

## 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—

埼玉県環境科学国際センター 正会員 ○池田 和弘  
京都大学 正会員 清水 芳久

## 1. 目的

微量有機汚染物質の水生生物細胞膜への分配は、生物への取り込みを支配する重要な因子の一つであり、毒性、蓄積性を評価する上で重要である。特に疎水性の微量有機汚染物質は一般に水中から受動拡散によって細胞内に取り込まれる。その透過流束は、細胞膜への分配係数 ( $P_{mw}$ )、細胞膜内での拡散係数および細胞膜内外での濃度差に比例する。また、細胞膜は麻酔作用を示す毒性物質の標的部位そのものであるため、 $P_{mw}$  は直接的な毒性指標としても重要となる。

一方、水環境中や排水中には溶存有機物質 (DOM) が常に存在し、疎水性有機物質を強く収着し、その挙動に影響を与える。疎水性の強い微量有機汚染物質に対し、DOM はその毒性や生物濃縮性を低減することが報告されている<sup>1)</sup>。われわれは既報<sup>2)</sup>で PAHs (多環式芳香族炭化水素類) に関し、DOM へ収着したものが細胞膜を透過できないことを示し、DOM による生物利用性の低減機構を明らかにした。DOM によりどれだけ生物利用性が低減するか定量することは、微量有機汚染物質の実環境におけるリスクを評価するうえで重要である。

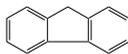
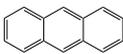
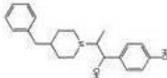
細胞膜への分配係数 ( $P_{mw}$ ) の測定は、医薬品開発における人体への取り込み評価のために行われことはあるが、微量有機汚染物質に対してはあまり精力的には行われていない。これは、リポソームなどモデル細胞膜の作成や分配実験に設備や労力がかかることが原因と考えられる。そこで本研究では、市販のモデル細胞膜 (商品名: Transil®) を利用し、 $P_{mw}$  を測定する実験系を構築した。その後、水環境中で検出される医薬品であるイフェンプロジルの  $P_{mw}$  を測定し、また共存する DOM の影響を評価した。

## 2. 実験方法

## 2. 1 試薬および微量有機汚染物質の定量

測定対象とした微量有機汚染物質 (表 1) は和光純薬から購入した。定量は蛍光検出器付き HPLC (日本ウォーターズ 616L システム; SYMMETRY™ C18 カラム使用, あるいは日立 D7000 形システム; 日本ウォーターズ ATLANTIS T3 カラム使用) で行った。分析条件は表 1 中に示した。DOM としては Suwannee River NOM (International Humic Substance Society) を使用した。

表 1 使用した微量有機汚染物質

名称	fluorene	phenanthrene	anthracene	pyrene	Ifenprodil
構造式					
LogD	4.18	4.52	4.34	4.88	1.97
蛍光強度測定 波長 (nm)	(励起) 264 (蛍光) 305	294 367	250 383	335 376	275 295
溶離液組成	アセトニトリル 80% 水 20%	アセトニトリル 80% 水 20%	アセトニトリル 80% 水 20%	アセトニトリル 80% 水 20%	アセトニトリル 30% 水 70% ギ酸 0.1%

2. 2 細胞膜への分配係数 ( $P_{mw}$ ) の測定

モデル細胞膜である 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 (EPC) とした。 $P_{mw}$  は、リン酸緩衝液 (pH 7.4, 20 mM) 中での回分式分配平衡実験で求めた。微量有機汚染物質の初期濃度は 1mg/L 以下かつ水溶解度の 50% 以下とした。平衡実験後 TRANSIL® を遠沈し分離し、上澄み中の物質濃度を定量し  $P_{mw}$  を算出した。比較のためこれまでモデル細胞膜としてよく使用されてきたリポソームを用い、

蛍光増感法 (PAHs) や平衡透析法 (イフェンプロジル) で  $P_{mw}$  を算出した。 $P_{mw}$  の定義は両相の微量有機汚染物質濃度比すなわち[モデル細胞膜中の単位脂質炭素あたりの濃度]/[水相中濃度]とした。

### 3. 実験結果

TRANSIL<sup>®</sup>は  $P_{mw}$  を簡易に測定しやすいように、96 穴マイクロプレートにあらかじめ異なる濃度となるように封入されたキットとしてのみ販売されている。冷凍されており解凍するとその日のうちに使用することが推奨されているが、一度解凍した TRANSIL<sup>®</sup>をピペットなどで回収し保存液として数日

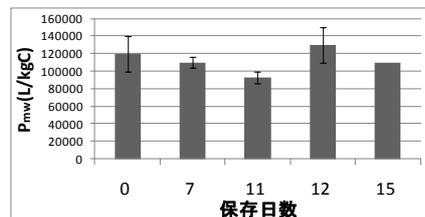


図 1 アントラセンの  $P_{mw}$

間使用できれば利点が多い。たとえばプラスチックに吸着する物質の  $P_{mw}$  測定はマイクロプレートでは困難だが、TRANSIL<sup>®</sup>の保存液があればガラス遠沈管などを利用して測定ができる。また  $P_{mw}$  の大きさに応じた TRANSIL<sup>®</sup>量とすることができるので低コストとなる。アントラセンを対象とし解凍した直後に測定した  $P_{mw}$  と 4°C で保管したものの  $P_{mw}$  を図 1 にしめす。解凍してから 2 週間たっても  $P_{mw}$  はほとんど変化なく、TRANSIL<sup>®</sup>は十分使用できることが分かった。

表 2 に  $P_{mw}$  を TRANSIL<sup>®</sup> とリポソームで測定した結果をしめす。

PAHs に関しては TRANSIL<sup>®</sup>で測定したものは細胞膜の相状態が同じ液晶相であるリポソーム Lip12 で測定したものとほぼ同じ大きさとなった。PAHs についてはゲル相のリポソーム Lip16 に対する  $P_{mw}$  は TRANSIL<sup>®</sup>で測定したものより著しく小さかったが、イフェンプロジルではそれほど変わらなかった。この理由は、PAHs は細胞膜の内部に分配されるが、イフェンプロジルは表面付近に吸着していることが考えられた。

表 2 異なるモデル細胞膜で測定した  $P_{mw}$   
Lip12 はジラウロイルホスファチルコリン Lip16 は  
ジパルミトイルホスファチルコリンで構成される

	リポソーム	
	Transil EPC	Lip12 Lip16
フルオレン	28000	30000 3100
フェナントレン	94000	87000 7800
アントラセン	120000	89000 11000
ピレン	670000	540000 30000
イフェンプロジル	4300	2200

図 2 に TRANSIL<sup>®</sup>で測定した  $P_{mw}$  を  $K_{ow}$  と比較してしめす。塩基性医薬品であるイフェンプロジルは  $K_{ow}$  から考えると比較的高い  $P_{mw}$  となったが、pH7.4 の条件ではほぼプラスに帯電しているため細胞膜表面のマイナスの電荷と相互作用しよく分配されたと推測された。DOM を 40mgC/L 共存させた時のイフェンプロジルの  $P_{mw}$  を測定したところ、非共存下での 4300±300 (L/kgC) に対し、共存下では 4000±100 (L/kgC) とほとんど変わらず、DOM はイフェンプロジルの細胞膜への分配にほとんど影響しなかった。

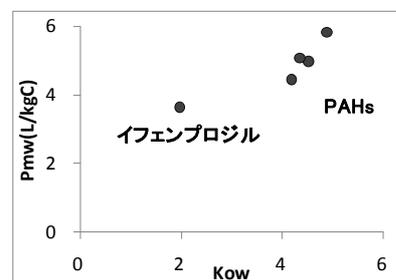


図 2  $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  の比較

### 4. まとめ

微量有機汚染物質の毒性や蓄積性を評価する重要な因子である細胞膜への分配係数 ( $P_{mw}$ ) の測定法を構築し、PAHs とイフェンプロジルの分配特性を評価した。市販のモデル細胞膜 TRANSIL<sup>®</sup>を利用し、アントラセンの  $P_{mw}$  を測定した結果、モデル細胞膜は 2 週間 4°C で保存しても使用可能であることが分かった。また、PAHs に関して卵黄ホスファチルコリンで構成された TRANSIL<sup>®</sup>への  $P_{mw}$  は同じ相状態のリポソームに対するものとほぼ同じ大きさとなった。イフェンプロジルの  $P_{mw}$  は  $K_{ow}$  から推測される値より大きくなり、細胞膜との静電的相互作用が推測された。イフェンプロジルの  $P_{mw}$  に対する DOM の影響はほとんどなかった。

### 参考文献

- 1) M. Haitzer, S. Hoss, *Aquatic Toxicology*, 45, 147-158, 1999.
- 2) 池田和弘等：環境工学研究論文集, Vol.40, pp.627-638, 2003.

キーワード 微量有機汚染物質, モデル細胞膜, 分配, 溶存有機物質

連絡先 347-0115 埼玉県加須市上種足 914 環境科学国際センター 水環境担当 TEL0480-73-8353