

【研究課題名】

海棲哺乳類の化学物質毒性評価における in vitro から in vivo への外挿法
(In vitro-to-in vivo extrapolation for marine mammal chemical toxicity assessment)

【共同研究者名】

遠藤智司（国立環境研究所，環境リスク・健康領域）

Islem Boukara（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

吉井咲夢（国立環境研究所，環境リスク・健康領域）

Do Thi Ngoc Anh（国立環境研究所，環境リスク・健康領域）

落合真理（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

1. 研究目的

鯨類は海洋生態系の食物連鎖の最上位に位置し、化学物質のリスク評価における指標生物である。鯨類の残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants, POPs）への曝露実態は、漂着個体の組織を用いた分析などから知見が蓄積している。一方、鯨類の試料採取や毒性試験の実施は倫理的・技術的な制約から困難である。近年、動物実験代替手法として、鯨類由来の細胞培養系を用いた in vitro 試験による化学物質の毒性評価が進められている。しかしながら in vitro 毒性試験における曝露濃度と実際の体内濃度とは直接比較できるものではなく、in vitro から in vivo への定量的外挿法 (Quantitative In Vitro to In Vivo Extrapolation, QIVIVE) の検討が必要とされている。本研究では in vitro 細胞バイオアッセイによる毒性データと平衡分配モデルを活用し、スナメリ (*Neophocaena asiaeorientalis*) を対象に POPs 等の化学物質のリスク評価を試行した。

2. 研究方法

平衡分配モデル：

鯨類組織中の化学物質の蓄積濃度は、「組織の湿重量あたりの濃度 (mg/kg-wet など)」として測定される。一方、in vitro 毒性試験における曝露濃度は「培地体積あたりの濃度 (mg/L など)」として調製され、10% 影響濃度 (EC₁₀) や 10% 阻害濃度 (IC₁₀) などの毒性値も同様な濃度で報告される。本研究では in vivo、in vitro におけるそれぞれの濃度をフリー溶存濃度 (C_{free}) に換算し、比較した。

In vitro 毒性値は以下の式により換算した（ここでは IC₁₀ を例とした）。

$$IC_{10,free} = IC_{10,nom} / K_{medium/water} \quad (1)$$

IC_{10,free} はフリー溶存濃度として算出した IC₁₀、IC_{10,nom} は設定培地濃度から求めた IC₁₀、K_{medium/water} は培地／水分配係数である。K_{medium/water} は培地組成を使い、以下の式から算出した。

$$K_{medium/water} = C_{protein} \times K_{protein/water} + C_{lipid} \times K_{lipid/water} + f_{water} \quad (2)$$

C_{protein} 及び C_{lipid} はそれぞれ培地中のタンパク質濃度、脂質濃度である。 f_{water} は培地中の水の体積分率である。 $K_{\text{protien/water}}$ と $K_{\text{lipid/water}}$ はそれぞれタンパク質／水分分配係数、脂質／水分分配係数である。

鯨類脂皮及び全血中の *in vivo* 濃度は以下の式により C_{free} に換算した（ここでは脂皮を例とした）。

$$C_{\text{blubber,free}} = C_{\text{blubber,nom}} / K_{\text{blubber/water}} \quad (3)$$

$C_{\text{blubber,free}}$ は脂皮中の C_{free} 、 $C_{\text{blubber,nom}}$ は脂皮全体における濃度、 $K_{\text{blubber/water}}$ は脂皮／水分分配係数である。 $K_{\text{blubber/water}}$ は式 2 に準じて推定した。

式 1 から 3 で必要とされる C_{protein} 、 C_{lipid} は後述する方法で測定した。各物質の $K_{\text{protien/water}}$ 及び $K_{\text{lipid/water}}$ は可能な限り実測値を用い、実測値がない場合は推算値を用いた。

対象試料：

本研究では、2012 年から 2020 年にかけて瀬戸内海沿岸に漂着したスナメリ 3 個体の全血および脂皮を用いた。試料は愛媛大学沿岸環境科学研究センター（CMES）の *es-Bank* に保管されているものを使用した。

対象化学物質：

ポリ塩化ビフェニル（PCBs）、2,3,7,8 テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン（TCDD）、ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）、ジクロロジフェニルトリクロロエタン（*p,p*-DDT）とその代謝物（*p,p*-DDE、*p,p*-DDD）、および水酸化 PCBs（OH-PCBs）を対象とし、これらのリスクを評価した。

タンパク質の測定：

スナメリの全血および脂皮に含まれる総タンパク質は、Wessel & Flügge (1984) によるメタノール沈殿法で抽出し、Pierce™ BCA プロテインアッセイキットを用いて測定した。また、培養液に含まれるウシ胎仔血清（Charcoal-Dextran 処理済）についても、同様の手法で総タンパク質量を測定した。

脂質の測定：

各試料の脂質含有量はスルホ-ホスホ-バニリン（SPV）法を用いて 定量した。SPV 法は試料中の 脂質を高温で硫酸処理後、バニリン及びリン酸と反応させることで発色させ、吸光度測定により測定する方法 である。貯蔵脂質（トリグリセリド）、中性脂質は、改良した Bligh-Dyer 法により抽出・分離した。リン脂質は 1-ブタノールを使用した極性脂質抽出法により抽出・分離した。分画した中性脂質、貯蔵脂質、リン脂質を SPV 法により 定量した。検量線はトリオレイン

(貯蔵脂質)、コレステロール(中性脂質)、ホスファチジルコリン(POPC、リン脂質)を各脂質の標準物質として使用し測定した。

3. 研究成果

タンパク質および脂質の含有量：

スナメリの全血におけるタンパク質含有量は 12–62 mg/mL であった。対象とした 3 個体の内、2 個体では約 12 mg/mL であったのに対し、1 個体は 62 mg/mL と非常に高値を示した。この差異は、剖検時に血液を採取した場所(血管血、胸水、腹水など)に依存するものと考えられる。全血中の総脂質含有量は 8.5–15 mg/mL であり、そのうち極性脂質が 64–79%を占め、最も高い割合を示した。中性脂質は 20–35%であり、貯蔵脂質は検出限界値以下であった。

一方、脂皮におけるタンパク質含有量は 0.14–0.78 mg/mL であり、全血に比べて大幅に低い値を示した。脂質に関しては、貯蔵脂質のみが検出され、脂皮中の脂質含有量は 81–96%と高い割合を占めた。

フリー溶存濃度 (C_{free}) の推定：

鯨類組織においても *in vitro* 細胞バイオアッセイにおいても化学物質の C_{free} は、総濃度に比べて数桁低い値を示した。特に TCDD や PCBs は脂質への結合率が 90%以上と高く、その結果 C_{free} は極めて低値であった。さらに、脂皮における C_{free} は全血よりも低かった。POPs が脂質に強く結合し、長期間体内に残留する可能性を示唆している。

特異性の評価とリスク評価：

鯨類を用いた細胞バイオアッセイの結果を解析したところ、PCBs および PBDEs の一部は毒性比 (TR) 値が 10 未満であり、非特異的な細胞膜毒性(ベースライン毒性)を示した。一方、TCDD およびダイオキシン様 PCBs は TR 値 > 10 であり、特異的な毒性作用が示唆された。

全血および脂皮中の総濃度から C_{free} を算出し、細胞バイオアッセイによる $IC_{10, \text{free}}$ と比較しリスク評価を行ったところ、ほとんどの場合、体内の C_{free} は $IC_{10, \text{free}}$ を下回ったものの、DDE の体内濃度は細胞毒性(アポトーシス)を引き起こす可能性のあるレベルであることが示された。

4. 結論と今後の課題

本研究ではスナメリを対象に、細胞バイオアッセイと平衡分配モデルを組み合わせ、リスク評価を実施した。 C_{free} を統一した指標とすることにより、細胞バイオアッセイ系内および生体組織内の物質分布の差異を考慮した。細胞バイオ

アッセイにおいては、対象とした POPs 等の C_{free} は総濃度よりも数桁低いと推定され、特に脂質への蓄積が顕著であることが示された。TCDD およびダイオキシン様 PCBs は特異的な毒性作用が示唆され、環境中でのリスクが懸念された。一方で、DDE などは特異的な毒性作用は認められなかったものの、ベースライン毒性を引き起こす可能性のある濃度で残留していることが示唆された。

今後は、鯨類における化学物質の蓄積濃度や検出頻度の調査に加え、特異的な毒性作用を含めた包括的な毒性の評価が求められる。本研究で用いた手法は、環境化学物質の海棲哺乳類への影響評価において有効なアプローチであり、他の鯨種や他の化学物質に適用されることが求められる。そのためには各鯨種の組織組成に関する知見を充実させるとともに、各化学物質の分配係数の一層の精緻化に取り組む必要がある。