

モツゴ (*Pseudorasbora parva*) における PAH 耐性とジェノタイプの関係

益永・中井&松田研究室 川瀬謙一

1. 緒言

化学物質の排出規制等によって人体に甚大な影響を与えるような水環境汚染は急激に減少した。しかしながら、生態系という観点からするといまだに回復例は少ない。そこで本研究室での先行研究¹⁾では、この原因として考えられる規制、未規制を問わない化学物質による慢性毒性、あるいは生息環境変化などのストレスの評価法として、遺伝的解析手法の一つである Amplified Fragment Length Polymorphism (以下、AFLP 法) を用いた評価手法の開発を行ってきた。具体的には AFLP 法により検出された DNA フラグメントの有無でモツゴ (*Pseudorasbora parva*) の個体群内の遺伝的多様性を比較し、主要ストレスを評価するというものである。そこで本研究では先行研究において主要ストレスとして抽出された PAH (多環芳香族炭化水素) の一つである Fluoranthene (以下、Flt) について (図 1)、遺伝的な型と Flt への耐性が実際に関係を有しているかを、急性毒性試験法を用い検討した。

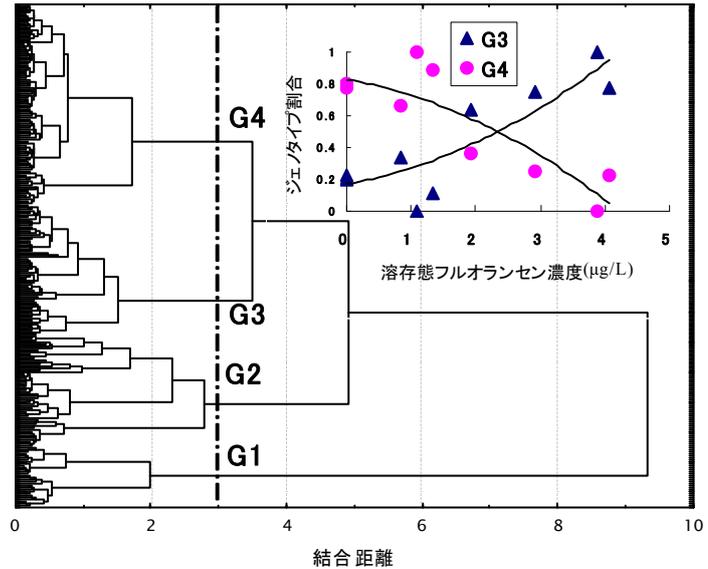


図 1 モツゴ DNA フラグメントのクラスター分析と溶存態 Flt 濃度とジェノタイプの割合

2. 実験および方法

2.1 供試魚および助剤: 供試魚であるモツゴは野川(東京都世田谷区)、および水元公園(東京都葛飾区)において採取し、研究室にて 2 週間馴化後、毒性試験に供した。なお、Flt を高濃度で暴露するため、助剤としてジメチルスルホキシドを用いた。

2.2 魚類急性毒性試験²⁾: OECD 化学テストガイドラインの TG 203 魚類急性毒性試験に準拠した方法で行ったが、モツゴは酸素不足に弱いためエアレーションを使用した。なお、予備試験の結果により、濃度区は 100、50、25、12.5、6.25mg/L の 5 濃度区と対照区を設定した。各濃度区とも供試魚 7 匹、48 時間で 1 度の水交換を行う半止水式、明暗比を 2:1 で行い、生息地が野川の供試魚で 2 反復、水元公園の供試魚で 3 反復行った。

2.3 AFLP 法: 毒性試験後にモツゴより採取した尾ヒレから DNA を抽出し、制限酵素処理、アダプターのライゲーション、予備増幅、選択的増幅を行い、DNA 多型を検出した。

2.4 半数致死濃度および遊泳障害半数影響濃度 (以下、LC₅₀、および EC₅₀): 対象が魚類であることからプロビット法を用いて求めた。

2.5 クラスター分析: AFLP 法によって得られた DNA フラグメントデータを本研究室の先行研究によって得られた図 1 のクラスター分析(ワード法、ユークリッド距離)の結果¹⁾ (結合距離 3.0 付近)に毒性試験を供したモツゴを一匹ずつあてはめることで、図 1 の 4 グループ(ジェノタイプ)のどれに属するかを同定した。

2.6 急性毒性試験: 毒性試験後にモツゴより採取した尾ヒレから DNA を抽出し、制限酵素処理、アダプターのライゲーション、予備増幅、選択的増幅を行い、DNA 多型を検出した。

2.7 半数致死濃度および遊泳障害半数影響濃度 (以下、LC₅₀、および EC₅₀): 対象が魚類であることからプロビット法を用いて求めた。

3. 結果と考察

3.1 個体群の Flt に対する耐性 Flt に対するモツゴの急性毒性試験の結果より、LC₅₀ および EC₅₀ を生息地別で求め、表 1 にまとめた。表 1 における野川、水元公園の 2 生息地間の LC₅₀ を比較すると有意な差を持って水元公園を生息地としていたモツゴが野川を生息地

としていたモツゴに比べ耐性が強いことが示された。また、EC₅₀においても同様の結果がみられた。

表 1 生息地別 Flt に対する LC₅₀、EC₅₀

3.2 ジェノタイプと耐性 次にクラスター分析を行い、モツゴを図 1 の G1~G4 に分類した。その結果を利用し、次の 2 つの関係を求めた。生息地ごとのジェノタイプ割合は生息地により違いがあることが分かった (図 2)。各生息地の特徴として、野川は各ジェノタイプが比較的類似した割合で存在しているのに対し、水元公園は G4 のみで大半を占めていた。ジェノタイプ別の LC₅₀ (G1 は個体数が少ないため除外) を表 2 に表した。結果として、Flt への耐性は強い方から順に G4、G3、G2 となった。ただし、尾ヒレの一部を切除することによる毒性試験への影響を考慮したため、毒性試験後、尾ヒレを切除し AFLP 法を行なった。このため事前にジェノタイプがわからず、ジェノタイプ別の検査個体数に偏りが生じた結果、得られた LC₅₀ に信頼性に問題が生じ有位差は得られなかった。

	野川産モツゴ	水元公園産モツゴ
LC ₅₀	20.3 mg/L	72.6 mg/L
95%上限信頼限界	29.1 mg/L	134.8 mg/L
95%下限信頼限界	13.4 mg/L	50.4 mg/L
母標準偏差	2.9 mg/L	3.3 mg/L
傾き	2.166	1.940
EC ₅₀	15.0 mg/L	29.9 mg/L
95%上限信頼限界	21.1 mg/L	44.7 mg/L
95%下限信頼限界	9.5 mg/L	20.9 mg/L
母標準偏差	2.7 mg/L	3.7 mg/L
傾き	2.281	1.743

以上の結果 (図 2 および表 2) より、生息地別の LC₅₀ において差が生じている現象は G4 が個体群において占める割合の大小によっていることが示唆された。

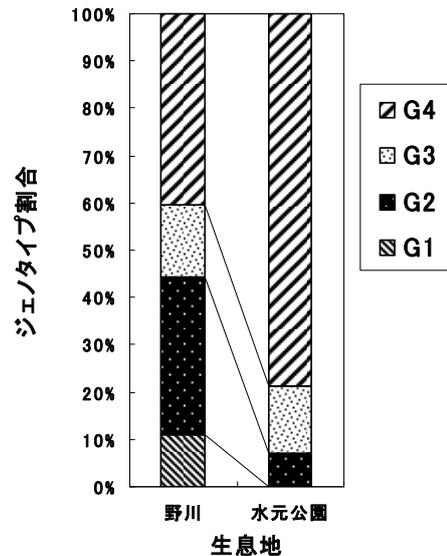


図 2 生息地別ジェノタイプ割合

3.3 考察と課題 生息地間の Flt に対する耐性の違いはジェノタイプによって説明できる可能性が示された。しかし、残念ながら先行研究で得られた各生息地における溶存態 Flt 濃度とジェノタイプ比 (G3:G4) の関係 (図 1 右上) で見られた傾向と、今回の

表 2 ジェノタイプ別 LC₅₀

モツゴ	LC ₅₀	個体数	95%上限信頼限界	95%下限信頼限界
G2	18.2 mg/L	27	42.0 mg/L	0.1 mg/L
G3	37.2 mg/L	11		
G4	69.3 mg/L	37	285.3 mg/L	40.2 mg/L

毒性試験を利用した結果で見られた傾向との間で、一致した関係性は見られなかった。その理由としては Flt の慢性影響がジェノタイプの違いに効いていたにもかかわらず、今回の研究における耐性の評価は急性毒性試験によったことなどが考えられる。

そこで今後は慢性毒性試験や稚魚毒性試験等、低用量で Flt の影響が現れる試験を検討する必要がある。また、ジェノタイプと化学物質の関係以外に、ジェノタイプと生息地周辺環境との関係等も含めて、広い視野でジェノタイプへの影響因子を考えていく必要があると考える。

[参考文献]

- 1) 亀田豊, 益永茂樹 (2006) : 関東地方に生息するモツゴ地域個体群内の遺伝的多様性の評価及びそれに対するストレスの推定に関する研究 水環境学会誌, Vol.29, No9, p553-560
- 2) 日本環境毒性学会 (2003) : 生態影響試験ハンドブック-化学物質の環境リスク評価 朝倉書店