

銀ナノ粒子の生態系影響評価におけるマイクロコズム試験の有効性の検証

千葉工業大学大学院 生命環境科学専攻 学員 ○清水達也
 千葉工業大学 生命科学科 正員 村上和仁

1. 目的

化学物質の生態系影響を評価する試験法は単一生物種試験と複数生物種試験に大別される。生態系影響評価手法において、従来法である単一生物種試験では生態系機能への影響を含めた生態系リスク評価がなされていないことが現状である。マイクロコズムは生態系の構造・機能を持つモデル生態系であり、高い再現性と安定性を兼ね備えており、生態系影響評価手法として適していると考えられる。また、近年幅広く利用されている銀ナノ粒子・銀イオンは、排水や河川水を通じて水圏生態系に及ぼす影響について知見が得られていない。

本研究では、マイクロコズム試験およびマイクロコズム構成種を用いた単一種試験により、銀ナノ粒子・銀イオンによる影響を比較検討し、生態系影響評価におけるマイクロコズム試験の有効性について検証することを目的とした。

2. 方法

2.1 供試マイクロコズム

Gnotobiotic 型マイクロコズム (N-system) を用いた。なお、このマイクロコズム (N-system) は構成種が既知であり、高い安定性と再現性を有することを特徴とするモデル微生物生態系である。本研究で用いた N-system は、生産者として 2 種の緑藻類 *Chlorella* sp.、*Scenedesmus quadricauda*、1 種の糸状藻類 *Tolypothrix* sp.、捕食者として 1 種の原生動物繊毛虫類 *Cyclidium glaucoma*、2 種の後生動物輪虫類 *Lecane* sp.、*Philodina erythrophthalma*、1 種の後生動物貧毛類 *Aelosoma hemprichi*、分解者として 4 種の優占細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、coryneform bacteria にて構成されている (図 1)。

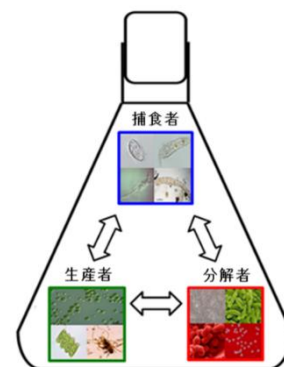


図1 マイクロコズムの概要

2.2 培養方法および測定項目

マイクロコズムの培養は、ポリペプトン濃度を 100mg/l となるよう調整した TP 培地 200ml を 300ml 容三角フラスコに入れ、継代培養しているマイクロコズムを種として 10ml 接種した後、25℃、2,400lux (明 12hr / 暗 12hr)、静置条件とした。

単一種試験の培養は、300ml 三角フラスコに Taub 培地 200ml、動物プランクトン培養時は米を二粒入れ、それぞれマイクロコズムから単離培養している *Chlorella* sp. を 1ml (6.0×10^3 N)、*Tolypothrix* sp. を 5ml (0.8×10^1 cm) それぞれ接種した後、温度 25℃、照度 5,000lux の条件下で *Chlorella* sp. を 96 時間、*Tolypothrix* sp. を 120 時間、*Philodina erythrophthalma* を 5ml (2.0×10^2 N) 接種した後、温度 25℃、暗所で 14 日間または 14 日間+48 時間の静置培養を行った。

2.3 添加金属

銀イオン (Ag^+ 、日本イオン株式会社製銀イオン濃縮液)、銀ナノ粒子 (AgNP 、日本イオン株式会社製ナノシルバー分散液、平均粒子径：10nm) を添加して負荷を与えた。銀イオン・銀ナノ粒子濃度は段階的に設定し、マイクロコズム試験では培養開始 16 日目の安定期に添加した。

単一種試験では、*Chlorella* 培養系、*Tolypothrix* 培養系、*Cyclidium* 培養系において培養開始時に添加 (培

キーワード：マイクロコズム 銀イオン 銀ナノ粒子 m-NOEC 単一種試験

〒275-8588 千葉県習志野市津田沼 2-17-1 (千葉工業大学大学院生命環境科学専攻) TEL:047-478-0455 FAX:047-478-0455

表1 マイクロコズム試験および単一種試験の影響評価

		機能パラメータ (DO) LOEC	構造パラメータ (個体数) LOEC	m-NOEC		NOAEC
AgNP		0.03mg/L	0.05mg/L	0.02mg/L		0.10 μg/L
Ag ⁺		0.02mg/L	0.1mg/L	0.01mg/L		0.05 μg/L
		<i>Chlorella</i> sp.	<i>Tolypothrix</i> sp.	<i>Cyclidium glaucoma</i>	<i>Philodina erythrophthalma</i>	NOAEC
AgNP	10mg/L～	0.001～ 0.01mg/L	0.005～ 0.01mg/L	～1mg/L	40mg/L～	0.01～ 0.1 μg/L
Ag ⁺	10mg/L～	0.001～ 0.01mg/L	0.01～ 0.02mg/L	～1mg/L	10～20mg/L	0.01～ 0.1 μg/L
		(EC ₅₀)	(EC ₅₀)	(EC ₅₀)	(LC ₅₀)	(<i>Tolypothrix</i> sp.) (<i>Cyclidium glaucoma</i>)

養開始時添加系)、*Philodina* 培養系において 14 日間の培養後に添加 (増殖安定後添加系) を行った。

2.4 評価手法

個体数 (構造パラメータ) および DO、P/R 比 (機能パラメータ) の枝分かれ型分散分析の検定結果から影響なしと評価された濃度のうち、最も高い濃度をマイクロコズム最大無影響濃度 (m-NOEC) とした。なお、先行研究より m-NOEC をアセスメント係数 200 で除することで実際の生態系を保護可能とされている。

単一種試験では、培養開始時添加系では、24 時間ごとにサンプリングし、プランクトン計数板にマイクロピペットで 1ml 採り、光学顕微鏡下で検鏡・計数して生長阻害率・比増殖速度を測定し、半数効果濃度 (EC₅₀) から評価した。増殖安定後添加系では、培養開始 14 日目に十分な個体数の増殖を確認して添加後、光学顕微鏡下で 24、48 時間後の個体数を検鏡・計数し、半数致死濃度 (LC₅₀) から評価した。

3. 結果および考察

マイクロコズム試験および単一種試験の結果を表 1 に示した。構造パラメータおよび機能パラメータの評価結果から、m-NOEC は、AgNP 添加系で 0.02mg/L、Ag⁺添加系で 0.01mg/L と評価された。m-NOEC をアセスメント係数 200 で除すると、AgNP 添加系で 0.10 μ g/L、Ag⁺添加系で 0.05 μ g/L で実際の生態系を保護可能と考えられた。単一種試験の結果から、EC₅₀ をアセスメント係数 100 で除して算出した生態系を保護可能な濃度は、最も低濃度で影響が生じた *Tolypothrix* sp.、*Cyclidium glaucoma* を用いた試験から、AgNP、Ag⁺添加系のいずれも 0.01 μ g/L から 0.1 μ g/L の間と評価した。マイクロコズム試験の個体数変遷から、AgNP が下位捕食者に蓄積し生物濃縮を起こすことや Ag⁺の影響は生態系内で銀ナノ粒子と比較して影響が緩和することが考えられる。増殖安定後添加系の *Philodina erythrophthalma* の結果から、AgNP は Ag⁺と比較して、単一種試験では高次捕食者に対して影響が大きくなる可能性が示唆された。生態系を保護可能な濃度を比較すると、マイクロコズム試験では単一種試験より AgNP で 1 $\sim$ 10 倍、Ag⁺で 0.5 $\sim$ 2 倍の濃度となった。これは、物質循環・エネルギーフロー・生物間相互作用といった自然生態系の基本要素を包含しているマイクロコズム試験が単一種試験と同程度の感受性を有していることを示している。

4. まとめ

本研究では、AgNP、Ag⁺を被験物質としてマイクロコズム試験とマイクロコズム構成種を用いた単一種試験を比較検討し有効性を検証した。単一種試験から 0.01 μ g/L $\sim$ 0.10 μ g/L の範囲、マイクロコズム試験から AgNP 添加系が 0.10 μ g/L、Ag⁺添加系が 0.05 μ g/L で実際の生態系を保護可能と評価された。マイクロコズム試験による生態系機能評価は、検出感度の高い単一種試験と同程度の感受性が得られた。マイクロコズム試験では生態系構造の解析により、下位捕食者に対して Ag⁺の影響の緩和や生態系内で AgNP の生物濃縮が起きている可能性が示唆された。化学物質のリスク評価においては、特定生物や生態系の一部の種に着目して影響解析する従来法の単一種試験に加えて、生態系機能を含めた解析ができるマイクロコズム試験の併用が重要であると考えられた。今後、他の金属を対象としたマイクロコズム試験と単一種試験を比較し、金属ナノ粒子・イオンが与える環境影響を評価することが必要である。

参考文献

- 1) 清水達也ら：銀ナノ粒子および銀イオンの生態系影響評価におけるマイクロコズム試験と単一種試験の比較, 環境情報科学学術論文集, 34 巻, pp.186-191 (2020.12.)
- 2) Inamori, Y. ed : Microcosm Manual for Environmental Impact Risk Assessment : From Chemicals to Whole Effluent Toxicity (WET), Springer, New York (2019)