

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 27 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)
国立大学法人 鹿児島大学 水産学部

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（ハイライト）

我が国はその消費する石油の大半を海外、特に中近東からの輸入に依存している。そのため、その輸送経路における石油流出事故への対応について準備しておく責務がある。本研究では、石油流出事故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研究を目的としている。

研究成果の概要

海岸に漂着した石油類の分解をシミュレーションするため、図 1 に示す塩ビ円筒にサンゴ砂などを用いた人工底質を充填し、そこに C 重油を添加してその分解過程を観察した。この際、装置内にバイオリメディエーション（以下バイリメ）効果を発揮させるため、肥料を加えた。

その結果、図 2 に示すとおり、肥料添加しなかった区（A-BR）に比べ添加したバイリメ区（BR-L および BR-H）の海水中石油成分濃度の低下が認められ、試験装置内でのバイリメ効果が確認された。しかし、試験装置から採取した海水にジャワメダカ（汽水性メダカ）を暴露したところ図 3 に示すとおり、バイリメ区で 60%を超える死亡が認められた。一方、これらの海水をろ過すると毒性が認められなかったことから、その毒性は海水中に溶存石油成分によるものではなく、懸濁粒子あるいはその成分によるものと考えられた。

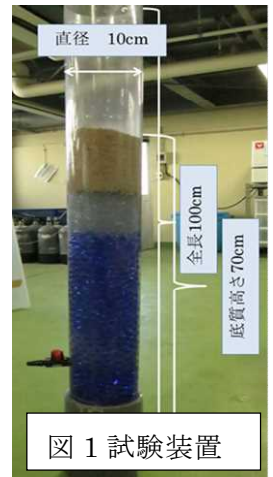


図 1 試験装置

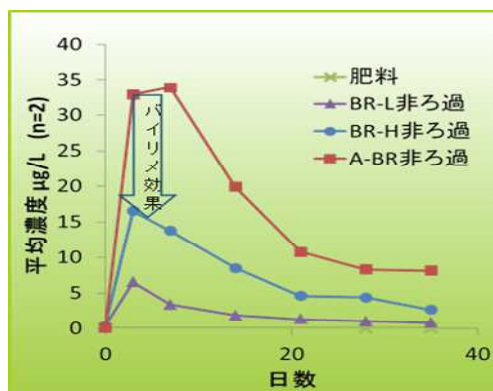


図 2 試験海水中多環芳香族炭化水素類濃度の変化



図 3 試験海水に暴露したジャワメダカの死亡率

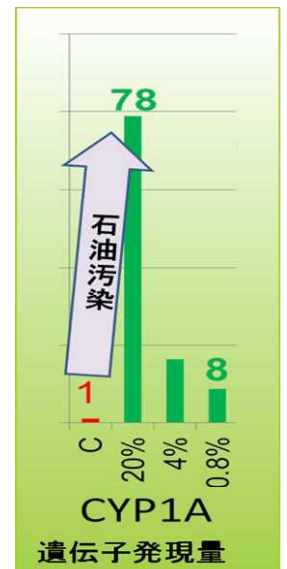


図 4 バイリメ海水暴露ジャワメダカ肝臓の薬物代謝酵素 CYP1A 遺伝子の発現量

図 4 には、バイリメ区海水に 24 時間暴露したジャワメダカ肝臓中の薬物代謝酵素 CYP1A 遺伝子の発現量を示した。バイリメ区海水を 5 倍（20%）～125 倍（0.8%）希釈しても対照区（C）に比較して明らかに CYP1A 遺伝子の発現の認められることから、ジャワメダカ CYP1A が石油類暴露に対する鋭敏なバイオマーカーとして有用であること明らかとなった。

海岸に漂着した石油類をバイオリメディエーション技術で処理する場合、上記のような有害な物質を含む懸濁粒子を生じる可能性がある。良好な海水交換による急速な懸濁粒子拡散の期待できる地点とは異なり、東南アジアなどに分布するマングローブ林の場合、速やかな懸濁粒子拡散が期待できず、バイオリメディエーション技術適用には生態系へのリスクが懸念される。

ジャワメダカの分布する東南アジア沿岸域では、ジャワメダカの CYP1A が石油類暴露に対する鋭敏なバイオマーカーとなり、高価な機器分析に代わる有用なモニタリング技術になることが

期待される。

目 次

1. はじめに	4
2. 研究成果の概要	4
材料および方法	4
1.1 試験装置	4
1.2 サンプル海水の採水と水質測定	6
1.3 水質測定	6
1.4 ジャワメダカを用いた毒性評価	8
2.1 暴露試験	9
2.2 cDNA の合成	9
2.3 リアルタイム PCR	10
3. 結果および考察	10
3.1 水質および分解菌数	10
3.2 水中蛍光油分、 Σ PAHs、 Σ alk-PAHs	12
3.3 ジャワメダカを用いた石油 BR 海水毒性評価	16
4.1 ジャワメダカ成魚の各臓器における CYP1 遺伝子群のバイ リメ海水による誘導	19
4.2 ジャワメダカ受精卵における CYP1 遺伝子群のバイリメ海 水による誘導	21
5. まとめ	22
5.1 流出石油成分の環境残留性とその生物影響	22
5.2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法	22
6.3 年間のまとめ	23
7. 参考文献	24

1. はじめに

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。

本事業は、国内での石油流出事故、我が国への石油搬入経路での流出事故が万一生じた場合の海洋生態系への影響の評価手法、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。

昨年度の試験は、バイオレメディエーション（以下 BR）技術により分解処理する技術の安全性を評価するため、塩化ビニール管に、サンゴ砂、ガラスビーズ小および大、さらにその上に重油 35g を入れ、肥料添加の有無による重油分解の違い、試験装置内の分海水の有害性評価を行うことを目的とした。今年度は、昨年度のバイレメ装置を一回り大型にし、添加重油の量をさらに増加させて分解実験を行い、これを毎日換水し、得られた海水中の油分あるいは毒性などを測定した。

一方、昨年度までの研究で石油汚染の環境モニタリング魚としてのジャワメダカの有用性が示された。特に、遺伝子スーパーファミリーを形成するシトクロム P450（以下 CYP と略す）の CYP1 ファミリーに属する CYP1A、-1B1、-1C1 各遺伝子の発現に対する石油汚染の影響が顕著に見られた。今年度は、上記バイレメ装置から採取した試験水に暴露したジャワメダカの CYP1A、-1B1、-1C1 の転写発現に及ぼす影響について調べた。

2. 研究成果の概要

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。

材料および方法

(1) 流出石油成分の環境残留性とその生物影響

1.1 試験装置

実験期間を 37 日とし、以下の通りの装置を用いて実験を行った。

塩化ビニール管（高さ 100cm、直径 10cm）内に、底質としてガラスビーズ大（直径 20mm）7kg、ガラスビーズ小（直径 5mm）1.5kg、サンゴ砂 1.5kg を詰めて人工底質とした。C 重油添加区では、C 重油とサンゴ砂をヘラで十分に混ぜて均一にしたものをカラムに加えた（図 1）。肥料はサンゴ砂表面に均一に散布した。実験装置は 30℃設定のウォーターバス内に設置した。

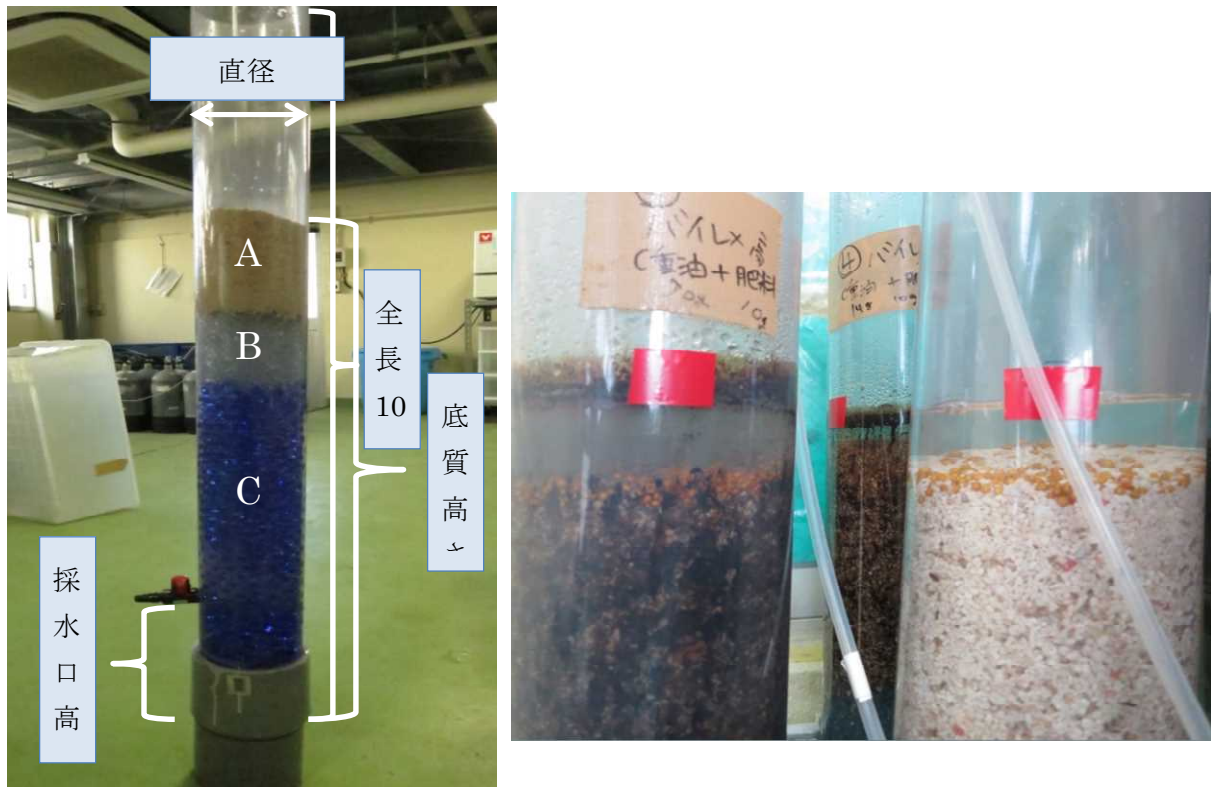


図1 石油分解装置全体（透明塩ビ製）
 装置全体（右側）、C重油混合サンゴ砂（左側、黄色粒子は肥料）
 A：サンゴ砂（+C重油）、B：ガラスビーズ小、：ガラスビーズ小
 C：ガラスビーズ大

以下の通りの4実験区を準備した。

- ・肥料区・・・C重油非添加、肥料（オスモコート）10g 添加した。
- ・非バイオレメディエーション区（以下 A-BR 区）・・・C重油 70g 添加、肥料非添加した。
- ・バイオレメディエーション-C重油少量添加区（以下 BR-L 区）・・・C重油 14g および肥料 10g 添加した。
- ・バイオレメディエーション-C重油多量添加区（以下 BR-H 区）・・・C重油 70g および肥料 10g 添加した。

BR 区には、石油 BR 実験 1 回目 C 重油添加量の 2 倍量および 1/5 量の 2 区を設定し、BR の影響がより明確になるように設定した。肥料量は、昨年度の重油 BR 実験で無機態窒素（I-N）が枯渇していたことから、昨年度の 300g/m² の 5 倍量である 1500g/m² を用い、さらに栄養塩濃度変化を見ながら実験 13 日目に BR-H 区および BR-L 区にそれぞれ 10g 追肥をした。

0 日目添加海水は A-BR 区および肥料区で海水、BR-H 区および BR-L 区で石油分解菌強化海水*²とした。30℃に温調した海水を、水面がサンゴ砂表面から 3cm 上になるまで装置下部の採水口より添加した（装置内海水量 3L）。海水交換は 1 回/日で行い、採水口より上部の海水を抜き取り、そのまま 1 時間底質を干出させ、再び元の水位まで 30℃に温調した海水（全区画共通の海水）を添加した（交換海水量 2.2L）。

エアレーションは装置下部の採水口より空気を吹き込み行った。C 重油中の揮発成分が過剰に喪失することを防ぐため、空気の吹き込む量は緩やかにした。

*2 石油分解菌強化海水

鹿児島県鹿児島市住吉町鹿児島港 (31° 35' 16.2" N、130° 33' 50.5" E、漁港) よりエクマンバージ採泥器で採取した海泥を 1 mm メッシュのふるいにかけ、さらに遠心分離して (4℃、760g、10min) 泥と間隙水とに分けた。間隙水を取り除いた泥 1 g・wet と Bushnell-Haas 培地 (2%NaCl) 50mL および A 重油 1 mL を 100mL 容積の試験管に入れ、綿で密栓し、28℃で 5 日培養した。50mL 容積の遠沈管に培養液の中層液 25mL および海水 25mL を入れ、手での攪拌、遠心分離した後、遠沈管の底から 25mL 取り出した (培養液分解菌の洗浄)。この操作を 3 回行い、洗浄した合計 75mL の培養液を作成した。これと海水 6925mL を足し合わせて培養液 1 %濃度の石油分解菌強化海水を作成した。石油分解菌強化海水は実験 0 日目のみ用いた。

1.2 サンプル海水の採水と水質測定

海水交換時に下部採水口から抜き取った海水 (石油 BR 海水) は、2.5L 容積ガラス容器にすべて採水した。石油 BR 装置内の水質項目として、採水した海水の溶存酸素濃度 (DO)、pH、水温および塩分を測定した。水質項目測定は、石油 BR 実験開始より 14 日目までは毎日、以降は 2~3 日毎に行った。

下部採水口から抜き取った海水をガラス容器内で 1 時間静置し、容器中層からガラスサイフォンを用いて採水した海水 (非ろ過サンプル) およびそれを GF/C フィルター (保留粒子径 1.2μm、Whatman) で減圧ろ過したろ過サンプルを分析用サンプルとして作成した。

1.3 水質測定

1.3.1 栄養塩濃度測定

1.2 で得られた石油 BR 海水の亜硝酸態窒素 (NO₂-N、ナフチルエチレンジアミン吸光光度法)、硝酸態窒素 (NO₃-N、銅・カドミウムカラム還元-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法)、アンモニア態窒素 (NH₄-N、インドフェノール青吸光光度法) および無機リン酸態リン (PO₄-P、モリブデン青 (アスコルビン酸) 吸光光度法) 濃度を、JIS K0102 にしたがって測定した。

1.3.2 海水および底質中石油分解菌数測定

石油分解菌数の測定は、石油を唯一の炭素源とした MPN 法 (Most Probable Number 法) を用い、方法は JR Haines et al. (1996) および Edward J. Brown et al. (1990) を参考にした。実験使用試薬はすべて MLS-375CF オートクレーブ (SANYO、Japan) で滅菌した (条件 120℃、30min)。器具はオートクレーブ、乾熱、70%エタノールのいずれかで滅菌または殺菌した。MPN 作業はすべてクリーンベンチ内で行った。

底質サンプルは、あらかじめ重量を測定した 2mL 容積のマикроチューブに干出させたサンゴ砂の最表面部 約 0.2g およびサンゴ砂重量 10 倍量の 2%NaCl を加え、これを 1 区画につき 3 個作り、振とう機 (Tissue Lyser II) で振とうし (条件 20 振とう/s、30s)、液相を各マイクロチューブより 0.3mL ずつ取り足し合わせ、区画の底質サンプルとした

培地は Bushnell-Haas Broth (Difco Laboratories、USA) 3.27g および NaCl (試薬特級、和光純薬工業、Japan) 20g を milliQ 水に溶かした Bushnell-Haas 培地を使用した。発色試薬は INT

[2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride] (試薬特級、同仁化学研究所、Japan) 0.3g を milliQ 水 100mL に溶かしたものを使用した。

サンプルは 1.2 で得られた石油 BR 海水とし、10mL 容積のねじ口試験管に入れ、培地に添加するまで冷蔵保存した。

石油分解菌の培養には 48 ウェルマイクロプレートを用い、A2~A8 ウェルに 2%NaCl 0.9mL を入れ、B1~F8 ウェルに培地 0.9mL および A 重油 0.01mL を入れた。A 重油の添加には連続分注機を用いた。A1 ウェルにサンプル約 1mL を入れ、A2~A8 に入れた 2%NaCl を用いて 100 から 10⁻⁷ まで希釈し、培地に 0.1mL ずつ加えて 1 希釈段階ごとの繰り返し 5 となるプレートを作成した(図 2)。培養は 28℃で 7 日間行い、7 日目に B1~F8 へ発色試薬を 0.1mL 加え、さらに 1 日インキュベートした。判定は目視で行い、コントロール(培地、A 重油、2%NaCl のみで培養)と比較して赤褐色に発色したウェルをポジティブ(石油分解菌が存在する)判定とした(図 3)。

底質中石油分解菌数を求める式は以下とした。

底質中石油分解菌数 (cells/g・sediment)

= [MPN の結果得られた菌数 (cells/mL) × 2%NaCl 添加量(mL)] / 底質重量 (g・sediment)

石油分解菌数を求める統計的処理はベルリン自由大学ウェブサイト上からダウンロードできるフリーソフトウェア (MPN_ver3.xls) を用いた。

(<http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/chemalige/wilrich/index.html>)

ベルリン自由大学)

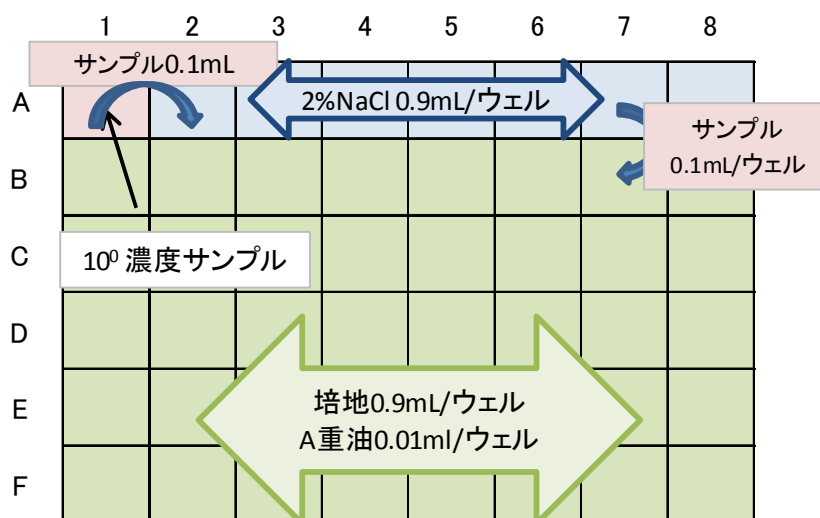


図 2 MPN マイクロプレート内サンプル配置模式図

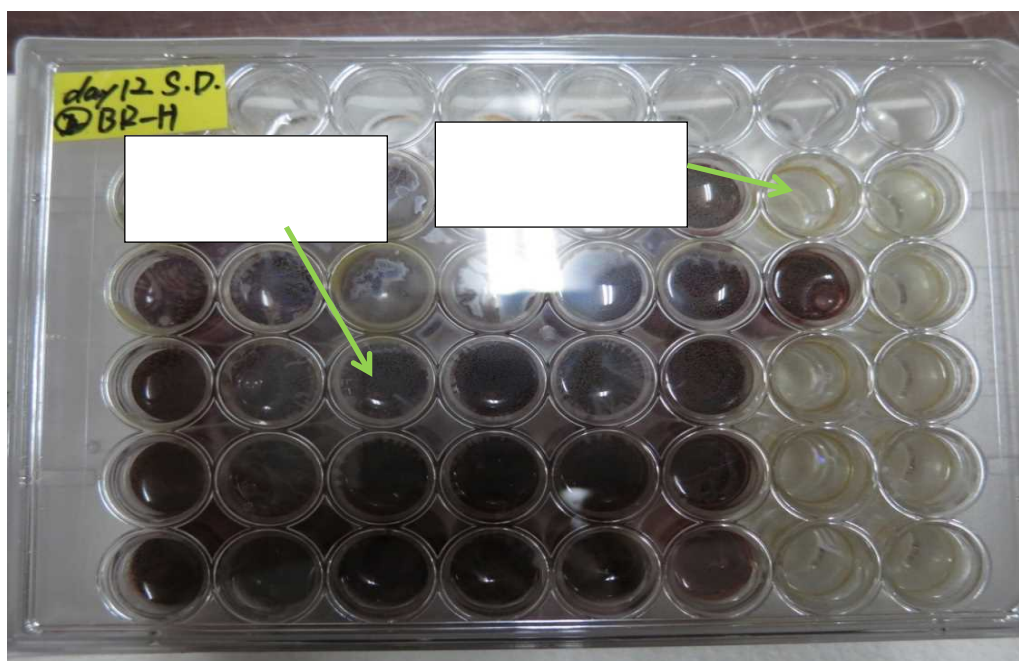


図 3 MPN 発色試薬添加後の写真

1.3.3 蛍光油分および多環芳香族炭化水素（PAHs）、アルキル PAHs（alk-PAHs）分析

蛍光油分は多環芳香族炭化水素全体の変動を見ることを目的として測定した。PAHs は麻痺毒性や発ガン性を持つものが存在することが知られており、石油中に含まれる主な毒性物質として分析した。alk-PAHs は PAHs と類似の構造を持つことから、PAHs 同様の毒性を持つ物質として分析した。

1.2 で得られた石油 BR 海水 100mL に、ヘキサン：ジクロロメタン（3：1 v/v）50mL を添加し、振とう抽出した。この操作を 2 回行い、抽出溶媒を混合した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これをエバポレーターおよび N₂ 吹きつけで 0.5mL まで濃縮し、ヘキサンで 10mL にした。この内 1 mL を蛍光油分分析サンプルとし、クリセンを標準として励起波長 310nm、蛍光波長 360nm で蛍光油分の測定を行った。

上記の残り 9mL のヘキサンは N₂ 吹きつけで 0.5mL まで濃縮し、3%含水シリカゲルカラムによるクリーンアップを行った後、100μL まで N₂ 吹きつけで濃縮し、GC/MS で PAHs および alkPAHs の定量を行った。

1.4 ジャワメダカを用いた毒性評価

1.4.1 Toxic Unit

石油 BR 海水の毒性評価のために、1.3.3 で得られた石油 BR 海水中の PAHs・alk-PAHs 濃度および東條（2010）の各 PAH あるいは alk-PAH のジャワメダカ（孵化後 2 週間稚魚）に対する半数致死濃度を用いて Toxic Unit（以下 TU）を計算した。計算式は以下を用いた。

$$TU = C / LC_{50}$$

C：石油 BR 海水中的の各 PAH あるいは alk-PAH 濃度

LC₅₀：各 PAH、alk-PAH のジャワメダカ孵化後 2 週間稚魚半数致死濃度

各 PAH あるいは alk-PAH の毒性機構が同様とした場合、毒性が相加的であることから、 ΣTU (TU 合計値) が 1 となる場合、ジャワメダカ孵化後 2 週間稚魚の半数が死亡することとなる。

1.4.2 毒性試験

孵化後 2 週目のジャワメダカを用い、1.2 で得られた石油 BR 海水の毒性評価を行った。暴露条件は以下のとおりであった。

- ・ 供試個体：ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) 孵化後 7 日目仔魚 10 尾/容器 ($n=1$)
- ・ 実験区：BR 海水使用区、A-BR 海水使用区、肥料区、海水区 (コントロール)
- ・ 使用海水：石油 BR 実験 21~28 日目に得られた海水
- ・ 実験期間：7 日間
- ・ 換水方式：止水式 (24 時間ごとに全量交換)
- ・ 給餌：あり (水替え前にアルテミアを 1 日 1 回投与)
- ・ エアレーション：なし (酸素封入)
- ・ インキュベーション温度：26°C
- ・ 観察項目：生死、全長、体重 (g・wet)
- ・ 曝露試験環境観察項目：DO、pH、水温

(2) 残留石油成分の生物学的モニタリング手法

2.1 曝露試験

1.1 のバイリメ実験装置から得られた下記試験水を曝露試験に用いた。

- ・ 対照区：海水のみ
- ・ 非 BR 区：C 重油のみ添加
- ・ BR 区：C 重油とオスモコートを追加

オスモコートは、窒素やリン等を含む微生物用の肥料であり、バイオリメディエーション (BR) を想定して使用した。C 重油の濃度は、小山らの方法で作成された石油汚染水を 100%汚染水とし、海水を希釈水として 20%、4%、0.8%汚染水を調製した

ジャワメダカ成魚は、孵化後 10 か月の雌雄混合 40 匹を、5 匹ずつ 8 つの区画に分け、24 時間曝露した。ジャワメダカ受精卵は、受精 10 日後のもの 120 個を、15 個ずつ 8 つの区画に分け、48 時間曝露した。

2.2 cDNA の合成

cDNA の合成は PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて行った。

2.3 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR に用いたプライマーは、次の表のとおりである。 β -actin 遺伝子は、多くの臓器で構成的に発現することが知られているので、内部標準として用いた。

	名前	位置	塩基配列
CYP1A	CYP1A_1F	1163→	CATTCACAATCCCACACTGC
	CYP1A_2R	←1288	ATGGATCCTGCCACAGTTTC
CYP1B	CYP1B_1F	1188→	GAGCTACACCATCCCCAAGA
	CYP1B_2R	←1320	CTTGTTTCAGCTTCCCCTCTG
CYP1C	CYP1C_1F	1240→	ACCAGTTCTCCGTCAACCAC
	CYP1C_2R	←1381	GCCGTTTACCTGTGGAGAAA
β -actin	β -actin_1F		TCCACCTTCCAGGGGATGTG
	β -actin_2R		AGCATTTGCGGTGGACGAT

結果および考察

(3) 流出石油成分の環境残留性とその生物影響

3.1 水質および分解菌数

石油 BR 海水の水質、石油分解菌数および無機態窒素 I-N ($\text{NO}_2\text{-N}+\text{NO}_3\text{-N}+\text{NH}_4\text{-N}$)、無機態リン I-P ($\text{PO}_4\text{-P}$) 濃度は、実験期間を通して表 1 および図 4 に示すとおりであった。

装置内水質は表 1 に示すとおり、実験期間を通して安定的であった。

栄養塩濃度では BR-L 区および BR-H 区において実験 7 日目には IN があまり供給されていなかったため、実験 13 日目に BR-L 区および BR-H 区のみ肥料 10g を追肥した。その結果、21 日目に再び減少したが、I-N で約 3mg/L 以上、I-P でも 0.5mg/L 以上を維持できた (図 4)。製品評価技術基盤機構による報告では、石油分解菌のバッチ培養においては窒素 2mg/L およびリン 0.5mg/L 以上であれば十分な生育を示すとされており (http://www.bio.nite.go.jp/nbdc/bioreme2009/bct_result_4.html 製品評価技術基盤機構)、本研究の石油 BR 海水中の栄養塩濃度はそれらを満たしていた。

石油分解菌数では底質中、海水中ともに実験期間を通じて安定的に石油分解菌が存在し、BR-L 区および BR-H 区の石油分解菌数は A-BR 区、肥料区のそれを大きく上回っていた。また BR-L 区および BR-H 区底質中の石油分解菌数は 10^7 cells/g と比較的多く、石油分解菌は海水中よりも底質 (サンゴ砂) 中にはるかに多く存在することが分かった (図 5)。

この結果より石油 BR 実験 2 回目の環境は石油分解菌の増殖に十分なものであり、また石油分解菌も実験期間を通じて安定的かつ BR 区に多量に存在したと分かった。

表 1 石油 BR 海水の水質

実験区	DO(mg/L)	pH	水温 (°C)	塩分(psu)
肥料区	6.26±0.42	8.32±0.09	27.9±0.7	34±1
A-BR 区	6.06±0.69	8.10±0.13	28.5±0.7	33±1
BR-L 区	4.51±0.78	7.86±0.16	28.0±0.5	33±1
BR-H 区	4.59±0.51	7.80±0.16	28.5±0.6	34±1

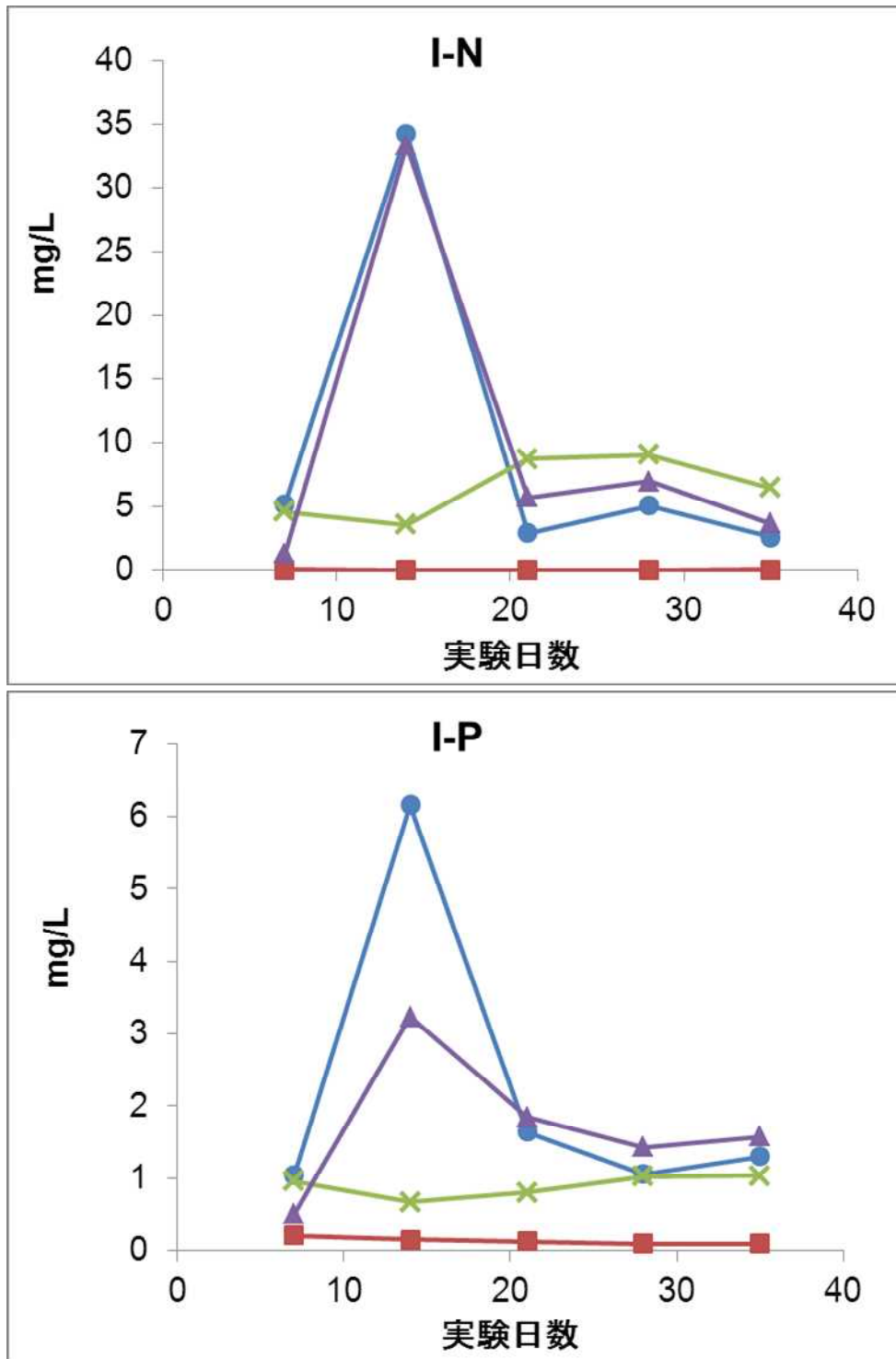


図4 海水中 I-N (上) および I-P 濃度 (下) の経日変化
 —■— A-BR 区、—●— BR-H 区、—×— 肥料区、—▲— BR-L 区

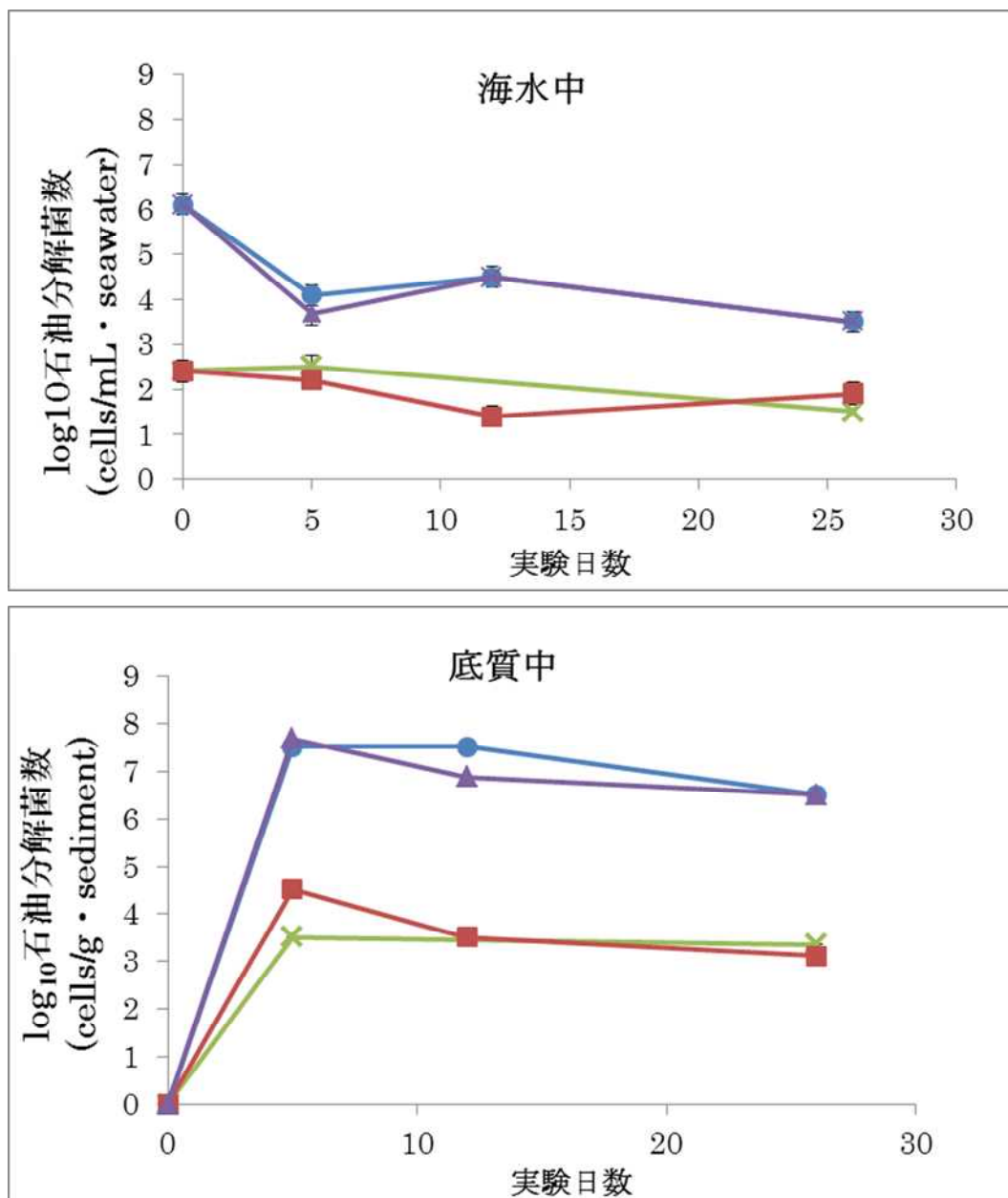


図5 底質中および海水中の石油分解菌数経日変化
 —■— A-BR 区、—●— BR-H 区、—×— 肥料区、—▲— BR-L 区

3.2 水中蛍光油分、 Σ PAHs、 Σ alk-PAHs

非ろ過サンプルの蛍光油分は BR-L 区および BR-H 区で実験中～後期にかけて急激に増加したが、ろ過サンプルの蛍光油分は BR-L 区および BR-H 区で増加しなかった。また実験 2～3 日目以降、BR-L 区および BR-H 区非ろ過海水中に多くの黒色懸濁物が確認された。これらのことから蛍光油分増加には懸濁物が関連していると考えられた。また BR-L 区および BR-H 区非ろ過海水の蛍光油分増加が顕著であったことから、懸濁物は石油分解菌によって乳化・分散された C 重油である可能性が考えられた。(図 6)

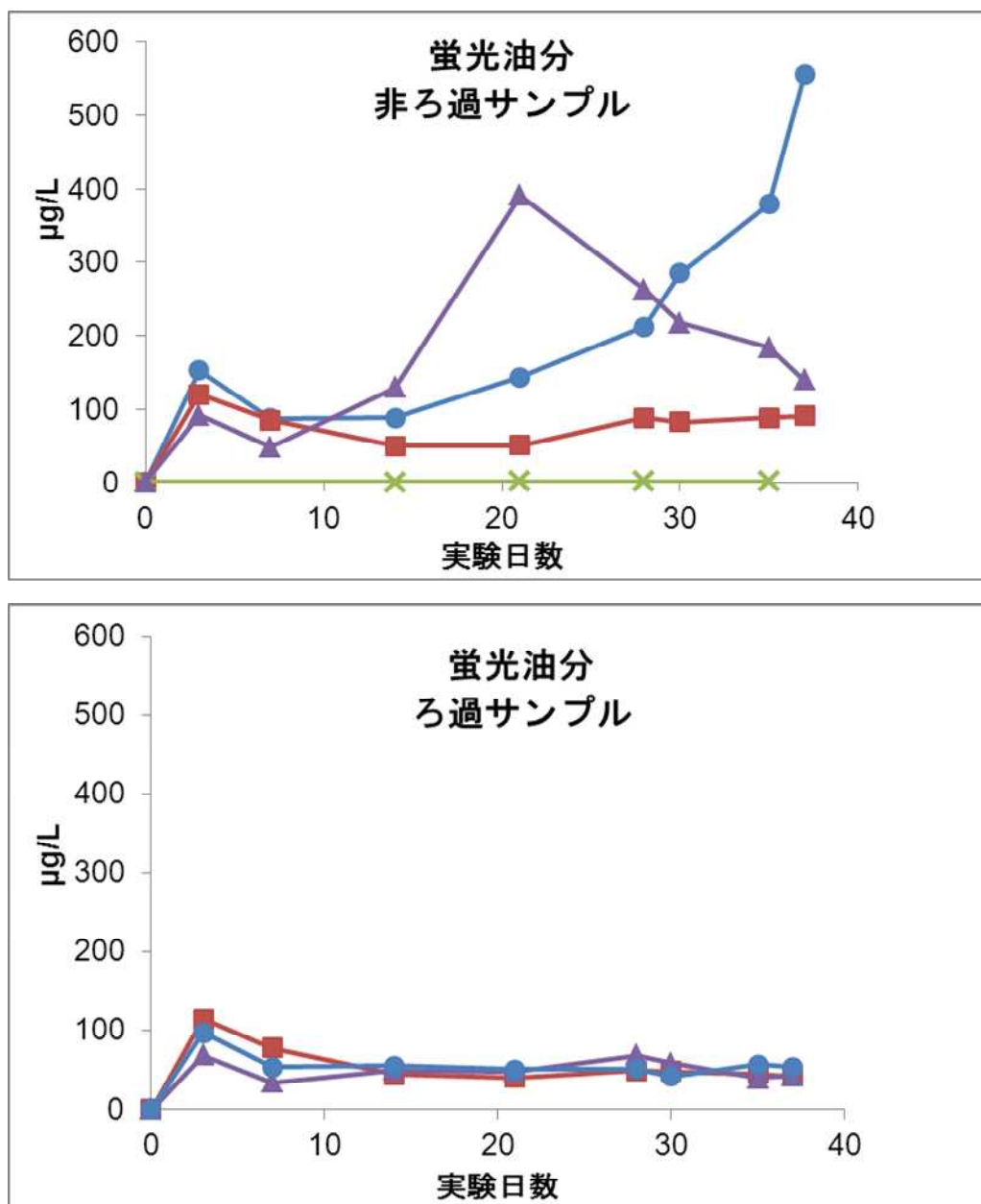


図 6 蛍光油分経日変化

—■— A-BR 区、—●— BR-H 区、—×— 肥料区、—▲— BR-L 区

一方、BR-L 区および BR-H 区非ろ過サンプルとろ過サンプル間で Σ PAHs、 Σ alk-PAHs 濃度差が大きくなかったことから、この懸濁粒子が Σ PAHs、 Σ alk-PAHs 濃度に大きな影響を与えなかったと考えられる。また A-BR 区の Σ PAHs、 Σ alk-PAHs 水中濃度は実験期間 BR-H 区のそれを大きく上回った。(図 7,8)

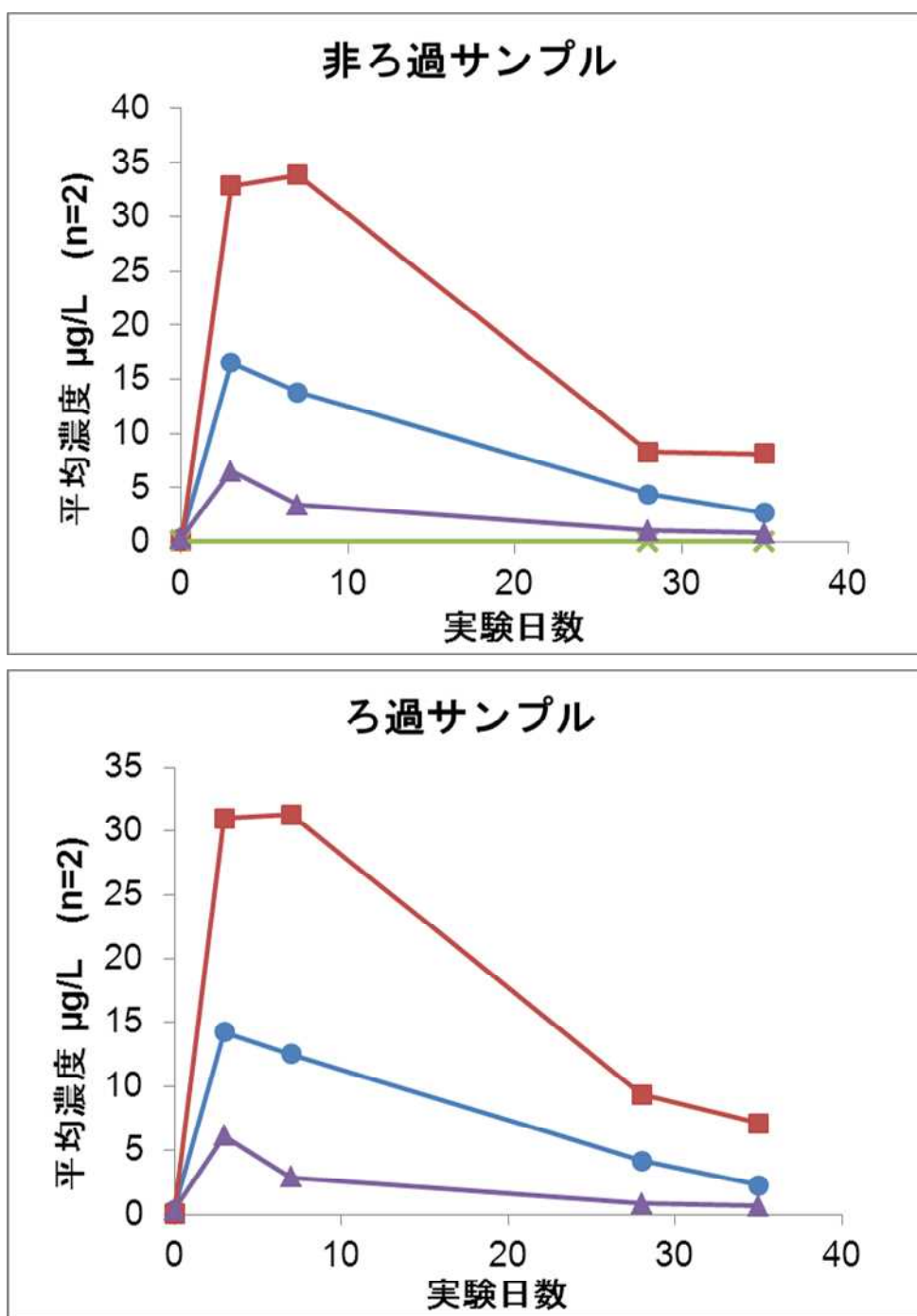


図7 ΣPAHs 経日変化 非ろ過サンプル（上）、ろ過サンプル（下）
 —■— A-BR 区、—●— BR-H 区、—×— 肥料区、—▲— BR-L 区

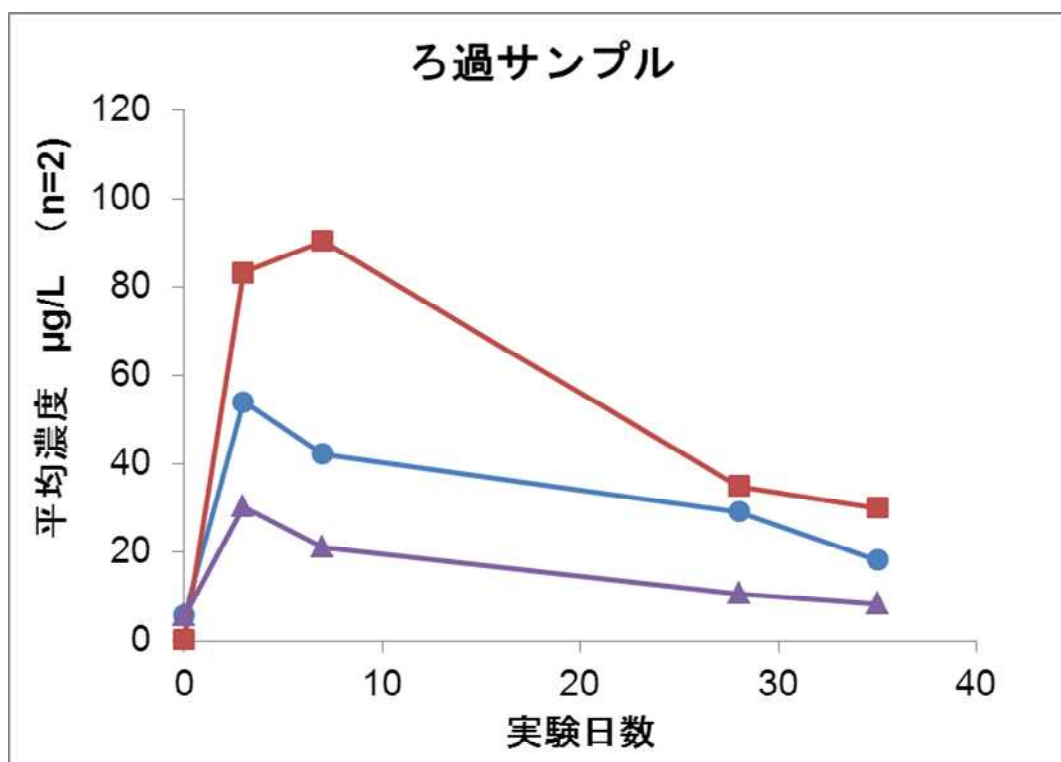
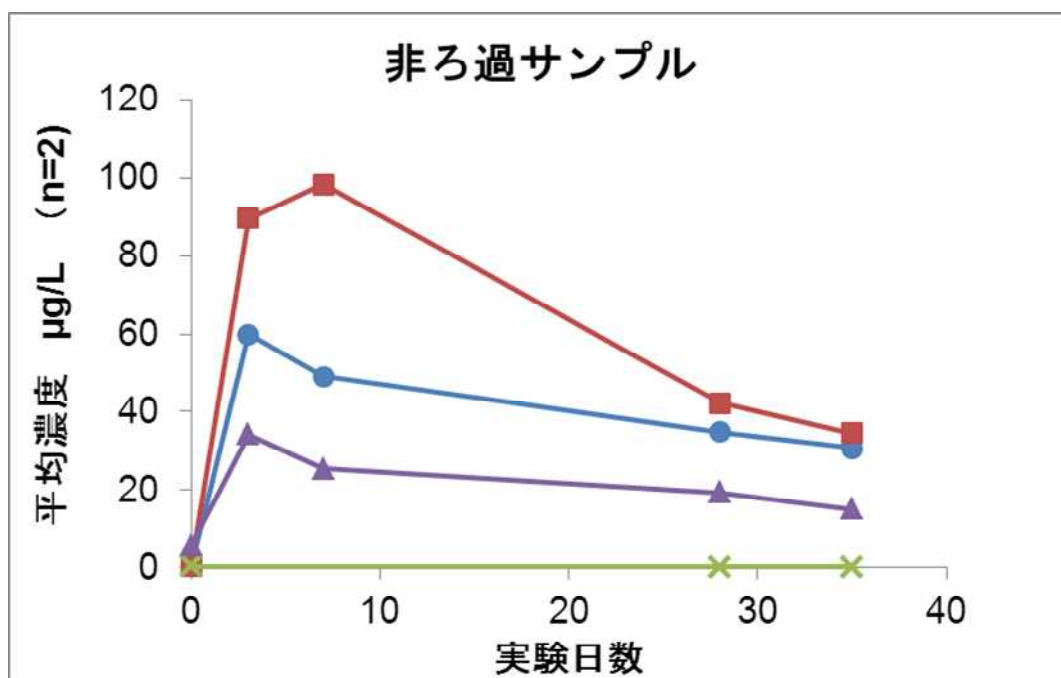


図 8 Σ alk-PAHs 経日変化 非ろ過サンプル (上)、ろ過サンプル (下)
 —■— A-BR 区、—●— BR-H 区、—×— 肥料区、—▲— BR-L 区

3.3 ジャワメダカを用いた石油 BR 海水毒性評価

3.3.1 Toxic Unit

ろ過サンプルの ΣTU は、全実験区共に実験 3～7 日目に最大となり、その後は減少した。特に BR-L 区および BR-H 区の ΣTU 減少が著しく、実験 7 日目には A-BR 区 ($\Sigma TU=0.60$) と BR 区 ($\Sigma TU=0.24$) とで ΣTU に大きな差が認められた。しかし BR-L 区および BR-H 区の ΣTU は実験 7 日目以降では急激に減少せず、0.15~0.2 を維持した。一方で A-BR 区の ΣTU は徐々に減少し、実験 28 日目には BR-H 区と A-BR 区の ΣTU にほとんど差が認められなかった(図 9)。この原因としては、BR 区では石油分解菌の影響を強く受ける低分子量の多環芳香族炭化水素類が早期に消え、より分解を受けにくい高分子量の物質が長期的に残留したことによる考えられる。

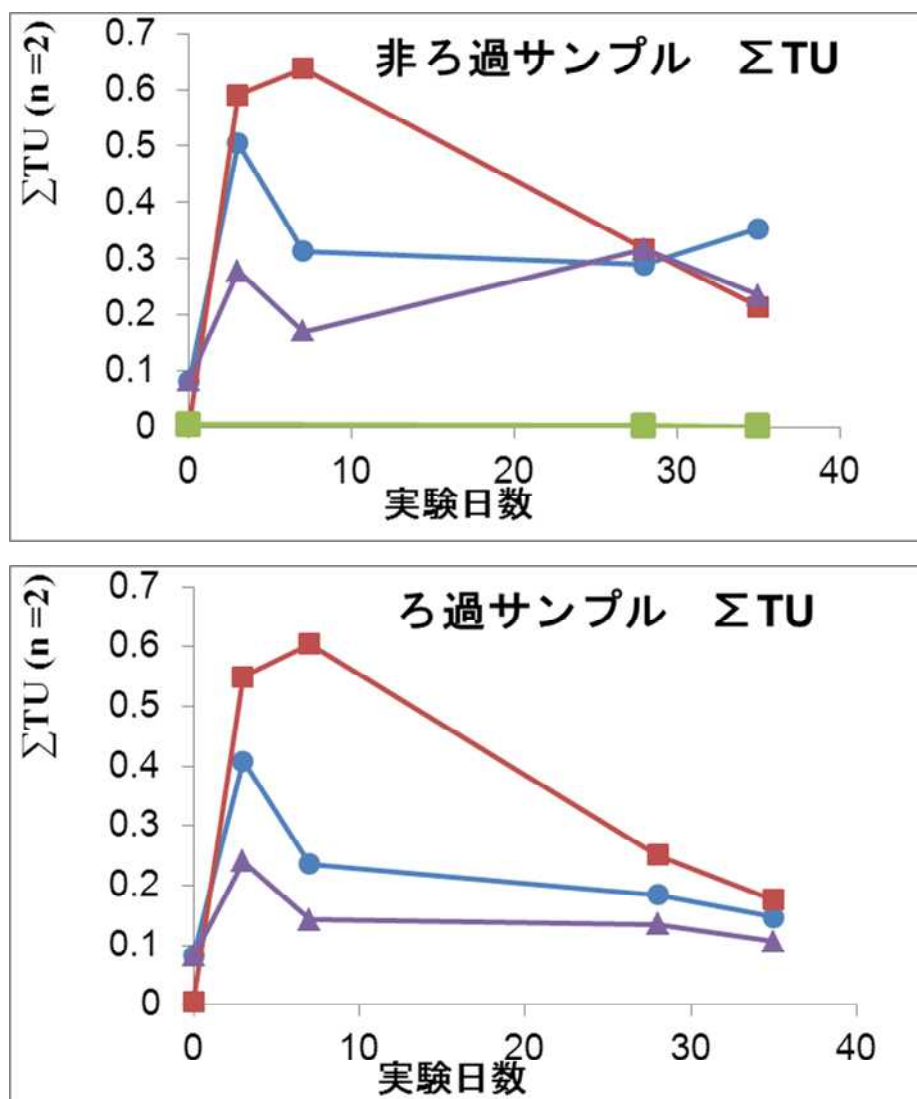


図 9 ΣTU 経日変化 非ろ過サンプル (上)、ろ過サンプル (下)
—■— A-BR 区、—●— BR-H 区、—×— 肥料区、—▲— BR-L 区

3.3.2 毒性試験

曝露終了時の生存率は BR-H 非ろ過海水使用区で最も低い 37% となり、次いで A-BR 非ろ過海水区の 63% であった (図 10)。 Σ TU では A-BR 区の方が BR-H 区よりも高いのに対して実際の毒性では逆転して BR-H 区で高くなり、BR-H ろ過海水区では生存率 93% と上がることから、BR 区では PAHs・alk-PAHs 毒性に加えて蛍光油分で確認された粒子状の石油が物理的にジャワメダカ仔魚の生存に影響を与えたのではないかと考えられた。

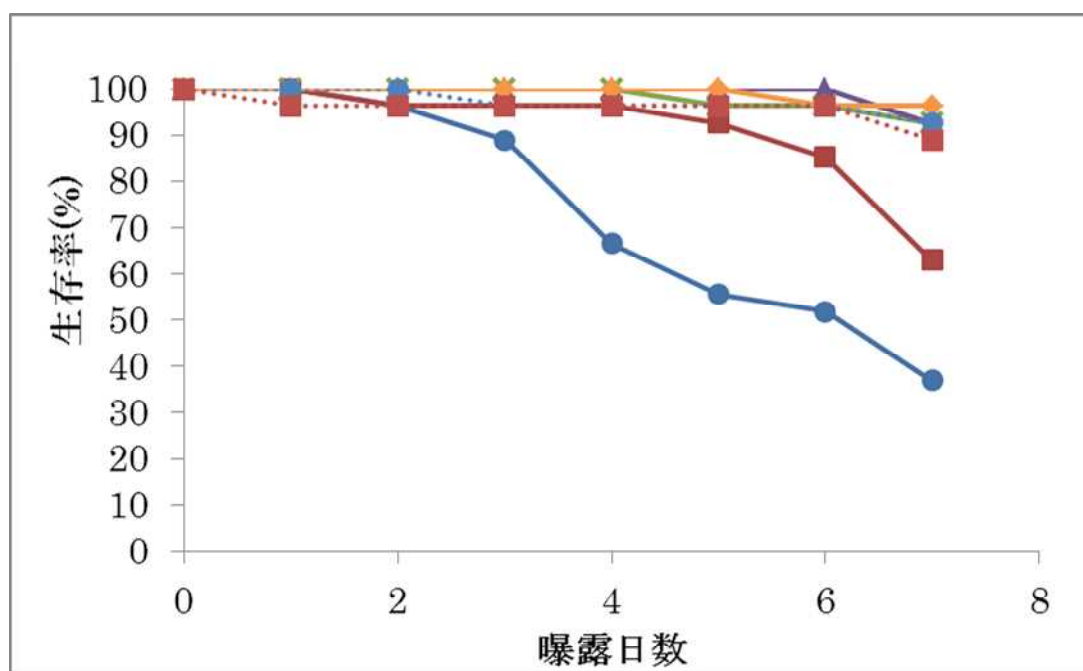


図 10 BR 海水暴露ジャワメダカの生存率経日変化

—■—A-BR 非ろ過区、—●—BR-H 非ろ過区、—×—肥料区、—▲—BR-L 非ろ過区、—◆—海水区、...■...A-BR ろ過区、...●...BR-H ろ過区

曝露終了時の体重および体長では、ダネットの多重比較にかけた結果 (有意確率 0.05) 海水区に対して BR-H、BR-L、A-BR 区のほとんどすべての区に有意な低下が認められ、唯一 BR-H 非ろ過海水使用区の標準体長は有意な低下が認められないが、これはデータ数の少なさが影響していると考えられた (図 11)。また曝露 7 日目個体と孵化後 0 日目 (曝露初日) 個体の体重および標準体長を比較すると、BR-L 区、BR-H 区、A-BR 区のすべてで体重が減少し、体長も伸びていないことが分かった。このことに加えて、BR-L 区、BR-H 区、A-BR 区ではジャワメダカ仔魚に尾びれの未発達が確認され (図 21)、遊泳障害も認められた。これらのことから、BR-L 区、BR-H 区、A-BR 区では PAHs、alk-PAHs、懸濁部物粒子などが作用してジャワメダカ仔魚の遊泳が困難になり、エサを食べることができず、エネルギー不足で死亡していったのではないかと考えられる。

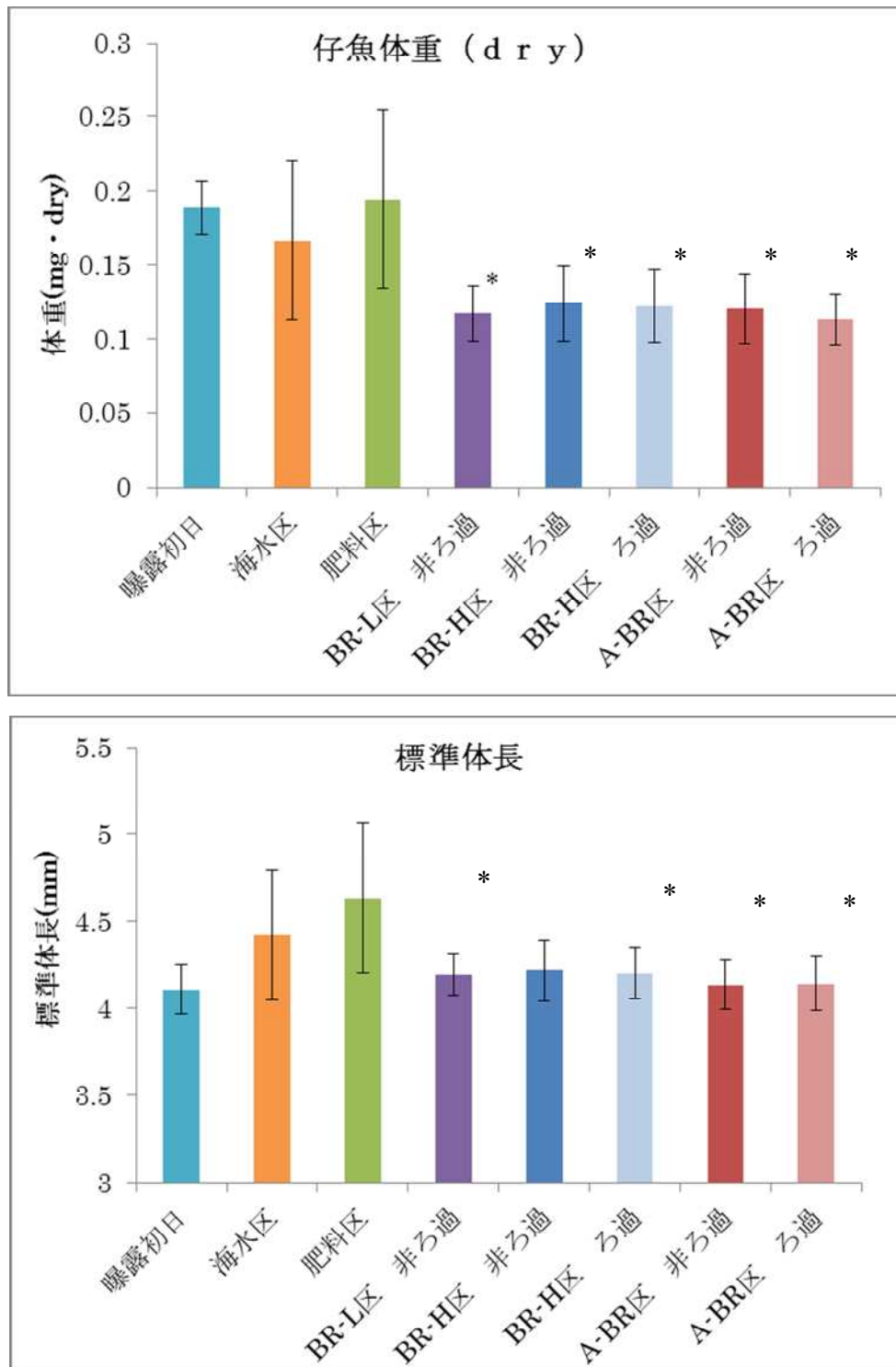


図 11 曝露 7 日目のジャワメダカ仔魚体重 (上) および標準体長 (下)
(平均値±SD)

* : 海水区に対して有意差あり ($p<0.05$)

曝露初日: 孵化後 0 日目仔魚

(4) 残留石油成分の生物学的モニタリング手法

4.1 ジャワメダカ成魚の各臓器における CYP1 遺伝子群のバイリメ海水による誘導

CYP1A は、肝臓、腸、筋肉でバイリメ海水による高い誘導的発現を示した。(図 12~14) (20% バイリメ海水では、対照と比較して、肝臓では 78 倍、筋肉では 279 倍と極めて高い誘導であったが、0.8 バイリメ海水でも 10 倍前後の、容易に検出できるレベルの誘導を示した。また、腸と筋肉では、BR 区 (バイリメ試験装置に肥料を添加) で誘導が顕著に下がる傾向が観察された。鰓においては他の臓器と比較して弱い誘導であった。(図 15)

CYP1B1、-1C1 は、肝臓と鰓では CYP1A と異なって誘導を示さなかったが、腸と筋肉では CYP1A 同様に高い誘導を示し、これも CYP1A と同様に BR 区で誘導が顕著に下がる傾向が見られた。

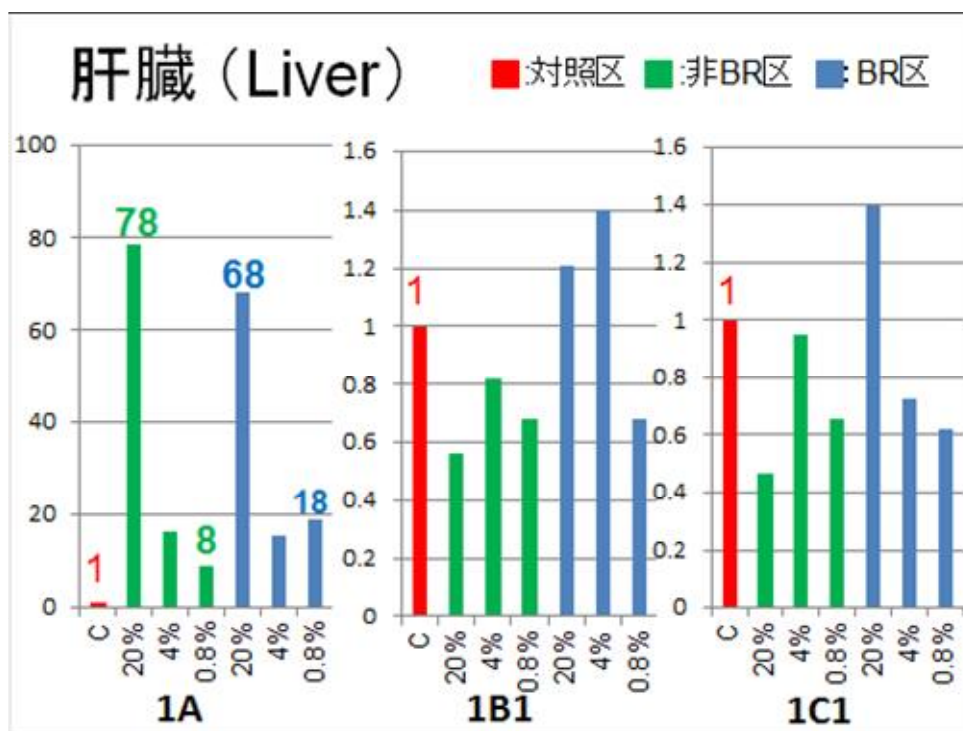


図 12 バイリメ海水による肝臓 CYP1 誘導

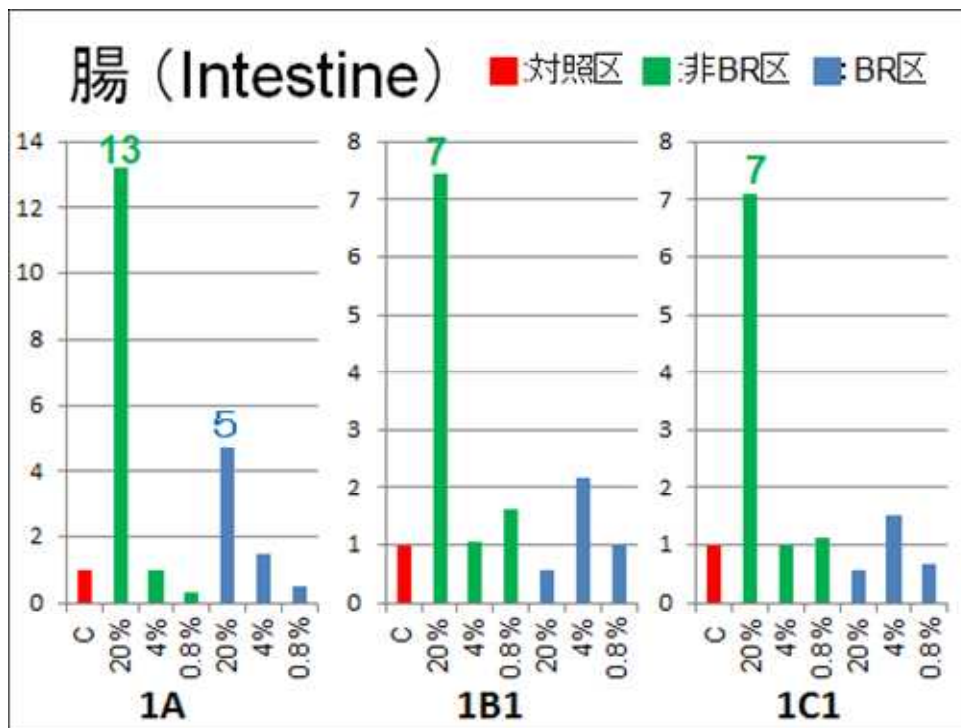


図 13 バイリメ海水による腸 CYP1 誘導

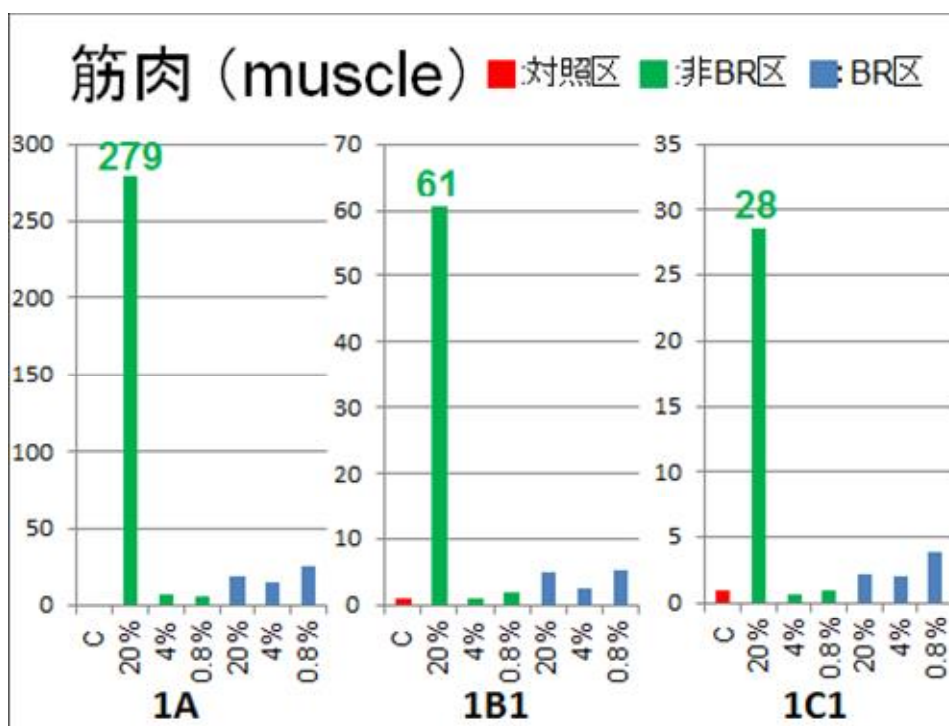


図 14 バイリメ海水による筋肉 CYP1 誘導

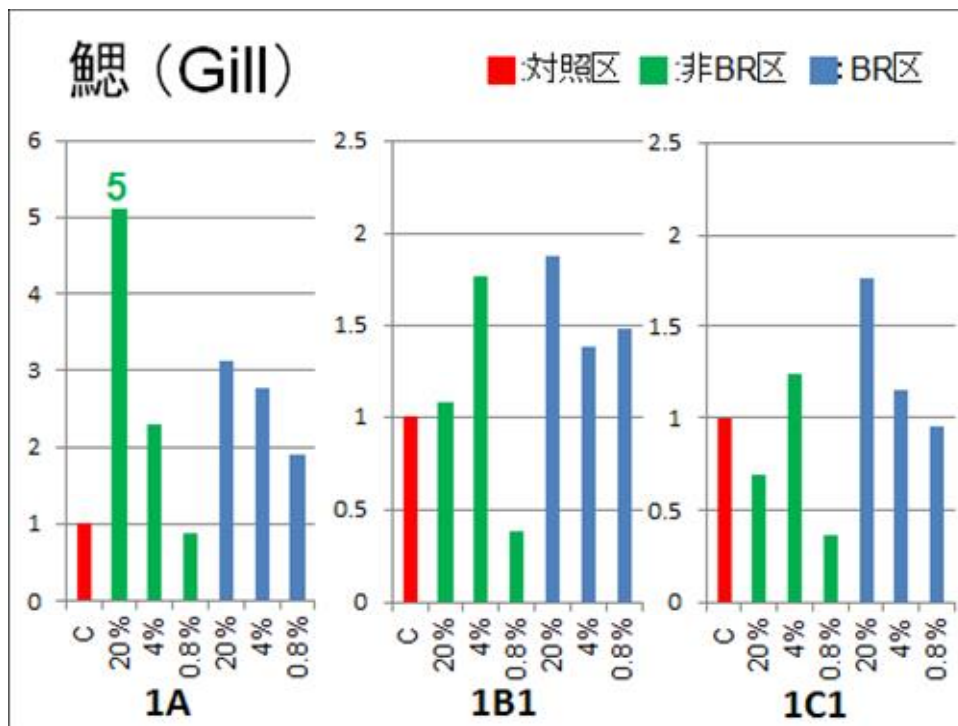


図 15 バイリメ海水による鳃 CYP1 誘導

4.2 ジャワメダカ受精卵における CYP1 遺伝子群のバイリメ海水による誘導

受精卵では、CYP1A、-1B1、-1C1 でバイリメ海水による誘導が見られ、誘導の強さは石油汚染水の濃度に依存する傾向があった。また、BR 区で誘導が高くなるという成魚の各臓器とは逆の結果が示された。(図 16)

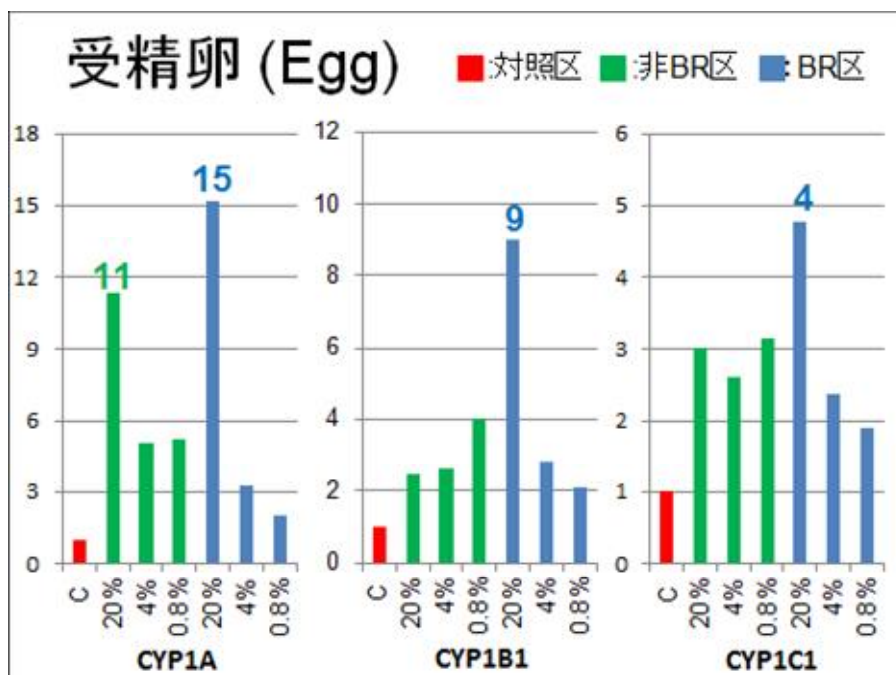


図 16 バイリメ海水による受精卵 CYP1 誘導

(5) まとめ

5.1 流出石油成分の環境残留性とその生物影響

本研究では石油 BR が水中の低分子 PAHs、alk-PAHs を速やかに微生物分解するため、水生生物に対する石油毒性の低減につながる事が分かった。しかし、石油の分解がある程度進むと石油 BR 海水の毒性低下の鈍化することがわかった。これは、低分子物質の分解がすすむ一方で、高分子物質が微生物分解を受けにくくなるためではないかと推測される。懸濁粒子の多く存在した BR-H 区非ろ過海水で最も強い毒性が求められた。これは、石油分解菌の持つ界面活性物質により、C 重油が水中に懸濁粒子となって乳化・分散したことにより、高分子量（高毒性）の物質が水中に溶出することなどによるものと推測される。そのため石油 BR を適用するには、海水交換頻度の高い地形、石油存在量などを加味して実施するか否かを判断する必要があると考えられる。

5.2 残留石油成分の生物学的モニタリング手法

CYP1A 遺伝子の発現量は、肝臓、腸、および筋肉を試料として用いた時に、極めて高感度な石油汚染指標となり得ることが示された。CYP1B1、-1C1 遺伝子の発現量は、腸および筋肉を試料として用いた時に、同様に高感度な指標となり得る。

CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の組織特異的な誘導的発現は、遺伝子発現の薬物誘導機構の基礎的研究の対象として興味を持たれるが、石油成分が生体に与える影響を研究する上でも有用な知見である。

腸と筋肉で、BR 区の誘導が下がり、逆に受精卵では少し上がる傾向が見られたが、細菌による分解等による石油成分の変化の分析結果と照らし合わせる研究が今後必要となるものと考えられる。

今回の実験は室内実験装置で行ったものであり、比較的毒性の低い C 重油を用いているが、今後石油 BR が石油除去手法として適応されるためには、今回の手法含め様々な条件下で石油 BR を実施し底質中、水中それぞれの生物への影響評価を行うことが必要となるはずである。そのため本研究が今後の BR 研究の発展に一役担うことを期待する。

(6) 3年間のまとめ

石油 BR による水生生物影響

カラムを用いて実験室内で行った重油バイオリメディエーション実験の結果、海水中低分子 PAHs あるいは alk-PAHs 濃度低下が起こり、微生物による重油の分解の進んでいることが分かった。一方、海水中高分子 PAHs あるいは alk-PAHs 濃度は若干ではあるが上昇したことから、分解菌による重油の乳化の起こっていたことが示唆された。また、毎回の実験で、期間後半（3 週間から 4 週間後）での蛍光油分および懸濁粒子濃度の上昇が認められた。これは当初、分解物である水酸化 PAH が寄与しているものと考えられたが、バイオリメディエーション実験海水をろ過することによって蛍光油分の上昇の認められないことが判明したことから、懸濁粒子中の何らかの物質がその上昇に寄与したものと考えられる。バイオリメディエーション実験海水の魚類に対する毒性は、比較的強く、生残のみならず成長にも影響することが分かった。この毒性は、実験海水をろ過することによってほとんど消滅したことから、蛍光油分と同様に懸濁粒子中の何らかの物質がその毒性に寄与したものと考えられる。

ダイオキシンやベンゾピレンなどの多環芳香族炭化水素によって薬物誘導される CYP1 遺伝子群に着目し、石油汚染の指標としての有用性をしらべた。石油汚染は海で発生することが多いので、海水でも飼育できる小型魚、ジャワメダカを実験魚として選択した。2012 年度は、CYP1A、-1B1、-1C1 の各遺伝子の発現量をそれぞれ特異的に測定するための基礎として、各遺伝子の cDNA をクローニングした。2013 年度は、石油成分が CYP1 遺伝子群を誘導することを確認するために、まず、確実に投与できる経口投与によって誘導を試みた。その結果、CYP1A、-1B1、-1C1 の遺伝子が、ジャワメダカの腸においてそれぞれ 1000 倍以上の誘導的発現を示した。また、受精卵の利用の可能性を見るため、石油汚染水による誘導を試みたところ、CYP1A、-1B1 で誘導が確認できた。2014 年度は、本計画の最終年度として、石油汚染水の濃度の影響を、ジャワメダカ成魚の肝臓、腸、筋肉、鰓ならびに受精卵における CYP1A、-1B1、-1C1 遺伝子の誘導的発現を指標としてしらべた。その結果、CYP1 遺伝子群の発現が、極めて高感度な石油汚染指標になり得ること、石油汚染におけるバイオリメディエーションや石油汚染の生態系への影響に関する研究において有用なバイオマーカーになり得ることが示された。

以上の結果、流出油のバイオリメディエーションは、その分解物（上記の懸濁粒子も含む）による毒性が問題であるが、海水交換のよい水域でその適用を行えば、有害性成分の急速な分散により、水生生物に大きな影響を及ぼすことはないと考えられるが、東南アジアなどに分布するマングローブ林に漂着した流出油に本手法と適用した場合、有害性成分の急速な分散が期待できず、現場の沿岸生態系に大きな影響を及ぼす可能性がある。したがって、流出油のバイオリメディエーション手法はその除去に有効であるものの、その技術の適用場所などに注意を払うべきものであると考える。

(7) 参考文献

- JIS K0102 (工場排水試験法) 日本工業規格、1986.
- Paul F. Kingston, 2002. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. Spill Science & Technology Bulletin Vol.7, Nos.1-2, 53-61
- Ronald M. Atlas, 1995. Bioremediation of Petroleum Pollutants. Internal Biodeterioration & Biodegradation (1995) 317-327
- James R. Bragg, Roger C. Prince, E. James Harner, Ronald M. Atlas, 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Nature, Vol. 368 413-418
- Anabela P. Rosa, Jorge A. Triguís, 2007. Bioremediation process on Brazil Shoreline. Environmental Science and Pollution Research 14(7), 470-476
- K. A. Burns, S. Codi, N. C. Duke, 2000. Gladstone, Australia Field Studies: Weathering and Degradation of Hydrocarbons in Oiled Mangrove and Salt Marsh sediments With and Without the Application of an Experimental Bioremediation Protocol. Marine Pollution Bulletin, Vol.41, Nos. 7-12, 392-402
- Eliona Z Ron, Eugene Rosenberg, 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Environmental biotechnology, 249~252
- JR Haines, BA wren, EL Holder, KL Strohmeier, RT Herrington, AD Venosa, 1996. Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. Journal of Industrial Microbiology (1996) 16 , 36-41
- Edward J. Brown, Joan F. Braddock, 1990. Sheen Screen, a Miniaturized Most-Probable-Number Method for Enumeration of Oil-Degrading Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology , Dec , 1990 , 3895-3896
- Per S. Daling, Liv-Guri Faksness 2002. Laboratory and reporting instructions for the CEN/BT/TF 120 Oil Spill Identification-Round Robin Test-May,2001. SINTEF REPORT
- David J. Hansen, Dominic M. DiToro, Joy A. McGrath, Richard C. Swartz, David R. Mount, Robert J. Ozretich, Heidi E. Bell, Mary C. Reiley, Tyler K. Linton, 2003. Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ECBs) for the Protection of Benthic Organisms: PAH Mixture. EPA/600/R-02/013
- 東條智仁、2010. 鹿児島大学水産学部卒業研究 “石油成分の魚類に対する毒性評価”.