

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651024

研究課題名（和文） 低塩素化水酸化体 PCBs の分析法開発と脳移行に関する予備的研究

研究課題名（英文） Pilot study of analytical methods for the lower-chlorinated hydroxylated PCBs in the blood and brain of wildlife

研究代表者

田辺 信介（TANABE SHINSUKE）

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：60116952

研究成果の概要（和文）：

世界で報告例のない 4 塩素化以下の低塩素化の水酸化 PCBs (OH-PCBs) の分析法を開発し、野生生物の血液および脳に蓄積する OH-PCBs の実態を明らかにすることを目的とした。開発した OH-PCBs の分析法により、鯨類の血中には 3,4,5 塩素の低塩素化 OH-PCBs が高蓄積していることを明らかにした。同様に鯨類の脳中に残留する OH-PCBs を分析した結果、OH-PCBs は血液と異なる異性体組成を示し、5 塩素化 OH-PCBs の特異的な脳移行と高蓄積が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The present study investigated the accumulation features of lower-chlorinated OH-PCBs in the blood and brain of cetaceans and transitional state of these OH-PCBs into the brain was clarified. Optimization of the extraction and clean-up method was developed for the analyses of lower-chlorinated OH-PCBs in the blood and brain of cetaceans. OH-PCBs tend to accumulate at higher levels in brain than in blood, yet no statistical significance was observed. Congener profile of OH-PCBs in brain was different from that in blood; penta-chlorinated congeners were dominant in the brain. Thus, specific transfer and accumulation of penta-chlorinated congeners in brain was suspected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	0	1,300,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境分析・有害化学物質・PCBs・代謝活性化

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)は、多様な野生生物から検出されており、今なお高次生態系の汚染が顕在化している。PCBs は胎盤・授乳を通して母仔間移行することから、世代を超えた影響が懸念され、汚染の長期化が予測されている。近年、PCBs は親化合物だけで

なく代謝物の毒性も問題視され、特に甲状腺ホルモン(TH)や脳神経系への影響が危惧されており、生物の行動異常に関わる物質として学術的関心を集めている。PCBs は生体内に取り込まれた後、肝臓で薬物代謝酵素(CYP)の働きにより OH-PCBs へと変換され(第 1 相反応)、第 2 相反応で抱合酵素の作用

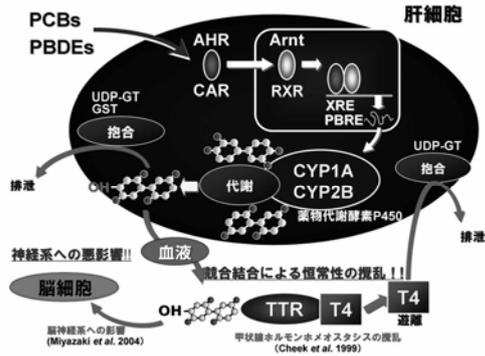


図1 有機ハロゲン化合物の代謝経路: 代謝物と甲状腺ホルモンのTTR競合結合

により体外へ排泄される。しかしながら、一部の OH-PCBs は甲状腺ホルモンのサイロキシン(T4)と構造や物理化学性が類似しているため、血中の甲状腺ホルモン輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)に対して強い結合性を示し、甲状腺ホルモンの恒常性攪乱や脳神経系への影響が示唆されている(図1)。このような背景から、ヒト血中におけるOH-PCBsの分析や代謝機構に関する研究は報告されているが、野生生物の包括的なモニタリング情報は依然として少ない。とくに置換塩素数の少ない低塩素化 OH-PCBs による野生生物の汚染実態に関する研究例は少なく、その曝露の態様、体内変化と挙動、蓄積の特徴、そしてリスク評価に関する研究は皆無である。

近年、OH-PCBsの脳神経系阻害に関する研究が本格化し、小脳細胞系の *in vitro* 試験では、極低濃度(10^{-10} M)の OH-PCBs が、甲状腺ホルモンレセプターを介したトリヨードサイロニン(T3)遺伝子の転写活性を抑制することが報告されている。これまでの研究により、鯨類など一部の野生生物の血中には、低塩素化 OH-PCBs の高蓄積が報告されている。鯨類の血液に高蓄積する低塩素化 OH-PCBs は甲状腺ホルモンレセプターと結合しやすいことが示唆されており、脳に移行して脳神経系へ悪影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、これまでに鯨類の脳から OH-PCBs を検出した例は、申請者の研究グループが実施した鯨類の研究を含めて2報のみであり、これらに関しても分析法上の制約から低塩素化 OH-PCBs を計測していないため、鯨類のリスクを評価するには不十分である。極性のリン脂質が豊富な脳に低塩素化 OH-PCBs が移行・残留することは十分予想されるため、脳に残留する低塩素化体を含む OH-PCBs およびその親化合物の態様の理解は、脳発達期における PCBs のリスクを総合的に評価する上で必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では世界で報告例のない生体組織中に残留する4塩素化以下の低塩素化 OH-PCBs の分析法を開発し、野生生物の血液および脳に蓄積する OH-PCBs の実態を明らかにすることを目的とした。また、動物種による蓄積濃度・異性体組成パターンとの差異を調査することにより、OH-PCBs の生成および脳移行の態様を解明し、ハイリスクアニマル特定のための道筋の開拓を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血中 OH-PCBs の分析法開発

検討に用いた野生生物の血液試料は、愛媛大学の生物環境試料バンク(es-BANK)に冷凍保存(-25 °C)されている鯨類の血液を分析に供試した。鯨種は、ハクジラ類:カズハゴンドウ(*Peponocephala electra*, ♀=7, ♂=7)、スナメリ(*Neophocaena phocaenoides*, ♀=3, ♂=4)、オウギハクジラ(*Mesoplodon stejnegeri*, ♀=7, ♂=5)、カマイルカ(*Lagenorhynchus obliquidens*, ♀=2, ♂=5)、コブハクジラ(*Mesoplodon densirostris*, ♀=2, ♂=2)、シャチ(*Orcinus orca*, ♀=2, 不明 1)、シロイルカ(*Delphinapterus leucas*, ♂=1)、マッコウクジラ(*Physeter macrocephalus* ♂=2)、およびヒゲクジラ類:ニタリクジラ(*Balaenoptera bridei*, ♀=1, ♂=1)、ミンククジラ(*Balaenoptera acutorostrata*, ♀=1, ♂=1)、ザトウクジラ(*Megaptera novaengliae*, ♀=1)を選定した。

分析法は既報を参考に、幾つかの改良点を加えたものを採用した。とくに低塩素化 OH-PCBs (3-4塩素化体)は水溶性が増すため、抽出・分配効率や分画・クリーンアップ条件を検討するなど、効果的・現実的な分析法の確立を目指した。まず、血液に残留する低塩素化 OH-PCBs の分析が、5-8塩素化体に関する既存の方法の適用で測定可能か否か検証した。血液などの生体試料から OH-PCBs を抽出すると、抽出液には脂肪やタンパク質など多量のマトリックス成分が含まれる。OH-PCBs の分析には、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)の使用が必須であるが、そのためには誘導体化(メチル化)処理が必要である。しかしながら、低塩素化体は酸に不安定なため、誘導体化処理前の酸処理によるクリーンアップが適用できない。そこで数種の不活性吸着剤の使用を検討し、高い誘導体化効率が維持可能な条件を選定した。とくにシリカゲルクロマトグラフィーにおけるシリカゲルの含水率や種類、溶出溶媒を検討し、詳細な分画チェックを試みた。その結果、抽出後の OH-PCBs 画分に対して、5%含水のシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wako S-1)を適用することで、高いクリーンアップ

効果を得ることができた。溶出溶媒は、50%ジクロロメタン/ヘキサンを用いることで、3-8 塩素の OH-PCBs を効率よく分画することに成功した。

血液試料 (約 10 g) に 6N HCl と 2-Propanol を加えてタンパク質を変性させ、サロゲート物質として $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs・ $^{13}\text{C}_{12}$ -OH-PCBs を添加後、50% Hexane/Methyl-t-butyl-ether (MTBE) でホモジナイザーを用いて攪拌抽出した。有機層を回収して濃縮し、ヘキサン転溶後 1 M KOH 水溶液を加えて振とう抽出し、KOH 層を分取した。OH-PCBs を含む KOH 層は濃硫酸を加えて pH 2 に調整し、50% MTBE/hexane で OH-PCBs を再抽出後、5% 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wako-gel S-1) で夾雑成分を除去した。溶出液は濃縮後、Trimethylsilyldiazomethane (TMSDAM) を用いて OH-PCBs を誘導体化した。誘導体化後の溶液はゲル分配クロマトグラフィー(GPC: Bio-Bead S-X3)、および活性シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wako-gel S-1) で夾雑成分を除去し、濃縮後シリンジスパイクとして $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs を添加し最終検液とした。PCBs を含む KOH 分配後の残有機層は GPC および活性シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wako-gel DX) で夾雑成分を除去し、濃縮後シリンジスパイクとして $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE を添加し最終検液とした。PCBs は 62 異性体、OH-PCBs は 53 異性体を対象とし、PCBs は低分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定し、OH-PCBs は高分解能 GC/MS (HRGC/HRMS) を用いて測定した。

(2) 脳中 OH-PCBs の分析法開発

これまで脳と肝臓に残留する 4 塩素以下の OH-PCBs を分析した事例がないため、まず分析法の確立を目指した。脳中には多量のリン脂質やタンパク質が含まれており、GC/MS 分析に必要な誘導体化(メチル化)処理には、これら夾雑物質の除去が必須である。申請者の研究グループが脳から OH-PCBs を検出した例では、誘導体化前の硫酸処理で夾雑物質を取り除いていた。しかしながら、酸に不安定な低塩素化 OH-PCBs は分解されるため、酸を使わない新たな方法でクリーンアップを行う必要がある。そこで血液試料で開発した分析法を参考に、いくつかの改良点を検討した。

検討に用いた試料は 2005 年から 2010 年に瀬戸内海および大村湾に漂着・混獲したスナメリ (*Neophocaena phocaenoides*) 13 検体 (オス、 $n = 10$; メス、 $n = 3$) の脳および血液を供試した。脳試料 5 g に 6M の HCl を加えてタンパク質を分解した後、propanol と 50% methyl t-butyl ether (MTBE)/hexane を添加し攪拌・抽出した。遠心分離後の抽出液を

MTBE/Hexane でさらに 2 回抽出し、エバポレーターで濃縮した。 $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs および $^{13}\text{C}_{12}$ -OH-PCBs を内部標準として添加した後、1M KOH 50% ethanol/H₂O 溶液を加え、液液分配により有機層に PCBs を、フェノール層に OH-PCBs を分配した。有機層は硫酸で洗浄後、Gel Permeation Chromatography (GPC) で脂肪を除去し、活性化シリカゲルカラムによるクリーンアップ処理後、濃縮して PCBs の最終溶液とした。OH-PCBs を含むフェノール層は、硫酸を加え PH2 に調整し、50% MTBE/hexane を加えて計 2 回抽出した。この抽出液をさらに精製するため 50% acetonitril/hexane 溶液を加え、フェノール相を硫酸で酸性にした後、50% MTBE/hexane で 2 度抽出した。精製した抽出液を不活性シリカゲルカラム (5% 含水) に通して夾雑物を除去した後、trimethylsilyldiazomethane で誘導体化した。誘導体化処理液は GPC で脱脂した後、活性化シリカゲルカラムでクリーンアップ処理し最終溶液とした。OH-PCBs の定量には高分解能 GC/MS を使い、PCBs は GC/MS で計測した。

4. 研究成果

(1) 血中 OH-PCBs の回収率

鯨類の血中の OH-PCBs の回収率を算出した結果、 $^{13}\text{C}_{12}$ -OH-PCBs の回収率はそれぞれ、4'OH-T₃CB29 (64–73%)、4'OH-T₄CB61 (92–105%)、4'OH-P₃CB120 (82–94%)、4'OH-H₆CB159 (68–71%)、4'OH-H₇CB172 (59–66%)、4OH-H₇CB187 (57–62%) であり、変動係数(CV)および標準偏差(SD)もすべての異性体で 10%未満($n=5$)となり良好な結果が得られた。

(2) 脳中 OH-PCBs の分析精度

表 1 に 3~7 塩素化体の $^{13}\text{C}_{12}$ -OH-PCBs の回

表 1 鯨類の脳中 OH-PCBs の回収率 ($n = 5$)

異性体	回収率(平均)	SD	CV
$^{13}\text{C}_{12}$ -4'OH-CB29	102	3.7	3.6
$^{13}\text{C}_{12}$ -4'OH-CB61	98	1.1	1.1
$^{13}\text{C}_{12}$ -4OH-CB79	75	2.6	3.5
$^{13}\text{C}_{12}$ -4'OH-CB120	52	1.6	3.0
$^{13}\text{C}_{12}$ -4OH-CB107	77	2.3	3.0
$^{13}\text{C}_{12}$ -4'OH-CB159	73	2.6	3.6
$^{13}\text{C}_{12}$ -4'OH-CB172	75	3.6	4.8
$^{13}\text{C}_{12}$ -4OH-CB187	83	7.6	9.2
$^{13}\text{C}_{12}$ -4OH-CB146	79	2.5	3.2

収率と SD および CV ($n = 5$)の結果を示す。回収率、CV、SD 共に良好な結果が得られた。本分析法によりクリーンアップ条件と誘導体化効率が改善され、脳試料のような夾雑物質が多量に含まれる生体組織試料においても、幅広い異性体分析が可能となった。

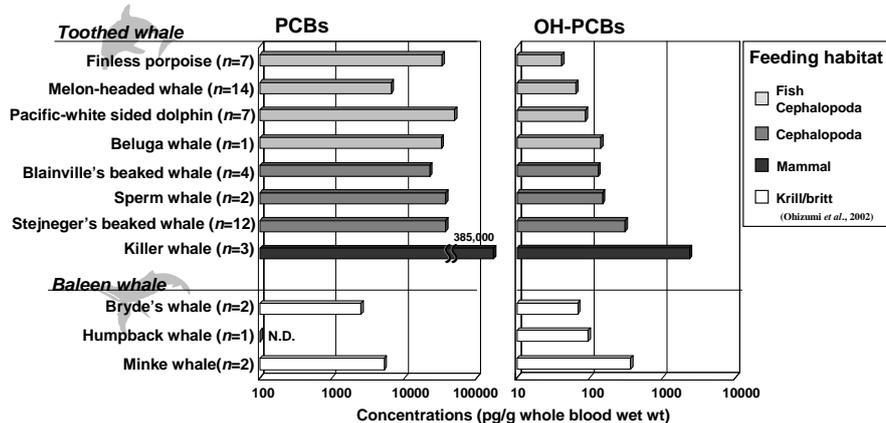


図2 ハクジラ類およびヒゲクジラ類の血中 PCBs および OH-PCBs 濃度(pg/g 湿重量あたり)

(3) 鯨類の血中 PCBs および OH-PCBs の残留レベル

鯨類 10 種の血液試料から PCBs が検出された (図 2)。PCBs 蓄積量を食性別に分類すると、海棲哺乳類等高次生物を捕食するシャチは、他鯨種に比べ 1-2 桁高い濃度を示した。次いで頭足類食性のハクジラ類グループ、小魚や小型の頭足類を主食とするハクジラ類グループの順で蓄積していた。これらハクジラ類とオキアミや群集性の小型魚類を摂餌するヒゲクジラ類の PCBs 濃度を比較すると、前者は有意な高濃度を示した ($p < 0.05$)。次に、鯨類 11 種を外洋性と沿岸性のグループに分け PCBs 蓄積量を解析したところ、生息域による有意差は認められなかった。

OH-PCBs は鯨類 11 種全ての血液試料から検出された(図 2)。PCBs と同様に、シャチは他種に比べ 1-2 桁高い濃度を示した。この理由として、PCBs を高蓄積するシャチ体内では薬物代謝酵素が強く誘導されるため多量の OH-PCBs が生成されていること、または餌となる高次生物が OH-PCBs を体内に高蓄積しているため、その曝露量が多いことなどが考えられる。他鯨類の OH-PCBs 蓄積量を食性別に比較すると、頭足類を捕食するハクジラ類グループとヒゲクジラ類の蓄積量は同程度であった。しかしながら、小魚や小型の頭足類を摂餌するハクジラ類グループの蓄積量は、他グループより有意に低値を示した ($p < 0.05$)。これら鯨種間で見られた OH-PCBs の蓄積傾向は親化合物の PCBs と大きく異なっており、食性に加え代謝能や TTR との結合能に種差のあることが示唆された。

(4) 鯨類血中 OH-PCBs の同属体プロファイル

鯨種別の OH-PCBs 同属体プロファイルに注目すると、マッコウクジラ以外のハクジラ類では低塩素化 OH-PCBs (3, 4, 5 塩素化体)が

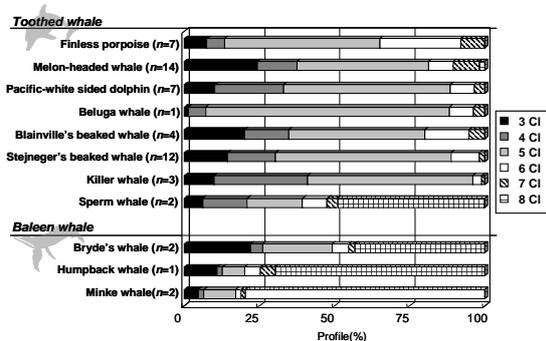


図3 ハクジラ類およびヒゲクジラ類の血中 OH-PCBs の同族体プロファイル

主要同属体であった (図 3)。これら同族体の濃度は総 OH-PCBs の約 6 割から 8 割を占めており、6, 7 塩素化体が高割合を占めるヒトや鳍足類、鳥類とは異なるプロファイルを示した。ハクジラ類から主要異性体として検出された 3, 4 塩素化 OH-PCBs の化学構造に注目すると、その多くはパラ位に OH 基が置換し、隣接するメタ位のどちらか一方のみに塩素原子が置換しているトリヨードサイロニン(T3)様構造を有していた。またマッコウクジラとヒゲクジラ類 3 種では、4OH-CB202 (8 塩素化体)の特異的な蓄積がみられ、他鯨種に比べて 1-2 桁高い濃度を示した。これまでの研究で、ヒトや他高等生物の血中には T4 様構造の OH-PCBs 異性体が顕著に残留しており、本研究で得られた鯨類の OH-PCBs 蓄積特性は特異的と考えられる。

本研究で開発した低塩素化 OH-PCBs の分析法により、鯨類の血中には低塩素化 OH-PCBs が高蓄積していることを明らかにした。今後は、血液以外の脳や肝臓など臓器・組織の OH-PCBs 異性体を分析し、体内動態の解明と標的組織に注目したリスク評価が必要と考えられる。

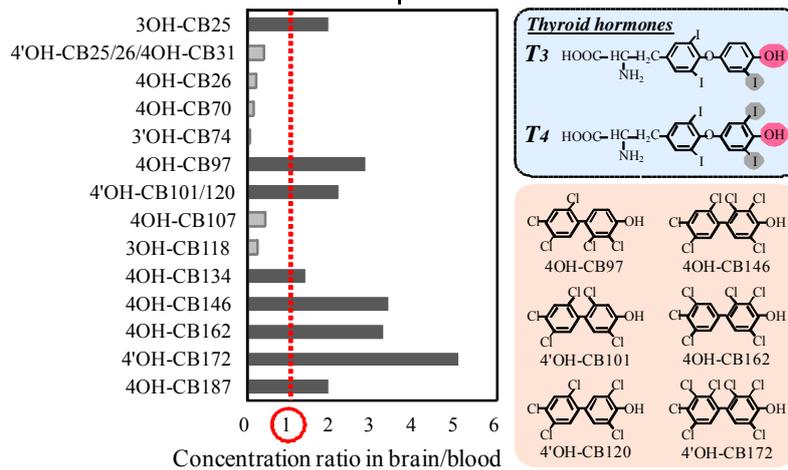


図4 スナメリの脳および血中 OH-PCBs の異性体別濃度比、および脳中でみられた OH-PCBs 異性体の構造

(5) 鯨類の脳中 PCBs および OH-PCBs の残留レベル

すべてのスナメリの脳および血液から PCBs および OH-PCBs が検出された。OH-PCBs 濃度の中央値は脳と血液で同程度であったが (脳: 31 pg/g wet wt, 血液: 33 pg/g wet wt)、相対的に脳で高い濃度が認められた (図 4)。また、血中と脳内 OH-PCBs 濃度の間に有意な正の相関が認められ ($p < 0.01$)、OH-PCBs は TTR に結合して血液脳関門を通過し、血中濃度依存的に脳へ移行することが推察された。異性体組成に注目すると、PCBs は血液と脳組織中で類似していたが、OH-PCBs は異なる異性体組成を示した。OH-PCBs は、血液では 3、4 塩素化体が相対的に高割合であったが、脳内では 5 塩素化体の割合が高く、5 塩素化 OH-PCBs の特異的な脳移行と残留が示唆された。そこで、OH-PCBs 異性体の血中濃度と脳内濃度の比を算出し、脳へ移行しやすい異性体の特定を試みた。濃度比が 1 を超え、脳内濃度が血中より高値を示した主要異性体は、4OH-CB172、4OH-CB164、4OH-CB162、4OH-CB97 および 4'OH-CB101/120 であった (Fig. 2)。これら異性体はすべて水酸基がパラ位又はメタ位に置換しており、その片方もしくは両側に塩素原子が置換する T3、T4 様構造を有していた。以上の結果から、これらの異性体は甲状腺ホルモンの恒常性を攪乱し、脳神経系へ影響を及ぼすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Eguchi A., Nomiyama K., Devanathan G., Subramanian A., Bulbule K.A., Parthasarathy P., Takahashi S., Tanabe S. Different Profiles of Anthropogenic and Naturally Produced Organohalogen Compounds in Serum from Residents Living near a Coastal Area and E-waste Recycling Workers in India. *Environment International*, 2012, in press. (査読有)
2. Nomiyama K., Uchiyama Y., Horiuchi S., Eguchi A., Mizukawa H., Horai Hirata S., Shinohara R., Tanabe S. Organohalogen compounds and their metabolites in the blood of Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*) and scalloped hammerhead shark, *Chemosphere*, 2011, 85, 315-321.
3. Nomiyama K., Eguchi A., Mizukawa H., Ochiai M., Murata S., Someya M., Isobe T., Yamada T.K., Tanabe S. Anthropogenic and naturally occurring polybrominated phenolic compounds in the blood of cetaceans stranded along Japanese coastal waters, *Environmental Pollution*, 2011, 159, 3364-3373. (査読有)
4. Nomiyama K., Murata S., Kunisue T., Yamada T. K., Mizukawa H., Takahashi S., Tanabe S. Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in the blood of toothed and baleen whales stranded along Japanese coastal waters. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44, 3732-3738. (査読有)
5. 他 10 件

[学会発表] (計 31 件)

1. Ochiai, M., Nomiyama K., Isobe, T., Yamada, T. K., Tajima, Y., Matsuishi, T., Amano, M. and Tanabe S. (2011):

Accumulation of halogenated phenolic compounds in small toothed whales. The 6th Global COE International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Pollution and Ecotoxicology, Matsuyama, Japan, August, Abstract Book, 35.

2. Ochiai, M., Nomiyama, K., Isobe, T., Yamada, T. K., Tajima, Y., Matsuishi, T., Amano, M. and Tanabe, S. (2011): Accumulation of anthropogenic and natural origin organohalogen compounds in three porpoise species. 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2011), Brussels, Belgium, August, Abstract Book, ID 3816.
3. 落合真理・野見山 桂・磯部友彦・山田 格・田島木綿子・松石 隆・天野雅男・田辺信介(2011): ネズミイルカ科の小型鯨類に残留する人為起源および天然起源ハロゲン化フェノール類の蓄積特性, 第 20 回環境化学討論会, 熊本市, 7 月, 講演要旨集, 222-223.
4. 他 2 8 件

[図書] (計 6 件)

1. Mizukawa, H., Nomiyama, K., Nakatsu, S., Yachimori, S., Hayashi, T., Tashiro, Y., Yamamoto, M. and Tanabe, S. (2012): Accumulation features of organohalogen metabolites in the blood of Japanese terrestrial mammals. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Vol. 6, Advanced Environmental Studies by Young Scientist. Kawaguchi, M., Misaki, K., Sato, H., Yokokawa, T., Itai, T., Tue, N. M., Ono, J. and Tanabe, S. (Eds), TERRAPUB, Tokyo, Japan, 203-210. (査読有)
2. Nomiyama, K., Murata, S., Kunisue, T., Yamada, T. K., Mizukawa, H., Takahashi, S. and Tanabe, S. (2010): Polychlorinated biphenyls and hydroxylated polychlorinated biphenyls in the blood of toothed and baleen whales stranded along Japanese coastal waters. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Vol. 4, Environmental Specimen Bank: Exploring Possibility of Setting-up ESBs in Developing Countries, Isobe, T., Nomiyama, K., Subramanian and Tanabe, S. (Eds), TERRAPUB, Tokyo, Japan, 67-74. (2010)
3. Ochiai, M., Nomiyama, K., Isobe, T., Yamada, T. K., Tajima, Y., Matsuishi, T., Amano, M. and Tanabe, S. (2012): Accumulation of halogenated phenolic compounds in small toothed whales.

Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Vol. 6, Advanced Environmental Studies by Young Scientist. Kawaguchi, M., Misaki, K., Sato, H., Yokokawa, T., Itai, T., Tue, N. M., Ono, J. and Tanabe, S. (Eds), TERRAPUB, Tokyo, Japan, 187-192. (査読有)

4. 他 3 件

[その他]

ホームページ等

<http://ehime-u.cyber-earth.jp/g-coe2007/jp/index.aspx>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 信介 (Tanabe Shinsuke)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター
教授
研究者番号 : 60116952

(2) 研究分担者

なし

(2) 連携研究者

野見山 桂 (Nomiyama Kei)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター
助教
研究者番号 : 30512686
高菅 卓三 (Takasuga Takumi)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター
客員教授
研究者番号 : 10451379