

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340088

研究課題名(和文)海産ゴカイ類への消化管経由でのPFOSの移行動力学の解明

研究課題名(英文)Transfer kinetics of PFOS to a marine sandworm species via the gut

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・環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号：90311323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)の、イソゴカイへの消化管を経由した移行動力学を明らかにすることが本研究の目的である。個体別飼育曝露系、ゴカイおよび餌試料中PFOS分析方法、PFOS添加餌作成方法を確立した後、移行実験を実施し、動力学解析を行った。消化管での取り込み効率はほぼ100%、消失半減期は91日と推定された。他の水生生物、および同種での呼吸に伴う取り込みの場合と比べて、消失半減期が長く、この理由、メカニズムについて、今後、類縁の化合物を含めてさらに検討を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study to elucidate the transfer kinetics of perfluorooctanesulfonate (PFOS) to a marine sandworm species via the gut. We established an individual-exposure system, chemical analytical method of PFOS in sandworm and food pellet samples, and the method to spike PFOS to food pellets. We then conducted a transfer experiment and kinetically analyzed the results. We estimated the gut absorption efficiency at about 100% and the depuration half-life at 91 days. The depuration was statistically insignificant. The depuration half-life was longer than the results of earlier studies using other aquatic organisms and of a previous experiment of the respiratory uptake of this species. Thus, further investigations, also regarding other perfluoro/polyfluoro-alkyl acid compounds, on the underlying mechanisms of this difference is needed.

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 水環境からさまざまな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]。食べ物としての水生生物(魚介類)の摂取は環境中に存在する化学物質の人への主な曝露経路の一つであり、特に日本など魚介類を多く食する国および地域で重要となる。

(2) 底質中の化学物質は、水圏食物網への化学物質の一つの供給源と考えられる[2]が、その入口である底生動物への化学物質の移行動力学は知見が限られている[3, 4]。また、海産物は食糧資源として重要だが、淡水生物に比して海産生物への移行研究は少ない[1]。多毛類は、堆積性の沿岸域や浅海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[5]、魚、貝、甲殻類などの動物の食物となる。しかし、ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)を含むパー/ポリフルオロアルキル化合物の多毛類における生物蓄積動力学研究は報告されていない。

(3) PFOSは、環境中に残留し世界中に遍在しており、2009年にはストックホルム条約の残留性有機汚染物質(POPs)として追加された。しかし、PFOSを含むイオン性化合物は、環境中動態の予測モデル化に必要な知見が不足している。水生生物への移行動力学の知見も限られており、とくに、種々の生物に適用可能な予測モデル構築の観点から重要な、取り込み効率まで明らかにした報告が殆どない。

(4) 本研究では、イソゴカイ(*Perinereis wilsoni* [6])を多毛類のモデル動物として用いた。本種は東アジアに分布し、日本で広く干潟に分布している[7]こと、釣り餌として養殖業が確立しており単一種として入手しやすいこと、イソゴカイを含む属(*Perinereis*)の動物はほぼ世界中に分布していること[6]、さらに化学物質の移行研究に適用されていること[3, 4]から、モデル動物として適切と考えた。

2. 研究の目的

PFOSの、海産多毛類イソゴカイへの、消化管を経由した移行動力学を明らかにする。すなわち、消化管に摂取した食物からのPFOSの取り込み効率(消化管を通過するPFOSのうち消化管から体内に取り込まれる割合)および体内からの消失半減期を明らかにすることが本研究の目的である。この目的を達成するために、以下の研究を行った。

- (1) 個体別飼育曝露系の確立
- (2) ゴカイおよび餌試料中PFOS分析方法の確立
- (3) PFOS添加餌作成方法の確立
- (4) 確認実験

- (5) 移行本実験
- (6) 本実験試料中PFOS濃度の分析
- (7) 結果の解析

3. 研究の方法

(1) 個体別飼育曝露系の確立

汚染底泥中でのPCBへのゴカイ曝露実験の実績[2]を踏まえ、実験の間、行動に異常なく、活発に摂餌を行い、容器外へ逃走しない個別飼育系を構築する。あわせて、巣穴水の採水、および巣穴水中のDO計測方法も確立する。また、添加餌投与の際の手順を確立する。

(2) ゴカイおよび餌試料中PFOS分析方法の確立

既報[8, 9]に基づき検討する。同位体希釈法により液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計を用いて行う。

(3) PFOS添加餌作成方法の確立

PFOSメタノール溶液を餌と混合後にメタノールを揮散させる方法[10](混合揮散法)と、個別の餌粒にPFOSメタノール溶液を添加する方法(個別添加法)とについて、主に添加濃度のばらつき観点から検討する。

(4) 確認実験

概略の設計、条件設定により、移行実験および試料分析を行い、添加餌の摂餌状況、巣穴中のPFOS濃度、取り込み効率および半減期の概略値を確認する。また、これに従い、本実験の設計、条件を検討する。

(5) 移行本実験

PFOSを添加した餌を与える曝露期間と、これに続いて清浄な餌を与える浄化期間とからなる実験を実施し、定期的にゴカイ、巣穴海水試料を採取するとともに、水温、DO濃度等の水質を計測する。曝露実験区とは別に、全期間PFOSを餌に添加しない対照実験区を設置する。確認実験に基づき、添加濃度を設定し、本実験スケジュールを決定する。

(6) 本実験試料中PFOS濃度の分析

(2)で確立した方法により、ゴカイ、餌、海水試料中のPFOS濃度を測定する。

(7) 結果の解析

動力学解析を一次反応速度論に基づくマスバランスモデル[2, 9]により行う。この際、曝露量は、実測に基づく餌一粒あたりのPFOS量と摂餌数との積により求める。ゴカイからの排出等により、巣穴海水中に低濃度のPFOSの存在が想定される。この水中PFOSの体表面からの取り込みの寄与は、巣穴水中のPFOS濃度、溶存酸素(DO)濃度、および先行実験[11]により把握している取り込みパラメータを用いて計算し、差し引いた上で解析を行う。

4. 研究成果

(1) 個別飼育曝露系の確立

底部に穴を開けたポリプロピレン製円筒容器（容量 0.58 L）に、砂利（粒径 3-6 mm 程度）を入れ、巣穴としてテフロン製のチューブを設置したものを飼育容器とし、これをゴカイ一頭ごとの一つ用いることとした。確認実験および本実験における飼育容器外への脱出はほとんど見られなかった。

巣穴水は、ポリエチレン製チューブを巣穴内へ差し込むことにより採水した。巣穴中の DO 濃度は、一つの飼育容器において、あらかじめ巣穴内に設置した蛍光型 DO センサーにより測定した。

曝露給餌の際は、添加餌（対照区では PFOS を添加しない）を、巣穴上端に接続したトレイ上に置き、一定時間ゴカイに自由に摂餌させることとした。摂餌前後の餌の粒数を記録し、その差を各ゴカイの摂餌数とした。曝露以外の給餌は、無添加の餌粒を砂利面に撒くことで行った。

(2) ゴカイおよび餌試料中 PFOS 分析方法の確立

ゴカイおよび餌試料は、同位体標識した内標準を添加後、20%メタノール水溶液により高速溶媒抽出装置で抽出した。その後固相抽出カートリッジにより精製し、濃縮したものの一部を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、PFOS の同定、定量を行った。定量は同位体希釈法によった[8, 9]。繰り返し分析 ($n = 6$) により求めた検出下限は 0.009 ng/g-wet、添加回収による回収率は 99% ($n = 4$, 添加量 1.0 ng) であり、良好な精度で分析が行えることを確認した。海水中の PFOS は既報[12]に従い分析した。

(3) PFOS 添加餌作成方法の確立

餌料は海産仔稚魚用配合飼料（粒径 1 mm 弱程度）を用いた。PFOS のカリウム塩のメタノール溶液を添加溶液とした。混合揮散法では、ナスフラスコ中の添加溶液に配合餌料を投入後、ロータリーエバポレーターでメタノールを揮散させた。密封しないように覆ったナスフラスコ中でそのまま一晩静置した後に、配合餌料を回収した。個別添加法では、マイクロウェルプレートの各ウェルに、配合餌料を一粒ずつ入れ、ウェルの底面にマイクロシリンジで添加溶液を注入することにより、餌粒に添加溶液をしみこませた。密封しないように覆いをして一晩静置した後に、配合餌料を回収した。

混合揮散法では一粒あたり PFOS 量の変動係数が高く、改善を試みたが依然 60%を超える値であった。個別添加法では一粒あたり PFOS 量の変動係数は 30%程度であり(図 1) さらに変動係数の値が比較的安定していたことから、本研究では本法を採った。なお、いずれの方法でも、添加量のうちある程度は、

器壁等に失われることが予想され、実際にそのような結果であった。対照区の餌は、PFOS を含まないメタノールを同様に添加して作成した。

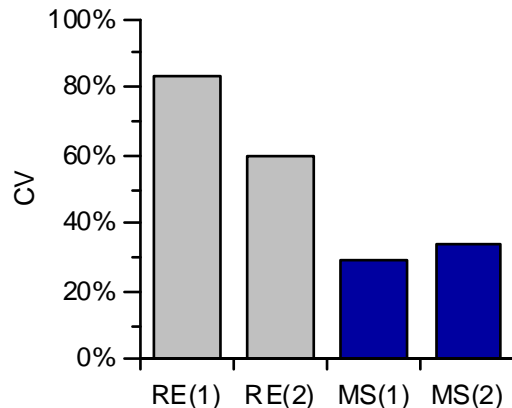


図 1 異なる方法で添加したときの一粒子ごとの PFOS 含有量の変動係数(CV)。混合揮散法: RE(1), $n = 10$, 設定値 18 ng; RE(2), $n = 4$, 設定値 21 ng。個別添加法: MS(1), $n = 7$, 設定値 14 ng; MS(2), $n = 7$, 設定値 5.0 ng。

(4) 確認実験

以下の設計で確認実験を実施した。曝露区と対照区とを設定し、それぞれでゴカイを個別別に飼育容器内に導入した上で、水位を一日周期で規則的に変化させた。ゴカイは曝露区 47 個体、対照区 20 個体を用いた。導入日を 0 日目とし、10 日間(0-9 日目)の実験期間で行った。1 日目に、曝露区では PFOS 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、それぞれ摂餌させた。曝露区で曝露時に摂餌のなかった個体は飼育を中断した。曝露区で曝露時に摂餌のあった個体は、3 日目に、新たな飼育容器に移した。両実験区ともに 4 日目より一日おきに何も添加しない餌の給餌を行った。

試料は、導入前にゴカイと水試料、曝露区で 3、6、9 日目にゴカイ、1、2、3、6、9 日目に水試料（巣穴、飼育容器間隙水、水槽）を、対照区で 9 日目にゴカイと水試料を採取した。これら試料および添加餌および無添加餌中の PFOS 濃度を(2)に述べた方法で分析し定量した。採取したゴカイの個体ごとの質量（湿）を記録した。

ゴカイの摂餌率は曝露区 30%、対照区 40%であった。曝露区添加餌中の PFOS 量は平均 18.1 ng/粒、CV 83%であった。曝露区のゴカイ中濃度のばらつきが非常に大きかったため、消化管からの取り込み効率と、体内からの消失半減期について、概略の値を確認するにとどまった。一方、実験の設計としては大きな問題は無く実施可能であると判断できた。

課題として、餌一粒あたり添加量のばらつきを下げる（確認実験では混合揮散法で作成）曝露給餌の際の手順の効率化と摂餌数の記録をより確実にを行うことなどが挙げ

られた。これらは本実験までに検討を行い改善した。

(5) 移行本実験

これまで述べた検討を踏まえた上で、以下の設計で本実験を実施した。曝露区と対照区とを設定し、それぞれでゴカイを個別に飼育容器内に導入した上で、水位を一日周期で規則的に変化させた。ゴカイは曝露区 48 個体、対照区 18 個体を用いた。導入日を 0 日目とし、18 日間(0-17 日目)の実験期間で行った。1 日目に、曝露区では PFOS を添加し対照区ではメタノールのみを添加した配合飼料を、それぞれ摂餌させた。曝露区で曝露時に摂餌のなかった個体は飼育を中断した。曝露区で曝露時に摂餌のあった個体は、5 日目に、新たな飼育容器に移した。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。

試料は、導入前にゴカイと水試料、曝露区で 3、5、9、13、17 日目にゴカイ、1、2、3、5、9、13、17 日目に水試料(巣穴、飼育容器間隙水、水槽)を、対照区で 17 日目にゴカイと水試料を採取した。採取したゴカイの個体ごとの質量(湿)を記録した。

(6) 本実験試料中 PFOS 濃度の分析

ゴカイ試料(曝露区 17、対照区 8) 餌試料(添加 5、無添加 2) 水試料(曝露区: 巣穴水、間隙水、水槽水いずれも 7。対照区: 巣穴水、間隙水、水槽水いずれも 2)中の PFOS 濃度を(2)に述べた方法で分析し定量した。

ゴカイ試料では、個体あたり体内存在量として曝露区で 6.4-37 ng、対照区で 0.28-0.53 ng であった。添加餌一粒あたりの量は 3.2 ng (CV 32%)、メタノールのみ添加餌はおよそ 0.9 pg/粒、未処理餌は<0.04 pg/粒。水試料は、曝露区の水槽水のいくつかの試料で、0.043-0.22 ng/L が検出された。他はすべての試料で検出下限未満であった。この結果に基づき次節の解析を行った。

(7) 結果の解析

曝露時の摂餌率は、両実験区共に 30%程度だった。個体ごとの曝露は、摂餌数によりおよそ 3.2~19 ng の範囲であった。水試料および対照区試料の分析により、汚染の無いあるいは無視できる環境で実験が行われたことが確認できた。曝露区の巣穴水中には PFOS は不検出であり、水中 PFOS の呼吸に伴う取り込みの影響は無視できる水準であった。また、曝露用の添加餌以外の餌中の PFOS 量は、添加餌と比べて小さく、無視できる水準であった。

曝露区において、摂餌数で規準化した体内存在量(図 2)について、一次動力学によるモデル解析を行った。体内からの消失半減期は 91 日と計算されたが、摂餌数で規準化した体内存在量は、5 日目以降ほとんど減少しておらず、減少は統計学的に有意ではなかつ

た。この半減期は、PFOS についての他の水生動物における先行研究や別々に実施したイソゴカイへの海水からの取り込み実験で得られた半減期(15 日程度)[11]と比して長かった。Martin ら[10]は、ニジマスにおいて、腸肝循環が、PFOS を含む一連のパーフルオロアルキル酸化合物が体内に残留するメカニズムとして示唆されると議論している。消化管や体内循環の構造が魚類と多毛類とでは異なるため単純な比較はできないが、何らかの関連したメカニズムにより、イソゴカイへの消化管経由の曝露の場合に消失半減期が長くなっている可能性がある。ただし、半減期が長い理由は現時点ではわからなかった。

この半減期に基づき曝露時点での体内存在量を推定することにより、消化管からの取り込み効率を求めた。モデルによる計算値は 150% (95%信頼区間 120%~200%) であった。100%より高い値となったのは実験上のばらつきなどが原因と考えられ、取り込み効率はほぼ 100%と推定された。これは PFOS についてのニジマスにおける既往知見(120% [10])と同様であった。

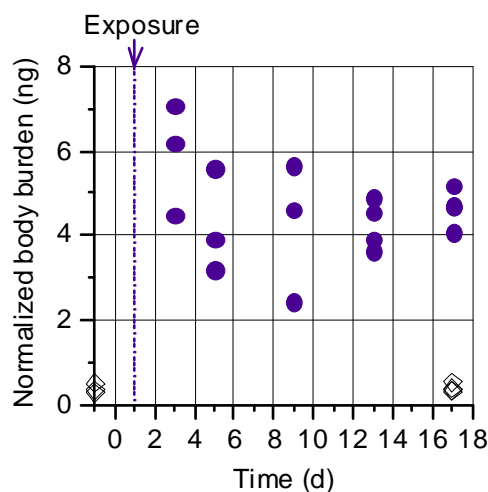


図 2 曝露区における摂餌粒数あたりのゴカイ体内 PFOS 存在量(●)、比較のために対照区個体あたり存在量を示した(◇)。

(8) まとめ

以上により、個別飼育曝露系、ゴカイおよび餌試料中 PFOS 分析方法、PFOS 添加餌作成方法を確立した上で、海産多毛類イソゴカイにおける、PFOS の消化管を経由した移行動力学を明らかにした。本研究では、他の水生生物、および同種での呼吸に伴う取り込みの場合と比べて、ゴカイ体内からの消失半減期が長いことが示された。この理由、メカニズムについて、今後、類縁の化合物を含めてさらに検討を進める必要がある。

< 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. Kono K, et al. 2010. Environ Toxicol Chem 29:1512-1519.

4. Nurulnadia M, et al. 2013. Bull Environ Contam Toxicol 91:372-376.

5. McLusky DS. 1989. Blackie Academic & Professional, London.

6. Glasby CJ, Hsieh HL. 2006. Zool Stud 45:553-577.

7. 吉田俊一. 1984. 大阪府水産試験場研究報告 6:1-63.

8. 環境省環境保健部環境安全課. 2004.

9. Sakurai T, et al. 2013. Environ Toxicol Chem 32:2009-2017.

10. Martin JW, et al. 2003. Environ Toxicol Chem 22:189-195.

11. Sakurai T, et al. (in preparation).

12. Sakurai T, et al. 2010. Environ Sci Technol 44:4110-4115.

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1件)

Sakurai, T., Kobayashi, J., Kinoshita, K., Ito, N., Serizawa, S., Shiraishi, H., Lee, J.-H., Horiguchi, T., Maki, H., Mizukawa, K., Imaizumi, Y., Kawai, T., Suzuki, N., 2013. Transfer kinetics of perfluorooctane sulfonate from water and sediment to a marine benthic fish, the marbled flounder (*Pseudopleuronectes yokohamae*). Environmental Toxicology and Chemistry 32, 2009-2017, 査読あり, doi:10.1002/etc.2270

〔学会発表〕(計6件)

松山恵里菜, 吉本未来, 山田勝雅, 岡村和磨, 櫻井健郎, 内山幸子, 小林淳 (2016) アミノ酸窒素安定同位体比を用いた有機フッ素化合物の食物連鎖蓄積解析, 第25回環境化学討論会, 2016.06.09, 朱鷺メッセ(新潟市)

櫻井健郎, 小林淳, 伊藤希, 芹澤滋子, 白石寛明, 矢部徹, 石井裕一, 鈴木規之 (2016) 溶存態PFOSの海産ゴカイへの移行動力学, 第25回環境化学討論会, 2016.06.08, 朱鷺メッセ(新潟市)

前田佳貴, 小森田智大, 石橋弘志, 櫻井健郎, 小林淳 (2015) 有明海河口域における有機フッ素化合物の食物連鎖蓄積の評価, 第24回環境化学討論会, 2015.06.25, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

櫻井健郎, 小林淳 (2015) 生物蓄積実験のための配合餌料へのPFOSの添加方法の検討, 第24回環境化学討論会, 2015.06.25, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

前田佳貴, 伊牟田優希, 石原史隆, 中島尚哉, 小林淳, 小森田智大, 石橋弘志, 有

園幸司, 古賀実 (2014) 有明海河口域における有機フッ素化合物の生物蓄積, 第23回環境化学討論会, 2014.05.15, 京都大学(京都市)

川中理可, 小林淳, 石原史隆, 櫻井健郎, 小森田智大, 石橋弘志, 有園幸司, 古賀実 (2014) 汽水域に棲息する多毛類のポリ塩化ビフェニルの取込み経路と体内動力学, 第23回環境化学討論会, 2014.05.14, 京都大学(京都市)

6. 研究組織

(1) 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・環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号: 90311323

(2) 研究分担者

小林 淳 (KOBAYASHI, Jun)

熊本県立大学・環境共生学部・准教授

研究者番号: 00414368

矢部 徹 (YABE, Tohru)

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

研究者番号: 50300851