

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21328

研究課題名（和文）魚類の耳石微量元素を用いた環境ストレス暴露情報の抽出

研究課題名（英文）Assessment of the experienced environmental stress of fish by using otolith microchemistry

研究代表者

山本 洋嗣（Yamamoto, Yoji）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：10447592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トウゴロウイワシをモデルとし、耳石を用いた魚類の環境汚染物質暴露評価技術の可能性を探った。境汚染物質として、塩化トリブチルスズ（TBT）と紫外線吸収剤UV-Pを用い、トウゴロウイワシ稚魚を濃度の異なるTBT溶液とUV-P溶液にそれぞれ曝露した。曝露期間終了後、電子線プローブマイクロアナライザーを用い、耳石微量元素を測定した。TBT曝露試験区では、KおよびNaで濃度依存的な上昇傾向が認められた。対して、UV-Pを用いた曝露試験では、KおよびNaで濃度依存的な減少傾向が認められた。以上の結果より、環境汚染物質の種類によって、耳石微量元素の変動パターンに特徴がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の耳石は年齢査定に利用されることが多いが、本課題では耳石輪紋の中に時系列に蓄積される微量元素量変動と各種環境汚染物質曝露の因果関係を調査することで、野生魚が経験した汚染物質暴露情報の抽出技術開発を目指した。本研究により、特定の汚染物質に対して耳石内の各種元素が特徴的に増減する可能性が示され、より多くの環境汚染物質やその他環境ストレスと耳石の元素変動の因果関係を調査することで、野生魚の汚染物質曝露情報を抽出可能であることが示された。魚類の食資源としての安全・安心な利用のためには、種々の環境汚染物質が魚類に与える様々な悪影響の評価技術の確立が急務であり、本課題はその実現に寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tested the possibility of using elemental information chronologically accumulated across fish otolith increments to reveal past exposure of fish to environmental contaminants. Tributyltin chloride (TBT) and UV-P at different concentrations were used as environmental pollutants and juvenile silversides were used as test fish. After a 7-day pollutant exposure period, otolith trace elements were measured in areas formed before, during, and after exposure using an electron probe microanalyzer. A concentration-dependent increasing trend was observed for K and Na in the TBT exposure group whereas the opposite was observed for the same elements in the UV-P exposure group. These results suggest that elemental information permanently stored in otolith increments may be useful for the assessment of past exposure to environmental pollutants in fish.

研究分野：魚類繁殖生理・魚類繁殖生態学

キーワード：環境ストレス 海洋汚染物質 耳石 元素含有量 トウゴロウイワシ

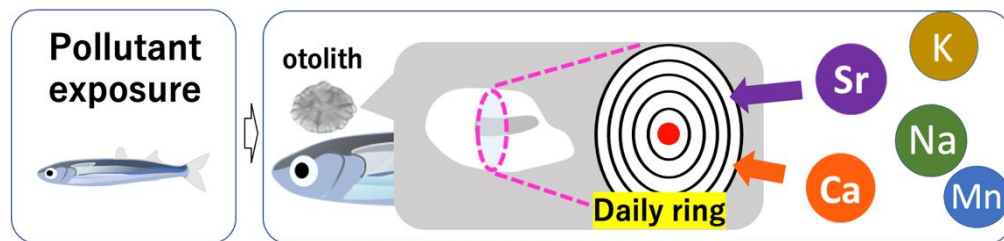
## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化や海洋酸性化、残留性汚染物質など、多くの人為的環境ストレスが海洋生物に悪影響を与えることが危惧されている。しかし、野生環境下では種々の環境要因が複雑に相互作用するため、疑いのある環境ストレスと生理的な表現型異常の時系列的な因果関係を立証することができず、水圏生態系の高次消費者である魚類については、未だ正確な環境影響評価技術の開発には至っていない。この問題を解決するため、本研究では魚類内耳に存在する硬組織である「耳石」に着目した。耳石は多くの魚類で年齢査定に利用されることが多いが、環境水中あるいは生体内の元素を取り込み伸長・増大するという特性がある。この耳石への元素の取り込みは、体内の生理状態が影響すると言われるが、その研究例はほとんどない。もし、各種環境ストレスの強弱と特定の元素量の増減の相関が証明できれば、耳石の年齢形質と微量元素の組成変化を組み合わせることで、野生個体が経験した環境ストレス暴露情報を抽出することが可能となると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、魚類の有効な環境ストレス影響評価技術の確立を最終目標とし、まずは各種環境汚染物質が耳石の元素量に与える影響を調査し、その因果関係を調査した。



### 3. 研究の方法

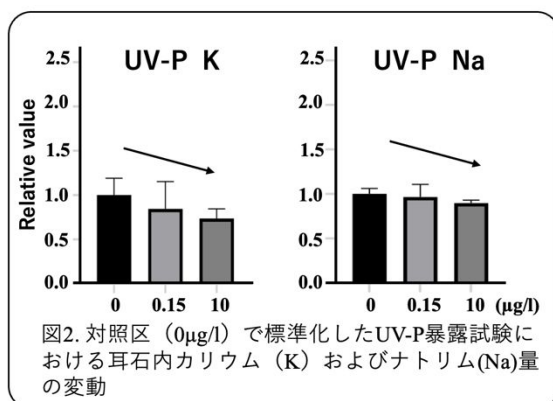
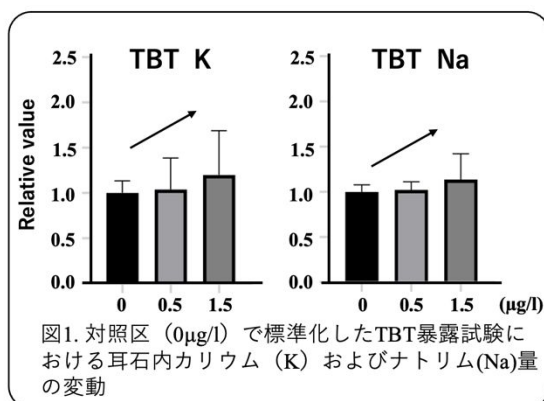
供試魚にはトウゴロウイワシ目アテリノブシス科に属するペヘレイ *Odontesthes bonariensis* を用いた。トウゴロウイワシの仲間は、世界中に生息しており、環境変化に敏感であるため、指標生物として優れた特性を持つ。そこで、ペヘレイ稚魚を環境汚染物質に暴露し、その濃度と耳石微量元素量の変動の相関を調査した。本研究では、環境汚染物質として、塩化トリブチルスズ (TBT) と、紫外線吸収剤 2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-メチルフェノール (UV-P) を用いた。有機スズ化合物である TBT は長年船底塗料や漁網防汚剤として使用されてきたが、雄化現象など様々な生物に悪影響を与えるため日本では 1990 年の法規制や業界の使用自粛により使用量が減少したが、未だに自然環境中に存在している。事実、令和元年度に東京湾で実施された調査では、TBT はスズキ *Lateolabrax japonicus*、マアナゴ *Conger myriaster*、マコガレイ *Pseudopleuronectes yokohamae*、ホンビノスガイ *Mercenaria mercenaria* から検出された (令和元年度東京湾産魚介類の化学物質汚染実態調査、東京都福祉保健局)。一方、UV-P は主にプラスチックなどの劣化防止に使われる物質で、他に UV-320 や UV-328 等、多数の類似物質が存在する。これらの紫外線吸収剤は魚類の肝臓及び免疫系に対する毒性など、多くの水圏動物に対する毒性が危険視されている。市場に流通する魚類を用いて、その含有量を調査したところ、クロマグロ *Thunnus orientalis*、メバチマグロ *Thunnus obesus*、アトランティックサーモン *Salmo salar*、マサバ *Scomber japonicus* など、多くの魚種において高濃度で検出された (山口ら、大阪府立公衛研究所報 52 号)。

TBT 曝露試験には塩化トリブチルスズ Tributyltin Chloride (東京化成工業株式会社) を使用した。濃度はペヘレイの原産国であるアルゼンチンの河川で実際に検出された濃度 (Horii et al, 2018) を参考に、0 µg/l、0.5 µg/l、1.5 µg/l の計 3 試験区を設定した。一方、UV-P 曝露試験には 2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)benzotriazole (東京化成工業株式会社) を使用した。濃度は欧州の沿岸域で実際に検出された濃

度 (Montesdeoca-Esponda et al., 2019) を参考に、0  $\mu\text{g/l}$ 、0.15  $\mu\text{g/l}$ 、10  $\mu\text{g/l}$  の計 3 試験区を設定した。TBT と UV-P 共にジメチルスルホキシドに溶解し、暴露試験に用いた。11 日齢のペヘレイ稚魚を 2 L ビーカーに 7 尾ずつ収容し、25°C で 7 日間各濃度溶液に曝露した。暴露試験期間中は 1 日 2 回アルテミアを与え、2 L/日 で換水した。曝露期間終了後、汚染物資を含まない飼育水にて 8 日間飼育した後、サンプリングを行った。サンプリングした供試魚から耳石を取り出し、洗浄し、風乾した。耳石は UV レジンを用い、耳石の背腹軸と平行な軸で、体軸と垂直に核を通るように研磨面を設定し包埋した。研磨には研磨機ドクターラップ (株式会社マルトー) を用い、耐水研磨紙 #120- #2400 (Reflex 耐水研磨紙, メイワフォーシス) で、頭側から核手前までを研磨した。その後、同様の方法で耳石反対面を包埋、尾側から耳石を再び核周辺まで研磨した。最後に粒度 6 および 1  $\mu\text{m}$  の順でダイヤモンドペーストを用い、研磨面に鏡面研磨を施すことで薄片切片を作製した。鏡面仕上げしたサンプルに導電性を与え、EPMA での分析を可能にするために、表面にイオンスパッターを使用し、白金バナジウムを蒸着させた。その後 EPMA を用いて、分析点を設定した。分析点はいずれも 4  $\mu\text{m}$  間隔で、ビーム径は直径 3  $\mu\text{m}$  に設定した。なお分析点は生後 11 日目までの通常飼育期間 (曝露前) 及び TBT 溶液に曝露した 7 日間 (曝露中)、その後、通常の飼育水にて飼育した 8 日間 (曝露後) に形成された耳石領域からそれぞれ 12~15 点分析点を取り、ストロンチウム (Sr)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、炭素 (C)、ナトリウム (Na) の 5 種の元素分析を行った。

#### 4. 研究成果

TBT および UV-P を用いた曝露試験において、水質悪化により全個体が斃死した 1 試験区を除き、各濃度区における試験終了後の生残率は 100%、奇形率は 0% であった。EPMA を用いた定量分析の結果、TBT 暴露試験区では、Ca、C、Sr には変動は認められなかったが、K および Na において濃度依存的な上昇傾向が認められた (図 1)。一方、UV-P を用いた曝露試験では、TBT 暴露試験区と同様に、Ca、C、Sr には変動は認められなかったが、K および Na では濃度依存的な減少傾向が認められた (図 2)。以上の結果より、環境汚染物質の種類によって、耳石微量元素の変動パターンに特徴がある可能性が示唆された。すなわち、耳石微量元素変動と輪紋解析を併せて調査することで、野生魚が過去に経験した環境汚染物質暴露を追跡調査できる可能性が示唆された。今後は、TBT および UV-P 以外の環境汚染物質についても同様の調査を行い、各種環境汚染物質と耳石元素量のプロファイリングシートを作成していきたいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 C.A. Strussmann, Y. Yamamoto, R.S. Hattori, J.I. Fernandino and G.M. Somoza	4. 巻 15
2. 論文標題 Where the Ends Meet: An Overview of Sex Determination in Atheriniform Fishes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 80-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000515191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Carlos Augusto Strussmann, Kaho Miyoshi, and Shota Mitsui	4. 巻 40
2. 論文標題 A Novel, Efficient Method for Otolith Specimen Preparation Using UV-Cured Resins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 North American Journal of Fisheries Management	6. 最初と最後の頁 1187-1194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nafm.10484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本浩杜、三好花歩、横田賢史、Carlos Augusto Strussmann、山本洋嗣
2. 発表標題 野生環境下におけるギンイソイワシ仔稚魚の成長と性分化
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoji Yamamoto, Kosei Inaba, Takehiko Sasaki, Aoi Kobayashi, Kaho Miyoshi, Masashi Yokota and Carlos Strussmann
2. 発表標題 Multi-year field survey on the effects of environmental factors on the sex determination in the cobaltcap silverside <i>Hypoatherina tsurugae</i>
3. 学会等名 12th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山本洋嗣、三好花歩、服部ヒカルド修平、ストルスマン カルロス	4. 発行年 2021年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 258
3. 書名 魚類の性決定・性分化・性転換 (菊池 潔、井尻成保、北野 健 編) / 第4章トウゴロウイワシ目魚類の性決定機構	

1. 著者名 Y. Yamamoto and JA. Luckenbach	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 26
3. 書名 Sex Determination and gonadal sex differentiation, In Encyclopedia of Fish Physiology, Second edition (in press)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	Strussmann C.A.  (Strussmann Carlos)  (10231052)	東京海洋大学・学術研究院・教授      (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------