

平成 31 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 瀬戸内海区水産研究所 環境保全研究センター化学物質グループ 大久保信幸、伊藤真奈、羽野健志 資源生産部資源増殖グループ 米田道夫

1. 目的

プラスチックごみが細かく碎けて海洋に散在するマイクロプラスチック（5mm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。MPを含む海洋ゴミ問題は主要国首脳会議（サミット）等でも取り上げられた国際的な課題として認識されている。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化学的影響（化学物質の移行など）、および物理的影響（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. 31年度計画

本事業では、MPが海産魚類に与える化学的影響および物理的影響の評価に必要なデータを収集するため、(1) MPの海産魚類における摂取量および体内滞留時間の解明、(2) MPに吸着した有害化学物質の魚類消化管内での溶出量の推定に関する試験を以下の年度計画で実施する。

対象魚種は、毒性試験のモデル海産魚であるマミチョグ、および水産重要種であり、摂餌生態の異なるマダイ、カタクチイワシを用いる。また、使用するMPは、日本沿岸域で検出の報告例があり、かつ消化管内に取り込まれることが確認されているサイズ（300μm前後）、および材質（ポリエチレン）のビーズを主に用いる。

(1) カタクチイワシを用いた曝露試験を実施し、MPの摂取量を明らかにすると共に、体内滞留時間測定法を検討する。また、30年度と異なるサイズ、材質のMPを用いた、マミチョグおよびマダイの曝露試験を実施し、MPの摂取量、体内滞留時間を明らかにする。

(2) H30年度に実施した消化管内容物溶出試験法に基づき、PAHsを吸着させたMPを消化管内容物懸濁液中に一定時間浸漬し、反応時間ごとの懸濁液中のPAHs濃度を分析し、MPからの溶出速度を明らかにする。なお、用いるMPはH30年度と同様とする。また、消化管内容物の消化管での滞留時間など、MPに吸着した有害化学物質の魚類消化管内での溶出量を推定するためのモデル構築に向けた基盤形成を進める。

3. 細部課題の構成

(1) MP の海産魚類における摂取量および体内滞留時間の解明

①カタクチイワシを用いた MP 曝露試験を実施し、MP の摂取量を明らかにすると共に、体内滞留時間測定法を検討する。なお、カタクチイワシは通常、毒性試験等に用いる魚種ではないため、曝露試験の実施には困難が予想される。このため、カタクチイワシの飼育、種苗生産実績のある瀬戸内水研資源生産部伯方島庁舎と共同で試験を実施する。使用する MP は0.3mm 前後、または、より大型の PE ビーズを用い、取り込み試験を実施する。MP サイズや試験条件の違いが摂取量に及ぼす影響について調べ、体内滞留時間の測定のための最適な試験条件を絞り込んだ後、MP の排泄試験を実施し、体内滞留時間の測定を試みる。これらの試験により、動物プランクトン食性であり、東京湾で MP の取り込み事例が報告されているカタクチイワシにおける MP の取り込み量や体内滞留時間が、他の魚種とどの程度異なるのかを考察する。

②平成30年度と異なるサイズ、材質の MP として水産資材系廃プラスチックを粉砕したものを用い、マミチョグまたはマダイの曝露試験を実施し、粉砕した MP の摂取量、体内滞留時間を明らかにする。これらの結果を30年度に算出した0.3mm 前後の PE ビーズでの結果と比較し、MP の性状の差異と摂取量との魚への関係を考察する。

また、MPの海産魚への物理的影響について、エサとの誤認によるMPの摂取により、栄養状態や成長の悪化が生じるかを室内試験により検証するため、飢餓耐性が低く、影響を受けやすいと考えられる仔魚期～稚魚期の海産魚（マミチョグ等）を用い、0.3mm 前後のPEビーズ曝露試験の方法を検討する。

(2) MP に吸着した有害化学物質の魚類消化管内での溶出量の推定

対象有害化学物質として、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）を選定し、MP に吸着した PAHs の魚類消化管内における溶出量を推定する。対象魚種をマダイまたはマミチョグ、対象 MP の材質は PE（サイズ0.3mm 前後）とする。

H30年度当該事業で確立した消化管内容物溶出試験法に基づき、PAHsを吸着させたMPを消化管内容物懸濁液中に浸漬した後、反応液中の対象化学物質をガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）により分析し、MPからのPAHsの溶出量および溶出速度を明らかにする。また、消化管内容物の滞留時間など、MPに吸着した有害化学物質の魚類消化管内での溶出量を推定するためのモデル構築に必要な各種変数の情報収集を行う。

4. 結果の要約

(1) MP の海産魚類における摂取量および体内滞留時間の解明

1) カタクチイワシを用いた MP 曝露試験法の検討

成魚および幼魚を用いて MP 取り込み試験を実施し、排泄試験に用いる MP のサイズを 250–300 μ m とした。成魚を用いて排泄試験を実施した結果、平均 MP 数は 0–6

時間目にかけて大きく減少した後、ゆるやかに減少した。排泄試験開始 20 時間後の供試魚の消化管内平均 MP 数は、試験開始時の 10%以下であった。この結果、平成 30 年度に実施した魚種と同様、取り込んだ MP の多くは消化管内容物と共に速やかに排泄される可能性が示唆された。

2) 粉砕 MP を用いた曝露試験

カキ養殖用パイプを粉砕した MP の取り込み・排泄試験をマミチヨグ稚魚を用いて行った結果、供試魚が取り込んだ MP の 90%以上が 20 時間以内に排泄された。これは、昨年度実施した 250–300 μ m PE ビーズの排泄時間より若干長く、MP の形状により、排泄時間が変化することを示唆している。また、粉砕 MP の曝露濃度とマダイ稚魚による取り込み量との関係を検討したところ、高濃度曝露区 (0.9mg/L) でも消化管内に十分な MP を取り込まなかった。

3) マミチヨグ仔魚を用いた MP 曝露試験の検討

マミチヨグふ化仔魚を用い、ビーカー内で MP を曝露する手法をほぼ確立した。

(2) MP に吸着した有害化学物質の魚類消化管内での溶出量の推定

マダイの消化管内容物の懸濁液を用い、MP からの PAHs の溶出試験を実施した結果、本試験系において 24 時間で溶出する PAHs 量の約 90 %が、反応 3 時間以内に溶出することが明らかとなった。また、その溶出速度は PAHs の種類（物性）によって異なり、log K_{ow} が大きくなるにつれて小さくなる傾向が認められた。

マミチヨグの消化管内容物の懸濁液を用いた溶出試験を実施した結果、マミチヨグの消化管内において MP に吸着した PAHs が溶出することが示された。また、その溶出量は消化管の部位によって異なり、食道直下の前腸でより多くの PAHs 溶出が確認された。しかしながら、その溶出量は MP に吸着している PAHs の 20 %未満と推定されたことから、今後更なる検証を要する点はあるものの、MP を介した PAHs の魚体への曝露は低いレベルにあると推察された。

5. 成果の発表、活用等

・学会発表 2 件（予定）

令和 2 年度日本水産学会春季大会「マイクロプラスチックの形状やサイズが海産魚の摂取量および体内滞留時間に与える影響の検討」、「マイクロプラスチックに吸着した有害物質の魚類消化管内での溶出評価」

・シンポジウム 1 件

令和元年度漁場環境保全関係研究開発推進会議有害物質部会「プラスチックによる海洋汚染と海洋生物への影響に関する研究の現状」

6. 事業推進上の問題点等
特になし。

平成 31 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) 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
機 関 名 担当者名	水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 大久保信幸・伊藤真奈（環境保全研究センター）・米田道夫（資源生産部）

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（平成 31 年度）

2. 1 カタクチイワシを用いた MP 曝露試験（6、10～11 月、瀬戸内海区水産研究所伯方島庁舎）

カタクチイワシを用いた MP 曝露試験を実施し、MP の摂取量、および消化管内滞留時間を明らかにする。使用する MP は 0.3mm 前後、または、より大型の PE ビーズを用い、取り込み試験を実施する。MP サイズや魚のサイズ等、試験条件の違いが摂取量に及ぼす影響について調べ、消化管内滞留時間測定のための最適な試験条件を絞り込んだ後、MP の排泄試験を実施し、滞留時間の測定を試みる。これらの試験により、東京湾で MP の取り込み事例が報告されているカタクチイワシにおける MP の取り込み量や消化管内滞留時間が、他の魚種とどの程度異なるのかを考察する。

2. 2 異なる材質、サイズの MP を用いた曝露試験（5～7、11、12 月、瀬戸内海区水産研究所廿日市庁舎）

水産資材系廃プラスチックを粉砕した MP を用い、マミチヨグまたはマダイの曝露試験を実施し、粉砕した MP の摂取量、消化管内滞留時間を明らかにする。これらの結果を 30 年度に算出した 0.3mm 前後の PE ビーズでの結果と比較し、MP の性状の差異と海産魚の排泄との関係等を考察する。

2. 3 マミチヨグ仔魚を用いた MP 曝露試験の検討（6～7 月、廿日市庁舎）

エサとの誤認による MP の摂取により、栄養状態や成長の悪化が生じるかを室内試験により検証するため、飢餓耐性が低く、影響を受けやすいと考えられる仔魚期～稚魚期のマミチヨグを用い、0.3mm 前後の PE ビーズ曝露試験の方法を検討する。

3. 材料と方法

3. 1 供試生物

マミチョグ（写真 1）は瀬戸内海区水産研究所・廿日市庁舎で継代飼育しているものを用いた。マダイ（写真 2）は（株）アーマリン近大から購入した。カタクチイワシ（写真 3）は、取り込み試験に用いた成魚については、香川県水産試験場で継代飼育された標本を瀬戸内海区水産研究所・伯方島庁舎に搬送し、馴致させたものを用いた。また、稚魚、および排泄試験に用いた成魚は種苗生産した個体を用いた。



写真 1 マミチョグ稚魚



写真 2 マダイ稚魚



写真 3 カタクチイワシ

3. 2 MP

1) 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（250–300 μ m、および 710–850 μ m、比重 1.00）、蛍光緑色ポリエチレン粒子（250–300 μ m、比重 1.00）、およびクリアーポリエチレン粒子（250–300 μ m、比重 0.96）を用いた。

2) 海岸に漂着したカキ養殖用パイプ（PE 製、直径 1.5cm x 長さ 24cm、黄色、写真 4 左）を洗浄、3cm 片に切断後、プラスチック・カッティングミル（大阪ケミカル社）を用いて粉碎し、目開き 500 μ m および 100 μ m の篩に通し、100 μ m の目合上に残った MP（写真 4 右）を用いて曝露試験を実施した。

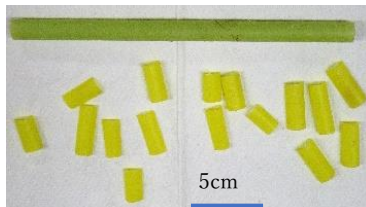


写真 4 カキ養殖用パイプ
および切断したもの（上）、
粉碎した MP（下）

3) ポリスチレン（PS）製蛍光 MP ビーズとして、Fluoresbrite YG Microspheres（90 μ m、比重 1.05、ポリサイエンス社）を用いた。

3. 3 曝露試験

3. 3. 1. カタクチイワシを用いた試験

取り込み試験、排泄試験にはポリカーボネート製円型水槽（内側青色、1 t）を用い、20℃ に調温した海水を注水した。取り込み試験は止水式で、排泄試験は流水式で行った。また、溶存酸素濃度の低下を防ぐため各水槽に微弱な通気を行った。試験時の給餌はアルテミア幼生を 1 尾/mL になるよう投与した。

1) 取り込み易い MP サイズの検討

人工生産の幼魚および天然成魚を用い、250–300 μ m および 710–850 μ m の 2 種類の蛍光黄色 PE ビーズを使って取り込み試験を実施した。カタクチイワシ成魚（4.14 – 8.59 g、89.0 –

118 mm) 15 尾、および幼魚 (0.17 - 2.70 g、29.8 - 71.3 mm) 85 尾を別々の 1t 水槽 に収容し、流水で 5 日間馴致後、注水を止めて 2 種類のビーズをそれぞれ設定濃度 10 個/L (0.15、および 2.68 mg/L) で複合曝露した。試験開始時にアルテミア幼生を給餌し、試験開始 2 時間後に魚を網で取り上げ、麻酔後、消化管を摘出し、10%KOH 下で 24 時間以上、42℃でアルカリ分解した。成魚の全数、および幼魚 20 尾分の分解液をそれぞれガラスろ紙 (GF/C) でろ過し、ろ紙上の MP を実体顕微鏡下で計数した。

2) MP の色の検討

カタクチイワシ幼魚 (0.40 - 2.47 g、39.9 - 74.0 mm) 108 尾を 1 t 水槽に収容し、流水で 5 日間馴致後、注水を止めて 2 時間、250-300 μ m PE ビーズ (蛍光黄色、蛍光緑色、およびクリアーポリエチレン粒子) をそれぞれ設定濃度 0.15 mg/L で複合曝露した。また、アルテミア幼生を合わせて投与した。その後、魚を 1) と同様に処理した。

3) 成魚を用いた排泄試験

カタクチイワシ成魚 (3.4 - 11.7 g、42.0 - 106.7 mm) 71 尾を 1 t 水槽に収容し、流水で 5 日間馴致後、注水を止めて 2 時間、250-300 μ m PE ビーズ (蛍光黄色) を設定濃度 0.15 mg/L で曝露した。また、アルテミア幼生を合わせて投与した。その後、魚を取り上げて一部をサンプリングした後、別途用意した排泄試験用 1 t 水槽 5 基に 10-13 尾ずつ移し、注水 (約 8L/分) を行った。移設後 3、6、20、44、144 時間目に 1 つの水槽中全ての魚を網で取り上げ、上記 1) と同様に処理した。

排泄時間は、魚体重 1g あたりの消化管内 MP 数を体内濃度とし、縦軸に ln (体内濃度)、横軸に時間を取り、直線回帰式から得られた傾きを用いて算出した。

3. 3. 2. 粉碎 MP を用いた曝露試験

マミチヨグおよびマダイ稚魚を用いた取り込み試験は、海産生物毒性試験指針¹⁾を参考に行った。角型ガラス水槽 (10L または 20L) に活性炭ろ過海水を 10L または 20L 入れ、水温を 20.2 - 21.0℃に保ち、取り込み試験は止水式で、排泄試験は半止水式で行い、溶存酸素濃度の低下を防ぐため各水槽に微弱な通気を行った。試験時の給餌はアルテミア幼生を 1 尾/mL になるよう投与した。

1) マミチヨグ

試験は平成 30 年度当該事業²⁾で開発した手法に準じて行った (図 1)。マミチヨグ稚魚 (体重 2.36 - 3.31 g、全長 56.1 - 62.2 mm) 9 尾を 20L 水槽に収容し、粉碎 MP を設定濃度 0.45 mg/L で 3.5 時間曝露した。その後、魚を取り上げてトリカルネット製のかご (10cm x 10cm x 10cm) に 3 尾ずつまとめて

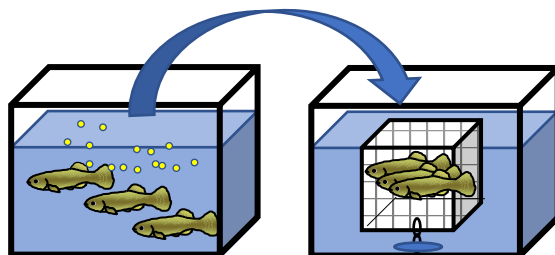


図 1. マミチヨグを用いた取り込み・排泄試験の模式図

収容し、別途用意した排泄試験用 10L 水槽 3 基の水面下にそれぞれ移設した（図 1）。移設後、2、4、6、20、25 時間後に排泄水槽内に排泄された MP をネットおよびサイフォンで回収し、ポリカーボネート製メンブレン（黒、孔径 0.4 μm ）でろ過後、計数した。MP 回収時に減った海水は追加した。試験終了時に麻酔後に消化管を摘出し、10%KOH 下で 24 時間以上、42°C でアルカリ分解した。KOH 溶液を上記のポリカーボネート製メンブレンでろ過し、メンブレン上の MP を実体顕微鏡下で計数した。給餌は取り込み試験開始時、および排泄試験開始 20 時間目の MP 回収後にアルテミア幼生を投与した。

排泄試験におけるかご当たりの MP の総排出量から、各サンプリング時間における消化管内の MP 数を逆算し、魚体重 1g あたりの消化管内 MP 数を体内濃度として排泄時間を算出した。

2) マダイ

マダイ稚魚（4.87 - 6.56 g、65.6 - 73.6 mm）を 5 尾ずつ 10L 水槽 3 基に収容し、設定濃度 0.3 と 0.9 mg/L で粉砕 MP を、また、陽性対照区として 250–300 μm PE ビーズ（蛍光黄色）を 0.3 mg/L でそれぞれ 3 時間曝露した。試験開始時にはアルテミア幼生を給餌した。試験終了後に魚体を取り上げ、上記 1) と同様に処理した。

3. 3. 3. マミチヨグ仔魚を用いた試験

300mL ガラスビーカーに活性炭ろ過海水を 200mL 入れ、マミチヨグふ化仔魚を 6 尾ずつ収容し、半止水式で 14 日間、恒温器中で MP を曝露した。水温は 20°C で行い、MP 曝露区と対照区を各 4 区ずつ設け、MP 曝露区には 250–300 μm PE ビーズ（蛍光黄色、設定濃度 50 個/200mL（3.5 mg/L））および 90 μm PS ビーズ（設定濃度 200 個/200mL）を複合曝露した。曝露水は実験開始 2、4、7、9、11 日後に全量交換し、給餌は開始時および水替え時にアルテミア幼生を 8 尾/mL になるよう投与した。試験終了後、仔魚を 70%エタノールで一晩固定し、全長を顕微鏡下で測定した後、乾燥重量を測定した。

4. 結果および考察

4. 1. カタクチイワシを用いた MP 曝露試験

1) MP 曝露試験法の検討

各個体の MP 取り込み数にばらつきが大きかったが、成魚では 250–300 μm ビーズの取り込みが、710–850 μm ビーズより有意に多かった（表 1、 $p=0.009$ ）。一方、幼魚では両サイズに有意差は認められなかった。以上の結果から、成魚、幼魚の試験共に多く取り込む 250–300 μm ビーズを用いることとした。

表 1. 異なるサイズの MP 取り込み試験におけるカタクチイワシの平均体重、および消化管内の MP 数

試験区	平均体重 (g±SE)	消化管内の MP 数 (平均値±SE)		
		250－300μm	710－850μm	合計
成魚	6.53±0.33	61.3±8.2	23.9±10.5	85.2±16.0
幼魚	0.85±0.05	33.1±6.1	35.6±13.2	66.7±15.7

2) MP の色の違い

各個体の MP 取り込み数にばらつきが大きかったが、MP の色の有無により取り込みの違いが見られた。蛍光黄色と蛍光緑の取り込みに有意差は認められなかった（表 2）一方、クリアービーズの取り込みは蛍光黄色（ $p=0.002$ ）、蛍光緑（ $p=0.02$ ）に比べ有意に少なかった。このため、以後の実験では、蛍光黄色ビーズを用いて取り込み・排泄試験を実施することとした。

表 2. 異なる色の MP 取り込み試験におけるカタクチイワシ消化管内の MP 数

消化管内 MP 数	MP ビーズの色			
	蛍光黄	蛍光緑	クリアー	合計
平均±SE	87.2±20.5	74.3±21.5	49.7±21.3	211.2±62.5
中央値（範囲）	44（19-495）	36（8-513）	12（1-487）	98.5（28-1495）

3) 成魚を用いた排泄試験

各排泄時間ごとの消化管内 MP 数には大きなばらつきが認められたものの、平均 MP 数は 0－6 時間目にかけて大きく減少した後、ゆるやかに減少し、排泄試験開始 20 時間後の供試魚の消化管内平均 MP 数は、試験開始時の 10%以下であった（図 2）。この結果、平成 30 年度に実施したマミチヨグやマダイ²⁾と同様、取り込んだ MP の多くは消化管内容物と共に速やかに排泄される可能性が示唆された。

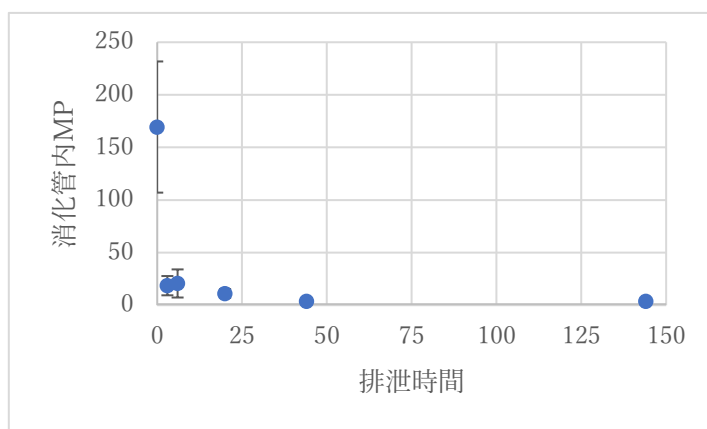


図 2. 排泄試験でのカタクチイワシ成魚消化管内の MP 数（平均±SE）の変化

一方、0－20 時間目までのデータを用いて排泄時間の算出を試みたところ、50%排出時間

=11.3 (h)、95%排出時間=48.9 (h)であり、マミチヨグやマダイより遅い結果となった。これは、より複雑な構造の胃を持つカタクチイワシの特徴が影響している可能性がある。

また、魚の消化速度は餌の種類や量、水温、魚のサイズなどに影響されると報告されている³⁾。このうち、餌の種類や水温は各試験共通であり、また魚のサイズについては、魚体重1gあたりで排泄時間を計算している。今回の排泄時間は、大量の餌と共にMPを取り込んだ一部の個体で、全ての消化管内容物とMPを排泄するまでにより多くの時間がかかった影響も考えられた。

4. 2. 粉砕MPを用いた曝露試験

1) マミチヨグ

カキ養殖用パイプを粉砕したMPの取り込み・排泄試験を行った。各水槽間のMPの排泄数に差は認められたものの、供試魚が取り込んだMPの90%以上が20時間以内に排泄された(図3)。

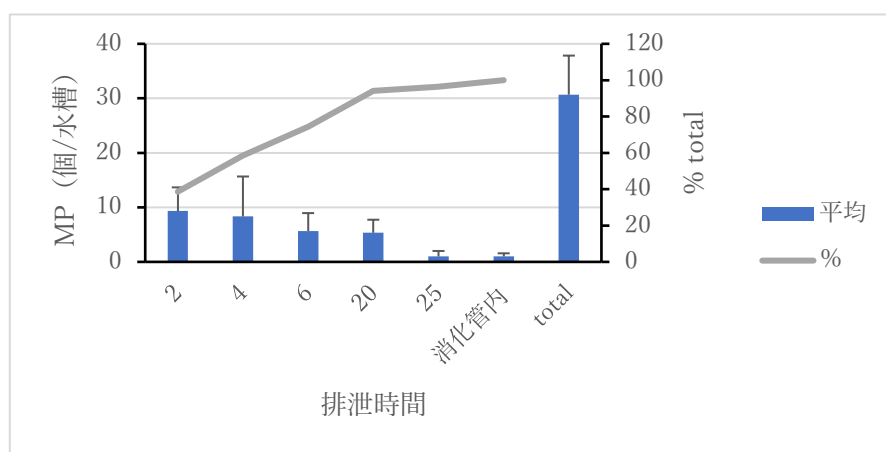


図3. 粉砕MP取り込み・排泄試験における経過時間ごとのMP排泄数(棒グラフ)とその割合(折れ線)

また、6時間目までのデータを用いて排出時間を算出したところ、50%排出時間=3.0 (h)、95%排出時間=12.8 (h)であった。これは、昨年度実施した250–300 μ m PEビーズの排泄時間(50%排出時間=1.8 (h)、95%排出時間=7.9 (h))より若干、遅くなった。この結果は、MPの形状により、排泄時間が若干、変化することを示唆している。

2) マダイ

粉砕MPの曝露濃度とマダイ稚魚による取り込み量との関係を検討したところ、高濃度曝露区(0.9mg/L)でも消化管内に十分なMPを取り込まなかったため(表3)、排泄試験を実施することは困難であった。昨年度の250–300 μ m PEビーズ曝露試験でも、マダイの平均MP取り込み数は、マミチヨグより少ない傾向が見られており²⁾、アミ類やヨコエビ類等、比

較的底層に分布する生物を主な餌とするマダイ稚魚⁴⁾はマミチョグに比べ、MP を取り込みにくい可能性が改めて示唆された。

表 3. 異なる濃度での破碎 MP 取り込み試験におけるマダイの平均体重、および消化管内の MP 数

試験区	平均体重 (g±SE)	曝露濃度 (mg/L)	消化管内の MP 数	
			平均値±SE	中央値 (範囲)
陽性対照区	5.52±0.28	0.3	24.0±4.8	25 (7-36)
低濃度区	5.46±0.27	0.3	5.2±1.2	5 (2-9)
高濃度区	5.28±0.34	0.9	13.4±5.0	12 (5-37)

4. 3. マミチョグ仔魚を用いた MP 曝露試験法の検討

高濃度の MP を 2 週間曝露した仔魚の全長および乾燥重量は、処理区間に有意な差は認められなかった (表 4)。

なお、今回の試験では 250–300μm PE ビーズおよび 90μm PS ビーズを複合曝露したが、試験終了時に 250–300μm PE ビーズを取り込んでいた仔魚の割合は 25%であり、90μm PS ビーズを取り込んだ割合 (75%) より低かった。このことから、ふ化仔魚にとって 250–300μm PE ビーズは大きすぎる可能性があった。また、250–300μm PE は曝露期間中の水中濃度は比較的安定だったが、90μm PS ビーズ水中濃度は大きく変動した。この理由として、PS ビーズの比重が若干重いため、水替え時のデカンテーションで除去されにくいことが考えられた。

表 4. MP 曝露試験における平均水中 MP 濃度、試験終了時のマミチョグの平均全長、および乾燥重量

試験区	曝露濃度 (個/200mL±SE)		全長 (mm±SE)	乾燥重量 (mg)
	250–300μm PE	90μm PS		
Cont.1	-	-	8.16±0.12	0.48
Cont.2	-	-	8.84±0.27	0.67
Cont.3	-	-	9.40±0.15	0.82
Cont.4	-	-	8.99±0.10	0.77
MP1	47.6±5.3	212±63	9.10±0.18	0.80
MP2	52.3±6.9	254±74	9.35±0.41	0.87
MP3	48.2±1.3	196±46	9.43±0.16	0.78
MP4	47.5±1.7	249±66	8.77±0.14	0.72

-:n.d.

5. 要約

1) カタクチイワシを用いた MP 曝露試験法の検討

成魚および幼魚を用いて MP 取り込み試験を実施し、排泄試験に用いる MP のサイズを 250–300 μ m とした。成魚を用いて排泄試験を実施した結果、平均 MP 数は 0–6 時間目にかけて大きく減少した後、ゆるやかに減少した。排泄試験開始 20 時間後の供試魚の消化管内平均 MP 数は、試験開始時の 10% 以下であった。この結果、平成 30 年度に実施した魚種と同様、取り込んだ MP の多くは消化管内容物と共に速やかに排泄される可能性が示唆された。

2) 粉碎 MP を用いた曝露試験

カキ養殖用パイプを粉碎した MP の取り込み・排泄試験をマミチョグ稚魚を用いて行った結果、供試魚が取り込んだ MP の 90% 以上が 20 時間以内に排泄された。これは、昨年度実施した 250–300 μ m PE ビーズの排泄時間より若干長く、MP の形状により、排泄時間が変化することを示唆している。

また、粉碎 MP の曝露濃度とマダイ稚魚による取り込み量との関係を検討したところ、高濃度曝露区 (0.9mg/L) でも消化管内に十分な MP を取り込まなかった。

3) マミチョグ仔魚を用いた MP 曝露試験の検討

マミチョグふ化仔魚を用い、ビーカー内で MP を曝露する手法をほぼ確立した。

6. 参考文献

- 1) 小山次朗 (2000) 急性毒性試験. 「海産生物毒性試験指針」、水産庁、1-11.
- 2) 大久保信幸、伊藤真奈 (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.
- 3) Fänge R., Grove D. (1979) Digestion. In Fish Physiology VIII Bioenergetics and Growth, Academic Press: New York, 161-278.
- 4) 榎田 晋 (1987) マダイ、「魚類解剖図鑑」、緑書房、東京、175-176.
- 5) Isobe A., Uchiyama-Matsumoto K., Uchida K., Tokai T. Microplastics in the Southern Ocean. Mar. Pollut. Bull., 114, 623–626, 2017.

7. 成果の発表、活用等

・学会発表 1 件

令和 2 年度日本水産学会春季大会「マイクロプラスチックの形状やサイズが海産魚の摂取量および体内滞留時間に与える影響の検討」(予定)

・シンポジウム 1 件

令和元年度漁場環境保全関係研究開発推進会議有害物質部会「プラスチックによる海洋汚染と海洋生物への影響に関する研究の現状」

8. 事業推進上の問題点等

特になし。

9. 今後の課題

本研究では水中 MP 濃度（例えば 250–300 μ m ビーズ 0.15mg/L は約 10,000 個/m³）を実海域で報告されている最高濃度（3.7 個/m³）⁵⁾と比べて極めて高い濃度に設定している。これは、水槽内で試験魚への MP の取り込み、排泄という一連の現象を確実に捕捉することを主な目的として行ったためである。

カタクチイワシ成魚を用いた排泄試験において、消化管内 MP 数は試験開始 0–6 時間目にかけて大きく減少した後、ゆるやかに減少した。今回は 0–20 時間目までの消化管内 MP データを一括して排泄時間を試算したが、このような場合、2つのフェーズでそれぞれ直線を回帰する方が当てはまりが良い可能性がある。なお、カタクチイワシでは排泄試験中に餌を与えていないこと等、実験条件が若干異なるため、留意が必要である。

マミチョグ稚魚を用いた粉砕 MP の排泄試験の結果、250–300 μ m PE ビーズの排泄時間より若干、長くなった。この結果が MP の形状による影響か、サイズによる影響かについて、今後さらに検討する必要がある。

また、マミチョグ仔魚を用いた MP 曝露試験では、今後、より小型の PE ビーズを曝露する等の検討が必要である。

平成 31 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吸着した有害化学物質の魚類消化管内での溶出量の推定
機 関 名 担当者名	水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 伊藤 真奈・羽野 健志（環境保全研究センター 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（平成 31 年度）

2. 1 マダイ消化管内容物を用いた PAHs 溶出速度の算出

魚類消化管内における MP に吸着した有害化学物質（多環芳香族炭化水素; PAHs）の溶出量を推定するためのモデル構築に向け、本年度は平成 30 年度に確立した簡易溶出試験法を用い、マダイに取り込まれた MP からの PAHs 溶出速度を算出する。

2. 2 無胃魚（マミチヨグ）の消化管内容物を用いた溶出試験

MP からの溶出量が消化管の形態（魚種）によって異なるかを検証するため、無胃魚であるマミチヨグの消化管を3部位に分け、各消化管部位の内容物を用いた溶出試験を実施する。得られた溶出量を昨年度実施した有胃魚であるマダイの結果と比較することで、消化管の形態または魚種による差異を明らかにする。

3. 材料と方法

3. 1 供試生物

マダイ稚魚（全長（TL）約 3 cm、体重（BW）約 0.5 g）を（株）アーマリン近大から購入し、瀬戸内海区水産研究所で配合飼料（日清丸紅飼料おとひめ: EP0）を 1 日 2 回給餌し、約 20 °C で一定期間馴致した。マミチヨグは当研究所にて継代飼育されている個体群を用いた。

3. 2 試薬

PAHs 吸着 MP は、MP（素材：ポリエチレン、サイズ: 250 – 300 μm）を 16 種 PAHs（各 2 ppb）が溶解した海水に48時間浸漬し作成した。MP に吸着した PAHs 濃度は、H 30 年度同研究課題（細部課題 2）と同様の試験法にて抽出・測定した（図 1）。

3. 3 マダイ消化管内容物を用いた PAHs 溶出速度の算出のための溶出試験

マダイ（TL 245±8.57 mm、BW 283±20.4 g）を給餌5時間後に解剖し、消化管を摘出した。消化管は胃、幽門垂および前腸、後腸の3部位に分け、幽門垂および前腸の内容物のみ（以下、マダイ消化管内容物）を搾取し、液体窒素で凍結後、-80℃にて冷凍保存した。

凍結した消化管内容物をそれぞれ5倍量（重量比）の 0.25 M Sucrose 液中でポリトロンホモジナイザー（セントラル科学貿

易）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 MP とその 200 倍量（v/w）の反応液（緩衝液：消化管内容物懸濁液 = 9:

1、または緩衝液：消化管内容物懸濁液 = 10:0）を入れ、20℃、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 と水溶液を分取した。水溶液中に溶出した PAHs は内部標準を添加しヘキサンを用いて抽出後、ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS）にて分析した。

溶出速度定数（ k_2 ）は、OECD ガイドライン¹⁾の排出速度定数を参考し、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水溶液中に溶出した量から換算した。

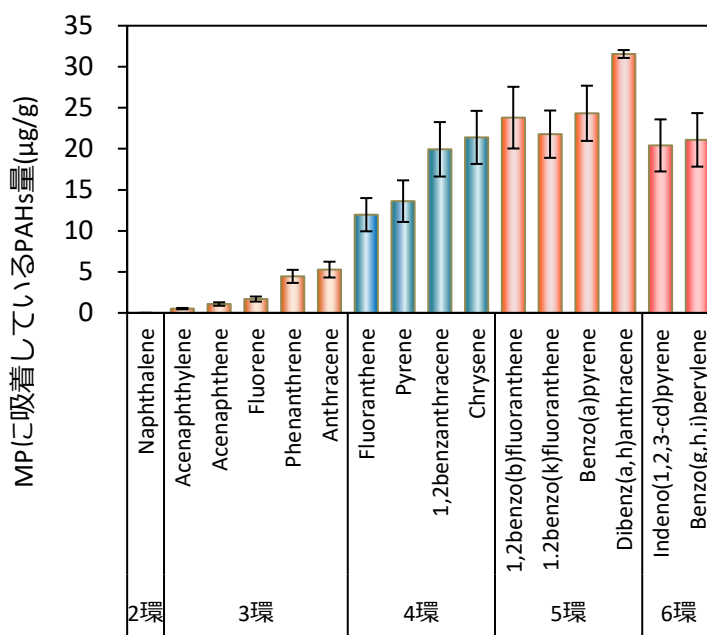


図 1. 試験で使用した MP に吸着していた PAHs 量

3. 4 マミチョグ消化管の部位別 pH 測定試験

マミチョグ（TL 111±5.99 mm、BW 25.0±4.03 g）を空腹時、給餌 15 分および 3 時間後に 3 尾ずつ解剖し、消化管を摘出した。消化管を前腸、中腸、後腸に分け、各消化管部位の内容物の pH を AQUAtwin（HORIBA）にて測定した。また、エサの pH は配合飼料を海水に一定時間浸漬し、測定した。

3. 5 マミチョグの消化管内容物を用いた溶出試験

マミチョグ（TL 126±5.08 mm、BW 34.8±4.00 g）は解剖の 1 および 5 時間前に給餌した。摘出した消化管を前腸、中腸、後腸に分け、各消化管部位の内容物を搾取した。内容物懸濁液は、3.3 と同様の方法にて、6 個体分の各消化管部位内容物を合わせ、部位それぞれの内容物懸濁液を作製した（5 反復）。反応に用いる緩衝液は、食後の各消化管部位の pH

に合わせ、前腸、中腸、後腸それぞれ pH 6.0、7.0、7.5 の 0.1M Phosphate buffer (PB) を用いた。

溶出試験は 3.3 と同様の方法にて反応液を調整し、緩衝液のみ、あるいは消化管内容物懸濁液を加えた系に PAHs を吸着させた MP を加え、一定時間後の PAHs 溶出量を測定した。また、ブランクとして消化管内容物懸濁液および PAHs を吸着させていない MP を加えた系を設け、PAHs 量を測定した。反応は 20 °C、暗条件下で 24 時間振盪した。24 時間後、反応液をガラス繊維ろ紙で濾過し、MP と水溶液を分取した。水溶液中に溶出した PAHs は内部標準を添加しヘキサンをを用いて抽出後、GC-MS にて分析した。なお、内容物懸濁液添加による PAHs の溶出量は、消化管内容物懸濁液を加えた系にて溶出した量から緩衝液のみで溶出した量を差し引いた値とした。

4. 結果および考察

4. 1 マダイ消化管内容物を用いた PAHs 溶出速度の算出

マダイ消化管内容物の懸濁液の中に PAHs を吸着させた MP を入れインキュベートし、一定時間ごとの溶出量を測定した。その結果、反応開始後 3 時間以内に 24 時間で溶出する PAHs 量の約 90 % 以上が溶出しており、反応 24 時間では MP からの溶出量はほぼ定常状態であることが明らかとなった。

本試験系における溶出反応は大きく 0-3 時間と 3-24 時間の 2 反応に分けられると推察され、各 PAHs の溶出速度定数 (k_2) をそれぞれの時間で算出した結果、16 種 PAHs の平均 k_2 は、0-3 時間で 0.57、3-

24 時間では 0.016 であった。溶出速度が高い 0-3 時間の k_2 は、PAHs の種類によって異なり、3 環で高く ($k_2=0.75$)、5-6 環で小さい ($k_2=0.42$) 傾向が認められた (表 1)。また、PAHs の物性 (水溶解度や親油性の指標であるオクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$) との関係性を調べたところ、 $\log K_{ow}$ が大きくなるにつれて k_2 が小さくなる傾向が認められた (表

表 1. 16 種 PAHs の $\log K_{ow}$ と溶出速度定数

$\log K_{ow}$			k_2	
			0-3hr	3-24hr
2環	Naphthalene	3.4	-	-
3環	Acenaphthylene	4.1	0.53 ± 0.12	0.013 ± 0.030
	Acenaphthene	3.9	0.59 ± 0.14	0.023 ± 0.029
	Fluorene	4.2	0.85 ± 0.19	0.024 ± 0.031
	Phenanthrene	4.5	0.83 ± 0.18	0.028 ± 0.028
	Anthracene	4.6	0.94 ± 0.27	0.016 ± 0.027
4環	Fluoranthene	5.2	0.71 ± 0.17	0.031 ± 0.027
	Pyrene	5.2	0.62 ± 0.15	0.029 ± 0.026
	1,2benzanthracene	5.6	0.57 ± 0.17	0.014 ± 0.020
	Chrysene	5.9	0.41 ± 0.12	0.011 ± 0.016
5環	1,2benzo(b)fluoranthene	6.1	0.47 ± 0.12	0.012 ± 0.021
	1,2benzo(k)fluoranthene	6.8	0.40 ± 0.13	0.0052 ± 0.014
	Benzo(a)pyrene	6.5	0.29 ± 0.08	0.0050 ± 0.010
	Dibenz(a,h)anthracene	6.5	0.37 ± 0.11	0.0043 ± 0.018
6環	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	6.6	0.38 ± 0.10	0.010 ± 0.022
	Benzo(g,h,i)perylene	7.1	0.66 ± 0.13	0.018 ± 0.029

1)。以上のことから、 $\log K_{ow}$ が大きく、水溶解度が小さい化学物質ほど MP に吸着されやすく²⁾、消化管内での溶出割合が小さくなるものと推察された。また、消化管内での PAHs の溶出速度と $\log K_{ow}$ に関係性が認められたことから、PAHs 以外の有害化学物質においても $\log K_{ow}$ を一つの指標とすることで MP からの溶出をある程度推定できることが示唆された。

4. 2 マミチョグの消化管内の部位別 pH

マミチョグの消化管内環境に類似した条件下で溶出試験を実施するため、消化管内のpHを測定した結果、空腹時には 3 つの消化管部位間に差は認められず pH 8.0 付近であったのに対し、給餌後 15 分では部位間に差が認められ、前腸および中腸で pH が低下した（表 2）。その後、給餌後 3 および 6 時間ではいずれの消化管部位においても再び pH 8.0 付近まで上昇した。

食後の消化管内で生じた pH の低下は、エサの pH に起因するものと推察されたもの

の、この現象も消化管環境の一部であるとみなし、これら各消化管部位における pH を考慮し、食後の pH 条件下で溶出試験を実施した。

表 2. 摂餌に伴う各消化管部位の pH

	空腹時	食後15分	食後3時間	食後6時間
前腸	8.3 ± 0.24	6.1 ± 0.09	7.8 ± 0.43	8.3 ± 0.090
中腸	7.7 ± 0.45	6.8 ± 0.061	8.2 ± 0.11	8.3 ± 0.24
後腸	7.5 ± 0.50	7.5 ± 0.13	8.2 ± 0.12	8.1 ± 0.12
エサ		5.3 ± 0.010	5.3 ± 0.029	5.4 ± 0.012

4. 3 マミチョグの消化管内容物を用いた溶出試験

MP に吸着した PAHs が各 pH の緩衝液へ溶出するかを検討した結果、いずれの pH 条件下でも、3-4 環の PAHs がわずかに溶出し、疎水性が高い 5-6 環の PAHs ではほとんど溶出が確認されなかった。MP に吸着した PAHs 量に対する溶出量の割合（環別）は、16 種 PAHs を平均して 2 % であった（図 2）。

マミチョグの前腸、中腸および後腸の各内容物懸濁液の中に PAHs を吸着させた MP を添加し、24 時間後の PAHs の溶出の程度を検討した結果、いずれの消化管部位においても PAHs の溶出が確認された。溶出量は消化管部位によって異なり、前腸 > 中腸 > 後腸の順に高く、前腸では後腸に比較して約 3 倍の PAHs が溶出した（図 3A）。また、その溶出量は、16 種 PAHs のうち特に 4 環以降の PAHs（Fluoranthene ～）が多かった（図 3B）。この結果は MP に吸着している PAHs 量を反映しているためと考えられた（図 1）。また、MP に吸着した PAHs 量に対して溶出した PAHs 量の割合を算出したところ、16 種 PAHs を平均して前腸で 9.3 %、中腸で 5.1 %、後腸で 3.6 % が溶出していることが明らかとなった。

無胃魚であるマミチョグは、食道直下の前腸で最も多くの PAHs が溶出したのに対し、昨年度実施した有胃魚であるマダイでは、胃、幽門垂＋前腸、後腸のうち特に幽門垂＋前腸で

の溶出量が高かった²⁾。以上のことから、消化管の形態（魚種）によって PAHs の溶出へ寄与する消化管部位が異なることが明らかとなった。また、マダイでの溶出割合（MP に吸着した PAHs 量に対して溶出した PAHs 量の割合）は、胃、幽門垂+前腸、後腸で、それぞれ 1、6、2 %であり³⁾、マダイに比べマミチヨグのほうがより多くの PAHs を溶出させることが示された。しかしながら、マミチヨグの消化管内における MP の滞留時間がマダイに比べて短いこと⁴⁾、吸着した PAHs の 80 % 以上は MP に残存していること、また、昨年度と同様、本試験で用いた MP は国内沿岸域の海水で検出されている PAHs 最高濃度（約 0.04 ppb）⁵⁾ に比べ、約 800 倍高い濃度の条件下で浸漬・吸着させた MP を使用していることから考察すると、MP を介した PAHs の溶出による魚体への曝露量は低いレベルにあると推察された。

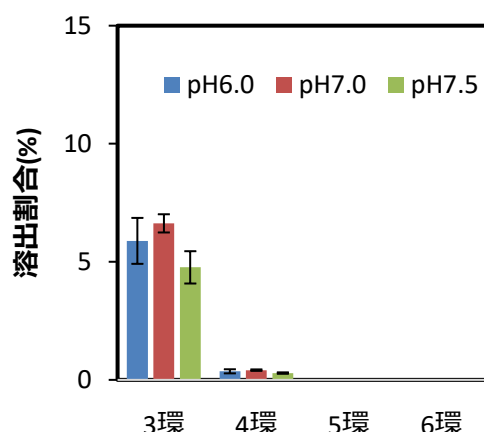


図 2. MP に吸着した PAHs 量(環別)に対して各 pH 緩衝液中へ溶出した PAHs 量の割合

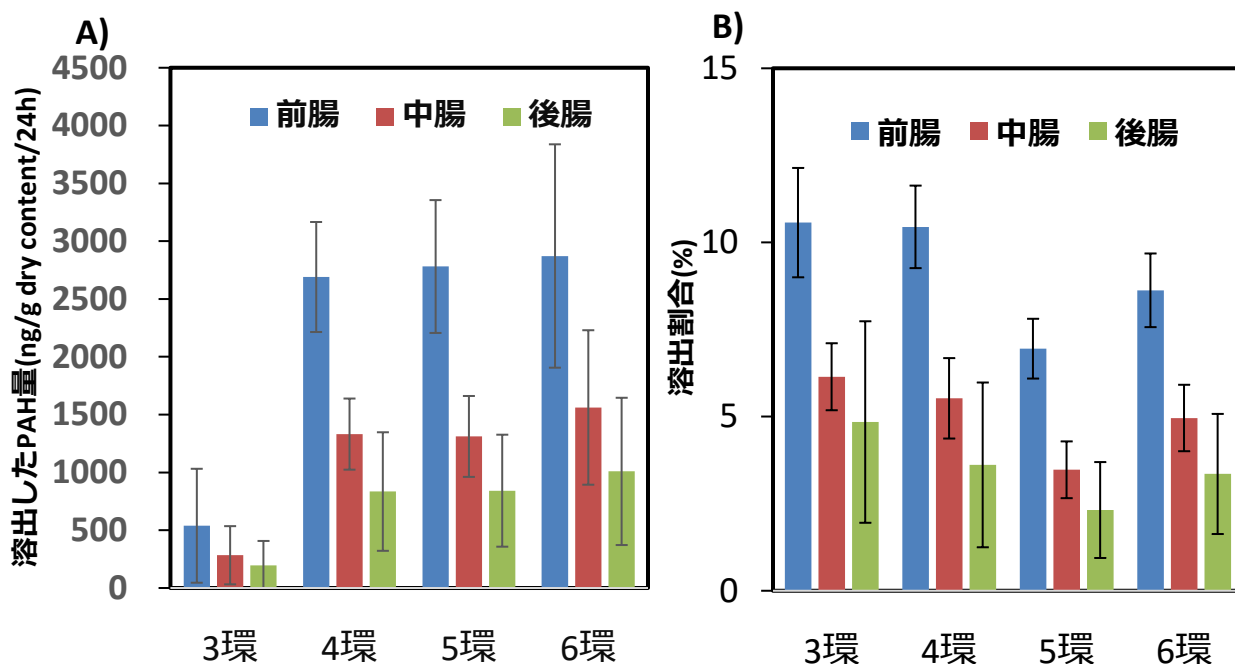


図 3. 消化管内容物 1 g あたりの溶出 PAHs 量 A)、および MP に吸着した PAHs 量に対して溶出した PAHs 量の割合 B)。

5. 要約

マダイの消化管内容物の懸濁液を用い、MP からの PAHs の溶出試験を実施した結果、本試験系において 24 時間で溶出する PAHs 量の約 90 %が、反応 3 時間以内に溶出するこ

とが明らかとなった。また、その溶出速度は PAHs の種類（物性）によって異なり、 $\log K_{ow}$ が大きくなるにつれて小さくなる傾向が認められた。

マミチョグの消化管内容物の懸濁液を用いた溶出試験を実施した結果、マミチョグの消化管内において MP に吸着した PAHs が溶出することが示された。また、その溶出量は消化管の部位によって異なり、食道直下の前腸でより多くの PAHs 溶出が確認された。しかしながら、その溶出量は MP に吸着している PAHs の 20 %未満と推定されたことから、今後更なる検証を要する点はあるものの、MP を介した PAHs の魚体への曝露は低いレベルにあると推察された。

6. 参考文献

- 1) OECD (2000). Test Guideline 305. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS.
- 2) 河野久美子 (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 pp13-22
- 3) 伊藤真奈、羽野健志 (2019) マイクロプラスチックに吸着した有害化学物質の簡易溶出試験の確立. 「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 pp23-27
- 4) 大久保信幸、伊藤真奈 (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 pp4-12
- 5) 田中博之、河野久美子 (2015) 希少種の生息する生態系に及ぼす有害化学物質の影響評価. 「生物多様性に配慮した漁業推進事業 (平成 27 年度)」、水産庁、28-35.

7. 成果の発表、活用等

学会発表 1 件

伊藤真奈、羽野健志、河野久美子、大久保信幸、マイクロプラスチックに吸着した有害物質の魚類消化管内での溶出評価. 令和 2 年度日本水産学会春季大会

8. 事業推進上の問題点等

特になし。

9. 今後の課題

本年度明らかとなった MP からの PAHs の溶出速度、魚体内での MP の滞留時間（細部課題1の成果）、文献等の情報等を組み込み、実態に即した魚体内での MP からの PAHs 溶出量を推定するモデル構築が必要である。また、消化管内で溶出した PAHs がその後どのような経路を辿るのか、魚体内への取り込み量等を推定するまたは実証確認する必要がある。