

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

非意図的に副生成する臭素系ダイオキシン類の
包括的なリスク管理とTEF提示

(5－1705)

平成29年度～令和元年度

A Comprehensive Risk Management and Presentation of Toxicity Equivalency Factors
of Unintentional Brominated Dioxin-like Compounds

〈研究代表機関〉

国立研究開発法人国立環境研究所

〈研究分担機関〉

愛媛大学

令和2年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発と政策貢献的モニタリング （国立研究開発法人国立環境研究所）	17
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 排水で検出される臭素系ダイオキシン類の魚類毒性評価 （愛媛大学）	46
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	

Ⅱ-3 排出ガスで検出される臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価 (国立研究開発法人国立環境研究所)	62
---	----

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

Ⅲ. 英文Abstract	75
---------------	----

I. 成果の概要

課題名 5-1705 非意図的に副生成する臭素系ダイオキシン類の包括的なリスク管理とTEF提示

課題代表者名 鈴木 剛 (国立研究開発法人国立環境研究所 資源循環・廃棄物研究センター
基盤技術・物質管理研究室 主任研究員)

研究実施期間 平成29～令和元年度

研究経費（累計額） 138,060千円

(平成29年度：46,800千円、平成30年度44,460千円、令和元年度：46,800千円)

本研究のキーワード 臭素系ダイオキシン類、リスク管理、TEF、排出実態、毒性試験

研究体制

- (1) 臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発と政策貢献的モニタリング
(国立研究開発法人国立環境研究所)
- (2) 排水で検出される臭素系ダイオキシン類の魚類毒性評価
(愛媛大学)
- (3) 排出ガスで検出される臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価
(国立研究開発法人国立環境研究所)

1. はじめに（研究背景等）

臭素系ダイオキシン類は、2011年に開催された世界保健機関（WHO, World Health Organization）と国連環境計画（UNEP, United Nation Environment Programme）の専門家会合において、WHO-TEF（Toxic Equivalency Factor）によるリスク管理の重要性が指摘され、臭素化ダイオキシン類については、塩素化ダイオキシン類と同等の扱いで国際的に管理すべきことが提案された。国内では、ダイオキシン対策特別措置法（特措法）の附則2条「政府は、臭素系ダイオキシンにつき、人の健康に対する影響の程度、その発生過程等に関する調査研究を推進し、その結果に基づき、必要な措置を講ずるものとする」の条文に基づいて、環境省による臭素系ダイオキシン類排出実態調査が2002年から実施されており、家電リサイクル施設やデカブロモジフェニルエーテル（デカBDE）を取扱う難燃繊維加工施設から、塩素化ダイオキシン類の排出基準に相当する値を大幅に超過する臭素化ダイオキシン類の排出が確認されている。2016年には、臭素系ダイオキシン類の発生源や排出実態に関する特徴をまとめ、さらなる実態解明や詳細な排出インベントリの把握等に向けた今後の課題が検討・整理された。環境省は、現状の排出実態を継続して調査すると共に、排出実態を踏まえた制御や管理方策に資する知見を収集している。

環境省による排出実態調査は、ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計（GC-HRMS）法で行われているため、分析に要する時間と費用の制約から調査対象とする施設数や業種を絞って実施されている。そのため、環境省は、2002年から2016年にかけて複数の業種を調査して重要排出源を明らかにしてきたが、重要排出源からの現在の排出状況のフォローができていない。また、非2,3,7,8位置換の臭素化ダイオキシン類や塩素化臭素化ダイオキシン類等の臭素系ダイオキシン類を個別に測定対象とすることもほとんどなく、制御を検討するために有用な難燃剤の測定も限定的なものになっている。現状では、臭素系ダイオキシン類の包括的なリスク管理に資する排出実態調査となっているといえない。

毒性に関してみると、ラットやマウスによる研究例が少ないため固有のWHO-TEFが整備されておらず、置換位置と数が同じ塩素化ダイオキシン類のWHO-TEFを用いて、臭素系ダイオキシン類のリスク管理が実施されている。しかし、アリルヒドロカーボン受容体（AhR, Aryl hydrocarbon Receptor）結合活性に基づく2,3,7,8-TCDD比活性（REP, Relative Potency: WHO-TEF算出の際の評価項目）をみると、家電リサイクル施設や難燃繊維加工施設で高い頻度で検出される臭素化ジベンゾフランのREPとWHO-TEFに差がみられる。また、臭素系ダイオキシン類の魚類毒性は、評価実施例が非常に少なく、リスク管理に資する知見が乏しい。適切なリスク管理を推進していくためには、WHO/UNEPの専門家会合が要求する通り、臭素系ダイオキシン類のWHO-TEF設定に資する知見を積み上げていく必要がある。

2. 研究開発目的

本研究では、環境省やWHO/UNEPによる臭素系ダイオキシン類の制御や管理方策の策定に資する知見の獲得を目的として、臭素系ダイオキシン類を対象とした政策貢献的モニタリングと魚類・哺乳類毒性評価を実施した。具体的には、次の3つのサブテーマを実施して当該目的を達成した。

1) 臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発と政策貢献的モニタリング

サブテーマ1では、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法とハロゲン化ダイオキシン類及び難燃剤を検出する機器分析網羅検出法を最適化して、臭素系ダイオキシン類及び関連物質を検出する包括的迅速検出法を開発した。包括的迅速検出法を用いる政策貢献的モニタリングでは、環境省過年度調査に基づいて、重要排出源と未調査業種に分けて、現状の臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出実態を調査し、リスク管理や排出削減の観点で実測データを取りまとめた。

2) 排水で検出される臭素系ダイオキシン類の魚類毒性評価

サブテーマ2では、2,3,7,8-TCDDを陽性対照物質として曝露試験を実施して、試験条件の最適化を行い、高い再現性で鋭敏に毒性を検出するエンドポイントを受精後28日目の死亡率に決定した。エンドポイントに対する6種の臭素系ダイオキシン類の毒性値と魚類REPを算出して、曝露水やメダカ胚の化学分析結果との関連性を考察すると共に、WHO-TEFと比較した。

3) 排出ガスで検出される臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価

サブテーマ3では、2,3,7,8-TCDDを陽性対照物質として曝露試験を実施して、発達神経毒性や肝毒性といったエンドポイントの基準となる基礎データを得た。各エンドポイントに対する4種の臭素系ダイオキシン類の毒性値と哺乳類REPを算出して、脳、血漿及び肝臓の化学分析結果との関連性を考察すると共に、WHO-TEFと比較した。

3. 研究開発の方法

1) 臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発と政策貢献的モニタリング

臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発では、臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法とハロゲン化ダイオキシン類及び難燃剤のGCxGC-HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法の最適化と適用性評価を実施した。生物検定スクリーニング法の最適化では、平成25年度から平成27年度に実施した環境研究総合推進費で開発した生物検定法による塩素化ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の分別測定評価法の抽出・精製・分画操作の簡略化を行った。機器分析網羅検出法の最適化では、臭素化ダイオキシン類、塩素化ダイオキシン類、塩素化臭素化ダイオキシン類及び難燃剤の各種標準物質を対象として、GCxGC-HRTofMS法では測定物質の分離や検出下限の確認、UHPLC/APGC-QToFMS法では各種測定パラメーターの調整を実施した。適用性評価では、環境省の過年度排出実態調査の難燃製品取扱施設の排水及び作業環境試料のうち、臭素化ダイオキシン類の実測濃度が測定されている試料について、生物検定スクリーニング法及び機器分析網羅検出法で測定した。

包括的迅速検出法を用いた政策貢献的モニタリングでは、環境省過年度調査に基づいて、重要排出源として家電リサイクル施設とデカBDE取扱施設を、未調査業種として一般廃棄物最終処分場、産業廃棄物最終処分場、その他難燃剤取扱施設と廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設を選定して、臭素系ダイオキシン類と関連物質の排出実態調査を実施した。家電リサイクル施設では10施設を対象として作業環境と排水等を採用した。デカBDE取扱施設では16施設を対象として排水や関連する下水処理施設の流入水や放流水を採用した。一般廃棄物最終処分場と産業廃棄物最終処分場では10施設と6施設を対象として浸出水や放流水を採用した。その他難燃剤取扱施設では、3施設を対象として排水や関連する下水処理施設の流入水や放流水を採用した。廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設では、燃焼物、燃焼残渣、排ガスや排水等を採用した。採取試料について生物検定スクリーニング法及び機器分析網羅検出法で測定した。

2) 排水で検出される臭素系ダイオキシン類の魚類毒性評価

初期生活段階のヒメダカ (*Oryzias latipes*) を対象に臭素系ダイオキシン類の毒性を評価し、各異性体の毒性値及び相対毒性強度を求めた。臭素系ダイオキシン類の試験に先立って、2,3,7,8-TCDD (TCDD) を陽性対照として試験条件を検討した。受精後3時間以内のヒメダカの胚に対して被検物質を6時間曝露し、その後は清水にて飼育を継続し、受精後28日目までの間、ふ化、心嚢または卵黄嚢の浮腫、死亡を観察した。試験は4連で実施し、1つは被検物質の卵内濃度の測定用に、残りの3つを上記エンドポイントの観察に用いた。また、曝露開始時及び終了時の曝露溶液を回収し、被検物質の濃度測定に用いた。この条件で、1,3,6,8-/1,3,7,9-TeBDD (TeBDD)、2,3,8-TrBDF (TrBDF)、2,3,7,8-TeBDF (TeBDF)、2-C-3,7,8-BDF (TeXDF)、1,2,3,7,8-PeBDF (1-PeBDF)、2,3,4,7,8-PeBDF (2-PeBDF) の試験を行った。各曝露試験における被検物質の測定結果から、曝露開始時及び終了時の試験水中濃度を求め、その平均値を算出した。また、各被検物質の卵内濃度も算出した。各試験における死亡率、ふ化率、浮腫の発生率に対して用量応答曲線を求めた。得られた用量応答曲線から、受精後21日目または28日目における20%または50%致死濃度 (LC₂₀またはLC₅₀)、ふ化阻害または浮腫が発生する20%または50%影響濃度 (EC₂₀またはEC₅₀) をそれぞれ求めた。得られた各毒性値に基づき、TCDDの毒性を1とした時の各化合物の相対毒性強度 (REP) を算出した。さらに、被検物質の分子構造から水/オクタノール分配係数 (Log K_{ow}) を予測し、Log K_{ow}から試験水から卵に移行する被検物質の量を推定した。加えて、

ヒメダカ胚におけるTCDDのLC₂₀値及び*in vitro*で求めた臭素系ダイオキシン類のREPに基づいて、各異性体のLC₂₀値を予測するモデルを構築した。

3) 排出ガスで検出される臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価

発達神経毒性研究のために妊娠雌C57BL/6Jマウスを、肝毒性及び体内動態の解析のために成体雄C57BL/6Jマウスを用いて、臭素系ダイオキシン類の毒性を評価し、各異性体の毒性値及びREPを求めた。4種類の臭素系ダイオキシン類(TrBDF、TeBDF、1-PeBDF、TeXDF)の毒性評価に際して、曝露量の根拠となる現行のWHO-TEFに基づき、陽性対照物質であるTCDDの低用量群と高用量群(0.6 µg/kg bw: 低用量群、3.0 µg/kg bw: 高用量群)に対応する2種類の用量の曝露群を異性体毎に作製した。対照群には溶媒(0.6% n-ノナンを含むコーン油)を投与した。発達神経毒性研究のための曝露に関しては、妊娠12.5日目の妊娠マウスに経口投与をおこない、産仔の発達神経毒性を評価した。肝毒性と体内動態研究に関しては、8週齢の成体雄C57BL/6Jマウスに経口投与を行い、投与後1、3、7、28日目(一部は56日目も追加)に肝臓、脳、血漿を採取した。発達神経毒性試験としては、①母子間の社会的コミュニケーションの指標となる新生仔の超音波発声試験と②集団型全自動・記憶学習測定システムIntelliCageを用いた行動試験を実施した。①に関しては、生後3日目から9日目にかけて、防音箱内に30℃にセットしたホットプレート上に一匹ずつ置いた条件で高周波マイクロホンで1分間超音波を記録し、各個体の60~100kHzの超音波の周波数の合計持続時間を算出して対照群と曝露群とで比較した。②に関しては、胎仔期に臭素系ダイオキシン類の曝露を受けた9~11週齢の雄マウスをIntelliCage(New Behavior社、Zurich)に導入し、1週間行動観察した。IntelliCageは、プラスチック製のケージ(55×37.5×20.5 cm)の中に、4隅にマウスが内部に侵入して鼻でスイッチを押す「ノーズポーク」を行うことで水を飲むことができるコーナーと呼ばれる小部屋(15×15×21 cm)を備えており、1ケージ16匹までのマウスの行動を観察することができる。本研究では、2台のIntelliCageシステムを用いて、32匹の雄の行動パターンの同時計測を行った。特に、IntelliCageシステムに入ってから1日目の新奇環境におけるデータ解析と、環境に慣れた状態であるIntelliCageに入ってから7日間のデータ解析に注目した。体内動態の解析に関しては、肝臓及び脳は、試料採取時点でプールし(n=5~6)、GC-qMSまたはGC-HRMSを用いて測定した。

4. 結果及び考察

1) 臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発と政策貢献的モニタリング

(1) 臭素系ダイオキシン類及び関連物質を検出する包括的迅速検出法の開発

臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法の最適化: 精製・分画操作の簡易化を行うため、省

供試料・省資材・省溶媒を検討した。省供試料と省溶媒として、排水で0.2 L相当、作業環境で1 m³相当の抽出液を供試料量とした。省資材と省溶媒として、精製カラムの55%硫酸シリカゲル積載量を1 gとして精製画分をヘキサン8 ml溶出、分画カラムの10%硝酸銀シリカゲル積載量を0.1 gとして塩素化ダイオキシン類をヘキサン3 ml溶出(塩素化ダイオキシン類画分)、臭素化ダイオキシン類を4%アセトン/ヘキサン3 ml溶出(臭素化ダイオキシン類画分)とした。定量下限は、排水で1.0 pg TCDD-EQ (TCDD等量)/L、建屋内空気0.25 pg TCDD-EQ/m³を下回るようにした。最終的に確定したフローを図1に示す。

機器分析網羅検出法の最適化: GCxGC-HRTofMSでは、化学物質標準品を添加した難燃製品取扱施設の排水抽出液の測定時の二次元トータルイオンクロマトグラム(2D-TIC)を得て、化学物質標準品の保持時間と各種ダイオキシン類の溶出傾向を確認した。臭素化ダイオキシン類の溶出は遅く、塩素化ダイオキ

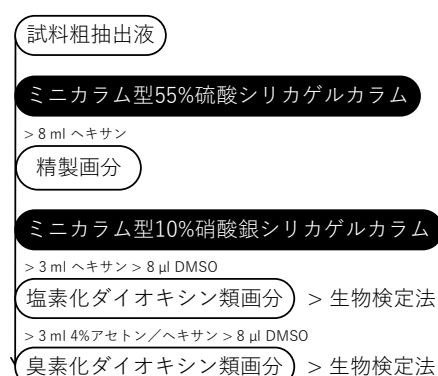


図1 臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法のフロー

シン類間よりも臭素化ダイオキシン類間の二次元保持時間の差は大きかった。塩素化臭素化ダイオキシン類の保持時間の傾向は、塩素化ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の中間とみられた。S/N比（約3）による便宜的な検出下限は、塩素化ダイオキシン類、臭素化ダイオキシン類及び塩素化臭素化ダイオキシン類で、それぞれ絶対量として5~10 pg、1~10 pg及び1~5 pg程度であった。UHPLC/APGC-QToFMSの各種測定パラメーターの最適値は、乾燥ガス流量が3 L/min、乾燥ガス温度が350℃、シースガス流量が7.5 L/min、シースガス温度が325℃、ネブライザ圧力が55 psi、キャピラリー電圧が3500 V、ノズル電圧が100 Vであった。APGC-QToFMS法の各種測定パラメーターの最適値は、キャリアガス流量が8 mL/min、コロナ電流値が0.5 μ A、乾燥ガス流量が5 L/min、乾燥ガス温度が360℃、キャピラリー電圧が2500 Vであった。この条件で、0.3~80 pgの臭素化ダイオキシン類及び難燃剤が検出可能であった。

適用性評価：環境省が過年度に実施した排出実態調査の難燃製品取扱施設の排水20試料及び作業環境20試料の臭素化ダイオキシン類のWHO-TEQ（WHO-TEQ_{PBDD/DFs}：GC-HRMSによる臭素化ダイオキシン類の実測値に塩素化ダイオキシン類のWHO-TEFを乗じて算出）と臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法で得られるTCDD-EQ（TCDD-EQ_{PBDD/DFs}：生物検定法DR-CALUXアッセイによる臭素化ダイオキシン類画分の実測値）を算出して比較した（図2）。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/WHO-TEQ_{PBDD/DFs}比をみると、両試料共に0.1以下を示すものはなかった。難燃製品取扱施設の排水20試料のうち、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高く検出された3試料を対象として、GCxGC-HRToFMS及びUHPLC/APGC-QToFMSによる網羅分析検出法の試行的評価を実施した。これらの3試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}（GC-HRMSによる臭素化ダイオキシン類の実測値に生物検定法DR-CALUXアッセイにおける2,3,7,8-TCDD比活性（CALUX-REP）を乗じて算出）は、排水試料①で360 pg TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lと430 pg Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/L、排水試料②で380 pg TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lと24 pg Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/L、排水試料③で360 pg TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lと1.8 pg Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lである。排水試料①のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}は臭素化ダイオキシン類で説明できるのに対して、排水試料②や③のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}は臭素化ダイオキシン類だけで説明できないことがわかる。GCxGC-HRToFMSによる評価では、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の関係性を反映して、排水試料①と比較して、排水試料②と③でより多くの臭素化合物由来のマススペクトルが確認された。UHPLC/APGC-QToFMSによる評価についても、臭素化ダイオキシン類を不純物として含有するデカBDEの濃度が、排水試料①で190,000 ng/L、排水試料②で2,300 ng/L、排水試料③で120 ng/Lであり、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の関係性を概ね反映した結果が得られた。

本研究の結果は、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法の定量下限を、塩素化ダイオキシン類の基準の10%以下に設定することで、把握すべき臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出を適切に検出できることを示唆した。また、GCxGC-HRToFMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法を適用することで、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}関連物質の把握が可能であると考えられた。本研究では、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が定量下限以上の試料について、検出濃度や評価優先度に応じて、臭素化ダイオキシン類や関連物質の構成を把握するアプローチをとることとした。

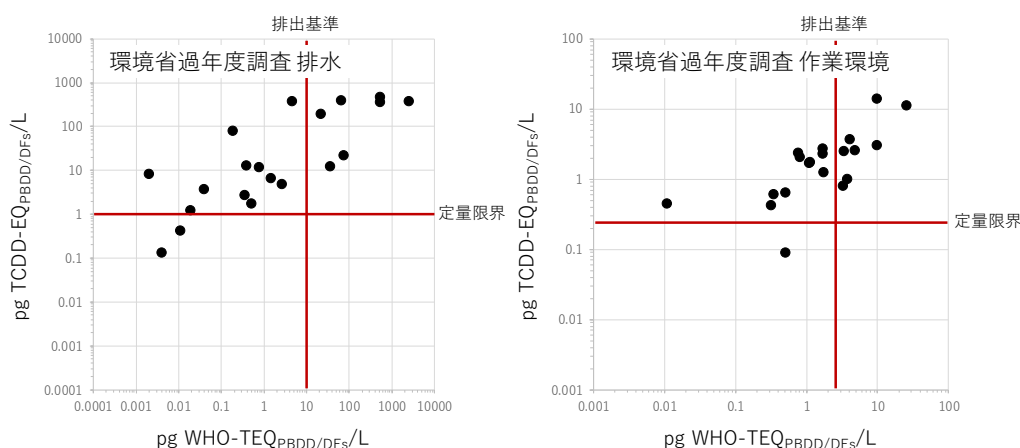


図2 環境省が過年度に実施した排出実態調査の難燃製品取扱施設の排水20試料及び作業環境20試料のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PBDD/DFs}

(2) 政策貢献のモニタリング

重要排出源における排出濃度：家電リサイクル施設とデカBDE取扱施設における臭素化ダイオキシン類（WHO-TEQ_{PBDD/DFs}）を含む臭素系ダイオキシン類（TCDD-EQ_{PBDD/DFs}）の排出実態調査と環境省過年度調査の結果概要を表1に示す。一部の家電リサイクル施設は、作業環境と排水の濃度に基づく、過年度調査と同じく、臭素系ダイオキシン類の排出源であった。一方で、臭素化ダイオキシン類の排出源としての重要度は、過年度と比較して低下していた。一部のデカBDE取扱施設は、排水の濃度に基づく、過年度調査と同じく、臭素系ダイオキシン類の排出源であった。臭素化ダイオキシン類の排出源としての重要度は、2017年度時点で過年度と比較して同程度であった。

表1 重要排出源におけるTCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びWHO-TEQ_{PBDD/DFs}の排出濃度（中央値と範囲）

分類	業種	媒体	ダイオキシン類基準	年次	排出濃度		
重要排出源	家電リサイクル施設	作業環境	2.5 pg WHO-TEQ/m ³	FY2002*	37 (3.2~180)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /m ³	(n=10)
				FY2011*	3.1 (0.34~9.8)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /m ³	(n=16)
				FY2017	1.1 (0.32~7.5)	pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /m ³	(n=21)
				FY2017	4.9 (2.1~6.8)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /m ³	(n=4)**
	デカBDE取扱施設	排水	10 pg WHO-TEQ/L	FY2002*	31 (2.5~65)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=6)
				FY2011*	88 (1.4~530)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=10)
				FY2017	5.4 (<1.0~1,500)	pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	(n=12)
				FY2017	5.2 (0.99~74)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=4)**
				FY2004*	不検出	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=6)
				FY2006*	0.69~27	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=2)
				FY2013*	2.7 (2.0~2,500)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=5)
				FY2015*	0.59~39	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=2)
				FY2017	23 (1.3~860)	pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	(n=12)
				FY2017	7.7 (0.48~130)	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=5)**

*環境省過年度調査、**TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が塩素化ダイオキシン類の基準と比較して高い或いは評価重要度が高いと判断した試料

未調査業種における排出濃度：一般廃棄物最終処分場、産業廃棄物最終処分場、その他難燃剤取扱施設と廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設における臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出実態調査の結果概要を表2に示す。未調査業種は、放流水や排ガスの濃度に基づく、排出源としての重要度が低いと考えられた。

表2 未調査業種におけるTCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びWHO-TEQ_{PBDD/DFs}の排出濃度（中央値と範囲）

分類	業種	媒体	ダイオキシン類基準	排出濃度				
未調査業種	一般廃棄物最終処分場	排水	10 pg WHO-TEQ/L	<1.0 (<1.0～8.6)	pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	(n=10)		
	<0.006			pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=1)*			
	8.5 (<1.0～32)			pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	(n=6)			
	<0.006			pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=1)*			
	その他難燃剤取扱施設	排水	10 pg WHO-TEQ/L	2.2 (<1.0～7,100)	pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	(n=4)		
				2.3	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=1)*		
	廃電子基板を再資源化する 非鉄製錬施設			排水	10 pg WHO-TEQ/L	1.1	pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	(n=1)
						0.0030	pg WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /L	(n=1)*
	排ガス	0.1～1 ng WHO-TEQ/m ³ N	0.010 (0.0050～0.046)	ng TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /m ³ N	(n=3)			
			0.000091 (0.000060～0.0076)	ng WHO-TEQ _{PBDD/DFs} /m ³ N	(n=3)*			

*TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が塩素化ダイオキシン類の基準と比較して高い或いは評価重要度が高いと判断した試料

臭素化ダイオキシン類とデカBDEについて：デカBDE製剤は、臭素化ダイオキシン類を不純物として含むことが良く知られている。ここでは、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}とデカBDEが共に定量できている試料のうち、臭素化ダイオキシン類の熱分解や非意図的な副生成の影響を受けている試料（非鉄製錬施設の廃ガス、燃焼物及び排水）を除く試料（n=18）を対象として、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}とデカBDEの関連性を評価した（図3）。両者は、非常に強い正の相関関係を示し（ $r=0.917$, $P<0.001$ ）、臭素化ダイオキシン類がデカBDE関連物質であることを強く示唆した。デカBDEは、2017年5月に開催されたストックホルム条約の締約国会議において、同条約の付属書A（廃絶）に追加され、原則として製造・使用等が禁止されている。日本では、これを受けて、2018年4月に化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）

の第一種特定化学物質にデカBDEを指定した。これらは、2018年4月以降、日本でデカBDEが使用されなくなり、それに伴って製造・使用を通じた臭素化ダイオキシン類の環境排出が減少することを示唆している。

臭素化ダイオキシン類と臭素系ダイオキシン類

について：臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法は、前処理方法や使用するDR-CALUXアッセイの検出原理を考慮すると、臭素化ダイオキシン類に加えてその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質を検出する。ここでは、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}に対する臭素化ダイオキシン類やその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質の寄与を評価した。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が共に定量できている試料 (n=28) を対象として、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の関連性を評価した (図4)。両者は、強い正の相関関係を示し (r=0.795, P<0.001)、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}と共にTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高くなることを示した。評価対象試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}／Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の比は、数十～数千となるケースがあり、臭素化ダイオキシン類だけでなく、臭素化ダイオキシン類と発生源や挙動が類似するその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質がTCDD-EQ_{PBDD/DFs}に関与していることを示唆している。そこで、塩素化ダイオキシン類の基準と比較してTCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高い或いは評価重要度が高いと判断された試料について、PXDD/DFs評価を実施した。塩素と臭素が混合して置換しているTri～PeXDD/DFsの濃度範囲は、160～2,300 ng/Lであり、Tri～PeXDD/DFsは、TCDD-EQとの単純な関係性が示されないものの、検出濃度を考慮するとTCDD-EQに関連すると考えられた。次いで、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤が共に定量できている試料 (n=65) のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤の関連性を評価した (図5)。両者は、強い正の相関関係を示し (r=0.821, P<0.001)、難燃剤と共にTCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高くなることを示した。本研究の結果は、臭素化ダイオキシン類を含むその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質が難燃剤と発生源や挙動を共にすることを示し、その制御において難燃剤の管理が重要であることを示唆した。

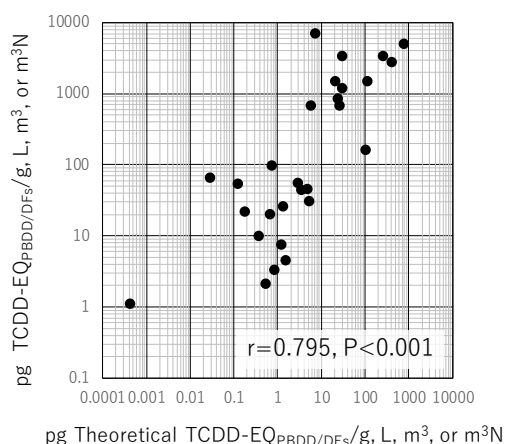


図4 本研究で評価した試料 (n=28) のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}

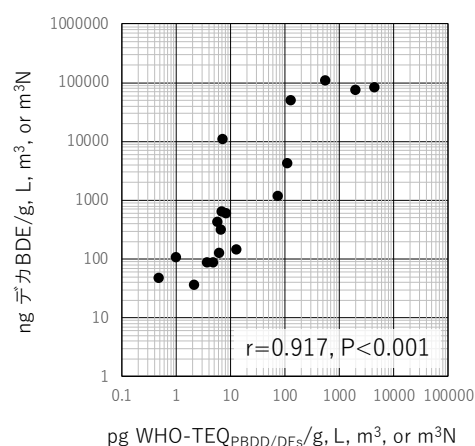


図3 本研究で評価した試料 (n=18) のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}とデカBDE濃度

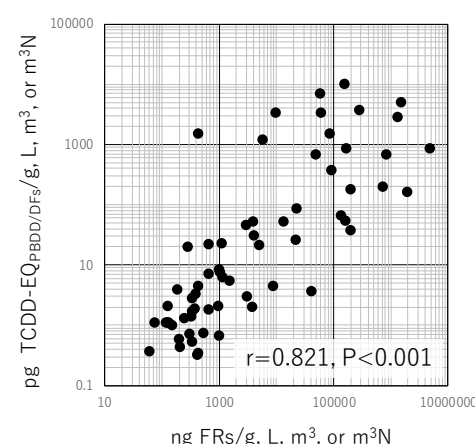


図5 本研究で評価した試料 (n=65) のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤濃度

排水・排ガス処理過程における臭素系ダイオキシン類及び難燃剤の挙動について：排水処理では懸濁態の除去を目的とした多段階の排水処理が、排ガスではバクフィルターや電気集塵機による除塵が、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出低減に有効であった (図6)。臭素化ダイオキシン類については、塩素化ダイオキシン類と同様に疎水性や粒子吸着性を示すことから、塩素化ダイオキ

シン類と同じく、作業環境、排水及び排ガスにおいて液相や気相ではなく粒子相に存在すると考えられる。この結果として、排水については懸濁態に、作業環境や排ガスについては粒子相に、それぞれ着目した処理が有効であると考えられる。臭素系ダイオキシン類については、臭素化ダイオキシン類以外の物質が特定できていないが、塩素化ダイオキシン類や臭素化ダイオキシン類と同様の物性を示す可能性が高く、挙動を共にする粒子状物質の管理が重要であると考えられた。

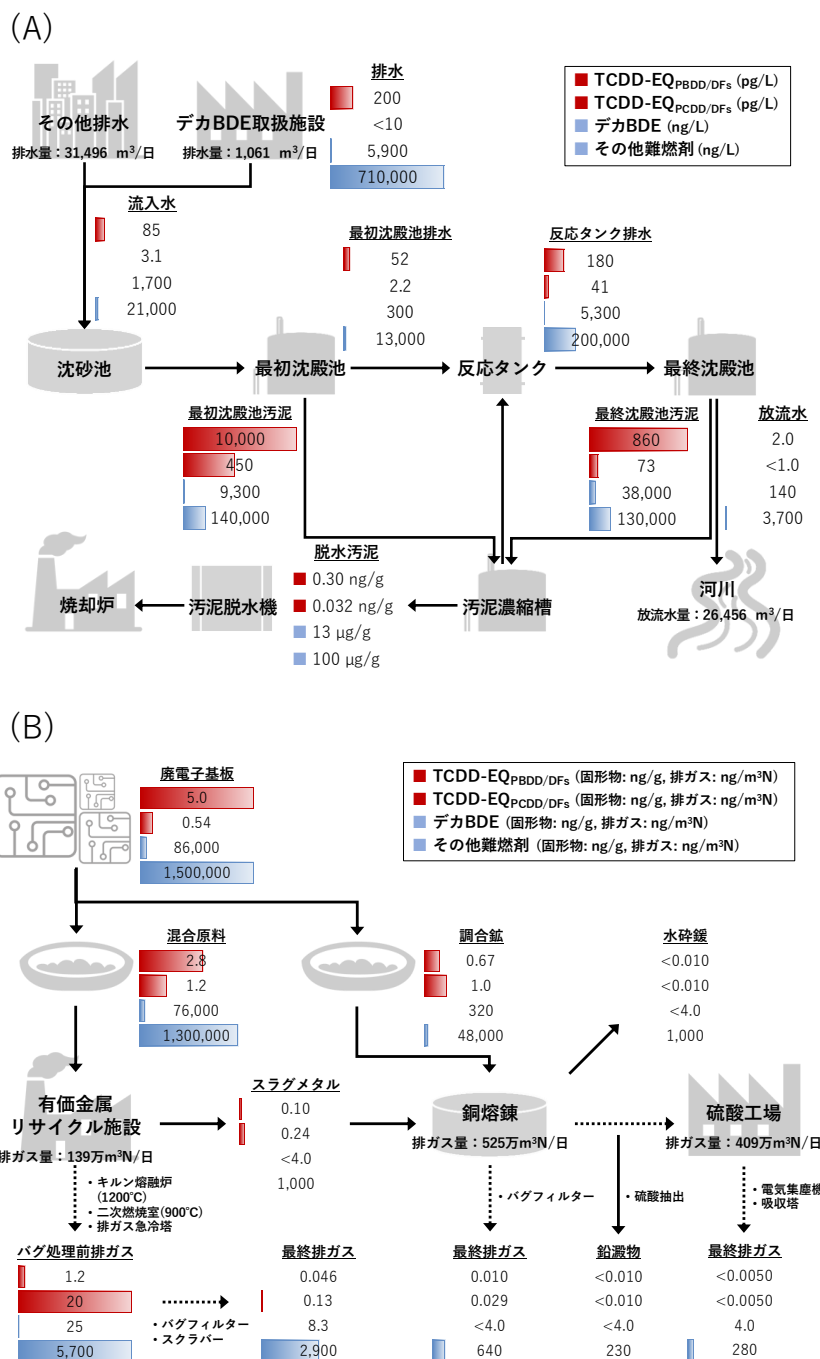


図6 排水・排ガス処理過程における臭素系ダイオキシン類及び難燃剤の挙動

(A) デカBDE取扱施設の排水が流入する下水処理施設、(B) 廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設

2) 排水で検出される臭素系ダイオキシン類の魚類毒性評価

TCDDを用いた魚類毒性試験法の確立：TCDDを陽性対照として用いた試験条件検討の結果、表3に示す条件で曝露試験を実施することにした。観察項目は受精後28日目までの個体の生死、浮腫の発生、正常なふ化とした。多数の異性体の毒性を評価するために繰り返し試験を実施する必要がある、本試験条件は試験期間及びコストともに妥当であると考えられた。

表3 初期生活段階のヒメダカを対象にしたダイオキシン類曝露試験の条件

項目	内容
生物種	ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>) の胚、受精後3時間以内のもの
溶媒	ジメチルホルムアミド
試験水	調製水 (Reconstituted water ISO 6341-1982)
濃度区	5濃度区と対照区 (公比3の希釈系列)
試験個体数	15個体
繰り返し数	4 (発生及び生存の観察に3, 曝露水及び卵の化学物質測定に1)
照明時間/設定温度	15時間/25℃
曝露時間	6時間
飼育容器	曝露時～受精後7日目: 内径41.5 mm ガラス製ディッシュ ● 曝露開始時の24～48時間前に各曝露濃度の曝露水でプレコンディショニングを行う。 ● 曝露終了時に清浄なディッシュに移し替える。 受精後7日目～21日目: 48穴プレート (各ウェルに1個体ずつ) 受精後21日目～28日目: 200 mL 容ガラス容器
振とう	プレコンディショニング時から受精後21日目まで、緩やかに振とう (35～40往復/分)
水質測定	水温、pH、溶存酸素濃度

臭素系ダイオキシン類の魚類毒性試験: 毒性試験の結果、2, 3, 7, 8位にハロゲンが置換していないTeBDD及びTrBDFを除く全ての被検物質において、卵黄囊の浮腫、血栓、尾部からの出血などblue-sac diseaseと呼ばれるダイオキシン類曝露による典型的な影響が観察された。これらの症状が重篤な個体はふ化せずに死亡したが、ふ化した個体においても遊泳失敗及び摂餌障害により受精後28日目まで断続的に死亡が観察された。

受精後28日目のLC₂₀に基づいてREPを算出したところ、毒性の強いものから順にTeXDF>TCDD>TeBDF>2-PeBDF>1-PeBDFとなった (表4)。このREPの順位及び卵内濃度から算出したREPは、ニジマスの胚を対象にインジェクション法で実施された試験や、齧歯類の細胞を用いた*in vitro*試験からそれぞれ算出されたものと概ね一致していた。これらのことは、本研究で確立した試験法の妥当性を示している。一方、曝露水中の濃度をベースに算出したREPは、卵内濃度をベースにしたREPより低くなる傾向を示し、とくに5臭素化体ではその乖離は大きくなった。このことから、5臭素化体よりも臭素の置換数が多い異性体については、曝露水から卵への移行量が少なくなるため、曝露水中濃度から求めたREPは、各化合物がもつポテンシャルよりも低くなることが予想された。

表4 被検物質の曝露水中または卵内濃度から求めた受精後28日目のLC₂₀値とそれに基づくREP

化合物名	LC20-water		LC20-egg		REP-water		REP-egg		ニジマス	DR-CALUX
	µg/L	pM	pg/g	pmol/g	weight	molar	weight	molar	molar	molar
TCDD	0.00417	13.0	617	1.92	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
TeBDF	0.00829	17.1	1012	2.09	0.50	0.76	0.61	0.92	0.25	0.67
TeXDF	0.00248	5.63	185	0.421	1.7	2.3	3.3	4.6	未評価	未評価
1-PeBDF	1.16	2057	5804	10.3	0.0036	0.0063	0.11	0.19	0.041	0.16
2-PeBDF	0.153	272	1955	3.47	0.027	0.048	0.32	0.55	0.071	0.25

そこで、臭素系ダイオキシン類の各異性体の分子構造から水/オクタノール分配係数 (Log K_{ow}) を推定し、卵/曝露水濃度の比との関係を解析した (図7)。TrBDFを除き、Low K_{ow}と卵/曝露水濃度比の間には有意な負の関係が検出された。臭素置換数が増加するに従って、曝露水から卵への移行量が減少することが明らかとなった。臭素が置換した化合物の場合、塩素が置換したものと比較して置換数の増加に伴うLog K_{ow}の上昇量が大きくなるため、とくに高臭素化体では卵への移行量が著しく減少すると予想される。図7で求めた回帰式から6及び7臭素化DFの曝露水から卵への移行割合を求めると、5臭素化体と比較しても一桁程度少なくなると予想された。さらに、本研究では、EPI suiteで推定したLog K_{ow}、*in vitro*のCALUXアッセイのEC₂₀から求めたREP、メダカの卵におけるTCDDのLC₂₀値を用いることで、4～7臭素化DFの毒性値を予測できることが示唆された。

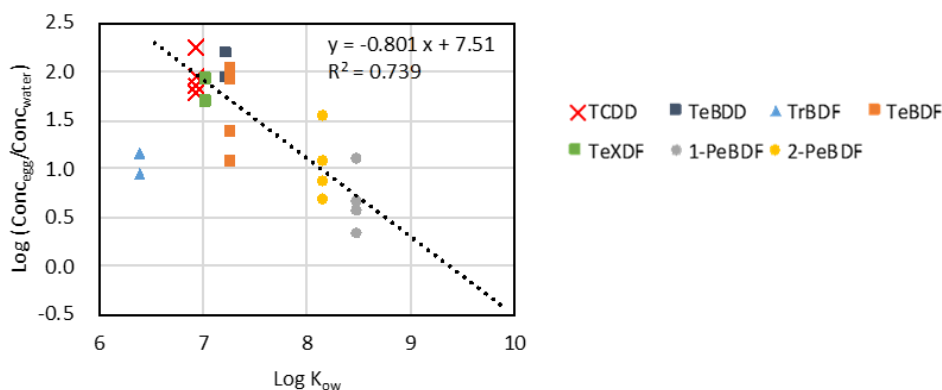


図7 ダイオキシン類のLog K_{ow}と卵／曝露水濃度比との関係

3) 排出ガスで検出される臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価

超音波発声試験：陽性対照としてTCDD曝露群の超音波発声解析を行った結果、1分間の測定時間中の累積発声時間がTCDDの高用量曝露群（3.0 μg/kg bw）で有意に減少することが明らかとなった。同様に臭素系ダイオキシン類を評価した結果、TeBDFとTeXDFに関しては、高用量曝露群（45 μg/kg bwと40 μg/kg bw）でTCDDと同様の有意な累積発声時間の低下が認められた。一方で、TrBDFと1-PeBDFに関しては、高用量曝露群（375 μg/kgと175 μg/kg bw）においても、超音波発声の累積時間は対照群と有意な差が認められなかった。

集団型全自動・記憶学習測定システムIntelliCageによる行動試験：IntelliCageに胎仔期TCDD曝露マウスを導入して、24時間の累積コーナー侵入回数を比較すると、TCDDの高用量曝露群で対照群と比較して有意に侵入回数が低下していた。この結果は、ダイオキシン類の曝露によって新奇環境における探索行動が変化する可能性を示唆している。臭素系ダイオキシン類についてもIntelliCageに最初に導入してから24時間の累積コーナー侵入回数を指標に評価を行った結果、TeBDFの高用量曝露群で対照群と比較して有意な累積コーナー侵入回数の低下が認められた。一方、TrBDF、1-PeBDF、TeXDFでは、高用量曝露群においても、対照群との有意な差が認められなかった。

肝毒性及び体内蓄積量の解析：8週齢の成体雄マウスを用いて、TCDD曝露群で摘出した脳及び肝臓の重量を測定した結果、TCDD高用量曝露群で有意な肝重量の増加が観察された。臭素系ダイオキシン類についても肝重量を比較した結果、TeBDF、1-PeBDF、TeXDFの高用量曝露群で有意な肝重量の増加が認められた。一方、TrBDFでは高用量曝露群でも肝重量の増加が認められなかった。TCDDの体内蓄積量は、曝露1日後の時点でTCDD投与量の69%が肝臓、0.36%が血漿、0.23%が脳に蓄積していた（図8）。臭素系ダイオキシン類に関して、TeBDFは肝臓33%、血漿0.11%、脳0.02%、TrBDFは肝臓0.007%、血漿0.0007%、脳0.001%、1-PeBDFは肝臓24%、血漿0.04%、脳0.004%、TeXDFは肝臓35%、血漿0.12%、脳0.03%であり、特にTrBDFで顕著に蓄積量が少なかった。肝臓における半減期は、TCDDで8.7日、TeBDFで8.8日、TrBDFで1.2日、1-PeBDFで13日、TeXDFで5.6日であった（図8）。

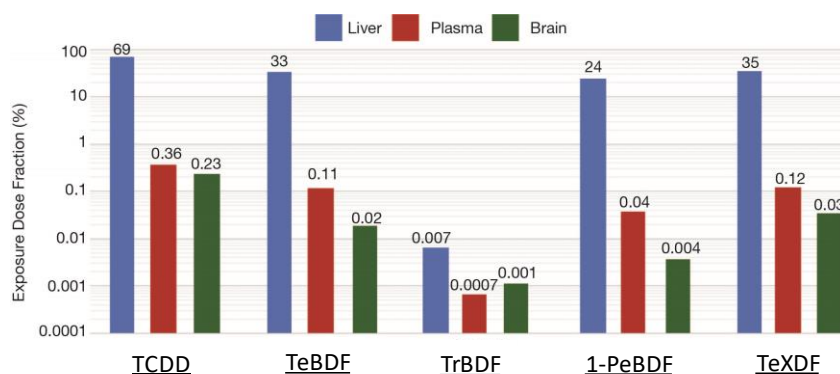


図8 成体雄へのTCDD及び4種の臭素系ダイオキシン類の投与後1日目の肝臓、血漿、脳における蓄積割合

胎仔期曝露による行動影響と成体曝露による肝重量増加に関する考察：TCDD曝露で観察された超音波発声の累積発声時間の低下やIntelliCageにおける新奇環境中の探索行動の低下のうち、両方或いはいずれか一つは胎児期TeBDF及びTeXDF曝露でも観察された。脑中蓄積割合はTCDD>TeBDF≒TeXDF>1-PeBDF>>TrBDFであり、脳内蓄積割合が多い臭素系ダイオキシン類が発達神経毒性を強く誘発する可能性が示唆された。また、成体における肝重量増加はTrBDFを除く全ての群で観察され、肝臓蓄積割合はTCDD>TeBDF≒TeXDF≒1-PeBDF>>TrBDFであり、やはり蓄積量と肝重量増加の間にも関連性が示唆された。

哺乳類REPに関する考察：臭素系ダイオキシン類のREP順位を整理すると、TeBDF≒TeXDF>1-PeBDF>TrBDFの順番となった（表5）。投与重量ベースのREPは、肝重量変化を指標とするとWHO-TEFとよく一致した。行動影響を指標とすると、TrBDFや1-PeBDFでは、脳内移行量が低下することで行動影響が現れにくくなるため、REPが低くなる可能性が示唆された。よって、臭素系ダイオキシンのWHO-TEFによるリスク管理は、哺乳類では肝重量変化を指標とした場合に妥当であり、行動影響を指標した場合でも5臭素化以上で過大評価になる傾向であるが、安全側にたって考えると概ね妥当と考えられる。

表5 本研究で示された哺乳類REP

化学物質名	PCDD/DFs WHO-TEF (2006)	DR-CALUX (H4IIE-Luc) EC20-REP	新生仔 超音波発声	成体			
				新奇 探索行動	肝臓 AhR発現	脳重量 変化	肝重量変化
TrBDF	-	0.00039	<0.0079	<0.0079	<0.0079	変化なし	<0.0079
TeBDF	0.1	0.16	0.067<0.33	0.067<0.33	>0.067	変化なし	0.067<0.33
1-PeBDF	0.03	0.090	<0.017	<0.017	検討せず	変化なし	0.017<0.086
TeXDF	0.1	0.61	0.075<0.38	<0.075	検討せず	変化なし	0.075<0.38

5. 本研究により得られた主な成果

本研究では、サブテーマ1～3において、申請書の研究計画に記載している研究を概ね着実に遂行し、測定法や毒性評価法の最適化によって追加データを得ることができ、当初の想定以上の成果を得ることができた。具体的には、サブテーマ1では難燃剤を対象とした包括的迅速検出法の開発やそれに基づく排出実態調査や排ガス処理過程における挙動・消長に関する詳細調査を追加実施することで臭素系ダイオキシン類のリスク管理に資する重要な知見を得た。サブテーマ2では当初予定よりも多くの臭素系ダイオキシン類の毒性評価を実施すると共に卵や曝露水の化学分析を追加実施して臭素化ダイオキシン類と魚類毒性の関係性に関する考察を深めることができた。サブテーマ3では、脳、血漿、肝臓といった生体組織の化学分析を追加実施して臭素化ダイオキシン類と哺乳類毒性の関係性に関する考察を深めることができた。

(1) 科学的意義

サブテーマ1の臭素系ダイオキシン類及び関連物質を対象とした政策貢献的モニタリングで得られた成果のうち、特に意義の大きいものは次の三点と考えられる。一つ目は、製造・再資源化・最終処分を通じて、臭素化ダイオキシン類とデカBDEに極めて強い正の相関関係が示された点である（ $r=0.917$, $P<0.001$ ）。これは、2018年4月に化審法の第一種特定化学物質にデカBDEが指定されたことに伴って、製品ライフサイクルの上流側からの臭素化ダイオキシン類の排出量が激減することを示唆する。二点目は、製造・再資源化・最終処分を通じて、塩素化ダイオキシン類と同様の毒性反応を示す臭素化ダイオキシン類以外の臭素系ダイオキシン類が濃度高く存在することが示された点である。そのリスク性に注視する必要があるものの、臭素系ダイオキシン類と難燃剤に比較的強い正の相関関係が示され

（ $r=0.821$, $P<0.001$ ）、難燃剤の適切な管理にアプローチすることで、臭素系ダイオキシン類のリスクを管理できる可能性が示された。三点目は、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出低減の要点として、粒子状物質の管理が重要であることを明らかにした点である。排水では懸濁態に、作業環境や排ガスでは粒子相に、それぞれ着目した処理が有効であった。一方で、施設内の排水処理や排ガス処理を通じて臭素系ダイオキシン類が集積する媒体の把握やその管理、処理実態の確認が必

要と考えられた。

サブテーマ2の臭素系ダイオキシン類を対象とした魚類毒性試験で得られた成果のうち、特に意義が大きいものは次の三点と考えられる。一つ目は、初期生活段階の魚類に対して毒性を評価した場合、臭素化ダイオキシン類でも塩素化ダイオキシンと同様に、2,3,7,8位置換体の毒性ポテンシャルが高く、観察される表現型が酷似していた点である。このことから、臭素系ダイオキシン類の生態リスクを評価するには主に2,3,7,8位置換体に留意すべきということが言える。二つ目は、臭素化ダイオキシン類の推定 $\text{Log } K_{ow}$ と環境水から卵への移行割合との間に有意な負の関係が検出されたことである。臭素の置換数が増えるに従って卵への移行量が著しく減少することが示唆され、WHO-TEFだけでなく卵への移行量を考慮した魚類REPを用いなければリスクを過大に見積もる可能性が高いことが示された。三つ目は、ヒメダカの卵内濃度をベースに求めたREPは、齧歯類の細胞を用いて *in vitro* で求めたREPと概ね一致していたことである。つまり、体内への取り込みを考慮せずに各化合物のポテンシャルを比較した場合、魚類と哺乳類との間で大きな違いはなく、*in vitro* の結果を魚類への影響予測に適用可能であることが示された。ただし、塩素化臭素化体については、魚類において強い毒性を示したため、水生生物へのリスク評価の際に注意が必要であるとともに、その詳細な機構の解明が必要である。

サブテーマ3の臭素系ダイオキシン類を対象とした哺乳類毒性試験で得られた成果のうち、特に意義が大きいものは次の三点と考えられる。一つ目は、臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性を評価する場合、発達神経毒性に関して、新生仔期の超音波発声及び成体における新奇環境への適応能力が有効なエンドポイントであることがわかった点である。二つ目は、毒性影響と臓器蓄積量に一定の関連性が示されたことである。これは、臭素系ダイオキシン類の体内動態を把握することで毒性影響がある程度推測できる可能性を示している。三つ目は、WHO-TEFと発達神経毒性及び肝毒性に基づくREPを比較した結果、エンドポイント毎の僅かな差異はあるものの、概ね一致していた点である。これは、哺乳類ではWHO-TEFを用いて臭素系ダイオキシン類のリスク管理を行うことが妥当であることを示唆する。

サブテーマで得られた成果を総合すると、臭素化ダイオキシン類の環境排出は製品ライフサイクルの上流から減少していくものの下流から継続する見込みであり、これらと挙動を共にする粒子状物質の制御が重要である。粒子状物質に着目した排出削減やリスク管理を実施するにあたっては、人ではWHO-TEFの応用が妥当であると考えられるが、魚類ではWHO-TEFと共に魚類REPを併用することが望ましい。また、本研究の実施によって、塩素化臭素化ダイオキシン類を例として、臭素化ダイオキシン類以外の臭素系ダイオキシン類の環境排出や哺乳類・魚類毒性が示され、その評価重要度が明らかとなった。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

環境省・臭素系ダイオキシン類の排出源情報の収集・整理調査検討会において、デカBDE取扱施設からの臭素系ダイオキシン類排出実態調査結果を検討委員に説明し、重要排出源における臭素系ダイオキシン類の排出実態の現状と今後の展望に関する議論に貢献した。また、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法を用いて、検討会で詳細調査する施設の選定に貢献した。家電リサイクル施設における排出実態調査結果については、関連する業界団体に提示して、臭素系ダイオキシン類の排出の管理状況や今後の見通しについて意見交換した。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

臭素化ダイオキシン類の排出実態や排出低減に係る実測データは、環境省において現在検討中の臭素系ダイオキシン類の排出抑制対策のとりまとめに貢献できる可能性がある。臭素系ダイオキシン類と共にPBDEsを含む廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設における調査結果は、電気電子機器製品の膨大な発生量（世界で年間4,600万トン）や再資源化のニーズを考慮すると、ストックホルム条約「PBDEsに関するBAT/BEPガイダンス」策定に際して有用な知見になり、国際的な化学物質政策の推進に資する知見となる可能性がある。

初期生活段階のヒメダカを対象にした試験から得られた臭素化ダイオキシン類のREPが得られたことで、WHO-TEFを適用するよりも正確な水生生物へのリスク評価が可能となる。また、本課題では試験対

象としなかった異性体についても、Log K_{ow} 、*in vitro*試験で求めたREP、ヒメダカに対するTCDDのLC₂₀値を用いることで、曝露水中濃度ベースのREPを予測することが可能となった。これらの実測及び予測REPは、排水等、水圏に対する臭素系ダイオキシン類の流入を想定した場合の基準値の検討に際し、有用な科学的根拠のひとつとなると思われる。

臭素系ダイオキシン類の人健康影響に関する疫学的知見は報告が極めて少なく、現時点では動物モデルの毒性値・体内動態を用いてリスク評価を行う必要がある。本研究では、3～5 臭素化DFについて、REPがWHO-TEFに概ね一致することや、曝露後の臓器移行量と毒性影響の関連性を示すことができ、行政が環境中の実測値から健康リスクを評価するための基礎となる知見が得られた。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. TAKIGAMI: Toxicol. In Vitro, 44, 134-141 (2017) Dioxin-like activity of brominated dioxins as individual compounds or mixtures in in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.
- 2) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. HANDA, H. TAKIGAMI: Anal. Chim. Acta, 975, 86-95 (2017) Separate screening of brominated and chlorinated dioxins in field samples using in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.
- 3) 橋本俊次：地球環境, 24 (1), 3-14 (2019) 包括的二次元ガスクロマトグラフィーと精密質量分析による環境モニタリングの試み
- 4) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, H. MATSUKAMI, Y. NOMA, N. KAJIWARA: Chemosphere, 244, 125448 (2020) Validity of using a relative potency factor approach for the risk management of dioxin-like polychlorinated naphthalenes.
- 5) E. KIMURA, G. SUZUKI, N. URAMARU, T. ENDO, F. MAEKAWA: Environ. Int. Behavioral impairments in infant and adult mouse offspring exposed to 2,3,7,8-tetrabromo dibenzofuran in utero and via lactation. (Accepted)
- 6) S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI, T. IEDA, G. SUZUKI: Anal. Chem. Comprehensive Analysis of Polybromochlorodibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans as Mixed Halogenated Compounds in Wastewater Samples from Industrial Facilities by GC×GC/ToFMS and Post Data Processing. (Under review)

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 鈴木剛、仲山慶、前川文彦、Nguyen Minh Tue、木村栄輝、道中智恵子、松神秀徳、橋本俊次：廃棄物資源循環学会誌、29(6), 470-481 (2018) 臭素系ダイオキシン類の毒性評価と排出実態調査-現状と今後の展開-
- 2) 鈴木剛：廃棄物資源循環学会誌、30(3), 179-185 (2019) ダイオキシン類のリスク管理 —AhRに着目したアプローチと類縁化合物への展開—

(2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) 木村栄輝、前川文彦、遠山千春：第187回日仏生物学会例会 (2017) 仔の鳴き声から探るダイオキシンの曝露影響と毒性メカニズム
- 2) F. MAEKAWA: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AUTISM (2017) Experimental approaches toward understanding the association between early-life exposure to environmental chemicals and developmental disorders.

- 3) 橋本俊次、松神秀徳、家田曜世、鈴木剛：第27回環境化学討論会（2018）ハロゲン化ダイオキシン類及びその関連物質の包括的迅速検出法の開発～GC×GC-ToFMSを用いた多成分網羅分析法の検討～
- 4) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, S. SAKAI: SETAC North America 39th Annual Meeting (2018) Effect-based approach for evaluation of brominated dioxins and dioxin-like compounds in effluents and indoor air from BFRs treating facility.
- 5) H. Matsukami, S. Hashimoto, G. Suzuki. 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2018) GC-APCI/LC-ESI/QTOF-MS for the determination of brominated dioxins and brominated flame retardants released from flame-retarded product handling plants.
- 6) S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI, T. IEDA, G. SUZUKI: 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2018) Comprehensive analysis of halogenated compounds in discharge water samples by GC×GC/ToFMS.
- 7) 橋本俊次：統計数理研究所共同研究「平成30年度 統計学的アプローチによる問題解決のための環境化学分析の最適化・高度化に関する研究集会」（2018）ノンターゲットモニタリングへの精密質量分析の応用.
- 8) 木村栄輝、鈴木剛、浦丸直人、前川文彦：日仏生物学会第189回例会（2018）環境中に存在する臭素系ダイオキシンの発達期曝露により誘導される行動異常
- 9) 前川文彦：第35回生殖・発生毒性学東京セミナー（2018）発達期の環境化学物質曝露と行動の発達
- 10) G. SUZUKI, H. MATSUKAMI: 廃棄物管理に関する大阪国際会議-官民連携による環境技術（2019）Heading towards the environmentally sound management of e-waste: Current situation of hazardous chemical emission control in e-waste recycling in Japan
- 11) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI: 9th International Symposium on Flame Retardants (2019) Current status of brominated dioxins and related compounds emission from commercial DecaBDE handling facility in Japan.
- 12) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, S. SAKAI: 9th International Symposium on Flame Retardants (2019) Development of in vitro cell-based detection method for brominated dioxins in waste water and working air of BFRs handling facility.
- 13) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Brominated dioxins emission from e-waste recycling facility in Japan.
- 14) S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI, T. IEDA, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) COMPREHENSIVE ANALYSIS OF PXDD/Fs AND HALOGENATED COMPOUNDS IN DISCHARGE WATER SAMPLES BY GC×GC/TOFMS.
- 15) 鈴木剛、道中智恵子、橋本俊次、松神秀徳：第28回環境化学討論会（2019）家電リサイクル施設における臭素系ダイオキシン類の排出実態
- 16) 鈴木剛、道中智恵子、橋本俊次、松神秀徳：第28回環境化学討論会（2019）デカBDE取扱施設における臭素系ダイオキシン類の排出実態
- 17) G. SUZUKI: 12th BioDetectors Conference (2019) Effect-based detection and evaluation of brominated dioxins from significant emission sources in Japan: The current status and perspective of PBDD/DFs and related compounds.
- 18) H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, G. SUZUKI: 9th International Symposium on Flame Retardants (2019) Emission status of flame retardants in sewage effluents from commercial DecaBDE handling facility in Japan.
- 19) H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated

Persistent Organic Pollutants (2019) Emission status of flame retardants in indoor air and water effluent from e-waste recycling facility in Japan.

- 20) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI: SETAC North America 40th Annual Meeting (2019) Brominated dioxins emission from e-waste recycling facility in Japan.
- 21) 橋本俊次：新しい水質分析に関するワークショップ～水道への展開～（2019）最近の分析技術：GCxGC/ToFMSによるノンターゲットモニタリングの試み.
- 22) 松神秀徳：統計数理研究所共同研究「令和元年度 統計学的アプローチによる問題解決のための環境化学分析の最適化・高度化に関する研究集会」（2019）GC-APCI/LC-ESI/QTOF-HRMS法による廃水のノンターゲット分析.
- 23) 仲山 慶, Nguyen Minh Tue, 徳住英彰, 藤岡直人, 浦丸直人, 鈴木剛：日本動物学会第90回大阪大会シンポジウム「動物学から考える動物モデルの活用戦略：種の選択と健康・環境研究への応用」（2019）魚類胚を用いた化学物質の有害性評価について～臭素系ダイオキシン類の毒性評価を例に～
- 24) 木村栄輝, 鈴木剛, 浦丸直人, 前川文彦：第46回日本毒性学会学術年会（2019）臭素系ダイオキシン類の周産期曝露が発達期および成熟期マウスの行動に及ぼす影響.
- 25) N.M. TUE, E. KIMURA, F. MAEKAWA, A. GOTO, T. KUNISUE, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Uptake, clearance and metabolites of 2,3,7,8-tetrabrominated dibenzofuran in mouse.
- 26) F. MAEKAWA: NIPS international workshop “Sensing food/nutrient/environment toward integrative metabolic regulation” (2019) Early developmental exposure to environmental chemicals and energy metabolism.

＜ポスター発表＞

- 1) 松神秀徳、橋本俊次、鈴木剛：第27回環境化学討論会（2018）ハロゲン化ダイオキシン類及びその関連物質の包括的迅速検出法の開発～工場排水の自動固相抽出法及びUHPLC/APGC/QTOFMSを用いた多成分網羅分析法の検討～
- 2) 鈴木剛、道中智恵子、松神秀徳、橋本俊次、酒井伸一：第27回環境化学討論会（2018）難燃製品取扱施設の排水及び建屋内空気を対象とした臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法の開発
- 3) K. NAKAYAMA, N.M. TUE, N. FUJIOKA, H. TOKUSUMI, N. URAMARU, G. SUZUKI: SETAC North America 40th Annual Meeting (2019) Relative potency factors of brominated dioxins based on Japanese medaka early-life stage toxicity test.
- 4) 徳住英彰, Tue NM, 藤岡直人, 浦丸直人, 鈴木 剛, 仲山 慶：第25回日本環境毒性学会研究発表会（2019）メダカの胚を用いたダイオキシン類の相対毒性強度（REP）を求めるための試験法の検討
- 5) 藤岡直人, 徳住英彰, Tue NM, 浦丸直人, 鈴木 剛, 仲山 慶：第25回日本環境毒性学会研究発表会（2019）メダカの初期生活段階毒性試験に基づく臭素系ダイオキシン類の相対毒性強度（REP）の算出
- 6) K. NAKAYAMA, N.M. TUE, N. FUJIOKA, H. TOKUSUMI, N. URAMARU, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Relative potency factors of brominated dioxins based on Japanese medaka early-life stage toxicity test.
- 7) K. NAKAYAMA, N.M. TUE, N. FUJIOKA, H. TOKUSUMI, G. SUZUKI: 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (2019) Toxic equivalency factors of brominated dibenzofurans based on Japanese medaka early-life stage toxicity test.

- 8) E. Kimura, G. Suzuki, N. Uramaru, F. Maekawa: The 55th Congress of the European Societies of Toxicology (2019) Disruption of liver gene expression and ultrasonic vocalization of infant mouse offspring perinatally exposed to 2,3,7,8-tetrabromodibenzofuran.
- 9) E. KIMURA, G. SUZUKI, N. URAMARU, F. MAEKAWA: NIPS international workshop “Sensing food/nutrient/environment toward integrative metabolic regulation” (2019) Perinatal exposure to dioxins impacts on gene expression and infant behavior in the mouse.
- 10) 木村栄輝、鈴木剛、浦丸直人、前川文彦：第46回日本毒性学会学術年会（2019）臭素系ダイオキシン類の周産期曝露が発達期及び成熟期マウスの行動に及ぼす影響
- 11) E. Kimura, N. Uramaru, G. Suzuki, F. Maekawa: The Society of Toxicology 58th Annual Meeting (2019) Behavioral impairments of infant and adult mice exposed to 2,3,7,8-tetrabromodibenzofuran in utero and via lactation.
- 12) F. Maekawa, E. Kimura, N. Uramaru, G. Suzuki: 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (2019) Common behavioral characteristics in the mice maternally exposed to different types of dioxins.

7. 研究者略歴

研究代表者

鈴木 剛

岩手大学大学院連合農学研究科修了、博士（農学）
現在、国立研究開発法人国立環境研究所 主任研究員

研究分担者

1) 橋本 俊次

愛媛大学農学部卒業、博士（学術）
現在、国立研究開発法人国立環境研究所 室長

2) 仲山 慶

九州大学大学院生物資源環境科学府修了、博士（農学）
現在、愛媛大学 講師

3) Nguyen Minh Tue

愛媛大学大学院連合農学研究科修了、博士（農学）
現在、愛媛大学 研究員

4) 前川 文彦

早稲田大学大学院人間科学研究科修了、博士（人間科学）
現在、国立研究開発法人国立環境研究所 主任研究員

II. 成果の詳細

II-1 臭素系ダイオキシン類の包括的迅速検出法の開発と政策貢献的モニタリング

国立研究開発法人国立環境研究所

資源循環・廃棄物研究センター

環境計測研究センター

基盤技術・物質管理研究室

応用計測化学研究室

鈴木 剛

橋本 俊次

<研究協力者>

国立研究開発法人国立環境研究所

資源循環・廃棄物研究センター

基盤技術・物質管理研究室

松神 秀徳

道中 千恵子

平成29～令和元年度研究経費（累計額）：108,920千円（研究経費は間接経費を含む）

（平成29年度：37,700千円、平成30年度：35,815千円、令和元年度：35,405千円）

[要旨]

本研究では、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法と塩素化臭素化ダイオキシン類を含むハロゲン化ダイオキシン類及び難燃剤を検出するGCxGC-HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法から成る包括的迅速検出法を開発し、環境省の過年度調査で重要排出源と評価されたデカBDE取扱施設と家電リサイクル施設に加えて、これまで未調査の一般廃棄物最終処分場、産業廃棄物最終処分場、デカBDE以外の難燃剤取扱施設と廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設を対象として、臭素系ダイオキシン類及び関連物質の排出実態を調査した。重要排出源からの臭素化ダイオキシン類の高濃度排出は、重要排出源のデカBDE取扱施設や家電リサイクル施設の一部施設で認められるものの、過年度と比較して減少傾向であった。未調査業種からの臭素化ダイオキシン類の排出濃度は、重要排出源と比較して低い傾向であった。臭素化ダイオキシン類とデカBDEに極めて強い正の相関関係が示され（ $r=0.917$, $P<0.001$ ）、デカBDEを管理することで臭素化ダイオキシン類のリスクを管理できることが強く示唆された。製造・再資源化・最終処分を通じて、臭素化ダイオキシン類以外の臭素系ダイオキシン類も比較的高い濃度で存在していた。そのリスク性に注視する必要があるものの、臭素系ダイオキシン類と難燃剤に比較的強い正の相関関係が示され（ $r=0.821$, $P<0.001$ ）、難燃剤の適切な管理にアプローチすることで、臭素系ダイオキシン類のリスクを管理できる可能性が示された。排水及び排ガス中の臭素系ダイオキシン類は、塩素化ダイオキシン類と同様の処理で低減可能であったが、処理を通じて臭素系ダイオキシン類が集積する媒体の把握やその管理、処理実態の確認が必要と考えられた。本研究の実施によって、現状の重要排出源や未調査業種からの臭素系ダイオキシン類の排出実態が把握でき、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の低減対策とその効果に関する知見が得られた。取得結果は、環境省による臭素系ダイオキシン類の制御や管理方策の策定に資する有用なデータになると考えられる。

[キーワード]

臭素系ダイオキシン類、生物検定法、リスク管理、排出実態、難燃剤

1. はじめに

臭素系ダイオキシン類は、塩素化ダイオキシン類の塩素が臭素に置き換わっている臭素化ジベンゾ-パラ-ダイオキシン (PBDDs, polybrominated dibenzo-*p*-dioxins) と臭素化ジベンゾフラン (PBDFs, polybrominated dibenzofurans)、塩素と臭素が混在して置換している塩素化臭素化ジベンゾ-パラ-ダイオキシン (PXDDs, mixed halogenated dibenzo-*p*-dioxins) と塩素化臭素化ジベンゾフラン (PXDFs, mixed halogenated dibenzofurans) の総称である。臭素化ダイオキシン類には塩素化ダイオキシン類と同じく210種類の異性体が、塩素化臭素化ダイオキシン類には理論上約4,600種類の異性体が存在するが、塩素化ダイオキシン類と同様に、毒性や難分解性を示す2,3,7,8位にハロゲンが置換した臭素化ダイオキシン類や塩素化臭素化ダイオキシン類のことを意味することが多い。

臭素系ダイオキシン類は、デカブロモジフェニルエーテル (デカBDE) 等の臭素系難燃剤 (BFR, Brominated Flame Retardant) に含まれる不純物であり^{1,2)}、電気電子機器や防災家具等のBFR含有製品のライフサイクルを通じて生じる非意図的分解生成物でもある³⁻⁹⁾。難燃剤は、プラスチックや繊維等の燃えやすい材料を難燃化するために広く使用されている物質であり、火災の発生や延焼を防ぎ火災による死亡リスクを低下する有用性を持つ。身の回りの難燃剤含有製品は、電気電子機器や防災カーテンの他、防災家具や自動車の内装等が挙げられ、一般生活に欠かせないものとなっている。環境省の取りまとめによると、2018年の国内における難燃剤の推定需要は、臭素系難燃剤で38,650トン/年、リン系難燃剤で27,700トン/年、無機系難燃剤で28,900トン/年となっており、臭素系難燃剤が最も高い状況である (塩素系難燃剤は2018年の需要なし)。従って、非意図的に副生成する臭素系ダイオキシン類の環境排出は、臭素系難燃剤含有製品のライフサイクルを通じて今後も継続すると考えられる。

臭素系ダイオキシン類は、2011年に開催された世界保健機関 (WHO, World Health Organization) と国連環境計画 (UNEP, United Nation Environment Programme) の専門家会合において、WHO-TEF (Toxic Equivalency Factor) によるリスク管理の重要性が指摘され、塩素化ダイオキシン類と同等の扱いで国際的に管理すべきことが提案されている¹⁰⁾。国内では、特措法の附則2条「政府は、臭素系ダイオキシンにつき、人の健康に対する影響の程度、その発生過程等に関する調査研究を推進し、その結果に基づき、必要な措置を講ずるものとする」の条文に基づいて、環境省による臭素系ダイオキシン類排出実態調査が2002年から実施されており、一部の家電リサイクル施設やデカBDEを取扱う難燃繊維加工施設から、塩素化ダイオキシン類の排出基準に相当する値を大幅に超過する臭素化ダイオキシン類の排出が確認されている状況にある¹¹⁾。2016年には、臭素系ダイオキシン類の発生源や排出実態に関する特徴をまとめ、さらなる実態解明や詳細な排出インベントリの把握等に向けた今後の課題が検討・整理されている¹¹⁾。環境省は、現状の排出実態を継続して調査すると共に、排出実態を踏まえた制御や管理方策に資する知見を収集している。

一方、環境省排出実態調査は、ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計 (GC-HRMS) 法で行われているため、分析に要する時間と費用の制約から調査対象とする施設数や業種が限られている。環境省は、2002年から2016年にかけて複数の業種を調査して重要排出源を明らかにしてきたが、現状の重要排出源からの排出状況を把握できていない。当該調査の期間において、テトラ～ヘプタブロモジフェニルエーテル (テトラ～ヘプタBDE) 及びヘキサブロモシクロデカン (HBCD) は、2009年5月及び2012年10月にそれぞれ残留性有機汚染物質 (POPs, Persistent Organic Pollutants) に関するストックホルム条約 (POPs条約) へ追加され、国内において化審法 (化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律) の第一種特定化学物質として規制された。これに伴って、国内で生産・使用される臭素系難燃剤の種類や量は変化しており、臭素系ダイオキシン類の環境排出も変化している可能性が高い。そのため、過去と現在の臭素系ダイオキシン類の排出実態は必ずしも一致しないと考えられ、現状の排出実態の把握は制御や管理方策の検討に必要不可欠である。また、排出実態調査では、非2,3,7,8位置換の臭素化ダイオキシン類や塩素化臭素化ダイオキシン類等の臭素系ダイオキシン類を個別に測定対象とすることもほとんどなく、制御を検討するために有用な難燃剤の測定も限定的なものになっている。現状では、臭素系ダイオキシン類の包括的なリスク管理に資する排出実態調査となっているといえない。

2. 研究開発目的

申請書の研究計画では、一年目に臭素系ダイオキシン類と関連物質の包括的迅速検出法の開発及び排出実態調査の計画立案と排出源スクリーニング開始、二年目と三年目に排出源スクリーニングと排出源施設内での挙動・消長に関する詳細調査の実施と成果の取りまとめとしていた。

これに基づいて、本研究では、臭素系ダイオキシン類と関連物質の包括的迅速検出法を開発して、環境省による臭素系ダイオキシン類の制御や管理方策の策定に資する知見の獲得を目的とした政策貢献的モニタリングを実施した。はじめに、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法と塩素化臭素化ダイオキシン類を含むハロゲン化ダイオキシン類及び難燃剤を検出するGCxGC-HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法を最適化して、臭素系ダイオキシン類及び関連物質を検出する包括的迅速検出法を開発した。次に、包括的迅速検出法を用いる政策貢献的モニタリングでは、環境省過年度調査に基づいて、重要排出源と未調査業種に分けて、現状の臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出実態を調査し、リスク管理や排出削減の観点で実測データを取りまとめた。重要排出源としては、過年度調査で臭素化ダイオキシン類の重要排出源と位置付けられている施設を対象とした。未調査業種としては、環境省によってこれまでに調査が実施されていない業種を対象とした。

3. 研究開発方法

1) 臭素系ダイオキシン類及び関連物質を検出する包括的迅速検出法の開発

本研究は、(1) 臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法の最適化、(2) GCxGC-HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法の最適化、(3) 難燃製品取扱施設の排水や建屋内空気による適用性評価の3つの課題で構成される。各課題について以下に記載する。

(1) 臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法の最適化

環境省告示の生物検定法の中から、「AhRバインディングアッセイ法」のDR-CALUXアッセイ法を活用した。DR-CALUXアッセイは、哺乳類細胞を用いるAhR結合レポーター遺伝子アッセイであり、毒性ベースでダイオキシン類縁化合物を検出できることから臭素化ダイオキシン類の毒性評価にも応用されている¹²⁻¹⁴⁾。ここでは、平成25年度から平成27年度に実施した環境研究総合推進費で開発した生物検定法による塩素化ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の分別測定評価法の抽出・精製・分画操作の簡略化を行った¹⁵⁾。具体的には、精製カラム（55%硫酸シリカゲルカラム）と分画カラム（10%硝酸銀シリカゲルカラム）の省供試料・省資材・省溶媒を行い、化学物質標準品や排水・作業環境試料の粗抽出液による回収試験や再現性評価を実施した。

(2) GCxGC-HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法の最適化

多次元ガスクロマトグラフィー／高分解能飛行時間記録型質量分析（GCxGC-HRTofMS）と四重極飛行時間型質量分析計（QToFMS）を検出器として超高速液体クロマトグラフ（UHPLC）と大気圧ガスクロマトグラフ（GC-APCI）を適宜交換して測定する多成分網羅分析法（UHPLC/APGC-QToFMS法）を、機器分析網羅検出法に活用した。臭素化ダイオキシン類、塩素化ダイオキシン類、塩素化臭素化ダイオキシン類及び難燃剤を対象として、GCxGC-HRTofMS法では化学物質標準品の分離と検出下限の確認を、UHPLC/APGC-QToFMS法では各種測定パラメーターの調整を実施した。

(3) 環境省過年度調査の難燃製品取扱施設の排水及び作業環境を用いた適用性評価

環境省の過年度排出実態調査¹⁰⁾において難燃製品取扱施設で採取された排水及び作業環境のうち、臭素化ダイオキシン類の実測濃度が測定されている試料を20試料ずつ選定して、臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法及びUHPLC/APGC-QToFMSによる機器分析網羅検出法に適用した。臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法で得られるTCDD等量（TCDD-EQ_{PBDD/DFs}）と臭素化ダイオキシン類のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}（機器分析の実測値に塩素化ダイオキシン類のWHO-TEF¹⁴⁾を乗じて算出）や臭素化ダイオキシン類と難燃剤の従来測定法とUHPLC/APGC-QToFMSによる機器分析網羅検出法で得られる定量値の

比較考察を行い、適用性や活用法について考察した。また、GCxGC-HRToFMS及びUHPLC/APGC-QToFMSによる機器分析網羅検出法を一部試料に適用し、TCDD-EQ関連物質の把握を試行的に実施した。

2) 政策貢献的モニタリング

本研究は、臭素系ダイオキシン類及び関連物質を検出する包括的迅速検出法を用いた政策貢献的モニタリングである。ここでは、(1) 重要排出源を対象とした試料採取、(2) 未調査業種を対象とした試料採取、(3) 採取試料中の臭素系ダイオキシン類及び関連物質の測定に分けて記載する。

本研究における試料採取やGC-HRMS法による臭素化ダイオキシン類の測定については、「ポリブロモジベンゾ-パラ-ジオキシン及びポリブロモジベンゾフランの暫定調査方法（平成19年3月 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室）」に準じて実施した。

(1) 重要排出源を対象とした試料採取

重要排出源は、環境省過年度調査で臭素化ダイオキシン類の重要排出源と位置付けられている家電リサイクル施設とデカBDE取扱施設とした¹¹⁾。

家電リサイクル施設：本研究では、2011年度に環境省が排出実態調査を実施した10施設を対象とした。家電リサイクル施設は、全国に47施設が存在しており（令和元年7月1日現在）、特定家庭用機器再商品化法（家電リサイクル法）に基づいて、主にテレビ、家庭用エアコン、電気冷蔵庫・電気冷凍庫、電気洗濯機・衣類乾燥機の家電4品目について、再商品化等処理を実施している¹⁷⁾。全国の再商品化等処理重量（2018年度実績）は、56.4万トンと報告されている。調査対象10施設の再商品化等処理重量（2018年度実績）は、本研究のアンケート調査によると20万トンであり、全国の4割を占めている。

家電リサイクル施設では、保管、手解体、破碎、素材分離を経て、再資源化商品の出荷が行われている。ここでは、臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出や人への曝露実態を把握するため、手解体工程の作業環境及び排水を採取した。調査対象10施設のうち、6施設は公共水域へ、3施設は下水道へ、それぞれ排水していた。1施設は、施設内で焼却処理していた。作業環境は、作業者が手解体を行う工程で、ハイボリウムエアサンプラー（吸引量：500 L/min）を用いて、施設操業中の午前と午後2時間ずつ採取した。排水は、施設総合排水を表層から、操業時間中の午前と午後褐色ガラス瓶に3.5 Lずつ採水した。また、処理前の排水についても、素材分離工程排水等を採取した。試料採取は、一般社団法人家電製品協会の協力を得て、2017年12月から2018年2月に実施した。

デカBDE取扱施設：2015年度のPRTRデータによると、デカBDE取扱施設は、全国に24施設存在している。本研究では、このうち16施設を調査対象とした。調査対象施設のデカBDE移動登録量（2015年度実績）は、2.6～73,000 kgであった。調査対象施設の業種と施設数は、繊維工業が6施設、非鉄金属製造4施設、ゴム製品2施設、化学工業2施設、プラ製品1施設であった。

デカBDE取扱施設では、デカBDEを原料として製品製造や加工が実施されており、施設内で生じた工程排水が排水処理を経て施設外へと排出されている。ここでは、臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出実態を把握するため、排水を採取した。調査対象16施設のうち、6施設は公共水域へ、10施設は下水道へ、それぞれ排水していた。このうち、12施設では、施設外に排出されている排水を各ピットの表層から、施設操業中に褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採水した。下水道に排水している施設のうち、3施設については、これら施設の排水が流入している2カ所の公共下水処理施設の流入水と放流水を表層から、褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採水した。試料採取は関係の自治体に事前に相談して、必要の際は試料採取許可や現場立ち会い等の協力を得て、2017年12月から2018年2月に実施した。

2017年12月から2018年2月に調査した施設のうち、臭素系ダイオキシン類の濃度が高く、排水量も多い3施設を対象として、2019年10月に再度排水試料を採取した。これは、2018年4月にデカBDEが化審法の第一種特定化学物質に指定されたことを踏まえて実施したものであり、デカBDEの使用禁止による臭素化ダイオキシン類の排出実態の変化を評価することを目的とした。調査対象3施設のうち、2施設は公共水域へ、1施設は下水道へ排水しており、後者の施設については、施設の排水だけでなく、施設排水が流入している下水処理施設の調査も実施した。当該下水処理施設では、流入水を沈砂池に集め、

最初沈殿池、反応タンク、最終沈殿池を経て、公共水域に放流水を排出している。ここでは、排出実態の把握に加えて、排水処理過程における臭素系ダイオキシン類及び関連物質の挙動を評価するため、施設排水、流入水、最初沈殿池排水、反応タンク排水、最初沈殿池汚泥、最終沈殿池汚泥及び脱水汚泥を採取した。排水及び汚泥は施設操業中に褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採取し、脱水汚泥は同じく施設操業中にステンレスバット上に複数回採取混合して褐色ガラス瓶に1 kg程度採取した。

(2) 未調査業種を対象とした試料採取

未調査業種は、環境省によってこれまでに調査が実施されていない業種のうち、臭素系難燃剤含有媒体或いはデカBDE以外の難燃剤を取扱っている一般廃棄物最終処分場、管理型産業廃棄物最終処分場、その他難燃剤取扱施設及び廃電子基板の再資源化を行う非鉄製錬施設を対象とした。

一般廃棄物最終処分場：2016年度の環境省廃棄物処理技術情報¹⁸⁾によると、一般廃棄物最終処分場は、埋立中が1194施設、埋立終了を加えると1698施設存在している。本研究では、燃焼過程で非意図的に副生する臭素系ダイオキシン類の評価を意図して、焼却残渣（主灰）と焼却残渣（飛灰）を処理している埋立中の9施設と埋立終了の1施設の10施設（準好気性埋立構造）を対象とした。処理対象廃棄物の上位5種は、不燃ごみ、焼却残渣（主灰）、破碎ごみ・処理残渣、焼却残渣（主灰）、粗大ごみであり、焼却残渣は一般廃棄物最終処分場において埋立処分されている代表的なものといえる。

一般廃棄物最終処分場では、一般廃棄物由来の再利用や再資源化が困難なものが埋立処分されており、雨水が廃棄物層を浸透して廃棄物由来物が溶け込んだ浸出水が発生する。一般的に、浸出水は、施設内で調整池に集められ、凝集沈殿、生物処理、砂ろ過、活性炭処理を経て、施設外に放流されている。ここでは、臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出実態を把握するため、排水を採取した。調査対象10施設のうち、7施設は公共水域へ、2施設は下水道へ、それぞれ排水していた。1施設は、施設内で焼却処理に利用していた。各施設の排水は、浸出水を調整池の表層から、最終放流水を浸出水処理施設の放流ピットの表層から褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採水した。試料採取は、所管自治体の協力を得て、2019年1月から2月に実施した。

産業廃棄物最終処分場：大阪府産業資源循環協会¹⁹⁾によると、産業廃棄物最終処分場の2017年4月の施設数は、有害物や有機物が付着しておらず雨水等にさらされてもほとんど変化しない安定型廃棄物（廃プラ、ゴムくず、金属くず、ガラスくず・コンクリートくず、がれき類）を埋立処分する安定型最終処分場が1040施設、有害な燃え殻、ばいじん、汚泥、鉍さい等を埋立処分する遮断型最終処分場が24施設、遮断型最終処分場でしか処理できない産業廃棄物以外のものを埋立処分する管理型最終処分場が719施設存在している。本研究では、浸出水が発生する管理型最終処分場6施設を対象とした。処理対象物は、汚泥、鉍さい、燃え殻、ばいじん、がれき類、廃プラスチック類等である。

管理型最終処分場では、産業廃棄物由来の再利用や再資源化が困難なものが埋立処分されており、雨水が廃棄物層を浸透して廃棄物由来物が溶け込んだ浸出水が発生する。一般的に、浸出水は、施設内で調整池に集められ、凝集沈殿、生物処理、窒素除去、砂ろ過、活性炭処理を経て、施設外に放流されている。ここでは、臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出実態を把握するため、排水を採取した。調査対象6施設は、公共水域へ排水していた。各施設の排水は、浸出水を調整池の表層から、最終放流水を浸出水処理施設放流ピットの表層から褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採水した。試料採取は、産業廃棄物最終処分場の管理会社の協力を得て、2018年10月から11月に実施した。

その他難燃剤取扱施設：その他難燃剤取扱施設については、臭素化ダイオキシン類が非意図的に副生する可能性があるデカBDE以外の難燃剤を取扱う施設と、難燃効果の向上を意図してデカBDEと一緒に使用されているアンチモンを取扱う施設を評価対象とした。前者は、臭素化ダイオキシン類の前駆体となりえる2,4,6-トリブロモフェノール（TrBPh）を取扱う施設を対象とした。該当する施設は全国で1施設であり、TrBPh移動登録量（2016年度実績）は20,000 kgであった。後者のアンチモン取扱施設は、アンチモンを使用しているプラスチック製造業170施設のうち、最もアンチモンの取扱量が多い施設を含む2施設を対象とした。

TrBPh取扱施設は、TrBPhを原料として難燃剤を製造しており、施設内で生じた工程排水を排水処理し

て、下水道へ排水していた。ここでは、臭素系ダイオキシン類や関連物質の排出実態に加えて、排水処理過程における挙動を把握するため、TrBPh取扱施設の排水をマンホールから、当該排水が流入する下水処理施設の流入水と放流水を各ピットの表層から、施設操業中に褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採水した。アンチモンを使用しているプラスチック製造施設は、アンチモンを原料として難燃プラスチック製品を製造しており、施設内で生じた工程排水を排水処理して、公共域へ排水していた。調査対象2施設については、施設外に排出されている排水を、施設操業中に褐色ガラス瓶に3.5 Lを2本ずつ採水した。試料採取は、関係の自治体に事前に相談して、必要の際は試料採取許可や現場立ち会い等の協力を得て、2019年1月から2月に実施した。

廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設：液晶テレビやパソコンに含まれる電子基板には、難燃化を目的としてテトラプロモビスフェノールA (TBBPA) やTBBPAエポキシ化体等の臭素系難燃剤が使用されているケースがある。従って、電子基板の廃棄物（廃電子基板）については、臭素系ダイオキシン類の非意図的な副生成を防ぐために、適正な再資源化处理並びに最終処分する必要がある。ここでは、年間11万トンの廃電子基板を再資源化している非鉄製錬施設を評価対象とした。

当該非鉄製錬施設は、有価金属リサイクル施設、銅熔錬施設、硫酸工場、排水処理の4つのパートに分けられる。有価金属リサイクル施設では、混合原料（廃電子基板 3,000～4,000 t/月、自動車シュッレダーダスト (ASR) 1,500 t/月、廃家電 10 t/月、スラッジ 100 t/月、銅滓 200 t/月）をキルン熔融炉に投入して1,200℃で焼却熔融し、キルン燃焼ガスを約900℃の二次燃焼室で燃焼処理している。二次燃焼ガスは、急冷塔で約200℃まで急冷され、消石灰を噴霧されて排ガス中の二酸化硫黄と塩化水素を消石灰に固定し、バグフィルターで固定物やばいじんが除去されている。更に、触媒棟でダイオキシン類が分解され、スクラバーで排ガス中に残留している二酸化硫黄や塩化水素を除去して、最終排ガスを煙突より大気へ排出している。銅熔錬施設では、調合鉱（銅精鉱 70,000 t/月、廃電子基板 4,000～5,000 t/月、珪砂 10,000 t/月）と有価金属リサイクル施設のキルン熔融炉で生じるスラグメタル

（4,000 t/月）を銅熔錬炉に投入して、精製炉で精製後、銅アノードを鑄造し、銅電解工場で電気銅を生産している。銅熔錬炉や精製炉で生じる排ガス（銅熔錬施設の鉱石乾燥排ガス及び局所吸引ガス）は、硫酸工場に排出され、バグフィルターで粉じんを除去し、最終排ガスとしてNo.2高排気筒より大気に排出している（最終排ガスNo.2）。硫酸工場では、銅熔錬炉や精製炉で発生する二酸化硫黄ガスからダストを除去して、ガスに含まれる硫黄分を硫酸（濃硫酸、発煙硫酸）及び石膏（排脱石膏）として回収する。ダストと硫黄分を除去したガスは、最終排ガスとしてNo.3高排気筒より大気に排出している

（最終排ガスNo.3）。除去したダストを含む硫酸原水は排水処理されている。排水処理では、硫酸工場からの硫酸原水その他、有価金属リサイクル施設からのスクラバー排水や系外の飛灰スラリーについて、中和処理と排水中懸濁態をスラッジとして分離するシクナー処理を3回実施して、最終放流水を公共水域に排出している。

当該非鉄製錬施設では、排ガスや排水を通じた排出実態を評価することに加えて、排ガスや排水処理過程における臭素系ダイオキシン類及び関連物質の挙動を評価するため、各種試料を採取した。有価金属リサイクル施設では、混合原料、バグフィルター処理前の燃焼ガス（バク前排ガス）、最終排ガス、スラグメタルを採取した。銅熔錬施設では、調合鉱、最終排ガスNo.2、中間物製品の水砕鏝と中間産物の鉛澱物を採取した。硫酸工場では、最終排ガスNo.3を採取した。排水処理工程では、硫酸原水、3次シクナー排水（処理後排水）、最終放流水を採取した。試料採取は、2019年8月に実施した。

（3）採取試料中の臭素系ダイオキシン類及び関連物質の測定

抽出：作業環境試料は、建屋内空気の浮遊粒子に吸着した物質をガラス繊維ろ紙に、ガス状物質をポリウレタンフォーム (PUF) に採取しており、ろ紙上残留物とPUFについて、トルエンーソックスレー抽出とアセトンーソックスレー抽出を実施して、それぞれ粗抽出液を得た。排水試料は、ろ過を実施して、排水中の懸濁態に吸着した物質をガラス繊維ろ紙に、溶存態に存在する物質をろ液に大別した。ろ紙上残留物とろ液について、トルエンーソックスレー抽出とジクロロメタンー液液抽出を実施して、それぞれ粗抽出液を得た。排ガス試料は、粒子状物質とガス状物質に大別して採取した。粒子状物質は、塩酸

処理後に水溶液をろ過して、ろ紙上残留物とろ液について、トルエン-ソックスレー抽出とジクロロメタン-液液抽出を実施して、それぞれ粗抽出液を得た。ガス状物質は、ガス状物質を捕集した樹脂とラインの洗液等の水溶液について、トルエン-ソックスレー抽出とジクロロメタン-液液抽出を実施して、それぞれ粗抽出液を得た。非鉄製錬施設で採取した固形試料は、塩酸処理後に水溶液をろ過して、ろ紙上残留物とろ液について、トルエン-ソックスレー抽出とジクロロメタン-液液抽出を実施して、それぞれ粗抽出液を得た。

TCDD-EQ評価：TCDD-EQ評価では、作業環境試料 1 m³相当、排水試料 0.2 L相当、排ガス試料 0.05 m³N相当、固形試料 0.05 g相当の粗抽出液を分取し、55%硫酸シリカゲルカラム処理、10%硝酸銀シリカゲルカラム処理を実施して、臭素化ダイオキシン類或いは塩素化ダイオキシン類を含む抽出液を調製した。精製と分画の詳細は図4.1.1に示す。これらの抽出液について、DR-CALUXアッセイを用いてTCDD-EQを算出した²⁰⁾（臭素化ダイオキシン類画分のTCDD-EQ [TCDD-EQ_{PBDD/DFs}]、塩素化ダイオキシン類画分 [TCDD-EQ_{PCDD/DFs}]）。本研究の定量下限は、作業環境試料 0.25 pg TCDD-EQ/m³、排水試料 1.0 pg TCDD-EQ/L、排ガス試料 0.005 ng TCDD-EQ/m³N、固形試料 0.010 ng TCDD-EQ/gであり、日本の塩素化ダイオキシン類の各種基準（作業環境基準 2.5 pg WHO-TEQ/m³、排水基準 10 pg WHO-TEQ/L、排ガス基準 0.1 ng WHO-TEQ/m³N（新設の廃棄物焼却施設）及び1 ng WHO-TEQ/m³N（既設の廃棄物焼却施設）、ばいじん・燃え殻 3 ng WHO-TEQ/g）の10%程度以下に設定した。

WHO-TEQ評価：WHO-TEQ評価では、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が塩素化ダイオキシン類の基準と比較して高い或いは評価重要度が高いと判断した試料を対象として、GC-HRMSを用いて臭素化ダイオキシン類の測定を行い、臭素化ダイオキシン類の実測濃度に、表4.1.1に示す塩素化ダイオキシン類のWHO-TEF¹⁶⁾を乗じて、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}を算出した。

Theoretical TCDD-EQ評価：Theoretical TCDD-EQ評価では、GC-HRMSを用いて得られた臭素化ダイオキシン類の実測濃度に、表4.1.1に示す臭素化ダイオキシン類のDR-CALUXアッセイで得られた2,3,7,8-TCDD比活性（REP, Relative Potency）¹⁴⁾を乗じて、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}を算出した。WHO-TEFとCALUX-REPを比較すると、環境中で頻度高く検出されるPBDFsのうち、六臭素化体と七臭素化体で1桁程度の差が生じている。本研究では、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}に対する臭素化ダイオキシン類の寄与を把握するため、CALUXアッセイにおける臭素化ダイオキシン類の反応性の差を考慮してTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}を算出した。

PXDD/DFs評価：GCxGC-HRToFMSを用いるPXDD/DFs評価は、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が塩素化ダイオキシン類の基準と比較して高い或いは評価重要度が高いと判断した試料を対象として実施した。PXDD/DFs評価では、リスク管理上重要度が高いと考えられる3～5つのハロゲン（臭素と塩素）が置換したダイオキシン類と推定される化学物質の概算濃度を算出した。具体的には、GCxGC-HRToFMS測定で得られた精密質量スペクトルデータから、任意の組成式に基づく全同位体の精密質量スペクトルを抽出する自作ソフトウェア「ComEx」を使用し、特に毒性が高い成分が含まれると予想される3～5つの塩素或いは臭素を含むPXDD/DFs由来の同位体クラスターイオンを抽出した（①）。抽出した質量スペクトルの再構成イオンクロマトグラム（RIC, Reconstituted Ion Chromatogram）において、一次元目のGC保持時間（RT, Retention Time）が15～30分の範囲に検出されたピークの精密質量スペクトルについて、理論同位体比との一致度を最小二乗法により比較した。決定係数 $r^2 > 0.9$ の成分をPXDD/DFs候補とした（②）。元素の質量欠損を利用し、一定の分子あるいはフラグメントイオンの精密質量スペクトルを抽出する自作ソフトウェア「MDF」により、①と同じデータから炭素と水素のみで構成される化合物（炭化水素など）を除いた質量スペクトルを抽出し、②で得られた候補成分とRTが一致する成分の質量スペクトルについてNIST17マススペクトルライブラリ検索を行った。最終的に、ライブラリ検索により他の化合物でないことを確認した成分をPXDD/DFsとみなし、標準物質のRIC強度の平均値との比を算出して、概算濃度とした。

難燃剤評価：UHPLC/APGC-QToFMSを用いる難燃剤評価では、PBDEsを含む各種難燃剤を測定した。

4. 結果及び考察

1) 臭素系ダイオキシン類及び関連物質を検出する包括的迅速検出法の開発

(1) 臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法の最適化

精製・分画操作の簡易化を行うため、省供試料・省資材・省溶媒を検討した。省供試料と省溶媒として、排水で0.2 L相当、作業環境で1 m³相当の抽出液を供試料量とした。省資材と省溶媒として、精製カラムの55%硫酸シリカゲル積載量を1 gとして精製画分をヘキサン 8 ml溶出、分画カラムの10%硝酸銀シリカゲル積載量を0.1 gとして塩素化ダイオキシン類をヘキサン 3 ml溶出（塩素化ダイオキシン類画分）及び臭素化ダイオキシン類を4%アセトン／ヘキサン 3 ml溶出（臭素化ダイオキシン類画分）とした。定量下限は、排水で1.0 pg TCDD-EQ/L、建屋内空気では0.25 pg TCDD-EQ/m³を下回るようにした。定量下限の設定は、塩素化ダイオキシン類の排出基準が排水で10 pg WHO-TEQ/L、作業環境基準が2.5 pg WHO-TEQ/m³であることに基づいている。最終的に確定したフローを図4.1.1に示す。化学物質標準品混合物の添加回収試験は、精製画分で塩素化ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類が、塩素化ダイオキシン類画分で塩素化ダイオキシン類が、臭素化ダイオキシン類画分で臭素化ダイオキシン類が、それぞれ80%以上の回収率であり、繰り返し試験の平均値からの誤差が30%以下であった。難燃製品取扱施設の排水と作業環境の粗抽出液3試料ずつを用いた予備検討試験についても、精製画分、塩素化ダイオキシン類画分及び臭素化ダイオキシン類画分のTCDD-EQは、繰り返し試験の平均値からの誤差が30%以下であった。結果に基づくと、当該最適化法は、適切な溶出で再現性の良い方法であると判断できた。

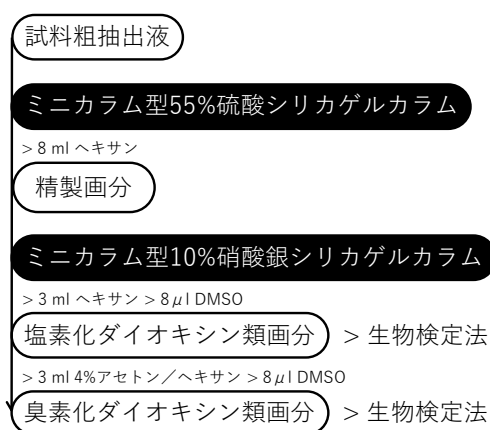


図4.1.1 臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法のフロー

(2) GCxGC-HRToFMS及びUHPLC/APGC-QToFMSを用いる機器分析網羅検出法の最適化

臭素化ダイオキシン類、塩素化ダイオキシン類、塩素化臭素化ダイオキシン類及び難燃剤を対象として、GCxGC-HRToFMSでは化学物質標準品の分離と検出下限の確認を、UHPLC/APGC-QToFMSでは各種測定パラメーターの最適化を実施した。

GCxGC-HRToFMSについて、13種の臭素化ダイオキシン類、23種の塩素化ダイオキシン類及び16種の塩素化臭素化ダイオキシン類の化学物質標準品を添加した難燃製品取扱施設の排水抽出液の測定時の二次元トータルイオンクロマトグラム（2D-TIC）を図4.1.2に示す。図中に個々の化学物質標準品の保持時間と各種ダイオキシン類の溶出傾向線を示した。図4.1.2から分かるように、塩素化ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類は二次元側（縦軸）の分離傾向に違いが見られた。総じて臭素化ダイオキシン類の溶出は遅く、塩素化ダイオキシン類間よりも臭素化ダイオキシン類間の二次元保持時間の差は大きかった。塩素化臭素化ダイオキシン類の保持時間の傾向は、塩素化ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の間とみられる。今回使用した計52種類の標準品のうち、7臭素化物と8臭素化物以外のダイオキシン類縁化合物は、二次元GCでの完全分離が確認できた。S/N比（約3）による便宜的な検出下限は、塩素化ダイオキシン類、臭素化ダイオキシン類及び塩素化臭素化ダイオキシン類で、それぞれ絶対量として5～10 pg、1～10 pg及び1～5 pg程度であった。

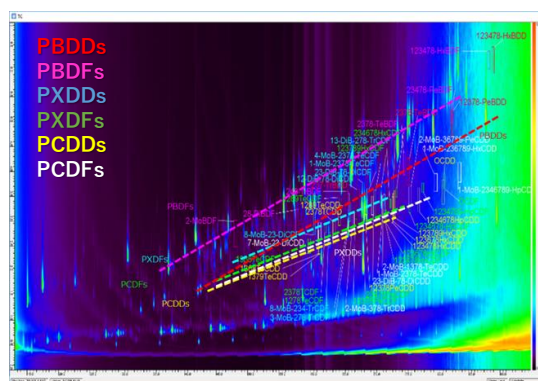


図4.1.2 13種の臭素化ダイオキシン類、23種の塩素化ダイオキシン類及び16種の塩素化臭素化ダイオキシン類の化学物質標準品を添加した難燃製品取扱施設の排水粗抽出液のGCxGC-ToFMS測定におけるトータルイオンクロマトグラム (TIC)

UHPLC/APGC-QToFMSについて、各種測定パラメーターの最適値を検討した。各種測定パラメーターの最適値は、乾燥ガス流量は3 L/min、乾燥ガス温度は350℃、シースガス流量は7.5 L/min、シースガス温度は325℃、ネブライザ圧力は55 psi、キャピラリー電圧は3500 V、ノズル電圧は100 Vであった。また、APGC-QToFMS法の各種測定パラメーターの最適値は、キャリアガス流量は8 mL/min、コロナ電流値は0.5 μ A、乾燥ガス流量は5 L/min、乾燥ガス温度は360℃、キャピラリー電圧は2500 Vであった。この条件で、0.3～80 pgの臭素化ダイオキシン類及び難燃剤が検出可能であった。

(3) 環境省過年度調査の難燃製品取扱施設の排水及び作業環境を用いた適用性評価

環境省が過年度に実施した排出実態調査の難燃製品取扱施設の排水20試料及び作業環境20試料のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PBDD/DFs}を図4.1.3に示す。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/WHO-TEQ_{PBDD/DFs}比をみると、両試料共に0.1以下を示すものはなかった。0.1～1の試料は、主にデカBDEを取り扱う難燃繊維加工施設やデカBDEを含有するブラウン管テレビのリサイクル施設で採取されたものであり、デカBDE製剤に不純物として含まれている臭素化ダイオキシン類（主に高臭素化ジベンゾフラン）の濃度が高いものであった。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/WHO-TEQ_{PBDD/DFs}比が1より低くなる原因としては、1,2,3,4,7,8-HxBDF、1,2,3,4,6,7,8-HpBDF、OBDFのCALUX-REP¹⁴⁾が、対応するWHO-TEF¹⁶⁾と比較して1桁程度低いことによると考えられた（表4.1.1）。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/WHO-TEQ_{PBDD/DFs}比が1以上の試料は、臭素化ダイオキシン類以外のダイオキシン類の関与を示唆しており、デカBDE以外の臭素系難燃剤含有製品や破碎プラ、焼却灰取扱施設で採取されたものであった。

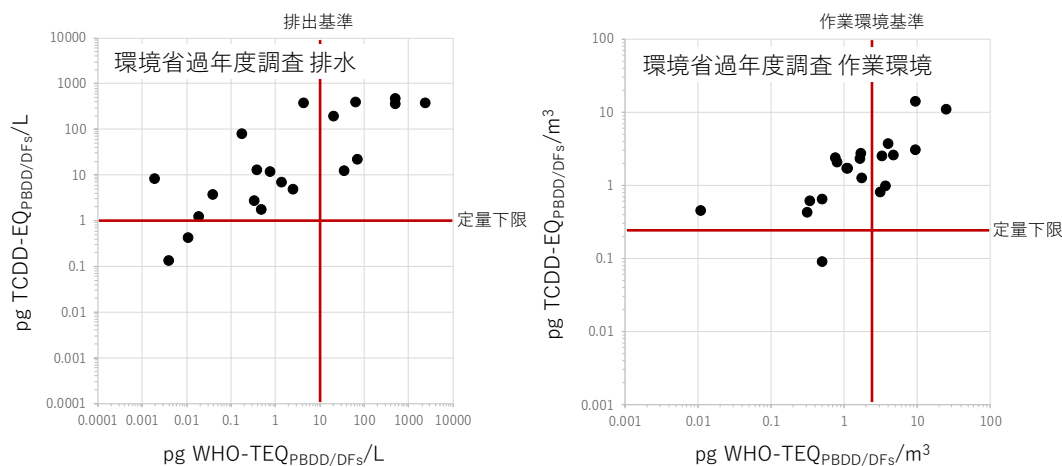


図4.1.3 環境省過年度調査の難燃製品取扱施設の排水20試料及び作業環境20試料のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PBDD/DFs}

表4.1.1 塩素化ダイオキシン類のWHO-TEF¹⁶⁾と臭素化ダイオキシン類のCALUX-REP¹⁴⁾

Compound	2005	Compound	Mass basis		
	WHO-TEF		REP-EC _{5TCDD}	REP-EC ₂₀	Average
PCDDs		PBDDs			
2,3,7,8-TCDD	1	2,3,7,8-TBDD	0.29	0.31	0.30
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1,2,3,7,8-PeBDD	0.090	0.076	0.083
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,4,7,8-HxBDD	0.031	0.015	0.023
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,6,7,8-HxBDD	0.0023	0.0025	0.0024
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	1,2,3,7,8,9-HxBDD	0.0093	0.0067	0.0080
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1,2,3,4,6,7,8-HpBDD	0.0042	0.0031	0.0037
OCDD	0.0003	OBDD	0.00011	0.00014	0.00013
PCDFs		PBDFs			
2,3,7,8-TCDF	0.1	2,3,7,8-TBDF	0.57	0.44	0.51
1,2,3,7,8-PeCDF	0.03	1,2,3,7,8-PeBDF	0.1	0.09	0.095
2,3,4,7,8-PeCDF	0.3	2,3,4,7,8-PeBDF	0.25	0.14	0.20
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	1,2,3,4,7,8-HxBDF	0.011	0.0094	0.010
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	1,2,3,6,7,8-HxBDF	NA	NA	NA
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	1,2,3,7,8,9-HxBDF	NA	NA	NA
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	2,3,4,6,7,8-HxBDF	NA	NA	NA
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	1,2,3,4,6,7,8-HpBDF	0.0016	0.0011	0.0014
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	1,2,3,4,7,8,9-HpBDF	NA	NA	NA
OCDF	0.0003	OBDF	0.00011	0.00012	0.00012

NA：未測定

難燃製品取扱施設の排水20試料及び作業環境20試料を対象として、これまで環境省による排出実態調査で適用されてきた測定法（GC/EI-HRMS法及びLC/ESI-MSMS法）とUHPLC/APGC-QToFMS法による臭素化ダイオキシン類と難燃剤（PBDEs及びHBCD）の分析値を比較した結果、両者の間に良好な相関関係が認められ（図4.1.4）、臭素化ダイオキシン類、PBDEs及びHBCDの定量法としてのUHPLC/APGC-QToFMS法の有効性が示された。

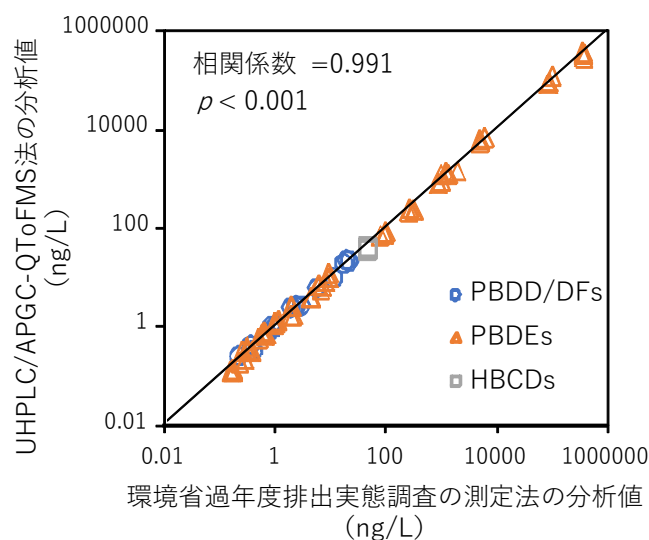


図4.1.4 環境省排出実態調査で使用されている測定法とUHPLC/APGC-QToFMS法による臭素化ダイオキシン類及び難燃剤の分析値の関係

難燃製品取扱施設の排水20試料のうち、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高く検出された3試料を対象として、GCxGC-

HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMによる網羅分析検出法の試行的評価を実施した。これら3試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}は、排水試料①で360 pg TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lと430 pg Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/L、排水試料②で380 pg TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lと24 pg Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/L、排水試料③で360 pg TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lと1.8 pg Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Lである。排水試料①のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}は臭素化ダイオキシン類で説明できるのに対して、排水試料②や③のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}は臭素化ダイオキシン類だけで説明できないことがわかる。GCxGC-HRTofMSによる評価では、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の関係性を反映して、排水試料①と比較して、排水試料②と③でより多くの臭素化合物由来のマススペクトルが確認された。UHPLC/APGC-QToFMによる評価についても、臭素化ダイオキシン類を不純物として含有するデカBDEの濃度が、排水試料①で190,000 ng/L、排水試料②で2,300 ng/L、排水試料③で120 ng/Lであり、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の関係性を概ね反映した結果が得られた。

本研究の結果は、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法の定量下限を、塩素化ダイオキシン類の基準の10%以下に設定することで、把握すべき臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出を適切に検出できることを示唆した。また、GCxGC-HRTofMS及びUHPLC/APGC-QToFMを用いる機器分析網羅検出法を適用することで、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}に関連する難燃剤等の関連物質の把握が可能であると考えられた。本研究では、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が定量下限以上の試料について、検出濃度や評価優先度に応じて、臭素化ダイオキシン類や関連物質の構成を把握するアプローチをとることとした。

2) 政策貢献的モニタリング

(1) 重要排出源における排出濃度

家電リサイクル施設：家電リサイクル施設の作業環境と排水で得られたTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、PBDEs及びPBDEs以外の難燃剤（以下、その他難燃剤）の各種濃度を表4.1.2と表4.1.3に示す。難燃剤の組成を図4.1.5と図4.1.6に示す。

作業環境のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}の中央値と範囲は、1.1 (0.32~7.5) pg/m³ (n=21) と0.36 (0.25~1.6) pg/m³ (n=21) であり、塩素系ダイオキシン類と比較して臭素系ダイオキシン類で高い傾向であった。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高値を示した作業環境のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}は、2.1~6.8 pg/m³ (n=4) であり、2施設3地点で塩素化ダイオキシン類の作業環境基準 (2.5 pg WHO-TEQ/m³) に相当する値を超過していた。一方で、作業環境のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}の濃度レベルは、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の濃度レベルを考慮すると、環境省過年度調査における家電リサイクル施設の作業環境のWHO-TEQ_{PBDD/DFs} (FY2002 : 37 (3.2~180) pg/m³ (n=10)、FY2011 : 3.1 (0.34~9.8) pg/m³ (n=16))¹¹⁾と比較して低い傾向であり、経年で低減していると考えられた。PBDEsとその他難燃剤の排出濃度の中央値と範囲は、19 (5.3~700) ng/m³ (n=21) と280 (53~990) ng/m³ (n=21) であった。臭素系難燃剤では、PBDEs、DBDPE、TBBPA、2,4,6-TBPhが、リン系難燃剤では、TDCIPP、TPhP、BPA-BDPP、PBDMPが、頻度高く検出された。

廃水（処理前排水）のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}の中央値と範囲は、1,900 (31~3,700) pg/L (n=4) と110 (8.5~230) pg/L (n=4) であり、排水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}の中央値と範囲は、5.4 (<1.0~1,500) pg/L (n=12) と1.4 (<1.0~50) pg/L (n=12) であった。廃水と排水共に、塩素系ダイオキシン類と比較して臭素系ダイオキシン類が高い傾向であった。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高値を示した廃水と排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}は0.99~110 pg/L (n=5) であり、排水については1施設1地点で塩素化ダイオキシン類の排水基準 (10 pg WHO-TEQ/L) に相当する値を超過していた。一方で、廃水と排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}の濃度レベルは、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の濃度レベルを考慮すると、環境省過年度調査における家電リサイクル施設の排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs} (FY2002 : 31 (2.5~65) pg/L (n=6)、FY2011 : 88 (1.4~530) pg/L (n=10))¹¹⁾と比較して低い傾向であった。PBDEsとその他難燃剤の排出濃度の中央値と範囲は、110 (5.7~26,000) ng/L (n=16) と930 (58~260,000) ng/L (n=16) であり、一部施設で相対的に高い濃度の難燃剤が検出されることを示した。ヒアリング調査に基づくと、高い濃度の難燃剤が検出される施設では、家電リサイクル施設の廃プラ再資源化工程で廃水が生じていることがわかった。臭素系難燃剤では、PBDEs、DBDPE、TBBPA、2,4,6-TBPh、TBBPA-BDBPE、TDBP-TAZTO、TTBP-TAZが、リン系難燃

剤では、TCEP、TCIPP、TDCIPP、DEG-BDCIPP、TMPP、PBDMP、TBOEPが、特定の施設で非常に高い濃度で検出された。

家電リサイクル施設の一部施設は、作業環境と排水の濃度に基づくと、過年度と同じく、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出源であった。一方で、臭素化ダイオキシン類の排出源としての重要度は、過年度と比較して低下していた。

表4.1.2 家電リサイクル施設の作業環境のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度

試料名	採取場所	ダイオキシン類緑化合物				難燃剤	
		TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	TCDD-EQ _{PCDD/DFs}	WHO-TEQ _{PBDD/DFs}	Theoretical TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	PBDEs	Other FRs
		pg/m ³	pg/m ³	pg/m ³	pg/m ³	ng/m ³	ng/m ³
家電リサイクル施設1-作業環境-冷蔵庫	冷蔵庫解体場	0.72	0.31	NA	NA	19	280
家電リサイクル施設1-作業環境-エアコン外	エアコン室外機手解体場	7.5	1.6	6.8	1.2	700	340
家電リサイクル施設1-作業環境-住設機器	住設機器手解体場	0.34	<0.25	NA	NA	13	410
家電リサイクル施設2-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	1.1	<0.25	NA	NA	8.9	65
家電リサイクル施設2-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	1.1	<0.25	NA	NA	8.6	110
家電リサイクル施設3-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	2.1	0.31	2.1	0.52	45	930
家電リサイクル施設3-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	1.0	<0.25	NA	NA	18	130
家電リサイクル施設4-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	1.9	0.39	NA	NA	89	280
家電リサイクル施設4-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	1.3	<0.25	NA	NA	9.5	240
家電リサイクル施設5-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	0.58	<0.25	NA	NA	27	170
家電リサイクル施設5-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	0.44	0.32	NA	NA	19	190
家電リサイクル施設6-作業環境-エアコン内	エアコン室内機手解体場	0.73	0.40	NA	NA	14	520
家電リサイクル施設6-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	0.32	<0.25	NA	NA	12	410
家電リサイクル施設7-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	1.4	0.39	NA	NA	73	250
家電リサイクル施設7-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	0.66	<0.25	NA	NA	14	990
家電リサイクル施設8-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	0.53	<0.25	NA	NA	5.3	330
家電リサイクル施設8-作業環境-エアコン内	エアコン室内機手解体場	1.7	0.40	NA	NA	22	320
家電リサイクル施設9-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	4.5	0.29	6.2	1.5	150	280
家電リサイクル施設9-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	3.3	<0.25	3.7	0.83	100	290
家電リサイクル施設10-作業環境-CRTテレビ	ブラウン管テレビ手解体場	1.1	0.25	NA	NA	21	110
家電リサイクル施設10-作業環境-FPDテレビ	薄型液晶テレビ手解体場	0.37	<0.25	NA	NA	7.5	53

NA：未測定

表4.1.3 家電リサイクル施設の排水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度

試料名	採取場所	放流先	ダイオキシン類緑化合物				難燃剤	
			TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	TCDD-EQ _{PCDD/DFs}	WHO-TEQ _{PBDD/DFs}	Theoretical TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	PBDEs	Other FRs
			pg/L	pg/L	pg/L	pg/L	ng/L	ng/L
家電リサイクル施設1-排水	油水分離槽	公共水域	<1.0	1.5	NA	NA	9.5	790
家電リサイクル施設2-廃水-1	原水（マンホール）		3700	180	NA	NA	26000	260000
家電リサイクル施設2-廃水-2	原水（スクリーン入）		370	30	NA	NA	12000	81000
家電リサイクル施設2-排水	処理水（オーバーフロー）	下水道	1500	50	74	21	1400	83000
家電リサイクル施設3-排水	施設前側溝	公共水域	2.1	1.3	NA	NA	35	91
家電リサイクル施設4-排水-1	施設入口油水分離槽	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	5.7	240
家電リサイクル施設4-排水-2	施設奥油水分離槽	公共水域	2.8	1.5	NA	NA	39	292
家電リサイクル施設5-排水	最終放流口	公共水域	26	4.9	5.7	1.3	510	21000
家電リサイクル施設6-廃水	原水		3400	230	110	30	4800	56000
家電リサイクル施設6-排水	処理水（オーバーフロー）	下水道	8.4	1.0	NA	NA	12	970
家電リサイクル施設7-排水	最終放流口	公共水域	6.3	1.7	NA	NA	260	880
家電リサイクル施設8-排水-1	入荷ヤード油水分離槽	公共水域	22	<1.0	0.99	0.18	110	540
家電リサイクル施設8-排水-2	第2工場油水分離槽	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	28	58
家電リサイクル施設9-排水	施設前側溝	公共水域	20	1.3	4.7	0.65	110	170
家電リサイクル施設10-廃水	原水ビット		31	8.5	13	5.1	170	3900
家電リサイクル施設10-排水	最終放流口	下水道	4.5	2.9	NA	NA	50	8800

NA：未測定

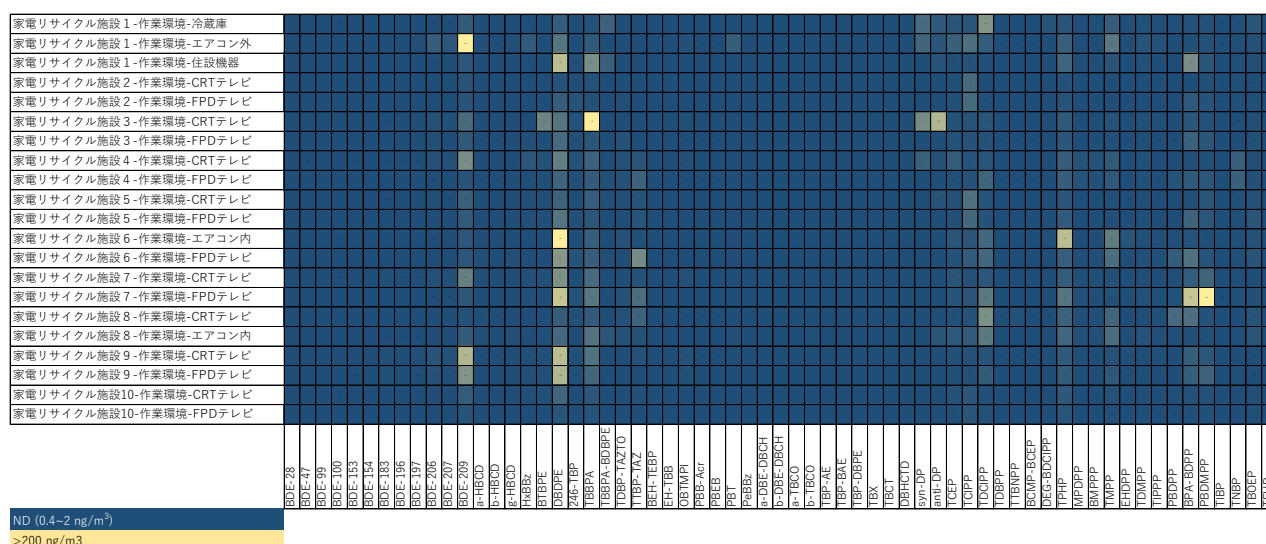


図4.1.5 家電リサイクル施設の作業環境の難燃剤組成

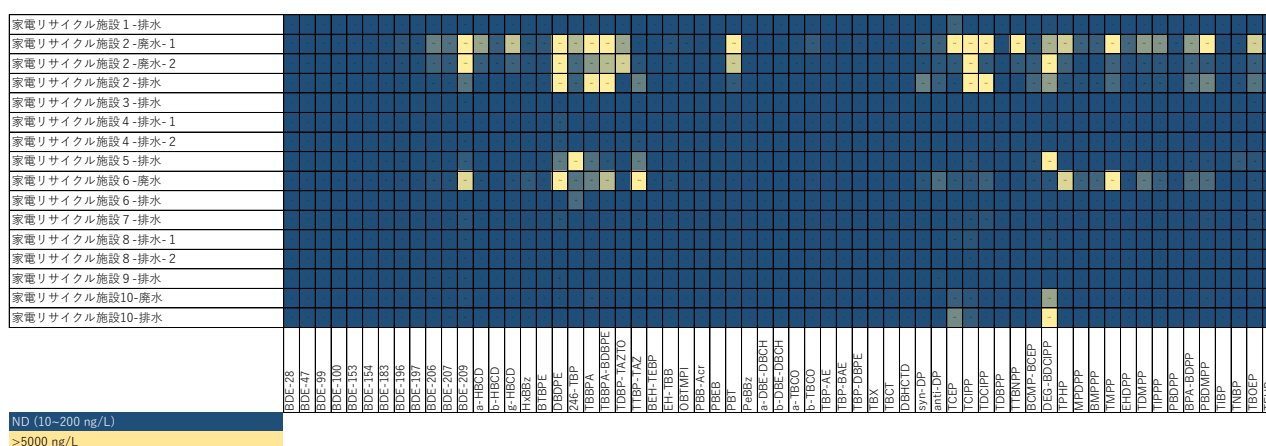


図4.1.6 家電リサイクル施設の排水の難燃剤組成

デカBDE取扱施設：デカBDE取扱施設の排水で得られたTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度を表4.1.4に示す。難燃剤の組成を図4.1.7に示す。

2017年度に採取した排水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}の中央値と範囲は、23 (1.3~860) pg/L (n=12) と3.6 (<1.0~78) pg/L (n=12) であり、塩素系ダイオキシン類と比較して臭素系ダイオキシン類で高い傾向であった。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高値を示した排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}は0.48~550 pg/L (n=5) であり、下水道に放流している2施設2地点で塩素化ダイオキシン類の排水基準 (10 pg WHO-TEQ/L) に相当する値を超過していた。一方で、排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}の濃度レベルは、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の濃度レベルを考慮すると、環境省過年度調査のデカBDE取扱施設排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs} (FY2004：不検出 (n=6) , FY2006：0.69~27 (n=2) , FY2013：2.7 (2.0~2,500) pg/L (n=5) 、FY2015：0.59~39 pg/L (n=2))¹¹⁾と同程度であった。これは、少なくともFY2006からFY2017までのPBDEsのデカBDE製剤の使用状況に大きな変化がないことを示唆している。デカBDE取扱施設の排水が流入する下水処理場 (デカBDE取扱施設13と14) の放流水の濃度は、排水基準 (10 pg WHO-TEQ/L) に相当する値以下であった。デカBDE取扱施設8~10については、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高く、日平均排水量も高いことから、2019年度においても排出実態調査を実施した。2019年度採取試料の評価結果は後述する。2017年度に採取した排水のPBDEsとその他難燃剤の排出濃度の中央値と範囲は、340 (<4.0~110,000) ng/L (n=12) と2900 (150~4,800,000) ng/L (n=12) であり、一部施設で相対的に高い濃度の難燃剤が検出されることを示した。臭素系難燃剤では、PBDEs、DBDPE、TDBP-TAZTOが、リン系難燃剤では、TCIPP、TDMPP、PBDMP、BPA-BDPP、PBDMPが、頻度高く検出された。

(2) 未調査業種における排出濃度

一般廃棄物最終処分場：一般廃棄物最終処分場の浸出水と放流水で得られたTCDD-EQ_{PBDD/DFS}、TCDD-EQ_{PCDD/DFS}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度を表4.1.5に示す。

放流水のTCDD-EQ_{PBDD/DFS}とTCDD-EQ_{PCDD/DFS}の中央値と範囲は、<1.0 (<1.0~8.6) pg/L (n=10) と<1.0 (<1.0~2.0) pg/L (n=10) であり、両者共に定量限界以下を示すものが多く、非常に低い濃度であった。放流水のPBDEsとその他難燃剤の排出濃度の中央値と範囲は、<4.0 (<4.0~6.6) ng/L (n=10) と51 (6.6~2900) ng/L (n=10) であり、TCDD-EQ_{PBDD/DFS}とTCDD-EQ_{PCDD/DFS}と同様に難燃剤も非常に低い濃度であった。一般廃棄物最終処分場は、放流水の濃度に基づく臭素系ダイオキシン類の排出源としての重要度が低いと考えられた。

産業廃棄物最終処分場：産業廃棄物最終処分場の浸出水と放流水で得られたTCDD-EQ_{PBDD/DFS}及びTCDD-EQ_{PCDD/DFS}を表4.1.6に示す。

放流水のTCDD-EQ_{PBDD/DFS}とTCDD-EQ_{PCDD/DFS}の中央値と範囲は、8.5 (<1.0~32) pg/L (n=6) と<1.0 (<1.0~150) pg/L (n=10) であり、両者共に定量限界以下を示すものが多く、非常に低い濃度であった。放流水のPBDEsとその他難燃剤は、TCDD-EQ_{PBDD/DFS}とTCDD-EQ_{PCDD/DFS}と同様に排出濃度が非常に低いと想定されたため、分析を実施しなかった。産業廃棄物最終処分場は、放流水の濃度に基づく臭素系ダイオキシン類の排出源としての重要度が低いと考えられた。

表4.1.5 一般廃棄物最終処分場の浸出水と放流水のTCDD-EQ_{PBDD/DFS}、TCDD-EQ_{PCDD/DFS}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度

試料名	放流先	ダイオキシン類縁化合物				難燃剤	
		TCDD-EQ _{PBDD/DFS}	TCDD-EQ _{PCDD/DFS}	WHO-TEQ _{PBDD/DFS}	Theoretical TCDD-EQ _{PBDD/DFS}	PBDEs	Other FRs
		pg/L	pg/L	pg/L	pg/L	ng/L	ng/L
一般廃棄物最終処分場 1-浸出水	下水道	2.0	<1.0	NA	NA	<4.0	97
一般廃棄物最終処分場 1-放流水		8.6	<1.0	NA	NA	<4.0	ND
一般廃棄物最終処分場 2-浸出水		1.2	<1.0	NA	NA	<4.0	110
一般廃棄物最終処分場 2-放流水	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	6.6
一般廃棄物最終処分場 3-浸出水-1		4.6	<1.0	NA	NA	<4.0	380
一般廃棄物最終処分場 3-浸出水-2		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	ND
一般廃棄物最終処分場 3-放流水	下水道	<1.0	<1.0	NA	NA	6.6	6.6
一般廃棄物最終処分場 4-浸出水-1		130	<1.0	NA	NA	<4.0	64
一般廃棄物最終処分場 4-浸出水-2		2.6	<1.0	NA	NA	<4.0	150
一般廃棄物最終処分場 4-放流水	公共水域	3.1	<1.0	NA	NA	<4.0	48
一般廃棄物最終処分場 5-浸出水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	260
一般廃棄物最終処分場 5-放流水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	ND
一般廃棄物最終処分場 6-浸出水	公共水域	2.0	2.4	NA	NA	<4.0	62
一般廃棄物最終処分場 6-放流水		2.0	2.0	NA	NA	<4.0	ND
一般廃棄物最終処分場 7-浸出水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	1300
一般廃棄物最終処分場 7-放流水	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	51
一般廃棄物最終処分場 8-浸出水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	270
一般廃棄物最終処分場 8-放流水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	430
一般廃棄物最終処分場 9-浸出水	公共水域	3.4	<1.0	NA	NA	<4.0	3300
一般廃棄物最終処分場 9-放流水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	2900
一般廃棄物最終処分場10-浸出水		<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	85
一般廃棄物最終処分場10-放流水	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	73

NA：未測定、ND：不検出

表4.1.6 産業廃棄物最終処分場の浸出水と放流水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びTCDD-EQ_{PCDD/DFs}

試料名	放流先	ダイオキシン類縁化合物				難燃剤	
		TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	TCDD-EQ _{PCDD/DFs}	WHO-TEQ _{PBDD/DFs}	Theoretical TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	PBDEs	Other FRs
		pg/L	pg/L	pg/L	pg/L	ng/L	ng/L
産業廃棄物最終処分場 1-浸出水	公共水域	8.0	2.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 1-放流水		<1.0	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 2-浸出水	公共水域	85	150	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 2-放流水		8.5	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 3-浸出水	公共水域	20	7.9	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 3-放流水		8.4	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 4-浸出水	公共水域	2.5	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 4-放流水		13	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 5-浸出水	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 5-放流水		32	<1.0	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 6-浸出水	公共水域	16.0	56	NA	NA	NA	NA
産業廃棄物最終処分場 6-放流水		<1.0	<1.0	NA	NA	NA	NA

NA：未測定

その他難燃剤取扱施設：アンチモン取扱施設とTBPh取扱施設の排水で得られたTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度を表4.1.7に示す。TBPh取扱施設の排水の難燃剤の組成を図4.1.8に示す。

アンチモン取扱施設の排水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}の中央値と範囲は、<1.0 (<1.0~3.9) pg/L (n=3) と<1.0 pg/L (n=3) であり、両者共に定量限界以下を示すものが多く、非常に低い濃度であった。排水のPBDEsとその他難燃剤の排出濃度の中央値と範囲は、<4.0 (<4.0~13) pg/L (n=3) と170 pg/L (ND~250) (n=3) であり、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}と同様に難燃剤も非常に低い濃度であった。アンチモン取扱施設は、放流水の濃度に基づくと臭素系ダイオキシン類の排出源としての重要度が低いと考えられた。

TBPh取扱施設の排水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}は、7100 pg/Lと100 pg/Lであり、非常に高い濃度であった。一方で、当該排水のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}は3.5 pg/Lであり、予想に反して低い濃度であった。TBPh取扱施設の排水が流入する下水処理場については、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTCDD-EQ_{PCDD/DFs}共に放流水で定量限界以下であった。排水、流入水、放流水のPBDEsとその他難燃剤の排出濃度の中央値と範囲は、<4.0 (<4.0~240) ng/L (n=3) と8000 (2600~58000) ng/L (n=3) であった。臭素系難燃剤については、TBPh、TBBPA、TBBPS-BDBPE、TDBP-TAZTOが、TBPh取扱施設で高い濃度で検出された。リン系難燃剤については、TBOEPが、下水処理場で高い濃度で検出された。TBPh取扱施設は、施設排水の濃度に基づくと、臭素化ダイオキシン類以外の臭素系ダイオキシン類の排出源としての重要度が高いと考えられた。

表4.1.7 アンチモン取扱施設とTBPh取扱施設の浸出水と放流水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}、Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、PBDEs及びその他難燃剤の各種濃度

試料名	対象施設の業種	放流先	ダイオキシン類縁化合物				難燃剤	
			TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	TCDD-EQ _{PCDD/DFs}	WHO-TEQ _{PBDD/DFs}	Theoretical TCDD-EQ _{PBDD/DFs}	PBDEs	Other FRs
			pg/L	pg/L	pg/L	pg/L	ng/L	ng/L
アンチモン取扱施設 1-排水-1	プラスチック製品製造	公共水域	3.9	<1.0	NA	NA	13	170
アンチモン取扱施設 1-排水-2		公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	250
アンチモン取扱施設 2-排水	プラスチック製品製造	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	ND
トリプロモフェノール取扱施設-排水	化学工業	下水道	7100	100	3.5	7.2	240	58000
トリプロモフェノール取扱施設-流入水	下水処理施設		65	5.2	0.21	0.028	<4.0	8000
トリプロモフェノール取扱施設-放流水	下水処理施設	公共水域	<1.0	<1.0	NA	NA	<4.0	2600

NA：未測定

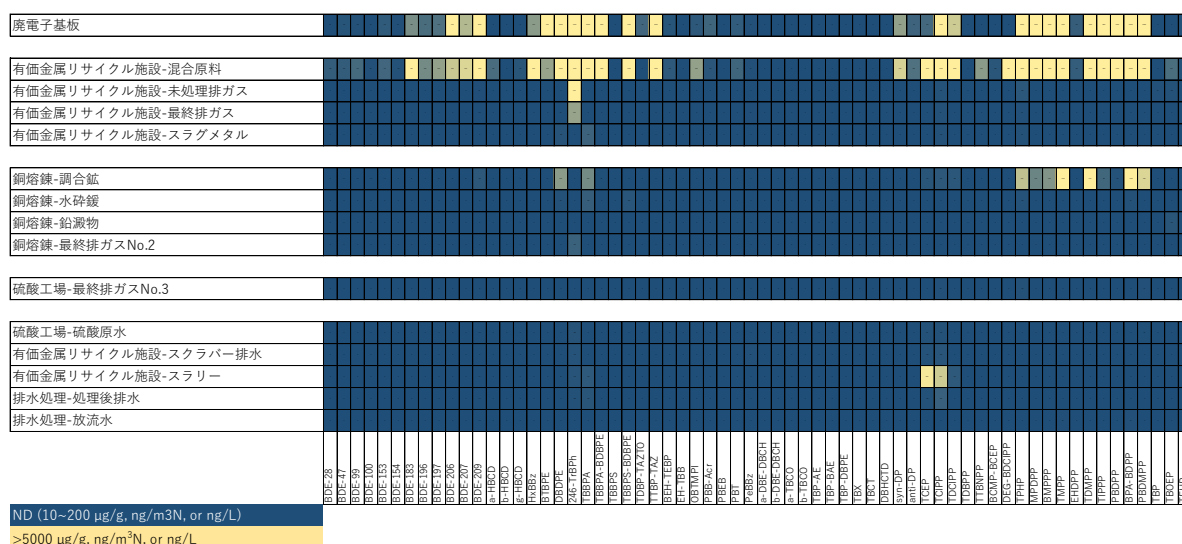


図4.1.9 廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設における有価金属リサイクル施設、銅熔錬施設、硫酸工場及び排水処理の各種試料の難燃剤組成

(3) 臭素化ダイオキシン類とデカBDEについて

デカBDE製剤は、臭素化ダイオキシン類を不純物として含むことが良く知られており^{1,2)}、本研究においてもTCDD-EQ_{PBDD/DFs}やWHO-TEQ_{PBDD/DFs}と並行してデカBDEを測定している。ここでは、両者の関連性を評価するため、WHO-TEQ_{PBDD/DFs}とデカBDEが共に定量できている試料のうち、臭素化ダイオキシン類の熱分解や非意図的な副生成の影響を受けている試料（非鉄製錬施設の廃ガス、燃焼物及び排水）を除く試料を評価対象とした。具体的には、家電リサイクル施設の作業環境（n=4）、家電リサイクル施設の排水（n=6）、デカBDE取扱施設の排水（n=5）及び非鉄製錬施設の廃電子基板（n=1）、混合原料（n=1）及び調合鉱（n=1）を評価対象とした（図4.1.10）。評価対象試料のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}とデカBDE濃度は、非常に強い正の相関関係を示し（ $r=0.917$, $P<0.001$ ）、臭素化ダイオキシン類がデカBDE関連物質であることを強く示唆した。デカBDEは、2017年5月に開催されたストックホルム条約の締約国会議において、同条約の付属書A（廃絶）に追加され、原則として製造・使用等が禁止されている。日本では、これを受けて、2018年4月に化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）の第一種特定化学物質にデカBDEを指定した。これらは、2018年4月以降、日本でデカBDEが使用されなくなり、それに伴って製造・使用を通じた臭素化ダイオキシン類の環境排出が減少することを示唆している。

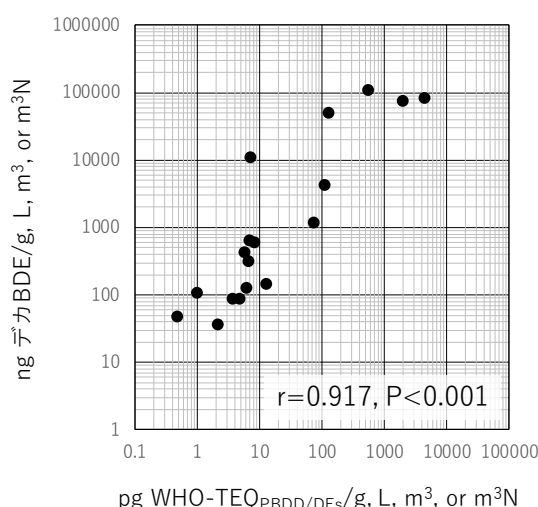


図4.1.10 家電リサイクル施設の作業環境（n=4）、家電リサイクル施設の排水（n=6）、デカBDE取扱施設の排水（n=5）及び非鉄製錬施設の廃電子基板（n=1）、混合原料（n=1）及び調合鉱（n=1）のWHO-TEQ_{PBDD/DFs}とデカBDE濃度

本研究では、デカBDEの規制に伴う臭素化ダイオキシン類の排出実態の変化を評価するため、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高く日平均排水量（1,100～25,000 m³/日）も多いデカBDE取扱施設3施設（デカBDE取扱施設8～10）を対象として、2017年12月と2019年10月におけるデカBDE、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}及び難燃剤（デカBDE＋その他難燃剤）の排出実態を比較した（図4.1.11）。デカBDEについては、いずれの施設においても、2017年12月と比較して2019年10月で顕著に濃度が低減していた。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤については、デカBDE取扱施設10を除く、デカBDE取扱施設8と9で、2017年12月と比較して2019年10月で顕著に濃度が低減していた。これらの結果は、デカBDEの規制を受けてデカBDEとそれに付随する臭素化ダイオキシン類の環境排出が減少傾向であることを示すと共に、臭素化ダイオキシン類以外のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}関連物質が存在することや難燃剤とTCDD-EQ_{PBDD/DFs}に関連性があることを示唆した。

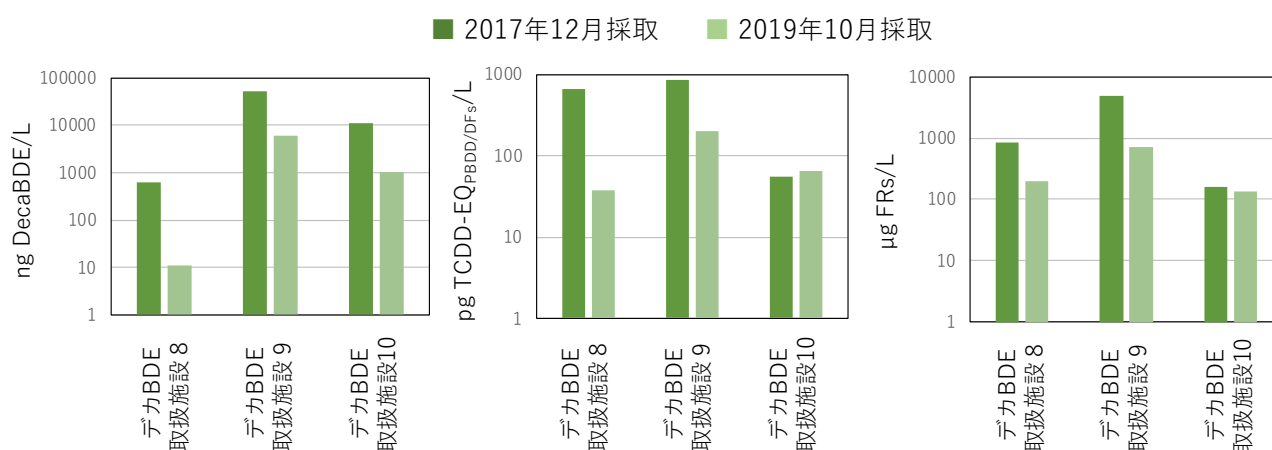


図4.1.11 デカBDE取扱施設における2017年12月と2019年10月のデカBDE、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}及び難燃剤（デカBDE＋その他難燃剤）の排出実態の比較

（4）臭素化ダイオキシン類と臭素系ダイオキシン類について

臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法は、前処理方法や使用するDR-CALUXアッセイの検出原理を考慮すると、臭素化ダイオキシン類に加えてその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質を検出する。ここでは、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}に対する臭素化ダイオキシン類やその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質の寄与を評価した。

はじめに、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が共に定量できている家電リサイクル施設の作業環境（n=4）、家電リサイクル施設の排水（n=6）、デカBDE取扱施設の排水（n=5）、TBPh取扱施設の排水（n=2）、非鉄製錬施設の廃電子基板（n=1）、混合原料（n=1）、調合鉱（n=1）、排ガス（n=3）、スラグメタル（n=1）及び排水（n=4）の計28試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の関連性を評価した（図4.1.12）。評価対象試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}は、強い正の相関関係を示し（ $r=0.795$, $P<0.001$ ）、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}と共にTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高くなることを示した。一方で、評価対象試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の比をみると、家電リサイクル施設の作業環境では3.0～6.0、家電リサイクル施設の排水では6.1～120、デカBDE取扱施設の排水では1.6～440、非鉄製錬施設の燃焼物（廃電子基板、混合原料及び調合鉱）では6.7～120、排ガスでは9.6～40、スラグメタルでは130、排水では13～2,700であり、その他臭素系ダイオキシン類や類縁物質がTCDD-EQ_{PBDD/DFs}に寄与していることを示している。評価対象試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}/Theoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の比は採取媒体に依存して大きく変わっていることが予想されたが、当該比率と採取場所には明確な関連性がみられていない。

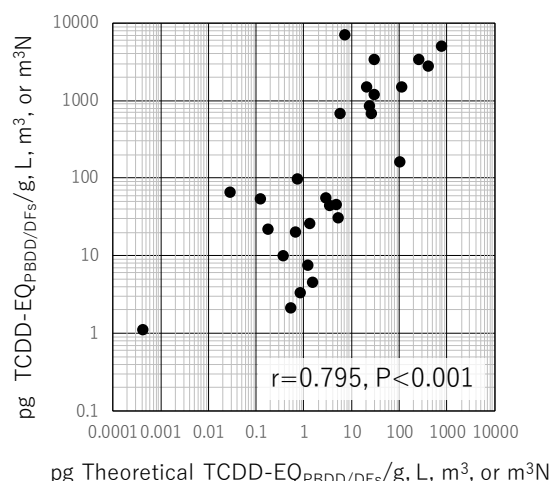


図4.1.12 家電リサイクル施設の作業環境 (n=4)、家電リサイクル施設の排水 (n=6)、デカBDE取扱施設の排水 (n=5)、TBPh取扱施設の排水 (n=2)、非鉄製錬施設の廃電子基板 (n=1)、混合原料 (n=1)、調合鉱 (n=1)、排ガス (n=3)、スラグメタル (n=1) 及び排水 (n=4) のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}とTheoretical TCDD-EQ_{PBDD/DFs}

これらの結果は、臭素化ダイオキシン類だけでなく、臭素化ダイオキシン類と発生源や挙動が類似するその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質がTCDD-EQ_{PBDD/DFs}に関与していることを示唆している。そこで、塩素化ダイオキシン類の基準と比較してTCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高い或いは評価重要度が高いと判断されたデカBDE取扱施設3、4、8、9及び10の排水、産業廃棄物最終処分場2の浸出水と排水、一般廃棄物最終処分場4の浸出水、TBPh取扱施設の排水を対象として、PXDD/DFs評価を実施した。塩素と臭素が混合して置換しているTri~PeXDD/DFsの濃度範囲は、160~2,300 ng/Lであり、濃度順位は、産業廃棄物最終処分場2の浸出水（2,300 ng/L）が最も高く、TBPh取扱施設の排水（320 ng/L）、デカBDE取扱施設8の排水（220 ng/L）、デカBDE取扱施設9の排水（160 ng/L）、産業廃棄物最終処分場2の排水（170 ng/L）であった（図4.1.13）。一方で、デカBDE取扱施設3、4及び10の排水、一般廃棄物最終処分場4の浸出水では、検出されなかった。Tri~PeXDD/DFsは、TCDD-EQとの単純な関係性が示されないものの、検出濃度を考慮するとTCDD-EQに関連する可能性が高い。

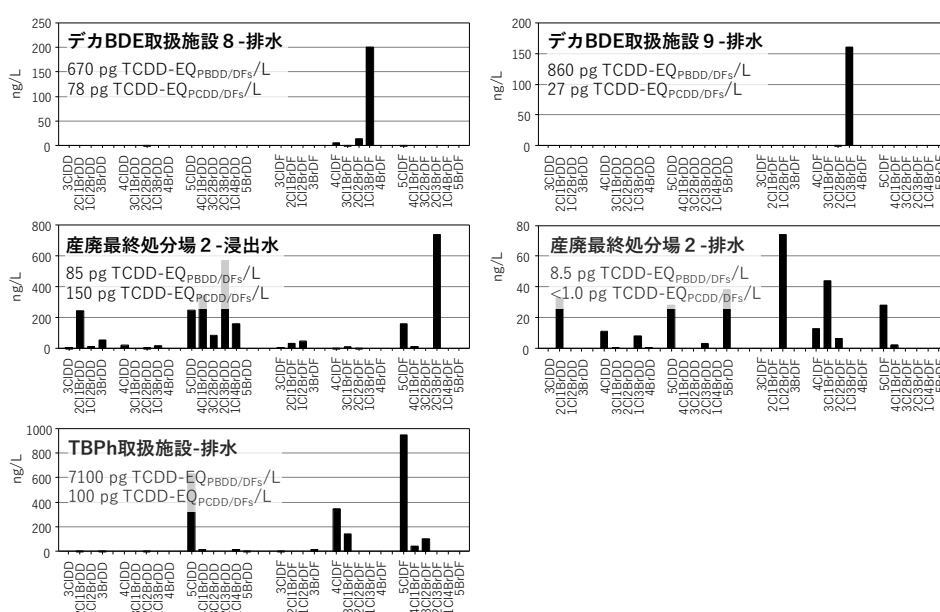


図4.1.13 デカBDE取扱施設8の排水、デカBDE取扱施設9の排水、産業廃棄物最終処分場2の浸出水と排水及びTBPh取扱施設の排水で検出されたTri~PeXDD/DFsパターン

次いで、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤が共に定量できている試料（n=65）のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤の関連性を評価した（図4.1.14）。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤は、強い正の相関関係を示し（ $r=0.821$, $P<0.001$ ）、難燃剤と共にTCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高くなることを示した。臭素化ダイオキシン類やその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質は臭素や塩素が置換している難燃剤との関連性がより強くなると予想されたが、両者の相関関係はTCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤と同程度であった（ $n=65$, $r=0.825$, $P<0.001$ ）。本研究の結果は、臭素化ダイオキシン類を含むその他臭素系ダイオキシン類や類縁物質が難燃剤と発生源や挙動を共にすることを示し、その制御において難燃剤の管理が重要であることを示唆した。

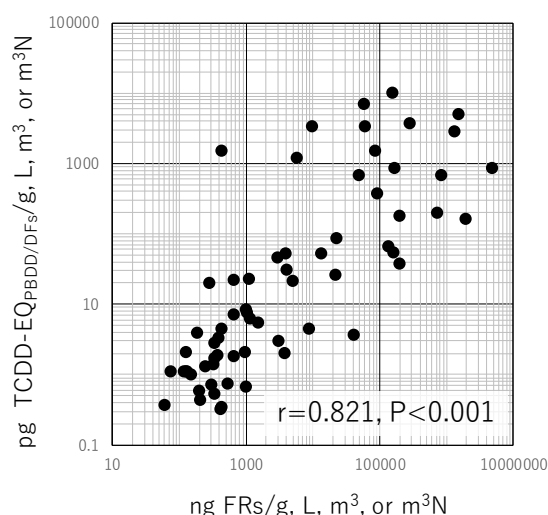


図4.1.14 本研究で評価した各種試料（n=65）のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}と難燃剤濃度

（5）排水処理過程における臭素系ダイオキシン類及び難燃剤の挙動

重要排出源及び未調査業種の排出実態調査では、塩素化ダイオキシン類の排出基準相当値を超過するTCDD-EQ_{PBDD/DFs}を含む排水の存在が確認されるものの、排水処理を通じて排出濃度が低減する傾向であった。ここでは、排水処理を通じた臭素系ダイオキシン類の挙動を評価するため、処理前後の排水を採取できており濃度低減ができていないケースを取り上げて処理内容と濃度低減の関連性を整理するとともに、デカBDE取扱施設の排水が流入する下水処理施設の排水処理過程における臭素系ダイオキシン類の挙動を考察した。

施設名、処理前排水と処理後排水のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、処理前後のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}の除去率、排水処理法を表4.1.8に示す。家電リサイクル施設では、除去率が59%～99%となっており、施設内の排水処理を通じて濃度低減した排水を下水道へ放流していた。TCDD-EQ_{PBDD/DFs}が非常に高い施設2と6に着目すると、両施設における濃度低減効果に差がみられている。施設2と6の排水は、再生プラスチックの有価性を高めるために実施している湿式比重選別で生じる排水であり、破碎された家電プラスチックや付着ダスト等の懸濁物を多く含んでいる。施設2では凝集沈殿処理のみであるが、施設6では凝集沈殿処理に加えて砂ろ過処理を実施している。これらの結果は、懸濁物に着目した排水処理が、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の濃度低減に効果的であることを示している。下水処理施設、一般廃棄物最終処分場及び産業廃棄物最終処分場では、主な排水処理法に示されている通り、懸濁物に着目したより多段階の排水処理が行われており、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}の濃度低減に繋がっている。一方で、最終処分場については、濃度低減できていないケースがあり、一般廃棄物最終処分場1（表4.1.5）及び産業廃棄物最終処分場4と5（表4.1.6）において、浸出水と比較して放流水でTCDD-EQ_{PBDD/DFs}が高くなっている。この原因は不明であるが、最終処分場では降雨によって浸出水が希釈される可能性があり天候に影響を受けている可能性がある。

表4.1.8 評価対象施設の排水処理前後のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}

施設名	処理前排水 pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	処理後排水 pg TCDD-EQ _{PBDD/DFs} /L	除去率 %	主な排水処理法
家電リサイクル施設2	3700	1500	59%	凝集沈殿→下水道
家電リサイクル施設6	3400	8.4	99%	凝集沈殿→砂ろ過→再利用（オーバーフロー水は下水道）
家電リサイクル施設10	31	4.5	85%	中和処理→下水道
デカBDE取扱施設13（下水処理場）	21	<1.0	>95%	最初沈殿→生物処理→最終沈殿→砂ろ過→海域
一般廃棄物最終処分場4	130	2.6	98%	カルシウム除去→生物処理→凝集沈殿→砂ろ過→活性炭→河川
産業廃棄物最終処分場2	85	8.5	90%	凝集沈殿→生物処理→カルシウム除去→砂ろ過→活性炭→キレート吸着→河川
産業廃棄物最終処分場3	20	8.4	58%	凝集沈殿→生物処理→カルシウム除去→砂ろ過→活性炭→キレート吸着→河川
産業廃棄物最終処分場6	16	<1.0	>94%	凝集沈殿→生物処理→カルシウム除去→活性炭→MF膜処理→海域
TBPh取扱施設（下水処理場）	65	<1.0	>98%	最初沈殿→生物処理→最終沈殿→砂ろ過→海域

2019年度に採取したデカBDE取扱施設9の排水と当該排水が流入する下水処理施設の関連試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、デカBDE及びその他難燃剤の各種濃度、デカBDE取扱施設9の平均日排水量（1,061 m³/日）、下水処理施設の平均日流入水量からデカBDE取扱施設9の平均日排水量を差し引いて求めたその他排水量（31,496 m³/日）及び下水処理施設からの平均日放流水量（26,456 m³/日）を下水処理施設の排水処理フローと併せて図4.1.15に示す。デカBDE取扱施設9の排水を下水処理施設の流入水と比較すると、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}は43%に、デカBDEは29%に、その他難燃剤は3%程度に希釈されていた。これら希釈率の差は、採取時間で排水量や流入水量の比率が変わることを考慮する必要があるものの、デカBDE取扱施設9以外のデカBDE及びその他難燃剤の排出源の存在を示唆する。下水処理施設の流入水を放流水と比較すると、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}は2.4%に、デカBDEは8.2%に、その他難燃剤は18%程度に、それぞれ濃度が低減していた。さらに、流入水量と比較して放流水量が低いことも考慮すると、下水処理施設では、排水処理工程を経て、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}、デカBDE及びその他難燃剤が濃度低減及び排出削減されていた。排水処理工程における各種試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、デカBDE及びその他難燃剤の濃度をみると、流入水と比較して反応タンク排水で各種濃度が上昇していた。また、工程汚泥の各種濃度は、流入水や排水と比較して、非常に高かった。下水処理施設では、反応タンク内の活性汚泥濃度を維持するため、汚泥濃縮槽に収集された最初沈殿池や最終沈殿池で沈殿した余剰汚泥の一部を反応タンクに返送している。これによって、排水中の懸濁物質と挙動を共にするTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、デカBDE及びその他難燃剤は、活性汚泥に集積して、活性汚泥と共に、下水処理施設内で循環していると考えられた。一方で、汚泥濃縮槽の活性汚泥は、脱水汚泥として日平均625トンが産業廃棄物焼却炉で処理されていた。これらの結果は、排水処理過程において臭素系ダイオキシン類が懸濁態と挙動を共にしていること、適切に懸濁態を処理している排水処理施設であれば臭素系ダイオキシン類の環境排出を低減できることを示した。

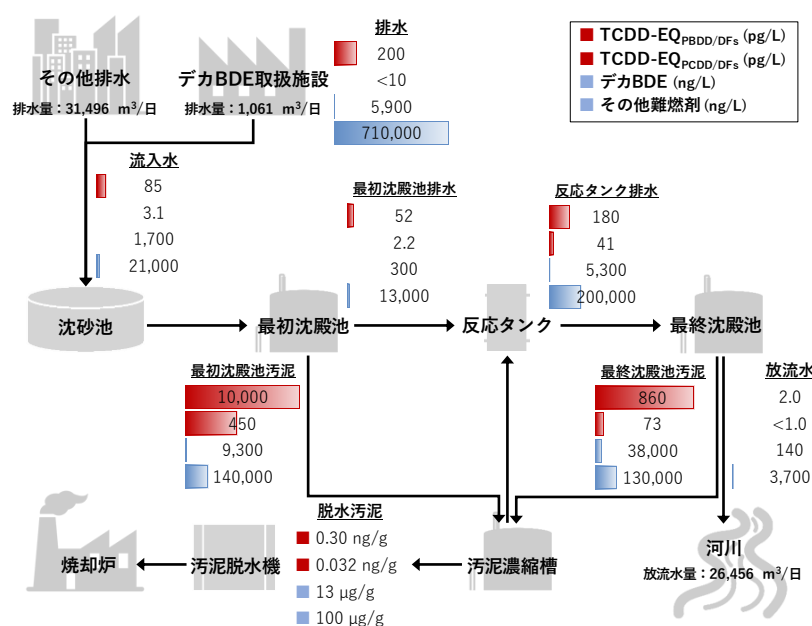


図4.1.15 デカBDE取扱施設9の排水と当該排水が流入する下水処理施設の関連試料の各種濃度と下水処理施設の排水処理フロー

(6) 排ガス処理過程における臭素系ダイオキシン類及び難燃剤の挙動

廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設は、臭素系ダイオキシン類の重要排出源ではなく、塩素化ダイオキシン類のばいじん等処理基準（3.0 ng WHO-TEQ/g）に相当する値を超過する臭素化ダイオキシン類を含有する廃電子基板を適正に処理していた。ここでは、排ガス処理を通じた臭素系ダイオキシン類の挙動を評価するため、廃電子基板や廃電子基板を含む燃焼物、処理前後の排ガスや燃焼残渣相当物を取り上げて処理内容と濃度低減の関連性を整理した。有価金属リサイクル施設、銅熔錬施設及び硫酸工場の関連試料のTCDD-EQ_{PBDD/DFs}、TCDD-EQ_{PCDD/DFs}、デカBDE及びその他難燃剤の各種濃度、有価金属リサイクル施設の最終排ガス量（139万m³N/日）、銅熔錬施設の最終排ガス量（525万m³N/日）及び硫酸工場の排ガス量（409万m³N/日）を排ガス処理フローと併せて図4.1.12に示す。

固形物試料をみると、燃焼残渣のスラグメタルでは、投入物の混合原料と比較して、各種濃度が総じて低くなっていた。特筆すべき点として、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びTCDD-EQ_{PCDD/DFs}は10分の1程度低くなっている程度であったが、デカBDE及びその他難燃剤は1000分の1以上低くなっていた。これは、臭素系ダイオキシン類や塩素系ダイオキシン類といったTCDD-EQ関連物質が熱処理過程で非意図的に生成していることや、デカBDEやその他難燃剤と比較して熱処理過程で分解し難いことを示唆している。銅熔錬施設で工程で生じる水碎鍍や鉛鍍物では、投入物の調合鉱やスラグメタルと比較して、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びTCDD-EQ_{PCDD/DFs}がデカBDE及びその他難燃剤と同様に低くなっていた。これは、混合原料とスラグメタルでみられた関係性と異なっている。調合鉱やスラグメタルでは、混合原料と比較して、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びTCDD-EQ_{PCDD/DFs}とデカBDE及びその他難燃剤の濃度差が小さく（数十倍程度）、これに起因してTCDD-EQ関連物質の非意図的生成量が低いのかかもしれない。排ガス試料をみると、有価金属リサイクル施設の最終排ガスの各種濃度は、バグフィルター処理前排ガスと比較すると、TCDD-EQ_{PBDD/DFs}及びTCDD-EQ_{PCDD/DFs}が100分の1程度に減少しており、TCDD-EQ関連物質が飛灰と共にバグフィルターで除去されていることを示した。銅熔錬施設の最終排ガスの各種濃度は、有価金属リサイクル施設と同じくバグフィルターで排ガスを処理しているが、有価金属リサイクル施設の最終排ガスと比較して総じて低くなっている。これは、混合原料と比較して調合鉱やスラグメタルの各種濃度が低いことを反映していると考えられる。硫酸工場の最終排ガスの各種濃度は、銅熔錬施設の最終排ガスと比較して更に低い傾向であり、TCDD-EQ関連物質が飛灰と共に電気集塵機で除去されていることを示している。

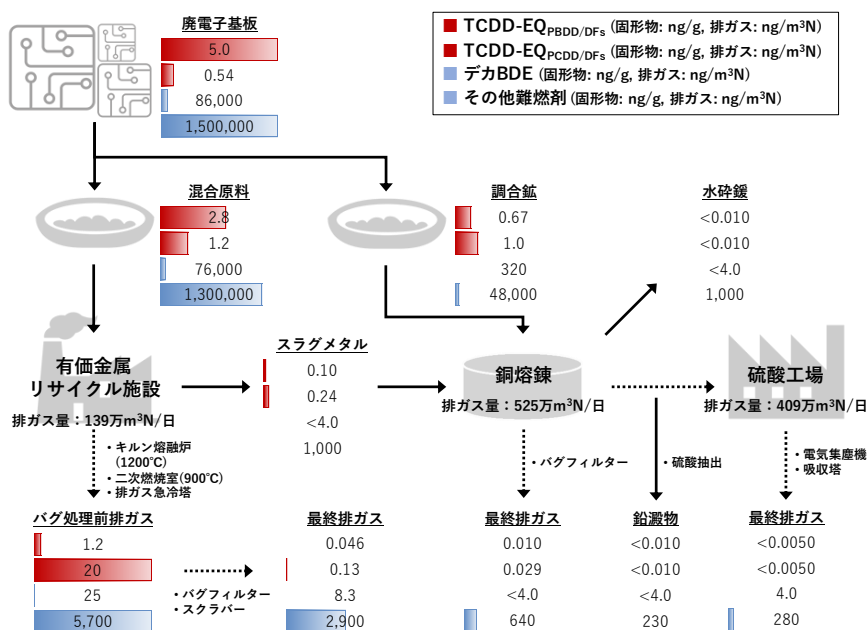


図4.1.12 廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設の関連試料の各種濃度と排ガス処理フロー

5. 本研究により得られた成果

本研究では、一年目に臭素系ダイオキシン類と関連物質の包括的迅速検出法の開発及び排出実態調査の計画立案と排出源スクリーニング開始、二年目と三年目に排出源スクリーニングと排出源施設内での挙動・消長に関する詳細調査を実施し、申請書の研究計画に記載している研究を概ね着実に遂行した。難燃剤を対象とした包括的迅速検出法の開発やそれに基づく排出実態調査や排ガス処理過程における挙動・消長に関する詳細調査は、当初研究計画に入れていなかったが、本研究を取りまとめるにあたって必須なデータと判断したため追加的に実施しており、当初の想定以上の結果が得られた。

(1) 科学的意義

本研究では、環境省との連携のもと、関連する業界団体や地方公共団体の協力を得ることができ、通常の調査研究で対象とすることが難しい施設において、臭素系ダイオキシン類や難燃剤の排出実態を調査することができた。本研究の調査内容は、世界的にみても、実施例のほとんどない貴重なものであり、環境科学分野や国際的な化学物質管理において意義が大きいと考えられる。特に意義の大きいものは次の三点と考えられる。

一つ目は、製造・再資源化・最終処分を通じて、臭素化ダイオキシン類とデカBDEに極めて強い正の相関関係が示された点である ($r=0.917$, $P<0.001$)。これは、デカBDEを管理することで臭素化ダイオキシン類のリスクを管理できることを強く示唆しており、国内外の化学物質管理施策の妥当性を示している。デカBDEについては、2017年5月にストックホルム条約の付属書Aに追加されたことに伴い、2018年4月に化審法の第一種特定化学物質に指定され、国内での製造や使用が禁止されている。これに伴って、製品ライフサイクルの上流側からの臭素化ダイオキシン類の排出量は激減すると考えられる。実際、本研究では、デカBDE取扱施設からの臭素化ダイオキシン類の排出量が、2017年12月より2019年10月にかけて減少傾向にあることを確認している。一方で、製造・再資源化・最終処分を通じた臭素化ダイオキシン類とデカBDEの相関関係は、製品寿命を考慮すると製品ライフサイクルの下流側からの臭素化ダイオキシン類の排出が継続することを示唆している。具体的には、本研究の結果に基づく、熱処理や埋立処分に加えて、デカBDEを含有する可能性が高い製品（電気電子機器製品や自動車関連製品など）の再資源化施設といった中間処理施設からの排出が継続すると考えられ、留意が必要である。

二点目は、製造・再資源化・最終処分を通じて、塩素化ダイオキシン類と同様の毒性反応を示す臭素化ダイオキシン類以外の臭素系ダイオキシン類が濃度高く存在することが示された点である。これは、臭素化ダイオキシン類のリスクを管理できたとしても、同様のリスク性を有する類縁物質の挙動にも注視する必要があることを示唆する。臭素系ダイオキシン類の候補物質として、塩素化臭素化ダイオキシン類が想定されたが、決定的な関連性が見出せていない。ただし、臭素系ダイオキシン類に関しては、全くの手探り状態ではない。本研究では、臭素系ダイオキシン類と難燃剤に比較的強い正の相関関係が示されており ($r=0.821$, $P<0.001$)、製造・再資源化・最終処分を通じて両者が挙動を共にする可能性が示されている。これは、これまでのように個別の物質管理のために臭素系ダイオキシン類の同定にアプローチする以外にも、難燃剤の適切な管理にアプローチすることで、臭素系ダイオキシン類のリスクを管理できる可能性を示唆する。実際には、臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法でリスクの蓋然性を判断して、蓋然性の高いケースについて機器分析網羅検出法で管理すべき難燃剤を濃度ベースで選定することが、臭素系ダイオキシン類のリスク管理において有効かもしれない。

三点目は、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出低減の要点として、粒子状物質の管理が重要であることを明らかにした点である。作業環境ではPUFではなくろ紙上で（データを示していない）、排水ではろ液ではなくろ紙上で、それぞれ臭素系ダイオキシン類の9割以上が検出された。これを反映して、排水処理では懸濁態の除去を目的とした多段階の排水処理が、排ガスではバクフィルターや電気集塵機による除塵が、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出低減に有効であった。臭素化ダイオキシン類は、塩素化ダイオキシン類と同様の疎水性や粒子吸着性を示すことから、塩素化ダイオキシン類と同じく、作業環境、排水及び排ガスにおいて液相や気相ではなく粒子相に存在すると考えられる。この結果として、排水は懸濁態に、作業環境や排ガスは粒子相に、それぞ

れ着目した処理が有効であると考えられる。臭素系ダイオキシン類は、臭素化ダイオキシン類以外の物質が特定できていないが、塩素化ダイオキシン類や臭素化ダイオキシン類と同様の物性を示す可能性が高く、挙動を共にする粒子状物質の管理が重要であると考えられた。本研究は、臭素化ダイオキシン類を含む臭素系ダイオキシン類の排出低減の要点を体系的に示しており、そのリスク管理に繋がる利用可能な最良の技術／環境のための最良の慣行（BAT/BEP, Best Available Techniques/Best Environmental Practices）に資する有用な知見となった。一方で、施設内の排水処理や排ガス処理を通じて臭素系ダイオキシン類が集積する媒体の把握やその管理、処理実態の確認が必要と考えられた。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

環境省・臭素系ダイオキシン類の排出源情報の収集・整理調査検討会において、デカBDE取扱施設からの臭素系ダイオキシン類排出実態調査結果を検討委員に説明し、重要排出源における臭素系ダイオキシン類の排出実態の現状と今後の展望に関する議論に貢献した。また、臭素化ダイオキシン類を検出する生物検定スクリーニング法を用いて、検討会で詳細調査する施設の選定に貢献した。具体的には、平成30年度検討会では、産業廃棄物最終処分場6施設から1施設を選定する際に、生物検定スクリーニング試験結果を共有した。令和元年度検討会では、平成29年度（2017年度）のデカBDE取扱施設からの臭素系ダイオキシン類排出実態調査結果を共有して、検討会で詳細調査するデカBDE取扱施設やその排水が流入する下水処理施設の選定に貢献した。家電リサイクル施設における排出実態調査結果については、関連する業界団体に提示して、臭素系ダイオキシン類の排出の管理状況や今後の見通しについて意見交換した。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

臭素化ダイオキシン類の排出実態や排出低減に係る実測データは、環境省において現在検討中の臭素系ダイオキシン類の排出抑制対策のとりまとめに貢献できる可能性がある。臭素系ダイオキシン類と共にPBDEsを含む廃電子基板を再資源化する非鉄製錬施設における調査結果は、電気電子機器製品の膨大な発生量（世界で年間4,600万トン）や再資源化のニーズを考慮すると、ストックホルム条約「PBDEsに関するBAT/BEPガイダンス」策定に際して有用な知見になり、国際的な化学物質政策の推進に資する知見となる可能性がある。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

- 1) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. TAKIGAMI: Toxicol. In Vitro, 44, 134-141 (2017) Dioxin-like activity of brominated dioxins as individual compounds or mixtures in in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.
- 2) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. HANDA, H. TAKIGAMI: Anal. Chim. Acta, 975, 86-95 (2017) Separate screening of brominated and chlorinated dioxins in field samples using in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.
- 3) 橋本俊次：地球環境, 24 (1), 3-14 (2019) 包括的二次元ガスクロマトグラフィーと精密質量分析による環境モニタリングの試み
- 4) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, H. MATSUKAMI, Y. NOMA, N. KAJIWARA: Chemosphere, 244, 125448

(2020) Validity of using a relative potency factor approach for the risk management of dioxin-like polychlorinated naphthalenes.

- 5) S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI, T. IEDA, G. SUZUKI: Anal. Chem. Comprehensive Analysis of Polybromochlorodibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans as Mixed Halogenated Compounds in Wastewater Samples from Industrial Facilities by GC×GC/ToFMS and Post Data Processing. (Under review)

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 鈴木剛、仲山慶、前川文彦、Nguyen Minh Tue、木村栄輝、道中智恵子、松神秀徳、橋本俊次：廃棄物資源循環学会誌、29(6)、470-481 (2018) 臭素系ダイオキシン類の毒性評価と排出実態調査-現状と今後の展開-
- 2) 鈴木剛：廃棄物資源循環学会誌、30(3)、179-185 (2019) ダイオキシン類のリスク管理 ―AhRに着目したアプローチと類縁化合物への展開―

(2) 口頭発表 (学会等)

<口頭発表>

- 1) 橋本俊次、松神秀徳、家田曜世、鈴木剛：第27回環境化学討論会 (2018) ハロゲン化ダイオキシン類及びその関連物質の包括的迅速検出法の開発～GC×GC-ToFMSを用いた多成分網羅分析法の検討～
- 2) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, S. SAKAI: SETAC North America 39th Annual Meeting (2018) Effect-based approach for evaluation of brominated dioxins and dioxin-like compounds in effluents and indoor air from BFRs treating facility.
- 3) H. Matsukami, S. Hashimoto, G. Suzuki. 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2018) GC-APCI/LC-ESI/QTOF-MS for the determination of brominated dioxins and brominated flame retardants released from flame-retarded product handling plants.
- 4) S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI, T. IEDA, G. SUZUKI: 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2018) Comprehensive analysis of halogenated compounds in discharge water samples by GC×GC/ToFMS.
- 5) 橋本俊次：統計数理研究所共同研究「平成30年度 統計学的アプローチによる問題解決のための環境化学分析の最適化・高度化に関する研究集会」(2018) ノンターゲットモニタリングへの精密質量分析の応用.
- 6) G. SUZUKI, H. MATSUKAMI: 廃棄物管理に関する大阪国際会議-官民連携による環境技術 (2019) Heading towards the environmentally sound management of e-waste: Current situation of hazardous chemical emission control in e-waste recycling in Japan
- 7) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI: 9th International Symposium on Flame Retardants (2019) Current status of brominated dioxins and related compounds emission from commercial DecaBDE handling facility in Japan.
- 8) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, S. SAKAI: 9th International Symposium on Flame Retardants (2019) Development of in vitro cell-based detection method for brominated dioxins in waste water and working air of BFRs handling facility.
- 9) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Brominated dioxins emission from e-waste recycling facility in Japan.
- 10) S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI, T. IEDA, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) COMPREHENSIVE ANALYSIS OF PXDD/Fs AND HALOGENATED COMPOUNDS IN DISCHARGE WATER SAMPLES BY GC×GC/TOFMS.

- 11) 鈴木剛、道中智恵子、橋本俊次、松神秀徳：第28回環境化学討論会（2019）家電リサイクル施設における臭素系ダイオキシン類の排出実態
- 12) 鈴木剛、道中智恵子、橋本俊次、松神秀徳：第28回環境化学討論会（2019）デカBDE取扱施設における臭素系ダイオキシン類の排出実態
- 13) G. SUZUKI: 12th BioDetectors Conference (2019) Effect-based detection and evaluation of brominated dioxins from significant emission sources in Japan: The current status and perspective of PBDD/DFs and related compounds.
- 14) H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, G. SUZUKI: 9th International Symposium on Flame Retardants (2019) Emission status of flame retardants in sewage effluents from commercial DecaBDE handling facility in Japan.
- 15) H. MATSUKAMI, S. HASHIMOTO, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Emission status of flame retardants in indoor air and water effluent from e-waste recycling facility in Japan.
- 16) G. SUZUKI, C. MICHINAKA, S. HASHIMOTO, H. MATSUKAMI: SETAC North America 40th Annual Meeting (2019) Brominated dioxins emission from e-waste recycling facility in Japan.
- 17) 橋本俊次：新しい水質分析に関するワークショップ～水道への展開～（2019）最近の分析技術：GCxGC/ToFMSによるノンターゲットモニタリングの試み。
- 18) 松神秀徳：統計数理研究所共同研究「令和元年度 統計学的アプローチによる問題解決のための環境化学分析の最適化・高度化に関する研究集会」（2019）GC-APCI/LC-ESI/QTOF-HRMS法による廃水のノンターゲット分析。

<ポスター発表>

- 1) 松神秀徳、橋本俊次、鈴木剛：第27回環境化学討論会（2018）ハロゲン化ダイオキシン類及びその関連物質の包括的迅速検出法の開発～工場排水の自動固相抽出法及びUHPLC/APGC/QTOFMSを用いた多成分網羅分析法の検討～
- 2) 鈴木剛、道中智恵子、松神秀徳、橋本俊次、酒井伸一：第27回環境化学討論会（2018）難燃製品取扱施設の排水及び建屋内空気を対象とした臭素化ダイオキシン類の生物検定スクリーニング法の開発

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 鈴木剛：国立環境研究所一般公開「春の環境講座」講演会「いらなくなった電気製品はどこに行く？どうなる？」（2018年4月22日，つくば市，参加者749名）
- 2) 松神秀徳：国立環境研究所一般公開「春の環境講座」パネル展示「化学物質がまる見えに！？廃水検査研究の最前線」（2018年4月22日，つくば市，参加者749名）
- 3) 橋本俊次：国立環境研究所一般公開「春の環境講座」パネル展示「空気や水の中の化学物質、とりあえず測ってみました」（2018年4月22日，つくば市，参加者749名）
- 4) 鈴木剛：生物化学的測定研究会 第23回学術集会プログラム 各種レポーター遺伝子アッセイ法の取り組み・応用（学生無料）招待講演「非意図的に副生成する臭素系ダイオキシン類の包括的なリスク管理へのレポーター遺伝子アッセイ法の適用」（2018年6月8日，東京都港区，参加者50名）
- 5) 鈴木剛：つくば市立並木小学校つくばスタイル科お仕事先生 特別授業「こわれた電気製品はどこに

行く？」(2018年12月17日, つくば市, 参加者25名)

- 6) G. SUZUKI, H. MATSUKAMI: プラスチックごみ問題に関する国連環境計画シンポジウム 招待講演 (日英同時通訳) 「Heading towards the environmentally sound management of e-waste: Current situation of hazardous chemical emission control in e-waste recycling in Japan」(2019年5月22日, 大阪市, 参加者200名)
- 7) 鈴木 剛: 国立環境研究所ニュース 38巻4号「電気電子機器の適切な再資源化にむけて: 国内の家電リサイクル施設の調査結果から考える」(2019年10月発行, 国立環境研究所ホームページ)
- 8) 鈴木剛: 資源循環・廃棄物研究センター オンラインマガジン環境, 5月号 循環・廃棄物のけんきゅう「電気電子機器プリント基板の再資源化のあり方〜金属資源の回収と臭素化ダイオキシン類の適正処理の両立〜」(2020年5月28日発行, 国立環境研究所資源循環・廃棄物研究センターホームページ)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) N. HANARI, K. KANNAN, Y. MIYAKE, T. OKAZAWA, P.R. KODAVANTI, K.M. ALDOUS, N. YAMASHITA: Environ. Sci. Technol., 40(14), 4400-4405 (2006) Occurrence of polybrominated biphenyls, polybrominated dibenzo-p-dioxins, and polybrominated dibenzofurans as impurities in commercial polybrominated diphenyl ether mixtures.
- 2) M. REN, P. PENG, Y. CAI, D. CHEN, L. ZHOU, P. CHEN, J. HU: Environ. Pollut., 159(5), 1375-1380 (2011) PBDD/F impurities in some commercial deca-BDE.
- 3) N. KAJIWARA, Y. NOMA, H. TAKIGAMI: Environ. Sci. Technol., 42(12), 4404-4409 (2008) Photolysis studies of technical decabromodiphenyl ether (DecaBDE) and ethane (DeBDethane) in plastics under natural sunlight.
- 4) S. SAKAI, J. WATANABE, Y. HONDA, H. TAKATSUKI, I. AOKI, M. FUKAMATSU, K. SHIOZAKI: Chemosphere, 42(5-7), 519-531 (2001) Combustion of brominated flame retardants and behavior of its byproducts.
- 5) H. WICHMANN, F.T. DETTMER, M. BAHADIR: Chemosphere, 47(4), 349-355 (2002) Thermal formation of PBDD/F from tetrabromobisphenol A--a comparison of polymer linked TBBP A with its additive incorporation in thermoplastics.
- 6) N. ORTUÑO, J. MOLTÓ, J.A. Conesa, R. Font: Environ. Pollut., 191, 31-37 (2014) De novo synthesis of brominated dioxins and furans.
- 7) N. ORTUÑO, S. LUNDSTEDT, L. Lundin: Chemosphere, 123, 64-70 (2015) Emissions of PBDD/Fs, PCDD/Fs and PBDEs from flame-retarded high-impact polystyrene under thermal stress.
- 8) M. ZHANG, A. BUEKENS, X. LI: J. Hazard. Mater., 304, 26-39 (2016) Brominated flame

retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion.

- 9) N.M. TUE, T. MATSUSHITA, A. GOTO, T. ITAI, K.A. ASANTE, S. OBIRI, S. MOHAMMED, S. TANABE, T. KUNISUE: *Environ Sci Technol.*, 53(6), 3010-3017 (2019) Complex Mixtures of Brominated/Chlorinated Diphenyl Ethers and Dibenzofurans in Soils from the Agbogbloshie e-Waste Site (Ghana): Occurrence, Formation, and Exposure Implications.
- 10) M. VAN DEN BERG, M.S. DENISON, L.S. BIRNBAUM, M.J. DEVITO, H. FIEDLER, J. FALANDYSZ, M. ROSE, D. SCHRENK, S. SAFE, C. TOHYAMA, A. TRITSCHER, M. TYSKLIND, R.E. PETERSON: *TOXICOL. SCI.*, 133, 197-208 (2013) Polybrominated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, and Biphenyls: Inclusion in the Toxicity Equivalency Factor Concept for Dioxin-Like Compounds.
- 11) 環境省：臭素系ダイオキシン類排出実態調査報告書（平成14～28年度）
http://www.env.go.jp/chemi/dioxin/chosa/result_h28.pdf（参照 2018年11月）
- 12) P.A. BEHNISCH, K. HOSOE, S.-I. SAKAI: *Environ. Int.* 29, 861-877 (2003) Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds.
- 13) H. OLSMAN, M. ENGWALL, U. KAMMANN, M. KLEMP, J. OTTE, BV. BAVEL, H. HOLLERT: *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2448-2454 (2007) Relative differences in aryl hydrocarbon receptor-mediated response for 18 polybrominated and mixed halogenated dibenzo-p-dioxins and -furans in cell lines from four different species.
- 14) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. HANDA, H. TAKIGAMI: *Toxicol. In VITRO*, 44, 134-141 (2017) Dioxin-like activity of brominated dioxins as individual compounds or mixtures in in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.
- 15) 鈴木剛：環境研究総合推進費補助金（2013-2015）生物検定法による塩素化／臭素化ダイオキシン類測定評価法の確立と高度利用に関する研究
- 16) M. VAN DEN BERG, L.S. BIRNBAUM, M. DENISON, M. DE VITO, W. FARLAND, M. FEELEY, H. FIEDLER, H. HAKANSSON, A. HANBERG, L. HAWS, M. ROSE, S. SAFE, D. SCHRENK, C. TOHYAMA, A. TRITSCHER, J. TUOMISTO, M. TYSKLIND, N. WALKER, R.E. PETERSON: *Toxicol. Sci.*, 93(2), 223-241 (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds.
- 17) 一般財団法人家電製品協会：家電リサイクル年次報告書平成30年度版（2019）
- 18) 環境省：廃棄物処理技術情報
http://www.env.go.jp/recycle/waste_tech/index.html（参照 2019年10月）
- 19) 公益社団法人大阪府産業資源循環協会：産業廃棄物の処理について
<http://www.o-sanpai.or.jp/about/about01.html>（参照 2019年10月）
- 20) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. HANDA, H. TAKIGAMI: *Anal. Chim. Acta.*, 4(975), 86-95 (2017) Separate screening of brominated and chlorinated dioxins in field samples using in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.

Ⅱ-2 排水で検出される臭素系ダイオキシン類の魚類毒性評価

愛媛大学

沿岸環境科学研究センター

汚染・毒性解析部門

仲山 慶

Nguyen Minh Tue

平成29年度～令和元年度研究経費（累計額）：17,080千円（研究経費は間接経費を含む）

（平成29年度：5,200千円、平成30年度：4,940千円、令和元年度：6,940千円）

【要旨】

臭素系ダイオキシン類の毒性を初期生活段階のメダカを用いて評価する試験法を構築し、以下に示す7異性体の毒性を評価した。対象とした異性体は、2,3,8-TrBDF、2,3,7,8-TeBDF、1,2,3,7,8-PeBDF、2,3,4,7,8-PeBDF、2-C-3,7,8-BDF（TeXDF）、1,3,6,8-/1,3,7,9-TeBDDとし、さらに陽性対照として2,3,7,8-TCDDを用いた。各異性体をメダカの胚に曝露し、ふ化率、浮腫の発生率、受精後28日目までの生存率をそれぞれ求めた。得られた毒性値に基づき、TCDDの毒性を1とした時の各化合物の相対毒性強度（REP, Relative Potency）を算出した。毒性試験の結果、2,3,7,8位にハロゲンが置換していないTrBDF及びTeBDDを除くすべての被験物質において、ダイオキシン類曝露による典型的な影響が観察された。受精後28日目に20%の致死を引き起こす曝露水中の被験物質濃度に基づいてREPを算出したところ、毒性の強いものから順に、TeXDF（2.3）>TCDD（1.0）>TeBDF（0.76）>2,3,4,7,8-PeBDF（0.048）>1,2,3,7,8-PeBDF（0.0063）であった。上記REPを卵内の被験物質濃度で算出すると、TeXDF（4.6）>TCDD（1.0）>TeBDF（0.92）>2,3,4,7,8-PeBDF（0.55）>1,2,3,7,8-PeBDF（0.19）となった。本研究で示された被験物質のREPの順位は既報と一致しており、求めたREPはニジマスの胚を対象にインジェクション法で実施された試験や、齧歯類の細胞を用いた*in vitro*試験から、それぞれ算出されたものと概ね一致していた。これらの結果は、本研究で確立した試験法の妥当性を示している。一方、曝露水中の濃度をベースに算出したREPは、卵内濃度をベースにしたREPより低くなる傾向を示し、とくに5臭素化体ではその乖離が大きくなった。このことから、5臭素化体よりも置換数の多い異性体については、臭素の置換数に依存した分子量の増大あるいは疎水性の増強により、卵内への取込量は著しく減少し、魚類の胚への影響は低くなることが予想された。以上の結果から、魚類への毒性影響を考慮した臭素化ダイオキシン類の生態リスクを管理する場合、2,3,7,8位にハロゲンが置換した4及び5臭素化体（または塩素化臭素化体）の排出量に留意する必要がある。また、高臭素化体の分解産物として高いREPを示す異性体が生成する可能性については、別途考慮する必要があるだろう。

【キーワード】

メダカ、胚、相対毒性強度、blue sac disease

1. はじめに

サブテーマ1で明らかにしたように、臭素化ダイオキシン類は家電リサイクル施設や難燃繊維加工施設、下水道終末処理施設の排水中から検出されている。この排水を介して環境中に放出される臭素化ダイオキシン類のリスク評価及び管理にあたり、塩素化ダイオキシン類のWHO-TEFを、ハロゲンの置換位置が同じ臭素化ダイオキシン類に適用して毒性等量（TEQ, Toxic Equivalent）を求めることが提言されている。しかしながら、臭素化ダイオキシン類の魚類に対する毒性評価の知見は乏しく、適切なリスク管理を行うためには、水生生物に対する毒性データを補完し、それに基づく相対毒性強度（REP, Relative Potency）を求める必要があると考えた。

ダイオキシン類の魚類に対する毒性に関する報告は多数存在するが、ダイオキシン類が非意図的に生成する化学物質ということもあり、テストガイドラインに則った試験法による評価はほとんど無く、

個々の報告事例において試験条件が異なり、既存のデータ間での毒性値の比較が困難である。また、報告事例の多くはダイオキシン類の中で最も毒性の強い2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を対象としているため、低濃度かつ短時間での曝露条件で実施されており、この試験条件では相対的に毒性の弱い異性体の影響を検出できない可能性がある。さらに、多数の異性体を同一の試験法で評価するため、繰り返し試験を行うにあたり許容できる試験期間及びコストで実施可能な試験法の構築が必要であった。したがって、臭素化ダイオキシン類の毒性評価に先立って、TCDDの毒性試験を実施し、曝露時間等の条件や最適なエンドポイントを決定した。

また、本研究では排水が放流される水環境における臭素化ダイオキシン類のリスク評価を目的としているため、被験物質の取り込みを考慮する必要がある。したがって、被験物質は試験水に添加し、環境水から曝露することとした。この時、曝露前後での試験水中の被験物質濃度を測定し、実測濃度に基づいてREPを算出することにした。一方、先行研究ではニジマスの胚に被験物質を直接注入してその影響を観察しているため¹⁾、この結果と比較するために本研究ではメダカの卵に移行した被験物質の濃度も併せて測定することにした。

2. 研究開発目的

申請書の研究計画では、一年目にTCDDを用いた魚類毒性試験の試験条件の確立、二年目と三年目に臭素系ダイオキシン類4種類の魚類毒性試験の実施と成果の取りまとめとしていた。

これに基づいて、本研究では、初期生活段階のメダカを対象に臭素系ダイオキシン類の毒性評価を行い、環境水からの取り込みを考慮したREPを求めることを目的とした。そのために、TCDDを陽性対照として曝露試験を実施し、試験条件を最適化するとともに、高い再現性で鋭敏に毒性を検出するエンドポイントを決定した。確立された試験法を用いて、サブテーマ1で実施したモニタリングにて比較的検出頻度が高く、*in vitro*試験でAhRアゴニスト活性が相対的に高いことが判明した異性体を対象に毒性試験を実施し、各エンドポイントに対する毒性値を得るとともに、臭素化ダイオキシン類のリスク評価及び管理に活用するためのREPを算出した。

3. 研究開発方法

1) 曝露試験に用いるメダカの胚の取得

試験には鹿児島大学から譲渡を受けたヒメダカ (*Oryzias latipes*) を愛媛大学にて継代飼育したものをを用いた。水温が24~25℃になるよう、室温を25℃に設定したインキュベーションルームで飼育し、餌料としてアルテミア幼生を毎日飽食量与えた。換水は毎日行い、飼育水には脱塩素水道水を用いた。照明時間は明期15時間、暗期9時間とした。

上述の条件でヒメダカが性的に成熟するまで飼育し、親魚が毎日産卵することを確認した。曝露試験には、新魚の集団から採取した受精後3時間以内の受精卵を用いた。卵から付着糸を取り除いた後に、未受精卵及び奇形卵を除去した。得られたヒメダカ受精卵を0.9%過酸化水素水で処理し、胚培養液 (Reconstituted water [ISO 6341-1982]) でリンスした。

2) 被検物質の調製

試験に用いた被検物質及びその入手方法を表3.2.1に示す。各化合物をジメチルホルムアミド (DMF, Dimethylformamide) に溶解し、各調製液を得た。胚培養液をナシ型フラスコに入れ、同溶液にDMFの終濃度が0.01%となるように各被検物質の調製液を添加し、目的濃度の曝露溶液を作製した。各被検物質の曝露濃度範囲は表3.2.2に示す。

表 3.2.1 本試験にて使用した化合物種と入手先

化合物名	略称	入手方法
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	TCDD	Wellington Laboratories から購入
1,3,6,8-/1,3,7,9-tetrabromodibenzo- <i>p</i> -dioxin	TeBDD	Wellington Laboratories から購入 (2つの異性体が50%ずつ混合されたもの)
2,3,8-tribrominated dibenzofuran	TrBDF	日本薬科大学にて合成 (純度 99%以上)
2,3,7,8-tetrabrominated dibenzofuran	TeBDF	日本薬科大学にて合成 (純度 99%以上)
1,2,3,7,8-pentabrominated dibenzofuran	1-PeBDF	Cambridge Isotope Laboratories から購入
2,3,4,7,8-pentabrominated dibenzofuran	2-PeBDF	Cambridge Isotope Laboratories から購入
2-chloro-3,7,8-tribromo dibenzofuran	TeXDF	日本薬科大学にて合成 (純度 77%)

表3.2.2 各TCDD曝露試験での曝露濃度範囲

試験 No.	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4
データ種別	実測値	実測値	設定値	実測値
濃度区	6	6	3	5
公比	3	3	10	3
濃度範囲 (pM)				
最小濃度	1.45	19.3	12.8	10.2
最大濃度	325	4910	3110	372

3) 曝露試験条件の検討

(1) TCDD曝露試験 1

TCDDの曝露にはガラス製ディッシュ (φ 41.5 mm) を用い、曝露開始直前に各目的濃度のTCDD曝露溶液を添加・廃棄し、TCDDをガラス壁面に吸着させるプレコンディショニングを行った。プレコンディショニング後の各容器に20個のヒメダカ胚 (F0) を入れ、5 mLの各目的濃度のTCDD曝露溶液を添加した。TCDD曝露濃度は表3.2.2に示す濃度となるよう調製し、試験は3連で行った。ヒメダカ胚は26℃に設定したインキュベーター内で培養した。1時間後にTCDD曝露溶液を取り除き、10 mLの胚培養液と置換した。曝露開始前後の曝露溶液はTCDDの濃度測定に用いた。F0受精後5日目に胚をビデオ撮影し、心拍数の計測に用いた。F0受精後7日目に、50 mLの胚培養液を入れた200 mL容ガラス容器に胚を移し、F0受精後14日目までインキュベーター内で培養した。この期間、胚は毎日観察し、ふ化個体を計数するとともに、発生が停止または死亡した個体は取り除いた。なお、胚をディッシュから200 mL容器に移す際を除き、換水は行わなかった。

F0受精後15日目にメダカ仔魚を200 mL容ガラス容器に入れたまま、親魚を飼育するインキュベーションルームに移し、飼育水を100 mLに増やして飼育した。F0受精後36日目まで生存した個体を1.8 L容ガラス製水槽に移し、性成熟するまで飼育した。この期間、毎日換水し、アルテミア幼生を飽食量与えた。

F0受精後92日～94日の3日間、各水槽から卵を回収し、産卵数及び受精率を算出した。F1受精卵を6穴プレートで培養し、F1受精後7日目に200 mL容ガラス容器に移した。F1受精後21日目まで飼育を継続し、ふ化率及び生存率を求めた。F1世代の飼育はF0世代と同様の条件下で行った。

F0世代の個体はF0受精後113日目に全長及び体重を測定し、表現型の性を記録した。また、各個体の尾びれを一部切り取り、100%エタノールで固定した。固定したひれは遺伝的性の判別に用いた。

遺伝的な性を判別するために、エタノール固定したメダカ尾びれ試料から、Kaneka Easy DNA Extraction Kit (ver. 2, Kaneka) を用いてDNAを抽出した。得られたDNA溶液をテンプレートとし、メダカのDMRT1及びDMYを同時に増幅可能なプライマー (PG17.5及びPG17.6)²⁾を用いてPCR反応を行った。得られた増幅産物を1.2%アガロースにて電気泳動し、遺伝的雌雄の判別を行った。

(2) TCDD曝露試験 2

TCDD曝露試験 1 を一部改変し、再度曝露試験を行った。ガラス製ディッシュに15個のヒメダカ胚をそ

れぞれ入れ、5 mLの各目的濃度のTCDD曝露溶液を加えた。最大濃度の目標値を1000 ng/L (3106 pM) とし、以下公比3で6濃度区を設定した。試験は3連で行った。曝露開始から3時間後にTCDD曝露溶液を取り除き、胚を胚培養液で3回リンスした。リンスした胚は清浄なディッシュに移し、10 mLの胚培養液中で培養した。受精後7日目に胚を48穴プレートの各穴に1つずつ移し、1 mLの胚培養液中で受精後21日目まで飼育した。受精後21日目に、100 mLの胚培養液を入れた200 mL容ガラス容器に胚を移し、受精後35日目まで飼育した。試験期間中は、形態的な異常を観察するとともに、ふ化率及び死亡率を求めた。なお、試験期間中は毎日胚培養液を全量交換した。

(3) TCDD曝露試験3

TCDD曝露試験2と同じ試験方法で、曝露時間を3、6、24時間の3段階に設定し、21日間の短縮試験を実施し、最適な曝露時間を検討した。

(4) TCDD曝露試験4

TCDD曝露試験2及び3の結果を受け、以下の条件を改変して曝露試験を実施した。曝露開始前のプレコンディショニングを、緩やかに振とう(35~40往復/分)した条件下で24時間行なった。また、曝露時間は6時間とし、曝露開始から受精後21日目までのガラス製ディッシュ及び48穴プレートでの培養期間中は常に先述の条件で緩やかに振とうさせた。試験は受精後28日目まで実施した。

4) 臭素系ダイオキシン類の曝露試験

TCDD曝露試験で確立した条件で試験を実施した。本試験に先立って、2段階または3段階の濃度で予備試験を実施し、各異性体の曝露濃度を検討した。本試験では各濃度区に4つのディッシュを準備し、そのうち1つのディッシュは曝露物質の卵内濃度の測定用に、残りの3つのディッシュを発生異常、ふ化率、死亡率を求めるのに用いた。また、曝露開始時及び終了時の曝露溶液を採取し、被検物質の濃度測定に用いた。

5) ダイオキシン類の濃度測定

水試料中のダイオキシン類はヘキサンで2回抽出した。卵に含まれるダイオキシン類はアセトンで2回、ジクロロメタンで1回抽出した。いずれも1回目の抽出時にラベルした標準品を添加した。抽出液を濃縮した後に、デカンに転溶した。本溶液をガスクロマトグラフ質量分析装置に供試し、各被検物質を定性・定量した。なお、TeXDFの低濃度区の卵内濃度測定にのみGC (Agilent 6890N)-HRMS (JEOL JMS-800D)を用い、それ以外はGC (Agilent 7890A)-qMS (Agilent 5975C)を使用した。

6) データ解析

各曝露試験から得られた被検物質の濃度データから、水中濃度の平均値または卵内濃度を算出した。各試験における死亡率、ふ化率、浮腫の発生率に対して、R言語(ver. 3.5.2)のdrcパッケージ³⁾を用いて用量応答曲線を求めた。得られた用量応答曲線から、受精後21日目または28日目における20%または50%致死濃度(LC₂₀またはLC₅₀)、ふ化阻害または浮腫が発生する20%または50%影響濃度(EC₂₀またはEC₅₀)をそれぞれ求めた。また、TCDD曝露試験1における心拍数、産卵数、受精率、次世代のふ化率はDunnet法またはSteel法にて多重比較を行った。さらに、雌雄比についてはカイ二乗検定で比較した。

4. 結果及び考察

1) 試験条件の検討

(1) TCDD曝露試験1

受精後5日目に心拍数を計測したところ、いずれの区においても106~110 beats/minとなり、有意な違いは検出されなかった。また、発生が進むにつれて、卵黄囊の浮腫、血栓、尾部からの出血など、blue-sac diseaseと呼ばれるダイオキシン類曝露による典型的な症状が観察された(図4.2.1)。

受精後14日目までには対照区のすべての個体がふ化したが、TCDD曝露区では濃度依存的に生存個体が減少した。TCDDの曝露濃度が15.2 pM以上の区では、ふ化後の遊泳失敗及び摂餌障害により、受精後30日目前後まで断続的に死亡個体が観察されたが（図4.2.1）、それ以降はほぼ観察されなかった。受精後21、28日目のLC₅₀値を算出したところ、それぞれ36.7、18.9 pMとなった。

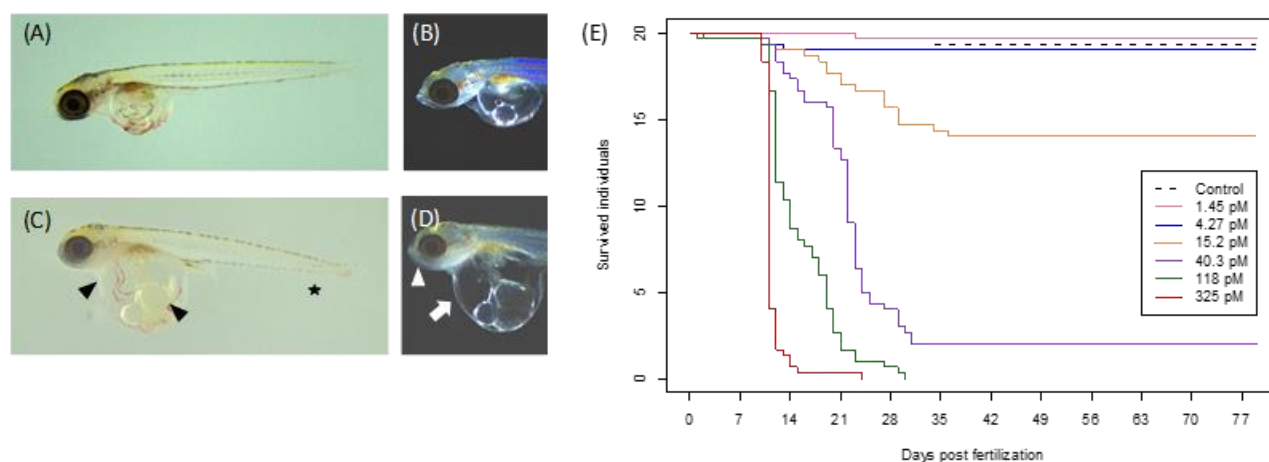


図4.2.1 メダカの胚に2, 3, 7, 8-TCDDを曝露した際に生じる典型的な影響と生存個体数の推移
(A)、(B) 正常個体、(C)、(D) TCDD曝露個体。卵黄囊の血管に血栓が見られ（(C)矢じり）、尾部からの出血も認められる（(C)星印）。また、重度の卵黄囊の浮腫（(D)矢印）及び下顎の形態的異常（(D)矢じり）も見られる。（E）受精後79日目までの各濃度区の平均生存個体数。

F0世代の産卵数及び受精率とF1世代のふ化率を表4.2.1に示す。いずれの項目もTCDD曝露による影響は見られなかった。また、F0世代の表現型の性比は、対照区も含めてやや雄が少ない傾向にあったものの（表4.2.1）、TCDDの曝露に起因する影響は観察されなかった。遺伝型の性判別を行ったところ、全220検体のうち4検体で表現型と遺伝型の性が一致しなかった。これら4検体はいずれも雄の二次性徴を呈しておらず、尻びれの形状からは雌と判別されたが、遺伝子型は雄であった。ただし、これらの表現型と遺伝型の性の不一致は、1.45 pM TCDD区を除く各濃度区に1検体ずつ存在しており、TCDDの曝露濃度依存的な影響とは言えなかった。

表4.2.1 TCDD曝露試験1におけるF0世代の性比、産卵数、受精率とF1世代のふ化率

試験区	性比（オス%）		産卵数	受精率（%）	ふ化率（%）
	表現型	遺伝型			
対照区	23:34 (40.4)	24:33 (42.1)	22.2 ± 4.3	86.9 ± 8.0	91.6 ± 1.3
1.45 pM	23:35 (39.7)	23:35 (39.7)	21.4 ± 6.7	85.4 ± 10.2	88.5 ± 3.2
4.27 pM	27:30 (47.4)	28:29 (49.1)	23.0 ± 2.5	86.7 ± 8.7	90.6 ± 8.9
15.2 pM	18:24 (42.9)	19:23 (45.2)	36.5 ± 4.9	85.7 ± 8.5	94.4 ± 1.6
40.3 pM	2:4 (33.3)	3:3 (50.0)	27.5	98.3	92.7

性比：試験終了時まで生存していた全個体を対象に調査した結果

産卵数：採卵した3日間の総産卵数を水槽内の雌の数で割ったもの

産卵数、受精率、ふ化率：各水槽の3日間の平均値を代表値とし、その平均値及び標準偏差を各群で算出

以上の結果から、胚期のメダカに対するダイオキシン類の濃度依存的な影響を評価するには、性成熟や再生産のように曝露から長期間経た後の影響を観察するよりは、死亡個体が観察されなくなる受精後28日目までの発生、ふ化、生存を観察すべきであると結論づけられた。また、受精後28日目の死亡率は、心臓または卵黄囊の浮腫の発生による卵黄吸収阻害に加え、下顎の低形成に起因すると予想される摂餌障害による餓死の両者を合わせた影響を反映しているため、今回観察した項目の中では最も鋭敏なエンドポイントであると考えられた。さらに、多数の化合物の毒性を評価するために繰り返し実施する

必要がある試験としては、28日間という試験期間は妥当であると言える。

(2) TCDD曝露試験 2

予備的検討において、TCDD曝露終了時の卵を、TCDDを含まない胚培養液でリンスして清浄なディッシュに移す工程を挿入すると、曝露濃度及び曝露時間がTCDD曝露試験 1 と同様の条件では胚発生及びふ化率に全く影響が見られなかった。したがって、さらに予備実験を行った結果から、曝露濃度の範囲を高濃度側にシフトさせるとともに、曝露時間を3時間に延長することとした。

上述の通り改変した試験を実施した結果、TCDD曝露濃度依存的な浮腫の発生、ふ化阻害、個体の死亡が観察された。生存個体数の推移は、TCDD曝露試験 1 と同様に、受精後28日目まで減少し、その後横ばいとなった。受精後21、28日目の LC_{50} 値を算出したところ、それぞれ220、78.3 pMとなった。また、ふ化阻害及び浮腫発生の EC_{50} 値はそれぞれ249、285 pMとなった。

TCDD曝露試験 1 の結果と比較すると、曝露時間を延長したにもかかわらず、 LC_{50} 値は4～6倍高い値となった。このことは、TCDD曝露試験 1 において、ディッシュに吸着したTCDDが卵に移行し続けたことに起因すると考えられた。したがって、同一曝露時間での影響を異性体間で比較するためには、曝露終了時に卵を胚培養液でリンスし、新たなディッシュに移すことで、被験物質のキャリーオーバーを防ぐべきである。ただし、卵-胚培養液-ディッシュ間での分配は、被験物質の物理化学的特性によって大きく異なることが予想されるため、本試験では卵に移行した被験物質の濃度を測定することにした。

(3) TCDD曝露試験 3

3段階のTCDD曝露濃度を設定し、曝露時間を3時間、6時間、24時間とした場合の生存個体数の推移を図4.2.2に示す。曝露時間が3時間、6時間、24時間の時の受精後21日目での LC_{50} 値は、それぞれ945、253、59.7 pMであった。ただし、TCDD曝露試験 3 では、曝露水中のTCDD濃度を測定していないため、設定濃度に基づいて算出した毒性値であり、経験的に実測濃度に基づく毒性値は上記の50%程度であると推定された。したがって、便宜的に曝露時間が3時間、6時間、24時間の時の受精後21日目での LC_{50} 値は、それぞれ473、127、29.9 pMとする。

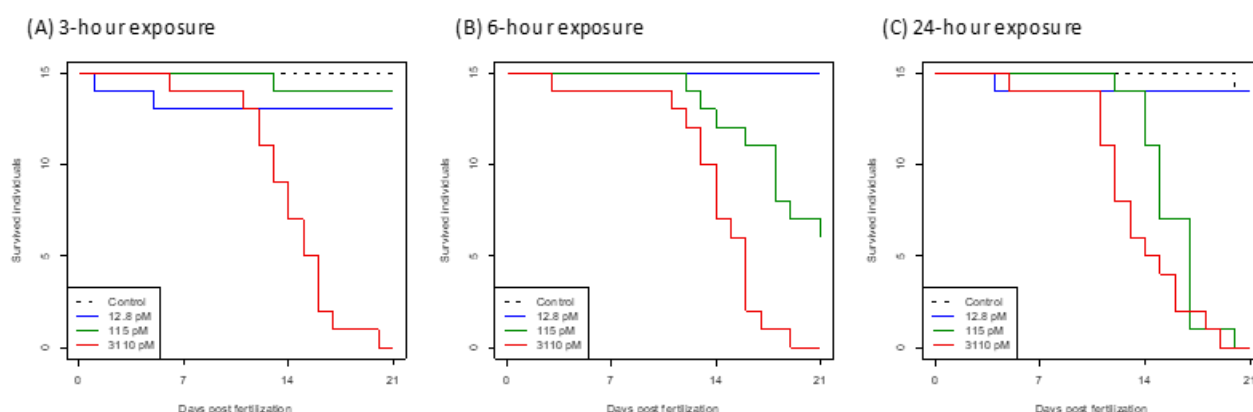


図4.2.2 メダカの胚に2,3,7,8-TCDDを (A) 3時間、(B) 6時間、(C) 24時間曝露した後の受精後21日目までの生存個体数の推移

いずれの曝露時間においても、濃度依存的にTCDDの影響が観察された。ただし、3時間曝露では最高濃度区でしか影響が観察されず、ポテンシャルの低い異性体の影響を検出するには、曝露時間を延長する必要があると考えられた。一方、24時間曝露においては、中濃度区においても受精後21日目までに全ての個体が死亡したため、より低い濃度範囲での曝露試験が求められる。しかしながら、TCDDをはじめとした高ポテンシャルの異性体の曝露試験を想定した場合、曝露水及び卵内の被験物質の濃度が極めて低濃度となり、被験物質の定量に支障をきたすケースが生じうると予想された。したがって、本試験に

おける曝露時間は6時間にすることとした。

(4) TCDD曝露試験4

TCDD曝露試験1～3と同様に、濃度依存的にTCDD曝露による影響が観察された。受精後、すなわち曝露後8日目以降に心嚢または卵黄嚢の浮腫が観察され始め、症状が重篤な個体はふ化しない、もしくはふ化しても遊泳できずに死亡した。さらに、一見正常にふ化した個体であっても、アルテミアを摂食できずに餓死する個体も見られた。このような表現型の影響及びそれらが生じるタイミングについては、高い再現性で確認することができた。受精後21、28日目のLC₅₀値を算出したところ、それぞれ31.3、21.2 pMとなった。また、ふ化阻害及び浮腫発生のEC₅₀値はそれぞれ53.8、107 pMとなった。

曝露時間6時間の場合の受精後21日目のLC₅₀値をTCDD曝露試験3と4で比較すると、試験4の方が4倍程度低い値となった。このことから、プレコンディショニングの時間を延長すること、また曝露期間中にディッシュを振とうさせることで、より低濃度のTCDD曝露であっても初期生活段階のメダカには影響が生じることが明らかとなった。その理由として、ディッシュに吸着するTCDDの量を減少させたことや、振とうにより卵膜へのTCDD吸着機会の増大などにより、卵に移行したTCDDの量が増加したと考えられた。

卵に移行したTCDDの濃度に基づいて、受精後21、28日目のLC₅₀値を算出したところ、それぞれ2.88、2.34 pmol/gであった。また、ふ化阻害及び浮腫発生のEC₅₀値はそれぞれ4.44、7.97 pmol/gとなった。受精後28日目のLC₁₀及びLC₅₀を重量ベースで換算すると、それぞれ550、753 pg/gとなる。先行研究⁴⁾にて算出されたメダカのLC₁₀及びLC₅₀がそれぞれ656、1110 pg/gであり、本研究で得られた毒性値と概ね一致することから、本研究で採用した試験条件の妥当性が示された。

以上の結果から、臭素化ダイオキシン類の毒性評価には、表4.2.2に示す条件で曝露試験を実施することにした。

表4.2.2 確定させた曝露試験条件

項目	内容
生物種	ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>) の胚, 受精後 3 時間以内のもの
溶媒	ジメチルホルムアミド
試験水	調製水 (Reconstituted water ISO 6341-1982)
濃度区	5 濃度区と対照区 (公比 3 の希釈系列)
試験個体数	15 個体
繰り返し数	4 (発生及び生存の観察に 3, 曝露水及び卵の化学物質測定に 1)
照明時間/設定温度	15 時間/25°C
曝露時間	6 時間
飼育容器	曝露時～受精後 7 日目: 内径 41.5 mm ガラス製ディッシュ ● 曝露開始時の 24～48 時間前に各曝露濃度の曝露水でプレコンディショニングを行う。 ● 曝露終了時に清浄なディッシュに移し替える。 受精後 7 日目～21 日目: 48 穴プレート (各ウェルに 1 個体ずつ) 受精後 21 日目～28 日目: 200 mL 容ガラス容器
振とう	プレコンディショニング時から受精後 21 日目まで, 緩やかに振とう (35～40 往復/分)
水質測定	水温, pH, 溶存酸素濃度

(5) 臭素系ダイオキシン類の毒性評価

臭素系ダイオキシン類の曝露試験結果の概要を表4.2.3に示す。TeBDD及びTrBDFはダイオキシン類の曝露による典型的な影響であるBlue-sac diseaseの症状を示さなかった。それ以外の、TeBDF、TeXDF、1-PeBDF、2-PeBDFは初期生活段階のメダカに対してTCDDと酷似した影響を及ぼした。被験物質の曝露水中濃度（曝露前後の平均濃度、曝露前の濃度、曝露後の濃度）と卵内濃度から求めた受精後28日目の死亡率に対するNOEC、LC₂₀及びLC₅₀を表4.2.3に示す。また、被験物質の曝露水中濃度（平均値）または卵内濃度に基づく各エンドポイントの毒性値を表4.2.4または表4.2.5にそれぞれ示し、各毒性値に基づい

てTCDDの毒性を1とした場合のREPを表4.2.6または表4.2.7にそれぞれ示した。これらの結果から、REP順位はTeXDF>TCDD>TeBDF>2-PeBDF>1-PeBDFとなることが明らかとなった。TeXDFを除いた化合物のREPは、ニジマスの胚に対する曝露試験から得られた結果¹⁾や、齧歯類の細胞を用いた*in vitro*試験の結果⁵⁾と近い値を示し、その順位は一致していた(表4.2.8)。メダカとニジマスで毒性値を比較すると、卵内の被験物質濃度に基づくLC₅₀値は、1-PeBDFではメダカで10倍程度高い値であったが、TeBDF及び2-PeBDFではメダカで約1.6倍高い値であった¹⁾。卵内濃度に基づく2種間でのTCDDに対する感受性差が約2倍程度であることを考慮すると、TeBDF及び2-PeBDFで得られたLC₅₀値は妥当なものであると言える。

曝露水中の被験物質の濃度に基づいて算出したREPと、卵内濃度に基づいて算出したものとを比較すると、4臭素化物(または塩素化臭素化物)についてはほぼ一致していた(表4.2.6~8)。一方で、5臭素化物については、曝露水濃度に基づいて算出したREPが約一桁低い値であった。このことは、臭素の置換数が1つ増えることで、分子量が大幅に増加し、より疎水性になることから、卵に取り込まれにくくなったことが原因として考えられる。曝露水と卵内のダイオキシン類濃度を異性体ごとにプロットしたものを図4.2.3に示す。破線はTCDDのデータから得られた近似直線である。TeBDD、TrBDF、TeXDFはいずれの濃度区においてもこの直線上にプロットされ、曝露水から卵への移行率がほぼ同等であることを表していた。TeBDFは低濃度区では波線上にプロットされたが、曝露濃度の上昇に従い卵への移行割合が減少していた。一方、5臭素化物については、近似直線の下方に離れてプロットされており、明確に卵への移行割合が低いことを示した。

この現象を考察するため、本研究のREPとオクタノール/水分係数(Log K_{ow})の関係性について比較考察した。化学物質の物性等の情報を推算するEPI suiteを用いて各異性体のLog K_{ow}を計算し(表4.2.9)、卵内の濃度と曝露水中の濃度の比を対数変換した値との関係を解析した(図4.2.4)。その結果、TrBDFを除き、Log K_{ow}と卵/曝露水濃度比の間には有意な負の関係が存在することが示された。このことから、臭素置換数が増加するに従って、曝露水から卵への移行量が減少することが明らかとなった。臭素が置換した化合物の場合、塩素が置換したものと比較して置換数の増加に伴うLog K_{ow}の上昇量が大きくなるため、とくに高臭素化体では卵への移行量が著しく減少すると予想される。図4.2.4で求めた回帰式から6及び7臭素化DFの曝露水から卵への移行割合を求めると、5臭素化体と比較しても一桁程度少なくなると予想された。以上の結果から、臭素が5つ以上置換したDFのREPを卵内濃度に基づいて算出した場合、被験物質のAhRアゴニストとしてのポテンシャルを反映したものにはなるが、生態リスクを論じる際に重要となる環境水から生体内への取り込み量を考慮していないため、過大評価となることを示した。

さらに、EPI suiteで推定したLog K_{ow}、*in vitro*のCALUXアッセイのEC₂₀値から求めたREP、メダカの卵におけるTCDDのLC₂₀値を用いて、4~7臭素化DFの毒性値を予測した(表4.2.9)各異性体における毒性が発現することが予想される卵内濃度の閾値を①式から求め、この閾値に達する際の水の濃度を②式から予測した。

$$\text{Threshold Conc}_{\text{egg}} = \text{REP}_{\text{CALUX}} \times \text{TCDD LC}_{20} \cdots \cdots \text{①}$$

$$\text{Log} \frac{\text{Conc}_{\text{egg}}}{\text{Conc}_{\text{water}}} = -0.801 \times \text{Log K}_{\text{ow}} + 7.51 \cdots \cdots \text{②}$$

予測した結果を、4及び5臭素化DFの実測値と比較したところ、予測値で3倍程度高い値であったが、概ね良好であった。このモデルを用いて6及び7臭素化DFの曝露水におけるLC₂₀値を算出したところ、それぞれ35.5及び13,000 µg/Lとなり、これらの数値が排水基準を検討する際の科学的根拠のひとつとして活用できる。また、TeXDFについては、*in vitro*のREPと本研究で求めたREPとの間に比較的大きな乖離があるため、予測精度が相対的に低くなっている。この塩素化臭素化体の魚類に対するポテンシャルの高さについては、さらなる研究で明らかにする必要がある。

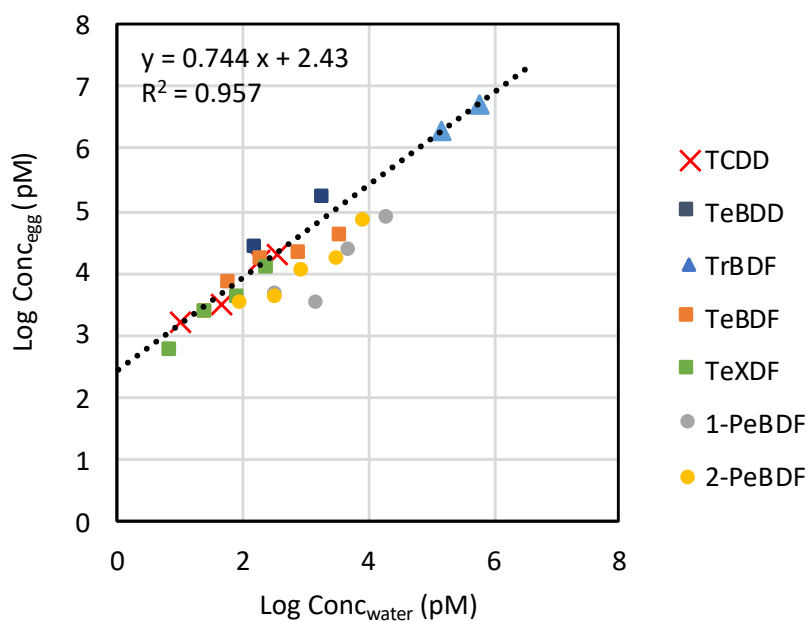


図4.2.3 ダイオキシン類を曝露した際の試験水及び卵内の被験物質の濃度との関係
波線はTCDDのデータから得られた回帰直線を示す。

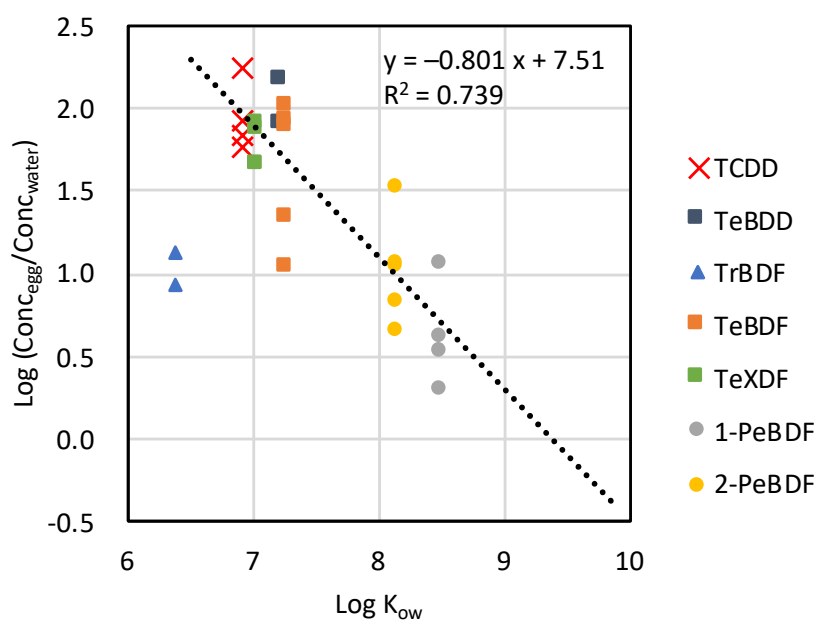


図4.2.4 各異性体の $\text{Log } K_{ow}$ と卵内濃度と試験水濃度の比との関係
破線はTrBDFを除く全異性体のデータから得られた回帰直線を示す

表4.2.3 臭素化ダイオキシン類曝露試験結果の概要

化合物名	分子量	曝露水濃度範囲 (pM)	Blue-sac disease	曝露水濃度 (μg/L)			曝露水濃度 (pM)			卵内濃度 (pmol/g)		
				NOEC	LC ₂₀	LC ₅₀	NOEC	LC ₂₀	LC ₅₀	NOEC	LC ₂₀	LC ₅₀
TCDD	321.97	10.2-372	+	0.00329 0.00455 0.00203	0.00417 0.00599 0.00214	0.00684 0.0101 0.00336	10.2 14.1 6.31	13.0 18.6 6.66	21.2 31.4 10.4	1.79	1.92	2.34
TeBDD	499.77	168-2110	-	>1.05 >1.82 >0.285			>2110 >3640 >571			>171		
TrBDF	404.88	145000-585000	-	>237 >332 >142			>585000 >819000 >350000			>5140		
TeBDF	483.78	28.0-3720	+	0.0135 0.0227 0.00438	0.00829 0.0133 0.00301	0.0284 0.0460 0.0102	28.0 46.9 9.06	17.1 27.7 6.23	58.7 95.2 21.1	2.39	2.09	5.01
TeXDF	439.33	2.14-275	+	0.00343 0.00594 0.000914	0.00248 0.00440 0.000530	0.00667 0.0115 0.00176	7.80 13.5 2.08	5.63 10.0 1.22	15.2 26.2 4.01	0.68	0.421	1.12
1-PeBDF	562.67	142-21700	+	3.02 4.37 1.66	1.16 1.57 0.695	50.1 55.4 47.7	5360 7760 2960	2060 2790 1240	89000 98500 84800	22.6	10.3	176
2-PeBDF	562.67	98.9-9470	+	0.560 0.878 0.242	0.153 0.245 0.0593	1.98 3.09 0.857	995 1560 430	272 436 105	3520 5490 1520	11.0	3.47	27.3

NOEC、LC₂₀、LC₅₀：受精後28日目の死亡率に基づいて算出したもの

各毒性値：上から曝露前後の平均値、曝露前、曝露後の曝露水濃度から算出したもの

表4.2.4 被験物質の曝露水濃度に基づく各エンドポイントの毒性値

化合物名	分子量	重量濃度 (μg/L)								モル濃度 (pM)							
		受精後 21 日目		受精後 28 日目		ふ化阻害		浮腫		受精後 21 日目		受精後 28 日目		ふ化阻害		浮腫	
		LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
TCDD	321.97	0.00514	0.0101	0.00417	0.00684	0.00827	0.0173	0.0153	0.0345	16.0	31.3	13.0	21.2	25.7	53.8	47.7	107
TeBDF	483.78	0.0146	0.0519	0.00829	0.0284	0.0109	0.0292	0.0161	0.107	30.1	107	17.1	58.7	22.5	60.3	33.4	221
TeXDF	439.33	0.00392	0.0114	0.00248	0.00667	0.00466	0.0156	0.0171	0.0382	8.92	26.0	5.63	15.2	10.6	35.5	39.0	87.0
1-PeBDF	562.67	4.17	452	1.16	50.1	4.68	237	23.7	194	7410	804000	2060	89000	8320	422000	42200	345000
2-PeBDF	562.67	0.344	3.44	0.153	1.98	0.355	3.62	1.49	7.84	611	6120	272	3520	631	6430	2650	13900

表4.2.5 被験物質の卵内濃度に基づく各エンドポイントの毒性値

化合物名	分子量	重量濃度 (pg/g)								モル濃度 (pmol/g)							
		受精後 21 日目		受精後 28 日目		ふ化阻害		浮腫		受精後 21 日目		受精後 28 日目		ふ化阻害		浮腫	
		LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
TCDD	321.97	625	927	617	753	829	1430	1150	2570	1.94	2.88	1.92	2.34	2.58	4.44	3.57	7.97
TeBDF	483.78	1570	3700	1010	2420	1200	2520	2270	5600	3.25	7.64	2.09	5.01	2.48	5.21	4.70	11.6
TeXDF	439.33	282	791	185	491	330	1030	1120	2110	0.643	1.80	0.421	1.12	0.750	2.33	2.54	4.79
1-PeBDF	562.67	16300	383000	5800	99400	17000	259000	51800	168000	28.9	681	10.3	177	30.3	460	92.1	298
2-PeBDF	562.67	3570	24300	1960	15400	3670	25300	11400	45700	6.35	43.1	3.47	27.3	6.52	45.0	20.2	81.2

表4.2.6 被験物質の曝露水中濃度に基づく毒性値から算出したREP

化合物名	分子量	重量濃度 (μg/L) ベース								モル濃度 (pM) ベース							
		受精後21日目		受精後28日目		ふ化阻害		浮腫		受精後21日目		受精後28日目		ふ化阻害		浮腫	
		LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
TCDD	321.97	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
TeBDF	483.78	0.35	0.19	0.50	0.24	0.76	0.59	0.95	0.32	0.53	0.29	0.76	0.36	1.1	0.89	1.4	0.48
TeXDF	439.33	1.3	0.88	1.7	1.0	1.8	1.1	0.90	0.90	1.8	1.2	2.3	1.4	2.4	1.5	1.2	1.2
1-PeBDF	562.67	0.0012	0.000022	0.0036	0.00014	0.0018	0.000073	0.00065	0.00018	0.0022	0.000039	0.0063	0.00024	0.0031	0.00013	0.0011	0.00031
2-PeBDF	562.67	0.015	0.0029	0.027	0.0035	0.023	0.0048	0.010	0.0044	0.026	0.0051	0.048	0.0060	0.041	0.0084	0.018	0.0077

表4.2.7 被験物質の卵内濃度に基づく毒性値から算出したREP

化合物名	分子量	重量濃度 (pg/g) ベース								モル濃度 (pmol/g) ベース							
		受精後 21 日目		受精後 28 日目		ふ化阻害		浮腫		受精後 21 日目		受精後 28 日目		ふ化阻害		浮腫	
		LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	LC ₂₀	LC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
TCDD	321.97	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
TeBDF	483.78	0.40	0.25	0.61	0.31	0.69	0.57	0.51	0.46	0.60	0.38	0.92	0.47	1.0	0.85	0.76	0.69
TeXDF	439.33	2.2	1.2	3.3	1.5	2.5	1.4	1.0	1.2	3.0	1.6	4.6	2.1	3.4	1.9	1.4	1.7
1-PeBDF	562.67	0.038	0.0024	0.11	0.0076	0.049	0.0055	0.022	0.015	0.067	0.0042	0.19	0.013	0.085	0.010	0.039	0.027
2-PeBDF	562.67	0.17	0.038	0.32	0.049	0.23	0.056	0.10	0.056	0.31	0.067	0.55	0.086	0.39	0.10	0.18	0.10

表4.2.8 異なる試験系から得られた臭素化または塩素化DFのREP比較

置換ハロゲン	試験系	REP 算出の元データ	2,3,7,8	2,3,7,8 (Cl + 3Br)	1,2,3,7,8	2,3,4,7,8	参照
臭素	メダカ胚への水曝露	曝露水濃度に基づく LC ₂₀	0.50	1.7	0.0036	0.027	本研究
		曝露水濃度に基づく LC ₅₀	0.24	1.0	0.00014	0.0035	
		卵内濃度に基づく LC ₂₀	0.61	3.3	0.11	0.32	
		卵内濃度に基づく LC ₅₀	0.31	1.5	0.0076	0.049	
	ニジマス胚への接種 DR-CALUX	卵内濃度に基づく LD ₅₀	0.25	NA	0.041	0.071	Hornung et al., 1996 ¹⁾
		EC ₂₀	0.67		0.16	0.25	Suzuki et al., 2017 ⁵⁾
		EC ₅₀	0.45		0.13	0.14	
塩素	WHO-TEF (魚類)		0.05		0.05	0.5	van den Berg et al., 1998 ⁶⁾
	WHO-TEF (ほ乳類)		0.1		0.03	0.3	

表4.2.9 オクタノール／水分配係数 (Log K_{ow}) 及び *in vitro* で求めた REP から予測した卵及び曝露水の LC₂₀ 値

化合物名	分子量	Log K _{ow}	REP _{CALUX} ⁵⁾ Mol basis	LC ₂₀ 予測値			LC ₂₀ 実測値		
				卵 (pmol/g)	試験水 (pM)	試験水 (µg/L)	卵 (pmol/g)	試験水 (pM)	試験水 (µg/L)
TCDD	321.97	6.92	1.0	1.92*	20.7	0.00666	1.92	13.0	0.00417
TeBDF	483.78	7.27	0.67	2.86	58.9	0.0285	2.09	17.1	0.00829
TeXDF	439.33	7.03							
1-PeBDF	562.67	8.50	0.16	12.0	2380	1.34	10.3	2060	1.16
2-PeBDF	562.67	8.16	0.25	7.67	815	0.458	3.47	272	0.153
HxBDF	641.57	9.05	0.019	101	55300	35.5			
HpBDF	720.47	9.94	0.0003	6390	18100000	13000			

Log K_{ow} : EPI suite を用いて算出*: 他の異性体の LC₂₀ 値を予測するために、TCDD のみ実測値を使用した

5. 本研究により得られた成果

本研究では、一年目にTCDDを用いた魚類毒性試験の試験条件の確立、二年目に臭素系ダイオキシン類を用いた試験条件の最適化、三年目に臭素系ダイオキシン類6種類の魚類毒性試験を実施しており、最適化試験法によって申請書の研究計画で記載した4種類以上の臭素系ダイオキシン類の魚類毒性試験を実施することができた。また、中間評価ヒアリングにおいて取得結果の一般化を目指すべきとのご指摘を頂き、当初研究計画に入れていなかった卵や曝露水の化学分析を追加的に実施し、臭素系ダイオキシン類のうち、臭素化ダイオキシン類の魚類毒性に関して物性と影響の関係性に言及することができ、当初の想定以上の結果が得られた。

(1) 科学的意義

本研究により、臭素化ダイオキシン類も塩素化ダイオキシン類と同様に、初期発生段階のメダカに対していわゆるblue-sac diseaseと呼ばれる症状を引き起こすことが明らかとなった。また、これらの影響はダイオキシンまたはフランの骨格に対し、2,3,7,8位すべてが臭素（あるいは塩素と臭素）で置換された化合物の曝露によって引き起こされ、この2,3,7,8位のうち1つでも置換されていないとその影響が観察されないこと、また2,3,7,8位に加えて1位または4位に臭素が置換するとそのREPは低下することが示された。このことは、齧歯類の細胞を用いた*in vitro*の試験結果と一致する⁵⁾。塩素化DFでは、2,3,7,8位が塩素で置換した4塩素化体よりも、2,3,4,7,8位が置換した5塩素化体の方がTEFは大きくなるが⁶⁾、臭素化DFでは5臭素化体の方がREPは小さくなることが確認され、ニジマスの胚を用いた試験結果と一致した⁴⁾。このことは、塩素と臭素の特性の違いにより、置換数の増減に伴うDF分子の分子量をはじめとした物理化学的特性の変化が大きいことに起因すると予想される。

また、2,3,7,8位に4つのハロゲンが置換した4臭素化体と1塩素化3臭素化体のメダカ胚への影響を比較すると、後者が明確に高いREPを示した。サブテーマ1で使用している*in vitro*試験では両者のREPはほぼ同等であり、メダカの胚を対象とした*in vivo*の結果とは一致しなかった。この原因は今のところ不明だが、4塩素化DFよりも4臭素化DFの方がREPが大きいことや、塩素化臭素化DFの中にはTCDDとほぼ同等の高い活性を示す異性体も存在する⁵⁾ことから、2,3,7,8位のうち一部または全ての塩素が臭素に置換した異性体の方が、高いAhRアゴニスト活性を有するであろうと予想される。塩素と臭素の比及び置換位置の異なる塩素化臭素化DFの魚類のAhRに対するアゴニスト活性や、胚への影響について調査する必要がある。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究で求めたREPが水生生物を対象にした臭素系ダイオキシン類のリスク管理に活用されることが見込まれる。従来法では、塩素化ダイオキシン類のWHO-TEFを、同一置換位置の臭素化ダイオキシン類のTEFとして用い、臭素化ダイオキシン類に起因する排水中のTEQを算出している。本研究で初期生活史のメダカを対象に求めた臭素化DFのREPは、4臭素化体でWHO-TEFより高く、5臭素化体で低くなっており、従来法では前者で過小評価に、後者で過大評価となっていたことが明らかとなった。とくに、5臭素化体については、曝露水中の濃度に基づいて算出したREPがWHO-TEFより1桁程度低い値となっており、これは環境水からの生体内への取り込み量が少ないためであると推察された。また、WHO-TEFは低いものの排水中に比較的高濃度で含まれるため排水のTEQに対する寄与率の高い傾向の6臭素化体及び7臭素化体については、環境水を介した水生生物体内への取り込み量はさらに少なくなることが予想されるため、それらのREPはWHO-TEFと比較して大幅に小さくなると考えられた。ただし、経口摂取による腸管からの吸収や、環境中における高臭素化体の分解によって生成する低臭素化体のリスクについて

は、別途検討が必要である。

また、本研究で初めて *in vivo* での毒性を評価した塩素化臭素化DFについては、TCDDよりも強い毒性を示した。現状では、塩素化臭素化DFのモニタリング手法が確立されていないため、個々の異性体の排水中の濃度を知る術はないが、とくに魚類に対して強い毒性を示す可能性があるため、注意を払う必要がある。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

<口頭発表>

- 1) 仲山 慶, Nguyen Minh Tue, 徳住英彰, 藤岡直人, 浦丸直人, 鈴木剛: 日本動物学会第90回大阪大会シンポジウム「動物学から考える動物モデルの活用戦略: 種の選択と健康・環境研究への応用」(2019) 魚類胚を用いた化学物質の有害性評価について～臭素系ダイオキシン類の毒性評価を例に～

<ポスター発表>

- 1) K. NAKAYAMA, N.M. TUE, N. FUJIOKA, H. TOKUSUMI, N. URAMARU, G. SUZUKI: SETAC North America 40th Annual Meeting (2019) Relative potency factors of brominated dioxins based on Japanese medaka early-life stage toxicity test.
- 2) 徳住英彰, Tue NM, 藤岡直人, 浦丸直人, 鈴木 剛, 仲山 慶: 第25回日本環境毒性学会研究発表会(2019) メダカの胚を用いたダイオキシン類の相対毒性強度(REP)を求めるための試験法の検討
- 3) 藤岡直人, 徳住英彰, Tue NM, 浦丸直人, 鈴木 剛, 仲山 慶: 第25回日本環境毒性学会研究発表会(2019) メダカの初期生活段階毒性試験に基づく臭素系ダイオキシン類の相対毒性強度(REP)の算出
- 4) K. NAKAYAMA, N.M. TUE, N. FUJIOKA, H. TOKUSUMI, N. URAMARU, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Relative potency factors of brominated dioxins based on Japanese medaka early-life stage toxicity test.
- 5) K. NAKAYAMA, N.M. TUE, N. FUJIOKA, H. TOKUSUMI, G. SUZUKI: 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (2019) Toxic equivalency factors of brominated

dibenzofurans based on Japanese medaka early-life stage toxicity test.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) M.W. HORNING, E.W. ZABEL, R.E. PETERSON: Toxicol. Appl. Pharmacol., 140(2), 227-234 (1996) Toxic equivalency factors of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and polyhalogenated diphenyl ether congeners based on rainbow trout early life stage mortality.
- 2) M. MATSUDA, A. SHINOMIYA, M. KINOSHITA, A. SUZUKI, T. KOBAYASHI, B. PAUL-PRASANTH, E.L. LAU, S. HAMAGUCHI, M. SAKAIZUMI, Y. NAGAHAMA: PNAS, 104(10), 3865-3870 (2007) DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish.
- 3) C. RITZ, F. BATY, J.C. STEIBIG, D. GERHARD: PLoS ONE 10(12), e0146021 (2015) Dose-response analysis using R.
- 4) G.E. ELONEN, R.L. SPEHAR, G.W. HOLCOMBE, R.D. JOHNSON: Environ. Toxicol. Chem. 17(3), 472-483 (1998) Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development.
- 5) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. HANDA, H. TAKIGAMI: Toxicol. in Vitro 44, 134-141 (2017) Dioxin-like activity of brominated dioxins as individual compounds or mixtures in in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.
- 6) M. VAN DEN BERG, L. BIRNBAUM, A.T.C. BOSVELD, B. BRUNSTRÖM, P. COOK, M. FEELEY, J.P. GIESY, A. HANBERG, R. HASEGAWA, S.W. KENNEDY, T. KUBIAK, J.C. LARSEN, F.X.R. VAN LEEUWEN, A.K.D. LIEM, C. NOLT, R.E. PETERSON, L. POELLINGER, S. SAFE, D. SCHRENK, D. TILLITT, M. TYSKLIND, M. YOUNES, F. WÆRN, T. ZACHAREWSKI: Environ. Health Perspect. 106(12), 775-792 (1998) Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife.

Ⅱ-3 排出ガスで検出される臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター

生体影響評価研究室

前川 文彦

＜研究協力者＞

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター

生体影響評価研究室

木村 栄輝

平成29年度～令和元年度研究経費（累計額）：12,060千円（研究経費は間接経費を含む）

（平成29年度：3,900千円、平成30年度：3,705千円、令和元年度：4,455千円）

〔要旨〕

臭素系ダイオキシン類が、塩素系ダイオキシン類と同様にヒトを含む哺乳類において低用量曝露でも発達神経毒性を引き起こす可能性が疑われている。しかしながら先行研究が少ないため、毒性等価係数（TEF, Toxic Equivalency Factor）に関して発達神経毒性に基づく推定がなされていない。本研究では、塩素系ダイオキシンの2,3,7,8-TCDD（TCDD）を陽性対照物質として発達期曝露により見出された2種類の行動影響エンドポイント（①乳仔期の超音波発声、②成体期の新奇環境での探索行動）を指標に4種類の臭素系ダイオキシン類を評価することで、臭素系ダイオキシン類に現行のWHO-TEFが適用可能か検討を行った。各臭素系ダイオキシン類は、WHO-TEFに応じてモル濃度ベースで用量を決定した2用量群（低用量群、高用量群）と溶媒のみ投与する対照群の3群を作製し、妊娠12.5日目の母体に投与することで、胎仔期に臭素系ダイオキシン類に曝露された仔への影響を検討した。その結果、2,3,7,8-TeBDF（TeBDF）と2-C-3,7,8-BDF（TeXDF）では上記2種類の行動影響エンドポイントのうち両方もしくは片方に統計的に有意な影響が認められたが、2,3,8-TriBDF（TriBDF）、1,2,3,7,8-PeBDF（1-PeBDF）では有意な影響は認められなかった。また、臭素系ダイオキシンの体内動態を成体雄マウスを用いて調べたところ、脳移行量はTCDD>TeBDF≒TeXDF>1-PeBDF>>TriBDFであり、臭素化レベルに応じて移行量が異なることが明らかとなった。従って、脳への移行量が発達神経毒性の違いを生じさせる原因となっている可能性が示唆された。加えて、成体雄マウスで肝臓重量の増加を指標とした肝毒性についても検討したところ、肝移行量に比例した肝重量の増加が観察された（TCDD>TeBDF≒TeXDF≒1-PeBDF>>TriBDF）。これらの結果は、一部の臭素系ダイオキシン類は脳移行量が多くなるため、比較的低用量でも発達神経毒性を誘導する可能性を示唆している。また、これらの結果は、WHO-TEFから推測される毒性値と概ね一致しており、WHO-TEFは哺乳類において臭素化ダイオキシン類にも適用可能であることが示唆された。

〔キーワード〕

発達神経毒性、行動影響、体内動態、哺乳類

1. はじめに

疫学研究によりダイオキシン類の周産期曝露が、子どもの社会的認知機能の障害や知能指数低下などの発達神経毒性を誘導することが報告されている¹⁻⁴⁾。また、哺乳類を用いた動物実験では環境汚染物質の代表例としてメチル水銀⁵⁾、ヒ素⁶⁾及びPBDEs⁷⁾などの周産期曝露によって認知機能・注意力・運動機能などの神経行動異常が誘発されることが報告されているが^{8,9)}、それらの神経毒性物質と同様に最も毒性の高いダイオキシンであるTCDDの周産期曝露によって、仔の成長後の恐怖記憶¹⁰⁾、空間学習¹¹⁾及び行動柔軟性¹²⁾の障害が報告されている。さらに、新生仔期においても周産期にTCDDに曝露された仔マウスの母子間コミュニケーションの指標となる超音波発声の異常が観察されている¹³⁾。仔マウスの超音

波発声異常は自閉症スペクトラム障害モデルマウスにおいても報告されており¹⁴⁾、早期に発達神経障害を検出するための有用なエンドポイントと考えられている。

臭素化ダイオキシン類の哺乳類毒性は、TCDDと同様にAhRを介して誘導されると考えられている。世界保健機関（WHO, World Health Organization）と国連環境計画（UNEP, United Nation Environment Programme）の専門家会合がとりまとめた総説¹⁵⁾によると、ダイオキシン類と臭素化ダイオキシン類の毒性を比較した結果、強い毒性を示す異性体はREP（Relative Potency）が同程度であるとして取りまとめられている。例えば、TCDDと2,3,7,8-TeBDDは、げっ歯類のAhRを介して発現する水腎症や口蓋裂等の催奇性影響が同程度であることが報告されている¹⁵⁾。また、マウスの肝臓、肺、皮膚における2,3,7,8-TeBDDのAhRを介したタンパク質CYP1A1誘導のREPは、組織濃度に基づいて算出すると0.63～4.5の範囲であり、TCDDと同程度と推測された¹⁵⁾。近年、免疫機能及び発達期の脳機能についても臭素化ダイオキシン類の毒性影響が詳細に研究されているが、マウスでは免疫学的エンドポイントに関して2,3,7,8-TeBDDとTCDDでほぼ同様の影響を示すとの報告がある¹⁶⁾。また、発達期に2,3,7,8-TeBDDを曝露されたマウスは恐怖条件づけ試験において記憶力の低下が観察され、その程度はTCDDと同程度であることが報告されている¹⁰⁾。このような報告から臭素系ダイオキシン類についてもWHO-TEFを用いたリスク評価が可能ではないかと考えられるが、WHO-TEFによる臭素系ダイオキシン類のリスク管理の実効性を判断するためには依然として臭素系ダイオキシン類の*in vivo*評価事例が少ないのが現状である。

2. 研究開発目的

申請書の研究計画では、一年目にTCDDを用いた哺乳類毒性試験の試験条件の確立、二年目と三年目に臭素系ダイオキシン類4種類の哺乳類毒性試験の実施と成果の取りまとめとしていた。

これに基づいて、本研究では、臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性評価に関して、最も感受性が高いエンドポイントの一つである発達神経毒性を指標として、TCDDを陽性対照物質として、4種の臭素系ダイオキシン類の評価を行い、WHO-TEFの臭素化ダイオキシン類への応用の妥当性について検討を行った。また、それぞれ体内動態に関しても検討を行い毒性との関係性について考察した。具体的には、次の通り実施した。

1年目は、陽性対照物質としてTCDDを妊娠12.5日目のマウスに単回投与して、出生後の仔マウスの母子間コミュニケーションの指標となる超音波発声試験や、集団型全自動・記憶学習測定システムIntelliCageによる行動毒性試験を実施し、各エンドポイントの影響濃度を算出した。また、TCDDを成体雄マウスに単回投与して、血中から肝臓や脳への移行量を評価した。

2年目は、臭素系ダイオキシン類のうち、TeBDF及びTrBDFを妊娠12.5日目のマウスに単回投与して、TCDDと同様の行動試験を実施した。各エンドポイントの影響濃度を算出してTCDDとの比較を行った。また、TeBDF及びTrBDFを成体雄マウスに単回投与して、血中から肝臓や脳への移行量を評価した。

3年目は、臭素系ダイオキシン類のうち、1-PeBDF及びTeXDFを妊娠12.5日目のマウスに単回投与して、TCDDと同様の行動試験を実施した。各エンドポイントの影響濃度を算出してTCDDとの比較を行った。また、1-PeBDF及びTeXDFを成体雄マウスに単回投与して、血中から肝臓や脳への移行量を評価した。

3. 研究開発方法

1) 動物飼育管理

研究で使用した動物実験プロトコールは、国立環境研究所の実験動物委員会の承認を受けて行われた。妊娠雌C57BL/6Jマウスまたは成体雄C57BL/6JマウスをCLEA Japanから購入し、温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12/12時間の明暗サイクル（7:00～19:00に点灯）で動物施設にて飼育した。

2) 投与試薬及び用量

TCDD（純度>98%）はCambridge Isotope Laboratory（Andover, MA, USA）から購入した。また、

TeBDF（純度>99%）、TrBDF（純度>99%）、1-PeBDF（純度77%）、TeXDF（純度77%）は既報研究¹⁷⁾に記載された方法で合成されたものを使用し、それぞれ0.6% n-ノナンを含むコーン油に溶解して投与した。対照群には0.6% n-ノナンを含むコーン油を投与した。発達期曝露影響に関する研究では、曝露量の根拠となる現行のWHO-TEFに基づいて（TeBDF：0.1、TrBDF：0.01（WHO-TEF適用対象ではないので仮に0.01とした）、1-PeBDF：0.03、TeXDF：0.1）、TCDDの低用量曝露群と高用量曝露群（0.6 µg/kg bwと3.0 µg/kg bw）に対応する2種類の用量を各化合物に設定した結果、それぞれ下記のような投与量となった：TeBDF（低用量曝露群：9 µg/kg bw、高用量曝露群：45 µg/kg bw）、TrBDF（低用量曝露群：75 µg/kg bw、高用量曝露群：378 µg/kg bw）、1-PeBDF（低用量曝露群：35 µg/kg bw、高用量曝露群：175 µg/kg bw）、TeXDF（低用量曝露群：8 µg/kg bw、高用量曝露群：40 µg/kg bw）。発達期曝露に関しては、妊娠12.5日目の妊娠雌マウスに経口投与を行い、その後継続して飼育を行って産仔を用いて発達神経毒性を評価した。体内動態研究においては、8週齢の成体雄C57BL/6Jマウスに高用量曝露群の用量で経口投与を行った。

3) 超音波発声試験

新生仔の超音波発声の記録及び分析は、高周波マイクロホン（7116型、Aco株式会社）、増幅器（4116型）及びソフトウェア（URS-9100ソフトウェア）から構成されるげっ歯類USV分析システム（USV-01、小原医科産業株式会社）を用いて行った。具体的な手順としては、生後3日目から9日目にかけて、全ての同腹仔を母体から離し、37℃のホットプレートに集めた上で、防音箱内に30℃にセットしたホットプレート上に一匹ずつ置いた条件で高周波マイクロホンで1分間超音波を記録した。全同腹仔の測定が完了次第、仔を母体に戻した。記録データはUWA-9100ソフトウェア（小原医科産業株式会社）を用いて解析し、各個体の60～100kHzの超音波の周波数の合計持続時間を算出して、対照群と曝露群との間で比較した。結果は各母体当たりの平均値を算出して、さらにその平均値及び標準誤差として表示した。

4) 集団型全自動・記憶学習測定システムIntelliCageによる行動試験

胎仔期に母体を介してTCDDあるいは臭素系ダイオキシン類の曝露を受けた9～11週齢の雄マウスを集団型全自動・記憶学習測定システムIntelliCage（New Behavior社、Zurich）に導入し、1週間行動観察した。IntelliCageは、プラスチック製のケージ（55×37.5×20.5 cm）の中に、4隅にマウスが内部に侵入して、鼻でスイッチを押す「ノーズポーク」を行うことで水を飲むことができるコーナーと呼ばれる小部屋（15×15×21 cm）を備えており、1ケージ16匹までのマウスの行動を観察することができる（図3.3.1）。装置に導入する2～3日前に、マウスに塩酸メドミジン（ドミツール、明治製菓株式会社）、ミダゾラム（ドーミカム、アステラス）、ブトルファール（ベトルファール、明治製菓株式会社）を含む混合麻酔薬を投与して麻酔下で高周波によって個体識別可能な固有のIDコードを持つガラス製のトランスポンダー（RFIDタグ、Datamrs）を皮下に移植した（図3.3.2）。各マウスに埋め込まれたRFIDタグを各コーナーの入口に設置されたアンテナで認識することで、コーナーの侵入回数、ノーズポーク回数、飲水回数を自動的に記録した。本研究では、2台のIntelliCageシステムを用いて、32匹の雄の行動パターンの同時計測を行った。特に、完全にナイーブな状態であるIntelliCageシステムに入ってから1日目のデータ解析と、環境に慣れた状態であるIntelliCageに入ってから7日間のデータ解析に注目した。



図3.3.1 IntelliCageの外観



図3.3.2 RFIDタグのマウスへの移植

5) 定量PCRによるAhR標的遺伝子発現の解析

上記の超音波発声試験及びIntelliCageによる行動試験で行動影響が認められたTeBDF群と行動影響が認められなかったTrBDF群を対象に、行動影響と *in vivo*におけるAhR関連遺伝子発現を定量PCRにより検討した。生後1日齢の新生仔の肝臓を摘出し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてTotal RNA を単離した。cDNAはPrimeScript RT試薬キット (タカラ) を用いて合成した。遺伝子発現の定量はLightCycler System (Roche Molecular Biochemicals) を用いて行った。使用遺伝子及びプライマーを表3.3.1にまとめた。増幅特異性を検証するために、各PCRの最後に生成物の融解曲線分析を行った。Cyp1a1、Cyp1b1及びAhrr mRNAの発現レベルは $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて計算し、18S rRNA発現で正規化した。

表3.3.1 定量PCRに用いたプライマー

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
18S rRNA	5'-GGACCAGAGCGAAAGCATTTG-3'	5'-TTGCCAGTCGGCATCGTTTAT-3'
Cyp1a1	5'-CACCGTATTCTGCCTTGGAT-3'	5'-CAGCATGTGACCAATGAAGG-3'
Cyp1b1	5'-GGACAAGGACGGCTTCATTA-3'	5'-GCGAGGATGGAGATGAAGAG-3'
Ahrr	5'-CAGGGCAGACATTGTGGTTA-3'	5'-CTCCATTGCTCTTTCCTGCT-3'

6) 体内蓄積量の計測

TCDDとTeBDFに関しては、投与後1、3、7、28、56日目に、肝臓、脳、血漿のサンプリングを行った。TCDD、TeBDFの結果から56日目のサンプリングは必須ではないことが明らかになったため、TrBDF、1-PeBDF、TeXDFに関しては、投与後1、3、7、28日目にサンプリングを行った。その際、肝臓重量及び脳重量も測定した。肝臓及び脳サンプルは、サンプリング時点毎にプールし (n=5~6)、凍結乾燥した後、tert-ブチルメチルエーテル (tBME) /ヘキサン (1:1=v/v) で高速溶媒抽出装置を用いて抽出した。血漿試料はtBME/ヘキサン (1:1=v/v) で液液抽出した。水酸化カリウム溶液を用いたアルカリ分

配処理を実施して、ダイオキシン類から水酸化代謝物を分離した。ダイオキシン類画分は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）と多層シリカゲルカラムを用いてクリーンアップした。代謝物画分はアセトニトリルで分離し、メチル化した後、GPCを用いてクリーンアップした。ダイオキシン類及びメトキシ化誘導体は、GC-qMSまたはGC-HRMSを用いて測定した。

7) 統計処理

図表は平均値±標準誤差を表示した。超音波発声の累積時間及び探索行動回数は二元配置反復測定分散分析を用いて分析した。遺伝子発現は一元配置分散分析を用いた。全ての検定において $p<0.05$ を統計的に有意とした。

4. 結果及び考察

(1) 超音波発声試験

1年目にTCDDを陽性対照として超音波発声解析を行った。その結果、特に顕著な影響として1分間の測定時間中の累積発声時間が高用量群であるTCDD 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与により有意に減少することが明らかとなった（ $*p<0.05$ vs 対照群、分散分析、図4.3.1）。低用量群であるTCDD 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では対照群との間に有意な違いは認められなかった。

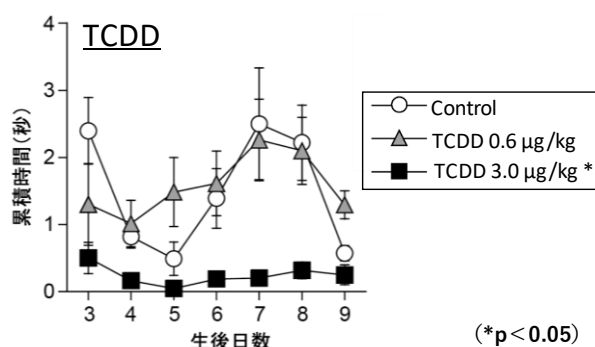


図4.3.1 胎仔期TCDD曝露が新生仔の超音波発声に与える影響

そこで2年目以降は累積発声時間を指標として、各臭素系ダイオキシン類の評価を行った。2年目にTeBDFとTrBDFの評価を行ったところ、TeBDFに関しては、高用量曝露群であるTeBDF 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群でTCDDと同様の有意な累積発声時間の低下が認められた。低用量曝露群であるTeBDF 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では有意差は認められなかった（ $*p<0.05$ vs 対照群、分散分析、図4.3.2）。一方、TrBDFに関しては、高用量曝露群（375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、低用量曝露群（75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）ともに超音波発声の累積時間は対照群と有意な違いは認められなかった（図4.3.2）。

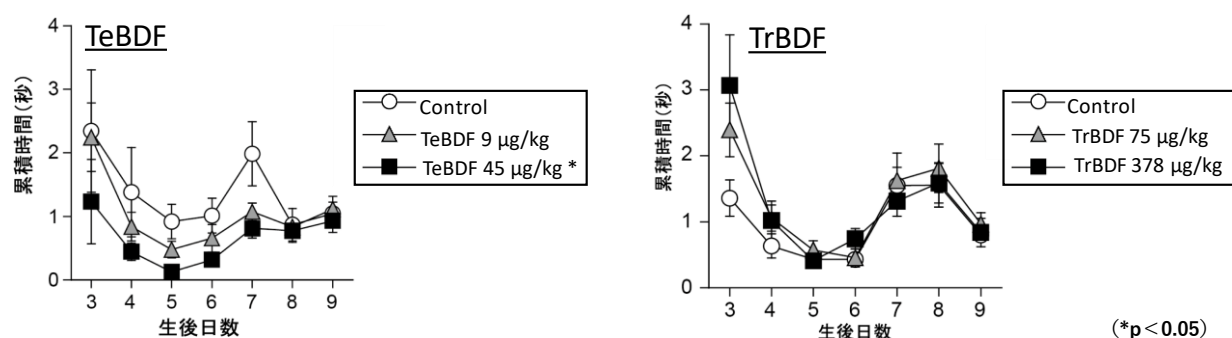


図4.3.2 胎仔期TeBDFまたはTrBDF曝露が新生仔の超音波発声に与える影響

3年目には、1-PeBDF及びTeXDFの超音波発声への影響評価を行った。1-PeBDFに関しては、高用量曝露群（175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、低用量曝露群（35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）ともに超音波発声への影響は認められなかったが（図

4.3.3)、TeXDFに関しては高用量曝露群 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) において有意な累積発声時間の低下が認められた (* $p<0.05$ vs 対照群、分散分析、図4.3.3)。低用量曝露群 (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と対照群間では有意な違いは認められなかった。

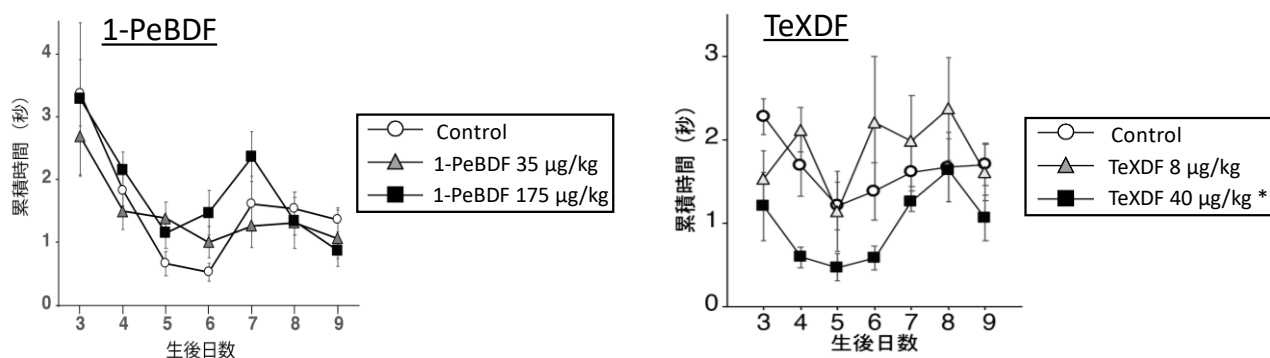


図4.3.3 胎仔期1-PeBDFまたはTeXDF曝露が新生仔の超音波発声に与える影響

(2) 集団型全自動・記憶学習測定システムIntelliCageによる行動試験

1年目の研究では、IntelliCageに胎仔期TCDD曝露マウスを導入して、1週間の行動を網羅的に評価した。その結果、胎児期TCDD曝露群と対照群間で1週間の総コーナー侵入回数、総ノーズポーク回数、飲水回数、昼夜の活動パターン等に有意な違いは認められなかった。一方、IntelliCageに最初を導入してから24時間の累積コーナー侵入回数を比較すると、高用量群であるTCDD 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で有意に侵入回数が低下していた (* $p<0.05$ vs 対照群、分散分析、図4.3.4)。この結果は、ダイオキシン類の曝露によって新奇環境における探索行動に有害影響が表れる可能性を示唆している。

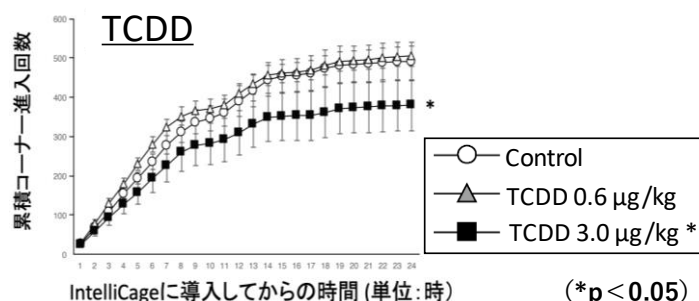


図4.3.4 胎仔期TCDD曝露がIntelliCageに導入してから24時間の累積コーナー侵入回数に与える影響

そこで、2年目移行は、IntelliCageに最初を導入してから24時間の累積コーナー侵入回数を指標に臭素系ダイオキシン類の評価を行った。2年目にはTeBDFとTrBDFの曝露評価を行ったが、TeBDFの高用量曝露群 (45 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で対照群と比較して有意な累積コーナー侵入回数の低下が認められたが (* $p<0.01$ vs 対照群、分散分析、図4.3.5)、低用量曝露群 (9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) では、有意差は認められなかった。一方、TrBDFに関しては高用量曝露群 (378 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、低用量曝露群 (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 共に、対照群と有意差は認められなかった。3年目には1-PeBDF及びTeXDFの曝露評価を行ったが、いずれも高用量曝露群 (175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bwと40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw)、低用量曝露群 (35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bwと8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw) 共に対照群との有意差は認められなかった (図4.3.6)。

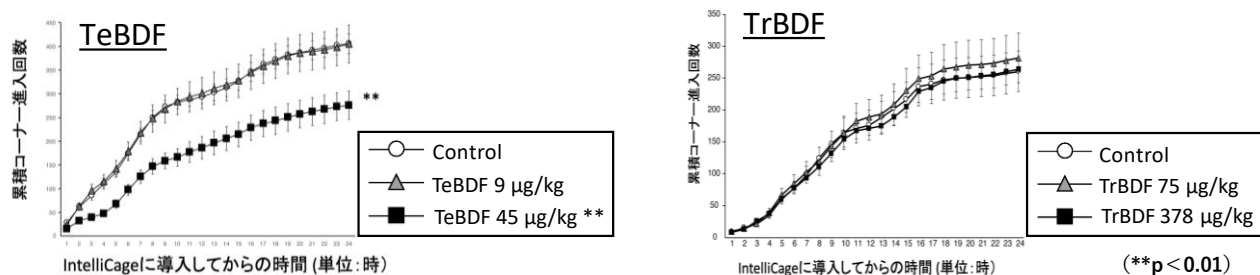


図4.3.5 胎仔期TeBDF及びTrBDF曝露がIntelliCageに導入してから24時間の累積コーナー侵入回数に与える影響

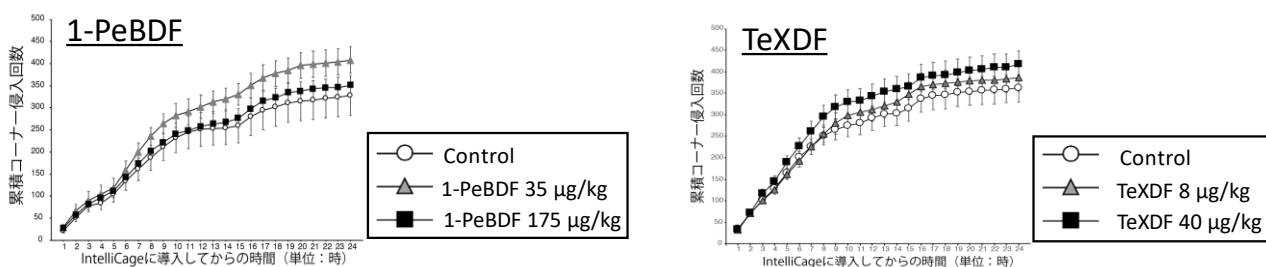


図4.3.6 胎仔期1-PeBDF及びTeXDF曝露がIntelliCageに導入してから24時間の累積コーナー侵入回数に与える影響

(3) 定量PCRによるAhR標的遺伝子発現の解析

行動影響が顕著に認められたTeBDF曝露群と行動影響が全く認められなかったTrBDF曝露群の間で、*in vivo*のAhR活性に違いがあるか調べるため、生後1日目の新生仔の肝臓におけるAhRに関連した遺伝子発現を比較した。その結果、行動影響が認められたTeBDF曝露群ではAhR関連遺伝子であるCyp1a1、Cyp1b1、Ahrr mRNAの遺伝子発現レベルが用量依存的に有意に増加した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 対照群、分散分析、図4.3.7)。一方、TrBDF曝露群は、遺伝子発現に群間の有意差が認められなかった。行動影響は*in vivo*でのAhR活性化を介して誘導される可能性を示唆している。

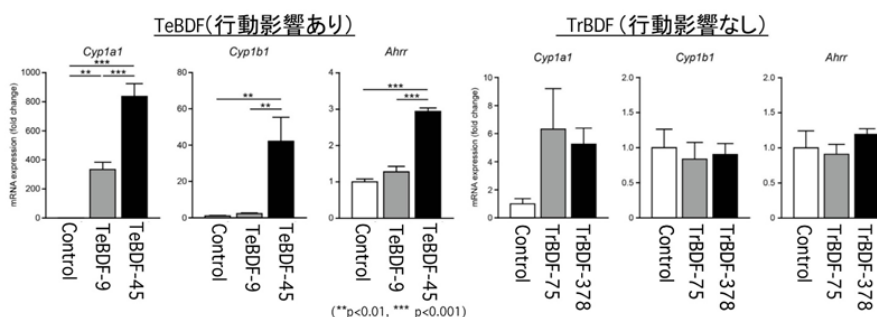


図4.3.7 胎仔期TeBDF及びTrBDF曝露が生後1日目の新生仔肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響

(4) 体内蓄積量

8週齢の成体雄マウスを用いて、TCDD及び4種の臭素系ダイオキシン類の体内蓄積量を測定した。1年目においてTCDD曝露群でサンプリングの際、脳、肝臓を摘出した重量を測定した結果、TCDD高用量曝露群 (3.0 µg/kg) において有意な肝重量の増加が観察されたため (* $p < 0.05$ vs 対照群、分散分析、図4.3.8)、併せて2年目及び3年目において臭素系ダイオキシン類に関しても肝重量の変化を比較した。その結果、TeBDF曝露群、1-PeBDF曝露群、TeXDF曝露群において有意な肝重量の増加が認められた (* $p < 0.05$ vs 対照群、分散分析)。一方、TrBDF曝露群では肝重量の増加が認められなかった。

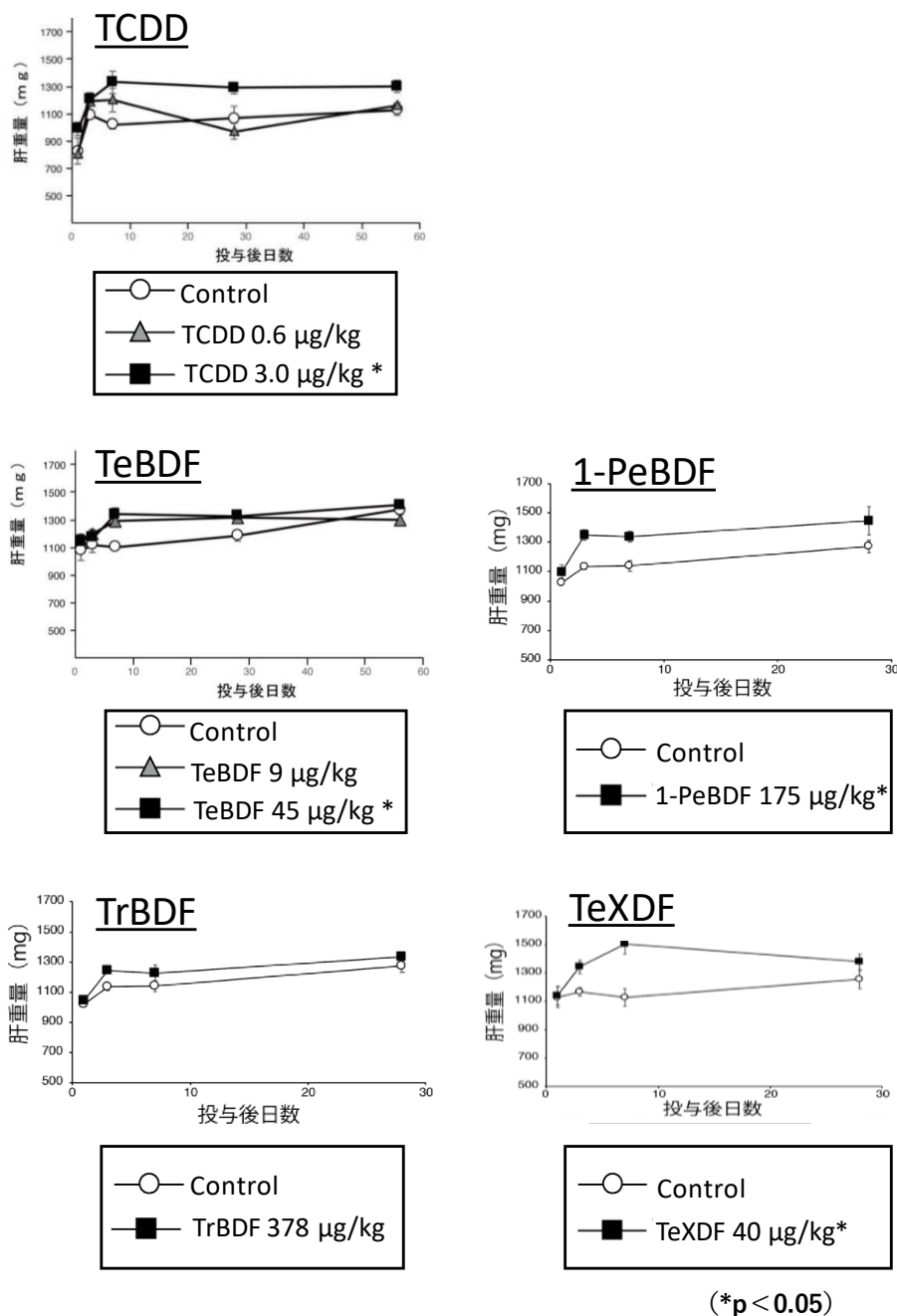


図4.3.8 成体雄へのTCDD及び4種の臭素系ダイオキシン類曝露が肝重量に与える影響

TCDDの体内蓄積量においては、曝露1日後の時点でTCDD投与量の69%が肝臓、0.36%が血漿、0.23%が脳に蓄積が認められた（図4.3.9）。臭素系ダイオキシン類に関して、TeBDFは肝臓33%、血漿0.11%、脳0.02%、TrBDFは肝臓0.007%、血漿0.0007%、脳0.001%、1-PeBDFは肝臓24%、血漿0.04%、脳0.004%、TeXDFは肝臓35%、血漿0.12%、脳0.03%であり、特にTrBDFで顕著に蓄積量が少なかった。以上の結果から、肝臓蓄積量が高い物質は肝臓重量増加が認められ、脳蓄積量が高い物質は行動異常が現れやすい傾向が示唆された。また、肝臓における蓄積量は時間経過と共に一次カイネティクスに従って減少し、半減期はそれぞれTCDDで8.7日、TeBDFで8.8日、TrBDFで1.2日（1～7日目で算出）もしくは3.3日（3～28日から算出）、1-PeBDFで13日、TeXDFで5.6日であった。

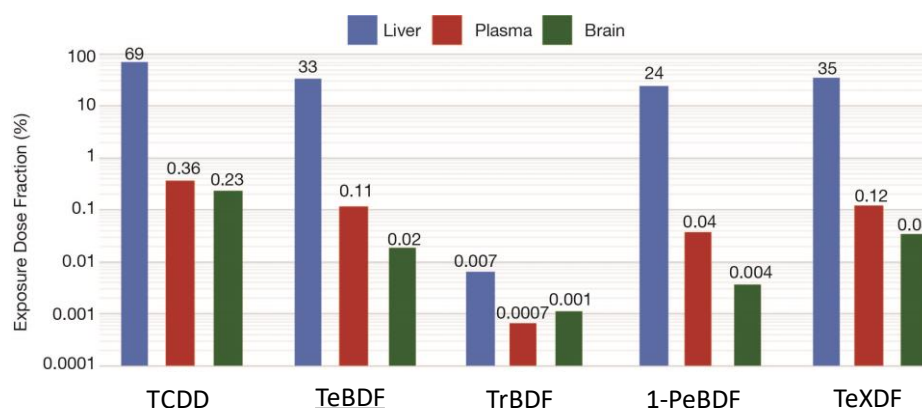


図4.3.9 成体雄へのTCDD及び4種の臭素系ダイオキシン類の投与後1日目の肝臓、血漿、脳における蓄積割合

(5) 胎仔期曝露による行動影響と成体曝露による肝重量増加に関する考察

TCDD曝露で観察された超音波発声の累積発声時間の低下や、IntelliCageにおける導入後24時間のコーナー侵入回数の低下のうち、両方あるいはいずれか一つは胎児期TeBDF及びTeXDF曝露でも観察された（表3.3.2）。脑中蓄積割合はTCDD>TeBDF≒TeXDF>1-PeBDF>>TrBDFであり、脳内蓄積割合が多い臭素系ダイオキシン類が発達神経毒性を強く誘発する可能性が示唆された。また、成体における肝重量増加はTrBDFを除く全ての群で観察され、肝臓蓄積割合はTCDD>TeBDF≒TeXDF≒1-PeBDF>>TrBDFであり、蓄積量と肝重量増加の間にも関連性があることが示唆された。

表3.3.2 TCDD及び4種の臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性影響のまとめ

		TCDD		TeBDF		TrBDF		1-PeBDF		TeXDF	
曝露の根拠となるTEF				0.1		0.01≧		0.03		0.1	
曝露量 (μg/kg bw)		0.6	3.0	9	45	75	378	35	175	8	40
胎仔期曝露	超音波発声	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
	IntelliCage最初の24時間のコーナー侵入回数	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	肝臓AhR標的遺伝子発現	+	++	+	++	-	-	NE		NE	
成体曝露	脳重量変化	-	-	-	-	NE	-	NE	-	NE	-
	肝重量変化	-	+	-	+	NE	- 増加傾向	NE	+	NE	+

NE：検討していない

(6) 哺乳類REPに関する考察

本研究結果を総括し、臭素系ダイオキシン類のREP順位を整理すると、TeBDF≒TeXDF>1-PeBDF>TrBDFの順番となった（表3.3.3）。投与重量ベースのREPは、肝重量変化を指標とするとWHO-TEFとよく一致した。行動影響を指標とすると、TrBDFや1-PeBDFでは、脳内移行量が低下することで行動影響が現れにくくなるため、REPが低くなる可能性が示唆された。よって、臭素系ダイオキシン類のWHO-TEFによるリスク管理は、哺乳類では肝重量変化を指標とした場合に妥当であり、行動影響を指標した場合でも5臭素化以上で過大評価になる傾向であるが、安全側にたって考えると概ね妥当と考えられた。

表3.3.3 本研究で示された哺乳類REP

化学物質名	PCDD/DFs WHO-TEF (2006) ¹⁸⁾	REP _{CALUX} ¹⁹⁾ Mass basis	新生仔 超音波発声	成体			
				新奇 探索行動	肝臓 AhR発現	脳重量 変化	肝重量変化
TrBDF	-	0.00039*	<0.0079	<0.0079	<0.0079	変化なし	<0.0079
TeBDF	0.1	0.16	0.067<0.33	0.067<0.33	>0.067	変化なし	0.067<0.33
1-PeBDF	0.03	0.090	<0.017	<0.017	検討せず	変化なし	0.017<0.086
TeXDF	0.1	0.61*	0.075<0.38	<0.075	検討せず	変化なし	0.075<0.38

*未発表データ

5. 本研究により得られた成果

本研究では、一年目にTCDDを用いた哺乳類毒性試験の試験条件の確立、二年目と三年目に臭素系ダイオキシン類4種類の哺乳類毒性試験を実施し、申請書の研究計画に記載している研究を着実に遂行した。中間評価ヒアリングにおいて取得結果の一般化を目指すべきとのご指摘を頂き、当初研究計画に入っていなかった生体組織（脳、血漿や肝臓）の化学分析を追加的に実施し、臭素系ダイオキシン類の哺乳類毒性に関して体内分布と影響の関係性に言及することができ、当初の想定以上の結果が得られた。

（1）科学的意義

臭素系ダイオキシン類のエンドポイントは、哺乳類毒性を評価する場合、新生仔期の超音波発声及び成体における新奇環境への適応能力が有効な影響評価エンドポイントであることが明らかとなった。体内動態をみると、毒性影響と臓器蓄積量には一定の相関があることから、臭素系ダイオキシン類の体内動態把握により毒性影響がある程度推測できる可能性が示された。また、本研究では、WHO-TEFと臭素系ダイオキシン類の発達神経毒性影響及び肝毒性影響に基づくREPが概ね一致しており、哺乳類においてWHO-TEFを用いて臭素系ダイオキシン類のリスク管理を行うことの妥当性が示された。

（2）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

臭素系ダイオキシン類の人健康影響に関する疫学的な知見は報告が極めて少なく、現時点では動物モデルの毒性値・体内動態を用いてリスク評価を行う必要がある。本研究では、3～5臭素化DFについて、REPがWHO-TEFに概ね一致することや、曝露後の臓器移行量と毒性影響の関連性を示すことができ、行政が環境中の実測値から健康リスクを評価するための基礎となる知見が得られた。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) E. KIMURA, G. SUZUKI, N. URAMARU, T. ENDO, F. MAEKAWA: Environ. Int. Behavioral impairments in infant and adult mouse offspring exposed to 2,3,7,8-tetrabromo dibenzofuran in utero and via lactation. (Accepted)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（２）口頭発表（学会等）

<口頭発表>

- 1) 木村栄輝、前川文彦、遠山千春：第187回日仏生物学会例会（2017）仔の鳴き声から探るダイオキシンの曝露影響と毒性メカニズム
- 2) F. MAEKAWA: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AUTISM (2017) Experimental approaches toward understanding the association between early-life exposure to environmental chemicals and developmental disorders.
- 3) 木村栄輝、鈴木剛、浦丸直人、前川文彦：日仏生物学会第189回例会（2018）環境中に存在する臭素系ダイオキシンの発達期曝露により誘導される行動異常
- 4) 前川文彦：第35回生殖・発生毒性学東京セミナー（2018）発達期の環境化学物質曝露と行動の発達
- 5) 木村栄輝、鈴木剛、浦丸直人、前川文彦：第46回日本毒性学会学術年会（2019）臭素系ダイオキシン類の周産期曝露が発達期および成熟期マウスの行動に及ぼす影響.
- 6) N.M. TUE, E. KIMURA, F. MAEKAWA, A. GOTO, T. KUNISUE, G. SUZUKI: 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (2019) Uptake, clearance and metabolites of 2,3,7,8-tetrabrominated dibenzofuran in mouse.
- 7) F. MAEKAWA: NIPS international workshop “Sensing food/nutrient/environment toward integrative metabolic regulation” (2019) Early developmental exposure to environmental chemicals and energy metabolism.

<ポスター発表>

- 1) E. Kimura, G. Suzuki, N. Uramaru, F. Maekawa: The 55th Congress of the European Societies of Toxicology (2019) Disruption of liver gene expression and ultrasonic vocalization of infant mouse offspring perinatally exposed to 2,3,7,8-tetrabromodibenzofuran.
- 2) E. KIMURA, G. SUZUKI, N. URAMARU, F. MAEKAWA: NIPS international workshop “Sensing food/nutrient/environment toward integrative metabolic regulation” (2019) Perinatal exposure to dioxins impacts on gene expression and infant behavior in the mouse.
- 3) E. Kimura, N. Uramaru, G. Suzuki, F. Maekawa: The Society of Toxicology 58th Annual Meeting (2019) Behavioral impairments of infant and adult mice exposed to 2,3,7,8-tetrabromodibenzofuran in utero and via lactation.
- 4) F. Maekawa, E. Kimura, N. Uramaru, G. Suzuki: 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (2019) Common behavioral characteristics in the mice maternally exposed to different types of dioxins.

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

- 1) 第187回日仏生物学会例会プレゼンテーション賞、日仏生物学会、2017年12月16日 木村栄輝、前川文彦、遠山千春 第187回日仏生物学会例会 (2017) 仔の鳴き声から探るダイオキシンの曝露影響と毒性メカニズム

8. 引用文献

- 1) Y.C. CHEN, Y.L. GUO, C.C. HSU, W.J. ROGAN: JAMA, 268(22), 3213-3218 (1992) Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs.
- 2) Y.C. CHEN, M.L. YU, W.J. ROGAN, B.C. GLADEN, C.C. HSU: Am. J. Public. Health. 84(3), 415-421 (1994) A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children.
- 3) M. NISHIJO, T.T. PHAM, A.T. NGUYEN, N.N. TRAN, H. NAKAGAWA, L.V. HOANG, A.H. TRAN, Y. MORIKAWA, M.D. KIDO, M.N. NGUYEN, H.M. NGUYEN, H. NISHIJO: Mol. Psychiatry. 19 (11), 1220-1226 (2014) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in breast milk increases autistic traits of 3-year-old children in Vietnam.
- 4) W.J. ROGAN, B.C. GLADEN, K.L. HUNG, S.L. KOONG, L.Y. SHIH, J.S. TAYLOR, Y.C. WU, D. YANG, N.B. RAGAN, C.C. HSU: Science. 241 (4863), 334-336 (1988) Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan.
- 5) N. ONISHCHENKO, C. TAMM, M. VAHTER, T. HOKFELT, J.A. JOHNSON, D.A. JOHNSON, S. CECCATELLI: Toxicol. Sci. 97 (2), 428-437 (2007) Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice.
- 6) K.H. AUNG, C. KYI-THA-THU, K. SANO, K. NAKAMURA, A. TANOUE, K. NOHARA, M. KAKEYAMA, C. TOHYAMA, S. TSUKAHARA, F. MAEKAWA: Front. Neurosci. 10, 137 (2016) Prenatal exposure to arsenic impairs behavioral flexibility and cortical structure in mice.
- 7) I. BRANCHI, F. CAPONE, E. ALLEVA, L.G. COSTA: Neurotoxicol. 24 (3), 449-462 (2003) Polybrominated diphenyl ethers: neurobehavioral effects following developmental exposure.
- 8) P. GRANDJEAN, P.J. LANDRIGAN: Lancet. 368 (9553), 2167-2178 (2006) Developmental neurotoxicity of industrial chemicals.
- 9) P. GRANDJEAN, P.J. LANDRIGAN: Lancet Neurol. 13 (3), 330-338 (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity.

- 10) A. HAIJIMA, T. ENDO, Y. ZANG, W. MIYAZAKI, M. KAKEYAMA, C. TOYAMA: *Neurotoxicol.* 31(4), 385-390 (2010) In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice.
- 11) M. KAKEYAMA, T. ENDO, Y. ZANG, W. MIYAZAKI, C. TOYAMA: *Arch. Toxicol.* 88(3), 789-798 (2014) Disruption of paired-associate learning in rat offspring perinatally exposed to dioxins.
- 12) T. ENDO, M. KAKEYAMA, Y. UEMURA, A. HAIJIMA, H. OKUNO, H. BITO, C. TOYAMA: *PLoS One.* 7(12), e50741 (2012) Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation.
- 13) E. KIMURA, C. TOYAMA: *Arch. Toxicol.* 92(5), 1741-1749 (2018) Vocalization as a novel endpoint of atypical attachment behavior in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed infant mice.
- 14) J.L. SILVERMAN, M. YANG, C. LORD, J.N. CRAWLEY: *Nat. Rev. Neurosci.* 11(7), 490-502 (2010) Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism.
- 15) M. VAN DEN BERG, M.S. DENISON, L.S. BIRNBAUM, M.J. DE VITO, H. FIEDLER, J. FALANDYSZ, M. ROSE, D. SCHRENK, S. SAFE, C. TOYAMA, A. TRITSCHER, M. TYSKLIND, R.E. PETERSON: *Toxicol. Sci.* 133(2), 197-208 (2013) Polybrominated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls: inclusion in the toxicity equivalency factor concept for dioxin-like compounds.
- 16) K. AO, T. SUZUKI, H. MURAI, M. MATSUMOTO, H. NAGAI, Y. MIYAMOTO, C. TOYAMA, K. NOHARA: *Toxicology* 256, 25-31 (2009) Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-p-dioxins in mice.
- 17) G.W. SOVOCOL, R.K. MITCHUM, J.R. DONNELLY: *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* 14(10), 579-582 (1987) Use of the 'ortho effect' for chlorinated biphenyl and brominated biphenyl isomer identification.
- 18) M. VAN DEN BERG, L.S. BIRNBAUM, M. DENISON, M. DE VITO, W. FARLAND, M. FEELEY, H. FIEDLER, H. HAKANSSON, A. HANBERG, L. HAWS, M. ROSE, S. SAFE, D. SCHRENK, C. TOHYAMA, A. TRITSCHER, J. TUOMISTO, M. TYSKLIND, N. WALKER, R.E. PETERSON: *Toxicol. Sci.*, 93(2), 223-241 (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds.
- 19) G. SUZUKI, M. NAKAMURA, C. MICHINAKA, N.M. TUE, H. HANDA, H. TAKIGAMI: *Toxicol. in Vitro* 44, 134-141 (2017) Dioxin-like activity of brominated dioxins as individual compounds or mixtures in in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines.

III. 英文Abstract

A comprehensive risk management and presentation of toxicity equivalency factors of unintentional brominated dioxin-like compounds

Principal Investigator: Go SUZUKI

Institution: National Institute for Environmental Studies (NIES)

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, JAPAN

Tel: +81-29-850-2205 / Fax: +81-29-850-2269

E-mail: g-suzuki@nies.go.jp

Cooperated by: Ehime University

[Abstract]

Key Words: brominated dioxins, risk management, TEF, emission characteristic, toxicity test

The toxicity profiles of brominated dioxins such as polybrominated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans (PBDD/DFs) are similar to those of their chlorinated analogues. PBDD/DFs may have contributed substantially to the total dioxin toxic equivalents of daily human background exposure because of their unintentional release during the lifecycle of products containing brominated compounds such as brominated flame retardants (BFRs). A joint World Health Organization (WHO) and United Nations Environment Programme (UNEP) expert panel has therefore recommended that the WHO toxicity equivalency factor (TEF) scheme be used for assessment of human health effects and the ecotoxicological risk associated with brominated dioxin-like compounds.

In sub-theme 1, the DR-CALUX assay together with GC × GC-HRTOFMS and UHPLC/APGC-QTOFMS were used to analyze effluents and emission gases to determine the current emissions of brominated dioxins (BDs) and related compounds from sources in Japan. Although concentrations tended to be lower in this study than in previous work, facilities handling BFRs and recycling electronic waste—but not final disposal sites and a nonferrous metal smelter for recycling printed circuit boards—were identified as emission sources. The strong correlation between BDs and decabromodiphenyl ether (decaBDE) ($r=0.917$, $P<0.001$, $n=18$) suggests that emissions of BDs will decrease in response to restrictions on the manufacture and use of decaBDE. Unidentified brominated dioxin-like compounds should be identified to determine the importance of their risk management. Reduction of BD emissions will require control of particulate matter in effluents and emission gases.

In sub-theme 2, embryo toxicity tests using Japanese medaka (*Oryzias latipes*) were conducted to determine the potencies of PBDFs relative to 2,3,7,8-TCDD because of the lack of such data for fish. The toxic effects of six BDs were investigated to estimate their relative potencies (REPs). With the exception of 2,3,8-TrBDF and 1,3,6,8-/1,3,7,9-TeBDD, BDs induced a

typical symptom called blue-sac disease. The order of REPs was 2-C-3,7,8-BDF (2.3) > TCDD (1.0) > 2,3,7,8-TeBDF (0.76) > 2,3,4,7,8-PeBDF (0.048) > 1,2,3,7,8-PeBDF (0.0063). These REPs will be useful for risk assessment and management of BDs in aquatic environments.

In sub-theme 3, we examined the toxic effects of *in utero* and lactational exposure to four BDs on the behavior of infant and adult offspring mice to detect effective behavioral endpoints in developmental neurotoxicity assessments. In the mice exposed to 2,3,7,8-TeBDF and 2-C-3,7,8-BDF—but not 2,3,8-TrBDF and 1,2,3,7,8-PeBDF—developmental neurotoxicity was detected based on analyses of adult exploratory behavior in a novel environment and/or ultrasonic vocalizations during infancy. Both the neurotoxicological and hepatotoxicological endpoint-based REPs suggest that the WHO-TEF concept is applicable to BDs for mammals.