

成長速度解析を加えたオオミジンコ短期毒性試験による河川水質評価手法の開発

日本大学大学院理工学研究科土木工学専攻 学生会員 ○松本昌也, 鹿野哲之介
日本大学理工学部土木工学科 正会員 小沼 晋, 齋藤利晃

1. はじめに

河川における有機汚濁の代表的な指標である BOD の環境基準達成率は平成 23 年度には 93.0%に達しており¹⁾, この観点から見れば河川環境は改善されてきていると言える。しかし, 河川における生態系がこれに見合った回復を遂げているかは疑問であり, 微量化学物質の影響を否定できない。化学物質による複合的な生態毒性を評価する手法として, OECD のテストガイドラインに準拠したオオミジンコ急性毒性試験が知られている。しかし, 我々の既往研究²⁾によれば, 河川水の生態毒性評価には急性の致死判定では低感度であることが懸念される。そこで我々は, より検出感度良く河川の生態毒性を評価することを目指し, 短期での成長阻害に着目した。既存の知見^{3,4)}によれば, 幼体のオオミジンコの成長阻害は致死に比べ高感度に毒性影響を評価できることが示唆されている。しかし, これらは単独物質の評価であり, 多種多様な微量化学物質が存在する実河川においてオオミジンコの成長阻害を評価項目とした適用例は存在しない。

2. 研究目的

そこで本研究では, オオミジンコの成長阻害から河川の生態毒性を評価することを目的とする。今回は最大成長速度を保証する試験条件を構築し, 成長阻害から毒性を評価する手法の確立を目指す。また実河川において本研究の手法を適用し, 実用性を評価する。

3. 試験方法

3.1. 致死毒性試験

毒性試験には, 毒性試験キット Daphtoxkit F magna (MicroBioTests 社製) を用いた。試験はキット付属の OECD プロトコル⁵⁾に従い, 幼体のオオミジンコを試験水へ 2 日間曝露した後, 致死から毒性を評価した。対照系には ISO6341⁶⁾に準じた標準淡水を用いた。

3.2. 成長速度の算出方法

試験前後の供試生物をデジタルカメラ(Canon 製 IXY 3)のマクロモードにより接写撮影し, PC 用ソフ

トウェア「長さ・面積測定」⁷⁾により写真から体長を測定した。測定結果の差から算出される試験中の体長増分を試験時間で割ることで単位時間当たりの体長成長速度($\mu\text{m}/\text{h}$)を算出した。

3.3. 最大成長速度を担保する条件の抽出

最大成長速度を担保するため, 試験水と対照系にオオミジンコの餌となる藻類を添加した。藻類は *Chlorella vulgaris* CK-22 (樹立元: クロレラ工業) 超純水洗浄済み濃縮液 (販売元: エコジェノミクス, 実測濃度: 28mg/ml) を用いた。使用前に遠心分離 (3000 rpm, 10 分) による超純水洗浄を 3 回行った。適切な添加量を定めるため, 標準淡水にクロレラ溶液を 0~0.125 μl (0.025 μl 毎) 添加した。そこにオオミジンコの幼体を 20 匹ずつ投入し, 2 日後の体長を測定した。

3.4. 河川水を用いた実用性評価

清流ルネッサンス計画により水質改善, 生物保全の取り組みが行われている綾瀬川から 3 地点と, その支流の伝右川, 毛長川, 古綾瀬川から各 1 地点ずつ, 計 6 地点(図 1)の橋の上からバケツを用いて河川水を採取した。3.3.で最適化された条件でオオミジンコの 2 日間の成長阻害として河川水の毒性を評価した。



図 1 サンプルングポイント

4. 実験結果および考察

4.1. 致死毒性試験結果

試験結果を表 1 に示した。桑袋大橋および弁天橋の河川水では 5%と低い値ではあるが致死率が計測された。しかし, 弁天橋では対照系でも 5%の致死率が示されたこと, 致死率が低いことから河川水の毒性の有無を明確に判断することは難しい。また残りの 4 地点

では致死を確認できなかった。

表 1 オオミジンコの致死率

	新加平橋	浮花橋	桑袋大橋	弁天橋	吉笹原橋	毛長橋
対照系	0	0	0	5	0	5
河川水	0	0	5	5	0	0

4. 2. OECD 試験での成長速度解析結果

OECD プロトコルを用いた試験の成長速度解析結果を図 2 に示す。対照系に比べいずれの河川水も成長が促進されている。しかし OECD 試験の結果では毒性要因と成長要因のバランスにより成長速度が示されている可能性を否定できない。したがって最大成長速度を保証することによって成長の条件を一定とし、成長阻害として毒性のみ評価することが必要である。

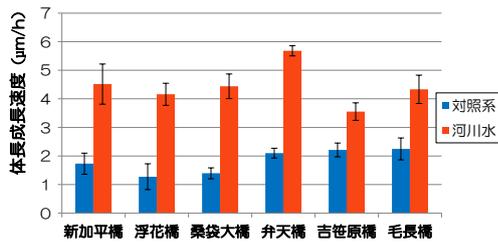


図 2 OECD 試験における成長速度解析結果

4. 3. クロレラ添加量の選定実験結果

図 3 に 3. 3. の手順で用意した溶液に 2 日間投入したオオミジンコの平均体長を示した。対照系に比べクロレラ添加系は平均体長が大きく、標準淡水 10ml 当りクロレラ 1.4mg でピークを迎えた。t 検定(p<0.05)では添加系の平均には差が示されなかったが、本試験では最も平均値が大きく測定された標準淡水 10ml 当りクロレラ 1.4mg を試験中の添加量として定めた。

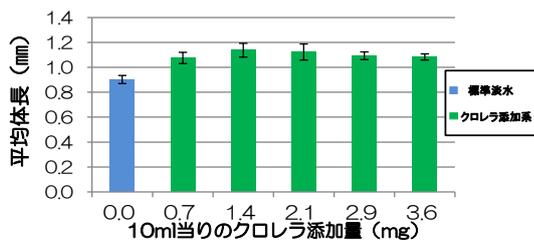


図 3 クロレラ添加量の選定実験結果

4. 3. 河川水を用いた実用性の検討

本研究のクロレラ添加試験を河川水へ適用した結果を図 4 に示す。対照系に比べいずれの河川水も成長速度の平均値は低い値を示した。この結果から、クロレラ添加により最大成長速度が担保され、成長阻害として河川水の生態毒性を評価できていると考えられる。算出結果を t 検定(p<0.05)したところ、対照系と河川水の成長速度に有意差を認められた地点は新加平橋、弁天橋、吉笹原橋の 3 地点であった。以上より、致死では確認できなかった毒性を成長阻害によって評価できることが示唆された。

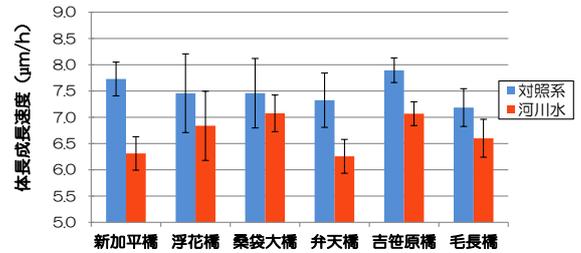


図 4 最大成長速度を担保した試験結果

5. まとめ

本研究は、河川水の生態毒性を高感度で検出することを目的として、オオミジンコの成長阻害を利用した新しい評価手法の確立を目指した。クロレラを試験溶液へ添加することにより、試験中の最大成長速度を担保する手法を用いたところ、致死では検出されなかった毒性を成長阻害から評価することができた。このことは、本手法が致死毒性では評価できない河川水の生態毒性を検出感度良く評価できる有効な生物毒性評価手法であることを示している。尚、本手法の最大の特徴は最大成長速度を担保することにより、成長因子の影響を受けずに真に毒性影響のみを抽出して評価できることにある。本研究の成果により、最大成長速度を担保できるクロレラの最適投入量として標準淡水 10ml 当りクロレラ 1.4mg が得られた。

また本手法の課題は、オオミジンコの個体差が大きい試験があったこと、手法の信頼性を明らかにすることである。試験終了時には試験溶液にクロレラが沈殿していたことから、うまく摂取できなかった個体があったことも予想される。今後はクロレラが沈殿した試験水は攪拌するなど作業手順を検討したい。またクロレラと河川の組み合わせにより成長阻害が生じている可能性もある。単独物質の毒性評価などにより本研究の手法の信頼性を検証する必要もある。

参考文献

- (1) 環境省 水・大気環境局, 平成 23 年度公共用水域水質測定結果, 2012.12
- (2) 松本昌也, 成長速度解析を加えたオオミジンコ急性毒性試験による都市河川水質の評価, 日本大学学術講演会, 2012.11
- (3) I.Trubetskova, The Juvenile Growth Rate of Daphnia: A Short-Term Alternative to Measuring the Per Capita Rate of Increase in Ecotoxicology, 2002.
- (4) T.Hanzato, Growth Analysis of Daphnia Early Juvenile Stages As An Alternative Method to Test The Chronic Effect of Chemicals, 1998
- (5) MicroBioTests Inc.HP, Daphtoxkit F magna™, <http://www.microbiotests.be/product.htm>.
- (6) ISO, ISO 6341 Water quality, http://www.iso.org/iso/home/stores/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=21923
- (7) !0_0! Excel 長さ・面積測定, Ver.2.22, <http://hp.vector.Co.jp/authors/VA004392/>.