

ICRマウスにおける難燃剤テトラブロモビスフェノールA2週間投与の影響

多田幸恵*, 藤谷知子*, 小縣昭夫*, 上村尚**

The Effect of Two Weeks Administration of Tetrabromobisphenol A, a Flame Retardant, in ICR Mice

Yukie TADA*, Tomoko FUJITANI*, Akio OGATA* and Hisashi KAMIMURA**

Keywords : テトラブロモビスフェノールA tetrabromobisphenol A, 難燃剤 flame retardant, マウス mouse, 肝臓 liver, 脂質代謝 lipid metabolism, 総コレステロール total-cholesterol

はじめに

プラスチック難燃剤テトラブロモビスフェノールA Tetra-bromobisphenol A [2,2-bis-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-propane; TBBPA]は世界中で最も多く使われている臭素系難燃剤¹⁾, 2002年アジアにおけるTBBPAの需要は世界の84.6% (110,000トン)にあたる (www.bsef.com, 2004). TBBPAの環境中の濃度は, スウェーデンの廃水処理工場泥から n.d.-220 ng/g湿重量²⁾, スウェーデンのプラスチック工場下流の底質から270 ng/g乾燥重量³⁾, プラスチック分解工場あるいはコンピュータを設置した事務室の空気からそれぞれ55あるいは0.066 pmol/m³⁴⁾と報告されている. 日本では埋立地からn.d.-620 ng/L (未焼却)及びn.d.-11 ng/L (焼却済)の報告がある⁵⁾. 近年ヒト血清中濃度の上昇が指摘され, ノルウェイの保存血清及びスウェーデンのコンピュータ技師の血清から, それぞれ0.57-1.3 pmol/g lipid⁶⁾及び<1 pmol/g lipid⁷⁾と報告され, またノルウェイで母乳から67 pg/g lipidと報告された⁸⁾.

TBBPAの経口半数致死量 (LD50)はラットで>5 g/kg体重, マウスで>4 g/kg体重, 皮膚塗布によるLD50はウサギで>2 g/kg体重と報告された⁹⁾. TBBPAの反復投与毒性及び発生毒性は, 影響が無い, あるいは低いとの報告が多い^{1, 9-10)}.

前回, 我々はICRマウスを用いてTBBPAの妊娠期及び授乳期投与の影響を検討し, TBBPAは妊娠期間, 産仔数, 新生仔の体重及び出生後の発育等に影響を与えないとの結果を得た¹¹⁾. しかしながら病理学的検査において, TBBPA投与群の母及び仔マウスに肝臓重量の増加が認められた¹¹⁾. 今回我々は, 肝臓に及ぼすTBBPAの影響を検索するため, ICRマウスにTBBPAを14日間強制経口投与し, 肝臓及び主要器官の変化を血清生化学及び病理学的に検索した.

実験方法

1. 被検物質

テトラブロモビスフェノールA (Lot No. GH01; 純度99.1%)は東京化成工業から購入し, 乳鉢で粉碎し微粉末とした後実験に用いた.

2. 実験動物

Crj:CD1 (ICR)の雄マウスを日本チャールスリバー (株)より4週齢で購入し, 3週間馴化飼育後7週齢で実験に用いた. 馴化及び試験期間中, マウスはクリーンチップ (日本クレア)を敷いたプラスチック製ケージに1匹ずつ収容し, 温度23±1°C, 湿度55±10%, 照明12時間, 換気回数毎時10回の飼育室で, 基礎飼料CE-2 (日本クレア)及び水 (細菌ろ過器を経由)を自由に摂取させ飼育した. 実験期間中は毎日体重測定し一般症状を観察した.

3. 投与方法

マウスが7週齢時に体重測定し, 層別化ランダム方式により対照群7匹, 投与群8匹の4群に分け, オリーブオイル (日本薬局方)に懸濁させたTBBPAを, 投与用量0 (対照群), 350, 700及び1,400 mg/kg体重, 投与液量10 mL/kg体重で1日1回14日間胃ゾンデを用いて強制経口投与した.

4. 血液及び血清生化学検査

投与終了後24時間後に, エーテル軽麻酔下で大動脈・静脈を切開し, EDTA2K処理したポリプロピレン製試験管に血液を採取し, 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン濃度 (HGB), ヘマトクリット (HCT), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC), 白血球数 (WBC)及び血小板数 (PLT)を多項目自動血球計数装置 (シスメックス株式会社 KX-21NV)を用いて測定した.

* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター環境保健部

表1. テトラブロモビスフェノールAを14日間強制経口投与したICRマウスの血液性状

	TBBPA (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	350	700	1400
試験動物数	7	8	8	8
RBC (x10 ⁴ /μL)	917.3±35.1	861.8±43.1	856.8±36.4	860.5±49.6
HGB (g/dL)	14.8±0.9	14.5±0.7	14.3±0.4	14.2±0.6
HCT (%)	49.1±1.5	46.6±2.4	46.0±1.6	46.1±2.4
MCV (fL)	53.5±1.2	54.3±1.5	53.7±0.8	53.7±1.4
MCH (pg)	16.2±1.0	16.8±0.4	16.7±0.6	16.5±0.7
MCHC (g/dL)	30.2±1.5	31.0±0.5	31.1±0.7	30.7±0.7
WBC (x10 ² /μL)	59.6±19.9	61.4±15.4	50.1±17.9	61.5±11.9
PLT (x10 ⁴ /μL)	110.0±25.1	100.0±26.2	110.0±23.2	122.1±11.6

RBC: 赤血球数, HGB: ヘモグロビン濃度, HCT: ヘマトクリット, MCV: 平均赤血球容積,
MCH: 平均赤血球ヘモグロビン量, MCHC: 平均赤血球ヘモグロビン濃度, WBC: 白血球数,
PLT: 血小板数
数値は平均値±標準偏差

表2. テトラブロモビスフェノールAを14日間強制経口投与したICRマウスの血清生化学性状

	TBBPA (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	350	700	1400
試験動物数	7	8	8	8
AST (IU/L)	89.6±21.4	82.3±20.5	86.4±46.3	74.8±9.3
ALT (IU/L)	37.3±5.3	37.1±5.4	36.1±7.8	35.4±3.9
T-CHO (mg/dL)	160.4±23.9	162.9±39.0	165.8±21.9	189.3±19.7
TG (mg/dL)	89.1±35.1	78.3±40.0	76.0±37.5	87.4±36.3
GLU (mg/dL)	183.3±18.4	184.1±15.5	192.1±29.0	191.3±21.2
BUN (mg/dL)	21.2±3.0	18.9±2.3	23.6±4.1	21.7±2.1

AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ,
T-CHO: 総コレステロール, TG: 中性脂肪, GLU: ブドウ糖, BUN: 尿素窒素,
数値は平均値±標準偏差

血清生化学検査は日立自動分析装置 Automatic Analyzer7150を用いてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 総コレステロール (T-CHO), 中性脂肪 (TG), ブドウ糖 (GLU) 及び尿素窒素 (BUN) を測定した。

5. 病理学的検査

マウスを解剖し, 肉眼観察した後, 胸腺, 脾臓, 肝臓, 腎臓, 精巣及び副腎を摘出し, 重量測定後, 体重100 gあたりの体重比重量を算出した。秤量した器官及び異常所見の見られた器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後, 定法に従いパラフィン包埋し, 薄切後HE染色し, 顕微鏡観察した。

6. 統計解析

血液・血清生化学データ及び器官重量の対照群とTBBPA投与群間の差はScheffeの多重比較検定, 組織観察データはFisherの直接確率検定を用いて解析した。有意水準はいずれも5%とした^{1,2)}。

実験結果

1. 一般症状

試験期間中, 動物の死亡及び投与に関連した一般症状の変化は見られなかった。

2. 血液及び血清生化学検査

血液検査の結果を表1に示した。統計学的に有意な差ではなかったが, すべての投与群でRBC, HGB及びHCTが対照群と比較し低い値を示した。

血清生化学検査の結果を表2に示した。対照群と比較し1,400 mg/kg体重群のT-CHOが高い値を示した。AST及びALTは投与群で減少傾向であった。

3. 病理学的検査

最終体重及び器官重量を表3に示した。有意な差ではなかったが, 投与群の最終体重が用量相関性に増加した。脾臓及び肝臓の重量は, 対照群と比較しすべての投与群で高い値を示し, 1,400 mg/kg体重群の肝臓は絶対重量, 相対重量とも有意に高かった。

肉眼観察で, 1,400 mg/kg体重群の肝臓に軽度の腫脹が, また1,400 mg/kg体重群の脾臓に軽度の腫脹と浮腫が観察された。

表3. テトラブロモビスフェノールAを14日間強制経口投与したICRマウスの体重及び器官重量

	TBBPA (mg/kg 体重)			
	0 (対照群)	350	700	1400
試験動物数	7	8	8	8
初期体重 (g)	34.7±1.2	34.4±1.7	34.3±1.7	34.3±1.7
最終体重 (g)	35.0±2.0	35.3±1.4	35.8±2.1	36.7±1.6
実重量 (mg)				
胸腺	38.4±11.5	40.0±8.3	46.8±12.8	40.2±8.6
脾臓	96.4±14.3	99.1±21.8	111.8±11.3	119.0±24.5
肝臓 (g)	1.736±0.232	1.923±0.174	1.956±0.201	2.133±0.206 *
腎臓	508.9±46.2	520.8±89.2	519.1±20.2	520.8±63.7
精巣	217.3±20.4	249.5±24.9	227.6±26.7	234.8±31.3
副腎	5.4±0.6	4.6±0.8	4.8±0.8	5.1±0.6
相対重量 (mg/100g 体重)				
胸腺	109.1±30.6	113.8±25.0	132.3±40.7	109.3±22.5
脾臓	275.7±41.8	281.1±61.0	313.4±39.4	324.5±68.6
肝臓 (g)	4.949±0.446	5.449±0.372	5.456±0.302	5.806±0.444 *
腎臓	1455.3±117.1	1475.9±240.0	1452.4±66.2	1417.8±157.9
精巣	621.6±55.3	707.4±59.8	637.2±80.3	639.4±79.6
副腎	15.5±1.3	13.1±2.2	13.5±2.2	13.8±1.7

数値は平均値±標準偏差。

対照群との比較で有意差 (* $P < 0.05$, Scheffeの多重比較検定)

表4. テトラブロモビスフェノールAを14日間強制経口投与したICRマウスの組織所見

		TBBPA (mg/kg 体重)			
		0 (対照群)	350	700	1400
試験動物数		7	8	8	8
肝臓	肝細胞腫大	1 ^a	3	7 *	5
	肝細胞空胞化	1	2	1	2
	炎症性細胞浸潤	2	8 *	8 *	8 *
	肝細胞の巣状壊死	3	6	5	8 *
腎臓	尿細管拡張	1	2	1	3
	嚢胞形成	1	0	0	3
	尿細管萎縮	4	2	2	5
	尿細管壊死	1	0	0	2
	尿細管再生	2	1	0	2
膵臓	分泌顆粒の増加	0	2	3	3

^a数値は変化を示した動物数

対照群との比較で有意差 (* $P < 0.05$, Fisherの直接確立検定)

TBBPA投与に関連した組織所見を表4に示した。投与群の肝臓で肝細胞の腫大、炎症性細胞の浸潤及び肝細胞の巣状壊死が多く認められ、炎症性細胞の浸潤はすべての投与群で、また肝細胞の巣状壊死は1,400 mg/kg体重群で有意な増加を示した。腎臓では1,400 mg/kg体重群に尿細管の拡張及び嚢胞形成がやや多く認められた。膵臓では対照群と比較し投与群で分泌顆粒の増加が認められた。他の組織(胸腺、脾臓、精巣及び副腎)にはTBBPA投与に関連した所見は観察されなかった。

考 察

TBBPAは環境中に容易に蓄積しない安全な難燃剤とし

て開発され(www.bsef.com, 2004), これまでに報告された動物実験の結果から、ラットあるいはマウスの肝臓や腎臓など主要器官に、有害な作用を及ぼさないとされてきた⁹⁾。しかし今回、ICR雄マウスにTBBPAを350-1,400 mg/kg体重で14日間連続経口投与したところ、TBBPA1,400 mg/kg体重群で血清総コレステロールの上昇及び肝臓重量の増加が認められ、すべての投与群で肝細胞の腫脹、炎症性細胞の浸潤及び肝細胞の巣状壊死が多く認められた。TBBPA投与によるこれらの変化は前回我々が行った実験においても同様に観察された¹¹⁾。妊娠期及び授乳期にTBBPA添加飼料(0.01, 0.1あるいは1.0%)を投与した親マウス及び出生仔マウスで、血清総コレステロールの上昇、肝臓重量の

増加が認められ、肝細胞の巣状壊死及び炎症性細胞の浸潤が対照群と比較し多く認められた¹¹⁾。TBBPAによる血清脂質及び肝臓重量の増加、肝臓の組織変化の出現には再現性があり、TBBPAによる肝障害の可能性が示唆された。

解剖時の肉眼観察で、1,400 mg/kg体重群の膵臓に軽度な肥大と浮腫が認められ、組織観察で膵臓の腺房細胞の分泌顆粒が対照群と比較し1,400 mg/kg体重群に多く認められた。膵臓の酵素は消化管における食物の消化や吸収、特に脂質の加水分解に必要であり、膵臓に対する急性毒性障害は通常、重量の変化と浮腫を引き起す¹³⁾とされる。今回の実験及び前回我々が行った実験¹¹⁾で認められた血清総コレステロールの上昇は、TBBPAによる脂質代謝の変化を示唆しており、今回投与群で膵臓に認められた肉眼及び組織学的変化と関連があるかもしれない。TBBPA投与群で認められた脂質代謝及び膵臓における変化がどのような機序により発現したか明らかではないが、この点に関してはさらなる研究が必要であると思われる。

Fukudaらは新生仔ラットにTBBPAを40-600 mg/kg体重で15日間経口投与した実験で、腎臓の嚢胞症が出現することを報告した¹⁴⁾。今回の実験においても、TBBPA投与群の腎臓に尿細管の拡張及び嚢胞が対照群よりも多くみられたが、その差は有意でなく用量相関性も認められなかった。

TobeらはB6C3F1マウスを用いてTBBPAの90日間投与試験を行った。その結果、4,900 mg/kg dietの投与(約700 mg/kg体重/dayに相当)ではどのような影響もみられず、15,600 mg/kg dietの投与で(約2,200 mg/kg体重/dayに相当)、体重の減少、脾臓重量の増加、RBC及び血清蛋白・血清トリグリセライドの減少がみられたと報告している¹⁵⁾。今回我々の実験においては、TBBPAの350 mg/kg体重投与群で赤血球パラメータの減少、肝臓重量の増加及び肝臓の組織変化が認められた。これらの変化はTBBPAの700及び1,400 mg/kg体重投与で顕著となった。SzymanskaらはラットにTBBPAを7-28日間投与し、肝臓の酵素及び尿中へのポルフィリン排泄等を検討した。ポルフィリン排泄はTBBPAの50 mg/kg体重投与で認められ、10 mg/kg体重投与では認められなかった。故にSzymanskaらはTBBPAの無毒性量NOAELは10 mg/kg体重であると述べている¹⁶⁾。現在TBBPAのNOAELはTobeらの実験結果¹⁵⁾から4,900 mg/kg diet (700 mg/kg体重/dayに相当)とされているが⁹⁾、我々の今回の結果及びSzymanskaらの結果は、TBBPAのNOAELが700 mg/kg体重/dayよりも低い可能性を示している。

TBBPAはプラスチック製品の生産、使用、特に使用済み器具・機材の破壊工程において環境中に放出される。これまでTBBPAは環境中に容易に蓄積せず、強い毒性を示さない安全な不燃剤であるとされてきた^{1, 9-10)}。しかし最近、TBBPAのエストロゲン様活性¹⁷⁻¹⁹⁾、甲状腺ホルモンへの影響²⁰⁻²¹⁾、免疫毒性²²⁾、腎障害¹⁴⁾あるいは肝臓の酵素への影響^{16, 23)}が報告された。今回の実験においてもTBBPA投与による肝障害の可能性が示唆された。一般の人

が食物及び住環境からTBBPAを取り込む量はわずかであるが、TBBPAの安全性には十分な注意が払われるべきである。

ま と め

プラスチック難燃剤テトラプロモビスフェノールA (TBBPA) をオリーブオイルに懸濁させ0, 350, 700及び1,400 mg/kg体重の投与用量で、ICR雄マウスに14日間強制経口投与し、血液・血清生化学及び病理学的に検索した。

1. すべての投与群でRBC, HGB及びHCTの減少傾向が認められた。
2. 1,400 mg/kg体重群の血清総コレステロールに増加が認められた。
3. 用量相関性に肝臓重量の増加が認められ、1,400 mg/kg体重群では有意な増加であった。
4. 組織観察で、投与群の肝臓に肝細胞の腫脹、炎症性細胞の浸潤及び肝細胞の巣状壊死が多く認められた。

文 献

- 1) de Wit, C.A.: *Chemosphere*, **46**, 583-624, 2002.
- 2) Öberg, K., Warman, K. and Öberg, T.: *Chemosphere*, **48**, 805-809, 2002.
- 3) Sellström, U. and Jansson, B.: *Chemosphere*, **31**, 3085-3092, 1995.
- 4) Bergman, Å., Athanasiadou, M., Klasson, W.E. et al.: *Organohalogen Compd.*, **43**, 89-92, 1999.
- 5) Osako, M., Kim, Y. and Sakai, S.: *Chemosphere*, **57**, 1571-1579, 2004.
- 6) Thomsen, C., Lundanes, E., Becher, G. et al.: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1414-1418, 2002.
- 7) Jakobsson, K., Thuresson, K., Rylander, L. et al.: *Chemosphere*, **46**, 709-716, 2002.
- 8) Thomsen, C., Leknes, H., Lundanes, E. et al.: *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 129-137, 2002.
- 9) WHO/IPCS: *Environ. Health Criteria*, **172**, 1995, Geneva, Switzerland.
- 10) Darnerud, P.O.: *Environ. Int.*, **29**, 841-853, 2003.
- 11) Tada, Y., Fujitani, T., Yano, N., et al.: *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1408-1413, 2006.
- 12) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for toxicologists. In Hayes, A.W. (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd ed., 221-274, 1994, Raven Press, New York.
- 13) Longnecker, D.S., Wilson, G.L.: Pancreas. In Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. (Eds), *Handbook of toxicologic pathology*, 253-278, 1991, Academic press, San Diego.
- 14) Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M. et al.: *Toxicol. Let.*, **21**, 145-155, 2004.
- 15) Tobe, M., Kurokawa, Y., Nakaji, Y. et al.: Report to the Ministry of Health and Welfare (in Japanese), 1986.
- 16) Szymanska, J.A., Piotrowski, J.K. and Frydrych, B.: *Toxicol.*, **142**, 87-95, 2000.

- 17) Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S. *et al.*: *Environ. Health. Perspect.*, **109**, 399-407, 2001.
- 18) Olsen, C.M., Meussen-Elholm, E.T., Samuelsen, M. *et al.*: *Pharmacol. Toxicol.*, **92**, 180-188, 2003.
- 19) Samuelsen, M., Olsen, C., Holme, J.A. *et al.*: *Cell Biol. Toxicol.*, **17**, 139-151, 2001.
- 20) Meerts, I.A., Zanden, J.J., Luijckx, E.A. *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **56**, 95-104, 2000.
- 21) Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 554-559, 2002.
- 22) Pullen, S., Boecker, R. and Tiegs, G.: *Toxicol.*, **184**, 11-22, 2003.
- 23) Ronisz, D., Finne, E.F., Karlsson, H. *et al.*: *Aquat. Toxicol.*, **69**, 229-245, 2004.