

# メダカ DNA マイクロアレイによる最終処分場環境影響評価システムの研究－ I

## －最終処分場に含まれる化学物質のメダカ胚への影響－

半野勝正, 尾田正二<sup>1)</sup>, 平山真<sup>1)</sup>, 仁平雅子, 栗原正憲, 三谷啓志<sup>1)</sup>, 依田彦太郎, 原雄

(1) 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻動物生殖システム分野)

### 1. はじめに

最終処分場は、その重要性にもかかわらず「迷惑施設」として山中に作られる場合が多い。処分場に降り注いだ雨は埋め立てられた廃棄物を洗い流し、多様な有害化学物質を含んだ「処分場浸出水」（以下「浸出水」）は、水処理施設を経て一般環境に放出される。放出された浸出水の自然環境への影響評価及び管理は自然環境保全にとって欠くべからざる重要な課題である。現在、わが国ではこれら有害化学物質の環境影響評価は、個々に基準値を設け、化学分析による管理をしている。しかしながら、全ての化学物質を分析することは時間・労力・コスト的に不可能であり、また、未知物質や複合作用等の影響の把握は困難である。一方、バイオアッセイ法は、複合的な汚染を簡便に検出できるが、その定量性と汚染原因物質の同定には限界がある。メダカは、わが国で開発された実験生物であり、近年そのゲノム情報も充実している。メダカを使ったDNAマイクロアレイでは、1回の測定で数千の遺伝子情報も得ることが可能である。これらの情報をプロファイル化、解析、データベース化することにより複合汚染の程度の把握とともに発現原因物質の絞り込みをも行える環境影響モニタリングシステムの実現が期待できる。今回は、DNA マイクロアレイ作製条件把握のため最終処分場浸出水に含まれる化学物質等のメダカ卵の胚発生過程に与える影響について検討した。

### 2 DNAマイクロアレイの原理

マイクロアレイは DNA チップとも呼ばれ、ガラスやシリコン製の小基板上に DNA 分子を高密度に配置（アレイ, array）したものである。マイクロアレイを用いると数千から数万種といった規模の遺伝子発現を同時に解析することができる。(図1)

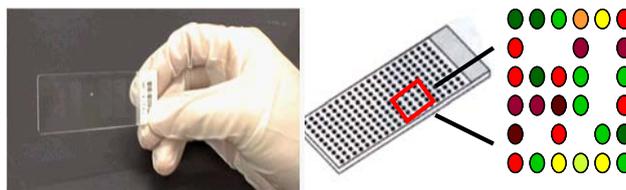


図1 DNAマイクロアレイの外観

DNA マイクロアレイ解析の流れを図2に示す。

- ① マイクロアレイの作成  
スライドガラス等の基板上に異なる種々のターゲットDNAを高密度にスタンプしてDNAマイクロアレイを作成する。
- ② サンプルの調製  
細胞や組織から抽出したmRNAやtotalRNAから逆転写反応を行い、蛍光色素などでラベルしてプローブDNAを合成する。
- ③ ハイブリダイゼーション  
蛍光プローブDNAをマイクロアレイにハイブリダイズさせ、各ターゲットDNAからのシグナルをスキャナーで検出し、得られたデータを解析する。

(注) mRNA: [蛋白質](#)に[翻訳](#)され得る[塩基配列](#)情報と構造を持った[RNA](#)。(messenger RNA)  
ハイブリダイズ: 蛍光色素ラベルされた cDNA (相補的 DNA) を DNA マイクロアレイに固定した遺伝子 DNA と相補的に結合させる操作。

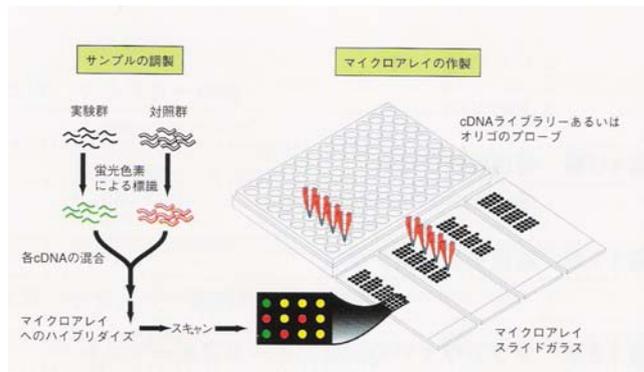


図2 DNAマイクロアレイ解析の流れ

### 3 検討試料及び供試卵

#### 3-1 検討用試料

本研究に供した試料は、①県内処分場浸出水原水-固相抽出液-A液(トルエン溶液)、②内分泌攪乱物質:ビスフェノールA, ダイオキシン類(2378-T4CDD), フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、③重金属類(Pb, Cd, As)である。①及び②は一定量分取後、溶媒を窒素でパージし、DMSO(ジメチルスルホキシド)に転溶したものである。

(A液の操作フロー図は図3:3万倍濃縮液。)

③はICP分析用標準液のpH値を7.2に調製したものである(Pb:47mg/L, Cd:48mg/L, As:97mg/L)。

試料調製フロー

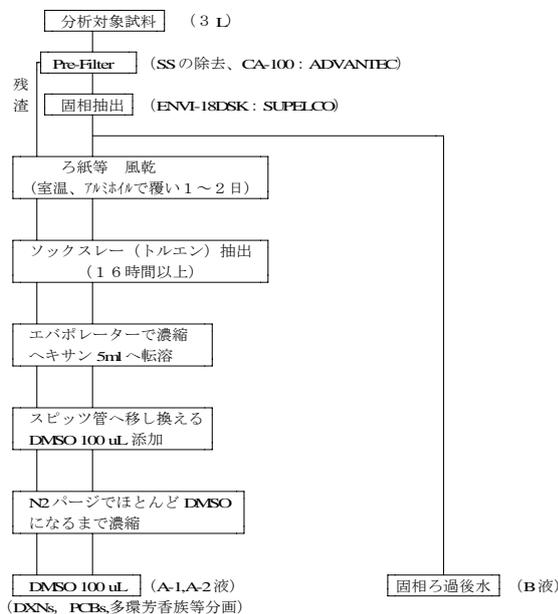


図3 A液試料調製フロー図

#### 3-2 処分場浸出水原水中の化学物質濃度

処分場浸出水原水に含まれる化学物質の濃度(分析方法)は、以下の通りであり、ビスフェノールAが極めて高濃度の試料であった。

ダイオキシン類 : 9.8pg-TEQ/l (GC/MS)

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) : 6ug/L (GC/MS)

ビスフェノールA : 10mg/L (GC/MS)

Cl<sup>-</sup> : 4400mg/L (イオンクロマト), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> : 4000mg/L (イオンクロマト), Na<sup>+</sup> : 2100mg/L (イオンクロマト), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> :

1500mg/L (イオンクロマト)

Fe : 0.30mg/L (ICP), Mn : 0.15mg/L (ICP),

Pb, Cd, As : <0.01mg/L (ICP)

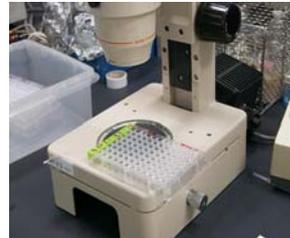
#### 3-3 供試卵

試験に用いた供試卵は、純系メダカ(Hd-rR)の受精卵でその日の午前11時頃採取した当日卵である。

### 4 実験方法

#### 4-1 メダカ胚の観察

試験には、メダカ(Hd-rR)の当日受精卵を96穴プレート各セルに入れ、各化学物質試験液(100uL)に浸して胚発生への阻害を顕微鏡で観察した。暴露期間は最大21日とし、胚発達ステージ、正常孵化、孵化異常、死亡、発達異常、血流異常、心臓異常、血栓等について観察を行った。(図4)



顕微鏡観察



メダカ胚(循環系完成期)

図4 メダカ胚の観察

#### 4-2 DMSO濃度

メダカ胚に対するDMSOの孵化阻害について、濃度を0%, 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%の5段階で検討したところ、いずれも影響ないことがわかった。そこで、今回行った試験液中のDMSO濃度を0.01%に固定した。

### 5 実験結果

#### 5-1 処分場浸出水A液によるメダカ胚への阻害

最終処分場浸出水-A液によるメダカ胚への阻害状況を図5に示す。A液は3万倍濃縮液であるので、3万倍希釈したものが原液濃度相当であり、図4に示した中の5万倍希釈したものが最も原液濃度に近い。縦軸にメダカ胚の阻害割合(%), 横軸に経過日数を示している。これを見ると、試験開始4日目から血流阻害を示すメダカが10%程度現れ、6日目から孵化するメダカが現れている。

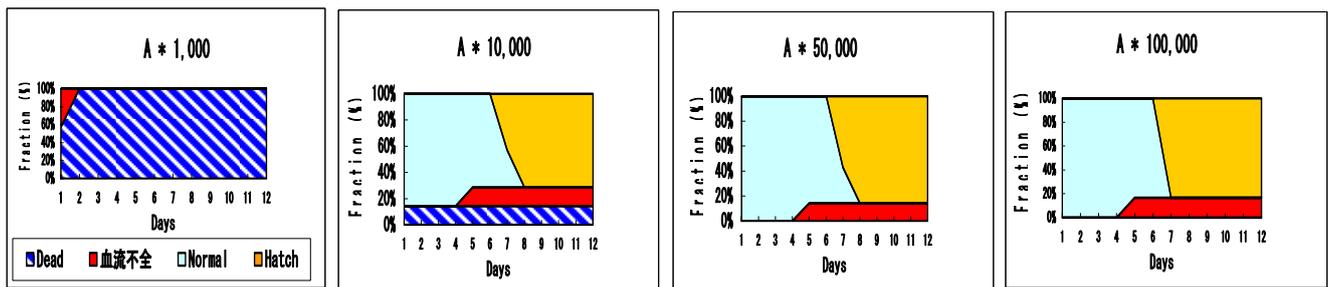


図5 最終処分場浸水浸出水A液のメダカ胚への阻害状況

## 5-2 内分泌攪乱物質によるメダカ胚への阻害

### 5-2-1 ビスフェノールA

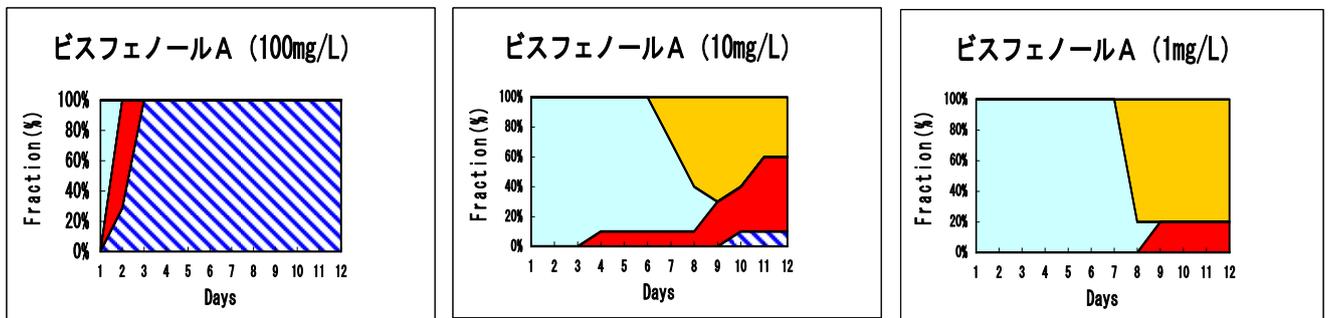


図6 ビスフェノールAのメダカ胚への阻害状況

最終処分場浸出水の分析結果から最も含有されていた有害有機化学物質がビスフェノールAであったので、標準品によるメダカ胚への阻害状況を図6に示す。10mg/Lの場合、3日目から血流阻害が現れ、6日目から孵化するメダカが現れており、図5の5

万倍希釈の図と比較して最終処分場浸出水A液によるメダカ胚への阻害状況とほぼ同じである。A液のビスフェノールAの分析値も10mg/Lで一致しており、メダカ胚への阻害要因の多くがビスフェノールAによるものと推察できる。

### 5-2-2 ダイオキシン類 (2378-T4CDD)

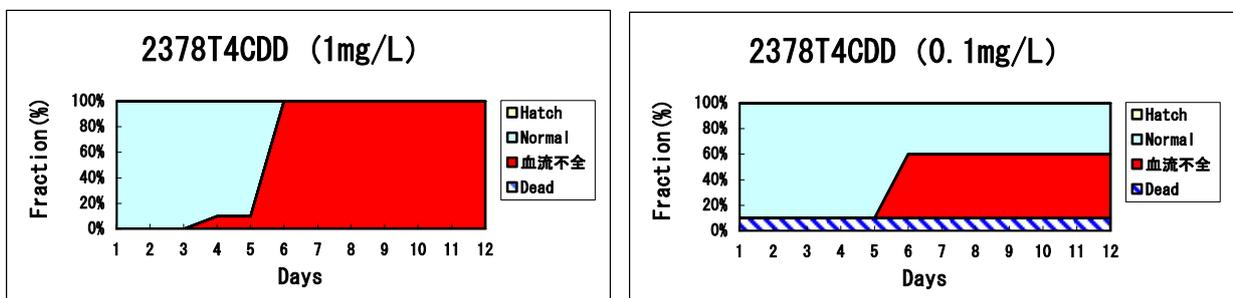


図7 ダイオキシン類 (2378-T4CDD)のメダカ胚への阻害状況

ダイオキシン類 (2378-T4CDD)によるメダカ胚への阻害状況を図7に示す。1mg/Lでは、3日目から血流阻害が出現し、6日目以降は全てのメダカ胚(20匹)が血流阻害となった。

0.1mg/Lでは、5日目から血流阻害が現れるが、正常なものも40%残っている。しかしながら、12日経過してもまだ孵化したメダカはいなく、発育が遅れている。

### 5-3 重金属類による影響

#### 5-3-1 鉛 (Pb)

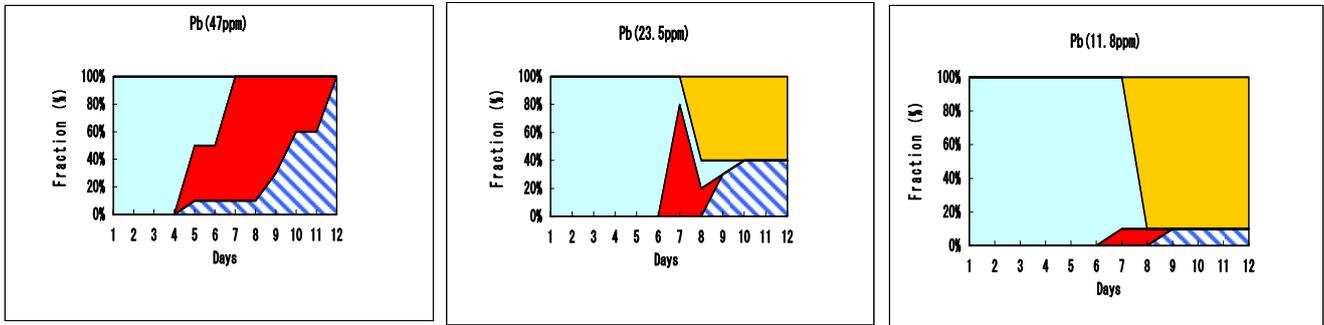


図8 鉛 (Pb) のメダカ胚への阻害状況

鉛は 47mg/L の場合 4 日目から血流阻害が現れ、すぐ死亡してしまう。23.5mg/L では、6 日目で血流阻害が現れるが孵化するものも 60%あり、死亡は 40%にとどまる。11.8mg/L では6 日目で血流阻害が現れるが孵化するものが 90%になり、死亡は 10%にとどまる。

#### 5-3-2 カドミウム (Cd)

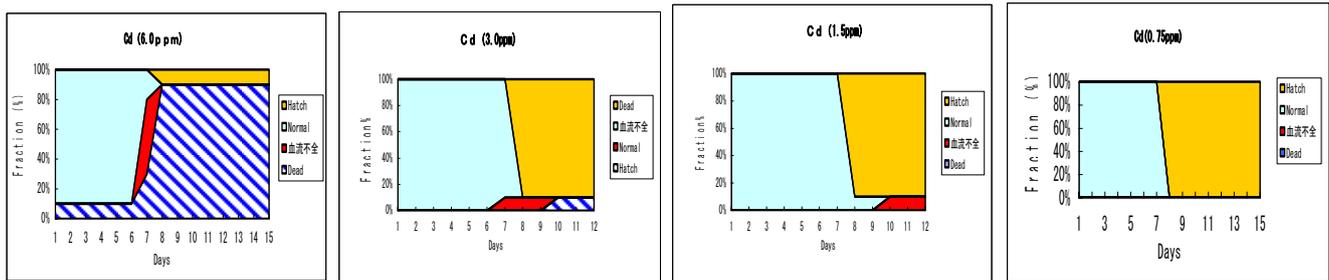


図9 カドミウム (Cd) のメダカ胚への阻害状況

カドミウムは 6.0mg/L で6 日目から血流阻害が現れるがすぐ死亡し、孵化したのは 10%のみであった。1.5mg/L では血流阻害が現れるのが 9 日目と遅くなり、0.75mg/L になると血流阻害はなく、全て孵化した。

#### 5-3-3 ヒ素 (As)

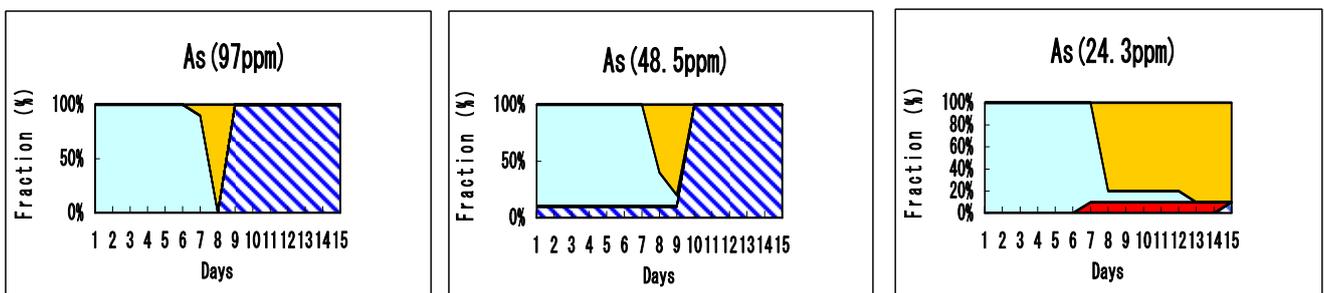


図10 ヒ素 (As) のメダカ胚への阻害状況

ヒ素は 97mg/L では、7 日目から孵化するが、すぐ死んでしまう。24.3mg/L になると、6 日目から血流阻害になるものが 10%現れ、孵化することなく死んでしまった。その他は全て孵化した。

### 6 まとめ及び今後の研究方向と課題について

#### 6-1 化学物質のメダカ胚への成長阻害

今回、メダカ DNA マイクロアレイ作製のための基礎データとして、最終処分場浸出水原水(A)及びビ

スフェノール A, 2378-T4CDD, 重金属類等の標準液を用いてメダカ (Hd-rR) 胚への影響を調査した。その結果, 各化学物質に対するメダカ胚への成長阻害は以下のとおりであった。

- ① **最終処分場浸出水原液(A)**: 試験開始4日目から血流阻害を示すメダカが10%程度現れ, 6日目から孵化するメダカが現れている。
- ② **ビスフェノール A**: 試験開始3日目から血流阻害が現れ, 6日目から孵化するメダカが現れており, ほぼ最終処分場浸出水 A 液によるメダカ胚への阻害状況と同じである。
- ③ **ダイオキシン(2378-T4CDD)**: 1mg/L では, 3日目から血流阻害が出現し, 6日目以降は全てのメダカ (20 匹) が血流阻害となった。0.1mg/L では, 5日目から血流阻害が現れるが, 正常なものも40%残っている。しかしながら, 12日経過してもまだ孵化したメダカはいなく, 発育が遅れている。
- ④ **鉛 (Pb)**: 47mg/L の場合4日目から血流阻害が現れ, すぐ死亡してしまう。23.5mg/L では, 6日目で血流阻害が現れるが孵化するものも60%あり, 死亡は40%にとどまる。11.8mg/L では6日目で血流阻害が現れるが孵化するものが90%になり, 死亡は10%にとどまる。
- ⑤ **カドミウム (Cd)**: 6.0mg/L で6日目から血流阻害が現れるがすぐ死亡し, 孵化したのは10%のみであった。1.5mg/L では血流阻害が現れるのが9日目と遅くなり, 0.75mg/L では血流阻害はなく, 全て孵化した。
- ⑥ **ヒ素 (As)**: 97mg/L では, 7日目から孵化するが, すぐ死んでしまう。24.3mg/L になると, 6日目から血流阻害になるものが10%現れ孵化することなく死んでしまうが, 他は全て孵化した。

本研究では, 純系メダカ (Hd-rR) を用いることにより, 毒性原因物質によって, それぞれ特異的な発生阻害が引き起こされることが明らかになった。マイクロアレイによって, 今回見出された特異な発生阻害に特徴的な遺伝子発現パターンを検出することができれば, マイクロアレイによる毒性評価

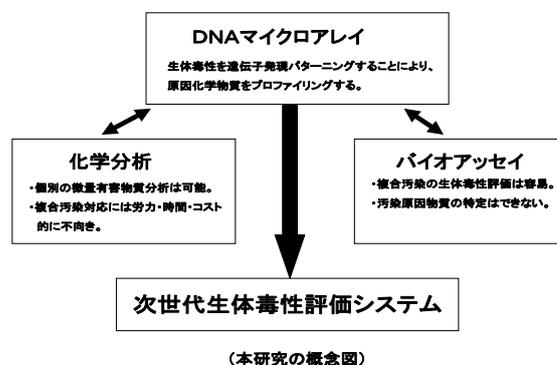
システムは十分に実現可能であると考えられる。本研究により, 以下のようにメダカ卵の採取時期, 採取卵数, 試験化学物質の濃度を決定した。

- ① メダカ卵は, 血流開始期 (25 期, 2 日 4 時間) 以降のものとする。
- ② 採卵は, 1 試験に対して当日卵を最低 100 卵以上とする。(試験: 50 卵, 対象: 50 卵, 合計 100 卵以上/回)
- ③ 各化学物質に対して, メダカ胚への成長阻害が見られる最小濃度で曝露させる。

## 6-2 今後の研究方向

本研究は, 浸出水のような複雑・多様な化学物質を含む環境水について, 生物毒性, 毒性原因物質の種類・濃度を高い再現性で迅速に評価することが可能な毒性評価システムを DNA マイクロアレイ技術により実現することを目的とする。そのために, 今後以下の4段階をもって, システムの構築を行う。

- ① 浸出水中有害化学物質の化学分析とバイオアッセイによる毒性評価
- ② DNA マイクロアレイの作製
- ③ DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現原因物質の同定法の確立
- ④ DNA マイクロアレイによる次世代生体毒性評価システムの構築



(参考文献)

- 1) 尾崎夏栄, 小野芳郎, 柏田祥策: 廃棄物焼却灰溶出毒性評価へのヒメダカ試験系の適用, 第 15 回廃棄物学会研究会講演論文集, 1298-1300(2004)
- 2) 炭谷晃平, 柏田祥策, 尾崎夏栄ら: 廃棄物埋立処分場の処理水がヒメダカ胚に対する生態影響, 廃

棄物学会論文誌, 472-479(2004)

- 3) 半野勝正, 尾田正二ら: メダカ DNA マイクロアレイを用いた化学物質の環境毒性評価法の検討 (I), 環境化学会討論会, 628-629(2005)

## A Study of environmental toxic evaluation method on Waste-Landfill Sites with medaka DNA microarray (I)

Katsumasa HANNO, Shouji ODA, Makoto HIRAYAMA, Noriko NIHEI, Masanori KURIHARA, Hiroshi MITANI

### 要旨

最終処分場浸出水のような複雑・多様な化学物質を含む環境水について, 生物毒性, 毒性原因物質の種類・濃度を高い再現性で迅速に評価することが可能な毒性評価システムを DNA マイクロアレイ技術により実現することを目的とし, 今回, DNA マイクロアレイの作製条件を把握するため, 最終処分場浸出水, ビスフェノール A, ダイオキシン (2378-T4CDD) 及び重金属類等の標準液を用いてメダカ (Hd-rR) 胚への影響を調査した。その結果, 最終処分場浸出水 A 液についてはメダカ卵の胚形成 30 期 (3 日 10 時間後) に血流が流れない異常胚が多く発生した。これらの結果をもとに, 今後の DNA マイクロアレイの作製条件を決定した。

キーワード: メダカ, DNA マイクロアレイ, 最終処分場, 血流阻害