

C-3 (3) 酸性降水物の水生生物に及ぼす影響に関する基礎的研究

	研究代表者	中央水産研究所	西村 定一
農林水産省 水産庁 中央水産研究所			
内水面利用部	魚類生態研究室	東井純一・井口恵一朗	
	漁場環境研究室	西村定一・伊藤時夫	
	漁場管理研究室	伊藤文成・山口元吉	
		木曾克裕・岡田行親	
農林水産省 水産庁 養殖研究所			
日光支所	繁殖研究室	北村章二・生田和正	
	育種研究室	岩田宗彦	
	平成2-4年度合計予算額	34,239千円	

〔要旨〕 酸性環境と水生植物、温水性・冷水性魚類、及び水生昆虫等の餌生物のこれに対する応答、重金属との複合作用、耐酸性等について研究を行った。主要な結果は以下の通りである。水生植物にpH緩衝能が認められた。コイによるpHとAl濃度の組合せ実験で、低温(10℃)と高温(25℃)では斃死は殆どなく、中間の温度(14と18℃)では斃死が生じ、低pHとAlの毒性は温度の影響を受けること、孵化稚魚は卵より弱く、卵には致死的でない水温22~26℃で硬度70ppmCaCO₃の井戸水によるpH5.2・Al0.2ppm・5日間の条件で致死の影響を受けること、飼育水の硬度を5,25,50,100ppmCaCO₃と変えた実験では低pHとAlの致死毒性は硬度が低い程強くなるが、25ppmCaCO₃でも致死毒性が強いことが明らかになった。サクラマスによる実験で硫酸酸性環境による鰓浸透圧調節機能に対する障害はH⁺が主要因であり、硝酸、塩酸でも同様であること、ベニサケ稚魚への24時間の酸性環境暴露(pH5.0)で、血清Na濃度の低下は降海期中のものにのみ見られ、この時期のみが酸性環境暴露に特に弱いことが明らかになった。アユ、イワナ等の精子活性へのCu、Alと低pHの複合作用が見られ、花崗岩、安山岩からの酸性水中へのAlの溶出はpH5までは顕著でないが、pH4.5以下で顕著となり、4.0では15日で4.44ppmとなり、精子活性に影響する濃度より100倍以上高濃度になった。アユ、ワカサギ等の受精卵はpH5.3以上では発生が進行し孵化に至るが、4~5では発眼以後斃死した。6魚種の仔稚魚の耐酸性はワカサギ>モツゴ>ウグイ>フナ&コイ>アユの順と判断され、ミジンコ、ワムシは魚類と大差ないがユスリカは強い耐酸性を示した。pH5.5の水を注水し続けた水量1.2tの水槽は14週後にpH6.4であったが、対照モツゴの体重は増大したがこの区のそれは減少し、弱酸性環境でも生態系に悪影響が生じる可能性が示された。サケ・マス類6魚種の孵化稚魚の24hrLC₅₀pHは4.1~3.6で、ヒメマスが最も弱く、ブラウンマスが最も強かった。ニジマス雌親魚の酸性水飼育(pH4.5・2週間)は発眼率の低下と奇形率の上昇をもたらして次世代へ悪影響を与え、水生昆虫の耐酸性はコカゲロウでは魚類より低かったが、カワゲラ、トビゲラ等は魚類より高かった。

〔キーワード〕 酸性雨、淡水生物、浸透圧、金属溶出、アルミニウム、モデル生態系

1. 序

近年、北欧、北米等では、産業活動に由来する酸性降下物による森林や内水面生態系の深刻な破壊や機能低下が顕在化し、その実態調査や対策研究が地球的規模で推進されてきている。わが国においても、酸性雨が原因と考えられるスギ林の衰退が観測されて以来、中部山岳地域の河川湖沼水のpHが、1977年7.4が1988年6.8のように、ここ10年間に0.6前後低下していること（栗田ら¹⁾）、山頂付近ではpH4.0以下の霧が発生すること、また最近の環境庁「第二次酸性雨対策調査中間報告」でも酸性雨が依然継続的に降り続けていること等が明らかにされつつあり、酸性降下物が内水面生態系に何らかの影響を与える可能性は、ますます高くなっている。

酸性降下物は、内水面環境に対しても大きな影響を与えることが予想され、特に水生生物が生息する環境の悪化、物質循環機能の低下等が懸念されている。しかし、これらに対する調査研究は、わが国ではほとんど着手されていない。

本課題は、酸性降下物が水生生物に及ぼす影響のメカニズムの解明とこれらの生育環境に及ぼす影響の評価並びに河川湖沼の酸性化に対する指標生物を検索するための基礎研究を行なうことにより、酸性降下物による水生生物の被害の低減と対策技術の確立を図ることを目的とした。

2. 酸性環境における生物反応機構の解明

(1) 水生植物の生理・病理学的特性の解明

①研究目的：淡水域の酸性環境における水生植物の、可視障害、光合成との関係、成長阻害要因と光合成及び呼吸量の関係、成長への影響及びpH緩衝能等を明らかにする。

②研究方法：

酸性環境における可視障害及び酸性化と光合成の関係—供試生物として、ウキクサ、クロモ、コカナダモ、エビモ、オオフサモを用いた。これら植物を、所定のpHに調節した試水2 l入りのビーカーに入れ、そのビーカーを直径1 m、容量500 lの水槽内に置き、同一水温に保ちながら、7日間の可視障害を観察した。また、河川水の酸性化速度と植物の光合成量を測定するために千曲川水500 lを入れた水槽3個（1-3区）を養魚池内に設置し、1,2区には、それぞれコカナダモ10gとオオフサモ15gを入れた。1,3区には、pH4.0-4.1に調整した河川水を、対照の2区には無処理の河川水を、毎日それぞれ14 lを入れ、定期的に水槽水のpHとアルカリ度を測定した。水槽内の水が1回交換される日数は、約36日である。両水槽の水でコカナダモとエビモを培養し、その光合成量を陸水生物生産研究法（1969）により定期的に測定した。

成長阻害要因と光合成及び呼吸量の関係—コカナダモ及びエビモの光合成量にpHとアルカリ度のどちらがより大きな影響を与えるかを明らかにするために、人工淡水に硫酸、酢酸、苛性ソーダ、炭酸カリウムを用いてpH、アルカリ度、炭酸量を調整し、陸水生物生産研究法（1969）により呼吸量と光合成量を測定した。

成長への影響及びpH緩衝能—止水域のモデルとして3面の池（5m×1m）を用い、各1.5tonの水を入れ、コイ、モツゴ、ウグイをそれぞれ5尾収容した。各池の注水部側1/3底面には小砂利を敷き、1区、2区ではそこに注水部からヨシ、オオフサモ、ヒシ、コカナダモ、エビモの順に植え付けた。3区では植物を植えなかった。実験期間中、1区には千曲川水、2区、3区には硫酸によりpH3.5に調節した千曲川水を毎日70l注入した。

③実験結果と考察：

酸性環境における可視傷害及び酸性化と光合成の関係—5種類の植物の耐酸性順位は オオフサモ>コカナダモ>クロモ>エビモ>ウキクサであり、その可視障害が現れる限界pH値は、それぞれ3.5、4.1、4.2、4.2、4.5であった。103日後における pHとアルカリ度を見ると2区（対照）では9.1と1.2me/lに対し、1区、3区で、それぞれ5.2と0.16me/l、4.9と0.1me/lであった。3区の方が酸性化速度が大きく、水生植物には緩衝能があることがわかった。光合成量は、pH、アルカリ度が低下するに従って減少したが、呼吸量は、いずれとも一定の関係は見いだせなかった。また、光合成量とアルカリ度とは正の相関が認められるが、pHとは認められなかったことから、pH低下に伴う炭酸量の減少が光合成抑制の大きな要因になっているものと推定された。

成長阻害要因と光合成及び呼吸量の関係—コカナダモの光合成量と炭酸カリウムで調整したpHとは正の相関を示したが、酢酸及び苛性ソーダで調整したpHとは相関は認められず、酢酸調整の場合はコカナダモの枯死限界pH値4.2以上で負の相関の傾向がみられた。また、いずれの試薬で調整した試験水のアルカリ度も光合成量と正の相関を示した。コカナダモ及びエビモの光合成量と水中の炭酸量は炭酸量30~40mg/lまでは正の相関を示すが、それ以上の値では一定となった。また、両植物の呼吸量と水中の炭酸量との関係はほぼ一定であった。

成長への影響及びpH緩衝能—1区と2区の藻場の部分のpHは常に高かった（8.0~9.0）が、2区では植物を除去することによりpHは急速に低下した。3区のpHは実験開始後2月で4.0となった。2区における植物の日間成長率はヒシ5.8%、コカナダモ2.5%、ヨシ1.1%、オオフサモ0.37%、エビモ-4.4%であり、いずれも1区より劣った。魚類の成長は1区と2区とでは差が見られなかった。死魚は3区のpHが4.2以下になった時、観察された。

（2）温水魚類の生理・病理学的特性の解明

①研究目的：コイを用いて、酸性環境による鰓の形態的变化と血清浸透圧、血清中Cl・Naイオン濃度変化の解明、低pHで水中への溶出が高まり魚類への毒性が増大することが知られるAlについて、飼育水温の低pHとAlの複合毒性への影響の解明、受精卵と孵化稚魚への低pHとAlの複合毒性の影響の解明及び飼育水硬度の低pHとAlの複合毒性への影響の解明を目的とする。

②研究方法：

酸性環境による鰓の形態的变化と血清浸透圧、血清中Cl・Naイオン濃度変化の解明—コイ（平均体重約28g）60尾ずつを井戸水（全硬度約70mgCaCO₃/l）にpHコントローラーを用いて硫酸でpHを調節し、AlとしてAlCl₃を添加した4種類の飼育水（対照区pH7.0・Al:0ppm、1区pH4.2・Al:0、2区pH4.4・Al:0、3区pH4.8・Al:0.8ppm、水温約17℃）に収容し、0、1、2、3、5、7日後に8尾ずつ、鰓と血清を採集して、顕微鏡によるえらの組織学的観察と血清浸透圧（蒸気圧測定法）及び血清中Cl（塩化銀反応法）とNa（原子吸光法）イオンの測定を行った。なお、飼育水は2日毎に全量を交換し、無給餌とした。

飼育水温の低pHとAlの複合毒性への影響の解明—コイ（平均4.1g）を20尾ずつ井戸水（アルカリ度42mgCaCO₃/l、全硬度73mgCaCO₃/l）70Lに収容し、AlCl₃をAlとして0、0.2、0.4、0.8ppm添加し、pHを硫酸で7.0、5.2、5.0、4.8に調製し、飼育水を25、18、14、10℃に保って6日間飼育した。一部飼育水を採集し、フレイムレスアトマイザーによりAl濃度を実測した。

受精卵と孵化稚魚への低pHとAlの複合作用の影響の解明—授精後1日のコイ卵とふ化後5日のコイ稚魚を前述と同様に井戸水のpHとAl濃度を調節し、底面を網にした2Lポリビーカーに80卵と

20尾収容して、5日後の生残率を観察した。

飼育水硬度の低pHとAlの複合作用への影響の解明—全硬度5、25、50、100ppmCaCO₃/lの人工淡水を飼育水として、これを硫酸によりpH7.0、5.5、5.0とし、各組合せの供試水をAlCl₃・6H₂OによりAl濃度0、0.2、0.4、0.8ppmに調整し、コイを入れて、6日間無給餌で飼育後、生残率を見た。水温は18℃とした。

③実験結果と考察：

酸性環境による鰓の形態的变化と血清浸透圧、血清中Cl⁻・Na⁺イオン濃度変化の解明—実験区1～3において二次弁表面の塩類細胞による被覆が進行した。pHの低下に伴い、血清浸透圧、Cl⁻、Na⁺が顕著に減少した。3区ではCl⁻のみが低下し、浸透圧とNa⁺への影響は小さかった。従って、Cl⁻の浸透圧への関与の重要性から考えて、Al濃度によっては酸性条件下での浸透圧調節失調はpH4.8でも発生すると予測できる。

飼育水温の低pHとAlの複合作用への影響の解明—斃死率は18と14℃、Al0.8ppmでは50、35%と高く、25と10℃では斃死は殆どなく、飼育水温により影響が大きく異なることが確認された。Atlantic salmonの稚魚で1～19℃では温度が高い方が低pHとAlの毒性は高いというPoleo et al.²⁾の報告とこの温度範囲においては矛盾しない。25℃はAtlantic salmonにとって正常範囲外であり、実験不可能な温度である。コイにとっては好適な温度であり、この温度で毒性が低いことは興味深く、この理由については今後の検討課題である。

受精卵と孵化稚魚への低pHとAlの複合作用の影響の解明—卵よりも孵化稚魚への影響が強くpH5.2・Al0.2ppmで致死的な影響が生じた。

飼育水硬度の低pHとAlの複合作用への影響の解明—コイに対するAlと低pHの複合作用は硬度の影響を強く受け、硬度を5、25、50、100ppmと変えると硬度が低い程、生残率は低くなり、25ppmまで生残率は低くなった。また、硬度5ppmでは低pH、高Al濃度区において24時間以内に90%が死亡した。

(3) 冷水魚類の生理・病理学的特性の解明

①研究目的：硫酸による酸性環境の障害要因の解明、硫酸以外の酸が魚類に及ぼす影響の比較・検討、降海回遊途中のサケ属魚類が酸性水域に遭遇した場合のその後の海洋生活での浸透圧調節に及ぼす生理学的な影響の解明を目的とする。

②研究方法：

硫酸による酸性環境の障害要因の解明—雨水が酸性になる時、原因物質として主要な酸である硫酸を取り上げた。1990年10～12月に天然淡水環境pH6.9～7.2で飼育されたサクラマス2⁺（体重74.5±1.5g）を用いた。鰓による電解質輸送の指標であるtransepithelial potential (TEP:鰓経上皮電位)は、Iwata and Bern³⁾の方法に従い、0.2% 2-phenoxyethanol中に維持する実験魚の背頭部筋肉中に、4% argar-Ringer電極（夏目SP61, 0.86mmφ）を挿入し、他の電極をえら外側部環境水中に設置した。これらの電極はKClキャロメル電極を経て電圧記録計（TOA, EPR-66A）に接続した。測定時間は手術後飼育水と同じ天然淡水で4時間、実験水に変更後3時間の期間にTEPを環境水pHとともに測定した。実験では、1.天然淡水pH7から、pH6、pH5、pH4、pH3に変更してTEPを測定した。2.天然淡水pH7から、pH4およびpH3に変化させ得る硫酸と、その硫酸と等価のNaOHをあらかじめ反応させて中和した溶液を添加した。3.天然淡水pH7から、pH4およびpH3に変化させて1時間後、等価のNaOHを加えて中和した。

硫酸で得られた結果と他の酸が魚介類に及ぼす影響の比較・検討—サクラマスを用いてTEP:経

上皮電位)を測定した。測定時間は手術後飼育水と同じ天然淡水で4時間、実験水に換水後3時間である。これらの実験は硝酸、塩酸、酢酸で求めるpHに調製した試験水中で行い、実験完了後直ちに尾部血管から採血し、遠心した血漿の塩素濃度をクロリドメーター (BUCHLER 4-2500) で定量した。

降海回遊途中のサケ属魚類が酸性水域に遭遇した場合のその後の海洋生活での浸透圧調節に及ぼす生理学的な影響の解明—天然湧水を供試水とし、酸性水はこれに硫酸を添加してpH6.0、5.0、4.0とした。供試魚にはヒメマス、ギンザケ、スチールヘッド、サクラマス、ニジマス、シロサケを用いた。採血は供試魚の尾部血管から行い、遠心後血清を凍結した。解凍血清につきNa、Ca、K濃度を原子吸光法、塩素濃度をクロリドメーター (BUCHLER 4-2500) で定量した。

③実験結果と考察：

硫酸による酸性環境の傷害要因の解明—pH7の天然水では、TEPは約-10mVである。この条件から環境水をpH6、pH5、pH4、pH3に変更すると、TEPは-9mV、0mV、+8mV、+15mVに変化する。このpHの変化と、それに応じて生ずるTEPの増分は直線的関係であった ($r=0.99$)。この結果は、鰓による電解質輸送がpHの関数であることを示唆する。淡水からpH4あるいはpH3に変更し得る濃度の硫酸と、等価のNaOHをあらかじめ中和してから実験水に加えると、TEPは変化せず天然淡水中と同様のTEPを示した。同様にpH4およびpH3で1時間維持してから、硫酸と等価のNaOHで環境水を中和すると、TEPは天然淡水と同様の値まで戻る。水中で、 H_2SO_4 と等価のNaOHによって中和すると、 $H_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow Na^{2+} + SO_4^{2-} + 2H_2O$ となり、右辺の各要素は、鰓の浸透圧調節機能には影響を与えなかった。すなわち、硫酸イオンの高濃度の環境は特に鰓機能に悪影響を与えていない。一方、硫酸だけが環境水中に添加されると、 $H_2SO_4 \rightarrow 2H^+ + SO_4^{2-}$ となり、上述のように SO_4^{2-} イオンが影響を与えないので、硫酸酸性環境による鰓浸透圧調節機能に対する障害は、 H^+ が主要因であることが明らかになる。

硫酸で得られた結果と、他の酸が魚介類に及ぼす影響の比較・検討—天然水から硝酸、塩酸、酢酸でpHを6.5、4.3に調製して3時間実験魚を曝すと、pHの低下とともにTEPは上昇し、pH5付近で電氣的にイオン輸送が平衡する。酢酸ではpH3でTEPは20.8mVまで増加して、20分後に8.5mVまで低下して死亡した。酢酸は細胞上皮膜を固定して、その機能を消失させたものと考えられる。3時間後の血液塩素濃度は、すべての酸でpH6、5、4では低下せず、pH3になると約30mEq/L低下する。種々の酸でpH4に切り替えた直後と3時間後のTEPをみると、実験水切り替え当初、魚は正常な血液塩素濃度と鰓のイオン輸送機能を保持しているはずだが、pH4や3の強い酸性中では時間経過とともに鰓の機能が低下してTEPが減少する。その度合いは酢酸で最も大きく塩酸がそれに続く。

硝酸でpH4、塩酸と酢酸ではpH3に調製して1時間後に水酸化ナトリウムで中和すると、中和とともにTEPは対照群と等しくなる。3時間の実験後に採血の血液塩素濃度はpH4では顕著な変化が現れないもののpH3を中和すると塩素イオンの流出が緩和される。実験の初めから酸を水酸化ナトリウムで中和しておく、とTEPに変化が現れず、血液塩素の流出も殆どなくなる。

以上の結果は、酸の陰イオンは酸性水による魚類の鰓機能障害に関与しないとする今年の結論を支持するとともに、硫酸、塩酸、硝酸は同じメカニズムで酸性障害を引き起こすと考えられた。

降海回遊途中のサケ属魚類が酸性水域に遭遇した場合のその後の海洋生活での浸透圧調節に及ぼす生理学的な影響の解明—天然水から硝酸、塩酸、酢酸でpHを6.5、4.3に調製して3時間実験魚を曝すと、pHの低下とともにTEPは上昇し、pH5付近で電氣的にイオン輸送が平衡する。酢酸では

pH3でTEPは20.8mVまで増加して、20分後に8.5mVまで低下して死亡した。酢酸は細胞上皮膜を固定して、その機能を消失させたものと考えられる。3時間後の血液塩素濃度は、すべての酸でpH6、5、4では低下せず、pH3になると約30mEq/L低下する。種々の酸でpH4に切り替えた直後と3時間後のTEPをみると、実験水切り替え当初、魚は正常な血液塩素濃度と鰓のイオン輸送機能を保持しているはずだが、pH4や3の強い酸性中では時間経過とともに鰓の機能が低下してTEPが減少する。その度合いは酢酸で最も大きく塩酸がそれに続く。

硝酸でpH4、塩酸と酢酸ではpH3に調製して1時間後に水酸化ナトリウムで中和すると、中和とともにTEPは対照群と等しくなる。3時間の実験後に採血の血液塩素濃度はpH4では顕著な変化が現れないもののpH3を中和すると塩素イオンの流出が緩和される。実験の初めから酸を水酸化ナトリウムで中和しておく、TEPに変化が現れず、血液塩素の流出も殆どなくなる。

降海期（4月）のシロサケ稚魚を24時間酸性水に曝してから海水に投入した。淡水中での血清Na濃度は 158 ± 1.0 mEq/l、実験水槽に移して24時間静置回復後、淡水を再び更新して24時間後の対照群は 155 ± 1.2 mEq/lで、両者に差はない。このようなシロサケ稚魚を酸性水中に24時間維持すると、その血清Na濃度はpH5.0区と4.0区において対照区より有意に減少した。同時にpH3.0区では2時間以内に供試した30個体全てが死亡した。これらの結果は、酸性強度が増すに従い、多量の血清Naが体外に流出することを示している。この減少は血清Clにおいても同様に認められた。次に、pH6.0と5.0区の魚を淡水中に戻すと24時間後には血清Na濃度が対照群の水準まで回復したが、3.0区では回復は認められなかった。供試魚を淡水から直接海水に投入すると24時間後に血清Na濃度は変わらなかった。酸性水暴露後に海水に投入した場合も、酸性強度に関係なく血清Na濃度は変わらなかった。これらの結果は、24時間以内の酸性環境への暴露が海水中での浸透圧調節機能に影響をあたえなかったことを示している。

降海期（6月）のベニザケの血清Na濃度は 155 ± 1.6 mEq/lで、海水に移して24時間後は 159 ± 1.2 mEq/lであった。pH5.0区ではシロサケと同様に血清Na濃度は低下し、海水に投入されてもその濃度を正常な水準に維持した。しかし、海水適応能が未発達の前降海期（4月）あるいは降海後期（8月）にpH5で処理をすると、酸性水中での血清Na濃度の低下は認められず、海水中では対照群及び酸性処理群でも血清Na濃度は海水適応水準より高い。即ち、酸性水への暴露が血清イオン濃度の恒常的維持に障害を及ぼす現象は、降海期にのみ発生することが明らかになった。

0+及び1+の6種のサケ属魚種を4月あるいは6月のそれぞれの種の降海期に酸性水に曝した。対照として海水適応能が最も低下する夏期に同様の実験を行った。降海期に酸性水に曝される降海性魚種では、いずれも血清イオン濃度の極端な低下が観察されたが、非降海性のニジマスでは同様な現象は観察されなかった。夏期には降海性と非降海性魚種による反応に一定の傾向は認められなかった。

結論として、淡水生活域での降海性サケ属魚種では、比較的短い降海期に淡水に適応する浸透圧調節機能と海水に適応するための機能を合わせ持つ。これらの相反する機能はいずれも主に鰓の塩類細胞での能動的イオン輸送の機能によって保証されている。通常の淡水環境水では遭遇することのない高濃度の水素イオンが降海期に敏感になっている（ $\text{Na}^+ \leftarrow \text{O} \rightarrow \text{H}^+, \text{NH}_4^+$ ）イオンポンプの働きに異常を起こさせるものと考えられる。

（4）重金属毒性との複合作用

①研究目的：重金属としてしばしば取り上げられるCu、及び低pHで高濃度に含まれると予測され

るAlを取り上げ、Alと低pHの精子活性への影響の解明、アユの精子に対する複合毒性の解明、岩石中に含まれるアルミニウムの酸性水中への溶出の解明、花崗岩中に含まれるアルミニウムの酸性水中における挙動と精子活性に対する溶出液の毒性評価を目的とする。

②研究方法：

Cu、Alと低pHの精子活性及び受精卵への複合作用の解明—実験材料として、群馬県の養魚場で飼育されているイワナ親魚から搾出された精子および卵を用いた。硬度25ppmの人工淡水（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ：26.1ppm、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ：17.7ppm、 K_2SO_4 ：1.1ppm、 NaHCO_3 ：25.3ppm）を基準水として、これに金属濃度が1000ppmの CuCl_2 あるいは AlCl_3 溶液を加えて所定濃度の金属含有人工淡水を作成し、それぞれ H_2SO_4 あるいは NaOH によりpH調整を行い供試水とした。精子活性への影響は、金属濃度0～10.24ppm、pH3～7に調整した供試液中での精子の運動時間、運動能を有する精子の割合、運動強度、凝集反応の強さを指標として評価し、金属とpHの複合毒性の有無を検討した。上記の供試液に暴露された精子の受精能は次の方法で評価した。10mlの供試液に20 μl の精液（数尾の精液を混合）を入れ、10秒間暴露し、続いて供試液とともに卵にかけて10秒間媒精した後、生理食塩水で十分洗卵し、井水内で発生させて、受精率を調べた。また、媒精直後の卵を供試液に24時間浸漬することにより、金属とpHの暴露を行い、発眼率を指標として受精卵への複合毒性の有無を検討した。

アユの精子に対する複合毒性の解明—CuまたはAlの濃度0～10.24ppm、pH3～7に調製した供試液中での精子活性を精子の運動時間、運動能を有する精子の割合、運動強度、凝集反応の強さを指標として評価し、金属とpHのアユ精子への複合毒性の有無を検討した。

岩石中に含まれるアルミニウムの酸性水中への溶出の解明—人工淡水1500mlに径1～5mmの花崗岩あるいは安山岩の破片150gを入れ、硫酸によりpHを調製した。調製後0、2、及び4日目に各区より採水し、孔径0.45 μm のフィルターで濾過した後、フレームレスアトマイザーを用いて溶存アルミニウムを測定した。また、水の量に対する岩石量の多少による溶出量の違いを確かめた。

花崗岩中に含まれるアルミニウムの酸性水中における挙動と精子活性に対する溶出液の毒性評価—pH3.5～7.0に調製した硬度25ppmの人工淡水3000ml中に径4-8mmの花崗岩破片を300g入れ、15日間毎日Al濃度を測定した。同様にpH4.0に調製した人工淡水中に破片径の異なる花崗岩を入れ、Al濃度を測定した。また、一度溶出試験に用いた花崗岩を再度同じ条件下で供試した。溶出液はpHとAl濃度を調整後その中で精子活性を精子の運動時間、運動能を有する精子の割合、運動強度、凝集反応の強さを指標として評価した。

③実験結果と考察：

Cu、Alと低pHの精子活性及び受精卵への複合作用の解明—pH7の供試液中ではイワナ精子に対するCuの影響は10.24ppmから認められるのに対し、Alの影響は0.64ppmと非常に低濃度から認められた。これらの濃度はキンキョで影響がみられた濃度より高かった。pHの低下に伴い金属の影響はより低濃度からみられ始め、pH4では両金属ともに0.16ppmで精子の運動活性を阻害した。イワナ卵に対する酸の影響はpHの低下とともに増大し、pH3では全く生存不可能であった。pH7においてCuは2.56ppmから致死的毒性をみせたのに対し、Alは2.56ppmまで全く影響をみせなかった。また、CuはpHの低下に伴い、より低濃度から毒性を示した。一方、AlはpH4において0.01ppmから複合毒性を示したが、濃度の上昇に伴い毒性は低下した。

アユの精子に対する複合毒性の解明—pH7の供試液中では、アユの精子に対するCuの影響は2.5

6ppm以上、Alの影響は0.64ppm以上で現れ、精子の運動時間の短縮、運動精子の割合の低下等が観察された。pHの低下にともない金属の影響はより低濃度から現れ、pH4ではCuは0.64ppm、Alは0.16ppmから精子の運動活性を阻害した。即ち、アユの精子はイワナより弱く、キンギョより強かった。岩石中に含まれるアルミニウムの酸性水中への溶出の解明—pH5までは、両岩石とも環境水中へのAlの溶出量は少ないが、pH4では4日目までに顕著な溶出がみられ、環境水のAl濃度は花崗岩で148ppb、安山岩で74ppbに達した。環境水に対して岩石の量が多くなると、それに伴い溶出量も増加した。これらのことから、環境水のpHの低下によって水生生物に影響が現れる程のAlが底質から溶出する可能性が明きらかとなった。

花崗岩中に含まれるアルミニウムの酸性水中における挙動と精子活性に対する溶出液の毒性評価—pH6.0以上の人工淡水内では花崗岩からのAlの溶出はごく僅かであったが、pH4.5、4.0および3.5では顕著であり、Al濃度は15日目までにそれぞれ1.36、1.68および5.17ppm達した。また、再溶出過程においても初回後半同様の溶出傾向が続いた。同じpH環境であっても破片径により溶出量が異なり、2-4mm、4-8mm、8-16mm、16-24mmの場合、15日目のAl濃度はそれぞれ4.44、1.68、1.03および1.12ppmであった。これらの結果から、水域の酸性化が進行すると、環境水中にかなりの濃度のAlが添加されることが明らかになった。

キンギョ精子に及ぼすpHの影響は4.4から現れはじめたのに対し、Alが800ppb添加された人工淡水では5.2とやや高かった。Alを800ppb含有する溶出液は7.0からすでに精子活性を阻害した。しかし、pHの低下に伴う溶出液の毒性の高まりは、Alを添加された人工淡水のそれと比べ緩慢であった。コイではpHのみの影響は5.0まではほとんど認められなかったが、4.5から現れはじめ、4.0では大部分の精子が運動能をうしなった。Al添加人工淡水ではその影響はpH7.0において2.56ppmから観察されたのに対し、4.0においては0.64ppmでも阻害された。溶出液ではpH7.0においてAl濃度0.64ppmから阻害が始まり、pHの低下に伴い、その濃度はさらに低くなり、5.0において0.16ppm、4.5において0.04ppmになった。これらのことは溶出液が実際に魚類の精子活性に影響を及ぼすことを示している。即ち、酸性雨による水域の酸性化は同時に溶存Al量の増加をもたらし、両者の複合作用により水生生物に強い影響を及ぼすものと予想される。

3. 生物の耐酸性評価と指標生物の類型化

(1) 温水域生息生物の耐酸性評価

①研究目的：

ウグイ、コイ、モツゴ、アユの授精卵及びそれらの生育段階の異なる仔稚魚の耐酸性評価、フナ、ワカサギ、セスジユスリカ、ミジンコの耐酸性評価、モデル生態系を用いた、止水域の酸性化による水質および生物相への総合的影響の解明を目的とする。

②研究方法：

ウグイ、コイ、モツゴ、アユの授精卵及びそれらの生育段階の異なる仔稚魚の耐酸性評価—供試生物として、ウグイ、コイ、モツゴ、アユの授精卵及びそれらの生育段階の異なる仔稚魚を用いた。供試酸は、単一酸としては硫酸、複合酸は硫酸：塩酸：硝酸を2：1：2の割合で混合したもの（各1N）を使用し、pHは7.0（対照）から3.5まで公差0.5とし、8階級を設定した。なお各実験区とも2区制とした。原水は浅井戸水、水量は卵、仔魚では1.5l、稚魚は3.0lとした。換水は毎日1回、新しく所定のpHに調整した供試水に供試生物を移す方法によった。なお、毎日換

水してもpHの変化（上昇）がみられたので、変動の中間値（平均）を採用し、半数致死濃度はDodoroffの方法（水質調査指針）により算定した。

フナ、ワカサギ、セスジユスリカ、ミジンコの耐酸性評価—供試生物は魚類はフナとワカサギそれ以外の水生生物はセスジユスリカ、ミジンコ、ミズワムシである。

モデル生態系を用いた、止水域の酸性化による水質および生物相への総合的影響の解明—表面積1.65m²、水深80cm、水量1.2m³のFRP水槽3個を準備し、それぞれに十分プランクトンを発生させた水を満たして止水域モデルとした。水槽のうち1個は対照区（C区）として浅井戸水（pH7.5）を、他の2個には同じ水を硫酸によりpH調整した酸性水（それぞれ5.5、4.0）を定量ポンプを用いて注水し続けた。なお、注水量は毎時3.300ml（平均滞留時間約15日）とし、実験期間は7月13日より10月19日までの14週間であった。なお、実験開始15日後、各区に体重約2gのモツゴ、フナを収容した。水質は毎日、プランクトンは週1回、常法により調査した。

③実験結果と考察：

ウグイ、コイ、モツゴ、アユの授精卵及びそれらの生育段階の異なる仔稚魚の耐酸性評価—各魚種ともに平均pH5.2～5.3程度以上では発生が進行し、浮上まで至った。4.6～4.8では発眼まで進むが、以後斃死した。なお、ウグイは、4.11においても一部発眼するものもみられ、他の3魚種とは異なっていた。

4魚種の仔稚魚の24時間半数致死pHは、どのサイズでも、ほとんど4.0～5.0の間にあった。仔稚魚の生育段階による耐酸性は、ウグイとコイでは50～100mg以上になると高まるが、モツゴではあまり変化がみられず、アユでは逆に大型仔魚の方が耐酸性が弱まった。

各魚種の受精卵の24、48時間半数致死pHを予備的に調べたところ、一般に仔稚魚より耐酸性が高いようにみられた。

以上の結果を総合すると、4魚種の耐酸性は大まかに、モツゴ>ウグイ>コイ>アユの順と判断された。

硫酸と3種複合酸に対する各魚種の感受性には大きな差はみられなかった。

フナ、ワカサギ、セスジユスリカ、ミジンコの耐酸性評価—フナ・ワカサギの受精卵はともに平均pH5.2程度以上ではほぼ正常に発生が進行しふ化まで至った。4～5では発眼まで進み以後斃死したが、ワカサギ卵は4.0区においても発眼率がかなり高かった。

前実験の4魚種を加えた結果を総合すると6魚種の耐酸性は大まかにワカサギ>モツゴ>ウグイ>フナ<コイ>アユの順と判断された。魚類以外の水生生物の耐酸性はセスジユスリカ>>ミジンコ<ミズワムシと判断され、ミジンコ、ワムシは魚類と大差がなかった。しかし、ユスリカは極めて強い耐酸性を示した。

モデル生態系を用いた、止水域の酸性化による水質および生物相への総合的影響の解明—pHはC区では8-9で推移したが、5.5区および4.0区では6週間後より次第に低下し、10週以降は5.5区では6.4-7、4.0区では注水のpHに近い値を示した。アルカリ度はC区では全期間1.2meq程度でほぼ一定であったが、5.5区、4.0区では注水後直ちに低下を始め、6週以降は0.2以下となった。NO₃-N、PO₄-Pは次第に減少して3-5週以後は注水の濃度と同程度で推移した。NH₄-NはC区では2週以後不検出であったが、5.5区、4.0区では4週以後急増した。

プランクトンのうち甲殻類は各区とも漸減し、4-10週後には消滅した。輪虫類はC区、5.5区では甲殻類の減少後増加したが、4.0区では14週後に消滅した。藻類のうち鞭毛藻類はC区、5.5区

では時間的変動が少なかったのに対し、4.0区では9週以降激増した。珪藻類、緑藻類はpHの低下とともに減少し、4.0区では珪藻類はごく微量に、緑藻類は皆無になってしまった。

モツゴはC区では幾分増重したのに対し、5.5区ではやや減少し、4.0区では13週後に2尾が死亡し、他魚の体重も著しく減少した。フナは3区とも増重したが、4.0区では低い値に留まった。

(2) 冷水域生息生物の耐酸性評価

①研究目的：ヒメマスの発生初期段階における耐酸性評価、各種サケ・マス類及び水生昆虫等の餌生物の耐酸性評価、ニジマス雌親魚の酸性環境飼育による卵の発生阻害の確認、水生昆虫等の餌生物の耐酸性評価、酸性環境によるヒメマス卵膜の性質変化機構解明を目的とする。

②研究方法：

ヒメマスの発生初期段階における耐酸性評価－ヒメマスの発眼卵、孵化稚魚及び浮上稚魚の各発育段階で各pHにおける生残率の経時変化を調べ、LC₅₀を比較した。また、6種のサケ科魚で、孵化稚魚のLC₅₀を比較した。11月、成熟したニジマス3年魚の雌雄それぞれ5尾ずつを対照群、1週間酸性水飼育後1週間通常水飼育群、2週間酸性水飼育群の3群として飼育した。酸性水のpHは3.0～6.0の範囲で変動した。飼育終了時、それぞれの実験群同士で卵と精子を掛け合わせ、通常飼育水中で孵化・飼育して生残率を比較した。また、血中および生殖腺のpH、イオン、性ホルモン濃度を比較した。なお、酸性化は10%硫酸を飼育水（流水、9±0.5℃）に適下して行った。

各種サケ・マス類及び水生昆虫等の餌生物の耐酸性評価、ニジマス雌親魚の酸性環境飼育による卵の発生阻害の確認－供試生物はふ化後9～10ヵ月令のヒメマス、ホンマス、ブラウントラウト、カワマス、イワナの幼魚と、日光支所内の水路で採集されたヨコエビ、ヒゲナガトビゲラ、オオクマダラカゲロウである。次世代への影響を確認するため、ニジマス11月7日に3⁺ニジマス成熟雌（未排卵）を選別し、10尾ずつ300L円形流水タンク4槽に入れ、11月11日より酸性化実験を開始した。12月4日に、各群の排卵雌より採卵を行い、個体別に10尾の通常雄より採取し混ぜ合わせた精子と授精させ、発眼率、ふ化率、浮上率、奇形率を比較した。採卵時に、血漿、体腔液、卵黄のpHを測定し比較した。

水生昆虫等の餌生物の耐酸性評価－酸性環境によるヒメマス卵膜の性質変化機構解明－ヒメマス卵はリンガー液で満たしたガラスシャーレの台座に乗せ、ガラス電極を差込み、オシロスコープを用い、卵内外の電位差を測定した。

③実験結果と考察：

ヒメマスの発生初期段階における耐酸性評価－耐酸性は発育が進むにつれて低下する傾向を示した。各魚種孵化稚魚のLC₅₀は、ヒメマス4.07、ホンマス3.98、ニジマス3.83、ブラウン3.63、カワマス3.67、イワナ3.70で、回遊性の強いものほど耐酸性が弱い傾向を示した。

ニジマス親魚酸性化実験では、卵の発眼率が対照群で約100%、1週間群で約80%、2週間群ではほとんど0%であった。雄親魚に対する酸性化は孵化稚魚の奇形率を高めた。血中および生殖腺中のpHは変化がなかった。性ホルモン濃度は、採卵された卵中の17 α 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（17 α 20 β -P）が対照群に比べ酸性水飼育群で有意に低かった。血中17 α 20 β -Pは排卵時に高まるため、酸性化は排卵に伴う卵への物質の移行を抑制した可能性が示唆された。

各種サケ・マス類及び水生昆虫等の餌生物の耐酸性評価、ニジマス雌親魚の酸性環境飼育による卵の発生阻害の確認－9～10ヵ月令魚のLC₅₀は、ヒメマス(29.7g)で4.06、ホンマス(6.72g)で3.99、ニジマス(15.5g)で4.02、ブラウントラウト(4.04g)で3.73、カワマス(40.8g)で3.66、イワナ

(10.5g)で4.02であった。この値は、ふ化稚魚期のLC₅₀と比し同等か或いは高くなっており、成長しても耐酸性は変わらないか、低下していくものと思われる。従って魚種間のLC₅₀の傾向は稚魚の場合と同じく、回遊性の強い太平洋サケ属で高いという結果となった。餌生物のLC₅₀はヨコエビで2.44、ヒゲナガトビゲラで2.54、オオクママダラカゲロウで3.32であり、魚類に比べかなり高い耐酸性を示した。特に、ヨコエビやトビゲラといった底生生物は耐酸性が高いと思われる。

ニジマス雌親魚の卵への影響は昨年同様発眼率において見られ、pH4.5群の平均が65.8%と対照群の90.6%に比し劣った。奇形率もpH4.5群で高い傾向を示した。しかし、pH6.5群とpH5.5群では影響が全く見られないため、酸性化の影響はpH5付近よりさらに低い酸性環境で発現してくると考えられる。体腔液、卵黄のpHは全く差が見られなかった。血漿のpHは酸性化群でむしろ僅かに高くなる傾向を示したが、pH5.5群とpH4.5群で差がないため、直接卵発生に影響を与えたとは考えにくい。

水生昆虫等の餌生物の耐酸性評価、酸性環境によるヒメマス卵膜の性質変化機構解明－供試餌生物の24hrLC₅₀pHは、コカゲロウ(4.13) > ユリミミズ(3.77) > ユビオナシカワゲラ(3.00) > ミズムシ(2.37) > ヒゲナガカワトビケラ(2.13) > ヤマユスリカ(2.03)で、全体として高い耐酸性を示していた。

ヒメマス卵の電位差は対照区では卵内が-6mV程度の陰極になっていたが、pH4.5の硫酸酸性水に曝した実験群ではほとんど0になっていた。このことは酸性水飼育が卵膜の透過性を抑制したことを示唆する。

4. 参考文献

- 1) 栗田秀実・堀順一・浜田安雄・植田洋匡(1993):中部山岳地域河川上流域における河川・湖沼pHの経年的低下と酸性雨の関係について. 大気汚染学会誌, 28(5), 308-315.
- 2) Poleo, A.B.S., E. Lydersen and I.P. Muniz(1991): The Influence of temperature on Aqueous Aluminium Chemistry and Survival of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Fingerings. Aquat. Toxicol. 21, 3-4, 267-278.
- 3) Iwata, M and H. Bern(1985): Responses to Salinity and the Effect of Prolactin on Whole Animal Transepithelial Potential in the Goboid Teleost, *Gillichthys mirabilis*. Gen. Comp. Endocrinol., 60, 434-440.

5. 研究発表の状況

発表者氏名	発表課題	発表誌・学会名
岩田宗彦・下山友二・酒井典久・鈴木敬二・井田斉・武藤光司・阿久津梅二	硫酸による酸性環境がイワナの浸透圧調節能に与える影響	平成2年12月養殖研報, 18, 31-37.
伊藤文成・山口元吉	キンギョの精子活性に対する数種の金属の毒性およびpHの影響	平成元年7月日本水産学会中部支部例会講演(要旨集 p. 37~)

山口元吉・伊藤文成	環境の酸性化がウグイの行動に及ぼす影響の実験的解析	平成2年4月日本水産学会春季大会講演(要旨集 p.162)
西村定一・伊藤時夫・山口元吉・伊藤文成・岩田宗彦・橋本康	コイ, モツゴ, フナ, ウグイに対する酸とアルミニウムの影響	平成3年4月日本水産学会春季大会講演(要旨集 p.63)
山口元吉・伊藤文成・松原尚人	数種の魚類の酸に対する忌避行動	平成3年4月日本水産学会春季大会講演(要旨集 p.60)
生田和正・鹿間俊夫・織田三郎・奥本直人	サケ科魚類の産卵および卵稚仔に及ぼす酸性環境の影響	平成3年4月日本水産学会春季大会講演(要旨集 p.160)
岩田宗彦・久田哲也・山森邦夫	硫酸酸性環境がサクラマスの経上皮電位(TEP)に及ぼす影響	平成3年4月日本水産学会春季大会講演(要旨集 p.161)
生田和正・鹿間俊夫・織田三郎・奥本直人	Effects of acidification on reproduction of the rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	平成3年11月Proc. Jap. Soc. Comp. Endocrinol., 6, 9.
生田和正・鹿間俊夫・織田三郎・奥本直人	サケ科魚類の発眼卵と稚魚の耐酸性評価	平成4年4月養殖研報, 21, 39-45.
西村定一・伊藤時夫・山口元吉・伊藤文成・橋本康	コイに対する酸とアルミニウムの影響-飼育水温による毒性の変化	平成4年4月日本水産学会春季大会講演(要旨集 p.240)
伊藤文成・山口元吉	イワナの精子活性に対する低pHと溶存金属(銅およびアルミニウム)の複合毒性	平成4年7月日本水産学会中部支部例会講演(要旨集 p.11)
山口元吉・伊藤文成	酸性水による岩石からのAlの溶出と溶出Alのキングョ精子に及ぼす影響	平成4年7月日本水産学会中部支部例会講演(要旨集 p.13)
山口元吉・伊藤文成	環境水の酸性化と溶存金属の淡水魚類への複合毒性 I. 酸性環境における底質からのAlの溶出	平成5年4月日水学会春期大会講演(要旨集p.339)
伊藤文成・山口元吉	環境水の酸性化と溶存金属の淡水魚類への複合毒性 II. 溶出Alの魚類精子に対する毒性	平成5年4月日水学会春期大会講演(要旨集p.340)
渡辺智治その他	短時間硫酸酸性環境に暴露されたサケ属6種の海水適応能	平成5年4月日水学会春期大会講演(要旨集p.149)
生田和正その他	サケ科魚類の餌料生物の耐酸性評価	平成5年4月養殖研究所報告22号 p.43-48
Watanabe, T., et al.	Serum Ion Regulation in Pacific Salmon Exposed to Short term Acid-water Stress during the Migratory and Post Migratory Season	平成5年12月Suisangakkaishiへ投稿