水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

塩化トリブチルスズ(TBTCl)の組織器官への生物濃縮の成熟に伴った変化

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産総合研究センター 公開日: 2024-10-02 キーワード (Ja): キーワード (En): BCF; tissue distribution; maturation; mummichog; tributyltin chloride 作成者: 堀, 英夫, 角埜, 彰, 池田, 久美子, 山田, 久 メールアドレス: 所属: 日本冷凍食品検査協会, 瀬戸内海区水産研究所, 瀬戸内海区水産研究所, 瀬戸内海区水産研究所
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010806

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

水研センター研報，第11号，1－10，平成16年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 11, 1-10, 2004

塩化トリブチルスズ(TBTCl)の組織器官への生物濃縮の成熟に伴った変化

堀　英夫[*1]，角埜　彰[*2]，池田久美子[*2]，山田　久[*2]

Changes in bioaccumulation of tributyltin chloride (TBTCl) in the tissues and organs of immature and maturating mummichogs (*Fundulus heteroclitus*)

Hideo HORI[*1], Akira KAKUNO[*2], Kumiko IKEDA[*2] and Hisashi YAMADA[*2]

Abstract　Male and female mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) were exposed to water-borne tributyltin chloride (TBTCl) for 56 or 77days at different maturation stages during the refractory and the maturating periods. Differences in TBT bioaccumulation in the tissues and organs as well as entire body by sex and degree of maturation were studied for a discussion on the influence of TBTCl on the reproduction processes.

The BCF during the refractory period was 9,100±640 for the males and 9,200±1,700 for the females, indicating that mummichogs bioaccumulated TBTCl in much higher concentration than other marine fish species. The TBT concentration was the highest in the blood and the lowest in the digestive tract of male and female mummichogs. The TBT concentrations in the liver and gonads were similar to one another. The differences between the males and females in terms of TBT concentration and BCF were neglegible during the refractory period. On the other hand, TBTCl had bioaccumulated significantly in the testes during the maturating period, and the BCF was 7 times larger in the testes than in the ovaries. The high bioaccumulation in the testes suggests that TBTCl inhibits the reproduction processes of male fish more seriously.

Key Words:　BCF, tissue distribution, maturation, mummichog, tributyltin chloride

船底防汚塗料の殺生物剤として使用されてきたトリブチルスズ（TBT）化合物の魚類に対する有害性については，急性毒性の把握（小山，清水，1992；堀口，清水，1992），初期生活段階毒性試験による慢性毒性（清水，1992）および最大許容毒物濃度の把握（小山，清水，1992），無影響濃度の推定（小山，清水，1992），生物濃縮係数の把握（山田，1992; Yamada and Takayanagi，1992），病理組織観察による標的臓器の推定（Wester *et al.*, 1990; 清水，木村，1992; 清水，木村，1994）などの多くの研究が行われてきた。これらの研究の成果から，TBT化合物は，魚類に高濃度に蓄積されるとともに，急性および慢性的な毒性を有することが明らかにされた。

酸化トリブチルスズ（TBTO）の海産魚の組織・器官に及ぼす長期的影響を調べた研究（清水，木村，1992; 小山，清水，1992; 清水，木村，1994）では，TBTOが①鰓上皮の肥厚および過形成，②肝細胞の萎縮，変性および壊死，③尿細管硝子滴変性，糸球体腔拡張および尿細管の壊死，④造血細胞の減少，⑤腸管上皮細胞の萎縮および壊死，⑥表皮の変性，萎縮およ

2004年２月18日受理（Received on February 18, 2004）
水産総合研究センター業績 A 第49号（Contribution No. A 49 from the Fisheries Research Agency）
*1 日本冷凍食品検査協会　〒105-0012　東京都港区芝大門2-4-6（Japan Frozen Foods Inspection Corporation, 2-4-6, Shibadaimon, Minatoku, Tokyo, 105-0021, Japan）
*2 瀬戸内海区水産研究所　〒739-0452　広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5　（National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5, Maruishi, Ohno, Saeki, 739-0452, Japan）

び配列の乱れ，⑦卵巣の発達阻害，⑧胸腺の萎縮並びに⑨精巣の発達阻害および精子形成の停止を引き起こすことが報告された。①から⑦の組織・器官の異常が飼育水中TBT濃度が1.0〜2.1μg/L（96時間 LC_{50} 値の1/2〜1/4）の比較的高濃度の場合に起こるのに対し，⑧胸腺の萎縮並びに⑨精巣の発達阻害および精子形成の停止は，飼育水中TBT濃度が0.1μg/L（96時間 LC_{50} 値の約1/40）の低濃度において起こることが明らかにされた。したがって，TBT化合物の海産魚類に対する特徴的な作用は，胸腺組織を中心とした造血免疫系への影響および精子形成を中心として雄の生殖系への影響であると指摘されている（清水，木村，1994）。

TBTOは卵巣に比較して精巣に対し特に著しい影響を及ぼすことが明らかにされているが，生殖腺の発達阻害に対する作用機構はほとんど解明されていない。生殖腺に対する影響が雌雄で異なることは，TBT化合物の蓄積濃度が卵巣と精巣で異なることに起因することも考えられるが，その詳細は明らかでない。したがって，本研究ではTBT化合物の生殖腺に対する作用機構と生殖腺に対する影響の雌雄による差異の一端を解明するために，飼育水から暴露された塩化トリブチルスズ（TBTCl）の卵巣および精巣をはじめとする組織・器官への分布および生殖腺の成熟に伴った蓄積濃度の変化を明らかにすることを目的としている。

なお，本研究で試験魚として用いたマミチョグは北アメリカ大陸東岸汽水域に生息する広塩性の小型魚であり，小型水槽で容易に成熟させることができる。マミチョグの我が国における成熟産卵周期はShimizu（1997）により研究され，GSIの季節変化および繁殖時期が解明されている。したがって，小型水槽による実験の容易さの他に不応期および成熟開始時期からの暴露試験計画の立案が容易なために試験魚としてマミチョグを選定した。

材料と方法

塩化トリブチルスズ（TBTCl）

東京化成工業㈱製の試薬（純度95%）を暴露試験に用いた。暴露試験開始までは冷暗所に保存した。一方，関東化学㈱製の有機スズ化合物標準原液（1 mg/mLトルエン溶液）を化学分析用標準物質として使用した。また，代謝物質分析のためにAldrich社製の塩化モノブチルスズ（$MBTCl_3$）（純度95%）および塩化ジブチルスズ（$DBTCl_2$）（純度96%）を化学分析用標準物質として使用した。

不応期における暴露試験

試験生物

瀬戸内海区水産研究所で産卵・ふ化させた後に屋内水槽において自然水温で飼育したマミチョグ（*Fundulus heteroclitus*）成魚（雄および雌）を試験に用いた。試験は産卵が終了したマミチョグを用いて不応期にあたる10月31日〜12月26日に行った。また，試験に用いた雌マミチョグの体長および体重は，それぞれ11.3±0.6cmおよび22.9±3.7gであった。また，雄マミチョグの体長は10.7±0.2cm，体重は19.4±2.2gであった。

暴露試験

雌暴露区および雄暴露区を設定し，堀ら（2002）が作成した循環濾過式生物濃縮試験装置を用いて試験を行った。角型ガラス製水槽（容積約58L）を試験水槽として用い，雌暴露区には15尾，雄暴露区には20尾収容した。30L/hの流量で飼育水を各水槽に供給し，水槽内の飼育水を１日に約15回換水した。

既報（堀ら，2002）の実験と同様な方法でTBTClを試験水槽へ導入した。すなわち，ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解したTBTCl原液を，撹拌混合させながらろ過海水に溶解させて中間薬液を調製した。この中間薬液を，微量定量ポンプ（Iwaki社製，EH-B10 S-100PR9-L型）を用いて一定流量で試験水槽に添加し，飼育水中のTBT濃度を一定に維持した。平成12年10月31日〜12月26日の56日間暴露試験を実施した。

試験期間中は水温を20℃に保ち，室内の照明を16時間明，８時間暗の明暗周期で制御した。また，体重の２%の配合飼料（マルハ(株)製，マルハヒラメ稚魚１号）を１日２回（朝と夕方）に分けて投与した。毎朝残餌および糞を取り除いた。

暴露区試験の14日目，28日目，42日目および56日目にマミチョグを取り上げ，採血した後に解剖し，肝臓，生殖腺，消化管およびその他の部位（筋肉，心臓，鰓，骨，表皮等，以下「その他」と表記）に分け，それぞれの部位をひとまとめにした。２〜３尾ずつひとまとめにして３個の分析用試料を調製した。さらに，「その他」から筋肉を一部採取し，これら採取した血液（全血），肝臓，生殖腺，消化管，「その他」および筋肉についてTBT濃度を測定した。「その他」のTBT濃度は，別に測定した筋肉中TBT濃度も合わせて補正して示した。

TBTの分析方法

飼育水中のTBTClはn-ヘキサンを用いて抽出し，n-プロピルマグネシウムブロミドを用いてプロピル誘導体に変換した後，キャピラリーカラム（Ultra-1）およびFPD検出器（Snフィルター使用）を装備したガスクロマトグラフ（GC-FPD）を用いて測定した。この方法の定量下限値は10ng/Lであり，添加回収率は96.7±1.2%（平均±標準偏差，n＝3），それらの変動係数は1.2%

であった。

マミチョグ組織中TBTClの分析は高見ら（1987）の方法に準拠して測定した。すなわち，マミチョグ組織中のTBTClは1N塩酸メタノール・酢酸エチル（1：1，V/V）混液を用いて抽出した。抽出物を陰イオンと陽イオン交換樹脂を用いて精製した後に，飼育水中TBTCl の分析と同様にプロピル誘導体に変換し，GC-FPD（Snフィルター使用）で測定した。この方法の定量下限値は0.005μg/gであり，また，添加回収率は97.9±1.3%（平均±標準偏差，n＝3），それらの変動係数は1.3%であった。なお，濃度はTBT^{+}として湿重量当たりに換算して表示した。

成熟開始時期から産卵期における曝露試験

試験魚

前年の春に産卵・ふ化した後に瀬戸内海区水産研究所の屋内水槽で自然条件下で飼育した当歳魚を試験に用いた。試験は平成13年２月５日～５月７日の91日間（77日間の暴露試験とそれに続く14日間の排泄試験）実施した。すなわち，マミチョグの成熟開始時期から成熟，産卵期について試験を実施した。試験開始時の雌マミチョグの体長および体重は，それぞれ6.4±0.2cmおよび6.5±1.2gであり，雄マミチョグの体長および体重は，ぞれぞれ6.5±0.3cmおよび7.2±0.9gであった。

暴露試験

雌対照区，雄対照区，雌暴露区および雄暴露区の４試験区を設定し，瀬戸内海区水産研究所に設置している流水式曝露試験装置を用いて暴露試験を行った。

試験水槽として角型ガラス水槽（容積約50L）を用い，雌対照区および雄対照区には，雌および雄それぞれ40尾を，また，雌曝露区および雄曝露区には55尾の雌あるいは雄マミチョグを収容した。砂および活性炭でろ過した自然海水を27L/hの流量で試験水槽に注水し，水槽内飼育水を１日に約13回換水させた。

上で述べた不応期における暴露試験と同様にTBTClを溶解させた中間薬液を，微量定量ポンプを用いて定量的に試験水に添加し，飼育水中のTBT濃度を一定に維持した。平成13年２月５日～４月23日の77日間の暴露試験を実施した。暴露試験終了後TBTClの添加を中止するとともに，TBTClを添加しない飼育水中で４月23日～５月７日まで14日間マミチョグを飼育し，TBTClの排泄を調べた。

暴露および排泄試験の間，試験魚を自然水温（91日間の試験の間に10.0℃から15.9℃に上昇した）および14時間明，10時間暗の明暗周期の条件下で飼育した。また，体重の２%の配合飼料（協和発酵(株)製初期飼料C-2000）を１日２回（朝と夕方）に分けて投与するとともに，毎朝残餌および糞を取り除いた。

対照区の飼育水は７日目，28日目，63日目および77日目に採取しTBT濃度を測定した。暴露区の飼育水中TBT濃度は，暴露試験期間中21および56日目を除いて毎週測定した。

対照区のマミチョグは経時的に３尾づつ取り上げ，解剖した後に肝臓，生殖腺，消化管および「その他」に分け，それぞれの部位をひとまとめにした。モノブチルスズ（MBT），ジブチルスズ（DBT）およびTBTのブチルスズ化合物（BTs）濃度は，91日目（排泄14日目）の試料について測定した。

暴露区のマミチョグは，経時的に３～５尾取り上げ，BTs 濃度は，試験開始時，暴露試験の15日目，77日目および排泄試験の14日目（試験開始から91日）に取り上げたものを用いた。対照区と同様に肝臓，生殖腺，消化管および「その他」に分けて，取り上げたマミチョグをひとまとめにして分析用試料とした。

GSIの測定

魚体を解剖して分析用試料を調製する際に体重および生殖腺重量を測定し，次式により生殖腺指数（GSI）を計算した。

$$GSI\ (\%) = (\text{生殖腺重量}/\text{魚体重}) \times 100$$

飼育水TBTおよびマミチョグ中MBT，DBTおよびTBTの分析方法

飼育水中のTBT濃度は不応期における暴露試験において述べた方法に準拠して測定した。ただし，飼育水中TBT濃度が不応期の暴露試験に比較して高いため分析操作上定量限界値を20ng/Lとした。一方，不応期の暴露試験で採用した分析方法では，マミチョグ組織中のMBT，DBTおよびTBTを同時に分析することができないため，TBTおよび代謝物質は張野，福島（1994）が開発した方法に準拠して分析した。すなわち，マミチョグ組織中のBTsは１%トロポロン・アセトン溶液を用いて抽出し，抽出物をベンゼンに転溶させた後に，MBT，DBTおよびTBTのプロピル誘導体に変換後，フロリジルカートリッジカラムで精製した。濃縮した後にFPD検出器（Snフィルター使用）付きガスクロマトグラフ（GC）を用いて測定した。GCの分析条件は張野，福島（1994）に準拠し，その濃度は$MBT3^{+}$，DBT^{2+} およびTBT^{+}として湿重量当たりに換算して示した。この方法による定量下限値は，GC用試験溶液量の違いから３物質ともに対照区で0.02μg/g，暴露区で0.05μg/gであり，また，MBT，DBTおよびTBTの添加回収率は，それぞれ，99.0±4.9%，83.7±4.2%および94.8±3.7%（平均±標準偏差，n＝5），変動係数はMBTで4.9%，DBTで5.0%，また，TBTで3.9%であった。

結果および考察

不応期における生物濃縮

飼育水中のTBT濃度

試験に用いた海水のTBT濃度は定量下限（10ng/L）未満であった。試験期間における飼育水中TBT濃度はTable1に示したように，雌暴露区で74～130ng/L，また，雄暴露区で85～130ng/Lの範囲で変動した。飼育水中TBT濃度の平均値±標準偏差は，雌暴露区で120±21ng/L，雄暴露区で110±19ng/Lであった。

Table 1. TBT concentration (ng/L) in rearing seawater of refractory period experiment

Exposure period(day)	Exposure experiment	
	Female	Male
initial	74	85
7	130	85
14	120	120
21	120	120
28	89	98
35	130	120
42	120	120
49	120	130
56	89	98
Mean±SD	120±21	110±19

魚体中TBT濃度の経時的変化と生物濃縮係数

曝露14～56日目の全魚体中TBT濃度をTable 2に示した。なお，56日目の濃度は，各部位のTBT濃度と各部位の重量比から算出した。雌暴露区の14日目，28日目，42日目および56日目の魚体中TBT濃度は，それぞれ，0.31μg/g，0.51μg/g，0.71μg/gおよび1.1μg/gであり，14～28日目および28～42日目において有意に上昇し（t検定，2～4週目$p<0.01$，4～6週目$p<0.05$），42～56日目においては有意差は認められなかった。また，雄曝露区も同様にTBT濃度は，14～28日目および28～42日目において有意に上昇し（t検定，$p<0.01$），42～56日目においては有意差は認められなかった。したがって，マミチョグ体内に取り込まれたTBTは42日目以降ほぼ平衡に達したと考えられた。試験開始前のマミチョグの魚体中TBT濃度は定量下限（0.005μg/g）未満であり，56日目の暴露区マミチョグの濃度を用いてTBTClの生物濃縮係数（BCF）を計算した。BCFは，Table 3に示したように，雌で9,200±1,700，また雄で9,100±640であり（平均±標準偏差，n=3），雌雄のマミチョグで有意に異ならなかった。TBTClの海産魚によるBCFはマダイで6,800±900であることが報告されており（山田，1992），マミチョグはマダイと同様にTBTClを高濃度に濃縮することが明らかであった。

Table 2. TBT concentration in whole body of mummichog exposed to waterborn TBTCl

Exposure period(day)	TBT concentration (μg/g wet wt)	
	Female	Male
14	0.31±0.03*2	0.36±0.03
28	0.51±0.03	0.57±0.05
42	0.71±0.10	0.90±0.09
56*1	1.1 ±0.20	1.0 ±0.07

*1 TBT concentrations were calculated by using concentration in each tissues and the percentage of each tissues to whole body
*2 Mean±SD (n=3)

TBT濃度および生物濃縮係数の組織・器官による差異

暴露56日目のマミチョグ各部位別のTBT濃度はTable 3に示したように，血液で特に高く雌雄のマミチョグでそれぞれ1.9μg/gおよび1.6μg/gであった。雌マミチョクでは肝臓，「その他」および生殖腺のTBT濃度は，それぞれ，1.2μg/g，1.1μg/gおよび1.0μg/gであり，血液に次いで高いが，これらの部位の濃度差は明確ではなかった。雌マミチョグの消化管TBT濃度は0.68μg/gと他の部位に比較して低かった。雄マミチョグについても，血液以外の部位別TBT濃度は，肝臓，「その他」，生殖腺および消化管，それぞれ，0.92μg/g，1.0μg/g，0.99μg/gおよび0.70μg/gであり，雌マミチョグに比較すると，消化管では濃度が低く，また，肝臓，生殖腺および「その他」におけるTBT濃度差は小さく，部位別TBT濃度は雌雄のマミチョグで類似する傾向であった。「その他」から筋肉を一部採取し，筋肉中濃度を測定した結果は，雌および雄それぞれ0.78μg/gおよび0.96μg/gであった。雌マミチョグの筋肉中TBT濃度は消化管と同等であり，雄マミチョグのそれは肝臓，生殖腺と同等であった。

部位別TBT濃度の有意差を一元配置分散分析をした後に多重比較を行って検定した。その結果，雌雄ともに血液中のTBT濃度は他の部位に比べ有意に高かった（Tukey，$p<0.01$）。本研究の結果は，酸化トリブチルスズ（TBTO）に暴露したマダイの組織・器官のTBT濃度が筋肉に比較して肝臓，鰓および表皮で高い傾向が認められるもののその差は小さいこと（Yamada and Takayanagi, 1992）およびマコガレイやヒラメの血清中にTBTが高濃度に検出される既往の報告（Oshima *et al.*, 1997; 大嶋ら，1998a; Oshima *et al.*, 1998b）に一致するものである。

TBTClの各部位におけるBCFをTable 3に併せて示した。雌マミチョグの各部位におけるBCFは，血液（全血），肝臓，「その他」，生殖腺，筋肉および消化管で，それぞれ15,800，10,000，9,200，8,300，6,500およ

Table 3. TBT concentration and BCF in several tissues and organs of mummichog exposed to waterborn TBTCl for 56 days

Tissue and organ	TBT Concentration(μg/g wet wt)*4		BCF	
	Female	Male	Female	Male
Blood	1.9±0.34*5	1.6±0.33	15800±2800	14500±3000
Liver	1.2±0.28	0.92±0.04	10000±2300	8400± 360
Residue*1	1.1±0.22	1.0±0.07	9200±1800	9100± 640
Gonad	1.0±0.13	0.99±0.11	8300±1100	9000±1000
Muscle	0.78±0.09	0.96±0.10	6500± 750	8700± 910
Digestive tract*2	0.68±0.16	0.70±0.05	5700±1300	6400± 450
Whole body*3	1.1±0.20	1.0±0.07	9200±1700	9100± 640

*1 including muscle, gill, heart, kidney, bone, skin and airbladder
*2 including gallbladder, spleen and adipose tissue aroud the digestive tract
*3 TBT concentrations were calculated by using TBT concentration in each tissues and the percentage of each tissues to whole body
*4 Three samples were analyzed
*5 Mean±SD

び5,700であった。一方，雄マミチョグの各部位におけるBCFは，血液（全血），肝臓，「その他」，生殖腺，筋肉および消化管で，それぞれ，14,500，8,400，9,100，9,000，8,700および6,400であった。また，筋肉のBCFは，雌および雄それぞれ6,500および8,700であった。すなわち，雌雄のマミチョグの部位別のBCFは大差なく，不応期におけるTBTClのマミチョグへの生物濃縮は性によって著しく異なることはないと考えられた。

成熟開始時期から産卵期における暴露試験

飼育水中のTBT濃度

飼育水中のTBT濃度の経時変化をTable 4に示した。対照区の飼育水からはTBTは検出されず，TBT濃度は定量下限（20ng/L）未満であった。雌暴露区および雄暴露区の飼育水中のTBT濃度は，それぞれ，710～1,600ng/Lおよび630～2,500ng/Lであり，平均±標準偏差は雌暴露区で1,100±370ng/L，また，雄暴露区で1,400±670ng/Lであった。

生殖腺の成熟状況の変化

雄マミチョグのGSIはFig. 1に示すように対照区では実験開始時の4.1±1.6%から次第に大きくなり実験開始後63日後に8.5±2.6%の最大値を示した。その後，GSIは次第に小さくなり，実験終了時には5.8±2.3%に低下した。暴露区では，対照区と同様に変化し，実験開始時の5.0±0.4%から次第に大きくなり実験開始63日後には9.0±1.7%の最大値を示した。その後は対照区と同様に次第と小さくなり，実験終了時には5.9±0.6%に低下した。雄マミチョグは本研究の飼育条件では，実験開始後63日（4月9日）を中心として成熟の盛期に達しているとことが明らかであった。

実験終了時（排泄試験の14日目）に放精している雄マミチョグのGSIは，対照区で4.7±0.8%，暴露区で6.1±0.5%であり，実験終了時の未放精個体のGSIに比較すると小さかった。すなわち，最大成熟期を過ぎた雄マミチョグのGSIは放精により次第に低下することが示唆された。

Shimizu（1992）によると，三浦半島西側沿岸の荒崎におて自然環境で飼育した雄マミチョグ当歳魚のGSIは2月から次第と大きくなり，精巣成熟のピークは4～5月でこの時のGSIは5～6.5%に達することが報告されている。精巣のGSI値およびその経時的変動傾向から暴露試験の後半から排泄試験期間中の雄マミチョグは充分成熟した状態であったと考えられる。

雄マミチョグのGSIおよびその経時的な変動傾向は対照区と暴露区で明確な相違は認められなかった。清水，木村（1992）はアゴハゼの成熟過程におけるTBTO

Table 4. TBT concentration (ng/L) in rearing seawater of maturating period experiment

Exposure period(day)	Control		Exposure experiment	
	Female	Male	Female	Male
1	＜20	＜20	1400	850
10			820	630
14			710	860
28	＜20	＜20	1500	2500
35			1600	2300
42			1600	2100
49			1300	1200
60	＜20	＜20	840	1100
70			830	940
77	＜20	＜20	870	1400
Mean±SD			1100±370	1400±670

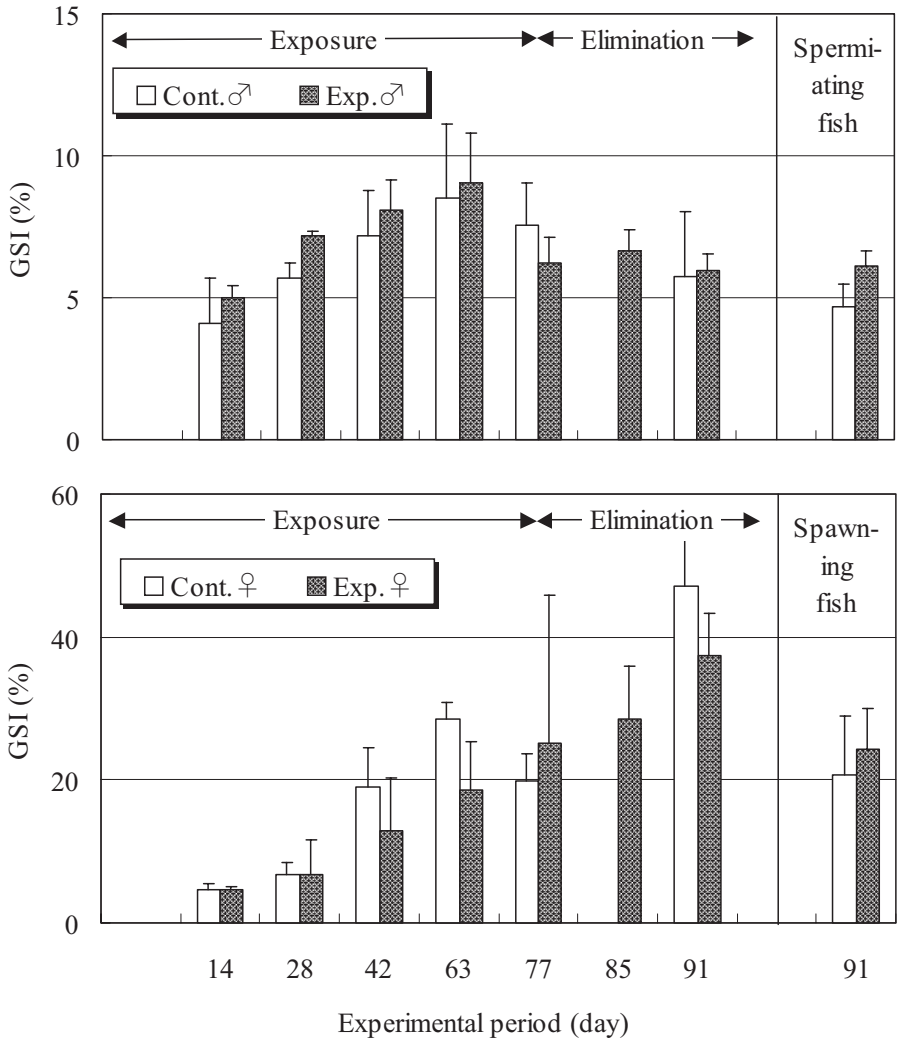

Fig. 1. Changes of gonad somatic index（GSI）during the experimental period

の影響を調べ，飼育水中TBT濃度が本研究（1,400±670ng/L）の1/10 低い濃度（＜100～200ng/L）において，雄アゴハゼのGSIが有意に低下した報告している。使用したTBT化合物が本研究（TBTCl）とアゴハゼの研究（TBTO）では異なるが，魚体内に取り込まれたTBTOとTBTClはTBTイオンとして存在すると推察すると，TBTOとTBTClの魚類精巣に対する作用機構は類似していると考えられる。したがって，精巣の成熟に対するTBT化合物の影響はマミチョグに比較してアゴハゼで強く発現することが示唆される。

雌マミチョグのGSIはFig. 1に示すように対照区では実験開始時の4.6±0.5%から次第に大きくなり実験終了時（5月7日）に47.1±7.2%の最大値を示した。一方，暴露区のマミチョグのGSIは対照区と同様な変化を示し，実験の終了時に最大のGSI（37.5±5.9%）に達した。実験の終了時には対照区および暴露区ともに産卵している個体が認められ，本研究の飼育条件下では4月下旬から5月上旬が産卵期と考えられる。実験終了時（排泄試験の14日目）に産卵している雌マミチョグのGSIは，対照区で20.7±8.3%，暴露区で24.4±5.6%であり，GSIは産卵に伴って小さくなることが明らかであった。

上述したShimizu（1997）の研究によると，当歳のマミチョグの卵巣は3月から急激な発達を開始し，4月から6月に成熟がピークに達し，この時のGSIは16%～22%であることが報告されている。91日間の試験終了時の対照区および暴露区のGSI（それぞれ47.1%および37.5%）はShimizuが観察した値より大きいが，GSIの経時的変動から本研究に用いた雌マミチョグは，雄マミチョグと同様に暴露試験の後半から排泄試験期間において充分成熟した状態であったことが明らかである。

卵巣のGSIおよびその経時的な変動傾向は，雄マミチョグと同様に対照区と暴露区で明確な相違は認められなかった。TBTOのアゴハゼの成熟過程に対する影響を調べた清水，木村（1992）の研究では，雌アゴハゼのGSIの有意な低下は，飼育水中TBT濃度が本研究（1,400±670ng/L）よりもわずかに高い濃度（2,100±800ng/L）で認められたと報告されている。すなわち，雌マミチョグの卵巣の成熟に対するTBT化合物の影響はアゴハゼと大差ない傾向であった。TBT化合物の精巣および卵巣の成熟過程に対する影響は，アゴハゼとマミチョグの2魚種により異なることが示唆されるが，その原因については試験に用いたTBT化合物の種類と影響発現の関係などさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

マミチョグ各組織中BTs濃度

マミチョグの各組織中のBTs濃度をTable 5および6に示す。Table 5に示したように，対照区の雌雄のマミチョグからはTBT濃度は定量下限（0.02μg/g）未満であった。DBTは雌の肝臓並びの雄の精巣および消化管から検出され，その濃度はいずれも0.03μg/gであった。これら以外の組織中DBT濃度は定量下限（0.02μg/g）未満であった。MBTは雄の消化管から0.05μg/gの濃度で検出されたが，これ以外の組織器官では検出されず，定量下限（0.02μg/g）未満であった。

Table 6に示したように，TBTClに暴露した雌マミチョグからBTsが検出され，肝臓，消化管および「その他」のTBT濃度は暴露試験の15日目より暴露期間が長い77日目の方が高く，暴露期間の延長に伴って濃度が高くなり蓄積していることが明確であった。また，2週間の排泄試験の間に濃度が低下するために魚体から排泄されることが明らかであった。一方，卵巣中のTBT濃度は他の部位とは異なる変化を示した。すなわち，排泄実験においてもその濃度は低下せず，排泄試験終了時においても77日間の暴露試験終了時と同じ濃度を維持していた。すなわち，卵巣のGSIは91日間の試験期間の終了時まで次第に大きくなったために体内に取り込まれたTBTClの一部分は，排泄試験期間中に卵巣へ移行したことが推察されるが，魚体内での移行および再分布は今後追求する必要のある重要な課題と考えられる。

TBTClに暴露した雄マミチョグの肝臓，消化管，精巣および「その他」のTBT濃度は暴露15日目より77日目の方が高く，暴露試験期間中に濃縮・蓄積された。77日間の暴露試験終了時における，肝臓，精巣，消化管および「その他」のTBT濃度は，それぞれ，1.8μg/g，2.1μg/g，1.6μg/gおよび1.0μg/gであり，精巣で高い傾向が認められた。一方，精巣中TBT濃度2.1μg/gは，卵巣中濃度に比較して著しく高かった。精巣中TBT濃度は排泄試験期間中に2.1μg/gから1.1μg/gへと半減したが，排泄試験期間中の肝臓，消化管およびその他におけるTBT濃度の変化は小さかった。特に，消化管および「その他」のTBT濃度はわずかに増加傾向であり，排泄試験期間中に低下しなかった。この濃度変化の傾向は雌マミチョグとは異なるが，その原因については明らかでない。

精巣のGSIは生物濃縮試験63日で最大値，9.0±1.7%を示し，その後低下している。したがって，排泄試験期間中には精巣は次第に退行しており，このために精巣中TBT濃度は卵巣とは異なり排泄試験期間中2.1μg/gから1.1μg/gへ次第に低下したと考えられる。

MBT，DBTおよびTBTの合計であるΣBTsの雌マミチョグ肝臓中濃度は，15日で0.49μg/g，77日で3.18μg/g，91日で4.90μg/gであり，排泄試験期間においてもその濃度は増大した。一方，ΣBTsに対するTBT代謝物質（MBTおよびDBTの合計）の割合は試験期間15日の18.4%から91日には88.8%に増大した。雄マミチョグ肝臓におけるΣBTs濃度およびΣBTsに対するTBT代謝物質の割合の経時変化の傾向は雌マミチョグと同様であった。また，マミチョグで認められた結果は，TBTOに暴露されたマダイ肝臓において報告されたMBT，DBTおよびTBT濃度の経時変化（山田，1999）と同様であった。これらの結果から，マミチョグにおいても魚体内に蓄積されたTBTClは他の海産魚

Table 5. Concentrations of butyltin compounds in several tissues and organs of the control mummichog(μg/g wet wt)

Tissue and organ	Concentration in female			Concentration in male		
	MBT	DBT	TBT	MBT	DBT	TBT
Liver	<0.02	0.03	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Gonad	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.03	<0.02
Digestive tract	<0.02	<0.02	<0.02	0.05	0.03	<0.02
Residue	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

類と同様に主として肝臓において代謝されることが示唆された。

ΣBTsに対するTBT代謝物質の割合は，卵巣で25%，精巣で9.8～17.1%，雌雄の消化管で24.5～47.6%，雌雄の「その他」で0～38.8%であり，その割合は消化管で大きい傾向が認められる。肝臓で生成されたTBT代謝物質は，胆汁とともに消化管に分泌されるために消化管ではΣBTsに対してTBT代謝物質の占める割合が大きくなると考えられる。

不応期と成熟期における体内分布の比較

不応期に行った試験による雄および雌マミチョグの肝臓，生殖腺，消化管および「その他」におけるBCFは，それぞれ，8,400～10,000，8,300～9,000，5,700～6,400および9,100～9,200であった（Table 3）。一方，成熟期に行った試験によるこれらの値は780～1,300，220～1,500，1,100～1,300および700～2,200であり，不応期のBCFは成熟期の試験で得た値に比較して約4～40倍大きかった。これらの2回の試験は，マミチョグの大きさ，試験水温および飼育水中のTBT濃度等が異なる試験条件下で実施されており，これらの試験条件の差異はBCFを変化させる要因となると考えられる。特に，飼育水中濃度はBCFを変動させる主要な要因であり，その濃度が高いほどBCFが小さくなることが報告されている（山田，1999）。本研究では，成熟期における試験の飼育水中TBT濃度（1,100～1,400ng/L）は不応期の試験（110～120ng/L）に比べて約10倍高いために，成熟期マミチョグの組織・器官におけるTBTClのBCFは，不応期の試験に比較して小さくなったと考えられ，不応期と成熟期におけるBCFの差異は成熟に伴ったマミチョグの生理的変化に起因するものではないと推察される。

本研究で対象とした組織・器官におけるBCFは，不応期の試験では雌雄により大差なかった。一方，成熟期の試験では，消化管におけるBCFは雌雄による差が認められないが，肝臓および生殖腺におけるBCFは雄マミチョグにおいて，また，「その他」におけるBCFは雌マミチョグにおいて大きかった。特に，成熟期マミチョグの精巣にはTBTClが高濃度に蓄積され，BCFが卵巣に比較して7倍大きくなることが明らかであった。

TBTClを含有する飼育水で魚類を飼育すると，飼育水中TBTClは主として鰓を経由して吸収され，血液を通して魚体全体に移行する。肝臓における薬物代謝酵素の作用によりその一部分は代謝産物（TBT化合物の場合はMBTおよびDBT）に変換され，TBTClおよび代謝産物は血液を介して再循環する。TBTClは魚体内ではTBT^{+}として存在すると考えられており，また，血液中ではある種のタンパク質に結合した状態で溶存するとことが確認されている（大嶋ら，1998a; Oshima *et al.*, 1998b; Shimasaki *et al.*, 2002）。一方，生殖腺の成熟過程において精巣や卵巣において生殖腺の成熟に関与する特異な物質（タンパク質等）が合成されることが報告されている（Mochida *et al.*, 2002a; Mochida *et al.*, 2002b; Miura *et al.*, 2002; Andreassen *et al.*, 2002）。これらの生成された物質が，血液中のTBTータンパク質複合体あるいはTBTに対して強い親和性を有すると，血液中TBTの精巣への

Table 6. The concentrations of butyltin compounds and BCF in several tissues and organs of mummichog exposed to waterborn TBTCl

Tissue and organ	Experimental period(day)		Concentration in female(μg/g wet wt)				BCF of TBT	Concentration in male(μg/g wet wt)				BCF of TBT
			MBT	DBT	TBT	ΣBTs		MBT	DBT	TBT	ΣBTs	
Liver	Exposure	15	<0.02*1	0.09	0.40	0.49		0.11	<0.05	0.31	0.31	
		77	0.02	2.0	0.86	3.18	780	0.39	3.3	1.8	5.49	1300
	Elimination	91	0.65	3.7	0.55	4.90		0.52	4.4	1.3	6.22	
Gonad	Exposure	15	<0.05	<0.05	0.38	0.38		0.06	<0.05	0.29	0.29	
		77	<0.05	<0.05	0.24	0.24	220	0.12	0.23	2.1	2.45	1500
	Elimination	91	<0.05	0.08	0.24	0.32		<0.05	0.12	1.1	1.22	
Digestive tract	Exposure	15	0.07	<0.05	0.27	0.34		<0.05	<0.05	0.75	0.75	
		77	0.27	0.28	1.4	1.95	1300	0.15	0.37	1.6	2.12	1100
	Elimination	91	0.18	0.21	0.43	0.82		0.19	0.38	1.7	2.27	
Residue	Exposure	15	<0.05	<0.05	0.58	0.58		0.14	<0.05	0.22	0.36	
		77	0.06	0.23	2.4	2.69	2200	<0.05	0.15	1.0	1.15	700
	Elimination	91	<0.05	0.11	0.67	0.78		<0.05	0.16	1.7	1.86	

*1 The concentration below the detection limit was treated as zero in the calculation of ΣBTs

移行および高濃度蓄積が引き起こされると考えられる。今後，精巣の成熟過程で生成される物質とTBTの親和性および精巣におけるTBT化合物の存在状態等を詳細に検討することが，TBT化合物の精巣への蓄積および精巣の発達阻害の解明において重要である。

TBT化合物による精巣の発達阻害は卵巣に障害を引き起こす濃度に比較すると1/100の低濃度で引き起こされることが確認され（清水，木村，1992），TBT化合物の魚類生殖過程への影響は精巣に対して特に顕著であることが報告されている。飼育水中のTBT化合物が成熟期には精巣に高濃度に蓄積される本研究結果は，TBT化合物が精巣に対して特に著しい影響を及ぼすことを傍証する情報であるが，TBT化合物の精子形成等雄魚の生殖過程に対する影響と作用機構を詳細に検討することが今後の重要な課題であると考えられる。

謝　　辞

本研究は，水産庁事業「海産生物再生産影響評価技術開発事業」（平成12～14年度）によって行ったものであり，本研究の推進のためにご指導およびご助言を賜った検討委員会委員の先生方並びに瀬戸内海区水産研究所有馬郷司化学環境部長に深謝する。また，英文要旨の校閲を賜った高柳和史博士に深く感謝する。

文　　献

Andreassen T. K., Skjoedt K., Anglade I., Kah O., and Korsgaard B., 2003: Molecular cloning, characterisation, and tissue distribution of oestrogen receptor alpha in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen. Comp. Endocrinol.,* **132**, 356-368.

張野宏也，福島　実，1994: ブチルスズおよびフェニルスズ化合物の分析法「有害化学物質分析法指針（1994年版）」（環境庁環境保健部保健調査室監修）公害研究対策センター，東京，pp.219-232.

堀　英夫，立石晶浩，山田　久，2002: 閉鎖循環式試験装置を用いた長期飼育試験による有機スズ化合物のクルマエビへの生物濃縮．日水誌，**68**，37-45.

堀口敏宏，清水　誠，1992: Ⅳ．水生生物に対する影響，7．貝類及び他の水生生物，有機スズ汚染と水生生物影響（里見至弘，清水　誠編），恒星社厚生閣，東京，pp.86-135.

小山次朗，清水昭男，1992: Ⅳ．水生生物に対する影響，6．魚類．有機スズ汚染と水生生物影響（里見至弘，清水　誠編），恒星社厚生閣，東京，pp.86-98.

Miura C., Miura T., and Yamashita M., 2002: PCNA protein expression during spermatogenesis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zool. Sci.,* **19**, 87-91.

Mochida K., Matsubara T., Andoh T., Ura K., Adachi S., and Yamauchi K., 2002a: A novel seminal plasma glycoprotein of a teleost, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), contains a partial von Willebrad factor type D domain and a zona pellucida-like domain. *Mol. Reporod. Dev.,* **62**, 57-68.

Mochida K., Matsubara T., Kudo H., Andoh T., Ueda H., Adachi S., and Yamauchi K., 2002b: Molecular cloning and immunohistochemical localization of ubiquitin C-Terminal hydrolase expressed in testis of a teleost, the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. J. Exp. Zool.,* **293**, 368-383.

Oshima Y., Nirmala K., Go J., Yokota Y., and Koyama J., 1997: High accumulation of tributyltin in blood among the tissues of fish and applicability to environmental monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.,* **16**, 1515-1517.

大嶋雄治，Nirmala, K.，横田佳子，島崎洋平，郷　譲治，今田信良，本城凡夫，小林邦 男，1998a: トリブチルスズ（TBT）の魚類血液への蓄積とTBT-PCB複合汚染による産卵・ふ化への影響．環境毒性学会誌，**1**，26-35.

Oshima Y., Nirmala K., Yokota, Y., Go J., Shimasaki Y., Nakao M., Lee R. F., Imada N., Honjo T., and Kobayashi K., 1998b: High accumulation of tributyltin (TBT) in the blood of flounder and dab intraperitoneally administered with TBT. *Mar. Environ. Res.*, **46**, 587-590.

Shimasaki Y., Oshima Y., Yokota Y., Kitana T., Nakao M., Kawabata S., Imada N., and Honjo T., 2002: Purification and identification of a tributyltin-binding protein from serum of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus. Environ. Toxicol. Chem.,* **21**, 1229-1235.

清水昭男，1992: 第１章マミチョグによる慢性毒性試験法の開発，1．初期生活段階毒性試験法の開発，海産生物に及ぼす汚染物質の慢性影響評価手法の開発（研究成果332），農林水産技術会議編，pp.5-13.

清水昭男，木村関男，1992: 酸化トリブチルスズがアゴハゼの成熟と諸器官組織に及ぼす長期的影響．日水誌，**58**，1595-1602.

清水昭男，角埜　彰，1994:酸化トリブチルスズがマダ

イの各器官組織に及ぼす長期的影響．中央水研報，**6**，47-55.

Shimizu A., 1997: Reproductive cycles in a reared strain of the mummichog, a daily spawner. *J. Fish Biol.,* **51**, 724-737.

高見勝重，奥村為男，山崎裕康，中本雅雄，1987: ガスクロマトグラフィーによる魚介類 中のトリフェニルスズ及びトリブチルスズ化合物の定量．分析化学，**37**，449-455.

山田　久，1992: Ⅳ．水生生物に対する影響，8．生物濃縮．有機スズ汚染と水生生物影響（里見至弘，清水誠編），恒星社厚生閣，東京，pp.136-153.

Yamada H. and Takayanagi H., 1992: Bio-concentration and elimination of bis (tributyltin) oxide (TBTO) and triphenyltin chloride (TPTC) in several marine fish species. *Water Res.*, **26**, 1589-1595.

山田　久，1999: 有機スズ化合物の海域環境における挙動と魚類による生物濃縮に関する研究．瀬戸内水研報，**1**，97-162.

Wester P. W., Canton J. H., Van Iersel A. A. J., Krejnc E. I., and Vaessen H. A. M. G., 1990: The toxicity of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) and di-n-butyltinchloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). *Aquatic toxicology*, **16**, 53-72.

塩化トリブチルスズ（TBTCl）の組織器官への生物濃縮の成熟に伴った変化

堀　英夫（日本冷凍食品検査協会）
角埜　彰・池田久美子・山田　久
（瀬戸内海区水産研究所）

塩化トリブチルスズ化合物のマミチョグ（*Fundulus heteroclitus*）の全魚体及び各器官への生物濃縮や排泄の性及び成熟過程による変動が長期間の飼育実験により調べられた。不応期における全魚体の生物濃縮係数（BCF）は雄で9,100，また，雌で9,200であり，BCF及び体内分布ともにマミチョグの性による差は認められなかった。一方，TBTClは成熟期マミチョグの精巣に卵巣中濃度の約７倍もの高濃度に蓄積され，TBTClが精巣の発達過程を著しく阻害することが生物濃縮の観点からも示唆された。

No. 11, 1-10 (2004)