

B-42 発光細菌を用いた毒性試験法に影響を与える因子の考察と底質試料への適用

○ 間瀬 賢一・尾崎 則篤・大橋 晶良・金田一 智規

広島大学大学院工学研究科(〒739-0046 広島県東広島市鏡山1-3-2)

✉ mail:m113435@hiroshima-u.ac.jp

1. はじめに

現在、多種の化学物質が製造されその一部は環境中に放出されており環境への影響が懸念されている。中でも非特定汚染源由来の有害化学物質は面的に広く分布する性質上、規制することが困難であり動態解明が強く求められている。こうした背景を受け各地で多くの調査が行われており、本研究グループでもそういった取り組みの一環として、燃焼という幅広く普遍的な発生源を持ち発がん性もあるとされている多環芳香族炭化水素(PAHs)を指標として捉え、この PAHs の定量化とバイオアッセイを組み合わせて各ステージにおける微量有害物質の環境毒性評価を行ってきた¹⁾。このバイオアッセイは複数検討する必要があると考えており、PAHs も関与していると考えられるダイオキシン様毒性(AhR)、変異原性(umu 試験)を調べ、また一般毒性を見るために海洋性発光細菌に対する毒性試験も併せて実施してきた¹⁾。この海洋性発光細菌に対する毒性試験法はPAHsに代表される物質による毒性発現とは異なるが一定程度毒性を発現する PAHs 種もあり、また PAHs 量と組み合わせると相関を見ている事例も多いことから²⁾、本研究グループでも相関性に基づいた毒性起源の模索という用い方ができると考えている。

こういったバイオアッセイを環境中に適用させるには、微量な毒性を測定する必要上、抽出及び濃縮をすることが一般的である。本研究では基本的に固相や懸濁相を対象とし、PAHs を抽出する方法とほぼ同一の手順で抽出された抽出液を対象としている。ここで特に発光細菌を用いた毒性試験に関して試験方法および結果の解釈に関わる以下の2点の検討を行った。①本来毒物ではない一般的な物質が極端に濃縮された際に試験生物に阻害を示し、毒性試験としての結果が過大評価されている可能性についてである。こうした物質は一般的な有機物、塩分、硫黄(特に発光細菌への影響に関しては硫黄の影響が多く検討されている³⁾)など多岐にわたるが、その中でも有機物と塩分に着目して検討した。②試験に供すべき適切な菌体濃度についてである。特に高濃度になった場合は菌体自体の濁度による吸光が発光を測定する阻害になると考えられ、その程度を考察した。本測定は ISO11348-1 (2007) に準拠しており、そこでは菌体

濃度は 10^6 RLU 以下と規定されているが、どの程度の吸光でどの程度の発光阻害が起こり得るかを明確化することはデータの信頼性の向上の観点から意義があると考えている。

2. 実験方法

実験の流れとしては、①については実際の固相サンプルに対し抽出を行い、抽出量を把握する。併せて実際のサンプルから多く抽出され、かつ無害と考えられる物質の高濃度サンプルに対して毒性試験を行い、両者の結果を比較することで高濃度阻害が起こり得るかということを検討した。また、②における菌液自体の濃度の影響に対しては菌の培養時間を変えた様々な濁度の菌液を用いて、濃度-発光量の検量線を作成し、検討を行った。以下に具体的な手順を概説する。

(1) 毒性試験について

試験に用いた海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177) は ISO 11348-1 (2007) の基準に沿って培養し、発光量の測定は発光マイクロプレートリーダー(マイクロテックニチオン社:LP-5000)を用いた。次に毒性試験の方法を示す。まず固形物をジクロロメタン(DCM)に浸漬し60分間超音波抽出を行う。その後、ジメチルスルオキシド(DMSO)に溶媒転移をし、DMSO の影響を無くすために希釈液(塩分溶液)で10倍希釈したものを検液とする。この検液を用いて希釈系列を作成し(1 ウェルに $100 \mu\text{L}$ 、1 倍の系は検液100%で、他は50%、25%と倍希釈してゆく)、全ての系に発光細菌の培養液 $100 \mu\text{L}$ を曝露させ15分後の発光量を測定する。したがってDMSOの最終濃度は5%となる。また結果の項の試料の濃度とは培養液を加えた際の濃度とする。毒性のパラメーターは GAMMA 値を用い、これは消失した発光量/残存している発光量として表され、消失した発光量に対してはブランク補正を行う。

(2) サンプルの高濃度阻害について

次に濃縮に関して述べてゆく。まずこの問題を検討する際、実際の固相サンプルとしては、多くの物質の環境動態の終着点である海洋性底質を対象とした。そして高濃度阻害を引き起こし得る無害性物質として、海洋水の影響で多く含まれている塩分(NaCl)、そして有機物に関しては糖やタン

パク、脂質などの生体起源の一般有機物とし、これらの濃縮による影響を調べた。底質は河口付近ではなく、かつ有機物も程よく含まれていることを考慮し、呉湾の底質(II=11.7%)を検討に用いた。サンプリング地点の詳細な位置情報を表1に、個別16PAHsの含有量(ng g^{-1})を図1に示す。16PAHsの合計量は 456.56 ng g^{-1} であり筆者らが主たる対象としている広島湾または呉湾のなかでは比較的汚染が少ない底質といえる⁴⁾

表1 底質詳細

座標	位置	陸からの距離
北緯 34° 13'30"	江田島市江田島町	0.9km
東経 132° 30'0"	秋月沖	

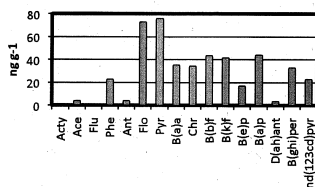


図1 底質中16PAHs含有量

また抽出に用いる底質の量は 1 g とし、この抽出法における最大量で行った。これは最も塩分、有機物が抽出されやすい条件で検討することで他のケースでの濃縮の問題を包括的に評価できるようにするためである。そしてこの底質を前処理の手順に沿って処理し、得られた検液中に含まれる塩分、有機物量を推定した。次に推定方法の詳細を示す。まず塩分に関しては、底質を超音波抽出する。そして抽出後、本研究で用いる 塩分濃度計(堀場製作所:ES-51)は有機溶媒には対応していないため、milli-Q 水 30 mL に溶媒転移を行い塩分濃度を測定する。この濃度から抽出する塩分量が分かり、その後濃縮されて希釈された、検液中の塩分濃度(g L^{-1})を算出する。またどの程度の塩分濃度で毒性を示すかを明確化させる為、 NaCl 溶液に対して毒性試験を行った。一方有機物の検討は、強熱減量(II; 400°C で4時間経過時の減少量から算出)を全有機物量(g)の評価指標とし、それに対して抽出前後の減少した重量を抽出された有機物量(g)とし、それらの比を抽出率(%)として求めた。その結果からの検液中の抽出された有機物濃度(g L^{-1})を算出し、高濃度阻害があるかを判定するといった流れで行う。ここでもまたどの程度の有機物濃度で毒性を示すかを明確化させる為、本研究では比較のため糖類としてグルコース、タンパク質としてペプトン、脂質としてサラダ油(市販)を対象とし試験を行った。これらの物質は生物の一般的な栄養源となる有機物であり一般的な無害な有機物がある程度代表できると考える。

(3) 高濃度菌液について

高濃度菌液についての検討方法を示す。菌自体が高濃度であることにより考えられる問題としては、高濃度すぎて発光自体が阻害される可能性、そして強い光が機器の測定限界に達してしまう可能性が挙げられる。そこで菌体量と発

光量が異なる条件で調べるために様々な培養状態で発光量と吸光量(575 nm での吸光)との関係を調べた。

3. 結果と考察

(1) 底質

まず底質を抽出した場合の塩分、有機物濃度の推定値を示す。2-2 の手順に従って測定したところ、塩分に関しては機器の検出限界以下であり、最終的な検液中の塩分濃度は 1 g L^{-1} 以下であることが分かった。また、対象とした底質の II は 11.7% 、抽出率は 75.1% となったので、底質 1 g を抽出した場合の、最終的な検液中の有機物濃度は約 8.8 g L^{-1} であることが分かった。

(2) 濃縮についての検討

対象物質それぞれ 150 g L^{-1} の溶液を作成して阻害試験を行った。結果を以下に示す。

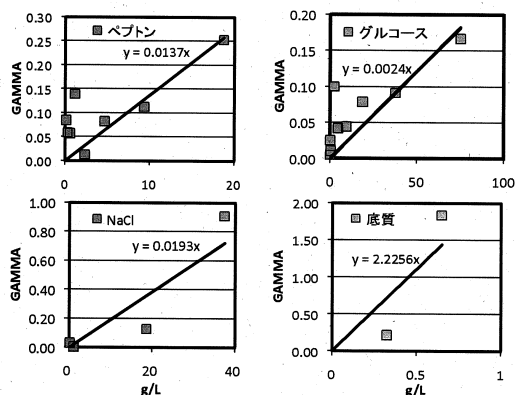


図2 底質、高濃度サンプル毒性試験結果

結果はこのようになり、サラダ油は濃度に関わらず阻害を全く示さなかった。3-(1)の結果と比較すると、対象とした底質中の塩分、有機物濃度が示す阻害は、図2より、 $\text{GAMMA} = 0.1$ 以下であり、塩分と有機物の濃縮による影響はない、もしくは極めて微量なものだと推察できる。

次に、これらの無害物質と、今回の検討対象とした底質を含む様々な底質および大気粉塵⁴⁾との半数致死濃度: EC_{50} (g L^{-1})とを比較した(図3)。 EC_{50} はそのサンプルの持つ毒性の強さを表すパラメーターであり、 $\text{GAMMA} = 1$ に対応する濃度である。なお、ここでの表記は分かりやすいように EC_{50} の逆数を有機物量ベースであらわした $\text{TU} (\text{g}^{-1})$ という指標を用いた。

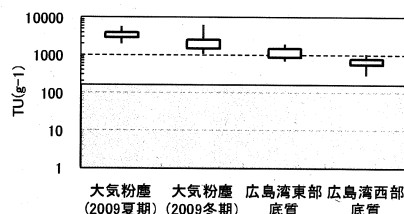


図3 環境サンプルとのTU比較

ここでは阻害が比較的強かったペプトンの TU: 159.9g⁻¹を基準とし、つまり環境サンプルの TU がこの値以下(灰色の領域)であれば、その結果は有害物質によるものとは言えず、濃縮による影響が大きいと考えられる。

しかし結果から、環境サンプルは今回対象とした底質の TU(1330.2 g⁻¹) 含め、全てペプトンの基準より高い結果となり、有害物質の存在が示された形となった。

(3) 高濃度菌液の検討

まず高濃度ゆえに光が正確に読み取れない点について検討していく。検討のために様々な異なる菌液で実験を実施した(n=6)。菌液の発光量は濃度が高くなると収束していく傾向にあり、その際の発光量も一様ではなかった。したがって機器の測定限界というより菌液自体の濃度が原因と考え、以下のように吸光が観測の阻害になっている可能性について検討を行った。

まず吸光度(Abs)は Lambert-Beer の法則から以下のように定義される。

$$\text{Abs} = -\log_{10}(\text{Light}_{\text{受光部}}/\text{Light}_{\text{光源}}) \cdots (1)$$

Light_{受光部}と Light_{光源}との関係は以下ようになる。

$$\text{Light}_{\text{受光部}} = \text{Light}_{\text{光源}} \times \exp(-kL) \cdots (2)$$

ここで k は単位距離当たりの減衰係数(m⁻¹)、L は行路長(m)である。(2)→(1)で

$$kL = \text{Abs}/0.43 \cdots (3)$$

続いて菌の吸光について検討する。

吸光阻害ない場合の真の発光量を Vf₀、観測された発光量を Vf とする。すると両者の関係は以下ようになる。

$$Vf = Vf_0 \times \frac{1}{L} \int_0^L \exp(-kx) dx \cdots (4)$$

真の発光量(Vf₀)は以下のように菌の量、すなわち吸光度(Abs)に比例するとする。

$$Vf_0 = a \times \text{Abs} = a \times 0.43 \times kL \cdots (5)$$

この a は検量線の傾きを指し、濃度が薄いところでは菌液濃度による阻害が起きていないと仮定し、その範囲から求めた近似線の傾きから算出した。菌液ごとの a の値は(4×10⁵~2×10⁶と 5 倍程度異なった。幅広い発光の状態で検討したことになる。

ここで得られた a の値と、k の値を用いて実験値とフィッティングを行った。k の値は吸光から得られる値と等しいとした。(4)→(5)で

$$Vf = a \times 0.43 \times (1 - \exp(-\frac{\text{Abs}}{0.43}))$$

これをフィッティングしたところ実験結果と概ね一致した(図4)。

以上より菌液濃度上昇による発光上昇の低減は吸光による測定の阻害であると考えられる。

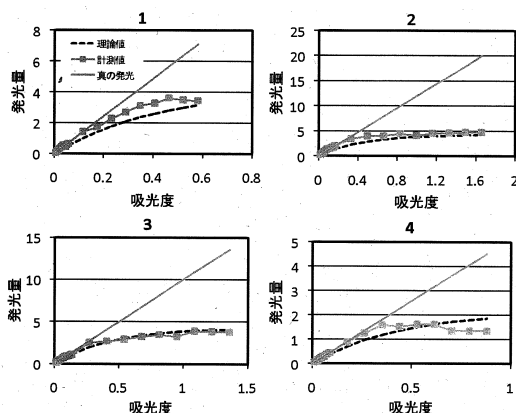


図4 菌液ごとの発光-吸光について

4. まとめ

本研究では海洋性発光細菌の方法及び結果に与える因子の検討として、①無害物質による高濃度阻害、②菌液濃度の影響の2点に対し検討を行った。①については塩分、一般有機物を用いて高濃度阻害を起こしうる濃度を明確化させ、底質を抽出した際に得られる濃度との比較を行い、今回の条件では問題がないことが確認された。同時に、ペプトンを用いて EC50 (g L⁻¹) を算出し、無害物質が濃縮により示す EC50 というものが得られた。今後はより多くの無害性物質に試験を行い、この EC50 の値の信頼性の向上に努め、本試験法のブランク値として確立させることが課題として挙げられる。また、②については、菌液自体が発光の観測を阻害するといった仮定の下に作成したモデルと観測値がほぼ一致という結果が得られたことから、ある程度理論的に明らかにすることが出来たのではないかと考えている。

5. 参考文献

- 1) 中島ら, 水汚泥のコンポスト化における PAHs および毒性の変化と環境負荷量の把握, 第 45 回日本水環境学会年会講演集, p57 (2011)
- 2) E. Vouitsis et al., An investigation on the physical, chemical and ecotoxicological characteristics of particulate matter emitted from light-duty vehicles, Environmental Pollution 157, p2320-2327 (2009)
- 3) Jacobs et al., The Toxicity of Sulfur to Microtox® from Acetonitrile Extracts of Contaminated Sediment, Environmental Toxicology and Chemistry 11, p1137-1143 (1992)
- 4) Ozaki et al., PAH concentration toxicity in organic solvent extracts of atmospheric particulate matters and sea sediment, Water Science and Technology (2012)