

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：16301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23710077
 研究課題名（和文） 海洋魚類生態系におけるハロゲン化・非ハロゲン化難燃剤の生物濃縮特性の解明
 研究課題名（英文） Bioaccumulation of Halogenated and Non-halogenated Flame Retardants through Marine Food Web
 研究代表者
 磯部 友彦 (ISOBE TOMOHIKO)
 愛媛大学・上級研究員センター・講師
 研究者番号：50391066

研究成果の概要（和文）： PBDEs の POPs 条約登録を受けて、ハロゲン化代替難燃剤・リン酸エステル難燃剤などの需要増大が予想されるが、その環境汚染実態や生物蓄積に関する情報は皆無である。本研究では、環境・生物試料の分析法確立と、アジア地域における汚染の地理的分布・食物連鎖を介した生物濃縮の解明を試み、先進工業国におけるハロゲン化代替難燃剤汚染の顕在化、および一部のリン酸エステル難燃剤(TPhP)の生物濃縮が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Since PBDEs were listed in Stockholm Convention, halogenated alternative flame retardants and phosphorus flame retardants (PFRs) are of public concern. Contamination status and biomagnification of those alternative flame retardants were investigated in the coastal waters of Asia. Results suggest that PBDEs have been substituted by halogenated alternatives in industrialized nations. In addition, levels of triphenyl phosphate (TPhP) in fish showed a positive correlation with $\delta^{15}\text{N}$, indicating that it was biomagnified through food web.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：生物濃縮・臭素系難燃剤・リン酸エステル系難燃剤・魚類生態系・代替難燃剤

1. 研究開始当初の背景

残留性有機ハロゲン化合物(POPs)による海洋汚染は地球規模で拡大し、野生生物への蓄積や毒性影響が懸念されている。海洋環境はこうした人為由来汚染物質の最終的な到達点であり、シンク(溜り場)になると考えられている。海洋に到達した POPs や一部の臭素系難燃剤(BFRs)は、環境残留性・脂溶性が高いために食物網を介して高次栄養段階の生物に濃縮される。塩素系 POPs についてはストックホルム条約等で世界的にその生産・使用が規制されているのに対し、BFRs は家電製品や建築材料・室内装飾品などの生活用品を難燃化する目的で今なお広域利用さ

れており、環境や生物に対する影響が懸念されている。我々のこれまでの研究で、外洋の魚類食物網において、PCBsなどの塩素系 POPs に加えてポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)やヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)といったBFRsの生物濃縮が確認された。同時に、北太平洋の西側と東側の生態系で生物濃縮の特徴を比較したところ、食物網構造の違いによってその態様が異なることも明らかになった。すなわち、北太平洋西部の食物網では POPs や BFRs が高次生物に生物濃縮されたのに対して、東部海域では栄養段階と汚染物質レベルの間に相関は認められなかった。この結果は、食物網構造の違いに

よって化学物質の生物濃縮特性、ひいては食用魚を通じたヒト曝露リスクに差異が生じることを示唆しており、汚染物質の測定と同時に食物網構造を理解することが不可欠であることを示した。欧米を中心に、BFRsによる環境汚染はいくつか報告されているものの、食物連鎖を介した生物濃縮性に関する研究、とくに外洋生態系における調査研究は膨大な費用や時間がかかるためほとんど実施されていない。さらに、PBDEsやHBCDsなどの生物蓄積性BFRsがストックホルム条約に登録あるいは登録が検討されていることから今後使用量や環境負荷の減少が予想されるのに対し、デカブロモジフェニルエタン(DBDPE)やビストリブロモフェノキシエタン(BTBPE)、デクロランプラス(DP)などのハロゲン化難燃剤、およびリン酸エステル系難燃剤などの非ハロゲン化難燃剤といった代替物質の需要増加が見込まれる。しかしながら、その環境および生態系汚染に関する情報は皆無であり、包括的な分析法の開発と生態系汚染の実態、食物連鎖を介した濃縮挙動の解明が急務である。

2. 研究の目的

本研究のゴールは、ハロゲン化・非ハロゲン化代替難燃剤という新たな環境化学物質に注目し、世界各地の魚介類生態系における汚染実態と蓄積特性を解明することにある。そこでまず、GC-MSおよびLC-MS/MS等の分析機器を用いて代替難燃剤の分析法を開発し、魚類等の生物試料の分析に適用した。また、同一試料から $\delta^{15}\text{N}$ および $\delta^{13}\text{C}$ を測定して食物網構造を解析し、代替難燃剤の生物濃縮特性を解析した。分析試料は、生物環境試料バンク(es-BANK)に保存されているこれまでに採取されたアジア沿岸のイガイ試料を活用するとともに、フィリピン・マニラ湾において現地共同研究者の協力のもとにプランクトンや魚介類などの試料を採集して分析に供試した。

(1) GC-MSを用いたハロゲン化代替難燃剤の分析法確立とイガイを指標としたアジア沿岸域におけるハロゲン化難燃剤の汚染モニタリング

(2) UHPLC-MS/MSを用いたリン酸エステル系難燃剤の分析法開発と生物濃縮特性の解明

3. 研究の方法

(1) GC-MSを用いたハロゲン化代替難燃剤の分析法確立とイガイを指標としたアジア沿岸域におけるハロゲン化難燃剤の汚染モニタリング

臭素系難燃剤(BFRs)であるポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)やヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)は、防燃・延焼防止目的

で、電気・電子製品や繊維製品などに添加されている。PBDEsやHBCDsは残留性有機汚染物質(POPs)と類似の生物蓄積性や環境残留性を示すことから、近年、PBDE工業製剤がPOPsに指定され、その製造・使用が規制された。また、HBCDsもPOPs候補物質として社会的関心を集めている。これらのことから、PBDEsやHBCDsの代替品として、他のハロゲン化難燃剤の使用増加が予想される。PBDEsのPenta-, Octa-BDE製剤の代替品として使用されている1,2-Bis-(2,4,6-tribromophenoxy) ethane (BTBPE)やDeca-BDE製剤の代替品であるDecabromodiphenyl ethane (DBDPE)は、PBDEsと構造が類似していることから、生態系に及ぼすリスクが危惧されている。既報の研究において、BTBPEやDBDPEは生物相や環境中から検出されているが、その汚染実態は充分解明されていない。とくに、アジア地域のBTBPEとDBDPE汚染に関する情報は乏しく、様々な汚染物質が流入する沿岸域をモニタリングした事例は皆無である。そこで本研究では、指標生物であるイガイを分析に供試し、アジア沿岸域におけるBTBPE、DBDPE等ハロゲン化難燃剤汚染の実態解明を試みた。2003年から2008年に、カンボジア(n=2)、中国(n=6)、インド(n=3)、インドネシア(n=3)、香港(n=1)、日本(n=19)、韓国(n=22)、マレーシア(n=4)、フィリピン(n=2)、ベトナム(n=5)のアジア10カ国からムラサキイガイ(*Mytilus edulis*)またはミドリイガイ(*Perna vidis*)を採取し、その軟体部を化学分析に供試した。PBDEs、HBCDs、BTBPE、DBDPEの分析は既法に従い、ソックスレー抽出、GPCによる脱脂、シリカゲルカラムによる精製後、PBDEs、BTBPE、DBDPEはGC-MSで、HBCDsはLC-MS/MSでそれぞれ定性・定量した。

(2) UHPLC-MS/MSを用いたリン酸エステル系難燃剤の分析法開発と生物濃縮特性の解明
リン酸エステル系難燃剤(Organophosphorous flame retardants; PFRs)はプラスチック製品の可塑材、難燃剤などに含まれ、世界的に広範囲に使用されている。近年、一部の臭素系難燃剤(BFRs)は生物蓄積性や毒性が指摘されたため、ストックホルム条約により使用が規制され、その代替品としてPFRsの需要増大が予測されている。しかし、一部のPFRsについては、*in vitro*試験で変異原性や発ガン性が報告されていることから、その毒性影響が懸念される。しかし、途上国におけるPFRsの汚染実態は未だ調査されていない。そこで本研究では、フィリピンのマニラ湾で採集された魚類を対象に9種類のPFRsの蓄積状況について調査するとともに、その蓄積特性の解明を試みた。また、水圏食物網を介した生物濃縮の可能性

を検討するため、安定同位体比を利用して食物網構造を解析し、栄養段階の変化に伴うPFRsの蓄積濃度の変化について調べた。標準物質は9種類のPFRs (TBEP、EHDPP、TnBP、TCP、TEP、TPeP、TPhP、TPrP、TEHP)を用いた。これらは全て acetonitrile (ACN) に溶解し、1mg/mL の ACN 溶液を作製し、標準原液とした。標準溶液(0.01-10ng/mL)は標準原液を ACN で適宜希釈して調整した。超高速液体クロマトグラフは島津社製、質量分析計は AB Sciex 社製 AB5500 Q-Trap を用いた。分析カラムは Superlco 社製 Asentis express C18 (2.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm)、移動相は Milli-Q (A:0.1% ギ酸溶液)と MeOH (A:10mM 酢酸アンモニウム溶液)を使用し、流速は 0.2mL/min に設定した。また、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、注入量は 10 μ L とした。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いて positive mode (ESI+) で測定した。試料は 2008 年にフィリピン・マニラ湾で採取し、愛媛大学の生物環境試料バンク (es-BANK) に冷凍保存された魚類 20 種 ($n=58$) を化学物質に供した。分析方法は試料約 0.5g を秤量し、凍結乾燥後、hexane/acetone (1:1) の混合液を用いて、高速溶媒抽出装置で抽出した。抽出液は 4g の 5% 含水不活性化シリカゲル (和光純薬) を用いて精製後、窒素ガス気流下で濃縮し、ACN 1mL に再溶解して UHPLC-MS/MS で測定した。

4. 研究成果

(1) GC-MS を用いたハロゲン化代替難燃剤の分析法確立とイガイを指標としたアジア沿岸域におけるハロゲン化難燃剤の汚染モニタリング

イガイ試料 ($n=67$) から検出された PBDEs、HBCDs の検出頻度は、それぞれ 100%、98% であり、これらの臭素系難燃剤によるアジア沿岸の広域汚染が明らかとなった。また、PBDEs、HBCDs の濃度範囲はそれぞれ 0.06 ~ 440、<0.01 ~ 1400 であった (図 1, 2)。また、本研究において、イガイ試料 ($n=67$) から検出された BTBPE、DBDPE の検出頻度は、それぞれ 12%、25% であり、濃度範囲はそれぞれ 0.59 ~ 13、0.43 ~ 22 ng/g lipid wt であった (図 3, 4)。これらの結果から、アジア地域における PBDEs と HBCDs 汚染の広域化が明らかとなり、BTBPE と DBDPE 汚染は一部の国・地域で進行していることが示唆された。PBDEs は韓国、香港、中国、フィリピンで採取したイガイ試料から高濃度で検出され、これらの地域で PBDEs 汚染が深刻化していることが考えられる。一方、日本、韓国のイガイ試料の HBCDs 濃度は他のアジア諸国と比べ高値を示したことから、HBCDs 汚染は日本や韓国で深刻化していることが示唆された。とくに、日本においては PBDEs に比べて HBCDs

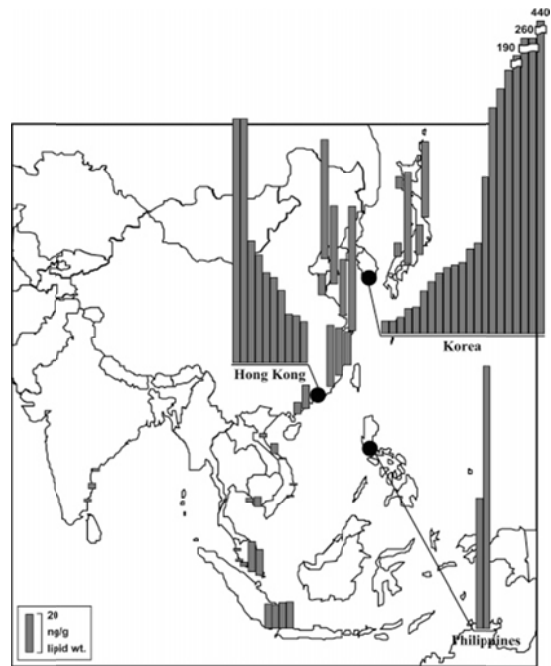


図 1. アジア沿岸域におけるイガイ中 PBDEs 濃度 (ng/g lipid wt) の地理的分布

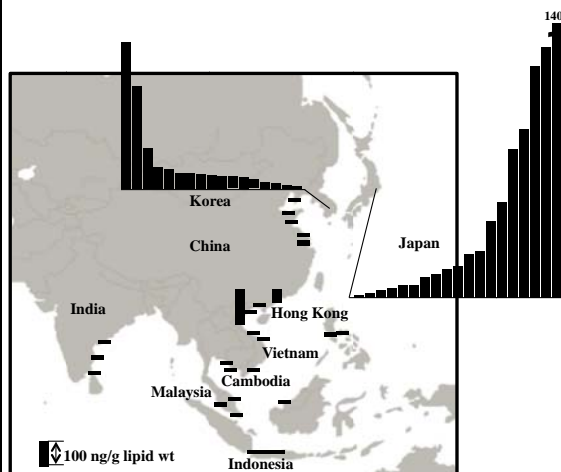


図 2. アジア沿岸域におけるイガイ中 HBCDs 濃度 (ng/g lipid wt) の地理的分布

の濃度が高く、国内の臭素系難燃剤の使用実態を反映していると考えられる。事実、現在の HBCDs の国内需要量は PBDEs を上回っており、本研究の結果はこの傾向と一致している。BTBPE は中国、香港、韓国、マレーシア、インドネシア、ベトナムの一部の地域から採取したイガイ試料から検出されたが、日本、インド、カンボジアで採取したイガイ試料からは検出されなかった。韓国 Shihwa lake のイガイ試料から検出された BTBPE は最高濃度 (13 ng/g lipid wt) を示したが、PBDEs や HBCDs 濃度と比較すると、1~2 桁低値であった。これらのことから、アジア地域における BTBPE 汚染は、PBDEs や HBCDs ほど、進行し

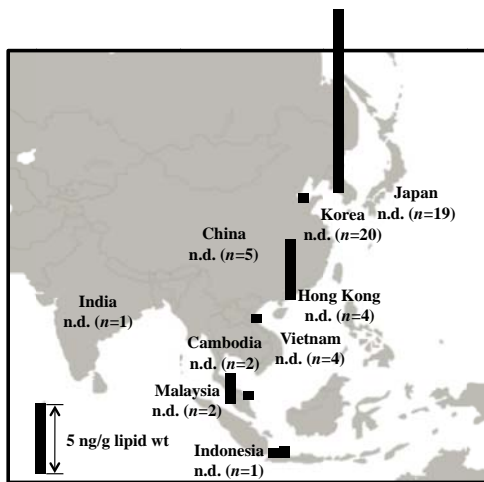


図 3. アジア沿岸域におけるイガイ中 BTBPE 濃度(ng/g lipid wt)の地理的分布

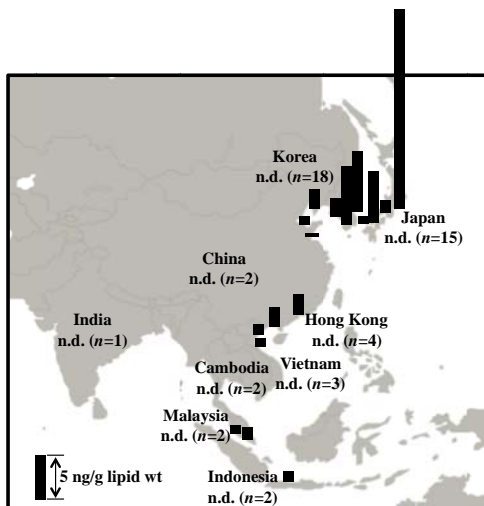


図 4. アジア沿岸域におけるイガイ中 DBDPE 濃度(ng/g lipid wt)の地理的分布

ていないことが示唆された。DBDPE は日本、韓国、中国、ベトナム、マレーシア、インドネシアで採取したイガイ試料から検出され、インド、カンボジアで採取したイガイ試料からは検出されなかった。とくに、日本のイガイ試料から高濃度の DBDPE (22 ng/g lipid wt) が検出された。BTBPE は Penta、Octa-BDE 製剤の代替品として使用されていることか

ら、これらの製剤に含まれる PBDE 異性体 (Penta: BDE-47, 85, 99, 100, 153, 154, Octa: BDE-153, 183, 196, 197, 203, 206, 207) 濃度と BTBPE 濃度を比較した。その結果、マレーシア Port Dickson から採取したイガイ試料では、Penta-BDE 製剤に含まれる PBDE 異性体よりも BTBPE の方が高値を示した。また、韓国 Shihwa Lake やベトナム Quang Binh のイガイ試料では Octa-BDE 製剤に含まれる PBDE 異性体よりも BTBPE の方が高濃度で検出された。これらのことから、一部の地域で Penta、Octa-BDE 製剤の代替として BTBPE の利用が進んでいると推察される。また、ベトナムの Quang Binh から採取したイガイ試料において、BDE-209 より高濃度の DBDPE が検出され、ベトナムでは Deca 製剤から DBDPE への移行が進んでいる可能性がある。一方で、日本のイガイ試料では、DBDPE は BDE-209 よりも低値を示した。しかし、1997 年以降における日本の DBDPE 需要量は Deca-BDE 製剤需要量を上回っており、今後 Deca-BDE 製剤から DBDPE への代替化が進むことで、DBDPE 汚染は進行する可能性がある。

(2) UHPLC-MS/MS を用いたリン酸エステル系難燃剤の分析法開発と生物濃縮特性の解明 試料を分析した結果、フィリピン・マニラ湾で採取した大半の魚類から PFRs が数 ng/g から数百 ng/g の濃度範囲で検出され、これらの物質による広域汚染が明らかとなった。各物質の検出レベルを比較したところ、TEHP (169 ng/g lw) が最も高濃度であり、TEP (165 ng/g lw)、TnBP (129 ng/g lw) および EHDPP (58 ng/g lw) の順で検出された (図 5)。このことから、マニラ湾沿岸では TEHP の使用量が多いか、または、オクタノール-水分配係数 (logKow) は 9.49 であることから生体内に蓄積されやすいと考えられる。しかし、TEP のオクタノール-水分配係数は 0.80 であり、フィリピンでは TEP の使用量が多いと考えられる。

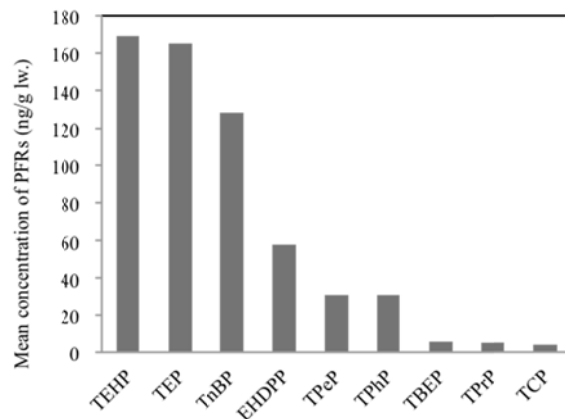


図 5. フィリピン・マニラ湾の魚類中 PFRs の検出頻度(%)

魚類の種別 PFRs 蓄積濃度は Yellowstriped goatfish で最も高濃度が検出され (1880 ng/g 脂肪重量当たり)、次いで Silver sillago (1800 ng/g)、Tripletail wrasse (1480 ng/g)の順で高値を示した(図 6)。この結果から、種間によって餌生物の種類や摂取量が異なること、また、代謝分解力の違いによる蓄積パターンの差異が考えられた。一方、底棲生物と水系生物の検出濃度を比較したところ、底棲生物の方が高濃度で検出された。このことは、PFRs が粒子などに吸着性が高く、水より沈殿物に対象物質が吸着されたものを食べて体内に最も蓄積されたと示唆された。PFRs 濃度と栄養段階の指標となる $\delta^{15}\text{N}$ との相関関係を調べた結果、TPhP のみにおいて有意な相関が認められ、食物網を介して生物濃縮していることが示唆された(図 7)。しかし、他の PFRs は栄養段階との間で有意な相関が認められないことから、食物網を介した生物濃縮よりも堆積物や水からの取り込みによる蓄積の方が大きいと考えられた。フィリピン・マニラ湾の魚類における PFRs を分析し、これら物質による汚染実態と生物蓄積性を調査した。さらに窒素・炭素安定同位体比の解析により食物網の構造を明らかにし、PFRs の挙動を解析した。本調査地域の魚類から PFRs が数 ng/g から数百 ng/g の濃度範囲で検出され、これらの物質による広域汚染が明らかとなった。また、魚類から検出された PFRs 濃度に種間差が認められたことから、生息域や食性・代謝力等が蓄積に関与すると推察された。TPhP は食物網を介して高次栄養段階の生物に濃縮されることが判明した。

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 13 件)

(1) Tomohiko Isobe, Shohei P Ogawa, Karri Ramu, AgusSudaryanto, Shinsuke Tanabe. Geographical Distribution of Non-PBDE Brominated Flame Retardants in Mussels from Asian Coastal Waters. Environmental Science and Pollution Research (2012) vol. 19, no. 8 pp. 3107-3117
DOI: 10.1007/s11356-012-0945-6

(2) Joon-Woo Kim, Tomohiko Isobe, Kwang-Hyeon Chang, Atsuko Amano, Rommel H. Maneja, Peter B. Zamora, Fernando P. Siringan, Shinsuke Tanabe; Levels and Distribution of Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers in Fishes from Manila Bay, the Philippines; Environmental Pollution; (2011) vol. 159,

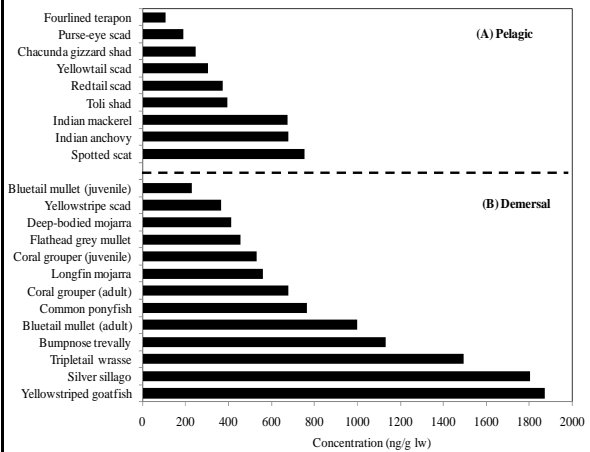


図 6. フィリピン・マニラ湾の魚類中 PFRs 濃度 (ng/g lipid)
(A) 遊泳魚、(B) 底生魚

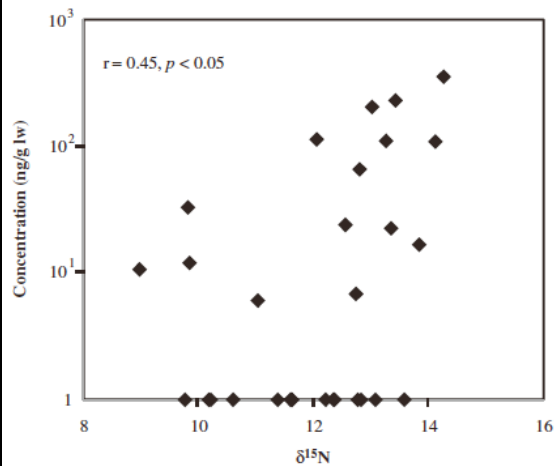


図 7. フィリピン・マニラ湾の魚類中 PFRs 濃度と窒素安定同位体比の関係

no. 12, pp. 3653-3659

DOI: 10.1016/j.envpol.2011.07.020

(3) Joon-Woo Kim, Babu Rajendran Ramaswamy, Kwang-Hyeon Chang, Tomohiko Isobe, Shinsuke Tanabe; Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry; Journal of Chromatography A; (2011) vol. 1218, pp. 3511-3520
DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.006,

(4) Tomohiko Isobe, Tomoko Oshihoi, Hiroki Hamada, Kei Nakayama, Tadasu K. Yamada, Yuko Tajima, Masao Amano, Shinsuke Tanabe;

Contamination Status of POPs and BFRs and Relationship with Parasitic Infection in Finless Porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) from Seto Inland Sea and Omura Bay, Japan; Marine Pollution Bulletin; (2011) vol. 63, no. 5-12, pp. 564-571

DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.01.014

[学会発表] (計 16 件)

(1) Isobe, T., Hamada, H., Chang, K-H., Shibata, J-Y., Sogabe, A., Omori, K. and Tanabe, S. (2012): Spatial distribution and bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecanes (HBCDs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in aquatic ecosystems of Seto Inland Sea, Japan. 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2012), Cairns, Australia, 26-31, August, Abstract Book, B62.

(2) 磯部友彦・濱田宏基・張光玟・宝来佐和子・高橋真・田辺信介 (2012): 有機塩素化合物・臭素系難燃剤による東シナ海の魚介類汚染と生物濃縮, 第21回環境化学討論会, 松山市, 7月11-13日, 講演要旨集, 344-345.

(3) Isobe, T., Ogawa, S. P., Ramu, K. and Tanabe, S. (2011): Geographical distribution of non-PBDE type brominated flame retardants in mussels from Asian coastal waters. 13th EuChemS International Conference on Chemistry and the Environment, ETH Zurich, Switzerland, 11-16, September, Abstracts, 172.

(4) 磯部友彦・濱田宏基・豊島沙織・田辺信介・張光玟 (2011): 臭素系難燃剤の生物濃縮とヒトのリスク評価, 第14回日本水環境学会シンポジウム, 仙台, 9月10-11日, 講演要旨集, 20.

[図書] (計 7 件)

(1) Hamada, H., Isobe, T., Chang, K. H., Shibata, J., Omori, K. and Tanabe, S. (2012): Contamination status and geographical distribution of polybrominated diphenyl ethers, hexabromocyclododecanes and polychlorinated biphenyls in fish from the Seto Inland Sea. 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, p 470 (437-445).

(2) Shohei P. Ogawa, Tomohiko Isobe, Karri Ramu, Annamalai Subramanian, Shinsuke Tanabe (2011) Monitoring of Contamination of Non-PBDE Brominated Flame Retardants in Asian Coastal Waters Using Mussels as a Bioindicator. In Proceedings of Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol. 5- Modeling and Analysis of Marine Environmental Problems, Koji Omori, Xinyu Guo, Naoki Yoshie, Naoki Fujii, Itsuki C. Handoh, Atsuhiko Isobe, and Shinsuke Tanabe, (Eds), TERRAPUB, Tokyo, Japan, p 277 (205-211)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部友彦 (ISOBE TOMOHIKO)

愛媛大学・上級研究員センター・講師

研究者番号: 50391066