

## <研究発表>

### 多環式芳香族炭化水素類のモデル細胞膜への分配特性

池田 和弘<sup>1</sup>, 小栗 拓也<sup>1</sup>, 清水 芳久<sup>1</sup>, 川田 篤史<sup>1</sup>, 松井 三郎<sup>2</sup>

京都大学工学研究科 流域圏総合環境質研究センター (〒520-0811 大津市由美浜 1-2 E-mail: ikeda@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp)  
 京都大学地球環境学堂 (〒606-8501 京都市左京区吉田本町 E-mail: matsui@eden.env.kyoto-u.ac.jp)

#### 概要

本研究では、疎水性有機汚染物質の水生生物に対する Baseline Toxicity を評価するためにモデル細胞膜への分配係数 ( $P_{mw}$ ) の測定を提案し、最適なモデル細胞膜を選定するための基礎的研究を行った。モデル細胞膜として粒径  $1\mu\text{m}$  程度のリポソームを作製し、24時間の回分式実験により  $P_{mw}$  を測定した。疎水性有機汚染物質として多環式芳香族炭化水素類 (PAHs) を測定対象とし、モデル細胞膜の構成リン脂質の違いが PAHs の分配に与える影響について評価した。その結果、Pyrene の  $P_{mw}$  は構成リン脂質 (ホスファチジルコリン) の脂肪鎖の長さによって大きく異なり、細胞膜が流動相となるリン脂質で特に大きくなった。4種の PAHs に対し、流動相となる細胞膜とゲル相となる細胞膜への  $P_{mw}$  を測定した結果、両者の間には良好な相関関係があった。この結果、PAHs に関しては、実際の生物のものと同じ状態ではあるが、不安定である流動相となる細胞膜の代わりに、ゲル相となる細胞膜を用いて  $P_{mw}$  を類推することができることが分かった。

キーワード: 多環式芳香族炭化水素類、Baseline Toxicity、モデル細胞膜、構成リン脂質、相状態

#### 1. はじめに

水環境保全において水生生物の保護という概念が導入され始めており、個々の化学物質の管理や排水処理における除去特性の評価に藻類などを用いた生物試験が期待され、導入されつつある。生態リスクを評価し、原因物質を除去するシナリオを作成するという観点から考えると、毒性の種類を同定・定量することは極めて重要と言える。

Baseline Toxicity はそれぞれの化学物質が持つ毒性の中で最も低い毒性であり、化学物質が細胞膜に分配し、何らかの機能障害を引き起こすことにより発生すると考えられている。この毒性は相加的に効くため、特に疎水性有機汚染物質が基本的に細胞膜の疎水性領域に分配しやすいことを考慮すると、処理水など複雑な混合系の場合は無視できないものとなることも予想される。

Baseline Toxicity を個々の化学物質に対し、あるいは、処理水に対し、迅速に評価するためには、モデル細胞膜を用いて膜への分配係数 ( $P_{mw}$ ) を測定することが望ましい。もちろん、 $P_{mw}$  の大きさと、各種水生生物に対する毒性の  $\text{LC}_{50}$  などとの関係を把握することも必要とされる。また、処理水などでは  $P_{mw}$  は化学物質全体に対し測定する必要があるため、実測は困難であり、膜への分配した総量を何らかの信号としてとらえる必要がある。





モデル細胞膜は実験室で合成可能であり、また近年は市販もされている。リポソームは実験室で合成できるもののひとつであり、医薬品開発においては  $P_{mw}$  を測定することによって体内への吸収効率の評価を行うなど、すでに利用されている。

細胞膜は生物種や器官によって異なる脂質で構成されている<sup>2)</sup>。水生生物は藻類や魚類など多様な種を含むため、

その細胞膜の特性は大きく異なると考えられる。したがって、広範な種類の水生生物に対する Baseline Toxicity の評価に  $P_{mw}$  を利用するためには、使用するモデル細胞膜の種類あるいは組み合わせを適切に選択する必要がある。

そこで本研究では、最適なモデル細胞膜の選定のための基礎的な情報を得ることを目的とし、モデル細胞膜を構成する脂質の種類が疎水性有機汚染物質の膜への分配に与える影響について評価した。特に、構成脂質の脂肪鎖の長さに注目した。測定対象物質としては代表的な疎水性有機汚染物質である多環式芳香族炭化水素類 (PAHs) を用いた。

Table 1 PAHs の物理化学的特性

名称	Fluorene	Phenanthrene	Anthracene	Pyrene
構造式				
分子量	166.2	178.2	178.2	202.3
$\log K_{ow}$	4.18 <sup>5)</sup>	4.52 <sup>5)</sup>	4.34 <sup>5)</sup>	4.88 <sup>5)</sup>
水溶解度 (mg/L)	1.98 <sup>5)</sup>	1.29 <sup>5)</sup>	0.0730 <sup>5)</sup>	0.135 <sup>5)</sup>
蛍光強度測定波長 (nm)				
励起	264	294	250	335
蛍光	301	363	379	371

#### 2. 実験方法

##### 2.1 PAHs

本研究では、無極性の疎水性有機汚染物質である4種の PAHs、Fluorene、Phenanthrene、Anthracene および

Pyrene (いずれも和光純薬) を  $P_{mw}$  の測定対象とした。Table 1 にこれらの物質の物理化学的特性を示す。これらのオクタノール/水分配係数 ( $K_{ow}$ ) は  $\log K_{ow}$  として 4.18 から 4.88 である。PAHs 水溶液の作製は溶解助剤などを用いずに行った<sup>6)</sup>。PAHs の定量は蛍光光度計 (島津製作所 RF-5000) を用いた。各 PAHs に対する測定条件を Table 1 中に示す。なお、光分解を避けるため試料調整や測定は暗所で行った。

## 2.2 モデル細胞膜

### (1) モデル細胞膜の選定

細胞膜はリン脂質などを主要構成成分とし、脂質二重層の構造を持つ。リポソームは脂質二重層を持つ小胞体であり、さまざまな脂質を用いて作製することができるが、使用する脂質によって表面電荷や流動性が異なってくる。特に、流動性 (脂質分子間の密度と関連する) は構成脂質の脂肪鎖が短くなるほど上昇する。流動性は温度依存的でもあり、膜は相転移温度の上下で流動相とゲル相という異なる相状態をとる。またその中間ではさざなみ相となる (Fig. 1 参照)。実際の生物の細胞膜は不飽和の脂肪酸を含むさまざまな脂質やタンパク質から構成されるため流動相となっているが、部分的には流動性のやや低い部分も存在する。

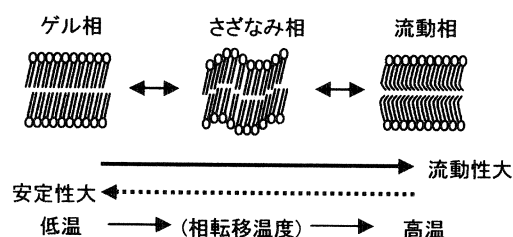


Fig. 1 細胞膜の相状態

本研究においてはリン脂質として、動物細胞の主要構成成分のひとつであるホスファチジルコリン (Fig. 2 参照) を用いリポソームを作製した。ホスファチジルコリンの脂肪鎖の炭素数を 12、14、16、18 および 20 とし (いずれも Sigma Co.)、5 種類のリポソームを作製した。以降それぞれのリポソームを Lip12、Lip14、Lip16、Lip18 および Lip20 と呼ぶ。 $P_{mw}$  を測定する実験は 23°C で行ったため、Lip12 は流動相、Lip14 はさざなみ相、Lip16、Lip18 および Lip20 はゲル相となる。これらの使用したリポソームの特徴を Table 2 にまとめる。

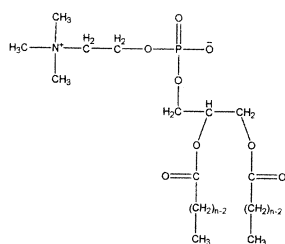


Fig. 2 脂肪鎖の炭素数  $n$  個のホスファチジルコリン

Table 2 リポソームの特性

構成リン脂質		リポソーム		
名称	脂肪鎖炭素数	略称	相転移温度(°C)	23°Cでの相
ジラウロイル ホスファチジルコリン	12	Lip12	0	流動相
ジミリストイル ホスファチジルコリン	14	Lip14	23	さざなみ相
ジパルミトイル ホスファチジルコリン	16	Lip16	43	ゲル相
ジステアロイル ホスファチジルコリン	18	Lip18	55	ゲル相
ジアラキドイル ホスファチジルコリン	20	Lip20	64	ゲル相

リポソームは作製方法によりさまざまなサイズのものができる。あまりに小さいものは曲率の関係から実際の細胞膜と脂質の密度が異なってしまうため、本研究においては生物の細胞にも匹敵する大きさの粒径 1  $\mu\text{m}$  のものを作製した。

### (2) リポソームの作製

リポソームは松原ら<sup>3)</sup>が用いた方法で作製した。ここでは概略を示す。まず適量のホスファチジルコリンをクロロホルムに溶かし、この溶液をリン酸緩衝液 (10 mM, pH7.0) と混合させ、ロータリーエバポレーター (Büchi Co. Rotvapor R-124, Vac V-500, Vauum Controller B-721) を用いてクロロホルムを蒸発させることで粒径 1  $\mu\text{m}$  を超えるリポソームを作製した。次に、これを孔径 1.2  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート膜 (Millipore 社 アイソポア直径 25 mm) を通過させることによってエクストルージョンを行い、粒径を約 1  $\mu\text{m}$  に調整した。

## 2.3 $P_{mw}$ の測定

本研究では PAHs の細胞膜への分配係数を測定するが、実験手法から見ると、リポソームという収着剤による PAHs の収着実験と言える。したがって、この収着係数を求め  $P_{mw}$  とする。

収着係数は、10 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で、23°C、24時間、30 rpm の回転攪拌の条件で 10 mL ガラス製遠濾管を用いた回分式実験により求めた。PAHs 濃度はそれぞれの水溶解度の 50% 以下となるように設定した。

収着が線形るとき、収着剤であるリポソーム濃度  $[Lip]$  と収着 (分配) 係数  $P_{mw}$  の間には次の関係が成立する。

$$C_0/C = F_0/F = 1 + P_{mw} [Lip] \quad (1)$$

式 (1) において、 $C$  は遊離 (未収着) PAHs 濃度、 $C_0$  はリポソームのないときのもの、 $F$  と  $F_0$  はそれぞれの濃度に対応する蛍光強度である。本研究ではリポソーム濃度を最低 5 段階振り、遊離 PAHs 濃度に対応する蛍光強度  $F$  を測定することで、式 (1) に対応する近似直線の傾きから  $P_{mw}$  の算出を行った。

遊離 PAHs 濃度はリポソームを固液分離すれば測定できるが、超遠心や透析膜の使用は PAHs のプラスチックなどへ

の吸着などによる誤差を生じさせる心配がある。そこで、本研究では松原ら<sup>3)</sup>が開発した、リポソーム中の PAHs がより強く蛍光を発するようになる性質を利用した方法を用いた。ここでは簡略に説明するため、詳細な方法などは参考文献をみていただきたい。

収着実験において同一のリポソーム濃度の遠沈管を複数用意し、収着平衡後、それぞれを異なる強さで遠心沈降させると、上澄み中のリポソーム濃度が異なる。リポソーム濃度は吸光度測定により求めることができる。それぞれの上澄みの蛍光強度を測定すると、遊離の PAHs が発する蛍光強度とリポソーム中の PAHs が発する蛍光強度の和が得られる。遊離の PAHs 濃度はどれも同じであるのに対し、リポソーム中の PAHs が発する蛍光強度はリポソーム濃度に比例するため、上澄みの蛍光強度とリポソーム濃度の関係を外挿することで遊離の PAHs 濃度を求めることができる。

松原ら<sup>3)</sup>は、本研究で使用したのと同じ PAHs の  $P_{mw}$  をゲル相のリポソームである Lip18 に対し測定している。本研究では、流動相とさざなみ相のリポソームに対してこの方法を用いており、その適応性も検証しつつ測定を行った。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 $P_{mw}$ の測定結果

本研究で測定した 4 種類の PAHs の 5 種類のリポソームに対する  $P_{mw}$  の測定結果を Table 3 に示す。表中には同時に、 $P_{mw}$  の算出のために得た、式 (1) に対応する近似直線の決定係数 ( $R^2$ ) と切片を示す。

Table 3  $P_{mw}$  の測定結果

PAHs	$P_{mw}$ (L/kgC)				
	Lip12	Lip14	Lip16	Lip18	Lip20
Pyrene	$5.4 \times 10^5$ (1.8) (0.72)	$1.4 \times 10^5$ (2.2) (0.68)	$3.8 \times 10^4$ (0.95) (0.99)	$2.0 \times 10^4$ (1.0) (0.98)	$1.5 \times 10^4$ (0.92) (0.75)
Phenanthrene	$8.9 \times 10^4$ (0.98) (0.99)		$7.8 \times 10^3$ (1.0) (0.97)		
Anthracene	$8.7 \times 10^4$ (1.0) (0.96)		$1.1 \times 10^4$ (0.94) (0.94)		
Fluorene	$3.0 \times 10^4$ (1.0) (0.95)		$3.1 \times 10^3$ (0.96) (0.80)		

\* 各セルの上段が  $P_{mw}$ 、中段が式 (1) に対応する近似曲線の切片、下段が近似曲線の決定係数 ( $R^2$ )。

表より、いずれの場合の決定係数は比較的高く ( $R^2 > 0.68$ )、測定は良好に行われたといえる。流動相のリポソーム Lip12 に対しても、Pyrene を除くと  $R^2 > 0.95$  であり、本実験で適応した方法は、流動相のリポソームの  $P_{mw}$  の測定に利用できることがわかった。ただし、Pyrene の Lip12、Lip14 に対する  $P_{mw}$  測定に関しては、 $R^2$  がそれぞれ 0.68 と 0.72 であり、他と比較すると低くなった。これは、 $P_{mw}$  の値が高いため、未収着の Pyrene 濃度を蛍光光度計の定量限界以上になるよう設定すると、リポソーム濃度が極めて低くなり、

その濃度測定の際のばらつきが大きくなるのが原因であった。したがって、これ以上  $P_{mw}$  が大きくなるような物質では本方法は適用困難となる可能性がある。

#### 3.2 構成リン脂質の脂肪鎖長の $P_{mw}$ への影響

細胞膜を構成するリン脂質の脂肪鎖長が Pyrene の  $P_{mw}$  に与える影響をみるために、Fig. 3 に測定結果をまとめた。まず、同じゲル相のリポソームである Lip16、Lip 18 および Lip 20 の  $P_{mw}$  の比較から、炭素数が低いほど  $P_{mw}$  は高くなった。炭素数が少ないほど、脂質同士の相互作用が小さくなるため、細胞膜の流動性は上昇する。このことが同じゲル相内で Lip16 の  $P_{mw}$  が最大となる原因であると考えられる。

一方、さざなみ相のリポソームである Lip14 と流動相のリポソームである Lip12 はゲル相のリポソームと比べ、はるかに大きい  $P_{mw}$  となった。特に、Lip12 は著しく大きくなった。これらのことから、Pyrene の細胞膜への分配には構成リン脂質の脂肪鎖長が大きく影響を与え、特に細胞膜の流動性や相状態が重要であることがわかった。

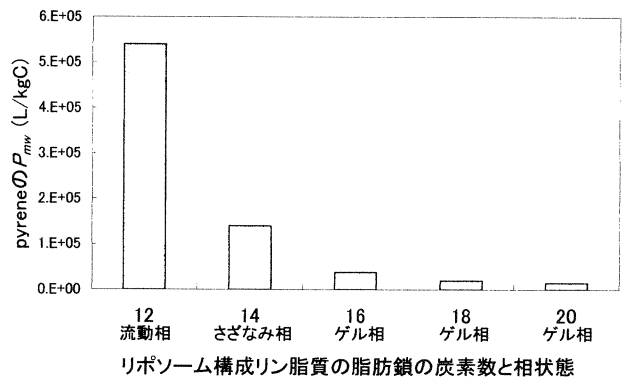


Fig. 3 構成リン脂質の脂肪鎖長が Pyrene の  $P_{mw}$  に与える影響

#### 3.3 ゲル相および流動相のリポソームに対する PAHs の $P_{mw}$ の相関

4 種の PAHs に関し、ゲル相のリポソーム Lip16 と流動相のリポソーム Lip12 に対する  $P_{mw}$  の相関をみるために Fig. 4 に測定結果をプロットした。その結果、両者の  $\log P_{mw}$  の間には良好な相関関係 ( $R^2 = 0.94$ ) が認められた。この結果から、これら PAHs に関しては、ゲル相のリポソームを用いて流動相のリポソームへの  $P_{mw}$  を類推することができることが分かった。

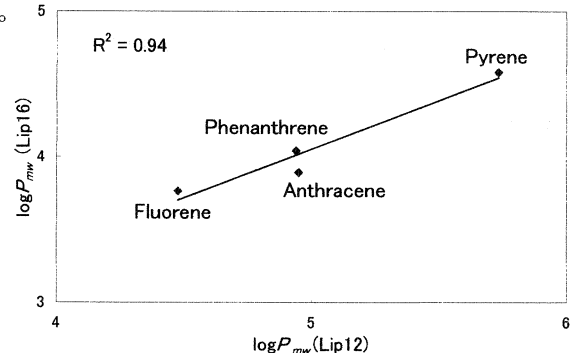


Fig. 4 ゲル相のリポソーム Lip16 と流動相のリポソーム Lip12 に対する PAHs の  $P_{mw}$  の相関

実際の生物の細胞膜と同じ状態である流動相のリポソームは、長時間保存すると凝集あるいは融合する傾向がある。そのため、Baseline Toxicity の評価試験法として  $P_{mw}$  の測定を導入するという観点からは、安定性という点で使用しにくい面もある。今後、さまざまな構成脂質からなるリポソームに対し、同様の相関があるか検証していく必要はあるが、本研究の結果は、この点を克服できる可能性があることを示唆している。

### 3.4 PAHs の $P_{mw}$ と $K_{ow}$ の相関

疎水性指標である  $K_{ow}$  は、疎水性有機汚染物質の毒性の代替指標として用いられてきたことから、ここでは  $P_{mw}$  が  $K_{ow}$  で類推できるか検証する。Fig. 5 に、本研究で得られた PAHs に対する  $P_{mw}$  を  $K_{ow}$  に対してプロットした。その結果、Lip16 と Lip12 の両方に対して  $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  の間には良好な相関が見られた ( $R^2=0.84$  および  $0.94$ )。ただし、Phenanthrene と Anthracene の  $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  の大小は逆転しており、正確に  $P_{mw}$  を類推することは難しいかも知れない。

オクタノールはバルクな液体であるのに対し、細胞膜は立体構造を持ち、大きな分子サイズの疎水性有機汚染物質は排除する性質がある<sup>4)</sup>。また、オクタノールとは保有する親水性官能基が異なるため、親水基を有する化学物質群に対しては  $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  の間の相関は低くなる可能性がある。しかし、本研究で使用した PAHs は無極性のものであるため、分配は疎水性相互作用に基づくものとなり、 $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  に良好な相関が認められたと考えられる。また、分子サイズの面では、3 から 4 環程度の PAHs については、細胞膜の立体障害の影響を受けないことが分かった。

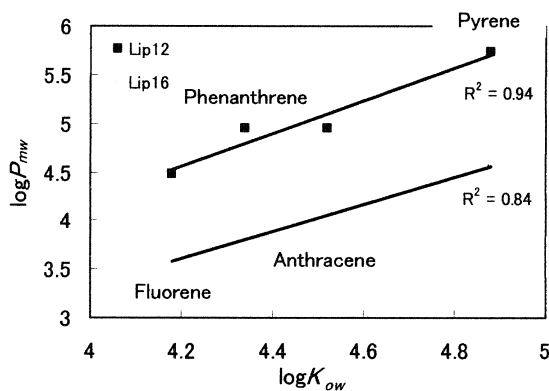


Fig. 5 PAHs に関する  $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  の相関

## 4. まとめ

本研究では、疎水性有機汚染物質の水生生物に対する Baseline Toxicity を評価するためにモデル細胞膜への分配係数 ( $P_{mw}$ ) の測定を提案し、最適なモデル細胞膜を選定するための基礎的研究を行った。以下に本研究で得られた成果をまとめる。

① Pyrene の  $P_{mw}$  は構成リン脂質 (ホスファチジルコリン) の

脂肪鎖の長さによって大きく異なり、細胞膜が流動相となるリン脂質で特に大きくなった。Pyrene の細胞膜への分配には細胞膜の流動性が大きく影響を与えることが分かった。

② 4 種の PAHs に対し、流動相となる細胞膜とゲル相となる細胞膜への  $P_{mw}$  を測定した結果、両者の間には良好な相関関係があった。この結果、これらの PAHs に関しては、実際の生物のものと同じ状態ではあるが、不安定である流動相となる細胞膜の代わりに、ゲル相となる細胞膜を用いて  $P_{mw}$  を類推することができることが分かった。

③ 3 種の PAHs の  $P_{mw}$  と  $K_{ow}$  との間に良好な相関があることが分かった。このことから、3 から 4 環程度の PAHs については  $K_{ow}$  から  $P_{mw}$  を類推することができることが分かった。

### [参考文献]

- 1) Beate I. Escher and Joop L. M. Hermens, *Environ. Sci. Technol.*, 36, 4201-4217 (2002).
- 2) ロバート B. ゲニス, “生体膜 分子構造と機能”, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 (1990) pp.18-27.
- 3) 松原淳, 清水芳久, 高橋淳一, 池田和弘, 松井三郎, *水環境学会誌*, 25, 675-680 (2002).
- 4) Antoon Opperhuizen, Els W. v. d. Veide, Frank A. P. C. Gobas, Dijen A. K. Liem and Jan M. D. v. d. Steen, *Chemosphere*, 14, 1871-1896 (1985).
- 5) 環境庁環境化学物質研究会, “環境化学物質要覧”, 丸善 (1988) pp.41, 387, 390, 431.
- 6) 小栗拓也, 京都大学大学院環境地球工学専攻修士論文 (2003)