研究成果報告書 科学研究費助成事業





6月28日現在 今和 3 年

機関番号: 1 3 7 0 1
研究種目: 基盤研究(C)(一般)
研究期間: 2018 ~ 2020
課題番号: 18K04418
研究課題名(和文)水溶性ナノマテリアルの定量法の開発と下水から取込んだ有機汚染物質との複合影響評価
研究细眄夕(英文)Development of analytical methods for hydrophilic persentarials (UNMa) and
m先課題名(英文) Development of analytical methods for hydrophilic handmaterials (hinks) and evaluation of the combined effect on aquatic biota caused by HNMs and organic
pollutants incorporated in wastewater
研究代表者
鈴木 裕識(Yuji, Suzuki)
岐阜大学・工学部・准教授
研究者番号:20762272
交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):水溶性ナノマテリアルを対象に、下水処理場および下流水環境中の動態と生物への毒 性影響の把握を目的として研究を行い、(1)下水処理場の通日調査から、ナノ粒子としてのTiO2は全チタンより も下水処理水中に残存しやすい傾向を把握するとともに、(2)有機系HNMsの一つとして水酸化フラーレンに着目 し、残留性微量有機汚染物質のーブーレクルオクタンスルホン酸と共存させてブラフィッシュへ曝露試験 を行った結果、奇形発生率とメタボローム解析の両方の観点から、同時曝露系でゼブラフィッシュへの影響が大 きくなり、複合影響が生じることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義 本研究では、水環境中の水溶性ナノマテリアルの存在実態と挙動について未だ知見がほとんどみられない中、下 水処理場における現地調査により無機系のTiO2について下水処理過程における存在濃度および挙動を把握すると ともに、有機系のC60-OHとPFOSの同時曝露によるゼブラフィッシュへの複合影響を室内実験により示した。本研 究で得られた知見は限られたナノマテリアルや影響対象生物種に関するものにはなるが、今後ますます環境中へ の排出量が増加すると考えられる水溶性ナノマテリアルの汚染制御に資するものである。

研究成果の概要(英文): This study was aimed to understand the behavior of hydrophilic nanomaterials during wastewater treatment processes and in the downstream environment. The main achievements were as follows; 1) The smaller particles nano-TiO2 were indicated to remain more in treated wastewater than the larger particles and 2) The co-existence and exposure of C60-OH and PFOS to zebrafish resulted in more effects on its growth in terms of teratogenic and metabolic abnormality.

研究分野: 環境工学

キーワード: ナノマテリアル 水溶性 下水 酸化チタン 水酸化フラーレン PFOS ゼブラフィッシュ 複合影響

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に ついては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様 式 C-19、F-19-1、Z-19(共通) 1. 研究開始当初の背景

近年、外寸 100 nm 以下に合成されたナノマテリアル(以下、NMs)が市場に出回るようになった。その物理化学的特性は従来サイズとは異なり、新たな環境影響を起こすことが指摘されている¹⁾。産業界や日用品中で使用された NMs は下水道に流入していると考えられるが、炭素系素材の場合、同時に流入する有機汚染物質を取込んで輸送媒体となる恐れがあり、処理水が放流先に及ぼす複合影響が懸念される。一方、国内外の影響評価研究を調べると、経口曝露評価等の大気を対象とした研究取組みが多く、水環境を介した健康・生態影響に関する知見が少ない。調査事例では、東京都の水道水と多摩川河川水中のフラーレン(代表的な NMs)の分析報告があるが、すべて検出下限値以下であった²⁾。これまでは主な研究対象が水に溶けにくい NMs であったために、水環境中に現存する NMs の汚染実態を正しく把握できていない可能性がある。本研究では、ここ数年で新たに開発されてきた水溶性ナノマテリアル(以下、HNMs)に着目する。

2. 研究の目的

新素材である水溶性ナノマテリアル (HNMs) は、従来のナノマテリアルと同様の毒性影響が 懸念されるとともに、水環境中への残留性や有機汚染物質の水中における輸送媒体となる恐れ がある。本研究では、生活排水や産業排水の公共用水域への経路である下水処理場に着目し、下 水中における HNMs の動態と生物への毒性影響を把握することを目的として、1)下水処理過 程における酸化チタン粒子 (TiO₂)の挙動調査、2)質量分析技術を用いたポリ水酸化フラーレ ン (C₆₀(OH)_n)の分析方法の検討、3)C₆₀-OH存在下におけるペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)がゼブラフィッシュに及ぼす影響評価を実施した。

3. 研究の方法

(1) 下水処理過程における TiO2の挙動調査

TiO₂の下水処理過程における挙動を把握するために、2018 年 6 月 14 日 13 時から 6 月 15 日 13 時にかけて、国内の下水処理場で通日調査を実施した。6 地点の下水処理工程(流入原水、 最初沈殿池流入水、最初沈殿池流出水、反応槽流出水、最終沈殿池流出水、放流水、返送汚泥) から 2 時間毎に採水し、各々をスポット試料として 50 mL ずつ保管すると共に、地点別に 13 回の採取試料を 1 L ずつ混合することで各地点のコンポジット試料を作成した。初沈汚泥は、 採水開始時と終了時に採泥した 2 試料を混合し、コンポジット試料とした。前処理は硝酸と塩 酸を用いたマイクロ波分解法により行い、ICP-OES (iCAP7000、Thermo Fisher Scientific) により 全 Ti 濃度を測定した。また、TiO₂成分は孔径 0.1 μm の PVDF 膜でろ過した後に ICP-OES に供 した。各地点の Ti 濃度と流量から物質収支を算出した。

(2) 質量分析技術を用いた C60(OH)n 分析方法の検討

標準品 Polyhydroxylated fullerenes, water soluble (C₆₀(OH)_n · mH2O(n>40, m>8, Sigma-Aldrich)を 用いて質量分析条件を検討した。まず、従来型の装置である LC-MS/MS (LC 部: Agilent1100 、 Agilent、MS 部: API4000、SCIEX)を用いたインフュージョン法によりプリカーサーイオンのス ペクトルの確認を試みた。測定条件は、イオン化法として ESI と APCI の 2 通り、イオン化モー ドとして正イオンと負イオンの 2 通り、移動相としてメタノールのみと 5mM 酢酸アンモニウム in メタノールの 2 通り、イオン化電圧として 60 V と 120 V の 2 通りの 16 通りを検討した。注入 濃度を 100、300、1,000 µg/L の 3 段階でインフュージョンし、3 点濃度の直線近似の決定係数(R^2) が 0.9 以下のスペクトルを排除しつつ、有力なスペクトルを検討した。

次に LC-QToF-MS で得られるデータ非依存 MS/MS 情報を活用して、重合体であるポリ水酸 化フラーレンの分析手法を検討した。 $C_{60}(OH)_n \cdot mH2O$ (n>40, m>8)を 0、 0.5、 1.0、 5.0、 10、50 µg/L となるようメタノールと超純水 (1/1, v/v)を用いて調整し、LC-QToF-MS (Waters)に 供した。イオン化は ESI 法を用いた。また、水環境模擬試料としてゼブラフィッシュの飼育水 中に $C_{60}(OH)_n$ を添加したもの(試料 A)、他の有機汚染物質として PFOS を添加したもの(試料 B)、コントロール(無添加、試料 C)を各 *n*=20 作成し、測定に供した。全測定時間において 10-40 V のコリジョン電圧を無段階(ステップレス)でかけて、測定データを取得し、データ非 依存 MS/MS 情報として取り込んだ。

(3) C60-OH 存在下における PFOS がゼブラフィッシュに及ぼす影響評価

HNMs と有機汚染物質の複合影響を検討するために、有機汚染物質として環境水中での検出 率が高く、また、残留性の高い PFOS に着目し、C60-OH 存在下における PFOS がゼブラフィ ッシュに及ぼす影響評価実験を行った。産卵から6時間以内のゼブラフィッシュの卵を6種試験水、 ①DMSO(15 mg/L)、②C₆₀-OH (10 mg/L)、③PFOS(5 mg/L)、④PFOS(10 mg/L)、⑤PFOS(5 mg/L)+ C₆₀-OH (10 mg/L)、⑥PFOS(10 mg/L) + C₆₀-OH (10 mg/L)に暴露した(図 1)。卵(27-32 個、n=3)を各 試験溶液 30 m/L に入れ、26°C、明期 16h/暗期 8h で飼育し、試験水は 3 日目で一度換水した。孵化 から4 日目 (暴露開始から7 日目)の個体を採取し、生残率、奇形率、切片観察、メタボローム解析を 行った。奇形率については、各条件下の稚魚(27-34 匹)に対し、imageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html)を用いて、体長、目の幅、体の折れ曲がり角度を測定し、解析



を行った(図 2)。メタボローム解析については、各条件で飼育した稚魚 30 匹を1サンプルとして代謝物 を抽出し、CE-TOFMS(Agilent)を用いて測定した。残りの個体は切片観察に用いた。各個体を 4%パラ ホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定した後、パラフィン包埋したサンプルの切片を作成し、HE 染色後、顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) 下水処理過程における酸化チタン粒子(TiO2)の挙動調査

下水処理場内の物質収支を計算した結果を図3 に示す。全 Ti 負荷量は、流入時点で 223 g-Ti/day であったが、放流時には 17.8 g-Ti/day にまで減少しており、下水処理工程を経ることで 約92%が減少していた。最初沈殿池に流入した全 Ti 負荷量の68.3%が初沈汚泥に、最終沈殿池 に流入した全 Ti 負荷量の約100%が活性汚泥に移行していた。

粒径別の Ti 濃度を図4 に示す。下水の全 Ti 濃度は、流入時点で 36 µg-Ti/L であったが、放流時には 3.1 µg-Ti/L にまで減少し、下水処理工程を経ることで 91.4%減少していた。一方で、 TiO₂ナノ粒子は、流入時点で 1.8 µg-Ti/L 、放流時で 0.76 µg-Ti/L であり、下水処理前後で 57.3% の減少であった。放流水に含まれる TiO₂ ナノ粒子の Ti 濃度は、粒径 0.22 µm 以下の TiO₂ 粒子 を対象とした他国の結果(1.6 µg-Ti/L)⁴と同程度であり、また流入原水に含まれる全 TiO₂ 粒子 に占めるナノ粒子の割合は約 5 %と低かった。

(2) 質量分析技術を用いた C60(OH)n分析方法の検討

① LC-MS/MS を用いた検討

検討した 16 種の測定条件のうち、有力なスペクトルが検出されたのは、ESI(+)、移動相メ タノール、イオン過電圧 60Vの条件であった。その時の最大注入濃度1,000 µg/L における C₆₀(OH)_n のマススペクトルを図5 に示す。高強度で検出されたスペクトルに着目すると、 $m/z = 500 \sim m/z$ =1,000 程度の範囲において、m/z = 537, m/z = 611, m/z = 685, m/z = 759, m/z = 833, m/z = 907 の m/z = 74 毎 の特徴的なスペクトルパターンがみられた。m/z = 74 毎のパターンを C₆₀(OH)_n からの部分構造の 脱離であると考えると、C₂H₂O₃ が一つずつ脱離したものがスペクトルとして検出されていると 推測された。しかし、その他にも C,H,O で構成され得る m/z = 74 としては C₃H₆O₂、C₄H₁₀O があ

り、C₃H₆O₂では酢酸メチルとの 分離が容易ではない。また、既 報に示されている通り、周辺器 具からのコンタミネーション としてシリコン樹脂由来のス ペクトル (Si(CH₃)₂O) がみられ る可能性があり⁵⁾、C₆₀(OH)_n由 来のスペクトルが検出される としても *m/z*=74 を用いた条件 では他物質との分離が不十分 となることが懸念された。ま



た、高強度スペクトルからはプリカーサーイオンとして添加物質 $C_{60}(OH)_n \cdot mH2O$ (n>40, m>8) にあてはまるスペクトルを検出されなかった。次に、3 点濃度の直線近似の決定係数(R^2)が 0.9 よ り大きく、[M]+として添加物質の条件にあてはまるスペクトルを探索したところ、m/z=1,655 に おいて C60 (OH)₅₅ とみられるスペクトルが全 3 段階の添加濃度(100、300、1,000 µg/L) で検出 され、これらを直線近似した時の決定係数は 0.907 であった。しかしながら、添加濃度 100 µg/L のスペクトルは夾雑スペクトルと同程度の強度となり、対象物質として明確な測定条件は見出 せなかった。また、重合体である $C_{60}(OH)_n$ に対して、m/z=1,655 以外検出されていないことから、 測定条件のさらなる最適化が必要であることが示された。

LC-QToF-MS を用いた検討

ESI 正モードで得られた測定データについて、標準試料やブランクを含む合計 78 試料のいず れかから確認されたピークの合計数は 2,376 個であった。これらから、強度 1,000 未満、標準品 データを直線近似した時の R^2 が 0.9 未満であったものを排除し、残ったスペクトルの妥当性を 精査した結果、保持時間 RT=24.990 と 15.9785 における 2 つのピークが見出された。このうち RT=24.990 のピークは強度が高かったが、水環境模擬試料と照合すると、 C_{60} (OH)_n無添加の試料 B や試料 C からも検出され、夾雑ピークであることが示唆された。一方で、RT=15.9785 のピー クは試料 A で全 20 試料から検出され、試料 B と C のどれからも検出されなかった。この RT で検出されたピークのうち最大の信号強度は *m/z*=360.311 でみられた。*m/z*=360.311 はフラーレ ン C60 の分子量 720 の半数 360 に対し質量誤差が 863.1 ppm であった。この誤差は小さくは ないものの、安定同位体を持つ炭素を多く含む化合物としての特徴である、m/z 値が 1 つ違い のスペクトル群が近傍にみられたことから、m/z=360.311 が C₆₀(OH)_n のプロダクトイオンであ る可能性が示唆された。

正モードの ESI 正モードで得られた測定データでは m/z=44 毎の特徴的なスペクトルパターン がみられ、C₆₀(OH)_n との関連が示唆されたが、ポリエチレングリコールの部分構造やエチレンオ キシドである可能性の高い C₂H₄O との分離が容易ではなく、関連イオンとして有効なスペクト ルは見出せなかった。今後は、データ取り込み手法や正確な絞り込み手順の検討により、物質の 同定に資する有力なスペクトルを決定する必要がある。LC-QToF-MS によるデータ非依存測定手 法が適用可能となれば、従来の環境汚染物質の一斉分析と同時に C₆₀(OH)_n の分析も達成でき、 効率化を図れることから、今後のさらなる検討が求めれる。

(3) C₆₀-OH 存在下における PFOS がゼブラフィッシュに及ぼす影響評価

生理学的検討

水溶性ナノマテリアルである C₆₀-OH 存在下での PFOS の影響を明らかにするため、ゼブラフィッシュ ュ卵に PFOS と C₆₀-OH を曝露し、その影響を検討した。各条件下におけるゼブラフィッシュの生残率を 検討したところ、いずれの条件でも孵化4日目では、生残率に影響が見られなかった(図6)。一方、C₆₀-OH の存在に関わらず PFOS 存在下では、脊柱の湾曲や、泳げず横たわった状態の個体が多数確認さ れた。既存の論文では、ゼブラフィッシュに PFOS を曝露すると、体長が短くなり、脊柱の湾曲症状が観 察されることが報告されている^{6,7,8}。そこで、ゼブラフィッシュの奇形率について検討を行った。体長、目 の幅、脊柱の湾曲角度について検討を行ったところ、PFOS(5 mg/L)では、C₆₀-OH の有無に関わらず いずれも大きな差は見られなかったが、PFOS(10 mg/L)では、C₆₀-OH が存在すると、体長が短く、脊柱 の湾曲角度と目の幅が小さくなる個体が増加することが明らかになった(図7,8)。また、PFOS(10 mg/L) +C₆₀-OH では、特に体長が短い個体で頭部の膨らみが観察された(図8-⑥)。ゼブラフィッシュに PFOS を曝露すると、浮袋が委縮することが報告されている^{6,7,8}。本研究でも同様に、ゼブラフィッシュ





図9 ゼブラフィッシュの切片観察

の切片観察では、PFOS(10 mg/L)と PFOS(10 mg/L)+C₆₀-OH の両者に 浮袋の萎縮(**図9黄色破**線)が確認 されたが、特に PFOS(10 mg/L)+ C₆₀-OH では腹部に浮腫が確認され た(**図9黄色矢印**)。これらの結果か ら、PFOS と C₆₀-OH が共存すると、 ゼブラフィッシュに及ぼす影響が大 きくなることが推察された。

② メタボローム解析

各条件下でのゼブラフィッシュを 用いて、メタボローム解析を行った。 PFOS(10 mg/L)+C₆₀-OH で特異的 な生理学的特徴が観察されたこと から、本条件下でのサンプルを中 心として解析を行った。コントロール に比べて 1.5 倍以上を示す誘導代 謝物は26物質、0.75倍以下の抑制 代謝物は 69物質であった。これら 誘導代謝物のうち、PFOS(10 mg/L) に比べて PFOS(10 mg/L)+C₆₀-OH で 1.2倍以上増加した代謝物を表1 に示す。15物質のうち4物質はプリ ン合成に関与する代謝物であり、2

曝露条件で特異的に誘導された代謝物 PFOS5pr PFOS10ppm +C60-OH C60-OH PFOS5ppm PFOS10ppm +C60-OF Metabolite unction vs vs vs Control Control Control C60-OH С60-ОН 0.30 0.31 0.75 ADP urine bases AMP 0.98 0.66 1.14 1.04 1.55 Salvage pathw 2'-Deoxyguanosine 0.80 2.08 2 00 2 4 8 urine bases 1.34 2.04 0.84 1.37 1.69 Guanosine urine base: 0.87 1.50 14.30 Formiminoglutamic acid iver desease _iver desease Nicotinamide 1.12 0.95 1.23 1.03 1.52 Sepiapterin 0.92 1.20 1.38 1.54 1.67 Ser 0.83 1.95 1.39 2.25 1.90 Cellular Proliferation Methylated compounds N.N-Dimethylglycine 0.99 1.33 1.32 1.31 1.71 Oxidative stress 0.89 1.37 1.60 N¹-Acetylspermidine Differentiation Renal disease. Uremic oxin, Transmethyration NOS inhibitor, Vascula SDMA 0.89 1.26 1.27 1.54 1.66 disease, Methylated compounds, Protein netab Allantoic acid 0.79 0.89 1.11 1.18 1.53 N.D. Betaine aldehvde +H₂O 0.73 1.20 N.D. 0.43 β -Hydroxyisovaleric acid 0.91 0.75 1.23 1.22 1.62 N.D. 0.77 XA0019 0.62 0.60 1.28 1.96 N.D.

倍率 0.125> 0.25-0.125 0.5-0.25 0.75-0.5 1-0.75 1-1.5 1.5-2 2-2.5 2.5-3 3<

物質は肝臓の機能障害に関与する代謝物、2 物質は神経系に関与する代謝物であった。プリンはプリン作動性シグナル伝達に関与する物質として、胎児の発達や様々な疾患に関与することが報告されている ⁹。生理学的検討では、特に PFOS(10 mg/L)+C₆₀-OH で稚魚の発達に影響が見られた事と合わせて考えると、PFOS は単独より C₆₀-OH が共存することで、その影響が増幅されることが推察された。

N.D.: 不検出

<引用文献>

- 1. Zhao, Y., Xing, G. and Chai, Z. (2008). Are carbon nanotubes safe?. *Nature nanotechnology*, **3**(4), 191-192.
- 2. 小杉有希, 冨士栄聡子, 鈴木俊也, 保坂三継, 小縣昭夫, 中江大. (2014). 液体クロマトグラ フー質量分析による水環境中フラーレンの定量. 環境化学, 24(2), 51-55.
- 3. 鈴木裕識, 阿部翔太, 髙沢麻里, 北村友一, 山下洋正. (2020). LC-QToF-MSのdata independent MS/MS情報を活用した下水試料からの共通検出化合物の探索. 第23 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 23, 218-219, 2020
- 4. Khosravi, K., Hoque, M. E., Dimock, B., Hintelmann, H. and Metcalfe, C. D. (2012). A novel approach for determining total titanium from titanium dioxide nanoparticles suspended in water and biosolids by digestion with ammonium persulfate. *Analytica chimica acta*, **713**, 86-91.
- 5. 芳本有史,西本ゆかり,石原千津子,川崎英也,荒川隆一.(2009). 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法で使用する器具からの汚染物質の分析. 分析化学, 58(2), 95-100.
- Huang, H., Huang, C., Wang, L., Ye, X., Bai, C., Simonich, M. T., Tanguay, R. L. and Dong, Q. (2010). Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonicacid (PFOS). *Aquatic toxicology*, 98(2), 139-147.
- Chen, J., Tanguay, R. L., Tal, T. L., Gai, Z., Ma, X., Bai, C., Tilton S. C., Jin, D., Yang, D., Huang, C. and Dong, Q. (2014). Early life perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) exposure impairs zebrafish organogenesis. *Aquatic toxicology*, **150**, 124-132.
- 8. Martínez, R., Navarro-Martín, L., Luccarelli, C., Codina, A. E., Raldúa, D., Barata, C., Tauler, R. and Piña, B. (2019). Unravelling the mechanisms of PFOS toxicity by combining morphological and transcriptomic analyses in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*, **674**, 462-471.
- Huang, Z., Xie, N., Illes, P., Di Virgilio, F., Ulrich, H., Semyanov, A., Verkhratsky, A., Sperlagh, B., Yu, S., Huang, C. and Tang, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1-20.

表1 PFOS(10 mg/L) + C₆₀-OH (10 mg/L)の

5.主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1 . 発表者名

Suzuki, Y., Tsushima, I., Yamagata, N., Yamamura H., Yamashita H.

2.発表標題

Survey on the Occurrence and Behavior of Titanium Dioxide Nanoparticles in a Wastewater Treatment Plant

3 . 学会等名

Water and Environment Technology Conference 2019 (WET2019)(国際学会)

4.発表年 2019年

 1.発表者名 山形仁紀 鈴木裕識 對馬育夫 山村寛 渡辺義公

2.発表標題

下水処理過程におけるTiO2 粒子の物質収支と粒径100 nm 未満の成分比率の把握

3 . 学会等名

第53回日本水環境学会年会

4 . 発表年

2018年~2019年

1.発表者名

鈴木裕識 阿部翔太 村田里美 對馬育夫 髙沢麻里 北村友一 山下洋正

2.発表標題

LC-QToF-MS を用いた水環境試料中のポリ水酸化フラーレンの分析手法の検討

3.学会等名 第55回日本水環境学会年会

4 . 発表年

2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6.研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 周平 (Tanaka Shuhei)	京都大学・地球環境学堂・准教授	
	(00378811)	(14301)	

6	. 研究組織 (つづき)		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
БЩ	對馬 育夫	国立研究開発法人土木研究所・土木研究所(つくば中央研究 所)・主任研究員	
≌究分担者	(Tsushima Ikuo)		
	(50462487)	(82114)	
τп	村田 里美(水上里美)	国立研究開発法人土木研究所・土木研究所(つくば中央研究 所)・研究員	
研究分担者	(Satomi Mizukami-Murata)		
	(10573678)	(82114)	

7.科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関