

<特集>

毒物検知システム

田中 良春

富士電機水環境システムズ(株) 開発部

(〒191-8502 日野市富士町1番地 E-mail:tanaka-yoshiharu@fesys.co.jp)

概要

バイオセンサーは生物材料の特性を巧みに利用したセンサーであり、水環境の水質計測へ広く応用されることが期待されている。筆者らは水環境計測用バイオセンサーの研究開発を鋭意進めて来た。本稿では、水環境試料への適用に特に留意した毒物検知システムについて述べる。

キーワード: バイオセンサー, バイオアッセイ, 毒物センサー, 水環境計測

進めて来た。本稿では、筆者らが水環境への適用の経験から特に留意し開発した毒物検知システムについて紹介する。

1. はじめに

バイオアッセイは生物材料を用い、その生物応答から生物作用量を評価する方法である。したがって、対象とする物質は生物作用物質で医薬品や機能性食品など有益な生物作用の評価を目的とした場合と、環境汚染物質のような有害影響を評価を目的とする場合がある。すべての化学物質は毒性を持っており、ある化学物質が有害である、あるいはどの程度危険であるかということは生体へのその物質の暴露量とそれに対する生体側の反応の量的関係に依存する。

1.1 水環境計測へのバイオアッセイの応用

現状、個々の化学物質に対して環境での濃度基準や排出を規制する基準が定められているが、個々の物質毎にすべての物質を監視することは困難であり、さらに、未規制の物質や非意図的な物質(処理の過程で生成する副生成物や分解生成物)、複合的な毒性作用の評価は難しく、物理化学的計測手段では限界がある。このため、バイオアッセイの水環境分野での利用が期待される¹⁾。

1.2 バイオセンサーによる自動計測

自動測定やオンライン計測のための方法のひとつとして、生物材料を固定化する技術とその生物材料からのシグナルを検出するセンシング技術を融合させたバイオセンサーがある。特別な技術や知識、操作の熟練度などを必要とせず、誰でも簡単に生物材料を利用しなければ計測が難しい水質情報を再現性良く得るための手段として有効と考える。

環境計測用バイオセンサーには、酵素や抗体などの基質特異性や選択性のある生体材料を利用した物質量を測定するセンサーと微生物や細胞を利用し、総括的に“汚染の度合い”や“毒性”を測定するセンサーがある。

前者には抗原抗体反応を利用した特定の農薬などを測定するイムノセンサー、後者には、水質汚濁の指標であるBOD(生物化学的酸素要求量)を測定するBODバイオセンサーや毒物センサーがある。

筆者らは水環境計測用バイオセンサーの研究開発を鋭意

2. 活性コントロール形毒物モニター

2.1 開発の背景

硝化細菌は活性汚泥プロセスの微生物の中でも有害化学物質に対してもっとも感受性が高い微生物として知られている。そこで、純粋培養した硝化細菌を利用した急性毒物センサーを開発した。

2.2 原理と構成

バイオセンサーは、有害化学物質に対して鋭敏な硝化菌の純粋培養株(*Nitrosomonas europaea*)を固定化した微生物膜と溶存酸素電極で構成される(Fig. 1)。

検水に硝化菌の基質となるアンモニア性窒素を含む緩衝液(フィード液)と空気を混合し、センサー部に連続的に供給し、固定化された硝化菌の酸素消費量を溶存酸素電極で常時測定する。検水中に毒物が混入し、硝化菌が呼吸障害を受けると、酸素消費率が減少し、酸素消費率が90%に達した時(阻害率10%)水質異常と判定し警報を出力する。

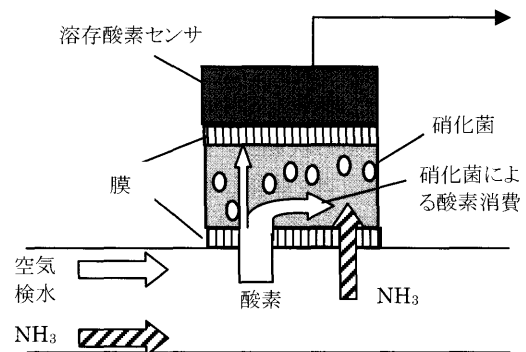


Fig. 1 毒物センサーの基本構成

2.3 微生物活性度制御²⁾

バイオセンサーの使用条件は、使用する生物材料の長期安定性を保つために、一般に至適 pH 条件、至適温度条件に設定して使用する。

しかしながら、河川水等環境試料に適用する場合、センサーのフィード液出力値は硝化菌の活性や菌数が原水中に含まれる微量栄養成分によって変動し、センサー出力は見かけ上 100% (酸素電極出力 0mV) で飽和しているが、硝化菌活性は上昇し続け、有害物質に対する呼吸阻害率 (毒物感度) が低下する場合がありますと考えられた。そこで、フィード液出力値が常に 100% より少なくなるように硝化菌の活性度を温度制御すれば、より高い毒物感度が得られると考えバイオセンサーの微生物活性度制御システムを構築した。(Fig. 2)

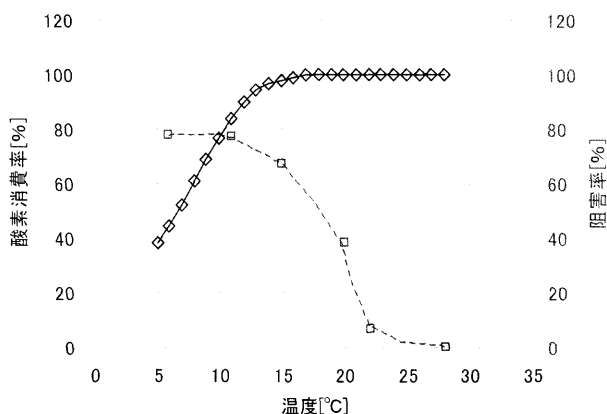


Fig. 2 温度と酸素消費率、阻害率(毒物感度)の関係

2.4 実証試験

微生物活性度制御システムを搭載した水質安全モニタ (MK-II) の性能確認を(財)水道技術研究センターの実施した環境影響低減化浄水技術開発研究 (e-Water) (2004 年 1 月～2005 年 3 月) の持ち込み研究にて実施した。

結果を Fig. 3 に示す。本実験では 0.1～0.3% のアセトン水溶液を模擬毒物として使用した。図中、水質異常警報レベルは、微生物の呼吸阻害率が閾値以上 (10% 以上) になったときに毒物の混入があったと判断する呼吸阻害率のレベルを示す。実験期間中は常に毒物検知レベル以上の毒物検知感度を安定的に維持していることが確認でき、本活性度制御法の妥当性を確認できた。

毒物感度の変動は、原水水質中の微量栄養成分の変動と微生物膜製膜時の菌の状態によると考えられ、今後連続的な原水水質データ取得と詳細な解析を行うことにより、原水水質に関する新たな知見が得られる可能性も示唆された。

2.5 毒物モニタの適用分野

毒物検知システムは、浄水場の取水、原水監視システムや河川水質事故監視システムとして、旧型および上述の新型を含め、全国で 50 台以上稼働している。

今後は、下排水分野への適用を目的とした開発を進めて行

き、広く水環境分野の *Bio-early warning system* として展開して行きたいと考えている。

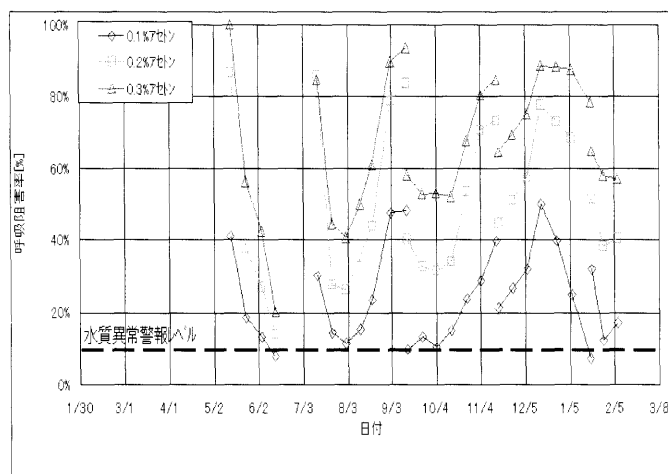


Fig. 3 フィールド実証試験結果

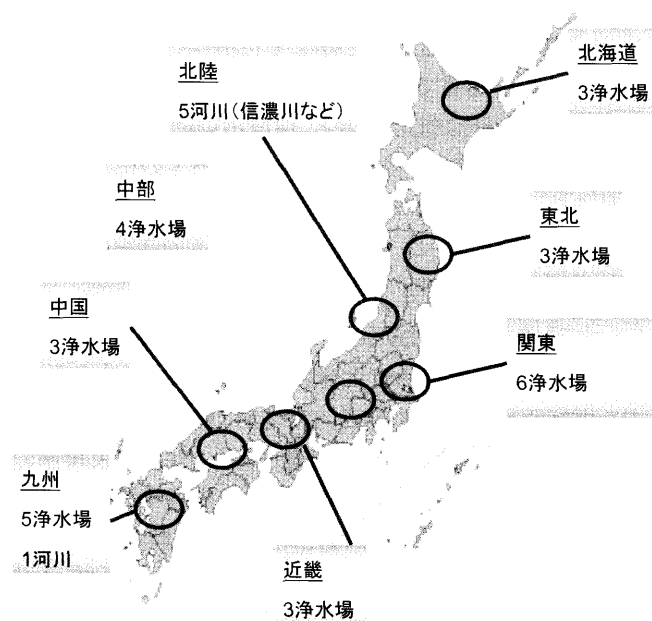


Fig. 4 毒物検知システムの導入状況

3. リファレンス同時測定形発光 *umu* センサ

3.1 開発の背景

(1) *umu* 試験

umu 試験 (試験管法) は、変異原性、すなわち遺伝子を損傷するような化学物質の試験方法である。

日本では、1993 年に上水試験方法として採用、1997 年に下水試験方法に採用されており、海外ではドイツの排水安全性試験のひとつとして採用されている (DIN38415-3)。

2000 年には、ISO/DIS13829 として、水と排水の遺伝子毒性試験法として承認され、2001 年には排水安全性試験 (ISO/TC147/SC) として採用されている。

(2) センサーの開発^{3), 4)}

umu 試験法は Ames テストより手法が簡略化されているも

の、酵素反応には希釈、細胞破碎、手順を踏んだ試薬の分注など、煩雑な操作が必要である。また、レポーター遺伝子として β -ガラクトシダーゼ遺伝子を利用しているため、ある種の物質に対して感度が低い、着色による妨害が著しいという問題がある。

発光 *umu* 試験法 (*umu-lux* test) はレポーター遺伝子として海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群 (*luxCDABE*) を利用した変異原性試験法であり、*umuDC* 遺伝子の下流に発光遺伝子群を連結しており、本連結遺伝子導入株は変異原性物質に反応して発光する。

この方法の特長はレポーター遺伝子として発光遺伝子群を利用しているためルシフェラーゼとともに発光基質 (RCHO) を合成でき、宿主のサルモネラ菌が自ら発光する点にある。

よって、発光基質の添加や細胞破碎処理といった煩雑な操作が不用となり、簡便、迅速に変異原性を測定することが可能であり、また発光検出であるため試料の着色による妨害を受けず、*umu* 試験法よりも高感度な変異原性の検出が可能である。これらの特長から発光 *umu* 試験法はバイオセンサー開発におけるエンドポイント測定の迅速化、高感度化、検出系の簡略化、自動化などの有利であると考えられる。

そこで、発光 *umu* 試験法の簡易化、自動化を目指し、発光 *umu* 試験菌株を用いた遺伝子損傷物質検出装置の開発を行った。

3.2 原理

発光 *umu* 試験の試験菌株 (TL210 株) は、発光遺伝子群 (*luxCDABE*) を *umuDC* 遺伝子の下流に連結した組換え遺伝子をサルモネラ菌 TA1535 株に導入した菌株であり変異原性物質に反応して発光する。

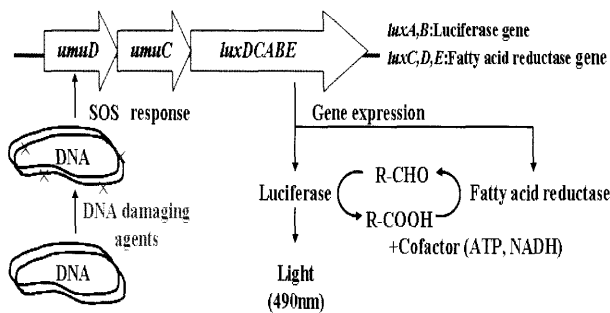


Fig. 5 発光 *umu* センサの原理

リファレンス株 (TL210ctl 株) は、発光遺伝子群 (*luxCDABE*) をプラスミドベクター pBR322 のテトラサイクリン ORF に挿入した組換え遺伝子をサルモネラ菌 TA1535 株に導入した菌株であり、常にルシフェラーゼを発現し発光する。そのため、試料中の溶媒による TL210 株の発光量の減少を補正および環境試料中に共存し、菌の生育を阻害する有害物質を検出するリファレンス株として用いる (false negative の防止機能)。

3.3 センサーの構成

発光 *umu* センサーの構成を Fig. 6 に示す。微生物膜は

菌体を、菌株が漏出せず菌体へ栄養分と酸素の供給が可能な微孔性膜と菌体からの発光が透過できる光透過性膜とで挟み固定化した。微孔性膜としては菌株の漏出を防ぐため安全をみてポアサイズ 0.22 μ m のニトロセルロース膜を使用し、光透過性膜としては厚さ 0.03mm の透明ポリエチレンシートを使用した。

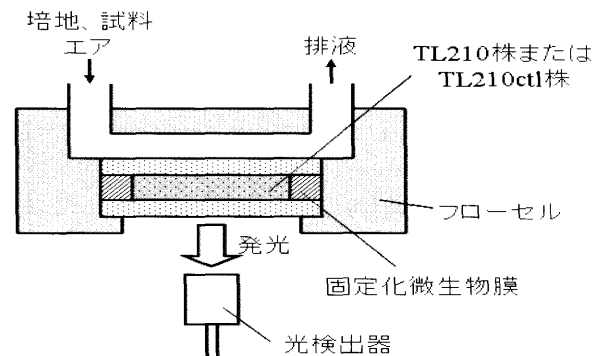


Fig. 6 発光 *umu* センサーの基本構成

3.4 センサーの特性

(1) 遺伝子損傷性物質への応答

遺伝子損傷性物質として終濃度 0.3mg/L(2%_DMSO) の 4NQO を暴露したところ、TL210ctl 株のセンサー出力が上昇し、TL210 株のセンサー出力の上昇も確認できた (Fig. 7)。また、終濃度 0.03mg/L(2%_DMSO) の AF-2 でも同様な結果が得られ、遺伝子損傷性物質を正確に検出可能であることがわかった (Fig. 8)。これらより、発光 *umu* センサーは通常の *umu* テスト (試験管法) と比較し、8 倍以上高感度であることがわかった。

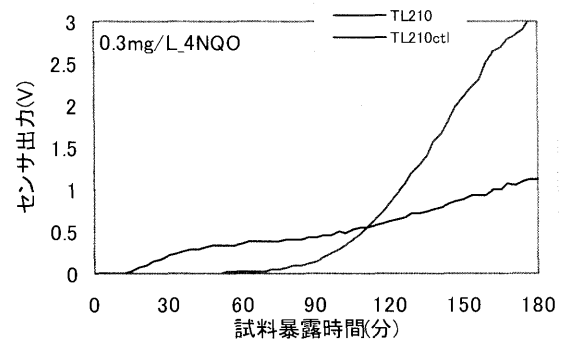


Fig. 7 4NQO の測定結果

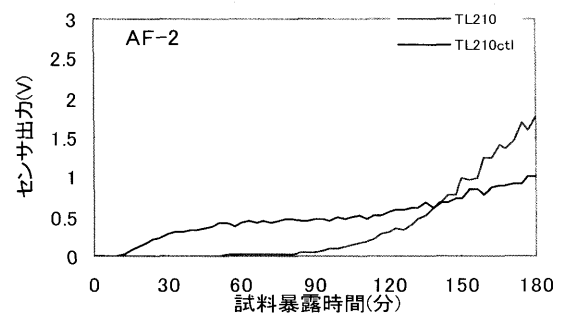


Fig. 8 AF-2 の測定結果

(2) false negative の防止機能の確認

生育阻害物質として終濃度 10mg Hg²⁺/L の塩化第二水銀を暴露したところ、両方の微生物膜ともに発光せず、リファレンス株を用いた false negative の防止機能が確認できた (Fig. 9)。

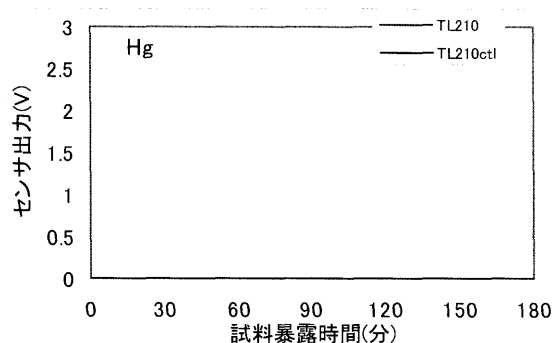


Fig. 9 常に Hg²⁺ の測定結果

[参考文献]

- 1) 田中良春, 「バイオ技術を利用した毒物センサー」, 『ぶんせき』, No.6(2000), 323-326
- 2) 田中良春, 横山勝治, 金川直樹, 「水の安全・安心をサポートする水質計測システム」, 富士時報, Vol.79, No.6(2006), 465-468
- 3) 田口和之, 田中良春, 今枝孝夫, 平井正名, 毛利紫乃, 山田正人, 井上雄三, 「最終処分場浸出水バイオモニタリング用バイオセンサーの開発」, 『第37回日本水環境学会年会講演集』(2003), 538
- 4) 田口和之, 田中良春, 今枝孝夫, 平井正名, 毛利紫乃, 山田正人, 井上雄三, 「バイオセンサーを用いた遺伝子損傷性物質検出装置の開発」, 『第37回日本水環境学会年会講演集』(2004), 98
- 5) 楠井隆史, 「水環境とバイオアッセイ 第24回 ヨーロッパにおける排水管理へのバイオアッセイ応用」, 『用水と廃水』, Vol.43, No.9 (2001), 58-59

3.5 適用分野

発光 *umu* センサーについては、現状、試作段階のものであり、製品化まで開発を進めていない。今後、排水毒性など測定ニーズが高まると予想された段階で完成度を高め、製品化したいと考えている。

4. まとめ

アメリカ、カナダ、ヨーロッパ諸国では水環境の管理にバイオアッセイの導入が進められている。特に、ドイツでは排水を規制する総合的なパラメーターとして毒性(バイオアッセイ)を利用している。ドイツ排水令(Waste Water Ordinance)の中で現状、Table.1 に示すような5種のバイオアッセイ(魚、ミジンコ、海洋性発光細菌、藻類、*umu* 試験)が用いられている⁵⁾。

欧米では、動物愛護の観点から、魚類による試験は代替試験の方法が検討されつつあり、今後、新たなバイオセンサーの開発も考えられる。バイオセンサーが水環境の分野で広く普及し、展開されることを期待している。

Table 1 ドイツ排水令の中で用いられているバイオアッセイ

供試生物	パラメーター	時間	規格
魚 <i>Leuciscus idus</i>	致死	48時間	DIN38412-L31
ミジンコ <i>Daphnia magna</i>	遊泳阻害	24時間	DIN38412-L30
海洋性発光細菌 <i>Vibrio fischeri</i>	発光阻害	0.5時間	DIN38412-L34
藻類 <i>Scenedesmus subspicatus</i>	生育阻害	72時間	DIN38412-L33
<i>Umu test</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	変異原性 (遺伝子損傷性)	2時間	DIN38415-T3