

魚胚を用いた水域底質の影響リスク評価

鹿児島大学 水産学部 教授 宇野 誠一

要 旨

本報告では、我が国ではあまり注目されていない底質汚染の生物影響リスクの現状を紹介するとともに、魚胚を利用して実際に東京湾と広島湾底質の影響リスク分布を明らかにした調査について報告する。東京湾ではヒメダカ胚を利用して湾西側 7 地点について、広島湾ではジャワメダカ胚を利用して厳島の周辺海域の 11 地点について、底質リスク評価を試みた。東京湾における影響評価では、胚の孵化遅延程度の影響しか観察されず、ヒメダカ胚の感受性の低さも考慮する必要があるが、今回対象とした 7 地点の底質影響はかなり小さいと考えられた。広島湾に関しては、調査した半数以上の地点でジャワメダカ胚の死亡率が 20% を超え、いくつかの地点では孵化稚魚に奇形を与えるような底質も見出された。そのため、広島湾では僅かながらでも底質汚染の影響を受けている底生生物がいる可能性が示唆された。

1. はじめに

我々の生活の中で使用された化学物質は、その一部が環境中に放出される。さらに様々なルートを経て河川などに流入し、最終的には海域に到達する。海域に到達したもののうち、水に溶解するものは海水で希釈されるが、溶解しないものは水中の懸濁微粒子に吸着し、やがて沈降して海底質(底泥)に堆積する。底質に堆積した化学物質は長期にわたり分解されないものも多く、物質によっては高濃度で長期間にわたり残留する。底質に堆積する化学物質は様々であり、都市部近郊沿岸域は特にその物質数、濃度共に大きくなる傾向にある。

底質では、上層水中と同様に個々が密接に関係を持つ多種多様な底生生物が生息している。生物によっては上層水、底質の両方を住処にして、そのどちらの食物連鎖にも大きく関わっているものも少なくない。もし、底質の汚染が著しくなった場合、そこに生息する生物への影響リスクが懸念される。残留する個々の化学物質が生物影響を誘発する濃度以下であった場合でも、多くの物質に一度に長期にわたり暴露されるため、予想もできないような複合影響が生じることも考えられる。しかし、実環境における底質汚染由来の生物影響はほとんど知られていない。

2. 底質汚染の影響リスク評価の問題点

野外底質、特に海域の底質影響を知るのは大変難しい。通常、海水の透明度はせいぜい数 m しかなく、潜水でもしない限り、底質の様子を目視で確認することは難しい。底質で異変が起こっていてもそれに気が付くのが遅れることもあり得る。ある場所で深刻な底質汚染が起こり、その場所で幾つかの生物が影響を受けて個体群を維持するのが難しくなっている場合、何も手を施すことができず、その群がひっそりと絶滅してしまうこともあり得る。そのため、底質の生物影響リスクを知ることは重要であるが、底質汚染影響リスクを評価する確固たる手法は非常に限定されているのが現状である。

水中に溶存する化学物質に対する生物影響リスク評価法は日本の化審法における、藻類、甲殻類、魚類のいわゆる 3 点セットの急性毒性試験の他、様々な影響試験が確立されている。化審法と深い繋がりを持つ OECD でも、短期、長期の試験など多くの試験法が設定されている。一方で、OECD が提供する底質影響試験法はユスリカ幼生を用いたもの(TG218)のみであり、他には確立されていない。TG218 は野外底質を模した人工底質に単一種の化学物質を添加して、暴露試験を行うものである。本試験法は水中化学物質の影響リスク評価法に準じたものであり、底質版 PNEC (PNEC_{sed}) の

算出のために行われることが多い。また、欧米では同様の添加底質を用い、ユスリカ幼生の代わりに淡水性ヨコエビ *Hyalella azteca* を用いた試験が広く行われている¹⁾²⁾。本法は、あくまでも単一の化学物質が、もし底質に残留したらどの程度生物影響を与えるのか、を調べるものであり、単一の化学物質が底質に残留した際の影響の可能性を示すものと判断して良いだろう。

前述の通り、野外底質には様々な化学物質が残留していて、その影響評価は様々な面からアプローチされている。最も簡単なリスク評価は、その複合影響が相加的に起こっていると仮定して、検出された底質中の化学物質の PNEC_{sed} を足し合わせて考える手法である。しかし、実際に野外底質では種々の物質が残留しているために、その中の一部物質が拮抗あるいは相乗的な影響を与える可能性もある。結果として、PNEC_{sed} の足し算による複合影響評価では、実際に観察される影響とは大きく乖離する可能性もある。

残留する化学物質種と濃度にはある程度目をつぶって、観察される生物影響から、その地点の底質影響リスクを評価しようとする試みも古くから行われている。海域底質評価の場合、ウニ類³⁾、甲殻類⁴⁾、多毛類⁵⁾、魚類⁶⁾など様々な水生生物が対象とされ、検証されている。しかし、海産生物の場合、多くの研究室で飼育可能な生物が少ないのが現状であり、影響評価が為されている地点でも、他地域で他の試験生物で実施された結果との比較が難しいという欠点がある。一方で、淡水では底質影響評価に特化した試験生物をピックアップするのは難しくないかもしれない。その代表的なものは国産種ではないが、*H. azteca* を用いたものである。

海産生物は一般的に飼育が難しく、大きな水量が必要であることもまれではなく、実際に飼育法が確立されて、実験室内で継続的に飼育可能な種は現在では限定されていると言わざるを得ない。OECD で近年試験魚として扱われることになったマダイもその例に漏れず、普通の実験室内で卵～親魚の全ライフサイクルを継続的に飼育するのは不可能に近い。海域の影響評価を淡水生物で評価するのも悪くはないが、淡水生物—海産生物間の生理学的相違は大きく、化学物質感受性も物質種によっては大きく異なることが知られている。そのため、

海域の影響評価は海産生物を用いて実施すべきだという意見が根強くある。

底質影響研究は欧米各国では積極的に行われている。海外学会などに参加すると、底質影響に関するセッションなどが設けられていることが多く、発表数も多い。一方で我が国においては、一部の研究者が底質影響評価および研究について必要性を唱えているが、底質影響評価研究は人気があるとはいえない。野外底質の影響調査に関しても、原因物質の特定が極めて難しいこともあって、すこぶる人気がない。結果、我が国の淡水および海水域において、生物影響試験を実施して得られた底質リスク分布はほとんど知られていないのが現状である。

3. 魚胚の底質影響評価への適用

我々はこれまで日本の都市部沿岸域を中心に様々な海域で化学物質の底質中分布や動態を調べてきた。大阪湾などでは、多環芳香族炭化水素類 (PAHs)⁷⁾⁸⁾ や内分泌攪乱物質 (ECDs)⁹⁾ が、ある程度生物影響リスクがあるのではないかと予想されるレベルで検出されたこともあった。大阪湾は大阪市や神戸市などの大都市に接しており、阪神工業地帯などの大工業地域が海岸線の一部を構成していて、PAHs や ECDs 以外にも多種にわたる化学物質が放出されている可能性が高い。このような地域で底質影響リスクを調べる際には、化学物質を1つ1つ特定し、その上でさらに個々の物質のリスク評価をする、という手順が考えられるが、湾内の影響リスク分布や原因物質の特定までにはかなりの時間を要するのが現状であろう。そこで我々はリスクがある物質の探索からスタートしてリスクを調べようとする「化学物質からのアプローチ」は止めて、原因物質の探求は後回しにし、「生物影響からアプローチして」、まずは海域底質の影響リスク分布を明らかにすることに目的をシフトして調査を進めていくことにした。そのために比較的簡便に実施可能な底質影響評価法を確立できないかを考えていたところ、Barjhoux らの魚胚による底質影響試験法¹⁰⁾ は我々のニーズに応えることができるのではないかと感じる点が多々あった。Barjhoux らの方法はゼブラやヒメ

ダカの胚(卵)を少し湿らせた底質の上に置き、発生を促すものであり、湿らせるために用いた水分は野外底質における間隙水に相当する。また、この試験ではこれ以上の飼育水は注がず、上層水に相当するものはない。そのため、底質に置いている間は、魚胚は底質中の化学物質に“直接暴露”されることになる。本法では上層水が無いために、化学物質の底質から上層水への分配を考慮する必要がなく、直接底質から受ける影響リスクを的確に判断できる特徴を持つ。もちろん野外では、底質から一定量の化学物質が平衡分配の関係により上層水へと移行すると考えられており、その影響も考慮されるべきである。しかし、この部分は水暴露試験をすればある程度分かるため、底質からの直接受ける影響にこだわって評価する際にもこの方法は有用であると考えている。

魚胚は稚魚ほどではないがそれでも化学物質感受性が高い時期にあり、発生中に現れる影響も卵膜が透明であるために観察がしやすい。動物倫理の観点から見ると、胚は生物と見なされないため動物試験の 3R も満たす。また、魚種に依存して浮上卵と沈降卵とに別けられるが、沈降卵を産む魚種にとっては底質に胚が一定期間動かずに暴露されることになるため、魚胚を底質影響評価試験に用いるのはそれほどの外れではない。

我々は、上層水が無く、底質を湿らせた状態で魚胚が発生するかどうかを確認するために、化学物質を含まない珪砂を湿らせてその上にヒメダカ胚を置いて日々観察を続けたところ、水中で飼育したときとあまり変わらない速さで発生が進むことを確認した。また、孵化直前にこの胚を水中に移せば、その後問題なく正常な稚魚が孵化した。その後、いくつかの底質種(粘土、砂質、ヘドロ質)に相当する媒体に化学物質を添加して、同様の方法で胚を置き、暴露したところ、暴露の影響も胚や孵化稚魚に現れることを確認した。このことから、本法は底質暴露試験に適用可能であると判断された。

実環境底質評価に関しては、水域底質を現場から採取して実験室内に持ち帰り、この魚胚を用いた試験法を室内で実施すれば、現場で起こり得る生物影響リスクの一端が見出せるのではないかと考え、まずは幾つかの都市部海域底泥を採取して、これらに対してヒメダカ

胚を用いてリスク評価を行った。

さらに、海域の底質は海産生物で評価すべき、ということをおき、ヒメダカと同属の汽水魚ジャワメダカ *Oryzias javanicus* を用いて引き続き底質影響評価を実施した。ジャワメダカは純海水で卵から親魚まで飼育が可能で、海水下で問題なく産卵もする。飼育は、海水を用いる、胚が孵化するまでにヒメダカよりも長期間を要する、という以外は、ヒメダカを飼育するのとさほど変わらず、扱いやすい。筆者が生息地のマレーシア・ペナン島でジャワメダカを観察したところ、河口付近の海域で塩分が 30‰以上あるところでも問題なく泳ぐ個体が数多くいたため、野外でも海水域で産卵もしていると予想される。我々の研究室ではジャワメダカを 20 年にわたり継代飼育をしている。

4. 魚胚を用いた東京湾および底質の影響評価

本稿では東京湾底質をヒメダカ胚により¹¹⁾、さらに広島湾では海産魚ジャワメダカ胚により¹²⁾、影響評価した例を紹介する。

4.1 底質採取地点と底質前処理

東京湾で採泥したのは図 1 に示す湾西側の St. 1~7 である。底質は陸上からエクマン・バージ採泥器により採取し、これを鹿児島大学の研究室に持ち帰った。さらに、広島湾では図 2 に示す厳島周辺の 11 か所であり、これは愛媛大学沿岸環境科学研究センターの調査実

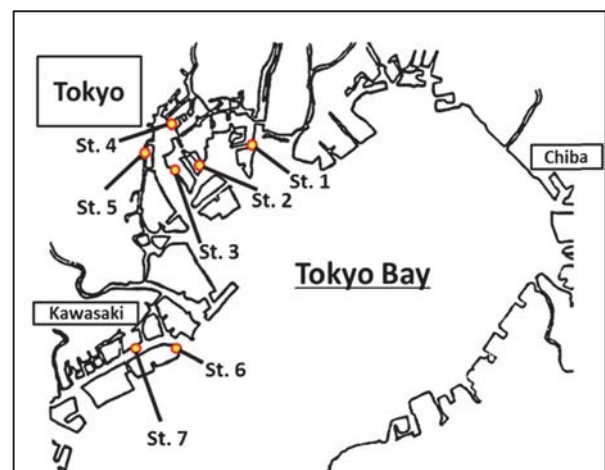


図 1 東京湾における採泥地点

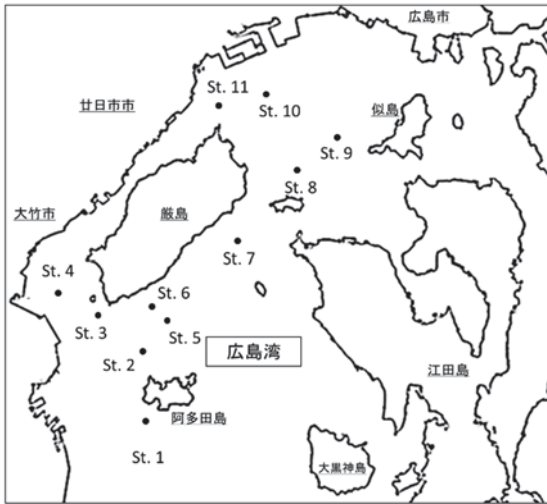


図 2 広島湾における採泥地点

習船「いさな」の協力のもと、船上からスミス・マッキンタイヤー採泥器で採泥した。

採取した底質は 1 mm 目のふるいでふるった後、風乾した。風乾した底質は、ヒメダカ胚を用いる試験では胚の発生に必要な微量成分を含む飼育溶液、ジャワメダカ胚を用いる場合は人工海水に浸した後、余計な水分を遠心分離により除去した。この状態を間隙水を含む底質、とした。各地点から得た底質に対して同じ処理を実施した。

4.2 魚胚の底質暴露方法

試験開始の午前中、ヒメダカの雌雄を 1 : 2 の構成比で飼育して、そこで得た卵を採集した。その後、数時間放置し、桑実期まで発生が進んだ胚を顕微鏡下で選別し、これを以下の試験に用いた。

ガラスシャーレに 4.1 項で調製した底質を敷き、その上に採集・選別した胚を半分程度が埋まるような形でヒメダカ、ジャワメダカ共に 10 粒ずつ置いた。その上には上層水は注がず、毎日胚表面を湿らす程度のわずかな霧吹きをした。シャーレに蓋をして、底質が乾燥しないように蓋と皿の部分の隙間をパラフィルムを巻いて閉じた。これをヒメダカでは 24°C、ジャワメダカでは 26°C に設定したインキュベータに収容した。胚の様子は毎日インキュベータから取り出して、シャーレの蓋を開けて観察した。この状態でヒメダカは 7 日間、ジャワメダカは 11 日間、底質暴露を続けた。

暴露後、48 ウェルマイクロプレートの各穴に、ヒメダカ試験では脱塩水を滅菌したもの、ジャワメダカ試験では人工海水を注ぎ、そこに 1 粒 / 1 穴ずつ収容して、孵化後 3 日目まで引き続き上記の各温度に設定したインキュベータで飼育した。孵化後 3 日目の稚魚はすべて横臥させて顕微鏡下で写真を撮影し、骨形成異常や奇形の有無などを検証した。

この両魚種胚を用いた底質影響評価法のエンドポイントとして死亡、未孵化、発生中の異常、孵化後の異常、孵化日数などに注目した。

4.3 東京湾および広島湾の影響リスク分布

東京湾底質に対するヒメダカ胚の影響はそれほど顕著ではなく、影響と見なせるような 20% 以上の死亡などが観察された地点はなかった(図 3)。影響が見られた点を強いて挙げれば、St. 3 の孵化日数の遅れであり、対照区が 10.1 ± 0.7 日であったのに対し、St. 3 は 12.5 ± 1.6 日であった。孵化日数の遅れは影響と見なさない研究者もいるようだが、魚胚は自発運動ができないため、野外では他生物からの捕食リスクが高くなることが懸念される。そのような St. 3 でもその孵化率は 97% であり、奇形を呈した稚魚も 10% 以下の孵化率であった。他の地点ではほぼ影響は観察されなかった。そのため、ヒメダカ胚を用いた東京湾のリスク評価からは底質影響は

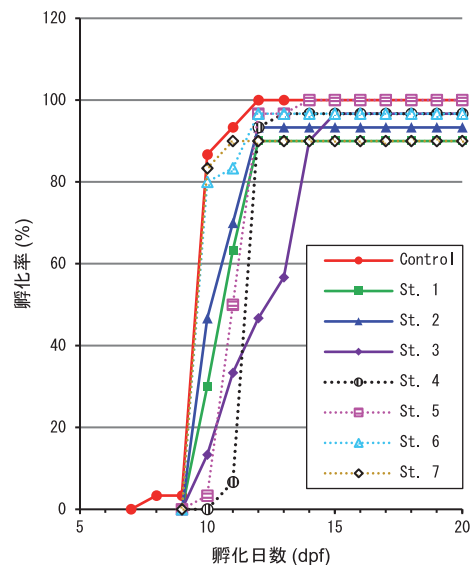


図 3 東京湾底質暴露による孵化率と孵化日数

ほとんど見出せなかった。

広島湾におけるジャワメダカの底質影響評価では、死亡率が 20%以上の地点が St. 2, 4, 6, 7, 10, 11 と調査地点の半数を超えた。また、何らかの奇形を呈した稚魚が St. 1, 4, 7 で、また孵化日数が有意に長い地点も 6 地点で観察された。St. 11 は廿日市市に近接する地点だが、この地域の汚染負荷源は良く分からない。また、St. 2 は阿多田島の近傍であるが、大竹市の近郊でもある。大竹には工場群が海岸線を形成しており、St. 2, 3, 4 の 3 地点の影響パターンを考えるとこれら 3 つの地点では共通の汚染物質から底質影響が引き起こされている可能性があり、その工場廃液などは検証対象となるであろう。ここでは詳細に述べないが、これまで我々が実施してきた各所の底質影響試験において、多くのケースにおいて、ヒメダカ胚よりもジャワメダカ胚の方が感受性が高い傾向にある。そのため、広島湾の底質影響をヒメダカで調べた場合はそれほど影響がみられない可能性もある。一方で東京湾でジャワメダカ胚の試験を実施すればもっと鋭敏に影響が表れる地点も出てくるかもしれない。このヒメダカとジャワメダカ胚の影響差の原因は、孵化までの日数がジャワメダカの方が要するため、結果として底質暴露期間を長く設けることができる、という暴露期間の差に由来する可能性が強いと考えているが、化学物質感受性がジャワメダカの方がヒメダカよりも高い、もしくは海産魚の方が淡水魚よりも鋭敏に化学物質に影響を受ける可能性もあるかもしれない。

表 1 広島湾底質に暴露した後のジャワメダカ胚の孵化率、孵化日数、死亡率および奇形率

地点	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	奇形率 (%)
コントロール	93.3±5.77	15.0±1.0	6.67±5.77	0
St.1	86.7±5.77	14.3±0.4	13.3±5.77	26.9±16.7
St.2	66.7±5.77	13.7±0.2	33.3±5.77	10.3±9.01
St.3	83.3±20.8	14.3±0.6	16.7±20.8	14.4±17.1
St.4	80.0±10.0	17.0±1.5 *	20.0±10.0	21.0±14.4
St.5	83.3±5.77	17.3±1.0 *	16.7±5.77	15.7±5.61
St.6	73.3±5.77	18.0±0.8 *	26.7±5.77	9.3±8.49
St.7	76.7±15.3	16.7±0.8	23.3±15.3	22.7±10.4
St.8	83.3±20.8	17.7±1.8 *	16.7±20.8	8.89±8.39
St.9	83.3±15.8	16.7±0.5	16.7±15.8	8.10±7.33
St.10	76.7±5.77	18.3±2.0 *	23.3±5.77	13.7±14.3
St.11	63.3±5.77 *	18.3±1.2 *	36.7±5.77 *	14.3±24.7

* : ダネットの多重比較により有意だったもの

5. 底質影響評価の今後の課題

最後に底質影響試験の今後の課題を挙げて、本稿の終わりにしたい。

本研究で紹介したように魚胚を用いた底質影響試験は簡便で感受性も比較的良い。省スペースで実施できたり、海産魚ジャワメダカによる影響評価ができることも確認した。しかし、この魚胚の試験だけで全ての底質影響は語れないだろう。やはり、甲殻類などの無脊椎動物を初めとする様々な生物を用いて影響を調べた上で底質影響を判断すべきで、そのためにもできる限り早く、魚胚以外の海産生物を用いた影響試験法を確立することが今後の野外影響リスク評価をする上で重要となる。

もう一点、現状、なかなか難しいのは承知の上で書くと、やはり多様な影響物質の同定、および汚染源の特定法の確立が必要となるであろう。影響物質の的確な定性・定量は、高度な分析機器を使うことも重要なかもしれないし、汚染源の特定には統計学的手法を駆使する必要もあるかもしれない。現状の生物だけの影響を示しただけでは、行政に対してのアピール度は小さく、その汚染物質に迫ることがなければ規制値も設定できない。最近、網羅分析が化学分析の分野で盛んに発表されるようになり、そのデータベースの構築などから、底質影響評価の際に有用なデータを提供することを期待する。

参考文献

- 1) Mcdonough et al.: An evaluation of the ability of chemical measurements to predict polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediment toxicity to *Hyalella Azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1545-1550 (2010).
- 2) Liber et al.: Utilization of Marine Crustaceans as Study Models: A New Approach in Marine Ecotoxicology for European (REACH) Regulation. *Ecotoxicol. Environ Saf.*, 74, 1171-1179 (2011).
- 3) Bonaventura et al.: Development and validation of new analytical methods using sea urchin embryo bioassay to evaluate dredged marine sediments. *J.*

- Environ. Manage.*, 281, 111862 (2021).
- 4) Strode et al.: Sediment quality assessment using survival and embryo malformation tests in amphipod crustaceans: The Gulf of Riga, Baltic Sea AS case study. *J. Mar. Sys.*, 172, 93-103 (2017).
 - 5) Gribo et al.: Toxicity Assessment of Impacted Sediments from Southeast Coast of Tunisia Using a Biomarker Approach with the Polychaete *Hediste diversicolor*. *Arch. Environ Contam Toxicol.* 76, 678-691 (2019).
 - 6) Ribocco et al.: Teleost fish (*Solea solea*): A novel model for exotoxicological assay of contaminated sediments. *Aquatic Toxicol.*, 109, 133-142 (2012).
 - 7) Miki et al.: Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in Osaka Bay, Japan. *Mar. Pollut. Bull.*, 85, 558-565 (2014).
 - 8) Uno et al.: Distributions of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of Osaka Bay, Japan. *Mar. Pollut. Bull.*, 124, 1014-1019 (2017).
 - 9) J. Koyama et al.: Relative contribution of endocrine-disrupting chemicals to the estrogenic potency of marine sediments of Osaka bay, Japan. *Water, Air & Soil Pollut.*, 224, 1570-1579 (2013).
 - 10) I. Barjhoux: Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 79, 272-282 (2012).
 - 11) S. Uno, et al.: Toxic evaluations of sediments in Tokyo Bay, Japan, using Japanese medaka embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, 27702-27709 (2017).
 - 12) 宇野ら: ジャワメダカ胚を用いた広島湾底質のリスク影響評価. *マリンエンジニアリング*, 54, 860-864 (2019).