

水域環境に人工材料を使用する際の 長期的な環境影響評価法の提案とその検証

SAFETY ASSESSMENT OF RECYCLING MATERIALS IN AQUATIC ENVIRONMENT

間野伸宏¹・中瀬浩太²・廣瀬一美³・永倉大朗⁴・古賀大三郎⁵

Nobuhiro MANO, Kouta NAKASE, Hitomi HIROSE, Dairou NAGAKURA and Daisaburo KOGA

¹農博 日本大学専任講師 海洋生物資源科学科 (〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

²正会員 五洋建設株式会社 環境事業部 (〒112-8576 東京都文京区後楽 2-2-8)

³農博 日本大学名誉教授 海洋生物資源科学科 (〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

⁴日本大学学生 海洋生物資源科学科 (〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

⁵工博 五洋建設株式会社 環境事業部 (〒112-8576 東京都文京区後楽 2-2-8)

Recently, environmental materials that use the recycling material are developed. When environmental materials are applied in the sea area, it is necessary to confirm the safety to the environment. However, a standard assessment to evaluate long-term safety to the aquatic ecosystem is not established. In this study, we designed a long term toxicity test using either freshwater or marine fish for safety assessment to the recycling materials. Experimental fishes were administered in small aquarium tank spread with divided dose of 0, 25, 50, 100, and 200g/L artificial zeolite (AZ) prepared from incineration ash. After 90 days, there were no apparent signs of toxicity and significant histological changes such as degeneration and necrosis of kidney and gill lamellae were not observed. On the other hand, blind side pigmentation (staining) was observed in all flounder administrated with high dose AZ. These results indicate that fish toxicity of AZ was low and flounder used in this study was effect by different factors as toxicity. We discuss the effectiveness of long term toxicity test using fish to safety assessment in this study.

Key words: Evaluation method, recycling material, aquatic environment, long term toxicity test
oryzias latipes, *paralichthys olivaceus*, sand capping

1. はじめに

大都市周辺の湾奥部に形成される閉鎖性海域は、もともと栄養分が過剰な上、波浪の影響が小さい場所にあるため、海水交換が円滑ではなく、系内での物質滞留時間が長いのが基本的特徴である。このため、対象海域に対して負荷量が増加すると容易に水質底質が悪化する¹⁾。

水質悪化の要因となるリン酸塩や窒素化合物の供給源が海底に堆積した有機物である場合、これらを除去する浚渫や図-1に示すように砂で覆って溶出を封じ込める覆砂が数多く実施されてきた²⁾。しかし、近年天然資材が枯渇・高騰する中で、覆砂工法を採用する場合、砂の代わりにリサイクル材の利用が検討されるようになった。

リサイクル材を活用する場合、環境への安全性を確認することが基本となる。化学特性については分析方法および基準値が規定されており、生物に対しては急性毒性試験から評価されることが一般的である。しかし、生態系への長期的な影響を評価するための標準的な手法は定まっていない。

本研究では、環境資材の長期的環境影響を評価する方法として、被検材料を底面に敷設した水槽内に

て対象生物を配置して、3ヶ月間の亜急性毒性試験を行うとともに、病理組織学的観察を実施する影響評価法を考案した。ここでは被検物質として製紙灰を原料とした人工ゼオライトを用い、考案した環境影響の評価とその妥当性を検証した。

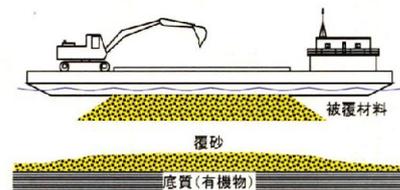


図-1 覆砂施工イメージ図

2. 人工ゼオライト

(1) 特徴

人工ゼオライトとは、主にケイ素とアルミニウムからなり、多孔構造の結晶構造の中に陽イオンを持つ材料である。吸着・イオン交換・触媒などの多様な特性を有し、肥料中の保肥材、洗剤中の軟水化材や脱臭材など、幅広い用途で利用されている³⁾。特

に海域の覆砂材として用いた場合にはアンモニウムイオンなどの吸着効果が期待される。

(2) 基本特性

実験では片山らの製造方法⁴⁾に従い製造した人工ゼオライトを使用した。

a) 物理特性

実験に用いた人工ゼオライトの土粒子密度は $2.63\text{g}/\text{cm}^3$ であり、一般土砂と同程度であった。また、**図-2**に示す粒度分布から地盤工学的には「きれいな礫」に分類された。

b) 化学特性

人工ゼオライトを海域環境へ散布する場合、土壤汚染対策法や海洋汚染防止法を遵守する必要がある。そこで、定められた手順に従い分析し、土壤汚染対策法による含有量・溶出量試験、および海洋汚染防止法の水底土砂の判定基準をクリアしていることを確認している。

(3) 効果

底質から溶出するアンモニア性窒素の覆砂による封じ込め試験⁵⁾によると、砂に重量比5%の人工ゼオライトを混合した混合砂の覆砂厚10cmは、砂のみの覆砂厚30cmと同等の封じ込め効果となっている。つまり、人工ゼオライトの混合率を増加させることで、天然砂の利用度を大幅に低減させることや抑制期間を長期化させることが可能になると言える。

3. 実験方法

(1) 供試魚

供試魚には、3週間以上馴致飼育を行ったヒメダカ *Oryzias latipes* 成魚およびヒラメ *Paralichthys olivaceus* (魚体重約2または3g)を用いた。

(2) 亜急性毒性試験

亜急性毒性試験の概要は**図-3**に示した。なお被検物質が粒状の非可溶性物質のため、飼育水量(1L)当りの被検物質質量(g/L)を基準単位とした。また、毎日一定時刻に魚類の行動観察および死亡個体の確認と計数を行った。それぞれの供試魚に対する実験条件や管理方法は**表-1**に示す。

a) ヒメダカ

本研究で使用した人工ゼオライトおよび大磯砂を**図-4**に示す。両材を混合することにより、1水槽につき混合土(混合率:0, 12.5, 25, 50, 100%)2000gを作製した。これにヒメダカ飼育水10Lを加えて1時間攪拌した後、水槽に配置した。この水槽を12時間静置して沈殿させた後、**表-1**の条件で供試魚をこの水槽に移して亜急性毒性試験を開始した。死亡魚が出た場合には馴致飼育中の魚体を実験水槽に移し、1水槽当りの魚体数に差異がでないようにして

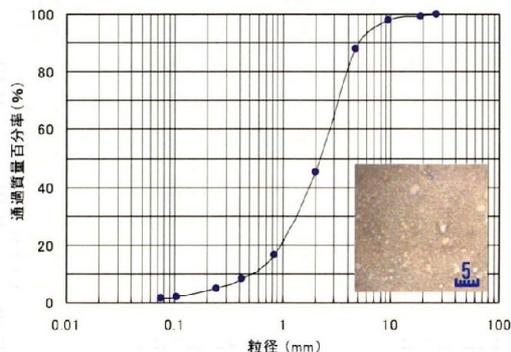


図-2 人工ゼオライトの粒度分布

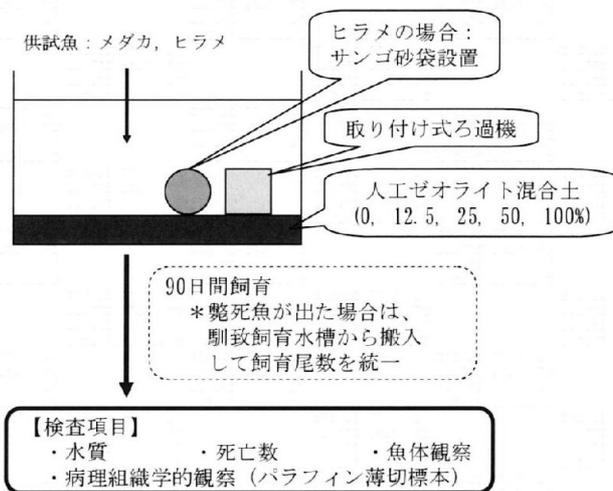


図-3 亜急性毒性試験の概要

表-1 実験および管理条件

条件	ヒメダカ	ヒラメ
飼育水	曝気水道水	人工海水(比重1.021)
水質管理	投入式濾過槽	投入式濾過槽(定期的に濾過槽洗浄)
	蒸発分のみ飼育水を補充	サングラス入ネット配置(pH安定化)
水温	20°C±1°C	23°C±1°C
飼育密度	7尾/1水槽	I: 6尾/水槽, II: 4尾/水槽
日照	人工照明 12L/12D	人工照明 12L/12D
給餌	配合飼料適当量(毎日)	配合飼料 魚体重の1~3%(毎日)
水質測定	pH, DO, NH4(毎週)	pH, DO, NH4(毎週)
水槽容積	20リットル	30リットル
飼育水体積	10リットル	20リットル
ケース数	2水槽/1濃度	同条件2回実施(魚体数違い)
その他	—	飼育水比重調整(毎週)

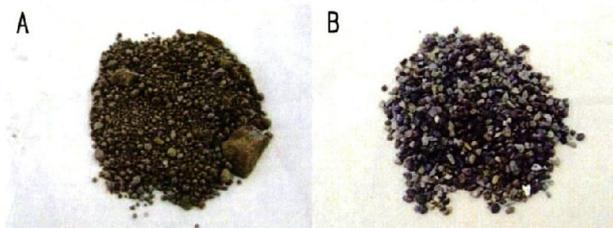


図-4 本研究で使用したAZ(A)および大磯砂(B)

飼育実験を継続した。実験最終日には全尾について鰭の欠損や潰瘍の有無等を肉眼で観察した後、ブアン液で魚体ごと固定した。定法に従いパラフィン薄切標本を作製後、マイヤーのヘマトキシレン・エオシン二重染色 (HE 染色) または PAS 染色を施し、光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を実施した。なお病理組織学的検査では、供試魚のロット (年齢、成熟状況、水質や給餌内容等を含む各種飼育条件) の違いによって組織の状態は変化するため、正常個体による標準基準組織を設けることは困難であった。すなわち、他ロットの魚体による標準組織との比較は被検物質が関係していない影響要因を検出してしまふ恐れがあったことから、本実験における異常の判定では人工ゼオライト混合率 0% の個体を標準対照組織として、常に光学顕微鏡上で同組織と人工ゼオライト区の標本を比較し、その違い (組織・細胞構造、染色性など) を全て記録する形で実施した。また高倍率観察 (200 倍以上) では、デジタルカメラを用いて組織画像を記録し、複数の観察者によりコンピューター画面上で実験区間を比較した。

なお魚類に毒性物質を投与した場合、ミネラルの吸収・排出に重要な役割を果たしている鰓組織の上皮細胞の増生や、排泄器官である腎臓組織構成細胞の壊死などがよく観察される。図-5⁶⁾ に毒性物質を暴露させた魚類の典型的な病理組織像を示す。毒性物質を含む環境水中に暴露したコイの鰓組織では上皮細胞が増生して鰓弁が棍棒化し、腎臓では尿管が壊死崩壊していた。またストレス環境下で飼育した魚類の皮膚や腸管組織では上皮細胞の剥離や粘液の分泌活性の亢進などが観察される。図-6 は水温を 30℃ に上昇させたヒラメの有眼側の皮膚組織であるが、水温 20℃ で飼育していた対照区の魚体の皮膚に比べ、矢印で示した粘液細胞が顕著に増加している様子を認めることができる。そこで本研究では、毒性物質の影響を受け易い鰓や腎臓組織を中心に、皮膚などの粘膜組織についても詳細な観察を行った。

b) ヒラメ

ヒラメの亜急性毒性試験に使用した実験水槽を図-7 に示す。ヒラメでは、作製した混合土 4000g に人工海水 (比重 1.021) 20L を加えて攪拌したものを 30L ガラス製水槽に移し、pH 安定のため約 250g のサ

ンゴ砂を入れたネットを設置した。なお、ヒラメを用いた亜急性毒性試験では異なる魚体サイズを用いて 2 回同試験を実施した。

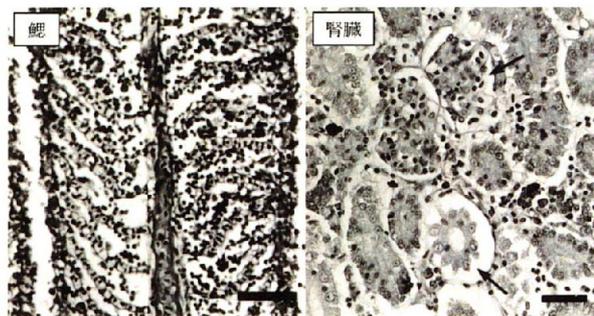


図-5 毒性物質に暴露させたコイの鰓 (A) および腎臓 (B) における典型的な病理組織像⁶⁾。HE 染色。

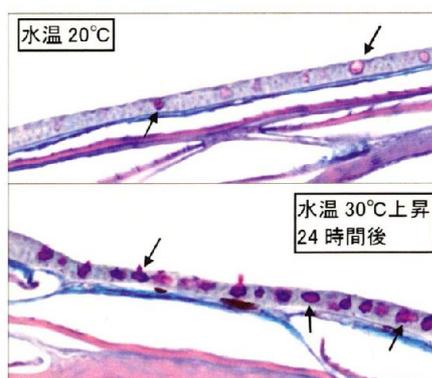


図-6 水温を 30℃ に上昇させたヒラメの皮膚組織。PAS 染色。間野ら (未発表)



図-7 ヒラメの亜急性毒性実験水槽

表-2 亜急性毒性試験におけるヒメダカの死亡状況 (表内の数値は死亡魚数を示す)

実験区	経過日数																			累積死亡数					
	3	5	9	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	29	30	32	36	43	62		68	78	79	89	
100%	I												1	2											3
	II	1					1	1				1													4
50%	I									1				1	2	2	2			1					9
	II		1				1																		2
25%	I																								0
	II																						1		1
12.5%	I														1								1		2
	II																				1				1
0%	I							1			1	2							1	1		1			7
	II			1	3	1	1			1													1		8

1回目(実験I)では1水槽当り6尾(魚体重約2g),2回目では実験Iで魚体間の競合が認められたため4尾(魚体重約3g)を供試魚として90日間給餌飼育した.なお死亡魚が出た場合はヒメダカ同様に馴致水槽から同サイズの魚体を移し,1水槽当たりの魚体数に差異がないように調整した.

実験最終日に全尾取り上げ,形態や体色などを中心に肉眼により魚体観察を行った.また解剖して皮膚,鰓,および内臓組織を採取し,ヒメダカと同様の手順で病理組織学的検査を実施した.

4. 結果

(1) ヒメダカ

ヒメダカによる亜急性毒性試験の死亡状況に関する結果を,表-2に示す.試験開始3-9日後にかけて病的症状を示さず死亡する個体が認められた.また,実験開始20-30日後には細菌感染症(尾ぐされ病)やミズカビ病が発生し,その後多くの実験区において散発的に死亡魚が観察された.しかし,実験終了時の累積死亡数は対照区より高い値を示した実験区はなく,人工ゼオライト12.5%および25%区は他区に比べ死亡数が少ない傾向がみられた.なお実験期間を通して魚体の摂餌や遊泳行動に異常は観察されず,水質も実験区間で大きな違いは認められなかった.

病理組織学的検査における典型的なヒメダカの組織像を図-8および図-9に示した.光学顕微鏡を用いて主に鰓,皮膚,消化管(腸管),肝臓,および腎臓組織を観察したところ,全ての人工ゼオライト区において人工ゼオライト混合率0%の対照区の魚体と異なる病理組織学的に異常と判断された組織像は確認されなかった.また多くの供試魚は生殖腺組織が発達しており,病理組織観察において異常は観察されず,卵巣組織では各成熟段階の卵細胞が認められた.また,精巣組織の精管内には鞭毛を有する成熟した精子が観察された.

本研究では供試魚の産卵に関する詳細な観察は実施していないが全ての実験区で産卵が確認されてお

り,病理組織学的検査においても卵や精子の成熟過程に異常は認められなかった.得られた発眼卵を他の水槽に移し飼育したところ,ほぼ全ての卵は孵化し,その7割が成魚まで生育した.

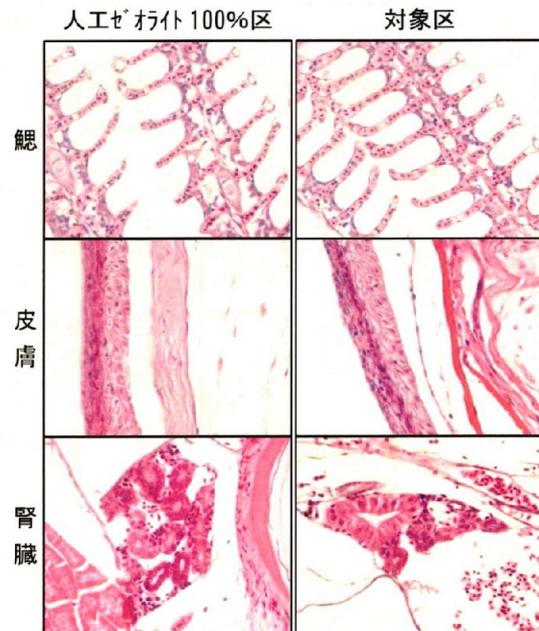


図-8 ヒメダカの鰓,皮膚,および腎臓組織のパラフィン薄切組織標本(×400倍).HE染色.

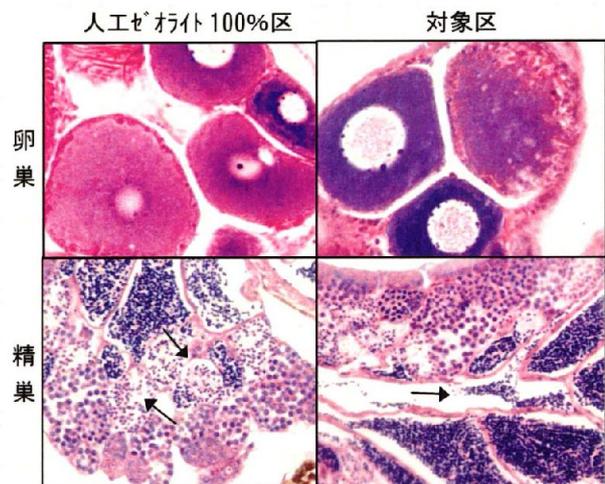


図-9 ヒメダカの卵巣および鞭毛を有する成熟した精子(矢印)が認められる精巣組織のパラフィン薄切組織標本(×400倍).

表-3 亜急性毒性試験におけるヒラメの死亡状況

実験区	経過日数																累積死亡数
	10	20	22	38	42	43	45	55	61	69	71	80	83	85	90		
100%	I												1	2		3	
	II	1					1	1				1				4	
50%	I									1					1	2	
	II		1				1									2	
25%	I															0	
	II															0	
12.5%	I														1	1	
	II															0	
0%	I							1			1	2				4	
	II			1	3	1	1				1					7	

(2) ヒラメ

ヒラメにおける亜急性毒性試験の死亡状況に関する結果を、表-3 に示す。実験Ⅰでは、飼育開始 10 日後から散発的に死亡する個体が認められ、累積死亡数は人工ゼオライト 50% 区が最も多く 6 尾であった。しかし、対照区 (0% 区) でも 4 尾死亡しており、人工ゼオライト混合率との間に関連性は認められなかった。なお全ての死亡個体が死亡時の生存個体より小型であり、死亡前から摂餌行動を示さなくなっていたことから、死亡原因は餓死によるものと推察された。また実験Ⅰの結果を踏まえ、実験Ⅱでは 1 水槽中の飼育個体数を 6 尾から 4 尾に減らして実施したところ、全濃度区で死亡尾数は減少した。なお生存個体の摂餌行動は実験区間で差異は認められなかったが、実験開始直後における人工ゼオライト 50% や 100% 区のヒラメは着底の際に舞い上がる混

合土から逃避するような遊泳行動が認められた。同行動は実験開始 20 日後以降では全く観察されなくなったが、実験終了時に魚体を取り上げ観察したところ、個体差はあるものの人工ゼオライト 50-100% 区の魚体は無眼側が黒化する傾向が観察された。特に実験Ⅰでは、図-10 に示すように無眼側の大部分が黒化する魚体も観察された。なお実験区間で成長率や水質に違いは認められなかった。

病理組織学的検査における典型的なヒラメの組織像を図-11 に示した。ヒメダカと同様に各組織を観察したところ、腎臓組織において矢印で示したメラノマクロファージセンター (MMC) と推定されるメラニンの沈着が多数認められた。しかし、MMC は対照区のヒラメでも認められており、本実験において人工ゼオライト区に特異的な異常や違いは観察されなかった。

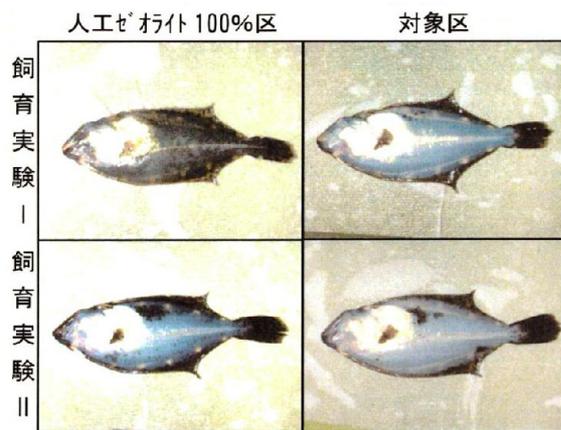


図-10 飼育実験ⅠおよびⅡ終了後に取り上げたヒラメの無眼側。

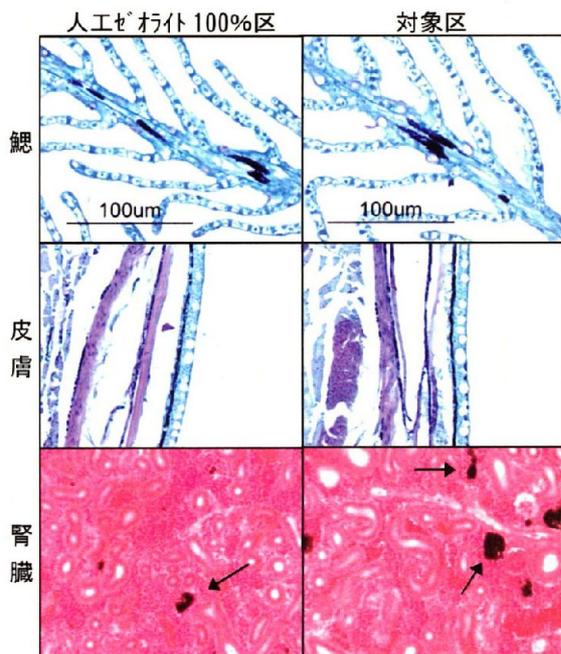


図-11 ヒラメの鰓、皮膚、および腎臓組織のパラフィン薄切組織標本 (×400 倍)。PAS または HE 染色。

5. 考察 (今後の展望)

リサイクル資材の海域環境への活用は、砂等の良質な埋立材料の逼迫にともない、今後とも国内外で増加してゆくと考えられる。これらの材料が実海域で用いられるときには、大量の材料が長期間にわたって海域に暴露されることになる。このような場合に従来のような半数致死濃度を求めるだけでは、周辺の漁業者や生活者から材料の安全性に関わる不安を取り除くことは困難であると思われる。そこで、海域に生息する生物の生態や生理まで踏み込んだ検証を行うことが必要である。

哺乳類における亜急性毒性試験は、被検物質を長期間連続して投与あるいは暴露することによって物質の毒性を検索し、ヒトに生ずる中毒の予測と使用量の安全量を推定するために実施される。一方、水中生活者である魚類 (水生生物) を対象とした同試験は、被検物質による魚類への影響限界濃度を求めると同時に、水環境や生態系を介したヒトへの影響を推察することを目的としている⁷⁾。しかし、陸上動物に比べ魚類などの水生生物は総じて飼育が困難であり、個体差も生じ易いため、安定した再現性の高い長期の飼育実験を遂行するには経験豊かな技術者を必要としてきた。また海産魚を利用するためには、通常、飼育用の海水を含めた飼育設備の問題を解決しなければならない。そこで本研究では、魚類を実験動物とした簡易な亜急性毒性試験法を模索した。供試魚には年間通じてペットショップや種苗センターから購入することが可能なヒメダカおよびヒラメを選択した。飼育水槽には簡易な取り付け式の濾過槽を設置したのみの 20 または 30L の小型水槽を使用し、飼育水も場所を選ばず入手可能な水道水や人工海水を用いた。また飼育期間中における感染症等のトラブルに対応するため、実験期間を通して供

試魚の馴致水槽を用意しておき、死亡魚が出た場合はその水槽から実験水槽に必要尾数を移す形で実験を継続した。本毒性試験の結果、実験期間を通して死亡尾数は認められたものの累積死亡数は対照区と差異が認められず、本ゼオライトが魚類に悪影響を及ぼす現象は確認されなかった。また本研究では主に病理的組織検査により上記結果の検証を実施したが、やはり対照区を含めた実験区間で差異は認められなかった。

病理組織学的検査は、被検物質による影響を受けた組織の障害像を直接把握でき、被検物質の毒性発現の作用機序や症因を推察する上でも有効な検査手法である。しかし魚類の毒性試験において同法を採用していない事例も多い。これは組織観察には修練をつんだ経験者が必要であると考えられており、得られた観察結果を数値化することも難しいことなどによるものと推察される。本研究では組織異常を観察・記録するのではなく、光学顕微鏡やデジタルカメラによる撮影組織画像の比較観察により、対照区と異なる組織像を全て検出していく方式を採用した。特にデジタルカメラにより記録した組織画像をコンピューター画面上に並べた比較観察は、短期間で観察が終了し、得られた検出記録も観察者間で差異が認められず、今後の魚毒性の解析手法の一つとして推奨できるのではないかと考えている。

なおヒラメでは人工ゼオライトの高混合率区において実験開始後しばらく忌避様の行動が認められ、無眼側が黒化する傾向も観察された。ヒラメなどの異体類における無眼側黒化は、本来色素胞が発達しない無眼側が有眼側化する左右の形態異常によるものと考えられており、その発現機構については不明な点が多いものの、ストレス要因がする存在する環境下では発生し易いことが報告されている^{8,9)}。本実験の被検物質である人工ゼオライトは、大磯砂に比べると細かい粒子状であり、特に実験開始後しばらくはヒラメの行動の際に粒子が舞い上がる様子が観察されていたことから、ヒラメにとって一種のストレス源となっていた可能性がある。江上⁷⁾は亜急性毒性試験の評価項目として、死亡数（生残率）以外に外部形態観察、遊泳・摂餌行動、成長、繁殖性、摂餌量、血液学的検査、および病理組織学的検査等を挙げており、従来のような単なる死亡個体数や生残率のみでなく、魚種や研究設備に応じて評価実験を併用することによって、多様な視点から被検物質の安全性評価ができるものと考えられた。

水中に溶存あるいは懸濁した物質が魚毒性を有する場合、通常、魚類の体内に取り込まれてはじめて毒性を発揮する⁷⁾。しかし、毒性発現までにかかる

表-4 本毒性試験と従来の急性毒性試験の比較

要件	本試験	従来の急性毒性試験
利点	<ul style="list-style-type: none"> ・低毒性物質の解析 ・蓄積性物質の影響解析 ・実験動物の生理機能に対する被検物質の影響解析 ・被検物質の生態系への影響解析 	<ul style="list-style-type: none"> ・強毒性物質の解析 ・短い実験期間 ・標準法やモデル魚が存在し、既報との比較が可能
欠点・課題	<ul style="list-style-type: none"> ・長期の飼育実験 ・実験魚種を選択 ・被検物質に対する実験動物の適応性に関する解釈 	<ul style="list-style-type: none"> ・低毒性物質の解析 ・蓄積性物質の影響解析

時間は物質によって大きく異なるものと推察され、低毒性や蓄積性物質の場合、表-4 で示したように従来の急性毒性試験では検出できないケースも多数あるものと考えられる。実験結果が得られるまでに時間が必要なことや実験魚種の選定など課題もあるが、本研究で取り上げた人工材料には様々な物質が含まれており、また急性毒性試験と同様に別々の研究結果を比較解析できるよう、魚類の亜急性毒性試験の基準となるガイドラインを検討していく必要がある。

今後とも各種のリサイクル材を海域に適用することを考慮する場面が増加することが考えられる。このような場合に、ここで提案したような実験を事前に行うことで、漁業者をはじめとする関係者に納得していただくことが、資源の有効利用および事業の円滑な推進を目指すために必要なことである。

参考文献

- 1) 山本民次, 古谷研編: 閉鎖性海域の環境再生, 恒星社厚生閣, 2007.
- 2) 港湾・海域環境研究所: 自然と生物にやさしい海域環境創造事例集, 財団法人港湾空間高度化センター, 1999.
- 3) 逸見彰男, 坂上越朗: 人工ゼオライトが地球を救う, ジャパンタイムズ, 1999.
- 4) 森山亮: 人工ゼオライト製造プラントの開発, エネルギー総合工学研究所, 第27巻, 第2号, pp. 64-72, 2004.
- 5) 植田和哉, 塩田耕司: 加圧・加熱型スラリー反応法を用いた人工ゼオライト製造システムの開発, 平成15年度次世代廃棄物処理技術基盤整備事業に係る終了事業の事後評価について, 2003
- 6) 森野恵美, 森強士, 廣瀬一美: 天然抗菌剤, ヒノキチオール, シトラール, およびイソチオシアン酸アリルのコイ, *Cyprinus carpio* に対する急性毒性, 水産増殖, 第46巻, pp. 145-150, 1998.
- 7) 江上信雄: 実験動物としての魚類—基礎実験法と毒性試験—, p568, ソフトサイエンス社, 1981.
- 8) 鈴木信洋: 養殖ヒラメ無眼側皮膚の微細構造とその体色異常性の組織学的検討, 南西水研報, 第27号, pp. 113-128, 1994.
- 9) 青梅忠久: ヒラメ幼魚の無眼側の着色に及ぼす光照射, 有眼側の体色, および供試魚の由来の影響, 水産増殖, 第39巻, pp. 173-180, 1991.