

有機塩素系農薬の生体内における代謝に関する研究

第 1 編

Liquid Scintillation Counterによる有機塩素農薬の

生体内分布に関する研究

岡山大学医学部平木内科 (指導: 平木 潔教授)

副 手 吉 岡 洋 子

(昭和49年8月13日受稿)

I. 緒 言

有機塩素系農薬はその優れた殺虫効果によって、昆虫媒介伝染病の予防、害虫駆除による農作物の増収など、人類に多大の貢献をしてきた。しかし一方でその強力な残効性と比較的安定な性質のために、これら農薬が破壊されずに自然界に残存し、食品として常時人体内に摂取、蓄積されつつあることが判明してきた。特に、有機塩素系農薬は、我が国においては使用されなくなった現在でも、土壌汚染、食品汚染など環境汚染という問題、人体蓄積あるいは慢性中毒症、更には発癌、催奇性などの多くの問題を残している。しかしこれらの問題に関しては、これまで殆んど研究されていないので、著者はこれら諸問題のうち、特にこれら薬剤の生体内での作用機序を解明するために、先ずマウスを用いて、Liquid Scintillation Counterによる、生体内でのこれらの薬物の時間的変動よりみた分布について検討し、興味ある新知見をも得たので報告する。

II. 実験材料及び実験方法

実験動物: 純系 ICR マウスで、生後4週の重量17~20gのものを使用した。

実験に使用した核種: ^{14}C -DDT [Phenyl-ring-C 14(u)]; code CFA 226 Batch 20 Specific Activity 67 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (The Radiochemical Centre Amersham), ^{14}C -Dieldrin; code CFA 210 Batch 15 Specific Activity 168 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (The Radiochemical Centre Amersham) を用いた。

その他の材料及び器具

- Ethyl-Ether $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ (和光製薬)
- 9% NaCl
- Benzoyl-Peroxide 飽和トルエン溶液 ($\text{C}_6\text{H}_6\text{CO}_2$)

O_2 (半井化学薬品株式会社)

- NCS (tissue solubilizer F 9440, 0.6N solution order No 190620 in toluene Amersham/Searle Corporation)
- Scintillation Solvent
PPO (Packard Instrument Company)
POPOP (Packard Instrument Company)
Toluene $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (石津製薬)
- Liquid Scintillation Counter (島津)
- 超音波 4251 S型振動子 (海上電機株式会社)

実験方法:

純系 ICR マウスに ^{14}C -DDT を 2 μCi (29.9 γ) ずつ Corn oil にとかけて経口的に投与した。その後経時的にエーテル麻酔のもとにマウスを脱血させた後、主要臓器 (肝、腎、心、脳、肺、脾、大網の脂肪組織) を取り出して、それぞれの全量を秤量後、これら各臓器の4倍量の9%生理食水を加えた後、超音波で、250mA, 5分間平均homogenizeした後、その80mgを秤量し、Scintillation用バイアルびんに入れて、Benzoyl-Peroxide 飽和トルエン溶液0.3 mlを加えてよく混和後、NCS 3 mlを加えて30分間40°Cで加温し、透明になった後、Scintillation Solvent 10cc (PPO 6g + POPOP 50mg/l Toluene) を入れて30分間冷却後、Liquid Scintillation Counter で ^{14}C 放射能を測定した。

又この実験において、 ^{14}C -DDT を投与する前に6日間もって Cold DDT (RI. をラベルしていない DDT) を 5 mg/kg 経口的に連続投与した後、 ^{14}C -DDT を 2 μCi (29.9 γ) 投与して、 ^{14}C -DDT の分布を測定し、cold-DDT 投与群と無投与群との比較検討を行なった。

又 ^{14}C -Dieldrin については、この 2 μCi (11.9 γ) をマウスに経口投与し、一定時間後に屠殺、各

臓器を取り出し、秤量した homogenize し、Benzenne にて抽出し、40℃で蒸発乾固してから Lipid Scintillation Counter で計測を行なった²⁾

核種の投与量は数回の予備実験により、Scintillation Counter の計測に必要な最少量として、決定した。この量は ¹⁴C-DDT ではマウス経口 LD₅₀, 300 mg/kg の約 1/200, ¹⁴C-Dieldrin ではマウス経口, LD₅₀, 38mg/kg の約 1/3 にあたり、薬剤量としても中毒症状をおこすことなく代謝過程の推測には適量と考えた。

III. 実験成績

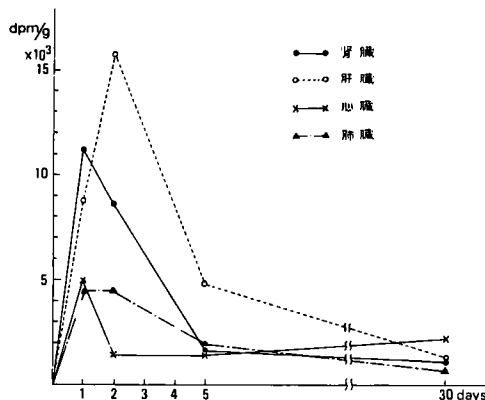
1) ¹⁴C-DDT の臓器分布

¹⁴C-DDT を 2 μ ci あてマウスに経口投与し、経時的に主要臓器 (肝, 腎, 心, 脳, 肺, 脾, 大網脂肪組織) に取り込まれた ¹⁴C 放射能を測定した。¹⁴C-DDT を投与後、24 時間, 48 時間, 5 日, 30 日後の各臓器の ¹⁴C を測定したが、各臓器ともほぼ一定の傾向がみられ、投与後 48 時間で最高値を示し、なかでも肝では急激な取り込みがみられた。(第 1 表, 第 1, 2 図) 即ち、肝においては 24 時間値 8787 dpm/g で、48 時間では 15848 dpm/g と上昇し、5 日目では 4614 dpm/g と、時間の経過と共に減少した。大網の脂肪組織における取り込みも肝と同様の傾向がみられたが、投与後 5 日目, 30 日目の残留量が多いのが特徴的であると共に、投与後 2 日目に最高値を示す臓器が多いのに比し、腎臓のみは投与後 24 時間で最高値を示し、以後漸減したことが特徴的であった。

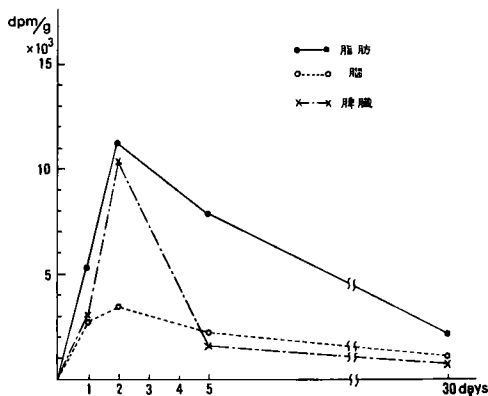
次に cold DDT 5mg/kg. を 6 日間連続経口投与しておいた群に ¹⁴C-DDT を先の実験と同量投与して、その ¹⁴C 放射能の分布を検討した。(第 3, 4 図, 第 2 表) この場合には、cold DDT を投与しない実験に比べて各組織に取り込まれた ¹⁴C 放射能の量が低

値であると共に、各臓器内 ¹⁴C-DDT 濃度は投与後 24 時間 (1 日目) が最高値を示し、以後漸減傾向がみられたことが非常に特徴的であった。即ち、肝への

第 1 図 ¹⁴C-DDT 無処置群の各臓器における残留 (その 1)



第 2 図 ¹⁴C-DDT 無処置群の各臓器における残留 (その 2)



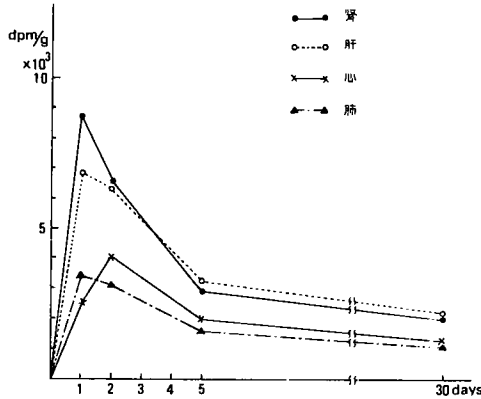
第 1 表 各臓器における DDT の残留
I) ¹⁴C-DDT 無処置群

臓器	例数	24 時間後	48 時間後	5 日後	30 日後
腎	6	11146 ± 4321	8583 ± 2653	1764 ± 198	1181 ± 94
肝	6	8787 ± 2583	15848 ± 4028	4614 ± 282	1491 ± 483
心	6	4921 ± 1407	1362 ± 471	1549 ± 299	2350 ± 1169
肺	6	4690 ± 1868	4571 ± 2776	1858 ± 126	813 ± 91
脂肪	6	5300 ± 2914	11330 ± 5839	7879 ± 1201	2112 ± 230
脳	6	2767 ± 718	3451 ± 1012	2205 ± 585	1151 ± 350
脾	6	2999 ± 1498	10534 ± 4739	1582 ± 261	908 ± 70

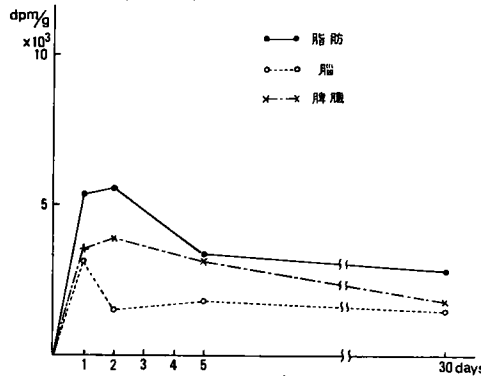
Mean ± SD, dpm/g

取り込みは無処置群の最高値は48時間後(2日目)の15848dpm/gであるのに比べて、前処置群では24時間後(1日目)の6809dpm/gと約43%にしかすぎず大網脂肪組織においても無処置群の11330dpm/gに比べて、前処置群では、5481dpm/gと約47%の含有量であった。

第3図 ^{14}C -DDT前処置群の各臓器における残留(その1)



第4図 ^{14}C -DDT前処置群の各臓器における残留(その2)



第2表 各臓器におけるDDTの残留
II) ^{14}C -DDT前処置群

臓器	例数	24時間後	48時間後	5日後	30日後
腎	6	8377 ± 1492	6527 ± 1063	2890 ± 303	1964 ± 582
肝	6	6809 ± 1751	6408 ± 583	3220 ± 270	2127 ± 618
心	6	2528 ± 230	4093 ± 1201	2036 ± 446	1303 ± 400
肺	6	3356 ± 352	3132 ± 156	1601 ± 340	1140 ± 242
脂肪	6	5287 ± 418	5481 ± 329	3274 ± 522	2756 ± 398
脳	6	3132 ± 1020	1501 ± 538	1801 ± 406	1495 ± 391
脾	6	3453 ± 871	3868 ± 561	3124 ± 834	1749 ± 101

Mean ± SD, dpm/g

この様に、各臓器における ^{14}C -DDTの取り込み量はcold DDT投与群では無処置群に比べて少なかったのであるが、投与後30日目における ^{14}C -DDTの残留濃度については、腎、肝、肺、脂肪、脳、脾臓と、心臓を除く他のすべての組織において無処置群に比べて多かったのも特徴の1つである。

又前処置群、無処置群のいずれにおいても投与後30日目における ^{14}C -DDTの残留量は、大網脂肪組織が一番多く含まれており、長期にわたって脂肪組織には残留する傾向が著明であった。

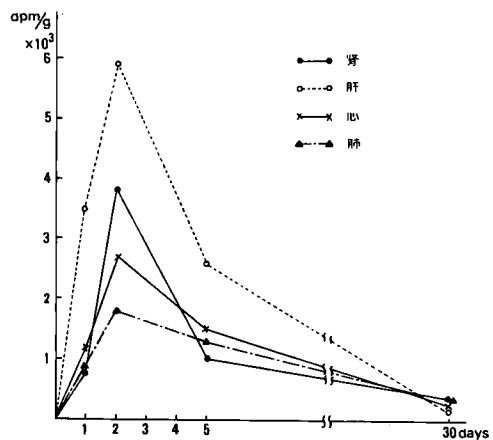
2) ^{14}C -Dieldrinの臓器分布

^{14}C -Dieldrin 2 μCi (11.92 γ)をcorn oil, にかして経口投与し、24時間、2日、5日、30日後の各臓器の ^{14}C 放射能を測定し検討した。

(第5, 6図, 第3表)

Dieldrinの場合も、DDTの場合とほぼ同様に、経口投与後48時間において各臓器の分布量が最高値に達した。投与後30日目においても、DDTの場合と同

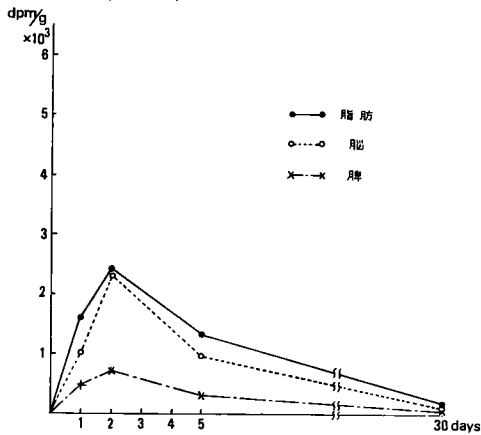
第5図 各臓器における ^{14}C -Dieldrinの残留(その1)



第3表 各臓器における¹⁴C-Dieldrinの残留

臓器	例数	24時間後	48時間後	5日後	30日後
腎	6	780±120	3820±1030	1000±200	350±60
肝	6	3500±980	5940±1210	2560±590	150±30
心	6	1180±290	2710±100	1450±290	260±40
肺	6	750±280	1810±520	1340±210	280±40
脂肪	6	1580±670	2440±840	1320±420	160±30
脳	6	1000±120	2260±430	960±100	75±10
脾	6	510±200	730±470	270±50	65±10

Mean ± SD, dpm/g

第6図 各臓器における¹⁴C-Dieldrinの残留
(その2)

様に各臓器への残留性が認められた。そしてDDTと異なった点は、腎における分布量がDDTでは24時間値が最高値を示したのに対し、Dieldrinにおいては48時間値が最高を示した。さらに投与後30日目の組織含有量は腎においては350 dpm/gと大網脂肪組織中の160 dpm/gより多く含まれていたことであった。

IV. 考 按

DDT, BHC, Dieldrinなどで代表される有機塩素化合物は化学的に安定しており、生体内での代謝分解もおそく、脂溶性であるために、食物連鎖などを通じて生物に濃縮されやすい。これらの物質は残留性に富み、毒性を示す中間化合物が集積することがしばしば認められている。従ってヒトの脂肪組織や鳥類の肝臓を分析してみると、DDT, BHC, Dieldrinなど多くの有機塩素化合物が、同時に検出されることが普通とされている⁷⁾。

一方土壌に散布されたこれらの農薬は十数年も残留するといわれており、野菜、穀物のみならず、牛

乳、魚肉の広範な汚染が指摘されている今日である⁸⁾。

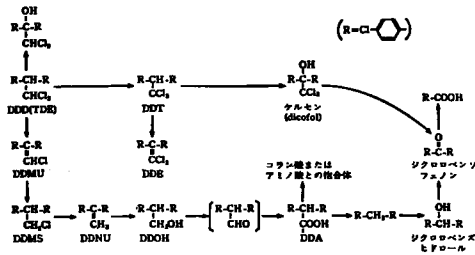
これらの残留性農薬の取り込みは、経口のみならず、吸入、経皮吸収されることが知られ、WHO及びFAO(食料農業機関)の農薬合同委員会においても微量毒性物質としてとりあげられ、人体一日摂取許容量(acceptable daily intake for man, ADI)が定められた⁹⁾。

しかしこれはその決定方式(多くの場合、動物実験における最大無作用量 maximum no effect level を基にし、十分と思われる安全係数から算出している。)からもわかるごとく、多分に便宜的なものであって、人体にとって全く安全無害であることを意味するものではない。実験動物と人間の感受性の相違、人間の中でもかなりの個体差があることを考えねばならず、いずれにしてもいまだ不明である作用機序の解明と共に、その生体内における代謝過程の推移を確認することは急務である。

著者はマウスを用い、これら有機塩素系農薬のうち、DDTとDieldrinの生体内各臓器内分布の推移をLiquid Scintillation Counterにて、測定検討した結果を述べることにする。

まずDDTについての検討であるが、DDTの生体内での代謝過程はなお不明な点が多いが、生体内では肝で比較的簡単にDDEとなる。この物質はDDTから塩酸一つが除かれたにすぎないものであり、大変安定な化合物であり、DDTと共に脂肪組織中に貯蔵されてしまっただけでこれ以上化学変化を受けない。D-DTは肝で、DDEのほかに塩素が一個とれたDDDとなり、これは血清中などにみられる主な中間代謝産物で、更に代謝されて最終的には、DDAとなり尿中に排泄される⁹⁾。即ち、DDTの代謝を図示すれば第7図の如くなる⁷⁾。摂取量と体内蓄積量が平衡している様な時には、摂取量の約20%が、DDAとして排泄

第7図 pp'-DDTの代謝経路



されるのであるが⁹⁾ そうでない場合には、摂取された DDT はそのまま又は DDE となって脂肪組織に蓄積されるのである⁹⁾ このことは Kazantzis らの、一般人では肝臓に含まれた全 DDT のうちの 81% が DDE であったのに対し、DDT 職業的従事者では DDE の占める割合は 41% にすぎなかったという⁹⁾ ことからもうなずける。

DDT 誘導体の人体蓄積の報告は Howell が 1948 年に報告¹⁰⁾ 以来、西本らの報告⁹⁾ もみられる。

著者の DDT の臓器残留についての検討では、経口投与で ¹⁴C-DDT を投与した場合には、よく吸収されて、Liquid Scintillation Counter による ¹⁴C 放射能の測定において、脂肪組織、肝を中心として、腎、脾、心、肺、脳と大部分の臓器に ¹⁴C-DDT の取り込みがみられ、無処置群では、経口投与後 48 時間で組織内 ¹⁴C 放射性物質の濃度は最高値に達し、以後漸減し、30 日後にもなお残留が各臓器に認められた。この成績は Backstrom ら¹¹⁾ の妊娠マウスを用いた ¹⁴C-DDT 筋注による実験成績とはほぼよく似た成績であるが、筋肉よりの吸収は不良であったという点で著者の経口投与と実験の方がすぐれていると考える。しかし、ラットを用いた Dale の実験¹²⁾ によれば、生後 100 日のラットに 150mg/kg の DDT を経口投与すると、投与後 2 時間では無症状に経過するが、3 時間後には、Tremor が出現し、その後この Tremor はさらに増強して、4.5 時間では強い Tremor に、5.5 時間では痙攣をおこすにいたる。症状の激しさと比例して脳への DDT 濃度は明らかに上昇を示す。しかし強い Tremor で死んだラットと痙攣を起こしたラットの脳内濃度に有意の差はなく、血中と腎においては軽い Tremor 出現まで上昇、肝に於ては強い Tremor が出現するまで DDT 濃度の上昇が、みられた。強い Tremor 又は痙攣、死に至る時にはもはや脳内 DDT 濃度の上昇はみられない。DDT 投与後 26 時間を経過すると、中毒症状は全くみられなくなり

血液、肝、腎における DDT 濃度は低下し、脳中の濃度も著しく減少して、逆に脂肪組織中の DDT の増量をみとめ、他組織から脂肪組織への移動がおこったものと考えられる。

次に cold DDT を 6 日間連続投与しておいた後に ¹⁴C-DDT を投与した実験では、各臓器に取り込まれた ¹⁴C-DDT の量は cold DDT を投与しなかった無処置群に比べて低値を示すと共に、投与後 24 時間で最高値に達したのであるが、この場合は、各組織に含まれる DDT の量がほぼ最高値に達していることを意味するものであり、経口投与により各臓器に送られると直ちに平衡状態 (plateau level) に達したものと考えられる。従って経口投与によって一応組織まで運ばれたであろう ¹⁴C-DDT も、組織に入ることができなかった ¹⁴C-DDT は、血中より尿中に急速に排泄されたものと考えられる。

DDT の残留蓄積は DDT が脂溶性であるためか、脂肪組織に多く認められるのであるが、他の臓器にもその脂質含量に応じて蓄積されるが、脳での蓄積量は脂質含量に比べて非常に近値であり、Morgan ら¹³⁾ の報告とよく一致する。

したがって著者の実験における脳中濃度の低いことは、時間的な差の結果であって、この観察的にはすでに一過性に急激に脳中に移行し、さらに他組織へと移動してしまっただめと考えられる。

有機塩素系農薬の中枢神経刺激作用の本態は未だあきらかではないが、以上の推測からすると、急性中毒神経症状はやはり脳に取り込まれた DDT 量と関係があると考えられる。

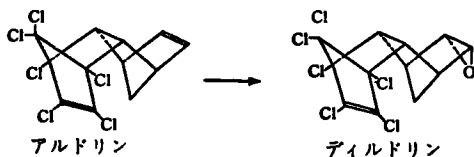
このように DDT による中毒症状のうち最も重要なものは中枢神経症状であるが、その症状出現は脳中に集まった DDT の直接作用の他に、DDT が神経終末の K, Na, Mg-ATP-ase の抑制を行い、イオン輸送の障害がおこるためともいわれ¹⁴⁾ 又、代謝活性の面からみた場合、少量の有機塩素殺虫剤でも持続的に暴露させると、その代謝系酵素が刺激されて肝などにおける代謝の変調がおこり、これが原因になるともいわれるが¹⁵⁾ いずれにしても、DDT の体内への蓄積、残留傾向が大きな原因となっていることは確実である。経口投与後の各臓器内濃度は 48 時間後に最高値を示し、以後減少して数ヶ月を経過してほとんど認められなくなり、生体外に排泄されることを示しているが、Stiff & Cartillo の実験¹⁶⁾ では一度に大量の DDT を経口投与した場合には、血中濃度は 2 時間ですでに平衡状態 (plateau level) に達

し、それ以後の上昇は極くわずかであり、Laugerら¹⁷⁾も同様の実験で臓器におけるDDTの濃度は2～5時間で最高値に達すると報告している。これら濃度推移の時間的差異はおそらく投与量の差であって著者が行った、あらかじめcold DDTを投与しておいておこなった実験結果でも同様の結果を得ていて、大量投与時にはいち早く飽和濃度に達するためであろうと考えられる。今回の著者の実験は、日常生活における汚染食品からの微量経口摂取の問題を対象としているので、大量投与を行なったのでは問題解決にならないが、微量でも反復摂取の可能性のあることを考えると非常に参考になる点がある。

DDTの一回投与よりも、くり返して投与した場合の方が脂肪組織への蓄積は、蓄積されやすいが、毎日一定量のDDTを投与すると、Hayesら¹⁸⁾の実験にみられる様に、脂肪組織の、DDTの蓄積はしばらくの間、平衡状態に達するまで上昇し、DDT投与量が増加すると、その平衡状態における濃度の上昇がみられ、結局排泄と摂取のバランスがDDT摂取量の上昇によってくずれるときには極めて危険な状態に陥ることが考えられる。

ところでDDTの毒性であるが、Hayes¹⁹⁾はDDT 2.5mg/kg/day投与で軽い病的状態を、6mg/kg/dayで痙攣をおこすといひ、菅谷²⁰⁾はDDTの人体投与実験で、皮下脂肪中の濃度が500ppmを越えても人体に悪影響はみられなかったと報告しており、一定しないが、Durhamら²¹⁾は米国の平均的食餌による、一日一人当たり摂取量は0.164mg (DDT), 0.083mg (DD-E)とし、Hayesら¹⁸⁾は0.5mg/kg/day (35mg/man/day), 18ヶ月投与実験で全く身体に異常ないといひJagerら²²⁾はDDT製造従事者でも一日摂取量3.6～18mg/dayと推定されるが、9～19年従事していても慢性疾患の発生率は一般人と差がないと述べている。これは著者の実験での投与量を換算すると、約1.5mg/kgとなり、これでも約3ヶ月で十分に体外に排泄が行なわれているから、生物による種族差を考慮してもこの程度の摂取ではなかなか生体への障害は出現しにくいものと考えられる。

第8図 アルドリン・ディルドリンの代謝



Dieldrinの代謝に関しては第8図に示す如くである。⁷⁾ Dieldrinはそのままの形で排泄されるが、日時が長く経過すると親水性代謝物に変じ、²³⁾尿中あるいは糞便中にはこの親水性代謝物が多く検出されるようになる。Dieldrinの代謝蓄積はDDTとは異なり、筋注した場合にも24時間ですべての臓器に吸収される。¹³⁾ Morgan¹³⁾によると、Dieldrinも脂肪組織に多く蓄積されるが、単位脂肪重量当りにすると、DDTより大分少ないといひ、著者の成績によく一致した。又、Morgan¹³⁾のDieldrinの非脂肪組織にもかなり蓄積されるという成績ともよく一致した。

著者の成績中注目すべきは、Dieldrin投与30日後の腎のDieldrin濃度が350 dpm/gで脂肪組織の160 dpm/gより多かったことであるが、これはBackström¹⁴⁾らも腎、膀胱中に多く排泄され、排泄機構がよく働いているとのべ、それらと一致する成績であると考えられる。Hunter²⁴⁾は英国人の一日一人当たりDieldrin摂取量を0.0225mg程度と考えているが、この程度では著者の実験結果のように排泄機構がかなり速やかに働き、有害な作用は生じないと推測されるが、Hunter²⁵⁾のいうDieldrinの人体血中よりの半減期が369日(144～592日)とすれば、反復摂取する場合には血中レベルの上昇と障害の出現が考えられ、注意が必要であろう。血中濃度が0.2ppmになれば、痙攣がおこるともいわれている。²⁶⁾

これら有機塩素系農薬は、神経症状発現のほか、再生不良性貧血²⁷⁾や、白血病^{28),29)}発生の原因になるといふ報告もあり、動物実験で腫瘍誘発剤としての報告³⁰⁾もみられ、名和らの剖検例の検討でも¹¹⁾各臓器に有機塩素剤の残留毒性をみている点より、諸疾患の発病との相関にも関心がもたれるところである。

したがって今回の実験において、微量摂取ではかなり排泄機構の存在するを知り得たことは、今後のこれらの管理、コントロールに重要な意味をもつものと考えられる。

V. 結 論

有機塩素系農薬は強力な、残効性をもっているため、使用されなくなった現在でも、これら残留農薬による慢性中毒の可能性が重大な関心事である。そこでこれら薬剤の生体内での作用機序を解明するために、マウスを用いて、生体内でのこれら薬剤の時間的変動よりみた分布についてLiquid Scintillation Counterにより観察した。その結果、DDT, D-

ieldrinいずれの場合も、経口投与後24時間においてすべての臓器（肝、腎、心、肺、脾、脳、大網脂肪組織）に取り込まれ、特に肝、脂肪組織に著明で、ひきつづき各臓器における取り込みは増加し、48時間後においてこれら各臓器への取り込みは最高値に達し、以後時間の経過と共に漸減傾向がみられたが、投与後30日目においてさえ、これら薬剤の一部は多くの臓器（肝、腎、心、肺、脾、脳、大網脂肪組織）に残留し、なかでも脂肪組織には特にその傾向が著明であった。このように一旦生体内に取り込まれた

薬剤は非常に長期に亘り体内に残留することが認められる。以上の結果より、これら薬剤のひきおこす慢性毒性には十分なる配慮が必要であると痛感される。

稿を終るにあたり、御指導御校閲いただきました恩師平木潔教授ならびに直接御指導を賜りました岩崎一郎助教授、名和英明博士、原昭則先生に感謝致します。

尚、参考文献は第二編の終りに一括掲載する。

Studies on organo-chlorine pesticides Metabolism in animal tissues.

By

Yoko Yoshioka

Department of Internal Medicine, Okayama University
Medical school

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

PART I

The distribution of organo-chlorine pesticides in mice using a liquid scintillation counter

The first part of this paper is concerned with the distribution of organo-chlorine pesticides in mice using a liquid scintillation counter, and an attempt was made to make clear its mode of action.

¹⁴C-DDT and ¹⁴C-Dieldrin were given orally to mice.

It was found that after 24 hours, both compounds were taken up by all tissues examined (liver, kidneys, heart, lungs, spleen, brain, with high concentrations in fat tissues).

Their concentrations gradually increased, reaching the peak levels after 48 hours and thereafter gradually decreased, but even after 30 day a small amount of these compounds was still detectable in most organs, especially in fat tissues.

Since these compounds once deposited in tissues, remain unexcreted for a long period of time, much attention should be paid to prevent their chronic intoxication.