

VII-80 ノリの殻胞子を供試生物とした毒性試験における影響評価法の検討

宮崎大学工学部 学員 高見 徹

宮崎大学工学部 正員 鈴木祥広

宮崎大学工学部 正員 丸山俊朗

1. 背景と目的

大型藻類は沿岸海域において一次生産者であり、動物再生産の場を形成し、極めて重要な生物群集である。毒性試験用の生物は、生物学的重要種で、しかも社会経済学的重要種であることが望ましい。¹⁾ ノリは、わが国において、最適の供試生物の一つと考える。さらに、ライフサイクルの中で感受性の高いステージを供試体とするのが望ましい。大型藻類を供試生物とした毒性試験法における影響評価項目には、生残（死滅）²⁾、発芽¹⁾、生殖阻害³⁾、幼葉の生長⁴⁾ などがある。一般に成葉よりも小芽（初期発生段階）の方が、さらに生残による評価よりも生長による評価の方が感受性が高い²⁾とされている。米国カリフォルニア州策定のジャイアントケルプを供試生物とした毒性試験法では、発芽による評価よりも、配偶体の発芽管の長さ（生長）による評価の方が感受性が高い¹⁾とされている。

ノリ殻胞子は着生から4細胞程度に分裂するまでの期間が4～5日である。また、細胞分裂の様子が検鏡によって容易に観察できる。図-1はノリ殻胞子の発芽から数細胞期の発芽体への生長の様子を示したものである。ノリ殻胞子を供試体とした毒性試験においても殻胞子の発芽から細胞分裂段階の方が感受性が高いと予想される。

そこで本研究では、スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) 殻胞子を供試体として、殻胞子の基質への着生から発芽体（初期発生段階）に対する銅とモノクロラミンについて毒性試験を行い、毒性物質に対する影響評価のための、(1) 適切な曝露期間はいくらか、(2) 生残率と発芽率および細胞分裂のいずれが高い感受性を示すかを明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

供試体は本研究室で保存培養しているスサビノリのフリー糸状体から、実験当日に1/20PES培地中に放出させた殻胞子をガラスプレート上に沈降・着生させたもの⁵⁾を用いた。毒性試験の基本培地は天然海水をベースとした1/20PES培地を用いた。毒性物質として、銅 (Cu) とモノクロラミン (NH₂Cl) を用いた。Cuには硫酸塩を用いた。NH₂Clはジエチルエーテル抽出法で精製した。試験培地の塩分と栄養塩濃度が一定となるように、試水の添加率を全て10%とした。試験培地のCu濃度は0～1000 μg Cu/ℓの範囲で10濃度区、NH₂Cl濃度は0～100 μg Cl₂/ℓの範囲で8濃度区とした。毒性試験は全ての濃度区について3連とし、培養期間は試験培地に曝露後120時間とした。培養条件は短日・低温（明暗期10hL:14hD、照度7000lux、水温15℃）で静置培養を行った。検鏡は曝露時から120時間後まで24時間毎に行い、殻胞子（非発芽体）、1～2細胞期発芽体、および3細胞期以上の発芽体に区分し、それぞれの個体数を計数した。データ解析は、まず曝露0～120時間後まで24時間ごとに、非発芽体と各細胞期の発芽体数を加算して全個体数を求め、全ての濃度区において曝露時の全個体数に対する所定時間後における全個体数の割合（生残率）を求めた。所定の毒性物質濃度における影響評価は毒性物質濃度0 mg/ℓを対照区とした。次に、曝露期間0～120時間後

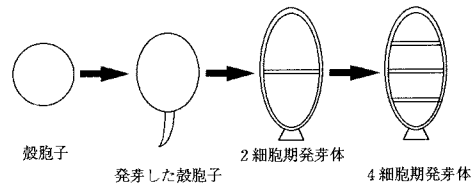


図-1 ノリ殻胞子の発芽と生長の過程。

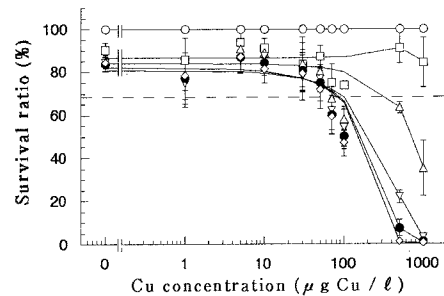


図-2 所定曝露期間におけるノリ殻胞子・発芽体の生残率に対する銅の影響 (n=3)。

○, 0hr; □, 24hr; △, 48hr; ▽, 72hr; ●, 96hr; ◇, 120hr; ---, Critical value after 96 hr.

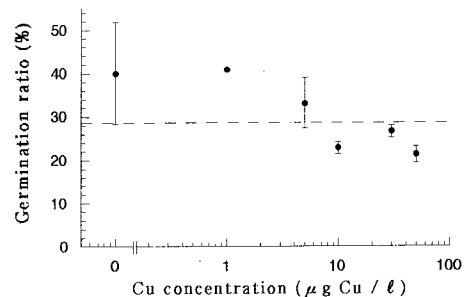


図-3 曝露96時間後におけるノリ殻胞子の発芽率に対する銅の影響 (n=3)。

Critical value after 96 hr.

まで24時間ごとに、生残率において有意な影響の表れなかった濃度区における所定時間の全個体数に対する発芽体数の割合（発芽率）と、所定時間の全個体数に対する3細胞期以上の発芽体の占める割合（3細胞期以上の発芽体の割合）を求めた。有意差検定は、USEPAの藻類の毒性試験³⁾に採用されているANOVA test（分散分析）に従った。対照区に対して有意差の表れた（ $p < 0.05$ ）最も低い濃度を最小影響濃度（Lowest Observed Effect Concentration, LOEC）とした。

3. 結果と考察

所定のCu濃度におけるノリ殻胞子・発芽体の生残率は、曝露後、経時的に変化して、約96時間後に安定した（図-2）。殻胞子・発芽体は毒物のインパクトを受けても完全な死滅（細胞内の色素の脱色や細胞膜・質の消滅）に時間を要することがわかった。生残率から求めたLOECは70 $\mu\text{g Cu}/\ell$ （培養48時間以降に影響が表れた）であった。発芽率から求めたLOECは10 $\mu\text{g Cu}/\ell$ （96時間以降）（図-3）となり、感受性は発芽率の方が生残率と比較して7倍高くなった。この結果はジャイアントケルプに対するCuの毒性試験結果¹⁾の10~50 $\mu\text{g Cu}/\ell$ とほぼ一致した。3細胞期以上の発芽体の割合から求めたLOECは10 $\mu\text{g Cu}/\ell$ （96時間以降）であり、発芽率から求めたLOECと一致した（表-1）。

所定の NH_2Cl 濃度におけるノリ殻胞子・発芽体の生残率は、曝露から72~96時間後に安定した（図-4）。生残率から求めたLOECは64 $\mu\text{g Cl}_2/\ell$ （72時間以降）であった。発芽率と3細胞期以上割合から求めたLOECはいずれも20 $\mu\text{g Cl}_2/\ell$ （24時間後、48時間後）（図-5、表-1）となり、感受性は生残率と比較して約3倍高くなった。 NH_2Cl の毒性試験における生残率の安定と、発芽率と3細胞期以上の発芽体の割合のLOECが表れる培養期間はCuの場合より短い。この理由は、 NH_2Cl の酸化力、あるいは毒性発現機構の違いと思われる。また、Cuにおける発芽率と3細胞期以上の発芽体の割合のLOEC値は、96時間以降で一定であるのに対して、 NH_2Cl では曝露期間が長くなると影響濃度が高くなった（表-1）。この理由は、 NH_2Cl が海水に添加後に毒性の低い酸化物質に変化するためと、有機物（ノリ）によって消費されるためと考えられる。

以上の結果より、発芽しなければ細胞分裂がおこらないことと、細胞分裂が進むと計数に時間がかかり過ぎることから、生長に対する影響は、細胞分裂よりも発芽率によって評価するのが適切であることが明らかとなった。

4. まとめ

ノリ殻胞子とその初期発生段階（発芽）に対する毒性試験の影響評価は、(1) 曝露から96時間後の生残率と、曝露から24~96時間後までの発芽率から評価できること、(2) 生残率よりも発芽率による評価の方が感受性が高くなることが明らかとなった。

参考文献 1) State Water Control Board (1989) Marine bioassay project Forth report, 1-37. 2) 松井敏夫 (1980) 水質汚濁調査指針, 413-415, 恒星社厚生閣, 東京. 3) USEPA (Cincinnati, OH) (1988) EPA/600/4-87/028. 4) 丸山俊朗ら (1991) 第28回下水道研究発表会講演集, 189-191. 5) 高見徹ら (1995) 土木学会第50回年次学術講演会講演概要集第2部 (B), 1002-1003.

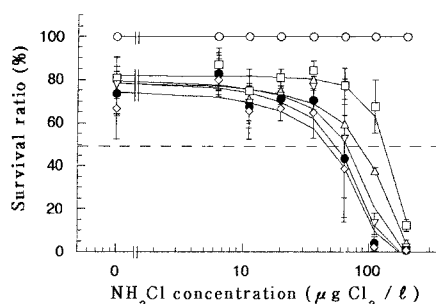


図-4 所定曝露期間におけるノリ殻胞子・発芽体の生残率に対するモノクロアミンの影響 (n=3).
○, 0hr; □, 24hr; △, 48hr; ▽, 72hr; ●, 96hr; ◇, 120hr; ---, Critical value after 96 hr.

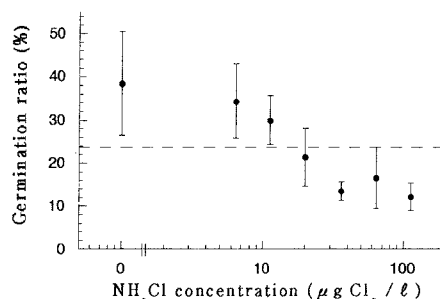


図-5 曝露24時間後におけるノリ殻胞子の発芽率に対するモノクロアミンの影響 (n=3).
---, Critical value after 24 hr.

表-1 銅とモノクロアミンの毒性試験における各影響評価項目に対するLOEC値と曝露期間

End point	Copper		Monochloramine	
	LOEC ($\mu\text{g Cu}/\ell$)	Cultivation period (hr)	LOEC ($\mu\text{g Cl}_2/\ell$)	Cultivation period (hr)
Survival ratios	70	48~120	64	72~120
Germination ratios	10	96~120	20	24
Ratios of over 3 celled germlings	10	96~120	20	48