

# 海底鉱物資源開発における 実用的環境影響評価技術に関する研究

(所内公募型提案研究)

Study on practical assessment technique for marine environment during seafloor mineral mining

令和元年度～令和3年度  
FY2019～2021

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<https://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第145号

NIES Research Project Report, No.145

SR - 145 - 2024

# 海底鉱物資源開発における 実用的環境影響評価技術に関する研究

(所内公募型提案研究)

Study on practical assessment technique for marine environment during seafloor mineral mining

令和元年度～令和3年度  
FY2019～2021

所内公募型提案研究「海底鉱物資源開発における実用的環境影響評価技術に関する研究」

(期間：令和元年度～令和3年度)

課題代表者：河地正伸

執筆者：河地正伸、大田修平、越川海、東博紀、淵田茂司、武内章記、山岸隆博

編者：河地正伸、越川海

## 序

本報告書は、令和元年度～令和3年度の3年間にわたって実施した所内公募型提案研究「海底鉱物資源開発における実用的環境影響評価技術に関する研究」の成果をとりまとめたものです。日本における金属鉱山の開発の歴史は古く、13世紀にはマルコポーロが黄金の国ジパングとして世界に紹介しています。しかし、今日の国内の陸上鉱山の多くは掘り尽くされ、金属資源の多くは輸入に依存しています。世界的に見ても金属資源は潤沢ではありません。金属種によって異なるものの陸上鉱山の可採年数が僅か20年という金属もあり、市場価格は不安定でしばしば資源国の輸出規制が行われています。我が国における金属資源の安定確保は喫緊の課題と言えるでしょう。こうした中、注目を集めているのがほぼ手つかずの海底鉱物資源であり、特に広大な排他的経済水域に様々な資源の存在が明らかになってきた日本をはじめとして、世界各国が資源探査や掘削技術の開発を急ピッチで進めています。その一方、海底資源開発に伴う海洋環境・生態系への影響に関する懸念も多く、環境保全との両立が科学的に説明されない限り、国際的に認められた海底資源開発を実現することは難しいでしょう。

国立環境研究所は、平成26年度～平成30年度に実施された内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代海洋資源調査技術-海のジパング計画」において、現地調査を通じて海底鉱物資源開発の潜在的環境影響の検討を進め、特に商業生産時の資源の洋上回収過程においては表層水質への影響リスク（鉱石からの重金属溶出と生態系影響）が高いことを明らかにしました。この成果を受け、SIP期間中に「洋上バイオアッセイ」という新たな表層水質監視技術の開発をスタートさせましたが、SIPの終了時点では、実用化には未だ距離が残されていました。令和元年度に開始された本所内公募型提案研究では、SIP課題で着想された洋上バイオアッセイについてリアルタイム性や簡便さなどの実用面での課題を新規派生技術等により解決するとともに、その標準化に向けた取り組みを進めました。SIP課題では未検討であった水銀やヒ素などの生物影響が強く懸念される元素の溶出特性の検討や流動モデルを用いた資源開発影響の範囲推定など、国立環境研究所ならではの多様な視点をもつ研究も盛り込まれています。令和5年度からは、海洋開発における環境影響評価手法の社会実装をめざした第3期SIP課題「海洋安全保障プラットフォームの構築」への参画も決まっており、本所内公募型提案研究の成果の反映が期待されています。

令和6年3月

国立研究開発法人 国立環境研究所  
理事長 木本昌秀

# 目 次

1	研究の概要.....	1
1.1	研究全体の目的、目標、構成等.....	1
1.1.1	研究全体の目的と目標.....	1
1.1.2	研究全体の構成.....	1
1.2	研究の概要.....	1
2	研究の成果.....	3
2.1	フローサイトメトリーを利用した重金属の植物プランクトンへの影響評価.....	3
2.1.1	背景と目的.....	3
2.1.2	方法.....	3
2.1.3	結果と考察.....	5
2.1.4	まとめ.....	8
2.2	L 乾燥による試薬化藻類を用いた遅延発光バイオアッセイ法の開発.....	10
2.2.1	目的と経緯.....	10
2.2.2	方法.....	10
2.2.3	結果と考察.....	12
2.2.4	まとめ.....	15
2.3	外洋性植物プランクトンへの重金属等の影響及び SSD 解析.....	17
2.3.1	背景と目的.....	17
2.3.2	方法.....	18
2.3.3	結果と考察.....	19
2.3.4	まとめ.....	22
2.4	リアルタイム水質監視システムの開発.....	23
2.4.1	背景と目的.....	23
2.4.2	方法.....	24
2.4.3	結果と考察.....	28
2.4.4	まとめ.....	31
2.5	鉱石からの水銀溶出動態と洋上水銀分析の検討.....	33
2.5.1	背景と目的.....	33
2.5.2	方法.....	33
2.5.3	結果と考察.....	34
2.5.4	まとめ.....	39
2.6	鉱石からの金属溶出動態 (Zn、Pb、As) の検討.....	41
2.6.1	背景と目的.....	41
2.6.2	方法.....	42
2.6.3	結果と考察.....	43
2.7	漏出事故を想定した揚鉱水の海洋拡散シミュレーション.....	48
2.7.1	背景と目的.....	48
2.7.2	方法.....	48
2.7.3	結果と考察.....	49
2.7.4	まとめ.....	53

[資料]

1 研究の組織と研究課題の構成 .....	56
1.1 研究の組織 .....	56
1.2 研究課題と担当者 .....	56
2 研究成果発表一覧 .....	57
2.1 誌上発表 .....	57
2.2 口頭発表 .....	58

# 1 研究の概要

## 1.1 研究全体の目的、目標、構成等

### 1.1.1 研究全体の目的と目標

開発と環境保全の調和が求められる中、海底鉱物資源開発の現場における水質管理手法の開発・整備が必要とされている。平成26年度～平成30年度に実施された内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代海洋資源調査技術 - 海のジパング計画」において、我々が開発した洋上バイオアッセイ技術は、リアルタイム性や簡便さ（キット化）といった実用面での課題、そして標準化に向けた作業が残されていた。また現場微生物群集への影響や脆弱性に関する知見不足も課題となっていた。更に現場海域における物理・化学的動態、すなわち鉱石からの重金属の溶出機構、特にこれまで未着手であった水銀及びヒ素の溶出動態、そして揚鉱水漏洩時の拡散範囲についても明らかにしておく必要があった。本研究では、こうした課題の解決に取り組みながら、実用的な環境影響評価技術を確立することを目標とした。

### 1.1.2 研究全体の構成

上述の目的、目標を達成するために、本研究課題では、以下の7つのサブテーマを設けて、研究に取り組んだ。最初の4つのサブテーマは、洋上バイオアッセイ技術の高度化を目指したものであり、1つ目は洋上においてフローサイトメトリーを用いて海底鉱物資源開発海域（多くは外洋域）に生息する微生物群集への重金属の影響を判定するための技術開発、2つ目は洋上バイオアッセイの簡便化やキット化を目指す新たな遅延発光バイオアッセイの開発であり、L乾燥法を適用した技術開発、3つ目は外洋性植物プランクトンを対象として、重金属に対する種の感受性分布（SSD）を用いて行う複合影響評価研究、そして4つ目は植物プランクトンの発する蛍光収率を指標としてリアルタイムに水質を監視するシステム開発である。次の3つのサブテーマは、金属溶出特性の把握や現場海域における物理・化学動態の解明を目指したもので、5つ目として鉱石からの水銀溶出の動態把握と洋上水銀分析について検討した研究、6つ目は鉱石からの金属溶出動態（Zn、Pb、As）の検討を行った研究、そして7つ目として、漏出事故を想定した揚鉱水の海洋拡散シミュレーションを行って、揚鉱水の拡散範囲を推定・把握した研究である。

1. フローサイトメトリーを利用した重金属の植物プランクトンへの影響評価
2. L乾燥による試薬化藻類を用いた遅延発光バイオアッセイ法の開発
3. 外洋性植物プランクトンへの重金属等の影響及びSSD解析
4. リアルタイム水質監視システムの開発
5. 鉱石からの水銀溶出動態と洋上水銀分析の検討
6. 鉱石からの金属溶出動態（Zn、Pb、As）の検討
7. 漏出事故を想定した揚鉱水の海洋拡散シミュレーション

## 1.2 研究の概要

海底鉱物資源開発の現場で行える「実用的環境影響評価（EIA）技術」の開発を目指して、洋上バイオアッセイ技術の高度化（サブテーマ1～4）及び金属溶出特性と物理・化学動態解明（サブテーマ5～7）に掛かる研究開発に取り組んだ。鉱石からの溶出が懸念される重金属等による開発海域の水質汚染を定期的に監視するための洋上バイオアッセイ技術の高度化を図るとともに、亜鉛、鉛等に加えて、新たに水銀・ヒ素の溶出特性を明らかにし、漏洩事故シナリオに基づく揚鉱水の海洋拡散シミュレーションの実施に取り組んだ。以下は各サブテーマの概要である。

1. フローサイトメトリーを利用した重金属の植物プランクトンへの影響評価（担当：大田、山口、越川、河地）

水界微生物群集のモニタリングで利用されているフローサイトメトリーを用いて、重金属汚染の微生物群集への影響を判定するための手法開発に取り組んだ。死細胞や細胞膜に損傷を受けた細胞を検出できる蛍光染色剤の1つ、ヨウ化

プロピジウム (PI) を用いて染色、フローサイトメトリーで解析することで、船上においても迅速かつ簡便に現場植物プランクトンに対する影響を検出する手法を確立することができた。

#### 2. L 乾燥による試薬化藻類を用いた遅延発光バイオアッセイ法の開発 (担当: 大田、山岸、越川、河地)

複数試験株の L 乾燥試料を作成し、重金属や光合成系阻害剤添加時の遅延発光応答を解析することで、最短 0 分から数十分で、重金属は ppm、光合成阻害剤は ppb レベルでの検出が可能となった。また L 乾燥物の品質を迅速にチェックする方法、更に真空ガラスアンプルを使わない低コストの L 乾燥物作製方法を確立することができた。

#### 3. 外洋性植物プランクトンへの重金属等の影響及び SSD 解析 (担当: 山岸、山本、大曲、大田、河地)

外洋性植物プランクトン複数種の重金属毒性データ (EC50 値) の調査を行い、累積確率を算出し、Zn、Pb 及び Cu について種の感受性分布 (SSD) のグラフを作成するとともに 3 金属について 5% の種が影響を受ける濃度 (HC5) を算出した。また作成した 3 つの SSD に CA (Concentration addition) モデルを適用することにより、複数物質によって影響を受ける種の割合 (msPAF) を算出することができた。金属各々の SSD に関する知見を増やすことで、コアの組成や溶出液の組成から影響を予測可能となるため、こうした SSD を用いた複合影響モデルは、開発現場での環境リスク評価の有用なツールとなることが期待される。

#### 4. リアルタイム水質監視システムの開発 (担当: 越川、河地)

第 1 期 SIP において取得したデータの詳細解析、解析結果に基づくシステム運転条件の構築、システム実用化を図る上で必要なハード・ソフトウェアの改良を行うとともに、実海域における改良型システムの長時間連続観測を実施した。また PAM センサーの制御、測定、データ解析や保存を PLC に集約するなど、より実用的なシステムを開発することができた。また本システムについて、国内特許出願及び PCT 制度による米国、仏国、中国への出願を行うことができた。

#### 5. 鉱石からの水銀溶出動態と洋上水銀分析の検討 (担当: 武内、淵田)

実操業において海底熱水性鉱石及び底質に微量に含まれる水銀の拡散ポテンシャルについて検討するために、固体試料中の水銀含量及び海水溶出試験を行った結果、熱水鉱石からは、溶出量は極めて少ないものの、一般的な海水中水銀濃度を大きく超えるレベルの水銀溶出が確認されたこと、外洋海底質中の水銀濃度は低く、環境基準値以下であることが分かった。また洋上でも実施可能な水銀分析方法について検討した結果、海水中の水銀に関しては、アメリカの公定法を基本とする分析方法で、採水日翌日には結果が得られること、そして底質や粒子に関しては、船上では振動の影響を受け、定量分析は困難であり、洋上では簡易的な半定量的分析に留めておいて、後日、陸上で定量分析を行うのが妥当と言えた。

#### 6. 鉱石からの金属溶出動態 (Zn、Pb、As) の検討 (淵田、武内、越川)

深海鉱物資源開発海域における鉱物から海水への重金属溶出挙動を明らかにするために、実際の海底熱水性鉱石を用いた海水溶出試験を実施し、主な溶出成分である亜鉛、鉛及びヒ素を対象として、それらの溶出速度及び化学形態変化に関して調査した。その結果、Zn 及び Pb の溶出速度 (量) は鉱石中のガルバニック比 (FeS<sub>2</sub> の量) と可溶性鉱物量によって決まること、また熱水性鉱石から数百 ppb レベルのヒ素の溶出が確認され、その大部分は亜ヒ酸であることなどが明らかになった。

#### 7. 漏出事故を想定した揚鉱水の海洋拡散シミュレーション (東、越川)

深海鉱物資源開発が実施される可能性の高い 5 つのサイトを選定し、実際の気象・海象条件下で、商業生産時を想定した揚鉱水漏出時の海洋拡散シミュレーションを行い、揚鉱水の影響範囲に関する知見の収集とそれを簡易的に特定する手法について検討した結果、実際の現場において漏出水の影響範囲を特定する簡易的手法として利用可能な近似式を得ることができた。

## 2 研究の成果

### 2.1 フローサイトメトリーを利用した重金属の植物プランクトンへの影響評価

#### 2.1.1 背景と目的

沖縄トラフや伊豆小笠原の海底熱水鉱床には、銅、鉛、亜鉛などのベースメタルやレアメタルを含む鉱石が分布している。これらの鉱石は将来的な非鉄金属資源として注目されているが、鉱石の大規模な採掘作業による環境中への金属溶出汚染が懸念される (Boschen et al. 2013, Hauton et al. 2017, Van Dover 2011, Wedding et al. 2015)。本稿執筆時点では商業的な海底掘削はまだ行われていないが、近い将来の大規模な掘削オペレーションに備えるため、金属溶出に対する表層海域の環境影響評価手法の確立は不可欠である。表層海域には一次生産者として多種多様な植物プランクトンが生息している。それらのベースラインモニタリング調査や環境影響評価手法は、海底鉱物資源の採掘の潜在的な影響を特定し、リスクを低減するために重要である。掘削オペレーションは海上に長期間滞在して行うため、陸上にサンプルを持ち帰って実施するような環境影響評価は難しい。このため、現場海域で環境影響評価を行う必要がある。しかし船上で分析やバイオアッセイを行う場合、様々な制約を伴う。例えば、インキュベーター、質量分析計などの実験機器や大型分析機器を搭載できる研究船は少ない。本研究では船舶のような限られた空間で効率的に毒性評価を行うシステムを開発することを目指して研究を行った。遅延発光 (DF) を用いたバイオアッセイはコンパクトなシステムで実現できるバイオアッセイ法の一つであり、OECD Test No. 201 (Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test) に代表される標準的な成長阻害試験 (グロースアッセイ) よりも大幅に時間短縮できる (OECD 2011, Katsumata et al.2006, Yamagishi et al.2016)。DF 法は、グロースアッセイと比較して簡便かつ迅速な手法であるが、DF を計測するためには比較的高密度の細胞 (例えば、試験株として使用される *Cyanobium* sp.の細胞の場合、 $> 10^7$  cells/mL) を用意しなければならない。海底資源が分布している海域は貧栄養環境がほとんどであり、海水中の藻類細胞は非常に低密度で存在するため、濃縮をせず現場海水を直接観測に用いることは困難である。また、濃縮の過程で細胞に様々なダメージを与える可能性があるため、海水を直接観測に使用する代替システムが求められている。本研究では船舶に搭載可能な小型のフローサイトメーターを使用し、生死判定試薬であるヨウ化プロピジウム (PI) により、細胞密度の希薄な海水試料であっても、細胞のダメージを直接検出することが可能な“PI-based FCM アッセイシステム”を開発した (Ota et al. 2022)。

#### 2.1.2 方法

国立環境研究所微生物系統保存施設 (MCC-NIES, <https://mcc.nies.go.jp>) にて保存されている代表的な海産植物プランクトンである微細藻類種を選定、入手し、フローサイトメトリーにより重金属の細胞への影響について評価した。代表株として、本研究では、シアノバクテリアの *Cyanobium* sp. NIES-981, *Synechococcus* sp. NIES-969, *Prochlorococcus* sp. NIES-2885、そして真核藻類の *Bathycoccus prasinus* NIES-2670 の 4 株を使用した (表 1、図 1)。NIES-969、NIES-981、及び NIES-267 については ESM 培地、NIES-2885 については Pro-99 培地を 10mL 含むガラス試験管内で、 $20\sim 40\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  で、12:12 時間の明 (L) :暗 (D) サイクル、 $20^\circ\text{C}$  で予備培養をした。

表 1 本研究で使用した MCC-NIES 藻類株

株番号	種名	綱	門	細胞長径
NIES-969	<i>Synechococcus</i> sp.	Cyanophyceae	Cyanophyta	1–2 $\mu\text{m}$
NIES-981	<i>Cyanobium</i> sp.	Cyanophyceae	Cyanophyta	1–3 $\mu\text{m}$
NIES-2670	<i>Bathycoccus prasinus</i>	Prasinophyceae	Chlorophyta	2 $\mu\text{m}$
NIES-2885	<i>Prochlorococcus</i> sp.	Cyanophyceae	Cyanophyta	1 $\mu\text{m}$

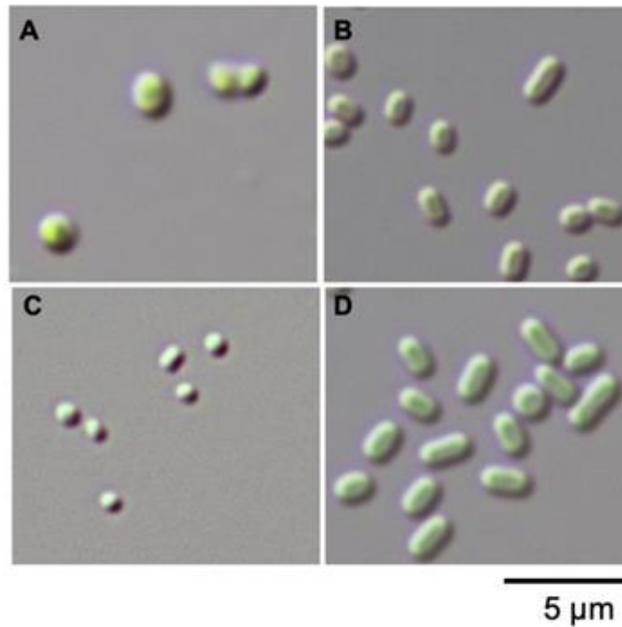


図1 本研究で使用した藻類株の微分干渉顕微鏡画像。(A) *Bathycoccus prasinos* NIES-2670、(B) *Synechococcus* sp. NIES-969、(C) *Prochlorococcus* sp. NIES-2885、(D) *Cyanobium* sp. NIES-981。

重金属暴露ストレス源として、銅または混合金属 (CK) を含む溶液を使用した。2016年に実施された JAMSTEC D/V Chikyu CK16-05 調査航海で得られた金属溶出実験データを参考に、主に亜鉛や鉛を含む金属混合溶液 (CK) を作成して実験に用いた (Yamagishi et al. 2018)。培地中のキレート効果の影響を排除するため、対数増殖後期から定常期の藻類培養液を滅菌海水で希釈した (最終濃度  $1 \times 10^6$  cells/mL)。銅暴露は、 $\text{CuSO}_4$  原液 (100 ppm) を試料に添加することにより行った。CK 暴露は、濃縮原液 (10×CK 原液) を培養液に添加した。銅または CK 添加後、試料を 48 穴マイクロプレート (1 mL/well) に入れ、白色発光ダイオードを用いて  $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の照明 (L:D=12:12) で 20°C、24 時間インキュベートした。インキュベーション後、200  $\mu\text{L}$  のサンプルに対して 1 mg/mL のヨウ化プロピジウム (PI) を 1  $\mu\text{L}$  添加した後、室温 (25~28°C) の暗所で少なくとも 15 分間インキュベートした。二重染色が必要な場合、SYBR Green I (BioWhittaker, Rockland, ME, USA) を最終濃度 1:10,000 で培養液に添加した。FCM 分析の直前に、染色した培養液をろ過した海水で 4~5 倍に希釈し、バックグラウンド蛍光を低くした (この実験系では遠心分離は不可能であるため)。その後、On-chip Sort フローサイトメーター (On-Chip Biotechnologies, Tokyo, Japan) を用いて、488 nm の青色レーザー励起の散乱光あるいは蛍光を解析した。解析細胞数は、真核藻類の NIES-2670 株は 400 細胞、シアノバクテリア 3 株は 2,000 細胞とした。検出チャンネルは FL2 (543/22 nm)、FL3 (591.5/43 nm)、FL5 (716/40 nm) を用いた (表 2)。本研究のゲーティングストラテジー概要を図 2 に示す。

表 2 フローサイトメーターの検出フィルタと蛍光色素

検出フィルター	検出波長	蛍光色	蛍光試薬または自家蛍光
FL2	543/22 nm	Green	SYBR Green I, Phycoerythrin
FL3	591.5/43 nm	Yellow/ orange	Propidium iodide
FL5	716/40 nm	Red	Chlorophyll <i>a</i>

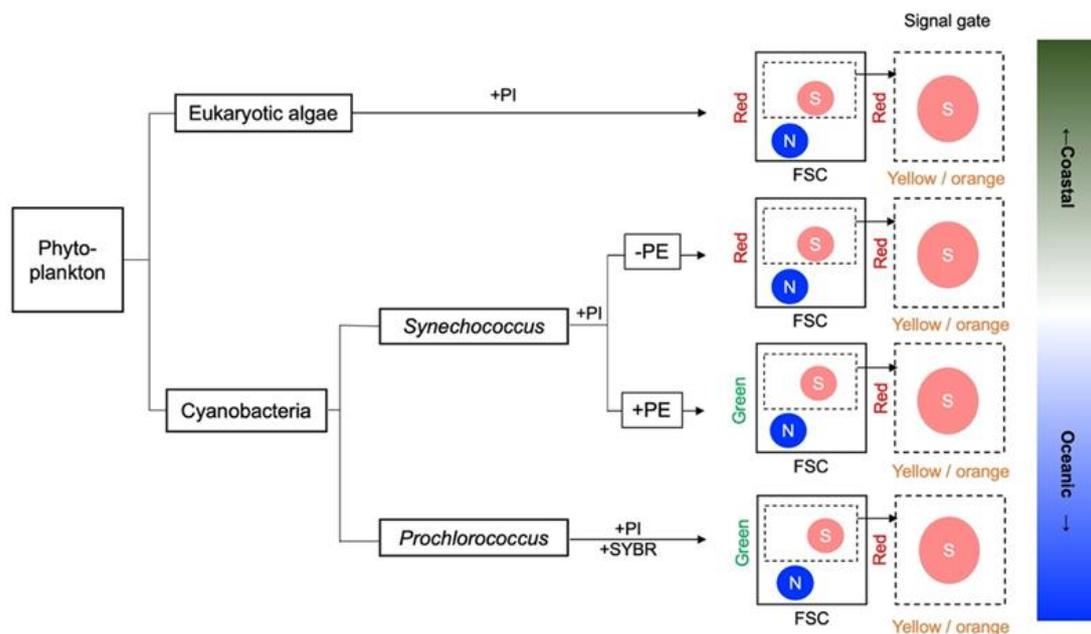


図2 各海産藻類群のゲーティングストラテジーのフローチャート。Green、Yellow、RedはそれぞれFL2、FL3、FL5検出フィルターを用いて測定した蛍光強度を模式的に示す。Coastal（沿岸環境）と Oceanic（外洋環境）は、藻類群が比較的多く優占する海域を示す。例えば、外洋環境ではプロクロロコッカスが比較的多く、優占している。PI: propidium iodide; +PI: PI-staining; +SYBR+PI: SYBR Green I と PI の二重染色; N:ノイズ; S:シグナル; FCS: 前方散乱光; PE: フィコエリスリン。

### 2.1.3 結果と考察

海産微細藻類株（NIES-2670、NIES-969、NIES-2885、NIES-981）を用いて、金属暴露ダメージの検出試験を行った。金属混合液（CK）を用いた暴露試験を図3に示した。NIES-2670株では、金属濃度の増加とともにPI陽性細胞の割合が増加し、100% CK（試験で溶出した金属濃度に相当）の暴露時には81.9%に達した（図3）。また、NIES-2670のクロロフィル蛍光（FL5）は、CK濃度50%及び100%に暴露したカルチャーでは減少していた。20%以下のCK濃度でインキュベートした場合、クロロフィル蛍光は1K（FL5）まで観測されたが、50%以上のCK濃度でインキュベートした場合、細胞はほぼ100 au.付近の蛍光強度（FL5）まで下がった（図3）。これは、高い金属濃度でのクロロフィル蛍光が消光したことによるものと思われる。

緑色自家蛍光をもつフィコエリスリンを含むNIES-969とSYBR Green Iで染色したNIES-2885は緑から黄色の蛍光を示した。フィコエリスリンやSYBR Green Iの発光蛍光はPI蛍光と一部重なるため、陽性/陰性の細胞が明確に区別できる領域に閾値を設定することができない。そこで、ヒストグラムのピークから右にシフトした位置（例えば、NIES-969では図4の右ヒストグラム）に任意の閾値を設定し、PI蛍光の増加を示す細胞の割合を観察した。その結果、FL3蛍光値が増加し、ダメージ細胞が検出されることが確認された。NIES-981では、CK濃度50%及び100%で培養した場合、PI陽性細胞の割合がわずかに増加することが確認された（図3）。上記のように任意の閾値を設定し、FCMによる細胞解析を行った結果、金属暴露細胞のFL3蛍光は非暴露細胞のそれと比較して増加方向にシフトしていることが確認された。0%と50%のCKに暴露した培養液を比較すると、蛍光の増加を示す細胞数は、NIES-969では22.4%から63.2%に増加し、NIES-2885では11.5%から26.1%に増加していた（図3）。

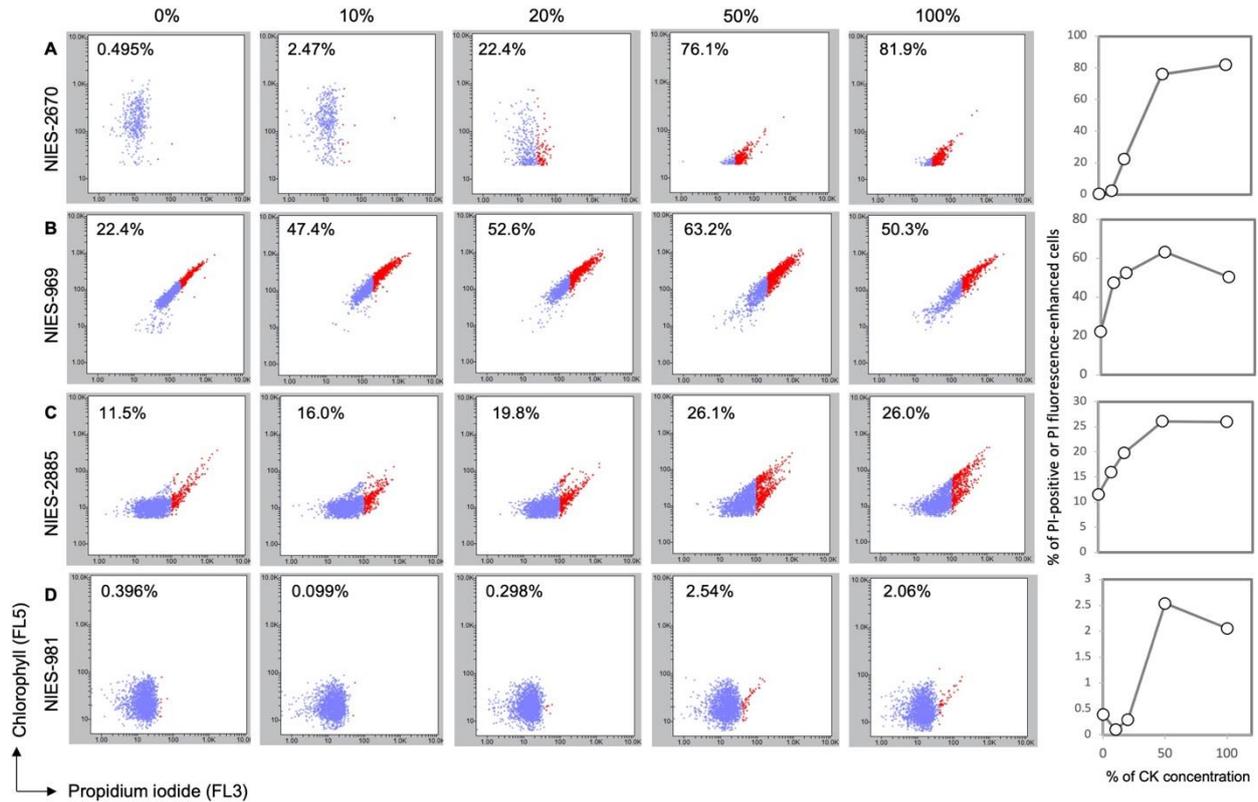


図3 CK 金属暴露条件下でのフローサイトメトリーアッセイの結果。NIES-2670 (A)、NIES-969 (B)、NIES-2885 (C)、NIES-981 (D) のそれぞれのフローサイトメトリー散布図を示す。赤いドットは、任意の閾値 (A では FL3>30 a.u.、B では FL3>40 a.u.、C では FL3>200 a.u.、D では FL3>100 a.u.) 以上の蛍光輝度をもつ PI 陽性細胞であることを示す。任意の閾値は、ゼロコントロールのヒストグラムの最も左側 (NIES-981、NIES-2670)、またはヒストグラムのピークからやや左側の任意の点 (NIES-969、NIES-2885) でとった (図 4 も参照)。x 軸は PI 蛍光輝度 (FL3)、y 軸はクロロフィル自家蛍光輝度 (FL5) を表す。散布図上の数字は、CK 暴露の最終濃度 (%) を示し、散布図中の数字は、解析した細胞の総数に対する PI 陽性細胞または PI 蛍光が増加した細胞の割合を示している。左のグラフは、FCM の結果に基づく金属濃度と陽性細胞の割合を示している。

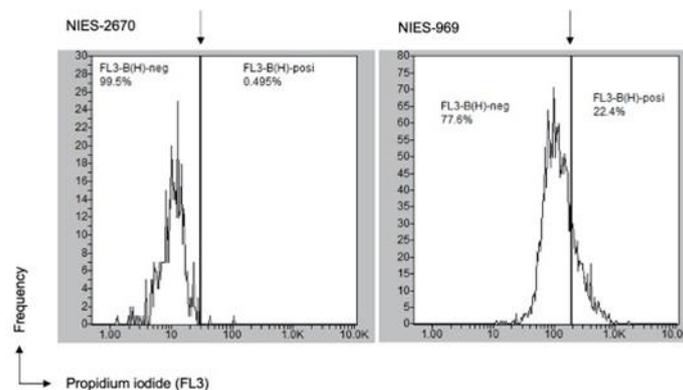


図4 任意の閾値 (矢印) の設定例。左図は NIES-2670、右図は NIES-969 (フィコエリスリン含有シネココッカス)。任意の閾値は、ゼロコントロールのヒストグラムの最も左側 (NIES-981、NIES-2670)、またはヒストグラムのピークからやや左側の任意点 (NIES-969、NIES-2885) に設定した。

次に銅暴露試験の結果を図 5 に示す。CK 暴露結果と同様に、NIES-2670 のカルチャーでは銅暴露レベルの増加とともに PI 陽性細胞の割合が増加した。PI 陽性細胞は銅濃度 0.01 mg/mL で観察され、1 mg/mL 濃度で陽性細胞の割合は

39.8%に達した(図5)。NIES-2670のクロロフィル蛍光(FL5)が、0.1-1 mg/mLの銅濃度に曝された培養液でも減衰した。この消光は、CK暴露の場合と同じメカニズムによるものと考えられる。NIES-969及びNIES-2885の金属暴露細胞も同様にフローサイトメトリーにより評価した。非暴露細胞に比べ、金属暴露細胞はFL3蛍光の上方シフトを示した。0 mg/mL(コントロール)及び0.1 mg/mLの銅に暴露させたカルチャーを比較すると、蛍光の増加を示す細胞の割合はNIES-969では23.5%から31.3%に、NIES-2885では10.4%から23.3%に増加した(図5)。NIES-981の培養では、銅濃度1 mg/mLに暴露した培養でPI陽性細胞の割合のわずかな増加が観察された(図5)。

本稿で紹介したPI-based FCMアッセイシステムは、植物プランクトン密度が希薄な外洋海水を濃縮せずにそのまま解析に使用できる。NIES-981の場合、 $10^5$ - $10^6$  cells/mLの密度でも細胞ダメージを検出できることが確認できた。このレンジ濃度以下では、DFアッセイは検出限界以下となるため、外洋海水をターゲットとする場合、PI-based FCMアッセイシステムを利用するメリットは大きいと考える。今後、両手法の利点を活かし、現場で対応可能な金属毒性評価システムを構築する必要がある。JAMSTEC「かいめい」の調査航海で予備調査を実施したところ、本システムが自然海水に適用可能であることが確認できた。しかしながら現時点では、データ収集が十分とは言えず、今後、追加的なフィールドワークによる実証実験が必要である。

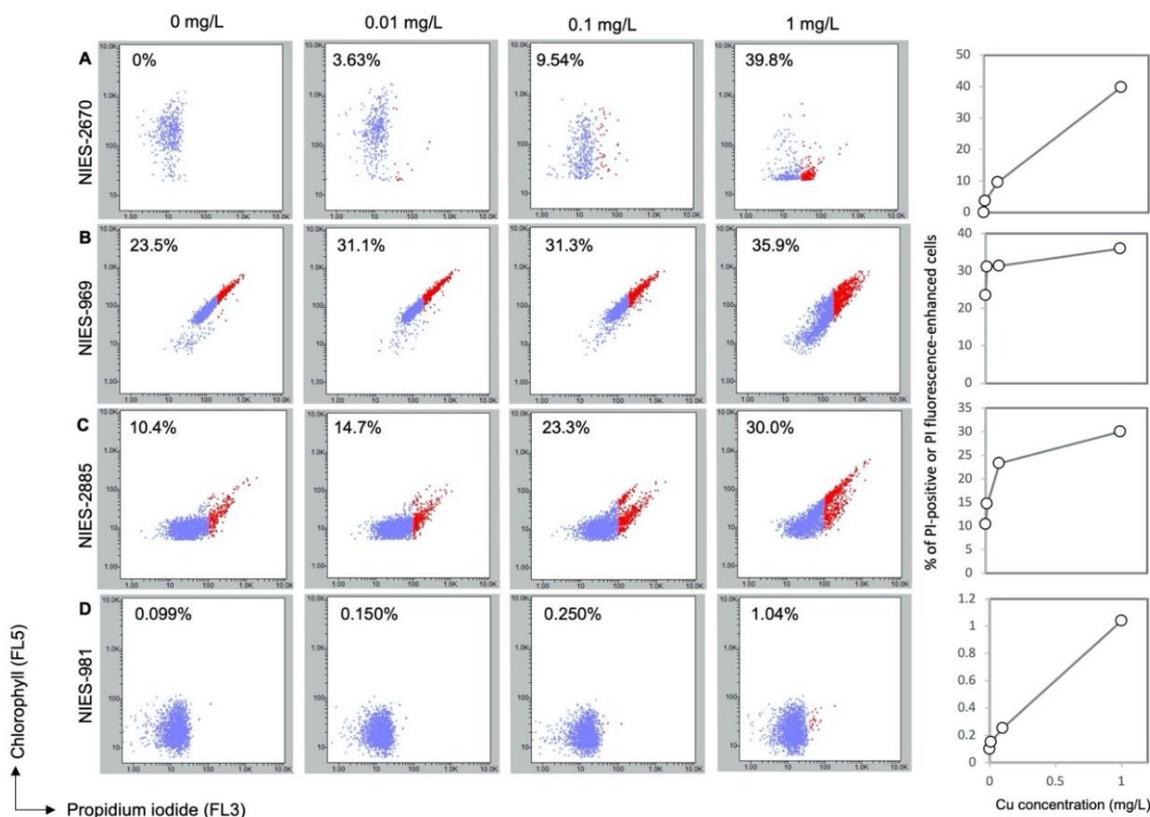


図5 銅暴露下でのPI染色細胞のフローサイトメトリーアッセイの結果。NIES-2670 (A)、NIES-969 (B)、NIES-2885 (C)、NIES-981 (D)のフローサイトメトリー散布図をそれぞれ示す。赤いドットは任意の閾値以上のPI陽性細胞を示す(AではFL3>30 a.u.、BではFL3>40 a.u.、CではFL3>200 a.u.、DではFL3>100 a.u.)。任意の閾値は、ゼロコントロールのヒストグラムの一番左側(NIES-981とNIES-2670)、またはヒストグラムのピークからやや左側の任意の点(NIES-969とNIES-2885)でとった(図4も参照)。x軸はPI蛍光輝度(FL3)、y軸はクロロフィル自家蛍光輝度(FL5)を表す。散布図上の数字は、CK暴露の最終濃度(mg/L)を示し、散布図中の数字は、解析した細胞の総数に対するPI陽性細胞またはPI蛍光が増加した細胞の割合を示している。左のグラフは、FCMの結果に基づく金属濃度と陽性細胞の割合を示している。

本研究で紹介したFCM法は主要な海洋プランクトンすべてに対して適用可能である。一方、調査海域によっては優占する植物プランクトンが異なるため、すべての微生物群を分析する必要はない。例えば、真核藻類は通常、外洋より

も沿岸域に多く存在するため、沿岸域では真核藻類のみを対象とした影響評価を行うことができる。また、貧栄養海域では、真核藻類よりもプロクロコッカスやシネコッカスを主要な植物プランクトンとしてターゲットにすることが可能である（図 2）。このように、調査海域の優占する植物プランクトンの種類に応じて、様々な藻類グループに対応できるのが本アッセイシステムの利点と考えている。本方法ではまた、事前に FCM によるベースラインの調査を実施し、群集解析を行うことも可能で、調査海域に適切なグループをオペレーション前に特定することができる。

#### 2.1.4 まとめ

将来的に海底資源の採掘が広く実施されることが予想されており、本格的な深海採掘を開始する前に、実現可能なモニタリングの基礎を確立し、船上での環境評価技術を開発する必要がある。本研究では、FCM を用いて、金属毒性が外洋海水中の植物プランクトンに与える影響を評価する手法を確立した。本研究では、代表的な真核藻類・シアノバクテリアの株を用いて実験を行い、金属の毒性影響を検出することに成功した。FCM のデータから、本手法の感度は藻類、シアノバクテリアともに実用レベルであることが示唆された。フィコエリスリンを含む細胞や SYBR green で染色された細胞からなる集団については、閾値の設定が任意であるため、観測者で結果に差がでる可能性がある。今後ゲーティングストラテジーの改善が必要であろう。また、染色方法の最適化だけでなく、FCM 解析におけるフィルター設定や励起レーザー波長の検討も今後の課題である。

### 引用文献

- 1) Boschen, R. E., Rowden, A. A., Clark, M. R., & Gardner, J. P. A. (2013). Mining of deep-sea seafloor massive sulfides: A review of the deposits, their benthic communities, impacts from mining, regulatory frameworks and management strategies. *Ocean and Coastal Management*, 84, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2013.07.005>
- 2) Hauton, C., Brown, A., Thatje, S., Mestre, N. C., Bebianno, M. J., Martins, I., ... Weaver, P. (2017). Identifying toxic impacts of metals potentially released during deep-sea mining—a synthesis of the challenges to quantifying risk. *Frontiers in Marine Science*, 4, 368. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00368>
- 3) Katsumata, M., Koike, T., Nishikawa, M., Kazumura, K., & Tsuchiya, H. (2006). Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research*, 40(18), 3393–3400. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.016>
- 4) OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (2011). Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Retrieved from [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test\\_9789264069923-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en)
- 5) Ota, S., Fuchida, S., Yamaguchi, H., Yamagishi, T., Yamamoto, H., Koshikawa, H., & Kawachi, M. (2022). Propidium iodide staining and flow cytometry-based assessment of heavy metal impact on marine phytoplankton. *Cytologia*, 87(2), 177–187. <https://doi.org/10.1508/cytologia.87.177>
- 6) Van Dover, C. L. (2011). Tighten regulations on deep-sea mining. *Nature*, 470 (7332), 31–33. <https://doi.org/10.1038/470031a>
- 7) Wedding, L. M., Reiter, S. M., Smith, C. R., Gjerde, K. M., Kittinger, J. N., Friedlander, A. M., ... Crowder, L. B. (2015). Managing mining of the deep seabed: Contracts are being granted, but protections are lagging. *Science*, 349(6244), 144–145. <https://doi.org/10.1126/science.aac6647>
- 8) Yamagishi, T., Katsumata, M., Yamaguchi, H., Shimura, Y., Kawachi, M., Koshikawa, H., ... Tatarazako, N. (2016). Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the marine cyanobacterium *Cyanobium* sp. (NIES-981). *Ecotoxicology*, 25(10), 1751–1758. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1718-7>

9) Yamagishi, T., Fuchida, S., Katsumata, M., Horie, Y., Mori, F., Kitayama, A., . . . Tatarazako, N. (2018). Evaluation of the toxicity of leaches from hydrothermal sulfide deposits by means of a delayed fluorescence-based bioassay with the marine cyanobacterium *Cyanobium* sp. NIES-981. *Ecotoxicology*, 27(10), 1303–1309. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1989-2>

## 2.2 L 乾燥による試薬化藻類を用いた遅延発光バイオアッセイ法の開発

### 2.2.1 目的と経緯

近年、沖縄トラフや伊豆小笠原に広がる海底熱水鉱床域における非鉄金属資源や南鳥島周辺海域のレアアースなどの海底鉱物資源が注目されている。これらの資源は、世界的に枯渇しつつある鉱物資源の安定供給に役立つことが想定され、国内外で高い関心もたれている。商業的な採鉱・揚鉱に向けた研究開発が進められているなか、2017年には、JOGMEC が世界で初めて、水深約 1,600m の海底において掘削した鉱石を収集、水中ポンプを使って洋上へと連続して揚げる揚鉱パイロット試験に成功した。本格的な資源開発が行われる際には、深海・洋上における掘削機や揚鉱パイプ等の設置と運用、揚鉱水の洋上処理、採鉱母船から輸送船への積み込み等、様々な洋上オペレーションが行われることが想定される。いずれの作業工程においても鉱物の漏洩リスクを想定した対応が必要と言える (Boschen et al. 2013, Hauton et al. 2017, Van Dover 2011, Wedding et al. 2015)。

我々は 2014 年度から 2018 年度まで内閣府戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) 次世代海洋資源調査技術プロジェクトに参画し、海底熱水域での鉱物資源開発を想定した海洋生態系の調査観測と変動予測の手法の研究開発に従事した。その過程で、外洋域のベースラインモニタリングや希薄外洋海水の環境影響評価手法の確立に取り組んだ (Ota et al. 2022)。一方、SIP プロジェクトの進捗により、新たな課題が浮き彫りとなり、その課題を解決すべく、2019 年度から本所内公募型提案研究 A により、引き続き実用的な環境影響評価技術の確立を目指した研究を実施した。

従来の藻類を用いたバイオアッセイでは、試験株として継代培養株もしくは凍結保存株を甦生させた生細胞を用いることが想定されている (OECD 2011)。継代培養株や凍結保存株を用いる場合、継続的な継代培養や試験日程に合わせて試験株の継代・解凍操作と前培養の工程が必要である。これらの工程は、試験全体のコストを上昇させるばかりでなく、化学物質が培養環境にも影響を与えるため、細胞数、温度条件や光条件を厳密に制御しなければ、再現性が低下する要因となりうる。また、培地中に有機物などキレート効果のある物質が含まれると、重金属の影響を過小評価するなどの問題があげられる。さらに、生きた藻類細胞によるアッセイでは、標準的な生長阻害試験でも、前培養を除き 72 時間 (例: OECD Test No. 201) を要し、迅速な評価結果が求められる現場のニーズを充足している状況とは言い難い。そこで、本研究では、「藻類試験のキット化」に掛かる研究を実施し、L 乾燥法により藻類の乾燥標品を試薬のように長期間安定して保存すること、また、藻類乾燥物をそのままバイオアッセイに用いた場合の化学物質検出性能を評価した。

### 2.2.2 方法

#### (1) 微細双対を L 感想してアッセイ用試薬を作製する工程

本研究では、国立環境研究所微生物系統保存施設 (MCC-NIES) のカルチャーコレクション株 NIES-35 (淡水産緑藻)、NIES-969、NIES-981、NIES-2885 (いずれも海産藍藻類) を用いた。L 乾燥時に使用する保護培地 (表 3) は淡水・海産で使い分けた。L 乾燥に使用する培養試料 (カルチャー) は、1L の培地に 20~30 mL の種株を植え付け、約 2 週間、明暗周期 12:12 時間条件で通気培養したのち、藻体を遠心分離した。増殖培養では MCC-NIES で指定された培地を使用した。遠心分離の条件は 50 mL 遠心管に分注した場合、4400 rpm (3000 ×g)、20-30 分とした。遠心後のカルチャーの上清を除いたあと、ペレット状の細胞塊に、保護培地 (表 3) を 8 mL 加えて再懸濁させた。細胞懸濁液を集めボルテックス等で十分に均一化した後、100 μL ずつクライオバイアルまたはガラスバイアルに分注した。4°C に予冷した金属製チューブラックに分注したバイアルを立て、L 乾燥装置により 2~3 時間低温真空乾燥を行った。真空乾燥中は真空容器の外側を氷等で冷却した。L 乾燥中はクライオバイアルの蓋をせず、開放した。乾燥後、バイアルを容器から取り出し、シリカゲルを敷いたデシケータ内で数時間~一晚、大気圧下で追加乾燥させた。従来の L 乾燥法はガラスアンプル中で乾燥させた後、真空を維持したまま溶封 (アンプルの口を閉じる工程) 作業が必要であったが、本研究ではこの工程を省略してもバイオアッセイの品質に影響しないことが確かめられた (図 6)。長期保存する場合は、シリカゲルを入れたジップ付きプラスチック袋に藻類乾燥物を入れて、4°C で保存した。

表 3 保護培地 100 mL の処方

	SM11 (海産用)	SM12 (淡水産用)
超純水または蒸留水	24 mL	88 mL
ろ過海水	25 mL	-
糖類ストック液*	50 mL	10 mL
5 M トリスバッファー (pH 7.4)	1 mL	-
0.5 M リン酸バッファー (pH 7.0)	-	2 mL

\*糖類ストック液：グルタミン酸ナトリウム 5 g、アドニトール 1.5 g、ソルビトール 1 g を超純水で溶解し、100 mL にメスアップしたもの。

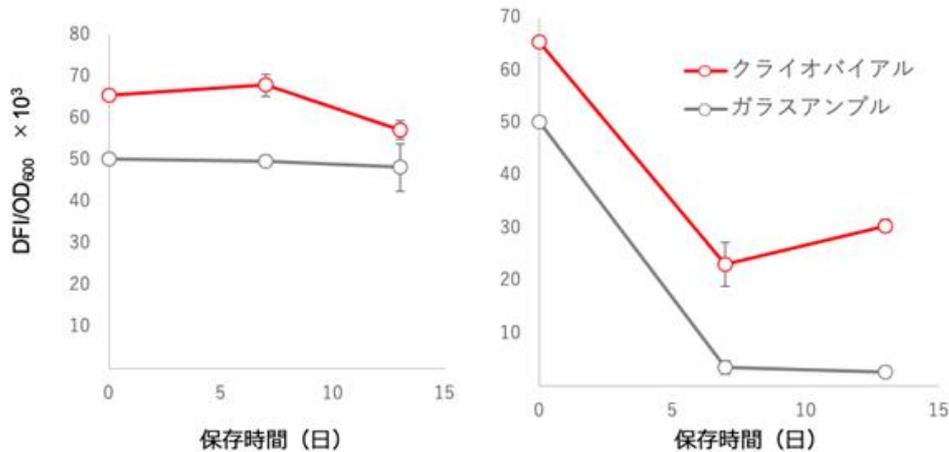


図 6 ガラスアンプル（従来法）とクライオバイアル（本方法）の藻類 L 乾燥物の品質比較。4°C安定条件（左）及び 37°C劣化加速条件（右）。DFI が高いほど品質が保たれている。クライオバイアルの乾燥物の品質が良いのは、溶封による熱の影響がないためであると考えられる。NIES-981 乾燥物を使用。

(2) 遅延発光装置により、化学物質の存在を検出する工程

試薬化藻類の復水、化学物質の暴露、遅延発光の測定、評価値の算出、データの比較・評価を行った。バイアルに入った L 乾燥物にろ過海水、または化学物質を含む海水を加え、ピペッティングまたはボルテックスにより素早く攪拌し、吸光度計測用キュベットに移し替えた。淡水産藻類の場合は、復水に蒸留水または超純水を用いた。復水量はトータルで 3.5 mL とした。暴露直後、または、一定時間経過（15～90 分）した後、遅延発光を測定した。ここで復水後、短時間（～90 分）のうちに観測され、数時間以内に消失する遅延発光を「短期寿命遅延発光」と呼ぶ。これは L 乾燥藻類で見られる独自の現象である。本研究では短期寿命遅延発光をアッセイの評価パラメーターとして用いた（図 7）。復水暴露後、浜松ホトニクス社製ウルトラミノメーターにより、10 秒間遅延発光を計測し、その間のフォトンカウントを積算した。これを積算遅延発光（integrated delayed fluorescence; DFI）と呼ぶ。積算遅延発光量を暴露区、非暴露区で比較することで、化学物質の存在を評価した。なお、本実験では化学物質暴露時に 1cm 光路長の波長 600 nm における吸光度を同時に測定した。この値で DFI を除しているが（DFI/OD 600nm）、これはロット間の細胞数のばらつきを考慮するための指標であり、同一ロットを使用している場合、実用上は吸光度を測定しなくても問題ない。

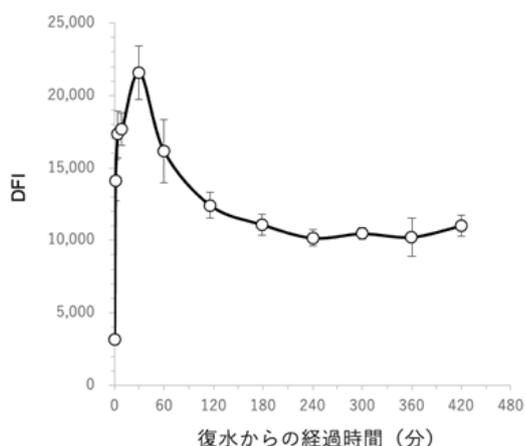


図7 NIES-981 乾燥物の復水経過からの積算遅延発光 (DFI) の推移。復水直後から DFI が急激に上昇し、30 分後をピークに徐々に減衰している。本バイオアッセイでは復水から 90 分以内に見られる短期寿命遅延発光を利用した。エラーバーは標準偏差を示す (n=4)。

### (3) L 乾燥した藻類の迅速な品質評価を行う工程

L 乾燥標品は数年程度の長期保存が可能であるが、徐々に劣化することが確認されている。また、試薬化藻類、L 乾燥物は湿度に弱く、大気湿度程度でも急速に劣化するので、試験前にロット毎の品質チェックが不可欠である。本研究では L 乾燥物の品質を迅速にチェックする方法も検討した。従来の品質チェック法は、コロニー形成単位法 (CFU) を利用する方法が用いられてきたが、この方法は細胞の増殖までに数週間以上を要し、品質判定までに時間がかかる。本手法では電子伝達阻害剤 DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea) を用いて、L 乾燥物の劣化の程度を数分~数十分程度で判定できた。L 乾燥物を復水すると同時に、DCMU を最終濃度  $1\mu\text{M}$  となるように添加し、0~15 分後の間に遅延発光を計測した。DFI 値が対照区 (非暴露区) と比較して有意に上昇していれば、バイオアッセイとして使用できる品質を保持していると判定した。ここで DFI 値の差は、光化学系 II の電子伝達系が機能していることを意味する。

## 2.2.3 結果と考察

### (1) 化学物質の存在の検出

クライオバイアル内に得た各種の藻類乾燥物、及び試験水を用意した。また、化学物質を含有しないコントロール (対照区) も用意した。DCMU、HA (ヒドロキシルアミン)、金属混合液 (CK) (海洋研究開発機構「ちきゅう」調査航海により採集したコアサンプルの岩石溶出液の組成に基づき、模擬的に調製した金属混合液で主に鉛と亜鉛を含む (Yamagishi et al. 2018))、銅、亜鉛、鉛、ヒ素を含む試験水について試験した。測定容器としてキュベットを使用し、上記の細胞懸濁液  $100\mu\text{L}$  を乾燥させた L 乾燥物 1 単位を、試験水又はコントロール水 (濾過海水またはミリ Q 水)  $3.5\text{mL}$  に、再懸濁 (復水) した。復水後、L 乾燥物と試験水又はコントロール水とを速やかにピペティングにて十分に混和し、測定サンプル (測定対象物) を得た。サンプルを微弱発光計測装置にセットし、装置付属の光源により励起光照射後、復水時点から直後 (30 秒以内)、15 分後、30 分後、60 分後、及び 90 分後に遅延発光の計測を行った。1 回あたりの遅延発光の計測時間は 10 秒とした。10 秒間に計測した遅延発光量 (フォトンカウント) の総和を計算し、これを積算遅延発光 (DFI) とした。また、復水後のサンプルについて、 $1\text{cm}$  光路長の波長  $600\text{nm}$  における吸光度を同時に測定し、この値で DFI を除し (DFI/OD600)、L 乾燥物の細胞数あたりの DFI 値を求めた。3 回独立測定の T 検定で有意差判定し、DFI 値が対照区と比較して有意に高値または低値であれば、試験水に化学物質や重金属が混入していると判定した。

試験に用いた各種化学物質について、対照区と比較して DFI の有意な高値及び低値が観測された (図 8、表 4)。また、復水後にはじめて有意差が生じた時間を最短検出時間として表 4 に記載した。例えば、DCMU を NIES-35 乾燥物に暴露した場合、15 分暴露で有意に検出が可能であり、さらに、シアノバクテリア乾燥物では 0 分暴露、すなわち試験液を加えた直後に有意な差が検出可能であることがわかった。藻類乾燥物の種類によってはヒ素に関して検出が難しい種が確認できた。例えば、 $0.5\text{ppm}$  As (III) の場合、NIES-969 乾燥物は 15 分間で検出できたものの、それ以外の藻類乾燥物

では有意な差が見られなかった（表4）。銅、亜鉛、鉛に関してはほとんどの藻類乾燥物で90分以内に検出が可能であることが確認できた。以上のアッセイの結果から、藻類乾燥物を用いた遅延発光量の計測により、迅速且つ高精度に対象の化学物質に対するアッセイが可能であることが示された。

表4 各種化学物質の最短検出時間

	DCMU 1 $\mu$ M	HA 50 $\mu$ M	CK1%	As(III) 0.5 ppm	As(III) 1 ppm	As(V) 0.5ppm	As(V) 1 ppm	Cu <sup>2+</sup> 0.5ppm	Cu <sup>2+</sup> 1ppm	Zn <sup>2+</sup> 0.5ppm	Zn <sup>2+</sup> 1ppm	Pb <sup>2+</sup> 0.5 ppm	Pb <sup>2+</sup> 1 ppm
NIES-35	15 min**	15 min**	15 min**	NA	NA	NA	30 min**	15 min**	15 min**	15 min**	15 min**	15 min**	15 min**
	上昇	下降	上昇	変化なし	変化なし	変化なし	下降	下降	下降	上昇	上昇	上昇	上昇
NIES-969	0 min**	0 min**	60 min**	15 min*	90 min*	NA	15 min**	90 min*	15 min*	15 min**	60 min**	15 min**	15 min**
	上昇	下降	上昇→ 下降	減少	増加	変化無	上昇	下降	下降	上昇→ 下降	下降	上昇→ 下降	上昇→ 下降
NIES-981	0 min**	0 min**	0 min**	NA	NA	NA	NA	15 min*	15 min**	15 min**	15 min**	NA	15 min**
	上昇	下降	上昇	変化無	変化無	変化無	変化無	上昇	上昇	上昇	上昇	変化無	上昇
NIES-2885	0 min*	0 min**	0 min*	NA	0 min*	NA	90 min*	NA	0 min**	0 min*	30 min**	0 min*	15 min**
	下降→ 上昇	下降	上昇→ 下降	変化無	上昇	変化無	下降	変化無	下降	上昇→ 下降	上昇→ 下降	上昇→ 下降	上昇→ 下降

藻類 L 乾燥物に化学物質または重金属を暴露させ、復水直後から90分までの積算遅延発光を計測した。上段：最短検出時間、下段：コントロールに対する反応を表記した。暴露後初めてコントロールに対して有意差が生じた時間を最短検出時間として記載した。銅、亜鉛、鉛に関しては NIES-2885 以外のすべての株で90分以内に検出可能であった。NAは有意差が見られなかったことを示す。CK: 重金属混合溶液 (Yamagishi et al. 2018)  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

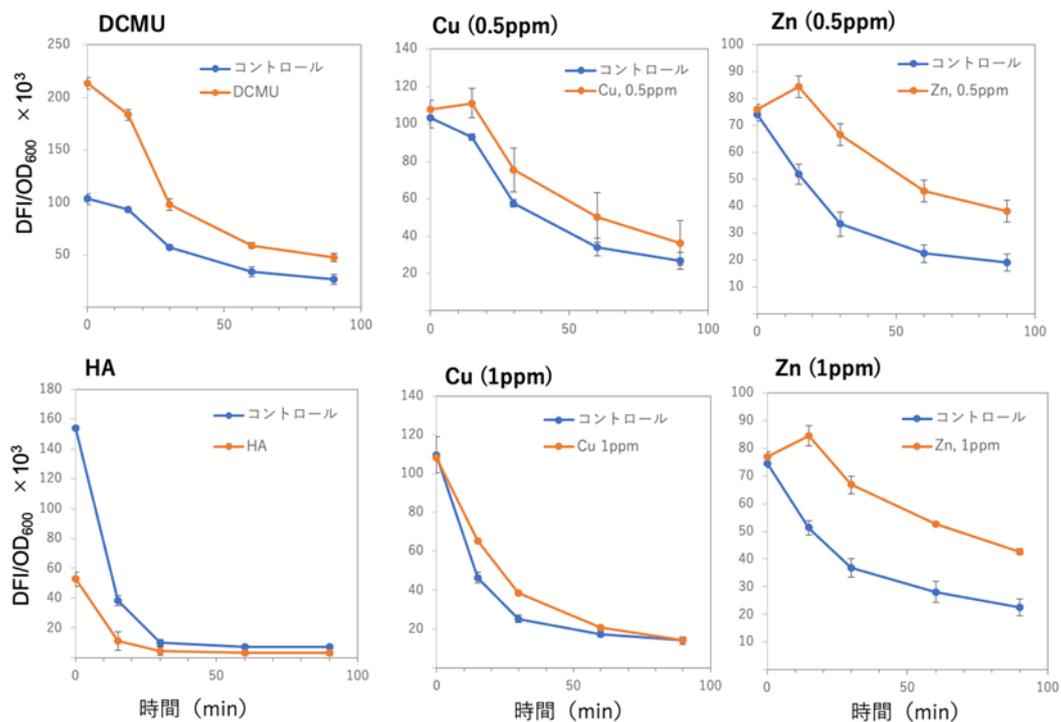


図8 アッセイ結果の例。NIES-981 乾燥物に化学物質または重金属を暴露させ、復水直後から90分までの積算遅延発光をプロットした。コントロールは非暴露区を示す ( $n=3$ 、平均±標準偏差)。

対照区と比較し、DFIの値が高値となるか低値となるか、また化学物質の種類によって反応の違いが生じることに ついて、そのメカニズムの詳細は不明ではあるが、光合成反応における化学物質の反応阻害部位の違いを反映しているものと考えられる。図9は、光合成電子伝達反応及び遅延発光における、電子供与体及び電子受容体と、それらの酸化還元電位の変化を説明する模式図である。例えば、HAはP680のマンガンクラスターの機能を阻害することが知られる。

そのため、HA の暴露により P680 を起点とした電子の流れが阻害され、遅延発光自体も阻害されると考えられる。DCMU では、キノン電子受容体部位に高い特異性をもって結合することが知られる。そのため、DCMU の暴露による電子伝達の阻害により、電子の逆流が生じ遅延発光が増加することとなると考えられる。今後は、短期寿命遅延発光と反応メカニズムについて詳細な研究が必要だろう。

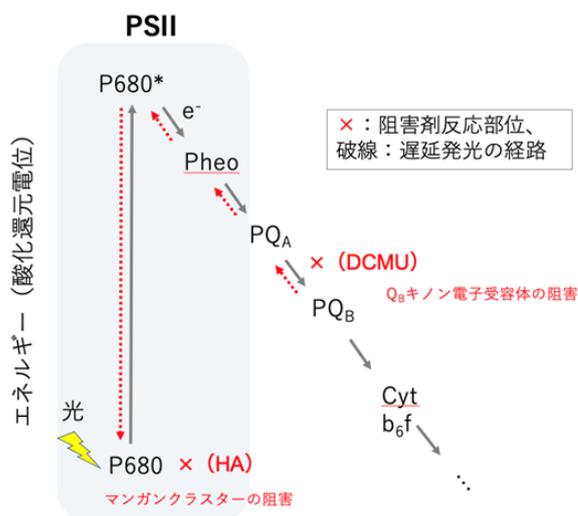


図9 光合成電子伝達系。Cyt b<sub>6</sub>f以降は省略した。HAはP680マンガンクラスターを遊離させ反応中心を阻害する。DCMUはQBキノン電子受容体を阻害する。赤破線は遅延発光に関わる電子の流れ(推定)。

## (2) L乾燥物の品質評価法の検討

NIES-981乾燥物を保存した場合の推定半減期(遅延発光が半分減少する時期)は約2.6年と見積もられた(図10)。この推定は藻類乾燥物を真空ガラスアンプル容器中で低温保存した場合であり、大気湿度にさらされた場合や、室温以上の高温環境下では劣化が加速されることが知られている。例えば、L乾燥物を4°Cで保存した標品と、37°Cで保存した標品(加速劣化標品)を比較した4°C保存したL乾燥物では、DCMU添加区と非添加区で差が見られたが、37°Cで保存したL乾燥物ではDCMU添加区と非添加区で有意差が見られず、37°Cで保存したL乾燥物の劣化が確認された(図11)。従来では細胞を寒天平板等に植え付け、コロニー数をカウントするコロニー形成単位法(CFU)が用いられたが、この方法は判定までに数週間から数ヶ月を要する。一方、DCMU等の電子伝達阻害剤を品質チェックに用いることで、L乾燥物について、非常に短時間で品質判定を行えることがわかった。DCMUにより判定できる理由は、藻類乾燥物において光合成電子伝達系の機能が保持されているかどうかを直接観測できるからであると推察している。DCMU暴露・非暴露区で差が見られないことは、電子伝達系の機能が停止している、つまり品質が劣化していることを示す。

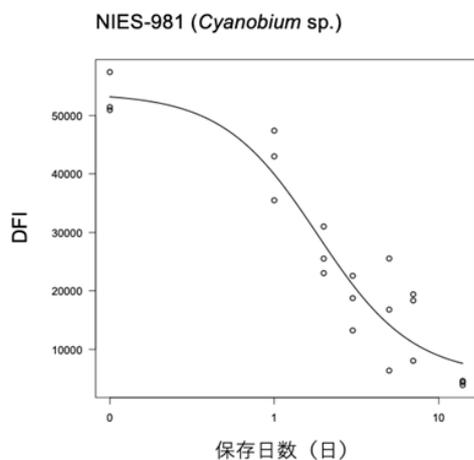


図10 推定半減期 NIES-981 乾燥物の劣化加速試験結果。37°C条件で10日間保存が4°Cで20年間の保存に相当すると仮定した。ガラスアンプル中において理想的な条件で保存した場合の推定半減期は約2.63年と計算された。

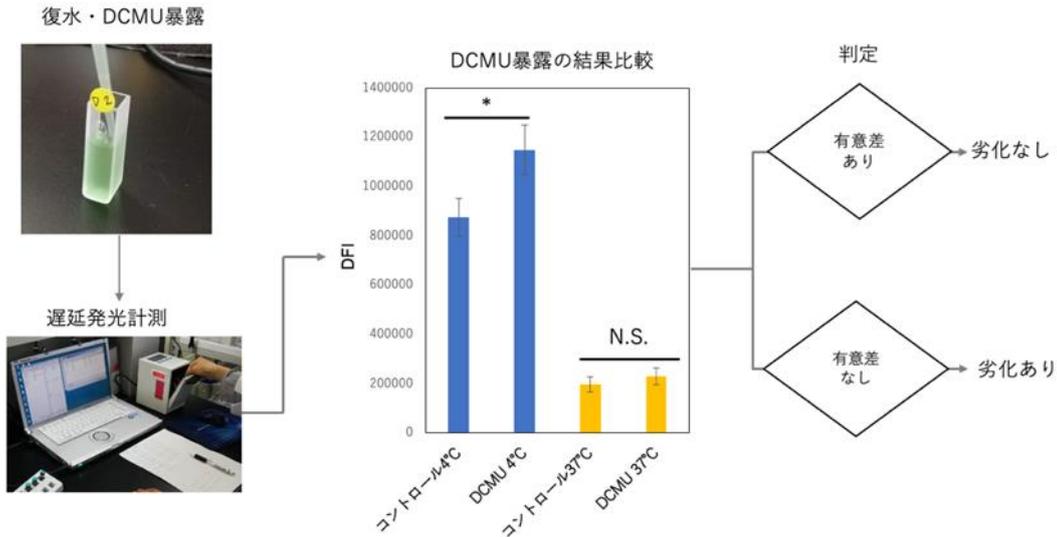


図 11 藻類乾燥物の品質チェックのフロー。中央の棒グラフは実際の実験例。37°Cで保存した場合は品質劣化が加速している。品質が劣化している場合、DCMU を暴露してもコントロールと比べて有意差が見られない (N.S.)。\*P<0.05。

## 2.2.4 まとめ

本研究では藻類 L 乾燥物を利用したバイオアッセイ方法を確立した。L 乾燥物の遅延発光応答は、生体細胞による遅延発光応答とは異なり、最短 0 分から数十分で検出可能であることがわかった。本研究では真空ガラスサンプルを使わない L 乾燥物作製方法を確立し、バイオアッセイとして利用できる品質を保持していることを確認した。さらに、光合成電子伝達阻害剤である DCMU を暴露させ、藻類の光合成機能が保持されているかどうかを見ることにより、L 乾燥物の品質を迅速にチェックする方法を確立した。L 乾燥物を利用したバイオアッセイは、藻類を試薬のように取り扱うことが可能であり、試験に必要な分だけを前培養なしに利用でき、再現性の高いバイオアッセイを実施できる。将来的には海底鉱物資源開発海域における洋上での環境影響評価だけでなく、港湾などの沿岸環境や河川、湖等の陸水や鉱山などの陸上における有害物質検知の一次スクリーニングとしても利用されることが期待される。

## 引用文献

- 1) Boschen, R. E., Rowden, A. A., Clark, M. R., & Gardner, J. P. A. (2013). Mining of deep-sea seafloor massive sulfides: A review of the deposits, their benthic communities, impacts from mining, regulatory frameworks and management strategies. *Ocean and Coastal Management*, 84, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2013.07.005>
- 2) Hauton, C., Brown, A., Thatje, S., Mestre, N. C., Bebianno, M. J., Martins, I., ... Weaver, P. (2017). Identifying toxic impacts of metals potentially released during deep-sea mining—a synthesis of the challenges to quantifying risk. *Frontiers in Marine Science*, 4, 368. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00368>
- 3) OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (2011). Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Retrieved from [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test\\_9789264069923-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en)

- 4) Ota, S., Fuchida, S., Yamaguchi, H., Yamagishi, T., Yamamoto, H., Koshikawa, H., & Kawachi, M. (2022). Propidium iodide staining and flow cytometry-based assessment of heavy metal impact on marine phytoplankton. *Cytologia*, 87(2), 177–187. <https://doi.org/10.1508/cytologia.87.177>
- 5) Van Dover, C. L. (2011). Tighten regulations on deep-sea mining. *Nature*, 470 (7332), 31–33. <https://doi.org/10.1038/470031a>
- 6) Wedding, L. M., Reiter, S. M., Smith, C. R., Gjerde, K. M., Kittinger, J. N., Friedlander, A. M., ... Crowder, L. B. (2015). Managing mining of the deep seabed: Contracts are being granted, but protections are lagging. *Science*, 349(6244), 144–145. <https://doi.org/10.1126/science.aac6647>
- 7) Yamagishi, T., Fuchida, S., Katsumata, M., Horie, Y., Mori, F., Kitayama, A., ... Tatarazako, N. (2018). Evaluation of the toxicity of leaches from hydrothermal sulfide deposits by means of a delayed fluorescence-based bioassay with the marine cyanobacterium *Cyanobium* sp. NIES-981. *Ecotoxicology*, 27(10), 1303–1309. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1989-2>

## 2.3 外洋性植物プランクトンへの重金属等の影響及び SSD 解析

### 2.3.1 背景と目的

近年、欧米では、多様な生物種全体を考慮した定量性の高い影響評価を目的に、種の感受性分布 (Species Sensitivity Distribution、SSD) の概念を用いた影響評価手法が主流となりつつある。SSD は、多数の生物種の感受性は対数正規分布に適合するという仮説を前提に、累積確率分布で種間の感受性差を統計学的に表現したものである。一方で、SSD は、ある一定数以上の毒性データ (EC50 値) を必要とすることから (通常異なる 5 生物種以上の毒性データ)、信頼性の高い毒性データを可能な限り取得することが信頼性の高い SSD の構築の鍵となる。

また、これまで、化学物質等の影響評価やリスク評価は個別の化学物質を対象として進められてきており、一般環境中で想定されるような、複数化学物質の暴露影響 (化学物質の複合影響) についての検討が進んでいない。より実環境に則した生態影響評価を目的に、近年では、Backhaus (2000) らの、個別物質の影響が相加的に作用すると仮定した Concentration addition (CA) モデルや個別物質の影響が独立に作用すると仮定した Independent action (IA) モデルを活用した複合影響の予測手法に関する研究などが数多く発表されている。さらに、2011 年には、人健康を想定したものであるものの、WHO/IPCS フレームワークが提示されており、現在、生態影響の複合影響評価手法についても検討が進められている。

本研究課題「海底鉱物資源開発における実用的環境影響評価技術に関する研究」においては、基本的には単一の生物種 (藻類) を用いた、個別の金属種の影響評価を想定しており、SSD を用いた多様な藻類種全体を考慮した影響評価と複数の金属種の同時暴露を想定した複合影響評価が課題となっていた。

本サブテーマでは、より実環境に則した生態影響評価を目的に、第一に Ota (2019) らの複数藻類種における重金属毒性データ (表 5) を活用することで、Zn、Pb 及び Cu について信頼性の高い SSD を構築した。さらに、Zn、Pb 及び Cu について、Backhaus (2000) らの複合影響予測モデルを用いた複合影響評価を行うとともに、ケーススタディーとして複数物質によって影響を受ける種の割合を算出した。

表 5 解析に用いた Zn、Pb、Cu の EC50 値\* (mg/L) のまとめ (Ohta et al. 2019 から引用)

系統番号	綱名	種名	Zn (mg/L)	Pb (mg/L)	Cu (mg/L)
NIES-981	Cyanophyceae	<i>Cyanobium</i> sp.	0.0005	3.62	0.06
NIES-969	Cyanophyceae	<i>Synechococcus</i> sp.	0.001	0.57	0.007
NIES-971	Cyanophyceae	<i>Synechococcus</i> sp.	0.034	1.80	0.02
NIES-1411	Prasinophyceae	<i>Micromonas pusilla</i>	0.6	2.59	2.30
NIES-2670	Mamiellophyceae	<i>Bathycoccus prasinos</i>	-	0.17	-
NIES-2587	Eustigmatophyceae	<i>Microchloropsis gaditana</i>	5.13	1.72	2.89
NIES-1000	Prymnesiophyceae	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.79	0.93	1.34
NIES-1001	Prymnesiophyceae	<i>Dicrateria rotunda</i>	0.70	-	1.42
NIES-1310	Prymnesiophyceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	2.42	2.36	1.51
NIES-613	Dinophyceae	<i>Amphidinium kkebsii</i>	1.39	0.29	-
NIES-323	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema marinoi-dohrnii</i>	0.15	-	-
NIES-988	Cyanophyceae	<i>Synechococcus</i> sp.	0.04	-	-
NIES-1046	Bacillariophyceae	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	-	1.96	-

\*それぞれの EC50 値は各濃度区の生長阻害率データ n=3 or 4 の平均値を用いて算出した。

### 2.3.2 方法

#### (1) EC50 値の算出

Ota (2019) らの複数藻類種における重金属毒性データを活用して、EC50 値を Log-logistic モデル (2 パラメーター) (式 1) を用いて回帰した濃度反応曲線から算出した。

$$f(x; b, e) = \frac{1}{1 + \exp(b[\log(x) - \log(e)])} \quad (1)$$

$x$  : 濃度  
 $b, e$  : パラメーター

#### (2) SSD 解析

SSD のグラフは、基本的に Aldenberg and Jaworska (2000) に従い、それぞれの種で算出された EC50 値に基づき累積確率を  $(No. - 0.5) /$  属数で算出し、濃度 (EC50 値) を横軸に、累積確率 (影響を受ける種の割合) を縦軸にプロットして作成するとともに、作成した SSD から HC5 (5% Hazardous Concentration: 5% の種が影響を受ける濃度) を算出した。

#### (3) CA 法及び IA 法による複合影響の予測

個別物質の影響が相加的に作用すると仮定した Concentration addition (CA) 法、独立的に作用すると仮定した Independent action (IA) 法により、混合溶液の影響を予測した。予測値は Backhaus ら<sup>9)</sup>の示す計算手順によって以下のよう算出した。

CA 法は、濃度  $C$  を  $x\%$  影響値  $EC_x$  で割った毒性単位  $TU$  を足し算することで、混合溶液の毒性単位を求められると仮定している。式 2 のように表され、 $TU$  の総和が 1 になるとき、混合溶液は  $x\%$  の影響を示す。

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x_i}} = 1 \quad (2)$$

$C_i$  : 混合溶液中の物質  $i$  の濃度  
 $EC_{x_i}$  : 物質  $i$  単独で  $x\%$  の影響を及ぼす濃度

このとき混合溶液の物質  $i$  の成分比  $p_i$  が一定であれば、 $x\%$  の影響を示すときの混合溶液の濃度を  $EC_{x_{mix}}$  とすると、 $c_i$  は式 3 で表され、これにより式 2 は式 4 に書き直される。

$$c_i = p_i EC_{x_{mix}} \quad (3)$$

$$EC_{x_{mix}} = \left( \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x_i}} \right)^{-1} \quad (4)$$

$p_i$  : 混合溶液中の物質  $i$  の (成分比) 濃度比  
 $EC_{x_{mix}}$  : 混合溶液で  $x\%$  の影響を及ぼす濃度

IA 法はそれぞれの影響は独立な事象で起きると仮定しており、濃度  $C_{mix}$  の混合溶液の影響は式 5 のように表現される。

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(C_i)] \quad 5$$

$E(C_{mix})$  :  $i$  個の物質の合計濃度  $c_{mix}(=\sum c_i)$  における混合溶液の影響%  
 $E(C_i)$  : 混合溶液中の物質  $i$  の、濃度  $c_i$  における単独影響%

まず、CA法の式4からx% (x=1~99) 影響を示す混合溶液の濃度  $EC_{x_{mix}}$  を算出した。この混合溶液中の各物質 i の濃度  $c_i$  を式3によって算出し、式5に代入することで、CA法においてx%の影響を示す混合溶液がIA法において及ぼす影響  $E(C_{mix})$  を算出した。これをx=1~99%についてそれぞれ算出することで濃度反応曲線を得た。

### 2.3.3 結果と考察

#### (1) Zn、Pb及びCuの種の感受性分布

Ota (2019) らの複数藻類種における重金属毒性データ (EC50 値) をもとに累積確率を算出し (表6、表7、表8)、SSDのグラフを作成した (図12)。Znについては、合計11種の藻類について累積確率が得られ (表6)、SSDのグラフからは特に藍藻類の感受性が高いことが明らかになった (図12)。また、11種の中で *Cyanobium* sp. の感受性が最も高く (図12)、ZnのSSDから算出されたHC5 (5% Hazardous Concentration: 5%の種が影響を受ける濃度あるいは95%の種が保護される濃度) は0.0008 mg/Lであった。Pbについては、合計10種の藻類について累積確率が得られ (表7)、SSDのグラフからは特に分類群特異的な感受性差の傾向は見られなかった (図12)。PbのSSDから算出されたHC5は0.19 mg/Lであった。Cuについては、合計8種の藻類について累積確率が得られ (表8)、SSDのグラフからはZnの場合と同様に藍藻類の感受性が高いことが明らかになった (図12)。また、CuのSSDから算出されたHC5は0.0023 mg/Lであった。

表6 藻類11種におけるZnの毒性値の解析

No. (属数)	系統番号	種名	EC50 値 (mg/L)	累積確率
1	NIES-981	<i>Cyanobium</i> sp.	0.0005	0.04545455
2	NIES-969	<i>Synechococcus</i> sp.	0.001	0.13636364
3	NIES-971	<i>Synechococcus</i> sp.	0.034	0.22727273
4	NIES-988	<i>Synechococcus</i> sp.	0.04	0.31818182
5	NIES-323	<i>Skeletonema marinoi-dohrnii</i>	0.15	0.40909091
6	NIES-1411	<i>Micromonas pusilla</i>	0.6	0.5
7	NIES-1001	<i>Dicrateria rotunda</i>	0.70	0.59090909
8	NIES-1000	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.79	0.68181818
9	NIES-613	<i>Amphidinium kkebsii</i>	1.39	0.77272727
10	NIES-1310	<i>Emiliana huxleyi</i>	2.42	0.86363636
11	NIES-2587	<i>Microchloropsis gaditana</i>	5.13	0.95454545

表7 藻類10種におけるPbの毒性値の解析

No. (属数)	系統番号	種名	EC50 値 (mg/L)	累積確率
1	NIES-2670	<i>Bathycoccus prasinos</i>	0.17	0.05
2	NIES-613	<i>Amphidinium kkebsii</i>	0.29	0.15
3	NIES-969	<i>Synechococcus</i> sp.	0.57	0.25
4	NIES-1000	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.93	0.35
5	NIES-2587	<i>Microchloropsis gaditana</i>	1.72	0.45
6	NIES-971	<i>Synechococcus</i> sp.	1.8	0.55
7	NIES-1046	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	1.96	0.65
8	NIES-1310	<i>Emiliana huxleyi</i>	2.36	0.75
9	NIES-1411	<i>Micromonas pusilla</i>	2.59	0.85
10	NIES-981	<i>Cyanobium</i> sp.	3.62	0.95

表 8 藻類 8 種における Cu の毒性値の解析

No. (属数)	系統番号	種名	EC50 値 (mg/L)	累積確率
1	NIES-969	<i>Synechococcus</i> sp.	0.17	0.05
2	NIES-971	<i>Synechococcus</i> sp.	0.29	0.15
3	NIES-981	<i>Cyanobium</i> sp.	0.57	0.25
4	NIES-1000	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.93	0.35
5	NIES-1001	<i>Dicrateria rotunda</i>	1.72	0.45
6	NIES-1310	<i>Emiliana huxleyi</i>	1.8	0.55
7	NIES-1411	<i>Micromonas pusilla</i>	1.96	0.65
8	NIES-2587	<i>Microchloropsis gaditana</i>	2.36	0.75

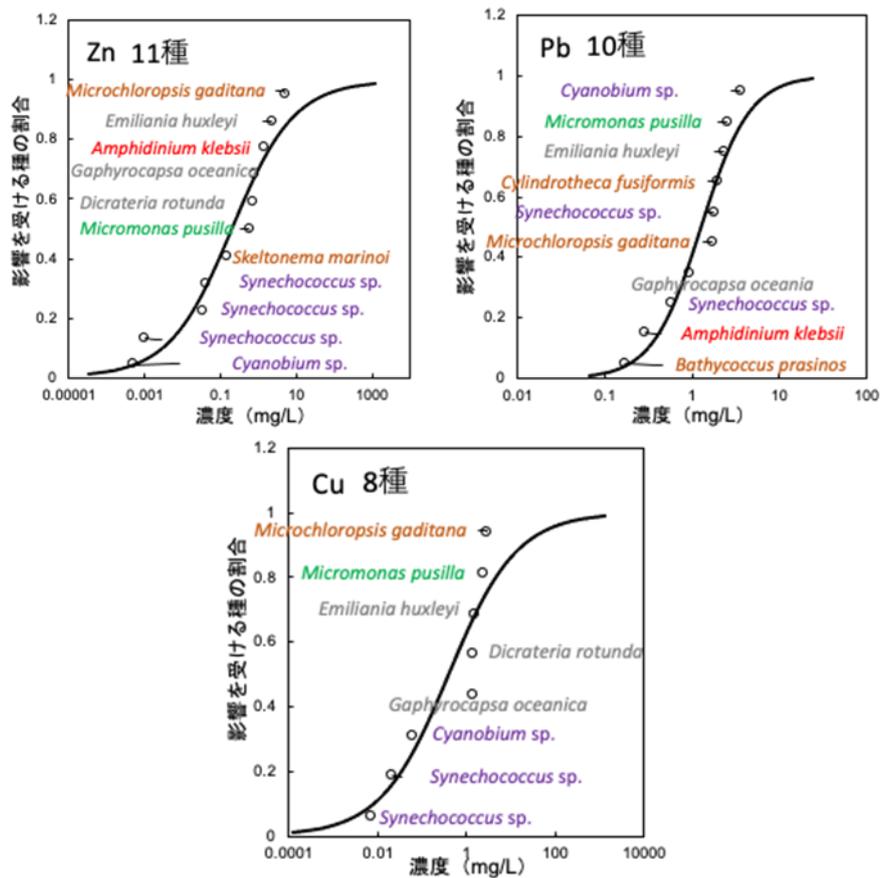


図 12 Zn、Pb 及び Cu の種の感受性分布。

紫：Cyanobacteria、茶：Ochrophyta、緑：Chlorophyta、灰：Haptophyta。

(2) SSD を用いた複合影響分析 (Zn、Pb、Cu のケーススタディー)

Zn、Pb 及び Cu の SSD を濃度反応関係とみなし、CA モデルを適用することで複数物質によって影響を受ける種の割合 (multi substance potentially affected fraction, msPAF) (de Zwart and Posthuma 2005) を算出した。

Zn、Pb、Cu の割合を Zn : Pb : Cu = 0.023 : 21 : 2.3 (*Cyanobium* sp. で各金属の毒性が等しくなる場合 : 0.33TU (EC50 の 1/3)) とした場合の HC5 は 0.047 mg/L と算出された (図 13)。また、Zn、Pb、Cu (Zn : Pb : Cu = 0.023 : 21 : 2.3) の CA モデルから算出した EC50 値に基づく SSD は msPAF の曲線とほぼ一致した (図 13)。

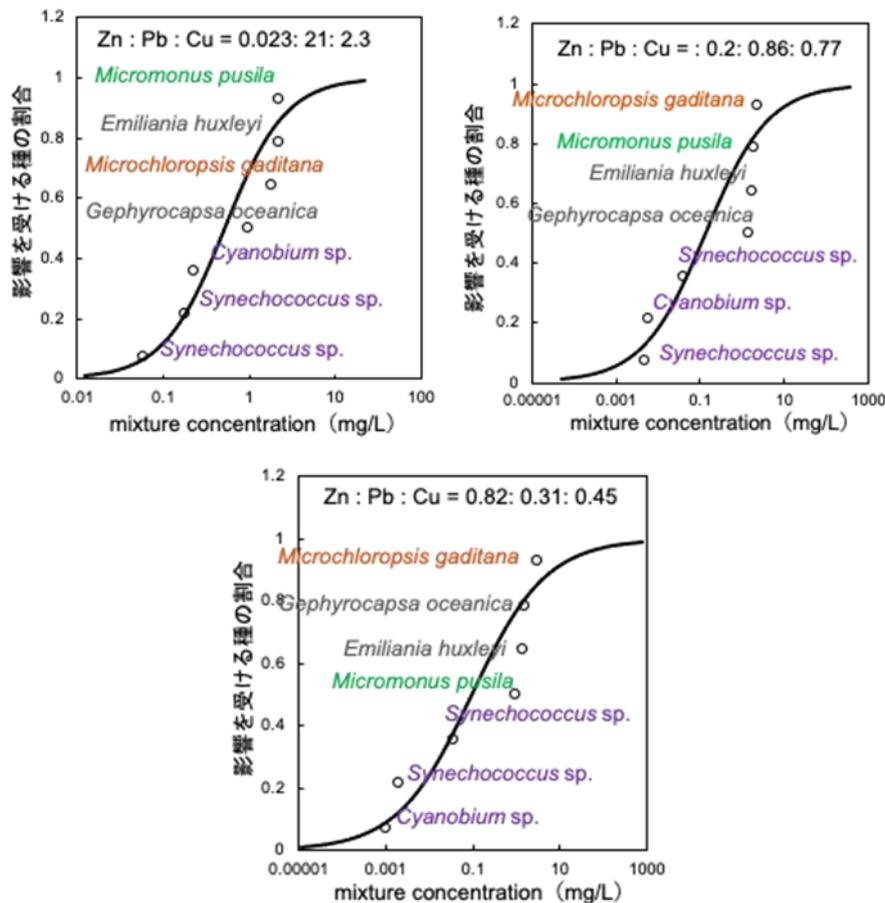


図 13 複数物質によって影響を受ける種の割合。

Zn : Pb : Cu = 0.023 : 21 : 2.3 は *Cyanobium* sp. で各金属の毒性が等しくなる場合、Zn : Pb : Cu = 0.2 : 0.86 : 0.77 は *Micromonas pusilla* で各金属の毒性が等しくなる場合、Zn : Pb : Cu = 0.82 : 0.31 : 0.45 は *Gephyrocapsa oceanica* で各金属の毒性が等しくなる場合。実線 : msPAF、プロット : CA モデルから算出した EC50 値に基づく SSD。

Zn、Pb、Cu の割合を Zn : Pb : Cu = 0.2 : 0.86 : 0.77 (*Micromonas pusilla* で各金属の毒性が等しくなる場合 : 0.33TU (EC50 の 1/3)) とした場合の HC5 は 0.0009 と算出された (図 13)。また、Zn、Pb、Cu (Zn : Pb : Cu = 0.2 : 0.86 : 0.77) の CA モデルから算出した EC50 値に基づく SSD は msPAF の曲線とほぼ一致した (図 13)。Zn、Pb、Cu の割合を Zn : Pb : Cu = 0.82 : 0.31 : 0.45 (*Gephyrocapsa oceanica* で各金属の毒性が等しくなる場合 : 0.33TU (EC50 の 1/3)) とした場合の HC5 は 0.0003 と算出された (図 13)。また、Zn、Pb、Cu (Zn : Pb : Cu = 0.82 : 0.31 : 0.45) の CA モデルから算出した EC50 値に基づく SSD は msPAF の曲線とほぼ一致した (図 13)。

SSD に CA モデルを適用することで算出した msPAF の曲線と CA モデルから算出した EC50 値に基づく SSD がほぼ一致したことは、msPAF 算出の戦略が一定の信頼性を有することを示している。また、本研究におけるケーススタディーでは、特に 3 種の重金属 (Zn、Pb、Cu) にフォーカスしたが、今後は実際のコアサンプルの溶出プロファイルを参考にして、より実態に則した金属種の選定とそれぞれの金属濃度比を設定した検証が必要であると考えられる。このために、信頼性の高いさらなる金属データベースの構築が求められる。さらに、現在、重金属の作用機序に関する知見は限定的であることから、msPAF の算出には CA-IA 混合モデルを適用せずに、相加作用を前提とした CA モデルのみを適用した。今後は、金属の複合影響評価における CA モデル適用の是非に関する検証も必要である。

#### 2.3.4 まとめ

Ota (2019) らの複数藻類種における重金属毒性データ (EC50 値) をもとに累積確率を算出し、Zn、Pb 及び Cu について SSD のグラフを作成するとともに 3 種の金属について HC5 を算出した。さらに、作成した 3 つの SSD に CA モデルを適用することにより、msPAF を算出した。msPAF の実験的な検証は困難であるが、msPAF の曲線と CA モデルから算出した EC50 値に基づく SSD がほぼ一致したことから、本研究で用いた msPAF 算出のストラテジーは一定の信頼性を有することが示された。Zn、Pb、Cu 以外の金属毒性データの整備がさらに進めば、実態に則した金属の組み合わせと混合比の設定が可能になることから、SSD を用いた複合影響モデルは、限られたスペースと十分な実験環境が望めない海底資源掘採現場において、環境リスク評価の有用なツールとなり得ると結論する。

#### 引用文献

- 1) Aldenberg, T., Jaworska J.S. (2000). Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 1-18.<https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1869>
- 2) Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H. (2000). The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology*, 49, 49-61.[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00069-7)
- 3) De Zwart, Posthuma, L. (2005). Complex mixture toxicity for single and multiple species: Proposed methodologies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2665-2676.<https://doi.org/10.1897/04-639R.1>
- 4) Ota, S., Yamaguchi, H., Vanel, F., Fuchida, S., Koshikawa, H., Yamagishi, T., Yamamoto, H., Kawachi, M. (2019). Differential heavy metal sensitivity in seven algal species from NIES culture collection based on delayed fluorescence assays. *Phycological Research*, 68, 41-49.<https://doi.org/10.1111/pre.12403>

## 2.4 リアルタイム水質監視システムの開発

### 2.4.1 背景と目的

次世代の金蔵資源として海底鉱物が注目されている。東太平洋のクラリオン・クリッパートン海域に賦存するマンガン団塊など公海上の資源については、国際海底機構 (ISA) が 2000 年代以降、深海資源の探査に関する鉱業規則を定め、近年になって実際に海底資源を採掘するための規則やガイドライン、すなわち商業的な開発・生産を見据えたルール作りを進めている (International Seabed Authority, 2019)。草案段階の採掘規則及び附属書では、海洋環境保全に資する採掘方法のほか、採掘操業中の環境影響評価のためにモニタリングすべき対象に関しても記述され、深海環境及び生態系のみならず、表層水質及び植物プランクトンや一次生産を含めた表層生態系もモニタリング対象として挙げられている。ISA の鉱業規則の対象範囲は公海に限られるが、近い将来見込まれる日本の領海及び排他的経済水域の海底鉱物資源の採掘においても、国際的標準である ISA の鉱業規則に準じたルールの下での実施が求められるようになると考えられる。

我々研究グループは、本研究課題に先立ち行われた第 1 期 SIP「次世代海洋資源調査技術」課題 (2014~2018 年度) において、沖縄トラフ海域の海底熱水鉱床を対象として鉱物資源採掘中の環境影響の検討及び評価手法の開発を実施した。その中で、海底鉱石の海水への金属類溶出に関する試験を行い、深海よりも温度や溶存酸素濃度の高い表層環境において、金属類の溶出が促進されることが明らかとなった (Fuchida et al., 2018; Fuchida et al., 2021)。深海掘削による地形の直接的な変化や濁質の発生、それらに伴う深海生態系への影響などは海底鉱物資源開発における環境影響として従来からしばしば指摘されてきたが、鉱石からの金属溶出が表層環境において促進されるという結果は、揚鉱作業や洋上での鉱石の一時保管といった採掘操業プロセスにおいて、表層水質及び生態系に対する影響リスクが増大することを示唆している。採掘プロセスにおける深海環境の影響評価や影響軽減策の必要性は言うまでもないが、海洋表層への鉱石粒子や溶出成分を多く含む海水の流出防止の徹底、それらの流出を監視するための実用的な水質モニタリング手法の提案、確立が求められている。

ISO 登録などの国際標準化を進めた洋上バイオアッセイ法は、洋上でのオンサイト分析が困難な海水中の微量金属分析に代えて、現場水質モニタリングを実現するための有望技術である。しかし、洋上バイオアッセイ法は、微量金属分析と同様に、サンプリングから分析結果が得られるまでに数時間以上が必要であり、また実験的な操作を要する。このため、連続操業が行われるような現場であっても、昼夜の連続的なモニタリングへの適用は難しい。

本研究では、こうしたモニタリングの連続性の確保に関する課題を解決するため、パルス変調蛍光 (以下、PAM という) (Schreiber, 2004) により測定される蛍光量子収率の変動に基づく、表層水の連続水質モニタリングシステムの開発を進めた。蛍光量子収率は植物の光化学系 II に吸収された光エネルギーの光合成利用効率であり、海水に浮遊した植物プランクトンを非破壊のまま数秒以内で測定可能である。光合成速度や活性を推定するためのパラメーターとして利用されるほか、重金属などの光合成器官、光合成電子伝達系、光合成に関わる酵素反応などを劣化・阻害する物質の存在により迅速に応答・低下することが知られている (Kumar et al., 2014)。化学分析の定量的な情報と比較すると間接的な水質情報ではあるものの、海底鉱物資源開発現場の表層に存在する植物プランクトンの蛍光量子収率を連続的に測定することにより、金属類の混入による水質劣化の発生の有無を連続的に監視するためのツールになると考えられた。

PAM を用いた連続モニタリングシステムの開発は、第 1 期 SIP 前半 (2015~2016 年) に実施した沖縄トラフ海域表層水を用いた船上でのフラスコレベルの金属添加実験 (回分実験) において蛍光量子収率の低下応答を確認し、2017 年度より着手した。基本システムは 2017~2018 年度に製作され、実海域での基礎試験を行った。2019 年度に開始された本研究課題では、2018 年度までの試験で取得したデータの解析、その結果に基づく本システムの特許出願 (国内及び米国、仏国、中国特許)、ならびに基礎結果を基に本システムの実用化に向けた改良を行った。

本稿では、2018 年度までに取得した観測データの解析結果と本システムの新規性 (特許化のポイント) を示すとともに、本研究課題において行ったシステムの改良内容について報告する。また、本研究課題期間後の 2022 年 8 月に行われた改良型システムの実海域における長期連続稼働試験の結果について紹介する。なお、本システムは、海底鉱物資源開発現場の植物プランクトン (phytoplankton) の蛍光量子収率の連続的な変化に基づくリアルタイムな水質異常の発報 (alert) を目標としており、我々は Phyto-Alert System と名付けている。

## 2.4.2 方法

### (1) Phyto-Alert System の概要

第1期 SIP 期間中に開発した Phyto-Alert System (初期型) の概要とその動作スケジュールを図14に示す。本システムに供給する現場海水は調査船(作業船)の船底からポンプ等により揚水され、3つの5Lの遮光反応槽に一定時間、一定流量で順次貯水される(e.g. 5L/15min)。反応槽内の海水は、スターラで穏やかに混合されながら、一定時間、暗条件で保持又は反応槽上面に設けたLED装置により弱光が照射される。遮光処理又は弱光照射処理を行った海水は、チューブポンプにより一定流量で排水される。反応槽とチューブポンプの間には蛍光量子収率計(PAMセンサー)が設けられ、短い時間間隔(e.g. 1min)で蛍光量子収率の測定が行われる。

図14の動作スケジュールに示すように3つの反応槽への海水の受水、遮光処理又は弱光照射、排水・測定を、時間差を設けて繰り返す(カスケード動作)ことにより、現場植物プランクトンの取水時間平均の蛍光量子収率が測定される。また各反応層の蛍光量子収率は複数回測定(e.g. 15回/15min)され、外れ値検定(Smimov-Grubbs Test)により測定異常値を除いた後、平均値が算出される。各反応層の流路切替用の電磁弁はプログラマブルロジックコントローラ(PLC)(三菱電機社製シーケンサ、FX3シリーズ)により自動制御が行われる。PAMセンサー(Walz社Water PAM又はFlowthrough PAM)はWindows用測定ソフトウェアWinControl-3(Walz社)のバッチプログラムにより測定タイミング制御とデータ保存が行われる。チューブポンプ(L/Sデジタルポンプ、Cole-Parmer社)は内蔵タイマーを用いて蛍光量子収率測定中に送液動作を一時停止するよう制御される。

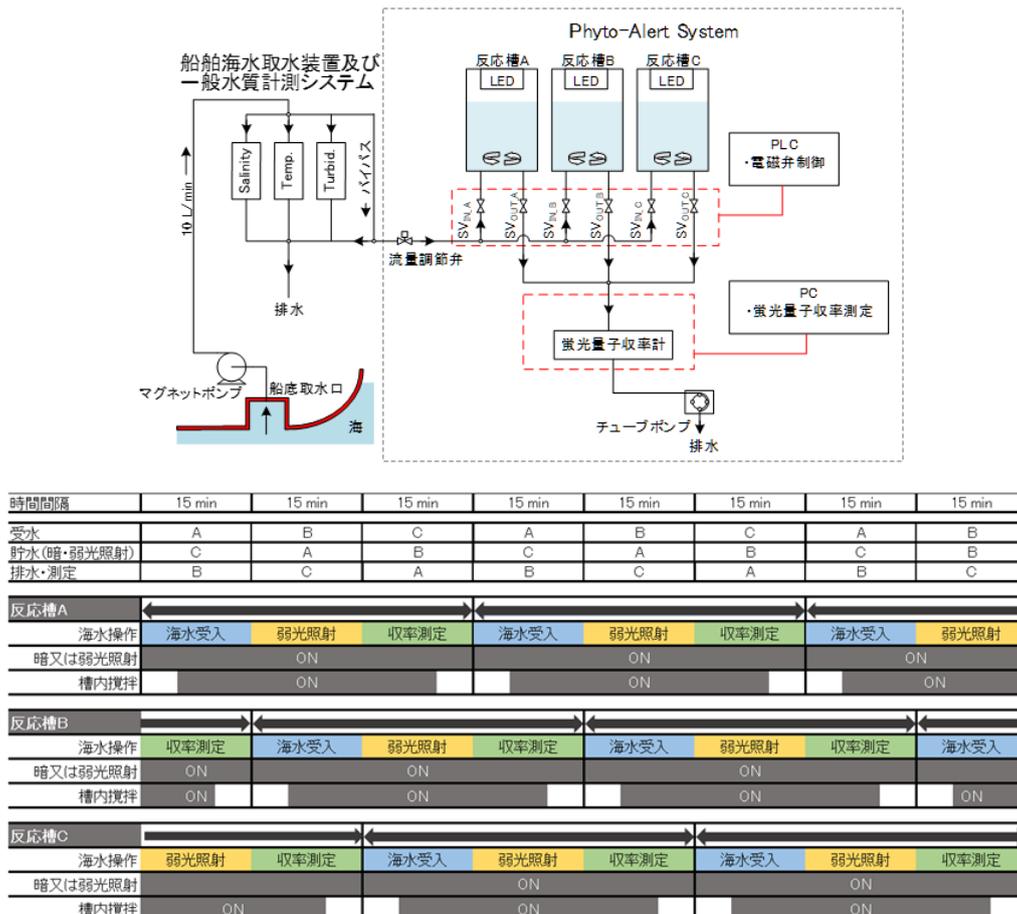


図14 リアルタイム水質監視システム(Phyto-Alert System)の概要図とカスケード動作スケジュール。

本システムの開発にあたっては、外洋表層水の水質(水温、塩分、栄養塩や微量必須元素濃度など)は、台風などの急激な海象変化が生じない限り数日から数週間にわたって安定的で、現場に生息する植物プランクトンの蛍光量子収率

も水質に依存した変動はほとんど生じないと仮定した。この仮定が成り立つならば、自然の変化幅を超える蛍光量子収率の低下を検出することにより、現場植物プランクトンの光合成機構を低下させる何らかの生態阻害物質の混入の可能性、すなわち水質劣化イベントの検出が可能となると考えた。

開発当初は、遮光性反応槽に供給した表層海水は暗所に一定時間 (e.g. >15min) 保持し、その後、蛍光量子収率を測定する動作を適用した。昼夜で異なる光環境に曝された現場植物プランクトンは、昼夜で異なる光化学系 II の酸化還元状態を有すると言われ蛍光量子収率を変化させると考えられたが、採取した表層水を一定時間、暗所に保持 (暗順応処理) することにより光化学系 II は完全に酸化され、昼夜の酸化還元状態の変化が引き起こす蛍光量子収率の変化を除去することができる考えた。なお、暗順応処理により光化学系 II が完全に酸化されたときの蛍光量子収率は、その植物の光合成における最大利用効率に相当し、最大蛍光量子収率 (Fv/Fm) と呼ばれる (Baker, 2008)。

しかし、2018 年までの沖縄トラフ海域における試験結果は、設計当初の予想とは異なり、遮光反応槽で暗順応させた表層水の植物プランクトンの Fv/Fm は昼夜で大きく変動し、かつ空中の光合成有効放射 (PAR) の変化と負の相関を有することが明らかとなった (図 15 左)。南中時の空中 PAR は最大 1000~2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に達しており、過剰な光に曝された日中の植物プランクトンは、吸収した光の一部を日中以外の時間帯よりも大きな割合で熱として散逸させる機構を発現させ、その結果、Fv/Fm が低下したものと推定された。また、強光により発現した熱放散機構が強まった光化学系 II は、暗順応処理 (15~30 分) のみでは、弱光 (朝・夕) や暗所 (夜間) の状態に戻すことはできないことも明らかとなった。

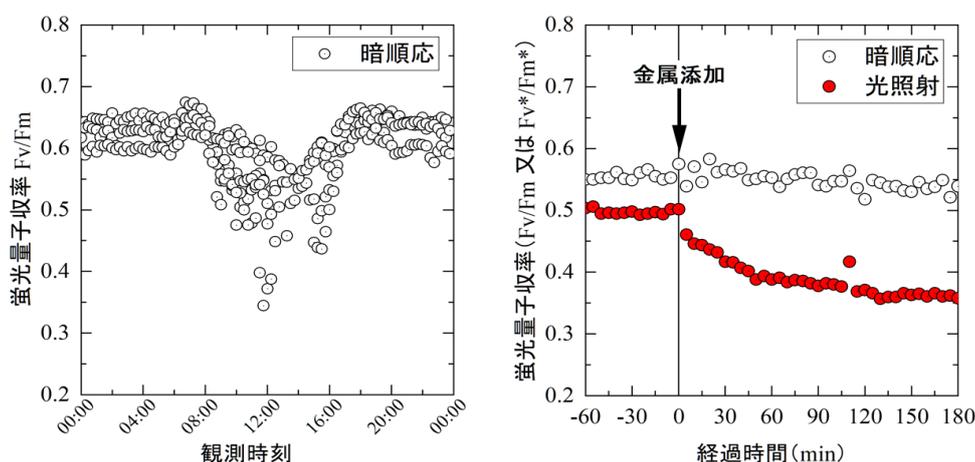


図 15 左: 暗順応処理を適用した Phyto-Alert System における蛍光量子収率 Fv/Fm の日内変化 (72 時間観測値のオーバーレイ)、右: 表層水に金属を添加したときの蛍光量子収率の時間応答 (暗順応処理及び光照射処理の比較)。

また、表層水への金属類暴露に対する Fv/Fm の応答特性を把握するために、Phyto-Alert System と同じ遮光反応槽に表層水を貯水し、反応槽内の試水に Zn 及び Pb (最終濃度 1 ppm 及び 0.3 ppm) を添加するバッチ実験を行った。本バッチ実験では反応槽の試水を微小流量で連続的に排出し PAM センサーに導入し、Fv/Fm の時間変化を測定した。その結果、遮光反応槽内の試水に金属を添加しても、Fv/Fm はほとんど変化しないことが示された (図 15 右、「暗順応」のプロット)。この結果は、システム開発前のフラスコレベル実験で確認されていた金属暴露に対する Fv/Fm の高い感受性 (暴露後に急速に低下) とも異なった。フラスコレベルの金属暴露実験は、Fv/Fm 測定直前の暗順応処理を除いて、室内光又は照明付培養庫内で行われていた。このことは、金属暴露による光化学系 II の阻害は光エネルギーが利用可能な環境において生じやすいことを示唆した。遮光反応槽内では、新たな光合成反応が起こらないために酸素産生が停止し、金属の生態毒性原因の 1 つである活性酸素の生成が抑えられ、その結果、Fv/Fm の短時間の低下がほとんど生じなかったものと推察された。

上記の結果は、1) 暗順応処理が適用された現場海水の  $F_v/F_m$  は昼夜の PAR 変化の影響を強く受けて変動し、したがって、昼夜連続観測における  $F_v/F_m$  の変動が PAR 変化の影響によるものなのか、金属等の光化学系 II 阻害物質の混入による影響なのかを判別することが容易ではないこと、さらに、2) 光化学系 II を阻害するレベルの金属混入が生じても、そのタイミングが夜間（暗所）であれば  $F_v/F_m$  の低下はほとんど起こらず、蛍光量子収率の水質劣化の検出手段としての機能が低下することを意味した。

暗順応処理によって測定される  $F_v/F_m$  は、様々な生育環境や化学物質に曝された植物の光合成活性を把握する手段として応用例も多い。しかしながら、我々の目標は、金属を中心とした光化学系 II 阻害物質の現場海域における連続観測・検出であり、その目標の達成は暗順応処理では困難であると考えられた。そこで、我々は、蛍光量子収率測定前の暗順応処理を取り止め、代わりに遮光反応槽の上部に簡易 LED 照明（デスクライト）を取り付け、取水から排出・測定までの間、海水に光を連続照射する方法を試みた。少なくとも、金属添加に対する蛍光量子収率の応答・低下が観察されることが期待された。前述した Zn 及び Pb を添加したバッチ実験と同様な試験を、遮光の代わりに LED 照射を与えながら行った。異なる日時に取得された表層水ではあるものの、遮光条件とは異なり、蛍光量子収率の明瞭かつ数十分以内の急速な低下が確認された（図 15 右、「光照射」のプロット）。また、複数濃度で金属を添加した実験では、添加濃度に応じて蛍光量子収率の低下速度が異なることも確認された（図 16）。なお、本試験では、反応槽から PAM センサーまでの流路は遮光チューブ、PAM センサー内は蛍光量子収率測定中の測定光及びパルス光以外の光源はないものの、反応槽に光を照射しながら検液を PAM センサーに導入している。したがって、ここで測定される蛍光量子収率は、最大蛍光量子収率  $F_v/F_m$  や PAM センサー内を含め一定の光を照射したときに測定される実効蛍光量子収率とは異なる。このため、本方式で測定される蛍光量子収率は  $F_v^*/F_m^*$  と定義、名付けた。

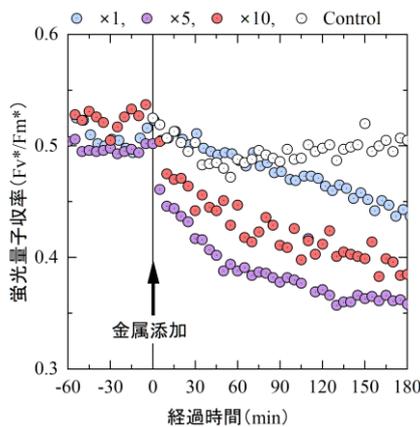


図 16 光照射下の表層水に Zn=0.2 ppm、Pb=0.06 ppm (x1)、5 倍 (x5)、10 倍 (x10) 濃度で添加又は無添加(Control)における  $F_v^*/F_m^*$  の経時変化。

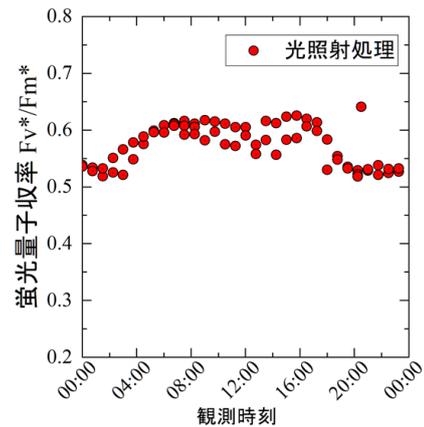


図 17 光照射処理を適用した Phyto-Alert System における  $F_v^*/F_m^*$  の日内変化（48 時間観測値値のオーバーレイ）。

バッチ実験に続き、Phyto-Alert System の反応槽上部に LED 照明を設け、表層水の  $F_v^*/F_m^*$  の昼夜観測を行った。その結果、現場の PAR に対する蛍光量子収率  $F_v^*/F_m^*$  の変動は、暗順応処理を行ったときの蛍光量子収率  $F_v/F_m$  の変動と比較して、かなり抑制されることが明らかとなった（図 17）。光阻害により低下した植物プランクトンの  $F_v/F_m$  が、 $F_v/F_m$  測定前の光照射によって回復する現象は、既に From et al. (2014) により報告されているが、光照射処理によって、昼夜変動が少ない蛍光量子収率  $F_v^*/F_m^*$  の測定が可能なが示された。なお、From et al. (2014) は、強光に曝された植物プランクトンに暗順応処理を行うと  $F_v/F_m$  の測定条件である光化学系 II の酸化は進むものの、外部からのエネルギー供給が途絶える暗条件の下では、強光下で熱放散型に変化した電子伝達系の光利用型への転換や、強光によって損傷を受けた細胞、光合成器官あるいは DNA の修復が十分に進まない可能性があるとして指摘している。Phyto-Alert System

による  $F_v^*/F_m^*$  の測定における光照射時間（平均 30 分）は、From et al.（2014）の照射時間（数時間）と比較すると短い、蛍光量子収率の回復は同様なメカニズムによって生じているものと考えられた。

## (2) 基本システムの課題と実用化に向けた改良

上述の試験により、表層から取水した海水に一定時間光を照射した後、蛍光量子収率を測定することによって、野外の光環境の影響を抑えた測定値が得られ、かつ蛍光量子収率を低下させるレベルの金属混入が夜間に生じていたとしても、光照射処理を加えることによって、検出が可能となると考えられた。一方、Phyto-Alert System の実用化にあたって幾つかの課題が残され、本研究課題において改良を行った。

### 1) 光照射処理の最適化のための実験と解析

初期の試験において、デスクライトを用いた光照射処理は蛍光量子収率の日内変化の抑制や金属に対する応答性の確保に有効であることが示されたが、最適な光の照射強度や照射時間に関する知見が不十分であった。このため、Phyto-Alert System にデジタル電源駆動の LED フラット照明（CCS 社 TH2）を組み込み、日中及び夜間に採取した表層海水に異なる強度の光を照射し、最適な光量及び照射時間の検討を行った。試験は 2018 年度に沖縄トラフ海域で行った。航海中の日中の 2 回（海面 PAR は  $800\sim 1200\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）、夜間に 3 回表層海水を採取し、それぞれ遮光反応槽に導入し、暗所で 30 分間保持した。その後、LED を点灯し、一時貯水槽の海水に  $300$ 、 $150$ 、または  $35\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  の光を 60 分間照射した。光照射を停止し、さらに 30 分間、暗所に保持した。反応槽の試水は、採水直後から小流量で排出し、 $F_v^*/F_m^*$  を 1 分間隔で測定した。

### 2) 連続モニタリング中の蛍光量子収率の測定精度の改善とオンライン解析のためのシステム改良

2018 年度時点の Phyto-Alert System では、反応槽の流路切替は PLC による制御、PAM センサーの測定間隔制御やデータ保存は PC の PAM センサー専用ソフトウェア（WinControl 3）、PAM センサーへの通水・一時止水を制御するチューブポンプはポンプ内蔵のタイマーが利用されていた。また、PAM 測定データと反応槽の流路切替ログは、それぞれ PC 及び PLC に独立して保存されていた。このため、PC 上に保存された測定データと PLC 上の反応槽の流路切替ログの照合や蛍光量子収率の時間変化などの解析は、それぞれの機器から別の PC 等にデータをダウンロードした上で、事後に行う必要があった。また、長時間の稼働では、タイマー誤差により蛍光量子収率の測定データの質の確保において重要な測定とポンプの一時停止の同期がしばしば損なわれた。連続観測及びリアルタイムな水質劣化情報の発報を目標とした本システムの実用化を進める上で、これらの課題の解決が求められた。そこで、本研究課題では、反応槽の流路切替制御及び切替ログ、PAM センサーの測定動作とデータ保存、PAM センサーの測定とチューブポンプの駆動制御などを 1 つの制御系に統合するシステム改良を行い、長時間稼働における測定精度維持及びオンラインでのデータ表示・解析を実現させた。具体的には、PAM センサーを制御していた専用ソフトウェアの機能の一部を独自開発の PLC プログラム及びタッチパネル式のユーザーインターフェイスを有するデータ解析装置（三菱電機シーケンサ FX5 及びグラフィックオペレーションターミナル GOT2000）に移植し、また反応流路制御用 PLC の制御状態の取得機能、ならびに PAM センサー制御用 PLC からの信号によりチューブポンプを駆動させるための機能の組み込みを行った。また、PLC プログラムによる PAM センサー制御では、試水のクロロフィル濃度に合わせた光電子倍增管のゲインの自動調整機能を新たに組み、長期連続観測における現場海域の植物プランクトン現存量の自然変動に対応した。

### 3) 改良システムを用いた海域における連続モニタリング試験

本研究課題において改良したシステムの実海域における試験は、乗船機会の都合により、本研究課題終了後の 2022 年 8 月に茨城県沖において実施された（JAMSTEC ちきゅう、CK22-02C 航海）。船上においてシステムの組み立てを行い、8 月 15 日～8 月 31 日までの 18 日間にわたり終夜運転を行った。反応槽への受水、光照射、排水・測定工程はそれぞれ 15 分に設定し、光照射は受水及び排水・測定工程中也継続した。観測開始から 3 日間は 3 つの反応槽について同

じ前処理を与え、その後、1つの反応槽についてはLED制御線を取り外すことにより、光照射の代わりに暗順応処理を与えた。光照射処理系と暗順応処理系の蛍光量子収率（それぞれ  $Fv^*/Fm^*$  及び  $Fv/Fm$ ）の日周変化を解析し、光照射処理の効果を確認するとともに、表層水の水質劣化を判定するための条件について検討を行った。

## 2.4.3 結果と考察

### (1) 光照射処理の最適化のための実験と解析

日中に採取した表層水の初期の蛍光量子収率は0.4~0.5の間であった（図 18-a）。その値は、暗所保持した30分間、ほとんど変化しなかった。光照射開始直後から上昇し約30~45分後には0.60~0.65に達した。光照射を停止した後、蛍光量子収率はほぼ一定に保たれた。日中に採取した海水に照射した光は150及び35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の2段階であるが、光照射による蛍光量子収率の上昇傾向にはほとんど差は認められなかった。夜間に採取した表層水の初期の蛍光量子収率は、0.55~0.65であった（図 18-b）。その値は、暗所保持した最初の30分間はほとんど変化せず、光を照射した続く60分間では僅かな低下が認められた。また、光照射を停止した後は、ほぼ一定に保たれた。

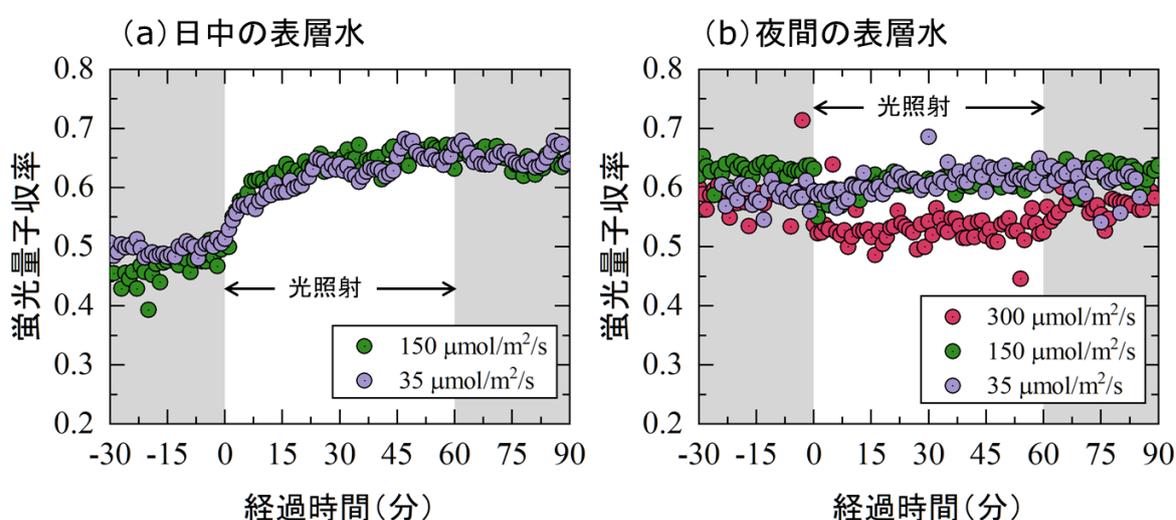


図 18 昼間 (a) 及び夜間 (b) に採取された沖縄トラフ表層水の光照射及び暗所保持に対する蛍光量子収率の応答。灰色帯は暗所保持、白帯は光を照射した時間帯。

以上の結果は、蛍光量子収率が低下した日中の表層水に35~150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を照射すると、蛍光量子収率は上昇し始め、約30~45分後には夜間の表層水の値近くまで回復すること、蛍光量子収率の回復後は、照射を継続しても、照射を停止しても、数十分から1時間はほとんど変化しないことを示した。また、夜間の表層水に光を照射しても、35~300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射では、昼間の表層水で観察されるような蛍光量子収率の低下は引き起こされず、また昼間の表層水に光照射したときのような蛍光量子収率の上昇も起こらないことを示した。

日中に採取した表層水に300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を照射する実験は行っていないが、夜間の表層水に300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を照射しても蛍光量子収率の低下はほとんど起こらず、その一方で、海面PARが300~500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超える海域の表層水の蛍光量子収率は明らかに低下することを踏まえれば、自然海域における蛍光量子収率の日内変動を抑制するための光照射の上限強度は、300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 前後であると推定された。光照射の下限強度は、35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光の照射でも十分な効果が認められたため、それ以下の強度であると推定された。改良型システムでは、反応槽内の水中光量を最大400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定可能な白色LEDシステムを採用したが、蛍光量子収率の回復に適した光強度の範囲は幅広く、民生用の安価な光源で得られる弱い光でも十分な性能が期待できることが示された。

光照射は、蛍光量子収率の上昇が停止するまで継続されること（例えば60分間）が望ましい。しかし、光照射の長時間化は表層海水の取水から蛍光量子収率の測定までの時間遅れにつながり、連続観測におけるリアルタイム性が損な

われる。実施例は限られるものの、日中に採取した表層水を用いた実験では、光照射開始から約 30 分で蛍光量子収率の最終回復値の 90%以上の回復が認められた。したがって、連続観測のリアルタイム性と蛍光量子収率の日内安定性の両立を考慮し、光照射時間は30分程度に設定することが妥当であると考えられた。なお、Phyto-Alert Systemにおいて30分間の光照射を実施するには、受水、光照射、排水・測定各工程を30分に設定する方法のほか、3つの工程を各15分に設定した上で、受水中及び排水・測定中にも光照射を継続することで、平均光照射時間を30分にすることができる。後者の方法を用いれば、受水期間と最初の測定値出力までの時間差は最短で15分となり、本システムのリアルタイム性も十分確保されることが考えられた。

光照射処理を取り入れた Phyto-Alert System では、光照射後の次工程として暗順応処理を設け、反応槽内の光照射によって還元された光化学系 II の酸化を促し、最大蛍光量子収率  $F_v/F_m$  で定義可能な蛍光量子収率の測定を行う方法も検討した。しかし、暗順応処理工程を設けることは、光照射時間の長時間化と同様に連続観測のリアルタイム性を損なう要因になるほか、実験データの解析によれば、光照射後に最大 30 分の暗所保持を行っても蛍光量子収率がさらに増加・安定化することは期待できないことが示された。すなわち、Phyto-Alert System においては、光照射処理に加えて暗順応処理を導入する利点は、測定した蛍光量子収率が  $F_v/F_m$  で定義され研究例も多い「最大蛍光量子収率  $F_v/F_m$ 」であること以外には、ほとんどないと考えられた。

以上の検討より得られた運転条件に関する知見（各処理工程の時間設定及び光照射強度等）は 2022 年 8 月に実施した実海域試験において活用した。

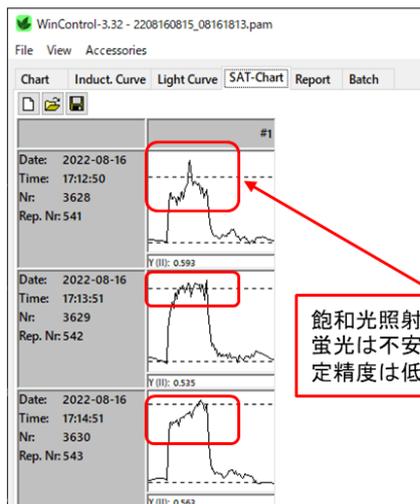
## (2) Phyto-Alert System の制御システム改良による測定精度の確保

PAM センサーによる蛍光量子収率の測定は、外光を遮蔽したチャンバーに導入された植物プランクトンを含む試水に、最初に光合成電子伝達を駆動しない強度のパルス変調測定光を照射し、試水の初期の蛍光収量  $F_o$  が測定される。次いで、測定光を照射しながら、光合成電子伝達が飽和する高強度の飽和パルス光を測定光とは異なる周波数で 1 秒弱（800 msec）照射し、飽和パルス光照射中の測定光に対して放出される蛍光収量  $F_m$  が測定される。蛍光量子収率  $F_v/F_m$  または  $F_v^*/F_m^*$  は  $F_o$  及び  $F_m$  の測定値をもとに算出される（式 6）。ここで、 $F_v/F_m$  と  $F_v^*/F_m^*$  の違いは、 $F_m$  及び  $F_o$  の測定前の試水の暗順応の有無である。

$$\frac{F_v}{F_m} \text{ or } \frac{F_v^*}{F_m^*} = \frac{F_m - F_o}{F_m} \quad (6)$$

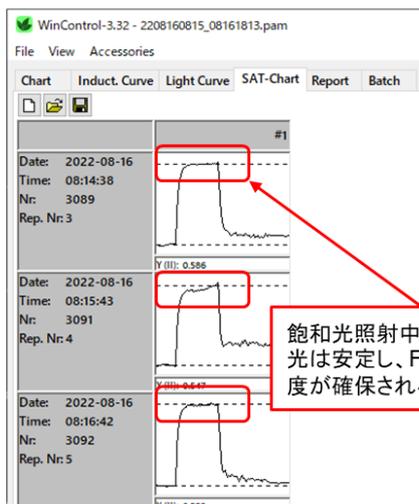
このように、蛍光量子収率の測定では  $F_o$  と  $F_m$  の測定を順次行う必要があり、当然、同一の試水に対して行われる必要がある。図 19 左は、PAM センサー測定制御とチューブポンプの駆動・一時停止制御の同期が損なわれ、蛍光量子収率の測定中にチューブポンプが駆動したために  $F_m$  の測定値が不安定化した例である。ポンプ駆動の継続により試水が次々と入れ替わるため、飽和パルス光により光化学系 II の還元が起こっていない植物プランクトンが測定対象となり、 $F_m$  を測定するための蛍光収量は大きく乱れている。図 19 右は、測定中にポンプ駆動を一時停止した例である。飽和パルス光照射中の蛍光収量は安定し、高精度な  $F_m$  が測定されている。初期の Phyto-Alert System では PAM センサーによる測定とポンプ動作の排他的動作の関係が崩れ、しばしば図 19 左のような質での測定を余儀なくされたが、PLC を用いた測定とポンプ動作の統合制御により、長時間の連続稼働においても図 19 右の状態の持続が可能となった。

### チューブポンプ駆動中



飽和光照射中に放出される  
蛍光は不安定で、Fmの測  
定精度は低い。

### チューブポンプ一時停止中



飽和光照射中に放出される  
蛍光は安定し、Fmの高い測定精  
度が確保される。

図 19 PAMセンサー測定とチューブポンプ駆動の PLC 統合制御による蛍光量子収率測定の実定化の具体例。2022 年 8 月の茨城沖調査においてシステム改良効果の確認を目的として、初期型における同期不良時（左）及び改良型における模擬的に再現した。蛍光収量の測定には WinControl-3 を用いた。

#### (3) 改良システムを用いた連続モニタリング試験

茨城沖調査船上の長時間連続モニタリング試験中の植物プランクトン濃度は、クロロフィル *a* 濃度で概ね  $0.2 \sim 0.3 \mu\text{g L}^{-1}$  の低い濃度の状況が継続したが、一時的に  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  を超える短期的な変動が観測された。改良システムにおいて導入された PAM センサーの自動ゲイン設定機能は、概ね設計どおりに動作し、クロロフィル *a* 濃度の変化に応じて自動で最適なセンサー感度が選択されることが確認された。

連続観測した蛍光量子収率には、光照射処理の有無にかかわらず、朝から夕方にかけて低下し、夕方から翌朝にかけて上昇する日内変化が認められた。しかし、その最小値は、光照射処理系の  $F_v^*/F_m^* = 0.426$  に対し、暗順応処理系では  $F_v/F_m = 0.240$  に達していた。暗順応処理系の最小値は、日差しの強かった 8/19 に記録された。本航海では空中・水中照度が観測されておらず、照度の高低は目視による推定に限られるが、暗順応処理系の  $F_v/F_m$  の日内変動は、沖縄トラフ海域で観察された結果に類似し、高照度（快晴）の日の日中に大きく低下する傾向が認められた。光照射処理系の  $F_v^*/F_m^*$  は、沖縄トラフ海域での光照射試験の結果とは異なり、日内変動の完全な除去には至らなかった。しかしながら、夏季の強い日射にも関わらず、暗順応処理系と比較すると、狭い範囲での日内変動に抑制された。

連続観測期間を通じての光照射処理系の  $F_v^*/F_m^*$  の変動範囲は  $0.426 \sim 0.640$  であった。また、2018 年度の沖縄トラフ海域における試験では、 $F_v^*/F_m^*$  の  $0.5 \sim 0.6$  の範囲で変動する現場海水に Zn (1 ppm) と Pb (0.3 ppm) の混液を添加したとき、 $F_v^*/F_m^*$  は添加後 30 分以内に 0.4 以下まで低下し、時間の経過によりさらに低下する傾向が示されている。自然海域の  $F_v^*/F_m^*$  の変動範囲や金属等の光化学系 II 物質に対する  $F_v^*/F_m^*$  の応答特性に関するデータは依然として十分とは言えないが、連続観測中の  $F_v^*/F_m^*$  が  $0.4 \sim 0.35$  を下回ったとき、生態阻害物質の混入が疑われる等の情報をほぼリアルタイムに発報することが可能であると考えられた。

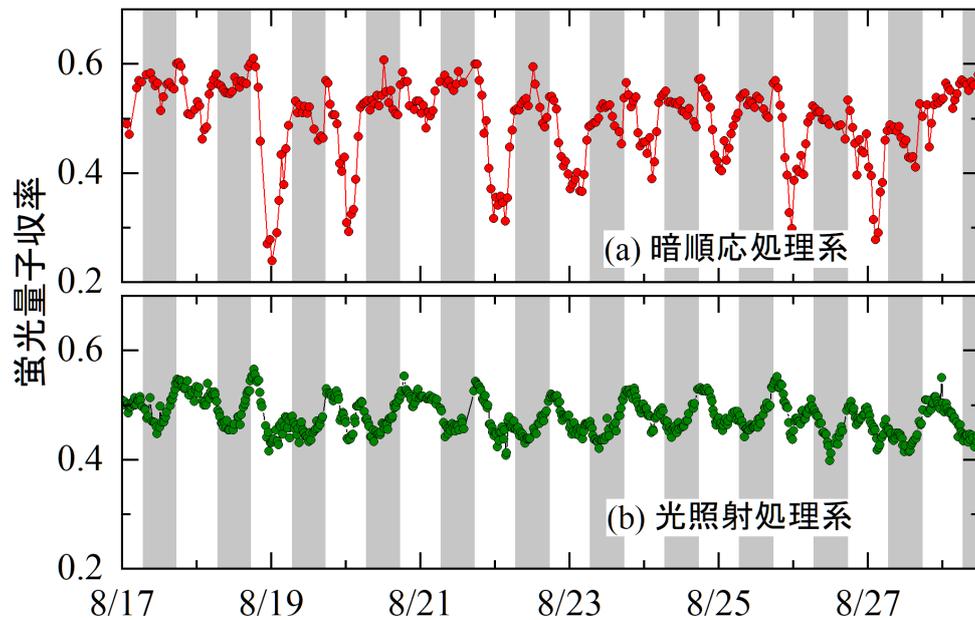


図 20 改良型 Phyto-Alert System を用いた茨城沖表層水の蛍光量子収率の長時間連続観測結果。(a) : 暗順応処理系、(b) : 光照射処理系。反応槽への光照射により蛍光量子収率の日内変動が抑制された。

#### 2.4.4 まとめ

本研究では、第 1 期 SIP 期間（2017～2018 年度）に海底鉱物資源開発海域における新たな表層水質リアルタイムモニタリング手法として開発に着手した Phyto-Alert System に関して、SIP 期間に取得したデータの詳細解析、解析結果に基づくシステム運転条件の構築、システム実用化を図る上で必要なハード・ソフトウェアの改良を行った。本研究期間終了後の 2022 年には、実海域における改良型システムの長時間連続観測の機会を得られ、その改良効果が確認された。また、PAM センサーの制御、測定、データ解析や保存を PLC に集約したことにより、研究用途から実用向けのシステムに近づけることができた。また、制御の PLC への集約により、Phyto-Alert System と他のモニタリング手法との連携運用についても実現可能な段階に入った。例えば、Phyto-Alert System 運転中に水質劣化の閾値を超えたとき、水質異変の疑いを通知するのみならず、試水の一部を自動で分取・保存する機能の実装が可能であり、洋上バイオアッセイやその他の化学分析等に提供する等の連携が考えられる。一方、自然海域における  $F_v^*/F_m^*$  の変動範囲や実際に水質劣化が発生したときの  $F_v^*/F_m^*$  の応答特性に関しては、依然として十分なデータが蓄積されているとは言えない。陸上実験室では、外洋水水質を模擬した培地を用いて外洋域に生息する植物プランクトンを培養することは容易ではなく、陸上試験のみで本システムの性能を評価することは難しい。したがって、本研究課題終了後も本システムの運転試験を行う機会を捉え、性能評価や合理的な水質劣化の判定基準の設定について検討を継続する必要があると考える。なお、本稿で示した Phyto-Alert System の開発アイデア及び実施例の一部については、国内で特許出願するとともに、PCT 制度により米国、仏国、中国において出願中である（越川ら 2019）。

## 引用文献

- 1) Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59, pp. 89-113). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- 2) From, N., Richardson, K., Mousing, E. A., & Jensen, P. E. (2014). Removing the light history signal from normalized variable fluorescence (Fv/Fm) measurements on marine phytoplankton. *Limnology And Oceanography: Methods*, 12(11), 776-783. <https://doi.org/10.4319/lom.2014.12.776>
- 3) Fuchida, S., Ishibashi, J.-i., Shimada, K., Nozaki, T., Kumagai, H., Kawachi, M., Matsushita, Y., & Koshikawa, H. (2018). Onboard experiment investigating metal leaching of fresh hydrothermal sulfide cores into seawater [journal article]. *Geochemical Transactions*, 19(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12932-018-0060-9>
- 4) Fuchida, S., Kawachi, M., & Koshikawa, H. (2021). Kinetic investigation of galvanic dissolution of ZnS and PbS with FeS<sub>2</sub> from hydrothermal sulfides in seawater. *Applied Geochemistry*, 129, 104963. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104963>
- 5) <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104963>
- 6) International Seabed Authority. (2019). Draft regulations on exploitation of mineral resources in the Area. *ISBA/25/C/WP.1*.
- 7) Kumar, K. S., Dahms, H. U., Lee, J. S., Kim, H. C., Lee, W. C., & Shin, K. H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence [Review]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 51-71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>
- 8) Schreiber, U. (2004). *Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview* (Vol. 19). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_11)
- 9) 越川海, 河地正伸, 淵田茂司, 大田修平, 三輪哲也, 古島靖夫, 近藤俊裕 (2019). 光合成阻害物質混入検出装置及び光合成阻害物質混入検出方法. (特願 2019-26026)

## 2.5 鉱石からの水銀溶出動態と洋上水銀分析の検討

### 2.5.1 背景と目的

水銀は地球環境汚染物質として対策及び研究が進められており、2017年に人為的に排出される水銀とその化合物から環境、そしてヒトと野生生物の健康被害を未然に防止する水俣条約が締結された (Outridge et al. 2018)。水銀は大気環境や水環境などあらゆる環境に存在している。特に、水環境中で微生物が生成するメチル水銀は水俣病の原因物質として毒性が強いことが知られている (Fitzgerald and Lamborg 2007)。またメチル水銀は生物相での残留性と濃縮性が高いことが知られており、一般的に深海魚や大型魚類中の可食部に蓄積する。こうした水銀の主要な自然発生源は火山と熱水活動である。火山ガスにはガス状の金属水銀が含まれているのと同時に、温泉や海底熱水にも比較的に多量の水銀が含まれていることが報告されている (Fitzgerald and Lamborg 2007)。そのために、火山活動に関連する陸上鉱山の硫化物や、活動中の海底熱水鉱床に形成される硫化物の塊であるチムニーに比較的多量の水銀が含まれている。

近年のハイテク産業やグリーンテクノロジー関連において、ニッケルやコバルトなどの微量元素を多く必要としており、こうした元素や金銀等の有価金属を比較的多く含む海底資源鉱物が注目されている。海底資源開発においては、水深千メートル以上の深海から鉱物を海面まで引き上げる技術開発と同時に、海底資源開発によって想定される海洋環境への影響を把握しておく必要がある。例えば、表層から深海までの水柱において懸濁物質が増加する可能性や、水質及び生物相への影響が懸念されている。これまでの先行研究で、硫化鉱物を多く含む鉱石が海水と反応すると、鉄や亜鉛を含む海底熱水鉱石から元素が溶出されることが確認されている (Fuchida et al. 2017)。将来の海底資源開発を推進するためには、予想される環境への影響を事前に把握しておく必要があり、水銀の挙動と海洋環境動態の把握と、必要に応じて操業時のリアルタイムでの環境監視を実施する必要がある。そこで本研究では、沖縄トラフ海底熱水鉱石の水銀溶出特性の把握と、レアアース泥に関係する海底質の水銀分布を把握し、洋上での海水と底質中の水銀分析について検討を行った。

### 2.5.2 方法

本研究では、以前の熱水調査で採取され、先行研究で使用された沖縄トラフの伊是名と伊平屋北海底熱水鉱床で採取された4種類の鉱石 (1.鉄—亜鉛—鉛鉱石; 2.バリウム鉱石; 3.鉄鉱石; 4.亜鉛—鉛鉱石) を用いて溶出実験を実施した。これらの熱水域のチムニーの特徴や、熱水の性質についてはすでに報告されている (Fuchida et al. 2017)。本研究で使用した鉱石に含まれている鉱物と化学的な主要な成分についても、先行研究でエックス線回折装置 (XRD) と誘導結合プラズマ質量分析装置による分析が実施されている (Fuchida et al. 2017)。また本研究においては、総有機炭素量と有機窒素量を元素分析計で分析した。

一般的に、誘導結合プラズマ質量分析装置による網羅的な多元素分析で、水銀の定量分析は含まれない。そこで、原子蛍光分析装置を用いた鉱石の分析を次のように3回繰り返して実験を実施した。約0.05gから0.1gの粉末化した鉱石サンプルを酸洗浄済みのテフロンバイアルに分取し、王水を加えて、95°Cで加温しながら24時間反応させた。反応後に、溶解液を0.5%の一塩化臭素溶液で50mLにメスアップをして、塩酸ヒドロキシルアミン溶液を添加して余分なハロゲン元素を除去した後に、弱王水で約30,000倍から70,000倍に希釈した。この希釈液を0.45 $\mu$ mのテフロンメンブレンを装着したシリンジで濾過をして分析溶液とし、測定直前に水銀を除去した塩化スズ溶液を加えて、金アマルガム法を用いた原子蛍光計測装置 (CV-AFS) で水銀分析を実施した。

水銀を含む鉱石の溶出試験は人工海水を用いて、粉末試料と溶出液の割合を30に保って3回繰り返して実験を実施した。溶出振盪時間は、日本環境省、アメリカ環境保護庁、そしてアメリカ地質調査所が推奨する比較可能な5分、6時間、そして18時間で実施した。約0.25gから1.0gの粉末試料を酸洗浄済みのホウ珪酸ガラス管に秤量して、7.5mLから30mLの人工海水を加えて遮光条件下で溶出振盪試験を実施した。振盪後は遠心分離で粉末と上澄み液に分離をして、上澄み液を0.45 $\mu$ mのテフロンメンブレンを装着したシリンジによるろ液を酸洗浄済みのホウ珪酸ガラス瓶に保存して、0.5%の一塩化臭素溶液として酸固定をした。各振盪時間の上澄み液の一部はpH測定用に分取し、携帯型の電極で計測

した。この溶出試験後の上澄み液は、塩酸ヒドロキシルアミン溶液を添加して、水銀濃度が約 5ppt になるように弱王水で希釈して、塩化スズ溶液を添加後に上記と同様に CV-AFS で水銀定量を実施した。

海底質中の水銀分析は、白鳳丸 KH-15-3 次航海、KM19-7 次航海、そして KM20-8 次航海で採取された伊豆小笠原海溝周辺海域で採取された表層から 5cm までの底質を用いて分布を明らかにした。海底質は、各航海の採取地点でマルチプルコアラーを用いて採取した。採取したコアは、採取後 4 時間以内にプラスチック製のコア切り道具を用いて 1cm と 2cm ごとにカットして、研究所まで冷凍輸送した。冷凍底質試料は凍結乾燥器で水分を除去し、均質化させて分析まで褐色ガラス瓶に保存した。底質の総水銀分析は、水銀を事前に除去したセラミックボートに約 50mg を秤量して加熱気化原子吸光分析計 (TD-AAS) を用いて実施した。同時に、各試料の含水率を計測し、乾燥重量で定量した。

海水と海底質の洋上分析の検討については、洋上測定で実績のある CV-AFS を用いて海水中水銀定量分析を実施すると同時に、最新の可搬型 TD-AAS を用いて海底質の水銀分析の検討を実施した。CV-AFS で使用する還元溶液の安定性を確認しつつ、検量線を作成した。可搬型 TD-AAS については研究船の振動の影響と試料秤量の精度を確認すると同時に、吸光セル内の光源の耐震性について評価した。

### 2.5.3 結果と考察

#### (1) 海底熱水鉱石中水銀濃度

調査対象の海底熱水鉱石中の水銀濃度は、他の金属元素濃度と比較して約 2 から 4 オーダー程度低かった (図 27)。4 種類の鉱石ではバリウム鉱石中の水銀濃度が一番高く、鉄—亜鉛—鉛鉱石中の水銀濃度が一番低かった。4 種類の有機炭素と窒素濃度は、元素分析計の検出下限値 (0.03%) よりは高かったが、定量下限値 (0.1%) より低かった。XRD による構成する主要な鉱物を明らかにする分析では、鉄や亜鉛等の主要な金属元素を含む鉱物を確認することができたが、水銀を含む硫化鉱物は検出されなかった。

トラフの海底熱水鉱石に含まれる水銀濃度は、他の金属元素濃度よりは低かったが、一般的な海底質中の水銀濃度や、陸域土壌中の水銀濃度より約 2 から 5 オーダー程度高かった (Kim et al. 2018)。これまでの海底熱水環境の研究結果では、水銀は比較的沸点が低い金属であるために、ヒ素やアンチモンのように気相に凝縮されることが指摘されてきた (Varekamp and Buseck 1984)。本調査試料においても、比較的ヒ素濃度が高いバリウム鉱石中の水銀濃度が高く、比較的ヒ素濃度が低かった鉄—亜鉛—鉛鉱石中の水銀濃度が 4 つの内でも最も低かった。また周期表での同族元素である亜鉛とは逆相関の関係が見られた (図 22)。亜鉛は、ヒ素や水銀と異なり熱水域で液相に凝縮される金属元素である。そのために、亜鉛濃度が高い熱水鉱石は液相に凝縮された金属元素濃度が比較的高くなり、気相に比較的多く存在する元素濃度が低くなることが知られている。以上のことから、本研究の沖縄トラフの海底熱水鉱石の水銀は、熱水の気相に凝縮された水銀が地下から海底面に運ばれて、海底に噴出した水銀は他の金属元素と同様に沈殿したのと同時に、同じ海底熱水域でも異なる化学的な性質をもった鉱石が存在することを示唆している。

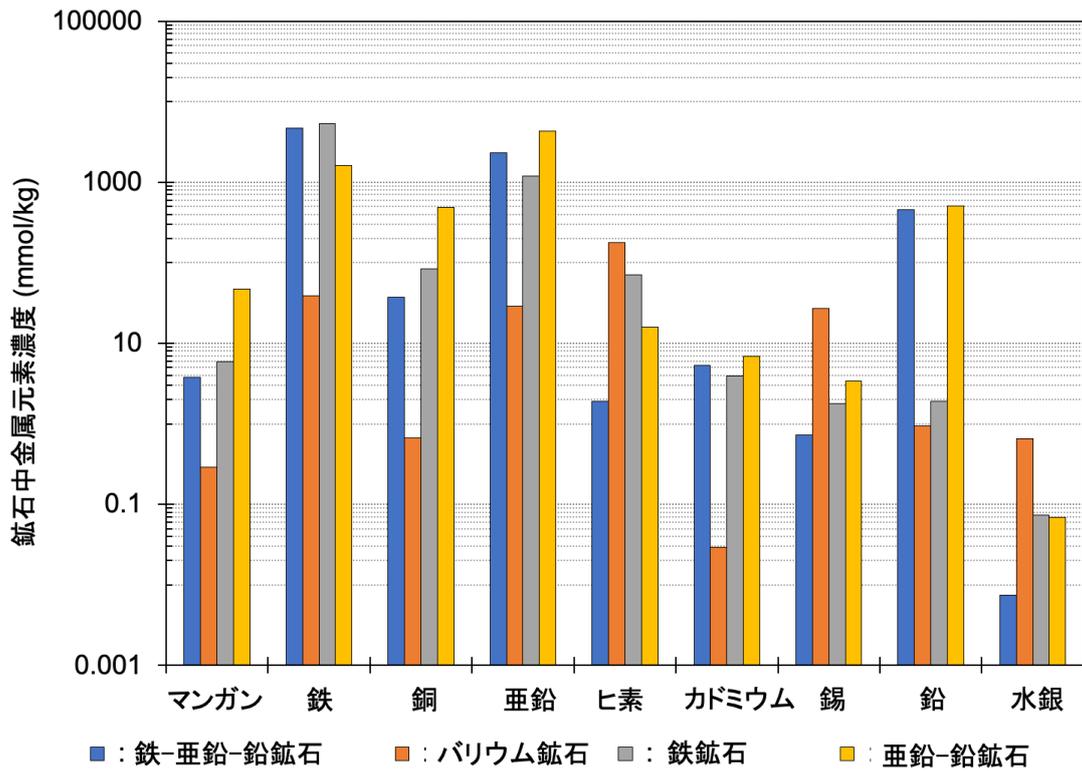


図 21 調査対象海底熱水鉱石サンプル中の金属元素濃度。

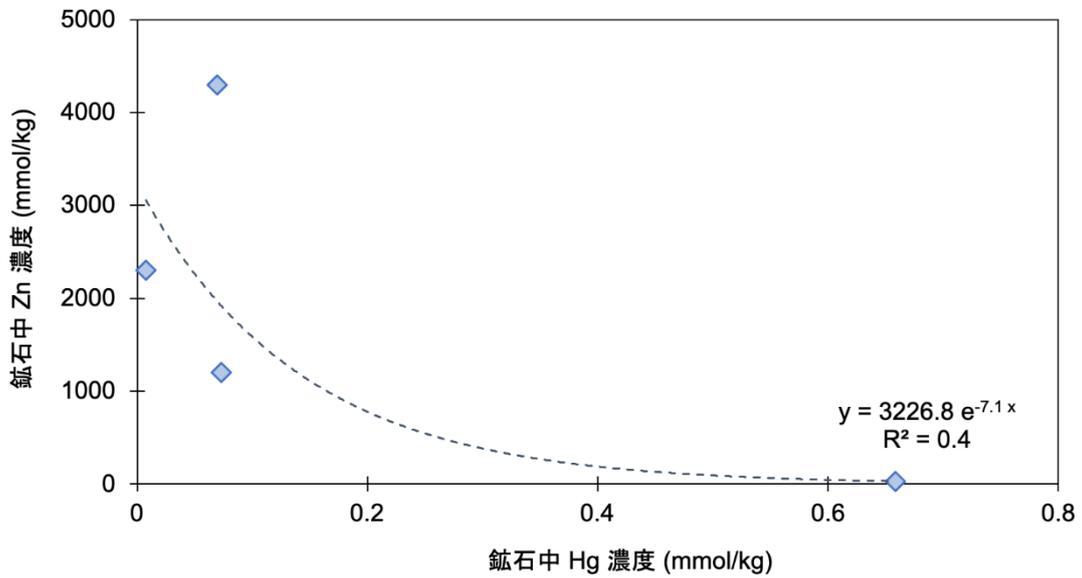


図 22 熱水鉱石中の亜鉛と水銀濃度の関係。

## (2) 溶出試験結果

沖縄トラフの海底熱水鉱石を用いた溶出試験の結果、反応時間の経過とともに溶液中の水銀濃度が増加する知見を得た(図23)。水銀溶出が見られたバリウム鉱石、鉄鉱石、そして亜鉛-鉛鉱石は、最初の5分間でそのほとんどの水銀が溶出され、バリウム鉱石と亜鉛-鉛鉱石は6時間後に追加で少し溶出し、いずれの鉱石でも6時間と18時間に水銀溶出量に差は見られなかった。

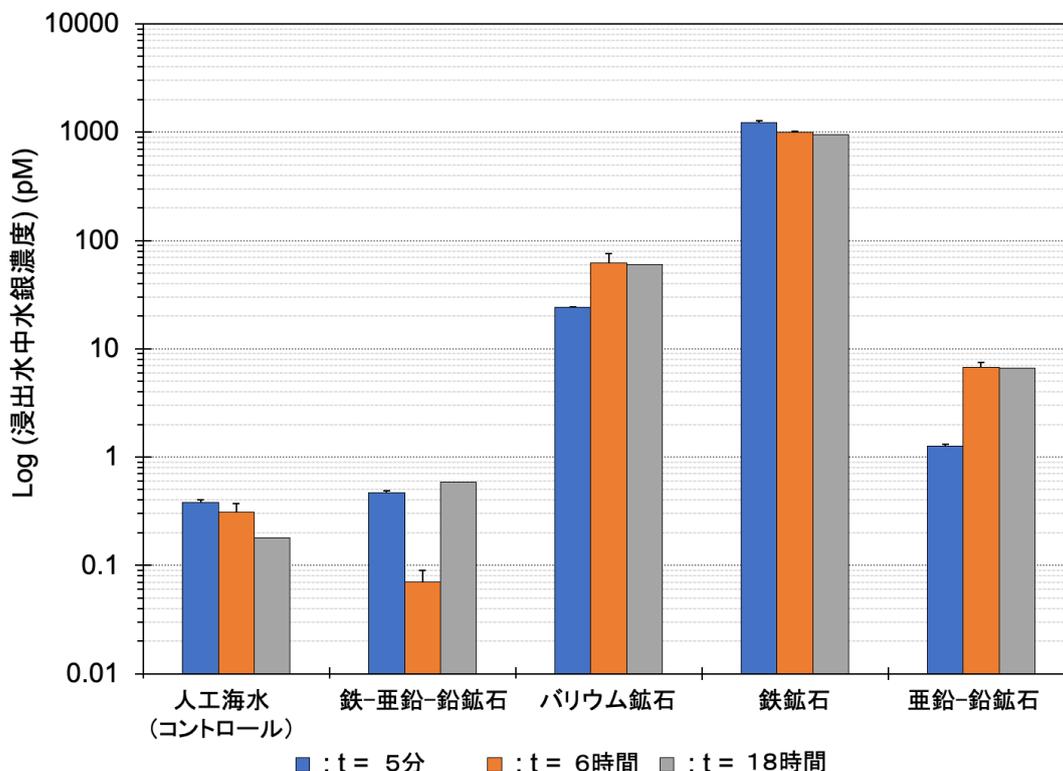


図23 各反応時間の溶液中水銀濃度。

水銀溶出が確認された鉱石中の水銀濃度と、溶出試験によって人工海水に溶け出した水銀量には相関関係は見られなかった。最も水銀濃度が高かったバリウム鉱石から溶出された水銀量よりも、鉱石中の水銀濃度はバリウム鉱石の半分以下だった鉄鉱石から最も多量の水銀が溶出された。また鉄鉱石と水銀濃度が同レベルであった亜鉛-鉛鉱石からは、鉄鉱石から溶出された水銀量よりも約2オーダー低い水銀量しか溶出されなかった。そして最も水銀濃度が低かった鉄-亜鉛-鉛鉱石からはほとんど水銀が溶出しなかった。海底熱水鉱石において、水銀はそのほとんどが硫化物として存在していると考えられており、そして硫化水銀鉱物は深海も含む一般的な pH レベルの地表環境での安定度定数が高いことから、溶出しないと考えられていた (Fitzgerald and Lamborg 2007)。しかしながら、本研究では、海底熱水鉱石に存在する水銀の一部が溶出することが確認できた。そのことから、本研究で対象とした鉱石中の水銀のほとんどは硫化水銀鉱物として溶出することはないが、一部は硫化水銀鉱物として存在しておらず、溶出可能な水銀が存在していることを示唆している。

海底熱水鉱石に含まれる水銀量に対して溶出される水銀量の程度を、他の金属の溶出率と比較することで評価した結果、もっとも水銀溶出量が多かった鉄鉱石でも、水銀の溶出率は他の金属元素の溶出率よりも約4オーダー程度低かった(図24)。同じ溶出試験で鉄やマンガンなどの主要な金属元素は $\mu\text{M}$ から $\text{mM}$ オーダーで溶出していたのに対して、水銀は $\text{pM}$ から $\text{nM}$ レベルの溶出であった。先行研究の結果、鉄鉱石が含有するマンガン、銅、亜鉛、カドミウム濃度に対して、溶液中のそれらの金属濃度の比は0.1を超えていたのに対して、水銀の溶出率は約0.0001しかなかった (Fuchida et al. 2017)。このことから、熱水鉱石中の水銀のほとんどは不溶出の形態をしていることを示唆しており、

硫化水銀鉱物で存在している可能性が高いことを示す。しかしながら、バリウム鉱石、鉄鉱石、そして亜鉛—鉛鉱石を用いた溶出試験では、溶液中の水銀濃度が一般的な海水中の総水銀濃度よりも高くなることが示唆された (Laurier et al. 2004)。

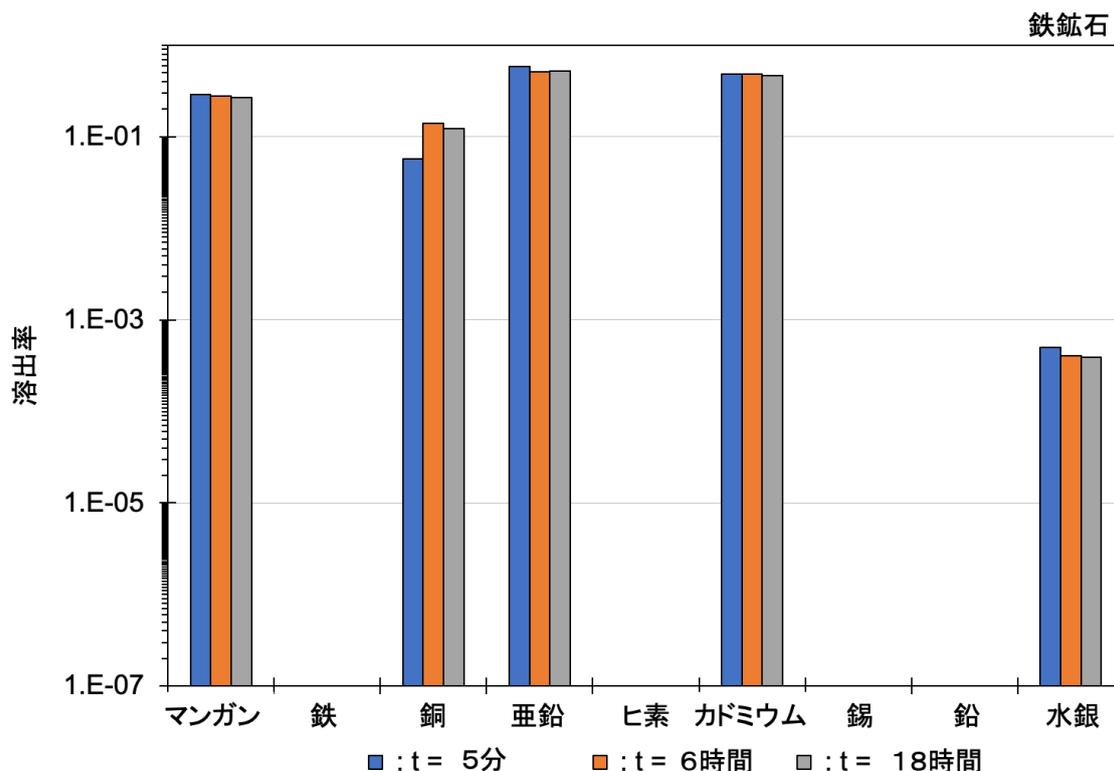


図 24 鉄鉱石における金属元素の溶出率比較。

### (3) 水銀溶出メカニズム

水銀の溶出メカニズムに関する知見を深めるために、溶液中の各反応時間の pH 変化を記録した (図 25)。コントロールに比べて、反応時間が増加することに pH が減少した。特に水銀溶出量の多かった鉄鉱石は、実験開始直後に人工海水がアルカリ性から中性になり、5 分後には酸性になった。同様の pH 変化を鉄—亜鉛—鉛鉱石でも確認されたが、その鉱石からの水銀溶出量は多くなかった。一方、硫化鉄を含まない鉱石を用いた実験では人工海水の pH は劇的に低下しなかった。このような pH 低下が見られた要因としては、先行研究で確認された海水中での硫化鉄の酸化反応による硫酸の生成が考えられる。pH 低下による溶液の酸性化は一部の硫化鉱物の溶解を促進させる可能性がある。しかしながら、一般的に硫化水銀の溶解には pH2 以下の強酸溶液が必要であることが知られており、本研究の実験で生成した酸溶液で硫化水銀の溶解は困難である。

熱水鉱石に含まれる水銀鉱物からの溶出が起こりにくい条件下で、溶液中の水銀起源として考えられるのが、鉱石に含まれる二次生成鉱物の表面に吸着していた水銀である。水酸化鉄や粘土鉱物の表面に水銀が吸着されることはよく知られている。また本研究で実施した実験では、最初の 5 分間で溶液に移行可能な水銀のほとんどが溶液に存在していた。こうした現象は水中での水銀と粒子間の分配係数を調査する実験でも見られた現象であり (Hintelmann and Harris 2004)、海底熱水鉱石を構成する鉱物表面に吸着していた水銀が反応実験で人工海水に溶けたと考えられる。

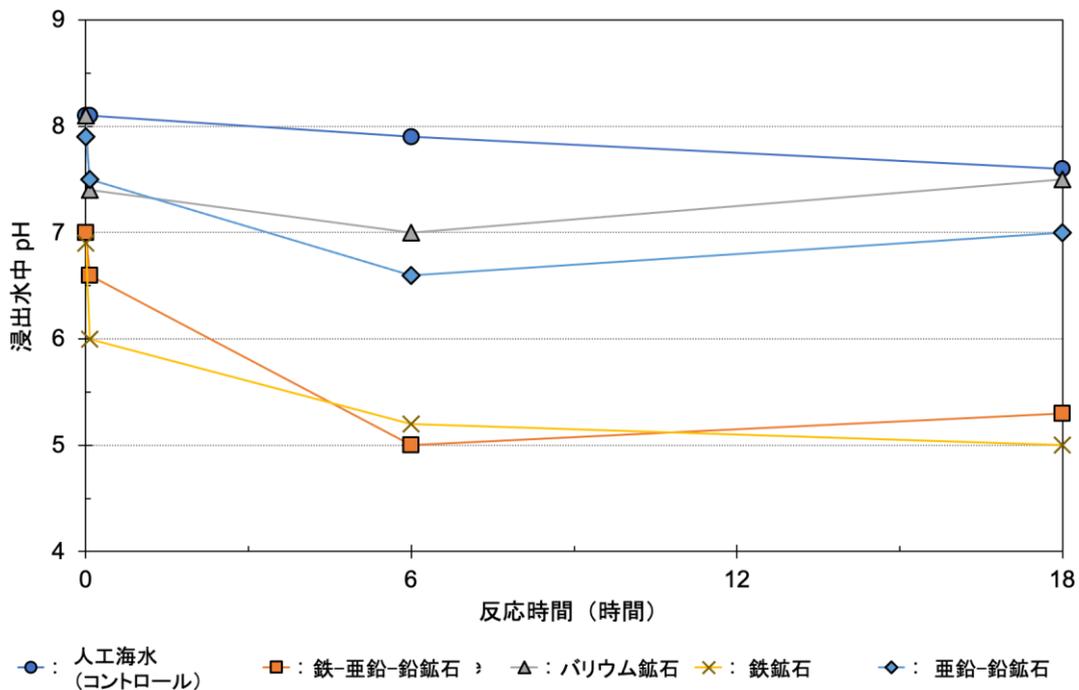


図 25 各反応時間の溶液中の pH 変動。

#### (4) 洋上水銀分析

海底資源開発に伴う環境影響を評価するためには、作業中にリアルタイムでその影響を明らかにする必要がある。これまでの研究で、海底熱水鉱石からの水銀溶出量は極めて低く、高感度な分析が必要である。海水中的水銀分析は洋上分析の実績がある原子蛍光計を使用することを推奨する。その中で定量分析を実施するには検量線のスタンダードと用事調整する還元溶液が必要となる。還元溶液は洋上実験施設で調整が可能であるが、微量な水銀標準液を不規則な振動と揺動が伴う洋上で調整することは不可能である。そのために、乗船前に試薬を調整し、安定的に使用できるかどうか確認する必要がある。本研究では異なる素材の PFA 瓶とガラス瓶に、1.0 ppb と 0.1ppb の水銀標準液を用意し、冷蔵保管で定期的に測定した結果、1.0ppb 溶液であれば PFA 瓶でも約 3 ヶ月保存が可能だが、0.1ppb 溶液はガラス瓶なら 3 ヶ月保存が可能ながことが判明した。そのため 3 ヶ月以内の航海であれば、事前に陸上で調整して積載することが可能である。

洋上分析において、不規則な振動は TD-AAS を用いた底質中の水銀分析の底質前処理と計測に影響があることが判明した。海洋研究開発機構研究船かいめいの航海中の実験室の振動を調査した結果、常時揺れているのに加えて、波と風の影響で震度 1~2 相当の振動が時々発生することが明らかになった。これは底質前処理における精密秤量に影響を与えるのと同時に、TD-AAS の光源に影響を与えることが判明した。そのため、洋上での底質分析は半定量分析にとどまる。

#### (5) 伊豆・小笠原海溝周辺海域の表層底質中水銀濃度の分布

レアアース泥の採掘が計画されている中で、共存する水銀が周辺水柱に拡散される可能性があることから、伊豆・小笠原海域周辺の海底表層底質中の水銀濃度分布を明らかにした (図 26)。その結果、プレート境界近くの火山活動が活発な地域と海溝軸の表層底質で総水銀濃度が高くなる傾向を示したが、いずれの地点も一般底質の環境基準値以下であった。今回分析した表層底質の水銀濃度は、関東地方の太平洋沿岸の底質中水銀濃度と同レベルか、約 2 倍程度の濃度であった (地質調査総合センター 2004)。また、人間活動の影響で比較的有害金属濃度が高いと知られている東京

湾の底質と比較して、今回の調査対象試料の水銀濃度は半分以下であった。このことから外洋の低質には直接的な火山・熱水活動の影響がない限り、比較的水銀濃度は低いと考えられる。

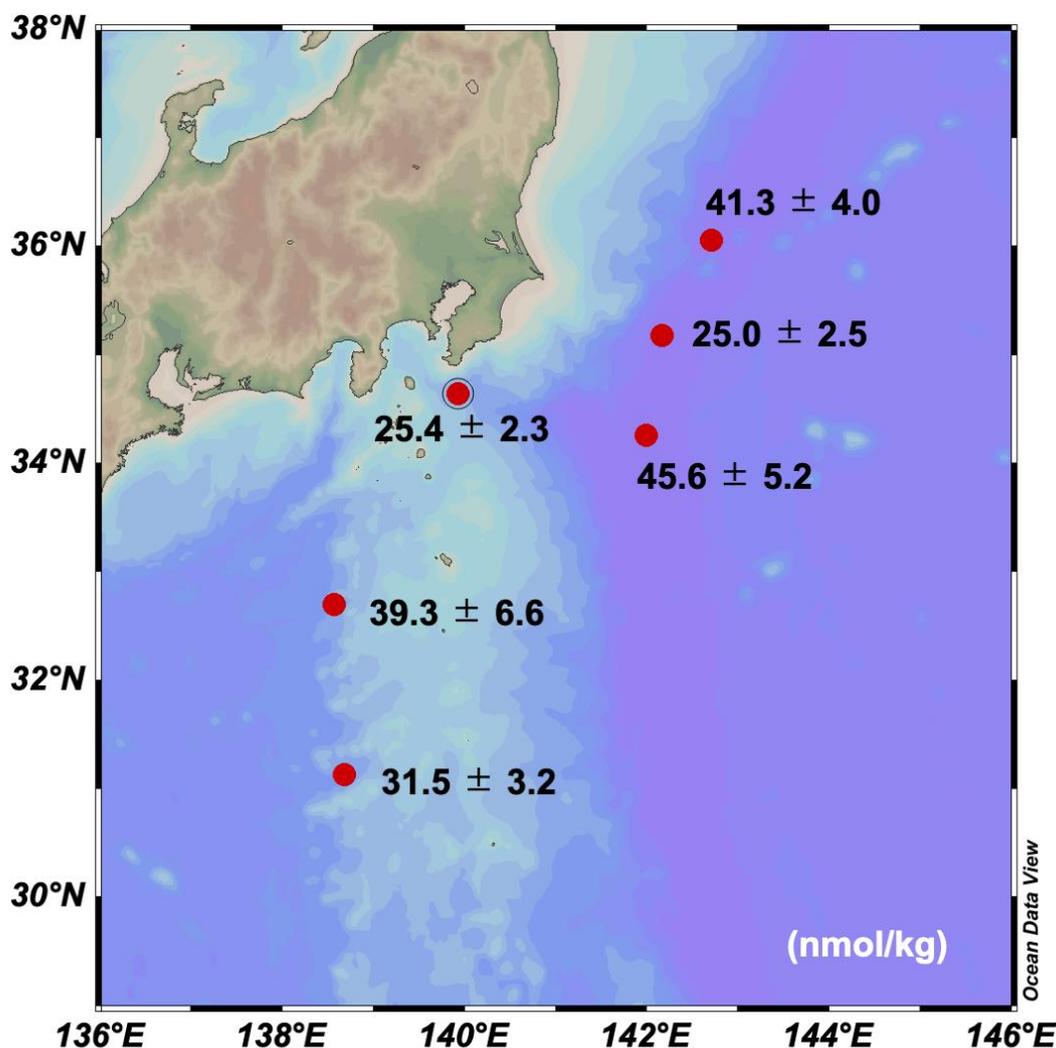


図 26 伊豆・小笠原海域周辺の海底表層底質中の水銀濃度分布。

#### 2.5.4 まとめ

一部の陸上鉱山跡周辺で水や土壌の重金属汚染が報告されている。今後さらに開発が進むと考えられる海底資源開発において、周辺環境への汚染や影響を予測し、未然に防止するためには想定される現象を把握しておく必要がある。先行研究では、海底熱水鉱石と海水との反応による主要な金属の溶出特性について研究が進んでいたが、毒性が強く、地球環境汚染物質である水銀の特性について把握できていなかった。本研究では水銀を含有する海底熱水鉱石の溶出試験を実施し、極わずかの水銀が溶出するという知見を得た。水銀の溶出量は極めて少ないが、一般的な海水中水銀濃度を超えるレベルに達するという知見を得た。熱水鉱石中の水銀は主に硫化水銀鉱物として存在しており、非常に安定しているが、一部の水銀が鉱石中の二次生成鉱物の表面に吸着されており、それが溶出したと考えられる。一方、外洋海底質中の水銀濃度は一般的には低く、伊豆・小笠原海溝周辺海域の海底表層底質中の水銀濃度は、関東太平洋沿岸底質と同等、そして人間活動の影響が大きい東京湾より低かった。海底資源開発において、現場での環境モニタリングが重要になってくる。原子蛍光計や原子吸光計を用いて洋上定量、半定量分析を実施し、持続可能な資源開発を展開する必要がある。

## 引用文献

- 1) Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., 2007. Geochemistry of Mercury in the Environment. *Treatise on Geochemistry* 9-9, 1-47. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/09048-4>
- 2) Fuchida, S., Yokoyama, A., Fukuchi, R., Ishibashi, J., Kawagucci, S., Kawachi, M., Koshikawa, H., 2017. Leaching of Metals and Metalloids from Hydrothermal Ore Particulates and Their Effects on Marine Phytoplankton. *ACS Omega* 2, 3175-3182. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.7b00081>
- 3) Hintelmann, H., Harris, R., 2004. Application of multiple stable mercury isotopes to determine the adsorption and desorption dynamics of Hg(II) and MeHg to sediments. *Mar. Chem.* 90, 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.03.015>
- 4) Kim, J., Lim, D., Jung, D., Kang, J., Jung, H., Woo, H., Jeong, K., Xu, Z., 2018. Sedimentary mercury (Hg) in the marginal seas adjacent to Chinese high-Hg emissions: Source-to-sink, mass inventory, and accumulation history. *Mar. Pollut. Bull.* 128, 428-437. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.058>
- 5) Laurier, F.J.G., Mason, R.P., Gill, G.A., Whalin, L., 2004. Mercury distributions in the North Pacific Ocean - 20 Years of observations. *Mar. Chem.* 90, 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.02.025>
- 6) Outridge, P.M., Mason, R.P., Wang, F., Guerrero, S., Heimbürger-Boavida, L.E., 2018. Updated Global and Oceanic Mercury Budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11466-11477. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01246>
- 7) Varekamp, J.C., Buseck, P.R., 1984. The speciation of mercury in hydrothermal systems, with applications to ore deposition. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48, 177-185. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90359-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90359-4)
- 8) 地質調査総合センター, 2004. 日本の地球化学図. 209p.

## 2.6 鉱石からの金属溶出動態 (Zn、Pb、As) の検討

### 2.6.1 背景と目的

海底熱水鉱床開発において想定される化学的な環境影響として、掘削に伴う鉱物微細粒子の拡散、掘削時の騒音や振動の影響のほか、回収した鉱石の偶発的な漏洩、鉱石から海水への金属溶出などが挙げられる (図 27) (淵田他, 2020)。実際に、地球深部探査船「ちきゅう」による航海で沖縄トラフ伊是名海穴の熱水マウンドから採取したコア試料を使用して船上で海水との反応実験を行ったところ、鉱石と接触した海水中には数 mg/L オーダーの溶存態亜鉛 (Zn) 及び鉛 (Pb) の溶出が確認された (Fuchida et al., 2018)。その際、深海環境 (5°C、初期溶存酸素濃度: 1 mg/L) と浅海環境 (20°C、初期溶存酸素濃度: 5-6 mg/L) を模した条件で両金属元素の溶出速度を算出したところ、浅海条件で両金属元素の溶出が最大となった。さらに、試験に用いる鉱石の種類に応じてその速度は大きく変化し、XRD では検出されないレベルの微細な閃亜鉛鉱 (ZnS) や方鉛鉱 (PbS) の粒子が黄鉄鉱中に無数に含まれる試料で溶出速度が最大となった。

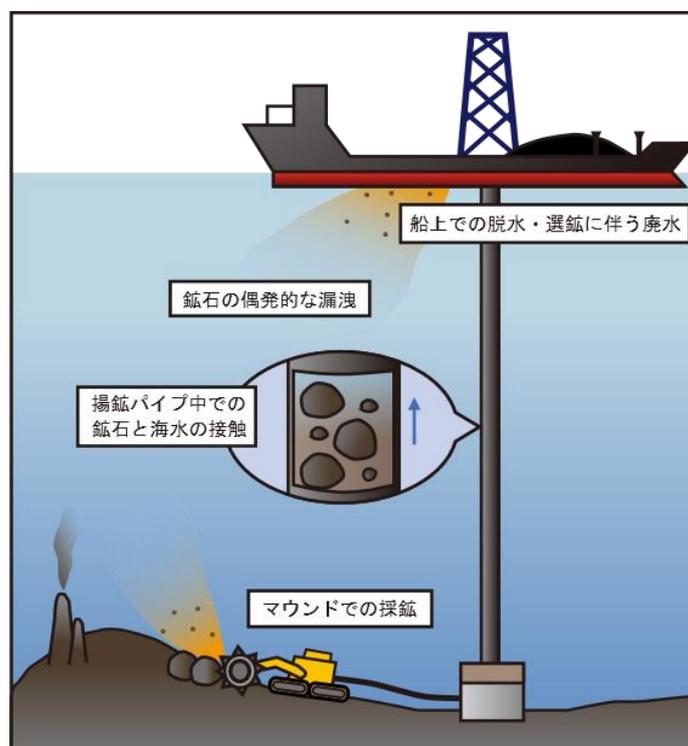


図 27 海底熱水鉱床開発における化学的影響のまとめ (淵田他, 2020)。

以上の結果から、鉱石から溶出する金属量は、反応する海水の物理化学特性の違いと、鉱石の化学組成及び鉱物組み合わせに大きく依存することが明らかとなった (Fuchida et al., 2018)。特に、黄鉄鉱 ( $\text{FeS}_2$ ) の存在量に応じて ZnS の PbS 溶解速度が変化することが明らかとなった。 $\text{FeS}_2$  とのガルバニック反応 (電子の授受) により、ZnS や PbS が選択的に溶解していると考えられる。すなわち、鉱石中の鉱物の溶解反応は通常酸化溶解反応 (図 28 (a)) に加え、異なる鉱物間で生じるガルバニック反応 (図 28 (b)) が支配因子として重要であることも明らかとなった (Fuchida et al., 2018; Fuchida et al., 2021)。以上を踏まえ、本課題ではまず、化学組成の異なる 4 種類の鉱石を新たに準備し、鉱石中の亜鉛及び鉛硫化鉱物 (ZnS・PbS) の海水中での酸化溶解速度の律速段階となるガルバニック反応の影響を定量的に評価した。また、しばしば鉱石中にヒ素が濃縮しており、海水との接触により容易に溶出することが確認されている (Fuchida et al., 2017)。濃集しているヒ素の溶出動態については不明である。とくに、ヒ素には酸化数 (3 価、5 価) の異なる形態が存在し、それによって化学反応性や生態毒性が大きく異なることから、形態別に溶出動態を把握する必要

がある。ヒ素をそこで、濃集した熱水性鉱石からのヒ素の溶出速度及び溶出形態解析の一部を実施することを目的に、ヒ素含有率の高い鉱石を対象に溶出試験を実施した。

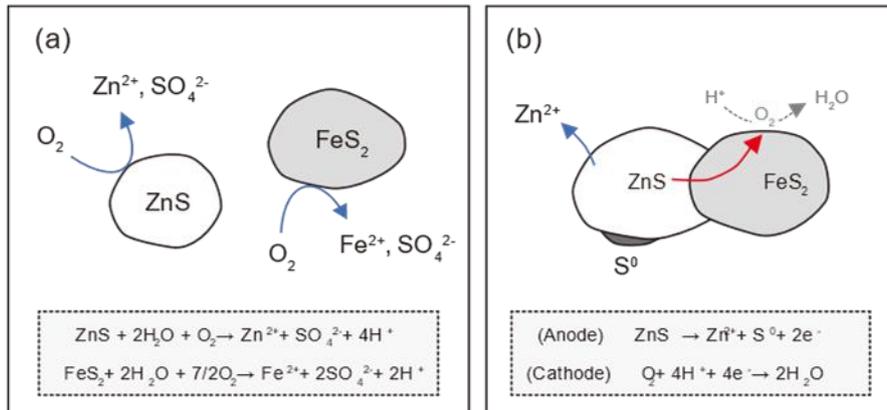


図 28 閃亜鉛鉱 (ZnS) と黄鉄鉱 (FeS<sub>2</sub>) を例とした (a) 酸化溶解反応と (b) ガルバニック反応機構の違い (Fuchida et al., 2021)。

## 2.6.2 方法

### (1) ガルバニック反応実験

実験には沖縄トラフの海底熱水噴出孔周辺から採取した 4 種類の鉱石試料を使用した。鉱石の化学組成を決定するために、鉱石の粉末試料を塩酸 (HCl) + 硝酸 (HNO<sub>3</sub>) の王水と混合し (3:1)、80°C で加熱して全溶解した (表 9)。この表から、試料 1 及び試料 3 は Fe 濃度が 1000 mmol/kg 以上であり、鉱石中の FeS<sub>2</sub> 含有量が高いと考えられる。すなわちこれらの試料について図 28 (b) のようなガルバニック反応が生じると期待される。一方、試料 2 及び試料 4 は Fe 含有量が 5 mmol/L 以下であり、ガルバニック反応を誘発する FeS<sub>2</sub> の含有量は低いと考えられる。

表 9 ガルバニック反応実験に用いた鉱石試料の化学組成 (Fuchida et al., 2021)

	濃度(mmol/kg)				
	Fe	Cu	Zn	Cd	Pb
試料 1	1590	491	4280	6.75	514
試料 2	4.24	0.205	2480	6.04	1070
試料 3	1190	669	4450	18.3	4.14
試料 4	4.33	0.206	1980	3.59	1070

これらの鉱石をメノウ乳鉢で粉碎し (平均粒径: 1.1~170 μm)、6 M HCl 及びアセトンで洗浄し粉碎後に生成した二次鉱物 (酸化物、水酸化物) を除去したのち凍結乾燥した。乾燥試料 0.5 g に対し人工海水 (3.5% NaCl, 0.1% NaHCO<sub>3</sub>) 50 mL を PTFE 製遠沈管内で混合し、200 rpm で最大 144 h 往復振とうした。ろ過処理 (<0.45 μm) 溶液は脱塩処理後、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) で金属濃度を測定した。また、反応後の固体試料は凍結乾燥後、X 線光電子分光 (XPS) 及び EDTA 溶媒抽出操作に供した。EDTA 溶媒抽出では、0.2 g の乾燥試料に対して 0.05 M EDTA 溶液 30 mL を PTFE 製遠沈管内で混合し、200 rpm で最大 3 h 往復振とうした。抽出液はろ過処理後 (<0.45 μm)、ICP-MS で金属濃度を測定した。

(2) ヒ素溶出実験

実験には沖縄トラフの海底熱水噴出孔周辺から採取したヒ素含有量が高い 3 種類の鉱石試料 (254~347 mmol/kg) を使用した。粉末にした鉱石 0.5 g をアクリル製容器内で人工海水 200mL と混合し、室温で攪拌した。反応試料を所定の時間 (5 分、6 時間、18 時間) で溶液を採取して 0.45 $\mu$ m (PTFE) フィルターで濾過した。溶液中のヒ素の濃度は ICP-MS 及びボルタンメトリー (Metrohm, VA884) で測定した。

2.6.3 結果と考察

(1) ガルバニック反応実験

各鉱石と反応した海水中には図 29 (上図) で示すように Zn と Pb の溶出が確認された。Zn の溶出量は時間とともに増加し、試料 1 及び試料 3 で著しく高くなった。また、Pb 溶出量は試料 1 で高くなり、反応開始直後で最大値となった。ただし、海水条件では炭酸塩や水酸化物を生成するため、実際の溶出量を正確に評価することは難しい。そこで、EDTA 図溶液を用いることで硫化物以外の生成二次鉱物を溶解し、実際の Zn 及び Pb 溶出速度を求めた。その結果、図 29 (下図) で示したような結果が得られた。この値をもとに、以下の式 7 を用いて各鉱石からの Zn 及び Pb 溶出速度を算出した (Fuchida et al., 2018)。

$$R = \frac{a}{(A_{BET} \cdot r) \cdot m} \text{ (mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}) \tag{7}$$

ここで、 $a$  は反応時間に対する Zn 及び Pb 濃度変化直線の傾き (mol/L/s)、 $A_{BET}$  は鉱石粒子の比表面積 (m<sup>2</sup>/g)、 $r$  は鉱石中のヒ素重量比 (-)、 $m$  は溶液中に存在するヒ素鉱物の量 (g/L) を示している。ただし、鉱石の比表面積は窒素ガス吸着法 (MicrotracBEL, BELSORP-max) で測定した値 (1 m<sup>2</sup>/g) を使用した。

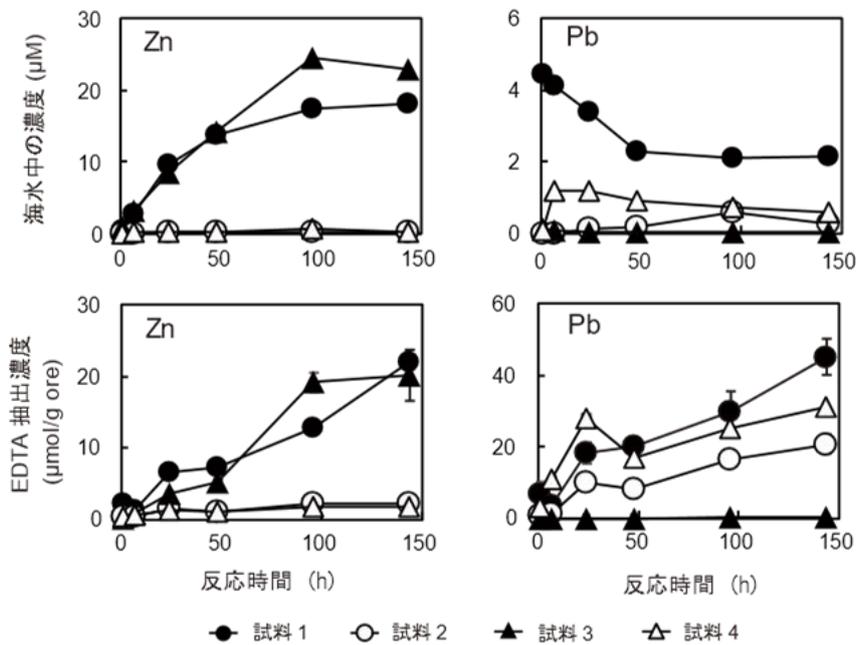


図 29 鉱石と反応後の海水中及び沈殿態 (EDTA 抽出) Zn・Pb 濃度の経時変化 (Fuchida et al., 2021)。

計算の結果、表 10 で示した Zn 及び Pb 溶出速度が得られた。この結果から、Zn の溶出速度は試料 1 及び試料 3 で 1 桁ほど大きくなるのがわかる。これらは前述のとおり、黄鉄鉱を含むことからガルバニック反応による硫化鉱物の溶解促進が期待される試料である。よって、本解析結果から、ガルバニック反応が ZnS の溶解を促進する律速段階となっ

ている可能性が高いことが示唆される。一方、Pbは試料1で溶解速度が最大となったが、他の試料とそれほど大きく変化しなかった。鉱石試料を X 線粉末回折で測定したところ、硫化鉱物より溶解度積の大きい硫酸鉛鉱 ( $\text{PbSO}_4$ ) の存在が確認された。 $\text{PbSO}_4$  の含有量を定量測定することは難しいが、Zn の場合とは異なり Pb は  $\text{PbSO}_4$  の溶解が主な律速段階であると考えられる。この結果をもとに、Zn 及び Pb の溶出速度と鉱石中の Fe/Zn 及び Fe/Pb モル比の関係について図 30 にまとめた。ここからわかるように、硫化鉱物の単純な酸化溶解反応によって鉱石から溶出する Zn 及び Pb の影響は小さく、 $\text{FeS}_2$  との反応によりその速度が 1 桁程度大きくなり、溶解度積の高い鉱物が含まれる場合はその溶解が支配的となり、急速な金属溶出を引き起こすことがわかる。すなわち、鉱石中の Fe 量や硫酸塩鉱物量を簡便に測定できれば、現場レベルで鉱石の金属溶出ポテンシャルを評価できると考えられる。

表 10 各鉱石からの Zn・Pb 溶出速度 (Fuchida et al., 2021)

	Dissolution rate ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	
	Zn	Pb
SMS-1	$1.5 \times 10^{-10}$	$8.4 \times 10^{-10}$
SMS-2	$1.8 \times 10^{-11}$	$5.0 \times 10^{-10}$
SMS-3	$1.3 \times 10^{-10}$	$2.4 \times 10^{-12}$
SMS-4	$1.6 \times 10^{-11}$	$8.0 \times 10^{-10}$

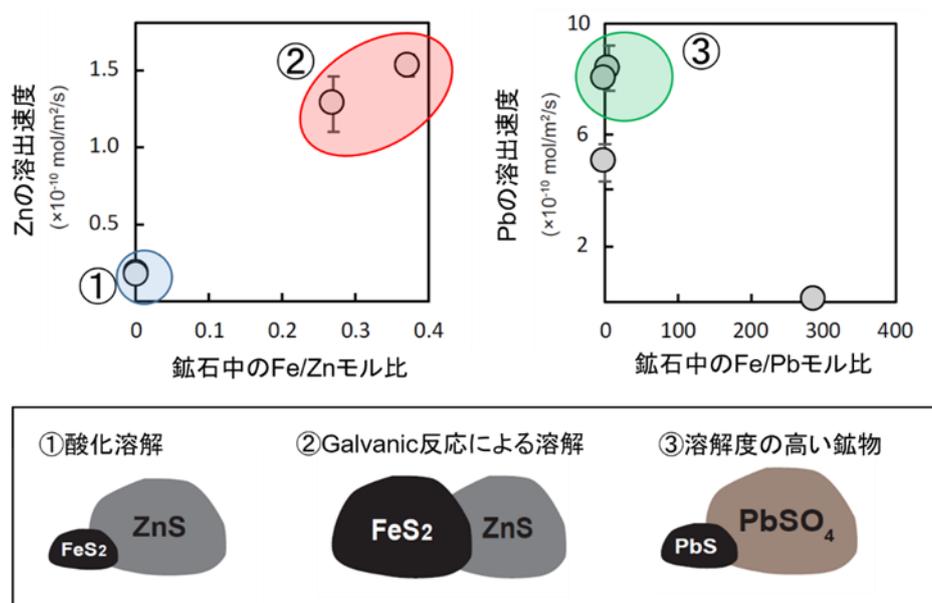


図 30 溶解速度と鉱石中の Fe 含有量との Fe/Zn・Fe/Pb モル比の関係。

#### (1) ヒ素溶出実験

##### 1) 亜ヒ酸分析条件の検討

海水中のヒ素を ICP-MS 分析する場合、ArCl の干渉により正確な定量は難しい。そこでまず、固相キレートカラムを使用し、溶液中の Cl を選択的に除去する方法を検討した。固相キレートカラムには MetaSEP IC-Ag (GLサイエンス社) 及びノビアスキレートカラム (日立ハイテック社) を使用した。それぞれのキレート樹脂を洗浄、活性化した後模擬試料

(As 50  $\mu\text{g/L}$ ) を通じてその回収率を確認した。処理後の溶液中の As 濃度を ICP-MS で測定した結果、いずれの固相キレートカラムを使用した場合でも回収率は 30~50 % と低く、前処理方法としては不十分であった。これは海水中の Cl やその他の夾雑物質がキレートカラム内で捕捉される際に As も同時に除去されたためだと考えられる。つぎに、ボルタンメトリー装置を利用した分析方法を検討した。この方法では検出下限値は数  $\mu\text{g/L}$  と ICPMS と比較して 1/100 程度感度は下がるが、海水など高マトリックス中の元素をより正確に定量できる。本研究では Salaiin et al. (2007) を参考に、ボルタンメトリー装置による最適な分析条件を検討した。まず、文献に記載されている通り試料に HCl を混合し、低 pH 条件下で測定した (方法 1)。その結果、ピークがブロードとなり再現性も低くなることが分かった。次に、緩衝液としてクエン酸溶液を加えて測定した (方法 2)。その結果、図 31 のとおりピークがブロードせず検出できた。標準添加法による検量線を作成したところ、 $R^2=0.99$  となり、定量性にも問題が無いことが確認された。以後、ヒ素の分析にはボルタンメトリー法を適用した。

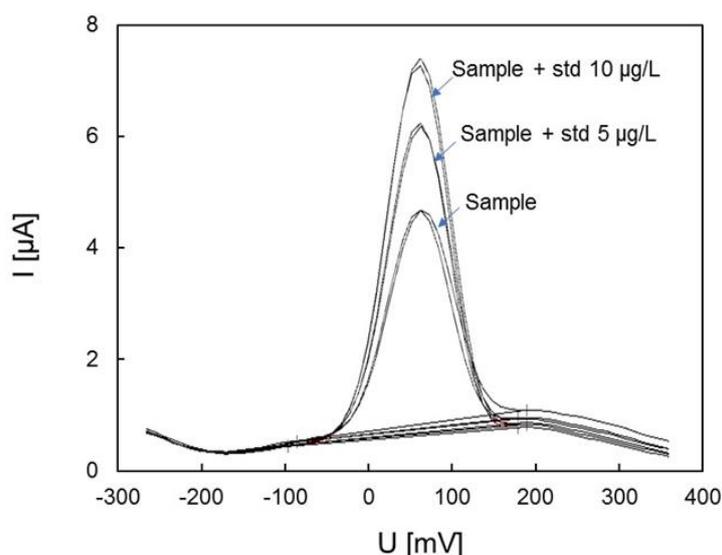


図 31 ボルタンメトリーによるヒ素測定例(方法 2)。

## 2) 亜ヒ酸溶出実験

総ヒ素濃度と亜ヒ酸濃度を比較したところ、95%以上が亜ヒ酸であることが確認された。3 価の亜ヒ酸は 5 価のヒ酸と比べてその毒性が非常に高く、自然環境中における動態に関して不明な点が多い。そのため、本研究では総ヒ素濃度ではなく亜ヒ酸の溶出挙動に着目した。14 種類の熱水鉱石中のヒ素濃度を網羅的に分析し、そのうちヒ素濃度の高い 3 つの試料 (試料 A: 19.04 mg/g (254 mmol/kg)、試料 B: 20.96 mg/g (279 mmol/kg)、試料 C: 26.03 mg/g (347 mmol/kg)) を選択した。3 つの試料を溶出試験に供したところ、5 分という短時間で全ての鉱石からおおよそ 50  $\mu\text{g/L}$  の亜ヒ酸が溶出した。さらに 6 時間後には 170~250  $\mu\text{g/L}$ 、18 時間後には 260~300  $\mu\text{g/L}$  となった (図 32)。この濃度は国内のヒ素の一律排水基準値 (100  $\mu\text{g/L}$ ) よりも高い。実際の溶出試験法では固体:液体比=1:10 で実施するため、さらに高い濃度でヒ素が検出されると予想される。また溶液中に溶出したヒ素の量は鉱石中の総ヒ素量のうち 1%未満であり、さらに長時間反応させた場合、ヒ素の溶出量が増加すると考えられる。得られた結果をもとに各鉱石からの亜ヒ酸溶出速度 ( $R$ ) を計算した。計算には以下の式 8 を使用した (Fuchida et al., 2018)。

$$R = \frac{a}{(A_{BET} \cdot r) \cdot m} \quad (\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) \quad (8)$$

ここで、 $a$  は反応時間に対するヒ素濃度変化直線の傾き ( $\text{mol/L/s}$ )、 $A_{BET}$  は鉱石粒子の比表面積 ( $\text{m}^2/\text{g}$ )、 $r$  は鉱石中のヒ素重量比 (-)、 $m$  は溶液中に存在するヒ素鉱物の量 ( $\text{g/L}$ ) を示している。ただし、鉱石の比表面積は窒素ガス吸着

法 (MicrotracBEL, BELSORP-max) で測定した値 ( $1 \text{ m}^2/\text{g}$ ) を使用した。sample A、B、Cからのヒ素溶出平均速度を計算したところ、表 11 のような値が得られた。鉱石中のヒ素は主に鶏冠石 ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) であるが、その溶解速度は pH8 付近で  $1.0 \times 10^{-10} \text{ mol/L/s}$  程度と報告されており、実験結果より 2桁程度小さい値となった。これは鉱石中のヒ素がより分解しやすい非晶質体や他鉱物に含まれた形態で存在していたか、鉱石中の他鉱物との相互反応による鶏冠石分解反応が促進されたかのどちらかの可能性が考えられる。

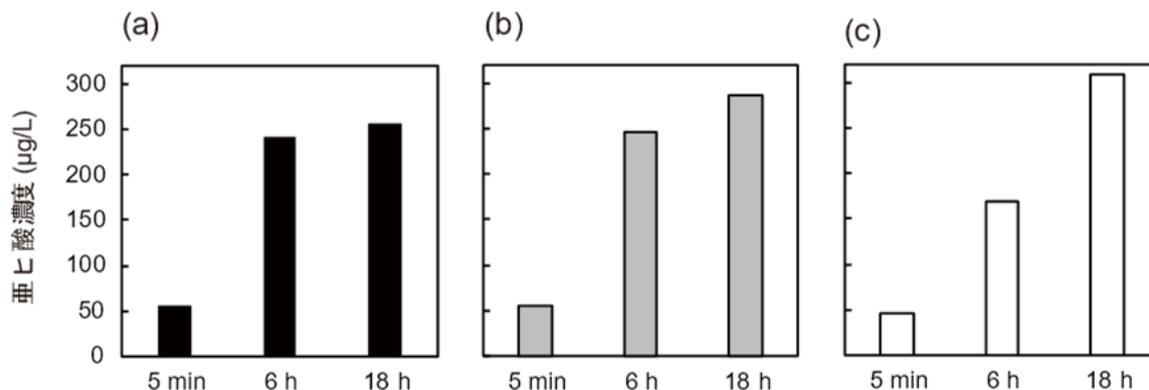


図 32 (a) 試料 A、(b) 試料 B、(c) 試料 C 反応系の亜ヒ酸濃度の時間変化。

表 11 鉱石からのヒ素溶出速度

	As 含有率 (%)	As 溶出速度 ( $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )
試料 A	1.9	$1.2 \times 10^{-8}$
試料 B	2.1	$1.4 \times 10^{-8}$
試料 C	2.6	$1.6 \times 10^{-8}$

### 3) ヒ素含有鉱物の観察

熱水性鉱石中のヒ素含有鉱物を同定するために、熱水鉱石 (試料 B) を作成し走査型電子顕微鏡 (SEM-EDS) で分析した。鉱石粒子の研磨片を作成し、ZnS 及び PbS とみられる断面を分析した。その結果、それぞれヒ素の含有率が 3.4 at%、9.6 at% と高い値を示した (図 7)。熱水鉱石中の As の大部分は鶏冠石 ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) のような溶解速度の遅い硫化鉱物として存在しているが、ガルバニック反応にともなう ZnS 及び PbS の選択溶解によって As が海水中へ溶出すると考えられる。実際に、実験で得られた As の溶出速度は  $\text{As}_4\text{S}_4$  の溶解速度より 2桁程高いことから (Lengke et al., 2009)、熱水鉱石からの As 溶出は ZnS や PbS の酸化溶解反応に起因することが裏付けられる。

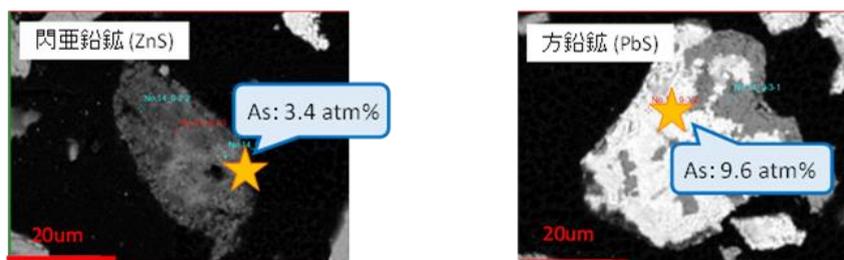


図 33 SEM-EDS による ZnS 及び PbS 粒子中のヒ素含有量測定結果。

## 引用文献

- 1) Fuchida S., Ishibashi J., Shimada K., Nozaki T., Kumagai H., Kawachi M., Matsushita Y., & Koshikawa H. (2018). Onboard metal leaching experiment of fresh hydrothermal sulfide cores into seawater, *Geochemical Transaction*, 19, 15.
- 2) <https://doi.org/10.1186/s12932-018-0060-9>
- 3) Fuchida S., Kawachi M., & Koshikawa H. (2021). Kinetic investigation of galvanic dissolution of ZnS and PbS with FeS<sub>2</sub> from hydrothermal sulfides in seawater, *Applied Geochemistry* 129, 104963 <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104963>
- 4) Lengke F. M., Sanpawanitchakit C., & Tempel G. (2009). The oxidation and dissolution of arsenic-bearing sulfides. *The Canadian Mineralogist* 47, 593-613 <http://dx.doi.org/10.3749/canmin.47.3.593>
- 5) Salatin P., Planer-Friedrich B., & van den Berg C. M. G. (2007). Inorganic arsenic speciation in water and seawater by anodic stripping voltammetry with a gold microelectrode. *Analytica Chimica Acta* 585, 312-322
- 6) <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.048>
- 7) 淵田茂司, 越川海, 河地正伸. (2020) 海底熱水鉱石の金属溶出特性—海底鉱物資源開発における環境影響評価—, *地球化学* 54, 17-24. <https://doi.org/10.14934/chikyukagaku.54.15>

## 2.7 漏出事故を想定した揚鉦水の海洋拡散シミュレーション

### 2.7.1 背景と目的

近年、有望な海底鉦床が深海で相次いで発見され、その資源獲得に向けた技術開発や調査研究が活発に進められている（福島, 2017）。その重要なテーマの一つとして、開発に伴う環境・生態系への影響やその緩和策を講じた場合の効果を予測する環境影響評価の手法確立・国際標準化が求められている。海底資源開発による影響としては、海底の攪乱が真っ先に挙げられ、海底掘削時や揚鉦排水時に大量発生する懸濁粒子の拡散・再堆積等によって開発区とその周辺の生態系破壊が想定される。また、鉦床に含まれる重金属や放射性物質など有害物質の溶出による影響も懸念されている。

海洋表層についても、洋上プラントからの揚鉦水や有害物質の漏出が懸念される。これまでの調査研究では、海底から海上に移送された揚鉦水は、母船において鉦石の採集と懸濁粒子の除去などの処理が行われた後、再び海底近くまで送られて海洋放出されることが想定されている（Nautilus Minerals Niugini Ltd., 2008）。しかし、揚鉦水の移送や母船での処理の過程において何らかの事故・トラブルが発生し、海洋表層に揚鉦水が大量漏出する可能性は否定できない。本研究では、海底資源開発の環境影響評価手法の確立に向けた一研究として、商業生産時の揚鉦水漏出事故を想定した海洋拡散シミュレーションを行い、揚鉦水の影響範囲に関する知見の収集とそれを簡易的に特定する手法について検討した。

### 2.7.2 方法

#### (1) 海洋流動モデルの概要

数値シミュレーションには、先行研究（Higashi et al., 2015）で開発した3次元流動モデルを使用した。本流動モデルは一般によく用いられる連続式、静水圧近似・ブシネスク近似の運動方程式、塩分・熱輸送方程式、UNESCO（1981）の状態方程式で構成され、数値解法にはコロケート格子・レベル座標系の有限差分法、自由水面の追跡にはVOF法（Hirt and Nichols, 1981）を採用している。乱流混合には、水平方向にはSmagorinsky（1963）、鉛直方向にはFuruichi et al.（2012）のパラメタリゼーションを使用している。また、大気-海洋間で生じる運動・熱交換については、Kondo（1975）の手法に従って算定している。

#### (2) 揚鉦水の海洋拡散と漏出条件

漏出した揚鉦水については、沈降や内部生成・消失がないパッシブトレーサと見なし、海水中における動態は塩分と同様の輸送方程式に従うものとして拡散解析を行った。

トレーサの濃度は漏出水を基準（100%）とした濃度比で表現するものとし、漏出水の流量については2017年に沖縄近海で実施された採鉦・揚鉦パイロット試験（石黒ら, 2018）を参考にして次のとおりを設定した。このパイロット試験では、水深1600mの海底において集鉦機で吸い込んだ鉦石が約7分で海上の揚鉦母船に到達しており、揚鉦水の流量を目標値 $140\text{ m}^3/\text{h}$ （ $=0.039\text{ m}^3/\text{s}$ ）の $\pm 5\text{ m}^3/\text{h}$ で安定して制御することに成功したと報告されている。試験時は内径約100mmの揚鉦管を使用しているが、商業生産時にはその数倍となることが想定されている（川野, 2018）。商業生産時における揚鉦管の内径をその3倍の300mmと仮定し、流速は変わらないものとする、そのときの揚鉦水の流量は $1260\text{ m}^3/\text{h}$ （ $=0.35\text{ m}^3/\text{s}$ ）と算定される。これは漏出事故発生時の集鉦機1台あたりの最大流量と見なせるため、この値を本シミュレーションにおける揚鉦水の漏出流量条件として採用した。なお、複数台の集鉦機を使用した大規模開発のときの揚鉦水の流量はさらに増えることが予想されるが、複数台同時の事故発生確率は1台のときよりも著しく低いと考えられるため、本研究では検討対象から除外した。

#### (3) 解析対象領域・期間と気象・海象条件

揚鉦水の海洋拡散は、気象・海象条件に左右されるため、予想される様々な状況を踏まえた包括的な検討が必要と考えられる。気象・海象は海域によっても異なるため、本研究では海底資源が有望視されている5つのサイト（図34）を選定し、2017年1～12月を解析対象とした。主な解析条件と使用データの一覧を

表 12 に示す。解析領域は、いずれの海域においても東西 5.0 km×南北 6.7 km の矩形領域 (241×241 格子) を設定し、水平解像度は 20.5×27.7 m、鉛直層は海面から 32 m 深までの 20 層 (層厚 1~3 m) とした。揚鉍水の漏出地点は解析領域中心の 1 格子とし、上記の漏出流量・濃度条件を全期間一定で与えた。

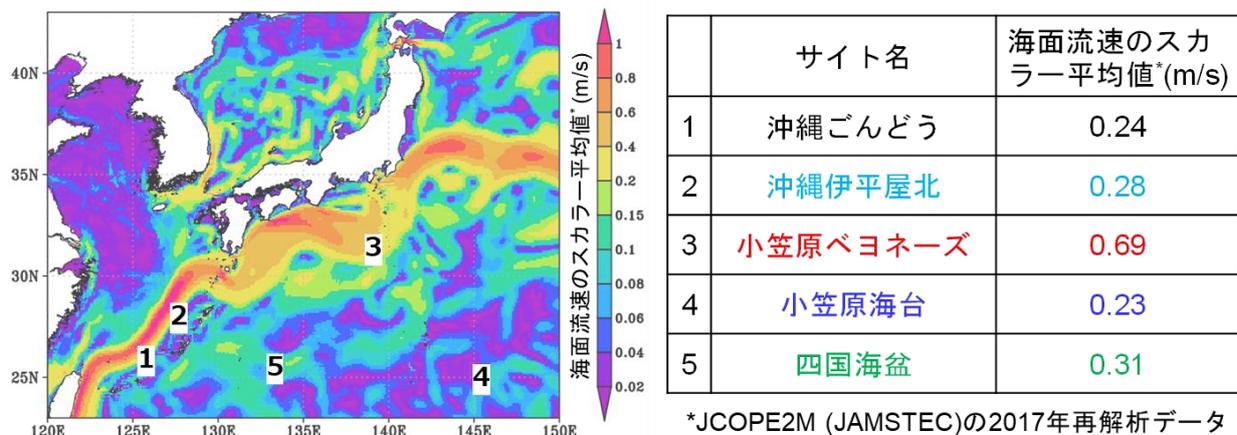


図 34 揚鉍水の海洋拡散シミュレーションで対象とした5つのサイト。

表 12 解析条件と使用データの一覧

解析期間	2017年1月1日~12月31日
解析領域	東西 1/20°×南北 1/16.5° (格子数 241×241)
水平解像度	東西 1/4800°×南北 1/4000°
鉛直解像度	海面下 32m まで 20 層 (層厚 1~3 m)
海上気象	短波・長波放射量: JRA-55 (気象庁)、その他: GPV-MSM (気象庁)
外洋境界	水温・塩分: JCOPE2M (JAMSTEC)、潮位: NAO99Jb (NAO) 流速: Flather 式 (潮流) + JCOPE2M (残差流)
揚鉍水漏出流量、濃度	0.35 m <sup>3</sup> /s (一定)、1 (=100%) (一定)

### 2.7.3 結果と考察

#### (1) 揚鉍水 (トレーサ) の水平・鉛直拡散と海洋希釈

図 35 に 5 つのサイトの揚鉍水の海洋拡散シミュレーションで得られた各格子における海面トレーサ濃度比の最大値の分布を示す。鉍石の金属類溶出試験において亜鉛 (1.1 ppm) と鉛 (0.6 ppm) は日本の水質環境基準 (亜鉛: 0.01~0.02 ppm、鉛: 0.01 ppm) の概ね 50~100 倍の濃度であったため、100 倍希釈に相当する濃度比 1% を指標にすると、揚鉍水の拡散範囲は漏出点から数百 m 程度までしか拡がらないことが分かる。この結果はあくまでも最大値の分布であるため、瞬間的にはこれよりもさらに狭い範囲に留まる。図 36 は漏出点におけるトレーサ濃度比の鉛直断面時系列を示しているが、深さ方向においても濃度比 1% 以上の領域は非常に限定的であり、最も深いところ (沖縄ごんどう) でも海面下 6 m 程度であることが分かる。商業生産時を想定した揚鉍水の漏出流量を計算に与えたとはいえ、海洋の流動に比べれば非常に小さいものであったため、拡散過程において希釈効果が卓越する結果になったと考えられる。

サイト間の結果を比較すると、水平方向 (図 35) と鉛直方向 (図 36) のいずれも濃度比 1% の範囲は小笠原ベヨネーズが最も狭い傾向が見られる。他の 4 つのサイト間にも拡散方向など多少の違いは見られるが、明らかに小笠原ベヨネーズは他と異なる濃度分布を有している。図 34 に JCOPE2M 再解析データ (JAMSTEC) における 2017 年の海面流速のスカラ平均値を併示してあるが、小笠原ベヨネーズは、流速が他の 4 つのサイトのほぼ 2 倍以上と突出して大きく、比較的海水の流れが速いサイトと言える。そのため、小笠原ベヨネーズでは他のサイトよりも海洋拡散による希釈効果が強く表れたと考えられる。

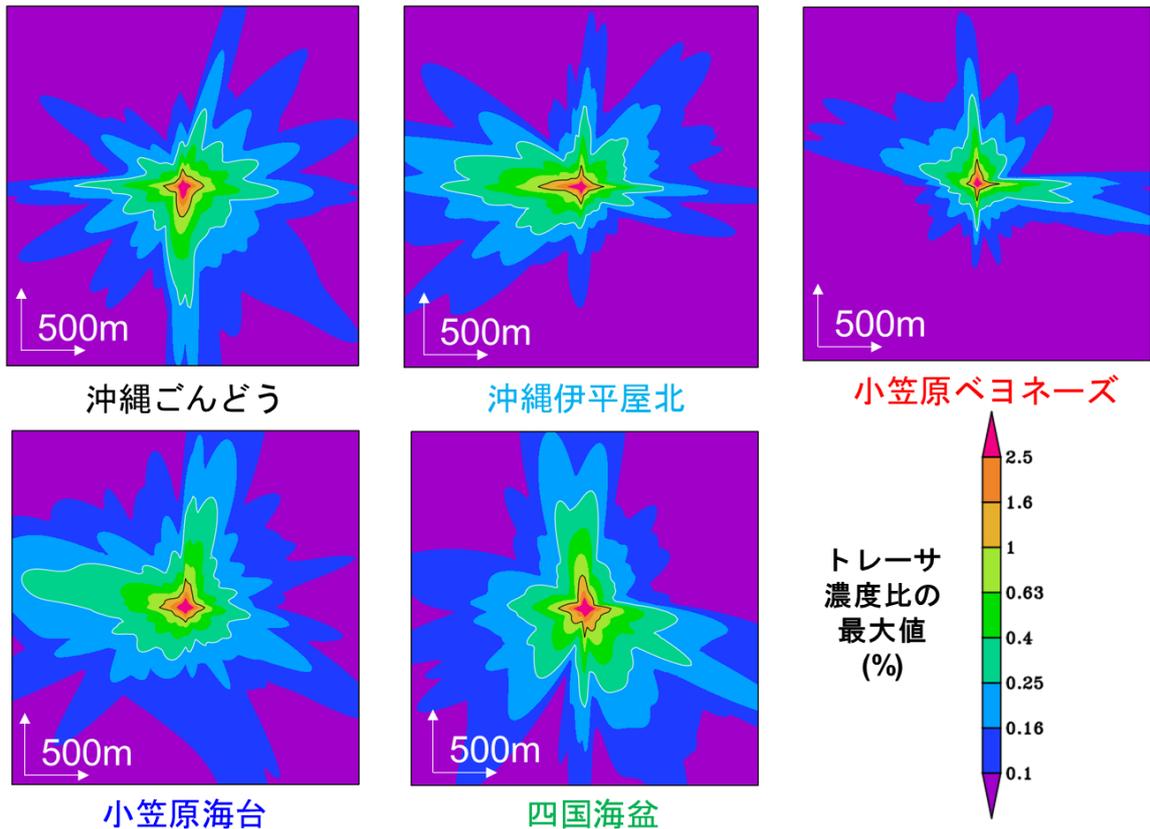


図 35 シミュレーション結果における各格子の海面トレーサ濃度比の最大値（いずれも漏出点は中心）。

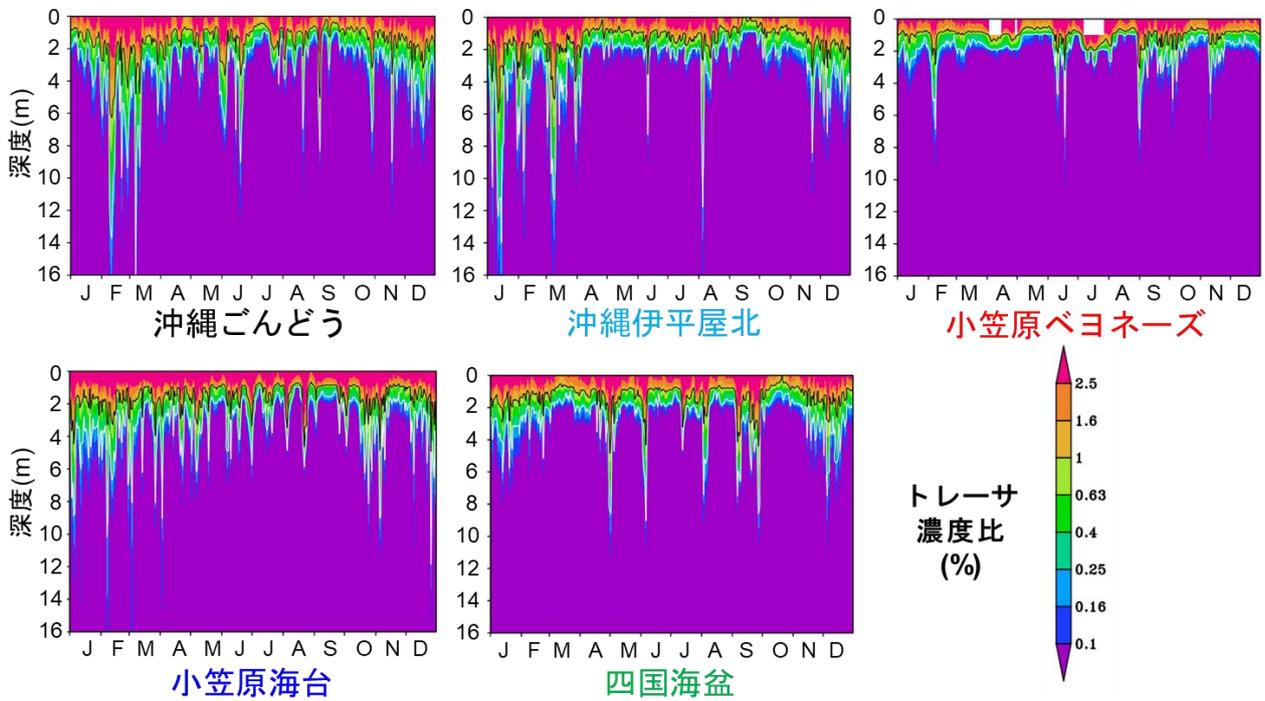


図 36 シミュレーションで得られた漏出点におけるトレーサ濃度比の鉛直断面時系列。

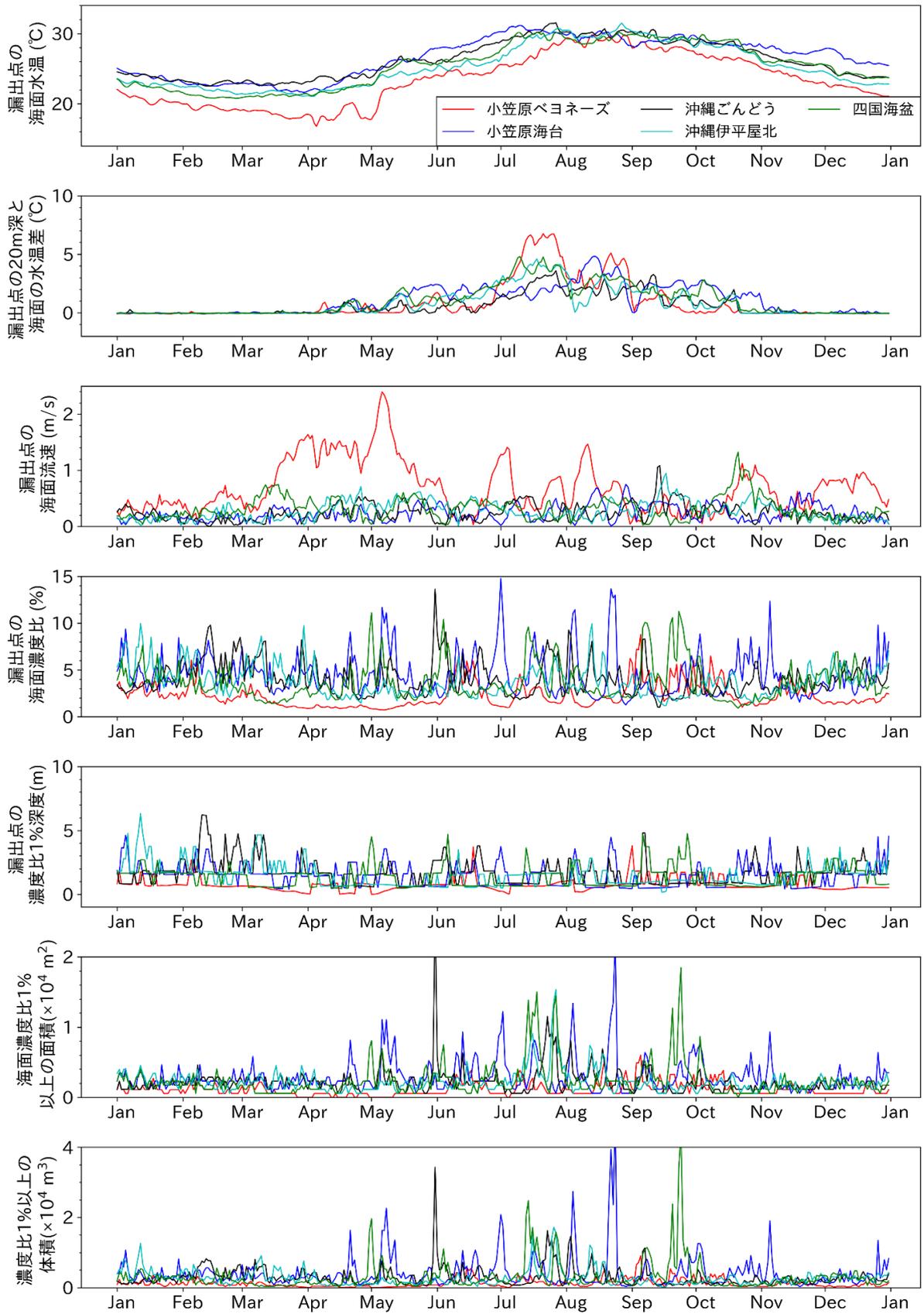


図 37 揚鉦水の海洋拡散シミュレーションで得られた時系列データ。

### (1) 海洋拡散の季節性

図 37 に揚鉦水の海洋拡散シミュレーションで得られた 5 つのサイトの時系列データを示す。まず、濃度比 1% 以上の面積と体積の変動を見ると、概ね 5 月から 11 月にかけて、急峻な増加と減少が頻発化する季節性がすべてのサイトで確認できる。同期間は漏出点の 20m 深と海面の水温差が大きいことから、成層の発達によって上層と下層の混合が弱まり、海面近傍における鉛直方向の希釈が抑制されるため、比較的高濃度の水塊が形成されやすい環境であるといえる。反対に、鉛直混合が強い 12~4 月は、漏出点直下においては濃度比 1% 深度が深くなる傾向が見られる (図 36) もの、濃度比 1% 以上の面積と体積に大きな変動は見られない (図 37)。一方、夏場は常に高濃度というわけでもなく、濃度比 1% 以上の面積と体積が急増するときは、海面流速が弱い期間に限られることが分かる (図 37)。この短期的な流速の変動は、言うまでもなく、海流や気象擾乱に支配されるものである。

以上をまとめると、濃度比 1% 以上の水塊の形成には、鉛直混合と水平輸送の両方が一定期間停滞し、常時漏出する揚鉦水の滞留・蓄積が必要であると考えられる。反対に、流れや混合が速くなるほど、海洋の希釈効果が強まるため、揚鉦水漏出の影響は小さくなると言える。

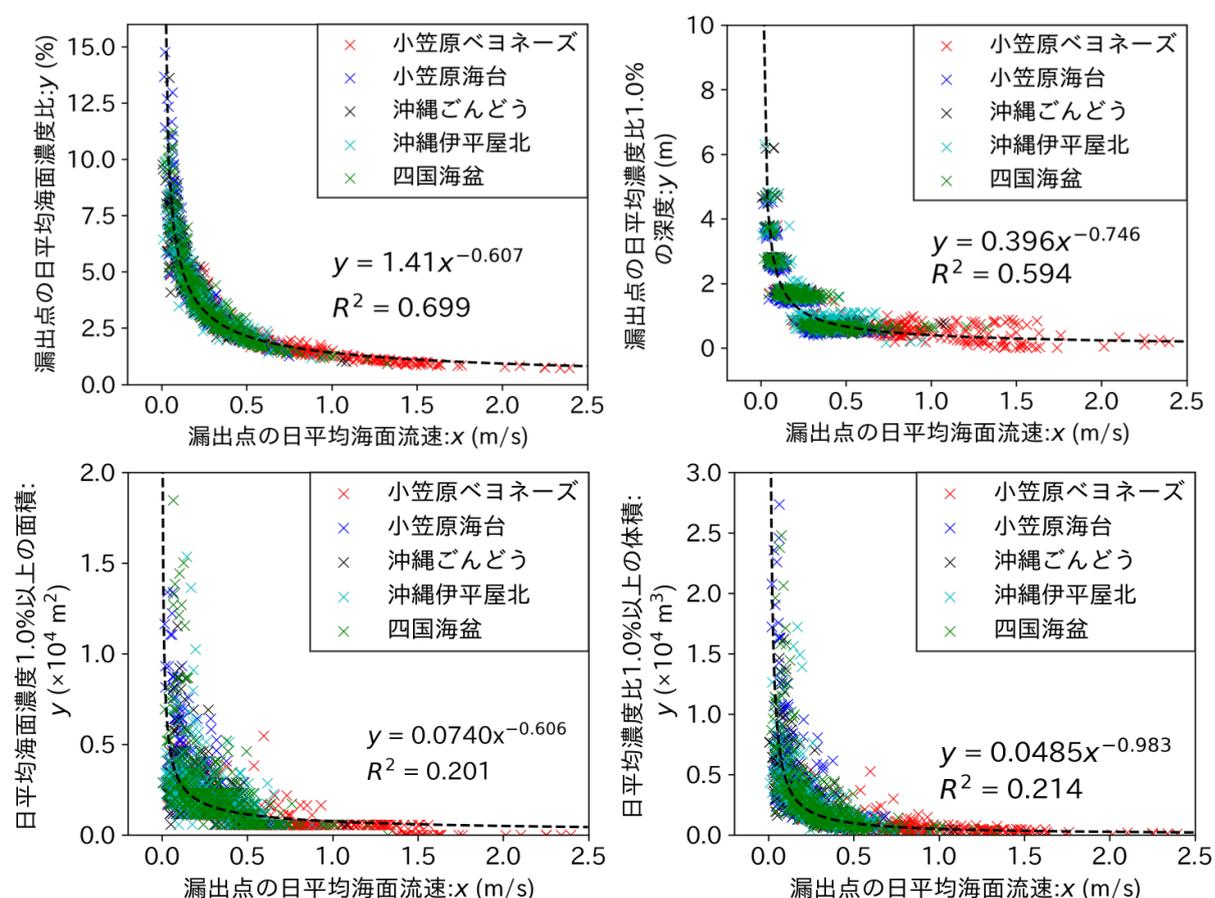


図 38 漏出点の海面流速と 4 つの指標 (左上: 漏出点の海面濃度比、右上: 漏出点の濃度比 1% 深度、左下: 海面濃度比 1% 以上の面積、右下: 濃度比 1% 以上の体積) の関係 ( $R^2$  は決定係数)。

### (2) 揚鉦水の拡散と流速の関係・経験則

数値シミュレーションを使用せずに揚鉦水の海洋拡散を特定する簡易的な手法の開発は、実際の現場においても有用であると考えられる。これまでの考察結果より、揚鉦水の高濃度水塊の形成と海洋拡散は流速に強く依存することが示唆された。現場の流速データは船舶に搭載されている ADCP 等によって比較的容易に取得可能であることを踏まえ、漏出点の海面流速を基準として、5 つのサイトのシミュレーション結果の整理・解析を行った。

図 38 に漏出点の海面流速と 4 つの指標（漏出点の海面濃度比、漏出点の濃度比 1% 深度、海面濃度比 1% 以上の面積、及び濃度比 1% 以上の体積）の関係を示す。なお、海面流速と 4 つの指標にはいずれも日平均値を使用した。まず、漏出点（厳密には水平解像度 20.5×27.7 m の格子内平均）の海面濃度比を見ると、5 つの異なるサイトの計算結果にも関わらず、海面流速を説明変数とする 1 つの累乗近似式によく適合している（決定係数 0.699）ことが分かる。漏出点の濃度比 1% 深度については、モデルの鉛直解像度の制約によって深度の値が不連続である点は課題であるが、こちらも海面流速を用いた近似式の有用性が窺える（決定係数 0.594）。

海面濃度比 1% 以上の面積と濃度比 1% 以上の体積については、同じく海面流速を説明変数とする近似式で表せるように見えるが、流速 0.5 m/s 以下の領域における誤差が大きく、決定係数も 0.2 程度と適合性が良くないことが分かる。両者は、漏出点のみでなく、計算領域全体を対象とした濃度比 1% 以上の水塊スケールを表す指標であるため、同じ日平均流速でも、初期の水塊の位置によって 1 日経過後も水塊が領域内に留まる、領域外に流出するといった違いが生じてしまう。また、流れや混合が停滞する期間は 1 日とは限らないため、揚鉍水の蓄積・滞留が日平均流速では対応できないことも原因として考えられる。揚鉍水の高濃度水塊のスケールを推定する手法には改善の余地が残されており、今後の課題である。

#### 2.7.4 まとめ

本研究では、海底資源が有望視されている 5 つのサイト（沖縄ごんどう、沖縄伊平屋北、小笠原ベヨネーズ、小笠原海台、四国海盆）を選定して、実際（2017 年）の気象・海象条件のもと、商業生産時の揚鉍水漏出事故を想定した海洋拡散シミュレーションを実施した。漏出揚鉍水の 100 倍希釈に相当する濃度比 1% に着目して解析した結果、濃度比 1% 以上の水塊の形成には、鉛直混合と水平輸送の両方が一定期間停滞し、常時漏出する揚鉍水の滞留・蓄積が必要であることが分かった。反対に、流れや混合が速くなるほど、海洋の希釈効果が強まるため、揚鉍水漏出の影響は小さくなることが明らかになった。また、漏出点の海面濃度比と濃度比 1% の深度は、海面流速との明瞭な関係性が見られ、サイト間で共通する 1 つの近似式で表現できることを見出した。これらの近似式は、実際の現場において漏出水の影響範囲を特定する簡易的手法として有用であると考えられた。

本数値実験は、沈降や内部生成・消失がない溶存物質を対象として実施したが、鉍物粒子との吸脱着の影響や水中を沈降する粒状態物質の海洋拡散に関する知見の収集は今後の課題である。今後の展開としては、海底鉍石の溶出試験やバイオアッセイの結果を活用した生態系への影響評価シミュレーション、開発規模に応じた環境影響評価とそれに必要なモニタリング体制（調査点の数や位置、サンプリング頻度等）の方策検討などがあげられる。

## 引用文献

- 1) Furuichi, N., Hibiya, T., Niwa, Y. (2012) Assessment of turbulence closure models for resonant inertial response in the oceanic mixed layer using a large eddy simulation model, *J. Oceanogr.*, 68, 285-294. <https://doi.org/10.1007/s10872-011-0095-3>
- 2) Hirt CW, Nichols BD (1981) Volume of fluid method for the dynamics of free boundaries, *J. Comput. Phys.*, 39, 201-225. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(81\)90145-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(81)90145-5)
- 3) Higashi H, Morino Y, Furuichi N, Ohara T (2015) Ocean dynamic processes causing spatially heterogeneous distribution of sedimentary caesium-137 massively released from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, *Biogeosciences*, 12, 7107-7128. <https://doi.org/10.5194/bg-12-7107-2015>
- 4) Kondo, J. (1975) Air-sea bulk transfer coefficients in diabatic conditions, *Bound.-Layer Meteor.*, 9, 91-112. <https://doi.org/10.1007/BF00232256>
- 5) Nautilus Minerals Niugini Ltd. (2008) Environmental Impact Statement, Solwara 1 Project, Executive Summary, 1-42 <https://dsmobserver.com/wp-content/uploads/2017/05/Environmental-Impact-Statement-Executive-Summary-English-1.pdf>
- 6) Smagorinsky, J. (1963) General circulation experiments with the primitive equations, I. The basic experiment, *Mon. Weather Rev.*, 91, 99-164. [https://doi.org/10.1175/1520-0493\(1963\)091<0099:GCEWTP>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1963)091<0099:GCEWTP>2.3.CO;2)
- 7) UNESCO (1981) Tenth rep. of the joint panel on oceanographic tables and standards, UNESCO Tech. Pap. in Marine Science, No. 36, UNESCO, Paris, 25p.
- 8) 石黒慎二, 益田将寛, 小松正夫, 山路法宏, 川野誠矢 (2018) 海底熱水鉱床 採鉱・揚鉱パイロット試験システムの開発, 三菱重工技報, 55(3), 1-6.
- 9) 川野誠矢 (2018) 採鉱技術開発～世界初の採鉱・揚鉱パイロット試験～, 平成 30 年度第 1 回 JOGMEC 金属資源セミナー資料 ([https://mric.jogmec.go.jp/wp-content/uploads/2018/05/mrseminar2018\\_01\\_02.pdf](https://mric.jogmec.go.jp/wp-content/uploads/2018/05/mrseminar2018_01_02.pdf)).
- 10) 福島朋彦 (2017) 海底鉱物資源開発の EIA のための影響要因と環境要素の再検討, 第 26 回海洋工学シンポジウム講演論文集, OES26-008, 5p.

[資 料]

# 1 研究の組織と研究課題の構成

## 1.1 研究の組織

### [A 研究担当者]

生物・生態系環境研究センター	
生物多様性資源保全研究推進室	河地正伸 大田修平 山口晴代
地域環境研究センター	
海洋環境研究室	越川 海 東 博紀
環境計測研究センター	
基盤計測化学研究室	武内章記
環境リスク・健康研究センター	
生態毒性研究室	山本裕史 山岸隆博
曝露影響計測研究室	大曲 遼*

(注) 所属・役職は年度終了時点のもの。また、\*印は過去に所属していた職員等を示す。

### [B 共同研究員]

淵田茂司 (早稲田大学) (令和元年度～令和3年度)

## 1.2 研究課題と担当者

- サブテーマ1 フローサイトメトリーを利用した重金属の植物プランクトンへの影響評価  
大田修平、山口晴代、越川 海、河地正伸
- サブテーマ2 L 乾燥による試薬化藻類を用いた遅延発光バイオアッセイ法の開発  
大田修平、山岸隆博、越川 海、河地正伸
- サブテーマ3 外洋性植物プランクトンへの重金属等の影響及びSSD解析  
山岸隆博、山本裕史、大曲 遼、大田修平、河地正伸
- サブテーマ4 リアルタイム水質監視システムの開発  
越川 海、河地正伸
- サブテーマ5 鉱石からの水銀溶出動態と洋上水銀分析の検討  
武内章記、淵田茂司\*
- サブテーマ6 鉱石からの金属溶出動態 (Zn、Pb、As) の検討  
淵田茂司\*、武内章記、越川 海
- サブテーマ7 漏出事故を想定した揚鉱水の海洋拡散シミュレーション  
東 博紀、越川 海

(注) \*共同研究員

## 2 研究成果発表一覧

### 2.1 誌上発表

<雑誌>

---

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

---

Tsuboi, S., Yamaguchi, H., Fuchida, S., Koshikawa, H., Kawachi, M., 2019. Short-Term Changes in Marine Prokaryotic and Eukaryotic Microalgal Communities Exposed to the Leachate of a Seafloor Hydrothermal Sulfide. *Water, Air, & Soil Pollution* 230, 175, doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4224-8>

淵田茂司, 越川海, 河地正伸 (2020). 海底熱水鉱石の金属溶出特性—海底鉱物資源開発における環境影響評価—, *地球化学* 54, pp 17-24, doi: <https://doi.org/10.14934/chikyukagaku.54.15>

Ota, S., Yamaguchi, H., Vanel, F., Fuchida, S., Koshikawa, H., Yamagishi, T., Yamamoto, H., Kawachi, M., 2020. Differential heavy metal sensitivity in seven algal species from the NIES culture collection based on delayed fluorescence assays. *Phycological Research* 68, 41-49, doi: <https://doi.org/10.1111/pre.12403>

Fuchida, S., Kawachi, M., Koshikawa, H., 2021. Kinetic investigation of galvanic dissolution of ZnS and PbS with FeS<sub>2</sub> from hydrothermal sulfides in seawater. *Applied Geochemistry* 129, 104963, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104963>.

ISO 23734 (2021) Marine technology — Marine environment impact assessment (MEIA) — On-board bioassay to monitor seawater quality using delayed fluorescence of microalga, <https://www.iso.org/standard/76789.html>

Ota, S., Fuchida, S., Yamaguchi, H., Yamagishi, T., Yamamoto, H., Koshikawa, H., Kawachi, M., 2022. Propidium iodide staining and flow cytometry-based assessment of heavy metal impact on marine phytoplankton. *Cytologia* 87, 177-187, doi: <https://doi.org/10.1508/cytologia.87.177>

<書籍等 (分担執筆) >

---

発表者・(刊年)・題目・編著者名・書名・出版社・頁

---

Yamagishi, T., Ota, S., Yamaguchi, H., Koshikawa, H., Tatarazako, N., Yamamoto, H., Kawachi, M., 2019. Ecotoxicological Bioassay Using Marine Algae for Deep-Sea Mining, in: Sharma, R. (Ed.), *Environmental Issues of Deep-Sea Mining: Impacts, Consequences and Policy Perspectives*. Springer International Publishing, Cham, pp. 255-271, doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-12696-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-12696-4_10)

Fuchida, S., Ishibashi, J.-i., Nozaki, T., Matsushita, Y., Kawachi, M., Koshikawa, H., 2019. Metal Mobility from Hydrothermal Sulfides into Seawater During Deep Seafloor Mining Operations, in: Sharma, R. (Ed.), *Environmental Issues of Deep-Sea Mining: Impacts, Consequences and Policy Perspectives*. Springer International Publishing, Cham, pp. 213-229, doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-12696-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-12696-4_8)

河地正伸, 大田修平, 越川海, 海水中の重金属の存在を検出する方法及びキット, 特願 2018-218366 (2018/11/21), 特開 2020-80696 (2020/06/04), 特許第 7148127 (2022/09/27).

越川海, 河地正伸, 淵田茂司, 大田修平, 三輪哲也, 古島靖夫, 近藤俊裕, 光合成阻害物質混入検出装置及び光合成阻害物質混入検出方法, 特願 2019-26026 (2019/02/15 出願), 特開 2020-130016 (2020/08/31 公開), 特許第 7193087 (2022/12/12), 国際出願 PCT/JP2020/004646 (欧州 EP20756452.7, 米国 US17/430,244, 中国 CN202080013741.7).

淵田茂司, 越川海, 河地正伸, 大気における海底鉱石の重金属溶出防止方法 特願 2019-055381 (2019/03/22), 特開 2020-152998 (2020/09/24), 審査において拒絶通知受領 (2023/01/17).

大田修平, 河地正伸, 越川海, 検出方法、藻類乾燥物の製造方法、藻類乾燥物、及び藻類乾燥物の品質管理方法, 特願 2022-047117 (2022/03/23 出願), 国際出願 PCT/JP2023/011478 (2023/3/23 出願).

## 2.2 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

大田修平, 淵田茂司, 越川海, 河地正伸 (2019) ベースラインデータ収集のためのフローサイトメトリー解析技術の応用—海底鉱物資源開発域における海洋表層環境への影響評価技術の確立に向けて—. ブルーアースサイエンス・テク 2019年2月, 横浜.

淵田茂司, 島田和彦, 石橋純一郎, 野崎達生, 熊谷英憲, 松下能孝, 越川海, 河地正伸 (2019) 海底鉱物資源開発の環境影響-熱水鉱床開発による海洋金属汚染の可能性を考える-. ブルーアースサイエンス・テク 2019年2月, 横浜.

淵田茂司, 越川海, 島田和彦, 石橋純一郎, 河地正伸 (2019). 海水中の硫化鉱物酸化還元反応と金属溶解プロセスの解明”, 資源地質学会第69回年会, 2019年6月, 東京.

大田修平, 淵田茂司, 山口晴代, 山岸隆博, 山本裕史, 越川海, 河地正伸 (2019) フローサイトメトリーを利用した海底鉱物資源開発域における植物プランクトンへの影響評価技術の開発. 日本植物学会第83回大会, 2019年9月, 仙台.

Fuchida S., Koshikawa H., Kawachi M. (2019) Evaluation of galvanic effects of sulfide minerals on metal dissolution from hydrothermal sulfides in seawater; implications for impact assessment of SMS-mining on marine environment. AGU Fall Meeting 2019, 2019年12月, San Francisco.

Takeuchi A., Fuchida S., Kawachi M. (2020) Mercury Leaching from Seafloor Massive Sulfide Deposits. Goldschmidt 2020, 2020年6月, オンライン開催.

大田修平, 平川泰久, 河地正伸 (2020) 緑藻類ホスファチジルイノシトール3リン酸の細胞内動態と重金属感受性に対する影響. 日本藻類学会第44回大会, 2020年3月, 鹿児島.

大田修平, 平川泰久, 河地正伸 (2021) 重金属暴露ストレス下で見られる緑藻のPI3P局在とLysoTracker局在の比較解析. 日本藻類学会第45回大会, 2021年3月, オンライン開催.

大田修平, 淵田茂司, 山岸隆博, 山口晴代, 越川海, 山本裕史, 河地正伸 (2021) PI染色による植物プランクトンへの重金属影響評価手法の開発と希薄海水サンプルへの適用. 日本植物学会第85回大会, 2021年9月, オンライン開催.

山本裕史, 山岸隆博, 河野真知, 渡部春奈, 岡健太, 河地正伸 (2021) 環境省推進費・海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発 (海産藻類、カイアシ、アミ) ~国環研の取組. 第24回日本水環境学会シンポジウム, 2021年9月, オンライン開催.

越川海, 河地正伸, 大田修平, 淵田茂司, 三輪哲也, 古島靖夫, 近藤俊祐 (2021) 現場植物プランクトン蛍光の量子収率を指標とした揚鉱中の表層水質のリアルタイム監視手法の開発. 海と地球のシンポジウム, 2021年12月, 東京.

大田修平, 淵田茂司, 山口晴代, 山岸隆博, 山本裕史, 越川海, 河地正伸 (2021) フローサイトメトリーを利用した海底金属資源開発域における植物プランクトンへの影響評価技術開発. 海と地球のシンポジウム, 2021年12月, 東京.

大田修平, 平川泰久, 河地正伸 (2021) PI3P分子を指標とした藻類細胞のストレス動態と多様性. 日本藻類学会第46回大会, 2022年3月, 福井 (オンライン開催).

河地正伸, 大田修平, 越川海, 山岸隆博 (2022) 藻類を用いた環境診断—海底鉱物資源開発に向けた環境影響評価手法の開発— SATテクノロジー・ショーケース 2022年2月, つくば.

Yamamoto H., Kawachi M., Iijima K., Kawagucci S., Miwa T., Inomata K., Kyo M., Koshikawa H., Tsutsumi K., Yoshida K. (2023) Practice of Marine Environmental Impact Assessment and Monitoring Using Iso Standards. 2023 IEEE Underwater Technology, 2023年3月, Tokyo.

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 145号  
NIES Research Project Report, No.145

(SR-145-2024)

海底鉱物資源開発における実用的環境影響評価技術に関する研究  
(所内公募型提案研究)

令和元年度～令和3年度

Study on practical assessment technique for marine environment during  
seafloor mineral mining  
FY2019～2021

---

令和6年3月発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会  
発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所  
〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2  
E-mail : pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies  
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan  
March 2024

---

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。

<https://www.nies.go.jp/kanko/index.html>