene (B[a]P)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)に曝露し、濃度依存性、再現性について検討した結果、両者とも、濃度依存性があること、突然変異頻度を有意に上昇させることが明らかになった。さらに、B[a]P によって生じた突然変異の一部について、塩基配列を決定した。

A. 研究目的

我々は既に、水環境中の変異原物質を、個体レベルで、定量的に検出できる新しい実験魚類として、変異原物質検出用シャトルベクターを導入したトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を確立している。本トランスジェニック魚が、廃棄物浸出水などの毒性試験に適用可能か検討するために、これらの環境水中に含まれる標準物質として B[a]P、MeIQx を用いて、濃度依存性、再現性について検討した。さらに、B[a]P 処理により、生じた突然変異について、塩基配

列決定を行った。

B. 研究方法

1.トランスジェニック魚を用いた変異原物質検出の原理

トランスジェニック魚のすべての細胞には、変異原物質を検出するためのシャトルベクタープラスミド pML4 (図1) が組み込まれている。rpsL が変異原物質をモニターする遺伝子 (ストレプトマイシン (Sm) 感受性遺伝子)、KanR

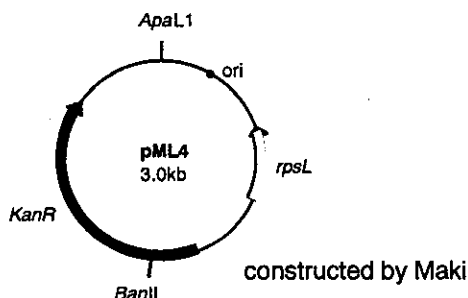


図1 トランスジェニック作製に用いたシャトルベクター

Determination of mutant frequency

Host <i>E. coli</i> (RR1) (Km ^R Sm ^R)	Colony formation	
	Km plate	Km & Sm plate
wild rpsL Sm sensitive Kan ^R	+	-
mutant rpsL Sm resistant Kan ^R	+	+

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{No. of colonies on Km \& Sm plate}}{\text{No. of colonies on Km plate}}$$

図2 突然変異頻度算出の原理

がこのプラスミドを大腸菌に感染させるときのマーカー遺伝子（カナマイシン（Km）耐性遺伝子）である。魚個体を、変異原物質に曝露した後、このシャトルベクターを魚から取り出し、宿主大腸菌（RR1）に感染させて、変異原物質モニター遺伝子に生じた突然変異を検出する（図2）。RR1はKm感受性かつSm耐性であるが、pML4が感染すると、pML4のKm耐性遺伝子は、優性であるので、Km寒天培地にコロニーを形成する。また、rpsL遺伝子に関しては、正常なSm感受性のほうが優性であるので、突然変異の入っていないrpsL遺伝子をもつプラスミドの感染した大腸菌は、Sm感受性とり、Sm寒天培地にコロニーを作らない。ところが、rpsL遺伝子に突然変異が入ると、宿主大腸菌はSm耐性になり、Sm寒天培地にコロニーを形成する。よって、以下の式により、突然変異頻度を算出できる。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{KmとSmを含む寒天培地に生えたコロニー}}{\text{Kmを含む寒天培地に生えたコロニー}}$$

2. 実験材料

トランスジェニックゼブラフィッシュ系統は、シャトルベクター pML4 を約 350 コピー組み

込んだ LF21 系統を用いた。飼育水としては、逆浸透水に人工海水（千寿製薬）を溶かして 0.1% としたものを用いた。標準物質として、B[a]P（和光特級）、MeIQx（和光特級）を用いた。標準物質は、DMSO に溶かして 10mg/ml のストック溶液とし、-80℃に保存したものを用いた。

3. 曝露実験

トランスジェニック魚（ヘテロ接合体）と、非トランスジェニック魚をかけ合わせて受精卵を得、24時間胚にまで、発生させた。この胚を複数群に分け（1群140匹以上）、対照群として、1% DMSO を含む飼育水（10ml）、曝露群として、標準物質を飼育水で希釈した溶液 10ml 中に 26℃にて、16時間曝露した。曝露後は、飼育水で、3回洗浄し、曝露開始から3日目まで、26℃にて飼育して、変異を定着させた。この間にほとんどの胚は、孵化して、稚魚となった。3日目までの生存率は94%以上、孵化率87%~100%で、孵化率は曝露群でやや低い傾向にあったが、卵の状態によるばらつきの寄与のほうが大きかった。

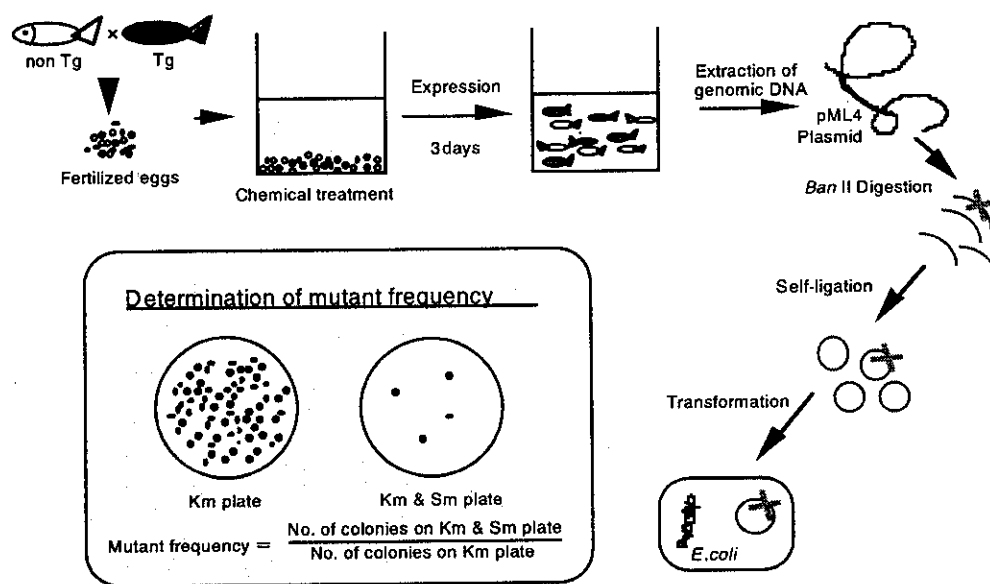


図3 変異原物質への曝露と、突然変異頻度のアッセイ

4. 実験魚からのシャトルベクターの回収と、突然変異頻度のアッセイ (図3)

変異を定着させた稚魚は、各群ごとにチューブにまとめ、5mM EDTA, 1%SDS, 0.2mg/ml の Proteinase K を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 中、30℃、一晚消化後、フェノール/クロロホルム法により、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA からのシャトルベクター回収は、権藤らの方法によった。すなわち、ゲノム DNA を制限酵素 BanII で消化し、そこに含まれるシャトルベクター (pML4 プラスミド) を T4DNA リガーゼで自己環状化したのち、エレクトロポレーション法により、宿主大腸菌 (RR1) に導入した。この大腸菌を①Kmを含む寒天培地と、②KmとSmを含む寒天培地にまいて、37℃19時間培養した後、コロニーを数え、前述の式により突然変異頻度を算出した。

3. 塩基配列決定

KmとSmを含む寒天培地に生えたコロニーから、大腸菌を培養し、プラスミド (シャトルベクター) を調製した。このプラスミド上の rpsL 遺伝子には、突然変異の生じているはずである。そこで、ABI の BigDye Terminator 法で反応を行い、ABI PRISM 310 シーケンサーにて、rpsL 遺

伝子の塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. 標準物質による濃度依存性

B[a]P: 5, 10 μ g/ml, MeIQx : 100, 300 μ g/ml で、濃度依存的に、突然変異頻度が上昇した (図4)。

2. 標準物質による再現性

トランスジェニック魚の胚 (1群 141 匹以上) を、B[a]P (10 μ g/ml)、あるいは、MeIQx (300 μ g/ml) それぞれに、各 5 群づつ暴露したところ、有意に、突然変異頻度が上昇した (表1)

3. DNA 塩基配列決定

B[a]P 曝露によって生じた突然変異コロニーの一部について、rpsL 遺伝子の塩基配列を決定し、正常 rpsL 遺伝子の塩基配列と比較した。

1 塩基欠失が約 50%を占めており (表2)、欠失場所の多くは、対照群とは異なっていた。また、点突然変異は全体の約 30%で、B[a]P で起こるとされている G:C \rightarrow T:A transversion が多い傾向にあった。

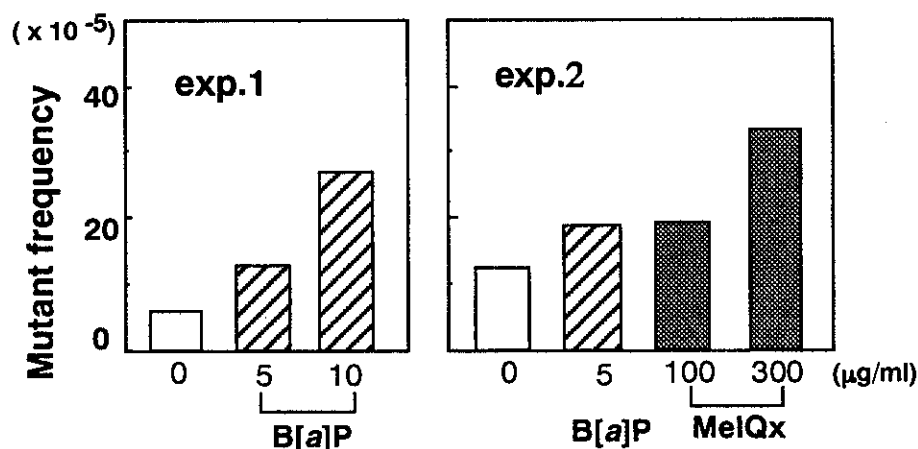


図4 標準物質の曝露濃度とモニター遺伝子の突然変異頻度

1群個体数: exp.1 167embryos, exp.2 164embryos

3日目の生存率: 全群98%以上

形態異常 (実体顕微鏡下で容易にわかるもの): B[a]P, 10 μ g/ml 群のみ22%
その他は1%以下

表1 標準物質による突然変異頻度アッセイの再現性

Exp. No.	Control			B[a]P			MeIQx		
	KmR	KmRSmR	MF	KmR	Km RSmR	MF	KmR	Km RSmR	MF
1	33.9	20	6	15.6	43	27			
2	32.0	38	12				7.2	24	33
3	17.0	13	8	10.0	57	57	12.7	16	13
	12.9	7	5	15.7	30	21	6.0	10	17
4	8.9	6	7	15.6	40	26	18.3	25	14
				5.6	18	32	6.8	9	13
Average			7.6	32.6			18.0		
S.D. (N=5)			2.4	12.7			7.6		
Students' t-test						0.0047	0.032		

1 群個体数：141 匹以上

3 日目の生存率：全群 94%以上

表2 B[a]P 曝露により、変異原物質モニター遺伝子に生じた突然変異スペクトラム

mutation type	base change	mutations		B[a]P induced (%)
		control (%)	n	
Transition	A:T→G:C	0	1	(3)
	G:C→A:T	1	0	(6)
Transversion	G:C→T:A	0	4	(11)
	G:C→C:G	0	2	(8)
	A:T→C:G	0	2	(6)
Deletion	A:T→T:A	0	1	(3)
	1 base-T	1	4	(11)
	-A	3	5	(14)
	-C	8	6	(17)
	-G	0	4	(11)
	2 base -TA	1	3	(8)
	12 base	0	1	(3)
Insertion	6base	1	0	(6)
del.+p.mut.		0	1	(3)
rearrangement		0	1	(3)
no mutation		1	0	(6)
Total		16	36	(100)

D. 考察

本トランスジェニック魚を用いた変異原物質検出法により、廃棄物浸出水などの環境水に含まれる B[a]P や MeIQx の変異原性を再現性よく検出できたことから、本方法は、廃棄物浸出水の毒性評価に適用可能と考えられる。そのためには、さらにいくつかの標準物質を用いた曝露

実験を行うことにより、基礎データを集める必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H., and Aoki, Y. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nature Biotechnology.*, 18(1) : 62-5,