

多摩川水系飲用水の生物作用の調査
遺伝子情報の不安定化と免疫機能
の攪乱に関する水質検査

2004年

喜多 和子
千葉大学大学院医学研究院講師

目 次

1 .	要約-----	1
2 .	背景と目的-----	1
3 .	材料と方法-----	2
	1) 試験管内細胞レベルの解析-----	2
	2) ヒト固体レベルの解析-----	4
4 .	結果-----	4
5 .	考察-----	5
6 .	参考文献-----	7
図 1	水濃縮サンプルで処理された R S 細胞における変異誘導頻度-----	8
図 2	GRP78 発現抑制細胞 AS3 の紫外線高感受性-----	8
図 3	AS3 細胞における都市河川水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用に 対する高感受性-----	9
図 4	水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用 (1) -----	9
図 5	水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用 (2) -----	10
図 6	GRP78 発現抑制細胞 AS2,AS3 における bisphenolA 誘導変異頻度--	10
図 7	水濃縮サンプルで処理された A S 細胞における変異誘導頻度-----	11
図 8	ボランティアの血清で処理された RS 細胞における変異誘導頻度----	11
図 9	ダイオキシンによる CD69 陽性リンパ球数の増加-----	12
表 1	変異原性を有する化学物質によるヒトリンパ球細胞に対するプロテ アーゼ誘発作用-----	12

課題『多摩川水系 飲用水の生物作用の調査：遺伝子情報の不安定化と免疫機能の攪乱に関する水質検査』

代表研究者 千葉大学 医学 研究院・環境影響 生 化学 教室
喜 多和子

1 . 要約

本研究では、多摩川水系 飲用水のヒトへの生物作用を解析した。そのために、まず、環境化学物質に対して感度よく応答する培養ヒト細胞 AS を樹立した。水質検査の対象としたのは、多摩川水系 水道水 3 種、利根川荒川水系 水道水 3 種、多摩川河川水、千葉県 都川 河川水である。これらの水サンプル中の有機化合物を Oasis HLB カラムで濃縮し、AS 細胞を用いて試験管内細胞増殖阻害と遺伝子毒性作用を調べた。その結果、都川河川水に強い増殖阻害作用、拜島桜堤付近の多摩川河川水に遺伝子変異誘発作用が認められた。水道水濃縮サンプルには、顕著な細胞増殖阻害作用は観察されなかった。遺伝子毒性作用については、利根川荒川水系 水道水の方が多摩川水系 水道水に比べやや強い変異誘発性が認められた。多摩川水系 飲用水を摂取している八王子在住のボランティア血清に遺伝子変異誘発作用は観察されなかった。また、リンパ球を用いた解析では、化学物質処理による細胞表面の活性化マーカーの発現量の増大とプロテアーゼ誘発作用が示された。

2 . 背景と目的

近年、環境化学物質などによる河川汚染のヒトへの影響が憂慮されている。また、汚染の強い河川の水を飲用水として使用するための高度の化学処理にも問題があり、その処理により生じる種々の有機塩素化合物のヒトの健康への影響も懸念される。この問題は、代表的都市河川である多摩川も例外ではない。多摩川水の飲用水としての活用が、急増している癌や各種の生活習慣病、アレルギー疾患にどのような因果関係をもつかを解明することは、重要な課題である。

そこで、本研究では、多摩川水系 飲用水のヒトへの生物作用を、ヒト細胞に対する細胞毒性と遺伝子毒性、および免疫機能を担うヒトリンパ球系細胞の活性を指標として調べる。試験管内細胞レベルでの解析と共に、ヒト個体レベルでの解析を同時に行う。試験管内細胞レベルでの解析では、紫外線や環境化学物質の高感受性の培養ヒト細胞を樹立し、その細胞を用いて飲用水の細胞増殖阻害作用や遺伝子毒性を調査する。また、個体レベルでの解析とは、申請者がこれまで明らかにしてきた生理機能を利用したものである。この機能は、ヒト個体において、化学物質により遺伝子の変異が誘導される際に、血清中のサイトカイン様因子によりその誘導の程度が調節される(1)というものである。食生活習慣、特に、飲料水は、この機能を左右する可能性がある。最近の急激な水質環境の変化と都市生活というストレス環境の複合作用に対して、この生理機能が遺伝子情報の安定化にどのように対応しているのかを調査する。

3. 材料と方法

1) 試験管内細胞レベルの解析

1)-1 水サンプル採取：下記の場所で採取した水道水、およびその比較として河川水を使用した。

多摩川水系水道水：

八王子市打越町下田公園（サンプル名、TS1）、八王子市元本郷町元本郷公園（サンプル名、TS2）、八王子川町よしの沢公園（サンプル名、TS3）。

利根川・荒川水系水道水：

板橋区赤塚（利根川+荒川、サンプル名、ARS）、千葉市花見川（利根川+印旛沼、サンプル名、KS）千葉市亥鼻（利根川+千葉県内ダム、サンプル名、CUS）。

河川水：

多摩川河川水（多摩川拜島桜堤付近、サンプル名、TG）、

都川河川水（千葉市都川大和橋付近、サンプル名、MG）。

1)-2 水サンプルの前処理

濃縮しないサンプル—未濃縮の各水サンプルに細胞培養用の粉末培地を溶かして、その溶解液を無菌濾過したものを細胞培養液として使用した。

濃縮サンプルの調製—水サンプル中の有機化合物を下記の方法で、Oasis HLBカラム（Water社）に吸着させて約1700・4000倍に濃縮した。水サンプル（250ml）をOasis HLBカラム3mlに流し、有機化合物を吸着させた。このカラムを5%メタノール2.0mlで洗浄後、吸着成分を100%メタノール2.0mlで溶出し、デシケータで減圧乾燥後ジメチルスルホキシド（DMSO）150・63 μ lに溶解したものを濃縮サンプルとして使用した。Oasis HLBカラムは、合成ポリマーを基剤とし、極性、非極性有機化合物を共に結合することから、このカラムの使用により、水中の有機化合物を幅広く濃縮できると考えられる。

1)-3 細胞

RS細胞株は、ヒト胎児線維芽細胞にSimian virus 40とRous sarcoma virusを同時に感染させ、不死化し樹立したものである。この細胞では、紫外線照射や環境中の化学物質暴露後、致死高感受性および高頻度変異誘導性がみられる（2-4）。また、環境化学物質により高感度に応答する細胞を開発するため、RS細胞を遺伝子改変した。標的遺伝子は、ストレスタンパク質78-kDa glucose-regulated protein (GRP78)遺伝子とした。最近我々は、GRP78が遺伝子変異に対して防衛的に作用しているとの示唆を得ており（5）、また、他の研究者から、細胞毒性のある有機化合物に曝露された細胞において、ストレスタンパク質のうちGRP78の発現が上昇すると報告されているからである（6）。そこで、ストレスタンパク質78-kDa glucose-regulated protein (GRP78)のcDNAをアンチセンス方向にベクターpcDNA3.1に組み入れた発現プラスミドを構築し、RS細胞に導入した。遺伝子導入細胞のGRP78タンパク質の発現レベルを、抗体を用いたWestern解析で調べ、発現抑制細胞AS2、AS3を選択した。

1)-4 MTT法による細胞増殖阻害作用の解析

96穴プレートに植えた細胞、各濃度の水濃縮サンプルを添加した培養液(5%血清含有)で3日間培養した後、細胞生存率を、MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]を基質としてミトコンドリア酵素活性を測定することにより解析した(7)。

1)-5 細胞を用いた遺伝子毒性の解析

K-*ras*コドン12変異誘導の検出

RS細胞を、水濃縮サンプルを1/100量添加した培養液(血清無添加)で5時間処理した後、5%血清添加培地で4日間培養した。この細胞からDNAを抽出し、既報に従いK-*ras*遺伝子の変異を調べた(8)。サンプルDNAのK-*ras*コドン12周辺の目的配列を5'-GACTGAATATAAACTTGTGG-3'と3'-GCTTATACTAGGTTGTTATC-5'のプライマーを用いたPCRにて増幅した。電気泳動により増幅産物を確認後、ナイロン膜上にドットプロットした。そのナイロン膜をプレハイブリダイゼーション後、アイソトープラベルされた次のようなプローブと共にハイブリダイゼーションした。K-*ras*コドン12の突然変異プローブは、6種

(5'-GTTGGAGCTAGTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTCGTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTTGTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTGATGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTGCTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTGTTGGCGTAGG-3')を等量混合したものである。結合シグナルをオートラジオグラフィで可視化し、黒いドットとして確認された場合、変異ありと判定した。

ウワバイン耐性テスト

各水濃縮サンプルを添加した培養液(血清無添加)で16時間処理した後、5%血清添加培地で4日間培養した。この細胞を再播種し、 4×10^8 Mウワバイン存在下で2週間培養した後、生き残った細胞コロニーを数えた。このコロニー数を、同時にウワバイン非存在下で培養した細胞コロニー数で割り、ウワバイン耐性細胞の出現頻度を計算し、変異誘導頻度とした(4)。この方法原理は、 Na^+ , K^+ ATPase遺伝子に変異を持つ細胞が、 Na^+ , K^+ ATPaseの阻害剤ウワバインに耐性になることを利用している。

1)-6 ヒトリンパ球を用いた解析

プロテアーゼ活性

リンパ球標品を ^{125}I フィブリン結合チューブに加え、プラスミノゲン存在下に、37°C、20分間インキュベーションした。インキュベーション後、上清を回収し、遊離されてきたフィブリンの放射能をカウンターにて測定した(9)。この反応の原理は、アクチベーター様カスケード反応を利用したものである。

活性化分子マーカー

免疫機能の1つの指標として、既報に従いリンパ球細胞表面活性化マーカーCD69の発現量を調べた(10)。リンパ球標品を各濃度のダイオキシンで処理した後、抗体を用いたFACS解析により発現量の変化を調査した。

2) ヒト個体レベルの解析

2)-1 ヒト血清による変異誘導調節作用

RS細胞を、ボランティア血清を1/100量添加した培養液(10%牛血清含有)で24時間培養した後紫外線照射(10J/m²)し、その後通常の血清添加培地で4日間培養した。この細胞のK-*ras*コドン12遺伝子の変異をdifferential dot-blot hybridization法により調べた。

4. 結果

1) 親株RS細胞を用いた水濃縮サンプルの遺伝子毒性

未濃縮サンプルでは、細胞に対する遺伝子毒性生育阻害ともに観察されなかった(結果省略)。濃縮サンプルで処理されたRS細胞を、differential dot-blot hybridization法によるK-*ras*遺伝子の変異検出法を用いて解析した結果、多摩川系水道水のTS3(八王子川町よしの沢公園)と、多摩川河川水TG(多摩川拝島桜堤付近)に弱い変異原性のある可能性が示唆された(図1)。しかしながら、この作用は弱く、さらにより高感度の細胞を用いて検討を行った。

2) ストレスタンパクGRP78発現抑制細胞を用いた水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用

今回、樹立したAS2、AS3細胞(ストレスタンパク質GRP78の発現抑制細胞)は、ベクターのみを導入したコントロール細胞V2に比べ、紫外線による増殖阻害(図2A)および変異誘導性(図2B)に対してより高い感受性を示した(AS2細胞に関しては結果省略)。また、このAS3細胞はコントロール細胞V2に比べ、都川河川水MG濃縮サンプルの増殖阻害に対して、より高い感受性を示した(図3A, B)。そこで、AS3細胞を用いて、各水4000倍濃縮サンプルの各濃度での細胞増殖阻害作用をMTT法で調査した。都川河川水MGを培養液100μlに3μl添加した場合(1/30量添加)した場合、最も強い増殖阻害作用が観察された(図4)。また、同濃度の多摩川系水道水TS3でも弱い増殖阻害作用が観察された(図4)。さらに、2003年度7月に採取した各水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用を、2002年10月に同地点で採取した各水濃縮サンプルの阻害作用と比較した。両年共に、都川河川水MGに強い阻害作用、多摩川系水道水TS3に弱い阻害作用が認められた(図5A, B)。

3) ストレスタンパクGRP78発現抑制細胞を用いた水濃縮サンプルの遺伝子毒性

まず、GRP78発現抑制細胞AS2, AS3が紫外線だけでなく、環境中の化学物質の遺伝子毒性に対しても高い感受性を有しているかを調べた。化学物質として、近年健康被害が懸念されている環境汚染物質bisphenol Aを選択した。bisphenol Aの変異原性については、salmonella菌やchinese hamster細胞でAmes試験や6-thioguanine耐性試験などの形質変異検出法を用いて調べられてきたが、変異原性が検出されていないことから、従来、変異原性を持たない化学物質と報告されてきた。しかし、最近我々は、RS細胞をウワバイン耐性試験とK-*ras* codon 12の遺伝子変異検出系を用いて解析し、bisphenol Aに変異誘導作用があることを見出している(11)。AS2, AS3細胞におけるbisphenol Aの変異誘導作用をウワバイン耐性試験を用いて調べた結果、10⁻⁸・10⁻⁹M濃度で検出された(図6)。この検出限界濃度は、コントロール細胞V2での検出限界濃度10⁻⁵M(図6)に比べ、非常に低濃度であった。従って、AS2, AS3細胞は、環境化学物質による変異誘導作用に対しても

感度よく応答する可能性が示唆された。

そこで、AS2、AS3細胞を用いて、2003年7月および2002年10月に採取した各水の濃縮サンプルの変異誘導性をウバイン耐性試験法により調べた。両年共に、拝島桜堤付近で採取した多摩川河川水 TG濃縮サンプルに変異誘導性が、また、利根川荒川水系水道水 ARS濃縮サンプル、都川河川水 MGサンプルに弱い変異誘導性が観察された(図7)。

4) ヒト個体レベルの解析

八王子在住の都立大学学生ボランティア9名の血清の変異誘導調節作用を differential dot-blot hybridization法による K-ras遺伝子の変異検出法を用いて解析した結果、9名共血清そのものに変異誘導性は観察されなかった(図8)。また、紫外線による変異誘導作用が血清前処理により促進される現象も認められなかった(図8)。

5) ヒトリンパ球を用いた解析

ヒトリンパ球細胞表面の活性化マーカーの発現量の変化に関しては、低濃度ダイオキシン処理後 CD69の発現量が増加することが観察された(図9)。また、プロテアーゼ活性の変化に関しては、環境中の種の化学物質のうち変異原性を有する化合物が極めて低濃度でプロテアーゼ誘発能を示すことが判明した(表1)。

5. 考察

AS細胞は、紫外線だけでなく水濃縮サンプル中の有害物質による増殖阻害作用および変異誘導性にも、高い感受性を有することが明らかになった。従って、生物毒性作用から見た水質を調べる上で、非常に有用な細胞であると考えられる。この細胞を用いた2002年度および2003年度の解析から、河川水の濃縮サンプルには、細胞の増殖阻害および変異誘導作用があることが示された。千葉市の都川河川水 MGの濃縮サンプルには両年ともに強い増殖阻害が見られた。一方、多摩川河川水 TG濃縮サンプルには、両年共に、変異誘導作用が認められた。MG濃縮サンプルの変異誘導作用がTG濃縮サンプルより弱いのは、使用した負荷量では細胞の生育阻害が強すぎる可能性が考えられる。あるいは、これらの生物作用の差に両河川水中の汚染物質の差が関わる可能性が考えられる。サンプル中の有機化合物成分の分析を平行して行い、成分と生物作用の関連研究へと展開できる。

多摩川水系水道水と利根川荒川水系の水道水濃縮サンプルには、両年共に、顕著な細胞増殖阻害作用は観察されなかった。遺伝子毒性作用については、2002年度の1700倍濃縮サンプルでは多摩川水系水道水と利根川水系の水道水に顕著な差は認められなかったが、2003年度の4000倍濃縮サンプルでは利根川水系の水道水の方が多摩川水系水道水に比べ、やや強い変異誘導性が認められた。

多摩川水系飲用水を摂取していると考えられる八王子在住の学生ボランティアの血清について、dot-blot hybridization法による簡便法を用いて行ったヒト個体レベルでの解析では、血清に変異誘導作用も変異誘導調節作用も観察されなかった。比較実験として、千葉大学の学生ボランティアの血清についても同様の解析を行ったが、これらの血清にも変異誘導作用は観察されていない(結果省略)。また、リンパ球を用いた解析では、ダイオキシン処理により細胞表面の活性化マーカー CD69の発現量が増大する

こと、変異原性を有する低濃度の化学物質が、fibrin分解プロテアーゼ誘発作用を有することが示された。このプロテアーゼ誘発は、これまでの我々の研究から、化合物による細胞増殖阻害や遺伝毒性作用と密接に関連すると考えられることから、環境中の化学物質の遺伝毒性作用のスクリーニングに使用できる可能性が示唆される。予備実験として、水濃縮サンプルで処理したリンパ球系細胞の活性化マーカーとプロテアーゼ活性の変化の解析を行ったが、濃縮サンプル溶解液DMSOによる影響のためか、明らかな解析結果が得られなかった。今後より詳細な検査が必要と考えられる。

今後AS細胞を用いて、採取回数や採取地点を増やすなどより詳細な水質比較検査の実施、多摩川を含む都市河川水由来飲用水と農山村部などを含めた地域の飲用水などの比較解析により、水の生物作用を総合的に評価できる。また、個体レベルの解析を同時に行うことで、ヒトの健康への影響をも考慮にいたった評価が可能である。

6. 参考文献

1. N. Suzuki, M. Ishibashi, K. Kita, Y. Wu, J. Nomura, Y. Takakubo, K. Hiroshima, K. Genga, H. Ohwada and Y. Hayashi, Detection of serum factors enhancing cell mutability from lung cancer patients by application of hypermutable human RS cells. *Int. J. Cancer* 78 (1998) 550 -555.
- 2 T. Kuwata, T. Oda, S. Sekiya and N. Morinaga, Characteristics of a human cell line successively transformed by Rous sarcoma virus and Simian virus 40, *J. Natl. Cancer Inst.* 56 (1976) 919 -926.
3. N. Suzuki and A. Fuse, A UV-sensitive human clonal cell line, RSa, which has low repair activity, *Mutation Res.* 84 (1981) 133 -145.
4. H. Suzuki, N. Suzuki, M. Sasaki and K. Hiraga, Ortho-phenyl phenol mutagenicity in a human cell strain. *Mutation Res.* 156 (1985) 123 -127.
5. K. Kita, J. Nomura, H. Yamamori, N. Nakajima and N. Suzuki, Involvement of Bip/GRP78 in mutation enhancing activity by pancreatic cancer factors. (abstract in Japanese) *Proc. Jpn. Cancer Assoc.*, 59th Annu. Meet. 96 (2000) 317.
6. F. Croute, J. Poinot, Y. Gaubin, B. Beau, V. Simon, J.C. Murat and J.P. Soleilhavoup, Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress protein in cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1591 (2002) 147.
7. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55 -63.
8. H. Suzuki and N. Suzuki, Detection of K -ras codon 12 mutation by polymerase chain reaction and differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human RSa cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196 (1993) 956 -961.
9. S. Takahashi, X. Chi, J. Nomura, S. Sugaya, K. Kita and N. Suzuki, A novel method of analyzing environmental chemical mutagens in human cell systems. *Water Science anTechnology*, 42 (2000) 133-138.
10. J. Nomura, Y. Arase, T. Sugita, S. Sugaya, S. Takahashi, K. Kita, H. Yamamori, S. Sekiya and N. Suzuki, Increased and decreased expression of CD69 and CD23, respectively, in gravity -stressed lymphocytes. *Activation, Space, and Environmental Medicine, The Aerospace Medical Association*, 72 (2001) 727 -732.
11. S. Takahashi, X. Chi, Y. Yamaguchi, H. Suzuki, S. Sugaya, K. Kita, K. Hiroshima, H. Yamamori, M. Ichinose and N. Suzuki, Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon - α in human RSa cells. *Mutat Res.* 490 (2001) 199 -207.

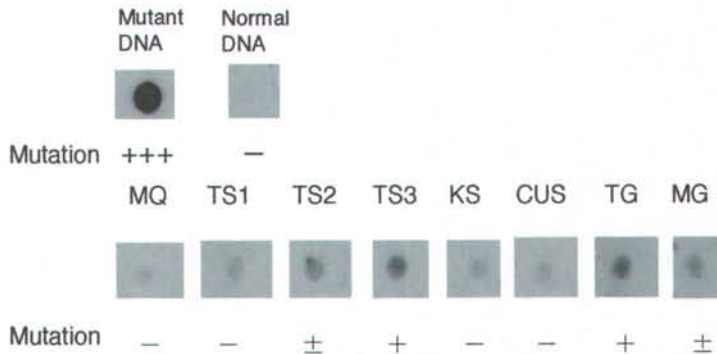


図1 水濃縮サンプルで処理されたRS細胞における変異誘導頻度

各水1700倍濃縮サンプル液を1/100量添加した培養液（血清無添加）で5時間処理した後、通常の血清添加培地で4日間培養した。この細胞のK-ras コドン12遺伝子の変異を differential dot-blot hybridization 法により調べた。

Mutant DNA ; K-ras コドン12遺伝子に変異を持つヒト大腸癌細胞SW480のDNA
Normal DNA ; K-ras コドン12遺伝子が正常のヒト胎盤細胞のDNA

MQ ; ミリQ水、TS1 ; 八王子市打越町下田公園水道水、TS2 ; 八王子市元本郷町元本郷公園水道水、TS3 ; 八王子川町よしの沢公園水道水、KS ; 千葉市花見川水道水（利根川+印旛沼）、CUS ; 千葉市亥鼻水道水（利根川+千葉県内ダム）、TG ; 多摩川河川水（多摩川拜島桜堤付近）、MG ; 都川河川水（千葉市都川大和橋付近）

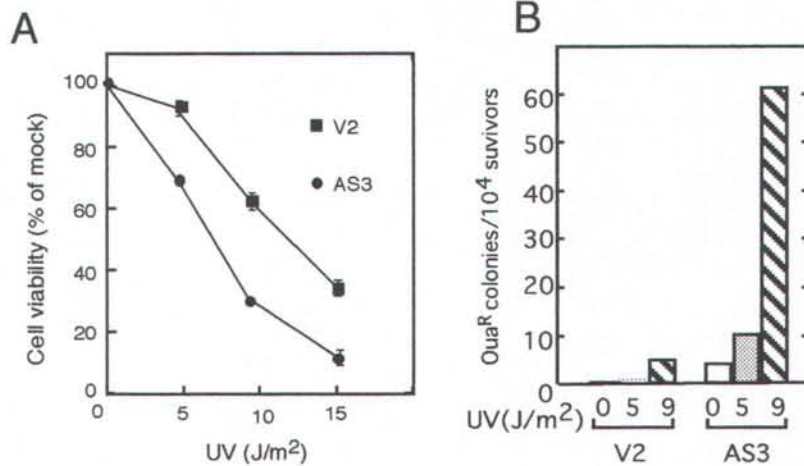


図2 GRP78発現抑制細胞AS3の紫外線高感受性

A : 紫外線による細胞増殖阻害作用 ; 紫外線照射後3日目の細胞生存率を、MTT法で解析した。

B : 紫外線誘導変異頻度 ; 紫外線照射後の変異頻度を、ウワバイン 耐性細胞の出現頻度で調べた。

V2: ベクターのみをRS細胞に導入したコントロール細胞
AS3: GRP78アンチセンスDNAをRS細胞に導入した細胞

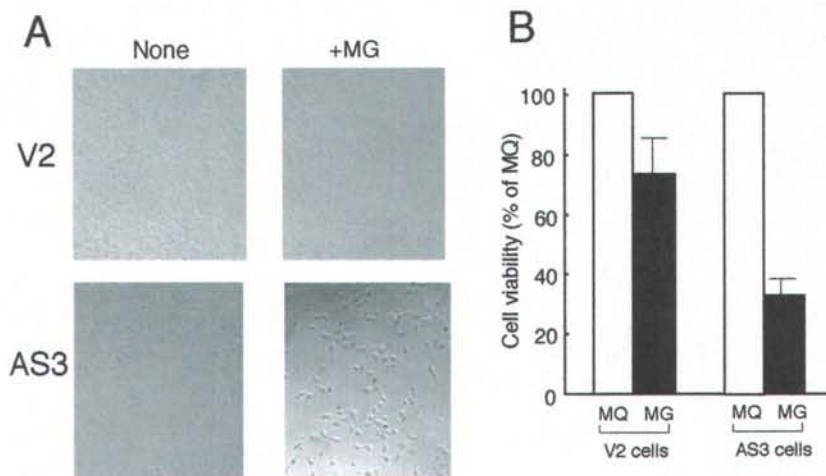


図3 AS3細胞における都川河川水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用に対する高感受性

A: 都川河川水(MG) 1700倍濃縮サンプルを1/100量添加した培養液(血清無添加)で16時間処理した後、通常の血清添加培地で3日間培養した。この細胞を顕微鏡観察下に写真撮影した。
 B: 都川河川水(MG) 4000倍濃縮サンプルを細胞培養液の1/30量添加した培養液(5%血清含有)で細胞を3日間培養した後、生存率をMTT法で解析した。各水サンプル処理後の生存率を、ミリQ水(MQ)濃縮サンプルで処理された細胞の生存率に対する相対値で表した。データは平均値±標準偏差で表してある。

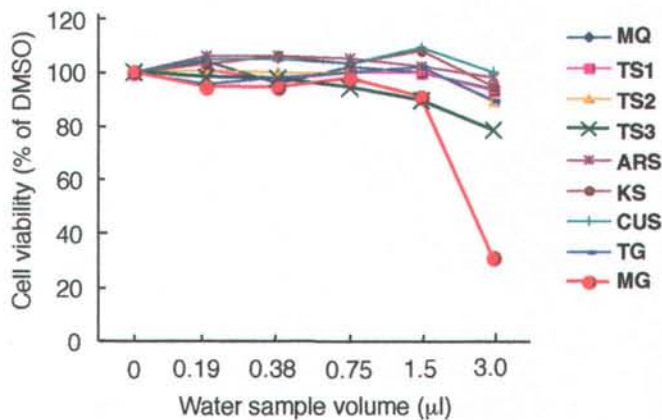


図4 水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用

培養液100 μl (5%血清含有) に、4000倍濃縮した水サンプルを各量添加し、AS3細胞を3日間培養した後、生存率をMTT法で解析した。各水濃縮サンプル処理後の生存率を、同量のDMSO溶液で処理された細胞の生存率に対する相対値で表した。

MQ; ミリQ水、TS1; 八王子市打越町下田公園水道水、TS2; 八王子市元本郷公園水道水、TS3; 八王子市川町よしの沢公園水道水、ARS; 板橋区赤塚水道水(利根川+荒川)、KS; 千葉市花見川水道水(利根川+印旛沼)、CUS; 千葉市亥鼻水道水(利根川+千葉県内ダム)、TG; 多摩川河川水(多摩川拜島桜堤付近)、MG; 都川河川水(千葉市都川大和橋付近)

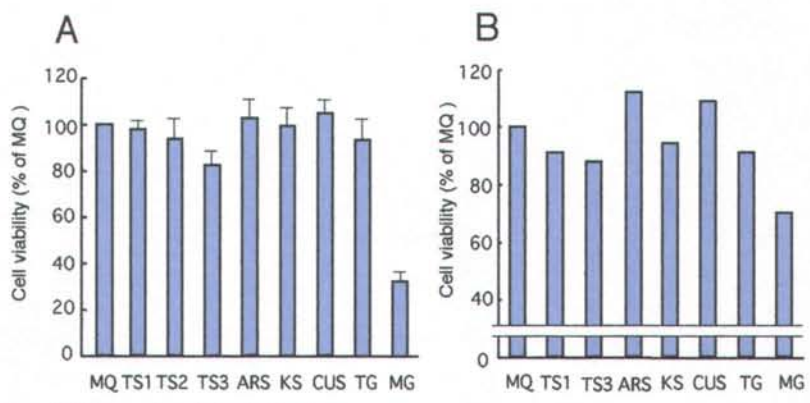


図5 水濃縮サンプルの細胞増殖阻害作用

各水濃縮サンプルを添加した培養液（5%血清含有）でAS3細胞を3日間培養した後、生存率をMTT法で解析した。各水サンプル処理後の生存率を、ミリQ水濃縮サンプルで処理された細胞の生存率に対する相対値で表した。

A：2003年7月に採取した各水の4000倍濃縮サンプルを細胞培養液の1/30量添加。データは平均値±標準偏差で表してある。

B：2002年10月に採取した各水の1700倍濃縮サンプルを細胞培養液の1/20量添加。

MQ；ミリQ水、TS1；八王子市打越町下田公園水道水、TS2；八王子市元本郷公園水道水、TS3；八王子市川町よしの沢公園水道水、ARS；板橋区赤塚水道水（利根川＋荒川）、KS；千葉市花見川水道水（利根川＋印旛沼）、CUS；千葉市亥鼻水道水（利根川＋千葉県内ダム）、TG；多摩川河川水（多摩川拝島桜堤付近）、MG；都川河川水（千葉市都川大和橋付近）

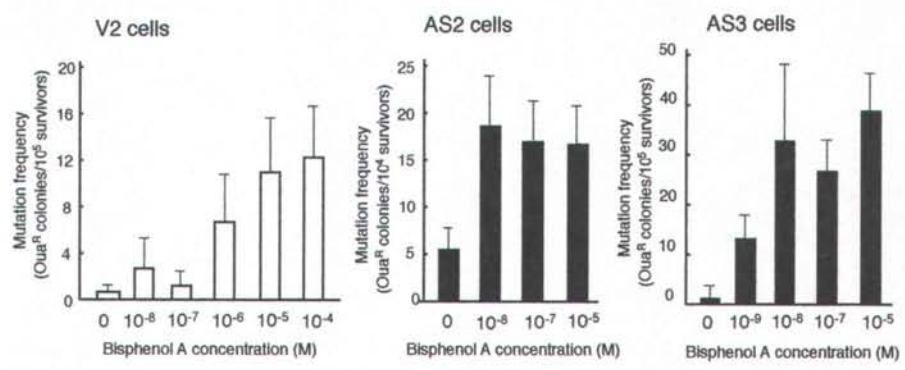


図6 GRP78発現抑制細胞AS2, AS3におけるbisphenol A誘導変異頻度

V2細胞およびAS2, AS3細胞を各濃度のbisphenol Aで処理後、各々の変異頻度を、ウバイン耐性細胞の出現頻度で調べた。

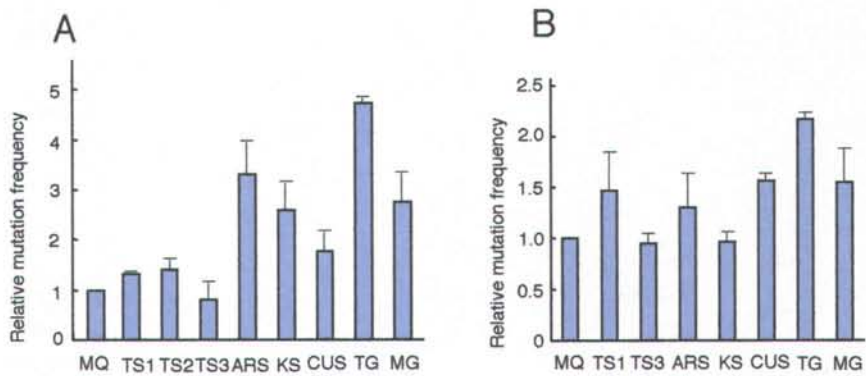


図7 水濃縮サンプルで処理されたAS細胞における変異誘導頻度
 各水濃縮サンプルを添加した培養（血清無添加）で16時間処理した後、通常の血清添加培地で4日間培養した。この細胞の変異誘導頻度をウバイン耐性細胞の出現頻度で調べた。各水濃縮サンプルで処理された細胞の変異頻度を、ミリQ水濃縮サンプルで処理された細胞の変異頻度に対する相対値で表した。
 A: 2003年7月に採取した各水の4000倍濃縮サンプル液をAS2細胞培養液の1/130量添加。
 B: 2002年10月に採取した各水の1700倍濃縮サンプル液をAS3細胞培養液の1/100量添加。
 データは平均値±標準偏差で表してある。

MQ; ミリQ水、TS1; 八王子市打越町下田公園水道水、TS2; 八王子市元本郷公園水道水
 TS3; 八王子市川町よしの沢公園水道水、ARS; 板橋区赤塚水道水（利根川+荒川）、
 KS; 千葉市花見川水道水（利根川+印旛沼）、CUS; 千葉市亥鼻水道水（利根川+千葉県内ダム）、
 TG; 多摩川河川水（多摩川拝島桜堤付近）、MG; 都川河川水（千葉市都川大和橋付近）

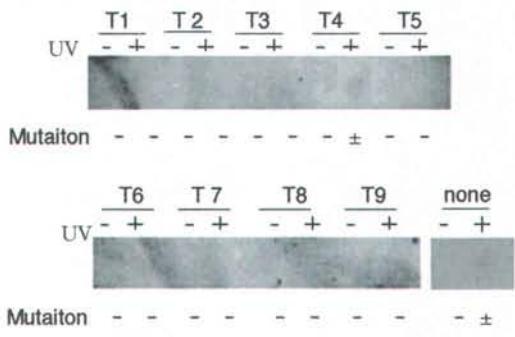


図8 ボランティアの血清で処理されたRS細胞における変異誘導頻度

RS細胞を、ボランティア血清を1/100量添加した培養液（10%血清含有）で24時間培養した後、通常の血清添加培地で4日間培養した。この細胞のK-ras コドン12遺伝子の変異を differential dot-blot hybridization 法により調べた。

T1~T9: 八王子在住の都立大学生9名の血清。
 UV+: ボランティア血清処理後、紫外線(10J/m²)照射有り。
 UV-: ボランティア血清処理後、紫外線照射なし。

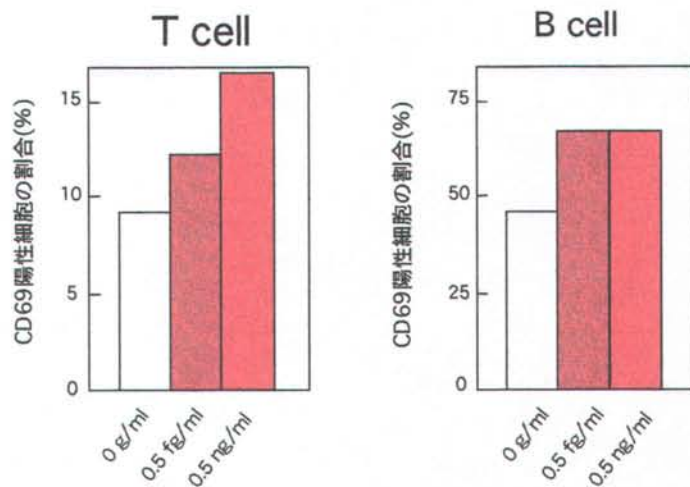


図9 ダイオキシンによるCD69陽性リンパ球数の増加

ダイオキシン(TCDD)で処理されたヒトリンパ球細胞のCD69の細胞表面発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。

表1 変異原性を有する化学物質によるヒトリンパ球細胞に対するプロテアーゼ誘発作用

Chemicals	Mutagenicity ^a	Protease Inducibility ^b
MNNG	+	+
4-NQO	+	+
ultraviolet C	+	+
saccharin	+	±
piperonyl butoxide	+	+
orthophenylphenol	+	+
chlorpropham	+	+
di(2-ethylhexyl)phthalate	+	+
bisphenol A	+	+
nonylphenol	-	-
4-(tert-octyl) phenol	-	-
styrene monomer	-	-
methyl methacrylate	-	-

^a 変異原性は、高頻度変異誘導が可能なRS細胞を各化学物質で処理した後、DNAを抽出し、癌遺伝子K-rasのコドン12の変異を、differential dot-blot hybridization 法による高感度変異検出系を用いて調べた。

^b プロテアーゼ誘発は、ヒトリンパ球を各化学物質で処理した後、標識したfibrinを基質として、その分解活性を指標として測定した。

「^たまがわ^{すい}けい^{いん}よう^{すい} ^{せい}ぶつ^きよう ^ちょう^さ
多摩川水系飲用水の生物作用の調査

^いでん^しじょう^{ほう} ^ふあん^{てい}か ^{めん}えき^{きのう}
遺伝子情報の不安定化と免疫機能

^かくらん ^{かん}
の攪乱に関する水質検査」

(研究助成・学術研究 VOL.33-NO.247)

著 者 ^きた ^{かず}こ
喜多 和子

発行日 2005年3月31日

発行者 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141