オオミジンコ急性遊泳阻害試験による排水評価の実施に向けた検討

齋藤辰善，田村良三，笠原貢

Examination about *Daphnia magna* Acute Immobilisation Test for Effluent Assessment

Tatsuyoshi Saito, Ryozo Tamura and Mitsugu Kasahara

Effluent assessments by bioassays have been watched with interest in Japan recently. We examined *Daphnia magna* acute immobilisation test according to the guidelines, such as OECD and CSCL, to introduce the system into our institute. To ensure reliability, we chose copper sulfate as exposure solutions in this test, and checked the reproducibility. We calculated 50 % effective concentration (EC_{50}) from the five tests. The average of EC_{50} (48h) was 4.4 micrograms per liter, and their reproducibility was good. Therefore, we think that some factors (e.g. daphnids age, immobilisation criteria and water hardness) probably affect the results, and the results imply the importance of comparing in multiple laboratories.

Keywords: Bioassay, Acute immobilisation test, *Daphnia magna*, Copper sulfate

1　はじめに

現在，アメリカやカナダ等の複数の国では，生態影響試験を用いた事業場排水の管理手法が導入されており[1]，我が国においても，導入に向けた検討作業が進められている[2),3)]．このような中，地方自治体の環境研究所は，試験の実施機関としての役割が期待されている[4)]．そこで，当研究所でのオオミジンコ（*Daphnia magna*）急性遊泳阻害試験の実施可能性について検討を行うこととし，その端緒として，室内での再現性の確認及び既知の毒性物質を用いての文献値との比較を行ったので報告する．

2　材料と方法

供試生物の飼育方法及び試験方法については，OECD テストガイドライン[5),6)]及び化審法テストガイドライン[7)]を参考とした．

2.1　供試生物

試験には，国立環境研究所水環境実験施設（NIES アクアトロン）より分譲されたオオミジンコ（NIES 系統）を用いた．飼育は植物環境制御装置内で行い（Fig. 1），温度は 20±1℃，照明条件は 16 時間明期，８時間暗期とした．飼育水は，水道水を市販の活性炭フィルターを用いて脱塩素した後，24 時間以上ばっ気を行ったものを用いた．飼育水の硬度は 40mg/L（$CaCO_3$ 換算）程度であった．餌はクロレラ溶液を消費量に応じて適宜与えた．なお，変色もしくは奇形が認められた個体及び親個体の第一産仔は除外した．

2.2　曝露物質

水生生物に対して，重金属の中でも高い毒性を持つ[8)]銅を含み，殺菌剤，銅メッキ及び冶金用途として広く用いられている硫酸銅（Ⅱ）を曝露物質として選択した．試験溶液の調整については，硫酸銅（Ⅱ）五水和物及び超純水を用い，50mg/L の水溶液を作成し，以降の希釈には飼育水と同様の水を用いた．本報告では，濃度範囲を広く取った予備試験を行い，その結果より濃度範囲を 50μg/L から倍々希釈で 3.13μg/L までの５段階に設定した．

2.3　試験方法

試験溶液もしくは対照として飼育水と同様の水を，それぞれ 50mL ずつ 100mL ガラスビーカーに入れ，オオミジンコを投入，曝露開始から 24 時間後及び 48 時間後の遊泳阻害状況を観察した．なお，判定については，ビーカーを穏やかに動かしても 15 秒間泳げず，ビーカー底面から浮き上がることができない個体を遊泳阻害とみなした．

試験実施中の温度及び明暗周期は飼育時と同様とした．ただし，給餌，換水及びばっ気は行わない．１ビーカーあたりの個体数は５頭とし，１濃度区あたり４ビーカー，20 頭を試験に用いた．また，試験に用いる個体の条件は，親個体の第一産仔によるものではない，24 時間齢未満の仔虫とした．

Fig. 1. Daphnids bred in the incubator of our laboratory.

3　結　　果

同一の条件により，それぞれ異なる時期に実施した，５回の試験によって得られた結果を Table 1 に示す．なお，前述のガイドラインに従い，対照区において 10%，つまり２頭を超える遊泳阻害がみられた試験については試験不成立とし，結果を除外した．

これらの結果から，プロビット法[9] により用量反応曲線を作成し（Fig. 2），曝露開始から 24 時間後及び 48 時間後の半数影響濃度（50 percent Effective Concentration; EC_{50}）を求めた．文献値との比較を行うため，$CuSO_4$ 及び Cu としての濃度へ換算を行った EC_{50}，５回の試験による平均値，標準偏差及び変動係数を Table 2 に示す．

なお，用量反応曲線の作成及び EC_{50} の算出には Ecotox-Static（Ver.2.6d，日本環境毒性学会）を用いた．

4　考　　察

まず，室内での再現性については，甲殻類の急性遊泳阻害試験において，毒性値として用いられる EC_{50}（48h）の変動係数が 10% 以内に収まっており，比較的良好な結果が得られたと考えられる．ただし，今回の試験は分譲後５ヶ月間の間に行われたものであるため，年単位での継代飼育を行っていった場合，変異やオス個体の発生等の影響により，オオミジンコの状態が変動することによる再現性の低下が懸念される．

なお，現在の化審法テストガイドライン等においては，繰り返し精度及び再現性についての，良否の判定基準は定められていない．そのため，現状では他機関で得られた結果との比較が，試験の信頼性確保において重要である．

次に，文献値との比較であるが，Mark and Solbe（1997）[10] によりまとめられた ECETOC Aquatic Toxicity（EAT）のデータによれば，Cu 換算の EC_{50}（48h）で，8.8μg/L － 14μg/L という範囲が示されている．いずれもオオミジンコ急性遊泳阻害試験により求められた値であるが，詳細な試験条件については不明である．本試験で得られた EC_{50}（48h）の平均値は，これらと比較すると低い値であった．

Table 1. Results of acute immobilisation test.

	Time	Number of immobilisation					
		Concentration (μg/L, as $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)					
		Blank	3.13	6.25	12.5	25	50
1	24h	**0**	**0**	**0**	**2**	**8**	**20**
	48h	**2**	**4**	**6**	**16**	**18**	**20**
2	24h	**0**	**0**	**2**	**4**	**10**	**20**
	48h	**2**	**6**	**8**	**16**	**20**	**20**
3	24h	**0**	**0**	**0**	**3**	**9**	**20**
	48h	**1**	**5**	**6**	**16**	**18**	**20**
4	24h	**0**	**0**	**1**	**2**	**8**	**20**
	48h	**2**	**6**	**8**	**16**	**20**	**20**
5	24h	**0**	**0**	**2**	**4**	**11**	**20**
	48h	**2**	**4**	**7**	**16**	**18**	**20**

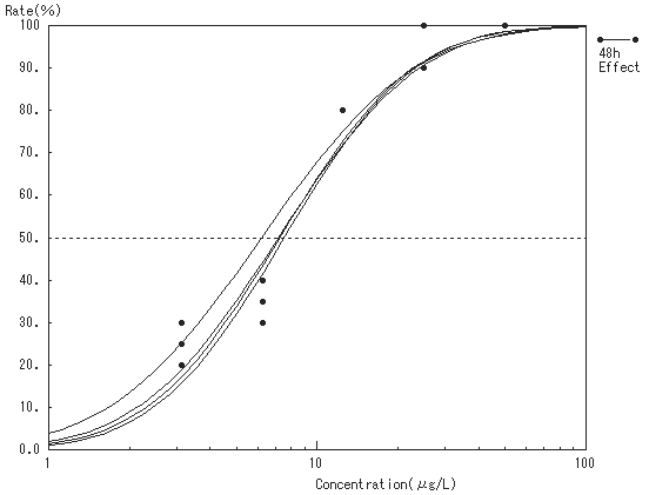

Fig. 2. Dose-response curves calculated by Probit method. (n=5)
(Y axis; immobilisation rate, X axis; Concentrations of solutions as $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

Table 2. EC_{50} calculated by Probit method, standard deviation and coefficient of variation.

Time	EC_{50} (μg/L, as $CuSO_4$)					Average (μg/L)	Standard deviation (μg/L)	Coefficient of variation (%)
	1	2	3	4	5			
24h	**19.0**	**16.8**	**17.6**	**21.3**	**15.1**	**18.0**	**2.3**	**13.0**
48h	**4.8**	**4.0**	**4.6**	**4.0**	**4.6**	**4.4**	**0.4**	**9.1**

Time	EC_{50} (μg/L, as Cu)					Average (μg/L)	Standard deviation (μg/L)	Coefficient of variation (%)
	1	2	3	4	5			
24h	**7.5**	**6.7**	**7.0**	**8.5**	**6.0**	**7.1**	**0.9**	**13.0**
48h	**1.9**	**1.6**	**1.8**	**1.6**	**1.8**	**1.8**	**0.2**	**9.1**

得られる EC_{50} に差が生じる原因としては，供試個体の生後日数の違い，遊泳阻害の判定基準の違い，水の硬度の影響等，様々な可能性が考えられる．例えば，Rathore et al.（2002）[11] によれば，重金属による毒性影響は水の硬度に影響を受け，硬度が上昇する程，毒性影響は減少するとされている．欧米諸国に比べ，我が国の水の硬度は低い傾向があるため，結果として重金属の毒性影響による EC_{50} は低い値となる場合が多くなるものと考えられる．

５　ま　と　め

今回実施した，硫酸銅（Ⅱ）を曝露物質として用いたオオミジンコ急性遊泳阻害試験では，EC_{50}（48h）として 4.4μg/L（$CuSO_4$ 換算）という値が得られた．試験結果の信頼性に関しては，室内での再現性について比較的良好な結果が得られた．ただし，文献値との比較においては低い値であり，飼育及び試験における種々の条件の差が影響しているものと考えられた．試験の信頼性を確保するためは，他機関との情報交換及び複数機関による試験結果の比較を行うとともに，他の物質についてもデータを蓄積していくことが重要である．

謝　　辞

本稿を終えるにあたり，飼育方法及び試験方法についてご指導いただいた，独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境リスク研究推進室 鑪迫典久先生，並びに同研究室の皆様に感謝申し上げます．

文　　献

１）鑪迫典久：水と水技術，**3**，68（2009）
２）鑪迫典久：水環境学会誌，**29**，426（2006）
３）環境省：WET 手法を活用した排水規制手法検討調査 http://www.env.go.jp/guide/budget/h21/h21-gaiyo/163.pdf（2009）
４）国立環境研究所：環境儀 No. 38 バイオアッセイによって環境をはかる-持続可能な生態系を目指して，国立環境研究所（2010）
５）OECD: OECD Guideline for Testing of Chemicals 202, “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test”（1984）
６）OECD: OECD Guideline for Testing of Chemicals 202, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test（2004）
７）厚生労働省，経済産業省，環境省：新規化学物質等に係る試験の方法について（2011）
８）Arambasic, M.B., Bjelic, S., Subakov, G. : Water Research **29**, 497（1995）
９）Finney, D.J. : Probit analysis（3rd ed.）, Cambridge University Press, p.333（1971）
10）Mark, U., Solbe, J. : Chemosphere **36**, 155（1997）
11）Rathore, R.S., Khangarot, B.S. : Water, Air, and Soil Pollution **142**, 341（2002）