

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450252

研究課題名(和文) 除草剤のアマモに対する生態リスク解析 - アマモ場の衰退機構解明と再生を目指して -

研究課題名(英文) Ecological risk assessment for a couple of herbicides to eelgrass (*Zostera marina*)

研究代表者

持田 和彦 (MOCHIDA, KAZUHIKO)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・グループ長

研究者番号：00371964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：藻場を象徴する種であるアマモを試験生物として、作用機構の異なる除草作用を持つ船底塗料用防汚物質や農薬(除草剤)の毒性影響を調べた。試験の結果、光合成を阻害する物質群に特に強い毒性影響が認められた。瀬戸内海における除草剤の検出頻度や濃度を考えると、光合成阻害作用を持つ物質のアマモに対する生態リスクがより高いことが示唆された。また、船底塗料用防汚物質であるイルガロールに曝露した個体について代謝物総体解析を行った結果、スクロース等の糖が減少すると同時にアミノ酸類の増加が認められ、光合成阻害により不足する恒常性維持に必要なエネルギーをタンパク質の分解により補う反応であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Eelgrass (*Zostera marina*) is the commonest species of seagrass beds that are an important component of many coastal marine environments. Toxicity of an antifouling biocide, or agricultural chemicals that act as herbicide with various mechanism of action to eelgrass were examined using the leaf growth and potential quantum yield as endpoints. Herbicides, that inhibit photosynthetic activity, exhibited the strongest toxicity, comparing to herbicides with other mechanism of action. Considering the detected concentrations of these herbicides in the Seto Inland sea, it is suggested that ecological risk of herbicides with the photosynthesis inhibiting activity to eelgrass is higher than those with other mechanism of action. Metabolome analysis for a herbicide (Irgarol 1051)-exposed eelgrass revealed that decrease in sugars, such as sucrose, and increment of amino acids occurred. This phenomenon is considered to be compensation for loss of metabolic energy due to the decrease in sugars.

研究分野：生態毒性学

キーワード：代謝物総体解析 最大量子収率 クロロフィル量 イルガロール

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アマモは「アマモ場」と呼ばれる海中林を作り、沿岸域の水質浄化や多様な魚介類(とくに稚仔魚)の生育を支える重要な場(海のゆりかご)を提供する。しかしながら1960年代以降、各地の内湾環境においてアマモ場の消失が顕著となり、沿岸生態系機能に対する悪影響が懸念されている。

(2) アマモ場の消失については、埋め立てや富栄養化等に起因する濁度上昇による光量の減少が主要因であると考えられているが(南西水研 1974、他) これらの要因だけでは十分に説明できないケースも多く存在する(Tamaki et al. 2002、他)。また、アマモ場の沿岸生態系における重要性が見直され、各地で再生事業が行われているが、これまでのところ成功に到った事例はほとんどない。

(3) 沿岸域においてアマモのように藻場を形成する海産藻類・草類は、船底・漁網用防汚剤や陸域由来の農薬(=「除草剤」と総称)の影響を常に受けていると考えられる。防汚剤として頻用されている Irgarol 1051 (イルガロール)や Diuron (ジューロン)は、強い光合成阻害作用を有する。さらに、これらの物質は瀬戸内海沿岸域の海水中から高い頻度で検出されており(Okamura et al. 2003; Balakrishnan et al. 2012、等)、これらの除草剤がアマモに対して負の影響を及ぼしている可能性がある。過去にアマモ場の消失原因として陸域からの除草剤負荷の可能性を指摘した例はあるが(Yamamuro et al. 2006)、現場環境中における除草剤のアマモへの影響を科学的に検証した事例は皆無である。

従って、アマモ場の再生につながる効果的なリスク低減策策定のためには、上述の化学物質のアマモに対する毒性影響を調べ、生態リスクを詳細に解析することが必要である。

### 2. 研究の目的

(1) 除草剤は主に光合成阻害、栄養代謝阻害、および微小管重合阻害の3種類の異なる作用機序を持つ物質群に分類され、これらの作用により生長阻害を引き起こし、殺草作用を示す。本研究では、異なる作用機序を持つ各種除草剤のアマモに対する毒性影響を明らかにする。

(2) 対象とする除草剤の実環境中における濃度分布調査を実施する。

得られた結果に基づき、各種除草剤のアマモに対する生態リスク(生物や生態系に対する潜在的危険性)を詳細に解析し、アマモ場再生のためのリスク低減策策定に資することを本研究の最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 毒性試験: アマモ親株を試験生物とし

て毒性試験を実施した。被験物質は船底塗料用防汚物質であるイルガロール(光合成阻害)、陸上で農薬として使用される、プレチラクロール(脂肪酸鎖延長阻害=「栄養代謝阻害」)、およびプロモブチド(微小管重合阻害)を用いた。

我々の予備調査からいずれの物質も瀬戸内海沿岸域で検出されている。これらの物質にアマモ親株を2週間曝露した。影響評価指標は主に生長および光合成能(最大量子収率  $F_v = (F_m - F_o) / F_m$ )とし、生長阻害および各指標の変化量との相関を調べた。さらに、イルガロール曝露個体についてはガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いた代謝物総体解析を既報(Hano et al., 2017)により行った。

また、暗条件および高水温(27)の環境ストレス下で2週間飼育し、生長および光合成能について調べるとともに、代謝物総体解析を行い、イルガロール曝露個体との比較を行った。

(2) 環境中被検物質濃度: 瀬戸内海沿岸域を調査地点とし、定期的に海水サンプリングを実施した。なお、被検物質濃度の分析はGC-MSを用いて行った。また、被検物質の環境中濃度に関する文献調査もあわせて実施した。

(3) 生態リスク推定: 調査および文献により得られた環境中被検物質濃度、および毒性試験結果より、被検物質ごとの生態リスクを比較した。以上の結果をもとに調査海域におけるアマモ生長阻害要因について考察した。

### 4. 研究成果

(1) 環境ストレスのアマモに対する影響

#### 除草剤

イルガロールに曝露したアマモの生長について調べた結果、曝露濃度依存的な生長阻害効果が認められた(図1A)。また、1 μg/L以上の濃度区で助剤対照区との間に有意差が認められた。また、光合成能の指標である最大量子収率についても同様に曝露濃度依存的な減少傾向が認められた(図1B)。

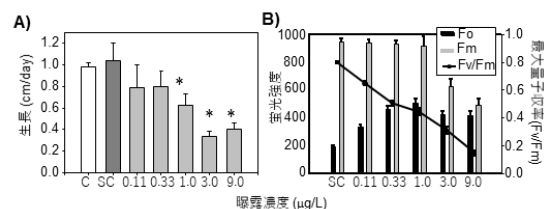


図1. イルガロール曝露2週間後のアマモの生長(A)および最大量子収率(Fv/Fm)(B)。C, 対照区; SC, 助剤対照区。\*は助剤対照区との間に有意差(P < 0.05)があったことを示す。

最大量子収率の減少については、クロロフィル蛍光のバックグラウンド値であるFoの曝露濃度依存的な上昇が原因であり(図

1B) また、この現象はイルガロールにより光化学系 II の電子伝達に障害が起こったため、行き場を失った電子のエネルギーによりクロロフィルが蛍光を発したためであると考えられた。生長および最大量子収率について 14 日間半数影響濃度を計算した結果、それぞれ 4.2 (1.0-7.3)  $\mu\text{g/L}$  および 0.5(0.41-0.66)  $\mu\text{g/L}$  が得られた (括弧内の数字は 95%信頼区間を示す)。

他の作用機序を持つ除草剤のアマモに対する毒性について調べた。プレチラクロールについては 90  $\mu\text{g/L}$  まで、プロモブチドについては 1 mg/L の濃度までで試験を試みたが、いずれの物質についても生長および最大量子収率ともに顕著な影響は認められなかった。

### 暗条件および高水温の影響

暗条件および高水温に 2 週間処理した個体の生長および光合成能を図 2 に示した。それぞれの処理区の個体の平均生長は対照区の個体の 44% および 66% であった (図 2A)。なお、最大量子収率については対照区との間に顕著な差は認められなかった (図 2B)。

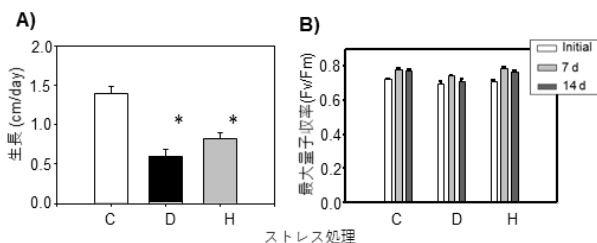


図 2. 暗条件(D)および高水温処理(H)個体の生長阻害(A)および光合成能(B)。C, 対照区。\* は対照区との間に有意差 ( $P < 0.05$ ) があつたことを示す。

### 代謝物総体解析

アマモの葉体内代謝物として、糖、アミノ酸、その他有機酸など 50 種の代謝物を同定した。まず、イルガロール曝露によるそれらの変動を主成分分析により調べた (図 3)。

分析の結果、曝露濃度に依存して代謝物の変動を受けている傾向が顕著にみとれ、その傾向は曝露期間が長くなればより明確となっていた。

特に変動の大きい代謝物を見ると、3-ホスホグリセリン酸やスクロースの減少が顕著であった。さらに、ミオイノシトールの増加も顕著であった (図 4)。

3-ホスホグリセリン酸はカルビン回路において最初に二酸化炭素を固定する分子である。イルガロールにより光化学系 II における電子伝達が阻害され、二酸化炭素を固定するためのエネルギーが十分でなくなったため、結果として 3-ホスホグリセリン酸の量も減少したと考えられた。さらに、糖新生に必要なエネルギーや分子も不足したためスクロースが顕著に減少したと考えられた。

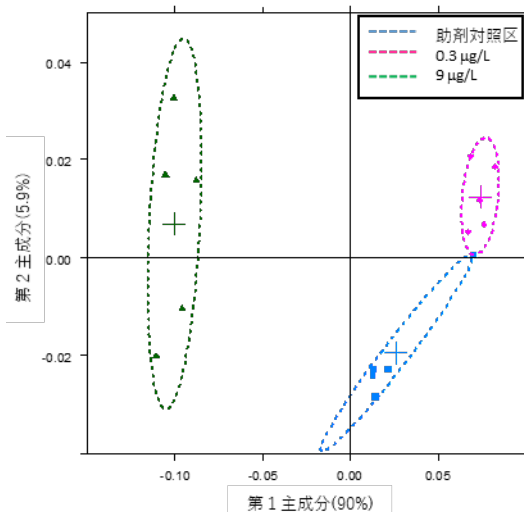


図 3. イルガロールに 14 日間曝露したアマモ葉体内代謝物の主成分分析の結果。

ミオイノシトールは植物において様々な機能を持つことが知られている (Loewus and Murthy, 2000)。イルガロール曝露個体では生長阻害が観察されたが、ミオイノシトールは細胞壁の合成においても機能しているため、合成過程に何らかの障害が生じた可能性が考えられた。

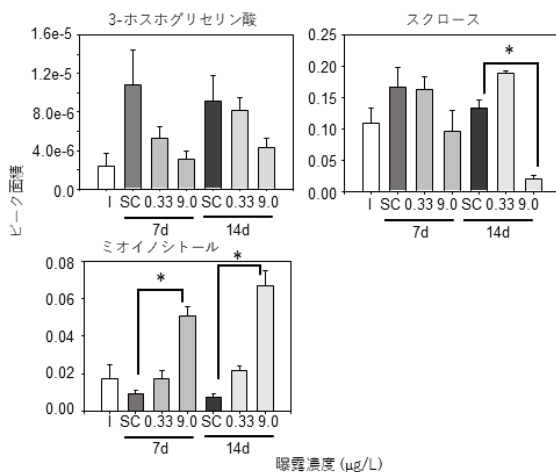


図 4. イルガロールに曝露したアマモ葉体内代謝物の変動。I, 曝露前個体; SC, 助剤対照区。\* は助剤対照区との間に有意差 ( $FDR < 0.05$ ) があつたことを示す。

次に、暗条件および高水温処理した個体についても代謝物変動について調べた。主成分分析を行った結果、特に、暗条件処理による代謝物の変動が顕著であった (図 5)。代謝物の内訳についてみると、暗条件処理個体においてスクロースの減少は顕著であったが、3-ホスホグリセリン酸の顕著な減少は認められなかった (図 6)。暗条件処理個体においても生長阻害が認められたことから、カルビン回路以外の代謝系の障害がより顕著であることが示唆された。また、ミオイノシトールについても顕著な増加が認められ、イルガロ

ール曝露個体同様に、暗条件処理個体においても、細胞壁合成過程において何らかの障害が生じていることが示唆された。

また、イルガロール曝露個体や暗条件処理個体においてはいくつかのアミノ酸の顕著な増加が認められた(図7)。

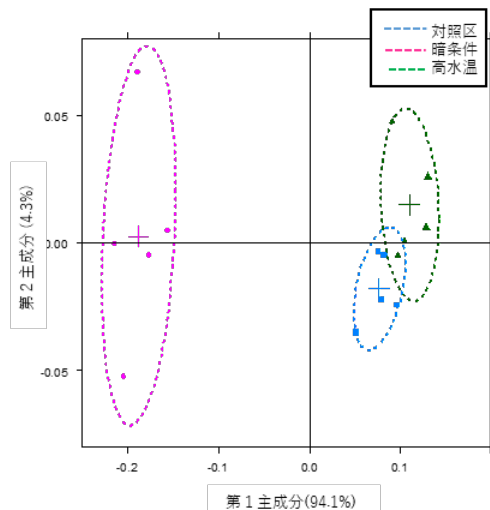


図5. 暗条件(D)および高水温(H)下で14日間飼育したアマモ葉体内代謝物の主成分分析の結果。

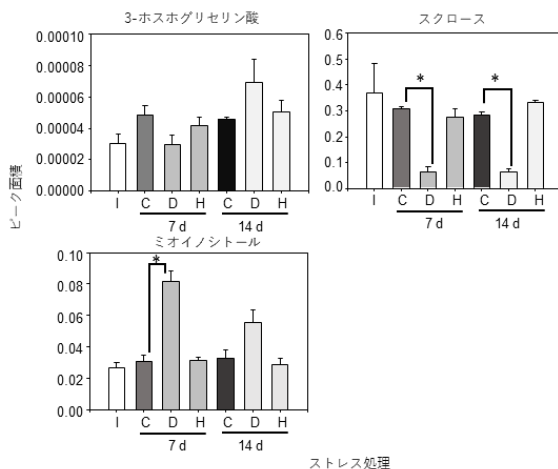


図6. 暗条件(D)および高水温(H)下で飼育したアマモ葉体内代謝物の変動。I, 曝露前個体。\*は助剤対照区との間に有意差 ( $FDR < 0.05$ ) があったことを示す。

どちらの処理もスクロースなど糖の減少により恒常性維持に必要なエネルギーが不足していると考えられる。そこで、アミノ酸を増加させ、それらを原料として糖の減少に伴い不足するエネルギーの減少分を補っていることが示唆された。アミノ酸の増加については、オートファジーによりタンパク質を分解して生じている可能性が考えられるため、今後はオートファジーが実際に生じているか生化学的および組織学的な証拠を集積する必要がある。

なお、高水温処理個体については分析に用いた代謝物の中で特徴的な変動を示す物質は認められなかった。今回は糖、アミノ酸等

の水溶性代謝物を対象としたが、脂溶性の代謝物も視野に入れ、高温ストレスに特異的指標を検索する必要がある。

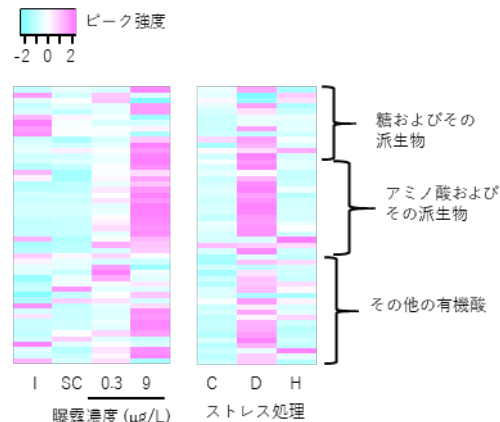


図7. イルガロール曝露および環境ストレス処理下で2週間飼育したアマモの葉体内代謝物のヒートマップ図。I、曝露前個体；C、対照区；SC、助剤対照区；D、暗条件処理；H、高水温処理。

## (2) 生態リスク解析

瀬戸内海沿岸域において検出されたイルガロールの濃度について文献調査を実施した。1997年から2013年まで断続的にモニタリングした結果が報告されている (Okamura et al., 2003; Balakrishnan et al., 2012; Kaonga et al., 2015)。最高検出濃度は  $1.1 \mu\text{g/L}$  であるが (Kaonga et al., 2015)、海水中濃度の平均は  $40 \text{ ng/L}$  であり、報告されている期間を通じてほとんど変化していない。アマモ親株の生長や光合成能を指標とした毒性値は  $4.2 \mu\text{g/L}$  および  $0.54 \mu\text{g/L}$  であり、特に、最大量子収率については環境中濃度と10倍程度しか乖離していない。また、瀬戸内海における最高検出濃度は最大量子収率を指標とした毒性値を上回っており、少なくとも光合成能に何らかの影響が出ている可能性が考えられる。

瀬戸内海沿岸域数地点での2年にわたる調査の結果、プレチラクロールおよびプロモブチドの最高検出濃度はそれぞれ  $6 \text{ ng/L}$  および  $176 \text{ ng/L}$  であった。本研究で毒性試験を試みたそれぞれの物質の最高濃度はプレチラクロール  $90 \mu\text{g/L}$  およびプロモブチドが  $1 \text{ mg/L}$  であり、これらの値は、環境中からの最高検出濃度のそれぞれ15000倍および5900倍に相当する。プレチラクロールおよびプロモブチドについては上述の濃度で毒性影響は認められなかったため、少なくともこれらの物質についてはアマモの親株に対する生態リスクは極めて低いと考えられた。

イルガロールの毒性値や海水中濃度および検出頻度を考えると、アマモの親株に対しては、光合成阻害作用を持つ除草剤のリスクが、他の作用機序を持つ除草剤より高いことが推察される。今後は光合成阻害作用を持つ除草剤の複合的な影響や、水温や光条件などの環境ストレス因子が除草剤の毒性に及ぼ

す影響について詳細に調べる必要がある。

#### 引用文献

- Balakrishnan, S. Takeda, K. Sakugawa, H. Occurrence of Diuron and Irgarol in seawater, sediments and planktons of Seto Inland Sea, Japan. *Geochem. J.* 46, 2012, 169-177.
- Hano, T., Ohkubo, N., Mochida, K. A hepatic metabolomics-based diagnostic approach to assess lethal toxicity of dithiocarbamate fungicide polycarbamate in three marine fish species. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 138, 2017, 64-70.
- Kaonga, C.C. Takeda, K. Sakugawa, H. Antifouling agents and fenitrothion contamination in seawater, sediment, plankton, fish and selected marine animals from the Seto Inland Sea, Japan. *Geochem. J.* 49, 2015, 23-37.
- Loewus, F.A., Murthy, P.P.N. Myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150, 2000, 1-19.
- 南西海区水産研究所 瀬戸内海の藻場 昭和46年の現状 1974, 1-39.
- Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y., Nishida, T. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar. Poll. Bull.* 47, 2003, 59-67.
- Tamaki, H., Tokuoka, M., Nishijima, W., Terawaki, T., Okada, M. Deterioration of eelgrass, *Zostera marina* L., meadows by water pollution in Seto Inland Sea, Japan. *Mar. Poll. Bull.* 44, 2002, 1253-1258.
- Yamamuro, M., Hiratsuka, J., Ishitobi, Y., Hosokawa, S., Nakamura, Y. Ecosystems shift resulting from loss of eelgrass and other submerged aquatic vegetation in tow estuarine lagoons, Lake Nakamumi and Lake Shinji, Japan. *J. Oceanograph.* 62, 2006, 551-558.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計 5 件)

- 持田和彦、他 4 名 船底塗料用防汚物質 Irgarol 1051 の海産大型草類アマモに対する毒性。第 20 回日本環境毒性学会研究発表会。2014.9.11 「富山国際会議場(富山県、富山市)」
- 持田和彦、他 4 名 防汚物質イルガロール 1051 のアマモに対する毒性影響。平成 27 年度日本水産学会春期大会 2015.3.29 「東京海洋大学(東京都、品

川区)」

持田和彦、他 4 名 除草剤 2 種のアマモに対する毒性比較。第 21 回日本環境毒性学会研究発表会。2015.9.2 「東洋大学(東京都、文京区)」

持田和彦(代表者)、羽野健志(発表者) 他 3 名 防汚物質イルガロールに曝露されたアマモの葉体内代謝物変動。第 67 回生物工学会大会。2015.10.26 「城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)」

持田和彦、他 4 名 除草剤などの様々な環境ストレスがアマモに及ぼす影響 生長、光合成活性、および葉体内代謝物変動比較。第 22 回日本環境毒性学会研究発表会。2016.9.6 「愛媛大学(愛媛県、松山市)」

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

持田 和彦 (MOCHIDA, Kazuhiko)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
瀬戸内海区水産研究所・グループ長  
研究者番号: 00371964

##### (2) 研究分担者

吉田 吾郎 (YOSHIDA, Goro)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
瀬戸内海区水産研究所・グループ長  
研究者番号: 40371968

隠塚 俊満 (ONDUKA, Toshimitsu)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
瀬戸内海区水産研究所・主任研究員  
研究者番号: 00371972

羽野 健志 (HANO, Takeshi)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
瀬戸内海区水産研究所・主任研究員  
研究者番号: 30621057

##### (3) 連携研究者

桑原 隆治 (KUWAHARA, Ryuji)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
瀬戸内海区水産研究所・環境保全研究センター長  
研究者番号: 10416026

伊藤 克敏 (ITO, Katsutoshi)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
瀬戸内海区水産研究所・主任研究員  
研究者番号: 80450782