

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6月 19日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12837

研究課題名(和文)代謝的に利用可能な重金属蓄積量を指標とした底質毒性評価

研究課題名(英文) Sediment toxicity evaluation to benthic organisms based on metabolically available metal accumulation

研究代表者

日置 恭史郎(Hiki, Kyoshiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・特別研究員

研究者番号：10792913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、底質毒性評価・予測の新たな指標として「代謝的に利用可能な重金属蓄積量(MAF; Metabolically Available Fraction)」を導入することを目指し、底生端脚類のニホンドロソコエビ(*Grandidierella japonica*)と*Hyalella azteca*を用いて、基礎的な知見の収集をおこなった。その結果、MAFの定量法を確立し、NOEC以下の亜鉛曝露に対して濃度依存的に端脚類内の亜鉛MAFが増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質の多くは最終的に底質に高濃度に蓄積し、底生生物あるいは食物連鎖を通じて生態系全体に悪影響を及ぼすが、現状の化学物質管理・評価は、底質における影響を考慮できていない。その一因は、水系に比べて底質では曝露経路が複雑であり、そもそも毒性影響を評価する指標が確立されていないためだと考えられる。本研究は、底質での化学物質影響を評価するための新指標を検討したものであり、生態毒性学として重要な研究であるだけでなく、適切な化学物質管理のための基礎的知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：With an aim to evaluate and predict sediment toxicity correctly, I focused on metabolically available fraction of metals (MAF) in benthic organisms and collected fundamental information on MAF in *Grandidierella japonica* and *Hyalella azteca*. MAF in the amphipods were obtained by homogenization, centrifugation and heat processing, and were quantified using ICP-MS. MAF of zinc in the amphipods were demonstrated to be increased with increasing zinc concentrations in sediment and water. MAF is expected to be used as a predictive indicator for sediment toxicity.

研究分野：生態毒性学

キーワード：底質毒性 生態毒性 金属 亜鉛 端脚類 ニホンドロソコエビ *Hyalella azteca*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属類は人間社会で利用された後、水環境に排出され、その多くは底質に蓄積する。底質では底生生物に継続的に曝露し続け、食物連鎖などを通じて生態系全体に悪影響を及ぼす。しかし日本では、未だ生態系保全に係る環境基準が制定されていないなど、金属による底質汚染についての対策はほぼ施されていない。

底質に蓄積した重金属による底生生物への毒性影響を説明・予測する指標は確立していない。一方、水系においては Biotic ligand model (BLM, エラへの吸着量が毒性を予測可能というモデル) がほぼあらゆる水質での重金属の毒性の説明・予測に成功し、既に EU や北米での実務的リスク評価に導入されている (EU, 2006; USEPA, 2016)。底質汚染に関しても、水系と同様に毒性予測の指標を確立する必要がある。かつて底質における金属毒性は、間隙水 (底質粒子中の保持水分) 中の溶存態金属濃度によって説明・予測できると考えられていた (Di Toro ら, 2005, *Environ Toxicol Chem*)。溶存態の方が、堆積物に付着している粒子態の金属類より生物学的利用能 (bioavailability) が高いとされたためである。しかし近年、底質での毒性影響に対しては粒子態の摂食が無視できない曝露経路であり (Strom ら, 2011, *Environ Toxicol Chem*)。溶存態金属の寄与しか想定しない手法は不十分だと指摘が出ており、精度の高い底質汚染リスク評価のためには溶存態濃度に代わる新たな毒性指標が必要である。

本研究は、粒子態の毒性への寄与を考慮できる新たな指標として「代謝的に利用可能な重金属蓄積量 (MAF; Metabolically Available Fraction)」を導入することを目指し、基礎的な検討をおこなった。MAF は、体内に蓄積された重金属総量から、解毒済みの画分を引いた量であり、毒性との高い関連性が示唆されている (Rainbow と Louma, 2011, *Aquatic Toxicol*)。MAF は摂食曝露の影響を受け (Adams ら, 2010, *IEAM*)。溶存態・粒子態の双方の寄与を考慮できる。そのため MAF を新指標に用いることができれば、高精度な底質毒性の予測が可能になり、効果的な汚染対策の発展が期待できる。体内の重金属蓄積量から毒性を説明・予測するというアプローチは、水系において上述の BLM によって実証済みであるため、有効だと考えた。

2. 研究の目的

上記のように MAF は底質毒性の説明・予測に有用な指標であると期待されるが、底生生物を用いて MAF の挙動を評価した研究は限られている。そこで本研究は、汽水産底生端脚類のニホンドロソコエビ (*Grandidierella japonica*) および淡水産底生端脚類 *Hyaella azteca* を用いて、底質における重金属毒性の指標として MAF を導入するための基礎的な知見の収集を目的とする実験をおこなった。具体的な目的は、これらの生物種体内の MAF 定量法の確立と、亜鉛に曝露した個体内の MAF 評価、そして これら生物種の底質毒性試験種としての特性把握である。

3. 研究の方法

端脚類体内の MAF 定量法の確立

G. japonica、*H. azteca* および食品店で購入したサクラエビを用いて、MAF の定量方法を検討した。具体的には、端脚類およびサクラエビを乳棒等で破碎した後、超遠心と加熱処理により分画し、懸濁態の画分については硝酸分解して、ICP-MS による各画分の金属量評価をおこなった。適切な内部標準 (^{45}Sc または ^{89}Y) と試験生物の破碎条件の影響を検討した。

亜鉛に曝露した端脚類体内の MAF 評価

亜鉛に曝露した *G. japonica* と *H. azteca* の MAF を評価した。試験用水および清浄な河川底質に硫酸亜鉛を添加し、それらに試験生物を 96 時間曝露した後、その手法に従って MAF を評価した。*H. azteca* については 1~72 時間の曝露した際の体内蓄積量の経時変化を評価した。さらに *G. japonica* については、体内に取り込まれた金属の無毒化の機構を考察するために、金属無毒化酵素であるメタロチオネイン様遺伝子の応答を定量 PCR を用いて調べた。

試験生物種の特性把握

汽水産端脚類である *G. japonica* は日本国内の汽水域に広く生息し、かつ底質毒性試験のガイドライン (USEPA, 1994) に試験種として挙げられている貴重な生物種である。しかしながら、その生活史特性や塩分、底質粒子径分布などの環境要因に対する応答は明らかになっていない。そこで、本研究では *G. japonica* の試験生物種としての特性把握のために、飼育条件下における体長増加率と一腹仔数、寿命などを調べた。また、異なる塩分 (5~35 PSU) および底質粒子径分布に対する生存、成長の応答を調べた。さらに本種が実際の環境底質の毒性評価に適用できるかどうかを検討するため、東京湾沿岸域で採取した環境底質を用いた毒性試験を実施した。

4. 研究成果

端脚類体内の MAF 定量法の確立

食料品店で購入したサクラエビを用いて体内蓄積金属の分画手法を検討した。結果、ICP-MS 分析前の酸添加によって生じる白色沈殿が内部標準であるスカンジウム (^{45}Sc) を吸着するため、Sc は内部標準として不適切だと示唆され、イットリウム (^{89}Y) の使用が適切であることが明らかになった。また検討した手法を *G. japonica* に適用したところ、成体 34 ~ 70 mg wet から MAF (0.25 ~ 1.0 $\mu\text{g Zn/g wet}$) を測定できることが確認出来た。

亜鉛に曝露した端脚類体内の MAF 評価

96 時間の底質毒性試験の結果、*G. japonica* に対する亜鉛の LC50 は 1663 mg Zn/kg-dry であった (図 1)。無影響濃度 (NOEC; no observed effect concentration) 以下の濃度区においても、亜鉛曝露濃度の増加に伴って生存個体中の MAF は増加することが確認できた。硫酸亜鉛を添加した海水を用いて 96 時間的水系試験を実施したところ、同様に *G. japonica* 内の MAF の濃度依存的な上昇が確認できた。水系試験と底質試験の結果を比較すると、致死率が同程度であった濃度区では、MAF も同程度の範囲を示した。このことは、MAF が曝露経路に依らない指標であることを示唆する。ただし、今回の実験は 96 時間という短期間での影響しか見ていないため、懸濁態の摂餌曝露の影響がより顕著になるとと思われる長期の影響を今後は検討する必要がある。

さらに体内蓄積亜鉛の多くはメタロチオネイン様タンパク質 (Metallothionein-Like Protein; MTLP) に結合している画分であったことから、*G. japonica* のメタロチオネイン様遺伝子の発現変動を定量 PCR によって調べたところ (対照区、156 $\mu\text{g Zn/L}$ 、780 $\mu\text{g Zn/L}$)、メタロチオネイン mRNA の発現は亜鉛濃度依存的に増加した。今回対象にした端脚類は、メタロチオネイン様遺伝子を用いて金属類の無毒化をしていることが示唆された。

H. azteca の体内亜鉛蓄積量および MAF は、1 ~ 72 時間の範囲では曝露時間によって有意な変動を示さなかったため、亜鉛の蓄積速度・排出速度を求め動力学的な解析をおこなうことはできなかった。今後はさらに曝露時間を延長して同様の検討を実施する必要がある。

以上は、端脚類に対する金属類の毒性発現の機構を考察するうえで重要な基礎的な知見である。

試験生物種の特長把握

ニホンドロソコエビの試験生物としての特性として、飼育条件下での体長増加率と一腹仔数 (雌 1 匹あたり平均 29 匹)、塩分耐性、異なる粒子径分布の人工底質に対する応答を調べた。結果、ニホンドロソコエビは幅広い塩分 (5 ~ 35 PSU) に対して強い耐性を持つ一方 (図 3)、極端な粒径分布の底質 (シルト・粘土分 0% または 25% 以上) に対しては成長を鈍化させることが明らかになった。

さらに東京湾沿岸域で採取した底質の毒性評価を実施したところ、すべての底質試料で、有意な致死毒性は見られなかったが、採取地点によって 10 日間の体長

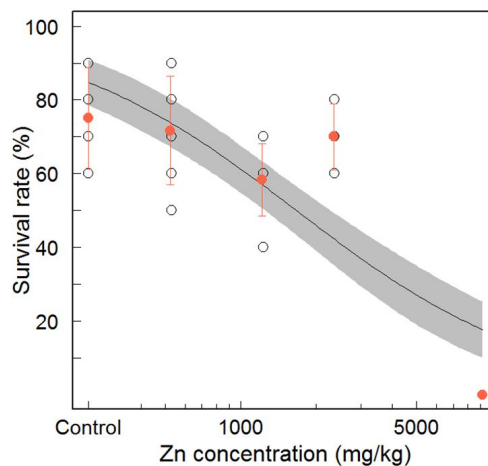


図 1: 底質毒性試験における底質中亜鉛濃度と *G. japonica* の 96 時間致死率の関係

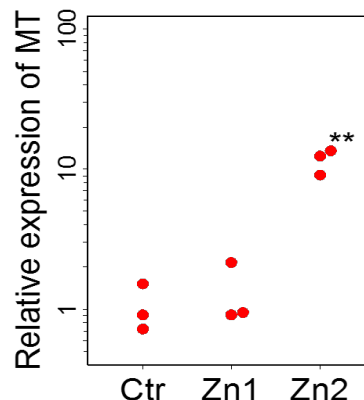


図 2: 異なる亜鉛濃度に曝露した *G. japonica* のメタロチオネイン様遺伝子の発現変動

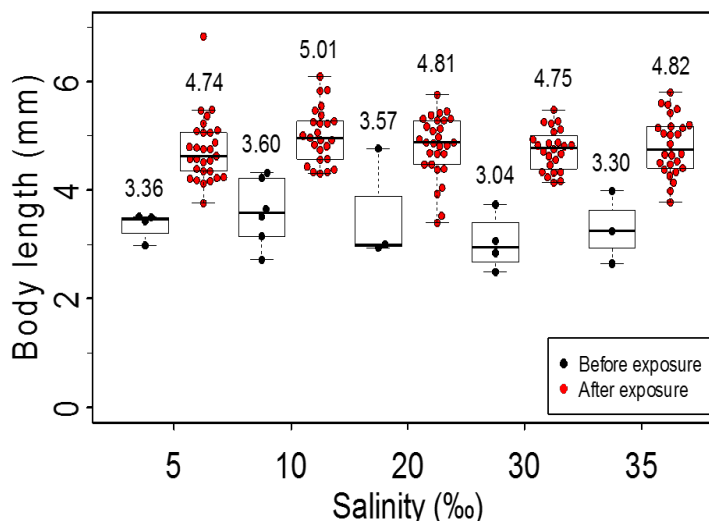


図 3: 異なる塩分下における *G. japonica* の 10 日間成長

増分に差が見られた。上記の異なる粒子径分布の人工底質での結果および化学分析の結果と比較することで、旧中川平成橋で採取した底質における成長阻害は汚染物質による成長阻害影響であることが示唆された。これらの結果は Journal of Water and Environment Technology 誌 17 号 2 巻に掲載された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kyoshiro Hiki, Fumiya Nakajima, Tomohiro Tobino, Wei Nan, 2019, Sediment toxicity testing with the amphipod *Grandidierella japonica* and effects of sediment particle size distribution, Journal of Water Environment and Technology, 査読あり, Vol 17, No. 2, p. 117-129

〔学会発表〕(計 1 件)

日置恭史郎, 中島典之, 飛野智宏, 汽水産端脚類ニホンドロソコエビを用いた東京湾底質の毒性評価, 第 52 回日本水環境学会年会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

特になし

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、研究者個人に帰属されます。