

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00617

研究課題名(和文) 海産ゴカイ類へのパーフルオロアルキル酸化合物の移行動力学の解明と予測

研究課題名(英文) Transfer kinetics and its prediction of perfluoroalkyl acids to a marine sandworm species

研究代表者

櫻井 健郎 (Sakurai, Takeo)

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・室長

研究者番号：90311323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：一連のパーフルオロアルキル酸化合物(PFAAs)を対象に、海産ゴカイ類への移行動力学を明らかにすることが本研究の目的である。実験系の改良、確立を行った後、海水曝露および餌曝露実験を行い、試料の分析、動力学解析を行った。PFAAs 10化合物の体表面と消化管とでの取り込み効率(体内に取り込まれ得る量のうちに取り込まれた割合)、また体内からの消失半減期を化合物ごとに明らかにした。また、これに基づき水中および食物中濃度よりゴカイ中PFAAs濃度を予測するモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海産底生動物への化学物質の移行は、食糧資源としても重要な沿岸海域食物網への化学物質の入口として重要であるが、知見が限られている。また、パーフルオロアルキル酸化合物を含むイオン性化合物は環境中の動態に関する知見が限られている。本研究の成果は、多様な化学物質の排出から曝露に至る動態予測を確立する際の基礎となるものである。本研究成果を他化合物に対して一般化し、環境媒体中濃度と生息環境の状況から、底生動物中さらに魚類や哺乳類を含む他生物中の化学物質濃度を動力的に予測する研究へ展開できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study to elucidate the transfer kinetics of perfluoroalkyl acids (PFAAs) to a marine sandworm species. We established an individual-exposure system for both seawater and food exposure. We then conducted transfer experiments from seawater and food, analyzed the samples, and kinetically analyzed the results. We obtained estimates of the respiratory uptake efficiency, the gut uptake efficiency and the depuration half-life for 10 PFAA compounds. Then we constructed a model equation to predict PFAA concentrations in the sandworm from their concentrations in water and in food.

研究分野：環境科学、環境化学

キーワード：汚染質動態とモデリング 残留性 生物蓄積 底生動物 動力学 吸収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 水環境から水生生物への多種の化学物質の移行を明らかにし、また精度良く予測することは、環境の保全および化学物質の悪影響のリスク管理のために重要である[1]。海産底生動物は、食糧資源としても重要な沿岸海域食物網への化学物質の入口として重要である[2, 3]が、化学物質の移行動力学の知見が限られている。

(2) 全フッ素置換されたアルキル基と官能基からなるパーフルオロアルキル酸化合物 (PFAAs) またその前駆化合物は、幅広い用途に使用され、PFAAs は世界中の環境中に残留している。うち二化合物がこれまでにストックホルム条約の残留性有機汚染物質に指定されている。しかし、PFAAs を含むイオン性化合物は環境中動態の予測に必要な知見が不足している。とくに、種々の生物に適用可能な予測モデル構築に重要な取り込み効率まで明らかにした報告が殆どない[2-5]。

(3) 多毛類は、堆積性の沿岸域において、底生大型無脊椎動物の生産量のうち大きな割合を占め、魚、貝、甲殻類などの食物となるとともに、環境中の化学物質が人間への曝露に至る重要な経路である。われわれは底生動物のモデル動物の一つとして、イソゴカイに着目して研究を進めてきた[2, 3]。イソゴカイは、日本に広く生息した類縁種がほぼ世界中の沿岸部に分布しているため、生物蓄積性、毒性評価のための国際的に標準化した試験法への展開も見据えた実験モデル動物として適していると同時に、わが国で釣り餌として養殖業が確立しており入手しやすい。

(4) われわれはイソゴカイにおいて、PFAAs の一である PFOS の移行動力学をはじめ明らかにした[3, 6]。しかし、PFAAs の他の化合物の動力学は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

一連の PFAAs を対象に、海産ゴカイ類への移行動力学を新たに明らかにする。すなわち、PFAAs の体表面での呼吸に伴う取り込み効率(体内に取り込まれ得る量のうちの取り込まれた割合)と消化管での取り込み効率、また体内からの消失半減期を明らかにする。また、これに基づき水中および食物中濃度よりゴカイ中 PFAAs 濃度を予測するモデルを構築する。

3. 研究の方法

(1) 個体別飼育曝露系の改良

すでに確立した個体別飼育曝露系[6]について、実験の効率化のための飼育容器の小型化および曝露給餌の際の採餌率の向上の検討を行った。

(2) ゴカイおよび餌試料中 PFAAs 分析方法の確立

既報に基づき、特にゴカイ、配合餌料への適用を中心に検討した。

(3) 餌への PFAAs 添加方法の確立

PFAAs の一である PFOS について応募者らが確立した個別添加法[7]を適用した。

(4) 確認実験

小規模な確認実験と分析を行い、実験系のブランク水準、添加餌の摂餌状況、曝露水中の PFAAs 濃度、取り込み効率と消失半減期の概略値等を確認し、本実験の設定に反映させた。

(5) 移行本実験

いずれの実験も、PFAAs はアルキル鎖長 3-9 のカルボン酸 (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA) と鎖長 4、6、8 のスルホン酸 (PFBS, PFHxS, PFOS) とを対象とし、混合物で曝露した。ゴカイは養殖業者より購入したイソゴカイ (*Perinereis wilsoni*) を用いた。定期的にゴカイ、海水試料を採取し、分析までゴカイ試料は冷凍、水試料と餌試料は冷蔵保存した。また、水温、溶存酸素 (DO) 濃度等の水質を計測した。曝露濃度は一段階とし、曝露区とは別に PFAAs を曝露しない対照区を設置した。餌料は海産仔稚魚用配合飼料 (粒径 1 mm 弱程度) を用いた。

海水曝露実験では、ゴカイを個体別に飼育容器 (100 mL) 内に導入した上で、水位を一日周期で規則的に変化させた。ゴカイは曝露区 55 個体、対照区 16 個体を用いた。導入日を 0 日目とし、PFAAs を添加した海水中で飼育する曝露期間 7 日間、これに続き清浄な環境中で飼育する浄化期間 10 日間、計 17 日間 (0-17 日目) の実験期間で行った。曝露期間には、曝露区で設定濃度 40 ng/L (各化合物) となるよう PFAAs を添加混合した海水を実験水槽に導入することでゴカイを PFAAs に曝露させた。対照区では PFAAs の添加に必要な量と同量のメタノールを添加した海水を用いて、他は曝露区と同様に実施した。7 日目に、両実験区ともに新たな飼育容器にゴカイを移し、移行後は無添加の海水を用いて実施した。両実験区ともに曝露期間は給餌せず、8 日目より一日おきに給餌 (配合餌料) を行った。

餌曝露実験では、ゴカイを個体別に飼育容器 (300 mL) 内に導入した上で、水位を一日周期で規則的に変化させた。容器内の砂利中に巣穴としてテフロン製のチューブを設置した。ゴカイは曝露区 50 個体、対照区 20 個体を用いた。導入日を 0 日目とし 23 日間 (0-23 日目) の実験期間で行った。1 日目に、曝露区では PFAAs を添加し、対照区ではメタノールのみを添加した配合餌

料をそれぞれ摂餌させ、個体ごとに摂餌数を記録した。両実験区ともに3日目より一日おきに何も添加しない餌の給餌を行った。排泄物等からの再曝露の可能性を減らすため、5日目に全個体をそれぞれ新たな飼育容器に移した。以降は巣穴の設置無しで飼育した。

(6)本実験試料中 PFAAs 濃度の分析

(2)で確立した方法により、ゴカイ、海水、餌試料中の PFAAs 濃度を測定した。

(7)結果の動力学解析

海水曝露実験における PFAAs の動力学は、ゴカイ中濃度の一次速度論に基づくマスバランス式(式1)により化合物ごとに解析した[2-5]。

$$\frac{dC_b(t)}{dt} = k'_{\text{resp}} C_w - (k'_d + k'_g) C_b(t) \quad (1)$$

$$k = \frac{24}{23} = k' \quad (2)$$

$$\alpha_r^* = \frac{k_{\text{resp}} DO}{r} \quad (3)$$

ここで、 C_b はゴカイ中 PFAA 濃度、 C_w は水中 PFAA 濃度、 t は時刻、 k_{resp} は呼吸に伴う取り込み速度定数、 k'_d は消失速度定数、 k'_g は成長速度定数、 α_r^* は呼吸に伴う取り込み効率(溶存酸素に対する相対値)、 DO は溶存酸素濃度、 r は体質量あたりの呼吸速度[11]である。なお、体内からの消失半減期 $t_{1/2} = (\ln 2)/k'_d$ である。データを対数値の最小二乗法により式1に当てはめて各速度定数を推定した。水位が飼育容器底面の間(1日に1時間)は、取り込み、消失は起こらないと仮定し、見かけの速度定数(′付き)を式2で補正して速度定数を求めた上で、取り込み効率を計算した(式3)。 C_w および DO は飼育容器内の間隙水中の実測値の平均値を用いた。

餌曝露実験における PFAAs の動力学はゴカイ体内存在量の一次速度論に基づくマスバランス式(式4、5)により化合物ごとに解析した[2-5]。

$$\frac{db(t)}{dt} = \frac{a'_i m_i}{t_2 - t_1} - k'_d b(t) \quad (t_1 \leq t \leq t_2) \quad (4)$$

$$\frac{db(t)}{dt} = -k'_d b(t) \quad (t_2 \leq t) \quad (5)$$

ここで、 b は摂餌数で規準化したゴカイ中 PFAA 存在量、 t_1 は添加餌取り込み開始時刻(= 1 d)、 t_2 は添加餌取り込み終了時刻(= 2 d)、 a'_i は消化管からの取り込み効率、 m_i は餌一粒中の量(実測値の平均値)である。データを対数値の線形回帰により式5に当てはめて k'_d を推定し、次に式4により a'_i を推定した。

(8)移行予測モデルの構築

得られた動力学パラメーターに基づき、水中および食物中濃度よりイソゴカイ中 PFAAs 濃度を予測するモデルを構築した。

4. 研究成果

(1)個体別飼育曝露系の改良

海水曝露系、餌曝露系いずれも、底部および側面に穴を開けたポリプロピレン製円筒容器に、砂利(粒径3-6 mm程度)を入れたものを飼育容器とし、ゴカイ一頭ごとに用いた。海水曝露系では容量100 mLの容器を用いた。餌曝露系では容量300 mLの容器を用い、巣穴として砂利内にテフロン製のチューブを設置した。以前の容器の容量580 mLより小型化し、実験作業が効率化された。ただし、容器の小型化に伴い飼育容器外への脱出の頻度が高くなった。また100 mL容器では脱出した個体が別容器に入ったと思われるケースも複数観察された。小型化の利点と脱出の頻度を勘案すると、容器の大きさとしては容量300 mL程度が妥当と考えられる。餌曝露実験における曝露給餌の際の採餌率を上げるため検討を行ったが、安定して高い採餌率を得ることはできなかった。本実験での採餌率は3割程度であり、引き続き改善の検討が必要である。

(2)ゴカイおよび餌試料中 PFAAs 分析方法の確立

ゴカイおよび餌については既報[8-10]をもとに検討、修正を行った。試料に同位体標識した内標準を添加後、アルカリ分解、溶媒抽出し、溶媒転換後、固相抽出カートリッジにより精製することとした。海水は、既報[8]に従い、固相抽出カートリッジにより濃縮、精製し分析した。この際、試料容器に採取した試料に、保存の前に、同位体標識した内標準を添加することとした。

(3)餌への PFAAs 添加方法の確立

餌一粒あたりの添加量を確認した。対象とする10化合物について平均値で1.2-1.6 ng、化合

物ごとに粒間の相対変動は 12%-23%程度であった ($n = 5$ あるいは 6)。

(4) 確認実験

海水曝露実験については、本実験と同様の設営で、ゴカイは導入せずに、添加海水を実験水槽に流し入れ、実験水槽水および飼育容器内の間隙水を採取し分析した。曝露区での水中濃度は概ね設定濃度に近かった (平均 43 ng/L)。また対照区での濃度は概ね曝露区での濃度の 1/100 より小さかった。以上より、曝露濃度の実測値に基づき解析することで実験は実施可能と判断した。

餌曝露実験については、本実験と同様の設営で 10 日間の実験を行った。ゴカイの摂餌率は曝露区 22%、対照区 39%であった。曝露区添加餌中の PFAAs 量は化合物平均で 1.3 ng であった。化合物ごとに、おおむね、摂餌量に見合う体内存在量が確認され、その経時変化を確認することができたため、実験の実施は可能であると判断した。ただし、濃度減少の傾向が明確でない化合物があったため、本実験はより長期間で行うこととした。

(5) 移行本実験

海水曝露実験では、飼育容器内の温度は 17.6 ± 0.2 (平均 \pm 標準偏差) DO 濃度は $61\% \pm 20\%$ であった。飼育容器から脱出した個体は、可能なものは飼育容器に再導入して実験を継続した。

餌曝露実験では、飼育容器内の温度は 17.7 ± 0.2 、DO 濃度は $100\% \pm 4.2\%$ であった。巣穴中の DO 濃度は $85\% \pm 8.9\%$ であった。曝露時の摂餌率は曝露区 24%、対照区 32%。摂餌数 (摂餌のあったもの) は 2-8 粒であった。

(6) 本実験試料中 PFAAs 濃度の分析

海水曝露実験では、ゴカイ試料 (曝露区 41、対照区 4) 水試料 (曝露区: 間隙水 11、水槽水 9。対照区: 間隙水 4、水槽水 4) 中の PFAAs 濃度を分析した。ゴカイ試料では、体内濃度として化合物ごとに曝露区で検出下限未満から 90 ng/g-wet、対照区でおおむね検出下限未満であった。対照区で PFHxA が 0.2 ng/g-wet に相当する水準で検出されたが曝露区個体中濃度より十分に低かった。水試料は、曝露区の間隙水で化合物の平均として 44-62 ng/L の範囲であった。対照区試料中濃度は検出下限未満か操作ブランクと同等であり、無視できる水準であった。

餌曝露実験では、ゴカイ試料 (曝露区 16、対照区 8) 餌試料 (添加 6、MeOH 添加 3、無処理 3) 水試料 (曝露区: 巣穴水 3、間隙水 6、水槽水 6。対照区: 巣穴水 2、間隙水 3、水槽水 3) 中の PFAAs 濃度を分析した。ゴカイ試料では、体内存在量として、化合物ごとに曝露区で検出下限未満から 12 ng、対照区で検出下限未満から 0.31 ng であった。添加餌一粒あたりの PFAAs 量は化合物ごとに平均 1.2-1.3 ng (CV 12%-20%)、メタノールのみ添加餌および無処理餌はブランクと同等の水準で、添加餌と比べて小さく無視できると判断した。水試料は、大部分の試料でブランクと同等の水準であった。

以上、両実験とも汚染の無視できる環境で行われたと判断し、解析を行った。

(7) 結果の動力学解析

呼吸に伴う取り込み効率 (図 1) は溶存酸素に対する相対値として 2.0%-54% の範囲であり、スルホン酸よりもカルボン酸が高かった。また、スルホン酸ではアルキル鎖長が長いと取り込み効率が高い傾向があったが、カルボン酸ではアルキル鎖長に対する明確な傾向は認められなかった。魚類における既往研究では、カルボン酸においても鎖長が長いと取り込み効率が高い傾向があり、同じ鎖長ではスルホン酸の方がカルボン酸よりも高い傾向があった [11]。ゴカイにおいては、官能基や鎖長に対する傾向が魚とは異なった。

消化管からの取り込み効率 (図 1) は 48%-130% の範囲で幾何平均値は 79% であり、アルキル鎖長および官能基に対する明確な傾向は認められなかった。

体内からの消失半減期 (図 2) は、値の不確実性を考慮すると、曝露経路による半減期の違いは明確ではなかった。両者の幾何平均値において、比較的速やかに減少する PFBA、PFPeA ($t_{1/2} < 7$ d)、穏やかに減少する PFDA、PFBS、PFOS ($t_{1/2} < 60$ d 程度)、減少傾向が明確でない他 5 化合物に分かれた。減少傾向の見られた化合物については、半減期はおおむねこれまでに魚 [11] やオヨギミズ [12] において報告されている範囲であったが、5 化合物で減少傾向が明確でないことは、イソゴカイにおける特徴的な結果であった。

(8) 移行予測モデルの構築

動力学解析の結果に基づき、水中および食物中濃度よりイソゴカイ中 PFAAs 濃度を予測するモデルを式 6 の通り構築した。なお、記号上にバー (-) を付したパラメーターについては、生息場所の干出時間等に応じて適切な平均的な値を与えることとする。

$$\frac{dC_b(t)}{dt} = \alpha_{ur} \frac{\bar{r}}{DO} C_w + \frac{I}{W} \alpha_{ug} C_f - (\bar{k}_d + k_g) C_b(t) \quad (6)$$

ここで、 W はゴカイの質量、 I は摂餌速度である。

(9) まとめ

以上により、一連の PFAAs を対象に、海産ゴカイ類への移行動力学を新たに明らかにした。ま

た、これに基づき水中および食物中濃度よりゴカイ中 PFAAs 濃度を予測するモデルを構築した。本研究の主要な成果は以下の通りである。

1. PFAAs のゴカイにおける移行動力学を調べるための実験系を確立した。
2. PFAAs の 10 化合物について海産ゴカイ類への移行動力学、すなわち、体表面での呼吸に伴う取り込み効率と消化管での取り込み効率、また体内からの消失半減期を明らかにした。
3. 呼吸に伴う取り込み効率は、溶存酸素に対する相対値として 2.0%-54% の範囲であり、カルボン酸の方がスルホン酸より高かった。スルホン酸では鎖長に伴い高い値となる傾向があったが、カルボン酸では鎖長に対する明確な傾向は認められなかった。
4. 消化管からの取り込み効率は 48%-130% の範囲で幾何平均値は 79% であり、アルキル鎖長および官能基に対する明確な傾向は認められなかった。
5. 半減期については、比較的速やかに減少する PFBA、PFPeA ($t_{1/2} < 7$ d) 穏やかに減少する PFDA、PFBS、PFOS ($t_{1/2} < 60$ d 程度) 減少傾向が明確でない他 5 化合物に分かれた。
6. 取り込み効率および半減期の値、またその官能基および鎖長に対する傾向は、魚類についてこれまで報告されている結果とは異なる点が多かった。
7. 今後の課題として、ゴカイにおける動力学のさらなる実験的解明(温度、成熟度の影響等)、他の生物種における動力学、化合物間および種間での動力学の違いのメカニズム、底生食物連鎖さらに水域全体における PFAAs の挙動・マスバランスなどが挙げられる。

<引用文献>

1. Sakurai T et al. 2009. Mar Pollut Bull 58:1072-1077.
2. Kobayashi J et al. 2011. Chemosphere 82:745-750.
3. Sakurai T et al. 2017. Bull Environ Contam Toxicol 99:203-207.
4. Kobayashi J et al. 2013. Chemosphere 93:1479-1486.
5. Sakurai T et al. 2013. Environ Toxicol Chem 32:2009-2017.
6. 櫻井健郎 et al. 2017. 第 26 回環境化学討論会要旨集, P-020.
7. 櫻井健郎, 小林淳. 2015. 第 24 回環境化学討論会要旨集, P-134.
8. Taniyasu S et al. 2005. J Chromatogr A 1093:89-97.
9. Lesch V et al. 2017. Chemosphere 175:153-160.
10. 岩淵勝己, 鑓迫典久. 2018. 水環境学会誌 41:61-71.
11. 櫻井健郎, 小林淳. 2018. 第 27 回環境化学討論会要旨集, P-048.
12. Higgins CP et al. 2007. Environ Sci Technol 41:4600-4606.

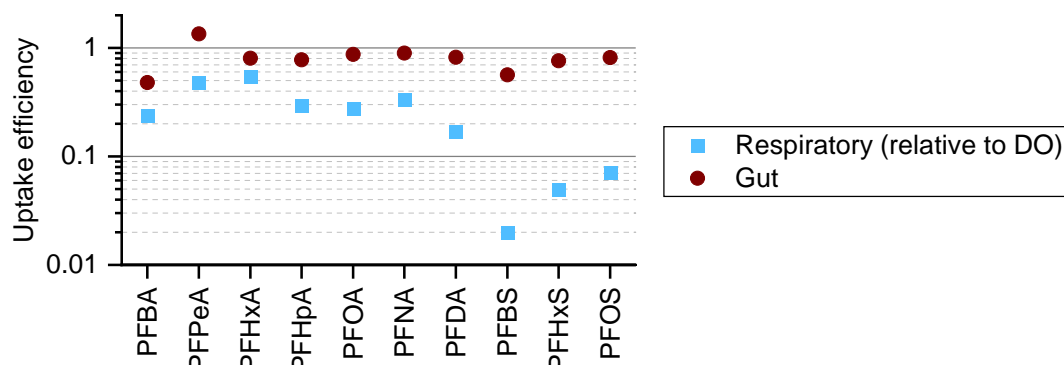


図 1 ゴカイにおける PFAAs の取り込み効率。呼吸に伴う取り込み効率は溶存酸素に対する相対値。

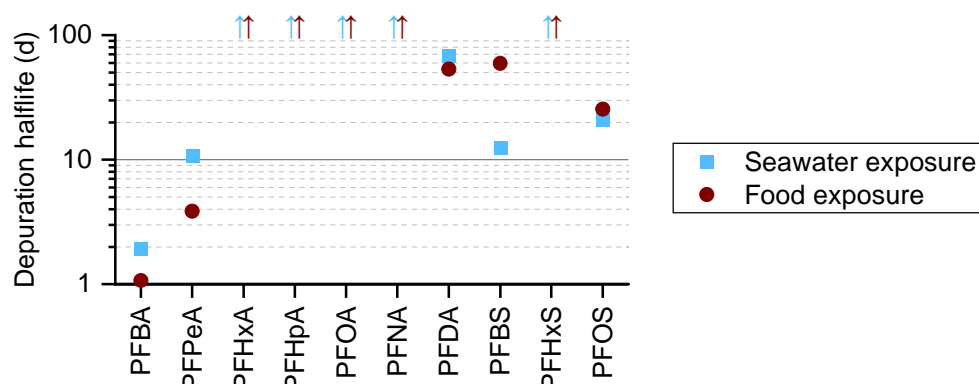


図 2 ゴカイにおける PFAAs の消失半減期。海水暴露、餌暴露それぞれについて示した。半減期が 100 日を超えるあるいは実験期間中に減少が認められない場合は上向きの矢印で示した。

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 1件）

1. 著者名 Sakurai Takeo, Kobayashi Jun, Ito Nozomi, Serizawa Shigeko, Shiraishi Hiroaki, Yabe Tohru, Ishii Yuichi, Suzuki Noriyuki	4. 巻 99
2. 論文標題 Respiratory uptake and depuration kinetics of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in a marine sandworm species	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology	6. 最初と最後の頁 203 ~ 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00128-017-2124-4	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 PFAAsの魚類における生物蓄積動力学パラメーター
3. 学会等名 第27回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村亮輔、池田健登、櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 ニジマス肝S9による有害化学物質の代謝速度に関する検討
3. 学会等名 第27回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 諸熊恵美、櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 イオン性化合物の血漿タンパク結合に関する種間比較:有機フッ素化合物を例に
3. 学会等名 第27回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura R., Ikeda K., Sakurai T., Kobayashi J.
2. 発表標題 Comparison of metabolic rates for harmful chemicals in S9 of rainbow trout
3. 学会等名 SETAC Asia Pacific 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morokuma E., Sakurai T., Kobayashi J.
2. 発表標題 Comparison of protein binding constants for perfluorinated compounds by in vitro and in silico approach
3. 学会等名 SETAC Asia Pacific 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井健郎、伊藤希、矢部徹、小林淳
2. 発表標題 PFOSの海産ゴカイへの消化管経路による移行動力学
3. 学会等名 第26回環境化学討論会
4. 発表年 2017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
研究 分担者	小林 淳 (Kobayashi Jun) (00414368)	熊本県立大学・環境共生学部・准教授 (27401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	矢部 徹 (Yabe Tohru) (50300851)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員 (82101)	