

学 位 論 文 要 旨

氏 名	ジョセフ・オルクマ・チェイキュラ
題 目	魚類による石油由来多環芳香族炭化水素化合物の取り込み経路とその影響に関する研究 Main uptake route and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in some marine fishes.

研究の目的は、石油汚染の指標物質である多環芳香族炭化水素化合物 (PAHs) の、マダイ、ヒラメおよびジャワメダカ (東南アジア産汽水魚) による蓄積特性により、その環境汚染に対する指標生物として適性を評価すると共に、PAHs の魚類に対する毒性を評価することである。

ヒラメを、水中濃度 2.49 及 7.87 $\mu\text{g/L}$ のフェナントレン (Phe)、3.19 及び 10.4 $\mu\text{g/L}$ のピレン (Pyr)、4.27 及び 12.7 $\mu\text{g/L}$ のクリセン (Chr) 及び 0.99 及び 3.42 $\mu\text{g/L}$ のベンゾピレン (BaP) に、マダイを 3.01 及 2.77 $\mu\text{g/L}$ の Phe、2.97 及び 3.11 $\mu\text{g/L}$ の Pyr、2.13 及び 9.04 $\mu\text{g/L}$ の Chr 及び 1.28 及び 1.17 $\mu\text{g/L}$ の BaP に、それぞれ流水条件で 10 日間暴露した。同様にジャワメダカを、水中濃度 2.01 $\mu\text{g/L}$ の Phe、3.83 $\mu\text{g/L}$ の Pyr、6.23 $\mu\text{g/L}$ の Chr 及び 1.37 $\mu\text{g/L}$ の BaP に流水条件で 10 日間暴露した。また、マダイ及びジャワメダカについては、餌投与による上記 4PAHs への暴露を 14 日間、7 日間の排泄実験も実施し、魚類 PAHs 蓄積特性の暴露経路による差も検討した。

水暴露の場合、いずれの魚種とも体内 PAH 濃度は、Phe が最も高い値を示した。ヒラメの総 PAHs 濃度最大値は、 $180 \pm 108 \text{ ng/g w.w.}$ (2 日目) 及び $397 \pm 230 \text{ ng/g w.w.}$ (5 日目) であり、マダイでは $572 \pm 305 \text{ ng/g w.w.}$ (10 日目) 及び $572 \pm 350 \text{ ng/g w.w.}$ (10 日目)、ジャワメダカでは $388 \pm 109 \text{ ng/g w.w.}$ (2 日目) であった。ヒラメでは Phe 及び Pyr、マダイでは Phe、Pyr と低濃度の Chr の蓄積が認められたが、BaP の蓄積は認められなかった。一方、ジャワメダカでは 4 種の PAH の蓄積が認められた。ヒラメ及びジャワメダカの PAHs 蓄積濃度は、暴露期間経過に伴い低下したが、マダイでは増大を示した。

餌暴露の場合、マダイ、ジャワメダカとも 2 日目に体内 PAHs 濃度の最大値を示した。両魚種とも 4 つの PAH すべてを蓄積し、マダイでは Phe が、ジャワメダカでは Chr が 4PAH の中で最大値を示した。

PAHs の取り込み経路による EROD 活性誘導に差は認められず、水暴露ヒラメの EROD 活性は $0.18 \pm 0.1 \text{ nmol/min/mg protein}$ で、3 魚種で最も低い値であり、ジャワメダカでは $4.2 \pm 2.8 \text{ nmol/min/mg protein}$ で最大値であった。PAHs 暴露マダイの赤血球の小核及び核異常出現率は、対照区に対して有意な増加を示しており、PAHs の genotoxicity が示唆されるとともに、魚類赤血球の小核及び核異常が化学物質の genotoxicity の biomarker として有用と考えられた。

以上の結果、PAHs の取り込み経路によってマダイ及びジャワメダカでは PAHs の蓄積傾向の異なることが明らかとなった。PAHs の低蓄積性及び EROD 誘導活性の低さからヒラメは指標生物として推奨できず、一方、PAHs の高蓄積性、EROD 誘導活性の高さ、赤血球の小核、核異常の高頻度出現などから、マダイ及びジャワメダカが指標生物として優れていることが明らかとなった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Joseph Orkuma CHEIKYULA
題 目	Main uptake route and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in some marine fishes. 魚類による石油由来多環芳香族炭化水素化合物の取り込み経路とその影響に関する研究

The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), red sea bream (*Pagrus major*), and Java medaka (*Oryzias javanicus*) were assessed for use in the biomonitoring of PAH pollution in Asian waters and laboratory ecotoxicology studies.

The Japanese flounders and red sea breams were exposed to two concentrations of water-borne PAHs and Java medaka to one, in flow-through systems for ten days. Red sea breams and Java medakas were further exposed to 2 concentrations of dietary PAHs for 14 days and seven days of depuration.

PAH accumulation and hepatic EROD activity induction were evaluated in all the fish species. In the red sea bream, SDH activity, LSI, micronuclei and other nuclear abnormalities (MN&NA) formation were further assessed for liver hepatotoxicity, general pollution stress, and genotoxicity respectively.

Japanese flounder water exposures were 2.49, 3.19, 4.27, and 0.99 $\mu\text{g/L}$ for phenanthrene, pyrene, chrysene, and B[a]P respectively, and 7.87, 10.4, 12.7, 3.42 $\mu\text{g/L}$ for the low and high concentration exposures respectively. The red sea bream exposures were 3.01, 2.97, 2.13, and 1.28 $\mu\text{g/L}$ for phenanthrene, pyrene, chrysene, and B[a]P, respectively, and 2.77, 3.11, 9.04, 1.17 $\mu\text{g/L}$ for the low and high concentration exposures respectively. Water PAH concentrations in the Java medaka exposure were 2.01, 3.83, 6.23, and 1.37 $\mu\text{g/L}$ for phenanthrene, pyrene, chrysene, and B[a]P respectively.

Fish PAH accumulations were species-specific and significantly different from control. In the water-borne exposures, Japanese flounder accumulated only phenanthrene and pyrene with highest whole body total PAH concentrations (TPAH) of 180 ± 108 , and 397 ± 230 ng/g (w.w.) on days 2 and 5 in the low and high concentration exposures respectively. The red sea bream also did not accumulate B[a]P but accumulated the other three PAHs with highest TPAH of 572 ± 305 and 572 ± 350 ng/g (w.w.) on days 10. Java medaka accumulated all PAHs with highest TPAH of 388 ± 109 ng/g (w.w.) on day 2. The dominant accumulated PAH in all species was phenanthrene.

In the dietary exposure, all test PAHs were detected in the red sea bream and Java medaka with highest TPAH on day 2 in both. PAHs were detected in the depuration period, but not B[a]P. The dominant PAH was chrysene now in the Java medaka, but it was still phenanthrene in red sea bream.

All exposure EROD activity inductions were significantly higher than controls; Japanese flounder had the lowest EROD activity of 0.18 ± 0.1 nmol/min/mg protein while Java medaka had the highest EROD in both exposures with the highest induction of 4.2 ± 2.8 nmol/min/mg protein in the water-borne exposure. PAH uptake route did not affect EROD induction in all species. Significantly higher than control erythrocytic MN&NA formations were confirmed in the red sea bream from both water- and dietary-borne PAH exposures.

This study has concluded that uptake route affects PAH uptake in the red sea bream and Java medaka. The two species are recommended for their high PAH accumulation and high EROD induction, and susceptibility of red sea bream to MN&NA formation. The Japanese flounder is not recommended for biomonitoring because of its low EROD induction and low PAH bioaccumulation.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	ジョセフ・オルクマ・チェイキュラ Joseph Orkuma CHEIKYULA
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 野呂 忠秀
	副査 宮崎 大学・教授 幡手 英雄
	副査 鹿児島大学・教授 板倉 隆夫
	副査 佐賀 大学・講師 上野 大介
審査協力者	
題 目	魚類による石油由来多環芳香族炭化水素化合物の取り込み経路とその影響に関する研究 Main uptake route and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in some marine fishes.
<p>研究の目的は、石油汚染の指標物質である多環芳香族炭化水素化合物（PAHs）の、マダイ、ヒラメおよびジャワメダカ（東南アジア産汽水魚）による蓄積特性により、その環境汚染に対する指標生物として適性を評価すると共に、PAHsの魚類に対する毒性を評価することである。</p> <p>ヒラメを、水中濃度 2.49 及 7.87 $\mu\text{g/L}$ のフェナントレン（Phe）、3.19 及び 10.4 $\mu\text{g/L}$ のピレン（Pyr）、4.27 及び 12.7 $\mu\text{g/L}$ のクリセン（Chr）及び 0.99 及び 3.42 $\mu\text{g/L}$ のベンゾピレン（BaP）に、マダイを 3.01 及 2.77 $\mu\text{g/L}$ の Phe、2.97 及び 3.11 $\mu\text{g/L}$ の Pyr、2.13 及び 9.04 $\mu\text{g/L}$ の Chr 及び 1.28 及び 1.17 $\mu\text{g/L}$ の BaP に、それぞれ流水条件で 10 日間暴露した。同様にジャワメダカを、水中濃度 2.01 $\mu\text{g/L}$ の Phe、3.83 $\mu\text{g/L}$ の Pyr、6.23 $\mu\text{g/L}$ の Chr 及び 1.37 $\mu\text{g/L}$ の BaP に流水条件で 10 日間暴露した。また、マダイ及びジャワメダカについては、餌投与による上記 4PAHs への暴露を 14 日間、7 日間の排泄実験も実施し、魚類 PAHs 蓄積特性の暴露経路による差も検討した。</p> <p>水暴露の場合、いずれの魚種とも体内PAH濃度は、Pheが最も高い値を示した。ヒラメ</p>	

の総 PAHs 濃度最大値は、 180 ± 108 ng/g w.w. (2 日目) 及び 397 ± 230 ng/g w.w. (5 日目) であり、マダイでは 572 ± 305 ng/g w.w. (10 日目) 及び 572 ± 350 ng/g w.w. (10 日目)、ジャワメダカでは 388 ± 109 ng/g w.w. (2 日目)であった。ヒラメでは Phe 及び Pyr、マダイでは Phe、Pyr と低濃度の Chr の蓄積が認められたが、BaP の蓄積は認められなかった。一方、ジャワメダカでは 4 種の PAH の蓄積が認められた。ヒラメ及びジャワメダカの PAHs 蓄積濃度は、暴露期間経過と伴い低下したが、マダイでは増大を示した。

餌暴露の場合、マダイ、ジャワメダカとも 2 日目に体内 PAHs 濃度の最大値を示した。両魚種とも 4 つの PAH すべてを蓄積し、マダイでは Phe が、ジャワメダカでは Chr が 4PAH の中で最大値を示した。

PAHs の取り込み経路による EROD 活性誘導に差は認められず、水暴露ヒラメの EROD 活性は 0.18 ± 0.1 nmol/min/mg protein で、3 魚種で最も低い値であり、ジャワメダカでは 4.2 ± 2.8 nmol/min/mg protein で最大値であった。PAHs 暴露マダイの赤血球の小核及び核異常出現率は、対照区に対して有意な増加を示しており、PAHs の genotoxicity が示唆されるとともに、魚類赤血球の小核及び核異常が化学物質の genotoxicity の biomarker として有用と考えられた。

以上の結果、PAHs の取り込み経路によってマダイ及びジャワメダカでは PAHs の蓄積傾向の異なることが明らかとなった。PAHs の低蓄積性及び EROD 誘導活性の低さからヒラメは指標生物として推奨できず、一方、PAHs の高蓄積性、EROD 誘導活性の高さ、赤血球の小核、核異常の高頻度出現などから、マダイ及びジャワメダカが指標生物として優れていることが明らかとなった。これらの成果は、今後の石油汚染生態影響評価の研究に大きく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。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	ジョセフ・オルクマ・チェイキュラ Joseph Orkuma CHEIKYULA
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 野呂 忠秀
	副査 宮崎 大学・教授 幡手 英雄
	副査 鹿児島大学・教授 板倉 隆夫
	副査 佐賀 大学・講師 上野 大介
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月7日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査及び副査の5名は、平成21年1月7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>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（水産）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	ジョセフ・オルクマ・チェイキュラ Joseph Orkuma CHEIKYULA
<p>[質問1] 飼育水による PAHs 暴露方法について、どのように実施したのか、説明してほしい。</p> <p>[回答1] 試験は流水式暴露で実施した。溶媒に溶解した PAHs を、定量ポンプで一定流量の海水に添加して濃度を一定に保った。</p> <p>[質問2] 脂質含量と PAHs 蓄積量の相関は検討したのか。</p> <p>[回答2] 種内での検討は行わなかった。これは個々の脂質含量を測定していないので、固体別の PAHs と脂質含量との相関を取ることはできなかった。しかし、発表にもあったように、魚種間では、脂質含量の多い魚種に高い PAHs 蓄積量が認められており、PAHs 蓄積に生物の脂質含量が重要な因子となることは明らかと考えている。</p> <p>[質問3] 3 魚種を使った理由は何か。</p> <p>[回答3] アジアに生息している魚種の中から試験魚として 3 魚種を選択した。マダイはの本を代表する海産魚であり、化学物質に対する感受性の高いことが知られている。ヒラメは底層付近に生息し、底質の影響を受ける魚種として選択した。ジャワメダカは東南アジアに生息する汽水魚として選択した。</p> <p>[質問4] PAHs の水からの生物濃縮係数 (Bioconcentration factor, BCF)、餌からの生物濃縮係数 (Biomagnification factor, BMF) は計算したのか。</p> <p>[回答4] 計算した。BCF の場合、蓄積量が低下あるいは上昇したため、一定した蓄積量が得られなかったため敢えて示さなかった。BMF の場合、その値が 0.001 未満という著しく小さい値であったため、これも敢えて示さなかった。</p> <p>[質問5] 水暴露では PAHs 蓄積量が増加したのに対し、餌暴露をした場合、マダイ PAHs 蓄積量が低下したのはなぜか。</p> <p>[回答5] 水暴露の場合、マダイは鰓を通過する海水に常時さらされているため、常時 PAHs を鰓から摂取している。一方、餌暴露の場合、摂餌した時のみ PAHs に暴露されており、それ以外の時は PAHs を排泄しているため、餌暴露をしたマダイ PAHs 蓄積量が低下したものと考えている。</p> <p>[質問6] 質問ではなくコメントであるが、略語が多いので、論文を読む人の助けとなるよう尾、巻末に略語リストを付けてほしい。</p> <p>[回答6] リストを巻末に追加する。</p>	