様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ９ 月　 ２ 日現在

機関番号：８２１１４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ００６２８

研究課題名（和文）オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a safety evaluation method of treated sewage on the metamorphosis of tadpoles

研究代表者
北村　友一（Kitamura, Tomokazu）

国立研究開発法人土木研究所・土木研究所（つくば中央研究所）・その他

研究者番号：３０３５５７９７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：　下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、二次処理水と総残留塩素濃度0.07,0.04,0.03,0.02mg/Lの4段階の塩素処理水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体、甲状腺、生殖腺組織観察から調査した。その結果、塩素濃度0.07mg/Lでオタマジャクシ期の死亡数が他の曝露区より多くなったが、生残したオタマジャクシは全てカエルに変態し、変態停止や変態遅延は観察されなかった。他の曝露区でも変態異常は観察されなかった。さらに、オタマジャクシの甲状腺、成長したカエルの生殖腺組織にも異常は観られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　流入下水には、女性、男性、甲状腺ホルモンを攪乱する物質が含まれている場合があり、下水処理が不十分な場合、下水処理水放流先の水生生物の存続に影響が生じる可能性がある。本研究代表者は、これらの生物影響を評価できる生物としてカエルに着目した。カエルは、甲状腺ホルモンの分泌によりオタマジャクシからカエルに変態する。甲状腺ホルモンの分泌に異常が生じると変態に異常が生じる。変態と生殖腺組織の異常を指標とすることで、下水処理水のホルモン攪乱の影響を評価できると考えた。本研究では下水処理水がオタマジャクシの変態、変態したカエルの生殖腺に与える影響を調べ、通常の下水処理水には影響がないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To clarify the effect of treated sewage on tadpole metamorphosis, tadpoles from the genus Xenopus were exposed to treated sewage and chlorinated treated sewage until the tadpoles metamorphosed into frogs and were grown. The chlorine exposure treatments used for the chlorinated treated sewage were: 0.07, 0.04, 0.03, and 0.02 mg/L total residual chlorine. The effects on the metamorphosis and growth of the tadpoles were investigated based on observation of the phenotype, the thyroid during the metamorphosis stage, and the gonad organization of grown frogs.
The number of deaths during the tadpole stage increased slightly at a total residual chlorine concentration of 0.07 mg/L. However, all the tadpoles that survived metamorphosed into frogs. Prevention or delay of metamorphosis were not observed in any of the treatments. In addition, abnormalities were not observed in the thyroid gland organization of the tadpoles or the gonad organization of grown frogs.

研究分野：環境影響

キーワード：アフリカツメガエル　下水処理水　変態　生殖腺組織

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

流入下水には、女性、男性、甲状腺ホルモンを攪乱する物質が含まれている場合があり[1)]、下水処理が不十分な場合、下水処理水放流先の水生生物の存続に影響が生じる可能性がある。さらに、下水処理水は塩素消毒後、河川に放流されることが多いが、塩素消毒剤の中には甲状腺に異常を生じる塩素化合物[2)]が含まれる可能性も指摘されている[3)]。

著者らは、これらの生物影響を評価できる生物としてカエルに着目している。両生類であるカエルは、甲状腺ホルモンの分泌によりオタマジャクシからカエルに変態する。甲状腺ホルモンの分泌に異常が生じるとカエルに変態できない、または、変態遅延などの影響が生じる。オタマジャクシの変態と性成熟後の生殖腺組織の異常を指標とすることで、下水処理水のホルモン攪乱の影響を評価できると考えられる。

水生生態系保全の観点からも下水処理水がカエルに与える影響把握は重要である。下水処理水の再利用先に、水田灌漑用水やビオトープへの利用もある。水田やビオトープにはカエルが生息しており、カエルは中間的捕食者として生態系を支えている。

これまでに、下水処理水がカエルの繁殖に与える影響の調査例はなく、その影響は未解明である。下水処理水の再利用にあたっては、下水処理水がカエルの繁殖に与える影響を確認しておくことも重要である。

２．研究の目的

本研究では、下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、活性汚泥二次処理水とその塩素処理水中でオタマジャクシがカエルに変態し、性発達するまで飼育し、オタマジャクシが正常な繁殖能力のあるカエルに変態できるかどうかを、形体と甲状腺、生殖腺の組織観察験から調査した。

３．研究の方法

(1)　供試オタマジャクシ

本実験で使用するアフリカツメガエルのオタマジャクシは以下の方法で得た。アフリカツメガエルの成体の産卵を誘導するため 1ml の注射器でカエルの背部リンパ嚢にヒト胎盤性 gonadotorophin (1,000u/L)を雄に 250 μL、雌に 500 μL を注射した。カエルをペアにして一晩置き、翌日、産卵された卵を脱塩素水道水の流水式水槽に移し、そこで孵化した 2 日目のオタマジャクシを曝露実験に供した。

(2)　下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽

図-1 に下水処理実験装置とオタマジャクシの曝露水槽の概要を示した。下水処理実験装置は、最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L×4 槽）、最終沈殿池（700L）、砂ろ過塔から構成されている。流入下水は、主に生活排水が流入する下水処理場の生下水を用いた。生物反応槽は、第 1 槽から第 4 槽まで全面エアレーションを行う、活性汚泥法による処理を行った。水理学的滞留時間は約 10 時間であった。二次処理水は SS 分を取り除くため砂ろ過を行った。砂ろ過水は、接触時間約 35 分で次亜塩素酸ナトリウムにより塩素消毒を行った。塩素混和池での総残留塩素濃度は約 0.2 mg/L、遊離塩素濃度は約 0.06 mg/L であった。砂ろ過した二次処理水と塩素処理水をオタマジャクシの曝露水とした。

曝露条件は塩素濃度勾配をつけた次の 5 条件とし、100%二次処理水（0%塩素処理水）、50%塩素処理水、25%塩素処理水、12.5%塩素処理水、6.25%塩素処理水とした。塩素処理水の希釈水は、本来、脱塩素水道水が望ましいが、脱塩素水道水で飼育したオタマジャクシに死亡個体が多数観られたため、二次処理水で行った。

オタマジャクシの曝露方式は流水式とし、5L 水槽を用い各曝露区 1 水槽、滞留時間を 1.4 時間とし、3.(1)で得たオタマジャクシを 35 匹投入した。

(3)　水質分析

曝露期間中の水質の安定性を把握するため、各曝露水槽の水温、pH、DO、EC、DOC、NO_3-N、残留塩素濃度（HACH 社ポケット残留塩素計）の分析を週 1 または 2 回行った。

(4)　オタマジャクシ、カエルの曝露実験

オタマジャクシ、変態後のカエルの曝露条件は以下のとおりである。

水　　温：21℃、
明暗周期：明期 12h, 暗期 12h、
給　　餌：1 日 1 回、オタマジャクシまたはカエル用餌（浜松生物教材）を飽食量

オタマジャクシの変態観察は、変態が始まった曝露後 21 日目から、週 2 回、1 匹ずつ曝露水槽から取り出し、P.D.Nieuwkoop and J.Faber の発達ステ

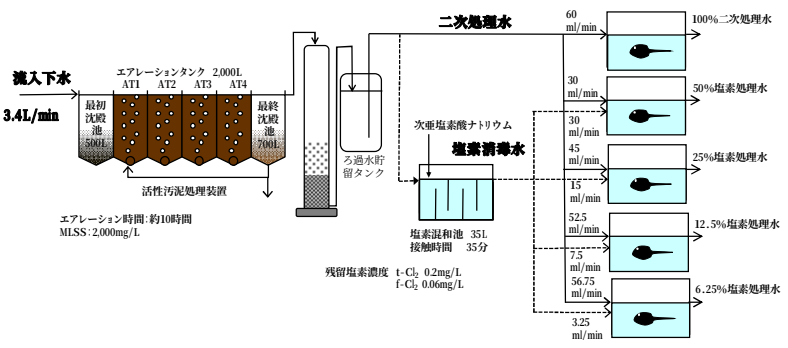

図-1　下水処理実験装置とオタマジャクシの曝露水槽の概要

ージ表[4]と比較し、発達ステージを目視判定し記録した。また、甲状腺組織の観察のため、ステージ 62 に達したオタマジャクシを 50%塩素処理水曝露区は 3 匹、他の曝露区は 5 匹間引いた。

成長試験では、変態後のカエルを約 130 日まで曝露を継続し、生殖腺が正常に発達しているかどうかを確認した。評価方法は、産卵管の有無の目視観察によりオス 3 匹、メス 3 匹を間引き、遺伝子型と生殖腺の表現型による性の一致の確認、および生殖腺組織が性に見合った発達となっているかを組織観察から評価した。さらに、二次処理水曝露区と 12.5%、6.25%塩素処理水曝露区は、成長試験後性成熟するまでの約 270 日間曝露を継続した。その後、性腺刺激ホルモン注射による人工産卵実験を行い、産卵数も調査した。図‐2 上図に曝露スケジュールを図示した。なお、遺伝子レベルでの性決定、および、組織観察の評価は OECD のガイダンス[5)6)7)]に従った。

(5) オタマジャクシの甲状腺組織観察

甲状腺組織のために間引いた個体は、氷冷麻酔し、Davidson 液、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した後、頭胴長、頭部幅を測定した。甲状腺組織の観察は、パラフィン包埋、薄切後、エオシン・ヘマトキシリン染色し、顕微鏡観察した。

(6) カエルの遺伝子レベルの性決定

遺伝子レベルでの性決定および生殖腺観察を行うアフリカツメガエルは、10% MS-222（3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩）を各個体へ皮下注射により投与し、麻酔をかけ、後肢指先をハサミで切除し、DNA 分析用の被験試料とした。

遺伝子レベルでの性の確認は、文献 5）に準拠した。すなわち、常染色体上遺伝子である DMRT1 遺伝子および雌の W 染色体上遺伝子である DM-W 遺伝子を性判別用マーカーとして用いた。これらのマーカー遺伝子は PCR 法により確認した。

(7) カエルの表現型の観察

露出させた生殖腺を目視や顕微鏡で観察し、その表現型から精巣と判断される個体を雄、卵巣と判断される個体を雌とした。

(8) カエルの生殖腺組織観察

生殖腺組織の観察位置は、生殖腺の中央部と、そこから頭部側の前半部、総排泄口側の後半部の 3 カ所とし、前半部中央、中央部、後半部中央から適切なサイズの精巣、卵巣組織片をトリミングした。

トリミングした生殖腺は、パラフィン包埋、薄切後、エオシン・ヘマトキシリン染色し、顕微鏡観察した。

４．研究成果

(1) 曝露水水質

曝露期間中の各曝露水の水質項目の分析結果を図-2 に示す。水温は夏季を除き、各曝露区とも概ね 22℃に維持されていた。pH、DO、EC、DOC、NO_3-N とも各曝露区間で顕著な違いは観られなかった。各塩素処理水曝露区の平均総残留塩素は、0.07、0.04、0.03、0.02 mg/L であった。

(2) オタマジャクシの変態観察の結果

図-3～7 に各曝露区のオタマ

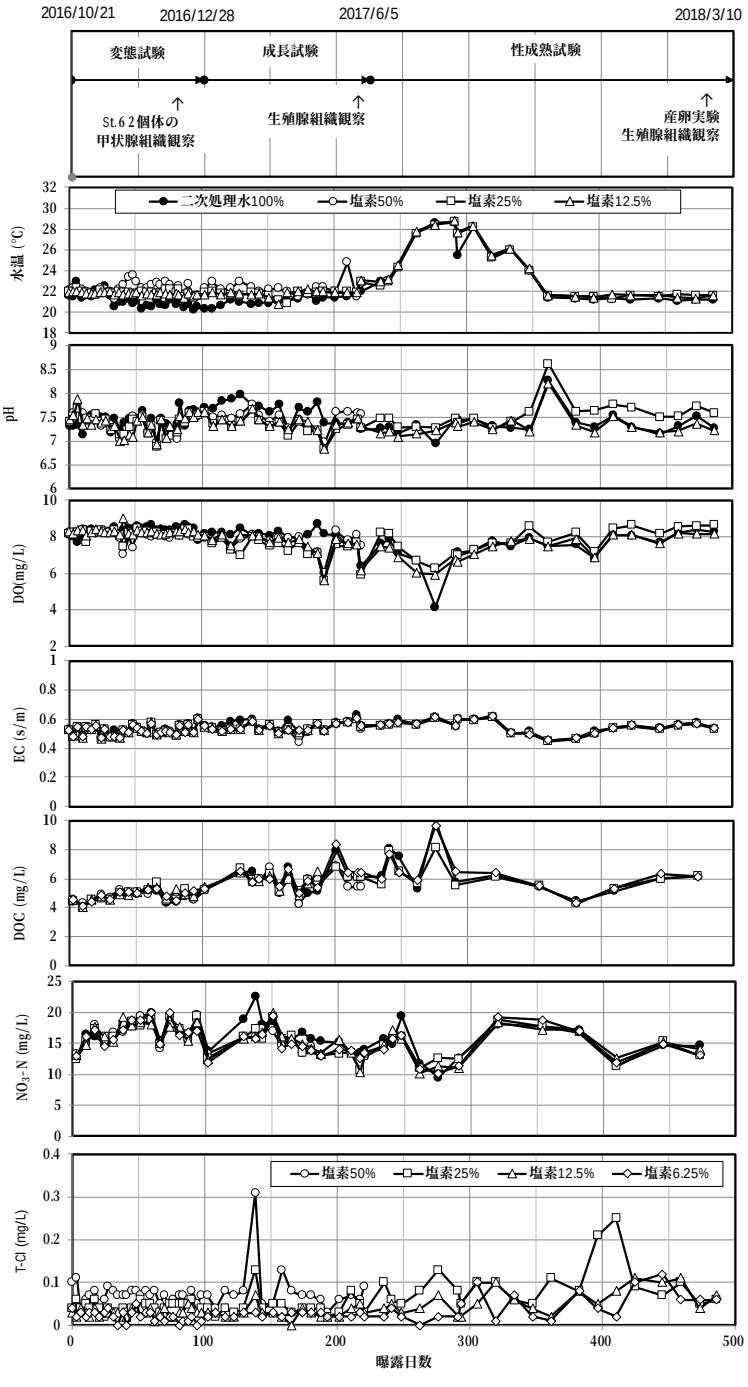

図-2 曝露スケジュールと曝露期間の水質分析結果

ジャクシの 46 ステージ以降の変態の進行結果を示す。図には各水槽の生残率も合わせて示した。各曝露区とも変態は 100 日までに完了した。各曝露区ともオタマジャクシ期に死亡個体が観られたが、50%塩素処理水曝露区（総残留塩素濃度 0.07mg/L）でオタマジャクシ期での死亡個体が多くなった。25%塩素処理水曝露区（総残留塩素濃度 0.04mg/L）の死亡個体数は、二次処理水 100%曝露区と同等であった。100%二次処理水と 50%、25%、12.5%、6.25%の各塩素処理水曝露区について、中央値から読み取ったステージ 62 に要する日数は、65 日、55 日、68 日、69 日、72 日となった。ステージ 62 に要する日数は、50%塩素処理水曝露区が 55 日と他の曝露区より早くなる傾向となったが、これは、オタマジャクシ期に死亡した個体が多かったため、見かけ上、早くなったことによる。

各曝露区とも、変態停止や顕著な変態遅延は観られなかったことから、本実験範囲では、二次処理水とその塩素処理水が変態に与える影響はないと考えられた。

(3)　オタマジャクシの甲状腺組織観察結果

図-8 に甲状腺組織観察のために間引いたステージ 62 に達したオタマジャクシの頭胴長と頭部幅の測定結果を示す。二次処理水曝露区と塩素処理水の各曝露区の間に違いは観られないことから、塩素処理水が変態に及ぼす影響はないと考えられた。

表-1 に各曝露区の甲状腺組織の観察結果を示す。各曝露区とも、甲状腺組織異常の典型症例である、甲状腺の肥大（Thyroid gland hypertrophy）、甲状腺の萎縮（Thyroid gland atrophy）、濾胞上皮細胞の肥大（Follicular cell hypertrophy）、濾胞上皮細胞の過形成（Follicular cell Hyperplasia）については、全ての曝露区でグレード 0～1 であり、異常は観られなかった。

(4)カエルの成長試験後の生殖線組織観察結果

表-2 に成長試験後の各曝露区の生殖腺観察結果を示した。なお、目視観察により産卵管の有無で雄と雌を判定し間引いたが、本段階では、性が未発達の個体も多く確実に性が判定できなかった。そのため、生殖腺観察した個体の性比に偏りが生じている。評価の詳細は次のとおりである。

① 精巣の発達段階 (Testis stage)は、二次処理水曝露区でスコア 5、12.5%塩素処理水曝露区の試料番号 03-01 を除いてスコア 5 であった。

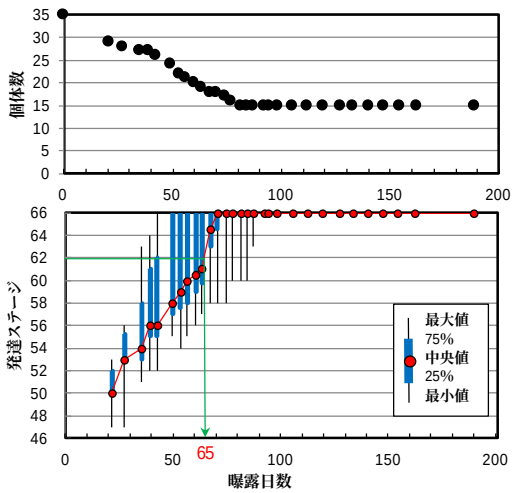

図-3　二次処理水 100%曝露区のオタマジャクシの生残数と発達ステージ

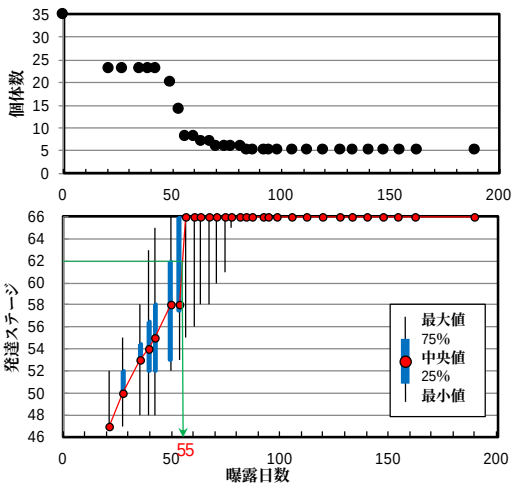

図-4　50%塩素処理水曝露区のオタマジャクシの生残数と発達ステージ

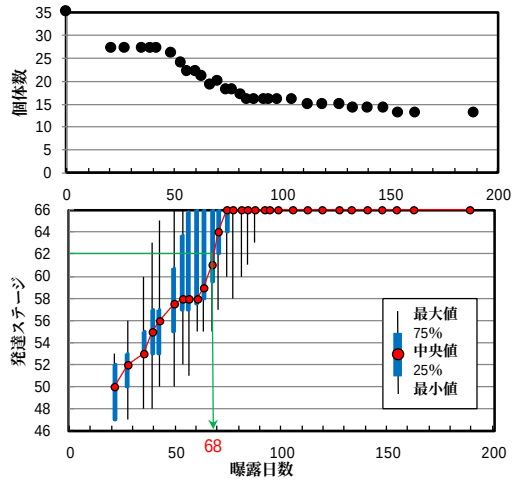

図-5　25%塩素処理水曝露区のオタマジャクシの生残数と発達ステージ

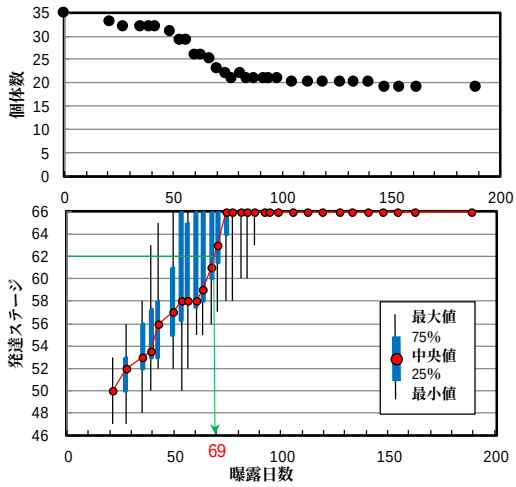

図-6　12.5%塩素処理水曝露区のオタマジャクシの生残数と発達ステージ

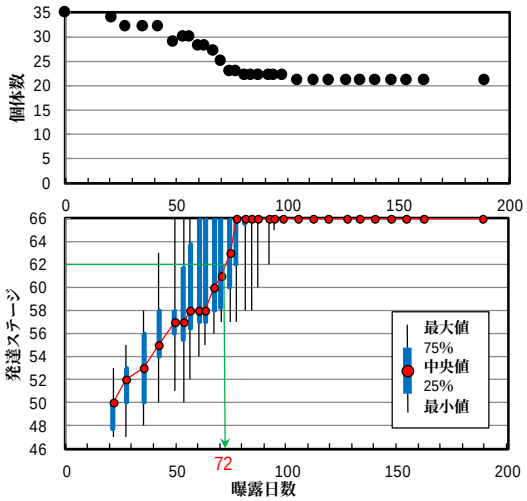

図-7　6.25%塩素処理水曝露区のオタマジャクシの生残数と発達ステージ

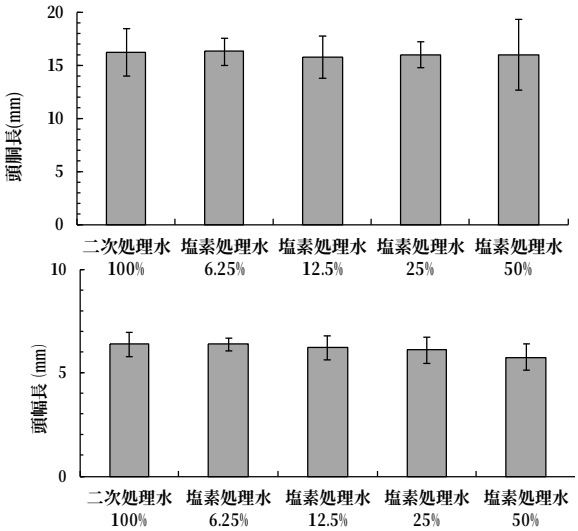

図-8　各曝露区の個体の頭胴長と頭幅長

表-1　各曝露区の甲状腺組織の観察結果

試験濃度区	試料ＩＤ	甲状腺断面積 (μm^2)	甲状腺の肥大 (Thyroid gland hypertrophy)	甲状腺萎縮 (Thyroid gland atrophy)	濾胞上皮細胞肥大 (Follicular cell hypertrophy)	濾胞上皮細胞過形成 (Follicular cell hyperplasia)	濾胞腔面積 (Follicular lumen area)		コロイドの質 (Colloid quality)	濾胞上皮細胞の高さ/形(Follicular cell height/shape)
							No change, Increase, Decrease	Grade	Homogeneous, Heterogenous	Cuboidal, Low/High columnar
99 二次処理水 100%	99- ①	45,596	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	99- ②	77,867	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	99- ③	100,882	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	99- ④	125,531	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	99- ⑤	122,384	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
01 塩素処理水 50%	01- ①	50,214	0	0	0	0	Decrease	2	Homogeneous	Cuboidal
	01- ②	84,451	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	01- ③	104,441	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
02 塩素処理水 25%	02- ①	48,316	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	02- ②	55,356	0	0	0	0	Decrease	1	Homogeneous	Cuboidal
	02- ③	73,822	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	02- ④	84,550	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	02- ⑤	96,019	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
03 塩素処理水 12.5%	03- ①	58,499	0	0	0	0	Decrease	2	Homogeneous	Cuboidal
	03- ②	45,868	0	0	0	0	Decrease	2	Homogeneous	Cuboidal
	03- ③	84,681	0	0	0	0	Decrease	1	Homogeneous	Cuboidal
	03- ④	80,463	0	0	0	0	Decrease	1	Homogeneous	Cuboidal
	03- ⑤	78,332	0	0	0	1	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
04 塩素処理水 6.25%	04- ①	90,278	0	0	0	0	Decrease	1	Homogeneous	Cuboidal
	04- ②	63,437	0	0	0	0	Decrease	1	Homogeneous	Cuboidal
	04- ③	83,949	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	04- ④	57,032	0	0	0	0	No change	0	Homogeneous	Cuboidal
	04- ⑤	149,492	0	0	0	0	Increase	＊	Homogeneous	Cuboidal

② 細精管発達スコア(Tubule development score)は、精巣を持つ個体のうち、二次処理水曝露区の 1 個体（試料番号 99-02）および 12.5%塩素処理水曝露区の 1 個体（試料番号 03-01）で、内腔がある細精管の占める割合は 50%未満（スコア 1）であった。その他の精巣を持つ個体では、内空がある細精管の占める割合は 50%以上（スコア 2）であった。

③ 卵巣の発達段階(Ovary stage)は、卵巣を持つすべての個体のステージは 4 であった。

④ 生殖腺表現型スコア(Gonad phenotype score)は、生殖腺の表現型から判定した雌雄と、遺伝的な雌雄は、すべての個体において一致していた。また、精巣における精巣卵や、卵巣における精巣の構成要素などは確認されなかった。

⑤ 生殖細胞の退行については、すべての個体においてスコア 1 であった。

⑥ 単核細胞の浸潤すべての個体においてスコア 1 であった。

以上、二次処理水曝露区と塩素処理水曝露区で生殖腺の発達遅延や異常は観られなかった。このことから、二次処理水および塩素濃度 0.07mg/L 以下の処理水は性発達に悪影響を及ぼさないと考えられた。

(5)　性成熟試験後の産卵結果

成長試験後も生残個体が多いかった二次処理水 100%、12.5%、6.25%塩素処理水曝露区は、成長試験後性成熟するまで 270 日間曝露を継続し、生殖腺組織観察を行った。二次処理水 100%、12.5%塩素処理曝露区については産卵実験も行った。その結果、産卵実験では、メス一匹当たり約 1,000～2,000 個の産卵が確認された。また、全ての曝露区で生殖腺組織の異常は観られなかった。

(6)おわりに

下水処理水がオタマジャクシの変態に及ぼす影響を明らかにするため、アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態するまでの間、活性汚泥二次処理水と総残留塩素濃度 0.07, 0.04, 0.03, 0.02 mg/L の二次処理水の塩素処理水で飼育し、オタマジャクシの変態への影響を形体と甲状腺組織観察から調査した。その結果、総残留塩素濃度 0.07 mg/L で、オタマジャクシ期の死亡個体が他の曝露区より多くなる傾向となったが、全ての曝露区で生残したオタマジ

ャクシはカエルに変態し、変態停止や変態遅延の影響は観察されなかった。甲状腺、精巣、卵巣の組織にも異常は観られなかった。本実験からは、二次処理水、塩素濃度約 0.07 mg/L 以下が残留する二次処理水がオタマジャクシの変態、カエルの成長に与える悪影響は低いと考えられた。

表-2 各曝露区の生殖腺組織の観察結果

試験濃度区	試料ID	Observation							
		精巣の発達 Testis	精細管発達 Tubule development	卵巣の発達 Ovary	生殖腺表現型 Gonad phenotype score	Male or Female		生殖細胞の退行 Germ cell degeneration	単核細胞の浸潤 Monounclear cell infiltrates
		stage	score	stage		Genotype	Phenotype		
99 二次処理水 100%	99-01	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	99-02	5	1	-	0	Male	Male	1	1
	99-03	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	99-04	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	99-05	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	99-06	5	2	-	0	Male	Male	1	1
01 塩素処理水 50%	01-01	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	01-02	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	01-03	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	01-04	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	01-05	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	01-06	5	2	-	0	Male	Male	1	1
02 塩素処理水 25%	02-01	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	02-02	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	02-03	5	2	-	0	Male	Male	1	1
	02-04	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	02-05	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	02-06	-	-	4	0	Female	Female	1	1
03 塩素処理水 12.5%	03-01	3	1	-	0	Male	Male	1	1
	03-02	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	03-03	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	03-04	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	03-05	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	03-06	-	-	4	0	Female	Female	1	1
04 塩素処理水 6.25%	04-01	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	04-02	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	04-03	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	04-04	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	04-05	-	-	4	0	Female	Female	1	1
	04-06	5	2	-	0	Male	Male	1	1

<参考文献>

1) 岡本誠一郎、北村友一：レポータージーンアッセイを用いた再生水の安全性評価に関する研究、平成 27 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 No.4347、pp.240-251、2016
2) 環境省：化学物質の環境リスク評価 第 9 巻、過塩素酸、pp.11-14、平成 23 年 3 月
3) 高野敬志、伊藤八十男、千葉真弘、泉敏彦：次亜塩素酸ナトリウム溶液保存中における過塩素酸イオン濃度の増加、道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 61, pp.11-13、2011
4) P.D.Nieuwkoop and J.Faber: Normal table of Xenopus lavies (Daudin), Routledge, pp.Ⅶ-X, 1994
5) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS The Laval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) (Adopted: 28 July 2015)
6) OECD Series on testing and assessment No 82: Guidance document on amphibian histology (24 October 2007)
7) DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON AMPHIBIAN HISTOPATHOLOGY TECHNIQUES AND EVALUATION, 5 March 2015

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 北村友一、小川文章：カエルの変態、成長、繁殖を指標とした下水処理水の水質評価、第 55 回下水道研究発表会講演集、日本下水道協会、pp.461-463、2018.7
2. 藤村幸裕、北村友一、小川文章：オタマジャクシの変態を指標とした下水処理水の生態影響評価の試み、第 54 回環境工学フォーラム講演集、土木学会、p.5、2017.11

〔その他〕（計 2 件）

1. 北村友一、オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価、平成 29 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.138-143、2018.8
2. 北村友一、オタマジャクシの変態を指標にした下水処理水の安全性評価、平成 28 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.122-133、2018.1