

## 研究課題名

ペットネコにおける抽出可能性有機態ハロゲン(塩素・臭素)の全身分布

## 研究代表者

向井 康太 (京都大学大学院工学研究科)

## 共同研究者

藤森 崇 (京都大学大学院工学研究科)

高橋 真 (愛媛大学大学院農学研究科)

Hoang Quoc Anh (愛媛大学大学院農学研究科)

野見山 桂 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

## 研究目的

環境中には、既知の化合物では説明ができない有機態塩素・臭素（未同定有機態塩素・臭素）が存在していることが示唆されている。その量を明らかにするためには有機態塩素・臭素の定量が必要不可欠である。

有機塩素・臭素化合物の一部は、ポリ塩化ビフェニル（PCBs）やポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）のように生体蓄積性を持つことが考えられるため、食物連鎖高次の生物において高濃度で存在することが予想される。したがって、食物連鎖高次の生物における有機態塩素・臭素の定量およびその中に占める既知有機塩素・臭素化合物の寄与を調査することは、生体蓄積性を持つ未同定有機塩素・臭素化合物の存在量を知るうえで重要な知見を与える。しかしながら、有機態塩素・臭素に関する研究事例は非常に限られており、陸棲哺乳類に関する報告は少なくとも代表者の知るところでは存在しない。

特にネコは、ヒトと近い環境に棲息し、かつ他の陸棲哺乳類と比べ有機塩素・臭素化合物に対する代謝・排泄能が低いことが知られていることから、未同定化合物を含む有機塩素・臭素化合物をより高濃度で蓄積している可能性がある。そこで、本研究課題では、1. ネコにおける有機態塩素・臭素の存在量、2. 既知化合物由来の塩素・臭素（既知有機態塩素・臭素）

が有機態塩素・臭素に占める割合、3. 有機態塩素・臭素の体内分布を明らかにすることを当初の目的とした。なお、分析上の制約から、本年度はこれらのうち1, 2に絞り研究を実施した。

## 研究内容

試料：愛媛大学の生物環境試料バンク (*es-BANK*) に冷凍保管されている試料から、先行研究<sup>1</sup>において個別有機塩素・臭素化合物の濃度が報告されており、かつ残量が十分にあるネコの肝臓組織 6 検体 (オス  $n=3$ , メス  $n=3$ ) を選択した (Table 1)。

抽出および抽出液の洗浄：アセトン、アセトン:ヘキサン=1:1 混合溶媒、ヘキサンを用いた超音波抽出により行った。抽出液に含まれる無機塩素・臭素を除去するため、抽出液を硫酸ナトリウム/ヘキサン洗浄水 (1:20) および MTBE/ヘキサン (1:1) 溶液で洗浄した。GPC による分画：洗浄後の抽出液に対して、ゲル浸透カラムクロマトグラフィー (GPC) による分画を行った。DecaBDE (分子量 959) のフラクションポイントを考慮し、最初の 120 mL を高分子量画分、後の 120 mL を低分子量画分とした。

塩素・臭素の定量：分画後の抽出液 2 mL をポリエチレン袋に入れ常温常圧で乾固させ密封し、中性子による放射化を行った。放射化は京都大学研究炉の Pn-3 (熱中性子束は約  $2.0\text{--}2.4\times 10^{13}\text{cm}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ ) を用いた。10 または 15 分間の照射で生成した放射性核種  $^{38}\text{Cl}$  ( $t_{1/2}=37.18\text{ min}$ ,  $E_{\gamma}=1642\text{ keV}$ ) および  $^{80}\text{Br}$  ( $t_{1/2}=17.6\text{ min}$ ,  $E_{\gamma}=617\text{ keV}$ ) をゲルマニウム半導体検出器で 5 分間測定した ( $n=2$ )。ピーク面積に対し半減期補正の計算を行い、比較法により塩素・臭素を定量した。

**Table 1** Information of samples in this study

Species	Sample ID	<i>es-BANK</i> No.	Tissue	Collected Area	Collected Year	Sex
Domestic cat ( <i>Felis silvestris catus</i> )	DC1	ET00833	liver	Ehime, Japan	2008	Male
	DC4	ET00836	liver	Ehime, Japan	2008	Female
	DC5	ET00840	liver	Ehime, Japan	2008	Male
	DC8	ET00856	liver	Ehime, Japan	2008	Female
	DC13	ET00924	liver	Ehime, Japan	2009	Female
	DC21	ET01427	liver	Ehime, Japan	2011	Male

## 研究成果

### 1. ネコにおける抽出可能性有機態塩素・臭素 (EOX; X=Cl or Br) の濃度

**Table 2** Concentrations of EOCl, EOCl-H, EOCl-L, and Cl in each group of identified compounds in liver samples from six domestic cats

	Domestic cat, liver						mean $\pm$ SD
	DC1	DC4	DC5	DC8	DC13	DC21	
	Male	Female	Male	Female	Female	Male	
<i>Concentrations of Cl; <math>\mu\text{g/g lipid}</math> (<math>\mu\text{g/g wet}</math> in parentheses)</i>							
EOCl <sup>a</sup>	210 (7.3)	120 (10)	160 (7.1)	230 (6.7)	200 (7.3)	270 (10)	190 $\pm$ 53 (8.1 $\pm$ 1.6)
EOCl-H	120 (4.1)	74 (6.6)	97 (4.3)	130 (3.7)	90 (3.4)	180 (6.7)	110 $\pm$ 37 (4.8 $\pm$ 1.5)
EOCl-L	89 (3.1)	42 (3.7)	61.0 (2.7)	100 (3.0)	110 (3.9)	89 (3.3)	81 $\pm$ 25 (3.3 $\pm$ 0.45)
EOCl-L/EOCl-H	0.76	0.57	0.64	0.82	1.2	0.50	0.72 $\pm$ 0.24
<i>Concentrations of Cl; ng/g lipid</i>							
Identified Cl (total)	170	2800	1200	370	76	310	830 $\pm$ 1100
PCBs	170	2800	1200	370	75	300	810 $\pm$ 1000
OH-PCBs	5.4	89	13	7.3	1.4	10	21 $\pm$ 33
Identified Cl/EOCl-L (%)	0.19	6.8	2.0	0.37	0.072	0.35	1.6 $\pm$ 2.6

<sup>a</sup> sum of EOCl-H and EOCl-L.

**Table 3** Concentrations of EOBr, EOBr-H, EOBr-L, and Br in each group of identified compounds in liver samples from six domestic cats

	Domestic cat, liver						mean
	DC1	DC4	DC5	DC8	DC13	DC21	
	Male	Female	Male	Female	Female	Male	
<i>Concentrations of Br; <math>\mu\text{g/g lipid}</math> (<math>\mu\text{g/g wet}</math> in parentheses)</i>							
EOBr <sup>a</sup>	29 (1.0)	26 (2.3)	25 (1.1)	26 (0.77)	20 (0.75)	29 (1.1)	26 $\pm$ 3.3 (1.2 $\pm$ 0.58)
EOBr-H	26 (0.9)	24 (2.1)	23 (1.0)	20 (0.6)	17 (0.65)	27 (1.0)	23 $\pm$ 3.4 (1.1 $\pm$ 0.56)
EOBr-L	3.2 (0.11)	2.2 (0.20)	1.8 (0.080)	5.6 (0.17)	2.5 (0.095)	1.9 (0.073)	2.9 $\pm$ 1.4 (0.12 $\pm$ 0.050)
EOBr-L/EOBr-H	0.12	0.092	0.077	0.27	0.15	0.073	0.13 $\pm$ 0.075
<i>Concentrations of Br; ng/g lipid</i>							
Identified Br (total)	870	410	12	1700	350	1600	830 $\pm$ 700
PBDEs	860	270	5.0	1700	320	1600	790 $\pm$ 720
OH-PBDEs	4.9	120	3.1	2.9	3.5	4.1	24 $\pm$ 49
MeO-PBDEs	6.9	4.4	0.40	0.48	4.3	12	4.8 $\pm$ 4.5
BRPs	0.13	17	3.9	4.6	15	0.79	6.8 $\pm$ 7.2
Identified Br/EOBr-L (%)	27	19	0.69	31	14	83	29 $\pm$ 28

<sup>a</sup> sum of EOBr-H and EOBr-L.

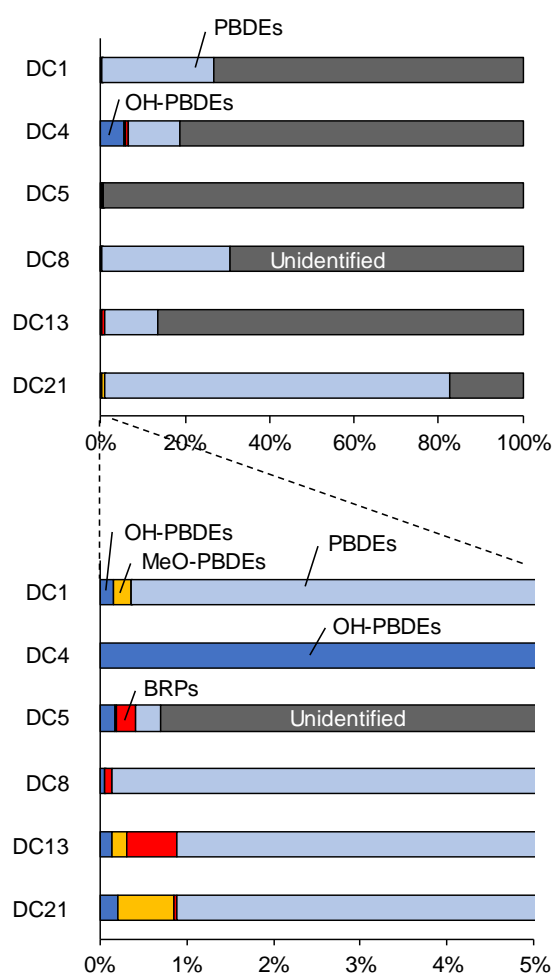
ネコにおける EOCl 濃度を Table 2 に、EOBr 濃度を Table 3 に示す。6 個体を平均すると、EOCl および EOBr はそれぞれ 190  $\mu\text{g/g lipid wt}$  および

26  $\mu\text{g/g lipid wt}$  であった。そのうち、低分子量画分における塩素 (EOCl-L) および臭素 (EOBr-L) はそれぞれ 81  $\mu\text{g/g lipid wt}$  および 2.9  $\mu\text{g/g lipid wt}$  であり、高分子量画分における塩素 (EOCl-H) および臭素 (EOBr-H) はそれぞれ 110  $\mu\text{g/g lipid wt}$  および 23  $\mu\text{g/g lipid wt}$  であった。低分子量と高分子量の比 (EOX-L/EOX-H) に着目すると、塩素、臭素ともにでは高分子量が支配的に存在しており、特に臭素では高分子量が卓越した。

個体間の変動係数は、EOCl-L: 31%、EOCl-H: 32%、EOBr-L: 49%、EOBr-H: 15% であり、個体差が確認された。生息環境における曝露レベルの違いや食性の多様性を反映していると考えられた。

## 2. 既知化合物由来の塩素・臭素 (既知有機態塩素・臭素) が有機態塩素・臭素に占める割合

濃度が既知の化合物 (PCBs、OH-PCBs、PBDEs、OH-PBDEs、MeO-PBDEs、ブロモフェノール) の塩素、臭素換算濃度を計算し、既知有機態塩素・臭素濃度とした。これらの化合物の分子量は低分子量画分に相当するため、EOX-L に対して既知有機態塩素・臭素濃度が占める割合を算出したところ、塩素で  $1.6 \pm 2.6\%$ 、臭素で  $29 \pm 28\%$  であった (Table 2, 3)。このうち、塩素よりも臭素において既知化合物の寄与が大きく、その内訳を見ると PBDEs が支配的であることが分かった (Figure 1)。ヒトの住環境において難燃剤として使用される PBDEs の高い曝露を受けていることが原因であると考えられ



**Figure 1** Relative contributions (%) of Br in PBDEs, OH-PCBs, MeO-PBDEs, and bromophenols to EOBr-L in liver samples from six domestic cats.

た。また、既知化合物の寄与やその内訳は個体間で大きく異なっており (Figure 1, 2)、生息環境や食性の多様性を反映していることが考えられた。残りの塩素 (98.4%)、臭素 (71%) は未同定の有機塩素・臭素化合物に由来していることを意味しており、多くの未同定有機塩素・臭素化合物の存在が示唆された。

#### 引用文献

1 Nomiya, K.; Takaguchi, K.; Mizukawa, H.; Nagano, Y.; Oshihoi, T.; Nakatsu, S.; Kunisue, T.; Tanabe, S. Species-and tissue-specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in cats and dogs. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 5811-5819.

#### 成果発表

(太字が代表者、下線が共同研究者)

**Mukai, K.**; Fujimori, T.; Anh, H. Q.; Fukutani, S.; Kunisue, T.; Nomiya, K.; Takahashi, S. Characterization of Extractable Organohalogen (EOX) in Biological Samples. *2nd Chemical Hazard Symposium*, Ehime, Japan, Dec. 2018.

向井康太, 藤森崇, Hoang Quoc Anh, 福谷哲, 野見山桂, 国末達也, 高橋真. 環境多媒体中の抽出可能性有機塩素・臭素の中性子放射化分析. 京都大学複合原子力科学研究所 専門研究会 放射化分析及び中性子を用いた地球化学的研究-2-, 大阪, 1月, 2019.

#### 今後の展望

本研究課題を通して、ネコの肝臓組織における未同定有機態塩素・臭素の存在が示唆された。既に得られたデータを用いた統計解析、測定可能な化合物の定量を加え、学会および論文として発表する予定である。本研究課題で確立した方法を適用、もしくは応用し、当初の課題であった”有機態塩素・臭素の体内分布”の解明、さらなる分画による有機態塩素・臭素の性質の絞り込み、高分子量化合物も含めた未同定有機塩素・臭素の探索へと発展することが期待される。