

実験 J. 生物分解性試験 (Biological degradation)

1. はじめに

急性毒性は摂取量次第である

一般に、どのような化学物質でも少量なら毒性を示さず、多量に摂取すれば毒性を示す。曝露量の小さい順に、無影響 → 頭痛 → 吐き気 → 痙攣 → 死亡、というように影響が徐々に量に依存して生じることが急性毒性には多い。食塩のような基本的には無害な化学物質でも多量に摂取すれば死亡する。

ヒトへの毒性は、これまでの事故例などを解析して求めることが多いが、まだ事故などが無い物質について毒性を知りたい場合には、実験で求める。ヒトに似ているサルで試験したいところだが、コストや技術上の問題でラットやマウスで試験することが多い。

水環境への毒性は、生態系の生産者、一次消費者、高次消費者に対応させて、緑藻(生産者)、ミジンコ(1次消費者)、メダカ(高次消費者)で試験することが多い。

発がんも慢性毒性の一つ

長期の曝露で生じる悪影響のことを慢性毒性といい、発がん性は特殊な慢性毒性のひとつである。亜ヒ酸は古来から毒殺に使われてきたが、死ぬほどではない低濃度で長期に曝露した場合に、皮膚がんなどの慢性毒性が亜ヒ酸には知られている。本来、毒に分類されない食塩も、ある程度の量を長期に摂取すると高血圧など体に様々な慢性影響が生じる。

急性毒性を示さない程度の低用量を長期に摂取した場合に、ある化合物に毒性があることを証明するのは極めて難しい。その理由として、低濃度曝露の影響は、すべての人に必ず生じるのではなく、確率的に生じることと、他の生活環境因子の影響があるため、その物質が原因で病気になったのかについて、因果関係を断定することが難しいことが挙げられる。

低用量曝露の動物実験は実質不可能である

水道水の場合には、1日2リットルを70年間飲んだとして、発がんする確率が計算上1/10,000～1/100,000になる濃度を水道水質基準値とすることが多い。しかし、この「計算上」というのが曲者である。

低用量曝露の動物実験としてマウスやラットを使う場合、そもそもマウスやラットは70年も生きないし、1万分の1の確率を議論しようとするれば、10万匹レベルの数のマウスを飼って、何群かに分け、用量の異なる毒入りのエサを食べさせる大規模な実験を計画しなければならない。長期に飼育していれば、毒を入れなかった群のマウスであっても、いろいろな理由で死んでしまうことが予想でき、統計的に有意な結果を得ることは難しい。

安全と安心は違う

さらに、話がややこしいのは、安全と安心は違うということである。「1日2リットルを70年間飲んだとして、発がんする確率が計算上1/10,000になる濃度」というレベルを専門家であれば、「実質的に安全なレベル」と判断できるが、一般の人は、こんなことでは安心できない。科学的な安全性とは無縁の、安心かどうかで、食品や化粧品を選択している人も多い。

分解できるかどうかは安全性のひとつの尺度である

急性毒性については、どの程度の用量から毒性が発現するかの評価がやさしいが、慢性毒性(発がんを含む)については、評価が難しい。そこで、毒の程度はわからないけど、「分解するものなら長期間摂取しても体内に蓄積せず安心だ」「分解するなら、環境中にも蓄積しないから、環境にもやさしいに違いない」とそんな考え方がある。もちろん、分解する途中で毒性を発揮する化合物もあり、「分解するものは毒性がない」と考えるのは軽率だが、「分解しにくい性質は慢性毒性につながる」と考えることには一定の合理性がある。

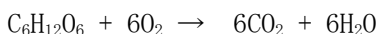
有機物とは何か

そもそも有機物の定義は何かと学生に訊くと、うまく答えられない人が多い。「生物が作るものが有機物だ」という学生も多いのだが、この説に従って、我々が呼吸で作る二酸化炭素を有機物だという人はいない。有機ホウレン草という表現があるので、そうでないホウレン草は無機物なのかというと、そんなこともない。硫酸アンモニウムやリン酸カリウムなどの化学肥料(無機物)ではなく堆肥や畜産残渣などの有機肥料を与えて作った野菜を本来的には有機野菜というが、のちに、有機野菜には、無化学肥料に加えて無農薬の意味が付け加わったようである。

有機物の定義は分野によって少し異なるが、有機物とは、「C(炭素)を含む化合物のうち、C_n(炭素の単体)、CO(一酸化炭素)、CO₂(二酸化炭素)を除いたもの」と、この実験では理解しておくことにしよう。

酸素の存在する環境では、有機物は最終的に二酸化炭素にまで分解される

酸素のある環境では、有機物は微生物などに利用されて、呼吸反応によって、最終的に二酸化炭素にまで分解される。たとえば、グルコースは以下の化学反応式にしたがい分解される(解糖系、TCA回路、電子伝達系の合計で)。



ここで、グルコースが分解される程度を測定するには、この式の左辺に注目して、酸素が減少する程度を測定すればよいことに気づく。つまり、グルコースと微生物を含んだ水を密閉保管し、保管中にどの程度酸素が消費されるかを測定すればよい。同様にして、グルコース以外の有機物の分解性も酸素濃度の減少によって測定することができる。

本実験では、化学物質の分解の程度を酸素濃度の減少から測定する方法を学ぶ。分解しやすそうなものの例として、グルコースを用いる。分解しにくそうなものの例として、化粧品色素赤色202号溶液を用いる。

また、溶存酸素測定については、最近は、D0 計を用いることが多くなっているが、本実験演習では、JIS-K-0102-32.1(ウインクラー・アジ化ナトリウム変法)に従って行う。

【予習課題 1 週目-1】このテキストのここまでの記述によれば、なぜ、急性毒性に比較して慢性毒性は評価が難しいのですか。

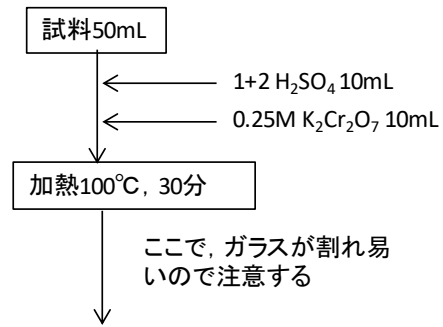
【予習課題 1 週目-2】テキストを書いた人は、「安全」と「安心」の差をどのようなものだと考えていますか。

【予習課題 1 週目-3】このテキストのここまでの記述によれば、なぜ、酸素濃度の減少で有機物の分解性を判断できるのですか。

【予習課題 1 週目-4】このあとの「5.操作と解析」の項を参考にして、5.1(1 週目部分)について、実験操作手順を右のようなフロー図でまとめなさい。

【予習課題 2 週目-1】このあとの「5.操作と解析」の項を参考にして、5.2(2 週目部分)について、実験操作手順を右のようなフロー図でまとめなさい。

【予習課題 2 週目-2】このあとの「5.操作と解析」の項を参考にして、結果を記入するための表 4、表 5 をあらかじめ実験ノートに書き写しておく。



予習課題のフロー図の作成例

2. 器具

2. 1 1 週目

テフロン糸付き 100 ml 酸素瓶 6 本 (糸を瓶からはずさないこと)
共栓付 500 ml メスシリンダー

2. 2 2 週目

溶存酸素測定(実験 H)に準じる

3. 試薬

2 週目の溶存酸素測定(実験 H)で用いるものに加えて以下のものを使用する。

試薬番号	調製済み試薬	参考 (調製方法)
A 液	リン酸緩衝液 (pH 7.2)	リン酸水素二カリウム 2.175 g, リン酸二水素カリウム 0.85 g, リン酸水素二ナトリウム十二水和物 4.46 g および塩化アンモニウム 0.17 g を水に溶かして全量を 100 ml とする。
B 液	硫酸マグネシウム溶液	硫酸マグネシウム七水和物 2.25g を水に溶かして 100 ml とする。
C 液	塩化カルシウム溶液	無水塩化カルシウム 2.75g を水に溶かして 100 ml とする。
D 液	塩化鉄(III)溶液	塩化鉄(III)六水和物 0.025g を水に溶かして 100 ml とする。使用直前に調製する。

⑦	希釈水	純水に A 液～D 液（微生物の生育に必要な無機栄養塩）を 1 リットルにつきそれぞれ 1 ml ずつ加えて混合する。さらに全量の 1/20 量(全量 10 l なら 500 ml)の本学調整池の水を微生物植種源として加え、20℃でエアープンプにより 5 時間以上曝気する。最初に 1 リットル容器に 800 ml 採水したものを各グループに配布する。 【業務用メモ】24 班で 30 l
⑧	試料水(1 g/l グルコース溶液)	グルコース 1 g を純水で溶解し、1 l としたものの。 【業務用メモ】各班 10 ml 配ったとして、24 班で 250 ml
⑨	試料水（化粧品色素；1 g/l 赤色 202 号溶液）	Lithol Rubin BCA 1 g に水を約 100 ml 加え、硫酸 1+2 を 1 ml 加え十分に溶解したあと、約 900 ml まで水でメスアップし、水酸化ナトリウムで pH を 6.8 付近まで中和し(pH 試験紙にて確認)、1 l にメスアップしたものの。

5. 操作と解析

5. 1 グルコース、および、化粧品色素の生物分解性の測定（1 週目）

本実験では、自然界での化学物質の分解のしやすさを、工科大の池の水の中で好氣的分解を受け、7 日間で消費される酸素量で評価する。酸素が減っているほど、好氣的分解を受けたと評価し、酸素が減っていない場合には、分解しなかったと判定する。今回はグルコース 10 mg/l、化粧品色素 10 mg/l、希釈水の 3 サンプルを 7 日間保管し、7 日後に、どの程度、溶存酸素濃度が低下したのかを測定する。

- (1) 酸素瓶 6 本を取り、「Glu」「Glu」「Red」「Red」「Di1-F」「Di1-L」とラベルする。また、翌週まで他の班の試料と同じ場所で保管するので、すべての瓶に曜日・班名(月-α-6 など)をラベルする。
- (2) あらかじめ酸素を飽和まで溶解させ植種微生物、栄養塩を含んだ希釈水(以下、単に「希釈水」と呼ぶ)を「Di1-F」と書かれた酸素瓶に共栓部分がすべて水没するまで入れる。
- (3) 栓を瓶中に気泡を残さないように落とし込み、栓の上部に 5 mm 以上の水位で希釈水が存在していることを確認する。水中に気泡が残っていると、その気泡中の酸素が利用されてしまうので、絶対に気泡を瓶中に残してはならない(気泡が追い出せなかった場合には、再度栓をし直す)。また、栓の上部には必ず水が残るようにして(これを水封という)、栓の擦り合わせ部分からも酸素が入り込まないようにする。
- (4) グルコース 10 mg/l を次の手順でつくる。希釈水を共栓付 500 ml メスシリンダーに 200 ml ぐらいまで採取する。本実験では、ほぼ飽和の酸素が溶け込んでいるので、空気の溶解を気にする必要はあまりないが、微細な泡状のものが試料に含まれると溶存酸素測定で正の誤差を生じるので、メスシリンダーを斜めにしてゆっくり加えることを推奨する。そこにグルコース 1 g/l 溶液 2.5 ml を 5000 のマイクロピペットで加える。さらに希釈水をメスシリンダーの 250 ml の標線まで静かに加える。栓をして静かに(泡をたてないように)5 回ほどメスシリンダーの左右を上下させて十分に均一になるまで混ぜ合わせ、混ぜ合わせたら、「Glu」の瓶 2 本へ先ほどの希釈水と同じ要領で流し込む。水封

する。残りの溶液は(廃液とはせずに)流しに捨てる。

(5) 次に赤色 202 号の 10 mg/l をグルコースのときと同様の手順で、赤色 202 号の 1 g/l 溶液 2.5 ml を 250 ml になるように希釈し、「Red」試料を作成し、2 本の瓶に詰める。先ほどと同じく水封する。赤色素は化粧品に使われているもので、有害というほどではないが、生分解しにくい成分を含んでいるので、グルコースのときと違って、流しには捨てず廃液とする。

(6) 最後に、希釈水を「Di1-L」と書かれた酸素瓶に同様に詰め、水封する。

(7) 各班の水封された 6 本の酸素瓶の上部をパラフィルムで包んだ状態で 20℃のインキュベーター内に入れ、7 日間保存し、翌週、溶存酸素量を定量する。水封がインキュベーター内で切れないように、乾きやすいインキュベーターでは金曜くらいに水を水封部分に足す。

5. 2 グルコース、および、化粧品色素の生物分解性の測定 (2 週目)

翌週、6 本の瓶に残った溶存酸素濃度を定量し、以下の表 5 を埋める。具体的手順は以下の通り。

(1) 実験 H の試薬の欄の「⑩でんぷん溶液」を作成する。

(2) **試薬の標定** 実験 H の「5. 2 チオ硫酸ナトリウム溶液の標定」にしたがって、以後の滴定に用いる「②1/40M-チオ硫酸ナトリウム溶液」の標定をする。表 4 のデータを取得し、その場でファクターを計算する。

表 4 チオ硫酸ナトリウム溶液の標定

	滴定量(ml)	平均滴定量 x	ファクター f
1 回目	x_1		
2 回目	x_2		

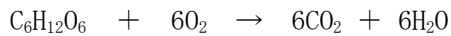
(3) **溶存酸素の測定** 7 日間保存した 6 本の酸素瓶内の溶存酸素濃度を実験 H の「5. 3 溶存酸素の測定」にしたがって定量。その際、生成した沈でんの色を確認し、だいたいの滴定量を予測することによって、滴定の失敗を防ぐことができる。結果を表 5 にまとめる。その場で溶存酸素濃度を計算する。

表 5 試料水の 7 日後の溶存酸素濃度の測定結果

試料名		酸素瓶の内 容積 V (ml)	沈でんの色	チオ硫酸ナト リウムの滴定 量 a (ml)	ファクター f	DO (mg/l)
グルコース (Glu)						
赤色 202 号 (Red)						
希釈水	(FIRST)					
	(LAST)					

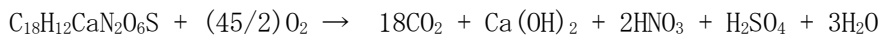
6. 結果の吟味

(1) グルコース ($C_6H_{12}O_6$) が、酸素の存在下で、完全に、二酸化炭素と水にまで分解する化学反応式は、TCA 回路 (クエン酸回路) の名称で知られている通り、解糖系や電子伝達系を含めたトータルでは、

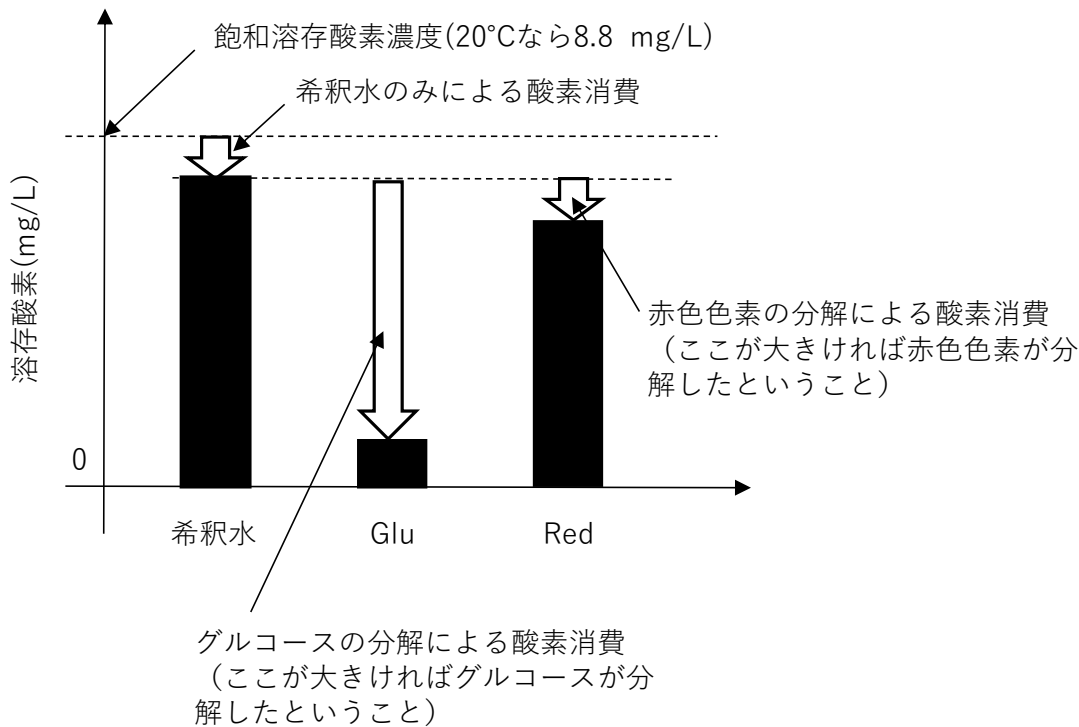


である。グルコースの分子量を 180、酸素の分子量を 32 とすると、10 mg/l のグルコース溶液が完全な好気性分解を受けた場合、溶存酸素量は、 $10 \times (32 \times 6 / 180) = 10.7$ mg/l だけ減るはずであるが、もともと、それだけの量の酸素が瓶の中にはなかったと考えられるので (最大でも実験室温での飽和溶存酸素濃度、20°C なら 8.8 mg/l)、7 日間の反応で瓶の中の酸素が使われ果たして、グルコース 10 mg/l の瓶の溶存酸素濃度は 0 mg/l 付近になっていることが期待される。そうならない場合には、実験のどこかが間違っている可能性がある。

(2) 次に赤色色素は完全分解するなら、次式で分解される。



もしも、赤色色素も酸素を使った好気性分解が進むと仮定すると、赤色色素の分子量を 424 とし、同様の計算で、赤色色素 10 mg/l の瓶中で $10 \times (32 \times 45 / 2 / 424) = 17.0$ mg/l だけ溶存酸素量が減少する計算で、グルコースの場合と同じく、酸素が使われ果たして、DO は 0 付近になりそうだが、実際には、赤色色素には生物分解性がほとんどないため、この反応はほとんど進まない。



7日目の溶存酸素濃度(上記黒棒)から化合物の分解性がわかる原理

7. レポート課題

【結果 1】(必須) チオ硫酸ナトリウムの標定結果(表 4)を示せ。

【結果 2】(必須) 表 5 を完成させなさい。表で示すことに加えて、さらにこのページの図で示すような棒グラフなどの形で結果を図示すると、さらに評価が高くなる。

【考察 1】(必須) グルコースや化粧品色素である赤色 202 号は、工科大の池の水という環境で分解されるものなのか、「6 結果の吟味」をよく読んで、結果を踏まえて考察せよ。

【考察 2】各 2 本のサンプルの間の値の差は満足できる程度に小さかったか。

【考察 3】(必須) その他、考察、実験の感想などを自由に記せ。(5 行以上～2 ページ以内)