

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12367

研究課題名(和文) 超疎水性有機化合物とイガイ類の種差を利用した生物濃縮プロセスの解明

研究課題名(英文) bioconcentration processes of superhydrophobic organic compounds using species differences in the mussels

研究代表者

水川 薫子 (Mizukawa, Kaoruko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50636868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、溶存態・懸濁態経由の曝露の違いが超疎水性有機化合物LABsの生物濃縮性に反映されるという仮説を立証するために、有機汚染物質の主要な曝露経路が異なると考えられる二種のイガイ類について、実環境とは異なる経路での曝露実験を実施した。その結果、曝露経路が異なるとLABsの同族体組成は実環境と異なる結果が示唆され、仮説が支持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機化合物の生物濃縮性は疎水性と共に増すが、高すぎると逆に下がる事が知られている。しかし、このような超疎水性化合物が全く生物に移行しないわけではなく、その移行条件を探ることは超疎水性化合物に分類される多くの物質の濃縮性を把握する上で重要である。本研究で得られた結果から、溶存態の影響が強い二枚貝は、超疎水性化合物のうち比較的疎水性が低い物質の寄与が多くなる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to prove the hypothesis that differences in exposure via dissolved and suspended forms are reflected in the bioaccumulation potential of the superhydrophobic organic compound (LABs), exposure experiments were conducted on two mussel species that are considered to have different primary exposure pathways to organic contaminants, pathways that differ from those in the real environment. The results suggest that the homologue composition of LABs differs from that in the real environment when the exposure pathways are different, supporting the hypothesis.

研究分野：環境化学

キーワード：生物濃縮 超疎水性化合物 溶存態 懸濁態 イガイ

### 1. 研究開始当初の背景

沿岸海洋環境の化学物質汚染のモニタリングの代表的な手法として、イガイ科の二枚貝を指標生物としたモニタリング(mussel watch)があり、1970年代以降から非常に多くのデータの蓄積がある。その中でも *Mytilus* 属のムラサキイガイ(*M. galloprovincialis*)と *Perna* 属のミドリイガイ(*P. viridis*)は mussel watch において最も主要な属であるが、世界規模モニタリングでは異なる種の比較を要したり、温暖化による両種の生息域の変動が懸念されたり、空間的・時間的な比較を行うためには種差を考慮する必要があるものの、現状では蓄積特性の種差は考慮されていない。

既存の研究<sup>1)</sup>から、上記の二種の二枚貝において、直鎖アルキルベンゼン(LABs)の同族異性体組成に顕著な種差が認められた。LABsは合成洗剤の一種である直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩の原料やワックス中潤滑油などとしても用いられたりしている難分解性物質で、アルキル基の炭素数の異なる C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub> の同族体を持つ。東京湾の複数地点で採取したムラサキイガイおよびミドリイガイ中の疎水性有機汚染物質の蓄積性を比較したところ、LABsの同族異性体組成に顕著な違いが認められ、ムラサキイガイでは C<sub>11</sub>、ミドリイガイでは C<sub>13</sub> の同族体が優占されていた(図 1a,b)。ミドリイガイの組成は海底堆積物中の LABs 組成と類似しており(図 1d)、ミドリイガイは堆積物または懸濁物の影響を強く受けていると考えられた。一方、ムラサキイガイの LABs 組成は東京湾で係留したポリエチレンシート中 LABs 組成と類似していた(図 1c)。疎水性ポリマーは水中の疎水性有機物を吸着する性質を持ち、海水をろ過したものよりも真の溶存

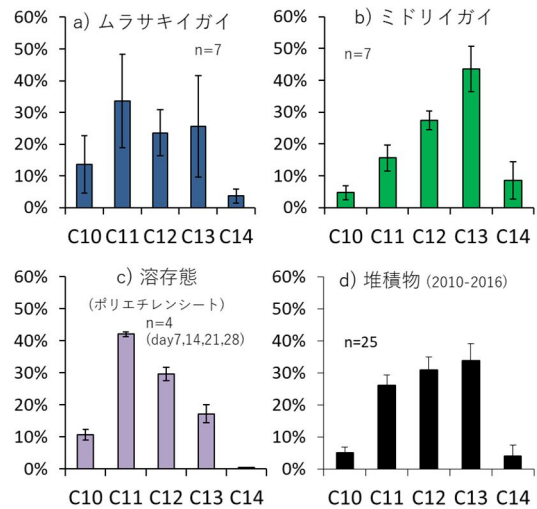


図 1 実環境中におけるイガイ類及び溶存態・堆積物中 LABs 相対組成

態濃度・組成を反映すると考えられている。そのため、ムラサキイガイの LABs 組成は溶存態を反映していると示唆された。その要因として、ムラサキイガイはミドリイガイと比較して海水のろ過量が多いこと<sup>2)</sup>、ミドリイガイはムラサキイガイよりも餌の同化効率が高いこと<sup>3)</sup>が報告されており、相対的にムラサキイガイは海水と組織間での分配がおこりやすいことが考えられた。

このような種差は、LABs よりも低い疎水性のポリ塩化ビフェニル(PCBs)や多環芳香族炭化水素(PAHs)では認められず、LABs の高い疎水性がこの種差をもたらしたと考えた。疎水性を示すオクタノール水分配係数(log K<sub>ow</sub>)は、研究例の多い PCBs や PAHs では 4.6 (Phenanthrene)-6.7 (6Cl PCBs)であるのに対し、LABs は 7.0 (C<sub>10</sub>)-9.2 (C<sub>14</sub>)と高く、超疎水性化合物(super hydrophobic compounds)に分類される。LABs は PCBs や PAHs と比較して研究例が少ないこともあり、既存の種差の研究ではこれまで生物濃縮性の違いが明らかにできなかったことが予想された。

### 2. 研究の目的

本課題では LABs の超疎水性とイガイの種差を組み合わせ、溶存態曝露源として LABs 吸着プラスチックの利用を試みた両種への曝露実験を実施する。それにより本仮説の検証を行うこととした。また、そのために、超疎水性化合物の溶存態曝露方法の検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### 【溶存態曝露方法の概要(図 2a)】

溶存態曝露によりミドリイガイの組成が変化するかを調べることを目的とした。検討のためにムラサキイガイも対象とした。ムラサキイガイまたはミドリイガイをステンレスかごに入れ、ガラス繊維ろ紙(GF/F)でろ過した人工海水中(約 30‰)で馴致させた。その後 LABs を環境雰囲気下で新品のポリエチレン製レジンペレットに吸着させたもの(約 2 µg/g-pellet)を海水に浮かべ曝露を行った。ペレットに吸着した LABs は高い疎水性ながらも水中に溶出し、同じく有機物体であるイガイ類の軟体部に蓄積させることを目的とした。給餌は、ペレットを加えていない水槽中に 1 日に 2 時間程度イガイ類を移し、市販の二枚貝の餌を与えた。

#### 【懸濁態曝露方法の概要(図 2b)】

懸濁態曝露によりムラサキイガイの組成が変化するかを調べることを目的とした。人工海水(約 30‰)に LABs を高濃度を含む堆積物を加え静置させたのち、ムラサキイガイをステンレスかごに入れて飼育した。給餌は行わず、1 日に一度堆積物を攪拌することにより懸濁物経由の曝露を行った。対照区として、人工海水のみの系でムラサキイガイの飼育をした。

## 【試料の分析方法】

得られた二枚貝は、溶存態曝露のみを行った実験では軟体部すべてを分析対象組織とした。懸濁態曝露と溶存態曝露を行った際は、中腸線に摂食した懸濁粒子を含まれている可能性があるため、生殖腺のみを分析対象組織とした。対象組織は必要に応じて複数個体をプールし、ホモジナイズしながらジクロロメタンにて抽出、または凍結乾燥後に粉化したものをジクロロメタンにて超音波集抽出した。さらに、二段階のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、ガスクロマトグラフ質量分析計で同定・定量した。

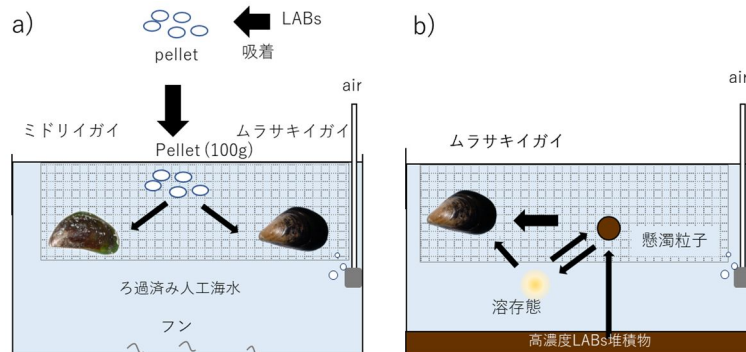


図2 曝露方法デザイン a) 溶存態曝露、b) 懸濁態曝露

## 4. 研究成果

### 【溶存態曝露実験の検討および結果】

まず、ムラサキイガイ 3 個体を用いて考案した溶存態曝露方法により LABs 濃度が増加するか検討を行った。曝露は 0 日目、7 日目に LABs 吸着ペレット 100 g を入れ替え、合計 15 日間の曝露を行った。なお、ミドリイガイは十分な数を確保できなかったが、1 個体のみ同時に曝露を行った。その結果、ムラサキイガイでは  $C_{11-13}$  のうち、複数の異性体で曝露前と比較して優位に割合が増加した。ミドリイガイは 1 個体のみ分析となったが、 $C_{12}$  の LABs が最も高い割合を示した。先行研究では、自然環境下のミドリイガイは  $C_{13}$  の LABs が最も高い割合を常に占めており、それは懸濁体の寄与によるものと予想されていた。本実験では、懸濁粒子が少ない環境下で溶存態による曝露を行ったことにより変化が生じたと考えられた。

疎水性に幅のある PCBs の場合、疎水性が相対的に低い低塩素 PCBs と比べて疎水性が相対的に高い高塩素 PCBs はペレットからの吸脱着に時間を要することが知られている<sup>4)</sup>。そのため、LABs のような疎水性の高い化合物がペレットから溶出し、イガイ類に移行するには長期間の曝露が必要となることが考えられた。

そこで、より曝露量を増やすためにムラサキイガイを用いて曝露期間を 69 日に延長した実験を行った。溶存態曝露区では、LABs の  $C_{10-12}$  の同族異性体 14 種について、day0 と比較して day69 の LABs 濃度は平均 2.9 倍となった。15 日間の曝露では平均 1.8 倍であったことから、日数を増やすことで濃度の増加率は増すことは示されたが、超疎水性化合物が曝露源であるペレットから溶出するためにはより多くの時間を要することも示唆された。

さらに脱着効率を高めるために、飼育水に分散剤(Tween 80)を加えることとした。進行研究において、分散剤を添加した海水中で疎水性プラスチック添加剤を含有するマイクロビーズ(125-250  $\mu\text{m}$ )をムラサキイガイに曝露すると、 $\log K_{ow} 12-13$  の超疎水性添加剤も溶出経路でイガイに曝露されることが明らかになった<sup>5)</sup>。そのため、本研究においても分散剤濃度を先行研究に倣い 10 mg/L とした人工海水中で 15 日間ミドリイガイ 15 個体の飼育を行った。対照区は分散剤を加えた人工海水中でミドリイガイを飼育した。

その結果、曝露区のミドリイガイの組成は  $C_{13}$  が優先する組成のまま、対照区で  $C_{11}$  が優先する組成となった(図 3)。この要因として、曝露区ではペレットから溶出した LABs はミドリイガイに吸収されずペレットに再吸着してしまい溶存態曝露が成立しなかったことが考えられた。また、今回曝露源として用いたペレットのサイズは先行研究で用いたマイクロビーズよりもサイズが大きいため(約 5 mm)、溶出に時間を要した可能性も考えられた。一方、対照区で組成が変化したことについては、予想外の結果であったが、その要因を考察した。まず、分散剤により元々ミドリイガイ組織中に蓄積していた LABs が水側に分配に偏ったことが考えられた。しかし、その場合は疎水性が相対的に低い短炭素鎖の LABs の方がより水に分配しやすくなるため、この可能性は低いと考えられる。次に考えられたのは環境雰囲気下からの海水への溶け込みである。実験を行った建物は、室内環境中の LABs が高く、それにより曝露源として用いた LABs

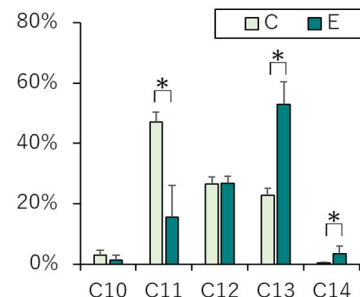


図 3 溶存態曝露区におけるミドリイガイ中 LABs 相対組成、C: 対照区、E: 曝露区、n=3、\*: p<0.05 (t-test)

吸着ペレットを作成できていたが、分散剤が海水に含まれたことにより環境雰囲気下から海水への LABs の溶解が分散剤によって促進された可能性が示唆され、結果的に真の溶存態曝露が成立したと考えられた。初回の検討実験で分散剤の無い条件下でミドリイガイの組成が変化したことについては、曝露源と被曝露体のバランスも重要な要因となることが示唆された。本現象を検証するためにはさらなる実験が必要となったが、フィールド試料で検出されていた C<sub>13</sub> が優先するミドリイガイの組成は、C<sub>11</sub> を多く含む溶存態の曝露により変化することが示された。

#### 【懸濁態曝露実験の結果】

懸濁態経由の曝露には京浜運河の御楯橋付近の堆積物を用いた。この地点は、事前の分析により約 40 μg/g-dry の濃度で LABs を含むことが明らかになっている。水槽内に人工海水と約 2 kg-wet の堆積物を入れ攪拌・静置させて沈降させた後に、ステンレスかごにムラサキイガイ 6 個体を加え、曝露を行った。懸濁態曝露実験では、ムラサキイガイの C<sub>11</sub> の割合は、対照区と比較して有意に減少した(図 4)。統計的な有意差は認められなかったが、堆積物に多く含まれる C<sub>13</sub> の割合も対照区と比較して増加した。フィールド試料において、ムラサキイガイ中の LABs 相対組成はミドリイガイと比較してばらつきが大きかった。溶存態経由の C<sub>11</sub> を主体とする LAB の曝露は、平衡に達しているため一定の組成での曝露になることが予想される。一方、海水中の懸濁粒子が多い場合は C<sub>13</sub> を多く含む LABs の曝露量が相対的に増加すると考えられる。ムラサキイガイの組成のばらつきの多さは地点による懸濁粒子の曝露量に起因するである可能性が考えられた。

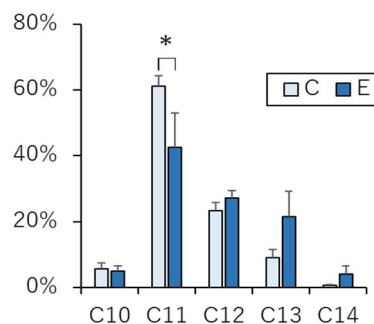


図 4 懸濁態曝露区におけるムラサキイガイ中 LABs 相対組成, C: 対照区, E: 曝露区, n=3, \*: p<0.05 (t-test)

#### 【両実験から得られた成果】

以上より、実環境中で異なる組成を示していた二種のイガイ類は、室内実験で実環境中と大きく異なる曝露源に曝されることによりその組成に変化が生じることが示された。実験系としては、本研究により超疎水性化合物の真の溶存態曝露を実施するにあたり必要な課題が明確になり、今後の環境化学分野の発展に資する結果となったと考えられる。

#### 引用文献

- 1) 水川薫子, 榊原寛之, 高田秀重 (2017), イガイ類への疎水性有機化合物(HOCs)蓄積プロセスの種間差, 第 26 回環境化学討論会要旨集
- 2) 磯野 良介, 中村 義治 (2000), 二枚貝による海水濾過量の推定とそれにおよぼす温度影響の種間比較, 水環境学会誌, 23, 683-689
- 3) Wong, Levinton, Twining, Fisher, Kelaher and Alt (2003), Assimilation of carbon from a rotifer by the mussels *Mytilus edulis* and *Perna viridis*: a potential food-web link, *Marine Ecology Progress Series*, 253, 175-182
- 4) Endo, Yuyama, Takada (2013), Desorption kinetics of hydrophobic organic contaminants from marine plastic pellets, *Marine Pollution Bulletin*, 74, 125-131
- 5) 水川薫子, 高野泰地, 高田秀重 (2022), 二枚貝へのマイクロプラスチック曝露実験による臭素系難燃剤とベンゾトリアール系紫外線吸収剤の生物組織への移行評価, 第 30 回環境化学討論会要旨集

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水川薫子
2. 発表標題 イガイ類への超疎水性化合物の溶存態曝露実験
3. 学会等名 環境化学オンライン研究発表会2020
4. 発表年 2020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
---------	---------