2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ９ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６０４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2023
課題番号：１８Ｋ１１６８２

研究課題名（和文）中分子量高分子化合物と環境化学物質の複合影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the combined effects of medium molecular weight polymers and environmental chemicals

研究代表者

四ノ宮　美保（Shinomiya, Miho）

大妻女子大学・社会情報学部・教授

研究者番号：６０２９１０６９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：中分子量高分子化合物と環境化学物質の複合影響を明らかにするため、電荷等の異なる5種の高分子化合物と農薬他の化学物質の共存下で培養細胞の増殖・生存に与える影響を検討した。その結果、高分子化合物単独では、陽イオン性のポリエチレンイミン（PEI）が最も強く細胞増殖・生存を抑制することが確認された。さらに、PEI単独では影響を与えない濃度において、チウラム（殺菌剤）による細胞毒性を相殺すること、一方で、パラコート（除草剤）の細胞毒性作用を増強することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
中分子量高分子化合物と環境化学物質の複合影響に関する基礎的知見が乏しい現状において、本研究では高分子化合物の種類と細胞毒性の強弱の関係を示すとともに、PEIがチウラムに対してはその毒性を相殺し、パラコートに対してはその毒性を増強することを明らかにした。本研究の成果は、化学物質の複合暴露によるリスク評価の基盤となる知見を提供し、今後のリスク評価の高度化に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The effects of five polymeric compounds on the growth and survival of cultured cells in the presence of pesticides and other chemicals were investigated to understand the combined effects of medium molecular weight polymers and environmental chemicals. The cationic polymer polyethyleneimine (PEI) was found to be the most potent inhibitor of cell growth and survival among the polymers evaluated. PEI was found to counteract the cytotoxic effect of thiram (fungicide) at concentrations that it alone did not affect, while it enhanced the cytotoxic effect of paraquat (herbicide).

研究分野：環境化学

キーワード：高分子化合物　中分子量　農薬　複合影響

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－19、F－19－1（共通）

１．研究開始当初の背景
(1) 化学物質の複合影響：社会活動によって環境中に放出される化学物質のうち、ヒトの健康や環境中の動植物の生育・生長に影響を与えるものに関しては、国がその毒性に対応した環境基準を設定し、事業所等への排出規制、さらに物質によっては製造・使用禁止などの措置がとられている。このような化学物質の管理には、対象となる化学物質の有害性や環境中濃度・動態に関するデータが重要な役割を果たしている。現在、その有害性評価に関しては、個別の化学物質を対象に種々の試験が進められている。しかし、様々な化学物質は環境中で混合物として存在するため、複数の化学物質に同時に曝露されたときの影響（化学物質の複合影響）が注視されはじめており、各国で複合影響評価手法確立のための事業が進められ、評価手法の確立とその手法の国際的調和が将来的な課題の１つに挙げられている。このような社会的背景のもと、近年、化学物質の複合影響に関する研究例が増加してきている。特に、数種類の有害化学物質を混合した際に、複合作用が濃度加算あるいは独立作用により予測可能かを評価した研究例（Watanabe *et al.*, 2016)、混合による相乗効果や拮抗作用を議論した研究例（Cedergreen, 2014)、また新規の数理モデルの提唱に向けた研究例（Tanaka *et al.*, 2016）などは、評価手法開発につながる基盤的な研究である。

(2) 高分子化合物の環境動態と生体毒性評価：高分子化合物はその溶解性の低さと分子の大きさから、ほとんど細胞に取り込まれることがないと考えられており、ヒトの健康や生態系に影響を与える可能性が少ないものとして毒性研究の観点からはあまり重視されてこなかった。近年、海洋汚染で注目されているマイクロプラスチックは、それ自身の有害性よりも DDT や PCB 等の疎水性有害化学物質を吸着して運搬する機能を有することから捕食した海洋生物への有害物質の移行と蓄積が問題視され、生態影響に係る研究例も報告されるようなってきている。一方、近年水溶性ポリマー等の高機能性高分子が数多く開発されており、様々な分野で使用されている。化学物質排出・移動量届出制度（PRTR）のデータによると、特にポリ（オキシエチレン）＝アルキルエーテルは公共用水域への排出量も多い。水溶性ポリマーの生態毒性に関し、米国有害物質規制法（TSCA）には、陽イオン性ポリマーは高い毒性を有する等、そのイオン性と界面活性作用の有無により毒性の一般的指標が示されている。また、一部の陽イオン性水溶性ポリマーは、ドラッグデリバリーでの研究分野において生体毒性評価に関するアプローチがあり、構造単位の違いによる *in vitro* での細胞毒性の比較研究が報告されている。
　以上のように、細胞に取り込まれにくい高分子化合物であっても細胞毒性を示す例もあり、また、有害物質のキャリアーとなることもある。このような側面も有する高分子化合物について、他の有害化学物質との複合影響については不明な点が多く、その影響の評価は社会的に大きな意義があると考えられる。

２．研究の目的
　農薬等の様々な環境化学物質の複合影響の評価については、有害性の作用機序が解明されている数種類の化学物質が共存する系を使用し、相加、相乗あるいは拮抗効果などのメカニズムの解析が主に進められている。また、これまでは共存する化学物質も、農薬、医薬品、内分泌かく乱化学物質といったグループ内での複合影響評価のみが行われてきた。しかし、一般的には毒性が低いと考えられている高分子化合物、特に分子量範囲が 600～2,000 程度のものと環境化学物質の複合影響を評価した論文は少なく、どのような物理化学的性質を有する中分子量高分子化合物がどのようなメカニズムで環境化学物質による細胞毒性の発現に影響を与えるのかについては未解明のままである。そこで本研究では、環境中に共存する中分子量高分子化合物が環境化学物質による細胞毒性発現に及ぼす影響を明確にすることを目的とした。

３．研究の方法
(1) 中分子量水溶性高分子化合物の細胞毒性評価
　高分子化合物は、水溶性かつ分子量が 1,200～1,400 の範囲内にある電荷の異なる次の 5 物質を対象とした。中性のポリビニルアルコール（PVA、数平均分子量 1,300)、ポリエチレングリコールデシルエーテル（PEOA、数平均分子量 1,400）及び Tween20（分子量 1227.72))、陽イオン性のポリエチレンイミン（PEI、平均分子量 1,200)、陰イオン性のポリアクリル酸（PAA、数平均分子量 1,300）は血清無添加の培地に溶解して標準原液を調製し、酸性及び塩基性のポリマーはそれぞれ水酸化ナトリウム水溶液及び塩酸を用いて pH7 に調整してから使用した。
　細胞毒性の評価には、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞及びヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用い、継代培養した細胞を 96-well プレートにて 16 時間培養後、高分子化合物を添加して培養した。対照群（Control）は 0.5%DMSO/培地とし、１～３日間培養後に Cell Counting Kit-8 を用いて、増殖・生存の評価を行った。450nm での吸光度からバックグランド（620nm での吸光度）を引いた値を評価に用いた。

(2)高分子化合物と環境化学物質の共存下における細胞毒性評価

環境化学物質としては、主に PRTR 第１種指定化学物質の中から有害性の作用機序が異なると考えられる物質（チアメトキサム、グリホサート、チウラム、フルアジナム、パラコート他）を選択した。その他、DDT の代謝物 p,p’-DDE と難燃剤であるテトラブロモビスフェノール A (TBBPA) も検討に加えた。適切な濃度で調製した各物質の標準原液（水溶液あるいは DMSO 溶液）を培地で希釈して使用した。

細胞の増殖・生存への影響は、高分子化合物単独の場合と同様 SH-SY5Y 細胞と Caco-2 細胞を用い、単独では影響を与えない濃度で高分子化合物を添加後、直ちに対象とした環境化学物質を加えて培養し、１～３日後にアッセイを実施することにより評価した。また、位相差顕微鏡により細胞の形態観察を行った。

(3)膜透過性の評価

細胞膜透過性の評価には、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を Transwell®で培養し単層膜を形成させたものを使用した。膜電気抵抗値 (TEER) および Lucifer Yellow CH の透過量を測定することで Tight junction (TJ) に対する影響を評価した。

４．研究成果

(1) 中分子量水溶性高分子化合物が培養細胞に与える影響

①SH-SY5Y 細胞

4 種類の中分子量高分子化合物 (PEI、PAA、PEOA、Tween20)を添加し、24 時間、48 時間及び 72 時間培養後における SH-SY5Y 細胞の増殖・生存を評価した結果を図１に示した。陽イオン性の PEI は 0.25～1.0 mg/mL の濃度範囲において、対照群と比べ明確な増殖・生存抑制効果を示したが、陰イオン性の PAA による抑制効果は弱く、1.0 mg/mL においてのみ若干の抑制傾向が認められた。また、オキシエチレンの繰り返し部分を有する PEOA と Tween20 は、0.5 及び 1.0 mg/mL において、共に抑制効果を示したが、Tween20 の方が PEOA よりも強い効果を示した。一方、PVA においては、対象とした高分子化合物の中で最も効果が小さく、1 mg/mL の濃度まで細胞の増殖・生存にほとんど影響を与えなかった。

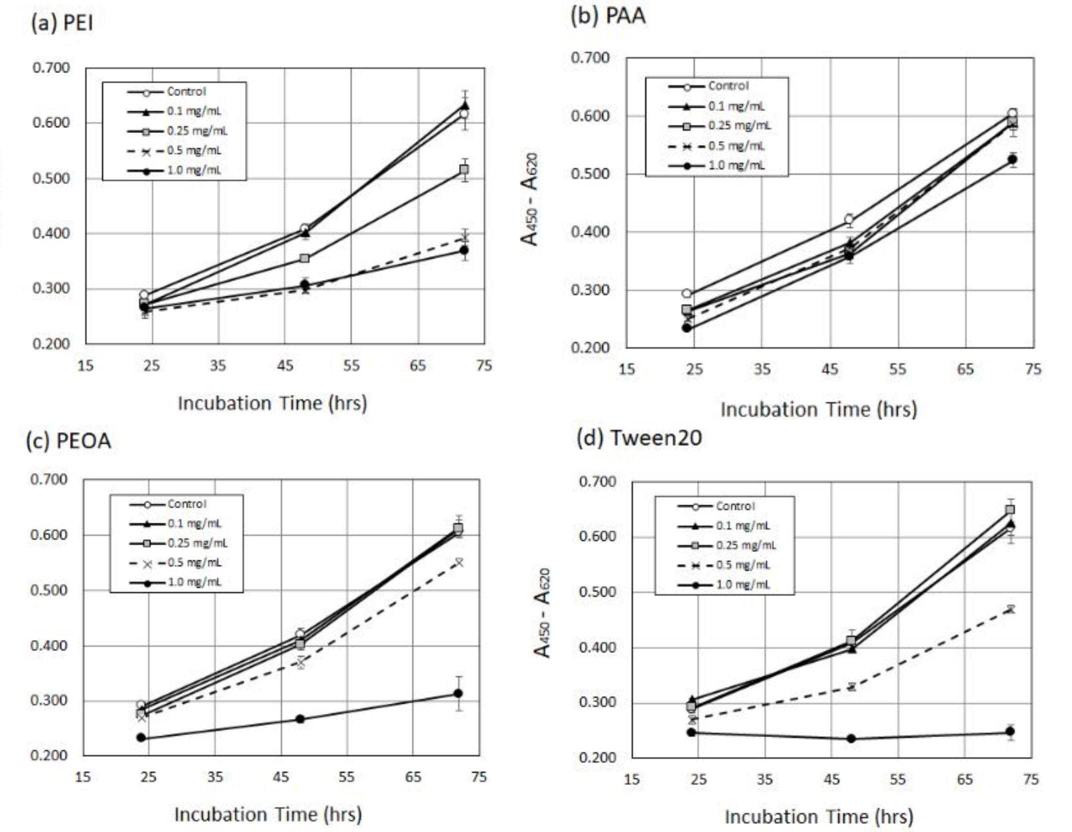

図１　高分子化合物が SH-SY5Y 細胞の増殖・生存に与える影響

②Caco-2 細胞

SH-SY5Y 細胞と同様に評価を行ったところ、細胞の増殖・生存に与える影響は PEI＞Tween20＞PEOA＞PAA＞PVA の順であることが確認された。また、PEI の同一濃度で比較すると、Caco-2 細胞が SH-SY5Y 細胞より影響を受けやすいことが判明した。

③PEI の分子量による毒性の違い

PEI の分子量 600，1,200 及び 1,800 で比較したところ、Monnery らの報告 (Monnery *et al.*,

2017）と同様に分子量が大きいほど強い毒性を示し、分子量 600 では 1.0 mg/mL でもほとんど細胞の増殖・生存に影響を及ぼさなかった。

(2) 高分子化合物存在下における環境化学物質による細胞毒性への影響

図 2(a) はチウラムと PEI を添加後、2 日間培養した際の SH-SY5Y 細胞の増殖・生存への影響をグラフにしたものである。チウラム単独添加群では、濃度依存的に細胞の増殖・生存が抑制されたが、PEI（平均分子量 1,200）が 0.1 あるいは 0.25 mg/mL の濃度で共存すると、その抑制効果は相殺された。一方で、図 2(b)に示した PEOA のようにチウラムと他の高分子化合物を共存させても相殺や相乗効果などの影響は見られなかった。さらに、この傾向は Caco-2 細胞でも同様であった。

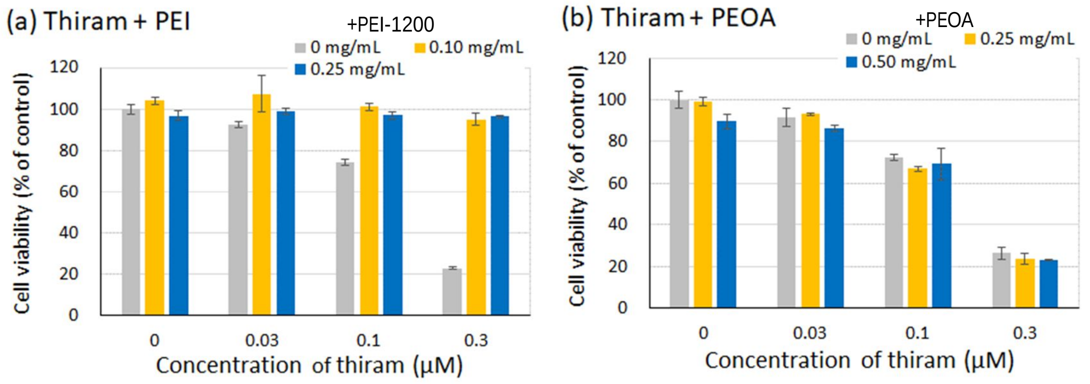

図 2 高分子化合物とチウラムの共存が SH-SY5Y 細胞の増殖・生存に与える影響（添加 2 日後）

一方、図 3 に示したように、パラコート単独添加群では、100 μM 濃度まで細胞増殖・生存に対して 20%未満の抑制効果しか認められなかったが、0.05 mg/mL 濃度の PEI の共存により 100 μM 濃度での増殖・生存率は 40%程度に低下した。この増強効果は PEI の分子量に依存せず、600 及び 1,200 で大きな違いは見られなかった。

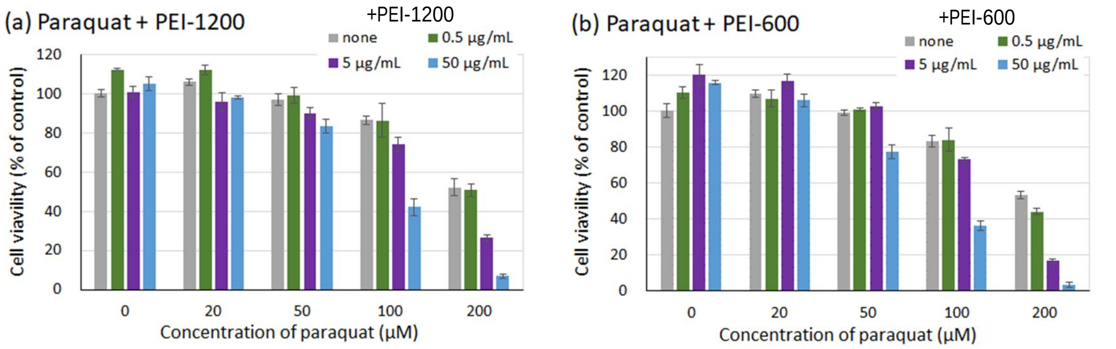

図 3 PEI とパラコートの共存が SH-SY5Y 細胞の増殖・生存に与える影響（添加 3 日後）

他の検討を行った中分子量高分子化合物と環境化学物質の組み合わせでは、Tween20 の存在下でテトラブロモビスフェノール A の毒性を若干増強する傾向が認められた以外は、共存による影響は見られなかった。

(3) PEI がチウラムの細胞毒性を相殺するメカニズムの検討

チウラムと同じジチオカルバメート系化合物であるジスルフィラムは Cu^{2+}と結合することで毒性を示すことが報告されている(Cen *et al.*, 2004)。また、紫外可視吸収スペクトルの解析から、チウラムと PEI は直接相互作用をしないこと、PEI が Cu^{2+}にキレートすることによりチウラムと Cu^{2+}の結合を阻害することを確認した。そこで、PEI が Cu^{2+}にキレートすることによって、ジチオカルバメート系化合物による細胞毒性を抑制しているかどうかを検討するため、チウラム及びジメチルジチオカルバミン酸ナトリウムと Cu^{2+}と既に結合したジメチルジチオカルバミン酸銅（II）を用いて比較実験を行った。図 4 に示したように、チウラムと比べ、ジメチルジチオカルバミン酸銅（II）においては PEI による毒性抑制効果が弱い傾向が認められた。なお、ジメチルジチオカルバミン酸ナトリウムでは、チウラムと同等の挙動を示した。以上の結果から、PEI がジチオカルバメート系化合物の有する細胞毒性を相殺するメカニズムとして、その Cu^{2+}へのキレート作用が寄与している可能性が強く示唆された。

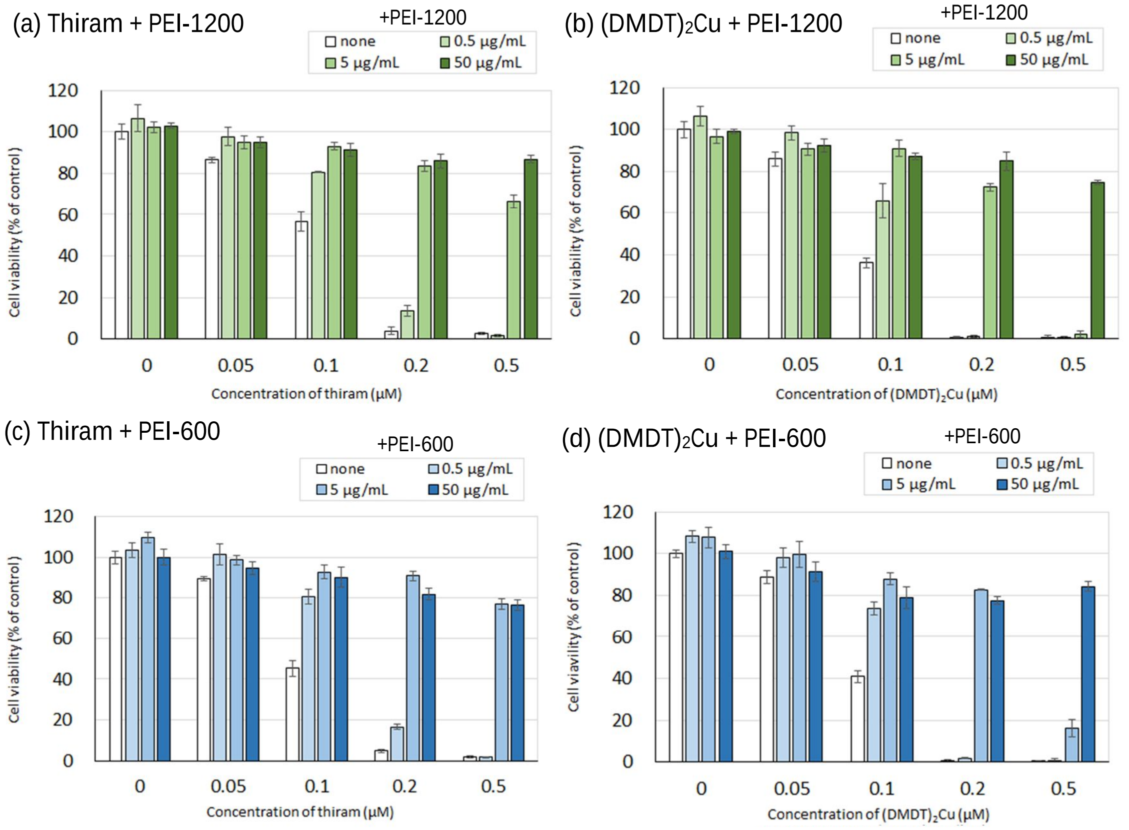

図 4　PEI とジチオカルバメート系物質の共存が神経細胞 SH-SY5Y の増殖・生存に与える影響

(4) PEI による膜透過性への影響

中分子量（1,200 及び 1,800）の PEI を細胞毒性を示さない濃度（100 及び 25 μg/mL）で添加したところ、添加後 5 時間までに顕著な TEER 値の低下や Lucifer Yellow CH (LYCH)の basal 側（基底膜側）への移行は見られなかった（図 5）。PEI による毒性増強作用としては、TJ に作用し細胞接着を緩めることで共存する化学物質の体内への吸収を促進する可能性が考えられるが、本結果からは、少なくとも細胞毒性を示さない濃度においては、PEI はそのような作用を有していないことが示唆された。

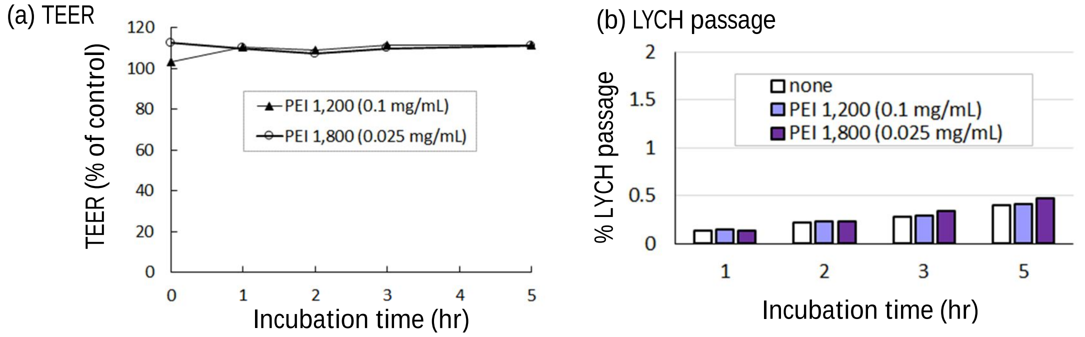

図 5　フィルター上単層 Caco-2 細胞のタイトジャンクション透過性に及ぼす PEI の影響

＜引用文献＞

① Watanabe H et al., Chronic toxicity of an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals to three aquatic organisms (alga, daphnid, and fish). *Environ Toxicol Chem*, 35, 996-1006 (2016)
② Cedergreen N, Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE*, 9, e96580 (2014)
③ Tanaka Y et al., Generalized concentration addition approach for predicting mixture toxicity. *Environ Toxicol Chem*, 36, 265-275 (2016)
④ Monnery BD et al., Cytotoxicity of polycations: Relationship of molecular weight and the hydrolytic theory of the mechanism of toxicity. *Int J Pharm*, 521, 249-258 (2017)
⑤ Cen D et al., Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem*, 47, 6914-6920 (2004)

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 四ノ宮美保、小澤美優香
２．発表標題 培養細胞を用いたポリエチレンイミン存在下における環境化学物質の毒性評価
３．学会等名 環境化学物質 3 学会合同大会（第30回環境化学討論会）
４．発表年 2022年

１．発表者名 四ノ宮美保、四ノ宮成祥
２．発表標題 ヒトCaco-2細胞を用いた高分子化合物と環境化学物質の毒性評価
３．学会等名 第29回環境化学討論会
４．発表年 2021年

１．発表者名 四ノ宮美保、四ノ宮成祥
２．発表標題 高分子化合物共存下での環境化学物質によるヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞への影響
３．学会等名 第28回環境化学討論会
４．発表年 2019年

１．発表者名 四ノ宮美保、四ノ宮成祥
２．発表標題 ジチオカルバメート系化合物によるヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞への影響
３．学会等名 第27回日本環境化学討論会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	四ノ宮　成祥 (Shinomiya Nariyoshi)		

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関