〈論 文〉

バイオアッセイで評価した化学物質および 環境水の複合的な毒性の定量的記述

庄 司   良*   迫 田 章 義*   酒 井 康 行*
内 海 英 雄**   鈴 木 基 之***

Quantitative Description of Mixture Toxicity of Chemicals and Environmental Waters Detected by Bioassays

Ryo SHOJI*, Akiyoshi SAKODA*, Yasuyuki SAKAI*,
Hideo UTSUMI** and Motoyuki SUZUKI***

- * Institute of Industrial Science, University of Tokyo 7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106-8558 Japan
(at present, Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo National College of Technology, 1220-2
Kunugida-Machi, Hachioji, Tokyo 193-0997 Japan)
- ** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582 Japan
- *** The United Nations University, 53-70-5, Jingumae Shibuya-ku, Tokyo 150-8925 Japan
/Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106-8558 Japan

Abstract

Organizing bioassay data of various chemicals was tried in this work to make use of those data much more effectively and practically for the toxicity control and management of environmental waters. We organized the bioassays' data of single/multi-component chemicals by fitting their dose response relations with formulas. The formulation was generally successful for single/multi-component chemicals except some cases. In addition, interactions among component chemicals were examined by isobole diagram. The toxicity contribution of each chemical in environmental water could be estimated by this method. These trials could be useful for water quality control based on bioassays.

Key words : bioassay, dose-response curve, environmental water, interaction, mixture toxicity

1. はじめに

最近、環境水中の多種多様な化学物質による飲料水を経由した人体への影響が問題になっている。通常河川水中には、個々の物質の濃度は非常に低いが極めて多数の化学物質が同時に含まれている。それらの複合的な毒性も考えられるため、生体の応答を利用して総括的毒性評価の可能性を有するバイオアッセイが注目される¹⁾。現行の機器分析による物質の濃度を指標とした水質基準を基礎とする水環境管理体系においては、ヒトなどのほ乳類細胞を用いたバイオアッセイ系による濃度依存的な用量作用関係を含む毒性評価データを有効利用していくことが、物質レベルでの水環境管理にも有効になると考えられるからである。一方、近年のバイオアッセイ研究によって、代表的な数百種類の化学物質の毒性に関する情

報が出揃いつつあり、これらの情報を有効活用することは、今後バイオアッセイによる水環境管理論に重要な布石を与えうると考えられる²⁾。

しかしほとんどのバイオアッセイデータとしては、EC₅₀に代表される濃度の情報しか利用されていないのが現状であろう。個々の物質や環境水の毒性情報（用量作用関係）を数式を用いて検討することによって、数理的なデータの解釈が可能になる³⁾。また環境水中で特に問題となる複合的な毒性の解析の上で、それを構成する単一化学物質および環境水自体の用量作用関係の定式化は必要不可欠であると考えられる^{2,3)}。実際の環境サンプルを用いてその複合毒性を数理的に検討した報告例はあまり無い。環境サンプル中の各構成成分の総括的な毒性に与える寄与などの計算や見積りは、US. EPA (United States. Environmental Protection Agency) の TRE

* 東京大学生産技術研究所 〒106-8558 東京都港区六本木 7-22-1
(現東京工業高等専門学校物質工学科 〒193-8610 東京都八王子市梶田町1220-2)

** 九州大学大学院薬学研究科 〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

*** 国際連合大学 〒150-8925 東京都渋谷区神宮前 5-53-70
/東京大学生産技術研究所 〒150-8925 東京都港区六本木 7-22-1

(Toxicity Reduction Evaluation)¹⁴⁾などの物質レベルでの毒性削減を指向した水環境管理に重要となろうが、これには環境サンプルに化学物質を加えた場合の複合毒性の検討がその基礎的な知見を与えうると考えられる。

そこで本研究では、ヒト由来細胞を用いたバイオアッセイによる化学物質及び環境水の毒性データを定式化し、化学物質の2成分系と環境水の多成分系における複合毒性を構成単成分毒性データから記述する手法について検討して、複合毒性の実験データと比較した。加えて等効果線法を用いて複合作用の分類を試み、考察した。

2. 方 法

2.1 試 料

環境水としては、鶴見川下流の汐鶴橋（1999年1月26-27日）及び多摩川中流の日野橋と関戸橋、多摩川支流の浅川の新井橋（1999年6月18-19日）において採取し、TOC (Total Organic Carbon concentration; TOC-5000A, Shimadzu, Kyoto, Japan)を測定した後、0.22 μmのフィルター (Advantac DISMIC-25cs, TOYO Co., Tokyo, Japan)で濾過滅菌した河川水を用い、必要に応じて超純水 (Milli-Q UF, Millipore Co., Bedford, MA)で希釈して実験に供した。ちなみに鶴見川水は潮流の影響を受けていないことを電気伝導度の測定によって確かめている。この試料水90%に10倍濃縮したDMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium; Nissui Pharm., Tokyo, Japan)を添加し、血清 (FBS; fetal bovine serum; Cosmo Bio, Tokyo, Japan) 1.25%を添加して細胞に曝露した。河川水用量作用曲線の検討には試料水の濃縮は行わず、超純水によって10, 100, 1000, 10000倍に希釈した試料を調整し培地を作成した。培地には他に20mM-HEPES (N-2-hydroxyethylpypelazine-N-2-ethansulfonic acid, Dojindo Lab. Kumamoto, Japan)と100units-penicillin・m⁻¹ and 100μg-streptomycin・m⁻¹を添加した。複合毒性実験に使用した化学物質をTable 1に示す。使用した化学物質はいずれも環境中によく検出される代表的な環境汚染物質であり、これらは環境庁の未来環境創造型基礎研究制度「化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究」から供与を受けたものである。必要に応じてDMSO (Dimethyl sulfoxideSIBU; 特級; Wako, Osaka, Japan)に溶解させ、培地に添加しているが、DMSOの

培地中最終濃度は0.5vol%であり、その場合DMSO自体の細胞に対する毒性は無視できることを確認している。複合毒性試験に用いた曝露化学物質添加培地の作成に関しては、曝露濃度の2倍濃度の培地を予め調整して、1:1で混合し曝露した。

2.2 毒性試験

各種毒性試験に広く使われており、培養も比較的容易なヒト肝臓ガン由来細胞株 Hep G2¹⁵⁾を各種化学物質を溶解させた培地もしくは環境水から調製した培地にて培養し、48時間後の細胞生存率を測定した。培養は5% CO₂, 37°Cの下で行った。細胞生存率はAP (Acid Phosphatase; AP) 法¹⁶⁾によって測定した。つまり添加した

p

-ニトロフェニルフォスフェイトが細胞質に一定量存在する酸性フォスファターゼ (AP) により黄色の発色を呈する

p

-ニトロフェノールを吸光度を測定することで定量し、生細胞数を測定した。吸光度と生細胞数が直線関係となるように、原法を基本として予め測定手法を再決定した。すなわち、96穴マルチチャンネルウェルプレート0.32cm²・well⁻¹; Sumilon, Tokyo, Japan)に、細胞を播種密度1×10⁵cells・cm⁻²で播種し、24時間後に各種化学物質または河川水添加培地に交換した。その後48時間培養後にAPの基質である

p

-ニトロフェニルフォスフェイト (Sigma, St. Louis, USA)/酢酸緩衝液を100μl/wellおよびTriton X-100 (Wako, Osaka, Japan)を添加し、2時間37°Cの下で反応後、プレートリーダー (MPR A4i, TOSOH Co., Tokyo, Japan)で

p

-ニトロフェノールの405nmの吸光度を測定した。データの測定は、6ウェルの平均値とした。この時、標準偏差は、平均値の±10%以内であった。

2.3 回帰計算

実験から得られた用量作用関係（濃度の対数に対する細胞生存率）を(1)式に示すロジスティック式により定式化を試みた。定式化には、非線形最小2乗法による回帰を行い、相関係数とAIC値を同時に算出した。

$$y = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{x - m}{s}\right)}$$
 (1)

y: 細胞生存率(-), 0 ≤ y ≤ 1
x: log C
(C: 化学物質の濃度 (mM) 又は河川水の濃縮倍率)
m: log EC₅₀ (y = 0.5になる log C)

Table 1 List of chemicals tested in this work.

Substance	Cas No.	M. W.	m (=LogEC ₅₀)	S (mM)	R ²
Acrlamide (AA)	79-06-1	71.1	5.29	1.9	0.359
2-Chloro-1,1,2-trifluoroethyl ethylether (CFE)	310-71-4	163	-0.92	0.38	0.500
2,4-Dichlorophenol (DCP)	120-83-2	163	-0.91	0.034	0.506
Glyoxal (GOA)	4405-13-4	58	-0.96	0.028	0.931
Methylmercury chloride (MMC)	115-09-3	252	-2.23	0.279	0.989
3-Methylchloroanthrene (MC)	56-49-5	267	-2.36	0.273	0.961
Nickel (II) chloride (NiCl ₂)	7718-54-9	123	-0.69	0.402	0.649
4-Nitroquinoline-N-oxide (4NQO)	56-57-5	200	-2.31	0.45	0.852
Paraquat (PRQ)	1910-42-5	257	-1.14	0.395	0.987
Pentachlorophenol (PCP)	87-86-5	266	-1.05	0.027	0.957
1,2-Phenylenediamine (PDA)	95-54-5	108	-0.98	0.026	0.631
Tributyltin chloride (TBC)	1461-22-9	325	-6.17	2.385	0.972
2,4,5-Trichlorophenol (TCP)	95-95-4	198	1.99	3.368	0.972
p-Toluenesulfoneamide (TNA)	70-55-3	171	-1.84	0.67	0.867

s: 曲線の傾きを間接的に表すパラメータ

また、環境庁未来環境創造型基礎研究制度「化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究」における分担研究の成果である230種類の化学物質の細胞生存率試験のデータ¹⁸⁾を定式化の適合性評価の一部に用いた。

本研究では、複合毒性は個々の化学物質を単独で曝露したときに発現する細胞毒性による細胞生存率の積として表すことが出来ると仮定し、環境水を試料とする場合に限定して、その妥当性と実用性を検討した。この理由としては化学物質 A と B を細胞に複合曝露する場合において、A 成分の毒性によってまず細胞の活性が A の用量作用曲線に従って減少し、細胞活性は新たな正規分布を取り、更に B 成分の細胞毒性によって、B の用量作用曲線に従って細胞の活性が減少するという A と B の間の相互作用のない独立した毒性発現を仮定したためである。すなわち複合曝露系の細胞生存率を Y 、構成成分単独曝露における細胞生存率を y_i とすると、

$$Y = \prod_i y_i \quad (2)$$

物質間相互作用（相加、相乗、拮抗）の決定には、等効果線法を利用した。Haas らによって提唱されているより一般化された等効果線法¹²⁾に基づく、相加作用の場合、以下に示す(3)式が成立する。

$$\sum_i \frac{C_i}{I_i} = 1 \quad (3)$$

ここで C は実際に曝露した物質の濃度 (mM) で、 I は(1)式の逆関数である(4)式で計算される濃度 I (mM) である。

$$\text{Log } I = x = m + s \ln \left(\frac{1-y}{y} \right) \quad (4)$$

(4)式に複合毒性実験によって得られる細胞生存率試験のデータ y を代入することによって、その細胞生存率に対応する各物質の濃度 I (mM) が決定され、これで実際に曝露した物質の濃度 C (mM) を規格化した値 (毒性単位; $C \cdot I^{-1}$ (mM・mM⁻¹)) の和によって相互作用 (相加、相乗、拮抗) を決定する方法であり、(3)式の左辺が 1 を越えた場合は拮抗作用、1 未満の場合は相乗作用と判断される。本研究では 5 桁にわたる広い濃度領域で用量作用曲線を検討したが、一方の物質の細胞毒性が複合毒性を決定しているような場合には、用量作用曲線は理想的には 0 か 1 の一定値を取るためこの等効果線法による相互作用の解析は不可能である。そのため本研究では、用量作用曲線の直線範囲 (相対細胞活性の変化が濃度の対数の変化に比例する) のみにおける実測値と推算値を用いて、相互作用を検討した。

回帰計算には非線形最小二乗法を使用し、相関係数を同時に算出した。計算に使用したプログラムは Delta-Graph ver 4.0.5 (SPSS. US) である。

3. 結 果

3.1 用量作用曲線の定式化

用量作用曲線を定量的に解析するために、用量作用曲線を定式化する試みを行った。用量作用曲線の数量的な解析には様々なモデル式が提案されている。細胞の活性は正規分布に基づくため、プロビットモデルは用量作用曲線を記述する上で最も良く用いられている⁴⁾が、その回帰計算は実験データが 0 ~ 1 の範囲しか対応できないため、環境試料水の評価でしばしば見られる相対細胞活

Table 2 Comparison of dose response models.

	Logit		One-hit		Weibul		Gonperz	
Equation	$y = \frac{1}{1 + \exp\{-\{a + b \text{Log} C\}\}}$		$y = 1 - \exp(-b \text{Log} C)$		$y = 1 - \exp(-a C^b)$		$y = 1 - \exp\{-\exp(a + b \text{Log} C)\}$	
Number of parameter	2		1		2		2	

(Whole conc. range)								
Substance	Logit		One-hit		Weibul		Gonperz	
	AIC	R ²	AIC	R ²	AIC	R ²	AIC	R ²
Trichlorophenol	-4.718	0.972	-5.027	0.936	-4.671	0.973	-4.671	0.973
Tributyltin chloride	-5.991	0.972	-6.720	0.936	-5.622	0.978	-4.173	0.904
Pentachlorophenol	-4.980	0.957	-7.689	0.983	-5.199	0.965	-0.705	0.566
Methylmercury chloride	-11.421	0.989	-12.966	0.987	-8.277	0.969	-10.090	0.980
Methylchloroantherene	-8.116	0.961	-10.033	0.959	-6.122	0.909	-10.027	0.948
Toluenesulfoneamide	-9.891	0.866	-10.595	0.722	-10.364	0.895	-8.695	0.722
Dichlorophenol	-9.530	0.506	-11.530	0.506	-9.530	0.506	-9.530	0.506
Nickel chloride	-7.207	0.649	-9.123	0.654	-7.196	0.651	-7.196	0.651
Glyoxal	-6.766	0.931	-9.070	0.82	-8.960	0.905	-11.418	0.905
Paraquat	-11.921	0.987	-9.139	0.96	-8.960	0.955	-11.418	0.985
Phenylene diamine	-8.422	0.941	-11.139	0.710	-5.158	0.698	-9.463	0.965

(Lower conc. range below ED ₅₀)								
Substance	Logit		One-hit		Weibul		Gonperz	
	AIC	R ²	AIC	R ²	AIC	R ²	AIC	R ²
Trichlorophenol	-4.738	0.982	-5.327	0.941	-4.231	0.975	-4.671	0.978
Tributyltin chloride	-5.321	0.992	-6.453	0.949	-5.444	0.979	-4.321	0.911
Pentachlorophenol	-4.830	0.991	-7.922	0.988	-5.121	0.969	-0.715	0.874
Methylmercury chloride	-11.888	0.998	-11.483	0.983	-9.831	0.974	-10.11	0.960
Methylchloroantherene	-8.157	0.984	-10.021	0.975	-6.893	0.963	-10.836	0.983
Toluenesulfoneamide	-9.839	0.936	-10.528	0.823	-10.928	0.931	-8.343	0.793
Dichlorophenol	-9.534	0.755	-11.983	0.683	-9.232	0.603	-9.634	0.622
Nickel chloride	-7.283	0.778	-9.222	0.721	-7.733	0.719	-7.253	0.732
Glyoxal	-6.838	0.988	-9.9321	0.899	-8.738	0.991	-11.721	0.976
Paraquat	-11.441	0.989	-9.135	0.965	-8.983	0.956	-11.118	0.988
Phenylene diamine	-8.637	0.983	-11.288	0.788	-5.135	0.747	-9.356	0.993

性が1を超える用量作用曲線データは扱えない。ロジスティックモデルも用量作用曲線に見られるS字型の曲線をよく記述でき、マルチヒットモデルは発ガン試験で良く用いられている⁵⁾。11種類の化学物質の細胞生存率試験から得られた用量作用曲線をこれらのモデルを用いて非線形最小2乗法で回帰計算し、実測値との整合性を検討した結果をTable 2に示す。相関係数に加えて式に含まれるパラメータの数を考慮した情報量基準のAIC分析を同時に行ったが、その結果用いるモデルによる実験データとの相関性の差はほとんど見られなかった⁶⁾。そこで本研究では以下に列記した理由から、(1)式に示すロジスティック式により定式化を試みた。

1) Table 2より用量作用曲線の検討した濃度領域全体では、相関係数、AIC値ともにモデル間の差は見られない。

2) 本研究は多種多様な化学物質の低濃度水溶液である環境試料水を対象とするが、 EC_{50} より低い濃度領域に限って実験データを回帰した場合においてはロジスティックモデルが最も良い相関係数を示した。

3) 細胞の活性の分布は正規分布を取るため、用量作用曲線はシグモイド型となる。

4) 回帰計算のための、数値解析が比較的容易である。

(1)式により定式化した用量作用曲線と実測値との比較の一例をFig. 1に示す。トリブチル錫を曝露した場合の実験データと回帰した用量作用曲線は比較的良く一致していたが、リン酸トリブチルのような低濃度領域においても強い細胞毒性を発現する物質を曝露した場合には、相関係数(R^2)は0.7程度と低い値になった(Fig. 1a)。後者のように EC_{50} を変曲点とした点対称な用量作用曲線ではなく、非対称な用量作用曲線を与える物質に関しては、実測値と回帰曲線の間の相関係数は低かった。128種の化学物質のうち104種類の物質が相関係数 $R^2=0.70$ 以上と、実測値と回帰曲線は良く一致したことから、(1)式は単成分系の用量作用曲線を表す式として用いても差し支えないと考えられる。

鶴見川汐鶴橋付近において約3時間おきに24時間採取した河川水において、最も低い値を示した河川試料水(採取日時; 1999年1月26-27日16:15)では細胞生存率が0.2程度であった。これは、雨水の流出によって地表に蓄積した道路上における多環芳香族化合物¹⁷⁾などの大気汚染物質の河川への混入などが原因の一つとして考えられる。しかし毒性の原因究明には、採取した河川水サン

Fig. 1 Formulation of dose-response curves. (Single component)

Each point represents the mean $\pm$ SD of the experimental values in 6 wells.

ルの物質レベルの個別分析を行う必要がある。

本河川試料水を超純水で希釈することで得られる用量作用曲線を、(1)式で定式化した結果をFig. 1bに示す。この河川試料水の場合には、(1)式によって相関係数(R^2)は0.87及び0.89と高い相関性で回帰することができた。この例以外に10種類の河川試料水について同様に定式化を行ったところ、すべての試料について相関係数(R^2)は0.86以上での定式化が可能であった(Table 3)。このことから、単一化学物質および河川水の用量作用曲線も(1)式で表されるロジスティック式で記述することが可能であり、毒性発現の濃度依存性を同じパラメータで記述できることがわかった。

3.2.2 成分系複合毒性 (1+1)

まず、(2)式による複合毒性の記述の妥当性を確認する

Table 3 Formulation of the cytotoxicity of Tama-River water samples.

Sample spot	Time	Day	m (=Log EC_{50} (TOC))	s	R^2
Sekido-bashi	22:00	6/18, 99	2.602	2.376	0.980
Arai-bashi	18:00	6/18, 99	0.884	0.641	0.920
Hino-bashi	16:00	6/18, 99	0.148	0.371	0.989
Araki-bashi	00:00	6/19, 99	-0.219	1.225	0.978
Araki-bashi	22:00	6/18, 99	0.342	1.203	0.987
Araki-bashi	2:00	6/19, 99	0.247	1.085	0.954
Sekido-bashi	2:00	6/19, 99	0.485	0.615	0.986
Sekido-bashi	6:00	6/19, 99	0.685	0.648	0.867
Hino-bashi	12:00	6/19, 99	0.611	0.574	0.943
Hino-bashi	00:00	6/19, 99	1.14	0.877	0.990
Tsurumi 1	16:15	1/26, 99	-2.031	0.534	0.870
Tsurumi 2	19:20	1/26, 99	-1.444	0.502	0.894

Fig. 2 Formulation of dose-response curves. (Two components)
Each point represents the mean $\pm$ SD of the experimental values in 6 wells.

Fig. 3 Formulation of dose response curves. (Multi-component chemicals)
Each point represents the mean $\pm$ SD of the experimental values in 6 wells.

ために、Table 1 に示した15種類の化学物質の中から選んだ2組の2成分系 (PDA+NiCl₂および PDA+TCP) の複合毒性のデータと、(2)式を用いて記述した用量作用曲線を比較した (Fig. 2)。実測値と回帰曲線との相関係数 (R^2) を同図に収載した。検討の結果、単成分系での細胞毒性の強弱に関わらず、高濃度領域を除いて概ね推算と実測はよく一致した。更に、7通りの2成分系の組み合わせにおいても、(2)式で推算される細胞毒性と実測値はほぼ一致した (Fig. 5)。ただし、Fig. 5において例えば 4 NQO+MC, DCP+TNA や TBC+MMC の組み合わせのように、(2)式による推算値が実測値と比較して低く見積もられてしまう例も見られた。これらの例については2成分間の相互作用に関する更なる検討が必要であるが、一般的には2成分系の複合細胞毒性を(2)式で記述することが可能であると言えよう。

3.3 多成分系複合毒性 ($n+1$)

次に、多成分系である河川試料水に更にある1種類の化学物質を添加した場合の複合毒性を解析する方法を検討した。多成分系 (n 成分系) である鶴見川河川水にフェニレンジアミンを加えて ($n+1$) 成分系とした場合の複合曝露における相対細胞活性の実測値と(2)式を用いて得られる用量作用曲線は化学物質2成分系と比較して高濃度領域を除いては良く一致した (Fig. 3)。さらに、3通りの組み合わせで同様の検討を行ったが (Fig. 5)、それらの場合、実測値と推算値は良好に一致しており、($n+1$) 系の複合毒性も(2)式で表現できるとしてよいと思われる。以上の結果から帰納的に、多成分系の河川試料水に化学物質を加えた複合毒性は、実際に環境中で問題となる化学物質の低濃度領域に限定していえば、その河川試料水と化学物質の細胞毒性の積で概ね表現できると結論できる。また Fig. 5 において化学物質2成分系よりも多成分系 ($n+1$ 成分系) の相関性が高く、これは河川試料水中に存在する多種多様な化学物質がいずれも低濃度のために、新たに加えた化学物質との相互作用が顕著に発現しないためと考えられる。

以上の検討では、広範囲な濃度領域での複合細胞毒性の実測値と(2)式による推算値との整合性を確認したが、個々の成分の一方が複合毒性を支配している場合、一方の成分の挙動だけが(2)式によって良く記述されている可能性もある。そこで、Fig. 3a に示した河川試料水とフェニレンジアミンの複合曝露系における用量作用曲線の中で、複合毒性に対する両方の成分の寄与がほぼ等しい濃度領域である $x(\text{PDA}) = 0 \sim -2$ 及び $x(\text{River water \#1}) = 0 \sim -1$ における用量作用曲線を Fig. 4 に示して、(2)式による複合曝露系における相対細胞活性の記述の整合性を更に検証した。その結果、河川試料水を最も高濃度に曝露した場合の用量作用曲線においては、実測値と推算値との差が大きくなったものの、他の河川試料水の曝露濃度では実測値と推算値とは良い一致が見られた。この良い一致が見られた濃度領域では、複合した成分の細胞毒性の寄与は河川試料水と化学物質で同程度であり、一方の成分が細胞毒性を支配していない場合での実測値と(2)式によって推算した用量作用曲線との相関性は高くなった。以上の事から、(2)式は多成分系である河川試料水に化学物質を加えた複合曝露系で、片方の成分が総括的な毒性を支配していない場合でも、相対細胞活

Fig. 4 Formulation of dose response curves in high concentration range. (Multi-component chemicals) Each point represents the mean $\pm$ SD of the experimental values in 6 wells.

Fig. 5 Comparison between predicted and experimental Y values.

性を相関性良く記述できるといえる。

3.4 相互作用の分類

2物質の複合毒性の相互作用の検討のため、用量作用曲線の直線範囲（相対細胞活性が濃度の対数に比例して減少する濃度範囲）について、等効果線法による解析を行った（Fig. 6）。この図の両軸は、複合曝露系での相対細胞活性に対応する各構成成分の物質の濃度で実際に曝露した物質の濃度を規格化した毒性単位（ $C_i \cdot I_i^{-1}$ ）であり、図中点線で示した(3)式で表される線上が相加作用を表す。図中の括弧内の数字（ C_1, C_2 ）は実際に曝露した2

Fig. 6 Isobole diagram.

成分の濃度（mM）を示す。この相互作用の検討の結果、複合する化学物質の組み合わせやそれらの濃度比によって作用が複雑に変化することがわかる。また、GOAと NiCl_2 の組み合わせではFig. 6に示すように(3)式の左辺で示される毒性単位の和は0.5となり相乗作用と判断され、Fig. 5においても推算値は実測値よりも高くなった。逆に、PRQとPDAの組み合わせでは(3)式の左辺で示される毒性単位の和は1.5となり拮抗作用と判断され、推算値は実測値よりも低い相対細胞活性を示した。また、(3)式の左辺で示される毒性単位の和は1.0となり相加作用を示すと判断される組み合わせでは(2)式による計算値と実測値はよく一致した。(2)式は、複合曝露系で個々の成分間の相互作用がない場合、すなわちFig. 6における斜線の付近に相当する場合には、特に相関性高くその複合毒性を記述することが可能であると考えられる。しかしこの等効果線法による物質間相互作用の解析は、用量作用曲線における濃度と作用が直線的に変化する濃度領域のみに適用できるものであり、本研究で扱った広い濃度領域における相互作用の解析は不可能である。

また河川試料水に化学物質を加えた場合、良い相関で複合毒性を表現することが可能であったが、これは非常に低濃度の多種多様な化学物質の混合物である河川試料水では、相互作用を起こすような特定の機構由来の細胞毒性の寄与は少なく、また仮にそうした化学物質が存在したとしても、その相互作用の相手となる物質は極めて低い濃度であるが故に、物質間相互作用が無視できる作用（相加作用）となるためと考えられる。

4. 考 察

化学物質や環境水の毒性を定式化することによって、数学的な解析が可能となりその利点を生かし、構成成分の用量作用曲線を記述する数式を組み合わせた複合毒性の記述手法を提案した。複合毒性の予想手法の確立によって、河川にある排水を流出させた場合の全体に与える影響の見積りが可能になる。また環境水の定量分析データが明らかな物質について、毒性データベースからその物質の総括的な毒性に与える寄与率が単純な割算で計算できるようになるなどの利点が考えられ、本研究で示した複合毒性の記述法は、水環境管理の上で非常に有効な方法論となりうると考えられる。今回は記述した結果が、哺乳類細胞を利用した人体影響を評価する目的を持つバイオアッセイによる水環境管理において、こういった利点が生じるのかという点に着目して研究を進めた。結果として、化学物質2成分や多成分系の複合毒性をある程度高い相関性で記述することが可能であった。特に環境水に化学物質を加えた場合、良い相関で毒性を表現することが可能であったが、これは非常に多種多様のそして極低濃度の化学物質の混合物である環境水では、相互作用を起こすような特定の機構由来の毒性の寄与は少なく、また仮にそうした化学物質が存在したとしても、その相互作用の相手となる物質は極めて低い濃度であるが故に、物質間相互作用が無視できる作用すなわち相加作用となるためと考えられる。

(2)式で示したように、本研究では複合毒性を単純に構成する個々の成分の細胞毒性の積で表現した。これは単純に細胞の活性の分布は正規分布に従い、細胞毒性は弱った細胞には強く正常な細胞には弱く発現するという仮定、すなわち毒性は曝露される細胞の活性に応じて発現するという仮定の下に成り立つものである。実際の複合曝露系の細胞毒性は物質間の相互作用による複合的な毒性を考慮する必要がある場合もあり得る^{10,11)}。しかし環境試料水中の毒性原因同定のために必要となる多成分系環境試料水における個々の物質の毒性寄与率の計算には薬物の副作用や複合投与の影響の解析に必要な詳細且つ正確な複合毒性の推算は必要とせず、Fig. 3 に示したような相関係数 (R^2) が0.8程度の整合性が確保できれば実用上十分である。

複合毒性の記述には、物質間相互作用（相加、相乗、拮抗）を考慮する必要がある場合もあるが、これには化学物質の毒性発現機構が大きく関与する。複合した場合の機構が明確な組み合わせとしては、界面活性剤類との複合毒性に関する研究が多く有り⁸⁾、界面活性剤を含む組み合わせにおいてはほとんどの場合に相乗的効果が確認されている。Nirmalakhandan らは EC_{50} で規格化した毒性単位を用いる等効果線法で、それぞれ構造活性相関や親水/疎水性の視点から、物質間相互作用（相加・相乗・拮抗）を予測した¹⁰⁾。しかし、彼等の方法によると記述できる化学物質の種類や濃度範囲が限定される¹¹⁾。また、Haas らは熱力学でよく用いられる Margueles 式を拡張して適用することで広範囲な濃度領域で相乗・拮抗作用の程度を解析している¹²⁾。しかし、物質の濃度のみの一次元的な比較だけでは、より複雑な環境試料水に対する適用が困難である。Berenbaum は複合毒性の数学的

な記述法を提案しており¹³⁾、実験的な確証を得ているわけではないが、全く異なる視点から式を誘導している点で興味深い。他にも幾つかの複合毒性の記述が提案されているが、いずれの方法も適用するためのデータが広範囲な濃度領域で求められるため、環境試料水に適用するためには濃縮等の前処理が必要になり、環境管理のツールとしての適用には改善の余地がある。また、これら既知の毒性発現機構に基づいて物質間相互作用を明確に分類する方法は、高濃度の化学物質の2成分の組み合わせ等極めて限られた局面でのみ通用するものであり、環境水を対象とする場合には、広範囲な濃度領域で適用できるようより一般化した方法が必要になろう。そこで、環境試料水と化学物質の用量作用曲線を同一の指標と同型の数式で記述すれば、直接的な数式による演算が可能になるために、環境管理へ適用するのが容易な方法となると思われる。

本論文でも等効果線法による因子解析等の検討によって(2)式で得られる複合曝露系での細胞生存率データと比較を行ったが、この結果を元にして(2)式に相互作用を示すパラメータを盛り込むことによって、より確実な複合毒性の予測が可能になると考えられる。Fig. 6 において、各点の原点からの距離で相加作用を示す(3)式の原点からの距離を割算して得られる補正係数 a は以下の(5)式で示される。

$$a = \left(\sum_i \frac{C_i}{\Gamma_i} \right) \quad (5)$$

この補正係数を(2)式の右辺に乗じて得られる

$$Y = a \prod_i y_i = \sum_i \frac{C_i}{\Gamma_i} \prod_i y_i \quad (6)$$

は、相互作用を考慮した実験式となり、実際にこの(6)式による計算値と実験値は一致した。以上より、(2)式は構成する成分が相加作用（構成成分間の相互作用がない）を示す場合、その複合による毒性を記述することが可能になり、(6)式によって相乗または拮抗を示す組み合わせでも、その複合毒性を記述することが可能であると考えられる。ただし Fig. 6 で一部示したように等効果線法で用いた毒性単位 $C \cdot \Gamma^{-1}$ は濃度領域に応じて広範な値を取り得るため、(5)式で示した補正係数を全濃度領域で単純に(2)式に乗ずることはできない。このことは2成分または多成分の相互作用は、その濃度比によって複雑に変化することと等効果線法では用量作用曲線が直線的に変化する領域のみ物質間の相互作用を解析できるという限界のためであり、複合毒性における相互作用の解釈の難しさを示している。米元らもラット胎仔肢芽培養法を用いて環境中の有機塩素化合物の相互作用を等効果線法を用いて解析している。細胞増殖と分化の両方を毒性のエンドポイントとして、複合毒性を解析しており、物質の組み合わせによる複合毒性の機構の複雑さを指摘している⁷⁾。

また今回用いたロジスティック式は、単一化学物質及び河川水の用量作用曲線をほぼ記述することが可能であったが、一部の物質で相関性が悪かった物質も有り、単一物質でさえもその毒性発現機構の複雑さを示しているものと考えられる。その原因についても今後考察をする必要がある。

(2)式に示した複合曝露系の相対細胞活性をロジス

ティックモデルに基づいた個々の化学物質の用量作用曲線の積により表現する方法は、特に河川試料水に化学物質を加えた複合曝露系での実測値を良い相関性で記述することが可能であった。このことから、少なくとも河川水等の多成分混合系を対象とする場合においては、毒性発現機序の理解に基づいた相互作用を考慮する必要はなく、複合毒性を(2)式により記述することが可能かつ現実的であると言える。

加えて、本研究で示した複合毒性記述法は(1)式の濃度の単位を工夫することによって、河川の合流による毒性の変化の予測等、多成分系同志 ($m+n$ 成分系) の複合毒性の評価に応用することも可能であると考えられ、今後の検討として興味深い。

現行の化学物質の濃度を基準とする水質基準体系に対して、バイオアッセイは化学分析をするまでも無く総括的な毒性を直接評価することができるという利点から水環境分野でも着目されてきている。しかしバイオアッセイの結果、何らかの処理や対策が必要であることを示しても、実際の管理手法に有効な情報を与えることはバイオアッセイの結果だけでは困難である。本研究で検討した複合毒性の記述法は化学物質の濃度の分析値とその用量作用曲線から得られる毒性の情報で河川水における物質間相互作用によって生じる複合的な細胞毒性を記述することを可能として、現行の化学分析による水質基準体系とバイオアッセイを統合させることにより、より説得力のある統合的水質評価とそれに基づく管理の対象となる化学物質を示すことが可能となろう。

以上、複合曝露系の細胞生存率をロジスティックモデルに基づいた構成単成分用量作用曲線の積により単純に表現した結果、実測値を良い相関性で記述することが可能であった。このことから、環境水の総括的な毒性に与える構成成分の毒性の影響を(2)式によって簡単に見積もることが可能になった。現行の物質の濃度を基準とする水質基準体系に対して、バイオアッセイは総括的な毒性を把握するという利点から水環境分野でも着目されてきているが、本手法のようなアプローチで、物質(群)単位での水環境管理にも、バイオアッセイによる水環境評価の適用が可能であると考えられる。

謝 辞

本研究でモデル化学物質として用いた化学物質は、九州大学大学院薬学研究科の内海英雄教授を代表とする環境庁未来環境創造型基礎研究制度「化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究」から供与を受けたものである。また本研究の実験に際し、東京理科大学の大村佳子さん(現東京工業大学大学院)、荻原有紀さんの協力を得た。深甚の謝意を表する。

(原稿受付 1999年9月13日)

(原稿受理 2000年5月25日)

参 考 文 献

- 鈴木基之, 酒井康行 (1995) 工学からみたバイオアッセイの有用性, アニテックス, 7, 27-31.
- 2) 庄司良, 大村佳子, 酒井康行, 迫田章義, 内海英雄, 鈴木基之 (1999) 環境水及び化学物質の複合毒性に関する定量的評価の試み, 生産研究, 51, 571-574.
- 3) Sakoda, A., Shoji, R., Sakai, Y. and Suzuki, M. (1998) An attempt to organize bioassays' data of various chemicals, *Proc. of 7th Japan/Korea Symposium on Water Environment*, 126-133.
- 4) Fishbein, L. (1980) Overview of some aspects of quantitative risk assessment, *J. Toxicol. Environ. Health*, 6, 1275-1296.
- 5) Rai, K. and Ryzin, J. (1981) A generalized multihit dose-response model for low-dose extrapolation, *Biometrics*, 37, 341-352.
- 6) 庄司良, 大村佳子, 酒井康行, 迫田章義, 鈴木基之 (1999) 化学物質複合毒性のバイオアッセイによる定量的評価, 第33回日本水環境学会年会講演集, 79.
- 7) 米元純三, 曾根秀子, 白石寛明, 稲葉一穂, 相馬悠子, 小林智 (1997) 環境中有機塩素化合物の相互作用の解析, 水環境学会誌, 20, 757-762.
- 8) Witte, I., Jacobi, H. and Juhl-Strauss, U. (1996) Suitability of different cytotoxicity assays for screening combination effects of environmental chemicals in human fibroblasts, *Toxicol. Letts.*, 87, 39-45.
- 9) Sprague, J.B. (1970) Measurement of pollutant toxicity to fish II Utilizing and applying bioassay results, *Wat. Res.*, 4, 3-32.
- 10) Nirmalakhandan, N., Arulgnanendran, V., Mohsin, M., Sun, B. and Cadena, F. (1994) Toxicity of mixtures of organic chemicals to microorganisms, *Wat. Res.*, 28, 543-551.
- 11) Veith, G.D. and Broderius, S.J. (1990) Rules for distinguishing toxicants that cause type I and type II necrosis syndromes, *Environ. Health Pers.*, 87, 207-211.
- 12) Haas, C.N., Cidambi, K., Kersten, S. and Wright, K. (1996) Quantitative description of mixture toxicity: Effect of level of response on interactions, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1429-1437.
- 13) Berenbaum, M.C. (1985) the expected effect of a combination of agents: the general solution, *J. theor. Biol.*, 114, 413-431.
- 14) U.S. EPA. (1989) Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations (TREs), EPA/600/2-88/070.
- 15) Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. And Knowles, B.B. (1979) Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, *Nature*, 282, 615-616.
- 16) Connolly, D.T., Knight, M.B., Harakas, N.K., Wittwer, A.J. and Feder, J. (1986) Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay, *Anal. Biochem.*, 152, 136-140.
- 17) 小野芳朗, 岡村秀雄, 河原長美, 青山勲, 小田美光 (1999) 雨天時路面排水水中塵埃の遺伝毒性・生態毒性評価, 水環境学会誌, 22, 561-567.
- 18) Shoji, R., Sakai, Y., Sakoda, A., Suzuki, M. and Utumi, H. (1998) Rapid bioassay of toxicity in environmental water by LDL-uptaking activity of human cell, *Wat. Sci. Tech.*, 38, 271-278.

- 1) 鈴木基之, 酒井康行 (1995) 工学からみたバイオアッセイの有