

多摩川の潜在的な希土類元素汚染と水生生物に対する
生体影響の解析

2019年

関本 征史

麻布大学 生命・環境科学部 准教授

共同研究者

麻布大学 生命・環境科学部 教授 伊藤 彰英

麻布大学 生命・環境科学部 講師 中野 和彦

麻布大学 獣医学部 講師 松井 久実

多摩川の潜在的な希土類元素汚染と水生生物に対する生体影響の解析

研究代表者 麻布大学 生命・環境科学部 准教授 関本 征史
共同研究者 麻布大学 生命・環境科学部 教授 伊藤 彰英
麻布大学 生命・環境科学部 講師 中野 和彦
麻布大学 獣医学部 講師 松井 久実

1. 概要

環境中に放出されたガドリニウム (Gd) などの希土類元素は、水生生物や水生生態系に何かしらの悪影響を及ぼす可能性が懸念される。本研究ではまず、多摩川の中流～下流域河川水および下水処理流入水を採取し、希土類 14 元素をキレート固相抽出法 / ICP-MS 法により定量した結果、Gd とランタン (La) の濃度異常が観察された。特に Gd 濃度は下水処理放流水合流後に急激に上昇することから、医薬品由来であることが示唆された。過去の報告と本研究結果の比較から、この 20 年の間に多摩川河川水中の Gd 濃度が 3~4 倍に増加していることが示された。Gd の環境中の変動幅や動態が明らかとなっていないため断言はできないが、河川水中に検出された Gd は医薬品 (MRI 造影剤) 由来であることから、河川中の Gd 濃度は今後も増加していく可能性が高い。今後、河川水中の Gd 濃度を注視していく必要がある。

次に、Gd 含有医薬品および採取した河川水の毒性影響を検討した。高濃度の Gd 含有医薬品はアフリカツメガエル由来 A8 細胞での遺伝子発現のかく乱と受精卵の発生異常 (体軸の屈曲および頭部形成不全を伴う奇形) を引き起こした。しかし、遺伝子発現変動を惹起する転写因子の活性化は認められなかった。さらに河川水を処理したところ、含まれる Gd の影響は明確ではないものの、転写因子 (AP-1 や NF- κ B) の活性化が見られ、受精卵の発生異常が観察された。Gd 単体を使った毒性試験の結果からは、現在の河川水濃度の Gd が水生生物 (アフリカツメガエル) 由来培養細胞および受精卵への毒性を示す可能性は小さいと思われた。しかし、本研究で採取した河川水そのものでも培養細胞および受精卵への毒性が認められた。これらの結果から、河川水中に含まれる Gd 以外の成分による影響、あるいはそれら成分と Gd との複合影響の可能性が考えられた。今後、水生生物に対して毒性を及ぼす河川中成分の探索研究と、Gd の関与を明らかにする必要がある。

2. 背景

カドミウム、水銀、亜鉛などの重金属類による河川の汚染は、水生生物やヒトに対して悪影響を及ぼすことから、環境基準が定められている。また、その他の重金属についても要監視項目・要調査項目として、その河川中濃度が注視されている。一方、日常的に測定が行われていない希土類元素によっても、潜在的な環境汚染が起こっていることが明らかとなってきた。例えば 2000 年前後から、国内外の都市域河川水中で希土類元素のガドリニウム (Gd) の存在度が隣接する他の希土類元素に比べて特

に高いこと（Gd の濃度異常）が報告されている。^{1~6}この要因としては、病院で人体断層写真撮影時に利用される MRI（磁気共鳴画像診断法：magnetic resonance imaging）の造影剤であるガドリニウム化合物によることが確認されている。この化合物は人体に投与された後、し尿として排出され、下水処理で完全に除去されずに環境水中に流出したと考えられ、水生生物や水生生態系に及ぼす影響が懸念されている。

最近でも国外では河川水中 Gd の濃度異常に関する研究は増加傾向にあり、化学形態別分析や水生生物への取り込み、水道水への混入など様々な観点から検討されている。⁷⁻¹²しかしながら日本国内では 2010 年頃までは東京、大阪、名古屋の都市河川水について報告されているが、2010 年以降はほとんど報告がない。MRI 保有台数が世界第 2 位で都市域に人口が集中する日本国内においても、Gd の潜在的汚染の現状を把握する必要がある。そこで伊藤・中野を中心に、Gd の潜在的汚染の現状把握を目的とした検討を行った。具体的には、多摩川河川水の中流域から河口域までのすべての希土類元素を、ICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析：Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry）による直接定量だけでなく、キレート固相抽出法による前濃縮を行った後 ICP-MS で測定をすることにより精密定量を試みた。この結果から希土類元素存在度パターン（希土パターン）を作成し、希土類元素の濃度異常について考察を行った。さらに、人為起源物質の流入を確認するために下水処理場の前後の河川水及び下水処理放流水の測定も行った。また、希土パターンから Gd の濃度異常の程度を異常度として数値化した。得られた結果から、希土類元素濃度変化を下水処理放流水から流入する人為起源元素の影響と関連づけて考察し、現在の多摩川における希土類元素の潜在的汚染の状況を評価した。

前述の通り、環境中に放出された Gd などの希土類元素は、水生生物や水生生態系に何かしらの悪影響を及ぼす可能性が懸念される。しかし、希土類元素の水生生物に対する生体影響評価を行っている例は著しく少ない。一部の化合物については、藻類の生長阻害や魚類・甲殻類などに対する毒性試験が行われているが、潜在的な汚染が進行していることが懸念される希土類元素の影響を考える上では、より軽微な生体影響を予測でき、毒性発現機構を類推できる実験系が望ましい。研究代表者である関本がこれまでに研究を進めてきた毒性学領域では、重金属類の毒性発現機構を解析する目的で、培養細胞や標的臓器での毒性バイオマーカー（毒性特異的に発現変動する遺伝子・タンパク質）を指標とした解析が進められている。この手法を環境中の希土類元素についても適用すれば、毒性バイオマーカーの発現変動を指標とした希土類元素による汚染の検出や、生体影響の評価が可能となる。

そこで関本を中心に、水生生物由来細胞における毒性バイオマーカーの発現変動を指標として、多摩川を潜在的に汚染している可能性がある希土類元素の影響を明らかにすることを目的とした。具体的には、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）肝臓由来 A8 細胞およびウナギ肝臓由来 Hepa-E1 細胞を用いて、種々重金属または Gd 含有医薬品処理による細胞毒性を Alamar Blue Assay により検討した。さらに、重金属または Gd 含有医薬品を処理した A8 細胞におけるバイオマーカー遺伝子発現変動を定量的リアルタイム PCR 法により測定した。さらに、これら遺伝子発現を制御している転写因子の活性変化を簡便にモニタリングできるルシフェラーゼレポーター細胞株を作成し、Gd 含有医薬品や環境水の生物影響を評価した。

さらに、松井を中心に、Gd が水生脊椎動物初期発生時の形態形成に及ぼす影響について、アフリカツメガエルを用い、3つの試験を行った。この試験では、アフリカツメガエル初期胚への Gd 曝露による死亡率や形態形成異常の発生率を指標として「Gd 毒性評価について、アフリカツメガエルへの影響が既知である重金属との比較」「Gd の無機態である塩化 Gd および医療用 Gd 製剤について急性毒性試験」「高濃度の Gd による潜在的汚染が報告された多摩川（東京都）の河川水を用い急性毒性評価試験」をそれぞれ行った。

3. 材料と方法

3-1. 分析に利用した装置

本実験における河川水中希土類元素の測定には、コリジョンリアクションセルを搭載した四重極型の誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS、アジレントテクノロジー製 7700x）を使用した。pH 測定には簡易型 pH メーター（堀場製作所製 Twin pH メータ）を用いた。タンパク定量時の吸光度測定および Alamar Blue Assay 時の蛍光測定にはマルチプレートリーダー（DS ファーマバイオメディカル社製 パワースキャン MX BT-SMATBL）を、ルシフェラーゼアッセイ時の発光測定にはマイクロプレート型ルミノメータ（ATTO 社製 AB-2350 フェリオス）を、遺伝子発現量の測定にはリアルタイム PCR システム（Applied Biosystems 社製 StepOne）をそれぞれ使用した。

3-2. 使用動物および細胞

アフリカツメガエル *Xenopus laevis* は雌雄生体を浜松生物教材（株）より購入して使用した。アフリカツメガエル肝由来 A8 細胞（RCB0773）、ウナギ肝由来 Hepa-T1 細胞（RCB1156、当初はティラピア由来としていたが、後日ウナギ由来であることが判明した）、ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞（RCB1886）は理研バイオリソースセンターより分与を受けた。マウス肝ガン由来 Hepa1c1c7 細胞（CRL-2026）は American Type Culture Collection（ATCC）より入手して使用した。

A8 細胞は基礎培地を L-15 培地（SIGMA-ALDRICH）とし、ウシ胎児血清（FBS、Bio sera 社、最終濃度 10%）、100 倍濃縮 抗生物質-抗真菌剤混合溶液（ナカライテスク、最終濃度 1 倍）を添加した増殖用培地にて、通常大気で密閉下、25°C で培養した。

Hepa-T1 は基礎培地を E-RDF 培地（極東製薬株式会社）とし、細胞培養用培地添加剤 RD-1（極東製薬株式会社）、ウシ胎児血清（FBS、Bio sera 社、最終濃度 10%）、100 倍濃縮 抗生物質-抗真菌剤混合溶液（ナカライテスク、最終濃度 1 倍）を添加した増殖用培地にて、通常大気で密閉下、28°C で培養した。

HepG2 および Hepa1c1c7 は基礎培地を DMEM（日水製薬株式会社）とし、ウシ胎児血清（FBS、Bio sera 社、最終濃度 10%）、100 倍濃縮 抗生物質-抗真菌剤混合溶液（ナカライテスク、最終濃度 1 倍）を添加した増殖用培地にて、5%CO₂ 条件下、37°C で培養した。

3-3. 試薬

検量線作成用には ICP-MS 測定において軽希土類元素から中希土類元素に、または中希土類元素から重希土類元素にスペクトル干渉をおこす恐れがあるため、各元素の関東化学製の原子吸光分析用標準溶液 (1000 mg L^{-1}) を軽希土類元素 (La、Ce、Pr、Nd)、中希土類元素 (Sm、Eu、Gd、Tb、Dy)、重希土類元素 (Ho、Er、Tm、Yb、Lu) の 3 つに分けて混合、希釈して、 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ の混合標準溶液を調製した。キレート固相抽出法における添加回収率実験で用いる添加溶液は SPEX 社製の希土類元素 16 元素混合標準液 (10 mgL^{-1} 均一) を希釈して 1 mg L^{-1} の混合溶液を調製して用いた。また、ICP-MS 測定において内標準補正に用いた内標準元素は Be、Re を選択し、関東化学製の原子吸光分析用標準溶液 (1000 mg L^{-1}) を用いて、Be $100 \mu\text{g L}^{-1}$ と Re $10 \mu\text{g L}^{-1}$ を含む内標準元素混合溶液 (1 M 硝酸溶液) に調製し、硝酸、酢酸及びアンモニア水は関東化学製の電子工業用試薬 (EL) を使用した。酢酸アンモニウムとして使用する場合は、酢酸とアンモニア水を等モル量ずつ混合し、それぞれの溶液で pH を調整して用いた。試料溶液の調製及び希釈、実験器具の洗浄にはすべて Millipore 社の超純水製造機で作製したミリ Q 水 (超純水) を使用した。

アフリカツメガエル培養細胞および個体に対するバイオアッセイには重金属化合物および医薬品を購入し、滅菌したミリ Q 水に溶解して使用した。塩化銅第二水和物 (99%)、塩化コバルト (II) (無水) (97%)、塩化カドミウム (99%)、塩化亜鉛 (97%、和光純薬工業)、塩化ニッケル (II) 六水和物 (99%)、塩化マンガン (II) 四水和物 (99.9%)、塩化水銀 (II) (99.5%)、塩化ガドリニウム六水和物 (99.9%)、塩化セリウム七水和物 (99.9%)、二クロム酸ナトリウム二水和物 (99%)、およびひ素標準液 (1 mg/mL) は和光純薬工業のものを購入・使用した。マグネスコープ (Gd-DOTA、ゲルベ・ジャパン株式会社)、マグネビスト (Gd-DTPA、バイエル薬品株式会社) およびオムニスキャン (Gd-DTPA-BMA、第一三共株式会社) はいずれも医療用のものを購入した。

3-4. 河川水試料

多摩川中流域から河口域までの採水地点を Fig. 1 に示す。河川水試料及び下水処理放流水の採水は、2017 年の 7 月から 12 月にかけて、中流域 (東京都福生市) から河口域 (東京都大田区) までの 13 地点 (TM-1~13)、下水処理放流水は東京都稲城市 (TM-ST-1)、東京都府中市 (TM-ST-2)、川崎市 (TM-ST-3) の 3 地点で採水した。採水した試料を化学分析に供する場合には、Millipore 製の孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルター (JH、オムニポアフィルター、直径 47 mm) で濾過後、0.1 M の硝酸溶液となるように濃硝酸を添加し、ポリエチレン製容器に保存した。いずれの試料も、硝酸を添加して 1 週間以上経過後分析に供した。

アフリカツメガエル培養細胞および受精卵を用いたバイオアッセイには、2018 年の 10 月および 2019 年の 2 月に多摩川の中流域 (TM1~5) で採取したものを使用した。採水した河川水は採取した河川水は大学に帰着後、すぐに -30°C にて凍結保存した。測定直前に溶解し、必要に応じて Millipore 製の孔径 $0.45 \mu\text{m}$ PVDF メンブランフィルター (マイレクス-HV フィルター) で濾過後、培地に混和して使用した。

3-5. キレート固相抽出法

キレート固相カラムは、12 mL のジーエルサイエンス社製の InertSep®用エンブテ
ィリザーバーにキレート固相（ジーエルサイエンス社製 InertSepME-2）を 250 mg
充填して作成した。キレート固相カラムのコンディショニングは、エタノール 5 mL、
2 M 硝酸 12 mL、超純水 24 mL、0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 5 mL を順次通液し、
十分に洗浄してから使用した。

添加回収率試験用の希土類元素混合標準液を $1 \mu\text{gL}^{-1}$ となるように河川水に添加し
た添加試料、河川水のみが無添加試料、それぞれ 50 mL をポリプロピレン製チュー
ブ（ジーエルサイエンス社製 デジチューブ）に分取し、キレート固相抽出法で脱塩
濃縮を行った。キレート固相抽出法による脱塩濃縮操作は以下の通りである。

まず、すべての試料に pH を目視でも確認できるよう 0.5 %メチルレッド溶液を 50
 μL 加えた。また、緩衝作用を得るために 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝溶液を 5 mL
加えた。すべての試料を約 8.0 M アンモニア水溶液で $\text{pH}=5.0\pm 0.1$ に調整した後、予
めコンディショニングを行ったキレート固相カラムに流速 1 mL min^{-1} で通液するこ
とで微量金属を捕集した。その後、カラム中に残在している主成分元素を洗浄するた
め、超純水 50 mL を通液した。最後に 1 M 硝酸 5 mL（2.5 mL \times 2 回）でカラムに捕
集吸着された希土類元素を溶出し、10 倍濃縮液を得た。無添加試料については独立 3
回の分析を行った。

また、添加試料と無添加試料中の各元素濃度と濃縮後の容量（5 mL）から濃縮液
中の各元素の絶対量を求め、各元素について添加試料の絶対量から無添加試料の絶対
量を引いた量を、実際に添加した絶対量（各 50 ng）に対する割合をキレート固相抽
出法における回収率（%）として、測定値の補正に用いた。

3-6. ICP-MS 測定法及び測定条件

3-5 で添加試料及び無添加試料についてキレート固相抽出を行って得られた濃縮液
を ICP-MS で測定した。Table 1 に ICP-MS の測定条件を示す。

ICP-MS 測定においては、Be、Re を内標準元素として用いる内標準補正を行った。
ICP-MS 測定時に試料溶液と一定量混合しながら装置内に導入した。

また、Table 2 に河川水中希土類元素を定量する際に見られるスペクトル干渉と干
渉補正係数を示す。Table 2 に示すように、試料溶液中の Sb が $^{123}\text{Sb}^{16}\text{O}^+$ として $^{139}\text{La}^+$
に、Ba が $^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$ として $^{153}\text{Eu}^+$ に、Gd が $^{141}\text{Pr}^{16}\text{O}^+$ として $^{157}\text{Gd}^+$ に、Tm が $^{153}\text{Eu}^{16}\text{O}^+$
として $^{169}\text{Tm}^+$ に、Lu が $^{159}\text{Tb}^{16}\text{O}^+$ として $^{175}\text{Lu}^+$ に、それぞれスペクトル干渉を引き
起こすため、これらの元素の信号強度をスペクトル干渉補正係数法⁴⁾により補正した。

3-7. 細胞死アッセイ (Alamar Blue Assay)

各細胞に対応する培地中に HepG2 細胞、Hepal1c7 細胞及び A8 細胞は 2×10^4
cells/mL、Hepa-T1 細胞は 1×10^4 cells/mL、となるようにそれぞれ懸濁した後、96
ウェルプレートの各ウェルに 100 μL ずつ播種し、上記の条件で 24 時間前培養した。
前培養後、12 種類の金属化合物をそれぞれ最終濃度で添加した。試薬添加から 24 時
間後に培地を取り除き、80 μL の PBS で洗浄、その後、5% Alamar Blue 溶液
（Invitrogen）を含んだそれぞれの培地を各ウェルに 100 μL ずつ添加し、各細胞の

培養条件下で3時間培養した。その後、上清 80 μ L を蛍光測定用 96 well Black well プレートへ移し、マルチプレートリーダーで蛍光強度（励起波長：535 nm、測定波長：595nm、感度：60）を測定した。

3-8. 遺伝子発現量の測定 (RT-qPCR)

試薬処理をした細胞より総 RNA をセパゾール（ナカライテスク）を用いて単離した。総 RNA 量は吸光度をもとに濃度を計算し、RNase Free 水（ナカライテスク）を加え濃度を均一に調整し、総 RNA 溶液とした。総 RNA 溶液を 65°C で 15 分加温して熱変性させたのち、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を添加し、25°C で 10 分間、37°C で 120 分間、85°C で 5 分間加温することにより逆転写酵素反応をおこなった。反応終了後、RNase Free 水を加え希釈し、RT 反応液とした。この RT 反応液に Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) と遺伝子特異的プライマーを加え、StepOne (Applied Biosystems) を用いて qPCR 反応を行った。

3-9. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

転写因子の活性化を測定可能なルシフェラーゼレポータープラスミドとして、芳香族炭化水素受容体 (AhR) の結合配列 (XRE) を含んだ XRE-Luc、転写因子 NF- κ B の結合配列を含んだ pGL4.32、転写因子 p53 の結合配列を含んだ pGL4.38 および転写因子 AP-1 の結合配列を含んだ pGL4.44 を用いた。XRE-Luc は関本が別研究により作成したものを使用した。また、pGL4.32、pGL4.38 および pGL4.44 は Promega 社のものを購入し使用した。

A8 細胞に対して、上記ルシフェラーゼレポータープラスミドを Lipofectamine LTX Reagent (ThermoFisher Scientific 社) を用いて遺伝子導入した。導入した細胞を再度播種し、500 μ g/mL の Hygromycin B を含んだ培地により 3 週間培養することで、ルシフェラーゼレポーター遺伝子が安定的に発現した A8-XRE-Luc、A8-pGL4.32、A8-pGL4.38 および A8-pGL4.44 を得た。これらをレポーター細胞とする。各レポーター細胞株を 1×10^4 cells/100 μ L 培地/ウェルとなるように 96 穴プレートに播種し、24 時間前培養した。24 時間後、重金属や 50%環境水を含んだ培地を処理し、6 時間培養した。処理後、培地を除去し、PBS で洗浄した後に、40 μ L の 1 \times Reporter Lysis Buffer (Promega) を加え 15 分加温後、-80°C で凍結することによって細胞溶解液を調製した。この細胞溶解液 10 μ L に対して 200 μ L のルシフェラーゼ基質液 (Gold Bio プロトコールにより作成) を添加し、生じた発光をルミノメーターにより測定した。また、BCA-protein assay kit (TAKARA) を用いて細胞溶解液中のタンパク濃度を測定し、タンパクあたりの発光強度を算出した。

3-10. アフリカツメガエル受精卵を用いた初期発生の観察

ガドリニウム (Gd) が水生脊椎動物初期発生時の形態形成に及ぼす影響について、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用いた試験を行った。アフリカツメガエルの卵は発生後約 72 時間で孵化に達する。このことから、本試験は受精確認後から 3 日目までのアフリカツメガエル初期発生に対する急性毒性評価試験として行った。人工

授精によって発生ステージの揃った受精卵を得、実験に供した。1匹のメスから1回の採卵で約200~300卵が得られることから、実験は同一クラッチ卵を複数の条件群に分けて設定した。人工授精後の卵は発生用バッファー中で20℃下、12時間の明暗周期で発生させた。受精の成立は受精後1~1時間半後に起こる卵割の有無によって判別し、受精卵のみを実験に供した。親の卵の状態が受精率及び発生率へ及ぼす影響を少なくするため、1クラッチの受精率が80%以上のもののみを実験に用いた。

実験Ⅰ（Gd と他の重金属を用いた急性毒性比較試験）では受精卵を無処理で暴露実験に用い、実験Ⅱ（FETAX法を用いたGd及び医療用Gd製剤の影響評価）およびⅢ（多摩川河川水を用いた試験）では脱ゼリー処理を行って卵周囲のゼリー層を除去した。実験Ⅰ及びⅢは10cmシャーレに40mLの暴露水を準備し20卵程度の卵数で実験を行い、実験ⅡはFETAX法（ASTM、1993）を用い、2mLの暴露水に1個の受精卵で試験を行った。発生ステージ表はGosner（1960）を用い、試験後の個体はホルマリン浸漬標本とした。

結果と考察

4-1. 多摩川河川水中希土類元素濃度

Table 3 に 2017 年 7 月に採水した多摩川中流域の下水処理放流水流入後の試料（Fig. 1 の採水地点 TM-5）のキレート固相抽出法 / ICP-MS 法により測定した 14 元素の定量値、独立 3 回測定により得られた相対標準偏差（RSD）、キレート固相抽出操作における添加回収率、空試験値、分析検出限界を示す。分析検出限界は、ICP-MS の装置検出限界からキレート固相抽出操作における濃縮倍率（10 倍）と回収率を考慮して求めた。装置検出限界は ICP-MS でブランク溶液（1M 硝酸溶液）を 10 回測定したときの各元素の m/z における信号強度の標準偏差（ σ ）の 3 倍（ 3σ ）に相当する濃度とした。本法における希土類元素の分析検出限界は、0.01~0.03 ng L^{-1} であり、環境水中の希土類元素を定量する上で十分低い値であった。Table 3 からわかるように、TM-5 で採水した多摩川河川水中希土類元素は Gd の 65.0 ng L^{-1} から Eu 及び Tb の 0.41 ng L^{-1} ですべて希土類元素が、相対標準偏差（RSD）2~10% の良好な分析精度で定量することができた。キレート固相抽出操作における希土類元素の添加回収率は 100~120% であり、元素の回収は定量的に行われたと考えられる。また、空試験値はいずれの元素も 0.1 ng L^{-1} 以下あるいは検出限界以下であり、定量値と比べて無視できる濃度レベルであった。

4-2. 同一地点で異なる時期に採水した多摩川河川水中希土類元素濃度

Table 4 に同一地点(TM-1)で異なる時期に採水した多摩川河川水中 Gd 濃度を示す。Table 4 からわかるように、下水処理放流水合流後の TM-5 では、採水時期により Gd 濃度が 46.1~112 ng L^{-1} まで変化していることが明らかになった。採水時期によりかなり濃度に違いがあるが、TM-1~TM-4 の下水処理放流水が合流していない地点での Gd 濃度が 1~3 ng L^{-1} 程度であったため、下水処理放流水の合流により、常に高い値で推移していることが明らかになった。

4-3. 多摩川河川水中希土パターンと濃度異常

各河川水試料中希土類元素の相対存在量を比較し、濃度異常の有無を確認するために希土パターンを作成した。Fig. 2 に多摩川河川水中希土パターンを示す。希土パターンを作成する際、通常は Leedey Chondrite 隕石中の希土類元素濃度で規格化するが、ここでは、各河川水試料中希土類元素濃度をオーストラリアの頁岩 (Post-Archean Australian average shale : PAAS) 中希土類元素濃度で規格化した。環境水では、頁岩により規格化した希土パターンが良く用いられる。

Fig. 2 からわかるように、下水処理放流水が流入する前の試料 (TM-1~TM-4) では La~Lu まで滑らかな直線となる環境水特有の希土パターンを示したが、下水処理放流水合流地点より下流の試料 (TM-5~TM-13) では Gd の存在度が隣接する他の希土類元素よりも明らかに高いことが確認された。この Gd の濃度異常は、TM-5 から TM-16 の河口域試料までのすべての試料で確認された。これまでの国内外で報告されているように、都市域河川水に見られる Gd の正の濃度異常は病院で MRI の造影剤として人体に投与された Gd の化合物が、し尿として排出された後、下水処理場でも完全に除去されずに、河川水に流出したために引き起こされたと考えられる。

Fig. 3 に多摩川の下水処理放流水の希土類元素存在度パターンを示す。Fig. 3 からわかるように、多摩川において下水処理放流水から Gd の正の濃度異常が確認された。さらに、Fig. 3 から Gd の他に La の濃度異常が確認された。同様の濃度異常はドイツの河川水でも観測されており、工業用の触媒起源と推察されている。

4-4. Gd 濃度及び Gd 異常度の地点間の比較

Fig. 4 に多摩川河川水中の中流域から河口域における地点間の Gd 濃度変化を図示する。Fig. 4 からわかるように、明らかに下水処理放流水合流後に Gd の濃度が急激に上昇し、その後減少することを繰り返すジグザグの分布を示した。特に 4ヶ所の下水処理放流水が合流した直後の TM-5 で最も濃度が高く、このときの Gd 濃度は 65.0 ng L^{-1} であった。この値は本研究における最上流の採水地点である TM-1 と比べると約 40 倍高い値である。また、TM-9 において同地点での過去の文献値¹³⁾と比較すると、約 4 倍高い値を示した。したがって、17 年前に比べて Gd の潜在的汚染がより進行した可能性が示唆された。しかし、4-2 に示したように、採水時期により Gd 濃度はかなり異なるため、変動幅を明らかにしたうえで議論する必要がある。また、どの地点も下水処理放流水と河川水の合流後は Gd 濃度が減少していることから、Gd 濃度が低い河川水で希釈、あるいは懸濁粒子に吸着して取り込まれた可能性があると考えられる。

しかし、このように地点間や過去のデータと Gd 濃度を比較する場合、元々含まれている希土類濃度レベルが天候などによって左右されるため、Gd の潜在的汚染の進行度合を比較する際には注意が必要である。そこで、各河川水試料間、及び過去のデータの Gd の濃度異常の比較を客観的に行うために、Gd の濃度異常の大きさを Gd 異常度として数値化することを試みた。

多摩川中流域に位置する TM-5 の値を用いて、Fig. 5 に Gd 異常度の算出法を例示する⁴⁾。Gd 異常度は希土類元素存在度パターンにおける正の Gd 異常度を数値化したもので、下式のように定義した。

$$\text{Gd 異常度} = \{ [\text{Gd}]_{\text{shale}} - [\text{Gd}]_{\text{'shale}} \} / [\text{Gd}]_{\text{'shale}} \times 100 (\%)$$

[Gd] _{'shale} は Gd の濃度異常がないと仮定した場合の近似規格値である。各河川水試料中の Gd 濃度の PAAS 規格化値を [Gd] _{shale}、Gd 濃度異常が全く存在しないと仮定した場合の理論的な（計算上の）規格化値を [Gd] _{'shale} とした。[Gd] _{'shale} は Gd と原子番号が隣接する元素の中から、Sm、Tb、Dy を選び、これらの元素の PAAS 規格化値を用いて最小二乗法で直線近似して求めた。ただし、Eu は Gd に隣接するが、濃度異常が見られる地点もあったため、直線近似には用いなかった。また、過去のデータを用いる際、Tb のデータがなかった地点、あるいは Sm の値が隣接する他の希土類元素よりも高い値を示していた地点では例外として Nd を用いて直線近似した。TM-5 での異常度は 3065 だった。この値は清浄地点の TM-1 と比べ著しく高い値を示した。

Fig. 6 に多摩川の上流から下流にかけての Gd 異常度を示す。Fig. 6 からわかるように、TM-1～TM-4 多摩川の下処理放流水の合流がない中流の地点では Gd 異常度が 7～11 と低く、Gd の濃度異常はほとんど観測されなかったが、Fig. 5 の Gd 濃度の場合と同様に下処理放流水合流後に Gd 異常度の上昇が見られた。しかし、Fig. 5 に示す Gd 濃度では、TM-5 が最も高い値を示したが、Fig. 6 に示す Gd 異常度では、TM-11 で 6107 と最も高い Gd 異常度を示し、Fig. 5 の Gd 濃度が最も高かった地点と Fig. 6 の Gd 異常度が最も高かった地点が異なる結果となった。TM-5 では、Gd 濃度が高いが同時に他の希土類元素濃度も上昇したことが示唆される。これに対して TM-6 では Gd 濃度の上昇は比較的穏やかに起こるが、他の希土類元素と比べると Gd の濃度異常の程度が比較的高いといえる。このことから、河川水中の Gd 濃度が高くても必ずしも異常度も高いとは限らないことがわかる。

4-5. Gd 異常度の過去データとの比較

Table 5 に本研究で測定した多摩川における Gd 濃度と Gd 異常度を過去の文献データとの比較した表を示す。Table 5 からわかるように、河口 (TM-13) においては、Y. Nozaki²⁾らの文献では 1995 年の Gd 濃度は 3.93 ng L⁻¹、Gd 異常度は 151 であったが、2017 年の Gd 濃度は 11.5 ng L⁻¹、Gd 異常度は 580 と 22 年の間に Gd 濃度は約 3 倍、Gd 異常度も著しく高くなった。また、中流 (TM-9) においては、赤木らの報告¹³⁾によると 2000 年の Gd 濃度は 6.32 ng L⁻¹、Gd 異常度は 169 であったが、2017 年の Gd 濃度は 24.9 ng L⁻¹、Gd 異常度は 3895 であり、17 年の間に Gd 濃度は約 4 倍、Gd 異常度も著しく高くなっていた。よって、この 20 年程の間に多摩川では中流域、河口域共に、Gd 濃度と Gd 異常度が上昇していることが分かった。

4-6. 重金属処理および Gd 含有医薬品処理による *in vitro* 細胞毒性の検討

環境試料水中には希土類元素の他にも、様々な有機物や無機物が存在しているため、その水生生物への毒性は複合的なものとなり、解析は困難を極める。そこでまず、希土類元素そのものが培養細胞株に毒性を有するか否かを、希土類元素（純物質）を用いて解析した。なお、*In vitro* 試験では、水生生物細胞株としてアフリカツメガエル肝由来 A8 細胞とウナギ肝由来 Hepa-T1 を、また、比較対象の哺乳類細胞株としてヒト肝がん由来 HepG2 細胞とマウス肝がん由来 Hepa1c1c7 細胞をそれぞれ用いた。

上記細胞株にまず、希土類元素 (Ce と Gd) 無機塩、環境基準が定められている重金属 (As、Cd、Cr、Hg、Pb および Zn) 無機塩、さらに、要監視・調査項目となっている重金属 (Co、Cu、Mn および Ni) 無機塩を処理し、その細胞毒性を比較した。その結果、As、Ce、Co、Cu、Gd、Ni、Mn、Pb および Zn は高濃度 (As のみ 5 μM 、他は 100 μM) を処理しても顕著な細胞毒性を示さなかった。Hg は全ての細胞株で強い細胞毒性 (生存率 20%以下) を示した。さらに、Cd および Cr は HepG2、Hepalcl7 および Hepa-T1 に対して強い細胞毒性を示すのに対し、Cr は A8 細胞に対して弱い細胞毒性 (生存率 40%程度) しか示さず、また、Gd は A8 細胞に対して細胞毒性を示さなかった (Figs. 7 および 8)。そこで、Cd、Cr および Hg の 24 時間および 72 時間処理による細胞毒性の濃度依存性を検討した。A8 細胞では、Cd による細胞毒性が 24 時間では最大濃度 (100 μM) でも認められなかったが、72 時間では 100 μM 処理群でのみ細胞毒性が認められた。一方、他の細胞の 24 時間処理では、12.5~25 μM の Cd により細胞毒性が観察された。また Cr は、A8 細胞に対して 24 時間よりも 72 時間でより低濃度から毒性を示すが、その作用は Hepa-T1 で見られるものより弱いことが確認された (Figs. 9A および B)。これらの結果から、哺乳類由来細胞と水生生物由来細胞の間でいくつかの環境汚染重金属の毒性影響が異なることが示された。特に、アフリカツメガエル肝由来 A8 細胞は Cd に低感受性である可能性が考えられた。この感受性の違いは、用いた細胞間での「重金属の取込・排泄」「重金属毒性発現に関わる細胞内因子」「培養条件」の相違に起因することが考えられた。

さらに、Gd を含有する医薬品であるガドテル酸メグルミン (Gd-DOTA、商品名：マグネスコープ)、ガドジアミド水和物 (Gd-DTPA-PMA、商品名：オムニスキャン)、ガドペンテト酸ジメグルミン (Gd-DTPA、商品名：マグネビスト) の細胞毒性についても検討した。その結果、これら医薬品は Gd 無機塩と同様、試験した 4 細胞株に対して 100 μM 、72 時間まで細胞毒性を示さなかった (Figs.9C および D)。この結果から、Gd (無機塩) および Gd 含有医薬品は顕著な細胞毒性を持たないことが明らかとなった。今回試験した最大濃度 (100 μM) は Gd 量として 15.7 mg/L に相当し、実験 4-1 で得られた環境水中の最大濃度 (65 ng/L) の約 24,000 分の 1 に過ぎない。このことを考えると、環境中の Gd 単体では細胞死を基盤とした毒性を起こす可能性は低いものと思われる。

4-7. 重金属処理および Gd 含有医薬品処理によるバイオマーカー遺伝子の発現変動

前項 4-6 の検討から、Gd は顕著な細胞毒性を示さないことが明らかとなった。ところで、様々な化学物質の処理により、アフリカツメガエルの形態形成異常が生じるが、その際に様々な遺伝子の発現変動が起こることが知られている。¹⁴⁻²²⁾ そこで、A8 細胞を各種重金属で 24 時間処理し、Table 6 に示した各種遺伝子の発現変動を毒性のバイオマーカー (指標) として、各種重金属が細胞に対してどのような作用を示すのかを qPCR 法により検討し、各種重金属の分子レベルでの毒性影響を解析・考察した。Fig. 10 には内分泌かく乱作用の指標となるアンドロゲン受容体 (Androgen receptor : AR) とダイオキシン様作用の指標となるシトクロム P450IA7 (CYP1A7)

の遺伝子発現量を示した。なお、遺伝子発現量は内部標準である *RPL27* の発現量で標準化し、対照群との相対比で示した。

AR はコントロールと比較し、Pb、Ni、Mn、Gd 以外の重金属暴露細胞での発現減少がみられ、特に Cu では対照群の 0.1 倍以下の顕著な減少が確認された。その一方、Gd 処理では対照群の 10 倍程度の顕著な増加が確認された。*CYP1A7* は Cu や Cr 処理で発現量の減少が確認される一方、Gd 処理時には対照群の 5 倍以上の顕著な増加が確認された。各遺伝子の発現量をレーダーチャート化して比較したところ、Cu では全遺伝子の発現が対照群よりも低下する一方で、Gd は全遺伝子の発現が対照群よりも増加することが示された。これらのことから、Gd（無機塩）は顕著な細胞毒性を持たないものの、遺伝子発現レベルでは Cu とは全く逆の、特徴的な遺伝子発現パターンを示すことがわかった。次に、Gd（無機塩）および Gd 含有医薬品を A8 細胞に 24 時間処理し、バイオマーカー遺伝子の発現をレーダーチャート化して Fig. 12 に示した。その結果、Gd 含有医薬品はいずれも Gd と同様の遺伝子発現パターンを示した。

バイオマーカー遺伝子の発現変動を指標とした検討から、高濃度の Gd および Gd 含有医薬品はダイオキシン様作用や内分泌かく乱作用を示す可能性が示唆された。実際にヒト神経培養細胞を用いた検討では、Gd 含有医薬品が恒常性ホルモン（トリヨードチロニン：T3）の作用をかく乱することで神経分化を阻害することが示されており、²³⁾ 本研究結果との関連性に興味を持たれる。環境中濃度レベル Gd によるバイオマーカー遺伝子の発現変動はまだ明らかに出来ていないが、Gd は様々な転写因子を活性化／抑制することで、長期的には種々遺伝子の発現変動を介して多様な毒性を惹起する可能性が考えられた。

4-9. レポーター細胞株を用いた環境水および Gd 含有医薬品の影響評価

レポーター遺伝子アッセイは、環境中化学物質のモニタリングに繁用されている。研究代表者である関本も実際にこれまで、ヒトや実験動物由来細胞株を用いてダイオキシン様化合物のレポーター細胞株を樹立してきた。²⁴⁾²⁵⁾ そこで、この手法を応用し、様々なレポータープラスミドを導入した A8 細胞を作成することで、毒性バイオマーカー遺伝子発現に関連する転写因子の活性化を評価することを試みた。転写因子である AhR、AP-1、NF- κ B および p53 の活性化を測定できるルシフェラーゼレポータープラスミドを A8 細胞に導入し、選択培地で培養することにより安定発現細胞を作成した (Fig. 12)。これに、サンプリングした多摩川の環境水および種々濃度の Gd 化合物 (GdCl₂、Gd-DOTA、Gd-DTPA および Gd-DTPA-PMA) を添加し、6 時間後における各転写因子の活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

A8 レポーター細胞に、2019 年 2 月にサンプリングした多摩川 6 地点の河川水 (TM-1、TM4、TM4D、TM5U、TM5) および TM4~TM5 の間に放流される放流水 (ST-A および ST-B) を培地中に 50% となるように加え処理し、転写因子の活性化 (ルシフェラーゼ活性の変化) を測定した。NF- κ B 活性および AP-1 活性は放流水 (ST-A) で対照の 3 倍以上の高値を示し、この放流水が流入する河川水 (TM4D、TM5U および TM5) でも高値を示した。また、これらの活性化はろ過処理によっても変化しなかった (Figs. 13C および D)。一方、AhR 活性および p53 活性は放流水

(ST-A) でわずかに高値を示したが、この活性化は 0.45 μm フィルターによるろ過処理を行うことにより消失した。また、河川水では顕著な活性の変動は見られなかった (Figs. 13A および B)。

バイオアッセイで使用した環境水中の Gd 濃度は未測定ながら、4-2 の検討から環境水 (TM-5) および放流水 (ST-A) には比較的高濃度で Gd が含まれていることが推定される。下水処理放流水が流入する前の試料 (TM-1 および TM-4) に比べて、下水処理放流水の流入が想定される試料 (TM4D、TM5U および TM5) あるいは放流水 (ST-A) の処理により転写因子 AP-1 および NF- κ B の活性化が認められたことから、この環境水や放流水に含有される Gd 化合物にも同様の作用があることが懸念される。そこで、Gd 化合物を用いて、これら転写因子活性化への影響を検討した。ダイオキシン様作用を持つ有機化学汚染物質である 3-メチルコランスレン (MC) でこれら転写因子の活性化が濃度依存的に認められたが、環境中に残留していることが知られる抗菌薬トリクロサン、毒性重金属として知られる Cd には顕著な活性変動は認められなかった (Fig. 14)。また、いずれの Gd 化合物 (GdCl₂、Gd-DOTA、Gd-DTPA および Gd-DTPA-PMA) を最大濃度 (100 μM) まで処理しても活性の変化は認められなかった (Fig. 15)。

Gd 化合物単独処理では転写因子の活性化が認められないことから、環境水や放流水処理による転写因子の活性化は、環境水や放流水中に含まれる他の潜在的汚染物質による作用、あるいは他の潜在的汚染物質と Gd による複合影響により起こっている可能性が考えられた。また、放流水 (ST-A) が有する AP-1 活性および NF- κ B 活性がフィルター処理により活性が低下することから、その活性化を示す成分の一部は粒子吸着態であることが示唆された。

4-10. Gd と他の重金属を用いた *in vivo* 発生影響評価

Gd と他の希土類元素の影響を比較するため、塩化 Gd、塩化カドミウムおよび二クロム酸ナトリウムを曝露対象とした。塩化カドミウムはアフリカツメガエル初期発生への影響が既知であるため、毒性評価の陽性対照物質とした。各物質の曝露濃度は 50、75、100 μM および 0 μM (陰性対照群) とした。

結果、3つの曝露群のうち、陽性対照とした塩化カドミウム曝露群において最終死亡率は全ての設定濃度で 100%となった。一方で、塩化 Gd 曝露群の最終死亡率は、17-24%、二クロム酸カリウム曝露群の最終死亡率は、11-45%であった。陰性対照群における最終死亡率は 16%であった (Table 7)。陰性対照群と Gd 曝露群間の死亡率に有意な差はみられなかった。塩化 Gd 曝露群では奇形個体が、二クロム酸ナトリウムでは発生遅延の個体が観察された。このことから、Gd は水生脊椎動物の生存率に対する影響は少ないことが示唆された。しかし、奇形の発生がみられたことから、水生脊椎動物の初期発生において何らかの影響を及ぼす可能性も残された。

4-11. FETAX 法を用いた Gd 及び医療用 Gd 製剤の *in vivo* 発生影響評価

次に、急性毒性試験である frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)²⁶⁾ の変法を用い、胚に対する影響をより直接的に試験できる方法で塩化 Gd および Gd 化合物 (Gd-DOTA) の急性毒性試験を行った (ASTM, 1993)。無機態 Gd、両物

質ともに曝露濃度の設定は各々、25、50、75、100、300 μM および 0 μM (陰性対照) とした。実験中の換水は行わず、20°C 下で st8-9 (桑実胚期-胞胚期後期) から受精 72 時間後まで観察した。また、飼育水として使用した FETAX 溶液は実験前に濾過滅菌しエアレーション処理を行った。使用した胚は、脱ゼリー後、正常に発生している胚を選別して用いた。

結果、塩化 Gd およびマグネシウムコープのすべての曝露群において、胚の最終死亡率は 10% 以下であった。陰性対照群における最終生存率は 6% となった (Fig.16)。塩化 Gd および Gd-DOTA 曝露群において奇形個体が出現した。陰性対照群においても奇形の発生がみられたが、その表現形は陰性対照群と Gd 曝露群では異なっていた (Fig.17)。

陰性対照群で確認された奇形は、身体の一部の浮腫、体軸伸長異常、体軸の腹側側への屈曲、頭部形成異常であった。曝露群では、陰性対照群に同様の奇形に加え、小眼症、全身性の重度の奇形がみられた。また、体軸異常の中でも腹部と尾部の境界付近が屈曲する奇形は、曝露群のみで観察された (Fig. 18)。

上記の中で、塩化 Gd およびマグネシウムコープ曝露群において陰性対照群より多く観察された奇形は、体軸の腹側への屈曲と、頭部形成異常 (頭部欠損、眼球の欠損または小眼症) であった。ただし、奇形の発生率や奇形の重篤性は、親個体のロットや試験によって差があり、一様な傾向はみられなかった。塩化 Gd およびマグネシウムコープ曝露群の奇形率を比較すると、Gd-DOTA よりも塩化 Gd 曝露群において奇形率が高かった (Figs. 16 および 17)。

身体の一部に生じる浮腫の発生時間は st.13-14 (神経胚; 受精後 24 時間後) から st.21 (孵化; 受精後 72 時間) ではじめて観察されるまで様々であった。体軸異常および伸長異常に関しては、伸長が完了する st.19 (受精後 48 時間) から現れた。頭部の形成異常に関しては、眼球形成後である st.19 (受精後 48 時間) から眼球欠損個体が確認され始めた。小眼症の個体は、眼球形成の初期には正常個体と見分けがつかず、st.20 (受精後 51-53 時間) で他個体との差が顕著になった。奇形によっては生存してはいるが発生ステージが止まる現象が確認された。軽微な体軸形成異常は、st.19 (受精後 48 時間) に奇形として観察された後、st.21-22 (受精 72 時間後) では観察されなくなったこともあった。

実験 4-11 の曝露群において観察された体軸の屈曲および頭部形成不全は、特に曝露群において多く観察されたため、Gd の影響を受けている可能性が示唆された。陰性対照群においても奇形個体は出現したため、本来奇形となる因子を持っていた個体が Gd によって奇形が誘発された可能性も考えられる。また、小眼症および腹側への体軸の屈曲は陰性対照群では観察されなかったため、他の奇形の表現形よりも Gd の影響を反映している可能性がある。なお、Fig. 16 および Fig. 17 に示す結果から、これらの奇形発生率は、塩化 Gd において濃度依存的に高くなることが考えられる。本実験における塩化 Gd と Gd-DOTA による奇形率の差は、Gd の化学的形態の違いに起因するものと考えられる。これは、実験に使用したマグネシウムコープは医薬品であり、生体への影響の少ないよう Gd にキレート構造を付加し製造されているため、無機態である塩化 Gd よりも化学反応の反応性が抑えられ、急性毒性が小さくなったと考えられるためである。親個体や実験毎の奇形発生率の差異は、胚のダメージの状態によ

って Gd の及ぼす影響が変化したためと考えられる。これは、親個体や卵の状態の差、脱ゼリー処理で胚本体が受けるダメージの差等が考えられる。

4-12. 多摩川河川水を用いた *in vivo* 発生影響評価

多摩川河川水がアフリカツメガエル初期発生に及ぼす影響を評価するため、多摩川の複数ポイントで採水された水を用いた試験を行った。卵の脱ゼリー後、1 シャーレあたり 40 mL の試験水を加え、1 シャーレ卵数 30 個、換水は行わず 20°C で飼育管理し、受精 72 時間後まで観察した。試験水は Gd 濃度が比較的低値であることが推定されるポイント（2018 年 10 月採取、TM-4）、比較的高値であることが推定されるポイント（2018 年 10 月採取、Point A と TM-5）の 2 つを用いた。陰性対照群には、水道水を一晚以上汲み置きしたものを用いた。

河川水を用いた試験では、実験 4-11 と同様の体軸の屈曲または頭部形成不全を示した奇形個体が各群で 1 個体以上観察された。試験水 a において最終奇形率が減少したのは、前回の観察で見られた微小な体軸異常および伸長異常個体が正常と判断できる状態になったためである。なお、死亡率は試験水 b において 13% となり最も高かった（Figs. 19 および 20）。

この実験では、使用した河川水中に、Gd 以外の重金属をはじめとする化学物質も含まれている。また、滅菌処理を行わずに試験水を使用した。このことから、観察された奇形が Gd の直接的影響であるのかは判断できない。さらに、ゼリー層を除去した胚を用いたため、自然状態の胚とはいえないため、その影響は定かでない。しかし、実験 4-10 および 4-11 よりも低濃度の Gd など化学物質を含む環境水で奇形が観察されたことは、河川水においても何らかの影響がある可能性を示唆している。

各実験中に観察された奇形の中に、Gd の影響を受けている個体がある可能性が示唆された。体軸異常ならびに頭部形成異常の発生メカニズムに関しては、次のようなことが考えられる。体軸異常に関しては、伸長が完了する st.19-20 頃から現れはじめることから、それまでの発生段階において脊椎形成に異常を起こしたことや、屈曲として現れる細胞分裂の背腹非同調が起きた可能性が考えられる。頭部の形成異常に関しては、眼球が観察できるようになる st. 17-18 から眼球を欠損する奇形個体が観察されはじめることから、頭部形成に関わるオーガナイザーが正常に働かなかつたことや、頭部形成関連遺伝子の発現が抑制されたことが考えられる。頭部形成異常を伴わない小眼症については、頭部形成が誘導されたものの眼形成のオーガナイザーの機能異常や遺伝子発現抑制等が原因となった可能性が考えられる。今回、Gd によって引き起こされるアフリカツメガエル初期胚の形態形成の異常の種類が明らかになったので、今後は特定の分子マーカーを用いた表現形解析が望まれる。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、サンプリングや実験を担当いただいた、麻布大学生命・環境科学部 環境衛生学研究室、環境分析学研究室ならびに獣医学部 生理学第一研究室の学生諸氏に感謝申し上げます。

6. 引用文献

1. M. Bau, P. Dulski : Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **143**, 245-255 (1996).
2. Y. Nozaki, D. Lerche, D. S. Alibo, and M. Tsutsumi : Dissolved indium and rare earth elements in three Japanese rivers and Tokyo Bay: Evidence for anthropogenic Gd and In, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **64**, 3975-3982 (2000).
3. 水戸 誠哉, 大畑 昌輝, 古田 直紀 : イミノ二酢酸キレート樹脂をカラムとして用いる全自動オンラインカラム誘導結合プラズマ質量分析法による河川水に含まれる希土類元素の定量, *分析化学*, **52**, 575-582 (2003).
4. Y. Zhu, M. Hoshino, H. Yamada, A. Itoh, H. Haraguchi : Gadolinium Anomaly in the Distributions of Rare Earth Elements Observed for Coastal Seawater and River Waters around Nagoya City, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 1835-1842 (2004).
5. 経遠 篤, 鈴木 美成, 古庄 義明, 古田 直紀 : 改良型イミノ二酢酸キレート樹脂をオンライン濃縮カラムに用いる海水中希土類元素の ICP-MS 定量法の開発と東京湾海水試料への応用, *分析化学*, **58**, 623-631 (2009).
6. T. Ogata, Y. Terakado : Rare earth element abundances in some seawaters and related river waters from the Osaka Bay area, Japan: Significance of anthropogenic Gd, *Geochemical J.*, **40**, 463 (2006).
7. S. Kulaksiz, M. Bau : Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **362**, 43-50 (2013).
8. V. Hatje, K. W. Bruland, and A. R. Flegal : Increases in Anthropogenic Gadolinium Anomalies and Rare Earth Element Concentrations in San Francisco Bay over a 20 Year Record, *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 4159-4168 (2016).
9. Z. M. Migaszewski, A. Galuszka : The use of gadolinium and europium concentrations as contaminant tracers in the Nida River watershed in south-central Poland, *Geol. Quart.*, **60**, 65-74 (2016).
10. S. Kulaksiz, M. Bau : Anthropogenic gadolinium as a microcontaminant in tap water used as drinking water in urban areas and megacities, *Appl. Geochem*, **26**, 1877-1885 (2011).
11. L. Telgmann, M. Sperling, U. Karst : Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: A review: *Anal. Chim. Acta*, **764**, 1-16 (2013).
12. P. Ebrahimi, M. Barbieri : Gadolinium as an Emerging Microcontaminant in Water Resources: Threats and Opportunities: *Geosciences*, **9**, 93 (2019).
13. 赤木 右 : 希土類元素群からみた多摩川水系の化学的評価, とうきゅう環境財団学術成果報告書 (2001).
14. B. T. Searcy, S. M. Beckstrom-Sternberg, J. S. Beckstrom-Sternberg, P. Stafford, A. L. Schwendiman, J. Soto-Pena, M. C. Owen, C. Ramirez, J. Phillips, N. Veldhoen, C. C. Helbing, C. R. Propper : Thyroid hormone-dependent development in *Xenopus laevis*: a

- sensitive screen of thyroid hormone signaling disruption by municipal wastewater treatment plant effluent. *Gen Comp Endocrinol.*, **176**, 481-492 (2012).
15. G. C. Boorse, C. A. Kholdani, A. F. Seasholtz, R. J. Denver : Corticotropin-releasing factor is cytoprotective in *Xenopus* tadpole tail : coordination of ligand, receptor, and binding protein in tail muscle cell survival. *Endocrinology.* **147**, 1498-1507 (2006).
 16. M. Kim, J. Son, M. S. Park, Y. Ji, S. Chae, C. Jun, J. S. Bae, T. K. Kwon, Y. S. Choo, H. Yoon, D. Yoon, J. Ryoo, S. H. Kim, M. J. Park, H. S. Lee : In vivo evaluation and comparison of developmental toxicity and teratogenicity of perfluoroalkyl compounds using *Xenopus* embryos. *Chemosphere.*, **93**, 1153-1160 (2013)
 17. Y. Fujita, H. Ohi, N. Murayama, K. Saguchi, S. Higuchi : Identification of multiple cytochrome P450 genes belonging to the CYP4 family in *Xenopus laevis*: cDNA cloning of CYP4F42 and CYP4V4. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **138**, 129-136 (2004).
 18. T. Oka, O. Tooi, N. Mitsui, M. Miyahara, Y. Ohnishi, M. Takase, A. Kashiwagi, T. Shinkai, N. Santo, T. Iguchi : Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.*, **87**, 215-226 (2008)
 19. D. V. Iwamoto, C. M. Kurylo, K. M. Schorling, W. H. Powell : Induction of cytochrome P450 family 1 mRNAs and activities in a cell line from the frog *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol.*, **114-115**:165-172 (2012)
 20. F. Mouchet, M. Baudrimont, P. Gonzalez, Y. Cuenot, J. P. Bourdineaud, A. Boudou, L. Gauthier : Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquat Toxicol.*, **78**, 157-166 (2006).
 21. J. J. Soriano, J. Mathieu-Denoncourt, G. Norman, S. R. de Solla, V. S. Langlois : Toxicity of the azo dyes Acid Red 97 and Bismarck Brown Y to Western clawed frog (*Silurana tropicalis*). *Environ Sci Pollut Res Int.* **21**, 3582-3591 (2014)
 22. R. M. Zaya, Z. Amini, A. S. Whitaker, C. F. Ide : Exposure to atrazine affects the expression of key genes in metabolic pathways integral to energy homeostasis in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquat Toxicol.*, **104**, 254-262 (2011).
 23. W. Ariyani, T. Iwasaki, W. Miyazaki, E. Khongorzul, T. Nakajima, S. Kameo, H. Koyama, Y. Tsushima, N. Koibuchi : Effects of Gadolinium-Based Contrast Agents on Thyroid Hormone Receptor Action and Thyroid Hormone-Induced Cerebellar Purkinje Cell Morphogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* **7**, 115 (2016).
 24. M. Sekimoto, H. Kawamagari, S. Nakatani, K. Nemoto, M. Degawa : Establishment of a Human Hepatoma Cell Line HepG2-A10 for a Reporter Gene Assay of Arylhydrocarbon Receptor Activators. *Genes Environ.*, **29**, 11-16 (2007)
 25. M. Sekimoto, M. Iwamoto, S. Miyajima, K. Nemoto, M. Degawa : Establishment of a rat hepatic cell line, KanR2-XL8, for a reporter gene assay of aryl hydrocarbon receptor ligands. *J. Health Sci.*, **50**, 530-536 (2006)
 26. ASTM : Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (Fetax). *Annual Book of ASTM Standards*, E1439-91 (1993)

Table 1 ICP-MSの測定条件

ICP-MS : Agilent 7700x	
Plasma conditions :	
RF power	1.55 kW
Plasma gas flow rate	15.0 L min ⁻¹ Ar
Auxiliary gas flow rate	0.90 L min ⁻¹ Ar
Makeup gas flow rate	0 L min ⁻¹ Ar
Carrier gas flow rate	1.05 L min ⁻¹ Ar
Sampling depth (mm from load coil)	8.0 mm
Cell gas	He mode:4.3 mL min ⁻¹ H2 mode:6.0 mL min ⁻¹
Nebulizer	Micro Mist
Sample uptake rate	0.45 mL min ⁻¹
Data acquisition :	
Accumulation time	0.3-1.0 s / point
Data point	3 point / peak
Repetition	3 times

Table 2 ICP-MSにおける干渉補正係数

Interfered element	Isotope	Interfering polyatomic ion	Interference correction coefficient (ppt/ppb)
La	139	$^{123}\text{Sb}^{16}\text{O}^+$	0.546
Eu	153	$^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$	0.137
Gd	157	$^{141}\text{Pr}^{16}\text{O}^+$	34.5
Tm	169	$^{153}\text{Eu}^{16}\text{O}^+$	0.256
Lu	175	$^{159}\text{Tb}^{16}\text{O}^+$	6.48

Table 3 キレート固相抽出/ICP-MSによる多摩川河川水(TM-5)中希土類元素の分析結果

element	m/z	concentration ^{a)} /ng L ⁻¹	RSD ^{b)} /%	recovery /%	blank value /ng L ⁻¹	analytical detection limit ^{c)} /ng L ⁻¹
La	139	4.70	3.2	112	0.071	0.018
Ce	140	4.04	1.8	105	0.039	0.012
Pr	141	0.893	5.5	112	<0.037	0.011
Nd	146	3.95	2.1	104	<0.11	0.032
Sm	147	1.08	7.7	115	n.d.	0.023
Eu	153	0.407	4.6	114	n.d.	0.016
Gd	157	65.0	1.6	120	n.d.	0.020
Tb	159	0.409	3.9	120	n.d.	0.012
Dy	163	3.41	2.3	110	n.d.	0.029
Ho	165	1.27	2.5	115	n.d.	0.011
Er	166	5.36	1.9	105	n.d.	0.012
Tm	169	1.13	2.5	109	n.d.	0.012
Yb	172	10.3	2.4	105	n.d.	0.018
Lu	175	2.41	3.4	100	n.d.	0.011

a) mean values of independent 3-times measurement,

b) relative standard deviation (n=3),

c) analytical detection limit was calculated from instrument detection limit by taking into consideration of concentration factor and recovery,

d) not detected

Table 4 同一地点(TM-5)で異なる時期に採水した希土類元素の定量値 (ng/L)

採水時期	Gd濃度
Jul-17	65
Apr-18	47.7
Jul-18	112
Oct-18	46.1
Feb-19	70.2

Table 5 Gd異常度の過去データとの比較

採水地	年	Gd 異常度(ng L^{-1})	Gd 異常度	年	Gd 異常度(ng L^{-1})	Gd 異常度
多摩川・河口水	1995	3.93	151	2017	11.5	580
多摩川・中流	2000	6.32	169	2017	24.9	3895

Table 6 アフリカツメガエル肝臓における毒性バイオマーカー遺伝子

暴露化合物	毒性	肝臓での変動遺伝子（マーカー候補）
甲状腺ホルモン	変態の遅延	TR β , CRHBP, DIO2, FAP α
性ホルモン	性分化異常	VTGb1, ESR1, ESR2, AR, Aromatase 等
過フッ素化合物類（PFCs）	発生異常・奇形	xPTB
医薬品（PPARリガンド）	脂質代謝変動	CYP4F42, CYP4F4
ダイオキシン様化合物	他生物への悪影響	CYP1A6, CYP1A7, CYP1B, CYP1C
重金属類	酸化ストレス	MT-1, SOD, SODMt, GADD, rad51 等
除草剤（アトラジン）	催奇形性	HIF-1 α , PPAR β , FR, ACAD, CPS1 等

Table 7 Gdおよび重金属による*in vivo*発生影響評価

	濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	暴露 個体数	死亡率(%) 括弧内は死亡個体数	
			st12-13	st21
塩化ガドリ ニウム	50	29	24(8)	24(8)
	75	31	16(5)	19(6)
	100	41	22(9)	22(10)
ニクロム酸 ナトリウム	50	30	17(5)	100(30)
	75	32	96(31)	100(32)
	100	34	74(26)	100(34)
塩化カドミ ウム	50	46	11(5)	11(5)
	75	39	39(15)	45(18)
	100	29	17(5)	2(9)
陰性対照	0	96	11(11)	16(15)

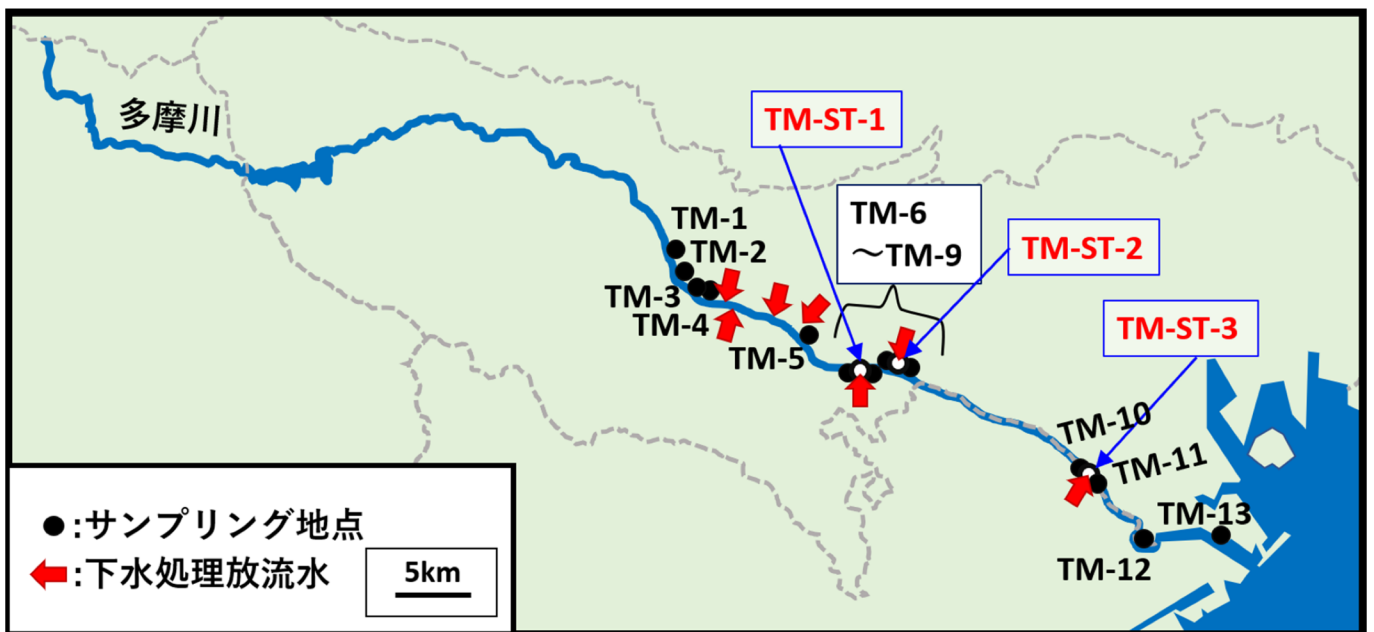


Fig. 1 多摩川河川水のサンプリング地点

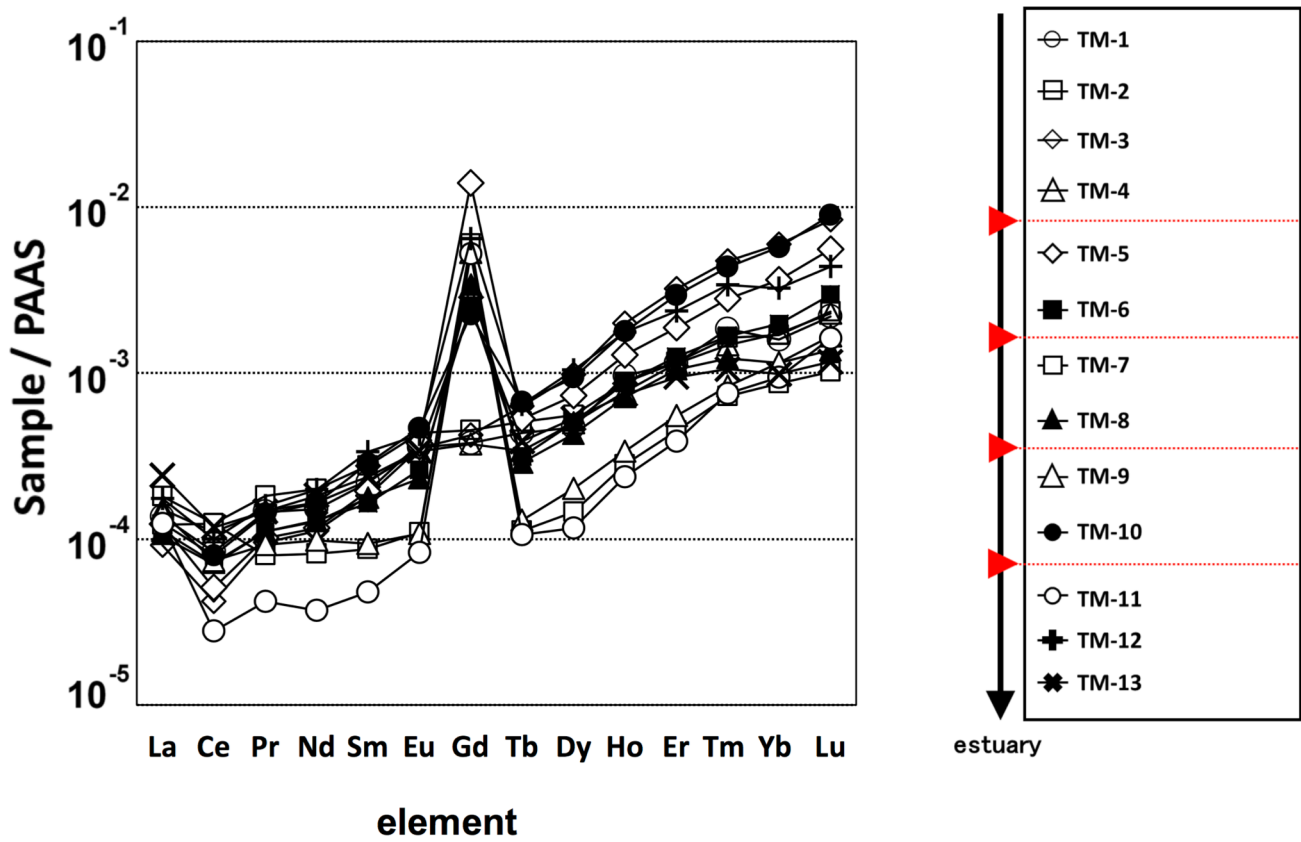


Fig. 2 多摩川河川水の希土パターン

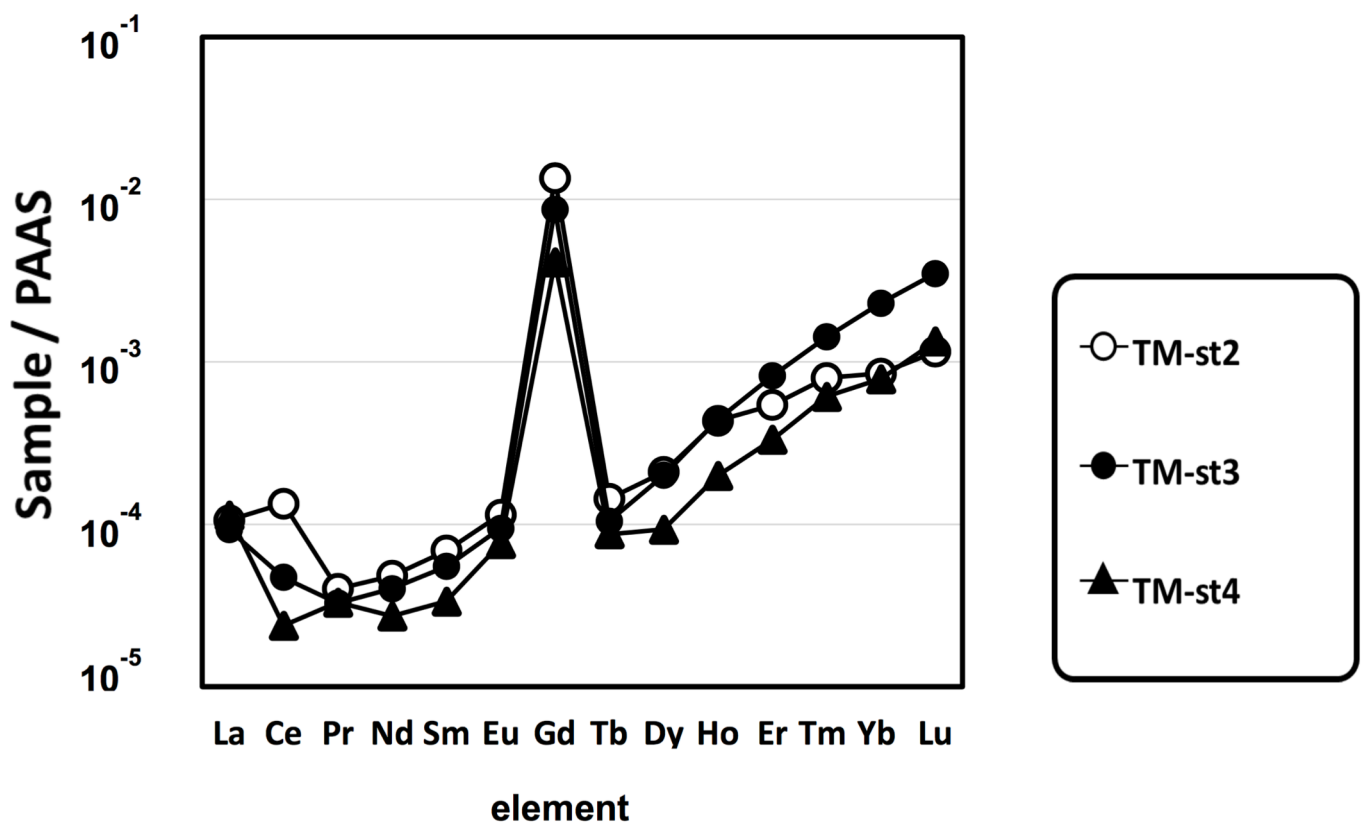


Fig. 3 下水放流水の希土パターン

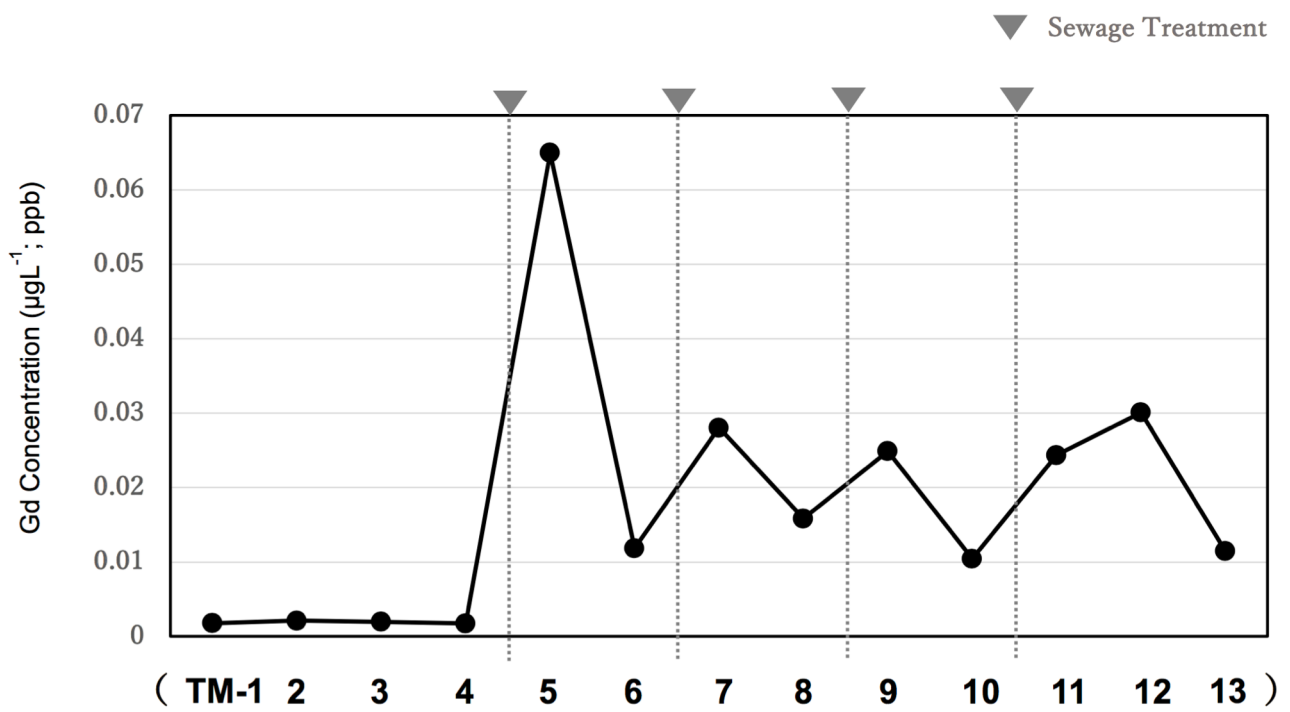


Fig. 4 上流域から河口付近における Gd 濃度変化

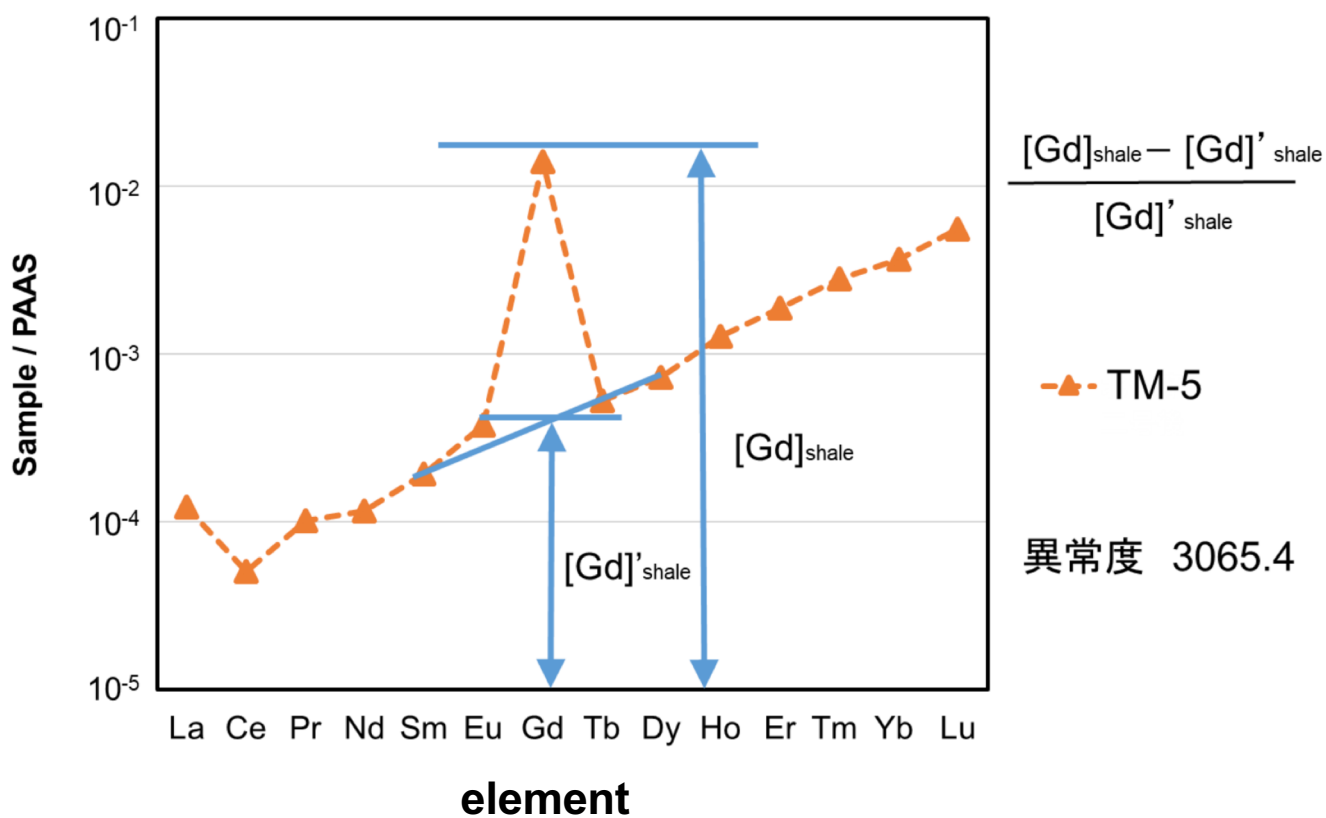


Fig. 5 Gd異常度の算出法

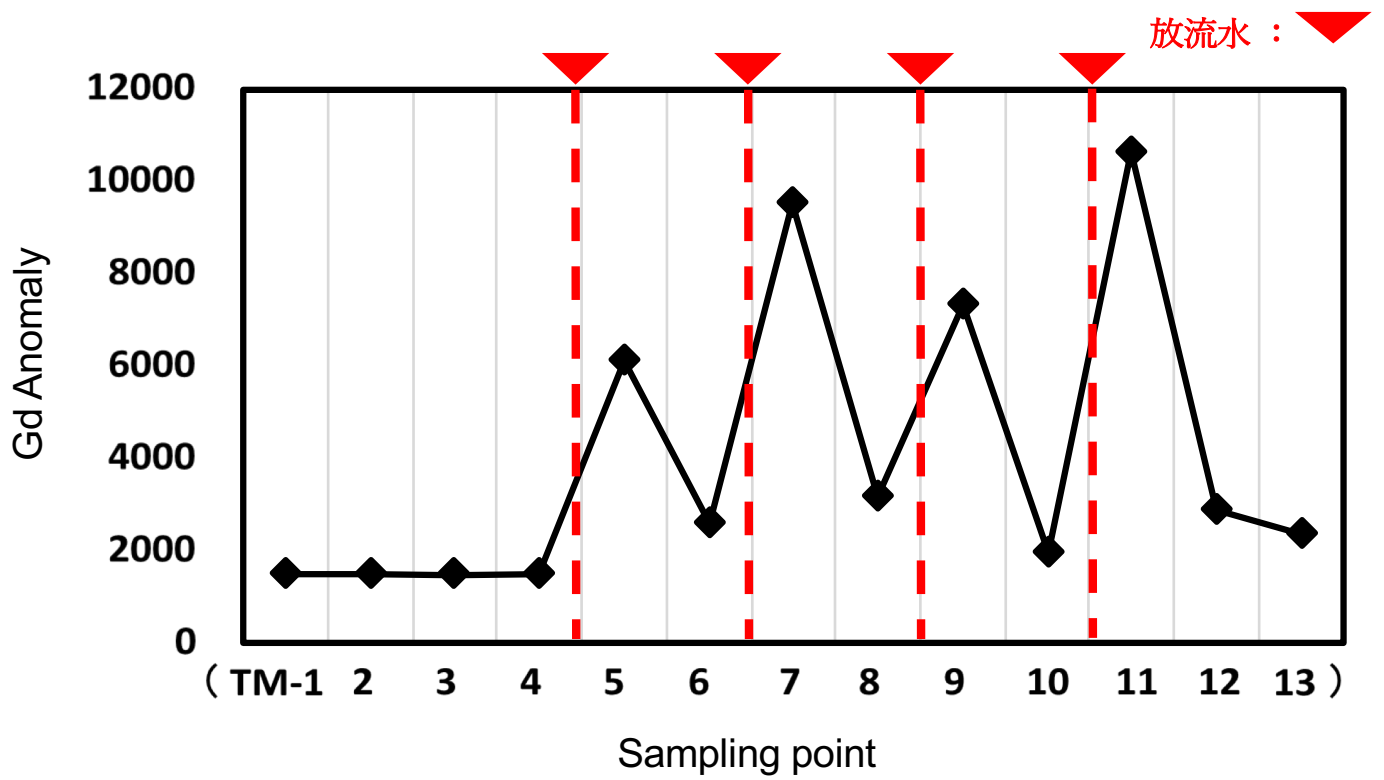


Fig. 6 多摩川河川水のサンプリング地点ごとのGd異常度

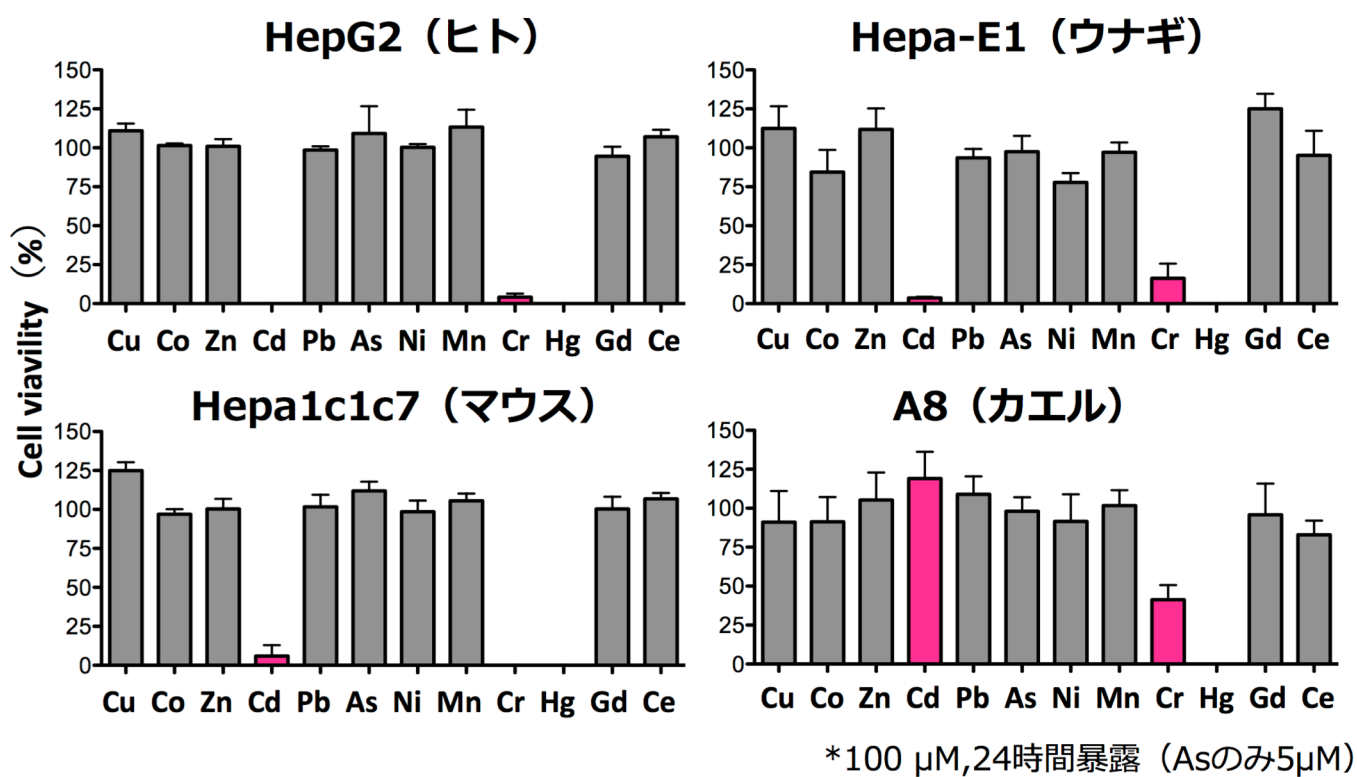


Fig. 7 重金属処理による各細胞の生存率

各細胞をそれぞれの培養条件にて前培養した後、重金属類を最終濃度100 μM(Asのみ5 μM)で24時間処理した。24時間後、Alamar Blue assayを行い、細胞生存率を算出した。

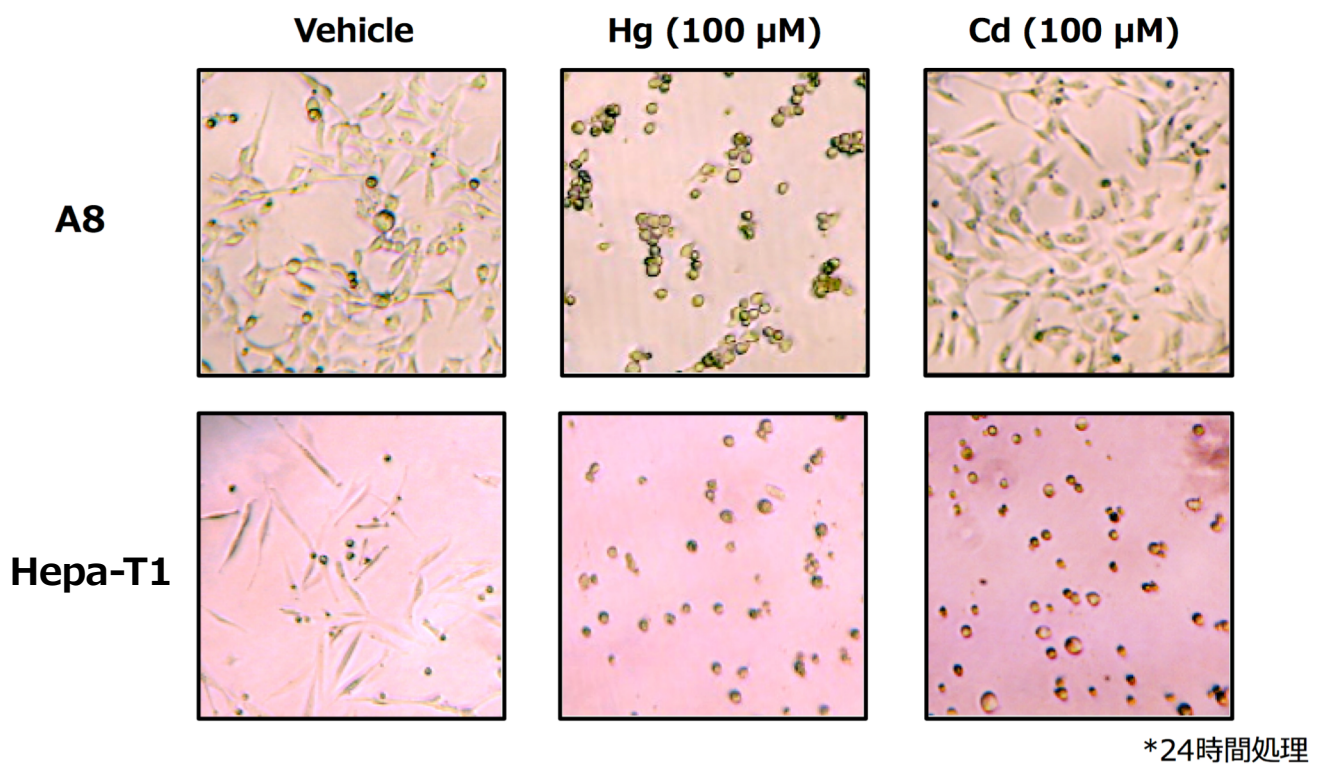


Fig. 8 重金属処理による各細胞の形態変化

各細胞をそれぞれの培養条件にて前培養した後、重金属類を最終濃度100 μ Mで24時間処理した。24時間後、細胞の形態を観察し、写真撮影した。

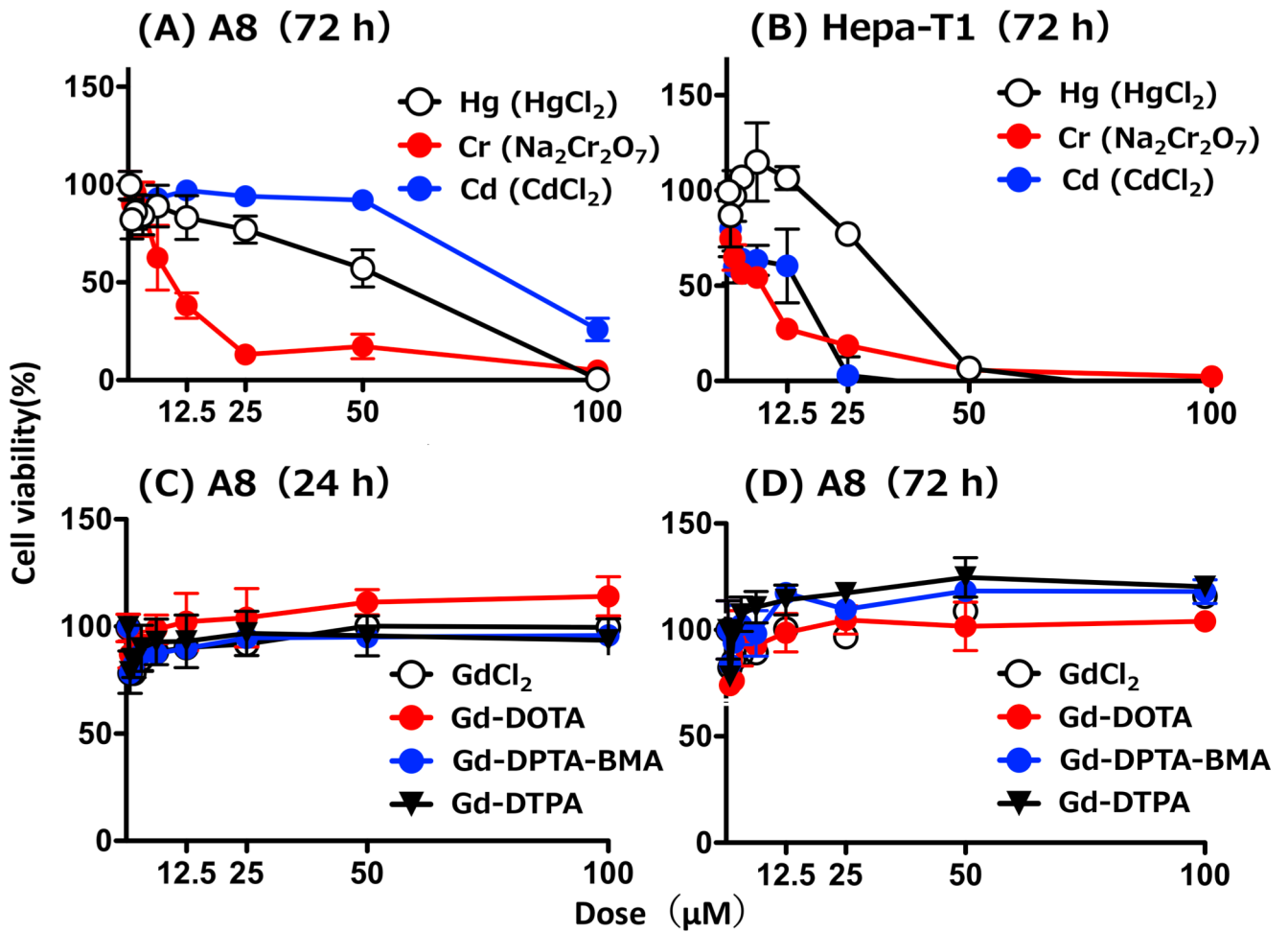


Fig. 9 重金属およびGd含有医薬品処理による各細胞の生存率

各細胞をそれぞれの培養条件にて前培養した後、重金属類およびGd含有医薬品を各種濃度で24~72時間処理した。処理後、Alamar Blue assayを行い、細胞生存率を算出した。

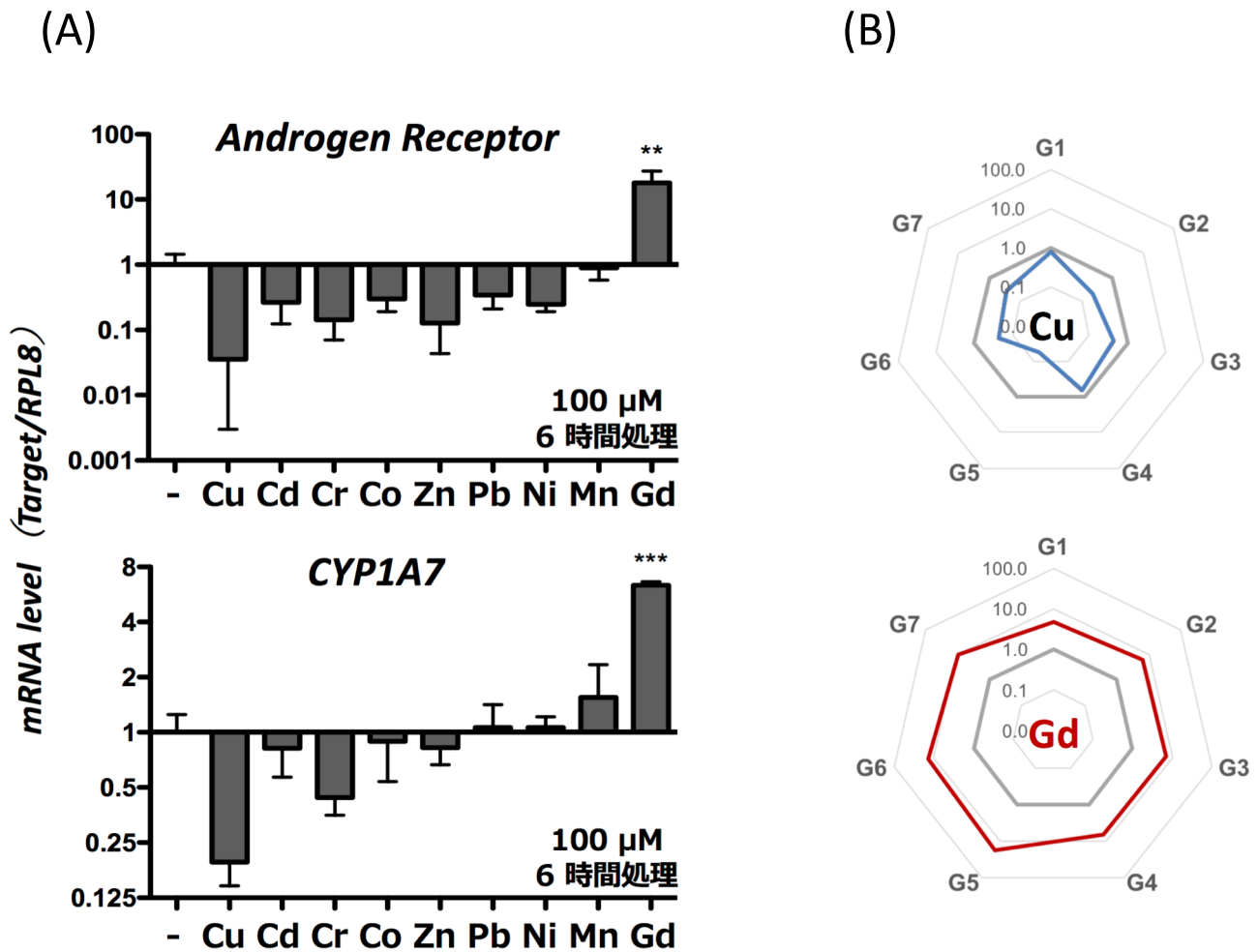


Fig. 10 重金属処理A8細胞における遺伝子発現変動

A8細胞に重金属類(100 μM)を6時間処理したのち、RT-qPCR法により毒性バイオマーカー遺伝子の発現量を測定した(A)。データは対照群を1とした相対平均±相対標準偏差として示した。さらに、これら遺伝子の発現量をレーダーチャート化した(B)。灰色の線は溶媒処理(相対発現量=1)を、また、着色した線は対応する重金属処理時の発現量を示す。

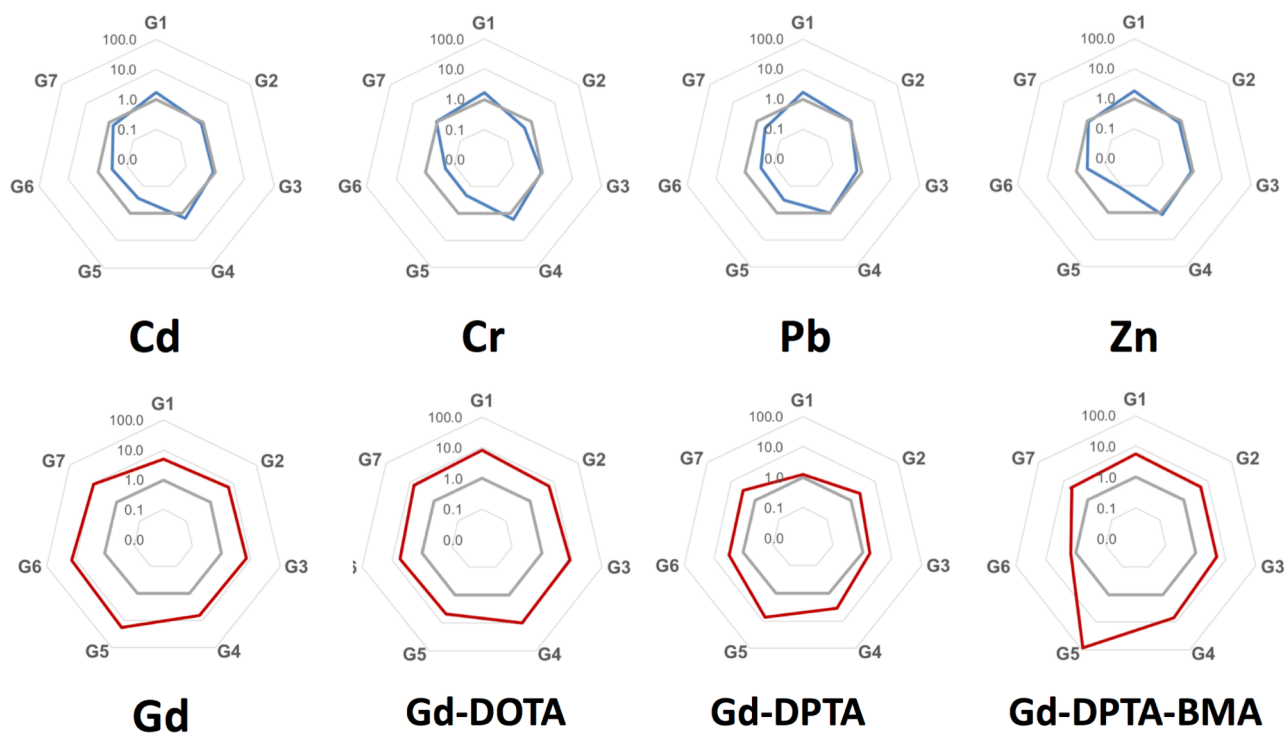
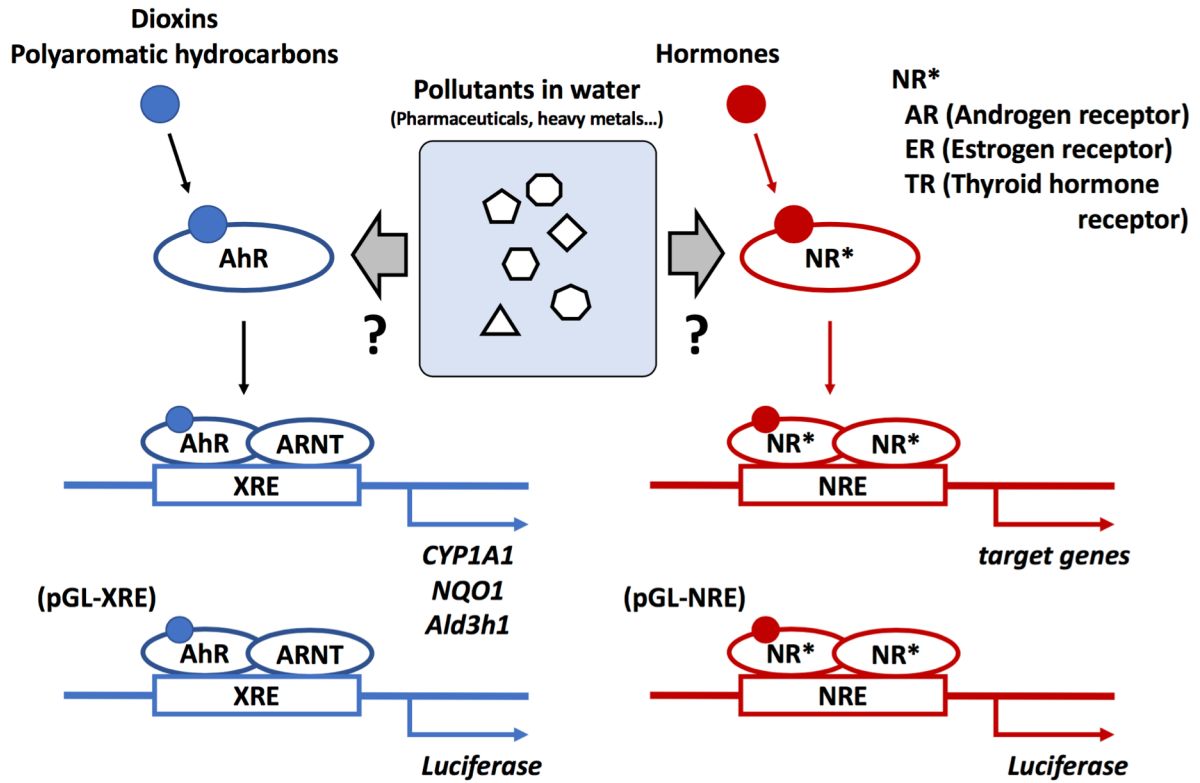


Fig. 11 重金属およびGd含有医薬品処理A8細胞における遺伝子発現変動

A8細胞に重金属類およびGd含有医薬品(100 μ M)を6時間処理したのち、RT-qPCR法により毒性バイオマーカー遺伝子の発現量を測定した。さらに、これら遺伝子の発現量をレーダーチャート化した。灰色の線は溶媒処理(相対発現量=1)を、また、着色した線は対応する重金属またはGd含有医薬品処理時の発現量を示す。

(A)



(B)

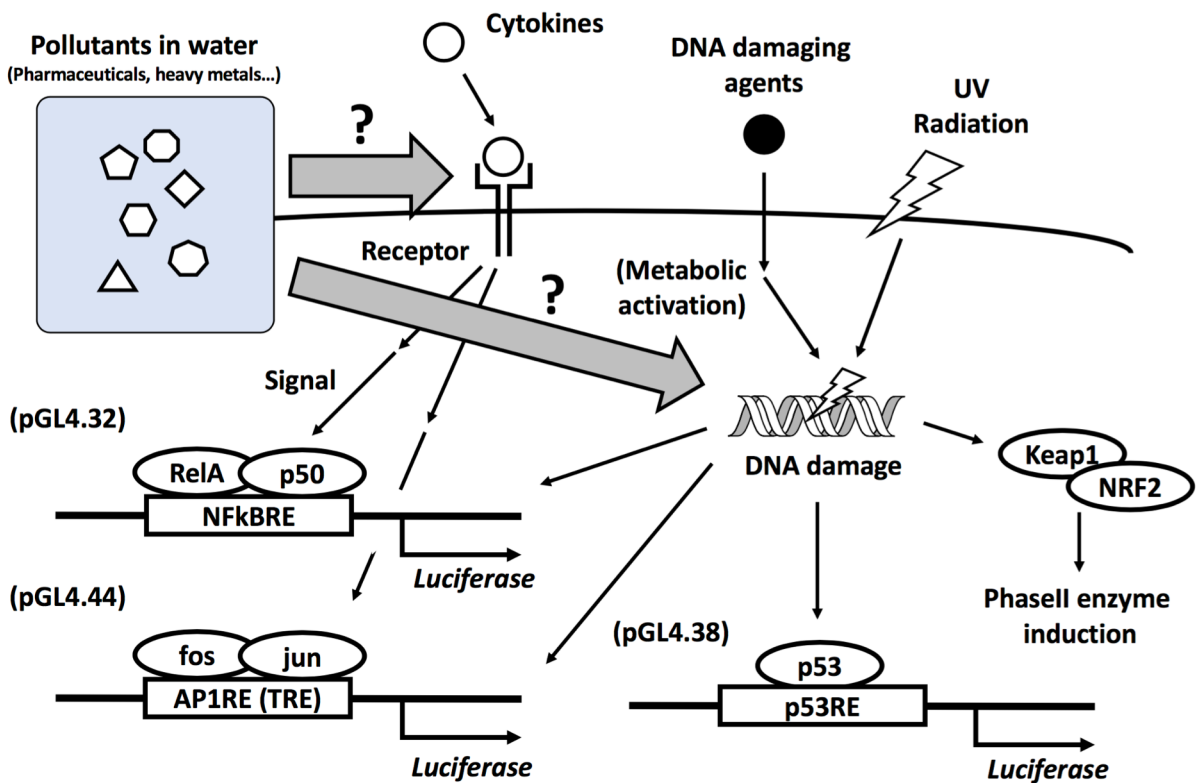


Fig. 12 化学物質により活性化される転写因子

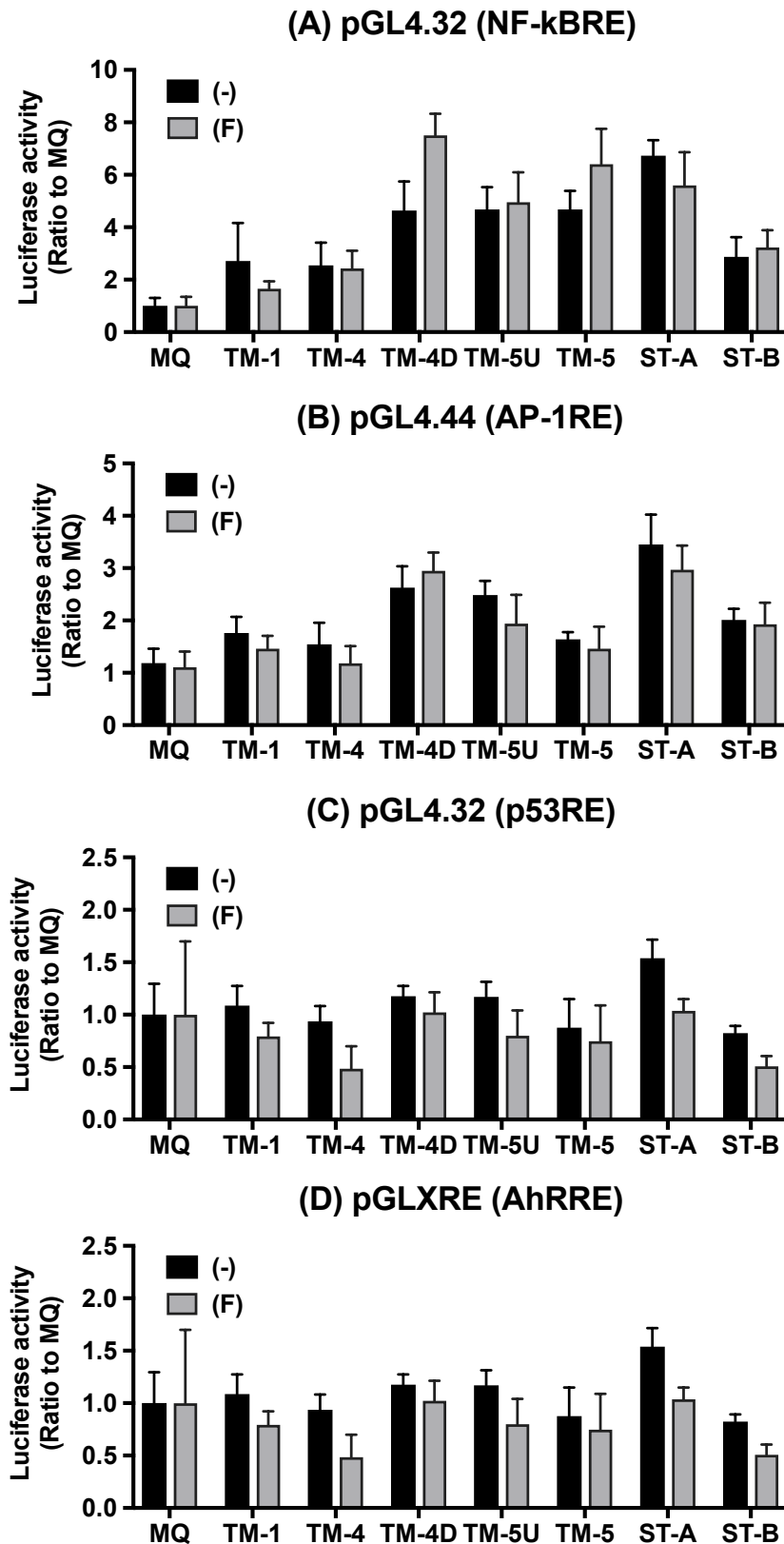


Fig. 13 環境水処理したA8由来レポーター細胞における転写因子の活性化

A8細胞由来レポーター細胞に対して環境水を2倍濃の培地と1:1で混合し、細胞に対して6時間処理した。対照群には環境水の代わりにミリQ水(MQ)を処理した。処理後、細胞溶解液を調製し、各細胞でのルシフェラーゼ活性を転写因子活性化の指標とした。データは対照群を1とした相対平均±相対標準偏差として示した。なお、環境水は2019年2月に以下の場所からサンプリングした。TM-1:福生南公園、TM-4:多摩上流水再生センター上流、TM-4D:多摩上流水再生センター下流、TM-5:北多摩二号水再生センター上流、TM-5D:北多摩二号水再生センター下流、ST-A:多摩上流水再生センター放流水、ST-B:北多摩二号水再生センター放流水。これら環境水は必要に応じてろ過して使用した(黒:ろ過なし、灰:ろ過あり)。

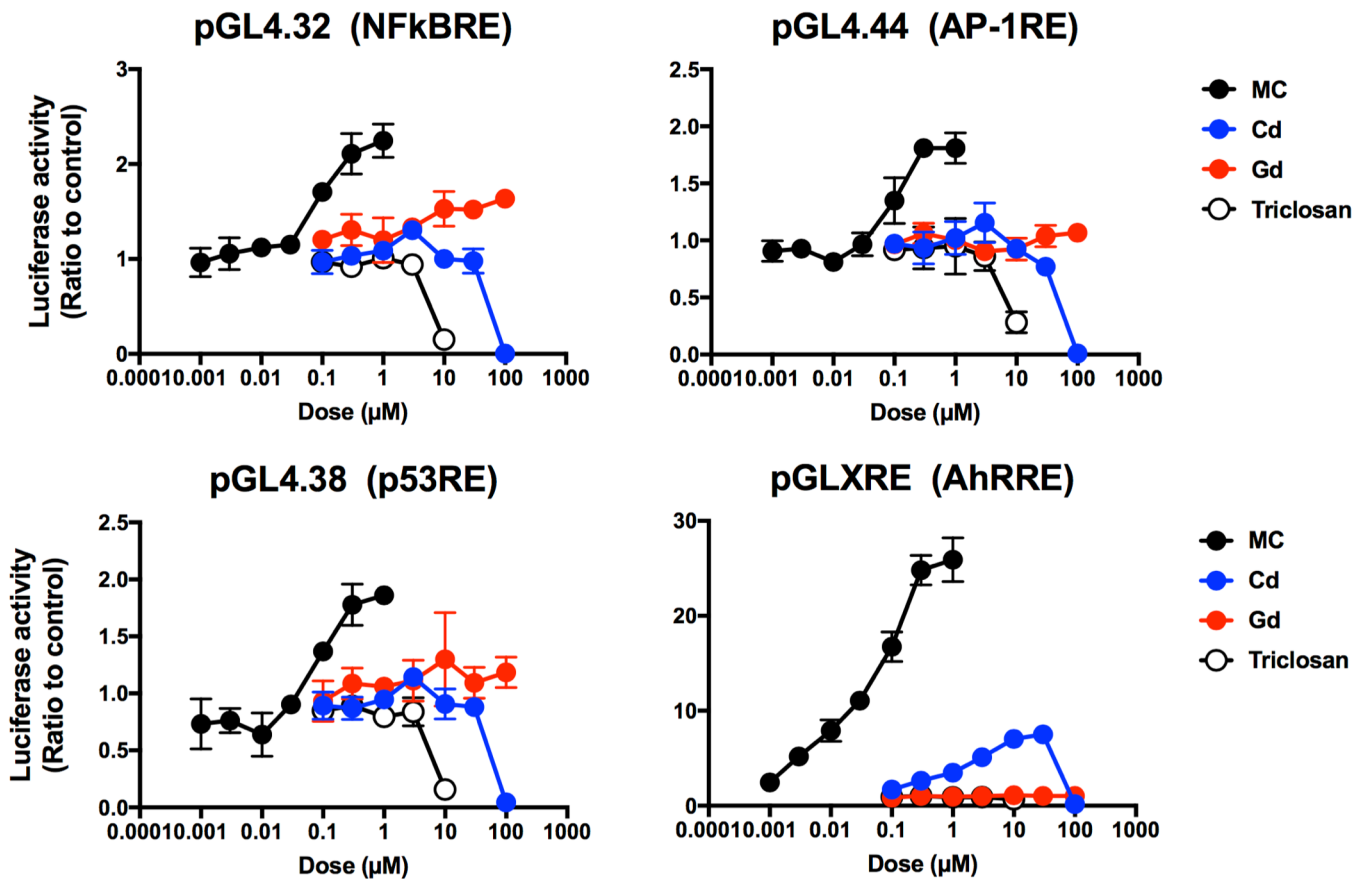


Fig. 14 Gdおよび代表的な汚染物質を処理したA8由来レポーター細胞における転写因子の活性化

A8細胞由来レポーター細胞に対して3-メチルコランズレン(MC)、塩化ガドリニウム(Gd)、塩化カドミウム(Cd)およびトリクロサンを核種濃度で6時間処理した。処理後、細胞溶解液を調製し、各細胞でのルシフェラーゼ活性を転写因子活性化の指標とした。データは対照群を1とした相対平均±相対標準偏差として示した。

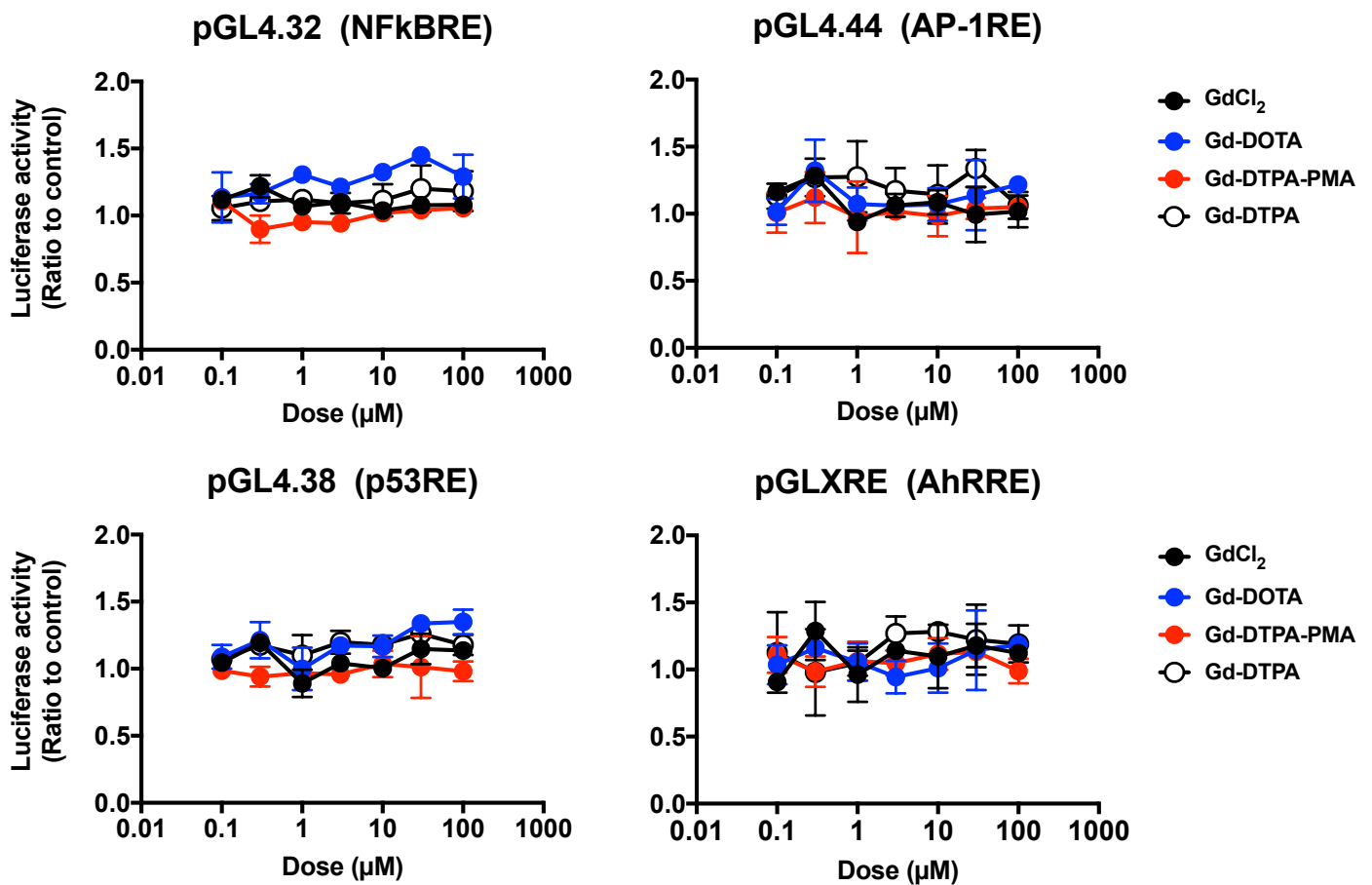


Fig. 15 Gd含有医薬品を処理したA8由来レポーター細胞における転写因子の活性化

A8細胞由来レポーター細胞に対してガドリニウム含有医薬品を各種濃度で6時間処理した。処理後、細胞溶解液を調製し、各細胞でのルシフェラーゼ活性を転写因子活性化の指標とした。データは対照群を1とした相対平均±相対標準偏差として示した。

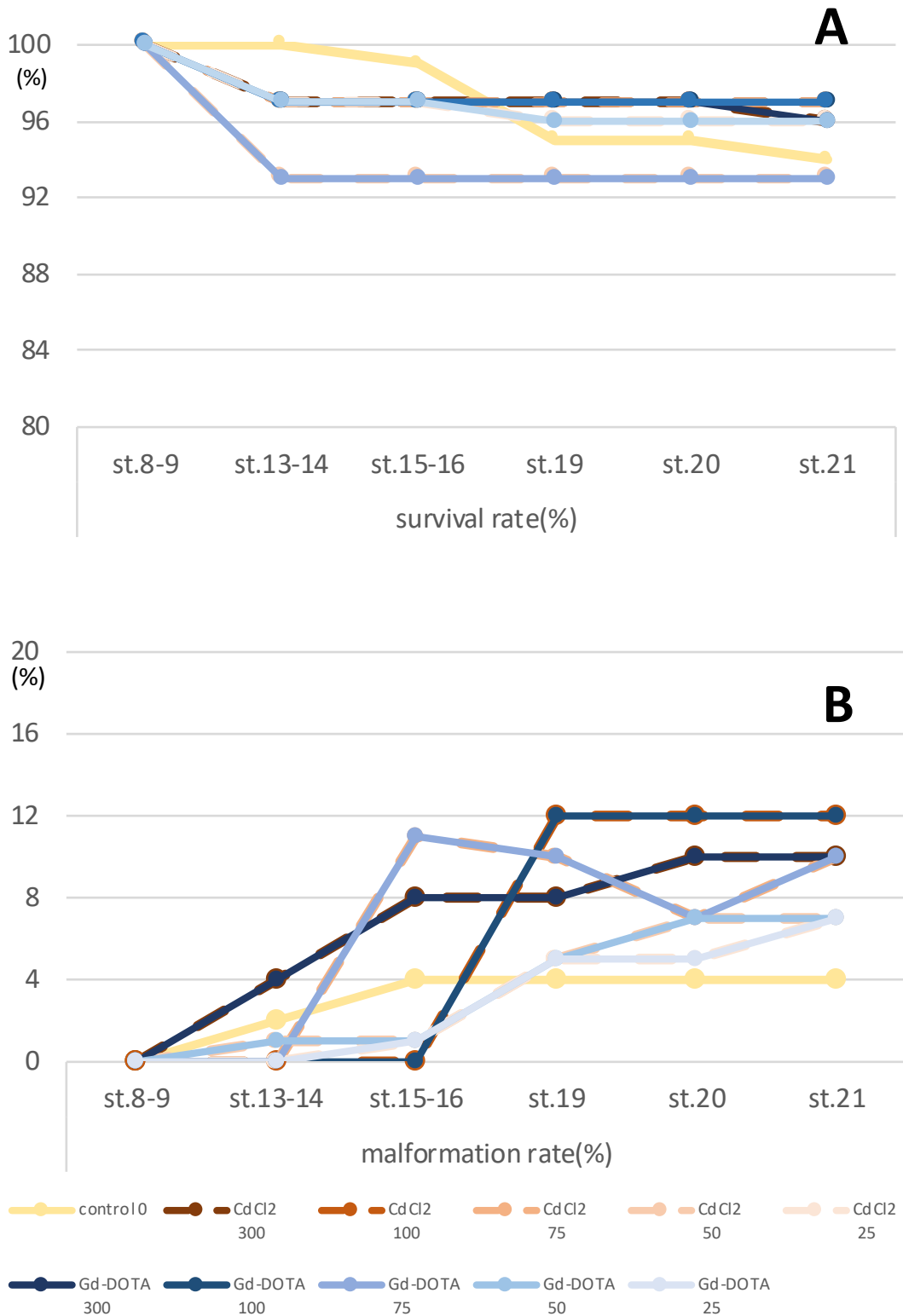


Fig. 16 Gd, Gd-DOPA暴露(FETAX法)時の生存率・奇形発生率の変化

A: 生存率の変化、B: 奇形発生率の変化
 control(n=172), CdCl₂ (25,50,75,100,300μmol/L暴露, n=97),
 Gd-DOTA (25,50,75,100,300μmol/L暴露,n=73)

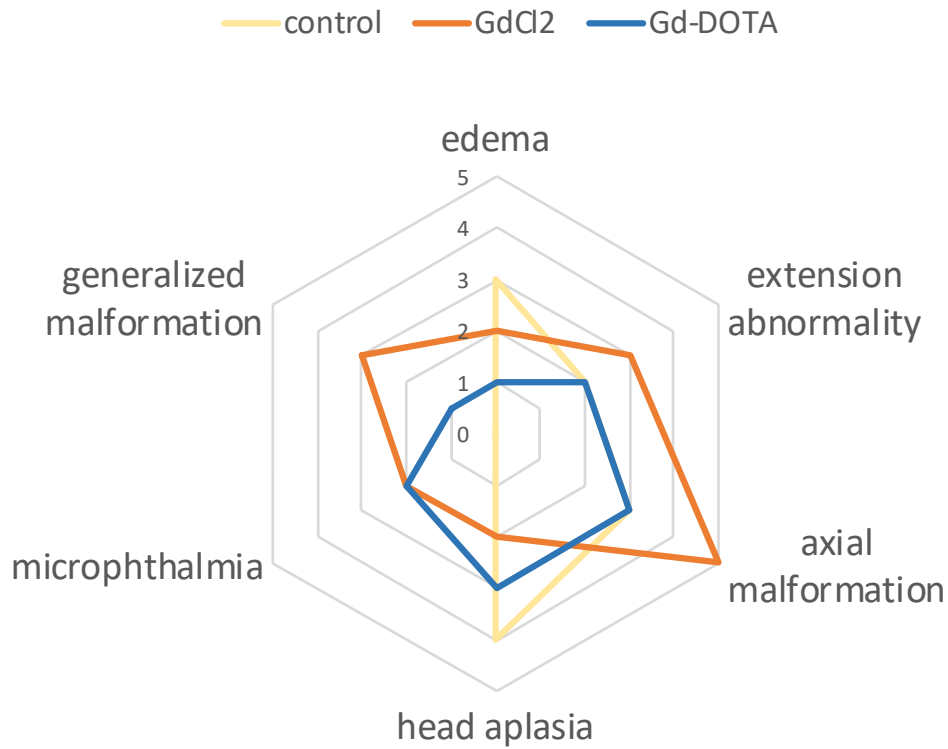


Fig. 17 Gd, Gd-DOPA暴露時に発生した奇形の分類

繰り返し実験(5回)中に発生した奇形の分類。
 各実験回でその奇形が発生した場合を1ポイントとしている。
 ポイントが大きい場合はほぼ毎実験回にその奇形形質が現れることを示す。

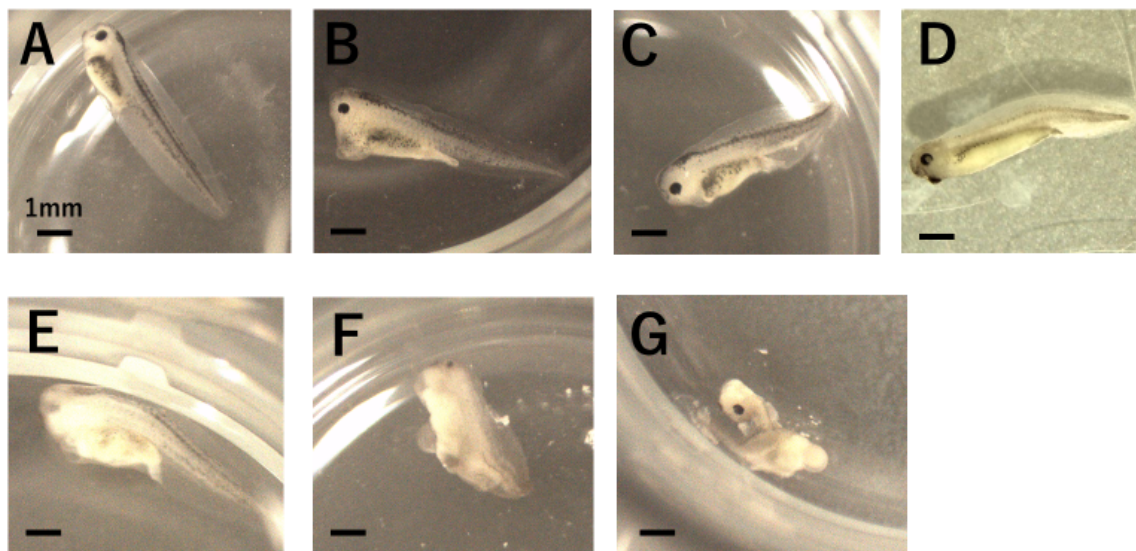


Fig. 18 FETAX法によりGdを曝露したアフリカツメガエル幼生の正常個体および奇形個体の写真(受精72時間後st21時点)

A:正常 B:浮腫 C:伸長異常 D:体軸異常 E:頭部形成異常 F:小眼症を伴う全身性の重度の奇形 G:全身性の重度の奇形

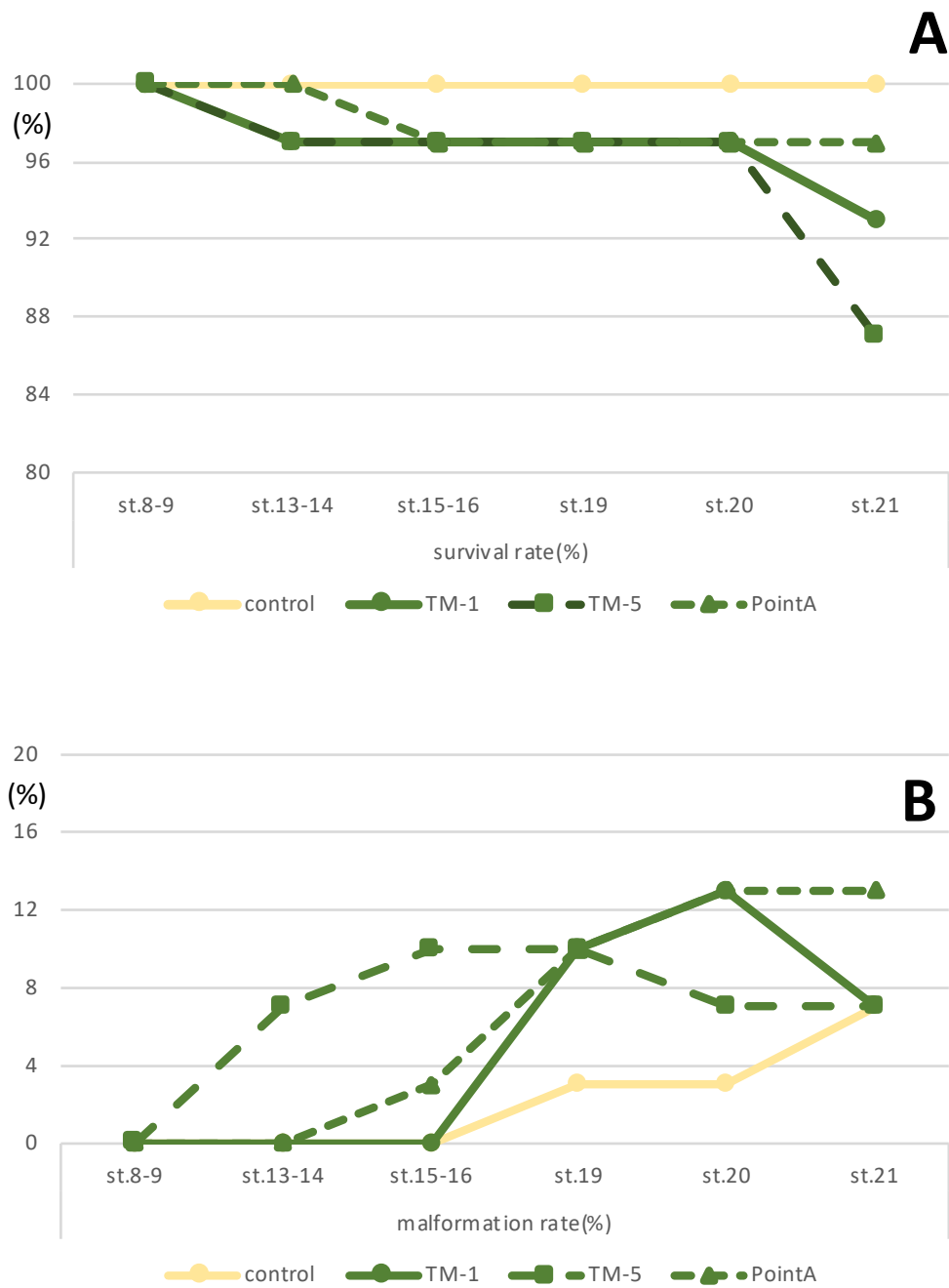


Fig. 19 環境水処理による生存率変化と奇形発生状況(n=70)

A: 生存率の変化、B: 奇形発生率の変化

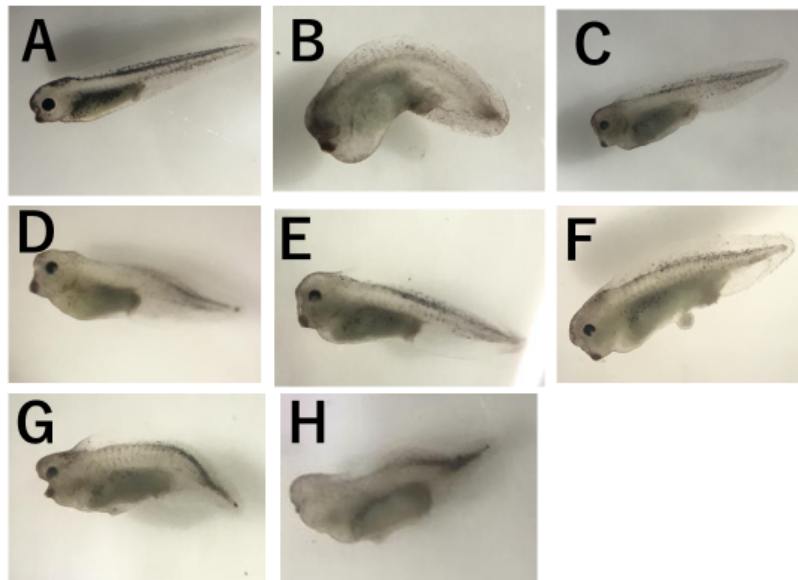


Fig. 20 環境水を曝露したアフリカツメガエル幼生の正常個体および奇形個体の写真
(受精72時間後st21時点)

A:正常個体 B-C:コントロール群での奇形個体 D:環境水aでの奇形個体
E-F:環境水bでの奇形個体 G-H:環境水cでの奇形

多摩川の潜在的な希土類元素汚染と水生生物に対する生体影響の解析
(研究助成・学術研究 VOL. 48—NO. 340)

著 者 関本 征史

発行日 2019年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

FAX (03) 3496-2965

<http://foundation.tokyu.co.jp>