

自活性線虫を用いた化学物質のバイオアッセイ法に関する研究 (III)

Study on Bioassay of Chemicals for Free-living Nematode (III)

砂古口 博文 佐藤 正資*
Hirofumi SAKOGUCHI Masashi SATO

要 旨

前報で、*C. elegans*は加水分解能が低い可能性が示唆されたため、4-ヒドロキシ安息香酸エチルを用いて、加水分解能のチェックを行ったところ、餌として加えた大腸菌の影響のほうが大きく、*C. elegans* 自体の加水分解能は低いことが分かった。

キーワード：線虫 *Caenorhabditis elegans* パラベン 4-ヒドロキシ安息香酸エチル 分解

I はじめに

近年、医薬品類や化粧品類などの日用品由来の化学物質、いわゆる、PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products; 医薬品及びパーソナルケア製品) が、水環境における新たな汚染物質として、注目されている。PPCPsは何らかの活性を持つことを期待されて製造・使用されている一方、その毒性データは整備されていないものが多い。そういったものが、水環境中に放出された場合、水生生物等への影響が懸念される。

線虫は、分類学上、線形動物門 (nematode) に属する動物の総称で、50 万種以上に分類され、大半の種は、微生物を餌として、非寄生性の生活を営んでいる。その自活性線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* は、近年、多細胞生物のモデル生物として、研究が盛んに行われている。モデル生物としての *C. elegans* の優れた利点を列挙すると、自活性線虫であり、寄主を必要としないため培養が容易なこと、体長が約 1mm で透明な体を持つため、各器官の観察が容易なこと、生活環が短く約 3 日で卵から 4 回の脱皮を経て、抱卵成虫となり、数日のうちに約 300 個の自家受精卵を産卵すること、全ゲノム情報 (約 19000 の遺伝子を持ち、ヒトでクローン化された約 5000 の遺伝子のうち 74% は非常によく似た遺伝子が *C. elegans* のゲノムにも認められる。) や細胞系譜など生物としての基本的な情報がそろっていること、などが挙げられる¹⁾²⁾。

前報³⁾の結果から、*C. elegans* という生物種は加水分解能が低いのではないかとする仮説が考えられたため、*C. elegans* に対して致死性の影響が見られ、かつ、加水

分解によって、その活性が失われる化合物であった 4-ヒドロキシ安息香酸エチルを用いて、その加水分解能を調べることにした。

II 方法

1 試薬・培地等の調製

C. elegans の培養等に用いる試薬・培地等の調製方法は、原則として、Brenner の方法に従った⁴⁾。

2 *C. elegans* の培養

アッセイに用いる *C. elegans* は野生型の N2 株を用いた。*C. elegans* の培養は、餌として、大腸菌 *Escherichia coli* OP50 株を用い、NGM プレート上で、20°C で静置培養を行った。

3 L1 幼虫の分離

L1 幼虫の段階から、MGN プレート上で約 6 日間培養したものを、M9 緩衝液を用いて遠沈管に集め、遠心分離で上澄み液を取り除いた。得られた沈降物に、M9 緩衝液を約 6ml 加えた後、アルカリハイポクロライド溶液 (4mo1/L 水酸化ナトリウム溶液と次亜塩素酸ナトリウム溶液を 2:3 の割合で混合したもの。用時調製。) を約 3ml 加え、アルカリハイポクロライド処理を行った。処理後、直ちに遠心分離を行い、上澄み液を捨て、残留物を M9 緩衝液で 3 回、S-basal 培地で 2 回洗浄した。なお、アルカリハイポクロライド処理を開始してから、最初の洗浄用の M9 緩衝液を入れるまでの操作は、5 分以内に行った。得られた沈降物に S-basal 培地を約 9ml 加え、20°C で 24 時間以上振とう培養を行い、L1 幼虫の懸濁液 (以下、L1 溶液とする。) を得た。

* 香川大学農学部

4 大腸菌 OP50 株の培養

餌となる大腸菌 *E. coli* OP50 株は、LB 液体培地で、37°C で 24 時間以上振とう培養したのち、遠心分離で培地を取り除き、M9 緩衝液で 1 回、S 培地で 1 回洗浄し、可能な限り水分を取り除いた。*C. elegans* の培養に用いるときは、少量の S 培地に懸濁し、NGM プレートに置いた。バイオアッセイに供するときは、28.57g-wet/L となるよう S 培地に懸濁し、これを OP50 原液とした。

5 分解試験

4-ヒドロキシ安息香酸エチル濃度を大半の線虫が生き残る濃度に調製し、分解試験を行うことにした。すなわち、4-ヒドロキシ安息香酸エチル約 7.2g を秤量し、S 培地 40ml に溶解させ、4-ヒドロキシ安息香酸エチル溶液を作製した。50ml 容三角フラスコに、4-ヒドロキシ安息香酸エチル溶液を 10ml、OP50 原液を 2ml、S 培地を 7.8ml 入れ混合した。ここにあらかじめ、L1 溶液を S 培地で希釈し、約 50 頭/10 μ l に調製した液を 200 μ l (=約 1000 頭) 加え、シリコ栓をし、20°C で振とう培養を行った。コントロールとして、L1 調製液の代わりに S 培地 200 μ l 加えたものも調製し、同様に 20°C で振とう培養を行った。これらは、一定期間培養の後、1ml ずつ抜き取り、4-ヒドロキシ安息香酸エチル等の濃度を調べた。

6 濃度測定

4-ヒドロキシ安息香酸エチル濃度の測定は、原則として、笹井らの方法⁵⁾に従って行ったが、内部標準物質として使用するヘキサクロロベンゼン-¹³C₆ の入手が困難だったため、アセナフテン-*d*₁₀ およびフェナンスレン-*d*₁₀ を代わりに用いた。

すなわち、分取した培養液に、直ちに、6N 塩酸を 100 μ l 加え、酢酸エチル 20ml で液液分配を行った。酢酸エチル層を分取後、再度、水層を酢酸エチル 20ml で液液分配を行い、酢酸エチル層を分取した。得られた酢酸エチル層を合せ、硫酸ナトリウム (無水) を加え、脱水乾燥を行い、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、全量を酢酸エチルで 10ml にメスアップした。

このうち、100 μ l を分取し、酢酸エチルを 0.9ml 加えた。そこに N, O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(BSTFA)を 200 μ l 加え、TMS 化を行った。室温で 1 時間以上放置した後、窒素ガス気流下で約 0.1ml まで濃縮した。酢酸エチルで 1ml に定容し、内部標準物

質を加え、GC/MS(SIM)で定量を行った。GC/MS の条件を以下に示す。

GC/MS : GC 部 ヒューレットパッカー HP6890

MS 部 日本電子 JMS-AM1150

カラム : スペルコ SLB-5ms (30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m)

昇温条件 : 70°C (1min) \rightarrow 7°C/min \rightarrow 210°C (0min) \rightarrow

20°C/min \rightarrow 280°C (5min)

注入口温度 : 240°C

注入法 : スプリットレス (パージ開始時間 1min)、1 μ l

キャリアーガス : He (35kPa、圧力一定)

インターフェイス温度 : 280°C

イオン源温度 : 240°C

イオン化電圧 : 70eV

イオン化電流 : 300 μ A

イオン化方式 : EI

検出モード : SIM

モニターイオン

アセナフテン-*d*₁₀ $m/z=164$

フェナンスレン-*d*₁₀ $m/z=188$

TMS 化 4-ヒドロキシ安息香酸エチル $m/z=238, 223$

TMS 化 4-ヒドロキシ安息香酸 $m/z=267, 193$

7 代謝物探索

4-ヒドロキシ安息香酸エチルの代謝産物が 4-ヒドロキシ安息香酸以外に存在するかどうか調べるため、長期培養液を用いて、GC/MS による SCAN 分析を行った。

培養液 1ml から得た抽出液について、誘導体化処理を行わなかったものと誘導体化処理を行ったものを GC/MS(SCAN) 分析に供した。なお、抽出液の全量はどちらも 1ml とした。GC/MS の条件は同じ条件を用い、SCAN 範囲は、 $m/z=50\sim 400$ 、測定時間 10 ~ 30 min とした。

III 結果

1 分解試験結果

分解試験開始後、6 日間程度は、培養液は餌の大腸菌によって、コントロールと同程度に濁っていたが、その後、徐々に濁りが薄くなっていき、10 日後にはほぼ透明となった。そのときの培養液を顕微鏡で観察すると、様々な生育ステージの *C. elegans* を観察することができた。4-ヒドロキシ安息香酸エチルの分解試験結果を図 1 に示す。どちらの培養液からも TMS 化 4-ヒドロキシ安息香酸は若干検出されたが、経時変化を確認できるほどには検

出されなかった。

コントロール区では、徐々に分解され、6日以降、はっきりと分かる程度に濃度減少が見られたが、*C. elegans* 区では、濃度減少はほとんど観察されなかった。このことから、大腸菌は4-ヒドロキシ安息香酸エチルを若干ではあるが、分解することができるが、*C. elegans* は、4-ヒドロキシ安息香酸エチルをほとんど分解することができないことが分かった。

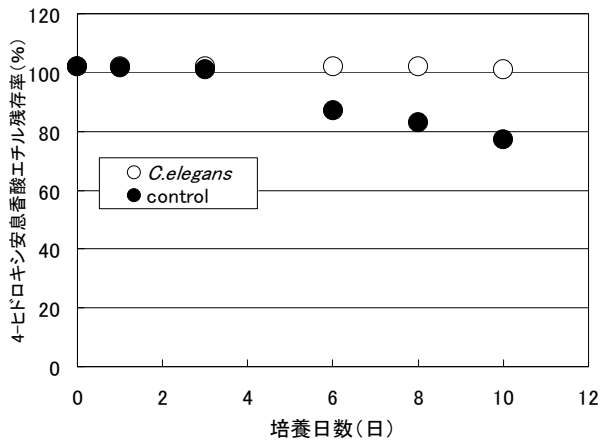


図1 4-ヒドロキシ安息香酸エチル分解曲線

2 代謝物探索結果

GC/MS(SCAN)分析で得られたクロマトグラムを図2、3に示す。得られたクロマトグラムは、コントロール区と*C. elegans* 区、どちらもほぼ同等であったので、*C. elegans* 区のみを示す。

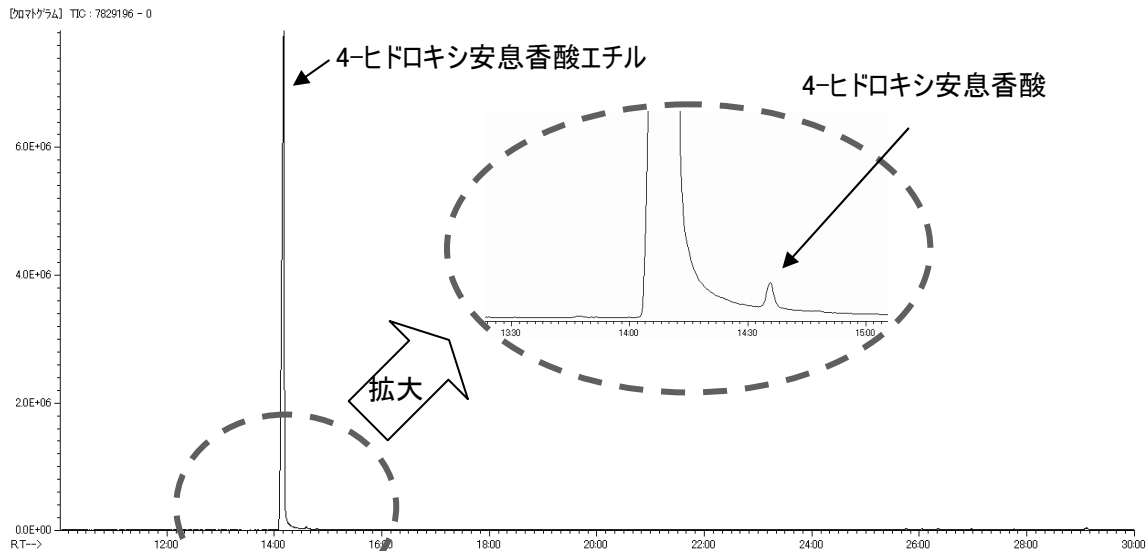


図2 *C. elegans* 培養液のクロマトグラム (TMS 誘導体化前)

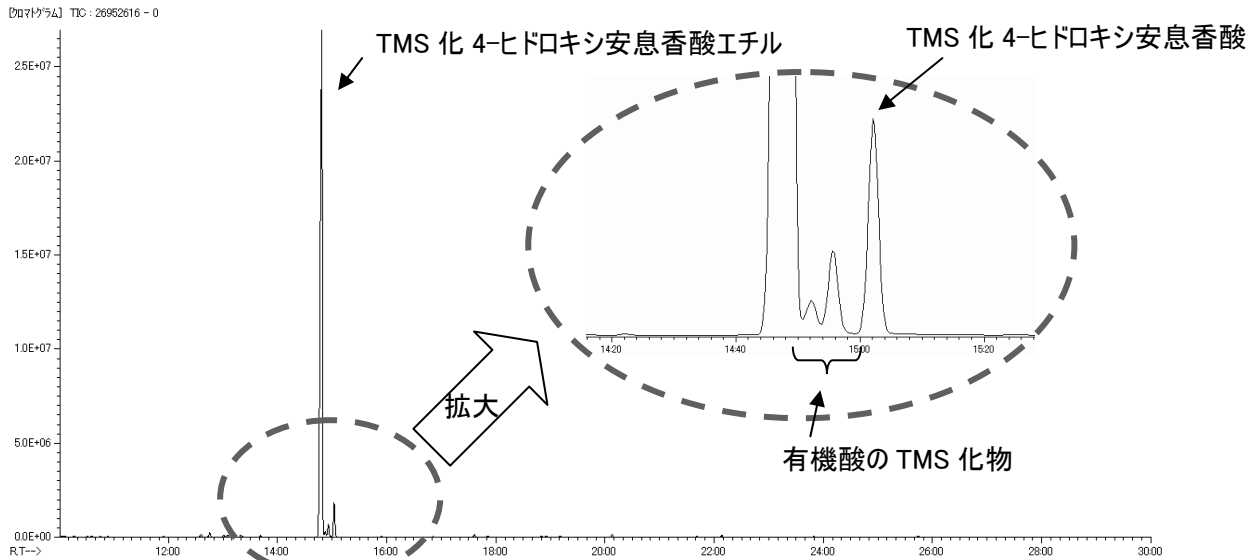


図3 *C. elegans* 培養液のクロマトグラム (TMS 誘導体化)

IV 考察

前報³⁾において *C. elegans* は、4-ヒドロキシ安息香酸エチルからは致死性の影響を受けるが、その加水分解産物である 4-ヒドロキシ安息香酸からは致死性の影響を受けないということが分かった。そこで、その原因は *C. elegans* の加水分解能が低いためではないかと考え、4-ヒドロキシ安息香酸エチルの分解試験を行った。

その結果、大腸菌単独の方が 4-ヒドロキシ安息香酸の分解が大きいことが分かった。これは、*C. elegans* が大腸菌を捕食することにより、徐々に大腸菌の影響を受けなくなったためであると容易に考えられる。

4-ヒドロキシ安息香酸エチルがどのように作用して、*C. elegans* に対して、致死性の影響を与えているか分からないが、今回の 4-ヒドロキシ安息香酸エチルの濃度レベルは、前報³⁾の結果からほとんど影響を受けない濃度であり、また、4-ヒドロキシ安息香酸エチルは若干であるが、水に可溶性のため、低濃度では *C. elegans* の体内に全く吸収されず、素通りしたとも考えられる。しかし、高濃度大腸菌存在下では、わずかではあるが分解が認められ、また、4-ヒドロキシ安息香酸エチルは抗菌性を有することから、大腸菌とともに体内に取り込まれた可能性は十分考えられるので、やはり、加水分解をはじめとする薬物代謝能が低いとも考えられる。

また、高濃度大腸菌存在下では、4-ヒドロキシ安息香酸エチルの濃度低下は認められ、すなわち、分解が認め

られるが、それに対応するように、加水分解産物である 4-ヒドロキシ安息香酸の濃度は上昇しないため、加水分解以外の分解経路があると考えられるが、これ以外の分解産物と考えられる物質は検出されなかったため、その詳細は不明である。

V まとめ

自活性線虫: *C. elegans* に対して、4-ヒドロキシ安息香酸エチルは致死性の毒性を持つが、その加水分解産物である 4-ヒドロキシ安息香酸は致死性の毒性を持たない。

このことから、*C. elegans* は加水分解能が低いため、4-ヒドロキシ安息香酸エチルを無毒化できないと考え、4-ヒドロキシ安息香酸エチルの分解試験を行ったところ、大腸菌と比べても *C. elegans* は加水分解も含め、4-ヒドロキシ安息香酸エチルを分解する能力が低いことが分かった。ただし、大腸菌による分解は、加水分解以外の分解経路があることが推察された。

文献

- 1) 小原雄治 編：線虫[1000 細胞のシンフォニー]，共立出版，(1997)
- 2) 三谷昌平 編：線虫ラボマニュアル，シュプリンガー・フェアラーク東京，(2003)
- 3) 砂古口博文，佐藤正資：香川県環境保健研究センター所報，11，31-34，(2012)

- 4) Lewis J. A., Fleming J. T.: "Caenorhabditis elegans, Modern Biological Analysis of an Organism", ed. by Epstein H. F., shakes D.C., Academic Press, New York, pp.13-29, (1995)
- 5) 笹井春雄, 武田洋一: 環境庁環境保健部環境安全課編平成 11 年度化学物質分析法開発調査報告書(その1), p1-41, (1999)

Abstract

In our previous report, it was suggested that *C.elegans* had low ability to hydrolyze chemicals. We examined the hydrolysis ability for ethyl 4-hydroxybenzoate in *C.elegans*. On the basis of the result, we concluded that the hydrolysis ability of *C.elegans* is lower than that of *E.coli*.