

環境水及び化学物質の複合毒性に関する定量的評価の試み

Quantitative evaluation of toxicity of environmental water and chemicals mixture

庄 司 良*・大村佳子**・酒井康行*
迫田章義*・内海英雄***・鈴木基之*

Ryo SHOJI, Keiko OHMURA, Yasuyuki SAKAI,

Akiyoshi SAKODA, Hideo UTSUMI and Motoyuki SUZUKI

1. はじめに

最近、環境水中の多種多様な化学物質による人体への影響が問題になっている。特に都市河川は様々な人間活動によって汚染されている。通常河川水中には、個々の物質の濃度は非常に低いが極めて多数の化学物質が同時に含まれており、それらの物質による複合毒性も考えられるため、水質基準のみで汚染の程度を把握することは不可能になってきている¹⁾。そこで、生体の応答を利用することにより、人体影響を包括的に評価できるバイオアッセイが注目されている²⁾。しかし従来のバイオアッセイは、個々の物質の毒性や環境水の包括的な毒性は評価できるものの、定量的な毒性データの解析手法が確立されていない。従って、実際の環境水リスク管理に必要な個々の物質の毒性データから環境水の毒性を予測することや、環境水の包括的な毒性情報から個々の物質の影響を見積もるといような検討はあまり行われていない³⁾。

そこで本研究では、ヒト由来細胞を用いたバイオアッセイによる化学物質及び環境水の毒性データを定式化し、得られたパラメータを用いて、多角的に毒性情報を収集・整理した。更に化学物質の2成分系と環境水の多成分系における複合毒性を、構成成分毒性データから予測する手法について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 培養方法

各種毒性試験に広く使われており、培養も比較的容易なヒト肝臓ガン由来細胞株 Hep G 2⁴⁾を各種化学物質を溶解

させた培地もしくは環境水から調製した培地で培養し、48時間後の細胞生存率を測定した。

環境水としては、鶴見川下流の汐鶴橋において採取した河川水を用い、必要に応じて超純水 (Milli-Q 水) で希釈して実験に供した。ちなみに本河川水は潮流の影響を受けていないことを電気伝導度の測定によって確かめている。この試料水 90% に 10 倍濃縮した DME 培地を添加し、血清 (FBS) 1.25% を添加して細胞に負荷した。培養は 5% CO₂, 37°C の下で行った。複合毒性実験に使用した化学物質を Table 1 に示す。使用した 5 種類の化学物質はいずれも環境中によく検出される代表的な環境汚染物質である。

負荷後 48 時間後における細胞生存率は AP (Acid Phosphatase; AP) 法⁵⁾によって測定した。つまり添加した *p*-ニトロフェニルフォスフェイトが細胞質に一定量存在する酸性フォスファターゼ (AP) により黄色の発色を呈する *p*-ニトロフェノールを吸光度を測定することで定量し、生細胞数を測定した。吸光度と生細胞数が直線関係となるように、原法を基本として予め測定手法を再決定した。すなわち、96 穴マルチチャンネルウェルプレート (0.32 cm²/well) に、細胞を播種密度 1 × 10⁵ cells/cm² で播種し、24 時間後に各種培地を負荷した。その後 48 時間培養後に AP の基質である *p*-ニトロフェニルフォスフェイト/酢酸緩衝液を 100 μl/well 添加し、2 時間 37°C の下で反応後、

Table 1 化学物質用量作用関係の Eq. 1 による回帰結果

Chemicals	m	s	R ²
2,4,5-Trichlorophenol	-1.311	0.4023	0.972
Tributyltin Chloride	-2.932	0.4137	0.957
Paraquat	-1.143	0.3945	0.987
1,2-Phenilenediamine	-0.8269	0.4780	0.887
Trinitrioloacetic acid	-0.1843	0.6695	0.866

*東京大学生産技術研究所 第4部

**東京工業大学大学院 理工学研究科

***九州大学大学院 薬学研究科

研 究 速 報

プレートごと ELISA リーダーで *p*-ニトロフェノールの 405 nm の吸光度を測定した。データの測定は、4 ウェルの平均値とした。この時、標準偏差は、平均値の ± 10 % 以内であった。

2.2 定式化

実験から得られた用量作用関係（濃度の対数に対する細胞生存率）に対して Eq. 1 に示すロジスティック式を用いて定式化を試みた。定式化には、非線形最小 2 乗法による回帰を行い、相関係数を同時に算出した。

$$y = 1 / (1 + \exp((x - m) / s)) \quad \dots \text{Eq. 1}$$

y : 細胞生存率(-)

x : log C

(C : 化学物質の濃度 (mM) 又は河川水の濃縮倍率)

m : log ED₅₀ (y=0.5 になる log C)

s : 曲線の傾きを間接的に表すパラメータ

また、環境庁未来環境想像型基礎研究制度における分担研究の成果である 180 種類の化学物質の細胞生存率試験のデータを定式化の適合性評価に用いた。

また、複合毒性の表現には、各化学物質を単独で暴露したときの毒性の積で表すことが出来ると仮定した。すなわち複合暴露系の細胞生存率を Y、構成成分単独暴露における細胞生存率を y_i とすると、

$$Y = \prod y_i \quad \dots \text{Eq. 2}$$

3. 結果と考察

3.1 単成分系用量作用曲線

Eq. 1 により定式化した用量作用曲線と実験データとの比較の一例を Fig. 1 に示す。Fig. 1 の Tributyltin Chloride を暴露した場合の回帰した用量作用曲線は比較的实验データとよく一致していたものの、Thiobencarb のような毒性以外の生理活性⁶⁾を有する物質を暴露した場合、相関係数は 0.77 程度と多少低い値にとどまった。しかし 180 種の化学物質のうち毒性を検出した物質については約 8 割の物質が相関係数 R²=0.80 以上と、データと回帰曲線は良く一致

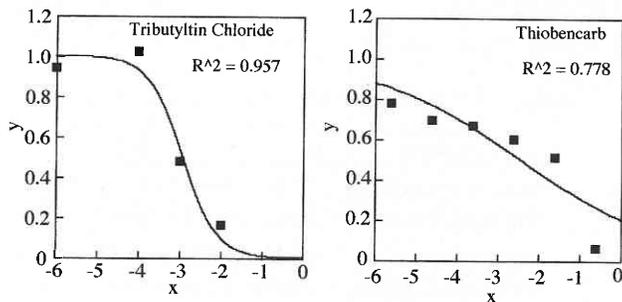


Fig. 1 単成分系用量作用曲線の例

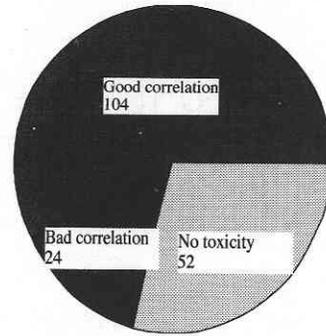


Fig. 2 用量作用曲線の相関性

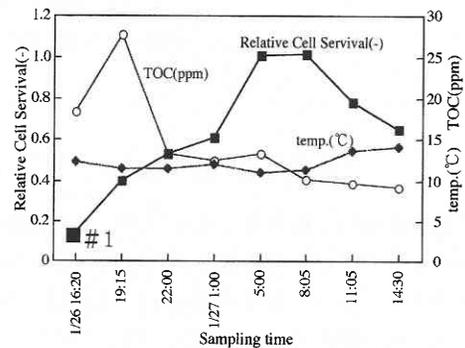


Fig. 3 鶴見川河川水の経時的毒性変動

した (Fig. 2) ことから、Eq. 1 は一部の例外を除いては単成分系の用量作用曲線を表す式として用いても差し支えないと考えられる。本研究において複合毒性のモデル化学物質として用いた 5 種類の化学物質の用量作用関係は Eq. 1 で良い相関性で回帰できた (Table 1)。しかし正確な毒性データの回帰が求められる場合、それぞれの化学物質の毒性発現機序に基づき、本研究で用いたロジスティックモデルだけではなく他の最適な回帰曲線 (例えば発ガン性物質に対してはワンヒットモデル⁷⁾) を使い分ける必要があると考えられる。

3.2 河川水用量作用曲線

鶴見川汐鶴橋付近において約 3 時間おきに 24 時間採取した河川水の毒性 (細胞生存率) と TOC (Total Organic Carbon concentration)、水温の変動を Fig. 3 に示す。水温は採取した時間帯では継続して安定した値を示したものの、TOC の変動は測定のはじめにおいて特に大きな変動が確認された。また、細胞生存率も低い値を示した。採取当日の天候は雨のち晴れで、雨水の流出によって地表に蓄積した大気汚染物質 (特に道路上における多環芳香族化合物⁸⁾) などの河川への混入などが原因の一つとして考えられる。しかし毒性の原因究明には、採取した河川水サンプルのな物質レベルの個別分析を行う必要がある。

今回採取した河川水サンプルのうち、最も毒性の強いサ

ンプル (1999. 1. 26 16:00) を希釈することにより得られた用量作用関係についても Eq. 1 を用いて回帰した曲線と実験データは $R^2 = 0.972$ という良い相関が得られた (Fig. 4). 同様に多摩川河川水サンプルについて同様の検討を行ったところ、極めて良い相関で同式による回帰ができた⁹⁾ (Table 2). 希釈した環境水の用量作用曲線に関しても Eq. 1 が概ね適用出来ると考えられる.

3.3. 化学物質の毒性情報による整理

3.1.において Eq. 1 により 180 種類の化学物質の用量作用関係を定式化した結果導かれたパラメータ m , s をプロットしたものを Fig. 5-(1) に示す. さしあたってフェノール類, その他の芳香族, その他の有機化合物, 重金属化合物のように分類した. 物質群による傾向の相違は確認できないが, それぞれの化学物質が持つ官能基などによって詳細に区分, 整理を試みることで, 水環境管理における物質の群単位での制御の指針になるものと考えられる.

この中で, 主たる環境汚染の原因となっている有機化合物のみに着目し, 物質質量基準の濃度 m (mol/l) を炭素量基準の濃度 ($\text{mg-C/l} \div \text{ppm}$) に変換したものを Fig. 5-(2) に示す. また同時に, Fig. 4 で示した河川水の用量作用曲線の濃縮倍率 m を同時に測定した TOC (ppm) データを用いて同じく炭素量に変換した m , s も同図中にプロットし, 河川水と化学物質単独のそれぞれの毒性情報を直接比較することを試みた.

環境水の毒性がある単独成分によって支配されているとき, 環境水の用量作用曲線はその毒性支配物質より大きな m と同値の s を持つと考えられる. この検討によって数十種類の毒性支配物質の候補が挙げられた. 本研究で行った細胞生存率試験とは別の独立した毒性評価系によって同様の検討を行うことで, 挙げられる候補物質と照合することで, この方法による毒性支配物質の探索がより確実なものとなると考えられる. 実際に LDL の取込み活性阻害評

Table 2 河川水用量作用関係の Eq. 1 による回帰結果

Sample	m	s	R ²
Sample 1	1.5748	0.7475	0.9248
Sample 2	1.3486	0.8988	0.9366
Sample 3	0.4795	1.6013	0.8769
Sample 4	0.2387	1.6895	0.8930
Sample 5	-0.4185	2.0467	0.9842
Sample 6	-0.6187	1.8913	0.8700

価に基づく毒性評価法¹⁰⁾によって同様の検討を行ったところ, 更に数十種類の毒性支配物質の候補が挙げられ, 照合したところ候補物質を数種類にまで絞り込むことができる見込みを得ている. 今回の河川水サンプルのように, かなり強い毒性が確認されるサンプルや, 工場排水など特定の毒性支配物質が存在するようなサンプルに対しては, こうした検討は有効になると考えられ, 水環境のリスク軽減のための水処理対策に応用できると考えられる.

3.4. 複合毒性

しかし一般的な環境水は多種多様な汚染物質の混合物であり, その総括的な毒性に与える各成分の単独の寄与は非常に小さいと予想されるため, 前章で示した手法は適用が難しいと考えられる. そこで総括的な毒性を微量構成成分の複合毒性として解析する方法を検討した. まず, 2種の化学物質の複合毒性を, 単成分系の用量作用曲線から Eq. 2 を用いて定式化した曲線と実験データを比較した (Fig. 6). 単成分系での毒性の強弱に関わらず, 多少相関性が悪くなった高濃度領域を除いて, 概ね良く曲線とデータが一致した. 2成分系の複合毒性を Eq. 2 のように構成成分単独の毒性の積で予測することが可能であると考えられる. しかし, 複合する化学物質の毒性発現機序によっては, 細胞の活性に依存して発現しないことも考えられる¹¹⁾ため, 単純に毒性の乗法で複合毒性を表現できないことも考えら

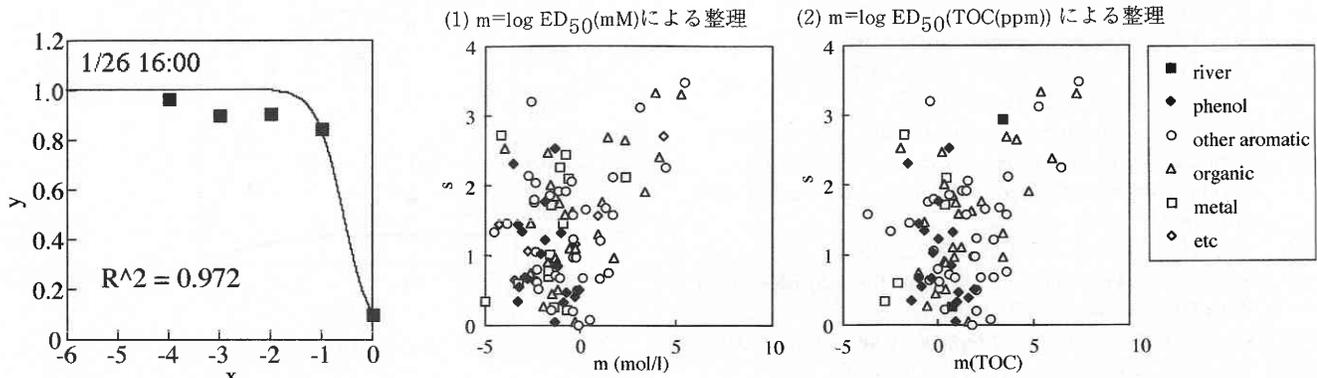


Fig. 4 河川水用量作用曲線

Fig. 5 毒性情報による整理

研究速報

れる。今後より多くの物質の組み合わせで検証していく必要がある。

また、多成分系 (n 成分系)である鶴見川河水に1,2-Phenylenediamine (PDA)を加え $n+1$ 成分系とした場合の複合毒性データをEq. 2を用いて定式化した (Fig. 7)。データと曲線は比較的良く一致していることから、 $n+1$ 系の複合毒性もEq. 2で表現できると考えられる。

以上の検討および3.1の結果から帰納的に考察すると、多成分系の複合毒性は構成成分単成分系の毒性の積で概ね表現できると考えられる。これにより、環境水中に存在する化学物質とその濃度が化学分析で定量出来れば、その物質が総括的な毒性に与える寄与率が容易に計算可能となり、リスク低減効果とそのコストに関する視点から、最も有効な管理対象物質(群)についての情報が得られると期待される。

4. 結論

動物細胞の生存率試験によるバイオアッセイの毒性データの定式化を行った結果、定量的な毒性情報を従来よりも多角的に導き出すことに成功し、水環境における優先、対策物質の候補を示す手法について検討した。加えて、多成分複合毒性は構成単成分毒性の定式化の結果得られる数式の積によって概ね表現できることを見出した。本研究で検討した方法論は、今後バイオアッセイ評価に基づいた水環境のリスク低減について重要な指針を与えると考えられる。

謝辞

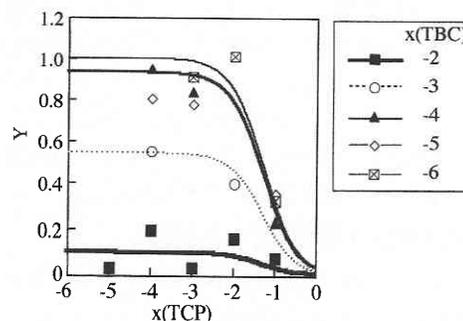
本研究の一部は環境庁未来環境想像型基礎研究制度の補助によるものである。

(1999年3月30日受理)

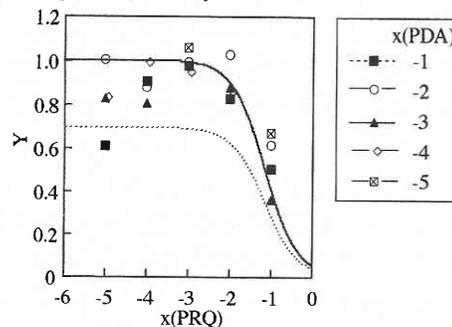
参考文献

- 1) 酒井康行ら, 生産研究, **47**, 216-219 (1995).
- 2) 鈴木基之ら, 水環境学会誌, **20**, 746-751 (1997).
- 3) 庄司良ら, 日本水環境学会講演要旨集, **33**, 79 (1999).
- 4) Aden *et al.*, *Nature*, **282**, 615-616 (1979).
- 5) Connolly *et al.*, *Analytical Biochemistry*, **266**, 136-140 (1986).
- 6) Chen *et al.*, *Journal of Pesticide Science*, **7**, 335-340 (1982).
- 7) Litchfield, *Annals of New York Academy of Science*, **123**, 457-479 (1965).
- 8) 小野芳郎ら, 水環境学会誌, **20**, 738-745 (1997).
- 9) Sakoda *et al.*, Proceedings of 7th Japan/Korea Symposium on Water Environment, 126-133 (1998).
- 10) Shoji *et al.*, *Water Science and Technology*, **38**, 271-278 (1998).
- 11) Witte *et al.*, *Toxicology Letters*, **87**, 39-45 (1996).

(1) 2,4,5-Trichlorophenol - Tributyltin Chloride



(2) Paraquat - 1,2-Phenylenediamine



(3) 1,2-Phenylenediamine - 2,4,5-Trichlorophenol

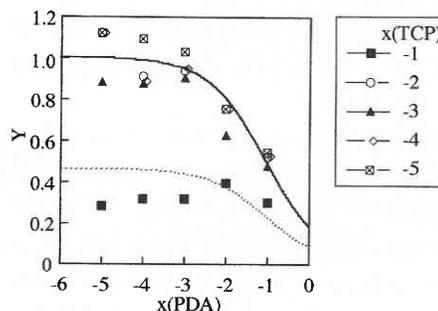


Fig. 6 単成分系複合毒性

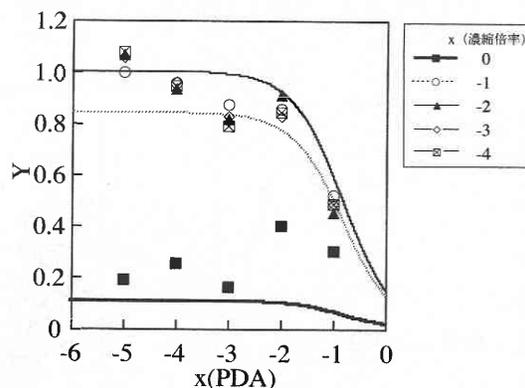


Fig. 7 多成分系複合毒性