

22

助成番号 0122

エコシステムを利用した瀬戸内海沿岸の海洋環境汚染物質の除去・回収法の開発～環境ホルモン関連物質を中心として～

助成研究者:石原 浩二(京都教育大学教育学部理学科)

共同研究者:中島 伸佳(岡山県立大学保健福祉学部)

:内村 祐之(愛媛県水産試験場)

:浜田 博喜(岡山理科大学理学部)

我々はこれまでに、多様な化学物質や環境毒性物質に対する、各種微生物や微細藻類の、細胞、あるいは、酵素レベルでの酸化還元反応における変換効率や立体選択性を「指標」とした物質変換能力に関する研究を重ねてきた。本研究は、我々の長年に渡る研究データを応用して、特に、海洋性微細藻類の外来物質の変換、細胞内への蓄積といった能力を巧みに利用することにより、海洋という広範囲に希釈された環境汚染関連物質の効率的な回収を可能にし、海洋環境汚染防止に貢献しえる「環境浄化への新たな道」を切り開くことを目的として検討を行った。

研究に用いた植物プランクトンは、瀬戸内海沿岸海域から単離された株(*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri*)、動物プランクトンとしてはアルテミア(*Artemia* sp.)とシオミズツボワムシ(*Brachinous* sp.)を使用した。環境汚染物質(内分泌攪乱関連物質)は、フタル酸ジエチルヘキシル(DOP)、ビスフェノールA(BPA)の2種類を使用した。海洋性微細藻類の培養は人工海水中、蛍光灯による照射下(1000 lx)、2週間、20°Cで通気(2L/分)培養を行った。培養液(微細藻類懸濁液)50 mlに、環境ホルモン物質 1.2 μmol (アセトン溶液)を加え、蛍光灯照射下(1000 lx)、20°C、好氣的条件にて6日間インキュベートし、ガスクロマトグラフにて分析し基質の回収率を求めた。

DOP については時間経過とともに、微細藻類による分解が観測された。BPA については、*Nannochloropsis* を用いた場合、時間経過とともに細胞内へ取り込まれることがわかった。そこで、アルテミア及びワムシと *Nannochloropsis* を組み合わせて利用し、海水中の BPA が植物プランクトンを介して動物プランクトンに移行・蓄積するかどうかを調べた。プランクトンネットを利用して、動物プランクトンを取り出し、その細胞内に BPA の存在を調査した結果、アルテミアやワムシを用いた両者の場合において、BPA が動物プランクトンの細胞内に蓄積されていることがわかった。

22

助成番号 0122

エコシステムを利用した瀬戸内海沿岸の海洋環境汚染物質の 除去・回収法の開発 ～環境ホルモン関連物質を中心として～

助成研究者：石原 浩二（京都教育大学教育学部理学科）
共同研究者：中島 伸佳（岡山県立大学保健福祉学部栄養学科）
 ：内村 祐之（愛媛県水産試験場）
 ：浜田 博喜（岡山理科大学理学部基礎理学科）

1. 研究目的

我々人類は、これまでに様々な活動において多種多様な化学物質を作り出し、それらによって生活を豊かにしてきた。しかしながら、人類は豊かさを追い求めるあまり、自然環境への影響を軽視し、様々な環境汚染物質をも生み出し、その結果、地球環境を破壊してきた。特に最近、環境ホルモンと称されている外因性内分泌攪乱化学物質が、我々の環境を汚染し、人類だけでなく数多くの野生生物の活動に多大な影響を及ぼし、深刻な社会問題となっている。ダイオキシンやアルキルフェノールなどの環境ホルモン物質は、地上で発生したり使用されたりしているが、これらの化合物は大気や水の流れを通じて、最終的には海洋に流れ込むことになる。従って、海洋における拡散や移動が環境ホルモンの残留に大きな影響を及ぼすことは容易に推察できる。しかしながら、このような環境ホルモン関連物質の分解や除去に関する研究のほとんどが内陸地で行われており、海洋に流れ込んだ汚染物質をターゲットとした研究はほとんど行われていない。

我々はこれまでに、微生物を“生体触媒”として用いた物質変換反応とその応

用について研究を重ね、酵母やカビ、および耐熱性細菌などの微生物に優れた物質変換能力が存在することを明らかにしてきた¹⁻¹²⁾。また、環境汚染物質の一つとして考えられている外因性内分泌攪乱物質の無毒な化合物への変換反応についても研究を展開している。しかし、我々が扱ってきた微生物は陸生であり、海中など食塩が含まれている海水域の環境改善には利用できないのが現状である。そこで、我々は新規な生体触媒として海洋性微細藻類に着目し、それらの物質変換能力の有無について調査を行った結果、海洋性微細藻類にも各種の化合物に対する変換能力が存在すること、および外来物質を細胞内へ蓄積することを見出した¹³⁾。

本研究では、海洋性微細藻類の細胞内に蓄積された環境汚染物質を、食物連鎖で上位者である動物性プランクトンへ捕食させながら、生物濃縮を利用することで効率的に環境汚染物質を回収することで、沿岸海域の海洋環境汚染防止に貢献しえる「環境浄化への新たな道」を切り開くことを主目的として検討を行った。

研究に用いた微細藻類などの海洋生物は、瀬戸内海沿岸海域から単離されたものを使用し、環境汚染物質（内分泌攪乱関連物質）としては、フタル酸エステル類、および、アルキルフェノール類を研究対象とした。

2. 実験方法

1. 実験に使用した海洋性微細藻類と基質

海洋性植物プランクトンとして、*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri* の4種類を以下の実験に使用した。これらの微細藻類は愛媛県水産試験場のタイプカルチャーである。海洋性動物プランクトンとして、アルテミア (*Artemia* sp.) とシオミズツボワムシ (*Brachionus* sp.) の2種類を使用した。環境ホルモン物質としては、フタル酸ジエチルヘキシル (DOP) , および、ビスフェノールA (BPA) を用いることにした。

2. 海洋性微細藻類の培養条件

2-1. 植物プランクトンの培養

植物プランクトン類は、蛍光灯による照射下 (1000 lx) , 2 週間, 20 °C で通気 (2 L / 分) 集積培養を行った。培地組成は以下通りである。蒸留水 1L に, 塩化ナトリウム (NaCl) 20.747 g, 塩化マンガン四水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.8 mg, 塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 9.474 g, 塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1.326 g, 硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) 3.505 g, 塩化カリウム (KCl) 597 mg, 炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 171 mg, 臭化カリウム (KBr) 85 mg, 硼酸ナトリウム十水和物 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 34 mg, 塩化ストロンチウム (SrCl_2) 12 mg, 弗化ナトリウム (NaF) 3 mg, 塩化リチウム (LiCl) 1 mg, ヨウ化カリウム (KI) 0.07 mg, 塩化コバルト六水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.2 mg, 三塩化アルミニウム六水和物 ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 8 mg, 三塩化鉄六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5 mg, タングステン酸ナトリウム二水和物 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.2 mg, モリブデン酸アンモニウム ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) 0.02 mg, NM 溶液 1.0 ml を加えたものを培地とした。NM 溶液とは, 蒸留水 1L に, 硝酸ナトリウム (NaNO_3) 150 g, リン酸水素ナトリウム (Na_2HPO_4) 10 g, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA-2Na) 0.9 g, ビタミン B₁₂ 1.5 mg, チアミン塩酸塩 75 mg, ビオチン 1 mg, エチレンジアミン四酢酸鉄 (EDTA-2Fe) 2.5 g, トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 5 g を加えたものである。 *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp.については培地中に 0.0045%のケイ酸ナトリウムを加えて培養した。

2-2. 動物プランクトンの培養

アルテミアおよびシオミズツボムシの培養は, 2-1で培養した海洋性クロレラ (*Nannochloropsis* sp.) を餌として培養し, プランクトンネットで回収,

新鮮な海水で洗浄後、実験に用いた。

3. 海洋性微細藻類による環境ホルモン物質の蓄積実験

2. で培養した培養液(微細藻類懸濁液) 50 ml に、環境ホルモン物質 1.2 μmol (アセトン溶液) を加え、蛍光灯光照射下 (1000 lx) , 20 °C, 好氣的条件にて6日間インキュベートした。反応終了後、ガラスフィルターでろ過し、培養液と微細藻類とを分離した。微細藻類については、新鮮な培地で3回洗浄し、その洗浄液はろ過培養液(使用済み培養液)と一緒にした。ろ過培養液については、ジエチルエーテルで3回抽出後、無水硫酸ナトリウムで有機層を乾燥させ、減圧下で溶媒を留去後、ガスクロマトグラフ分析により基質の回収率を求めた (Frac-B) 。ろ過後の微細藻類についてもジエチルエーテルで洗浄、抽出し、同様の操作を行い、ガスクロマトグラフ分析により基質の回収率を求めた (Frac-A) 。基質の回収率は、GC分析における標準物質との比較により、検量線を用いて算出した。なお、上の実験とは別に、ブランク実験(微細藻類を使用しない実験)を行い、実験操作上での基質の損失を考慮することにした。実験のフローチャートを Fig. 1 に示した。

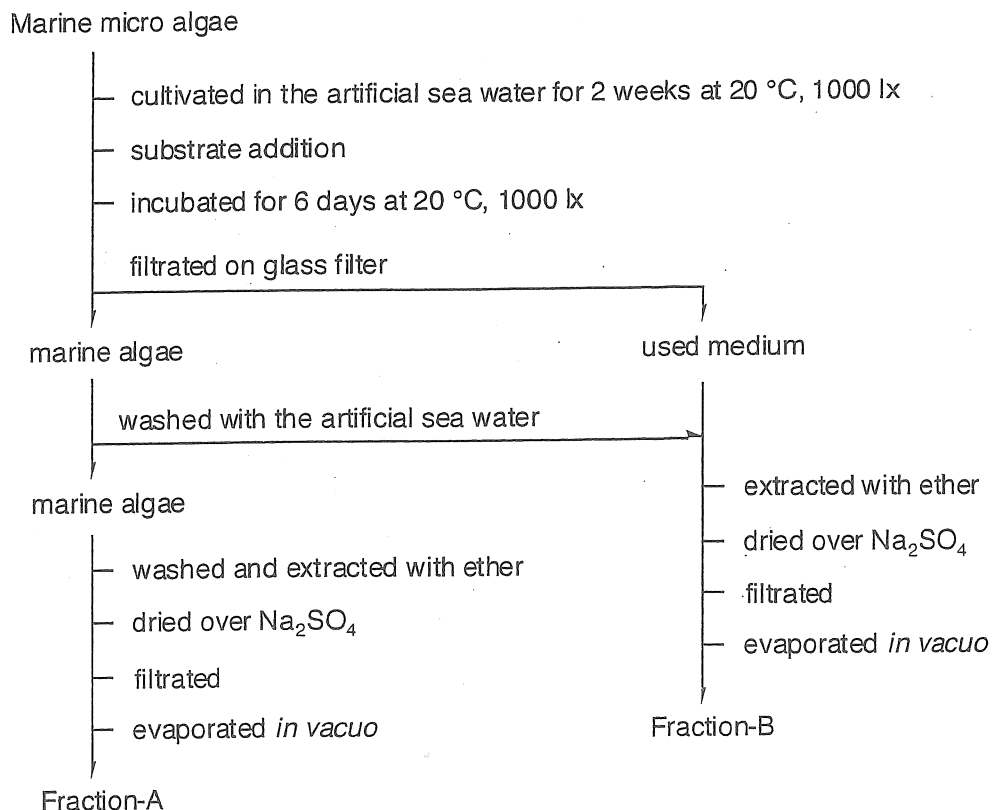


Fig. 1. Flow chart of the experiment.

4. エコシステムを利用する海水からの環境ホルモン物質の回収実験

エコシステムを利用する海洋汚染物質の回収・除去のための実験モデルとして次のような方法を考案した。Step 1) 海水中の汚染物質が植物プランクトン中に取り込まれる。Step 2) 次に汚染物質を取り込んだ植物プランクトンを動物プランクトンに捕食させる。Step 3) 最後に、汚染物質を蓄積した動物プランクトンを採取する。この生物濃縮を利用した汚染物質回収法を確立するために、1L ビーカー内に、底部にナイロンメッシュを貼ったアクリル製の筒を取り付けた装置を作成した (Fig. 2)。

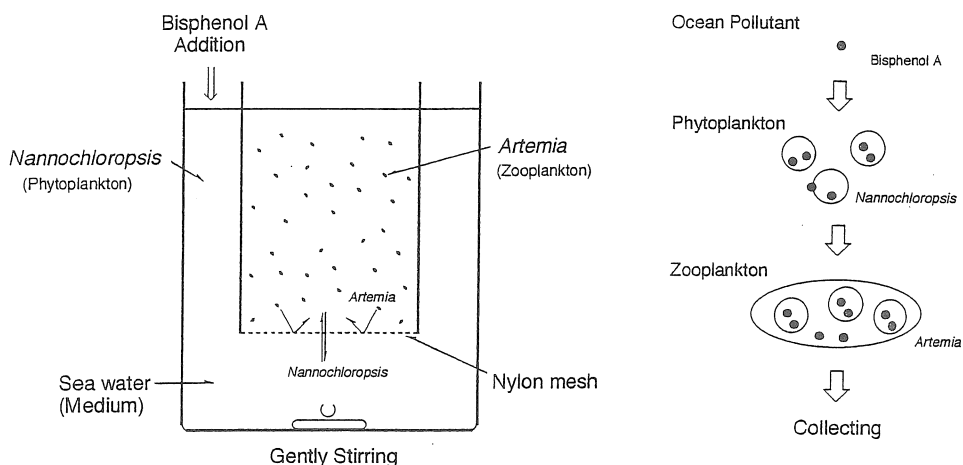


Fig. 2. Ocean Pollutant Collecting Model using "Eco-system"

ビーカーには上述の2で培養した *Nannochloropsis* を入れ、アクリル筒には卵からふ化させ、海洋性クロレラを餌として生育したアルテミアを約 100 匹入れた。ナイロンネットのメッシュについては *Nannochloropsis* は自由に移動できるが、アルテミアやワムシは出ることにはできない大きさとした。最後に環境ホルモン関連物質としてビスフェノールAを 5 μmol 添加し、蛍光灯照射下、5日間静かに攪拌し、2と同様に残存環境ホルモン物質の量をGC分析により定量した。

3. 研究結果および考察

1. 培養条件の検討

人工海水に微量元素を溶かした培地中、通気・蛍光灯照射下での集積培養を行った結果、1~2週間で生育は最大(濁度が最大)に達した。愛媛県沖(宇

和島湾)の海水, および岡山県牛窓沖の海水をろ過滅菌後, 原海水として利用しても同様に培養が可能であった。これらの結果から, 培地を使い分けることにより, 研究室でのスモールスケール培養から実用的スケールでの大量培養まで, 効率的な培養が可能であることがわかった。

Chaetoceros の培養については, 人工海水利用時に, ケイ酸ナトリウムを添加しない条件下では, 生育速度が遅くなり, 良好な生育は見られなかった。

スクリーニングした4種類の海洋性微細藻類の中で, *Chaetoceros gracillis* と *Nannochloropsis* sp.の生育速度が速く, 2週間で集積培養が可能であったので, 以下の実験には, *Chaetoceros gracillis* と *Nannochloropsis* sp.の2種類の海洋性微細藻類を用いることにした。

2. 海洋性微細藻類による環境ホルモン物質の分解・回収

○フタル酸ジエチルヘキシル (DOP)

Chaetoceros gracillis と *Nannochloropsis* sp.の培養液に DOP を添加し, 培養液中の DOP の残量と微細藻類細胞内(細胞への付着も含む)の DOP 量をガスクロマトグラフ分析により経時的に調べた。その結果を Table 1 に示した。

Table 1. The reaction of DOP with marine micro algae.

Marine Algae	0 day		2 days		6 days	
	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B
<i>Nannochloropsis</i> sp.	11.8	68.3	19.3	43.8	23.1	23.2
<i>Chaetoceros gracilis</i>	24.9	57.4	22.7	32.6	20.9	13.7

Nannochloropsis, *Chaetoceros* とともに、時間の経過につれ、培地中の DOP 残量 (Frac-B) が減少していることがわかった。その一方で、Frac-A 中の DOP 量は大きく変化していなかった。この結果は、添加基質である DOP が微細藻類の細胞内へ取り込まれて分解しているためではないかと考えられる。DOP の総回収量を考慮すると、時間経過に伴う減少傾向が認められることから、微細藻類の細胞内へ取り込まれ、分解されていることが予想される。微細藻類細胞内のプロテアーゼなどの酵素により、DOP のエステル結合が切断されているのではないかと推定される。実際に、Frac-B から微量ではあるが、フタル酸が検出された。

○ビスフェノールA (BPA)

Chaetoceros gracillis と *Nannochloropsis* sp. の培養液に BPA を添加し、培養液中の BPA の残量と微細藻類の細胞内 (細胞への付着も含む) BPA 量をガスクロマトグラフ分析により経時的に調べた。その結果を Table 2 に示した。

Table 2. The reaction of BPA with marine micro algae.

Marine Algae	0 day		3 days		6 days	
	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B	Frac.-A	Frac.-B
<i>Nannochloropsis</i> sp.	14.2	68.3	49.3	23.8	53.1	13.2
<i>Chaetoceros gracillis</i>	15.3	57.4	22.7	42.6	24.7	33.7

Nannochloropsis, *Chaetoceros* とともに、時間の経過につれ、培地中の BPA 残量 (Frac-B) が減少していることがわかった。*Chaetoceros* については Frac-A

の BPA 量も全体の回収量も大きく変化しないことから考えて、DOP とは異なり、分解されにくい基質であると考えられる。その一方で、*Nannochloropsis* については、Frac-A 中の BPA 量が時間の経過と共に増加していることがわかった。これは、BPA が細胞内へ取り込まれ、蓄積されていることためではないかと考えられる。よって、以下のエコシステムを利用する環境ホルモンの回収実験には、基質として BPA、植物プランクトンとして *Nannochloropsis* sp.を用いることにした。

3. エコシステムを利用する海水からの環境ホルモン物質の回収

図2のような装置を用いて、分解されにくい基質である BPA が動物プランクトン細胞内に蓄積するかどうかを調査した。その結果を Table 3 に示した。

Table 3. The reaction of BPA with phyto and zooplankton "Eco-system".

plankton	rec.(%)		
	zooplankton	phytoplankton	medium
<i>Artemia</i> sp. <i>Nannochloropsis</i> sp.	40.5	9.1	8.6
<i>Brachionus</i> sp. <i>Nannochloropsis</i> sp.	43.9	9.5	9.7
<i>Nannochloropsis</i> sp.	---	46.3	11.2
<i>Artemia</i> sp.	5.3	---	82.6
<i>Brachionus</i> sp.	6.1	---	79.8

反応5日後の、動物プランクトン、植物プランクトン、および海水に含まれる BPA 量をGC分析で求めた。その結果、アルテミア、ワムシともに、海水へ添加した BPA が動物プランクトン内に取り込まれていることがわかった。コントロール実験としてアルテミア及びワムシ単独を用いた場合では、添加した基質のほとんどが海水中へ残っていたこと、しかも、*Nannochloropsis* の細胞内へは BPA が取り込まれていることを考えると、海水中の BPA が、植物プランクトンを介して、動物プランクトンへ移動していることがわかった。

4. 結 論

内分泌攪乱作用があると考えられているフタル酸ジエチルヘキシル (DOP) , ビスフェノールA (BPA) 2種類の基質について、海洋性微細藻類の物質変換能力により分解されるかどうかについて調査した。その結果、DOP については、海水中に添加した場合、その量が明らかに減少することがわかった。また少量ながら細胞中にも取り込まれていることがわかった。しかし、全体の回収量を考慮すると、細胞内への蓄積よりも、分解の方が主として起こっていると考えられる。

その一方で、BPA のように分解されにくい基質は、細胞内へ蓄積される傾向があることがわかった。特に海洋性クロレラ (*Nannochloropsis* sp.) は BPA を蓄積する能力が高いことがわかった。

そこで、海洋性クロレラに蓄積された BPA を動物プランクトンに補食させ、回収可能かどうかについて調査した結果、期待通りに動物プランクトンより、海水に添加した BPA が回収されることが確認された。

本実験のように、一旦、海洋性微細藻類に蓄積させ、その後、より高等な動物プランクトン (ワムシ、アルテミアなど) に捕食させることにより、最終的にはその動物プランクトンを回収することで、生物濃縮を繰り返しながら、海洋中に

広範囲に希釈された汚染物質を効率的に回収できる可能性が期待できる。

今後は、「エコシステム（生物濃縮）」を用いた植物プランクトンと動物プランクトンの組み合わせについてより詳細な研究を行い、「生物濃縮型」の環境汚染物質回収法についての実用化に関する研究を進めていく予定である。さらに、実際に沿岸海洋域に溶け込んでいる微量な環境ホルモン関連物質に対する、モデルタイプの「海水循環型のバイオリアクター」を設計し、海洋汚染物質の回収・除去に関する実地的な検討も試みたいと考えている。

5. 参考文献

- 1) N. Nakajima, K. Nakamura, A. Matsuyama, N. Esaki, and K. Soda,
Purification and Characterization of Aldehyde Reductase from *Leuconostoc dextranicum*,
Biosci. Biotech. Biochem., **57**(1), 160-161 (1993).
- 2) N. Nakajima, K. Ishihara, S. Kondo, S. Tsuboi, M. Utaka, and K. Nakamura,
Differences in Protein Structure and Similarities in Catalytic Function of Two L-Stereoselective
Carbonyl Reductases from Bakers' Yeast, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(11), 2080-2081
(1994).
- 3) K. Ishihara, N. Nakajima, S. Tsuboi, and M. Utaka,
Asymmetric Reduction of 1-Acetoxy-2-alkanones with Bakers' Yeast: Purification and
Characterization of α -Acetoxy Ketone Reductase, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**(12), 3314-3319
(1994).
- 4) K. Ishihara, Y. Higashi, N. Nakajima, M. Utaka, and K. Nakamura,
Enzymatic Production of (*S*)-1-Acetoxy-2-alkanol with Bakers' Yeast Cell-Free Extract in a
Membrane Reactor, *J. Ferment. Bioeng.*, **81**(3), 266-268 (1996).
- 5) K. Ishihara, S. Kondo, K. Nakamura, and N. Nakajima,
Protein Sequences of Two Keto Esters Reductases: Possible Identity as Hypothetical
Proteins, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(9), 1538-1539 (1996).
- 6) K. Ishihara, K. Iwai, H. Yamaguchi, N. Nakajima, and K. Nakamura,
Stereoselective Reduction of α - and β -Keto Esters with Aerobic Thermophiles,
Bacillus Strains, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(11), 1896-1898 (1996).
- 7) K. Ishihara, M. Nishitani, H. Yamaguchi, N. Nakajima, T. Ohshima, and K.
Nakamura,

Preparation of Optically Active α -Hydroxy Esters: Asymmetric Reduction of α -Keto Esters with Thermophilic Actinomycetes, *J. Ferment. Bioeng.*, **84**(3), 268-270 (1997).

- 8) K. Ishihara, H. Yamaguchi, H. Hamada, K. Nakamura, and N. Nakajima,
Asymmetric Redcution of α -Keto Esters with Thermophilic Actinomycete:
Purification and Characterization of α -Keto Ester Reductase from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, **10**(4), 419-428 (2000).
- 9) K. Ishihara, H. Yamaguchi, H. Hamada, N. Nakajima, and K. Nakamura,
Stereocontrolled Reduction of α -Keto Esters with Thermophilic Actinomycete, *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, **10**(4), 429-434 (2000).
- 10) K. Ishihara, H. Yamaguchi, N. Adachi, H. Hamada, and N. Nakajima,
Stereocontrolled Reduction of α -Keto Esters with Micro Green Algae, *Chlorella* Strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**(10), 2099-2103 (2000)
- 11) K. Ishihara, N. Nakajima, H. Yamaguchi, H. Hamada, and Y. Uchimura,
Stereoselective Reduction of Keto Esters with Marine Micro Algae. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, **15**(1-3), 101-104 (2001).
- 12) H. Yamaguchi, N. Nakajima, and K. Ishihara,
Purification and Characterization of Two α -Keto Ester Reductases from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**(3), 588-597 (2002).

Recovery of Ocean Pollutants with Bio-concentration (Ecosystem)

Kohji Ishihara ^a, Nobuyoshi Nakajima ^b, Yu-ushi Uchimura ^c, and Hiroki Hamada ^d

^b *Department of Chemistry, Kyoto University of Education.*

^a *Department of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University.*

^c *Ehime Prefectural Fisheries Experimental Station.*

^d *Department of Applied Science, Okayama University of Science.*

To date, we have been investigated that the biotransformation of various compounds with microorganisms such as yeast, thermophilic bacteria, fungi, and micro algae. Recently, we reported the functional modification of naturally occurring endocrine disruption related substances via enzymatic glucosylation. In this study, the recovery of ocean pollutants, mainly synthetic endocrine disruption related substances, using marine plankton was investigated as an improvement method of the ocean environment by the bioremediation.

The phytoplankton (*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., and *Pavlova lutheri*) was photoautotrophically cultivated in an artificial seawater for 2 weeks at 20°C with constant aeration by air with illumination by white fluorescent light. The substrate (dioctyl phthalate or bisphenol A) was added in the growing algal suspension and incubated at 20°C with gently shaking under white fluorescent light. The reaction mixtures were filtered on glass-filter to remove the algal cells. The used medium and the filtered algal cells were extracted. The remaining amounts of substrates in the used medium and the algal cells were determined by GLC analysis.

The amount of dioctyl phthalate in the medium (seawater) was decreased by the algal cells. While, bisphenol A (BPA) was accumulated in the cells of *Nannochloropsis* sp. (marine *Chlorella*).

The recovery of BPA from the seawater via a bio-concentration (using both zooplankton and phytoplankton) was also investigated. As a result, it was found that BPA added in the seawater was transferred and accumulated in the zooplankton cells (*Artemia* or *Brachinous*) and accumulated via marine *Chlorella* cells.