

凍結防止剤及び融雪剤に対する人工土壌を用いたシマミミズの急性毒性試験

明石工業高等専門学校 学生会員 ○木村真悠

同上 非会員 田村修司

同上 正会員 渡部守義

西日本工業大学 正会員 高見 徹

1. はじめに

積雪寒冷地における冬期の凍結路面对策として、凍結防止剤散布が実施されている。融氷特性に優れ、安価な塩化ナトリウムを中心とした塩化物系の凍結防止剤の利用が主である。一方で、塩化物系の凍結防止剤散布による飛散や浸透による沿道環境への負荷が懸念されている。道路施設や構造物に関する塩害の研究はされているものの、土壌生物に対する知見は少ない。ミミズは土壌を摂食し排泄することで、栄養塩の回帰、物質循環を行う。また、土壌の団粒化による通気性の確保を行うなど健全な土壌維持に不可欠である。そこで、本研究では土壌生物に対する凍結防止剤の基本的な知見を得るため、シマミミズ (*Eisenia fetida*) を試験生物とした LC₅₀ (半数致死濃度) を得ることを目的とした。

2. 試験方法

試験方法は、OECD テストガイドライン TG207¹⁾に準拠し、生態影響試験ハンドブックによる毒性試験を参考にした急性毒性試験に準じて行う。TG207 では濾紙接触毒性試験による急性毒性試験と人工土壌による急性毒性試験が設けられている。本研究では実際に薬剤が散布された状態におけるミミズへの影響を調べるため、人工土壌を用いることとした。

試験生物はシマミミズ ((有)相模浄化サービスから入手) を用いた。シマミミズの飼育方法は、蓋つきのプラスチック容器 (幅約 87.5 cm×奥行き約 38.5 cm×高さ約 39 cm) において十分に湿り気を与えた腐葉土とともに培養した。人工土壌は TG207 に従い、珪砂 70%、カオリン粘土 20%、ピートモス 10%、炭酸カルシウム (CaCO₃) 0.3%の割合で作成した。試験開始 1 週間前に人工土壌に、ミミズ約 60~70 匹を馴致させる。その後、人工土壌に試験薬剤を混合し

含水率が 35%、質量 750 g になるように調整する。各試験薬剤に対し 5 濃度区を設定し、馴致したミミズ 10 匹を投入し、7 日目と 14 日目の死亡数を記録する。死亡数から用量反応曲線を得て、LC₅₀ を求める。LC₅₀ は化学物質の急性毒性試験の代表的な値として利用される。また、試験期間中シマミミズが人工土壌内部に留まっていることを確実にするために連続照明下で行う。これはミミズが暗期に土壌表面に這い出て活動する習性に対し、それを抑制し土壌暴露を維持させるためである。一方、土壌の pH は、土壌中での生物学、化学的变化に大きな影響を持つことから、試験期間における土壌の間隙水の pH を地盤工学会基準 JGS T 211 に従い測定を行った。

以上の試験概要を表 1 に示す。LC₅₀ の予測は縦軸に生存確率、横軸に薬剤濃度をとったシグモイド曲線を取る。結果の整理は用量反応曲線を作成し、LC₅₀ と 95%信頼区間濃度を MOSAICsurvival を用いて求めた。

表 1 ミミズ急性毒性試験
(TG207, 人工土壌試験) の方法

生物種	<i>Eisenia fetida</i> (<i>Michaelsen</i> :シマミミズ) 等
試験媒体	人工土壌 750g (被験物質を含む)
試験期間	14 日
試験濃度	等比級数で 5 濃度区以上
試験温度	20±2℃
照明	連続照射 (400~800 ルクス)
給餌	記載なし
観測, 測定	死亡率(7, 14 日目), 異常行動と病的変化 (7 日目)
結果の算出	LC ₅₀

キーワード 急性毒性試験, ミミズ, 人工土壌, 半数致死濃度, 凍結防止剤, 融雪剤

連絡先 Mayu Kimura, Syuji Tamura, Moriyoshi Watanabe, Tohru Takami mwata@akashi.ac.jp

本研究では、試験薬剤として、塩化ナトリウム、塩化カルシウム（二水和物）、プロピオン酸ナトリウム、塩化ナトリウムとプロピオン酸ナトリウムの混合物（重量比で 8:2、以下混合物と略す）を対象とした。また、プロピオン酸ナトリウム、混合物は金属腐食の抑制効果が期待されており、凍結防止剤として利用され始めている。

3. 試験結果と考察

14 日目の各試験薬剤における個体の様子、薬剤を用いた用量反応曲線の結果を図 1 に示す。上から塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、塩化ナトリウム (NaCl)、混合物である。

まず、塩化カルシウムでは、個体の様子から自切や縮み、赤黒い色を呈した個体が見られた。半数致死濃度 (LC_{50}) は 8.96g/kg を示し、信頼区間 95%濃度は $8.02\sim 11.6\text{g/kg}$ となった。次に、塩化ナトリウムでは個体の様子から自切や縮み、くびれを呈した個体が見られた。半数致死濃度 (LC_{50}) は 4.32g/kg を示し、信頼区間 95%濃度は $3.85\sim 5.45\text{g/kg}$ となった。最後に、混合物では個体の様子から紐状や赤黒い色を呈した個体が見られた。半数致死濃度 (LC_{50}) は 3.83g/kg を示し、信頼区間 95%濃度は $2.92\sim 6.98\text{g/kg}$ となった。

ミミズの死亡要因としては、個体の様子及び薬剤の性質から、薬剤による吸水作用、浸透圧の変化などが考えられる。塩化カルシウムには自重の約 10 倍の吸水作用があると考えられており、塩化ナトリウムにおいても脱水作用がある。また、図中の写真は個体の確認できたものを示しており、高濃度ではいずれの薬剤においても個体は溶けて確認出来なかった。

LC_{50} 値を薬剤の種類別に表 2 にまとめる。表より、毒性が強い順に混合物 3.83g/kg 、プロピオン酸ナトリウム 4.08g/kg 、塩化ナトリウム 4.32g/kg 、塩化カルシウム 8.96g/kg となった。

また、シマミミズの至適 pH は 5~8 とされている。試験中に pH は 6.36~7.63 であり、大きな変化がなかったことから、pH が試験結果に影響していないと考えられる。人工土壌の含水率についても、試験前後で 35%付近にあることから試験条件は満たされていたと言える。

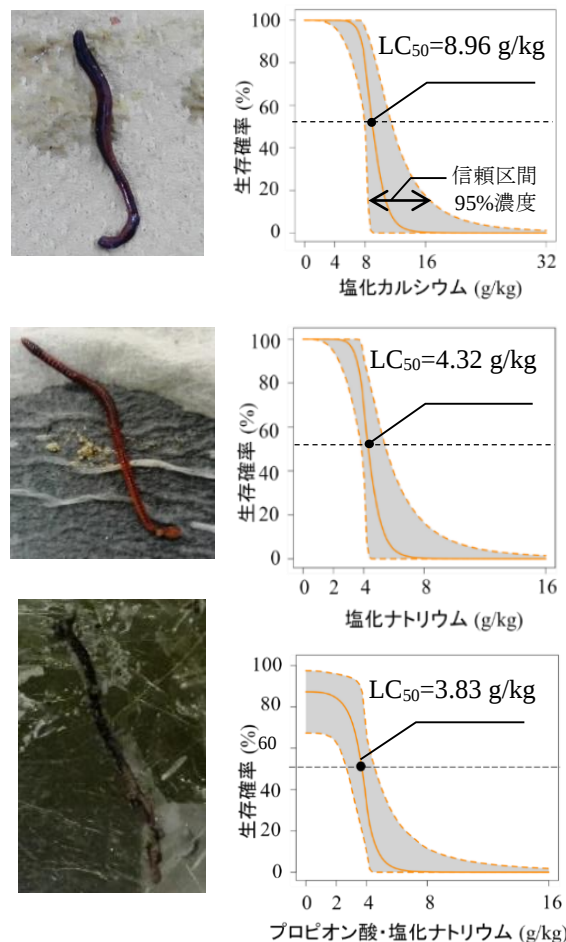


図 1 各試験薬剤における個体の様子、用量反応曲線

表 2 LC_{50} の各薬剤の推定値

試験薬剤名	信頼区間 95%濃度 (g/kg)	LC_{50} (g/kg)
塩化カルシウム	8.02~11.6	8.96
塩化ナトリウム	3.85~5.45	4.32
プロピオン酸ナトリウム	2.79~6.81	4.08
混合物	2.92~4.93	3.83

4. おわりに

本研究ではシマミミズに対する人工土壌での融雪剤、凍結防止剤における半数致死濃度 LC_{50} の推定及びそれぞれの薬剤の毒性の比較の検討を行うことで、土壌生物に対する薬剤への基本的な知見が得られた。

参考文献

- 1) OECD : Earthworm Acute Toxicity (No 207), OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, 1984
- 2) 渡辺弘之 : ミミズの有効利用とその技術, 静脈産業技術資料シリーズ, 1 巻, p.239, 1978