

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 (II)

Study on Bioassay of Chemicals using Free-living Nematode (II)

砂古口 博文 佐藤 正資*
Hirofumi SAKOGUCHI Masashi SATO

要 旨

自活性線虫：*Caenorhabditis elegans*を用いた化学物質のバイオアッセイを行った。今回は対象化学物質として、PPCPs(Pharmaceutical and Personal Care Products;医薬品及びパーソナルケア製品)と総称される化学物質のうち、紫外線吸収剤及びその類似化合物を対象にバイオアッセイを行った。

このうち、顕著な影響のあった化合物についてのみ、LC50を調査したところ、ベンゾフェノン：72mg/l、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン：1711mg/l、4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル：102mg/l、4-ヒドロキシ安息香酸エチル：332mg/lと算定された。

キーワード：線虫 *Caenorhabditis elegans* PPCPs 紫外線吸収剤 ベンゾフェノン パラベン

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⁾。

PPCPsのうち、医薬品や抗生物質等を除けば、大部分は香料や紫外線吸収剤であると考えられる。紫外線吸収剤は、日焼け止めや化粧品等に配合されているほか、合成樹脂の耐候性改良剤として配合されており、環境中への放出の機会も多い。そこで、今回は、文献等³⁾⁴⁾に掲載されていた紫外線吸収剤および類似化合物のうち、比較的入手が容易であった化合物を対象に、*C. elegans* に対する毒性を調査することにした。

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⁵⁾。

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℃で静置培養を行った。

3 L1幼虫の分離

L1幼虫の段階から、NGM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(4mo/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、

※ 香川大学農学部

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。得られた沈殿物に 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。

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、OP50 原液とした。

5 スクリーニング試験

今回入手することができた紫外線吸収剤及びその類縁化合物を Table1 に示す。これらの化合物は水溶解度はさ

ほど高くないため、まず、ジメチルスルホキシドに溶かし、約 0.2g/ml 溶液を作製した。

OP50 原液を S 培地で 9.5 倍に希釈した。これを OP50 希釈液とした。

バイオアッセイに用いる器具には、ポリスチレン製 24 穴平底プレートを用いた。L1 溶液に S 培地を加え、10 μ l 中概ね 10 頭程度になるよう希釈し、各ホールに 10 μ l ずつ分注した。分注した後、実際に各ホールに入った L1 幼虫の数を顕微鏡を用い、計測した。

その後、各ホールにあらかじめ分注した L1 溶液となるべく混合しないように OP50 希釈液を 190 μ l ずつ分注した。次に各化合物のジメチルスルホキシド溶液を 10 μ l 容マイクロシリンジを用いて、1 μ l ずつ、ホール中の OP50 希釈液に添加した。1 物質につき、4 ホールに添加した。全てのホールに添加した後、蓋をし、パラフィルムで密閉し、各ホールの液を十分混合し、底一面に混合液が広がるように攪拌した。これを 20°Cで静置培養を行い、セットから 24 時間ごとに顕微鏡で観察を行い、72 時間後の生存数を計測した。

Table 1 Organic UV filters used in this study

Test chemical	CAS. No	Supplier	Grade
Benzophenone	119-61-9	Wako	Wako Special Grade
2-Hydroxy-4-methoxy benzophenone	131-57-7	Wako	Wako 1st Grade
1-(p-t-Butylphenyl)-3-(p-methoxyphenyl)-1,3-propanedione	70356-09-1	Wako	Wako 1st Grade
2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone	131-54-4	Wako	Wako 1st Grade
4-Hydroxybenzophenone	1137-42-4	Wako	—
2-Ethylhexyl 4-dimethylaminobenzoate	21245-02-3	Wako	Wako 1st Grade
2-(3,5-Di-tert-amyl-2-hydroxyphenyl)benzotriazole	25973-55-1	TCI*	—
Benzyl 4-hydroxybenzoate	94-18-8	TCI*	—
2-(3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole	3864-99-1	TCI*	—
2-Ethylhexyl salicylate	118-60-5	TCI*	—
Ethyl 4-hydroxybenzoate	120-47-8	Wako	Wako Special Grade
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	Wako	Wako 1st Grade

* Tokyo Chemical Industry Co. LTD.

前報⁶⁾におけるジメチルスルホキシドの影響は、0.1%濃度では致死率0%、1%濃度では致死率約5%であり、0.5%濃度での影響は調べられていないため、スクリーニング試験に先立って、上記の方法が妥当かどうか調べるため、予備試験を行った。24ホール全てにジメチルスルホキシドを1 μ lずつ添加し、20°Cで72時間、静置培養したところ、死亡した虫はいなかったため、ジメチルスルホキシドの影響はないものと考えた。

6 LC50の算定

スクリーニング試験で、4ホール全てのホールで生存率が100%であると確認できなかった化合物についてのみ、LC50を算定した。

スクリーニング試験時と同様、各化合物をジメチルスルホキシドに溶解させ、それを数段階に希釈したものを各ホールに添加したOP50希釈液に1 μ lずつ添加した。ひとつの希釈濃度につき、4ホールずつ添加した。これを20°Cで静置培養を行い、セットから24時間ごとに顕微鏡で観察を行い、72時間後の生存数を計測した。判定にあたっては、4ホール全ての結果を合計した。

III 結果

1 スクリーニング試験の結果

スクリーニング試験を行ったところ、生存率が100%とならなかった化合物は、ベンゾフェノン、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン、4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル、4-ヒドロキシ安息香酸エチルであった。

これら4化合物についてプロビット法⁷⁾⁸⁾を用いてLC50値を算定した。

2 LC50の算定結果

これら4化合物について算定したLC50値をTable2に示す。なお、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノンについては、試験濃度が低すぎたため、LC50値の算定はできなかったものの、95%信頼限界の算定はできなかった。

Table 2 LC50 of *C. elegans* for organic UV filters

Test chemical	Tested concentration (mg/l)	Mortality rate	LC50 (mg/l)	95% confidence limits (mg/l)
Benzophenone	60	7/59	72	70 - 74
	72	26/58		
	84	54/61		
2-Hydroxy-4-methoxy benzophenone	804	8/69	1711	Not calculated
	905	9/58		
	1006	12/60		
Benzyl 4-hydroxybenzoate	40	2/96	102	95 - 110
	60	12/86		
	80	19/97		
	100	40/70		
	201	66/70		
Ethyl 4-hydroxybenzoate	201	10/64	332	307 - 358
	302	19/58		
	402	48/65		
	503	46/57		

IV 考察

今回の結果から、紫外線吸収剤のうち、自活性線虫 *C. elegans* に影響を与える可能性のある物質は、ベンゾフェノン骨格を持つものと 4-ヒドロキシ安息香酸エステル類（いわゆるパラベン類）であることが分かった。

ベンゾフェノン類についてみると、極性が高くなるにつれ、影響が少なくなる傾向にあるものと考えられる。4-ヒドロキシベンゾフェノン及び 2,2'-ジヒドロキシ-4,4'-ジメトキシベンゾフェノンが 1000mg/l の濃度レベルで無影響であるという事実がこのことを補強している。しかしながら、水溶性が高まるほど影響は少なくなると考えられる。すなわち、水環境中で検出される可能性のある化合物ほど影響が少なくなる傾向があるといえる。

ただ、4-ヒドロキシベンゾフェノンと 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノンの極性は、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノンの方が大きい可能性があり、1000mg/l を超える濃度でバイオアッセイを行えば結果は逆転していた可能性があることは否めない。

4-ヒドロキシ安息香酸エステル類は、紫外線吸収剤としての用途だけでなく、抗菌剤としての用途がある物質である。一般的にアルキル基が長いほど抗菌力は高いことが知られており、今回の抗線虫活性についても同様な傾向があるものと考えられる。また、4-ヒドロキシ安息香酸エステル類の加水分解生成物である 4-ヒドロキシ安息香酸では無影響、前報⁶⁾から同程度の濃度のエタノールでも無影響という事実と照らし合わせると、*C. elegans* という生物種は加水分解能が非常に弱い生物であることが言える。反対に加水分解能が強い生物にとっては、4-ヒドロキシ安息香酸エステル類は容易に無毒化されるので、影響が少ないと言える。

また、ベンゾフェノン系の化合物も適正な異化代

謝が行われ、水溶性が高くなれば無毒化されうることが示唆される。

V まとめ

PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products; 医薬品及びパーソナルケア製品) と総称される物質のうち、紫外線吸収剤をターゲットとして、自活性線虫: *C. elegans* に対する毒性を調べた。今回の研究では、比較的低濃度で影響のあった化合物は、ベンゾフェノン系の化合物と 4-ヒドロキシ安息香酸エステル類であった。今回、調査した化合物の中で、これらの化合物は極性が低いほど毒性が高い傾向にあることが分かった。

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) 亀田豊, 山下洋正, 尾崎正明:水環境学会誌, **30**, 707-713, (2007)
- 4) 亀田豊, 山下洋正, 尾崎正明:水環境学会誌, **31**, 39-46, (2008)
- 5) 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,
- 6) 砂古口博文, 佐藤正資: 香川県環境保健研究センター所報, **10**, 29-32, (2011)
- 7) 吉村功, 大橋靖雄 責任編集者: 毒性試験講座 14 巻 毒性試験データの統計解析, 地人書館, 135-145, 1992.
- 8) 日本環境毒性学会 編: 生態影響試験ハンドブック - 化学物質の環境リスク評価 -, 朝倉書店, 301-313, 2003.

Abstract

We examined the toxicity of PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) using the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. In this study, we have selected the organic UV filters from PPCPs.

We have calculated the LC50 values for the only chemicals that have significant effects, and have estimated those to be benzophenone, 72mg/l; 2-hydroxy-4-methoxy benzophenone, 1711mg/l; benzyl 4-hydroxybenzoate, 102mg/l; and ethyl 4-hydroxybenzoate, 332mg/l.