

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（その3）

宇野 誠一（鹿児島大学水産学部准教授）
國師 恵美子（鹿児島大学水産学部助教）

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水の出口がない。そのため、日本でも水交換率が特に悪い水域の1つとなっている。本湾は有数の大都市である大阪市や神戸市に接し、また神戸市から泉大津市までの海岸域一帯は大規模な工業地帯が連なっている。海岸域には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、排水を通じて人間活動由来の化学物質が常時流入する状態にある。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も同時に大量に運んでいると考えられる。このような様々な要因により、大阪湾は化学物質汚染がかなり進んでいる。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てきたが、これらの調査から特に人間の生活域に近い海岸線沿いの水環境汚染がかなり進んでいることが分かっている。

モニタリング調査から得られる化学物質濃度分布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、実際はかなり困難である。現在、化学物質審査法などによる化学物質管理においても、1) 生物影響評価は単一の物質に対してのみ行われており、複合暴露影響までは考慮されていない、2) 湾内には通常の実験技術では検出不可能な物質や未知の化学物質も多数あり、これらの生物影響は未知であるケースがほとんどである、などが要因となっている。さらに様々な化学物質が高濃度で残留している底質に着目した生物影響試験法は、確固たるものが確立されていない。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、まず化学物質汚染と生物影響リスク両方の現状を知り、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。中でも、水域の中でも恐らく最も化学物質残留濃度が高い海底質のリスクを明らかにすることが早急に求められる。

魚の卵(胚)は未成熟であり、魚類の成長段階の中で最も化学物質暴露影響を受けやすい期間の1つである。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*)が、様々な化学物質を対象としてその影響試験が行われており、数多く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試験が行える。最近、我々は飼育水を注がず、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、この試験法の最大のメリットはこれまで底質影響の直接評価を難解にして

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へのダイレクトな影響を評価することが可能となった。この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たところ、実環境影響評価法として十分に適用可能であることを確認した。本法の基本的なエンドポイントは、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。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。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、軽度な健康影響から致死まで幾つかの段階での影響評価を1回の試験で可能とするようなさらに現場の実態を明確に反映するような新しい指標が確立出来ると考えた。本研究は、実際に大阪湾で底質を採取して実験室に持ち帰り、ヒメダカ胚による底質影響試験を行った。加えて、メタボロミクスによりこの影響試験中の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28年度は堺市～和歌山までの海岸域底質の影響評価を行った。

2. 方法

平成27年度までに15ヶ所の底質を採取したが、平成28年度は図1に示すSt.16～26の11地点から底質を採取し、その影響を調べた。採取した底質から遠心分離により余分な間隙水を取り除いた。その後、僅かな水分を含んだ状態で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。8日目からは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。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メタボロミクス分析に供した。影響の数値は死亡が観察された際の影響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(±標準偏差)とこれらから得られたリスクファクターを示した。St.16、19、24では死亡率が10%以上観察された。本影響調査において、死亡が観察された地域は少なかったが、今回調査した地点はその傾向が異なった。一方、孵化率の低下は今回の調査地点ではほぼ観察されなかった。孵化日数もSt.16が3日ほど遅くなり、また、その他の場所でも2日ほど遅れる傾向が見られた。これまで

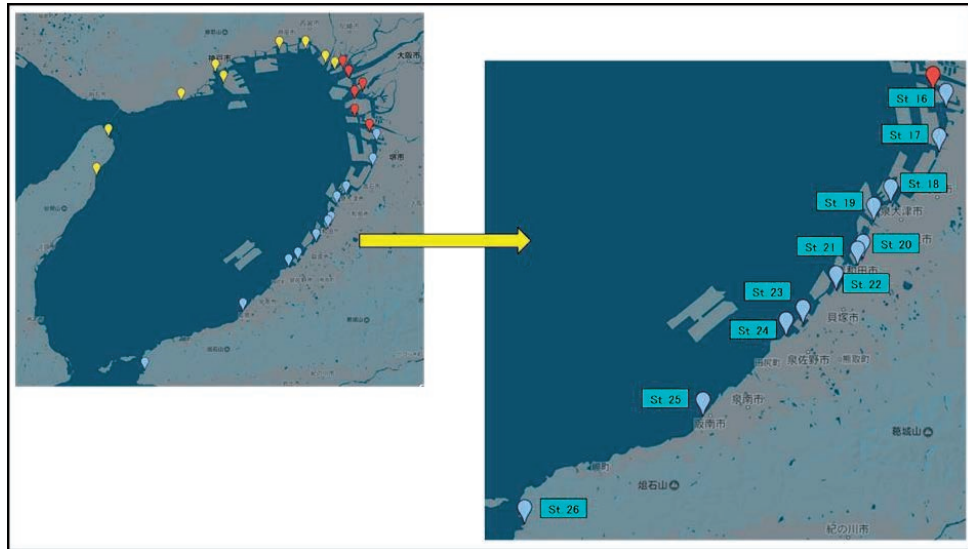


図1. サンプルング地点

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

地点	死亡率(%) ^a	孵化率(%) ^a	孵化日数(日)
コントロール	0	100	10.3 ± 0.6
St. 16	10 ± 10	90 ± 10	13.1 ± 1.4
St. 17	0	100	11.5 ± 1.2
St. 18	0	100	12.3 ± 2.6
St. 19	13 ± 10	87 ± 6	12.5 ± 1.6
St. 20	3 ± 6	93 ± 6	12.5 ± 1.5
St. 21	0	100	12.0 ± 1.5
St. 22	3 ± 6	97 ± 6	12.2 ± 1.5
St. 23	0	93 ± 6	11.1 ± 1.2
St. 24	10 ± 10	90 ± 10	12.2 ± 1.4
St. 25	0	100	10.9 ± 1.4
St. 26	0	100	11.3 ± 1.8

a: 3 つのシャーレの中で観察された各率の平均値 ± 標準偏差 (n=3)

表2. メタボロミクスから得られた健康リスクファクター

地点	メタボロミクスから得られたファクター
St. 16	228
St. 17	38
St. 18	15
St. 19	213
St. 20	92
St. 21	49
St. 22	124
St. 23	168
St. 24	225
St. 25	116
St. 26	1

の調査でも述べたように、自由に動き回れない卵の状態が長くなると、他の生物からの補食リスクは高まる。孵化までの時間が通常よりも遅れると、そのリスクは大きくなるため、無視はできないと考える。死亡、未孵化、孵化日数において、今回の毒性影響試験結果は、初年度に行った大阪市近郊での調査と比べると総体的にその傾向は異なっていた。孵化を遅らせる要因と死亡を引き起こす要因物質は異なると考えられ、今後、どのような物質が強く寄与しているかを具体的に示していくことが課題の1つとなる。表

1に毒性試験の結果と合わせて、リスクファクターを示したが、死亡率が10%以上であった St. 16、19、24 でその値が高い結果となった。また、メタボロミクスから得られた健康リスクファクター（表2）は死亡が確認された St. 16、19、24 で高く、死に至るような影響は胚の代謝にも影響を及ぼしていたと考えて良い。

上記結果から各リスクファクターを総合し、総リスクファクターとして示したものが図2のグラフである。ここでは3年間で行った全ての結果を掲げる。総リスクファクターが最も大きかった地点は今年度調査を行った St. 19 であり、さらにそれに類した値が St. 24 で得られた。この地点では10%程度の死亡が観察された他、孵化日数の遅れや、代謝への攪乱など、複合的に影響が誘発されていたためにリスクファクターが高くなった。3年間の調査を通して、この両地点の底質環境の修復が大阪湾沿岸環境の中でも最も必要としているといえる。また、St. 16 も高いリスクを示した。今年度、生物影響リスクが高い地点は堺市、泉大津市、泉佐野市周辺に分布していたが、その要因はこの3市周辺の工場地域に由来する可能性がある。また、初年度の調査で高いリスクファクターを記録した St. 1 は淀川からの化学物質負荷が大きいため生物影響リスクが高いと考えられたが、今年度の調査で影響が見られた地点とこの St. 1 では影響を誘発した化学物質種や要因が異なる可能性がある。

4. 本研究の総括

本研究ではヒメダカ胚を用いて、大阪湾一縁の底質影響評価を行った。その結果、淀川河口域、神戸市、堺市、泉佐野市、泉大津市周辺にリスクの大きな地点があることが分かった。全調査を通して大阪湾底質は局所的にリスクが高い地域があるものの、一時よりもその環境はかなり改善していると思われた。今後は今回調査できなかった場所での調査を試みると共に、さらに発展的に海産魚胚による影響評価を行うこと、影響要因となる化学物質種を探求する、などを予定している。特に今回は淡水魚胚を用いたが海産魚胚を用いればその感受性が異なるため、さらに新たな影響リスクが見出せるかもしれない。この3年間に得られた結果を、今後の大阪湾底質で生物リスクが高い地域の底質改善に役立てられれば幸いである。

図8 各調査地点における総リスクファクター（黒い棒グラフのリスクファクターは左縦軸、白い棒グラフは右縦軸が数値を示す。グラフ上の数字はリスクファクター）

