アクアリウムを用いた生態系に対する排水の安全性評価に関する研究

土井 麻記子*
深 津 和 彦*

高 村 嘉 幸*
鴻 野 雅 一**

Assessment of Safety of Water Discharged in Circumference Ecosystem Using Medaka in an Aquarium System

Makiko DOI*, Yoshiyuki TAKAMURA*
Kazuhiko FUKATSU* and Masakazu KONO**

* Department of Environmental and Symbiotic Science, Prefectural University of Kumamoto, Tsukide 3-1-100, Kumamoto 862-8502, Japan

** BioRangers, Inc., Chiyoda-ku, Iwamotochou 2-1-17, Tokyo 101-0032, Japan

Abstract

An economical and simple method of evaluating the impact of water discharged into natural ecosystems was examined using an ecosystem model. An ecosystem model containing medaka and water grass (*Egeria densa*) was prepared. The three water types used were underground water polluted with volatile organic compounds (VOCs) including trichloroethylene, and diluted with tap water; effluent water that was treated with a biological treatment system; and tap water. Spawning and hatching, maintained hepato-somatic index (HSI), gonad somatic index (GSI) and concentration of vitellogenin (VTG) were monitored. The polluted water, the spawning and hatching of medaka were normal, but the growth of the water grass was restricted although trichloroethylene had been volatilized by pumping air through the water. In contrast, fish that were held in aquarium that contained treated water appeared almost the same as fish bred in tap water, exhibiting no abnormalities in spawning, hatching, or growth. In addition, water grass did not degenerate in such an environment. The areas for improvement of this evaluation method were identified. It is not yet known which types of water are the best controls for the tests.

Key words : medaka, safety assessment, aqua culture, trichloroethylene, biological treatment

1. はじめに

近年、土壌・地下水汚染の問題が顕在化しており、2003年に施行された「土壌汚染対策法」により、浄化等の対策が土地所有者等に対し義務づけられることになった。このため、汚染土壌や地下水汚染を浄化するための技術開発が行われると共に、処理された汚染水や土壌が、実際に生態系に排出された場合の安全性を評価する方法等が社会的にも強く求められてきている。

我が国では、1970年に制定された水質汚濁防止法において、環境基準を「人の健康を保護し、および生活環境を保全するうえで維持されることが望ましい基準」と明記しているように、生態系の保全の観点よりも、人にとって衛生的な環境という観点から水質規制が行われてきた。その後、1993年に環境基本法が制定され、水質から水環境全体へと保全の対象が広がった。現在、生態系への長期に渡る影響を迅速簡便に評価する環境影響評価手法の検討がすすめられている¹⁾。OECD（経済開発協力機構）では生態系保全の観点からの有害物質管理が強化され、化学品の有害性を評価するための試験法として「テストガ

イドライン」が作成されている。これらは、魚類、藻類、甲殻類、鳥類、底性無脊椎動物など、単一の生物種を用いて化学物質の毒性評価を行うものであるが、稲森ら²⁾は、複数の生物種による生態系モデルを用いた生態影響評価手法の重要性について言及し、単一の生物種による評価で化学物質の生態系への影響を判断するには限界があるまとめている。また、多種生物系試験の必要性はOECDにおいても理解されているものの、多種生物を用いた試験の予測不確実性、試験生物から人体への外挿の困難性、時間やコスト面での不経済性から、評価方法が十分に確立されていないのが現状である³⁾。このように、化学物質管理を行う上での評価方法が模索されているのが現状であるが、リスクコミュニケーションを行うにあたっては予防的な見地から専門家以外の一般市民にも分かりやすく生態系における排水の安全性を示すことが急務な課題となっている。そこで、筆者らは、砂利、水草、エアレーションを設置したアクアリウム水槽を生態系モデルとして用いた生態系における排水の安全性を経済的で簡便に評価する方法の確立を目指して検討を行った。水槽内の生

* 熊本県立大学環境共生学部 〒862-8502 熊本市月出3-1-100

** 株式会社バイオレンジャーズ 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2-1-17 宮中ビル7F

物には、ヒメダカを用いた。ヒメダカは、OECDの魚類の初期生活段階試験(TG210)において、化学物質の慢性的な影響を捕らえることを目的として用いる魚種となっており、科学的知見が豊富かつ日本人に馴染みの深い魚でもある。飼育水には、揮発性有機化合物等で複合汚染された地下水を微生物製剤で処理して得られた排水（以後処理水という）を用いた。本研究では、ヒメダカの生育と生育個体の再生産能力が健全であることを安全性の指標として試験を行った。ヒメダカの孵化仔魚をアクアリウム水槽内で成魚になるまで飼育し、雌雄比、外観の異常、生存率、そして、生育個体の再生産安定性を確認するために、全ての生存個体についてペアリング試験を行い、産卵数、受精率、孵化率、孵化仔魚の体型異常の有無について調査した。その後解剖を行い、体重、肝臓体指数(HSI)、生殖腺体指数(GSI)、ビテロジェニン(VTG)測定などの生化学試験も行った。

2. 方法

2.1 実験条件

1) 汚染水と処理水：汚染水は、油や揮発性有機化合物によって複合汚染された地下水を用いた。処理水は、汚染水を油や揮発性有機塩素化合物に優れた分解作用を持つ複数の天然微生物によって構成された複合微生物製剤(オッペンハイマー・TCE・フォーミュラ：米国オッペンハイマー・バイオテクノロジー社製)と、微生物の分解能力を最大限に発揮する装置を組み合わせたバイオリアクターシステムで処理したものである。

2) 試料水水質：試験には、「処理水」、処理前の試料である複合汚染水を水道水で希釈した「希釈汚染水」および、希釈に用いた「水道水」を試料水として用いた。試料水中の有機塩素化合物等の濃度はTable 1に示すとおりであり、定量分析はJIS K 0125 5.2に準じてを行った。複合汚染水の主要な汚染物質はトリクロロエチレン(TCE)であるが、実験開始時の「処理水」のTCE濃度は $0.008\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、「希釈汚染水」のTCE濃度は、 $0.64\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ である。複数の汚染物質のうち、濃度の高かったTCEについて水槽内における実験開始後の汚染物質の揮発状況の経時変化を、ガス検知管を用いて追跡調査した。

3) 水槽管理：砂利(層厚2cm)、アナカリス(*Egeria densa*)と巻貝を入れ、エアレーションを設置した10L水槽を、試料水毎に4槽設け(4槽×3試験区で全12槽)、各槽15匹のメダカを仔魚時から成魚になるまで、止水式で約3ヶ月間飼育した。餌は水槽内で飼育直後から約2週間は仔魚用の餌(パピイ, Kyorin Co. Ltd.)とアルテミア・ノウプリウスを与え、以後は成魚用の餌(めだかのえさ, Kyorin Co. Ltd.)とアルテミア・ノウプリウスをいずれも1日2～3回適量を与えて飼育した。

2.2 試験方法

1) 急性致死毒性試験：汚染水、処理水、水道水について急性致死毒性試験を行った。200mLのガラスビーカーに試料水を100mL、生後10から14日間までの稚魚を15尾ずつ入れ、各試料水毎に3回、合計45尾を試験した。試験では96時間継続し、試験開始から24時間おきに死魚数を

記録し、死魚はその都度除去した。試験期間中は試料水の入れ替えや給餌は行わなかった。汚染水は100%濃度での試験のほか、0, 10, 20, 40および80%の希釈系列を設けた。希釈水には、対照水での生存率を高めるために、人工海水を10倍希釈した塩類溶液を用いた。各試料における生存率は、各濃度段階で供した45尾の稚魚を合計した結果から生存率を算出し、供試個体数と生存率から95%信頼区間を推定している。また、結果をプロビット解析し、半数致死濃度を求めた。

2) 産卵試験：成育試験開始後、約75～100日間(2.5～3ヶ月)の間に産卵試験を行った。生き残った全個体について試料水毎に雌1個体と雄1個体のペアをつくり、活性炭ろ過水道水1Lを入れたビーカーで7日間試験した。また、各試料水のメダカを同時に産卵試験する事が困難であったため、試料水毎に1週間、通算約3週間かけて全試験を行った。産卵試験は、「水道水」から開始し、「希釈汚染水」、「処理水」の順で試験した。産卵試験中の7日間も水槽内の飼育期間と同じように、1日3回ビーカー内に適量を給餌し、ビーカー内の水は毎日全量入れ替えた。そして、7日間の飼育期間中における産卵数、受精率、その後の孵化率・孵化日数を毎日調べた。採取した卵は、蒸留水をいれた6cmプラスチックシャーレ内で、指の腹で付着糸を除去しながら洗浄した。同時に産卵数と未受精卵数を確認し、未受精卵はピンセットで取り除いた。ここで得られた受精卵は、9cmプラスチックシャーレに約18mLの蒸留水を入れ、 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調節した恒温器で孵化させた。また、光周期は明期16時間・暗期8時間とした。孵化までの10日間前後は、試料水入れ替え、シャーレ交換を毎日実施した。

3) 生理学的試験：産卵試験終了後、メダカを解剖し、生殖腺体指数、肝体指数、血漿中のVTG濃度を定量した。血漿中のVTG濃度は、血液から血漿を上清分離し、メダカVTG測定用アッセイキット(Amasham EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system)を用いて測定した。

4) 再現試験：希釈汚染水で見られた現象について、再現試験を行った。再現試験では、砂利や水草等の条件は先行して行った実験と同条件とした。希釈汚染水1槽、処理水2槽を設け、各槽15尾の稚魚を入れ、成魚になるまで約3ヶ月飼育した。その後、希釈汚染水槽で成長したメダカと、処理水槽2槽の内1槽で成長したメダカを入れ替え、残りの処理水槽1槽のメダカは入れ替えなしとし、1ヶ月後に生じた体重変化を調査した。

3. 結果

3.1 水質変化

各試料水の揮発性有機化合物および分析結果をTable 1に示す。実験開始後の希釈汚染水槽におけるTCE濃度(Fig. 1)は、エアレーション開始とともに低下し、12時間後にはN.D.を示した。TCEは比重が高いため、水槽の砂利間隙(砂利層)に滞留している可能性が考えられたので、砂利層のTCE濃度変動を調査した。その結果、水中の濃度低下に伴い、砂利間隙水中のTCE濃度も低下しており、本実験条件において砂利層部位間のばらつきは認

Table 1 The levels of organic material in water samples

	Units	Effluent	Influent	Tap water
Dichloromethane	mg · l ⁻¹	0.004	0.051	<0.002
Carbon Tetrachloride	mg · l ⁻¹	<0.0002	<0.0002	<0.0002
1,2-Dichloroethane	mg · l ⁻¹	0.0006	0.0023	<0.0004
1,1-Dichloroethylene	mg · l ⁻¹	<0.002	<0.002	<0.002
Cis-1,2-Dichloroethylene	mg · l ⁻¹	0.022	0.56	<0.004
1,1,1-Trichloroethane	mg · l ⁻¹	<0.0005	0.01	<0.0005
1,1,2-Trichloroethane	mg · l ⁻¹	<0.0006	0.001	<0.0006
Trichloroethylene	mg · l ⁻¹	0.008	0.64	<0.002
Tetrachloroethane	mg · l ⁻¹	<0.0005	<0.0005	<0.0005
1,3-Dichloropropene	mg · l ⁻¹	<0.0002	<0.0002	<0.0002
Benzene	mg · l ⁻¹	<0.001	<0.001	<0.001
Toluene	mg · l ⁻¹	<0.001	<0.001	<0.001
Xylene	mg · l ⁻¹	<0.001	<0.001	<0.001
Ethylbenzen	mg · l ⁻¹	<0.002	<0.002	<0.002
Vinylchloride	mg · l ⁻¹	<0.002	<0.002	<0.002
TOC	mg · l ⁻¹	2	3	<1
TOC (soluble)	mg · l ⁻¹	2	3	<1

Influent: The VOCs polluting the groundwater were diluted with tap water

Figure 1 Change in the trichloroethylene concentration in the experimental aquarium. The values were measured using a trichloroethylene detector tube.

Table 2 Survival rate (96 h) of juvenile medaka exposed to water samples.

Sample water	Conc. (%)	Number of deaths	Survival rates (%)
Influent (VOCs polluted under ground water/ artificial sea water are diluted 10 times by tap water)	0	0	100 ± 0.0
	20	1	98 ± 4.3
	40	4	91 ± 8.3
	60	36	20 ± 11.7
	80	45	0 ± 0.0
	100	45	0 ± 0.0
Effluent	100	4	91 ± 8.3
Tap water	100	5	89 ± 9.2

The values in parentheses are the 95% confidence limits.

められなかった。

3.2 急性致死毒性試験と孵化試験

稚魚の急性致死毒性試験の結果をTable 2に示す。希釈前の汚染水における96時間後の半数致死濃度LD₅₀は汚染水の割合で56%であった。また、処理水、水道水における急性致死毒性は認められなかった。

3.3 生存率、性比

各試料水で飼育したメダカの生存率と性比をTable 3に示す。処理水槽よりも水道水槽の生存率が低い値を示したが、この両者に有意差は認められなかった ($p>0.05$, G-test)。一方、希釈汚染水槽での生存率は62%と低い値を示し、他の2槽での生存率と比較すると有意差が認められた ($p<0.05$, G-test)。生存個体における雌雄比は、処理水槽、希釈汚染水槽ではほぼ1対1であるのに対し、水道水槽で

Table 3 Survival and sex ratio of 60 medaka 4 months after hatching

Sample	Number of females	Number of males	Total Number of medaka	Survival rate (%)
Effluent	24	26	50	83.3
Influent	19	18	37	61.7
Tap water	18	29	47	78.3

Table 4 Reproduction test of medaka for 7 days

Water sample	Number of Pairs	Fecundity (The number of eggs/day/spawning)	Fertility (%)	Hatchability (%)
Effluent	26	14.2 ± 1.3	89.9 ± 2.2	95.0 ± 1.2
Influent	19	16.7 ± 2.8	84.6 ± 3.1	88.1 ± 5.9
Tap water	29	18.7 ± 0.9	90.2 ± 3.4	94.4 ± 2.6

The values in parentheses are the standard deviation of the mean.

は雄が雌よりも11尾多く、雌雄比は1対1.6であり、雄の比率が高かった。しかし、雌雄比を検定した結果、すべての試料水において雌雄比1対1との有意差は認められなかった (2 × 2 test)。

3.4 産卵能力

Table 4に、一回の産卵当たりの産卵数、受精率、孵化率の平均を示した。

1) 産卵数: 各群における、ペア毎の1回の産卵における産卵数平均は、槽ごとに有意差は認められなかった ($p>0.05$, ANOVA test)。よってすべての試料水による飼育が、飼育後の産卵活動に与える影響はなかったことが確認できた。

2) 産卵日数: 試験したメダカの中で処理水槽のメダカだけに7日間で5~6日しか産卵しないペアが多くみられた。他の2群では、希釈汚染水槽では雌の1個体のみ1週間で4日間産卵が見られなかったが、水道水槽では、全ペアで1週間毎日産卵し続けた。

3) 受精率・孵化率: 受精率は、各試料水とも一般的に受精率(85%以上)レベルである。受精率の各槽平均は84~90%であり、各試料水間に有意差は認められなかった ($p>0.05$, ANOVA-test)。また、孵化率の各槽の平均は88~95%であり、こちらも各試料水間に有意差は認められなかった ($p>0.05$, ANOVA-test)。

3.5 解剖試験

希釈汚染水槽で飼育された個体の平均体重は、他の二つの試料よりも約30%重く、肝臓体指数(HSI)にも有意差が認められた(Table 5)。生殖腺は、オスでは各試料水の生殖腺体指数に有意な差はなかった。しかし、メスでは水道水槽が他の二槽と比較して有意に小さかった。解剖した生殖腺を観察すると、GSIの大きかった処理水槽と希釈汚染水槽には成熟した卵母細胞が認められたが、水道水槽のメスは卵母細胞は成熟しておらず、それが重量の差に反映されていたことが分かった。

VTG確認試験において微量なVTGの誘導を比較する場合、メスとの接触でVTGが誘導される危険を防ぐ為にオスとメスを別々に管理した状態にして初期VTG値を低下させたり、事前に高い個体群をイレギュラーとして用いないようにしたりする。今回の試験ではこのような操作は行わず自然状態で試験を行った。試験結果から、VTG

Table 5 Results of physiological test of Medaka

Sex	Water sample	n	Body weight (g)	Total length (mm)	HSI (%)	GSI (%)	VTG (ng/ml)
Male	Effluent	26	0.22 ± 0.03	25.0 ± 1.17	1.7 ± 0.40	1.2 ± 0.3	18.4 ± 16.0
	Influent	18	0.30 ± 0.04*	29.6 ± 2.92	2.2 ± 0.66*	1.0 ± 0.36	12.3 ± 11.4
	Tap water	29	0.23 ± 0.03	25.3 ± 1.37	1.5 ± 0.70	1.0 ± 0.4	13.8 ± 15.0
Female	Effluent	24	0.26 ± 0.04	30.1 ± 1.39	2.6 ± 0.90	8.5 ± 4.34*	
	Influent	19	0.32 ± 0.04*	31.5 ± 1.71	3.6 ± 1.11*	8.2 ± 4.00*	
	Tap water	18	0.27 ± 0.04	30.4 ± 1.67	2.8 ± 0.70	4.6 ± 1.80	

*: $p < 0.05$ Tukey-Kramer *post hoc* test, significant difference compared with other fish groups

濃度が $10 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1}$ 以上の個体も確認されたが、メス個体の VTG 濃度 (約 10^2 から 10^3) に匹敵するほど高い VTG 濃度を示す個体はなかった。

3.6 槽内環境

飼育開始時からの約3ヶ月間において、水槽内に 10/ 入れた試料水の水量は徐々に減少していき途中で同じ試料水を追加していたが補充分の各試料水が足りなくなり、最終的には半分以下の 4 L 程度まで減少した。

水道水槽と処理水槽において、試料水の外観は、槽内のメダカが外から確認されないほど緑色に変化した。しかし希釈汚染水の槽内は、1ヶ月半経過時にはやや緑色に変化した。試験終了時には水槽の奥にいるメダカをはっきり確認できる程度まで、透明度が回復していった。アナカリスは、水道水槽と処理水槽で、実験開始当初の2倍以上に繁茂した。

一方、希釈汚染水槽ではアナカリスの成長が見られず、枯渇したかのようにであった。飼育終了時には飼育開始時とほぼ同じ大きさであった。また、開始約一ヶ月後には、槽内を黒い藻が覆うという現象が確認されたが、この現象は水道水槽、希釈汚染水槽では見られなかった。この黒藻は、水槽に薄くはり付いており、飼育終了時に藻に触ると簡単に剥がれるものであった。この黒藻を実態顕微鏡により観察したところ、ネンジュモ (*Nostocales anavaena*) を主体としたラン藻類で構成される生物膜であることが分かった。希釈汚染水槽のメダカは頻繁に黒藻を啄んでいた。

3.7 再現試験

追試験においても、ネンジュモの発生と成長促進が再現よく繰り返された。生後3ヶ月目の体重は、希釈汚染水槽での体重が処理水の二槽と比較して有意に重かった (Table 6)。希釈汚染水槽のメダカと処理水槽のうち一槽のメダカを入れ替えて3ヶ月目から4ヶ月目までの1ヶ月間、その体重増加を測定したところ希釈汚染水槽から処理水槽に移動させたメダカの体重は入れ替える前と比較してあまり変化しなかった。一方、処理水槽から希釈汚染水槽に入れ替えたメダカの体重は大きく増加し、入れ替えを行わなかったものと比較して有意差が認められた ($p < 0.05$, Turkey-kramer, *post hoc*-test) (Fig. 2)。

4. 考察

4.1 希釈汚染水とメダカの生育・水槽環境の変化

希釈汚染水は、揮発性有機化合物によって複合的に汚染されていたものである。メダカ稚魚への急性致死毒性は認められなかったが、飼育における稚魚時の生存率

Table 6 Three-month-old medaka allowed to grow for one month in the reappearance test

Medaka group name		A	B	C
Survival rate(%), (n)		53.3 (8)	86.7 (13)	80.0 (12)
3 months old	Water sample	Effluent 1	Effluent 2	Influent
	Body weight			*
	Mean $\pm$ S.D.(g)	0.140 $\pm$ 0.04	0.114 $\pm$ 0.03	0.177 $\pm$ 0.03
4 months old	Water sample	Effluent 1	Influent	Effluent 2
	Body weight		**	
	Mean $\pm$ S.D.(g)	0.159 $\pm$ 0.03	0.198 $\pm$ 0.04	0.185 $\pm$ 0.04

*: $p < 0.05$ Significant differences between A and C and between B and C

**: $p < 0.05$ Significant difference between A and B

All the results were compared using the Tukey-Kramer, *post hoc* test

Figure 2 Three-month-old medaka allowed to grow for one month in (A) effluent water, (B) transferred to influent from effluent, or (C) transferred to effluent from influent. The bars indicate the S.D. of the mean.

が、他の水槽と比較して有意に低くなった。しかし、生存した個体は、他の水槽よりも早く、大きく成長し、再生産能力も正常であった。

水槽設置当初、希釈汚染水槽での、エアレーションによる揮発性有機化合物の揮発状況を、TCE濃度を指標として測定したところ、エアレーション開始後から急激に濃度が低下し、12時間後には定量下限値を下回る値となった。従って、他の揮発性有機化合物のほとんどがTCEと同様に揮発したものと考えられた。水槽の管理は止水式であり、新たな汚染物質の流入がないため、当初の汚染物質の濃度は変化する。実験開始当初、エアレーションによる揮発・拡散の効果が大きいため、汚染物質は槽内環境に影響を与えないものと予想された。しかし、実際には実験開始一ヶ月後にはアナカリスの成長阻害がはっきりと観察された。アナカリスは、揮発性有機化合物が高濃度であったために阻害を受けたわけではなく、むしろ微量に残留した何らかの化学物質やその水槽内での代謝を通じた化学

物質の分解産物等によって影響を受けたことが推察された。

希釈汚染水槽では、アナカリスの成長阻害が起こると同時に、ネンジュモが増殖し、ネンジュモの成長は水槽の内壁および砂利層表面をすっかり覆うほどの勢いであった。ネンジュモはラン藻類の一種であり、ラン藻類は、富栄養状態の指標生物となっている。ネンジュモは、成長阻害を受けたアナカリスが栄養塩類を利用しなかったために、余剰となった栄養塩類を摂取して増殖していったものと考えられた。また、メダカは希釈汚染水槽で形成された水環境によって大きく成長した。その原因は、主に槽内に生えたネンジュモを食べることによって、他槽より餌が多く供給されることと考えられ、再現試験により確かめられた。

希釈汚染水によってもたらされた、上記のような環境条件のもと、ネンジュモの摂取によって成長が促進されたメダカのHSIは、処理水槽、水道水槽のメダカのHSIよりも高く、有意差が認められた。魚類のHSIは成長に伴って若干変動もする⁹⁾ため、槽毎のHSIを比較するに当たっては、体重が同程度のもの同士を比較する必要があるが、体重200mg～300mgの範囲にある個体だけを対象に再検定したところ、やはり希釈汚染水と水道水との間に有意差($p<0.05$, Turkey-kramer, *post hoc*-test)が認められた。HSIは、薬物代謝やホルモンの分泌が盛んな場合に増加することがあるが、必ずしも増加傾向と代謝活性が一致しないため指標性は低いようである⁹⁾。産卵試験、血漿中VTG濃度には異常はみられず、女性ホルモン様物質の影響でHSIの増加が生じたのではないことは分かった。しかし、HSIが増加した可能性については、成長段階の違いによるものと、汚染物質代謝の活発化によるものとふた通り考えられ、メダカへの悪影響であると断定することは難しい。

4.2 生殖腺の成熟と疲労および水質の関係

産卵試験において、処理水槽のメダカにおける産卵日数が少なかった原因としては、雌の産卵期が初期の頃であり、産卵のピークに達していなかったことが考えられる。道家⁶⁾は、メダカは、同一条件で飼育したとしても、すべての個体が同じ大きさには成長せず、個体に大小が生じるので、産卵試験等を行う場合は体の大きさが同程度の個体を選ぶほうが適当であると報告している。つまり、産卵のピークは生後の齢期よりも成長具合に左右される。

また、今回の試験を通じて、試料水の違いによって、形成される環境が異なれば、成長速度が異なることが分かった。また、生存率の違いによって密度効果が働けば、さらに個体にばらつきがでることになる。産卵試験を行った時、処理水槽のメダカは、まだ産卵初期であり、十分成熟期に達しておらず、その差が産卵日数に反映されたものと考えられる。

次に、水道水槽のメダカにおいて、解剖時点でのGSIが他の2槽と比較して有意に低かった点について述べる。実験水槽はメダカの生殖内分泌機能が疲労しやすく、GSIの低下が起きやすい環境にあったと考えられる。なぜなら、羽生⁷⁾によると、「雌メダカの生殖内分泌機能は疲労しや

すい」という事が実験結果より得られており、そのメカニズムとして、温度の影響があるとされているためである。今回の試験で、実験室の気温は、メダカが活発に活動するとされる温度域の25℃に管理されており、水温も、約23～24℃で保たれていたが、この温度は、羽生⁷⁾による実験において高温域であることが記されている。希釈汚染水槽、処理水槽においてGSIの低下が生じなかった原因は不明であるが、水道水槽のメダカは、産卵試験を最初に実施しており、解剖までの待ち時間が3試料のうち最も長く、ペアリングによる産卵試験での産卵促進の影響があり、そのストレスが疲労につながったことで、GSI低下が最も早く現れたと考えられる。希釈汚染水・処理水槽のメダカでも解剖時期をさらに延ばせば、水道水槽のメダカと同様にGSIが低下するものと考えられる。

4.3 処理水の評価

いずれの試料水においてもメダカの生育に対する化学物質の影響と思われる現象は、認められなかったものの、希釈汚染水におけるメダカのHSIの増加は、肝臓に負担を与えたものとも推察され、次世代の継続的な試験を通して世代を経た影響についても確認し、処理水飼育での結果と照らし合わせて評価しておく必要があると考えられる。一方、処理水は希釈汚染水で生じたような影響を及ぼさなかった。つまり、微生物製剤による処理は希釈やエアレーションだけの処理とは異なり、アナカリスに成長阻害を及ぼした物質を残存させることなく処理し、水道水と同程度の水槽環境を維持させる水質へと改善させたとと言える。微生物製剤は希釈汚染水を適切に処理し、排水が野外環境中へ排出された後、人の生活水である水道水と同程度に、生物に影響を与えない水質であることが予測された。また、揮発処理による汚染物質の濃度低下は結果として大気中に拡散させていることであり、水中に保持した状態で微生物処理するほうが適切に汚染物質を処置できるものと考えられる。

4.4 試験条件の改良点

1) 産卵試験：今回の試験において、試料水の違いによって形成される環境が異なり、それによってメダカの成長速度や成長個体の大きさも左右された。成熟具合によって、産卵数や毎日産卵の調子が異なれば、対照との比較の意味合いも低くなる。したがって、産卵試験の方法は、ペアリングではなく、個体群（ひと水槽）からの一定量の採卵、その卵の孵化試験（孵化数、孵化率、孵化後の体型異常の有無）という方法が妥当であると考えられる。この方法は、ペアリング試験と比較して、産卵試験における人的労力が軽減される上に、産卵試験での飼育水として、水槽内の水を用いることができ、より実際的な結果を反映させることができる。また、実験環境におけるメダカへのストレスを軽減できると考えられる。

2) 生態系モデル水槽：水道水、処理水槽において、試験後期に植物プランクトンの増殖があり、槽内が濃い緑色となった。アナカリスが繁殖しているにもかかわらず、水道水、処理水槽において植物プランクトンが大発生した、その背景として、アナカリスによって消費しきれない

栄養塩類が水中に存在していたことが示唆された。今回の試験条件である、砂利層厚が2cm程度では、試験期間中の砂利層において水中の廃棄物が十分に保持されなかったと考えられる。試験に必要な期間は、メダカが生育し、産卵が本格化するまでの約3ヶ月間であり、その試験期間中において発生する廃棄物が保持されるだけの十分な量の砂利の敷設や濾過機能の付与が必要であった。砂利層の設置に関しては、量、質、設置方法ともに、今後様々な知見を元に比較検討し、改良する余地がある。実験槽であるアクアリウム水槽への濾過機能の付与によって、新たに生態系の形成を評価することもできるようになると考えられる。

3) 対照水：生育試験では水道水飼育において高い生存率が得られたが、同じ場所の水道水を用いた場合でも毎回の試験で高い生存率が得られるとはかぎらない。水道水はメダカにとっての地域差が大きく、水源の違いによっても水質に違いがある。これらは親の産卵期の違いによるメダカの外的環境に対する抵抗力の違い、水源の違いによる卵の疾病の有無⁸⁻⁹⁾等、未解明要因が生存率に影響していると考えられる。各地域の水道水を用いたメダカの飼育は、経験に基づいた対応が行われているものの、比較するために調査された事例はない。生態系評価を行うに当たっては、どんな水を対照として用いるのが適当であるかや水道水をコントロールとして用いる場合の留意点について、実施場所や比較対照をふまえ、評価目的に応じた検討を行う必要があるだろう。

4) 生存率：排水をアクアリウムで試験するに当たって、その水質は時間の経過とともに水槽内で変化していると考えられる。水槽内の環境が対照水と同等に形成されれば、排水の水質は水槽内で回復可能なレベルであるということも示すことになる。従って、生存率の評価に当たっては、実験開始初期には生存率が低下するような水質であっても生存個体の健康や適応度の観点からの評価も踏まえた考察を行う必要があると考えられた。

5. まとめ

1) アクアリウム水槽を用いた生育試験によって、希釈やエアレーションだけでは除去されない有害物質の影響が示された。

2) アクアリウム水槽を用いた生育試験によって、希釈やエアレーションでは除去されない有害物質が微生物処理によって除去されたことが示された。

3) 槽内環境の形成が、試料水毎のメダカの成長速度の違いとなって現われた。

4) メダカの HSI に認められた有意差は、成長速度の違いに伴う差とも、汚染物質代謝の活発化による差とも考えられ、汚染水によって悪影響があったと断定することはできなかった。

5) メダカの生育や再生産能力の確認だけでなく、水槽内に形成される環境やメダカ成長速度の比較によって生態系の機能や構造への影響を評価できることが示唆された。

6) 本研究を通して、アクアリウム水槽で試験する場合の適切な再生産能力の確認方法について知見が得られた。

7) 生育試験の対照水として、最も適切な水質について検討課題が残された。

謝 辞

本研究は、次世代埋立システム研究会で実施した処分場排水のモニタリングシステムの研究が基盤となっています。また、「平成13年度（補正予算）地域新生コンソーシアム研究開発事業」の助成を受けて実施しており、ここに記して感謝の意を表します。

（原稿受付 2003年12月18日）

（原稿受理 2004年3月4日）

参考文献

- 1) 福島悟, 畠山成久 (1998) 生物指標を用いた農薬等の有機物質の生態影響評価, 水のリスクアセスメント実務指針(土屋悦輝, 中室克彦, 酒井康行 編, サイエンスフォーラム, 390-400.
- 2) 稲森悠平, 高松良江, 須藤隆一 (1998) マイクロコズムによる生態系影響評価, 廃棄物学会誌, 9(2), 368-378.
- 3) 環境省 (2001) 生態系保全等に係る化学物質審査規制検討会 (第3回), 参考資料5 模擬生態系試験法について
- 4) 板沢靖男, 小栗幹郎, 田村保, 羽生功 (2000) 魚類生理学概論, 田村保 編, 恒星社厚生閣, 96.
- 5) 若林明子 (2000) 化学物質と生態毒性, 社団法人 産業環境管理協会, 220-221.
- 6) 道家信道 (1980) 実験動物としての魚類A現状とその問題点, 生態化学, 3(2), 51-53.
- 7) 羽生功 (1988) 魚類の成熟・産卵と光周期, 水産動物の日周運動, 羽生功, 田畑満生 編, 恒星社厚生閣, 63-78.
- 8) Makiko Doi and Tohru Takahashi (2003) Softening disease of medaka (*Oryzias latipes*) eggs as an indicator of water quality, IQHA08.
- 9) 田中麻記子, 高橋徹 (2002) ヒメダカ (*Oryzias latipes*) 卵の水道水曝露による卵膜軟化現象, 第13回廃棄物学会研究発表会講演論文集, 1051-1053.