

化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究及び 野生生物の生物学的知見研究について(案)

1. 背景

EXTEND2010 では、研究課題を公募し、有識者により構成される「化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究企画評価検討部会」及び「野生生物の生物学的知見研究検討部会」により課題の採択及び研究成果の評価を行ってきた。

一方で、より行政施策への活用に適した研究成果を得ることができるよう、

- ・環境リスク評価の進展に寄与し得る研究課題を優先的に選定する
- ・必要に応じて「指定研究」の形で課題を設定する

等の見直しを行うとともに、その成果については公開セミナー等を通じて公表してきた。

EXTEND2016 の下では、研究課題の新規採択は行っていないが、EXTEND2010 の下で着手された研究の評価を行ってきている。

2. 平成 30 度の実施状況

平成 29 年度に実施した化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究(基盤) 1 課題及び野生生物の生物学的知見研究(野生) 1 課題の合計 2 課題について、その研究成果について、EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究企画評価検討部会及びEXTEND2016 野生生物の生物学的知見研究検討部会により開催した評価会(平成 30 年 3 月 1 日開催、非公開)において評価を行った。

その結果として、本年度は表 1 に示した 2 課題を継続して実施することとした(各代表研究者が作成した研究概要、研究計画及び研究結果については別紙参照)。

なお、本年度採択した 2 研究課題については、本年度が最終実施年度となる。

表1 平成30年度に実施する研究課題一覧

(敬称略)

区分 番号	代表研究者 所属	研究課題名	実施期間
化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究			
基盤1	宮川信一 東京理科大学	魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の <i>in vitro</i> 評価系構築	H27～H30
野生生物の生物学的知見研究			
野生1	国末達也 愛媛大学	座礁・漂着鯨類における新規 POPs および POPs 代替物質の蓄積特性とリスク評価に関する研究	H27～H30

平成 30 年度

EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する

基盤的研究企画評価検討部会委員名簿

(敬称略)

氏 名	所属・役職
井口泰泉	横浜市立大学 特任教授
小山次朗	鹿児島大学 名誉教授
遠山千春	筑波大学 客員教授
永沼章 (座長)	東北大学 名誉教授
内海 透	住友化学株式会社 生物環境科学研究所 研究グループ(生体科学) グループマネージャー

平成30年度

EXTEND2016 野生生物の生物学的知見研究検討部会委員名簿

(敬称略)

氏 名	所属・役職
門上希和夫	北九州市立大学 環境技術研究所 特命教授
川合眞一郎	甲子園大学 甲子園大学栄養学部フードデザイン学科 特任教授
田辺信介 (座長)	愛媛大学 特別栄誉教授／名誉教授
椿宜高	京都大学 名誉教授

(別紙)

平成 30 年度 EXTEND2010 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究等の 研究計画及び研究結果概要

基盤 1 : 魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の *in vitro* 評価系構築

研究者：東京理科大学：宮川信一(代表研究者)

1. 研究概要：医薬品類や生活日用品等に含まれる化学物質の曝露により引き起こされる、内分泌系や核内受容体を介して発現すると予想される様々な影響に対処する必要がある。日本の代表的な環境指標動物であるメダカをモデルとして、Obesogen 問題で注目されている代謝に関わる内分泌かく乱の生体影響について、核内受容体である PPAR γ と RXR に注目しながら、作用メカニズムの解明と評価系を構築することを目的とする。本研究は、多様な作用経路を有すると推測される様々な化学物質の内分泌かく乱作用を評価していくためのモデルケースとなるものであり、魚類に対する新たな内分泌かく乱作用のエンドポイントの策定と短期間で影響予測できるスクリーニング系の開発を目指す。

2. 研究計画：本研究では、日本の環境指標動物であるメダカ (*Oryzias latipes*) において、その知見がほとんどない、Obesogen による内分泌かく乱影響の可能性を探索し、その知見を集積する。我々は、稚魚期に TBT を曝露したメダカの成体において、肝臓においてエネルギー代謝（特に糖代謝）に関わる遺伝子が長期的に変動していることを発見した。この現象は、Obesogen 曝露による長期的な悪影響としては世界で初めての作用として見出されたものであり（未発表データ）、研究が先行している他の動物でも全く報告されていない。この実験系では、TBT 濃度を 1 nM 以下として設定している。これは、上記の TBT に関する毒性試験の報告書（トリブチルスズ (TBT) が魚類に与える内分泌かく乱作用の試験結果に関する報告書）でも毒性影響はほぼないと考えられる濃度である（本研究は毒性影響を誘導してその表現型を解析するものではなく、TBT をはじめとする Obesogen 候補物質によって表現型がでるかどうかも解析の目的としている）。平成 30 年度は、この実験系を利用し、遺伝子発現変化だけでなく、実際に体内のグルコース濃度などの生体レベルでの影響解析をおこなう。また、現在多くの内分泌かく乱化学物質の問題で継世代影響が話題となっている。エネルギー代謝に関わる遺伝子発現変動が世代を超えて顕れることにより、個体のみならず、動物集団への健康影響が懸念される。そこで、メダカに対する Obesogen 作用においても継世代影響がみられるかどうかを解析する。さらに、我々は、稚魚に Obesogen を曝露し、Oil red O 染色することで、メダカに対する Obesogen 活性をもつ化学物質をスクリーニングする系を開発した。このアッセイ系を応用し、脂質の蓄積を定量的に解析する手法を開発することで、メダカの稚魚に対する、化学物質の Obesogen 活性測定のための評価系構築の完成を目指す。

以上の実験結果をまとめ、その成果を論文として取りまとめる。

3. 研究結果概要：

1. メダカ稚魚へのObesogen作用の解析

【実験方法】

1) 実験動物

メダカ (*Oryzias latipes*) は基礎生物学研究所メダカバイオリソースから入手した Cab ラインを使用した。全ての動物実験及び遺伝子組換え実験に関しては、所属する大学の動物実験委員会及び組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、関連する法令に従い、動物愛護の精神をもって行った。

2) 化学物質

以下に使用した化学物質について記載した (図 1)。これらは DMSO に溶解し、その後-30°C で保存した。

- Ciglitazone (>97%; 和光ケミカル社) CAS No. 74772-77-3

チアゾリジン系ヒト PPAR γ アゴニスト

- nTZDpa (>98%; Sigma 社) Cas No. 118414-59-8

非チアゾリジン系ヒト PPAR γ パーシャルアゴニスト

- Tributyltin (IV) Chloride Standard (TBT) (>97%;

和光ケミカル社) CAS No. 1461-22-9

有機スズ



図1. 本解析で使用した化学物質の構造

3) 曝露実験

採卵した卵を 6 well プレートに移し、孵化直後から 1 nM の TBT 及び 1 μ M の Ciglitazone、nTZDpa となるように調製した飼育水 (0.65% NaCl、0.25% KCl、0.03% CaCl₂、0.02% NaHCO₃) を 1 日おきに交換し、7 日間曝露した。コントロールには、飼育水 1 ml あたり DMSO を 1 μ l 添加した溶液を使用した。餌 (KilliMin; Tetra 社) は毎朝一回一定量添加した。最後の添加から 24 時間後にサンプリングし、各種解析に供した。ゼブラフィッシュでは孵化後短期間の Obesogen 曝露 (受精後 3 日目から 11 日目までの曝露) により、コントロール群よりも早期に脂質蓄積が確認されることが報告されている (Riu *et al.*, *Toxicol Sci* 2014; 139:48-58)。本研究ではゼブラフィッシュとメダカの発生段階の違いを考慮し、孵化直後のメダカに化学物質を 7 日間曝露した。

4) Oil red O 染色

生後 7 日目の稚魚を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 2-4 時間固定した。0.1% Tween20 を含む PBS で洗浄後、0.3% Oil red O (WALDECK GmbH & Co KG 社) 中で 3 時間インキュベートした。Oil red O は、使用時ごとに、100%イソプロパノールで 0.5%としたストック溶液を、水で 60%イソプロパノール (すなわち 0.3% Oil red O 溶液) となるように希釈した。激しく攪拌後、10 分静置して濾過してから使用した。染色後、滅菌水で 4x10 分間洗浄し、20 μ l のイソプロパノールを入れた

96 well plate に移し、遮光密閉しながら 30 分間振盪後に、510nm の吸光度を測定した (図 2)。有意差検定は、Single factor analysis of variance (ANOVA) の後 Bartlett test を行い、 $p < 0.05$ である場合に有意とした。

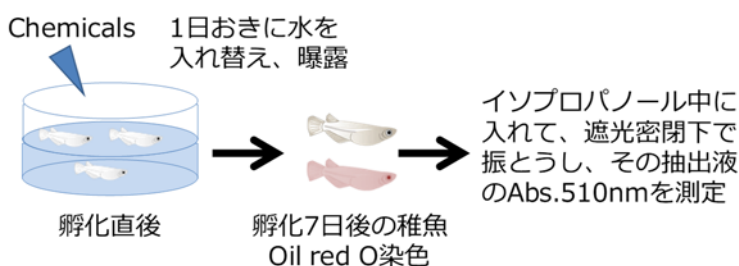


図2. 稚魚のOil red O染色実験のスキーム

【実験結果と考察】

メタボリックシンドローム/肥満は、糖尿病や心脈管系異常等、健康に対する Adverse effect を誘導する要因であり、他にも様々な生活習慣病に関連する一方、発生段階での栄養状態等を含む発生プログラム異常との関連も疫学的に示唆されている。動物実験では、発生期の環境化学物質曝露と肥満及び脂質代謝異常との関連性が示されている。例えば TBT は PPAR γ -RXR α 複合体を活性化し、カエルとマウスへの発生期曝露によって脂肪組織の蓄積を促進する (Grün *et al.*, Mol Endocrinol 2006;20:2141-2155)。このような発生影響は魚類でも報告されており、ゼブラフィッシュでは孵化後短期間の Obesogen 曝露により、コントロール群よりも早期に脂質蓄積が確認されることが報告されている (Riu *et al.*, Toxicol Sci. 139:48-58, 2014)。この手法では、化学物質曝露によって顕れる異常な脂肪細胞分化促進や脂肪の蓄積等の生体影響を検出する。我々はこれまでに、孵化直後から7日間化学物質を曝露したメダカ稚魚を用いて Oil red O 染色を行うことで、*in vivo* での Obesogen 活性をもつ化学物質の評価法を構築した。しかしながら、このような目視による染色スコアの評価では、わずかな差を有意に見出すことが難しく、定量的に Obesogen 活性を測定することが課題であった。そこで本年度は、Oil Red 染色後の稚魚からイソプロパノールにより Oil red O を再抽出し、その吸光度から Oil red O の取り込み量を測定する手法により、Obesogen 活性を定量化することを試みた。

これまで行ってきた染色スコアによる評価では、Ciglitazone (1 μ M) や nTZDpa (1 μ M) 曝露群はコントロール群と比べて有意な変化は認められなかった一方、TBT (1nM) はメダカ稚魚の脂肪の蓄積を促進する結果

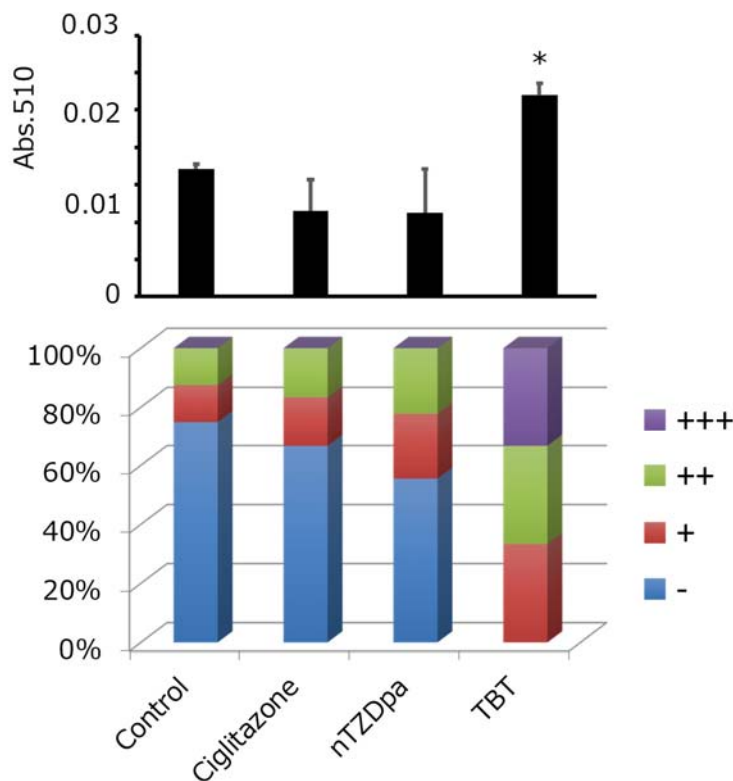


図3. Oil-red-O染色の吸光度によるObesogen活性評価

が得られていた（図3下；昨年度の結果）。Oil red Oの取り込み量の結果も同様のこれと同様な結果が得られた。すなわち TBT（1nM）曝露群のみで、コントロールに比べて有意に Oil red Oの取り込み量が増加した。

以上のように我々は、本研究課題においてメダカ稚魚に対する Obesogen 活性を持つ化学物質のスクリーニング手法として、Oil red O 染色によって染色強度をスコアリングする手法、及び Oil red O の取り込み量を吸光度から測定する手法を確立した。

本研究報告書を作成中、九州大学の島先生グループが、TBT と perfluorooctane sulfonate (PFOS) のメダカに対する Obesogen 活性について論文を発表した（Qiu *et al.*, *Chemosphere*, 2018 Dec 29;220:687-695）。この論文では、化学物質を受精卵にマイクロインジェクションによって投与しており、0.05µg/egg の投与群で孵化後 12 日目のナイルレッドの蛍光強度がコントロール群と比べて増加したことを報告している（ナイルレッドは脂肪組織を蛍光によって検出できる）。化学物質の曝露方法が我々の実験系とは異なるために濃度の単純な比較はできないが、TBT は曝露経路を問わず、メダカに対して強力な Obesogen として作用することが示唆された。

2. 稚魚期にTBTを曝露したメダカ成魚の解析

【実験方法】

1) 遺伝子発現解析

実験項目 1.に述べた方法に則り、孵化直後から 1 nM の TBT で 7 日間曝露したメダカを、8 日目以降は通常の飼育水で飼育し、約 3 か月後に肝臓を摘出した。成体メダカの最後の給餌から 16-18 時間後にサンプリングした。各群 3 個体以上から肝臓を摘出して、RNAlater（Thermo Scientific 社）中で保存し、その後 mRNA を抽出した。これを各群 N=3 となるように用意し、ライブラリー作製後（Total RNA-Seq Kit v2 及び Ion One Touch System (Hi-Q OT2 Kit); Thermo Scientific 社）、Ion PGM System (Hi-Q Sequencing Kit; Thermo Scientific 社) に供した。遺伝子発現解析には CLC Genomics Workbench (Qiagen 社) を用いた。レファレンスシークエンスは NCBI genbank の“Bonyfish”RefSeq データベースを利用した。

2) 組織学的解析

生殖腺組織はブアン液（ヘマトキシリン-エオシン染色）または 4%パラホルムアルデヒド（PFA）（PAS 染色）で固定し、脱水後にパラフィン中に包埋し、6 µm 厚の組織切片を作製した。作製した切片はヘマトキシリン-エオシン染色または PAS 染色（武藤化学社）に供した。

【実験結果と考察】

メタボリックシンドローム/肥満は、糖尿病や心脈管系異常等、健康に対する Adverse effect を誘発する。したがって、上記実験項目で得られた稚魚の段階での Obesogen の影響が、一過的なのか成熟後まで続く影響なのかを検討する必要がある。我々は昨年度までに、稚魚期に TBT を曝露したメダカの成熟後の段階での肥満への影響（肝臓や生殖腺の組織重量）及び生殖への影響（産卵数、

受精率、孵化率)を解析したが、コントロール群と TBT 稚魚期曝露群で有意な差は認められなかった。しかしながら、遺伝子発現レベルでは、糖新生に関わる遺伝子発現が、稚

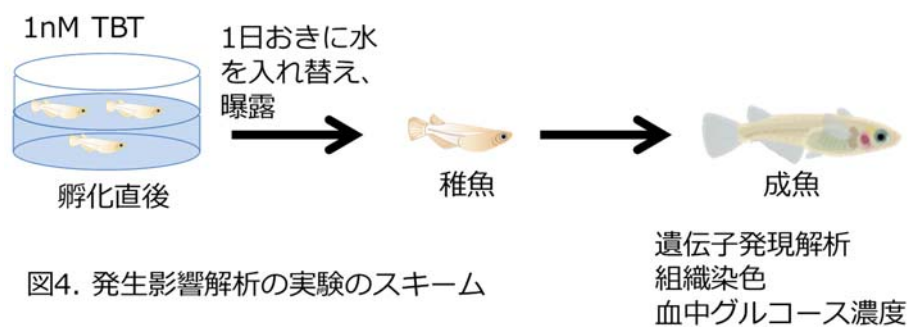


図4. 発生影響解析の実験のスキーム

魚期に TBT に曝露された成魚の肝臓で上昇していたことから、長期的な TBT の健康影響が示唆されていた。これは、3 個体以上の個体由来の肝臓を解析したものであったが、バイオロジカルレプリケートはなく、N=1 であった。本年度我々は、サンプルに供するメダカを増やして、バイオロジカルレプリケートを N=3 とすることで、詳細なトランスクリプトーム解析を実施した。さらに生理学的なアウトプットとして、組織学解析及び血中グルコース濃度について検討を行った (図 4)。

稚魚期 (孵化直後から 7 日間) に 1nM の TBT を曝露し、3 ヶ月間飼育したメスのメダカの肝臓の遺伝子発現を、RNAseq 法を用いてコントロール群と比較した (以下、TBT 曝露群とコントロール群とした)。この条件では、肝臓で 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は 18 個、減少した遺伝子は 69 個であった。N=3 の解析としたが、遺伝子発現変動の傾向は昨年度と似たものであった。

次に、肝臓の組織レベルでの影響を解析した。昨年度、我々は、稚魚期 (7 日齢) と成魚の肝臓の組織像を HE 染色によって解析したが、上記の遺伝子発現レベルでの変化を受けて、多糖類を染める PAS 染色を行った。しかしながら、肝臓において明確な PAS 染色陽性の細胞はみられず、コントロール群と TBT 曝露群の差は、稚魚と成魚ともに認められなかった (図 5)。

現在多くの内分泌かく乱化学物質の問題で継世代影響が話題となっている。エネルギー代謝に関わる遺伝子発現変動が世代を超えて顕れることにより、個体のみならず、動物集団への健康影響が懸念される。特に、メダカに対する *Obesogen* 作用においても継世代影響がみられるかどうかは大きな問題であった。本年度、我々は稚魚期に TBT を曝露したメダカ (F1) から生まれた、次世代のメダカ (F2) での解析を計画していたが、研究期間中にメダカが大量死してしまっただけで、研究計画の変更を余儀なくされた。この大量死はコントロールなどにも起きたため、TBT 曝露の影響とは考えられない。また、

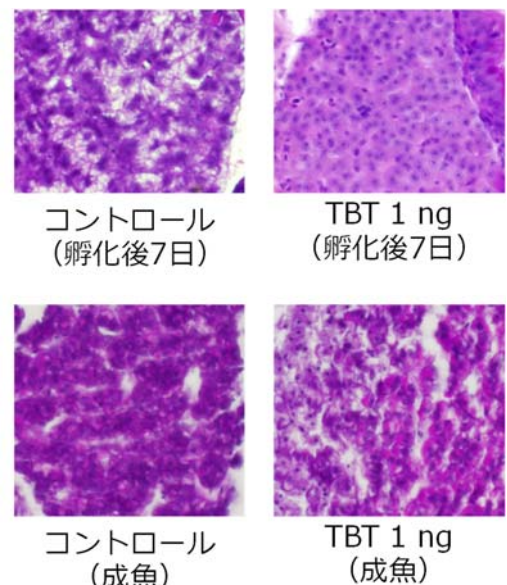


図5. 稚魚と成魚の肝臓のPAS染色

F2 のメダカは正常通り生まれ、成長していたことから、成育に異常はない。現在も TBT 曝露群を成長させており、本研究課題終了後ではあるが、継世代影響を調べる予定である。

本研究では、体重や肝臓及び生殖腺などの組織重量などの面からみた成長への悪影響が顕れない低濃度（1 nM）かつ短期間（孵化後から 7 日間）の曝露を行った。次世代生産（繁殖）には直接的に影響しないものの、現在問題視されている他の内分泌学かく乱化学物質や、環境中に存在する医薬品由来の化学物質との複合影響などを鑑みると、継続して注視していく必要があるだろう。

4. 研究期間全体のまとめと考察

本研究課題において、日本の環境指標動物であるメダカ（*Oryzias latipes*）において、Obesogenによる内分泌かく乱影響を研究するための分子基盤を構築することができた。研究期間全体の主な研究成果を以下にまとめた。

- ・メダカ（*Oryzias latipes*）からolPPAR α 1、olPPAR α 2、olPPAR β 、olPPAR γ をクローニングし、メダカにおけるPPAR系の遺伝子構造を整理するとともに、olPPAR γ に関するレポーターアッセイを構築した。複数の化学物質（特にGW1929、Ciglitazone、TBT、nTZDpa）に対して比較的高い反応性を確認したが、メダカのPPAR オルソログのリガンド特異性応答性は、ヒトのそれとはかなり異なることが分かった。例えば、ヒトPPAR γ 特異的なアゴニストであるRosiglitazone に対して、メダカPPAR γ の応答性は低い。したがってヒトのPPAR オルソログのリガンド特異性の情報を、直ちにはメダカに外挿することができないことが明らかになった。

- ・上記のObesogen候補化学物質をメダカ稚魚に曝露し（孵化直後から7日目まで）、脂肪細胞分化に与える影響をOil red O染色によって解析したところ、TBTが強いObesogen活性（早期の脂肪蓄積促進）を有することが明らかとなった。一方で、他の化学物質については、Obesogen活性は弱い、あるいはほとんど活性は見られなかった。ただし、化学物質の曝露時期や曝露時間等の実験条件にも依存することは留意を要する。実際にTonoyamaらは、我々よりもより長い期間Rosiglitazonをメダカに曝露して、脂肪の蓄積を報告した（Tonoyama et al., PLoS One, 2018 Oct 18;13:e0205888）。

- ・稚魚期に一過的なTBTを曝露した成魚では、肥満度と生殖能に関しては、個体重量・組織重量あるいは生殖能の差異に有意差を与えるほどの顕著な影響は観察されなかった。しかしながら、遺伝子発現レベルでは、特に糖新生に関わる遺伝子発現が稚魚期にTBTに曝露された成魚の肝臓で上昇しており、成熟後にエネルギー代謝を修飾する作用をもつ可能性と長期的なTBTの健康影響が示唆された。実際、稚魚期に一過的なTBTを曝露した成魚では、コントロール群と比べて血中グルコース濃度が高い値を示した。このことは、Obesogenは曝露時期・曝露量によっては、既存の脂肪蓄積だけでなく、異なる経路で動物の健康に悪影響を及ぼす可能性を示唆している。

野生 1：座礁・漂着鯨類における新規 POPs および POPs 代替物質の蓄積特性とリスク評価に関する研究

研究者：愛媛大学：国末達也(代表研究者)、Nguyen Minh Tue、国立環境研究所：磯部友彦、国立科学博物館：田島木綿子

1. 研究概要：本研究では日本沿岸に座礁・漂着した鯨類を対象に、1) POPs 代替物質の分析法開発、2) 新規 POPs および POPs 代替物質による汚染実態と蓄積特性の解明、3) 保存試料を用いた既存 POPs、新規 POPs、POPs 代替物質の蓄積プロファイルの過去復元、4) 鯨類体内に蓄積する未知化学物質の探索と *in vitro* バイオアッセイ法を用いた活性評価、の課題に挑戦し、個体数減少の一要因となり得る内分泌かく乱化学物質のリスク評価を試みる。

平成 27 年度は、北海道沿岸に座礁したイシイルカとネズミイルカを対象に新規 POPs (PBDEs および HBCDs) の研究を展開した結果、沖合まで回遊するイシイルカの蓄積濃度は沿岸性の強いネズミイルカより高値を示したことに加え、生物環境試料バンク(*es*-BANK)の保存試料の分析から 1980 年以降明らかに濃度上昇していたことが判明した。また平成 28 年度に、北海道沿岸に漂着したナガスクジラ、ザトウクジラ、ミンククジラの脂皮からも PBDEs および HBCDs が検出され、ヒゲクジラに対する新規 POPs の曝露が明らかとなった。さらに、2015 年に集団座礁したカズハゴンドウと *es*-BANK 保存試料の分析から、イシイルカと同様に、近年における HBCDs の濃度上昇が確認された。平成 29 年度は、上記のクジラ 3 種を対象に、PCBs および PBDEs の主要異性体における経年変化を解析した結果、外洋性 2 種の PCB 異性体濃度は 2000 年以降低減していなかったことに加え、BDE154 はすべての種で定常状態もしくは濃度上昇を示した。また、沿岸性種であるスナメリの肝臓から初めて、代替難燃剤であるリン酸エステル系難燃剤(PFRs)を検出し、脂皮中に蓄積する化学物質の網羅的スクリーニングにより天然有機ハロゲン化合物の存在を明らかにした。

このように、多様な鯨類が POPs に曝露しており、とくに外洋性種の汚染は長期化することが示唆された。加えて、人間活動の影響を受けやすい沿岸性の鯨種は、PFRs などの代替難燃剤だけでなく多様な未同定の有機ハロゲン化合物に曝露している可能性が高く、その実態調査を展開したいと考えている。

2. 研究計画：これまでの研究から沿岸性だけでなく、外洋性鯨種にまで新規 POPs の汚染が進行しており、PBDEs の主要異性体である BDE154 および HBCDs の濃度は、現在も定常状態もしくは増加傾向にあることが判明した。PCB 主要異性体も外洋性鯨種で定常状態を示していることから、継続してストラディンクネットワークと連携をとりながら鯨類試料の採集に努め、多種の分析から蓄積特性の種差を解明する。

平成 30 年度は、とくに沿岸性の強いスナメリを対象に曝露実態と蓄積特性の解明を試みる。過去に POPs 汚染が顕著であった瀬戸内海に棲息するスナメリだけでなく、大村湾・有明海系群の脂皮も化学分析に供試し、海域による近年の汚染実態を明らかにするとともに、*es*-BANK の保存試料を用

いて POPs 汚染の経年変化を解析する。また瀬戸内海においては、過去採集した魚が *es-BANK* に保存されているため同種の試料採取を新たに試み、化学分析に供試することで PCB および PBDE 同属体濃度の変動を解析し、餌生物からの曝露プロファイルの寄与を考察する。既存・新規 POPs に加え、代替ハロゲン系難燃剤であるデクロランプラスやデカブロモジフェニルエタンも分析し、スナメリにおける曝露実態を検証する。また昨年度、予備的調査を実施したリン酸エステル系難燃剤(PFRs)についても分析を継続し、蓄積レベルの地理的分布を明らかにする。

平成 29 年度に確立した新規スクリーニング手法により、スナメリの脂皮に蓄積する多様な有機ハロゲン化合物の網羅的な検出と物質同定が可能となった。しかしながら、GC×GC-HRTtoFMS による高感度分析では、鯨類脂皮に高蓄積する PCBs や OCPs の著しいピークテーリングが観測され、他成分との共溶出やマススペクトルの干渉が認められた。このような分析化学的な課題を踏まえ、平成 30 年度は GC×GC のグラジエント条件を最適化し、2D TIC に溶出するピークの高分離化を促進するとともに、解析ソフトウェアによるスペクトルデータのデコンボリューション法を開発・検討する。また、近年漂着した瀬戸内海系群のスナメリにおける追加調査に加え、日本近海に座礁した他種の鯨類においてもスクリーニング分析を実施し、有機ハロゲン化合物の継時的蓄積プロファイルの変化と種間比較を統合的に解析する予定である。

また、研究代表者のグループがこれまでに構築した鯨類ネットワークを継続して活用し、組織試料の採集と解剖ワークショップを実施する。H27～29 年度に解析した外洋性鯨類の POPs 蓄積濃度の経年変化に関する研究成果を論文としてまとめ、国際誌への投稿を目指す。

3. 研究結果概要：

1. スナメリにおける POPs の蓄積特性

【実験方法】

大村湾系群と瀬戸内海系群のスナメリ(*Neophocaena phocaenoides*)における POPs (PCBs, DDTs, CHLs, HCHs, HCB, PBDEs, HBCDs)の蓄積特性を解明するため、近年(2013～2017年)漂着した検体の脂皮を化学分析に供試した。また、POPs汚染の経年変化を解析するため、生物環境試料バンク(*es-BANK*)に冷凍保存された2000～2012年の検体も分析した。化学分析は既法に従い、高速加熱溶媒抽出装置を用いて抽出し、ゲル浸透クロマトグラフィーおよび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-MS、GC-MS/MSおよびLC-MS/MSで定性・定量した。経年変化の解析には、対数変換した POPs 濃度(Log[C])を目的変数、そして採取年(西暦)と体長(cm)を説明変数として重回帰式を求め、有意に低減したものは傾きから半減期を算出した。

【実験結果】

1) 汚染実態： 2013～2017 年に漂着した検体の脂皮試料すべてから POPs が検出され、濃度順位は両系群ともに PCBs > DDTs > CHLs > HBCDs > PBDEs > HCHs ≒ HCB であった (図 1)。しかしながら瀬戸内海の地理的分布に着目すると、福岡・大分、愛媛、兵庫と比べ大阪の沿岸に漂着した検体で POPs 濃度は相対的に高く、とくに PCBs と HBCDs は高値を示した (図 2)。

2) 経年変化： 大村湾系群の保存試料を活用し、スナメリの脂皮中 POPs 濃度の経年変化を解析し

た結果、2005年以降すべてのPOPsで有意な変動はみられず定常状態を示した(図3)。全検体から検出されたPCB・PBDE同属体濃度の解析もおこなったところ、4~10塩素・臭素化体については定常状態であったが、3塩素・臭素化体であるCB28とBDE28の濃度には有意な低減が認められた。

2. GC×GC-HRToFMSを用いたスクリーニング分析

【実験方法】

スナメリの脂皮に蓄積する有機ハロゲン化合物のスクリーニングを実施するため、POPs溶出画分溶液を二次元ガスクロマトグラフ-高分解能飛行時間型質量分析計(GC×GC-HRToFMS)で分析した。取得した二次元トータルイオンクロマトグラム(2D TIC)は、GC Image(ver. 2.7r3)を用いて解析した。POPsの標準品をGC×GC-HRToFMSで測定し、各物質の保持時間(1t_r [min], 2t_r [s])とマススペクトル情報(精密質量、分子イオンクラスターのハロゲン同位体比、フラグメントパターン)をデータベース化し、NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library(NIST2017)も用いて比較・照合解析することにより、スナメリの脂皮に内在する有機ハロゲン化合物の同定を試みた。

【実験結果】

1) 有機ハロゲン化合物のスクリーニング：2000年と2015年に漂着したスナメリの脂皮試料をGC×GC-HRToFMS分析した結果、約50種の有機ハロゲン化合物が同定され、PCBs、CHLs、DDTsの検出強度が卓越していた(図4)。また、BDE47やそのメトキシ誘導体に加え、構造未知の有機ハロゲン化合物による曝露が両年代のスナメリで認められた。

2) 未知物質の構造解析：構造未知有機ハロゲン化合物のマススペクトルを詳細に解析した結果、この物質の元素組成は $C_9H_3Cl_7N_2$ と推定された(図5)。 $C_9H_3Cl_7N_2$ の実測精密質量(385.80866 u)は、理論精密質量(385.80866 u)と概ね一致し、分子イオンクラスターの塩素同位体比も許容値の範囲内($\pm 15\%$)にあった。またSciFinderおよびNIST2017を用いたデータベース検索の結果、 $C_9H_3Cl_7N_2$ に該当する候補物質は、2,3,3',4,4',5,5'-Heptachloro-1'-methyl-1,2'-bipyrrole(MBP-Cl7)と考えられた。

4. 研究期間全体のまとめと考察

1. 大村湾系群と瀬戸内海系群のスナメリにおけるPOP_s汚染と地理的分布

2013～2017 年にかけて大村湾と瀬戸内海沿岸に漂着したスナメリの脂皮を分析した結果、すべての試料から POP_s が検出された。両系群の POP_s 濃度に有意差はなく、PCBs が最も高値で検出され、次いで DDTs > CHLs > HBCDs > PBDEs > HCHs ≒ HCB の順であった (図1)。このことから、日本の沿岸域には依然として POP_s 汚染が顕在化していると考えられた。興味深いことに、瀬戸内海の地理的分布に着目すると、福岡・大分、愛媛、兵庫と比べ大阪の沿岸に漂着した検体で PCBs, DDTs, PBDEs, HBCDs は相対的に高い濃度を示した (図2)。とくに HBCDs 濃度は卓越しており、その蓄積濃度は PCBs に匹敵していた。同様の傾向は、以前実施された底質や二枚貝のモニタリング調査でも報告されており、大阪湾で採取された検体の HBCDs 濃度は他の海域より高濃度であったことが示されている。上記の結果は、近年における大阪湾への PCBs および HBCDs の流入を示唆している。また、近年 (2016 年) 大阪湾に漂着したスナメリの PCBs 濃度は、ゼニガタアザラシの投与試験で観察された免疫抑制を示すと予測される脂皮中レベルを上回っており、毒性上のリスクは継続しているものと推察された。

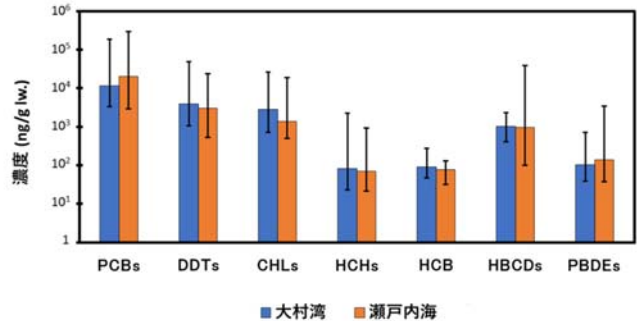


図1. 大村湾系群と瀬戸内海系群のスナメリから検出された脂皮中 POP_s濃度

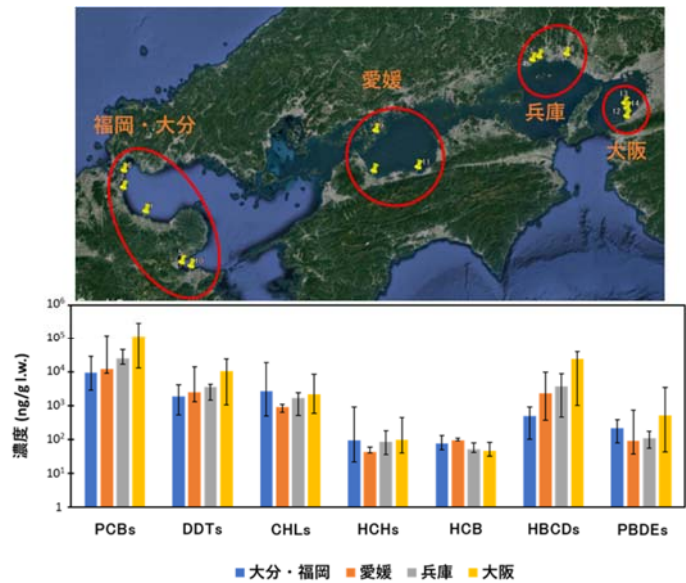


図2. 瀬戸内海系群のスナメリから検出された脂皮中 POP_s濃度の地理的分布

2. 大村湾系群のスナメリにおける POP_s 汚染の経年変化

2005～2012年にかけて大村湾沿岸に漂着したスナメリの脂皮 (es-BANKの保存試料) を化学分析し経年変化を解析した結果、すべてのPOP_sで有意な濃度変動はみられず定常状態を示した (図3)。この結果から、大村湾系群のスナメリは2005年以降も同レベルのPOP_sに曝露されており、その汚染は長期化することが示唆された。分析したすべての試料から検出されたPCB・PBDE同属体濃度の経年変化も解析したところ、4～10塩素化・臭素化の同属体については定常状態を示したが、3塩素化体であるCB28と3臭素化体であるBDE28の濃度には有意な低減が認められた。一般に、鯨類の

PCBs代謝能は弱いと考えられているが、上記の異性体は高塩素化・臭素化体と比べ、スナメリで代謝されやすいことが推察された。

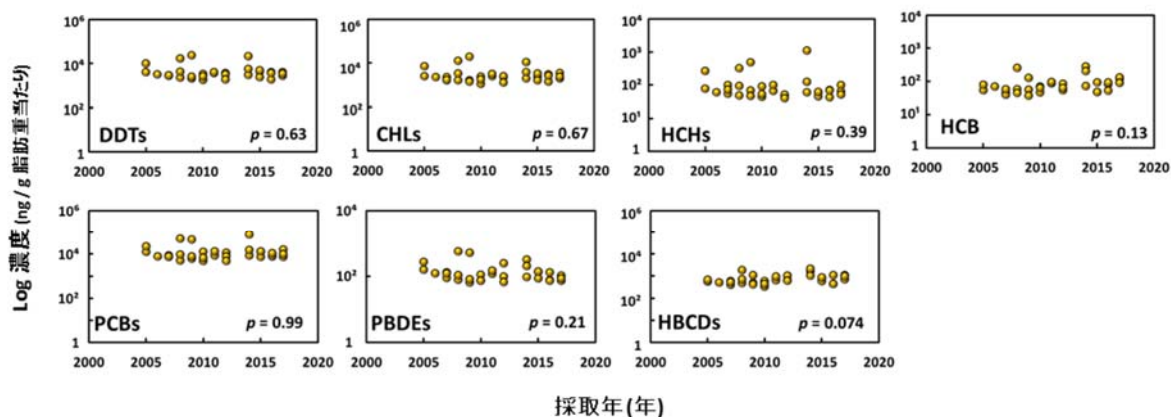


図3. 大村湾系群のスナメリから検出された脂皮中POPs濃度の経年変化

3. スナメリの脂皮に残留する有機ハロゲン化合物のスクリーニング分析

GC×GC-HRToFMS分析の結果、2000年と2015年に座礁したスナメリの脂皮試料から、約50種の有機ハロゲン化合物（異性体）が検出・同定され、なかでもPCBsとOCPs (CHLs [*cis/trans*-chlordanes, *cis/trans*-nonachlors, oxychlordanes], DDXs [*o,p'*-/*p,p'*-DDD, DDEs, DDTs]) の検出強度は卓越していた。また、PBDEs (BDE47) やそのメトキシ誘導体 (2'-MeO-BDE68/6-MeO-BDE47) に加え、構造未知の有機ハロゲン化合物による蓄積が両年代のスナメリで認められた。検出された有機ハロゲン化合物の組成割合は2000年と2015年の検体間で類似していたことから、瀬戸内海西岸における汚染プロファイルは、過去15年間で変動していないものと推察された。

2D TIC上で観測された構造未知有機ハロゲン化合物のマスペクトルを詳細に解析した結果、この物質の元素組成は $C_9H_3Cl_7N_2$ と推定された。 $C_9H_3Cl_7N_2$ の実測精密質量 (385.80866 u) は、理論精密質量 (385.80866 u) と概ね一致し (質量誤差: -5.4 ppm)、分子イオンクラスターの塩素同位体比も許容値の範囲内 ($\pm 15\%$) にあった。またSciFinder及びNIST2017を用いたデータベース検索の結果、 $C_9H_3Cl_7N_2$ に該当する候補物質は、2,3,3',4,4',5,5'-Heptachloro-1'-methyl-1,2'-bipyrrole (MBP-Cl7) と考えられた。MBP-Cl7は、PCBs様構造を有する海洋起源の天然化合物であることが近年の研究で明らかにされており、鯨類などの高次捕食者に生物濃縮することが指摘されている。またMBP-Cl7は、AhRを介して弱いダイオキシン様活性を示すことが確認されている。瀬戸内海のスナメリから検出されたMBP-Cl7がPCBsと同等のピーク強度であったことを考慮すると、スナメリは人工有害化学物質に加え、天然由来のダイオキシン様活性物質にも慢性的に曝露されている可能性が高い。

4. 座礁・漂着鯨類の試料採集

平成30年度に実施した解剖ワークショップおよび鯨類ネットワークを活用した外部機関からの受入れ実績は以下の通りで、貴重な鯨類試料を es-BANK に保管することができた。

- ・解剖ワークショップ

実施日：2018年12月16日

主催：愛媛大学沿岸環境科学研究センター（国末：研究代表者）

解剖数：スジイルカ1頭・スナメリ2頭

・外部機関からの受け入れ

国立科学博物館（田島：研究分担者）：17種 197試料

北海道大学（松石教授：協力者）：11種 98試料

長崎大学（天野教授：協力者）：1種 22試料

宮崎大学（西田准教授：協力者）：2種 8試料

海響館（原田研究員：協力者）：3種 23試料

東京農業大学（小林教授：協力者）：2種 71試料