

バイオアッセイを用いた沿岸海水中の環境汚染物質の検出および高精度化 インドメダカを用いた生態毒生試験

堀江 好文

秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科

概要 近年、水産養殖業の発展に伴う「残餌や排泄物などの富栄養化による赤潮の発生」や「水産用医薬品（環境汚染物質）の使用による海洋汚染」、マイクロプラスチック汚染など、海洋汚染は最も深刻な環境問題の1つとなっている。従来の環境汚染物質の調査研究は、「フィールドより採取してきたサンプル水中に含まれる環境汚染物質の汚染濃度の測定する方法」と、「環境汚染物質を水生生物にばく露する（生態毒性試験）ことで、その生態影響を明らかにする方法」の2つがある。しかし、汚染濃度の測定法では、汚染物質の濃度を個別に測定する必要があり、対象以外の環境汚染物質の検出を見落とす可能性が大きい。また、生態毒性試験法では、対象物質の生態影響は正確に評価することはできるが、一般環境中で想定されるような、環境中に排出された多種多様な汚染物質が、複合的に水生生物に与える生態影響を明らかにするのは難しい。

我々の研究グループは、2019年度のソルト・サイエンス研究財団からの助成金（助成番号；1915）を受けて、我々の研究グループが新たに開発した海産生物を用いた生態毒性試験法を応用することで、実際の沿岸海水中に含まれる環境汚染物質を検出するバイオアッセイを用いた新たなスクリーニング手法を開発した。

そこで本研究では、新たに開発したスクリーニング手法を用いて、引続き、秋田県内の沿岸海水中に含まれる環境汚染物質のスクリーニングを行う。さらに、淡水環境中と比較して、沿岸海水中で医薬品、農薬などの化学物質の生態毒性値の変化についても明らかにすることを目的とする。

まず始めに、火力発電所から排水が流れ込む沿岸域と製紙工場近辺にある漁港を対象にバイオアッセイを行った。その結果、両地点共に深刻な環境汚染は認められなかった。

次に、一般化学物質と殺菌剤、農薬の合計5種類の化学物質を用いて、淡水環境中と海水環境中での生態毒性値の比較を行った。その結果、5物質中3物質で淡水メダカより、海産メダカの方がより低濃度で死亡することが明らかとなった。

1. 研究目的

近年、水産養殖業の発展に伴う「残餌や排泄物などの富栄養化による赤潮の発生」や「水産用医薬品（環境汚染物質）の使用による海洋汚染」、マイクロプラスチック汚染など、海洋汚染は最も深刻な環境問題の1つとなっている。さらに、2011年に発生した東日本大震災にともなう福島第一原子力発電所の被災による海域に大量の放射性物質などが放出されたことから、海水環境や海産生物の生息

環境の保全に関する技術が注目されている。

従来の環境汚染物質の調査研究は、「フィールドより採取してきたサンプル水中に含まれる環境汚染物質の汚染濃度の測定する方法」と、「環境汚染物質を水生生物にばく露する（生態毒性試験）ことで、その生態影響を明らかにする方法」の2つがある。しかし、汚染濃度の測定法では、汚染物質の濃度を個別に測定する必要があり、対象以外の環境汚染物質の検出を見落とす可能性が大きい。また、

生態毒性試験法では、対象物質の生態影響は正確に評価することはできるが、一般環境中で想定されるような、環境中に排出された多種多様な汚染物質が、複合的に水生生物に与える生態影響を明らかにするのは難しい。

そのため、近年、河川や公共用水、事業所排水に含まれる環境汚染物質の影響を総合的に把握・評価することができる WET 手法(バイオアッセイを利用した排水管理手法)が注目されている。WET 手法では、生物を用いて排水に毒性があるかどうかを総合的に評価することが可能である。そのため、米国やカナダ、ヨーロッパ諸国では既に法整備がなされており、日本でも平成 21 年より環境省よりその導入検討が進められている。しかし、WET 手法を含めた環境汚染物質に対するバイオアッセイは淡水域を想定しており、沿岸域の生態リスクを評価するバイオアッセイは構築されていないのが現状である。

我々の研究グループは、2019 年度のソルト・サイエンス研究財団からの助成金(助成番号; 1915)を受けて、我々の研究グループが新たに開発した海産生物を用いた生態毒性試験法^(1-1, 1-2)を応用することで、実際の沿岸海水中に含まれる環境汚染物質を検出するバイオアッセイを用いた新たなスクリーニング手法を開発した。

そこで本研究では、新たに開発したスクリーニング手法を用いて、引続き、秋田県内の沿岸海水中に含まれる環境汚染物質のスクリーニングを行う。さらに、淡水環境中と比較して、沿岸海水中での医薬品、農薬などの化学物質の生態毒性値の変化についても明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2. 1. 秋田県内の沿岸海水を対象にしたバイオアッセイ ・試験生物

本研究には、タイ国プーケット由来のインドメダカ(*Oryzias melastigma*)を用いた(図 1)。インドメダカはペットショップで購入後、12S および 16S リボソーム RNA 遺伝子を利用した種属識別⁽¹⁻¹⁾、2018 年以降秋田県立大学にて継代飼育をしている。

・採水地点

採水地点は、火力発電所から排水が流れ込む沿岸域を地点 1、製紙工場近辺にある漁港を地点 2 に設定した(図 2)。採水は、11 月に行い、採水時の現場では、水温・pH・電気伝導率・溶存酸素・塩濃度などの一般水質項

目を測定することで、採水現場の水質状況を調べた。



図 1 *Oryzias melastigma*



図 2 採水地点

・バイオアッセイ

バイオアッセイは魚類急性毒性試験(OECD TG 203)を参考にして行った。試験にはガラスビーカーを使用し、100%, 50%, 25%, 0%(対照区)の割合で希釈調整し、インドメダカにばく露する。1容器あたり孵化後 3-4 ヶ月齢のインドメダカを 3 尾入れ、各濃度区は 4 容器(n=4)とした(図 3)。試験期間は 96 時間とし、24 時間ごとに観察し、致死・行動異常を明らかにする。死亡した魚は除去し、水替えは毎日行った。試験期間中、水温は 25±2°C、光周期は明期 16 時間・暗期 8 時間に設定した。また、試験期間中は給餌を行なわなかった。試験終了後、生残している魚の割合から生残率を求めた。

2. 2. 淡水メダカ(ニホンメダカ)と海産メダカ(インドメダカ)

間での化学物質の生体毒性値の比較

・試験生物

本研究には、淡水メダカは NIES-R 系統のニホンメダカ

対照区 25% 50% 100%

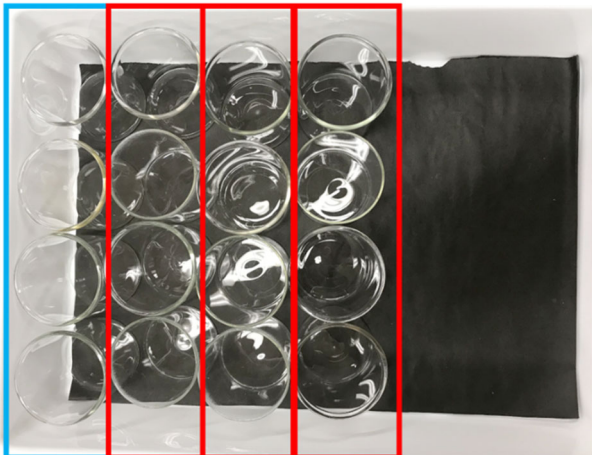


図 3

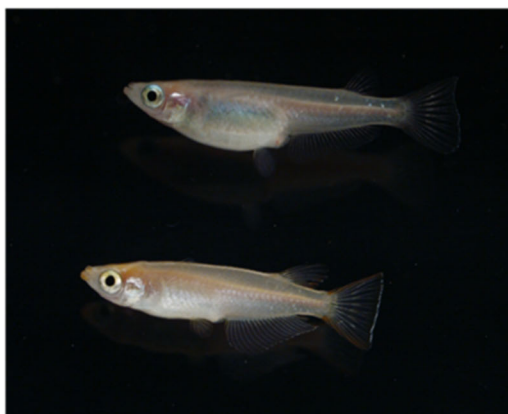


図 4 *Oryzias latipes*

(*Oryzias latipes*)を用いた(図 4)。NIES-R 系統は、2017 年以降、国立環境研究所より秋田県立大学に分譲後、継代飼育をしている。海産メダカはタイ国プーケット由来のインドメダカ(*Oryzias melastigma*)を用いた(図 1)。インドメダカはペットショップで購入後、12Sおよび16Sリボソーム RNA 遺伝子を利用した種属識別し⁽¹⁻¹⁾、2018 年以降秋田県立大学にて継代飼育をしている。

・試験物質

本研究では、試験物質として 3-クロロアニリン(CAS 108-42-9, 純度 > 99%), トリクロサン(抗菌剤)(CAS 3380-34-5, 純度 > 98%), 3,4-ジクロロアニリン(CAS 95-76-1, 純度 > 98%), フェニトロチオン(有機リン・有機硫黄系殺虫剤)(CAS 122-14-5, 純度 > 98%), ピリプロキシフェン(昆虫成長制御剤)(CAS 95737-68-1, 純度 > 99%)を用いた。

・生態毒生試験

生態毒生試験は魚類急性毒性試験(OECD TG 203)を参考にして行った。試験にはガラスビーカーを使用し、各ばく露物質の設定濃度は表 1 に示す。1 容器あたり孵化後 7 日以内のメダカを 10 尾入れ、各濃度区は 4 容器(n=4)とした(図 5)。試験期間は 96 時間とし、24 時間ごとに観察し、致死・行動異常を明らかにする。死亡した魚は除去し、水替えは毎日行った。試験期間中、水温は 25±2°C、光周期は明期 16 時間・暗期 8 時間に設定した。インドメダカを用いた試験では、塩分濃度は 17±1 PSU に設定した。また、試験期間中は給餌を行なわなかった。試験終了後、生残している魚の割合から生残率を求めた。

表1 各ばく露物質の設定濃度

ばく露物質	設定濃度	
	ニホンメダカ	インドメダカ
3-クロロアニリン	control, 6, 12, 25, 50 mg/L	control, 6, 12, 25, 50 mg/L
トリクロサン	control, 150, 300, 600, 1200 µg/L	control, 150, 300, 600, 1200 µg/L
3,4-ジクロロアニリン	control, 31, 62, 125, 250 µg/L	control, 31, 62, 125, 250 µg/L
フェニトロチオン	control, 1.75, 3.5, 7, 14 mg/L	control, 1.75, 3.5, 7, 14 mg/L
ピリプロキシフェン	control, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 mg/L	control, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 mg/L

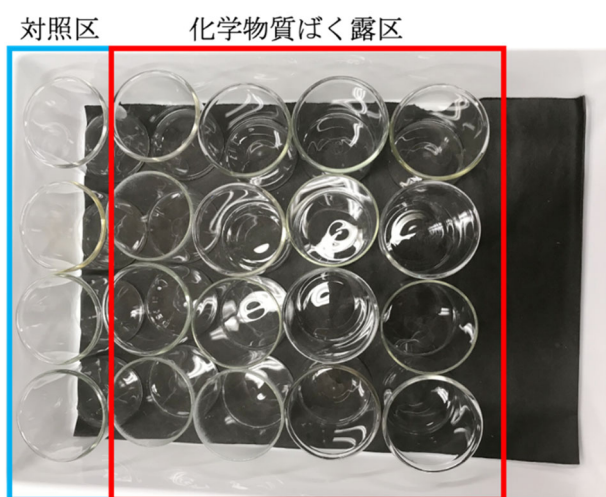


図5

3. 研究結果

・秋田県内の沿岸海水を対象にしたバイオアッセイの結果

バイオアッセイの結果を図6に示す。バイオアッセイは、地点1および地点2共に、全てのばく露区で高い生残率(100%)を示しており、対照区と比べて有意な悪影響は認められなかった。

・ニホンメダカとインドメダカ間での化学物質の生体毒性値の比較

各化学物質がインドメダカおよびニホンメダカに与える致死影響の結果を図7-11に示す。また、各化学物質に対する最小影響濃度(LOEC)のまとめを表2に示す。

はじめに、本研究でばく露した全ての化学物質は、インドメダカとニホンメダカの致死を誘導することが明らかとなった(図7-11)。

次に、ニホンメダカとインドメダカ間での化学物質の生体毒性値を比較した結果、トリクロサン、3,4-ジクロロアニリン、ピリプロキシフェンではニホンメダカより、インドメダカ

の方がより低濃度で死亡することが明らかとなった(表2)。一方で、3-クロロアニリンおよびフェニトロチオンのLOECは同じ値であった(表2)。

4. 考察

昨年度と同様にインドメダカを用いたバイオアッセイを実施した結果、地点1、地点2共に生物影響は認められなかった。2019年度、2020年度の2年間を通して秋田県内の火力発電所から排水が流れ込む沿岸域と製紙工場近辺にある漁港を対象にバイオアッセイを行った結果、魚類に深刻な悪影響をもたらす環境汚染は発生しなかったことが考えられる。

我々の研究グループは、2019年度のソルト・サイエンス研究財団からの助成金(助成番号;1951)を受けて、重金属類は沿岸海水中では白色沈殿を形成し、海産生物に対する生態毒性値が淡水環境中と比べて約10倍異なる(生態毒性値;淡水<沿岸海水)ことを明らかにした。そこで本研究では、一般化学物質と殺菌剤、農薬の合計5種類の化学物質を用いて、淡水環境中と海水環境中での生態毒性値の比較を行った。その結果、致死率のLOECは5物質中3物質で異なっていた。このことは、化学物質が水生生物に与える生態毒性値を調べる場合、淡水生物を用いて得られた生態毒性値は、海水環境中に生息する水生生物に与える生態毒性値に直接適応できず、海洋における化学物質の生物影響を明らかにするためには、海産生物を使用する必要があることを示している。さらに、今後、沿岸環境を保全するためには、環境汚染物質が海産生物に与える生物影響を明らかにするとともに、海水中での汚染動態も明らかにする必要がある。

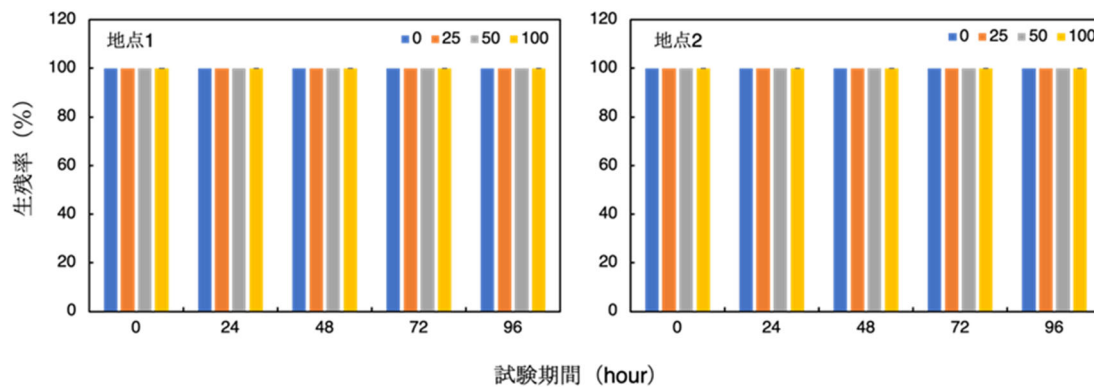


図6 地点1および2のバイオアッセイの結果 注)値は平均±標準偏差 (n=3)で示す。

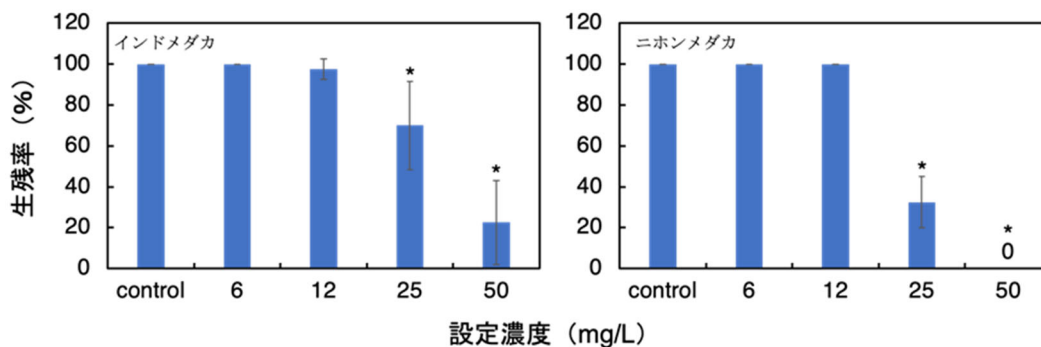


図7 3-クロロアニリンの結果 注)値は平均±標準偏差 (n=4)で示す。
*は $p < 0.05$ で対照区に比べて統計学的な有意差あり

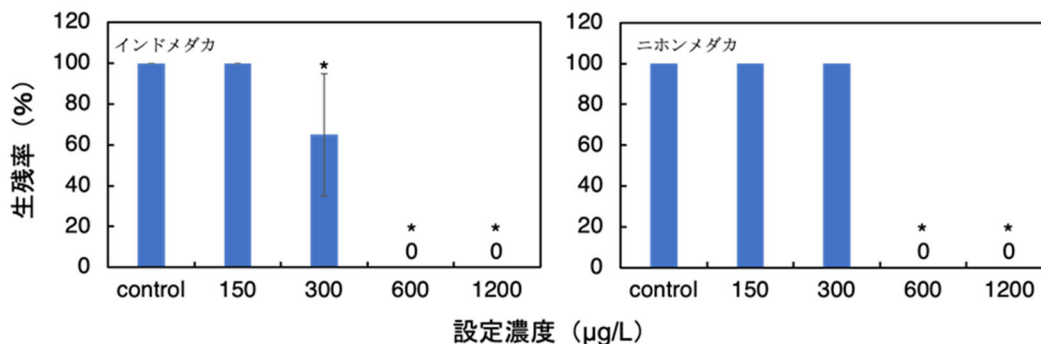


図8 トリクロロアニリンの結果 注)値は平均±標準偏差 (n=4)で示す。
*は $p < 0.05$ で対照区に比べて統計学的な有意差あり

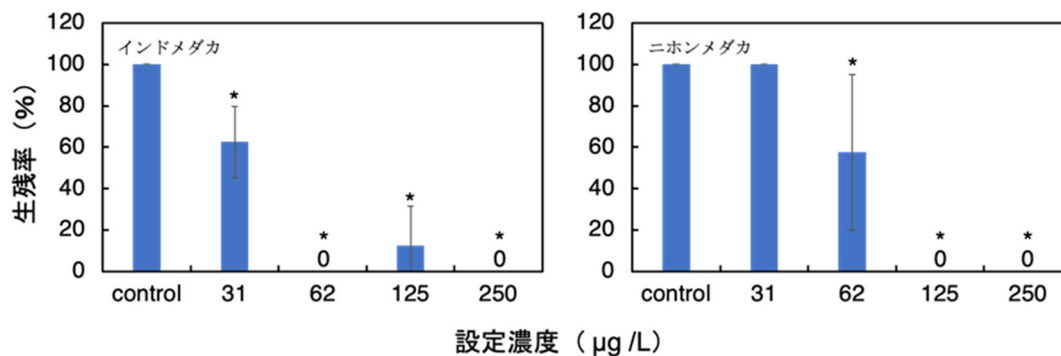


図9 3,4-ジクロロアニリンの結果 注)値は平均±標準偏差 (n=4)で示す。
*は $p < 0.05$ で対照区に比べて統計学的な有意差あり

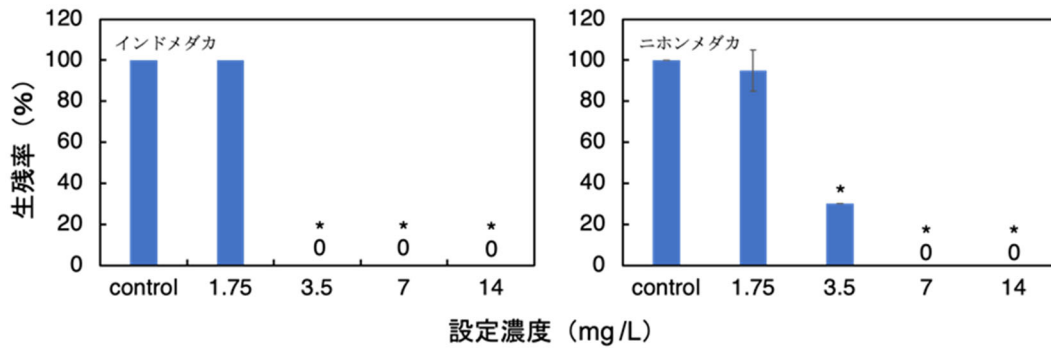


図 10 フェニトロチオンの結果 注)値は平均±標準偏差 (n=4)で示す。
*は p<0.05 で対照区に比べて統計学的な有意差あり

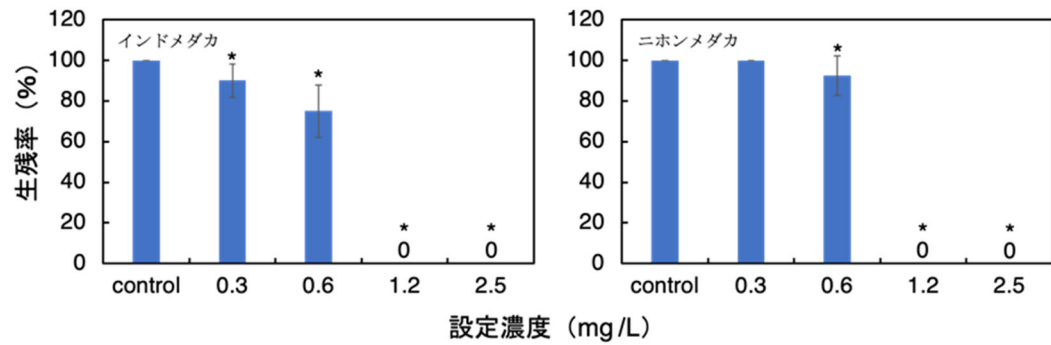


図 11 ピリプロキシフェンの結果 注)値は平均±標準偏差 (n=4)で示す。
*は p<0.05 で対照区に比べて統計学的な有意差あり

表 2 各ばく露物質の最小影響濃度 (LOEC)

ばく露物質	最小影響濃度 (LOEC)	
	インドメダカ	ニホンメダカ
3-クロロアニリン	25 mg/L	25 mg/L
トリクロサン	300 µg/L	600 µg/L
3,4-ジクロロアニリン	> 31 µg/L	31 µg/L
フェニトロチオン	3.5 mg/L	3.5 mg/L
ピリプロキシフェン	> 0.3 mg/L	0.6 mg/L

5. 今後の課題

化学物質が水界生態系に与える生態系への影響を調べる場合、一次生産者である藻類や一次消費者である甲殻類、高次消費者である魚類への生物影響を調べるのが一般的である。本研究成果によって、化学物質が海産魚類に与える生物影響を調べるための手法や、海産魚類を用いたバイオアッセイ手法を構築することができた。その

ため今後は、海産藻類や海産甲殻類を用いた新たな生態毒生試験法の開発やバイオアッセイ手法の開発研究を行う必要があることが課題として挙げられる。

6. 文献

- 1-1 Horie, Y., Kanazawa, N., Suzuki, A., Yonekura, K., Chiba, T., Influences of Salinity and Organic Compounds on Embryo Development in Three Medaka *Oryzias* Congeners with Habitats Ranging from Freshwater to Marine, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.103, No.3, pp.411-415, September, 2019.
- 1-2 Horie, Y., Kanazawa, N., Yamagishi, T., Yonekura, K., Tatarazako, N., Ecotoxicological Test Assay Using OECD TG 212 in Marine Java Medaka (*Oryzias javanicus*) and Freshwater Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.101, No.3, pp.344-348, September, 2018.

A New Screening Method to Detect Environmental Pollutants in Coastal Seawater in Akita: Ecotoxicity Test Using Indian Medaka

Yoshifumi Horie

Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Summary

The potential adverse effects of environmental pollutants on aquatic ecosystems pose a serious global threat. Conventional studies on environmental pollutants employ the method of measuring the concentration of the environmental pollutants contained in water samples collected from the sites as well as the method of exposing aquatic organisms to environmental pollutants (ecotoxicity test). However, in the method of measuring the concentration of environmental pollutants, it is necessary to measure the concentration of each pollutant. This is because there is a high possibility of overlooking the detection of environmental pollutants other than the target. In addition, although the ecological effects of a target substance can be accurately evaluated by the ecotoxicity test method, a wide variety of pollutants discharged into the general environment cannot be detected in the aquatic environment by this method. Recently, our research group developed a new screening method to detect environmental pollutants in coastal seawater using marine medaka.

Therefore, the aim of this study was to more understand a new screening method using a bioassay that can comprehensively detect and evaluate the ecological effects of the environmental pollutants contained in aquatic environments.

Firstly, a bioassay employing the fish acute toxicity test was performed. Water was sampled from two sites, a coastal area where wastewater flows from a thermal power plant (site 1) and a fishing port near a paper mill (site 2). The results revealed that no ecological effects were observed at sites 1 and 2 in 2020, indicating the environmental pollutants that can adversely affect marine fish were not detected. Next, we estimated the lethal effects of 3-Chloroaniline, 3,4-Dichloroaniline, Triclosan, Fenitrothion, and Pyriproxyfen on *Oryzias melastigma* and *Oryzias latipes*. The results revealed that the lowest observed effect concentration (LOEC) values of 3-Chloroaniline and Fenitrothion for lethal effect were the same in *O. melastigma* and *O. latipes*. On the other hand, the LOEC values of 3,4-Dichloroaniline, Triclosan, and Pyriproxyfen for lethal effect in *O. melastigma* were lower than in *O. latipes*. These results highlight the importance of using marine organisms to evaluate the ecological effects of marine pollutants.