

水生昆虫等による魚類へい死事故調査について (第2報)

吉田耕一郎・長谷川耕治・森陰早也香

Investigative Method of Fish Kill Incidents by Aquatic Insects (2)

Koichiro YOSHIDA, Koji HASEGAWA, Sayaka MORIKAGE

1. はじめに

河川における魚類へい死事故の原因判明率が低い理由として、事故発生から試料採取までの時間経過やへい死魚の下流への流下、生き延びた魚の舞い戻りなどが考えられる。

前報¹⁾において、川底などに生息し魚類に比べて移動量が少ない水生昆虫や貝類などに着目し、カゲロウを用いた複数薬剤による生物影響試験を行った結果、シアン化カリウム以外の薬剤では水生昆虫等が有害物質から受ける影響が魚類と同程度であった。このことから、魚類へい死事故現場においてもカゲロウも魚類と同程度の被害を受けているものと推定し、事故現場周辺でカゲロウ等水生昆虫の被害状況を詳細に観察することにより、原因物質の流入箇所を特定できる可能性が示唆された。

また、その実験過程において、ヒルが毒物に曝された際に体表面から生体防御のためと考えられる多量の粘液を分泌することを確認した。今回、この粘液物質を毒物被曝の有無判定の指標として利用できないかと考え、一般的な河川に普遍的に生息し、かつ比較的薬剤耐性が強いと考えられるカワナナおよびヒルを用いて各種薬剤による曝露試験を行い、事故現場でも適用可能な粘液物質の簡易定量を試みたので報告する。

2. 試験方法

2. 1 水生昆虫

カワナナは、長野県内の飼育業者から購入した体重0.4~1gのものをを用いた。これを約20°Cの一定水温に保った揚水ろ過式の循環型暴気水槽内でイオン交換水を少しずつ補給交換しながら5日以上馴化した後、元気の良い個体を選んで1か月以内に試験に供した。

ヒルは、鞍谷川で採取した体重0.2~0.5gのシマイシビルを用いた。河川水とともに実験室に持ち帰り、暴気蒸留水で水を交換しながら1日以上馴化した後、形体が正常で元気の良い個体を選んで1週間以内に試験に供した。

2. 2 試験薬剤および曝露試験薬液

試験薬剤は、前報において使用した9薬剤のうち、カゲロウへの生物影響の発現濃度が極めて高く非現実的であった硫酸銅と塩化亜鉛を除く、塩酸、水酸化ナトリウム、シアン化カリウム、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア水、フェノールおよびイプロベンホスの7薬剤とした。

また、曝露試験薬液は、各試験薬剤を蒸留水で希釈して調整した3~5段階濃度のものを使用した。

2. 3 薬物曝露試験

薬物曝露試験は、各曝露試験薬液25mlを入れた50ml

ビーカー内に水生昆虫を1個体投入して行い、投入後約1分間隔でビーカーを軽く揺すりながら1~10分間放置して行った。また、その間の生死等の状況についても観察した。

なお、暴気蒸留水による対照試験を並行して行うとともに、薬物曝露試験および対照試験とも3~5個体ずつの並行試験により行った。

2. 4 回復試験

薬物曝露試験後の被検体に付着した薬液を50mlビーカー内で暴気蒸留水20mlで3回洗浄した後、30mlの暴気蒸留水中に時々軽く揺すりながら30分間放置して回復試験を行った。

2. 5 粘液物質の溶出

薬物曝露試験後の水生昆虫をピンセットで摘み、0.03M塩化ナトリウム溶液10mlを入れた12mlスピッツ管内にすばやく移し入れ栓をした後、30秒間緩やかに手振りによる横振とう(振とう幅約20cm、振とう回数約80回)を行い、水生昆虫の体表面に分泌された粘液物質を溶出した。この溶出液を10mlスピッツ管に移したものを試験溶液とした。

なお、試験溶液の安定性を保持する目的で、トリトンX-100の10%水溶液を100 μ l加えた。

2. 6 粘液物質の定量

試験溶液の0.2~1.0mlを10mlスピッツ管に採り、0.05Mりん酸ナトリウム緩衝液2ml加えた後、試験管ミキサーを用いて激しく振とうしながらフルオレサミン溶液(0.03%アセトン溶液)1mlを加え、約20分後に表1に示した測定条件で蛍光強度を測定した。なお、第一級アミンの標準物質としてグルタミン酸ナトリウムを用いた。

表1 蛍光分光光度計の測定条件

装置	楸島津製作所製 RF-5300PC
波長	励起 390nm、蛍光 475nm
バンド幅	励起 3nm、蛍光 5nm
感度	High

3. 結果と考察

3. 1 粘液物質の定量法の検討

粘液物質の主な成分は一般的に糖蛋白質、糖類、無機塩類である²⁾といわれていることから、今回粘液物質の定量法として蛋白質中の第一級アミンと反応して強い蛍光物質を生成するフルオレサミン法³⁾を採用し、試験溶液中のアミン量としての算出を試みた。

蛋白質中の一般的な第一級アミンであるグルタミン酸

ナトリウムを用いてフルオレサミン法による蛍光を測定したところ、図1に示すようにアミン量として0~2.0 μg の範囲でほぼ直線に近い検量線が得られたことから、同法により糖蛋白質の第一級アミンを指標とした粘液物質の定量が可能と考えられた。

なお、生成した蛍光物質は、5 $^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫内保存で24時間後では蛍光強度の低下は認められなかったが、72時間後には2割程度の低下が認められた。

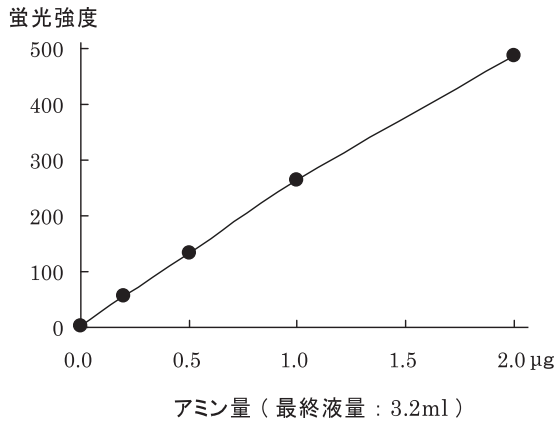


図1 検量線

3. 2 粘液物質の溶出法の検討

3. 2. 1 溶出液の検討

水生昆虫が薬物に曝露されたときに分泌する粘液物質は表在性であり、一般的に表在性蛋白質の可溶化には0.2~1M濃度の塩化カリウム溶液や塩化ナトリウム溶液が用いられる⁴⁾。

そこで、蒸留水と0.01M、0.03M、0.1Mおよび0.3M濃度の各塩化ナトリウム溶液を用いて粘液物質の溶出効果について検討した。なお、溶出は試験管ミキサーでの1分間振とう法により行い、フルオレサミン法での定量には試験溶液の1.0mlを用いた。

0.03M水酸化ナトリウム溶液に10分間曝露したカワニナおよびその対照を用いて行った結果を図2に示した。

検出したアミン量の平均値でみると、対照では塩化ナトリウム濃度が高くなるほど検出アミン量が若干多くなる傾向がみられたが、水酸化ナトリウム溶液曝露ではバラツキは大きいものの0.03M濃度で検出アミン量が最も多くなった。

したがって、以後の試験では、水酸化ナトリウム溶液曝

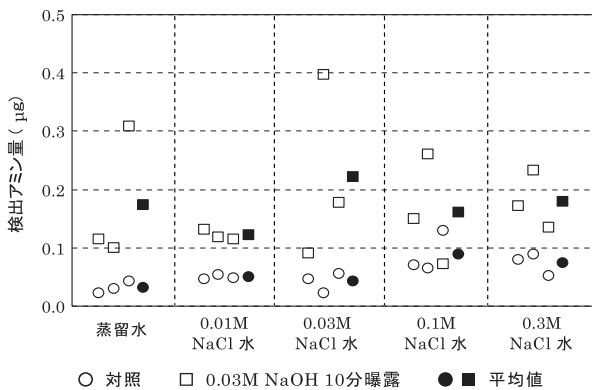


図2 溶出液の違いによる検出アミン量の変化

露における検出アミン量が多く、対照での検出アミン量も比較的少なかった0.03M塩化ナトリウム溶液を溶出液として用いることとした。

3. 2. 2 溶出方法の検討

粘液物質の可溶化には、溶出液とともにどのような溶出方法を用いるかで大きく違ってくると考えられ、強力な溶出方法を用いれば粘液物質以外の組織的な蛋白質(内在性蛋白質)まで抽出されてしまうおそれもある。

そこで、試験管ミキサー(1分)、超音波(1分)および手振り(振とう幅約20cm、振とう回数約80回、30秒)の各振とう法を用いて粘液物質の溶出効果について検討した。なお、溶出液には0.03M塩化ナトリウム溶液を用い、フルオレサミン法での定量には試験溶液の1.0mlを用いた。

0.03M水酸化ナトリウム溶液に10分間曝露したカワニナおよびその対照を用いて行った結果を図3に示した。

検出したアミン量の平均値でみると、対照では手振り振とう法が他の振とう法に比べて検出アミン量が少なく、水酸化ナトリウム溶液曝露では超音波振とう法で最も検出アミン量が多いもののバラツキも大きかった。

したがって、以後の試験では、実際の事故現場での簡便性も考慮して、手振り振とう法により粘液物質の溶出を行うこととした。

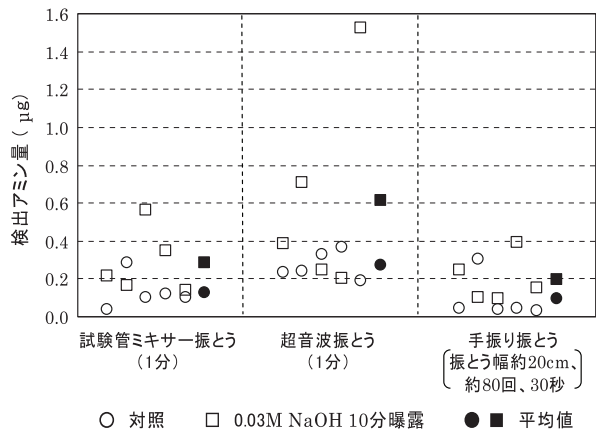


図3 溶出方法の違いによる検出アミン量の変化

3. 2. 3 試験溶液の安定性

ヒルを0.01M水酸化ナトリウム溶液に10分間曝露して作成した試験溶液について、アミンの安定性を検証した。5 $^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫内で2週間保存しても検出アミン量に変化は認められず、安定していることが確認された。

3. 3 薬物被曝水生昆虫からの蛋白質定量

3. 3. 1 カワニナ

上記2. 試験方法に従い、カワニナを用いて各種薬剤による曝露試験を行い、粘液物質中の蛋白質をアミン量として定量した結果について図4~図10に示した。曝露時間はすべて10分で行い、フルオレサミン法による定量には試験溶液の1.0mlを検液として使用した。

なお、薬物曝露後にすべての被検体の生存を確認するとともに、一部被検体の体表面から明らかな粘液の分泌を認めた。

塩酸溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、0.01M 濃度では対照とほぼ同レベルであったが、0.03M、0.1M 濃度ではそれぞれ 0.11 μg 、0.20 μg と曝露濃度が高くなるほど検出量が多くなった (図4)。

水酸化ナトリウム溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、0.01M、0.03M、0.1M 濃度でそれぞれ 0.10 μg 、0.15 μg 、0.19 μg と曝露濃度が高くなるほど検出量が多くなった。また、今回試験した薬剤の中では最も検出アミン量が多かった (図5)。

シアン化カリウム溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、シアンイオンとして 3mg/l 濃度では対照とほぼ同レベルであったが、10mg/l、30mg/l 濃度ではそれぞれ 0.06 μg 、0.08 μg と対象よりも若干検出量が多くなった。なお、30mg/l 濃度では曝露後の被検体から目視により粘液の分泌が確認された (図6)。

フェノール溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、100mg/l、300mg/l、1000mg/l 濃度でそれぞれ 0.07 μg 、0.09 μg 、0.11 μg と対照の 0.06 μg よりも若干多くなったが、個々の値のばらつきが大きいことから、有意的な差はないように思われた (図7)。

アンモニア水による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、10mg/l、30mg/l 濃度では対照とほぼ同等であったが、100mg/l、300mg/l 濃度ではそれぞれ 0.08 μg 、0.10 μg と対照の 0.04 μg よりも若干多くなった (図8)。

なお、アンモニア水が第一級アミンと類似構造を有しているため、アンモニア水自身による蛍光物質生成の可能性について検討したところ、アンモニア水 10 μg からアミン量として 0.09 μg 検出された。アンモニア水曝露液から最終試験溶液へのアンモニア水持ち込み量を 0.03ml と仮定

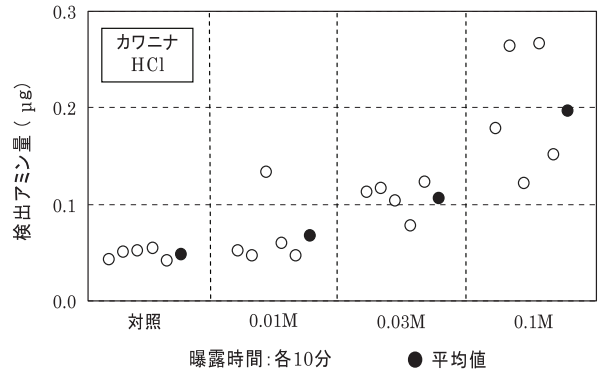


図4 塩酸曝露試験 (カワニナ)

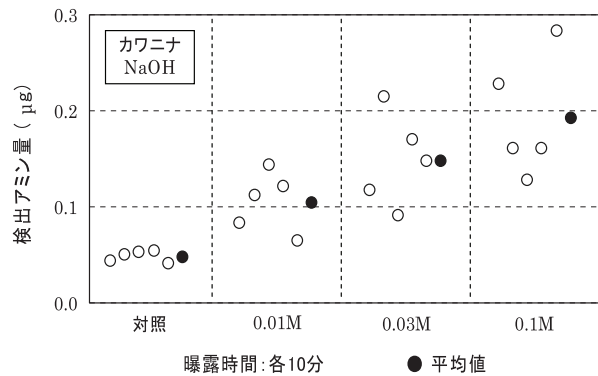


図5 水酸化ナトリウム曝露試験 (カワニナ)

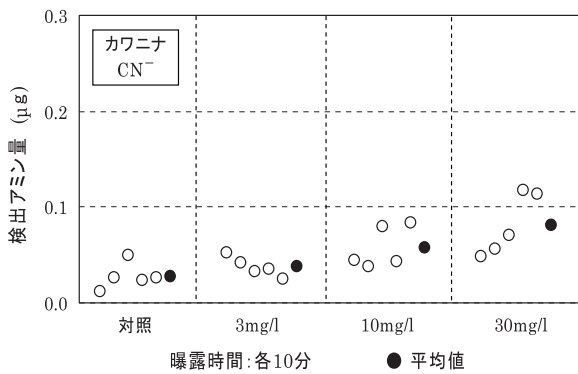


図6 シアン曝露試験 (カワニナ)

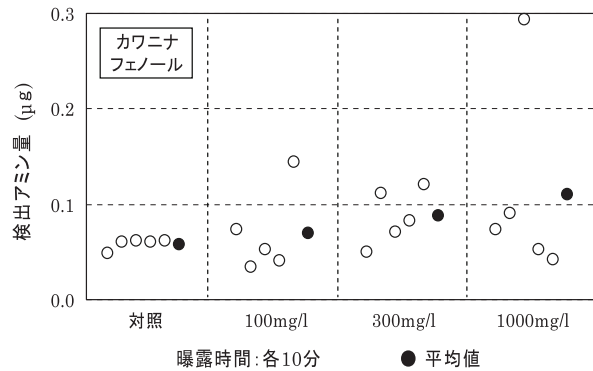


図7 フェノール曝露試験 (カワニナ)

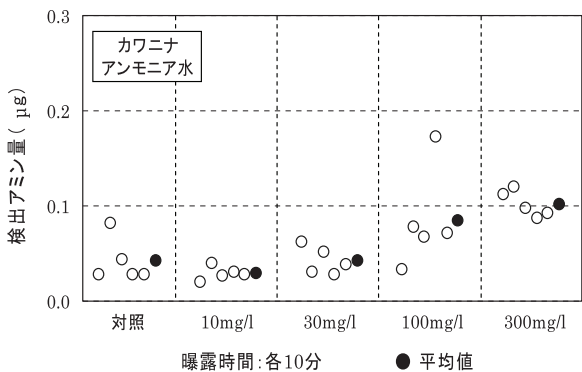


図8 アンモニア水曝露試験 (カワニナ)

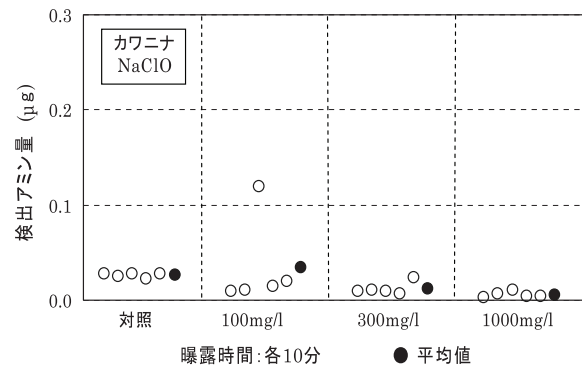


図9 次亜塩素酸ナトリウム曝露試験 (カワニナ)

すると、300mg/l 濃度の場合では持ち込み量が 9 μg となることから、今回のアンモニア水曝露によるアミンの検出は、曝露液からの持ち込みによる可能性が高いものと考えられた。

次亜塩素酸ナトリウムによる曝露試験では、ほとんどの被検体で検出アミン量が対照よりも少なかったことから、次亜塩素酸ナトリウムが蛋白質と反応して第一級アミンが消費されている可能性が考えられた (図 9)。

なお、グルタミン酸ナトリウムと次亜塩素酸ナトリウムとを混合してフルオレサミン法で測定したところ、蛍光は全く測定されなかった。

イプロベンホスによる曝露試験では、個々のばらつきは大きかったが、対照とほぼ同レベルと考えられた (図 10)。

3. 3. 2 ヒル

ヒルを用いて各種薬剤による曝露試験を行い、粘液物質中の蛋白質をアミン量として定量した結果について、図 11 ~ 図 17 に示した。曝露時間は塩酸および水酸化ナトリウムでは 1~10 分、その他の薬剤では 10 分で行った。また、フルオレサミン法による定量試験では、カワニナよりも感度良くアミンが検出されたため、試験溶液のうち 0.2ml を検液として使用した。

なお、薬物曝露中ほとんどの被検体は生存していたが、塩酸、水酸化ナトリウムおよび次亜塩素酸ナトリウムでは一部で死亡が確認されるとともに、塩酸、水酸化ナトリウムおよびアンモニア水では一部で出血が認められた。

さらに、薬物曝露後の目視観察では、次亜塩素酸ナトリウムを除いて多くの被検体体表面から粘液の分泌が認められたが、そのすべてを溶出させることができなかったこともあり、検出されたアミン量は粘液物質の多寡に必ずしも一致していなかった。

塩酸溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、0.003M 以下の濃度では 10 分曝露でも対照とほぼ同レベルであったが、0.01M、0.03M、0.1M 濃度の 1 分曝露ではそれぞれ 0.17 μg 、0.24 μg 、0.30 μg 、また、0.01M、0.03M 濃度の 10 分曝露ではそれぞれ 0.27 μg 、0.91 μg 検出され、0.01M 以上の濃度では曝露濃度が高くなるほど検出量が多くなった。なお、0.01M 濃度の 10 分曝露では 0.27 μg と同濃度の 3 分曝露での 0.56 μg より検出量が少なくなったが、これは被検体の死亡による影響が考えられた (図 11)。

水酸化ナトリウム溶液による曝露試験では、カワニナでの試験と同様に今回試験した薬剤の中では最も検出アミン量が多かった。検出アミン量の平均値で見ると、0.001M 濃度では 10 分曝露でも対照とほぼ同レベルであったが、0.003M、0.01M、0.03M 濃度の 1 分曝露ではそれぞれ 0.10 μg 、0.12 μg 、0.79 μg 、0.003M、0.01M 濃度の 3 分曝露ではそれぞれ 0.09 μg 、0.46 μg 、また、0.003M、0.01M、0.03M 濃度の 10 分曝露ではそれぞれ 0.19 μg 、0.79 μg 、1.4 μg 検出され、曝露濃度が高くなるほど検出量が多くなった。なお、0.1M 濃度の 1 分曝露では 0.49 μg と 0.03M 濃度の 1 分曝露での 0.79 μg より検出量が若干少なくなったが、これは被検体が死亡していないことを考えると強度の毒物に曝されたことによるバリアー機能が働いた可能性が考えられた (図 12)。

シアン化カリウム溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値で見ると、シアンイオンとして 30mg/l、100mg/l、300mg/l 濃度でそれぞれ 0.03 μg 、0.03 μg 、0.04 μg と対照の 0.01 μg よりも若干多くなったが、曝露濃度が非常に高

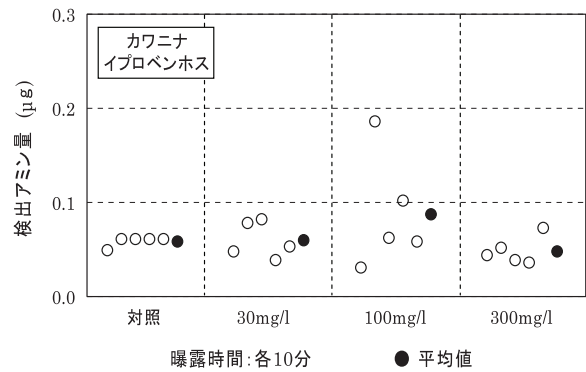


図 10 イプロベンホス曝露試験 (カワニナ)

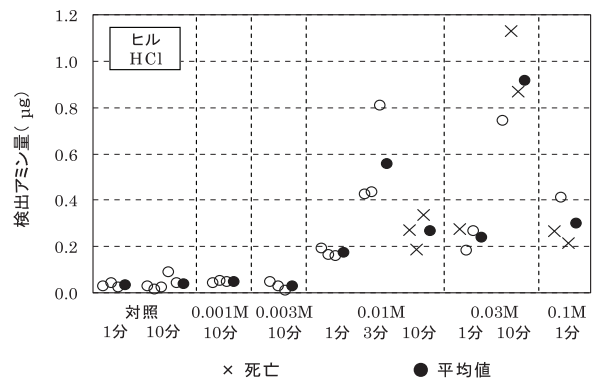


図 11 塩酸曝露試験 (ヒル)

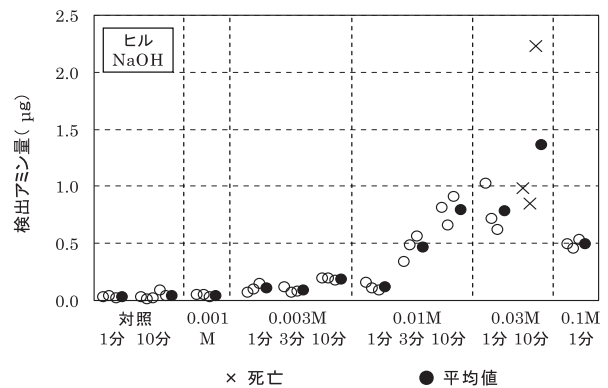


図 12 水酸化ナトリウム曝露試験 (ヒル)

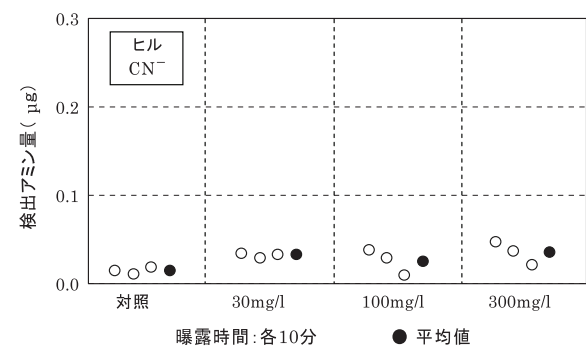


図 13 シアン曝露試験 (ヒル)

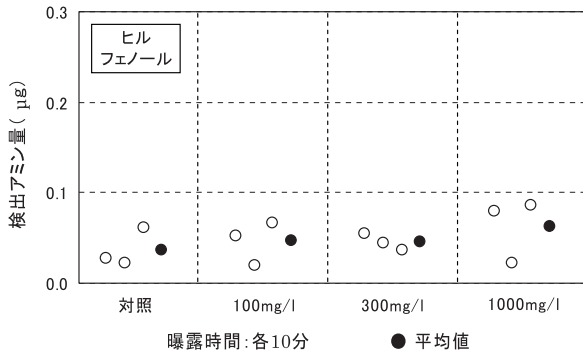


図14 フェノール曝露試験 (ヒル)

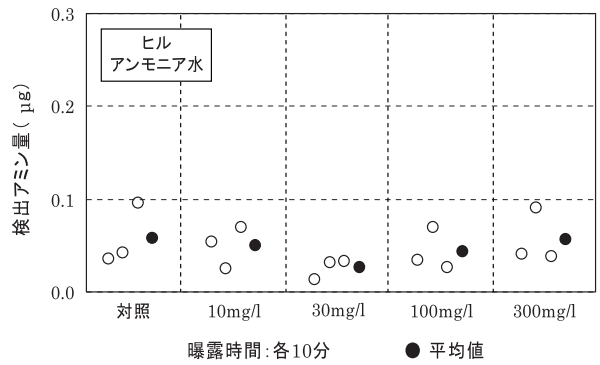


図15 アンモニア水曝露試験 (ヒル)

濃度でもあり、判定指標としての利用は困難と考えられた (図13)。

フェノール溶液による曝露試験では、検出アミン量の平均値でみると、100mg/l、300mg/l、1000mg/l 濃度でそれぞれ 0.05µg、0.05µg、0.06µg と対照の 0.04µg よりも若干多くなったが、カワナでの試験と同様に個々の値のばらつきが大きく有意的な差はないように思われた(図14)。

アンモニア水、次亜塩素酸ナトリウムおよびイプロベンホスによる曝露試験では、検出アミン量の平均値でみると、ほとんどが対照よりも少なかったことから、判定指標としての利用は困難と考えられた (図15~図17)。

3.3.3 回復試験

本研究は、水生昆虫が一時的に毒物に曝されてもほとんど動かずにその場に生存し続けることと、多少時間が経過しても被曝した水生昆虫が毒物被曝の痕跡を残していることを前提にしている。

そこで、実際の魚類へい死事故現場を想定して、カワナおよびヒルを用いて薬物曝露後に暴気蒸留水による回復試験を行い、その後に体表面の粘液物質の定量を行った。

この回復試験後の結果と先に記述した薬物曝露直後の結果を比較して、粘液物質の残存率を推定した。

なお、曝露薬剤には今回の薬剤曝露試験においてアミン量が多く検出された塩酸溶液および水酸化ナトリウム溶液を用いた。

カワナでの結果を図18に示したが、検出アミン量の平均値でみると、0.1M 濃度での10分曝露で回復試験後には曝露直後に比べて検出アミン量が塩酸では55%に、水酸化ナトリウムでは53%に減少していた。

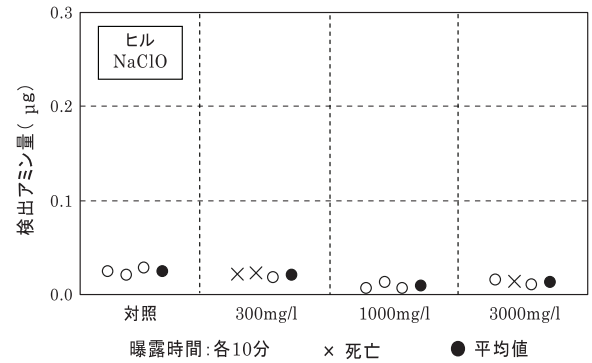


図16 次亜塩素酸ナトリウム曝露試験 (ヒル)

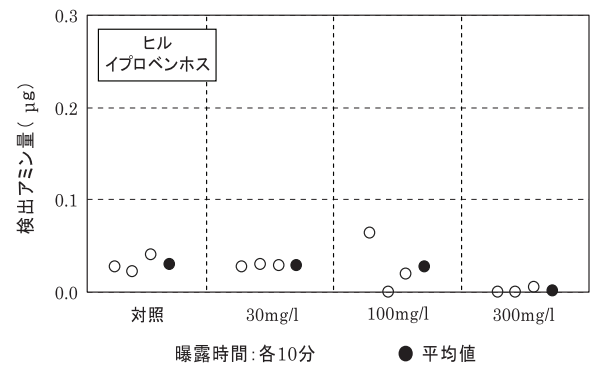


図17 イプロベンホス曝露試験 (ヒル)

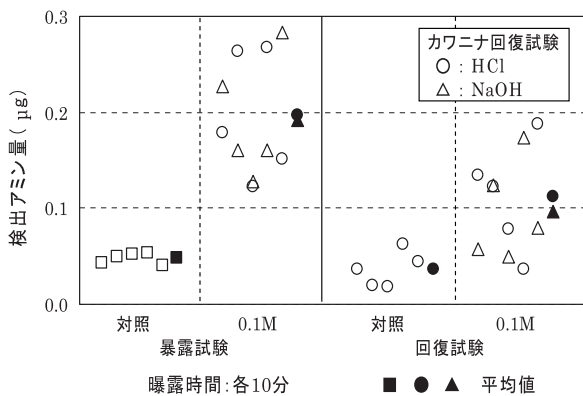


図18 毒物曝露後の回復試験 (カワナ)

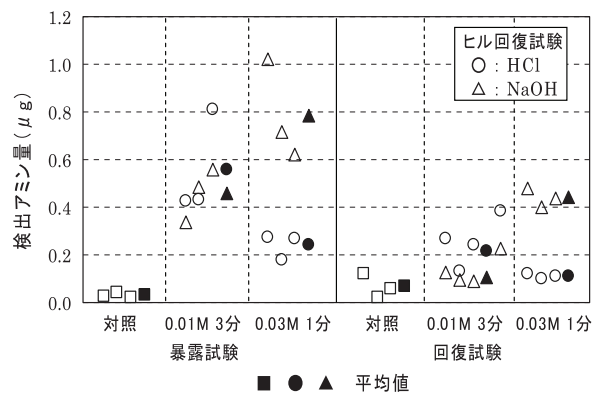


図19 毒物曝露後の回復試験 (ヒル)

またヒルでの結果を図 19 に示したが、検出アミン量の平均値でみると、0.01M 濃度での 3 分曝露では回復試験後には曝露直後に比べて検出アミン量が塩酸では 39%に、水酸化ナトリウムでは 22%に減少し、0.03M 濃度での 1 分曝露では回復試験後には曝露直後に比べて検出アミン量が塩酸では 46%に、水酸化ナトリウムでは 56%に減少していた。

これらの結果から、水生昆虫の体表面に分泌された粘液物質は水中における時間の経過とともに減少する可能性が高いことが示唆された。

4. まとめ

水生昆虫が毒物被曝の際に体表面から分泌する粘液物質が魚類へい死事故時における原因物質流入箇所特定のための指標として利用可能かどうか検討した。

その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 蛋白質の第一級アミンの定量に用いられるフルオレサミン法により、粘液物質中の蛋白質をアミン量として定量することが可能であった。
2. カワナナおよびヒルを用いて行った各種薬物曝露後の粘液物質の定量では、
 - (1) 塩酸および水酸化ナトリウムでは、0.01M 程度の低濃度曝露でも比較的多くのアミン量が検出された。
 - (2) その他の薬剤では、高濃度曝露でも検出量が少なく、特に、次亜塩素酸ナトリウムおよびアンモニア水では、

判定指標としての本法の適用は困難と考えられた。

- (3) 今回用いた溶出法では、粘液物質のすべてを溶出させることができなかったこともあり、検出されたアミン量は粘液物質の多寡に必ずしも一致していなかった。
3. 塩酸および水酸化ナトリウムによる曝露後に暴気蒸留水による 30 分間の回復試験を行ったところ、曝露直後に比べて検出アミン量が 22%~56%に減少したことから、水生昆虫の体表面に分泌された粘液物質は水中における時間経過とともに減少する可能性が示唆された。
4. 魚類へい死事故時に原因物質の流入箇所を特定する目的で本法を利用できる可能性については、塩酸、水酸化ナトリウムではある程度の有用性が示唆された。

参考文献

- 1) 坊栄二他：水生昆虫等による魚類へい死事故調査について（第 1 報），福井県衛生環境研究センター年報,6,82-84(2007)
- 2) 八杉龍一他：生物学辞典,4,p1060,岩波書店,東京(1996)
- 3) Böhlen,P.et al.: Fluorometric assay of proteins in the nanogram range.Arch.Biochem.Biophys.,155,213-220(1973)
- 4) 日本生化学会：タンパク質 I.検出・構造解析法,基礎生化学実験法（伊藤明夫他）,3,p50,東京化学同人,東京(2001)