

生体指標を用いた新規環境評価の提案 ～大気中の有機リン化合物測定法の検討～

2011年3月修了 環境システム学専攻 柳沢幸雄教授 47-096672 高木真衣

キーワード：環境評価、シックハウス症候群、化学物質過敏症、in vitro、生体影響、
有機リン化合物、大気、酵素阻害反応、呈色

【背景】

現在までに化学物質に関して、様々な法規制や環境基準値が定められてきたが、環境基準値以下でもシックハウス症候群や化学物質過敏症という健康影響が生じるケースがある。そのため、個々の化学物質の濃度を主体とした現在の環境評価は、発症を予防するには不十分であり、多種多様な化学物質が共存する際の未知の安全性について評価を行う新たな手法が求められている。

有機リン化合物は体内の酵素コリンエステラーゼを阻害して神経毒性を生じる物質であり、この環境濃度が問題となっている。酵素阻害反応を利用した食品や土壌中の有機リン化合物の測定手法は確立されているが、大気濃度を測定できる手法はまだない。

【目的】

本研究では化学物質個々の濃度を以って安全性を評価する方法に代わる、新たな環境評価方法を提案する。すなわち生体内と同じ反応を利用し、生体影響をベースに環境を評価することで、安全性評価を試みる。

また、同時に環境中の濃度、暴露程度も判定できるような予防スクリーニング手法として利用できる測定手法の確立を目指す。この案を具体化する一例として有機リン化合物に着目し、コリンエステラーゼとの特異的な反応を、呈色試薬を用いて視覚的、数值的に簡易的に検出する方法について検討した。

【研究概要】

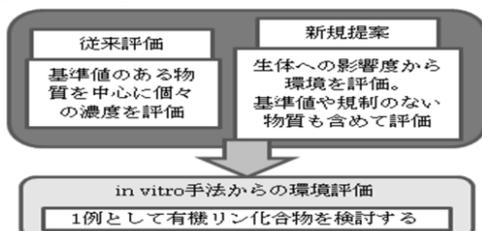


Fig.1 Flow of my study.

酵素阻害反応で得られた結果を基に、濃度評価および安全性面での環境評価を行う。

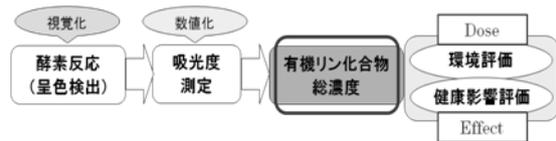


Fig.2 Flow of my experimental study.

【新規環境評価の提案】

1. 環境基準値の欠点

環境基準値は化学物質の特性や毒性を基に定められてきたが、基準値を用いた環境評価では考慮できていない点を以下にまとめる。

- ① 規制化学物質の濃度が基準値以下であっても必ずしも「安全」と言えない。その原因として、化学物質間における毒性の相加・相乗関係が存在すること、化学物質に対する感受性の違いが挙げられる。
- ② 規制されている特定の化学物質だけが着目されがちである
- ③ 規制された化学物質に代わる代替物質が新たな毒性物質として無尽蔵に増える可能性がある
- ④ 規制対象でない化学物質や未知物質の評価・規制ができない
- ⑤ 新たに規制をするには定性・毒性評価に時間もお金もかかる
- ⑥ 有害性を秘めているすべての化学物質に対応することができない
- ⑦ ②～⑥が繰り返される

2. 発症予防の観点から

発症の予防に繋げるために、今後の環境評価に求められることを以下にまとめる。

- I. 測定を簡略化し、「濃度」としてではなく「危険度」としての認知度を高め、健康被害を未然に防ぐ
- II. 化学物質を個別にではなく、環境全体としての総合的な測定・評価を行う
- III. 増え続ける代替物質のように構造や毒性が未知の化学物質も含めて評価する

3. in vitro 手法の応用

従来の物理・化学的手法では、低濃度の化学物質に対しても高精度な計測が可能な半面、濃度の計測のみで生体影響の評価は別に考えねばならない、さらに定期的な測定が困難であるという欠点があった。

これに代わり生物学的手法が注目されている。その一つが in vitro 手法で、酵素や抗体などの生体物質が、特定の化学物質と反応する際に生じる化学的・物理的変化を測定する手法である。環境中の濃度だけでなく生体への作用量の計測も可能であるとともに、比較的簡便性が高い。この手法は化学物質の中毒の判定や症状の経過を生身の体を傷つけることなく評価するために、臨床現場で利用されている。

本研究では、in vitro 手法の「化学物質の濃度だけでなく生体への作用量の計測も可能である」ことと「簡便性の高さ」に着目し、環境評価へ応用することで新たな環境評価のアプローチを提案したい。

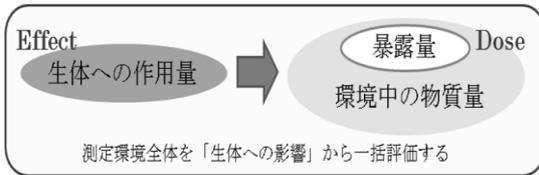


Fig.3 My proposition of environmental evaluation.

4. Dose⇒Effect から Effect ⇒Dose へ

現在の環境評価は、濃度を測定し、環境基準値と比較することで、「安全」といえるかを判定している。測定のきっかけが健康被害の顕在化である場合には、測定の目的は化学物質の定性・定量が主である。その様な測定は事後対応であり、未然に発症を予防するという意味での環境測定ではない。

環境中の濃度、暴露量を Dose、生体への影響を Effect として考えると、現行の環境評価は Dose⇒Effect のステップである。

本研究では、Dose⇒Effect のアプローチでなく、Effect⇒Dose へとアプローチすることにより、環境基準値ありきの濃度にとらわれた環境評価に代わる、生体への影響度を主体に環境を評価する考え方を新規提案する。これにより、化学物質を特定しなくても測定したい環境下に存在する有害性

を秘めた化学物質すべてを評価できると考えられる。また、環境基準値のない構造や毒性が未知の化学物質が今後現れても、それら全てを評価することが可能となる。

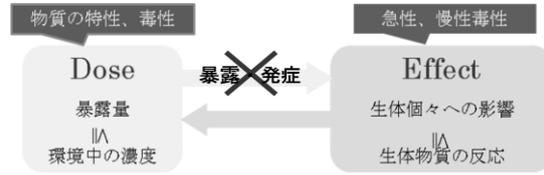


Fig.4 Flow of my approach.

【提案の具現化】

1. ターゲットの選定

新たな環境測定手法を具体化していくにあたり、有機リン化合物をターゲットとした。選択した理由は以下の通りである。

- ① 既知物質であり、定性定量できる。
→化合物内に P=O 結合や P=S 結合を持ち、GC/FPD で定性定量が可能。
- ② 物質個々、あるいは一つの群としての性質が既知である。
→有機リン化合物はコリンエステラーゼを特異的、不可逆的に阻害する。
- ③ 暴露して症状が顕在化する際、体内の生物化学的変化が既知である。
→コリンエステラーゼと結合し、コリン過剰により神経毒性を生じる。
- ④ 大気汚染物質として指針値濃度が存在し、目標の濃度目安が定められる。
→クロルピリホスには室内濃度指針値が存在する。
- ⑤ 汚染物質としての問題性が高い。
→ダイアジノン是一般の薬店で購入可能だが、使用方法を誤る人もいる。使用時に希釈が必要な散布農薬を希釈なしに散布する事故事例が存在する。

2. 既往研究の課題

GC/MS、GC/FPD に代わる検出法として、酵素阻害反応時の生化学的変化を呈色反応や電位差測定で検出する方法がある。発症予防スクリーニング手法として利用できる測定手法の確立を考慮すると、検出のわかりやすさと簡便さから呈色が望ましいといえる。しかし、大気中の有機リン化合物を測定するとなると、これまでに残留農薬等で検討されてきた有機リン化合物濃度以上

に微量な濃度を捕集・濃縮する必要がある。また、呈色試薬も微細な変化を鋭敏に反映できるものでなくてはならない。

3. 反応原理

有機リン化合物のコリンエステラーゼ阻害反応では、 H_2O_2 が生成する。本研究では、低濃度の H_2O_2 でも鋭敏に反応する SAT-3 を呈色試薬として選択した。

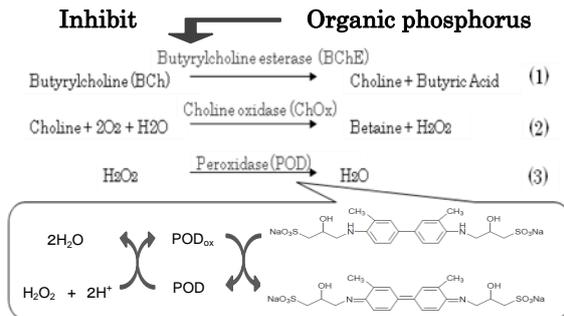


Fig.5 Principle of the BChE activity assay .

Color reaction of SAT-3 with H_2O_2 and POD.

【測定検出方法の簡略化の検討】

1. 呈色試薬 SAT-3 の検量線

実験方法

H_2O_2 水溶液 (10 μ M-100mM, 50 μ L)、POD(10-20 U/mL, 200 μ L)、リン酸緩衝液 (pH6.5, 50 mM, 700 μ L) を反応させ、SAT-3 で発色 5 分後に吸光度(474nm)を測定し、検量線を作成した。

結果

吸光度測定で直線性の得られる範囲は 10 μ M-10 mM の H_2O_2 溶液を添加した場合であった。POD とリン酸緩衝液で希釈されているので、最終的な濃度としては 0.43 μ M ~0.43 mM の範囲で直線性が得られた。

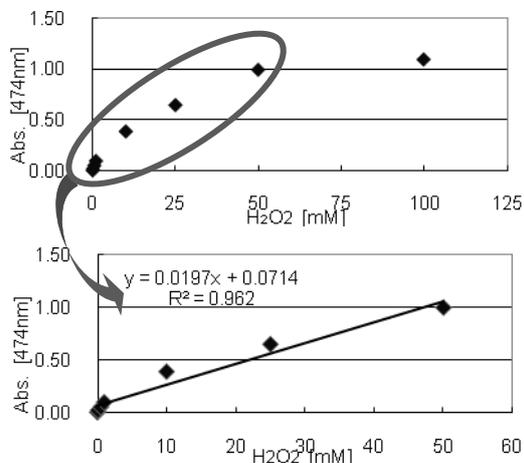


Fig.6 Standard curves as the function of POD activity.

2. BChE を失活させない溶媒の検討

実験方法

10%メタノール水溶液、アセトン、エタノールの 3 種を比較検討した。溶媒 50 μ L、BChE (250 mg/L, 200 μ L)を 22 $^{\circ}$ C で 1 分反応後、ChOx (100 mg/L, 200 μ L)、BChCl(50 mg/L, 300 μ L)を加え、さらに 1 分反応させ、POD(10-20 U/mL, 200 μ L)、2%硫酸水溶液 40 μ L、SAT-3(1 mM, 40 μ L)、2%硫酸水溶液(120 μ L)を加え 5 分後に吸光度(474 nm)を測定した。

結果

10%以下では酵素活性が保持できるとされるメタノール水溶液に対し、アセトンでは大きく吸光度が下がり、エタノールでは約 10%低下してメタノール水溶液よりやや低い値となった。以上より、10%メタノール水溶液を溶媒として選択することにした。

Table.1 Influence of solvents on the Inhibition of Enzyme Reaction.

	Abs.
10%Methanol aq .	0.939
Acetone	0.271
Ethanol	0.829

3. 酵素反応の最適条件の検討

実験方法

呈色試薬で検出可能な H_2O_2 濃度を生成する酵素濃度を調べるため、10%メタノール水溶液 50 μ L を用いて、2.と同様の手順で ①BChCl(0.1-100 mg/L)、②POD 添加前までの酵素反応時間(1-3-5-10 分)、③呈色後の発色時間(1-3-5-10-15-30 分)を BChE (0.5-500 mg/L)を変化させて検討した。

結果

①BChCl は 0.1-50 mg/L では検出限界以下、50-100 mg/L ではほぼ同等の H_2O_2 生成量となり、②酵素反応開始 1-3 分後までに検出可能な量の H_2O_2 が生成した。③BChE は 0.5-500 mg/L の全濃度範囲において、呈色反応 5 分後が最も吸光度誤差が少なくなった。以上より、BChCl 濃度 50 mg/L、酵素反応時間 1 分、発色時間 5 分でこれ以後の実験を行うこととした。

4. 温度別の H₂O₂ 検量線

実験方法

H₂O₂ 溶液 (10% メタノール水溶液 10 μ M-100mM, 50 μ L)を用いて、2.と同様の手順で溶液温度が 22、25、27 $^{\circ}$ C の場合の違いを検討した。

結果

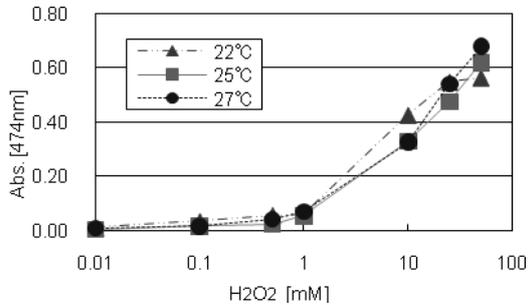


Fig.7 Standard curves as the function of POD activity.
(H₂O₂10%Methanol aq. 10 μ M-100mM)

n=3~5 で検討した結果、生成する H₂O₂ 濃度が低くなるにつれて、温度別の吸光度の差異が小さくなるという傾向を確認することができた。H₂O₂ 試薬でこのような傾向が確認されたことから、BChE が多く阻害される(H₂O₂ 生成量が減る)ほど、温度別の測定誤差としては小さくなると思われる。

5. 酵素反応で生成する H₂O₂ での呈色試験

実験方法

BChE 濃度 (0.5-500 mg/L) と生成する H₂O₂ の吸光度との関係を確認した。溶液温度 22、25、27 $^{\circ}$ C で、10%メタノール水溶液を用い、2.と同様の手順で検討した。

結果

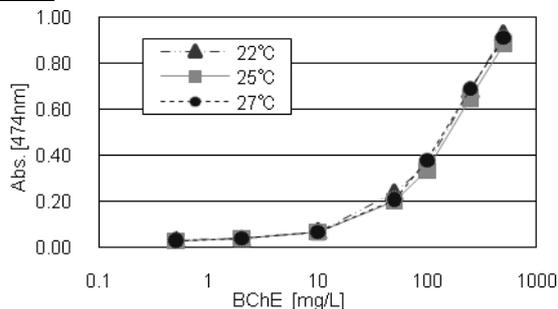


Fig.8 Standard curves as the function of POD activity.
Color reaction of SAT-3 with H₂O₂ and POD.

検討したすべての温度において、BChE の酵素反応で生成させた H₂O₂ でも、試薬の

H₂O₂ を用いた検量線と同様の吸光度変化を確認でき、吸光度の値から BChE の濃度を定量できることが確認された。また、酵素阻害率は BChE 濃度から算出されるため、吸光度から酵素阻害率を求めることができるため、今後は有機リン濃度と酵素阻害率との相関について検討する必要がある。

【測定法確立に向けての課題】

本研究ではコリンエステラーゼとの特異的な反応を、呈色試薬を用いて視覚的、数値的に簡易的に検出する方法について検討した。一貫した測定法として確立するために、本研究で検討した条件において今後以下の検討が必要である。

1. 有機リン化合物による酵素阻害反応と吸光度の相関、阻害率の確認。
2. 有機リン化合物 Thion 体→Oxon 体への酸化反応による検出感度の向上の検討。
3. 有機リン化合物の捕集(気相)→反応(液相)への転相の検討。
4. 気→液相→反応の用量-反応曲線(気相有機リン化合物濃度-酵素反応)の検討。
5. 既存測定手法との比較検討。
6. 測定値と曝露量、生体影響の比較対応。
7. 有機リン化合物以外マトリクスの影響。

【今後の展望】

低毒性の化学物質の開発・実用化が求められる中で、代替物質の増加に伴い検査需要に見合った測定装置の開発が求められる。現状の測定手法では検出に分析機器を用いるケースが多いが、簡略化とコストダウンのためには、装置の小型化や測定液量の微量化が必要となる。また、定性定量を行うだけでなく、生体への影響度を考慮して曝露量や生体影響評価から環境評価へと繋げることが望ましい。有機リン化合物で、酵素阻害反応の結果から曝露量と懸念される症状とが予測できる様に、他の化学物質でも両面からの評価アプローチが必要とされる。

【参考文献】

- [1]AbdullahA,et al,(2004)*Analytical Profile*
- [2] Brandy J. White,et al,(2003) *Sensors and Actuators B* 91, 138-142
- [3]L.Campanella,et al,(1992)*The Science of Total Environment*,123/124, 1-16