
Mini Review

原生動物ミドリゾウリムシに対するアクリルアミドの毒性

高橋利幸*, 小阪敏和, 細谷浩史

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻細胞生物学研究室
〒739-8526 広島県東広島市鏡山1-3-1

The effects of acrylamide on a green paramecium, *Paramecium bursaria*

Toshiyuki TAKAHASHI*, Toshikazu KOSAKA and Hiroshi HOSOYA

Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

はじめに

アクリルアミドは、土壌安定剤や接着剤等として使用されるポリアクリルアミドの原料である。ポリマーのアクリルアミドが生体に比較的無毒なのに対して、モノマーのアクリルアミドは実験動物及びヒトに対して神経障害やガンを誘発する事が報告されている。一方、国連の世界保健機関 (WHO) 及びスウェーデンの研究グループにより、糖質の豊富な食物を高温で加熱調理すると、食品中の糖とアミノ酸との間でメイラード反応という反応が起こり、調理食品中 (フライドポテトやポテトチップスなど) に高濃度のアクリルアミドが生成されることが報告された (WHO, 2002; Mottram *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2002)。この事は、我々が日常の食生活を通してアクリルアミドを取り込む危険性が高いことを示しており、食の安全性の面から大きな社会問題となっている。食品中のアクリルアミドの問題に加え、セメントなどに用いられたアクリルアミドの環境中への

漏出も環境問題の一つとして取り扱われている (Weideborg *et al.*, 2001)。従って、生物に対するアクリルアミドの毒性の作用機序の解明とその毒性を抑制する物質の探索は緊急の課題である。

重金属や発ガン物質、除草剤などの環境汚染物質が生物におよぼす毒性を評価するために、原生動物、微生物または哺乳動物培養細胞などを用いた様々な生物検定法が開発されている。従って、アクリルアミドの毒性を簡便・迅速に評価する為に、どのような生物検定法がベストであるか、その方法を探る事は極めて重要な課題である。

検出体としてのミドリゾウリムシ

我々の研究グループでは、環境汚染物質の毒性評価を目的とし様々な研究を行っている。これらの研究の一環として、原生動物ゾウリムシ種を用いて、各種ゾウリムシの増殖に対する様々な環境汚染物質の影響を既に報告している (Miyoshi *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2005) (表)。ゾウリムシは哺乳動物の培養細胞と異なり培養に特別な設備を必要としないという利点をもつ。又、ゾウリムシ種の中でも、ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は、体内に共生する共生藻に由来する光合成産物を利用できる為、バクテリアなどの特別なエサを必要とせず、

*Corresponding author

Tel: +81-82-424-7445, Fax: +81-82-424-0734

e-mail: mttaka@hiroshima-u.ac.jp

Received: 27 Jan 2006.

表：環境汚染物質に対する種々の細胞の感受性

| 環境汚染物質 | 細胞種 | | | | | |
|-------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| | <i>Paramecium trichium</i> ^a | <i>P. caudatum</i> ^a | <i>P. bursaria</i> ^b | HeLa ^b | NB-1 ^b | NRK-52E ^b |
| 除草剤 | | | | | | |
| 2,4-D | 365.9 | 1,300 | 72.33 | 968.68 | 1,628.0 | 1,773.5 |
| PCPhOH | 4.55 | 1.47 | 0.26 | 193.11 | 93.86 | 298.27 |
| Lindane | 92.1 | no data | 5.85 | 1,019.44 | 835.5 | 1,728.67 |
| Malathion | 50.3 | 43.34 | 51.00 | 1,726.26 | 1,214.0 | 1,125.38 |
| 金属含有物 | | | | | | |
| MgHgCl | no data | 0.035 | 0.0082 | 14.47 | 1.78 | 2.33 |
| NiCl ₂ | 2.35 | 8.41 | 5.10 | 319.35 | 529.6 | 785.79 |
| KCN | no data | no data | 340 | >5,000.0 | >5,000.0 | >5,000.0 |
| 発がん物質など | | | | | | |
| BisPhA | 0.85 | 10.8 | 23.5 | 198.8 | 135 | 275.32 |
| 2-AA | 0.98 | 0.15 | 0.074 | >1,000 | 2,849 | >1,000 |
| B(a)P | no data | no data | 90 | >1,000 | >5,000 | >1,000 |

(単位：μM)

環境汚染物質に対する細胞の感受性を各細胞の増殖率が半減する濃度 (IC₅₀値) で評価した (^aMiyoshi *et al.*, 2004; ^bTanaka *et al.*, 2005)。

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid PCPhOH: pentachlorophenol Lindane: γ-hexachloro-cyclohexane MgHgCl: Methylmercury chloride BisPhA: bis-phenol-A 2-AA: 2-aminoanthracene B(a)P: benzo[a]pyrene

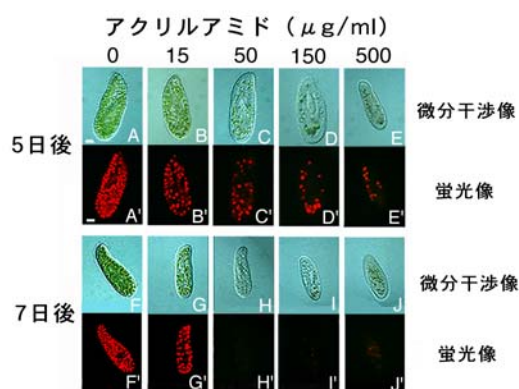


図1：ミドリゾウリムシに対するアクリルアミドの影響

アクリルアミド処理5日及び7日後のミドリゾウリムシ (Takahashi *et al.*, 2005a)。上段が微分干渉顕微鏡像、下段が蛍光顕微鏡像 (カラー写真はPDFファイル参照)。ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻は、紫外線照射により赤色の自家蛍光を発する。図からアクリルアミド濃度依存的に共生藻数が減少している事がわかる。

光照射のみで培養が可能であるという他のゾウリムシ種にはない特徴を持つ。我々の報告から、多くの環境汚染物質に対し、ミドリゾウリムシは培養細胞よりはるかに高い感受性を示すことが明らかにされている (Tanaka *et al.*, 2005)。これらの事実は、環境汚染物質の毒性評価を行う上でミドリゾウリムシが極めて優れている事を示している。本研究では、ミドリゾウリムシを用いて、アクリルアミドの毒性を検出する生物検定法の開発を試みた。

ミドリゾウリムシに対するアクリルアミドの影響

アクリルアミドを含む培養液でミドリゾウリムシを培養すると、アクリルアミド濃度依存的なミドリゾウリムシ本体の増殖阻害及び細胞内共生藻数の減少 (図1) が生じる (Takahashi *et al.*, 2005a; Takahashi *et al.*, 2005b)。特に、共生藻はアクリルアミドに対する感受性がミドリゾウリムシ本体よりも高く、低濃度のアクリルアミド存在下で共生藻数の大きな減少が起こる (図2)。この共生藻とミドリゾウリムシ本体のアクリルアミドに対する感度の差の為に、ミドリゾウリムシでは、アクリルアミド処理により、共生藻数の減少したミドリゾウリムシ (白い

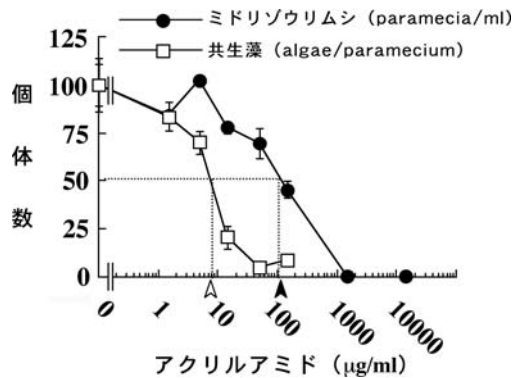


図2：ミドリゾウリムシと共生藻に対するアクリルアミドの影響

アクリルアミド処理7日後のミドリゾウリムシ数及び共生藻数を測定した。個体数は、アクリルアミド濃度ゼロの時の個体数を基準とした相対値で表示した (Takahashi *et al.*, 2005a)。アクリルアミド濃度依存的にミドリゾウリムシ数及び共生藻数の両者が減少を示すが、共生藻の方がより低濃度のアクリルアミドで個体数の減少を示す。白矢頭は共生藻、黒矢頭はミドリゾウリムシ本体のアクリルアミドに対する IC₅₀ 値。

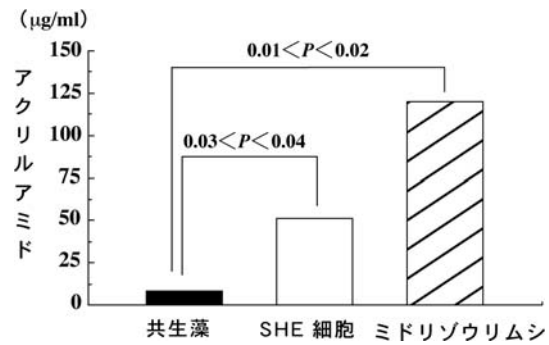


図3：各種細胞のアクリルアミドに対する感受性

ミドリゾウリムシ本体、共生藻及びハムスター由来の SHE 細胞のアクリルアミドに対する感受性を比較した (Takahashi *et al.*, 2005a)。上図棒グラフは、アクリルアミド存在下での増殖率が半減するアクリルアミド濃度を示している。ミドリゾウリムシ細胞内の共生藻は、ミドリゾウリムシ本体や SHE 細胞よりも低濃度のアクリルアミドで増殖率が半減する。これらの事から、共生藻はアクリルアミドに対する感度が非常に高いといえる。

ミドリゾウリムシ) が出現する。これらの事実から、白いミドリゾウリムシの出現を、アクリルアミドの毒性評価の指標として利用できないかと考えた。

アクリルアミドの検出におけるミドリゾウリムシの有効性

アクリルアミドの検出におけるミドリゾウリムシの有効性を検証する為に、アクリルアミドに対する感受性をミドリゾウリムシ及びハムスター由来の SHE 細胞で比較した (Takahashi *et al.*, 2005a) (図3)。両者の比較の基準として、ミドリゾウリムシでは、アクリルアミド処理7日後のミドリゾウリムシ本体及び共生藻の IC₅₀ 値 (図2参照) を用い、SHE 細胞では、アクリルアミド処理7日でコロニー形成率が半減する濃度 (*SHE細胞の感受性: Park *et al.*, 2002) を用いた。両者を比較した結果、共生藻はミドリゾウリムシ本体やSHE細胞に比べ、アクリルアミドに対する感受性が高い事が明らかとなった。

環境中のアクリルアミドを感知し、さらに漏出濃度の概算を行うには、幅広いアクリルアミド濃度に

感受性を示す指標生物が必要である。ミドリゾウリムシは、アクリルアミドに対して耐性を示すミドリゾウリムシ本体と感受性の高い共生藻の共生体である。従って、図2及び図3で明らかな様に、ミドリゾウリムシの個体数の変化及び白いミドリゾウリムシの出現比率を指標にすれば、5 μg/ml程度から1000 μg/mlの範囲でのアクリルアミドが感知可能である。これまでに報告されている環境中へのアクリルアミドの漏出濃度は、9.7~90.6 μg/mlであるという報告があるので (Weideborg *et al.*, 2001)、ミドリゾウリムシを用いてアクリルアミドの感知を行う事は十分可能である。それに対して、ハムスター由来の細胞や他種の動物細胞では、感知できる濃度範囲がミドリゾウリムシに比べ狭く、環境中に漏出する低濃度のアクリルアミドを検出できない。これらの事実から、ミドリゾウリムシを用いてアクリルアミドを検出する方法は、哺乳動物培養細胞を含む他の生物検定法よりも優れた方法であると考えられる。

おわりに

現在、多種の生物が生物検定法の材料として実際

に使用されている。しかし、検定結果判定の定量性に優れた哺乳動物培養細胞などは、それらの維持・管理及び設備に要する費用や手間の負担が大きく、検定の簡便性に問題がある。一方、ミドリゾウリムシは、原生動物の中でもとりわけ株の培養や維持・管理が容易な生物である。特に、アクリルアミドによるミドリゾウリムシの白化は、高度な分析機器を必要とせず、簡易な顕微鏡を用いた目視で観察が可能である。しかし、アクリルアミド以外にもミドリゾウリムシを白化させる物質が複数知られており（除草剤など）、環境中におけるアクリルアミドの毒性を正確に評価する為に、それらの影響をどのように除外するかについては今後の重要な課題である。

参考文献

- Press Release (2002) WHO / 32, 26 April
- Miyoshi N., Kawano T., Tanaka M., Kadono T., Kosaka T., Kunimoto M., Takahashi T. and Hosoya H. (2003) Use of Paramecium species in bioassays for environmental risk management: Determination of IC₅₀ values for water pollutants. *J. Health Sci.*, 49, 429-435.
- Mottram D. S., Wedzicha B. L. and Dodson A. T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449.
- Park P., Kamendulis L. M., Friedman M. A. and Klaunig J. E. (2002) Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicol. Sci.*, 65, 177-183.
- Stadler R. H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P. A., Robert M. and Riediker S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449-450.
- Takahashi, T., Yoshii, M., Kawano, T., Kosaka, T. and Hosoya, H. (2005a) A new approach for the assessment of acrylamide toxicity using a green paramecium. *Toxicol. in Vitro*, 19, 99-105.
- Takahashi, T., Yoshii, M., Kosaka, T. and Hosoya, H. (2005b) The effect of acrylamide inducing the reduction of nitrobluetetrazolium on the ciliate and human cultured cells. *ITE Lett. on Batteries, New Technol. Med.*, 6, 50-58.
- Tanaka M., Ishizaka Y., Tosuji H., Kunimoto M., Hosoya N., Nishihara N., Kadono T., Kawano T., Kosaka T. and Hosoya H. (2005) A new bioassay for toxic chemicals using green paramecia, *Paramecium bursaria*. In: *Environ. Chem.* (Eds., Lichtfouse, E., Schwarzhauer, J. and Robert, D.), Springer-Verlag, Berlin, 673-680.
- Weideborg M., Källqvist T., Ødegard K. E., Sverdrup L. E. and Vik E. A. (2001) Environmental risk assessment of acrylamide and methylolacrylamide from a grouting agent used in the tunnel construction of Romeriksporten, Norway. *Water Res.* 35, 2645-2652.