

生物学的手法を用いた環境モニタリング手法についての研究（Ⅳ）

半野勝正 稲生義彦 依田彦太郎

1 はじめに

化学的分析手法は既知物質や単一物質による汚染には大変有効な手段であるが、未知物質や複合汚染について化学的分析手法だけで解明することは難しい。一方、生物の生体反応により毒性を検出するバイオアッセイ法は、複合的な汚染を簡便に検出できる利点を持つが、その定量性と汚染原因物質の同定には限界がある。メダカは、わが国で開発された実験動物であり、淡水・海水域の両方に適応可能であり塩濃度の高い最終処分場周辺水域での実験に適している。当センターでは、平成17年度からメダカの卵を使った各種生物学的手法を用いた環境モニタリング手法について検討している。今回は、南房総地域の最終処分場周辺環境水のメダカ胚形成期における影響について検討したので報告する。

2 試験方法

調査した17地点を図1に示す。今回の調査試料は、いずれも南房総方面の「共同命令」以前の遮水工のない埋立処分場等の観測井戸及びその周辺流域の環境水である。採水した各試料は1 μ mGFPでろ過後、各試験に供した。試験は化学分析の他、生物的試験として、マイクロトックス試験及び一部試料についてはメダカ DNA マイクロアレイ試験

を行った。調査地点の詳細は、No1～4：A 処分場、No5～7：B 処分場、No8～10：C 処分場、No11～14：D 埋立地、No15～16：E 処分場、No17：リゾート開発地周辺である。調査年月日は、2008. 8. 14～9. 26である。メダカ胚形成阻害実験は、96 穴プレート各セル内に上記試験液 200・L ずつ注入し、受精後 24 時間経過（24hpf）のヒメダカ卵を浸せきし、経時的に卵胚の様子を顕微鏡により観察した。メダカ卵観察方法は図2に示す。

3 結果と考察

表1に各試験結果を示す。No5 及び No16 の処分場下放流水の EC 及び塩類濃度が非常に高かった。この試料に関してメダカ胚形成阻害試験では、ふ化が遅れる傾向が見られたが、マイクロトックス試験での影響は見られなかった（EC₅₀>100）。試験試料のメダカ胚への生育影響について Fig3 のグラフで表した。グラフの横軸は、メダカ卵（24hpf）を各試料に浸せきした後の経過時間を、縦軸はメダカ卵浸漬後の各経過時刻（h）における正常（normal）、血流不全（奇形も含む）、ふ化（hatch）、死亡（death）の比率（%）を示す。その結果、今回の処分場周辺環境水のメダカ胚への影響は図3の右に示す4パターンに分類された。

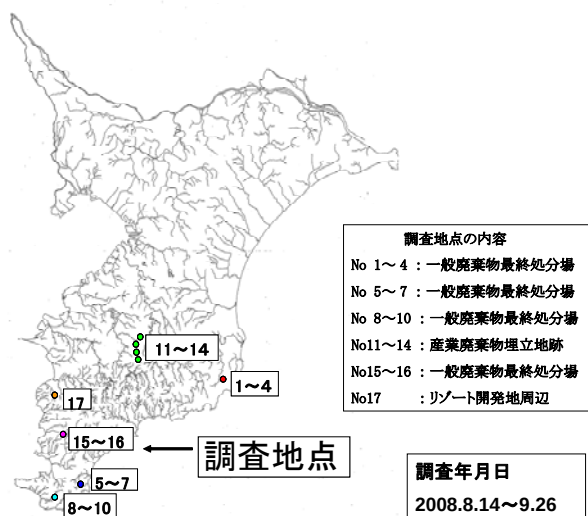


図1 分析試料採取地点

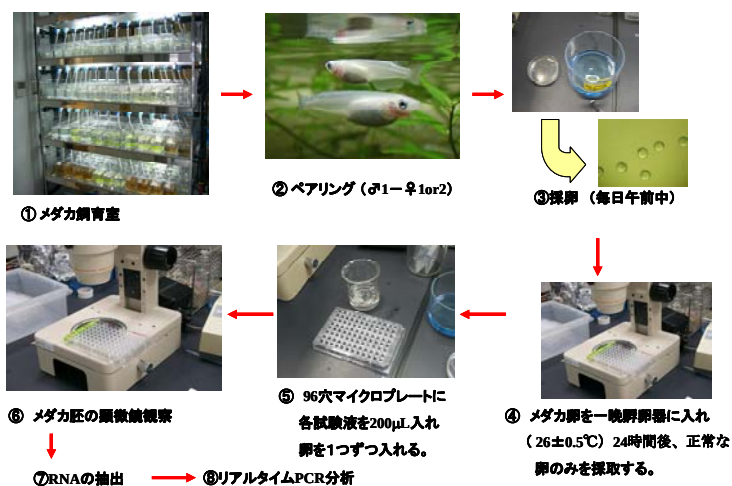


図2 実験手順

		表1 分析結果														
		(mS/m)	anion (mg/l)				cation (mg/l)				Medaka embryos		MicroTOX (EC50%)			
No.	Sampling sites	EC	Cl	Br	NO3	SO4	Na	K	Mg	Ca	Hatching days(D)	Hatchability (%)	5 min	15 min	30 min	
1	A処分場観測井	60	50	1.8	3.7	290	32	12	26	160	22.2	92.7	54.5	47.7	43.6	
2	A処分場崖下	130	160	2.0	5.4	210	70	25	34	160	26.0	92.7	66.9	72.8	70.9	
3	A処分場先沼	80	79	1.8	1.1	110	45	15	23	120	15.3	46.9	55.2	49.8	53.5	
4	A処分場隣沢	24	24	1.7	7.5	38	14	3.1	15	84	17.7	80.2	48.7	55.8	55.8	
5	B処分場放流水	370	1100	5.3	37	250	470	240	42	190	26.0	57.5	100<	100<	100<	
6	B処分場枝沢上	53	62	1.8	3.3	36	77	14	13	65	16.2	61.3	100<	54.2	51.4	
7	B処分場枝沢下	66	23	1.6	2.0	29	59	4.5	12	59	12.7	48.8	48.0	46.0	45.1	
8	C処分場直下	86	45	1.8	5.4	74	53	13	11	45	30.6	95.2	44.3	100<	100<	
9	C処分場下流	78	52	1.8	0.85	62	52	14	20	97	26.1	93.4	100<	100<	100<	
10	C処分場枝沢	20	40	1.7	1.2	26	37	4.2	13	48	21.6	94.7	100<	100<	100<	
11	D処分場上流	19	9.5	ND	1.5	24	12	2.6	9.8	21	22.4	91.3	100<	100<	100<	
12	D処分場下	13	6.1	ND	0.08	7.6	7.3	5.9	11	77	26.9	96.9	100<	100<	100<	
13	D処分場枝沢	32	8.0	1.6	1.3	23	15	3.7	20	39	21.4	97.5	100<	100<	100<	
14	D処分場枝沢下	40	160	5.3	3.2	31	51	17	9.4	57	28.1	88.5	100<	100<	100<	
15	E処分場上流	38	28	1.6	5.4	32	44	5.4	7.1	16	16.5	66.7	55.1	53.6	52.9	
16	E処分場下流	760	3000	14	29	260	1300	490	54	290	25.9	86.3	100<	100<	100<	
17	Fリゾート地	32	12	ND	4.5	41	36	4.1	8.3	38	23.3	92.7	100<	100<	100<	

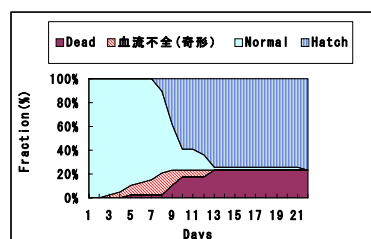
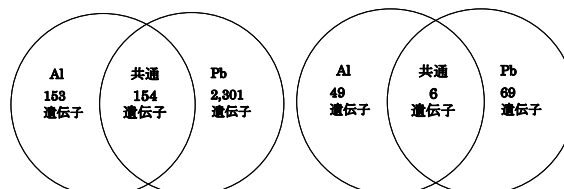


図3 分析試料のメダカ胚生育への影響について

Group1 : 正常 平均ふ化日一約10日 ふ化率一100% ブランク水
Group2 : 平均ふ化日一長い, 25日以上 ふ化率一約100% A, C, D, E, F処分場
Group3 : 平均ふ化日一ふつう15日程度 ふ化率一低い A, B処分場
Group4 : 平均ふ化日一長い, 25日以上 ふ化率一低い B処分場

	解析有効 遺伝子	2倍以上 発現上昇	0.5倍以下 発現低下	発現変動 遺伝子
Cont. vs Pb	29,243	2,455	75	2,530
Cont. vs Al	29,123	307	55	362



(1) Pb 及びAl における発現上昇遺伝子の共通性 (2) Pb 及びAl における発現減少遺伝子の共通性

図4 Pb, Al 溶液(10mg/L)暴露によるメダカ胚中遺伝子の発現変動

また、前報 1) でふ化阻害の原因と思われた Al と埋立廃棄物中関連の重金属として Pb を選択し、メダカ cDNA マイクロアレイ試験を行った。試験は、Pb 及び Al 試験水（各 10mg/L）に 24hpf メダカ卵を 48 時間浸漬した後 t-RNA を抽出し分析に供した。方法は、アジレント社製メダカカスタムアレイの 1 色法で行った。結果は、両物質共通に発現上昇した遺伝子が 154 個、発現減少した遺伝子が 6 個抽出された。これら共通に発現変動した遺伝子に関するベン図を図 4 に示す。

4 結論

1) No5 及び No16 の処分場下放流水の EC 及び塩類濃度が非常に高かった。この試料に関してメダカ胚形成阻害試験では、ふ化が遅れる傾向が見

られたが、マイクロトックス試験での影響は見られなかった。(EC50>100)

2) 最終処分場周辺環境水のメダカ胚への影響は、4 パターンに分類された。

3) Pb, Al (各 10mg/L) に 48 時間暴露したメダカ胚を用いて行ったマイクロアレイ試験では、154 個の共通発現上昇遺伝子及び 6 個の共通発現減少遺伝子が抽出された。

5 参考文献

- 1) 半野ら：生物学的手法を用いた環境モニタリング手法の研究(Ⅱ), 第17回環境化学討論会, 2008, 786-787.
- 2) 半野ら：メダカ卵を用いた最終処分場周辺環境水のモニタリング手法についての研究, 第16回環境化学討論会, 2007, 534-535.