

シロアリ駆除剤(クロルピリフォス)及び前駆物質の焼却処理による熱反応生成物のメダカへの生物毒性影響に関する研究

半野勝正, 尾田正二¹⁾, 中野武²⁾, 三谷啓志¹⁾, 吉澤 正

(¹⁾東京大学大学院, ²⁾大阪大学大学院)

1. はじめに

クロルピリフォスは、シロアリ駆除剤として日本家屋に多く使用されており、廃屋木材は焼却処理され埋立処分されている。しかしながら、クロルピリフォス及びその前駆物質である 3,5,6-トリクロロ-2-ピリジノール(ピリジノール)の熱反応生成物がダイオキシン類類似体(2,3,7,8-TCDD ピリジン類似体)となるという報告があり¹⁾、千葉県内の焼却場においても廃屋木材の焼却によりダイオキシン類類似体が合成され、ヒト及び生物への影響が懸念される。そこで、クロルピリフォス及びピリジノールの熱反応生成物(図1)の生物毒性影響についての評価を試みた。

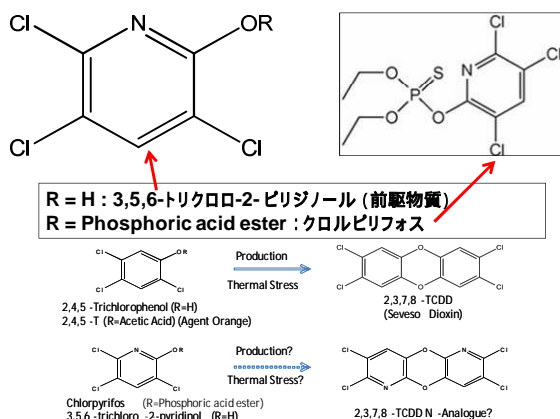


図1 クロルピリフォスとピリジノールの構造式とダイオキシン類類似体の合成反応

2. 試料及び実験方法

2.1 試験液の調製

クロルピリフォス(2mg)と 3,5,6-トリクロロ-2-ピリジノール(8mg)をそれぞれアンプルに封入し、300、340、380 の温度で10分間反応させた。アンプルの内容物を1.5mLのトルエン溶液にして、150μLをバイアルに分取し、乾固させて、DMSO(ジメチルスルホキシド)60μLで再溶解させ、

保存用標準液とした(バイアル当たりのクロルピリフォス; 0.2mg, ピリジノール; 0.8mg)。

2.2 メダカ卵と曝露方法

試験魚として、東京大学大学院で飼育されているヒメダカを使用した。初期発生で自然に起こりうる発生異常を起こした個体を取り除くために、採卵から24時間経過したStage 17-18のメダカ初期胚を曝露試験に用いた。化学物質曝露試験は、曝露する化学物質毎に96ウェルプレート1枚を使い、各ウェルに試験液を200μLずつ注入しメダカ試験胚を1個/ウェルずつ浸漬曝露させ、その後のメダカ胚の発育状況を観察した。曝露時間はいずれも48時間とした。

2.3 全RNA抽出とリアルタイムPCR

熱分解生成物試験液に曝露させたメダカ胚を蒸留水でよく洗浄した後、全RNAをISOGEN(ニッポンジーン)で抽出し、RNeasy MinElute Cleanup Kit(キアゲン)で精製、ReverTraAce-α(東洋紡)を用いてcDNAを合成した。その後、ダイオキシン類及び重金属類に特異的に発現することを確認している20個の遺伝子(バイオマーカー遺伝子)について、SYBR®PremixExTaq(TaKaRa, Otsu, Japan)及びSmart Cycler® system(Cepheid, CA, USA)を用いて定量的リアルタイムPCRにより定量を試みた。分析条件は、95 10秒で初期変性後、95 5秒、60 20秒のサイクルを45サイクル行った。これらの実験は3回以上の繰り返しで再現性を確かめた。

2.4 統計処理

リアルタイムPCRの解析結果の統計処理には、統計解析環境 R (<http://www.R-project.org/>)のStudent's t-testを使用した。

表1 クロルピリフォス及び前駆物質の熱分解生成物曝露による環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導

No.	Group	gene	Pri_BL	p	Pri_300	p	Pri_340	p	Pri_380	p	2378T4CDD	p	Chl_300	p	Chl_340	p	Chl_380	p
1	1	CYP1A1	0.9	NS	3.4	***	6.6	***	312.2	***	327.6	***	0.7	NS	1.4	NS	0.5	**
2		UDPGT	1.2	*	2.2	***	0.9	NS	2.0	***	1.1	NS	1.4	**	2.2	***	1.4	*
3		AhR1b-1	0.6	**	1.0	NS	0.5	***	0.7	***	1.2	*	0.9	NS	1.1	NS	0.7	**
4		AhR2a	0.8	*	1.1	NS	0.9	NS	1.5	***	2.9	***	2.6	***	1.4	**	0.9	*
5		AhRR	0.6	***	0.9	*	0.8	*	2.2	***	3.0	***	0.9	NS	0.9	NS	0.5	***
6		ER-b	0.7	**	1.5	**	0.8	*	1.1	***	1.5	**	1.1	NS	1.4	**	0.8	*
7	2	CACHD1	1.7	***	2.2	***	1.8	***	2.3	***	0.9	NS	2.6	***	1.9	***	1.1	NS
8		RAR-a	0.8	*	1.1	NS	1.2	*	1.4	**	1.2	*	1.5	**	1.6	***	0.9	NS
9		ER-a	1.0	NS	1.1	NS	1.3	*	1.6	***	1.0	NS	1.3	**	1.1	NS	0.8	**
10		VEGF-R	0.8	*	0.9	*	0.8	*	1.0	NS	1.7	***	0.7	*	0.8	*	0.7	**
11	3	AGXT	0.9	NS	1.4	**	1.1	NS	1.3	*	1.9	***	1.7	***	1.7	***	1.4	**
12		MTF1	1.0	NS	1.3	**	1.1	NS	1.3	**	1.5	***	1.2	**	1.2	*	0.9	NS
13		Tropomyosin	1.4	**	2.4	***	1.3	*	1.9	**	1.3	**	1.5	**	1.7	***	0.6	**
14		HS P90	0.7	**	0.7	***	0.5	***	0.7	***	0.8	*	0.6	**	0.6	***	0.3	***
15	4	TBP	0.7	**	1.0	NS	0.6	**	0.8	*	1.2	*	0.8	NS	0.9	*	0.7	**
16		TNF-R	1.0	NS	1.5	***	1.0	NS	1.3	**	1.5	***	1.3	**	1.5	***	1.2	*
17		CDC37	0.9	NS	1.3	**	0.7	**	1.3	**	1.2	*	1.0	NS	1.2	*	0.9	*
18		HS P70	0.4	***	0.5	***	0.4	***	0.5	***	1.0	NS	0.6	**	0.4	***	0.3	***
19		MT	0.2	***	0.3	***	0.1	***	0.4	***	0.6	**	0.2	***	0.4	***	0.2	***
20		Ependymin1	0.9	NS	1.3	*	0.7	**	1.3	**	1.9	***	1.0	NS	1.2	*	0.9	*

(注) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, NS; not signification (p>0.05)

Pri; ピリジノール, Chl; クロルピリフォス, Pri_300; ピリジノールの300 熱分解生成物

3. 結果及び考察

クロルピリフォス及びその前駆物質(ピリジノール)を300, 340, 380で反応させた場合の生成物の生物毒性について、環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導(相対発現誘導量)と有意水準からみた結果を表1にまとめた。環境水バイオマーカー遺伝子²⁾のメダカ胚細胞内での主な機能を調べたところ、以下の4グループに分類された。Group 1; 解毒・異物代謝, Group 2; 血管形成・細胞増殖, Group 3; 恒常性制御・筋収縮制御, Group 4; 炎症防御・アポトーシス誘導である。これらの遺伝子群の中で t-検定で有意水準 0.1% かつコントロールに比べて2倍以上または1/2以下の特異的な発現変動を示す遺伝子について灰色で示す。Group 1は、解毒、異物代謝を司る遺伝子群である。特に、ダイオキシン類に対して特異的に発現誘導されるのが、CYP1A1である。ダイオキシン類に曝露したメダカ胚では、ほぼTEF(毒性等価係数)に比例した発現誘導量を示すことが明らかになっている²⁾。特にピリジノールは、高温での反応が進むとCYP1A1の発現誘導量が増加し、380で反応させた場合、ダイオキシン類で最も生物毒性の高い2,3,7,8-T4CDDとほぼ同様の発現誘導量を示した。その他、AhR2a, AhRRなども同様の傾向を示した。逆に、クロルピリフォスではこれらの遺伝子の発現誘導量の増加は認められな

かった。これらの結果は、クロルピリフォスは前駆物質であるピリジノールにリン酸エステルがついた化合物であるので、熱による反応過程でリン酸エステルが脱離しにくく、そのために、ピリジノールに比較してクロルピリフォスからの2,3,7,8-T4CDDピリジン類似体が合成されにくいと推測される。Group 4は、炎症防御・アポトーシス誘導に関係する遺伝子群である。特に、MT(metallothionein)は、金属類曝露に対して特異的に発現誘導する遺伝子である。ピリジノール及びクロルピリフォスは、ダイオキシン類以上に発現が特異的に抑制された。この結果から、これらの化学物質の生物毒性メカニズムは重金属類とは異なることが示唆された。

参考文献

- 1) Sakiyama T., Weber R., Bennisch P., Nakano T. Preliminary assessment of dioxin-like compounds in/from chlorpyrifos A potential precursor of the pyridine analogue of 2,3,7,8-TCDD. Organohalogen Compounds. 31, Dioxin 2011 (2011)
- 2) Hanno K., Oda S., Mitani H. Effects of dioxin isomers on induction of AhRs and CYP1A1 in early developmental stage embryos of medaka (Oryzias Latipes). Chemosphere, 78, pp. 830-839 (2010)