

技術報告

- ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験について -

一瀬 諭^{*1} 若林 徹哉^{*1} 伊藤 貢^{*1}

**Test of Chemical Compounds on Ecological Influence
Acute Immobilization Test Using Bioassay by Daphnia**

Satoshi ICHISE^{*1}, Tetsuya WAKABAYASHI^{*1},
and Mitsugu Ito^{*1}

化学物質によるリスクを評価するための基礎研究の一環として、ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験についての検討を行った結果、*Daphnia magna* にとって快適水温下(20℃)では単為生殖を営みコントロールが非常に安定していた。また、試験が比較的簡便・迅速であり、環境水に含まれる化学物質の生態系への影響を把握するためのスクリーニング手法として有効であり、今後、当所においても琵琶湖の生態系に及ぼすリスクを評価するための手法として活用して行きたい。また、琵琶湖在来種を用いた急性遊泳阻害試験についても実施していきたい。

キーワード:生態影響試験, *Daphnia magna*, 急性遊泳阻害試験, ミジンコ, ダイアジノン

はじめに

化学物質による人の健康や生態系への影響を未然に防止するため、化学物質の環境リスクを評価し、それに基づいて化学物質管理を進めることが近年望まれるようになってきている¹⁾。しかし、現在は化学物質を規制する際に、人への健康影響に対する配慮はあるが、生態系を守るという視点からみれば不十分と言える。OECDでは化学物質が生態系に及ぼすリスクを評価する際には、少なくとも生物種に対する毒性データ²⁾を用いて総合的に評価する必要があるとしている。当センターにおいても、近年、生態影響試験の実用化に向けた検討をはじめている。我々は昨年度までに、緑藻類を用いた藻類生長阻害試験の検討³⁾や、ミジンコを用いた繁殖阻害試験の実施にあたっての検討について前所報⁴⁾で報告してきた。また、我々は今回基礎研究の一環として、ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験実施にあたっての技術的な検討を行ったので報告する。

試験方法

1. 試験生物

急性遊泳阻害試験に使用したミジンコは、OECDのテストガイドラインの中で使用されているオオミジンコ

(*D. magna*)であり、本種は滋賀県立大学の安野正之教授より分譲頂いた。

オオミジンコ⁵⁾は北半球温帯に広く分布し、ステップ、ツンドラにある浅い水たまりに分布する。特に富栄養化した小型藻類に富む湖沼に出現する。しかし、日本の湖沼での分布は確認されていない種類であり、生態系の攪乱を防止する観点から取り扱いには注意を要する。

表1 ミジンコ類急性遊泳阻害試験の方法と条件

項目	方法および条件
生物種	<i>Daphnia magna</i> (オオミジンコ)
開始時	生後24時間以内の幼体
試験期間	24時間、48時間
試験濃度	5濃度と対照区試験
生物数	5頭4連×5濃度
試験方式	止水式
助剤使用	有機溶剤(対照区:アセトン)
希釈水	天然水・規定の調整水
生物密度	10ml以上/頭
温度	20 ± 1
照明	16時間明/8時間暗
測定	幼体の生死(頭数) 幼体の遊泳阻害(頭数) pH(換水前後) 溶存酸素(換水前後)
結果の算出	死亡率 遊泳阻害率 EC50:半数遊泳阻害濃度

*1 滋賀県立衛生環境センター 〒520-0834 滋賀県大津市御殿浜13-45
Shiga Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science,
13-45, Gotenhama, Ohtsu, Shiga, 520-0834, Japan

2. 試験化学物質

化学物質としては、琵琶湖周辺で水稲や野菜等の害虫防除に使用されている有機リン系殺虫剤のダイアジノンと一年生雑草の防除に主に使用されているカーバメイト系除草剤のチオベンカルブの2種を用いた。なお、両化学物質は水に溶けにくく、溶剤としてアセトンを使用し、その影響についても対照試験を併せて実施した。

3. 試験方法

試験方法は、OECDの生態影響試験法テストガイドライン 202⁶⁾、ミジンコ類急性遊泳阻害試験法に準じて行った。表1にミジンコ類急性遊泳阻害試験の方法と条件について示す。

4. 希釈水

希釈水はサントー社製造の天然水(硬度約30mg/L、ナトリウム4.9mg/L、マグネシウム1.4mg/L、カルシウム9.7mg/L、カリウム2.8mg/L)を使用し、事前に希釈水として適正であるか前報⁴⁾の繁殖試験を実施し確認した。また、試験中には試験水の交換は行わず、餌も与えなかった。

5. 試験条件

急性遊泳阻害試験には生後24時間以内の幼体が必要となる。試験開始2日前に体に幼体が詰まった親ばかりを、500ml ビーカーに分離し、1日前に産仔した幼体はすべて除去した。その後、24時間以内に産仔した120頭を用いた。培養条件はプレハブ型培養室を使用し、水温は20℃、照度1000～2000lux(16時間明/8時間暗条件)に設定し、開始時と終了時にpHおよび溶存酸素量を測定した。

試験には100ml用ビーカーを用い予備試験、本試験

の2回に分けて実施した。ミジンコ数は1試験濃度につき20頭を5頭ずつ4群に分けて使用した。予備試験では本試験の濃度設定の範囲を決めるため、濃度比(公比)を10にして広い範囲で行い、本試験では公比を1.8(10⁴)で設定した。本試験の結果から環境毒性学会提供ソフトを使用し、プロビット法等で半数遊泳阻害24hrEC₅₀および48hrEC₅₀を求めた。遊泳阻害の基準としては、試験容器を穏やかに動かした後、ミジンコが遊泳しないか、触角は動かせていても正常に遊泳できない状態を遊泳阻害とした。

6. 親の飼育条件

飼育親の餌としては、琵琶湖産の緑藻や藍藻および鞭毛藻約10種類について単藻分離・培養し検討を行った結果、緑藻綱のクロレラ(*Chlorella vulgaris*)やイトクズモ(*Ankistrodesmus falcatus*)が最も良かったので、本種を別途大量培養し餌として用いた。親ミジンコの給餌回数は週に5回以上、少量ずつ与えた(大量に餌を与え過ぎると親が衰弱することが多い)。試験にはすべて生後24時間以内の活発に動き回る幼体を使用した。

結果および考察

1. 飼育環境

ミジンコ幼体は各試験区で良好であり、溶剤として使用したアセトン(最高濃度1%)添加対照区においても各区ともミジンコ幼体の遊泳阻害は1頭も認められず、コントロールが非常に安定していた。このことはミジンコが適正環境では単為生殖を営むため、各個体のバラツキ

表2 ミジンコ急性遊泳阻害試験 本試験結果

チオベンカルブ 24時間後

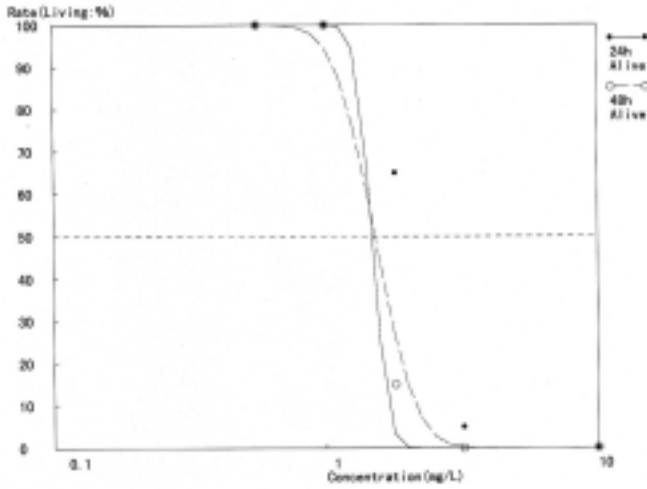
	濃度 μg/L	pH		DO (%)		DO (mg/l)		遊泳阻害数					阻害率 (%)	
		試験前	試験後	試験前	試験後	試験前	試験後	1	2	3	4	計		
コントロール	アセトン1%	7.85	-	105	-	9.64	-	0	0	0	0	0	0	0
1	560	7.85	-	104	-	9.65	-	0	0	0	0	0	0	0
2	1000	7.84	-	103	-	9.58	-	0	0	0	0	0	0	0
3	1800	7.84	-	103	-	9.50	-	2	1	3	1	7	35	
4	3200	7.85	-	105	-	9.65	-	5	4	5	5	19	95	
5	10000	7.84	-	104	-	9.62	-	5	5	5	5	20	100	

チオベンカルブ 48時間後

	濃度 μg/L	pH		DO (%)		DO (mg/l)		遊泳阻害数					阻害率 (%)
		試験前	試験後	試験前	試験後	試験前	試験後	1	2	3	4	計	
コントロール	アセトン1%	-	7.80	-	102	-	9.07	0	0	0	0	0	0
1	560	-	7.77	-	103	-	9.18	0	0	0	0	0	0
2	1000	-	7.77	-	104	-	9.20	0	0	0	0	0	0
3	1800	-	7.79	-	104	-	9.25	4	5	4	4	17	85
4	3200	-	7.79	-	103	-	9.09	5	5	5	5	20	100
5	10000	-	7.80	-	104	-	9.18	5	5	5	5	20	100

が少なかったためと考えられた。また、今回の試験期間中における各試験溶液のpHの範囲は7.7～7.9と安定しており、溶存酸素濃度も試験終了時においても全ての

試料で8.0mg/l以上で、ミジンコの飼育環境としては良好であった。



Dose-response curve for 50% of Daphnia Acute Immobilization Test (Probit method)

図1 チオベンカルブ本試験結果

表3 チオベンカルブの計算結果(ミジンコ急性遊泳阻害)

計算法	予備実験(µg/L)		本実験(µg/L)	
	24hr EC ₅₀	48hr EC ₅₀	24hr EC ₅₀	48hr EC ₅₀
プロビット法	2019	1635	1479	1519
ロジット法	1944	1790	2011	1520
ロジスティック法	-	-	2077	1527
EPA文献値	-	-	-	1240

2. チオベンカルブ

除草剤であるチオベンカルブの急性遊泳阻害の予備試験は、1～10,000 µg/Lの範囲を5段階の濃度で行った。ミジンコの遊泳阻害は1,000 µg/L以下の濃度では全く認められず、10,000 µg/Lでは全てのミジンコに遊泳阻害が認められた。この結果から24hrEC₅₀ および48hrEC₅₀ は1,000～10,000 µg/Lの範囲であることが分かった。そこで本試験は表2に示す、560～10,000 µg/Lの範囲を5段階の濃度で行った。本試験の結果を図1に示した。プロビット法によりミジンコ遊泳阻害EC₅₀を算出すると、表3に示すように24hrEC₅₀では1,480 µg/L、48hrEC₅₀では1,520 µg/Lであった。ロジット法では24hrEC₅₀で2,000 µg/L、48hrEC₅₀で1,520 µg/Lであった。また、ロジスティック法による計算結果においても24hrEC₅₀で2,100 µg/Lであり、48hrEC₅₀で1,530 µg/Lで同様の結果であった。EPA⁵⁾が発表している農薬とそのオオミジンコに対する48hrEC₅₀値を引用すると、チオベンカルブの急性遊泳阻害試験結果は48hrEC₅₀値は1,240 µg/Lであり、今回の試験結果とほぼ一致した結果であった。

3. ダイアジノン

ダイアジノン急性遊泳阻害試験の予備試験も同様に、1～10000 µg/Lの範囲を5段階の濃度で行った。その結果、急性遊泳阻害は1 µg/Lではミジンコに対する影響は観察されなかったが、10 µg/Lでは100%のミジンコに急性遊泳阻害が観察された。この予備試験の結果から、24hrEC₅₀値は1～10 µg/Lの範囲であることが分かった。

表4 ミジンコ急性遊泳阻害試験 本試験結果

ダイアジノン 24時間後

	濃度 µg/L	pH		DO (%)		DO (mg/l)		遊泳阻害数					阻害率 (%)	
		試験前	試験後	試験前	試験後	試験前	試験後	1	2	3	4	計		
コントロール	アセト1%	7.87	-	106	-	9.65	-	0	0	0	0	0	0	0
1	1	7.83	-	104	-	9.62	-	0	0	0	0	0	0	
2	1.8	7.81	-	105	-	9.50	-	0	1	0	1	2	10	
3	3.2	7.84	-	104	-	9.56	-	4	4	5	4	17	85	
4	5.6	7.85	-	104	-	9.62	-	5	5	5	5	20	100	
5	10	7.85	-	103	-	9.44	-	5	5	5	5	20	100	

ダイアジノン 48時間後

	濃度 µg/L	pH		DO (%)		DO (mg/l)		遊泳阻害数					阻害率 (%)
		試験前	試験後	試験前	試験後	試験前	試験後	1	2	3	4	計	
コントロール	アセト1%	-	7.67	-	103	-	9.14	0	0	0	0	0	0
1	1	-	7.71	-	102	-	9.09	0	0	0	0	0	0
2	1.8	-	7.72	-	103	-	9.21	5	4	4	5	18	90
3	3.2	-	7.75	-	102	-	9.12	5	5	5	5	20	100
4	5.6	-	7.77	-	103	-	9.14	5	5	5	5	20	100
5	10	-	7.76	-	103	-	9.17	5	5	5	5	20	100

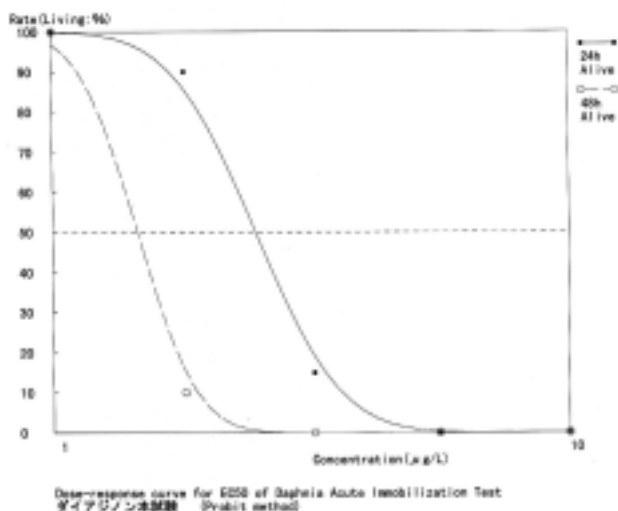


図 2 ダイアジノン本試験結果

表 5 ダイアジノンの計算結果 (ミジンコ急性遊泳阻害)

計算法	予備実験 (µg/L)		本実験 (µg/L)	
	24h E C 50	48h E C 50	24h E C 50	48h E C 50
プロビット法	3.16	3.16	2.46	1.46
ロジット法	3.16	3.16	2.48	1.48
ロジスティック法	2.54	2.54	2.48	1.49
E P A 文献値	-	-	-	0.84

そこで本試験は表 4 に示すように 1 ~ 10 µg/L の範囲で 5 段階の濃度に設定し実施した。ダイアジノン本試験の結果を図 2 および表 5 に示す。24hrEC₅₀ および 48hrEC₅₀ 値は、プロビット法では、それぞれ 2.46 µg/L と 1.46 µg/L であり、ロジット法では 24hrEC₅₀ 2.48 µg/L、48hrEC₅₀ では 1.48 µg/L であった。また、ロジスティック法による計算結果についても 24hrEC₅₀ では 2.48 µg/L、48hrEC₅₀ では 1.49 µg/L と同様の結果であった。E P A が発表⁵⁾している 48hrEC₅₀ 値は、0.84 µg/L であり、今回の 48hrEC₅₀ 値は E P A 発表値よりやや高い値とな

った。しかし、他の文献値^{7,9)}のバラツキから考慮するとほぼ一致した結果であると考えられた。

まとめ

ミジンコは一次生産者と、より高次の生物を結ぶ食物連鎖の中間に位置し、大きさが小さくライフサイクルも短く、更に化学物質に対する感受性が高い生物である。今回、化学物質が生態系に及ぼすリスクを評価するための基礎研究としてミジンコの急性遊泳阻害試験の実施にあたっての検討を行った結果、本種は培養条件下ではコントロールが安定していることや、試験期間が 3 日間と短く簡易に行えることから、当所においても化学物質のモニタリング手法の一つとして、ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験が実施できることが確認できた。また、本検定種である *Daphnia magna* については、琵琶湖には産しない種であるため、今後、琵琶湖の生態系を守っていく意味からも、在来のミジンコ種と本種との比較実験を行い、在来種での本法の適用についても検討を進めたい。

引用文献

- 1) 畠山成他：化学物質の生態評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究, 国立環境研究所, SR-29-99, 1-44 (1999)
- 2) OECD Guideline for testing of Chemicals. OECD, (1984)
- 3) 若林哲哉：セレナスツルムを用いた藻類成長阻害試験の検討 (未発表資料)
- 4) 一瀬諭：滋賀県立衛生環境センター所報, 35, p.88-93 (2000)
- 5) U.S.E.P.A. データベース, AQUIRE. (1995)
- 6) Draft OECD test Guideline 202 part 2, *Daphnia magna* reproduction test to be used in the final ring test (1994)
- 7) 田中二良編集：水生生物と農薬 急性毒性資料編, サイエントリスト社 (1978)
- 8) 田中 晋：富山大学教育学部紀要 B, 48, 37-42 (1996)
- 9) 西内康浩編集：続・水生生物と農薬 急性毒性資料編, サイエントリスト社 (1992)