

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 41 - 2001

環境中の化学物質総リスク評価のための
毒性試験系の開発に関する研究
(特別研究)

Development of comprehensive toxicity testings for the assessment
of total risk from environmental chemicals

平成 10 ~ 12 年度

FY 1998 ~ 2000

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

SR - 41 - 2001

環境中の化学物質総リスク評価のための
毒性試験系の開発に関する研究
(特別研究)

Development of comprehensive toxicity testings for the assessment
of total risk from environmental chemicals

平成 10 ~ 12 年度

FY 1998 ~ 2000

独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「環境中の化学物質総リスク評価のための毒性試験系の開発に関する研究」
(期間 平成 10 ~ 12 年度)

特別研究責任者：森田昌敏

特別研究幹事：国本 学

報告書編集担当：国本 学

序

人類の生活の向上に計り知れない貢献をしてきた化学物質は、いま広範に環境を汚染しており、様々な環境媒体を介して野生生物や我々人類に対し悪影響を及ぼす可能性が指摘され、負の面がクローズアップされています。化学物質は、もはや我々の生活にとって欠くことのできないものとなっており、その使用を取り止めることは不可能である以上、化学物質によるベネフィットとリスクを正確に評価して、最小のリスクで最大のベネフィットが得られる使用形態を目指すことが理想でしょう。環境を汚染する化学物質のリスクを評価するためには、化学物質による汚染の実態を正確に把握することは必須です。しかし、10万種類にのぼるといわれる化学物質が環境中に存在しているというような状況のもとでは、個々の物質の化学分析による評価では、到底すべてをカバーすることはできません。

そのような状況の中で、本特別研究は、化学分析に替わる方法として、生物学的な反応を利用した評価試験（バイオアッセイ）を用いて、化学物質に由来する有害性・リスクを総合的に評価する手法の開発を試みたものです。さらに、環境中に存在する化学物質を総体として、総括的に評価することを目指しており、次世代の化学物質環境リスク管理に道を拓く可能性を秘めたものであります。

本特別研究がきっかけとなって、暫定的ではあっても生物学的な有害性総合評価指標を用いた信頼性、再現性のある環境モニタリングデータの蓄積が始まれば、そう遠くない将来これらのデータが、例えば水質に関して言えばBOD、CODと並ぶような指標値として規制を含む様々な分野で利用されるようになることが期待されます。

平成 13 年 9 月

独立行政法人 国立環境研究所

理事長 合 志 陽 一

目 次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の目的	1
1.2	研究の経緯	1
1.3	研究の概要	3
2	研究の成果	5
2.1	<i>In vitro</i> 毒性試験値の毒性学的意義付け	5
2.2	各種バイオアッセイの比較	6
2.2.1	参照化学物質の選定	6
2.2.2	参照化学物質を対象とした各バイオアッセイ及び実験生物毒性試験の実施	7
2.2.3	バイオアッセイデータの比較	7
2.3	バイオアッセイによる化学物質混合物の毒性評価	9
2.3.1	化学物質混合物の組み合わせおよび用量の設定	9
2.3.2	化学物質混合物試料を対象としたバイオアッセイの実施	10
2.4	環境水試料の有害性評価へのバイオアッセイの適用	11
2.4.1	基礎細胞毒性試験の簡便化	11
2.4.2	減圧濃縮による毒性回収率の検討	12
2.4.3	環境水試料の前処理と細胞毒性試験	12
2.4.4	水質データとの比較	15
2.4.5	農薬量との比較	16
2.4.6	細胞毒性の由来の解析	16
2.4.7	減圧濃縮法と組み合わせた基礎細胞毒性試験の有用性	16
2.5	排水試料へのバイオアッセイの適用	17
2.5.1	排水試料採取と前処理	17
2.5.2	排水試料の化学分析等	17
2.5.3	排水試料のバイオアッセイ	17
2.5.4	化学分析等の結果とバイオアッセイでの毒性値との比較	19
2.5.5	排水試料の浸透圧の影響の解析	19
2.5.6	排水試料の有害性総合評価におけるバイオアッセイの有用性	21
2.6	バイオアッセイのキット化の試み	21

2.7 今後の課題と展望	22
2.8 終わりに	23

[資 料]

研究の組織と研究課題の構成	27
1 研究の組織	27
2 研究課題と担当者	27
研究成果発表一覧	28
1 誌上発表	28
2 口頭発表	30

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

化学物質は、人類の生活の質の向上に計り知れないほどの大きな貢献をしたが、一方で環境中に放出された化学物質がヒトの健康や生態系に対して様々な有害影響をもたらしている。現在では、いわゆる「公害」のような特定の化学物質による重篤な環境汚染はみられなくなったものの、汚染の実態はますます複雑化、深刻化している。多くは微量ではあるが無数の化学物質による複合汚染であり、ダイオキシン類のように非意図的に生成されたもの、さらには環境中で変換されたものも存在している。したがって、化学分析によってこれらすべてを検出、同定し、定量するのは事実上不可能であり、現実には環境基準、要監視項目等に指定された一部の化学物質が化学分析によってモニタリングされているのみである。このため、極めて重大な有害性を持つ物質が見逃されてしまっている可能性も存在しているわけであり（例えば図1の化学物質A, B…, 等）、実際、昨今大きな社会的関心を集めている内分泌攪乱化学物質は、その典型例であるといえよう。それらを検出・評価できる試験系の

開発が待たれている。環境基本計画にも示されているように、環境を汚染しヒトの健康や生態系への有害な影響を及ぼすおそれのある化学物質のリスク評価は、環境リスク対策の重要な柱である。

比較的早くから環境モニタリングに使われてきている変異原性試験は、ヒトや実験動物での発ガンとの関連がかなり明らかにされているうえ、試料中に存在する化学物質の種類に関係なく変異原性という指標で判定し、通常の化学分析では漏れてしまうものまで網羅しうる。本特別研究では、様々な生物学的評価試験法（バイオアッセイ）を用いて、この変異原性試験に相当するような、試料中に存在するいわゆる一般毒性（急性、亜慢性毒性）の総量を反映しうる新たな有害性総合評価指標を確立することを目的とした。

1.2 研究の経緯

人間活動に伴って環境中に放出されたり、環境中で非意図的に生成された化学物質は、無数に存在しさらにその数は増大しつつある中、環境媒体の安全性評価は極め

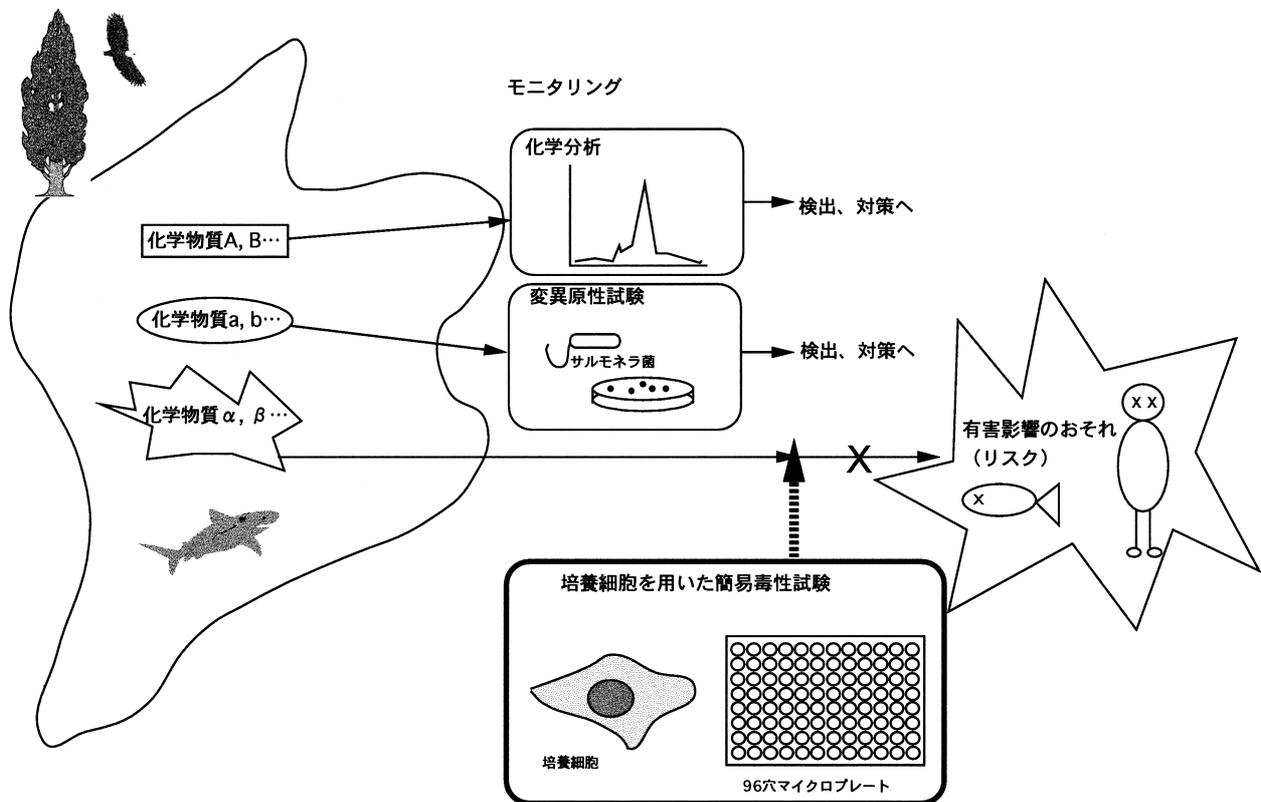


図1 化学物質による環境の汚染とバイオアッセイ

て重要な課題である。毒性試験の中心となってきた動物実験は現在でも最も重要で信頼性の高いものであるが、多種類の化学物質を迅速に評価するには様々な制約があり、また動物愛護の観点からも、動物実験に代わる方法の開発が急がれている。現在までにほ乳類細胞を用いた多くの *in vitro* (試験管内) 試験が開発・提案されてきたが、OECD 毒性試験ガイドラインでは遺伝毒性試験としていくつかリストされているだけで、遺伝毒性以外の一般毒性の試験法では皆無である(表1)。これは、生体内での吸収、分布、代謝等の毒物動態学的過程までも取り入れた試験系がまだ確立されていないためである。もう一つの大きな問題点は現在のところ試験方法に統一の基準がなく、結果の相互比較が不可能に近いことである。化学物質の評価指標として利用されるためには、何等かの基準の設定と組織的な取り組みが必須である。これらを解決するための試みが国際的な枠組みの中で数多くなされている。

また、化学物質による環境リスクの評価とその削減の試みは活発に行われてきているが、そのほとんどすべては個別の化学物質についてのものである。現実の環境中では、化学物質が単独で存在することはない。冒頭でも述べたように、微量ではあっても無数の化学物質の混合物として存在している。複数の化学物質が共存する場合、それらの毒性作用は相加的に現れる場合、相乗的に現れる場合もあれば、拮抗的、相殺的に現れる場合もあ

る。したがって、このような複合影響を、個別物質の毒性データに基づいて予測することは極めて困難である。

米国EPAでは、Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures を作成(1986年のGuidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures の補遺として1999年に発行)しているが、ここでは“Chemical Mixtures”を「標的集団における毒性に協同的に寄与する可能性のある複数の化学物質(同定不可能なものも含む)の組み合わせ」と定義している。想定されている混合物は、ディーゼル排ガス、水道水消毒副生成物、廃棄物処分場浸出水、農薬製品等である。混合物そのものを評価する手法と、単純な混合物中の構成成分に基づいて評価する方法が採り上げられているが、いずれの方法にも問題点が指摘されており、科学の進歩に応じて適宜改訂される予定となっている。米国では、構成成分の毒性に基づいた混合物のリスク評価は比較的多く試みられているようであるが、複雑な混合物そのものについて健康リスク評価が試みられた例は、ディーゼル排ガスのみである。

実際の環境試料(廃棄物処分場浸出水等)の場合、通常その構成成分が明らかにされるのは抽出濃縮等の過程を経た後で、しかも機器分析可能なものに限られ、重量ベースでは試料中成分の10%に満たない場合が多いという。未知物質を含む化学物質の混合体である環境試料の有害性を、総合的に評価できる試験系の開発が待たれ

表1 OECD 毒性試験ガイドライン項目

急性毒性試験 (Acute toxicity)

- 401 急性経口毒性試験
- 402 急性経皮毒性試験
- 403 急性吸入毒性試験
- 404 急性皮膚刺激性/腐食性試験
- 405 急性目刺激性/腐食性試験

皮膚感作性試験 (Skin irritancy)

- 406 皮膚感作試験

亜慢性毒性試験 (Sub-chronic toxicity)

- 407 反復投与経口毒性一齧歯類: 28日または14日試験
- 408 亜慢性経口毒性一齧歯類: 90日試験
- 409 亜慢性経口毒性一非齧歯類: 90日試験
- 410 反復投与経皮毒性: 21日または28日試験
- 411 亜慢性経皮毒性: 90日試験
- 412 反復投与吸入毒性: 28日または14日試験
- 413 亜慢性吸入毒性: 90日試験

生殖試験 (Reproduction)

- 414 催奇形性試験
- 415 一世代生殖毒性試験
- 416 二世代生殖毒性試験

毒性学的生体内運命試験 (Toxico-kinetics)

- 417 毒物動態(生体内運命)試験

神経毒性試験 (Neurotoxicity)

- 418 有機リン系物質の急性遅発性神経毒性試験
- 419 有機リン系物質の亜慢性神経毒性試験: 90日試験

癌原性・慢性毒性試験 (Carcinogenicity・Chronic toxicity)

- 451 癌原性試験
- 452 慢性毒性試験
- 453 慢性毒性/癌原性組合せ試験

遺伝毒性試験 (Genotoxicity)

- 471 遺伝毒性: サルモネラ(Salmonella typhimurium)復帰変異試験
- 472 遺伝毒性: 大腸菌(Escherichia coli)復帰変異試験
- 473 遺伝毒性: *In vitro*哺乳動物細胞遺伝学的試験
- 474 遺伝毒性: 小核試験
- 475 遺伝毒性: 哺乳動物骨髄細胞を用いる *in vivo*細胞遺伝学試験一染色体分析
- 476 遺伝毒性: *In vitro*哺乳動物細胞遺伝子突然変異試験
- 477 遺伝毒性: ショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)を用いる伴性劣性致死試験
- 478 遺伝毒性: 齧歯類を用いる優性致死試験
- 479 遺伝毒性: 哺乳動物細胞を用いる *in vitro*姉妹染色分体交換試験
- 480 遺伝毒性: 酵母(Saccharomyces cerevisiae)を用いる遺伝子突然変異試験
- 481 遺伝毒性: 酵母(Saccharomyces cerevisiae)を用いる体細胞組み換え試験
- 482 遺伝毒性: DNA傷害及び修復/哺乳動物細胞を用いる *in vitro*不定期DNA合成試験
- 483 遺伝毒性: 哺乳動物生殖細胞を用いる細胞遺伝学的試験
- 484 遺伝毒性: マウス・スポット・テスト
- 485 遺伝毒性: マウス転座試験

ている。

環境試料中に存在する一群の化学物質を総体として総合的に評価できる化学的及び生物学的試験系としては、既に実際に用いられているものもある。これらの方法によって、特定の物質群（例えばダイオキシン類、内分泌攪乱化学物質等）の総量が個別成分の化学分析をすることなく推定可能となり、その物質群についての総合的なリスク評価に道を開くものと考えられる。

これまでに我々は、ヒトを含む様々なほ乳動物細胞培養系を用いて、環境試料や各種有害化学物質の毒性評価、特に既知毒性物質の作用機構の解析を行ってきた。さらに、*in vitro* 毒性試験法の有用性評価のための国際的プログラムの一つ MEIC (Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity) に参加し、試験法の標準化と *in vivo* (生体内) での毒性値との関連づけを模索してきた。

本特別研究開始前に実施した関連研究課題は以下のとおりである。

「環境中の毒性化学物質を検出するための遺伝子導入動物の開発」

(科学技術庁振興調整費重点基礎研究, 平成7年度)

「環境水の安全性評価のための培養細胞を用いたバイオアッセイ系の簡便化と高度化に関する研究」

(総合健康推進財団研究助成, 平成7年)

「*In vitro* 系を用いたリスクアセスメント手法の開発」

(科学技術庁振興調整費国際共同研究, 平成8年度)

1.3 研究の概要

本特別研究では、培養細胞を用いた *in vitro* 毒性試験をはじめとする各種バイオアッセイ法を用いて、環境媒体の有害性を総体として評価できる指標の確立を目指した。したがって、これらのアッセイ系は、個別物質の毒性評価に用いられる毒性試験法とは、当然求められる条件が異なってくる。その条件としては、安価にかつ迅速に再現性のよいデータが得られること、未知物質を含む混合物試料にも対応可能であること、そしてできればヒトでの毒性値を反映しうること等が挙げられる。そのために踏むべきステップとしては、(1) 環境試料への適用を前提とした現行の各種バイオアッセイ法の validation (有用性, 妥当性の評価) (2) 環境試料への適用に伴う問題点の洗い出しと対策法の検討 (3) 化学分析に匹敵するような高感度なバイオアッセイの確立が考えら

れる。そこで本特別研究では、以下のサブテーマを中心として研究を進めた。

1) *In vitro* 毒性試験値の毒性学的意義付け

国際的な *in vitro* 毒性試験の validation プログラムである MEIC (前述) との共同で行っているが、これまでに、各細胞に共通の基本機能に対する毒性、基礎細胞毒性 (Basal Cytotoxicity) と、ヒトで急性毒性が発現する際の血中濃度との間の相関が見いだされつつあり、短期一般毒性の指標としての基礎細胞毒性の利用の可能性が示唆されている。ほ乳類細胞を用いた毒性試験値の毒性学的意義付け、すなわちヒトでの毒性との関連づけをさらに進めた。

2) バイオアッセイ法の標準化と簡便化

将来発展性のある試験法の確立と、より利用価値が高い試験データの蓄積のための第一歩として、特に環境試料への適用を念頭に置いて、*in vitro* 細胞毒性試験をはじめとする各種バイオアッセイ法の validation を行った。具体的には、環境中でその影響が危惧されている化学物質を約 30 種類リストアップし、研究所内外の研究者にそれぞれの試験系で毒性評価を行ってもらい、提供された試験データについての解析、評価を行った。その結果と、MEIC プログラム等ほかの validation プログラムでの成果並びにその勧告等を参考にして、主として用いるべき試験法の組み合わせを策定してその利用を呼びかけ、それらに必要な材料 (細胞, 培地等) のキット化と供給体制の確立も試みた。

3) 混合物試料を対象とする毒性試験の毒性学的意義付け

未知物質を含む混合物試料という現実の環境試料に対処するため、数種類の化学物質からなる人工的な混合物試料を 10 種類程度調製し、それらについて *in vitro* 毒性試験を実施し、化学物質単独の場合の毒性試験結果との比較解析を行った。さらに、一部の実験生物を用いた *in vivo* 試験も実施した。

4) 環境試料を対象とする際の技術的問題点の洗い出しと対応法の検討

環境試料を対象とする際の技術的問題点 (例えば試料の pH, 浸透圧の影響等) を洗い出して、それらへの対応法を検討した。さらに、低毒性の環境試料をも評価可能にするために、有害性の定量的な回収が可能な減圧濃縮法の確立と、細胞変性の初期段階の変化を高感度に検出できるバイオマーカーの検索を試みた。

化学物質による環境汚染を把握する簡易モニタリング系としてのバイオアッセイ法は、未だ完全なものではできあがっていない。しかし、いつまでも手をこまねいているわけにもいかないし、各研究者が個別に単発的に毒性試験を行ってもその利用価値は残念ながら決して高いものとはなり得ない。本特別研究によって、この分野にかかわる研究者による組織的な validation と試験法の標準

化が達成されれば、暫定的ではあっても基礎細胞毒性のような簡易毒性評価指標を用いた信頼性、再現性のあるデータの蓄積が始まる。そう遠くない将来これらのデータが、例えば水質に関して言えば BOD, COD と並ぶような指標値として規制を含む様々な分野で利用されるようになることが期待される。

2 研究の成果

2.1 *In vitro* 毒性試験値の毒性学的意義付け

生体，特にヒトに対する毒性の評価を行う際に，毒性試験の中心となってきた動物実験は現在でも最も重要で信頼性の高いものである。しかし，多種類の化学物質を迅速に評価するには様々な制約があり，また動物愛護の観点からも，動物実験に代わる方法の開発が急がれている。現在までにほ乳類培養細胞を用いた多くの *in vitro* 試験が開発・提案されてきたが，OECD 毒性試験ガイドラインでは遺伝毒性試験としていくつかリストされているだけで，遺伝毒性以外の一般毒性の試験法では皆無である（表 1）。これは，生体内での吸収，分布，代謝等の毒物動態学的過程までも取り入れた試験系がまだ確立されていないためである。もう一つの大きな問題点は現在のところ試験方法に統一的基準がなく，結果の相互比較が不可能に近いことである。化学物質の有害性評価指標として利用されるためには，何等かの基準の設定と組織的な取り組みが必須である。これらの解決のために，組織的な試験法の有用性評価（validation）が全世界で数多く行われている。その一つ，SSCT（The Scandinavian Society of Cell Toxicology）を中心とする MEIC（Multicenter Evaluation of *In vitro* Cytotoxicity）プログラムに参加した。

MEIC では，ヒトでの急性毒性発現用量が判明している化学物質を 50 種類参照化学物質として選定し（表 2），*in vitro* での毒性試験を実施している各国の研究機関にそれらの毒性試験を依頼し，提供された 50 % 毒性発現濃度データの解析・評価を行っている。このプログ

ラムでは，多様な試験法（ほ乳動物由来の初代培養細胞，株化細胞，ヒト由来の株化細胞，初代培養細胞を用いた系から，ミジンコ，植物，酵母，バクテリアを用いた系まで）が参加して，様々な毒性エンドポイントでの結果が集積された。

68 種類の試験法による，参照化学物質 50 種類についての試験結果がとりまとめられ，以下の結論が得られている¹⁻⁹⁾。1) 多くの化学物質の毒性は曝露時間に応じて上昇する。2) 一般にヒト細胞への毒性はほ乳動物細胞に対する毒性と良く相関するが，生態毒性学的試験法の結果とはさほど良い相関ではない。3) 試験法が似通っている場合，細胞種が異なっても似通った毒性値が得られる。4) 細胞種が同じ場合，試験のエンドポイントによらず似通った毒性値が得られる。なお，2) の結論では，ヒト細胞を用いた試験と生態毒性学的試験法（例えばミジンコでの急性遊泳阻害試験）との相関は，ほ乳動物細胞を用いた試験法との相関程良くはないとされているが，それでも相関係数 r^2 値は 0.6 前後であり有意な相関である。しかも，3 種類程度の化学物質についての結果を除外すればその値は 0.8 前後にまで上昇する。

本特別研究期間中，さらに解析が進められ，血液脳関門を通過する物質について補正を行うことにより，ヒト由来の培養細胞での 24 時間曝露における 50 % 阻害濃度 (IC_{50}) の平均値と，ヒトでの 50 % 致死血中ピーク濃度との間に非常に高い相関 ($r^2 = 0.88$) が認められることが明らかになった（図 2⁹⁾。そして，わずか 3 種類のヒ

表 2 MEIC プロジェクトにおける参照化学物質

1. Paracetamol	17. Xylene	34. Carbon tetrachloride
2. Acetyl salicylic acid	18. Nicotine	35. Isoniazid
3. Ferrous sulphate	19. Potassium cyanide	36. Dichloromethane
4. Diazepam	20. Lithium sulphate	37. Barium nitrate
5. Amitriptyline	21. Theophylline	38. Hexachlorophene
6. Digoxin	22. Dextropropoxyphene	39. Pentachlorophenol
7. Ethylene glycol	23. Propranolol HCl	40. Verapamil HCl
8. Methanol	24. Phenobarbital	41. Chloroquine phosphate
9. Ethanol	25. Paraquat	42. Orphenadrine HCl
10. Isopropyl alcohol	26. Arsenic trioxide	43. Quinidine sulphate
11. 1,1,1-Trichloroethane	27. Cupric sulphate	44. Fenytoin
12. Phenol	28. Mercuric chloride	45. Chloramphenicol
13. Sodium chloride	29. Thioridazine HCl	46. Sodium oxalate
14. Sodium fluoride	30. Thallium sulphate	47. Amphetamine sulphate
15. Malathione	31. Warfarin	48. Caffeine
16. 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid	32. Lindane	49. Atropine sulphate
	33. Chloroform	50. Potassium chloride

ト由来株化培養細胞を用いた細胞毒性試験系の組み合わせ（バッテリー）によって、ヒトでの急性毒性発現血中濃度が予測可能と結論された。

ある化学物質が細胞に対し毒作用を及ぼす場合、その作用点は極めて多様であり得るが、その細胞の由来した臓器に特異的な成分、機能、過程（例えば神経組織由来の神経細胞であれば、軸索タンパク質、神経伝達物質の合成と放出等）と、各細胞に共通に存在する基本的な成分、機能、過程（細胞膜、核酸合成等）の二つに大きく分けることができる（図3）。MEICプログラムでの結果からも明らかなように、細胞種の違いによらず多くの化学物質で似通った毒性値が得られている。このことは、多くの化学物質の細胞毒性が、各細胞に共通の成分、機能、過程に対する毒作用を反映していることを意味しており、MEICプログラムではこれを Basal Cytotoxicity（基本的細胞毒性あるいは基礎細胞毒性）と呼んでいる。この基礎細胞毒性は化学物質が有する最小限の細胞毒性とも言え、これに加えて、物質によっては臓器に特異的な機能に対する毒性（臓器特異的毒性）を有しており、

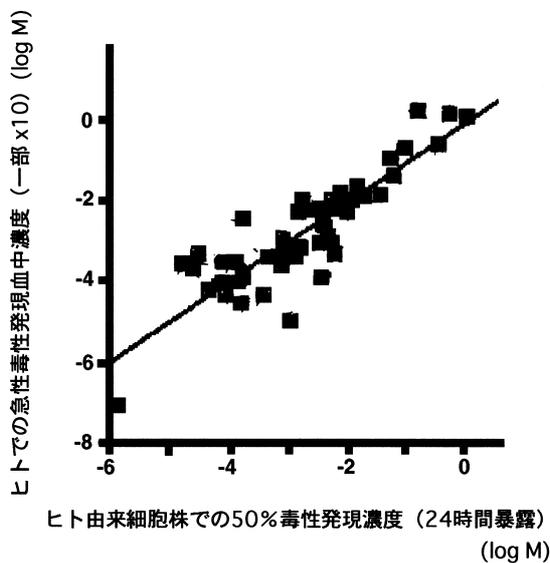


図2 化学物質によるヒトでの急性毒性と細胞毒性の関係

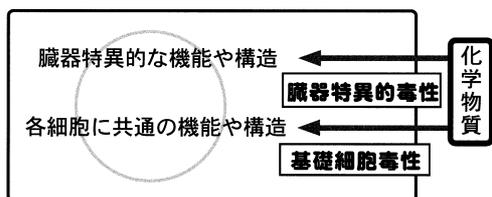


図3 基礎細胞毒性の概念

これはより低濃度で発現する。

米国 EPA では、高生産量化学物質リスク評価プログラム（通称 HPV Challenge）において、基本的毒性データがそろっていない化学物質の毒性試験を実施するにあたって、試験法の選定を行っているが、急性毒性試験（OECD 毒性試験ガイドライン 401号（表1）に相当）に代替する方法の候補として、このMEICプログラムの基礎細胞毒性試験を最優先に考えるとしている。

基礎細胞毒性試験は、安価に、かつ迅速に再現性のよいデータを得ることが可能であり、またヒトでの急性毒性発現血中濃度を反映するものであることも示された。したがって、基礎細胞毒性試験は有害性総合評価指標としてきわめて有力な候補であるといえよう。

2.2 各種バイオアッセイの比較

2.2.1 参照化学物質の選定

各バイオアッセイ系の感度と特異性を知るため、参照化学物質を用いた比較試験を計画した。環境基準項目、要監視項目、要調査項目等によりリストアップされており、環境での汚染が問題となっている化学物質 180 種類余りを対象として、ヒト神経芽細胞腫 NB-1 細胞を用いた基礎細胞毒性試験による予備的スクリーニングを行った。その結果と、各種毒性試験で広く使われていること、毒性の種類と強弱の多様性、入手の容易さ等を考慮し、MEIC プロジェクトの結果などを踏まえて、参照化学物質として溶媒対照の DMSO も含めた 32 物質を選定した（表3）。これら参照化学物質は、選定した。参照化学物質と入手先は以下のとおりである。Bis-phenol-A, p-nylonphenol（以上は東京化成より）、methylmercury chloride, pentachlorophenol, phenol（以上は半井化学より）、lindane（-HCH）、hexachlorophene（以上はSigma Chemical Co.より）、Triclosan（Irgasan）（Ciba-Geigy Ltd. Coより）、2-amino-anthracene, benz(a)pyrene, di-2-ethylhexyl phthalate, 2,5-dichlorophenol, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, formaldehyde, 4-nitroquinoline-N-oxide, sodium arsenite, thiuram, tributyltin chloride, trichlorophenol, Trp-p-2（Acetate）、paraquat, cadmium chloride, malathion, maneb, nickel chloride, potassium dichromate, triphenyltin chloride, benthocarb, mercuric chloride, potassium cyanide（以上は和光純薬より入手）。なお、水に対して難溶な物質に対しては、dimethylsulfoxide（DMSO, 和光純薬）に最終濃度 0.5 M

以下の濃度で溶解した原液を希釈して用いた。

多くあり、単純な比較は不可能であった。

2.2.2 参照化学物質を対象とした各バイオアッセイ及び実験生物毒性試験の実施

ヒト由来細胞並びに齧歯類由来細胞 10 数種類を用いた毒性試験系で参照化学物質の毒性評価を行った。また、実験生物としてヒメダカ、ミジンコ、線虫、ゾウリムシ、酵母を用いた毒性試験（表 4）も一部実施した。さらに、ヒトあるいは齧歯類での毒性発現濃度に関するデータの収集も行った。各試験系で得られた 50 % 毒性発現濃度（ μM ）を、表 5 に示したが、細胞活性を指標としたような試験系（ペルオキシゾームの増殖、細胞の遊走・浸潤等）をはじめとして数値化の困難な試験系も

2.2.3 バイオアッセイデータの比較

ヒト由来培養細胞を用いた細胞毒性試験では、参照化学物質のうち、毒性が弱いために IC_{50} を算出できなかった benz(a)pyrene と potassium cyanide の 2 種を除いた、28 種の化学物質で IC_{50} を算出できた。thiuram のみ、細胞種により IC_{50} に 100 倍以上の差が見られたものの、残りの 27 種の化学物質では、細胞種間で IC_{50} に 5 倍以上の差は見られなかった。図 4 には、細胞種間（NB-1, U87MG, MCF7）での IC_{50} （対数表記）の相関関係を示した。ここで得られた相関係数 r^2 は、NB-1 と MCF7 では 0.97, NB-1 と U87MG では 0.88, MCF7 と U87MG

表 3 本特別研究における参照化学物質

1. 2-Aminoanthracene	12. Sodium Arsenite	23. Potassium dichromate
2. Benzo (a) pyrene	13. Thiuram	24. Triphenyltin chloride
3. Bis-phenol-A	14. Tributyltin chloride	25. Phenol
4. Di-2-ethylhexyl phthalate	15. 2,4,5-Trichlorophenol	26. Benthio carb
5. 2,5-Dichlorophenol	16. Trp-P-2 (Acetate)	27. Hexachlorophene
6. 2,4-D	17. Paraquat	28. Triclosan
7. Formaldehyde	18. Cadmium chloride	29. Mercuric chloride
8. Methylmercury chloride	19. Lindane (gamma-HCH)	30. Cupric sulphate
9. 4-Nitroquinoline-N-oxide	20. Malathion	31. Potassium cyanide
10. p-Nonylphenol	21. Maneb	32. DMSO
11. Pentachlorophen	22. Nickel chloride	

表 4 本特別研究で実施したバイオアッセイとその実施機関

分類	名称	エンドポイント 1	エンドポイント 2	分担施設
ヒト由来細胞	NB-1	増殖阻害/生存率	神経突起伸展	国立環境研
	MCF7	増殖阻害/生存率		国立環境研
	A431	増殖阻害/生存率		国立環境研
	HeLa	増殖阻害/生存率		国立環境研
	WI38	増殖阻害/生存率		国立環境研
	U87 MG	増殖阻害/生存率		国立環境研
	HUVEC	増殖阻害/生存率	活性酸素産生	北里大
	HepG2	増殖阻害/生存率		国立環境研
齧歯類由来細胞	PC12h	増殖阻害/生存率		国立環境研
	NRK52E	増殖阻害/生存率		国立環境研
	RBL3A1uci/p4A1	増殖阻害/生存率	peroxisome 増殖活性	国立医薬食研
	HT1080	増殖阻害/生存率	細胞浸潤	静岡県大
実験生物	ヒメダカ	生存率 (96hr)		三菱安科研
	ミジンコ	急性遊泳阻害 (24hr)		三菱安科研
	線虫	急性毒性		熊本県大
	ミドリゾウリムシ	急性毒性	共生藻放出	広島大
	酵母	増殖阻害/生存率	プリオン生成他	生命工研
キット(準公定法)	ToxAlert 100 (Microtox)	生物発光阻害		国立環境研
	Daphtokit F magna	急性遊泳阻害 (24hr)		国立環境研

表5 参照化学物質の各種バイオアッセイでの毒性値 (EC₅₀, IC₅₀ or LC₅₀ (μM))

Chemicals	NB-1	MCF-7	U87MG	HeLa	Wi38	A431	PC12h	NRK-52E	HUVEC	HUVEC(DCF)	RBL3Aluci/p4A1	GFP-CHO-K1(IC20)
1 2-Aminoanthracene	*2849	*2704	*1039			*1153.97			20	ROS production	+	4.6
2 Benzo(a)pyrene	>5000								>1000		++	6.6
3 Bis-phenol-A	135	130.7	143.5	198.8	209.48	146.07	123.41	275.32	300	++	inconclusive	7.3
4 Di-2-ethylhexyl phthalate	*4380	1978	2369		2687.81	*4550.98			>1000		+	21.7
5 2,5-Dichlorophenol	469.3	477.6	374.4	572.52	411.6	488.06	578.34	710.18	1000	+++	inconclusive	>10
6 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	1628	4670	1241	968.68	1197.51	1302.97	1992.85	1773.5	>1000		+	>20
7 Formaldehyde	91.13	159.35	157.5	302.45	227.21	171.32	134.81	125.59	>1000		+++++	*2.3
8 Methylmercury chloride	1.78	3.91	2.99	14.47	8.56	6.81	0.99	2.33	20		++	>0.2
9 4-Nitroquinoline-N-oxide	0.39	0.14	0.5	1.28	3.22	0.8	0.53	0.47	1.5	+	+++++	*0.03
10 p-Nonylphenol	62.77	54.76	57.39	*180	35.78	64.17	196.99	166.68	50	+++	+++++	1.5
11 Pentachlorophenol	93.86	106.9	98.93	193.11	92.98	93.28	138.29	*298.27	200		+	1.56
12 Sodium Arsenite	8.7	16.86	5.94	*>100	20.92	14.62	9.03	22.83	30		+++++	0.96
13 Thiuram	0.14	0.09	13.92	*85.29	34.9	36.16	0.27	0.32	100		inconclusive	>1
14 Tributyltin chloride	0.48	0.33	0.58	0.67	0.9	0.42	0.61	0.71	1.5		++++	>2
15 2,4,5-Trichlorophenol	72.54	126.4	92.8	151.84	160.06	104.49	205.6	244.19	300	+	+++++	>10
16 Trp-P-2	14.05	17.23	6.02	12.12	15.55	3.14	8.96	18.67	100		+++++	0.78
17 Paraquat	134.6	152.8	632.4	*1587.17	873.16	166.8	57.76	373.17	>1000		-	>10
18 Cadmium chloride	12.55	36.53	10.12	*>100	*201.71	39.21	2.18	13.73	125		-	>1
19 Lindane (gamma-HCH)	835.5	611.5	1356	1019.44	866.91	236.52	752.11	1728.67	>1000		+++++	>20
20 Malathion	1214	1285	1535	1726.26	1168.51	976.02	*1962.64	1125.38	>1000		inconclusive	1.62
21 Maneb	29.57	42.81	26.22	*157.77	15.87	72.69	7.02	20.75	50		+++++	5.07
22 Nickel chloride	529.6	996.6	412.3	319.35	712.68	454.11	636.22	785.79	600		++	8.42
23 Potassium dichromate	3.37	6.24	2.34	4.07	3.19	3.7	1.91	9.85	12.5		-	>0.1
24 Triphenyltin chloride	0.21	0.25	0.21	0.36	0.31	0.27	0.22	0.5	1		++++	>0.01
25 Phenol	*8539	*10450	*5006	*5606.04	4880.15	2431.01	4332.06	4716.83	>1000		-	>50
26 Benthocarb	232.6	545.1	905.7	988.9	628.49	381.05	904.47	*3396.84	80		+++++	4.18
27 Hexachlorophene	27.89	23.3	17.06	18.8	27.42	13.94	45.28	144.3	100	+++	++	0.65
28 Triclosan	27.3	32.16	28.35	54.43	34.47	40.24	*55.77	*139.77	100	++	+++++	>1
29 Mercuric chloride	19.83	33.78	18.77	59.98	39.68	47.63	6.88	10.34	100		+++++	0.33
30 Cupric sulphate									20		inconclusive	7.65
31 Potassium cyanide									>1000		+	47.95
32 DMSO									>1%			*20% stimulation

MEIC(human)	MEIC(Animal)	Human(LC50)	Rat(LD50)	Medaka	Daphnid	Nematoda	Protozoa(1d)	Protozoa(5d)	DaphTox	ToxAlert	Yeast (LC50)	Yeast (IC50)	Yeast (HSP104)	
		(umol/kg)	(umol/kg)				0.1	0.07	0.07	164	8 mM	1.0mM	2.7mM	
							0	>200	80		0.84mM	1.8mM	ND	
							11.9	35	25	45.5	0.68mM	1.2mM	ND	
				*191.52	*>250		>100	>2500	>2500		>2.5mM	10mM	ND	
							17.6	30	40	20	>10mM	0.21mM	0.89mM	
2455	1148	1798	1698				4.4	55	50	>500	560	0.13mM	8.4mM	0.2mM
				942.4	419.58		>100	300	200	1200	1100	>5mM	1.6mM	1.3mM
				0.5	0.27		0.4	0.01	0.003	0.215	0.18	0.8 μM	2.9 μM	0.73 μM
							>1	0.16	0.05	2.82	1.4	0.3 μM	1.3 μM	0.61 μM
							0.2	8	5.5	1.37		4.5 μM	6.7 μM	20 μM
87.1	51.3	107.2	102.3				17	0.7	0.2	1.88		13 μM	36 μM	ND
				275.57	49.26		>10	7100	7100	53.3	1200	>1.0mM	0.59mM	89 μM
				0.828	0.765		9.3	2.5	2.5	0.025	0.69	4.1 μM	59 μM	9.9 μM
				0.039	0.031		>1	0.7	0.55	0.036	0.025	3.9 μM	1.1mM	2.0 μM
							9.3	2.25	2.5	7	3.25	0.26mM	12 μM	11 μM
				11	5.25		2.2	11.25	2.5	16		0.19mM	0.12mM	0.26mM
1820	851	190.5	537	386.14	111.28		>100	500	25	72		58 μM	22mM	0.8mM
							>100	2.5	0.45	0.96	320	1.4 μM	2.9mM	3.3 μM
89.1	281.8	831.8	263	0.478	2.02		8.2	45	6	24		>20mM	38mM	5.8mM
1479	575	2239	871	3.03	0.012		0.2	45	50	0.039		>2.0mM	1.6mM	1.6mM
							>100	10	10	3.65	6.2	7.9 μM	67 μM	88 μM
							>100	30	4.5	100		18 μM	3.0mM	99 μM
							10	>10	0.88	6.2	52	>0.1 mM	>0.1 mM	0.08mM
							>1	0.3	0.02	0.14		0.45 μM	3.7 μM	2.7 μM
7413	1698	1660	3388				>100	5000	1500	100	210	33mM	4.3mM	13mM
							100	45	5.5	10		6mM	0.71mM	5.3mM
35.4	3	524.8	138	0.265	0.046		0.3	0.55	0.5	0.13		0.39 μM	1.6 μM	0.74 μM
				*2.31	*0.93		0.6	3.25	4	0.94		8.5 μM	1.8 μM	3.3 μM
19.5	8.51	79.4	3.7	0.91	0.63		10	0.45	0.026	0.055	0.47	2.7 μM	52 μM	2.2 μM
501	389	1259	537				43.6	25	3.25	2.14		1.5 μM	3.3mM	11 μM
3715	2089	457.1	776.2	6.93	17.5		>100	525	300	54	1500	>50mM	1.7mM	55 μM
							>1%	>1%				>10%	-9.10%	8%

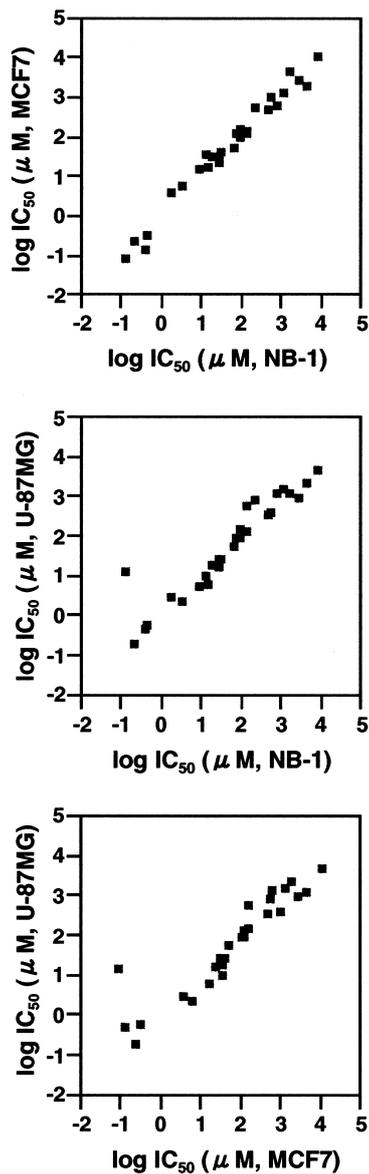


図4 参照化学物質の細胞毒性の細胞種間での比較

では0.84と、概ね高い値であった。これらの結果は、前項のMEICプロジェクトの結論でも述べられているように、多くの化学物質の毒性が、生物・細胞にとって共通の構造・機能への作用によって発現する「基礎細胞毒性」(図3)を反映したものであるためと考えられる。

比較的簡易な試験系として、上記の基礎細胞毒性試験(MCF7細胞の増殖阻害)と、海洋性発光細菌を用いた発光阻害試験(ToxAlert 100)、並びにミジンコ急性遊泳阻害試験(Daphtoxkit F magna)での結果の比較を行った。化学物質に対する各バイオアッセイの結果から50%阻害濃度(IC₅₀)を算出し、それぞれのアッセイ系間の関係を比較したところ(図5)、3種の試験系間で有意な相関関係が見られた。特に、ミジンコと海洋性発光細菌の間では、相関係数 $r = 0.83$ ($p < 0.01$)と、ほかと比べて強い相関が見られた。また、今回用いた参照化学物質に対する感受性は、培養細胞(MCF7)、海洋性発光細菌、ミジンコの順に高くなっていった。

ミジンコ急性遊泳阻害試験や海洋性細菌発光阻害試験(Microtox)は、欧米において排水管理等の現場ですでに導入されている例もあり、基礎細胞毒性試験が、それらと相関性のある試験値を与えたということは、有害性総合評価指標としての利用の可能性をさらに高めるものである。なお、今回用いた参照化学物質32種類に対する感受性の比較では、ミジンコ急性遊泳阻害試験 > 海洋性細菌発光阻害試験 > MCF7基礎細胞毒性試験の順に高かった。

2.3 バイオアッセイによる化学物質混合物の毒性評価

2.3.1 化学物質混合物の組み合わせおよび用量の設定

すでに述べてきたように、環境試料は未知物質を含む

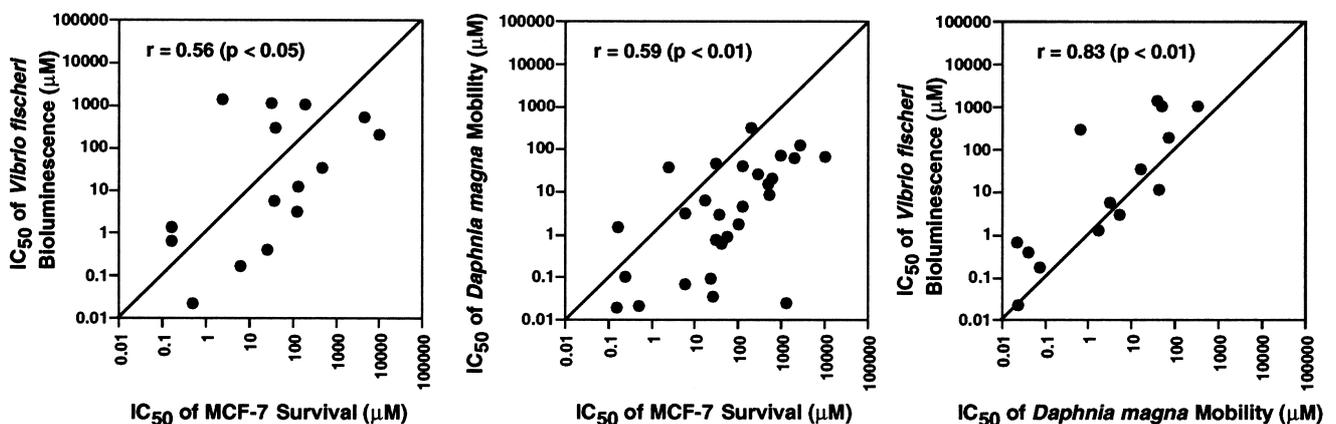


図5 参照化学物質の毒性影響のバイオアッセイ間での比較

無数の化学物質の混合物である。化学物質の複合影響評価の試みの第一歩として、個別物質についてすでに毒性試験を実施した前記参照化学物質の混合物についての毒性試験を策定した。その組み合わせについては、化学物質のカテゴリー（重金属、農薬、内分泌攪乱化学物質など）、個別試験での毒性の強弱等を判断基準として、表6に示した13種類の混合物を作成した。用量は、混合液原液中での濃度が個別試験で得られたEC₅₀値の100倍となるように調整した。ただし、EC₅₀値が得られなかった物質については、実験可能な最高濃度に調整した。

2.3.2 化学物質混合物試料を対象としたバイオアッセイの実施

上記の参照化学物質混合物試料を対象として、ヒトおよび齧歯類由来培養細胞を用いた毒性試験、並びに線虫、酵母、ミジンコを用いた毒性試験を実施した。しかし、多くの試験系では個別物質の試験の場合よりもさらに数値化が困難であり、相互比較はほとんど不可能であった。そこで、ヒト由来の株化細胞3種類（NB-1, U87MG, MCF7）を用いた試験での結果についてのみ、詳細な解析を行った。

図6には、13種類の化学物質混合物試料並びに溶媒対照としてのDMSOの基礎細胞毒性試験の結果を示した。暴露の最高濃度を、各構成化学物質のEC₅₀となるように調整し、その後×1/2の段階希釈で暴露を行ったものである。用量が相加的であると仮定される（作用点が同一）場合には、用量反応曲線はEC₅₀ = 0.4前後（約5倍希釈程度）を与えるはずであるが、実際多くの混合物試料のEC₅₀はそのあたりに集約している（図7）。も

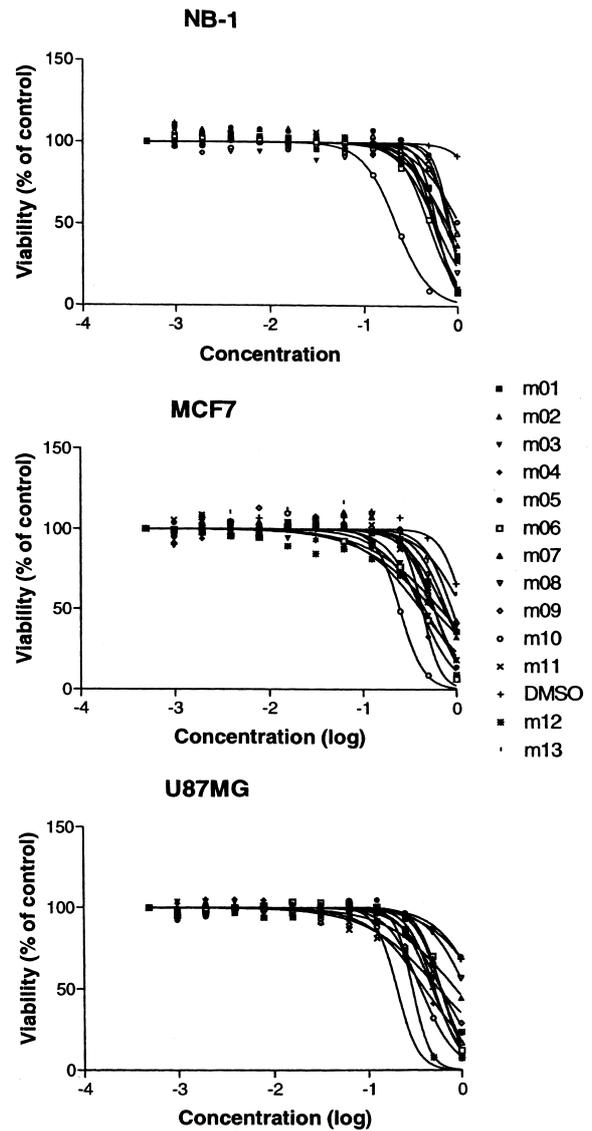


図6 参照化学物質混合物試料の細胞毒性試験

表6 化学物質混合物の組合せ

	Chemical 1	Chemical 2	Chemical 3	Chemical 4	Chemical 5	Note
Mixture 1	3	16	18	21	24	Variety
Mixture 2	8	12	18	23	24	Metals
Mixture 3	3	4	10	14	21	EDCs
Mixture 4	11	13	15	20	28	Biocides
Mixture 5	2	7	17	28	29	Minor
Mixture 6	2	3	4	17	20	Weak
Mixture 7	7	10	11	15	16	Moderate
Mixture 8	12	18	21	28	29	Strong
Mixture 9	8	13	14	23	24	Very strong
Mixture 10	11	12	17	20	29	MEIC
Mixture 11	7	8	13	14	17	Ecotox. tested
Mixture 12	7 8 10	11 12 13	14 15 16	18 21 23	24 28 29	m7 + m8 + m9
Mixture 13	2 3 4 7	8 10 11 12	13 14 15 16	17 18 20 21	23 24 28 29	m6+m7+m8+m9

もちろん、いくつかの混合物試料では、相乗的な効果、相殺的な効果が認められているが、EC₅₀ 値が相加的と仮定される場合の10倍以上、あるいは10分の1以下になったものはなく、基本的には混合物の毒性作用は相加的と仮定し、不確定係数（uncertainty factor）として10をみておけば、大きな支障は生じないものと考えられた。

米国 EPA では、化学物質混合物のリスク評価を行う際のガイドラインを最近改訂したが、その中で化学物質混合物の毒性は、デフォルトとしては各構成化学物質の毒性が相加的（用量の相加性もしくは効果の相加性）であると仮定するとしており、今回得られた結果もそれを支持するものであった。

以上のことから、ヒト由来培養細胞を用いた基礎細胞毒性試験は、化学物質混合物の有害性評価にも利用可能であり、環境試料中の有害性を総合的に評価するための試験系としての利用に道が開かれた。

2.4 環境水試料の有害性評価へのバイオアッセイの適用

最近、河川水等の低毒性環境水試料の有害性が、様々なバイオアッセイ系によって評価されている。しかし、多くの試験系では、樹脂吸着や抽出操作等によって事前に試料を高倍率で濃縮するため、試料の本来持っている毒性が定量的に回収されていない恐れがある。また、仮に試料中の毒性を高感度に検出できる試験系であっても、毒性学的意義が明確化していない場合、得られた結

果の解釈が困難となる。

これらのことから、試料中の毒性を定量的に回収できる濃縮法と、毒性学的意義が明確になっているバイオアッセイ系とを組み合わせれば、低毒性環境水試料の有害性をより正確に評価できると考えられた。

そこで、これらの条件を満たす試験法として、試料の減圧濃縮と、ヒト由来細胞を用いた基礎細胞毒性試験とを組み合わせる方法を採用し、その有用性について検討した。

2.4.1 基礎細胞毒性試験の簡便化

通常細胞毒性試験では、継代培養で維持された細胞を、計数後適宜希釈したものをプレートに播種して試験を実施する。しかし、この場合継代に伴って細胞の性質（化学物質への感受性等）が変化する場合があり、また継代培養には多くの労力、費用に加え、微生物汚染のリスクも伴う。試験法の簡便化と、再現性を高める目的で、同一ロットで大量に作成した凍結保存細胞を解凍・培養後そのまま細胞毒性試験に用いることを試みた。継代培養で維持した細胞との感受性・特異性の違いについて参照化学物質の一部を用いて比較検討したところ、少なくとも基礎細胞毒性のようなエンドポイントで評価する場合には、両者にほとんど差がないことが明らかになった（図8）。そこで、以降の細胞毒性試験は、以下のように実施した。液体窒素中で凍結保存しておいたヒト由来培養細胞を解凍し、96穴プレートに播種した（初期濃度はおよそ $5 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{well}^{-1}$ ($5 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$))。

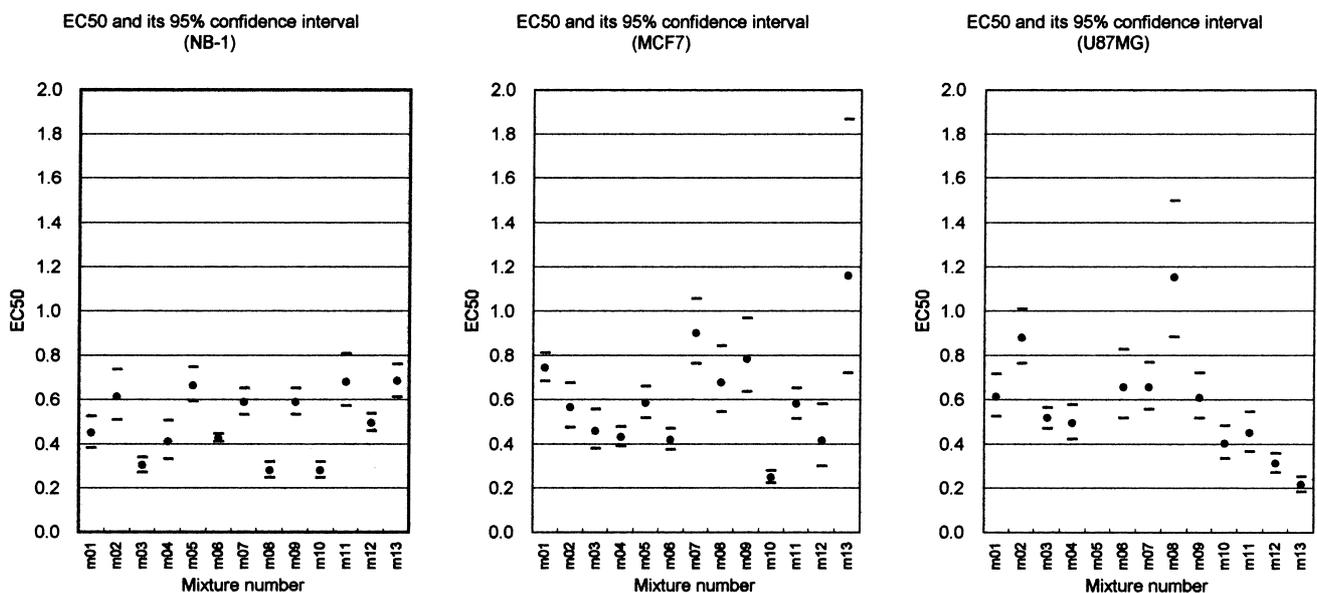


図7 参照化学物質混合物試料における細胞毒性の相加性の検証

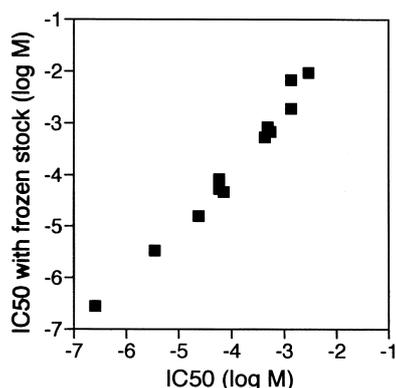


図8 凍結保存細胞と継代培養細胞での細胞毒性値の比較

24時間 (NB-1 では48時間) 細胞を前培養した後、培地混合試料を添加し、希釈系列を作成した。48時間の暴露後、クリスタルバイオレット染色法により、超純水に対する各試料の相対細胞生存率を求めた。

2.4.2 減圧濃縮による毒性回収率の検討

cadmium chloride (CdCl_2), formaldehyde (HCHO) の2種の化学物質を用いて、減圧濃縮による毒性成分の回収率を検討した。それぞれの化学物質について、非濃縮試料(暴露時の試料最高濃度が CdCl_2 で $100 \mu\text{M}$, HCHO で 1 mM となるよう調製した試料)と濃縮試料(減圧濃縮操作による化学物質の回収率が 100% のとき、濃度が非濃縮試料と等しくなるよう調製した試料)を作成した。減圧濃縮を行う際には、ポリプロピレン製マイクロチューブ (15 ml) に試料を分注し、遠心濃縮器(トミー精工 CC-181)によりチューブ内の容量が $1/8$ 以下になるまで減圧濃縮を行った後、超純水を加えて重量が濃縮前の $1/8$ となるよう調製した(濃縮倍率8倍)。作成した試料は、2.5に示した基礎細胞毒性試験に供した。ここで得られた用量反応曲線から IC_{50} (50% 増殖阻害濃度)を算出し、TR (Toxicity Recovery: 毒性回収率)とその RSD (Relative Standard Deviation: 相対標準偏差)を以下の式から求めた。

$$\begin{aligned} \text{TR} (\%) &= 100 \times (\text{非濃縮試料の } \text{IC}_{50}) / (\text{濃縮試料の } \text{IC}_{50}) \\ \text{RSD} (\%) &= (\text{TR の SD}) / (\text{TR の 平均値}) \end{aligned}$$

各化学物質について、3種の細胞を用いて非濃縮試料と濃縮試料、4回ずつ試験を行い、そこで得られた IC_{50} の平均値とSDから両群(非濃縮試料と濃縮試料)の等

表7 減圧濃縮過程での毒性回収率

Chemical	Cell line	n	Ave.TR (%)	SD (%)	p value
CdCl_2	NB-1	4	101.0	2.5	0.94
	MCF7	4	100.3	9.2	0.98
	U-87MG	4	107.6	12.7	0.37
HCHO	NB-1	4	94.8	9.2	0.26
	MCF7	4	92.1	4.3	0.02
	U-87MG	4	100.1	6.3	0.95

*TR: Toxicity Recovery

分散検定 (F 検定) と有意差検定を行った (F 検定の結果、すべての結果で等分散性が確認されたため、2標本 t 検定による有意差検定を行い、得られた p 値が 0.05 未満であるときに、両群に有意差があると判定した)。

表7には、各細胞種につき4回繰り返し行った基礎細胞毒性試験から得られた4種の化学物質の毒性回収率 (TR) の平均値 (%) と相対標準偏差 (RSD (%)), 有意差検定の結果 (p 値) を示した。この表に示すとおり、MCF7を用いた HCHO の試験を除いては、濃縮試料と非濃縮試料とで、得られた細胞毒性に有意差は見られなかった。また、有意差の見られたMCF7を用いた HCHO の試験に関しても、TRの平均値は 90% 以上と高い回収率が得られた。

2.4.3 環境水試料の前処理と細胞毒性試験

霞ヶ浦湖水試料は1999年4月~2000年12月にかけて月1回10地点より採取した(図9a)。諏訪湖湖水は2000年4~10月(5月除く)を月1回6地点より採取した(図9b)。また、琵琶湖湖水は2000年5, 8, 11月に5地点より採取した(図9c)。綾瀬川及び信濃川の河川水試料は、環境庁平成10年度公共用水域等におけるダイオキシン類等調査の重点水域に指定された20地点で採取されたものを用いた⁶⁾。採取した試料は、孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のPVDF (polyvinylidene fluoride) フィルターでろ過滅菌した後冷蔵保存した。また、試験前に減圧濃縮によって濃縮倍率を8倍に調整した後、2倍調製培地と $1:1$ の割合で混合して試料濃度を 400% (4 倍) とした。その後、試料は $0.22 \mu\text{m}$ のPVDF フィルターでろ過滅菌し、細胞基礎細胞毒性試験に供した。得られた細胞毒性の強さは、試料最高濃度(濃縮試料では 400% 、非濃縮試料では 50%)での超純水に対する相対細胞生存率として表した。

非濃縮試料の試験(試料最高濃度 50%)で得られた環境水試料の相対細胞生存率は、霞ヶ浦湖水試料の一部

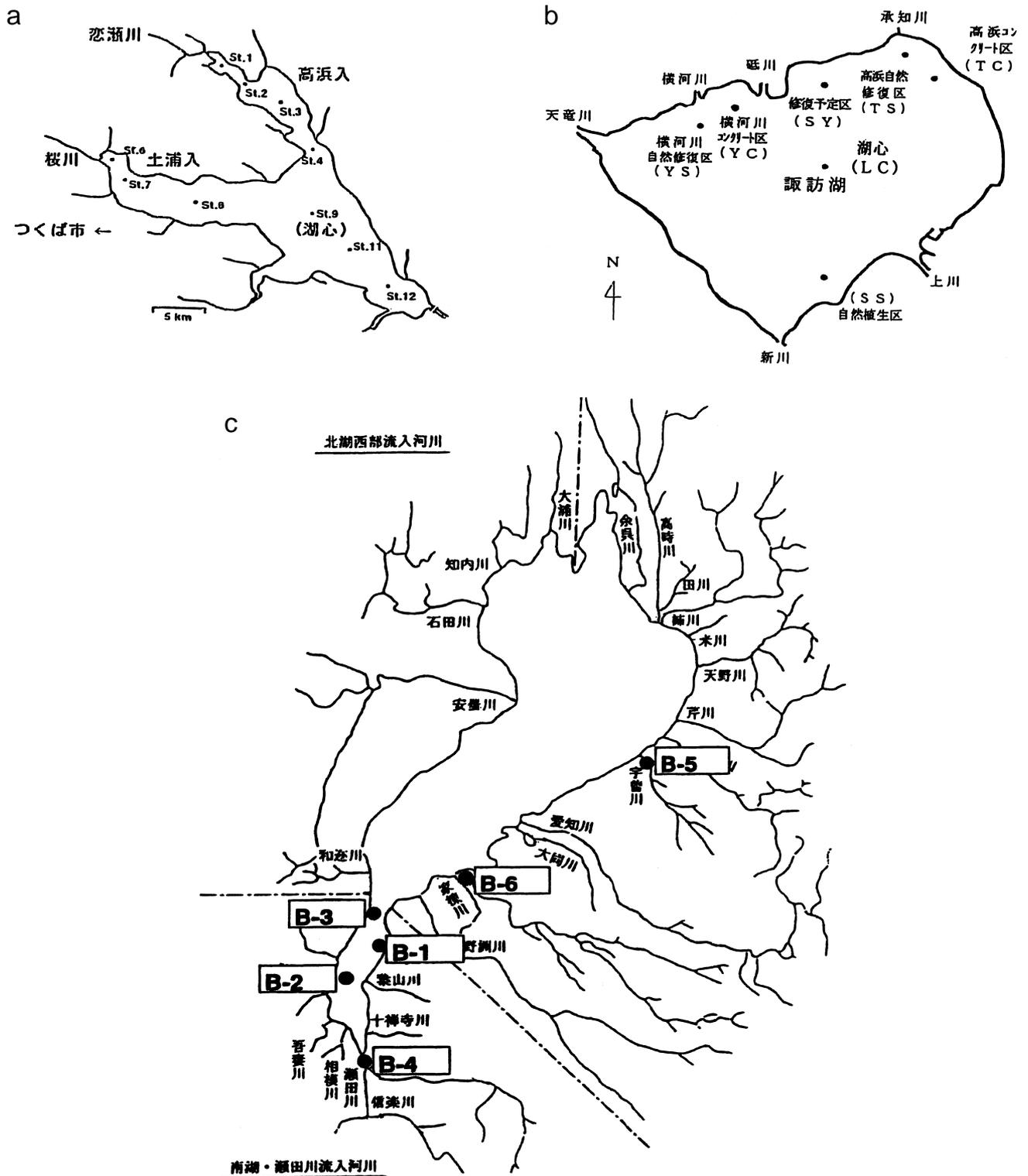


図9 霞ヶ浦での湖水試料採取地点

を除いたほとんどの試料で 100 % 前後の値を示し、細胞毒性は検出されなかった。一方で、濃縮試料の試験（試料最高濃度 400 %）では、試料によって有意な相対細胞生存率の低下が検出可能となった。図 10 には、濃縮試料の試験で得られた用量反応曲線の一つ（1999 年 8 月、9 月に霞ヶ浦 St. 1 で採取された試料の NB-1 の試験に

おける用量反応曲線）を示した。9 月の試料から得られた曲線（St. 1-Sep.）のように、試料濃度 50 %（非濃縮試料の試験での最高濃度）では有意な低下が見られなかった相対細胞生存率（平均値 ± SD = 99.8 % ± 7.2 %, $p = 0.98$ ）が、試料濃度 400 %（濃縮試料の試験での最高濃度）では有意に低下する（平均値 ± SD =

70.2% ± 2.0%, p < 0.001), という場合が多く見られた。したがって、以下には濃縮試料の試験で得られた結果を示す。

図 11 には綾瀬川水系試料と信濃川水系試料の相対細胞生存率 (試料濃度 400%) を示した (ともに横軸は試料名を表す)。綾瀬川水系試料では、S-9 試料で、信濃川水系試料では、河口付近の N-4, N-15 試料 (N-15 は NB-1 細胞のみ) で、20% 以上の細胞生存率の低下が見られた。

1999 年と 2000 年に採取した霞ヶ浦湖水試料の相対細胞生存率 (試料濃度 400%) の月変動を代表的な 3 つの

水域 (高浜入; St. 2, 土浦入; St. 6, 湖心; St. 9) に分けて、それぞれ図 12 と図 13 に示した。1999 年, 2000 年ともに, 高浜入水域で他の水域に比べ頻繁かつ強い細胞毒性が検出された。また, 湖全体として, 5 月頃より細胞毒性が検出され始め 8 月にピークを示すという季節変動性が確認された。

諏訪湖湖水試料の相対細胞生存率を図 14 a に、琵琶湖湖水試料の相対細胞生存率を図 14 b にそれぞれ示した。両湖水試料とも霞ヶ浦に比べ弱いものの, 夏季に一部の水域で有意な細胞毒性が検出された (p < 0.001)。

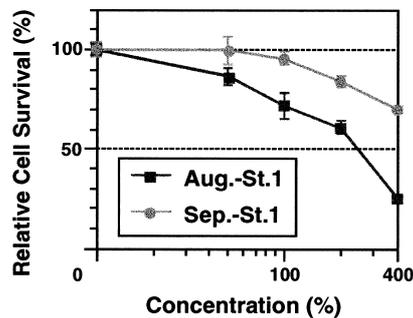


図 10 減圧濃縮による湖水試料細胞毒性試験の高感度化

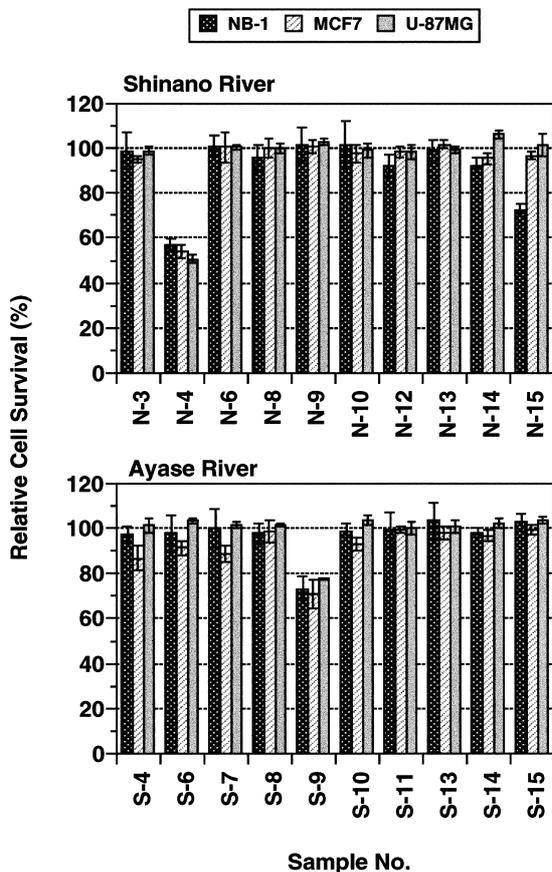


図 11 綾瀬川および信濃川河川水試料の細胞毒性試験

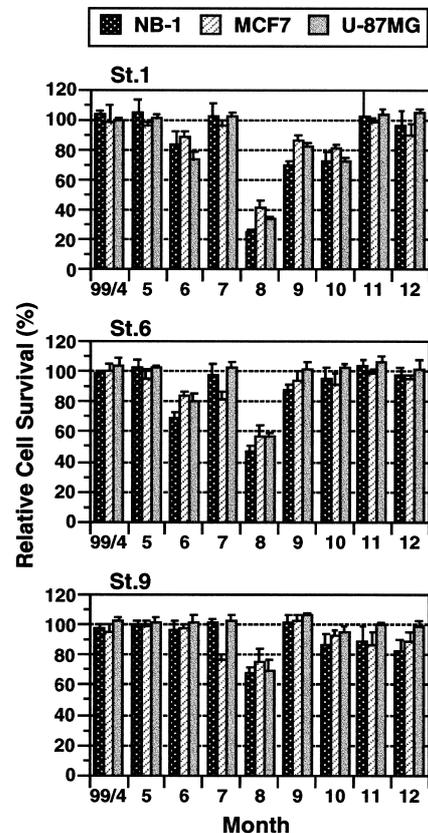


図 12 霞ヶ浦湖水試料の細胞毒性試験結果 (1999 年)

2.4.4 水質データとの比較

霞ヶ浦湖水試料では、細胞毒性試験の結果と、重金属、農薬、TOC：全有機炭素、DOC：溶存態有機炭素、AOX：吸着性全有機ハロゲン、T-N：全窒素、DTN：溶存態窒素、NO₂-N：亜硝酸態窒素、NO₃-N：硝酸態窒素、NH₄-N：アンモニア態窒素、T-P：全リン、DTP：溶存態リン、PO₄-P：リン酸態リン、T-COD：全化学的酸素要求量、D-COD：溶存態化学的酸素要求量、SS：浮遊物質、クロロフィル a、フィコシアニン、pH、浸透圧、EC：電気伝導度、の各種水質データとの比較を行った。一方、綾瀬川水系試料、信濃川水系試料では、細胞毒性試験の結果と、重金属、TOC、AOX、SS、pH、浸透圧、ECの各種水質データとの比較を行った。

その結果、pHを含む多くの水質データについては、両者に明確な関連性は見られなかった。しかし、一部の水質データにおいて、細胞毒性と類似の変動を示したことから以下に挙げる。

2000年の霞ヶ浦湖水の水質データ部を図15に示した。霞ヶ浦湖水試料では、富栄養化の指標となるNH₄-NやPO₄-Pが、細胞毒性と同様、8月にピークを示すも

が多かった。また、藍藻類量の指標となるフィコシアニンが一時期細胞毒性と類似の変動を示した。しかし、これらの水質データと細胞毒性とは、完全に対応しているわけではなかった。また、代表的な藍藻毒であるミクロキスチンLR、RR、YRに関しては、環境中での検出レベルでは細胞毒性への寄与が無視できるレベルであった。また、重金属などの毒性物質は検出下限値以下であ

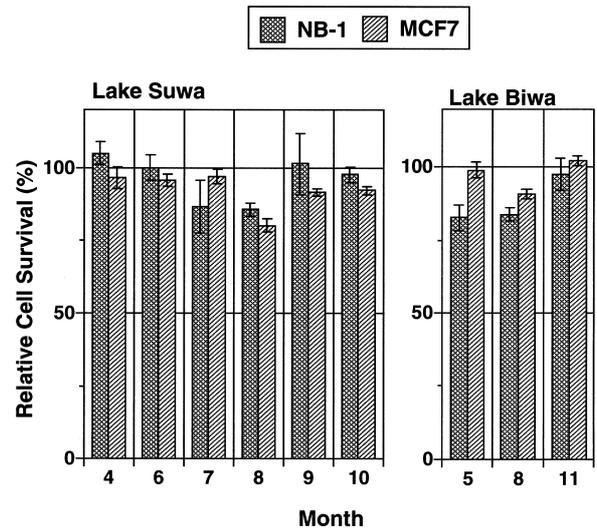


図14 諏訪湖および琵琶湖湖水試料の細胞毒性試験結果 (2000年)

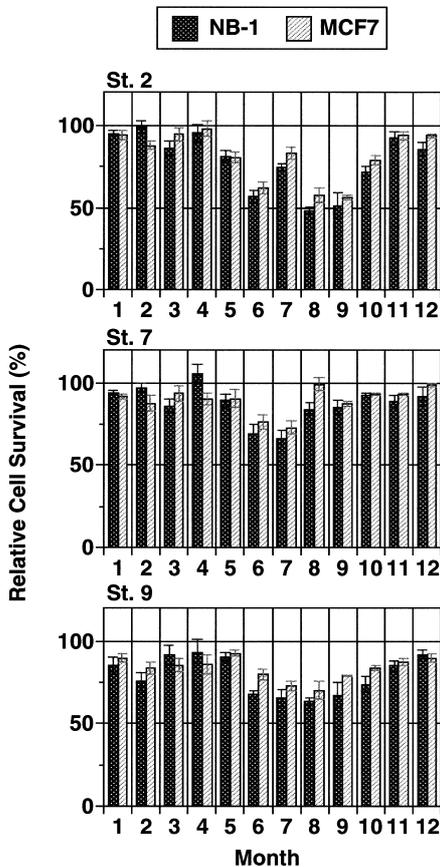


図13 霞ヶ浦湖水試料の細胞毒性試験結果 (2000年)

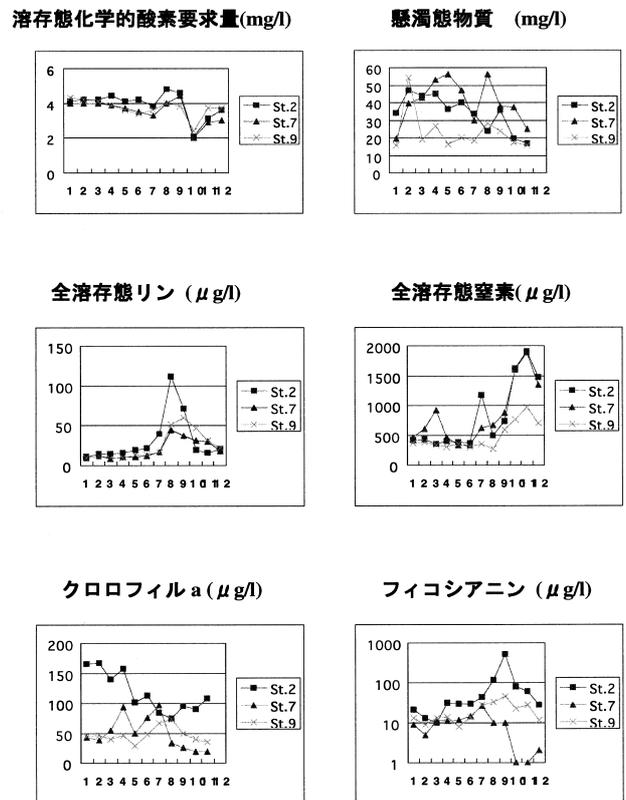


図15 霞ヶ浦湖水試料の水質データ (2000年)

り、浸透圧では濃縮試料で最大 24 mOsm (milliosmole \cdot l^{-1}), pH についても 7.6 ~ 8.2 と細胞毒性試験に影響を与えるような値は見られなかった。

綾瀬川水系試料で細胞毒性が検出された S-9 試料では、他の試料に比べて TOC が高い値 (290 mg C \cdot l^{-1}) を示し、定量下限値以上の Cr (55 μ g \cdot l^{-1}) が検出された (重金属で唯一定量下限値以上の濃度を示した)。

信濃川水系試料で細胞毒性が検出された N-4, N-15 試料では、浸透圧が高い値を示した (N-4 では 66 mOsm, N-15 では 27 mOsm)。

2.4.5 農薬量との比較

農薬は霞ヶ浦で通常検出される 28 種 (除草剤 12 種, 殺虫剤 7 種, 殺菌剤 7 種, その他 2 種) について測定した。そのうち実際に頻繁に検出された 6 種 (IBP, Flutolanil, Pyroquiron, Isoprothiolane, Simetryn, Bromobutide) について基礎細胞毒性試験を行い、比較を行った。

2000 年の霞ヶ浦で検出された農薬量を 3 つの水域に分けて図 16 に示した。高浜入水域で他の水域より高い値を示しており、夏季にピークを示していた。

また、頻繁に検出された 6 種の農薬について細胞毒性試験を行い算出した NOEC (最大無影響濃度) は、 $0.5\text{--}8.7 \times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と、検出された最大濃度 ($0.1\text{--}0.7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) に比べ 1 万倍程度高い値を示しており、個別の農薬による細胞毒性への影響は無視できるものであった。

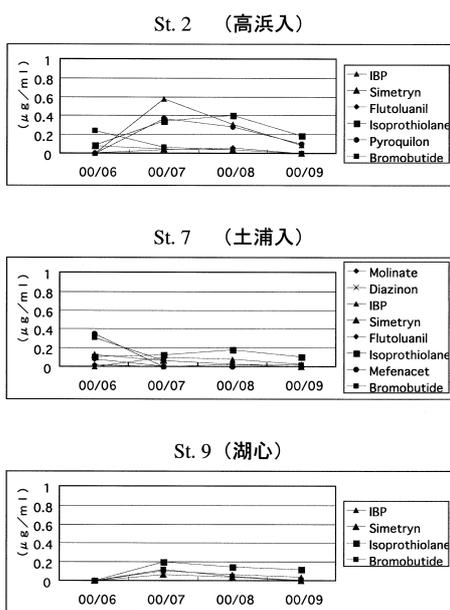


図 16 霞ヶ浦湖水試料中の農薬レベル (2000 年)

2.4.6 細胞毒性の由来の解析

霞ヶ浦湖水試料 (2000 年 8 月, St. 1) を限外ろ過フィルター (分子量 3,000) (Millipore 製), 陽イオン交換樹脂カートリッジ, 陰イオン交換樹脂カートリッジ, ODS カートリッジ (いずれも TOSOH 製), 活性炭充填カートリッジ (Waters 製) によってそれぞれ処理を行った試料の基礎細胞毒性試験を実施し、毒性因子の物質特性の解析を行った。

各種処理を行った試料の相対細胞生存率 (試料濃度 400%) を図 17 に示した。ODS, 陰イオン交換, 陽イオン交換, 活性炭充填カートリッジの処理を行った試料では、無処理の試料に比べ大幅に毒性が低減されていた。それに対し、限外ろ過フィルターによる処理を行った試料ではほとんど毒性が低減されていなかった。また、本試験で用いたカートリッジのイオン交換樹脂が疎水性物質吸着能を有していることを考慮すると、湖水試料中の毒性因子の多くは疎水性で分子量 3,000 以下の物質であろうと推察された。

2.4.7 減圧濃縮法と組み合わせた基礎細胞毒性試験の有用性

環境水中の有害性を総合的に評価するために、霞ヶ浦, 諏訪湖, 琵琶湖湖水試料について基礎細胞毒性試験を行った。霞ヶ浦湖水試料では 1999 年, 2000 年ともに夏季に毒性がピークを示し、北の水域である高浜入で他の水域と比較し強い細胞毒性が確認されるという毒性の季節変動性および水域間での相違が確認された。諏訪湖, および琵琶湖について同様の試験を行った結果、霞ヶ浦と比較し弱いものの夏季に一部の水域で有意な細胞

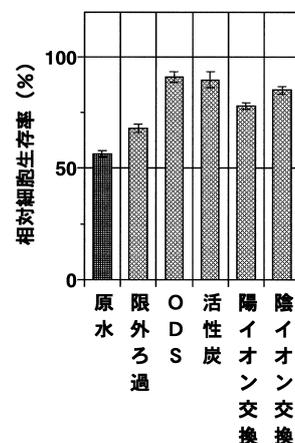


図 17 霞ヶ浦湖水試料 (2000 年 8 月, St. 1) の細胞毒性に対する各種前処理の影響

胞毒性が確認された。

また、霞ヶ浦湖水試料で確認された毒性について解析を行った結果、pH、浸透圧の影響は確認されず何らかの有害化学物質による影響が示唆されたが、農薬、重金属などの有害性化学物質の単独での影響はないことが確認された。また、多くの水質データとの関連は見られなかったがフィコシアニンについては細胞毒性と類似した変動を示していたが、これらの関係は不明確であった。

以上の結果より、基礎細胞毒性試験によって環境水中の有害性を総合的に評価し、季節、水域間の変動性が確認された。しかしながら毒性由来の解析においては明確な関連性を得ることができなかった。今後はより詳細な試験データを蓄積し、比較検討を行っていくことが重要である。

以上、減圧濃縮法と組み合わせた基礎細胞毒性試験を実際の環境水試料に適用した結果、減圧濃縮操作を行わない場合に比べて、より高感度に試料中の細胞毒性を検出できた。霞ヶ浦湖水の細胞毒性は、8月にピークを示すとともに、特定の水域で高くなる傾向が見られた。河川水では、浸透圧の高い河口付近の試料で細胞毒性が検出された。今回の対象試料では、浸透圧以外の各種水質データと細胞毒性との間に明確な関連性は見られなかった。

以上の結果から、本試験法は低毒性環境水試料の有害性総合評価に有用であることが示された。しかし、このような指標を環境管理に利用するためには、各種水質データと比較・検討した環境水試料の試験データを体系的、継続的に蓄積することが必須である。

2.5 排水試料へのバイオアッセイの適用

3種のバイオアッセイ（培養細胞毒性試験、発光細菌発光阻害試験、ミジンコ遊泳阻害試験）を30種の参照化学物質並びに浸透圧標準溶液に対して適用し、各アッセイ系の反応の特徴とそれら相互の関係を明らかにしたのち、これらを実際の排水試料に適用し、その有害性の評価とそれに伴う問題点の検討を試みた。排水試料や埋め立て処分場浸出水試料などは、高浸透圧を示すものが多いことが知られているため²⁾、特に浸透圧の影響を中心に解析を行った。

2.5.1 排水試料採取と前処理

一般廃棄物焼却施設 29 施設（試料番号 No. 1 ~ 29）および産業廃棄物焼却施設 7 施設（試料番号 No. 30 ~

36）の洗煙廃水等の処理排水を用いた。これらは環境庁の平成 10 年度ダイオキシン排水実態調査として採取されたものである⁷⁾。なおバイオアッセイにおいては、簡便に、しかも出来るだけ試料の持つ毒性を変化させることなく評価するため、濃縮等の前処理は行わずに各試験系に供した。

2.5.2 排水試料の化学分析等

化学的分析項目としては、吸着性有機ハロゲン量 (AOX)、ダイオキシン類 (coplanar PCB を含む)、pH、そして誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) による金属濃度を測定した。なお、吸着性有機ハロゲン量、ダイオキシン類濃度は環境庁の平成 10 年度ダイオキシン排水実態調査報告⁷⁾から引用した。物理的分析項目である浸透圧は、Knauer 社製浸透圧計 (SMO-1) を用いて測定した。

AOX は、検出限界以下 ($< 0.005 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) から $1.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を示した No. 27 まで、試料によってかなりのばらつきがあった。ダイオキシン類は、ほとんどの試料で $24 \text{ pg-TEQ} \cdot \text{l}^{-1}$ (No. 22) 以下であったが、一部 $390 \text{ pg-TEQ} \cdot \text{l}^{-1}$ (No. 30)、 $130 \text{ pg-TEQ} \cdot \text{l}^{-1}$ (No. 32) と高い値を示した。pH はほとんどの試料で 6 ~ 8 の間にあったが、一部の試料は弱アルカリ性を (8.1 (No. 19)、8.3 (No. 22)、8.2 (No. 32))、一試料がやや強い酸性 (3.6 (No. 34)) を示した。ICP-AES の結果、いくつかの試料においてナトリウム、カリウム、カルシウムが特に多く、No. 26, 27, 29 ではナトリウムが $10,000 \sim 20,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と高値を示した。カリウム、カルシウムはほとんどの試料でそれぞれ $1,000, 2,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下であり、マンガン、亜鉛、ホウ素、アルミニウム、カドミウム、クロム、銅等は多くの試料で検出されなかった。浸透圧は試料間のばらつきが大きく、2 (No. 28, 33, 34) から約 $1,500 \text{ mOsm}$ (No. 27) の範囲にあった (図 18)。

なお、一般廃棄物焼却施設と産業廃棄物焼却施設との間では、各測定値に特徴的な差違は認められなかった。

2.5.3 排水試料のバイオアッセイ

生物に対する広範な影響をみるために、3種のバイオアッセイ、培養細胞毒性試験、海洋性発光細菌発光阻害試験、並びにミジンコ遊泳阻害試験を実施した。

結果の表記にあたっては、排水試料に対する各バイオアッセイデータから IC_{50} を算出、さらに原液濃度 100

(%)をこの IC_{50} (%)で除した値を毒性単位(TU)とし、その各試験系での値を図に示した。この毒性単位は、 IC_{50} に至るまでの試料原液の希釈倍率を表し、試料原液の持つ毒性の大きさを間接的に表している。

培養細胞毒性試験は、前述の3種類のヒト由来株化細胞、ヒト神経芽細胞腫細胞NB-1、ヒト神経膠芽細胞腫U87MG、及び乳ガン細胞MCF7を用いた。試験方法は前述と同様に実施した。また、3種類の細胞ではほぼ同様の結果が得られたので、以下MCF7細胞の結果のみにして示した。

海洋性発光細菌発光阻害試験は、MERCK社製ToxAlert 100を用いて実施した。付属の液体乾燥した*Vibrio fischeri*と再溶解液を用いて菌体懸濁液を作成後、最終濃度2%となるようにsodium chlorideを加えた試験試料と1対1の割合で混合し暴露開始とした。暴露開始時と開始15分後に発光量を測定し、その減少量を発光阻害量とした。

ミジンコ遊泳阻害試験は、ミジンコ毒性試験キットDaphtoxkit F magna(ベルギー Creasel社)を用いて実施した。キット付属の*Daphnia magna*の休眠卵を20, 10,000 lux照射下で培養し、試験開始前24時間以内にふ化したミジンコに試験試料を添加して暴露開始とした。暴露開始48時間後に動かなくなったミジンコを計数し、遊泳阻害率を求めた。

各試験系で検出された排水試料の有害性を毒性単位(TU)の大きさとして図18に示した。培養細胞(MCF7)とミジンコに対しては、強い毒性を示した排水試料が数多くあり、毒性単位1以上の検出率は、ミジンコと培養細胞(MCF7)それぞれ53%, 39%であった一方で、発光細菌においては14%であった。なお、毒性単位の大きさにおいても、一般廃棄物焼却施設と産業廃棄物焼却施設(図18においてサンプル番号が枠付きで表示)との間では、特徴的な差違は認められなかった。

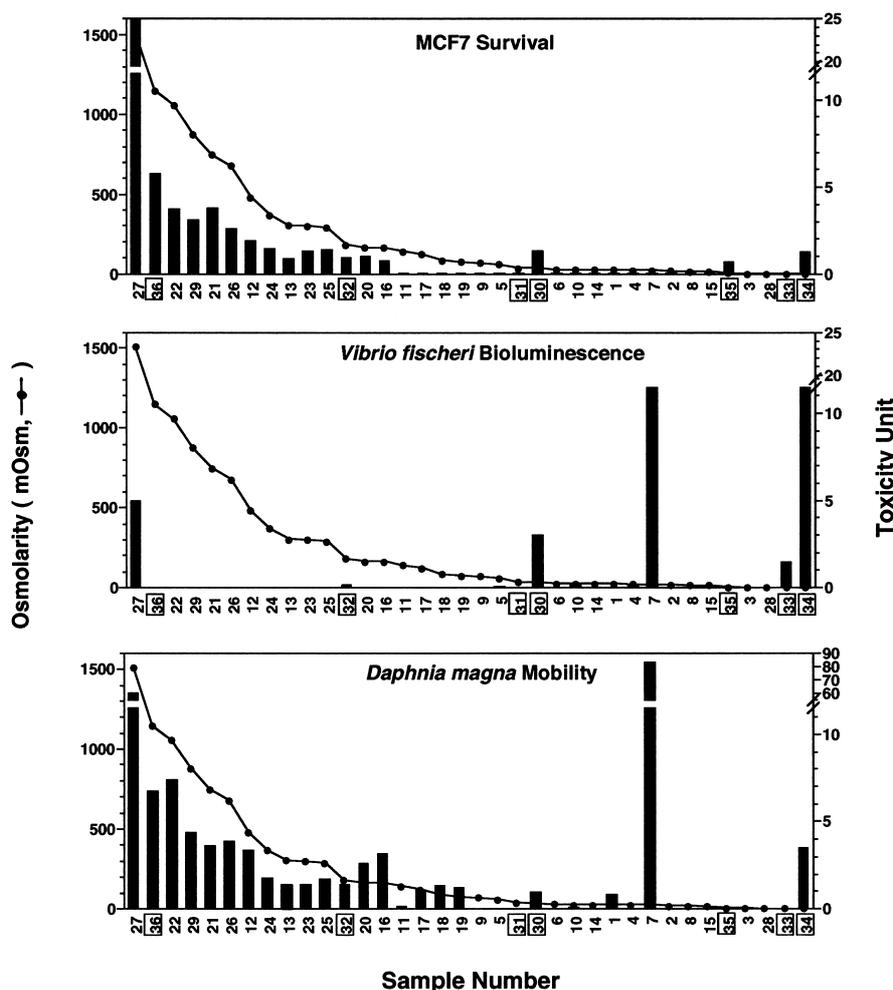


図18 事業所排水試料の3種類のバイオアッセイにおける毒性値

2.5.4 化学分析等の結果とバイオアッセイでの毒性値との比較

排水試料についての各バイオアッセイで得られた毒性値と化学分析結果との比較を試みた。図19には、MCF7細胞を用いた細胞毒性試験での毒性値（毒性単位で表示）とAOX、ダイオキシン類、pH、並びに浸透圧との比較をした結果を示した。毒性値とAOX、ダイオキシン類、およびpHとの有意な相関は見られなかったが、浸透圧との間には有意な相関（ $r = 0.75$, $p < 0.01$ ）が認められた（図19）。

2.5.5 排水試料の浸透圧の影響の解析

アッセイ系への浸透圧の影響を解析するため sodium chloride と glucose を用いて浸透圧標準溶液を調製した。図20には、調製した浸透圧標準溶液に対する各バイオアッセイ系の浸透圧 - 反応曲線を示した。海洋性発光細菌は浸透圧に対して比較的耐性であり、負荷浸透圧約460 mOsm でもほとんど阻害が認められなかった（図20）。一方ミジンコ、培養細胞（MCF7）は浸透圧に対して感受性が高く、それぞれ負荷浸透圧約60 mOsm、約110 mOsm から阻害が認められた。浸透圧に対する感受性はミジンコ、培養細胞（MCF7）、海洋性発光細菌の順に高かった。なお、sodium chloride 溶液と glucose 溶液を用いた試験結果に違いは見られなかったことが

ら、これらの結果が純粋に浸透圧のみの物理的影響によるものであると考えられた。

次に、排水試料で検出された毒性についても浸透圧による物理的影響を考察するため、排水試料と sodium chloride 溶液に対する浸透圧 - 反応曲線を比較、分析した結果、排水試料の毒性には大まかに2通りのパターンがあることが明らかになった。一つは、No. 36のよう

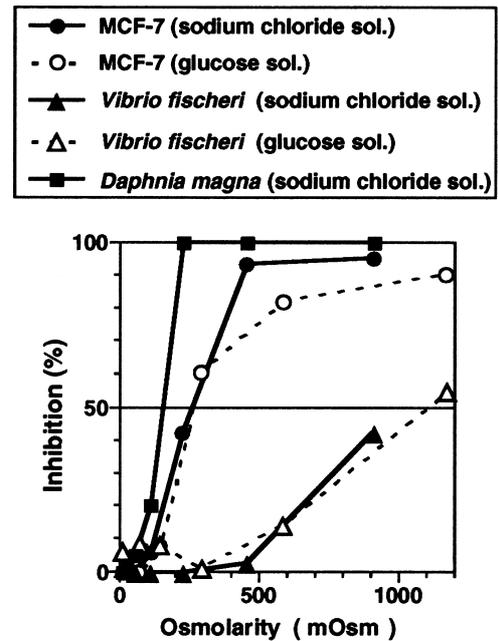


図20 3種類のバイオアッセイにおける浸透圧の影響

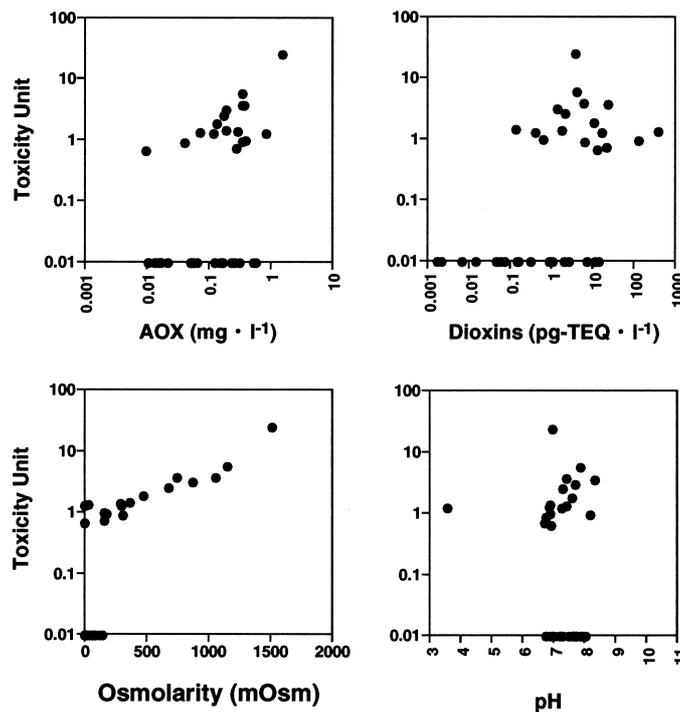


図19 事業所排水試料のバイオアッセイデータと化学分析データとの比較

に浸透圧標準溶液と試料の浸透圧 - 反応曲線が大変よく一致する場合であり、これは物理的毒性としての浸透圧がその毒性の主要因であることが考えられた (図 21 a)。もう一つは高希釈倍率での No. 27 のように、浸透圧標準溶液でまだ毒性が現れていない比較的低い浸透圧下で毒性が認められる場合であり、ここでは毒性化学物質による影響が推察された (図 21 b)。

このようにして、排水試料の物理的、化学的毒性要因の判定を行った後、毒性単位の結果を浸透圧の順に並べとて、特に高浸透圧の試料においては物理的要因である浸透圧が主な毒性要因となっているものが多くある一方で、毒性化学物質の存在が大きな毒性要因となっている試料 (実試料の IC_{50} が浸透圧の影響のみによる IC_{50} の 1/4 以下) も相当数 (No. 7, 16-20, 27, 30, 33-35 等) 存在した (図 19)。なお、高浸透圧の要因としては、ICP-AES の結果から、ナトリウムが浸透圧の 25 ~ 59 %、さらにこれにカリウム、カルシウムを加えると、その 44 ~ 67 % をそれらの物質が占めていた。なお、排水試料の浸透圧と、焼却炉の型、排水処理方式の関連についても検討したが、高浸透圧を示す排水上位 5 試料においては、焼却炉はすべて全連続型であり、排水処理方式は 4 試料が凝集沈殿、砂ろ過、キレートを組み合わせたものであった。しかし、同じ焼却炉の型と排水処理方式の試料でも低浸透圧の試料もあり、明確な関連は見いだせなかった。また、一般廃棄物焼却施設と産業廃棄物焼

却施設との間でも、特徴的な違いはみられなかった。

浸透圧の影響を除く方法としては、毒性物質の固相抽出を行うこと等が考えられるが、煩雑な操作が要求され毒性成分の回収率の問題も存在する。したがって、一次スクリーニングとしては、本研究で行ったように、浸透圧の陽性対照を用いた比較試験を行うのが最も簡便で現実的であると考えられる。高浸透圧でありながら、毒性化学物質による影響が示唆された試料については、固相抽出等を組み合わせて毒性成分の同定等を行えば、さらに正確な評価も可能となる。

また No. 7 や No. 34 の排水試料のように、二つの試験系で非常に強い毒性が検出された一方で、一つの試験系ではほとんど毒性が検出されない場合や、No. 35 や No. 33 のようにある一つの試験系でのみ有意な毒性を検出する場合もあった。これらの試料には、ある試験系に特異的に働く毒性化学物質の存在が推察された。これらの結果は、単一の試験系でのみ有害性を評価することは、不十分であることを示唆している (図 19)。

毒性単位は試料原液のもつ毒性を 50 % 阻害まで低減するための希釈倍率であるから、3 種類のバイオアッセイでの毒性単位のうち最大のものをとれば、他の 2 種類のバイオアッセイでの阻害は 50 % 以下に抑えられることになる。多くの排水試料は約 8 倍以上に希釈されれば毒性が 50 % 阻害以下まで低減されるが、いくつかの試料は、数十倍に希釈されても今回のアッセイ系を 50 %

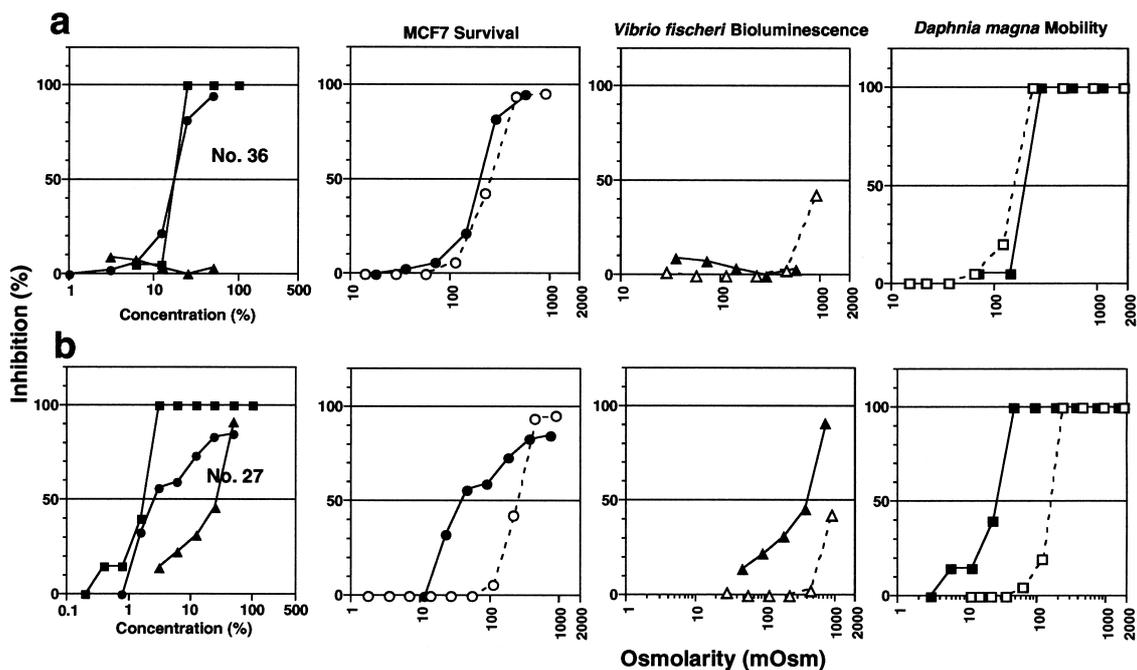


図 21 事業所排水試料のバイオアッセイデータと試料の浸透圧との比較

以上阻害しうる毒性を有しており、注意が必要である。

排水や、海水の影響を受ける河川下流では、浸透圧の高い状況が特に引き起こされやすいと考えられるため、このような調査対象にバイオアッセイを適用する場合、浸透圧による物理的影響と毒性化学物質の影響の見極めが非常に重要となる。もちろん、高浸透圧自体も排出先環境の生物相にとっては重大な有害因子である。今回測定されたもっとも高い浸透圧は約 1,500 mOsm であり、これは日本の一般的海水の 1.5 倍に相当する。したがって、排出先での希釈倍率を考慮した排水の浸透圧調整も検討されなければならない。

2.5.6 排水試料の有害性総合評価におけるバイオアッセイの有用性

排水中に存在する有害性を簡易かつ多角的に評価するために、3 種のバイオアッセイ（ヒト株化培養細胞を用いた *in vitro* 細胞毒性試験、発光細菌を用いた生物発光阻害試験、並びにミジンコ急性遊泳阻害試験）を、廃棄物焼却施設排水試料原液に適用し、得られたバイオアッセイのデータと、化学的分析および物理的分析の結果を比較検討した。バイオアッセイで得られた排水試料の毒性値と、AOX、ダイオキシン類濃度、重金属濃度、pH との間には有意な相関は認められなかった。しかし、*in vitro* 細胞毒性試験およびミジンコ急性遊泳阻害試験での毒性値と、排水試料の浸透圧値との間には相関が認められた。さらに、その浸透圧 - 反応曲線は sodium chloride あるいは glucose で調製した浸透圧標準溶液のものとはよく一致し、これらの排水試料の毒性発現において浸透圧が主要な寄与をしていることが示唆された。したがって、*in vitro* 細胞毒性試験やミジンコ急性遊泳阻害試験のようなバイオアッセイを無処理の排水試料に適用する際には、浸透圧の影響を十分に考慮する必要があり、毒性化学物質の影響を評価するためには、浸透圧標準溶液を用いた浸透圧 - 反応曲線との比較を行うことが簡便かつ有効であることが示された。

2.6 バイオアッセイのキット化の試み

本特別研究でも一部用いているが、ミジンコ急性遊泳阻害試験 (Daphtoxkit F magna)、海洋性発光細菌発光阻害試験 (ToxAlert, MicroTox) 等、一部のバイオアッセイはキット化され、市販されていて、コストの問題はあるが、我が国でも入手可能である。

一方、有用性が示唆された細胞毒性試験は、キット化されたものではなく、また細胞培養には厳密な無菌室と熟練が必要と考えられており、一部の研究者が研究レベルで実施しているという状況である。つまり、前述のように、通常細胞毒性試験では、継代培養で維持された細胞を、計数後適宜希釈したものをプレートに播種して試験を実施する。しかし、この場合継代に伴って細胞の性質（化学物質への感受性等）が変化する可能性があり、また継代培養には多くの労力、費用に加え、微生物汚染のリスクも伴う。本特別研究では、同一ロットで大量に作成した凍結保存細胞を解凍・培養後そのまま細胞毒性試験に用いることを試み、少なくとも基礎細胞毒性のようなエンドポイントで評価する場合には、実用上問題ないことが示された。これによって、継代培養の労力・費用が省け、しかも試験間でのばらつきも最小化することが可能となった。

この試験法をさらに多くの機関で、しかも実務レベルでも利用されるようにするためには、キット化が有効であると考えられる。すでに、凍結保存細胞を用いることが可能であることも示されており、技術的にはさほど困難ではない。凍結細胞の入ったセラムチューブは、ドライアイス中で輸送が可能であり、他の試薬類も、冷蔵もしくは室温での輸送が可能であることから、図 22 に示したような、基礎細胞毒性試験キットの供給はすぐにも実現可能である。

実際、本特別研究の研究分担者である岡山大学環境理工学部小野研究室では、国立環境研究所より供給された



図 22 基礎細胞毒性試験キット（想像図）

プロトタイプの「基礎細胞毒性試験キット」を用いて、参照化学物質の試験と廃棄物埋立処分場浸出水試料の毒性評価試験が実施されており、良好な成果が得られている。

2.7 今後の課題と展望

平成10年度より12年度まで実施した本特別研究「環境中の化学物質総リスク評価のための毒性試験系の開発に関する研究」によって、基礎細胞毒性試験をはじめとするいくつかのバイオアッセイ系が、環境（水）中に存在する有害性を総合的に評価する試験法として有用であり、実利用可能であることが示された。

今後は、これらの簡易なバイオアッセイ系のバッテリー（組み合わせ）を実用化し、実際の環境管理への導入と活用を試みる必要がある。具体的には、以下のような項目について、さらに検討を加える必要がある。

（1）各種バイオアッセイのキット化と供給体制の確立

本特別研究で得られた成果を基にして、新規のバイオアッセイ法としてヒト由来培養細胞を組み合わせ用いた細胞毒性試験法をキット化する。さらに、環境試料の前処理法を含めた操作方法をマニュアル化する。一部キット化されている既存の試験法を含む、これらの実利用可能なバイオアッセイ系バッテリーの供給体制を整える。

（2）バイオアッセイ適用対象の選定と評価

実利用可能なバイオアッセイ系の適用対象として、湖・河川水、各種事業所排水（廃棄物処分場、焼却処理

施設、下水処理施設等）が候補として挙げられるが、適用に際しての有用性評価と問題点についての検討を行う。特に、検出される有害性の分類とそれらの低減対策（処理方法）に重点を置く。

（3）バイオアッセイ指標のスコア化

前項に関連して、低減対策の優先取組施設を設定し、低減目標を定めるためにも、バイオアッセイ指標のスコア化が必要となる。管理対象に応じた、各バイオアッセイ値の重み付けを行い、数値化する。

（4）自治体の協力を得たパイロット事業の実施

各自治体の環境研究所等の協力を得て、キット化されたバイオアッセイ系の供給と環境試料の有害性評価への適用に関するパイロット事業を実施し、環境管理システムへの導入の方向性と実現可能性を探索する。

（5）バイオアッセイを導入した新たな環境管理システムの提案

現時点で実施可能なバイオアッセイを導入した環境管理システムを提案する。バイオアッセイ限界が見えつつある現行の個別物質の規制に基づく環境管理システムでカバーできない部分を補うものとして位置づけられる。

以上の検討により、図23に示したようなバイオアッセイを導入した新たな環境管理システムが構築され、実施されることを望むものである。

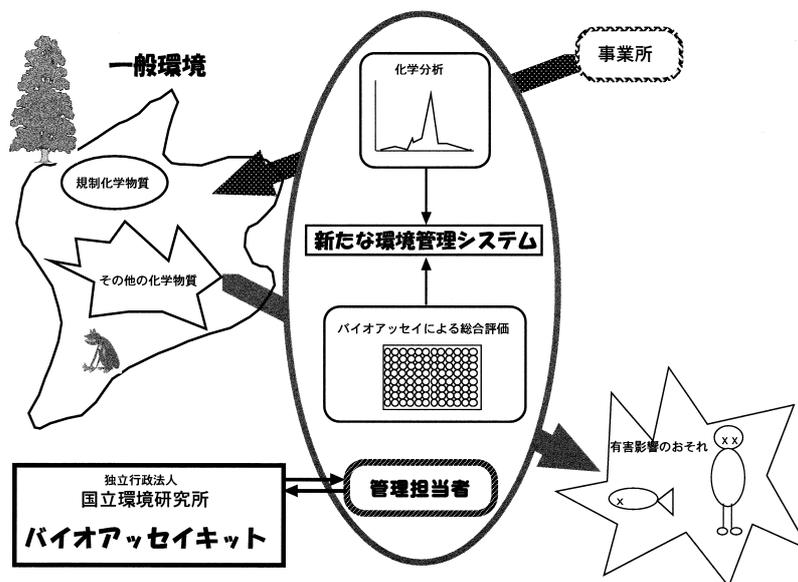


図23 環境管理とバイオアッセイ

2.8 終わりに

人間活動に伴って環境中に放出されたり、環境中で非意図的に生成された化学物質は、無数に存在しさらにその数は増大しつつある中、環境媒体の安全性評価は極めて重要な課題である。毒性試験の中心となってきた動物実験は現在でも最も重要で信頼性の高いものであるが、多種類の化学物質を迅速に評価するには様々な制約があり、動物実験に代わる方法の開発が急がれている。さらに、未知物質を含む混合物という環境中での化学物質の存在形態を考えれば、従来の毒性学、リスク科学にはとらわれない新たな発想と戦略が必要となる。

現段階では、環境化学物質によるヒトの健康に対する有害性を総合的に評価するためのバイオアッセイ系は、未だ完全なものではできあがっていない。しかし、いくつかのバイオアッセイを組み合わせ用いることにより、ヒトに対する急性毒性を反映した評価も可能となる。これらの試験法は、限界が見えつつある現行の個別物質の規制に基づく環境管理システムでカバーできない部分を補うものであり、米国で既に導入されている WET(Whole Effluent Toxicity)プログラム、TIE(Toxicity Identification

Evaluation)TRE (Toxicity Reduction Evaluation)プログラムと並ぶ次世代の環境管理システムとなりうるものである。バイオアッセイで得られた値が、例えば排水管理に関して言えば BOD、COD と並ぶような総合指標値として利用されるようになることが期待される。

〔謝 辞〕

霞ヶ浦湖水試料の一般水質データは国立環境研究所地域環境研究グループ(当時)、今井章雄総合研究官、松重一夫主任研究員に供与していただいた。深甚なる謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) Clemedson, C. *et al.* ATLA, 24: 249-272, 1996.
- 2) Clemedson, C. *et al.* ATLA, 24: 273-311, 1996.
- 3) Clemedson, C. *et al.* ATLA, 26: 131-183, 1998.
- 4) Ekwall, B. *et al.* ATLA, 26: 617-658, 1998.
- 5) Ekwall, B. *et al.* ATLA, 28: 201-234, 2000.
- 6) 海洋生物環境研究所 平成 10 年度水環境有害性総合指標検討調査報告書, 1999 .
- 7) 環境省 平成 10 年度ダイオキシン排水実態調査結果, 2001 .

[資 料]

研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織（当時）

[A 研究代表者]

地域環境研究グループ

バイオアッセイ環境リスク評価研究チーム

国本 学

[B 研究分担者]

地域環境研究グループ

バイオアッセイ環境リスク評価研究チーム

石堂 正美・足立 達美

交通公害防止研究チーム

田邊 潔

環境健康部

病態機構研究室

青木 康展・佐藤 雅彦

水圏環境部

地下環境研究室

稲葉 一穂

化学環境部

中杉 修身

[C 客員研究員]

東海 明宏

（北海道大学大学院工学研究科）

（平成 10 年度）

本田 靖

（筑波大学体育学系）

（平成 10 ~ 12 年度）

熊谷 嘉人

（筑波大学社会医学系）

（平成 12 年度）

迫田 章義

（東京大学生産技術研究所）

（平成 11 ~ 12 年度）

中川 靖一

（北里大学薬学部）

（平成 10 ~ 12 年度）

奥 直人

（静岡県立大学薬学部）

（平成 10 ~ 12 年度）

木苗 直秀

（静岡県立大学食品栄養学部）

（平成 10 年度）

井上 隆信

（岐阜大学工学部）

（平成 12 年度）

小野 芳郎

（岡山大学環境理工学部）

（平成 10 ~ 12 年度）

内海 英雄

（九州大学大学院薬学研究科）

（平成 10 ~ 12 年度）

有蘭 幸司

（熊本県立大学環境共生学部）

（平成 10 ~ 12 年度）

阿相 皓晃

（東京都老人総合研究所）

（平成 10 ~ 12 年度）

西村 哲治

（国立医薬品食品衛生研究所）

（平成 10 ~ 12 年度）

伏脇 裕一

（神奈川県衛生研究所）

（平成 11 ~ 12 年度）

大久保卓也

（滋賀県立琵琶湖研究所）

（平成 12 年度）

2 研究課題と担当者

2.1 *In vitro* 毒性試験値の毒性学的意義付け

国本 学

2.2 *In vitro* 毒性試験法の標準化と簡便化

中川靖一・奥 直人・小野芳郎・細谷浩史・内海英雄・有蘭幸司・岩橋 均・西村哲治・国本 学

2.3 混合物試料を対象とする毒性試験の毒性学的意義付け

本田 靖・中川靖一・奥 直人・小野芳郎・有蘭幸司・岩橋 均・西村哲治・国本 学

2.4 環境試料を対象とする際の技術的問題点の洗い出しと対応法のマニュアル化

井上隆信・稲葉一穂・田邊 潔・中杉修身・東海明宏・迫田章義・伏脇裕一・木苗直秀・花里孝幸・大久保卓也・小野芳郎・国本 学

2.5 低毒性試料の評価のための高感度試験法の開発

石堂正美・足立達美・青木康展・佐藤雅彦・熊谷嘉人・阿相皓晃・国本 学

研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
C. Clemedson, M. Andersson, Y. Aoki, F. A. Barile, M. Kunimoto <i>et. al.</i>	MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity	ATLA	26	131-183	1998
M. Kunimoto, T. Adachi, M. Ishido	Expression and Localization of Brain Ankyrin Isoforms and Related Proteins During Early Developmental Stages of Rat Nervous System	J. Neurochem.	71(6)	2585-2592	1998
国本 学	簡易毒性評価試験とその毒性学的意義	バイオアッセイ水環境のリスク管理(鈴木基之, 内海英雄編, 講談社, 258 p.)		42-55	1998
国本 学	環境モニタリング技術	人類生存のための化学(下)地球を守る化学技術(中杉修身, 水野光一編著, 大日本図書, 185 p.)		163-175	1998
国本 学	アンキリン, アンキリンリピート, スペクトリン	生化学辞典第3版(今堀和友, 山川民夫監修, 東京化学人, 1658 p.)		108,749	1998
A. Mitumoto, K-R. Kim, G. Oshima, M. Kunimoto, K. Okawa, A. Iwamatsu, Y. Nakagawa	Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-Responsive protein	Biochem. J.	344	837-844	1999
K. Murakami, H. Asou, T. Adachi, T. Takagi, M. Kunimoto, H. Saito, K. Uyemura	Neutral Glycolipid and Ganglioside Composition of Type-1 and Type-2 Astrocytes From Rat Cerebral Hemisphere	J. Neurosci. Res.	55	382-393	1999

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
M. Ishido, T. Suzuki, T. Adachi, M. Kunimoto	Zinc Stimulates DNA Synthesis during Its Antiapoptotic Action Independently with Increments of an Antiapoptotic Protein, Bcl-2, in Porcine Kidney LLC-PK ₁ Cells ¹	J. Pharm. Exp. Therap.	290	923-928	1999
M. Kunimoto	A Neuron-Specific Isoform of Brain Ankyrin, 440 kD Ankyrin _B , As a Useful Tool in Neurobiology and Neurotoxicology	J. Health Sci.	46(3)	178-181	2000
G. Oshima, M. Kunimoto, Y. Nakagawa ^a	Appearance of Extracellular Glutathione Peroxidase (eGPx) in the Ascite Fluid of Casein-Elicited Rats	Biol. Pharm. Bull.	23(5)	532-536	2000
M. Ishido, M. Kunimoto	Transcriptional Regulation of c-Jun during Inhibition by Selenite of Methyl-mercury-induced Apoptosis of Rat C6 Glioma Cells	Res. Adv. Neurochem.	1	13-22	2000
藤原朋広, 長島 寛, 杉浦則夫, 国本 学	ヒト由来培養細胞系を用いた簡易バイオアッセイの高感度化と湖水・河川水への適用	水環境学会誌	24(1)	58-63	2001
長島 寛, 藤原朋広, 国本 学	バイオアッセイによる排水試料の有害性評価に伴う問題点の解析	水環境学会誌	24(2)	110-114	2001
M. Ishido, M. Kunimoto	Regulation of Cell Fate by Cadmium and Zinc	J. Health Sci.	47(1)	9-13	2001

2 口頭発表

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
光本篤史, 大島源一郎, 中川靖一, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦	一酸化窒素応答蛋白質 (NORP 26) の等電点変化に及ぼす細胞内チオールの効果	日本薬学会第 118 年会	京 都	10 . 4
国本 学	培養神経細胞を用いた化学物質の毒性評価の試み	POPs, Eds & BIOASSAYS 残留性有機汚染物質, 環境ホルモンの環境負荷 とリスク管理に向けたバ イオアッセイの適用	東 京	10 .10
国本 学	新たな有害性評価指標の確立を目指して 培養神経細胞における神経突起伸展の 意味するもの	環境科学会 1998 年会	つくば	10 .10
光本篤史, 金 貴蓮, 大島源一郎, 中川靖一, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦	一酸化窒素に特異的に応答する蛋白質 (NORP 26) の還元可逆的修飾	第 71 回日本生化学会大 会	名古屋	10 .10
金 貴蓮, 光本篤史, 大島源一郎, 中川靖一, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦	NORP 26 蛋白質の NO 応答に及ぼす細胞 内チオールの効果	第 71 回日本生化学会大 会	名古屋	10 .10
国本 学	外因性内分泌攪乱物質の神経毒性とバ イオアッセイ	第 7 回日韓水環境シンポ ジウム	福 岡	10 .10
国本 学, 足立達美, 石堂正美, 中杉修身, 韓 眞伊, 内海英雄	培養神経細胞における神経突起伸展を指 標とした環境化学物質の毒性評価	第 24 回環境トキシコロ ジーシンポジウム・第 2 回衛生薬学フォーラム合 同大会	大 阪	10 .10
中川靖一, 光本篤史, 金 貴蓮, 大島源一郎, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦	一酸化窒素に応答する蛋白質 (NORP 26) の構造と機能	第 24 回環境トキシコロ ジーシンポジウム・第 2 回衛生薬学フォーラム合 同大会	大 阪	10 .10
足立達美, 石堂正美, 国本 学	メチル水銀による小脳神経細胞死誘導機 構の解析	第 24 回環境トキシコロ ジーシンポジウム・第 2 回衛生薬学フォーラム合 同大会	大 阪	10 .10
足立達美, 中井陽子, 桜井洋子, 吉村和法, 鶴尾吉宏, 国本 学, 阿相皓晃	ラット胎仔大脳皮質から A2B5 を用いたイ ムノパンニングによって得られるグリア 細胞の分化	第 3 回グリア研究会	大 阪	10 .11

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
金 貴蓮, 光本篤史, 大島源一郎, 中川靖一, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦	glyoxalase I の NO 応答における細胞内グルタチオン要求性	日本薬学会第 119 年会	徳 島	11 . 3
光本篤史, 金 貴蓮, 大島源一郎, 中川靖一, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦	S-nitrosoglutathione に対する glyoxalase I の感受性	日本薬学会第 119 年会	徳 島	11 . 3
藤原朋広, 杉浦則夫, 長島 寛, 井上隆信, 国本 学	ヒト由来培養細胞を用いた簡易バイオアッセイの高感度化と湖水・河川水への適用	第 34 回日本水環境学会年会	京 都	12 . 3
長島 寛, 藤原朋広, 国本 学	バイオアッセイの組み合わせによる各種排水の有害性総合評価	第 34 回日本水環境学会年会	京 都	12 . 3
山川 悟, 浅井知浩, 国本 学, 古川幸弘, 奥 直人	簡易ながん細胞浸潤測定系の開発とバイオアッセイ	日本薬学会第 120 年会	岐 阜	12 . 3
光本篤史, 金 貴蓮, 大島源一郎, 国本 学, 大川克也, 岩松明彦, 中川靖一	S-ニトロソグルタチオンの安定性における細胞性 1 価銅イオンの役割	日本薬学会第 120 年会	岐 阜	12 . 3
大島源一郎, 国本 学, 中川靖一	炎症局所浸出液中に出現するグルタチオンペルオキシダーゼ	日本薬学会第 120 年会	岐 阜	12 . 3
国本 学	神経毒性試験	第 3 回日本水環境学会シンポジウム	寝屋川	12 . 9
国本 学	Basal cytotoxicity as an index for the total hazard existing in environmental water samples	第 9 回日韓水環境シンポジウム	豊 橋	12 . 10
山川 悟, 上田洋子, 国本 学, 古川幸弘, 奥 直人	新しい細胞浸潤系を用いた環境化学物質のバイオアッセイ	フォーラム 2000 : 衛生薬学・環境トキシコロジー	東 京	12 . 10
国本 学	Neurotoxicity of Environmental Chemicals	The ROC-Japanese Symposium on Endocrine Disrupting Chemicals	Pingtung, Taiwan	12 . 11
ロキブラマニキ, 石堂正美, 国本 学, 梅澤嘉夫	内分泌攪乱物質の暴露によるヒト神経細胞の遺伝子発現変動の系統的解析	環境ホルモン学会第 3 回研究発表会	横 浜	12 . 12

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
国本 学	ビタミン E 等抗酸化剤による神経細胞死抑制効果	第 12 回ビタミン E 研究会	東 京	13 . 1
国本 学	In Vitro 試験系を用いた環境化学物質の神経発生毒性評価の試み	第 23 回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム	名古屋	13 . 1
福島寿和， 大久保卓也， 杉浦則夫，国本 学	培養細胞を用いた湖水試料の毒性評価とその解析	第 34 回日本水環境学会年会	岐 阜	13 . 3
長島 寛，宮原康明， 小野芳朗，国本 学	ヒト由来細胞を用いた処分場浸出水の毒性評価	第 34 回日本水環境学会年会	岐 阜	13 . 3
足立達美，高永博実， 石堂正美，国本 学， 阿相皓晃	グリア細胞の発達に及ぼす甲状腺ホルモンの影響	日本薬学会第 121 年会	札 幌	13 . 3

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR-41-2001

平成 13 年 9 月 28 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

電話 0298-50-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 アサヒビジネス株式会社

〒300-0066 茨城県土浦市虫掛 3317-2

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

September 2001