

## 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 (I)

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

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法を検討するにあたり、化学物質を溶解させるために使用する界面活性剤 (Tween20 および TritonX 100) と有機溶媒 (アセトン, エタノール, ジメチルスルホキシド) に対する線虫の耐性を調査した。

その結果, TritonX 100 は 0.1% レベルで, エタノール及びジメチルスルホキシドは 1% レベルで, 線虫に対する影響が見られたが, Tween 20 及びアセトンでは, 10% 濃度でも影響は見られなかった。ただし, アセトンについては, 追試の結果, アッセイに用いたポリスチレン製容器に吸着されることにより毒性が発現されないことが示唆された。

また, アセトン以外の影響の見られた 3 物質について, プロビット法による LC50 値 (72 時間) を調査したところ, それぞれ, 0.099%, 4.73%, 3.10% という値が得られた。

キーワード: 線虫 *Caenorhabditis elegans* アセトン ジメチルスルホキシド エタノール ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノラウレート Tween 20 ポリオキシエチレン(10) オクタチルフェニルエーテル TritonX 100 LC50

## I はじめに

化学物質による環境汚染は、一部の地域のみの影響にとどまらず、今や地球規模にまで拡大しつつある。化学物質は日夜その数が増え続けている一方で、その毒性データがよく分かっていないものも多く、環境に重大な影響を及ぼす可能性があることが懸念されている。

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、抱卵成虫になること、全ゲノム情報 (約 19,000 の遺伝子を持ち、ヒトでクローン化された約 5,000 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<sup>1)2)</sup>。

そこで、*C. elegans* を用いてバイオアッセイを行い、身近に存在する化学物質の毒性を調べることにした。

それに先立って、一般的に化学物質は、水への溶解度が低いため、バイオアッセイにあたっては、まず、目的とする化学物質を、いったん、有機溶媒や界面活性剤等に溶かしてから、培地に添加する必要性も生じてくるため、基礎的調査として、有機溶媒や界面活性剤に対する *C. elegans* の耐性を調査することにした。今回は、有機溶媒として、アセトン、エタノール、ジメチルスルホキシドを、界面活性剤として、ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノラウレート (以下、Tween 20 とする。)、ポリオキシエチレン(10) オクタチルフェニルエーテル (以下、Triton X 100 とする。) の 5 物質を選定した。

## 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<sup>3)</sup>。

※ 香川大学農学部

今回のバイオアッセイ対象物質として選定した有機溶剤のうちアセトンおよびエタノールについては関東化学製残留農薬試験・PCB 試験用 (300 倍濃縮検定品) を、ジメチルスルホキシドは和光純薬製生化学用を、界面活性剤として選定した Tween 20 及び Triton X 100 は、ともに和光純薬製化学用を用いた。

## 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、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 6ml 加えた後、アルカリハイポクロライド溶液 (4mol/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 3ml 加え、アルカリハイポクロライド処理を行った。処理後、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 (アルカリハイポクロライド溶液添加から最初の M9 緩衝液を加えるまで) は 5 分以内をめどに行った。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 原液とする) 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 バイオアッセイ

バイオアッセイ対象物質及び OP50 原液を S 培地で所定濃度に希釈した。OP50 原液は、10 倍希釈になるように調製した。

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 原液に S 培地を加え、10  $\mu$ l 中概ね 10 頭程度になるよう希釈し、各ホールに 10  $\mu$ 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、所定濃度に調製したバイオアッセイ対象物質の希釈液を各ホール 200  $\mu$ 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。添加後、各ホールの底一面に混合液が広がるように攪拌した。これにふたをし、パラフィルムで密閉し、20°C で静置培養を行った。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。なお、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 バイオアッセイの結果

各物質 2 回ずつバイオアッセイに供した。その結果を Table 1 に示す。

各物質とも、2 回の試験でほとんど同じ死亡率を示した。個別に各物質を見ていくと、アセトンおよび Tween 20 はともに 10% 濃度でも、抱卵成虫となっていた。エタノールは、0.1% 濃度では抱卵成虫になっていたが、1% 濃度では L4 幼虫までにしか成長しておらず、1% 濃度ではかなりの影響があることが分かる。一方、ジメチルスルホキシドは、1% 濃度でも抱卵成虫になっており、死ななかつた虫については、あまり生育に影響はないことが言える。Triton X 100 では、0.01% 濃度では抱卵成虫にまで達していたが、0.1% 濃度では、1 回目は L4 幼虫、2 回目は L3 幼虫にしか成長しておらず、個体間で影響に差があることが分かった。

### 2 LC50 の算定

同じバイオアッセイ手法を用いて、比較的、線虫に対して影響のあったエタノール、ジメチルスルホキシド、Triton X 100 について、プロビット法<sup>4)5)</sup>を用いて、LC50 を算定したところ、以下のような値が得られた。

エタノール LC50 値	4.728%
(95%信頼限界)	4.366%~5.935%
ジメチルスルホキシド LC50 値	3.104%
(95%信頼限界)	2.858%~3.275%
Triton X 100 LC50 値	0.099%
(95%信頼限界)	0.070%~0.128%

Table 1 Morality rate of *C. elegans* for various chemicals

Chemicals		Concentration					
		0%	0.001%	0.01%	0.1%	1%	10%
acetone	test 1	0% (0/18)	0% (0/28)	0% (0/31)	0% (0/24)	0% (0/21)	5.6% (2/36)
	test 2	0% (0/64)	0% (0/75)	0% (0/73)	0% (0/78)	0% (0/63)	0.0% (0/68)
	average	0% (0/82)	0% (0/103)	0% (0/104)	0% (0/102)	0% (0/84)	1.9% (2/104)
ethanol	test 1	0% (0/27)	0% (0/23)	0% (0/17)	0% (0/25)	10.0% (2/20)	100% (30/30)
	test 2	0% (0/49)	0% (0/40)	0% (0/31)	0% (0/44)	11.4% (5/44)	100% (54/54)
	average	0% (0/76)	0% (0/63)	0% (0/48)	0% (0/69)	10.9% (7/64)	100% (84/84)
dimethyl sulfoxide	test 1	0% (0/29)	0% (0/28)	0% (0/27)	0% (0/36)	11.5% (3/26)	100% (24/24)
	test 2	0% (0/51)	0% (0/50)	0% (0/51)	0% (0/44)	0% (0/33)	100% (35/35)
	average	0% (0/80)	0% (0/78)	0% (0/78)	0% (0/80)	5.1% (3/59)	100% (59/59)
Tween 20	test 1	0% (0/37)	0% (0/30)	0% (0/36)	0% (0/41)	0% (0/34)	5.3% (2/38)
	test 2	0% (0/38)	0% (0/30)	0% (0/35)	0% (0/40)	0% (0/29)	0.0% (0/33)
	average	0% (0/75)	0% (0/60)	0% (0/71)	0.0% (0/81)	0% (0/63)	2.8% (2/71)
Triton X 100	test 1	0% (0/20)	0% (0/28)	0% (0/23)	69.6% (16/23)	100% (34/34)	100% (47/47)
	test 2	0% (0/16)	0% (0/16)	0% (0/35)	52.0% (13/25)	100% (18/18)	100% (27/27)
	average	0% (0/36)	0% (0/44)	0% (0/58)	60.4% (29/48)	100% (52/52)	100% (74/74)

### 3 アセトンの影響確認

アセトンは、ポリスチレンを侵すため、アセトンの毒性が低く出たのは、ポリスチレンにアセトンが吸着されたため、影響が出なかったとも考えられる。そこで、ガラス製容器を用いて、確認試験を行うことにした。具体的には、培養容器として2ml 容スクリュウキャップ付褐色バイアルビンを用いて、同様なアッセイを行った。ただし、バイアルビンを使用した関係上、最初のL1 幼虫の数は計測できず、また、途中経過も観察できなかったため、72 時間経過後、中身をパスツールピペットを用いて取り出し、直接、顕微鏡で観察を行った結果で判定した。

その結果、0.1%濃度では抱卵成虫に達していたが、1%濃度ではL4 幼虫までにしか成長しておらず、また、10%濃度では全滅していた。

よって、アセトンで影響が出なかったのは、ポリスチレンにアセトンが吸着したためであることが推察された。定性的な結果から、少なくともアセトンはエタノールと同程度の毒性があることが分かった。

### IV 考察

これらの結果から、調査した化学物質の中で最も自活性線虫 *C. elegans* に対して影響の少ないものは、非イオン界面活性剤である Tween 20 であることが分かった。この Tween 20 は、既報<sup>6)</sup>の油処理剤に含まれる界面活性剤の成分のひとつと考えられる。

バイオアッセイに Tween 20 を用いる利点は、界面活性剤が混合した試料は、有機溶媒のみが混合した試料よりも表面張力がはるかに弱いいため、24 穴平底プレートの底

一面に広げやすいという点が挙げられる。しかしながら、Tween 20 原液は粘度が非常に高いため、原液のままでは扱いにくく、いったん、S 培地等で 10 倍程度に希釈を要する。その結果、目的物質を高い濃度で扱えないという欠点も考えられるが、界面活性剤が入った水に溶けないものが、何も入っていない水に溶けるとは通常考えられないので、問題はないのかもしれない。

いずれにせよ、今回の調査は、化学物質のバイオアッセイにおけるバックグラウンド調査が主たる目的であるので、今後のバイオアッセイに今回の結果が活かされれば、十分に使命を果たしたといえる。

### V まとめ

自活性線虫:*C. elegans* を用いた化学物質のバイオアッセイ法を検討するにあたり、まず、化学物質を溶解させるために使用する界面活性剤(Tween 20 および TritonX 100)と有機溶媒(アセトン、エタノール、ジメチルスルホキシド)に対する線虫の耐性を調査した。

その結果、界面活性剤の Tween 20 が *C. elegans* に対して、最も影響が少ないことが分かった。

今回の結果を、今後行う化学物質のバイオアッセイに活かしていきたい。

### 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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 砂古口博文, 白坂涼子: 香川県環境保健研究センター所報, 6, 96-100, (2007)

#### Abstract

We examined a bioassay method for chemicals using the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. As a preliminary, we estimated the resistance of *C.elegans* to surfactants (Tween20 and Triton X 100) and organic solvents (acetone, ethanol and dimethyl sulfoxide) which are used to dissolve chemicals. 0.1 % TritonX 100, 1% ethanol and 1% dimethyl sulfoxide exerted lethal effects on *C. elegans*, whereas Tween 20 and acetone showed no effect even at a concentration of 10%. However, according to our additional experiments, it was suggested that a considerable amount of acetone was adsorbed on polystyrene containers used in the assay. LC50 values by probit method (72 hours) for Triton X 100, ethanol and dimethyl sulfoxide were evaluated to be 0.099%, 4.73% and 3.10%, respectively.