

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12285

研究課題名(和文) 環境動態解明に資する塩素化パラフィンの成分組成及び毒性推定手法の開発

研究課題名(英文) Development of a method on the estimation of composition and toxicity of chlorinated paraffins for elucidating their environmental behavior

研究代表者

羽成 修康 (Hanari, Nobuyasu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・研究グループ長

研究者番号：10392648

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)：残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約の規制対象物質である塩素化パラフィン(CP)の環境挙動、なかでも毒性影響を把握するため、耐光試験前後のCPを二次元ガスクロマトグラフ質量分析計により異性体別分析を試みた。残念ながら試験後のCPパターンに劇的な変化は確認できなかったが、別途実施した水生生物への遊泳阻害影響結果を把握できたため、CP同族体や異性体のリスク懸念成分を可視化できる手法開発の一端を実施できた。この成果から、未解明な点の多いCPリスクプロファイルに関する新たな知見を得ることができたと考えられたが、CP組成とリスク評価のマッピング化にはさらなる検証が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光耐性の強い強毒性の塩素化パラフィン(CP)を実験的に生成させることは、同じ残留性有機汚染物質(POPs)である塩素化ナフタレンよりも困難だったことから、CPの光耐性が通常のPOPsよりも強いことが判明したこと、二次元ガスクロマトグラフ質量分析計でのCP溶出位置と水-オクタノール分配係数との関連性から水生生物へのリスク評価を把握する一端となる成果を得ることができたこと、また水生生物への遊泳阻害試験から、供した標準物質であるCPのリスク影響を明らかにできたことが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the environmental behavior of chlorinated paraffins (CP), which are substances subject to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, especially their toxic effects, we attempted to analyze CP isomers/homologs before and after a light fastness test using a two-dimensional gas chromatograph mass spectrometer. Unfortunately, we were unable to confirm any dramatic changes in the CP pattern after the test, but we were able to understand the results of a separate test to determine the acute immobilisation on aquatic organisms, which allowed us to develop a part of a method to visualize risk components of CP homologs and isomers. From these results, we believe that we have gained new knowledge about the CP risk profile, which has many unknown aspects, but further verification is required to map the CP composition and risk assessment.

研究分野：環境化学

キーワード：塩素化パラフィン 成分組成 二次元ガスクロマトグラフ 毒性推定

1. 研究開始当初の背景

塩素化パラフィン (chlorinated paraffin : CP) のなかでも、炭素数が 10 ~ 13 の塩素化パラフィンを短鎖塩素化パラフィン (short chain chlorinated paraffin : SCCP) と呼び、PCB と同様、環境への高残留性、生物等への高蓄積性・強毒性、さらには長距離移動性が懸念され、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約) の規制対象物質でもある、著名な環境汚染物質の一つである。そのため、環境モニタリングやリスク評価が行われ、土壌・海洋汚染が世界各所で確認されている。特に工業用に製造された CP 製剤は、米国・中国で大量に生産されたため、両国の製造工場付近の CP 汚染はより深刻である。ただし、リスク評価では各成分の毒性影響は未解明な点も多く、喫緊な課題解決が望まれている。構造はパラフィンの水素が塩素に置換した物質 (図 1) で、パラフィンの炭素数や塩素置換数により、多くの炭素・塩素同族体や異性体を持つ物質群である (1 つの炭素に 2 つ以上の塩素が置換しないと仮定した場合でも異性体数は理論上 6000 以上)。炭素数 14 ~ 17 の CP は中鎖塩素化パラフィン (MCCP)、18 以上は長鎖塩素化パラフィン (LCCP) と呼ばれ、研究当初は規制がほぼなく、現在でも製剤として生産され、可塑剤や金属加工油として使用されている。

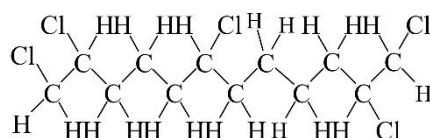


図 1 SCCP (炭素数 12) の構造式一例

以上から、SCCP は環境中で分解せず残留し、MCCP や LCCP は生産・放出され続けている。加えて、MCCP 製剤中に不純物として SCCP が数%程度含まれているため、環境媒体ごとの同族体・異性体別の正確な成分組成の報告は重要である。一方で、同族体・異性体数の多さから、結果の解析・評価は非常に困難で、また、どの同族体や異性体が強毒性を示すのか判別も困難、成分特定が可能な場合でも標品不足により成分同定が困難という状況である。また、SCCP 測定ではガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) だけでなく、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いることが可能で、幾つかの公定法等が存在する。国際標準分析法 ISO では GC-MS に負化学イオン化法を組み合わせた手法、国内の「化学物質と環境化学物質分析法開発調査報告書」では LC-MS に大気圧化学イオン化法を組み合わせた手法があり、環境モニタリングデータ取得への配慮がなされている。ただし、SCCP の正確な測定には異性体分離だけでなく、妨害物質の干渉への対処が必要で、GC 測定では環境試料中に残留する PCB 等の影響を排除することが、LC 測定では炭素数が 2 つ多い CP からの干渉への対処が必要である。加えて、製剤の製造工程では 1 つの炭素に 2 つ以上の塩素が置換したものが合成される可能性を否定できず、それとの分離も必要となる。そのため、より多くの SCCP 異性体を分離するには質量分析計が必須で、なかでも高い理論段数を活用できる GC-MS が重宝されている。他方、リスク評価は混合標品、または一部の単一成分標品での評価しかできず、研究者らは限られた標品で毒性影響評価を試みており、包括的なリスク評価は非常に困難である。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、PCB と同様に難分解性・高蓄積性を有し、POPs 条約の規制対象物質である CP の環境挙動、なかでも毒性影響を把握することにした。光耐性が強い成分は強残留性を示すため、CP の光反応特性を評価できる耐光試験を行い、試験前後の CP を二次元ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC×GC-MS) により異性体別分析する。GC×GC-MS は、2 つの分離カラムを備えることの可能な測定装置である。その結果と別途実施する毒性試験結果の相関性をマッピングすることで、従来法では評価困難な、CP 同族体や異性体の成分組成差異やリスク懸念成分を可視化できる手法開発を行う。この課題解決により POPs 条約での議論に必須であるが、未解明な点の多い CP リスクプロファイルに関する新たな知見を得るだけでなく、環境中での正確な挙動評価の実現性が増すため、リスク評価や汚染源推定の高度化に繋がると考えた。

3. 研究の方法

GC×GC-MS は一次元目のカラムで分離が困難であっても、二次元目のカラムでより多くの同族体・異性体分離が可能となる装置で、研究提案者の科研費 [若手研究 B (23710030)、基盤研究 C (15K00532)] による成果として、塩素化ナフタレン (PCN) 全 75 異性体中 73 異性体の分離を実現した。また、CP は異性体数の多さに反して単一成分標品がほとんどなく、異性体分離が実現しても SCCP 単一異性体としての同定が困難である。そのため、一次元目の溶出順位を x 軸に、二次元目を y 軸にした同一条件でのマッピングデータとして評価し、視覚的に

SCCP 成分組成差異を判断する手法を検討する。加えて、単一成分標品の不足から、特定異性体を選別した従来の積み上げ式のリスク評価は実現困難であるため、マッピングで溶出位置から同族体・異性体ごとの毒性推定も試みる。毒性推定では、購入可能な混合標品を希釈した水溶液をウェザーメーターでの耐光試験に供し、環境中での光反応特性を検討、試験前後の試料中 CP 同族体・異性体パターンをマッピングするだけでなく、動植物毒性試験にも供し、半数影響濃度との相関を評価する。また、CP 混合標品を土壤に添加し、同様に耐光試験を実施後、土壤中の CP を GC×GC-MS にて測定し、マッピングと動植物毒性試験結果との相関も併せて評価する予定であった。ただし、水溶液のウェザーメーターでの耐光試験では、CP の水溶解性の低さから十分な耐光試験後試料を得ることが困難であったため、CP バルクを直接耐光試験することにした。最終的には、毒性試験結果とマッピングの相関を明確にし、リスクプロファイル作成に資するデータ獲得を目指した。水溶液中及び土壤中での光反応特性と動植物毒性試験結果を関連づけた CP 研究はほとんどなく、新たな基礎的知見を得られ、加えて、マッピングを組み合わせた研究は、研究提案者の知る限り、ほぼ未開の研究領域であり、世界初の有益な分析データが得られると考えている。また、CP 分析は解決すべき課題が多く、信頼性の高いデータ取得は一般的には困難だが、研究代表者は SCCP の候補標準物質を調製し、国内外の研究者らと SCCP 分析値の信頼性向上に資する共同分析を別途実施しているため、高精度データの取得が期待できる。さらに、この研究は水質・土壤汚染環境を想定しているため、SCCP の物性やリスクプロファイルの知見にも直結し、これまでの環境モニタリングにより蓄積された、POPs の環境中での正確な挙動評価の実現性が高まり、POPs の適正管理への波及効果は極めて高いと考えられた。

以上を踏まえ、研究目的を大きく三つに分けた。一つめは GC×GC-MS で市販試薬の SCCP を測定し、その結果をマッピングすることである。従来の GC-MS でも測定は可能であるが、6000 以上の異性体を詳細分離することは困難である。そのため、GC×GC-MS を用いて異性体別に可能な限り分離することで、結果を視覚的に比較・検討することが可能となる。二つ目は、CP の水溶液（またはバルク）中及び土壤中での光反応特性を利用したウェザーメーターで耐光試験を実施することである。装着可能な各種ランプの赤外・紫外線領域の放射照度は明確であり、また試験条件なども JIS K7350 シリーズを参考に検討できるため、光反応特性に関するデータ蓄積を試みる。三つめは上記試験前後の試料について、CP のマッピングデータを取得すること、及び動植物毒性試験結果を併せて取得し、リスク評価に活用可能な相関性を把握することである。GC×GC-MS でのマッピングにより、溶出位置からある程度の物性推定は可能であることが知られており、かつ、スキャン測定から対象 CP だけでなく不純物情報も併せて得られるため、上述の毒性試験結果と組み合わせることで、水溶液（またはバルク）中及び土壤中の光耐性の高い（毒性の高い）CP との相関を推定する手法開発が可能になると考えている。なお、マッピングの比較対象として、二次元 LC を用いた外注試験も同時に実施する予定とした。

4. 研究成果

一つ目の研究目的に対応し得られた結果は、まず 6000 以上の異性体を可能な限り詳細分離することができる GC×GC-MS の分析条件である。当該研究課題の取り組み中に、標準物質として供給を開始した SCCP を試料とし 2 条件で評価したところ、混合物である SCCP の幾つかの成分群がマッピングされた（図 2）。得られたマッピング結果では、ある程度の炭素数順、塩素数順での溶出が確認できたが、詳細な溶出順の決定には単成分を用いた確認が必要となった。確認の結果、溶出順は炭素数 + 塩素数の合計値順で溶出していることが明らかとなった。

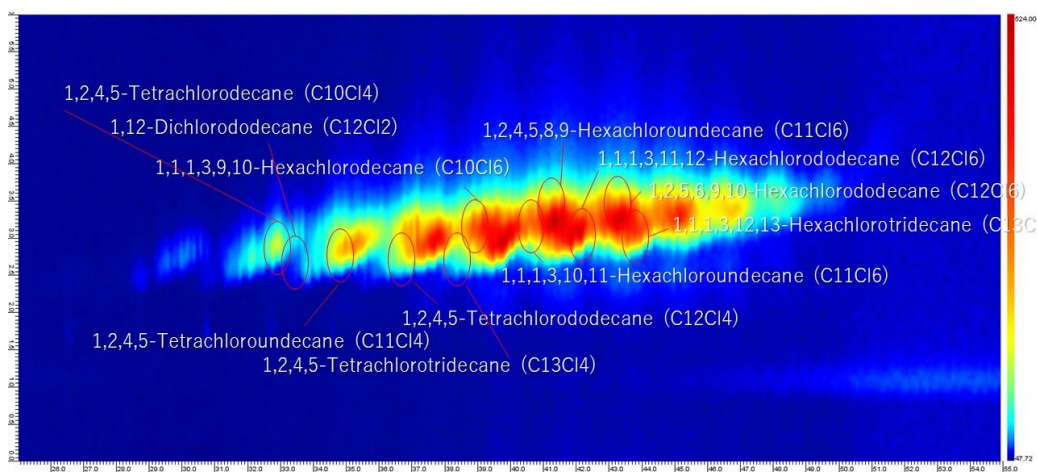


図 2 本研究により得られた GC×GC-MS を用いた SCCP クロマトグラム

なお、用いた 2 条件のうち、一つの条件では成分の溶出位置が、水生生物の毒性に強く影響を与える指標である水-オクタノール分配係数に連携したものであるため、標準物質である SCCP に

含まれる毒性懸念成分を評価できた。この結果は、SCCP のなかでも極一部の異性体（同族体）は水生生物に毒性影響を与える可能性が高い溶出位置であることが確認できるもので、他の類似研究と同様な傾向であった。

二つ目の研究目的に対応すべく、CP 水溶液での光反応特性を利用したキセノンウェザーメーターで耐光試験を実施したが、水溶解性が低く、有意な量を試験に供することができなかったため、バルクでの耐光試験を新規で追加し、実施した。CP 水溶液では最長 30 時間（4、8、16 時間も実施）の照射であったところを、バルクでは最長 200 時間（50、100 時間も実施）に延長し、耐光試験を行った（写真 1）。得られた耐光試験前後の試料は色味が異なっており、水素イオン化検出器付 GC 及びガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析計（GC-TOFMS）両方で評価したが、パターンに劇的な変化は確認できず、想定以上に光耐性が高いことが明らかとなった（本研究での耐光試験条件は、屋外暴露 5 か月強想定）。以前の PCN での耐光試験では、水溶液での 100 時間照射で全分解していたことから、CP は同じ POPs でありながら、大きく光耐性が異なるのか、もしくはより多くの物質群であるため、光反応開始がスムーズに進まないのか、など差異が示唆されたが、詳細な理由の解明には至っていない。そのため、当初想定していた、CP の水溶液（またはバルク）中及び土壌中での光反応特性を利用したキセノンウェザーメーターで耐光試験を実施することは困難となった。光透過性は土壌よりも水溶液の方が明らかに良いため、バルクでの耐光試験での光分解条件を検索し、それよりも過激な条件でないと土壌中では分解しないことが予想されるが、疎水性の高さから土壌に吸着し、全く分解しない可能性も考えられた。

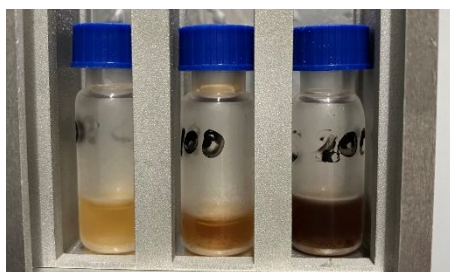


写真 1 耐候試験後の SCCP バルク

三つ目の研究目的に対応すべく、耐光試験前後の CP の毒性試験を計画したが、明らかな光分解が確認できなかったため、試験前の CP のみの毒性試験に注力した。

表 3 ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) の遊泳阻害個体数*

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative numbers of immobilized <i>C. dubia</i> (% of immobility)	
	24 hours	48 hours
Control	0 (0)	0 (0)
Solvent control	0 (0)	0 (0)
0.008	0 (0)	0 (0)
0.016	0 (0)	0 (0)
0.032	0 (0)	2 (10)
0.065	0 (0)	16 (80)
0.13	3 (15)	20 (100)

*EPA 法 : Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (Fourth Edition)

表 4 オオミジンコ (*Daphnia magna*) の遊泳阻害個体数**

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative numbers of immobilized <i>D. magna</i> (% of immobility)	
	24 hours	48 hours
Control	0 (0)	0 (0)
Solvent control	0 (0)	0 (0)
0.008	0 (0)	0 (0)
0.016	0 (0)	0 (0)
0.032	0 (0)	0 (0)
0.065	0 (0)	16 (80)
0.13	0 (0)	15 (75)

**OECD 法 : *Daphnia* sp., Acute immobilization test

毒性試験は、一つ目の研究目的で水生生物の毒性を評価可能な条件を検討したため、水生生物であるミジンコを選定した。手法が選択できたことから、ミジンコを2種(ニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* とオオミジンコ *Daphnia magna*) とし、EPA法とOECD法をそれぞれ用いて遊泳阻害影響を評価した。どちらの試験でも、予備試験を実施し、CP溶解のための助剤や試験設定濃度の検討を行った。本研究ではメタノールを助剤とし、0.008~0.13 mg/Lを濃度試験区とした。結果として、本実験で使用したCPバルクの2種のミジンコへの遊泳阻害影響は種間で異なることが明らかとなった(表3及び4)。具体的には、両者の50%遊泳阻害濃度(EC₅₀)が同程度であった一方で、エンドポイントとして追加した致死については、オオミジンコでニセネコゼミジンコよりも影響が強くなることが示唆されるものであった。なお、GCでの分析において差異が確認できなかった耐光試験後のCP試料でも同様の遊泳阻害影響を評価したが、試験前とほとんど変化がなかったことを確認している。

なお、研究目的には記載していないが、関連研究として候補標準物質としてSCCPを用いた共同分析を実施しており、これらの実施において候補標準物質の検証が進められたため、SCCP標準物質として供給できたことから、研究代表者の分析技術の検証や組成の解析に活用することができた。

本研究のまとめは、以下である。

POPs条約の規制対象物質であるCPの環境挙動、なかでも毒性影響を把握するため、耐光試験前後のCPをGC×GC-MSにより異性体別分析を試みた。残念ながら試験後のCPパターンに劇的な変化は確認できなかったが、別途実施した水生生物への遊泳阻害影響結果を把握できたため、CP同族体や異性体のリスク懸念成分を可視化できる手法開発の一端を実施できた。この成果から、未解明な点の多いCPリスクプロファイルに関する新たな知見を得ることができたと考えられたが、CP組成とリスク評価のマッピング化にはさらなる検証が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義としては、以下である。

光耐性の強い強毒性のCPを実験的に生成させることは、同じPOPsであるPCNよりも困難だったことから、CPの光耐性が通常のPOPsよりも強いことが判明したこと、GC×GC-MSでのCP溶出位置と水-オクタノール分配係数との関連性から水生生物へのリスク評価を把握する一端となる成果を得ることができたこと、またミジンコへの遊泳阻害試験から、供した標準物質であるSCCPのリスク影響を明らかにできたこと、が挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 羽成修康、中野武	4. 巻 83
2. 論文標題 Interlaboratory Comparison on Short-chain Chlorinated Paraffins using a Reference Material as standards for quantification: a Simulated Environmental Sample	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organohalogen Compounds	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 羽成修康、中野武	4. 巻 291
2. 論文標題 Comparison of short-chain chlorinated paraffin concentrations and homolog profiles by interlaboratory trial using a candidate reference material	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 132783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2021.132783	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 羽成修康、中野武	4. 巻 82
2. 論文標題 Interlaboratory comparison on short-chain chlorinated paraffin using a candidate reference material as standards for quantification: preliminary findings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organohalogen Compounds	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 羽成修康、中野武	4. 巻 30
2. 論文標題 Interlaboratory trial of short-chain chlorinated paraffin: comparison of mass fractions and homolog profiles in a simulation environmental sample	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 119450-119461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11356-023-30577-7	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 羽成修康、中野武	4. 巻 73
2. 論文標題 候補標準物質を用いる中鎖塩素化パラフィン分析法の比較研究	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 213-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.73.213	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 羽成修康、中野武
2. 発表標題 Interlaboratory Comparison on Short-chain Chlorinated Paraffins using a Reference Material as standards for quantification: a Simulated Environmental Sample
3. 学会等名 42nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽成修康、中野武
2. 発表標題 塩素化パラフィンの組成評価に資する共同分析 (第 3回 2020年度)
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽成修康、頭士泰之、小坂明正
2. 発表標題 ポストカラム反応装置を備えた 2次元 GC-MSによる PCBの簡易定量
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽成修康、中野武
2. 発表標題 Interlaboratory comparison on short-chain chlorinated paraffin using a candidate reference material as standards for quantification: preliminary findings
3. 学会等名 41st International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羽成修康、中野武
2. 発表標題 塩素化パラフィンの組成評価に資する共同分析 (第2回2019年度)
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 羽成修康、中野武
2. 発表標題 Interlaboratory Comparison of Medium Chain Chlorinated Paraffins Aimed for Future Development of a Reference Material
3. 学会等名 43rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羽成修康、岡村哲郎、戸田美沙、戸塚優
2. 発表標題 ニセネコゼミジンのSCCPに対する遊泳阻害の影響：SCCP標準物質 (NMIJ RM 4076-a) を例として
3. 学会等名 第31回環境化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羽成修康、中野武
2. 発表標題 塩素化パラフィンの組成評価に資する共同分析（第4回2022年度）
3. 学会等名 第31回環境化学討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センター物質計測標準研究部門有機組成標準研究グループ https://unit.aist.go.jp/mcm1/rg-org/index.html
--

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