

多摩川中流域の河川水に含まれる DNA 損傷性の調査

東京大学工学部附属総合試験所	正会員	島崎 大
東京大学工学部		赤間 馨介
東京工業大学工学部	正会員	浦瀬 太郎
東京大学環境安全研究センター	正会員	山本 和夫

1. はじめに

今日、微量で人体や生物に毒性を及ぼすと疑われる化学物質類が主に人間の生産活動の結果として排出され、環境中に存在していることが問題視されている。都市河川水においても内分泌攪乱物質をはじめとして各種の毒性物質が同定されており、これらの人間に対する健康影響を適切に評価することが急務である。このような問題を解明する試みとして、すでに Ames 試験、*umu* test、小核試験といったバイオアッセイが河川水を対象として広く適用され、様々な成果をあげるとしている。一方で、有核細胞を用いた DNA 損傷検出法としては近年コメットアッセイ (Single cell gel electrophoresis assay) の手法が広がりを見せている。既存の手法と比較して検出感度や操作の容易さなどの面で利点を持ち、現在までに DNA 損傷に関わる広範な分野への適用が行われている。コメットアッセイの水環境への適用例としては、現場に生息する水生生物を指標としたバイオモニタリングが主である一方、これまでにヒトリンパ球培養細胞株を用いたコメットアッセイによって廃棄物埋立処分場浸出水や河川水の濃縮試料から高感度に DNA 損傷性が検出できることが確認されており¹⁾²⁾、人への健康リスク評価を指向した DNA 損傷性検出法として適用できる可能性が大きいものと考えられる。本報告では、既報²⁾にて DNA 損傷の発現が明確でなかった多摩川中流域の河川水を対象として、再度調査を行った結果について示す。

2. 試験方法

1999 年 12 月中旬において、多摩川本流の 3 地点 (羽村堰、日野橋、関戸橋) および支流である浅川の 1 地点 (高幡橋) より河川水試料を各 2000mL 採取した。pH を 2 前後に調整した後、CSP800 樹脂充填カートリッジに通水し、DMSO 2.0mL で脱着後ろ過滅菌して、体積比で 1000 倍濃縮に相当する試料を得た。また Milli-Q 水を同様に操作して陰性対照とした。濃縮試料 40 μ L を対数増殖期にあるヒト B リンパ球由来 WIL2-NS 細胞株 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲、JCRB 番号: JCRB9063) の培養液 1.0mL と混和し、代謝活性化を行う系ではさらに S9mix を 0.2mL 添加した上、CO₂ インキュベータ内で 2 時間静置して接触させた。遠心洗浄後に細胞の生存率をトリパンブルー染色法で測定し、すべての系列において直接的な細胞毒性は生じていないことを確認した。コメットアッセイの操作方法は既報¹⁾に準じた。1 試料あたり 50 個の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で取り込み、DNA 損傷との相関をあらわす画像指標として Tail DNA% (断片化などの損傷を生じた DNA の存在割合) を用いて画像解析を行った。DNA 損傷の有無の判定にはウイルクソン順位和検定を用い、危険率 5% 未満で陰性対照との有意差を生じている試料を陽性とした。

3. 試験結果と考察

図 1 に S9mix 未添加の系における Tail DNA% のヒストグラムを示す。支流である浅川の高幡橋から採取した試料のみ陰性対照との差は認められなかったが、多摩川本流の羽村堰、日野橋、関戸橋から採取した試料

[キーワード] DNA 損傷性 都市河川水 コメットアッセイ ヒトリンパ球 代謝活性

[連絡先] 〒113-8656 東京都文京区弥生 2-11-16 東京大学工学部附属総合試験所

Tel.: 03-5841-7734 Fax: 03-5841-8538

については陽性と判定される有意な DNA 損傷が観察された。調査地点のなかで最下流に位置する関戸橋から強い DNA 損傷の発現が確認されており、当該流域において DNA 損傷性を持つ物質群が河川水中に流入していることが示された。またこれらは代謝活性化を受けなくとも損傷性を発現する直接変異原により構成されることが示唆された。多摩川では流域に位置する下水処理場から河川中に処理水が放流され、下流ほど流量が増大する傾向が見られている。特に日野橋から関戸橋の間には複数の下水処理場が存在しており、今回観察された DNA 損傷性の流入源の一つとして考えられる。この他、流域の道路路面排水、生活雑排水、工場排水なども流入源として想定される。

一方、S9mix を添加して代謝活性化を行った系では、2 回試験を行った両方の結果において陰性対照を含めたすべての系列に著しい DNA 損傷が生じ、損傷の判定を行うことが困難であった。後日 S9mix のみを添加して行った空試験では同様の損傷を再現することはできなかつたため、当該の試験系において操作上の不具合（電気泳動中の温度上昇など）による擬陽性が生じた可能性が大きいと思われる。

また同年の 5 月初旬に採水した試料を用いた既報の結果では、以上とは対照的に S9mix を添加した系にのみ有意な DNA 損傷が観察され、未添加の場合はすべての試料において全く損傷を生じなかつた²⁾。既報での試料の濃縮倍率が 500 倍である点に留意する必要があるが、その影響以上に、多摩川河川水中に含まれる DNA 損傷性の性質および強度に経時的な変化が現れている点が考えられる。これまでに多摩川においては、ヒト肝臓癌由来細胞を用いた増殖阻害試験により測定される細胞毒性の強度が短時間に大きな変動を示すとの知見が得られている³⁾。DNA 損傷性についても同様の傾向を持つ可能性があり、今後短期間ないし長期間における DNA 損傷性の経時的な推移について、さらに検討する必要がある。

4. 結論

多摩川流域の羽村堰、日野橋、関戸橋から採取した河川水の 1000 倍濃縮試料に対し、ヒトリンパ球培養細胞株を用いたコメットアッセイより代謝活性化を伴わない系において有意な DNA 損傷が検出された。調査対象流域における DNA 損傷性物質の流入、および損傷性の性質や強度に経時的な変動の存在する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 島崎ら (1999) 水環境学会誌, 22, 783-789.
- 2) 島崎ら (2000) 第 34 回日本水環境学会年会講演集, 214.
- 3) Sakai, Y., et al. (1996) Water Quality International'96, Singapore.

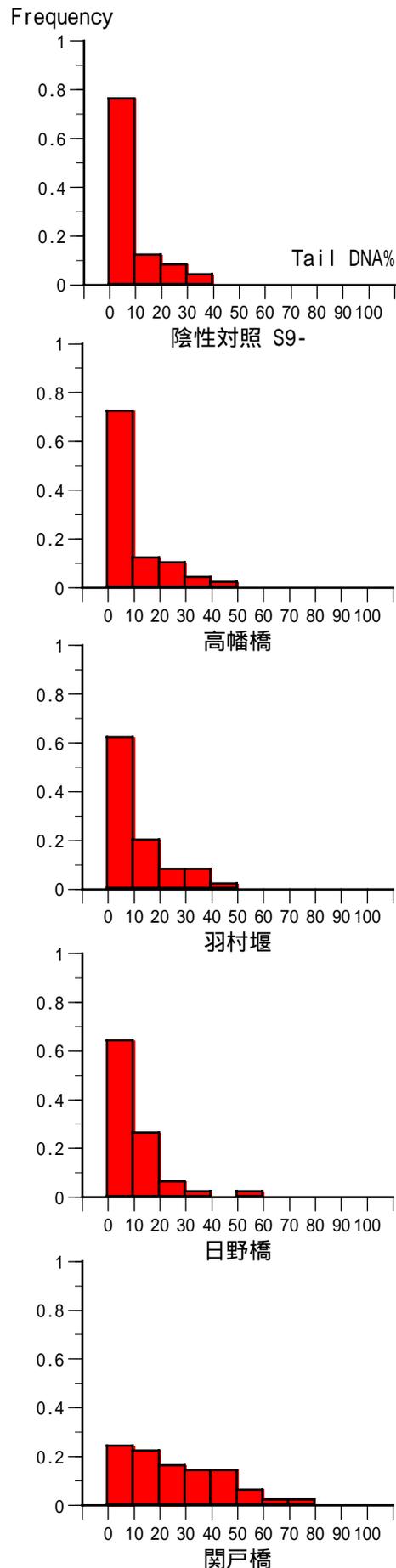


図 1 多摩川河川水 1000 倍濃縮試料との接触により生じた DNA 損傷