

(68) 内分泌かく乱物質の細胞膜への収着と共存 NOM の影響

Sorption of Endocrine Disruptors onto Cell Membrane and the Effect of NOM

池田和弘*, 清水芳久**, 小栗拓也**, 松井三郎***

Kazuhiro IKEDA*, Yoshihisa SHIMIZU**, Takuya OGURI**, Saburo MATSUI***

ABSTRACT; The sorption coefficients (K_{mw}) of several endocrine disruptors {17 β -estradiol (E2), 17 α -ethynylestradiol (EE2), nonylphenol (NP), 4-(*tert*-octyl)phenol (OP)} onto cell membrane were measured using artificial cell membranes for evaluating their bioavailability and bioconcentration potential; and the effects of co-existing natural organic matter (NOM) on the sorption was evaluated. The K_{mw} of endocrine disruptors were comparable to that of 3-ring or 4-ring PAHs, which suggested that the specific interaction between membrane and endocrine disruptors greatly contributed to the sorption. The NOM itself was neither sorbed onto cell membrane nor affected the membrane fluidity. The co-existence of NOM reduced sorption of OP, NP and non-polar PAHs onto cell membranes. The co-existence of NOM did not affect sorption of E2 and EE2 onto cell membranes although their sorption coefficients onto NOM were comparable to those of OP and NP. These phenomena suggested that OP, NP and PAHs bound to NOM could not be sorbed onto cell membranes but E2 and EE2 bound to NOM could; that is, the behavior of E2 and EE2 bound to NOM was similar to the non-bound (free) E2 and EE2.

KEYWORDS; Endocrine disruptors, Hydrophobic Organic Compound, NOM, Cell Membrane, Sorption

1 はじめに

内分泌かく乱物質のさまざまな生物に対する作用が報告され¹⁾、水環境中に放出されたそれらによる水系生態系に対する悪影響が懸念され、あるいは顕在化している。このため、水環境中の内分泌かく乱物質濃度の調査²⁾や水環境中でのそれらの運命に関して精力的な研究³⁾がなされてきた。しかしながら、内分泌かく乱物質の長期的な暴露による影響を評価するために必要となるそれらの生物濃縮性など未解明な部分も多く、特に環境水中の内分泌かく乱物質が生物へ取り込まれる過程に注目した研究はほとんどみられない。内分泌かく乱物質、特にエストロゲン様物質はステロイドホルモンの作用機序および脂溶性が高いことから考えると、水中から受動拡散によって細胞内に取り込まれると考えられる。受動拡散による疎水性物質の細胞内への透過流束は、細胞膜への収着係数 (K_{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⁴⁾する。実際の生物による疎水性物質の取り込み速度は、その代謝速度などの影響を受けるものの、 K_{mw} はその生物への取り込まれ易さを示す重要な因子となる。さらに、魚類による脂溶性難分解物質の生物濃縮は、食餌による経路よりエラや体表を通した水中からの直接的な取り込み経路が主要因となる報告⁵⁾があることや生物濃縮を評価すべき生物種が極めて多岐にわたることからも、 K_{mw} は生物濃縮性を評価する因子として

* 京都大学大学院工学研究科博士後期課程 (Doctor Course Student at Graduate School of Engineering, Kyoto University)

** 京都大学大学院工学研究科 (Graduate School of Engineering, Kyoto University)

*** 京都大学地球環境学堂 (Global Environmental Studies, Kyoto University)

も意義深いものとなる。

ところで、水環境中には天然有機物質 (NOM) が常に存在し、特にその中でもフミン質は疎水性有機物質を強く収着し、その挙動に影響を与える⁹⁾と考えられている。水環境中に溶存する疎水性有機物質は遊離体と NOM との結合体の両方の形で存在し、その比率は NOM 濃度とその NOM への収着係数 (K_{oc}) により決まる。ところが、内分泌かく乱物質の K_{oc} の測定はそれほどなされてはいない。

疎水性の強い有機物質に対し、NOM 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⁷⁾。これは、NOM との結合体が細胞膜を透過できないため、生物への取り込み量が減少することによると推測されており⁸⁾、この仮定に基づいた数学モデルはこの現象をよく説明している。一方で、NOM の存在が植物の根による無機イオンの取り込みを増大させる報告⁹⁾や NOM 自身が細胞膜へ吸着し、その細胞膜機能に様々な影響を与える報告¹⁰⁾、また NOM が生物活性を増大させる報告¹¹⁾もあり、様々な性質の化学物質の生物による取り込みに対して、NOM が与える影響およびその機構はまだまだ不明確であると言わざるを得ない。

内分泌かく乱物質の多くは疎水性であるものの、親水性の官能基を有するため、水環境中で単純な疎水性物質とは異なる挙動をとることが推測される。たとえば 17 β -エストラジオールのオクタノール/水分分配係数 (K_{ow}) は $\log K_{ow}$ として 4.0¹¹⁾ であるのに対し、ヘキサン/水分分配係数 (K_{hw}) は $\log K_{hw}$ として 0.07¹²⁾ であり、著しく低い。さらにオクチルフェノールの $\log K_{ow}$ は 4.1¹³⁾ であるのに対し $\log K_{hw}$ は 3.0¹³⁾ であり、やはりかなり低い。一方、単純な疎水性物質であるフェナンスレンに関しては、 $\log K_{ow}$ と $\log K_{hw}$ はともに 4.6¹²⁾ となっており、分配が疎水性相互作用に基づくことを示している。これらより、内分泌かく乱物質の多くは、両親媒性の有機溶媒であるオクタノールとの親和性が高く、この程度が K_{ow} の大きさを決定していることが推測される。

このような性質を持つ内分泌かく乱物質は NOM や細胞膜に対し、単純な疎水性物質とは異なる相互作用を示すことが考えられる。したがって、NOM は内分泌かく乱物質の細胞膜への収着に影響を与えるのか、与えたとしたらそれはどのような機構によるものなのかといったことが、実際の水環境での内分泌かく乱物質の生物への取り込みを考える上で解明すべき、重要かつ興味深い疑問となる。

これらのことから本研究では、いくつかの内分泌かく乱物質に対し次のような実験を行った。①生物への取り込まれ易さを評価することを目的とし、モデル細胞膜を利用した回分式収着平衡実験により K_{mw} (水相中の遊離体濃度に対する細胞膜中濃度 (単位脂質有機炭素あたり) の比) を測定した。②NOM への収着され易さを評価することを目的とし、回分式収着平衡実験を行い K_{oc} (水相中の遊離体濃度に対する NOM 中濃度 (単位有機炭素あたり) の比) を測定した。③細胞膜への収着に対する NOM の影響を調べることを目的とし、NOM 共存下でのモデル細胞膜を利用した回分式収着平衡実験を行い、水相中濃度 (遊離体および結合体濃度の和) に対する細胞膜中濃度の比 (分配係数: P_{mw}) の NOM 濃度依存性を測定した (図 1)。④細胞膜への収着に対する NOM の影響の機構を検討することを目的とし、NOM 自身の細胞膜への収着係数

{ K_{mw-NOM} : 水相中の遊離体濃度に対する細胞膜中濃度 (単位脂質有機炭素あたり) の比} を測定した。また、NOM が細胞膜機能に直接与える影響に関して、細胞膜の流動性に与える影響に着目し、NOM 存在下と非存在下での細胞膜の熱物性を比較した。なお、以上の実験は単純な疎水性物質である PAHs (多環式芳香族炭化水素類) に対しても同様に行い、それらの結果を比較し、機構などについて考察を行った。

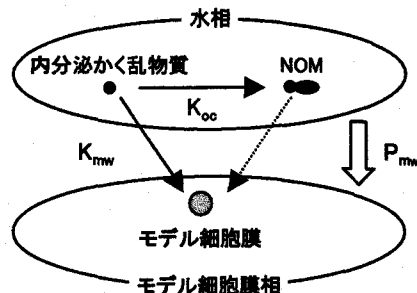


図1 研究の概念図

2 実験方法

2. 1 内分泌かく乱物質およびPAHsの選定と水溶液の作成

本研究では内分泌かく乱物質として天然エストロゲンである 17 β -エストラジオール (E2)、経口避妊薬の成分として含まれる人工合成エストロゲンである 17 α -エチニルエストラジオール (EE2)、またエストロゲン作用が指摘されている合成化合物であるノニルフェノール (NP) と 4-*tert*-オクチルフェノール (OP) を選び、測定に使用した。いずれも水環境中で比較的良好に検出されており¹⁴⁾、このうち NP は生物濃縮性が指摘されている¹⁵⁾。また、PAHs としては疎水性の異なる 3 環および 4 環のフルオレン、フェナンスレン、アントラセンおよびピレンを用いた。これらの物理化学的特性を表 1 に示す。いずれの測定対象物質も共役二重結合を有することから、その水溶液中濃度を蛍光光度計によって感度よく測定することができる。

これらの物質は水溶解度が低いことから、水溶液の作成のため、しばしば水に混和する有機溶媒に溶解させ、それを水溶液に加える方法が採られる。しかし、有機溶媒の存在が水相の性質を変化させ吸着過程と物質の定量に悪影響を及ぼすことが考えられる。したがって、ストックソリューションを以下のように作成した。はじめに E2 (Aldrich, 97%)、EE2 (Aldrich, 98%)、OP (Aldrich, 97%) および NP (Aldrich, 混合物) についてはアセトンに、フルオレン (和光純薬, 95%)、フェナンスレン (和光純薬, 95%)、アントラセン (和光純薬, 98%) およびピレン (和光純薬, 98%) についてはジクロロメタンに溶解させた。続いて、最終的にできる水溶液の濃度が最大でも水溶解度の 70% となるような量を取り、それぞれを試薬瓶の内壁に薄く貼付し放置することで有機溶媒を揮発させた。最後にリン酸緩衝液 (pH 7.4, 20 mM) を加え、遮光し、23°C で 48 時間以上スターラー攪拌した。

表1 測定対象物質

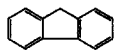
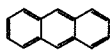
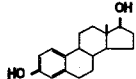
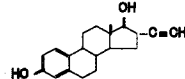
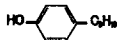
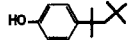
名称	fluorene	phenanthrene	anthracene	pyrene
構造式				
分子量	166	178	178	202
LogKow ¹⁵⁾	4.18	4.52	4.34	4.88
水溶解度 ¹⁵⁾ (mg/L)	1.98	1.29	0.0730	0.135
蛍光強度測定波長 (励起)	264	294	250	335
(nm) (蛍光)	305	367	383	376

表1 測定対象物質(続き)

名称	17 β -estradiol	17 α -ethynylestradiol	nonylphenol	4- <i>tert</i> -octylphenol
構造式				
分子量	272	296	220	206
LogKow	4.01 ¹⁶⁾	3.67 ¹⁶⁾	4.5 ¹⁸⁾	4.1 ¹⁸⁾
水溶解度 ¹⁶⁾ (mg/L)	3.85	19.1	5.4	8.0
蛍光強度測定波長 (励起)	279	279	275	275
(nm) (蛍光)	312	312	309	309

2. 2 NOMの選定と水溶液の作成

水環境中に存在する NOM は複雑な混合物であり、存在場所¹¹⁾や季節¹⁷⁾によって異なる構造や特性を持つことが知られている。ある水環境における NOM の役割や影響を研究するためには、本来そこから抽出した NOM を利用する必要があるが、抽出操作に労力がかかることから困難なことが多い。したがって、NOM の構造特性とその水環境中での役割や影響との関係を一般化することが望まれる。そこで本研究ではこの面での将来的な進展に寄与することを考え、元素分析など特性解析が比較的よく行われている Suwannee River NOM (International Humic Substance Society) を使用することとした。なお、疎水性有機物質の収着能としてはフミン質が最も強いが、本研究においては上述の特性を持つ内分かく乱物質を研究対象としていることや細胞膜への直接的な作用を考慮に入れていることから、フミン質を内部集合として含む NOM を用いた。NOM は 200 mgC/L となるようにリン酸緩衝液に溶解させ、これをストックソリューションとして用いた。

2. 3 モデル細胞膜の選定

これまでモデル細胞膜としては細胞膜と同じ脂質二重層を基本構造とする微粒子であるリポソームがよく使用されてきた。実際、リポソーム細胞膜への疎水性の薬物の収着係数と経口投与された薬物の腸からの吸収率に良好な相関関係があり¹⁸⁾、リポソームは薬物の受動拡散による取り込みを評価するのに優れているといえる。収着係数を測定するためには収着平衡後の水相中の遊離体被収着物質濃度を測定する必要があるが、リポソームはその比重が 1 に近い固液分離のためには超遠心分離装置を必要とする。しかしこの装置が高価なことから、透析膜を用いた収着実験がよく行われる。ところが、本研究で収着実験に使用する対象物質は薬物よりは疎水性が高く、透析膜などへ収着することによって正確な K_{mw} の測定が困難となる。さらに、両性リン脂質から構成されるリポソームは凝集しやすく、また融合する性質があり、これが細胞膜機能に影響を与え、本来の K_{mw} が測定できなくなる可能性がある。特に NOM には界面活性を持つ物質が含まれるが、一部の界面活性剤はリポソームの融合を促進する¹⁹⁾ことが知られる。ところが、実際の水環境中での生物の生息密度や細胞構造を考えると NOM によって細胞同士が融合することは考えにくい。

そこで本研究ではリポソーム内部にシリカビーズを封入した構造を持つ (図 2) TRANSIL[®] (Nimbus Biotechnology) を利用することとした。TRANSIL[®] はその比重が 2.6 となっており、緩やかな遠心操作により固液分離が可能となっている。また、粒径は 12 μm となっており、凝集や融合のおそれがない²⁰⁾。また、内部のシリカビーズと脂質二重層に強い相互作用はなく、細胞膜の流動性はリポソームと同等のものとなっている²¹⁾。さらに、酸性および塩基性の薬物に対してもシリカビーズに対する特異的吸着はないとされている²²⁾。

ところで、細胞膜の脂質二重層はさまざまな脂質から構成され、その構成成分は生物種や細胞の位置によって異なる。主要な構成成分はリン脂質であり、なかでも動物ではホスファチジルコリンが多い。細胞膜には流動性すなわち脂質の細胞膜内での運動性があり、これは相転移温度 (T_m) の上下で劇的に変化し、 T_m 以上の温度で流動相、以下でゲル相と呼ばれる状態となる。細胞膜への疎水性物質の収着はこの流動性に大きく影響される²³⁾。卵黄ホスファチジルコリン (EPC) は実際の生物から抽出し精製されたリン脂質で、これで構成された細胞膜は、細胞膜が通常環境中での状態である流動相となっている。したがって本研究では EPC で構成された TRANSIL[®] を収着実験で用いるモデル細胞膜として使用した。なお、購入した TRANSIL[®] はリン酸緩衝液中に懸濁しており、細胞膜内にも同じ緩衝液が存在する。

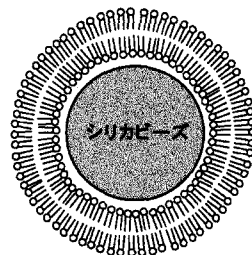


図2 TRANSIL[®]の構造

2. 4 収着係数の測定

収着係数 (K_{mw} , K_{oc} , K_{mw-NOM}) および分配係数 (P_{mw}) はすべて遮光したガラス製の遠沈管 (液量 10 mL) を用い、リン酸緩衝液 (pH 7.4, 20 mM) 中、24 時間、23°C、30 rpm での回転攪拌という条件での回分式収着平衡実験によって求めた。NOM 以外の測定対象物質 (被収着物質) はいずれも環境中に微量濃度で存在することから、収着平衡実験においてもその濃度は定量できる範囲でできるだけ低いもの (水溶解度が 1 mg/L 以上のものは 0.5 mg/L、それ以下のものは水溶解度の 30% 程度) とした。被収着物質量に対し収着部位が十分あることから、収着等温線は線形となることが予想され、収着係数 (K) をこれに基づき定義した。このとき被収着物質のマスバランスより次のスターン・ボルマー方程式が成立する。

$$C_0/C = 1 + KS \quad (\text{あるいは } 1 + P_{mw}S) \quad (1)$$

式 (1) において C_0 は収着剤のないときの被収着物質濃度、 C は収着剤濃度が S の時の、未収着の被収着物質濃度である。本研究では、遠沈管に入れる被収着物質濃度を一定とし、異なる濃度の収着剤添加時の、未収着の被収着物質濃度を測定し、式 (1) より K と P_{mw} を求めた。収着剤濃度は、少なくとも 50% の被収着物質が収着するまで上昇させた (NOM の場合は最大 100 mgC/L、TRANSIL[®] の場合は 130 mgC/L)。ただし、 K_{mw-NOM} の測定に関しては、その値が極めて低かったため、NOM 濃度を 10 mgC/L とし、TRANSIL[®] 濃度は 2,000 mgC/L まで上昇させた。

(1) K_{oc} の測定 収着剤は NOM で被収着物質は内分泌かく乱物質と PAHs となる。これらの被収着物質は NOM に収着すると蛍光を失う性質を持つため、収着平衡後の溶液の蛍光度を測定する (日立製作所 F-4500) ことで、未収着の物質濃度を求めた。表 1 に各物質の定量に使用した励起波長と蛍光波長をまとめた。ただし、この際 NOM によって Inner-filter 効果²⁴⁾ が生じるため、溶液の励起、蛍光波長における吸光度を測定する (島津製作所 UV-2500PC) ことで、この補正を行った。また、NOM 自身が発する蛍光度もブランク溶液の作成により補正した。

(2) K_{mw} および P_{mw} の測定 どちらも収着剤は TRANSIL[®] で被収着物質は内分泌かく乱物質と PAHs である。収着実験後、遠沈管を緩やかに遠心操作し (30 分、2,000 rpm)、TRANSIL[®] を沈降させ上澄みを採取した。 K_{mw} の測定においては共存物質がないため、溶液の蛍光分析により未収着の物質濃度を求めた。一方、 P_{mw} の測定においては NOM が存在する中で水相中の全物質濃度 (遊離体および NOM への結合体の濃度の和) を測定することが必要であった。そこで C18 カラム (日本ウォーターズ SYMMETRYTM C18 4.6 × 150 mm HPLC Column) を備えた蛍光検出器付き HPLC (日本ウォーターズ 616L システム) に上澄みを打ち込むことでその定量を試みた。予備実験として被収着物質を NOM に収着させ、この溶液を HPLC で分析しピークエリアを求めた。その結果、すべての被収着物質に関して、移動相をアセトニトリルと水の混合液 (体積比で 4:1) のイソクラティックとし、流量を 1.0 mL/min としたとき、同濃度の被収着物質のみを分析したときに確認されたピークと同じ保持時間に、同じピークエリアのピークが確認された。すなわち、カラム内で NOM と被収着物質とカラムとの間で再平衡がおき、NOM に収着されていたものが遊離体となり溶出することが分かった。このことは P_{mw} の測定時の全 NOM 濃度範囲において確認されたため、NOM 共存下における水相の全物質濃度が HPLC を用いて測定できることが分かった。

(3) K_{mw-NOM} の測定 収着剤は TRANSIL[®] で被収着物質は NOM であり、収着実験後の遠心操作を行い、上澄みを採取した。未収着の NOM 濃度は吸光度法 (測定波長 350 nm) で求めた。

2. 5 細胞膜の流動性の測定

各細胞膜は固有の相転移温度を持ち、細胞膜の流動性はその相転移温度に反映される。カルシウムイオンは細胞膜と相互作用し、その流動性を下げるため、細胞膜の相転移温度は上昇する²⁵⁾。相転移温度は、ゲル相から流動相への相転移が吸熱反応であることを利用し、示差走査熱量計 (DSC) によって測定することができる。本研究では NOM が細胞膜と相互作用し、その流動性に変化を与えるかに否かについて、NOM 共

存下における細胞膜の相転移温度を測定し、非共存下におけるものと比較することで調べた。

収着実験で用いた EPC で構成される細胞膜は、EPC が脂肪酸鎖の異なるホスファチジルコリンの混合物であるため、相転移温度がはっきり現れず、NOM の相互作用を見るのに適しているとはいえない。そこで本実験では、ジミリスチルホスファチジルコリン一成分で構成される TRANSIL[®]を用いた。NOM と TRANSIL[®] は P_{mw} を求める回分式収着実験と同じ条件で反応させた。なお、ここで用いた細胞膜も 23℃では流動相となる。DSC (島津製作所 DSC-60) の比較セルにはリン酸緩衝液を入れ、加熱速度は 2.00℃/min とした。なお、NOM 溶液のみでは細胞膜の相転移に匹敵するような吸熱反応は起きないことを、あらかじめ確認した。

3 実験結果と考察

3. 1 内分泌かく乱物質の細胞膜への収着係数

すべての内分泌かく乱物質および PAHs に対し、収着実験から得られたスターン・ボルマープロットは直線かつ切片が 1 となり、収着が線形であることが確認された。得られた K_{mw} を表 2 に示す。EE2、OP、NP に関しては 3 環から 4 環の PAHs に匹敵する K_{mw} となり、E2 についてはそれよりやや低いものとなった。これらの値は、医薬品である β -blocker のそれ²⁶⁾ と比べても概して大きく、生物に取り込まれやすい性質をもつことが分かった。図 3 に K_{mw} を K_{ow} と比較する形で表す。細胞膜は表面に正負両方の電荷と水素結合可能な部位を持ち、内部は疎水性領域ではあるが脂質二重層内部に向かって正の双極子ポテンシャルを持つ。単純な疎水性物質の細胞膜への収着は疎水性相互作用に基づくものであり、このとき、 $\log K_{ow}$ と $\log K_{mw}$ とには正の相関(直線関係)がある²⁷⁾。本研究においても PAHs に対してはこれが認められた。一方、内分泌かく乱物質に関しては E2 をのぞき、この直線よりも高い位置にプロットされた。このことから、内分泌かく乱物質の細胞膜への収着は疎水性相互作用によるものだけでなく、細胞膜との相互作用(水素結合、静電的相互作用、分子間力による相互作用など)が大きく寄与していることが示唆され、 K_{ow} からその大きさを類推すると、場合によっては過小評価する可能性があることが分かった。疎水性物質に対しては K_{ow} と生物濃縮係数(BCF)の間には $\log$ をとると直線関係があることが知られており²⁸⁾、 K_{ow} は生物濃縮の指標としても用いられている。しかし、これらの結果より、内分泌かく乱物質の生物への取り込みや生物濃縮性を K_{ow} では過小評価する可能性があり、危険である可能性が示唆された。

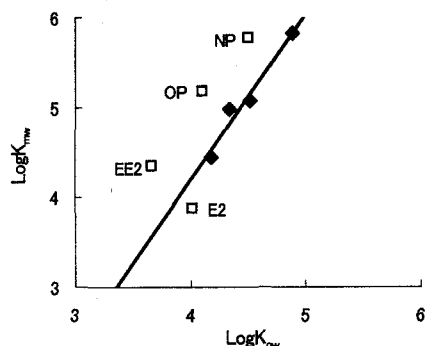


図3 K_{mw} と K_{ow} の比較

◆は PAHs であり、近似直線($R=0.96$)

はこれに対し求めたもの。

表2 対象物質の K_{mw} と K_{oc}

対象物質	K_{mw} (L/kgC)	K_{oc} (L/kgC)
fluorene	28,000	9,600
phenanthrene	94,000	7,300
anthracene	120,000	17,000
pyrene	670,000	19,000
17 β -estradiol	7,500	8,900
17 α -ethynylestradiol	22,000	7,400
4-(tert-octyl)phenol	150,000	7,100
nonylphenol	590,000	9,600

3. 2 内分泌かく乱物質の NOM への収着係数

すべての内分泌かく乱物質および PAHs に対し収着の線形性が確認された。得られた K_{oc} を表 2 に示す。また、図 4 に K_{oc} を K_{ow} と比較する形で示す。内分泌かく乱物質の K_{oc} は 3 環の PAHs と同程度であった。無極性の疎水性物質に対しては $\log K_{oc}$ と $\log K_{ow}$ との間には直線関係があると言われ²⁹⁾、本研究においても PAHs に対してはそれが確認された。ところが、4 つの内分泌かく乱物質に関しては、その $\log K_{ow}$ が最大で 0.8 異なる (EE2 と NP) にも関わらず、 K_{oc} はほとんど同一の値となった。このことより、内分泌かく乱物質の K_{ow} と K_{oc} は異なる熱力学的推進力によって決定されることが考えられ、 K_{ow} からでは K_{oc} は推測できないと考えられた。 K_{oc} を決定する収着機構に関しては、考察するための情報が十分でなく、異なる NOM や NOM の各分画に対する K_{oc} の測定が今後必要と考えられる。

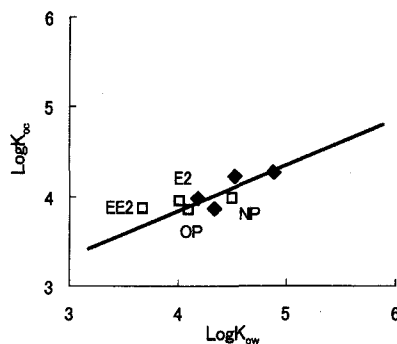


図4 K_{oc} と K_{ow} の比較

◆は PAHs であり、近似直線 ($R=0.65$) はこれに対し求めたもの。

3. 3 NOM 共存下における内分泌かく乱物質の細胞膜への分配係数

NOM 存在下においても、すべての内分泌かく乱物質および PAHs に対し細胞膜への分配に線形性が確認された。共存する NOM 濃度を変化させ P_{mw} を測定した結果を図 5 に示す。なお、グラフの縦軸は NOM が共存しないときの P_{mw} (すなわち K_{mw}) で正規化している。これらより、PAHs や NP、OP に関しては NOM の濃度が増加するにつれ細胞膜への分配が減少することが分かる。一方で、E2、EE2 に関しては NOM が存在しても細胞膜への分配が全く減少しなかった。すなわち、NOM は PAHs や NP、OP の生物による取り込みは減少させるものの、E2 や EE2 の取り込みは減少させない可能性が示唆された。

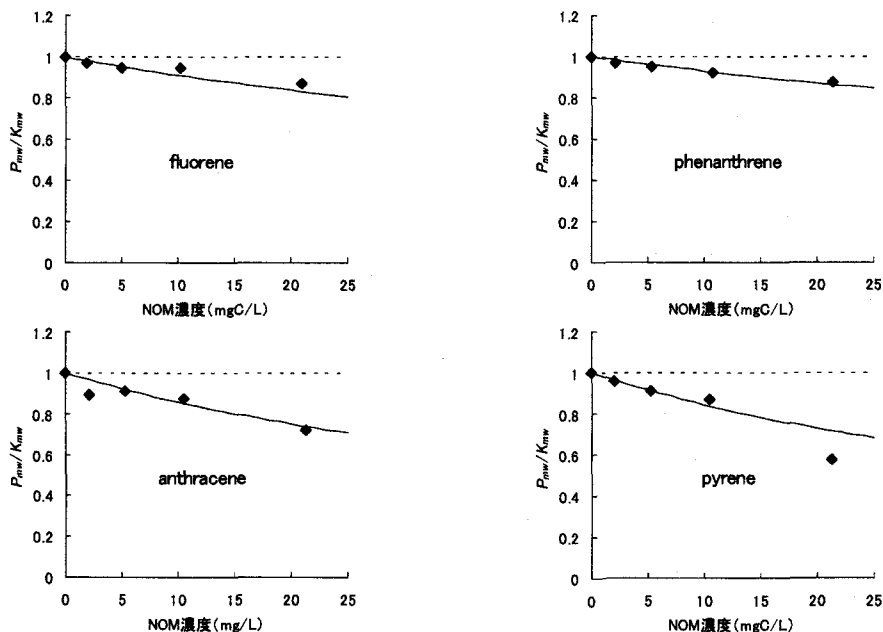


図5 P_{mw} に対する NOM の影響

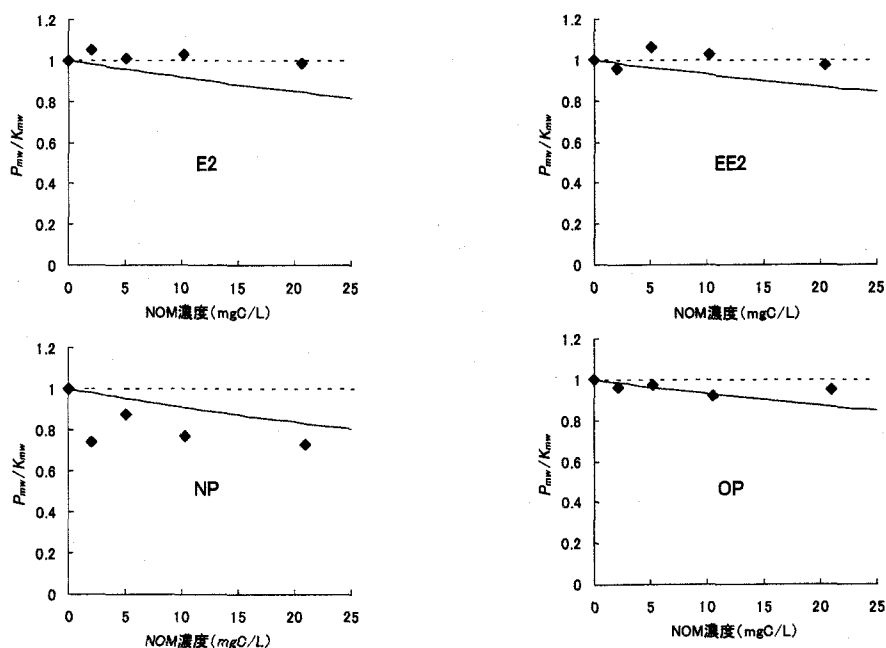


図5 P_{mv} に対するNOMの影響(続き)

共存するNOM濃度が上昇するにつれ、水中に遊離体で存在する疎水性有機物質濃度は減少する。もし、NOMとの結合体が細胞膜に収着されないとすると、 P_{mv} は次の式⁷⁾に従う。

$$P_{mv} = \frac{K_{mv}}{1 + K_{oc}[NOM]} \quad (2)$$

ただし、ここでは遊離体のNOMへの収着と細胞膜への収着は互いに独立であると仮定している。この仮定にはNOMが細胞膜と相互作用し、細胞膜機能を変化させることはないという仮定が含まれる。図5中の実線は先に測定した K_{mv} と K_{oc} を利用して式(2)による計算結果をプロットしたものである。PAHsとOPに関しては、計算結果と実験結果がよく一致している。従って、これらの物質とNOMの結合体は細胞膜に収着されず、この分だけ細胞膜への分配が減少したことが分かる。E2とEE2に関しては、計算結果と実測値が大きく乖離しており、NOMとの結合体が細胞膜に収着すると考えられる。NPに関しては計算結果よりも実験結果のほうがさらに小さい値となっており、NOMの存在が遊離のNPの細胞膜への収着にも影響を及ぼしたと、すなわちNOMが細胞膜機能に何らかの影響を与えた可能性が考えられた。

3. 4 内分泌かく乱物質の細胞膜への収着に対するNOMの影響機構

前節でNOMとE2、EE2の結合体が細胞膜へ収着すること、およびNOMが細胞膜機能に影響を与えNPの細胞膜への収着に影響を与える可能性が考えられた。そこで、まずNOM自身の細胞膜への収着係数(K_{mv-NOM})を測定した。図6にスターン・ボルマープロットを示す。NOM濃度と吸光度の間に比例関係が得られたため、縦軸は濃度比の代わりに吸光度比を用いた。図から分かるように収着実験においてTRANSIL[®]の濃度を高くしても遊離のNOMによる吸光度はTRANSIL[®]のないときの吸光度とほとんど変わらなかった(4%未満)。このことから K_{mv-NOM} は限りなくゼロに近いことが分かった。TRANSIL[®]の濃度は溶液が明らかに白濁するまで上昇させ、 P_{mv} を求める実験において使用した濃度の20倍以上としたが、吸光度の減少は

わずかに数%であった。したがって、内分泌かく乱物質または PAHs の NOM との結合体の性質が NOM のそれと同じだとすると、NOM がそれらの細胞膜へのキャリアーとして働くことは考えられない。このことから、NOM と E2 と EE2 の結合体の性質は E2 と EE2 のそれに近くなることが考えられる。NOM と疎水性有機物質の結合体が細胞膜を透過しない理由は、その分子サイズと極性の増大によって説明される⁷⁾。PAHs や NP、OP の NOM との結合体の性質と E2、EE2 と NOM との結合体の性質の違いは、混合物である NOM のどの成分にどのような形態で収着しているかに依存すると考えられる。特に NP、OP と E2、EE2 は同程度の水溶解度と K_{oc} を持つにも関わらず、その NOM との結合体は異なる挙動を示しており、それらが異なる NOM の成分に疎水性相互作用以外の異なる熱力学的推進力によって収着していることが考えられ、この解明が重要となる。

次に、DSC を用いて NOM が細胞膜の流動性に与える影響を調べた。NOM はほとんど細胞膜に収着しなかったものの、微量に収着したものが細胞膜の流動性を下げ NP の細胞膜への収着係数を減少させる可能性もある。図 7 に DSC による細胞膜の相転移温度の測定結果を示す。図が示すように、NOM が存在しても相転移温度が変化していないことから、NOM の共存による細胞膜の流動性の変化はないことが分かった。

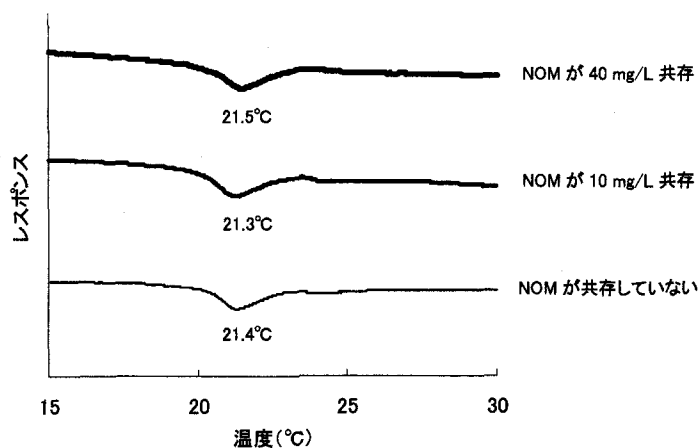


図7 示差走査熱量計による相転移温度の測定
グラフの頂点が相転移温度に対応する。

4 終わりに

最後に、本研究で得られた知見をまとめる。①E2、EE2、NP、OP の K_{ow} は 3 環から 4 環の PAHs と同等であり、生物へ取り込まれやすい性質を持つことが分かった。また、それらの細胞膜への収着には疎水性相互作用以外の相互作用が大きく関与しており、それらの生物への取り込まれ易さを K_{ow} から推測することは危険である可能性が示唆された。②E2、EE2、NP、OP の K_{oc} は 3 環の PAHs と同等であることが分かった。また、その値は K_{ow} から推測できないと考えられた。③NOM の存在は PAHs および NP と OP の細胞膜へ

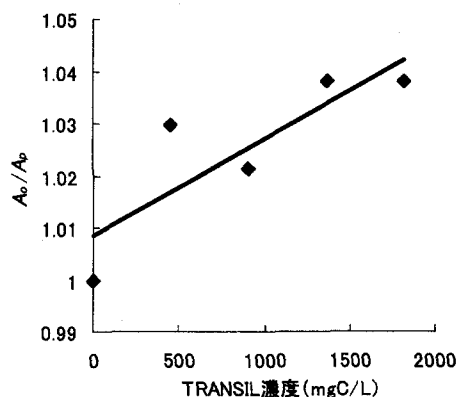


図6 NOM の細胞膜への収着実験

の分配を減少させることが分かった。しかし E2 と EE2 の細胞膜への分配は NOM の存在によって全く影響されなかった。④NOM は細胞膜へほとんど収着されず、細胞膜の流動性にも影響を与えなかった。PAHs および NP と OP の細胞膜への分配が NOM の存在によって減少する理由は、NOM との結合体が細胞膜に収着しないためであることが分かった。一方、E2 と EE2 の NOM との結合体は細胞膜に収着されるため、NOM がそれらの細胞膜への分配に影響を与えないことが分かった。

NOM が共存する水環境中での疎水性有機物質の挙動を把握する際、これまでは疎水性物質と NOM の結合体の挙動は NOM のそれと同じになると信じられており、疎水性物質としての特性を示すのは遊離体のみと考えられてきた。したがって、遊離の疎水性物質濃度を測定あるいは計算することが重要とされた。しかし、本研究によって E2、EE2 については（おそらく他のいくつかの親水基を有する疎水性物質についても）、この扱いはできないことが明らかとなった。E2、EE2 の NOM との結合体が水環境中で物理化学的に分解されにくい場合、生物に影響を与える物質濃度が高く維持されるため、この挙動の解析が重要と考えられる。また、NOM の成分であるフミン質は pH5 においては細胞膜に収着されるといった報告もあり¹⁰⁾、この条件で NOM が疎水有機物質の生物への取り込みに与える影響を解析する必要がある。

参考文献

- 1) 川合真一郎: 内分泌活性物質の生態影響, 内分泌かく乱物質研究の最前線, 季刊化学総説, No. 50, 32-54, 2001.
- 2) 藤塚哲朗: 水環境中の内分泌攪乱化学物質の存在状況実態調査について, 水環境学会誌, 第 22 巻 8 号, 624-628, 1999.
- 3) 松井三郎, 足立淳, 松田知成, 滝上英孝, 清水芳久: 天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動, 内分泌かく乱物質研究の最前線, 季刊化学総説, No. 50, 86-92, 2001.
- 4) 辻彰: 新薬剤学, 南江堂, 2002.
- 5) D. J. Randall, D. W. Connell, R. Yang, and S. S. Wu: Concentrations of Persistent Lipophilic Compounds in Fish are Determined by Exchange across the Gills, not through the Food Chain, *Chemosphere*, Vol. 37, No. 7, 1263-1270, 1998.
- 6) Y. Shimizu, H. Sogabe, and Y. Terashima: The Effects of Colloidal Humic Substances on the Movement of Non-ionic Hydrophobic Organic Contaminants in Groundwater, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 38, No. 7, 159-167, 1998.
- 7) M. Haitzer, S. Hoss, W. Traunsperger, and Christian Steinberg: Relationship between Concentration of Dissolved Organic Matter (DOM) and the Effect of DOM on the Bioconcentration of Benzo[a]pyrene, *Aquatic Toxicology*, 45, 147-158, 1999.
- 8) M. Haitzer, S. Hoss, W. Traunsperger, and C. Steinberg: Effects of Dissolved Organic Matter (DOM) on the Bioconcentration of Organic Chemicals in Aquatic Organisms, *Chemosphere*, Vol. 37, No. 7, 1335-1362, 1998.
- 9) 米林甲陽, 松村賢一, 上村元伸: 植物生育に対する腐植物質の影響, 第 18 回講演会講演要旨集, 日本腐植物質学会, 19-20, 2002.
- 10) B. Vigneault, A. Percot, M. Lafleur, and P. G. C. Campbell: Permeability Changes in Model and Phytoplankton Membranes in the Presence of Aquatic Humic Substances, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 34, No. 18, 3907-3913, 2000.
- 11) I. V. Perminova, N. Y. U. Grechishcheva, D. V. Kovalevskii, A. V. Kudryavtsev, V. S. Petrosyan, and D. N. Matorin: Quantification and Prediction of the Detoxifying Properties of Humic Substances Related to Their Chemical Binding to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 35, 3841-3848, 2001.
- 12) 谷口暢子: 17 β -エストラジオールの固相・水相間における挙動に関する研究, 京都大学大学院工学研究科環境地球工学専攻修士論文, 1999.

- 13) M. Ahel and W. Giger: Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates between Water and organic Solvents, *Chemosphere*, Vol. 26, No. 8, 1471-1478, 1993.
- 14) D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber, and H. T. Buxton: Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 36, No. 6, 1202-1211, 2002.
- 15) 環境庁環境化学物質研究会編: 環境化学物質要覧, 丸善, 1991.
- 16) C. Hansch, A. Leo, and H. David: Exploring QSAR – Hydrophobic, Fundamentals and Steric Constants, *ACS Professional Reference Book*, American Chemical Society, Washington DC, 1995.
- 17) 今井章雄, 福島武彦, 松重一夫, 井上隆信, 石橋敏昌: 琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画, *陸水学雑誌*, 59, 53-68, 1998.
- 18) K. Balon, B. U. Reibesehl, and B. W. Muller: Drug Liposome Partitioning as a Tool for the Prediction of Human Passive Intestinal Absorption, *Pharm. Res.*, Vol. 16, No. 6, 882-888, 1999.
- 19) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三: リポソーム, 南江堂, 152-166, 1994.
- 20) NIMBUS Biotechnologie (<http://www.nimbus-biotech.com/>)
- 21) A. L. Stahlhofen, J. Schmitt, J. Noller, T. Hartmann, H. Brodowsky, W. Schmitt and J. Keldenich: Solid-Supported Biomolecules on Modified Silica Surfaces – A tool for Fast Physicochemical Characterization and High-Throughput Screening, *Adv. Mater.*, Vol. 13, 1829-1834, 2001.
- 22) A. L. Stahlhofen, T. Hartmann, M. Schottner, C. Rohring, H. Brodowsky, J. Schmitt, and J. Keldenich: Multilamellar, Liposomes and Solid-supported Lipid Membrane (TRANSIL): Screening of Lipid-water Partitioning toward a High-throughput Scale, *Pharm. Res.*, Vol. 18, 1782-1788, 2001.
- 23) 小栗拓也: 多環式芳香族炭化水素類 (PAHs) のリポソームへの収着に及ぼす構成リン脂質の影響, 京都大学工学部地球工学科卒業論文, 2001.
- 24) Y. Shimizu and H. M. Lijstrand: Sorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons onto Natural Solids: Determination by Fluorescence Quenching Method, *Wat. Sci. Technol.*, 23, 427-436, 1991.
- 25) 日本膜学会(野澤ら): 膜学実験シリーズ 第I巻 生体膜編, 共立出版, 414-418, 1994.
- 26) X. Y. Liu, Q. yang, N. Kamo, and J. Miyake: Effect of Liposome Type and Membrane Fluidity on Drug-membrane Partitioning Analyzed by Immobilized Liposome Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 913, 123-131, 2001.
- 27) B. I. Escher and R. P. Schwarzenbach: Mechanistic Studies on Baseline Toxicity and Uncoupling of Organic Compounds as a Basis for Modeling Effective Membrane Concentrations in Aquatic Organisms, *Aquat. Sci.*, 64, 20-35, 2002.
- 28) International Council of Chemical Association (<http://www.icca-chem.org>)
- 29) R. P. Schwarzenbach and J. Westall: Transport of Nonpolar Organic Compounds from Surface Water to Groundwater, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 15, No. 11, 1360-1367, 1981.