

令和元年6月19日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01784

研究課題名(和文) 新規残留性有害化学物質における広域汚染・生物蓄積の実態解明と生態影響評価

研究課題名(英文) Elucidation of widespread contamination status and bioaccumulation features of emerging persistent organic pollutants and assessment of their ecological effects

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・特別荣誉教授

研究者番号：60116952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：既存の残留性有機汚染物質(POPs)に加え、近年POPs条約に追加登録された臭素系難燃剤および代替難燃剤による広域汚染の実態、生物蓄積特性、経年変化の究明に取り組んだ結果、アジア広域に生息する淡水魚がPOPsだけでなく代替難燃剤に汚染されていたこと、わが国では新規POPsのHBCDsの汚染が顕著であり野生鳥類に生物濃縮していたこと、そして外洋性鯨種の蓄積濃度は現在も上昇していることが明らかとなった。またin vitroアッセイ試験と機器分析から、野生鳥類の肝臓において未知のAhRアゴニストの存在が示唆され、途上国のe-wasteではミックスハロゲン化ダイオキシンの二次生成が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アジア太平洋地域に生息する野生生物を対象に新規POPsとして知られるヘキサブROMシクロドデカン(HBCDs)やPOPs代替物質のモニタリング事例はきわめて少なく、本研究で得られた成果は、POPs条約の有効性評価や対象物質の追加について重要な基礎的知見となり得る。また、電気・電子機器廃棄物(e-waste)の不適切なリサイクル処理による化学物質汚染は、既知のPOPsだけでなく多様な有害化学物質の二次生成も関与していることを初めて突き止めた本研究成果は、現地での廃棄物処理に関わる規制の整備が急務であることに加え、資源循環と越境移動の適正化を目指す国際的な枠組みを制定する必要性を強調するものである。

研究成果の概要(英文)：Widespread contamination status, bioaccumulation features, and temporal trends of persistent organic pollutants (POPs) and their candidate substances were determined. It was revealed that freshwater (brackish-water) fish, tilapia, collected from various areas in Asian countries have been widely exposed not only to POPs but also to a candidate substance, and in Japan, contamination of hexabromocyclododecanes (HBCDs) registered recently on the POPs convention was dominant and this new POP was bioaccumulated in various wild birds. When the temporal trends of POPs were analyzed in a pelagic whale species, HBCD levels increased significantly even in recent years. In addition, in vitro assay analysis indicated the presence of unknown aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists in the liver of wild avian species and instrumental analysis revealed the secondary formation of mixed halogenated dibenzofurans and dipheyl ethers in a developing country e-waste site.

研究分野：環境化学

キーワード：新規残留性有機汚染物質 生物蓄積 環境動態 生態影響 リスク評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学物質の環境汚染と生態影響について、とくに社会的関心を集めてきた物質群に残留性有機汚染物質(POPs)がある。POPs条約(ストックホルム条約)が2004年5月に発効し、ポリ塩化ビフェニル(PCBs)など12種類の有機塩素化合物(既存POPs)について、生産・使用の規制や非意図的生成の削減が世界規模で実行されることになったため、その環境汚染レベルは低減傾向にある。POPs検討委員会ではPOPs条約の有効性評価に加え、既存のPOPsに物理化学的性質が類似し地球規模での汚染の拡大と生態リスクが懸念される物質の追加についても継続的に議論されている。2004年の条約発効以降に追加が議論されてきた物質として、電気・電子機器やプラスチック製品等に含まれる有機臭素系難燃剤(BFRs)のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)があり、Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta-BDEsは2009年に追加登録(新規POPs)されたが、DecaBDEは審議中であり今なお使用が継続している(本研究期間の2017年に追加登録)。また、主に建材や装飾品等に添加されていたBFRsのヘキサブロモシクロデカン(HBCDs)も2013年に追加登録された。経済成長の著しい新興国・途上国では電気・電子機器廃棄物(e-waste)の適正処理が喫緊な課題となっており、PBDEsやHBCDsなどの有害物質の環境への放出が懸念されている。そのため多様な生物に対する健康影響が危惧されるが、曝露や蓄積レベルに関する研究例は乏しく、経年変化に関する調査も実施されていない。また、PBDEsおよびHBCDsの規制を受けデカブロモジフェニルエタン(DBDPE)やビストリプロモフェノキシエタン(BTBPE)などの代替BFRsの需要が増加しているが、これら代替物質によるヒトを含む動物への曝露の態様はほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では既存POPsに加え、近年POPs条約に追加登録されたPBDEsやHBCDs、そして代替BFRsであるDBDPEやBTBPEなどのPOPs候補物質に着目し、アジア太平洋地域における汚染実態、生物蓄積特性、経年変化の究明を試みた。また、BFRsの主要な環境放出源と考えられる途上国のe-waste処理場から採取した環境試料のスクリーニング分析と、わが国に生息する野生生物の肝臓抽出液を用いて*in vitro*レポーター遺伝子アッセイを実施し、未知の環境残留性・生物蓄積性化学物質(POPs様物質)の探索にも着手した。

3. 研究の方法

途上国に存在するe-waste処理場で採取した土壌試料およびアジア太平洋地域に生息する魚類・鳥類・鯨類などの生物組織試料を化学分析に供試し、1) 広域汚染の実態解明、2) 生物蓄積特性の解明、3) 未知残留性物質の探索、4) バイオアッセイによる活性評価、5) 汚染の過去復元と将来予測をおこなった。本研究を遂行するにあたっては、愛媛大学の貴重な研究基盤「生物環境試料バンク(es-BANK)」の保存試料およびガスクロマトグラフ高分解能質量分析計(GC-HRMS)・2次元ガスクロマトグラフ飛行時間型高分解能質量分析計(GC×GC-HRTOFMS)・高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計(HPLC-MS/MS)などの先端分析機器、そして本研究グループが構築した途上国研究者の人材ネットワークを有効に活用した。

4. 研究成果

(1) アジア地域に生息する魚類の汚染実態

POPs関連物質によるアジア地域の汚染実態と地理的分布を明らかにするため、日本(沖縄)、フィリピン(マニラ)、インドネシア(ジャカルタ)、ベトナム(ハノイ)、インド(ベンガル川)の河川から採集したティラピアの筋肉組織を化学分析に供試した。分析の結果、既存POPsのPCBsとDDTs、そして新規POPsのPBDEsとHBCDsは検出が認められたが、代替BFRsであるDBDPEとBTBPEはすべての検体で検出下限値未満であり、上記アジア諸国の淡水・汽水域に生息する魚類にはこれら代替BFRsの曝露が及んでいないものと考えられた。

筋肉組織に蓄積していたPOPs濃度の地理的分布を解析した結果、PCBs濃度はベトナム>日本>インド>インドネシア>フィリピンの順で検出された(図1)。ベトナムの検体が高値を示した理由として、ベトナム戦争当時、戦車や戦闘機などの軍用機材に使用されたPCB含有トランス・コンデンサーから流出したことが挙げられる。DDTs濃度はインドの検体で相対的に高く(図1)過去の使用量を反映したものと考えられた。興味深いことに、BFRs濃度は日本の検体で高く(PBDEs: 日本>ベトナム>インドネシア>インド>フィリピン、HBCDs:

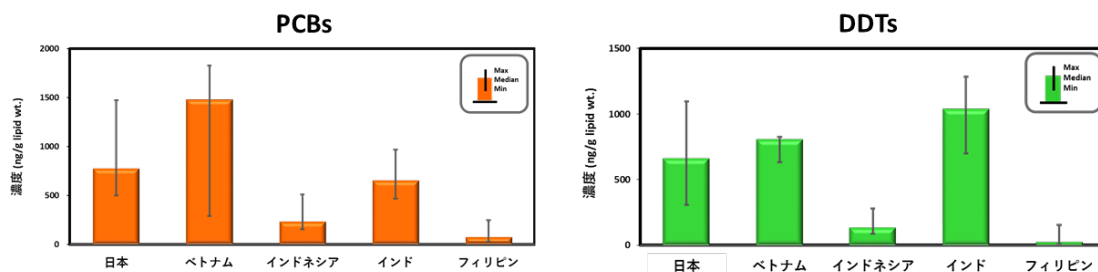


図1. アジア地域に生息するティラピアの筋肉組織から検出されたPCBsおよびDDTs濃度

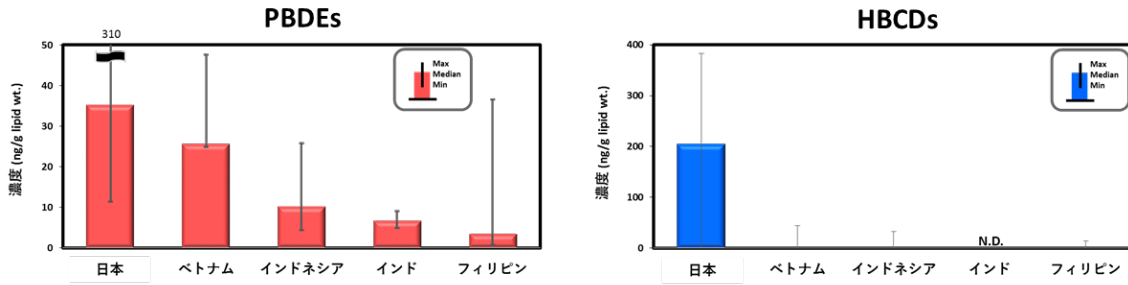


図2. アジア地域に生息するティラピアの筋肉組織から検出されたPBDEsおよびHBCDs濃度

日本 ベトナム>インドネシア>フィリピン>インド)、とくに HBCDs の汚染は顕著であり、その他の国では分析に供試した検体の 90%以上が検出下限値未満であった (図2)。この結果は、二枚貝を用いた先行研究と類似しており、日本で HBCD 製剤が大量に消費されたことに起因すると推察され、今後わが国では発生源の特定に関する調査や広域モニタリングの継続が必要である。前述したように代替 BFRs は全検体で検出下限値未満であったが、代替塩素系難燃剤であるデクロンプラス(DPs)がインドを除くティラピアから検出された (図3)。DPs 濃度はベトナムの検体で相対的に高く、DPs が主に米国と中国で生産されケーブル被膜等に添加されていることを考慮すると、ベトナムからの輸入製品の使用が疑われた。

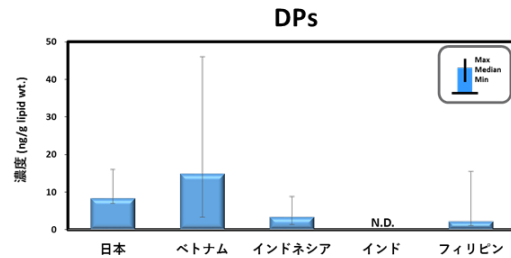


図3. アジア地域に生息するティラピアの筋肉組織から検出されたDPs濃度

(2) 野生鳥類の汚染実態と蓄積特性

本研究グループは、日本に生息する野生鳥類の PCBs 汚染実態をすでに報告しているが、一部の鳥種では依然として高濃度蓄積が認められている。そこで本研究では、PCBs だけでなく新規 POPs の PBDEs と HBCDs、そして代替難燃剤(DPs, BTBPE, DBDPE)の汚染実態と蓄積特性の解明を試みた。2008 年から 2013 年にかけて採取し es-BANK に冷凍保存されていた野生鳥類 (11 種) の肝臓を化学分析に供試した結果、PCBs だけでなく PBDEs と HBCDs もほぼすべての検体から検出され野生鳥類への曝露が明らかとなったが、その蓄積レベルは種により大きく異なっていた。PCBs 濃度は魚食性と肉食性の鳥種でほぼ同等であったのに対し、PBDEs 濃度は肉食性で高く、HBCDs 濃度は魚食性が高値を示した (図4)。この結果は、肉食性鳥類の餌となる野ネズミなどの小型哺乳類が相対的に高いレベルの PBDEs を蓄積している一方で、HBCDs は水域に汚染が拡大しており魚類に曝露が及んでいることを暗示している。

代替難燃剤の DPs、BTBPE、DBDPE は、それぞれ分析した検体の 68%、24%、3% から検出された。BTBPE と DBDPE は検出頻度だけでなく濃度も低いことから、環境への負荷は小さいことが推察された。一方 DPs は、検出率が高く食性間の濃度差も認められていないことから (図4) 環境汚染と野生鳥類への曝露は進行していることが考えられた。とくに雑食性で

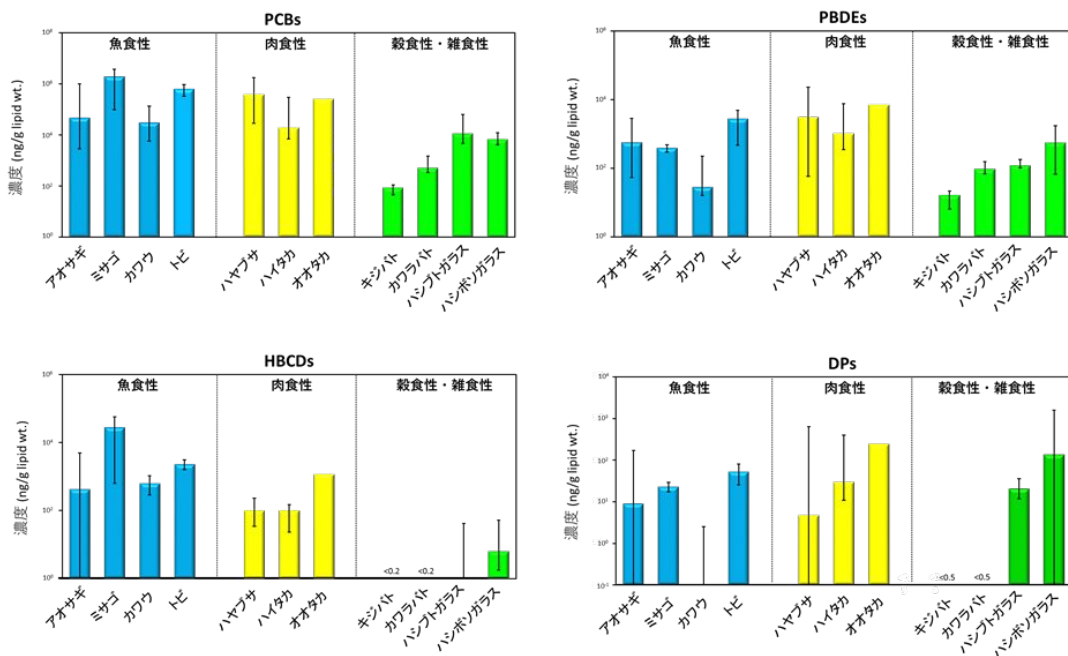


図4. 日本に生息する野生鳥類の肝臓から検出されたPCBs・PBDEs・HBCDs・DPs濃度

ある ハシブトガラスの肝臓から最高濃度の DP_s が検出されており、近年の人間活動や産業活動にともなう相当量の環境放出が示唆された。

(3) 外洋性鯨種に蓄積する POPs 濃度の経年変化

POPs 関連物質による外洋域の汚染を把握するため、1982 - 2015 年にかけて日本沿岸に集団座礁した外洋性（熱帯・亜熱帯）鯨種であるカズハゴンドウ (*Peponocephala electra*) の脂皮試料を化学分析に供試した。分析の結果、POPs は全試料から検出されたが、DBDPE と BTBPE はすべての検体で検出下限値未満であり、前述したテラピアからも検出されなかったことを考慮すると、これら代替 BFRs による水圏環境への汚染負荷はかなり小さいものと考えられた。また、DP_s もカズハゴンドウの脂皮から検出されなかったことから、外洋域への拡散はほとんどないものと推察された。

カズハゴンドウの脂皮に蓄積していた POPs 濃度の経年変化を、各検体の体長と採取年を説明変数として重回帰分析により解析した結果、CHLs 濃度のみ定常状態にあったが、PCBs、DDTs、HCHs、HCB の濃度は 2001/2002 年以降も有意な低減傾向を示し（図 5）、1970 - 1980 年代における生産・使用の禁止を反映したものと考えられた。大気経路で熱帯域から高緯度地域に化学物質が移動する様子をグラスホッパー効果（バタ効果）と呼び、POPs の環境動態の特徴の一つとされているが、過去環境中に放出された既存 POPs の相当量がすでに高緯度寒冷域に移行しているため、熱帯・亜熱帯の外洋域に生息するカズハゴンドウの蓄積濃度は低減を示したものと推察される。

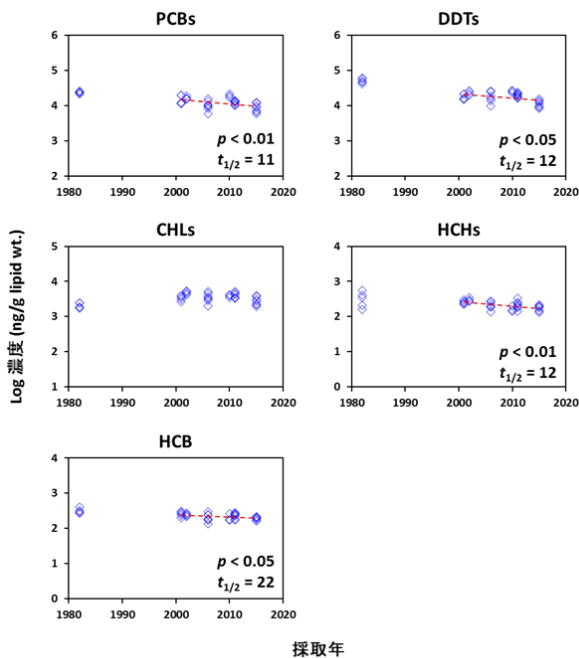


図 5. カズハゴンドウの脂皮に蓄積していた既存 POPs 濃度の経年変化

既存 POPs のパターンとは異なり、カズハゴンドウの PBDEs および HBCDs の蓄積濃度は 1982 年から 2001/2002 年の検体で明らかに上昇し、その後 PBDEs は定常状態を示したが、HBCDs は有意に増加していることが判明した（図 6）。この結果は、これら BFRs による熱帯・亜熱帯外洋域への移動拡散が継続しており、とくに近年規制された HBCDs の沈着量が大いことを示唆している。

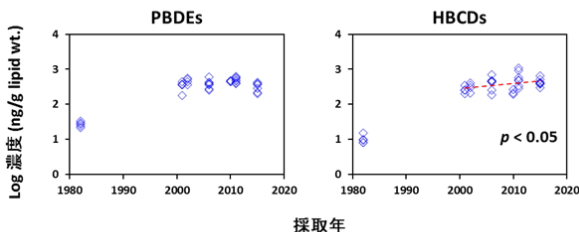


図 6. カズハゴンドウの脂皮に蓄積していた BFRs 濃度の経年変化

(4) *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ法による組織残留性 AhR アゴニストの活性評価

本研究グループはこれまでに、aryl hydrocarbon receptor (AhR) アゴニストである塩素化ダイオキシン類 (PCDD/Fs・DL-PCBs) が野生高等動物の肝臓へ特異的に蓄積することを明らかにしている。最近の研究から、化学構造が不安定なダイオキシン様活性物質（AhR アゴニスト）の存在が示唆されており、野生生物は構造未知物質を含む多様な AhR アゴニストに曝露されている可能性がある。しかしながら従来の分析・評価手法では、前処理・曝露実験行程における AhR アゴニストの分解・代謝が予想されるため、それらの毒性同定評価は困難な状況にある。そこで本研究では、ヒトと比べダイオキシン類 (DRCs) を高濃度蓄積している野生生物を対象に、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ法 (DR- and PAH-CALUX) を用いた組織残留性 AhR アゴニストの探索を試みた。

2008 - 2015 年に日本で採取された野生生物 (9 種) の肝臓試料を抽出し、硫酸処理により精製した抽出液を DR-CALUX に供試した結果、全ての検体でダイオキシン様活性が認められ (66 - 120,000 pg CALUX TEQ/g lw)、その活性値は鳥類で最も高く、次いで陸・海棲哺乳類 > 魚類の順であった（図 7）。このように、野生生物の中でも鳥類は、相対的に高いレベルのダイオキシン様活性物質を肝臓

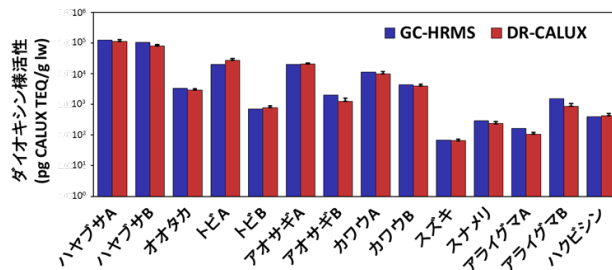


図 7. 機器分析 (GC-HRMS) と *in vitro* アッセイ (DR-CALUX) 法で測定された野生生物の肝臓中ダイオキシン類様活性

に蓄積していることが判明した。同一の肝臓試料を化学分析したところ、PCDD/Fs と DL-PCBs は全ての検体から検出されたが、臭素化ダイオキシン類(PBDD/Fs)は検出下限値未満であった。Relative Effect Potency (REP)から算出した PCDD/Fs・DL-PCBs の総 toxic equivalent (TEQ) レベルは 68 - 120,000 pg TEQ/g lw であり、DR-CALUX の総活性値と概ね同等であった(図7)。これらの結果から、野生生物の肝臓に蓄積するダイオキシン様活性物質の大半は、PCDD/Fs および DL-PCBs であることが示唆された。

次に、相対的に高いレベルのダイオキシン様活性が認められた野生鳥類(アオサギ・カワウ・トビ・ハヤブサ)を対象に、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で分画した肝臓抽出液を、DR-CALUX と比べ多様な AhR アゴニストの検出に適した PAH-CALUX に供試し、易分解性を含む AhR アゴニストの総活性を評価した。その結果、PAH-CALUX に供試した全鳥種の肝臓試料からダイオキシン様活性が検出され、その最高値はハヤブサで認められた(図8)。興味深いことに、カワウを除く3種の鳥類(トビ・アオサギ・ハヤブサ)では、GPC 処理溶液が硫酸処理溶液を上回る活性を示すことが明らかとなり、とくにアオサギでは両画分で検出された活性値に 42%の差が認められた。この結果は、硫酸処理で消失する AhR アゴニストが鳥類の肝臓に残留していることを示唆しており、今後、活性に寄与する易分解性 AhR アゴニストの特定が課題である。

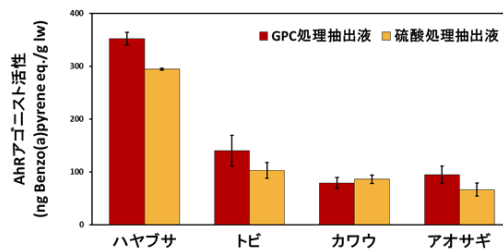


図8. GPC処理および硫酸処理による野生鳥類の肝臓中AhRアゴニスト活性の比較

(5) e-waste 処理場の土壌を用いた網羅的スクリーニング分析

経済成長の著しい途上国では、e-waste の不適切処理による有害化学物質の環境放出と汚染の拡大が懸念されている。そこで、e-waste の野焼きなど不適切な処理が顕著であるガーナの e-waste 処理場で採取した表層土壌を GC x GC-HRTofMS で分析し、有機ハロゲン化合物の包括的スクリーニングを試みた。野焼き区域と分解・解体区域で採取した土壌試料を精製・分画し、ダイオキシン画分と非ダイオキシン画分の最終溶液をそれぞれ GC x GC-HRTofMS で分析した。取得したクロマトグラムは、独自に作成した R スクリプト (H/Cl mass defect filtering) で処理し、有機ハロゲン化合物のピークを選択的に抽出後、GC-Image で解析した。

非ダイオキシン画分の解析から多様な有機ハロゲン化合物が検出され(図9)、PCBs や PBDEs などの POPs による汚染が確認された。この結果は、ストックホルム条約で国際的に生産・使用・流通が規制されている化学物質が、中古の電気・電子機器とともに越境移動していることを示唆している。また、電線・ケーブルの被覆樹脂に添加されている DPBs や、その構造類似化合物が PBDEs に次ぐ強度で検出された。興味深いことに、世界的に生産・使用実績のないミックスハロゲン化ジフェニルエーテル(PXDEs, X=Br and/or Cl)の検出が明らかとなり、本研究で初めて e-waste 処理場の土壌に残留していることを突き止めた。このように、e-waste に含まれる有機ハロゲン化合物だけでなく、野焼き等の不適切な処理過程において相当量の PXDEs が非意図的に生成し、環境中に放出されているものと推察される。

次にダイオキシン画分溶液を分析した結果、塩素化、臭素化、およびミックスハロゲン化ダイオキシン類(PCDD/Fs, PBDD/Fs, PXDD/Fs, X=Br and/or Cl)が検出され(図9)。その大半はジベンゾフラン類で占められていた。とくに、PBDFs の検出強度は卓越しており(PBDFs >> PXDFs > PCDFs)、この検出順位は、非ダイオキシン画分で確認されたハロゲン化ジフェニルエーテル類の傾向と一致していた(PBDEs >> PXDEs > PCDEs)。これらの結果は野焼き過程において、e-waste に含まれる PBDEs がより毒性の強い PBDFs に化学変換されていることを示唆している。また、野焼き地点の土壌から高濃度で検出された PXDFs の塩素置換数に着目すると、低塩素化同族体ほど検出強度が卓越しており、この傾向は PXDEs の結果と一致していた。したがって PXDFs は、e-waste の野焼き過程で生成した PXDEs の環化や PBDFs の塩素化により二次生成したものと推察される。これらの知見から e-waste 作業労働者への曝露リスクが危惧され、早急な汚染低減策が求められる。

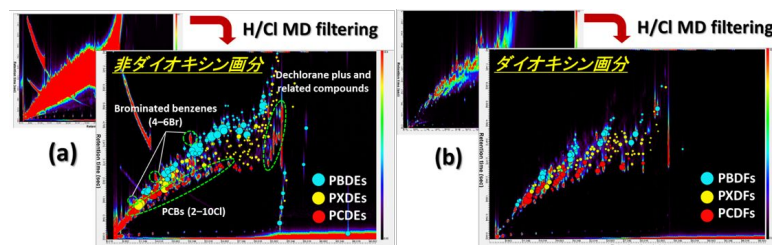


図9. e-waste処理場から採取した表層土壌の非ダイオキシン画分(a)とダイオキシン画分(b)のGC x GC-HRTofMS分析から得られた2D TIC

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 28 件のうち主要な 2 件)

- Goto, A., Tue, N. M., Someya, M., Isobe, T., Takahashi, S., Tanabe, S. and Kunisue, T. (2017): Occurrence of natural mixed halogenated-p-dioxins: specific distribution and

- profiles in mussels from Seto Inland Sea, Japan. *Environmental Science & Technology*, 51, 11771-11779. DOI: 10.1021/acs.est.7b03738 (査読有)
2. Tanoue, R., Margiotta-Casaluci, L., Huerta, B., Runnalls, T. J., Nomiyama, K., Kunisue, T., Tanabe, S. and Sampter, J. P. (2017): Uptake and metabolism of human pharmaceuticals by fish: a case study with the opioid analgesic tramadol. *Environmental Science & Technology*, 51, 12825-12835. DOI: 10.1021/acs.est.7b03441 (査読有)

[学会発表] (計 54 件のうち主要な 2 件)

1. Kasuya, M., Tue, N. M., Goto, A., Tanabe, S. and Kunisue, T. (2018): AhR agonists in Japanese wild birds evaluated by chemical analysis and bioassays. 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2018), Kraków, Poland, August, Program, 001 (page 79)
2. Kunisue, T., Egashira, K., Isobe, T., Nakayama, K., Tajima, Y., Yamada, T. K. and Tanabe, S. (2017): Temporal trends of brominated flame retardants and organochlorines in melon-headed whales stranded along the Japanese coastal waters: Utilization of samples and data stored in *es-BANK* and ChemTHEATRE. 37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2017), Vancouver, Canada, August, Program, P65-E

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他] 該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 国末 達也

ローマ字氏名 : (KUNISUE, Tatsuya)

所属研究機関名 : 愛媛大学

部局名 : 沿岸環境科学研究センター

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 90380287

研究分担者氏名 : 岩田 久人

ローマ字氏名 : (IWATA, Hisato)

所属研究機関名 : 愛媛大学

部局名 : 沿岸環境科学研究センター

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 10271652

研究分担者氏名 : 野見山 桂

ローマ字氏名 : (NOMIYAMA, Kei)

所属研究機関名 : 愛媛大学

部局名 : 沿岸環境科学研究センター

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 30512686

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。