

## C-2 酸性・汚染物質の環境－生命系に与える影響に関する研究

### (2) 東アジア地域における陸水魚類生態系に与える酸性雨影響評価技術の開発と応用

農林水産省養殖研究所

日光支所 繁殖研究室 生田和正・北村章二

育種研究室 矢田 崇・東 照雄

農林水産省中央水産研究所

内水面利用部 漁場環境研究室 伊藤文成・村上眞裕美・山口元吉・西村定一

東京大学海洋研究所 金子豊二

長崎大学水産学部 征矢野清・石松 淳

長崎大学環境科学部 長江真樹

北里大学水産学部 岩田宗彦

平成 11~12 年度合計予算額 18,842 千円

(うち、平成 12 年度予算額 9,376 千円)

〔要旨〕陸水の酸性化が魚類生態系へ与える影響を解析するための評価手法を確立し、野外調査への応用を試みるため、魚類の酸性環境への応答反応を調べ、その生理・生態学的メカニズムを解析するとともに、それらを生物学的指標として中禅寺湖流入河川でのサケ科魚類への影響調査を行った。その結果、以下のことが明らかになった。①ブラウントラウトはヒメマスと同様 pH 6 台の弱酸環境で繁殖行動に影響が現れたが、イワナはそれよりも耐性が高かった。②中禅寺湖流入河川では外山沢川が最も酸性化しやすいが、現時点では酸性雨が降っても中和能によって酸性化には至らず、魚類の産卵遡上行動や生理機能へ影響は現れなかった。しかし、源流部は河口部より電気伝導度が低くイワナしか生息しておらず、さらに調査の必要がある。③酸性ストレスは、未熟コイの内分泌機構を攪乱し、血中コルチゾルと同時に雌性ホルモンの分泌を促進した。④影響評価数値モデルを確立し影響予測を行い、ヒメマスは pH5.5 で個体群に大きな影響が出るという結果となった。⑤恐山湖の耐酸性ウグイの塩類細胞から、H<sup>+</sup>の排出機能分子の遺伝子をクローニングし、魚類の耐酸性機構を明らかにした。⑥酸性水暴露は、ウナギの心拍を低下させることを明らかにした。⑦サケ稚魚の海洋への降河回遊期には酸性ストレスは免疫能を高めるが、時期を過ぎスマルトが退行すると逆に免疫能が低下することから、海水適応能と耐酸性の間に相関があることが明らかとなった。これらの結果から、魚類生態系への酸性雨影響評価指標策定に資する基礎データが集積し、実際野外調査に応用できることが明らかとなった。

〔キーワード〕繁殖行動、影響評価モデル、耐酸性機構、酸塩基平衡機構、免疫機能

#### 1. はじめに

酸性降下物による陸水の酸性化は、水域の生態系に大きな影響を与えるため、魚類を中心として水産資源に被害を与えることが危惧されている。東アジア地域においては、急速

な工業化によって酸性汚染物質の排出量が急増しているが、この地域の魚類生態系に与える陸水酸性化の影響に関する知見は未だ乏しく、その影響を科学的に正しく把握するためには、魚類の環境酸性化に対する生物学的応答反応に基づく定性的・定量的評価法の確立と、野外生態系における応用およびそのデータに基づくリスク評価モデルの開発が必要である。

## 2. 研究目的

### (1) サケ科魚類の行動学的影響と産卵河川における実態調査

これまでの研究成果によって、サケ科魚類であるヒメマス<sup>1)</sup>およびブラウントラウト<sup>2)</sup>は pH 6 台の極めて弱い酸性環境で産卵行動が有意に抑制されることが明らかとなってきた。そこで、本研究では、さらにサケ科魚類では比較的耐酸性の強いイワナの産卵行動およびブラウントラウトの産卵遡上行動への pH 低下の影響を調べた。

また、野外河川環境におけるサケ科魚類への影響実態を調査するため、平成 11 ~ 12 年度にかけて、サケ科魚類の産卵場となっている中禅寺湖流入河川の pH・水質変化とヒメマス、ホンマス、ブラウントラウトの遡上率への影響および生理機能への影響を調べ、これまで明らかにされた影響評価法を野外へ応用することを目的とした。

### (2) 酸性ストレスによる内分泌攪乱と数値モデルによる影響評価

酸性雨による陸水の酸性化は、魚類の様々な生殖生理機能に影響を及ぼすことが明らかとなっている<sup>3~8)</sup>。しかし、これらの研究の多くは成熟個体を対象としたものであり、未熟魚に対する影響はほとんど解っていない。本研究では、未成熟コイの性ステロイドホルモン合成に対する低 pH 暴露の影響を調べた。

一方環境酸性化の生理的、行動的影響が現場の魚類の個体数(資源量)変動にどのような影響を及ぼすのかを予測することは、実際に自然界で環境酸性化が進んだ時の影響の程度を知り対策を講じる上で非常に重要である。そこで環境酸性化が淡水魚類の生残率や繁殖生理に与える影響を危険因子として組み込んだ数値モデルを開発し、酸性雨が淡水魚類の個体数変動に及ぼす影響を予測することを目的とした。

### (3) 魚類の耐酸性機構の解明

魚類は一般に酸性環境に弱いとされているが、下北半島の恐山湖(宇曾利山湖)に生息するウグイは、例外的に pH 3.6 - 3.7 の強酸性環境にも十分に適応している。恐山湖のウグイが酸性環境に適応するためには、優れた酸・塩基調節のメカニズムを備えているはずである。恐山湖のウグイでは鰓の塩類細胞が特殊な分化・発達を遂げ、多数の塩類細胞が濾胞状ないしは腺状に配列している。この特殊化した塩類細胞が、恐山湖のウグイの酸性耐性に関わっていると考えられる。我々のこれまでの研究により、1) 恐山湖のウグイに見られる強い酸性耐性能はウグイ全般に共通する特徴ではなく、恐山湖産のウグイに特有のものであること、2) 中性の沢に遡上したウグイで濾胞状の塩類細胞は観察されないが、酸性水に移すと鰓弁上に多くの塩類細胞が集まって濾胞状に配列すること、が判明している。以上の結果を踏まえ、本研究では恐山のウグイにおける酸性適応の生理学的機構を解明することを目的とした。

### (4) 魚類の酸塩基平衡調節機構に与える影響

魚類の酸性環境への適応機構およびへい死機構を明らかにするためには、酸塩基平衡調節機構を明らかにする必要があるが、従来サケ科のみで調べられており、東アジア地域に生息する温水性魚類についてはほとんど知見がない。そこで、ウナギの心拍出量と血圧に及ぼす酸性水の影響を明らかにする。また、血流計測のための手術技法を改善するため、極力無侵襲の方法を用いてウナギの心拍数に及ぼす酸性水の影響を明らかにする。

#### (5) 魚類回遊生態と免疫機能に及ぼす影響

北半球高緯度地域の水圏生態系で主要な生態的位置を占めるサケ科魚類資源にとって酸性雨による環境の酸性化は深刻な環境異変である。これまで銀化変態期のサケ科魚類が、降海回遊を誘起する過程を調べてきた。先にシロサケ稚魚の降海回遊時に酸性環境が浸透圧調節能を抑制しないことを示した<sup>9)</sup>。そこで本研究は、銀化変態期ギンザケ幼魚のストレスと免疫能への酸性環境の影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究方法

(1) イワナの産卵行動への酸性化の影響を調べるため、成熟した2才の雌魚をガラス水槽に収容し、中性環境中 (pH6.8) での産卵床造成行動 (ディギング) の頻度を観察した後、翌日環境水を pH コントローラーによって 10 % 硫酸水を滴下し pH を 6.6 ~ 4.5 に変化させたときの行動頻度変化を計測した。

また、ブラウントラウトの産卵遡上行動への河川酸性化の影響を調べるため、コンクリート池に塩ビパイプで2本の水路を設置し、一方に中性水 (pH7.0) を流し、他方の流水を pH コントローラーで 10 % 硫酸水を滴下し pH7.0、6.0、5.8、5.5 に調整し、それぞれへの親魚の遡上尾数を 48 時間計測した。

野外での河川 pH の変化とサケ科魚類産卵遡上行動への影響を調べるため、中禅寺湖千手が浜に流入する外山沢川、柳沢川、千手清水川、横川、観音水川の5河川と湖水、計15ヶ所で連続採水を行うとともに、雨水の採取を行い、pH、電気伝導度、アルカリ度、段階別中和能<sup>10)</sup>、溶存イオン ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ )、総アルミニウム濃度の経日変化を調べた。また、各河川河口に採捕トラップを設置し9~2月に遡上したヒメマス、ホンマス、ブラウントラウトの尾数を毎日計測するとともに、血液を採取し、ハンディー血中イオン・ガス測定器 (i-STAT) を用いて pH、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、ヘマトクリット等を測定した。

(2) コイ *Cyprinus carpio* 1年魚 (155 ~ 227 g) を2群に分け、実験用水槽 (地下水を常時給水、pH 7.0 ± 0.2、水温 20 ± 1 °C) で2週間馴致した。馴致後、一方の飼育水には pH コントローラーを用いて 1 N 硫酸を滴下し、pH を 4.5 ± 0.1 まで低下させた。その後、対照群 (pH 7.0 ± 0.2) および暴露群 (pH 4.5 ± 0.1) 各々の pH を維持して4週間飼育した。低 pH 暴露開始後2日、1、2および4週後に採血し、ELISA 法により血中エストラジオール-17 β ( $\text{E}_2$ ) 量および11-ケトテストステロン (11-KT) 量を測定した。また、1週間酸性暴露した個体から摘出した精巣および頭腎片をリンゲル液中で48時間培養し、培養液中の  $\text{E}_2$  濃度を測定した。さらに、コルチゾルの  $\text{E}_2$  産生に及ぼす直接効果を確認するため、精巣培養液中にコルチゾルを添加して48時間培養し、培養液中の  $\text{E}_2$  濃度を測定した。

生活史ステージ (成長段階) ごとの個体数を行列式で表し、各ステージでの生存率と、

次のステージへ成長する確率を仮定すれば、個体数変動を計算することができる。 $n(t)$ を、各生活史ステージごとの個体数を表すベクトルとすると、全生活史ステージの個体数の増減を表す行列個体群モデルは次の式で表される。

$$n(t+1) = A n(t)$$

射影行列  $A$  の  $ij$  成分  $a_{ij}$  は、時間  $t$  における  $j$  番目のステージの 1 個体が、成長や繁殖によって時間  $t+1$  における  $i$  番目のステージの個体を平均何個体出現させるかを表す。環境の悪化（例えば環境酸性化）が生存率や成長率、産卵などに及ぼす影響を、射影行列に組み入れる。本研究ではヒメマスを対象魚とし、その生態と生活史に基づいてモデル化した。

(3) ウグイが硫酸以外の酸性環境に晒された場合、どのような反応を示すのかは酸性耐性のメカニズムを解明する上で有力な手がかりとなる。そこで恐山湖産および上田産のウグイを実験室で中性付近の通常の淡水中で飼育し十分に順致した後、硫酸、硝酸あるいは塩酸を加えて環境水を酸性化した。酸性水中で 2 日間飼育し、鰓の塩類細胞の形態学的変化を観察した。

次に、鰓塩類細胞において酸性適応の鍵を握ると考えられる  $H^+$  と  $HCO_3^-$  の輸送について分子生物学的なアプローチを試みた。中性水に適応させた恐山ウグイを pH3.7 の硫酸酸性条件下に移行し、移行 0、2 および 7 日目のウグイ鰓からそれぞれ mRNA を抽出した。移行 7 日目のウグイ鰓から抽出した mRNA から cDNA を合成し、これを用いて  $H^+$  と  $HCO_3^-$  の輸送を担っていると考えられる  $Na^+/H^+$  exchanger (NHE3) と  $Na^+/HCO_3^-$  cotransporter (NBC) のクローニングを試みた。

(4) 心拍出量および心拍数を計測するために血流計測用プローブを供試魚の腹大動脈に装着した。装着後、実験水槽で約 48 時間回復させた。プローブを装着してから 24 時間後にヘマトクリットを測定し、ヘマトクリットの値が高く、48 時間まで安定した個体のみを実験で用いた。また、連続採血のため、脾臓動脈にポリエチレンカニューラを装着した。回復期間後 pH5.0 の酸性水の 72 時間曝露し、心拍出量・心拍数・血液酸塩基平衡動態を測定した。さらに、2 本のエナメル線を直接ウナギ（体重 179-334 g）の心臓部両脇に刺し、電極として使用した。電極装着後 48 時間回復させ、pH4.5 ± 0.1 硫酸酸性水・水温 25 °C の条件で 72 時間曝露し心電図計測した。なお 24 時間に 1 回実験水槽中の酸性水を換水した。

(5) ギンザケ 1 歳魚を用いた。予備実験で得た硫酸による pH4.1 の酸性水条件を、pH コントローラーで 24 時間実験魚に与え、その後通常飼育水に変更した。血中コルチゾル、チロキシン濃度は、免疫測定法 (TR-FIA) により、白血球数、リボゾームは定法により、頭腎白血球貪食能はスタフィロコッカス菌の貪食数として、活性酸素の殺菌能 (potential killing) はニトロブルーテトラゾリウム の酸化による産生ホルマゼン濃度を吸光度で測定した。

#### 4. 結果・考察

(1) イワナの産卵行動は、pH5.8 以下の酸性環境で有意に頻度が低下したが、pH4.5 でも行動を示す個体があった。これまでの研究で、ヒメマスおよびブラウントラウトは pH6.4 で有意な頻度低下が観察されたことから、イワナは耐酸性が高いだけでなく<sup>11)</sup>、産卵行動

においても比較的酸性環境に強いと考えられる。この結果から、酸性化の影響を受けやすい河川源流部に生息するイワナは、より酸性環境に適応しているものと推測される。

ブラウントラウトの産卵遡上行動は、pH6.0 で有意に抑えられほとんどの個体は中性水路に遡上し、pH5.5 で全く遡上が見られなかった。これは、以前ヒメマスで行った実験とほぼ同様の結果で<sup>12)</sup>、ブラウントラウトも敏感に酸性を感知し、pH6.0 という微弱な河川の酸性化が生じても産卵遡上が抑制され繁殖に影響を与える可能性を示した。

中禅寺湖流入河川及び雨水の水質・pH 変化とサケ科魚類の遡上・産卵行動および生理学的特性に及ぼす影響を調査した結果、採集された雨水は降り始めに強い酸性(pH4.09 ~ 4.08)を示し、高濃度の $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ が検出された。河川水 pH は降雨後低下する傾向を示したが、調査期間中(5 ~ 2月)酸性化までには至らず、遡上魚の血中 $\text{Na}^+$ 量も正常値の範囲内であった。アルカリ度と中和能の比較の結果、流入河川の内で遡上魚の最も多かった外山沢川が最も酸性化しやすい河川であることが判明した。ホンマス、ブラウントラウトの遡上は降雨時に促進されたことから、酸性雨によって酸性化が生じた場合、遡上行動の抑制が起こる可能性が推測されたが、現段階では影響は観察されなかった。また、外山沢川源流部にはイワナのみが生息したことから、耐酸性の比較的低い他のサケ科魚類には生息に不適な環境であることも推測された。

(2) 雌雄間の血中 11-KT 濃度には有意差が存在したが、雌雄各々の 11-KT 濃度は低 pH 暴露による有意な変化を示さなかった。一方、血中 $\text{E}_2$ 濃度は雌雄間に差はなく、低 pH 暴露 2 日後から有意に増加し、1 週間後には約 10 倍の値を示した後、徐々に減少した。また、頭腎培養液中の $\text{E}_2$ 濃度は、対照群および暴露群共にほとんど検出限界以下であった。これに対し精巣では、暴露群の培養液中 $\text{E}_2$ 濃度が対照群よりも明らかに高値を示した。精巣培養液へのコルチゾルの添加は培養液中 $\text{E}_2$ 濃度を増加させた。これらの結果から、低 pH 暴露が未熟期のコイ生殖腺における $\text{E}_2$ 合成を促進することが示唆された。また、この $\text{E}_2$ 合成の促進は、酸性ストレスによって血中量が増加するコルチゾルの作用<sup>13,14)</sup>に起因する可能性が示された。

pH 5.5 と pH 7.0 の場合について成魚の個体数変化を 10 年間計算した。pH 7.0 では個体数は季節変化を繰り返しながら漸増しているが、pH 5.5 では 4 年目まで減少して、pH 7.0 の場合の約 35% という低いレベルになった。このようにヒメマスを想定したモデルで、pH 5.5 で個体群動態に大きな影響が出るようになった。

(3) 恐山湖産ウグイでは硫酸ばかりでなく硝酸、塩酸酸性下でも濾胞状に配列した塩類細胞の発達が観察された。一方、上田産のウグイに塩類細胞の濾胞状構造はまったく見られなかった。恐山湖のウグイで濾胞状に配列した塩類細胞は、直接的あるいは間接的に $\text{H}^+$ の排出を促すと同時に、体外に流出した $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 等のイオンを能動的に取込むことで、酸性環境下での体液の酸性化と浸透圧の低下を抑えていると考えられる。

一方、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE3) と  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  cotransporter (NBC) のクローニングを試みた結果、両者の全塩基配列を決定することに成功した。ノーザン解析の結果、酸性適応に伴い NHE3 と NBC の発現量がともに顕著に増大していることが確認され、両者が酸性適応に重要な機能を担っている分子であることが推察された。また、免疫組織化学の結果、NBC3 は塩類細胞の apical 側に、NBC は basolateral 側に特異的に発現していることが示された。

以上の結果から、鰓で濾胞状に発達した塩類細胞において、NHE3 は  $\text{Na}^+$  を取込むのと交換に  $\text{H}^+$  を排出し、NBC は取込まれた  $\text{Na}^+$  とともに pH 緩衝剤として働く  $\text{HCO}_3^-$  を血中に送り込むことにより、効率よく体液の酸性化および浸透圧低下を防いでいることが明らかとなった。今回、同定された NHE3 と NBC は、ウグイばかりではなく魚類全般の酸性耐性メカニズムと酸塩基調節の本質を担う分子である可能性が高いと考え、今後さらに詳細な解析を進める予定である。

(4) 48 時間の開腹時間後、pH7.0 の中性水中で測定した安静状態での心拍出量は  $24.8\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$ 、心拍数は  $69\text{beats}/\text{min}$  であった。

酸性水曝露直後、心拍数及び心拍出量が急激に低下した。曝露 1 時間後には心拍数は 60 回前後で上下し、血流量が少なく最低血圧が低い相と血流量が多く最低血圧が高い相が交互に出現した。5 時間後心拍数は比較的安定し、70 回前後まで増加した。72 時間後には、心拍数が低下した。

上記の結果は、酸性水曝露がウナギの心機能に大きな影響を与える可能性があることを示唆している。しかし、今年度はかなりの数のウナギを用いて手術技法の確立を目指したにも関わらず、血流計測用プローブ装着がウナギの生理状態に与える影響を軽減することが困難であった。本研究と実験水温がほぼ同じオーストラリアウナギ (900-1,000g) の研究報告<sup>16)</sup>によると、心拍出量は  $10.2\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$ 、心拍数は  $50\text{beats}/\text{min}$  であった。ヨーロッパウナギ (600-1,000g) においても心拍出量は  $12.2\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$ 、心拍数は  $37\text{beats}/\text{min}$  であった<sup>17)</sup>。本研究の計測結果で、心拍出量がかなり高く、さらに心拍数が若干高かった原因は、プローブの装着によって頸部筋肉系を大きく切開することによる呼吸機能の不全、出血が考えられる。

ウナギについては非接触で心拍を計測することが可能であるが<sup>18)</sup>、今後はこの方法を用いて、無傷のウナギが酸性水に曝露された時の心拍数の変化を記録し、その結果を指標として手術技法の改善を試みる必要がある。

酸性水曝露直後に心拍数の低下は安静時における中性水中のもの  $68.5 \pm 5.6\text{beats}/\text{min}$  から  $47.0 \pm 4.3$  へ低下した。時間経過とともに心拍数は中性水中のレベルに徐々に回復した。曝露直後心拍間隔の S.D は安静時の 6.2 から 17.4 へ増加した。この心拍リズムの乱れも徐々に回復し、12 時間経過後にはほぼ中性水のレベルに戻った。数個体で曝露 72 時間後に除脈と頻脈が交互に現れるパターンが出現した。

酸性水曝露直後に起こる心拍数の低下と心拍リズムの乱れは迷走神経刺激による除脈が起きたと考えられる<sup>19)</sup>。しかし曝露 12 時間後には心拍リズムの乱れが治まり一定間隔の心拍リズムに戻ることから、早い段階での心拍調節回復がなされていたことが考えられる。本実験で、酸性水がウナギの心拍リズムに与える影響を明らかにした。

(5) 24 時間 pH 4.1 に曝した場合、冬季の変態前期の parr では曝露後 1 時間で血中コルチゾル濃度は  $180\text{ng}/\text{ml}$  まで上昇した。この上昇は変態中期の 5 月中旬まで継続したが、5 月後半から 7 月にはコルチゾル分泌は起こらなかった。変態期が終了した 11-12 月の退行 smolt では再び  $250-350\text{ng}/\text{ml}$  まで上昇した。

そこで銀化変態最盛期にギンザケ smolt を酸性水に曝露し、免疫能応答を 1, 4 日後に調べた。末梢血の白血球数、貪食能、活性酸素殺菌能はいずれも有意に上昇した。一方退

行 smolt では、血中コルチゾル濃度の有意な上昇、白血球、貪食能、活性酸素殺菌能はいずれも有意に減少した。

ギンザケの銀化変態と海水適応能獲得が1歳初夏に短期間生じることはよく知られている<sup>20)</sup>。本研究で海水適応能を獲得したギンザケ smolt で、酸性環境はストレスやそれにとともなう免疫能の低下は認められないが、変態の退行期には酸性環境が強いストレスをとともない免疫能を低下させた。このことは、海水適応能を支える塩類イオン調節機構が、酸性環境中で過剰になる体内の水素イオンを適切に体外へ排出していることを示唆している。

酸性環境中で生じる過剰な体内の H<sup>+</sup>イオンの排出は、鰓二次鰓弁基部の塩類細胞頂部<sup>21)</sup>あるいは隣接の被蓋細胞<sup>22)</sup>の H<sup>+</sup>排出 ATP ポンプ(V-ATPase)が担うと報告されている。塩類細胞での塩類排出能の発達と V-ATPase の亢進の関係に興味を持たれるところである。いずれにしても、先のシロサケにおける研究と本研究により、サケ科魚類の酸性環境に対する耐性は、銀化変態にとともなう過剰塩類排出能(海水適応能)の発達と同時に起こる現象であることが明らかになった。

## 5. 本研究により得られた成果

本研究により、東アジア地域に生息する魚類の、繁殖行動、内分泌機構、耐酸性機構、酸塩基平衡機構、免疫機構等に及ぼされる環境酸性化の影響に関して詳細なメカニズムが明らかとなり、陸水魚類生態系に対する酸性雨影響の評価指標となる基礎データが集積した。また、影響評価のための数値モデルの確立と野外調査への応用を試行し、これらの評価指標が有効であり、将来的な酸性雨影響の予測に資するものであると考えられた。

## 6. 引用文献

- 1) Kitamura, S. and Ikuta, K. (2000) *Aquat. Toxicol.*, 51, 107-113.
- 2) 北村章二ら(1999)日本水産学会講要, pp.34.
- 3) Tam, W.H. and Payson, P.D. (1986) *Can. J. Aquat. Sci.*, 43, 275-280.
- 4) Weiner, G.S. et al. (1986) *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115, 75-82.
- 5) Tam, W.H. et al. (1990) *Can. J. Zool.*, 68, 2468-2476.
- 6) Ikuta, K. and Kitamura, S. (1995) *Water, Air Soil Pollut.*, 85, 327-332.
- 7) Ikuta, K. et al. (1996) *Acidic Deposition and its Impacts*, pp.349-352.
- 8) Ito, F. et al. (1996) *Acidic Deposition and its Impacts*, pp.353-356.
- 9) Watanabe, T. et al. (1995) *Fish. Sci.*, 61, 3553-3554.
- 10) 井上隆信ら(1999)平成10年度環境庁地球環境研究総合推進費終了研究報告書, pp.61-74.
- 11) 生田和正ら(1992)養殖研報, 21, 39-45.
- 12) Ikuta, K. et al. (2001) *Water, Air Soil Pollut.* (in press)
- 13) Wendelaar Bonga, S.E. and Balm, P.H.M. (1989) *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, Morris, R., Taylor, E.W., Brown, D.J.A. and Brown, J.A. (eds.) Cambridge University Press, pp.243-267.
- 14) Van Dijk, P.L.M. et al. (1993) *J. Fish Biol.*, 42, 661-671
- 15) Yada, T. et al. (2000) *National Res. Inst. Aquaculture*, 29, 217-224.
- 16) Hipkins, S.F. and Smith, D.G. (1983) *J. Exp. Biol.* 227, 339-348.

- 17) Hughes, G.M. et al. (1982) J. Exp. Biol. 98, 277-288.
- 18) 山森邦夫ら (1971) 日本水産学会誌, 37, 94-97.
- 19) Altimiras, J. (1999) Comp. Biochem. Physiol., 124, 447-460.
- 20) Iwata, M. et al. (1987) Aquaculture, 66, 315-327.
- 21) 金子豊二 (1997) 化学と生物, 35, 76-382.
- 22) Perry, S.F. and Laurent, P. (1994) Fish Ecophysiology, (eds. Rankin JC, Jensen FB), Chapman & Hall, pp.231-264.

[国際共同研究等の状況]

なし

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表

- ① K. Ikuta, A. Munakata, K. Aida, M. Amano and S. Kitamura: Water, Air and Soil Pollut. (2001)  
"Effects of Low pH on Upstream Migratory Behavior in Land-locked Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka*" (in press)
- ② K. Satake, S. Kojima, T. Takamatsu, J. Shindo, T. Nakano, K. Tsunoda, S. Aoki, T. Fukuyama, S. Hatakeyama, K. Ikuta, M. Kawashima, Y. Kohno, K. Murano, T. Okita and H. Taoda: Water, Air and Soil Pollut. (2001)  
"Acid Rain 2000-Conference Summary Statement-Looking Back to the Past and Thinking of the Future-" (in press)
- ③ S. Kitamura and K. Ikuta: Water, Air and Soil Pollut. (2001)  
"Effects of Acidification on Salmonid Spawning Behavior" (in press)
- ④ K. Ogawa, F. Ito, M. Nagae, T. Nishimura, M. Yamaguchi and A. Ishimatsu: Water, Air and Soil Pollut. (2001)  
"Effects of Low pH Stress on Reproductive Functions in the Immature Carp, *Cyprinus carpio*" (in press)
- ⑤ M. Nagae, K. Ogawa, A. Kawahara, M. Yamaguchi, T. Nishimura and F. Ito: Water, Air and Soil Pollut. (2001)  
"Effects of Acidification Stress on Endocrine and Immune Functions in Carp, *Cyprinus Carpio*" (in press)
- ⑥ 生田和正: 遺伝、54, 11, 22-28 (2000) 「魚類の行動・生理への酸性雨影響」
- ⑦ K. Ikuta, T. Yada, S. Kitamura, F. Ito, M. Yamaguchi, T. Nishimura, T. Kaneko, M. Nagae, A. Ishimatsu and M. Iwata: Global Environ. Res., 4, 79- 87 (2000)  
"Recent Studies on the Effects of Acidification on Fish in Japan"
- ⑧ S. Kitamura and K. Ikuta: Aquat. Toxicol., 51, 107-113.  
"Acidification Severly Suppresses Spawning of Hime Salmon (Land-locked Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka*)"
- ⑨ 矢田崇、東照雄、北村章二、生田和正: 養殖研報、29, 217-214 (2000)  
「ニジマス血中ナトリウム濃度に及ぼす酸性環境水の pH 依存的効果」



- ⑩ 生田和正、天野勝文、北村章二：環境科学会誌、12, 2, 259-264 (1999)  
「陸水生態系に及ぼす酸性雨の影響－特に魚類への影響」
- ⑪ T. Kaneko, S. Hasegawa, K. Uchida, T. Ogasawara, A. Oyagi and T. Hirano: Zool. Sci., 16, 871-877 (1999)  
"Acid Tolerance of Japanese Dace (a Cyprinid teleost) in Lake Osorezan, a Remarkable Acid Lake"
- ⑫ K. Ikuta, T. Yada, S. Kitamura, F. Ito, M. Yamaguchi, T. Nishimura, T. Kaneko, M. Nagae, A. Ishimatsu and M. Iwata: UJNR (US-Japan Natural Resources) Tech. Rep., 28, 39-45 (1999)  
"Effects of Acidification on Fish Reproduction"
- ⑬ 生田和正：地球環境センターニュース、10, 7, 1-7 (1999)  
「酸性雨はわが国の魚類生態系に影響を与えるか」
- (2) 口頭発表
- ① 鈴木幸成、大井謙一、吉原喜好、生田和正、鹿間俊夫、中村英史、北村章二：日本水産学会春季大会 (2001)  
「中禅寺湖流入河川の降水等に伴う水質変化とサケ科魚類の産卵遡上」
- ② 長江真樹、小川浩義、山口元吉、伊藤文成：日本水産学会春季大会 (2001)  
「酸性暴露およびコルチゾルが精巢の性ステロイド合成に及ぼす影響」
- ③ 阿部信一郎、伊藤文成、村上眞裕美、山口元吉、西村定一：日本水産学会春季大会 (2001)  
「酸性水の流入が河川底正付着藻類群落の発達に及ぼす影響」
- ④ 伊藤文成・阿部信一郎・村上眞裕美・山口元吉・小川浩義・西村定一：日本水産学会春季大会 (2001)  
「自然酸性河川における付着藻類および底性動物群集」
- ⑤ K. Ikuta: Symposium of Aquatic Biology, Tokyo, Japan (2001)  
"The Effects of Water Acidification on Fish Physiology and Behavior"
- ⑥ F. Katoh, T. Kaneko and S. Hyodo: The 4th SANKEN Int. Symp., Osaka, Japan (2001)  
"Possible Involvement of V-ATPase in Sodium Uptake through Gill Epithelia in Freshwater-adapted Killifish"
- ⑦ K. Ikuta, T. Yada, S. Kitamura, F. Ito, M. Yamaguchi, T. Nishimura, T. Kaneko, M. Nagae, A. Ishimatsu and M. Iwata: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"The Effects of Acidification on Fish Physiology and Behavior"
- ⑧ S. Kitamura and K. Ikuta: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Effects of Acidification on Salmonid Spawning Behavior"
- ⑨ M. Iwata, M. Ogoh, H. Chiba, H. Yamada: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Acute Stress and Cortisol Level of Juvenile Salmon"
- ⑩ F. Ito, S. Abe, M. Yamaguchi, M. Nurakami, K. Ogawa and T. Nishimura: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Effects of Water Acidification on the Community of Attached Algae and Zoobenthos in the River"
- ⑪ K. Ogawa, F. Ito, M. Nagae, T. Nishimura, M. Yamaguchi and A. Ishimatsu: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Effects of Acidification Stress on Reproductive Functions in the Immature Carp, *Cyprinus carpio*"

- ⑫ M. Nagae, K. Ogawa, A. Kawahara, M. Yamaguchi, T. Nishimura and F. Ito F: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Effect of Acidification Stress on Endocrine and Immune Functions in Carp, *Cyprinus carpio*"
- ⑬ T. Kaneko: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Acid Tolerance of Japanese Dace (a Cyprinid Teleost) in Lake Osorezan, a Remarkable Acid Lake"
- ⑭ T. Yada, T. Azuma, S. Kitamura, K. Ikuta and F. Ito: 6th Int. Conf. Acid. Deposit., Tsukuba, Japan (2000)  
"Sodium Retention in Fish Exposed to Acid Water"
- ⑮ 平田拓、小野俊浩、仲里猛留、猿田洋子、金子豊二、若林繁夫、重川宗一、広瀬茂久：  
海洋生物の生理機能の比較分子生物学 (2000)  
「強酸性湖のウグイの鰓に特異的な輸送体タンパク質」
- ⑯ 小川浩義、伊藤文成、山口元吉、西村定一、長江真樹、石松惇：日本水産学会秋季大会 (2000)  
「酸性暴露によるコイのストレス反応」
- ⑰ T. Hirata, T. Ono, T. Nakazato, S. Hidayat, T. Kaneko, T. Hirano and S. Hirose: The 1st Int. Conf. Control Diseases Sodium Dependent Transport Proteins Ion Channels, Shizuoka, Japan (1999)  
"Maintenance of Acid-base Balance by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger (NHE3) and Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (NBC) in the Gill of Dace Adapted to Extremely Acidic Condition (pH 3.5)"
- ⑱ K. Ikuta, T. Yada, S. Kitamura, F. Ito, M. Yamaguchi, T. Nishimura, T. Kaneko, M. Nagae, A. Ishimatsu and M. Iwata: 28th UJNR Aquaculture Panel Meeting, Hawaii, U.S.A. (1999)  
"Effects of Acidification on Fish Reproduction"
- ⑲ 生田和正、矢田崇、北村章二、伊藤文成、山口元吉、村上真裕美、西村定一、金子豊二、石松惇、岩田宗彦：日本陸水学会シンポジウム (1999)  
「酸汚染による魚類生態系への影響」
- ⑳ 生田和正、北村章二、鹿間俊夫、中村英史、棟方有宗、鳥居修、斎藤秀徳、笹井淳二、天野勝文、山森邦夫：日本水産学会春季大会 (1999)  
「ヒメマスの産卵遡上行動に及ぼす環境酸性化の影響」
- ㉑ 北村章二、生田和正、鹿間俊夫、中村英史、棟方有宗、鳥居修、斎藤秀徳、笹井淳二、天野勝文、山森邦夫：日本水産学会春季大会 (1999)  
「ブラウントラウトの雌の性行動に及ぼす環境酸性化の影響」
- (3) 出願特許  
なし
- (4) 受賞等  
なし
- (5) 一般への公表・報道等
- ① 読売新聞 (1999年6月1日、全国版、サケ・マス繁殖への酸性雨影響の成果について)
- ② 奥日光清流清湖保全研修会 (2000年12月8日、酸性雨影響に関する市民講座)
- ③ 環境研究フォーラム 2000 (2000年12月1日、於つくば国際会議場、ポスター展示)