

学 位 論 文 要 旨

氏 名

古田 岳志

題 目

本邦産海産魚類を対象とした毒性試験法の開発に関する研究
(Development of toxicity test methods for marine fish species distributing in Japan)

近年わが国では、本邦産水生生物に対する毒性データを根拠とした水生生物保全水質環境基準の策定が進められている。しかしながら、海産魚類では試験法が未確立で毒性データが不足していることが、海域での基準を策定する上で障害となっている。そこで本研究は、本邦産海産魚類を対象とした毒性試験法、特に発生初期の段階を対象とした長期毒性試験法の開発を目的とした。

毒性試験対象魚種の探索：マダイ、ヒラメ、オニオコゼ、トラフグ、およびクマノミ類4種（カクレクマノミ、クマノミ、トウアカクマノミ、ハマクマノミ）の産卵特性および孵化仔魚の飼育特性を調べた。マダイ、ヒラメ、およびクマノミ類4種は周年卵または孵化仔魚が得られることから試験対象種として好ましい産卵特性を有すると考えられた。それら6魚種の孵化仔魚を毒性試験条件下で14日間飼育した結果、マダイとヒラメでは1週間以内にすべての個体が死亡したのに対し、クマノミ類4種は平均で4~48%の生残率であり、中でもカクレクマノミでは48±20%と最も高い値を示した。

魚種間の感受性差：ホウ素、銅、およびアンモニアについてマダイ、ヒラメ、およびカクレクマノミ稚魚を用いた急性および稚魚成長毒性試験を行った。いずれの物質および試験においても、カクレクマノミの感受性はマダイとほぼ同等であり、ヒラメよりも高いものと考えられた。

仔魚期を対象とした長期毒性試験：毒性試験に適した産卵特性および仔魚の飼育特性を有するとともに、マダイと同等の毒性物質に対する感受性を示したことから、カクレクマノミは仔魚期を対象とした長期毒性試験の試験対象魚種として最も有望な本邦産海産魚種であると考えられた。本種仔魚を供試魚として、水生生物保全水質環境基準の優先検討対象物質であるホウ素、銅、およびアンモニアについて長期影響試験を行った。その結果、生存または成長に対する長期影響濃度は、それぞれ87mg-B/L、0.06mg-Cu/L、および0.5mg-N/L（非乖離態）であることが明らかになった。また、0.04~0.16mg-Cu/Lの濃度に暴露したカクレクマノミでは、対照区（0mg-Cu/L）よりも生残率が有意に向上することがわかった。

本研究では、カクレクマノミを試験魚種とすることで、外国産の広塩性魚種以外では試験が困難であった仔魚期に対する毒性物質の長期影響濃度を明らかにすることができた。それらのデータは、本邦産海産魚では初めての知見であることから、水生生物保全水質環境基準の策定に際して極めて有用と考えられた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Takeshi FURUTA

題 目 Development of toxicity test methods for marine fish species distributing in Japan (本邦産海産魚類を対象とした毒性試験法の開発に関する研究)

Recently, new water quality standards to protect aquatic organisms are established for several substances in Japan. The standards are decided based on toxic data for aquatic organisms, distributing in Japan. However, since there have been little studies on toxicity tests for marine finfish than freshwater fish, it has been difficult to decide the standards for coastal water body. To develop toxicity test method, in particular for long-term test during early life stage, suitable fish species for the test was decided in terms of spawning characteristics and larval survival. Sensitivity of the selected fish to several toxicants was also compared to red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, widely used for toxicity test in Japan.

Applicable fish species to long-term test during early life stage: Spawning characteristics and larval survival were investigated for red sea bream, Japanese flounder, scorpaenid fish *Inimicus japonicus*, tiger puffer *Takifugu rubripes*, and four anemonefish species (false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*, Clark's anemonefish *A. clarkia*, saddleback anemonefish *A. polymnus*, tomato anemonefish *A. frenatus*), distributing in Japanese coastal water body. Because of small size of parental fish, regular semimonthly spawning interval, and survival rate for larva at $48 \pm 20\%$ for 14 days post after hatching, false clown anemonefish is considered to be applicable fish species to the test.

Sensitivity to toxicants: Acute and juvenile growth toxicity tests of boron, copper, and ammonia were conducted for juvenile red sea bream, Japanese flounder and false clown anemonefish. For all substances and both tests, it is considered that the sensitivity of Japanese flounder was inferior to that of red sea bream, while the sensitivity of false clown anemonefish seemed to be almost same as that of red sea bream.

Long-term test method for larval false clown anemonefish: False clown anemonefish is considered to be the most promising marine fish species for long-term toxicity test during larval stage because of its spawning characteristics, larval survival, and sensitivity to toxicants. Effect concentration to larval survival and/or growth for 28 days could be estimated at 87 mg-B/L, 0.06 mg-Cu/L, and 0.5 mg-N/L for boron, copper, and ammonia (un-ionized), respectively, those are candidates for Environmental Quality Standards to protect aquatic organisms in Japan. On the other hand, positive effect on larval survival was observed only for copper at 0.08 to 0.16 mg-Cu/L.

In this study, long term toxic data during larval stage, which could be obtained only for euryhaline species so far, could be clarified using false clown anemonefish as testing fish. Those data are considered to be quite valuable ones to establish the Environmental Quality Standards to protect aquatic organisms, since those data are the first ones on marine fish species distributing in Japan.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	古田 岳志
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 小山次朗
	副査 鹿児島大学 教授 越塩俊介
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 鹿児島大学 准教授 安樂和彦
	副査 佐 賀大学 講師 上野大介
審査協力者	
題 目	本邦産海産魚類を対象とした毒性試験法の開発に関する研究 (Development of toxicity test methods for marine fish species distributing in Japan)
<p>近年、我が国では生態系重視政策に基づく、水生生物保全のための新たな水質環境基準の策定が進められつつある。ここでは、淡水および海産生物に対する化学物質の有害性データを元に、水質環境基準を策定する枠組みとなっているが、海産生物のデータが圧倒的に不足していることが基準値策定の大きな障害となっている。これは海産魚類をはじめとする海産生物を対象とした生態毒性試験の確立が不十分なためである。本研究では本邦海産魚類で毒性試験に適した種類の選定、その魚種を対象とした毒性試験法、特に毒性データとしてより有効な長期毒性試験法の開発を目的とした。</p> <p>毒性試験対象魚として、マダイ、ヒラメ、オニオコゼ、トラフグおよびクマノミ類4種（カクレクマノミ、クマノミ、トウアカクマノミ、ハマクマノミ）を選定し、その産卵特性、孵化仔魚飼育特性を調べ、マダイ、ヒラメおよびクマノミ類4種が試験対象魚としての適性を有していることを明らかにした。毒性試験と同じ条件で14日間飼育した結果、マダイおよびヒラメで生残率0%、クマノミ類4種で4</p>	

～48%で、特にカクレクマノミで $48 \pm 20\%$ と最も高い値を示すことを明らかにした。複数の水温条件下で、複数のサイズのマダイ、ヒラメおよびカクレクマノミ稚魚に対するホウ素、銅およびアンモニアの急性毒性試験および稚魚成長毒性試験を実施した結果、カクレクマノミとマダイの試験物質に対する感受性がほぼ同等で、ヒラメより高いことが明らかとなった。

マダイと同様にカクレクマノミが毒性試験の試験魚として有望であることから仔魚期を対象とした長期毒性試験を実施した。その結果、試験魚生存および成長に対するホウ素、銅およびアンモニアの影響濃度がそれぞれ87 mgB/L、0.06 mgCu/L、および0.5 mgN/L（非乖離態）であることを明らかにし、銅濃度0.04～0.16 mg/Lに暴露したカクレクマノミ仔魚の生存率の向上することも明らかにした。

以上の結果、カクレクマノミが長期毒性試験の試験海産魚として有望であることを明らかにした。これらの知見は、今後の我が国の水質環境保全政策に貢献するものと考えられる。審査委員会では、本研究論文が学位論文として十分な内容であると判断した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	古田 岳志
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 小山次朗
	副査 鹿児島大学 教授 越塩俊介
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 鹿児島大学 准教授 安樂和彦
	副査 佐賀大学 講師 上野大介
審査協力者	
実施年月日	平成20年 7月18日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答 <input checked="" type="checkbox"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年7月18日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語(英語)の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士(水産学)の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	古田 岳志
<p>[質問 1] 銅、アンモニア、ホウ素を毒性試験供試物質として選んだ理由はなにか。</p> <p>[回答 1] 水生生物保全のための水質環境基準の対象物質として選ばれている。しかし 3 物質の海産生物に対する毒性情報がないため、これらを選択した。</p> <p>[質問 2] pH の低い海水を使用しているが、pH の影響はないのか。</p> <p>[回答 2] 対照区も同じ pH で試験し、生残への影響の無いことを確認している。本来であれば海水の pH (8 程度) 付近での試験が望ましいのだが、その pH では銅が十分溶解せず、毒性が出ないため、海水 pH を少し低いところに設定した。</p> <p>[質問 3] アンモニアの毒性試験では溶存酸素濃度 (DO) が十分維持されている。通常、アンモニア濃度が高い水域の DO は低いのに、なぜ DO の高い条件で試験したのか。</p> <p>[回答 3] 先ずは、アンモニアそのものの毒性を明らかにすることが目的であった。そのためには、アンモニア以外で有害となる要因をできる限り排除した条件で試験すべきと考えた。</p> <p>[質問 4] マダイ・ヒラメは何故クローンを使わなかったのか。</p> <p>[回答 4] クローンを用いると化学物質に対する感受性の個体差が小さくなるかもしれないが、化学物質に対する感受性の異なった個体が存在する生態系を想定したため、クローンを用いなかった。</p> <p>[質問 5] 銅、ホウ素とアンモニアが魚に影響を及ぼすメカニズムはわかっているのか。</p> <p>[回答 5] 銅については、エラの Na-ATPase 活性阻害が関係しているのではないかと考えている。アンモニアについては体内の中樞神経に影響を及ぼす知見がある。しかし、海産魚については調べられていない。</p> <p>[質問 6] 長期試験の有意差の有無はどのようにして出しているのか。水槽の平均値はどうしているのか。同時に一気にしているのか、論文に統計処理法が書かれていないので書いてください。例えば、一元配置をした後にダンカンをしたと表記するなど。</p> <p>[回答 6] おっしゃるように一元配置の分散分析をし、その後、Dunnet の多重比較を行っている。</p> <p>[質問 7] 試験魚の増重率が 40%以上となるよう、試験をしているが、この程度の増重率では対照区と試験区の間には有意さが出にくいのではないか。</p> <p>[回答 7] OECD などの長期毒性試験テストガイドラインでは、試験魚の増重率が 40%以上になることを要求している。このため、試験成立の目安として増重率 40%以上となることを目指した。</p> <p>[質問 8] カクレクマノミ仔魚期の銅暴露がその生残率を改善しているようであるが、初期餌料としてアルテミアがカクレクマノミに適しているのか。アルテミアの銅濃度が十分あれば、仔魚期銅暴露と同様の効果を持つのではないか。水および餌からの取り込み割合がどの程度なのか。吸収してから主に蓄積するのは肝臓か。</p> <p>[回答 8] アルテミア中の銅濃度を測定したが、特に高い値では無かった。したがって、アルテミアが銅の主な補給源になっているとは考えられない。銅の取り込み割合については、淡</p>	

水魚では同位体を用いて比較した例はあるが、本研究で用いた魚種のデータは無い。吸収後の蓄積器官の一つは肝臓であり、マダイおよびヒラメについて、論文の中でもそれを裏付ける結果が得られている。

[質問 9] 餌由来の銅の摂取量の違いが毒性に影響を与えるのではないか。銅によるプラスの影響は銅の抗酸化作用がきいているのでは。銅の免疫と毒性と関連性を今後検討してはいいかがか。

[回答 9] 今回、そこまでは検討していないが、今後、検討していきたい。

[質問 10] カクレクマノミは親魚が保護する特性があるが、親がいなくても孵化するのか。仔魚暴露する場合、影響があるのか。

[回答 10] 十分な試験データが有るわけではないが、基質に産み付けられた卵を剥がし、ビーカー内で孵化させたところ、孵化率が70%以上になることもあり、親魚の保護が無くても孵化する。しかし、孵化率を十分に高く保つためには、エアレーションなどで卵と海水を攪拌する必要があるが、強く攪拌すると卵が死亡してしまうため、現在、どのように攪拌するかを検討している。

[質問 11] 今後の課題として、対照区の生残率向上があげられているが、なにか具体的な対策はあるか。

[回答 11] 銅添加せずに向上できるのが希望。本研究で、希釈海水による仔魚の生残率向上が観察されている。このような方法を使って、仔魚生残率向上が図れるか、今後検討したい。また、銅添加による仔魚生残率向上のメカニズムを解明したい。

[質問 12] 銅添加することで毒性値は変わらなかったか。

[回答 12] 孵化後の2~3日間というごく短期間、銅を暴露した仔魚と暴露しなかった仔魚について、他の物質の毒性データを比較したところ、その毒性値に差は無かった。