

「ショウジョウバエを用いた個体レベルでの環境汚染の生物影響評価」

岡山大学薬学部 根岸友恵

1. 目的

環境汚染問題を論ずる場合、実際の汚染状況を把握する必要がある。これまで環境汚染のモニタリングは、そこに生息する生物を指標生物として特定の物質による汚染度を測定する方法、あるいはその地域から試料を採取して実験室に持ち帰り汚染物質濃度や生物に対する影響を調べる方法で行われてきた。すなわち本来重要と考えられる個体レベルで見られる環境の総合的な影響を調べる方法は行われていない。そこで、観測したい地点に決められた生物を置き、経日的、経年的に影響を調べることができるモニタリング方法が、特に大気環境汚染物質への慢性曝露の評価に有用なのではないかと考え、本研究では個体に対する環境の総合的な評価を行うことを目的として、方法の確立と生物モニタリングの実施を目指した。まずガス状物質への感受性を検討するため、実験室内でタバコ副流煙への曝露影響を調べた。

2. 方法

2.1 実験に使用したショウジョウバエ

実験動物としては取り扱いの簡便なショウジョウバエを使用した。DNA 傷害検出は *in vivo* DNA repair test を用いた。また酸化傷害の検出には、酸化傷害に感受性である尿酸欠損株を用いた。本研究で用いたショウジョウバエは梁治子博士（大阪大学医学部）並びに藤川和男博士（近畿大学理工学部）に分与していただいた。

2.1.1 ショウジョウバエ DNA 傷害修復試験

この試験系に用いる株 (*sc z<sup>l</sup> w<sup>+</sup>(TE) mei-9a mei-41D5/C(1)DX, yf*) は、図 1 に示したように常に雄は除去修復欠損（遺伝子 *mei-9*）、複製後修復欠損（遺伝子 *mei-41*）となるように工夫された株である。したがって雄はその体細胞 DNA に何らかの損傷を受けた場合、修復ができずに生存率が低下する。それに反して雌は正常に損傷を修復できるので生存数に変化は見られない。そこで成虫での雌雄の比を求めることによって修復可能な DNA 損傷の程度を

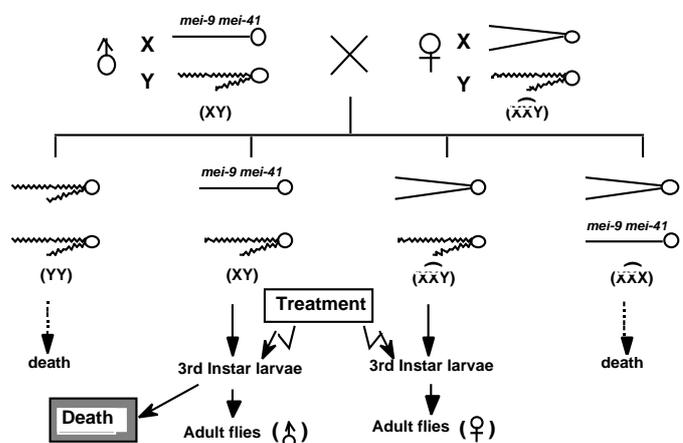


図 1 ショウジョウバエ DNA 傷害修復試験

知ることができる。タバコ副流煙曝露後、羽化してきた成虫の雌雄の個体数を計数して性比を得た。

### 2.1.2 尿酸欠損株を用いた酸化傷害の検出

尿酸はアルコールビン酸に匹敵する抗酸化作用を持ち、多くの生物で生体内で重要な活性酸素消去剤として働いていると言われている。ショウジョウバエにおいても排泄物としてではなく、むしろ生理活性物質として機能している可能性が高い。実際ショウジョウバエの尿酸欠損株は活性酸素産生化合物パラコートに感受性である(図2)2種の尿酸欠損株(*ry506*, *y v mal*)のパラコート感受性を調べた結果、より感受性の高かった *y v mal* と、野生株 Oregon-R を用いて、タバコ副流煙の作用を検討した。

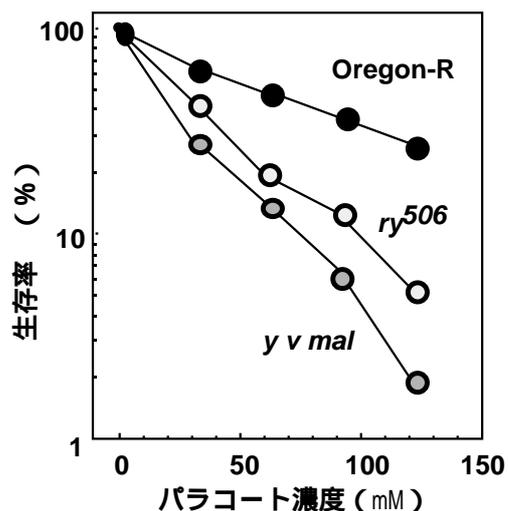
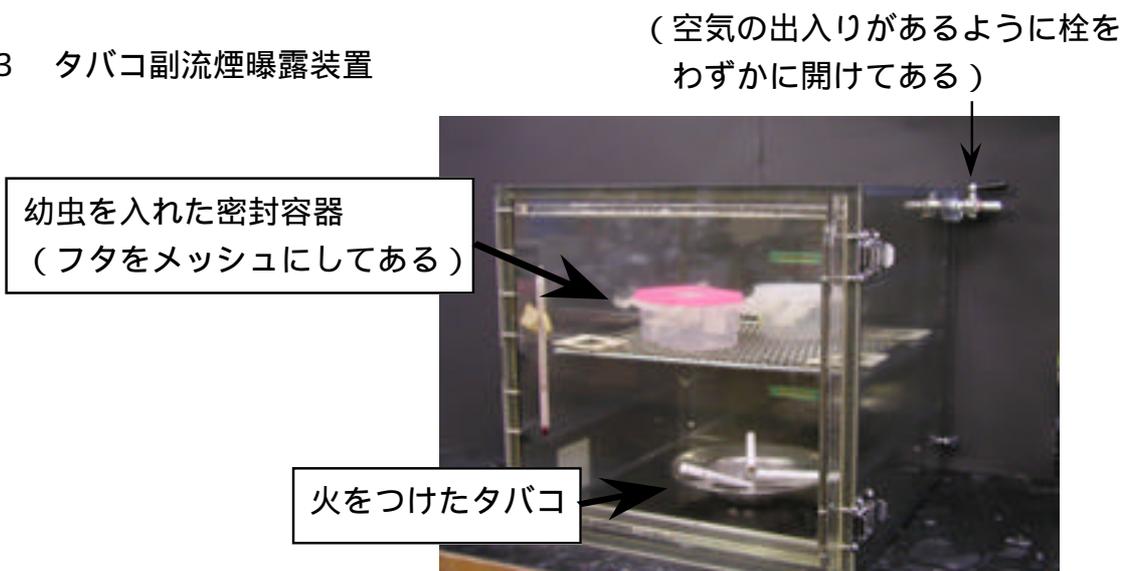


図2 パラコート感受性

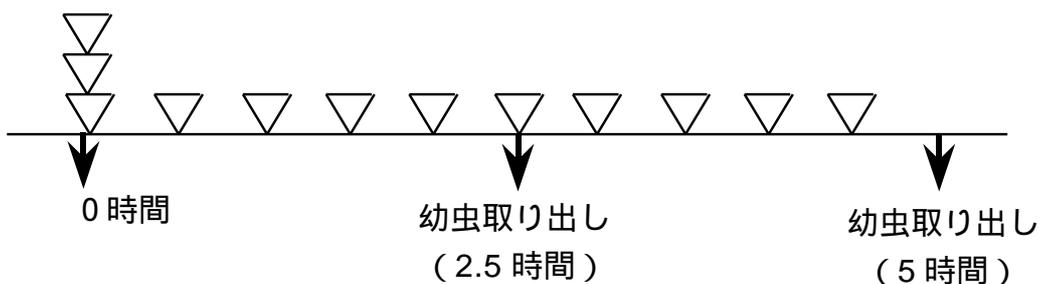
### 2.2 ショウジョウバエ幼虫のタバコ副流煙曝露方法

図3に示したように、ガス置換型デシケーターを用い、タバコ副流煙への曝露を行った。

図3 タバコ副流煙曝露装置



▽ タバコを入れる



3 齢幼虫を入れたナイロンメッシュでフタをした容器を網棚の上に置き、容器内に

は0.25 M しょ糖溶液をひたひたになるように加えた。上記に示すように最初に3本のタバコを入れ30分ごとに新しいタバコを追加し、常に煙が庫内に充満するようにした(図の写真はタバコに火をつけてない状態で撮影)。2.5時間、5時間で幼虫を取り出し流水で良く洗った後、インスタント培地に移した。

### 2.3 用いたタバコ

日常よく喫煙されているタバコを撰んでサンプルとした。それぞれのタバコに含まれるニコチン、タールの含量ならびに Ames test によるタバコ1本当りの突然変異原性は表1のようになっている。

表1 使用したタバコの性質

	ニコチン (mg/本)	タール (mg/本)	変異原性 (復帰コロニー数/本)
タバコ 1	0.7	8	6300
タバコ 2	1.2	14	2250
タバコ 3	1.0	12	7400

変異原性については、タバコ主流煙をフィルターにトラップして得た濃縮物を試料として求めたものである。

### 3. 結果

#### 3.1 DNA 傷害修復試験の結果

方法のところでも示したように、タバコ副流煙を曝露した幼虫から羽化した成虫の性比を調べたところ、図4に示すように、いずれのタバコでも性比の減少は見られず、5時間という短時間曝露では、DNA 傷害が観察されなかった。一緒に行った陽性対照のベンツピレン (BaP) 5 μmol を添加した培地では性比が0.1まで低下していた。しかしながら、雄ならびに修復に関して野生株である雌もその生存率が低下する傾向が見られた(図5)。曝露終了直後は幼虫が生存していることを確認しており、この致死効果がガス曝露による窒息が原因とは考えられない。そこでこの致死傷害がどのような障害によって引き起こされるかを検討した。タバ

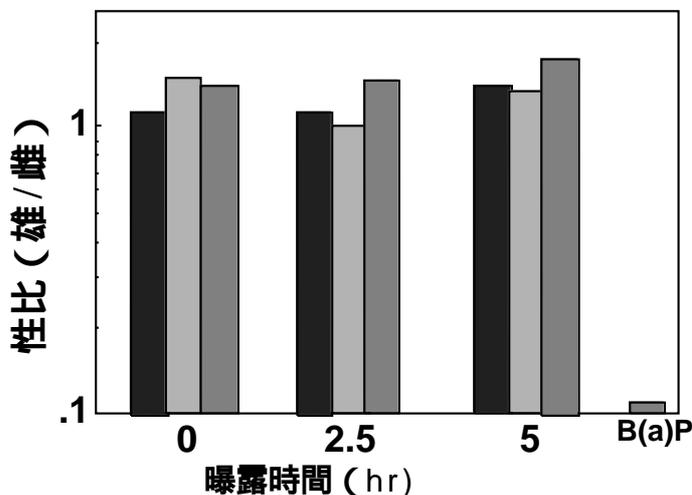


図4 In vivo DNA repair test におけるタバコ副流煙の効果

■ タバコ1    □ タバコ2    ▨ タバコ3

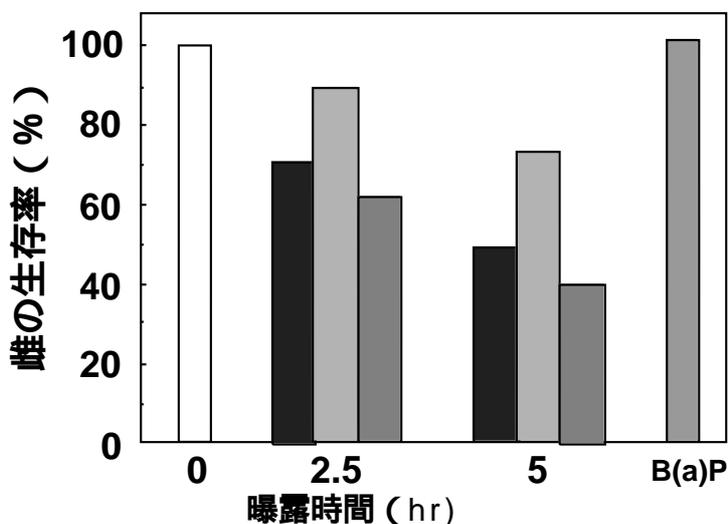


図5 タバコ副流煙による細胞毒性

コ副流煙中には活性酸素および活性酸素を発生させる化合物が存在すると言われてい  
るので、酸化的傷害感受性株を用いて副流煙への曝露を行った。

### 3.2 タバコ副流煙の酸化的傷害感受性株に対する致死作用

野生株 Oregon-R とパラコート感受性株 (*y v mal*) の3 齢幼虫を同様に副流煙曝露し  
た。その結果、図6 に示すように、いずれのタバコでも *y v mal* は Oregon-R と比べて  
タバコ副流煙に対して感受性が高いことが示唆された。

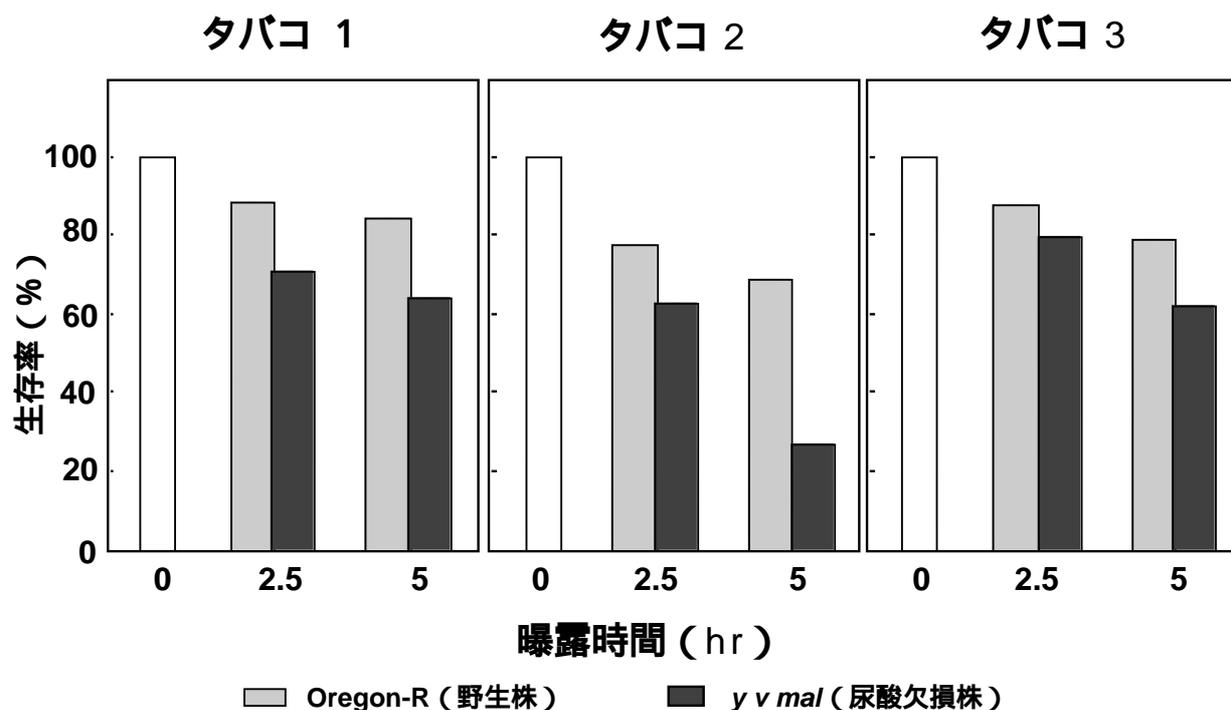


図6 パラコート感受性株に対するタバコ副流煙の曝露効果

### 4. 考察

本研究では実験的大気汚染としてタバコ副流煙曝露の生物影響をショウジョウバエ  
3 齢幼虫を用いて観察した。タバコの煙はがんの原因と認められ、煙濃縮物の変異原  
性や DNA 傷害性が報告されている。大気環境として曝露された場合にも DNA 傷害を  
引き起こすと考え、DNA 障害検出用ショウジョウバエに対し副流煙曝露を行ったが、  
除去修復あるいは複製後修復で修復されるような DNA 傷害は検出されなかった (図  
4)。また、染色体レベルの体細胞突然変異を検出する翅毛スポットテストも実施し  
たが、陽性結果は得られなかった。このことは、タバコ副流煙環境で5時間という短  
時間曝露では DNA への直接的な傷害は誘起されないことを示唆している。しかしな  
がら、これら実験の際に雌雄に関係なく曝露時間に比例して致死作用が観察された  
(図5)。タバコ煙は生体内で活性酸素を産生する物質を含有しているという報告が  
あるので、曝露対象として酸化的傷害感受性株を用いて野生株と致死作用に差がある  
かどうか調べた。その結果酸化的傷害感受性株において致死作用が強い傾向が認めら  
れた (図6)。

大気汚染物質には活性酸素を産生する物質も多く含まれていることと本研究結果を

合わせて考えると、大気環境のモニタリングには酸化的傷害感受性株を用いる方法が高感度な毒性評価方法となる可能性がある。現在、酸化的細胞傷害がどのようなものであるのか検討するため、過酸化脂質の定量を試みている。過酸化脂質の増加が曝露時間に対して定量的変化することが明らかになれば、生化学的マーカーとすることが可能である。また、高感度な体細胞突然変異検出系を用いた遺伝子傷害の検出の可能性も検討している。

## 5．謝辞

本研究の遂行にあたり資金面で助成をいただいたダバイエスプレック地球環境研究・技術基金に感謝いたします。また、実験に際し有益なご助言をいただいた岡山大学薬学部分子細胞薬品科学講座 岡本敬の介教授、実験協力者の学部学生遊間陽子さんに感謝致します。

## 6．成果発表

第41回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会（平成14年11月9, 10日）

「タバコ副流煙の障害について - ショウジョウバエを用いた研究 - 」

遊間陽子、岡本敬の介、根岸友恵