

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06497・19K21559

研究課題名(和文)魚介類に蓄積する有機ハロゲン化合物のノンターゲットスクリーニングと未知物質の探索

研究課題名(英文) Nontarget screening of organohalogen compounds in marine shellfish and searching for unknown substances

研究代表者

後藤 哲智 (Goto, Akitoshi)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・特定研究員

研究者番号：90825689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、二次元ガスクロマトグラフ-高分解能飛行時間型質量分析計(GCxGC-HRToFMS)及びガスクロマトグラフ-高分解能二重収束型質量分析計(GC-HRMS)を駆使した分析手法を確立し、広島湾の二枚貝と堆積物に残留する有機ハロゲン化合物(OHCs)のノンターゲット/ターゲットスクリーニングを実施した。測定・解析の結果、残留性有機汚染物質(POPs)など既知のOHCsに加え、未知のミックスハロゲン化合物(C₉H₆Br₃ClO, C₉H₅Br₄ClO, C₉H₄Br₅ClO)が沿岸域に遍在し、POPsと同等の高い生物蓄積性を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したノンターゲット/ターゲット分析法を環境モニタリングに適用することで、従来の手法では分離・検出・同定が困難であった化合物(異性体)の網羅的なスクリーニングが可能となり、これまで見落とされてきた毒性化合物の構造解析や起源推定の精緻化が期待できる。本研究では上記のスクリーニング手法を駆使して、海産の二枚貝から新たに生物蓄積性化合物を発見し、学術的に新規性の高い知見を提示した。この成果は、海洋生態系の保全や水産資源の安全性評価に資する有用な基礎データとなることが期待され、その社会的意義や波及効果は大きい。

研究成果の概要(英文)：The present study established analytical methods using two-dimensional gas chromatograph-high resolution time-of-flight mass spectrometer (GCxGC-HRToFMS) and GC-magnetic sector HRMS (GC-HRMS), and performed nontarget/target screening of organohalogen compounds (OHCs) in mussels and sediment from Hiroshima Bay, Japan. The results showed that unknown mixed halogenated compounds (C₉H₆Br₃ClO, C₉H₅Br₄ClO, C₉H₄Br₅ClO), in addition to known OHCs such as persistent organic pollutants (POPs), are ubiquitous in the coastal environment and possess bioaccumulative potential as high as POPs.

研究分野：環境化学

キーワード：有機ハロゲン化合物 GCxGC-HRToFMS 網羅分析 構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル (PCBs) やポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) などの残留性有機汚染物質 (POPs) は、環境残留性や生物蓄積性が高く、ヒトや野生生物に対する毒性影響が懸念されたことから、それらの生産・使用・流通は既にストックホルム条約 (POPs 条約) によって全面的に禁止・規制されている。POPs 条約が発効した 2004 年以降、2 年毎に開催されている締約国会議 (COP) では、上記で述べた性質や毒性が疑われる有害化学物質の追加指定に関する協議がなされており、それらの監視・管理体制の強化に加え、廃絶・使用規制にむけた法的枠組みの整備が国際規模で推進されている。しかしながら、世界的に注目を集めている POPs やその候補物質の多くは、生産・使用実績のある、もしくは非意図的生成の実態が認知されている既知の人工汚染物質に限定される。そのため、構造・起源未知物質を含む潜在的 POPs の網羅的スクリーニングは、多様化する化学汚染のリスク管理において喫緊の課題である。

最近の研究では、沿岸域における POP 様物質の天然生成が明らかにされており¹⁻³、海洋生物への慢性的な曝露が懸念されている⁴。なかでも、特定のハロゲン化ビフェニル (2,2'-diMeO-BB-80)、ジフェニルエーテル (6-MeO-BDE-47)、そしてビピロール (Q1) 類に代表される海洋起源の有機ハロゲン化合物 (HNPs) は、既存 POPs と類似の物理化学特性や毒性を示すことから^{4,5}、その残留レベルの動向や生態影響に大きな社会的・学術的関心が寄せられている。しかしながら、こうした天然有機ハロゲン化合物は法的な監視・規制の対象外であるため、沿岸域に生息する生物の曝露実態や経年変化に関する情報は欠落している。とくに魚食文化圏である日本では、海産の魚介類に蓄積する多様な有機ハロゲン化合物 (人工汚染物質、海洋天然物質、構造・起源未知物質) による複合汚染の実態と動向を把握する必要があり、とくに時系列データの集積は、海洋生態系の保全に加え、水産資源の安全性評価の観点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、海産の魚介類に蓄積する有機ハロゲン化合物の総体を把握し、海域における複合汚染のプロファイルや時空間トレンドを解明することである。具体的には、広島湾のイガイと堆積物を対象に、以下の 3 つの課題に取り組んだ。

- (1) 二次元ガスクロマトグラフ-高分解能飛行時間型質量分析計 (GC×GC-HRToFMS) の測定・解析手法を確立し、イガイに蓄積する有機ハロゲン化合物の網羅的プロファイリングと未知物質の探索・同定を試みた。
- (2) ガスクロマトグラフ-高分解能二重収束型質量分析計 (GC-HRMS) を駆使して、イガイと堆積物に残留する有機ハロゲン化合物濃度を定量し、汚染の地理的分布パターンや経年変化について解析した。
- (3) 生物相-堆積物蓄積係数 (BSAFs) を算出し、イガイに対する既知・未知有機ハロゲン化合物の生物蓄積性を包括的に評価した。

3. 研究の方法

本研究では、愛媛大学・生物環境試料バンク (*es*-BANK) の冷凍保存試料を活用した。具体的には、POPs 汚染の生物指標として広く認知されている二枚貝のイガイ、そして同一海域で採泥した堆積物を分析対象とした。イガイは 2012 年 10 月に山口県と広島県沿岸の 6 地点 (YM-1, HR-1 ~ HR-5)、堆積物は 2012 年 6 月に広島湾の 7 地点 (HB-1 ~ HB-7) でそれぞれ採集した。また 2018 年 7 月には、広島湾の HR-4 地点でサンプリング調査を実施し、イガイ (HR-4M) と堆積物 (HR-4S) を同時に採取した。

試料の前処理法は、既法を一部改変したメソッドを適用した⁶。イガイと堆積物は凍結乾燥した後、toluene 及び acetone/*n*-hexane 混合溶媒 (1:1 v/v) で抽出した。試料抽出液は、内部標準物質 (¹³C₁₂-PCBs, ¹³C₁₂-PBDEs, ¹³C₁₂-6-MeO-BDE-47) を添加し、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) と活性シリカゲルクロマトグラフィーで精製・分画後、脂溶性有機ハロゲン化合物が溶出するフラクション (POPs 溶出画分) を回収した。この溶液は、内部標準物質 (¹³C₁₂-CB-170, ¹³C₁₂-BDE-126/-205) を添加した後、窒素気流化で濃縮・定容した。

イガイの POPs 溶出画分に内在する有機ハロゲン化合物は、GC×GC-HRToFMS のフルスキャンモード (*m/z* 150-750, *R* > 5000, FWHM) で網羅的にスクリーニングした。二次元トータルイオンクロマトグラム (2D TIC) 上で観測されたピークは、保持時間やマススペクトルデータ (精密質量・分子イオンクラスターのハロゲン同位体比・フラグメントパターン) を基に化学構造を解析し、NIST/EPA/NIH mass spectral library 及び SciFinder を活用して化合物の同定を試みた。

上記のノンターゲット分析で定性された有機ハロゲン化合物については、GC-HRMS の選択イオンモニタリングモード (SIM, *R* > 10000, 10% valley) で定量分析をおこない、イガイと堆積物の残留濃度から汚染の時空間分布パターンを解析した。さらに、HR-4M と HR-4S の実測濃度データを基に BSAFs を算出し、イガイに対する各化合物の生物蓄積性を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 有機ハロゲン化合物の網羅的プロファイリング

GC×GC-HRToFMS を駆使したノンターゲット分析の結果、イガイ試料 (HR-4) から 59 種の

有機ハロゲン化合物（異性体）が検出され、マススペクトルを詳細に解析したところ、多数の POPs (PCBs: 36 異性体, OCPs: 7 化合物) や HNP (6-MeO-BDE-47, 2'-MeO-BDE-68, Q1, dibromoindole) が同定された。しかしながら、12 化合物のマススペクトルについては NIST/EPA/NIH mass spectral library に未登録であったため、これらは市場に流通している主要な人工化学物質ではなく、非意図的生成物質もしくは天然物質と考えられた。そのため本研究では、上記 12 化合物を未同定有機ハロゲン化合物として分類し、それらの化学構造や発生・排出起源の推定を試みた。

各未同定化合物の実測精密質量を基に分子イオンの構造を解析した結果、3 種の有機ハロゲン化合物については、示性式が $C_8H_4Br_3N$ 、 $C_9H_6Br_3N$ 、 $C_9H_5Br_4N$ と決定され、それらは tribromoindole、tribromomethylindole、tetrabromomethylindole であることが判明した (図 1)。上記の有機臭素化合物は、紅藻類 (*Laurencia* sp.) が生合成する海産のアルカロイドであることが知られており⁷、実際に *Laurencia* sp. は日本沿岸域に広く分布することが確認されている⁸。したがって、これらのアルカロイドは広島湾沿岸で天然生成されている可能性が高い。

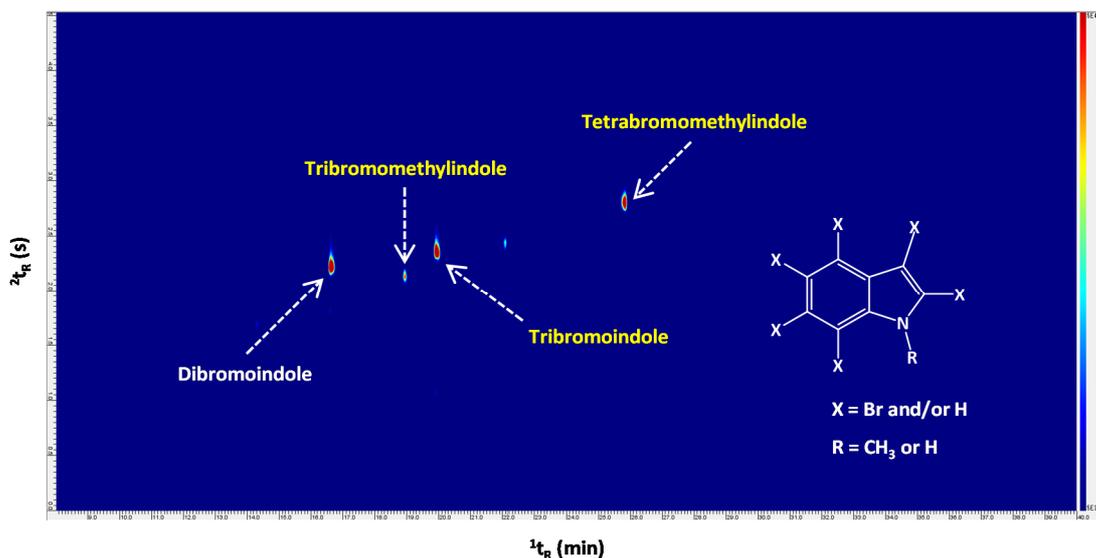


図 1. イガイから検出されたプロモインドール及びそのメチル誘導体の抽出イオンクロマトグラム

残り 9 種の未同定有機ハロゲン化合物について、それらの精密質量、分子イオンクラスターのハロゲン同位体比、そしてフラグメントパターンを詳細に解析した結果、示性式は $C_9H_6Br_3ClO$ (5 異性体)、 $C_9H_5Br_4ClO$ (3 異性体)、 $C_9H_4Br_5ClO$ (1 異性体) と推定された (図 2)。これら未知のミックスハロゲン化合物 (UHC-Br₃₋₅Cl) は、Hoh らの先行研究において検出が報告されており、著者らは 3-chloro-allyl-polybromophenyl ethers を候補物質として提示している⁹。事実、本研究で観測された UHC-Br₃₋₅Cl の実測精密質量は、上記候補物質の理論精密質量と概ね一致していた (mass error < 10 ppm)。この結果は、広島湾のイガイから検出された UHC-Br₃₋₅Cl が 3-chloro-allyl-polybromophenyl ethers であることを示唆している。

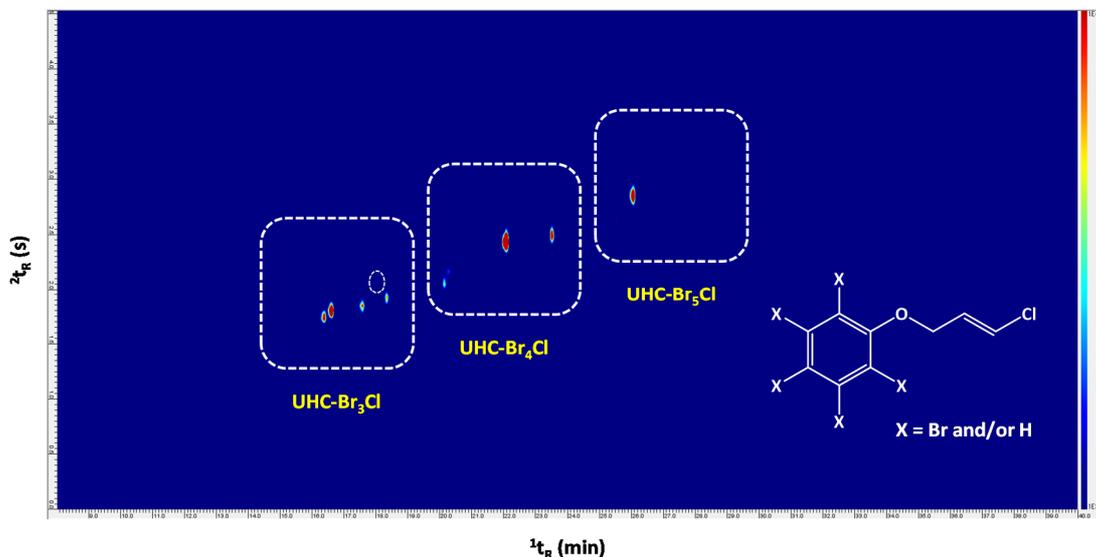


図 2. イガイから検出されたミックスハロゲン化合物の抽出イオンクロマトグラム

SciFinder 検索の結果、3-chloro-allyl-polybromophenyl ethers は 2 種の異性体 (CAS registry nos. 52235-75-3/52235-77-5) がデータベースに登録されていた¹⁰。米国と日本の特許情報によれば、上記化合物には防燃効果が認められているが^{11,12}、商業的な製造実績は日本を含む先進工業諸国において確認されていない¹⁰。興味深いことに、これらの化合物はハロゲン系難燃剤 (HFRs) や HFR 含有製品、そして陸域の環境・生物媒体からは未検出であるにもかかわらず、ノルウェー産タラの肝油や地中海の海綿など^{9,13}、海洋生物から検出が報告されている。以上の知見を考慮すると、広島湾のイガイから検出された UHC-Br₃₋₅Cl (3-chloro-allyl-polybromophenyl ethers) の起源は、陸域ではなく海域に存在するものと推察された。

(2) 有機ハロゲン化合物濃度の地理的分布と経年変化の解析

GC-HRMS 分析の結果、全てのイガイと堆積物試料から多様な有機ハロゲン化合物 (人工汚染物質、海洋天然物質、起源未知物質) が検出され、これらは広島湾の沿岸域に残留していたことが明らかとなった。

イガイから検出された有機ハロゲン化合物の濃度は、中央値で比較すると PCBs が最も高く (660 ng/g lw, 180–4500 ng/g lw)、次いで bromomethylindoles (98 ng/g lw, 40–430 ng/g lw) > UHC-Br₃₋₅Cl (85 ng/g lw, 29–630 ng/g lw) > DDTs (62 ng/g lw, 35–710 ng/g lw) > CHLs (57 ng/g lw, 49–120 ng/g lw) > MeO-PBDEs (55 ng/g lw, 18–330 ng/g lw) > PBDEs (7.8 ng/g lw, 1.2–30 ng/g lw) > Q1 (2.8 ng/g lw, 1.4–15 ng/g lw) > bromoindoles (2.3 ng/g lw, 1.5–1300 ng/g lw) の順であった。特筆すべきことに、UHC-Br₃₋₅Cl は DDTs と同等のレベルでイガイに蓄積し、沿岸域に遍在していたことが判明した。また興味深いことに、UHC-Br₃₋₅Cl は他の有機ハロゲン化合物とは異なる地理的分布パターンを示していた。さらに、2012 年 (HR-4) と 2018 年 (HR-4M) のイガイから観測された UHC-Br₃₋₅Cl 同族体 (異性体) は、年代間で組成割合に大きな差異が認められなかったことから、その特異な曝露源の存在が示唆された。

堆積物から検出された有機ハロゲン化合物の濃度は、中央値で比較すると PBDEs が最も高く (5.9 ng/g dw, 3.4–7.0 ng/g dw)、次いで PCBs (3.9 ng/g dw, 2.6–6.8 ng/g dw) > DDTs (0.90 ng/g dw, 0.50–1.6 ng/g dw) > MeO-PBDEs (0.37 ng/g dw, 0.023–0.58 ng/g dw) > CHLs (0.18 ng/g dw, 0.14–1.2 ng/g dw) > bromomethylindoles (0.11 ng/g dw, ND–0.26 ng/g dw) > Q1 (0.093 ng/g dw, 0.018–0.12 ng/g dw) > UHC-Br₃₋₅Cl (0.066 ng/g dw, ND–0.11 ng/g dw) > bromoindoles (ND, ND–0.44 ng/g dw) の順であった。この残留プロファイルは、イガイで認められた蓄積パターンとは明らかに異なっていた。また先述したように、UHC-Br₃₋₅Cl はイガイに高蓄積していた一方で、堆積物には相対的に低濃度で残留していた。したがって、沿岸域に存在する UHC-Br₃₋₅Cl は堆積物に沈降するよりはむしろ、優先的に生物へ移行・蓄積することが暗示された。

(3) 有機ハロゲン化合物の生物蓄積性評価

イガイ (HR-4M) と堆積物 (HR-4S) から検出された各有機ハロゲン化合物の濃度を基に BSAFs を算出した結果、POPs (CHLs, DDTs, PCBs, PBDEs) は 0.026–8.1 の範囲にあった。一方で HNP (bromoindoles, bromomethylindoles, Q1, MeO-PBDEs) は POPs と log オクタノール-水分配係数 (Log Kow) が概ね同等であるにもかかわらず、BSAFs は 1 桁高値を示していた (HNPs: 0.90–69 vs. POPs: 0.026–8.1)。この差は、堆積物経由の取込みに加え、天然物質を産生する海藻類からの直接的な曝露に起因するものと推察された。また特筆すべきことに、UHC-Br₃₋₅Cl は MeO-PBDEs と BSAFs が同等であり (UHC-Br₃₋₅Cl: 16–85 vs. MeO-PBDEs: 55–69)、その高い生物蓄積性が示唆された。先述したように UHC-Br₃₋₅Cl の起源は不明瞭であるが、HNPs (MeO-PBDEs) に匹敵する高い BSAFs を示した事実を考慮すると、このミックスハロゲン化合物は沿岸域で非意図的もしくは自然的に発生している可能性がある。

UHC-Br₃₋₅Cl (3-chloro-allyl-polybromophenyl ethers) の合成標品は市販されていないため、その毒性評価を試みた研究例は報告されていない。しかしながら、上記化合物と化学構造が類似した allyl 2,4,6-tribromophenyl ether (ATE)、2,3-dibromopropyl-2,4,6-tribromophenyl ether (DPTE)、そして 2-bromoallyl 2,4,6-tribromophenyl ether (BATE) は、抗アンドロゲン活性を示すことが先行研究で明らかにされており、内分泌系のかく乱や脳神経系への毒性が疑われている¹⁴。実際に、これら 3 種の有機臭素化合物 (ATE, BATE, DPTE) は、グリーンランドに棲息するタテゴトアザラシの脂皮や脳から検出が報告されている¹⁵。以上の知見から、本研究で同定された UHC-Br₃₋₅Cl についても野生高等動物種に生物蓄積 (生物濃縮) する恐れがあることから、低次–高次栄養段階生物を対象とした包括的なモニタリング調査に加え、生態毒性リスクの評価が今後求められる。

< 引用文献 >

1. Reddy, C. M.; Xu, L.; O'Neil, G. W.; Nelson, R. K.; Eglinton, T. I.; Faulkner, D. J.; Norstrom, R.; Ross, P. S.; Tittlemier, S. A., Radiocarbon evidence for a naturally produced, bioaccumulating halogenated organic compound. *Environ Sci Technol* 2004, 38, (7), 1992–1997.
2. Teuten, E. L.; Xu, L.; Reddy, C. M., Two abundant bioaccumulated halogenated compounds are natural products. *Science* 2005, 307, (5711), 917–920.
3. Teuten, E. L.; Reddy, C. M., Halogenated organic compounds in archived whale oil: a pre-industrial record. *Environ Pollut* 2007, 145, (3), 668–671.

4. Vetter, W., Marine halogenated natural products of environmental relevance. *Rev Environ Contam Toxicol* 2006, 188, 1–57.
5. Vetter, W.; Gribble, G. W., Anthropogenic persistent organic pollutants-lessons to learn from halogenated natural products. *Environ Toxicol Chem* 2007, 26, (11), 2249–2252.
6. Isobe, T.; Ogawa, S. P.; Ramu, K.; Sudaryanto, A.; Tanabe, S. Geographical distribution of non-PBDE-brominated flame retardants in mussels from Asian coastal waters. *Environ Sci Pollut Res Int* 2012, 19, 3107–3117.
7. Netz, N.; Opatz, T. Marine Indole Alkaloids. *Mar Drugs* 2015, 13, 4814–4914.
8. Saito, Y. Studies on Japanese species of Laurencia, with special reference to their comparative morphology. *Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 1967, 15, 1–81.
9. Hoh, E.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Ngo, H. L.; Vetter, W.; Pangallo, K. C.; Reddy, C. M. Capabilities of Direct Sample Introduction–Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry to Analyze Organic Chemicals of Interest in Fish Oils. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 3240–3247.
10. SciFinder; Chemical Abstract Service (CAS): Accessed November 2019: [Online database: <https://scifinder.cas.org>].
11. Hanson, V. M.; Falloon, B. S.; Meyer, W. Flame retardants for use in styrenic foams. *U.S. Pat. Appl. Publ* 2008, Publ. No.: US 20080221230 A1 20080911.
12. Takehana, K.; Kishikawa, J. Fire-resistant styrene polymers containing 3-chloroallyl bromophenyl ether. *Japan Pat. Appl. Publ* 1973, Publ. No.: JP 48,103,638 A 19,731,226 (in Japanese).
13. Melcher, J.; Janussen, D.; Garson, M. J.; Hiebl, J.; Vetter, W. Polybrominated hexahydroxanthene derivatives (PBHDs) and other halogenated natural products from the Mediterranean sponge *Scalispongia scalaris* in marine biota. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007, 52, 512–518.
14. Kharlyngdoh, J. B.; Pradhan, A.; Asnake, S.; Walstad, A.; Ivarsson, P.; Olsson, P. E. Identification of a group of brominated flame retardants as novel androgen receptor antagonists and potential neuronal and endocrine disrupters. *Environ Int* 2015, 74, 60–70.
15. von der Recke, R.; Vetter, W. Synthesis and characterization of 2,3-dibromopropyl-2,4,6-tribromophenyl ether (DPTE) and structurally related compounds evidenced in seal blubber and brain. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 1590–1595.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tue Nguyen Minh, Matsushita Takafumi, Goto Akitoshi, Itai Takaaki, Asante Kwadwo Ansong, Obiri Samuel, Mohammed Saada, Tanabe Shinsuke, Kunisue Tatsuya	4. 巻 53
2. 論文標題 Complex Mixtures of Brominated/Chlorinated Diphenyl Ethers and Dibenzofurans in Soils from the Agbogbloshie e-Waste Site (Ghana): Occurrence, Formation, and Exposure Implications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 3010 ~ 3017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.8b06929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Goto Akitoshi, Tue Nguyen Minh, Isobe Tomohiko, Takahashi Shin, Tanabe Shinsuke, Kunisue Tatsuya	4. 巻 54
2. 論文標題 Nontarget and Target Screening of Organohalogen Compounds in Mussels and Sediment from Hiroshima Bay, Japan: Occurrence of Novel Bioaccumulative Substances	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 5480 ~ 5488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.9b06998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Goto, A., Tue, N. M., Tanabe, S., Kunisue, T.
2. 発表標題 Target screening for potential dioxin-like compounds in Japanese bivalves using GCxGC-TOFMS
3. 学会等名 The 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Goto, A., Tue, N. M., Tanabe, S., Kunisue, T.
2. 発表標題 Non-target screening for POP-like compounds in Japanese bivalves using GCxGC-HRTofMS
3. 学会等名 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤哲智, Nguyen Minh Tue, 田辺信介, 国末達也
2. 発表標題 起源未知ミックスハロゲン化ダイオキシン類の構造解析と濃縮性評価
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----