

令和7年度産業保安等調査研究事業

(化学物質規制対策 (大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業))

経口暴露による化学物質の魚体内動態と

取込経路組織由来の代謝酵素画分による *in vitro* 分解との相関

調査報告書

令和8年2月

国立大学法人 鹿児島大学

目次

1. 背景と目的.....	1
2. 方法.....	2
2.1. 対象物質.....	2
2.2. 試験魚.....	2
2.3. 暴露用餌料の調製.....	3
2.4. 餌料中濃度分析.....	3
2.5. 生経口物蓄積性試験.....	4
2.6. 魚体中濃度分析.....	4
2.7. 生物濃縮係数の算出.....	4
2.9. S9 画分の調製.....	5
2.9.1. ニジマス肝臓由来 S9 画分の調製.....	5
2.9.2. ニジマス腸管由来 S9 画分の調製.....	5
2.9.3. コイ肝臓由来 S9 画分の調製.....	6
2.10. S9 画分の品質評価.....	6
2.10.1. タンパク質含量の測定.....	6
2.10.2. EROD 活性の測定.....	6
2.10.3. SDS-PAGE による含有タンパク質パターン解析.....	7
2.11. S9 画分による <i>in vitro</i> 分解試験.....	7
2.12. 生物蓄積試験における CYP1A 遺伝子の発現解析.....	9
2.13. コイの S9 画分における CYP1A 誘導試験.....	9
3. 結果と考察.....	10
3.1. 17 β -エストラジオールの生物蓄積性試験結果.....	10
3.2. ニジマス組織由来 S9 画分の評価結果.....	11
3.3. ニジマス肝臓由来 S9 画分の <i>in vitro</i> 分解試験結果.....	12
3.4. S9 画分による減衰・分解速度と BCF 及び BMF との関連性の検証結果.....	14

3.5. ニジマス腸管由来 S9 画分による <i>in vitro</i> 分解試験結果	16
3.6. コイ肝臓由来 S9 画分による <i>in vitro</i> 分解試験と CYP1A 誘導コイ肝臓の SDS-PAGE によるバンドの比較.....	17
3.7. コイの各組織における CYP1A 遺伝子の発現比較	18
3.8. 経口暴露後の肝臓及び腸管における CYP1A 遺伝子発現の経時的変化.....	18
4. 今後の課題.....	19
5. 人材育成.....	20
6. 業務実施体制.....	21
7. 参考文献.....	22

1. 背景と目的

魚類に対する化学物質濃縮試験は、多数の魚を必要とするが、近年、関心が高い動物愛護の観点から考えると、近い将来、実験魚を用いない試験法確立とそれによる評価が我が国でも求められると考えられる。そのため、将来を見据えたデータ構築と準備が必要である。コンパートメントモデルによる化学物質濃縮評価は、水中や餌中の化学物質の生物への取込と排泄の差に基づいて蓄積の大小が決定されるが、本モデルにおいてはその蓄積性は生物の化学物質排出能力に依存する。よって、化学物質の蓄積性は生物からの排泄速度と、排泄に寄与する薬物代謝能を把握すれば、ある程度把握できる可能性が高い。実際、欧州では蓄積性を判断する上で、魚類肝臓やミクロソーム由来で薬物代謝酵素を多く含む S9 画分により、化合物の *in vitro* 分解速度を予測モデルに組み込む方法が提案されている。一方、実際の魚体内の物質動態は複雑であり、単純に *in vitro* 化学物質分解のパターンと一致するかどうかは明らかではない。化学物質の生体内変化は物質依存的であるが、魚体中の化学物質の代謝、排泄に関するデータは限定的である。また、S9 画分による *in vitro* での物質分解と、実際に化学物質暴露された魚体生体内での蓄積から排泄までの動態が、どの程度一致するのかという見解も少ない。そのため、例えば化審法などの蓄積評価で直ちに *in vitro* 試験に移行したとしても、実生物体内の物質動態をどの程度外挿できるか、判断が難しいのが現状であろう。そのため、現在、*in vitro* 分解試験法の精度や信頼性において未知な部分が多い、実生物の取込・排泄・蓄積との関係性や、経鰓・経口取込時の排泄と S9 分解能の関係、*in vitro* における複数魚種から得た S9 の化学物質分解能の種間差、などを検討すれば、今後求められる非生物試験による蓄積評価法を確立する上で有用なデータを得られると考えられる。

そこで本研究では生物を用いない化学物質の蓄積評価試験の確立に寄与するデータを構築することを最終目標とした。令和 8 年度は、魚肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解速度と経口・経鰓生物蓄積試験から得られた BCF 及び BMF の値との関連性を調べ、実際どの程度実装できるかを検証した。また、*in vitro* 分解試験を行うにあたり、実装した際にどのような問題点が挙がるのかを検討した。

2. 方法

2.1. 対象物質

S9 画分による *in vitro* 分解試験では、コイやニジマスで生物蓄積性の異なる化学物質として、17 β -エストラジオール、ベンゾ[a]アントラセン、ピレン、ベンチオカーブ、フェナントレン、*o*-テルフェニル、ペンタクロロベンゼンを供試した (図 1)。このうち、経口生物蓄積性試験には 17 β -エストラジオールを供試した。

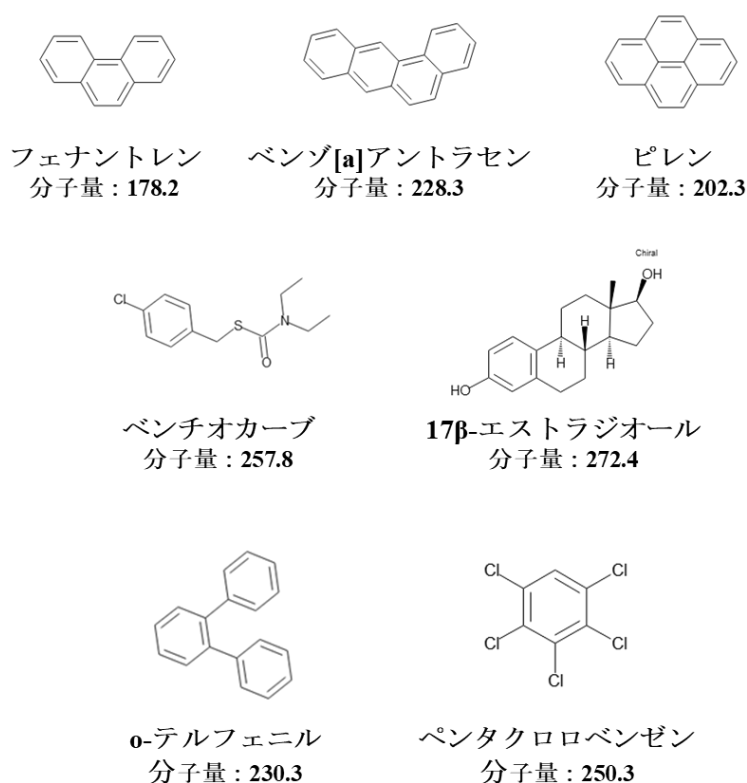


図 1 本研究における対象物質

2.2. 試験魚

本研究で用いるコイ (*Cyprinus carpio*) は、山口県下関市にある国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校から当歳魚、及び二歳魚を供与して頂いた。馴致のため、コイを実験室内の 200 L ポリカーボネート製タンク内に収容し、飼育した。

S9 画分を分画・調製用のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) は、富永養殖場より購入した。200L ポリカーボネート製タンク内に 50 尾程度を収容し、S9 画分の分画作業まで、16-17°C で 2 週間程度、馴致・飼育した。なお、馴致期間中は無給餌で飼育した。

2.3. 暴露用餌料の調製

17 β -エストラジオールをジエチルエーテルに溶解し、餌料中の終濃度が 10 $\mu\text{g/g}$ 、或いは 100 $\mu\text{g/g}$ となるようにコイ用餌料（フィード・ワン株式会社）と混合した。対照区の餌料は、ジエチルエーテルのみをコイ用餌料と混合した。その後、ドラフト内で 2 日間乾燥した。調製した餌料は、使用するまで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2.4. 餌料中濃度分析

17 β -エストラジオールの濃度分析では高濃度区と低濃度区の餌は、希釈のために各濃度が 333 ng/g になるように石英砂を量り取り、乳鉢で混ぜ合わせた。対照区の餌は曝露区と同様の比率になるように、餌と石英砂を同様の方法で混ぜ合わせた。混ぜ合わせた餌を各 0.3 g 量り取り、メタノールを 20 mL 加えて、15 分間超音波照射抽出した。遠心分離

(2000 rpm, 10 min., 4 $^{\circ}\text{C}$) を行ったのちメタノール層を採取した。同条件で 2 度目の抽出を行い、先のメタノール層と足し合わせた。このメタノール溶液に 3 mL の超純水とヘキサンを 20 mL 加えて、1 分間手で振とうし、遠心分離 (2000 rpm, 5 min., 4 $^{\circ}\text{C}$) を行ったのち、ヘキサン層は除去した。ヘキサンによる洗浄を計 3 回行ったのち、メタノール溶液を分液ロートに移し、50 mL の 5%塩化ナトリウム溶液、0.2 mL の濃塩酸、及び 20 mL ジクロロメタンを入れて振とう機で 15 分振とう後、ジクロロメタン層を回収した。ジクロロメタンによる抽出を計 2 回を行い、各ジクロロメタン層を足し合わせた後、ロータリーエバポレーターで 0.5 mL まで濃縮するとともに、ヘキサンに置換した。3%含水フロリジルを詰めたガラスピペット（長さ 17 cm、内径 6 mm）をヘキサンで洗浄後、サンプルを添加し、50 mL のイソプロピルアルコール-ヘキサン（1 : 9）で目的物質を溶出した。この溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、窒素気流下で乾固させ、アセトニトリルを 0.2 mL に再溶解した。溶解させたものを蛍光検出器付 HPLC（FP-4025, 日本分光株式会社）で定量を行った。分析時の条件は、以下の通りとした。

カラム：株式会社島津製作所 Shim-pack Scepter C18-120,5 μm （長さ 100 mm、内径 4.6 mm）

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：A=メタノール、B=超純水（70 : 30, v/v）

流量：1.0 mL/min.

注入量：20 μL

蛍光検出：Ex277 nm, Em318 nm

2.9. S9 画分の調製

2.9.1. ニジマス肝臓由来 S9 画分の調製

鹿児島県内のニジマス養殖場から入手したニジマスから肝臓由来S9画分の調製を行った。ニジマス肝臓由来S9画分の調製は、OECD TG319B、及び令和6年度化学物質規制対策「大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業（化学物質の魚類中体内動態と代謝酵素分画による*in vitro* 分解との相関）」を参考にした。

- 1) ニジマスを氷冷麻酔したのち、体重、体長を計測した。
- 2) 氷冷した解剖台の上におき、排泄腔前方から鰓膜の付近までハサミで縦切開を行い、内臓を露出させるために胸鰭の後ろまで横方向に切開を行った。
- 3) 生殖腺の外部形態で雌雄判別を行い、記録した。本研究では、雄と判断されたもののみを用いた。消化系を摘出し、ハンクス氏液（0.35 mg/mL NaHCO₃, 2.3 mM EDTA, 10 mM HEPES含有HBSS）で肝門脈に25G或いは23Gの注射針を装着したシリンジを用いて肝臓を灌流した。
- 4) 脱血した肝臓を消化系より摘出し、シャーレ内に満たした上述のハンクス氏液で洗浄したのち、細胞破碎液（50 mM Tris-Cl, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25 M スクロース含有）を満たしたシャーレにストックした。なお、全ての作業は氷上で行った。
- 5) 肝臓重量を計測した後、ハサミで細断し、金網で濾したのち、ガラス製ホモジナイザーに移し、適量の細胞破碎液を加えてホモジナイズした。
- 6) 得られた肝臓ホモジネートをマイクロチューブに2 mLずつ分注し、遠心分離（13,000 ×g, 20 min., 4°C）した。
- 7) 表層の脂肪の層を除去した後、上清（S9）を50 mLチューブにプールし、混合した。混合したS9を1.8 mL凍結保存用チューブに0.5 mLずつ分注し、すぐに液体窒素で凍結した。凍結後、-80°C冷凍庫で保存した。

2.9.2. ニジマス腸管由来 S9 画分の調製

鹿児島県内のニジマス養殖場から入手したニジマスから腸管由来 S9 画分の調製を行った。調製は以下の通り行った。

- 1) ニジマスを氷冷麻酔したのち、体重、体調を計測した。
- 2) 氷冷した解剖台の上におき、排泄腔前方から鰓膜の付近までハサミで縦切開を行い、内臓を露出させるために胸鰭の後ろまで横方向に切開を行った。
- 3) 腸管を採材し、腸管外部に付着している脂肪や他組織を取り除いた。
- 4) 先端を丸く炙ったパスツールピペットで幽門より腸管に挿入し、0.5%FBS-HBSS で洗浄した。
- 5) 腸管をハサミで割いて内側を露出させ、EDTA-HBSS 中で4°C, 30 分間培養した。
- 6) EDTA-HBSS 中で、カバーガラスを用いて腸管上皮を削いで、0.5%FBS-HBSS に再懸濁

した。

- 7) 遠心分離 (1,000×g, 10 min, 4°C) 後、上清を抜いた。
- 8) ビーズショッカーでホモジネート (300 rpm, 3 min., 3 times) した。
- 9) 遠心分離 (13,000×g, 20 min, 4°C) 後、表面の脂質を除去後、上清 (S9 画分) を回収した後、使用まで-80°Cで保管した。

2.9.3. コイ肝臓由来 S9 画分の調製

コイ肝臓由来 S9 画分の調製は、ニジマス同様に OECD TG319B、及び平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」を参考した。

- 1) コイを氷冷麻酔したのち、体重、体長を計測した。
- 2) 25G或いは23Gの注射針を付けた注射筒に上述のハンクス氏液を入れ、背大動脈より全身脱血を行った。その際、鰓弓或いは心臓の一部を切除し、血液が流れるようにした。
- 3) 氷冷した解剖台の上におき、排泄腔から鰓膜の付近までハサミで縦切開を行い、内臓を露出させるために胸鰭の後ろまで横方向に切開を行った。
- 4) 消化系とともに肝臓を摘出し、肝臓のみをトリミングした。
- 5) 肝臓重量を計測した後、ハサミで細断し、金網で濾したのち、ガラス製ホモジナイザーに移し、適量の上述の細胞破碎液を加えてホモジナイズした。
- 6) 得られた肝臓ホモジネートをマイクロチューブに2 mLずつ分注し、遠心分離 (13,000 ×g, 20 min., 4°C) した。
- 7) 表層の脂肪の層を除去した後、上清 (S9) を50 mLチューブにプールし、混合した。混合したS9を1.8 mL凍結保存用チューブに0.5 mLずつ分注し、すぐに液体窒素で凍結した。凍結後、-80°C冷凍庫で保存した。

2.10. S9 画分の品質評価

2.10.1. タンパク質含量の測定

前節で得られた S9 画分について、品質の評価をするため、タンパク質含量を測定した。測定は BIORAD 社のブラッドフォードプロテインアッセイを用いて、プロトコルに従い測定した。

2.10.2. EROD 活性の測定

前節で得られた RT-S9 について水酸化酵素 (EROD) 活性を測定した。7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) 活性は Vehniäinen ら (2012) の方法に従い、以下の手順で測定した。

- 1) 96 蛍光測定プレートに S9 (10 倍希釈、100 倍希釈、測定用とブランクを 3 ウェルずつ) を 20 µL ずつ加えた。
- 2) 2.5 µM 7-Ethoxyresorufin を 20 µL 加えた。

- 3) 100 mM の HEPES (pH 7.8) を 140 μ L 加えた
- 4) 5 mM NADPH in 100 mM HEPES を 20 μ L を加え、コロナ電気株式会社製グレーティングマイクロプレートリーダー-SH-9500 を用いて Resorufin 蛍光強度 (Ex. 540 nm/De. 584 nm; every 60s for 5 min.) を測定した。

2.10.3. SDS-PAGE による含有タンパク質パターン解析

S9 画分に含有しているタンパク質の種類を予測するために SDS-PAGE を行った。2 μ g/ μ L に調製した S9 画分溶液と EzApply (アトー株式会社) を 1:1 で混合し、100°C で 10 分間インキュベートした。分離用ゲル (e-PAGEL E-T12.5L, アトー株式会社) に調製した S9 画分サンプルを 20 μ L アプライし、電気泳動 (250 V, 20 mA, 80 min.) した。泳動後、EzStain AQua (アトー株式会社) で Coomassie Brilliant Blue 染色した後、超純水で洗浄した。

2.11. S9 画分による *in vitro* 分解試験

各魚種から得られた S9 画分による *in vitro* 分解試験は OECD TG319B、及び平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」に準じて以下の通り実施した。

- 1) 100 mM リン酸カリウム二塩基緩衝液と 100 mM リン酸カリウム一塩基緩衝液を 88 : 12 (v/v) で混合し、リン酸緩衝液を調製した。
- 2) S9 画分をタンパク質含量が 2 mg/mL になるようにリン酸緩衝液で希釈した。5 mL の S9 希釈液にリン酸緩衝液で 250 mg/mL に調製したアラメチシン溶液を 500 μ L 加え、氷上で 15 分間プレインキュベートした。なお、コイ肝臓由来 S9 画分には終濃度 100 μ g/mL となるように大豆由来のトリプシンインヒビターを添加した。
- 3) それぞれリン酸緩衝液で調製した 20 mM NADPH 溶液、5 mM UDPGA 溶液、5 mM L-グルタチオン還元型溶液、1 mM PAPS 溶液を各 500 μ L ずつ加えて S9 反応溶液を作成した。
- 4) 静かに攪拌した後、190 μ L ずつ GC バイアル瓶に分注した。
- 5) 終濃度が 0.1 μ M となるように被試験物質を 20 μ L 添加し、ニジマス由来 S9 画分は 12°C、コイ由来 S9 画分は 25°C で、一定時間反応させた。
- 6) メタノール 2 mL を添加して反応を停止させた。
- 7) 以下の工程で前処理をしたのち、GC/MS を用いて定量した。

反応停止後の溶液を Milli-Q 水とヘキサンを各 3 mL と飽和する量の塩化ナトリウムを加えた遠沈管内で 1 分間振とう後、遠心分離 (2000 rpm, 5 min., 4°C) を行った。無水硫酸ナトリウムを充填した 9 インチガラス製パスツールピペットに、遠心分離後の上層を脱水カラムに添加し脱水した。その後、遠沈管にもう一度ヘキサン 3 mL を添加し、再度同じ工程を行なった。その後、総量が 25 mL となるまでヘキサンをカラムに通した。窒素吹付により 2 mL まで濃縮を行い、PAHs (ピレン、フェナントレン、ベ

ンゾ[a]アントラセン)、*o*-テルフェニル、及びペンタクロロベンゼンではヘキサンで洗淨した。3%含水シリカゲルを充填した9インチガラス製パスツールピペットにサンプルを添加した。その後、10 mLのヘキサンで一度溶出し、次いで10 mLの3%アセトン/ヘキサン (v/v) で溶出した。ベンチオカーブは3%含水フロリジルを充填した9インチガラス製パスツールピペットにサンプルを添加し、10 mLのヘキサンで一度溶出し、次いで10 mLの3%アセトン/ヘキサン (v/v) で溶出した。クリーンアップ後、内部標準物質 (ナフタレン-d8、アントラセン-d10) を添加した。窒素吹付で0.1 mL まで濃縮し、測定サンプルとした。17β-エストラジオールの抽出・精製は2.4.及び2.6.の手法に従い分析した。

PAHsと*o*-テルフェニルの分析時の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：280°C

イオン源温度：230°C

注入量：1 µL

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25µm)

昇温条件：80°C (1 分間保持) →20°C/min.で昇温→300°C (3 分間保持)

分析時間：15 分間

分析モード：SIM モード

ベンチオカーブの分析時の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：280°C

イオン源温度：230°C

注入量：1 µL

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm)

昇温条件：50°C (1 分間保持) →20°C/min. で昇温→300°C (3 分間保持)

分析時間：21 分間

分析モード：SIM モード

ペンタクロロベンゼンの分析時の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：250°C

イオン源温度：230°C

注入量：1 µL

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm)

昇温条件：50°C (1 分間保持) →20°C/min.で昇温→300°C (7.5 分間保持)

分析時間：18.5 分間

分析モード：SIM モード

- 8) 縦軸に対数変換した被試験物質濃度、横軸に時間 (min.) を取り、直線回帰を行い、その傾きを分解速度定数 (min⁻¹) として算出した。

2.12. 生物蓄積試験における CYP1A 遺伝子の発現解析

PAH 類を代謝する主な代謝酵素である CYP1A の経口暴露後における発現の経時的変化を解析した。6 種類の PAH 類（ピレン、ベンゾ[a]アントラセン、クリセン、ベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[b]フルオランテン、ジベンゾ[a, h]アントラセン）を各 10 µg/g となるように餌料を調製した。給餌は 0.01 g/BWg/day となるように一日二回行った。経口蓄積試験開始後、0, 1, 3, 7, 14 日目にサンプリングを行った。サンプリングは、鰓弓の一部を裁断後、ハンクス氏液を用いて背大動脈より灌流・脱血し、肝臓と腸管を採取した。各組織は ISOGEN（株式会社ニッポンジーン）中でホモジナイズを行い、使用まで -80°C で保存した。

Total RNA の抽出とゲノム DNA の除去は、ISOGEN 及び DNase1（株式会社ニッポンジーン）の取扱説明書に従い行った。逆転写反応は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を用いて、その取扱説明書に従って逆転写を行い、cDNA を合成した。リアルタイム PCR は、LightCycler®96 システム（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）で使用した。ハウスキーピング遺伝子である EF1α と CYP1A の特異プライマーは表 1 に示した。リアルタイム PCR の反応は、10 倍希釈した cDNA を 5 µL、SYBR Green リアルタイム PCR マスターミックス（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を 10 µL、そしてについて 200 nM のプライマーセットを含む 20 µL の混合物中で行った。リアルタイム PCR は初期段階 95°C で 3 分間、次いで 95°C で 10 秒間、60°C で 10 秒間を 50 サイクルで増幅した。発現レベルは比較 CT 法で算出した。

表 1 CYP1A 遺伝子発現解析用プライマー

論文投稿データにつき掲載不可

2.13. コイの S9 画分における CYP1A 誘導試験

コイの肝臓由来の S9 画分において、PAH 類を代謝する CYP1A をはじめ代謝酵素の有無を調べるため、CYP1A の誘導能が高いとされるベンゾ[a]アントラセンを腹腔内接種したコイから単離した S9 画分における SDS-PAGE バンドパターンによるタンパク質分析を行った。1 mg/mL となるようにコーンオイル（富士フイルム和光純薬株式会社）で調製したベンゾ[a]アントラセンを 2 歳魚のコイに 100 g 魚体重当たり 1 mL となるように左体側より腹腔内接種した。72 時間後、上述の 2.9.3. コイ肝臓由来 S9 画分の調製に従い、S9 画分を分画した。タンパク質分析は 2.10.3. SDS-PAGE による含有タンパク質パターン解析に従って行い、未処理区と比較した。

3. 結果と考察

3.1. 17β-エストラジオールの生物蓄積性試験結果

17β-エストラジオールの餌料中濃度は、低濃度区で 10.4 μg/g、高濃度区で 108 μg/g であった。17β-エストラジオールの暴露期間中の体内濃度の変動を図 2 に示した。低濃度区の試験開始後 0, 1, 3 日目の魚体中から 17β-エストラジオールは検出されなかった。その後、7 日目から検出され、14 日目から 28 日目に濃度変動が±20%以内だったので、定常状態と判断し平均を定常状態の平均魚体中被験物質濃度として BMF_{ss} を算出した。高濃度区では試験開始後 1 日目から魚体内から被験物質が検出され、3 日目から 28 日目において定常状態であると判断し、BMF_{ss} を算出した。17β-エストラジオールの平均魚体内濃度は、低濃度区では 22.7 ng/g-wet、高濃度区で 24.8 ng/g-wet であった。BMF は、低濃度区で 0.00218、高濃度区で 0.00023 であり、17β-エストラジオールは低蓄積性物質に分類された。また、本研究で対象とした物質について、これまで当研究室で得られた BCF・BMF、及び文献の情報を基に、コイの BCF を基準として蓄積性の分類を行った (表 2)。



図 2 17β-エストラジオールの魚体内濃度の変動

表2 本研究における対象物質の蓄積性の分類

蓄積性の分類	物質名	ニジマス	コイ	
		BCF	BCF _{ss}	BMF _{ss}
低蓄積性物質	エストラジオール	報告なし	報告なし	L: 0.00218 H: 0.00023
	ベンゾ [a]アントラセン	N.D.	N.D.	0.000026
	ピレン	827~964	59	0.0035
	ベンチオカーブ	N.D.	155	N.D.
	フェナントレン	630~1,760	271	L: 0.310 H: 0.036
中程度蓄積性物質 (検討が必要)	O-テルフェニル	12,000	1,204	0.037
高蓄積性物質	ペンタクロロベンゼン	20,000	74,000	0.12

3.2. ニジマス組織由来 S9 画分の評価結果

本年度ニジマス肝臓由来 S9 画分のタンパク質含量は、15.6~58.4 mg/mL であった。海外で販売されている KJ SCIENTIFIC 社製の RT-S9 市販品の製品提供時のタンパク質含量は 18~30 mg/mL であり、*in vitro* 分解試験に使用するにあたり十分なタンパク質含量であると考えられた。また、EROD 活性を測定したところ、0.53~1.28 pmol/min./mg protein であり、KJ SCIENTIFIC 社製の EROD 活性である 1.12~6.31 pmol/min./mg protein の下限値と概ね同等の値であった。一方、ピレンを対象とした *in vitro* 分解試験の結果、その減衰率は 13.6% であり、明確な分解が確認できなかった (図 3)。本年度ロットの EROD 活性は、SCIENTIFIC 社製の下限値に近く、添加した量のピレンを十分に分解することができなかったことに起因していると考えられる。このため本年度は令和 6 年度ロットのニジマス肝臓由来 S9 を用いて分解試験を進めていくこととした。

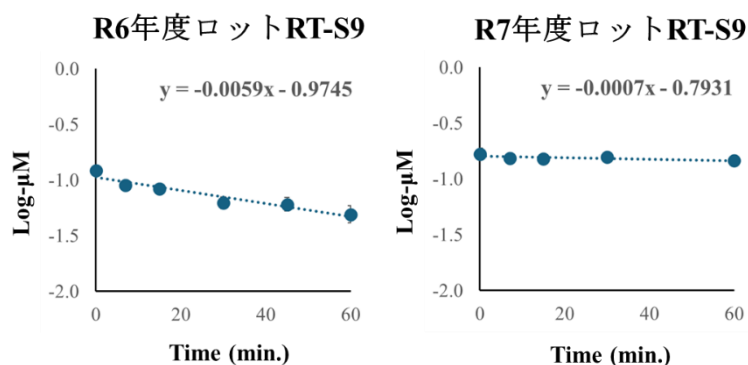


図3 S9 画分の *in vitro* 分解速度のロット間差

3.3. ニジマス肝臓由来 S9 画分の *in vitro* 分解試験結果

ニジマス肝臓由来 S9 画分による対象化学物質に対する *in vitro* 分解試験の結果を図 4 に示した。ニジマス肝臓由来 S9 画分による分解によって初期値より 30%以上の減衰率が確認できた対象化学物質は 7 種類中 4 種類であり、それぞれの減衰率はフェナントレンで 57.0%、ピレンで 77.7%、ベンゾ[a]アントラセンで 36.9%、ベンチオカーブで 86.6%であった。明確な減衰が確認できた対象物質の消失速度定数はそれぞれ、フェナントレンで 0.0061 min^{-1} 、ピレンで 0.0103 min^{-1} 、ベンゾ[a]アントラセンで 0.0026 min^{-1} 、ベンチオカーブで 0.0134 min^{-1} であった。昨年度と共通している化学物質の消失速度定数はそれぞれ、フェナントレンで 0.0085 min^{-1} 、ピレンで 0.0133 min^{-1} であり、その消失速度は本年度実施した試験の方が速かった。これは昨年度の初期濃度が 4 物質混合の合計 $1 \mu\text{M}$ (単物質当たり $0.25 \mu\text{M}$) に対して、本年度では初期濃度を $0.1 \mu\text{M}$ を採用したことに起因しているものと考えられる。これまでも初期濃度が低いほど消失速度が速いことが報告されているが、OECD TG319B では $1 \mu\text{M}$ 以下を推奨しているのみで、具体的な濃度は指定されていない。本研究では、全ての対象化学物質で検出可能な濃度として初期濃度を設定した。この濃度については、今後さらに詳細に検討していく必要があると考えられる。

エストラジオールと *o*-テルフェニルの減衰率はそれぞれ、4.2%と 4.5%であった。いずれも多少の分解は見られたが、20%未満の減衰率であり、明確な減衰を確認できなかった。また、ペンタクロロベンゼンにおいては全く分解が見られず、消失速度定数を算出することはできなかった。

論文投稿データにつき掲載不可

図4 ニジマス肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解速度

3.4. S9 画分による減衰・分解速度と BCF 及び BMF との関連性の検証結果

本研究で供試したペンタクロロベンゼンは、コイにおける BCF が 74,000、ニジマスにおける BCF が 20,000 であり、高蓄積性に分類される物質である (Inoue *et al.*, 2012)。また、コイにおける BMF も 1 を超えないものの、経口蓄積性の一つの目安となる 0.007 を大きく超える 0.12 である。一方、S9 画分による *in vitro* 分解試験の結果、物質の減衰は確認できなかった。これは、高蓄積性物質は S9 画分による代謝を受けづらく、減衰が見られなかったと考えられる。コイにおける BCF が 1,204 であり、化審法において検討が必要とされる中程度蓄積性物質に分類される *o*-テルフェニルも、S9 画分による *in vitro* 分解試験において明確な減衰が見られなかった。こちらもペンタクロロベンゼンと同様に S9 画分中の代謝酵素群では分解できないため、生体内においても代謝されず高蓄積性を示すと考えられる。

本研究で S9 画分による *in vitro* 分解試験によって明確な減衰が確認された化学物質は、ピレン、ベンゾ[a]アントラセン、ベンチオカーブ、フェナントレンであった。これらの化学物質のうちベンゾ[a]アントラセン以外は、コイにおける BCF が低蓄積性物質に分類される化学物質であった。これは、S9 画分による分解を受けやすい物質は生体内でも代謝されやすく、蓄積しにくい物質であることを示している。すなわち S9 画分による *in vitro* 分解試験の結果を生物蓄積試験の結果を反映している結果となった。経口蓄積しなかったベンゾ[a]アントラセンは分子量や化学物質構造のため経口取込されないと考えられる物質であるが、魚体内に入ったとしても速やかに分解されると考えられる。また、ベンゾ[a]アントラセンのコイの BMF において蓄積性は非常に低かったことから、S9 画分による分解試験はベンゾ[a]アントラセンの経口蓄積性も反映することができると考えられる。一方、S9 画分による *in vitro* 分解試験結果では明確な減衰が見られたフェナントレンでは、コイにおける BMF は 0.007 を超えており *in vitro* 分解との関連性を見出せなかった。フェナントレンのその他の PAH 類と比較して BMF 値が高い要因は十分に明らかではないが、主として腸管における取り込み速度が他の PAH 類と比較して効率的で速い可能性が示されている (de Gelder *et al.*, 2017)。また近年、フェナントレンは魚体内に取り込まれた後、血中アルブミンに結合することが報告されている (Rostamnezhad *et al.*, 2022)。R6 年度実施した本事業研究においても、経口取込が確認された 10 物質のうち、BCF ≤ 300 ではあるが、フェナントレンが最も高い BCF を示した。さらにニジマスとコイの BCF を比較するとニジマスの方が 2 倍以上高いが、これはコイの血中アルブミン濃度がおよそ 1.0 g/dL 以下であるのに対して、ニジマスは 1.0~2.4 g/dL と高く、そのため魚体内に取り込まれたフェナントレンは血中アルブミンに結合することによって魚体内蓄積性が高くなるのではないかと考えられる。この血中アルブミンにより代謝を受けにくい状況は、S9 画分による *in vitro* 分解試験において反応液中にアルブミンを添加することによって再現できると考えられる。

今回、最も低い蓄積性を示す物質として 17β-エストラジオールの経口暴露試験を実施し、BMF と *in vitro* 分解速度について比較した。その結果、BMF は 0.007 を大きく下回る値を示した。一方、*in vitro* 分解試験の結果、明確な減衰を確認することはできなかった。この

不一致に関していくつか要因が考えられる。一つ目は、17 β -エストラジオールを代謝する酵素の発現である。エストロゲンなどの性ホルモンは生体内では厳重に管理されている。すなわちそれらを代謝する酵素においても厳密に発現を管理されており、魚体の状態によってミクロソームあたりの代謝酵素量が変わることに起因している可能性である (Buhler *et al.*, 2000)。ニジマスの 17 β -エストラジオールを代謝する酵素は主として CYP3A27 とされているが、生体の状態によって大きく異なるとされている。すなわち今回供試した S9 画分の試験魚ロットの相対的な酵素量が少なかったのではないかと考えられる。もう一つは分析法に関わる点である。本研究では 17 β -エストラジオールのみ HPLC を用いて分析を行ったが、CYP 代謝後の水酸化物は親物質とピークを分けることが困難な場合があり、第I相の *in vitro* 分解を正しく評価できていない可能性もある。特に今回はニジマスの生育水温に合わせて 12°C であり第II相の相抱合反応が顕著に低下することで、第I相代謝物を測定してしまっている可能性もある。この分析技術の問題という可能性は低いと考えられるが、今後は第II相の相抱合反応まで十分に反応させるため、25-30°C ぐらいの温度で反応させる試験区の必要性がある。すなわち S9 画分による *in vitro* 分解試験ではその魚種の最適水温に合わせることはもちろん反応温度をいくつか振って実施することも検討する必要があると考えられる。

化審法において生物蓄積性評価について生物試験の必要性を問われる重要なステップとなるのが、蓄積性が高い化学物質の事前情報としてのスクリーニングである。本研究では少なくとも高蓄積性物質や要検討である中程度蓄積性物質である化学物質を S9 画分による *in vitro* 分解試験によって分類することができた。以上の結果より、S9 画分による *in vitro* 分解試験による化学物質の蓄積性の分類は、化審法の生物蓄積性評価においてファーストスクリーニングとして大変有用なツールであると考えられる。

3.5. ニジマス腸管由来 S9 画分の *in vitro* 分解試験結果

腸管由来 S9 画分のピレンに対して *in vitro* 分解試験を実施した。その結果、ピレンの分解は見られなかった (図 5A)。SDS-PAGE でタンパク質のバンドパターンを観察したところ、代謝酵素などを多く含む分子量域にバンドが見られず、タンパク質がほとんど含まれていないことが分かった (図 5B)。今回調製した腸管由来の S9 画分は、調製直後は粘性が少ないが、凍結解凍後では粘性が出てくるという特性があった。高濃度のタンパク質はお互いが絡み合い高粘性を生じることがある。本サンプルにおいてもこの凝集に代謝酵素画分が巻き込まれた可能性がある。また、詳細は後述するが、肝臓と比較すると腸管におけるピレンを代謝する酵素である CYP1A の通常の発現量が低いため、ピレンを分解するために必要な CYP1A が足りなかったことも考えられる。これらのことを解決すれば、腸管における S9 画分による *in vitro* 分解試験は可能であると考えられる。さらに各代謝酵素の含有を予測できる SDS-PAGE は、S9 画分の評価として有用であると考えられる。

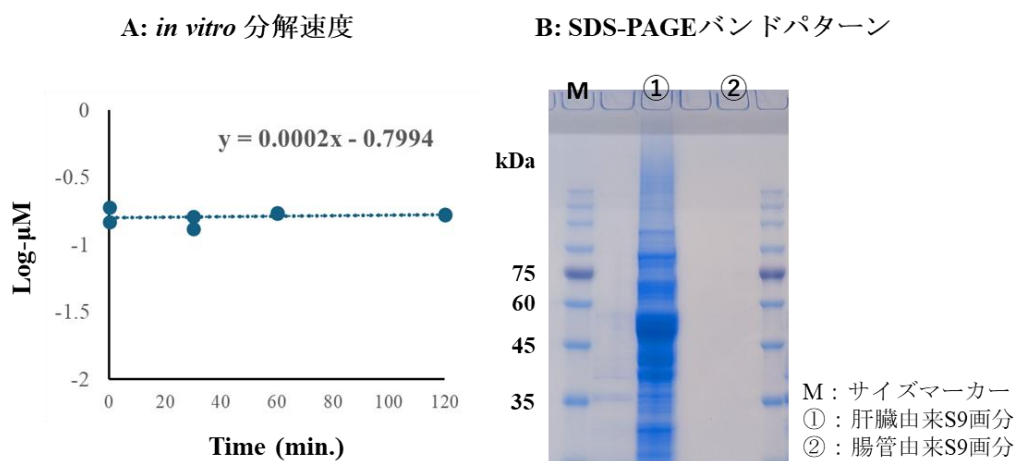


図 5 ニジマス腸管由来 S9 画分の *in vitro* 分解速度と SDS-PAGE バンドパターン

3.6. コイ肝臓由来S9画分による *in vitro* 分解試験と CYP1A 誘導コイ肝臓の SDS-PAGE によるバンドパターンの比較

コイ肝臓由来 S9 画分のタンパク質含量は 12 mg/mL であり、EROD 活性は 0.45 pmol/min./mg protein であり、非常に低い活性を示した。ピレンに対して *in vitro* 分解試験を実施した結果、ピレンの分解は見られなかった (図 5A)。コイの肝臓由来の S9 画分で *in vitro* 分解が確認できなかった理由を調べるため、CYP1A を誘導するベンゾ[a]アントラセンの腹腔内接種によって EROD 活性やタンパク質の発現が変化するかを調べた。EROD 活性は、2.78 pmol/min./mg protein であり、CYP1A の活性は上昇した。SDS-PAGE によるタンパク質分析の結果、未処理の S9 画分ではコイの CYP1A の予測分子量である 58 kDa 辺りにバンドが確認できなかった (図 5B)。これはコイの肝臓における CYP1A の発現が通常時は非常に少ないことを示している。これまでコイの肝臓由来 S9 画分はニジマスやブルーギル、ファットヘッドミノーなどと比較するとピレンの分解速度が遅いことが報告されているが、本研究結果はコイ肝臓の CYP1A の発現が他魚種より低いことに起因していると考えられる (Zercher *et al.*, 2024)。一方、誘導区ではバンドを確認することができたことから、通常肝臓における発現の低いコイの CYP1A も PAH 類の刺激により誘導されることが示された。コイの生物蓄積性試験において、多くの PAH 類は低蓄積性を示すが、経鰓や経口で PAH 類が魚体内に入った際にも CYP1A が誘導・代謝されることにより排泄されているのではないかと考えられる。

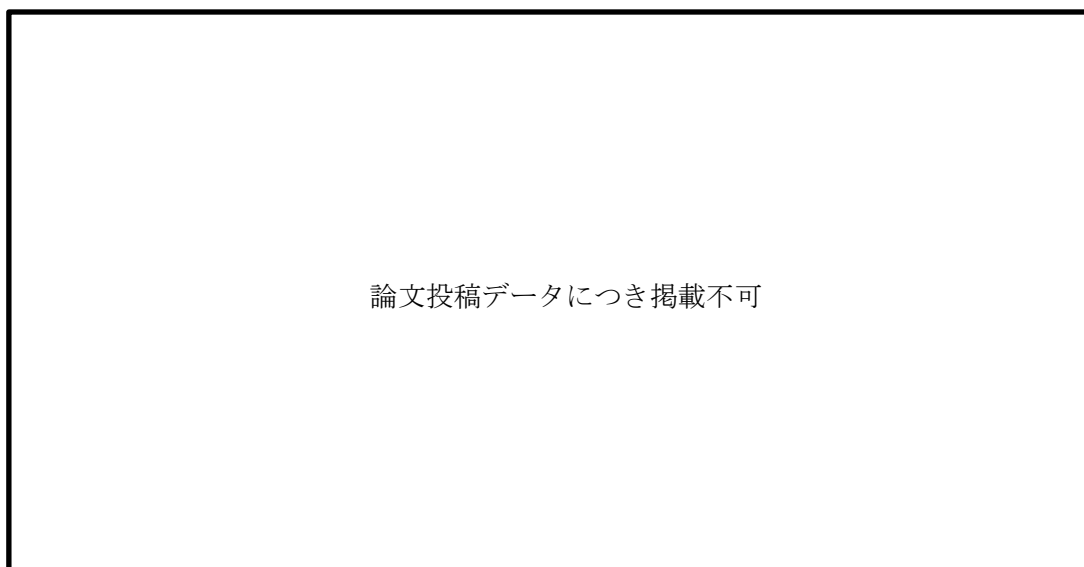


図 5 コイ肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解速度と CYP1A 誘導コイの SDS-PAGE によるバンドパターンの比較

3.7. コイの各組織における CYP1A 遺伝子の発現比較

コイの取込経路組織の CYP1A の発現を比較した (図 6)。その結果、肝臓に対して鰓では 0.6 倍、腸管では 0.3 倍 CYP1A の発現が低いことが明らかとなった。これは前述した SDS-PAGE の結果を反映している。また、ニジマスの腸管由来 S9 画分のピレンの分解が低いのも通常の腸管における CYP1A の発現が低いことに起因していると考えられる。

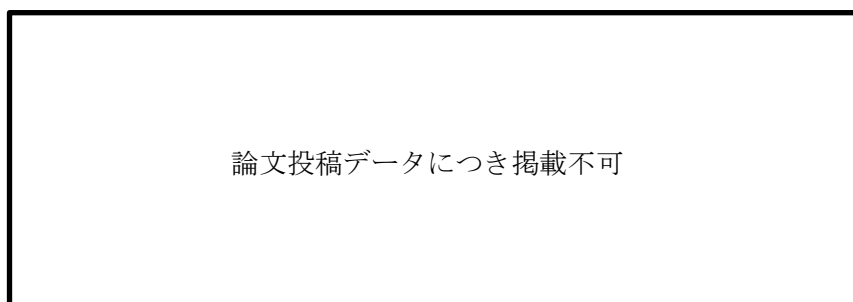


図 6 各組織における CYP1A の発現比較

3.8. 経口暴露後の肝臓及び腸管における CYP1A 遺伝子発現の経時的変化

PAH 類の経口蓄積試験の際、取込経路である腸管と代謝を主として司る肝臓における CYP1A がどのくらい増減するかを調べるため発現解析を行った。暴露開始後 1 日目に肝臓では 18 倍、腸管では 7 倍発現が増加した (図 7)。肝臓では 3 日に減少したが、生物蓄積が定常状態になる 7 日目や 14 日目には通常時の 2 倍程度の発現で安定した。また、腸管においても 7 日目及び 14 日目には通常時の 3 倍程度まで減少したことから、これで腸管における PAH 類の取込・接触が定常状態となったと考えられる。

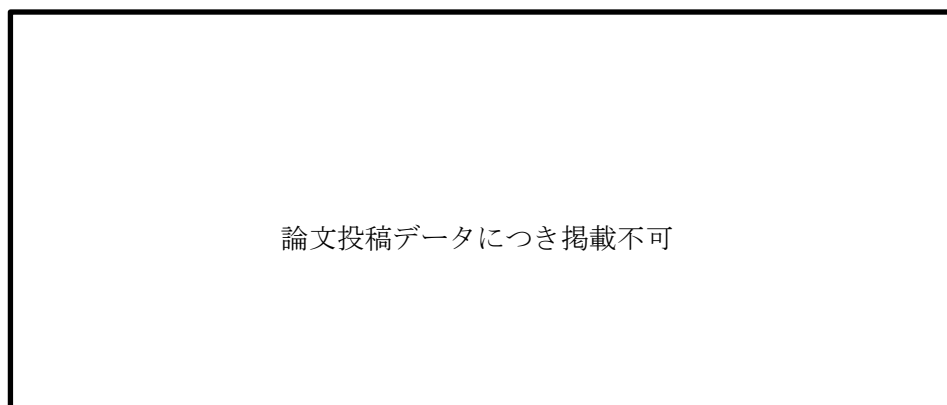


図 7 PAH 類経口暴露後の肝臓及び腸管における CYP1A 遺伝子発現の経時的変化

4. 今後の課題

本研究では将来の生物を用いない化学物質の蓄積評価試験の確立に寄与するデータを構築することを目的とし、近年着目されている *in vitro* における魚肝臓 S9 画分による化学物質分解と、実際に化学物質を蓄積した魚体内動態の相関性を明らかにすることを目的とした。令和 7 年度は経鰓及び経口蓄積性の異なる化学物質 7 種類を対象に S9 画分による *in vitro* 分解試験を実施し、分解の有無を確認するとともに減衰率と消失速度を算出し、BCF 及び BMF と比較した。その結果、多くの化学物質において、その蓄積性と減衰の有無や分解速度で関連性が認められ、*in vitro* 分解試験結果は化学物質の生物蓄積性を分類することが可能であった。一方、本年度は国内で本試験法を運用する上での多くの課題が積みあがった。ここでは今後解決すべき点と課題解決策について述べる。

一つ目に、ニジマスの肝臓由来 S9 画分の製品が国内では入手できずに、今後我が国で OECD TG309B を実装するにあたり研究機関や大学などで調製する必要がある。一方、実際に S9 画分を調製するにあたり、細かな工夫や注意点があることを痛烈に実感した。恐らく他組織においても、例えばオペレーターの違いが品質差を生む要因となりうると考えられる。当研究室では、本年度後半より SDS-PAGE によるタンパク質分析を新たに品質評価に加えた。これによりさらに詳しい解析が可能となった。また、今後はピレンやベンチオカーブ等を基準とした等価評価法の開発なども進めていく予定である。

二つ目に S9 画分による *in vitro* 分解試験に関する手法についてである。昨年度に引き続き解決すべき課題として *in vitro* 分解試験における対象化学物質の初期濃度について検討した。OECD TG319B の試験法では、推奨される初期物質濃度は $\leq 1 \mu\text{M}$ とされているが、これは哺乳類の代謝試験準拠であり、魚類の代謝活性は哺乳類のそれと比較し非常に低いことが報告されている (Weeks *et al.*, 2020, Black *et al.*, 2021)。そのため魚類 S9 画分による分解試験では基質量を少なくすることで、より良好な結果が得られることが報告されている (宮田ら, 2022)。昨年度 4 種類の PAH 類を $0.25 \mu\text{M}$ ずつ合計 $1 \mu\text{M}$ としていた初期基質量を単品として $0.1 \mu\text{M}$ としたところ、大変良好な結果を得ることができた。一方、化審法審査に挙がってくる化学物質の検出限界や最適基質量は不明であるため、基質に濃度勾配を設けて複数の試験区を実施すべきである。さらに本年度のフェナントレンのように腸管内における胆汁ミセル化や血中アルブミンへの結合力の高い物質等が今後も審査に挙がってくるであろう。その際に、アルブミン添加区など生体内をより再現した試験区の設定も必要となってくると考えられる。この時に各魚種に沿ったアルブミン濃度に設定することにより、魚種間差ということも再現できるかもしれない。さらに、 17β -エストラジオールの分解が確認できなかった点であるが、これはその魚種の至適水温に合わせるのは当然であるが、より酵素や補酵素の反応ポテンシャルを引き出すような条件での試験が必要であると考えられる。このように S9 画分による *in vitro* 分解試験を非生物蓄積評価の代替法として用いる上で、魚類の代謝能に最適化された方法を確立していく必要があると考えられる。

5. 人材育成

本研究課題を通して、生物蓄積性評価試験をはじめ化学物質評価や環境研究を担う人材育成も行ったので、実施内容と成果、問題点を列挙し説明していく。

1.) 卒論テーマとして生物蓄積評価試験の実施

本年度、卒論テーマとして本研究課題を提供した。近年、水産学部では行政施策に関与するような研究課題は選ばれなくなった。本年度は本研究課題を当初は希望していない学生が担当した。開始直後は自ら積極的に研究をすることはなく、失敗が続くことが多かった。また、学生へインタビューしたところ、OECDの試験内容や化審法の内容を理解するところまで読み込むことにも高いハードルを感じているようであった。一方、こちらで勉強内容や試験内容に優先順位をつけるとともに実験をしっかり組んで、成果を見せることで積極的に取り組む姿勢を得る事ができるようになった。また、最終的には本研究課題に大変興味を持ってもらい、化審法やそれにかかわる実験手法も自ら積極的に勉強を行うまでに成長した。この件で教育者として学んだ点としては、粘り強く成功体験を経験させ、自らの積極性を導くことができ、その結果埋もれている人材の発見と育成に一定の成果を上げることができると考えられる。

2.) 学生実験における生物蓄積評価に関わる題材の提供

本年度、生物を用いた経口蓄積性試験を題材に学部3年生向けの学生実験を行った。その際、採血や解剖、さらに化学物質の蓄積に伴い現れる生物影響（今年度は造血機能に関わる生物影響を調査）などを調べてもらい、学生の興味関心と高評価を得ることができた。また、2年生向けにはエストラジオールの長期暴露による表現型の変化と遺伝的な雌雄判別という事で実験を行ってもらい、生物蓄積性と表現型への影響に興味を持ってもらったと館得ている。来年度以降もさらに学生達に蓄積評価への興味関心を持ってもらうため、この学生実験は引き続き続けていく予定である。加えて、今後は化審法などの制度についてもさらに言及し、実験とセットで体験する機会を作りたいと考えている。

3.) 若手研究者育成について

昨年度に引き続き、経験の浅い研究代表者の研究課題を本事業に採択していただいた。本年度は、予測通りの結果にならないことや計画の大きな変更など余儀なくされることが多々あり、大きな成長の一年であった。また、若手研究者のように大学に異動してきて日が浅い研究者は予算を持っていないため、本研究分野に貢献できるような大規模な試験ができないことが多い。本事業では私のような若手研究者が研究できる機会を与えおり、当研究分野を通じて行政施策に貢献できる人材の育成をしている点において、十分な成果を上げていると考えられる。

6. 業務実施体制

以下に業務実施体制を示す。

- (1) 山崎雅俊 鹿児島大学 水産学部、助教：研究代表者、*in vitro* 試験、暴露試験、発現解析、タンパク質分析、化学分析、研究総括
- (2) 宇野誠一 鹿児島大学 水産学部、教授：アドバイザー
- (3) 國師恵美子 鹿児島大学 水産学部、助教：暴露試験
- (4) 今村和貴 鹿児島大学 連合農学研究科 3 年、化学分析、タンパク質分析
- (5) 若月隼人 鹿児島大学 水産学部 4 年生、*in vitro* 試験、暴露試験、化学分析
- (6) 湯ノ口夢叶 鹿児島大学 水産学部 3 年生、S9 画分の調製、タンパク質分析

7. 参考文献

平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」

令和 6 年度化学物質規制対策「大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業（化学物質の魚類中体内動態と代謝酵素分画による *in vitro* 分解との相関）」

宮田知代子, 的場好英, 椋本麻記子, 中川好秋, 宮川 恒. 魚肝臓 S9 代謝反応における速度定数と遊離基質補正值を用いたアルキルフェノール類の生物濃縮倍率の予測精度向上. 日本農薬学会誌. 2022, 47, 31-39.

Donald R. Buhler, Cristobal L. Miranda, Marilyn C. Henderson, Yea-Huey Yang, Su-Jun Lee, Jun-Lan Wang-Buhler. Effects of 17 β -Estradiol and Testosterone on Hepatic mRNA/Protein Levels and Catalytic Activities of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000, 168(2), 91-101.

Eeva-Riikka Vehniäinen, Eija Schultz, Heli Lehtivuori, Janne A Ihalainen, Aimo O J Oikari. More accuracy to the EROD measurements--the resorufin fluorescence differs between species and individuals. *Aquatic Toxicology*. 116-117, 102-108

Fatemeh Rostamnezhad, Mohammad Hossein Fatemi. Comprehensive investigation of binding of some polycyclic aromatic hydrocarbons with bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry*. 2022, 120, 105656-105671.

James M. Armitage, Liisa Toose, Louise Camenzuli, Aaron D. Redman, Tom F. Parkerton, David Saunders, James Wheeler, Alberto Martin, Eleni Vaiopoulou, Jon A. Arnot. A critical review and weight of evidence approach for assessing the bioaccumulation of phenanthrene in aquatic environments. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2021, 17(5), 911-925.

Kristin A. Connors, Bowen Du, Patrick N. Fitzsimmons, Alex D. Hoffman, C. Kevin Chambliss, John W. Nichols, Bryan W. Brooks. Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fractions. *Environmental Toxicology*. 2013, 32(8), 1810-1818.

Megan Zercher, Jason A Coral, Diane Nabb, Griselda Powers, Alan Jones, Karla Johanning. A Comparison of *In vitro* Metabolic Clearance of Various Regulatory Fish Species Using Hepatic S9 Fractions. 2024, 43(6), 1390-1405.

Nichols, J., Fay, K., Bernhard, M.J., Bischof, I., Davis, J., Halder M., Hu, J., Johanning, K., Laue, H., Nabb, D., Schlechtriem, C., Segner, H., Swintek, J., Weeks J., Embry M. Reliability of *In vitro* Methods Used to Measure Intrinsic Clearance of Hydrophobic Organic Chemicals by Rainbow Trout: Results of an International Ring Trial. *Toxicol Sci.* 2018, 164, 563–575.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. 2 October 2012.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Test No. 319B: Determination of *in vitro* intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub-cellular fraction (RT-S9). 27 June 2018

Seiichi Uno, Jiro Koyama, Emiko Kokushi, Harold Monteclaro, Sheryll Santander, J. Orkuma Cheikyula, Shizuho Miki, Nathaniel Añasco, Ida G. Pahila, Hilario S. Taberna Jr., Tatsuro Matsuoka. Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after one month from Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines. *Environmental Monitoring and Assessment.* 2010. 165. 501-515.

Sherry R Black, John W Nichols, Kellie A Fay, Sharlene R Matten, Scott G Lynn. Evaluation and comparison of *in vitro* intrinsic clearance rates measured using cryopreserved hepatocytes from humans, rats, and rainbow trout. *Toxicology.* 2021, 457, 152819-152836.

Stefan de Gelder, Liselot van Och, Jan Zethof, Thamar N.M. Pelgrim, Josef D. Rasinger, Gert Flik, Marc H.G. Berntssen, Peter H.M. Klaren. Uptake of benzo[a]pyrene, but not of phenanthrene, is inhibited by fatty acids in intestinal brush border membrane vesicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2017, 195, 1-8.

Yoshiyuki Inoue, Naoki Hashizume, Tomohiko Yoshida, Hidekazu Murakami, Yasuyuki Suzuki, Yuka Koga, Ryoko Takeshige, Erina Kikushima, Naoaki Yakata, Masanori Otsuka. Comparison of bioconcentration and biomagnification factors for poorly water-soluble chemicals using common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 2012, 63, 241-248.