

## ヒト由来細胞を用いた水中農薬及び農薬塩素処理分解生成物の 毒性評価

白石泰郎 田坂由里 宮本紫織 服部智子\* 井上智 四宮博人

Toxicity assessment of pesticides and their chlorinated decomposition products in water  
using cultured human cell lines

Tairo SHIRAIISHI, Yuri TASAKA, Shiori MIYAMOTO, Tomoko HATTORI  
Satoshi INOUE, Hiroto SHINOMIYA

Because pesticides in water were known to be decomposed by chlorination, it is necessary to evaluate toxicity of not only original pesticides but also chlorinated decomposition products, in order to precisely evaluate the influence of pesticides on humans. We conducted toxicity assays using human cultured cell lines to evaluate the toxicity of 79 pesticides and their chlorinated decomposition products. As a result, in 32 pesticides among 79 pesticides, IC<sub>50</sub> values, indicators of toxicity were calculated for both the original pesticides and their chlorinated decomposition products, which enabled to compare the toxicity of both. In 23 pesticides among 32 pesticides, IC<sub>50</sub> values of chlorinated decomposition products were determined to be lower than those of the original pesticides, indicating that about 72% of pesticides resulted in increase in their toxicity through chlorination. We then examined the time-course of chlorination using the toxicity of pesticides as index, and found that there were various cases including pesticides with increased toxicity immediately after chlorination, those with gradually increased toxicity and those with weakened toxicity over time. Change in toxicity of pesticides through chlorination was influenced by many factors, and thus it is necessary to conduct more detailed studies.

Keywords : pesticide , chlorination , toxicity assessment , human cell , IC<sub>50</sub> values

### はじめに

水道水中の農薬については、水質管理上留意すべき項目として水質管理目標設定項目に位置付けられており、現在120種類が対象となっている。農業用等として使用された農薬は、河川などを通じて水道原水に混入するが、一部の農薬は浄水場での塩素処理により新たに変化体を生成することが報告されている<sup>1)</sup>。農薬原体については、農薬取締法における登録審査において毒性試験が実施されているが、塩素処理過程における分解生成物の毒性等については十分な研究がされていない。安全安心な水道水の供給のためには、塩素処理過程における分解生

成物の毒性評価を実施する必要がある。

化学物質等の毒性評価の手法については、実験動物を用いた毒性試験が最も重要で信頼性の高いものであるが、毒性発現の種差や動物愛護の観点等に問題があり、培養細胞を用いた細胞毒性試験が毒性作用のスクリーニング法として広く用いられている。細胞毒性試験は、各細胞に共通の機能や構造に対する毒性(基礎細胞毒性)を反映すると考えられ、ヒト由来細胞への毒性とヒトへの一般毒性との間にある程度の相関が認められることが報告されている<sup>2)</sup>。

今回、水質管理目標設定項目及び愛媛県繁用農薬<sup>3)</sup>等の79農薬について、ヒト由来細胞を用いた細胞毒性試験により毒性評価を実施したので報告する。

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

\* 宇和島保健所

## 材料と方法

### 1 対象物質及び試薬

対象は、水質管理目標設定項目及び愛媛県常用農薬等のうち79農薬とした(表1)。農薬標準品は、和光純薬工業(株)、関東化学(株)あるいは林純薬(株)製の残留農薬試験用を用いた。農薬を溶解するために使用したエタノールは残留農薬試験用(関東化学(株))を用いた。

次亜塩素酸ナトリウム溶液は化学用(和光純薬工業(株))を、チオ硫酸ナトリウムは試薬特級(和光純薬工業(株))をそれぞれ滅菌精製水で希釈、溶解して用いた。

細胞培養用のMinimum Essential Medium (MEM) 培地、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline (PBS)) はSIGMA-ALDRICH社製を、ウシ胎児血清 (Fatal bovine serum (FBS)) はGIBCO Life Technologies社製を用いた。

### 2 細胞及び培養条件

細胞は、毒性試験に広く用いられ、ヒト由来の株化細胞で維持管理が容易なヒト乳がん細胞 (MCF-7) をDSファーマバイオメディカル(株)より購入して用いた。10%のFBSを添加したMEM培地 (FBS-MEM) を用い、CO<sub>2</sub>インキュベーターによりCO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cの条件下で培養した。

### 3 塩素処理実験

農薬を一定量精秤し、エタノールで200mMに調製したものを農薬標準原液とした。次に、マイクロチューブに農薬標準原液を50μL採り、遊離残留塩素として1000mMに調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液を50μL加え、滅菌精製水で全量を950μLとし、農薬と遊離残留塩素がモル比1:5となる混合溶液を調製した。混合溶液を一定時間(1440分)、20°C、暗所条件で静置後、1000mMチオ硫酸ナトリウム溶液50μLを加えて残留塩素を除去し、塩素処理試料とした。農薬原体試料は、遊離残留塩素及びチオ硫酸ナトリウムを含まない条件で同様に操作を行い調製した。対照試料として5%エタノールを含有する滅菌精製水を用いた。

### 4 細胞毒性試験

#### (1) 農薬原体及び塩素処理試料の細胞毒性評価

79農薬について、原体及び塩素処理試料の細胞毒性試験を実施した。

MCF-7をFBS-MEMを用いて5×10<sup>4</sup>個/mLに調製し、96穴マイクロプレートにウェルあたり100μLを播種して24時間培養後、上澄みを除去し、各ウェルにFBS-MEM90μL及び試料10μLを添加して48時間曝露した。試料は、細胞への曝露濃度が農薬原体として1, 10, 100, 500, 1000μMとなるように調製して用いた。48時間の曝露後、PBSで2回洗浄して、Cell Counting Kit-8(株)同仁化学研究所)を添

加し、2時間培養後、マイクロプレートリーダー(コロナ電気(株) MTP-450)を用いて主波長450 nmで吸光度を測定した。各曝露濃度に対して3ウェルの測定を行った。対照試料の吸光度を生細胞数100%として、各ウェルの相対細胞生存率を求め、50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>値)を算出した。

#### (2) チオノ型有機リン系農薬のオキソンの細胞毒性

分子内にP=S基を有するチオノ型有機リン系農薬は、塩素処理によりP=S基がP=O基に変化し、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用の強いオキソン体に変化することが報告されている<sup>1)</sup>。そこで、オキソン体の市販標準品が入手できたチオノ型有機リン系農薬9種 (EPN, イソキサチオン, イソフェンホス, クロルピリホス, ダイアジノン, ピペロホス, フェントロチオン, ブタミホス, マラチオン) のオキソン体について細胞毒性試験を実施し、原体及び塩素処理試料と細胞毒性を比較した。試験操作は3, 4(1)と同様に実施した。

表1 対象農薬一覧

EPN	テブフェノジド
アシベンゾラル-S-メチル	テフリルトリオン
アシラム	トリクロホスメチル
アセフェート	トリネキサパッカーエチル
アニコホス	ナプロパミド
アメリン	ニテンピラム
アラニカルブ	ハロスルフロネーメチル
イソキサチオン	ピペロホス
イソフェンホス	ピラゾキシフェン
イソプロチオラン	ピラゾスルフロネーエチル
イナベンフィド	ピリダフェンチオン
イプロジオン	ピリダベン
エスプロカルブ	ピリプチカルブ
エチルチオメチン	ピリミホスメチル
エトキシスルフロネ	フィプロニル
オキシニ銅	フェントロチオン
カズサホス	フェリムゾン
キノクラミン	フェンチオン
グリホサート	フェントエート
グルホシネート	フサライド
クロマフェノジド	ブタミホス
クロルピリホス	ブプロフェジン
クロルピリホスメチル	フラザスルフロネ
シアノホス	フルジオキシニル
ジウロン	ブロスルホカルブ
ジクロフェンチオン	プロパホス
シノスルフロネ	プロマシル
ジフルベンズロン	プロメリン
シプロジニル	ベノミル
ジメタメリン	ベンスリド
ジメエート	ベンスルフロネーメチル
シメリン	ペントキサゾン
ジメピペレート	ホキサム
ダイアジノン	ホサロン
ダイムロン	マラチオン
チアジニル	メソミル
チオジカルブ	メチダチオン
チオファネートメチル	メトリブジン
チオベンカルブ	モリネート
テニルクロール	

(3)塩素処理時間による細胞毒性の経時変化

4(1)により細胞毒性の顕著な変化を示した農薬のうち、特に愛媛県での使用量が多い<sup>3)</sup>キノクラミン、グリホサート及びフェントロチオンについて、塩素処理時間による細胞毒性の経時変化を確認するため、塩素処理時間を細分化(1, 10, 60, 180, 360, 1440分)し、3, 4(1)と同様に細胞毒性試験を実施した。

結果及び考察

1 農薬原体及び塩素処理試料の細胞毒性評価

79農薬について、農薬原体及び塩素処理試料の細胞毒性試験を実施した。また、農薬原体試料にチオ硫酸ナトリウムのみ、もしくは次亜塩素酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムをあらかじめ混合した試液を塩素処理試料と同濃度になるように添加して試験を実施し、添加する試薬が細胞生存率に影響を与えないことを確認した。

細胞毒性試験の結果について、図1に代表例を示した。79農薬中32農薬において原体、塩素処理試料ともに曝露濃度の増加とともに細胞生存率に顕著な低下が見られ、IC<sub>50</sub>値を算出することができた(図1 1. キノクラミン, 2. フェントロチオン)。その他の農薬については、原体、塩素処理試料あるいはその両方において、今回設定した曝露濃度の上限である1000μMでは細胞生存率に顕著な影響を与えず、IC<sub>50</sub>値による毒性の評価はできなかった(図1 3. テフリルトリオン, 4. ピリモホスメチル)。

IC<sub>50</sub>値が算出できた32農薬について、農薬原体と塩素処理試料の毒性をIC<sub>50</sub>値で評価した結果、塩素処理試料で細胞毒性が2倍以上となるものが23農薬、1/2以下となるものが2農薬であり、多くの農薬で塩素処理により細胞毒性が強まる結果となった(表2)。

農薬の混入事故等の健康危機発生時に適切な対応を行うために、原体のみならず、塩素処理分解生成物の毒性及び消長について把握することは重要であると考えられた。

2 チオノ型有機リン系農薬のオキソン体の細胞毒性

チオノ型有機リン系農薬9種について、原体、オキソン体及び塩素処理試料の細胞毒性をIC<sub>50</sub>値により評価した(表3)。

その結果、EPN、イソフェンホス、クロルピリホス、フェントロチオン、ブタミホス及びマラチオンの6農薬では、塩素処理試料とオキソン体が原体と比較して強い毒性を示し、特にイソフェンホス、クロルピリホス及びブタミホスはオキソン体と塩素処理試料がIC<sub>50</sub>値で比較して同等の毒性を示した。しかし、イソキサチオンは塩素処理により毒性が強まる

にも関わらず原体とオキソン体で毒性に顕著な差が見られず、また、フェントロチオンでは塩素処理試料がオキソン体より強い毒性を示すなど、9農薬全体では塩素処理試料とオキソン体の間で一貫した傾向は見られなかった。このことから、塩素処理によりオキソン体が生成される場合でも、オキソン体の更なる分解や他の分解生成物の影響等、複合的な要因により毒性が発現している可能性が示唆された。

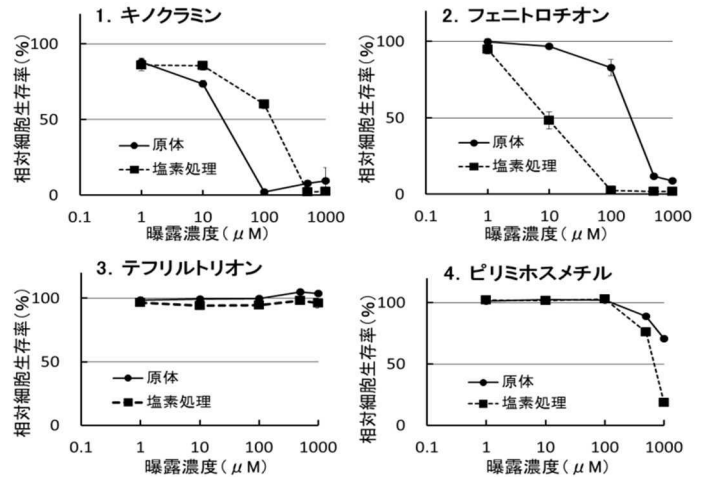


図1 農薬原体及び塩素処理試料の細胞毒性試験結果

表2 農薬原体及び塩素処理試料のIC<sub>50</sub>値一覧

農薬名	IC <sub>50</sub> 値(μM)		IC <sub>50</sub> 値の比 (原体/塩素処理)	系統
	原体	塩素処理		
EPN	289.9	188.4	1.54	有機リン系
アニコホス	824.6	414.0	1.99	有機リン系
アラニカルブ	192.4	120.0	1.60	カーバメート系
イソキサチオン*1	725.6	33.9	21.43	有機リン系
エスプロカルブ*1	394.8	58.0	6.81	カーバメート系
オキシ銅*1	33.2	3.1	10.56	有機銅
カズサホス*1	778.7	236.9	3.29	有機リン系
キノクラミン*2	21.5	132.6	0.16	その他(ナフキリン骨格)
グリホサート*1	873.7	30.2	28.91	アミノ酸系
クロマフェンジド*1	795.4	204.9	3.88	アシルヒドラン系
クロルピリホス*1	226.0	75.0	3.01	有機リン系
クロルピリホスメチル*1	465.2	22.5	20.65	有機リン系
ジウロン*1	621.6	251.4	2.47	尿素系
ジクロフェンチオン*1	812.9	57.4	14.16	有機リン系
シプロジニル*1	790.0	218.7	3.61	アニリピリミジン
チアジニル*1	500.7	18.1	27.61	チンジアゾールカルボキサミド系
チオジカルブ*1	293.0	30.9	9.47	カーバメート系
チオベンカルブ*1	277.1	30.9	8.97	カーバメート系
テニルクロール*1	281.2	103.1	2.73	酸アミド系
トリクロホスメチル*1	508.7	31.1	16.38	有機リン系
ナプロバミド	731.5	532.5	1.37	酸アミド系
ピペロホス*1	680.6	172.9	3.94	有機リン系
ピラキシンフェン	695.2	580.6	1.20	ピラゾール系
ピリダフェンチオン*1	779.0	26.9	28.97	有機リン系
ピリダベン*2	3.6	16.8	0.21	その他(ピリダジン骨格)
フェントロチオン*1	237.9	8.0	29.57	有機リン系
フェリムン*1	194.5	56.5	3.44	その他
フルジオキソニル	52.2	50.8	1.03	その他(フェルピロール骨格)
プロパホス*1	723.1	219.9	3.29	有機リン系
ペンシル*1	130.1	36.8	3.54	ベンゾチオジアゾール系
ペンスリド	370.8	532.9	0.70	有機リン系
マラチオン*1	656.2	115.9	5.66	有機リン系

\*1 IC<sub>50</sub>値の比が2以上  
\*2 IC<sub>50</sub>値の比が0.5以下

表3 チオノ型有機リン系農薬のIC<sub>50</sub>値一覧

農薬名	IC <sub>50</sub> 値(μM)		
	原体	塩素処理	オキソソ体
EPN	289.9	188.4	15.6
イソキサチオン	725.6	33.9	579.7
イソフェンホス	>1000	603.4	704.2
クロルピリホス	226.0	75.0	69.5
ダイアジノン	>1000	412.9	>1000
ピペロホス	680.6	172.9	972.6
フェントロチオン	237.9	8.0	42.7
ブタミホス	>1000	111.1	72.6
マラチオン	656.2	115.9	386.1

表4 塩素処理時間による細胞毒性の経時変化(IC<sub>50</sub>値一覧)

農薬名	IC <sub>50</sub> 値(μM)						
	原体	塩素処理時間(分)					
		1	10	60	180	360	1440
キノクラミン	21.5	26.6	30.4	36.3	74.0	83.2	131.7
グリホサート	873.7	32.9	32.1	32.4	32.2	33.7	30.2
フェントロチオン	182.8	209.3	19.9	28.2	28.3	21.6	5.6

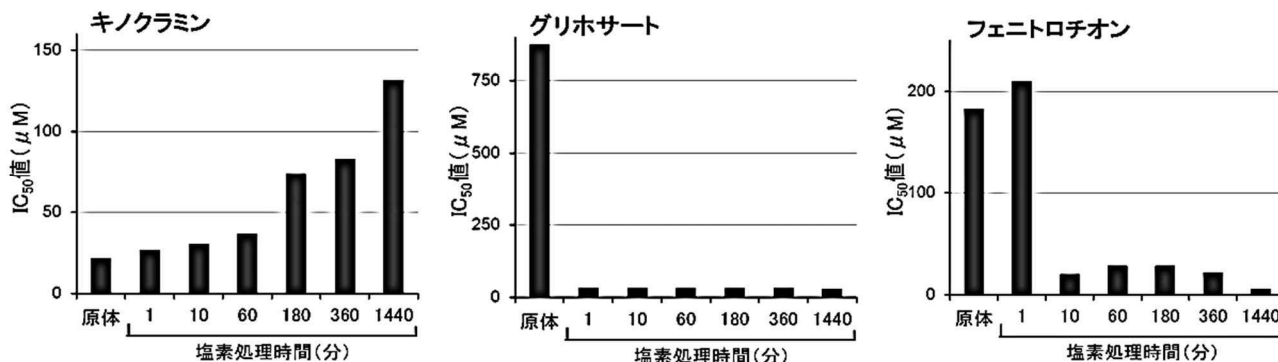


図2 塩素処理時間による細胞毒性の経時変化

### 3 塩素処理時間による細胞毒性の経時変化

塩素処理時間による細胞毒性の経時変化の結果について図2, 表4に示す。

キノクラミンでは、塩素処理時間の増加に従って徐々に細胞生存率が高くなり、細胞毒性が弱まった。このことから、キノクラミンと遊離残留塩素との反応が経時的に進み、原体より毒性の弱い分解生成物が生じると考えられた。

グリホサートでは、塩素処理後1分で細胞生存率が顕著に低下し、塩素処理後1440分まで細胞生存率に変化が見られなかった。このことから、グリホサートは遊離残留塩素と速やかに反応し、分解生成物を生じることで原体に比べて強い細胞毒性を示すと考えられた。

フェントロチオンでは、塩素処理後1分では細胞生存率に影響を与えないが、塩素処理後10分において顕著な細胞生存率の低下が見られ、塩素処理後60, 180, 360分までは同様の傾向となった。また、塩素処理後1440分でIC<sub>50</sub>値が最も低く、細胞毒性が最も高くなった。このことから、遊離残留塩素との反応が経時的に進み、分解生成物を生じることで毒性が強まると考えられた。

### まとめ

1 水質管理目標設定項目等の79農薬の原体及び塩素処理試料について、ヒト由来細胞を用いた毒性試験を実

施した結果、32農薬で両方のIC<sub>50</sub>値が算出でき、そのうち23農薬で塩素処理により細胞毒性が強まることを確認した。

2 チオノ型有機リン系農薬9種について、原体、塩素処理試料及びオキソソ体の細胞毒性試験を実施したが、塩素処理による毒性の変動とオキソソ体の毒性との間に一貫した傾向は見られず、塩素処理によってオキソソ体よりも強い毒性を示す農薬も確認した。

3 キノクラミン、グリホサート及びフェントロチオンについて、塩素処理時間による細胞毒性の変化を確認したところ、それぞれ異なる細胞毒性の経時変化を示した。

以上の結果から、農薬原体のみならず、塩素処理過程における分解生成物の毒性等を把握することは非常に重要であり、健康危機発生時等に適切な対応を行うためにも、個々の農薬について塩素処理後の毒性に関する評価を実施する必要があると考える。

### 文献

- 1) 渡辺貞夫ほか:神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 1-5(2007)
- 2) 森田昌敏ほか:国立環境研究所特別研究報告 環境中の化学物質総リスク評価のための毒性試験系の開発に関する研究, (2001)
- 3) 日本植物防疫協会:農薬要覧-2016-, (2016)