

非意図的副生物を含む工業製剤の安全性評価： *In vitro* レポーター遺伝子アッセイと LC/QToFMS による 縮合型リン系難燃剤の影響指向分析

Safety evaluation of technical chemical mixture containing unintentional byproduct:
Effect-based analysis of oligomeric and polymeric phosphorus-containing flame retardants by
using *in vitro* reporter gene assays and LC/QToFMS

鈴木 剛*・松神 秀徳

Go SUZUKI and Hidenori MATSUKAMI

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

Center for Material Cycles and Waste Management Research, National Institute for Environmental Studies

摘 要

工業製剤の安全性評価は、一般的に構成主体を想定して実施される。しかしながら、有機顔料中の PCBs、臭素系難燃剤中の臭素化ダイオキシン類や 2,4,6-トリブromoフェノールのように、構成主体よりも高い毒性や環境放散性を有する非意図的副生物が含まれる工業製剤が存在する。その結果、構成主体のみの安全性評価だけでは、含有非意図的副生物のリスク性が見過ごされてしまう場合や、非意図的副生物によるリスク性が評価されないことで構成主体の有用性が損なわれてしまう場合がある。本研究では、プラスチック樹脂や繊維製品中に汎用される縮合型リン系難燃剤を対象として、当該問題の把握に、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイと先端機器分析による影響指向分析を適用した。本研究によって、縮合型リン系難燃剤は、オリゴマー化やポリマー化といった縮合体化を通じて、環境放散性が低くなるだけでなく、生物利用能も低くなり毒性発現能も低下することが示された。これは、環境負荷低減化や安全性確保の観点から、縮合体化が化成品の適切なデザインとなり得ることを示唆する。一方で、縮合型リン系難燃剤による影響には、モノマーや水酸基が導入されている関連物質等の非意図的副生物の関与があると推定された。

キーワード：*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ、影響指向分析、LC/QToFMS、工業製剤、縮合型リン系難燃剤

keywords：*in vitro* reporter gene assay, effect-based analysis, LC/QToFMS, technical chemical mixture, phosphorus-containing flame retardant

1. はじめに

プラスチック樹脂や繊維製品中に使用される縮合型リン系難燃剤 (Despinasse and Schartel, 2012; Pawlowski and Schartel, 2007) は、オリゴマー化やポリマー化等縮合して製造され分子量が大きくなることから、モノマー型リン系難燃剤と比較して揮発等を通じた環境放散性が低くなると考えられている。人体への影響の観点においても、縮合型については、分子量が大きくなることで生体内への取り込みや標的組織での生物利用能が下がり、毒性発現能も低下していることが期待される。したがって縮合体化は、環境上適切な化成品のデザインの在り方と捉えることができる。一方で、有機顔料中の PCBs

(環境省) や臭素系難燃剤 (BFR: Brominated Flame Retardant) 中の臭素化ダイオキシン類 (酒井・滝上, 2013) や 2,4,6-トリブromoフェノール (鈴木ほか, 2013) を例として、構成主体の化成品よりも高い毒性や環境放散性を有する非意図的副生物が含まれる工業製剤が存在することがあり、含有非意図的副生物によるリスク性が無視できない場合がある。

縮合型リン系難燃剤は、ストックホルム条約上で残留性有機汚染物質 (POPs: Persistent Organic Pollutants) として規制されたヘキサブromシクロデカンやデカブromジフェニルエーテルといった臭素系難燃剤 (POP-BFR) の主要な代替物になると考えられている。縮合型リン系難燃剤は、既に一般家庭やオフィスなどの室内環境 (Brandsma *et al.*,

受付：2019年3月2日、受理：2019年5月14日

* 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2, E-mail: g-suzuki@nies.go.jp

2013), 廃電気電子機器リサイクル現場周辺の屋外環境(Matsukami *et al.*, 2015a)等に遍在している。製剤含有の非意図的副生物についても、同様に環境中に移行していると推察される。縮合型リン系難燃剤の含有成分としては、重合体とそのモノマー型リン系難燃剤の混合物であるといわれており(Brady *et al.*, 1995; Bright *et al.*, 1997; 大八化学工業株式会社, 1988, 1996; Gunkel and Barda, 1992; Levchik *et al.*, 2000; Pakalin *et al.*, 2007; Rossi and Heine, 2007; Syracuse Research Corporation, 2006), 我々の既報研究(Matsukami *et al.*, 2015b)によってモノマー型リン系難燃剤以外の非意図的副生物の存在も明らかとなった。一方で、非意図的副生物の影響への関与を明らかにする工業製剤の評価はこれまで実施されてこなかった。

本研究では、POP-BFRの代替物と考えられている縮合型リン系難燃剤のうち、国内外で広く販売されている4種類の工業製剤を対象として、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイと液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析計(LC/QToFMS)による影響指向分析を行なった。具体的には、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイによる工業製剤の影響評価を実施して、検出された影響の種類や強度に基づいて評価重要度が高いと判断された工業製剤含有成分を対象に、セミマイクロHPLCによる分離・分画を

行ない、得られた画分について *in vitro* レポーター遺伝子アッセイとLC/QToFMSによる影響評価/ノンターゲット分析を実施した。得られた結果に基づいて、影響関連物質を推定して縮合型リン系難燃剤の安全性やリスク性を考察した。

2. 方法

2.1. 縮合型リン系難燃剤

本研究では、国内外で販売されている1,3-フェニレンビス(ジフェニルホスフェート)(PBDPP)、ビスフェノールAビス(ジフェニルホスフェート)(BPA-BDPP)、1,3-フェニレンビス[ジ(2,6-ジメチルフェニル)ホスフェート](PBDMPP)、ジエチレングリコールビス[ジ(2-クロロイソプロピル)ホスフェート](DEG-BDCIPP)の4種類の縮合型リン系難燃剤の工業製剤を使用した(図1)。

2.2. *In vitro* バイオアッセイによる工業製剤の影響評価

2.2.1. 縮合型リン系難燃剤の調製

縮合型リン系難燃剤を30mg秤量後、1mlのDMSOに定容して製剤原液を調製した。試験時には、製剤原液で影響が確認されたものについて、用量反応データを取得するために段階的な希釈を行なった。本研究では細胞への曝露濃度を0.1% DMSO

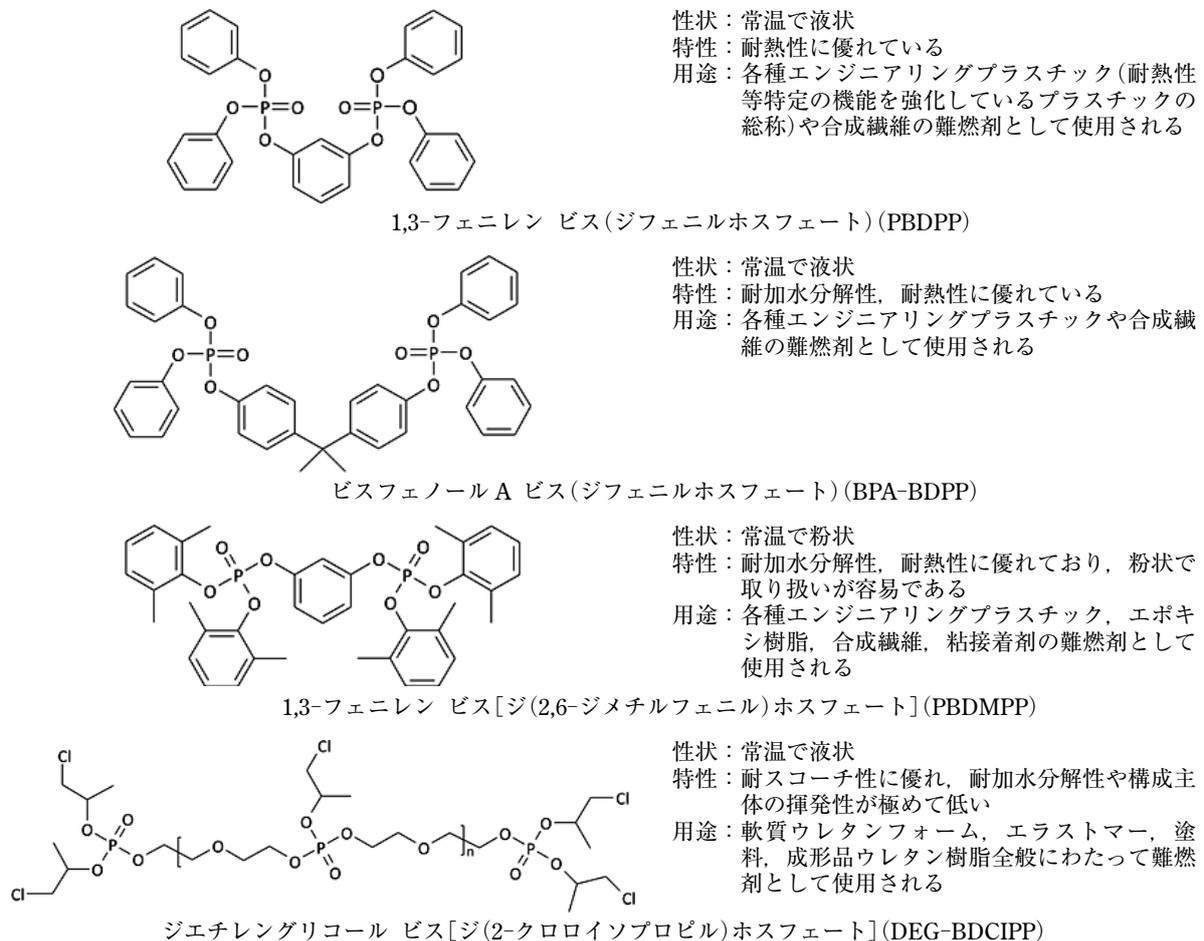


図1 本研究で対象とした4種類の縮合型リン系難燃剤。

表1 本研究で使用した *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ.

適用手法	対象核内受容体	核内受容体の機能
AR-CALUX アッセイ	ヒト・アンドロゲン受容体(AR)	男性ホルモン作用
ER α -CALUX アッセイ	ヒト・エストロゲン受容体 α (ER α)	女性ホルモン作用
PR-CALUX アッセイ	ヒト・プロゲステロン受容体(PR)	妊娠準備・維持作用
PPAR γ 2-CALUX アッセイ	ヒト・ペルオキシソーム増殖活性化受容体 γ 2(PPAR γ 2)	脂肪細胞の調節, 血糖降下作用

とするため、最高濃度の 30 mg/ml の製剤原液を曝露する場合は細胞への曝露濃度が 30 μ g/ml となる。

2.2.2. *In vitro* レポーター遺伝子アッセイ

本研究では、オランダ・BioDetection Systems b. v. で開発された表 1 に示す核内受容体結合レポーター遺伝子アッセイを用いて、縮合型リン系難燃剤の各種核内受容体の作動性(アゴニスト活性)及び拮抗性(アンタゴニスト活性)を評価した。影響指標は、生殖毒性や発達神経毒性等に着目して、ヒトのアンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体アルファ(ER α)、プロゲステロン受容体(PR)等のアゴニスト及びアンタゴニスト活性とした。AR、ER α 及びPRのアゴニスト及びアンタゴニスト活性は、EUで実施された臭素系難燃剤のリスク評価プロジェクト(FIRE: Flame retardants Integrated Risk assessment for Endocrine effects)に採用された実績を有する(Hamars *et al.*, 2006)。また、既報研究において、当該レポーター遺伝子アッセイでARアンタゴニスト及びER α アゴニストとしてスクリーニングされたモノマー型リン系難燃剤(Suzuki *et al.*, 2013)は、マウス哺乳類毒性試験で生殖や社会性行動に影響を与えることが確認されている(Kamishima *et al.*, 2018; Nakayama *et al.*, unpublished; Sano *et al.*, unpublished)。これらのマウス哺乳類毒性試験の結果に基づくと、当該レポーター遺伝子アッセイは生殖毒性や発達神経毒性のスクリーニング手法として有用であると考えられる。

影響評価は、外来遺伝子であるホタルのルシフェラーゼ遺伝子を安定的に挿入した組み換えヒト骨肉腫(U2OS)細胞を用いて既報に準じて実施した(Suzuki *et al.*, 2013)。概要を以下に示す。U2OS細胞は、培養用培地を用いて、37°C及び5% CO₂の条件で培養した。影響評価を行なう際には、培養プラスチック中のU2OS細胞を、96wellマイクロプレートに9,000-12,000 cells/wellの濃度で播種して、約24時間培養した。アゴニスト活性試験では、96wellマイクロプレートの各wellから培地を除去した後、DMSOに溶解した各種標準物質溶液と製剤原液・希釈液を培養用培地に対して0.1% DMSO濃度になるように添加して調製した培地を各wellに添加し、U2OS細胞への曝露を行なった。曝露24時間後、受容体結合に基づいて誘導されたルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。アゴニスト活性試験では用量反応を示し、アゴニスト標準物質の

最高濃度の活性を100%とした際の相対活性が5%(REC₅)以上であった場合にアゴニスト活性有りとして判断した。アンタゴニスト活性試験では、96wellマイクロプレートの各wellから培地を除去した後、アゴニスト標準物質溶液と製剤原液・希釈液を培養用培地に対してそれぞれ0.1%になるように添加して調製した培地(この場合、0.2% DMSO)を各wellに添加して、U2OS細胞への曝露を行なった。アンタゴニスト活性試験では、次の3種類の試験を順に実施して活性の有無を判断した: 試験①最高濃度の活性に対して50%を示す濃度(EC₅₀)のアゴニスト標準物質との共曝露試験を行ない、曝露24時間後に活性を測定した。得られた活性が用量反応を示し、アンタゴニスト標準物質の最高濃度の阻害活性を100%とした際の相対阻害活性が20%(RIC₂₀)以上であった場合に、試験②を実施した。試験②試験①と同様の曝露を行ない、細胞毒性を評価した。試験①で示された相対阻害活性が細胞毒性に因らないことを確認できた場合、試験③を実施した。試験③EC₅₀の100倍の濃度のアゴニスト標準物質との共曝露試験を行ない、曝露24時間後に活性を測定した。試験①で観察された阻害が、過剰量のアゴニスト標準物質との共曝露試験(試験③)で回復した(阻害されない)場合に、受容体特異的なアンタゴニスト活性と判断した。

2.2.3. データ解析

本研究では、各種試験を少なくともn=3で実施した。アゴニスト活性試験及びアンタゴニスト活性試験で用量反応を示した縮合型リン系難燃剤については、SigmaPlot 13を用いてシグモイド曲線を描き、EC₅₀とIC₅₀(共曝露したアゴニスト標準物質による活性を50%阻害する濃度)を算出した。

2.3. 影響関連物質のプロファイリング

縮合型リン系難燃剤には、構成主体のオリゴマー体あるいはポリマー体のリン系難燃剤以外にも、合成未反応物や分解生成物と想定される非意図的副生物が含まれている(Brady *et al.*, 1995; Bright *et al.*, 1997; 大八化学工業株式会社, 1988, 1996; Gunkel and Barda, 1992; Levchik *et al.*, 2000; Matsukami *et al.*, 2015b; Pakalin *et al.*, 2007; Rossi and Heine, 2007; Syracuse Research Corporation, 2006)。従って影響評価では、これらを含む全ての製剤含有成分による影響を評価している。本研究では、製剤含有成分から主要な影響関連物質を推定するために、製剤含有

の影響関連物質のプロファイリングを実施した。テトラヒドロフラン(THF, tetrahydrofuran)に溶解した各種縮合型リン系難燃剤(10 mg/ml)をセミマイクロ HPLC に供して、溶離時間に応じて溶離液を 96 deep well プレートに分取した。分離カラムには、昭和電工株式会社製の KF-402HQ(内径：4.6 mm, 長さ：250 mm, ポリスチレンでの排除限界：5,000)を使用した。移動相には、高速液体クロマトグラフ用 THF(安定剤不含)をメンブレンフィルターでろ過したものを要時調製して使用した。分離カラムの温度は 40℃, 移動相の流速は 0.3 ml, サンプルの注入量は 2 μ l(20 μ g 相当量)とした。分取した溶離液は、3% DMSO/ヘキサン洗浄水を添加後、THF を除去して、影響評価に供して影響を示す溶離液画分を選定した。当該溶離液画分を対象として、LC/QToFMS を用いたノンターゲット分析を実施して製剤含有成分を評価した。

2.4. LC/QToFMS を用いたノンターゲット分析による工業製剤の含有成分評価

2.4.1. 縮合型及びモノマー型リン系難燃剤の調製

縮合型リン系難燃剤を 10 mg 秤量後、10 ml の THF に定容した 1,000 μ g/ml の製剤原液を調製した。製剤原液を THF で 100 倍希釈した 10 μ g/ml の製剤希釈液を調製した。製剤中不純物と想定されるモノマー型リン系難燃剤のリン酸トリス(2-クロロイソプロピル)(TCIPP), リン酸トリフェニル(TPHP), リン酸トリス(2,6-ジメチルフェニル)(TDMPP)の同定及び定量には、それぞれ和光純薬工業株式会社製、東京化成工業株式会社製、林純薬工業株式会社製の標準物質を使用した。各標準物質を正確に 10 mg 秤量後、10 ml の THF に定容した 1,000 μ g/ml の標準原液を調製した。各標準原液を THF で 20 倍希釈した後(濃度：50 μ g/ml), 5 水準の濃度(0.01, 0.05, 0.2, 1, 5 μ g/ml)に希釈した標準希釈液を調製した。

2.4.2. LC/QToFMS

測定装置には、アジレント・テクノロジー株式会社製の Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システム(LC/QToFMS)を使用した。分離カラムには、昭和電工株式会社製の KF-402HQ(内径：4.6 mm, 長さ：250 mm, ポリスチレンでの排除限界：5,000)を使用した。移動相には高速液体クロマトグラフ用 THF(安定剤不含)を使用し、分離カラムの温度は 30℃, 移動相の流速は 0.3 ml, サンプルの注入量は 5 μ l に設定した。大気圧光イオン化(APPI)-QToFMS のキャピラリー電圧は 3,500 V, フラグメンターは 150 V, スキマーは 65 V に設定した。乾燥ガス及び気化ガスの温度は、それぞれ 350℃ 及び 300℃ に設定した。ネブライザーガスの圧力は 50 psi(345 kPa)に設定した。コリジョンガスにはアルゴン(>99.9999%)を使用した。精密質量データの取得及び解析には、アジレント・テクノロジー株式

会社製の MassHunter ソフトウェアを使用した。

2.4.3. モノマー型リン系難燃剤の同定及び定量

製剤希釈液と標準希釈液を対象として、m/z 100~3,200 の質量範囲で MS 測定を行い、製剤含有のモノマー型リン系難燃剤を同定した。具体的には、製剤含有成分のうち、標準物質で検出された分子量関連イオンの精密質量と保持時間が一致する成分を確認した。標準物質の分子量関連イオンをプリカーサーイオンに設定して m/z 50~1,500 の質量範囲で MSMS 測定を行い、標準物質で確認されたプロダクトイオンが一致することを確認した。製剤中モノマー型リン系難燃剤は次の手順で定量した。測定用標準溶液及び測定用製剤溶液について MS 測定で得られた質量データの中からモノマーの標準物質で確認された分子量関連イオンの抽出イオンクロマトグラム(EIC)を ± 20 ppm の質量範囲で作成した。モノマー型リン系難燃剤のピーク面積を求め、測定用標準溶液の濃度比から絶対検量線法に基づき定量値を求めた。当該測定法では、0.01~5 μ g/ml の範囲で作成した標準物質の検量線の相関係数が 0.99 以上であり良好な直線性が確認された。製剤含有成分のカラム分離、イオン化、飛行時間型質量分析計(Time-of-flight Mass Spectrometer : ToFMS)の精密質量分離により、モノマー型リン系難燃剤の正確な定量を干渉するオリゴマー型リン系難燃剤や不純物等は確認されなかった。3 回繰り返し測定で得られた定量値の変動係数(C. V.)は、0.9~6.6% の範囲であり、安定した定量分析が可能であった。分析工程における汚染は検出下限以下であることが確認された。

2.4.4. その他製剤含有成分の推定

製剤希釈液を対象として、m/z 100~3,200 の質量範囲で MS 測定を行い、製剤含有成分の分子量関連イオンの精密質量に基づいて元素組成を決定した。各成分の分子量関連イオンをプリカーサーイオンに設定して m/z 50~1,500 の質量範囲で MSMS 測定を行った。MSMS 測定時に設定したコリジョン電圧値は各成分の開裂に適した値を検討した。各成分のプロダクトイオンの精密質量から開裂経路を解析し、化学構造に基づいて構成成分を推定した。

3. 結果と考察

3.1. 縮合型リン系難燃剤の含有成分

縮合型リン系難燃剤の含有成分の詳細分析評価は、我々の既報(Matsukami *et al.*, 2015b)で詳述した。含有成分の構成については、本研究でも重要な情報であるため、要約して以下に記述する。

縮合型リン系難燃剤の含有成分は、分子サイズで分離後、APPI 条件下で水素付加イオンとなり、ToFMS で精密質量分離され、ポジティブイオンモードで検出された。分子量関連イオンの精密質量について EIC を作成した結果、PBDPP では 6 成分、

BPA-BDPP では 6 成分, PBDMPP では 4 成分, DEG-BDCIPP では 9 成分が, 各製剤の含有成分と推定された。PBDPP 及び BPA-BDPP では, 構成成分の 1 成分が TPHP 標準物質の分子量関連イオンの精密質量及び保持時間と一致した。PBDMPP では, 1 成分が TDMPP の標準物質と一致した。DEG-BDCIPP では, TCIPP の標準物質と一致した。さらに, 製剤中 TPHP, TDMPP, TCIPP と各標準物質のプロダクトイオンが一致することも確認された。

標準希釈液及び製剤希釈液の MS 測定データから作成した EIC を用いて, 製剤中のモノマー型リン系難燃剤 (TPHP, TDMPP, TCIPP) のピーク面積を求めて絶対検量線法に基づき定量値を求めた(表 2)。PBDPP 及び BPA-BDPP 中 TPHP の含有量はそれぞれ 2.0% 及び 1.2%, PBDMPP 中 TDMPP の含有量は 2.8% であった。PBDPP, BPA-BDPP 及び PBDMPP は, オキシ塩化リンと二価のフェノール系化合物及びフェノール(またはアルキルフェノール)との反応によって製造され(Daihachi Chemical Industry, 1988; Gunkel and Barda, 1992; Brady *et al.*, 1995), PBDPP には 5% 未満の TPHP, BPA-BDPP には 3% 未満の TPHP が含まれると報告されている(Bright *et al.*, 1997; Levchik *et al.*, 2000; Pakalin *et al.*, 2007; Rossi and Heine, 2007; Syracuse Research Corporation, 2006)。DEG-BDCIPP 中 TCIPP の含有量は 5.7% であった。DEG-BDCIPP は, 触媒の存在下で, アルキレンオキサイドとオキシ塩化リンとの反応によって製造され, 6% 未満の TCIPP を含有することが報告されている(Daihachi Chemical Industry, 1996)。我々の結果は, 既報と同程度であった。PBDMPP 中 TDMPP の含有量は, 我々が初めて報告した。

MS 測定で検出された PBDPP の 6 成分, BPA-BDPP の 6 成分, PBDMPP の 4 成分, DEG-BDCIPP の 9 成分を対象に MSMS 測定を実施した。各成分のプロダクトイオンの精密質量から元素組成を決定し, 開裂経路を解明して化学構造の候補を探索した。PBDPP では, TPHP とダイマーからペンタマーまでのオリゴマー, リン酸[(3-ヒドロキシフェニル)ジフェニル](HP-DPHP)が含有成分と推定

された。BPA-BDPP では, TPHP とダイマーからテトラマーまでのオリゴマー, リン酸[(4-[2-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン-2-イル]フェニル)ジフェニル](BPA-DPHP)などの BPA-BDPP の類縁物質が含有成分と推定された。PBDMPP では, TDMPP とダイマーとトリマーのオリゴマー, リン酸[(3-ヒドロキシフェニル)ジ(2,6-ジメチルフェニル)](HP-2,6-DDMPP)が含有成分と推定された。DEG-BDCIPP では, TCIPP とダイマーからペンタマーまでのオリゴマー, TCIPP 及び DEG-BDCIPP の類縁物質が含有成分と推定された。

3.2. 縮合型リン系難燃剤の影響評価

縮合型リン系難燃剤の影響を評価した結果, ER α アゴニスト活性, AR アンタゴニスト活性及び PR アンタゴニスト活性が検出された。PBDPP 及び DEG-BDCIPP では ER α アゴニスト活性と AR アンタゴニスト活性及び PR アンタゴニスト活性が, BPA-BDPP 及び PBDMPP では ER α アゴニスト活性と PR アンタゴニスト活性が検出されている。縮合型リン系難燃剤の ER α アゴニスト活性, AR アンタゴニスト活性及び PR アンタゴニスト活性の用量反応を図 2~図 4 に示す。各用量反応から算出した REC₅, EC₅₀ 及び RIC₂₀ を表 3 に示す。

縮合型リン系難燃剤の ER α アゴニスト活性については, REC₅ に基づく影響強度の順位が PBDMPP > PBDPP > BPA-BDPP > DEG-BDCIPP となっており, ポリマー体の DEG-BDCIPP で最も活性が低かった。評価濃度範囲で得られた用量反応に基づく, PBDPP と PBDMPP は, 17 β -エストラジオール(E2: ER α アゴニスト標準物質)と類似の用量反応性を示す ER α アゴニスト活性であると考えられた。RIC₂₀ に基づく影響強度の順位は, AR アンタゴニスト活性で PBDPP > DEG-BDCIPP, PR アンタゴニスト活性で PBDPP > PBDMPP = DEG-BDCIPP > BPA-BDPP であった。評価濃度範囲で得られた用量反応に基づく, PBDPP はフルタミド(AR アンタゴニスト標準物質)あるいは RU486(PR アンタゴニスト標準物質)と類似の用量反応性を示す AR アンタゴニストあるいは PR アンタゴニストであると考えられた。

表 2 縮合型リン系難燃剤含有のモノマー型リン系難燃剤の含有量(Matsukami *et al.*, 2015b).

対象製剤	TPHP		TDMPP			TCIPP			
	濃度(mg/g)		重量%	濃度(mg/g)		重量%	濃度(mg/g)		重量%
	平均	標準偏差	平均	平均	標準偏差	平均	平均	標準偏差	平均
PBDPP	20	0.55	2.0	—	—	—	—	—	—
BPA-BDPP	12	0.11	1.2	—	—	—	—	—	—
PBDMPP	—	—	—	28	0.88	2.8	—	—	—
DEG-BDCIPP	—	—	—	—	—	—	57	3.8	5.7

—: 測定していない

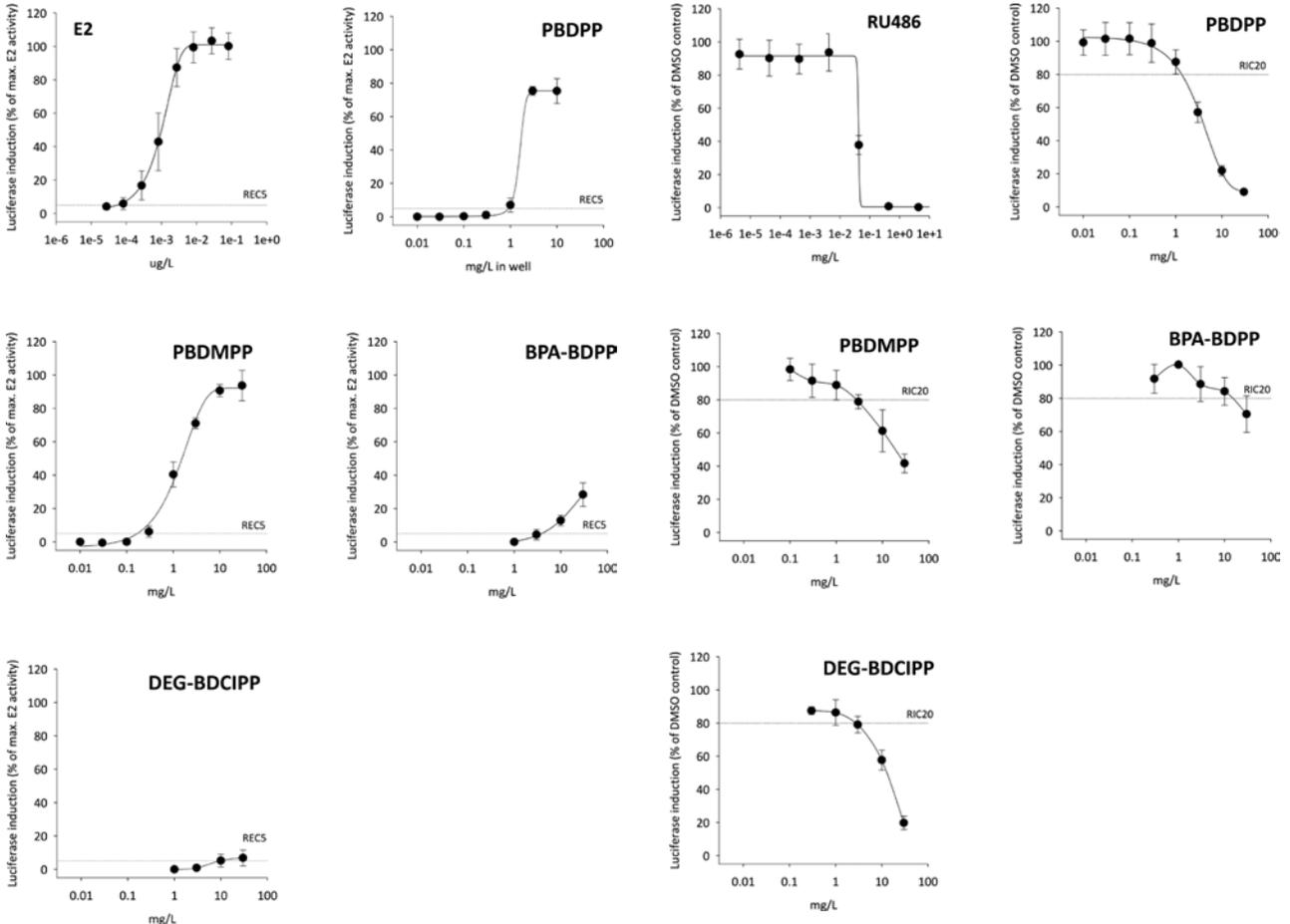


図2 17β-エストラジオール(E2：アゴニスト標準物質)と縮合型リン系難燃剤のERαアゴニスト活性の用量反応。

図4 RU486(アンタゴニスト標準物質)と縮合型リン系難燃剤のPRアンタゴニスト活性の用量反応。

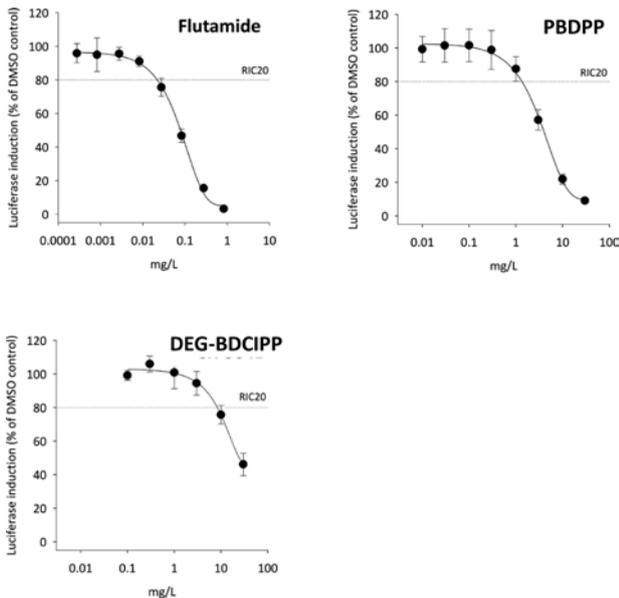


図3 フルタミド(アンタゴニスト標準物質)と縮合型リン系難燃剤のARアンタゴニスト活性の用量反応。

縮合型リン系難燃剤の構造から推測されるように、PBDPPとBPA-BDPPにはTPHPが、PBDMPPにはTDMPPが、DEG-BDCIPPにはTCIPPが、それぞれ不純物として数%程度含まれている(表2)。縮合型リン系難燃剤の影響強度を評価するために、各縮合型製剤に関連のあるモノマー型リン系難燃剤が示す影響と比較考察を行なった。モノマー型リン系難燃剤については、既報において検出される影響の種類や強度を明らかにしている(Suzuki *et al.*, 2013)。既報で明らかにしたTPHP、TDMPP及びTCIPPのREC₅あるいはRIC₂₀をモルベースから重量ベースに換えると、ERαアゴニスト活性のREC₅はTPHPで0.33 mg/l、TDMPPで0.0041 mg/l、TCIPPで>3.3 mg/l、ARアンタゴニスト活性のRIC₂₀はTPHPで0.98 mg/l、TDMPPで0.41 mg/l、TCIPPで3.3 mg/l、PRアンタゴニスト活性のRIC₂₀はTPHPで0.33 mg/l、TDMPPで0.41 mg/l、TCIPPで0.98 mg/lとなる。これらの影響濃度を縮合型リン系難燃剤のREC₅あるいはRIC₂₀と比較すると、いずれも関連するモノマー型リン系難燃剤よりも影響濃度が高くなっており、影響の強度が低くなっていることが示された(図1と表3参照：PBDPPとTPHP、BPA-BDPPとTPHP、PBDMPPとTDMPP、DEG-BDCIPPとTCIPP)。

表3 縮合型リン系難燃剤のアゴニスト活性(REC₅)とアンタゴニスト活性(RIC₂₀).

試験物質	アゴニスト(mg/l)		アンタゴニスト(mg/l)			
	ER α		AR		PR	
	REC ₅	EC ₅₀	RIC ₂₀	IC ₅₀	RIC ₂₀	IC ₅₀
E2	8.2×10^{-8}	9.7×10^{-7}	—	—	—	—
Flutamide	—	—	2.8×10^{-2}	1.8×10^{-1}	—	—
RU486	—	—	—	—	4.3×10^{-6}	4.1×10^{-5}
PBDPP	1.0	1.1	3.0	3.6	1.0	2.2
BPA-BDPP	1.0×10	NC	NE	NC	3.0×10	NC
PBDMPP	3.0×10^{-1}	1.3	NE	NC	3.0	NC
DEG-BDCIPP	3.0×10	NC	3.0×10	NC	3.0	1.4×10

—：試験を実施していない，NE：最高濃度(30 mg/l)で活性なし，NC：計算できない

さらに表2に示す各製剤に関連するモノマー型リン系難燃剤の含有濃度に基づいて、各種活性への寄与を算出し、上記の縮合型リン系難燃剤の結果と比較した。既報(Suzuki *et al.*, 2013)によると、TPHPとTMDPPがER α アゴニスト活性とARアンタゴニスト活性及びPRアンタゴニスト活性を、TCIPPがARアンタゴニスト活性及びPRアンタゴニスト活性を有しており、縮合型リン系難燃剤で検出されるハザードは、各縮合型リン系難燃剤含有のモノマー型リン系難燃剤で検出される影響の種類と概ねよく一致している。一方で、実験的に評価された縮合型リン系難燃剤の影響強度は、含有モノマー型リン系難燃剤の濃度から想定される影響強度に比べて高い傾向にあり、モノマー型リン系難燃剤以外の含有成分の影響への関与が想定された。中でもPBDPPは、すべての影響で想定よりも15倍以上強い活性が示された。その他の縮合型リン系難燃剤についても、検出される影響の強度が想定と異なっていた。モノマー型リン系難燃剤以外の含有成分についても、先述の通りLC/QToFMSで物質数や構造を推定しており、これら含有成分の影響への関与が想定された。

3.3. 影響関連物質のプロファイリング

上記のように縮合型リン系難燃剤に含有されるモノマー型リン系難燃剤以外の含有成分の各種影響への関与が想定されたが、それらは化学物質標準品が存在しないため、工業製剤中の濃度を正確に定量することはできない。そこで本研究では、セミマイクロHPLCによる製剤含有成分の溶離時間に応じた分離を行ない、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイとLC/QToFMSによる影響評価/ノンターゲット分析を実施して、影響関連物質を推定した。

縮合型リン系難燃剤で検出されたER α アゴニスト活性、ARアンタゴニスト活性及びPRアゴニスト活性については、既報においても難燃剤やハウスダストで共通して検出されており(Suzuki *et al.*, 2013)、相互に関連性のあるエンドポイントである

ことが考えられる。中でもER α アゴニスト活性は、ハウスダスト(Suzuki *et al.*, 2013)、室内空気(Kennedy *et al.*, 2009)、表層水(Murk *et al.*, 2002; van der Linden *et al.*, 2008)、環境水中粒子状物質(Murk *et al.*, 2002; Legler *et al.*, 2003)、下水処理水(Murk *et al.*, 2002; van der Linden *et al.*, 2008)、堆積物(Legler *et al.*, 2003; Grung *et al.*, 2011; Houtman *et al.*, 2006)、環境大気中粒子状物質(Houtman *et al.*, 2006)等の様々な媒体で検出されており、評価重要度の高い影響と考えられる。そこで検出された影響のうち、ER α アゴニスト活性を対象として、影響関連物質のプロファイリングを行なった。はじめに、セミマイクロHPLCを用いて縮合型リン系難燃剤の含有成分を分子サイズに応じて分離して分取した画分についてER α アゴニスト活性を評価した。得られた結果を図5に示す。DEG-BDCIPPを除く3種の縮合型リン系難燃剤でER α アゴニスト活性が示された。表3に示している通り、DEG-BDCIPPについては、ER α アゴニスト活性が評価対象製剤で最も低いため、影響関連物質を分離することで得られる活性プロファイルが取得できなかったと考えられた。縮合型リン系難燃剤のER α アゴニスト活性プロファイルを見ると、PBDPPでは溶離時間7分から7.5分にかけて二つのピークが、BPA-BDPPでは7分到一个のピークが、PBDMPPでは7分から8分にかけて二つのピークが、それぞれ示されている。実線で示される示差屈折率は、溶離溶媒と分離された含有成分を含む溶液との屈折率の差を示しており、製剤含有成分の相対的含有量の目安となると考えられる。従って、各製剤でみられる最も大きなピークは、構成比の高い縮合型リン系難燃剤の主要構成成分であるダイマーやトリマー由来と考えられた。活性プロファイルと示差屈折率の結果から、PBDPPについては示差屈折率の最も大きい縮合型リン系難燃剤のピークでER α アゴニスト活性が示されるものの、いずれの製剤についても縮合型リン系難燃剤の主要構成成分である重合体が主要な影響

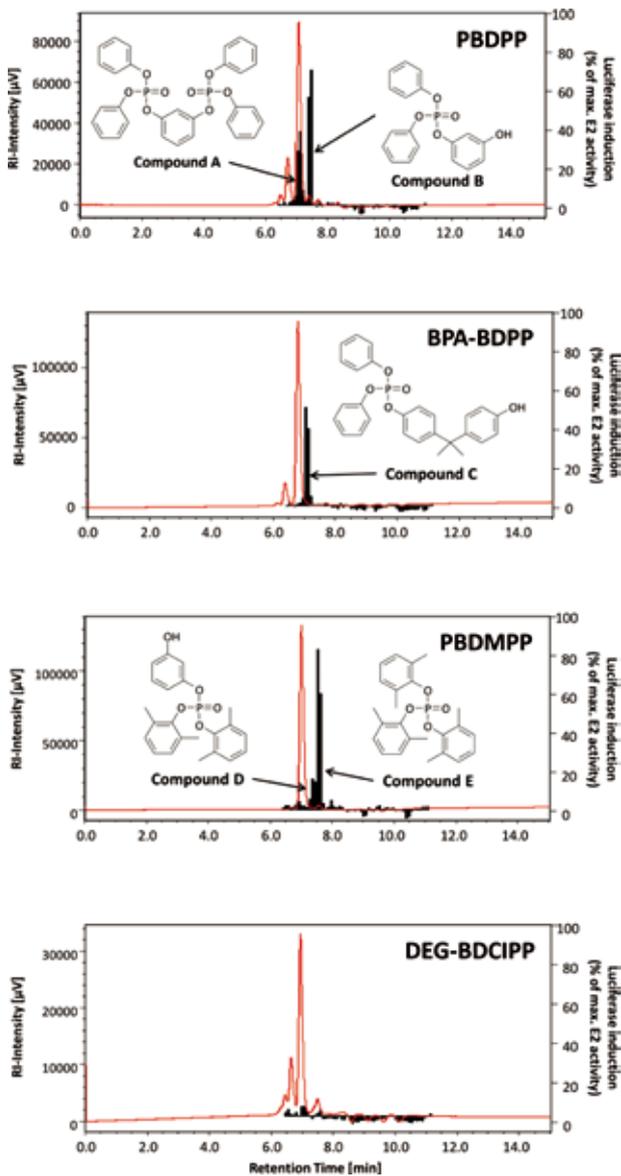


図5 縮合型リン系難燃剤のER α アゴニスト活性プロファイル。—：示差屈折率，■：ER α アゴニスト活性

関連物質ではないと考えられた。リン系難燃剤については、オリゴマー体やポリマー体といった縮合型にすることによって、環境放散性が低くなることが良く知られている。これに加えて、本研究の結果から、リン系難燃剤の縮合型化は、分子量が上がることで分子サイズが大きくなり、生物利用能や毒性発現能を低下させると考えられた。

縮合型とモノマー型リン系難燃剤以外の構成成分(非意図的副生物)の影響への関与を推定するため、ER α アゴニスト活性を示す画分と、活性を示さない前後の画分について、LC/QToFMSによるMS測定を行い、分子量関連イオンの精密質量に基づいて元素組成を決定して画分含有成分を推定すると共に、そのピーク面積を求めた。各画分含有成分のピーク面積と相対活性の関係性から、影響関連物質を推定した。PBDPPでは、対象画分にTPHPのダイマー(PBDPP)とトリマー、HP-DPHPが検出され、

PBDPP(図5 Compound A)とHP-DPHP(図5 Compound B)がER α アゴニストと推定された。BPA-BDPPでは、対象画分にBPA-BDPPとBPA-DPHPが検出され、BPA-DPHP(図5 Compound C)がER α アゴニストと推定された。PBDMPPでは、HP-2,6-DDMPP、TDMPP、TDMPPのダイマー(PBDMPP:PBDMPPの構成主体)が検出され、HP-2,6-DDMPP(図5 Compound D)とTDMPP(図5 Compound E)がER α アゴニストと推定された。影響関連物質については、合成等によって化学物質標準品を入手して物質同定を行い、製剤含有濃度や影響の強度を調査することでそのリスク性を評価することが可能となる。

3.4. 縮合型リン系難燃剤が示す影響に関する見解

本研究では、縮合型リン系難燃剤が構成主体として含まれる工業製剤で、ER α アゴニスト活性、ARアンタゴニスト活性及びPRアンタゴニスト活性を検出した。その影響の強度は、関連性のあるモノマー型リン系難燃剤と比較して低いと考えられた。縮合型リン系難燃剤については、縮合型にすることによって、環境放散性が低くなるだけでなく、生物利用能も低くなり毒性発現能も低下することが推察された。これは、オリゴマー体やポリマー体といった縮合体化が環境負荷低減化や安全性確保の観点から、化成品の適切なデザインとなり得ることを示唆する。一方で、縮合型リン系難燃剤含有の非意図的副生物の影響への関与が示された。本研究では、水酸基が導入された非意図的副生物の影響への関与が想定されており、気相経路だけでなく水相経路の環境放出とそれに伴う毒性等リスク性を考えていく必要がある。縮合体化という化成品デザインについては、構成主体ではなく、その製造プロセスで生じる未反応モノマーや水酸化体等の非意図的副生物のリスク性に着目する必要があるかもしれない。縮合型リン系難燃剤については、今後使用量が増えていく可能性が高く、含有製品の製造や使用、廃棄物処理、リサイクルといったライフサイクルにおける非意図的副生物の挙動把握と必要に応じたリスク管理が重要な課題と考えられる。

4. 結論

本研究では、市販されている縮合型リン系難燃剤の4製剤を対象として、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイとLC/QToFMSによる影響指向分析を行った。縮合型リン系難燃剤の含有成分を評価したところ、未反応モノマーと考えられるモノマー型リン系難燃剤が数%オーダーで検出され、PBDPP及びBPA-BDPPにはTPHPが2.0%及び1.2%、PBDMPPにはTDMPPが2.8%、DEG-BDCIPPにはTCIPPが5.7%、それぞれ含まれていた。また、化学物質標準品がないため定量はできていないが、

モノマー型リン系難燃剤以外にも、PBDPPでは5成分、BPA-BDPPでは5成分、PBDMPPでは3成分、DEG-BDCIPPでは8成分の含有成分の存在が明らかとなった。非意図的副生物を含む縮合型リン系難燃剤の影響を評価した結果、ER α アゴニスト活性、ARアンタゴニスト活性及びPRアンタゴニスト活性が検出された。縮合型リン系難燃剤で検出される影響の種類は、含有モノマー型リン系難燃剤で検出されるものと概ねよく一致していた。一方で、実験的に評価された縮合型リン系難燃剤の影響強度は、含有モノマー型リン系難燃剤の濃度から想定される影響強度に比べて高い傾向にあり、モノマー型リン系難燃剤以外の含有成分の影響への関与が想定された。セミマイクロHPLCによる製剤含有成分の溶離時間に応じた分離を行ない、得られた画分について *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ/LC/QToFMSによる影響評価/ノンターゲット分析を実施して、ER α アゴニスト活性を対象とした影響関連物質の推定を実施した。本研究で対象とした4製剤については、縮合型リン系難燃剤そのものが主要なハザード寄与物質ではないと考えられた。本研究の結果から、リン系難燃剤の縮合型化は、分子量が上がることで、生物利用能や毒性発現能を低下させ、結果として影響の強度を低くすることが示唆された。一方で、縮合型リン系難燃剤のER α アゴニスト活性には、モノマー型リン系難燃剤だけではなく、水酸基が導入されている関連物質の関与があると推定された。本研究の結果は、縮合体化の化成品デザインとしての有用性と共に、含有される非意図的副生物の環境放出や毒性等リスク性の評価の必要性を示した。

謝 辞

本研究は、環境研究総合推進費(3K133001)及びJSPS 科研費(17K00641)の助成を受けた。研究遂行に関しては、国立研究開発法人国立環境研究所の道中智恵子氏、米岡恭子氏、高木博夫氏の協力を得た。研究の構想については、滝上英孝氏の助言を得た。

引用文献

- Brady, B. L., Bright, D. A. and Schafer, F. M. (1995) Process for the manufacture of poly (hydrocarbylenaryl phosphate) compositions. *U. S. Patent*, 5, 457, 221, to Akzo Nobel, N. V. (October 10, 1995)
- Brandsma, S. H., Sellstrom, U., de Wit, C. A., de Boer, J. and Leonards, P. E. G. (2013) Dust measurements of two organophosphorus flame retardants, resorcinol bis (diphenylphosphate) (RDBPP) and bisphenol A bis (diphenylphosphate) (BPA-BDPP), used as alternatives for BDE-209. *Environmental Science and Technology*, 47, 14434-14441.
- Bright, D. A., Dashevsky, S., Moy, P. Y. and Williams, B. J. (1997) Resorcinol bis (diphenyl phosphate), a non-halogen flame-retardant additive. *Journal of Vinyl and Additive Technology*, 3, 170-174.
- 大八化学工業株式会社(1988)難燃剤の製造方法, 特開昭 63-227632号.
- 大八化学工業株式会社(1996)含ハロゲン系縮合リン酸エステル製造方法, 特開平 8-259577号.
- 大八化学工業株式会社(2019)難燃剤の製品一覧. Retrieved from http://www.daihachi-chem.co.jp/product_search/pdf/itiran_01.pdf
- Despinasse, M. C. and Scharrel, B. (2012) Influence of the structure of aryl phosphates on the flame retardance of polycarbonate/acrylonitrile-butadiene-styrene. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 2571-2580.
- Grung, M., Næs, K., Fogelberg, O., Nilsen, A. J., Brack, W., Lübcke-von Varel, U. and Thomas, K. V. (2011) Effects-directed analysis of sediments from polluted marine sites in Norway. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74, 439-454.
- Gunkel, L. T. and Barda, H. J. (1992) *European Patent Application*, 485, 807, FMC Corporation (May 20, 1992).
- Hamers, T., Kamstra, J. H., Sonneveld, E., Murk, A. J., Kester, M. H., Andersson, P. L., Legler, J. and Brouwer, A. (2006) In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological Science*, 92, 157-173.
- Houtman, C. J., Booij, P., Jover, E., Pascual del Rio, D., Swart, K., van Velzen, M., Vreuls, R., Legler, J., Brouwer, A. and Lamoree, M. H. (2006) Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses. *Chemosphere*, 65, 2244-2252.
- Kamishima, M., Hattori, T., Suzuki, G., Matsukami, H., Komine, C., Horii, Y., Watanabe, G., Oti, T., Sakamoto, H., Soga, T., Parhar, I. S., Kondo, Y., Takigami, H. and Kawaguchi, M. (2018) Early-life exposure to Tris (1,3-dichloroisopropyl) phosphate induces dose-dependent suppression of sexual behavior in male rats. *Journal of Applied Toxicology*, 38, 649-655.
- 環境省(2013)有機顔料中に副生するポリ塩化ビフェニルの有無等に関する再分析調査結果をまとめま

- した(お知らせ). Retrieved from <http://www.env.go.jp/press/16635.html>
- Kennedy, K., Macova, M., Leusch, F., Bartkow, M. E., Hawker, D. W., Zhao, B., Denison, M. S. and Mueller, J. F. (2009) Assessing indoor air exposures using passive sampling with bioanalytical methods for estrogenicity and aryl hydrocarbon receptor activity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 1413-1421.
- Legler, J., Leonards, P., Spenkellink, A. and Murk, A. J. (2003) In vitro biomonitoring in polar extracts of solid phase matrices reveals the presence of unknown compounds with estrogenic activity. *Ecotoxicology*, 12, 239-249.
- Levchik, S. V., Bright, D. A., Moy, P. and Dashevsky, S. (2000) New developments in fire retardant non-halogen aromatic phosphates. *Journal of Vinyl and Additive Technology*, 6, 123-128.
- Matsukami, H., Tue, N. M., Suzuki, G., Someya, M., Tuyen, L. H., Viet, P. H., Takahashi, S., Tanabe, S. and Takigami, H. (2015a) Flame retardant emission from e-waste recycling operation in northern Vietnam: Environmental occurrence of emerging organophosphorus esters used as alternatives for PBDEs. *Science of The Total Environment*, 515, 492-499.
- Matsukami, H., Suzuki, G. and Takigami, H. (2015b) Compositional analysis of commercial oligomeric organophosphorus flame retardants used as alternatives for PBDEs: Concentrations and potential environmental emissions of oligomers and impurities. *Environmental Science and Technology*, 49, 12913-12921.
- Murk, A. J., Legler, J., van Lipzig, M. M., Meerman, J. H., Belfroid, A. C., Spenkellink, A., van der Burg, B., Rijs, G. B. and Vethaak, D. (2002) Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 16-23.
- Pakalin, S., Cole, T., Steinkellner, J., Nicolas, R., Tissier, C., Munn, S. and Eisenreich, S. (2007) *European Report EUR 22693 EN*.
- Pawlowski, K. H. and Scharrel, B. (2007) Flame retardancy mechanisms of triphenyl phosphate, resorcinol bis (diphenyl phosphate) and bisphenol A bis (diphenyl phosphate) in polycarbonate/acrylonitrile-butadiene-styrene blends. *Polymer International*, 56, 1404-1414.
- Rossi, M. and Heine, L. (2007) The green screen for safer chemicals: Evaluating flame retardants for TV enclosures Clean Production Action.
- 酒井伸一・滝上英孝(2013)臭素系ダイオキシン類の発生と制御に関する現状と展望. *環境化学*, 23, 129-135.
- Suzuki, G., Tue, N. M., Malarvannan, G., Sudaryanto, A., Takahashi, S., Tanabe, S., Sakai, S., Brouwer, A., Uramaru, N., Kitamura, S. and Takigami, H. (2013) Similarities in the endocrine-disrupting potencies of indoor dust and flame retardants by using human osteosarcoma (U2OS) cell-based reporter gene assays. *Environmental Science and Technology*, 47, 2898-2908.
- 鈴木 剛・滝上英孝・渡部真文・酒井伸一(2013)臭素系難燃剤に含まれる不純物としての2,4,6-トリプロモフェノールの同定. *環境化学*, 23, 123-127.
- 鈴木 剛・鈴木弥生・滝上英孝・吉永 淳・高木麻衣・中山祥嗣(2014)エコチル調査パイロット調査におけるハウスダスト中樹脂添加剤等の測定. *環境科学会 2014 年会, 講演要旨集*, 216-217.
- van der Linden, S. C., Heringa, M. B., Man, H. Y., Sonneveld, E., Puijker, L. M., Brouwer, A. and van der Burg, B. (2008) Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science and Technology*, 42, 5814-5820.



鈴木 剛 / Go Suzuki

国立環境研究所主任研究員。1977年9月広島県呉市生まれ。2005年3月岩手大学大学院連合農学研究科修了, 博士(農学)。国立環境研究所 NIES ポスドクフェロー, 愛媛大学沿岸環境科学研究センター日本学術振興会特別研究員 (SPD), アムステルダム自由大学環境研究所客員研究員, 国立環境研究所任期付研究員を経て, 2015年4月より現職。哺乳類細胞を用いるレポーター遺伝子アッセイ法や模擬消化液を用いる溶出試験法等の生化学的手法と機器分析手法を統合して, 製品ライフサイクルを通じて排出される化学物質の排出実態把握・曝露影響評価・リスク管理に従事。



松神秀徳 / Hidenori Matsukami

国立環境研究所任期付研究員。1977年3月北海道札幌市生まれ。2016年3月東京大学大学院新領域創成科学研究科修了, 博士(環境学)。株式会社島津テクノロジー, 日本ウォーターズ株式会社, 国立環境研究所准特別研究員及び特別研究員を経て, 2018年4月より現職。廃棄物の処理・資源化施設における短鎖塩素化パラフィン類やリン系難燃剤等の製品含有化学物質の排出実態調査に従事。