

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22911

研究課題名(和文) 化学分析とバイオアッセイの統合手法による核内受容体介在型残留性未知物質の探索

研究課題名(英文) Searching of nuclear receptor-mediated persistent unknown contaminants by an integrated approach of chemical analysis and bioassays

研究代表者

国末 達也(Kunisue, Tatsuya)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：90380287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：野生鳥類5種7検体の肝臓試料を硫酸もしくはゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で精製した抽出液を、芳香族炭化水素受容体(AhR)介在活性の評価が可能なin vitroバイオアッセイに供試したところ、すべての検体でAhRアゴニスト活性が認められ、とくに猛禽類のハヤブサやトビで高い活性値を示した。また、硫酸処理抽出液よりGPC処理抽出液で高いAhRアゴニスト活性が検出されたことから、酸処理で消失するAhRアゴニストの存在が示された。高速液体クロマトグラフィーを用いた詳細分画と機器分析から寄与物質の推定を試みたところ、ダイオキシン類だけでなく多環芳香族炭化水素関連物質の肝臓蓄積が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したin vitroバイオアッセイと機器分析のアプローチ手法は、生物蓄積性を示す未知有害化学物質を探索する上で有用なツールとなり得る。本手法により、日本に棲息する野生鳥類の肝臓にダイオキシン類や多環芳香族炭化水素といった既知のAhRアゴニストだけでなく、AhRアゴニスト活性を示す未同定化合物が蓄積していることを示唆した研究成果は学術的にも重要である。従来のターゲット分析では見落とされていた生態リスクが懸念される生物蓄積性化合物の可能性が高いことから、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約等の要監視化学物質として検討すべき基礎データを提示することができた。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated aryl hydrocarbon receptor (AhR)-agonistic activities in sulfuric acid (H₂SO₄)- or gel permeation chromatography (GPC)-treated liver extracts from 5 wild avian species by using in vitro bioassays. AhR-agonistic activities were observed in all the liver samples, especially with high activities in raptors such as falcon and black kite. The AhR-agonistic activities in GPC-treated liver extracts were higher than those in H₂SO₄-treated liver extracts, suggesting the presence of acid-labile AhR agonist(s). HPLC (high performance liquid chromatography)-fractionation and instrumental analysis approach indicated the accumulation of not only dioxins but also PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)-related compounds, as possible AhR agonists, in the liver of Japanese wild birds.

研究分野：環境化学

キーワード：残留性未知物質 バイオアッセイ 機器分析 核内受容体 生物蓄積

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日常生活の多様化にともない産業界で生産される化学物質種は増大しており、ケミカルアブストラクトサービス(CAS)によると、すでに化学物質の登録数は1億種類を突破した。先進諸国では、生物蓄積性や毒性を示す化学物質の法的な監視・管理体制を強化したが、網羅的な曝露リスク評価は実際に利用されている物質の一部にすぎない。またそれらの代謝・分解産物や副生成物質等も法的規制の対象外であるため、潜在的な有害物質の種類や排出量は年々増加し、それらに起因する汚染や生態影響が表面化する恐れもある。とくに、経済発展の著しい開発途上国では不適切な廃棄物・排水処理等による環境汚染が今後深刻になる可能性が高い。しかしながら、環境残留性未知物質の同定に関する研究はきわめて乏しく、生物濃縮性を明らかにしている研究は存在しない。生活様式の多様化にともない、合成・使用される化学物質種は増大しており、それら物質の環境中への放出・分解・残留・挙動、そして生物への曝露・蓄積を検証することは、化学汚染のリスク管理にとって必須であり先見的な課題といえる。このように、環境残留性、生物蓄積性、そして毒性を示す未同定の化学物質は自然界に多種存在することが予想されるが、その実態はほとんど理解されていない。したがって、環境残留性・生物蓄積性未知化学物質を包括的に探索・同定することは、多様化する化学汚染のリスク管理にとって喫緊の課題といえる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-HRMS)および2次元ガスクロマトグラフ飛行時間型高分解能質量分析計(GC×GC-HRTOFMS)を用いた機器分析技術と細胞内受容体介在活性の評価が可能な *in vitro* アッセイを駆使し、生物蓄積性未知有害化学物質の探索を試みることにある。本研究では、生物蓄積性・細胞内受容体介在活性を有する残留性有機汚染物質(POPs)の高濃度蓄積が認められた野生鳥類に着目し、芳香族炭化水素受容体(AhR)アゴニストの総活性評価と寄与物質の解明を試みた。

3. 研究の方法

・試料

愛媛大学沿岸環境科学研究センター(CMES)の生物環境試料バンク(es-BANK)に冷凍保存されていた国内の野生鳥類5種7検体(ハヤブサ2検体、オオタカ1検体、トビ1検体、アオサギ1検体、カワウ2検体)の肝臓試料を分析対象とした。

・化学分析

肝臓試料の塩素化・臭素化ジベンゾパラダイオキシン/ジベンゾフラン類(PCDD/Fs・PBDD/Fs)およびダイオキシン様ポリ塩化ビフェニル(DL-PCBs)の分析は既報に従い、均質化・抽出した後、硫酸処理および多層・活性炭分散シリカゲルカラムにより精製した。定性・定量には GC-HRMS を用いた。

・*in vitro* バイオアッセイ

AhR アゴニスト活性は、Dioxin Responsive Chemically Activated Luciferase eXpression (DR-CALUX)に加え、用いた細胞系(H4IIE-luc)での代謝が指摘されている多環芳香族炭化水素(PAH)などの易分解性 AhR アゴニストの活性評価に適している PAH-CALUX を併用し測定した。

鳥類の肝臓試料は Figure 1 に示すフローの通り、CALUX アッセイ用に前処理した。まず、凍結乾燥後ホモジナイズし、アセトン/ヘキサン混合溶液で抽出した。得られた粗抽出液を、硫酸処理・硫酸シリカゲルクロマトグラフィーもしくはゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で精製し、DMSO 転溶後、DR-CALUX および PAH-CALUX に供試した。また、GPC で精製した肝臓抽出液は、フラクションコレクターを連結した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で詳細分画し DMSO 転溶後、PAH-CALUX により活性を測定した。各フラクションに溶出する活性寄与物質は、同一 HPLC 条件で分析した標準品(PCDD/Fs, DL-PCBs, PAHs)の保持時間を基に推定した。

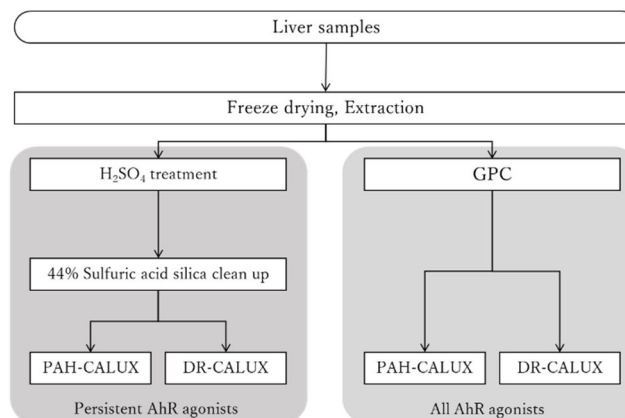


Figure 1. Analytical flow for evaluation of AhR agonist activities in wild birds.

4. 研究成果

(1) 硫酸・GPC 処理抽出液中の AhR アゴニスト活性比較(DR-CALUX)

各鳥種の肝臓試料における硫酸処理抽出液と GPC 処理抽出液を、DR-CALUX により3重測定した AhR アゴニスト活性値を Figure 2 に示す。GPC 処理抽出液に対する硫酸処理抽出液の活性値の平均割合はそれぞれ、72% (ハヤブサ A)、70% (ハヤブサ B)、120% (オオタカ)、79% (トビ)、

66% (アオサギ)、76% (カワウ A)、70% (カワウ B)であり、オオタカ 1 検体を除く 6 検体の GPC 処理抽出液で高かった。この結果から、国内に棲息する野生鳥類の肝臓中には硫酸処理で消失する AhR アゴニスト活性物質が蓄積していることが示唆された。肝臓から検出された PCDD/Fs と DL-PCBs (non-・mono-ortho PCBs)濃度 (PBDD/Fs は未検出)と先行研究で報告された毒性等価係数 (TEF) から毒性等量 (TEQs) を算出した結果、硫酸処理抽出液中の AhR アゴニスト活性と同等の値を示し、活性寄与物質の大半は PCDD/Fs と DL-PCBs であると考えられた。

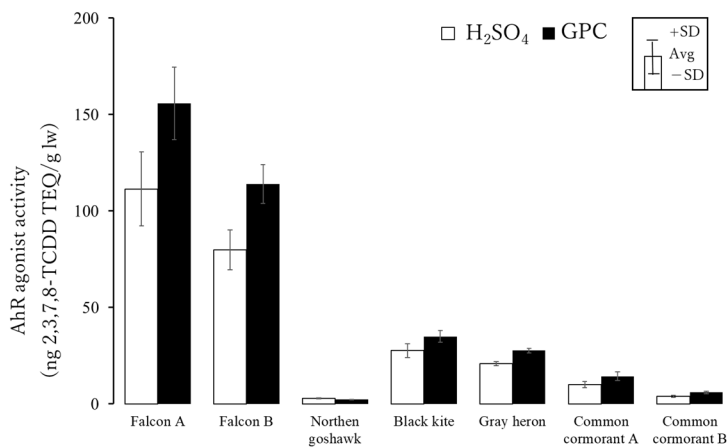


Figure 2. AhR agonist activities in H₂SO₄- and GPC-treated liver extracts from Japanese wild birds (DR-CALUX).

(2) PAH-CALUX による硫酸・GPC 処理抽出液中の AhR アゴニスト活性評価

次に、GPC または硫酸で処理した野生鳥類 (DR-CALUX の結果からハヤブサ・トビ・アオサギ・カワウの 4 検体) の肝臓抽出液を、それぞれ PAH-CALUX に供試した。肝臓試料で観察されたルシフェラーゼ誘導から、BaP に対する比活性値として AhR アゴニスト活性 (BaP eq.) を算出した。その結果、硫酸・GPC 処理したすべての肝臓抽出液から AhR アゴニスト活性が認められた (Figure 3)。硫酸処理抽出液の AhR アゴニスト活性はハヤブサで最も高く (290 ng BaP eq./g lw)、次いでトビ (100 ng BaP

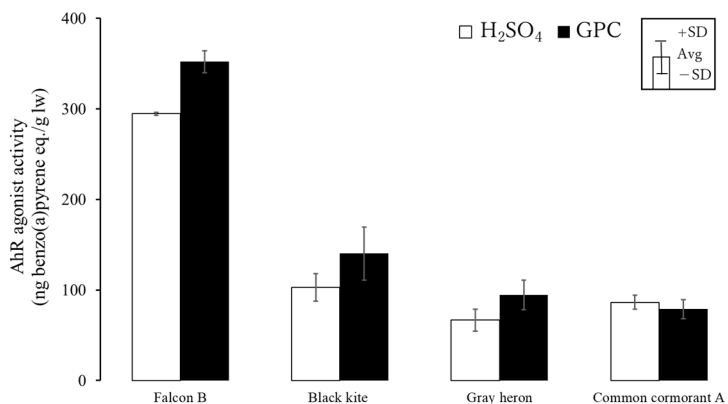


Figure 3. AhR agonist activities in H₂SO₄- and GPC-treated liver extracts from Japanese wild birds (PAH-CALUX).

eq./g lw)、カワウ (86 ng BaP eq./g lw)、アオサギ (67 ng BaP eq./g lw) の順であり、GPC 処理抽出液はハヤブサ (350 ng NaP eq./g lw) > トビ (140 ng BaP eq./g lw) > アオサギ (95 ng BaP eq./g lw) > カワウ (79 ng BaP eq./g lw) であった。硫酸処理抽出液と GPC 処理抽出液中の AhR アゴニスト活性を比較した結果、各検体における GPC 処理抽出液に対する硫酸処理抽出液の活性割合はそれぞれ、84% (ハヤブサ B)、73% (トビ)、71% (アオサギ)、110% (カワウ B) であり、DR-CALUX の結果と同様に、酸処理で消失する AhR アゴニストの蓄積が示唆された。



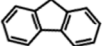




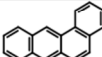
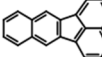

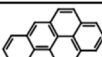
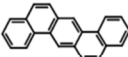
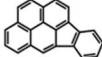

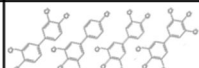
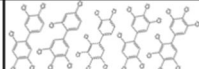
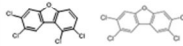
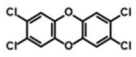
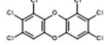
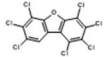
(3) HPLC 分画による活性寄与物質の評価

野生鳥類の肝臓に蓄積するダイオキシン類以外の易分解性 AhR アゴニストを推定するため、HPLC による詳細分画をおこない PAH-CALUX を用いて活性を評価した。主要な活性寄与物質である PCDD/Fs と DL-PCBs (13 物質) に加え、米国環境保護庁 (US EPA) が規制対象として指定している PAHs 14 物質について、標品を用いて溶出パターンを分析した。Table 1 に示すように、上記の既知 AhR アゴニストの溶出時間はオクタノール/水分配係数 (log K_{ow}) に依存する傾向が認められた。

ハヤブサとトビ肝臓の GPC 処理抽出液を HPLC で分画し、各フラクション溶液を PAH-CALUX に供試した結果、ハヤブサで活性値が検出下限値 (LOD) を上回った画分は No. 51-53, 55-56, 59-60, 67-68, 80, 89 であり、No. 51 で最大値を示した (Figure 4a)。標準物質 (Table 1) の溶出パターンと比較したところ DL-PCBs や PeCDF の溶出範囲と一致し (Figure 4b)、ハヤブサの肝臓に残留する AhR アゴニスト活性物質の大半は塩素化ダイオキシン類であることが推察された。トビでも、最も高い活性を示した画分は No. 51 であったが、溶出画分 No. 21-89 の幅広い範囲で AhR アゴニスト活性があり、塩素化ダイオキシン類だけでなく PAHs の溶出フラクション (No. 21 と No. 36) にも活性が認められた (Figure 4)。これら 2 つのフラクションから検出された活性割合はそれぞれ 4.4% と 5.8% BaP 1.25 μM であり、No. 51 と No. 52 を除く溶出画分の割合 (0%-2.7% BaP 1.25 μM) よりも高く、PAHs 類緑化合物が肝臓に蓄積していることが推察された。標準物質の溶出パターンから、No. 21 にはナフタレンとフルオランテンが、No. 36 にはベンゾ [k] フルオランテン

とベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレンが関与している可能性が考えられた(Table 1)。実際に先行研究では、これらの PAHs が野生鳥類の肝臓から検出されたことが報告されている。しかしながら、本研究と同じ H4IIE-luc 細胞株を用いて 24 種の PAHs を PAH-CALUX アッセイで AhR アゴニスト活性を評価した先行研究では、ナフタレンとフルオランテンの BaP に対する比活性値 (Relative Potency: REP) は極めて低く、AhR アゴニスト活性は弱いと考えられる。このことから、トビの肝臓抽出液におけるフラクション No. 21 で認められた活性は、ナフタレンとフルオランテン以外の AhR アゴニストに起因している可能性がある。

Table 1. Chemical structure, molecular weight, log Kow of tested AhR agonist standards and their elution patterns (retention times and fraction Nos.) by HPLC analysis

Compounds		Chemical structure	Molecular weight	Log Kow	Retention time	Fraction No.
PAHs	Naphthalene		128	3.359 ^a	5.5	7
	Acenaphthylene		152	4 ^b	6.5	10
	Fluorene		166	4.18 ^b	8	16
	Phenanthrene		178	4.552 ^a	8.5	18
	Anthracene		178	4.593 ^a	8.75	19
	Fluoranthene		202	5.22 ^b	9.5	22
	Chrysene		228	5.785 ^a	11.25	29
	Benz[a]anthracene		228	5.806 ^a	11.5	31
	Benzo[k]fluoranthene		252	6 ^b	12.75	35
	Benzo[b]fluoranthene		252	5.8 ^b	13	36
	Benzo[a]pyrene		252	6.388 ^a	13.25	37
	Dibenzo[ah]anthracene		278	6.998 ^a	14.25	41
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene		276	6.76 ^c	14.75	43
	Dibenzo[g,h,i]perylene		276	6.760 ^a	15	44
DL-PCBs	Non-orthoPCBs (CB77, 81, 126, 169)		292-361	6.34-7.41 ^c	14.5, 15, 16.75, 19	43, 45, 52, 61
	Mono-orthoPCBs (CB118, 123, 156, 167, 189)		326-395	6.98-8.27 ^c	16.5, 17, 18.25, 19, 20.75	51, 53, 58, 61, 68
PCDD/Fs	1,2,7,8/2,3,7,8-TCDF		306	6.23-6.63 ^c	15.5, 17	47, 53
	2,3,7,8-TCDD		320	6.8 ^b	16.75	52
	1,2,3,7,8,9-HxCDD		388	8.21 ^c	20	65
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF		406	7.92 ^c	23.75	81

^a Ferreira (2001), ^b Mackay et al. (1992), ^c EPISuite (www.chemspider.com)

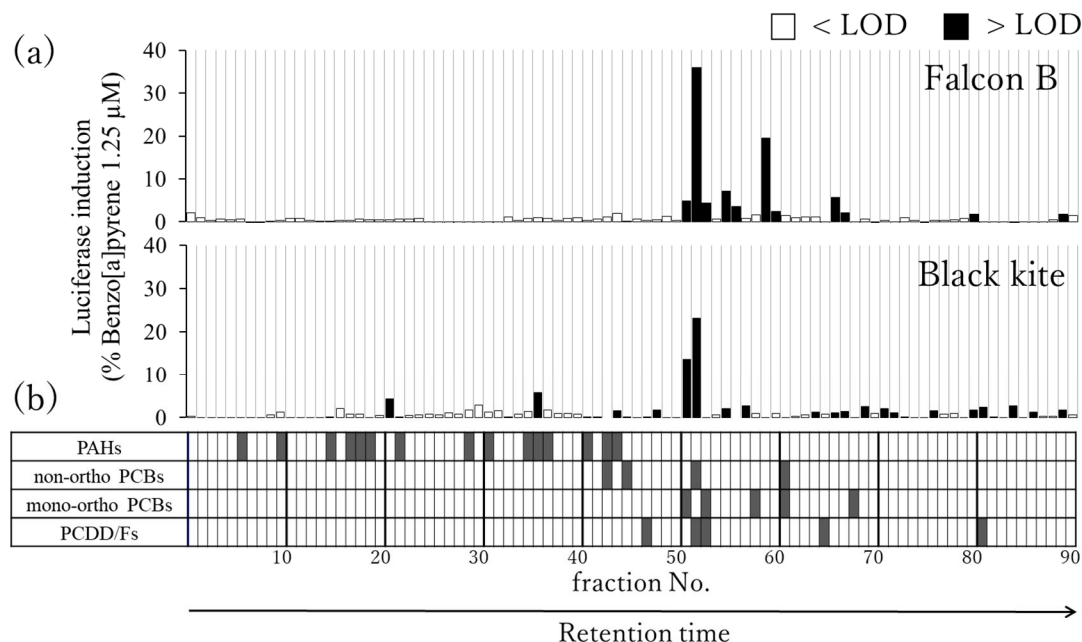


Figure 4. AhR agonist activities of HPLC fractions in GPC-treated liver extracts from falcon and black kite (a) and eluted fractions of PAHs, DL-PCBs, and PCDD/Fs (b).

そこで HPLC の PAHs 画分をプールした溶液を、既報¹⁾の設定条件で GC×GC-HRTOFMS 分析に供試した。得られた 2 次元トータルイオンクロマトグラムの干渉ピークから、活性に寄与する物質を複数抽出することは困難であったが、フィルタリング手法を用いて示性式が $C_{15}H_{12}O$ である物質の検出が明らかとなった。得られたマススペクトルをデータベースと照合したところ、マッチファクターの高い化合物はヒットしなかったため、今後、物質同定と AhR アゴニスト活性評価が課題となった。

< 引用文献 >

- Tue, N. M., Goto, A., Fumoto, M., Nakatsu, S., Tanabe, S., Kunisue, T., 2021. Nontarget screening of organohalogen compounds in the liver of wild birds from Osaka, Japan: specific accumulation of highly chlorinated POP homologues in raptors. *Environmental Science & Technology*, 55, 8691-8699.
- Goto, A., Tue, N. M., Someya, M., Isobe, T., Takahashi, S., Tanabe, S., Kunisue, T., 2017. Occurrence of natural mixed halogenated dibenzo-*p*-dioxins: Specific distribution and profiles in mussels from Seto Inland Sea, Japan. *Environmental Science & Technology*, 51, 11771-11779.
- Pieterse, B., Felzel, E., Winter, R., Van der Burg, B., Brouwer, A., 2013. PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. *Environmental Science and Technology*, 47, 11651-11659.
- Behnisch, P. A., Hosoe, K., Sakai, S., 2003. Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environment International*, 29, 861-877
- Roscales, J. L., González-Solís, J., Calabuig, P., Jiménez, B., 2011. Interspecies and spatial trends in polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Atlantic and Mediterranean pelagic seabirds. *Environmental Pollution*, 159, 2899-2905.
- Dhananjayan, V., 2013. Accumulation pattern and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in liver tissues of seven species of birds from Ahmedabad, India, during 2005–2007. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3414-3422.
- Goto, A., Tue, N. M., Isobe, T., Takahashi, S., Tanabe, S., Kunisue, T., 2020. Nontarget and target screening of organohalogen compounds in mussels and sediment from Hiroshima Bay, Japan: occurrence of novel bioaccumulative substances. *Environmental Science & Technology*, 54, 5480-5488.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tue Nguyen Minh, Goto Akitoshi, Fumoto Mitsuo, Nakatsu Susumu, Tanabe Shinsuke, Kunisue Tatsuya	4. 巻 55
2. 論文標題 Nontarget Screening of Organohalogen Compounds in the Liver of Wild Birds from Osaka, Japan: Specific Accumulation of Highly Chlorinated POP Homologues in Raptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 8691 ~ 8699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.1c00357	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 -

1. 著者名 Ieda Teruyo, Hashimoto Shunji, Tanabe Kiyoshi, Goto Akitoshi, Kunisue Tatsuya	4. 巻 1657
2. 論文標題 Application of inert gas-mediated ionization for qualitative screening of chlorinated aromatics in house dust by comprehensive two-dimensional gas chromatography?high-resolution time-of-flight mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 462571 ~ 462571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2021.462571	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 -

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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 国末達也
2. 発表標題 海産二枚貝を用いたバイオモニタリング - 未知物質スクリーニングの試み -
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤哲智・Tue, N. M.・田辺信介・国末達也
2. 発表標題 海産の魚類を対象とした生物蓄積性有機ハロゲン化合物のサスペクトスクリーニング
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021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 瀬戸内海の二枚貝と堆積物に残留する既知・未知有機ハロゲン化合物の生物濃縮性評価
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須之内 朋哉・後藤哲智・Nguyen Minh Tue・田島 木綿子・山田 格・田辺信介・国末達也
2. 発表標題 鯨類の脂皮に蓄積する有機ハロゲン化合物の網羅的スクリーニング
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goto, A., Tue, N. M., Tanabe, S., Kunisue, T
2. 発表標題 Evaluation of biota-sediment accumulation factors (BSAFs) for known and unknown organohalogen compounds in Japanese mussels
3. 学会等名 41th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tue, N. M., Goto, A., Fumoto, M., Nakatsu, S., Tanabe, S., Kunisue, T
2. 発表標題 Specific accumulation of C15-based chlordane-related compounds in the liver of wild birds from Japan
3. 学会等名 41th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒石佳奈・Tue, N. M.・後藤哲智・田辺信介・国末達也
2. 発表標題 瀬戸内海の二枚貝に残留する多環芳香族炭化水素レベルとAhRアゴニストの活性評価
3. 学会等名 環境科学会2020年会
4. 発表年 2020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 GC×GC-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 Ieda, T., Hashimoto, S., Tanabe, K., Goto, A., Kunisue, T.
2. 発表標題 Validation of soft ionization method mediated by inert gas for non-target screening of halogenated compounds and application to crude extract of house dust
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 Tue, N. M., Tuyen, L. H., Suzuki, G., Takahashi, S., Viet, P. H., Tanabe, S., Kunisue, T.
2. 発表標題 CALUX activities, flame retardants and polyaromatic hydrocarbons in indoor dust from informal waste recycling sites in Vietnam
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------