

沿岸海水中の環境汚染物質を検出する新たなスクリーニング法の開発 インドメダカを用いたバイオアッセイ

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。

そこで本研究では、環境水中に含まれる環境汚染物質の生態影響を総合的に把握・評価することができ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・構築することを目的とする。

まず始めに、バイオアッセイに使用する最適な発育段階を明らかにするため、塩化亜鉛を用いて胚・仔魚期短期毒性試験（孵化前）と魚類急性毒性試験（孵化後）を行った。その結果、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）ことが明らかとなった。次に、魚類急性毒性試験を参考にしてバイオアッセイを行った。採水は、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の 2 地点で年 4 回行った。その結果、地点 1、地点 2 共に年間を通して生態影響は認められなかった。本研究結果から、海産魚類に悪影響を与える環境汚染物質は検出されなかった。また、地点 1（20 ~ 25 PSU）と地点 2 間（1 ~ 8 PSU）では塩分濃度が大きく異なっていたが、耐塩性の高いインドメダカを用いることで幅広い沿岸域でバイオアッセイを行うことができることが明らかとなった。

1. 研究目的

地球上の水の量は、全水量に対して淡水が約 3%であるのに対して、海水は約 97%と海水の割合が圧倒的に高く、海産生物も多数生息している。しかし、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、沿岸域や海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、これまでに、海域で使用される環境汚染物質の生態影響を調べてきた。特に、船底塗料や漁網防汚剤である有機スズ類の淡水魚類への多世代影響を報告した^(1-1, 1-2)。しかし、「淡水生物と海産生物では環境汚染物質に対する感受性が大きく異なる」ことや「生態毒性試験に適した海産生物が依然として不明」なことから、2016 年に海産藻類シアノバクテリアを用いた生態毒性試験法を新たに開発した⁽¹⁻³⁾。さらに、2018 年には海産魚類ジャワメダカおよびインドメダカを用いた新たな生態毒性試験法を開発した⁽¹⁻⁴⁾。

そこで本研究では、近年、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・構築することを目的とする。

2. 研究方法

・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 (Fig 1)。

・試験に使用する最適な発育段階の選定

孵化前と孵化後、どちらの発育段階がバイオアッセイの実施に最適かを明らかにするため、以下の実験を行った。試験物質には塩化亜鉛 (CAS No. 7646-85-7, purity 98.0%)を用い、ばく露濃度は対照区, 0.48, 1.53, 4.8, 15.3, 48 mg/L の計 6 濃度区に設定した。また、塩分濃度区は FW(0 PSU), BW(17 PSU), SW(34 PSU)の 3 濃度区設定した。

孵化後のメダカを用いた試験は魚類急性毒性試験 (OECD TG 203)を参考にして行った。4 匹のインドメダカを各オールガラス水槽 (n = 3)に入れ(各ばく露濃度区あたり合計 12 匹)、96 時間ばく露した。試験期間中は餌を与えず、試験溶液は 48 時間ごとに交換した。試験は、25 ± 2° C の温度で、16 時間の明、8 時間の暗の明暗サイクルに設定した。

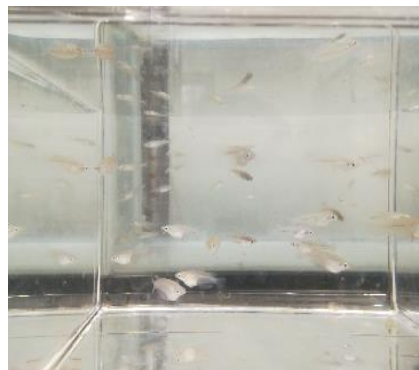


Figure 1 *Oryzias melastigma*

孵化前のメダカを用いた試験は胚・仔魚期短期毒性試験(OECD TG212)を参考にして行った。各ばく露濃度区では、4つの100 ml ガラス容器を使用した(合計24 容器)。受精後2 時間未満の受精卵を顕微鏡で選別し、各ばく露濃度区にばく露した。ばく露後、10 個の受精卵を各100 ml ガラス容器に分配し(各ばく露濃度区あたり合計40 個の受精卵)、孵化後5 日までばく露した。受精卵は顕微鏡下で24時間ごとに観察し、試験溶液は48時間ごとに交換した。試験は、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で、16 時間の明、8 時間の暗の明暗サイクルに設定した。

亜鉛(Zn)濃度は、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS, アジレント 7700x, アジレントテクノロジージャパン株式会社, 東京, 日本)を用いて測定した。

・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(Fig 2)。採水は、5月(春)・8月(夏)・10月(秋)・2月(冬)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。

・バイオアッセイ

「試験に使用する最適な発育段階の選定」の結果から、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。試験にはガラスピーカーを使用し、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。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 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、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。

3. 研究結果

・試験に使用する最適な発育段階の選定の結果

試験期間中の亜鉛濃度を Table 1 に示す。BW および SW(対照区を除く)では、15.3 および 48 mg/L 濃度区で白い亜鉛沈殿物が観察されたため、上清および沈殿物中の亜鉛濃度を測定した。一方、FW では、白い沈殿物は観察されなかったため、上清中の亜鉛濃度を測定した。対照区の亜鉛濃度はFW および BW では0.011 mg/L, SW では0.013 mg/L であった。白色沈殿物(設定亜鉛濃度15.3 および 48 mg/L)が観察されたBW および SW では、沈殿物中の亜鉛濃度が上清中の亜鉛濃度より高かった。しかし、設定亜鉛濃度が低いグループ(0.48, 1.53, および 4.8 mg/L)では、上清中と沈殿物中の亜鉛濃度に差は認められなかった。

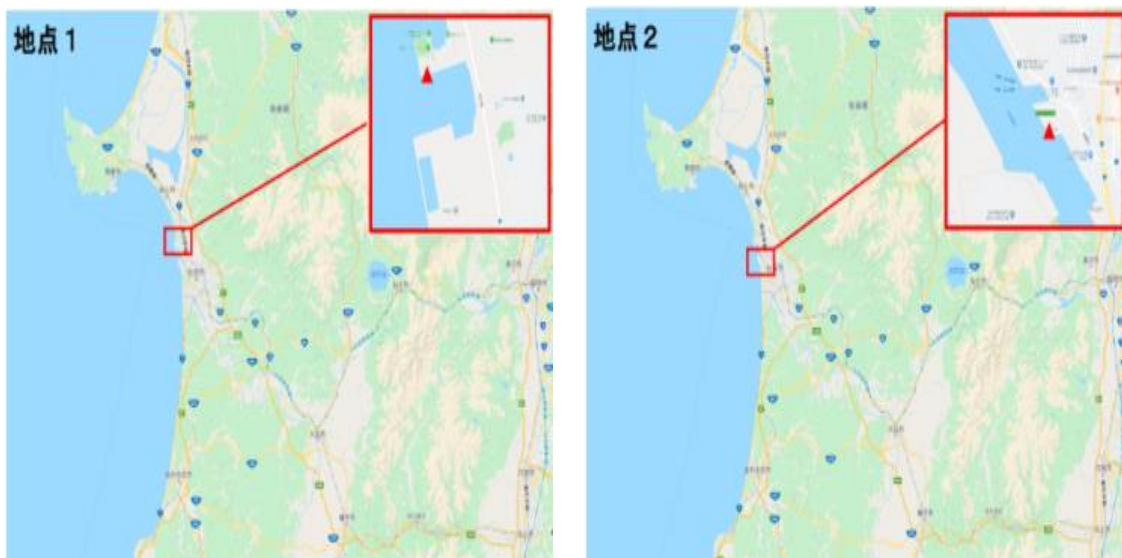


Figure 2 Sampling point

Table 1. Nominal and measured Zn concentrations for test assays

塩分濃度	設定 Zn 濃度	実測 Zn 濃度 (mg/L)	
	(mg/L)	上清	沈殿
FW	対照区	0.011	—
	0.48	0.39	—
	1.53	1.4	—
	4.8	5.5	—
	15.3	15	—
	48	42	—
	対照区	0.011	—
BW	0.48	0.51	0.51
	1.53	1.6	1.6
	4.8	4.6	4.7
	15.3	10	34
	48	31	99
	対照区	0.013	—
SW	0.48	0.53	0.52
	1.53	1.7	1.7
	4.8	4.7	4.7
	15.3	10	34
	48	19	130
	対照区	0.013	—

魚類急性毒性試験の結果を **Fig 3** に示す。FW では、全ての魚が 48 mg/L で 24 時間以内に死亡し、15.3 mg/L では 48 時間以内に死亡した。4.8 および 0.48 mg/L では、12 匹中 2 匹および 12 匹中 1 匹が死亡した。対照区および 1.53 mg/L では死亡個体は観察されなかった (**Fig 3A**)。BW では、12 匹中 2 匹が 48 mg/L で死亡し、0.48, 1.53, 4.8, および 15.3 mg/L では死亡個体は観察されなかった (**Fig 3B**)。SW では、48 mg/L で 12 匹中 1 匹が死亡したが、対照区, 0.48, 1.53, 4.8, および 15.3 mg/L では死亡個体は観察されなかった (**Fig 3C**)。

胚・仔魚期短期毒性試験の結果を **Fig 4** に示す。FW では、48 mg/L では全ての個体が孵化せずに死亡し (**Fig 4 A, D**)、15.3 mg/L では全ての個体が死亡した (**Fig 4 D**)。4.8 mg/L では、孵化率と生存率が対照区と比べて有意に低下した (**Fig 4 A, D**)。BW と SW では、48 mg/L の孵化

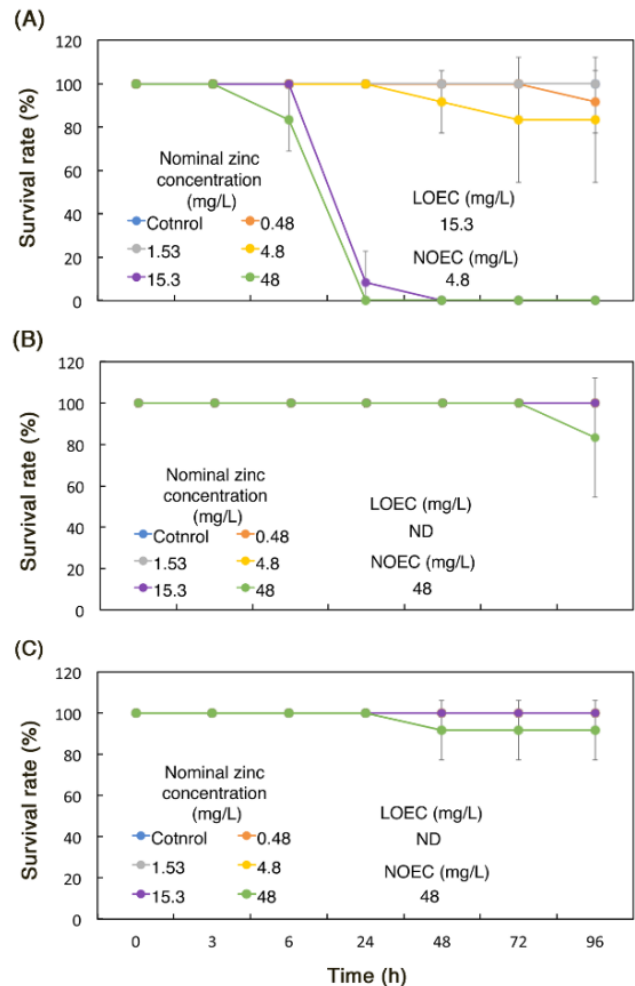


Figure 3. Results of 96-h zinc acute toxicity tests on adult fish at three salinity conditions: (A) FW, (B) BW, and (C) SW. Columns and error bars represent means \pm SEM (n = 3)

率と生存率が対照区と比べて有意に低下した (**Fig 4 B, C, E, および F**)。

・水質測定結果

水質測定結果を **Fig 5** に示す。水温, pH, Do については地点 1 と地点 2 間で似た結果を示した。一方で、地点 1 の EC が 35 ~ 40 μ S/cm であったのに対して、地点 2 の EC は 5 ~ 15 μ S/cm と地点 2 と比べて地点 1 の方が高い結果となった。また、地点 1 の塩分濃度が 20 ~ 25 PSU であったのに対して、地点 2 の塩分濃度は 1 ~ 8 PSU と地点 2 と比べて地点 1 の方が高い結果となった。

・バイオアッセイの結果

バイオアッセイの結果を **Fig 6, 7** に示す。バイオアッセイは、地点 1 および地点 2 共に、春・夏・秋・冬の合計 4 回

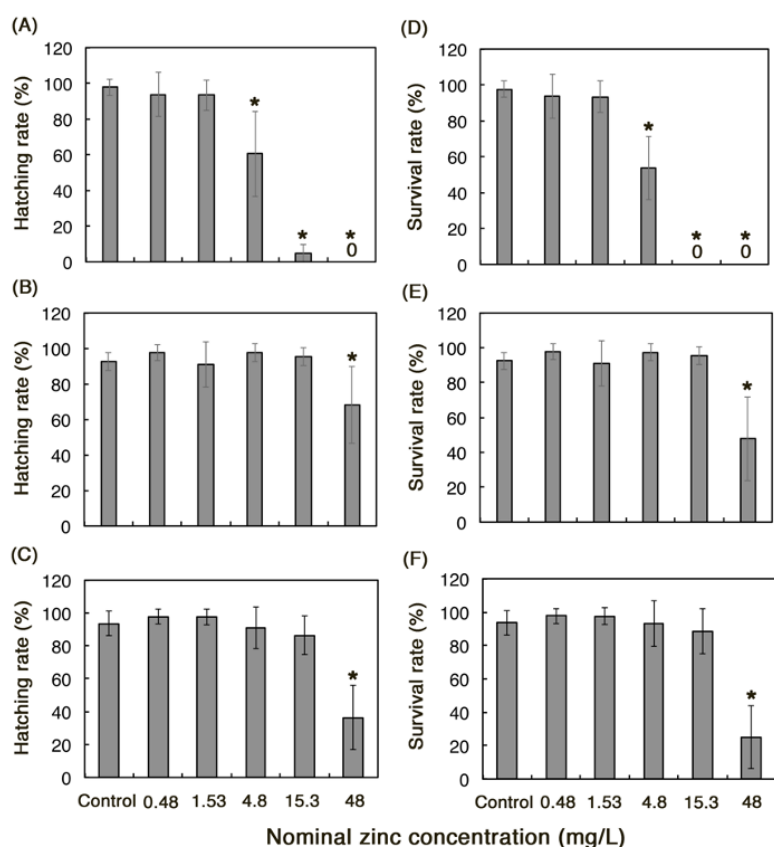


Figure 4. Results of short-term zinc toxicity tests on embryos and larvae at three salinity conditions: (A, D) freshwater, (B, E) brackish water, and (C, F) seawater. (A–C) Hatching percentage. (D–F) Survival rate at the end of the test assay. Columns and error bars represent means \pm SEM ($n = 4$). Asterisks indicate significant differences compared with controls ($p < 0.05$)

行った。その結果、年間を通して、地点1, 2共に全てのばく露区で高い生残率(80%以上)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。

4. 考察

本研究では、白色沈殿物がBWおよびSWの高処理濃度(5.3 および 48 mg/L 濃度区)で観察された。Angel et al⁽¹⁻⁵⁾は、鉛が海水に溶解すると沈殿物が形成され、溶解濃度が低下することを報告している。さらに、Lv et al⁽¹⁻⁶⁾は、NaOH を添加することで溶液からカドミウムを除去できることを報告している。これらの結果は、金属の飽和濃度が海水と淡水で異なることを示している。そのため、海洋における重金属類の生態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。

本研究では、致死率の無影響濃度区(LOEC)は孵化前と孵化後で異なっていた(FW では、孵化後:15.3 mg /

L, 孵化前:4.8 mg/L, BWとSWでは 孵化後:>48 mg / L, 孵化前:48 mg/L)。これは、塩分の有無によってばく露物質が沈殿を形成する場合、水中を遊泳することが可能な孵化後と、遊泳することができない孵化前では、生態毒性値に「差」が生じることを示している。そのため、沿岸海域中のバイオアッセイを実施する場合、水中を遊泳することが可能な孵化後の魚を用いて試験を実施した方が、より正確にリスク評価を行えるかもしれない。

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共に年間を通して生態影響は認められなかった。地点1と地点2間では塩分濃度が大きく異なっていたが、耐塩性の高いインドメダカを用いることで幅広い沿岸海域でバイオアッセイを行うことができることが明らかとなった。

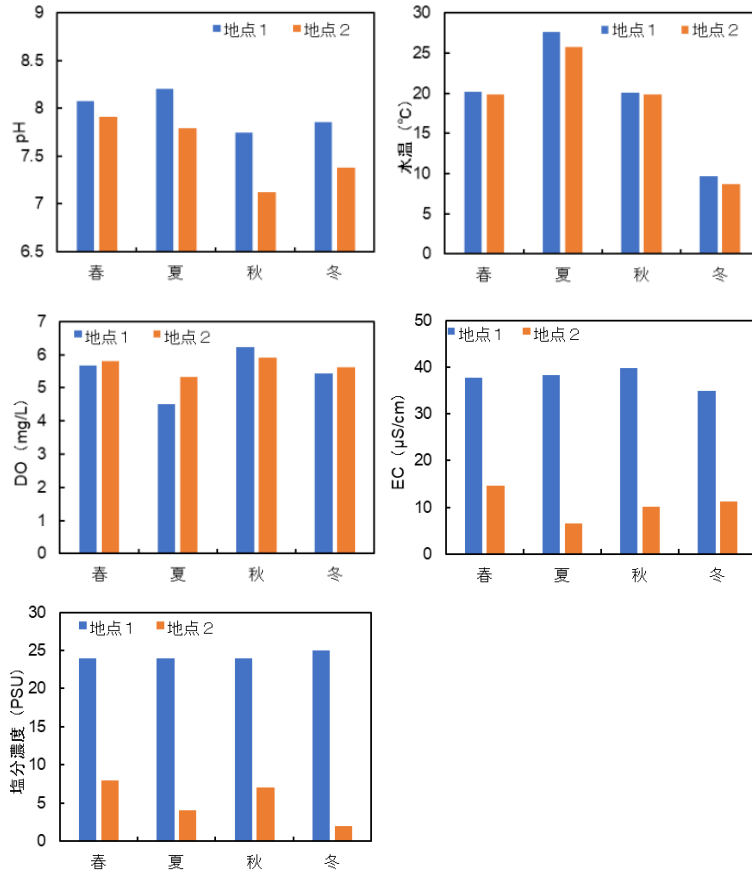


Figure 5. Results of water analysis

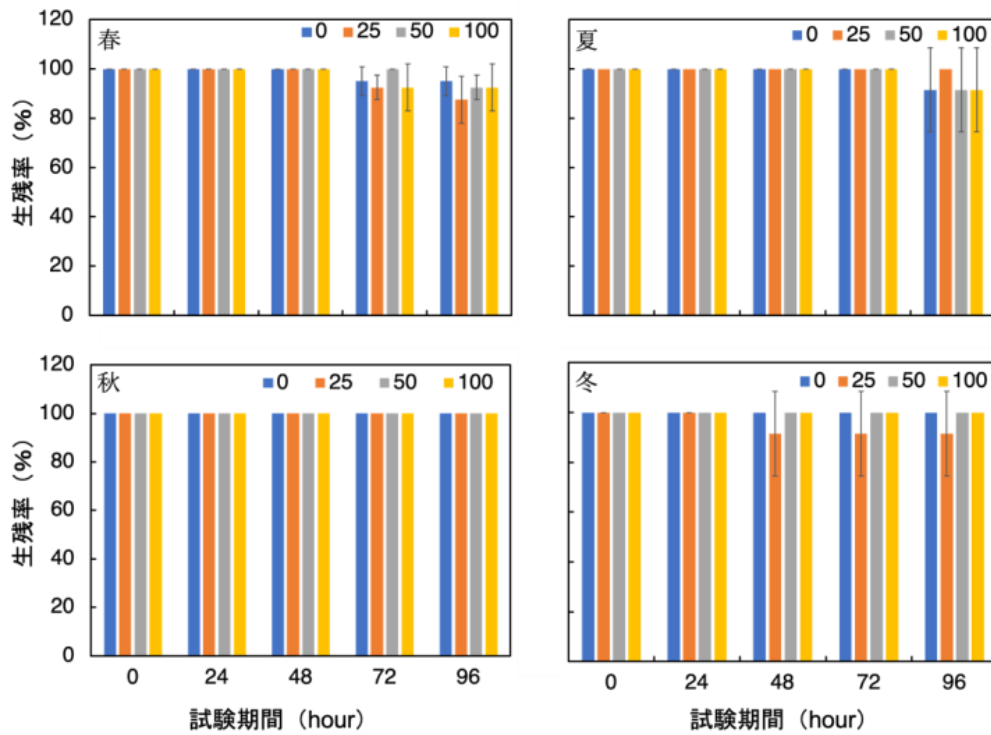


Figure 6. Results of bioassay at location 1: Survival rate at the each time of the test assay. Columns and error bars represent means \pm SEM (n = 3)

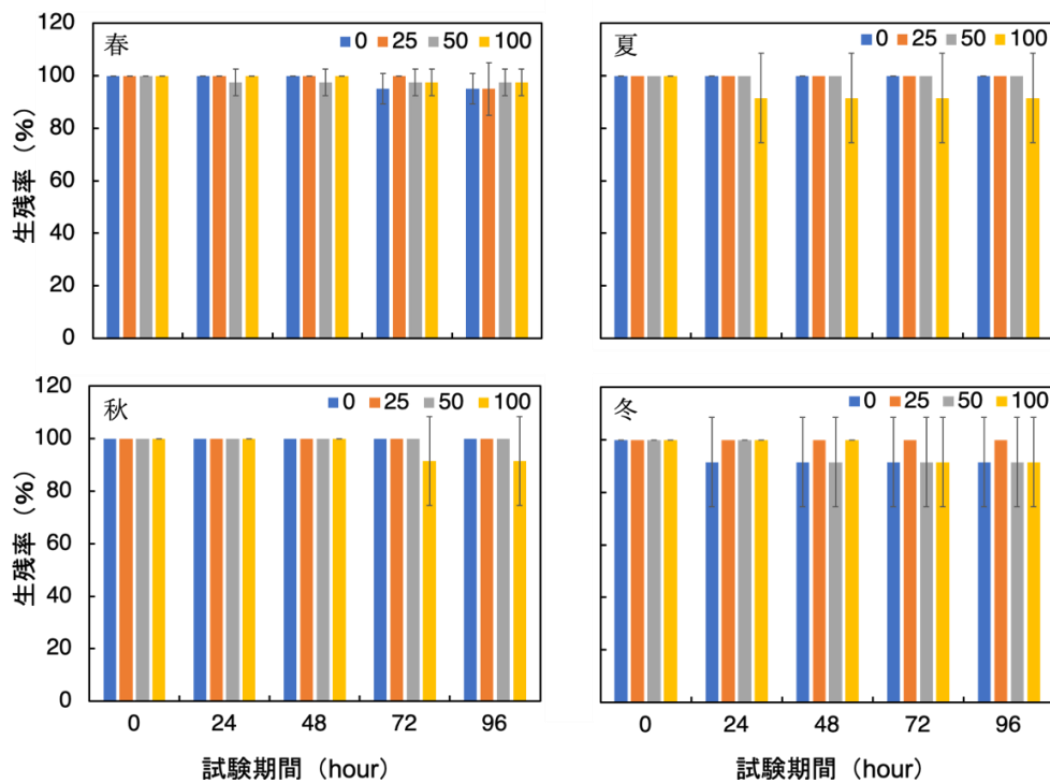


Figure 7. Results of bioassay at location 2: Survival rate at the each time of the test assay. Columns and error bars represent means \pm SEM (n = 3)

5. 今後の課題

本研究の結果から、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)ことが明らかとなった。このことは、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態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。

そのため今後は、淡水環境中と比較して、沿岸海水中での重金属、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が課題として挙げられる。

6. 文献

1-1: Horie, Y., Watanabe, H., Takanobu, H., Shigemoto, Y., Yamagishi, T., Iguchi, T., Tatarazako, N., Effects of triphenyltin on reproduction in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

across two generations, *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 192, 16-23, 2017.

1-2: Horie, Y., Yamagishi, T., Shintaku, Y., Iguchi, T., Tatarazako, N., Effects of tributyltin on early life-stage, reproduction, and gonadal sex differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere.*, 203, 418-425, 2018.

1-3: Yamagishi, T., Fuchida, S., Katsumata, M., Horie, Y., Mori, F., Kitayama, A., Kawachi, M., Koshikawa, H., Nozaki, T., Kumagai, H., Ishibashi, JI., Tatarazako, N., 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* (London, England), 27, 1303-1309, 2018.

1-4: 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.*, 101, (3), 344-348, 2018.

1-5: Angel BM, A Simon C. Apte ASC, A, C Graeme E. Batley A and Mark D. RavenB. 2015. Lead

solubility in seawater: an experimental study. *Environ. Chem.* 13, 489–495

1-6: Lv L, Yang Y, Tian J, Li Y, Li J and Yan S. 2018. Effect of salinity on the precipitation of dissolved metals in the wastewater that produced during fly ash disposal. *Earth and Environmental Science* 121; 032012

Development of a New Screening Method to Detect Environmental Pollutants in Coastal Seawater: A Bioassay 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.

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

First, in order to ascertain the optimum developmental stage of the fish to be used in the bioassay, a short-term toxicity test using embryo-larva stage (before hatching) and a fish acute toxicity test (after hatching) were conducted using zinc chloride. The results showed that metals form white precipitates in coastal seawater and that the ecotoxicity value for marine environment is about 10 times different from that of freshwater environment (ecotoxicity value: freshwater < coastal seawater). Then, a bioassay employing the fish acute toxicity test as reference was performed. Water was sampled four times a year 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 throughout the year. Additionally, the environmental pollutants that can adversely affect marine fish were not detected. Furthermore, there was a significant difference between the salinity of site 1 (20 - 25 PSU) and site 2 (1 - 8 PSU). Therefore, it is possible to perform bioassays in a wide range of coastal areas using salt medaka, a species with a high tolerance to seawater.