

N-4 メダカ肝臓のメタボロミクスによる 下水処理水の毒性評価

○北村友一^{1*}・岡本誠一郎¹・鈴木 穰²

¹ (独) 土木研究所水環境研究グループ (〒305-8516 つくば市南原1-6)

² (独) 土木研究所材料資源研究グループ (〒305-8516 つくば市南原1-6)

* E-mail: kitamura@pwri.go.jp

1. はじめに

動物は摂取する食物から、生命維持に必要なエネルギーを得ている。体内に摂取された食物は、糖類、アミノ酸、脂質などに分類でき、各分類下の代謝経路に従い様々な低分子代謝物に変換され、エネルギー源となり生命を維持している。ストレスによってその代謝物質の種類や量が変動することが明らかになってきた。この代謝物質の変動は遺伝子、蛋白質発現の後にくるものであり、生物の表現型に近いと考えられ、代謝物質群の網羅的な解析と解析 (メタボロミクス) から、病気毎のマーカー探索が行われている。このメタボロミクスは、水生生物の生体影響の把握に応用できる可能性がある。すなわち、魚を下水処理水および比較対照とする水道水などに曝露し、代謝物質の変動を比較することにより、下水処理水の生物影響の把握が可能になると考えられる。本研究は、モデル純物質および下水処理水に曝露したメダカの肝臓代謝物質の変動パターンの取得と既知の代謝物マーカーおよび統計的手法から下水処理水の毒性影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 化学物質曝露と下水処理水曝露実験

メダカの代謝物質濃度の変化から下水試料の毒性を評価する場合、比較対照となるモデル純物質の曝露も必要と考えられた。そこで、下水処理水に含まれ水生生物への影響が懸念されている物質を選定し、選定した物質の曝露実験を行った。曝露物質は、女性ホルモン (エストロン)、殺菌剤 (トリクロサン)、発がん性物質 (N-ニトロソジメチルアミン:NDMA)、抗男性ホルモン (フルタミド)、抗がん剤 (シクロホスファミド)、抗生物質 (クラリスロマイシン)、男性ホルモン (ジヒドロキシテストステロン:DHT)、界面活性剤 (LAS)、金属 (CdCl₂) とした。金属以外の曝露物質の濃度は、排水試料での最大濃度付近^{1), 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9)} とした。

毒性を評価する下水試料は、図-1 に示した実際の流入下水を連続処理している下水処理実験装置から得た。曝露下水試料は、下水処理工程で毒性低減効果をみるため、流入下水、2 次処理水、塩素処理水、担体処理水とし、24 時間連続方式で採水した。採水した試料を用いてメダカの曝露実験を表-1 に示した方法で行った。

9 種類の化学物質と下水試料の曝露実験は、全て同時に行うことができなかったため、4 回に分けて行った。なお、各曝露実験では対照区として脱塩素水道水の曝露実験も行った。

表-1 メダカの曝露条件

曝露方式	半止水式 (1日に1回水交換)
曝露時間	96時間
水温	24 °C
供試魚	メダカd-rR (3-9カ月齢)
供試生物数	5個体/曝露区
照明	16時間明, 8時間暗
餌	なし
エアレーション	DOが低い場合は緩やかに曝気
代謝物測定臓器	肝臓
曝露物質と濃度	
エストロン*	0.2 μg/L ¹⁾
NDMA*	1 μg/L ²⁾
トリクロサン*	5 μg/L ³⁾
フルタミド**	1000 μg/L ⁴⁾ 注1
クラリスロマイシン**	5 μg/L ⁵⁾
シクロホスファミド**	5 μg/L ⁶⁾
DHT***	4 μg/L ⁷⁾ 注1
LAS***	1000 μg/L ⁸⁾
CdCl ₂ ***	70 μg/L ⁹⁾ 注2
流入下水****	
2次処理水****	
塩素処理水****	
担体処理水****	
脱塩素水道水	対照

*Run1, **Run2, ***Run3, ****Run4

注1: 活性値として得られた濃度

注2: 魚類行動に影響が表れるレベル

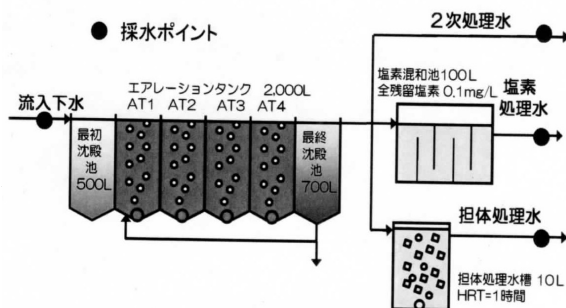


図-1 下水処理実験装置の概要

2.2 代謝物質の分析方法

曝露終了後、肝臓を取り出し、5匹分を1つに混合し1検体とした。各試料に500 μ Lのメタノール溶液(50 μ M 内部標準物質)を加え、冷却下にて卓上型破砕機により破砕した。その後、500 μ Lのクロロホルムおよび200 μ LのMilli-Q水を加えて攪拌し、遠心分離(2,300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分)を行った。遠心分離後、水層を限外ろ過チューブ(5 kDa)に400 μ L $\times$ 1本に移し取った。これを遠心(9,100 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 120分)し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び50 μ LのMilli-Q水に溶解して測定に供した。

試料中の代謝物質はキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計(CE-TOF-MS)で、カチオン、アニオンモードとも質量電荷比(m/z) 50~1000で網羅的測定を行った。

2.3 データ処理と解析

CE-TOF-MSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHandsを用いて自動抽出し、ピーク情報として m/z 、泳動時間とピーク面積値を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて相対面積値に変換した。

$$\text{相対面積値} = \frac{\text{目的ピーク面積値}}{\text{内部標準物質の面積値} \times \text{試料量(mg)}}$$

Human Metabolome Database¹⁰⁾から調べた毒性に係る代謝物マーカーの各曝露区での相対面積値比較と全代謝物質および代謝経路毎の各代謝物質の相対面積値を用いて、図-2のkishiら¹¹⁾のユークリッド距離(d)とピアソン相関($\cos \theta$)から生理影響度を求め毒性評価を行った。

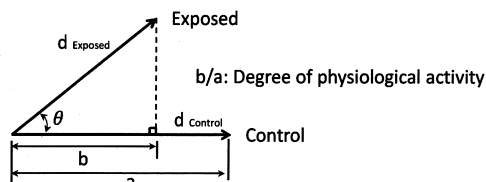


図-2 ユークリッド距離(d)とピアソン相関係数($\cos \theta$)による生理影響度(Degree of physiological activity)の算出¹¹⁾

3. 結果

3.1 各種代謝物マーカーによる毒性評価

全曝露実験を通して345種類の代謝物質が検出された。これらの中から、図-3に、酸化ストレス、腎障害、肝障害、エネルギーレベルの代謝物質マーカーの各曝露区の相対面積値倍率を示した。酸化ストレスは、グルタチオン(GSH)、その前駆物質システイン、オフタルミン酸、アスコルビン酸の変動が指標になると考えられる。流入下水曝露区では、グルタチオン(GSH)とシステインの低下、オフタルミン酸とアスコルビン酸の増加がみられた。流入下水には酸化ストレス作用があり、酸化作用が抗酸化作用を上回っていると考えられる。純物質曝露区では、エストロン、DHT曝露区でグルタチオンとシステインの増加、CdCl₂曝露区でグルタチオンとシステインの低下、フルタミド曝露区でアスコルビン酸の増加がみられた。腎障害のマーカーとなるクエン酸やクレアチニンと前駆物質のクレアチン、ホスホクレアチンは、流入下水曝露区で倍率が高く、処理レベルが高度になるに従い減少する傾向を示した。純物質ではトリクロサン曝露区でクレアチン、クレアチニン、ホスホクレアチンの増加がみられた。肝障害のマーカーとなるピペコリン酸、イソロイシン、バリリン、カルチニンでは、流入下水曝露区で倍率

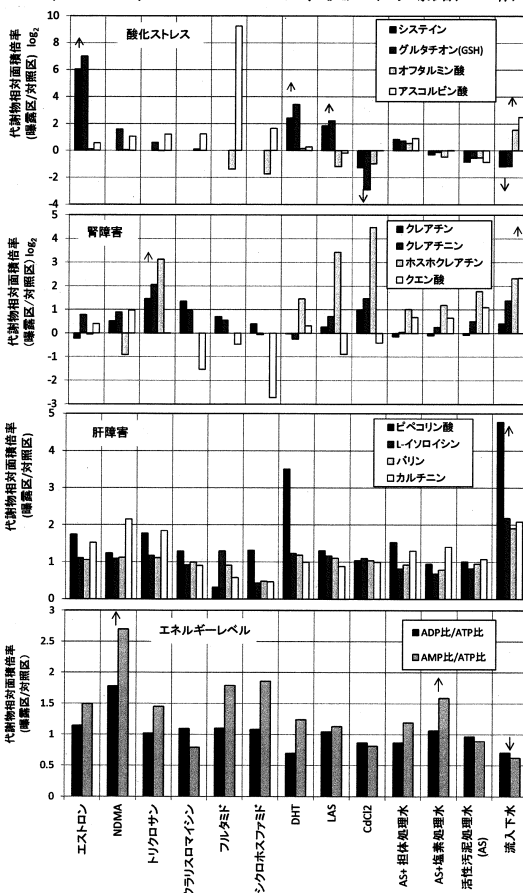


図-3 曝露試料毎の各代謝物マーカーの変動

は高くなったが、各処理水曝露区では1付近であり毒性影響が低減されていた。純物質ではDHT曝露区でピペコリン酸はが高くなっていた。エネルギーレベルの簡易指標となるADP/ATP、AMP/ATP比は、AMP/ATP比が塩素処理水曝露区で若干高くなる傾向がみられた。純物質ではNDMA曝露区で高くなる傾向を示した。ADP/ATP、AMP/ATP比の増加は発がん性物質存在の指標になる可能性がある。

流入下水に含まれる酸化ストレス、腎・肝毒性は活性汚泥処理で低下することがわかった。

3.2 統計解析による毒性評価

図-4は、各純物質と下水試料の全代謝物群（定量限界以上の147種類）と代謝経路毎の代謝物質群の相対面積値から算出された生理影響度である。代謝経路毎の分類は、KEEGデータベースを基に、解糖系+クエン酸回路、

アミノ糖とヌクレオチド代謝、尿素回路、プリン代謝、グリシン+セリン+スレオニン代謝、グルタミン+グルタミン酸+グルタチオン代謝とした。なお、生理影響度は、値が1に近くなるほど毒性影響が少ないと評価される。

全代謝物質による生理影響度は、0.5以上1.5以下であり、顕著な影響はみられなかった。しかし、代謝経路毎の生理影響度は、下水試料、化学物質によって異なることがわかった。解糖系+クエン酸回路では、流入下水曝露区で1より大きくなり、活性汚泥処理水曝露区では1を下回ったが、塩素と担体処理曝露区では1に近くなった。アミノ糖とヌクレオチド代謝では、流入下水曝露区で1より小さくなったが、処理の高度化に従い1に近づいた。尿素回路は、下水試料については解糖系+クエン酸回路と同様の傾向を示したが、純物質での挙動は異なり、CdCl₂曝露区で大きくなった。プリン代謝、グリシン+セリン+スレオニン代謝は処理レベルの向上に従い1に近づいた。グルタミン、グルタミン酸、グルタチオン代謝以外では処理レベルの向上に従い毒性影響が低減されることがわかった。

4. おわりに

下水試料の毒性をメダカ肝臓のメタボロミクスから評価した。その結果、流入下水には、酸化ストレス、腎・肝毒性影響が含まれるが、活性汚泥処理で毒性影響が低下することがわかった。

全代謝物および代謝経路毎でユークリッド距離とピアソン相関の関係から生理影響度を算出した結果、流入下水には解糖系とクエン酸回路、アミノ糖とヌクレオチド代謝、尿素回路に影響を与えることがわかったが、処理の向上に従い影響が低減されることが確認された。

下水処理レベルによって、代謝物質も変動することが明らかとなったが、今後は、どの程度の変動まで許容できるのかについての調査研究が必要と考えられる。

参考文献

- 1) K. Komori *et al*(2004), *Water. Sci. Technol.*, 50, 5, 93-100.
- 2) M. Krauss *et al*(2009), *Water Res.*, 43,17,4381-4391
- 3) R.U.Halden *et al*(2005), *Environ. Sci. Technol.*, 39,6,1420-1426
- 4) D. Stalter *et al*(2011), *Water Res.*, 45, 3, 1015-1024
- 5) G. C. Ghosh *et al*(2009), *Water. Sci. technol.*, 59,4, 779-786
- 6) T.Steger *et al*(1997), *Ecotox. Environ. safety*, 36, 2,174-179
- 7) L. A. Kirk *et al* (2002), *Environ. Toxi. Chem.*, 21, 5, 972-979
- 8) 真名垣ら(2005), 水環境学会誌, 28,10, 621-628.
- 9) J.H.Canton *et al*(1982), *Ecotox Environ Safety*, 6,1,113-128.
- 10) <http://www.hmndb.ca/>
- 11) Kishi *et al*(2008), *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Biological Responses to Chemical Pollutants*,143-154

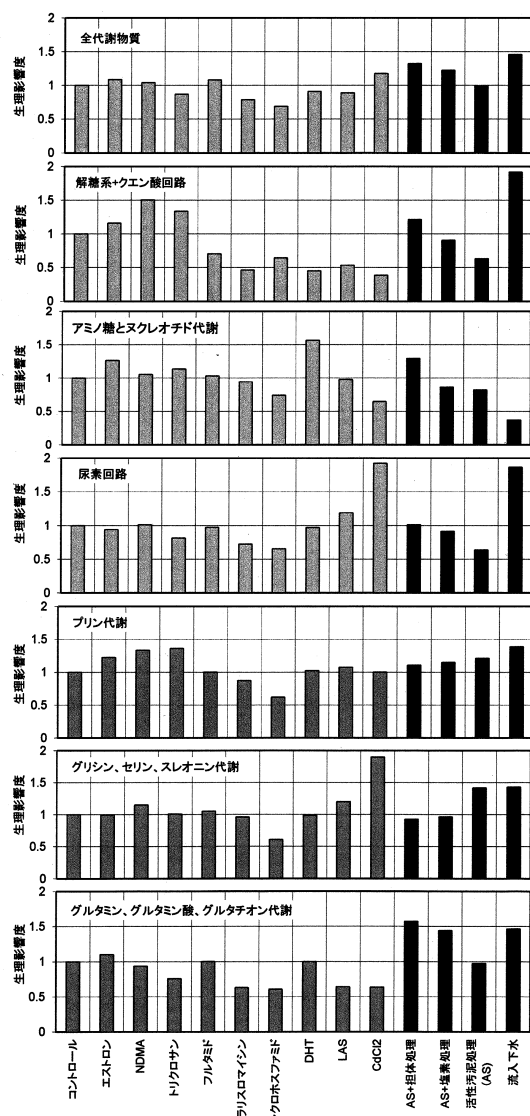


図-4 各化学物質と下水試料の生理活性度