4．筑波大学実験排水中に含まれる有機塩素化合物および生体影響に関する研究

（代表）下　條　信　弘
国府田　悦　男
島　田　秋　彦

はじめに

有害物質の毒性研究は、単独の物質についての報告がほとんどであり、これらを基盤として最大無作用量や最少影響量が算出されてきた。しかし、環境中には複数の有害物質が混在する場合が多々ある。そこで本プロジェクトでは、有害物質を複合暴露した培養細胞の毒性評価を行った。複合暴露は、有機塩素化合物８種（ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン、1,1,-ジクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン）と水銀化合物２種（塩化第二水銀（MC）、塩化メチル水銀（MMC））からそれぞれ１つずつ組み合わせることにより行った。実験に用いた有害物質は、クロロホルムを除いてすべて、「人の健康の保護に関する環境基準」が設定されているものである。特に有機塩素化合物は、近年工業使用の増大が顕著であり、平成５年の改正でジクロロメタン、四塩化炭素、1,3-ジクロロプロペン等の８つの有機塩素化合物について新たに環境基準が設定され、これに伴い、本学でもこれらの有機塩素化合物が実験排水の規制の対象となっている。細胞毒性評価は、従来から試験指標として汎用されている生存率や形態観察に加え、アポトーシスの誘導についても検討を行ったので、併せて報告する。

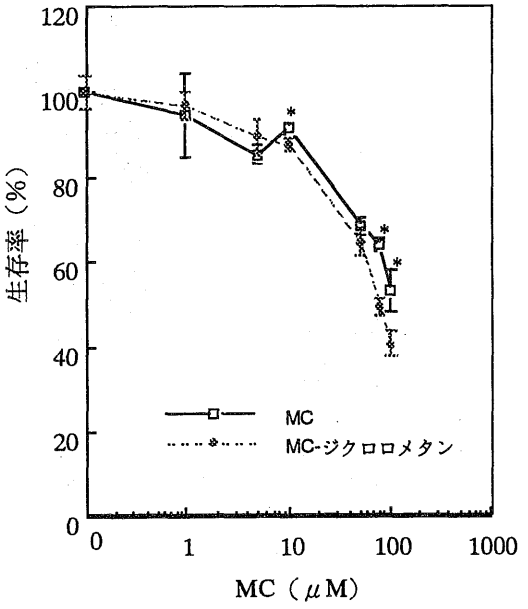
成果概要

１.水銀化合物と有機塩素化合物との複合暴露による毒性相乗効果

ラットのグリア細胞由来培養細胞C6に上記の有機塩素化合物をそれぞれ単独で８時間暴露したところ、2 - 5 mMでは著しい生存率の低下や形態変化は観察されなかった。これに対し水銀化合物をC6に暴露すると、有機塩素化合物の場合の1/2000 - 1/200の暴露量、すなわちMCの場合は10μM、およびMMCのそれは1μM以上の濃度から生存率の低下と暴露量依存的な形態変化が認められた。

生存率や形態変化を指標とし、これらから求めた最大無作用量を用いて有機塩素化合物と水銀化合物の複合暴露実験を行ったところ（クロロホルム，2mM；その他の有機塩素化合物，5 mM；MC，5μM；MMC，0.5μM）、明確な毒性相乗効果は観察されなかた。ところが、ジクロロメタンについて、その暴露量を5mMに固定し、水銀化合物の暴露濃度のみを増加させると、MC、MMCともに最大無作用量のわずか２倍の暴露量で、毒性相乗効果が生じることが判明した（Fig. 1）。この様な毒性相乗効果は、暴露６時間後の形態観察でも確認された（Fig. 2）。

Fig. 3には、細胞内水銀の取り込みについてMMC単独暴露と、ジクロロメタンとMMCの複合暴露との比較を示した（Fig. 3）。毒性相乗効果が観察された5μM　MMC以上の暴



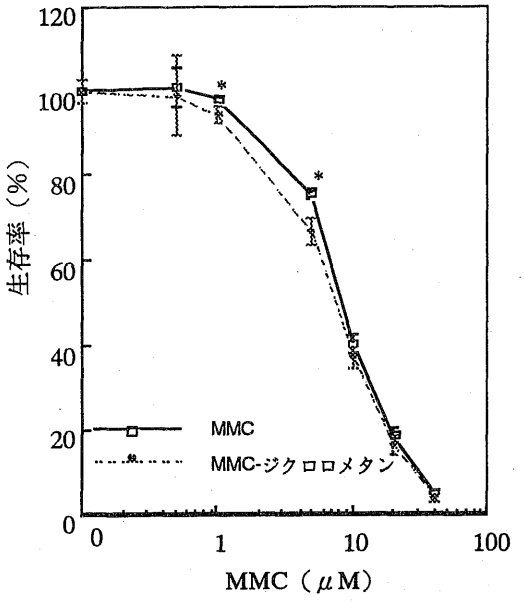


Fig. 1.　ジクロロメタンと水銀化合物を暴露したC6の生存率

＊：P<0.05

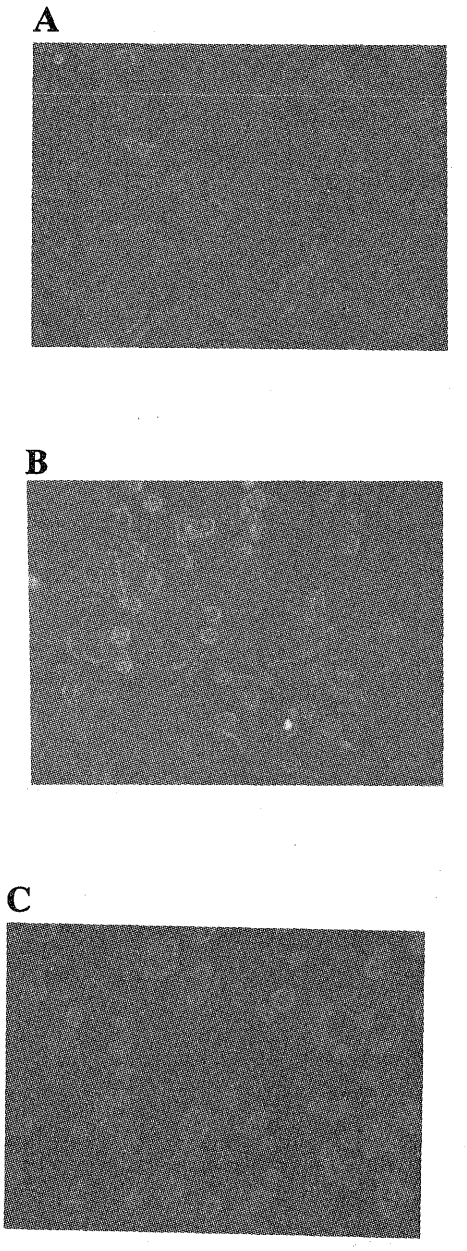


Fig. 2.　水銀化合物単独あるいはジクロロメタンとの複合暴露によるC6の形態変化

A：実験対象
B：MC(80μM)
C：MC(80μM)
　＋ジクロロメタン(2mM)

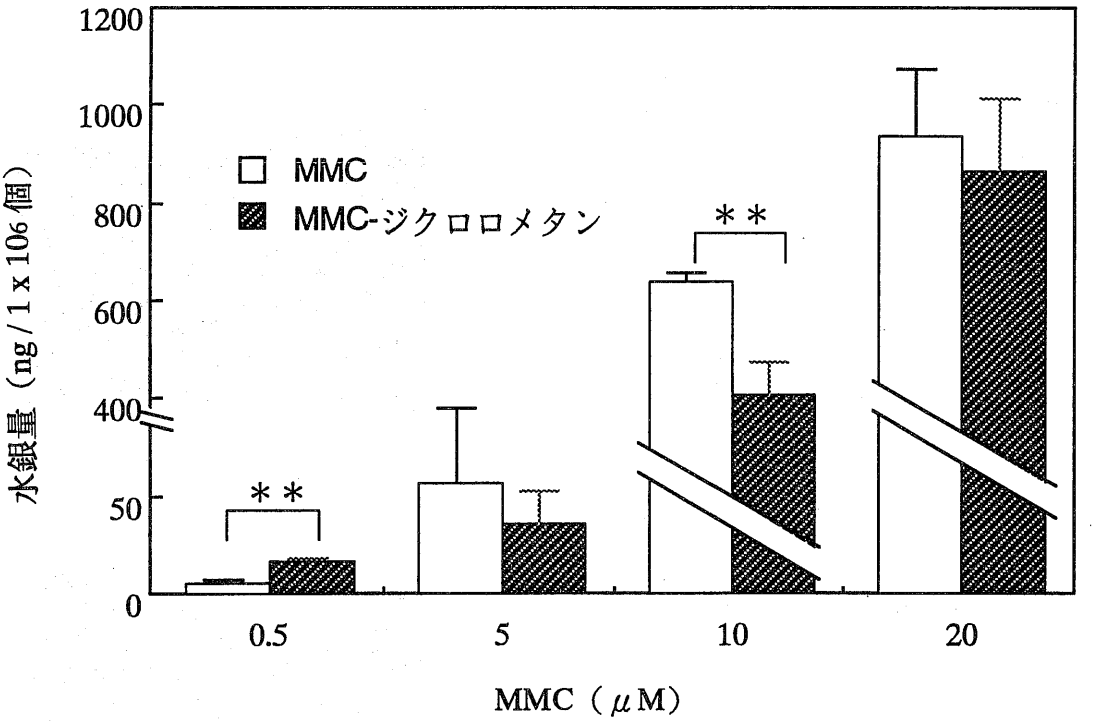


Fig. 3.　MMCの単独あるいはジクロロメタンと複合暴露したC6の水銀の取り込み
**：P<0.01

露量では、細胞内の水銀量は両暴露間で同じかむしろ複合暴露で低下した。しかし、単独では細胞の生存率に影響を与えないMMCの暴露量（0.5μM）では、複合暴露により水銀の取り込みが増加した。これらの結果から、細胞内水銀量の増大がジクロロメタンと水銀化合物の複合暴露による毒性の相乗効果の一因であることが考えられた。

2．有機塩素化合物によるアポトーシスの誘導

最近我々は、実験動物において有害重金属が従来からの毒性指標（細胞の破壊による酵素の流出や組織病理所見等）に先行して、アポトーシス（酵素的なDNAの切断を特徴とした自死、不必要な細胞の排他機構）を誘導することを見い出している。そこで有機塩素化合物のうち、クロロホルムを代表例として、アポトーシス誘導を指標として検討したところ、生存率の低下や形態変化を生じる暴露濃度以下でアポトーシスが検出された（Fig. 4）。本研究で行ったMTT法による生存率は、細胞のミトコンドリアの障害を反映するものであることを考え合わせると、上記の実験結果はクロロホルムがミトコンドリアよりも先にアポトーシスを介して核内に損傷を与えることを意味しており、アポトーシスが鋭敏な毒性指標として有効である可能性が示された。

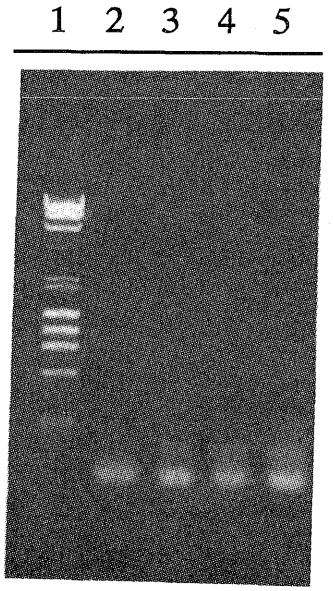


Fig.4.　クロロホルム暴露によるフラグメント化DNAの形成
1:サイズマーカー，2:実験対象，3:0.5mM暴露時，4:1mM暴露時，5:2mM暴露時

まとめ

本研究では、環境汚染として実際に起こり得る複雑な状況を想定して2種類の有害物質の複合暴露という単純な実験モデルで検討した。有機塩素化合物と水銀化合物の両有害物質の複合暴露により毒性が増強することから、これら有害物質の環境基準や排水基準の設定には複合暴露の効果を加味する必要があることが考えられた。低レベルでの有害物質の毒性影響を精度良く評価し、より敏感な生体側の応答を解明していくことは、予防的立場からも重要であり、本研究がその布石となることを期待したい。

なお、これらの研究を行うにあたり、武田志乃博士（社会医学系・助手）と廖　中強君（環境科学研究科・大学院生）の協力を得た。