

下水処理水が両生類の変態に及ぼす影響に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 26～平 28

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一

【要旨】 アフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、実下水処理水中で飼育し、変態と生殖腺への影響について調査した。その結果、下水処理水曝露による変態停止や顕著な変態遅延は見られなかった。変態後の生殖腺組織観察でも異常は見られなかった。水田に生息している野生のアマガエルを用いた変態試験でも変態への影響は見られなかったことから、下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす悪影響はないと考えられた。

キーワード： アフリカツメカエル、アマガエル、変態、下水処理水

1. はじめに

生体の内分泌をかく乱する化学物質は内分泌かく乱化学物質(Endocrine disrupting chemicals; EDCs)と呼ばれ、EDCs による水質汚濁は、健全な水生生態系維持に悪影響を与える問題として認識されている。たとえば、英国では下水放流水に女性ホルモンや女性ホルモン様物質が残存し、河川水による希釈が望めない場合、魚の性ホルモン作用がかく乱され、雄魚で雌特有のタンパク質の産生や精巣に卵母細胞が形成されることが報告されている¹⁾。

近年、水中の微量化学物質の分析技術の進展も相まって、医薬品等の生理活性物質の中には下水放流水中の検出が報告されている物質がある²⁾。公共用水域に到達した生理活性物質は、EDCs として水生生物の存続に影響を与える可能性が否定できない。我が国は世界的に見て医薬品等の生理活性物質の使用量が比較的多い³⁾といわれており、今後、高齢化に伴い医薬品の使用量が増加する可能性もあることから、これらの生理活性物質が公共用水域の水生生態系に影響を及ぼすことが懸念される。

これまで EDCs が水生生物に与える影響は、現実には水系で起こった現象を踏まえ、主に、魚類を対象とした性ホルモンのかく乱作用が研究されてきた¹⁾。一方、生物体内では恒常性維持のため、様々なホルモンが絶妙にコントロールされ分泌されており、EDCs の女性ホルモン作用以外のホルモンかく乱影響については未解明な点が多い。

健全な水生生態系を維持するためには、下水放流水

が様々な水生生物に与える影響について現況を把握し、評価することが必要である。

両生類であるカエルは環境中で変態（オタマジャクシがカエルになること）し、その後、性成熟（精巣や卵巣の発達）する。この変態と性成熟を指標とすることにより、2 種類のホルモンかく乱影響の評価が可能であり、カエルはホルモンかく乱作用を検出できる優れた試験生物の一つである。2015 年には OECD（経済協力開発機構）からカエルの成長と発達を指標とする化学物質のホルモンかく乱作用等を評価する試験法⁴⁾が公表され、カエルに対する EDCs の影響解明が期待されている。

下水放流水がカエルに与える影響は未解明であり、その実態把握も重要と考えられることから、下水処理水がオタマジャクシの変態や生殖腺に与える影響を把握するため、実下水処理水を用いたアフリカツメガエルオタマジャクシの長期間曝露実験と野生アマガエルの変態試験を行った。

2. アフリカツメガエルの長期間曝露実験方法

実際の下水処理水に孵化後のアフリカツメガエルのオタマジャクシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、下水処理水中で飼育し、オタマジャクシの変態への影響と生殖腺組織の変化を評価する実験を行った。

実験方法は以下のとおりである。

2.1 供試オタマジャクシ

本実験では、浜松生物教材から購入したアフリカツメガエルを、人工的に交尾・産卵させ試験に供するオ

タマジャクシを得た。交尾・産卵の手順は以下のとおりである。プラスチック製コンテナ 70L に、カゴ(コンテナ内に丁度収まる程度の大きさ)を合わせて底を2重にした水槽を用意した。これに卵を包んでいるゼリーが水槽の壁へ付着するのを防ぐため、0.2% NaClの水を水槽の7分目まで入れ、さらに、カゴの外からエアポンプで十分にエアレーションをおこなった。1mlの注射器でカエルの背部リンパ嚢にヒト胎盤性 gonadotrophin (1,000u/mL)を雄には 250 μ L、雌には 500 μ L を投与し、プラスチックコンテナに一晩入れた。翌日、産卵した卵を駒込ピペットで回収し、卵を包むゼリー状物質の除去は行わず、脱塩素水道水の流水式水槽に移し、孵化後2~3日のオタマジャクシを下水処理水曝露試験に供した。

2.2 下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽

下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要を図-1に示す。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)から構成されている。

流入下水は、分流式下水道として整備され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、標準活性汚泥法による処理を行った。水学的滞留時間(HRT)は、7時間となるように流入水量を制御した。二次処理水は砂ろ過を行い、砂ろ過水をオタマジャクシの曝露水とした。オタマジャクシの曝露は流水式とし、水槽は10L、1水槽とし、2.1に記したオタマジャクシを50匹投入した。対照区として脱塩素水道水曝露区を設置した。

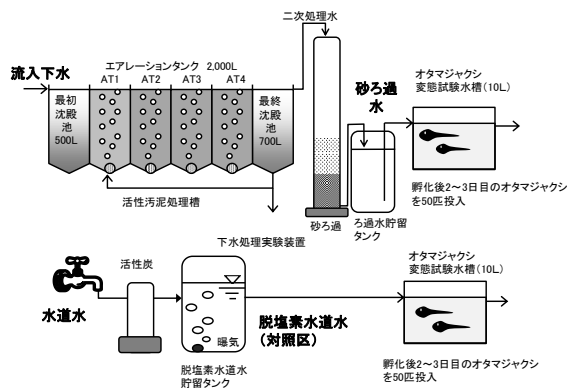


図-1 下水処理装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要

2.3 オタマジャクシの飼育と変態の観察

オタマジャクシの曝露条件は、水温: 23°C、明暗周期: 明期 16h, 暗期 8h、給餌: 1日1回オタマジャク

シ用餌(浜松生物教材)を給餌した。オタマジャクシの変態観察は、変態が始まった頃から1匹ずつ P.D.Nieuwkoop and J.Faber の発達ステージ表⁵⁾と比較し、発達ステージを目視判定し記録した。

2.4 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、NH₄-N、NO₃-Nの分析を週1回行った。

2.5 遺伝子レベルでの性決定の方法

全曝露期間は6か月弱となり、各曝露水でカエルに変態した後、生残した対照区7個体、下水処理水曝露区19個体について、遺伝子レベルでの性の決定と生殖腺組織の観察を行った。

各個体は、0.02% MS222 (3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩)を入れたビーカーに1個体ずつ投入し、動きが止まるまで静置して麻酔をかけた。指先をメスで切除し、DNA分析用の被験試料とし、分析に供するまで-80°Cで冷凍保存した。DNA分析用の各被験試料に10 mg/mLプロテインナーゼKを2 μ L、PCRバッファー(10×HS buffer)を2.5 μ L、滅菌した超純水を22 μ L加え、56°Cで60分、95°Cで3分インキュベートした後、滅菌した超純水50 μ Lを加え、PCR反応用の鋳型DNA溶液とした。

遺伝子レベルでの性決定のために用いたPCRプライマー配列を表-1に示した。遺伝子レベルでの性決定は、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いる。遺伝子レベルでの性の判定は、DMRT1遺伝子(203 bp)のバンドのみが確認された個体は遺伝的な雄、DMRT1遺伝子およびDM-W遺伝子(259 bp)両方のバンドが確認された個体は遺伝的な雌と判定される⁴⁾。

表-1 PCRプライマーの配列⁴⁾

Target	Primer sequence
DMRT1	
Forward	: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'
Reverse	: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'
DM-W	
Forward	: 5'-CCACACCCAGTCTCATGTAAAG-3'
Reverse	: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

PCR反応用の鋳型DNA溶液を0.5 μ L、TaKaRa Ex Taq(HS)を0.1 μ L、各プライマーを0.2 μ Lずつ、2.5

mM dNTP を 0.8 μ L、10 \times HS buffer を 1 μ L、滅菌した超純水を 6.8 μ L 混合し、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて PCR を実施した。

(step 1)	94 $^{\circ}$ C	2 min
(step 2)	94 $^{\circ}$ C	30 sec
(step 3)	62.5 $^{\circ}$ C	30 sec
(step 4)	72 $^{\circ}$ C	10 sec
(step 2-4: 40 cycles)		
(step 5)	72 $^{\circ}$ C	5 min

PCR で得られた増幅産物は、ローディング dye と混合後、3%のアガロースゲルで電気泳動(100 V、60 分)を行い、その後、SYBR Gold で染色し、UV 照射下でバンドの有無を確認した。

2.6 生殖腺組織観察の方法

各個体を 0.02% MS222 (3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩) で麻酔後、解剖用はさみを用いて開腹した。生殖腺と生殖腺と近く除去の難しい腎臓と脾臓は残し、他の不要な臓器は除去して生殖腺を露出させ、表現型の観察および生殖腺の組織標本作成に供した。

表現型の性は、露出した生殖腺を肉眼で観察し、形状から精巣と判断された試料の表現型を雄、卵巢と判断された試料の表現型を雌とした。

生殖腺の組織切片の作成法は以下のとおりである。生殖腺を含む頭部から胴体部分を Davidson 液に 72 時間浸漬し、その後、固定液を 10%中性緩衝ホルマリン溶液に置換して、生殖腺組織を固定した。

試料中の骨、軟骨組織を柔らかくするために、次の脱灰処理をした。10%中性緩衝ホルマリンに保存した試料をイオン交換水で水洗後、10%ギ酸に入れ、24 時間静置した。その後、試料を 70%エタノールで洗浄後、同液に入れ保存した。

すべての試料について、メスを用いて脾臓より上部を切除した。その後、図-2 に示すようにトリミングした。背骨に対して垂直に生殖腺の中央部を切断し、試料を頭部側 (以降、前半部とする) と肛門側 (以降、後半部とする) に二分した。ただし、生殖腺が小さい試料は、中央部の切断を行わずに組織標本作製に供した。また、左右の生殖腺の大きさや位置が異なっている試料は、左右どちらかの生殖腺の中央を切断した。トリミングした各試料は、パラフィン包埋に供するまで 70%エタノールに入れて保存した。

トリミングした各試料は、表-2 に示す手順で、脱水、透徹および溶融パラフィンの浸透処理を施した。

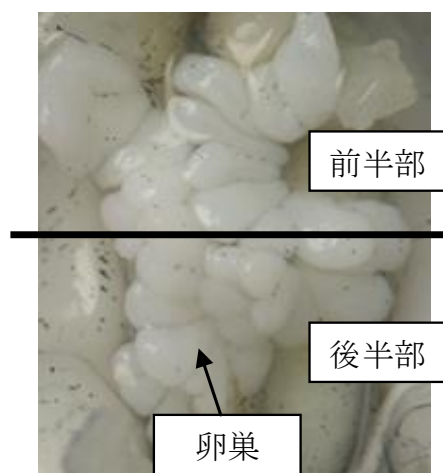
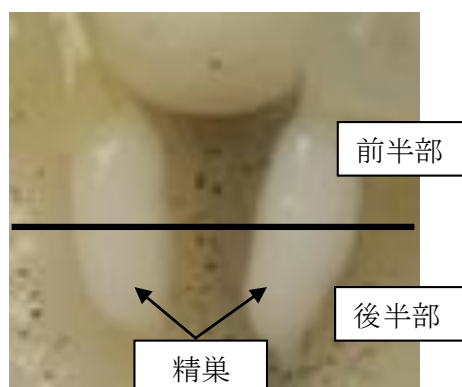


図-2 生殖腺の切断箇所

60 $^{\circ}$ Cで溶融させたパラフィンを金枠に流し入れ、金枠に試料を投入し、室温で表面が硬化するまで静置した。その後、冷水に金枠ごと投入し、完全にパラフィンを硬化させパラフィンブロックとした。

各試料を包埋したパラフィンブロックは、生殖腺中央切断面側から腎臓が露出するまでパラフィンを荒削りしてから、マイクロトーム(PR-50)を用いて薄切した。試料は、背骨と垂直となる面を、生殖腺中央部の切断面側から生殖腺の端部に向かって、8 μ mで薄切した。各試料の前半部において生殖腺中央部および前半部中央の2か所から、後半部において後半部中央の1か所から、計3か所の切片を取得した。作製した各切片は、適量のイオン交換水を載せたスライドガラス (MATSUNAMI MICRO SLIDE GLASS S7214、松浪硝子工業株式会社) に載せ、43 $^{\circ}$ Cのホットプレート上で切片を伸展させてから、イオン交換水を除きスライドガラスに添付した。切片を添付したスライドガラスは、ホットプレート上で1晩おいて完全に風乾させてから染色に供した。

スライドガラスに添付した切片は、表-3 に示す手順

表-2 パラフィン包埋の工程

Process (reagent)	温度	処理時間
(1) 90% ethanol	RT ^{*3}	12 hr
(2) Ethanol (>99.5%) (1st)	RT	60 min
(3) Ethanol (>99.5%) (2nd)	RT	60 min
(4) Absolute ethanol ^{*1}	RT	60 min
(5) Hemo-Clear ^{*2} (1st)	RT	3 min
(6) Hemo-Clear (2nd)	RT	50 min
(7) Hemo-Clear (3rd)	RT	50 min
(8) Paraffin Wax II60 (1st)	60°C	60 min
(9) Paraffin Wax II60 (2nd)	60°C	60 min
(10) Paraffin Wax II60 (3rd)	60°C	12 hr
(11) 包埋		

*1 Ethanol (99.5%)を合成ゼオライト A-3 (和光純薬工業)で脱水処理したもの

*2 Absolute Ethanol を Hemo-Clear で洗浄する工程

*3 RT; 室温

表-3 染色の工程

Process (reagent)	処理時間
(1) Xylene (1st)	2 min
(2) Xylene (2nd)	2 min
(3) Xylene (3rd)	2 min
(4) Ethanol (>99.5%) (1st)	1 min
(5) Ethanol (>99.5%) (2nd)	1 min
(6) 80% ethanol	1 min
(7) 50% ethanol	1 min
(8) Deionized water (1st)	3 seconds
(9) Deionized water (2nd)	1 min
(10) Mayer's hemalum solution	3 min
(11) Deionized water	3 seconds
(12) Tap water ^{*1}	10 min
(13) Deionized water	1 min
(14) 1% Eosin Y solution	4 min
(15) 90% ethanol	1 min
(16) Ethanol (>99.5%) (1st)	1 min
(17) Ethanol (>99.5%) (2nd)	1 min
(18) Ethanol (>99.5%) (3rd)	1 min
(19) Xylene (1st)	3 min
(20) Xylene (2nd)	3 min
(21) Xylene (3rd)	3 min
(22) Coverslipping	

*1 縦24 cm×横32 cm×高さ11 cmの平型バットに水道水を水深5.5 cmとなるように入れ、スターラーナーにより流水を生じさせてスライドガラスを洗浄する。

で、脱パラフィンおよびヘマトキシリン・エオシンの二重染色を施した後、封入剤 (Entellan new) を滴下し、カバーガラス (NEO MICRO COVER GLASS, 24x60mm, MATSUNAMI GLASS IND.,LTD.) で封入した。

OECD ガイダンス文書「Histopathology Guidance Document for the Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), (2015)」⁶⁾の生殖腺組織観察の評価基準に従い、各試料の生殖腺組織標本を評価した。

3. アフリカツメガエルの長期間曝露実験結果

3.1 曝露水質分析の結果

曝露水の各水質項目の分析結果を図-3に示す。水温は下水処理水曝露区、対照区とも概ね23°Cに維持されていた。pH、DOは対照区が高目となっていた。活性汚泥処理が硝化抑制運転となっていたため、下水処理水曝露区のNH₄-Nが高かった。雨の影響や流入下水ポンプの故障により性状が変動することがあったが、下水処理水の水質は概ね安定していた。

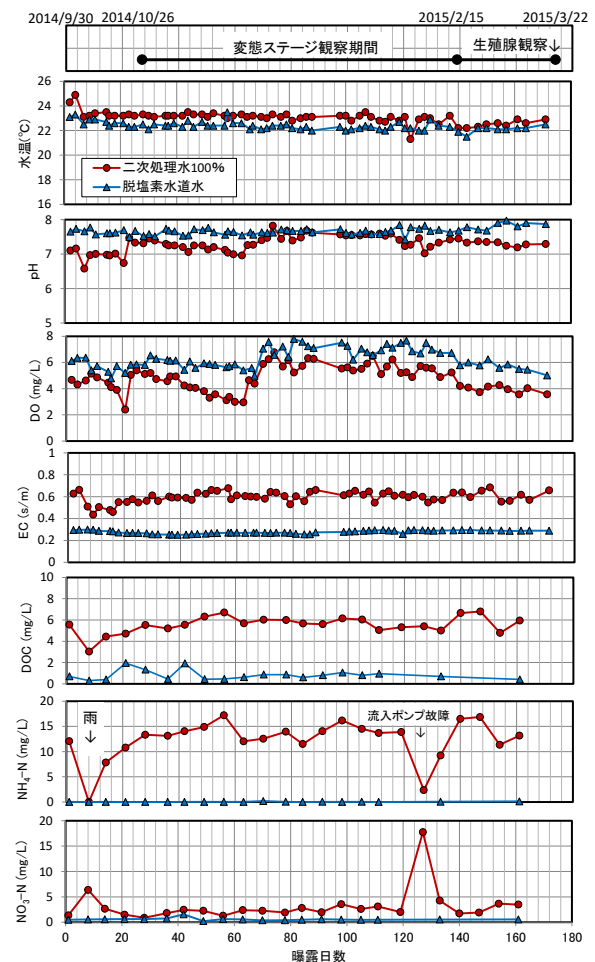


図-3 オタマジャクシ曝露水槽の水質

3.2 オタマジャクシの変態試験の結果

図-4に、本実験の変態観察時に撮影した、各発達ステージの代表的な写真を示す。P.D.Nieuwkoop and J.Faberのアフリカツメガエルの発達ステージ表⁵⁾と比較し、ステージ番号を付記した。P.D.Nieuwkoop and J.Faberらの発達ステージ表によると46ステージから後ろ足が始め、66ステージで変態が完了する。

対照区と下水処理水曝露区のおタマジャクシの46ステージ以降の変態の進行結果を図-5に示す。図には

各水槽の生残率も合わせて示した。脱塩素水道水と下水処理水曝露区で変態が完了した時点での生残率は、それぞれ16%、35%となった。下水処理水曝露区で変態中に死亡する個体が見られているが、対照区でも見られており、死亡の原因は下水処理水に起因するものではないと考えられる。

下水処理水曝露区は、対照区よりオタマジャクシの成長が早く、変態が始まる時期が早くなった。一方で、変態に要する時間は、中央値で見ると対照区では約60

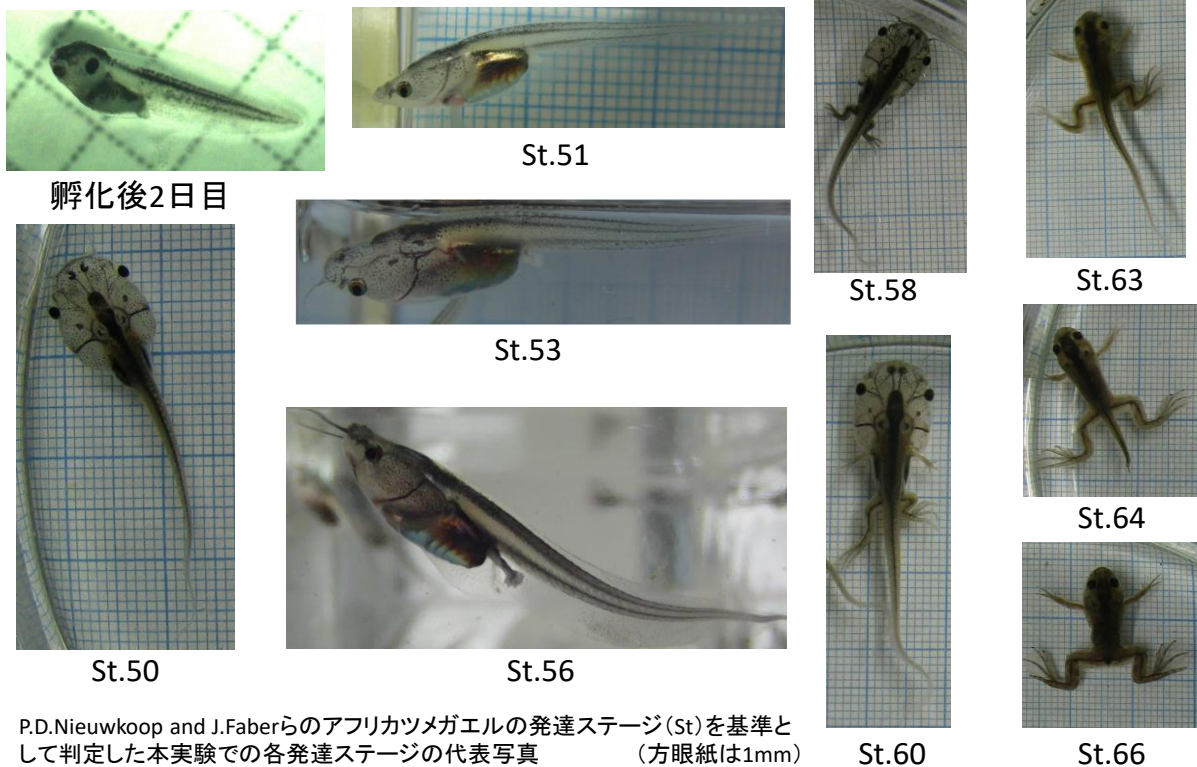


図-4 アフリカツメガエルの各発達ステージの代表写真

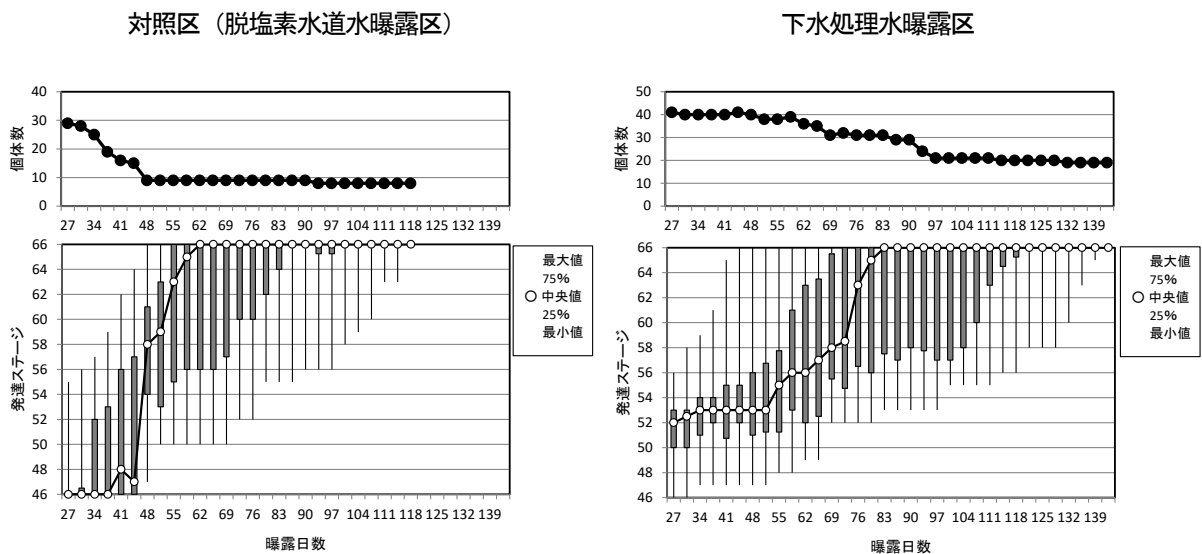


図-5 対照区と下水処理水曝露区の変態期間の生残率と変態ステージの経日変化

日、下水処理曝露区で約80日となり、下水処理水曝露区で変態遅延の傾向が見られた。ただし、図-5で示した試験結果のとおり変態ステージの個体差が大きかったこと、対照区はオタマジャクシ期の死亡数が多かったことから、下水処理水がオタマジャクシの変態速度に与える影響については、再実験による検証が必要と考えられる。再実験に当たっては、飼育密度の均一化や各個体の発達ステージが同調する近交系のカエルの使用など、実験条件の見直しも必要と考えられた。

3.3 変態後のカエルの雌雄の判定結果

図-6にPCR試料の電気泳動のバンドの一例を示す。下水処理水曝露区の試料については、1つの試料につき1つのレーン(1列)にDMRT1遺伝子およびDM-W遺伝子の2種類のプライマーを用いてPCRを実施した試料を電気泳動させた(図-6(a))。対照区の試料については、DMRT1およびDM-Wのバンドが不鮮明であったため、DMRT1遺伝子のプライマーを用いてPCRを実施した試料を1つのレーンに、DM-W遺伝子のプライマーを用いてPCRを実施した試料をもう1つのレーンに添加して電気泳動させた(図-6(b))。

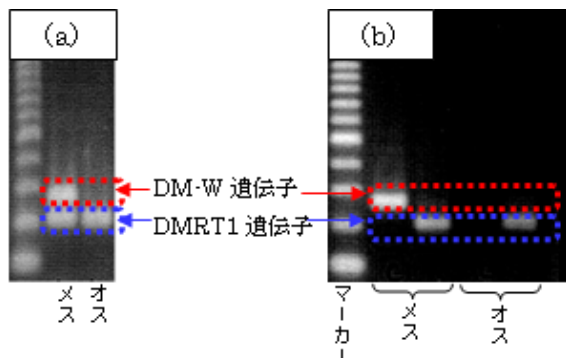


図-6 電気泳動した試料のバンドの一例

その結果、対照区7個体のうち、遺伝的雄は3個体、遺伝的雌は4個体で、性比(雄/雌)は0.75、下水処理水曝露区19個体のうち、遺伝的な雄は11個体、遺伝的な雌は8個体で、性比(雄/雌)は1.38であった。各曝露区とも性比に顕著な偏りは見られなかった。

3.4 生殖腺組織観察の結果

対照区と下水処理水曝露区の雄と雌の代表的な生殖腺の外観およびその組織標本像の図-7, 8に示す。対照区、下水処理水曝露区とも生殖腺の表現型から判定した雌雄と、遺伝的な雌雄は、すべての検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。精巣と卵巣の発達段階についても、対照区と下水処理水

曝露区との間に顕著な差は見られなかった。

4. アフリカツメガエルの長期間曝露試験のまとめ

下水処理水に曝露したオタマジャクシは変態が始まる時期が対照区より早くなった。下水処理水曝露区の生残個体は全てカエルに変態し、変態停止や顕著な変態遅延は見られなかった。

対照区と下水処理水曝露区の変態後のカエルの遺伝子レベルでの雌雄と、生殖腺観察から判定した雌雄は、すべての個体において一致し、精巣と卵巣の発達段階についても、対照区と下水処理水曝露区との間に顕著な差は見られなかった。

以上のことから、本実験においては下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす悪影響はないものと考えられた。

5. 下水処理水が野生アマガエルの変態に及ぼす影響

カエルのモデル生物であるアフリカツメガエルのオタマジャクシの下水処理水への長期間曝露試験から、下水処理水は変態、性成熟に顕著な悪影響はないと考えられた。国内の生態保全のためには、日本に生息するカエルでも下水処理水がオタマジャクシの変態に与える影響を確認しておく必要がある。

水田に生息している野生のオタマジャクシを採取し、下水処理水に曝露し変態への影響を調査した。

5.1 アマガエルのオタマジャクシの変態実験の方法

オタマジャクシは、2016年5月中旬につくば市の水田から採取し、脱塩素水道水で6月1日まで飼育し、生残していたオタマジャクシを実験に供した。写真-9は、実験に用いたオタマジャクシである。

オタマジャクシの変態試験は、図-1の下水処理実験装置とオタマジャクシの曝露水槽を用いた。曝露水は、下水処理水と脱塩素水道水とし、各水槽にオタマジャクシを3匹投入した。オタマジャクシの曝露実験は6月1日から開始した。その後、変態状況を毎日観察した。

5.2 アマガエルのオタマジャクシの変態実験の結果

写真-10は、オタマジャクシの観察の様子である。下水処理水と脱塩素水道水に曝露したオタマジャクシは全てアマガエルに変態した。表-4は、変態が完了した日付である。両曝露区で変態に要する期間に顕著な違いは見られなかった。アマガエルのオタマジャクシでも下水処理水が変態に及ぼす悪影響は観察されなかった。



図-7(a) 対照区の雄カエルの精巢



図-7(c) 対照区の雌カエルの卵巢

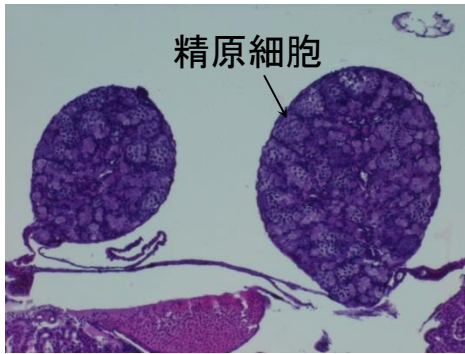


図-7(b) 対照区の雄カエルの精巢の組織像

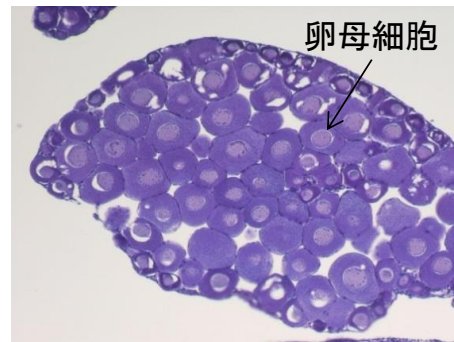


図-7(d) 対照区の雌カエル卵巢の組織像

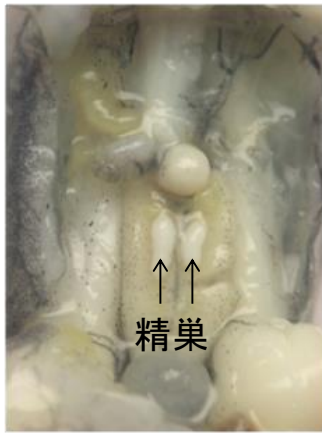


図-8(a) 下水処理水曝露区の雄カエルの精巢

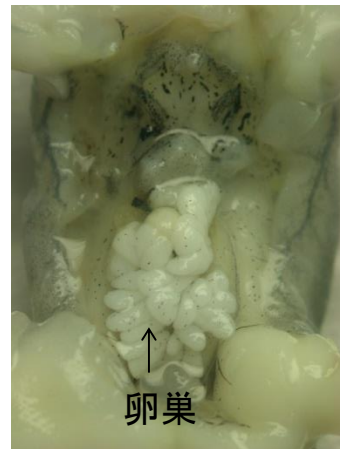


図-8(c) 下水処理水曝露区の雌カエルの卵巢

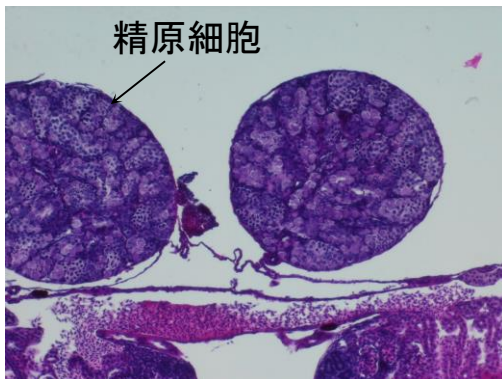


図-8(b) 下水処理水曝露区の雄カエル精巢の組織像

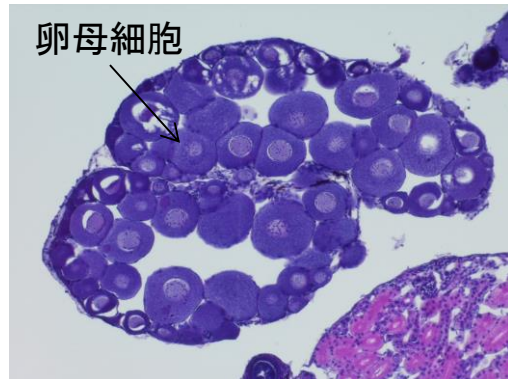


図-8(d) 下水処理水曝露区の雌カエル卵巢の組織像



写真-9 アマガエルのオタマジャクシ (5月22日)



写真-10(a) 下水処理水曝露区のオタマジャクシ (6月16日)



写真-10(b) 脱塩素水道水曝露区のオタマジャクシ (6月16日)

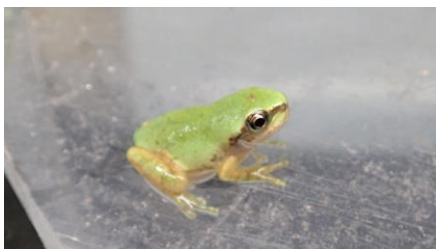


写真-10(c) 脱塩素水道水曝露区で変態したアマガエル (6月16日)

表-4 オタマジャクシの変態が完了した日付

個体番号	脱塩素水道水	下水処理水
#1	6月13日	6月16日
#2	6月20日	6月19日
#3	6月21日	6月27日

6. おわりに

健全な水生生態系を維持するためには、下水放流水が、様々な水生生物に与える影響について現況を把握し、評価する必要がある。海外ではすでにその影響が顕在化しているホルモンかく乱影響も、その科学的な知見の集積が必要な水質問題の一つである。

本研究では、ホルモンかく乱影響を検出できる優れた試験生物であるカエルを対象とし、アフリカツメガエルのオタマジャシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、実下水処理水中で飼育し、変態と生殖腺組織への影響について調査した。さらに、国内に生息している野生のアマガエルのオタマジャクシの変態試験も行った。いずれも、本研究では、下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす顕著な悪影響は見られなかった。

下水処理水は塩素消毒され公共水域に放流されている場合が多い。塩素化合物の中には甲状腺ホルモンの働きに影響する物質もある⁷⁾ことから、今後は、下水処理水の塩素消毒水がオタマジャクシの変態に与える影響について調査していく予定である。

参考文献

- 1) Charles Tyler: 魚類における内分泌かく乱作用の重要性について理解する, 環境省 平成25年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー資料, <https://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/seminar/seminar2013.html>
- 2) 成宮 他: 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, 環境工学研究論文集, 46, pp.175-186, 2009
- 3) 厚生労働省: 医薬品産業ビジョン2013, p.7, 平成25年6月26日
- 4) OECD: The Larvae Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), 28-July-2015
- 5) P.D.Nieuwkoop and J.Faber: Normal table of Xenopus laevis (Daudin), Routledge, pp.VII-X, 1994
- 6) OECD: Guidance Document on Histopathology Techniques and Evaluation for The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), p21, 2015
- 7) 環境省: 化学物質の環境リスク評価 第9巻, 過塩素酸, p.11-14, 平成23年3月