

難燃剤テトラブロモビスフェノールAとその抱合体の生体内分布

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**

Distribution of Tetrabromobisphenol A and its Conjugates in Mice

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

Tetrabromobisphenol A (TBBPA), a brominated flame-retardant, has been widely detected in the environment and its placental transfer and excretion to milk was observed in mice after single oral administration. Distribution of TBBPA and its conjugates (glucuronide and/or sulfate) was investigated in pregnant (on day 10 or 16 of gestation) and lactating (on postnatal day 10) mice given dietary TBBPA (100, 1,000 or 10,000 ppm) from day 0 of gestation. Free-TBBPA was detected in the blood, liver and kidney of dams, 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 in suckling pups, mainly in the 10,000 ppm group. TBBPA levels in the maternal liver and contents of stomach in suckling pups were higher than that of maternal blood and TBBPA was detected in the liver of dam and contents of stomach in suckling pups in the group of lowest TBBPA in the diet. Although free-TBBPA was not detected in the liver and kidney of suckling pups, conjugated TBBPA was detected in those organs. Total TBBPA level in the maternal liver was markedly high to compare with in other organs or blood.

Keywords: テトラブロモビスフェノールA tetrabromobisphenol, 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] (以下TBBPAと略す)は、プラスチック製品や繊維製品に使われる難燃剤で、下水処理場の汚泥²⁾、埋立地からの滲出水³⁾、河川の底質土^{4, 5)}、魚類、海鳥、海洋哺乳類^{5, 6)}、電化製品の廃棄物処理場、コンピューター室⁷⁻⁹⁾、人の血清あるいは血漿中⁹⁻¹²⁾に検出される。

TBBPAの生体影響については、試験管内試験で、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、動物による試験で、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、TBBPAの生体内分布、胎盤通過や母乳への分泌については、人、家畜のいずれにおいても、ほとんどわかっていなかった。当研究科で、TBBPAの生体影響試験を行うにあたりその生体内分布について調査したところ、マウスを用いた単回投与実験で、TBBPAが速やかに血中や臓器中に分布し、胎盤を通過すること、母乳に分泌されることがわかった²³⁾。そこで、経餌投与のTBBPAの生体内分布と同

時に、抱合体の形成について調査したので報告する。

実験方法

1. 試薬

酢酸アンモニウム (特級)、酢酸ナトリウム (特級)、酢酸 (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。抱合体の加水分解には、Sigma社のグルクロニダーゼ・スルファターゼ混合液 (G 0876) 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、陰栓の認められた雌を妊娠0日とし、以後、TBBPA 0, 100, 1,000あるいは10,000 ppm を含む餌を与えた。

* 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,各群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,各群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.これらはサンプル調整まで-20℃で保存した.HPLCサンプル調整およびHPLC分析は,すでに報告した方法^{2,4)}に従った.

上記HPLCサンプル(Free-TBBPA分析用サンプル)の一部(200 μL)を取り,1 mLの50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)およびグルクロニダーゼ・スルファターゼ混合液10 μLを加え,37℃で9時間,緩やかに振とうして,グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体を加水分解した.これに,2 mLのジエチルエーテルを加えて振とう機で15分間激しく振とうし,ジエチルエーテル層を分離することを3回くりかえし,合わせたジエチルエーテル層を室温で蒸散せしめ,残渣をメタノールに溶解して 総TBBPA分析用サンプルとした.総TBBPA分析用サンプルのTBBPA量とFree-TBBPA分析用サンプルのTBBPA量との差を抱合体TBBPA量とした.

結 果

妊娠0日から,100,1,000あるいは10,000 ppmの餌を摂取したマウスの,妊娠10日におけるTBBPAの生体内濃度をTable 1に示した.10,000 ppmの餌を摂取したマウスの,母マウスの血液,肝臓,腎臓,胎仔,受胎産物および羊水にTBBPAが検出されたが,母マウスの脳からは,検出されなかった.1,000 ppmの餌を摂取したマウスでは,母マウスの血液,肝臓および受胎産物にのみ検出された.また,100 ppmの餌を摂取したマウスでは,母マウスの血液,肝臓,胎仔および受胎産物にのみ検出され,母マウスの肝臓以外では,検出限界ぎりぎりの低濃度であった.

妊娠0日から,100,1,000あるいは10,000 ppmの餌を摂取したマウスの,妊娠16日におけるTBBPAの生体内濃度をTable 2に示した.10,000 ppmの餌を摂取したマウスの,母マウスの血液,肝臓,腎臓,脳,胎仔,羊膜,胎盤および羊水にTBBPAが検出された.1,000 ppmの餌を摂取したマウスでは,母マウスの血液,肝臓,胎仔,羊膜,胎盤および羊水にTBBPAが検出された.また,100 ppmの餌を摂取したマウスでは,母マウスの血液,肝臓および胎仔のみに検出され,胎仔においては,検出限界ぎりぎりの低濃度であ

Table 1. Concentration of TBBPA in Dam on Gestation Day 10

dietary TBBPA	100	1000	10000 ppm
Maternal blood (μg/mL)	0.06 #1	0.08 #1	3.30±2.07
Maternal liver (μg/g w.w.)	0.11±0.08	0.17±0.07	13.71±4.72
Maternal kidney (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	0.90±0.49
Maternal brain (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	N.D. #2
Embryo (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	1.23±0.96
Conceptus (μg/g w.w.)	0.002 #1	0.11 #1	2.71±2.32
Amniotic fluid (μg/mL)	N.D. #2	N.D. #2	0.63±0.27

Values are mean ± SD for three samples.

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

#2: TBBPA was not detected in three samples.

Table 2. Concentration of TBBPA in Dam on Gestation Day 16

dietary TBBPA	100	1000	10000 ppm
Maternal blood (μg/mL)	0.38±0.21	0.57±0.33	2.75±1.74
Maternal liver (μg/g w.w.)	0.11 #1	0.84±0.20	4.94±2.06
Maternal kidney (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	0.17 #1
Maternal brain (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	0.15 #1
Fetus (μg/g w.w.)	0.01 #1	0.45±0.15	3.36±0.54
Placenta (μg/g w.w.)	N.D. #2	0.36 #1	0.94±0.15
Amnion (μg/g w.w.)	N.D. #2	0.53±0.34	3.27±0.85
Amniotic fluid (μg/mL)	N.D. #2	0.25±0.13	1.33±0.48

Values are mean ± SD for three samples.

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

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

Table 3. Concentration of TBBPA in Dam and Pup on Postnatal Day 10

dietary TBBPA	100	1000	10000 ppm
Maternal blood (μg/mL)	0.42±0.17	1.76±0.05	3.15±0.26
Maternal liver (μg/g w.w.)	0.34 #1	1.53±0.45	9.68±1.17
Maternal kidney (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	0.69±0.40
Maternal brain (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	0.02 #1
Contents			
in pup stomach (μg/g w.w.)	1.45±0.15	2.03±1.09	18.83±2.16
Pup liver (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	N.D. #2
Pup kidney (μg/g w.w.)	N.D. #2	N.D. #2	N.D. #2

Values are mean ± SD for three samples.

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

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

った.

妊娠0日から,100,1,000あるいは10,000 ppmの餌を摂取したマウスの,出産後10日におけるTBBPAの生体内濃度をTable 3に示した.1,0000 ppmの餌を摂取したマウスの,母マウスの血液,肝臓,腎臓,脳および仔の胃の内容物にTBBPAが検出されたが,仔の肝臓と腎臓からは検出されなかった.1,000 ppmの餌を摂取したマウスと100 ppmの餌を摂取したマウスでは,母マウスの血液,肝臓および仔の胃

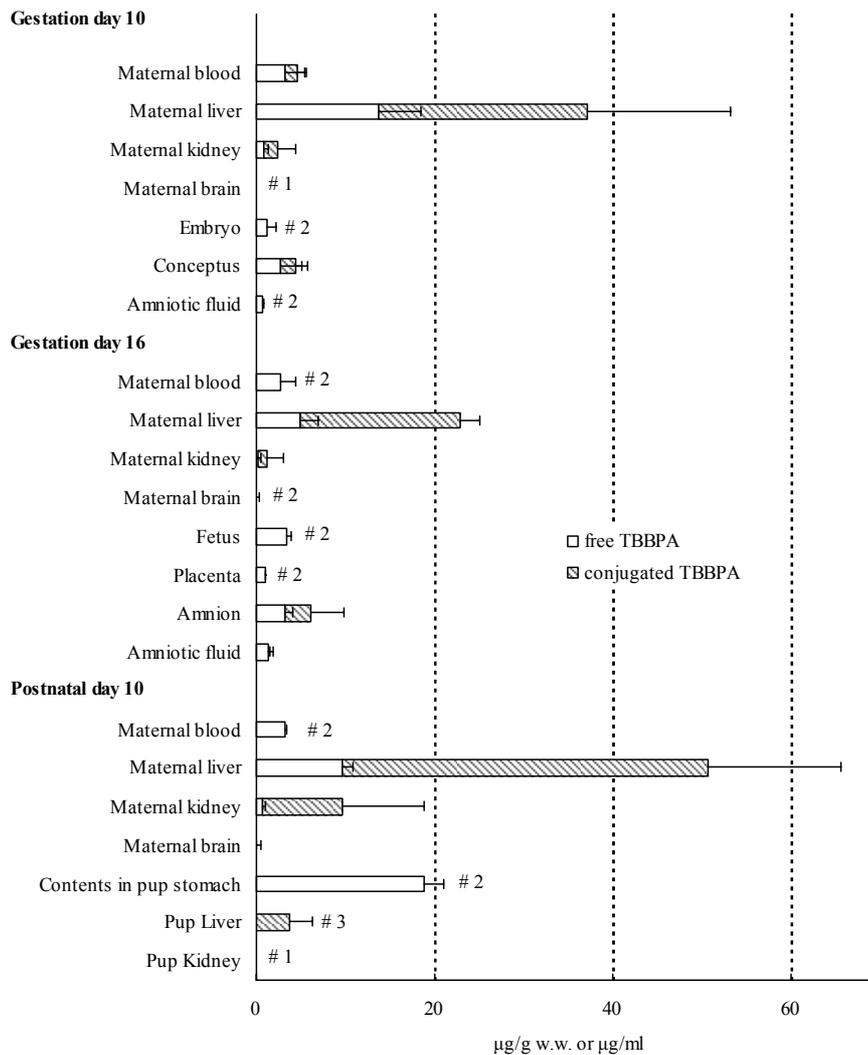


Fig. 1. Free and Conjugated TBBPA in Mice given 10,000 ppm TBBPA in diet from day 0 of pregnant

#1: There was no detectable free and conjugated TBBPA .

#2: There was no detectable conjugated TBBPA.

#3: There was no detectable free TBBPA .

の内容物にTBBPAが検出された。

妊娠0日から、10,000 ppmの餌を摂取したマウスの、妊娠10日、16日、あるいは出産後10日におけるTBBPAの抱合体の量を、抱合されていなかったTBBPAの量と合わせて、Fig. 1に示した。TBBPAの抱合体は、妊娠10日の母マウスの血液、肝臓、腎臓および受胎産物から検出されたが、母マウスの脳、胚子および羊水からは検出されなかった。妊娠16日では、TBBPAの抱合体は、母マウスの肝臓、腎臓、羊膜および羊水から検出されたが、母マウスの血液、脳、胎仔および胎盤からは検出されなかった。出産後10日では、TBBPA抱合体は、母マウスの肝臓、腎臓、脳、仔の肝臓から検出されたが、母マウスの血液、仔の胃の内容物および仔の腎臓からは検出されなかった。

考 察

単回投与実験^{2,3)}と同じに、TBBPAは、胎盤を通過して胚子や胎仔にまで分布した。特に、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。100あるいは1,000 ppm摂取群の妊娠10日目の胚子には、TBBPAは検出されなかったが、妊娠16日目では、100あるいは1,000 ppm摂取群の胎仔からも、TBBPAが検出された。単回投与実験^{2,3)}におけると同様に、経餌投与においても、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。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、母マウスが経餌摂取したTBBPAが乳汁に分泌されていたことが示された。しかも、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、他の臓器からの検出例が少ない100 ppm摂取群からも確実に検出された。人や家畜におけるTBBPA暴露のフィールドワーク調査において、血液(血清、血漿)と並んで、母乳が有効な試料となり得ることが示唆された。

ラットにおける¹⁴C-TBBPAの残留性の試験^{2,5,2,6)}では、経口摂取されたTBBPAの排泄は速やかであった。マウスに

における単回投与実験^{2,3)}では、臓器内濃度は投与後6時間以内がピークで、以後速やかに低下した。単回投与実験の投与量、1,600 mg/kg体重は、妊娠期の母マウスが10,000 ppmのTBBPAを含む餌を摂取した際の、一日のTBBPA摂取量とほぼ等しい。妊娠0日から毎日、1,600 mg/kg体重のTBBPAを摂取し続けたにも関わらず、10,000 ppm摂取群の体内TBBPA濃度は、測定した臓器・体液のほとんど全てで、単回投与後の最高濃度よりも低かった。経餌投与においても、TBBPAの吸収と排泄は速やかで、蓄積性はないと考えられる。例外は、仔の胃の内容物におけるTBBPA濃度で、単回投与後の最高濃度よりも10,000 ppm摂取群が高かった。ダイオキシンやPCBなどの脂溶性化合物は、母体から胎児や乳に移行しやすく、それ故に、胎児および母乳は、母体に残留するそれら化合物の排泄経路となっており、TBBPAもそのような可能性を否定できない。

TBBPAは、ラットにおいては、ビスフェノール骨格の両端の水酸基が、グルクロン酸あるいは硫酸で抱合され、その組み合わせによって三種類の抱合体が胆汁や糞中で同定されている^{2,6)}。しかし、その報告では、それらの抱合体の体内分布は示されていない。我々は、経費、作業時間および機材の制約上、それらの抱合体を直接、別々に分析することは出来なかった。しかし、グルクロン酸抱合と硫酸抱合の加水分解酵素を作用させた後に測定した総TBBPA量が、加水分解前の遊離TBBPA量より多かったことから、抱合体の存在が確認された。我々はこの、哺乳類におけるTBBPA抱合体の体内分布、特に胚仔、胎仔および乳仔での検出例を初めて明らかにした。胚仔および胎仔で検出されたTBBPA抱合体が、母マウス内で抱合されてから移行したのか、胚子あるいは胎仔内で抱合されたものかは不明である。これを明らかにするには、胚子培養のような、母マウスと胚子を分離したシステムによる実験が必要であろう。また、抱合されていないTBBPAが検出されなかった、仔マウスの肝臓で、抱合されていたTBBPAが検出され、単回投与実験^{2,3)}と同じに、仔マウスが摂取した乳汁中のTBBPAは、仔マウスの体内に吸収されて、肝臓に分布することが明らかになった。仔マウスの胃の内容物には抱合されていないTBBPAのみが検出されたことから、仔マウスの肝臓中に検出されたTBBPA抱合体は、仔マウスの体内で抱合されたものと考えられる。測定した臓器の中で、特に母マウスの肝臓では、抱合されていないTBBPAに加えて、抱合されていたTBBPA量も多く、血中濃度との比は、総TBBPAでは16倍であった。母体の継続的なTBBPA摂取による、胎児、乳児への影響とともに、肝臓への影響も懸念される。

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., Thureson 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., Thureson 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.*, **57**, , 2006.
- 24) Fujitani T., Tada Y., Takahashi H., et al.: *Ann. Rep. Tokyo Metro. Inst. P. H.*, **56**, 327-331, 2005.
- 25) Meerts I.A.T.M., Assink Y., Ceniijn P.H., et al.: *Organohalogen Compounds*, **40**, 375-378, 1999.
- 26) Haak H., Larsen G., Bergman Å., et al.: *Xenobiotica*, **30**, 881-890, 2000.