

簡易型 EROD 活性測定方法の検討と河川水を用いた実証試験

Demonstration Experiment of a Simple Measuring Method of EROD Activity, Using Real Environmental Waters

川原 志郎
関根 俊郎

Shiro KAWAHARA
Toshiro SEKINE

小林 弘明
原 美由紀

Hiroaki KOBAYASHI
Miyuki HARA

要旨

2013 年度の研究では、OECD のテストガイドライン No. 212 や「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」などに記載されている魚類の胚・仔魚期の短期慢性毒性試験のオプションとしての簡易型の EROD 活性測定方法について検討し、その可能性を示した。2014 年度の研究では本手法の実用性を検討するため、実際に市内河川水を用いて短期慢性毒性試験と EROD 活性の測定を行い、市内の河川水の評価を行った。

キーワード： EROD、仔魚、*in vivo*、Whole Effluent Toxicity（全排水毒性、WET）、生物応答を用いた排水試験法（検討案）

Key words: EROD, Larvae, *in vivo*, WET, Draft protocols of effluent testing using bioassays

1 はじめに

2013 年度の研究において、著者らは OECD のテストガイドライン No. 212 や「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」¹⁾などに記載されている魚類の胚・仔魚期の短期慢性毒性試験のオプションとしての簡易型の EROD 活性測定方法について検討し、その可能性を示してきた²⁾。

EROD 活性とは、薬物代謝酵素シトクロム P450 1A（以下、CYP 1A）の活性の度合いを示すものである。薬物代謝酵素は生体内のホルモンなどを正常な状態に保つ働きとは別に、化学物質など体外異物を体内に取り込んだ際に体外に排出しやすくする機能を有する。この機能を司るのが薬物代謝酵素群である。

薬物代謝酵素は基質特異性と呼ばれる性質を有し、暴露された化学物質の構造に応じた分子種が誘導されることが知られている。このため、生物体内である種の薬物代謝酵素の誘導が確認できれば、その生物はその薬物代謝酵素分子種に応じた化学物質に暴露された可能性が高いことが分かる。このような理由から、薬物代謝酵素の mRNA や活性はバイオマーカーとして有効とされている。

薬物代謝酵素分子種のうち CYP 1A は特に多環芳香族炭化水素（以下、PAHs）や有機塩素系化合物の暴露との相関が高いことが知られており、このため CYP 1A の活性の指標である EROD の誘導が確認された場合はその生物が PAHs などの物質に暴露された可能性を示す指標となる。

2013 年度は EROD 活性の誘導剤として β -ナフトフラボン（以下、 β NF）を用いて検討を行ってきたが、他の PAHs の暴露時に本手法でどのような反応を検知できるかは明らかになっていない。

ここで 2014 年度の研究では、PAHs のモデル物質と

してベンゾ[a]ピレン（以下、BaP）を暴露した際の EROD 活性の挙動を明らかにするとともに、実際に市内の河川水を対象として、魚類の胚・仔魚期短期慢性毒性試験と EROD 活性の測定を行い、市内の河川水の評価を行った。

2 実験材料と方法

2.1 試験生物の飼育条件

実験には国立研究開発法人国立環境研究所から購入したゼブラフィッシュを継代飼育した親魚から生まれた受精卵を用いた。

ゼブラフィッシュの飼育には脱塩素水道水を用い、明暗周期 16:8、水温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ とし、朝夕に一日 2 度、テトラミン及び孵化後 24 時間以内のアルテミア (*Artemia* spp. Nauplii) を適量与えた。産卵期の親魚は雌雄別々の水槽で飼育し、採卵する場合のみ前日の夕方から混泳させた。またこの時、場合によって水温を 1°C 程度上昇させた。

2.2 試薬

本研究に用いた β NF、レゾルフィンナトリウム塩（蛍光標準品、以下、resorufin）、7-エトキシレゾルフィン（以下、7-ER）、BaP、ジメチルスルホキシド（以下、DMSO）は全て和光純薬工業製から購入した。

2.3 EROD 活性の測定方法

暴露終了後、仔魚をそれぞれの試験区ごとに、脱塩素水道水で洗浄したのち、10 尾を褐色瓶に移し全体の水量を 2 mL とした。ここに蛍光基質である 7-ER 濃度を 2 mM に調製した DMSO 溶液を適量添加し（以下、反応溶液）、添加直後と一時間ごとに各反応溶液中の resorufin 濃度を分光蛍光光度計（日本分光株式会社：FP-8200）を用いて測定した。測定には蛍光用マイクロセルを用い、励起波長 (Ex) と蛍光波長 (Em) は

それぞれ 571nm 及び 582nm とした。試料量は 500 μ L とし、測定終了後 500 μ L の試料全て反応用の褐色瓶に戻した。酵素の働きにより生成した蛍光物質 (resorufin) の生成量は検量線の傾きより算出した。resorufin の検量線のレンジは 0nM から 50nM とした。酵素活性は、resorufin の量 (fmol) / 時間 (h) / 尾数 (larva) で表した。

2.4 BaP 暴露時の EROD 活性の挙動

代表的 PAHs である BaP 濃度を 1.1、3.3、10 及び 30 μ g/L とし、暴露試験を行い EROD 活性の挙動を明らかにした。実験にはスナップカップを用い、暴露水量は 40mL とし、それぞれ 15 個の受精後 4 時間以内の受精卵を暴露した。換水は 2 日に一度行った。基本的な試験手法は「生物応答を用いた排水試験法 (検討案)」に準じた。

2.5 市内河川水の調査

本手法は胚・仔魚期短期慢性毒性試験の後に用いることを想定したものである。このため、本手法の実効性を確認するため実際の河川水を用いて、胚・仔魚期短期毒性試験を行った後、EROD 活性の測定を行った。サンプリング地点は市内鶴見川水系の真福寺川と麻生川とした。2014 年 9 月から 10 月の間に真福寺川に関しては 1 回、麻生川については 2 回、別日にサンプリングした。サンプリングした試料水はプランクトンネットでろ過後、冷暗所に保存した。試験濃度区は対照区 (脱塩素水道水)、それぞれの河川水濃度が 80%、40% となるように脱塩素水道水で希釈したもの、及び EROD 活性の陽性対照区 (β NF 濃度 1.1 μ g/L) を設けた。麻生川の 2 回目の試験については河川水濃度が 20% の試験区も追加した。胚・仔魚期短期慢性毒性試験のエンドポイントとして、孵化率 (Hatch success)、生存率 (Survival ratio)、孵化後生存率 (Survival ratio at larval stage) を算出した。

2.6 統計処理

全ての統計処理は SPSS (Ver. 22, IBM 社) を用いて行った。EROD 活性は Levene の検定により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合には一元配置分散分析 (one way ANOVA) を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定 (Tukey HSD 検定) により有意差を検定した。等分散性が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には Bonferroni adjustment をもって Mann Whitney の U 検定を行った。

3 結果

3.1 BaP 暴露時の EROD 活性の挙動

β NF と同様に EROD 活性を誘導することが知られており、また代表的 PAHs である BaP の暴露実験を行い、EROD 活性との関係を明らかにした。その結果、濃度依存的な EROD 活性の誘導が確認され、溶媒対照区のみ

と比較した際には BaP 暴露濃度が 3.3 μ g/L の試験区から有意差が検出できることが示された (Fig. 1)。また、測定時間中、反応溶液中の resorufin は直線的に増加していることを確認した ($R^2=0.968-0.999$)。

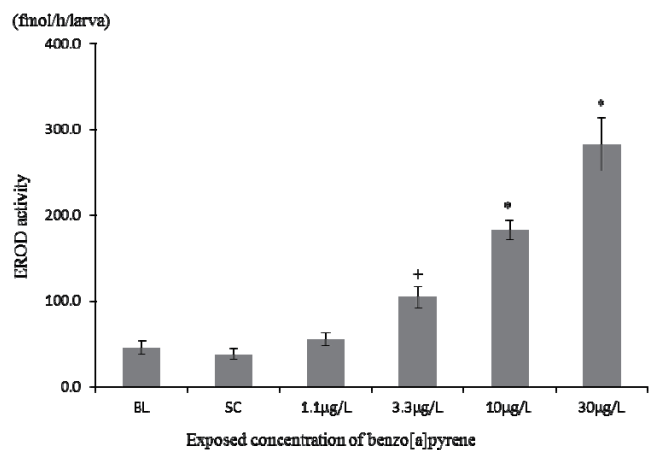


Fig. 1 Dose-response of BaP on EROD activity of zebrafish larva. Values represent means and standard deviations ($n=4$).

BL indicates blank control. SC indicates solvent control.

* : significant differences VS SC ($P<0.05$) on multiple comparison.

+ : significant differences VS of SC ($P<0.05$) on single comparison.

3.2 市内河川水を用いた実証試験

本市の鶴見川水系の真福寺川及び麻生川から採取した河川水について暴露試験を行った。1 回目の実験結果を Fig. 2 に示した。孵化率や生存率、孵化後の生存率には有意な差は検出されなかった。EROD 活性については麻生川の河川水暴露区に関しては対照区と比較して有意な誘導が確認できた。

2 回目の麻生川の試験結果を Fig. 3 に示した。孵化率や生存率、孵化後の生存率には有意な差は検出されなかった。EROD 活性については 20%~80% 全ての河川水暴露区で対照区と比較して有意な誘導が確認された。

4 考察

著者らは 2013 年度の検討において、 β NF を EROD 活性誘導剤のモデル物質として、魚類仔魚を用いた簡易な EROD 活性の測定方法の可能性について示してきた。

2014 年度の検討では、本手法の有効性を確認するため、環境中の代表的 EROD 活性誘導剤である PAHs のうち、BaP を対象に試験を行い、EROD 活性を測定した結果、濃度依存的な EROD 活性の誘導が確認できた。このことから、本手法は β NF のみならず、その他多くの PAHs など EROD 誘導剤の暴露影響測定に有効であるものと考えられた。

また、実際の市内の河川である真福寺川と麻生川の河川水を用いて胚・仔魚期の短期毒性試験を行ったのち、残った魚を用いて EROD 活性の測定を行った結果、全ての試験で胚・仔魚期短期慢性毒性試験のエンドポ

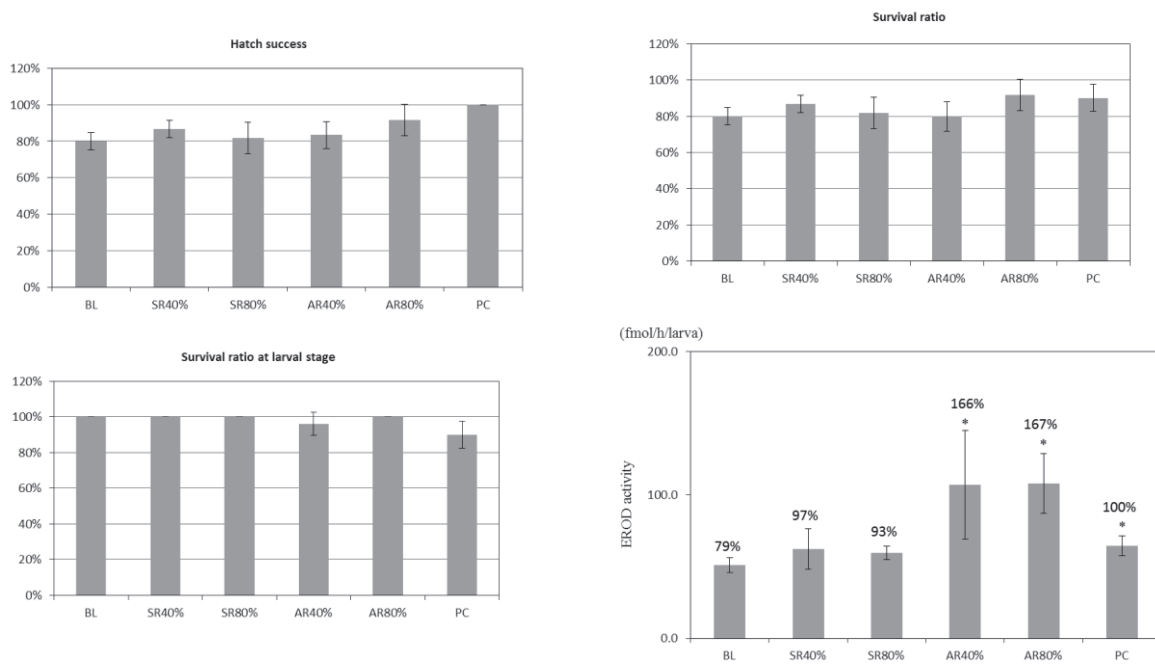


Fig. 2 Hatch success, Survival ratio, Survival ratio at larval stage and EROD activity (First sampling of *Shinpukuji river* and *Asao river*).

Values represent means and standard deviations (n= 4).

BL indicates blank control, and PC indicates positive control (β NF 1.1 μ g/L).

SR indicates *Shinpukuji river*, and AR indicates *Asao river*.

*Indicates significant differences VS BL (P<0.05)

The numbers described in the upper part of the bars indicates percentage VS PC.

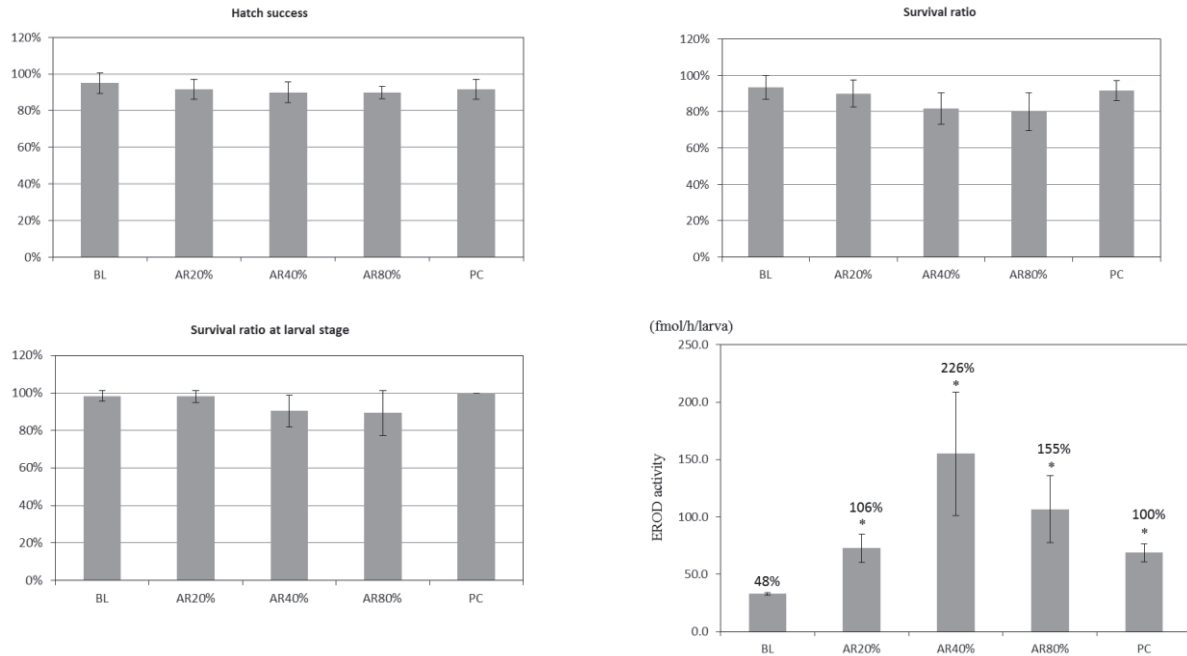


Fig. 3 Hatch success, Survival ratio, Survival ratio at larval stage and EROD activity (second sampling of *Asao river*).

Values represent means and standard deviations (n= 4).

BL indicates blank control, and PC indicates positive control (β NF 1.1 μ g/L).

AR indicates *Asao river*.

* indicates significant differences VS BL (P<0.05).

The numbers described in the upper part of the bars indicates percentage VS PC.

イントとした孵化率、生存率、孵化後の生存率に有意な差は無かった。EROD 活性については、真福寺川では有意な誘導は検出されなかったが、麻生川の河川水暴露区では対照区と比較して有意な誘導が検出された。このことより、麻生川の河川水には何らかの EROD 活性誘導剤が含まれている可能性が示唆された。

麻生川で2回目の試験結果では河川水濃度が40%の暴露区の方が80%よりも EROD 活性が高く誘導された。この原因としては、胚・仔魚期短期毒性試験のエンドポイントや目視による観察では捉えきれないながらも仔魚の健全状態に影響を及ぼしていたか³⁾、河川水中に EROD 活性の誘導抑制剤が含まれていた可能性が考えられた。このため、試料水中の EROD 活性誘導剤の有無のみでなく、総体としての EROD 活性誘導能を定量的に評価するためには複数の濃度区で測定を行うことが望まれる。最も高く誘導されたのは2回目のサンプリング時の河川水濃度40%の暴露区となり、陽性対照区(β NF 1.1 μ g/L)の226%となった。

これらのことより、本手法は環境水を用いた試験においても十分な検出感度を有するものと考えられ、さらに高い濃度が予想される事業所排水などにも対応できるものと考えられる。

5 まとめ

2013年度から検討している魚類の胚・仔魚期の短期慢性毒性試験のオプションとしての簡易型の EROD 活性測定方法について、代表的 PAHs である BaP を暴露した際の EROD 活性の挙動と、実際の市内河川水を対象とした短期慢性毒性試験後に EROD 活性を測定した際の挙動について明らかにし、その実用性について検証した。

BaP を暴露した際には濃度依存的な EROD 活性の誘導が確認できたことから、一般的な EROD 活性の測定と同様に、その他多くの PAHs などの暴露にも応答するものと考えられた。

市内河川水を対象にゼブラフィッシュの胚を用いた短期慢性毒性試験を行った結果、孵化率や生存率などには影響が無かったが、一部の河川においては EROD 活性の有意な誘導が確認できた。このため、本測定手法は環境水を対象とした試験においても有効であることが示された。

また、EROD 活性が誘導された河川水については、何らかの EROD 活性の誘導剤が含まれていることが推察できることから今後も定期的にモニタリングをしていきたい。

なお、本報は文献4)の内容をまとめたものである。

文献

- 1) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案）、（2014）
- 2) 川原志郎、小林弘明、関根俊郎、原美由紀：魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験のオプションとしての EROD 活性測定手法の検討、川崎市環境総合研究所年報、第2号、26～30（2014）
- 3) 柏田祥策：「生態毒性」評価のためのバイオアッセイ、ぶんせき、No.10、598～603（2004）
- 4) 川原志郎、小林弘明、関根俊郎、原美由紀：魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験のオプションとしての EROD 活性測定手法の検討、環境毒性学会誌、Vol.34、41～55（2014）