

【研究報告】

オゾンの魚類に対する急性毒性の発現機構

福永健治

日本医療オゾン研究会会報, Vol.4, No.2, 1-3. (1997)

研究報告

オゾンの魚類に対する急性毒性の発現機構

関西医科大学医学部公衆衛生学教室 福永健治

1. はじめに

オゾンは非常に酸化力が強く、殺菌、漂白、消臭などの作用を有することから医療、食品製造、浄水処理など多くの分野で利用されている。水産増養殖分野においてもオゾンの有する病原性微生物殺菌作用、水質改善効果を期待して1970年代後半からアメリカで用いられるようになり、すでに実用化段階に入っている。わが国でもオゾンは、小規模ながら種苗生産場、養殖場でサケ科魚類や付加価値の高い魚類を中心に使用されている。オゾンを安全に利用するため、装置、制御方法など様々な工夫、改良が行われてはいるが、時として短時間で飼育魚の斃死を見ることもある。事故防止を考える上で設備の充実は重要な課題であるが、オゾンの魚類に対する影響、とりわけ毒性の発現機構を明かにすることも不可欠であると考えられる。オゾンの魚類に対する毒性発現濃度と期待する効果、有効性との関係については、種々の魚類について報告されているが、毒性発現機構を解明した報告は少ない。Wedmeyerら*はニジマスを用いた一連の研究で、オゾンによる障害は鰓の呼吸および浸透圧調節機能失調が主要因であるとしている。しかし、この場合長時間、低濃度域での検討であるため個体差が極めて大きく、オゾンによる直接的な酸化ストレスの影響であるのか、あるいは飼育環境の変化による二次的要因のため障害が発現するのか明確とは言えない。そこで本研究では、直接的なオゾンの魚類に対する急性毒性発現機構を明かにすることを目的にニジマスを実験魚として用い、鰓および血液の変化を障害の指標に検討を行った。

2. 実験方法

供試魚は、ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)一年魚(平均体重 61.2 ± 3.6 g, 尾叉長 16.4 ± 0.7 cm)を用いた。屋外蓄養池で飼育されているニジマスを実験室内の20L容木村式高密度多目的水槽に移し、市販餌料給餌による2週間の予備飼育を行った。飼育水は、活性炭カラムを通し脱塩素処理した水道水(水温 15°C , 流速 $3.0\text{L}/\text{min}$ で給水)を用いた。オゾン曝露は、ニジマス5尾一群として図1に示した装置を用い、止水で行った。曝露濃度は $1.5\text{mg}/\text{L}$ とし、3分ごとにオゾン濃度の測定を行って一定濃度となるよう吹き込み量を調整した。曝露終了後、ただちに鰓の摘出を行い、尾静脈から採血を行った。鰓機能の指標として Na^+/K^+ -ATPase活性の測定、赤血球性状指標としてヘマトクリット値(Ht)、溶血率、血液中ヘモグロビン量(Hb)およびメトヘモグロビン量(metHb)の測定、さらに鰓組織、赤血球についてそれぞれ光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡による観察を行った。また、オゾン曝露は生体に酸化的な損傷をもたらすことから、鰓および血液の過酸化脂質、抗酸化性成分、活性酸素消去系酵素活性の測定も行った。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表し、Student's-testによって検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

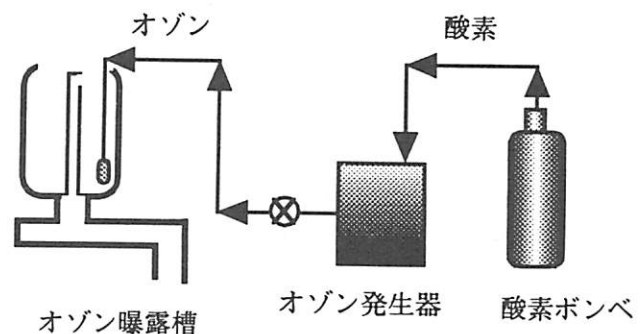


図1 オゾン曝露装置

3. 結果および考察

オゾン曝露時の供試魚の挙動を観察したところ、曝露開始5分間は、水槽底部に位置し変化はみられなかった。5-10分後の間は、全個体が穏やかな運動を繰り返した。曝露開始約15分を経過した時点では呼吸が不規則になり突発的な挙動が目立ち、その後苦悶状態が続き、水槽外に飛び出す個体も見られた。曝露開始約30分後には全個体が強い痙攣を起こし、曝露開始45分には死亡する個体も確認された。60分後には全個体の死亡が確認された。また、曝露途中5-10分間に飼育用の水槽に戻した場合、30-60分で苦悶状態に陥り、回復することなく2-3時間内に死亡した。これはオゾン曝露による障害が連鎖的に進行、発現して回復不能な程度にまで及んだ結果と考えられる。また、以上の結果は、今回検討したオゾン濃度よりも低い場合(0.1-1.0 mg/L)においても同様の傾向を示した。

45分間のオゾン曝露終了時点で、供試魚の鰓を観察したところ粘液などの付着はなかったが、著しい充血が見られた。そこでヘマトキシレン-エオシン染色による鰓組織の病理学的観察を行ったところ、鰓弁(鰓器官の最小単位で血管がよく発達しており、血液のガス交換を行う)毛細血管内に膨化赤血球の凝集塊がみられ、脱核、溶血している赤血球も見られた。一方、鰓弁を被覆する呼吸上皮、塩類細胞の損傷はほとんど見られなかった。さらに鰓機能に及ぼすオゾン曝露の影響を確認するためNa⁺/K⁺-ATPase(塩類細胞に存在し、Na⁺およびK⁺の交換的能動輸送を行う)活性の測定を行ったが、対照群の活性を100%としたとき曝露群は98.2±3.8%と有意な差は見られなかった。以上の結果からオゾン曝露による障害の発現は、鰓自身の機能不全あるいは形態変化が要因ではないことが明らかになった。

次に赤血球の性状指標を測定したところ、Hbに変化は見られなかったが、Ht、溶血率およびmetHbの有意な増加が見られた(表1)。Hbの変化が見られないにもかかわらずHtが増加するという事は、赤血球容積の増加(膨化)を意味し、溶血率の増加は膨化が亢進した赤血球が崩壊しHbが溶出した結果と考えられる。走査型電子顕微鏡による観察では、上述の結果を支持する赤血球の膨化、脱核、細胞破片の付着、膜表面の粗造などの変化がみられ、鰓組織の病理学的観察の結果とも一致した。

曝露後、鰓および血液の過酸化脂質、抗酸化性成分を測定したところ、鰓では有意な変化は見られなかったが、血漿、赤血球ともに過酸化脂質の増加、抗酸化性成分の有意な減少が見られた(表2)。オゾン曝露による酸化障害は、オゾン水に直接接触れる鰓より血液(赤血球、血漿)で発現していることがわかる。また、器官培養鰓を用いた*In vitro*での検討では、赤血球のHbを安定な一酸化炭素Hbに変換した場合は、オゾン曝露による影響が顕著に軽減されることを確認している。すなわち、鰓構成成分とは反応せず血液に到達したオゾン(あるいはオゾン由来の化学種)が赤血球のHbと反応して活性種の派生を招来し、連鎖的に酸化障害を惹起したものと考えられる。鰓の障害が見られなかった要因として、血液に比し高度不飽和脂肪酸など易酸化成分の含有量が少なく、反対に抗酸化性成分の含有量が多いことが推察される。

表1 ニジマス赤血球性状に及ぼすオゾン曝露の影響

		対照群	オゾン曝露群
Hb	g/dL血液	7.2±0.4	7.1±0.4
Ht	(%)	31.5±1.7	34.5±2.9
溶血率	(%)	0	23.6±4.1*
metHb	(%)	1.4±0.6	82.6±3.5*

n=5. p<0.01

表2 ニジマスの抗酸化性成分および過酸化脂質に及ぼすオゾン曝露の影響

		対照群	オゾン曝露群
鰓	アスコルビン酸	100 (%)	87.5±21.9(%)
	α-トコフェロール	100	96.7±11.1
	還元型グルタチオン	100	95.1±16.6
	マロンジアルデヒド	100	139.7±41.1
赤血球	アスコルビン酸	100	17.6±0.4*
	α-トコフェロール	100	83.2±6.5*
	還元型グルタチオン	100	90.3±5.4*
	マロンジアルデヒド	100	489.4±63.7*
血漿	アスコルビン酸	100	5.1±0.4*
	α-トコフェロール	100	84.2±8.5*
	マロンジアルデヒド	100	739.9±65.6*

n=5. p<0.01 対照群を100%として表示

抗酸化性成分のほか、生体の酸化障害を防御するシステムとして、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px)、カタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)などの活性酸素消去系酵素がある。本研究でも、これらの酵素活性に及ぼす影響を検討したところ、曝露後、鰓ではいずれの酵素活性にも有意な変化は認められなかった。しかし、赤血球では GSH-Pxおよびカタラーゼの活性低下が認められたが、SOD活性に変化はなかった(表3)。このような活性酸素消去系酵素活性のアンバランスは、特定の活性種の派生、蓄積をもたらし、少なからず障害発現に影響を与えているものと考えられる。

表3 ニジマスの活性酸素消去系酵素活性に及ぼすオゾン曝露の影響

		対照群	オゾン曝露群
鰓	SOD	100 (%)	97.8±10.8(%)
	GSH-Px	100	92.9±15.1
	Catalase	100	93.3±11.6
赤血球	SOD	100	101.1±5.1
	GSH-Px	100	73.9±5.2*
	Catalase	100	80.9±4.9*

n=0.5 p<0.01 対照群を100%として表示

以上のことから、オゾンの魚類に対する急性毒性発現機構は次のように説明できる。オゾンは鰓に障害を与えることなく鰓弁内毛細血管を循環する血液に作用して抗酸化系を崩壊し、赤血球の膨化、溶血さらにはHbの酸化を惹起する。このような赤血球の損傷は、酸素運搬という欠くべからざる生理機能を失うことを意味すると同時に活性種の派生をも助長し連鎖的に障害を進行させる。その結果、ガス交換不全によって窒息を起こし死に至る(図2)。

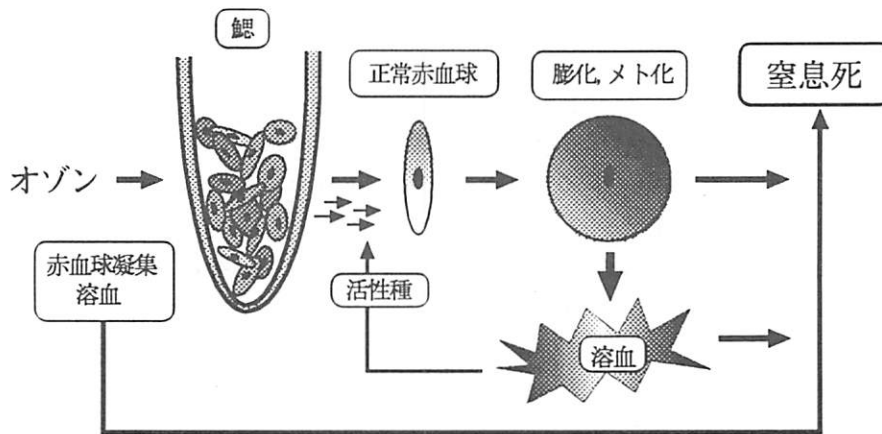


図2 魚類のオゾン曝露障害発現機構

本研究では、オゾンの魚類に対する毒性発現について検討を行い、標的器官(細胞)が赤血球であること、毒性発現は連鎖的に進行することを明かにした。これらの結果は、ヒトをはじめとして生体に及ぼすオゾンの影響を検討するうえで、またオゾン療法を行うにあたって重要な知見となるものと考えている。

文献

* Wedemeyer. G. A. et al., J. Fish. Res. Board Can., 34, 429 (1977)
 Wedemeyer. G. A. et al., Ozone Sci. Eng., 1, 429 (1977)
 Wedemeyer. G. A. et al., J. Fish. Res. Board Can., 36, 605 (1979)

ふくなが けんじ 1962年京都府生まれ。北海道大学大学院水産学研究科博士課程修了。日本学術振興会博士特別研究員、(財)応用生化学研究所を経て現職。専門は水産化学、栄養化学。研究テーマは脂質栄養と酸化障害の発現について。