

石油汚染の生態影響評価と
モニタリング技術に関する調査研究

報 告 書

平成 26 年 3 月 31 日

一般社団法人日本海事検定協会
(理化学分析センター)

鹿児島大学 水産学部

要旨

本事業は、石油流出事故が起こった場合の海洋生態系への影響評価及びモニタリング技術開発に関する調査研究を、鹿児島大学と日本海事検定協会が共同で実施し、その成果を報告書としてまとめ、公表することを目的とする。また、石油汚染からの海洋生態系あるいは海洋環境の回復の評価手法の開発に関する調査研究を行うことにより地球環境の保全に資することとする。

石油流出事故が起きた場合、その残留性から長期の調査が必要となるものの、どの時点で海洋環境が汚染から回復したかを見極める手段は現時点では確立されていない。

本研究の目的は、①海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響を評価する手法の開発、並びに、②石油残留量のモニタリング技術の開発である。

昨年度の試験は、海岸に漂着した流出C重油を、バイオレメディエーション技術により分解処理する技術の安全性を評価するため、石油を添加した人工底質をガラス管に収納し、循環止水式装置での分解試験を試みた。その結果、海水中蛍光油分が肥料添加区で増加するものの、多環芳香族炭化水素類（PAHs）などの濃度が低下した。個々のPAHs濃度に基づく魚類への短期的影響は小さいことが推定された。

一方、 β -ナフトフラボンに暴露したジャワメダカからCYP1A、-1B1、-1C1の全長cDNAを得、塩基配列を決定した。これによって、それぞれのCYPに対する特異的DNAプローブを設計し、それぞれの誘導の有無を確認することができる。

今年度は潮汐を想定し、C重油添加人工底質を収容した実験カラムに海水を入れ、これを毎日換水し、得られた海水中の油分などを分析した。また、ジャワメダカを種々の環境条件においた場合のCYP誘導を観察するとともに、石油分解海水に暴露しCYPがどの程度誘導されるかを検討した。

毎日換水式の石油分解実験から、バイオレメディエーション技術を用いた漂着油の微生物分解促進によって、一時的ではあるものの乳化した油成分による海水中油分濃度の上昇を招き、一部の水生生物に成長阻害などの影響を及ぼす可能性が示唆された。

一方、ジャワメダカのCYP誘導観察において、石油の経口投与では、ジャワメダカの腸でCYP1Aでは約1000倍、CYP1B1と-1C1では約10,000倍の誘導が見られた。卵の石油汚染水への暴露では、CYP1C1で6~8倍の誘導が見られ、成魚の石油汚染水への暴露では、鰓でCYP1A、-1B1の誘導が見られた。以上の結果によって、石油汚染の指標としてのCYP1遺伝子の有用性が示唆された。

目 次

1. 目的	4
2. 年度計画	4
3. 本年度の成果概要	4
3-1 海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法	4
3-2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法	4
4. 本年度の研究内容・結果の詳細	5
4-1 海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法	5
4-1-1 流出石油成分の環境残留性	5
4-1-2 流出油残留成分の生物影響	11
4-1-3 小括（海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法）	13
4-2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法	14
4-2-1 ジャワメダカにおける経口投与したC重油による CYP1A、 -1B1、-1C1 遺伝子の誘導	14
4-2-2 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する飼育 水塩分濃度の影響	15
4-2-3 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する絶食 の影響	15
4-2-4 石油汚染水（飼育水）によるジャワメダカ卵 CYP1A、-1B1、 -1C1 遺伝子の誘導	16
4-2-5 石油汚染水（飼育水）によるジャワメダカ成魚各臓器におけ る CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の誘導	17
4-2-6 小括（残留石油成分の生物学的モニタリング手法）	18
5. 次年度の課題・計画	19

1. 目的

石油流出事故が起きた場合、その残留性から長期の調査が必要となるものの、どの時点で海洋環境が汚染から回復したかを見極める手段は現時点では確立されていない。

本研究の目的は、①海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響を評価する手法の開発、並びに、②石油残留量のモニタリング技術の開発である。

2. 年度計画

本研究の年度毎のスケジュール（目標）を下記に示す。

年度	①海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法	②石油残留量のモニタリング技術
2012年度	流出油の環境残留性について基礎データを得るため、微量のC重油を添加した海水を汚濁海岸を模して作成したC重油分解装置に貯蔵し、経時的に海水中の油分量、PAHs*及びpH等の変化を調査する。	石油が生体内に吸収されると薬物代謝系酵素（CYP）が誘導されることを利用するため、2012年度は実験に使用するジャワメダカのCYP遺伝子の塩基配列を決定した。
2013年度	C重油分解装置を改良し、また、試験条件を止水式から換水式に変えて、汚染海水中の油分量等の経時変化を調査する。また、微生物によって海水中に分散した油分を特定する。更に石油分解菌数を追加することでその影響を調査する。	CYPに対する特異的DNAプローブを設計し、石油に暴露されたジャワメダカへの影響を調べる。
2014年度	海水中に分散した石油成分を詳細に特定し、それらの生物に対する毒性（有害性）を評価する。	水中油分を段階的に低下させ、CYPが誘導される水中油分の最低濃度を明らかにする。

3. 本年度の成果概要

本年度の研究によって明らかとなった事項の概要は以下の通りである。

3-1 海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法

毎日換水式試験で実施したC重油のバイオレメディエーションから以下の結果が得られた。

- (1) 蛍光油分が実験後半に上昇し、特に②C重油・肥料添加区でその上昇が著しかった。
- (2) 2、3環の比較的低分子のPAHsあるいはalkPAHs濃度は実験前半において低下したが、4環以上の高分子PAHsあるいはalkPAHs濃度は、実験後半に上昇することが明らかとなった。
- (3) PAH-OHの相対蛍光強度の高いことから、蛍光油分に対する寄与の大きいことが示唆された。
- (4) 新たに推定したLC50値で計算した実験終了時の試験水のΣ Toxic Unit値は0.23となり、長期毒性のある可能性が示された。
- (5) ジャワメダカ稚魚を用いた暴露試験によれば、②C重油・肥料添加区の試験水（海水）で明らかな成長阻害が認められた。

これらの結果から、バイオレメディエーション技術を用いた漂着油の微生物分解促進によって、一時的ではあるものの乳化した油成分による海水中油分濃度の上昇を招き、一部の水生生物に成長阻害などの影響を及ぼす可能性が示唆された。

3-2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法

石油の経口投与では、ジャワメダカ腸において、CYP1Aでは約1000倍、CYP1B1と-1C1では約10,000倍の誘導がみられた。卵の石油汚染水への暴露では、CYP1C1で6~8倍の誘導が見られ、成魚の石油汚染水への暴露では、鰓でCYP1A、-1B1の誘導がみられた。以上の結果によって、石油汚染の指標としてのCYP1遺伝子の有用性が示唆された。

4. 本年度の研究内容・結果の詳細

本年度の研究内容及び結果は以下の通りである。

4-1 海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法

流出油の環境残留性及び生物への影響について基礎データを得るため、以下の通り実験及び考察を行った。

4-1-1 流出石油成分の環境残留性

(1) 実験条件

直径 7.7 cm、長さ 70 cm の塩化ビニール管に、サンゴ砂、ガラスビーズ小（直径 0.5 cm）、ガラスビーズ大（直径 2 cm）を入れ、その上に C 重油 35 g を入れ、これを海水 1.6 L 入れた水槽（水温 30℃ に調温）に収容した（図 1、図 2）。

塩化ビニール管底部に装着したステンレスコックを使って毎日海水を交換し、この際 1 時間干出した。肥料添加区および対照区ではこれに緩効性肥料のオスモコート（以下、「肥料」）2 g を添加した。なお海水は、底部コックからゆっくりと入れた。各実験区カラムの条件は以下の通りである。

- ① コントロール： C 重油非添加で肥料 2 g を添加
- ② C 重油・肥料添加区： C 重油をサンゴ砂上に 35g 添加し、肥料 2 g を添加
- ③ C 重油添加区： C 重油をサンゴ砂上に 35g 添加し、肥料は非添加

①のカラムには海水のみ 1.6 L 添加した。②および③のカラムには、微生物強化海水（混合海水）1.6 L を添加した。混合海水は、鹿児島市内漁港の底質 10 g と海水 2.5 L に C 重油 5 g 及び肥料 0.5 g を添加して、27℃ のウォーターバス内でエアレーションしながら石油分解菌を 1 週間増殖させた後、30 分間静置して表層の C 重油が混ざらないように中層部から採取した水と海水を 1 : 9 の割合で混合したものである。

各カラムにはテフロン管によって通気を行い、十分な酸素濃度を維持しながら水温 25 ± 1℃ の水槽に静置し 28 日間の石油分解実験を行った。

なお、3 つの実験区についてカラム上部 70% の海水を 1 回/日交換し、その際、干出時間を 1 時間とった。

(2) 分析項目

カラム下部より抜き取った海水について経時的に、①栄養塩濃度 (PO_4^{3-} 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+)、⑤油分量（蛍光分光法/クリセン標準）、⑥PAHs、⑦alkPAHs、⑧石油分解菌数（MPN 法）を分析した。

なお、実験区調製時にカラム表層水の溶存酸素（DO）、pH 及び塩分を測定したところ、各カラム表層水質に差は無く、DO はほぼ 5 mg/L 以上に保たれていた。（表 1）

表 1 実験カラム表層水水質

区分	水温 (°C)	DO (mg/L)	pH	塩分
① 肥料添加区	23.5-26.3	4.9-8.0	8.2-8.5	33-34
② 重油・肥料添加区	23.0-26.1	5.0-8.3	8.2-8.4	34-35
③ 重油・肥料非添加区	23.1-25.7	5.6-8.0	8.3-8.5	34-35

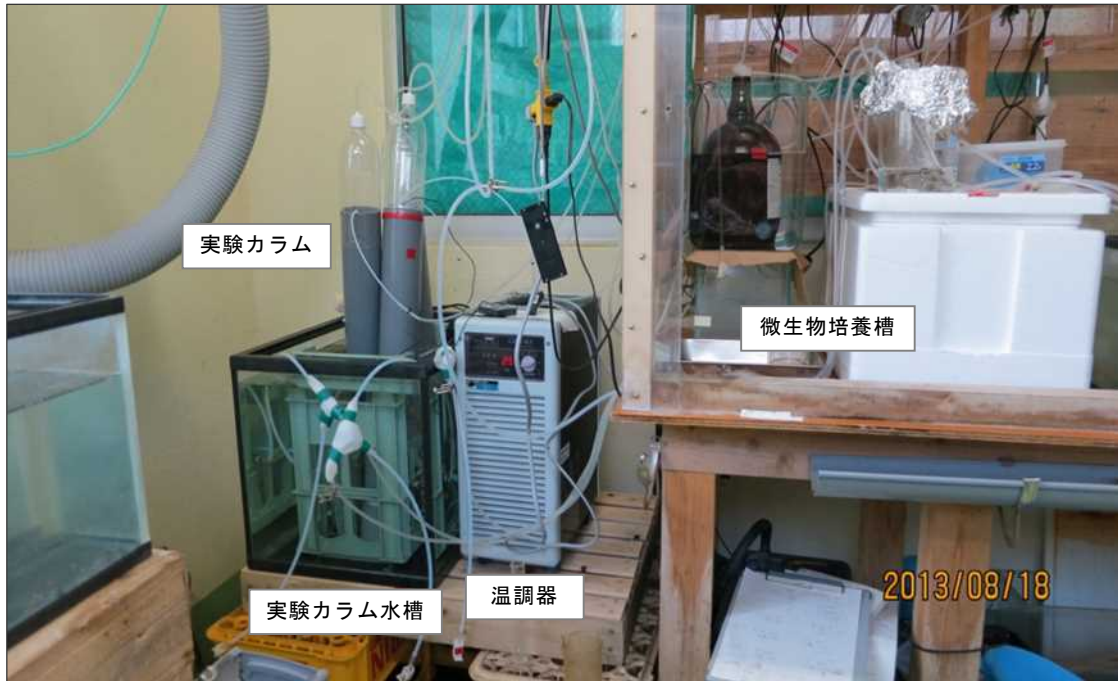


図1 石油分解装置（塩ビ製）

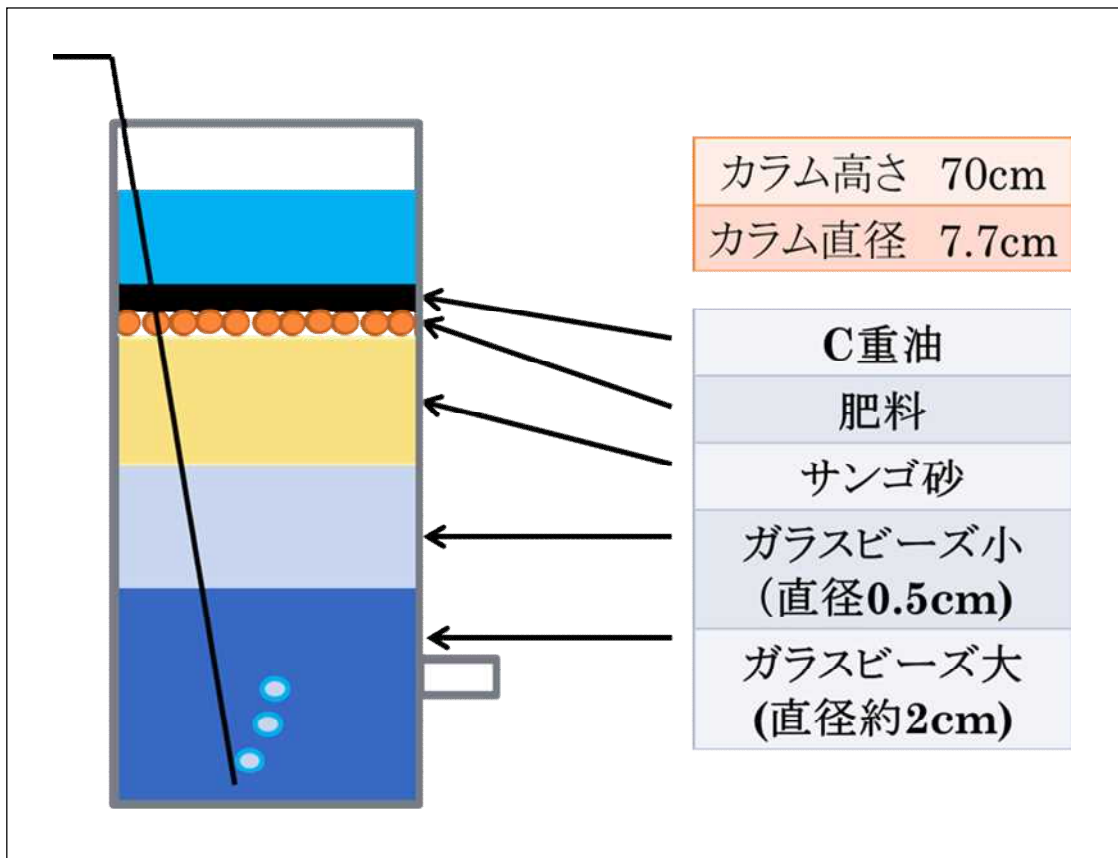


図2 実験カラム

(3) 分析結果及び考察

分析結果及び考察を以下に示す。

① 栄養塩濃度

カラム下部のステンレスコックから抜き取った海水の栄養塩濃度を図3および図4に示す。硝酸濃度は、①肥料添加区のみである程度高く維持できたものの、②C重油・肥料添加区および③C重油添加区では実験当初から有効濃度とされる2 mg/Lを下回っていた。(図3)

一方、リン酸濃度は、①肥料添加区および②C重油・肥料添加区で開始2週間までは有効濃度とされる0.5 mg/L以上であったが、その後0.5 mg/Lを下回った(図4)。③C重油添加区では1週間以降に有効濃度とされる0.5 mg/Lを下回った。今後は、特に②C重油・肥料添加区の栄養塩濃度のモニターをしながら、必要に応じて追肥などを考える必要がある。

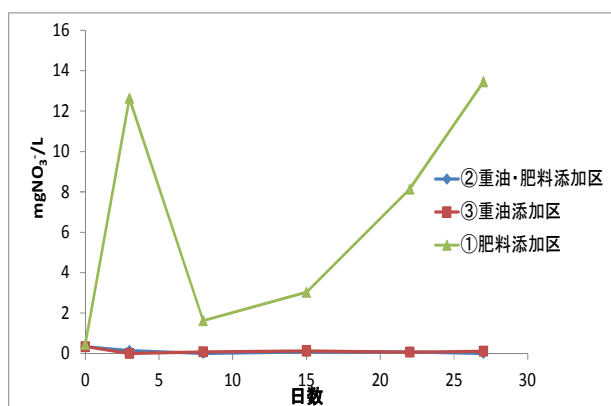


図3 海水中硝酸濃度

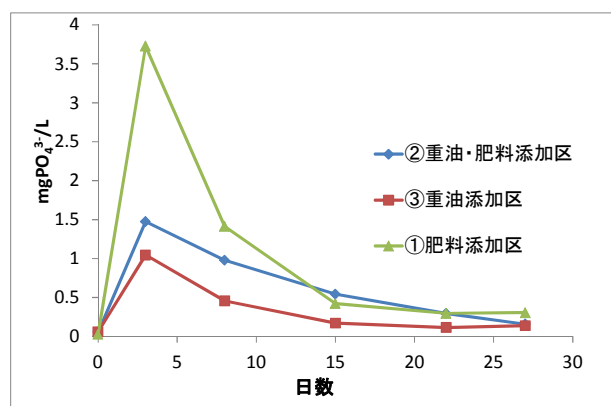


図4 海水中リン酸濃度

② 石油分解菌数

海水中の石油分解菌数をMPN法(鹿児島大)とフィルター法(NKKK)で調べた結果、いずれの方法でも、実験開始1日目で最大数を示した後、その菌数は減少した。(図5、図6)

これは図3および図4に示した通り、栄養塩、特に硝酸イオンが枯渇したためと考えられる。上述したように、今後は海水中栄養塩濃度をモニターしながら追肥などを行う必要がある。

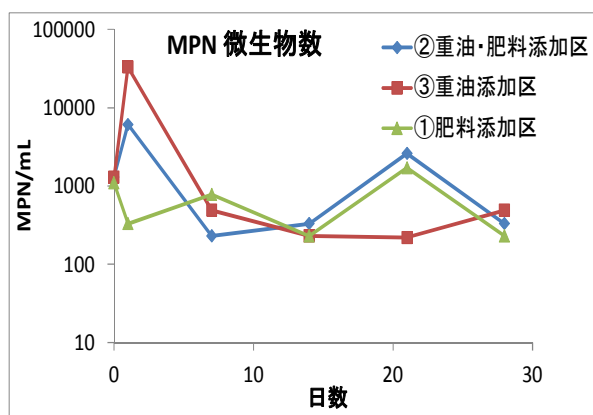


図5 海水中石油分解菌数 (MPN法)

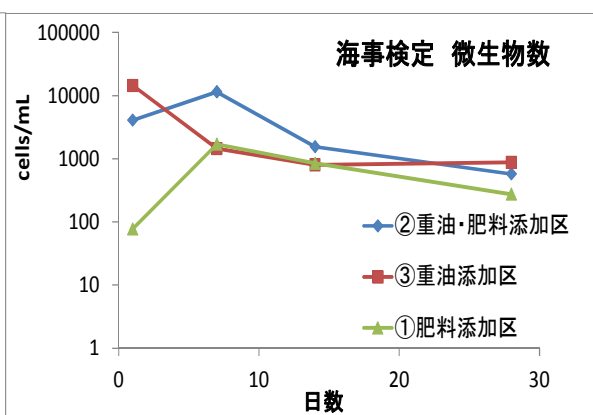


図6 海水中石油分解菌数 (フィルタ法)

③ 蛍光油分

海水中の油分量を蛍光分光法で定量した。標準にはクリセンを用いた。

蛍光油分量を図7に示す。②C重油・肥料添加区の値は他の区に比較して最も高い値を示しており、実験終了時である4週間後の値は、実験開始時の約2倍まで上昇した。昨年度と比較して添加したC重油量が多いことが蛍光油分の濃度に関係していると考えられるが、毎日換水して油分が希釈されているにもかかわらず実験後半の濃度上昇が著しかったことは、単なる油分の溶出のみではなく、石油分解・乳化が進んでいることを示唆するものと考えられる。

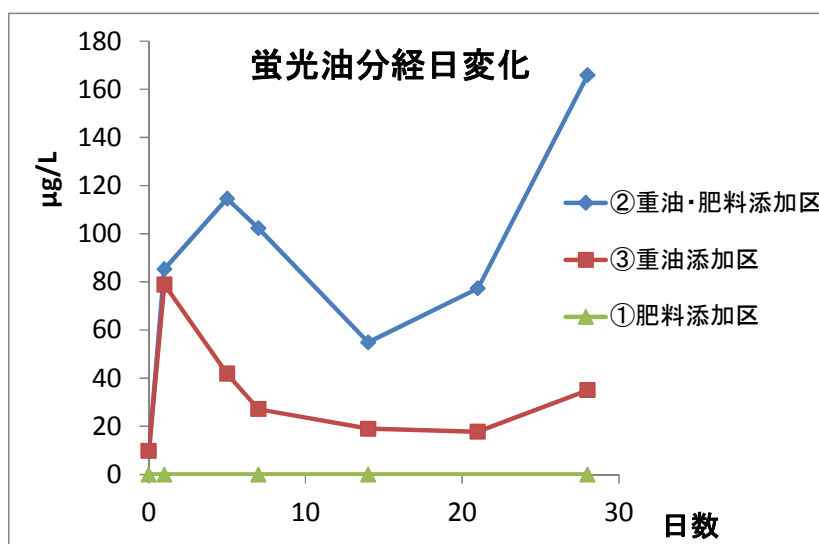


図7 海水中油分の経日変化

④ PAHs、alkPAHs

海水中のPAHs及びalkPAHs濃度を図8に示す。海水中PAHs濃度は実験期間を通して低下したが、alkPAHs濃度は②C重油・肥料添加区および③C重油・肥料非添加区とも実験期間後半で上昇が認められた。これは、図7に示した蛍光油分の実験後半の濃度上昇と同傾向であり、alkPAHs濃度の上昇が蛍光油分の濃度上昇の要因の一つと考えられる。ただし、口述する図11に示したように、PAHsの代謝物であるヒドロキシPAHsも寄与している可能性が考えられる。

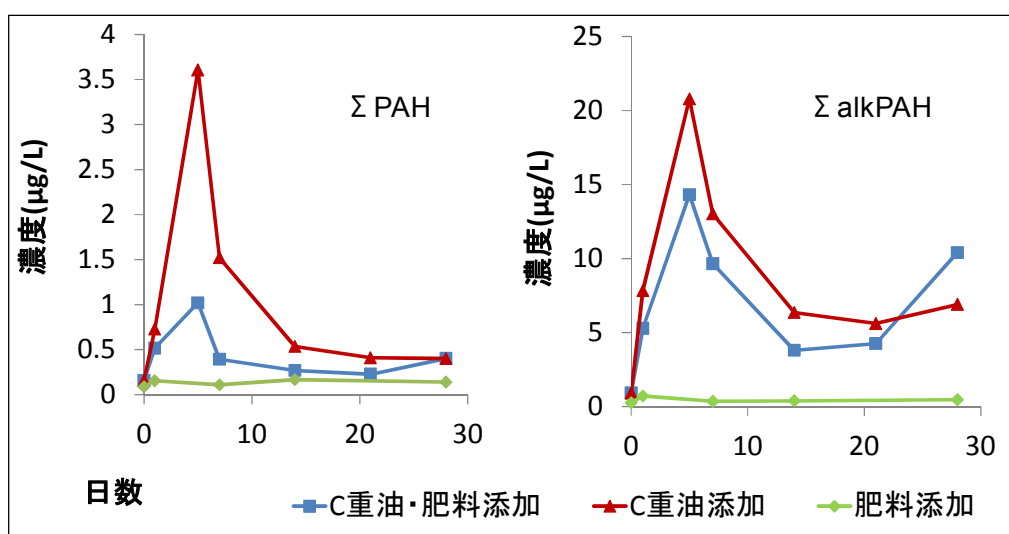


図8 海水ΣPAHsおよびΣalkPAHs濃度の経日変化

環数 PAHs 毎の濃度変化を図 9 に示す。PAHs 濃度の低下は、主に 2、3 環 PAHs の濃度低下によるものであり、4～6 環 PAHs の濃度は実験後半に上昇した。また、③肥料非添加区に比べ、②肥料添加区の 4～6 環 PAHs の濃度上昇傾向が大きい。

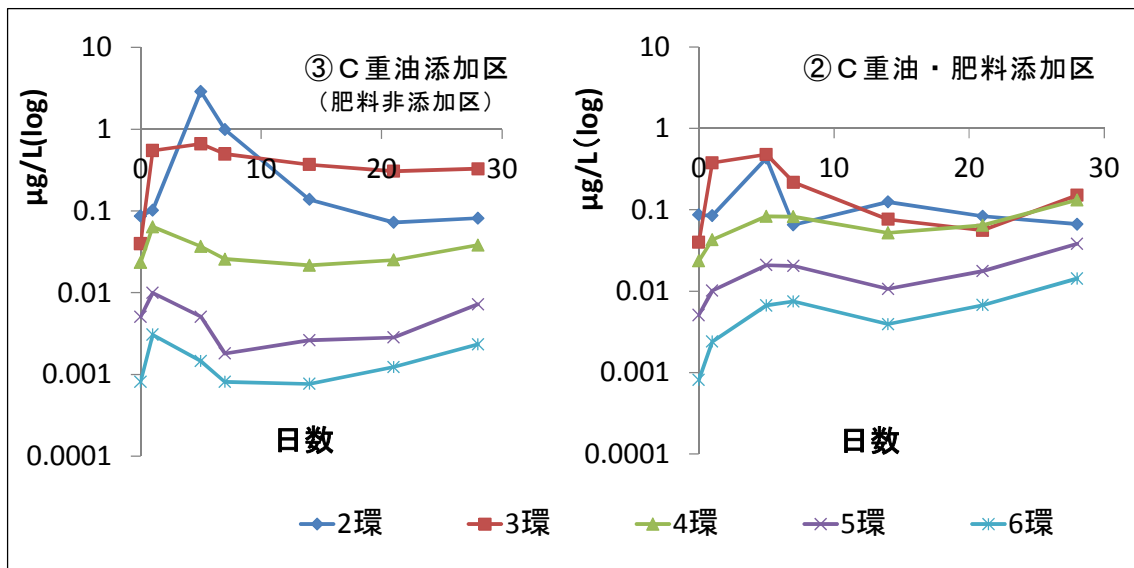


図 9 環数 PAHs 毎の濃度の経日変化

図 10 にはそれぞれの alkPAH の濃度変化を示した。C 重油中の組成比を反映して、alkPAH の海水中濃度は PAHs よりも高い。また、2 週間後まではそれぞれの濃度は低下したものの、その後徐々に上昇した。alkPAHs 濃度に対する肥料添加の効果は明瞭ではなかったが、図 8 でも説明したように、実験終了時には、肥料添加区の Σ alkPAHs 濃度が非添加区より高くなった。

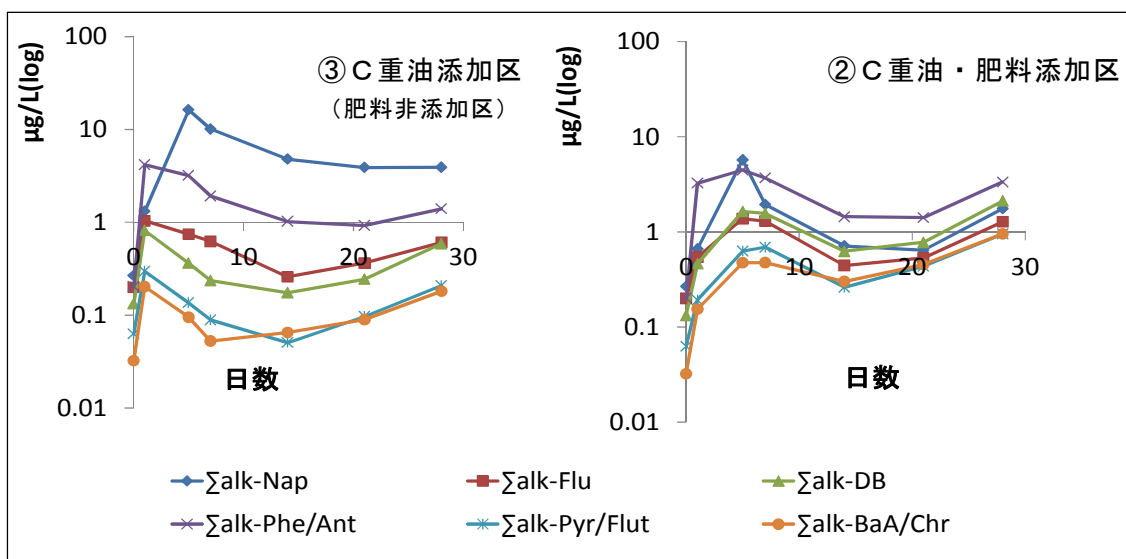


図 10 alkPAHs 毎の濃度変化

⑤ 蛍光油分と PAHs・alkPAHs に関する考察

蛍光油分と PAHs および alkPAHs の濃度変化傾向が一致していない原因を明らかにするため、PAHs および alkPAHs の分解物（主に PAH-OH）の蛍光油分に対する影響を調べた。図 11 に、主な PAHs および alkPAHs の相対的な蛍光強度を示した。Chrysene 以外の PAHs あるいは alkPAHs の蛍光強度は著しく小さく、一方、分解物である 1-hydroxy naphthalene あるいは 9-hydroxy phenanthrene の蛍光強度は強いことが明らかとなった。

すなわち、実験後半の蛍光油分上昇にこれらの PAH-OH が影響している可能性が示唆された。

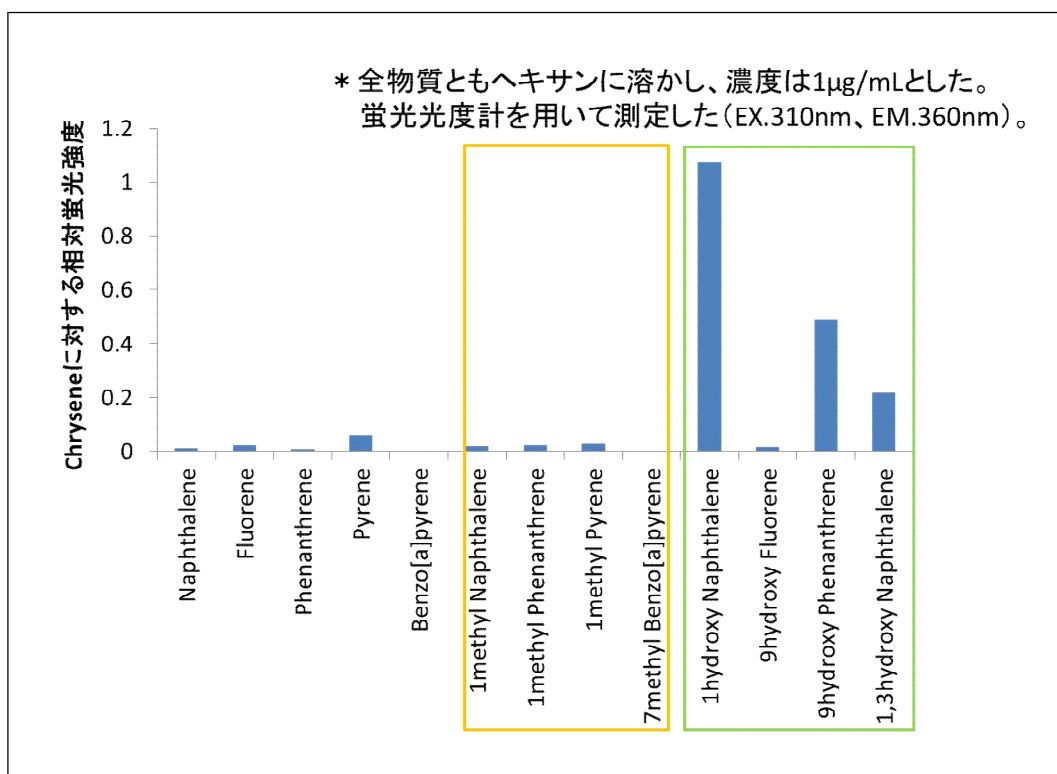


図 11 Chrysene に対する PAHs、alkPAHs および PAH-OH の相対的蛍光強度

4-1-2 流出油残留成分の生物影響

バイオレメディエーション技術を適用した流出油漂着現場で、石油分解菌によって石油成分、特に PAHs あるいは alkPAHs が乳化され、海水の油分が一時的に上昇し、生物に影響を及ぼすことが想定される。この推測は、**図 7** に示した結果から支持されるものである。

昨年度と同様の手法で、海水中の個々の PAHs あるいは alkPAHs 濃度をそれぞれの半数致死濃度 (LC50 値) で除して求めた Toxic Unit を累積した Σ Toxic Unit 値を計算したところ、**図 11** に示す通りの結果となった。

図 11 では、新たに計算し直した LC50 (左側) と昨年度の LC50 値によって算出した Σ Toxic Unit 値 (右側) の結果を示しており、新たな結果では、 Σ Toxic Unit が約 4.6 倍に上昇した。その結果、実験終了時である 4 週間後の試験水の Σ Toxic Unit 値は 0.23 となった。これは短期の毒性があまり大きくないことを示しているが、長期間の暴露では影響がある可能性も示唆している。

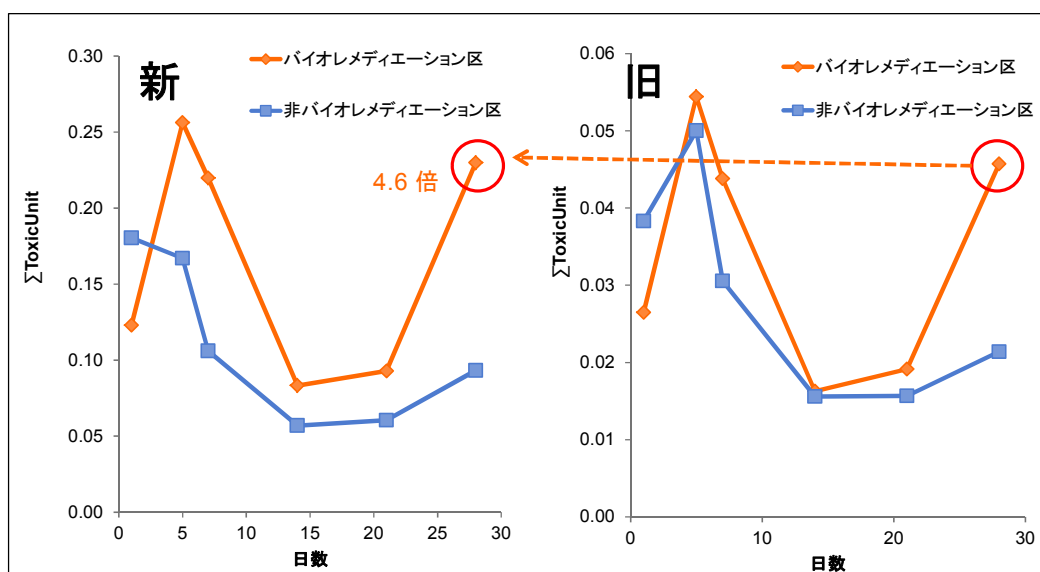


図 11 新旧 LC50 値による Σ Toxic Unit 値の経日変化

一方、**②**C 重油・肥料添加区と**③**C 重油添加区 (肥料非添加区) の海水中 Σ PAHs および Σ alkPAHs 濃度は、**図 12** に示す通りであった。いずれの場合も Σ alkPAHs 濃度が高く、 Σ Toxic Unit 値に対する alkPAHs の寄与の大きいことが明らかである。

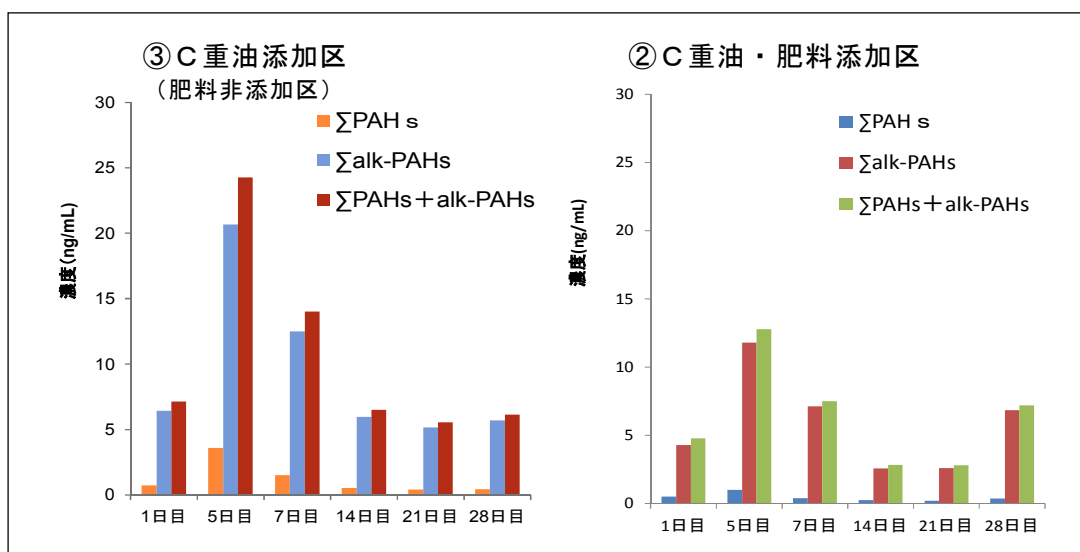


図 12 肥料添加および非添加による Σ PAHs および Σ alkPAHs 濃度の経日変化

循環式試験で実施した昨年度の Σ Toxic Unit 値と、毎日換水式で実施した今年度の値を比較すると、当初は昨年度で高い値が認められたものの、4週間後には明らかに今年度の値が高かった（図13）。換水によって毎日試験水が希釈された今年度の試験方法を考えると、今年度の結果が現場での毒性をより正しく反映しているものと考えられる。

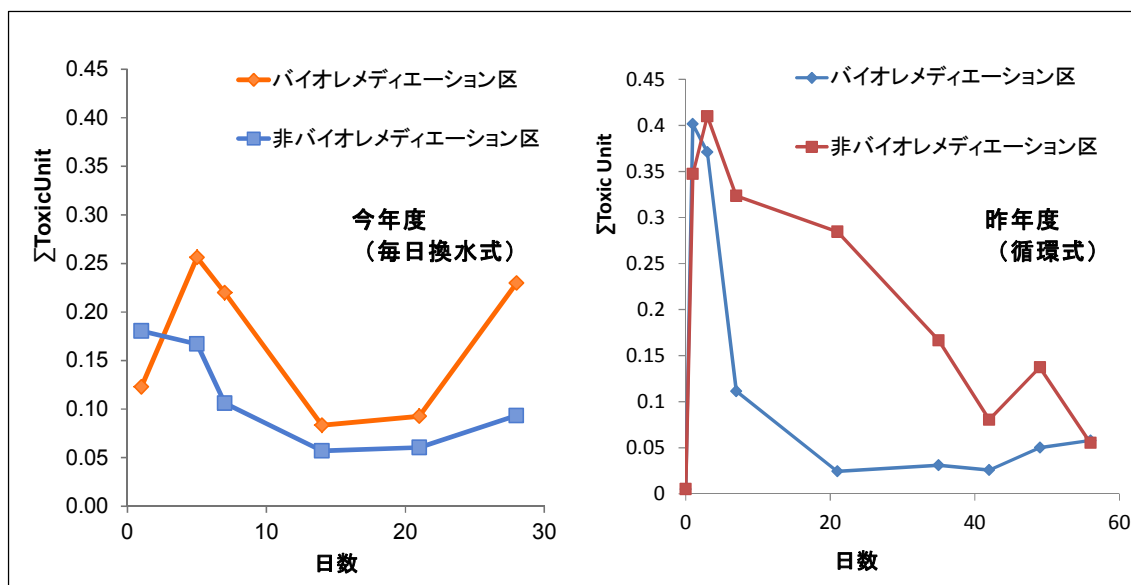


図13 昨年度（循環式試験）と今年度（毎日換水式試験）の Σ Toxic Unit 値比較

そこで、今年度の毎日換水式試験で得られた試験水（実験21～27日目の海水）に孵化後1週間のジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の稚魚を7日間暴露し、この間、飽食量のアルテミアを餌として投与して、成長に対する影響を検証した。その結果、図14に示す通り、全長および体重とも②C重油・肥料添加区の海水暴露によって対照区に対して有意な低下が認められた。

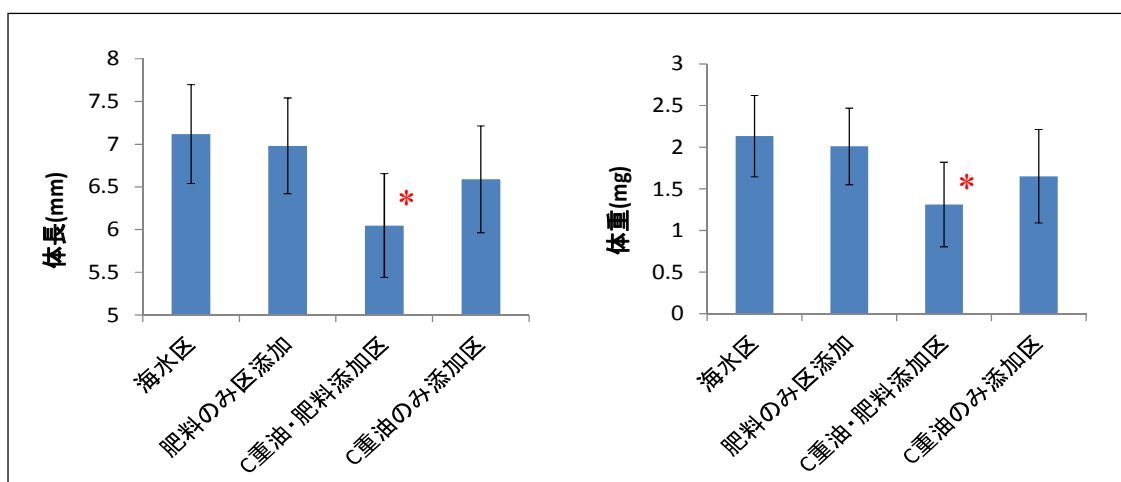


図14 石油分解海水に暴露したジャワメダカ稚魚の成長

4-1-3 小括（海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法）

毎日換水式試験で実施したC重油のバイオレメディエーションによって、以下の結果が得られた。

- (1) 蛍光油分が実験後半に上昇し、特に②C重油・肥料添加区でその上昇が著しかった。
- (2) 2、3環の比較的低分子のPAHsあるいはalkPAHs濃度は実験前半において低下したが、4環以上の高分子PAHsあるいはalkPAHs濃度は、実験後半に上昇することが明らかとなった。
- (3) PAH-OHの相対蛍光強度の高いことから、蛍光油分に対する寄与の大きいことが示唆された。
- (4) 新たなLC50値で計算した実験終了時の試験水の Σ Toxic Unit値は0.23となり、長期毒性のある可能性が示された。
- (5) ジャワメダカ稚魚を用いた暴露試験によれば、②C重油・肥料添加区の試験水（海水）で明らかな成長阻害が認められた。

これらの結果から、バイオレメディエーション技術を用いた漂着油の微生物分解促進によって、一時的ではあるものの乳化した油成分による海水中油分濃度の上昇を招き、一部の水生生物に成長阻害などの影響を及ぼす可能性が示唆された。

4-2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法

薬物代謝系で中心的役割を果たしているシトクロム P450 (CYP) の中で、特に CYP1 ファミリーの遺伝子は、環境汚染物質や医薬品など、様々な薬物によって誘導される(遺伝子の発現、すなわち mRNA への転写が促進される) ことで知られている。

汽水域に生息するジャワメダカは、海水でも淡水でも飼育できる小型魚であるため、水圏での環境汚染を研究するための実験魚として優れている。今年度は、昨年度得られたジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 各遺伝子の cDNA 塩基配列の情報を活用して、以下の研究を進めた。

各遺伝子の発現量をみるためのリアルタイム PCR に用いるプライマーは、昨年度の研究で得たジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 各 cDNA の塩基配列に基いて表 2 のように設計した。

表 2 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 に特異的なリアルタイム PCR 用プライマー

	Primer Name	Location	Primer Sequence (5'→3')
CYP1A	CYP1A_1F	286 - 304	acaccactgcccattcattg
	CYP1A_2R	327 - 346	tgaggctcaggtagggtctg
CYP1B1	CYP1B_1F	881 - 900	ttcaccgactttatccacga
	CYP1B_2R	923 - 942	atgctcttgactccatgct
CYP1C1	CYP1C_1F	893 - 912	agaggctggacaagtttgga
	CYP1C_2R	935 - 952	agggcattgacatccacca

4-2-1 ジャワメダカにおける経口投与した C 重油による CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の誘導

ジャワメダカに C 重油を 1% 含んだ餌を与え、各臓器における CYP1A、-1B1、-1C1 各遺伝子の発現の変化(薬物誘導)をみた。ジャワメダカ成魚 15 匹(誘導区)に石油を含んだ餌を投与した後、24 時間後に各臓器を摘出し、Total RNA を調製した。つづいて、逆転写反応によって cDNA を作成し、Real Time PCR 法で cDNA 量を測定した。常法で算出した cDNA 量を遺伝子の転写量とした。PCR 用プライマーは、昨年度の研究で得たジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 各 cDNA の塩基配列に基いて設計した。C 重油を含まない餌を投与した 15 匹(対照区)に対する転写量の比として表 3 に示す。

表 3 ジャワメダカにおける経口投与した石油による CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の誘導

臓器	転写量/対照区の転写量		
	CYP1A	CYP1B1	CYP1C1
肝臓	0.3	0.3	0.4
鰓	4.7	7.2	1.5
筋肉	5.4	2.8	1.6
腸	1、240	11、100	7、490

腸において、CYP1A で 1000 倍を超える誘導、CYP1B1 ならびに -1C1 では、およそ 1 万倍の誘導が見られた。CYP1 ファミリー遺伝子の発現を指標にすると、ジャワメダカの腸は、経口で魚体内に入る石油成分の存在を極めて高感度で検出できることが示された。特に、発現量(酵

素量) が少ないために酵素活性の変化で見ることが困難で報告も少ない CYP1B1 および-1C1 が、酵素活性に関して多くの報告がある-1A よりはるかに強い誘導を示したことは、酵素活性を指標にすることに比べて、個々の遺伝子の発現量を見ることの1つの優位性を示している。

臓器の中で薬物代謝において重要な役割を果たすと考えられている肝臓で、逆に転写量が減少していることは予想されなかった結果である。鰓、筋肉では誘導が見られているので、石油成分は腸から吸収されて血液循環によって全身に運ばれているものと考えられる。肝臓における CYP1A 遺伝子の発現については、さらなる研究が必要である。

4-2-2 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する飼育水塩分濃度の影響

ジャワメダカを石油汚染の研究に用いるための基礎的データを得るために、ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する、飼育水塩分濃度の影響を調べた。

海水中で飼育されたジャワメダカ成魚 15 匹 (実験区) を、2 日間絶食させた後、淡水に移した。24 時間後、各臓器を摘出して 4-2-1 と同様の方法によって各遺伝子の転写量を測定した。海水中で継続して飼育した 15 匹を対照とした。結果を表 4 に示す。

表 4 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する飼育水塩分濃度の影響

臓器	転写量/対照区の転写量		
	CYP1A	CYP1B1	CYP1C1
肝臓	0.6	1.4	1.1
鰓	25.0	13.4	7.3
筋肉	6.4	27.8	2.9
腸	1.7	0.6	0.9

飼育環境を淡水にするだけで、CY1A では鰓で 25 倍、CYP1B1 では鰓で 13 倍、筋肉で 28 倍、CYP1C1 では鰓で 7 倍の誘導が見られた。環境汚染の指標とされる CYP1A 遺伝子の発現が、環境の塩分濃度によって大きく影響されることは重要な知見である。今回は、石油を経口的に投与しているが、飼育水に混入して暴露する実験では、鰓への影響が重視されるので、飼育水の塩分濃度によっても影響されることに注意が必要である。また、このような実験が可能なのは、ジャワメダカの実験魚としての長所であるといえる。

4-2-3 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する絶食の影響

4-2-2 に続いて、ジャワメダカ CYP1A 遺伝子の発現に対する、絶食の影響を調べた。ジャワメダカ成魚 15 匹 (絶食区) を 1 週間絶食させた後、各臓器を摘出して 4-2-1 と同様の方法によって CYP1A 遺伝子の転写量を測定した。対照区の 15 匹は 1 日 2 回給餌した。

CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子は、絶食によって、各臓器で、おおむね、発現が低下する傾向が見られた (表 5)。特に肝臓での減少が顕著であった。環境汚染の指標となる CYP1A 遺伝子の発現量が、絶食、そしておそらく栄養状態によって、大きく影響されることは、遺伝子発現量を環境汚染の指標とする場合に注意すべきであることが示された。

表5 ジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現に対する絶食の影響

臓器	転写量／対照区の転写量		
	CYP1A	CYP1B1	CYP1C1
肝臓	0.03	0.00	0.00
鰓	1.5	1.00	0.5
筋肉	0.15	0.15	0.02
腸	0.39	2.11	0.41

4-2-4 石油汚染水（飼育水）によるジャワメダカ卵 CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の誘導

石油汚染水のジャワメダカ CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現への影響を調べた。石油汚染水には、4-1-1 流出石油成分の環境残留性で説明した、バイオレメディエーション実験試験水の14日および28日目の試験水を用いた。これに受精10日後のジャワメダカ卵を、15個ずつ、対照区、石油区、石油+肥料区に分け、それぞれ48時間、石油汚染水に暴露した。石油+肥料区は微生物の影響をみるための参考とすることを意図したもので、今回の実験では石油区と同等に考えてよい。

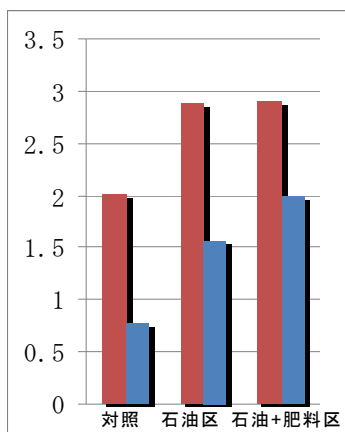


図15 ジャワメダカ卵 CYP1A 発現量に対する石油汚染水の影響

縦軸は、4-2-4 と 4-2-5 の実験を通しての発現量の相対値である。

■ 実験 1
■ 実験 2 (同じ実験を繰り返して行った)

CYP1A では、石油区、石油+肥料区において弱い誘導が見られた。

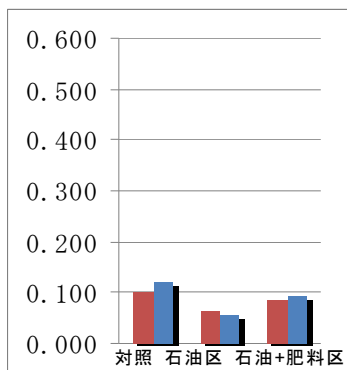


図16 ジャワメダカ卵 CYP1B1 発現量に対する石油汚染水の影響

■ 実験 1
■ 実験 2

CYP1B1 では、対照区、石油区、石油+肥料区でともに発現が低く、誘導は見られなかった。

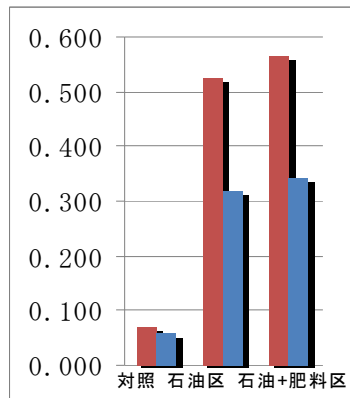


図 17 ジャワメダカ卵 CYP1C1 発現量に対する石油汚染水の影響

CYP1C1 では、石油区、石油+肥料区で対照区の約 6~8 倍の発現（強い誘導）がみられた。

4-2-5 石油汚染水（飼育水）によるジャワメダカ成魚各臓器における CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の誘導

ジャワメダカ成魚各臓器における CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の発現への石油汚染水の影響を調べるため、C重油 1g を海水 1L に添加し、23 時間攪拌、1 時間静置して得た水溶性画分（WAF）に、ジャワメダカ成魚を 48 時間暴露した。また、比較のために、CYP1 遺伝子の誘導剤として知られている β -ナフトフラボン（ β -NF）の影響も同時にみた。ジャワメダカ成魚を、10 匹ずつ、対照区（海水）、WAF 区、 β -NF 区、DMF 区¹に分け、それぞれ 48 時間、石油汚染水に暴露した。（図 18~図 20）

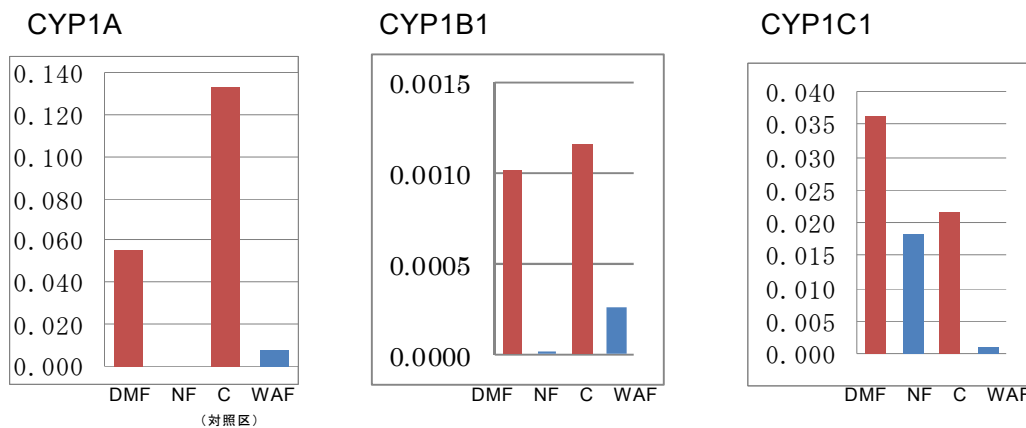


図 18 腸における CYP1 発現量に対する石油汚染水の影響

腸においては、対照区に比べて汚染区で CYP1 の発現がかなり低くなった。（図 18）

¹ N、N-ジメチルホルムアミド

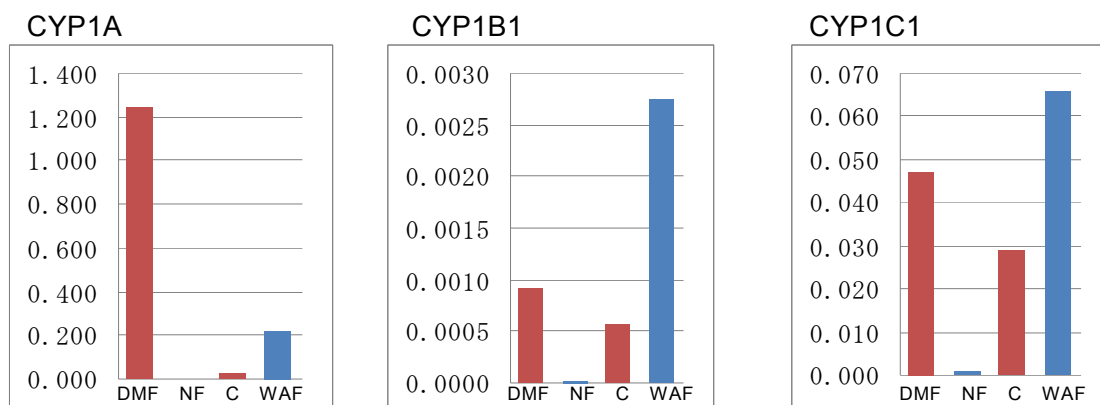


図 19 肝臓における CYP1 発現量に対する石油汚染水の影響

肝臓においては、石油区で CYP1 遺伝子の誘導が見られた。(図 19)

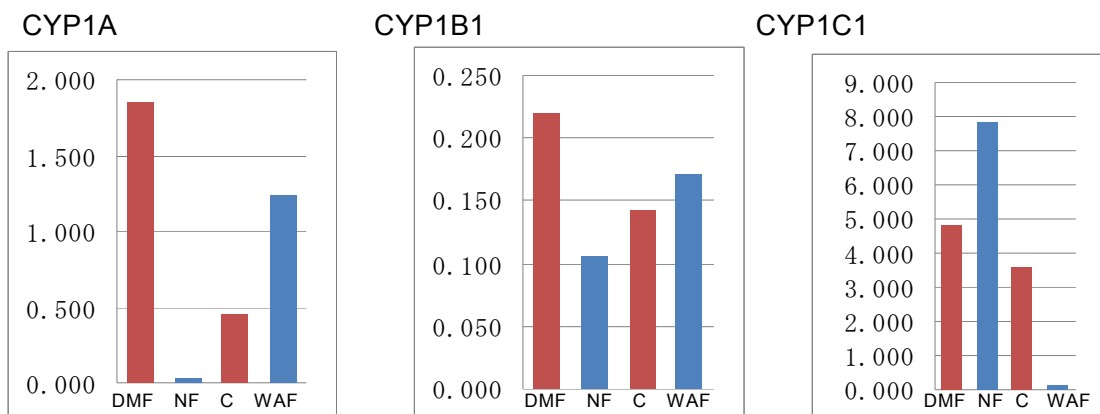


図 20 鰓における CYP1 発現量に対する石油汚染水の影響

鰓においては、CYP1A、-1B1 の石油区、-1C1 の β -NF 区において CYP1 遺伝子の誘導が見られた。(図 20)

4-2-6 小括 (残留石油成分の生物学的モニタリング手法)

石油の経口投与では、ジャワメダカの腸において、CYP1A では約 1000 倍、CYP1B1 と -1C1 では約 10,000 倍の誘導がみられた。卵の石油汚染水への暴露では、CYP1C1 で 6~8 倍の誘導が見られ、成魚の石油汚染水への暴露では、鰓で CYP1A、-1B1 の誘導がみられた。以上の結果によって、石油汚染の指標としての CYP1 遺伝子の有用性が示唆された。

5. 次年度の課題・計画

「4-1-1 流出石油成分の環境残留性」では、毎日換水式試験で石油の分解とそれに伴う油分の上昇が観察されたことから、次年度も同様の試験を実施することとする。ただし、今年度の試験では添加した栄養塩が実験途中でほとんど枯渇した状態であったことから、今後の実験では栄養塩濃度分析の結果から、追肥しながら実験を行うこととする。

「4-1-2 流出油残留成分の生物影響」ではジャワメダカ稚魚に成長阻害が観察されたが、試験魚の飼育期間が短かったため、明確な影響を見いだすことができなかった。今後の実験では受精卵を用いて暴露期間を2倍程度に延長し、孵化阻害、奇形誘発などの有害性を明らかにする。また、PAH-OHの蛍光油分および魚毒性に対する寄与を明らかにする。

「4-2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法」では、「4-1-1 流出石油成分の環境残留性」の課題と連動して、得られた石油分解液に暴露したジャワメダカで、CYP誘導と油分の関係を明らかにする。

以上