

有害環境汚染物質の新規毒性評価、診断を目指した親化合物、
その代謝物の定量手法の確立と評価、社会応用に向けた研究

代表者	本平航大	北海道大学大学院獣医学院
研究分担者	池中良徳	北海道大学大学院獣医学研究院
拠点構成員	野見山桂	愛媛大学沿岸環境科学研究センター

- 研究目的 -

日本を含む先進国では感染症コントロール、農畜産業における、殺虫剤、動物用医薬品の規制、検査体制が整っている。それに対して、開発途上国では散布の管理や動物に対する医薬品使用の管理が不十分である可能性も示唆されているが、対策が後回しになるケースも存在する。こうした国々では環境汚染化学物質によるヒト・動物の健康への脅威（ケミカルハザード）が危惧されているだけでなく、越境への汚染拡大や汚染が原因となり生じる薬剤耐性生物、耐性菌の拡大が危険視されており、人類の喫緊の課題と言える。

こうした事態に対応するためには、開発途上国における環境汚染物質のモニタリング、それに続く、先進国での評価法の確立、健康影響の解明が必要である。2020年度の共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」共同研究における「有害環境汚染物質に対する新規健康影響評価法・診断法の確立と社会普及啓発の検討」では1. 開発途上国における環境汚染物質、残留動物用医薬品のモニタリングと結果の途上国への還元、2. 環境汚染物質に対する生体への健康影響評価、3. 開発途上国での環境汚染物質に対する教育活動を目的とした。特に、モデルとして殺虫剤 Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)と途上国で問題となる残留動物用医薬品を対象とし、研究を実施した。

DDT を用いた試験では、その代謝物である Dichlorodiphenyldichloroethene (DDE) , Dichlorodiphenyldichloroethane (DDD) の定量も実施されることが多い。しかしながら、環境中のサンプルからはさらにそれらの代謝

物である methyl sulfone DDE や 1,1-Bis(p-chlorophenyl)-2-chloroethene (DDMU) なども検出されている。これまで軽視されてきた環境汚染物質の代謝物の評価にも注目していく必要があるが、依然その評価法の確立には至っていない。こうした背景から 2021 年度は 2020 年度の目的に加えて、DDT のさらなる代謝物を評価すべく、その定量手法の確立を目的とした。

- 研究内容と成果 -

< 殺虫剤 DDT >

本研究では、一般的に DDT 研究で多く検証されている代謝物である DDD, DDE に加え、4,4'-Dichlorobenzophenone (DBP) と DDMU の 2 種類の代謝物の計 5 つを対象とした。濃度の定量対象となることが多い、血液 (血漿) と肝臓における、これら化学物質の抽出、定量手法の検討を行った。

今回の定量ではガスクロマトグラフィー / 電子捕獲型検出器 (GC/ECD) を用いた。それぞれの化学物質のピークはクロマトグラム上で明確に分離した (図 1 左) (定量における詳細な条件は割愛する)。内部標準物質 (IS) としての利用を検討するため、異性体である *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT を同時に定量した。

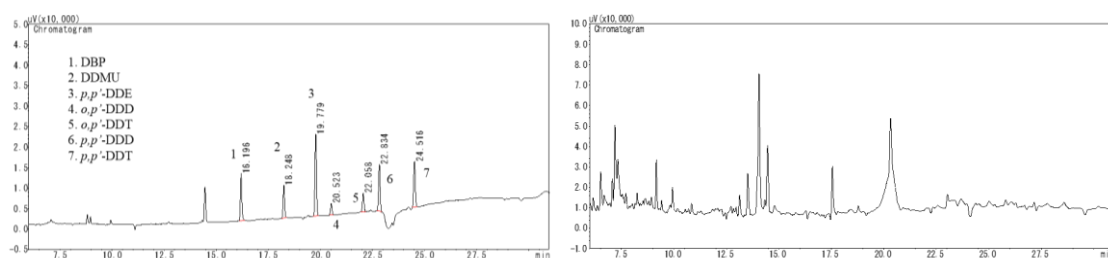


図 1 GC/ECD より検出したピーク 左：各標準液 右：肝臓ブランク抽出物

血漿においては、それぞれの化学物質における装置の定量下限を考慮し、血漿中濃度として 100 ppb (5 種全て), 5 ppb (DBP, DDMU), 1 ppb (DDD, DDE, DDT) の 3 パターンの添加回収試験を実施した。除タンパク、抽出過程としてアセトン抽出、精製過程として Florisil カードリッジを使うだ

けの簡便な手法を検証した。100 ppb に関しては内部標準によらず、特に親化合物側 DDTs (DDT, DDD, DDE)で高く、安定した回収率を得た(図 2 左)。下流のDBP, DDMUでは*o,p'*-DDTを用いて回収率の補正した際により良好な結果が得られた。低濃度側でも親化合物では高く安定した回収率を維持した。対して、DBP, DDMU では回収率の低下が見られた(図 2 右)。

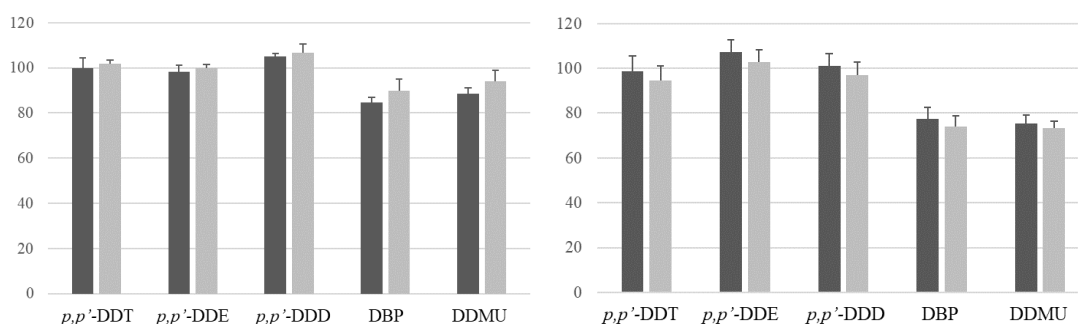


図 2 血漿における添加回収試験の結果 (エラーバーは標準偏差を示す。)

左：100 ppb (全化合物), 右：5 ppb (DBP, DDMU) 1 ppb (DDT, DDE, DDD)、黒色：内部標準として *o,p'*-DDD を使用、灰色：内部標準として *o,p'*-DDT を使用

次に肝臓を対象に残留農薬の検査によく利用され、親化合物では既にその有用性が示されている QuEChERS 法を用いた代謝物の抽出を試みた。抽出、精製法として抽出キット (EN メソッド)、分散 SPE キット (脂質と蠟質のある果物と野菜用) を利用した。肝臓中濃度 0.1 mg/kg (5 種全ての化合物) として添加回収試験を行った。血漿同様に異性体 *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT を IS として利用したが、肝臓抽出物のピークにより IS の定量は出来なかったため (図 1 右)、図 3 では、添加量とピークの高さをもとにした回収率を提示した。回収率は全ての化合物で安定した結果が得られた (図 3)。今回は異性体 *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT の IS 利用を試みるため、抽出キット (AOAC メソッド)、肝臓重量、IS 濃度を変更し、抽出を再実施しているが、十分な改善は見られなかった。サンプル中の DDT 定量の際には IS の利用が望ましく、今後、複数の IS を検討していく必要がある。

また先行研究から DDT は抽出、定量の過程で分解されてしまうことも報告されている。GC/ECD による定量過程での分解評価では 100 ppb の

DDTs (DDT, DDE, DDD)を定量した場合においても検出限界を超える DDMU, DBP は検出されなかった。また抽出過程の評価のため、上記、肝臓での試験と同様の手法を用いて DDTs のみを添加した添加回収試験を実施した。図 4 には結果のクロマトグラムにおける DBP, DDMU の検出領域を拡大して表示したが、2 化合物の該当位置にピークは確認されなかった。以上のことから本手法では、少なくとも低濃度帯において、親化合物の分解による DBP, DDMU の生成、それに伴う **DBP, DDMU 定量に対する親化合物の干渉は小さい**と結論付けた。

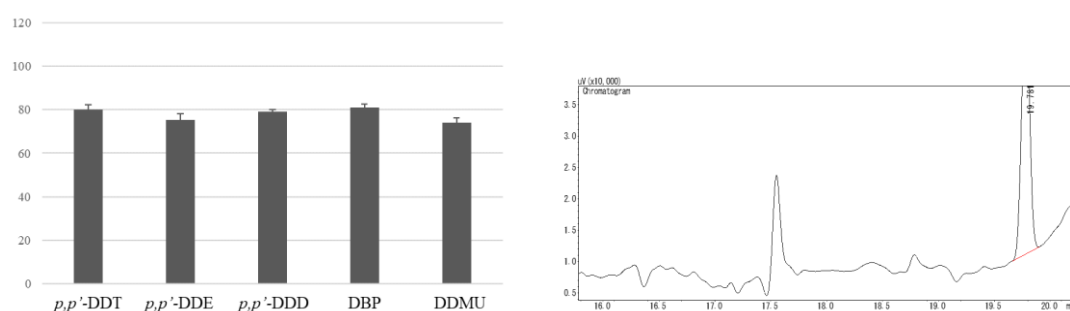


図 3 (左) 肝臓における添加回収試験の結果 (エラーバーは標準偏差を示す。)

図 4 (右) DDTs のみを添加した回収試験におけるクロマトグラム

<残留動物用医薬品>

2020年度から本研究にて継続してモンゴル国における残留動物用医薬品定量に関する技術輸出、教育活動を実施した。現地の支援先研究者が2021年11月に2度、フィールドで働く獣医師、計24人に対して残留動物用医薬品の問題点、その検査手法の指導を直接行った。申請者自身は新型コロナウイルスの影響で訪問できなかったが、オンラインにて実施にあたり技術的支援、前後で行うアンケート調査などの調整を行った。残留動物用医薬品の問題は実験室実験だけで解決する問題ではなく、社会に対する働きかけが非常に大切になると考える。本活動は問題の根本的な解決に向けた社会活動の事例として貴重であり、今後もこの活動をほかの地域に積極的にアプライしていく必要がある。

- 成果発表 -

5th International Chemical Hazard Symposium 「Method development for evaluating DDTs exposure and its effect on animals」 online, oral, 3rd Feb 2022
日本科学教育学会 「活動紹介：モンゴル生命科学大学との研究協力」 オンライン、口頭、2021年8月

- 今後の問題点 -

新型コロナウイルス感染症の影響を受け、DDT 汚染地域（アフリカ諸国）におけるフィールドのサンプリング調査は行っていない。汚染地域では DDT に限らず、多様な環境汚染物質が蓄積していることが予想されるため、今回利用した ECD により、ターゲット化合物が他の物質の干渉を受けずに定量できるかという点について、さらなる検証は必要である。

また DDT が抽出、定量の過程で分解されてしまう点についても本研究にて検証を行った。今回の実験ではその影響は小さいことが予想されたが、DDT 濃度が非常に高いときには、DDMU, DBP の濃度が定量過程での DDT の代謝により生じたものか判断がつかない可能性がある。標準物質 500 ppb DDTs を定量した際に、定量限界を超える DDMU が本研究でも検出されており、親化合物の濃度次第では DDMU, DBP の LOD, LOQ を補正するなどして、調整が必要であると考えられる。また本研究では同じく DDT の代謝物としてよく知られている Bis(4-chlorophenyl)acetic acid (DDA) と 2,2-Bis(4-chlorophenyl)ethanol (DDOH) についても研究を実施した。これらの物質の ECD での定量が難しく、高速液相クロマトグラフィー/UV 検出器を用いた定量を試みたものの、依然、改善が必要な結果となり、本稿では公表していない。また肝臓においては内部標準の定量が出来ておらず、回収率を補正することができなかった。今回、検出器として ECD を用いているが、質量分析計で定量することより、本件の問題は改善する可能性がある。今後は検出器を検討しながら、その他の DDT 代謝物に対しても対象を広げていく必要がある。