

C-2 酸性物質の生態系に与える影響に関する研究

(2) 環境酸性化の指標生物に関する研究

③ 環境酸性化の魚類に与える影響に関する研究

研究代表者 中央水産研究所内水面利用部漁場環境研究室 西村 定一

水産庁中央水産研究所

内水面利用部 漁場環境研究室 西村 定一・矢田 崇・伊藤 文成・山口 元吉
漁場管理研究室 内田 和男

水産庁養殖研究所

繁殖研究室 北村 章二・生田 和正
育種研究室 岩田 宗彦

平成5-7年度合計予算額 14,842千円
(平成7年度予算額 5,075千円)

【要旨】コイ発生初期段階への低pHとアルミニウム(A1)のより長期間の影響を明らかにするために、受精卵から40日間にわたり観察したところ、A1が50ppbというわずかな量でも飼育水に含まれると、それほどの低pHではないpH6.0でも19日後に対照と有意な差が生じ、大きな影響を受けた。酸性環境下での生残魚の成長を実験群と対照群を同一環境で飼育し、酸性環境を耐過したワカサギとコイ孵化仔魚のその後の成長・生残を比較したが対照と差が認められなかった。アユはpH5.2において、産卵ならびに排卵が阻害された。メダカの産卵において、死亡個体が見られたpH3.9以下では産卵は停止したが、死亡の見られなかったpH4.1以上では正常な産卵が継続された。メダカの雌雄で耐酸性に差が見られ、雌の方が浸透圧調整能力が高いこと、これにコルチゾル、プロラクチンなどのホルモンが関与することが明らかになった。ニジマスの雌成熟親魚を硫酸酸性水(pH4.5)に1週間及び2週間曝露した後、搾出された卵の胚の発眼率は対照群、1週間処理群、2週間処理群でそれぞれ約100、80、0%となり、卵に損傷が与えられた。同様に、雄成熟親魚を酸性水に曝露した場合、搾出された精子と受精した胚の奇形率が2週間処理で11%にまで高まった。酸性水処理雌では、排卵した卵中の卵核胞崩壊を促し卵成熟を引き起こす $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン量が低値を示した。いくつかの酸性条件下で雌親魚を飼育した結果、卵への影響はpH5以下で現れた。また、ヒメマス雌親魚をpH5.0硫酸酸性水で飼育したところ、排卵前1週間以上酸性環境に曝されると卵への影響が現れた。雄親魚では、酸性処理によって精子形成を促進する雄性ホルモン11-ケトテストステロンが異常な高値を示した。アルミニウムの添加は、酸性化による雄親魚の精質や生理的变化への障害をさらに高めた。これらの結果より、環境酸性化はサケ科魚類の配偶子形成の最終成熟過程における内分泌機構に影響を与える可能性が示された。このことは、酸性雨等による環境酸性化は、比較的弱く短期的な酸性環境であっても、魚類の繁殖機能を低下させることを示唆している。

【キーワード】 酸性化、魚類、産卵、配偶子形成、性ホルモン

1. 序

欧米と同様な酸性雨が全国的に観測されているものの、我が国の河川・湖沼への酸性雨被害は今のところ、報告されていない。しかし、「今程度の酸性雨が今後も降り続いた場合、早ければ10数年のうちに土壌が酸性化して植物に悪影響が出る」との予測も文部省の研究班により明らかにされている。一方、「今程度の酸性雨ならば、我が国の湖沼に酸性雨の被害はほとんどない」という予測が国立環境研から出されている。「今程度の酸性雨」に関しては中国・朝鮮半島における $SO_x \cdot NO_2$ の排出量は2010年には1986年の約3倍になるとの予測が同じく国立環境研から出されている。さらに、中国・朝鮮半島からの酸性雨原因物質の飛来に関する証拠が蓄えられつつあり、今程度の酸性雨が将来に渡って続く確実性は低いと思われる。10~20年後の河川・湖沼への酸性雨被害の顕在化が懸念される。

このような諸状況の中で、環境酸性化が我が国特有の魚種に与える影響に関する研究や諸外国の酸性雨研究での未開拓分野についての研究とそれらにもとづく対策技術の確立が求められている。魚類発生初期段階、産卵、精子、浸透圧調節機構などへの環境酸性化の影響について研究を行ったので報告する。

2. 研究目的

最も弱いと考えられる魚類発生初期への酸性環境とアルミニウムの影響を短期的、中期的に明らかにすること、酸性水に曝され、耐過し生き残った孵化仔魚はその後、成長・生残などに影響が残らないかどうかを明らかにすること、アユの産卵への酸性環境の影響を明らかにすること、メダカの雌雄で認められた耐酸性の機構を明らかにすることなどを目的とすると共に、産卵直前のサケ科魚類親魚に対する酸性化の影響に関し、酸性環境中でどのような生理変化が生じるのか調べるため、成熟親魚を酸性水中で飼育し、得られた卵や精子による胚の発生率や奇形率の変化を調べ、親魚への酸性ストレスが次世代の胚に影響を及ぼすかを解析すると同時に、体液中のpH、血中ヘマトクリット値、及び特に配偶子形成を促進するとされる性ホルモン分泌等の変化を測定することにより、その原因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究方法

(1) 魚類発生初期段階への低pHとアルミニウム(AI)の影響

飼育水は人工淡水(田端1969)により硬度を25 ppm $CaCO_3$ に設定し、モツゴ、フナ、コイの受精卵、孵化直後の仔魚、孵化5日後の仔魚の3発生段階に対する低pHとアルミニウムの毒性をpHを硫酸により7.0、5.5、5.2に調整し、AIは $AlCl_3$ を用い、濃度を0、100、200ppbの組み合わせで5~8日間飼育して、生残率を求めて調べた。ワカサギについては孵化当日の仔魚を水温を15℃にコントロールしたポットに50尾ずつ収容し、同様な硬度の飼育水を用い、pHは7.0、5.5と5.2、AIは0と100ppbの組み合わせで、7日間、無給餌で飼育し、斃死を観察した。より長期間の

影響を明らかにするために、受精直後のコイ卵を約50粒ずつ、直径30cmの丸バットに底を網にした2個の1リットルポリビーカーに収容し、40日間、天然餌料を充分に与えて飼育した。飼育水は同様に硬度25ppmとし、20℃に調整した。設定pHは対照7.0と6.0、5.5に調整し、Alとして0と50ppbとし、6通りの飼育条件とした。いずれも3日毎に全水を交換した。

(2) 酸性環境を耐え生残した仔魚の成長と生残

ワカサギ発眼卵の耳石標識法をALC濃度と浸漬時間をさまざまに組み合わせて標識し、10カ月後まで蛍光顕微鏡で観察して、標識の認定が可能かどうか及び生残率・成長を調査した。孵化直後のコイ仔魚をpH4.8で2日間飼育したところ(水温20℃)、60%が斃死した。この生残魚をALCにより耳石標識後、対照区(pH7.0)の仔魚と混合して14日間飼育し、両者の生残・成長を比較した。

1995年4月28から29日にかけて採卵・受精した諏訪湖産ワカサギ卵(約5000粒)を10℃で保育した。実験区と対照区の魚を識別するために、あらかじめ対照区のワカサギ卵には50 mg/lのALC(アリザリン・コンプレクソン)溶液に24時間浸漬して耳石標識を施し、実験区は無標識とした。孵化当日のワカサギ仔魚を実験区(pH 5.2, Al 100 µg/l)および対照区(pH 7.0, Al 0 µg/l)にそれぞれ約2500尾収容した。このうち、実験区と対照区のそれぞれ100尾を直径10cmの小型水槽に収容して、斃死個体数を観察した。実験区の魚の1/3が斃死した時に、この時生き残っていた仔魚(実験区)をpH7の対照区の仔魚と混合して屋外の飼育池に収容した。池にはあらかじめ醤油粕等を施肥してワカサギの餌となるワムシ類を増殖させた。飼育開始後27日目に約50個体の仔魚を採集して、実験区と対照区の生残比率と成長を比較した。なお、ワカサギの仔魚を小型水槽で飼育することは難しい。一方、大型の飼育池間で実験区と対照区的环境条件を揃えることは極めて困難である。ここでは、したがって、全く同じ環境条件を与えるために実験群と対照群を同一飼育池に混合して収容し、両群の成長・生残過程を比較した。

(3) 酸性環境下における淡水魚の産卵

実験には、新信濃川の河口で遡上時に捕獲し、その後中央水研上田庁舎の屋外池にて養成した海産アユ(*Plecoglossus altivelis*)およびメダカを用いた。アユの産卵する物理環境(水流および砂利)を設置した4個の400L水槽に完熟アユ雌雄を収容し、排卵および産卵経過を観察した。各水槽は井戸水にpHコントローラーにより硫酸を添加し、pH7.0(1水槽:対照群)およびpH5.2(3水槽:実験群)に維持された。実験群のうち一群は未処理(E1)、一群の雌雄には最終成熟を促すためHCG(胎盤性性腺刺激ホルモン)処理(15IU/gBW)を施し(E2)、他の一群(E3)にはすでに排卵している雌を用いた。メダカでは酸性環境化の産卵及び産出卵に及ぼす影響を受精率、生残、血中イオン濃度等を測定して調べた。経代飼育されているヒメダカ(*Oryzias latipes*)を材料に、光条件を14L-10D、水温を26℃、pHを7.0に維持した循環濾過水槽に雌雄、1ペアずつ隔離収容し、産卵を確認しながら1ヶ月間馴致した。ほぼ毎日産卵するペアを5群に分け、それぞれpH7.0(対照)、4.3、4.1、3.9、3.7に維持した水槽に移行して翌日以降の産卵を観察し、産卵が行われたペアの産出卵については受精率を確認した。

(4) メダカにおける酸性環境水中での浸透圧調節機構

魚類の体液浸透圧は、他の脊椎動物と同様常に一定に保たれている。しかし酸性化した環境水中では体表、特にガス交換のため大きな表面積を持つ鰓での電解質の流失が増大し、体液浸透圧が低下する危険に曝されることとなる。メダカを用いた実験では、酸性環境下での受精率・孵化率の低下が示されたが、親魚が酸性環境に入ってから時間経過に従って、これらの卵質低下が回復することも明らかにされた（伊藤ら1995）。この現象は環境水の酸性化による親魚の体液浸透圧調節の失調と、回復すなわち酸性環境に適応する過程で観察されたと考えられる。魚類の酸性環境への適応がどのような機構によるのか、浸透圧調節機構の変化とそれに対する内分泌調節機構の解明を試みた。

メダカをpH4.1の酸性環境水に移行し、雌雄の血中Na濃度および酵素Na⁺, K⁺-ATPaseの鰓での活性を測定した。続いて酸性環境下での浸透圧調節に対する内分泌調節機構を解明するため、メダカに副腎皮質ホルモン、コルチゾルを投与してpH3.8の酸性水に移行し、血中Naと鰓Na⁺, K⁺-ATPase活性への影響を調べた。さらにメダカにみられた酸性適応の雌雄の違いについて解明するため、魚類を含む脊椎動物全般での雌性ホルモンであるエストラジオールの投与を行った。

(5) ニジマス親魚の配偶子形成に及ぼす環境酸性化の影響

サケ科魚類親魚の酸性水曝露が卵や精子に影響を及ぼすか明らかにするため、ニジマス

(*Oncorhynchus mykiss*) 雌雄親魚を硫酸酸性水 (pH 3.0–6.0、平均4.5) で0 (対照群)、1、2週間飼育し、各群雌雄5尾ずつから採卵、採精し、各群間で交配し、常法により培養・孵化させ、発生率を比較した。飼育水は湧水で、水温、pHとも実験期間中 $9.4 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 、 7.2 ± 0.2 とほぼ一定で、総アルカリ度は53 CaCO₃ ppmであった。飼育開始時、雌の卵は排卵前であった。飼育開始時と終了時に血液及び生殖腺の採取を行い、体液pHとテストステロン (T)、エストラジオール-17 β (E2)、11-ケトテストステロン (11-KT)、17 α 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) の各種性ホルモン量を測定した。卵からのホルモンの抽出はFeist et al. (1987)の方法に従い、ホルモン量はラジオイムノアッセイ法 (Ikuta et al., 1987) によって測定した。 χ^2 検定、t検定、ダンカンの多段階検定によって統計検定を行った。

(6) ニジマス及びヒメマスの雌の卵形成過程に及ぼす影響

雌親魚の卵に影響を及ぼす臨界pHを調べるため、排卵直前の雌ニジマス5尾ずつをpH7.2 (対照群)、6.5、5.5、4.5酸性水で2週間飼育した。飼育水のpHはペリスタポンプによる10%硫酸水の滴下をpHコントローラ (日伸理化NPH-680D)で調節して行った。pHは ± 0.1 の変動内で安定していた。飼育終了時、各個体から卵を搾出し、通常飼育雄3尾から搾出した精子を混合しほぼ均等に分割したものを媒精させ、個体ごとに孵化槽に収容した。受精卵は定法に従って孵化させ、発眼率を比較した。また、卵に影響が及ぼされるタイミングを知るため、ヒメマス*O. nerka*の成熟未排卵雌15尾ずつを、pH5及び通常水で飼育し、排卵が確認された個体から採卵し、上記と同様に授精させ、発眼率を比較した

(7) ニジマス雄親魚の精子形成に及ぼす環境酸性化の影響

11月22日に、成熟し排精の確認されたニジマス雄を20尾ずつ、pHを調整した3槽の300L円形水槽に収容し、流水で2週間飼育を続けた。酸性条件は、無調整 (対照群)、pH5.0、pH4.0とし、調整

はペリスタポンプによる10%硫酸水の滴下をpHコントローラで調節して行った。pHは ± 0.1 の変動内で安定していた。飼育水は湧水で、水温、pHとも実験期間中 $10.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 7.4 ± 0.1 とほぼ一定で、総アルカリ度は43 CaCO_3 ppmであった。飼育開始後1、3、7、14日目に各群5尾ずつを任意に取り出し、50ppmアミノ安息香酸エチルで麻酔し、一回につき4尾の雌より搾出された卵を混合しほぼ均等に分割したものに各個体の精子を媒精させ、個体ごとに孵化槽に収容した。受精卵は定法に従って孵化させ、発眼率及び奇形率を比較した。採取された精液は直ちに3000rpmで15min遠心し、精漿のpHを測定した。同時に、精液と同様に遠心し血漿サンプルをとり、pHを測定した後ホルモン測定用として -80°C で凍結・保存した。血中T及び11-KT量はラジオイムノアッセイ法（Ikuta *et al.*, 1987）によって測定した。各群の平均値の有意差検定は、ダンカンの多段階検定あるいはt-検定を用いた。

（8）ニジマス雄親魚の精子形成に及ぼす酸性環境及びアルミニウムの影響

12月6日に、成熟し排精の確認されたニジマス雄魚を20尾ずつ、pH及びAl濃度を調整した300L円形水槽に収容し、流水で2週間飼育を続けた。飼育条件は、無調整（対照群；pH7.4）、pH5.0、pH5.0+Al添加の3群とした。pHの調整はペリスタポンプによる10%硫酸の滴下をpHコントローラで調節して行った。pHは ± 0.1 の変動内で安定していた。Alは計算値が100ppbAlとなるよう、 AlCl_3 溶液をペリスタポンプ流量を調節し滴下した。実験魚は、精子の産生量を調べるため、精液を完全に搾出してから実験水槽に投入した。飼育開始1週間後及び2週間後に各群から5尾ずつ任意に取り出し、麻酔後採精・採血し、精液量、ヘマトクリット値（血液中赤血球体積比）、血漿・精漿pH、血漿・精漿Na量、血漿生殖線刺激ホルモン（GTH）量、血漿雄性ホルモンのテストステロン（T）・11-ケトテストステロン（11-T）量、血漿副腎皮質ホルモンのコルチゾル（F）量を測定した。搾出した精子は各群ごとに同量ずつ混合し、一回につき3尾の雌魚より搾出された卵を混合しほぼ均等に分割した物に媒精し、定法によって孵化させ、稚魚の奇形率を群間で比較した。Na量は原子吸光法で測定した。GTH量は、時間分解蛍光免疫法で測定した。T、11-KT、F量は、ラジオイムノアッセイ法で測定した。

4. 結果及び考察

（1）魚類発生初期段階への低pHとアルミニウム（Al）の影響

硬度が25ppm CaCO_3 程度の時、pHが5.5であってもAlが100ppb程度以上含まれると、モツゴ、フナに壊滅的な影響が、コイにはAlが含まれていないpH5.5でも重大な影響が生じることがあることが明らかになった。なお、西村ら（1994）の5g程度のコイで得た同一の硬度とpHでのデータ：「800ppbのAlでも斃死はない」との比較により、コイの孵化仔魚は低pHとAlの毒性に極めて弱いことが確認された。3発生段階の感受性はコイにおいては孵化5日目の仔魚が最も高くなったが、モツゴ・フナでは明瞭な差は生じなかった。

ワカサギ孵化仔魚はコイの同一発育段階のものより酸性環境に対して抵抗性があり、pH5.2でもAlが含まれていなければ、対照と斃死に差はない。しかし、Alが100ppb含まれているとpH5.2で大きな影響を受けることが明らかになった。

上記の実験結果から実験水温に違いはあるが、発生初期段階の低pHとAlに対する抵抗性はコイ<フナ<モツゴ<ワカサギの順であった。

コイ卵から40日間、種々のpH・Al環境で飼育したところ、対照区(pH7.0/Al(-))は最終斃死率が24%となり、通常の斃死率とみなされるものであった。対照区との有意な差はpH5.5/Al(+)区の4日以降とpH6.0/Al(+)区の19日以降の2実験区に生じ、アルミニウムがわずかな量(50ppb)でも入ると、pH5.5では数日後、pH6.0というそれほど低くないpHでも約20日後には大きな影響が生じることがあることが明らかになった。一方、Farag *et al.* (1993)はcutthroat troutを受精卵から孵化後40日まで飼育し、pH6.0・Al 50ppbの条件で、生残が有意に減少することを観察した。著者らの結果はマス類だけでなく、コイでもpH6.0でAlが含まれると大きな影響が出る恐れがあることを示した。なお、Farag *et al.*の飼育水中のCaは1.43ppm、Mgは0.45ppmであり、より低pHとAlの影響が出やすい条件による結果であった。著者らの用いた飼育水には両イオン共に多く含まれ、Caが7.1ppm、Mgが1.7ppmであり、このような水でもコイにも影響が出ることが明らかになった。

(2) 酸性環境を耐え生残した仔魚の成長と生残

ワカサギ発眼卵の耳石標識におけるALCの適正濃度は、浸漬時間1.5hでは300~1000mg/l, 3hでは300~1000mg/l, 6hでは200~1000mg/l, 12hでは100~1000mg/l, 24hでは25~400mg/l, 48hでは25~200mg/lであった。24h・25mg/lで処理した耳石標識は、処理後8カ月目に約90%が識別できた。同時間・濃度で標識した群の308日後の生残率及び成長は、混合飼育した無標識の対照群のそれらと差が認められなかった。

低pH耐過コイ孵化仔魚の成長と生残：14日後、生残魚と対照魚の生残・成長に差は認められず、生残魚は酸性環境による成長の遅れを取り戻し、追いつくことが明らかになった。この結果はコイにおいては酸性環境の影響がその後の生残・成長に及ぶ可能性は少ないことを示した。

pH 5.2の実験区のワカサギは収容後5日目から斃死しはじめ、6日目の累積斃死率は34%であった。一方、pH7の対照区では斃死個体は3%に留まった。この時、生き残っていた実験区の仔魚を対照区の仔魚と混合して屋外の飼育池に収容した。混合した仔魚の割合は実験区が43% (推定1730尾)、対照区が57% (推定2308尾)であった。27日目に採集した仔魚50尾のうち31尾(62%)が標識魚(対照区)であり19尾(38%)が無標識魚(実験区)であった。両者の混合比と両群を池に収容したときの比との間に差は認められなかった(χ^2 テスト, $P>0.05$)。したがって、両群間の生き残りに差はないものと見なした。また27日目の平均体長は実験区と対照区の間で差が認められなかった(t テスト, $P>0.05$)。したがって、孵化直後のワカサギにおいては、低pHに曝されたときに生き残った魚では正常水に戻した後には順調に摂餌して、成長し、生き残り、酸性水暴露の後遺症はないものと思われる。

以上のようにコイとワカサギの両魚種で、孵化直後の酸性環境暴露に生き残った仔魚が正常水に戻された後は、順調に成長し、生き残り、酸性水暴露の後遺症はないと思われた。

(3) 酸性環境下における淡水魚の産卵

アユの半数致死pHはpH4.8であった。対照群のアユは3日目までに全てが排卵し、6日目までに全てが産卵した。これに対し、E1では7日目までに6割が排卵、2割が産卵したに留まった。E2ではHCG処理により5日目までに9割が排卵したが、7日目までに産卵したのは2割のみであった。実験開始時にすでに排卵していたE3では、酸性環境下であっても4日目までに全てが

産卵した。この結果は、環境の酸性化はアユの生理的最終成熟過程を阻害するだけでなく、それが数日以上続くと産卵行動にも影響を及ぼすことを示唆する。

メダカは、死亡個体が見られたpH3.9以下では産卵は停止したが、死亡の見られなかったpH4.1以上では正常な産卵が継続された。

(4) メダカにおける酸性環境水中での浸透圧調節機構

メダカをpH4.1の酸性環境水に移行すると、体液中に最も多量に含まれ浸透圧調節の指標となる血中Na濃度が雄では一旦低下し、1週間後に元のレベルに回復する過程が示された(Yada and Ito 1996a)。一方雌ではpH4.1に移行してもNa濃度の変化はみられず、雄よりも浸透圧調節能力が高いことが示された。Na輸送に中心的役割を果たす酵素 Na^+ , K^+ -ATPaseの鰹での活性は、酸性環境に移行すると雌雄ともに上昇し、長期にわたり高い活性が維持されていた。この結果は酸性環境下での浸透圧の回復・維持に鰹 Na^+ , K^+ -ATPaseを介した外界からのNaの取り込み機構が重要であることを示すと共に、この酵素を介さない異なる機構によって雌雄の能力の違いが生じたことを示唆している。海水中での浸透圧調節研究に広く用いられるティラピアにおいても、酸性環境下での浸透圧調節に2つの異なる機構の存在が示された。海水に適応できる種*Oreochromis mossambicus*をpH3.5に移行すると血中Na濃度は一旦低下した後回復するが、海水に適応できない種*O. niloticus*ではNaの回復はみられず死んでしまう(Yada and Ito 1996b)。この場合も、鰹 Na^+ , K^+ -ATPaseには兩種で活性の上昇がみられた。すなわちティラピアにおいてはNaの取り込み機構は兩種で活性化されたが、もう1つの機構が酸性環境への適応の可否を分けたと考えられる。

副腎皮質ホルモン・コルチゾルは魚類において鰹 Na^+ , K^+ -ATPaseを活性化し、海水中では過剰なNaの排出を、淡水中では逆に不足したNaの取り込みを促す(McCormick 1995)。コルチゾルを投与したメダカでは、酸性環境下での血中Naの保持と鰹 Na^+ , K^+ -ATPaseの活性化が濃度依存的にみられ、酸性環境への適応過程でみられたNa取り込み機構の活性化にコルチゾルが重要な役割を持つことが明らかとなった。下垂体ホルモン・プロラクチンは膜の透過性を変えることでイオンの流失を低下させ、魚類では淡水中でのNa保持を促す(McCormick 1995)。メダカへのプロラクチンの投与は酸性環境下での血中Naの低下を抑える効果を示したが、鰹の Na^+ , K^+ -ATPase活性には影響がみられなかった。これは Na^+ , K^+ -ATPaseを介さないNaの保持機構に対して、膜の透過性を調節するプロラクチンが重要な役割を持つことを示している。

エストラジオールは雄では Na^+ , K^+ -ATPase活性を変えずに酸性環境下での血中Naを保持する効果がみられたが、雌では効果を示さなかった。さらに雄に対してプロラクチンとエストラジオールの同時投与を行ったところ、プロラクチン単独の投与以上の相乗効果はみられず、2つのホルモンが共通の経路によってNa保持を行っていることが示された。メダカでみられた酸性適応の雌雄差は、雌でのより多いエストラジオール分泌によって、プロラクチンを介して間接的に引き起こされたことが考えられる。

様々な魚種においてコルチゾルとプロラクチンは、環境水の酸性化に伴ってその産生細胞の活性化・分泌量の増大が報告されており、魚類の酸性環境水への適応を調節する重要なホルモンの候補と考えられてきた(Wood 1989)。今回の結果はこの2つのホルモンの酸性環境水中でのナトリウム保持効果を直接明らかにすると共に、それぞれが異なる機構でその効果をもたらすことが明らかになった。これらの機構が酸性化した環境での生残りの成否に、大きく影響すると考えられ

る。また酸性適応の雌雄差は雌性ホルモンによって引き起こされることが示唆されたが、雌雄差ないしは性成熟の過程は、性ホルモンを介しての酸性化への耐性に影響することが考えられる。

(5) ニジマス親魚の配偶子形成に及ぼす環境酸性化の影響

胚発生率の比較：雌親魚の酸性水処理は、その卵の発眼率を有意に低下させた。対照群からの卵はほぼ100%の発眼率を示したのに、1週間酸性処理群および2週間酸性処理群からの卵の発眼率は、80%および0%であった。雌親魚への影響は発眼率のみに現れたので、雌親魚の酸性水曝露の影響は胚の初期発生へ影響を与えられとされる。一方、雄親魚への影響は、孵化稚魚の浮上率へ影響が現れた。これは、酸性処理雄からの精子で授精した胚の奇形率が高まったことによる。これらの結果は、酸性化の影響は親魚の配偶子に影響を与え、その後の胚発生にも影響が及ぶことを示している。

ホルモン量の比較：雌親魚の場合、本実験では血中の性ホルモン量に大きな差は観られなかった。しかし、酸性処理群の雌の卵中のDHP量が対照群に比し低い傾向を示した。DHPは卵の最終成熟にあたる卵核胞の崩壊及び減数分裂を引き起こし、排卵を促進するホルモンであり(Nagahama *et al.*, 1987)、雌親魚の酸性水曝露が卵形成過程に影響を及ぼしている可能性がある。雄では、精子形成を促進する雄性ホルモンである11-KTの血中量が、酸性処理群で高まる傾向を示した。この結果は、酸性化はやはり雄の精子形成過程にも何らかの影響を与える可能性があることを示す。

(6) ニジマス及びヒメマスの雌の卵形成過程に及ぼす影響

卵質に影響を与える臨界pH：受精卵の発眼率の低下が観られたのは、pH4.5群から搾出された卵のみで、卵質に影響を与える臨界pHは4.5と5.5の間に存在すると考えられた。この結果は、魚類を死に至らしめない比較的弱い酸性環境でも、卵に影響を与え次世代の胚の生残に影響を及ぼすことを示唆する。

卵質に影響を与えるタイミング：少なくとも酸性環境に1週間以上曝された雌から搾出された卵で、発眼率の低下が観られた。その発眼率は対照群の90%以上に対し、80%以下に低下した。この結果は、排卵の約1週間ほど前に起こる卵形成に関わる生理変化が生ずるタイミングに、雌親魚が酸性環境に曝されると、何らかの障害を受け、卵に影響が残ることを示唆する。

胚発生率の比較：雌親魚の酸性水処理は、その卵の発眼率を有意に低下させた。対照群からの卵はほぼ100%の発眼率を示したのに、1週間酸性処理群および2週間酸性処理群からの卵の発眼率は、80%および0%であった。雌親魚への影響は発眼率のみに現れたので、雌親魚の酸性水曝露の影響は胚の初期発生へ影響を与えられとされる。一方、雄親魚への影響は、孵化稚魚の浮上率へ影響が現れた。これは、酸性処理雄からの精子で授精した胚の奇形率が高まったことによる。これらの結果は、酸性化の影響は親魚の配偶子に影響を与え、その後の胚発生にも影響が及ぶことを示している。ホルモン量の比較：雌親魚の場合、本実験では血中の性ホルモン量に大きな差は観られなかった。しかし、酸性処理群の雌の卵中のDHP量が対照群に比し低い傾向を示した。DHPは卵の最終成熟にあたる卵核胞の崩壊及び減数分裂を引き起こし、排卵を促進するホルモンであり(Nagahama *et al.*, 1987)、雌親魚の酸性水曝露が卵形成過程に影響を及ぼしている可能性がある。雄では、精子形成を促進する雄性ホルモンである11-KTの血中量が、酸性処理群で高まる傾向を示した。この結果は、酸性化はやはり雄の精子形成過程にも何らかの影響を与える可

能性があることを示す。

(7) ニジマス雄親魚の精子形成に及ぼす環境酸性化の影響

奇形率の変化：各実験群の精子による奇形率の変化は、pH4.0群は2日目にすべて実験魚が死亡してしまったため観察できなかった。pH5.0群の精子による奇形率は14日目に对照群に比し高くなる傾向を示したが、本実験では奇形率が全体的に高く、以前観察された雄親魚の酸性化による有意な影響は観られなかった。胚の発生を示す発眼率も、各群で有意な差は観られなかった。前述のように、ニジマスの雄親魚を酸性水に曝すと、その精子と受精した胚の奇形率が高まる。しかし本研究では、pH 5.0 酸性水飼育後14日目の雄から搾出した精子で、对照群より奇形率を高める傾向が観られたものの、有意差は示されなかった。以前の観察では、奇形率は对照群で約1%、2週間酸性水飼育群で約11%程度の出現率であったのに対し、本実験では对照群でも20%以上の高い奇形率が示されたため、これは交配に用いた卵の方に問題があったと思われる。今回なぜこれだけ高率で使用した卵に奇形が生じたか理由は明らかではないが、使用する雌の卵質をそろえることが重要であろう。

体液のpH及びヘマトクリットの変化：血漿及び精漿のpHとヘマトクリットの変化は、pH4.0群では、1日目に血漿pHが有意に低下したが、pH5.0群では3日目までは差がなく、7日目以降は逆に高くなる傾向を示した。精漿pHは、酸性化群で実験期間を通し对照群より高い値を示した。ヘマトクリット値は、pH4.0群が1日目に異常な高値を示し、pH5.0群においても実験期間を通し对照群よりも高い値を示した。2日目に死亡してしまったpH4.0群の1日目の血漿pHを除いて、酸性環境下での体液のpHは、对照群と同等か高い値を示した。これは、体内の酸性化を緩衝させるため、鰓より炭酸水素イオンを取り込むことによると考えられている (Tang *et al.*、1988)。このように、魚類の体内には緩衝作用があるため、酸性化が直接生殖線内の配偶子形成に影響を与えるとは考えにくい。血液のヘマトクリット値は、pH4.0群で極めて高い値を示し、pH5.0群でも実験期間を通し有意に高い値を示した。ヘマトクリット値は、ストレスによって上昇することが知られているが、酸性化とAlイオンによっても上がるということが報告されている (Poleo and Muniz、1993)。ストレスは副腎皮質系に作用し、コルチゾールの分泌を高めることが知られているが、酸性化のストレスによっても上昇することがコイで報告されている (VanDijk *et al.*、1993)。過度のコルチゾールは免疫系を抑制し、電解質代謝等にも影響を及ぼす。ニジマス親魚にストレスを与えると、その卵の発生率を低下させるという報告もあり (Campbell *et al.*、1992)、コルチゾールを介した酸性化の影響も考慮する必要がある。

血中雄性ホルモン量の変化：雄性ホルモンであるTと11-KTの血中量の変化は、この時期が産卵期であるため、对照群では両ホルモンとも高値で安定していたが、pH4.0群では1日目に両ホルモンで急増が観察され、Tレベルは对照群に比し有意に ($p < 0.05$) 高い値を示した。pH5.0群でも両ホルモンに3日目から増加する傾向が示され、7日目に高いピークを示し、どちらも对照群に比し有意に ($p < 0.01$) 高い値を示し、その後減少する傾向にあった。酸性化によって精巣からの雄性ホルモンの分泌が亢進されることはこれまでに報告がない。本実験結果より、雄性ホルモンであるT及び11-KTは明らかに酸性化によって上昇した。11-KTはTより代謝・生成される魚類、特にサケ科魚類で最も活性の高い雄性ホルモンで (Fostier *et al.*、1983)、精巣における精子形成を促進する。pH5.0程度の比較的弱い酸性環境においても、1週間という短期間にこれだけ異常な高

濃度の精子形成促進因子が分泌されることは、精子形成過程に異常が起きる可能性は高いと考えられる。Vuorinen *et al.* (1990、1992a、1992b)、Vuorinen and Vuorinen (1991) は、水域の酸性化は魚類の繁殖に影響を与え、特に酸性化及びAlイオンの複合影響で雄の生殖腺重量が増加することをコクチマスやパーチで報告している。この報告では、精巢の肥大化は酸性環境による産卵期の遅滞のせいではないかと考察しているが、本実験結果から考えると、雄性ホルモンの分泌亢進もその一因ではないかと思われる。

(8) ニジマス雄親魚の精子形成に及ぼす酸性環境及びアルミニウムの影響

生残率：1週間目までの生残率は、対照群で90%、pH5群で85%、pH5+Al群で35%であった。これは、pH5.0程度の弱酸性環境では死に至る程の影響は与えないが、Alの添加によって強い毒性が現れたことを示す。pH5+Al群は死亡によって個体数が減少したため、1週間目でサンプリングを打ち切った。対照群、pH5群ではその後2週間目まで死亡個体は観察されなかった。

奇形率の変化：各実験群から搾出した精子による、稚魚の奇形率の変化は1週間の酸性処理で、対照群で1.62%の奇形率に対し、pH5群で7.05%、pH5+Al群で21.1%と、酸性及びAl添加群の精子が高い割合で稚魚の奇形を促した。この結果は、これまでに報告した雄親魚の酸性曝露がその精子による胚の奇形率を高めるという結果を支持するが、Alの添加によりさらにその効果が高まることが明らかとなった。2週間の酸性処理では、やはりpH5群で対照群より高い奇形率が示されたが、対照群の奇形率自体も1週間目に比し高くなった。これは、使用した卵の卵質が過熟等の原因により低下した可能性が高い。

精液量への影響：各群の精液量は（実験開始時に全ての個体で完全に予め精子を搾出してあるので、再排精量を示す）、pH5群、pH5+Al群ともに、対照群より少ない精液量を示した。この結果は、酸性化は精質を低下させるだけでなく、排精量も抑えることを示す。

体液pHへの影響：血漿及び精漿のpHは、処理1週間後にはpH5群ではこれまで報告したのと同様、対照群に比しどちらも高い値を示し、2週間後には差がなくなった。しかし、pH5+Al群では逆にpHは血漿・精漿どちらも低くなる傾向を示した。これは、Alによって体液のpHの低下を抑制する緩衝機能が何らかの阻害を受けていることを示唆する。

体液Na濃度への影響：酸性化は魚類の浸透圧調節機能に影響を及ぼし、体液のNaやCl濃度を下げると考えられているが、本実験では血漿Naには大きな変化は見られなかった。しかし、pH5+Al群で精漿のNa量が低下した。この結果は、酸性及びAl処理が精漿のイオン組成に影響を及ぼしていることを示唆する。

ホルモン分泌への影響：成熟に關与するGTH及び雄性ホルモン量は、pH+Al群で異常に分泌亢進していた。通常GTHは排精を促進すると考えられているが、本実験ではこの群で排精量が抑えられていたことから、酸性化とAlは体液性状の変化を通じ排精を阻害し、その結果ホルモン異常を引き起こした可能性も考えられる。

ストレス反応：ヘマトクリット値は魚類に与えられたストレスを反映すると考えられているが、pH5群、pH5+Al群で上昇する傾向を示した。また、ストレスによって分泌が亢進する副腎皮質ホルモンのコルチゾルが、pH5+Al群で異常な高値を示した。これらの結果は、酸性及びAlはニジマスに強いストレスを与えたことを示唆する。ニジマス親魚にストレスを与えると、その卵の発生率が低下することが報告されている (Campbell *et al.*, 1992)。また、過度のコルチゾルはニジ

マスやブラウンマスの成熟過程を阻害することが報告されており (Carragher *et al.*, 1989)、コルチゾルを介した影響の存在も考えられる。

以上の結果より、pH5.0程度の弱酸性環境でも、Alの存在によってニジマスに強いストレスを及ぼし、排精の抑制や、精質の低下による稚魚の奇形率の上昇を引き起こすことが明らかになった。酸性化は魚類の下垂体ーステロイドホルモン系に影響を及ぼし、あるいはコルチゾル等の副腎皮質系の関与によって配偶子形成に損傷を与える可能性が考えうる。今後は、これらのステロイドホルモン系の詳細な動態の解析と、投与による現象の実証を進める必要がある。

5. まとめ

コイ受精卵を酸性環境下で40日間にわたり観察したところ、Alが50ppbというわずかな量でも飼育水に含まれると、それほどの低pHではないpH6.0でも19日後に対照と有意な差が生じ、大きな影響を受けた。酸性環境下での生残魚の成長を実験群と対照群を同一環境で飼育し、酸性環境を耐過したワカサギとコイ孵化仔魚のその後の成長・生残を比較したが対照と差が認められなかった。アユはpH5.2において、産卵ならびに排卵が阻害された。メダカの産卵において、死亡個体が見られたpH3.9以下では産卵は停止したが、死亡の見られなかったpH4.1以上では正常な産卵が継続された。メダカの雌雄で耐酸性に差が見られ、雌の方が浸透圧調整能力が高いこと、これにコルチゾル、プロラクチンなどのホルモンが関与することが明らかになった。

サケ科魚類の配偶子成熟過程において酸性環境に曝露されると、pH5程度の比較的弱い酸性でも配偶子の質を低下させ、受精後の胚の発生に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。その影響に関する詳細なメカニズムに関しては未だ不明な点が多いが、酸性ストレスはホルモン分泌異常等を通じて、配偶子の染色体や遺伝子を変性させている可能性も考えられる。このことは、酸性雨等による陸水環境の酸性化が繁殖期に生ずると、魚類が死亡しない程度の弱い酸性化であったとしても、繁殖率が低下したり、次世代に影響が残り、資源量の減少を招く恐れがあることを示唆している。

6. 本研究により得られた成果

1. アルミニウムが50ppbというわずかな量でも飼育水に含まれると、コイ受精卵はそれほどの低pHではないpH6.0でも19日後に対照と有意な差が生じ、大きな影響を受けた。
2. 酸性水暴露の後遺症はコイとワカサギの酸性水耐過孵化仔魚では認められなかった。
3. アユではpH5.2において、産卵ならびに排卵が阻害された。
4. メダカの雌雄で耐酸性に差が見られ、雌の方が浸透圧調整能力が高いこと、これにコルチゾル、プロラクチンなどのホルモンが関与することが明らかになった。
5. 産卵期のサケ科魚類の雌が酸性環境に曝されると、生まれてくる卵の発生率が低下した。
6. 産卵期のサケ科魚類の雄が酸性環境に曝されると、その精子と受精した胚の奇形率が増加した。
7. 配偶子への影響は、親魚がpH5程度の弱酸性環境に1週間程度曝されるだけで現れた。
8. 親魚が酸性環境に曝されると、性ホルモンの異常な分泌亢進が起きた。
9. アルミニウムは5, 6, 7の現象を促進した。
10. 魚類が直接死亡しない弱酸性環境においても、親魚の配偶子形成過程が阻害され、繁殖に影響

響が及ぼされることが明らかになった。

7. 参考文献

- Campbell, P.M., Pottinger, T.G. and Sumpster, J.P. (1992): Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Reprod.*, 47:1140-1150.
- Carragher, J.F., Sumpster, J.P., Pottinger, T.G., and Pickering A.D. (1989) The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, Salmo trutta L. and Salmo gairdneri Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76: 310-321.
- Farag, A.M., Woodward, D.F., Little, E.E., Steadman B. and F.A. Vertucci 1993. *Env. Toxicol. Chem.* 12, 719-731.
- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B. and Zohar, Y. (1983): The gonadal steroid genesis. in *Fish Physiology*, Vol. 9A (W.S. Hoar, D.J. Randall & E.M. Donaldson, eds.) Academic Press: 277-372.
- Ikuta, K., Aida, K., Okumoto, N. and Hanyu, I. (1987): Effects of sex steroids on the smoltification of masu salmon, Oncorhynchus masou. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 65: 99-110.
- 生田和正、鹿間俊夫、織田三郎、奥本直人 (1991) : サケ科魚類の産卵及び卵稚仔に及ぼす酸性環境の影響. 日本水産学会講要 : p. 160.
- Ikuta, K., Shikama, T., Oda, S. and Okumoto, N. (1991): Effects of acidification on reproduction of the rainbow trout, Oncorhynchus masou. *Proc. Japan Soc. Comp. Endocrinol.*, 6: p. 9.
- 伊藤文成, 矢田 崇, 山口元吉 : 酸性環境がメダカに及ぼす影響Ⅳ. 低pHにおける産出卵の受精および発生不全原因について. 平成7年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p313 (1995)
- Johnson, D.W. and Webster D.A. (1977): Avoidance of low pH in selection of spawning sites by brook trout (Salvelinus fontinalis). *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 2215-2218.
- McCormick, S.D.: Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell function. In "Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation", edited by C.M. Wood and T.J. Shuttleworth, Academic Press, pp. 285-315. (1995)
- 西村定一・伊藤時夫・山口元吉・矢田崇・伊藤文成・橋本康 コイに対する低pHとAlの複合毒性に与える飼育水硬度の影響、平成6年度日本水産学会春季大会講演要旨、P. 300、1994.

- Poleo, A.B.S. and Muniz I.P. (1993): The effect of aluminium in soft water at low pH and different temperatures on mortality, ventilation frequency and water balance in smoltifying Atlantic salmon, Salmo salar. Environ. Biol. Fish., 36: 193-203.
- Tang, Y., Nolan, S. and Boutilier R.G. (1988): Acid-base regulation following acute acidosis in seawater-adapted rainbow trout, Salmo gairdneri: a possible role for catecholamines. J. Exp. Biol., 134: 297-312.
- VanDijk, P.L.M., Van Den Thillart, G.E.E.J.M., Balm, P. and Wendelaar Bonga, S. (1993): The influence of gonadal water acidification on the acid/base status and plasma hormone levels in carp. J. Fish Biol., 42:661-671.
- Vuorinen, P.J., Vuorinen, M. and Peuranen, S. (1990): Long-term exposure of adult whitefish (Coregonus wartmanni) to low pH/aluminium: effects on reproduction, growth, blood composition and gills. in Acidification in Finland (Kauppi, P., Anttila, P. & Kenttamies, K. eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 941-961.
- Vuorinen, P.J. and Vuorinen, M. (1991): Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (Coregonus wartmanni) reproduction and blood and plasma parameters. Finnish Fish. Res., 12: 125-133.
- Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Peuranen, S., Rask, M., Lappalaonen, A. and Raitaniemi, J. (1992a): Reproductive status, blood chemistry, gill histology and growth of perch (Perca fluviatilis) in three acidic lakes. Environ. Pollut., 78: 19-27.
- Vuorinen, P.J. and Vuorinen, M. (1992b): Acidification in Finland: a review of studies on fish physiology and toxicology. Finnish Fish. Res., 13:119-132.
- Weiner, G.S., Schreck, C.B. and Hiram, W.L. (1986): Effects of low pH on reproduction of rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc., 115: 75-82.
- Wood, C.M.: The physiological problems of fish in acid waters. In "Acid toxicity and aquatic animals", edited by R. Morris, E.W. Taylor D.J.A. Brown and J.A. Brown, Cambridge University Press, pp. 125-152. (1989)
- Yada, T and Ito, F: The female medaka (Oryzias latipes) is more tolerant to acidic environment than the male fish. Fish physiol. Biochem., submitted.
- Yada, T and Ito, F: Difference in the tolerance to acidic environment between two species of tilapia, Oreochromis mossambicus and O. niloticus. Bull. Natl. Res. Inst.

Fish. Sci., submitted.

研究発表状況

口頭発表

伊藤文成・矢田 崇・山口元吉(1995) 酸性環境がメダカに及ぼす影響 IV. 低pHにおける産出卵の受精および発生不全原因について. 平成7年度日本水産学会春季大会講要、P. 313.

矢田 崇・山口元吉・伊藤文成(1995) 酸性環境がメダカに及ぼす影響 V. 低pHへの適応過程における雌雄差. 平成7年度日本水産学会春季大会講要、P. 313.

西村定一・伊藤時夫・伊藤文成・山口元吉・矢田崇(1995) ワカサギ・コイの発生初期段階への低pHとアルミニウムの影響. 平成7年度日本水産学会春季大会講要、P. 314.

西村定一・伊藤時夫・伊藤文成・山口元吉・矢田崇(1996) コイ発生初期への低pHとアルミニウムの中期的影響. 平成8年度日本水産学会春季大会. P. 122

上原浩二・渡辺智治・山田英明・山森邦夫・井田斎・岩田宗彦(1995) シロサケとヒメマス稚魚の酸性環境下における行動とストレス. 平成7年度日本水産学会春季大会講要、P. 166.

Ikuta, K., and Kitamura, S. (1995) Acidification of adult fish damages the development of their coming generation. The 5th International Conference of Acid Deposition. Goteborg, Sweden.

生田和正・岩田宗彦・西村定一・伊藤文成(1995) 陸水の酸性化と魚類. 第42回日本生態学会大会.

生田和正・天野勝文・鹿間俊夫・中村英史・北村章二(1996) サケ科魚類の卵・精子成熟過程に及ぼす環境酸性化の影響. 平成8年度日本水産学会春季大会.

論文発表

Watanabe, T., Ida, H., and Iwata, M. (1995) Serum ion regulation in Pacific salmon exposed to short term acidwater stress during seawater migratory and post migratory seasons. Fish. Sci. 61(2); p. 353.

Ikuta, K., and Kitamura, S. (1995) Effects of low pH exposure of adult salmonids on gametogenesis and embryo development. Water, Air and Soil Pollution 85; 327-332

Yada, T and Ito, F: The female medaka (*Oryzias latipes*) is more tolerant to acidic environment than the male fish. Fish physiol. Biochem., submitted.

Yada, T and Ito, F: Difference in the tolerancne to acidic environment between two species of tilapia, Oreochromis mossambicus and O. niloticus. Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci., submitted.