

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年6月25日現在

機関番号：82405

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710034

研究課題名（和文）疎水性有機汚染物質の生物利用性に与える溶存有機物質の影響評価

研究課題名（英文）Evaluation of the effect of co-existing dissolved organic matters on the bioavailability of hydrophobic organic compounds

研究代表者

池田 和弘（IKEDA KAZUHIRO）

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・主任

研究者番号：60422987

研究成果の概要（和文）：溶存有機物質による毒性緩和効果を把握するため、疎水性有機汚染物質の生物利用性に与える影響をモデル細胞膜の利用により評価した。ピレン、1-アミノピレン、1-ヒドロキシピレン、フルオキセチンの生物利用性は溶存有機物質への収着により低下することが確認された。低下率は荒川において1.1%以下であり、下水処理水においては5.2%以下であった。荒川や下水処理場の溶存有機物質のピレンに対する収着能は、米国着色河川の溶存有機物質と同等であった。

研究成果の概要（英文）：The effect of co-existing dissolved organic matters on the bioavailability of hydrophobic organic compounds was evaluated using artificial cell membrane as surrogate of aquatic organisms in order to figure out toxicity reduction with dissolved organic matters. The bioavailability of pyrene, 1-hydroxypyrene, 1-aminopyrene and fluoxetine were decreased with their sorption to dissolved organic matters. The largest reduction was 1.1% in Arakawa river and 5.2% in sewage treatment plant effluent, respectively. The sorption coefficients of pyrene to them were comparable to colored river in the United States.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,300,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：生物利用性、溶存有機物質、疎水性有機汚染物質、医薬品、多環式芳香族炭化水素、モデル細胞膜、収着

1. 研究開始当初の背景

排水規制や水環境管理にバイオアッセイの導入が検討されているが、共存する溶存有機物質の影響は十分に評価されていない。溶存有機物質は疎水性有機汚染物質の毒性を緩和することが報告されている。これは溶存

有機物質に収着・結合した疎水性有機汚染物質が生物に取り込まれなくなるため、生物利用性が低減することによる。一方、溶存有機物質に収着・結合した汚染物質（以降収着体とする）が“一生”毒性を発揮しないとは保証できない。溶存有機物質が先に分解すれば

毒性が発揮される可能性があり、また溶存有機物質が河口など塩濃度の高い環境で沈降すれば底質を摂取する生物に毒性を与える。そのため、排水や環境水の“現在”の毒性を評価する上ではバイオアッセイは極めて有用であるが、潜在的な毒性を評価するためには、どの程度収着体が存在するか、言い換えれば、溶存有機物質により生物利用性がどの程度低減するのか把握しておくことが必要である。

溶存有機物質の毒性緩和効果を評価した研究は、カドミウムなどの重金属や PCBs などの疎水性有機汚染物質を対象に、特に海外において精力的に行われてきた。その中で毒性緩和効果は、汚染物質の特性とともに溶存有機物質の濃度と特性に依存することが報告されている。しかしながら、国内の河川や排水中の溶存有機物質の毒性緩和効果や汚染物質の収着に関する研究は十分とは言えない。国内河川の溶存有機物質の特性は、疎水性の成分が少ないことなど米国などのものとは異なるとの報告がある。

一方、近年医薬品など親水性の官能基を有する疎水性有機汚染物質の環境汚染が懸念されている。これらの生物への取り込みを溶存有機物質の影響を含めて報告した例は限定的である。

2. 研究の目的

本研究では、国内の水環境および排水中の溶存有機物質が持つ、疎水性有機汚染物質の生物利用性を低減させる効果を定量的に評価することを目的とした。それにより、どのような疎水性有機汚染物質がどの程度溶存有機物質の影響を受けるのか把握し、バイオアッセイによる水質管理に有用な情報を提供する。対象とする疎水性有機汚染物質群は、疎水性と電荷の点で幅広い特徴を持つものを選択した。また、国内河川の溶存有機物質の特性を評価し、海外および市販のものと比較し、低減効果の大きさとの関係性を調査した。

3. 研究の方法

(1) 溶存有機物質が持つ疎水性有機汚染物質の生物利用性を低減する効果の評価

疎水性有機汚染物質の水生物への移行は、基本的に細胞膜へ受動拡散で分配することにより生じる。そのため、本研究では疎水性有機汚染物質の生物への取り込みを、生物を模擬したモデル細胞膜への分配係数 (P_{mw}) の測定により評価した。これにより、実際の生物を利用する際に懸念される時間とコストの問題や低い再現性などを回避した。

溶存有機物質が持つ疎水性有機汚染物質の生物利用性を低減する効果は、溶存有機物質の共存と非共存時の P_{mw} を測定し、比較す

ることで定量的に評価した。

(2) 細胞膜への分配係数 (P_{mw}) の測定

モデル細胞膜 (TRANSIL) は Sovicell 社から購入した。細胞膜を構成するリン脂質は卵黄ホスファチジルコリンとした。 P_{mw} は、リン酸緩衝液 (pH 7.4, 20 mM) 中での 24 時間の回分式分配平衡実験で求めた。平衡実験後 TRANSIL を遠沈して分離し、上澄み中の物質濃度を HPLC/PDA/蛍光検出器で定量し P_{mw} を算出した。 P_{mw} の定義は両相の疎水性有機汚染物質濃度比、[モデル細胞膜中の単位脂質あたりの濃度] / [水相中濃度] とした。

(3) 溶存有機物質への収着係数 (K_{doc}) の測定

疎水性有機汚染物質が溶存有機物質に収着する程度を評価するために、蛍光消光法によりその収着係数 (K_{doc}) を測定した。 K_{doc} は P_{mw} 測定時と同条件の回分式収着平衡実験で測定した。

(4) 疎水性有機汚染物質の選択

調査する疎水性有機汚染物質としては、医薬品 8 種 (フルオキセチン、イブプロフェン、アテノロール、イブプロフェン、インドメタシン、アセチルサリチル酸、アセトアミノフェン、カルバマゼピン)、エストロジェン 1 種 (17 β -エストラジオール)、多環式芳香族炭化水素類 (PAHs) 6 種 (ピレン、フェナントレン、アントラセン、フルオレン、1-アミノピレン、1-ヒドロキシピレン) の 15 種を選択した。化学的特徴から分類すると親水基のない疎水性物質 4 種、アミン類 4 種、カルボン酸 3 種、そのほか親水基を有する物質 4 種となった。

(5) 溶存有機物質の抽出

溶存有機物質は、荒川、琵琶湖 (南湖最下流付近) および下水処理水から抽出した。荒川については、上流域の親鼻橋、中流域で武蔵水路により利根川の水が合流する地点の下流である御成橋、さらに下流の秋ヶ瀬取水堰および支川で人為的負荷のない唐沢川の 4 地点で採水を行った。また、下水処理水は標準活性汚泥法による処理場の放流水 (塩素添加前) とした。

溶存有機物質の抽出は分画分子量 1000Da の限外ろ過膜 (日本ミリポア社製 YM-1) と攪拌加圧型膜処理装置を用いて行い、約 20L の原水を 100 倍程度に濃縮し適宜希釈して実験に供した。三次元励起蛍光スペクトル法による腐植様物質含有量、紫外吸光度法による SUVA₂₆₀ (芳香族含有量の指標) を測定し溶存有機物質の特性解析を行った。

4. 研究成果

(1) 疎水性有機汚染物質の細胞膜への分配特性評価

評価対象の疎水性有機汚染物質の細胞膜への分配係数 (P_{mw}) を溶存有機物質の非共存下で測定し、受動拡散により生物に取り込まれやすいものを調査した。

モデル細胞膜は TRANSIL Intestinal Absorption Kit としてプラスチック製の 96 穴プレートに封入されて凍結状態で販売されている。本研究の対象物質はプラスチックに吸着する恐れのあるものも多く、分配実験はガラス製遠沈管内で行う必要があるため、細胞膜は一度すべて回収し保存溶液を作成し、必要量だけ使用することとした。このとき解凍凍結を数回繰り返すが、その際に細胞膜の劣化がないことをアントラセンの P_{mw} 測定により確認した。また、4 種の PAHs について、TRANSIL とモデル細胞膜として従来よく用いられるリポソームにより P_{mw} を測定したが、ほぼ同一の結果が得られた。TRANSIL は固液分離が容易で操作性が良いこともあり、 P_{mw} 測定に大変有用であった。

P_{mw} の測定結果を表 1 に、オクタノール/水分配係数 (D_{ow}) との比較を図 1 に示す。全体としては疎水性が強いほど細胞膜に分配しやすい傾向が見られたが、フルオキセチンやイフェンプロジルのように D_{ow} から想定するものより高い P_{mw} を有するものもあった。ピレンよりも D_{ow} の低い 1-アミノピレンや 1-ヒドロキシピレンはピレンよりも高い P_{mw} となった。細胞膜表面は正負両電荷あり親水基を有するので、疎水性相互作用以外の分配機構の関与が考えられた。アセチルサリチル酸やアテノロールは中性付近では受動拡散で生物にほとんど取り込まれないことがわかった。

表 1 疎水性有機汚染物質の P_{mw}

物質名	$\log P_{mw}$	物質名	$\log P_{mw}$
ピレン	5.3	イブプロフェン	1.6
フェナントレン	5.0	インドメタシン	2.5
アントラセン	5.1	アセチルサリチル酸	NA
フルオレン	4.4	アセトアミノフェン	1.5
フルオキセチン	4.8	カルバマゼピン	1.9
イフェンプロジル	3.9	17 β -エストラジオール	3.5
アテノロール	NA	1-ヒドロキシピレン	5.4
1-アミノピレン	5.5		

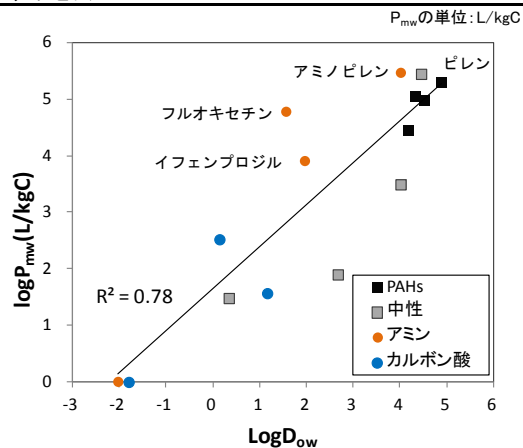


図 1 疎水性有機汚染物質の P_{mw} と D_{ow}

(2) 疎水性有機汚染物質の溶存有機物質への収着係数 (K_{doc}) の測定

評価対象の疎水性有機汚染物質について、溶存有機物質の影響を受けやすいものを調査するために、市販のフミン酸 (アルドリッチ社製: 以下 AHA と略す) と国際腐植物質学会が頒布している米国の着色河川の溶存有機物質 (Suwannee River NOM: 以下 SRNOM と略す) への収着係数 (K_{doc}) を測定した (表 2)。SRNOM に対する K_{doc} と D_{ow} との比較を図 2 に示す。

AHA は SRNOM よりも高い K_{doc} を有することが確認されたが、疎水性有機汚染物質間での順序は同じであり、1-アミノピレン、フルオキセチン、1-ヒドロキシピレン、ピレンの順となった。これらの物質は高い P_{mw} が計測されたものであり、受動拡散で生物に取り込まれやすいことが確認されている。したがって、この 4 種について、生物利用性に対する溶存有機物質の影響を詳細に評価することとした。

図 2 に示した直線は底質有機物への収着係数の予測によく使われる Karickhoff (1981) の式である。PAHs などこの式での予測値と近くなるものがある一方、フルオキセチン、イブプロフェンおよびイフェンプロジルは大きく逸脱しており、親水性の官能基を持つ物質へは適用できないことが確認された。

表 2 疎水性有機汚染物質の K_{doc}

物質名	$\log D_{ow}$	$\log K_{doc}$	
		SRNOM	AHA
ピレン	4.9	4.3	5.2
フェナントレン	4.5	3.9	-
アントラセン	4.3	4.2	-
フルオレン	4.2	4.0	-
フルオキセチン	1.6	4.3	5.4
イフェンプロジル	2.0	4.0	5.0
1-アミノピレン	4.0	4.5	5.5
イブプロフェン	1.2	3.6	3.6
17 β -エストラジオール	4.0	3.9	4.9
1-ヒドロキシピレン	4.5	4.3	5.2

K_{doc} の単位: L/kgC

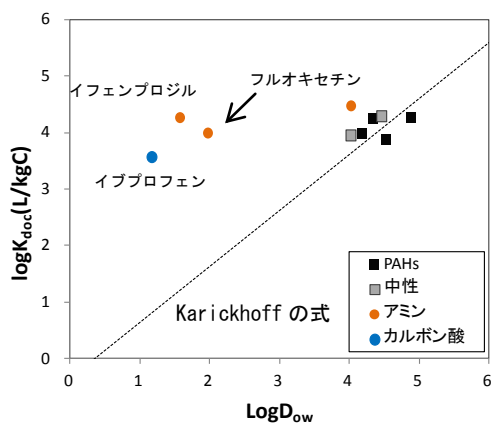


図 2 疎水性有機汚染物質の K_{doc} と D_{ow}

(3) 溶存有機物質が持つ疎水性有機汚染物質の生物利用性を低減する効果の評価

4種の疎水性有機汚染物質について、溶存有機物質共存下における P_{mw} の測定結果を図3～6に示す。グラフの縦軸は溶存有機物質非共存時の P_{mw} で正規化している。溶存有機物質の共存濃度は実環境中のものより高くしているが、その存在により疎水性有機汚染物質の細胞膜への分配が減少することが明確に示された。

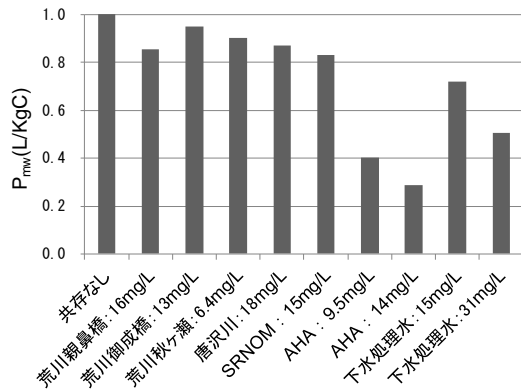


図3 ピレンの P_{mw} に対する溶存有機物質の影響

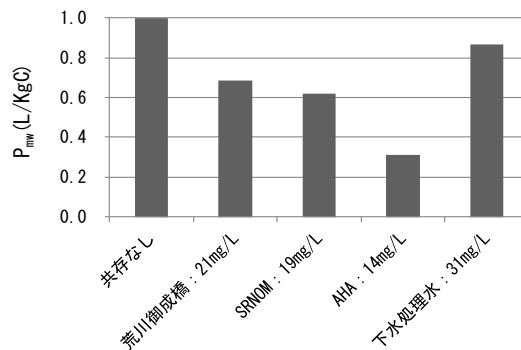


図4 1-アミノピレンの P_{mw} に対する溶存有機物質の影響

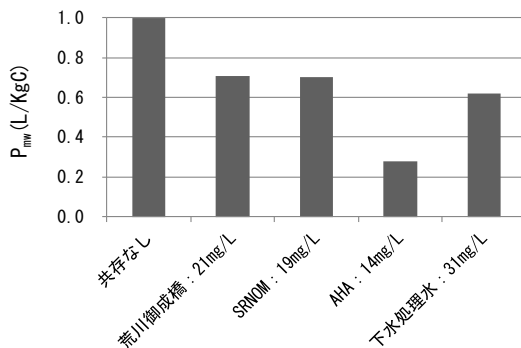


図5 1-ヒドロキシピレンの P_{mw} に対する溶存有機物質の影響

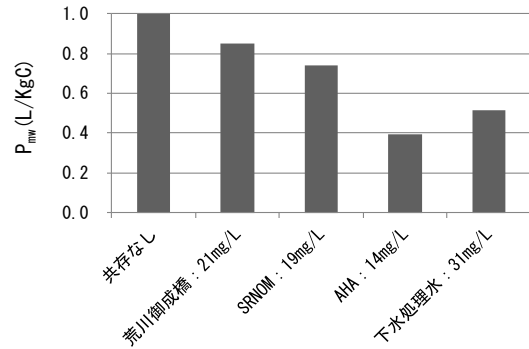


図6 フルオキセチンの P_{mw} に対する溶存有機物質の影響

P_{mw} と K_{doc} と溶存有機物質濃度 ($[DOM]$) との間には次式が成立する。ここで $P_{mw}(0)$ は溶存有機物質非共存時の P_{mw} である。

$$P_{mw} = \frac{P_{mw}(0)}{1 + K_{doc}[DOM]}$$

P_{mw} の測定結果から K_{doc} を計算した結果を、蛍光消光法により実測したものとあわせて表3に示す。蛍光消光法は K_{doc} の測定法のなかでは最も信頼性の高い方法である。両者は比較的良好に一致しており、得られた K_{doc} 値の信頼性は高いと考えられる。ただし、下水処理水に対するピレンの K_{doc} は蛍光消光法では算出されなかった (ゼロと判断された)。原因は不明確であるが、 K_{doc} の正確な測定は疎水性有機汚染物質と溶存有機物質の組み合わせによっては困難な場合もあることが報告されている。したがって、モデル細胞膜を用いて溶存有機物質の影響を直接評価する本研究の手法は優れていると考えられた。

表3 P_{mw} から計算した K_{doc} と実測値の比較

	ピレン		ヒドロキシピレン		アミノピレン		フルオキセチン	
	計算	実測	計算	実測	計算	実測	計算	実測
荒川親鼻橋	1.0×10^4	2.0×10^4	-	-	-	-	-	-
荒川御成橋	4.4×10^3	1.7×10^4	2.0×10^4	1.8×10^4	2.2×10^4	5.5×10^3	8.5×10^3	2.6×10^3
荒川秋ヶ瀬	1.6×10^4	1.8×10^4	-	-	-	-	-	-
唐沢川	8.4×10^3	9.7×10^3	-	-	-	-	-	-
下水処理水	2.9×10^4	NA	2.0×10^4	-	5.0×10^3	-	3.0×10^4	2.5×10^4
SRNOM	1.4×10^4	1.8×10^4	2.3×10^4	1.9×10^4	3.2×10^4	2.9×10^4	1.8×10^4	1.8×10^4
AHA	1.7×10^5	1.4×10^5	1.8×10^5	1.8×10^5	1.6×10^5	3.0×10^5	1.1×10^5	2.3×10^5

K_{doc} の単位: L/kgC

得られた K_{doc} と溶存有機物質濃度から、実際の水環境において溶存有機物質が生物利用性を低減する割合を計算した結果を、表4に示す。なお、本研究では膜濃縮により溶存有機物質を抽出したため低分子の成分は回収できていない。ピレンの低分子成分への K_{doc} を測定した結果、取着しないことが確認されたため、この成分には他の疎水性有機汚染物質も取着しないと仮定して計算を行った。荒川流域においては有機物濃度が低いことから生物利用性の低減率は極めて低く最

高でアミノピレンの 1.1%であり、溶存有機物質の影響はほとんどないことが分かった。下水処理水についてはフルオキセチンの生物利用性は 5.2%低下することが分かったが、大きな影響ではなかった。ただし、我が国においても、釧路湿原など有機物濃度が 50mgC/L 近い水域も存在するので、溶存有機物質の影響評価をすすめる必要はある。

表 4 実環境における生物利用性低減率

DOC (mg/L)	生物利用性低減率 (%)			
	ピレン	ヒドロキソピレン	アミノピレン	フルオキセチン
荒川親鼻橋	0.6	0.3		
荒川御成橋	1.0	0.2	1.0	1.1
荒川秋ヶ瀬	1.2	0.9		0.4
唐沢川	1.9	0.9		
下水処理水	5.9	5.1	3.5	0.9

(4) 溶存有機物質の特性と K_{doc}

本研究で抽出した溶存有機物質の特性と K_{doc} を市販の溶存有機物質と比較して表 5 に示す。荒川本川では蛍光・吸光特性やピレンに対する K_{doc} は 3 地点で非常に似かよっており、利根川の水が合流した後も変化はないことが分かった。

表 5 溶存有機物質の特性と K_{doc}

溶存有機物質	DOC (mg/L)	>1KDaの割合 (%)	蛍光強度*/DOC (OSU-L/mgC)	SUVA ₂₆₀ (L/mgC·cm)	ピレンの K_{doc} (L/kgC)
荒川親鼻橋	0.6	44	0.16	0.022	2.0×10^4
荒川御成橋	1.0	47	0.15	0.022	1.7×10^4
荒川秋ヶ瀬	1.2	50	0.18	0.024	1.8×10^4
唐沢川	1.9	57	0.27	0.042	9.7×10^3
琵琶湖	1.1	32	0.08	0.017	3.9×10^3
下水処理水	1.8	31	0.39	0.020	2.9×10^4
SRNOM			0.22	0.046	1.8×10^4
Pony Lake FA			0.21	0.022	3.9×10^3
Nordic Lake FA			0.25	0.043	2.7×10^4
Nordic Lake NOM			0.23	0.049	2.0×10^4
AHA			0.39	0.078	1.4×10^5

*腐植様物質に対応するピーク(励起波長320nm蛍光波長430nm)の蛍光強度

荒川秋ヶ瀬取水堰の水について 100 日間の分解試験を行った結果、DOC は 1.2(mg/L) から 0.8(mg/L) に低下した。この前後の三次元励起蛍光スペクトルを図 7 に示す。

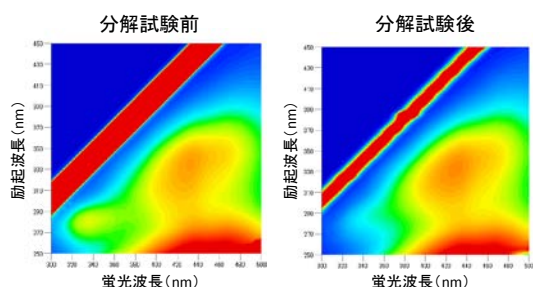


図 7 秋ヶ瀬の溶存有機物質の分解試験前後の三次元励起蛍光スペクトル

励起波長 285nm、蛍光波長 320nm 付近のピークはタンパク質に対応するが、この強度は分解試験により大幅に減少した。一方、励起

波長 320nm、蛍光波長 430nm 付近の腐植様物質に対応するピークの強度は変化しなかった。このことから DOC の生分解に伴い、腐植物質に収着した疎水性有機汚染物質は保存されるが、タンパク質に吸着した成分は放出される可能性が示唆され、今後実験的に検証する必要があると考えられた。

ピレンなど疎水性有機汚染物質に対する K_{doc} と溶存有機物質の SUVA₂₆₀ の間には正の相関が報告されている。本研究で得られた淡水系の溶存有機物質に対する K_{doc} と SUVA₂₆₀ の関係を図 8 に示す。

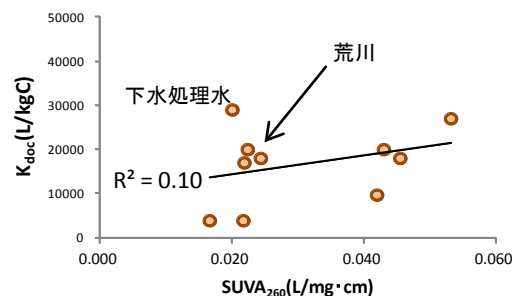


図 8 ピレンに対する K_{doc} と溶存有機物質の SUVA₂₆₀ との関係

下水処理水や荒川本川の溶存有機物質が、低い SUVA₂₆₀ に対して比較的高い K_{doc} をもっていたため、本研究においては、両者に良い相関は見られなかった。これらの K_{doc} は、琵琶湖のものよりも大きく、米国の着色河川のものに匹敵した。疎水性有機汚染物質の種類によっては、荒川や下水処理水においても生物利用性に影響がある可能性が示唆された。また SUVA₂₆₀ が低くても K_{doc} が大きいことがあることが示されたことから、今後もより多くの河川、排水中の溶存有機物質について調査を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 池田和弘、清水芳久、荒川の溶存有機物質が多環式芳香族炭化水素類の細胞膜への分配に与える影響、第 46 回日本水環境学会年会、2012 年 3 月 14 日、東洋大学 (東京都)
- ② 池田和弘、清水芳久、微量有機汚染物質の細胞膜への分配特性 —市販モデル細胞膜の利用—、平成 23 年度土木学会全国大会 第 66 回年次学術講演会、2011 年 9 月 9 日、愛媛大学 (愛媛県)
- ③ 池田和弘、高橋基之、柿本貴志、見島伊織、木村弘明、自然由来と疑われる泡が

流下する河川の有機物特性、第 45 回日本水環境学会年会、2011 年 3 月 18 日、紙上発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 和弘 (IKEDA KAZUHIRO)
埼玉県環境科学国際センター・
水環境担当・主任
研究者番号：60422987