

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740032

研究課題名(和文)非意図的生成PCBの異性体組成の解明とその生体影響評価に関する研究

研究課題名(英文)Clarification of the congener pattern of unintentional PCBs, and study on their effects on living organisms

研究代表者

姉崎 克典 (ANEZAKI, Katsunori)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・環境・地質研究本部環境科学研究センター・研究主任

研究者番号：20442634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：顔料や化成品の製造に伴い非意図的に生成するPCBsについて、新たにクロロフェニルシラン類にも含有している事を明らかとした。非意図的生成PCBsに特異的なコンジェナーについて、10種の核内受容体を介した作用を検討したところ、いくつかのコンジェナーにエストロゲン受容体(ER) / アゴニスト及びアンタゴニスト作用などが認められた。環境中での非意図的生成PCBsの動態について検討した。環境大気や底質ではカネクロールの影響が強かったものの、一定程度のアゾ系顔料に含まれるPCBsの影響も認められた。しかしながら、海棲哺乳類の脂皮や肝臓には顔料由来するPCBsはほとんど含まれていなかった。

研究成果の概要(英文)：Chlorophenylsilanes are PCBs produced unintentionally during the manufacturing of pigments and chemical products. It was observed that the specific congeners of PCBs had antagonistic activities on the estrogen-receptor (ER) and , mediated via 10 kinds of nuclear receptors. The dynamics of unintentionally produced PCBs in the environment were discussed. It was found that the effects of Kanechlor in the atmosphere and sediments were strong, and that the PCBs included in azo pigments have some effects. However, little pigment-derived PCBs were included in the blubber and liver of marine mammals.

研究分野：環境化学

キーワード：PCB 非意図的生成 ベイズ形半因子モデル 生物濃縮 レポータージーンアッセイ 生体影響

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境中で検出されるポリ塩化ビフェニル (PCBs) のほとんどはカネクロール (KC) に代表される工業製品由来である。しかしながら、顔料中に含まれる非意図的生成 PCBs は、例えばアゾタイプの顔料であれば PCB-11 や PCB-52 が、フタロシアンタイプ顔料であれば PCB-209 が高濃度を示し、その他のコンジェネーターはほとんど検出されない極めて特徴的な組成を有し、KC とは大きく異なっている。顔料中に非意図的に含まれている PCBs は、0.1~10ppm 程度と比較的高濃度の場合があり、種類によってはストックホルム条約で規制の対象となる 50ppm を超過するものさえ存在する。しかしながら、これらのコンジェネーターパターンが KC と大きく異なることから、従来考えられていた PCBs の生体影響とは異なる可能性が考えられる。PCBs の生体影響については PCB-126 といったダイオキシン様 PCBs (DLPCBs) や比較的塩素置換数の大きいコンジェネーターについては検討されているが、顔料に含まれるコンジェネーターはフタロシアン顔料を除き 4 塩素化体以下の低塩素化体に集中しており、これらのコンジェネーターの生体影響評価はほとんど行われていないことから、顔料中の不純物 PCBs の生体影響についても不明な状況である。特にこれらの顔料は印刷物をはじめとして開放系で使用されることが多いことから、環境中への放出、そしてその挙動や生態系への影響が極めて懸念される。

(2) 大気サンプリングに使用されるハイボリュームサンプラーを使用して PCBs の測定を行った際に、PCBs の異常値が検出される事例が頻発している。原因として消音材に含まれる短鎖塩素化パラフィンや接着材のシリコン中の非意図的生成 PCB の影響が指摘されている。これらの PCB コンジェネーターもまた KC とは大きく異なり、顔料と同様に低塩素化体 PCBs を中心に検出されている。しかしながら、その生成原因については解明されておらず、それらの化成品の使用による PCBs の環境影響が広範に及ぶ可能性が指摘されている。

(3) PCBs コンジェネーターの中にはダイオキシン受容体 (AhR) に結合してダイオキシン様作用を有するものがあることが知られている。また、近年、様々な化学物質による内分泌攪乱作用が指摘されているが、PCBs についてもその作用が明らかにされつつあり、特に、生体代謝物である水酸化 PCBs (OH-PCBs) によるエストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR) へのアゴニスト&アンタゴニスト活性が報告された。低塩素化 OH-PCBs については、高塩素化 OH-PCBs に比べ、これらの受容体活性が強いことから、顔料・化成品由来の PCBs が生体へ及ぼす影響は大きいものと推測され、その定量的把握が急務である。

2. 研究の目的

(1) PCBs 汚染について未だ詳細な調査がなされずにそのまま流通し使用されていると考えられる顔料や化成品がある可能性がある。このことから、PCBs の含有が予想される化成品等の調査を可及的速やかに進め、濃度やコンジェネーターパターンの特徴を把握する。

(2) 顔料や化成品に含まれている PCBs は一部を除き 1~4 塩素化の低塩素化体に集中している。これらの生体内での影響についてはほとんど検討されていないことから、この特徴的な PCB コンジェネーターの AhR やホルモン受容体との反応性についてコンジェネーター別に検討する。

(3) 環境試料 (大気・底質・生物) の PCBs 全コンジェネーター分析を進め、各媒体における顔料・化成品由来 PCBs がどの程度の割合で存在するかを明らかにする。生物試料については主として海域生物にスポットをあて、特に海棲哺乳類を調査対象とする。検討にあたってはケミカルマスバランスモデルを用いて統計的・定量的に進め、環境中に放出された顔料・化成品由来の PCBs がどのように移動し、生物濃縮されていくかを明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 未測定・未解明の顔料・化成品中の PCBs コンジェネーターパターンの把握

文献調査を進め、PCB の含有が疑われる顔料等の物質がないか検討する。すなわち、多環式顔料や、塩素化パラフィンやシリコンといった化成品中の PCBs 分析を実施し、そのコンジェネーターパターン、生成機構を解明する。

(2) 顔料・化成品の特徴的コンジェネーターの AhR 及びホルモン受容体との反応性の検討

DR-EcoScreen 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ法を利用し、顔料・化成品に含まれる PCB コンジェネーターについて AhR 活性を測定する。さらに、これら PCB コンジェネーターによるエストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR) 等のホルモン受容体に対するアゴニスト及びアンタゴニスト活性作用について検討する。これらのアッセイはチャイニーズハムスター卵巣由来細胞又はアフリカミドリザル腎臓由来細胞に、受容体発現プラスミド、受容体レポータープラスミド及びコントロールプラスミドを一過性に導入し、細胞内で産出されたルシフェラーゼの酵素活性を測定する (アゴニスト活性)。また、試験物質の添加を陰性対象物質の存在下で行い酵素活性を測定する (アンタゴニスト活性)。

(3) 環境・生体試料における顔料・化成品由来 PCBs の把握

大気、底質といった一般環境に加え、主に海域における哺乳類における PCBs の分析を進め、顔料・化成品に由来する PCBs コンジェネーターの濃度やそのパターンを検討する。特に生物種の分析では油分の影響が懸念され

ることから、より簡便・精確に測定する分析手法についても検討する。そして、環境中に放出された顔料・化成品由来の PCBs がどのような経路、濃縮の動態について評価する。汚染由来解析ではベイズ型モデルによる PCB 汚染由来解析法（ケミカルマスバランス：CMNK2）を適用し、統計学的に汚染寄与を把握する。

4. 研究成果

(1) 化成品中の PCBs

シリコンを使用している接着剤及びフェニル系シリコンの原料であるクロロフェニルシラン類中に非意図的に含まれる PCBs の濃度とコンジェネレーターパターンについて検討した。シリコンを使用した接着剤は、2012 年から 2013 年に製造された 5 つのロットについて検討した。また、日本国内外の 8 社の試薬メーカーが販売しているクロロフェニルシラン類の、うちトリクロロフェニルシラン（TCPS）、ジクロロジフェニルシラン（DCDPS）、クロロトリフェニルシラン（CTPS）、ジフェニルシランジオール（DPSDO）を検討対象とした。接着剤中の PCBs 濃度は ND～40mg/kg であった。TCPS、DCDPS、CTPS、DPSDO における PCBs 濃度は、それぞれ 0.00072～2.7、6.5～1,500、0.019～1.1、0.12～120 mg/kg であり、特に TCPS とその加水分解生成物である DPSDO における濃度が高い傾向が認められた。接着剤及びフェニル系シリコンのいずれも低塩素化体である mono-CBs（一塩素化体）や di-CBs（二塩素化体）が高い割合で検出された。特に di-CBs で検出されたコンジェネレーターは、PCBs における 2 つのビフェニル骨格に塩素原子が一つずつ置換した構造のものであり、クロロフェニルシラン類を合成する際に使用されるクロロベンゼンが、その合成過程でビフェニル誘導体化していることが示唆された。また、PCBs が検出された接着剤のロットの同族体及びコンジェネレーターパターンは DCDPS や DPSDO とほぼ同等であり、これらの接着剤がこれらをベースに製造されていることが示唆された。

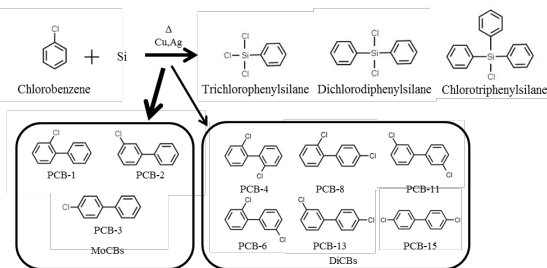


図 1 クロロフェニルシラン製造過程における PCBs の非意図的生成

(2) 顔料・化成品に含まれる PCB コンジェネレーターの核内受容体及びダイオキシン受容体を介した作用

顔料や化成品に非意図的に特徴的に含有

する 25 種の PCB コンジェネレーター（PCB-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 35, 40, 52, 56, 77, 101, 126, 153）について、ホルモン受容体を含む 10 種の核内受容体（ER α/β 、AR、甲状腺ホルモン受容体（TR α ）、グルココルチコイド受容体（GR）、レチノイド X 受容体（RXR）、レチノイン酸受容体（RAR）、プレグナン X 受容体（PXR）、ペルオキシゾーム増殖活性化受容体（PPAR） α/γ 及び AhR を介した作用を検討した。

ER α/β では 19 種及び 13 種の PCB コンジェネレーターについてアゴニスト活性又はアンタゴニスト活性あるいはそのいずれもがそれぞれ認められた。概ねビフェニル骨格の 2 位又は 3 位に塩素があるコンジェネレーターに ER α/β アゴニスト活性が認められた。GR については 5 種のコンジェネレーターに、AR については全てのコンジェネレーターにアンタゴニスト活性が認められた。AhR では 5 種のコンジェネレーターにアゴニスト活性が認められた。特に PCB-1, 35, 56 について新たに AhR アゴニスト活性を有することを発見した。しかしながら、顔料や化成品に特に非意図的に含まれており、また KC 等の PCB 工業製品に含まれていない PCB-11 については、他のコンジェネレーターに比べ各受容体への活性は低かった。

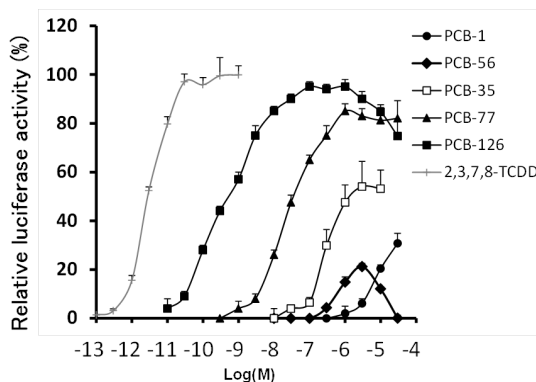


図 2 AhR アゴニスト活性用量反応曲線

(3) 海棲哺乳類における PCBs 分析方法の検討

高分解能質量分析計における SIM 測定では、測定における質量の変動を補正するためにペルフルオロケロセンなどの標準物質を導入してモニターするロックマス方式を用いる。しかし、油分などの妨害成分が存在すると、クロマトグラム上の妨害ピークが出現したり、ロックマスの変動が大きくなり、各 PCBs コンジェネレーターを正確に分析できなくなる。そこで、より簡便な油分除去法として Supelclean™ sulfoxide SPE tubes（スルホキシドカラム）と Discovery™ Ag-10N SPE tubes（銀イオンカラム）を適用した。ハブスオウギハクジラの脂皮の前処理においてスルホキシドカラムと銀イオンカラムを用いることで、ロックマスの落ち込みやうねりなどの変動が大幅に改善され、クロマトグラム上で PCBs の各コンジェネレーターのピークへ

影響はほとんど認められなくなった。スルホキシドカラムと銀イオンカラムで除去された妨害成分は、そのカラムの性能から油分、特に脂皮の生物由来の油分であると推測された。妨害成分は目的物質の同定や定量に支障を来すだけでなく、測定機器の劣化にも関連することから、効果的かつ簡便に生物由来の妨害成分を除去できるスルホキシドカラムと銀イオンカラムの有用性が確認された。

(4) 環境試料における非意図的生成 PCB の寄与

環境大気

・ 室蘭市のケース

室蘭市において平成 18 年 4 月から平成 29 年 3 月まで一ヶ月毎に環境大気中の PCBs の濃度及びその汚染由来について検討した。汚染由来解析には CMBK2 を用い、解析に使用する変数は前課題（科研費：24710016）で室蘭港の底質の PCB 解析において検討した 55 のコンジェナー及び同族体を用いた（雑誌論文）参照）。

室蘭市の 11 年間の大気中 PCBs 濃度は 18 ~ 190 pg/m³ であり、その幾何平均値は 59 pg/m³ であった。また気温の影響を受け、夏期に濃度が上昇し、冬期に下がる傾向が認められた。測定結果をコンジェナー別に整理し、CMBK2 に適用して PCB の汚染由来について解析した。汚染由来としてはカネクロール 4 種（KC300, KC400, KC500, KC600）、燃烧、そして顔料由来としてアゾタイプ顔料及びフタロシアニン顔料の計 7 種を想定した。その結果、KC300 の寄与が概ね 60% を占め、次いで KC500 の寄与が 30% 程度、そしてアゾ顔料の寄与が 10% 程度であった。未知発生源の存在がほぼ無視でき、仮定した 7 種の汚染由来で適切に説明された。この寄与率の傾向には季節的な変動は認められなかった。KC300 は KC の中でも三塩素化体といった低塩素化体の PCB コンジェナーが主であることから、比較的揮発性が高く大気環境に放出されやすいため寄与が高かったものと推測された。四塩素化体が主成分である KC400 については、その用途が熱媒体やトランス・コンデンサーといった密閉された状態での使用が主だったことから、環境中への放出があまりなかったために、寄与が低かったものと考えられた。アゾ顔料は黄色の顔料で多く使用されているものであり、印刷物や塗料など比較的開放的に使用されてきたこと、そして主成分が PCB-11 で低塩素化体であることから、環境中に放出されやすく、一定の寄与が認められたものと考えられた。同様にフタロシアニン顔料も緑顔料として一般的に用いられているが、主成分が PCB-209 であり揮発性に乏しく、特に大気中には放出されにくいことから、ほとんど寄与が認められなかったものと考えられた。

・ 農村部のケース

平成 19 年秋期における収穫後の田園地帯における環境大気中の PCBs の日間変動につい

て調査を行い、気象要因との関連性や高濃度

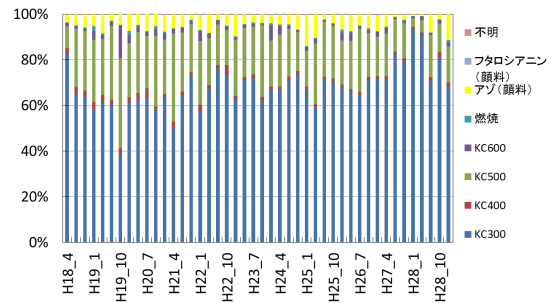


図 3 CMBK2 による環境大気中の PCB 汚染由来

(室蘭市: H18.4 ~ H29.3)

要因、ダイオキシン類濃度との関連性、非意図的生成 PCBs の影響等の検討を行った。21 日間の PCBs 濃度の濃度範囲と幾何平均値はそれぞれ 21 ~ 110 pg/m³、47 pg/m³ であった。CMBK2 による解析から、調査地点の大気中の PCB についてはダイオキシン類濃度が高い時は燃烧発生源由来の寄与が強く、低い場合はカネクロールの寄与が強くなっていた。一方、アゾ顔料及びフタロシアニン顔料の影響は小さかった。PCBs が高濃度となる気象的要因としては、風速が弱く大気が安定であること、降水が少ないこと等が確認された。

底質

室蘭港内外 21 ヶ所における表層底質中の PCBs の濃度及びその汚染由来について検討した。PCBs の濃度範囲は 1,100 ~ 65,000 pg/g dw でありその幾何平均値は 17,000 pg/g dw だった。PCBs 汚染由来を解析したところ、未知発生源の存在がほぼ無視でき、仮定した 7 種の汚染由来で適切に説明された。港湾内部では船底塗料として使用されてきた KC500 や KC600 の寄与が極めて高かったが、港湾外では一定アゾ顔料の影響も認められ、KC 以外の PCBs 汚染が環境中に無視できないレベルで存在していることが示唆された。（一部前課題（科研費：24710016）の成果を再掲。）

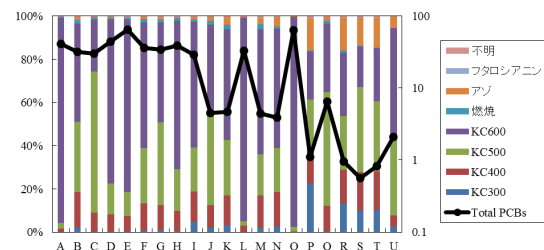


図 4 CMBK2 による底質中の PCB 汚染由来

(室蘭港)

海棲哺乳類（ハブスオウギハクジラ）

平成 25 年に日本の北海道沿岸に漂着したハブスオウギハクジラの脂皮及び肝臓中の PCBs の濃度及びその同族体やコンジェナーのパターンについて検討した。脂皮及び肝臓における PCBs 濃度は、それぞれ 13,000、

7,300 ng/g-lipid であり、脂皮の方が濃度が高かった。しかし、DLPCBs といった毒性の高いコンジェナーは肝臓に蓄積する傾向が認められ、DLPCBs による毒性等価濃度も肝臓 (740 pg-TEQ/g-lipid) の方が脂皮 (74 pg-TEQ/g-lipid) よりも高濃度であった。脂皮及び肝臓のいずれの試料でも同族体は 6 塩素化体が、コンジェナーは PCB-153 が最も高い割合を示した。コンジェナーパターンは概ねカネクロールと同等だったが、脂皮及び肝臓に特異的に残留するコンジェナー (PCB-28、52、74、99、118) や、逆にほとんど残留しないコンジェナー (PCB-31、70、110) が認められた。アゾ顔料由来の PCB-11 については、脂皮及び肝臓のいずれの試料からも検出されなかった。2 塩素化体のコンジェナーは PCB-11 以外についてもほとんど検出されおらず、生体中に残留せずに代謝されたものと考えられた。フタロシアン顔料由来の PCB-209 は、脂皮及び肝臓でそれぞれ 6.9、10 pg/g-lipid で検出された。しかしながら、PCB 製品に僅かに含まれる PCB-209 が蓄積したものが、顔料に由来したものは判別できなかった。

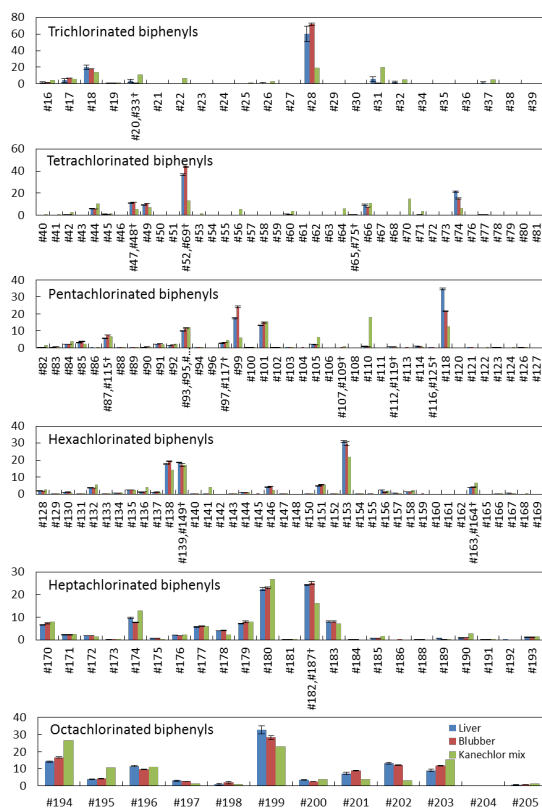


図 5 各同族体における脂皮、肝臓中の PCB コンジェナー組成と KC の組成との比較

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 4 件)

K Anezaki, T Nakano (2015) Unintentional PCB in chlorophenylsilanes as a source of contamination in environmental samples. *J Hazard Mater* 287:111-117、査読有
DOI:10.1016/j.jhazmat.2015.01.026

K Anezaki, T Nakano, N Kashiwagi (2016) Estimation of polychlorinated biphenyl sources in industrial port sediments using a Bayesian semifactor model considering unidentified sources. *Environ Sci Technol* 50:765-771、査読有
DOI: 10.1021/acs.est.5b03501

K Anezaki, A Matsuda, T Matsuishi (2016) Concentration and congener pattern of polychlorinated biphenyls in blubber and liver of Hubbs' beaked whale (*Mesoplodon carlhubbsi*), using a sulfoxide and an Ag-ION solid phase extraction cartridge as a simplified cleanup technique for biological samples. *Mar Pollut Bull* 113:282-286、査読有
DOI:10.1016/j.marpolbul.2016.09.051

S Takeuchi, K Anezaki, H Kojima (2017) Effects of unintentional PCBs in pigments and chemical products on transcriptional activity via aryl hydrocarbon and nuclear hormone receptors. *Environ Pollut* 227:306-313、査読有
DOI:10.1016/j.envpol.2017.04.059

(学会発表)(計 6 件)

姉崎克典、中野武 (2014) 化成品に含まれる非意図的生成 PCBs . 第 23 回環境化学討論会 京都府京都市

K Anezaki, T Nakano (2014) UNINTENTIONAL PCB CONTAMINATION IN CHLOROPHENYSILANE COMPOUNDS. International Conference of Asian Environmental Chemistry 2014, Bangkok, Thailand

姉崎克典、柏木宣久 (2015) ベイズ型組成半因子モデルを用いた環境中の PCBs 汚染由来の推定 . 第 24 回環境化学討論会 北海道札幌市

K Anezaki, T Nakano, N Kashiwagi (2015) ESTIMATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYL SOURCES IN SEDIMENT USING A BAYESIAN SEMI-FACTOR MODEL WITH CONSIDERATION OF UNIDENTIFIED SOURCES. Dioxin Symposium 2015, São Paulo, Brazil (Organohalogen Compounds 77:266-269)

姉崎克典、松田純佳、松石隆 (2016) 北海道様似町に漂着したハップスオウギハクジラ (*Mesoplodon carlhubbsi*) の脂皮及び肝

臓中の PCBs の濃度とコンジェナー組成 . 日本分析化学会第 65 回年会 北海道札幌市

姉崎克典、永洞真一郎 (2016) 秋期の田園地区における大気中ダイオキシン類及び PCBs の日間変動 . 日本分析化学会第 65 回年会 北海道札幌市

S Takeuchi, K Anezaki, H Kojima (2016) Effects of unintentional PCBs in pigments and chemical products on transcriptional activity via 10 nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor. The 9th International PCB Workshop, Kobe, Japan

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姉崎 克典 (ANEZAKI, Katsunori)

地方独立行政法人・北海道立総合研究機構・環境・地質研究本部・環境科学研究センター・環境保全部・研究主任

研究者番号：20442634

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

・橋本 俊次 (HASHIMOTO, Shunji)

国立研究開発法人・国立環境研究所・環境計測研究センター・応用計測化学研究室

・中野 武 (NAKANO, Takeshi)

国立大学法人・大阪大学・環境安全研究管理センター

・柏木 宣久 (KASHIWAGI, Nobuhisa)

大学共同利用期間法人・情報・システム研究機構・統計数理研究所

・小島 弘幸 (KOJIMA, Hiroyuki)

武内 伸治 (TAKEUCHI, Shinji)

北海道立衛生研究所