

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19984

研究課題名（和文）海洋汚染物質のノンターゲットスクリーニングと生物濃縮機構の解明

研究課題名（英文）Nontarget screening for marine pollutants and elucidation of their biomagnification mechanisms

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、瀬戸内海西岸の環境および生物相における海洋汚染物質のターゲット/ノンターゲットスクリーニングを実施した。スクリーニング分析の結果、多様な有機ハロゲン化合物（残留性有機汚染物質、海洋天然物質、構造未知物質等）による生物蓄積の実態が明らかとなった。とくに、ジクロロジフェニルトリクロロエタン（DDT）およびクロルデン（CHL）の合成不純物あるいは環境/生体内変化物と推察される多数の有機塩素化合物が、魚類のみならず魚食性鳥類にも蓄積していることが判明した。この結果は、海洋生物相に対するDDT・CHL様物質の慢性的な曝露と食物網を介した生物濃縮の可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、多次元クロマトグラフィーと精密質量分析を統合した分離計測技術を精緻化し、環境・生物汚染モニタリングに適用した結果、法的な監視や規制が及んでいない潜在的な有害物質群の検出に成功した。この成果は、応用計測科学や自然科学分野における研究の発展のみならず、自然環境や野生生物種の保全、そして化学物質の適正なリスク管理に資する有用な情報となり得る。

研究成果の概要（英文）：The present study performed target/nontarget screening of marine pollutants in the environment and biota from Seto Inland Sea, Japan. The results of screening analyses revealed the bioaccumulation of various organohalogen compounds such as persistent organic pollutants (POPs), marine natural products, and structurally unknown compounds. Notably, several organochlorine compounds, identified as synthetic by-products or environmental/biological transformation products of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and chlordane (CHL), were found to accumulate in not only marine fish but also fish-eating birds. The results indicate chronic exposure of marine biota to these compounds, and their biomagnification potential in the marine food web.

研究分野：環境化学

キーワード：ノンターゲットスクリーニング GCxGC-HRToFMS 有機ハロゲン化合物 生物濃縮 海洋生物

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) 等の有機ハロゲン化合物 (OHCs) は、環境残留性や生物蓄積性がきわめて高くヒトや野生生物に対する毒性影響が危惧されたことから、2004 年に発効した「残留性有機汚染物質 (POPs) に関するストックホルム条約」により生産・使用・流通が禁止 (規制) されている。また 2009 年以降に追加指定された新規 POPs や現在審議中の候補物質についても、既存 POPs と類似の物理化学特性や毒性が懸念されたことを受け、法的な監視・管理体制の強化に加え、廃絶や使用規制に拘わる国際的な枠組みの整備が進められている。しかしながら世界的に大きな注目を集めている POPs や関連候補物質の多くは、環境排出や生物曝露の実態が明らかとなっている既知の人工汚染物質に限定されるため、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となっている。

上記課題の重要性は国際的にも認識されているが、これまで国内外で実施されてきた POPs 様物質の汚染モニタリングは、調査対象となる物質種を限定したターゲット分析となっている。したがって、法的な監視や規制が及んでいない未同定物質 (合成不純物、環境分解物、生体内代謝物、天然物等) を網羅的に検出することは原理的に困難であり、それらの環境汚染や生物への曝露・蓄積に関する知見は得ることができない。このような背景から近年、欧米諸国ではノンターゲット分析法の開発と環境・生物汚染モニタリングへの適用研究が精力的に展開されている^{1,2)}。例えば米国の研究チームは二次元ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (GCxGC-ToFMS) を駆使して、海棲哺乳動物 (鯨類・鯨脚類) に蓄積する POPs 様物質のノンターゲット分析を実施している^{3,4)}。しかし、これらの先行研究では海洋高次生物の脂皮のみ分析していたため、環境中や生体内で比較的速やかに分解・代謝される、或いは特定の臓器に移行・分配する物質群の曝露は見落とされている可能性が高い。また申請者らの研究グループも最近、沿岸汚染の生物指標である付着性二枚貝 (イガイ) を対象に、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) 及び GCxGC-HRTofMS を併用したターゲット/ノンターゲット分析手法を開発し、多様な OHCs (人工汚染物質、海洋天然物質、構造・起源未知物質) の検出に成功した⁵⁾。しかしながら、既知・未知の海洋汚染物質による生物への複合曝露や蓄積プロファイル、そして生物濃縮性に関する知見は依然としてほとんど集積されていない。

2. 研究の目的

本研究では、海洋食物網を構成する低次-高次栄養段階生物を対象に海洋汚染物質のノンターゲット/ターゲット分析を実施し、複合曝露レベルや組成プロファイルの種差、そして生物濃縮機構の解明を目的とした。具体的には以下に示す 2 つの研究課題に取り組んだ。

- (1) 愛媛県沿岸の同一港湾内で採取した海水、底質、二枚貝、そして魚類試料を対象に既知・未知 OHCs の網羅的スクリーニングと残留濃度プロファイルの比較解析を実施した。
- (2) 愛媛大学の生物環境試料バンク (es-BANK) に冷凍保存されている魚食性鳥類の生体組織試料を活用して、上述の環境・生物媒体に残留していた OHCs の生物濃縮性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象試料

本研究では、カキやイガイ等の付着性二枚貝を捕食するクロダイを対象魚種とした。クロダイ ($n = 10$) は 2018 年から 2019 年にかけて松山港近傍で釣獲し、実験室内で臓器・組織別に解剖した。海水、底質、そしてカキは 2019 年に上記の港湾内で同日採取した。海水 ($n = 1$) はステンレス製のサンプラーで 15 L 採水した。底質 ($n = 2$, 各 3 検体プール) はエクマンバージ採泥器を用いて 2 地点でサンプリングをおこない、各地点 3 回採泥し混合したものを 1 試料とした。カキ ($n = 2$, 各 20 検体プール) は底質と同一の 2 地点からそれぞれ採集し、各地点 20 検体分の軟組織を混合・均質化したものを 1 試料とした。鳥類については、魚食性の猛禽類であるミサゴを本研究の対象種に選定した。ミサゴ ($n = 3$) は 2018 年に松山市内で死亡した野生個体であり、es-BANK に保管されている貴重な凍結サンプルから胸筋及び肝臓組織を分取・抽出した。

(2) 試料抽出液の作製

各環境・生物試料の抽出操作は既法に従った⁵⁾。海水試料 ($n = 1$) は JIS K0312 を一部改変したメソッドを適用しトルエンで抽出した。底質 ($n = 2$)、カキ ($n = 2$)、クロダイ (筋肉: $n = 10$, 肝臓: $n = 10$)、そしてミサゴ (筋肉: $n = 3$, 肝臓: $n = 3$) の全試料はフリーズドライ後に高速溶媒抽出機を用いて処理し、底質試料はトルエン、生物試料についてはアセトン/ n -ヘキサン混合溶媒で抽出した。得られた全試料の粗抽出液は n -ヘキサンに溶媒転溶した後、ガラス製の試験管内で保存した。

(3) OHCs のノンターゲット分析

釣獲したクロダイ 10 検体から最大サイズの個体を選定し、この代表サンプルの筋肉及び肝臓組織に内在する既知・未知 OHCs のノンターゲット分析を実施した。具体的には、各組織の試料抽出液にクリーンアップスパイク ($^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs, $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PBDEs, $^{13}\text{C}_{12}$ -

labeled 6-MeO-BDE-47) を添加後、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で夾雑成分を除去した。この粗精製溶液は、シリンジスパイク ($^{13}\text{C}_{12}$ -labeled CB-170, $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled BDE-126/-205) を添加して窒素気流化で濃縮・定容した後、得られた最終溶液を GCxGC-HRToFMS (EI, m/z 150-750, $R > 5000$, FWHM) のフルスキャンモードで測定した。本測定では、BPX5 (長さ: 30 m, 内径: 0.25 mm: 膜厚: 0.25 μm)、FST (長さ: 1.5 m, 内径: 0.1 mm)、そして BPX50 (長さ: 1.5 m, 内径: 0.1 mm: 膜厚: 0.1 μm) を連結した GCxGC カラムセットを使用した。GCxGC-HRToFMS の測定条件は表 1 に示す。

表 1. GCxGC-HRToFMS の測定条件

GCxGC	Agilent 7890A GC coupled with a Zoex KT2006
Modulation	Period: 4500 ms; releasing: 300 ms
Carrier gas	Ultra-pure Helium
Injection	Volume: 2 μL , Temperature: 280 $^{\circ}\text{C}$, Mode: splitless
Oven program	120 $^{\circ}\text{C}$, holding for 1 min, to 200 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, to 320 $^{\circ}\text{C}$ at 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, holding for 3 min
First column	BPX5 (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)
Second column	BPX50 (1.5 m, 0.1 mm i.d., 0.1 μm film thickness)
Flow control mode	Constant flow
Mass spectrometer	JMS-T100GCV
Interface	280 $^{\circ}\text{C}$
Ion source	Ionization mode: EI, Electronic energy: 70 eV, Ionizing current: 500 μA , Temperature: 280 $^{\circ}\text{C}$
Detector voltage	2400 V
Measuring mode	Full scan: m/z 150-750, sampling rate: 25 Hz
Resolving power	> 5000 (FWHM)

GCxGC-HRToFMS 分析により得られた二次元トータルイオンカレントクロマトグラム (2D TICCs) は、専用のソフトウェア (GC image ver.2.7r3) を用いて処理・解析した。2D TICCs 上で観測された各 OHCs のピークは、リテンションタイム (1t_R [min], 2t_R [s])、精密質量 (m/z)、ハロゲンイオンクラスターの同位体比 (%), そしてフラグメントパターンに基づいて解析し示性式推定をおこなった。また同一機器条件で測定した標準品のインハウスデータベースに加え、米国国立標準技術研究所が提供する質量スペクトルライブラリー (NIST17) やケミカルアブストラクトサービス (CAS) の化学物質データベース (SciFinder) を活用して、候補物質を検索した。

(4) OHCs のターゲット分析

ノンターゲット分析により、クロダイの代表サンプルから高検出強度で確認された主要な OHCs をリストアップし、全ての環境 (海水、底質) 及び生物 (カキ、クロダイ、ミサゴ) 試料を対象に定量分析を実施した。簡潔には、各試料の粗抽出液にクリーンアップスパイク ($^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs, $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PBDEs, $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled 6-MeO-BDE-47) を添加して前述の GPC 処理に供試した後、さらに活性シリカゲルクロマトグラフィーにより精製・分画した。この精製溶液はシリンジスパイク ($^{13}\text{C}_{12}$ -labeled CB-170, $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled BDE-126/-205) を添加して窒素気流化で濃縮・定容した後、得られた最終溶液を GC-HRMS (EI, $R > 10000$, 10% valley) の選択イオンモニタリング (SIM) モードで測定した。分析カラムは HT8-PCB (長さ: 60 m, 内径: 0.25 mm) 及び BPX5 (長さ: 15 m, 内径: 0.25 mm: 膜厚: 0.1 μm) を使用し、分離検出した各 OHCs の濃度は同位体希釈法により算出した。なお、各試料溶液に添加した内部標準物質の補正回収率は 60-120% の範囲内であった。

4. 研究成果

(1) クロダイの筋肉及び肝臓に蓄積する OHCs のノンターゲット分析

GPC のみでクリーンアップしたクロダイの筋肉及び肝臓の粗精製溶液を GCxGC-HRToFMS で分析した結果、両組織の 2D TICCs からそれぞれ約 90 種の OHCs が観測された (図 1)。各ピークのリテンションタイムと精密質量スペクトル情報を基に詳細な定性解析を実施したところ、PCBs や臭素系難燃剤 (BFRs) であるポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の異性体群に加え、有機塩素系殺虫剤 (OCPs) のクロルデン類 (CHLs) とジクロロジフェニルトリクロロエタン及びその類縁物質 (DDTs) が主要な OHCs として同定された。また CHL 及び DDT 製剤の合成不純物や環境変化体、生活関連物質 (PCPs) であるトリクロロサンのメチル誘導体 (Me-TCS)、そしてリン酸エステル系難燃剤 (PFRs) のリン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル) (TDCIPP) といった人工汚染物質だけでなく、海域で自然発生したと考えられる塩素化メチルピピロール (MBPs)、メトキシ化 PBDEs (MeO-PBDEs)、さらには構造未知のミックスハロゲン化合物 (UHCs-Br/Cl)⁵⁾ の検出も確認された。これらの検出強度プロファイルは両組織間でほぼ同様であり (図 1) 臓器特異な蓄積を示す物質や異性体は認められなかったが、UHCs-Br/Cl を含む多数の OHCs は先行研究で分析したイガイにも残留していたことから⁵⁾、沿岸域の魚介類は多種多様な OHCs に複合曝露されていることが示唆された。

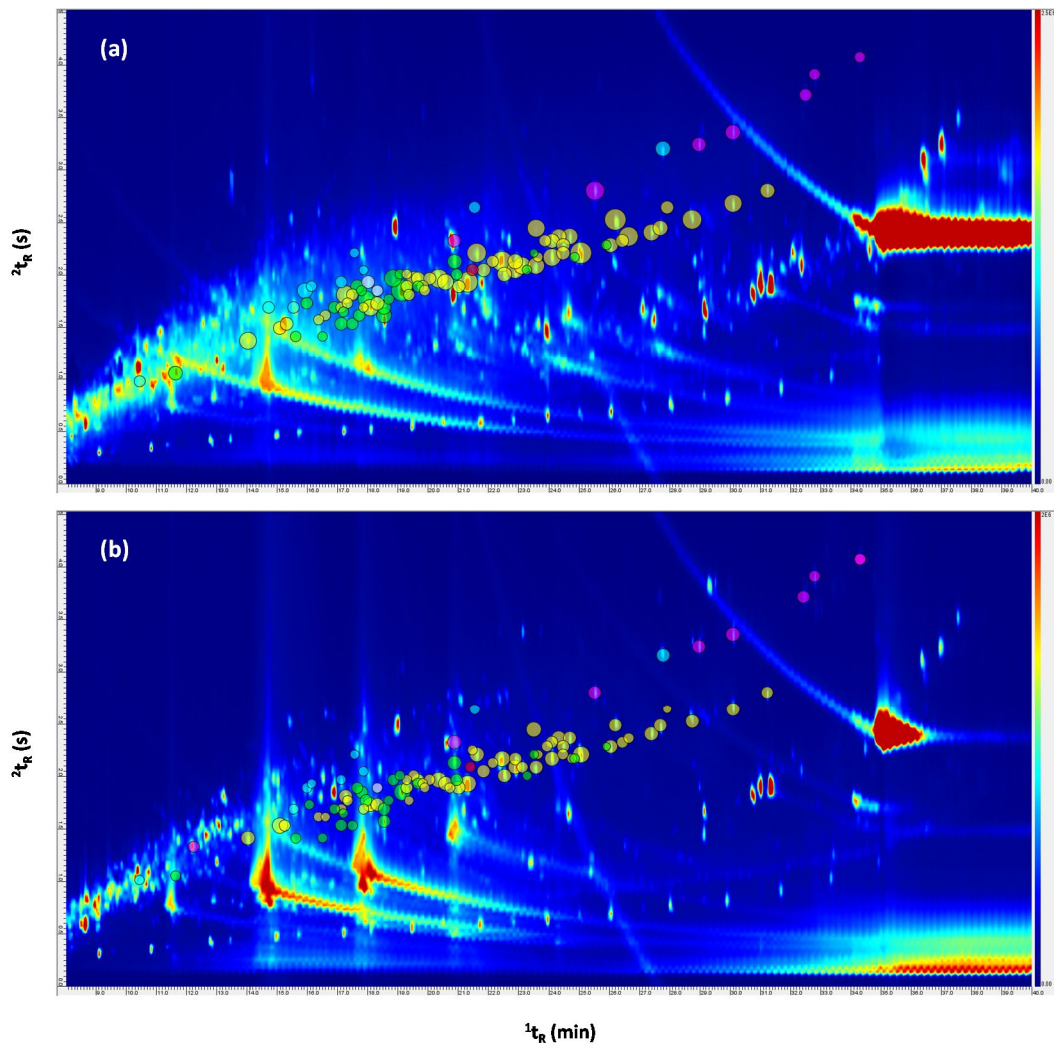


図 1. GCxGC-HRToFMS 分析で得られたクロダイ試料の 2D TICCs (a: 筋肉, b: 肝臓). プロブの色はアサインした OHCs のピークを示す (黄: ポリ塩化ビフェニル異性体, 緑: 有機塩素系農薬類, 赤紫: 臭素系難燃剤, 青: 海洋天然物質, 白: 生活関連物質の環境変化体, 赤: リン酸エステル系難燃剤).

(2) 海水・底質・カキ・クロダイに残留する OHCs のターゲット分析

同一港湾内で採取した環境・生物媒体の最終精製溶液を GC-HRMS で分析した結果、OHCs は全媒体から検出され沿岸域に遍在していることが明らかとなった。クロダイの組織中 OHCs 濃度を中央値と比較したところ、PCBs が最も高く (筋肉: 3800 ng/g lw, 肝臓: 3700 ng/g lw)、次いで DDTs (筋肉: 640 ng/g lw, 肝臓: 470 ng/g lw)、CHLs (筋肉: 380 ng/g lw, 肝臓: 350 ng/g lw) の順であり、UHCs-Br/Cl (筋肉: 15 ng/g lw, 肝臓: 11 ng/g lw)、MeO-PBDEs (筋肉: 9.6 ng/g lw, 肝臓: 11 ng/g lw)、PBDEs (筋肉: 8.1 ng/g lw, 肝臓: 11 ng/g lw)、そして MBPs (筋肉: 7.7 ng/g lw, 肝臓: 12 ng/g lw) は概ね同等のレベルであった。この蓄積濃度プロファイルはカキの結果と類似していたことから (PCBs: 1100 ng/g lw > DDTs: 460 ng/g lw > CHLs: 360 ng/g lw > UHCs-Br/Cl: 64 ng/g lw > MBPs: 63 ng/g lw > MeO-PBDEs: 49 ng/g lw > PBDEs: 13 ng/g lw)、クロダイは生息環境の餌生物を介して OHCs に曝露されていることが示された。加えて、PCBs については他の POPs に比べ生物濃縮係数 (BMF) が高値であったため、沿岸生態系の高次捕食者に対する相当濃度の曝露が懸念される。

また興味深いことに、UHCs-Br/Cl は同一港湾内の海水や底質からも検出が認められ、とりわけカキに高蓄積していたことが判明した。実際、生物相 (イガイ)-底質蓄積係数 (BSAF) を算出した先行研究では、UHCs-Br/Cl は同等の log オクタノール-水分配係数 (log K_{ow}) を有する POPs に比べ 1 桁以上高い BSAFs を示すことが明らかとなっており、この差は底質粒子の取り込みだけでなく発生源 (藻類等) からの直接的な曝露に起因することが示唆されている⁵⁾。同様の現象は UHCs-Br/Cl のみならず MeO-PBDEs でも観測されていることから、イガイやカキなどの附着性二枚貝は沿岸域で自然発生する OHCs に慢性曝露されている可能性が高い。

(3) ミサゴにおける OHCs の生物濃縮プロファイル

GC-HRMS 分析の結果、ミサゴの全検体から POPs の高濃度検出が確認され、沿岸生態系の頂点捕食者に対する汚染は現在も継続していることが明らかとなった。ミサゴの組織中 OHCs 濃度は、中央値と比較すると PCBs が最も高く (筋肉: 4200 ng/g lw, 肝臓: 2400 ng/g lw)、次いで DDTs (筋肉: 1000 ng/g lw, 肝臓: 480 ng/g lw)、CHLs (筋肉: 760 ng/g lw, 肝臓:

480 ng/g lw) > MBPs (筋肉: 460 ng/g lw, 肝臓: 410 ng/g lw) > PBDEs (筋肉: 100 ng/g lw, 肝臓: 54 ng/g lw) の順であり、MeO-PBDEs は 1 検体を除いて検出下限値未満、UHCs-BrCl については全検体で未検出であった。ミサゴにおける POPs の蓄積濃度プロファイルは、クロダイのパターンとも調和的であり、BMF の観点からも、これらの人工汚染物質は食物連鎖を介して生物濃縮していることが示された。一方で海洋天然物質の特異な検出パターンは、ミサゴが捕食する魚種や生息水域の差を反映したものと推察される。そのため、淡水や汽水水域の魚類における OHCs 曝露プロファイルやそれらの種差の解明、さらに安定同位体をトレーサーとした食性解析が今後必要である。

また特筆すべきことに、OCPs については製剤の主成分のみならず、不純物や環境変化体と考えられる多数の構造類縁物質が検出された。とくに CHL 様物質の検出強度は、*trans*-/*cis*-CHLs に比べ 1 桁高値を示していた (図 2)。同様の物質群は本研究で分析したクロダイや、日本の野生鳥類を対象にノンターゲット分析を実施した当研究室の先行研究⁶⁾においても確認されていることから、それらの化学構造や曝露起源の詳細解析、そして毒性リスクの評価が求められる。

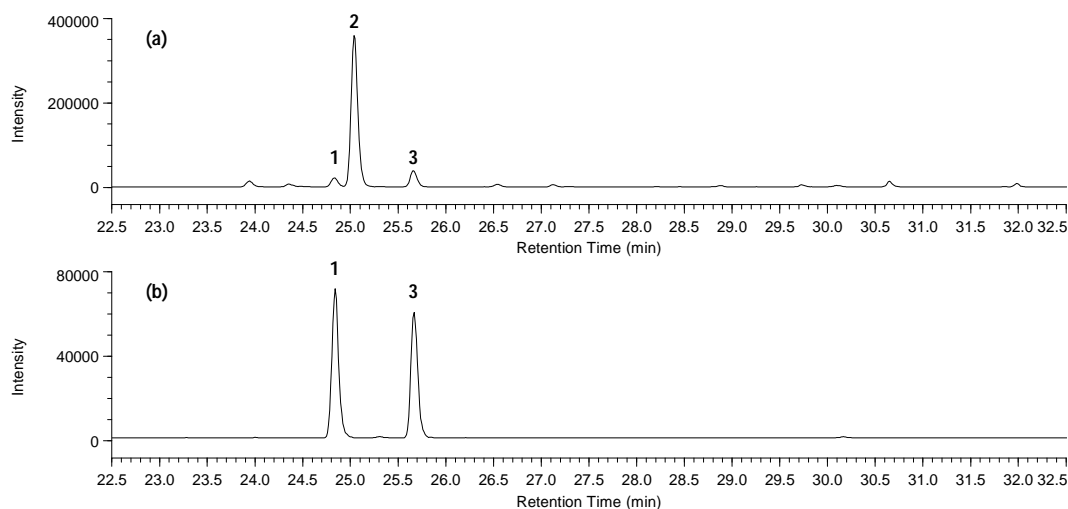


図 2. GC-HRMS 分析で得られたクロルデン類の SIM クロマトグラム (a: ミサゴの筋肉試料, b: 標準品)。番号はクロルデン類のピークを示す (1: トランス-クロルデン, 2: クロルデン様物質, 3: シス-クロルデン)。

以上の研究により、沿岸環境中には依然として未同定の POPs 様物質が残留しており、これらの汚染は生態系の低次-高次栄養段階生物種にまで及んでいることが明らかとなった。そのため、法的な監視・規制対象外の物質群を網羅的に検出できる新規スクリーニング分析手法の開発および多様な野生生物種への適用研究が今後の課題である。

< 引用文献 >

- 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. *Environmental science & technology* 2009, *43*, (9), 3240-3247.
- Pena-Abaurrea, M.; Jobst, K. J.; Ruffolo, R.; Shen, L.; McCrindle, R.; Helm, P. A.; Reiner, E. J., Identification of potential novel bioaccumulative and persistent chemicals in sediments from Ontario (Canada) using scripting approaches with GC×GC-TOFMS analysis. *Environmental science & technology* 2014, *48*, (16), 9591-9599.
- Hoh, E.; Dodder, N. G.; Lehotay, S. J.; Pangallo, K. C.; Reddy, C. M.; Maruya, K. A., Nontargeted comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry method and software for inventorying persistent and bioaccumulative contaminants in marine environments. *Environmental science & technology* 2012, *46*, (15), 8001-8008.
- Cossaboon, J. M.; Hoh, E.; Chivers, S. J.; Weller, D. W.; Danil, K.; Maruya, K. A.; Dodder, N. G., Apex marine predators and ocean health: proactive screening of halogenated organic contaminants reveals ecosystem indicator species. *Chemosphere* 2019, *221*, 656-664.
- Goto, A.; Tue, N. M.; Isobe, T.; Takahashi, S.; Tanabe, S.; Kunisue, T., Nontarget and target screening of organohalogen compounds in mussels and sediment from Hiroshima Bay, Japan: occurrence of novel bioaccumulative substances. *Environmental Science & Technology* 2020, *54*, (9), 5480-5488.
- Tue, N. M.; Goto, A.; Fumoto, M.; Nakatsu, S.; Tanabe, S.; Kunisue, T., 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* 2021, *55*, (13), 8691-8699.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 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 Goto, A., Tue, N. M., Tanabe, S. and 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 (DIOXIN 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tue, N. M., Goto, A., Fumoto, M., Nakatsu, S., Tanabe, S. and 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 (DIOXIN 2021)
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

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