

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-25-'98

環境中の有機塩素化合物の暴露量評価と 複合健康影響に関する研究

Studies on Exposure to Halogenated Organic Compounds
and its Human Health Effects

平成4～8年度
FY 1992～1996

NIES



NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

SR-25-'98

環境中の有機塩素化合物の暴露量評価と
複合健康影響に関する研究

Studies on Exposure to Halogenated Organic Compounds
and its Human Health Effects

平成4～8年度
FY 1992～1996

環境庁 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「環境中の有機塩素化合物の暴露量評価と複合健康影響に関する研究」
(期間 平成4～8年度)

特別研究責任者：森田昌敏
特別研究幹事：相馬悠子
報告書編集担当：相馬悠子・米元純三

序

本報告書は平成4年度から8年度にかけて実施した特別研究「環境中の有機塩素化合物の暴露量評価と複合健康影響に関する研究」をとりまとめたものである。

1987年の国連「環境と開発に関する世界委員会」で提唱された“sustainable development”（持続可能な開発）の理念は21世紀の日本の環境施策の基本でもある。化学物質の使用量が年々増加するとともに、生産される化学物質の種類も増加している現在、〈化学物質による質的低下をもたらさない環境の持続〉をするためには、どのような化学物質が環境に残存し、どのような影響を与えているかという化学物質の総合影響評価をする必要がある。

この特別研究では、化学物質の中でも難分解性であり有毒な物質が多い有機塩素化合物を取り上げ、有機塩素化合物の環境への影響を体系的に評価するための研究を行っている。大気、水、底質、生物のフィールド調査からどのような有機塩素化合物が残存しており、それらの毒性評価からどのような影響を与えるかの推定を行った。同時に生産量の大きい有機塩素化合物の国内生産量から環境への放出量の推定をし、フィールド調査結果と比較し、有機塩素化合物のリスク評価方法の検討をしている。そして有機塩素化合物のうち、環境への放出量が一番多い大気中の揮発性有機塩素化合物の個人暴露量調査を行い、人への健康リスク評価を行った。

またフィールドで検出された有機塩素化合物の毒性影響を各種細胞を使った *in vitro* 系システムで毒性評価、毒性機序の検討、細胞毒性と *in vivo* 毒性との相関を検討し、人の健康影響評価をするための *in vitro* 系システムの有用性を検討している。そして2種類以上の有機塩素化合物の混在で毒性がどのように変化するかの検討を行った。

これらの研究は、環境中に残存する多種類の有機塩素化合物の健康リスク評価を行うための基礎となり、手助けになると考えられる。

終わりに、研究を進める上で研究所外の多くの方々に、ご協力とご助言をいただいた。ここに深く感謝の意を表します。

平成10年3月

国立環境研究所

所長 石井吉徳

目 次

1 研究の目的と経緯	1
1.1 研究の目的	1
1.2 研究の構成	2
2 研究の成果	3
2.1 有機塩素化合物の暴露量評価に関する研究	3
2.1.1 GC/MS法による多成分一斉分析手法の河川水への応用	3
2.1.2 都市河川中に含まれる全有機ハロゲン (TOX) 濃度の季節変動とその発生源の解析	7
2.1.3 吸着性有機ハロゲン化合物 (AOX) 測定法の評価および同測定法を利用した 有機塩素化合物の排出量の推定	9
2.1.4 MX類縁化合物の分析	12
2.1.5 殺菌石鹼に含まれる殺菌成分トリクロサンの塩素化反応機構と微生物毒性	13
2.1.6 大気中揮発性有機化合物の個人暴露量と健康リスク評価	15
2.2 有機塩素化合物の複合健康影響評価に関する研究	16
2.2.1 ヒト由来細胞培養系を用いた水環境試料中の有機塩素化合物の毒性評価	17
2.2.2 不死化ラット肝細胞を用いた有機塩素化合物の毒性評価の試み	18
2.2.3 環境中有機塩素化合物の単独および2つの化合物の混合物の胎仔毒性の評価	22
2.2.4 多塩素化ビフェニル (PCB) およびその関連化合物によるP型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) 遺伝子の発現とその制御	23
2.2.5 ジクロロベンゼンの培養細胞へのガス暴露による遺伝毒性の評価	28
2.2.6 リン酸トリス (2-クロロエチル) の行動影響	31
2.3 環境中有機塩素化合物の総合影響評価	34
2.3.1 国内生産量から推定した有機塩素化合物の環境媒体への分配	34
2.3.2 化学物質のリスク評価の方法論の開発	37
[資 料]	
I 研究の組織と研究課題の構成	43
1 研究の組織	43
2 研究課題と担当者	44
II 研究成果発表一覧	45
1 誌上発表	45
2 口頭発表	48

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

我が国の化学物質の種類は生産量の増加率の数倍の速さで増加している。このことは図1に示したケミカルアブストラクト (Chemical Abstracts) に登録された化学物質数の増加からもうかがわれる。これはエレクトロニクス、新素材、複合材料、バイオテクノロジーといった先端産業の進歩とともに、化学製品の多様化、高付加価値化が要求され、それぞれの量は少ないが非常に多種類の化学物質が生産、使用されることによっている。そして将来生産される種類はますます増加すると予想され、それに伴って、化学物質の環境への放出も少量ではあるが多種類の放出になることが考えられる。

1987年の国連「環境と開発に関する世界委員会」で「持続可能な開発」の理念が提唱され、日本政府の21世紀に向けての環境施策の基本も「持続可能な開発」であるとされている。「化学物質による質的低下をもたらさない環境の持続」への危機を防ぐためには、どのような種類の化学物質がどのような環境に、どの位存在し、複合してどのような影響を環境に与えるかという、化学物質の総合影響評価をする必要がある。

化学物質の中でも塩素を含む有機化合物、有機塩素化

合物は、化合物としての安定性、化学合成中間体としての有用性から、化学工業製品の中でもその種類、割合はきわだっただけ多い。例えば昭和62年の工業製品の国内統計によると、有機化学品の生産および輸入量の13%以上、プラスチックの18%は塩素を含んだ製品であり、農薬原体生産量の46%は塩素の入った有機化合物である。一方化審法（化学物質審査及び製造等の規制に関する法律）に基づいて規制がなされている化学物質のうち、第一種特定化学物質で8種、第二種特定化学物質及び指定化学物質20種が塩素の入った物質であり、化合物の安定性、殺菌殺虫作用といった有機塩素化合物の有用性が難分解性、有毒性といった環境汚染につながっていると考えられる。

国立環境研究所では昭和62年度から平成元年度に特別研究「先端技術における化学環境の解明に関する研究」を実施した。その中では塩化ジベンゾフランとダイオキシン、有機スズ、重金属を中心に環境中濃度、環境中の挙動、生体内動態と毒性の研究を行った。本特別研究では、環境に存在する化学物質、特に有機塩素化合物の健康影響を体系的に評価するために、環境中の多種類の有機塩素化合物の暴露量評価及び健康影響評価に関する研究を行った。

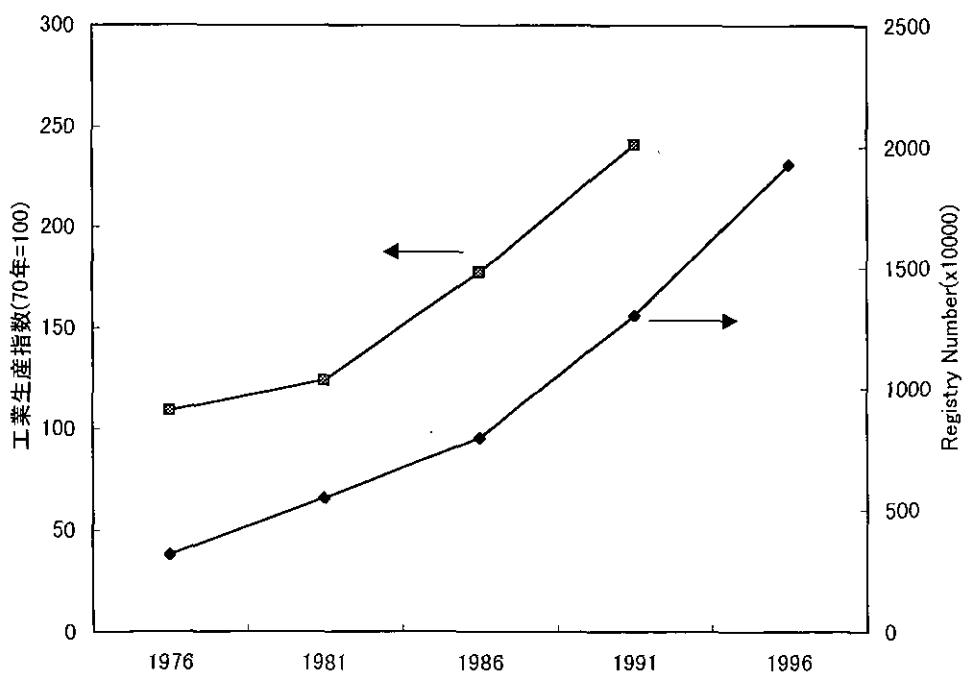


図1 日本の化学工業生産指数とChemical Abstractsの化学物質登録数

1.2 研究の構成

特別研究は3つのサブテーマに分かれて進められた。

(1) 有機塩素化合物の暴露量評価に関する研究

ここではどういう有機塩素化合物がどこに（大気、水、土壌、底質）どれだけあるのかの総合評価を目的として、イオントラップ質量分析法を用いた有機化合物の一斉分析（大気、海水、海底質、生物）、都市河川（水、底質）の有機塩素化合物と有機塩素量調査、国内の塩素化合物生産量から推定した有機塩素化合物の環境放出量等の研究を行った。

その結果、環境への放出量は揮発性有機塩素化合物が多く、水や底質中の有機塩素濃度には漂白殺菌により生成する有機塩素化合物の寄与が大きいことがわかった。そのため、特別研究の後半では揮発性有機塩素化合物の健康リスク評価と漂白殺菌由来の有機塩素化合物についての研究を進めた。

(2) 有機塩素化合物の複合健康影響評価に関する研究

in vitro 系システム（神経細胞、不死化ラット肝細胞、ラット胎仔胚芽細胞）による有機塩素化合物の毒性評価、毒性機序の検討、また2種以上複数の有機塩素化合物が共存するときの毒性作用の相加性や相乗性、および細胞毒性と *in vivo* の毒性データとの相関を検討した。

(3) 環境中有機塩素化合物の総合影響評価

ここでは有機塩素化合物の総合評価のため環境で検出される可能性のある有機塩素化合物の分析法、健康影響情報を集めリスト化した。構造と反応性と毒性の相関の研究からは実験データがない化合物に関する情報を得ることを目的とした。国内塩素化合物生産量から有機塩素化合物の環境への放出を推定し、フィールド調査の結果と比較検討し、有機塩素化合物のリスク評価法の検討を行った。

2 研究の成果

2.1 有機塩素化合物の暴露量評価に関する研究

2.1.1 GC/MS法による多成分一斉分析手法の河川水への応用

我が国で使用される化学物質の種類は、化学物質の生産量の増加率を数倍上まわる勢いで増加している傾向にある。これは、近年、化学物質の他製品との差別化、高機能化、高付加価値化が追求された結果、製造量は少ないものの他種類の化学物質が製造され、使用されるようになった結果によると思われる。環境庁の化学物質総点検調査によれば、1974年から1993年までに調査された716物質のうち257物質が大气、水、あるいは底質中から検出されている。このことは、環境中には数多くの汚染物質が存在していることを示しており、環境化学物質による生態影響や健康影響評価のためには、より多くの化学物質を分析する手法が必要とされている。GCやガスクロマトグラフ質量分析法による水中に存在するng/lレベルの化学物質の一斉分析手法がいくつか報告されているが、装置上の制約により同時分析できる化合物の種類としては多くても数十種類の物質の分析に限られるのが現状である。GC/イオントラップ質量分析法は感度が高く、従来の質量分析における質量選択イオン検出法(SIM)による検出感度と同等の感度で質量スペクトルが測定できるため、測定対象物質数を増加させることが比較的容易である。そこで、285種類の物質の同時分析手法を確立し、これを河川水の分析に適用した。

対象とした地点は、埼玉県綾瀬川および古綾瀬川の上流から下流にかけて、1994年5月、11月、1995年1月に採取した。古綾瀬川は、埼玉県草加市にある全長が6kmほどの小河川であり、綾瀬川の支流の一つとなっている。河岸付近には、製紙工場や工業団地があり、大小さまざまな化学工場が操業している。工業団地内の工場廃水は各事業所内の施設で処理された後、下水道に集められ、綾瀬川合流地点から上流約1.5kmにある放水口を通じて古綾瀬川に放流されている。また、住宅街が隣接しており、家庭排水による汚濁の進んだ河川でもある。河川水900mlをそれぞれ塩化メチレン50mlで2回抽出した後、6M塩酸でpHを2以下の酸性とし塩化メチレン50mlを用いて酸性物質をさらに抽出した。続いて、水層を6Mの水酸化ナトリウム水溶液でpH11以上のアルカリ性と

し、塩化メチレン50mlを用いて塩基性物質を抽出した。それぞれの塩化メチレン抽出液を合わせて1mlまで濃縮し内部標準物質を加えた後、GC/イオントラップ質量分析法により測定した。

測定対象とした物質を分子式別に分類した化合物数を、表1に示した。ハロゲンを含む化合物が103物質、含まない物質が182物質であり、総数で285物質である。図2に、今回の測定で検出された化合物の種類別の内訳を示した。芳香族アミン、フェノール類、ベンゼン誘導体など134化合物が検出された。このうち、ハロゲンを含む化合物は39種類であった。検出率が高い物質を表2に示した。上段にハロゲンを含む物質を示したが、ジクロロベンゼン類、リン酸トリス(2-クロロエチル)などのプラスチックの可塑剤、クロロフェノール類、クロロアニリン類などの検出率が高かった。表3に検出された最高濃度が高い物質を示した。ハロゲンを含む物質では、1,3,5-トリクロロベンゼン、1,3-ジクロロプロパノール、2,4,6-トリクロロアニリンが $10\mu\text{g/l}$ 以上の濃度で検出されていた。ハロゲン化芳香族化合物が、検出率、検出濃度ともに高い傾向にあった。

GC/イオントラップ質量分析法による一斉分析による個々の化合物濃度の積算値、そこに含まれるハロゲン量の積算値(塩素換算)、河川水を2l毎日飲用するとし

表1 イオントラップ質量分析法により一斉分析を行った物質の内訳

分子式・用途分類	官能基	総数	塩素なし	塩素あり
CH	鎖式化合物	25	21	4
	ベンゼン類	16	3	13
	多環芳香族	43	41	2
	その他CH	4	3	1
CHO	エーテル	8	3	5
	ケトン	5	5	
	フェノール	22	12	10
	フタル酸エステル	9	9	
	その他CHO	8	5	3
CHN(O)	芳香族アミン	36	21	15
	複素環	2	2	
	芳香族ニトロ	19	14	5
	ニトロソアミン	3	3	
CHS(NO)	CHS(NO)	7	7	
CHP(NOS)	CHP(NOS)	6	4	2
農薬	殺虫剤	36	11	25
	除草剤	20	11	9
	殺菌剤	16	7	9

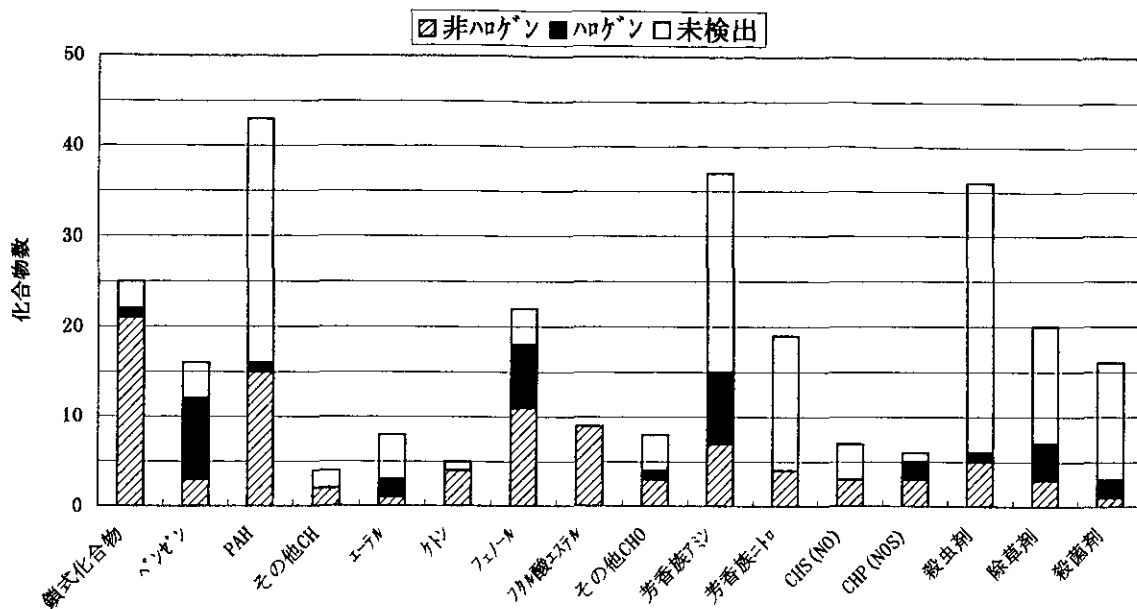


図2 綾瀬川より検出された化合物の種類別内訳

表2 綾瀬川河川水中より検出される頻度の高い物質

100-80%	80-60%	60-40%
1,4-ジクロロベンゼン	1,3-ジクロロベンゼン	2,4-ジクロロフェノール
1,2-ジクロロベンゼン	1,3,5-トリクロロベンゼン	2-クロロアニリン
リン酸 トリス (2-クロロエチル)	2,4,6-トリクロロアニリン	1,2,4-トリクロロベンゼン
1,3-ジクロロ-2-プロパノール	2,4,6-トリクロロフェノール	リン酸 トリス (1,3-ジクロロ-2-プロピル)
		2,4-ジクロロアニリン
		シマジン (CAT)
		チオベンカルブ
2,6-ジ-tert-ブチル-p-ベンゾキノ	1,3-ジメチルナフタレン	2-トルイジン
アセトフェノン	フタル酸 ジイソブチル	1-ナフチルアミン
イソホロン	フタル酸 ブチル ベンジル	2,6-ジメチルナフタレン
4-オクチルフェノール	α-テルピネオール	3,5-ジメチルフェノール
フェノール	ベンジルアルコール	2-クレゾール
フタル酸 ジメチル	フェノブカルブ	キノリン
フタル酸 ジブチル	ダイアジノン	スチレン
フタル酸 ジエチル	アントラキノン	2,6-ジイソプロピルナフタレン
フタル酸 ビス (2-エチルヘキシル)	フェニトロチオン (MEP)	2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール
2- (メチルチオ) ベンゾチアゾール		3-クレゾール
ベンゾチアゾール		4-クレゾール
リン酸 トリブチル		ジフェニルアミン
4-シメン		シメトリン
フェナントレン		イソプロチオラン
2-メチルナフタレン		
ナフタレン		
4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール		
ビフェニル		
2,4-ジメチルフェノール		
フタル酸 ジヘブチル		

表3 綾瀬川河川水中の最高濃度の高い化合物

>10ppb	<10ppb	1-0.5ppb
1,3,5-トリクロロベンゼン 1,3-ジクロロ-2-プロパノール 2,4,6-トリクロロアニリン	2,4,6-トリクロロフェノール ビス(2-クロロイソプロピル)エーテル シマジン(CAT)	1,2,4-トリクロロベンゼン 2,4-ジクロロアニリン リン酸 トリス(2-クロロエチル) ペンタクロロフェノール 2-クロロナフタレン
1-ナフチルアミン フタル酸 ジブチル フタル酸 ビス(2-エチルヘキシル) フェノール	2-ニトロアニソール キノリン 4-シメン 2,4-ジメチルフェノール フタル酸 ジエチル イソホロン リン酸 トリブチル アセトフェノン ダイアジノン ベンゾチアゾール フタル酸 ブチル ベンジル α -テルピネオール ナフタレン	3-クレゾール 4-クレゾール 2,6-ジ- <i>t</i> -ブチル- <i>p</i> -ベンゾキノ アニリン ベンジル アルコール 2-クレゾール ジベンジル エーテル フタル酸 ジメチル ナプロパミド

たときの許容摂取量 (RfD) に対する割合の積算値, 別途測定した河川水中の全有機ハロゲン量 (TOX), および発光細菌の発光量を半減させる濃度 (EC₅₀) に対する比率を表4に示した。個々の化合物濃度の測定値を積算した値と全有機ハロゲン, 計算により求めた積算ハロゲン濃度と全有機ハロゲンには, とともに正の相関が認められた。回帰式の傾きから, GC/イオントラップ質量分析法により測定したハロゲン量は, 全有機ハロゲンの約7%程度であることが推定される。また, 切片が0を通らず正の値となった。低濃度域の回帰式から, 今回用いたジクロロメタンによる溶媒抽出では抽出できない有機ハロゲンが河川水中に塩素濃度として30 $\mu\text{g/l}$ 程度であると推定された。

RfD値には, IRIS (Integrated Risk Information System, 米国EPA) の数値を用いた。測定物質285物質のうち, RfD値が得られた物質は62物質 (22%) であった。抽出された134物質のなかでは, 36物質 (27%) であった (表5)。最悪のケースを想定して河川水を2l毎日飲むとしても, RfDに対する比率の合計は1.7~5.8%となり, 個々の物質はもとより, 総和をとっても許容摂取量に対する割合が100%を超えることはなかった。

発光細菌の発光量の減少によって毒性を評価するマイクロトックス試験 (MTX試験: マイクロプレート法) を用い抽出液の毒性を評価した。河川水900mlを一斉分析法と同様にジクロロメタンで抽出し, 2mlに定容

した。このうち, 100 μl (河川水として45ml相当) をとり, 窒素気流中でジクロロメタンを揮散させた。これを, ジメチルスルホキシド (DMSO) 10 μl に溶解したのち, 2%塩化ナトリウム水溶液で1mlとした。これは, 河川水を45倍に濃縮したことに相当する。これの2倍希釈を7段階繰り返して, 試験溶液とした。発光細菌を含んだ培地 (2%塩化ナトリウム水溶液100 μl) に試験溶液100 μl を添加し, 5分後と15分後の発光強度を半減させる濃度 (EC₅₀) を求めた。ここでは, 濃度として河川水からの濃縮倍率をとった。マイクロトックス試験での濃縮倍率は最高で22.5倍 (対EC₅₀で4.4%), 最低で0.18倍 (対EC₅₀で560%) となる。表5に示したように, 抽出液の発光細菌に対する毒性は, 河川水中の濃度に換算すると1.6~60%であった。ガスクロマトグラフ質量分析法により測定された個々の化合物の積算濃度と発光細菌に対する毒性にも正の相関が認められた。抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより, ヘキサン, ジクロロメタン, メタノールを用いて溶出することで, 物質の極性に応じ3つに分画した。各分画の発光細菌に対する急性毒性は, メタノール画分に50%以上存在した。また, 各画分の毒性の比率は地点により若干異なるが, 大きな差は見られなかった。一方, GC/イオントラップ質量分析法により定量される物質濃度は, ジクロロメタン画分の濃度がもっとも大きかった。本方

表4 化合物別分析による総濃度、総ハロゲン量、RfDに対する比率(%)とTOX、マイクロトックス試験(MTX)との比較

		St. 2	St. 6	St. 5	St. 3	St. 7
		綾瀬川上流	古綾瀬川河口	古綾瀬川上流	綾瀬川合流	綾瀬川下流
総濃度	May-94	10.9		14.0	9.0	30.5
	Nov-94		98.5	34.5	8.6	16.7
	Jan-95		183.5	79.6	22.5	39.1
	平均	10.9	140.9	42.7	13.4	28.8
ΣCl(ppb)	May-94	0.2		1.0	0.2	0.4
	Nov-94		4.1	4.0	0.2	1.7
	Jan-95		19.4	8.2	1.4	2.1
	平均	0.2	11.7	4.4	0.6	1.4
ΣRID (%)	May-94	5.8%		7.8%	5.3%	3.7%
	Nov-94		3.2%	2.0%	3.3%	0.4%
	Jan-95		4.2%	2.7%	0.5%	1.2%
	平均	5.8%	3.7%	4.2%	3.0%	1.7%
TOX(ppb)	May-94	35		68	38	44
	Nov-94		358	276	40	108
	Jan-95		631	200	84	96
	平均	35	495	181	54	83
MTX	May-94	1.6%		5.5%	4.2%	4.0%
	Nov-94		26.4%	13.4%	6.1%	5.4%
	Jan-95		59.7%	15.2%	21.1%	13.0%
	平均	1.6%	43.0%	11.4%	10.5%	7.5%

表5 綾瀬川河川水を2l飲用したと想定した場合の暴露量と1日許容摂取量との比較(%)

化合物名	分子式	M.W.	mg/kg/day	発ガン	RfD率	
1	フルトラニル	C17H16F3NO2	323	0.00003		1.62%
2	フタル酸 ビス(2-エチルヘキシル)	C24H38O4	390	0.02	B2	0.94%
3	フタル酸 ジブチル	C16H22O4	278	0.1	D	0.17%
4	γ-HCH	C6H6Cl6	288	0.0003		0.12%
5	ニトロベンゼン	C6H5NO2	123	0.0005	D	0.09%
6	2,4-ジメチルフェノール	C8H10O	122	0.02		0.09%
7	1,2,4,5-テトラクロロベンゼン	C6H2Cl4	214	0.0003		0.08%
8	ペンタクロロベンゼン	C6HCl5	248	0.0008		0.07%
9	モリネート	C9H17NOS	187	0.002		0.06%
10	4-クロロアニリン	C6H6ClN	127	0.004		0.01%
11	アセトフェノン	C8H8O	120	0.1	D	0.01%
12	ヘキサクロロベンゼン	C6Cl6	282	0.0008	B2	0.01%
13	チオベンカルブ	C12H16ClNOS	258	0.01		0.01%
14	2-クレゾール	C7H8O	108	0.05	C	0.01%
15	フェノール	C6H6O	94	0.6	D	0.01%
16	イソホロン	C9H14O	138	0.2	C	0.01%
17	ペンタクロロフェノール	C6HOC15	264	0.03	B2	0.01%
18	3-クレゾール	C7H8O	108	0.05	C	0.01%
19	フタル酸 ブチル ベンジル	C19H20O4	312	0.2	C	0.004%
20	N,N-ジメチルアニリン	C8H11N	121	0.002		0.004%

注：毒性データIRIS(EPA)：計算可能な36化合物中、上位20のリスト

法で測定された化合物の多くは、ジクロロメタン画分に存在し、GC/イオントラップ質量分析法では、メタノール画分への対応が不十分であったように思われる。

GC/イオントラップ質量分析法による多成分一斉分析によって綾瀬川河川水より133化合物が定量された。このうち、38種類がハロゲンを含む化合物であった。これらの総量は、河川水中の全有機ハロゲンの約7%程度であると推定された。これらの毒性は、RfDの入手できた36化合物のRfDに対する比の合計は、最悪のケースを想定しても1.7~5.8%に過ぎなかった。また、個々の成分濃度を積算して得られる積算濃度や積算ハロゲン濃度は、総合的な水質指標である全有機ハロゲン濃度やマイクロトックス試験と相関を示した。個々の値を積み重ねることによっても、総合的な指標となりうる可能性が示された。

2.1.2 都市河川中に含まれる全有機ハロゲン (TOX) 濃度の季節変動とその発生源の解析

各地の河川や地下水などにおいて有機ハロゲン化合物による水質の汚染が報告されている。有機ハロゲン化合物はごく微量が微生物の代謝物として自然界に存在するが、そのほとんどは人間の生産活動の中で生産されたものであり、多くは毒性や発がん性を持つと考えられている。これらの化合物が含まれる水の危険性を考察するには各々の化合物の濃度と毒性の大きさを検討する必要があるが、環境水中に含まれる有機ハロゲン化合物は多岐にわたっており、例えばGC-MSやHPLCで同定・定量可能なものはこれらの化合物の全濃度の1割程度と言われている。

全有機ハロゲン (TOX) は有機ハロゲン化合物を熱分解して含まれるハロゲンをハロゲン化水素ガスとし、それを電量滴定により塩素原子の濃度に換算して測定する方法で、各々の化合物を分別して考察することはできないものの、含まれる有機ハロゲン化合物の総濃度を測定できるため汚染実態の把握とリスクのスクリーニングに有効と考えられる。本研究では都市河川に含まれるTOXが季節によりどのように変動しているかを測定し、さらに流域の土地利用情報や共存する化学物質の濃度から汚染に関与している発生源を推定することを試みた。

TOXの調査は埼玉県南東部を流れる綾瀬川とその支流である古綾瀬川で行った。綾瀬川は埼玉県桶川市を水源とし東京湾に流入する全長約50km、流域面積174km²の河川であり、古綾瀬川は草加市、越谷市にまたがる全

長約6kmの支流である。調査地点を図3に示す。St.1は付近に水田が点在する住宅地であり、St.2からSt.4は住宅および商業地区である。St.5からSt.6は草加八潮工場団地地区(図3のハッチ部分)であり、St.7は工場の点在する住宅および商業地域である。1993年7月から1995年11月まで定点において河川水を採取し、同時に水温を測定した。河川流量は浮子法で測定した。すべての採水は朝10時から正午の間に行い、試料水は氷冷して持ち帰りすぐにガラスフィルターろ紙(1μm)でろ過した。ろ液は空気を通じて揮発性成分を除いた後に活性炭に吸着させ、三変化成TOX-10全有機ハロゲン分析計により測定した。

表6にTOX濃度(C_{TOX})の測定値を示す。St.1から4までの値に比べてSt.5から7までの値は高く変動も大き

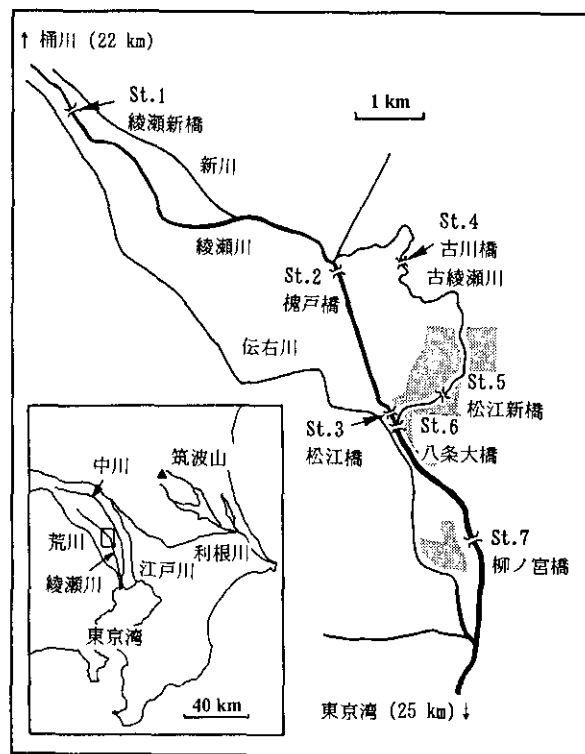


図3 TOX調査地点の概要

表6 綾瀬川水系におけるTOX濃度(μgCl/l)の測定結果

検査日	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6	St.7
1993. 7. 6	24	ND	42	94	124	340	ND
1994. 2. 7	62	67	96	195	1870	378	177
1994. 5. 9	35	39	38	ND	49	68	44
1994. 9. 1	27	18	56	ND	531	164	41
1994. 11. 15	27	35	40	ND	358	276	108
1995. 1. 18	54	71	84	40	631	200	96
1995. 11. 15	ND	ND	ND	57	266	144	ND

い。これは古綾瀬川の水質が付近の工場からの排水の影響を大きく受けているためと考えられる。

表6の値を基に綾瀬川流域におけるTOX汚染の詳細を以下のように検討した。TOXの発生源は様々なものが考えられるが、綾瀬川流域の土地利用形態を考慮すると自然由来 (nt)、生活排水由来 (dm)、農業排水由来 (ag)、工場排水由来 (id) の4種が中心と考えられる。ゆえにある地点yにおけるTOX濃度 $C_{TOX, y}$ は次式で表される。

$$C_{TOX, y} = C_{nt}^* F_{nt, y} + C_{dm}^* F_{dm, y} + C_{ag}^* F_{ag, y} + C_{id}^* F_{id, y}$$

ここで C^* は各発生源でのTOX平均濃度、 F は地点yにおける全水量中の各々の発生源からの水量の割合である。採水時に測定した水質と水量の調査結果および茨城県南部で別に測定した発生源濃度の結果を考慮して各々の発生源におけるTOX濃度 C^*_x と、測定地点yにおける F_x 値を次のように求めることを試みた。

(1) 自然由来TOXの影響

綾瀬川はその水源である埼玉県桶川市をはじめ、上流域に水田地帯が広がっており、湧水などの自然由来の水源水にも水田から浸透した排水の影響を受けていると考えられる。このため本来の自然由来TOXの値を上流域で直接測定することは難しいと判断し、同じ関東平野内にある筑波山の北面中腹の林地を流れる渓流水をバックグラウンド値 ($5 \mu\text{gCl}/l$) として使用した。生活および工場などで使用される水道水以外は流域内の自然由来の水であることから水量フラクション F_{nt} は考慮せず一律で差し引いて補正した。

(2) 農業排水由来TOXの影響

綾瀬川はその水域内に広大な水田を持ち、水田の灌漑に利用されている河川である。このため水量は灌漑期と平水期で大きく変動し、4月から8月までの灌漑期の水量は平水期の数倍まで上昇する。例えば建設省河川局の調査地点であるSt. 2での水量は9月から3月までは平均して $4.1 \text{m}^3/\text{s}$ であるのに対して4月から8月には $16.0 \text{m}^3/\text{s}$ となる。この変動は量、期間とも年ごとの変化は少ないことから、本研究ではこの灌漑期の水量の上昇分を農業排水と仮定して農業排水由来TOXを水田からの排水に含まれるTOXのみとして解析した。各地点において測定した灌漑期および平水期の水量を基に農業排水の水量フラクション F_{ag} を算出した。上流域に水田地帯を擁する本流のSt. 1から3では F_{ag} は0.7程度と大きな値を

示すが、住宅密集地および工場団地を流域とする古綾瀬川では F_{ag} は非常に小さい値となった。農業排水のTOX初濃度 C^*_{ag} は除草剤や殺虫剤の使用時期により変動するが、茨城県南部の水田排水および畑地排水の測定値の平均値 ($28 \mu\text{gCl}/l$) を用いた。

(3) 生活排水由来TOXの影響

綾瀬川流域は宅地化が高度に進行しており、St. 7より上流に約700,000人が居住しており人口密度が5000人/ km^2 を超える地域もある。このような住宅の開発に伴い下水道の敷設も進められてきたが、各住宅からの接続率は平均で30%程度であり、多くの生活排水は未処理のまま綾瀬川へと流入していると考えられる。そこで生活排水に定常的に含まれる合成洗剤の主成分であるウンデシルベンゼンスルホン酸塩 ($C_{11}\text{LAS}$) をマーカーとして生活排水の解析を行った。以前に茨城県八郷町の住宅団地で行った生活排水調査により、1人1日当たりの $C_{11}\text{LAS}$ 使用量は 0.457g 、水使用量は $220l$ であるから、流下中に $C_{11}\text{LAS}$ の分解や吸着による減少が起きなければ調査地点における $C_{11}\text{LAS}$ の濃度から希釈率を測定し、水量フラクション F_{dm} と発生源濃度 C^*_{dm} を計算できる。実際には $C_{11}\text{LAS}$ は流下中に微生物による分解と底泥への吸着により減少するが、その減少率はフェニルスルホン酸基の置換位置により異なる。そこで最も減少率の高い2-位に置換した異性体の濃度分率をHPLCにより測定し影響の大きさを検討した。生活排水の発生源においてはこの比率は約0.2であるが、河川水中では水温が上昇すると幾らか減少し水温が 15°C 以上では減少が無視できなかった。そこで水温が 15°C 以下の時のデータを用いて解析を行った。その結果、工場排水の影響が無視しうるSt. 1からSt. 4では C^*_{dm} の計算値はほぼ一定値 ($305 \mu\text{gCl}/l$) を示した。一方、生活排水のほかに工場排水が多く含まれていると考えられるSt. 5からSt. 7ではこの値よりも高い値を示し、ばらつきも大きかった。

(4) 工場排水由来TOXの影響

綾瀬川・古綾瀬川流域には化学、製紙、電気、食品など様々な業種の工場が存在しており、それらからの排水に含まれるTOX濃度は一定ではない。さらに工場の操業状況によってもその濃度は変動する。そこで本研究では工場排水については個別の推定を行わず、TOX全量から上記3種の寄与を差し引いたものを工場排水の影響

とした。

なお、以上の解析に際しては、1995年5月から1996年2月の間に行った茨城県南部地域における山林渓流水および農地排水に含まれるTOX濃度調査の測定値(表7)を用いた。

以上のように各調査地点の河川水中に含まれるTOXの発生源の分別を行い、各々の発生源から排出されたと考えられるTOXの1日当たりの量(A_x)を各地点の1日当たりの水量(V)から次のように計算した。

$$A_{total} = C_{tox} \times V$$

$$A_{nt} = 5 \times V$$

$$A_{ag} = C_{ag} \times F_{ag} \times V$$

$$A_{dm} = C_{dm} \times F_{dm} \times V$$

$$A_{id} = A_{total} - A_{ag} - A_{dm} - 5 \times V$$

計算により求められた1日当たりのTOX流下量を表8にまとめた。生活排水由来のTOX量(A_{dm})は年間を通して一定量が流下し、流域人口の増加に比例して増加する。全汚染量A_{total}に対するA_{dm}の寄与率は農業排水の影響を受ける夏期と工場排水の流入するSt. 5からSt. 7の間では低くなるもののかかなり高い値を示しており、綾瀬川のような生活排水による汚染が進行した都市河川においては下水道の整備などによる発生源対策が重要であることを示している。農業排水由来のTOXは解析の都合から夏期に限定されるが、水田地帯となっている上流域では生活排水由来のTOX量とはほぼ等しい量が流出していることがわかる。水田灌漑用水の排水は低濃度の汚染水が大量に流出するため生活排水や工場排水に比べて汚染処理が難しいと考えられる。このことから使用する殺虫剤や除草剤などの分解性を高めるなど、より一層性能を向上する必要がある。工場廃水由来のTOXは綾瀬川本流のSt. 1からSt. 3と古綾瀬川上流のSt. 4では土地利用情報からの推定通りほぼゼロとなり、古綾瀬川中流のSt. 5より下流域では生活排水に匹敵する大きな値を示した。工場排水由来のTOX量は生活排水由来および農業排水由来のTOXに比べて各調査日間でのばらつきが大きく、工場の操業状況を反映していることがうかがえた。

一方、流域の住宅では水道水を使用していることから生活排水由来TOX中にはトリハロメタンのような上水処理過程での塩素処理によりあらかじめ発生するTOXが含まれている。この影響を検討するために調査日ごとにSt. 2付近の水道水を採取してそのTOX濃度も測定し

表7 茨城県南部における自然水および農業排水中のTOX濃度(μgCl/l)の測定結果

	山林渓流水 (筑波山中腹)	水田灌漑用水 (八郷町)	畑地排水 (阿見町)
1995. 5	3	25, 25	28
1995. 8	6	17, 42	23
1995. 11	8	ND	30
1996. 2	4	ND	36
平均値	5	27	29

表8 綾瀬川の各調査地点を1日に流下するTOX量(kgCl/l)の推定値

TOX内容	季節	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7
A _{total}	winter	6.2	19.9	31.7	0.8	47.3	53.9	99.9
	summer	14.6	36.7	73.2	0.8	28.3	58.8	85.4
A _{nt}	winter	0.6	1.7	2.2	0	0.3	1.1	3.9
	summer	2.5	6.4	8.1	0	0.4	1.2	9.9
A _{ag}	winter	0	0	0	0	0	0	0
A _{dm}	summer	6.8	23.6	24.4	0	0.7	0.4	25.6
	yearly	5.6	18.0	28.5	1.1	3.3	4.9	42.9
	A _{id}	yearly	-0.4	-5.6	6.6	-0.3	33.8	50.1

た。その結果、この地区の水道水中のTOX濃度は平均で135 μgCl/lであった。このことから表7に示したA_{dm}の値の約45%はあらかじめ水道水に含まれていた有機ハロゲン化合物と考えられ、残りの55%は日常の生活活動により使用される有機ハロゲン化合物および水道水中の残留塩素や殺菌漂白剤の使用により塩素化された有機物の和であると考えられる。生活排水に含まれるTOXを削減するためには水道水の殺菌処理過程や家庭用漂白剤への塩素の使用を考慮する必要もあろう。

2.1.3 吸着性有機ハロゲン化合物(AOX)測定法の評価および同測定法を利用した有機塩素化合物の排出量の推定

特別研究の一環として、吸着性有機ハロゲン化合物(AOX)測定法の評価を行ってきた。本測定法は、水試料中の有機ハロゲン化合物を活性炭に吸着させて回収し、これを酸化的条件下で燃焼させて発生するハロゲン化水素の量から有機ハロゲン化合物を定量するものである。有機塩素化合物の人や環境への影響を評価する場合には、既知の化合物を個別に定量し、それぞれの毒性を合算して評価する方法がある。また、有機塩素化合物の

総量を測定し、それと毒性を関連づけて論じる方法がある。AOX測定法は後者に属するものであり、有機塩素化合物による汚染を概観するのに有用である。特に、多様な有機塩素化合物が存在する試料は、それらの個別定量が難しくなるため、AOX測定法が有効であるといえる。

本研究では、まずAOX測定法において問題となる幾つかの点について検討した。続いて、有機塩素化合物の排出源となり得る施設（紙パルプ工場、下水処理場）からの排水中のAOXを測定し、有機塩素化合物の排出量について調べた。

(1) AOX測定法の諸問題の検討

AOX測定法において、問題となると考えられる幾つかの点について検討した。

AOX測定では有機ハロゲン化合物を吸着するのに活性炭を使用するので、極性の強い物質は吸着されにくく、低い回収率を与える。有機塩素化合物約30物質について、100 $\mu\text{gCl/l}$ の溶液を調製して回収率を求めたところ、クロロ蟻酸メチル（4.8%）など極性物質では回収率は低かったが、ほとんどの物質で60%以上の回収率を示した。また、回収率の変動係数はおおむね7%以下であった。

試料の保存性について検討したところ、残留塩素を除いて硫酸酸性（ $\text{pH} < 2$ ）とした試料を、冷暗所（4℃）に保存することによって、測定値の変動係数を10%以内にする事ができた（紙パルプ工場排水、3ヵ月保存）。

懸濁物が多い試料では、有機塩素化合物が懸濁物に吸着して、測定結果に誤差を生じるおそれがある。紙パルプ工場排水（凝集沈殿処理後）をメンブランフィルター（孔径0.45 μm ）でろ過して、ろ液と残渣とのAOXの分配について調べたところ、ろ液中のAOXは2.14 mgCl/l 、残渣中の有機ハロゲン化合物は0.20 mgCl/l であった（フィルターごと燃焼して測定）。紙パルプ工場排水に関しては、懸濁物に吸着しているAOX量は、溶存している量よりもかなり少ないといえる。

(2) 紙パルプ工場からの有機塩素化合物排出量の推定

1990年頃より、紙製品中のダイオキシン類や紙パルプ工場排水中のダイオキシン類が社会的問題となった。ダイオキシン類を直接測定することは技術面やコスト面で難しいことから、業界団体は代替指標としてAOX量で自主規制を行うこととした（晒クラフトパルプあるいは

溶解パルプ工場について、パルプ1トン当たりAOX量で1.5kg)。この自主基準値は1993年末が達成年度であって、現在操業している工場のAOX排出量はすべてこの値以下である。しかし、ダイオキシン類の排出が問題にならないレベルであっても、有機塩素化合物の排出は完全にはなくならないので、これらの工場が排出源として注目すべき存在であることに変わりはない。

1992年に数カ所の紙パルプ工場排水中のAOX濃度を測定した結果を表9に示す。

表9 紙パルプ工場からのAOX排出量（1992年）

工場	分類	漂白 シーケンス	廃水処理	AOX濃度/ mgCl/l	放流量 m^3/day	AOX排出量/ kg/day
1	晒パルプ	OCDHE	活性汚泥 凝集沈殿	6.5	170300	1107
2	晒パルプ	CDHE	活性汚泥 凝集沈殿	3.8	28800	109
3	晒パルプ	CHE	活性汚泥 凝集沈殿	2.2	5407	12
4	古紙再生	H	活性汚泥 凝集沈殿	0.81	8020	6.5
5	古紙再生	H	凝集沈殿	3.9	4920	19
6	古紙再生	none	凝集沈殿	0.039	5300	0.2
7	未晒パルプ	none	凝集沈殿	0.23	42900	9.9

漂白シーケンスの略号：O=酸素，C=塩素，H=次亜塩素酸ナトリウム，E=水酸化ナトリウム。

AOX濃度は、最終放流水あるいはそれに近い処理水で、0.039~6.5 mgCl/l とかなり開きがある。これは一口に紙パルプ工場といっても規模や操業条件がさまざまであるため、古紙再生紙工場や無漂白パルプ工場ではかなり低い濃度となっている。普通の晒クラフトパルプ工場では、2.2~6.5 mgCl/l であった。また、1993年に測定した結果では、最終放流水で2.2~3.5 mgCl/l であり（表10）、これら晒クラフトパルプ工場では、おおむね数 mgCl/l の濃度となっている。

AOXの成分として代表的なものとしてされるクロロフェノール類について、1993年の試料についてGC/MSで定量した結果を示す（表10）。これらクロロフェノール類の濃度がAOX濃度に占める割合は1%にも満たなかった。また、これらの試料についてGC/MSでスキャン測定を行った結果、一部の試料からはクロロゲアヤコールやクロロシリコンゴールが検出された（図4）。これらの定量は行っていないが、クロマトグラムの強度ではクロロフェノールよりも強いものもあった。紙パルプ工場

表10 紙パルプ工場排水中のAOXおよびクロロフェノール類の濃度（1993年）単位はng/l

工場	AOX/ mgCl/l	24DCP	246 T ₄ CP	2346 T ₄ CP	PCP
A	2.9	188	2062	156	70
B	2.9	466	2157	145	126
C	3.5	14	390	118	171
D (1)	2.4	-	-	-	-
D (2)	2.2	145	700	64	94
E (1)	3.1	-	-	-	-
E (2)	3.2	-	-	-	-

24DCP=2,4-ジクロロフェノール、246T₄CP=2,4,6-トリクロロフェノール、2346T₄CP=2,3,4,6-テトラクロロフェノール、PCP=ペンタクロロフェノール。

排水の有機塩素化合物には同定されていないものも多く、毒性を評価する上で、個々の化合物を定量するだけでは、不十分であるといえる。

AOXの排出量としては、工場によって大きく異なるが、1992年の測定結果では、多い工場で日量1トンを超えている。この結果を見る限り、AOXの排出量を考慮する場合、その濃度よりもむしろ排出規模が支配的であるように思われる。

以上見たように、これら紙パルプ工場は有機塩素化合物の排出源としては重要なものである。しかしながら、ここに示した測定結果は業界の自主基準の達成年限以前のものであり、現在では漂白工程の改良や工業用水の循環使用などにより、有機塩素化合物の排出量はより減少しているものと考えられる。

(3) 下水処理場からの有機塩素化合物排出量の推定

下水処理場では、殺菌のために処理水に塩素処理を施してから放流している。このため、下水処理場も有機塩素化合物の発生源と考えることができる。1996年4月から12月にかけて、ある下水処理場の処理水試料（塩素処理直前のもの）を採取し、それぞれCl/C比が1.1~1.6となる条件で塩素処理を行ったときの、揮発性有機ハロゲン化合物（POX）と不揮発性有機ハロゲン化合物（NPOX）の生成量を図5に示した。ここで、POXは試料を60℃に加温して酸素ガスでパージしたときに揮発する有機ハロゲン化合物をいい、NPOXはPOXを除いた試料に含まれるAOXをいう。

年間を通じてPOXの濃度は60 μgCl/l程度であり、

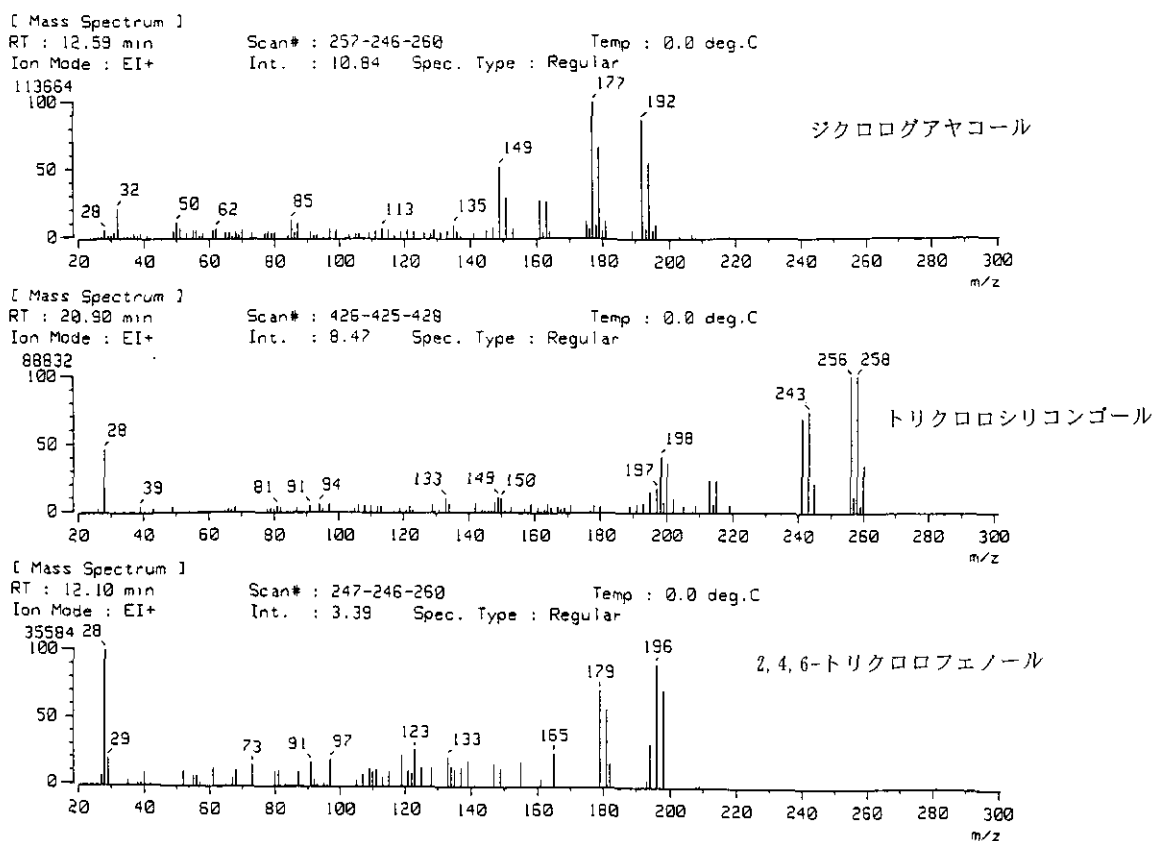


図4 紙パルプ工場排水中の有機塩素化合物のマスペクトル

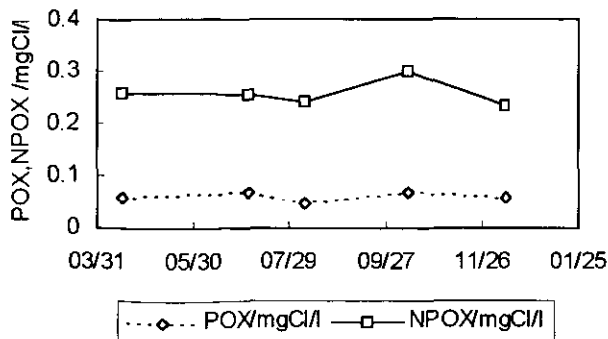


図5 下水処理水の塩素処理により生成したPOXおよびNPOX (Cl/C=1.1-1.6)

NPOXの濃度は $250 \mu\text{gCl/l}$ 程度であった。文献と比較したところ、下水処理水の塩素処理によって生成する有機塩素化合物の濃度としては、数百～数千 $\mu\text{gCl/l}$ 程度と考えられる。下水処理場で実際に塩素処理を行う場合、塩素濃度は3～5 ppmであり、Cl/C比はこの実験とほぼ同等なので、下水処理場から排出されるPOXおよびNPOXの濃度は、この実験結果と大差はないと考えられる。

また、季節によるPOX、NPOX生成量の変化はほとんど観察されなかった。TOC濃度などの指標も採取の時期によってさほど変化はなかったため、都市下水ということで水量や水質に大きな変動は起きにくいことから、これらの生成量についても大きな変化は起きなかったものと思われる。また、POXとNPOXの比率も年間を通じてほぼ一定であった(1:4)。

この下水処理場の一日当たりの下水処理量は、 $68,000\text{m}^3$ である。故に一日当たりの有機塩素化合物の排出量はPOXで4.8kg、NPOXで17kgとなる。これは小規模な紙パルプ工場の排出量と同程度であって、下水処理場も有機塩素化合物の排出源としては重要なものであるといえる。

2.1.4 MX類縁化合物の分析

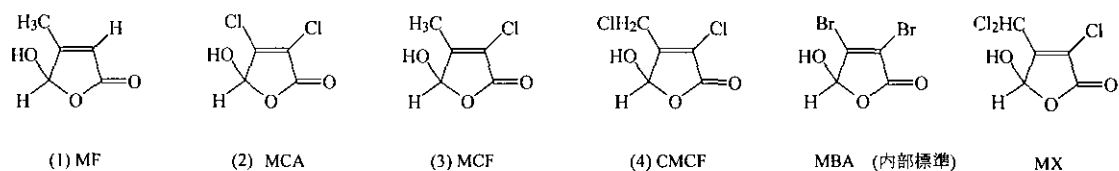
水道水中の塩素化合物に関する研究は、昭和50年代にトリハロメタン制御目標値が示されたことで広く行われるようになった。その後、水道水の安全性に対する懸念と微量化学物質の分析技術の進歩に伴いトリハロメタンのほかにも、ハロゲン化酢酸、ハロゲン化アセトニトリルおよび抱水クロラル等が生成することが明らかとなった。これらの化合物は、浄水処理過程で消毒用の塩素と水中の有機物が反応することにより生成している。その

反応している有機物の主要なものはフミンと言われており、トリハロメタンの生成量は原水の有機汚濁性が増すとともに増加している。一方、全有機ハロゲン化合物(TOX)生成量に占めるトリハロメタン生成量は、その1/4から1/5であり、ハロゲン化酢酸の生成量はトリハロメタン生成量の1/2程度である。これらを合計した既知の消毒副生成物全体のTOXに占める割合は30%程度と見積もられている。また、変異原性について見ても、これらの個々の化合物の変異原性の総和は、水道水から得られた変異原性の値より小さく、未知の変異原性物質の存在の可能性を示唆している。そのような中で、パルプの塩素漂白排水からアフラトキシンや防癌剤のAF2に匹敵する強変異原性を示す3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2-(5H)-furanone(MX)が検出されて以来、水道水の塩素消毒による副生成物としても注目され調査されてきた。日本においては、MXは 0.2ng/l から 9ng/l 程度の濃度で検出されている。しかし、MXのみでは、水道水中の変異原性の未知部分をまだ説明できていない。これらのことを考慮すると未知物質は、水からの抽出や分析が困難であることが推察される。一方、MXは必ず構造異性体の(E)-2-chloro-3-dichloromethyl-4-oxobutenoic acid (E-MX)を含んでいることや中性状態ではE-MXとして考える必要があることなどが指摘されている。この化合物が酸であることから抽出や分析操作に工夫が必要とされることや、変異原性の面からも、未知物質の生成については、これらの類縁化合物について検討する必要性が示唆される。そこで、新たにMXの骨格構造である2重結合と塩素を含んでいる塩素化ヒドロキシフラノン類(HF)4種と塩素化ブテノイック酸(BA)4種を新たに合成し、分析方法について検討した(図6)。

これらの化合物は、MXの水中濃度が、 10ng/l 以下程度であることから濃度がそれほど高くないことが予想されることやOH基やCOOH基があるために極性が高いことなどから、水からの抽出および濃縮方法の検討とともにGC/MSによる分析をそのままでは行えないため分析方法についても検討する必要がある。

これらの化合物の抽出および濃縮には、溶媒抽出法を用い、抽出溶媒はHF類及びBA類ともに酢酸エチルを試料水1lに対し 400ml 用いた。試料水のpHをpH2以下にすることで回収率は、70～90%を示した。溶媒を脱水処理した後ロータリーエバポレータで約 1ml まで濃

HF 類



BA 類

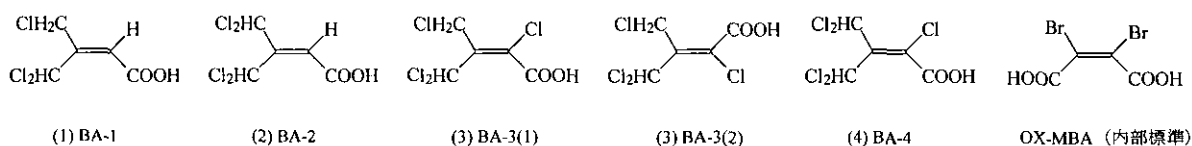


図6 MX類縁化合物の化学構造

縮し、メチル化に供した。メチル化法は、メチル化効率を考慮しHF類とBA類では異なる方法を採用した。HF類は、2%硫酸メタノール溶液を2ml加え、70℃で1時間加熱しメチル化を行った。2%炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を終了させた後、生成したメチル化物をヘキサン4mlにて抽出した。ロータリーエバポレータで約1mlまで濃縮しGC/MSにより分析をした。BA類は、BA-2とOX-MBAについて、メチル化物を別途合成し、3弗化ホウ素によるメチル化と比較した。その結果、3弗化ホウ素によるメチル化効率はほぼ100%であることから、3弗化ホウ素によるメチル化を行うこととした。15%BF₃メタノール溶液を1ml加え、100℃で12時間加熱しメチル化を行った。水を加え反応を終了させた後、生成したメチル化物をヘキサン4mlにて抽出した。ロータリーエバポレータで約1mlまで濃縮しGC/MSにより分析をした。HF類およびBA類のメチル化方法について同一の方法を検討したが良い結果は得られなかった。分析方法は煩雑になったが、本法の定量下限値は、おおよそ数十pgとなった。その結果、水中の化合物の濃度が数十ng/lまで測定でき、MX濃度の10倍程度あれば測定可能と考えられ、これらの化合物の変異原性がMXより低いとすれば十分な分析法と考えられた。

今後これらの手法を用いて、これらの化合物に限らず親水性塩素化合物の広範囲な調査が必要と考えられる。

2.1.5 殺菌石鹼に含まれる殺菌成分トリクロサンの塩素化反応機構と微生物毒性

本特別研究の一環として各地の河川で行った調査の結果から、都市河川において有機ハロゲン化合物が高濃度検出された。特に下水道の完備していない地域においては生活排水由来の汚染の寄与が非常に高く、例えば埼玉県南東部を流れる綾瀬川流域では生活排水の原水中に含まれる全有機ハロゲン (TOX) 濃度は305 μgCl/lであった。このうちの約45%が水道水にあらかじめ含まれているTOXであり、残りの約55%は日常生活で使用している有機ハロゲン化合物および水道水の残留塩素や漂白剤として使用している遊離塩素により非意図的に塩素化された有機物の和であると考えられる。このような化合物の中で殺菌石鹼に含まれる殺菌成分であるトリクロサン (2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシフェニルエーテル; I) はその化合物自体が既に有機塩素化合物であること、都市河川底泥中から頻りに検出されること、遊離塩素によりさらに塩素化されるという報告があること、骨格構造が有毒化学物質であるダイオキシンと類似していることなどから注目されている。本報告ではこの化合物と塩素との反応の機構と毒性の変化を明らかにすることを目的として塩素化実験を行った。

室温 (25℃) の条件下でトリクロサンを溶解した水溶液に規定量の遊離塩素を加え、一定時間ごとに採取してトリクロサンおよびその塩素化生成物濃度をHPLCとGC-MSで、塩素濃度の変化をo-トリジン発色-吸光度法により測定した。遊離塩素は次亜塩素酸水溶液により調整し、一般家庭で塩素殺菌・漂白に使用する濃度

(500ppm) の10%程度から水道水の残留塩素濃度程度までを実験の範囲とした。いずれの遊離塩素濃度においても混合後すばやく塩素濃度が減少し、それに伴ってトリクロサンの濃度も減少した。グラジエント溶出逆相分配HPLCによる測定でトリクロサンが減少する際に5種類の新たな化合物が生成することが確認された。このうちの3種はトリクロサンのフェニル基の3'-位および5'-位に結合している水素原子のいずれか(II, III)または両方(IV)が塩素置換された化合物であることがわかった。1原子の塩素で置換された化合物II, IIIは溶液内に遊離塩素が残留しているといずれも塩素と反応してIVとなり、さらに反応が進み濃度は減少するが同時にHPLCのクロマトグラム上に溶離時間が短い2本のピークが出現する。HPLCの溶離時間と紫外部の吸収波長を標準物質と比較した結果、2,4-ジクロロフェノールとテトラクロロフェノールの一種と同定された。テトラクロロフェノールは2,4-ジクロロフェノールの塩素化で生成することが標準物質の塩素化実験から確認できた。これらの反応は残留する遊離塩素が高濃度の場合には非常に速く進行し、遊離塩素初濃度が12ppm以上では反応開始から10分程度でビフェニルエーテル構造の化合物はほとんど消滅した。さらにクロロフェノール類も遊離塩素の存在下で次第に減少した。しかしこの減少速度は比較的小さかった。パーミアンドトラップ法によるGC-MSにより試料水を測定したところ反応の進行に伴い多量のクロロホルムが発生していることがわかった。これらのことからトリクロサンは十分な量の遊離塩素の存在下で最大2原子の塩素置換を受けて3種の同族体を生じること、これらの同族体は骨格構造となるビフェニルのエーテル結合を開裂してクロロフェノールを発生すること、さらに分解してクロロホルムを生じることが明らかとなった。トリクロサンと塩素との反応経路を図7に示す。

トリクロサンとその3種の塩素置換化合物、さらに塩素化反応の溶液について海洋性発光細菌を用いたバイオアッセイであるマイクロトックス法により毒性の評価を行った。4種の同族体について測定した50%影響濃度(EC₅₀)の結果とクロロフェノール類およびクロロホルムについての文献値を表11にまとめた。トリクロサンと塩素置換化合物では5'-位に塩素を置換した化合物(III)が最も毒性が高く、10⁻⁷M程度で発光を阻害することがわかる。トリクロサンとその塩素置換化合物のEC₅₀値と比べると既に報告されているクロロフェノール類やクロ

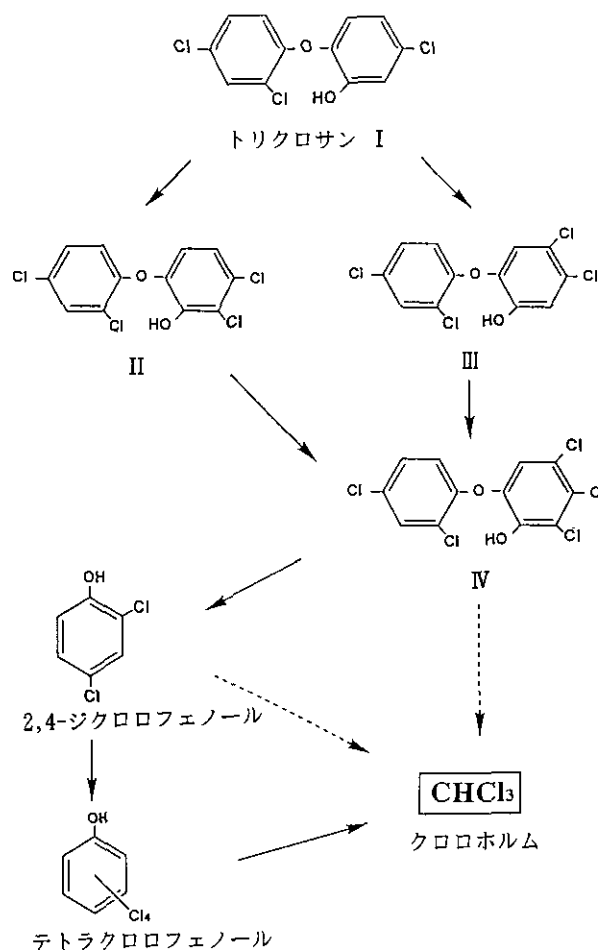


図7 トリクロサロンの塩素化反応の経路

表11 トリクロサンとその塩素化反応生成物のマイクロトックス毒性値

化合物	EC ₅₀ (μM)
トリクロサン I	1.04
II	0.58
III	0.13
IV	0.68
2,4-ジクロロフェノール	25
ジクロロフェノール (6種平均)	43
テトラクロロフェノール (3種平均)	6.9
クロロホルム	5600

ロホルムのEC₅₀は高い値を示しておりその毒性は小さいと判断できる。このことからトリクロサンと遊離塩素を混合した場合、溶液の毒性は塩素置換化合物の生成とともにいったん上昇するが、エーテル結合が開裂しさらにクロロホルムへと分解が進行するにつれて減少すること

が予想できる。10 μ Mのトリクロサンを10ppmの遊離塩素と反応させた場合のトリクロサン初濃度に換算したEC₅₀値の時間変化を表12に示す。反応開始後30秒で毒性はいったん強まるがその後減少していくことがわかる。

トリクロサンの国内の年間生産量は約40トンでありすべてが日常の家庭生活で使用されていると仮定すると、生活排水として放出されるトリクロサン濃度は1人1日当たりの水使用量(220l)と国民の人口から国民の平均値として 1.4×10^{-8} Mとなる。実際には国民すべてがトリクロサンを含む商品を使用していることはないと考えられるので使用者の生活排水中の平均濃度はこれよりも高い値となる。さらに実際の排水中では水使用の内容の変動による濃度変動があることからトリクロサン使用時の排水中濃度はより高くなると考えられる。よってトリクロサンを使用している家庭からの排水ではその濃度は断続的ではあるがEC₅₀を上回る事が予想される。マイクロトックス法で測定されるEC₅₀値は海洋性細菌の発光現象に対する毒性であり他の生物に対する普遍的な毒性とは必ずしも一致しないが、この暴露量の推定値からみると希釈されていない生活排水が流入する個々の受水域ではその生態系がトリクロサンとその塩素置換化合物の毒性の影響を受けている可能性がある。特に少量の遊離塩素が共存する条件では最も毒性の高いⅡ、Ⅲ、Ⅳが生じたまま減少しない可能性がありリスクが大きいと考えられる。これに対して分解生成物であるクロロフェノール類やクロロホルムは水域の生態系への影響は小さいと推定される。さらにトリクロサンとその塩素置換化合物は水への溶解度が非常に小さく(Ⅰ: 6.5×10^{-6} M, Ⅱ: 8×10^{-6} M, Ⅲ: 6×10^{-6} M, Ⅳ: 1.5×10^{-6} M)底泥や汚泥中へと吸着し蓄積されやすいと考えられる。水域の生態系への影響についてはこの点も考慮する必要があると考えられる。

2.1.6 大気中揮発性有機化合物の個人暴露量と健康リスク評価

大気中揮発性有機化合物の一般環境大気の測定は多く行われているが、揮発性有機塩素化合物の個人暴露量測定例は化合物濃度が低いこともあり、日本では測定例が少ない。吸入による健康影響を検討する場合には、人の1日の行動にそった測定が必要であり、半日とか1日の総暴露量または1日平均濃度が重要になる。そのためサンプリング用具を協力者に装着してもらい大気を捕集する個人暴

表12 塩素化反応溶液のマイクロトックス値

反応時間	EC ₅₀ (μ M)
0分	1.04
0.5分	0.65
1分	1.03
10分	1.69
120分	2.78

露量の測定が望ましい。吸引ポンプを使用せず大気の拡散だけで吸着管に大気中の有機化合物を捕集するpassive sampling(拡散サンプリング)は、経費が少なくて済むこと、協力者に小さなサンプリングチューブを装着してもらうだけなので協力してもらいやすくデータが集めやすい。しかし拡散により有機化合物がサンプリングチューブに吸着する量は、大気中濃度とともに、吸着管の口の大きさや形、吸着剤によって違い、前もって吸引法と比較して吸着速度に当たる関係をだしておく必要があり、精度として吸引法より落ちるが、ここでは、passive samplingで個人暴露量測定をした。

(1) 揮発性有機化合物の個人暴露量測定

個人暴露量測定に使用したサンプリングチューブはパーキンエルマー社製の吸着剤はTenax TAを使用した。拡散法で24時間協力者の胸にサンプリングチューブを装着し有機化合物を捕集した後、加熱脱着してGCに導入し質量分析計でSIM定量分析した。

拡散法によるサンプリングチューブの吸着速度は吸引法で24時間の大気中平均濃度(μ g/m³)と、同じ場所に同じ時間サンプリングチューブを置き、拡散法で24時間捕集による吸着量との比例関係から算出した。その結果吸着速度が算出でき拡散法で定量できたのは、EPAで大気中有害有機化合物の測定法TO-14で対象としている揮発性有機化合物38種類のうち、フロン類2種(フロン11, フロン113)、有機塩素化合物8種(ジクロロメタン、クロロホルム、1,1,1-トリクロロエタン、四塩化炭素、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、クロロベンゼン、p-ジクロロベンゼン)、芳香族化合物8種(ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、m,p-キシレン、o-キシレン、スチレン、1,3,5-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン)の18種類である。

調査した場所と時期は、つくばで96年6月に延べ37人、東京西部の大学の化学科学生を96年10月に延べ97人、東

表13 1日平均暴露濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

	Oct-96	Feb-97	Jun-96	一般環境大気濃度
	化学学生(97)	東京葛飾(68)	つくば(31)	$\mu\text{g}/\text{m}^3$
フロン11	0.65	0.84	1.52	1.04
フロン113	0.06	0.09	0.11	0.49
ジクロロメタン	3.02	2.23	1.77	0.76
クロロホルム	7.08	0.59	1.37	0.28
1,1,1-トリクロロエタン	10.10	8.38	3.27	1.31
四塩化炭素	10.10	0.35	0.50	0.59
ベンゼン	5.28	2.77	0.81	(8.22)
トリクロロエチレン	1.63	3.60	0.99	0.39
トルエン	58.70	64.40	21.70	(8.20)
テトラクロロエチレン	1.64	0.95	0.95	0.36
クロロベンゼン	0.06	0.05	0.06	
エチルベンゼン	4.64	3.27	2.96	
m, p-キシレン	9.19	6.59	5.46	(7.05)
o-キシレン	3.25	3.00	2.18	(3.45)
スチレン	8.99	3.56	2.57	
1,3,5-トリメチルベンゼン	1.04	1.42	1.01	
1,2,4-トリメチルベンゼン	4.64	7.76	5.27	
p-ジクロロベンゼン	35.60	61.60	47.50	(0.38)

京都葛飾区で97年2月に延べ68人である。東京都葛飾区の協力者は、環状7号と水戸街道交差点付近の交通混雑地区の住民である。表13に中央値で各化合物の1日平均暴露濃度の地域による違いを比較した。右欄には環境庁の一般環境大気濃度調査結果を示してある。化合物により3つの傾向があるのがわかった。四塩化炭素とフロン11は暴露濃度に地域差があまりなく、かつその暴露濃度が一般環境の大気中濃度とも大体同じで、協力者の近くに発生源がない化合物と考えられる。2番目は、一般環境大気中濃度に比較し暴露濃度が高いが、暴露濃度は地域差が少ない化合物で、典型的な化合物はp-ジクロロベンゼンで室内からの汚染の影響が大きい化合物と言える。3番目は、つくばに比べ東京での暴露濃度が高いベンゼンや1,1,1-トリクロロエタンで、都市大気汚染の影響が大きいと考えられる化合物である。環境研や東京の大学の化学科学生で一部の化合物の暴露量が非常に大きい人達があり、いずれも有機化学実験で使用している化合物であった。

これらの結果から揮発性有機化合物の暴露量に関して

- ①鼻先(身近)にある化合物の影響が大きい
- ②室内汚染の影響が大きい
- ③一般環境大気中濃度より1日平均暴露濃度に換算した個人暴露量の方が、濃度が高い化合物が多い

ということがわかり、個人暴露量調査の結論としては、人の健康リスク評価をする場合には、一般環境大気中濃

度の計測だけでは不十分な化合物が多いこと、また揮発性有機化合物は身近で使用する化合物や職業暴露での注意が大切である。

(2) 大気中揮発性有機化合物の健康リスク評価

表13で得られた個人暴露量の値から人の健康リスク評価の検討を行った。発がん性が認められている化合物の発がん性リスクを計算した。ユニットリスク(unit risk)は、生涯70年間ある化合物を単位暴露濃度($1\mu\text{g}/\text{m}^3$)を吸入し続けた場合、その化合物により発がんに至る確率であるが、EPAで算出された値を使用した。ユニットリスクに1日平均暴露濃度を掛けて得られた発がんリスクは 10^{-5} 以下が望ましいとなっているが、クロロホルムとベンゼンが大きい値になっており、注意を要する化合物ということになった。

がん以外の毒性については、呼吸量を1日 20m^3 とした1日暴露量と体重70kgの人の最大無作用量(NOEL)を安全係数100で割ったRID(reference dose)の比で比較した。値が大きく、注意を要する化合物は四塩化炭素とクロロホルムで、p-ジクロロベンゼンも防虫剤のパラゾールを使用している家では暴露量が非常に高い家があるので要注意である。これら要注意化合物の中でベンゼンは室内汚染との相関が低く、自動車排気ガスなどが大きな原因と考えられ、暴露量減少のためには排気ガス対策が必要と考えられる。クロロホルムは室内空気濃度との相関からも水道水や漂白殺菌剤使用などの塩素処理により生成する部分からの寄与が大きいと推定された。

2.2 有機塩素化合物の複合健康影響評価に関する研究

有機塩素化合物はその殺菌、殺虫作用、化合物としての安定性などから広く我々の生活の中で用いられている。殺菌剤、防虫剤としての使用は、直接これらの化合物への暴露も考えられ、また、新規の化合物も次々に市場に投入されていることから、有機塩素化合物の健康影響リスクを評価することは重要な課題と考えられる。そこで有機塩素化合物の健康影響評価の第一段階として *in vitro* および *in vivo* 試験系を用いて毒性評価を行った。ヒト由来の株化細胞(神経細胞、非神経細胞)、不死化ラット肝細胞を用いた *in vitro* 試験系では、*in vivo* データとの比較から *in vitro* 試験系の有用性の検討、および用いる細胞の由来臓器と毒性を評価する化学物質の標的臓器が同一である必要があるかを念頭に検討を行った。また、

混合物の毒性の評価についても検討を行った。胎仔毒性（催奇形性）を検出する系では、2つの物質の混合物の相互作用を検討した。これらの *in vitro* 試験系では、大都市周辺の河川底質において高頻度に検出された9種類の有機塩素化合物、p-ジクロロベンゼン（pDCB）、o-ジクロロベンゼン（oDCB）、p-クロロアニリン（pCA）、3,4-ジクロロアニリン（DCA）、リン酸トリス2-クロロエチル（TCEP）、2,5-ジクロロフェノール（DP）、2,5-ジクロロアニソール（DA）、トリクロサン（TR）、トリクロカルバン（TC）についての毒性評価を行った。これらの有機塩素化合物は水に難溶性であるためタウロデオキシコール酸20mg/mlを含むジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶解して用いた。毒性のメカニズムについての研究では、多塩素化ビフェニル（PCB）およびその関連化合物によるP型グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST-P）遺伝子の発現とその制御についての検討を行った。遺伝毒性については、培養細胞へガス暴露するというユニークなシステムを用いて、室内汚染でも問題となっているジクロロベンゼンについての毒性評価を行った。行動毒性試験はプラスチックの難燃剤として用いられ、廃棄物からの漏出が問題となっているリン酸トリス2-クロロエチル（TCEP）について行った。

2.2.1 ヒト由来細胞培養系を用いた水環境試料中の有機塩素化合物の毒性評価

河川底質試料で、頻繁にしかも高レベルで検出された有機塩素化合物を対象として、培養細胞を用いた *in vitro* 毒性試験法での毒性評価を試みた。その際、用いる細胞種としては、最終的にヒトへの影響評価を考える上でヒト由来の細胞が望ましいこと、維持が容易な株化細胞が望ましいこと、培地組成及び血清濃度が似通った細胞が望ましいこと等を考慮して、ヒト由来の株化細胞を使用した。

ヒト由来の株化細胞として選択した神経細胞であるNB-1と非神経細胞であるU-87MGは、いずれも接着性であり、培地組成、血清濃度も似通っている。細胞毒性の試験の際には、継代培養した細胞の浮遊液を（ 5×10^5 細胞/ml）を96穴のマルチウェルプレートにウェル当たり100 μ lまき込み、24時間前培養した後各濃度の有機塩素化合物に48時間暴露した。細胞の生存率（生細胞数）は、クリスタルヴァイオレット染色法、並びにニュートラルレッド取り込み法によって推定した。

表14 NB-1及びU-87MGにおける有機塩素化合物のIC₅₀（48hr）値（ μ M）

	NB-1		U-87MG	
	CV *	NR **	CV	NR
p-クロロアニリン	3000	-***	>3300	-
3,4-ジクロロアニリン	490	-	670	-
p-ジクロロベンゼン	2400	-	2300	-
o-ジクロロベンゼン	1500	-	1300	-
TCEP****	2400	-	2500	-
2,5-ジクロロフェノール	110	15	130	12
2,5-ジクロロアニソール	510	100	200	25
トリクロサン	14	5.1	20	5.9
トリクロカルバン	5.4	5.1	26	5.5

*クリスタルヴァイオレット染色,**ニュートラルレッド取り込み,***未試験,****トリス2-クロロエチルホスフェート

河川底質で頻繁に検出された9種類の有機塩素化合物の細胞毒性評価を行った。NB-1細胞及びU-87MG細胞における48時間暴露による生細胞数の変化をクリスタルヴァイオレット染色法（CV）並びに一部はニュートラルレッド取り込み法（NR）により推定した。表14には、各化合物の両細胞でのIC₅₀（48hr）値を示した。殺菌剤であるトリクロサンとトリクロカルバンを除いては、いずれの化合物もIC₅₀（48hr）値がmMオーダー前後であり、比較的細胞毒性は弱かった。また、得られたIC₅₀（48hr）値と文献的に入手できたラットにおけるLC₅₀値（p-クロロアニリン、3,4-ジクロロアニリン、o-, p-ジクロロベンゼン、トリス2-クロロエチルホスフェート（TCEP）、2,5-ジクロロフェノールとの比較を行ったところ、有意な相関は認められなかった（図8）。

ただ、2,5-ジクロロフェノールと2,5-ジクロロアニソールでは、NRでのIC₅₀値がCVでの値の1/10程度と低く数十 μ Mのオーダーであった。すなわち、ニュートラルレッド取り込みは、両化合物によりCVでほとんど影響がみられない用量ではほぼ完全に阻害されていた。この時位相差顕微鏡下で観察した細胞の形態にはほとんど変化は認められなかった。これらの結果は、2,5-ジクロロフェノールと2,5-ジクロロアニソールがリソゾーム機能を特異的に阻害している可能性を示唆している。

有機塩素化合物の複合影響評価の試みとして、p-クロロアニリン、3,4-ジクロロアニリンと、TCEPを両細胞に混合暴露し、その影響について検討した。そのうち、代表的な結果であるNB-1におけるp-クロロアニリン

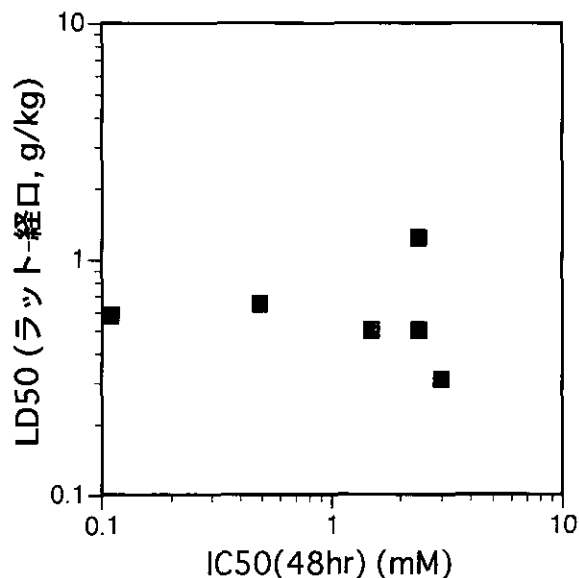


図8 NB-1細胞を用いて得られた有機塩素化合物についてのIC₅₀ (48hr)値とラットのLD₅₀値との比較

とTCEPの混合暴露の結果を(図9)に示したが、顕著な相乗効果や相殺効果は認められず、基本的には相加的な影響であると考えられた。

今回毒性評価の対象とした9種類の有機塩素化合物は、河川底質中で頻りに検出されたものであるが、一部についてはラットでの急性毒性発現用量(経口投与でのLD₅₀)が知られている。培養細胞を用いた毒性試験の値とLD₅₀との間に相関が認められれば、*in vitro*試験の結果から*in vivo*での毒性推定への道が開けるわけであるが、今回対象とした有機塩素化合物については両者の間に相関は認められなかった。もちろん、今回用いた*in vitro*毒性試験系では毒物動態学的過程が一切考慮されていないため、それらの関与の可能性が大きいと考えられる。ただLD₅₀の文献値に関しては、同時に同じ条件で行われた結果ではないことが相関の認められない原因の一つになっている可能性も考えられる。

さらに重大な問題としては、実際の環境中ではこれらの化合物が混合物として存在しているため、個別の毒性評価よりもむしろそれらの複合影響の評価の方が重要であるという点がある。本研究では一部について2種類の組み合わせによる複合影響の評価を試みたが、このような方法には限界があり、到底現実の複雑な混合系である環境の評価には適用できない。すなわち、個別の成分の影響の積み重ねとして複合影響を評価するという戦略は、少なくとも環境試料については有効ではなく、別の新たな戦略を考える必要があるだろう。

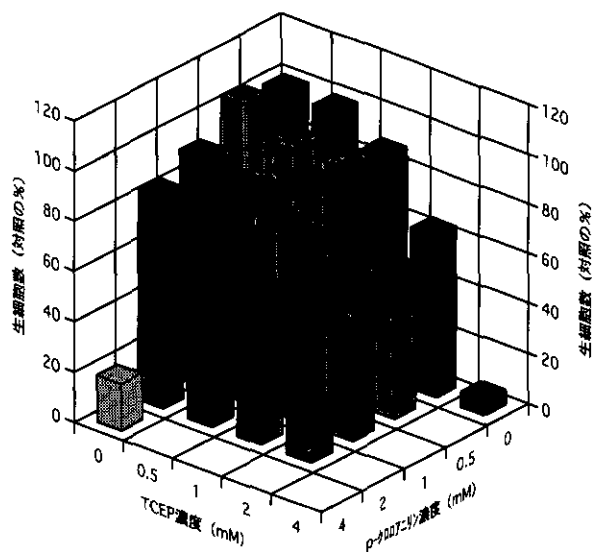


図9 NB-1細胞に対するp-クロロアニリンとTCEPの複合影響

2.2.2 不死化ラット肝細胞を用いた有機塩素化合物の毒性評価の試み

有機塩素化合物の生体影響を評価する場合、多種類の検体の有害性を同時に評価できる手法が必要となってきている。その一つに動物細胞を用いた培養システムの利用がある。動物細胞の培養システムを利用した環境化学物質の有害性評価についてはすでにいくつかの研究グループで実施されているが、実際にリスク評価を行うにはまだ多くの基礎情報の蓄積が必要である。その中でも、動物細胞の培養システムで環境試料をバイオアッセイする際に、用いる細胞の由来臓器と毒性を評価する化学物質の標的臓器とが同一でなければならないかどうかに関する疑問は明らかにされていない。

一般に経口による慢性的な暴露の影響では、特定の臓器に有害性が顕在化するものである。そのため、今回、肝臓組織への有害性を予測できうるかどうかを検討するため、肝細胞を用いて有害性の検討を試みた。さらに、文献およびデータベースの毒性情報から得られる生体影響評価との相関を検討し、培養システムにおける有害性評価が直接個体の毒性に外挿可能かどうか試みた。

大都市周辺の河川底質において高頻度に検出された9種類の有機塩素化合物を対象とした。

培養システムに用いた培養細胞はアデノウイルスV型のリコンビナントSV40で不死化された細胞LEA-RA9を使用した。細胞は5% CO₂ガス及び37℃に保ったインキュベーター(Sanyo)において、プラスチック製の

ボトルフラスコ (Falcon) 容器で培養し、 1×10^4 cells/ml になるように 10% FBS を含む Williams' E 培養液で調整した。その細胞培養液を 10% FBS を含む Williams' E 培養液で 48 時間培養後、各濃度の有機塩素化合物および対照である溶媒をその培養液に添加した。18 時間後、発色指示薬の安定のため培養液を血清の含まない 10% アラマブルーを含む Earle's 培養液に交換し、さらに 2 時間培養した。その後、570~600nm のアラマブルーの発色変化をプレートリーダー (Bio-Rad Microplate Reader, Model 550) で測定した。有機塩素化合物による生細胞の抑制率は溶媒添加におけるアラマブルーの発色値に対する減少率で示した。

各有機塩素化合物の毒性インデックスである IC_{50} (生細胞数を 50% に抑制する化学物質の濃度) は濃度-生細胞活性曲線から生細胞数が 50% に抑制する化学物質の濃度を算出し、 IC_{50} 値 (μM) とした。尚、 $1000 \mu M$ を細胞に添加しても 50% の細胞の生育阻害が認められなかった場合においては、 $1000 \mu M$ 以上の濃度を細胞に処理することを行わず、 >1000 と表示した。

9 種類の有機塩素化合物の細胞傷害性の効力を表 15 に示した。その結果、9 種類の効力及びその順位は、トリクロカルバン (TC) (16) > トリクロサン (IR) (39) > 3,4-ジクロロアニリン (DCA) (310) > 2,5-ジクロロフェノール (DP) (390) > 2,5-ジクロロアニソール (DA) (600) > p-ジクロロベンゼン (pDCB) (730) > p-クロロアニリン (pCA) (740) > o-ジクロロベンゼン (oDCB) (>1000) = リン酸トリス 2-クロロエチル (TCEP) (>1000) であった。検討した 9 種類の有機塩素化合物は構造特性から分類すると 4 つのグループに分けられる。ベンゼン環に塩

表 15 ラット不死化肝細胞における有機塩素化合物の細胞毒性

塩素化合物名	IC_{50} (μM)
p-クロロアニリン	740
3,4-ジクロロアニリン	310
p-ジクロロベンゼン	730
o-ジクロロベンゼン	>1000
リン酸トリス 2-クロロエチル	>1000
トリクロサン (イルガサン)	39
トリクロカルバン	16
2,5-ジクロロフェノール	390
2,5-ジクロロアニソール	600

素が 1 ないし 2 個付加したもの (pCA, DCA, pDCB, oDCB, DP, DA), ベンゼン環に塩素が 1 ないし 2 個付加した構造物がエーテル結合しているもの (IR), あるいはアミド結合しているもの (TC), ベンゼン環を持たないもの (TCEP)。pDCB に水酸基が付加されたものが DP であり, oDCB にアミノ基が付加されたものが DCA である。いずれも、親水性置換基であるアミノ基や水酸基が付加されると水溶性が向上し細胞傷害性もほぼ 2 倍となっている。また、最も効力の強かった TC 及び IR はいずれも 1 分子内に塩素化ベンゼンを 2 個含有している。今後これらの毒性の強さの要因を明らかにする必要があると思われる。本研究では培養システムに不死化細胞を使用した。不死化細胞は培養維持の簡便さ、細胞の性質ががん細胞から樹立されたものより正常な性質を比較的よく維持している特徴のため、近年、様々な分野でよく利用されている。例えば、Kulka ら (1993) は benzo[a]pyrene や aflatoxin B1 など構造特性の異なった 5 種類の原変異原物質の変異原性評価に彼ら独自に樹立したラット不死化肝細胞を利用しており、*in vivo* における変異原性評価と一致した結果を得ている。また、Carrie ら (1997) も化学構造の異なった 5 種のパーオキシゾーム増殖剤について、マウス不死化肝細胞を用いてそれらの細胞内シグナル伝達機構を詳細に調べている。このように不死化細胞は多数の検体について測定しなければならない環境試料の生体影響の研究のうえでも、有効な培養システムであると考えられた。

次に、細胞傷害性を調べた 9 種類の有機塩素化合物について、実験動物に関する毒性情報を収集整理し、表 16 にまとめた。情報源はデータベースである RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances), HSDB (Hazardous Substances Data Bank) 及び IRIS (Integrated Risk Information System) と通常の MEDLINE の文献検索から入手した。

急性毒性のインデックスとして動物の 50% 致死量 LD_{50} と慢性毒性の情報に関しては、通常毒性インデックスとして用いられる無有害作用量 (non-observed adverse effect level, NOAEL) あるいは最小作用量 (lowest-observed adverse effect level LOAEL) を記載した。13, 26 週間などの中期試験の NOAEL は長期試験期間 104 週の用量に補正した値も算出した (表 16)。その補正は次式で求めた。

$$NOAEL_{adjust} = NOAEL \times \text{中期投与期間} / 104$$

表16 9種の有機塩素化合物の急性毒性と慢性毒性に関する毒性情報

塩素化合物名	急性毒性 LD ₅₀ (PO, g/kg)	標的臓器	暴露期間 (週)	NOAELorLOAEL (mg/kg·day)	NOAELorLOAEL* (mg/kg·day)
P-クロロアニリン	0.3 (rat♂)	脾臓	78	12.5 (rat♂)	9.4
		脾臓	104	12.7 (rat♂)	—
		脾臓	104	25 (rat♂)	—
3,4-ジクロロアニリン	0.5 (rat♂)	肝臓	13	70 (rat♂)	8.75
		肝臓	26	20 (rat♂)	5
p-ジクロロベンゼン	3.8 (rat♂)	肝臓	13	300 (rat♂)	37.5
o-ジクロロベンゼン	1.8 (rat♂)	肝臓	104	85.7 (rat♂)	—
	0.5 (rat♂)				
リン酸トリス2-クロロエチル	1.2 (rat♂)	脳, 腎臓	104	44 (rat♂)	—
		腎臓	104	63 (rat♂)	—
トリクロサン (イルガサン)	3.7 (rat♂)	肝臓	13	10 (rat♂)	1.25
トリクロカルバン	>5.0 (mice♂)	肝臓	13	10 (rat♂)	1.25
2,5-ジクロロフェノール	1.6 (mice♂)				
2,5-ジクロロアニソール					

*はNOAELadjustは104週の暴露期間に補正したときのNOEL

各毒性インデックスにおける9種の有機塩素化合物の効力順位と培養細胞を用いた細胞傷害性における効力順位との相関性を検討し、(図10)及び(図11)にまとめた。

LD₅₀と細胞傷害性を示すIC₅₀との相関はR=0.556と低く相関性は認められなかった。さらに、9種の有機塩素化合物のうち、TC及びIRに関するLD₅₀とIC₅₀の効力順位には大きな隔たりがあったため、これら2化合物を除いて相関を調べた場合でもLD₅₀とIC₅₀間の相関は認められなかった。また、逆に、IC₅₀が求められなかったoDCB及びTCEFを除いて相関性を求めた場合においても、相関係数r=0.380と低い相関しか求められなかった。LD₅₀とIC₅₀との相関性の検討について相関が認められたとする報告もある。Ekwallら(1989)はヒトでの急性致死量が知られている物質について、細胞培養でのIC₅₀と動物でのLD₅₀との関係を調べ相関が認められたと報告した。試験を行った物質がヒトでの急性致死量が知られているものであるということは、生物利用率すなわち生体内への吸収効率が良いということを示している。従って、本研究において、LD₅₀とIC₅₀との相関性が認められなかったもうひとつの理由に物質による被検物質の高濃度における吸収率の違いの可能性も考えられる。

慢性毒性に関しては、投与期間を補正した場合の方が相関性が向上しIC₅₀とNOAELadjustとの間に比較的高い相関が認められた。また、標的臓器を肝臓に限定して再度NOAELliverとIC₅₀との相関性を求めると、相関係数

r_{liver}=0.947となり、標的臓器を肝臓に限定した場合が最も相関が高かった。この結果は、培養細胞を用いて細胞傷害性を評価するためには、用いる培養細胞の由来臓器の種と被検物質の標的臓器とを一致させた方が生体毒性をより綿密に予測するのに適していることを示唆している。逆に、未知試料でのアッセイを行うときには、多種類の臓器由来の細胞を使用する必要性が考えられる。

培養細胞での毒性評価と実験動物で得られる毒性評価との相関性を求めるために、本研究では毒性情報を利用した。毒性情報(toxicological information)は1966年米国において「生体または生体を構成するサブシステムに対する化学物質の影響について記述した一切の情報」と定義された。不特定多数の化学物質が含有している環境試料の毒性評価にはその作用の実態を明らかにする支援システムとして毒性情報の利用は不可欠である。化学物質の有害性に関するリスク評価において、実験動物における非発がん性の毒性指標にはNOAELが用いられている。環境中の化学物質のリスク評価には医薬品や農薬の場合よりも低コスト化と汚染への迅速な対応が要求されるためNOAELを用いた既存の毒性情報と培養細胞システムでの相関係数の標準化が可能であれば、培養細胞の結果からNOAELの予測が可能となり、予防的措置がとれる可能性がある。本研究での結果は、このような可能性を示唆している。

最後に、実際、環境試料への応用のために9種の有機塩素化合物の等量混合物について細胞傷害性を求めた。

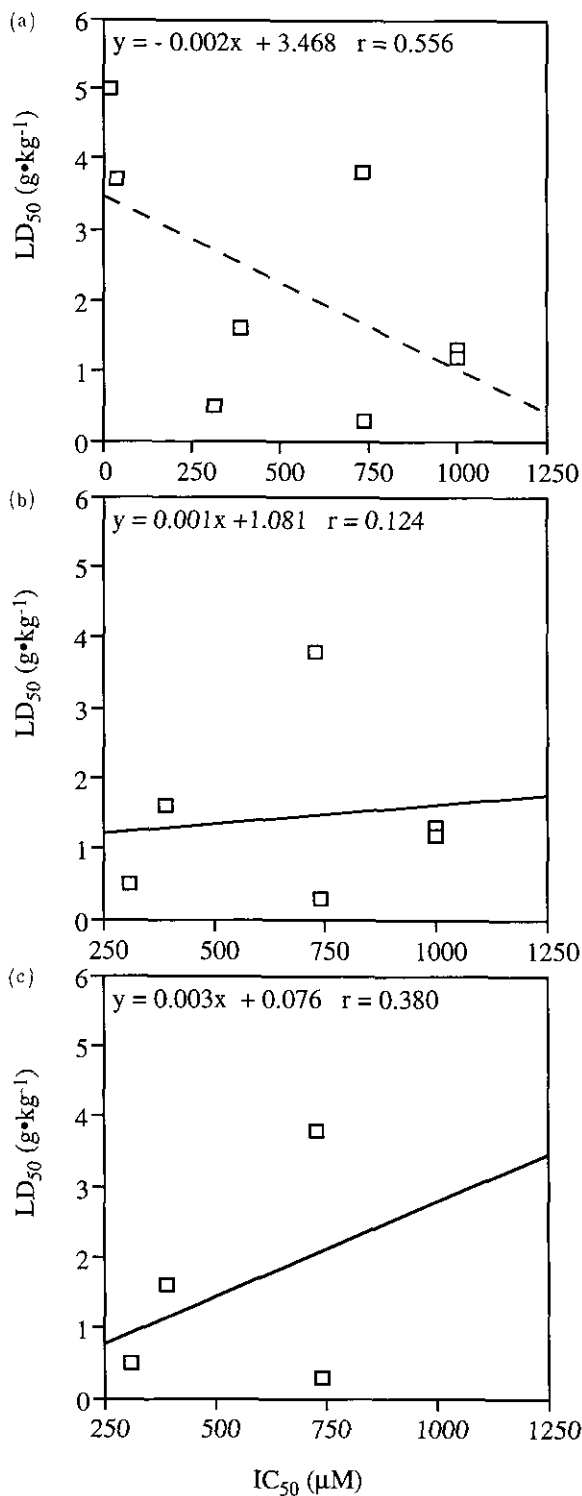


図10 9種の有機塩素化合物に関するLD₅₀とIC₅₀との相関関係
 (a)表15, 16からのオリジナル, (b)トリクロサンとトリクロカルバンを除いたもの, (c)トリクロサン, トリクロカルバン, o-ジクロロベンゼン, 及びリン酸トリス-2-クロロエチルを除いたもの。

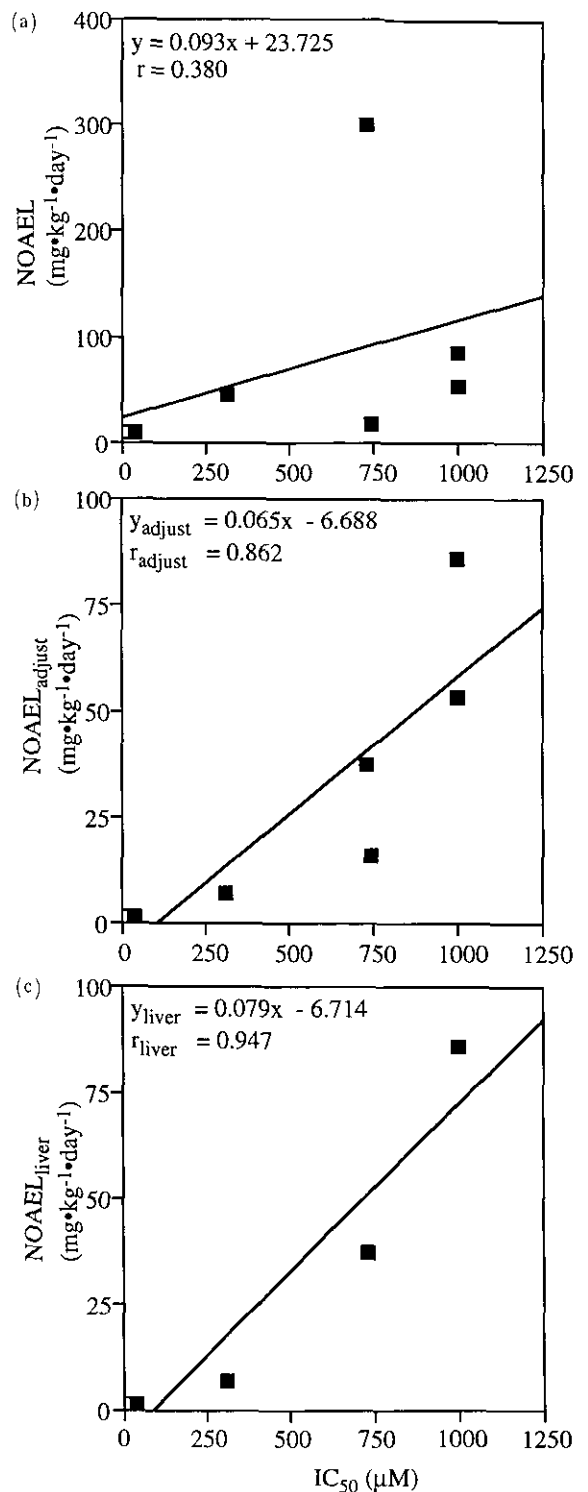


図11 9種の有機塩素化合物に関するNOAELとIC₅₀との相関関係
 (a)表15, 16からのオリジナル, (b)NOAEL_{adjust}は暴露期間を補正したもの, (c)NOAEL_{liver}は標的臓器が肝臓のみを選択した場合。

表17 9種の有機塩素化合物の等量混合物に関する細胞傷害性と毒性評価への外挿

	IC ₅₀ (μ M)	NOAEL	NOAEL adjust	NOAEL liver
等量混合物	82	31	5.4	<1
9種の有機塩素化合物の平均値	—	59	10.5	10.8

等量混合物のIC₅₀値は82Mとなり、これを(図11)から求めたNOAELとの相関式を用いて、個体レベルでの毒性評価への外挿を試みた。その結果を表17にまとめた。何れの外挿値も各9種のNOAELの平均値より小さく、毒性が強くなることが予想された。

2.2.3 環境中有機塩素化合物の単独および2つの化合物の混合物の胎仔毒性の評価

環境汚染化学物質の健康への影響の中でも、胎仔(胎児)への影響は、胎仔の感受性が高いこと、影響が次世代におよぶことから、種の存続に関わる問題であり、緊急かつ重要な課題である。

そこで、大都市周辺の河川水、河川底質において高頻度に検出された有機塩素化合物9種類について、胎仔肢芽培養法を用いて、胎仔毒性のスクリーニングを行うとともに、培養胎仔肢芽細胞における2種類の混合物の相互作用をToxic Unit (TU)とisobole diagramを用いて解析を試みた。

混合物の毒性の評価には複合作用のタイプ、様式、機

構を理解することが必要である。単独の物質への暴露におけるIC₅₀(50%阻害濃度)の値を1として相対化したToxic Unit (TU)とisobole diagramを用いて相互作用の有無、複合作用のタイプ、様式を示すことが提案されている。一方、胎仔毒性、催奇形性はその成因が多様であり、共通のメカニズムが働いているわけではない。したがって、発がんにおける変異原性試験のような*in vitro*の試験法は存在しない。細胞毒性が強ければ細胞は死に至り、胎仔毒性、催奇形性は現れない。細胞毒性はあまり強くないが発生・分化に特異的に傷害を及ぼす物質は、胎仔毒性、催奇形性のポテンシャルが高いという考えに立って、分化特異的な毒性を検出する系がいくつか考案されている。そのような試験法の一つが胎仔肢芽培養法である。胎仔肢芽培養法は、肢芽の中胚葉性の細胞を高密度で培養すると軟骨細胞へと分化することを利用したアッセイである。軟骨細胞へ分化した細胞が分泌するプロテオグリカン測定することにより、細胞増殖への影響と細胞分化への影響とを同時に定量的に評価できることから、*in vitro*の発生毒性スクリーニング法として有用であることが、催奇形性試験法を比較した結果および催奇形性物質を用いたvalidation studyにおいて示されている。

相互作用の解析においても、細胞増殖と細胞分化における相互作用を別々に評価できることから、より多くの情報を得ることができる。

9種類の有機塩素化合物の胎仔肢芽細胞への影響を表18に示す。細胞増殖に対する50%阻害濃度(IP₅₀)、細胞分化に対する50%阻害濃度(ID₅₀)、前者と後者の比(P/D比:細胞分化への特異的な毒性の指標)、細胞増

表18 有機塩素化合物の培養胎仔肢芽細胞への影響

化合物名	50% 阻害温度 (細胞増殖)	50% 阻害温度 (細胞分化)	P/D比	傾き (細胞増殖)	傾き (細胞分化)	傾きの比
	IP50 (μ M)	IP50 (μ M)	P/D	Slop (P)	Slop (D)	Slop (P/D)
p-ジクロロベンゼン (pDCB)	790	640	1.23	19.8	36.2	0.55
o-ジクロロベンゼン (oDCB)	740	630	1.17	31.7	32.0	0.99
p-クロロアニリン (pCA)	71	24	2.73	2.73	6.93	0.39
3,4-ジクロロアニリン (DCA)	210	190	1.10	3.48	6.80	0.51
リン酸トリス2-クロロエチル (TCEP)	3600	1570	2.30	3.30	3.40	0.97
2,5-ジクロロフェノール (DP)	>200	33	>6.1	—	6.92	—
2,5-ジクロロアニソール (DA)	650	470	1.38	15.1	28.0	0.54
トリクロサン (TR)	13.7	17.5	0.78	—	—	—
トリクロカンパン (TC)	4.6	4.4	1.05	—	—	—

殖のあてはめ曲線の傾き(slope(P)), 細胞分化のあてはめ曲線の傾き(slope(D)), 前者と後者の比(slope(P/D))を示す。

pCA, IR, TCのID₅₀とIP₅₀, DPのID₅₀は今回試験した化合物の中でも低かった(すなわち毒性が高かった)。DPのIP₅₀は200 μ Mまでの濃度では得られなかったので、DPのP/D比は非常に高くなっている(>6.1)。pCAのP/D比は2.95であった。DCA, pDCB, oDCB, DAのID₅₀とIP₅₀はsubmillimolarレベルであり、P/D比も1前後であった。TCEPのID₅₀とIP₅₀は今回試験した化合物の中では比較的高く毒性は低かったが、P/D比は2.30と比較的高かった。

用量-反応曲線の傾き, 特にpDCB, oDCBとDAのslope(D)の値は大きく用量-反応曲線が急峻であった。P/D比, 毒性の強さを胎仔毒性スクリーニングのためのプライオリティの判定基準とすると, 今回テストした化合物のうち, 比較的P/D比の高かったpCA, DP, TCEPとP/D比はそれほど高くなかったが, IP₅₀とID₅₀が低かったIR, TCは胎仔毒性のポテンシャルが高く, 次の段階のテストを行うプライオリティが高いと判断された。pDCBには細胞増殖促進作用が認められていることから, これらの化合物(IRを除く)との相互作用に関心もたれた。そこで2つの物質の相互作用の解析を, pDCB-pCA, pDCB-TCEP, pDCB-DP, pDCB-TC, TC-IRの5つの組み合わせについて行った。

混合物の相互作用はToxic Unit(TU)とisobole diagramを用いて評価した。混合物はそれぞれを足して1になるような割合につくる。すなわち, 単独の場合の濃度をA, Bとすると, 1:1の混合物では0.5A+0.5B, 3:1の混合物では0.75A+0.25Bのようになる。Toxic Unit(TU)は単独の場合の50%阻害濃度(IC₅₀)を1として相対化して求める。例えば1:1の混合物でそれぞれのIC₅₀(50%阻害濃度)がA, Bとして, 用量-反応曲線がそれぞれ単独の場合と同じであれば, 混合物のIC₅₀は(0.5A, 0.5B)で, Toxic Unit(TU)は(0.5A \cdot A-1, 0.5B \cdot B-1)=(0.5, 0.5)となる。いくつかの混合比の混合物についてTUを求め, 2次元平面にプロットしたものがisobole diagramである。これらのプロットが(1,0), (0,1)を結ぶ線上にあれば, これら2つの物質は相加的に作用していると考えられる。したがって, この直線よりプロットが内側に位置した場合は2つの物質の相互作用は相加作用より強く, 外側に位置した場合は相加作

用より弱いということになる。ここでは, 3:1, 1:1, 1:3の混合比の混合物を用いて相互作用を解析した。化合物の組み合わせや, 混合比によっては設定した濃度範囲では50%阻害濃度(IC₅₀)が求められない場合があり, そのような時には20%阻害濃度(IC₂₀)または30%阻害濃度(IC₃₀)を用いた。

2つの物質の相互作用におけるToxic Unit(TU)の分析に基づく5組のisobole diagramを(図12)に示す。pDCB-TCEP, pDCB-pCAでは, 細胞増殖に対してより毒性軽減作用がみられ, pDCB-DPでは細胞分化に対してより毒性軽減作用がみられた。IR-TCでは, 細胞増殖, 細胞分化いずれも相加作用を示した。

相互作用において細胞増殖が促進されれば, 細胞増殖の用量-反応曲線がシフトして, 細胞増殖の50%阻害濃度(IP₅₀)が高くなるのが単純には考えられるが, 実際には(図12)にみられるように化合物によっても, 混合比によっても相互作用は多様であった。pDCBに細胞増殖促進作用があれば, 細胞増殖と細胞分化とに異なった相互作用をすることが予想されたが, pDCB-TCの組み合わせのように, 細胞増殖と細胞分化とが同じような挙動を示す場合もあった。また, pDCB-DPのように, むしろ細胞分化に作用がより及んでいる場合もあった。IR-TCの場合は, 両者とも殺菌剤で作用点が似ているためか, ほぼ(0,1), (1,0)の直線上に並び, 典型的な相加作用が認められた。pDCBには試験した用量において細胞増殖促進作用はみられなかったが, 以上述べたように多様な相互作用を示したことから, 相加作用以外の何らかの相互作用が存在すると考えられる。

ここで用いたToxic Unit(TU)とisobole diagramによる相互作用の解析は, 結果を視覚的に把握できることから有用である。また, 胎仔肢芽培養法は, 細胞増殖と分化への影響とを同時に, 定量的に評価できることからより多くの情報を得ることができ, 胎仔毒性のスクリーニングだけでなく, 毒性機序の解明のためにも有用な方法であると考えられる。

2.2.4 多塩素化ビフェニル(PCB)およびその関連化合物によるP型グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST-P)遺伝子の発現とその制御

多塩素化ビフェニル(polychlorinated biphenyl PCB)類は数多くの有機塩素化合物の中でも, 最も毒性の強い化合物の一つである。現在, PCBの生産や使用は禁止さ

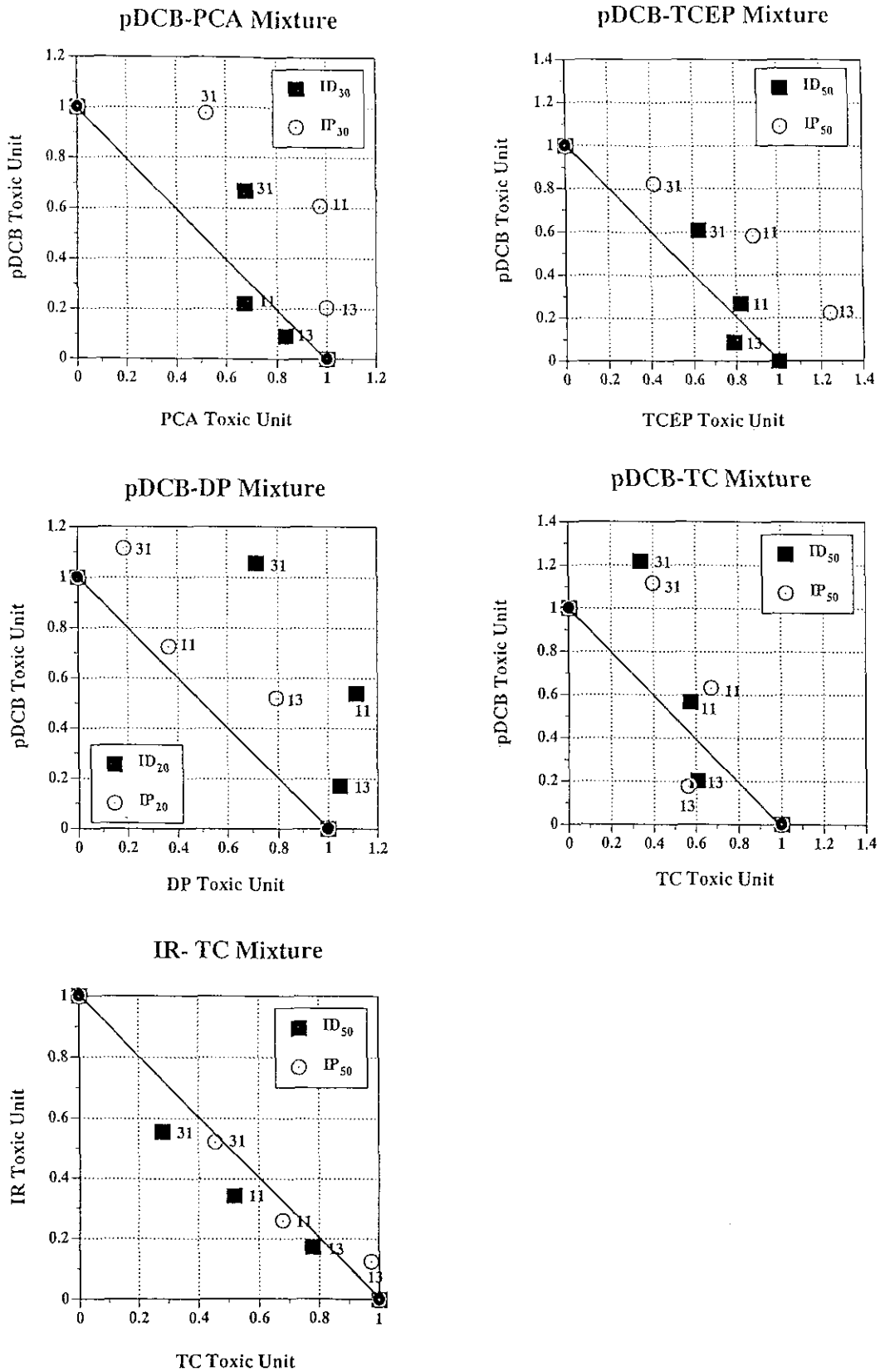
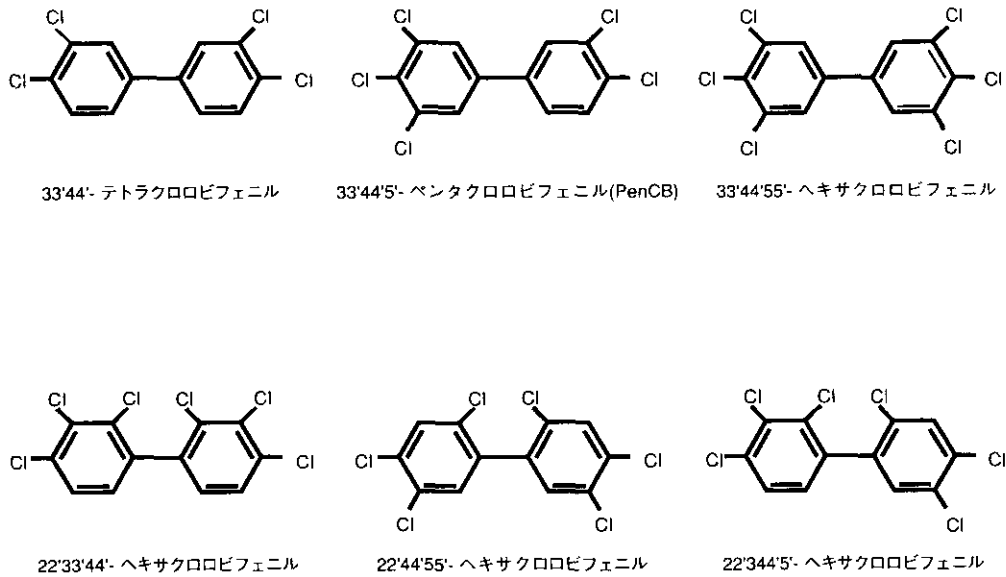


図12 培養胎仔胚芽細胞における2物質の混合物。pDCB-PCA, pDCB-TCEP, pDCB-DP, pDCB-TC, TR-TCの相互作用の isobole diagram
 31, 11, 13はそれぞれ混合比3:1, 1:1, 1:3を表す。(■)は細胞分化の50%阻害濃度を(○)は細胞増殖の50(30, 20)%阻害濃度を表す。

(a)



(b)

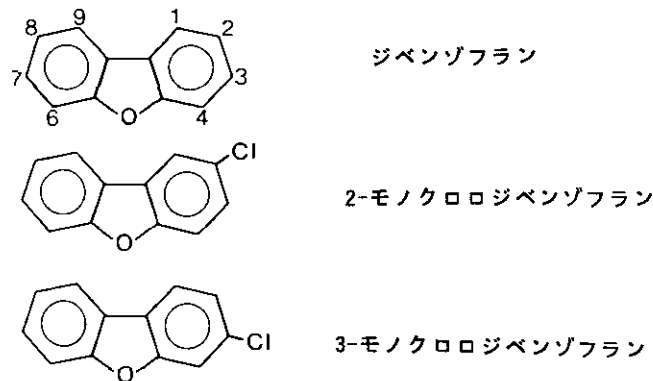


図13 (a)多塩素化ビフェニルの構造(上段はコプラナー-PCB, 下段は非コプラナー-PCB)
(b)低塩素化ジベンゾフランの構造

れているが、依然として環境中の残留濃度は高い。PCB同族体の中でもコプラナー(共平面)PCBと呼ばれる一連の化合物群は、毒性が特に強いことで知られている(図13a)。このコプラナー-PCBは生分解を受け難いことから、他のPCB同族体に比べて環境中の濃度は高く、今後とも監視を続ける必要のある環境汚染物質である。

コプラナー-PCBはそのシンプルな構造にもかかわらず、多様な毒性を示す。人における急性毒性としては皮膚の瘡瘍、いわゆるクロルアクネが、また、動物実験では発がん促進作用や催奇形性などが知られている。これらの毒性は、より低濃度の2,3,7,8-テトラクロロ-p-ダイオ

キシン(TCDD)や2,3,7,8-テトラクロロ-p-ジベンゾフラン(TCDF)の暴露によっても発現される。そのためTCDD, TCDFおよびコプラナー-PCBなどは、その立体構造上の類似性ともあいまってダイオキシン関連化合物と総称され(図13b)、共通の毒性発現機構が存在すると考えられている。

コプラナー-PCBなどのダイオキシン関連化合物は細胞内に取り込まれるとAhレセプター(Ah-R)と呼ばれる受容体タンパク質に結合する。コプラナー-PCBとAh-Rの複合体は核内に移動し、薬物代謝酵素・シトクロムP450-1A1(CYP-1A1)遺伝子上のAh-R結合領域に結

合する。この結合が引き金となってCYP-1A1遺伝子が発現され、CYP-1A1が生合成される。コプラナーPCBの中で最も毒性が強いといわれる3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル (penta-chlorobiphenyl, PenCB) がTCDDの場合と同量のCYP-1A1を誘導するためには、TCDDの約100倍の濃度が必要である。この差異は、各々の化合物とAh-Rの間の親和性の差によって説明されている。このダイオキシン関連化合物によるCYP-1A1誘導能は、各々の化合物の毒性の相対的な強さを評価する際にしばしば用いられる。コプラナーPCBにより誘導されたCYP-1A1は芳香族化合物等への酵素添加活性を持つが、コプラナーPCBやTCDDは高度に塩素化されているためにそれ自身は良い基質とならず代謝されない。そのかわり生体内のCYP-1A1の基質、例えばステロイドホルモン等の代謝が促進され、その結果、発がん作用などの有害作用が発現されると考えられる。しかしながら、単にCYP-1A1の誘導のみでコプラナーPCBの多様な毒性を統一的に説明できるとも考えられず、コプラナーPCBによって引き起こされるCYP-1A1の誘導以外の生体反応の解析が求められていた。

(1) コプラナーPCBによるP型グルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子の発現

我々は、コプラナーPCBの作用により特異的に発現される遺伝子を初代培養したラット肝実質細胞を用いて検索したところ、P型グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST-P) が誘導されることを見いだした。GST-Pは正常な肝実質細胞には存在せず、実質細胞のがん化によりはじめて発現することが知られており、コプラナーPCBの発がん促進作用との関連から興味を持たれた。また、GST-P遺伝子上にはAh-R結合領域が存在しないことがすでに知られており、このGST-P遺伝子の誘導はコプラナーPCBによる新しい遺伝子発現の機序の存在を示唆している。そこで、コプラナーPCBによるGST-Pの発現機序の解明を、CYP-1A1の発現と比較しつつ進めた。もし、コプラナーPCBがCYP-1A1と異なる機序でGST-Pを誘導しているならば、GST-Pの発現あるいはそれに関連した生体応答は、ダイオキシン関連化合物の毒性を評価する際の新たな基準として用い得る可能性がある。

(2) コプラナーPCBによるGST-P遺伝子発現へのプロテインキナーゼCの関与

GST-Pの遺伝子発現機構を明らかにするために、PenCB

以外のGST-Pを誘導する因子の検索を行った結果、上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) がGST-P遺伝子を発現した。図14に示すように、100nM PenCBによるばかりでなく、初代培養したラット肝実質細胞を10ng/ml EGFで12時間処理すると、GST-P mRNAが誘導された。EGFは細胞膜上に存在する受容体タンパク質 (EGF受容体) に結合してEGF受容体のチロシンキナーゼを活性化し、その作用を発現する。PenCBもこのチロシンキナーゼを活性化することが予想された。しかし、EGF受容体のチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインによって、PenCBのGST-P mRNA誘導は阻害されなかった (図14a)。これより、PenCBはEGF受容体に直接作用しないことがわかった。

EGF受容体のチロシンキナーゼは、プロテインキナーゼCを含むタンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) 群を活性化し、様々な遺伝子を発現することが知られている。PenCBはEGFと共通の機序でGST-P遺伝子を発現すると考え、PenCBのGST-P mRNA誘導に対するプロテインキナーゼC阻害剤・H-7の影響を調べた。その結果、PenCBによるGST-P mRNA誘導、EGFによる誘導ともに25~100 μ MのH-7により阻害された (図14b)。また、同様の阻害剤であるフロレチンもPenCBのGST-P mRNA誘導、EGFのGST-P mRNA誘導をともに阻害した (図14c)。一方、PenCBによるCYP-1A1 mRNAの誘導はH-7によっては阻害されず、GST-P遺伝子とCYP-1A1遺伝子の発現機構は異なるものと考えられた (図14d)。また逆に、プロテインキナーゼCの活性化剤であるフォルボールエステルによってわずかにGST-P mRNAは誘導された。これらより、PenCBによるGST-P遺伝子の発現にはプロテインキナーゼCあるいは類縁のプロテインキナーゼが関与していることが示唆された。

GST-P遺伝子の発現調節領域にはc-Junと呼ばれる遺伝子発現調節タンパク質の結合領域が存在している。このc-JunはプロテインキナーゼCの作用により活性化型に変換されることが知られており、c-JunのGST-P遺伝子発現への関与が予想された。そこで、PenCBによるGST-P遺伝子の発現に対するc-Junの活性のアンタゴニスト (拮抗阻害剤) ・デキサメタゾン (合成グルココルチコイド) の影響を調べた。その結果、10⁻⁷MデキサメタゾンによりPenCBのGST-P mRNA誘導は完全に阻害され、PenCBのGST-P遺伝子発現にc-Junが関与していることが示唆された。

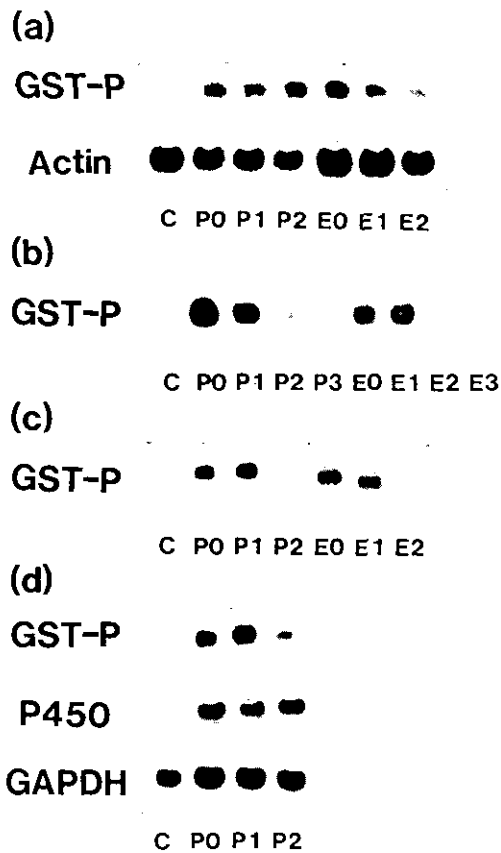


図14 プロテインキナーゼ阻害剤がPenCBあるいはEGFによるGST-P mRNAあるいはCYP-1A1 (P450) m-RNAの誘導に与える影響

細胞をPenCB (P1-P3) あるいはEGF (E1-E3) 存在下でインキュベートした後、mRNAレベルをノーザンブロットティング法により測定した。POとEOは阻害剤非存在下。アクチン (Actin) m-RNAとグルタルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) m-RNAはPenCBあるいはEGFにより影響を受けない対照のm-RNAとして測定している。

- (a) GST-P mRNAの誘導に対するゲニステインの影響 (P1とE1, 4 μ M; P2とE2, 20 μ M)。
- (b) GST-P mRNAの誘導に対するH-7の影響 (P1とE1, 5 μ M; P2, 25 μ M; P3とE3, 100 μ M)。
- (c) GST-P mRNAの誘導に対するフロレチンの影響 (P1とE1, 20 μ M; P2とE2, 100 μ M)。
- (d) GST-P mRNAの誘導に対するH-7の影響 (P1, 5 μ M; P2, 25 μ M)。Cは無処理細胞中のm-RNAレベル。

(3) コプラナーPCBによる遺伝子発現調節タンパク質 c-Junのリン酸化

上述のように、PenCBに依存した遺伝子発現へのc-Junの関与が示唆され、c-Junのリン酸化がPenCBの影響により調節されていることが予想された。これを確かめるために、100nM PenCBで6時間処理した細胞に³²P-正

リン酸を取り込ませ細胞内のタンパク質を放射標識した。ついで、細胞の粗抽出液より³²P標識されたc-Junを免疫沈降法により精製したのち、SDSゲル電気泳動で分離して、オートラジオグラムにより検出した (図15)。

c-Junのリン酸化は10ng/ml EGFによって促進されるが、同様に100nM PenCBによってもこのリン酸化は促進された。しかし、非コプラナー型のPCB, 100nM2,2',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル (hexachlorobiphenyl, HexaCB) や100ng/mlフォルボールエステル (TPA) ではこの促進は起こらなかった。この観察より、c-Junのリン酸化がPenCBにより特異的に促進されることが示された。

遺伝子発現調節タンパク質リン酸化の促進は、これまでに知られていないコプラナーPCBが細胞に与える作用である。他の化学物質の作用もタンパク質のリン酸化を促進することが予想される。リン酸化されたc-JunがGST-P遺伝子の発現に関与しているか否かを明らかにすることは今後の課題であるが、GST-P遺伝子の発現は化学物質によるタンパク質のリン酸化促進作用を反映した、新たな化学物質の暴露の指標として有用である可能性がある。

(4) 低塩素化ジベンゾフランによるGST-P遺伝子の発現

低塩素化ジベンゾフラン類 (図15) はわずかながら変異原性をもつ環境汚染物質である。これらの化合物はコプラナーPCBと同様に共平面構造をもつにもかかわらずCYP-1A1 m-RNAを誘導しない。しかし、低塩素化ジ

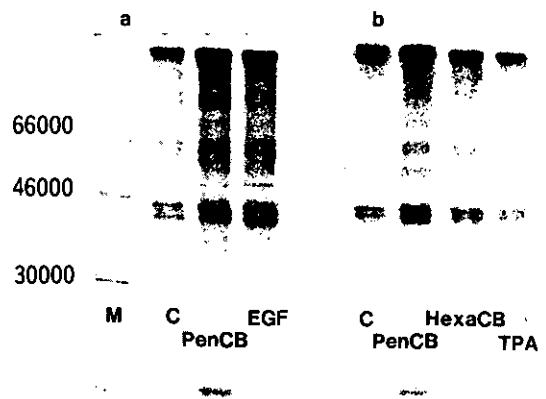


図15 PenCBあるいはEGFによるc-Junのリン酸化の促進 Cは対照細胞。Mは分子量マーカー (上から、66,000, 46,000, 30,000)。

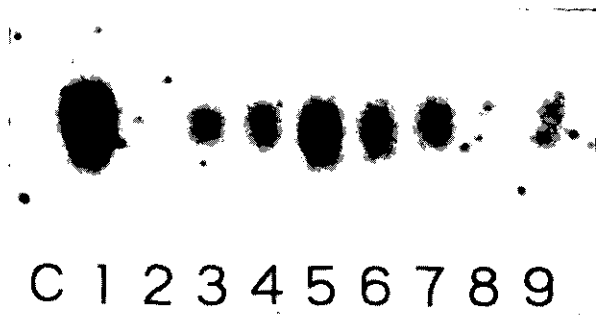


図16 低塩素化ジベンゾフラン (CDF) によるGST-Pm-RNAの誘導

Cは対照, 1はPenCB 100 μ M, 2は3-CDF 0.1 μ M, 3は3-CDF 1 μ M, 4は3-CDF 10 μ M, 5は3-CDF 100 μ M, 6は2-CDF 0.1 μ M, 7は2-CDF 1 μ M, 8は2-CDF 10 μ M, 9は2-CDF 100 μ M。

ベンゾフランのGST-P m-RNA誘導能を調べた結果, 比較的高濃度の暴露によってではあるがその誘導が認められた。

図16に示すように3-モノクロロジベンゾフラン (monochlorodibenzofuran, 3-CDF) を初代培養したラット肝実質細胞に暴露すると濃度に依存してGST-P m-RNAが誘導された。0.1および1 μ Mの2-モノクロロジベンゾフラン (monochlorodibenzofuran, 2-CDF) 暴露によってもGST-P m-RNAが誘導されたが, より高濃度では誘導は認められなかった。これは細胞毒性が発生したためと考えられる。また, 2,8-ジクロロジベンゾフランもGST-P m-RNAを誘導した。これら低塩素化ジベンゾフランによるGST-P m-RNAの誘導はPenCBの場合と同様にデキサメタゾンによって阻害された。低塩素化ジベンゾフランによる誘導機構はコプラナーPCBと共通であると推察された。

(5) まとめ

今回の我々の研究により, 最も毒性の強いコプラナーPCBであるPenCBは初代培養ラット肝実質細胞中でプロテインキナーゼが活性化し, その結果としてGST-Pを発現することが示唆された。これは, ダイオキシン関連化合物がAh-Rと複合体を形成し, この作用によりCYP-IA1などの薬物代謝酵素を誘導する以外にも, これらの化合物による新たな遺伝子発現機序が存在することを予想させるものである。また, CYP-IA1を発現することができない低塩素化ジベンゾフランによってもGST-Pは培養細胞中に発現され, GST-P遺伝子の発現はこれらの化合物に対する暴露の良い指標となり得ることが示唆された。

2.2.5 ジクロロベンゼンの培養細胞へのガス暴露による遺伝毒性の評価

ジクロロベンゼンは防臭剤, 防虫剤として現在でも広く一般家庭で使用されている有機塩素化合物である。特にパラジクロロベンゼンは室内空気から比較的高濃度に検出されており, 近年, 動物実験でその発がん性が指摘されている。しかしながら, 発がん性と関連づけられる遺伝毒性については, ジクロロベンゼンが揮発性でかつ水に難溶性であるために微生物や培養細胞への暴露手法が確立されていないことも一因となり, 陽性と陰性の両評価の報告が混在しているのが現状である。そこで, ジクロロベンゼンのような揮発性で, かつ水に難溶性の化合物の遺伝毒性を評価するため, ほ乳類培養細胞へのガス暴露システムの開発を試み, ジクロロベンゼンの3つの異性体 (オルト体; *o*-DCB, メタ体; *m*-DCB, パラ体; *p*-DCB) について遺伝毒性の評価を行った。

(1) 培養細胞へのガス暴露システムと毒性試験法

ジクロロベンゼンの3つの異性体は, 室温では液体あるいは個体のいずれも沸点が170℃程度の気中飽和濃度がおおよそ2,000ppm以下の揮発性化合物である。そのため, 通常の培養細胞への処理 (暴露) 法では, 37℃のインキュベーター内ですみやかに揮発し, 細胞への影響 (毒性) が安定して得られないなど問題があった。我々は, このような揮発性でかつ難溶性の化合物を培養細胞に定量的に, かつ再現性よく処理する方法として, ガス暴露による方法を採用した。ジクロロベンゼンは暴露ガス作成装置で所定濃度の空気混合ガスとして作成し, 試料とした。培養細胞 (チャイニーズ・ハムスター由来CHL細胞) はガラス製の培養角ビン内に付着単層培養して, ガス導入装置で角ビン内に暴露ガス (試料) を導入後, 密閉した。試料ガスを充填した培養角ビンは回転培養装置にセットして一定のスピードで回転させながら, 試料ガスが培養液及び細胞に接触するように暴露を行った。化合物自体の直接影響をみる実験系 (-S9と表記) では培養液とともに約24時間, 暴露と培養を同時に行い, 薬物代謝酵素により代謝された代謝物の影響をみる実験系 (+S9と表記) では薬物代謝酵素を含むS9混合培養液で回転しながら4時間暴露を行った後, S9混合培養液を捨て, その後に培養液を加えて約24時間静置培養を行っ

た。培養後、両実験系とも暴露した細胞の増殖細胞数を測定して、純空気を対照とした増殖細胞数と比較して細胞増殖抑制率を求め、細胞毒性の指標とした。一方、細胞内DNAの損傷の定量的測定法の一つである姉妹染色分体交換 (Sister-chromatid exchange; SCE)分析法を用いて暴露細胞と対照細胞のSCE頻度を測定し、対照群のSCE頻度に対する暴露群の誘発SCE比を求め、遺伝毒性の指標とした。

(2) ジクロロベンゼンの細胞毒性

細胞毒性が比較的弱い化合物の遺伝毒性を評価するとき、その化合物が生体への影響濃度下 (毒性発現領域) で実験が行われたか、どうかは遺伝毒性の有無の評価を左右する重要な要因となる。特に、水に難溶性で化学的に安定した化合物の遺伝毒性の評価については毒性作用のない無作用濃度領域で試みられた結果であることが疑われる報告もある。そこで、我々は、ジクロロベンゼンの遺伝毒性の有無を評価するにあたり、細胞増殖抑制が認められる細胞毒性発現領域で遺伝毒性を検索するために、3異性体の細胞毒性をあらかじめ検討した。

-S9の実験系では *o*-DCBと *m*-DCBは1,000~2,000ppm間の3段階の実験濃度で、*p*-DCBは400~1,200ppm間の3段階の実験濃度で濃度に比例した細胞増殖抑制作用が認められた (図17a)。一方、+S9の実験系では *o*-DCBと *m*-DCBは100ppm~1,000ppm間の3段階の実験濃度で、*p*-DCBは400ppm~1,200ppm間の3段階の実験濃度で濃度に比例した細胞増殖抑制作用が認められた (図17b)。異性体間の細胞毒性の強弱を比較するために20%の細胞増殖抑制率を示す濃度 (IC₂₀) を回帰直線式から求めると -S9の実験系では、*o*-DCBは990ppm、*m*-DCBは1,400ppm、*p*-DCBは1,100ppmと顕著な差は認められなかった。また、+S9の実験系では、*o*-DCBは310ppm、*m*-DCBは1,300ppm、*p*-DCBは1,100ppmであった。両実験系とも3つの異性体間では *o*-DCBがもっとも低い濃度で強い細胞毒性を発現するという結果が得られたが、特に、*o*-DCBは薬物代謝酵素存在下 (+S9) で比較的強い増殖抑制作用が認められることより、*o*-DCBの代謝物に強い細胞毒性が存在することが示唆された。ジクロロベンゼンの水への溶解性は *o*-DCBが145mg/l、*m*-DCBが111mg/l、*p*-DCBが79mg/lと異性体間で異なることから、ガス状物質の毒性作用は暴露中のガスから培養液への溶解率が毒性の強弱となっていることも重要な一因と考えられ

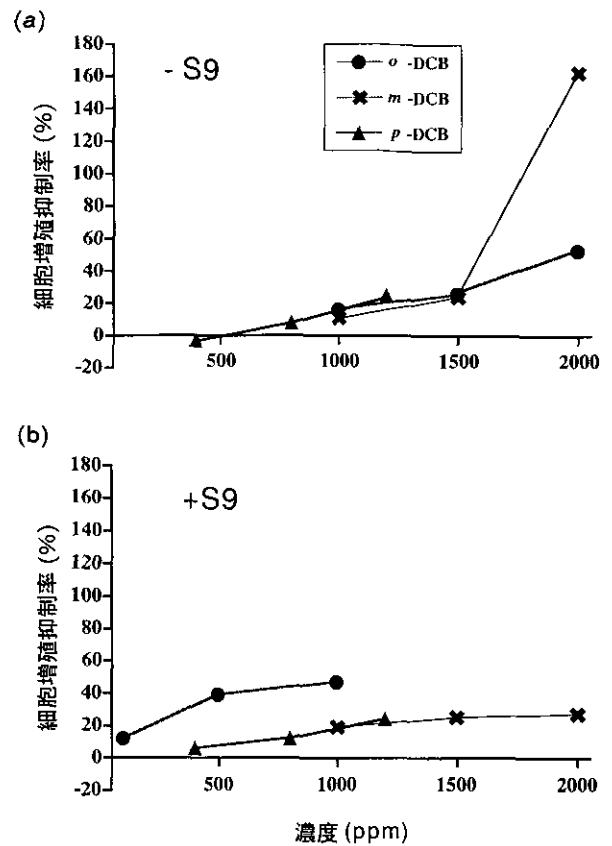


図17 ジクロロベンゼンの3異性体の細胞増殖抑制率

るが、*p*-DCBの水への溶解率は *m*-DCBよりも低いにもかかわらず、必ずしも毒性が弱くなく、溶解性だけではジクロロベンゼンの異性体間の細胞毒性の強弱の説明はできないことが明らかになった。

(3) ジクロロベンゼンの遺伝毒性

細胞毒性の検出される暴露濃度での遺伝毒性を誘発SCE比を指標にして検索した。-S9の実験系では、*o*-DCBは1,000~2,000ppmの濃度で対照を1としたとき、誘発SCE比は1.24~1.45倍といずれも有意なSCE頻度の上昇が観察された。*m*-DCBは1,500ppmで1.25倍と有意な誘発が認められたが、2,000ppmでは、細胞毒性が強く、SCE頻度は測定することができなかった。*p*-DCBは1,200ppmで1.34倍と有意なSCE頻度の誘発が認められたが、この濃度は気中飽和濃度に近く、これ以上の濃度での実験は不可能であった (図18a)。+S9の実験系では、*o*-DCBは100~1,000ppmの濃度で誘発SCE比が1.33~1.80倍といずれの濃度でも有意な誘発が認められた。*m*-DCBは2,000ppmのみで1.43倍と有意な誘発が認められた。*p*-DCBは800、1,200ppmで誘発SCE比が1.18倍、1.29倍と有意な

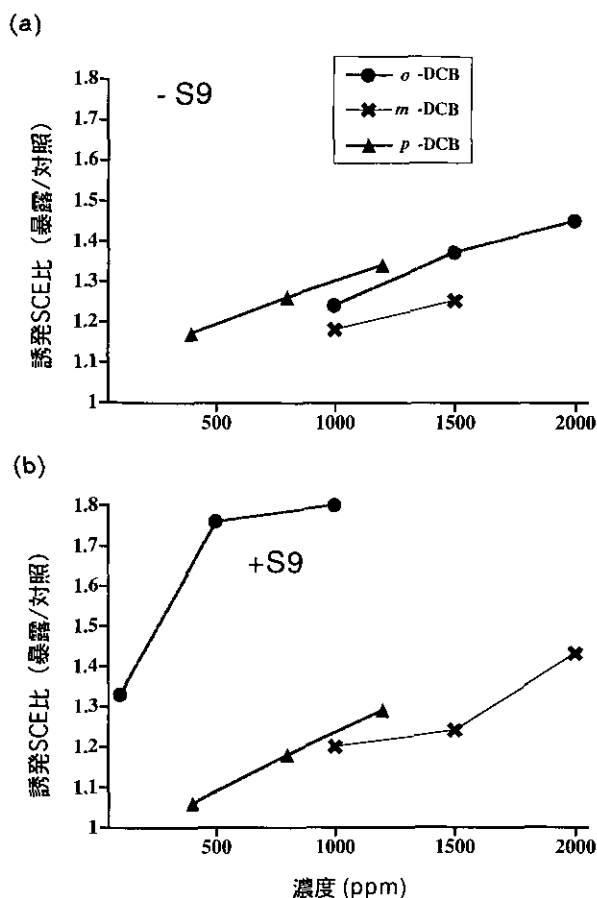


図18 ジクロロベンゼンの3異性体の遺伝毒性 (誘発SCE比)

誘発が認められた (図18b)。

3つの異性体とも3段階の実験濃度のいずれか、あるいはすべての濃度で統計的に有意なSCE頻度の誘発が認められたが、その誘発SCE比は最高でも *o*-DCBの1.80倍で2倍を超える結果は得られなかった。

(4) ガス状化合物の新しい遺伝毒性評価手法の試み

培養細胞を用いたSCE分析による遺伝毒性試験法においては、遺伝毒性が陽性であるという判定は通常、誘発SCE比が2倍以上を示す実験濃度が存在し、かつ濃度に依存した誘発能の上昇がみられることが条件とされている。しかしながら、ガス状化合物の場合、試験管内実験では、培養液中に十分に化合物が溶解できない場合もあり、SCEを分析するのに十分な暴露 (影響) 濃度を設定できないなど、水溶液で行われている一般的な試験法の評価法では不十分である。

一般に、遺伝毒性物質は細胞毒性の認められる濃度で濃度に依存したSCEの誘発が検出される。そして、細胞毒性が強くて誘発SCE比が低ければ、遺伝毒性は弱いと

判断され、逆に細胞毒性が弱くて誘発SCE比が高ければ、遺伝毒性は強いと判断される。我々は、ガス状化合物の遺伝毒性を評価するにあたり、ある特定の強さの細胞毒性を示す濃度における誘発SCE比を求めることにより、各化合物の遺伝毒性の強弱を具現化する試みを行った。すなわち、ガス状化合物の細胞毒性の強さの基準とした20%増殖抑制濃度 (IC₂₀) のときの誘発SCE比 (RSCE/IC₂₀) を暴露濃度に対する誘発SCE比の回帰直線式から求める方法を採用して各種ガス状化合物の遺伝毒性の強弱を検討した。たとえば、ヒトへの発がん性が確認されているベンゼンを+S9の実験系の遺伝毒性陽性対照として検討したところ、40,000~60,000ppmと極めて高濃度領域ではあるが濃度に比例した細胞毒性と1.40~2.30倍という誘発SCE比を認め、RSCE/IC₂₀は1.67倍という値が得られた。次に消火剤としてかつて使われ、遺伝毒性が確認されているプロモクロロメタンを-S9の実験系の陽性対照として検討したところ、5,000~20,000ppmの実験濃度で濃度に比例した細胞毒性と2.52~5.54倍という極めて高い誘発SCE比が得られ、RSCE/IC₂₀は2.65倍と高い値が得られた。ジクロロベンゼンの3つの異性体についてRSCE/IC₂₀を求めたところ、*o*-DCBは-S9で1.23倍、+S9で1.40倍、*m*-DCBは-S9で1.22倍、+S9で1.24倍、*p*-DCBは-S9で1.31倍、+S9で1.24倍という結果が得られた。SCE分析において処理群の平均SCE頻度が対照の1.2倍を越す値であれば、統計学的には有意な値であることが確認されていることから、RSCE/IC₂₀の値が1.2倍以上を陽性と判定できる根拠となるであろう。以上のことからジクロロベンゼンの3つの異性体はすべて弱いながら遺伝毒性は陽性で異性体間に遺伝毒性の強弱に顕著な差はないものと評価できる。

今回、試みた培養細胞への細胞毒性とSCE分析法を組み合わせた遺伝毒性評価法は、試料化合物が培養細胞に対して何らかの影響 (毒性作用) を示す暴露濃度領域で判定する点で、これまでガス状化合物の遺伝毒性試験で行われてきた可能性がある無作用濃度領域での遺伝毒性の判定を回避できるとともに、遺伝毒性の強弱を数値化することにより遺伝毒性物質間の強弱を比較評価できる可能性が示唆された。今後、既存の他の揮発性、あるいはガス状化合物についても本システムにより遺伝毒性の再評価を試み、データを蓄積するとともに、動物実験による発がん性データ及びヒトの疫学データとの比較検討を行う必要がある。

2.2.6 リン酸トリス(2-クロロエチル)の行動影響

リン酸トリス(2-クロロエチル)(TCEP)はプラスチックの難燃剤として工業的に大量に用いられている有機塩素化合物である。以前より産業場面におけるこの物質の健康影響は懸念されていた。近年の調査により、この物質の環境中への漏出が起っており、国内の河川の水及び底質の汚染、及び魚類の汚染が進行していることが示された。

TCEPによる環境汚染の進行により、この物質の健康影響が懸念されるものの、TCEPの毒性に関してはあまり知られていない。*in vitro*の試験により、TCEPは弱いながら脳及び血中のアセチルコリンエステラーゼ(アセチルコリン分解酵素)阻害作用を有することが知られていた。TCEPは脂溶性が高く、多くの有機溶媒に溶けることから、中枢神経系に影響を及ぼすであろうことは容易に推察される。TCEPをラットに末梢投与するとてんかん様痙攣が生じることが報告され、さらに7日後に海馬CA1野錐体細胞が脱落すること、及び記憶障害が起こることが知られている。このような神経毒性について種差、性差があることが知られており、マウス(B6C3F1)ではこのような神経毒性は見いだされていず、また雌ラットの方が雄ラットよりも神経毒性に対して鋭敏であることが示されている。2年に及ぶ慢性投与の実験により、TCEPにより雌ラットの脳で、灰白質及び白質で神経細胞の障害が広範に観察され、また雄ラットでも程度はより弱いものの同様の所見が得られている。他方、同様の実験はB6C3F1マウスでも行われたが、このような神経障害は認められていない。

TCEPのこのような神経毒性の機序に関しては、ごくわずかな事実が知られているに過ぎない。上述したようにTCEPには弱いアセチルコリンエステラーゼ阻害作用が示されている。高用量のアトロピンの前処置が、TCEPによる海馬CA1野錐体細胞の障害を防ぐことが知られており、TCEPのこのような神経毒性がアセチルコリン作動薬としての作用に由来することが示唆されている。一方、長時間に及ぶ痙攣が、脳虚血の場合と同様に、海馬CA1野錐体細胞の脱落を起こしている可能性もある。すなわち抗痙攣作用を有するクロルジアゼポキサイドの前処理が海馬における神経細胞の障害を防ぐことが知られている。

しかしながら、TCEPの毒性についてはいまだ十分な知見が得られているとは言えず、その全容は未解明であ

る。また文献的にはTCEPは間接的なアセチルコリン作動薬としての作用を有するようであるが、それが主作用なのか、それとも他の作用をも有するのかは明らかではない。そのためTCEPの生体影響の評価は現時点では困難である。

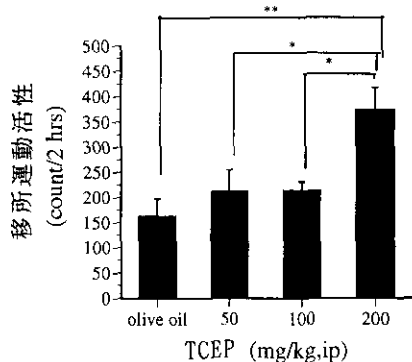
中枢神経系に作用を有する化学物質(向精神薬)は、一般に中枢刺激薬と中枢抑制薬に大きく分けられる。痙攣誘発は中枢興奮を意味するので、TCEPは中枢刺激薬と考えられるが、それだけでは証拠は不十分である。ラットやマウスの示す自発運動活性は化学物質が興奮性か抑制性かを判断するための基本的な指標である。原則的に中枢刺激薬はラット、マウスの自発運動活性を増加させ、中枢抑制薬は逆に抑制する。そこで本研究では、マウスの平面上の自発運動活性(移所運動活性)を指標として、それに及ぼすTCEPの作用について検討した。

B6C3F1マウスはTCEPに対して耐性を示す。しかし、予備実験の結果、TCEPはICR系マウスに痙攣を誘発することが明らかとなった。100 mg/kg以下のTCEPはICR系マウスに痙攣を起こさせない。しかし200 mg/kgで軽度の、300 mg/kgで明らかな痙攣をICR系マウスは示した。そこで200 mg/kg以下のTCEPがICR系マウスの移所運動活性に及ぼす影響を調べた。

50~200 mg/kgのTRCPをICR系マウスの腹腔内に投与したところ、200mg/kgによりオリーブ油投与時よりも有意に高い移所運動活性が認められた(図19(a))。図19(b)はTCEP投与後の10分当たりの移所運動活性の経過を示している。ICR系マウスは実験装置に入れられた直後は高い移所運動活性を示したが、それはやがて低下した(適応)。これらの動物にオリーブ油を投与しても移所運動活性に大きな変化は見られなかった。他方50~200 mg/kgのTCEPを投与した時、直後に移所運動活性の増加が観察された。この増加は用量に依存しており、100 および200 mg/kgで有意に高かった。その後、増加した移所運動活性は速やかに対照レベルにもどり、TCEPの移所運動活性増加作用は持続時間が短いことが示された。肉眼観察によると100 mg/kgを投与された動物では痙攣は観察されず、200 mg/kgの投与では20~30分後に軽度の痙攣が観察された。従って、TCEPのマウス移所運動活性増加作用は痙攣誘発の結果ではない。以上の事実は、TCEPは基本的に中枢刺激薬であることを示している。

上述したように、TCEPにはアセチルコリン作動薬としての作用があるものと期待される。例えばアセチルコ

(a)



(b)

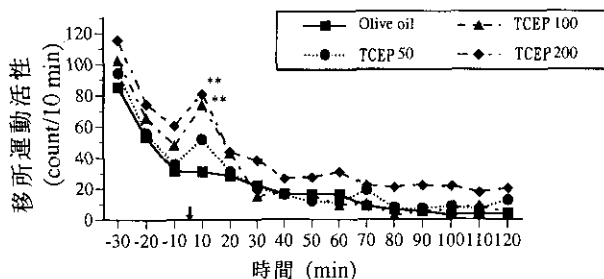


図19 (a)オリーブ油あるいはTCEP投与50, 100, 200mg/kgのICR系マウスの投与後2時間の移所運動活性の平均値(棒グラフ)と標準誤差 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

(b)オリーブ油あるいはTCEP投与前及びマウスの移所運動活性の時間経過
矢印は投与時点を示す。** : $p < 0.01$

リン作動薬のニコチンは、ラットやマウスの自発運動活性を増加させ、この作用はニコチン性コリン拮抗薬のメカミルアミンで拮抗される。そこで、TCEPとメカミルアミンの併用を行った。メカミルアミンはTCEPの移所運動活性増加作用を拮抗しなかった。従って、TCEPの移所運動活性増加作用はニコチン性コリン作動薬としての作用に由来しないものと考えられる。次いで、ムスカリン性コリン拮抗薬のスコポラミンとTCEPの併用をした。スコポラミンはマウスの移所運動活性を増加させるが、TCEPとスコポラミンの併用により、それぞれの単独投与時よりも高い移所運動活性が観察された(相加効果)。従って、TCEPの作用はムスカリン性コリン作動薬としての作用にも由来しないものと考えられる。以上、TCEPの移所運動活性増加作用はアセチルコリン作動薬としての作用に由来しないことが判明した。

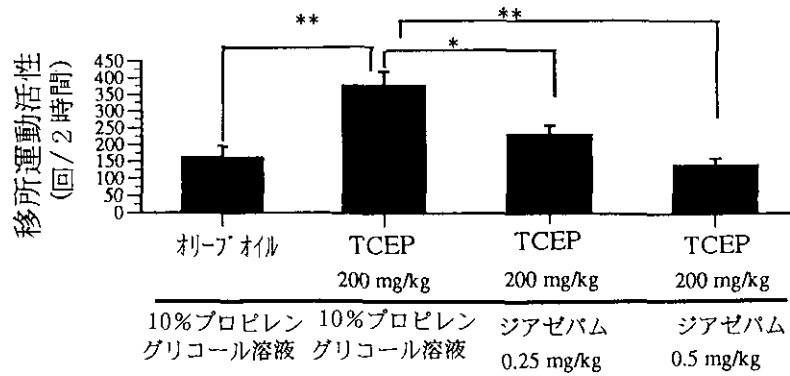
TCEPの神経障害作用はベンゾジアゼピン作動薬のクロルジアゼポキサイドにより減弱されることが知られている。ベンゾジアゼピン作動薬はベンゾジアゼピン-GABA (γ-アミノ酪酸) 受容体複合体に作用し、GABAの作用を増強する。従って、TCEPにGABA拮抗薬としての作用のあることが推察された。そこでGABA関連薬物とTRCPとの併用を次に行い、他の移所運動活性増加作用を有する薬物(スコポラミン、アポモルフィン)との比較を行った。

TCEPの移所運動活性増加作用は0.5mg/kgのジアゼパム(ベンゾジアゼピン作動薬)との併用により対照レベルまで減弱された(図20a)。他方スコポラミン(アセチルコリン拮抗薬)の移所運動増加作用は同用量のジアゼパムによりなら影響を受けなかった。アポモルフィン(ドーパミン作動薬)の移所運動活性増加作用は0.5mg/kgのジアゼパムにより若干抑制されたにすぎなかった。以上の知見は、TCEPの移所運動活性増加作用は、アセチルコリン拮抗薬やドーパミン作動薬のそれと異なり、ジアゼパムにより特異的に減弱されるものであることを示している。この事実はTCEPにはGABA拮抗薬としての作用があることを示唆している。

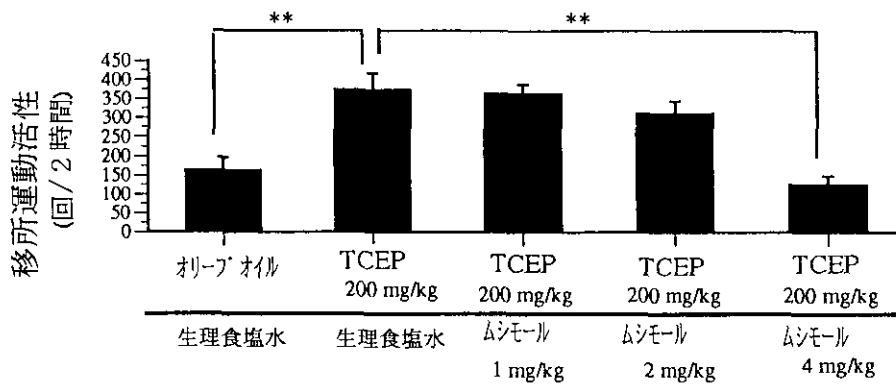
この可能性をさらに確かめるために、GABA作動薬とTCEPの併用を行い、スコポラミンとアポモルフィンの場合と比較した。GABA_A受容体作動薬のムシモールとTCEPを併用したところ、TCEPの移所運動活性増加作用は4mg/kgのムシモールにより対照レベルまで減弱された(図20b)。一方同用量のムシモールはスコポラミンの移所運動活性増加作用をむしろ増強させる傾向を示した。従って、TCEPの移所運動活性増加作用はスコポラミンのそれと異なり、ムシモールによって比較的的特異的に減弱されることが示された。他方、アポモルフィンの移所運動活性増加作用はムシモールにより完全に抑制された。この時ICR系マウスはカタレプシー様の不動状態を示した。従って、TCEPの作用はドーパミン作動薬としての作用とも異なることが判明した。一方、GABA神経とドーパミン神経には相互関連があり、GABA関連薬はこの相互関連を通じてドーパミン神経の機能に影響を及ぼし得ることが示された。

TCEPとバクロフェン(GABA_B作動薬)を併用したところ、TCEPの移所運動活性増加作用は2mg/kgのバクロフェンにより対照レベルまで減弱された(図20c)。他方スコポラミンの移所運動活性増加作用は同用量の

(a)



(b)



(c)

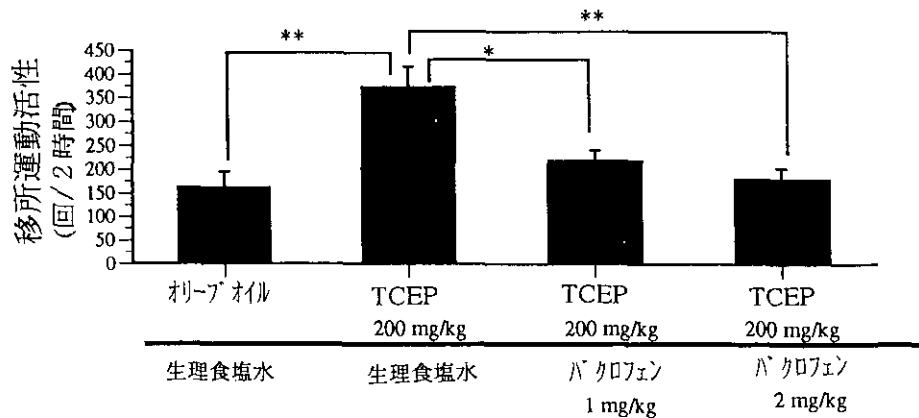


図20 (a)TCEPとジアゼパムの併用の影響
(b)TCEPとムシモールの併用の影響
(c)TCEPとバクロフェンの併用の影響

バクロフェンにより増強された。従って、この点でも TCEPの作用はスコポラミンのそれとは異なることを示している。一方、アポモルフィンの移所運動活性増加作用はバクロフェンにより減弱され、GABA神経とドーパ

ミン神経の相互関連が確認された。

以上TCEPの移所運動活性増加作用は、ジアゼパム、ムシモール及びバクロフェンにより比較的特異的に減弱されることが判明した。この事実は、TCEPはGABA拮

抗薬としての作用を有することを示している。事実、既知のGABA拮抗薬（例えばピククリン）は痙攣誘発作用を有しており、TCEPがICR系マウスやラットで痙攣を誘発するという事実とも矛盾しない。他方、上述の実験によりGABA神経とドーパミン神経とが機能的に関連していることが判明した。齧歯類の自発運動活性の制御にドーパミン神経が重要な役割を果たしていることは、以前より多くの研究に示されていた。今回の実験成績はそれを確認するとともに、GABA神経がドーパミン神経との連絡を通して自発運動活性に影響を及ぼし得ることを示している。今回の成績はTCEPがGABA拮抗薬としての作用があることを示したが、この作用がGABA-ドーパミン関連を通じてICRマウスの運動活性を増加させるものと考えられる。

以上の実験成績より、TCEPの中樞神経系への影響はGABA拮抗作用が明確であることが、マウスの行動影響の研究から示された。GABA拮抗作用は痙攣を誘発するので、TCEPの神経障害作用は、TCEPにより痙攣が誘発され呼吸困難が生じる結果、脳虚血時と同様の状態が脳に起こり、脳虚血と同様の機序により神経細胞死がおこるものと考えられる。

2.3 環境中有機塩素化合物の総合影響評価

2.3.1 国内生産量から推定した有機塩素化合物の環境媒体への分配

化審法に基づいて規制がなされている化学物質の多くはPCBを始めとする有機塩素化合物が多く、化合物の安定性、殺菌殺虫作用といった有機塩素化合物の有用性が難分解性、有毒性といった環境汚染につながっていると考えられる。

そこで有機塩素化合物の環境への年間放出量を推定することは環境汚染の予測に有用であると考えられる。しかし環境中に有機塩素化合物が日本全体でどのくらい放出されるかを推定することは、環境濃度分析からだけでは推定が困難である。そこで国内の含塩素製品の生産量から、日本国内に有機塩素化合物が1年にどのくらい放出されるかを推定した。有機塩素化合物は天然のものは非常に少なく、大部分は工業的に合成されたものなので、塩素を出発点とする化学工業品統計の有機塩素化合物の生産量は、国内で使用される有機塩素化合物生産量をほとんどカバーしていると考えた。これを基に主要有機塩素化合物が環境に放出される量を推定し環境運命モデル

計算の結果を使い環境媒体の大気、水、土壌、底質にどのように分配されるかを推定し、実測されている環境濃度との比較を行った。

(1) 有機塩素化合物の国内生産量

有機塩素化合物生産量の基としたのは、平成4年3月に日本ソーダ工業会より出された「塩素使用等の実態に関する調査研究報告書」である。報告書によると塩素を出発点として種々の工業製品が生産されているが、そのうち塩素を含む工業製品を揮発性有機塩素化合物、半揮発性有機塩素化合物、高分子物質、無機化合物に分けた。これら製品の環境への放出を推定するために、生産量の多い揮発性化合物20種、半揮発性化合物17種、高分子物質6種、無機化合物10種を報告書に従い中間体として使用される量、製品として、また輸出される量に分けた。塩化水素（塩酸）は含塩素製品の原料にもなり、また生産過程で発生して最終製品では除かれたり、再使用もあり、計算が複雑になるので塩化水素（塩酸）と食塩は除いた。

最終製品としては塩化ビニル物質など高分子に含まれる塩素量が多く、64%近くを占めている。揮発性化合物の90%は合成反応の中間体として生産されている。無機化合物の最終製品は85%は水処理、漂白、殺菌に使用されるものである。

(2) 環境への放出量推定

1) 揮発性および半揮発性化合物

中間体として使用される化合物は生産量の2%、輸出されるものはその輸送その他の過程で5%が、製品として生産されたものは、最終的に環境に50%が放出されたとした。また農薬は100%が環境に放出されたとした。

2) 高分子物質

塩化ビニルなどの高分子物質は使用の寿命が1年以上のものも多いので、環境に放出される量の推定は難しいが、文献に従って塩化ビニル製品生産量に対する廃棄物発生量の割合(1989年の値)24.2%を使用し、これを環境放出量とした。

3) 無機化合物

無機塩素化合物最終製品量の85%は、漂白、殺菌、水処理に使用される。含塩素無機化合物による漂白、殺菌、水処理はクロロホルム等の有機塩素化合物を生成する。有機塩素化合物生成量は、漂白殺菌や水処理の条件や無機化合物の種類によりさまざまであるが、ここでは無機

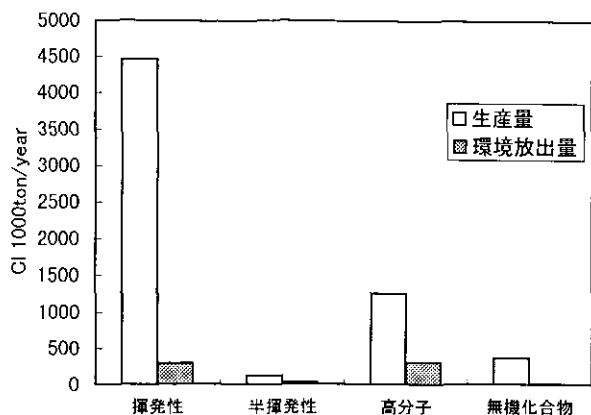


図21 国内の有機塩素化合物生産量と環境放出量
(1000ton塩素/年)

化合物量(塩素量)の3%が有機塩素化合物になるとした。無機化合物に関しては、最終製品量だけを考慮した。

ここまでの結果を図21に示した。塩素量で表した生産量は、揮発性化合物が多いが、合成反応中間体として使用される割合が多いため、環境放出量としては揮発性化合物と高分子物質で同程度の量となった。

図21では高分子物質の環境放出量としては、物質の廃棄量としたが、次に環境に放出された有機塩素化合物がどの環境媒体(大気、水、土壌、底質)に分配されていくかを推定するにあたっては、廃棄高分子物質が全部焼却されると仮定した。塩化ビニル樹脂の塩素は焼却により大部分が塩化水素になるが、焼却により生成する低分子量の有機塩素化合物を考慮した。焼却で生成する低分子量の有機塩素化合物は塩素量で廃棄量の0.5%とし、生成化合物は塩化ビニルがそのうちの90.7%、その他にジクロロベンゼン、トリクロロベンゼン、テトラクロロベンゼン、ペンタクロロベンゼン、ヘキサクロロベンゼン、クロロスチレンが生成されるとした。

漂白殺菌などの結果、生成する有機塩素化合物は24.4%塩素量がクロロホルムとし、残りをnonpurgeableの有機塩素化合物(NPOCl)とした。

(3) 有機塩素化合物の環境媒体への分配

環境に放出された揮発性有機塩素化合物20種、半揮発性化合物17種、高分子焼却由来物質7種、漂白殺菌由来物質2種が、最終的に大気、水、土壌、底質のどの媒体にどれ位の量が分配されていくかを、運命モデルの計算を使って推定した。使用したモデルは平衡モデルである

D. Mackeyらのfugacity modelのレベルIIIである。fugacity modelのレベルIIIでは大気、水、土壌、底質の4つの媒体を考え、それぞれの媒体内での分解反応、媒体間の移送も取り入れた計算をしている。その結果を利用して有機塩素化合物が環境に放出された時、大気、水、土壌、底質にどのような塩素重量比で分配されるかを見ることにした。

放出速度比は農薬は大気/水/土壌に50/250/700の比で、イソシアヌル酸と漂白殺菌から生成する物質は全部水に放出され、高分子焼却による生成物質は100%大気に放出、それ以外の物質は大気/水/土壌に600/300/100の割合で放出されると仮定した。

計算されていない物質は、分子構造、物性(沸点、Kow、溶解度、蒸気圧)が似ていて計算可能な化合物の値を採用した。また漂白殺菌からの生成物質NPOClは、特定されていない物質の総和である。これらNPOClが100%水に放出され、NPOClの半分はクロロフェノール、半分はエステルと仮定し分配比を出した。

それぞれの物質の環境媒体への分配比を、揮発性、半揮発性、高分子、漂白殺菌由来の化合物でまとめ塩素量を総計したものが、図22である。高分子物質は焼却すると環境に出てくる低分子量有機塩素化合物量が少ないため、放出有機塩素量は揮発性化合物が大部分(89%)である。大気や水中に放出された有機塩素化合物の中身もそれぞれ90%、62%が揮発性有機塩素化合物由来のものである。また塩素総重量は、大気と水にそれぞれ66%、29%で大部分が大気と水にいくと計算される。

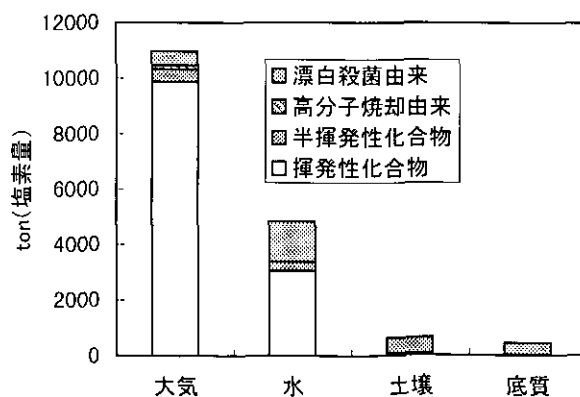


図22 生産量から推定した有機塩素化合物の定常状態での環境中存在量

(4) 有機塩素化合物，有機塩素量の実測値との比較

モデル計算から算出した有機塩素化合物の環境放出量を実際に環境で検出されている濃度と比較した。実測値としては，日本全体の平均濃度に近い値が必要である。

平成7年度環境庁環境保健部保健調査室から発行されている「化学物質と環境」を基にして，国内の大気中の揮発性有機塩素化合物濃度調査が行われている15物質のうち生物起源の放出がある塩化メチルを除いた14物質をC1，トリクロロエチレン/テトラクロロエチレン/1,1,1-トリクロロエタン，フロン類，および工場で使用される割合の多いC2～C3類（塩化ビニル，1,2-ジクロロエタン，1,1-ジクロロエチレン，ジクロロプロパン）の4種

に分けて塩素量で表すと図23aになる。同じ物質の生産量から推定した環境放出量比を図23bに示した。生産量からの推定ではクロロホルムには漂白殺菌由来，塩化ビニルには高分子物質焼却由来の大気放出量も加えた。生産量から推定したものに比べてC2～C3が実測大気濃度で低いのはこれらの大部分が工場など制限された場所での使用が多いため一般環境濃度は低くなっていると考えられる。また1,1,1-トリクロロエタンは1992年のモントリオール議定書締結以来，生産量は激減している。生産量は1990年度のものを使用し，大気や水中の1,1,1-トリクロロエタンの実測は1994年なので生産量からの推定に比べ実測のトリクロロエチレン/テトラクロロエチレン/1,1,1-トリクロロエタンの量が少なくなっている。

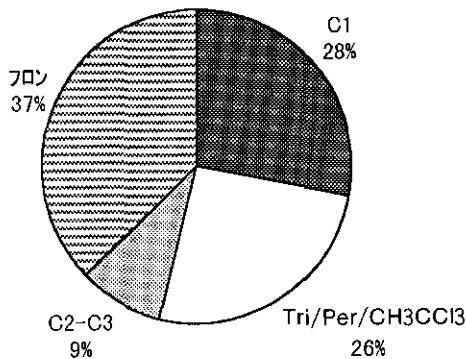
水中に放出された揮発性有機塩素化合物は，我々が1994年に調査した隅田川と古綾瀬川，綾瀬川の16地点の結果と比較した。比較した物質はC1（クロロホルム，四塩化炭素，ジクロロメタン），トリクロロエチレン/テトラクロロエチレン/1,1,1-トリクロロエタンとC2～C3（1,2-ジクロロエタン，1,2-ジクロロプロパン）である。実測からモデル計算のずれは，大気の場合と同じ傾向を示した。

(5) 半揮発性化合物，漂白殺菌由来物質の比較

半揮発性有機塩素化合物に関しては，我々の都市河川調査では環境でかなり安定（クロロベンゼン，ジクロロベンゼン，クロロ酢酸）や使用時期が集中する農薬（ベンチオカーブ）以外は水でも底質でもほとんど検出されなかった。多くの河川底質で検出されるのは生産量の多いジクロロベンゼンの他は殺菌剤（トリクロサン，トリクロカルバン），TCEPリン酸トリス（2-クロロエチル）のような生産量は少ないが底質で安定なものや現在は生産使用禁止になっているPCBであり，生産量から推定した放出量を説明していないことになった。

漂白殺菌由来の有機塩素化合物NPOCIはさまざまな物質から構成されていると考えられる。そこでTOX（全有機ハロゲン量）またはEOX（抽出有機ハロゲン量）からGCMSで検出された揮発性および半揮発性有機塩素化合物を除いた量の大部分が漂白殺菌由来のものと考えた。表19，20に河川水と都市河川底質の揮発性，半揮発性，漂白殺菌由来に分けた時の塩素量の割合を示した。生産量から推定したものに比べて漂白殺菌由来が非常に大きくなっている。その原因としては，実測値が大都市周辺で漂白殺菌の使用が大きいこと，GCMSで測定できない

(a)



(b)

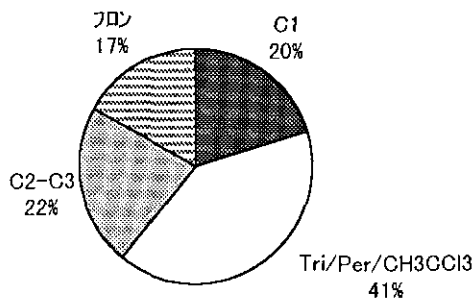


図23 揮発性有機塩素化合物の大気中濃度比(a)と生産量から推定した大気中揮発性有機塩素化合物存在量比(b)（塩素量換算）

表19 河川水中の有機塩素量比（綾瀬川6地点，隅田川5地点平均）

	綾瀬川93/4	隅田川93/7	モデル計算
揮発性化合物由来	0.14	0.12	0.63
半揮発性化合物由来	0.006	0.007	0.07
漂白殺菌由来	0.85	0.873	0.3

表20 12都市河川底質20地点平均有機塩素量比

	20地点平均	モデル計算
半揮発性化合物由来	0.01	0.04
漂白殺菌由来	0.99	0.94

半揮発性化合物の存在，底質では特に実測したものが単年の堆積物でなく安定な物質の多年の総和を測っていることによると考えられる。

（6）結論

生産量から推定した環境への放出量と，この放出量からモデル計算した有機塩素化合物の環境媒体中の定常存在量から，リスクアセスメントやリスク管理のためにどのような知見が得られるかを考えた。

揮発性化合物は，図23に示すように実測濃度の比を反映し，これは国内の生産量を調整することからリスク管理が可能であることを示している。

半揮発性化合物の水や底質での調査結果は，水や底質で安定な化合物のみが検出されることを示した。生産量の少ない半揮発性化合物に対しては環境への放出も限定された地域になると考えられ，使用地域でのモニタリング，リスク管理が必要であろう。また毒性が強く環境で安定な物質は生産量と関係なく長期間の監視が必要であることを示している。

高分子由来の焼却により生成する低分子量有機塩素化合物の環境放出量は少ないと見積もられたが，廃棄物焼却場周辺でのリスクアセスメント，管理が必要であろう。漂白殺菌由来物質は河川水，河川底質とも実測値もモデル値も大きい。都市河川では漂白殺菌由来物質は有機塩素化合物として大きな部分を占めているので，生態系を含めたリスクアセスメントのためにもNPOClの毒性評価はもう少しはっきりさせる必要があると思われる。

2.3.2 化学物質のリスク評価の方法論の開発

ダイオキシンの環境中ダイオキシンが大きな社会問題

となっている。そのリスク評価のためにも毒性発現機構の解明が急がれる。細胞内に入ったダイオキシンはAhレセプターと結合して複合体を形成し，核内に移行して異常な遺伝子発現を促進すると考えられている。しかし，その機構解明に必要な最も基本的なデータ，すなわち構造をはじめとする種々の物理量が不足している。一方生物学の諸現象を電子のレベルで考えていく時代がきたとして，多くの研究者が生体分子の電子状態とその機能を関連づけることを行うようになってきた。コンピューターの進歩によりいわゆる量子生物学（Quantum Biology）にも新たな動きが出つつある。計算の対象になりうる分子の大きさも格段に大きくなり，生体関連物質の分子軌道法のアプローチが可能になってきた。特に分子構造の研究分野は，この進歩の恩恵を受けるようになった。

このような状況の中，化学物質のリスク評価の方法論の一つとして，量子化学的（ab initio の分子軌道法）アプローチによるリスク評価方法の開発に関わるプロジェクト研究を平成4年度から始めた。本研究で得られた主な結果を下記の3項目について概略する。

（1）2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の構造とエネルギー

ab initio 分子軌道法に基づく基本的な波動関数であるHF法に加えて，電子相関を考慮した波動関数として，Becke3LYP法，MP法，QCISD法などを用い，平衡構造，全電子エネルギー等を求めた。基底関数は，Popleらの6-31G，Dunning-Huzinagaのcc-pVDZ，及びaug-cc-pVDZを用いた。

MP2/6-31Gによる計算で得られた2,3,7,8-TCDDの平衡構造（図24）を表21に示す。2,3,7,8-TCDDは平面構造をもつことがわかった。O-CおよびC-Cl間の距離を含めてすべての構造パラメーターは，電子相関を考慮した波動関数での計算により，実験値と非常によく一致した。

TCDDの2つの酸素原子を軸としてベンゼン環の折れ曲がりやすさを調べるため，平面構造からのずれに関するポテンシャルエネルギー変化を各計算レベルで求めた（図25）。折れ曲がりに際して，エネルギー変化は非常に小さく，ベンゼン環の構造変化，およびO-C間距離の変化もほとんどなく，2,3,7,8-TCDDは非常に折れ曲がりやすい分子であることがわかった。また，理論的振動解析によって，折れ曲がりの振動モードを明らかにすることができた。

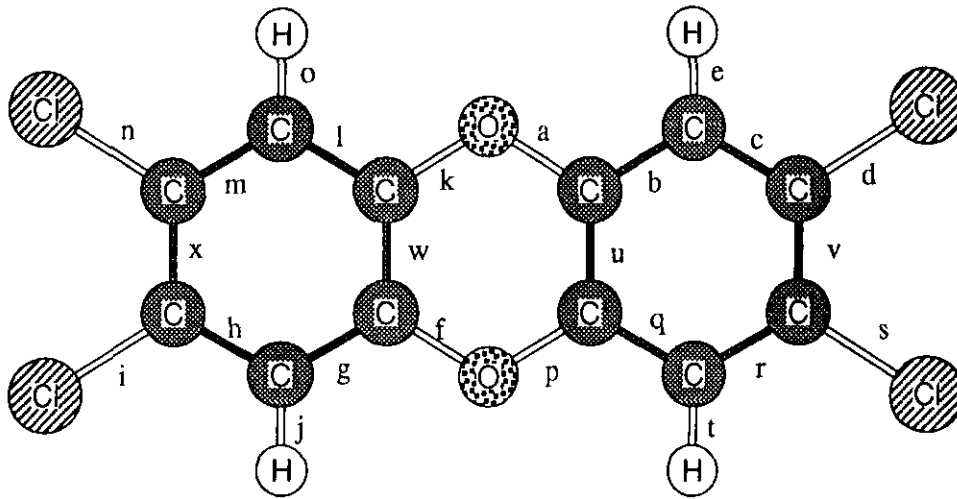


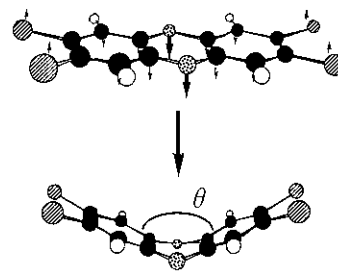
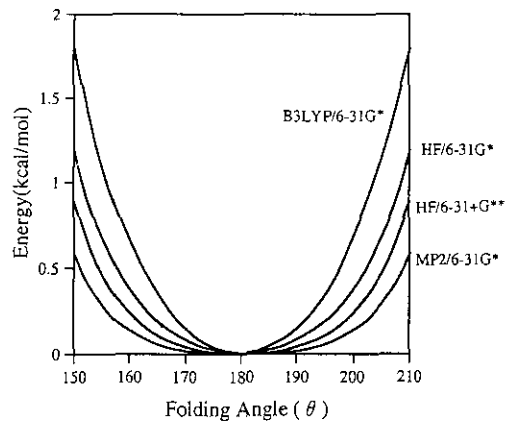
図24 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンの構造

表21 三種のRHFレベルab initio MOに於る2,3,7,8-ダイオキシ分子の最適化された構造

	6-31G	6-31G*	6-31G*(+0,C)	exptl
a, (f, k, p)	1.385	1.360	1.361	1.379
b, (g, l, q)	1.375	1.375	1.376	1.377
c, (h, m, r)	1.384	1.386	1.386	1.384
d, (i, n, s)	1.791	1.731	1.732	1.728
e, (j, o, t)	1.069	1.072	1.072	1.01
u, (w)	1.383	1.384	1.384	1.387
v, (x)	1.380	1.385	1.386	1.385
ab (=fg, kl, pq)	118.7	118.4	118.4	117.6
bc (=gh, lm, qr)	119.4	120.2	120.2	121
cd (=hi, mn, rs)	117.9	118.2	118.2	118.9
be (=gj, lo, qt)	119.5	119.2	119.3	119
au (=fw, kw, pu)	120.7	121.6	121.6	122.2
bu (=gw, lw, qu)	120.4	120.0	120.1	
cv (=hx, mx, rv)	120.2	119.8	119.8	
ak (=fp)	118.2	116.8	116.9	115.7

結合長さ(単位, オングストローム), 結合角(単位, 度)。

イオン化ポテンシャル (IP), 電子親和力 (EA) の値は, 毒性発現の機構を解析する上で重要である。しかしながら, それらの実験値を得ることは, 強い毒性のために非常に困難であり, 報告されているものは数少ない。そこで, 理論的にIP, EAを算出させるため, 電子相関を考慮した波動関数での計算を行い, 実験値との比較を行った。ダイオキシシ異性体 (PCDD) の種々の波動関数に基づいて算出した Adiabatic IPを求めた。これらの値の中, 2,3,7,8-TCDDのIPは8.0eV程度であると予想される。



2つのベンゼン環の折れ曲がりの構造変化 Butterfly Frapping Motion

図25 2,3,7,8-TCDDのベンゼン環の折れ曲がりに対するポテンシャルエネルギー曲線

(2) ダイオキシシとジベンゾフランの毒性(変異原性指数)と構造の相関関係

毒性は吸収, 生体内代謝, 排泄等での機序を含むが, PolandはPCDD類は生体内酵素に影響を及ぼし, 酵素誘導を用いて毒性の定量化が可能であることを示した。Polychlorodibenzofuran (PCDF)もPCDDと化学構造が類似する有機塩素系化合物である。両者とも代表的な生化学反応は, AHH活性の誘導である。PCDF, PCDDは

表22 毒性と毒性因子（パラメータ）のニューラルネットワーク法による解析

	IP	HF	DM	LUMO	Cl数	dioxin(+)/furan(-)
Receptor Binding	14.823	0.158	-0.540	-7.572	-2.947	-9.164
AHH	20.103	-0.082	-1.119	-9.995	-3.042	-2.763
EROD	21.086	-0.059	-0.753	-6.898	-2.188	-3.570

IP: イオン化エネルギー (eV) HF: 生成熱 (kcal/mol) DM: 双極子能率 (debye) LUMO: 最低空軌道準位 (eV)

結合する塩素原子の数と位置による異性体により毒性やAHH誘導性が異なるが、異性体と毒性の間には高い相関性が観察されている。AHHは細胞内のチトクロームP-450などにより構成される酵素複合体である。2,3,7,8-TCDDは代表的なAHH誘導剤である3-メチルコランズレンよりも約30,000倍のAHH誘導剤を有する。また、2,3,7,8-四塩化-ジベンゾフラン(TCDF)もAHH誘導性が高く、2,3,7,8の位置に塩素が結合していても六塩化体では酵素誘導性が低下する。PCDFやPCDD等には、AHH誘導性を示す最適な構造、最適な大きさがあるようである。

以上のような報告を基にし、我々は薬物の構造活性相関において現在のところ最も有効な方法であるニューラルネットワーク法を用い、14種のPCDFと8種のPCDDの異性体と毒性の構造活性相関を調べた。イオン化ポテンシャル(IP)、生成熱(HF)、双極子能率(DM)、最低空軌道準位(LUMO)、塩素原子の数に対し解析を行った。表22において数値の絶対値の大きい方が毒性への寄与が大きく、正の値は正の、また負の値は逆相関を示す。3種の生物活性値に対してはIP値とLUMOの準位が毒性に大きく関与することがわかる。それに対し生成熱および双極子能率は活性化には関係なく、Cl原子数も活性への関与は弱い。PCDD/PCDFの項では、PCDF類を1、PCDD類を2、とした結果、負の相関が得られた。これはPCDF類よりPCDD類が活性化が高いことを示す。IP値は最高被占軌道(HOMO)のエネルギー値を表す。また、LUMOも強く相関することにより、これらの化合物と酵素との結合は電荷移動型錯体形成によるこ

とが、強く示唆される。

(3) クロロプロペン類の分子軌道計算

有機塩素化合物の発がん機構についてはいづらか明らかになりつつあるものの、ほとんど未解決と言ってもよい。今回検討したクロロプロペン類は土壌改良剤としてや、プラスチック工業材料としても広く使われ、その幾つかに発がん性が認められ変異原性も調べられてきた。その結果クロロプロペン類は塩素の置換位置によって2通りの変異原性発現機構があると考えられている。このことを分子レベルで検討するために、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl}$ (1)、 $\text{CH}_2=\text{CCl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ (2)、 $\text{CHCl}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl}$ (3)、 $\text{CHCl}=\text{CCl}-\text{CHCl}_2$ (4)、 $\text{CHCl}=\text{CCl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ (5)、 $\text{CCl}_2=\text{CCl}-\text{CCl}_3$ (6)についてGAUSSIAN90, 92を用いて、分子軌道計算を実行した。各化合物について、考えられる構造異性体すべてについて機構最適化を完全に行った。塩素イオンが取れた時のアリルカチオンについては平面構造の範囲で機構最適化を行った。

主な結果として、1) 炭素原子の電荷の計算結果から、 $\text{C}=\text{C}$ がエポキシ化されやすいことが判明した。また、定量性はないが変異原活性の強いものほど電荷量は大きな値となっている、2) $\text{C}-\text{Cl}$ が加水分解され、 $\text{C}-\text{OH}$ となり、さらに $\text{C}=\text{O}$ になり過程で変異原性を示すと考えられる、3) アリルクロライド類では、塩素原子が取れてできるアリルカチオンが直接核酸塩基を攻撃するという説もあるので、アリルカチオンの計算を行った。クロロプロペンとそれに対応するカチオンが不安定なほど変異原活性が強いという傾向が見られた。

[資料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織（当時）

[A 研究担当者]

地域環境研究グループ

総括研究官	森田 昌敏
上席研究官	三浦 卓・中杉 修身
化学物質健康リスク評価研究チーム	相馬 悠子・米元 純三・白石 寛明・稲葉 一穂・ 梅津 豊司・曾根 秀子・高木 博夫
都市環境影響評価研究チーム	高橋 慎司

化学環境部

動態化学研究室	相馬 光之
計測技術研究室	藤井 敏博
計測管理研究室	安原 昭夫・伊藤 裕康・山本 貴士
化学毒性研究室	白石不二雄・宇野由利子

環境健康部

生体機能研究室	鈴木 明
病態機構研究室	青木 康展・松本 理
保健指標研究室	太田庸起子・國本 学

水圏環境部

水環境質研究室	小沢 秀明
---------	-------

[B 客員研究員]

天沼喜美子	(国立環境研究所非常勤)	(平成7年度)
市川 紘	(星薬科大学)	(平成4～7年度)
梅田 真郷	(東京都臨床医学総合研究所)	(平成6年度)
門上希和夫	(北九州市環境衛生研究所)	(平成5～8年度)
貴戸 東	(北九州市環境科学研究所)	(平成6年度)
後藤佐多良	(東邦大学薬学部)	(平成8年度)
小林 智	(北海道立衛生研究所)	(平成7～8年度)
篠田 裕之	(富山医科薬科大学薬学部)	(平成4～6年度)
鈴木 和夫	(千葉大学薬学部)	(平成4年度)
鈴木 孝治	(慶応義塾大学工学部)	(平成5年度)
丹野 恵一	(神戸市看護大学)	(平成8年度)
局 博一	(東京大学農学部)	(平成4～5年度)
常磐 広明	(立教大学理学部)	(平成6～8年度)
長尾 輝夫	(函館工業高校専門学校)	(平成5～8年度)
中川 靖一	(北里大学薬学部)	(平成7年度)
中西 準子	(東京大学環境安全センター)	(平成4年度)
花田 喜文	(北九州市環境衛生研究所)	(平成4～8年度)
細谷 浩史	(広島大学理学部)	(平成5年度)

三浦 卓	(東京薬科大学生命科学部)	(平成7～8年度)
山岸 皓彦	(北海道大学理学部)	(平成4～5年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

(1) 有機塩素化合物の暴露量評価に関する研究

稲葉一穂・白石寛明・門上希和夫*・花田喜文*・山本貴士・高木博夫・相馬悠子・小林 智*・
曾根秀子

(2) 有機塩素化合物の複合健康影響評価に関する研究

国本 学・曾根秀子・米元純三・白石寛明・稲葉一穂・相馬悠子・小林 智*・青木康展・
松本 理・白石不二雄・梅津豊司

(3) 環境中有機塩素化合物の総合影響評価

藤井敏博・市川 紘*・篠田裕之*・常磐広明*・相馬悠子・稲葉一穂・白石寛明

II 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
[平成4年度] K. Inaba, T. Hirata	Effects of coexisting linear alkylbenzenesulfonates on migration behavior of trichloroethylene in porous media	Environ. Technol.	13	259-265	1992
森田昌俊	有機スズによる環境汚染について	環境化学	2(2)	34-55	1992
Y. Aoki, K. Satoh, K. Sato, K.T. Suzuki	Induction of glutathione S-transferase P-form in primary cultured rat liver parenchymal cells by co-planar polychlorinated biphenyl congeners	Biochem. J.	281	169-179 539-543	1992 1992
M. Matsumoto, Y. Aoki, K.T. Suzuki	Induction of glutathione S- Transferase P-form in rat hepatocytes by coplanar polychlorinated biphenyl congeners and its mechanism	Jpn. J. Toxicol. Environ. Health	39	P-24	1993
化学物質健康リスク 評価研究チーム	先端技術における化学環境の解明に関する研究	国立環境研究所特別研究 報告	SR-10	67p.	1993
J. Yonemoto, H. Shiraishi, Y. Soma	<i>In vitro</i> assessment of teratogenic potential of organotin compounds using rat embryo limb bud cell cultures	Toxicol. Lett.	66(2)	183-191	1993
[平成5年度] 森田昌敏, 上岡真由美, 安原昭夫	母乳中の有機塩素化合物の残留レベル	環境化学	3	797-833	1992
相馬悠子, 白石寛明, 三浦 卓, 田中 敦, 森田昌俊	つくば市における揮発性有機塩素化合物の暴露量評価	日本リスク研究学会誌	5(2)	43-48	1994
M. Matsumoto, Y. Aoki	Induction of glutathione S-Transferase -P by chlorinated biphenyls and dibenzofurans, and inhibitory effect of dexamethasone on the induction	Jpn. J. Toxicol. Environ. Health	40	P-15	1994
[平成6年度] 相馬悠子	環境化学物質とリスクアセスメント	環境衛生	41(6)	11-14	1994
相馬悠子	環境中の有機塩素化合物	Ecochem. News Lett.	(14)	1-2	1994
T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, M. Morita	Imposex and organotin compounds in <i>Thais clavigera</i> and <i>T. bronni</i> in Japan	J. Mar. Biol. Ass. U. K.	74	651-669	1994

発表者	題目	掲載誌	巻(号)	ページ	刊年
T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, S. Yamazaki, M. Morita	Organotin compounds and their effects on aquatic organisms, focusing on imposex in gastro-pods	Main Group Metal Chem.	17(1-4)	81-100	1994
青木康展, 松本 理	PCBによる特異的遺伝子発現	グローバルネット	(42)	28-29	1994
Y. Aoki, M. Matsumoto, K.Tanno, I.Hatayama	Induction of glutathione S-transferase II in mouse liverparenchymal cells by 3453'4'-pentachlorobiphenyl-comparison between C57Bl. strain and DBA strain	Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.	41	33	1995
花田喜文, 門上希和夫, 白石寛明, 今村 清, 鈴木 茂, 長谷川敦子, 村山 等	ガスクロマトグラフィー/質量分析法を用いた環境中の化学物質検索	環境化学	5(1)	47-64	1995
[平成7年度] Inaba K., Shiraishi H., Soma Y.	Effects of salinity, pH and temperature on aqueous solubility of four organotin compounds	Water Res.	29	1415-1417	1995
花田喜文, 門上希和夫, 白石寛明, 今村 清, 鈴木 茂, 長谷川敦子, 村山 等	ガスクロマトグラフィー/質量分析法を用いた環境中の化学物質検索	環境化学	5(1)	47-64	1995
森田昌俊	大気中有害化学物質の計測法	資源環境対策	30(13)	19-22	1995
森田昌俊	環境の質を求めて —有害物質のリスクと微量計測—	Readout	(10)	5-9	1995
山本貴士, 伊藤裕康, 米元純三	有機ハロゲン化合物の分析	ぶんせき	1995(9)	730-736	1995
稲葉一穂, 白石寛明, 相馬悠子	都市中小河川の有機塩素化合物と有機塩素量	国立環境研究所資料 (国立環境研究所研究発表会予稿集)	F-83- '95/ NIES	51	1995
[平成8年度] Fujii T., Tanaka K., Tokiwa H., Soma Y.	Structure, Energy, Vibrational Frequencies, and Potential Energy Curve of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorinated Dibenzo-P-dioxin: Ab Initio Mo Studies	J. Phys. Chem.	100(12)	4810-4814	1996
国本 学, 安原昭夫, 相馬悠子, 中杉修身	哺乳動物培養細胞系を用いた水環境試料の毒性評価	水環境学会誌	19(11)	855-860	1996

発 表 者	題 目	掲 載 誌	卷(号)	ページ	刊年
Clemenson C., Kunimoto M. et al.	MEIC evaluation of acute systemic toxicity for the first 30 reference chemicals:Part II. In vitro results from 68 methods and comparative cytotoxicity analysis	ATLA	24	273-311	1996
K. Inaba, H. Shiraishi, Y. Soma	Analysis of source and material balance of total organic halogen in the polluted Ayase River system, Japan	Toxicol. Environ.Chem.	印刷中		1997
相馬悠子, 白石寛明, 稲葉一穂	国内生産量から推定した有機塩素化合物の年間環境放出量と環境媒体への分配	環境科学会誌	10(3)	245-255	1997

2 口頭発表

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
[平成4年度] 化学物質健康リスク 評価研究チーム	環境中の有害化学物質と毒性評価 －揮発性有機塩素化合物の健康リスク評価、 細胞毒性評価－ 【先端技術における化学環境の解明に関する研究】より	国立環境研究所研究発表会	つくば	4. 6
米元純三	胎仔胚芽培養法を用いた有機スズ化合物の 胎仔毒性スクリーニング	第32回日本先天異常学会学 術集会	東 京	4. 7
白石寛明,堀口敏宏, 相馬悠子	食物連鎖からみた潮間帯生物中の有機スズ 濃度	1992年度日本地球化学会年 会	府 中	4.10
堀口敏宏,白石寛明, 清水 誠,	イボニシとレイシガイにおける有機スズ汚 染の環境化学的研究－Ⅲ	平成4年度日本水産学会秋 季大会	下 関	4.10
堀口敏宏,白石寛明, 清水 誠,	イボニシとレイシガイにおける有機スズ汚 染の環境化学的研究－Ⅳ	平成4年度日本水産学会秋 季大会	下 関	4.10
青木康展,松本 理, 鈴木和夫	Coplanar PCBによる肝細胞における胎盤 型 Glutathione-s-transferase (GST-P) 誘 導の Protein Kinase 阻害剤による阻害	第64回日本生化学会大会	福 岡	4.10
松本 理,青木康展, 鈴木和夫	ラット肝細胞におけるコプラナー多塩素化 ビフェニルによる胎盤型グルタチオンS-ト ランスフェラーゼの誘導機構	第18回環境トキシコロジー シンポジウム	東 京	4.10
B. Ekwall, M. Kunimoto, et al.	Further MEIC evaluation:Acute lethal tox- icity in man of reference chemicals nos. 11-30 predicted by 60 <i>in vitro</i> toxicity assays and by oral LD ₅₀ in rodents	6th Int.Workshop <i>in vitro</i> Toxicicol.	De Haan	4.10
相馬悠子,白石寛明, 三浦 卓,田中 敦, 森田昌俊	つくば市における大気中揮発性有機塩素化 合物の暴露量評価	1992年度日本リスク研究学 会第5回研究発表会	京 都	4.11
B. Ekwall, C. Clemedson, M. Kunimoto, et al.	Acute lethal toxicity in man predicted by cytotoxicity in 52 cellular assays and by oral LD ₅₀ tests in rodents for the first 30 MEIC Chemicals	6th Annu. Meet. Jpn. Soc. Alternatives Animal Exp.	Tokyo	4.12
[平成5年度] B. Ekwall, C. Clemedson, M. Kunimoto, et al.	Human dose-responce skin irritancy data for the first 12 MEIC chemicals used to evaluate skin toxicity prediction by 77 cytotoxicity assays	J. F. Morgan Int. Symp. Current Trends: <i>in vitro</i> Skin. Toxicol. & Eye Irri- tancy Test.	Ottawa	5. 4

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
山本貴士, 安原昭夫, 森田昌敏	水試料中のクロロフェノール類の分析法について	第54回分析化学討論会	水 戸	5. 6
Y. Aoki	Exipression of glutathione S-transferase P-from by coplanar polychlorinated biphenyls in primary cultured rat liver parenchymal cells and its suppression by protein kinase inhibitors and dexamethasone	Gorden Res. Conf. Mech. Toxicity	Meriden	5. 7
梅津豊司	短日条件下におけるスナネズミの行動リズムに及ぼすイミプラミンと朝方光照射の影響	第23回日本神経精神薬理学会年会	東 京	5. 9
白石寛明, 宇野誠一, 大槻 晃	魚介類中の農薬分析への超臨界抽出法の適用	日本分析化学会第42年会	広 島	5.10
相馬悠子, 田中 敦	霞ヶ浦底質中の有機塩素化合物の鉛直分布	環境科学会1993年会	つくば	5.11
梅津豊司, 米元純三, 相馬悠子	トリクロロエチレンとテトラクロロエチレンの行動影響	第67回日本産業衛生学会	岡 山	6. 3
米元純三, 梅津豊司, 相馬悠子	胎仔肢芽培養法を用いた有機塩素化合物の発生毒性スクリーニング	第67回日本産業衛生学会	岡 山	6. 3
[平成6年度]				
堀口敏宏, 白石寛明, 清水 誠, 森田昌敏	イボニシとイシガレイにおける有機スズ汚染の環境化学的研究-VII TBTとTPTの濃縮, 蓄積と排泄	平成6年度日本水産学会春季大会	東 京	6. 4
稲葉一穂	種々の塩濃度, 水素イオン濃度, 温度におけるトリブチルスズおよびトリフェニルスズの飽和溶解度の測定	第55回分析化学討論会	富 山	6. 6
花田喜文, 佐藤健司, 門上希和夫, 馬場謙三, 白石寛明	GC/MSを用いた水環境中のベンゼン誘導体の分析	第3回環境化学討論会	大 阪	6. 6
白石寛明, 相馬悠子, 稲葉一穂	古綾瀬川中の新規有機塩素化合物の同定	第3回環境化学討論会	大 阪	6. 6
堀口敏宏, 白石寛明, 清水 誠, 森田昌敏	有機スズ化合物による海洋汚染と海産巻貝類の imposex	第55回分析化学討論会	富 山	6. 6
堀口敏宏, 白石寛明, 清水 誠, 吉永 淳, 柴田康行, 森田昌敏	中腹足目貝類(Mesogastropoda)に対する有機スズ汚染の影響-I マキガイにおける	第3回環境化学討論会	大 阪	6. 6
山本貴士, 伊藤裕康, 安原昭夫, 森田昌敏	母乳試料中のダイオキシン類およびコプラナー PCB の分析法の検討	第3回環境化学討論会	大 阪	6. 6

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
C.Clemedson, M.Kunimoto, B.Ekwall et al.	Comparisons of the toxicity of 30 chemicals as measured by 68 different <i>in vitro</i> toxicity tests	Congr.Cell & Tissue Cult.1994 Meet.Tissue Cult.Assoc.	Research Triangle Park (U.S.A)	6. 6
米元純三	胎仔胚芽培養法を用いた混合物の発生毒性の解析学術集会	第34回日本先天異常学会	高 知	6. 7
青木康展,松本 理, 丹野恵一,畑山一郎	3453'4'- pentachlorinated bipheylによるマウス肝実質細胞における glutathione S-transferase II の誘導-C57BL系とDBA系の比較	第20回環境トキシコロジーシンポジウム	東 京	6. 9
国本 学	培養神経細胞を用いたMEIC30化学物質の毒性試験	バイオアッセイ研究会 第3回研究集会	東 京	6. 9
C. Clemedson, M. Kunimoto, B. Ekwall, et al.	Comparisons of the toxicity of 30 chemicals as measured by 68 different <i>in vitro</i> toxicity tests	8th Int.Workshop <i>in vitro</i> Toxicol.	Kartause Ittingen	6. 9
T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, M. Morita	Imposex in Japanese gastropods and its development by tributyltin and triphenyltin from antifouling paints	North Pac. Mar. Sci. Organ.(PICES)3rd Annu. Meet.	Nemuro	6.10
相馬悠子,白石寛明, 稲葉一穂	都市河川底質中の有機塩素化合物と有機塩素量特性	環境科学会1994年会	つくば	6.11
田中 敦,伊藤裕康, 相馬光之,森田昌敏	霞ヶ浦底質中の塩素化ダイオキシン類の鉛直分布	環境科学会1994年会	つくば	6.11
Y. Aoki, M. Matsumoto, K.Satoh, K.T.Suzuki	Expression of glutathione S-transferase P-form by coplanar polychlorinated biphenyls in primary cultured rat liver parenchymal cells and its suppression by protein kinase inhibitors and dexamethasone	14th Int. Symp. Chlorinated Dioxins, PCB & Related Comp.	Kyoto	6.11
T.Horiguchi, H.Shiraishi, M.Shimizu, S.Yamazaki,M.Morita	Imposex in Japanese gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda): effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints	Int. Conf. Marine Pollut.& Ecotoxicol.	Hong Kong	7. 1
白石寛明	環境水中の塩化メトキシベンゼン類とその起源	日本化学会第69回春季年会	京 都	7. 3
林 繁信,相馬光之, 田中 敦	トリメチルスズ,ジメチルスズイオン交換ヘクトライトの NMR	日本化学会第69回春季年会	京 都	7. 3

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
[平成7年度] 稲葉一穂,白石寛明, 相馬悠子	綾瀬川水域における水中の全有機ハロゲン 量の変動とその発生源分別の試み	第4回環境化学討論会	つくば	7. 6
稲葉一穂,白石寛明, 相馬悠子	都市中小河川の有機塩素化合物と有機塩素 量	国立環境研究所研究発表会	つくば	7. 6
Aoki Y.(Yasunobu)	Phosphorylation of c-Jun stimulated in primary cultured rat hepatocytes by a co- planar polychlorinated biphenyl	Gordon Res. Conf. Mech. Toxicity	Meriden	7. 8
白石寛明, 門上希和夫, 花田喜文,稲葉一穂, 相馬悠子	河川水中の化学物質のイオントラップ質量 分析法による一斉分析	第1回エコトキシコロジー 研究会, バイオアッセイ研 究会合同研究発表会	東 京	7. 9
Tokiwa H.,Tanaka K., Fujii T.,Soma Y.	Ab initio study on 2,3,3,7,8,- tetrachlorinated Dibenzo-p-Dioxin	Molecular Quantum Mech :Methods & Appl.	Cambridge	7. 9
Soma Y.	Women's role as consumers of chemicals in the environmental problems	1st. Int. Symp. Women's Role. Environ. Probl. 21st Century	Seoul	7.10
Soma Y.,Shiraishi H., Inaba K.	Chlorinated organic compounds in urban river sediments	2nd. SETAC World Cong.	Vancouver	7.11
Inaba K.,Shiraishi H., Soma Y.	Source and behavior analysis of total organic halogen pollution in the Ayase River System Japan	Int. Workshop Chem. Safety Res	Tsukuba	8. 1
Sone H., Aoki Y., Yonemoto J.,Soma Y., Shiraishi H.,Inaba K.	Toxicity assesment of chlorinated organic compounds using immortalized- rat hepatic cell lines	化学物質の安全性に関する 国際ワークショップ	Tsukuba	8. 1
Yonemoto J.,Sone H., Soma Y.,Shiraishi H., Inaba K.,Kobayashi S.	Assessment of teratogenic potential of organochlorine compounds detected in urban river water and sediment using rat embryo limb bud cell culture	Int. Workshop Chem. Safety Res.	つくば	8. 1
常盤広明,藤井敏博, 田中謙次,相馬悠子	[2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin の構造と振動解析に関する分子軌道論的研究]	日本薬学会,第116回年会	金 沢	8. 3
[平成8年度] 米元純三,曾根秀子	環境中有機塩素化合物の単独および混合物 の胚芽培養法による胎仔毒性の検索	第66回日本衛生学会総会	札 幌	8. 5
青木康展,松本 理, 畑山一郎	3,3',4,4'-pentachlorinated biphenylによる培 養マウス肝実質細胞における Pi class glu- tathione S-transferase の誘導	第69回日本生化学会大会 第19回日本分子生物学会年 会	札 幌	8. 8

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
小林 智,相馬悠子	パッシブサンプリングー加熱脱着GC/MS法による室内環境中の揮発性有機化合物の測定	室内環境研究会1996年度研究発表会	東 京	8. 9
小林 智,神 和夫, 堀 義宏,相馬悠子	札幌市における冬季の室内環境中の揮発性有機化合物濃度	室内環境研究会1996年度研究発表会	東 京	8. 9
相馬悠子,稲葉一穂, 白石寛明	国内の塩素使用製品生産量から推定した主要有機塩素化合物の環境への放出量	環境科学会1996年会	東 京	8. 9
米元純三,曾根秀子, 相馬悠子	胎仔肢芽培養法を用いた環境中有機塩素化合物の胎仔毒性の検索	第2回バイオアッセイ研究会, エコトキシコロジー研究会	東 京	8. 9
国本 学	哺乳類培養細胞系を用いたバイオアッセイに未来はあるか	第2回バイオアッセイ研究会, エコトキシコロジー研究会	東 京	8. 9
青木康展,松本 理	コプラナー PCBによる初代培養ラット肝実質細胞におけるP型グルタチオンS-トランスフェラーゼの誘導とその調節	第40回日本薬学会関東支部大会	相模湖町	8.10
矢城美代子,常磐広明, 藤井敏博	環境汚染物質ダイオキシンに関する分子軌道論的研究II	1996年分子構造総合討論会	福 岡	8.10
矢城美代子,常磐広明, 藤井敏博	環境汚染物質の定量的構造活性相関ダイオキシンに関する分子軌道論的研究III	日本薬学会,第117回年会	東 京	9. 3
M. Yashiro, T. Fujii, H. Tokiwa	Ab initio MO Study of Environmental Pollutants: Polychlorinated Dibenzoo-Dioxins.	9th Int. Conf. Quantum Chem.	Atlanta	9. 3
白石不二雄, 米元純三,佐野友春, 彼谷邦光	培養細胞へのガス暴露によるジクロロベンゼンの遺伝毒性の検出	第6回環境化学討論会	多摩市	9. 6

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-25-'98

平成10年3月30日発行

編集 国立環境研究所 編集委員会

発行 環境庁 国立環境研究所

〒305-0053 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

〒305-0032 茨城県つくば市竹園2-11-6

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-0053 Japan

March 1998

本報告書は再生紙を使用しています。