

(14) HPLC-バイオアッセイを用いた 下水処理排水中のDNA損傷性および AhRリガンド活性の解析

乙部 史子¹・周 佩欣¹・松井 三郎¹・小田 美光²・松田 知成^{1*}

¹京都大学大学院地球環境学堂 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

²大阪府立公衆衛生研究所 (〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69)

* E-mail: matsuda@eden.env.kyoto-u.ac.jp

下水処理排水には様々な化学物質が存在し、その中にはDNA損傷性や内分泌攪乱性を示すものも存在する。これらの中には、まだ同定されていない物質も多種類存在していると考えられる。本研究では、京都市下水処理排水放流水をSep-PakC18カートリッジを用いて濃縮し、HPLCにて分画分取した試料について *umu* テスト、枯草菌Rec-assay及び酵母AhRレポーター遺伝子アッセイを実施した。解析の結果、すべてのバイオアッセイにおいてそれぞれ異なった分画で活性が確認され、DNA損傷性を示す物質やダイオキシン受容体と結合する性質を持つ微量汚染物質の存在が明らかになった。さらに、*umu* テストにおいて活性の高かった分画中には、非DNA損傷性物質である酸性染料物質Acid Blue 9が含まれていることを確認した。

Key Words : treated sewage effluent, bioassay, *umu* test, Rec-assay, yeast AhR reporter gene assay

1. はじめに

現在用いられている標準的な下水処理システムでは、変異原性や内分泌攪乱性を示す物質が処理しきれていないことが知られている。これまでにいくつかのバイオアッセイによって、下水処理排水中の毒性物質の評価・同定が行われてきた。

松井らは琵琶湖-淀川水系のXAD-2樹脂濃縮試料を用いて枯草菌Rec-assayによるDNA損傷性試験を行い、河川水のDNA損傷性において下水処理場の影響が大きいことを示した¹⁾。

Nukayaらは、淀川水系高瀬川に放出される下水処理排水地点でのブルーレーヨン (以下BR) 抽出物について Ames テストを行い、変異原性を示す 2-[2-(Acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1) を分離同定した²⁾。また、Oheらは桂川表流水中からPBTA-1の誘導体であるPBTA-3, PBTA-6, PBTA-7, PBTA-8をそれぞれ35 ng/g-BR, 3 ng/g-BR, 4.51 ng/g-BR, 0.2-15 ng/g-BRの量で検出した³⁾。

Oheらは *umu* テストによって淀川水系中のBR抽出物

の中に 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,5-b]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) などのヘテロサイクリックアミン類を検出し、これらの物質が河川での変異原性に対する寄与が高いことを示した⁴⁾。

また、周らはHPLCによる解析と酵母AhRレポーター遺伝子アッセイを組み合わせる京都市下水処理排水中の微量汚染物質の探索を行ない、BR抽出物中に新規AhRリガンドとして染料のRhodamine B baseを同定している⁵⁾。

本研究では、京都市の下水処理排水を対象としHPLCとバイオアッセイを用いた微量汚染物質のパターン解析 (HPLC-bioassay) を行なった。バイオアッセイには *umu* テスト、枯草菌Rec-assay、酵母を用いた多環芳香族炭化水素受容体 (別名ダイオキシン受容体: AhR) レポーター遺伝子アッセイの3つを使用した。また、未知の微量汚染物質の存在が疑われたため、水試料の濃縮には先行研究では用いられていなかったSep-PakC18カートリッジを用いた。

2. 方法

(1) 研究方法の概要

本研究における実験の流れを図-1に示した。対象試料として京都市の下水処理場放流口直下の河川水を用いた。

(2) 試料の前処理

a) 試料採取

下水処理場の放流口において15 lの水試料を採水した。試料は、プラスチック製バケツで採水しプラスチック製タンクに入れ研究室へ持ち帰った。試料はすぐに冷蔵保存し、48時間以内に抽出操作を行なった。

b) 固相抽出

試料中のSS成分を除くためグラスファイバー紙 (GS25: ADVANTEC TOYO) を用いて吸引ろ過を行なったのち、Sep-PakC18カートリッジ (35 cc: Waters) を用いて固相抽出を行なった。コンディショニングを行なった3本のカートリッジに、1本あたり試料5 lを $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で通水し、試料中の疎水性有機物質を吸着させた。カートリッジを50 mlのMilliQ水で洗浄したのち、1本あたり25 mlの50 %メタノールで溶出した。この溶出液を50 %メタノール抽出液とした。さらに、100 %メタノール35 mlとアセトン15 mlで溶出を行い、100 %メタノールアセトン抽出液とした。

c) 濃縮および溶媒置換

50 %メタノール抽出液および100 %メタノールアセトン抽出液をそれぞれロータリーエヴァポレーターで蒸発乾固したものを1.5 mlのDimethyl Sulfoxide (DMSO) で溶解し、10000倍濃縮液とした。

(3) HPLCによる分画分取

濃縮液80 μl をHPLC (LC-10ATポンプ, SPD-M10Aフオートダイオードアレイ検出器: 島津製作所) によって1分ごとに分取し、それぞれ36分画を得た。移動相としてA: MilliQ水, B: メタノールを用い、流量 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

表-1 LCグラジエント条件

時間(分)	0	20	30	40
B(%)	10	100	100	50

で表-1に示した条件でリニアグラジエント分析を行なった。カラムはShim-Pack FC-ODS 150 $\times$ 4.6mm (島津製作所) を使用した。

HPLCで得た36分画試料は遠心濃縮器で蒸発乾固した後、40 μl のDMSOに溶解し20000倍濃縮液としバイオアッセイに使用した。

(4) バイオアッセイ

a) umuテスト

umuテストはサルモネラ菌のSOS反応を利用してDNA損傷性を評価する方法である⁹⁾。本研究では、TA1535/pSK1002株及びアセチル転移酵素を産生するプラスミドをTA1535/pSK1002株に導入したNM2009株⁷⁾を使用した。

試験方法は小田らの方法を適用した⁹⁾。-80℃で凍結保存した菌液10 μl を2 mlのLB培地 (10 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ バクトトリプトン, 5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 酵母エキス, 5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl) に接種した。増殖によるプラスミドの欠落を防ぐため、TA1535/pSK1002株では5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ のアンピシリンを20 μl を加え、NM2009株では、5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ のアンピシリンを10 μl 、エタノールに溶解した5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ のクロラムフェニコールを4 μl を加えた。これを37℃で16時間振とう培養した。前培養した菌液をTGA培地 (10 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ バクトトリプトン, 5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, 0.2 % グルコース, 20 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ アンピシリン) で1/50量に希釈し、37℃でOD₅₉₅が0.15~0.3となるまで振とう培養した。試料をマイクロプレートに2 μl 加え、調整した菌懸濁液98 μl を分注し、37℃で2時間培養した。S9 mixを添加する場合は、S9 mix (オリエンタル酵母社) と菌懸濁液を3:17の割合で混合して用いた。培養後にOD₅₉₅を測定した。新しいマイクロプレートに培養液を10 μl 加え、90 μl のZ緩衝液 (0.06 M リン酸二ナトリウム, 0.04 M リン酸一ナトリウム, 0.01 M 塩化カリウム, 0.001 M 硫酸マグネシウム, 0.05 M 2- β -メルカプトエタノール) と0.1 % SDS 50 μl を加えて十分に攪拌し細胞膜を破壊した。これに発色基質であるchlorophenol red - β -galactopyranoside (CPRG) を10 μl 加え37℃の恒温器の中で酵素反応を進行させた。目視にて十分な橙色を呈したら (20~30分), 反応を停止させるためにNa₂CO₃を100 μl 加え、OD₅₄₀を測定し、次式より酵素活性を測定した。

RGA (Relative β -galactosidase activity) $\text{unit} = \text{OD}_{540} / \text{OD}_{595}$

b) 枯草菌Rec-assay

Rec-assayは枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換え修復機構

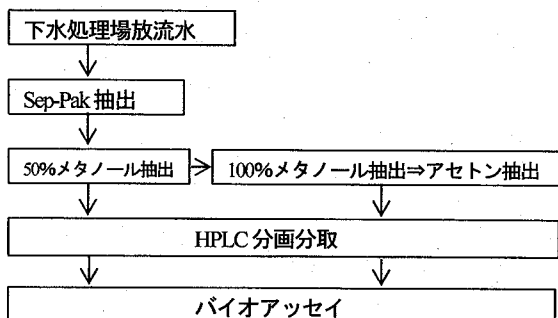


図-1 実験の流れ

の違いを利用する方法である⁹⁾。組換え修復機構欠損株 M45 (Rec⁻) は、正常なDNA修復機能を持つ野性株H17 (Rec⁺) よりもDNA損傷性に対して高い感受性を持つ。そのためRec⁺株とRec⁻株の致死感受性の差からDNA損傷性の有無を検出できる⁹⁾。本研究では、HPLCによって得られた分画試料について、まずRec⁻株に対する増殖阻害を調べた。

-80℃で凍結保存しているRec⁻株菌懸濁液をLB培地10mLに接種し、37℃で16時間振とう培養した。懸濁液の濃度がOD₅₉₅で0.1-0.3となるまで培養し、OD₅₉₅が0.02となるようにLB培地で希釈した。試料3μLをマイクロプレートに加え、調整した菌懸濁液50μLとLB培地47μLを分注した。S9 mixを用いる場合には、調整した菌懸濁液を50μLとS9 mix7.5μL、LB培地41.5μLを分注した。菌の増殖がOD₅₉₅で0.1-0.2となるまで培養し、培養前と培養後の差から菌の増殖量を求め、溶媒対象 (DMSO) と比較してRec⁻株の生存率を求めた。生存率は、試料におけるOD₅₉₅の増加量をDMSOのOD₅₉₅の増加量で除した値を百分率で表わした。

c) 酵母Ahrレポータージーンアッセイ

酵母Ahrレポータージーンアッセイでは、ヒトAhr/Amt遺伝子が組み込まれた酵母YCM3株¹⁰⁾を使用した。この酵母アッセイ系では、種々の物質のヒトAhr/Amt遺伝子を介した影響を検出できるとともに環境試料中のPAHsのスクリーニングとして有効である¹¹⁾。試験には足立らの方法¹²⁾を用いた。

-80℃で凍結保存している菌懸濁液を解凍し、最小グルコース培地 (1.3 g/L Dropout Powders ; 表-2を参照, 1.7 g/L Yeast Nitrogen Base without AminoAcid & Ammonium sulfate, 5.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 20.0 g/L D-グルコース) 1.5 mLと滅菌水1.5 mLに、菌液30μLを接種した。これを30℃で18時間振とう培養した。試料1μLをマイクロプレートに加え、最小ガラクトース培地 (1.3 g/L Dropout Powders ; 表-2を参照, 1.7 g/L Yeast Nitrogen Base without AminoAcid & Ammonium sulfate, 5.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 20.0 g/L D-ガラクトース) 200μLと酵母培養液5μLを分注し30℃で18時間培養した後、各ウェルをよく攪拌し

表-2 Dropout Powders の組成

Dropout Powders	(g)
アデニン(Hemisulfate salt)	0.25
L-アルギニン(HCl)	0.12
L-アスパラギン酸	0.6
L-グルタミン酸(Monosodium salt)	0.6
L-ヒスチジン	0.12
L-ロイシン	0.36
L-リシン(mono-HCl)	0.18
L-メチオニン	0.12
L-フェニルアラニン	0.3
L-セリン	2.25
L-スレオニン	1.2
L-バリン	0.9
ウラシル	0.12

表-3 LCグラジエント条件

時間(分)	0	20	40
B(%)	10	100	100

表-4 MS条件

項目	値
キャピラリー電圧 (kV)	2.99
コーン電圧 (V)	35
イオン源温度 (°C)	130
乾燥温度 (°C)	380
コーンガス流量 (L/hr)	31
乾燥ガス流量 (L/hr)	696
イオンモード	ES-
Start Mass	250.0
End Mass	800.0

OD₅₉₅を測定した。新しいマイクロプレートに培養液を10μLに加え、Z緩衝液 (60 mM リン酸水素ナトリウム, 40 mM リン酸二水素ナトリウム, 1mM 塩化マグネシウム, 2mM dithiothreitol, 0.2% N-Lauroylsarcosine) 140μLと、Z緩衝液に溶解した4 g/Lの2-Nitrophenol β-D-galactopyranoside (ONPG) 溶液50μLを加えて十分に攪拌した。これを37℃の恒温器の中で1時間酵素反応を進行させOD₄₀₅を測定し、次式より酵母1 mLの1分間あたり酵素活性を測定した。

$$\text{LacZ unit} = (\text{OD}_{405} / \text{OD}_{595}) \div 0.01 \div 60$$

(5) LC/MS

LCシステム (LC-10ADVPポンプ, SPD-M10AVPフォトダイオードアレイ検出器: 島津製作所) のカラムはShim-Pack FC-ODS 150×4.6 mm (島津製作所) を使用した。移動相としてA: MilliQ水, B: メタノールを用いて、流量0.4 mL/min⁻¹ でリニアグラジエント分析を行った。LCグラジエント条件は表-3に示した。MS (Quattro Ultima Pt, Waters) 測定条件は表-4に示した。

3. 結果と考察

図-2に下水処理排水濃縮水50%メタノール抽出液と100%メタノールアセトン抽出液のUV可視光クロマトグラムと3種類のバイオアッセイの結果を示す。

50%メタノール抽出液では、S9 mixを添加した枯草菌Rec-assayでRec⁻株に毒性を示す分画は存在しなかった (図-2E)。また、酵母Ahrレポータージーンアッセイにおいては、20-24分画においてわずかな活性が見られた (図-2G)。また、S9 mixを添加したumuテストで保持時間11-12分に活性を示す分画が確認された (図-2C)。この分画において、TA1535株とアセチル転移酵素を高産生のNM2009株で活性にあまり差が見られなかったこ

とから、この分画中に含まれる活性物質はヘテロサイクリックアミン類ではないことが示唆された。

*umu*テストで活性を示した分画のUV可視光クロマトグラムを見ると、630 nmに吸収極大を持つ物質のピークが確認された(図-2A)。分画中の630nmのUV-可視光を有する物質は、吸光スペクトル及びMSスペクトルから酸性染料の一つとして知られている Acid Blue 9 ($C_{17}H_{14}N_2Na_2O_9S_3$, MW: 792.86, λ_{max} : 630nm) であると推測された。

Acid Blue 9の標準品でのHPLC保持時間、吸光スペクトル及びMSスペクトルが分画中の物質のスペクトルと完全に一致したため、この物質がAcid Blue 9であると同一化した(図-3)。

Acid Blue 9の標準品についてS9mix存在下でTA1535株を用いた*umu*テストを行なったところ、 $0.15 \mu M$ の濃度においても活性が見られなかった。この濃度は分画中に存在する濃度よりも高いことから、見られた活性はこの物質由来ではないと考えられる(データは示さない)。

100%メタノール-アセトン抽出液では、S9mixを添加した*umu*テストで活性を示す分画は見られなかった(図2D)。

一方、S9mixを添加した枯草菌*Rec*-assayにおいて、保持時間24分及び30分の方画が*Rec⁻*株に毒性を示した(図-2F)。これらの分画について野生株*Rec⁺*株とDNA修復欠損株*Rec⁻*株の生存率を比較した結果を図-4に示した。保持時間24分の方画では、*Rec⁺*株の生存率が24.7%で

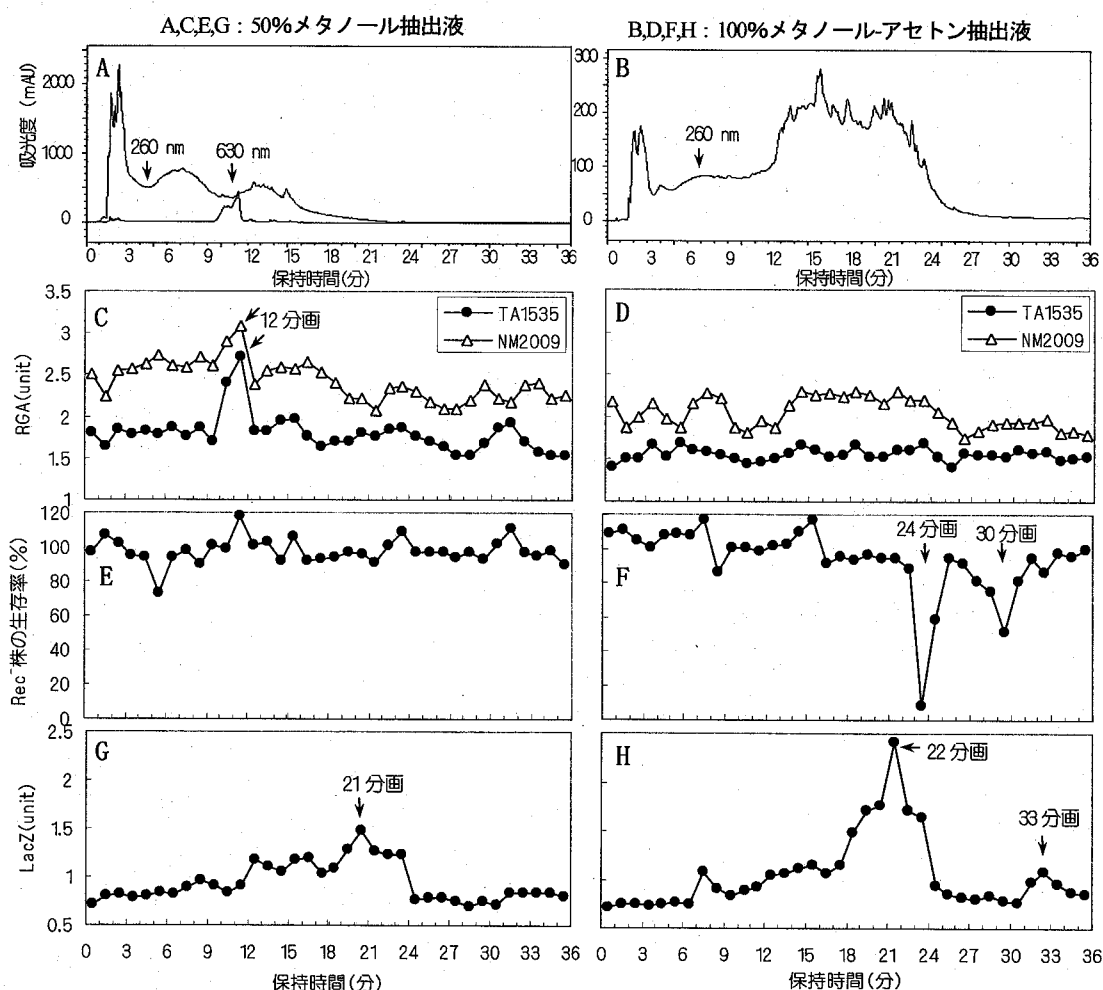


図-2 下水処理排水濃縮水 50%メタノール抽出液と 100%メタノール-アセトン抽出液の UV 可視光クロマトグラムと バイオアッセイの結果

A&B: UV-可視光スペクトルのクロマトグラム
C&D: *umu*テスト(S9mix添加)

E&F: *Rec*アッセイ(S9mix添加)
G&H: 酵母 AhR レポーター遺伝子アッセイ

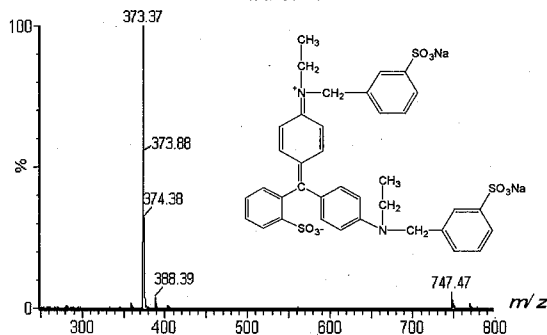
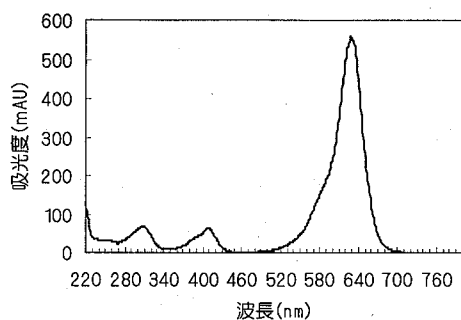


図3 Acid Blue 9のUV可視光スペクトルと構造式およびMSスペクトル

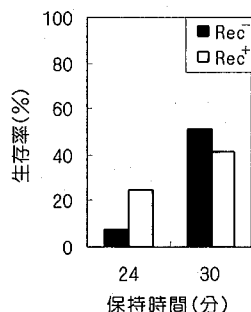


図4 Rec⁻株とRec⁺株によるRec-assayの結果

Rec⁻株の生存率7.8%を上回り、生存率に差が生じていたことから、この分画中にはDNA損傷性を示す物質が存在していることが示唆された。一方、保持時間30分の分画では、むしろRec⁺株の生存率がRec⁻株よりも低かったことから、この分画に存在する毒性物質はDNA損傷性を示さないと考えられる。

また、酵母AhRレポーター遺伝子アッセイでは19-24分及び32-33分の分画においてAhRリガンド活性が見られた(図-2H)。最も高い活性を示したのは22分の分画であった。異なる時期における、同一地点で採取されたBR抽出物に対して、周ら⁹が行なった酵母AhRレポーター遺伝子アッセイではRhodamine B baseが同定されたが、この物質のUV-可視光スペクトルは最も活性の高かった分画中のピークにおけるUV-可視光スペクトルと異なった吸収極大を有していたことから、保持時間22分

の分画中に存在したAhRリガンド活性物質はRhodamine B baseではないことが示された。また、過去の研究ではこの流域からPBTA類が検出されており、これらのPBTA類の中で保持時間がRhodamine B baseと近い物質であるPBTA-1と2-[2-(Acetylamino)-4-[N-(2-cyanoethyl)-ethylamino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-2)のClが脱離した構造を持つdeCIPBTA-2に対して行なった酵母AhRレポーター遺伝子アッセイでは弱いAhRリガンド活性が検出されている(データは示さない)。今回AhRリガンド活性物質が見られた分画の保持時間は、これらのPBTA類の保持時間と近いと、分画中の活性物質がこれらのPBTA類である可能性が示唆された。

4. まとめ

下水処理排水濃縮液を50%メタノール抽出分画、100%メタノール-アセトン抽出分画として粗分画し、HPLCによって分取した試料について3種類のバイオアッセイ、*umu*テスト、枯草菌Rec-assay及び酵母AhRレポーター遺伝子アッセイを行なった。それぞれのバイオアッセイで活性が見られた分画はすべて異なっており、試料中の異なる物質が各毒性に寄与していることが分かった。*umu*テストでは50%メタノール抽出液の12分の分画に、枯草菌Rec-assayでは100%メタノール-アセトン抽出の24分の分画に、そして酵母AhRレポーター遺伝子アッセイでは100%メタノール-アセトン抽出の22分の分画で最も強い活性を示した。

*umu*テストにおいて活性の高かった分画中から、酸性染料物質Acid Blue 9を同定した。しかし、この物質の*umu*テストにおける活性は認められなかった。

本研究で用いたHPLCで得られたフラクションごとに複数のバイオアッセイを行いそのパターンを解析することによって、共存物質が多く存在している水環境試料中から毒性をもつ微量汚染物質を検出することが可能である。今後、活性物質の単離精製を進め、水環境中の主要な毒性物質の構造決定を行なう必要がある。

参考文献

- 1) 松井三郎, 仙波範明, 紺野貴史, 松田知成, 山田春美, 竺彦, 中村正久: Rec-assayによる水質評価—琵琶湖—淀川水系におけるDNA損傷性物質の調査—, 用水と廃水, Vol.35, No.4, pp.22-27, 1993.
- 2) Nukaya H, Yamashita J, Tsuji K, Terao Y, Ohe T, Sawanishi H, Katsura T, Kiyokawa K, Tenzuka M, Oguri A, Sugimura T and Wakabayashi K: Isolation and Chemical-Structural Determination of a

- Novel Aromatic Amine Mutagen in Water from the Nishitakase River in Kyoto, *Chemical Research in Toxicology*, Vol.10, No.10, pp.1061-1066, 1997.
- 3) Ohe T, Watanabe T and Wakabayashi K : Mutagens in surface waters, *Mutation Research* 567, pp. 109-149, 2004.
- 4) Ohe T : Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PHiP, contributing highly to genotoxicity of river water, *Mutation Research* 393, pp.73-79, 1997.
- 5) P.-H. Chou, S. Matsui and T. Matsuda: Detection and identification of dyes showing AhR-binding affinity in treated sewage effluents, *Water Science & Technology*, Vol. 53, No.11, pp.35-42, 2006.
- 6) 小田美光 : 続医薬品の開発, 第 11 巻, 第 1 章, pp.30-40, 1990.
- 7) Oda Y, Yamazaki H, Watanabe M, Nohmi T, Shimada T: Development of high sensitive umu test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high *O*-acetyltransferase activity, *Mutation Research* 334, pp.145-156, 1995.
- 8) Oda Y, Funasaka K, Kitano M, Nakama A, Yoshikura T: Use of a High-Throughput umu-Microplate Test System for Rapid Detection of Genotoxicity Produced by Mutagenic Carcinogens and Airborne Particulate Matter, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 43, pp.10-19, 2004.
- 9) 松井宏樹, 滝上秀隆, 松田知成, 清水芳久, 松井三郎 : マイクロプレートを用いた枯草菌 rec-assay の開発とその評価, 環境工学研究論文集, Vol.35, pp.313-318, 1998.
- 10) Miller C.A. III : A Human Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway Constructed in Yeast Displays Additive Responses to Ligand Mixtures, *Toxicology and Applied Pharmacology* 160, pp.297-303, 1999.
- 11) 八木孝司, 坂本三千代, 川西優喜 : 酵母を用いた哺乳動物の多環芳香族炭化水素の応答系の構築, *Environ Mutagen Res* 25, pp.61-67, 2003.
- 12) Adachi J, Mori Y, Matsui S *et al*: Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine, *J. Biol. Chem* 276, pp.31475-31478, 2001.

(2006. 5.26受付)

Analysis of DNA damage and AhR ligand activity in treated sewage effluent by using HPLC-bioassay

Fumiko OTOBE¹, Pei-Hsin CHOU¹, Saburo MATSUI¹, Yoshimitu ODA²
and Tomanari MATSUDA¹

¹Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

²Dept. of Industrial Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health

In treated sewage effluents, DNA damage toxicity and endocrine disrupting activity have been detected. But the responsible toxic substances have not fully been identified.

In this study, we concentrated treated sewage effluents at Kyoto city by Sep-Pak C18 cartridges and eluted with methanol and acetone. The 50% methanol extract and the 100% methanol-acetone extract were fractionated by HPLC and three bioassays including *umu* test, a *Bacillus subtilis* rec-assay and a yeast AhR reporter gene assay were applied to each fraction. The results showed different patterns in three bioassays. By using *umu* test, the activity of DNA damage toxicity was detected in fractions of the 50% methanol extract. The *Bacillus subtilis* rec-assay and the yeast AhR reporter gene assay indicated DNA damage toxicity and AhR ligand activity in different fractions of the 100% methanol-acetone extract. Furthermore, Acid Blue 9 classified into acid dye was contained within the 50% methanol extract fraction. But DNA damage toxicity of Acid Blue 9 was not detected by *umu* test.