

難燃剤テトラブロモビスフェノールAの胎盤通過と母乳への分泌

藤谷 知子*, 多田 幸恵*, 高橋 博*, 矢野 範男*, 安藤 弘*, 久保 喜一*,
湯澤 勝廣*, 長澤 明道*, 小縣 昭夫*, 上村 尚**

Placental Transfer of Tetrabromobisphenol A and Excretion to Milk in Mice

Tomoko FUJITANI*, Yukie TADA*, Hiroshi TAKAHASHI*, Norio YANO*, Hiroshi ANDO*, Yoshikazu KUBO*,
Katsuhiko YUZAWA*, Akemichi NAGASAWA*, Akio OGATA*, and Hisashi KAMIMURA*

Tetrabromobisphenol A, a brominated flame-retardant, has been widely detected in the environment, wildlife, and also in human plasma, suggesting direct exposure or through the food-chain. Distribution of TBBPA, after oral administration, was investigated in pregnant (on day 10 or 16 of gestation) and lactating (on postnatal day 10) mice. At 1 or 3 hours after dosing, TBBPA was distributed in the blood, liver, kidney, and brain of the dam, in the embryo, conceptus, and amniotic fluid (on day 10 of gestation), in the fetus, placenta, amnion, and amniotic fluid (on day 16 of gestation), and in the contents of stomach, liver, and kidney of suckling pups (on postnatal day 10). TBBPA levels in the maternal liver, kidney, conceptus, fetus, amnion, and contents of stomach in suckling pups were higher than that in maternal blood, at 1, 3, 6, and/or 12 hours after dosing. Especially in the maternal liver, a large amount of TBBPA was detected. At 24 hours after dosing, TBBPA levels in those tissues or body fluids were almost declined. However, the level in liver at 24 hours after dosing was yet higher than the peak level in blood of dams on day 10 or 16 of gestation. The results indicated the necessity to examine the effects of TBBPA in the maternal liver, embryo, fetus, and suckling pups.

Keywords : テトラブロモビスフェノールA tetrabromobisphenol A, 生体内分布 distribution, 胎盤通過 placental transfer, 母乳への分泌 excretion to milk, マウス mouse, 臭素化難燃剤 brominated flame-retardant

はじめに

テトラブロモビスフェノール A [CAS No 79-94-7; 2,2-bis(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-propane, 以後TBBPAと略す]は、難燃剤として、プラスチック製品や繊維製品に使われる。2002年の年間生産量は、世界で130,000トン以上、そのうち85%がアジアで使われている¹⁾。

TBBPAは、野外環境では、下水処理場の汚泥²⁾、埋立地からの滲出水³⁾や河川の底質土^{4, 5)}、巻貝やヒトデなどの無脊椎動物、魚類、海鳥、海棲哺乳類⁴⁻⁶⁾から、屋内環境では、電化製品の廃棄物処理場やコンピューター室の埃や空気中から検出される⁷⁻⁹⁾。また、人の血清・血漿中からも検出され⁹⁻¹²⁾、職業暴露と食物暴露の両方が示唆されている。一方、TBBPAの生体への影響については、試験管内試験では、内分泌攪乱作用¹³⁻¹⁷⁾、免疫抑制作用¹⁸⁾、神経伝達の阻害¹⁹⁾が報告され、動物による試験では、鳥卵の致死毒性^{20, 21)}、出生直後の仔ラットでの腎毒性²²⁾などが報告されている。しかし、経口摂取されたTBBPAの生体内分布、胎盤通過、母乳への分泌については、人、家

畜、実験動物のいずれにおいても、ほとんどわかっていない。当研究科でマウスを用いた生体影響試験を行うにあたり、生体内分布および母乳への分泌について調査したので報告する。

実験方法

1. 試薬および被検物質

酢酸アンモニウム(特級)と分析標準用TBBPAは和光純薬から、HPLC用メタノールは関東化学から購入した。動物に投与したTBBPAは東京化成工業製(純度>98%)を、懸濁用剤は日本薬局方オリーブオイルを用いた。

2. 投与実験

ICRマウス(Crlj:CD1, 日本チャールスリバー)を4週齢で購入し、雄は1匹/ケージ、雌は5匹/ケージに収容し、水と標準飼料(日本クレア製CE-2)を自由に摂取させた。8から11週齢で雌雄を1:1で一夜同居させ、翌朝、膣栓の認められた雌を妊娠0日とした。

* 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

妊娠10日あるいは16日の母マウスに、オリーブオイルに懸濁したTBBPA 1,600 mg/kg体重 (10 mL オリーブオイル/kg体重) を投与し、1, 3, 6, 12および24時間後に、各3匹をエーテル麻酔下で、大腿静脈を切開してEDTA入り試験管に採血し、肝臓、腎臓および脳を採取し重量を測定した。子宮を切開し、胎盤、胎仔および羊膜を一緒に取り出して、生理食塩水ですすぎ、シャーレ上で26ゲージの針をつけた注射筒で羊水を吸引採取した後、胎仔および受胎産物 (妊娠10日)、あるいは胎仔、胎盤および羊膜 (妊娠16日) を採取し、それぞれを母マウスごとにまとめて重量を測定した。

出産後 10 日目の母マウスに、オリーブオイルに懸濁したTBBPA 1,600 mg/kg 体重を投与し、3, 6, 12 および 24 時間後に、母マウス各 3 匹をエーテル麻酔下で、大腿静脈を切開して EDTA 入り試験管に採血し、肝臓、腎臓および脳を採取し重量を測定した。この母マウスに哺乳されていた仔マウス、母マウスあたり各 3~5 匹 (雌雄は区別しなかった) をエーテル麻酔下で解剖し、胃の内容物 (ヨーグルト状の凝集物)、肝臓と腎臓を採取し、それぞれを母マウスごとにまとめて重量を測定した。これらは HPLC サンプル調製まで -20°C で保存した。HPLC サンプル調製と HPLC 分析法は、すでに報告した方法^{2,3)} に従った。

結 果

妊娠10日目の母マウスに投与した後の、TBBPAの体内分

布をTable 1に示した。1,600 mg TBBPA/kg体重は、実投与量では、平均58.1 mg TBBPA/匹で、混餌投与による生体影響試験の、妊娠期における一日化合物摂取量にほぼ等しい。投与後1時間で、母マウスの肝臓、血液、腎臓、脳、胎仔、受胎産物および羊水のすべてでTBBPAが検出された。

TBBPA濃度は、3時間後および6時間後に低下し、12時間後にやや上昇し、24時間後に再び低下する傾向を示した。母マウスの肝臓中におけるTBBPA濃度は、投与後1-24時間のすべての測定で、血中濃度をはるかに上回った。母マウスの腎臓および受胎産物におけるTBBPA濃度は、投与後1-3時間で、母マウスの血中濃度を上回っていた。母マウスの脳、胎仔および羊水におけるTBBPA濃度は、投与後1-24時間のすべての測定で、母マウスの血中濃度より低かった。

妊娠16日目の母マウスに投与した後の、TBBPAの体内分布をTable 2に示した。1,600 mg TBBPA/kg体重は、実投与量では、平均88.0 mg TBBPA/匹であった。投与後1時間で、母マウスの肝臓、血液、腎臓、脳、胎仔、胎盤、羊膜および羊水のすべてでTBBPAが検出された。母マウスの肝臓、腎臓および脳のTBBPA濃度は、投与後24時間まで速やかに低下した。胎仔、胎盤、羊膜および羊水のTBBPA濃度は、投与後3から6時間で上昇し、その後、羊膜を除いて、投与後24時間まで低下した。母マウスの肝臓中におけるTBBPA濃度は、投与後1-24時間のすべての測定で、血中濃度をはるかに上回った。また、胎仔および羊膜のTBBPA濃度は、投

Table 1. Distribution of TBBPA after Single Oral Dose of 1,600 mg/kg b.w. to Dam on Gestation day 10

hours after dosing	1	3	6	12	24
Maternal blood (µg/mL)	3.84±0.83	2.02±1.54	1.33±0.82	3.46±2.00	2.91±0.85
Maternal liver (µg/g w.w.)	72.21±11.17	48.76±11.33	11.58±6.72	24.87±10.06	8.44±5.51
Maternal kidney (µg/g w.w.)	4.08±1.39	4.54±2.16	0.48±0.06	1.11±0.71	0.12 #1
Maternal brain (µg/g w.w.)	1.92±0.48	1.90±1.87	0.17±0.03	0.73±0.76	N.D. #2
Embryo (µg/g w.w.)	2.21±0.47	1.67±1.56	0.48±0.40	0.83±0.51	0.85±0.28
Conceptus (µg/g w.w.)	5.52±1.03	4.53±2.57	1.02±0.68	1.47±0.57	1.20±0.67
Amniotic fluid (µg/mL)	1.77±0.21	0.78±0.40	0.55±0.46	0.57±0.32	0.56±0.35

Values are mean ± SD for three dam.
 #1: TBBPA was not detected in two of three samples.
 #2: No TBBPA was detected in all three samples.

Table 2. Distribution of TBBPA after Single Oral Dose of 1,600 mg/kg b.w. to Dam on Gestation day 16

hours after dosing	1	3	6	12	24
Maternal blood (µg/mL)	7.14±3.38	6.80±1.34	3.88±1.73	2.22±0.98	4.06±0.78
Maternal liver (µg/g w.w.)	84.90±8.50	58.07±20.61	30.23±10.23	13.61±4.15	12.26±2.14
Maternal kidney (µg/g w.w.)	5.96±1.18	4.83±2.01	2.54±1.63	0.69±0.30	0.32±0.10
Maternal brain (µg/g w.w.)	6.75±1.93	2.91±0.72	1.40±0.72	N.D. #	N.D. #
Fetus (µg/g w.w.)	7.16±4.64	9.98±2.99	6.47±2.07	2.52±0.45	2.05±0.70
Placenta (µg/g w.w.)	3.65±0.97	4.22±1.23	3.38±1.36	1.24±0.36	0.91±0.01
Amnion (µg/g w.w.)	4.97±2.68	11.19±1.33	12.37±2.92	5.66±2.36	4.62±2.16
Amniotic fluid (µg/mL)	0.92±0.30	4.06±1.18	4.34±0.83	2.39±0.79	3.48±1.41

Values are mean ± SD for three dam.
 #: No TBBPA was detected in all three samples.

Table 3 Distribution of TBBPA after Single Oral Dose of 1,600 mg/kg b.w. to Dam on Postnatal Day 10

hours after dosing	3	6	12	24
Maternal blood ($\mu\text{g/mL}$)	2.30 \pm 1.12	4.64 \pm 0.50	2.02 \pm 0.34	0.58 \pm 0.43
Maternal liver ($\mu\text{g/g w.w.}$)	43.89 \pm 6.85	21.44 \pm 3.34	10.23 \pm 3.93	1.86 \pm 0.67
Maternal kidney ($\mu\text{g/g w.w.}$)	2.74 \pm 0.70	0.47 \pm 0.24	N.D. #1	N.D. #1
Maternal brain ($\mu\text{g/g w.w.}$)	0.78 \pm 0.15	N.D. #1	N.D. #1	N.D. #1
Contents in pup stomach ($\mu\text{g/g w.w.}$)	8.21 \pm 5.70	4.76 \pm 4.25	4.33 \pm 0.53	1.77 \pm 0.83
Pup liver ($\mu\text{g/g w.w.}$)	1.83 \pm 2.12	0.17 \pm 0.02	N.D. #1	N.D. #1
Pup kidney ($\mu\text{g/g w.w.}$)	0.34 #2	N.D. #1	N.D. #1	N.D. #1

Values are mean \pm SD for three dam.

#1: No TBBPA was detected in all three samples.

#2: TBBPA was not detected in two of three samples.

与後3, 6, 12および24時間で, 母マウス血中濃度より高かった。母マウスの腎臓, 脳および胎盤のTBBPA濃度は, 投与後1-24時間のすべての測定で, 母マウスの血中濃度より低かった。

出産後10日目の母マウスに投与した後の, TBBPAの体内分布をTable 3に示した。1,600 mg TBBPA/kg体重は, 実投与量では, 平均76.7 mg TBBPA/匹であった。投与後3時間で, 母マウスの肝臓, 血液, 腎臓, 脳と, 仔マウスの肝臓, 腎臓, 胃の内容物のすべてでTBBPAが検出された。TBBPA濃度は, 投与後6時間でやや上昇した母マウスの血中濃度を除いて, すべての臓器で, 投与後24時間まで速やかに低下した。母マウスの肝臓中におけるTBBPA濃度は, 投与後3-24時間のすべての測定で, 血中濃度を上回った。仔マウスの胃の内容物のTBBPA濃度は, 投与後3-24時間のすべての測定で, 母マウスの血中濃度を上回った。母マウスの腎臓中のTBBPA濃度は, 投与後3時間では, 母マウス血中濃度を上回ったが, 以後, 血中濃度より低かった。仔マウスの肝臓においては, 投与後3および6時間ではTBBPAが検出されたが, 以後検出されなかった。母マウスの脳, 仔マウスの腎臓においては, 投与後3時間ではTBBPAが検出されたが, 投与後6-24時間では検出されなかった。

妊娠 10 日目, 妊娠 16 日目, 出産後 10 日目の三つの時期における 1,600 mg TBBPA/kg 体重の投与は, 実投与量で, それぞれ, 平均 58.1, 88.0, 76.7 mg TBBPA/匹と, 異なっていた。そこで, 実投与量に対する%で各臓器内の TBBPA 総量を, 各時期で比較した。母マウス肝臓に含まれる TBBPA の実投与量に対する%で表すと, Fig.1-A に示すように, 投与後 1-3 時間の TBBPA 量の変化はほぼ一致し, 24 時間後の TBBPA 量は, 出産後 10 日目で妊娠期より低かった。母マウス腎臓に含まれる TBBPA の実投与量に対する%は, Fig.1-B に示すように, 全体に, 出産後 10 日目で妊娠期より低かった。母マウス脳に含まれる TBBPA は, 出産後 10 日目では, 投与 3 時間後しか検出されなかったもので, 図に示さなかった。そのほかの臓器では, Fig.1-C に示すように, 実投与量に対する%が目立って高かったのが, 妊娠 16 日目の胎仔であった。妊娠 10 日目および妊娠 16 日目の羊水および母マウス血液については, 母親 1 匹あたりの羊水総量と血液総量を計測出来なかったため, 実投与

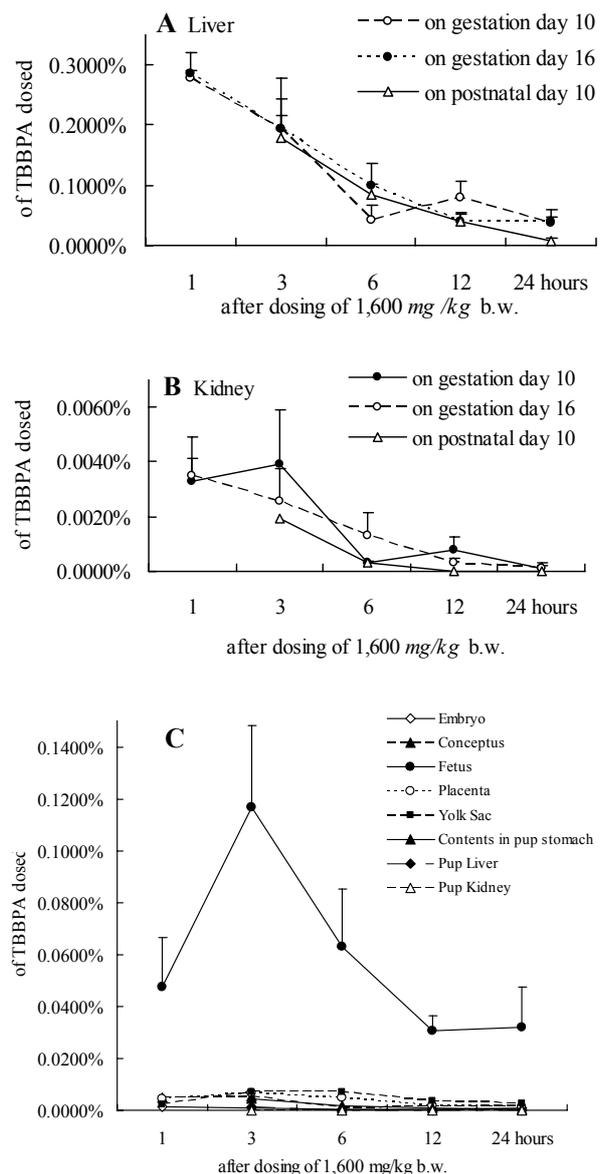


Fig. 1. Distribution of TBBPA in maternal liver (A) or kidney (B) and in embryo and conceptus on gestation day 10, fetus, placenta and yolk sac on gestation day 16 or contents in pup stomach, pup liver and pup kidney on postnatal day 10 (C), after single oral dose of 1,600 mg/kg b.w. to dam.

Symbol and bar represents mean and SD for 3 dams.

量に対する%は算出しなかった。

考 察

母マウスに経口投与したTBBPAは、速やかに、母マウスの血中、肝臓、腎臓および脳に分布し、投与後24時間には、その濃度はおおむね低下した。この結果は、ラットにおける残留性の試験で、経口投与された¹⁴C-TBBPAが、72時間までに92%が^{2,4)}糞中に排泄され、TBBPAの蓄積性は極めて低かったという結論と矛盾しない。しかし、これらの報告では、投与から排泄までのラット体内のTBBPA分布は示されていない。Szymańska^{2,6)}は、ラットへの腹腔内投与実験で、¹⁴C-TBBPAは、投与後1時間以内に脂肪組織、筋肉、肝臓等に分布し、速やかに排泄されると報告している。しかし、腹腔内のTBBPA曝露は、人や家畜、野生生物においては非現実的であり、食物連鎖や環境中での曝露の際の参考にはならない。我々は、ここに、経口摂取されたTBBPAの、哺乳類における体内分布について初めて明らかにした。

TBBPAは、胎盤を容易に通過して胚仔や胎仔にまで分布した。また、妊娠10日目の胚仔のTBBPA濃度は母マウスの血中濃度より低かったが、妊娠16日目の胎仔のTBBPA濃度は母マウスの血中濃度より高かった。TBBPAの胎盤通過は、着床後の胎盤機能の充実によって阻止され得なかったと考えられる。また、低用量のTBBPA摂取においても、胎盤通過の可能性があることが示唆された。実投与量に対する%が、肝臓以外では、妊娠16日目の胎仔で目立って高かったのは、この時期の胎仔の総重量が大きく、母マウス体重の約18%を占める結果と考えられる。TBBPAは、出産後10日目の仔マウスの胃の内容物からも検出された。この時期の仔マウスは、餌や飲水を自分で摂取することはなく、もっぱら、母マウスの乳汁のみで栄養と水分を摂取している。すなわち、仔マウスの胃の内容物は、母マウスの乳汁(の半消化物)である。仔マウスの胃の内容物にTBBPAが検出されたという結果は、母マウスに投与されたTBBPAが乳汁に分泌されていたことを示している。そして、仔マウスが摂取した乳汁中のTBBPAは、さらに、仔マウスの体内に吸収されて、肝臓や腎臓にまで分布していた。また、仔マウスの胃の内容物におけるTBBPA濃度は、母マウスの血中TBBPA濃度よりも高く、低用量のTBBPA摂取においても、母体から乳汁をとおして乳児への移行の可能性があると示唆された。また、母マウスの肝臓におけるTBBPA濃度が、他の臓器に比べて著しく高かったことは注目に値する。母体のTBBPA摂取による、胚子、胎児、乳児への影響とともに、肝臓への影響も懸念される。

ラットに妊娠10日から16日まで連続で5 mg ¹⁴C-TBBPA/kg体重を投与した実験^{2,5)}では、妊娠20日における残留量は、母マウス肝臓で総投与量の0.256%、胎仔全体で0.340%であった。この報告と本報告の結果は、連続投与と単回投与、ラットとマウスという違いがあるために、単純に比

較することは出来ないが、総投与量の少ないラットにおいて、マウスにおけるより多くのTBBPA(%)が、3日後まで肝臓や胎仔に残留していることから、連続摂取におけるTBBPAの体内分布も、高低の複数の濃度段階を設定して検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) BSEF. Bromine Science and Environmental Forum, Brussels, Belgium. Data reported in Fact sheet, edition 2004 at <http://WWW.Bsef.org>
- 2) Öberg K., Warman K., Öberg T.: *Chemosphere*, **48**, 805-809, 2002.
- 3) Osako M., Kim Y.J., Sakai S.: *Chemosphere*, **57**, 1571-9, 2004.
- 4) Watanabe I., Kashimoto T., Tatsukawa R.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**, 48-52, 1983.
- 5) Morris S., Allchin C., Zegers B., et al.: *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 5497-5504, 2004.
- 6) Berger U., Herzke D., Sandanger T.M.: *Anal. Chem.*, **76**, 441-452, 2004.
- 7) Sinkkonen S., Paasivirta J., Lahtiperä M., et al.: *Environment International*, **30**, 363-366, 2004.
- 8) Sjödin A., Carlsson H., Thuresson K., et al.: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 448-454, 2001.
- 9) Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: *J. Environ. Monit.*, **3**, 366-370, 2001,
- 10) Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1414-1418, 2002.
- 11) Jakobsson K., Thuresson K., Rylander L., et al.: *Chemosphere*, **46**, 709-716, 2002.
- 12) Hayama T., Yoshida H., Onimaru S., et al.: *J. Chromat. B*, **809**, 131-136, 2004.
- 13) Samuelsen M., Olsen C., Holme J.A., et al.: *Cell Biol. Toxicol.*, **17**, 139-151, 2001.
- 14) Meerts I.A.T.M., Letcher R.J., Hoving S., et al.: *Environmental Health Perspectives*, **109**, 399-407, 2001.
- 15) Olsen C.M., Meussen-Elholm E.T.M., Samuelsen M., et al.: *Pharmacol. Toxicol.*, **92**, 180-188, 2003.
- 16) Meerts I.A.T.M., van Zanden J.J., Luijckx E.A.C., et al.: *Toxicol. Sci.*, **56**, 95-104, 2000.
- 17) Kitamura S., Jinno N., Ohta S., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 554-559, 2002.
- 18) Pullen S., Boecker R., Tiegs G.: *Toxicology*, **184**, 11-22, 2003.
- 19) Mariussen E., Fonnum F.: *Neurochem. Int.*, **43**, 533-542, 2003.
- 20) Halldin K., Berg C., Bergman Å., et al.: *Arch. Toxicol.*, **75**, 597-603, 2001.
- 21) Berg C., Halldin K., Brunström B.: *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**, 2836-2840, 2001.

- 22) Fukuda N., Ito Y., Yamaguchi M., *et al.*: *Toxicol. Lett.*, **150**, 145-155, 2004.
- 23) Fujitani T., Tada Y., Takahashi H., *et al.*: *Ann. Rep. Tokyo Metro. Inst. P. H.*, **56**, 327-331, 2005.
- 24) Hakk H., Larsen G., Bergman Å., *et al.*: *Xenobiotica*, **30**, 881-890, 2000.
- 25) Meerts I.A.T.M., Assink Y., Cenijn P.H., *et al.*: *Organohalogen Compounds*, **40**, 375-378, 1999.
- 26) Szymańska J.A., Sapota A., Frydrych B.: *Chemosphere*, **45**, 693-700, 2001.