

水産庁委託事業

令和4年度

農林水産分野における持続可能なプラスチック利用対策事業  
(漁業における海洋プラスチック問題対策事業のうち  
海洋プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査)

報告書

令和5年3月

水産研究・教育機構 水産技術研究所

環境保全部 化学物質グループ

## 令和4年度報告書

課 題 名	海洋プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査
機 関 名 担当者名	水産研究・教育機構 水産技術研究所 環境保全部 化学物質グループ 大久保信幸、河野久美子、伊藤真奈、羽野健志

### 1. 目的

プラスチックごみが細かく砕けて海洋に散在するマイクロプラスチック（5 mm 以下のプラスチック片、以下 MP と略）は、海水中の有害化学物質を吸着し、高濃度に濃縮した形で海洋生物に取り込まれることが懸念されていることから、海洋生態系への新たな脅威となっている。本研究では、日本沿岸域で検出が報告されている材質、サイズの MP を用い、海洋の重要な生物資源である海産魚による取り込み量や魚体内における滞留時間、および MP に吸着した化学物質の生物体内での挙動等について実験を通じて明らかにすることで、MP が海産魚類に与える影響（化学物質の移行、成長阻害など）を調査し、生態リスク評価に資することを目的とする。

### 2. 年度計画

本調査・研究では、日本沿岸域での検出が報告されており、かつ魚体内に取り込まれることが確認されているサイズ（0.3 mm 前後）、材質（ポリエチレン；PE 等）の MP を用い、現場海域に則した条件で以下の室内試験を実施することにより、海水に溶存した有害化学物質の MP への吸着から魚体内への移行の程度、および取り込まれた MP が海産魚に及ぼす影響を推定する。

### 3. 細部課題の構成

#### (1) 海産魚介類のマイクロプラスチックの取り込みによる生態的影響の調査

過年度事業により得られた MP の魚類体内における滞留時間等の測定及び MP の取り込みによる成長遅延や飢餓ストレス等の影響の解析の結果を取りまとめ、研究集会等を通じて発表し広く周知する。また、MP 曝露による成長遅延等の影響について、より幼若なステージの海産魚における曝露の影響に関してマミチョグを用いた試験で検討する。

#### (2) マイクロプラスチックに起因する有害化学物質の魚介類への移行性の評価

過年度事業と異なる形状の MP を用い、MP に吸着した多環芳香族炭化水素（PAHs）の海産魚消化管内における溶出速度を生体外溶出試験法を用いて算出する。さらに、MP に吸着した PAHs の海産魚消化管内における溶出量を既存モデル等を参考に数値計算により推定し、形状による影響を考察する。また、過年度事業で実施した、PAHs を吸着させた MP とマダイを用いた曝露試験結果等も踏まえ、MP に起因する有害化学物質の魚類への移行性を総合的に評価する。

### 3. 年度計画

#### (1) 海産魚介類のマイクロプラスチックの取り込みによる生態的影響の調査

1) 過年度事業により得られた MP の魚類体内（消化管内）における滞留時間等の測定に関する成果と共に、MP の取り込みによる成長遅延や飢餓ストレス等の影響解析の結果を研究集会等を通じて発表し、都道府県水産試験場、および関係する法人の担当者等に広く周知する。（8～11月）

2) MP 曝露による成長遅延等の影響について、令和3年度本事業結果の取りまとめの過程で抽出された、より幼若なステージの海産魚における曝露の影響に関して、マミチョグを用いた試験で検討する。（6～8月）

#### (2) マイクロプラスチックに起因する有害化学物質の魚介類への移行性の評価

##### 1) 魚類消化管内における破砕 MP からの PAHs 溶出量の推定

不均一な形状の破砕 MP に吸着した有害化学物質の魚類消化管内における溶出の有無の推定に向け、各種パラメータを取得する。対象有害化学物質は石油の毒性成分であり日本沿岸域でも検出される多環芳香族炭化水素（PAHs）とし、MP の材質はポリエチレン（PE）とする。MP はビーズ状のプラスチックを破砕して作製した MP を用いる。具体的には破砕MPに吸着した PAHs のマミチョグ消化管内における溶出速度を生体外溶出試験法を用いて算出する。さらに、過年度事業で取得済みの知見（魚類による破砕 MP の摂取量および体内滞留時間）、および文献調査等に基づき、MP に吸着したPAHsの魚類消化管内における溶出量を数値計算により推定する。

##### 2) MPに吸着した PAHs の魚類への移行性に関する総合的評価

過年度事業にて実施した吸着および溶出試験の結果を統合的に取りまとめる。具体的には、MP の形状の違いによる MP への PAHs 吸着量、並びに魚種（消化管の形態）や MP の形状の違いによる魚類消化管内での PAHs 溶出量を比較考察する。また、生体外溶出試験および生体内溶出試験の結果を取りまとめ、魚類消化管内にて MP から溶出した PAHs 量と海水からの経鰓由来の取り込み量を比較し、MP に起因する有害化学物質の魚類への移行性を総合的に評価する。

### 4. 結果の要約

#### (1) 海産魚介類のマイクロプラスチックの取り込みによる生態的影響の調査

1) 本事業で得られた成果を広く周知するため、11/18 に開催した R4 年度有害物質研究会においてシンポジウム「マイクロプラスチック（MP）摂取が海産魚類に及ぼす影響と今後の課題」を開催し、成果を公表した。関係道府県、大学等の 35 機関から 63 名の参加があった。

## 2) マミチヨグ胚～仔魚を用いた MP 継続曝露試験

環境省・海産 WET 試験法を参考に受精後 10 日目の胚をガラスビーカーに収容し、20℃ のインキュベーター中に設置して 180–212 μm PE ビーズをふ化後 7 日目まで 11 日間曝露し、生残率、ふ化率、成長を対照区と比較した。5 mg/L、10 mg/L および 20 mg/L で曝露したところ、対照区との間に有意な低下は認められなかった。

## (2) マイクロプラスチックに起因する有害化学物質の魚介類への移行性の評価

マミチヨグの消化管内容物の懸濁液を用い、破砕 MP からの PAHs の溶出試験を実施した結果、破砕 MP は、球状 MP に比べて PAHs の溶出は長時間に渡ること、その溶出速度は速いことが明らかとなった。一方で、当該事業にて得られた成果および既報の情報を元に、実海域における MP を介した PAHs のマミチヨグ体内への取り込み量を推定した結果、消化管内における破砕 MP からの溶出に由来する魚体中濃度は、いずれの PAH (Phe、Pyr および Chr) においても球状の MP に比べて数倍高いと推定された。

これまで当該事業で実施した生体外溶出試験の結果、海産魚類は PAHs を吸着・濃縮した MP を摂食した際、消化管内での MP からの溶出に伴う PAHs の魚体内への付加的な取り込み（ベクター効果）は存在すると推察されるものの、その程度は海水から鰓を経由した取り込みに比べて低いと推察された。以上のことから、実海域での MP による PAHs のベクター効果は存在しても軽微であり、そのリスクは現時点では低いと考えられた。

## 5. 成果の発表、活用等

### ・論文発表 2 件

Ohkubo et al. (2022) Microplastic uptake and gut retention time in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) under laboratory conditions. *Marine Pollution Bulletin*, 176, 113433.

Ito et al. (2022) Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from polyethylene microplastics in two morphologically different digestive tracts of marine teleosts: Gastric red seabream (*Pagrus major*) and agastric mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Pollution*, 308, 119589.

・学会発表 2 件 (R4 年 6 月環境保全部化学物質 3 学会合同大会+R5 年 3 月日本水産学会 (予定))

・シンポジウム講演 2 件 (R4 年 11 月有害物質研究会)

## 6. 事業推進上の問題点等

特になし。

## 令和4年度報告書

課 題 名	海洋プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査
細部課題名	(1) 海産魚介類のマイクロプラスチックの取り込みによる生態的影響の調査
機 関 名 担当者名	水産研究・教育機構 水産技術研究所 大久保信幸・河野久美子（環境保全部）

### 1. 目的

本研究では、日本沿岸域で検出が報告されている材質およびサイズのマイクロプラスチック（MP）を用い、海洋の重要な生物資源である海産魚による取り込み量や魚体内（消化管内）における滞留時間について飼育実験を通じて明らかにする。これにより MP が海産魚類に与える影響（化学物質の移行、および成長阻害）を調査するための基礎とする。

### 2. 実施計画（令和4年度）

2. 1 過年度事業により得られた MP の魚類体内（消化管内）における滞留時間等の測定に関する成果と共に、MP の取り込みによる成長遅延や飢餓ストレス等の影響解析の結果を研究集会等を通じて発表し、都道府県水産試験場、および関係する法人の担当者等に広く周知する。（8～11月）

### 2. 2 マミチヨグ仔魚を用いた MP 継続曝露試験の検討

MP 曝露による成長遅延等の影響について、令和3年度本事業結果の取りまとめの過程で抽出された、より幼若なステージの海産魚における曝露の影響に関して、マミチヨグ胚を用いた試験で検討する。（6～8月）

### 3. 材料と方法

#### 3. 1 供試生物

マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) 胚及び仔魚（図）は廿日市庁舎で継代飼育しているものを用いた。



図. 受精後10日目のマミチヨグ胚（左、写真中のバーは1mm）およびふ化後7日目の仔魚（右、バーは2mm）

### 3. 2 MP

曝露試験用ポリエチレン (PE) 製ビーズは、Cospheric 社製蛍光黄色ポリエチレン粒子 (180-212 $\mu$ m、比重 1.00) を用いた。

### 3. 3 マミチヨグ胚～仔魚を用いた継続曝露試験

500mL ガラスビーカーに塩分 30 の人工海水 300mL を入れてマミチヨグ受精卵を收容し、20°C のインキュベーター中に設置して通気しながら飼育した。試験は海産魚種を用いた胚～仔魚期における短期毒性試験法 (海産 WET 試験法)<sup>1)</sup> を参考に、以下の通り実施した。300mL ガラスビーカーに人工海水を 200mL 入れて受精後 10 日目の胚を 12 ヶずつ收容し、シェイカーで攪拌しながら 180-212  $\mu$ m PE ビーズをふ化まで曝露した。試験中は 2~3 日に 1 回、海水を全量交換した。対照区のビーカーの過半数 (7 尾) 以上がふ化した日をふ化日とし、ふ化仔魚は別途準備した 300mL ビーカーに最大 7 尾ずつ收容し、ふ化後 7 日目まで引き続き曝露した。なお、ふ化後はアルテミア幼生をふ化日および 2 日に 1 回、海水交換時に合わせて給餌した。また、試験終了時まで生残率、ふ化率を記録した。

対照区、MP 5 mg/L、10 mg/L、および 20 mg/L 曝露区を各 3 反復設け、曝露区には MP を半止水式で曝露した。なお、MP/アルテミア 重量比は 5 mg/L 区で 0.01-0.02、10 mg/L 区で 0.02-0.04、20 mg/L で 0.04-0.08 となった。

試験終了時に供試魚を麻酔にて安楽死させた後、70%エタノール (v/v) で 24 時間固定し、全長を実体顕微鏡下で計測した。その後、60°C で 3 時間、乾燥し、乾燥重量を測定した。乾燥後の曝露区の仔魚を 10%KOH 下で 24 時間以上、42°C でアルカリ分解し、消化管内の MP を実体顕微鏡下で計数した。なお、MP を取り込んでいた個体の体重を対照区と比較する際は、MP の重量 (取り込み個数 x 平均 MP 重量 : 0.004 mg/個) を除く補正を行った。

## 4. 結果および考察

### マミチヨグ胚～仔魚を用いた継続曝露試験

曝露水中の実測 MP 濃度の平均値は 5 mg/L 区で設定値の 101%、10 mg/L で 79%、20 mg/L で 85% であり、また、酸素飽和度はいずれも 90% 以上であった。

マミチヨグ胚に 180-212  $\mu$ m PE ビーズを 11 日間高濃度で曝露した結果、死亡個体は観察されなかった。また、対照区と曝露区を比較したところ、ふ化率 ( $p=0.45$ )、乾燥重量 ( $p=0.46$ ) いずれにも有意差は認められなかった。なお、仔魚の全長については、対照区と曝露区との間には有意差は認められなかったが ( $p>0.11$ )、曝露区間の全長においては 5 mg/L 曝露区が 20 mg/L 曝露区より大きくなった ( $p=0.02$ )。この理由については不明であるが、全長の増加と MP 曝露濃度との間に濃度依存性は認められなかった。

表 1. MP 継続曝露試験における各ビーカーの平均水中 MP 濃度、試験終了時のマミチヨグの平均全長、乾燥重量、ふ化率、および MP 取り込み数

試験区	曝露濃度 (個/200 mL)	全長 (mm)	平均乾燥重量 (mg/尾)	ふ化率 (%)	平均 MP 取り込み 数 (個/尾)
Cont.	-	9.6±0.1	1.0±0.1	100	-
5 mg	241	9.8±0.1	1.1±0.1	97	1.7±0.7
10 mg	377	9.7±0.1	1.2±0.1	100	0
20 mg	995	9.5±0.1	1.1±0.1	100	1.3±0.5

表記は平均値±SE、-:n.d.

曝露区の仔魚の成長が対照区と比較して低下しないという結果は、仔魚を用いた 2021 年度の 100-500 μm 粉砕 PE ビーズ曝露<sup>2)</sup>、2020 年度の 180-212 μm PE ビーズ曝露<sup>3)</sup>、2019 年度の 250-300 μm PE ビーズおよび 90 μm ポリスチレン (PS) ビーズ複合曝露試験<sup>4)</sup>と同様であった。なお、他の海産魚の仔魚における個体レベルでの影響では (表 2)、インドメダカにおいて、受精卵から 28 日間の 10 μm PS ビーズ曝露<sup>5)</sup>、および受精卵から 45 日間の 2 μm PS ビーズ曝露<sup>6)</sup>あるいはゼブラフィッシュにおいて受精卵から 4 日間の <100 μm PS 断片、および <230 μm の劣化したポリプロピレン (PP) 断片の高濃度曝露<sup>7)</sup>で成長への影響が報告されていることから、より小型 (2-100 μm) の PS 製 MP、あるいは劣化した PP 製 MP 曝露では影響がある可能性もある。なお、上記 2 種の試験ではいずれも卵膜への MP の付着が観察されており、発生中の胚の酸素不足の影響が指摘されている。一方、今回のマミチヨグ胚を使った試験では、卵膜への MP の吸着は観察されなかった。

表 2. 海産魚胚、仔魚を用いた MP 曝露試験

魚種	MP の種類、 サイズ	曝露濃度	曝露期間 (発生 ステージ)	成長の低 下	その他の影 響
ヨーロッパ スズキ <sup>8)</sup>	PE ビーズ (10-45 μm)	1.2, 12 mg/g (餌曝露)	23 日 (20dph-)	無し	死亡率上昇 (12 mg 曝 露)
インドメダ カ	PS ビーズ (10 μm) <sup>5)</sup>	2-200 μg/L	28 日 (受精卵 一、ふ化後 11-12 日)	全長、体 重の減少	ふ化率低 下、ふ化遅 延
	PS ビーズ (2 μm) <sup>6)</sup>	2-200 μg/L	45 日 (受精後 2 日目一、ふ化後 33 日)	全長、体 重の減少	ふ化率低 下、心拍低 下
ゼブラフィ ッシュ <sup>7)</sup>	PP 断片 (<230 μm)、 PS 断片	2x10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup> 個 /L	4 日 (受精後 6h-、ふ 化後 1 日)	全長の減 少	心拍低下

	(<100 μm)				
マミチヨグ (本研究)	PE (250-300 μm) + PS ビーズ (90 μm) <sup>4)</sup>	3.5 mg/L (250 個/L) +1,000 個/L	14 日 (2dph-)	無し	—
	PE ビーズ(180-212 μm)、	2.5 mg/L <sup>3)</sup>	14 日 (7dph-)	無し	
	粉砕 PE ビーズ (100-500 μm) <sup>2)</sup>	5, 10, 20 mg/L	11 日 (受精後 10 日目-)	無し	
		2.5, 5 mg/L	14 日 (7dph-)	無し	

dph : ふ化後日数

以上の結果、これまで実施した試験条件下では試験を行ったサイズ、材質、および濃度の MP 曝露によるマミチヨグ仔魚への影響は小さいと推察された。

## 5. 要約

1) 本事業で得られた成果を広く周知するため、11/18 に開催した R4 年度有害物質研究会においてシンポジウム「マイクロプラスチック (MP) 摂取が海産魚類に及ぼす影響と今後の課題」を開催し、成果を公表した。関係道府県、大学等の 35 機関から 63 名の参加があった。

2) マミチヨグの受精後 10 日胚を用い、ビーカー内で 180-212 μm PE ビーズを 5 mg/L、10 mg/L および 20 mg/L でふ化後 7 日目まで 11 日間曝露したところ対照区との間に有意な成長の低下は認められなかった。この結果は過年度事業で実施した仔魚を用いた 100-500 μm 粉砕 PE ビーズ曝露、180-212 μm PE ビーズ曝露、250-300 μm PE ビーズおよび 90 μm PS ビーズ複合曝露試験と同様であった。

## 6. 5ヶ年の成果

### ① MP の消化管内滞留時間の測定等

#### ① -1 異なるサイズ、形状のMPの消化管内滞留時間の測定

マミチヨグ稚魚を用いた MP の取り込み・排泄試験法を確立し (H30)、形状やサイズの異なる PE 製 MP (250-300 μm および 710-850 μm ビーズ、養殖用パイプおよびビーズ粉砕 MP (100-500 μm)) を用い、摂取量、消化管内滞留時間を測定した (H30~R3)。その結果、いずれの MP も 90% 以上が 20 時間以内に排泄された。なお、漁具および PE ビーズを粉砕して、海洋環境中に存在するプラスチック片を模した MP は、250-300 μm ビーズに比べ滞留時間が約2倍長くなった。一方、250-300 μm と 710-850 μm ビーズでは滞留時間に差は認められなかった。

### ① ー2 消化管形態が異なる魚種での消化管内滞留時間の比較

魚種により MP の消化管内滞留時間に差があるかを明らかにするため、マミチョグ稚魚（無胃魚）とマダイ稚魚（有胃魚）を用いて 250-300  $\mu\text{m}$  PE ビーズの排泄時間を比較した（H30）。その結果、マダイでは、マミチョグに比べ PE ビーズの排泄開始が遅れるが、いずれの魚種でも 20 時間後には 90% 以上が排泄された。また、消化管形態が異なるカタクチイワシにおいても MP の排泄試験を実施した（H31~R2）。カタクチイワシの取り込んだ MP は 20 時間後には 90% 以上が排泄され、マダイ、マミチョグと大きな差は認められなかった。

### ② MP が仔魚の成長や生残に及ぼす影響

マミチョグ仔魚を用い、500mL ビーカー内で MP を 2 週間曝露する手法を確立し（R1）、180-212  $\mu\text{m}$  ビーズを 2.5 mg/L の濃度で（R2）、また、PE ビーズを粉砕した MP（100-500  $\mu\text{m}$ ）を 2.5 mg/L、および 5 mg/L の濃度で曝露したところ（R3）、対照区との間に生残率や成長の有意な低下は認められなかった。

マミチョグの受精後 10 日胚を用い、ビーカー内で 180-212  $\mu\text{m}$  PE ビーズを 5 mg/L、10 mg/L および 20 mg/L の濃度でふ化後 7 日目まで 11 日間曝露したところ対照区との間に生残率や成長の有意な低下は認められなかった（R4）。

### ③ 総括

MP の消化管内滞留時間の測定の結果、今回試験した MP の滞留時間はいずれもその 90% 以上が 20 時間以内に排泄され、残留性は低いことが明らかになった。また、MP サイズによる差はほとんどないが、MP の形状により 2 倍程度変化すること、消化管形態が異なる魚種についても大きな差が無いこと示された。

MP が仔魚期の成長や生残に及ぼす影響については、仔魚を用いた 250-300  $\mu\text{m}$  PE ビーズおよび 90  $\mu\text{m}$  ポリスチレン（PS）ビーズ複合曝露試験<sup>4)</sup>、180-212  $\mu\text{m}$  PE ビーズ曝露<sup>3)</sup>、100-500  $\mu\text{m}$  粉砕 PE ビーズ曝露<sup>2)</sup>、及び胚から仔魚を用いた 180-212  $\mu\text{m}$  PE ビーズ曝露において、いずれも生残、成長への影響は認められなかった。本研究の曝露濃度は今後 50 年間で予想される海洋中 MP の最高濃度（1 mg/L）<sup>9)</sup>を参考に数倍～20 倍高く設定したが、影響が観察されなかった。よって、今回試験したサイズの MP では形状の差異にかかわらず海産魚胚や仔魚への影響は低いと推定された。

## 7. 参考文献

- 1) 宗宮ら（2021）海産 3 魚種を用いた胚-仔魚期における短期毒性試験法の検討～総排水毒性（WET）試験への適用を目指して～. 環境毒性学会誌 24、79-90
- 2) 大久保ら（2021）マイクロプラスチックの体内滞留時間の測定等に関する試験. 「令和 2 年度プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」、水産庁、5-17
- 3) 大久保ら（2020）マイクロプラスチックの海産魚類における摂取量および体内滞留時間の

解明。「平成 31 年度プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」、水産庁、5-13

4) 大久保、伊藤 (2019) マイクロプラスチックの海産魚類における摂取量および体内滞留時間の解明。「平成 30 年度プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」、水産庁、4-12

5) Li et al. (2020) Low level of polystyrene microplastics decreases early developmental toxicity of phenanthrene on marine medaka (*Oryzias melastigma*). J. Hazard. Mater. 385, 121586

6) Wang et al. (2021) Adaptation of life-history traits and trade-offs in marine medaka (*Oryzias melastigma*) after whole life-cycle exposure to polystyrene microplastics. J. Hazard. Mater. 414, 125537

7) Prata et al. (2022) Effects of virgin and weathered polystyrene and polypropylene microplastics on *Raphidocelis subcapitata* and embryos of *Danio rerio* under environmental concentrations. Sci. Total Environ. 816, 151642

8) Mazurais et al. (2015) Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Mar. Environ. Res. 112, 78-85

9) Isobe et al. (2019) Abundance of non-conservative microplastics in the upper ocean from 1957 to 2066. Nat. com. 10, 417

#### 8. 成果の発表、活用等 (5 年間)

- ・論文発表 2 件

Ohkubo et al. (2020) Estimation of the uptake and gut retention of microplastics in juvenile marine fish: Mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) and red seabreams (*Pagrus major*). Mar. Pollut. Bull. 160, 111630

Ohkubo et al. (2022) Microplastic uptake and gut retention time in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) under laboratory conditions. Mar. Pollut. Bull. 176, 113433

- ・シンポジウム講演 2 件 (R1、R4 年、水産技術研究所・有害物質研究会)

- ・学会発表 5 件 (H30、H31、R2、R3、R5 年 (予定))

#### 9. 事業推進上の問題点等

特になし。

#### 10. 今後の課題

最近、海洋中で検出されるようになった、より小型 (10-100  $\mu\text{m}$ ) のサイズの MP の魚類以外の海産生物への影響に関する研究に注目する必要があると考えられる。

## 令和4年度報告書

課 題 名	プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査
細部課題名	(2) マイクロプラスチックに起因する有害化学物質の魚介類への移行性の評価
機 関 名 担当者名	水産研究・教育機構 水産技術研究所 伊藤 真奈・羽野 健志・河野久美子（環境保全部 化学物質グループ）

### 1. 目的

海洋環境中に漂うマイクロプラスチック（MP）は、海域に存在する有害化学物質を吸着することから、高濃度に濃縮したMPが海産生物に取り込まれ、生物の消化・排泄の過程においてMPから有害化学物質が遊離・溶出し、さらには生物体内に取り込まれることが危惧される。そこで本研究では、MPに吸着した有害化学物質が、海産生物の生理的環境下でどの程度溶出するかを推定し、MPによる海産生物への影響を評価する一助とする。

### 2. 実施計画（令和4年度）

#### 2. 1 魚類消化管内における破砕MPからのPAHs溶出量の推定

不均一な形状の破砕MPに吸着した有害化学物質の魚類消化管内における溶出の有無の推定に向け、各種パラメータを取得する。対象有害化学物質は石油の毒性成分であり日本沿岸域でも検出される多環芳香族炭化水素（PAHs）とし、MPの材質はポリエチレン（PE）とする。MPはビーズ状のプラスチックを破砕して作製したMPを用いる。具体的には破砕MPに吸着したPAHsのマミチヨグ消化管内における溶出速度を生体外溶出試験法を用いて算出する。さらに、過年度事業で取得済みの知見（魚類による破砕MPの摂取量および体内滞留時間）、および文献調査等に基づき、MPに吸着したPAHsの魚類消化管内における溶出量を数値計算により推定する。

#### 2. 2 MPに吸着したPAHsの魚類への移行性に関する総合的評価

過年度事業にて実施した吸着および溶出試験の結果を統合的に取りまとめる。具体的には、MPの形状の違いによるMPへのPAHs吸着量、並びに魚種（消化管の形態）やMPの形状の違いによる魚類消化管内でのPAHs溶出量を比較考察する。また、生体外溶出試験および生体内溶出試験の結果を取りまとめ、魚類消化管内にてMPから溶出したPAHs量と海水からの経鰓由来の取り込み量を比較し、MPに起因する有害化学物質の魚類への移行性を総合的に評価する。

### 3. 方法

#### 3. 1 供試生物

マミチヨグ（*Fundulus heteroclitus*）は水産研究・教育機構 水産技術研究所 廿日市庁舎にて継代飼育されているものを用いた。

### 3. 2 マミチョグ消化管内における破碎 MP からの PAHs 溶出量の推定

破碎MP (素材: PE、サイズ: 100–500  $\mu\text{m}$ ) はR3年度同研究課題 (細部課題 1) <sup>1)</sup> と同様の方法にて作製した。

破碎 MP と球状 MP (素材: PE、サイズ: 250–300  $\mu\text{m}$ ) への PAHs の吸着量を比較するため、破碎MPおよび球状MPを 16 種 PAHs (各 2  $\mu\text{g/L}$ ) が溶解した海水中でそれぞれ 48 時間攪拌後、ガラス繊維ろ紙 (GF/B; Whatman) にて濾過し、MP を回収した。MP に吸着した PAHs 濃度は、H 30 年度同研究課題 (細部課題 2) <sup>2)</sup> と同様の分析法にて抽出・測定した。

消化管内における破碎 MP からの PAHs 溶出量の推定に用いるため、マミチョグ消化管内における PAHs 溶出速度を算出した。解剖の 1 および 5 時間前に給餌したマミチョグ (TL120 $\pm$ 5.0 mm、BW 33 $\pm$ 3.9 g) から摘出した消化管を前腸、中腸、後腸に分け、前腸の内容物 (以下、マミチョグ消化管内容物) を搾取し、液体窒素で凍結後、-80  $^{\circ}\text{C}$  にて冷凍保存した。凍結した消化管内容物を5倍量 (重量比) の 0.25 M Sucrose 液中で超音波ホモジナイザー (Sonics Vibra-Cell VCX 130; Sonics and Materials Inc) にて破碎し、遠心後の水溶性画分を内容物懸濁液とした。溶出試験はねじロガラス試験管内に PAHs を吸着させた破碎 MP とその 200 倍量 (v/w) の消化管反応液 (緩衝液: 消化管内容物懸濁液 = 9:1) を入れ、20  $^{\circ}\text{C}$ 、暗条件下で振盪した。反応時間は 30 分、1、3、6 および 24 時間とした。反応後、反応液をガラス繊維ろ紙 (GF/C; Whatman) にて濾過し、MP を除去した。濾液に内部標準を添加後、ヘキサンをを用いて反応液中に溶出した PAHs を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) で分析した。溶出速度定数 ( $k_2$ ) は、OECD ガイドライン<sup>3)</sup> の排出速度定数を参考にし、反応式  $dC/dt=k_2 \cdot C$  ( $C$ : MP に残存している PAH 濃度、 $t$  溶出時間) から算出した。MP に残存している PAHs の濃度は、MP の初期 PAHs 濃度および各反応時間に反応液中に溶出した PAHs 量から換算した。

次に、過年度および本年度の当該研究にて得られた成果および既報の情報を元に、実海域における MP の摂食を介した PAHs の魚体内への取り込み量の推定を試みた。対象物質は環境中濃度および生物への蓄積性が比較的高く、推定に用いるパラメータ情報が入手可能なフェナントレン (Phe)、ピレン (Pyr)、およびクリセン (Chr) の 3 種類の PAHs とした。MP 濃度は今後2060年までに予想される最大濃度<sup>4)</sup>を用い、実海域から採取した MP に含まれる PAHs 濃度<sup>5)</sup>、および当該事業にて算出された MP に吸着した PAHs の海水への溶出率から海水中の PAHs 濃度を算出した。その後、マミチョグにおける海水中 PAHs の濃縮係数<sup>6)</sup>を用い、経鰓 (海水) 由来の PAHs の取り込みによる魚体中濃度を推定した。消化管内における MP からの PAHs 溶出に起因する魚体中濃度は、マミチョグにおける MP 摂取率 (細部課題 1, R3 年度成果) <sup>1)</sup> から摂取する MP 量を推定後、生体外溶出試験法にて得られた溶出速度定数 ( $k_2$ ) を用いて消化時間 6 時間 (細部課題1, R3 年度成果) <sup>1)</sup> でのマミチョグ消化管内における MP からの PAHs の溶出量を算出し、消化管内にて溶出した全ての PAHs が体内に吸収されると仮定して推定した。さらに、過年度に推定した球状MPに由来するマミチョグの魚体中濃度 (経鰓由来およびMP由来) と比較し、MP の形状による差異について考察した。

### 3. 3 MP に吸着した PAHs の魚類への移行性に関する総合的評価

5 年にわたり本事業にて実施した吸着および溶出試験の結果を以下 3 点について統合的に取りまとめる。

① MP の形状の違いによる MP への PAHs 吸着量の違い、②魚種 (消化管の形態) や MP の形状の違いによる魚類消化管内での PAHs 溶出量の違いについて比較考察した。また、生体外溶出試験および生体内溶出試験の結果を取りまとめ、③ 魚類消化管内にて MP から溶出した PAHs に由来する魚体中濃度と海水から鰓を経由した取り込みに由来する魚体中PAHs濃度を比較し、実海域におけるMP に起因する有害化学物質の魚類への移行性を総合的に評価した。

#### 4. 結果および考察

##### 4. 1 マミチヨグ消化管内における破砕 MP からの PAHs 溶出量の推定

破砕および球状 MP に吸着した PAHs の量を表 1 に示す。いずれのMPにおいても、ベンゼン環の数が多い PAH ほど MP への吸着量が多かった。破砕MPへの PAHs の吸着量は、球状 MP に比べて多く、特に 3-4 環の PAHsが多かった。

マミチヨグ消化管内容物懸濁液を用いた生体外溶出試験の結果、反応開始後 3 時間では 24 時間で溶出する量の 3 環では 64%、4 環では 72% が溶出した。昨年度実施した球状MPでは、反応開始 3 時間では、3 環 で 79% および 4 環 で 84% が溶出しており<sup>7)</sup>、破砕MPは球状 MP に比べて MP からの PAHs の溶出が長時間に渡ると推察された。

表 1. 球状および破砕 MP への PAHs の吸着量

		球状 MP (ng/g)	破砕MP (ng/g)	破砕MP/球状MP
3 環	Acenaphthylene	51 ± 7.0	130 ± 6.3	2.6
	Acenaphthene	59 ± 4.0	270 ± 12	4.6
	Fluorene	77 ± 2.5	400 ± 19	5.2
	Phenanthrene	150 ± 15	970 ± 54	6.4
	Anthracene	190 ± 13	1100 ± 56	5.8
4 環	Fluoranthene	330 ± 28	3200 ± 150	9.4
	Pyrene	370 ± 29	3800 ± 180	10
	1,2benzanthracene	4400 ± 180	10000 ± 580	2.3
	Chrysene	8900 ± 420	12000 ± 610	1.4
5 環	1,2benzo(b)fluoranthene	7700 ± 270	15000 ± 590	1.9
	1,2benzo(k)fluoranthene	12000 ± 320	15000 ± 310	1.2
	Benzo(a)pyrene	9800 ± 370	14000 ± 780	1.4
	Dibenz(a,h)anthracene	19000 ± 1000	19000 ± 630	1.0
6 環	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	12000 ± 200	14000 ± 1300	1.2
	Benzo(g,h,i)perylene	15000 ± 450	12000 ± 2200	0.8

平均値 ± 標準偏差

破砕 MP からの各 PAHs の溶出速度定数 ( $k_2$ ) を0-3 時間 (図 1A) と 3-24 時間 (図 1B) の各時間で算出した。その結果、16 種 PAHs の平均  $k_2$  は、0-3 時間で 2.1/d, 3-24 時間では 0.14/d であった。球状 MP からの PAHs の溶出速度定数は 0-3 時間で 0.56/d, 3-24 時間では 0.021/d であったことから<sup>7)</sup>、MP からの PAHs の溶出速度は、球状 MP に比べ破砕 MP の方が速いこと、また、破砕 MP からの PAHs の溶出は、長時間に渡ることが明らかとなった。

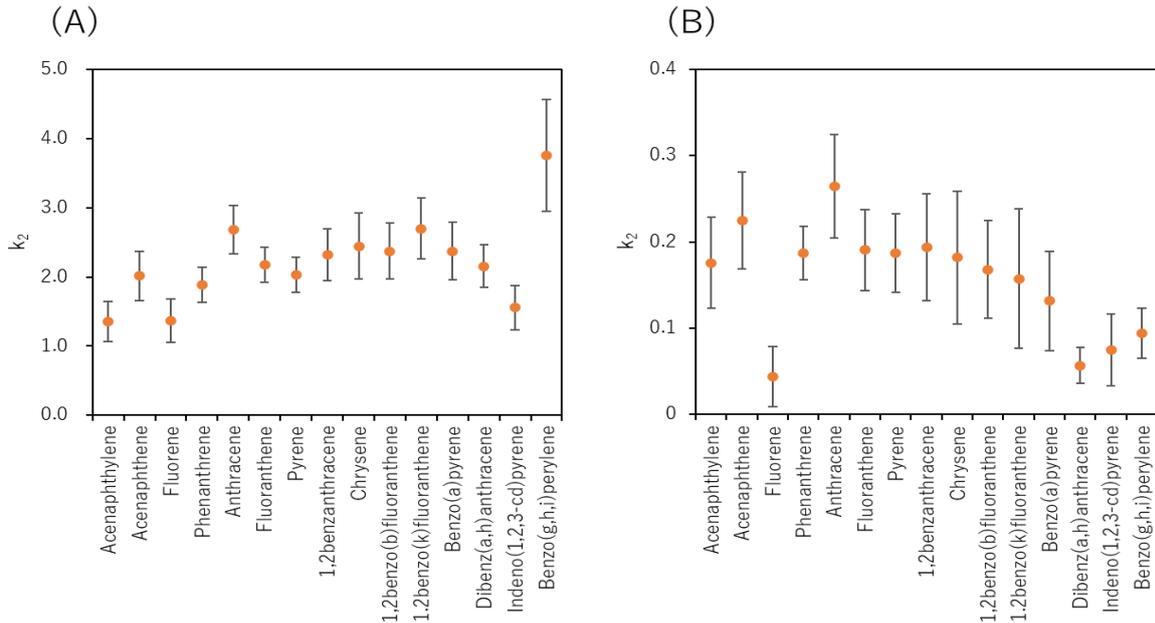


図 1. マミチョグ消化管内容物における破碎 MP からの各 PAH の 0-3 時間 (A) と 3-24 時間 (B) の溶出速度定数

次に、算出された溶出速度定数を用いて実海域における 破碎 MP を介した PAHs のマミチョグ魚体内への取り込み量の推定した結果、消化管における 破碎 MP からの溶出に由来する Phe、Pyr および Chr の魚体中濃度は、経鰓（海水）由来の魚体中濃度に比べてそれぞれ 1/200 倍、1/7.5 倍、および 4.2 倍と推定された。マミチョグの球状 MP における推定値と比較したところ、いずれの PAH においても破碎 MP 由来の魚体中 PAH 濃度の方が数倍高い値を示した（表 2）。これは、破碎 MP の方が溶出速度が速いこと、また、マミチョグ消化管内における MP の滞留時間が長いことに起因するものと推察された。

表 2. 推定に用いたパラメータおよび推定された魚体中濃度

	計算式	球状 MP			破碎 MP			破碎 MP			
		マダイ			マミチョグ			マミチョグ			
		Phe	Pyr	Chr	Phe	Pyr	Chr	Phe	Pyr	Chr	
海水中MP濃度 (mg/L)	a	1									Isobe et al., 2019
魚によるMP摂取率 (%)	b	0.010			0.019			0.019			当該事業課題1_H30,R3年度成果
消化時間 (hr)	c	3			3			6			当該事業課題1_H30,R3年度成果を参考
MP中濃度 (ng/g MP)	d	15000	5000	2500	15000	5000	2500	15000	5000	2500	Mai et al., 2018
海水への溶出率 (%)	e	42	26	38	42	26	38	42	26	38	当該事業課題2_R2年度成果
海水中濃度 (ng/L)	a*d*(e/100)/1000=f	6.3	1.3	0.95	6.3	1.3	0.95	6.3	1.3	0.95	
BCF	g	3400	520	3.1	11000	910	19	11000	910	19	市橋ら, 2002
魚体中濃度 (ng/g)	f*g/1000	<b>21</b>	<b>0.68</b>	<b>0.0029</b>	<b>70</b>	<b>1.2</b>	<b>0.018</b>	<b>70</b>	<b>1.2</b>	<b>0.018</b>	
MP中残濃度 (ng/g MP)	d*(1-(e/100))=h	8700	3700	1600	8700	3700	1600	8700	3700	1600	
溶出速度定数 (/d)	i	1.08	0.66	0.42	1	0.59	0.37	0.97	1.0	1.2	当該事業課題2_R2,3,4年度成果
MPからの溶出濃度 (ng/g MP)	h*(1-exp(-i*c/24))=j	1100	290	82	1000	270	69	1900	840	390	
魚体中濃度 (ng/g)	j*b/100	<b>0.11</b>	<b>0.029</b>	<b>0.0082</b>	<b>0.19</b>	<b>0.050</b>	<b>0.013</b>	<b>0.35</b>	<b>0.16</b>	<b>0.074</b>	
経鰓由来魚体中濃度/MP由来魚体中濃度		<b>190</b>	<b>23</b>	<b>0.35</b>	<b>370</b>	<b>23</b>	<b>1.4</b>	<b>200</b>	<b>7.5</b>	<b>0.24</b>	

#### 4. 2 MPに吸着したPAHsの魚類への移行性に関する総合的評価（5カ年のまとめ）

本細部課題では、PAHs を吸着した MP を魚類が摂食した際、消化管内における MP からの PAHs の溶出の有無、およびその溶出量を推定することを目的として実施した。

### ① MP への PAHs の吸着特性

異なる素材 (PE および PS) および形状 (球状および破碎) の MP における PAHs の吸着特性を検証した。その結果、いずれの素材および形状においても海水に溶解している PAHs を吸着した。PE および PS の粒状 MP への PAHs 吸着量は同等であり、材質による明確な違いは認められなかった。一方、粒状および破碎 MP への PAHs の吸着量を比較すると、不均一な形状の破碎 MP の方が球状 MP に比べて PAHs の吸着量は多く、特に 3-4 環の増加率が高かった (表 1)。各 PAH の MP への吸着量は、PAHs の物性によって大きく異なり、オクタノール/水分配係数 ( $\log K_{ow}$ ; 親油性の指標であり、値が高いほど水溶性が低くなることを示す) が高くなるにつれて MP への吸着量が増加した<sup>2)</sup>。また、海水中の PAHs 濃度と MP への吸着量には正の相関が認められたことから<sup>2)</sup>、実海域の MP への化学物質の吸着量は、化学物質の物性、海水中濃度や MP の形状によって変動すると考えられた。

### ② MP からの消化管内での溶出

消化管内において MP からの PAHs の溶出の有無を実際の魚類消化管内容物を用いた生体外溶出試験にて検証した。その結果、消化管の形態が異なるマダイおよびマミチヨグいずれの魚種においても、消化管内の環境にて MP から PAHs が溶出することが示された<sup>8)</sup>。また、各魚種の消化管を3部位に分け、それぞれの溶出特性を検証した結果、消化管の部位によって MP からの PAHs 溶出量が異なり、有胃魚 (マダイ) の胃ではほとんど PAHs は溶出されず、幽門垂に続く前腸で溶出量が高いこと、一方、無胃魚のマミチヨグでは食道直下の前腸で溶出量が高いことが明らかとなった。

球状 MP からの各 PAH の溶出速度は、マダイおよびマミチヨグの魚種間で大きな差異は認められなかった。一方、PAHs の物性によって溶出速度は異なり、PAHs の  $\log K_{ow}$  と溶出速度定数との間に負の相関が認められた。以上のことから、水溶性の低い PAHs ほど MP に吸着されやすいものの、消化管内での溶出速度は小さくなると推察された。

### ③ 実海域における PAHs の取り込み量の推定

本細部課題にて算出された溶出速度定数、細部課題1にて明らかとなった各魚種における MP の摂取率および消化管内滞留時間を参考にするとともに、既報の情報を用いて実海域における MP を介した PAHs の魚体内への取り込み量を推定した。推定は 16 種類の PAHs のうち、実海域での濃度が高く、生物への取り込みが懸念されている 3 種類の PAHs (Phe、Pyr および Chr) において実施した。マダイおよびマミチヨグの両魚種およびいずれの MP 形状 (球状および破碎) においても、消化管における MP からの溶出に由来する Phe および Pyr の魚体中濃度は、経鰓 (海水) 由来の魚体中濃度に比べて低いと推定された。一方、消化管における MP からの溶出に由来する Chr の魚体中濃度は、マダイの球状 MP およびマミチヨグの破碎 MP では、経鰓 (海水) 由来の魚体中濃度に比べて数倍高いと推定された。

今回の推定値をアメリカ食品医薬品局 (FDA) が定める発がんが懸念されるレベル値 (Phe 490  $\mu\text{g/g}$ , Pyr 49  $\mu\text{g/g}$ , および Chr 35  $\mu\text{g/g}$ )<sup>9)</sup> と比較した。その結果、MP 由来の魚体中 PAHs 濃度は上記レベル値の約 450 万分の 1 から 40 万分の 1 であり、現在実環境において魚体内にて摂食が多く報告されている大きさの MP においては、MP を介した魚体への PAHs の

取り込みの観点から見て、食品としてのリスクは極めて低いレベルであると推察された。なお、今回の試算に用いた魚体中濃度の推定値は、試算に用いるパラメータによってその値が変化することから、慎重に扱う必要がある。

また、今回の推定は、消化管内にて MP から溶出した PAHs の体内への吸収効率を100%（消化管内にて MP から溶出した全ての PAHs が体内に吸収される）と仮定して行っているが、吸収効率を考慮すれば実際の消化管内 MP 由来の魚体中 PAHs 濃度は今回の推定値よりも低くなると推察される。本事業においてもマダイ生体を用いた MP を介した PAHs の取り込み（MP による PAHs のベクター効果）を検証したが、MP を摂食したことによる PAHs の魚体中への移行は確認されなかった<sup>7,10</sup>。以上のことから、海産魚類が MP を摂食後、消化管内において MP から溶出する PAHs の取り込みは、海水から鰓を経由した PAHs の取り込みに比べて低く、MP の介在による新たな生物体へのリスクは低いと推察された（図 2）。

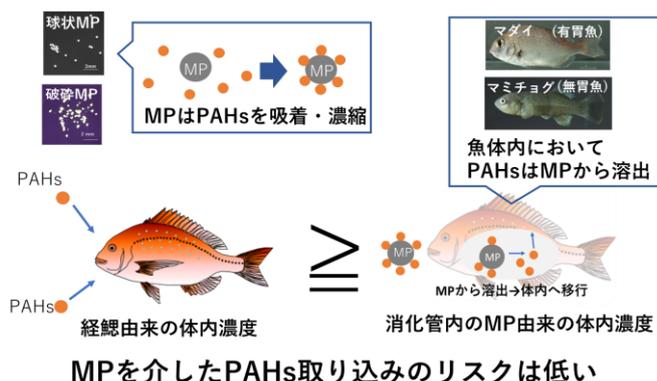


図 2. 本事業における結果の概要図

## 5. 要約

マミチョグの消化管内容物の懸濁液を用い、破碎 MP からの PAHs の溶出試験を実施した結果、破碎 MP は、球状 MP に比べて PAHs の溶出は長時間に渡ることで、その溶出速度は速いことが明らかとなった。一方で、当該事業にて得られた成果および既報の情報を元に、実海域における MP を介した PAHs のマミチョグ体内への取り込み量を推定した結果、消化管内における 破碎 MP からの溶出に由来する魚体中濃度は、いずれの PAH (Phe、Pyr および Chr) においても球状の MP に比べて数倍高いと推定された。

これまで当該事業で実施した生体外溶出試験の結果、海産魚類は PAHs を吸着・濃縮した MP を摂食した際、消化管内での MP からの溶出に伴う PAHs の魚体内への付加的な取り込み（ベクター効果）は存在すると推察されるものの、その程度は海水から鰓を経由した取り込みに比べて低いと推察された。以上のことから、実海域での MP による PAHs のベクター効果は存在しても軽微であり、そのリスクは現時点では低いと考えられた。

## 6. 5カ年のまとめ（総括）

詳細は上記 4. 2 に示す。

- ・魚類消化管内環境において MP に吸着した PAHs はその一割程度が溶出する。
- ・MP への PAHs の吸着特性および魚類消化管内での溶出特性は PAHs の物性によって異なる。

・魚類消化管内での MP からの PAHs 溶出に由来する魚体中濃度は、食品安全基準値に比べて極めて低く、MP を介した PAHs 取り込みのリスクは低いレベルである。

## 7. 参考文献

- 1) 大久保、河野 (2022) マイクロプラスチックの体内滞留時間の測定等に関する試験。「令和3年度プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」、水産庁、5-12.
- 2) 河野 (2019) 海水中溶存化学物質の MP への吸着特性の解明。「平成30年度プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」、水産庁 13-22
- 3) OECD (2000) OECD guideline for testing of chemicals. No. 106, Adsorption - desorption using a batch equilibrium method. Paris: OECD.
- 4) Isobe et al. (2019) Abundance of non-conservative microplastics in the upper ocean from 1957 to 2066. *Nat. com.* 10:417
- 5) Mai et al. (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbons affiliated with microplastics in surface waters of Bohai and Huanghai Seas, China. *Environ. Pollut.* 241:834-840
- 6) 市橋ら (2002) PAHs 複合添加時あるいは油処理剤添加時の有害性メカニズム解明及び石油有害性の予測。「流出油及び油処理剤の海産生物に対する有害性評価に関する研究」平成13年度環境省地球環境保全等試験研究費 研究成果報告書, 11-20
- 7) 伊藤ら (2022) マイクロプラスチックに吸着した有害化学物質の魚介類消化管内における溶出量の推定等に関する試験。「令和3年度 海洋プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」水産庁 13-22
- 8) Ito et al. (2022) Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from polyethylene microplastics in two morphologically different digestive tracts of marine teleosts: Gastric red seabream (*Pagrus major*) and agastric mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Pollut.* 308; 119589
- 9) U.S. FDA. (2010) Protocol for interpretation and use of sensory testing and analytical chemistry results for re-opening oil-impacted areas closed to seafood harvesting. Accessed on 08/15/2010 (<http://www.fda.gov/food/ucm217601.htm>).
- 10) 伊藤ら(2021) MP に吸着した有害化学物質の魚介類消化管内における溶出量の推定等に関する試験。「令和2年度 海洋プラスチックを摂食した魚介類の生態的情報等の調査報告書」水産庁 18-25
- 11) Qiu et al. (2020). Quantifying the vector effects of polyethylene microplastics on the accumulation of anthracene to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) *Aquat. Toxicol.* 228, 105643-105643

## 8. 成果の発表、活用等 (5年間)

・論文発表 1件

Ito et al. (2022) Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from polyethylene microplastics in two morphologically different digestive tracts of marine teleosts: Gastric red seabream (*Pagrus major*) and agastric mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Pollution*, 308, 119589

・シンポジウム講演 1 件 (R4 年、水産技術研究所・有害物質研究会)

・学会発表 3 件 (H31、R2、R4)

#### 9. 事業推進上の問題点等

特になし。

#### 10. 今後の課題

実環境では、本試験で用いた MP (250-300  $\mu\text{m}$ ) より小型のMPの検出の報告が近年相次いでいる。MPのサイズの差異 (小型化) は魚体内での動態や化学物質の吸着量にも大きく影響を与えることから<sup>11)</sup>、今後はより小型のMPを用いてベクター効果の検証を進めていく必要がある。