シクロデキストリンを用いたトリフェニルスズ化合物の急性毒性の抑制
-線虫を用いたバイオアッセイ-

九州大学大学院　学生会員　○深江信義　　九州大学大学院　　正会員　大石京子
三菱マテリアル(株)　古賀沙織

1. はじめに

トリフェニルスズ化合物(TPT)は生物の付着を防止することから、海外において船底の塗料に利用されていた。しかし、TPT は水生生物に対して極めて強い毒性を発現するため現在では使用が禁止されている。また、疎水性かつ難分解性であるため、船底から溶出した TPT が依然として沿岸域の底泥に蓄積している。これによる水生生物への影響が懸念されており、早急に対処しなければならない(1)。

一方、シクロデキストリン(CD)はグルコースが環状に結合したオリゴ糖で、環を形成するグルコースの数が 6、7、8 個のものをそれぞれα、β、γ-CD と呼び、それぞれ空孔の大きさが異なる。CD は空孔内に疎水性有機物を選択的に包接する分子認識能を有しており、包接したゲスト分子の性質を変化させる事がある。また、CD はグルコースで構成されているため、水溶性で環境負荷が小さい(2)。

本研究では、沿岸域におけるメイオベントス(体長 1mm～32μm)の中で最も優占する種である海産自由生活性線虫 *Prochromadorella* sp.1(以下 線虫)を生物指標として、CD による TPT の急性毒性の抑制効果について検討し、CD の毒性抑制効果を TPT の細胞膜透過性から評価した。

2. 実験方法

2.1 線虫の成虫の生存率に与える TPT と CD の影響

線虫を海産植物プランクトン培地 SWM-III 中で数回の世代交代をするまで培養し、遠心分離した後、上澄液を捨てることで高密度の線虫を得た。これを 96 穴マイクロプレートの 1 ウェルにつき 30μL ずつ分注し、顕微鏡で卵・成虫の数を計測した。卵 6 個以下、生存成虫 5 匹以上 15 匹以下の条件を満たすウェルに TPTCl や CD を含む培地を 30μL ずつ添加し、18、24 時間後に同様に計測し、生存率を求めた。線虫は 25℃、L:D=12:12(hour)の明暗条件下で培養し、添加物の最終濃度は TPT を 5×10^{-6}mol/L、CD を 5×10^{-5}mol/L とした。陽性対照区として無添加の試験区を設けた。図 1 に成虫、卵の写真を示す。

2.2 PAMPA を用いた TPT の膜透過実験

PAMPA(Parallel Artificial Membrane Permeability Assays)は疎水性有機物の膜透過性を測定する手法である。人工脂質膜透過により対象とする疎水性有機物の細胞受動輸送を評価することができ、主に薬物の膜透過性の測定に利用されている。本実験では、BD Gentest™ プレコート PAMPA プレートシステムを用いた。これは予めリン脂質を塗布したフィルタープレートとレシーバープレートからなる 96 ウェルインサートシステムである。

レシーバープレートに TPTCl や CD を添加した生理食塩水を 1 ウェルあたり 300μL ずつ加え、フィルタープレートには生理食塩水を 1 ウェルあたり 200μL ずつ加えた。フィルタープレートをレシーバープレートの上に重ね室温で 5 時間インキュベートした。両プレート内の溶液中の TPT 濃度を 257nm の吸光度から求め、レシーバープレートからフィルタープレートへ移動した TPT 量を算出し、透過速度に換算した。両プレートに加えた生理食塩水のメタノール濃度は 20%とし、初期 pH を 7.4 に調整した。レシーバープレートの初期添加物濃度は TPT を 2×10^{-4}mol/L、CD を 2×10^{-4}mol/L とした。

図 1 海産自由生活性線虫 *Prochromadorella* sp.1 の成虫および卵の写真

キーワード　TPT、シクロデキストリン、海産自由生活性線虫、PAMPA
連絡先　〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744 番地ウエスト 3 号館 9 階 917 九州大学 都市環境工学研究室 Tel092-802-3423

3.　実験結果及び考察

3.1 線虫の成虫の生存率における TPT と CD の影響

実験結果を図 2 に示す。TPT のみを添加した試験区と比較して、CD を添加した試験区のいずれも 18 時間後、24 時間後ともに生存率が高かった。CD には TPT の急性毒性を抑制する効果があり、特にβ-CD の抑制効果が高かった。

CD が TPT の急性毒性を抑制した理由として、CD の空孔の大きさが関係していると考えられる。TPT はベンゼン環を 3 個有しており、CD は空孔にベンゼン環を包接することができる。α-CD は空孔が小さく、ベンゼン環 1 個を浅く包接するため結合力が弱い。β-CD の空孔はベンゼン環 1 個を深く包接できる大きさであり、強く結合することができる。γ-CD は空孔が大きいためベンゼン環 2 個を深く包接できるが、結合力が弱い。つまり、α、γ-CD に対してβ-CD は結合が強いため、TPT の急性毒性の抑制効果が高かったと考えられる。

3.2 TPT の膜透過性に及ぼす CD の効果

PAMPA を用いた膜透過実験の結果を図 3 に示す。TPT の透過速度は 11.6×10^{-6}cm/sec であったのに対して、α、β、γ-CD を添加すると TPT の透過速度はそれぞれ 8.5×10^{-6}cm/sec、5.4×10^{-6}cm/sec、7.8×10^{-6}cm/sec となり、いずれの CD も TPT の人工膜透過を阻害した。CD の膜透過阻害効果はβ ＞ γ ＞ αの順に大きかった。

CD が TPT の透過速度を減少させた理由として、CD の性質が関係していると思われる。細胞膜は疎水性の有機物は透過するが、CD は水溶性の有機物であるため透過することができない。つまり、TPT と CD が吸着もしくは包接錯体を形成すると、TPT の膜透過が CD に妨害される。よって、CD が TPT の透過速度を減少させたと考えられる。

この結果は図 2 に示す線虫の生存率の結果と相関関係にあり、高い生存率を示したβ-CD は、膜透過速度の減少が顕著であった。

4.　結論

本研究により、CD は TPT の膜透過を阻害することで急性毒性を抑制する効果があり、TPT を包接または吸着する可能性が高いことが分かった。今後は CD が TPT に与える効果の発現メカニズムの解明が必要である。

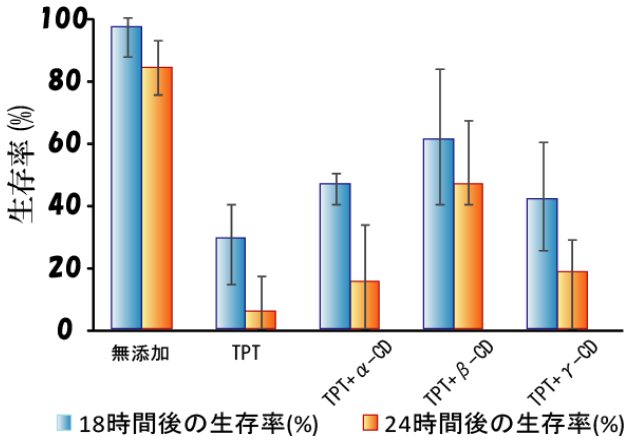

図 2 TPT と CD が線虫の成虫の生存率に与える影響
TPT：5×10^{-6}mol/L　CD：5×10^{-5}mol/L
DMSO 濃度：0.05%

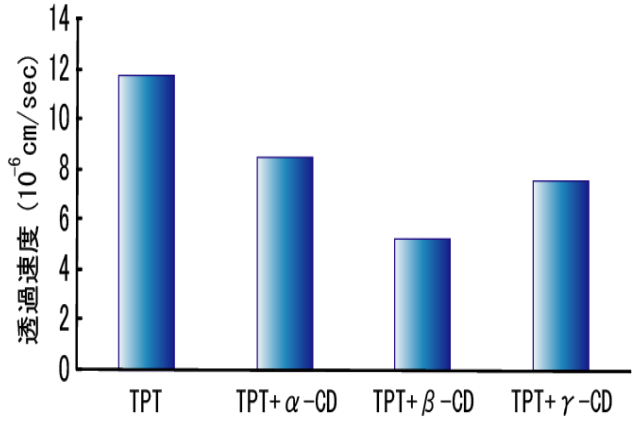

図 3 TPT の膜透過速度に及ぼす CD の効果
TPT：2×10^{-4}mol/L　CD：2×10^{-4} mol/L
メタノール濃度：20%

5.　謝辞

成虫の生存率の実験を行うにあたり、九州大学農学府水産生物環境学研究室の大嶋雄治准教授、島崎洋平助教にご指導いただいた。また、本研究は財団法人 国土技術研究センターに研究開発基金からの助成を受けて実施した。ここに感謝の意を表する。

6.　参考文献

(1) 伊藤靖(2007) 北部九州沿岸におけるトリブチルスズ汚染と海産自由生活性線虫 *Prochromadorella* sp.1 を用いた毒性評価に関する研究　九州大学農学府博士論文

(2) 戸田不二緒 監修・上野昭彦 編集(1995) シクロデキストリン-基礎と応用-　産業図書