

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710064

研究課題名（和文） 有機ハロゲン代謝物による陸棲哺乳類の汚染実態解明

研究課題名（英文） Contamination status of the terrestrial mammals by organohalogen metabolite

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

多様な陸棲哺乳類およびペットのイヌ・ネコの血中有機ハロゲン化合物とその水酸化代謝物を分析した結果、生物種間で OH-PCBs の残留傾向に種差があることを明らかにした。中でも、ネコの OH-PCBs 残留傾向は他種と大きく異なり、低塩素化 OH-PCBs（3～5 塩素化体）の高蓄積が顕著であったことから、本種は特異な代謝機能を有することが示唆された。さらにネコの OH-PBDEs 濃度は他種に比べ高値を示し、餌より天然起源の OH-PBDEs を取り込んでいることが推察された。

研究成果の概要（英文）：

The present study elucidates the accumulation features of PCBs, PBDEs and their hydroxylated metabolites, and specific differences in metabolic capacities of different species by analyzing the blood samples of various terrestrial mammals. As the results, metabolic capacity of PCBs in terrestrial mammals was found to vary widely among species. Lower chlorinated OH-PCB congeners (3-5 Cl) were predominant in cat blood, whereas higher chlorinated OH-PCBs were found in other mammals. The dominant congeners of OH-/MeO-PBDEs were 6OH-/MeO-BDE47 and 2'OH-/MeO-BDE68 in all the terrestrial mammals, which were already reported as natural products in the marine environment. Moreover, higher accumulation of OH-PBDEs and MeO-PBDEs were found in pet cats than pet dogs, suggesting cats may be intake of these compounds from pet food such as fish. Cats exhibited higher accumulation and a specific pattern of OH-PCBs, OH-PBDEs, and MeO-PBDEs, they may be at a high risk from these metabolites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：微量化学物質汚染評価、生体内動態、陸棲哺乳類、有機ハロゲン代謝物

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)に代表される残

留性有機汚染物質(POPs)は、多様な野生生物から検出され、高次生物を中心に今なお汚染

が顕在化している。一方、ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)などの臭素系難燃剤は、生産・使用が継続していることに加え、化学構造や物理化学性が PCBs と類似しているため、近年環境や野生生物、ヒトの汚染レベルが上昇しており、その生体リスクが注目されている。

PCBs や PBDEs などの有機ハロゲン化合物は、親化合物だけでなく代謝物の毒性も問題視され、とくに生物の行動異常に関わる毒性が注目されている。PCBs や PBDEs は体内(肝臓)の薬物代謝酵素(P450)の働きにより水酸化体(OH-PCBs、OH-PBDEs)に代謝され、最終的に抱合酵素の作用で生体外に排泄される(図 1)。しかしながら一部の OH-PCBs、OH-PBDEs は甲状腺ホルモンのサイロキシン(T4)と構造や物性が類似しているため、血中の TH 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す。そのため、極低濃度においても甲状腺ホルモンの恒常性攪乱や脳移行による神経系への悪影響が示唆されており、代謝物による生体や環境の汚染実態解明とリスク評価が求められている。

このような背景から、申請者はこれまでにヒト血中に残留する OH-PCBs 異性体を詳細に分析し、T4 に構造が類似した 20 種以上の OH-PCBs 異性体の残留を明らかにした。近年では野生生物からも有機ハロゲン代謝物の検出が報告されており、一部の鯨類や鳥類の血中に高蓄積していることが明らかとなっている。しかしながら、これまで陸棲哺乳類を対象とした研究事例は少なく、蓄積特性の種差に注目した代謝物の包括的なモニタリング情報は皆無である。

最近の研究により、ペットとして飼育されているネコは PBDEs を高蓄積していることが明らかとなり、増加する甲状腺機能亢進症と PBDEs 代謝物との関連性が強く疑われている⁵⁾。PBDEs の曝露経路はキャットフードなど餌からの取り込みに加え、ハウスダストの体毛付着と毛づくろい(グルーミング)による高濃度曝露が原因と考えられている。しかしながら、PBDEs の代謝物による汚染実態解明は開始されたばかりであり、その曝露の態様、代謝能・蓄積特性、そしてリスク評価に関する研究は極めて少ない。

申請者はこれまでの予備的研究で、複数の海棲哺乳類と陸棲哺乳類(ネコ、タヌキ:各 1 個体)について血中 OH-PCBs、OH-PBDEs 濃度を計測した。その結果、これら陸棲哺乳類の血中には CBs や PBDE を高蓄積しているシャチと同レベルの OH-PCBs が蓄積しており、特にネコは他の生物と比較して相対的に OH-PBDEs を高蓄積している可能性が示された。申請者はこれまでの研究により、P450 による PCBs、PBDEs の代謝能、および血中 TTR

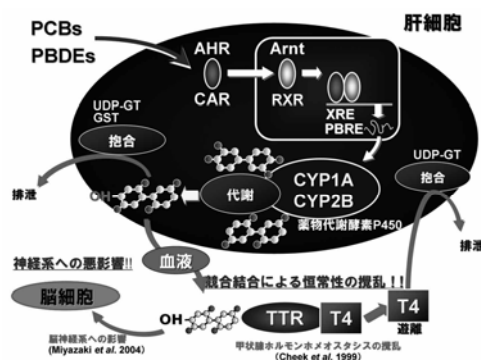


図 1. 有機ハロゲン化合物の代謝経路: 代謝物による TTR への甲状腺ホルモンとの競合結合

への OH-PCBs、OH-PBDEs の結合力には動物種差があることを示し、これら有機ハロゲン代謝物の生成や残留性、各臓器・組織への移行割合は動物種によって異なることを示唆した。以上のことから、OH-PCBs、OH-PBDEs の蓄積特性を多様な動物種で明らかにすることは、PCBs や PBDEs のリスクを総合的に評価する上で必要不可欠と考えられ、本申請研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、有機ハロゲン代謝物の実測例が乏しい陸棲哺乳類に着目し、高次栄養段階に位置する食肉目(イヌ、ネコ、タヌキ、ハクビシン、キツネ、マングース、アナグマ、アライグマ)の血液を供試して PCBs、PBDEs およびそれらの水酸化代謝物(OH-PCBs、OH-PBDEs)を分析するとともに、その汚染実態と蓄積特性の解明を試みた。さらにペット動物のイヌやネコに焦点を当て、血中の有機ハロゲン代謝物に加えてペットフード中の汚染物質濃度を測定し、餌を介した汚染物質曝露実態と代謝物によるリスクを評価した。

3. 研究の方法

本研究で供試する試料は、愛媛大学の生物環境試料バンク(es-BANK)に冷凍保存されている、日本各地より収集された陸棲哺乳類(イヌ、ネコ、タヌキ、キツネ、ハクビシン、マングース、アライグマ)の血液、肝臓、脳組織を対象とした。また、動物病院の協力によりペットとして飼育されているイヌ・ネコの血液を採取し分析した。

分析対象とする代謝物は、世界的に報告例が少ない 4 塩素以下の低塩素化 OH-PCBs 異性体を含む 3~8 塩素化体 OH-PCBs、そして新規 POPs 物質として注目される PBDE の代謝物である OH-PBDEs 異性体(3~5 臭素化体)、ハロゲン化フェノール類を測定対象とし、分析法は既報(Nomiyama *et al.* (2010) *Environ.*

Sci. Technol. 44, 3732-3738.)に従いトリメチルシリルジアゾメタンによる誘導体化処理後に高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/HRMS)で分析した。

ペットフードの分析に用いた試料は、2010年に愛媛県のペットショップで市販のペットフード(ドライフード: 固形乾燥餌、ウェットフード: 缶詰、パウチ)を購入したものを分析に供試した。餌試料を乳鉢で粉碎後、約10gに6M塩酸、2-プロパノール、50%MTBE/hexaneを加え攪拌・超音波抽出し、KOHを加えて振とう抽出を行い、有機層にPCBs、PBDEs、MeO-PBDEs、KOH層にOH-PCBs、OH-PBDEsを分配した。有機層は硫酸処理、GPCで脱脂し、活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/HRMS)(JEOL JMS 800-D)で定性・定量した。KOH層は50%MTBE/hexaneで再抽出し、5%含水シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップ後、トリメチルシリルジアゾメタンで誘導体化した。GPC、活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、GC/HRMSで定性・定量した。

4. 研究成果

① 陸棲哺乳類の代謝物蓄積特性

多様な陸棲哺乳類の血中有機ハロゲン化合物とその水酸化代謝物を分析し、食肉目の生物種間でOH-PCBsの残留傾向に種差があることを明らかにした。中でも、ネコのOH-PCBs残留傾向は他種と大きく異なり、低塩素化OH-PCBs(3~5塩素化体)の高蓄積が顕著であったことから(図2)、本種は特異な代謝機能を有することが示唆された。さらに、ネコのOH-PBDEs濃度は他種に比べ高値を示し(図3)、その異性体組成のパターンから、餌より天然起源のOH-PBDEsを取り込んでいることが推察された。ネコはフェノール化合物の代謝を担うグルクロン酸抱合能が欠損しているため、他種と異なる残留代謝物のパターンを示したものと考察される。そのため、グルクロン酸抱合で代謝・排泄されるフェノール類に属する化学物質の毒性に対してネコの感受性は高いことが予想され、本種は水酸化代謝物のハイリスクアニマルであることが示唆された。

② ペット動物における代謝物曝露の実態解明とリスク評価

ペットのイヌ、ネコの血中有機ハロゲン化合物とその代謝物を分析した結果、ネコの血中総PCBs濃度(平均値±SD湿重量)(93 ± 99 pg/g)は、イヌ(18 ± 35 pg/g)に比べ高値であり(図4)、イヌ、ネコともにCB153の割合が最

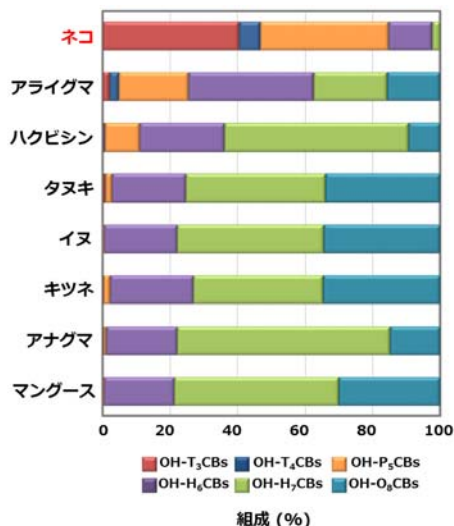


図2 陸棲哺乳類の血中OH-PCB同属体組成

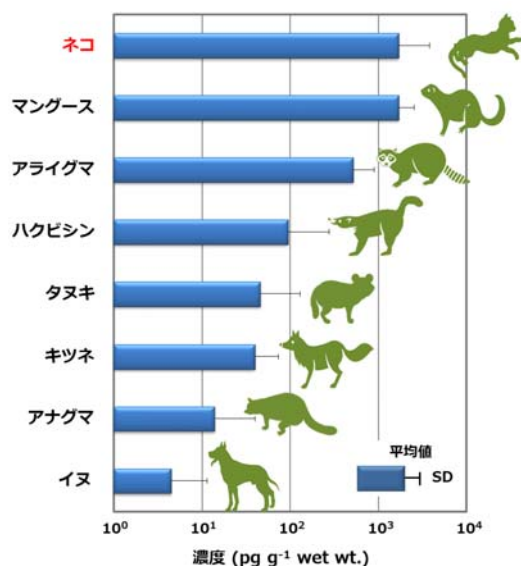


図3 陸棲哺乳類の血中OH-PBDEs濃度

も高く、同様の異性体組成を示した。一方、血中総OH-PCBs濃度は、ネコ(150 ± 80 pg/g)に比べイヌ(220 ± 260 pg/g)で高値を示した。

異性体組成に注目すると、イヌでは4OH-CB199、4OH-CB202などの高塩素化体が高濃度を示したのに対し、ネコでは4'OH-CB18、4OH-CB25/31/4'OH-CB26など低塩素化体が高濃度であり、イヌのPCBs代謝力はネコよりも強いと推察された。既報より、陸棲哺乳類では、5塩素以下の低塩素化OH-PCBsと血中のTTRとの結合能は低く、第II相反応へ速やかに移行し、体外へ排出されやすいと考えられるが、ネコは、フェノール化合物の代謝を担うグルクロン酸抱合能

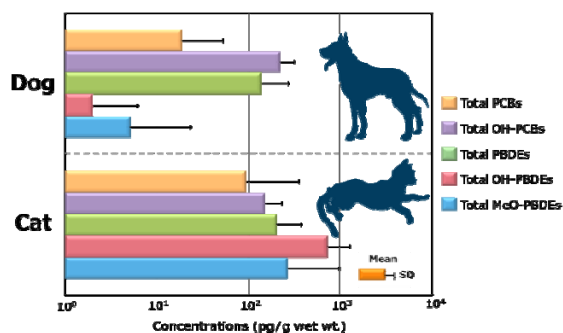


図 4. ペットのイヌおよびネコの血中 PCB, PBDEs, OH-PCBs, OH-PBDEs, MeO-PBDEs の残留レベル

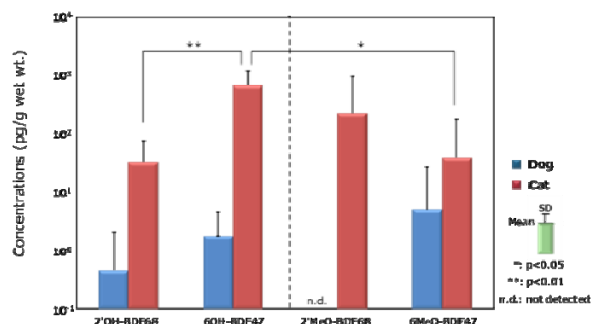


図 5. ペットのイヌおよびネコの血中 OH-PBDEs および MeO-PBDEs 異性体の残留レベル

が欠損しているため、他種と異なる代謝パターンを示したものと推察される。

本研究で検出されたペットのイヌ、ネコ血中 PBDEs 濃度は 140 ± 130 pg/g、 200 ± 170 pg/g であり(図 4)、アメリカ合衆国で報告されるペットのイヌやネコに比べ 1-3 桁低い値であった。異性体組成に着目すると、両種ともに BDE209 が主要異性体であり、餌やグルーミングによるハウスダストからの経口曝露が示唆された。

イヌの血中 OH-/MeO-PBDEs 濃度は、 2.0 ± 4.1 pg/g、 5.0 ± 22 pg/g と PBDEs より低値を示した(図 4)。一方、ネコの血中 OH-/MeO-PBDEs 濃度は 710 ± 560 pg/g、 270 ± 880 pg/g と、イヌより 2 桁高値であり、PCBs や OH-PCBs、PBDEs よりも高い値を示した。異性体に着目すると、イヌ、ネコともに 6OH-/MeO-BDE47 と 2'OH-/MeO-BDE68 のみが検出され、これらの化合物は海洋起源の天然生成物であることが報告されている。とくに、ネコ血中では 6OH-BDE47 と

2'MeO-BDE68 が高濃度であり(図 5)、キャットフードの主原料である魚介類から取り込んだ海洋天然物、あるいはそれらの代謝生成物であることが推察された。取り込んだ MeO-PBDEs は生体内で脱メチル化され OH-PBDEs へ代謝されることが報告されており、ネコ血中 OH-PBDEs の一部は、MeO-PBDEs の代謝生成物である可能性が考えられた。近年、OH-PBDEs は神経伝達物質や甲状腺ホルモンに影響を及ぼすことが指摘されており、ネコは水酸化代謝物によるこの種の毒性がとりわけ懸念される。

③ ペットフードに残留する有機ハロゲン代謝物の分析

ペットフード中 PCBs 濃度は、イヌ、ネコ血液と比べ高濃度で検出された。また、キャットフード中 PCBs 濃度はドッグフードと比べ高く、原材料に含まれる魚介類の寄与が示唆された。イヌ、ネコの餌中 OH-PCBs 濃度は、血液と比べ 1-2 桁低値($0.52-1.3$ pg/g wet wt.)であることが明らかとなった。

これらの結果より、ペットの血中に残留する OH-PCBs は、餌から取り込んだ PCBs の代謝生成物であると考えられた。ドライフード中 PBDEs 濃度は、イヌ、ネコともにウェットフードと比べ高濃度であり、血液と同程度であった。また、本研究より検出されたキャットフード中 PBDEs 濃度($74-330$ pg/g wet wt.)は、米国 ($170-2900$ pg/g wet wt.)で報告されたレベルより低濃度であった。ペットフードでは BDE209 が主要異性体であり、血中の組成と同様の傾向が認められたことから、餌を介した PBDEs 曝露が予想された。

キャットフード中 OH-PBDEs 濃度は血液より低値であったのに対し、餌中 MeO-PBDEs は血液と比べ同程度もしくは 1 桁高濃度で残留していることが明らかとなった(図 6)。さらに、海産物を原材料とするキャットフード中には、天然起源の 6MeO-BDE47 と 2'MeO-BDE68 が OH-PBDEs よりも高濃度で残留していた(図 6)。MeO-PBDEs は生体内で脱メチル化され OH-PBDEs へ変化することが報告されている。ネコ血中からも 6OH-BDE47 が高濃度で検出されたことから、ネコの血中 6OH-BDE47 の起源の大部分は、餌から摂取した海洋起源の 6MeO-BDE47 が代謝によって脱メチル化し、TTR と結合して血中に残留したものと推察された(図 7)。一方、ネコ血中 2'OH-BDE68 は低濃度であったことから(図 6)、ネコの 2'MeO-BDE68 脱メチル化能は低く、TTR への結合能は弱いと考えられる。近年の研究よ

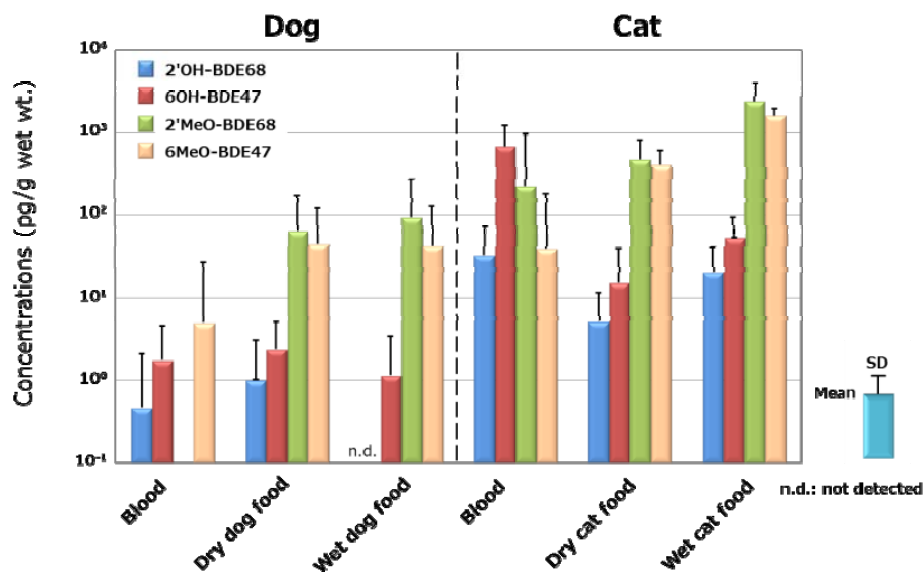


図 6. ドッグフード・キャットフード中に残留する OH-PBDEs および MeO-PBDEs 異性体の残留レベル、およびペットのイヌ・ネコ血中レベルとの比較

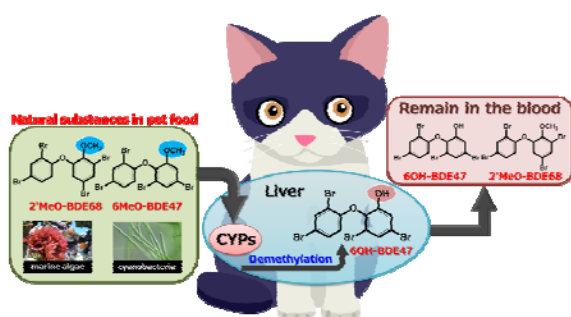


図 7. ペットネコに取り込まれる 6MeO-BDE47 から 6OH-BDE47 への生体内変化

り、OH-PBDEs は甲状腺ホルモンへの悪影響が指摘されており、ネコに海産物を主原料としたキャットフードを与え続けることによる、ハロゲン化フェノール類がもたらす甲状腺機能障害が懸念された。

④ まとめ

以上の結果から、陸棲哺乳類における PCBs、PBDEs 水酸化代謝物の残留パターンと代謝機能は、生物種によって大きく異なることが判明した。とくに、ペットフードを介した有機ハロゲン化合物とその水酸化代謝物に対するネコの感受性は高いことが予想され、海産物を主原料としたキャットフードをネコに与え続けることによる、ハロゲン化フェノール類がもたらす甲状腺機能への影響が懸念される。さらに、先述したように注視すべ

きもう一つの曝露ルートは、ハウスダストの体毛付着とグルーミングによる取り込みと考えられる。しかしながら、ハウスダストによるペットの汚染物質曝露実態は未だ不明な部分が多く、乳幼児への汚染リスクも類似の問題として危惧されることから、今後の興味深い研究課題である。ペットで増加している甲状腺機能障害と有機ハロゲン代謝物の関連性を明らかにする研究も予定しており、その成果はヒトの身近な化学物質汚染問題に重要な知見を提供できることが期待される。OH-PCBs、OH-PBDEs の生成と曝露実態を多様な種で明らかにすることは、PCBs や PBDEs の生体リスクを総合的に評価する上で必要不可欠であり、緊要な研究課題と考えられる。

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 6 件)

1. Mizukawa, H., Nomiyama, K., Nakatsu, S., Yachimori, S., Hayashi, T., Tashiro, Y., Tanabe, S. (2011): Organohalogen contaminants and their hydroxylated metabolites in the blood of Japanese terrestrial mammals. *Organohalogen Compounds*, 73, 1207-1210. 査読有
2. Nomiyama, K., Uchiyama, Y., Horiuchi, S., Eguchi, A., Mizukawa, H., Hirata, S.H., Shinohara, R., Tanabe, S. (2011): Organohalogen compounds and their metabolites in the blood of Japanese

amberjack (*Seriola quinqueradiata*) and scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) from Japanese coastal waters. *Chemosphere*, 85, 315-321. 査読有

3. Nomiyama, K., Eguchi, A., Mizukawa, H., Ochiai, M., Murata, S., Someya, M., Isobe, T., Yamada, T.K., Tanabe, S. (2011): Anthropogenic and naturally occurring polybrominated phenolic compounds in the blood of cetaceans stranded along Japanese coastal waters. *Environmental Pollution*, 159, 3364-3373. 査読有
4. 他 3 件

[学会発表] (計 13 件)

1. Mizukawa, H., Nomiyama, K., Nakatsu, S., Yachimori, S., Hayashi, T., Tashiro, Y., Tanabe, S. (2011): Organohalogen Contaminants and their hydroxylated metabolites in the blood of Japanese terrestrial mammals. 31st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin 2011), 2903, Brussels, Belgium, 21-25 August. 査読有
2. Mizukawa, H., Nomiyama, K., Nakatsu, S., Yachimori, S., Hayashi, T., Tanabe, S. (2011): Organohalogen metabolites in terrestrial mammals: Does carnivorous species have potential risk by hydroxylated metabolites?. The 4th Joint Forum of Environmental Sciences 2011, p.2, Matsuyama, Ehime, 20-21 June. 査読無
3. Mizukawa, H., Nomiyama, K., Nakatsu, S., Yachimori, S., Hayashi, T., Tashiro, Y., Yamamoto, M., Tanabe, S.: Comprehensive studies on halogenated phenolic compounds in blood of terrestrial mammals from Japan, 第 20 回環境化学討論会, 1E-11, 熊本市, 2011 年 7 月. 査読無
4. 他 10 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. Yamamoto, M., Isobe, T., Hayashi, T., Yachimori, S., Nomiyama, K. and Tanabe, S. (2012): Contamination status and accumulation features of organohalogen compounds in raccoon dog and masked palm

civet. *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, 211-219. 査読有

3. Mizukawa, H., Nomiyama, K., Kunisue, T., Watanabe, M. X., Subramanian, Takahashi, S. Tanabe, S. (2010): Accumulation features of hydroxylated-PCBs (OH-PCBs) in the blood of pigs collected from a dumping site for municipal wastes in India. *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, 175-181. 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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

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