

# バイオアッセイ法を用いた工業排水中の有害物質の一次スクリーニング

山田 博子

Yamada Hiroko

(株)コンティグ・アイ

## 1. はじめに

工業排水は水質汚濁防止法のほか、法令で排水基準が定められており、きびしく規制されている。また各化学物質については、化審法により安全性評価されている。よって、「危険」な化学物質も「安全」に利用して排出するよう規制されているが、化学物質の相互作用までは評価・規制しきれないのが現状である。また、毒性を有する化学物質の種類は非常に多く、個別に管理するのは不可能である。

排水の環境影響評価のため、各種処理後の排水の一部を水槽に入れ、メダカやコイ、アユなどを生育して影響評価を見たり、ミジンコや藻類などの生物を用いることもある。しかし例えばメダカが死んでしまったとしても、その原因物質を調べるのは困難である。手当たりしだいGC-MSやLC-MSを含むいろいろな分析方法を駆使して、ポジティブリスト制度での分析並に費用と時間をかけて的外れな分析となるより、何らかの方法で絞り込みたいところである。

そこで、排水中の有害物質の一次スクリーニング法として有用な新しい方法である酵母プロモーターアッセイを紹介する。

## 2. 酵母プロモーターアッセイとは

酵母プロモーターアッセイは、(独)産業技術総合研究所とダイキン環境研究所が(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の基盤技術研究促進事業の支援を得て開発した化学物質推定・毒性判定システムである。

原理は、人間の体で例えると、腐ったものを食べれば下痢・嘔吐をするように、酵母も何か有害な物質が体内に入ると毒物に合わせて色々な遺伝子が発現する。さらに毒物ごとに発現する遺伝子の組み合わせが異なることを利用している。

検体を酵母に加えるだけの簡単な操作で、従来法であるミジンコ等を用いたバイオアッセイ法に比べ試験時間は約1/10~1/20で、比較的安価なシステムである(図1)。

開発にあたって、まずさまざまな化学物質に反応する組換え体酵母を作製した。個々の遺伝子の反応に関する情報は、従前より(独)産業技術総合研究所で研究されており、その成果をフィードバックした。まず酵母のサッカロマイセス・セレビジェ(*S. cerevisiae*) W303株に、有害物質に反応する各遺伝子のプロモーターと緑色蛍光タンパク質(Green fluorescence protein:GFP)を入れた組

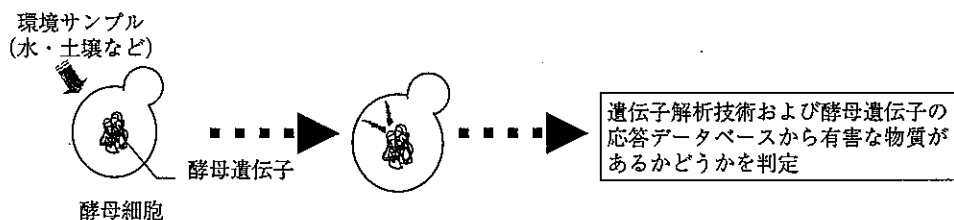


図1 酵母プロモーターアッセイの概略

換え体酵母400株を作製した。GFPは特定の波長の光を当てると緑色に光るタンパク質である。この組換え体酵母と重金属・界面活性剤・農薬・内分泌かく乱物質などの化学物質と反応させ、化学物質ごとに組換え体酵母の発光強度・パターンをデータベース化した。このデータベースを用いることで、排水中の有害物質を推定することができる(図2, 3)。

本法で含まれる有害物質の候補を絞り込むことで、全く未知の排水中の有害物質についても適切な定量分析を行うことが可能である。

### 3. なぜ酵母なのか?

環境影響評価法としては魚類, ミジンコ, 藻類などを用いた方法がある。人を含む生態環境への影響を評価するため、できるかぎりヒトに近い生

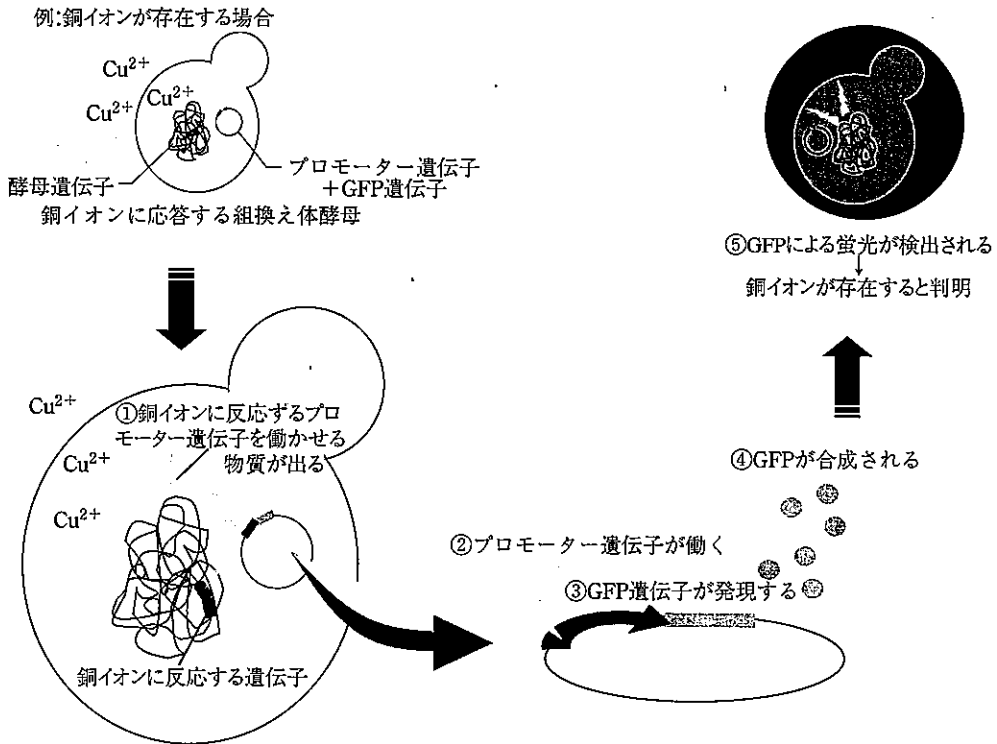


図2 酵母プロモーターアッセイの原理

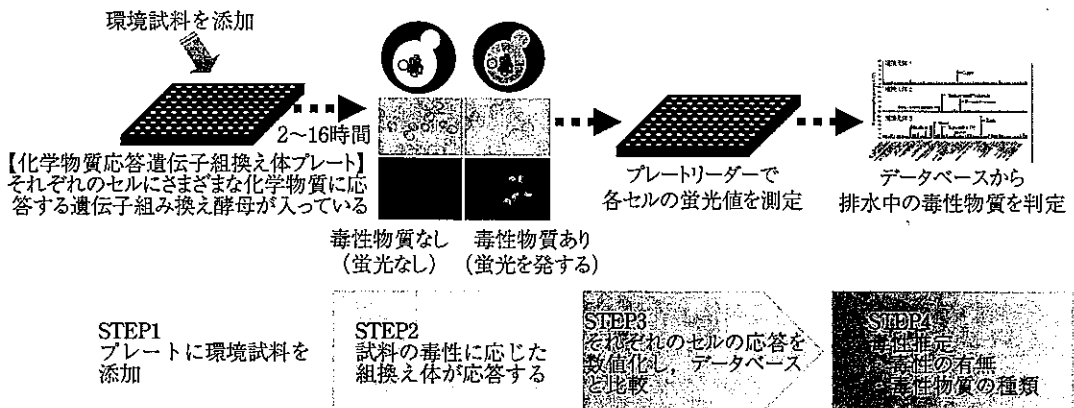


図3 酵母プロモーターアッセイの手順

物を用いたほうが正確なデータが得られることは確かだが、これまで用いられてきたマウス・ラット・ウサギ・イヌなどは徐々に制限されてきている。いずれの方法にも共通していることが、評価には非常に時間がかかるということである。刻々と変化する排水の評価に対し、1カ月から半年、さらには年単位の時間を割くことは無意味である。比較的扱いやすい魚類・ミジンコ・藻類についても、維持管理の必要がある。一定の生育日数の成体を試験に用いるため、常時水槽で生体を管理していなくてはならない。

排水を短時間で評価するには生態のサイクルが短時間で行われる生物を選ぶ必要がある。そこで対象になるのが微生物である。

微生物には大きく分けて原核生物と真核生物がある。原核生物は大腸菌などの細菌、真核生物はカビ・酵母などである。よりヒトに近いのが真核生物である。そこで、発酵技術でも馴染み深く、微生物としても十分に知見が得られている酵母であるサッカロマイセス・セレビジエを対象にした。本酵母は30℃で生育し、凍結・乾燥にも強いため比較的保存が容易である。生体の管理が容易であることに加え、1.5～2時間に1回分裂増殖するため、排水との反応時間は速くて2時間、長くても16時間で十分な応答が確認できる。

#### 4. 酵母プロモーターアッセイのメリット・デメリット

各毒性試験法のメリット・デメリットを表1に示した。

本法の欠点は大きく2つある。

①自家蛍光が大きい排水については感度が低くなる

排水中に含まれる蛍光物質がバックグラウンドの蛍光値となるため、自家蛍光が高すぎる場合は排水の希釈を要することがあり、応答の感度が1/10程度まで落ちることがある

②他の生物と比較して過敏になることがある

他の生物（メダカ等）では全く毒物として応答しない物質にも応答することがある（この欠点を利用して、有害物質以外の判定もできないか検討中である）

検体によっては試験が困難な場合があるため、当社では事前に簡易試験を行っている。

#### 5. 利用方法（排水管理）

酵母プロモーターアッセイは他の手法と比較して迅速に結果が出るので、定期的な排水管理には最適である。特に得意としているのが、排水基準では測りきれない安全性の評価である。

排水モニタリングとして1～2カ月に1回酵母プロモーターアッセイをご活用いただいている事例では、化学分析では排水基準を満たしているが、酵母プロモーターアッセイではある特定の物質数種が毎回検出されている。現在この物質の定量試験を行っている。このように従来試験では着目されなかった物質も、酵母プロモーターアッセイによる1次スクリーニングを行うことで、より適した排水処理法を検討できる。

#### 6. その他の利用方法

排水のほか、土壌、地下水の安全性の判定にも

表1 生物を用いた各毒性試験方法のメリット・デメリット

方法	メリット	デメリット
酵母を使用した影響評価 (酵母マイクロレイ/酵母プロモーターアッセイ)	ヒトと同じ真核生物であるため、 ・増殖が早く迅速に判定可能 ・ヒトを含む真核生物への影響を評価できる	・自家蛍光が大きい排水については感度が低くなる ・真核生物の中でも比較的毒性に対する応答が敏感である（ヒトに対する毒性が低くても敏感に応答することがある）
細菌への影響評価（変異原性試験）	増殖が早いので比較的迅速に結果が出る	細菌（原核生物）への影響は人などの真核生物への影響とリンクしないことが多い（環境生物やヒトに対する毒性を正確に評価できない）
藻類・魚類・鳥類等への影響評価 (親となる世代に物質を与え、次世代(子)に影響が出るかどうかを判定する)	環境生物およびその次世代に対する毒性を正確に評価できる	判定に時間がかかる

利用可能である。特に土壌については、土壌汚染対策法の施行、環境省の油汚染対策マニュアルの出版とともに、ニーズが出てきている。土壌汚染を浄化処理した後の土壌や地下水が安全であるかはその土地の跡地利用もあり非常に重要な問題である。油汚染については基準値がないため、何らかの有害な物質が残存していないかを絞り込める本法は非常に有用である。

同様に、河川水についても定期的な環境影響評価に加えることで、排水基準や水質基準では測れない内分泌攪乱物質（環境ホルモン）などのモニタリングが可能である。

また、食品中の残留農薬やカビ毒の判定にも利用可能であるが、食品に応じて適切な前処理が必要である。

## 7. 今後の展開

技術の発展によりさまざまな便利なものが生み出されているが、同時に人を含む生物は多くの化学物質に暴露されており、さまざまな悪影響が顕在化して、社会的な問題となっている。

現在、当社では（独）産業技術総合研究所およびダイキン工業（株）の特許許諾を受け、本検査の受託検査を行っている。お客様の要望に応じ、データベースにない化学物質についてもデータを集積しており、随時データベースのバージョンアップを図っている。さらに（独）産業技術総合研究所では、最新の技術を用いて組換え体酵母の高感度化を図っている。本法をさらに使いやすいものにする事でこの技術が排水管理法の一つとして役立つよう発展させたい。

## 参考文献

- 1) Takahashi J, Iwahashi H. multiple reporter gene assays for the assessment and estimation of chemical toxicity. Environ Sci. 2004; 11 (5): 269-82.
- 2) 高橋淳子：酵母による多種類化学物質のスクリーニング、ダイキン環境研究所、環境浄化技術 2005年2月号
- 3) 特願2003-85656：「バイオアッセイ装置」



やまだ・ひろこ

(株)コンティグ・アイ環境衛生検査センター

1999年3月 岐阜大学農学研究科生物資源利用学専攻修了

1999~2000年 (財)応用生化学研究所

2000~2003年 (株)ラカン 環境微生物研究所

2003年~現在 (株)コンティグ・アイ 研究開発部門

2005年12月 岐阜大学医学研究科修了

○山田博子, 江崎孝行：遺伝子検査による迅速な微生物検査法。食品と開発Vol. 37. No.1 p.6-7. 2002年1月1日刊行 CMPジャパン

○The cyclopedic detection of pathogens from digestive and respiratory system using polymerase chain reaction(PCR) and DNA microarray., JARMAM, 13巻1号 p.19-22, H. Yamada, Y. Kawamura, T. Ezaki 2002年12月号, 迅速診断研究会

○山田博子, 江崎孝行：遺伝子増幅による網羅的微生物検査法の開発と検査装置の現状, 食品工業Vol.45 No.24 p.24-28, 2002年12月30日号 (光琳)

○山田博子, 江崎孝行：遺伝子診断とバイオチップ, 月刊「新医療」2003年2月号, 2003年2月, (株)エムイー振興協会

○山田博子, 江崎孝行：DNAチップ/マイクロアレイ法の今後の展望 (応用と今後の展望), 臨床検査, 47巻2号 p.145-150, 2003年2月号, 医学書院

○山田博子, 河村好章, 江崎孝行：2004. オリゴDNAマイクロアレイ及び三次元DNAマイクロアレイを用いた消化器系感染症診断技術の開発 日本細菌学雑誌 (0021-4930) 59巻1号 Page.137