

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08043

研究課題名(和文) 絶滅危惧 類 (VU) タンチョウの保全に資する有機汚染物質曝露調査

研究課題名(英文) Research on exposure to organic pollutants for the conservation of Japanese Red crowned crane

研究代表者

鳥羽 陽 (Toriba, Akira)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：50313680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：北海道東部の湿原に生息するタンチョウは、絶滅危惧種に選定されている。近年、その生息域は人間の生活圏に近づき、人為起源の化学物質への曝露量が増える可能性があることから、化学物質への曝露量の推定は保護活動を行う上で重要である。本研究では、タンチョウの筋肉組織中の残留性有機汚染物質(POPs)を初めて測定し、観察された濃度は他の鳥類より低く、毒性発現を考慮すべきレベルではないことが分かった。また、胆汁に排泄される多環芳香族炭化水素(PAH)の代謝物である水酸化PAHの分析法を開発し、タンチョウの胆汁中に排泄される代謝物を検出することに成功し、PAH曝露指標の候補になることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Japanese Red-crowned crane inhabits the marsh in the eastern Hokkaido and it is classified as an endangered species. Nowadays, it lives near human beings and it is concerned that Red-crowned cranes are exposed to more anthropogenic chemical substances. Therefore, it is important to investigate the exposure levels of the chemicals for their protection. In this study, we determined the concentrations of persistent organic pollutants (POPs) in red-crowned crane muscle tissues and the concentrations were not high that their toxicities need to be considered. Furthermore, hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) excreted in the bile of the crane were successfully identified and quantified by using a developed analytical method. The biliary metabolites should be useful for the surveillance of exposure to PAHs.

研究分野：環境分析化学

キーワード：タンチョウ 有機汚染物質 多環芳香族炭化水素 残留性有機汚染物質 生体曝露評価

1. 研究開始当初の背景

タンチョウ(丹頂, *Grus japonensis*)は、環境省より絶滅危惧II類(VU)(絶滅の危険が増大している種)に指定され、国の特別天然記念物にも指定されている。北海道におけるタンチョウの生息数は、1952年において33羽まで減少したが、現在1,400羽程度まで生息数が回復した。一方、タンチョウの生息数の増加により、電線、列車及び車両への衝突事故のような新たな弊害も出始めている。さらに、生息域が人間の生活圏に近づいたことは、人為起源の化学物質との接触の機会を増加させ、今後タンチョウの生息環境の悪化が懸念される。タンチョウのつがい抱卵した卵が無事に成育することは少なく、化学物質への曝露により卵殻薄化や孵化率の低下を引き起こす可能性が考えられる。また、国境を越えて長距離輸送されてくる化学物質の中には、地元汚染源がなくとも生物濃縮される物質があり、潜在的脅威となる可能性もある。今後のタンチョウの保全活動を考える上で、様々な化学物質への曝露実態を解明することが重要である。

2. 研究の目的

タンチョウの生息環境からの化学物質曝露は、卵殻薄化や孵化率の低下を引き起こす可能性があり、化学物質の曝露状況の把握は保護活動を行う上で重要である。本研究では、1989年より25年間にわたり釧路市動物園にて保存されているタンチョウのへい死個体の臓器・組織(胸筋、肺、肝臓等)に蓄積されている残留性有機汚染物質(Persistent Organic Pollutants; POPs)や多環芳香族炭化水素類(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAH)を定量し、曝露量や毒性発現の可能性を推定することを目的とした。POPsについては組織中の脂肪に蓄積した対象物質を分析し、PAHについては胆汁に排泄される代謝物である水酸化PAH(OHPAH)を分析対象とした。また、生息地の汚染状況、寄与度の大きい曝露源(地元発生源または長距離輸送)を明らかにするための環境試料中PAHsの分析法の確立を目的とした。最終的に生息に影響を及ぼす可能性のある物質と環境要因を考察してタンチョウの保全活動に有用な情報を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) タンチョウ組織中 POPs の測定

北海道東部において交通事故や電線事故等により死亡し、釧路市動物園に保存されていた野生のタンチョウ成鳥47羽(雌22羽、雄25羽)を対象とした(表1)。保存状態を確認して2002年から2016年の間に収容された個体を対象とした。タンチョウの大腿筋試料10gに対し内部標準物質混合溶液(0.25-2.5 ng)を加え、ヘキサン/ジエチルエーテル混液(2/1, v/v)中でホモジナイズ粉砕したものを遠心分離した後、有機相を採取

表1 分析に供したタンチョウの個体情報

	平均 ± S.D. (範囲)
体重 (kg)	7.7 ± 1.3 (5.0 - 10)
体長 (mm)	1300 ± 89 (1000 - 1400)
大腿筋の脂肪含量 (%)	2.7 ± 2.0 (0.6 - 10)

する操作を2回行った。有機相を2% NaCl水溶液で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>による脱水操作を行った後、溶媒留去を行い脂肪重量の測定を行った(表1)。脂肪をアセトン/シクロヘキサン混液(3/7, v/v)に溶解しゲル浸透クロマトグラフィーによる脱脂精製操作を行った。分取した溶液を濃縮後44%硫酸含浸シリカゲルに負荷し、ヘキサンで溶出して濃縮後にノナン溶液に置換した検液をガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計で測定した。測定対象化合物は、ヘキサクロロベンゼン(HCB)、Mirex、ジクロロジフェニルトリクロロエタンとその代謝物(2,4'-DDT, 4,4'-DDT, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDE, 4,4'-DDE)、クロルデン関連物質(CHLs, *trans*-/*cis*-Chlordane, *trans*-/*cis*-Nonachlor, Oxychlordane)、ヘキサクロロシクロヘキサン(*alpha*-/*beta*-/*gamma*-HCH)、ポリ塩化ビフェニル(PCB #105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 169, 189)、ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDE #47, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 197, 206, 207, 209)とした。なお、内部標準物質として2,4'-DDT, 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, *trans*-Nonachlor, Oxychlordane, *beta*-HCH, *gamma*-HCH, PCB及びPBDE(#47, 99, 153, 154, 183, 197, 207, 209)の<sup>13</sup>C安定同位体を使用した。各対象化合物の検出下限は0.1-0.5 ng/g脂肪であった。

(2) 胆汁中 PAH 代謝物の測定

胆汁中のPAH代謝物の測定には、タンチョウ、あるいは予備実験用のニワトリの胆汁を用いた。0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5)に胆汁試料を懸濁し、β-グルクロニダーゼ/スルファターゼ、ブルーレーヨン(BR)、内部標準物質(代謝物の重水素化体)、抗酸化剤を添加した後、37℃の水浴で1時間インキュベートすることでグルクロン酸あるいは硫酸抱合体として胆汁中に存在するPAH代謝物をOHPAHに加水分解すると同時にOHPAHをBRに吸着させた。その後、BRを水で洗浄し、乾燥させてからBRにMeOH/NH<sub>3</sub>(50:1, v/v)を加え30分間超音波抽出を行い、吸着したOHPAHを溶出させた。溶出液は、抗酸化剤を添加した後に遠心エバポレータで乾固し、ダンシルクロリドによる誘導体化を行った後、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)で測定した。検出は、エレクトロスプレーイオン化法によるポジティブイオン(ESI<sup>+</sup>)モードにおける選択反応モニタリング(SRM)法で行った。OHPAHとして、2種のヒドロキシナフタレン(OHNap)、2種の

ヒドロキシフルオレン(OHFl<sub>e</sub>)、5種のヒドロキシフェナントレン(OHPhe)、3-ヒドロキシフルオランテン(3-OHFrt)、1-ヒドロキシピレン(1-OHPyr)、3-ヒドロキシベンゾ[*a*]ピレン(3-OHBaP)を測定対象とした

### (3)環境試料中 PAH 類の測定

PAH は、US EPA の指定する 16 種のうち 10 種を、ニトロ化 PAH (NPAH) については、18 種類を測定対象とした。PAH と NPAH はカラムスイッチング-蛍光検出 HPLC により同時分析した。PAH キノン誘導体(PAHQ)については、トリメチルシリル誘導体化の後、ガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計(GC-MS/MS)にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1)タンチョウ組織中 POPs の測定

タンチョウの大腿筋試料の脂肪 w/w% は 0.6-10%の範囲であった(表1)。主要な化合物または類似物質の合計の脂肪重量あたりの濃度(ng/g fat)を表2に示した。測定対象化合物のうち 47 羽全てから検出されたのは HCB、DDTs、CHLs 及び PCBs で、Mirex、HCHs 及び PBDEs の検出率はそれぞれ 77%、96%及び 94%であった。各化合物濃度に明確な雌雄差や季節差は見られなかった。DDTs のうち特に 4,4'-DDE が高濃度で検出され、続いて CHLs の濃度が高かった。HCB と DDTs の濃度は、中部地方で生息していたトビについて報告されている濃度、2 個体の平均報告値(HCB: 20, DDTs : 340 ng/g fat)に近い値であったが、HCHs と PCBs はトビ(HCHs:75 PCBs:2100 ng/g fat)に比較して低かった。また、カワウ(琵琶湖)、ハシブトガラス(大阪)中 PCBs 及び PBDEs 濃度について、それぞれ PCBs 中央値(3100000, 9500 ng/g fat)、PBDEs 中央値(530, 490 ng/g fat)と、今回の調査結果に比べて高い濃度であったことが報告されている。また、測定した POPs 間の濃度レベルについて正の相関を示すことが分かった。さらに、*alpha*-HCH のエナンチオマー比(全量に対する(+))体の比)が 0.51-0.87 (平均 0.69) と (+)体の割合が高くなっており、鳥類のエナンチオ選択的代謝の結果と考えられた。結論として、北海道東部に生息するタンチョウが有機ハロゲン化学物質に複合汚染されていることを明らかにした。それらの中央値は過去に報告されている野鳥中の値に比較し低

表2 大胸筋の脂肪に含まれる POPs濃度 (ng/g fat)

	中央値	平均値	範囲	検出率 (%)
HCB	16	23	2.4-130	100
Mirex	1.5	1.8	n.d. <sup>a)</sup> -7.9	77
Σ DDTs	150	410	7.7-9400	100
Σ CHLs	36	62	4.5-390	100
Σ HCHs	4.4	16	n.d.-170	96
Σ PCBs	240	370	27-1600	100
Σ PBDEs	1.8	20	n.d.-800	94

<sup>a)</sup> n.d. 不検出

く、POPs への曝露により卵殻薄化や孵化率の低下を引き起こす可能性は低いと推定された。ただし、濃度に個体差があることから、継続した調査が必要と考えられる。

### (2)OHPAH の検出法の確立

タンチョウ胆汁中の OHPAH 濃度は pg/mL 胆汁程度であると推定され、できる限り高感度に検出する必要があった。そこで LC-MS/MS により検出する手法の検討を行った。まず OHPAH を直接検出する分析法を開発し、フェノールの CO 脱離による開裂を利用した SRM 法により OHPAH の検出限界値は 0.1-56 fmol/injection となった。2-OHNap の感度が最も高く、2-OHFl<sub>e</sub> 及び 3-OHFl<sub>e</sub> の検出限界値は 56 fmol/injection 及び 49 fmol/injection と感度が低く、実試料への適用が困難であると判断した。次に、ESI<sup>+</sup>モードにおいて高感度化が期待できるダンシルクロリドによる誘導体化法を検討した。ダンシル誘導体のスルホニル基部分の特異的な開裂を利用した SRM 法により、検出限界値は 0.06-1.1 fmol/injection となった。2-OHNap 誘導体の感度が最も高く、3-OHBaP 誘導体の感度が最も低かった。ダンシル誘導体化により、直接分析法と比較して 2.1-452 倍高感度化された。推定されるタンチョウの胆汁中 OHPAH 濃度から、胆汁 500 µL を用いて前処理を行い精製して濃縮した場合、代表的な OHPAH である 1-OHPyr の検出限界値は、胆汁中濃度に換算すると 1.6 pg/mL となり、十分な感度が得られると判断した。また、直接分析法で十分な感度が得られなかった 2-OHFl<sub>e</sub> 及び 3-OHFl<sub>e</sub> についても、それぞれ 0.5 pg/mL、0.8 pg/mL となり、十分な感度が得られた。

### (3)胆汁試料の前処理法の確立と胆汁の分析

胆汁試料は分析する前に精製と濃縮を行う必要があり、そのための前処理法として、固相抽出法とブルーレーヨン(BR)法を検討した。固相抽出法では、フェニル基を持つ逆相系の固相カートリッジと陰イオン交換のエチレンジアミン N プロピル基固定カートリッジの 2 つの固相を組み合わせて OHPAH の回収率について検討した。固相抽出法では、4-5 環 OHPAH の回収率が低かった。そこで、BR を用いた前処理法を検討した。BR は 3 環以上の多環芳香族化合物を選択的に吸着する性質を持ち、PAH 類の吸着・抽出に使用されている。また、BR 法では、レーヨン繊維を試料中でインキュベートするだけで吸着できるため、OHPAH 代謝物の脱抱合と OHPAH の吸着を同時にでき、簡便である。BR 法では、4 環 OHPAH の 1-OHPyr 及び 3-OHFrt の回収率が固相抽出と比較して高く、BR 法で胆汁の前処理を行うこととした。ニワトリの胆汁試料に開発した分析法を適用して予試験を実施したところ、OHPAH を定量できた。さらにタンチョウの胆汁から 2-OHNap、2 種の OHFl<sub>e</sub>、4 種の OHPhe、3-OHFrt、1-OHPyr を検出する

ことに成功し、1-OHPyr が最も高濃度であった。胆汁中に排泄される OHPAH は、タンチョウの PAH 曝露指標の候補になることが明らかとなった。

#### (4)環境試料中の各種 PAH 類の分析

POPs については、環境試料の分析法が十分に確立されていることから検討は不要であるが、PAH 類については十分ではなく、燃焼発生源、長距離輸送、環境中二次生成を評価するための PAH、NPAH、PAHQ について分析法を確立した。いずれの分析法も環境試料に適用できる感度と特異性を有していた。タンチョウの曝露源の1つと考えられる大気に着目して大気粒子の分析を試みたところ、北海道を含めた国内都市域の大気試料について、十分な感度で PAH 類を分析可能であることが判明した。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計6件)

Kakimoto, K., Akutsu, K., Nagayoshi, H., Konishi, Y., Kajimura, K., Tsukue, N., Yoshino, T., Matsumoto, F., Nakano, T., Tang, N., Hayakawa, K., Toriba, A., Persistent organic pollutants in red-crowned cranes (*Grus japonensis*) from Hokkaido, Japan., *Ecotoxicol. Environmental Safety*, **147**, 367-372 (2018). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.060

Hayakawa, K., Tang, N., Nagato, E.G., Toriba, A., Sakai, S., Kano, F., Goto, S., Endo, O., Arashidani, K., Kakimoto, H. Long term trends in atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons: A study of Japanese cities from 1997 to 2014. *Environmental Pollution*, **233**, 474-482 (2018). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.envpol.2017.10.038

Boongla, Y., Orakij, W., Nagaoka, Y., TANG, N., Hayakawa, K., Toriba, A., Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro-derivatives in airborne particulates by using two-dimensional high-performance liquid chromatography with on-line reduction and fluorescence detection. *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **11**(4), 283-299 (2017). (査読有)  
DOI: 10.5572/ajae.2017.11.4.283

Hayakawa, K., Tang, N., Toriba, A., Recent analytical methods for

atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *Biomedical Chromatography*, **31**(1), e3862 (2017). (査読有)  
DOI: 10.1002/bmc.3862

Toriba, A., Homma, C., Kita, M., Uozaki, W., Boongla, Y., Orakij, W., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K., Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbon quinones by gas chromatography-tandem mass spectrometry, following a one-pot reductive trimethylsilyl derivatization. *Journal of Chromatography A*, **1459**, 89-100 (2016). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.chroma.2016.06.034

Kakimoto, K., Nagayoshi, H., Inazumi, N., Tani, A., Konishi, Y., Kajimura, K., Ohura, T., Nakano, T., Tang, N., Hayakawa, K., Toriba, A., Identification and characterization of oxidative metabolites of 1-chloropyrene, *Chemical Research in Toxicology*, **28** (9), 1728-1736 (2015). (査読有)  
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00173

#### [学会発表](計12件)

鳥羽 陽, 中谷沙織, 机直美, 吉野智生, 松本文雄, 唐 寧, 早川和一, 鈴木 亮, タンチョウの胆汁に排泄される多環芳香族炭化水素類の代謝物分析, 日本薬学会第138年会, 2018年3月26日, 石川県立音楽堂, 他(石川県・金沢市)

鳥羽 陽, 深川真夢, 唐 寧, 早川和一, 鈴木 亮, GC-MS/MS による多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発と大気試料への適用, 日本分析化学会第66年会, 2017年9月11日, 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都・葛飾区)

柿本健作, 永吉晴奈, 吉田優子, 小西良昌, 梶村計志, 大浦 健, 畑 光彦, 古内正美, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽, 多環芳香族炭化水素類の大気粉塵中における粒径分布の解明, 第26回環境化学討論会, 2017年6月7日, 静岡県コンベンションアーツセンター(静岡県・静岡市)

深川真夢, 長岡祐樹, 柿本健作, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽, 大気中の粒子状物質に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の粒径分布解析, 日本薬学会第137年会, 2017年3月27日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

中谷沙織, 机 直美, 吉野智生, 松本文雄,

唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽, タンチョウの胆汁に排泄される多環芳香族炭化水素類の代謝物分析, 日本薬学会北陸支部第128 回定例会, 2016 年 11 月 27 日, 北陸大学 (石川県・金沢市)

Kakimoto, K., Akutsu, K., Nagayoshi, H., Konishi, Y., Kajimura, K., Tsukue, N., Yoshino, T., Matsumoto, F., Tang, N., Hayakawa, K., Toriba, A., Organic halogen compounds in red-crowned cranes living in Hokkaido, Japan, The 9th International PCB Workshop, 2016.10.12, Kobe International Convention Center, (Kobe, Hyogo)

Boongla, Y., Tang, N., Hayakawa, K., Toriba, A., Development of an analytical method for simultaneously determining polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro-derivatives by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, 18th International Conference of International Humic Substances Society, 2016. 9. 13, Kanazawa Bunka Hall (Kanazawa, Ishikawa)

鳥羽 陽, 生体曝露評価に利用できる多環芳香族炭化水素類の代謝物分析, 第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月 29 日, 岐阜薬科大学 (岐阜県・岐阜市)

本間千春, 宇於崎和香, 北 将大, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽, GC-MS/MS による大気粉塵中多環芳香族炭化水素キノンの発生源評価, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

柿本健作, 阿久津和彦, 永吉晴奈, 小西良昌, 梶村計志, 机直美, 吉野智生, 松本文雄, 唐 寧, 早川和一, 鳥羽 陽, 北海道に生息するタンチョウに蓄積する有機ハロゲン化学物質, 第 25 回環境化学討論会, 2016 年 6 月 8 日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

鳥羽 陽, GC-MS/MS による多環芳香族炭化水素キノンの一斉分析法の開発と環境試料への適用, 第 82 回北陸質量分析談話会, 2015 年 11 月 28 日, 北陸大学 (石川県・金沢市)

永吉晴奈, 柿本健作, 稲角直也, 谷 篤史, 小西良昌, 梶村計志, 大浦 健, 中野 武, 早川和一, 鳥羽 陽, ヒトチトクローム P450 によるクロロピレンの *in vitro* 代謝解析, 第 24 回環境化学討論会, 2015 年 6

月 24 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K. (ed.), et al., Springer Nature, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons -Environmental Behavior and Toxicity in East Asia, Analytical Methods for Oxidative Derivatives of PAHs Including Application to Environmental and Biological Samples, 2018, 274(41-55)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~eisei/Eisei%20Previous%20HP/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥羽 陽 (TORIBA, Akira)

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授  
研究者番号: 5 0 3 1 3 6 8 0

### (2) 研究分担者

柿本 健作 (KAKIMOTO, Kensaku)

大阪健康安全基盤研究所・企画部・主任研究員

研究者番号: 4 0 4 3 5 8 8 9

### (3) 連携研究者

早川 和一 (HAYAKAWA, Kazuichi)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・特任教授

研究者番号: 4 0 1 1 5 2 6 7

唐 寧 (TANG, Ning)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授

研究者番号: 9 0 3 7 2 4 9 0

### (4) 研究協力者

松本 文雄 (MATSUMOTO Fumio)

釧路市動物園・ツル担当・園長補佐

吉野 智生 (YOSHINO, Tomoo)

釧路市動物園・ツル担当・学芸担当・主事

机 直美 (TSUKUE, Naomi)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・連携研究員