

図-7 道路路面粉塵のHPLC分画におけるAhRリガンド活性

”the Science of the Total Environment”の1999年の特集号, “Drugs and Hormones as Pollutants of the Aquatic Environment: Determination and Ecotoxicological Impact”の要旨

The Science of the Total Environment 225 (1999) 3-11

David E. Kime: 「A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction」

工業や農業で使われている化学物質、重金属、薬剤、ホルモン様活性を持った生産物などの環境汚染物質は魚などの水生野生生物の生殖作用を攪乱しているかもしれない。これらの生体外物質は生殖に関わる内分泌系を攪乱しているのかもしれないし、これらの物質のもつ細胞毒性や生殖細胞の発生段階におけるホルモン環境の改変の結果として、生殖細胞の発生やその発育力に直接影響を及ぼしているのかもしれない。この報告では、これらの生体外物質に影響を受ける可能性のある様々な部位について検討し、そして、生殖作用系を構成する特別な部位-攪乱に対して最も敏感で、致死効果や目に見える異変が現れるよりも低いレベルで影響を受ける部位-については独立した毒性試験がなされるべきだということを示唆している。このような毒性試験に最も適した水生生物として魚が提案されている。

225 (1999) 13-31

J. Sherry *et al.*: 「An ELISA for trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens」

ELISA(固相酵素免疫検定法)を、マスの血漿から卵黄の前駆物質であるビテロゲニンを検出するために適用した。17βエストラジオールを誘発されたマスから得られた純粋なビテロゲニンをELISA法の抗体として使用した。ELISA法のパフォーマンスは非常に満足がいくもので、特徴的であった。ELISA法の適用可能範囲は25-500ng/mLで、“Sensitivity(ビテロゲニン無しの状態でのELISA測定値)”は10.5ng/mLだった。また、抗原・抗体結合の実験毎の変動率は30-1000ng/mLの間において10%以下であった。また、ELISA法を工業排水全体またはその一部から、環境中のエストロゲンやエストロゲン様物質を検出するためのバイオアッセイの中で使用した。このバイオアッセイは3通りの試料への曝露法を基に行なわれた。即ち腹腔内投与による曝露、定期的に試料を混和した飼育水を交換する曝露法(Static renewal)、常に飼育水中の試料濃度を一定に保つ曝露法(flow exposer)の3つである。いずれの系においても、ビテロゲニン誘導の出発点は1-2μg ビテロゲニン/mLに限られていた。これはビテロゲニン誘導を受けてないオスの血漿中からも常に検出される微量のビテロゲニンによる妨害のためによる。バイオアッセイの感度はあらかじめ17βエストラジオールを投与することで把握した。腹腔内投与によるアッセイでは、少なくとも100μg/kgの17βエストラジオールに反応を示すが、このアッセイはパルプ製作所の排水と黒い液体からの抽出物のエストロゲン様活性をスクリーニングするために利用した。また、このアッセイは4-*tert*-octylphenol(OP)とPAHの派生物質、reteneのエストロゲン様活性を調べるためにも用いた。OPはビテロゲニンを誘導したが、reteneによるビテロゲニンの誘導は検出されなかった。Static renewalバイオアッセイは15日間による曝露で少なくとも0.1μg/mLの17βエストラジオールに反応を示すが、このアッセイはパルプ製作所の排水全体のエストロゲン様活性をスクリーニングするために利用した。ビテ

ロゲニンの誘導は検出されなかった。

225 (1999) 33-48

Wolfgang Korner *et al.*:「Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents」

エストロゲンレセプターを持ったヒト乳ガン細胞 MCF-7 を用いた細胞増殖試験(E-screen assay) は、公共下水処理施設の排水の全エストロゲン活性を感度よく定量するための方法として利用され、正当な方法として認められてきた。排水 1L を 0.2g ポリスチレン重合体または 1g C18 逆相物質で固相抽出し、溶媒を除去した後いかなるクリーンアップ操作もすることなく、E-screen assay を行った。4 つの排水サンプルからの 2 つの方法による抽出物は E-screen assay においていずれも類似の定量結果が得られた。ブランクサンプルは細胞増殖を誘導しなかった。単独の化学物質のエストロゲン活性の相加効果が、それぞれ 3 種類の生体外エストロゲンを含んだ 2 つの異なる試料について実証されたので、汚水サンプルの全エストロゲン活性-17 β エストラジオール当量 (EEQ) で表示-はポジティブコントロールとして用いた 17 β エストラジオールの EC₅₀ 値と比較することで算出可能であった。E-screen assay の検出限界は 0.05 pmol EEQ/L (0.014 ng EEQ/L)、定量限界は 0.25-0.5 pmol EEQ/L (0.07-0.14 ng EEQ/L) であった。実験全体では、ドイツ南部の異なる 5 つの公共下水処理施設から採取した 9 つの排水サンプルと 1 つの流入水サンプルを E-screen assay によって分析した。全サンプルともに投与量に依存した形で細胞増殖を協力的に誘導した。この増殖誘導はエストロゲンレセプターアンタゴニスト、ICI 162, 780 と一緒にインキュベートすることで阻害された。ポジティブコントロールとして用いた 17 β エストラジオールによる増殖と比べて、サンプルの増殖誘導効果は 30-101% であった。サンプルの 17 β エストラジオール当量濃度は 2.5-25 ng/L の間であった。このことはかなりの量のエストロゲン様物質が下水処理施設を経由して河川へ流入していることを示している。

225(1999) 49-57

Ilka Lutz *et al.*:「Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding」

環境へ放出されている多くの化学物質は毒性リスクを持っていなくても内分泌系を攪乱する可能性を秘めている。これらの内分泌攪乱物質は正常な内分泌系をかき乱し、ほとんど全ての脊椎動物において内分泌攪乱がこれまでに確認されている。この調査の目的は内分泌攪乱研究のために、両生類であるアフリカツメガエルを使って包括的なモデルを開発することである。内分泌攪乱物質のエストロゲンとしての潜在能力の評価するにはいくつかのレベルの調査が含まれる。1 つ目に「肝臓エストロゲンレセプターとの結合」、2 つ目に「in vitro での、培養肝細胞におけるビテロゲニン合成の誘導」、3 つ目に「in vivo での、幼生曝露による性分化への影響」である。この論文では肝細胞断片を使って [³H] 17 β エストラジオールの結合を利用した“放射性レセプターアッセイ”を確立することで、1 つ目の調査に焦点を当てた。満足のいく [³H] 17 β エストラジオールの結合条件を得るために、我々は速度論的実験、飽和測定法 (Saturation analysis)、競合的結合測定法 (competitive

displacement assay)を行なった。 $[^3\text{H}]$ 17 β エストラジオールとエストロゲンレセプターの結合から、最大の特異的結合が 18-48 時間のインキュベートで得られることが明らかとなった。飽和測定法を scatchard analysis によって分析したところ、飽和可能なエストロゲンレセプター集団の結合パラメーターに有為な性差は見られなかった。解離定数 K_d はオスにおいて 22.4 ± 6.0 、メスにおいて $15.0 \pm 2.8 \text{ nM}$ であった。一方、最大リガンド結合量 B_{max} はオスにおいて 89 ± 46 、メスにおいて $136 \pm 46 \text{ fmol/mg protein}$ であった。競合的結合測定法によって明らかになったエストロゲンレセプターの特異性は、エストロゲンについてのみ高い特異性を持ち、他の内因性ステロイドには高い特異性を示さなかった。エストロゲンレセプターの結合親和性は次のようにランクされた。17 β エストラジオール > estrone > dehydroepiandrosterone > aldosterone \geq testosterone \geq corticosterone \geq progesterone。環境中の化学物質の結合親和性は、17 β エストラジオールと比較した場合、17 β エストラジオール > tetrachlorobiphenyl > diethylphthalate > bisphenol A \geq 4-nonylphenol \geq 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole \geq 4-octylphenol > 4,4'-DDT、であった。5 つの下水排水サンプルの competitive displacement assay の結果は、3 つのサンプルで 17 β エストラジオールの特異的結合が 50% 以上置換された。“放射性レセプターアッセイ”とアフリカツメガエル肝細胞断片を使った $[^3\text{H}]$ 17 β エストラジオールの結合を組み合わせることは、エストロゲン様活性または抗エストロゲン様活性を引き起こす際に必ず形成されるエストロゲンレセプターの純物質またはそれらの混合物との結合を、スクリーニングする上で有用である。

225(1999) 59-68

Warner Kolas *et al.*:「Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II .Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo.」

いくつかの化学物質はほとんど全ての脊椎動物の内分泌系の発達や機能に相互作用することによってエストロゲン様活性を示すことが知られている。環境汚染物質によって引き起こされる両生類に対するエストロゲン様活性の影響について、より良い知見を得るために、この研究では両生類のアフリカツメガエルを使った内分泌攪乱評価モデルを開発することを目的としている。このモデルにおいては内分泌攪乱物質の潜在的エストロゲン様活性が、いくつかのレベルの調査によって測定される。1 つ目に「肝臓エストロゲンレセプターとの結合」、2 つ目に「in vitro での、培養肝細胞におけるビテロゲニン合成の誘導」、3 つ目に「in vivo での、幼生曝露による性分化への影響」である。ここでは、in vitro および in vivo における環境中化学物質のエストロゲン様活性を評価する手法の開発を扱っている。in vitro において我々は半定量的 RT-PCR を使い、アフリカツメガエルの培養肝細胞中でエストロゲン様活性のバイオマーカーであるビテロゲニンの mRNA 誘導を測定した。10⁻⁶M の 17 β エストラジオールを与えた場合と与えない場合におけるビテロゲニン mRNA の経時変化は次のような結果になった。17 β エストラジオールを与え続けた場合、ビテロゲニン mRNA 量は比較的安定したレベルで維持されていたのに対し、与えなかったコントロールでは 2 日後から mRNA 量が減少した。36 時間のインキュベーション後、10⁻¹⁰ から 10⁻⁵M の濃度範囲の 17 β エストラジオール、4-nonylphenol、bisphenol A のエストロゲン様活性をビテロゲニン mRNA の RT-PCR によって評価した。結果から次のような投与量依存的なランクが得られた。17 β エストラジオール > 4-nonylphenol > bisphenol A。in vitro におけるこのような結果は、in vivo におけるさらなる実験によって確認された。In vivo における実験では、幼生期に 17 β エストラジオールや環境中化学物質に曝露した後のアフリカツメガエルの性分化を測定した。10⁻⁷ から 10⁻⁸M の濃度の 17 β エストラジオールだけでな

く、 10^7 M の 4-nonylphenol もコントロールと比較して非常に多数のメスを誘導した。この傾向は *in vivo* においても *in vitro* と同じようなエストロゲン様活性の傾向があることを示している。さらに、butylhydroxyanisole と octylphenol はともに 10^7 M でメス化の傾向をしめした。octylphenol は 10^8 M でも影響が確認された。これらの結果は、エストロゲン様活性のバイオマーカーであるピテロゲニンの mRNA 誘導を測定することでエストロゲン様活性をスクリーニングするために初めて半定量的 RT-PCR を適用した結果をしめしている。エストロゲン様化学物質の生物学的重要性を決定するためにはこの新しく開発された方法と古典的な曝露実験を組み合わせることが必要不可欠である。

225(1999) 69-79

Klaus Graumann *et al.*:「Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay:synergy between natural and synthetic compounds?」

エストロゲン様の潜在能力を示す化学物質の混合物の特性についてはこれまで疑問が持たれてきた。内分泌攪乱物質の相乗効果が提案されてきたが、しかし、これまで確認されてこなかった。この研究では、生体外エストロゲンと植物性エストロゲンの転写活性化能力を酵母の系で評価している。Endosulfan や dieldrin, atrazine などの殺虫剤、および desthylatrazine, desisoropylatrazine などの主な代謝物を評価し、これらの混合物としての振る舞いを単一の化学物質としての振る舞いと比較している。我々の報告は生体外エストロゲンが 17β エストラジオール依存的な転写活性化を阻害する点において 1996 年の Tran 等の報告と対照的である。植物性エストロゲンについても同様な方法で評価した。生体外エストロゲンと植物性エストロゲンともに、相乗効果は確認されなかった。これらの化合物はいずれも弱いエストロゲン様物質であるか、エストロゲン様活性を完全に欠いていた。それゆえ、もっと複雑な系における内分泌攪乱能力は代謝活性化やステロイドホルモン産生阻害などの他の分子メカニズムに依っているはずである。この研究は、酵母の系がエストロゲン様特性をモニタリングする手段として有用であることを示している。

225(1999) 81-90

T.A.Ternes *et al.*:「Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil」

開発された手法は下水サンプルからなら 1ng/L のエストロゲンを、河川水からなら 0.5ng/L のエストロゲンを定量することが可能である。この手法では、地下水からの固相抽出、クリーンアップ後の平均回収率はたいてい 75%を超えていた。標準偏差は $0.05\ \mu\text{g/L}$ の濃度において 0-14%であった。公共下水処理施設への流入水や流出水においてもエストロゲンの平均回収率はほとんど 70%を超えていた。この手法を使ってドイツとカナダの公共下水処理施設における天然エストロゲンと避妊用の合成エストロゲンの振る舞いと存在を調査した。フランクフルトに近い公共下水処理施設の汚水において 17β エストラジオールとエストロンを測定した。平均濃度はそれぞれ $0.015\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.027\ \mu\text{g/L}$ であった。 17β エストラジオールと 16α -hydroxyestrone は 17α -ethinylestradiol と estron にくらべ高率で除去されていた。カナダとドイツにおいては公共下水処理施設から排出された 17β エストラジオール、 17α -ethinylestradiol、 16α -hydroxyestrone は ng/L の範囲で頻繁に検出されてい

る。Estron の最大検出濃度は 70ng/L であった。調査されたドイツの 15 の河川においては estron のみが検出され、その最大濃度は 1.6ng/L であった。

225(1999) 91-99

T.A.Ternes *et al.*:「Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—II.Aerobic batch experiments with activated sludge」

天然エストロゲンと避妊用の合成エストロゲンの永続性を調査するために、フランクフルトに近い公共下水処理施設からの活性汚泥を希釈した懸濁液を含む好気性バッチ試験を行った。バッチ試験の結果から次のことがわかる。活性汚泥と接触した天然エストロゲン、 17β エストラジオールは estrone へと酸化され、estrone はさらに時間依存的に除去されることがわかる。Estrone のさらなる代謝物は観察されなかった。 16α -hydroxyestrone は即座に除去され、さらなる代謝物は観察されなかった。避妊用の合成エストロゲン 17α -ethinylestradiol はこの実験の好気性条件では残留していた。その一方、mestranol は即座に除去され、脱メチル化によって僅かだが 17α -ethinylestradiol が形成されていた。加えて、 17β エストラジオールの 2 つのグルクロン酸抱合体(17β エストラジオール- 17 -glucuronide、 17β エストラジオール-3- glucuronide)は活性汚泥懸濁液中で脱抱合されていた。このようにして、 17β エストラジオールが放出されていた。活性汚泥の脱抱合活性は、活性汚泥懸濁液の Milli-Q 水水溶液中での 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide(MUF- β -glucuronide)の脱抱合によってさらに確認された。得られた MUF への転換率はほぼ一定で、 $0.1\ \mu\text{mol/L}$ であった。それゆえに、実際の公共下水処理施設において 17β エストラジオールグルクロン酸抱合体と他のエストロゲンのグルクロン酸抱合体が分解され、その結果としてフリーのエストロゲン濃度が上昇しているのかもしれない。

225(1999) 101-108

A.C.Belfroid *et al.*:「Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands」

地表水や地下水中の 4 つのエストロゲン様ホルモンを、 1ng/L 以下の濃度で分析可能なルーチン化された分析方法が開発された。エストロゲン様ホルモンの回収率は 88-98%で、検出下限値は測定される化合物や物質によってことなるが 0.1 - 2.4ng/L だった。この方法はネーデルランドの水環境中における 17β エストラジオールや 17α エストラジオール、estrone、 17α -ethinylestradiol の測定に使われた。実験結果から次のことがわかる。いくつかの場所の地表水においては、エストロゲン様ホルモンは 6ng/L の低濃度まで検出可能であった。下水処理施設からの流出水中から、estrone と 17β エストラジオールが ng/L の濃度範囲で検出された。 17α エストラジオールと避妊用の合成エストロゲン 17α -ethinylestradiol の濃度はたいていのサンプルで検出下限値を下回っていた。ほとんどの地表水と下水処理施設からの流出水中からはグルクロン酸抱合体は検出されなかった。

225(1999) 109-118

水環境中での薬剤残留物の最近のモニタリング調査によって興味深い結果が得られている。公共下水処理施設からの流出水中や河川水中から数 $\mu\text{g/L}$ の濃度で薬剤化合物が頻繁に検出されている。この論文では、様々な水試料中における macrolid 系抗生物質から Sulfoamide、penicillin、tetracycline にいたるまでの 18 の抗生物質の分析について述べている。試料は凍結乾燥によって濃縮した後、HPLC-MS によって定量した。分析した公共下水処理施設からの流出水中や河川水中からは erythromycin の分解物 roxithromycin と Sulfamethoxazole が頻繁に検出された。濃度は大きくて $6\mu\text{g/L}$ であった。Tetracycline と penicillin の検出下限値はそれぞれ $50\mu\text{g/L}$ 、 $20\mu\text{g/L}$ であるが、いずれも検出されなかった。ドイツの農業地帯から採取した地下水試料からは、2 つの場所をのぞいて抗生物質による汚染は確認されなかった、このことは家畜から水環境中への薬剤の移行はたいして重要ではないことを示している。

225(1999) 119-133

Mark H.M.M.Montforts *et al.*:「The exposure assessment for veterinary medicinal products」

家畜・ペットの病気治療に使われる医薬品の環境へのリスクを評価するための方法として、hazard quotient approach が提案されている。この論文では、オランダ農業へ適用した曝露モデルを用いて、医薬品曝露評価について詳しく述べる。曝露評価に基づいて、個々の製品の環境リスク許容値が決定される。それゆえに、規制当局は慎重に曝露の想定を行なわなければならない。ありふれた農業を対象とした一般的なモデルに少し手を加えるだけで曝露予想値は 2-40 倍も違ってくるのがこの論文で示されている。さらに、現在提案されている影響評価方法はあまりに多様であり、trigger value もさらなる試験を必要とするものであり、いずれも役に立たない。もしくは、少なくともそこから得られる結果には一貫性がない。曝露の想定を適切に行なうには、獣医学や農業の実状、リスク管理、環境毒性学や環境化学の知識を生かした、学際的は手法が要求される。

225(1999) 135-141

Marcus stumpf *et al.*:「Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil」

脂肪分調整薬、抗炎症剤などの残留物や薬剤の代謝物が、ブラジル リオデジャネイロ州において生下水、下水処理水、河川水から検出されている。これらの残留物はおもに人体からの排泄に起因している。公共下水処理施設からの流出水における平均濃度は、この研究で調査したほとんどの薬剤について $0.1-1\mu\text{g/L}$ であった。個々の薬剤の下水処理をとうしての除去率は 12-90% であった。薬剤残留物の不完全な除去の結果として、河川もまた汚染されていることが確認された。河川水における平均濃度は $0.02-0.04\mu\text{g/L}$ であった。また、観測された最大濃度は $0.5\mu\text{g/L}$ であった。

225(1999) 143-153

Wolfgang Kalsch *et al.*:「Biodegradation of the iodinated X-ray contrast media diatrizoate

and iopromide]

ヨウ素化血管造影剤、diatrizoate と iopromide の分解を調査した。血管造影剤の環境中における挙動を想定して、活性汚泥、河川水、河川水+低質における実験系を確立した。いくつかの実験において、低濃度領域における分解の調査と分解産物の検出のために¹⁴Cラベルした造影剤を使用した。Diatrizoate は好気性活性汚泥への吸着、好気性活性汚泥による分解ともに貧弱であった。このことは、Diatrizoate が下水処理施設にかなり残留していることを示している。河川水と低質の実験系においては、3週間の増殖誘導期の後に Diatrizoate の分解が始まり、その後は速度定数 0.15/day の1次反応的に分解していった。好気性条件下でのインキュベートにおいて200日間は安定な2つの代謝物が形成された。最終的には、無酸素状態において好気性代謝物が検出された。活性汚泥中で、約85%の iopromide が2つの物質へと代謝された。Iopromide と同じように、2つの代謝物も非常に親水性で活性汚泥と吸着したものは16%以下であった。河川水+低質の実験系においては、Iopromide は速度定数 0.04/day の1次反応的に分解していった。20日後には、インキュベート期間中安定であった1つの代謝物が形成された。河川水における濃度依存的な iopromide の分解を調査した。16.0 μmol/L の濃度において半減期は最短で3.1日であり、濃度が上昇したり減少したりすると半減期は3.1日より長くなった。Iopromide の代謝物は同定できなかったが、しかし、Iopromide の部分的な脱ヨウ素化は確認された。2つの血管造影剤とその代謝物の二酸化炭素への分解は観察されなかった。

225(1999) 155-165

Klaus Kummerer *et al.*:「European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources」

体外へ排泄された Cisplatin、carboplatin などの抗がん剤に起因するプラチナの濃度を、5つのヨーロッパの病院からの排水について分析した。病院から水環境中へのプラチナ放出量を与えてくれる、短期間の試験によって分析した。これらの放出量を、車からの推定放出量と比較した。病院排水中の日平均濃度は10-601ng/Lであった。消費量から推定すると、日平均濃度は10-710ng/Lの範囲であるべきである。病院からのプラチナ放出量は、ヨーロッパ各国における車からの推定放出量の3.3-12.3%(1.3-14.3kg/year)であった。下水処理施設中のプラチナについて、他の放出源と比べて病院からの放出量はごく微量である。しかし、病院からの放出を無視することはできない。さらなる調査を進めて、環境中へプラチナを放出する可能性のある他の汚染源が考慮されるべきである。

225(1999) 167-176

Ralf Falter *et al.*:「Determination of carboplatinum and cisplatinum by interfacing HPLC With ICP-MS using ultrasonic nebulisation」

化学治療に使われる carboplatinum(II) と cisplatinum(II) を測定するための新しい HPLC 技術が開発された。混合物は HPLC カラムによって分離した。溶離液はオンラインで超音波ネビュライザーによって霧状化された。エアゾールはネビュライザーのガスフローによって脱溶媒され、ICP-MS へと導入された。プラチナの分子量 195 が測定された。2つのプラチナの混合物を分離・検出するため

の最適条件を得るために C18 逆相クロマトグラフィーも試した。陰イオン交換法が操作、感度において最適な方法として採用された。この方法は 2 つのプラチナの混合物を 3 分以内に良く分離できる。carboplatinum と cisplatinum の検出下限値はそれぞれ 130pg、80pg であった。この新しい方法を使って、様々な陰イオンの影響下でプラチナ化合物類がどのように振舞うのかを調べた。この調査は将来環境サンプル中から carboplatinum と cisplatinum を抽出するための方法を開発する上で必要不可欠である。さらに、環境サンプルからプラチナ化合物類を抽出する方法を計画するために、Carboplatinum、cisplatinum、 $\text{Na}_2\text{Pt}(\text{II})\text{Cl}_4$ 、パラジウム化合物 $\text{Na}_2\text{Pd}(\text{II})\text{Cl}_4$ の水相/低質間、水相/木炭間、下水汚泥/水相間、そして鉄を加えて凝集処理後の水相とその沈殿間、それぞれにおける分配を調査した。

海棲哺乳動物およびヒトにおけるブチルスズ化合物と PCBs の免疫細胞毒性

研究者 田辺 信介・高橋 真 愛媛大学沿岸環境科学研究センター
中田 晴彦 熊本大学理学部

研究要旨

ヒトおよびイルカ・アザラシの血液中リンパ球を単離し、ブチルスズ化合物 (TBT: tributyl tin, DBT: dibutyl tin, MBT: monobutyl tin) とコプラナ PCBs (IUPAC 77, 126, 169) 添加後の細胞増殖活性を調べた。約 300 nM の TBT・DBT 添加時に有意な増殖阻害が観察され、いずれの生物種も類似の傾向を示した。一方、3600 nM の MBT、約 30 nM のコプラナ PCBs 添加では細胞への有意な影響は見られなかった。有機スズとコプラナ PCBs を同時添加したところ、[DBT+77] と [DBT+169] の組み合わせで増殖阻害が見られたが、[DBT+126] 混合時は増殖が亢進する傾向が観察された。以上のことから、TBT, DBT は相対的に強い免疫毒性を有することが示唆され、化学種暴露の相互作用により免疫バランスが攪乱される可能性が窺えた。

日本近海の野生鯨類数種を対象に血中 TBT および DBT の残留濃度を測定したところ、沿岸性鯨類のスナメリでリンパ球の増殖に対する TBT や DBT の毒性閾値を上回る濃度が認められた。このことは、比較的高濃度の化学汚染を受けている海棲哺乳類ではブチルスズによる免疫攪乱が起こる可能性を暗示している。また、ヒト肝臓および血液から数 10ppb レベルの有機スズ検出の報告もあることから、今後人体へのスズ暴露量評価やその影響について疫学調査・研究を進める必要がある。

A. 研究目的

近年、先進国周辺海域でウイルス感染によるイルカ・アザラシの大量死が頻発し、その要因に内分泌攪乱物質による海洋汚染の影響が疑われている (Ross *et al.*, 1996)。とくに、ダイオキシン・PCBs など有機塩素化合物は、発ガンや免疫抑制をはじめ様々な生体異変の原因物質として懸念され、社会的関心を集めている。一方、有機塩素化合物と同様に有機スズ化合物も代表的な内分泌攪乱物質であり、海洋生態系を広く汚染している。その免疫毒性は、スズ分子にブチル基が2-3付加した TBT, DBT が強く、*in vitro* 実験系では数 10ppb の暴露レベルでリンパ球に有意な影響が観察されている (Seinen and Pennink, 1979)。TBT は船底塗料や網の防腐剤など水産目的の使用が中心であったが、わが国の場合 1990 年の化審法第一種化学物質指定以後、その汚染は低減する傾向にある (Harino *et al.*, 1999)。ところが、DBT はエポキシ樹脂等の可塑剤として使用され、身近なプラスチック製品に含まれていることからヒトへの暴露が懸念され、実際にヒト肝臓および血液から数 10ppb レベルのブチルスズが検出されている (Kannan *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999)。さらに、日本近海産のイルカ有機スズ濃度は ppm レベルと極めて高いものがあり (Tanabe *et al.*, 1998)、この種の化学汚染と免疫影響との因果関係を解明する研究が求められている。そこで本研究では、

1. 有機スズおよび PCBs をヒト・海棲哺乳類の血液中リンパ球に添加し、増殖活性に影響を及ぼす濃度
2. 野生鯨類に蓄積した有機スズ・PCBs 濃度

を明らかにし、その知見から有機スズ・PCBs によるヒトおよび海棲ほ乳類の免疫影響とそのリスク評価を試みた。

B. 研究試料と研究方法

試料: 三陸沖で捕獲したイシイルカ 10 頭を船上で直ちに解剖し、化学分析用の脂肪と肝臓を採取した (Fig. 1, Table 1)。臓器組織は -20°C で冷凍保存した。同時にイシイルカ 3 頭から血液を採集してリンパ球増殖試験用試料とした。また、水族館で飼育中のバンドウイルカ、ゴマフアザラシ、カリフォルニアアシカと成人男性の血液も採集した (Fig. 1, Table 1)。血液試料はクラッシュアイス内で保存し、リンパ球の増殖活性に有意な低下が見られなかった時間内 (採血後 35 時間以内) に実験を開始した。さらに上記の鯨種に加え、日本近海で座礁又は捕獲された鯨類 5 種 (カズハゴンドウ、オオギハクジラ、スジイルカ、カマイルカ、スナメリ) から血液 (全血) を採取し、血液中の TBT 及び DBT 残留濃度測定用試料とした。これら全血試料は -20°C で保存した。

化学分析: プチルスズの分析は既報 (Tanabe *et al.*, 1998) に従った。1-2g の肝臓試料を 0.1% トロポロンアセトンで溶媒抽出し、濃縮後グリニャール試薬 (臭化プロピルマグネシウム) で誘導体化した。試料溶液をフロリジルカラムでクリーンアップした後、GC-FPD により TBT, DBT, MBT の定性・定量を行った。

有機塩素化合物 (PCBs [non-ortho コプラナ PCB を含む]・DDTs・HCHs・HCB・CHLs [クロルデン化合物]) の分析は既報に従った (Tanabe *et al.*, 1994)。約 3-4 g の脂皮を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ジエチルエーテル・ヘキサン混合溶液で抽出した。抽出液の一部をフロリジルドライカラムを用いて脱脂し、硫酸洗浄後フロリジルウエットカラムで分画を行った。目的物質の定性・定量は GC-MS および GC-ECD を用いた。

リンパ球の増殖活性の測定: 測定は Swart *et al.* (1994) の方法に従った。プラスチックチューブに Histopaque-1077 (Sigma Chem. MO, USA) と血液を等量入れ、400g で遠心分離した。血しょうとヒストパックの間に現れる白いバンド (リンパ球層) を別のチューブに移し PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) を得た。リンパ球数を計算盤でカウントし、これを 96 穴丸底プレートに細胞数 $1.5 \times 10^5/\text{well}$ に分注した。各 well に 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A (concanavalin A, Wako Pure Chemical, Japan) と、DMSO に溶解した有機スズ化合物 (TBT-Cl, DBT-Cl, MBT-Cl) またはコプラナ PCBs (IUPAC 77, 126, 169) をそれぞれ 0.30 - 3,600 nM, 2.8 pM-34 nM の濃度範囲で添加後、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。また、バンドウイルカのリンパ球について、TBT, DBT と各 PCB 成分を同時添加して、前述の条件下で細胞を培養した。培養日数はあらかじめ検討し、ヒト・アザラシ・アシカは 3 日、イルカは 4 日とした。培養終了 24 時間前に重水素でラベルしたチミジン (2.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) を添加し、24 時間後に液体シンチレーションカウンターで増殖活性を調べた。コントロールは 0.5% DMSO 溶液を単独添加したものとし、アッセイは 3 連で行った。有意差の検定は、Mann-Whitney *U*-test (SPSS ver. 6.0 for Macintosh) により行った。

C. 研究の結果と考察

汚染の実態: 分析した全てのイシイルカより有機塩素化合物および有機スズ化合物が検出された (Table 2)。

全般に PCBs・DDTs 濃度が高く、HCB, CHLs, HCHs は低値であった。PCBs, DDTs, CHLs の濃度を、過去に報告された同海域のイシイルカの濃度 (Prudente *et al.*, 1997) と比較すると 3-5 倍程度減少しており、本海域における過去 10 年間の有機塩素化合物汚染は低減していることが窺えた。コプラナ PCBs は 77, 126, 169 の順に高く、それぞれの平均濃度は 0.53, 0.18, 0.16 ng/g で大部分の検体は 1 ng/g 以下であった。

イシイルカ肝臓の総ブチルスズ濃度は 330-1,800 ng/g であった (Table 2)。DBT が最も高く、次いで TBT, MBT の順で、3 年前に同海域で採取したイシイルカの濃度や組成 (Tanabe *et al.*, 1998) とほぼ同じであった。TBT は化審法第一種特定化学物質に指定されて製造・輸入・新規使用が禁止されたが、海棲哺乳類の汚染は依然として顕在化していることが明らかとなった。

リンパ球添加試験：イシイルカ血中のリンパ球に 3 種のブチルスズ化合物を 3.0-3,600 nM (1-1,000 ng/ml) の濃度範囲で添加したときの増殖反応を Fig. 2 に示す。約 300 nM の TBT, DBT 添加時にコントロール値より有意な増殖低下が観察された。一方、MBT は 3,600 nM 添加時においても 3 検体のうち 2 検体は有意な活性低下は認められず、TBT, DBT に比べて弱い細胞毒性が窺えた。同様の傾向はブチルスズの LD₅₀ 値 (TBT: 122-349 mg/kg, DBT: 112-219 mg/kg, 2200-2300 ng/kg; Snoeij *et al.*, 1987) でも得られている。

一方、コプラナ PCBs を 2.8 pM-34 nM (0.001-10 ng/ml) の濃度範囲でバンドウイルカの血中リンパ球に添加した時の増殖活性変化を Fig. 3 に示す。PCBs 77, 126, 169 のいずれの異性体についてもコントロールに比べて有意な変動が観察されなかった。一方、TBT, DBT では添加濃度が約 300 nM 時にほぼ完全に増殖が阻害され、イシイルカと同様の結果が得られた。MBT では 360 nM 添加時に一検体で有意な減少が見られたが、3,600 nM では値の変動は認められなかった。本添加試験をゴマフアザラシ・カリフォルニアアシカ・ヒトの血液中リンパ球を用いて行ったが、いずれの場合もイルカとほぼ類似の傾向が得られた (Figs. 4, 5)。

免疫細胞にブチルスズを添加して DNA 増殖をラット胸腺細胞を用いて調べたところ、20 ng/ml の DBT-Cl 添加で影響があらわれ、100 ng/ml で細胞分裂が阻害されたことが報告されている (Seinnen & Pennink, 1979)。腫瘍細胞に対し攻撃性を有するヒト NK 細胞に 200 nM の TBT を添加した試験では、処理後一時間内で細胞増殖能は有意に低下していた (Whalen *et al.*, 1999)。これらの有機スズ添加濃度は、本研究のそれと近似している。また、ラット胸腺細胞に 100 nM の TBT を添加後、フローサイトメーターにより annexin positive 生存細胞を調べたところ、その数は増加傾向にあった。このことより、TBT による細胞のアポトーシスが発現しているか、細胞膜に TBT が直接作用したと考えられている (Nakata *et al.*, 1999)。

現時点で有機スズによるリンパ球増殖阻害のメカニズムを解明することはできないが、本研究の結果から TBT, DBT による免疫細胞への影響は数 10ppb レベルで起こりうることを確認され、この濃度レベルはヒトも海棲哺乳類も同程度で生物種間差は比較的小さいことが示唆された。

Non-ortho コプラナ PCBs 以外の異性体 (IUPAC 138, 153, 180, 169) をイルカの血中リンパ球に加えた研究では、CB-138 を 20 および 25 ppm 添加時に有意な増殖阻害が認められている (De Guise *et al.*, 1998)。興味深いことに、IUPAC 169 を 5-25 ppm (本研究の暴露濃度の 500-2,500 倍) の濃度範囲で添加しても、いずれも細胞への影響は見られていない。コプラナ PCBs やダイオキシン類は Ah レセプターとの結合能が強く、この種の毒性は P-450 薬物代謝酵素誘導を介して発現すると考えられている (Safe, 1990)。ところが、本研究の結果やこれまでの報告では免疫系に及ぼすコプラナ PCBs の影響は他の異性体より小さいことが推察され、免疫

毒性発現はAh レセプターを介さない機序が主体と考えられた。

有機スズ化合物とPCBsの同時添加による細胞増殖試験を試みた。添加濃度は、有機スズ化合物・PCBsのいずれも単独添加時に有意な変化を示さなかった範囲に設定した。TBT, DBT濃度を約30 nMとし、これにコプラナーPCBsをそれぞれ5種類の濃度で添加した (Fig. 6)。その結果、DBTとPCB77, 169添加時に有意な増殖阻害が観察され、とくにPCB169は2.8 nM以上と低濃度で阻害傾向が見られた。一方、DBTとPCB126混合時ではPCBs濃度が31 nMのときにコントロールに比べ有意な増加を示した。マウスにPCBsと有機塩素系農薬のディルドリン・カルボフランを混合暴露した実験では、有意な免疫阻害が報告されている (Flipo *et al.*, 1992)。De Guise *et al.* (1998)もPCBs異性体のIUPAC 138, 153, 180の同時添加で、脾臓細胞に有意な増殖阻害がみられたことを報告している。汚染化学種の相加・相乗作用メカニズムの解明は今後の研究を待たねばならないが、PCBsと有機スズ化合物は免疫機能を複合的に阻害/亢進し、免疫バランスを攪乱することが示唆された。

リスク評価：上記の実験結果から、イシイルカリンパ球に対するTBT, DBTの増殖阻害 EC_{50} 値は、それぞれおおよそ150 nM, 140 nMと推算された (組織中濃度に換算してそれぞれ44 ng/g, 33 ng/g)。実験に供した試料数が少ないため、野生鯨類の免疫毒性についてはさらなる研究が必要であるが、ここでは上記の値を一つの目安として野生鯨類の血中TBT, DBT濃度を比較し、そのリスク評価を試みた。その結果、野生鯨類から検出されたTBT, DBTの血中残留濃度はほとんどの検体でこれら EC_{50} 値を下回っていたが、瀬戸内海で座礁した沿岸性鯨類のスナメリからは、これらの閾値を上回る血中TBT, DBT濃度が検出された (それぞれ95 ng/g, 640 ng/g) (Fig. 7)。スナメリなど沿岸性の海棲哺乳類は、有機スズ化合物暴露量の多いことが予想され、今後免疫攪乱の可能性を検証する必要がある。免疫機能の失調は、ウィルスや細菌などに対する抵抗力を低下させ、感染症のリスクを高める。実際、北海や地中海では感染症で多数のアザラシやイルカが死滅しており、PCBなど免疫系を攪乱する化学物質の関与が示唆されているが、有機スズ化合物の影響も疑う必要がある。日本では今のところ感染症による大量死は発生していないが、沿岸性のスナメリの個体数が減少するなど、気がかりな事象が報告されている。

コプラナーPCBsのリンパ球増殖に対する毒性はブチルスズ化合物に比べ弱く、また実際の組織中濃度 (Table 2)と比較しても、毒性影響の可能性は低いことが本研究により示された。しかしながら、それ以外の毒性影響の可能性、例えばAhレセプターを介した影響や内分泌攪乱作用については検討を要する課題が残されている。また、本研究ではコプラナーPCBとブチルスズ化合物の複合的な影響が示唆されたが、日本沿岸の海棲哺乳動物は有機スズ化合物とともにPCBなどの有機塩素化合物も高濃度に蓄積しており、免疫系や内分泌系、薬物代謝酵素系に対するその複合的な影響が懸念される。

最近アメリカ人の血液から、TBTやDBTを検出した例が報告された (Kannan *et al.*, 1999)。一部アメリカ人の血中から検出されたTBT, DBTの残留濃度は、本研究で得られたリンパ球増殖阻害の閾値を上回っている (Fig. 7)。従って、ヒトの健康に関してもブチルスズ化合物が悪影響を与える可能性がある。日本人の肝臓組織や日常生活で利用されるプラスチック製品からブチルスズ化合物を検出した報告例もあり (Takahashi *et al.*, 2000)、今後人体へのスズ暴露量とその影響を評価する疫学的な研究を実施する必要がある。

References

- De Guise, S., Martineau, D., Beland, P. and Fournier, M. (1998) *J. Toxicol. Environ. Health*, 55: 479-493.
- Flipo, D., Bernier, J., Girard, D., Krzystyniak, K. and Fournier, M. (1992) *Int. J. Immunopharmacol.*, 14: 747-752.
- Kannan, K., Senthilkumar, K., Giesy, J. P., (1999) *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1776-1779.
- Harino, H., Fukushima, M. and Kawai, S. (1999) *Environ. pollut.*, 105: 1-7.
- Nakata, M., Oyama, Y., Okada, Y., Yamazaki, Y., Chikahisa, L. and Satoh, M. (1999) *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 7: 267-273.
- Nakata, H., Tanabe, S., Tatsukawa, R., Amano, M., Miyazaki, N. and Petrov, E. A. (1995) *Environ. Sci. Technol.*, 29: 2877-2885.
- Prudente, M., Tanabe, S., Watanabe, M., Subramanian, A., Miyazaki, N., Suarez, P. and Tatsukawa, R. (1997) *Mar. Environ. Res.*, 44: 415-427.
- Ross, P. S., Swart, R. L. D., Reijnders, P. J. H., Loveren, H. V., Vos, J. G. and Osterhaus, A. D. M. E. (1995) *Environ. Health Perspect.*, 10: 162-167.
- Safe, S. (1990) *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 21, 51-88.
- Seinen, W. and Penninks, A. (1979) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 320: 499-517.
- Snoeijs, N. J., Penninks, A. H. and Seinen, W. (1987) *Environ. Reser.*, 44: 335-353.
- Swart, R. L., Ross, P. S., Vesser, L. J., Timmerman, H. H., Heisterkamp, S., Loveren, H. V., Vos, J. G., Reijnders, P. J. H. and Osterhaus, A. D. M. E. (1994) *Ambio*, 23: 155-159.
- Takahashi, S., Mukai, H., Tanabe, S., Sakayama, K., Miyazaki, T. and Masuno, H. (1999) *Environ. Pollut.*, 106: 213-218.
- Tanabe, S., Prudente, M., Mizuno, T., Hasegawa, J., Iwata, H. and Miyazaki, N. (1998) *Environ. Sci. Technol.*, 32: 193-198.
- Tanabe, S., Sung, J.-K., Choi, D.-Y., Baba, N., Kiyota, M., Yoshida, K. and Tatsukawa, R. (1994) *Environ. Pollut.*, 85: 305-314.
- Whalen, M. M., Loganathan, B. G. and Kannan, K. (1999) *Environ. Reser.*, 81: 108-116.

F. 研究発表

1. 論文発表

田辺信介 (2000) 有機スズ化合物による海棲哺乳動物の汚染, *Biomedical Research on Trace Elements*, 11(3), 215-224.

Nakata, H., Sakakibara, A., Kanoh, M., Kudo, S., Watanabe, H., Nagai, N., Miyazaki, N., Asano, Y. and Tanabe, S. (2001) Toxic potential of butyltins and non-ortho coplanar PCBs in immune cells of marine mammals. *Environmental Pollution* (in press).

Minh, T. B., Watanabe, M., Tanabe, S., Yamada, T., Hata, J. and Watanabe, S. (2001) Specific accumulation and elimination kinetics of *tris*(4-chlorophenyl)methane, *tris*(4-chlorophenyl)methanol and other persistent organochlorines in humans from Japan. *Environmental Health Perspectives* (in press).

2. 学会発表

田辺信介 (2000): 海産哺乳類 水産環境における内分泌攪乱物質(環境ホルモン)問題の現状と課題. 平成12年度日本水産学会春季大会, 東京, 4月, 講演要旨集, 297.

伊藤由紀枝・高橋 真・田辺信介・馬場徳寿 (2000) 三陸沖で捕獲したキタオツトセイにおけるブチルスズ化合物の経年変動. 平成12年度日本水産学会春季大会, 東京, 4月, 講演要旨集, 27.

梶原夏子・渡部真文・田辺信介・天野雅男・宮崎信之 (2000) 日本近海のイシイルカにおける有機塩素化合物の汚染とその蓄積特性. 平成12年度日本水産学会春季大会, 東京, 4月, 講演要旨集, 28.

Takahashi, S., Shinomiya, M., Muraoka, S., Mukai, H., Tanabe, S., Hata, J., Yamada, T., Sakayama, K. and Miyazaki, R. (2000) Butyltin accumulation in humans and terrestrial higher animals and its possible sources. Third SETAC World Congress, Brighton, UK, May, Abstracts, 205.

中井美絵・渡部真文・田辺信介・小城春雄・柴田康行 (2000) 北海道利尻産ウミネコ (*Larus cirasiosttis*) における有機塩素化合物の蓄積特性. 第9回環境化学討論会, 札幌, 6月, 講演要旨集, 110-111.

田辺信介 (2000) 有機スズ化合物による海棲哺乳動物の汚染. 第11回日本微量素学会, 名古屋市, 6月, 抄録集, 34.

渡部真文・田辺信介・岩田久人・Minh, T. B.・梶原夏子・高橋 厚・國末達也・山田恭子・中井美絵・宮崎信之・馬場徳寿・樋口広芳・藤田正一・増田 泰・小城春雄・柴田康行・齋藤慶輔・須藤明子・遠藤孝一・山田健人・秦 順一・渡辺 昌 (2000) *Tris*(4-chlorophenyl)methane と *tris*(4-chlorophenyl)methanol によるヒトおよび野生高等動物の汚染. 第6回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会, 大阪, 9月, 講演要旨集, 88-89.

Iwata, H., Kim, Y. E., Hahn, M. E. and Tanabe, S (2000) Contamination of endocrine disrupting chemicals in marine mammals. Korea-Japan Endocrine Disrupters Symposium, Seoul, Korea, November, Abstracts, 1.

Minh, T. B.・渡部真文・田辺信介・山田健人・秦 順一・渡辺 昌 (2000) Contamination, specific accumulation and elimination kinetics of *tris*(4-chlorophenyl)methane *tris*(4-chlorophenyl)methanol and other persistent chlorinated endocrine disrupters in human from Japan. 環境ホルモン学会第3回研究発表会, 横浜, 12月, 講演要旨集, 59.

伊藤由紀枝・高橋 真・Le, L. T. H.・田辺信介・馬場徳寿・宮崎信之・藤瀬良弘 (2000) ブチルスズ化合物による北大平洋産鰭脚類および鯨類汚染の経年変動. 環境ホルモン学会第3回研究発表会, 横浜, 12月, 講演要旨集, 59.

新美聡子・渡部真文・中田晴彦・田辺信介・天野雅男・宮崎信之・藤瀬良弘・Petrov, E. (2000) 内分泌攪乱物質 (PCBs, 有機塩素系農薬) による鰭脚類および鯨類汚染の経年変動. 環境ホルモン学会第3回研究発表会, 横浜, 12月, 講演要旨集, 60.

藤井信洋・岩田久人・國末達也・渡部真文・田辺信介・中田晴彦・小城春雄・柴田康行 (2000) 魚食性鳥類における内分泌攪乱化学物質 (PCB および有機塩素系農薬) の蓄積・代謝とチトクローム

P450 の誘導 環境ホルモン学会第3回研究発表会, 横浜, 12月, 講演要旨集, 218.

村岡正義・高橋 真・田辺信介・山田健人・秦 順一・渡邊 昌・坂山憲史・宮崎龍彦・升野博志・Zheng, J (2000) プチルスズ化合物によるヒトおよび陸棲高等動物の汚染とその蓄積特性 環境ホルモン学会第3回研究発表会, 横浜, 12月, 講演要旨集, 323.

Tanabe, S (2000) Contamination and toxic effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife. International Symposium on Environmental Endocrine Disrupters 2000, Yokohama, December, Abstracts, 28-29.

Iwata, H., Fujii, N., Kunisue, T., Watanabe, M., Tanaka, H., Ogi, H., Shibata, Y. and Tanabe, S (2001) Accumulation of persistent organic pollutants, and induction of cytochrome P-450 in seabirds. International Workshop on Marine Pollution by Persistent Organic Pollutants (POPs) - The 17th "Global Environment Tsukuba", Tsukuba, February, Abstracts, 9-10.

G. 知的所有権の取得状況

特許

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

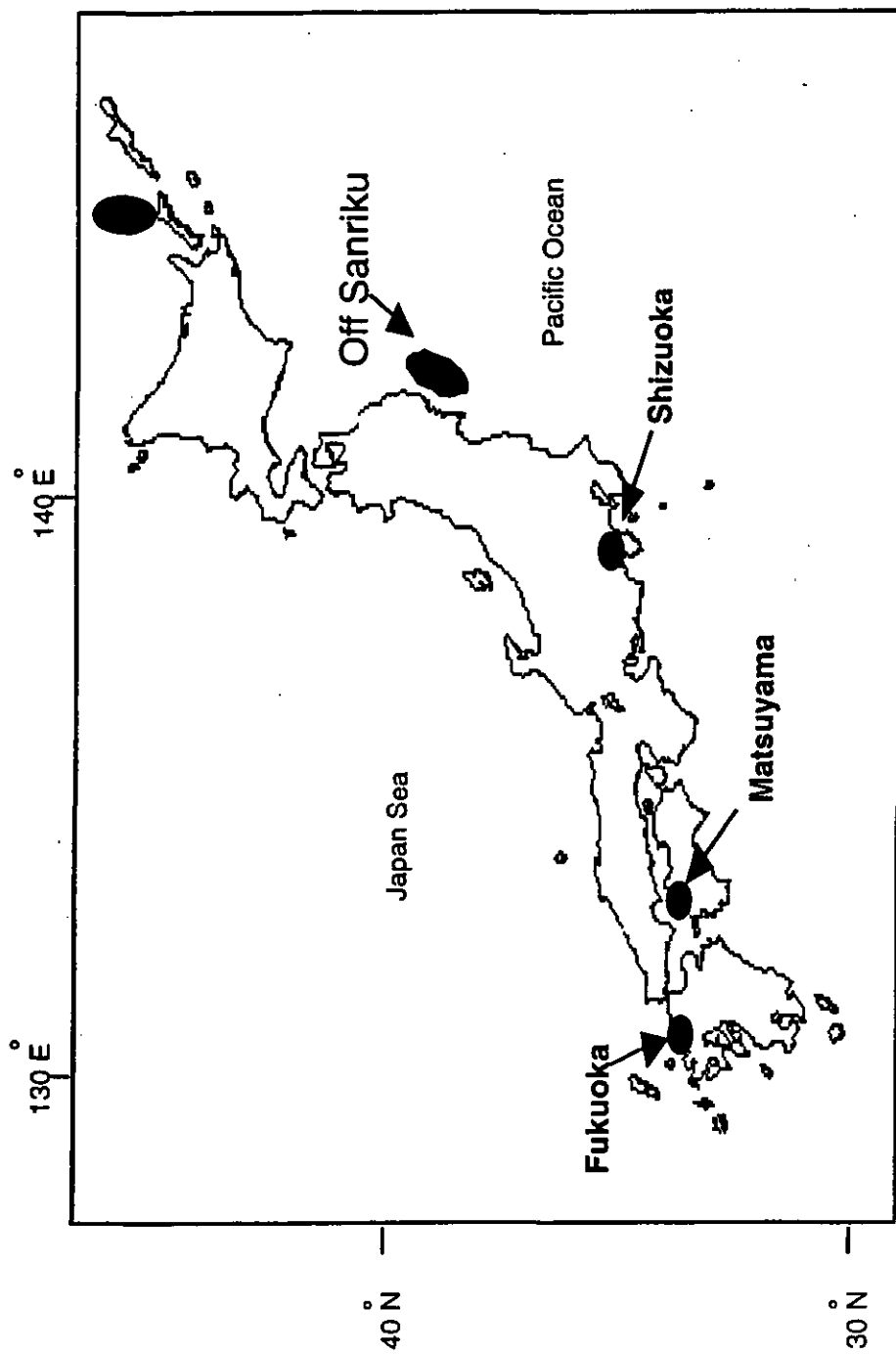


Fig. 1 Sampling locations of liver and/or blood of mammals

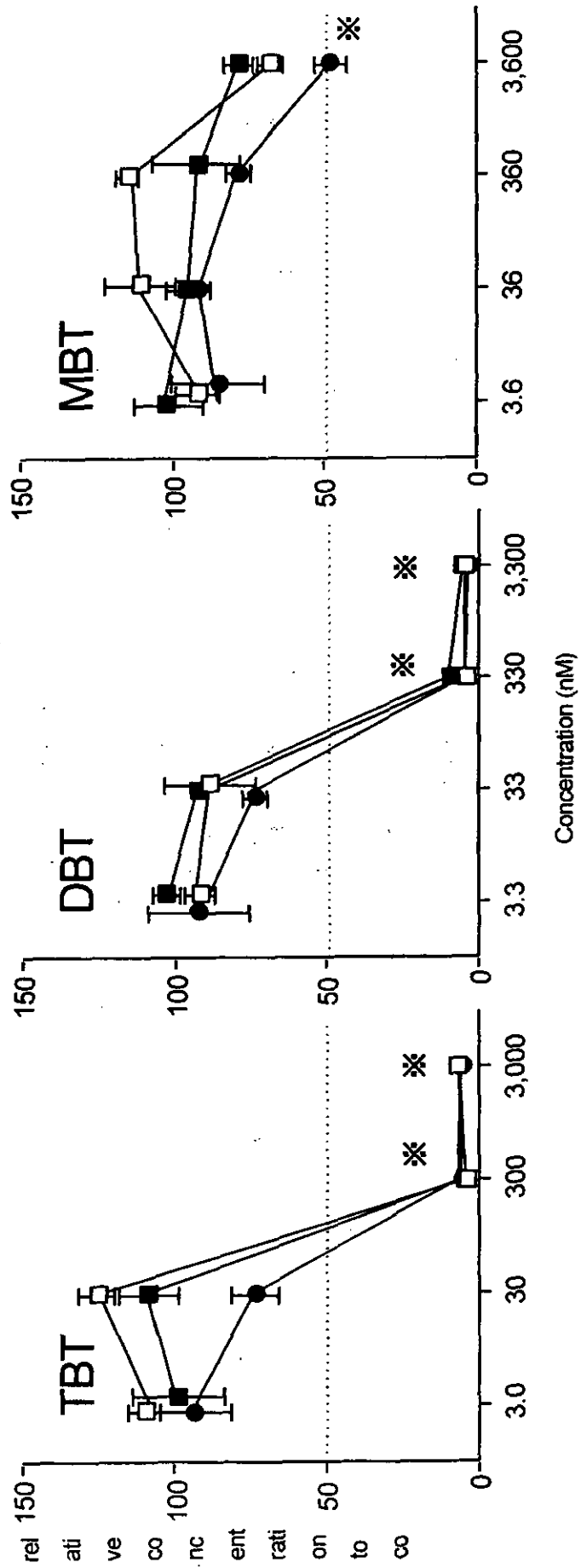


Fig. 2 Proliferation response of PBMCs in three Dall's porpoises following the treatment with butyltins. Asterisk: $p < 0.05$

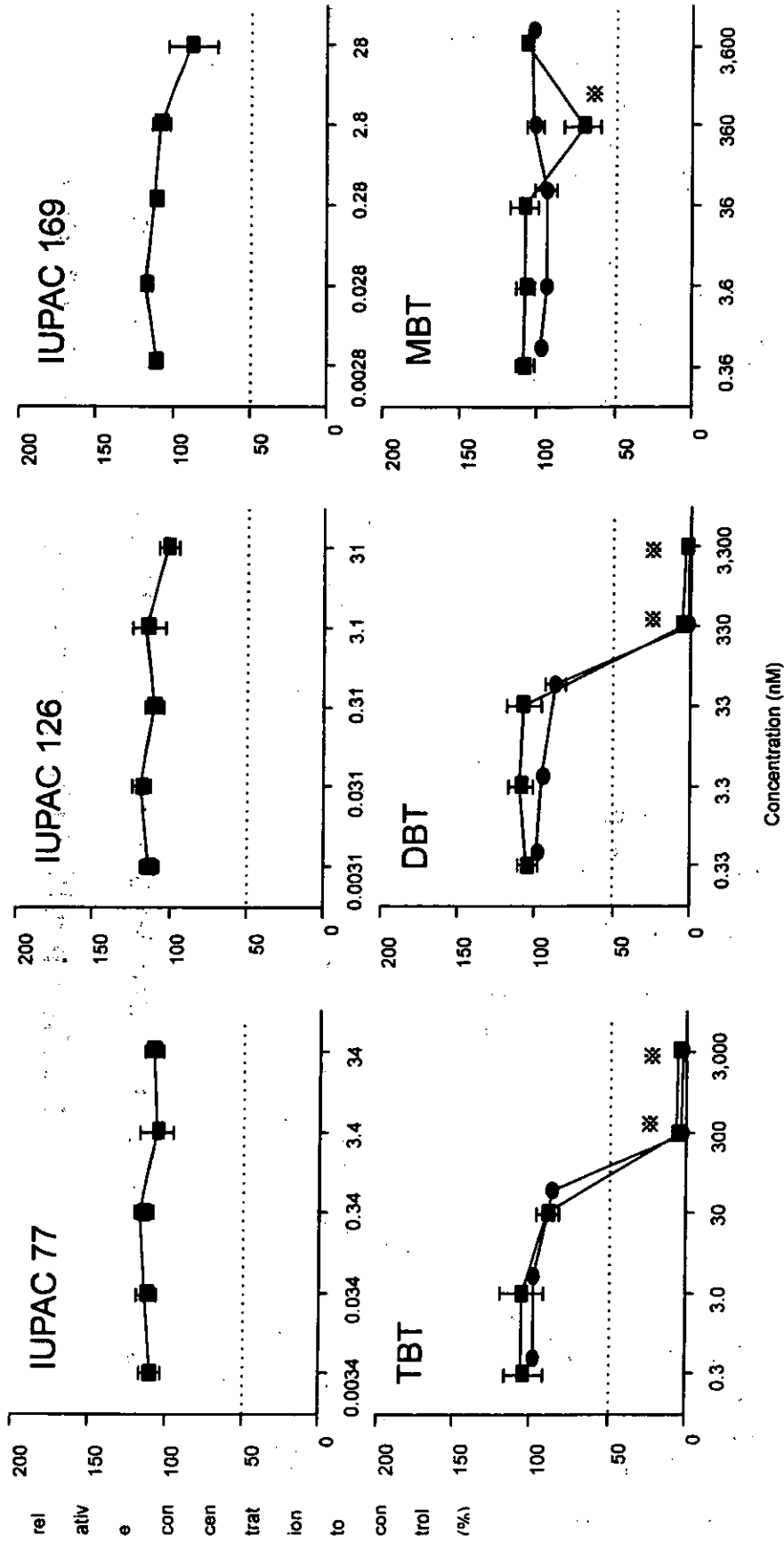


Fig. 3 Proliferation response of PBMCs in two bottlenose dolphins following the treatment with non-ortho coplanar PCB congeners and butyltins. Asterisk: $p < 0.05$

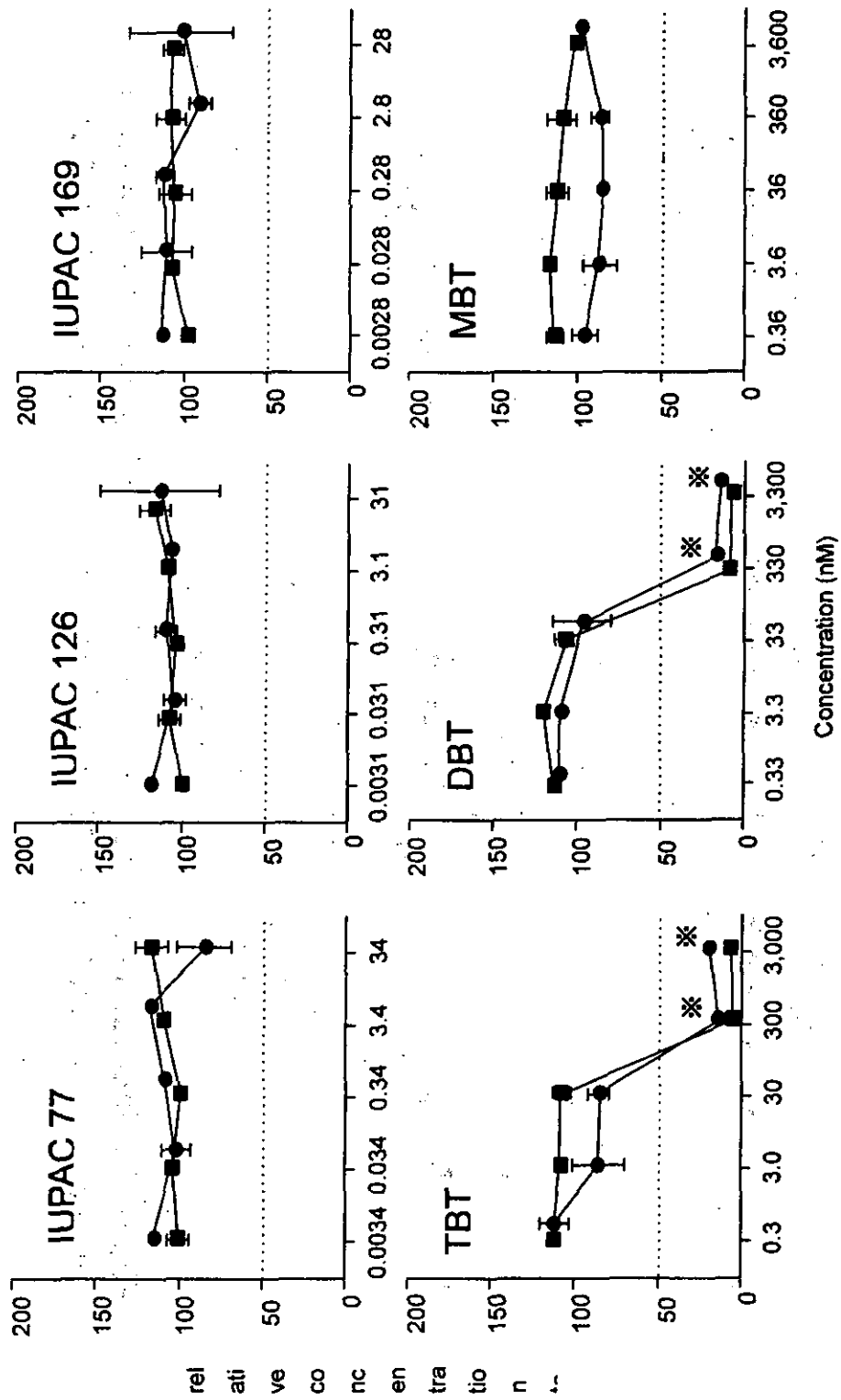


Fig. 4 Proliferation response of PBMCs in California sea lion (circle) and large seal (square) following the treatment with non-ortho coplanar PCB congeners and butyltins.