

大阪湾底質の魚類胚に与える汚染影響リスク評価と今後の底質環境修復のための現状把握

宇野 誠一
鹿児島大学水産学部
准教授

1. はじめに

大阪湾は紀伊半島から神戸市、淡路島に囲まれ、明石海峡と友ヶ島水道に2つの狭い湾口を持つ以外には水の出口がない。そのため日本の中でも水交換率が特に悪い水域の1つとなっている。この海域は日本でも有数の大都市である大阪市、神戸市に接しており、また神戸市から泉大津市にかけての海岸域一帯は大規模な工業地帯が連なっている。加えて海岸域に沿って阪神高速など交通量の多い幹線道があるため、自動車や工場排ガス、排水を介して人間活動由来の化学物質が常時流入している。さらに湾内には淀川を初めとする幾つかの河川水が流れ込んでいるが、この多くが人口密集域を流れ陸上域における人間活動由来の化学物質を大量に含み、この流入負荷も無視できない。これら様々な要因により、大阪湾はかなり化学物質汚染が進んでいる状態にある。湾内に入り込んだ化学物質は最終的に海底質に到達し、特に分解性の小さい物質は少しずつ底質中に残留、蓄積することになる。このような化学物質は無数にあると予想される。底質では海底質付近を住处とする底生生物が化学物質から何らかの影響を複合的に受けている可能性があるが、その状況はほとんど分かっていないのが現状である。

これまで我々は大阪湾において、底質や水生生物などの化学物質分布や動態を調査してきた。その結果、特に底質中からは数多くの化学物質をこれまで検出し、物質によってはかなり高い濃度で残留していることを明らかにした。他にも大阪湾では我々以外の研究グループによっても数多くの化学物質モニタリングが行われている。こういった調査から明らかになる化学物質濃度や動態パターンから、湾内底質に生息している生物に対する影響を予測するのは、実はかなり困難である。それは、現在、化学物質審査法などの化学物質管理においても、生物影響評価は単一の物質に対して行われており、実環境を考慮した複合暴露影響などを含む影響評価が現実的には行われていないこと、あるいは湾内には通常の実験技術では検出不可な物質や未知の化学物質も多数ありその生物影響は未知であること、などが要因となっている。加えてこれまで確固たる底質影響試験法は確立されていない。しかし、大阪湾のような汚染の進んだ海域の環境修復・再生を効率良く行うためには、まず汚染や生物影響リスクの現状を知り、そのデータをもとに計画的に進めていくことが必要である。

魚の卵(胚)は未成熟であり、魚類の発生段階の中で最も化学物質暴露影響を受けやすい。これまで魚卵を用いた毒性試験は数多く行われてきた。日本ではヒメダカ(*Olyzias latipes*)は多くの化学物質を対象としてその影響試験が行われており、多くの影響の知見が蓄積されて

いる。また、飼育が容易なため、常時、卵から成魚まで入手可能でいつでも容易に試験が行える。最近、我々は飼育水を必要とせず、間隙水の役割をする僅かな量の水を添加した底質上にヒメダカ胚を置き、孵化直前まで発生させる手法を確立した。本法は野外で採取した底質でも適用可能である。また、ヒメダカ胚発生のためにこれまで底質影響の直接的評価を難解にしていた直上水を加える必要がなく、底質に含まれる化学物質の胚の直接の影響を観察することが可能となった。我々は上記底質試験法を用いて、日本の幾つかの現場から底質を採取して、胚に対する影響を調べ、実際の試験に適用可能であることを確認した。本法ではそのエンドポイントとして致死、孵化率、そして孵化後の奇形発生率などを指標として、それを総合して底質の影響を判断する。

メタボロミクスは糖類やアミノ酸、有機酸など生体内代謝物の変動情報(メタボローム)を網羅的に収集し、生体内で今何が起きているかを調べる手法である。言い換えれば今の生物の健康状態を知ることができる手法である。近年、環境汚染物質影響評価法としても注目されているが、実環境の汚染影響評価に適用した例は極めて少ない。代謝物情報は遺伝子などと比べるとはるかに情報量が少ないが、反面、ゲノム情報を必要とせず、代謝物質や代謝経路の多くが生物種を通して共通しているため、多くの生物に対してその手法や情報が共有できる利点を持つ。我々はこのメタボロミクス研究を精力的に行い、化学物質影響評価への適用、さらには実環境影響評価への適用などの検討を行ってきた。これまで我々は魚体内のメタボローム情報を定性可能不可能にかかわらず、これを網羅的に収集して統計処理し、個体が化学物質暴露により受けた影響、特に化学物質暴露により生物の健康がどの程度影響を受けたかを1つの数値で示す方法開発を行って来た。そしてこのメタボローム情報を収集した解析法により、個体が受けた総合的な影響の大きさを数値で示すことを可能とした。

我々は上記のヒメダカ胚を用いた底質試験法とメタボロミクスの数値化法を組み合わせることで軽度な健康影響から致死までの過程を盛り込んだ、新しい底質の魚類胚に対する影響評価が行えるのではないかと考えた。そこで、本研究では実際に大阪湾で底質を採取して実験室に持ち帰り、底質の影響試験を行う。さらにメタボロミクスにより胚の健康状態をとらえ、死亡から微細な健康上影響まで全影響を総合して、底質のヒメダカ胚に対する影響の大きさを数値として表すことにより、大阪湾底質の生物に対するリスクの現状を明らかにすることを目的とした。リスクを示す数値を地点間で比較して、大阪湾底質の生物リスクの地点間差等を調べ、淡路島から和歌山側までの大阪湾底質汚染の現状を明らかにすることを最終目標とする。平成26年度は大阪市を中心とした海岸域の底質の影響評価を行った。

2. 方法

平成26年度は大阪市近郊の海岸域の6ヶ所から底質を採取した(図1)。この底質を僅かな水分を含んだ各地点の底質をガラスシャーレに敷き詰めた。底質上にヒメダカ胚を設置し、23℃で7日間飼育し、発生させた。その後、滅菌水を入れたマイクロプレートに胚を移し、胚の生存確認、孵化までの日数の計測、発生の遅延などを顕微鏡観察し、さらに孵化仔魚の奇形の有無なども調べた。

また、別途、メタボロミクス解析を行うために底質入りシャーレを各地点で5つずつ用意した。

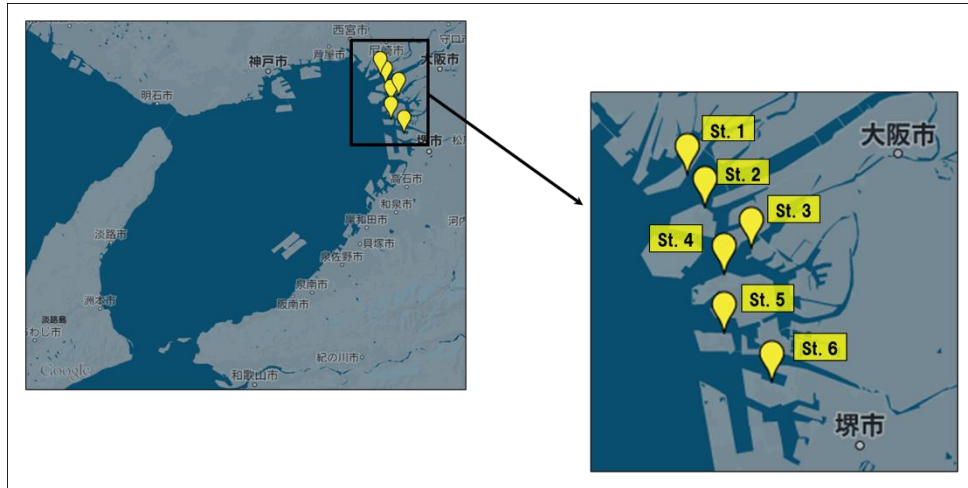


図1 サンプリング地点

そこに1つのシャーレに胚を25個ずつ設置した。6日目までインキュベータ内で飼育を行った後、胚をサンプリングして代謝物分析に供した。

影響の数値は死亡率のファクターの比率が最も大きくなるように設定しており、次に孵化率、孵化日数のファクターの順にその比率を小さく設定した。メタボロミクスから得られる数値は主成分分析の結果から算出した。

3. 結果と考察

表1に底質毒性試験から得られた死亡率、孵化率、平均孵化日数を示した。孵化率はSt. 1で胚は30個体中12匹が未孵化であり、その孵化率は60%とコントロールと比べると明らかに孵化率が低かった。また、St. 2とSt. 4では若干の孵化率の低下が観察された。この結果から、St. 1の底質はヒメダカ胚に与える毒性影響は他の地域よりも強く、また、St. 2と4についてもある程度の毒性影響は与えるリスクがあると考えられた。孵化日数については、コントロールと比較すると全ての区で有意な差が観察された。特にSt. 2ではコントロールよりも約6日の孵化遅延が見られ、また、St. 1、5及び6も3~4日程度の孵化遅延が見られた。孵化日数の遅

表1 魚類胚の底質毒性試験における各地点の死亡率、孵化率、孵化日数

	死亡率 (%)	孵化率 (%)	孵化日数 (日)
コントロール	3.33	96.7	10.4 ± 0.946 ¹
St. 1	3.33	60.0	13.8 ± 0.832*
St. 2	0	80.0	16.2 ± 2.32*
St. 3	0	100	11.8 ± 0.830*
St. 4	3.33	80.0	12.6 ± 1.50*
St. 5	3.33	90.0	13.4 ± 2.42*
St. 6	0	100	13.9 ± 2.60*

1: 平均 ± 標準偏差、*: p < 0.05 で有意だったもの

れは卵が他の生物から捕食されるなどのリスクが高くなると判断された。

メタボロミクス解析より得られた PCA スコアプロットを図 2 に示す。PCA の結果、コントロールにごく近い部分に St. 3 と 6 がクラスターを形成し、その他の地点は PC1 方向にコントロールから離れた位置にクラスターを形成した。

上記の底質毒性試験とメタボロミクス解析の結果から算出されたリスクファクターを総合し、それを総リスクファクターとして図 3 に示した。総リスクファクターが最も大きかった地点は St. 1 であり、その数値は他の地点と比べると遙かに高いものとなった。St. 1 は中島川と淀川が両河口で合流している地点である。中島川は幾つかの河川が最終的に合流して中島川を形成しているが、特に尼崎市を中心とした中島川周辺には広く工業地帯が広がっており、これが生物に影響を与えるような物質の排出源になっている可能性が考えられた。リスクファクターが 2 番目に高かった地点は St. 2 であった。St. 2 はやはり淀川河口付近に位置する。3 番目にリスクファクターが高かった St. 4 も地形的にある程度淀川の水の流入がある地域であろうと予測されたが、ここは他にもいくつかの要因が胚への影響に関わっていたかもしれない。

このように今回調査対象とした大阪市近郊では、特に淀川河口域一帯の底質が生物に与える影響リスクが強い、ということが本研究の結果から示唆された。

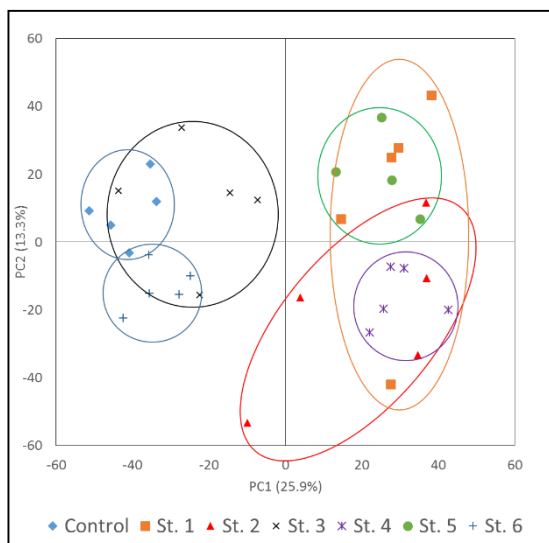


図 2 メタボロミクス解析から得られた主成分分析の結果

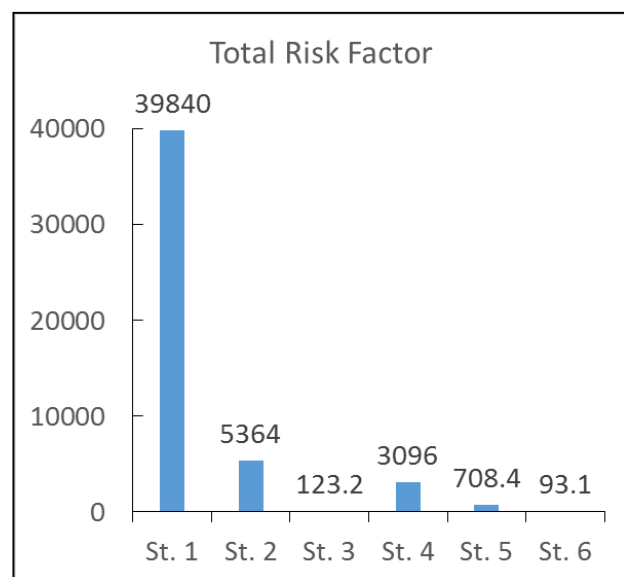


図 3 各調査地点における総リスクファクター