

## AFLP 手法を用いた魚類の慢性毒性影響評価 (1) 手法の基礎的検討

横国大院・環境情報 ○亀田 豊, 鍵谷澄絵, 益永茂樹, 鈴木 匡

A novel approach to identify multiple stressors to *Pseudorasbora parva* by AFLP analysis, by Yutaka KAMEDA, Sumie KAGIYA, Shigeki MASUNAGA and Masashi SUZUKI (Yokohama National Univ.)

### 1. はじめに

現在の生態リスクアセスメントは、非発癌性物質については急性毒性値を、残留性、蓄積性の高い発癌性物質については HQ 比をベースに行われている。この結果、欧米や国内の水域の水質は過去に比べ、著しく改善されてきたと報告されている。しかし、水質の改善にも係らず、水域の生態系が目的とするレベルまで回復した報告は国内外含め、少ない。この原因には、未規制の化学物質の慢性毒性やハビタットの量、質的变化、水域の水理学的影響、物理的影響（流速や底泥の特性など）などの複数の因子（以後ストレスと呼ぶ）が考えられている。

そこで、ドイツやアメリカでは魚類を中心とした生態系の回復のために、化学物質の濃度だけでなく、その他のストレスについても考慮するよう記述したマニュアル<sup>1)</sup>が作成された。この他にも、アメリカでは生息域のさまざまなストレスと生息する魚の種数との関係を統計的に明らかにする研究が、EU、カナダでは慢性毒性も加味した魚類の健康状況のモニタリング計画が行われている (SETAC North America 2003 にて)。

我が国においても水質の改善と共に水域の生態系が回復されたという例は少ない。そこで、著者は魚類を中心とした生態系の回復のためには、大きな影響を与えている主要なストレスの同定とその定量化が必要であると考えている。しかし、我が国の現状を鑑みると、多くの河川では統計解析に十分必要な数の魚類を捕獲することが困難なこと、生理学的な分析と環境分野の分析を同時に行えるような機関が少ないこと、ストレスの情報と魚種やその個体数の情報が揃っているデータベースが少ないことなどから、上述のようなモニタリングや統計解析手法を用いることは困難である。つまり、我が国に適した手法により、魚類が受けているストレスを同定、定量化する必要がある。

そこで著者はこれらの条件を満足しうる分析手法として AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) を魚類に適用することを考えている。

### 2. AFLP 手法

AFLP 手法とはサンプルとなる生物の DNA を特定の制限酵素により断片化し、その中の特定の断片のみを特定のプライマー対で増幅する手法で、1995 年に初めて報告された方法である。増幅した断片の長さが増幅量から、個体の遺伝子パターンを多型により識別できる。メリットとして、サンプル量が微量で良いこと、

再現性が RAPD 等の類似の手法よりも高いこと等が挙げられる。さらに、これらの遺伝子パターン情報は、化学物質の慢性毒性によるセレクションやその他のストレスのセレクションの影響を受けている可能性が高いことが示唆されている。

著者は、このメリットに注目し、魚類のヒレの一部をサンプルとし、AFLP 手法を用いることで、魚類を殺さずに再現性の高い遺伝子パターンを得られるかどうか検討を行った。

### 3. 実験方法

対象魚のモツゴを多摩川（調布堰付近）、三郷公園（埼玉県、小合溜）及びびん沼川（埼玉県）から採取し、尾ヒレ全体を 5 等分にし、それぞれについて AFLP 分析を行い、得られた断片の本数の再現性と全ての断片の増幅量（蛍光強度）の変動係数を評価した。

### 4. 結果及び考察

64 種類のプライマー対について AFLP 分析を行った結果、対によって断片数に大きな差が出るようになった。そこで、結果の良かったプライマー対 2 種について断片数の再現性を検討した結果、56~87%であった。この低さの原因は、電気泳動を genetic analyzer で行うと、増幅が不安定な断片まで検出してしまうためと考えた。そこで、断片の蛍光強度を全断片の蛍光強度に対する比率に変換し、その 1%未満を切り捨てたところ、再現性は 71~92%と良好な値となった。また、蛍光強度の変動係数も幾分改善され、多くの断片に対し、50%程度に抑えることができた。

以上のことから、モツゴでは、尾ヒレの 1/5 程度の微量試料でも AFLP 分析により、多変量解析等の統計解析処理にも利用可能なデータを得られることが明らかとなった。従来利用していなかった各断片の増幅量が連続量のデータとして利用できることは、遺伝子パターンからその個体が受けているストレスを推定できる可能性を示唆しているものと考えられる。

なお、本手法による応用結果は口頭発表で行う。

### 参考文献

1) EPA (2000) Stressor Identification Guidance Document, EPA/822/B-00/025

### 謝辞

本研究は 21 世紀 COE プログラム（世界的研究教育拠点の形成のための重点的支援）の支援を受けて行いました。