



# 未規制の高残留性化学物質を対象とした環境汚染実態及びP450を用いた生体毒性の把握による環境リスクの評価

鈴木, 元治

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2014-09-05

(Date of Publication)

2015-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3256号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003256>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

未規制の高残留性化学物質を対象とした  
環境汚染実態及び P450 を用いた生体毒性の把握による  
環境リスクの評価

平成 26 年 7 月

神戸大学大学院

鈴木 元治



## 目次

第1章 緒論	1
1-1 化学物質の規制について	1
1-2 日本における未規制化学物質に対する調査について	2
1-3 本研究の目的	2
第2章 ジイソプロピルナフタレンのリスク評価	4
2-1 諸言	4
2-2 IPN類の兵庫県下における環境汚染の実態調査	6
2-3 ヒト P450 を用いた DIPN の代謝物の確認	22
2-4 IPN類の <i>umu</i> 試験及び発光 <i>umu</i> 試験による変異原性試験	27
2-5 まとめ	36
第3章 水酸化 PCBs のリスク評価	42
3-1 諸言	42
3-2 OH-PCBs の兵庫県下における環境汚染の実態調査	44
3-3 尿による OH-PCBs のヒト体内の汚染状況の把握	59
3-4 まとめ	65
第4章 有機フッ素化合物のリスク評価	71
4-1 諸言	71
4-2 PFCs の兵庫県下における環境汚染の実態調査	73
4-3 ヒト P450 による FTOHs の代謝物の確認	79
4-4 尿を用いたヒトの PFCs 暴露状況の確認	83
4-5 まとめ	86
第5章 総合考察	93
謝辞	96



## 第1章 緒論

### 1-1 化学物質の規制について

20世紀に入り、人工的に製造された化学物質の開発と普及が急速に進んでいる。現在、化学物質IDの事実上の標準となっている Chemical Abstracts Service (CAS) には5000万種以上の化学物質が登録されているが、約10万の人工化学物質が毎年工業的に生産されており、そのうち約5000種は年間1000トン以上生産されている。日本に限っていえば、約300種が毎年新たに製造・輸入されている。

日本では、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の食用油への混入により、多くの健康被害を生んだカネミ油症事件を契機に、1973年に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」が制定され、ヒトの健康を損なう恐れがある化学物質は、その製造、輸入及び使用が規制されることとなった。1999年には「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律 (化管法)」が制定され、化学物質排出移動量届出 (PRTR; Pollutant Release and Transfer Register) 制度及び化学物質安全性データシート (MSDS; Material Safety Data Sheets) 制度が導入された。PRTR制度は、ヒトの健康や生態系に有害な恐れのある化学物質について、事業所からの排出量及び移動量を申告する制度である。MSDS制度は、その化学物質を他の事業者に譲渡・提供する際に、その性状や取扱いに関する情報の提供を義務付ける制度である。また、化審法は、ヒト中心から生態系保全を含む規制に改正され、安全性に疑いのある物質が監視されている。2004年には、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs条約; Persistent Organic Pollutants) が発効され、難分解性、高蓄積性、長距離移動性及び有害性の性質をもつクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) や PCBs など12物質を残留性有機汚染物質 (POPs) として、世界的に全廃する方針がとられることとなった。また、2009年には、有機フッ素化合物のひとつであるペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS; perfluorooctanesulfonic acid) など9種類の化学物質が POPs として追加された。POPs として登録された化学物質は、化審法の指定化学物質にも登録されることとなる。欧州では、2007年に制定された化学物質の登録、評価、認可及び制限 (REACH; Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) 規制により、これまで行政が行っていた既存化学物質のリスク評価を、新規化学物質と同様に事業者が行うことが決められた。

このように、近年では、人工化学物質に対する安全性の監視体制の強化が図られてきている。しかしながら、使用の規制を受けている化学物質はごく一部に限られている。POPs条約では、規制対象となる化学物質は、難分解性、高蓄積性、長距離移動性及び有害性の性質の全ての性質を満たすものに限定されている。一方、化審法では残留性・高蓄積性又は有害性のどちらかが認められていないものは、使用の届出が必要になるだけである。また、REACHにおいては、リスク評価のためのコスト増加や必要以上の動物実験が行われるという懸念があり、産業界やアメリカ、日本を含む各国から反対意見がでていた。疑いの

ある化学物質を全て規制するという対策は現実的ではなく、化学物質の有益性も考慮されるべきである。そのため、使用が認められている化学物質についても、将来の規制の際に迅速に対応するためには、常に安全性や環境、生体への蓄積状況の確認によりリスクを評価しておくことが必要と考えられる。

## 1-2 日本における未規制化学物質に対する調査について

日本では、既存化学物質の一般環境中の残留状況の把握を目的として、化学物質環境実態調査（化学物質エコ調査）が、化審法制定後の1974年から行われている。化学物質エコ調査により、およそ3000種の化学物質の環境安全性総合点検調査が1998年までに実施された。また、その他にも生物モニタリング、非意図的生成化学物質汚染実態追跡調査、水質・底質モニタリング及び指定化学物質等検討調査が行われてきた。

2002年には、これらの調査結果をPRTR法やPOPs条約などの環境中の化学物質対策に対して有効活用する考え方が導入され、2005年には施策の策定にも資する調査となるような体系が整えられることとなった。それらの調査体系は「初期環境調査」「詳細環境調査」「曝露量調査」「モニタリング調査」及び「ヒト生体試料調査」の5種である。初期環境調査では、環境中に対象の化学物質がどの程度存在するかを調査する。また、そのための分析方法の開発も行う。詳細環境調査では、初期環境調査で明らかになった環境中の汚染度について、サンプリング場所を変更したり、測定感度を改善したりすることによりさらに詳細な調査を行う。また、モニタリング調査では、難分解性及び高蓄積性であるPOPsなどの残留状況を調査する。初期環境調査及び詳細環境調査が1～3年程度で終わるのに対し、モニタリング調査は継続的に追跡するという特色がある。一方、曝露量調査では、食事や室内空気の汚染度について調査する。さらに、ヒト生体試料調査では、ヒトの血液や母乳に取り込まれた量を調査する。また、これらの調査の他にも支援事業として、「曝露量推計支援事業」「環境試料保存事業」及び「分析法開発事業」が実施されている。

## 1-3 本研究の目的

1-1節に記述したように、過去に比べて化学物質の安全性の監視体制は強化されてきているものの、依然として安全性が疑われる化学物質の環境汚染が報じられることがある。2007年には、有機フッ素化合物（PFCs）について、発がん性が指摘されながら環境汚染が深刻であると報道され、PFCsの環境汚染の実態調査や生体影響の調査が加速度的に進められる契機となった。一般的にいうと、一旦安全とみなされた化学物質であっても、研究報告の蓄積と安全性検査の見直し等によって危険性が明らかとなることがある。よって、化学物質の安全性や環境汚染の実態調査は環境省によって行われているものの、膨大な数の化学物質を調査するためには、調査の効率化、迅速化が必要である。また、生体影響の調査には、倫理的な問題からも動物実験をできる限り行わないような生体リスク評価が求められ

ており、特に、ヒトに対しては医薬品など直接投与されるものを除いて調査方法はごく限定されているのが現状である。

そこで、本研究では、未規制の化学物質の中から、ジイソプロピルナフタレン (DIPN)、水酸化 PCBs (OH-PCBs) 及び有機フッ素化合物 (PFCs) の 3 種を取り上げ、これらの環境リスクを評価することを目的とし、現在まで未解明となっている環境汚染の実態把握に加えて、迅速かつ簡便にヒトへの生体毒性などの影響を把握するため、*umu* 試験及び発光 *umu* 試験による変異原性の確認、ヒト P450 を用いた代謝能評価または尿を用いた曝露量の推定を行った。

## 第2章 ジイソプロピルナフタレンのリスク評価

### 2-1 諸言

ジイソプロピルナフタレン (DIPN) は、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の代替品として 1970 年頃からインクや農薬の溶剤、また熱媒体油などとして様々な分野で使用されている。また、DIPN の同族体であるイソプロピルナフタレン (MIPN) 及びトリイソプロピルナフタレン (TIPN) についても、DIPN と同様に熱媒体油として使用され、DIPN 製品にも一部含まれていることがある。DIPN、MIPN 及び TIPN (以下、IPN 類と呼ぶ。) の構造式及び物理化学的性質をそれぞれ図 2-1 及び表 2-1 に示す。

DIPN の安全性は、本薬剤が使用開始された当初に調査されており、環境中での残留性はあるが生物濃縮性や有害性は認められないと判断された(Haga and Ozaki 1984、Yoshida and Kojima 1978a)。DIPN は、多環芳香族化合物と比べてアルキル基が長いいため、生体影響が少なく (Hoke and Zellerhoff 1998)、海水性二枚貝への毒性も低いと考えられている (Scarlett ら 2011)。DIPN は環境に対して安全な化学物質であるとして、世界中で使用されてきた。1986 年には、DIPN 製品である KMC がドイツで 20,000 トンが生産され、当時の日本では毎年 6,000 トンが使用された。しかしながら、日本では 2004 年の化審法による再試験の結果、難分解性に加えて高蓄積性であることが判明し、化審法の第一種監視化学物質 (現、監視化学物質) に指定された。これにより、DIPN の製造・輸入実績数量、用途等を毎年届け出ることが義務付けられることとなった。2004 年以降は、DIPN の使用が控えられるようになってきているが、それでも毎年 600 トン程度が使用されている。2007 年には、感熱紙などの溶剤として 431 トン、熱媒体として 206 トン、農薬溶剤として 147 トン、その他に 17 トンが使用された。一方、MIPN は、高蓄積性はないが難分解性であり、1980 年代の調査により生体への有害性があることが確認されている。さらに TIPN は DIPN と同様に難分解性及び高蓄積性の性質をもつことも知られている。このことから、MIPN 及び TIPN は、当時、それぞれ化審法の第三種監視化学物質及び第一種監視化学物質 (現、監視化学物質) に指定されている。なお、2009 年の化審法の改正により、有害性のみであった化学物質の評価基準が曝露量を加味したリスクに基づくものになり、第二種監視化学物質、第三種監視化学物質は廃止され、優先評価化学物質に集約されたが、MIPN は優先評価化学物質からは外されている。

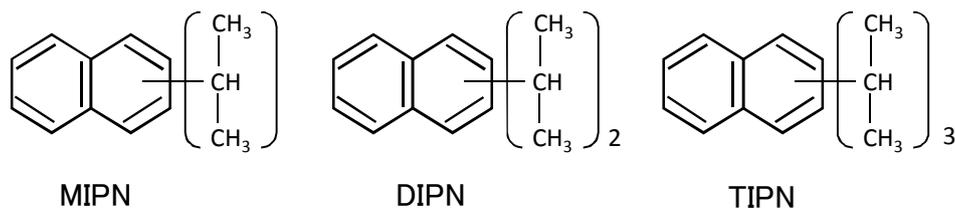


図 2-1 IPN 類の構造式

表 2-1 IPN 類の構造式及び物理化学的性質

	分子量	沸点 (°C)	蒸気圧 (Pa)	水溶解度 (mg/L)	LogPow
MIPN	170.25	273 <sup>※1</sup>	1.37 (25 °C) <sup>※1</sup>	6.885 (25 °C) <sup>※1</sup>	4.63 <sup>※1</sup>
DIPN	212.33	310 <sup>※1</sup> , 301 <sup>※2</sup>	0.0755 (25 °C) <sup>※1</sup> , 0.0620 (18 °C) <sup>※2</sup>	0.24 (25 °C) <sup>※1</sup> , 0.18~0.44 <sup>※3</sup>	6.08 <sup>※1</sup> , 4.90 <sup>※4</sup>
TIPN	254.40	341 <sup>※1</sup>	0.00798 (25 °C) <sup>※1</sup>	0.008181 (25 °C) <sup>※1</sup>	7.54 <sup>※1</sup>

※1 EPI Suite™ v4.10 (<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>)

※2 後藤稠,池田正之,原一郎編,産業中毒便覧・増補版,医歯薬出版(1991)

※3 International Uniform Chemical Information Database IUCLID Data Set

※4 Hazardous Substances Data Bank(HSDS), U.S.National Library Medicine(1996)

DIPN は、インク等の溶媒などとして一般環境に対して開放的に使用されているため、環境汚染が広まっていることが懸念されている。DIPN の環境調査は、1975 年、1977 年及び 1980 年に全国の水質、底質及び魚類を対象に環境省によって実施された（化学物質環境汚染実態調査 1980）。当時の調査結果では、環境水からは DIPN が全ての地点において不検出であり、底質及び魚類の一部からそれぞれ 1.9~190 ng/g 及び 0.52~48 ng/g の範囲で検出された。兵庫県の測定地点である姫路沖では、水質、底質及び魚類の全てにおいて不検出であった。その後、DIPN の環境調査は行われることはなく、2004 年に DIPN が第一種監視化学物質に指定されたことを契機に、再び環境調査が行われることになった。

一方、DIPN については食品の汚染も報告されている。Sturaro ら (1994) によると、インク溶媒である DIPN が古紙再生紙に含まれており、古紙再生紙の包装紙から食品に DIPN が移行すると報告されている。監視化学物質に指定された DIPN 及び TIPN は、ヒトや高次捕食動物への長期毒性が認められれば第一種指定化学物質に指定される事となっており、その結果、日本での使用・製造・輸入が事実上禁止されることになる。DIPN による生体影響についてはいくつか報告されている。魚類への急性毒性は、ヒメダカに対する LC<sub>50</sub> が 4.3 mg/L であり、OECD 分類基準では toxic に相当する。また、慢性影響として実験動物の肝臓肥大化や染色体異常の誘発などが報告されている。森田ら (1990) によると、DIPN は肝内胆管ガンを発生させ、リトコール酸がそれを促進する。しかしながら、現在のところ、DIPN の発がん性の有無は明らかになっておらず、TIPN については毒性に関する報告がほとんどないのが現状である。

そこで、本研究では、DIPN に加えて MIPN 及び TIPN を調査対象とし、その環境汚染の実態や生体への影響を調査することとした。2-2 節では、兵庫県下における IPN 類の環境汚染の実態調査の結果を示す。また、2-3 節では、DIPN の代謝について遺伝子組換えヒ

ト P450 を用いて調査した結果を示す。最後に、2-4 節では、*umu* 試験及び発光 *umu* 試験により IPN 類の変異原性を調査した結果を示す。

## 2-2 IPN 類の兵庫県下における環境汚染の実態調査

### 2-2-1 はじめに

MIPN 及び DIPN の環境水、底質及び生物試料中の濃度は、Kodama ら (1981) によって国内で初めて調査されている。また、環境省による環境汚染実態調査によって、1980 年、1983 年、1985 年及び 1997 年に DIPN の全国の汚染状況が調査されている。しかしながら、DIPN は当時、2,6-DIPN と 2,7-DIPN の 2 つの異性体のみが調査対象とされていただけであった。また、DIPN は構造的に 10 の異性体を持つが、当時、GC/MS のキャピラリーカラムに使用されていたのは無極性カラムであり、本カラムを用いた分析では DIPN の異性体を十分に分離することはできないことが Brzozowski ら (2002) によって報告された。そのため、当時の 2,6-DIPN と 2,7-DIPN のピークには、おそらく他の異性体が十分に分離されず、複数の異性体が重なって検出されていたと考えられる。DIPN 製品には、2,6-DIPN 及び 2,7-DIPN 以外にも異性体が含まれている。DIPN の汚染状況を評価するためには、様々な情報を入手する必要がある。また、2-3 節において代謝を評価するためにも、異性体を分離して測定することが必要である。このことは MIPN 及び TIPN についても同様である。

そこで、まず初めに IPN 類の異性体のパターンを把握することができる分析方法を開発した。さらに、本分析方法を用いて、兵庫県下の IPN 類の環境汚染の実態を調査した。

特に、主に IPN 類が環境中で最も蓄積していると考えられる河川及び海の底質を調査した。また、さらに同方法を発展的に応用することで、環境水、大気及び生物試料についても調査を行った。

### 2-2-2 材料及び分析方法

2,6-DIPN (>純度 99%)、2-MIPN (>純度 95%) 及び 1-MIPN (>純度 85%) は関東化学㈱から購入し、MIPN、DIPN 及び TIPN の工業原体は熱媒体として使用されているものをそれぞれ綜研テクニクス㈱から入手した。これらの試薬は、ガスクロマトグラフィー分析における異性体の保持時間の同定や回収率などを求めるための標品として用いた。また、Prof.Brzozowski から入手した DIPN の個々の異性体原液は、クロマトグラム上の DIPN の各異性体の保持時間を確認するために用いた。シリンジスパイクの HCB- $^{13}\text{C}_6$  及びその他有機溶媒は関東化学㈱から購入した。PCBs の同位体混合品 MBP-CG ( $^{13}\text{C}_{12}$ -MoCB ~  $^{13}\text{C}_{12}$ -DeCB) 及び MBP-70 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4',5'-TeCB) は、㈱ウエリントンラボラトリーズジャパンから購入し、それぞれ PCBs のサロゲート及びシリンジスパイクに用いた。試料の精製に用いた Supelclean ENVI™-Carb 及び LC-Silica カートリッジは、シグマアルドリ

ッチジャパン合同会社から購入した。大気サンプリングに用いた Sep-Pak Plus PS-Air は日本ウォーターズ㈱から購入した。

本研究で開発した大気、環境水、底質及び生物試料の IPN 類の同時分析方法についてそれぞれ図 2-2～図 2-5 に示す。DIPN は環境中のあらゆるところに存在することから、分析器具や精製カラムからの DIPN の混入が見られた。Agilent 製のオートサンプラー用シリンジには、プランジャーのテフロンチップ部から高濃度の DIPN 汚染が確認された。また、TPX 製のピペットチップにも DIPN の汚染がわずかながら確認された。また、精製カラムでは、SUPELCO 社製の Envi-18 や Florisil (500 mg in 6 mL Glass Tube)、Waters 社製の PS2 や C18 などから 10～1000 ng の DIPN が検出された。さらに、原因は不明であるが、Zymark 製の TurboVap II を用いた高純度窒素ガス吹付けによりヘキサンを濃縮する過程では、ヘキサンの濃縮量が多いほど、DIPN の混入量が増加した (ヘキサン 100 mL、200 mL 及び 300 mL を 1 mL に濃縮した場合、それぞれ 0.9 ng、1.4 ng 及び 2.9 ng の DIPN が検出した。以上の予備的検討結果から、本研究における分析方法の開発では、DIPN の混入量を最小限に抑えることが特に重要であることが判明した。

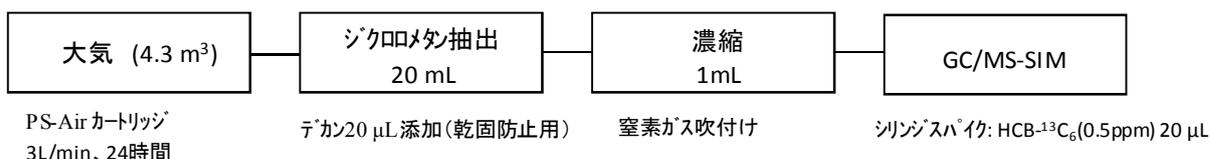


図 2-2 大気中の IPNs 類の分析方法

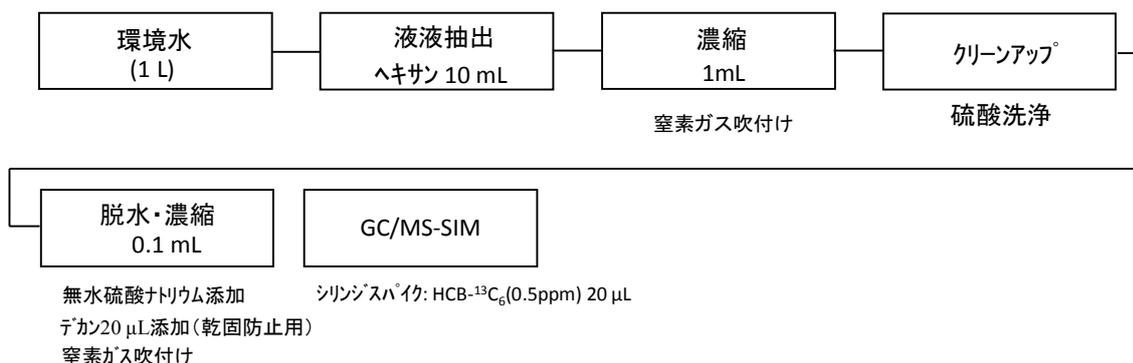


図 2-3 環境水中の IPNs 類の分析方法

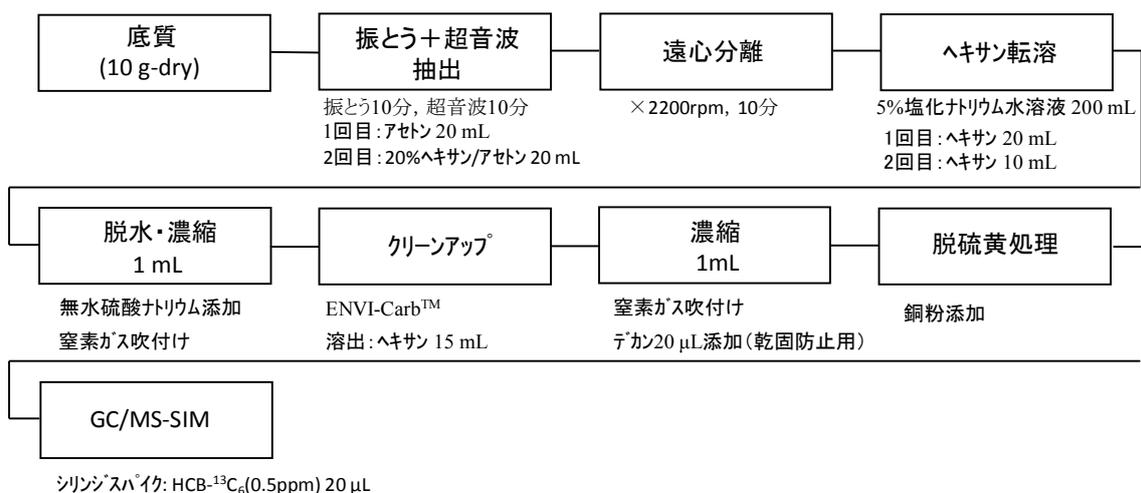


図 2-4 底質中の IPNs 類の分析方法

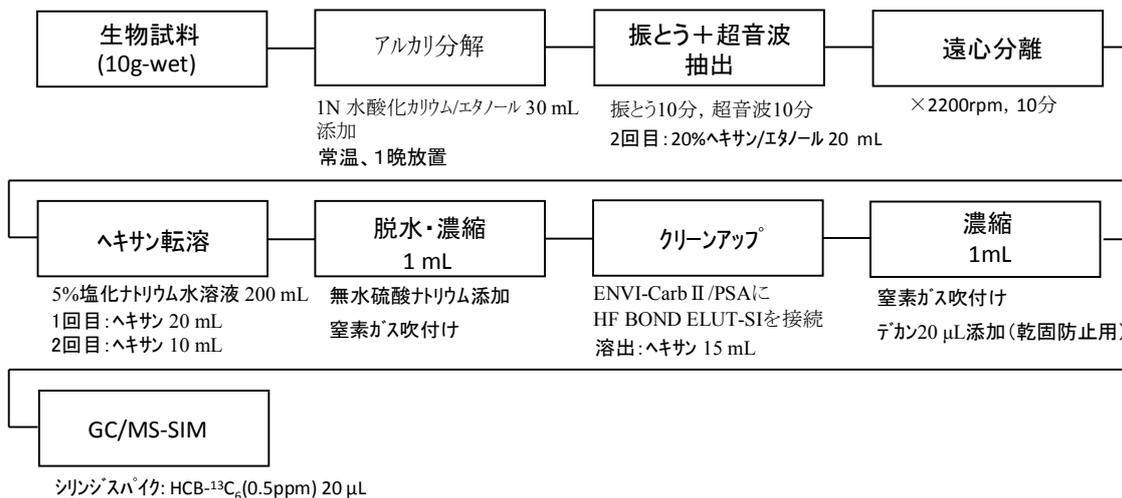


図 2-5 生物試料中の IPNs 類の分析方法

DIPN は、溶媒非存在下では容易に気化する性質を持つため、著しく回収率が低下する。そのため、窒素ガス吹付けによる濃縮時には乾固防止のためのキーパーとしてデカン又はノナンを添加した。デカン又はノナンの添加量は、試料量の 1/10 以上になるとクロマトのピーク形状が悪化するため、それ以下とした。

大気のサンプリング時間は、DIPN の捕集量を増やし、安定した濃度を得るために 24 時間とした。屋内（恒温室）及び屋外（兵庫県環境研究センター屋上）にてサンプリング時間を変えて測定した結果、屋外に比べて屋内の大気中 DIPN 濃度は、サンプリング時間による変動が比較的少なかった（表 2-2~2-4）。一般的に、屋外の DIPN の大気中濃度は建物内より低いため、ブランク値の影響を受けやすいと考えられている。また、屋外の大気濃度は時間帯によって変動した可能性もあると考えられる。

PS-Air カートリッジひとつで、24時間のサンプリングで捕集される IPN 類を保持できるかどうかを確認するため、カートリッジ4つを直列に接続した状態で恒温室にてサンプリングを行った。その結果、2列目以降のカートリッジからは、前処理中のコンタミと考えられる DIPN が 0.1 ng 程度検出されたのみであった（図 2-6）。カートリッジの保存性を確認するため、カートリッジに IPN 類標準液を 10 ng 又は 50 ng 添加し、窒素ガス吹付けによりアセトン溶媒を気化させた後に冷蔵保存し、1、3、5 及び 7 日後にそれぞれ IPN 類の濃度を確認した。その結果、7日間冷蔵保管しても濃度が減少することはないことが判明した（図 2-7、2-8）。

環境水については、DIPN の Log P は 4.9（化学物質安全性データシート（HSDS））であり疎水性が高いため、サンプリング容器の内側に DIPN が付着する可能性が高い。そのため、サンプルは 1L のガラスボトル内でヘキサン抽出を行うこととした。

底質の精製に用いた Supelclean™ENVI-Carb™は、他のシリカゲルなどの精製カートリッジ等に比べてカートリッジ内の DIPN のコンタミが少ないことが判明した（表 2-5）。また、混雑物はヘキサンにより容易に洗浄することができた。

表 2-2 屋外でのサンプリング時間と DIPN 大気中濃度

サンプリング時間(hr)	DIPN(ng/m <sup>3</sup> )	サンプリング日時
10	0.5	2008年3月7日AM8時48分～3月7日PM6時15分
14	1.5	2008年3月6日PM6時30分～3月7日AM8時48分
24	0.8	2008年3月6日PM6時30分～3月7日PM6時15分

サンプリング場所：兵庫県環境研究センター屋上

表 2-3 屋外でのサンプリング時間と DIPN 大気中濃度（その 2）

サンプリング時間(hr)	DIPN(ng/m <sup>3</sup> )	サンプリング日時
3	0.6	2008年3月5日PM3時20分～3月5日PM6時20分
6	2.1	2008年3月6日AM9時28分～3月6日PM3時15分
15	1.5	2008年3月5日PM6時20分～3月6日AM9時28分
24	0.8	2008年3月5日PM3時20分～3月6日PM3時15分

サンプリング場所：兵庫県環境研究センター屋上

表 2-4 屋内でのサンプリング時間と DIPN 大気中濃度

サンプリング時間(hr)	DIPN( $\text{ng}/\text{m}^3$ )	サンプリング日時
1	15.6	2008年3月4日AM10時16分～3月4日AM11時18分
2	19.9	2008年3月4日PM2時17分～3月4日PM4時14分
3	15.9	2008年3月4日AM11時18分～3月4日PM2時18分
16	16.1	2008年3月4日PM5時00分～3月5日AM10時14分
24	15.3	2008年3月4日AM10時16分～3月5日AM10時14分

サンプリング場所: 恒温室(25°C)

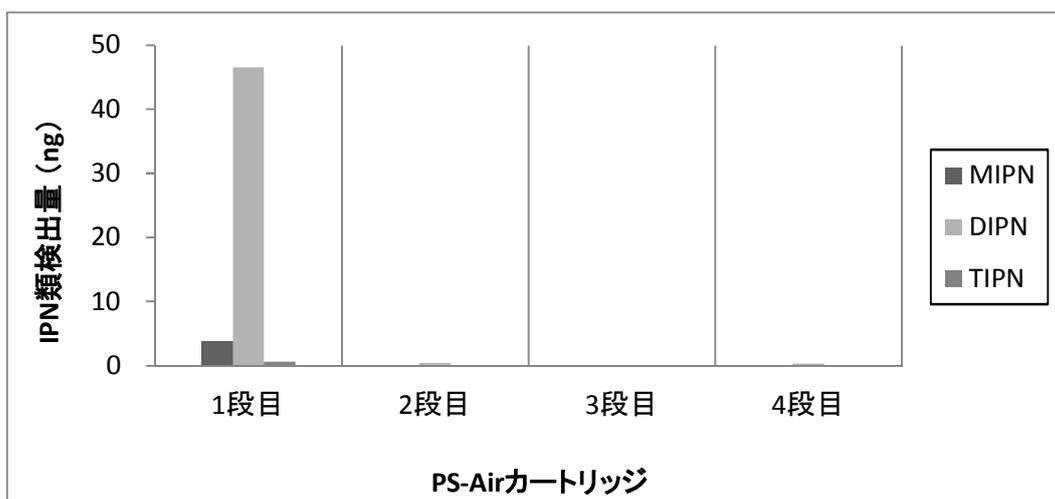


図 2-6 四段連結 PS-Air カートリッジにより捕集された IPN 類 (恒温室内にてサンプリング)

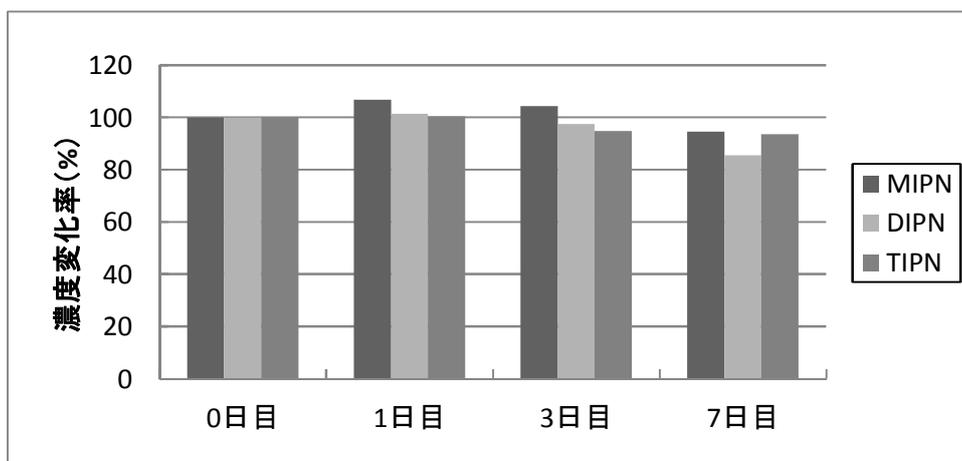


図 2-7 PS-Air カートリッジに捕集した IPN 類の保存性 (IPN 類 10ng 添加)

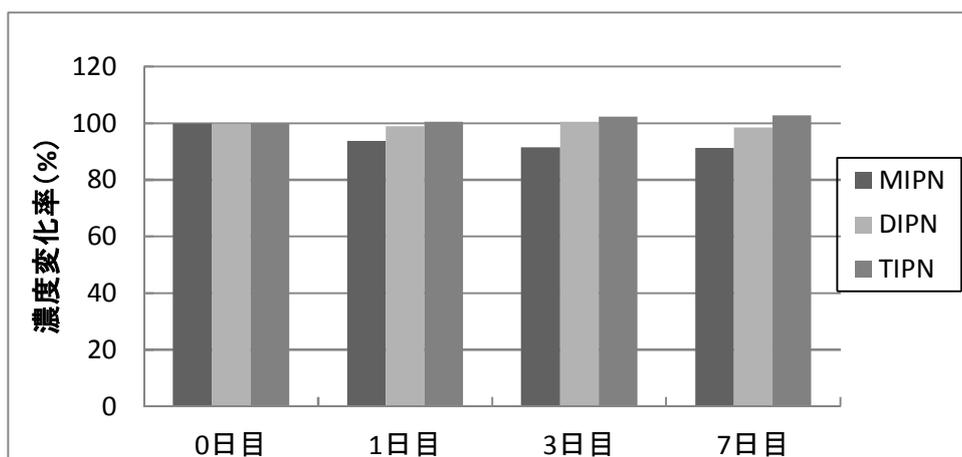


図 2-8 PS-Air カートリッジに捕集した IPN 類の保存性  
(IPN 類 50ng 添加)

表 2-5 精製カートリッジ等の DIPN 汚染レベル

固相吸着剤		DIPN汚染レベル (ng)
Envi-18	500mg in 6mL Glass Tube (SUPELCO社製)	1000 /個
Florisil	500mg in 6mL Glass Tube (SUPELCO社製)	100 /個
PS2	Sep-Pak Plus(Waters社製)	10~100 /個
C18	Sep-Pak Plus(Waters社製)	10 /個
ENVI-Carb II /PSA	500/500mg in 6mL SPE Tube (SUPELCO社製)	1~10 /個
ENVI-Carb	500mg in 6mL SPE Tube (SUPELCO社製)	1~10 /個
HF-BOND ELUT-Si	500mg in 3mL SPE Tube (VARIAN社製)	0~1 /個
C18 adsorbent	1g (BONDESIL社製)	1 /g

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) の分析条件を表 2-6 に示す。GC/MS システムとして、SPELCO WAX-10 キャピラリーカラム (30m×0.32 mm、0.25 μm) を装着したアジレント社製ガスクロマトグラフ 6890N/ JEOL 社製 Q1000GC 質量分析計を用い、定量分析を行った。

IPN 類 0.2 ng を分析した SIM クロマトグラムを図 2-9 に示す。IPN 類の異性体は、中極性である SPELCO WAX-10 キャピラリーカラムを用いることにより良好に分離することができた。DIPN の異性体は、Brzozowski ら (2001、2002) により単離、同定されている。クロマト上の 8 つの各異性体ピークは、Pref.Brzozowski から提供された DIPN の異性体毎の原体により同定した。TIPN については、6 つの異性体が工業原体から検出されたが、本研究では同定することができなかった。

検量線は、MIPN 及び DIPN は 2-IPN 及び 2,6-DIPN の標準液を用いて作成した。TIPN については市販されている標準液がないため、工業原体を用い、検出された全ての異性体の総ピーク面積から検量線を作成した。なお、本研究ではこれらの検量線から異性体総量として IPN 類を定量しているため、個々の異性体を必ずしも正確には定量しているとはい

えない。これは、PCBs等の多くの異性体をもつ他の環境負荷化学物質一般が、全ての異性体の標準品を調製することが出来ないという共通した性質に寄るものである。

IPN類の分析方法検出下限値（MDL）、定量下限値（MQL）及び回収率は、環境省の分析方法開発マニュアルに従い、工業原体を用いて算出した（表2-7）。表には示していないが、本測定方法の2,6-DIPNのMDLは、環境水で0.71 ng/L、底質で0.18 ng/g-dryであり、1997年に環境省から報告されているMDLと比較すると、本実験では10倍以上の高感度化が達成できた。このことを可能にしたのは、GC/MSの性能が向上したことに加えて、高感度で測定する妨げとなる前処理中のコンタミを除いたためと考えられる。

底質中のPCBs濃度は、環境省の分析方法に従い、サロゲート法により定量した（底質調査方法 環境省 水・大気環境局平成24年8月）。キャピラリーカラムにはHT-8PCB(60m、0.25mm i.d.)を用い、GCMSシステムとして、アジレント社製ガスクロマトグラフ6890NとJEOL社製800D高分解能質量分析計を用いた。

表2-6 GC/MSの分析条件

GC/MSシステム	6890N (Agilent Technologies)/ Jms-Q1000GC K9 (JEOL)
キャピラリーカラム	Supelcowax-10(Polyethleneglycol) (30m × 0.25mm × 0.25µm)
オープン	50 deg (1 min保持) → 20 deg/min → 100 deg → 5 deg/min → 210 deg → 20 deg/min → 270 deg (1 min保持)
注入モード, 注入量, 注入口温度	スプリットレス(1.5分パージ), 2 µL, 270 deg
キャリアーガス	ヘリウム(1.2mL/min)
イオン化法	EI法(200 uA, 70eV)
インターフェース温度, イオン源温度	240 deg, 210 deg
検出モード(モニターイオン(m/z))	SIMモード(MIPN: 170 and 155, DIPN: 212 and 197, TIPN: 254 and 239, HCB- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> : 290)

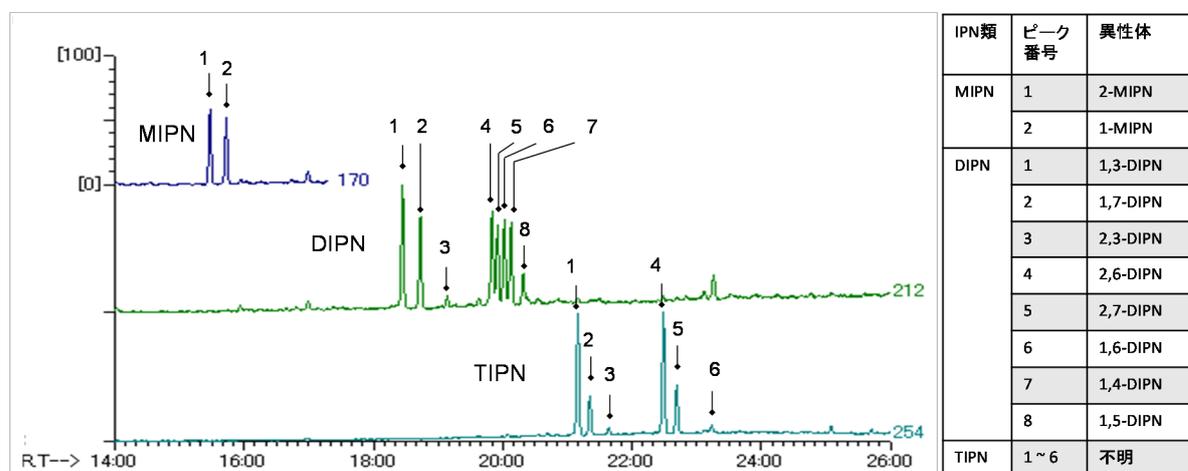


図2-9 IPN類(工業原体100 µg/mL)のSIMクロマトグラム

表 2-7 IPN 類分析方法の回収率、検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

	大気			環境水			底質			生物試料		
	回収率 (n=3)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	回収率 (n=3)	MDL (ng/m <sup>3</sup> )	MQL (ng/m <sup>3</sup> )	回収率 (n=5)	MDL (ng/g-dry)	MQL (ng/g-dry)	回収率 (n=4)	MDL (ng/g-wet)	MQL (ng/g-wet)
	(%)	(ng/L)	(ng/L)	(%)	(ng/m <sup>3</sup> )	(ng/m <sup>3</sup> )	(%)	(ng/g-dry)	(ng/g-dry)	(%)	(ng/g-wet)	(ng/g-wet)
MIPN	97±5.5	0.46	1.2	75±4.5	1.8	4.6	64±3.4	0.16	0.41	73±8.6	0.15	0.38
DIPN	102±8.6	0.48	1.2	77±4.0	1.9	5.0	86±3.8	1.1	2.9	79±11	0.60	1.6
TIPN	102±18	0.23	0.59	76±5.9	5.6	14	90±1.7	0.82	2.1	79±13	0.52	1.3

### 2-2-3 サンプルング地点

大気は地点 A1、河川は地点 R1~10 及び海域は地点 S1~40 をサンプルング地点とした (図 2-10 及び表 2-8)。大気は、地点 A1 の兵庫県環境研究センター (神戸市) の屋上及びセンター室内において、2008 年及び 2009 年にサンプルングした。環境水は、河川の全ての地点 R1~R10 及び海域の地点 S29 から 2009 年にサンプルングした。底質は、地点 R7 及び R8 を除く 8 つの河川地点からドレッジを用いて 2010 年にサンプルングした。また、海域の全 40 地点 (S1~S40) から 2009 年及び 2010 年にエクマンバージ採泥器を用いてサンプルングした。生物試料は、地点 S29 近傍で採れた *Lateolabrax japonicus* (以後、スズキと表記する。) の雄 5 匹と雌 5 匹を漁業組合から 2009 年に購入し、試料 1~5 を作製した。なお、本調査は環境省による化学物質環境実態調査の一環として実施しているため、その試料作製手順に従い、同地点のスズキの切り身を 1 検体あたり 1 kg 程度、雌雄別 5 検体を確保した。購入したスズキの個体重量は様々であったため、切り身を雌雄別に混合し、ミキサーによりミンチ状にしたものを 1 つの試料とした。試料 1 及び 2 は雄のスズキ 2 匹分及び 3 匹分の切り身からそれぞれを作製し、試料 3~5 は雌のスズキ 3 匹分、2 匹分及び 1 匹分の切り身からそれぞれを作製した。これらの大気、環境水、底質及び生物試料は、図 2-2 から図 2-5 に示した方法により定量分析した。

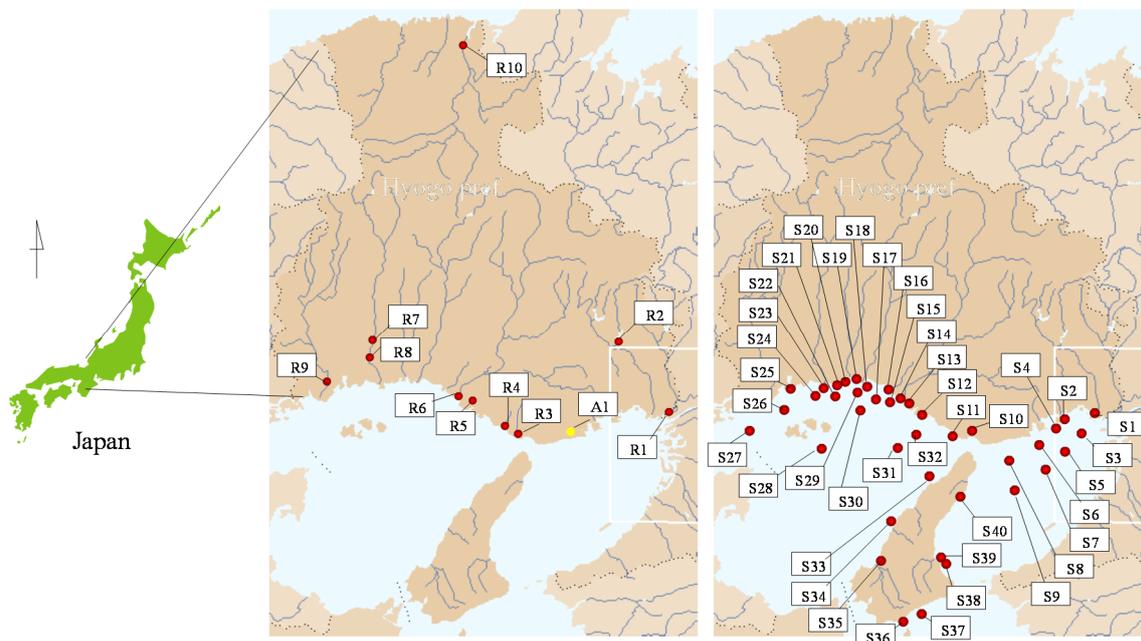


図 2-10 IPN 類の大気、環境水、底質及び生物試料のサンプリング地点

表 2-8 IPN 類の大気、環境水、底質及び生物試料のサンプリング地点情報

地点番号	地点名(市町名)	水域名	地点番号	地点名	水域名
R1	辰巳橋(尼崎市)	左門殿川	S21	網干港内	播磨海域
R2	百間樋(宝塚市)	武庫川	S22	姫路市西部沖合	播磨灘北西部
R3	嘉永橋(明石市)	明石川	S23	材木港内	播磨灘北西部
R4	谷八木橋(明石市)	谷八木川	S24	揖保川河口沖	播磨灘北西部
R5	十五社橋(加古川市)	別府川	S25	相生湾口	播磨灘北西部
R6	相生橋(相生市)	加古川	S26	赤穂市東部沖	播磨灘北西部
R7	竜野橋(たつの市)	揖保川	S27	赤穂市中央部沖	播磨灘北西部
R8	王子橋(たつの市)	揖保川	S28	家島本島南沖	播磨灘北西部
R9	坂越橋(赤穂市)	千種川	S29	飾磨港沖	播磨灘北西部
R10	城崎大橋(豊岡市)	丸山川	S30	東部工業港沖合	播磨灘北西部
S1	西宮市沖1	大阪湾	S31	別府港沖合	播磨海域
S2	神戸南東部沖1	大阪湾	S32	別府港沖	播磨海域
S3	西宮市沖2	大阪湾	S33	淡路市浜沖	淡路島西部北部
S4	神戸市東部沖2	大阪湾	S34	淡路市撫沖	淡路島西部南部
S5	神戸市東部沖3	大阪湾	S35	南あわじ市慶野沖	淡路島西部南部
S6	神戸市中央部沖	大阪湾	S36	南あわじ市白崎沖1	淡路島西部南部
S7	神戸市東部沖4	大阪湾	S37	南あわじ市白崎沖2	淡路島西部南部
S8	神戸市西部沖1	大阪湾	S38	洲本内港内	淡路島東部南部
S9	神戸市西部沖2	大阪湾	S39	洲本内港内	淡路島東部南部
S10	明石港内	播磨海域	S40	淡路市浜沖	淡路島東部北部
S11	明石林崎沖	播磨海域	A1	兵庫県環境研究センター(神戸市)	
S12	別府港内	播磨海域			
S13	高砂本港内	播磨海域			
S14	高砂西港港口先	播磨海域			
S15	高砂西港沖	播磨海域			
S16	大塩港内	播磨海域			
S17	白浜沖	播磨海域			
S18	東部工業港内	播磨海域			
S19	飾磨港内1	播磨海域			
S20	広畑港内	播磨海域			

#### 2-2-4 結果及び考察

地点 A1 の兵庫県環境研究センター（6 階建て）の屋上及び屋内（5 階廊下）において測定した IPN 類の大気中濃度を表 2-9 に示す。MIPN 及び TIPN は、2008 年 2 月 7 日~2 月 8 日に屋内において MIPN が定量下限値未満で検出された 1 回を除いて、全て不検出であった。一方、DIPN は屋上の大気から  $1.1 \pm 0.38 \text{ ng/m}^3$  の濃度で検出された。屋上でのサンプリングは 2008 年 5 月と 2009 年 11 月に行ったが、気温による濃度の違いはみられなかった。屋内では、DIPN が  $10 \text{ ng/m}^3$  及び  $16 \text{ ng/m}^3$  の濃度で検出され、屋上よりも 10 倍程度高かった。この原因としては、インク溶剤として使われている DIPN が屋内での発生源となっていると考えられた。屋内及び屋外の大気から検出された DIPN の異性体パターンは、工業原体と同じであった。2007 年には、地点 R7 近傍において DIPN の大気中濃度を測定しており、その結果は  $16 \text{ ng/m}^3$  であった。地点 R7 は揖保川中流部に位置する竜野橋であり、上流にある古紙再生工場からの排水・排気ガスの影響を受ける地点である。今回の屋上大気中の DIPN 濃度は、R7 近傍と比べて 10 倍程度低い濃度であった。2009 年には、環境省の調査により、本測定方法を用いて全国 20 地点（本調査の地点 A1 の結果を含む）の DIPN の大気中濃度が測定された。最も高濃度であったのは、大阪市内で観測された  $22 \text{ ng/m}^3$  であり、これを除くと  $1 \sim 10 \text{ ng/m}^3$  の濃度範囲であった。

河川水及び海水中の IPN 類の濃度を表 2-10 に示す。MIPN 及び TIPN は全ての地点で不検出であり、DIPN は  $< 1.9 \sim 9.8 \text{ ng/L}$  の濃度範囲であった。DIPN の異性体パターンは、大気と同じく工業原体と同一であった。2006 年及び 2007 年には、地点 S27 及び R7 を含む全国 20 地点において環境省による調査が実施され、DIPN の検出濃度は  $< 0.83 \sim 3.2 \text{ ng/L}$  であった。地点 R1、R3 及び R4 の DIPN 濃度レベルは、全国の濃度範囲よりも高濃度であることから、これらの地点の上流に DIPN の汚染源が存在することが示唆された。

表 2-11 に地点 S27 周辺で採取したスズキの IPN 類濃度を示す。なお、濃度の単位は全て生重量当たり ( $\text{ng/g-wet}$ ) とする。試料 1 及び 2 は雄のスズキ、試料 3~5 は雌のスズキから作成した。MIPN はほとんど全ての試料から検出されたが、定量下限値未満であった。TIPN は試料 3~5 の雌の試料のみから検出され、 $0.65 \sim 1.4 \text{ ng/g-wet}$  の濃度範囲であった。長谷川ら（1982）によると、DIPN は体脂肪及び皮下脂肪に蓄積する。試料 3~5 の雌のスズキの体脂肪率は平均  $1.2 \pm 0.22 \%$  であり、試料 1 及び 2 の雄の  $0.60 \pm 0.12 \%$  と比べて高かった ( $t$  検定  $p < 0.05$ )。TIPN は Log P が 7.54 (KOWWIN v1.68) であり、DIPN の 4.90 と比べて脂溶性が高いことから、体脂肪率の高い雌のみから検出されたと考えられる。TIPN の脂質中含量率は  $1.1 \text{ ng/g-lipid}$  であった。検出された TIPN の異性体は、図 2-9 に示すピーク番号 2、4 及び 5 であった。DIPN は全ての試料から  $1.2 \sim 3.4 \text{ ng/g-wet}$  の濃度範囲で検出されたが、雌と雄の違いは見られなかった。コイ (*Cyprinus carpio*) では 2,6-DIPN が代謝されることが児島ら（1982）によって報告されているが、その他の異性体についての報告例はない。本研究の結果では、雌の試料から検出された DIPN の異性体パターンは雄と異なっていた（図 2-11）。雄の試料では、工業原体とほぼ同一の異性体パター

ンを示したが、雌からは 1,3-DIPN 及び 1,4-DIPN が主に検出された。スズキから検出された DIPN 及び TIPN の異性体パターンが工業原体と異なったことから、DIPN 及び TIPN の異性体によって分解及び蓄積の程度が違うことが推測された。

表 2-9 大気中の IPN 類濃度

サンプリング場所	サンプリング日	大気中濃度 (ng/m <sup>3</sup> )		
		MIPN	DIPN	TIPN
屋内	2008/2/7~2/8	(0.84)	10	<0.23
	2008/5/5~5/6	<0.46	16	<0.23
屋上	2008/5/8-5/9	<0.46	1.2	<0.23
	2008/5/6~5/7	<0.46	(0.76)	<0.23
	2009/11/25~11/26	<0.46	(0.95)	<0.23
	2009/11/26~11/27	<0.46	1.7	<0.23
	2009/11/27~11/28	<0.46	(1.0)	<0.23

※()内の数値は検出下限値 MDL 以上定量下限値 MQL 未満を示す。

表 2-10 河川水及び海水中の IPN 類濃度

地点	水中濃度 (ng/L)		
	MIPN	DIPN	TIPN
R1	<1.8	9.8	<5.6
R2	<1.8	(2.5)	<5.6
R3	<1.8	5.1	<5.6
R4	<1.8	7.6	<5.6
R5	<1.8	(3.6)	<5.6
R6	<1.8	(3.5)	<5.6
R7	<1.8	(2.6)	<5.6
R8	<1.8	(1.9)	<5.6
R9	<1.8	<1.9	<5.6
R10	<1.8	<1.9	<5.6
S27	<1.8	<1.9	<5.6

※()内の数値は検出下限値 MDL 以上定量下限値 MQL 未満を示す。

表 2-11 スズキ (*Lateolabrax japonicus*) 中の IPN 類濃度

	性別	スズキ中濃度 (ng/g-wet)		
		MIPN	DIPN	TIPN
試料 1	♂	(0.23)	1.7	<0.52
試料 2	♂	(0.37)	1.8	<0.52
試料 3	♀	(0.19)	(1.3)	(0.67)
試料 4	♀	(0.19)	3.4	1.4
試料 5	♀	<0.15	(1.2)	(0.65)

※ ( ) 内の数値は検出下限値 MDL 以上定量下限値 MQL 未満を示す。

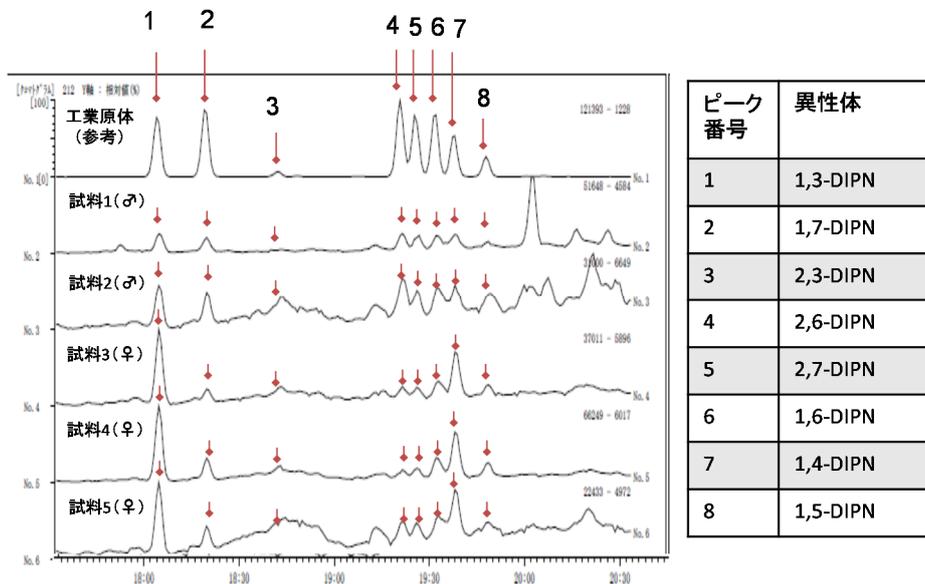


図 2-11 生物試料から検出された DIPN マスクロマトグラム ( $m/z=212$ )

2010年に採取した底質から検出した IPN 類の濃度を図 2-12 及び表 2-12 に示す。表には、PCBs 濃度も合わせて示す。なお、濃度の単位は全て乾燥重量当たり (ng/g-dry) とする。MIPN は <0.16~8.6 ng/g-dry (中央値 0.27 ng/g-dry)、DIPN は 1.1~4400 ng/g-dry (中央値 1.9 ng/g-dry)、TIPN は <0.83~500 ng/g-dry (中央値 0.20 ng/g-dry) であった。海域においては、海岸沿いの濃度がより高く、地点 S21 が最高濃度であり、その濃度は MIPN、DIPN 及び TIPN がそれぞれ 1.7、100 及び 9.0 ng/g-dry であった。地点 S21 は揖保川の河口であり、揖保川は古紙再生工場からの排水が流入している事から検出値が高かったものと推定される。我々の過去の調査では、揖保川の地点 R7 から DIPN 及び TIPN がそれぞ

れ 290 及び 3.3 ng/g-dry で検出されている (Suzuki 2007)。本調査で IPN 類の最も濃度が高かったのは、地点 R1 であり、MIPN、DIPN 及び TIPN がそれぞれ 8.6、4400 及び 500 ng/g-dry であった。Franke ら (2007) が 1999 年～2001 年に実施した調査では、ドイツの 2 河川から DIPN が <1～83 ng/g で検出されている。日本では、2009 年に本測定方法を用いて全国 30 地点での DIPN の調査が環境省により実施され、その結果、最大濃度は 230 ng/g-dry であった。これらの他の調査結果との比較から、地点 R1 は DIPN が高濃度で汚染されている地点のひとつといえる。検出された異性体パターンは、一部の地点のマスクロマトグラム ( $m/z=212$ ) を図 2-13 に示すが、全て工業原体と同様であった。

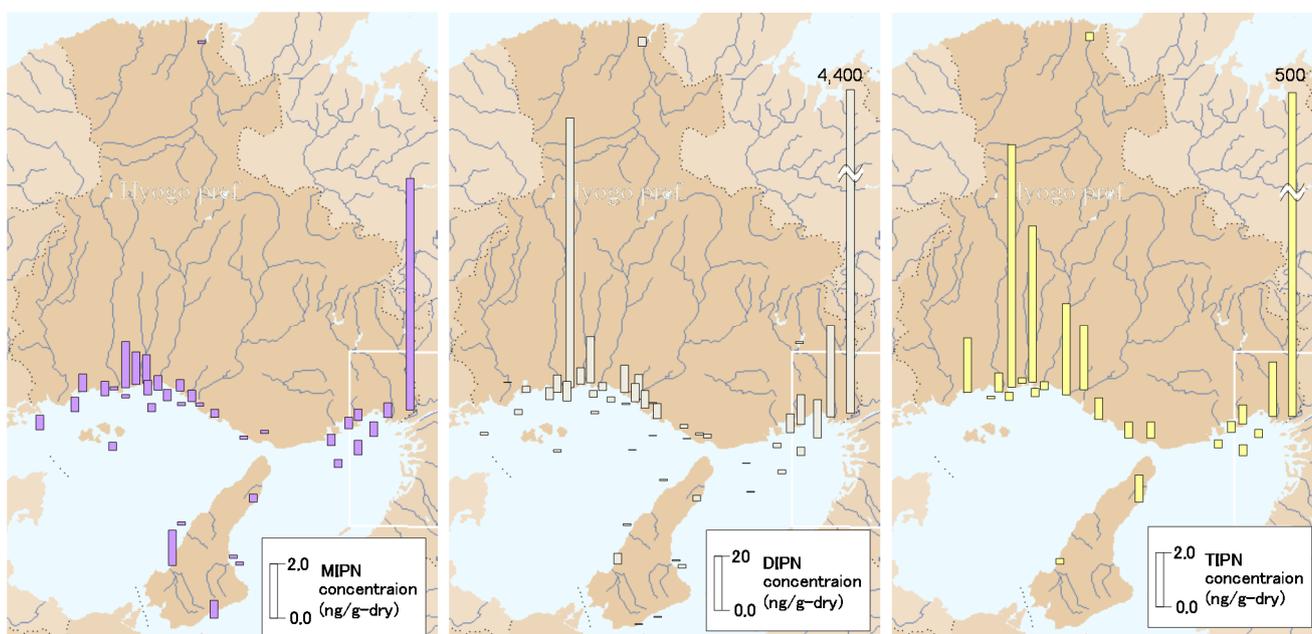


図 2-12 底質中の IPN 類濃度

表 2-12 底質中の IPN 類及び PCBs 濃度

地点番号	MIPN	DIPN (ng/g-dry)	TIPN	PCBs
R1	8.6	4400	500	1700
R2	<0.16	trace	trace	0.48
R3	<0.16	trace	trace	0.18
R4	trace	(1.4)	trace	0.70
R5	<0.16	trace	trace	2.9
R6	<0.16	9.2	2.4	27
R9	<0.16	trace	trace	0.20
R10	trace	3.2	trace	1.5
S1	0.64	34.1	2.0	34
S2	(0.39)	11.3	trace	40
S3	0.58	14.1	0.92	41
S4	0.43	6.9	trace	44
S5	0.48	3.1	trace	25
S6	0.45	(1.7)	trace	36
S7	(0.26)	(1.5)	trace	11
S8	<0.16	trace	trace	0.16
S9	trace	trace	trace	0.21
S10	trace	(1.3)	trace	11
S11	trace	trace	trace	0.09
S12	1.3	5.6	1.1	32
S13	(0.23)	6.5	1.6	54
S14	(0.38)	6.7	trace	58
S15	(0.13)	trace	<0.82	6.3
S16	(0.41)	10	3.4	48
S17	(0.40)	(1.9)	trace	13
S18	0.55	3.0	trace	14
S19	0.88	17	5.8	39
S20	1.2	6.1	trace	28
S21	1.71	100	9.0	48
S22	(0.25)	7.3	trace	15
S23	(0.16)	6.3	trace	25
S24	0.45	4.5	trace	15
S25	0.67	(2.3)	2.0	21
S26	0.62	(1.9)	<0.82	4.8
S27	0.60	(1.1)	<0.82	5.5
S28	(0.35)	trace	<0.82	6.0
S29	0.45	(2.4)	trace	10
S30	(0.27)	trace	trace	4.2
S31	trace	trace	trace	0.009
S32	trace	trace	<0.82	0.33
S33	<0.16	trace	trace	0.20
S34	trace	trace	trace	0.91
S35	1.3	3.9	trace	32
S36	trace	trace	trace	0.48
S37	0.70	trace	trace	2.5
S38	(0.25)	(1.3)	<0.82	2.7
S39	(0.21)	trace	<0.82	2.6
S40	(0.32)	(2.1)	1.0	9.3

trace:MDL未満の濃度で検出。

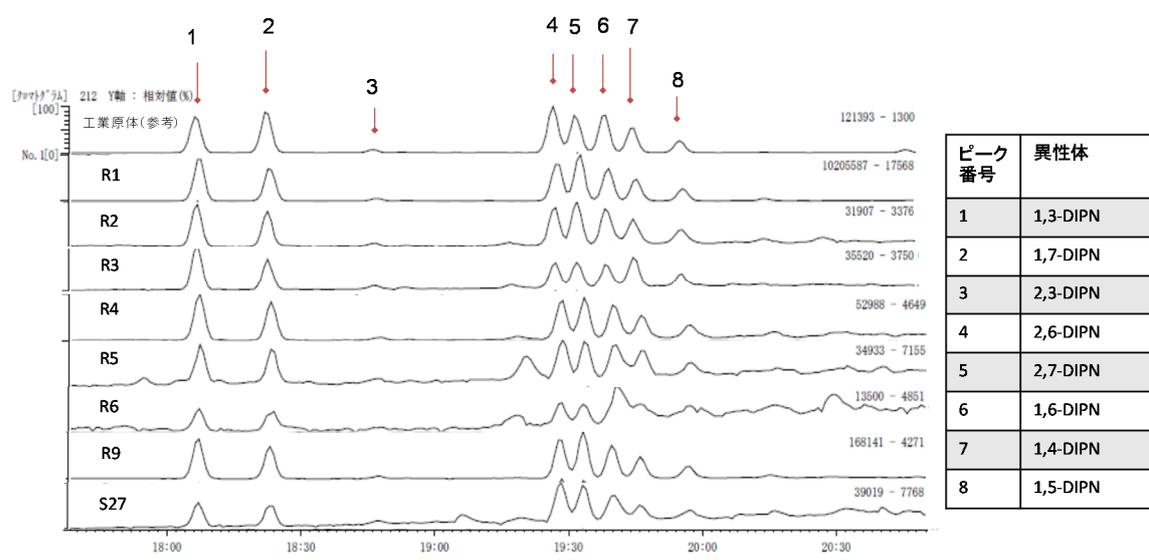


図 2-13 底質から検出された DIPN のマスクロマトグラム (m/z=212)

DIPN の環境媒体の存在割合を EPI Suite v3.20 の Fugacity Model レベル 3 を用いて計算すると、底質 56%、土壌 41%、環境水 3.4%及び大気 0.1%となる。一方、各媒体から検出された DIPN の中央値は、比重を 1 として存在割合で表すと底質 1900 ppt、環境水 3.1 ppt 及び大気 0.0010 ppt であり、底質への蓄積は他の環境媒体と比べて数百倍以上高かった。このことから、DIPN は推定される計算値よりもより多くが底質に蓄積していると考えられる。

スズキから検出された DIPN の中央値は底質と同じ濃度レベルであった。(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) による生物濃縮性試験では、DIPN 濃度が 0.5  $\mu\text{g/L}$  の水槽において、コイに 2400 倍濃縮されている。スズキを採取した地点の海水は、DIPN が定量下限値未満 (<1.9) であるため比較することができない。そこで、全ての環境水の中央値 (0.0031  $\mu\text{g/L}$ ) とスズキの DIPN 濃度を比較した結果、海水の 550 倍であることが判明した。濃縮率が NITE の試験結果と比べて低かったのは、環境水中の DIPN 濃度が NITE の試験と比べて 100 倍以上低かったことによるものと考えられる。

環境水中の DIPN 濃度は、オオミジンコ (*D. magna*) が遊泳障害を起こす濃度 0.035 mg/L (48 時間 EC50) の約 10,000 分の 1 の低濃度であることから、生物にとって安全な濃度レベルといえる。しかしながら、地点 S21 及び R1 の底質の DIPN 濃度は、100 ng/g-dry (0.1 ppm) 及び 4400 ng/g-dry (4.4 ppm) であることから、これらの濃度下では底質中に生息する生物に有害な影響を与えていることが懸念される。さらに、地点 R1 の濃度はメダカ (*O. latipe*) の 48 時間 LC50 値である 4.5 mg/L と同程度であり、魚に対しても悪影響を与えて

いる可能性がある。地点 R1 の底質は、TIPN 濃度も他の地点よりも高濃度であったが、現在のところ TIPN の毒性は明らかになっていない。

底質の PCBs 濃度を測定した結果、PCBs が 0.16~1700 ng/g-dry の範囲で検出された。DIPN 及び PCBs の相関を図 2-14 に示す。DIPN の濃度は、PCBs の濃度が高い地点ほど高い傾向にあった。DIPN の濃度が PCBs と比べて著しく高かった地点 S1、S21 及び R1 を除外しても、DIPN と PCBs に高い相関がみられた（相関係数  $R=0.619$ ）。これらのことから、環境中では DIPN は PCBs と同じ挙動をしていると考えられる。

3,3'-二塩化ビフェニル (CB11) は、印刷用インクに使用される 3,3'-二塩化ベンチジン塩から生成される (King ら. 2002)。そのため、CB11 は古紙再生工場からの影響を知るための指標となる。二塩化ビフェニル (DiCBs) に対する CB11 の濃度割合 (CB11/DiCBs) を確認すると、海域において DIPN が高濃度で検出された地点 S21 は 21% であり、他の地点の平均 17% に比べてやや高い割合であった。また、CB11 の濃度自体も 0.30 ng/g-dry であり、他地点の平均 0.17 ng/g-dry よりも高かったことから、地点 S21 は、古紙再生工場の影響を受けているといえた。DIPN が最も高濃度であった地点 R1 については、CB11 の濃度は 3.8 ng/g-dry と高かったが、CB11/DiCBs は、2.5% と他の地点よりもむしろ低かった。R1 は淀川水系の一級河川である神崎川が分流した左門殿川であり、兵庫県内でも大きな都市河川である。この河川には、多種多様な工場からの排水や生活排水が流入しているが、古紙再生工場からの排水はないことを確認している。よって、この河川の DIPN の汚染源については更なる調査が必要であると考えられる。

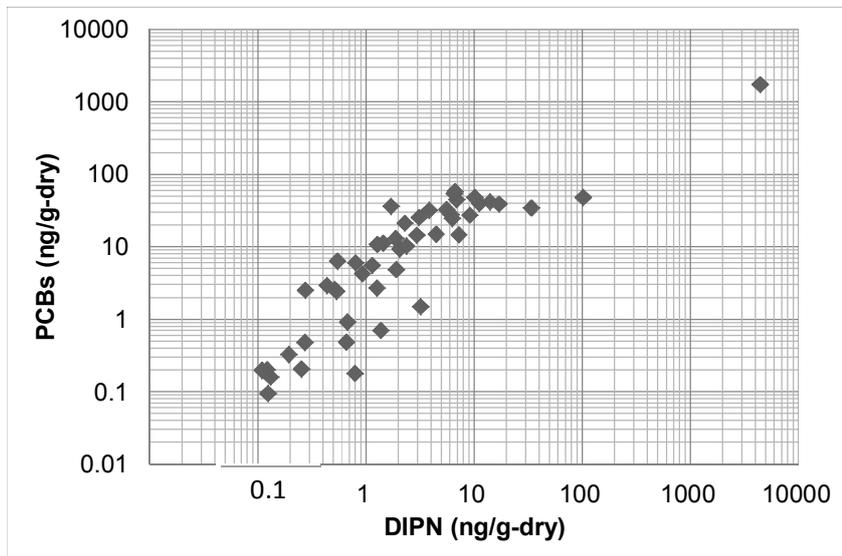


図 2-14 DIPN と PCBs の底質中濃度の相関

## 2-2-5 まとめ

DIPN とその同族体である MIPN 及び TIPN の大気、環境水、底質及び生物の分析方法を開発し、兵庫県下の環境汚染の実態を調査した。大気及び環境水からは、MIPN 及び TIPN は検出されなかった。屋上大気からは DIPN が  $1.1 \pm 0.38 \text{ ng/m}^3$  の範囲で検出された。これは室内の 10 倍程度低い濃度であった。環境水からは、DIPN が  $<1.9 \sim 9.8 \text{ ng/L}$  の範囲で検出された。スズキ (*L. japonicas*) からは、雌の検体のみから TIPN が  $0.65 \sim 1.4 \text{ ng/g-wet}$  の範囲で検出された。DIPN は雄、雌両方から  $1.2 \sim 3.4 \text{ ng/g-wet}$  の範囲で検出された。雌から検出された DIPN 及び TIPN の異性体パターンは、工業原体とは異なっていた。底質からは、MIPN、DIPN 及び TIPN が、それぞれ  $<0.16 \sim 8.6 \text{ ng/g-dry}$ 、 $<1.1 \sim 4400 \text{ ng/g-dry}$  及び  $<0.83 \sim 500 \text{ ng/g-dry}$  の範囲で検出され、DIPN が主たる汚染であることが判明した。底質の中で 2 番目に DIPN が高濃度であった地点の汚染の原因は、印刷用インクに含まれる CB11 の DiCBs に対する濃度割合が 21% であり、他の地点 (平均 17%) よりも高かったことから、古紙再生工場からの排水の影響によるものと考えられた。一方、最も DIPN が高濃度であった地点は、CB11/DiCBs の割合は 2.5% と他の地点よりも低かったことから、別の汚染源の影響を受けていると考えられた。これらの 2 地点は、生物に遊泳障害などの悪影響を与えていることが懸念される DIPN 濃度であった。底質中の DIPN 汚染の傾向は、PCBs と傾向が類似していた。PCBs の環境調査は IPN 類よりも頻繁に行われていることから、IPN 類の汚染の状況を調査する際には、PCBs の濃度が高い地域を重点的に調査することが効率的であるといえる。DIPN は、現在も年間およそ 600 トンが使用されていることから、底質や生物体内への汚染の蓄積が進行することが懸念されるため、定期的に調査を行うことが必要である。

## 2-3 ヒト P450 を用いた DIPN の代謝物の確認

### 2-3-1 はじめに

2-2 節の調査結果から、環境中では IPN 類の中では DIPN の汚染が主であり、PCBs と同様に環境中に蓄積されていることが分かった。本節では、DIPN のヒト体内での代謝について、遺伝子組換えヒト P450 を用いて調査した。

化学物質の生体内代謝には、シトクロム P450 が関わっている。一般的に、化学物質は体内に取り込まれると、P450 によって水酸化された後に、抱合反応等を経て尿や糞とともに体外に排泄される。現在まで、DIPN の生体内代謝については、主に動物についていくつかの研究報告がなされている。Yoshida ら (1978) が行った調査では、活性汚泥によって 4 週間後には  $^{14}\text{C-DIPN } 10 \text{ mg/L}$  で 20~40%、 $0.4 \text{ mg/L}$  で 80% が分解されていた。一方、化審法による DIPN の分解性試験では、活性汚泥 ( $100 \text{ mg/L}$ ) に DIPN  $30 \text{ mg/L}$  となるように添加した結果、4 週間後の分解度は 0% であった。この結果より、現在では DIPN は難分解性と判断されている (既存化学物質安全性点検データ集 1992)。また、羽賀ら (1984)

は、河川水中の微生物による分解性を調査した結果から、DIPN は 7 日後も微生物により分解されないと報告している。一方、捕食動物では、DIPN の代謝物が同定されている。小島 (1981) は、DIPN はラットとコイの体内で代謝されるが、その反応速度はアニリン・アミノピリン活性に比べて極めて遅く、酵素依存反応であることを示唆している。また、Kojima ら (1982) は、コイ体内で代謝される 2,6-DIPN の 5 つの代謝物を同定している。これらの実験結果から、DIPN はラットやコイ体内において P450 によって代謝されたと考えられる。しかしながら、P450 には基質特異性の違う多くの分子種があり、生物によって体内に存在する分子種も異なっている (Gonzalez FJ 1988, Nebert DW and Gonzalez FJ 1987, Nebert DW ら. 1989)。また、同じ分子種であっても生物が違ふとその分子種が担う役割が異なる。そのため、ヒトによる代謝を知るためには、ヒト P450 による代謝実験が必要である。

代謝の有無を確認するためには、ヒト P450 を多量に必要とするが、ヒト P450 の体内での発現量は極めて少なく、さらに性質がよく似た分子種が複数あることから、ヒトから精製することは極めて困難である。そこで、大腸菌や酵母を宿主とし、P450 分子種をコードする cDNA をクローニングしてヒト P450 を発現させる方法がある (Barnes HJ ら. 1991、Iwata H ら. 1998)。この方法により、ヒト P450 の大量培養が可能となったことから、現在では主に医薬品などの薬物代謝実験等が幅広く実施されるようになって来た。本章では、この手法を用いてヒト P450 を調製し、ヒト体内での DIPN の代謝について確認した。

### 2-3-2 ヒト P450 の調製

ヒト P450 分子種として、hCYP1A1, hCYP 1A2, hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 を、大腸菌 JM109 株にそれぞれ P450 リダクターゼと共に共発現させた。まず、JM109 に P450 を導入したプラスミド DNA を形質転換させ、アンピシリン (50  $\mu$ g/mL) を含む LB 培地で 37°C、16 時間培養した。次に、培養液 1mL を TB 培地 100 mL 及びアンピシリン (50  $\mu$ g/mL) に添加し、37°C、170 rpm で振とうし、OD600 nm $\approx$ 0.6 (約 3 時間) となったところで、P450cDNA の翻訳を誘導するために IPTG (1M) を添加した。また、ヘムの前駆体であるアミノレブリン酸 ( $\sigma$ -ALA) を終濃度 (500  $\mu$ M) で添加した。さらに、P450 の安定化剤として 50%グリセロールを添加した。次に、それぞれの分子種に最適な温度条件下で振とう (130 rpm) しながら、24 時間培養した。培養した大腸菌は 3000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上清を *E.coli* Stock Buffer (15mL) に再懸濁させ、ソニケーター (TAITEC VP-15s) により氷上で超音波破碎 (周期 40% $\times$ 4min) した。破碎液を遠心分離 (10,000 rpm $\times$ 30 min、4°C) した後の上清を回収した。残った沈殿物は、再び懸濁からの処理を行い、上清を回収した。回収した可溶性画分は超遠心 (40,000 rpm $\times$ 70 min、4°C) を行い、P450 を含む膜画分を回収し、Stock Buffer に再懸濁させた。総タンパク質に占める P450 発現量は佐藤・大村ら (1964) の方法に従って算出した。

P450 の発現量は、沈殿物に KPB (0.1M)、EDTA (1 mM) 及び 20%グリセロール含有 *E.coli* Stock Buffer を 5 mL 添加して懸濁させた後、亜ジチオン酸ナトリウム (還元剤) を 2 mL 添加し、CO を 1 分間吹き込んだ後、還元型 CO 差スペクトルを測定することにより確認した。また、総タンパク質は、試料に Dye Reagent Concentrate Bio-Rad Protein Assay 1 mL を添加し、混和後に 15 分間常温静置した後の吸光度 (OD595) を測定することにより定量した。得られた P450 酵素の活性は、7-エトキシマリンの代謝活性測定により確認した。

### 2-3-3 代謝物の測定方法

代謝実験のフローチャートを図 2-15 に示す。2-3-2 節で精製した hCYP1A1、hCYP1A2、hCYP2C9 及び hCYP3A4 を含む膜画分とヒトの P450 酵素を含まないコントロール膜画分 (pcw) をそれぞれ 500  $\mu$ L 取り、10 mM の DIPN 工業原体 20  $\mu$ L を加えた後に pH7.4、37°C の条件下で 24 時間反応させた。反応後の各サンプルは、酢酸エチルにより 2 回抽出 (1 回目 1 mL、2 回目 2 mL) したものを、硫酸ナトリウムで脱水し、窒素ガスにより 1 mL へと濃縮したものを SPEL COWAX-10 キャピラリーカラム (30m $\times$ 0.32mm、0.25  $\mu$ m) を装着した 6890N ガスクロマトグラフィー/Q1000GC 質量分析計 (GC/MS) の SCAN モードにより分析した。

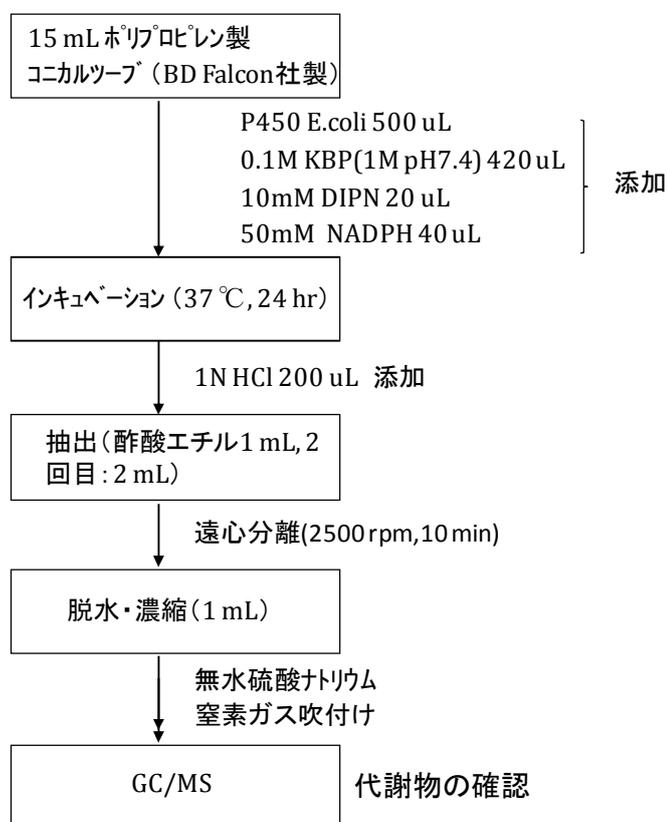


図 2-15 ヒト P450 を用いた DIPN の代謝実験フロー

### 2-3-4 結果及び考察

羽賀ら (1984) が同定したラットによる 2,6-DIPN の代謝物及び代謝経路は図 2-16 のとおりである。ラット中では、2,6-DIPN のイソプロピル基が水酸化され、中間体 I~III を経て、最終的に 5 つの代謝物 B~F が生成される。これらの 5 つの代謝物について、代謝実験によって生成されているかどうか、マスキロマトグラムにより確認した。

中間体 I の分子量である  $m/z=228$  のマスキロマトグラムを図 2-17 に示す。マスキロマトグラムでは、8 つのピークが対照実験 (pcw) を含む全ての代謝実験において確認された。これらのマススペクトログラム (図 2-18) を確認したところ、図中の②~⑤の 4 つのピークのフラグメントイオンはメチル基 (-CH<sub>3</sub>) の分子量 15 ずつに現れていることから、これらは中間体 I と考えられる。ピーク②のフラグメントイオンのパターンは他のピークとはやや異なっていたのは、夾雑物の影響と考えられる。その他、DIPN の代謝物と考えられる  $m/z$  のマスキロマトグラムを確認したが、その他の DIPN の代謝物と思われるピークは確認できなかった。

DIPN の残存量を確認するため、代謝物の確認と合わせて GC/MS により DIPN の定量分析を行った結果、代謝実験後の DIPN 量はおよそ 1/10 に減少していることが判明した。しかしながら、対照実験も同程度減少していたことから、DIPN の減少は、代謝によるものよりも実験操作による損失の影響が多かったと考えられる。なお、代謝実験前と後の DIPN の異性体パターンに変化はみられなかった。

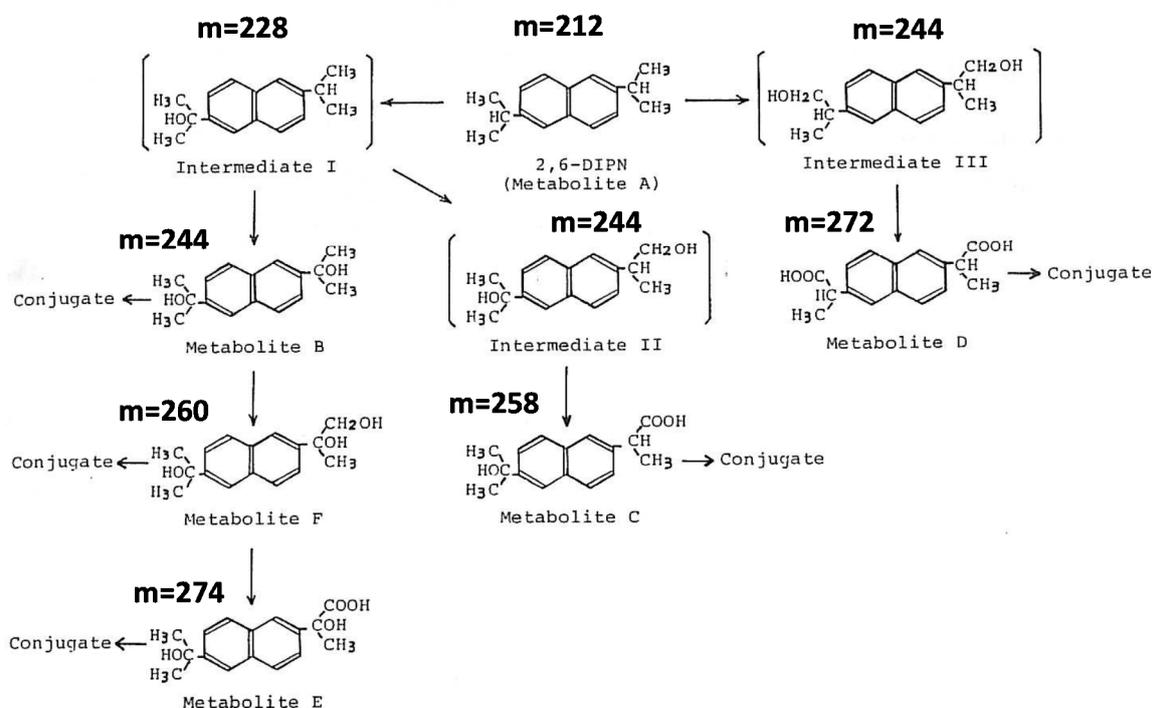


図 2-16 ラット中での 2,6-DIPN の代謝物及び代謝経路 (羽賀ら 1984)

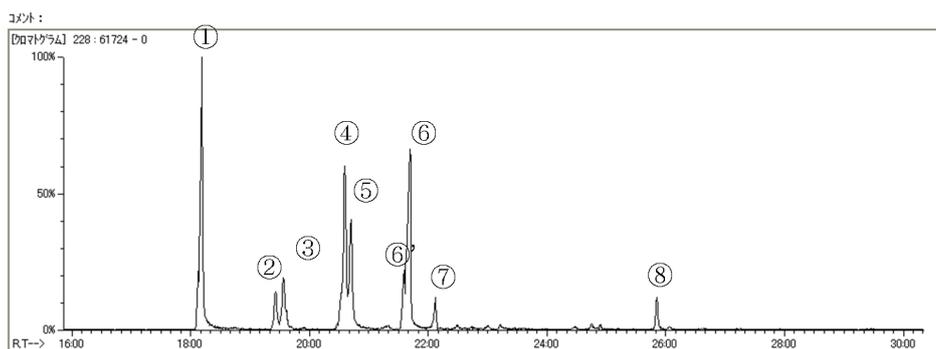


図 2-17 DIPN 代謝実験によるマスクロマトグラム (m/z=228)

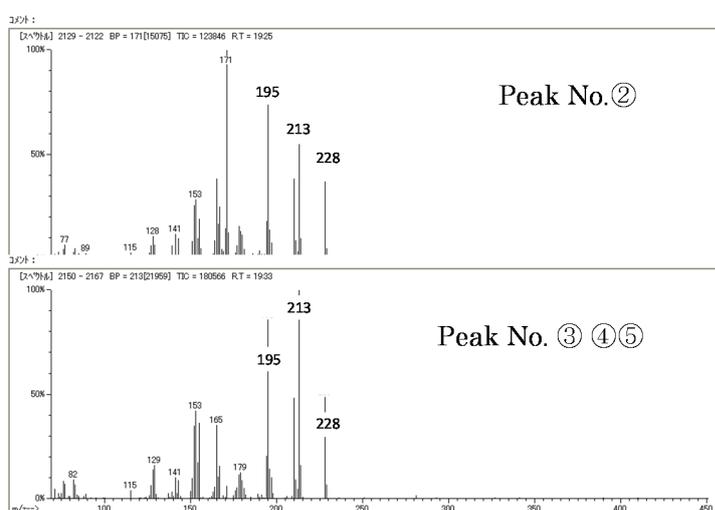


図 2-18 DIPN 代謝実験によるマススペクトログラム

中間体 I と考えられるピーク群の総面積は、hCYP1A1 が pcw の 3.6 倍と最も高かった。次に hCYP 1A2 及び hCYP 2C9 が 2.3 倍及び 2.7 倍と同程度であり、最も代謝量が低かったのは hCYP3A4 の 1.3 倍であった。薬物代謝型 P450 である CYP1 から CYP 3 のファミリーは、様々な化学物質の代謝に関与している事が知られている。CYP1 ファミリーは、いずれも多環芳香族化合物 (PAH) によって誘導されるが、hCYP1A1 はベンゾピレンなどの PAH、CYP1A2 はヘテロサイクリックアミンの代謝的活性化に関わっている事が知られている。一方、CYP2 シリーズは、様々な化学物質を広く代謝するといわれており、hCYP2C9 はワルファリン (抗凝固薬) などの医薬品を代謝する。CYP3 ファミリーは大多数の医薬品の代謝に関与するため、ヒトにとって重要な酵素である。特にサイズの大きい化合物を代謝し、hCYP3A4 はエストロゲンやテストステロンなど多くの医薬品の代謝に関与する事が明らかになっている。本結果では、hCYP1A1 による DIPN の代謝物量が最も多かったこと

から、hCYP1A1 が PAH の一種である DIPN をより代謝し易いことが示唆された。DIPN の代謝の速度を把握するためには、代謝時間を変えるなどの詳細な代謝実験が必要である。しかしながら、代謝後の DIPN の残量が対照実験とほとんど変わらなかったこと、また確認できた代謝物が中間体 I のみであったことから、DIPN のヒト P450 による代謝速度はそれほど速くないと推測される。

### 2-3-5 まとめ

本調査結果から、DIPN は 4 種類のヒト P450 によって代謝されることが分かった。GC/MS マススペクトログラムから生成された代謝物は 1 つであり、イソプロピル基が水酸化された代謝物である分子量 228 の中間体 I と推定された。中間体 I の生成量は、PAH を主に代謝する hCYP1A1 が最も多く、ついで hCYP 1A2、hCYP 2C9 及び hCYP3A4 の順に多かった。代謝物として中間体 I しか確認できなかったことや、代謝されずに残った DIPN 量から推測すると、ヒト P450 による DIPN の代謝速度はそれほど速くないと思われる。今後は代謝速度の検討を行い、PCBs など他の難分解性の化学物質と代謝の違いを比較するなどにより、DIPN の難分解性の性質がより明らかにされることが望まれる。

## 2-4 IPN 類の *umu* 試験及び発光 *umu* 試験による変異原性試験

### 2-4-1 はじめに

化学物質は、産業利用される前に安全性の確認が必要である。近年では REACH 規制などにより化学物質の国内外における安全性確認が強化されているが、環境中には依然として安全性の評価が不十分な化学物質も存在している。その主な原因としては、過去の使用による蓄積や、工場での化学反応や加工行程による非意図的生成などが考えられる。一般的に、化学物質の発がん性を知るためには、ラット等を用いた動物実験が行われるが、評価に数か月単位の時間と相当の費用を必要とする。そのため、ヒトに直接投与される医薬品は例外として、一般的な化学物質について使用前に詳細な発がん性試験が必ずしも行われているとはいえない。

IPN 類は、様々な生体影響の調査が過去になされているが、DIPN と TIPN のヒトや動物への発がん性については正式に確認されていない。そこで、本研究では、IPN 類の変異原性の有無を *umu* 試験とその変法である発光 *umu* 試験により調査することとした。また、古紙再生工場では、インク等の漂白のために塩素が使用されることがあり、インク溶剤として使用される DIPN が、塩素漂白の影響により、塩素化されている可能性がある。そこで、塩素化 MIPN (Cl-MIPN) 及び塩素化 DIPN (Cl-DIPN) についても、MIPN、DIPN と塩素を反応させることで作成し、それぞれ変異原性の有無を調査した。

#### 2-4-2 *umu* 試験及び発光 *umu* 試験と使用する菌株

*umu* 試験は、変異原性試験として広く用いられている *Ames* 法とほぼ同様の感度・特異性・正確性を持っている (Nakamura ら 1987)。*umu* 試験法は、DNA 損傷 (遺伝毒性) を検出する方法に属し、突然変異を指標とする *Ames* 法とは異なり、大腸菌の SOS 応答遺伝子の制御下でサルモネラ菌体内に生成される  $\beta$  ガラクトシダーゼ酵素などを測定する。

一方、発光 *umu* 試験は、近年開発されたルシフェラーゼ酵素を用いた発光系のサルモネラ細菌である TA1535/pTL210 を用い、発光検出手法より *umu* 試験を可視化する方法である。発光 *umu* 試験は研究に用いる菌株が市販されていないため、現在の所は広く普及はしていないが、従来の *umu* 試験と比べて基質添加などの操作を必要とせず、高感度であるなど多くの利点が認められている (Tanada ら 2001)。*umu* 試験及び発光 *umu* 試験は、試験に 2~3 日必要である *Ames* 法に対して数時間で試験を終了するため、厳密な無菌操作を必ずしも必要としない。また、使用菌株の要求アミノ酸類の共存の影響を受けないことなどの利点があり、試験法の簡易化や自動化が可能である。よって、すでに環境を汚染している化学物質について、早急に変異原性の有無を確認したい場合には、*umu* 試験や発光 *umu* 試験によるスクリーニングが適している。

本研究で *umu* 試験に使用する菌株は、ネズミチフス菌 TA1535/p SK1002 (*Salmonella typhimurium* TA1535/p SK1002) とした。この菌株に導入されているプラスミド (pSK1002) は、20 コピー数を持つマルチコピー型プラスミドである。この試験株は、ラクトースオペロンを持たないので、プラスミド上にある *lacZ* 遺伝子の発現を確認するのに適している。また、変異原物質の感受性を高めるため紫外線除去修復酵素を欠損している。さらに、化学物質の透過性を高めるため、外の細胞表面にあるリボ多糖体を欠失した変異を持っている。

発光 *umu* 試験には、発光細菌 *Vibrio fischeri* 由来の発光遺伝子群を大腸菌の *umuD,C* 遺伝子の下流に連結させたプラスミド pTL210 を *S. typhimurium* TA1535 株に導入し、形質転換させた *Salmonella typhimurium* TL210 株 (無試験変異原検出法: 公開特許公報 平 7-227285) を使用した。*Salmonella typhimurium* TL210 株は、DNA 損傷を受け SOS 遺伝子 (*umu* 遺伝子) が発現すると発光する性質をもっている。*Vibrio fischeri* の発光遺伝子群にはルシフェラーゼをコードする遺伝子 (*luxA, B*) と脂肪酸レダクターゼ (*luxC, D, E*) をコードする遺伝子が含まれているため、発光基質である脂肪酸アルデヒドは、発光反応により酸化されて脂肪酸になると、脂肪酸レダクターゼの作用により細胞内で再生される。そのため、従来の *umu* 試験と違って、基質添加などの操作を必要とせずに、DNA 損傷を指標とした遺伝子毒性を検出することができる。

#### 2-4-3 塩素化 MIPN 及び DIPN の作成

本研究では、塩素化された IPN 類の環境汚染の実態は調査しておらず、これまでも調査された例はない。IPN 類の塩素化体は、それ自体は工業品として使用されていないが、

古紙再生工場においてインク溶剤として使用されている DIPN が塩素漂白の影響により塩素化されている可能性がある。インク成分に含まれるフェニルフェノールは、塩素漂白によって塩素化され、OH-PCBs が生成されることが Nanba ら（2008）によって報告されている。そこで、塩素化 MIPN (Cl-MIPN) 及び塩素化 DIPN (Cl-DIPN) を作成し、変異原性の有無を調査することとした。

Cl-MIPN 及び Cl-DIPN の作製には図 2-19 に示す器具を用いた。まず、三角フラスコに次亜塩素酸水 80 mL と蒸留水 20 mL を入れ、MIPN 又は DIPN のアセトン溶液（10000 mg/L） 10  $\mu$ L を染み込ませたコットンを片側に詰め、もう片側は栓をした U 字管を接続する。そこに、パストゥールピペットにより塩酸を約 10 mL 添加し、マグネットスターラーにより攪拌する。1 時間後、コットンを取り出しヘキサンにより抽出した。塩素化体の濃度は、GC/MS により抽出液中の MIPN、DIPN を定量分析し、減少した量から推測した。Cl-MIPN 及び Cl-DIPN は DMSO 溶媒に転溶した後、C8 カラムを接続した高速液体クロマトグラフィーにより、塩素と反応せずに残った MIPN、DIPN と分離させた。

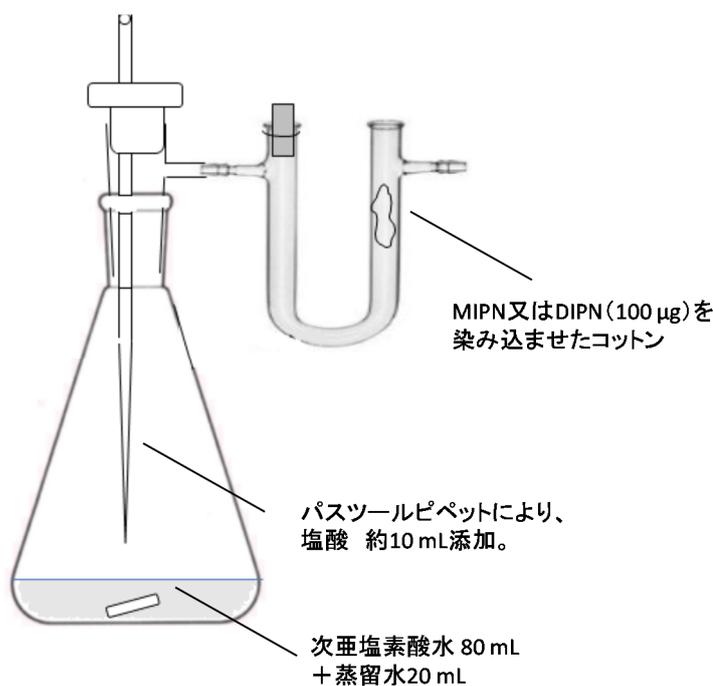


図 2-19 MIPN、DIPN の塩素化物の作成

#### 2-4-4 試験方法

*umu* 試験及び発光 *umu* 試験の試験手順をそれぞれ図 2-20 及び図 2-21 に示す。TGA 培地は、トリプトンペプトン溶液（バクトトリプトンペプトン 20 g、NaCl 10 g、蒸留水 1000 mL）及びグルコース溶液（グルコース 4g、蒸留水 1000 mL）を 1 : 1 で混合し作成した。S9 mix は、フェノバルビタールと 5, 6-ベンゾフラボンによって薬物代謝酵素を誘導したラット肝 9000 xg の上清分画（S9）1.0 mL に蒸留水 2.75 mL 及びコファクター（0.4 mol/L MgCl<sub>2</sub> 水溶液 0.2 mL、1.65 mol/L KCl 水溶液 0.2 mL、1.0 mol/L グルコース-6-リン酸水溶液 0.05 mL、0.1 mol/L NADPH 水溶液 0.4 mL、0.1 mol/L NADH 水溶液 0.4 mL 及び 0.2M ナトリウム-リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4） 5.0 mL）を加えて混合した。陽性対照物質として、非代謝活性化の場合は 2.5 µg/mL 4-ニトロキノリン 1-オキサイド（4NQO）、代謝活性化を行う場合は、0.40 mg/mL ベンゾピレン（BaP）（和光純薬工業製）を用いた。IPN 類、CI-MIPN 及び CI-DIPN は、それぞれ DMSO に希釈した。

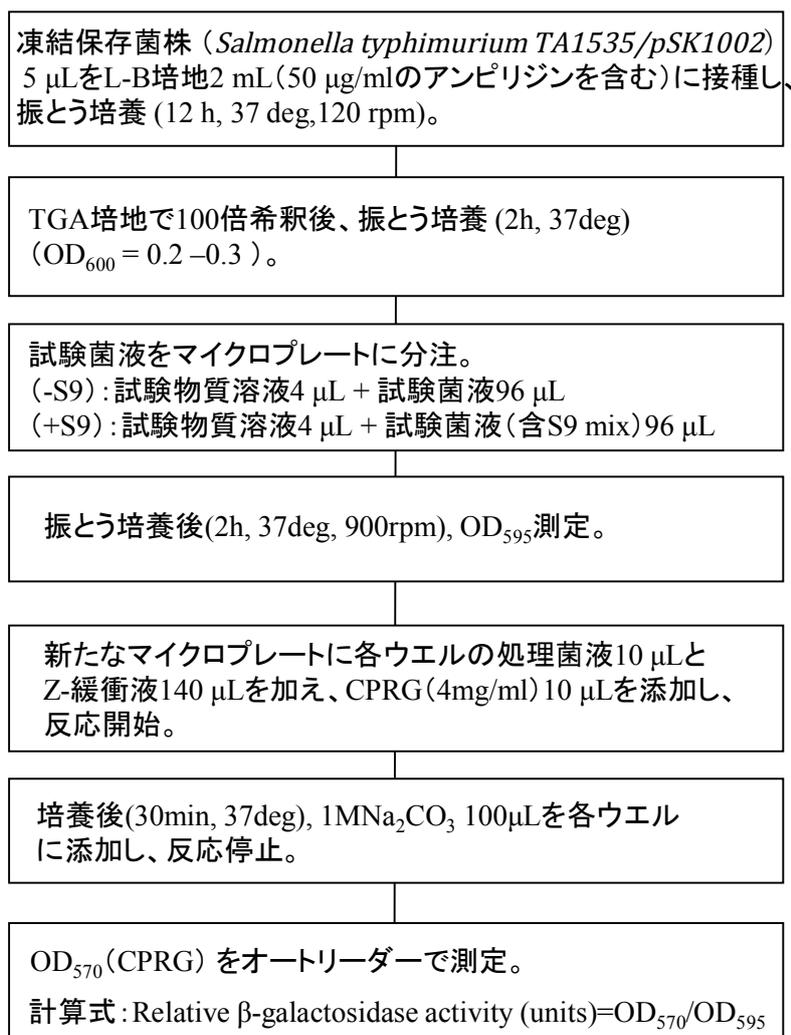


図 2-20 *umu* 試験の試験手順

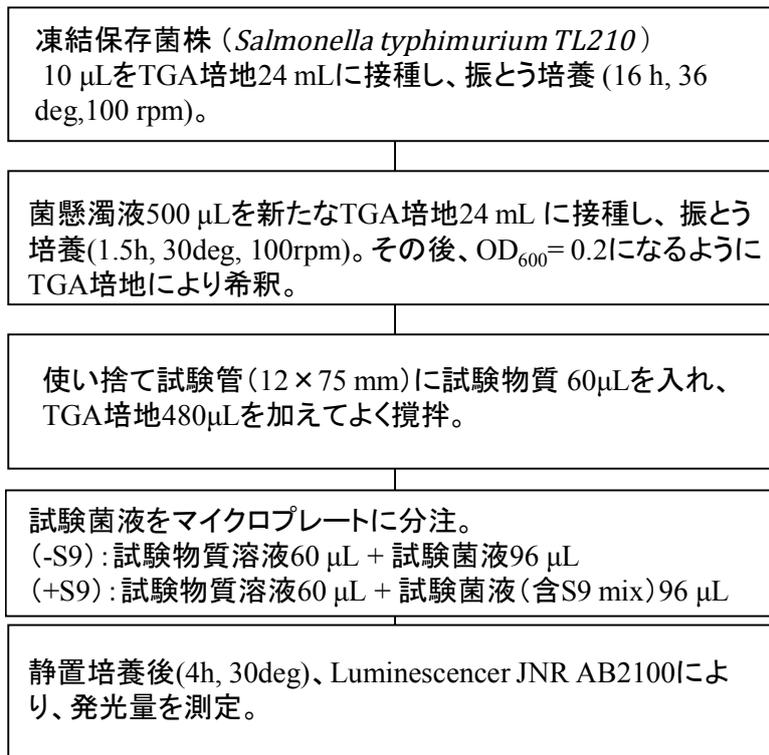


図 2-21 発光 *umu* 試験の試験手順

*umu* 試験では、IPN 類の添加量を 8 段階とし、それぞれ 0~80 ng/well 及び 0~2000 ng/well の計 2 回実施した。陽性対照物質は、非代謝系では 4-ニトロキノリン 1-オキサイド (4NQO)、代謝系では 2-アミノアントラセン (2-AA) とした。発光 *umu* 試験では、IPN 類、CI-MIPN 及び CI-DIPN の添加量を表 2-13 のとおりとし、*umu* 試験と同じく低濃度域と高濃度域の計 2 回実施した。陽性対照物質は、非代謝系では 4NQO、代謝系では BaP とした。

表 2-13 発光 *umu* 試験における試験物質の添加量

	times	additive amount							
		1	2	3	4	5	6	7	8
MIPN	1	0	0.4	0.8	1.5	3.0	6.0	12	24
	2	0	90	180	360	700	1400	2900	5800
DIPN	1	0	0.4	0.8	1.5	3.0	6.0	12	24
	2	0	90	190	380	750	1500	3000	6000
TIPN	1	0	0.4	0.8	1.5	3.0	6.0	12	24
	2	0	75	150	300	600	1200	2400	4800
Cl-MIPN	1	0	0.4	0.8	1.5	3.0	6.0	12	24
	2	0	3.0	6.0	12	24	48	96	190
Cl-DIPN	1	0	0.4	0.8	1.5	3.0	6.0	12	24
	2	0	1.0	1.9	3.9	7.8	16	31	62

(ng/well)

2-3-4 結果及び考察

IPN 類の非代謝系及び代謝系の *umu* 試験の結果を図 2-22 及び図 2-23 に示す。*umu* 試験では、濃度に依存して  $\beta$ -galactosidase 活性が増加し、かつ陰性対照（対象物質の添加量ゼロ）の 2 倍以上の活性を示すものを陽性と判定する。非代謝系では、最も活性が上昇したのは DIPN であり、10 ng/well において陰性対照の 2.1 倍の上昇がみられた。しかしな

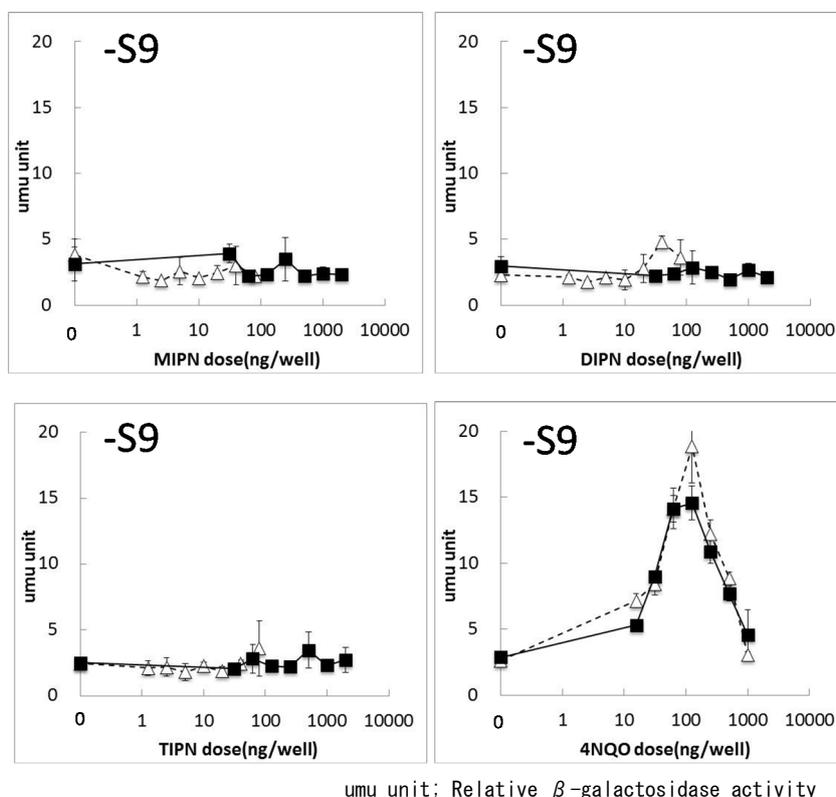
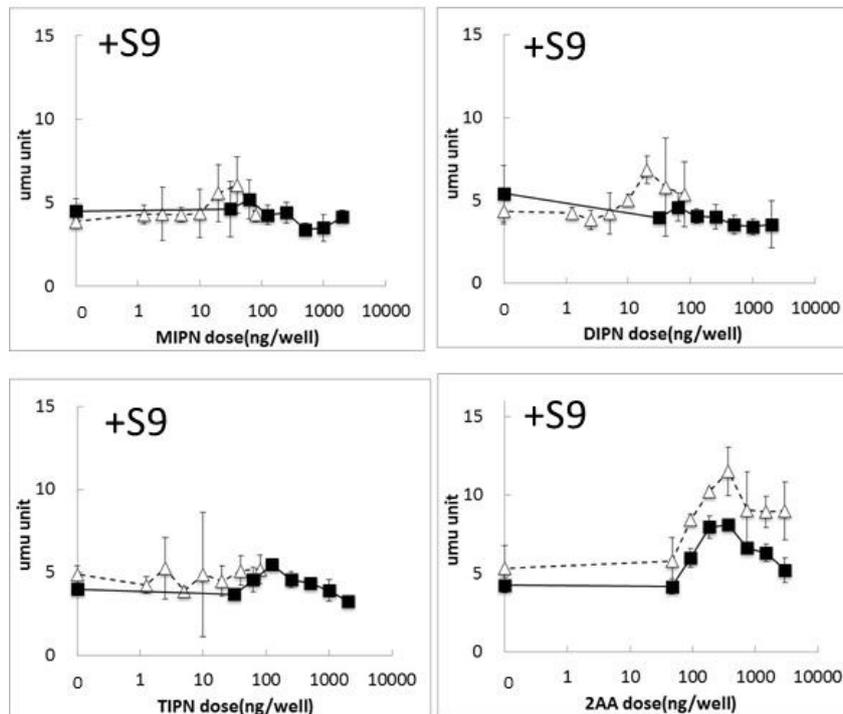


図 2-22 非代謝系 *umu* 試験による IPN 類及び 4NQO の  $\beta$ -galactosidase 活性比



umu unit: Relative  $\beta$ -galactosidase activity

図 2-23 代謝系 *umu* 試験による IPN 類及び 2AA の  $\beta$ -galactosidase 活性比

がら、この上昇がみられたのは 2 回の試験のうち 1 回だけであり、再現性がみられなかったこと、また、陽性対照 4NQO の最大 5 倍の活性上昇と比べると上昇率が低かったことから、陽性と判定しないこととした。よって、IPN 類は全て陰性と判定された。代謝系では、5~100 ng/well の範囲で IPN 類の活性に上昇がみられたが、最大でも陰性対照の 1.6 倍の上昇であり、陽性の判定基準には満たなかった。しなしながら、非代謝系よりも活性の上昇傾向は明確であり、代謝系 *umu* 試験は、S9 mix を添加することにより、代謝物による影響も確認できる試験であることから、何らかの代謝物が代謝活性化反応に影響している可能性が考えられる。

IPN 類の非代謝系及び代謝系発光 *umu* 試験の結果を図 2-24 及び図 2-25 に示す。発光 *umu* 試験においても、陽性の判定は陰性対照（対象物質の添加量ゼロ）との発光量の比が 2 倍以上であり、かつ添加量に依存するものとする。陽性対照物質の 4NQO 及び BaP の結果から、*umu* 試験よりも少ない添加量で発光量比がより明確に濃度に依存して上昇しており、*umu* 試験よりも本発光 *umu* 試験の方が変異原性の判定がしやすいことが示された。非代謝系では、MIPN が添加量 2900 及び 5800 ng/well において、発光量比がわずかに増加する傾向がみられ、5800 ng/well で発光量比が 2.5 倍となり、陽性と判定された。MIPN は、DIPN や TIPN と異なり、発がん性があることが知られていることから、それを支持す

る結果と考えられる。代謝系では、IPN 類が 24 ng/well の添加量で発光量比が最大 5.1 倍に増加したが、90 ng/well 以上の添加量では、発光量比に増加は見られなかった。そのため、添加量依存性はないと判断した。また、発光 *umu* 試験の利点は感度が高いことであり、陽性対照 BaP の発光量比が最大 21 倍であることと比べると IPN 類の増加率が低いことから、陰性と判定した。この挙動は、代謝系 *umu* 試験の 5~100 ng/well の範囲でみられた挙動と同様であり、何らかの代謝物が影響しているものと考えられる。

Cl-MIPN 及び Cl-DIPN の非代謝系及び代謝系発光 *umu* 試験の結果を図 2-26 に示す。なお、これらの試験は上記の IPN 類と同時に行っており、陽性対照試験の結果は図 2-24 及び図 2-25 に示したものと同一である。Cl-MIPN 及び Cl-DIPN の添加量は最大 100 ng/well 程度であり IPN 類と比べて少なかったが、非代謝系及び代謝系のいずれも発光量比にほとんど変化はみられなかった。

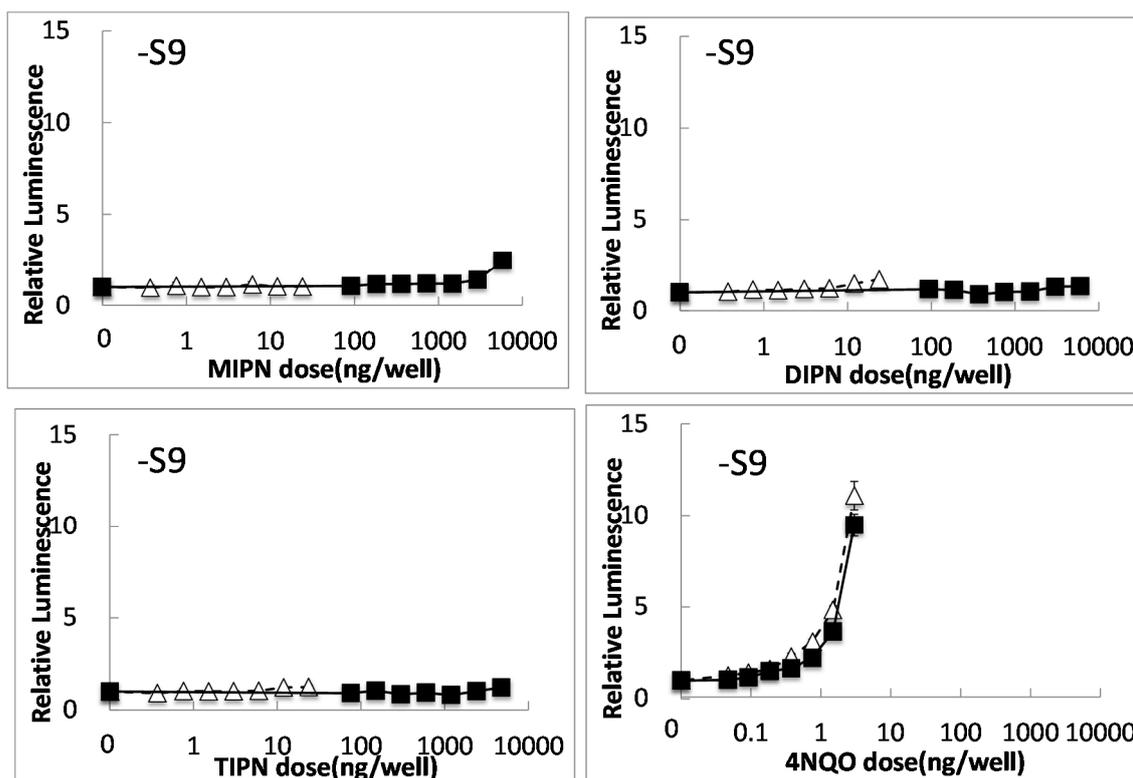


図 2-24 非代謝系発光 *umu* 試験による IPN 類及び 4NQO の発光量比

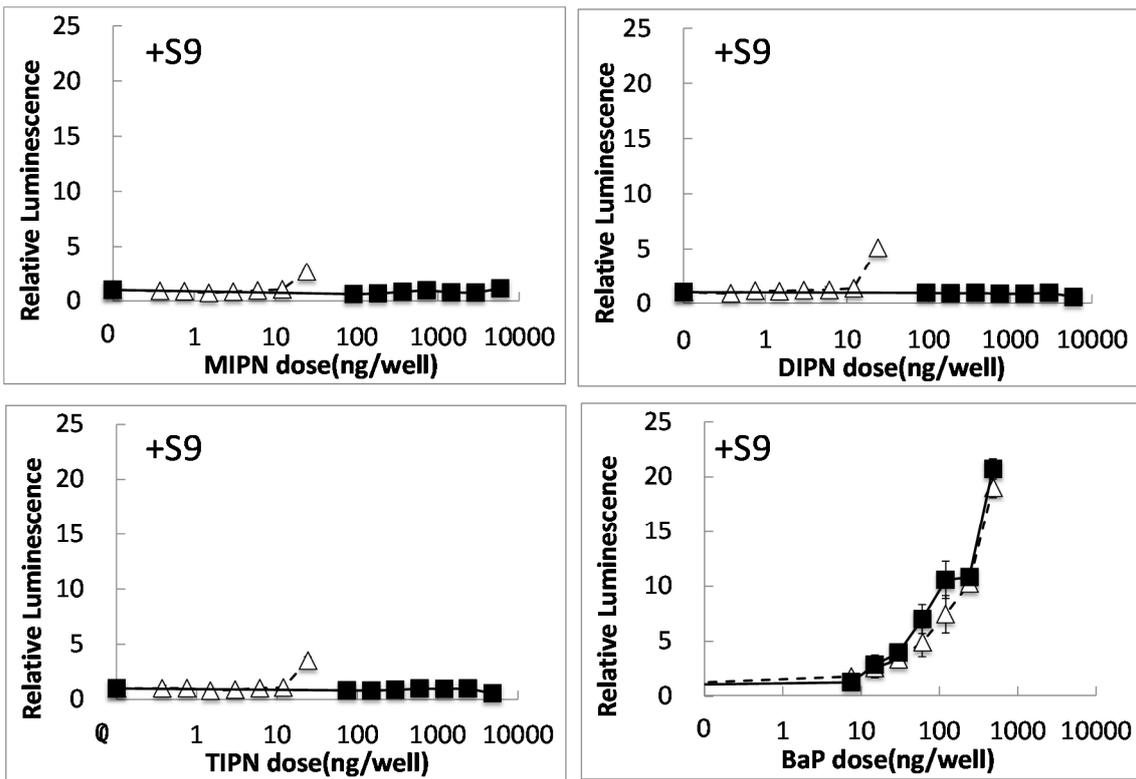


図 2-25 代謝系発光 *umu* 試験による IPN 類及び BaP の発光量比

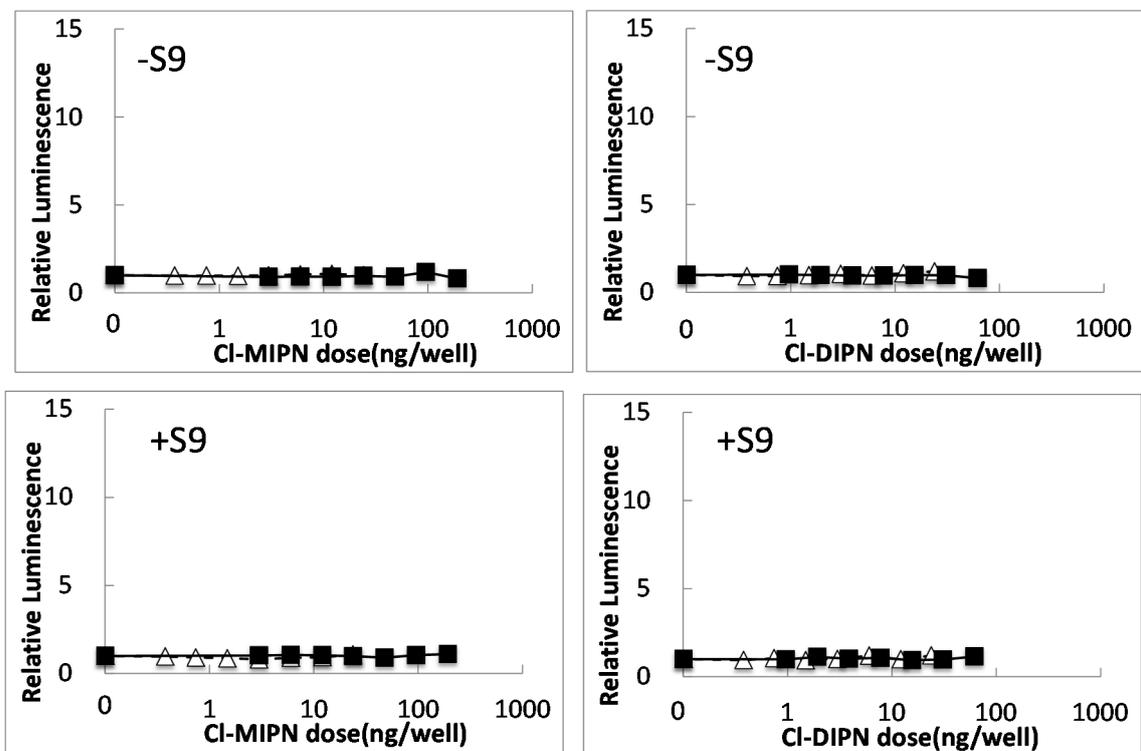


図 2-26 CI-MIPN 及び CI-DIPN の非代謝系及び代謝系発光 *umu* 試験による発光量比

### 2-3-5 まとめ

IPN 類と MIPN 及び DIPN の塩素化体 (Cl-MIPN 及び Cl-DIPN) について、*umu* 試験及び発光 *umu* 試験を行い、変異原性の有無を確認した。その結果、MIPN が非代謝系の発光 *umu* 試験において変異原性があることが確認できたが、それ以外では、*umu* 試験及び発光 *umu* 試験の非代謝系及び代謝系のいずれにおいても IPN 類に変異原性はみられなかった。なお、両試験の代謝系において、5~100 ng/well の範囲で遺伝子毒性を示す反応があったものの、陽性対照と比べて 2 割程度の反応であり、濃度依存性もみられなかった。既存の研究では、DIPN は代謝時に優先的にイソプロピル基が酸化されるため、エポキシ化されにくいと言われている。また、その代謝物は変異原性はないと考えられているが、今回の結果はそれを裏付ける内容であった。

古紙再生工場の塩素漂白の行程では、化学物質が塩素化されることにより、PCBs や OH-PCBs といった遺伝子毒性を持つハロゲン化学物質に変化することが知られている。よって、インク溶剤として使用されている DIPN が塩素化される可能性について懸念される。本研究では、実験室内において MIPN 及び DIPN と塩素を接触させると塩素化されることを確認した。さらに、塩素化された MIPN 及び DIPN を用いて発光 *umu* 試験を行った結果、100 ng 程度の代謝物では変異原性は示さないことが確認できた。

### 2-5 まとめ

本章では、まず初めに IPN 類の環境汚染の実態を調査した。その結果、大気、水質、生物及び底質の順に IPN 類の汚染の程度が高く、最も汚染濃度が高かったのは DIPN であった。底質中の DIPN 濃度が顕著に高かった地点は、古紙再生工場からの影響を受ける河川と兵庫県内でも有数の都市河川下流であった。これらの 2 地点では、特に DIPN 濃度が高かったことから、生物の遊泳障害などへ悪影響が懸念されることが明らかとなった。

一方、DIPN のヒト P450 による代謝の有無と IPN 類の変異原性の有無について調査した。その結果、DIPN は 4 種類のヒト P450 によって代謝されることが分かった。また、生成された代謝物は、分子量 228 のイソプロピル基が水酸化されたものと推定され、その生成量は、hCYP1A1、hCYP 1A2、hCYP 2C9 及び hCYP3A4 の順に多かった。

IPN 類と MIPN 及び DIPN の塩素化体 (Cl-MIPN 及び Cl-DIPN) の変異原性の有無を *umu* 試験及び発光 *umu* 試験により確認した。その結果、MIPN が非代謝系の発光 *umu* 試験において陽性であったが、それ以外は、*umu* 試験及び発光 *umu* 試験の非代謝系及び代謝系のいずれにおいても陰性であった。

これらの結果から、IPN 類は DIPN を主として環境汚染が広まっているものの、MIPN 以外の IPN 類については変異原性がないことが確認された。また、DIPN はヒト体内において P450 により代謝されることを確認した。よって、世界中で使用されている DIPN とその同族体 MIPN 及び TIPN の安全性が確認されたといえる。しかしながら、底質への蓄

積性や魚への濃縮性が確認されたことや DIPN の代謝速度がそれほど速くないと考えられることから、引き続き、環境や生物への汚染状況を監視していくことが必要と考える。

## 参考文献

- Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5597-5601
- Boccacci Mariani M, Chiacchierini E, Gesumundo C (1999) Potential migration of diisopropyl naphthalenes from recycled paperboard packaging into dry foods. *Food Addit Contam* 16(5):207-213
- Brzozowski R, Dobrowolski J, Jamroz MH, Skupinski W (2001) Studies on diisopropyl naphthalene substitutional isomerism. *J Mol Catal Chemical* 170:95-99
- Brzozowski R, Skupinski W, Jamroz HM, Skarzynski M, Otwinowska H (2002) Isolation and identification of diisopropyl naphthalene isomers in the alkylation products of naphthalene. *J Chromatogr A* 946:221-227
- Brzozowski R (2004) Shape-selectivity in diisopropyl naphthalene synthesis or analytical error? *Appl Catal A Gen* (272) 1/2, 215-218
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (1980) Report on environmental survey and wildlife monitoring of chemicals. Ministry of the Environment, Tokyo
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (1983) *Report on environmental survey and wildlife monitoring of chemicals*. Ministry of the Environment, Tokyo
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (1985) *Report on environmental survey and wildlife monitoring of chemicals*. Ministry of the Environment, Tokyo
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (1997) *Report on environmental survey and wildlife monitoring of chemicals*. Ministry of the Environment, Tokyo
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (1997) *Chemicals in the environment. Report on Analytical Methods of Chemicals*: 176-227

- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department,  
Ministry of the Environment Government of Japan (2008) *Chemicals in the environment. Report on Analytical Methods of Chemicals*: 389-410
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department,  
Ministry of the Environment Government of Japan (2008) *Chemicals in the environment. Report on Analytical Methods of Chemicals*: 762-778
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department,  
Ministry of the Environment Government of Japan (2008) *Chemicals in the environment*.
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department,  
Ministry of the Environment Government of Japan (2009) *Chemicals in the environment*.
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department,  
Ministry of the Environment Government of Japan (2011) *Chemicals in the environment*.
- Franke S, Grunenberg J, Schwarzbauer J (2007) The isomer-specific analysis of di-isopropylnaphthalenes. *Int J Environ Anal Chem* 87(6):437–448
- Gonzalez FJ(1988) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40 :243-288
- Hasegawa H, Sato M, Tsuruta H (1982) A toxicological study of di-isopropylnaphthalene (KMC) and 1-phenyl-1-xylyl-ethanes (SAS). *Ind Heal* 20:237–246
- 羽賀 考英, 尾崎 邦雄 (1984) 化学物質の水中における微生物分解性試験. 新潟公害研  
報告 No.9 : 50-53
- Hoke H, Zellerhoff R (1998) Metabolism and toxicity of diisopropylnaphthalene as compared to naphthalene and monoalkyl naphthalenes: a minireview. *Toxicology* 126:1–7
- Iwata H, Fujita K, Kushida H, Suzuki A, Konno Y, Nakamura K, Fujino A, Kamataki T (1998) High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in Escherichia coli. *Biochem. Pharmacol.* 55:1315-1325
- King TL, Yeats P, Hellou J, Niven S (2002) Tracing the source of 3,3'-dichlorobiphenyl found in samples collected in and around Halifax Harbour. *Mar Pollut Bull* 44(7):590–596
- Kodama T (1981) Determination of diisopropylnaphthalene in aqueous solution. *Bull Aichi Environ Res Cent* 9:34–39

- Kojima H, Saito H, Yoshida T (1982) Identification of 2,6-diisopropylnaphthalene metabolites in carp Part 1. In vivo experiment. *Chemosphere* 11(10):1003–1010
- 森田茂利 (1990) リトコール酸投与による DIPN 肝内胆管癌発生の促進効果及び背景因子に関する研究. *肝道* 4(4):430-442
- Nanba S, Hara A, Shiki Y, Matuda M, Kawano M, Morita M (2008) Hydroxylated PCBs: Its detection in water samples and suspected sources. *17th Symposium on Environmental Chemistry Programs and Abstracts*: 470-471
- Nakamura S, Oda Y, Shimada T, Oki I, Sugimoto K (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals, *Mutat. Res.* (192): 239–246
- Nakano T, Fukushima M, Shibata Y, Suzuki N, Takazawa Y, Yoshida Y, Nakajima N, Enomoto Y, Tanabe S, Morita M (2004) POPs monitoring in Japan—fate and behavior of POPs. *Organohalogen Compd* 66:1464–1469
- Nebert DW, Gonzalez FJ(1987) P450 genes, Structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*56:945-993
- Nebert DW, Nelson DR, Adesnick M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR (1989) The P450 gene superfamily: update on the naming of new genes and nomenclature of chromosomal loci. *DNA* 8:1-13
- 日本化学物質安全・情報センター，通産省化学品安全課監修（1992）化学品検査協会編，化審法の既存化学物質安全性点検データ集
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239 :2370-2378
- Peterman HP, Delfino JJ (1990) Identification of isopropylbiphenyl, alkyl diphenylmethanes, diisopropylnaphthalene, linear alkyl benzenes and other polychlorinated biphenyl replacement compounds in effluents, sediments and fish in the Fox River system, Wisconsin. *Biol Mass Spectrom* 19:755–770
- Suzuki M, Matsumura C, Moriguchi Y, Nakano T (2007) Investigation of mono-isopropylnaphthalene, di-isopropylnaphthalene and tri-isopropylnaphthalene in the environment around the paper recycling plant. *Organohalogen Compd* 69:2910–2913
- Koei Haga and Kunio Ozaki (1984) Degradation test of chemicals by microorganisms in river water. *新潟公害研報告* No.9 : 50-53
- Scarlett AG, Clough R, West C, Lewis CA, Booth AM, Rowland SJ (2011) Alkyl-naphthalenes: priority pollutants or minor contributors to the poor health of marine mussels? *Environ Sci Technol* 45:6160–6166

- Sturaro A, Parvoli G, Rella R, Bardati S, Doretto L (1994) Gas chromatographic–mass spectrometric, high-performance liquid chromatographic–UV and gas chromatographic–Fourier transform IR responses to an industrial mixture of diisopropyl-naphthalenes. *J Chromatogr A* 688:211–219
- Tanada K, Goto S, Kadokami K, Hirai M, Imaeda T, Suzuki M (2001) Modification of umu Test Using the Bioluminescent Bacteria and Application to Sediments and Soils. *Journal of Environmental Chemistry* 11(4):841-848
- Yoshida T, Kojima H (1978a) Studies on environmental safety of di-isopropyl-naphthalene (DIPN) part-I bioconcentration of <sup>14</sup>C-DIPN in carp. *Chemosphere* 7(6):491–496
- Yoshida T, Kojima H (1978b) Studies on environmental safety of di-isopropyl-naphthalene (DIPN) part-II biodegradation of <sup>14</sup>C-DIPN with activated sludge. *Chemosphere* 7(6):497–501

## 第3章 水酸化 PCBs のリスク評価

### 3-1 諸言

絶縁油や熱媒体として使用されてきたポリ塩化ビフェニル (PCBs) は、1972年に日本での製造・使用が禁止された。しかし、PCBsは難分解性かつ高蓄積の性質を有することから、現在も環境中や生体中の汚染が確認されている。また、PCBsは環境中ではOHラジカル反応 (Brubakerら1998)、生体中ではP450による酸化によって水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCBs) となることが知られている (Ariyoshiら1995、Bergmanら1982、Duignanら2004、Kaminskyら1981、Ishidaら1991、Kogaら1994、1996、1998(a)、1998(b)、Matsusueら1996)。

OH-PCBsの構造式及び物理化学的性質を図3-1及び表3-1に示す。PCBsには209の異性体が存在するが、そのモノ水酸化体であるOH-PCBsは1塩素体から9塩素体の計837の異性体が存在する。このOH-PCBsの中には代謝活性化する異性体があり、母化合物よりも急性毒性の指標であるLD50値が高くなることや、細胞の成長をより強く阻害することが報告されている (Yamamoto1973、Stadnickiら1979)。近年では、3位又は4位に水酸基があり、その両端に塩素原子があるものは、甲状腺ホルモン (TH) であるサイロキシシン (T4) と構造が似ていることから、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し、体内に残留することが報告されている (Fängströmら2002)。また、女性ホルモンの作用にも影響を与えることも報告されており (Kitamuraら2005、Braathenら2009)、内分泌攪乱物質のひとつとして考えられている。

OH-PCBsの生体曝露は、これまでにヒトやアザラシなどの血液中への残留について報告されている。しかしながら、ヒトの血液試料の入手は血液の採取が医師等の免許保持者に限られることや採取できる場所が限られることから困難である。従って、ヒト体内の汚染状況については報告例が限られている。

一方、OH-PCBsの環境中の汚染状況に関する報告については、国内では一部の水域のみに限られている。この理由としては、OH-PCBsの汚染が注目されるようになったのが最近であることや環境中の存在量が極微量であるため高感度の分析方法を必要とすることなどが考えられる。

そこで、本章では現在のOH-PCBsの環境リスクを評価することを目的に、3-2節では、環境中の汚染実態の中でこれまで調査例のない大気中の汚染状況について、また、汚染源のひとつと考えられている古紙再生工場の排水の影響について、さらに県下で最もPCBs濃度の高い河川底質の汚染状況の3つを調査することとした。3-3節では、ヒト体内の汚染状況を把握するため、血液よりも採取が容易な尿を対象とし、迅速かつ高感度な分析方法を開発し、OH-PCBsの体内汚染が懸念されるPCBs作業従事者とPCBs研究者の体内のOH-PCBsの汚染状況を確認した。

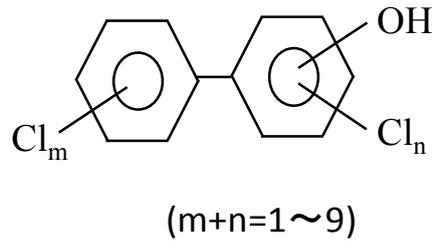


図 3-1 OH-PCBs の構造式

表 3-1 OH-PCBs の物理化学的性質

	分子量	沸点 (°C) <sup>1)</sup>	融点 (°C) <sup>1)</sup>	蒸気圧 25°C (Pa) <sup>*1</sup>	水溶解度 25°C (mg/L) <sup>*1</sup>	log P <sub>ow</sub>
OH-MoCB	204.66	338.05	108.76	1.43E-03	70.5	3.92 <sup>*1</sup> 3.7~4.6 <sup>*2</sup>
OH-DiCB	239.10	356.96	121.40	3.42E-04	13.0	4.57 <sup>*1</sup> 4.3~4.9 <sup>*2</sup>
OH-TrCB	273.55	375.65	140.19	6.99E-05	2.36	5.21 <sup>*1</sup> 5.1~5.6 <sup>*2</sup>
OH-TeCB	307.99	394.35	150.51	1.74E-05	4.19 E-01	5.85 <sup>*1</sup> 5.5~6.3 <sup>*2</sup>
OH-PeCB	342.44	413.04	167.73	3.56E-06	7.37 E-02	6.50 <sup>*1</sup> 5.7~6.6 <sup>*2</sup>
OH-HxCB	376.88	431.74	180.71	8.04E-07	1.28 E-02	7.14 <sup>*1</sup> 6.4~7.1 <sup>*2</sup>
OH-HpCB	411.33	450.43	189.44	2.00E-07	2.21 E-03	7.79 <sup>*1</sup> 6.5~7.5 <sup>*2</sup>
OH-OcCB	445.77	469.13	198.18	4.95E-08	3.79 E-04	8.43 <sup>*1</sup> 7.2 <sup>*2</sup>
OH-NoCB	480.22	487.82	206.91	1.21E-08	6.45 E-05	9.08 <sup>*1</sup> 7.3 <sup>*2</sup>

※1 EPI Suite™ v4.10による計算値

(<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm>)

※2 The version 3 of the algorithm to generate the XlogP value by PubChem

(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

## 3-2 OH-PCBsの兵庫県下における環境汚染の実態調査

### 3-2-1 はじめに

OH-PCBsの環境汚染の状況については、カナダの環境水から1.6~130 pg/LのOH-PCBsが検出されている(Uenoら2007)。日本では、Sakiyamaら(2007)によって大阪市の河川や河口の底質からPCBsの1.4~13%にあたる0.90~150 ng/g-dry wt.のOH-PCBsが検出されている。大気については、PCBsとOHラジカルからOH-PCBsが微量に生成されることが実験により確認されており(Brubakerら1998)、大気中でOH-PCBsがPCBsのOHラジカル反応によって生成されると考えられている(Tottenら2002、Mandalakisら2003、Andersonら1996)。これまでに、雨水や積雪からOH-PCBsが検出されているが(Darlingら2004、Uenoら2007)、大気からの検出例はない。また、近年では古紙再生工場の排水からPCBsを超える高濃度のOH-PCBsが検出されている(Nanbaら2008)。また、Nanbaらはインク成分に含まれるフェニルフェノールと塩素を反応させるとOH-PCBsが生成されることを報告しており、古紙再生工場の塩素漂白によりOH-PCBsが生成されている可能性が示された。

そこで、本節では、まず大気中のOH-PCBsを分析できる方法を開発し、大気中のOH-PCBsの汚染状況を確認することとした。また、古紙再生工場の排水の環境影響を調査するため、古紙再生工場の排水の流入がある河川底質のOH-PCBsの汚染状況を調査した。また、県下で最もPCBs濃度の高い河川底質についてもOH-PCBsの汚染状況を調査した。

### 3-2-2 材料及び分析方法

OH-PCBsは、これまでにOH基をメトキシ化してMe-PCBsとしてHRGC/HRMSにより定量する方法が用いられている。近年、我々はUPLC/Q-TOFMSによりOH-PCBsを誘導体化することなく定量する方法を開発している(Ezakiら2010、Suzukiら2011)。誘導体化をしないことにより、測定対象に含まれるOH-PCBsとMe-PCBsの両方を分析できる利点があるが、異性体の分解能はHRGC/HRMSのほうが高く、より多くの異性体を同定するには適している。よって本研究では、HRGC/HRMSによる定量方法を採用した。また、大気については採取方法や前処理方法等の検討を行った。

837異性体あるOH-PCBsのうち、市販されている全ての異性体37種をAccuStandard社及びWellington社から購入した。また、Okumura(2003)により合成された異性体77種を入手し、合わせて114種の1~9塩素体の異性体混合液を標準液とした(表3-2)。また、表3-3に示す2~7塩素体の<sup>13</sup>Cラベル体(50 μg/mL)をWellington社から購入し、それぞれ100 ng/mLのアセトン混合溶液をクリーンアップスパイクとした。その他一般試薬として、ダイオキシン分析用のアセトン、トルエン、ヘキサン及びメタノール、残留農薬試験・PCB試験用のエタノール及びジエチルエーテル及び硫酸ナトリウム(無水)は関東化学㈱から購入し、残留農薬試験・PCB試験用の塩化ナトリウム、試薬特級の水酸化ナトリウム、和光一級の硫酸ジメチルは和光純薬工業㈱から購入した。

表 3-2 標準試料に用いた OH-PCBs 異性体

	異性体名	入手・販売元		異性体名	入手・販売元		異性体名	入手・販売元
1	2-OH-5-MoCB	AccuStandard	39	2-OH-3,3',4'-TrCB	Okumura	77	2-OH-3,3',4',5'-TeCB	Okumura
2	4-OH-2-MoCB	AccuStandard	40	3-OH-3',5',6'-TrCB	Okumura	78	2-OH-2',3,4',6'-TeCB	Okumura
3	4-OH-3-MoCB	AccuStandard	41	3-OH-2',4,5'-TrCB	Okumura	79	2-OH-2',3,4',5'-TeCB	Okumura
4	4-OH-4'-MoCB	AccuStandard	42	3-OH-3',4',6'-TrCB	Okumura	80	2-OH-3,3',4',6'-TeCB	Okumura
5	2-OH-2',5'-DiCB	AccuStandard	43	4-OH-2',3,3'-TrCB	Okumura	81	3-OH-2,3',4,5'-TeCB	Okumura
6	3-OH-2',5'-DiCB	AccuStandard	44	3-OH-3',4,4'-TrCB	Okumura	82	4-OH-2',3,4',6'-TeCB	Okumura
7	4-OH-2',5'-DiCB	AccuStandard	45	3-OH-2',5',6'-TrCB	Okumura	83	4-OH-2,3',5,5'-TeCB	Okumura
8	4-OH-3,5'-DiCB	AccuStandard	46	2-OH-3,3',6'-TrCB	Okumura	84	4-OH-3,3',4',5'-TeCB	Okumura
9	2-OH-2',3'-DiCB	AccuStandard	47	4-OH-2',3,4'-TrCB	Okumura	85	2-OH-2',3,4,4'-TeCB	Okumura
10	2-OH-3',4'-DiCB	AccuStandard	48	3-OH-2',3',4'-TrCB	Okumura	86	2-OH-3',5,5',6'-TeCB	Okumura
11	2-OH-2',4',6'-TrCB	AccuStandard	49	4-OH-2',3,5'-TrCB	Okumura	87	3-OH-2,2',4,5'-TeCB	Okumura
12	2-OH-2',5',5'-TrCB	AccuStandard	50	3-OH-4,4',6'-TrCB	Okumura	88	3-OH-2,2',3,4'-TeCB	Okumura
13	3-OH-2',4',6'-TrCB	AccuStandard	51	3-OH-2,3',4'-TrCB	Okumura	89	4-OH-2',3,3',5'-TeCB	Okumura
14	4-OH-2',3,5'-TrCB	AccuStandard	52	2-OH-2',3',4',5'-TeCB	AccuStd	90	3-OH-2',4,4',5'-TeCB	Okumura
15	4-OH-2,2',5'-TrCB	AccuStandard	53	2-OH-2',3',5',6'-TeCB	AccuStd	91	3-OH-2,2',3',4,6'-PeCB	Okumura
16	2-OH-2',3,4'-TrCB	Okumura	54	2-OH-2',4',5',6'-TeCB	AccuStd	92	3-OH-2,3',4,5',6'-PeCB	Okumura
17	2-OH-3,4',5'-TrCB	Okumura	55	3-OH-2',3',5',6'-TeCB	AccuStd	93	3-OH-2,3',4,4',6'-PeCB	Okumura
18	4-OH-2,2',3',4'-TrCB	Okumura	56	3-OH-2',3',4',5'-TeCB	AccuStd	94	2-OH-2',3,4',5',6'-PeCB	Okumura
19	2-OH-3,4',6'-TrCB	Okumura	57	4-OH-2',3',4',5'-TeCB	AccuStd	95	3-OH-2,3',5,5',6'-PeCB	Okumura
20	2-OH-3,3',5'-TrCB	Okumura	58	4-OH-2,2',4',6'-TeCB	AccuStd	96	3-OH-2,2',3',5,6'-PeCB	Okumura
21	3-OH-2,2',5'-TrCB	Okumura	59	4-OH-2',3,5,5'-TeCB	AccuStd	97	2-OH-3,3',5,5',6'-PeCB	Okumura
22	3-OH-2,4,4'-TrCB	Okumura	60	4-OH-2',3',5',6'-TeCB	AccuStd	98	2-OH-3,3',4',5,6'-PeCB	Okumura
23	2-OH-3',5,5'-TrCB	Okumura	61	4-OH-2',3',5',6'-TeCB	Okumura	99	3-OH-2,3',4,4',5'-PeCB	Okumura
24	4-OH-3,3',6'-TrCB	Okumura	62	2-OH-2',3,3',4'-TeCB	Okumura	100	2-OH-2',3,3',5,6'-PeCB	Okumura
25	2-OH-3',4',5'-TrCB	Okumura	63	4-OH-2,2',3',5'-TeCB	Okumura	101	3-OH-2,3',4',5,6'-PeCB	Okumura
26	4-OH-2,3',5'-TrCB	Okumura	64	2-OH-2',3,5,5'-TeCB	Okumura	102	2-OH-2',3',4',5,5'-PeCB	AccuStandard
27	4-OH-3,3',4'-TrCB	Okumura	65	2-OH-3,3',5,5'-TeCB	Okumura	103	4-OH-2,2',3',4',5'-PeCB	AccuStandard
28	3-OH-2',4',6'-TrCB	Okumura	66	3-OH-2,2',5',6'-TeCB	Okumura	104	4-OH-2,3,3',4',5'-PeCB	AccuStandard
29	4-OH-2,4',5'-TrCB	Okumura	67	3-OH-2,2',3',6'-TeCB	Okumura	105	4-OH-2,3,3',5',6'-PeCB	AccuStandard
30	3-OH-2,2',4'-TrCB	Okumura	68	3-OH-2,3',4,4'-TeCB	Okumura	106	4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	AccuStandard
31	2-OH-3',4,5'-TrCB	Okumura	69	3-OH-3',4,4',6'-TeCB	Okumura	107	2-OH-2',3',5,5',6'-PeCB	AccuStandard
32	3-OH-2',4,4'-TrCB	Okumura	70	3-OH-2,2',4,4'-TeCB	Okumura	108	4-OH-2,2',3',5',6'-PeCB	AccuStandard
33	4-OH-3,4',5'-TrCB	Okumura	71	2-OH-3',4,5',6'-TeCB	Okumura	109	4-OH-2,3,3',4',5'-PeCB	AccuStandard
34	2-OH-2',3,3'-TrCB	Okumura	72	4-OH-2,3',4',5'-TeCB	Okumura	110	4-OH-2',3,4',5,6'-PeCB	AccuStandard
35	3-OH-3',4,6'-TrCB	Okumura	73	3-OH-2,2',4',6'-TeCB	Okumura	111	4-OH-2',3,3',5,5',6'-HxCB	AccuStandard
36	2-OH-3',4,6'-TrCB	Okumura	74	4-OH-2',3,4',5'-TeCB	Okumura	112	3-OH-2,2',3',4,4',5'-HxCB	Wellington
37	2-OH-3,3',5'-TrCB	Okumura	75	2-OH-3',4,5,5'-TeCB	Okumura	113	4-OH-2,2',3,4',5,5',6'-HpCB	Wellington
38	2-OH-2',4',5'-TrCB	Okumura	76	2-OH-2',3,3',5'-TeCB	Okumura	114	3'-OH-2,2',3,4,4',5,5'-HpCB	Wellington

表 3-3 クリーンアップスパイクに用いた OH-PCB 同位体

PCBs同位体
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-3',4'-DiCBs
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-2',4',5'-TrCB
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-2',3',4',5'-TeCB
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-2',3,4',5,5'-PeCB
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB
$^{13}\text{C}_{12}$ -4-OH-2,2',3,4',5,5',6'-HpCB

大気、環境水及び底質の OH-PCBs 分析方法を図 3-2 に示す。大気は、SIBATA 社製のハイボリウムエアサンプラーHV-1000F に、捕集材として石英繊維ろ紙 QR-100 (Advantec 社製) 及びダイオキシン用ポリウレタンフォーム (SIBATA 社製) を接続し、大気を約 1000m<sup>3</sup> 捕集した。捕集後、クリーンアップスパイク (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-OH-DiCB~HpCB : 100 ng/mL) 10 μL を添加し、捕集材は高速溶媒抽出装置 ASE300 (Dionex 社製) によりアセトン抽出を行い、窒素ガス吹付濃縮機 TurboVap- II (Zymark 社製) により約 2 mL に濃縮後、ヘキサンに転溶させた。

環境水は、ステンレスバケツにより採取した 1~100 L にクリーンアップスパイク 10 μL を添加し、Amberlite 社製 XAD-7PH 50 g を充填してフリッツで固定したカラムに通水した。通水後は、XAD-7PH は ASE300 により、フリッツは振とう・超音波抽出によりそれぞれアセトン抽出を行い、両抽出液を合わせてヘキサンに転溶した。

底質は、ドレッジにより採取した 15~30 g-wet にクリーンアップスパイク 10 μL を添加し、振とう・超音波抽出を行った。1 回目はアセトン、2 回目は 20%ヘキサン含有アセトンにより処理し、両抽出液を合わせてヘキサンに転溶した。

大気、環境水及び底質それぞれヘキサン転溶したものは、あらかじめ 0.5% ジエチルエーテル/ヘキサンで洗浄した Sep-Pak Plus Florisil に負荷し、0.5% ジエチルエーテル/ヘキサン 8 mL により PCBs 画分を溶出した後、OH-PCBs 画分を 50% アセトン/メタノール 10 mL で溶出させた。溶出液は乾固し、硫酸ジメチルと 3 mol/L 水酸化カリウム/エタノール (10% 含水) によりメチル誘導体化とアルカリ分解を行った。次に、ヘキサン転溶、濃縮・脱水し、あらかじめ 5%ジエチルエーテル/ヘキサンで洗浄した Sep-Pak Plus Florisil に負荷し、5%ジエチルエーテル/ヘキサン 8 mL で溶出させた。最終的に溶出液を 100 μL に濃縮し、シリンジスパイクとして <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-2,3',4',5'-TeCB (<sup>13</sup>C -CB70 ; 50 ng/mL) 10 μL を添加したものを表 3-4 の条件により HRGC/HRMS-SIM で定量した。Sakiyama ら (2007) によると、OH-PCBs の水酸基が m 位もしくは p 位にある場合は、イオン化のフラグメントイオンとして [M-COCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> が生成され、水酸基が o 位にある場合には、[M-ClCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> が生成される。そのため、これらを定量イオンの [M]<sup>+</sup> と同位体イオン [M+2]<sup>+</sup>、[M+4]<sup>+</sup> に加えて確認イオンとした。本系の場合、モニターイオン数が多いことからインジェクションは 2 回行うこととし、1~4 塩素体と 5~7 塩素体に分けて同定・定量を行った (表 3-5 及び表 3-6)。

OH-PCBs の濃度は、環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版)」に基づき、下式により算出した。なお、同じ塩素数のサンプリングスパイクがない場合は、塩素数が最も近いサンプリングスパイクを用いることとした。

(OH-PCBs 濃度 C の算出式)

$$C = (A_s / A_{is}) \times (C_{is} / RRF_{is}) / V$$

*C<sub>is</sub>* : 試験液中のサンプリングスパイクの量 (pg)

*A<sub>is</sub>* : 試験液中のサンプリングスパイクのピーク強度

$A_s$  : 試験液中の調査対象物質のピーク強度

$V$  : 試料量 ( $m^3$ )

※ 大気の場合は、上式に  $(273+t) / 293$  と  $101.3 / P$  を乗じた。

$t$  : 捕集時の平均気温( $^{\circ}C$ )

$P$  : 捕集時の平均気圧 (kPa)

$$RRF_{is} = (C_{is} / C_s) \times (A_s / A_{is}) \quad (5\text{点平均値})$$

$C_{is}$  : 標準液中のサンプリングスパイクの量 (pg)

$C_s$  : 標準液中の対象物質の量 (pg)

$A_{is}$  : 標準液中のサンプリングスパイクのピーク強度

$A_s$  : 標準液中の対象物質のピーク強度

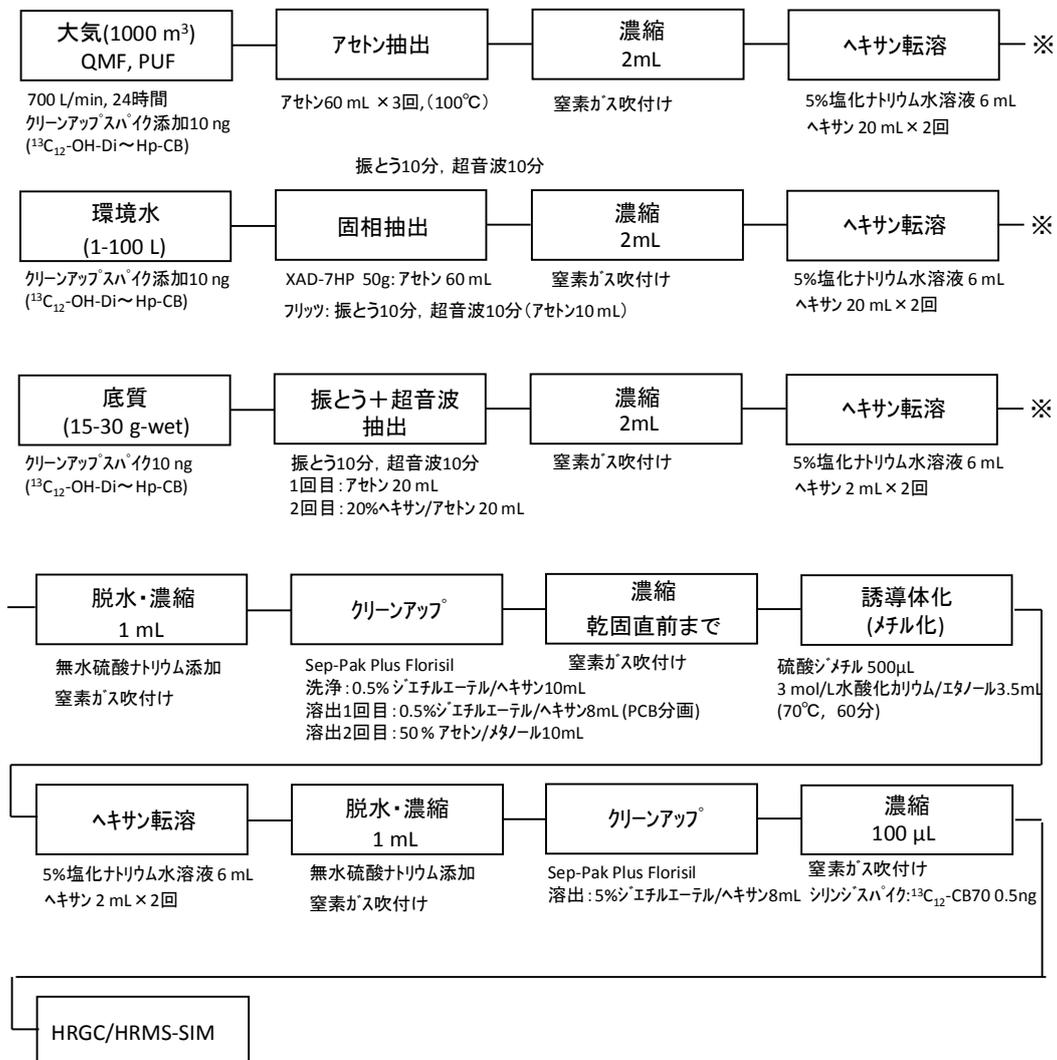


図 3-2 大気、環境水及び底質中の OH-PCBs の分析方法

表 3-4 HRGC/HRMS の分析条件

HRGC/HRMS システム	6890N (Agilent Technologies)/JMS-800D (JEOL)
キャピラリーカラム	HT8-PCB (60m × 0.25mm × 0.25μm)
オープン	130 deg (1 min保持) → 20 deg/min → 210 deg → 2 deg/min → 285 deg → 30 deg/min → 330 deg
注入モード, 注入量, 注入口温度	スプリットレス (1.5分パージ), 2 μL, 290 deg
キャリアーガス	ヘリウム (1.2mL/min)
イオン化法	EI法 (600 uA, 38eV)
インターフェース温度, イオン源温度	290 deg, 290 deg
検出モード	SIMモード

表 3-5 HRGC/HRMS のモニターイオン (インジェクション 1 回目)

	定量イオン [M] <sup>+</sup>	確認イオン [M+2] <sup>+</sup>	確認イオン2 [M-COCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	確認イオン3 [M-ClCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
Me-MoCBs	218.0498	220.0472	175.0315	168.0575
Me-DiCBs	252.0109	254.0081	208.9925	202.0185
Me-TrCBs	287.9691	289.9663	242.9535	235.9796
Me-TeCBs	321.9301	319.9329	278.9116	269.9406
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -Me-DiCB	264.0511	-	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -Me-TrCB	300.0092	-	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -Me-TeCB	333.9702	-	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3',4',5-TeCB	303.9597	-	-	-

表 3-6 HRGC/HRMS のモニターイオン (インジェクション 2 回目)

	定量イオン [M+2] <sup>+</sup>	確認イオン [M+4] <sup>+</sup>	確認イオン2 [M+2-COCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	確認イオン3 [M+2-ClCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
Me-PeCBs	355.8911	357.8882	312.8727	305.8987
Me-HxCBs	389.8521	391.8492	346.8337	339.8598
Me-HpCBs	423.8131	425.8102	380.7947	373.8208
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -Me-PeCB	365.9342	-	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -Me-HxCB	399.8952	-	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -Me-HpCBs	433.8563	-	-	-
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -2,3',4',5-TeCB	303.9597	-	-	-

一般的に、大気中の PCBs やダイオキシンなど、ごく微量に存在する物質を捕集するための捕集材には QMF 及び PUF が用いられるが、対象物質が PUF を破過する場合があることから、より捕集力の強い活性炭フェルトを後段に接続する場合もある。ただし、活性炭フェルトを用いると、溶出力の強いトルエンやジクロロメタンなどを抽出溶媒に加える必要があり、操作が煩雑となる欠点がある。そこで、本方法ではまず初めに、PUF の後段に活性炭フェルトを接続し、OH-PCBs 混合標準液を添加することで大気サンプリングを行った後、アセトン、ジクロロメタン、トルエンによる抽出を行い、抽出溶媒別の回収率を確認した (図 3-3)。図中では、添加した OH-PCBs のそれぞれの異性体の回収率を塩素数ごとに平均している。確認した結果、活性炭フェルトからは OH-PCBs が検出されなかった。活性炭フェルトからの抽出が不十分でないことは、別途、活性炭フェルトのみの添加回収試験において確認している。このことから、OH-PCBs は、PUF からの破過がないことが分かった。また、塩素数が多くなるにつれて QMF から検出される割合が高くなる傾向がみられた。

次に、QMF 及び PUF のみで OH-PCBs 混合標準液を添加して大気サンプリングをした後に、アセトン、ジクロロメタンの順で抽出を行い、抽出溶媒別の回収率を確認した (図 3-4)。その結果、4 塩素体以上の OH-PCBs では、アセトンでは抽出されず、ジクロロメタンにより抽出されるものもあったものが数%みられたが、ほとんどがアセトンで抽出されていることが分かった。

環境省の分析方法開発マニュアルに従い、回収率を OH-PCBs 混合標準液を QMF に添加してサンプリングからの一連の手順を 3 回実施した (表 3-7)。また、分析方法検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) については、低濃度添加回収試験を 7 回実施し、その標準偏差から求めた。なお、MDL 及び MQL は、標品の中でピークの重なりがない 21 種について算出した (表 3-8)。その結果、回収率はピークの重なりがある異性体を除くと、ほとんどの異性体が 60%~110% の範囲であり、50% 以下であったのは低塩素体 (1~3 塩素) の 7 種 (4-OH-3/4-OH-4', 2-OH-3',4', 2-OH-3,3',5', 2-OH-3',5,5', 2-OH-3',4',5 及び 4-OH-3,3',4') であった。低塩素体の回収率が低いことは、サンプリング中や前処理中での揮散や分解が原因と考えられた。なお、操作ブランクから OH-PCBs は検出されなかった。MDL 及び MQL の結果から、本測定方法により大気中の OH-PCBs を 0.1 pg/m<sup>3</sup> のレベルで検出することが可能であることが分かった。

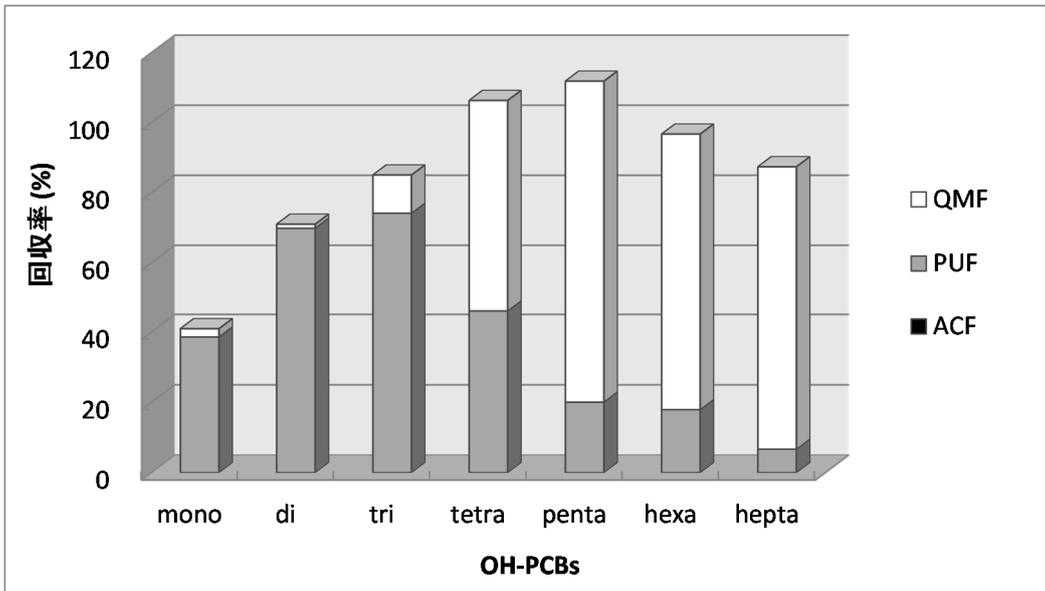


図 3-3 OH-PCBs の捕集材別回収率

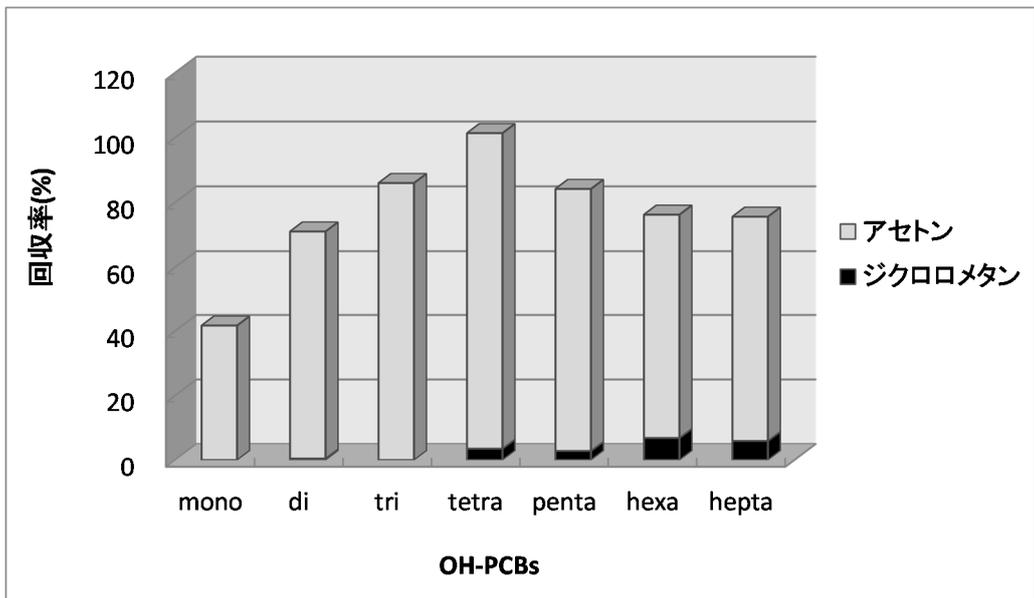


図 3-4 OH-PCBs の大気捕集材からの抽出溶媒別回収率

表 3-7 大気試料に対する OH-PCBs の回収率

同族体	異性体	回収率 (%)	標準偏差 (%)	同族体	異性体	回収率 (%)	標準偏差 (%)
OH-MoCB	2-OH-5	60.6	9.4	OH-TeCB	2-OH-2',3,4',6	74.7	7.0
	4-OH-2	60.0	10.5		2-OH-2'34'5	90.7	6.4
OH-DiCB	2-OH-2',5'	74.2	12.8	4-OH-2,2',4',6'	86.6	2.2	
	2-OH-2',3'	76.7	10.0	2-OH-3',4,5',6	75.7	3.9	
	3-OH-2',5'	80.0	7.1	3-OH-2,2',5',6	71.0	5.8	
	2-OH-3',4'	41.6	3.0	3-OH-2,2',4',6	63.7	1.2	
OH-TrCB	2-OH-2',4',6'	69.2	6.0	3-OH-2,2',3',4	67.5	14.4	
	2-OH-2',3,4'	77.5	7.3	2-OH-2',3',4',5'	69.5	7.1	
	2-OH-3',4,6	73.8	6.3	4-OH-2,3',5,5'	72.0	3.8	
	2-OH-2',3,3'	80.1	4.7	4-OH-2,2',3',5	88.5	10.6	
	3-OH-2',4',6'	89.0	7.4	4-OH-2',3,3',5	66.7	6.7	
	2-OH-3,3',5'	28.3	4.3	4-OH-2',3,4',6	67.6	12.3	
	2-OH-3,3',5	81.1	7.6	3-OH-2,3',4,4'	78.0	3.8	
	2-OH-2',5,5'	76.2	6.2	3-OH-2',3',4',5'	81.2	3.0	
	3-OH-2',5',6	89.1	8.7	4-OH-2',3,5,5'	72.0	6.2	
	2-OH-3,4',5	71.5	9.3	OH-PeCB	2-OH-2',3,4',5,6'	105.3	8.5
	3-OH-2',4',6	80.4	2.6		3-OH-2,2',3',4,6	80.5	8.3
	4-OH-2,2',5'	87.3	3.5		2-OH-2',3,3',5,6	110.5	2.2
	3-OH-2,2',5'	88.7	5.4		2-OH-3,3',5,5',6	85.6	5.8
	2-OH-3,3',4'	77.3	4.3		4-OH-2',3,4',5,6'	92.5	1.6
	3-OH-2,4,4'	59.3	8.1		3-OH-2,3',4,5',6	55.7	7.4
	2-OH-3',4,5'	78.5	3.8		2-OH-2',3',5,5',6'	109.1	3.9
OH-TrCB	3-OH-3',5',6	88.7	2.9		4-OH-2,2',3',5',6'	110.5	5.8
	2-OH-3',5,5'	45.2	4.8		2-OH-3,3',4',5,6	97.1	1.2
	3-OH-2',4,5'	86.1	1.8		3-OH-2,3',4,4',6	64.0	14.4
	4-OH-2',3,5	93.8	6.0	3-OH-2,2',3',5,6	91.9	5.9	
	3-OH-3',4,6	73.9	2.8	3-OH-2,3',5,5',6	87.9	7.1	
	3-OH-2',4,4'	80.7	3.2	2-OH-2',3',4',5,5'	99.6	3.8	
	4-OH-3,3',6	78.3	3.7	4-OH-2,3,3',4',5	69.3	4.9	
	3-OH-4,4',6	55.2	8.4	3-OH-2,3',4,4',5	76.2	10.6	
	4-OH-2,4',5	88.2	3.0	3-OH-2,3',4',5,6	88.0	6.7	
	4-OH-2',3,5'	81.3	4.2	4-OH-2',3,3',4',5'	101.8	12.3	
	2-OH-3',4',5	37.2	7.0	OH-HxCB	4-OH-2',3,3',5,5',6'	85.3	3.8
	4-OH-2,3',4'	85.6	5.2		3-OH-2,2',3',4,4',5	74.8	9.5
	3-OH-2,3',4'	78.8	3.3		4-OH-2',3,3',4',5,5'	80.0	3.0
	4-OH-2',3,3'	65.6	1.4	OH-HpCB	4-OH-2,2',3,4',5,5',6	73.2	6.2
	4-OH-2,3',5'	50.2	5.8		3'-OH-2,2',3,4,4',5,5'	74.0	4.8
	3-OH-3',4,4'	82.5	6.5				
4-OH-3,3',4'	29.1	2.7					

表 3-8 大気試料に対する OH-PCBs の分析方法検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

異性体	MDL (pg/m <sup>3</sup> )	MQL (pg/m <sup>3</sup> )
2-OH-5-MoCB	0.12	0.30
4-OH-4'-MoCB	0.12	0.32
2-OH-2',5'-DiCB	0.12	0.32
2-OH-2',3'-DiCB	0.16	0.42
4-OH-2',5'-DiCB	0.15	0.39
2-OH-2',4',6'-TrCB	0.10	0.26
3-OH-2',5,5'-TrCB	0.099	0.26
4-OH-2,2',5'-TrCB	0.091	0.23
2-OH-2',4',5,6'-TeCB	0.062	0.16
4-OH-2,2',4',6'-TeCB	0.10	0.26
3-OH-2',3',5',6'-TeCB	0.11	0.29
2-OH-2',3',4',5'-TeCB	0.13	0.33
4-OH-2',3',5',6'-TeCB	0.088	0.23
4-OH-2',3,4',5,6'-PeCB	0.069	0.18
2-OH-2',3',4',5,5'-PeCB	0.040	0.10
4-OH-2,2',3',5',6'-PeCB	0.064	0.16
4-OH-2,3,3',4',5'-PeCB	0.098	0.25
4-OH-2',3,3',5,5',6'-HxCB	0.079	0.20
3-OH-2,2',3',4,4',5'-HxCB	0.080	0.21
4-OH-2,2',3,4',5,5',6'-HpCB	0.18	0.46
3-OH-2,2',3,4,4',5,5'-HpCB	0.18	0.46

### 3-2-3 環境試料のサンプリング

大気、環境水及び底質のサンプリング地点を図 3-5 に示す。大気試料として、兵庫県環境研究センター（神戸市）の屋上（地点 H）の大気を、2009 年 5 月 20 日～22 日に 2500 m<sup>3</sup> を採取し、2009 年 1 月 9 日～10 日及び 4 月 9 日～10 日にそれぞれ 1000 m<sup>3</sup> を採取した。古紙再生工場からの排水がある揖保川では、地点 A、地点 C 及び地点 D からドレッジ又はステンレススコップにより底質 15-30 g-wet を採取した。古紙再生工場からの排水は、用水路である地点 B を通過し、地点 C より約 0.2 km 上流で揖保川と合流する。そこで、この地点 B からはステンレスバケツを用いて用水路水 8.2 L を採取した。

また、兵庫県南東部に位置する左門殿川の河口（地点 S）から底質 15 g-wet を採取した。この地点 S の底質からは、県下で最も高濃度の PCBs（1700 ng/g-dry）が検出されている（2-2 節参照）。

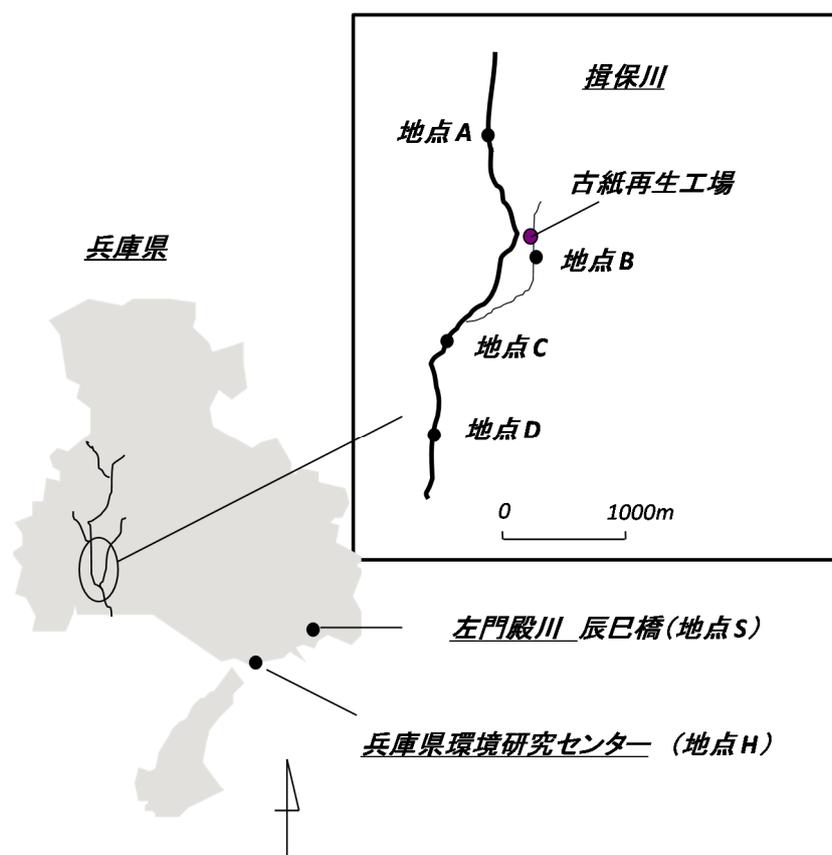


図 3-5 大気、環境水及び底質の採取地点

#### 3-2-4 結果及び考察

2009年1月9日～10日、4月9日～10日及び5月20日～22日にそれぞれ採取した大気試料からは、OH-PCBsが1.1～2.1 pg/m<sup>3</sup>の範囲で検出された。採気量が1000 m<sup>3</sup>の1月と4月の大気試料からはOH-MoCBsのみが検出されたが、採気量を2500 m<sup>3</sup>にした5月の大気試料からはOH-DiCBsも検出され、OH-TrCBsやOH-TeCBsもわずかに検出された(図3-6)。5月の大気試料から検出されたOH-MoCBs及びOH-DiCBsのマスクロマトグラムをそれぞれ図3-7及び図3-8に示す。OH-MoCBsは、同位体比([M]+/[M+2]+)が標品と一致したピークが7つ検出され、そのうち図中のピークNo.2、3及び6の保持時間が標品と一致したことから、それぞれ2-OH-5-MoCB、4-OH-2-MoCB及び4-OH-3-MoCBと同定した。OH-DiCBsは、同位体比が標品と一致したピークが8つ検出され、そのうち図中のピークNo.1、2及び5の保持時間が標品と一致したことから、それぞれ2-OH-2',5'-DiCB、2-OH-2',3'-DiCB及び4-OH-2',5'-DiCB/4-OH-3,5-DiCBと同定した。また、OH-MoCBsやOH-DiCBsと考えられるピークは、[M-COCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>または[M-ClCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>の確認イオンにおいてもピークが確認されている。Philipら(1996)により、大気中ではPCBsの塩素数が少ないほどOHラジカル反応速度が高くなることが報告されていること

から、大気中から検出された OH-PCBs は、PCBs の OH ラジカル反応により大気中で生成されたものと考えられる。

なお、4月の大気試料については、PCBs も測定しており、その濃度は 110 pg/m<sup>3</sup>であった。この屋上の PCBs の大気中濃度は、2007 年 5 月では平均 51 pg/m<sup>3</sup>であり (Suzuki ら 2008)、環境省による化学物質環境実態調査においても例年この程度の濃度が報告されている。よって、本調査により検出された OH-PCBs の大気中濃度は PCBs の 1%程度であったといえる。

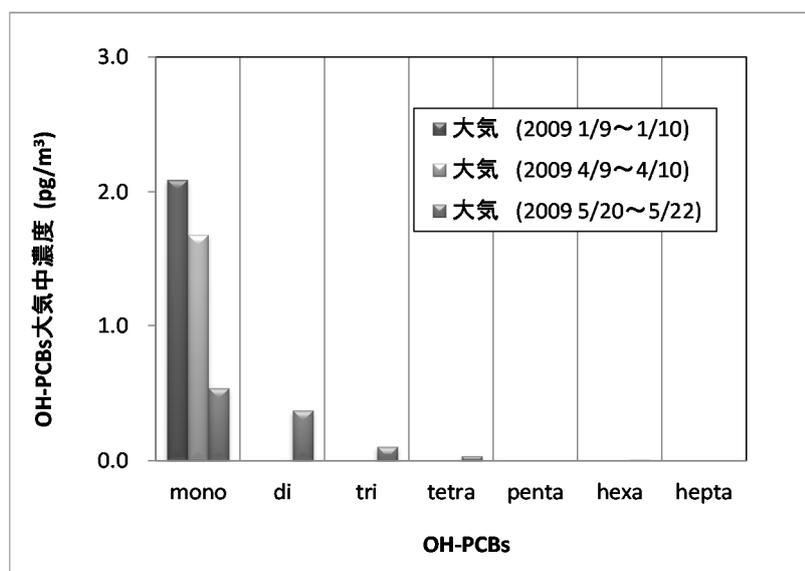


図 3-6 大気から検出された OH-PCBs の同族体別濃度

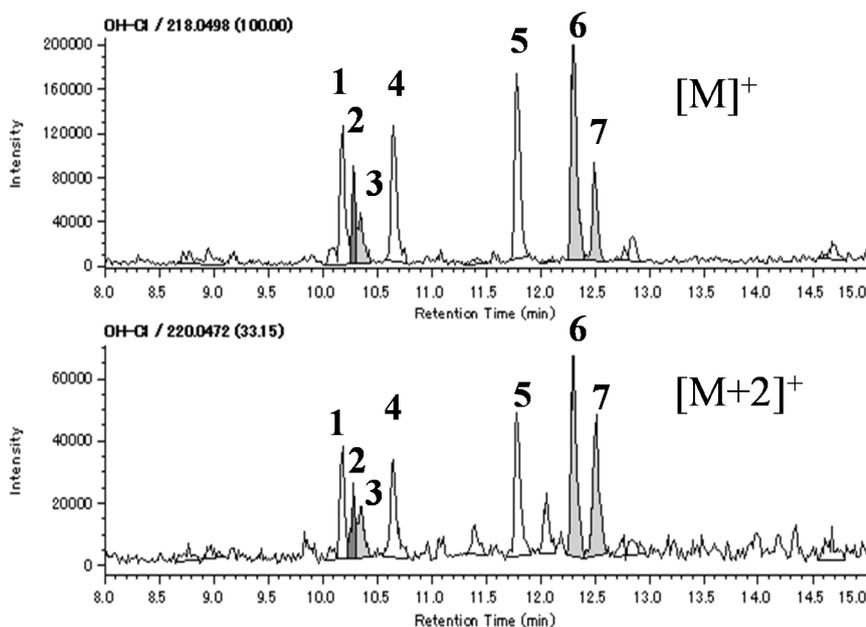


図 3-7 大気試料から検出された OH-MoCBs のマスクロマトグラム

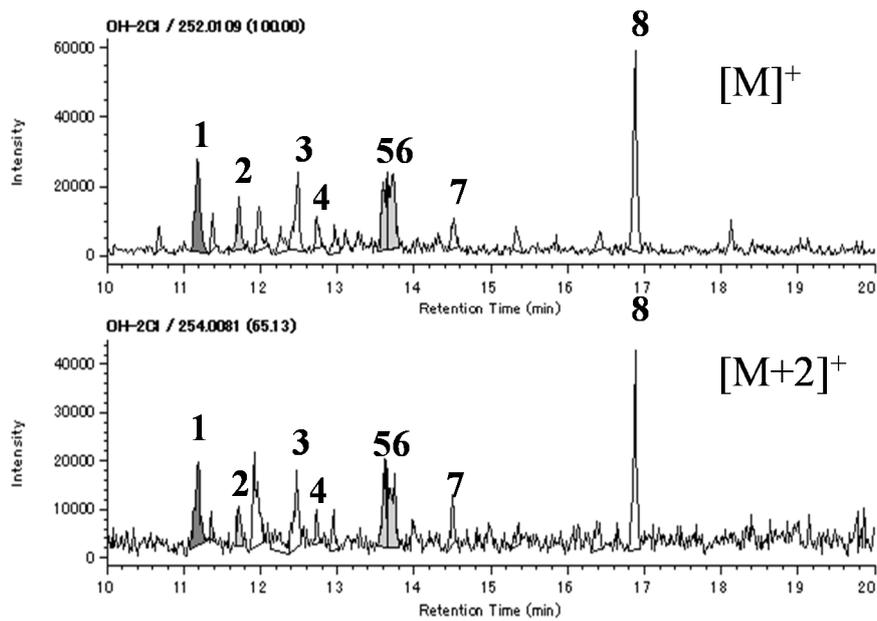


図 3-8 大気試料から検出された OH-DiCBs のマスクロマトグラム

古紙再生工場の排水による OH-PCBs の汚染状況を調査するにあたり、まず、揖保川の古紙再生工場の排水の影響の有無について、3,3'-DiCB (CB11) の DiCBs に対する割合 (CB11/DiCBs) から確認することとした。2 章でも述べた様に、CB11 は印刷用インクに使用される 3,3'-二塩化ベンチジン塩から生成されるため (King et al. 2002)、古紙再生工場からの影響を知るための指標となる。試料中の CB11/DiCBs を図 3-9 に示す。揖保川の地点 B~D から採取した用水路水及び底質は、左門殿川の地点 S の底質と比べて CB11/DiCBs が高く、古紙再生工場から離れるにつれてその割合が減少した。また、用水路との合流地点より上流に位置する地点 A の底質からは CB11 が検出されなかった。これらのことから、地点 B~D は古紙再生工場からの影響を受けていることが確認された。

環境水及び底質から検出された OH-PCBs 及び PCBs の同族体パターンを図 3-10 に示す。地点 B の用水路水からは OH-PCBs が 1.3 ng/L で検出され、1 及び 2 塩素体が全体の 8 割を占めており、古紙再生工場で生成される OH-PCBs 特有のパターンであった (Nanba ら 2008)。古紙再生工場の排水量 (4400 m<sup>3</sup>/day) と地点 B の濃度から推測すると河川への OH-PCBs の負荷量は 5.6 g/day であった。

地点 C の底質からは、OH-PCBs が 1.4 ng/g-dry で検出されたが、1 及び 2 塩素体は他の同族体と比べて特に高いものではなかった。一方、PCBs は古紙再生工場の排水 (地点 B の用水路水) に含まれる同族体パターンが地点 C の底質に強く反映されていた。地点 C よりも下流の地点 D では、OH-PCBs が 0.5 pg/g-dry で検出されたが、1 及び 2 塩素体はほとんど検出されず、PCBs と同族体パターンが同じであった。

これらのことから、揖保川では、古紙再生工場の排水に含まれる 1 及び 2 塩素体の OH-PCBs はほとんど底質に蓄積されないが、排水に含まれる 2~4 塩素体の PCBs が底質

に蓄積し、それらが底質中の微生物等の代謝分解によって OH-PCBs になり、2~4 塩素体の中で水溶性が最も低い 4 塩素体が主となって底質に蓄積していると考えられる。

県下で最も高濃度の PCBs が検出されている左門殿川の地点 S の底質からは、OH-PCBs が 151 ng/g-dry で検出された。これは、Sakiyama ら (2007) によって調査された大阪の河川底質の最大濃度と同程度であった。地点 S で最も濃度が高かったのは 3 塩素体であり、PCBs と同様の同族体パターンであったことから、揖保川と同じく底質中の PCBs が底質中の微生物等により代謝分解された結果 OH-PCBs が底質に蓄積していると考えられる。

OH-PCBs と PCBs (MoCBs~HpCBs) の濃度比 (OH-PCBs/PCBs) を図 3-11 に示す。Sakiyama ら (2007) の報告では、大阪府内の河川底質の OH-PCBs/PCBs は 1.4~13% である。地点 B の用水路水から検出された OH-PCBs が PCBs 由来ではないことは、OH-PCBs/PCBs が 51% であることから推測できる。河川底質では、揖保川の地点 C 及び地点 D が、それぞれ 1.8% 及び 4.0% であったのに対し、左門殿川の地点 S が 11% と高かった。これは、揖保川の底質が砂質であるのに対し、左門殿川の底質がヘドロであったことから、底質中の微生物群の量や種差が関係していると推測される。

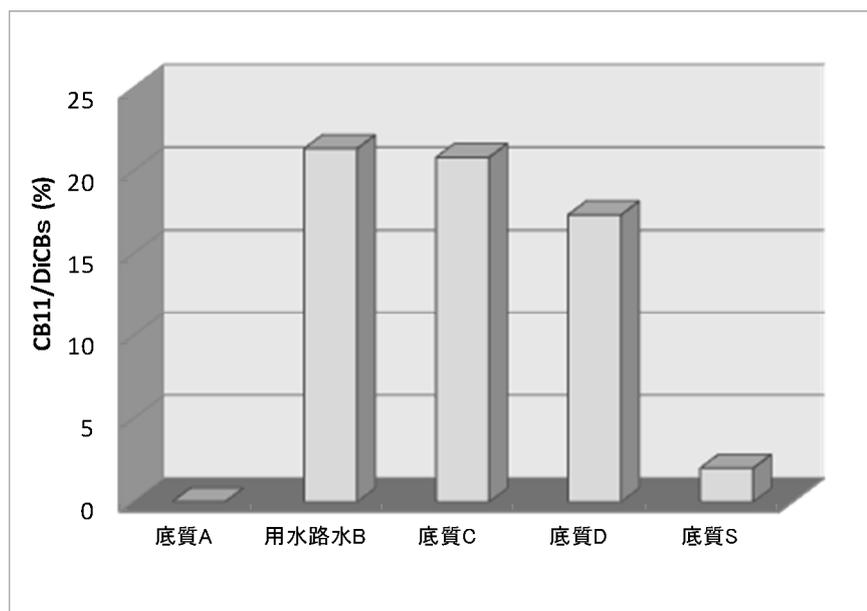


図 3-9 各地点から検出された 3,3'-DiCB (CB11) の DiCBs に対する割合

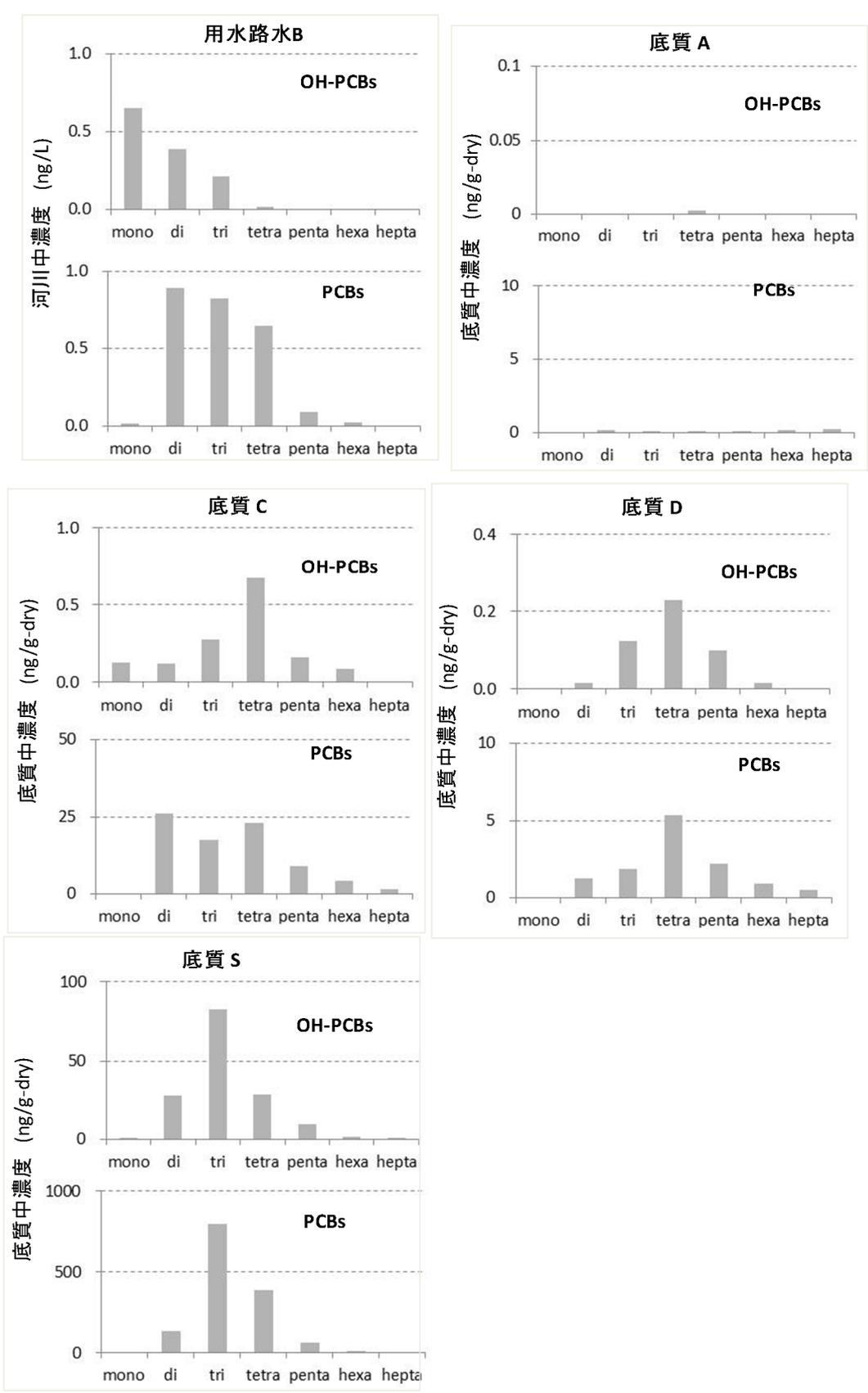


図 3-10 環境水及び底質から検出された OH-PCBs 及び PCBs 濃度

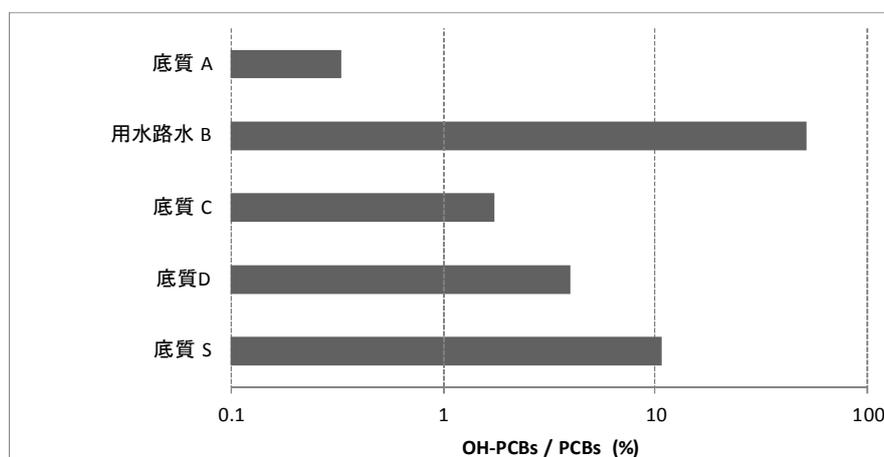


図 3-11 各地点から検出された OH-PCBs と PCBs (MoCBs~HpCBs) の濃度比

### 3-2-5 まとめ

大気中の OH-PCBs を  $0.1 \text{ pg/m}^3$  のレベルで検出可能な分析方法を開発し、OH-PCBs の大気中濃度を測定した。その結果、神戸市の大気から初めて  $1.1 \sim 2.1 \text{ pg/m}^3$  の OH-PCBs が検出され、主な同族体は 1 及び 2 塩素体であった。これらの OH-PCBs 大気中濃度は、PCBs の大気中濃度の 1% 程度であった。

古紙再生工場からの排水が OH-PCBs の汚染源となっていることが懸念されていることから、古紙再生工場からの排水が流入する揖保川の底質の汚染状況を調査した。古紙再生工場からの排水直下の用水路からは、1 及び 2 塩素体を主とした OH-PCBs が  $1.3 \text{ ng/L}$  で検出され、河川への負荷量は  $5.6 \text{ g/day}$  と推測された。揖保川では、この用水路の合流地点より約 200 m 及び約 800 m 下流の底質から、それぞれ  $1.4 \text{ ng/g-dry}$  及び  $0.5 \text{ pg/g-dry}$  の OH-PCBs が検出された。この OH-PCBs と PCBs の同族体パターンから、揖保川に流れ出た古紙再生工場の排水に含まれる 1 及び 2 塩素体の OH-PCBs は、ほとんど底質に蓄積されず、排水に含まれる 2~4 塩素体の PCBs が底質に蓄積し、それらが底質中の微生物等の代謝分解によって OH-PCBs となって底質に蓄積していると考えられる。

県下で最も高濃度の PCBs が検出されている左門殿川の地点 S の底質からは、OH-PCBs が  $151 \text{ ng/g-dry}$  で検出された。同族体パターンが PCBs と同様であったことから、揖保川と同じく底質中の PCBs が代謝分解された OH-PCBs が底質に蓄積していると考えられる。底質中の OH-PCBs/PCBs 濃度比は、揖保川が 1.8% 及び 4.0% であったのに対し、左門殿川が 11% と高かった。これは、揖保川の底質が砂質であるのに対し、左門殿川の底質がヘドロであったことから、底質中の微生物群の量や種差が関係していると推測される。本調査結果から、河川底質から検出された OH-PCBs は、底質中の PCBs の代謝分解によるものと考えられた。よって、PCBs の汚染度が高い地域に OH-PCBs の高濃度汚染があると推測

される。県下で最も PCBs 濃度の高い左門殿川の底質から検出された OH-PCBs はこれまでに大阪府内の河川底質から検出された最大濃度と同程度であったことから、今後は、OH-PCBs の底質の汚染状況を監視していくことが必要と考えられる。

また、大気については、OH-PCBs の濃度が低かったものの、1 地点のみの結果であるため、今後は本研究で開発した分析方法を用いてデータを蓄積していくことが必要と考えられる。

### 3-3 尿による OH-PCBs のヒト体内の汚染状況の把握

#### 3-3-1 はじめに

OH-PCBs のヒト体内の汚染状況は、OH-PCBs が蓄積されるのが主に血液であることから、これまでに血液を対象とした調査が主に行われている。しかしながら、血液の採取が医師等の免許保持者に限られることや採取できる場所が限られることから、血液試料の入手が困難であり、それらの報告例は限られている。ヒト体内に取り込まれた PCBs は、数々の代謝反応を受けて水溶性の高い代謝物となり、尿中あるいは胆汁を介して糞中へと排泄される。これまでに、実験動物の尿中あるいは糞中から PCBs 代謝物が検出されている

(Yamamoto と Yoshimura 1973、1987、Koga ら 1989、1992、Klasson-Wehler ら 1989、Haraguchi ら 1997、1998)。PCBs の代謝物の中で最も多いのは一水酸化体 (OH-PCBs) であり、肝小胞体に局在する P450 の働きが関与している。ヒト P450 による OH-PCBs の生成については、Ariyoshi ら (1995) が初めて報告している。また、尿からは抱合体となっている代謝物も排泄されており、Bloch と Cornish (1910) は、4-MoCB を投与したウサギの尿から 4'-OH-4-MoCB のグルクロン酸抱合体を確認している。

3-3 節では、血液よりも採取が容易な尿に注目し、尿中の OH-PCBs 濃度を測定することにより、ヒト体内の OH-PCBs の汚染状況を把握することとした。まず初めに、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体となっているものも含めて、ヒト尿中の OH-PCBs を高感度に測定するための方法を開発することとした。そして、PCBs 作業従事者と PCBs 研究者について、OH-PCBs の尿中濃度を測定することにより、体内の汚染状況の把握を試みることにした。

#### 3-3-2 材料及び分析方法

アセトン、エタノール、ジエチルエーテル、ヘキサン、メタノール、水酸化カリウム及び無水硫酸ナトリウムは関東化学㈱から購入し、アンモニア水、硫酸ジメチル、塩化ナトリウム及び RP-WAX カートリッジは和光純薬㈱から購入した。Sep-Pak Plus Florisil カートリッジは Waters 社から購入した。 $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase (GN-ASEz) は Merck ㈱から購入した。OH-PCBs の標準品及びラベル体の入手については 3-2 節に記載した。

本研究で開発した分析方法を図 3-12 に示す。まず、採取した尿 (20~50 mL 程度) を 10% ギ酸により pH4 に調整し、RP-WAX カートリッジに負荷し、6 mL の 0.1% 酢酸/メタノール溶液により溶出した。試料を濃縮するこの処理によって処理時間の短縮や脱抱合酵素等の試薬量が削減され、効率的な分析が可能となった。RP-WAX カートリッジによるグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体の保持・溶出が良好であることは、フェノールフタレイン-β-D-グルクロニドナトリウム (和光純薬工業株)、4-ニトロフェニル β-D-グルクロニド (東京化成工業株) 及びフェノールフタレイン二硫酸三カリウム水和物 (和光純薬工業株) を用いて確認した。

RP-WAX からの溶出液は、窒素ガス吹付により 1mL まで濃縮し、0.02M のリン酸緩衝液により pH7 に調整し、クリーンアップスパイク ( $^{13}\text{C}_{12}$ -OH-DiCB~HpCB; 100 ng/mL) を 10 μL 添加した後、脱抱合酵素 GN-ASE z 20 uL を添加して、37°C で 120 分間、脱抱合反応を行う。反応後の試料をヘキサン転溶した後は、3-2 節で示した環境試料と同様にクリーンアップとメチル化処理を行い、表 3-4 の条件のもと HRGC/HRMS-SIM により異性体毎の OH-PCBs を定量した。なお、OH-PCBs は、全 837 種の異性体のうち、標準品・合成品があるのが 134 種に限られるため、定量イオンと確認イオンの比率 (同位対比) が OH-PCBs の標準品と一致したピークを OH-PCBs として定量した。

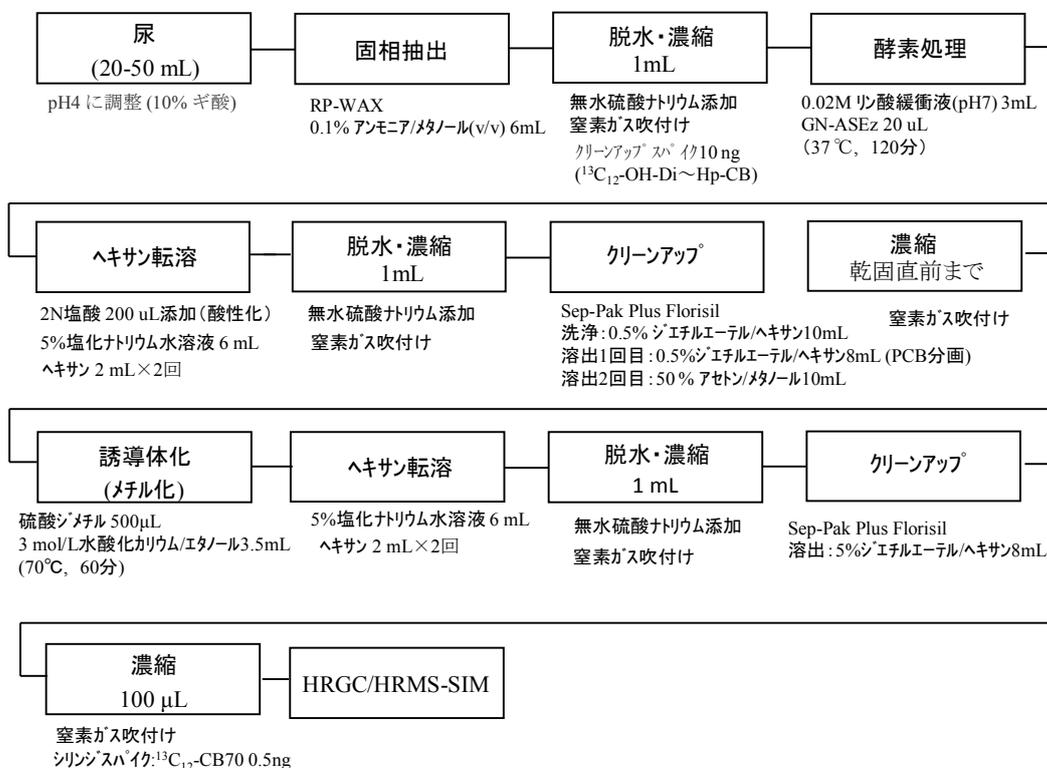


図 3-12 ヒト尿中の OH-PCBs の分析方法

### 3-3-3 尿試料のサンプリング

PCBs 作業従事者 3 人と PCBs 研究者 2 人から尿を採取した。PCBs 作業従事者は、PCBs を取り扱う作業を 2012 年 2 月 24 日 9:30~16:45 (作業 1) 及び 2 月 27 日 9:30~16:45 (作業 2) に実施しており、この間に尿を採取した。作業の内容は、PCBs 貯蔵庫内にて、PCBs を輸送用コンテナに PCBs 自体又は PCBs 廃棄物を移し替える作業であった。また、PCBs 研究者 2 人も、作業 1 の作業中、作業状況の確認とパッシブエアサンプラー (Tsurukawa ら 2009) による室内大気サンプリングのために貯蔵庫内に入っている。尿試料は、作業 1 の開始から最大 86.5 時間後までの間に自然排泄された尿をスポット毎にマヨネーズ瓶に採取した。なお、試料は全てインフォームド・コンセントを行ったうえで採取した。

### 3-3-4 結果及び考察

PCBs 研究者及び PCBs 作業従事者の尿から検出された OH-PCBs の濃度を同族体別に図 3-13 に示す。図中の時間軸は、作業 1 の開始 (2012 年 2 月 24 日 9:30) からの経過時間を示す。なお、OH-PCBs 濃度は、尿量誤差を補正するためにクレアチニン 1g あたりの濃度とした。PCBs 研究者の OH-PCBs の尿中濃度は、研究者 D が 0.012~0.16  $\mu\text{g/g-Cre}$  の範囲で検出され、作業 1 の開始 8 時間後に 0.1  $\mu\text{g/g-Cre}$  程度の濃度上昇がみられた。一方、研究者 E からは 0.13~0.24  $\mu\text{g/g-Cre}$  の範囲で検出されたが、特に濃度上昇はみられなかった。研究者 E の尿を採取したのは作業 1 の開始から約 16 時間後であり、研究者 D にみられた濃度上昇は約 16 時間後までであったことから、研究者 E においても尿を採取する前に濃度上昇があった可能性が考えられる。研究者 D、E とともに作業 1 から 50 時間以上経過した時点で採取した尿から検出された OH-PCBs 濃度は、通常時の濃度レベルと考えられるが、研究者 E は、研究者 D よりも 10 倍程度高い濃度であり、OH-PCBs の尿中濃度に個人差がみられた。年齢を比べると、研究者 D は 47 歳であるのに対して研究者 E は 62 歳であり、これまでに PCBs に接した時間は研究者 E のほうが長期に渡ることが分かっている。曝露量は定かではないが、これまでに曝露及び摂取によって体内に蓄積された PCBs が体内で OH-PCBs に代謝され、尿から徐々に排泄されているものと考えられる。

PCBs 作業従事者については、作業開始時 ( $h=0$ ) 又は開始直後 ( $h=3$ ) の作業員 A、B 及び C からそれぞれ 4.5  $\mu\text{g/g-Cre}$ 、0.77  $\mu\text{g/g-Cre}$  及び 1.7  $\mu\text{g/g-Cre}$  で OH-PCBs が検出された。これらの濃度は、PCBs 研究者よりも数倍から数百倍程度高かった。また、作業 1 の開始から 18~27 時間後には、3 人の濃度が上昇したことから、作業 1 において PCBs に曝露された可能性が示唆された。従事者 A 及び C は、作業 2 の開始後も尿を採取しているが、作業 1 と同様に OH-PCBs 濃度の上昇がみられている。考えられる原因は、経皮曝露及び吸気曝露である。パッシブサンプラーにより測定した貯蔵庫内の PCBs の大気中濃度は 700  $\text{ng/m}^3$  であり、PCBs の全国一般環境の大気中濃度 16~840  $\text{pg/m}^3$  (環境省;平成 25 年度版化学物質と環境) と比べて 3 桁ほど高濃度であった。しかしながら、研究者 D 及び E はマスクをせずに作業 1 に立ち会っているため、吸気曝露があったものと考えられるが、

OH-PCBsの尿中濃度にみられた濃度上昇は研究者Dの0.1  $\mu\text{g/g-Cre}$ のみである。よって、作業従事者の濃度上昇の原因は、経皮曝露によるものと考えられる。作業従事者の作業内容を確認すると、作業従事者は作業内容の記録をとるためにカメラ撮影やメモの作成を行っており、その度に手袋の脱着を繰り返していたことが分かった。この手袋の脱着の際に、手袋に付着したPCBsが手などの皮膚に触れることにより、経皮曝露していたと推測される。

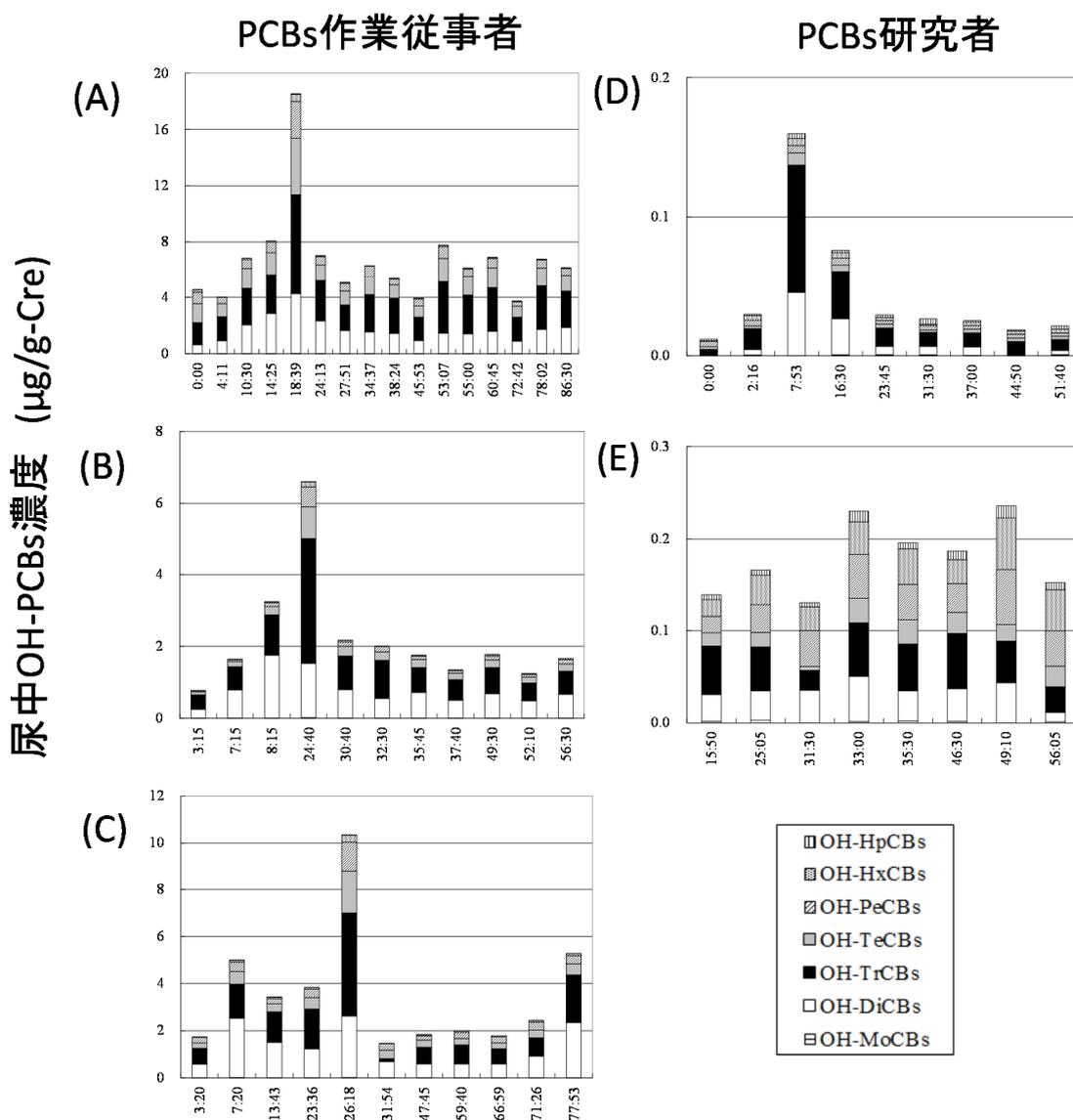


図 3-13 尿中 OH-PCBs の同族体別濃度

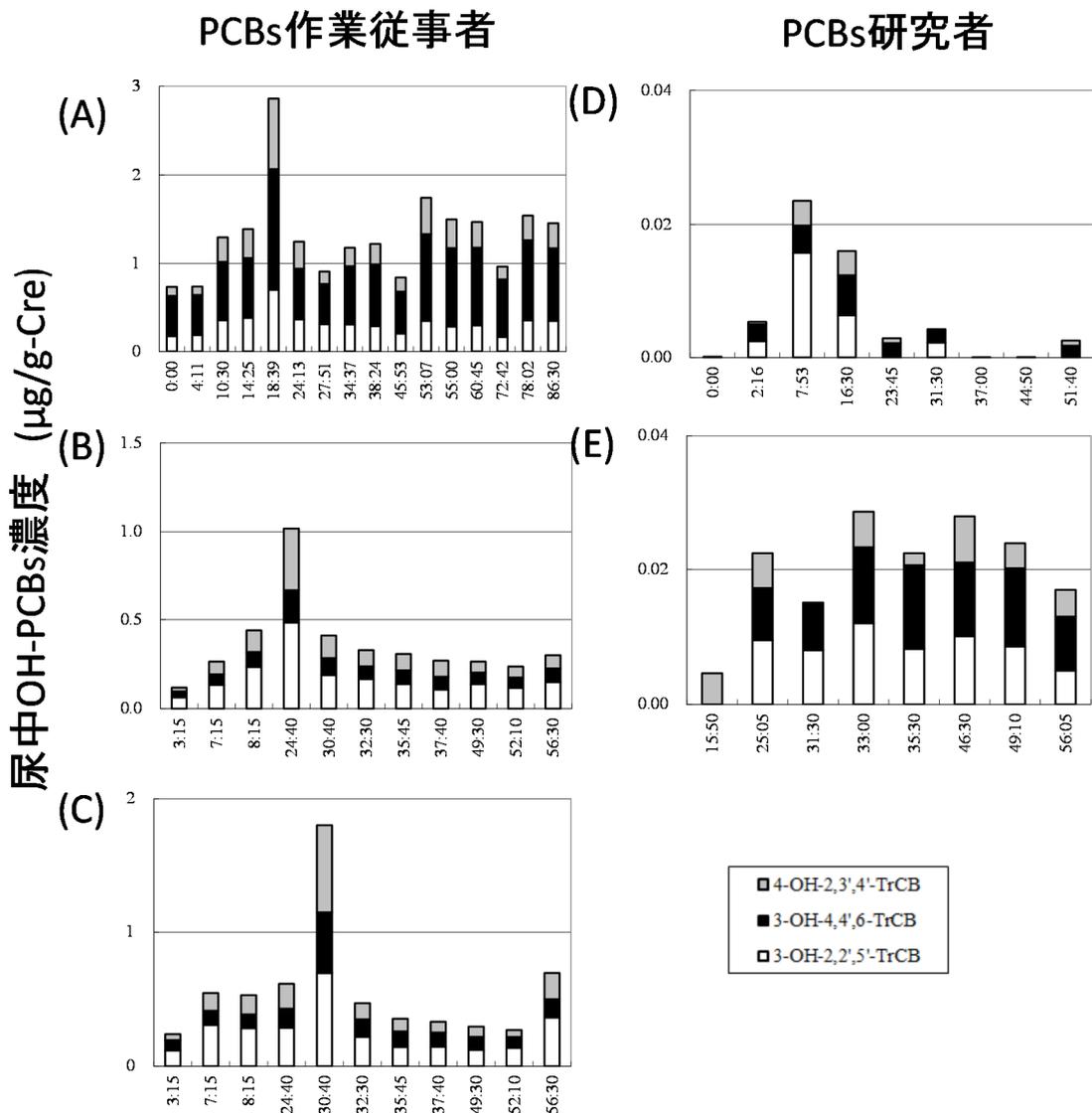


図 3-14 尿中 OH-TrCBs の異性体別濃度

尿から主に検出された同族体は 2 塩素体と 3 塩素体であり、濃度上昇もほとんど 2 塩素体と 3 塩素体によるものであった。これは、PCBs は塩素数が少ないほど代謝されやすいという Matthews と Anderson (1975) の報告と一致する。PCBs は、塩素がメタ位 (3,3' 又は 5,5'位) にあるものは代謝され難いといわれているが (Sipes ら 1979)、尿から検出された 3 塩素体の主な異性体は、図 3-14 のとおり、塩素がメタ位にない 3-OH-2,2',5'-TrCB、3-OH-4,4',6'-TrCB 及び 4-OH-2, 3', 4'-TrCB の 3 つであった。作業対象の PCBs 廃棄物からは、尿から検出されたこの 3 つの異性体の親となる PCBs 異性体が検出されていることから、これらの PCBs が体内で OH-PCBs に代謝され、尿から排泄されたものと考えられる (図 3-15)。

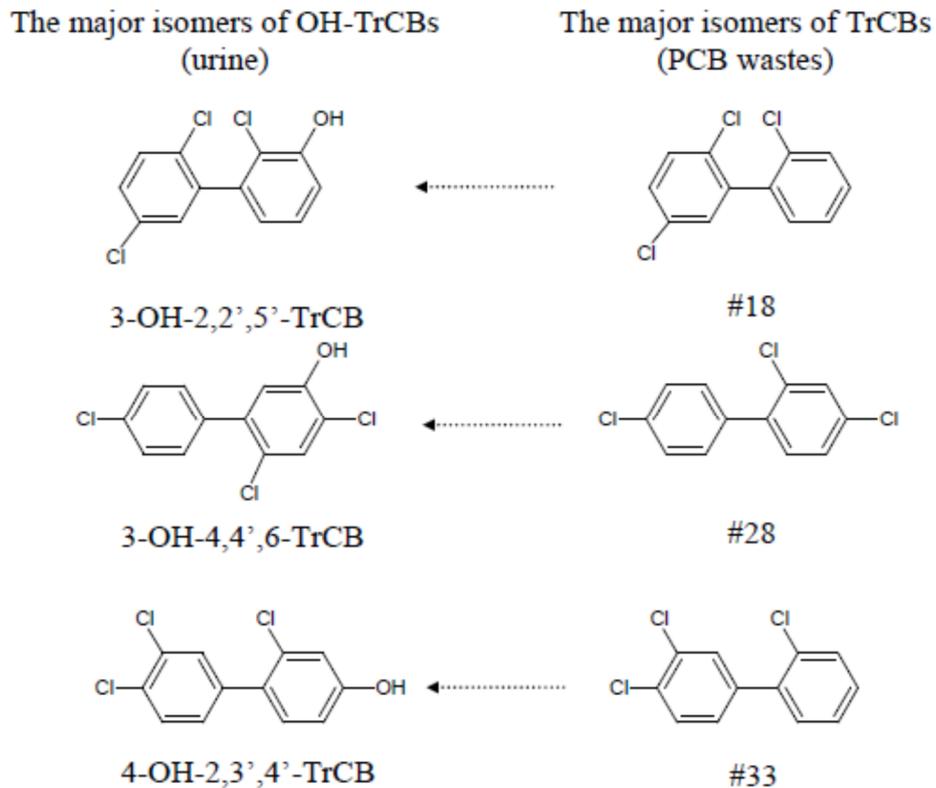


図 3-15 尿中の主要な OH-TrCBs と PCBs 廃棄物中の主要な TrCBs

### 3-3-5 まとめ

ヒト尿中の OH-PCBs をグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体のものも含めて迅速かつ高感度に測定する方法を開発した。この方法を用いて、PCBs 作業従事者 3 人及び PCBs 研究者 2 人を対象に尿中の OH-PCBs の尿中濃度を測定することにより、体内の OH-PCBs の汚染状況を把握することを試みた。

PCBs 研究者 2 人の尿中 OH-PCBs 濃度には約 10 倍の差がみられ、最大濃度は 0.24  $\mu\text{g/g-Cre}$  であった。2 人の年齢が 15 歳離れていることから、これまでに体内に蓄積された PCBs の量の違いによってこの濃度差が生じたものと考えられた。このことは、一時的な PCBs の曝露がない日常生活においても、尿中の OH-PCBs を測定することにより、被験者体内の PCBs 及び OH-PCBs の汚染状況やこれまでの PCBs 曝露量を把握できることを示唆している。また、PCBs の大気中濃度が  $700 \text{ ng/m}^3$  の PCBs 保管庫内に入った 16 時間後に OH-PCBs の尿中濃度が上昇したことから、PCBs の吸気曝露による影響が現れたと推測された。PCBs 作業従事者 3 人からは、PCBs 研究者よりも数倍～数百倍高い  $0.77\sim 19 \mu\text{g/g-Cre}$  の OH-PCBs が検出され、PCBs 廃棄物を取り扱う作業を行った 18～27 時間後に

濃度上昇がみられた。この濃度上昇の原因は、現場でカメラ撮影やメモの作成を行うために作業従事者が手袋の脱着を繰り返していたことから、この際に手袋に付着した PCBs が手などの皮膚にふれることによる経皮曝露によるものと推測された。作業従事者には、作業中に手袋を外さないよう助言した。尿から主に検出された OH-PCBs は 2 塩素体と 3 塩素体であり、なかでも 3 塩素体の主な異性体が 3-OH-2,2',5'-TrCB、3-OH-4,4',6'-TrCB 及び 4-OH-2,3',4'-TrCB の 3 つであったことから、この 3 つの OH-TrCBs が PCBs 曝露や体内の OH-PCBs 汚染状況を把握するための指標となる可能性が示唆された。

本研究により、尿中の OH-PCBs は、PCBs の曝露のない状態においても個人差があることが確認できた。また、一時的に PCBs の吸気曝露や経皮曝露があった際には、十数時間後に OH-PCBs の尿中濃度が上昇することも確認した。このことから、尿中の OH-PCBs の測定が、PCBs の曝露や体内の汚染状況を評価するのに有効であると考えられる。

今後は、尿と血液中の OH-PCBs の濃度関係を明らかにすることにより、尿から体内の汚染状況をより詳細に評価することが可能になると考えられる。

### 3-4 まとめ

本章では、OH-PCBs の環境リスクを評価することを目的として研究を行った。3-2 節では、環境中の OH-PCBs の汚染実態として、これまで報告例のない大気汚染状況、古紙再生工場の排水による環境影響、そして PCBs 濃度が県下で最も高い河川底質の 3 つについて調査した。また、3-3 節では、OH-PCBs のヒト体内の汚染状況を把握するため、血液よりも採取が容易な尿を用いて PCBs 作業従事者と PCBs 研究者を対象に調査した。

3-2 節の調査結果から、大気中の OH-PCBs の高感度の分析方法を開発したことにより、神戸市の大気から 1 塩素体及び 2 塩素体を主とした OH-PCBs が 1.1~2.1 pg/m<sup>3</sup> の濃度で検出され、PCBs の 1%程度の濃度で存在していることが分かった。

古紙再生工場の排水による OH-PCBs の環境汚染については、揖保川を対象に調査を行ったが、古紙再生工場から揖保川に流れ出た 1 及び 2 塩素体の OH-PCBs は、ほとんど底質に蓄積されず、排水に含まれる PCBs が底質に蓄積し、それらが底質中の微生物等により OH-PCBs へと代謝分解されたものが底質に蓄積していると考えられた。

県下で最も高濃度の PCBs が検出されている左門殿川の底質からは、PCBs の約 10%に相当する 151 ng/g-dry の OH-PCBs が検出され、大阪府内の河川底質の最大濃度と同程度の汚染度であることが分かった。これらの結果から、底質については、PCBs の汚染度が高い地域での OH-PCBs の汚染状況を監視する必要があることが判明した。

さらに、3-3 節の調査結果から、開発したヒト尿中の OH-PCBs の高感度分析方法により、PCBs の曝露のない状態において尿中の OH-PCBs の個人差を確認することができた。また、一時的に PCBs の吸気曝露や経皮曝露があった際には、十数時間後に OH-PCBs の尿中濃度が上昇することを確認した。このことから、曝露した PCBs がヒト体内の P450 により

OH-PCBsに代謝され、尿から排泄されていることが分った。一方、排泄されなかったOH-PCBsは、体内汚染に関与していることが推測できたことから、尿中のOH-PCBsの測定は、OH-PCBsの体内汚染状況を評価するのに有効である事が判明した。特に、PCBsの曝露リスクの高い状況で作業を行うPCBs作業従事者やPCBs研究者などは、PCBsの曝露状況を頻繁に確認することが必要であるため、今後は簡便かつ迅速な本方法によるリスク評価が有効であると考えられる。

OH-PCBsについては、現在の所環境調査や生体調査例が多いとはいえない状況のため、今後もより多くのデータを蓄積することが必要である。今後は、本研究で開発した大気や尿の分析方法を用いる事により、より詳細なOH-PCBsによる環境汚染の実態やヒト等の生体内の汚染状況の解明が進められることが期待される。

## 参考文献

- Anderson, P. N. and R. A. Hites (1996) OH radical reactions: the major removal pathway for polychlorinated biphenyls from the atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1756–1763
- Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, et al. (1995) Metabolism of highly persistent PCB congener, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 455–460
- Bergman A, Larsen G L, Bakke J E (1982) Biliary secretion, retention and excretion of five <sup>14</sup>C-labelled polychlorinated biphenyls in the rat. *Chemosphere* 11: 249-253.
- Bloch W D, Cornish H H (1959) Metabolism of biphenyl and 4-chlorobiphenyl in the rabbit. *J. Biol. Chem.* 234: 3301–3302
- Darling C, Alae M, Campbell L, Pacepavicius G, Ueno D, Muir D (2004) Hydroxylated PCBs in abiotic environmental matrices: Precipitation and surface waters. *Organohalogen Compd* 66:1470–1475
- Ezaki T, Yonekubo J, Suzuki M, Matsumura C, Nakano T (2010) Development of Low Level Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl (OH-PCBs) Analytical Method in Human Blood with UPLC/Q-ToF MS *Organohalogen Compd* 72:1617–1620
- Fångström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P, Bergman (2002) Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ Health Perspect* 110:895-899
- Gardner, A. M., Chen, J. T., Roach, J. A. G., et al. (1973) Polychlorinated biphenyls: Hydroxylated urinary metabolites of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl identified in rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 1377–1384
- Haraguchi, K., Kato, Y., Masuda, Y., et al. (1997) Metabolism of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl via sulphurcontaining pathway in rat: liver-specific retention of methylsulphonyl metabolite. *Xenobiotica* 27: 831–842
- Haraguchi, K., Kato, Y., Masuda, Y., et al. (1998) Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rats: Identification of metabolites with tissue affinity. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 1508–1515
- Ishida C, Koga N, Hanioka N, SAEKI HK, Yoshimura H (1991) Metabolism in vitro of 3, 4, 3', 4'- and 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyls by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn* 14: 276–284
- Kaminsky LS, Kennedy MW, Adams SM, Guengerich FP (1981) Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry* 20:7379–7384

- Kitamura S, Jinno N, Suzuki T, Sugihara K, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N (2005) Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 208: 377-387
- Klasson-Wehler, E., Bergman, A., Brandt, I., et al. (1989) 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl: Excretion and tissue retention of hydroxylated metabolites in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 17: 441-448
- Koga N, Beppu M, Ishida C, et al (1989) Further studies on metabolism in vivo of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats: identification of minor metabolites in rat faeces. *Xenobiotica* 19: 1307-1318
- Koga N, Shin'yama A, Ishida C, Hanioka N, Yoshimura H. (1992) A new metabolite of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rat feces. *Chem. Pharm. Bull* 40: 3338-3339
- Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H (1994) Metabolism of 3, 5, 3', 5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica* 24: 775-783
- Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H (1996) Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 685-688
- Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K, and Yoshimura H (1998a) Metabolism of 2, 3', 4', 5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere* 37, 1895-1904
- Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S, Yoshimura H (1998b) Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 60: 898-903
- Mandalakis M, Berresheim H, Stephanou E G (2003) Direct evidence for destruction of polychlorobiphenyls by OH radicals in the subtropical troposphere. *Environ. Sci. Technol.* 37; 542-547
- Marte B, Anne SM, Morten S, Janneche US, Augustine A (2009) Estrogenic Effects of Selected Hydroxy Polychlorinated Biphenyl Congeners in Primary Culture of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hepatocytes. *Arch Environ Contam Toxicol* 56:111-122
- Matsusue K, Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, and Yoshimura H (1996) Involvement of cytochrome b5 in the metabolism of tetrachlorobiphenyls catalyzed by CYP2B1 and CYP1A1. *Chemosphere* 32, 517-523
- Matthews H B, Anderson M W (1975) Effect of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls. *Drug Metab. Dispos* 3: 371-380

- Nanba S, Hara A, Shiki Y, Matuda M, Kawano M, Morita M (2008) Hydroxylated PCBs; Its detection in water samples and suspected sources. *17th Symposium on Environmental Chemistry Programs and Abstracts*: 470-471
- Okumura T (2003) Determination of Hydroxy Polychlorinated Biphenyls in Sediment and Fish Samples by GC/MS. *12th Symposium on Environmental Chemistry Programs and Abstracts*: 212-213
- Sakiyama T, Yamamoto A, Kakutani N, Fukuyama J, Okumura T (2007) Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls(OH-PCBs) in the Aquatic Environment: Levels and Congener Profiles in Sediments from Osaka, Japan. *Organohalogen Compd* 69:1380–1383
- Sipes I G, McKelvie D H, Collins R (1979) Excretion of hexachlorobiphenyls and 2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexabromobiphenyl in the dog. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48, A155
- Stadnicki, S. S., Allen, J. R. (1979) Toxicity of 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites, 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-3, 4-oxide and 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol to cultured cells in vitro. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 23, 788–796
- Suzuki M, Okuno T, Matsumura C, Sato N, Yonekubo J, Ezaki T, Inoue Y, Imaishi H, Nakano T (2011) Development of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl (OH-PCBs) Analytical Method in Human Urine with UPLC/Q-TOF MS. *Organohalogen Compd* 73: 1215–1218
- Suzuki M, Matsumura C, Nakano T (2008) Influence on the Air Concentrations of POPs by Asian Dust transported to Hyogo. *Proceedings of Hyogo Prefectural Institute of Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences* 5: 75–83
- Totten L A, Eisenreich S J, Brunciak P A (2002) Evidence for destruction of PCBs by the OH radical in urban atmospheres. *Chemosphere* 47: 735-746
- Tsurukawa M, Suzuki M, Takemine S, Matsumura C, Nakano T, Matsumoto D, Kondo A, Kaga A (2009) The levels of Dioxins and PCBs in ambient air and the attempt of predicting the concentration by numerical simulation technique. *Organohalogen Compd* 71:2016-2021
- Ueno D, Darling C, Alaei M, Campbell L, Pacepavicius G, Teixeira C, Muir D (2007) Detection of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Abiotic Environment: Surface Water and Precipitation from Ontario, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 41: 1841-1848
- Yamamoto H, Yoshimura H. (1973) Metabolic studies on polychlorinated biphenyl. III. Complete structure and acute toxicity of the metabolites of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chem. Pharm. Bull.* 21: 2237–2242

Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, et al (1987) Metabolism in vivo of 3, 4, 3',  
4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats.  
*Xenobiotica* 17: 897–910

## 第4章 有機フッ素化合物のリスク評価

### 4-1 諸言

1950年代に米国のデュポン社や3M社によって開発されたペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は、図4-1及び表4-1に示す構造及び物理化学的特性を持っており、界面活性及び熱・化学的安定性などの性質を有する。PFOS、PFOAなどの有機フッ素化合物 (PFCs) を原料としたフッ素樹脂は、強い撥水・撥油性を持つことから、繊維・紙・皮革製品の撥水 (防水)・撥油加工、調理器具焦付き防止コーティング剤及び半導体コーティング剤など幅広い分野で用いられてきた (USEPA 2000、Prevedourosら 2006)。しかし、3M社が工場労働者の血清中のPFOS濃度を測定した結果、PFOS濃度が通常人と比較して高濃度であることを公表すると共に、2002年にはその製造を中止したことを契機として、PFOSによる環境汚染問題が注目されるようになった。

PFOS及びPFOAは、その化学的また物理的特性から一般的な環境下では加水分解、光分解及び生物分解されることがなく、環境中に放出され続けた場合、環境中に蓄積し汚染が拡大し続ける (OECD 2002、Environmental Canada and Health Canada 2010)。特にPFOSは、難分解性、生物への高蓄積性、有害性及び世界規模の汚染が確認されたことから2009年にPOPsに追加され、一部の目的・用途を除いて製造・使用等が禁止されている。日本でも、PFOSは2010年4月に化審法第一種特定化学物質に登録され、特定用途以外での使用が禁止となった。一方、PFOAはPFOSより環境リスクは低いと考えられているものの、ヒトや環境の汚染が確認されており、国内外でPFOS同様に製造・使用を行わない措置がとられている。

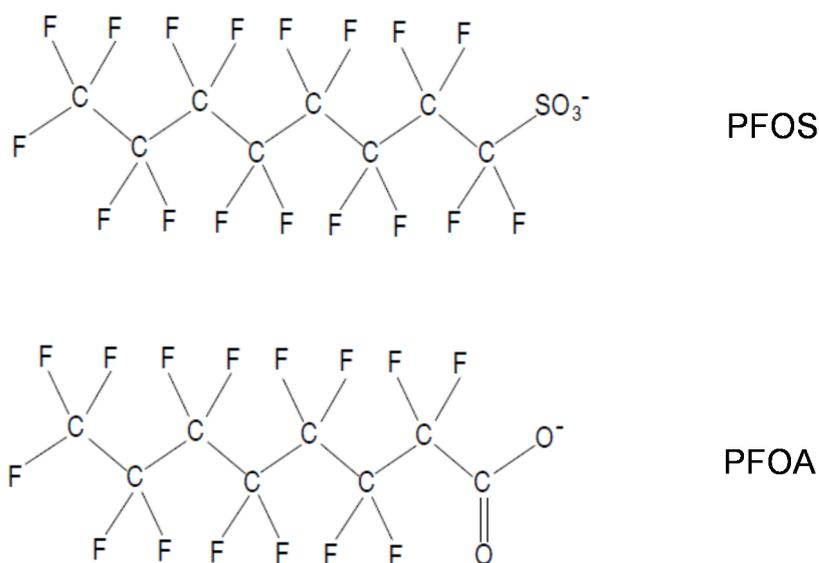


図4-1 PFOS及びPFOAの構造式

表 4-1 PFOS 及び PFOA の物理化学的性質

	分子量	沸点 (°C)	蒸気圧 (Pa)	水溶解度 (mg/L)	LogPow <sup>※3</sup>
PFOS	500.1	不明 (計算不可)	$3.31 \times 10^{-4}$ (20 °C) <sup>※1</sup>	570 (20±0.5 °C) <sup>※1</sup> 370 (精製水) <sup>※1</sup> 12.4 (海水) <sup>※1</sup>	5.25
PFOA	414.1	189-192 <sup>※1</sup>	$1.33 \times 10^3$ (25 °C) <sup>※2</sup>	3,400 (25 °C) <sup>※2</sup>	4.3

- 1) U.S. Environmental Protection Agency (USEPA)( 2005): Draft Risk Assessment of the Potential Human Health Effects Associated with Exposure to Perfluorooctanoic Acid and Its Salts. <http://www.epa.gov/>
- 2) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)(2002): Co-operation on Existing Chemicals Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (pfos) and Its Salts. <http://www.oecd.org/>
- 3) COMOthem model based on molecular structures による計算値

PFOS、PFOA の毒性については、ラットを用いた慢性毒性試験により、肝臓ガン、発達障害及び生殖障害が報告されている。また、妊婦の胎児仮死、微弱妊娠、軟産道強靭症といった妊娠期疾患のリスクが高くなること (EWG 2002) や、新生児の体重や頭周長を低下させることを示唆する結果が報告されている (中澤ら 2007)。このほかにも様々な有害性に関する報告があり、米国 EPA リスクアセスメント委員会報告書には、「ヒト発ガン性が示唆される」と記述されている。米国では、飲料水の PFOS の暫定基準は 200 ng/L と設定されており、PFOA は排出事業者に対する水質基準が 500 ng/L と設定されている。また英国では、飲料水の PFOS、PFOA の最大許容濃度はそれぞれ 300 ng/L、10,000 ng/L とされている。一方、日本では、2009 年 4 月 1 日に水道水質基準の「要検討項目」に PFOS 及び PFOA が新たに加えられたが、基準値は設定されておらず、必要な情報・知見の収集に努めていくべきものとされている。

PFOS 及び PFOA の使用が禁止された以降は、PFOS、PFOA の代わりに炭素鎖のより短いもの等が代替品として使用されている。PFOS、PFOA と炭素鎖が異なる同族体は、総称してそれぞれペルフルオロスルホン酸類 (PFASs)、ペルフルオロカルボン酸類 (PFCAs) と呼ばれている。一般的に、PFASs 及び PFCAs は、炭素鎖長が短いほうが体内での半減期が短く (Kudo ら 2001)、生物蓄積性が低く (Conder ら 2008)、毒性が弱い (Liu ら 2008) といわれているが、PFASs 及び PFCAs の毒性や環境影響等の調査は、ようやくここ数年

で始められたところである。兵庫県における PFASs 及び PFCAs の環境汚染の実態については、我々と共同研究を行った竹峰ら（2014）が報告している。

また、PFCs の環境リスクを調査する上で、フッ素テロマーアルコール（FTOHs）についても考慮する必要がある。FTOHs は、防汚、撥油及び撥水剤の製造に用いられ、それ自身もコーティング剤として世界中で使用されている。この FTOHs は、環境中での加水分解や生物代謝によって最終的に PFCAs になることが知られている。PFCAs がほとんど揮発しないのに対して FTOHs は揮発性があることから、PFCAs の汚染の拡散に大きく関わっているといわれている。この FTOHs についても環境調査が近年進められているが、ヒト体内での挙動については不明である。

本研究では、まず、4-2 節では兵庫県下の PFASs 及び PFCAs の環境汚染の実態について記述する。4-3 節では、遺伝子組換えヒト P450 を用いた代謝実験により、FTOHs のヒトによる代謝の有無を確認した結果を示す。4-4 節では、ヒト尿中の PFASs、PFCAs 及び FTOHs を測定することで、これらの PFCs のヒト体内の汚染状況を確認した結果を示す。最後に、4-5 節において、これらの調査結果から得られた PFCs の環境リスクについて示す。

## 4-2 PFCs の兵庫県下における環境汚染の実態調査

### 4-2-1 はじめに

環境中の PFCs に関する調査研究は近年数多く報告されている。特に、PFCSs 及び PFCAs は親水性が高いことから、環境水を対象とした調査が主に行われている（Ahrens et al 2009a, Ahrens et al 2009b, Li et al 2011, McLachlan et al 2007, Murakami et al 008, Rostkowski et al 2006, Saito et al 2004, Sakurai et al 2010, Skutlarek et al 2006, So et al 2004, So et al 2007, Yamashita et al 2004, Yamashita et al 2008, Zushi et al 2011）。環境水中の PFCs 濃度が高くなるのは、PFCs 製品の廃棄（Oliaei et al 2013, Weber et al 2013）や下水処理場からの排水（Ahrens et al 2009b）が原因であると報告されている。PFOA が使用されていた当時には、フッ素樹脂メーカーの排水が流入する下水処理場から PFOA が 67,000 ng/L と極めて高い濃度で検出され（Harada ら 2003）、フッ素樹脂メーカーの事業所内及びその近辺の井戸からも極めて高濃度の PFOA が検出されている（Saito ら 2004）。

兵庫県を含む京阪神地域では、PFCs の中でも特に PFOA の汚染が数多く報告されている（Harada et al 2005, 2006, 2007, Karrman et al 2009, Saito et al 2004, Takagi et al 2008, Oono et al 2008a, 2008b）。しかしながら、これらは主にフッ素樹脂メーカーからの排水による PFOA の高濃度汚染が確認された淀川下流域を中心としたものであり、兵庫県全域や大阪湾や播磨沖などの海域の汚染状況については明らかにされていない。

また、現在、国内のフッ素樹脂メーカーは、PFOA やその前駆体である 8:2FTOH、更に炭素鎖の長い PFCA s の排出を米国 EPA・2010/15 PFOA 管理責任プログラムに基づいて削減しており、炭素鎖が PFOA より 2 つ短いペルフルオロヘキサン酸 (PFHxA) などへの転換が進められている (USEPA 2006、Daikin 2007)。そのため、この転換が環境にどのような変化をもたらしているかを把握することが必要と考えられる。

本節では、Takemine ら (2014) が我々と共に行った兵庫県の河川及び沿岸域を対象とした PFASs 及び PFCA s の環境汚染の実態調査の結果について述べる。

#### 4-2-2 兵庫県における PFCA s の環境汚染の実態調査結果について

調査した地点は図 4-2 に示す河川 41 地点及び海域 38 地点であり、3 種類の PFASs (炭素鎖 4、6 及び 8) と 9 種類の PFCA s (炭素鎖 4、5、6、7、8、9、10、11 及び 12) を測定した。調査の結果、河川水中濃度は表 4-2 に示すとおりであり、PFOS が不検出 (<1.0 ng/L) ~97 ng/L、PFOA が不検出 (<0.5 ng/L) ~360 ng/L の範囲で検出されたが、いずれも過去に国内外で確認された範囲内の濃度であった (Saito ら 2004、So ら 2007、Li ら 2011、Skutlarek ら 2006、Rostkowski ら 2006、McLachla ら 2007、Zushi ら 2011)。PFOA は、約 9 割の地点から検出された、検出地点としては最も多かった。一方、測定地点中で最も濃度が高かったのは炭素鎖 6 の PFHxA であり、辰巳橋 (地点 41) から 16,000 ng/L で検出された。地点 41 は、PFOA も 140 ng/L と高濃度で検出された。この理由としては、観測地点の上流にあるフッ素樹脂メーカーの工場から流出した排水が、下水処理場を介して河川に流れ込んでいるためと考えられる。過去の調査結果からも、本地点からは 1270 ng/L の PFOA が検出されている (Saito ら 2004)。上流の工場では PFOA の使用を 2012 年末に止め、PFHxA へと転換された。PFOA の濃度がおよそ 10 分の 1 に減少していることや、PFHxA が高濃度で検出されたことは、工場での PFOA から PFHxA への転換による結果が反映されたものと考えられる。

河川流量から算出した地点 41 の PFHxA の総量は 29,000 kg/y である。これは、欧州の 14 主要河川の 2800 kg/y (McLachlan ら 2007) や、東京湾に流れ出る 6 河川の 30.2 kg/y (Zushi ら 2011) と比べてはるかに多い。PFOA の濃度が 360 ng/L と最も高かった地点 7 からは、炭素鎖 4~12 の PFCA s が検出された。地点 7 の上流には、フッ素ポリマー撥水撥油剤を使ったテキスタイル加工の工場があるため、そこからの排水の影響が現れたと考えられる。L-PFOS が最も高かったのは地点 4 であり、Yoshida ら (2007) と同様に排水路を通った雨水の影響によるものと考えられたが、汚染源は特定できていない。

また、地点 2、11、14 及び 27 では、炭素鎖 9 の PFNA の濃度が PFOA よりも高かった。Murakami ら (2008) 及び McLachlan ら (2007) によると、日本の主要河川における PFNA の汚染量はヨーロッパの主要河川よりも多い。また、Prevedouros ら (2006) によると、日本ではパーフルオロノナン酸アンモニウムが多く製造されていることから、これが汚染原因となっていると考えられる。

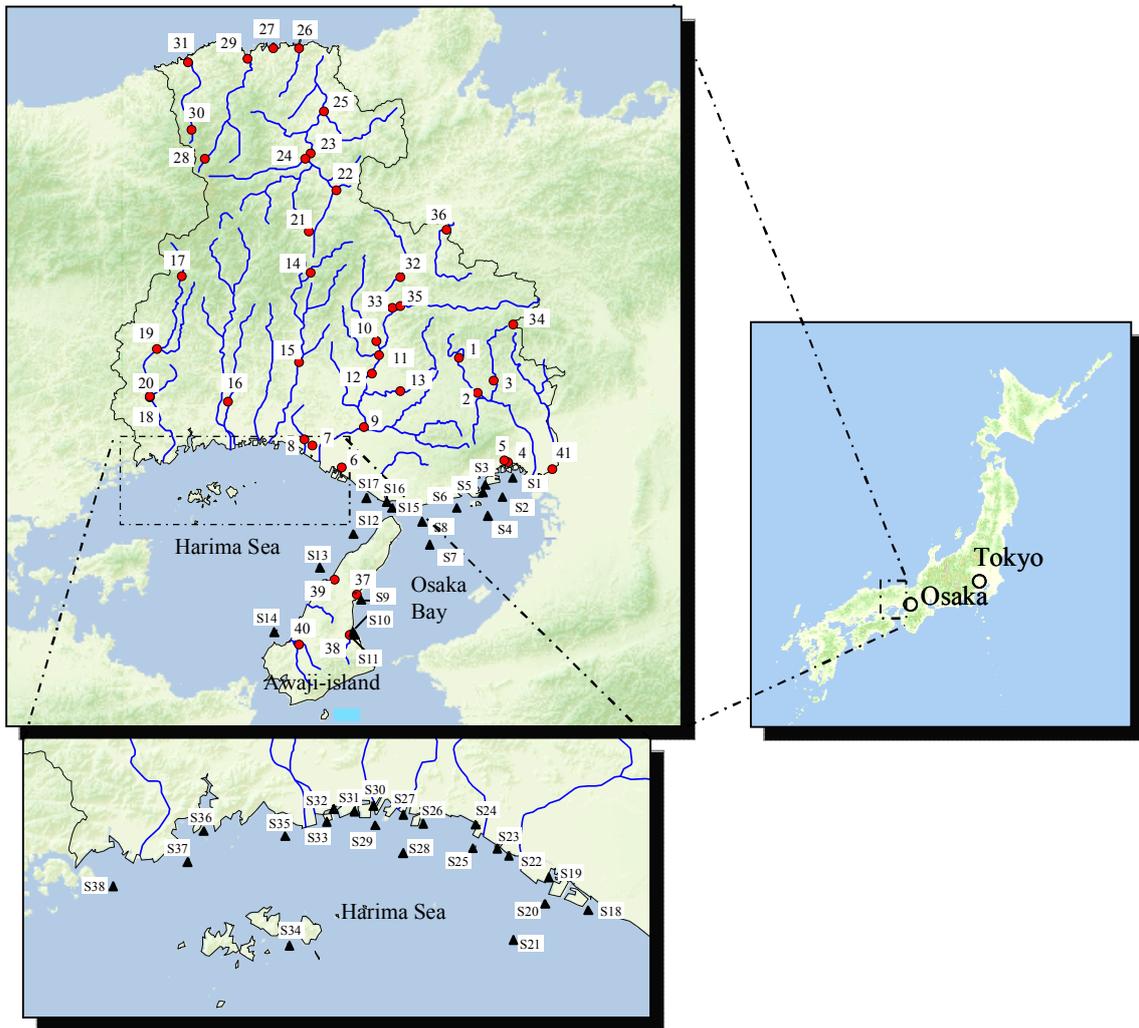


図 4-2 河川水及び海水のサンプリング地点

表4-2 兵庫県内のPFCAs及びPFASsの河川水中濃度

地点番号	河川	地点	濃度 [ng/L]															年平均流量 [m <sup>3</sup> /sec]	ΣPFCA's 推定流出量 [kg/year]
			PFCA's					PFAS's					ΣPFCA's						
			PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	L-PeBS		L-PHxS	L-PFOS				
1	武庫川上流	大橋	<1.5	<1.5	ND	<1.5	2.3	2.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9.1	1.17	0.336	
2	武庫川中流	三田大橋	13	6.3	6.9	4.6	11	28	<1.5	13	ND	ND	ND	ND	ND	95.3	1.26	3.79	
3	羽束川	神戸市墨ヶ池	<1.5	<1.5	ND	<1.5	2.0	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.0	0.803	0.203	
4	宮川	宮川橋	4.3	2.5	3.8	4.9	31	5.3	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	4.0	162.7	0.0573	0.294	
5	芦屋川	粟平橋	<1.5	ND	ND	<1.5	8.2	2.4	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15.1	0.162	0.0771	
6	響瀬川	野添橋	3.4	3.7	3.6	4.2	20	9.9	5.8	3.8	ND	ND	ND	ND	4.4	58.8	0.161	0.299	
7	法華山谷川	千鳥大橋	5.4	12	14	27	360	39	47	39	4.1	ND	ND	ND	<3.0	550.5	1.93	33.5	
8	天川	日笠砂道橋	ND	ND	6.0	2.5	10	5.5	2.8	2.8	ND	ND	ND	ND	<3.0	29.8	2.19	2.06	
9	美濃川	美濃川橋	6.4	6.4	2.7	3.2	33	3.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	49	105.7	2.47	8.23	
10	杉原川	番日橋	<1.5	<1.5	ND	<1.5	5.0	2.5	ND	ND	ND	ND	ND	<3.0	15.0	2.28	1.08		
11	野間川	岩井橋	<1.5	<1.5	ND	<1.5	3.3	4.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.3	1.58	0.613		
12	千鳥川	平安橋	3.9	2.2	<1.5	2.1	11	3.1	<1.5	ND	ND	ND	ND	<3.0	28.3	0.39	0.348		
13	東条川	水鏡橋	4.6	1.9	<1.5	2.0	5.9	3.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	20.9	0.951	0.627		
14	市川上流	真弓橋	ND	<1.5	ND	ND	ND	2.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.8	1.63	0.195		
15	市川上流	神崎橋	ND	3.3	3.5	<1.5	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.3	7.08	2.30		
16	林田川	中井橋	<1.5	<1.5	ND	<1.5	3.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.5	0.923	0.218		
17	千種川上流	釜橋	ND	ND	<1.5	<1.5	3.1	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	7.6	4.68	1.12		
18	千種川下流	隈見橋	ND	<1.5	<1.5	<1.5	3.5	1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	11.0	7.89	2.74		
19	志文川	坂田橋	ND	<1.5	<1.5	<1.5	2.0	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	6.5	1.65	0.338		
20	鞍馬川	建武橋	<1.5	<1.5	1.5	<1.5	3.3	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	10.8	0.597	0.203		
21	円山川上流	多々良木橋	ND	<1.5	1.5	<1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.0	4.83	0.914		
22	円山川上流	玉置橋	1.9	<1.5	2.0	<1.5	2.9	<1.5	2.0	<1.5	ND	ND	ND	ND	11.3	10.4	3.71		
23	円山川上流	上小田橋	2.7	1.8	ND	<1.5	3.5	2.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.2	55.7	21.4		
24	八木川	藤原橋	1.8	<1.5	<1.5	<1.5	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.0	14.6	3.68		
25	出石川	天神橋	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.6	9.70	2.32		
26	竹野川	竹野新橋	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.5	4.36	0.206		
27	佐津川	佐津川橋	ND	<1.5	ND	<1.5	<1.5	2.3	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	8.3	5.90	1.54		
28	矢田川上流	細野橋	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0	1.64	0.000		
29	矢田川下流	油良橋	ND	<1.5	ND	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.0	20.1	1.90		
30	岸田川上流	花口橋(帯橋)	ND	<1.5	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.0	1.45	0.137		
31	岸田川下流	清富橋	ND	<1.5	<1.5	<1.5	3.4	2.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.1	11.6	3.69		
32	加古川上流	錦橋	ND	<1.5	<1.5	<1.5	2.1	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.1	9.76	2.49		
33	加古川上流	井原橋	1.6	<1.5	<1.5	<1.5	3.0	<1.5	ND	<1.5	<1.5	ND	ND	ND	13.6	18.0	7.72		
34	羽束川	坂下橋	<1.5	<1.5	ND	<1.5	5.5	<1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	<3.0	13.0	0.373	0.153		
35	篠山川	山崎橋	<1.5	<1.5	1.7	<1.5	4.4	<1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	16.6	9.09	4.76		
36	竹田川	灰田橋	5.5	16	11	2.4	6.4	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	42.8	3.86	5.21		
37	赤沢川	赤沢橋	3.4	ND	4.3	3.7	39	5.1	4.0	3.7	ND	ND	ND	3.1	66.3	0.148	0.309		
38	洲本川	瀬橋	2.8	ND	6.5	2.9	1.9	1.5	2.7	ND	ND	ND	ND	3.1	38.5	4.78	5.80		
39	郡家川	上水源取水口	3.6	ND	3.3	2.6	23	1.6	2.8	2.8	ND	ND	ND	ND	36.9	0.108	0.126		
40	三原川	脇田橋	2.2	ND	2.8	ND	13	<1.5	ND	2.6	ND	ND	ND	<3.0	25.1	0.241	0.191		
41	左門殿川	辰巳橋	18	6.4	16000	3.3	140	6.3	3.1	3.3	ND	ND	ND	<3.0	16186.7	56.9	29000		
		最大濃度	18	16	16000	27	360	39	47	39	4.1	49	8.4	97	16186.7	56.9	29000		
		検出数	27	33	27	36	37	29	19	7	2	3	2	11					

大阪湾及び播磨沖の PFASs 及び PFCAs 濃度は表 4-3 に示すとおりであり、Ahrens ら (2010) や Wei (2007) によって明らかになった海洋の PFCs 濃度レベル (1pg/L から 10 pg/L) と比べて約 1000 倍以上も高濃度であり、So ら (2004) の調査による沿岸沖での濃度と同レベルであった。PFOA はほとんどの地点から検出され、その最大濃度は 38 ng/L であった。一方 PFHxA は、1.5~510 ng/L の範囲で全ての地点から検出された。特に PFHxA 濃度が高かったのは大阪湾の内湾部であった。河川で最も PFHxA の濃度が高かったのは、左門殿川の河口付近であった。図 4-3 は、地点 S1~S11 の PFHxA 濃度と左門殿川の河口からの距離との相関を示したものである。河口から離れるに従い、PFHxA の濃度が小さくなる傾向がみられ、海域に流れ出た河川水が海水によって希釈されていることが分かる。

表 4-3 兵庫県内の PFCAs 及び PFASs の海水中濃度

地点番号	海域	濃度 [ng/L]											
		PFCAs								PFASs			
		PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFBS	PFHxS	PFOS
S1	大阪湾	2.0	1.6	510	1.8	12	2.0	<1.5	ND	ND	ND	ND	<3.0
S2	大阪湾	1.7	<1.5	300	<1.5	9.0	1.5	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND
S3	大阪湾	1.7	<1.5	240	<1.5	7.2	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	<3.0
S4	大阪湾	<1.5	<1.5	81	<1.5	3.3	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S5	大阪湾	<1.5	<1.5	190	<1.5	5.7	<1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND
S6	大阪湾	<1.5	<1.5	120	<1.5	4.1	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S7	大阪湾	ND	ND	19	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	<3.0	ND	ND
S8	大阪湾	ND	ND	17	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S9	淡路島東部 (大阪湾)	<1.5	<1.5	25	<1.5	2.4	ND	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND
S10	淡路島東部 (大阪湾)	ND	ND	27	ND	2.0	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S11	淡路島東部 (大阪湾)	<1.5	ND	25	ND	1.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S12	淡路島西部 (播磨灘)	ND	ND	27	ND	1.7	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S13	淡路島西部 (播磨灘)	<1.5	<1.5	29	<1.5	1.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S14	淡路島西部 (播磨灘)	ND	<1.5	1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S15	播磨灘	ND	ND	16	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S16	播磨灘	ND	ND	21	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S17	播磨灘	ND	ND	15	ND	1.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S18	播磨灘	ND	ND	13	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S19	播磨灘	ND	ND	13	ND	2.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S20	播磨灘	ND	ND	12	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S21	播磨灘	ND	ND	11	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S22	播磨灘	ND	ND	13	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S23	播磨灘	ND	ND	13	ND	1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S24	播磨灘	<1.5	<1.5	8.7	<1.5	5.3	1.7	<1.5	<1.5	ND	ND	ND	ND
S25	播磨灘	ND	ND	11	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S26	播磨灘	ND	ND	11	ND	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S27	播磨灘	ND	ND	12	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S28	播磨灘	ND	ND	11	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S29	播磨灘	ND	4.1	14	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S30	播磨灘	ND	<1.5	13	<1.5	1.7	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S31	播磨灘	ND	ND	10	ND	1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S32	播磨灘	ND	ND	10	ND	2.0	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S33	播磨灘	ND	<1.5	10	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S34	播磨灘	ND	ND	14	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S35	播磨灘	ND	ND	10	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S36	播磨灘	<1.5	ND	16	ND	1.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S37	播磨灘	ND	ND	9.6	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S38	播磨灘	ND	ND	7.7	ND	<1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	最大濃度	2	4.1	510	1.8	12	2	-	-	-	-	-	-
	検出数	11	13	38	11	37	11	3	3	0	1	0	2

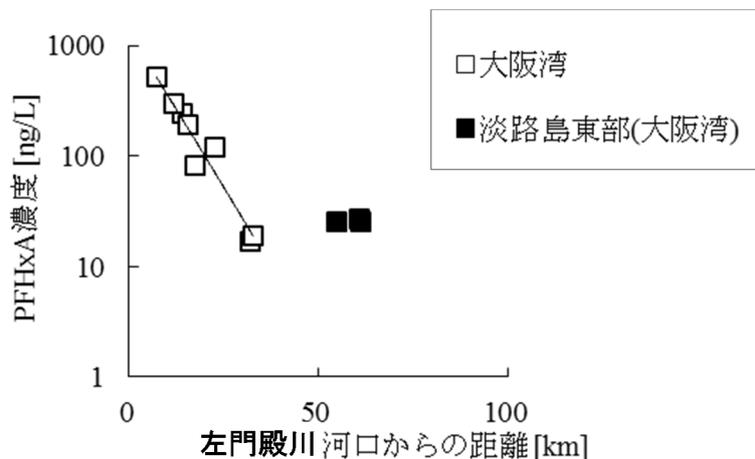


図 4-3 PFHxA の海水中濃度と左門殿川河口からの距離との相関  
大阪湾 (S1-8) の決定係数  $r^2=0.94$  ( $p<0.001$ )

予測環境中濃度 (PEC : Predicted Environmental Concentration) の予測無影響濃度 (PNEC : Predicted No-Effect Concentration) に対する比 (ハザード比 ; HR) に基づき (横溝 2010)、PFOS、PFOA 及び PFHxA のリスク評価を行った。予測環境中濃度は、対象の化学物質が環境中に存在する濃度の予測値で、モニタリング調査の結果や化学物質の環境中動態モデルを用いて計算される。PNEC は毒性試験で求められる  $LC_{50}$ 、 $EC_{50}$  及び  $NOEC$  などに安全係数を掛け合わせたものである。ハザード比が 1 以上の場合は、リスクが懸念されるレベルであると見なされる。PFOS 及び PFOA の河川の生態系に対する無影響濃度予測値 (PNEC) は、それぞれ 610 ng/L 及び 20,000 ng/L と報告されている (Qi ら 2011、Ward T ら 1995a、1995b)。PFHxA は PNEC が不明であったため、Latala ら (2009) による藻類の急性毒性  $EC_{50}=3.18$  mM ( $\approx 10^9$  ng/L) に安全係数 1000 で除した  $10^6$  ng/L を PNEC とした。本調査において検出された PFOS、PFOA の及び PFHxA のそれぞれの最大濃度は 97 ng/L、360 ng/L 及び 16,000 ng/L であり、これらを PNEC で除して算出したハザード比は、それぞれ 0.16、0.018 及び 0.016 であった。よって、PFOS、PFOA 及び PFHxA のハザード比は、全て 1 未満であることから、生態系へのリスクはそれほど深刻ではないと考えられる。

### 4-3 ヒト P450 による FTOHs の代謝物の確認

#### 4-3-1 はじめに

PFCAs の前駆体である FTOHs は、一般的に  $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  の骨格構造をもつ短鎖重合体であり、防汚、撥油、撥水剤の製造に用いられるとともに、それら自身もコーティング剤として使用される。炭素鎖が 10 の 8:2FTOH (図 4-4) は、これまで FTOHs の中で最も多く使用されており、環境中での加水分解、OH ラジカル反応及び生物代謝によって最終的に PFOA となることが知られている (David et al 2004)。この 8:2FTOH は揮発性が PFOA と比べて高いことから、8:2FTOH の大気を介した拡散が PFOA 汚染拡大に対する原因のひとつといわれている (Wallington ら 2006)。

FTOHs の環境汚染は、FTOHs 製品の使用時やフッ素テロマーの合成の際に環境中に FTOHs が放出されることが原因と考えられている。また、フッ素ポリマー製品中にも、未反応の FTOHs が不純物として混入しているため、製品の使用時に FTOHs が放出されている。さらに、フッ素ポリマーの加水分解によっても FTOHs が徐々に生成される事が知られている。FTOHs の大気中濃度の調査例をみると、神戸、大阪及び京都の京阪神地域では 8:2FTOHs が 57~2000 pg/m<sup>3</sup> で検出されており (Ono et al 2008)、日本全国の平均 133 pg/m<sup>3</sup> や北極、イギリス、ドイツ及び北アメリカなど諸外国の 7~240 pg/m<sup>3</sup> と比べても高い傾向がある (大野ら 2008、Berge 2005、Jahnke 2007、Shoeibi ら 2006、Stock ら 2004)。なお、大野ら (2008) の調査では、上記とは別に発生源周辺の大気から最大 2500 pg/m<sup>3</sup> の FTOHs が検出されている。

日本では FTOHs の法規制、環境基準は現在のところ設定されていない。しかし、PFOA に分解する 8:2FTOH については業界の自主的取り組みによって使用されなくなっている。現在では、8:2FTOH よりも炭素鎖の短い FTOHs として、例えば 6:2FTOH などが 8:2FTOH の代替として使用されている。

8:2FTOH の PFOA への代謝についてはいくつかの報告例がある。例えば Mary ら (2004) は、8:2FTOH が微生物によって最終的に PFOA に分解されることを報告している。また、工藤 (2006) 及び Kudo ら (2004) の研究では、8:2FTOH をラットやマウスへと投与すると、肝臓や血清から PFOA が検出される事を報告している。FTOHs の生分解経路は Dimetrov ら (2004) や Lange ら (2002) によって予想されている。また、FTOHs のラット中の CYP2E1 による代謝経路を Martin ら (2008) が報告している (図 4-5)。

本節では、8:2FTOH 及び 6:2FTOH のヒト体内での代謝の有無について、遺伝子組換えヒト P450 を用いて確認した結果を示す。



図 4-4 8:2-FTOH の構造式及び物理化学的特性

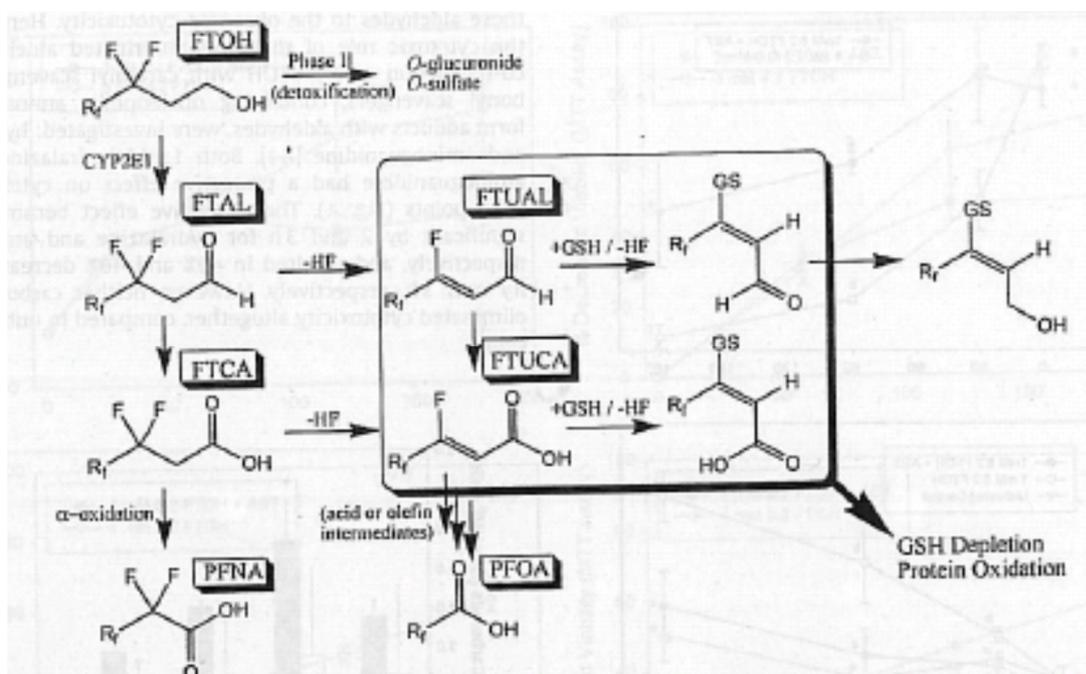


図 4-5 ラット CYP2E1 による FTOH の代謝経路 (Martin ら 2008)

#### 4-3-2 ヒト P450 の調製及び代謝物の測定方法

本研究で使用したヒト P450 分子種は、2-3-2 節と同様の方法で調整した hCYP1A1、hCYP 1A2、hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 の 4 種である。代謝実験のフローを図 4-6 に示す。10 mM の 8:2FTOH または 6:2FTOH (20  $\mu$ L) を hCYP1A1、hCYP 1A2、hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 を含む膜画分 500  $\mu$ L にそれぞれ添加し、pH7.4、37°C の条件下で 24 時間反応させた。また、対照実験として P450 を含まない膜画分 (pcw) も同様に反応させた。反応後は、2500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を Oasis WAX カートリッジカラムにより精製した。沈殿物は 1%アンモニア/メタノール溶液 5 mL を加えて超音波抽出を行った後、2500 rpm で 10 分間遠心分離し、クリーンアップ後の上清に加えて窒素ガス吹付により 1.5 mL に濃縮し測

定試料とした。測定試料は、4-2 節と同様に Acquity UPLC™ BEH カラム (C18、50 mm、2.1mm.i.d、1.7-mm particle size、Waters 社製) を接続した UPLC/MS/MS (Waters 社製) により PFOA 及び PFHxA の定量分析を行った。

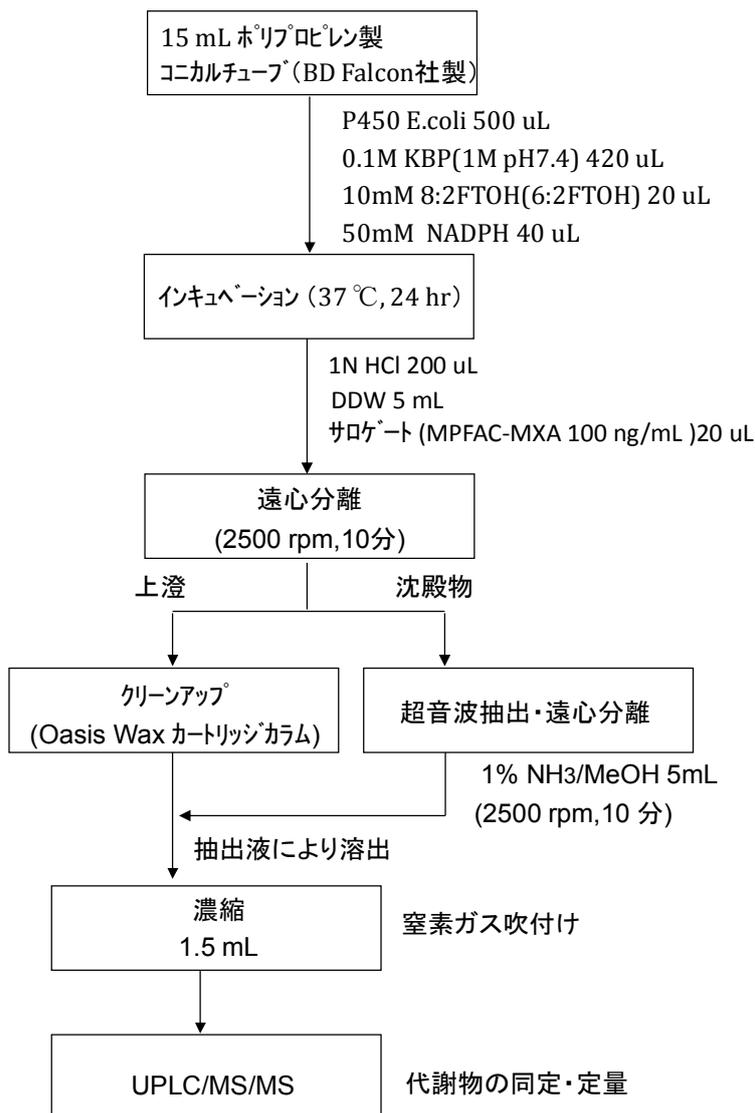


図 4-6 ヒト P450 を用いた FT0Hs の代謝実験フロー

### 4-3-3 結果及び考察

代謝実験の結果を表 4-5 に示す。8:2FTOH は、対照実験 (pcw) では PFOA が検出されなかったのに対し、hCYP1A1、1A2、2C9 及び 3A4 では 2.0~2.3 pmol の PFOA が検出された。PFOA の生成量については、hP450 の分子種による違いはほとんどみられなかった。それらの中でも、各 P450 を用いた代謝実験において最も生成量が多かったのは hCYP 2C9 であり、モル比で 8:2FTOH (200 nmol) のおよそ 0.002% であった。また、hCYP 1A2 及び hCYP 2C9 は、PFHxA がそれぞれ 0.24 pmol 及び 0.03 pmol 生成されていた。

一方、6:2FTOH を用いた実験では、PFHxA が hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 からそれぞれ 0.88 pmol 及び 0.07 pmol 検出された。PFHxA の生成量は、モル比で 6:2FTOH の添加量の 0.0004% 及び 0.000035% であり、8:2FTOH から PFOA が検出された量の半分以下であった。PFHxA より低炭素鎖長の PFCAs は、8:2FTOH 及び 6:2FTOH のいずれの実験からも検出されなかった。6:2FTOH による代謝物の生成量が 8:2FTOH よりも少なかった原因としては、6:2FTOH が 8:2FTOH よりも揮発性が高いため、代謝実験中の 6:2FTOH の揮発により P450 との反応が十分でなかった可能性がある。揮発性の高い FTOHs のような物質の代謝実験を良好に行うためには、小スケールの密閉容器を用いるなど実験系の改良が必要と思われる。また、FTOHs の P450 による代謝は脂肪酸の酸化反応であることから、アルコールの代謝を行う hCYP2E1 が主な代謝酵素であると考えられるが、本研究では hCYP2E1 を入手できなかった。そのため、今後の検討課題として hCYP2E1 の代謝実験も行う必要があると考えられる。

表 4-5 6:2FTOH 及び 8:2FTOH のヒト P450 による PFCAs の生成量

	P450	PFCAs生成量(pmol)	
		PFHxA	PFOA
6:2 FTOH	pcw	N.D	-
	1A1	N.D	-
	1A2	N.D	-
	2C9	0.88	-
	3A4	0.07	-
8:2 FTOH	pcw	N.D	N.D
	1A1	N.D	2.2
	1A2	0.24	2.0
	2C9	0.03	2.3
	3A4	N.D	2.0

(-): 未測定

#### 4-4 尿を用いたヒトの PFCs 曝露状況の確認

##### 4-4-1 はじめに

PFASs 及び PFCAs など PFCs のヒト体内の汚染状況については、血液、血清及び母乳を対象とした報告がある (Kannan ら 2004、Harada ら 2007、Karrman ら 2009、Apelberg ら 2007)。特に、大手フッ素樹脂メーカーによる PFOA の高濃度汚染があった大阪府では、2010 年に大阪府在勤の男女 44 名の血清中の PFCs 組成が調査され、PFOA 及び PFOS の濃度が依然として高いことが報告されている (安達ら 2010)。しかしながら、環境調査に比べるとヒト体内の汚染状況については報告例が少ない。その主な理由としては、一般人から血液などの生体試料を入手することが非常に困難であるためといえる。

そこで本研究では、PFCs の生体外排出経路のひとつと考えられ、入手が比較的容易な尿を検体として用い、尿中の PFCs 濃度を測定することにより、ヒト体内における PFCs の汚染状況を把握することとした。

##### 4-4-2 実験方法

測定対象の PFCs は、PFASs3 種 (炭素鎖 6、8 及び 10)、PFCAs10 種 (炭素鎖 5~14) 及び表 4-6 に示す 16 種の FTOHs とした。尿試料は、兵庫県在住の 30 代男性からスポット尿全量 116 g (尿試料 1) 及び 20 代から 60 代の男性 5 名から採取したスポット尿全量を混合した 484 g (尿試料 2) とした。試料 2 は、FTOHs を感度よく測定するために混合により試料量を増やした。また、参考として尿試料 2 を採取した 60 代男性の血液を 2009 年 5 月、7 月及び 9 月の計 3 回採取し、それぞれ 8000rpm で遠心分離した上澄みを血清試料とした。なお、試料は全てインフォームド・コンセントを行ったうえで採取した。

試料の前処理方法は、血液、血清及び肝臓を対象とした PFOS・PFOA の分析方法 (日本食品分析センター 2004) を参考にし、UPLC/MS/MS による定量分析条件は既報に従った (竹峰ら 2009)。測定時における分析対象化合物の回収率は、試料に添加したサロゲートから計算により求めた。FTOHs については、竹峰ら (2010) による液液抽出法及びパージ&トラップ法を用い、尿及び血清(1 g)についてそれぞれ分析した。

表 4-6 測定対象とした FTOHs

測定対象FTOHs	
1H,1H,2H,2H-Perfluorohexan-1- ol	4:2FTOH
1H,1H,2H,2H-Perfluorooctan-1- ol	6:2FTOH
1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol	8:2FTOH
1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-dodecanol	10:2FTOH
1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl acrylate	6:2FTAcrylate
1H,1H,2H,2H-Perfluorodectyl acrylate	8:2FTAcrylate
1H,1H,2H,2H-Perfluorodectyl methacrylate	8:2FTMethacrylate
1H,1H,2H-Perfluoro-1-decene	8:2FTOlefin
1H,1H,2H-Perfluoro-1-dodecene	10:2FTOlefin
1H,1H,2H-Perfluoro-1-tetradecene	12:2FTOlefin
1H,1H,2H,2H-Perfluorohexyl Iodide	4:2FTI
1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl Iodide	6:2FTI
1H,1H,2H,2H-Perfluorodectyl Iodide	8:2FTI
1H,1H,2H,2H-Perfluorododectyl Iodide	10:2FTI
Perfluorooctyl Iodide	PFOI
Perfluorododectyl Iodide	PFDoDI

#### 4-4-3 結果及び考察

60代の男性の血清試料から検出された PFASs 及び PFCAs を図 4-7 に示す。なお、サロゲートの回収率は、MPFCAs (<sup>13</sup>C-PFCAs) が 50~80%程度、MPFASs (<sup>13</sup>C-PFASs) が 20%程度でやや低い傾向にあったが、繰り返し精度はそれぞれ 10%程度で安定していた。2009年5月、7月及び9月に採取した3つの血清試料から検出された PFASs 及び PFCAs の濃度及び組成に違いはみられなかった。FTOHs は検出下限値が高かったものの、全て不検出 (<10 ng/g) であった。最も高濃度であった PFCs は PFOS であり、その濃度は 12000 ± 900 pg/g であった。PFCAs の中では、PFOA が最も高濃度 (5000 ± 700 pg/g) であった。一方、PFOA より炭素鎖が長い PFNA、PFDA 及び PFUnDA は 1000~2000 pg/g で検出された。また、PFOA より1つ炭素鎖が短い PFHpA や、PFOS よりも2つ炭素鎖が短い PFHxS が検出されたが、濃度はそれぞれ 270 ± 85 pg/g 及び 740 ± 160 pg/g であり、長炭素鎖のものとは比べて低濃度であった。その他は検出下限 (100 pg/g) 程度であり、ブランク試料と同程度であった。これらの濃度レベル及び組成は、安達ら (2010) や Karrman ら (2007) の研究結果と同様の傾向であった。

尿試料から検出された PFASs 及び PFCAs を図 4-8 に示す。なお、サロゲート回収率は、試料ごとにばらつきがみられたが、概ね 60%以上であった。尿試料 1 (30代男性) と尿試料 2 (20~60代男性 5人) は、ほぼ同様の濃度レベルであり、PFCAs が <1~26 pg/g、PFASs が <1~12 pg/g の範囲であった。Fair ら (2007) は、サウスカロライナ州やフロリダ州に生息するバンドウイルカの 2005年に採取した尿から 1000~1500 pg/g 程度の PFOS を検

出しているが、本調査結果のヒト尿中濃度はこれよりも百倍程度低かった。また、FTOHsは尿試料1及び2ともに全て不検出(試料1は<0.1 ng/g、試料2は <0.02 ng/g)であった。

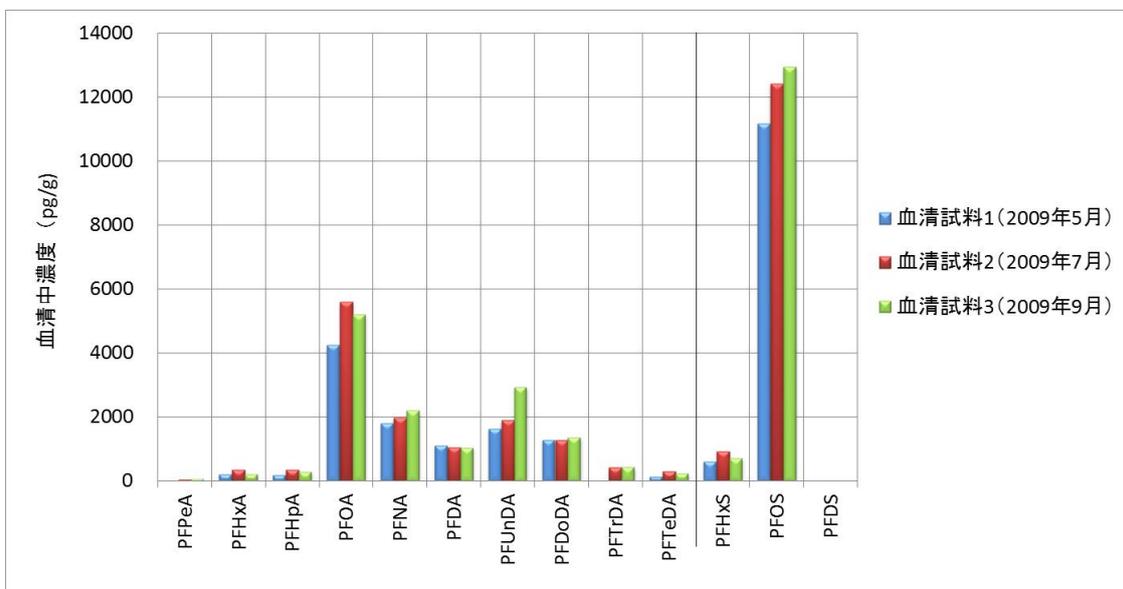


図 4-7 60 代男性から採取した血清中の PFCAs 及び PFASs 濃度

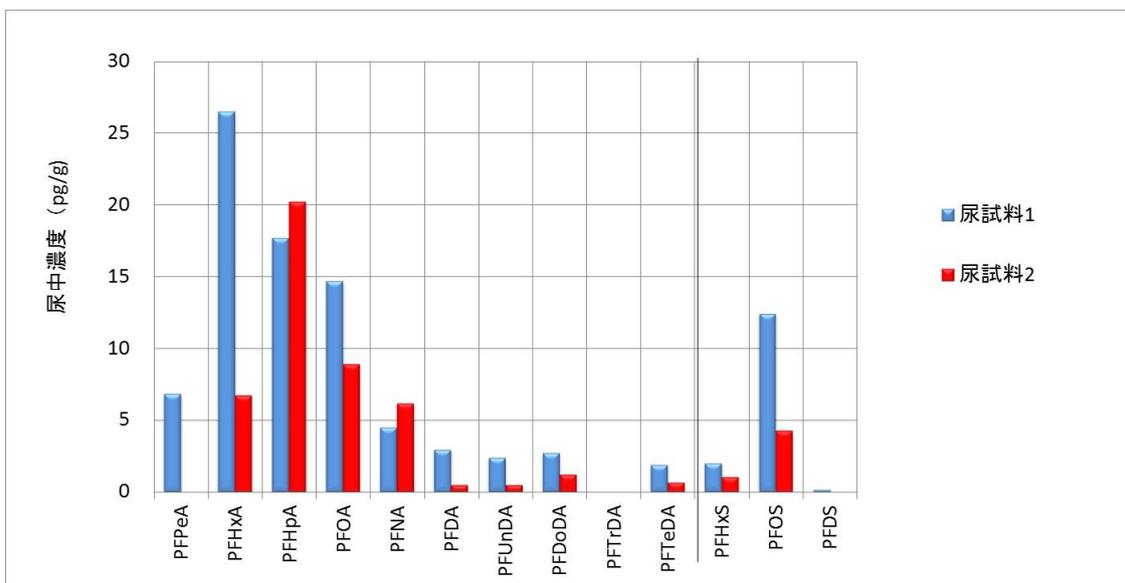


図 4-8 ヒト尿中の PFCAs 及び PFASs 濃度

PFHpA、PFOA 及び PFNA の濃度パターンは両試料とも類似した傾向であるが、PFHxA 及び PFOS の濃度レベルは尿試料 1 が顕著に高かった。また、尿試料 1 からは PFPeA が検出された。尿試料 1 を採取した 30 代男性の居住地は、兵庫県の南東部であり、尿試料 2 を採取した男性 5 名は、神戸市よりも南西部に在住している。4-3 節の河川・海域の環境調査の結果から、兵庫県の南東部の河川・海域からは、高濃度の PFHxA 汚染が確認されている。また、PFOS は、ほとんど不検出であったものの、例外的に東南部からは若干検出されている。このことから、尿中の PFASs 及び PFCAs 濃度は、居住地での曝露を反映している可能性が示唆された。

本調査では血清提供者のみの尿試料を測定していないが、尿と血清から検出され PFASs 及び PFCAs の濃度レベルを比較すると、尿中濃度は血清中濃度よりも数百倍低かった。また、両者の PFCAs の組成を比較すると、尿では炭素鎖長 6~9 個のものが主であったのに対し、血清ではそれよりも長い炭素鎖長 8~12 個のものが主であった。これは、炭素鎖が長くなるほど極性が低くなる性質が関係していると考えられる。つまり、尿中での割合が高く、血清中では低かった PFHpA や PFHxA は、他よりも高極性のため、尿へ移行しやすいことが考えられる。

4-3 節において、8:2FTOH 及び 6:2FTOH はヒト P450 により PFOA や PFHxA に代謝されることが確認されたが、代謝物の生成量から推測すると生体内での代謝速度はそれほど速くないと考えられる。そのため、8:2FTOH 及び 6:2FTOH が尿や血液から検出されなかったことは、体内で代謝されたのではなく、過去に曝露がほとんどなかったものと推測される。

#### 4-5 まとめ

本章では、PFCs の環境リスクの評価を行うことを目的とし、まず 4-2 節では兵庫県の PFASs 及び PFCAs の河川、海域における汚染状況について述べた。河川 41 地点及び海域 38 地点について調査した結果、PFOS 及び PFOA はそれぞれ <1.0~97 ng/L 及び <0.5~360 ng/L の範囲で検出された。これらの結果は、いずれも過去に国内外で確認された検出範囲内の濃度であった。一方、兵庫県南東部の左門殿川からは、フッ素樹脂メーカー工場からの排水が原因と考えられる PFHxA が 16,000 ng/L で検出され、左門殿川の河口から離れるにつれて PFHxA の濃度が小さくなる傾向が海域にみられた。河川の生態系に対する無影響濃度予測値 (PNEC) を用いて算出した PFOS、PFOA のリスク率は 1 未満であり、また PFOA の PNEC を用いて推定した PFHxA のリスク率も 1 未満であったことから、河川中の両化合物が生態系へと与える影響はそれほど大きくはないと推測される。

4-3 節では、遺伝子組換えヒト P450 を用いた代謝実験により、8:2FTOH 及び 6:2FTOH のヒト体内での代謝の有無について確認した。その結果、8:2FTOH は、hCYP1A1、hCYP1A2、hCYP2C9 及び hCYP3A4 によって PFOA に代謝されることが確認できた。また、

hCYP 1A2 及び hCYP 2C9 を用いた代謝実験により PFHxA が生成することも確認できた。さらに、6:2FTOH は、hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 によって PFHxA に代謝されることも確認できた。しかしながら、代謝物量が 8:2FTOH よりも少なかったため、6:2FTOH が実験中に揮散することで P450 との酵素反応が円滑に進まなかったことも考えられた。今後は実験方法の改良が必要と考えられる。

4-4 節では、PFCs の排出経路のひとつと考えられる尿中の PFCs 濃度を測定することでヒト体内の PFCs の汚染状況を確認した。30 代男性の尿及び 20 代～60 代の男性 5 名の混合尿の 2 つを測定した結果、PFCAs が <1～26 pg/g、PFASs が <1～12 pg/g の範囲で検出され、FTOHs は全て不検出 (<0.02 ng/g) であり、PFHxA 及び PFOS の尿中濃度は 30 代男性のほうが高かった。30 代男性の居住地は 4-3 節で高濃度の PFHxA 汚染が確認された南東部の地域であることから、居住地での曝露が尿に反映されている可能性が示唆された。

PFCAs と PFASs の尿中濃度は、血清と比べると数百倍低い濃度であった。PFCAs の組成は血清では主に炭素鎖長 8～12 個が存在するのに対し、尿では炭素鎖長 6～9 個が主であり、極性の高いものが尿として排出されていると考えられた。

本研究では、FTOHs が体内で PFCAs に代謝されるかどうかを確認したが、揮発性のある FTOHs に適した実験系ではなかったと考えられることから、代謝速度を知るためには実験方法の改良が必要である。また、尿から検出された PFASs 及び PFCAs が血清と異なる組成であったことから、今後、データの蓄積により、尿に移行する割合が明らかとなれば、ヒトの PFCs の曝露量や血清・血液への蓄積量を尿から推定することも可能になると考える。

## 参考文献

- Ahrens L, Xie Z, Ebinghaus R (2010) Distribution of perfluoroalkyl compounds in seawater from northern Europe, Atlantic Ocean, and Southern Ocean. *Chemosphere* 78:1011-1016
- Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U., Needham, L.L., Goldman, L.R. (2007) Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ. Health Perspect.* 115, 1670e1676.
- 安達史恵, 高木総吉, 吉田仁, 上掘美知子, 清水武憲, 園井一行 (2010) 大阪府内に勤務する人の血清中有機フッ素化合物について. 第19回環境化学討論会 : 516-517
- Berge U, Barber JL, Jahnke A, Temme C, Jones KC (2005) Analysis of fluorinated alkyl compounds in air samples from England. In *FLUOROS. An International Symposium on Fluorinated Organics in the Environment. Toronto, Ontario, Canada, August 18-19*
- Burris J, Lundberg J, Olsen G, Simpson C, Mandel, J (2002) Determination of serum half-lives of several fluorochemicals Interim Report #2, US EPA AR226-1086,
- Conder JM, Hoke RA, De Wolf W, Russell MH, Buck RC (2008) Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environ Sci Technol* 42:995-1003
- DAIKIN (2007) Elimination of PFOA in Fluorochemical Products, <http://www.daikin.com/press/2007/071221/>
- David E, Jonathan M, Amila S, Scott A, Michael H, Mads SA, Timothy W (2004) Degradation of Fluorotelomer Alcohols: A likely Atmospheric Source of Perfluorinated Carboxylic Acids. *Environ Sci Technol* 38 : p3316-3321
- Dimitrov S, Kamenska V, Walker JD, Windle W, Purdy R, Lewis M, Mekenyan O (2004) Predicting the biodegradation products of perfluorinated chemicals using catabol. *SAK QSAR Environ Res* 15: 69-82.
- de Lange T (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21 (4): 532-540.
- Environmental Working Group (EWG) (2003) PFCs global contamination, Consumers instantly recognize them as household miracles of modern chemistry — Teflon, Scotchgard, Stainmaster, Gore-Tex.
- Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (2005) *Chemicals in the environment. Report on Analytical Methods of Chemicals*: 39-45
- Environment Canada and Health Canada (2010): Draft Screening Assessment Perfluorooctanoic Acid, its Salts, and its Precursors.

[http://www.ec.gc.ca/lcpe-cepa/705376A7-E9EB-4B9C-9943-29FC214C98E1/PFOA\\_eng.pdf](http://www.ec.gc.ca/lcpe-cepa/705376A7-E9EB-4B9C-9943-29FC214C98E1/PFOA_eng.pdf)

Environmental Working Group (EWG) (2002) DuPont Hid Teflon Pollution For Decades. Available online at <http://www.ewg.org/policymemo/20021113/20021213.php>.

Environmental Health and Safety Division, Environmental Health Department, Ministry of the Environment Government of Japan (2003) *Chemicals in the environment. Report on Analytical Methods of Chemicals*: 37-50

Harada K, Saito N, Sasaki K, Inoue K, Koizumi K (2003) Perfluorooctane sulfonate contamination of drinking water in the Tama River, Japan: Estimated effects on resident serum levels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 71 : 31-36

Harada K, Koizumi A, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Date C, Fujii S, Hachiya N, Hirosawa I, Koda S, Kusaka Y, Murata K, Omae K, Shimbo S, Takenaka K, Takeshita T, Todoriki H, Wada Y, Watanabe T, Ikeda M (2007) Historical and geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human serum in Japan. *Chemosphere* 66:293-301

Jahnke A, Ahrens L, Ebinghaus R, Temme C (2007) Urban versus remote air concentrations of fluorotelomer alcohols and other polyfluorinated alkyl substances in Germany. *Environ Sci Technol* 41(3): 745-752

Karrman A, Ericson I, Bavel B, Darnerud P.O, Anue M, Glynn A, Lignell S and Lindstrom G (2007) Exposure of Perfluorinated Chemicals through Lactation: Levels of Matched Human Milk and Serum and a Temporal Trend, 1966-2004, in Sweden. *Environmental Health Perspective* 115(2): 226-230

環境衛生学分野 PFOS 総説-KUSPH

<http://hes.pbh.med.kyoto-u.ac.jp/pfcreview.htm#intro>

Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, Van Wouwe N, Yang JH, Aldoust KM (2004) Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ Sci Technol* 38:4489-4495

Karrman A, Harada KH, Inoue K, Takasuga T, Ohi E, Koizumi A (2009) Relationship between dietary exposure and serum perfluorochemical (PFC) levels- a case study. *Environ Int* 35:712-717

Kudo N, Suzuki E, Katakura M, Ohmori K, Noshiro R, Kawashima Y (2001) Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chem Biol Interact* 134:203-216

Kudo N, Kawashima Y (2003) Induction of Triglyceride Accumulation in the Liver of Rats by Perfluorinated Fatty Acids with Different Carbon Chain

- Lengths: Comparison with Induction of Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation. *Biol. Pharm. Bull.* 26(1):47-51
- 工藤なをみ (2006) フッ素系界面活性剤の生体内蓄積機構と安全性評価に関する研究. 薬学研究の進歩 22 : 21-26
- Latala A, Nedzi M, Stepnowski P (2009) Acute toxicity assessment of perfluorinated carboxylic acids towards the Baltic microalgae. *Environ Toxicol Pharmacol* 28:167-171
- Liu W, Chen S, Quan X, Jin YH (2008) Toxic effect of serial perfluorosulfonic and perfluorocarboxylic acids on the membrane system of a freshwater alga measured by flow cytometry. *Environ Toxicol Chem* 27:1597-1604
- Martin JW, Chan K, Mabury SA, O'Brien PJ (2008) Bioactivation of fluorotelomer alcohols in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 177(3):196-203
- Mary Joyce A, Dinglasan Yun Ye, Elizabeth A. Edwards, Scott A. Maruby (2004) Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Yields Poly- and Perfluorinated Acids. *Environ Sci. Technol*, 38 : 2857-2864
- 中澤 裕之, 伊藤 里恵, 岩崎 雄介, 中田 彩子, 斉藤 貢一 (2007) 内分泌攪乱物質の微量分析と健康リスクへの影響評価. *分析化学*, Vol. 56 : 1005
- Oono S, Matusbara E, Harada K H, Takagi S, Hamada S, Asakawa A, Inoue K, Watanabe I, Koizumi A (2008) Survey of Airborne Polyfluorinated Telomer in Keihan Area, Japan. *Bull Environ Contam Toxicol*, 80 : 102-106
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2002) Co-operation on Existing Chemicals Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (pfos) and Its Salts. Report #ENV/JM/RD(2002)17/FINAL. Robust Study Report Reference No. 8 - Early Life-Stage Toxicity Test with the Fathead Minnow. 3M Company, Environmental Laboratory- Wildlife International Ltd., Easton, MD.
- 大野佐代子, 原田浩二, Mahmoud Manal, 井上佳代子, 高木総吉, 渡邊功, 小泉昭夫 (2008) . パッシブエアサンプラーによる大気中フルオロテロマーアルコールの測定および日本国内における濃度分布. 第17回環境化学討論会要旨集 : 572-573
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH (2006) Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol* 40:32-44
- (財) 日本食品分析センター (2004) 平成 15 年度化学物質分析法開発調査報告書, 化学物質と環境 : 205-227
- P.A. Fair, D.C.G. Muir, J. Small, S. Sturman, J. Adams, M.Houde and G.D. Bossart (2007) Tissue Distribution of Perfluoroalkyl Compounds in Bottlenose Dolphins (*Tursiops Truncatus*) from Southeast Coastal USA. *Organohalogen Compd* 69 : 849-852

- Qi P, Wang Y, Mu J, Wang J (2011) Aquatic predicted no-effect-concentration derivation for perfluorooctane sulfonic acid. *Environ Toxicol Chem* 30:836-842
- Saito N, Harada K, Inoue K, Sasaki K, Yoshinaga T, Koizumi, A (2004) Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *J Occup Health*. 46: 49-59
- Saito N, Harada K, Inoue K, Sasaki K, Yoshinaga T, Koizumi A (2004) Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate Concentrations in surface water of Japan. *J. Occup. Health*. 46:49-59
- Sakaki K, Harada K, Saito N, Tsutsui T, Nakanishi S, Tsuzuki H, Koizumi A (2003) Impacts of Air-borne Perfluorooctane Sulfonate on the Human Body Burden and the Ecological System. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 71(2); 408-413
- Shoeibi M, Harner T, Vlahos P (2006) perfluorinated chemicals in the arctic atmosphere. *Environ Sci Technol* 40(24) : 7577-7583
- So MK, Taniyasu S, Yamashita N, Giesy JP, Zheng J, Fang Z, Im SH, Lam PK (2004) Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea. *Environ Sci Technol* 38:4056-4063
- Stock NL, Lau FK, Ellis DA, Martin JW, Muir DC, Mabury SA (2004) . Polyfluorinated telomere alcohols and sulfonamides in the North American troposphere. *Environ Sci Technol* 38 : 991-996
- 竹峰秀祐, 吉田光方子, 松村千里, 鈴木元治, 鶴川正寛, 中野武 (2009) 兵庫県内の河川および海域の有機フッ素化合物の汚染実態について. 財団法人ひょうご環境創造協会 兵庫県環境研究センター紀要 1 : 12-19
- 竹峰 秀祐、矢本 善也、奥野 俊博、種田 あずさ、松村 千里、鈴木 元治、鶴川 正寛、英保 次郎、川崎 英也、中野 武、荒川 隆一 (2010) 水試料中のフッ素テロマー化合物の分析法の検討. 日本水環境学会シンポジウム講演集 13 : 21-22
- Takemine S, Matsumura C, Yamamoto K, Suzuki M, Tsurukawa M, Imaishi H, Nakano T, Kondo A (2014) Discharge of perfluorinated compounds from rivers and their influence on the coastal seas of Hyogo prefecture, Japan. *Environmental Pollution* 184 :397-404
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2000) Perfluorooctyl Sulfonates; Proposed Significant New Use Rule, *Federal Register* 65, 62319-62333
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2002) Revised Draft Hazard Assessment of Perfluorooctanoic acid and salts. *US EPA AR* :226-1136
- Wallington T J, Hurley M D, Xia J, Wuebbles D J, Sillman S, Ito A, Penner J E, Ellis D A, Martin J, Mabury S A, Nielsen O J, Sulbaek Andersen M P (2006) Formation of C7F15COOH (PFOA) and Other Perfluorocarboxylic Acids during the

Atmospheric Oxidation of 8:2 Fluorotelomer Alcohol. *Environ Sci Technol* 40  
(3):924 -930

Ward T, Kowalski P, Boeri R (1995a) Acute toxicity of N2803-2 to the freshwater alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. Submitted to Office of Pollution Prevention and Toxics, US Environmental Protection Agency, OPPT Administrative Record AR226-1030a

Ward T, Magazu J, Boeri R (1995b) Growth and reproduction toxicity test with L-13492 and the freshwater alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. Submitted to Office of Pollution Prevention and Toxics, US Environmental Protection Agency, OPPT Administrative Record AR226-1030a 096

Wei S, Chen LQ, Taniyasu S, So MK, Murphy MB, Yamashita N, Yeung LW, Lam PK  
(2007) Distribution of perfluorinated compounds in surface seawaters between Asia and Antarctica. *Mar Pollut Bull* 54:1813-1818

横溝 裕行 (2010) 化学物質の毒性試験と生態リスク評価. *国環研ニュース* 29 巻 1 号 ; 6-7

## 第5章 総合考察

近年、人工化学物質に対する安全性の監視体制の強化が図られてきているが、たとえ PFOS・PFOA などのように世界中で使用されてきた化学物質であっても、研究報告の蓄積と安全性検査の見直し等によって危険性が明らかになると、POPs 条約等による規制の対象となることがある。このことから、現在のところ未規制の化学物質であっても、将来的に規制対象となるような有害性が疑われたとき、または規制対象となった際に、これらの問題に対して迅速に対応するためには、常に安全性や環境、生体への蓄積状況を把握すると共に、それらの環境リスクを評価しておく必要がある。すなわち現在では時間とコストがかかる毒性などの生体影響を、いかに迅速かつ簡便に評価できるかということが重要になってきた。

そこで本研究では、未規制の化学物質の中から、環境や生体への残留性が高いジイソプロピルナフタレン (DIPN)、水酸化 PCBs (OH-PCBs) 及び PFOS・PFOA やその関連物質である有機フッ素化合物 (PFCs) の 3 種の化学物質を取り上げ、環境汚染の実態把握を行うとともに、迅速かつ簡便なヒトへの生体影響の評価手法として、①umu (発光 umu) 試験による変異原性の確認、②ヒト P450 を用いた代謝能評価及び③尿を用いた曝露量の推定、の 3 点の異なる研究アプローチを組み合わせることにより、それぞれの対象化学物質の環境リスクに対する評価研究を行った。

第2章では、PCBs の代替物質である DIPN とその同族体であるモノイソプロピルナフタレン (MIPN) 及びトリイソプロピルナフタレン (TIPN) (以下、3 つを合わせて IPN 類と呼ぶ。) を対象に、まず、大気、水質、生物及び底質について環境汚染の実態を調査した。その結果、大気、水質、生物及び底質の順に IPN 類の汚染の程度が高く、最も汚染濃度が高かったのは DIPN であった。底質中の DIPN 濃度が顕著に高かった地点は、古紙再生工場からの影響を受ける河川と兵庫県内でも有数の都市河川下流であり、これらの 2 地点から検出された DIPN は、生物の遊泳障害などへの悪影響が懸念される濃度を上回っていることが判明した。

次に、遺伝子組換えヒト P450 を用いて DIPN 代謝の有無を調査した。その結果、DIPN は hCYP1A1、hCYP 1A2、hCYP 2C9 及び hCYP3A4 の 4 種類のヒト P450 によって代謝されることが分かり、代謝物は分子量 228 のイソプロピル基が水酸化されたものと推定された。さらに、IPN 類と古紙再生工場の塩素漂白によって生成されと考えられる MIPN 及び DIPN の塩素化体 (Cl-MIPN 及び Cl-DIPN) の変異原性の有無を、umu 試験及び発光 umu 試験により確認した。その結果、MIPN が非代謝系の発光 umu 試験において陽性であったが、それ以外は、umu 試験及び発光 umu 試験の非代謝系及び代謝系のいずれにおいても陰性であったことから、DIPN、TIPN、Cl-MIPN 及び Cl-DIPN がそれぞれ最大 6000 ng/well、4800 ng/well、100 ng/well 及び 62 ng/well の範囲において変異原性を有しないことがわかった。

これらの結果から、DIPN 及び TIPN には変異原性がみられなかったものの、主として DIPN による環境汚染が広まっていることが判明した。特に、DIPN の底質への蓄積や魚への濃縮が確認され、最も DIPN の濃度が高かった底質では、メダカ (*O. latipe*) の 48 時間 LC50 値 (4.5 mg/L) に匹敵する濃度であることが明らかとなった。また、ヒト体内における DIPN の代謝速度はそれほど速くないと考えられることから、引き続き、環境や生体中の DIPN 汚染状況を監視していくことが必要であると考えられる。

第 3 章では、PCBs の代謝物である OH-PCBs を対象に、まず、環境中の汚染実態を調査した。調査の対象は、①これまで調査例のない大気汚染状況と、②汚染源のひとつと考えられる古紙再生工場の排水による環境影響、さらに③県下で最も PCBs 濃度の高い河川底質の汚染状況の以上 3 点とした。調査の結果、新たに本研究で開発した大気中の OH-PCBs の高感度分析方法により、神戸市の大気から 1 塩素体及び 2 塩素体を主とした OH-PCBs が 1.1~2.1 pg/m<sup>3</sup> の濃度で検出された。よって本結果から、OH-PCBs は大気中では PCBs の 1% 程度の濃度で存在していることが分かった。

古紙再生工場の排水による OH-PCBs の環境汚染については、揖保川を対象に調査を行ったが、古紙再生工場から揖保川に流れ出た 1 及び 2 塩素体の OH-PCBs は、ほとんど底質に蓄積されていないことが分かった。一方、排水に含まれる PCBs が底質に蓄積し、それらが底質中の微生物等によって代謝分解された結果生じた OH-PCBs は、揖保川の底質に蓄積し、本河川における汚染を拡散させていることも確認された。特に、県下で最も高濃度の PCBs が検出されている左門殿川の底質からは、PCBs の約 10% に相当する 151 ng/g-dry の OH-PCBs が検出され、同族体パターンから、揖保川と同様に底質中の PCBs が代謝分解されたものが蓄積されていると考えられた。

次に、ヒト体内の汚染状況を把握するため、血液よりも採取が容易な尿を対象とし、開発した迅速かつ高感度な分析方法を用いて、PCBs の曝露リスクの高い PCBs 作業従事者と PCBs 研究者の体内の OH-PCBs の汚染状況を確認した。その結果、PCBs の曝露のない状態においても尿から OH-PCBs が検出され、これまでの曝露量の違いによると推測される個人差がみられた。また、PCBs を取扱う作業を実施した十数時間後に、作業に立ち会った PCBs 研究者と作業従事者の OH-PCBs の尿中濃度が上昇するという結果を得た。これらの原因として、PCBs 研究者は作業室内でマスクをしなかったことや作業従事者がメモ等を取るために手袋の脱着を繰り返していたことから、PCBs の吸気曝露や経皮曝露があったと考えられる。以上の結果から、尿中の OH-PCBs を測定することにより、PCBs の一時的もしくは恒常的な曝露を推測できると考えられる。今後、曝露した PCBs が体内で代謝され、血液等に蓄積されている OH-PCBs と尿から排泄される OH-PCBs の割合が分かれば、尿の測定によって体内の OH-PCBs の汚染状況も評価できると考えられる。

第 4 章では、PFCS を対象とし、まず、兵庫県下の PFASs 及び PFCA の環境汚染の実態について、Takemine ら (2014) と共に河川 41 地点及び海域 38 地点の環境水を対象に調査した。その結果、PFOS 及び PFOA は、それぞれ、不検出 (<1.0 ng/L) ~97 ng/L 及

び不検出 (<0.5 ng/L) ~360 ng/L の範囲で検出され、いずれも過去に国内外で確認された範囲内の濃度であった。一方、兵庫県南東部の左門殿川からは、フッ素樹脂メーカー工場からの排水が原因と考えられる PFHxA が 16,000 ng/L で検出され、左門殿川の河口から離れるにつれて PFHxA の濃度が小さくなる傾向が海域にみられた。しかしながら、PFOS、PFOA 及び PFHxA の河川の生態系に対する無影響濃度予測値 (PNEC) を用いて算出したハザード比は 1 未満であったことから、河川中の両化合物が生態系へと与える影響はそれほど大きくはないと推測される。

遺伝子組換えヒト P450 を用いた代謝実験により、8:2FTOH 及び 6:2FTOH のヒト体内での代謝の有無について確認した。その結果、8:2FTOH は、hCYP1A1、hCYP 1A2、hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 によって PFOA に代謝され、さらに hCYP 1A2 及び hCYP 2C9 によって PFHxA にも代謝されることが確認された。また、6:2FTOH は、hCYP 2C9 及び hCYP 3A4 によって PFHxA に代謝されることが確認された。代謝物の生成量は、FTOHs に対してモル比で最大 0.002% 程度であり、代謝速度が速いとはいえなかったが、主な代謝酵素と考えられる hCYP2E1 を調査できなかったことや、実験中の FTOHs の揮散によって hP450 との反応が不十分であった可能性が考えられるため、代謝速度については今後の課題とした。

PFCs の排出経路のひとつと考えられる尿中の PFASs、PFCAs 及び FTOHs を測定することで、これらの PFCs のヒト体内の汚染状況を確認した。30 代男性の尿及び 20 代~60 代の男性 5 名の混合尿の 2 つを測定した結果、PFCAs が <1~26 pg/g、PFASs が <1~12 pg/g の範囲で検出され、FTOHs は全て不検出 (<0.02 ng/g) であった。30 代男性は、PFHxA の尿中濃度が高かったが、これは居住地が高濃度の PFHxA 汚染が確認された兵庫県南東部の地域であることから、居住地での曝露が尿に反映されている可能性が示唆された。

PFCAs と PFASs の尿中濃度は、血清と比べると数百倍低い濃度であった。PFCAs の組成は血清では主に炭素鎖長 8~12 個が存在するのに対し、尿では炭素鎖長 6~9 個が主であり、極性の高いものが尿として排出されていると考えられる。今後、データの蓄積により、尿に移行する割合が明らかとなれば、ヒトの PFCs の曝露量や血清・血液への蓄積量を尿から推定することも可能になると考える。

以上、DIPN、OH-PCBs 及び PFCs の 3 つの未規制の高残留性化学物質について、環境リスク評価のための調査を行った結果、これまで把握されていなかった環境汚染状況及び生体への影響についての知見が得られた。本研究では、DIPN と OH-PCBs の 2 つの化学物質の環境媒体を対象とした分析方法を開発したことから、今後、これらの測定方法を用いて環境汚染のデータが蓄積されることを期待したい。

また、生体影響については、①umu (発光 umu) 試験による変異原性の確認、②遺伝子組換えヒト P450 を用いた代謝能評価及び③尿を用いた曝露量の推定、の 3 つの方法を用いたが、これらを用いる事で生体影響を評価する事が可能となった。一連の調査手順としては、まず、変異原性の有無が不明な場合は、umu 試験や発光 umu 試験により変異原性を確

認する。次に、ヒト体内で代謝されるかどうか、またどのような代謝物が生成されるかについて、遺伝子組換えヒト P450 を用いて確認する。最後に、その代謝物が尿からどの程度排泄されているかを調べることで曝露状況を把握する。これらの一連の生体影響試験により、動物実験や血液等の生体試料の採取などと比べて、迅速かつ簡便に生体への影響が評価可能となり、さらには時間やコストをかけることができない場合でも、未規制の化学物質のスクリーニング的な生体影響を評価可能な新たな手法として活用されることが期待される。

## 謝辞

本博士論文の執筆にあたり、終始適切なお指導、ご助言を賜りました神戸大学大学院農学研究科の今石浩正教授に深く感謝いたします。

また、多大なお協力、ご助言を頂いた、神戸大学大学院農学研究科の森垣憲一准教授、乾秀之准教授及び大阪大学先端科学イノベーションセンターの中野武特任教授、ならびに環境調査及び生体調査の実施にあたり多大なお協力を頂いた（公財）ひょうご環境創造協会兵庫県環境研究センターの松村千里主席研究員、羽賀雄紀主任研究員及び奥野俊博氏及び環境省環境調査研修所の竹峰秀祐教官、ならびに、*umu* 試験において多大なお協力とご指導を頂いた国立環境研究所環境リスク研究センターの白石不二雄室長、中島大介主任研究員及び郡山女子大学家政学部の影山志保講師、ならびに、OH-PCBs の分析等で多大なお協力を頂いた大阪市立環境科学研究所の先山孝則氏、日本フイルコン(株)の井上嘉則氏、P450 の代謝実験等で多大なお協力を頂いた兵庫県立健康生活科学研究所の北本寛明主任研究員及び神戸大学環境物質科学研究室の皆様にご心から感謝申し上げます。