

# バイオアッセイにおける新規測定技術とその応用

## バイオアッセイによる安全性評価研究委員会

本年度は、「バイオアッセイによる新規測定技術とその応用」と題して4件の依頼講演を実施し、活発な討論が行われた。内容として、藻類の微弱発光や Omics 技術、Real Time PCR など様々なバイオアッセイにおける新規測定技術を活用し、化審法等の化学物質の安全性評価や、現在環境省で検討中のバイオアッセイを用いた排水・環境水の評価・管理手法等への応用可能性について話題提供や事例紹介が行われ、約40名の参加をいただいた。

藻類の遅延発光を利用した新しい化学物質影響評価技術：勝又政和（浜松ホトニクス）ほかでは、試作した高感度ルミノメータを用いて、光合成の逆反応により生じる微弱な光（遅延発光）によって効率よく藻類の光合成活性を測定する方法が紹介された。この手法を緑藻の一種であるムレミカツキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*）に適用すると、除草剤でも光合成電子伝達反応阻害剤のジメタメトリンと、光合成に作用しない脂肪酸合成阻害剤のプレチラクロールの作用機序が異なる物質では曝露24時間後に計測した微弱発光の減衰パターンが異なることなどが示された。また、熱処理によって不活化された緑藻の発光量を調べたところ、従来の細胞数計測や吸光度・蛍光度測定などが不活化された細胞まで計測されるのに対して、遅延発光では生長細胞濃度を正確に測定することができ、生長速度をベースに評価を行う OECD TG No.201 への利用にも有効であることが示唆された。実際に、化学物質の評価・管理に一般的に用いられる TG201（72時間 EC<sub>50</sub>）と遅延発光の結果を40種について比較すると高い相関が確認された。さらに、この手法の排水評価系への適用結果も示され、試験時間短縮や作用メカニズムによる毒性原因物質の特徴化にも有効利用できると思われる。

DNA マイクロアレイを用いた化学物質評価・管理の最新事情：鏡良弘（エコジェノミクス）では、遺伝子発現の変化を網羅的に評価するゲノミクスの技術である DNA マイクロアレイ手法の現状や排水への適用事例についての報告がおこなわれた。本講演では、排水評価・管理手法として導入が予定されているゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）およびニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）について作製された DNA マイクロアレイの応用例が紹介された。A～Hの8事業所の排水について、ゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験およびニセネコゼミジンコ繁殖阻害試験の結果と比較したところ、毒性の強い事業所 D および E の排水について発現増加または減少した遺伝子が多く認められた。発現増加もしくは減少が生じた遺伝子の特徴に着目すると、細胞骨格の構築に関わる遺伝子群が多かったが、現時点では具体的な化学物質との相関性は確認できなかった。しかしながら、個別物質のデータ蓄積を進めることで、従来の化学

分析中心の特徴化よりも効率的に毒性削減評価（TRE）や毒性同定評価（TIE）に活用することが期待される。

Real-Time PCR による生分解性試験に用いる活性汚泥の評価：茅島孝和（化評研）ほかでは、段階的評価である化審法の最初のステップである生分解性試験（OECD TG No.301C に相当）で用いる活性汚泥の維持管理への適用を目的とした迅速かつ簡便な Real-Time PCR 法の適用可能性について検討した結果が報告された。この生分解性試験では、アニリンを基準物質として、BOD の分解度で妥当性を評価する。しかし、現時点では全国約10箇所採取して当該機構で調整・培養後に全国の試験機関に供給している活性汚泥のアニリン分解性は時間とともに低下するために、再試験が発生する恐れもある。そこで、アニリン分解に関与すると考えられる  $\alpha$ -アニリンジオキシゲナーゼのアミノ酸配列をアニリン分解菌のデータベースから検索し、PCR 用プライマーや TaqMan プローブを設計し、活性汚泥より抽出した DNA を Real-Time PCR によって増幅して、従来の MPN 法や BOD 測定による評価結果と比較した。その結果、PCR 法でもアニリン分解特性を十分に評価できることが示された。

メタボロームを活用した化学物質評価・管理—WET への適用可能性について：新野竜大（三菱化学メディエンス）では、代謝物の変化によって化学物質のクラス分けを試みるトキシコメタボロミクスに関する背景と現状、適用例が紹介された。まず、作用機序の異なるもしくは類似した除草剤を緑藻のムレミカツキモに OECD TG No.201 の EC<sub>50</sub> レベルで曝露した際に、<sup>1</sup>H-NMR を用いてメタボロームの変動パターンを SIMCA 法の Cooman's Plot や主成分分析などで調べた結果が紹介された。ともに光合成系や細胞合成や生体成分合成作用阻害など作用機序によって異なる変動パターンが確認された。他にもカブラ（*Brassica rapa*）を用いた植物生長試験（OECD No.208）を実施した際の代謝物の LC/MS での分析結果に主成分分析を実施したところ、同様に作用機序によって違いが観察された。メダカ胚にクロロフェノール類を曝露した際のメタボロームを <sup>1</sup>H-NMR と GC-MS で測定したところ、受精後の時間で主成分分析結果がシフトするほか、飽和脂肪酸のターゲット分析を組み合わせることで、より効率的に変動を把握できることがわかった。最後に、トキシコメタボロミクスのバイオアッセイによる排水評価・管理である WET（全排水影響）の毒性削減評価（TRE）や毒性同定評価（TIE）への適用可能性が示唆された。

最後に、当研究委員会委員長の有蘭幸司先生により全体総括を行い、セッションを閉じた。

（徳島大学大学院 SAS 研究部 山本裕史）