

ノニルフェノール曝露が魚の赤血球に及ぼす影響について

青木康展

‘erythrocyte’ ‘fish’ ‘nonylphenol’をキーワードとした PubMed により検索したところ、26 報の文献が見出され、うち、実験室内で魚への NP 曝露による赤血球への血液学的影響と病理学的変化を観察している 16 報の論文をレビューした。

多くの NP の曝露実験では、100 µg/L (MEOGRT 試験の LOEC 1.27 µg/L の 79 倍) 以上の sublethal 濃度で NP の曝露実験が行われている。100 µg/L 以上の濃度で NP は赤血球の核の形態の変異や DNA の断片化を引き起こしているが、これら赤血球への影響は、NP 曝露による酸化ストレス発生等を原因とするものである。同時に、100 µg/L 以上の sublethal 濃度での NP 曝露は、肝臓や腎臓などの様々の臓器にも影響を及ぼしている。

一方、100 µg/L より低濃度を曝露し、赤血球への影響を観察した報文は 3 報である。

論文[1]では、メダカ (雌、Hd-rR) に 50, 80, 100 µg/L の濃度で NP を 15 日間曝露し、赤血球の核形態の異常、アポトーシス (細胞死の過程であり DNA の断片化が発生する)、小核発生への影響を調べた。核形態異常の発生、アポトーシスの誘発は 100 µg/L で、小核の誘発は 80, 100 µg/L で統計学的に有意に上昇した。赤血球への NP の影響の NOEC は 50 µg/L であった。これは、MEOGRT 試験の LOEL の 39 倍の濃度である。

これまで NP が *in vitro*, *in vivo* の遺伝毒性試験で陽性を示す報告はなく、魚類での NP の小核誘発は酸化ストレスなど二次的響によるものと考えられる。

論文[16]では、より低濃度で NP の影響を試験している。5 か月齢 (幼若) のコイ (体重 15.2 ± 3.8 g) に 1, 5, 10, 15 µg/L NP を、より長期間 (70 日間) 曝露した。また、ethinylestradiol (EE2) を 500 µg/kg 体重の用量で 4 週に 1 回筋肉注射した。10, 15 µg/L NP で赤血球数の有意な減少は見られるものの、血中ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値 (赤血球総体積の指標) には NP 曝露による有意な変化は見られなかった。赤血球数、血中ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の 3 指標の同時低下をもって明確な貧血の発生と言える。従って、コイにおいて、1-15 µg/L (MEOGRT 試験と同等濃度) の長期間曝露で明確な貧血状態は発生していない。

一方、EE2 投与はヘマトクリット値の変動を起こさず、ヘモグロビン濃度を

有意に減少した。さらに 15 µg/L NP 曝露で、魚の造血器官である腎臓、および肝臓に病理学的変化が認められないが、EE2 投与魚の腎臓の尿細管に血球の滞留が認められた。

文献[11]では、アフリカナマズ（体重 500–1200 g、河川で採取）に、50, 80, 100 µg/L NP を 15 日間曝露し、影響を観察している。赤血球のアポトーシス、小核、核の形態の異常は濃度に依存して増加した。しかし、同じ濃度の NP 曝露で、赤血球数は有意に減少したものの、ヘモグロビン濃度は有意に減少せず、また、ヘマトクリット値は 80, 100 µg/L で有意に減少したが、50 µg/L では減少しなかった。従って 50 µg/L で明確な貧血は発生していない。ただし、河川から採取した魚を用いた実験であり、本知見は定性的な有害性評価に用いられるものである。

以上を総合すると、50 µg/L 以下の濃度で NP が明確に貧血状態を引き起こす、証拠は見当たらない。

100 µg/L 以上の濃度の NP 曝露中で観察された知見は、以下の通りである。

幾つかの魚種で検討されているが、中でも、アフリカナマズへの 14 日間曝露による赤血球への影響の観察が詳細である。200 µg/L [2]および 100 µg/L [3][9]の濃度でアポトーシスの発生が有意に上昇した。さらに、100 µg/L で核の形態に変異のある赤血球数上昇も観察された[10]。これらの濃度の NP 曝露では、肝臓の SOD (superoxide dismutase)やカタラーゼ(CAT)など酸化ストレスを防御する酵素の活性も変動し[2][3]、これに呼応して、酸化ストレス発生のマーカー（過酸化脂質量など）が上昇した。また、論文[9]では、血清中の SOD と CAT が増加した。これらの知見は、体内で酸化ストレス発生を示している。これらの知見は、100-200 µg/L NP は全身で酸化ストレスを誘導し、赤血球の異常を引き起こしたことを示している。より高濃度の 750, 1000 µg/L (1000 µg/L は LD50 の約 1/3 の濃度) では、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値（赤血球総体積）の有意な減少が観察されている[12]。

より高濃度での NP の曝露実験が、spotted snakehead を用いても実施されている。LD50=1270 µg/L の 1/2 (635 µg/L), 1/4 (317 µg/L), 1/8 (158 µg/L)の濃度の NP を 24, 48, 64, 96 時間曝露したところ、すべての濃度区で、すべての観察時間において、小核、および核の形態に異常のある赤血球数の上昇が観察され[4]、同様の濃度で、腎臓、肝臓、エラの細胞でも小核、核の形態異常、DNA の切断が観察された[7]。また、70, 100, 150 µg/L で 30, 60, 90 日間曝露したが、

どの曝露期間をとっても 100, 150 $\mu\text{g/L}$ の曝露で、小核発生が有意に増加したが [5]。さらに、158 $\mu\text{g/L}$ NP の 96 時間曝露で、ヘモグロビン量、赤血球数等が減少したが [6]、635 $\mu\text{g/L}$ 96 時間、および 126 $\mu\text{g/L}$ 90 時間の曝露で、肝臓での空胞形成、脂肪沈着、魚での造血組織である腎臓での各種の組織変成が観察されている [8]。赤血球の傷害は、NP が全身で細胞傷害を引き起こす状態のもとで発生している。

他にも、テラピアに、NP を 1000, 10000, 16000 $\mu\text{g/L}$ ($\text{LD}_{50} = 32 \text{ mg/L}$) の濃度で 72 時間曝露したが、小核の上昇は認められず、10000 $\mu\text{g/L}$ 以上の濃度で、核の形態に異常のある赤血球数が有意に増加した [13]。また、海水魚では、イシビラメに 30 $\mu\text{g/L}$ で 3 週間曝露を行っても、赤血球の小核数は上昇しなかったが [14]、シーバスでは、890 $\mu\text{g/L}$ の濃度での 24 時間曝露により、赤血球の小核数が増加した [15]。

しかしながら、これらの実験で用いた魚は、河川で採取、養魚場で入手、あるいは市場で購入したものであり（ただし、[2]では研究室内で維持した魚）、実験動物としての均一性や信頼性が確保できていない。従って、上記の実験からの知見は、NP 曝露の赤血球への影響といった定性的な有害性の知見となり得るが、定量的な量反応関係を明らかにする対象となる知見ではないことに留意する必要がある。

1 . Sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) to 4-nonylphenol subacute exposure; erythrocyte alterations and apoptosis.

Sayed AEH, Kataoka C, Oda S, Kashiwada S, Mitani H.

Environ Toxicol Pharmacol. 2018 Mar;58:98-104. doi: 10.1016/j.etap.2017.12.023. Epub 2017 Dec 26.

2 . Modulatory effects of green tea extract against the hepatotoxic effects of 4-nonylphenol in catfish (*Clarias gariepinus*).

Sayed AEH, Soliman HAM.

Ecotoxicol Environ Saf. 2018 Mar;149:159-165. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.007. Epub 2017 Dec 19.

3 . Induction of apoptosis and DNA damage by 4-nonylphenol in African catfish (*Clarias gariepinus*) and the antioxidant role of *Cydonia oblonga*.

Sayed AE, Hamed HS.

Ecotoxicol Environ Saf. 2017 May;139:97-101. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.024.

4 . Study on DNA damaging effects of 4-nonylphenol using erythrocytes from peripheral circulation, gill and kidney of fish *Channa punctatus*.

Sharma M, Chadha P.

J Environ Biol. 2016 Mar;37(2):313-8.

5 . 4-Nonylphenol induced DNA damage and repair in fish, *Channa punctatus* after subchronic exposure.

Sharma M, Chadha P.

Drug Chem Toxicol. 2017 Jul;40(3):320-325. doi: 10.1080/01480545.2016.1223096.

Epub 2016 Sep 1.

6 . Acute Toxicity of 4-nonylphenol on Haematological profile of Fresh water Fish *Channa punctatus*.

Sharma M. Chadha P.

Res. J. Recent. Sci. 2015 4, 25-31.

7 . Widely used non-ionic surfactant 4-nonylphenol: showing genotoxic effects in various tissues of *Channa punctatus*.

Sharma M, Chadha P.

Environ Sci Pollut Res Int. 2017 Apr;24(12):11331-11339. doi: 10.1007/s11356-017-8759-1. Epub 2017 Mar 16.

8. Histological alterations induced by 4-Nonylphenol in different organs of fish, *Channa punctatus* after acute and sub chronic exposure

Sharma M, Chadha P, Borah MK.

Journal of Entomology and Zoology Studies 2018; 6(4): 492-499

9. Antioxidant and antiapoptotic activities of *Calotropis procera* latex on Catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to toxic 4-nonylphenol.

Sayed Ael-D, Mohamed NH, Ismail MA, Abdel-Mageed WM, Shoreit AA.

Ecotoxicol Environ Saf. 2016 Jun;128:189-94. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.023. Epub 2016 Mar 3.

10. The biological activity of new thieno[2,3-c]pyrazole compounds as anti-oxidants against toxicity of 4-nonylphenol in *Clarias gariepinus*.

Sayed AEH, Zaki RM, El-Dean AMK, Abdulrazzaq AY.

Toxicol Rep. 2015 Oct 21;2:1445-1453. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.10.008. eCollection 2015.

11. Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822).

Mekkawy IA, Mahmoud UM, Sayed Ael-D.

Tissue Cell. 2011 Aug;43(4):223-9. doi: 10.1016/j.tice.2011.03.006. Epub 2011 Apr 17.

12. Toxicity studies of nonylphenol and octylphenol: hormonal, hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*.

Senthil Kumaran S, Kavitha C, Ramesh M, Grummt T.

J Appl Toxicol. 2011 Nov;31(8):752-61. doi: 10.1002/jat.1629. Epub 2011 Mar 15.

13. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae).

Rivero CL, Barbosa AC, Ferreira MF, Dorea JG, Grisolia CK.

Ecotoxicology. 2008 Nov;17(8):732-7. doi: 10.1007/s10646-008-0222-0. Epub 2008 May 9.

14. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to

xenobiotics under controlled conditions.

Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM, Sciutto A.
Aquat Toxicol. 2006 Jun 1;78 Suppl 1:S93-8. Epub 2006 Apr 4.

1 5 . Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to beta-naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 beta-estradiol individual and combined exposures.

Teles M, Gravato C, Pacheco M, Santos MA.
Chemosphere. 2004 Oct;57(2):147-58.

1 6 . Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*).

Schwaiger J, Spieser OH, Bauer C, Ferling H, Mallow U, Kalbfus W, Negele RD.
Aquat Toxicol. 2000 Nov;51(1):69-78.