

B-66 ニホンドロソコエビを用いた底質毒性試験における蛍光ビーズ摂食量測定手法の検討

○日置 恭史郎^{1*}・渡部 春奈²・中島 典之³・山本 和夫³

¹ 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

² 国立環境研究所環境リスク研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)

³ 東京大学環境安全研究センター (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

* E-mail: hikik@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. 研究の背景及び目的

環境試料の生物影響を調べるためには、化学物質間の相互作用や未知の物質の影響も含めて包括的に評価できる毒性試験が有効である。底質の生物影響は、水相への有害物質の溶出だけではなく、直接的な摂食や接触の影響が考えられることから、底生生物を直接底泥に曝露させる底質毒性試験をおこなう必要がある。海域及び汽水域における底質の試験手法は OECD や EPA によって制定され、端脚類や多毛類、二枚貝などが利用されているが、日本国内種を用いた検討例は少ない。このうち国内種のヨコエビ(端脚類)であるニホンドロソコエビ(*Grandidierella japonica*)が他の底生生物と同程度の感受性を持つ海域及び汽水域における底質の試験生物として使用されている¹⁾²⁾。しかし、ヨコエビを用いた急性底質毒性試験におけるエンドポイントには現在、致死と潜掘阻害(営巣阻害)が一般に使用されているが²⁾、潜掘阻害は毒性試験最終日の生存個体をコントロール底質に移して測定するため、評価は潜掘、非潜掘のみであり、1 個体に対する毒性の段階的・連続的な評価ができない。そこでオオミジンコを用いた既存研究³⁾を参考に、本研究ではヨコエビ 1 個体への毒性影響を定量的に評価可能な非致死エンドポイントとして蛍光ビーズの摂食阻害を新たに検討した。毒性試験後の生存個体に蛍光ビーズを投与してから破碎し、その蛍光強度によって摂食量を評価することを想定し、適切な蛍光ビーズの投与時間の設定及びヨコエビ破碎物由来の蛍光(自家蛍光)が蛍光強度測定に与える影響の分離方法について検討した。

2. 方法

(1) ヨコエビの飼育

2009 年 5 月に千葉県三番瀬(猫実川河口干潟)で採集し、実験室で飼育、繁殖させたニホンドロソコエビを用いた。飼育は USEPA のガイドライン²⁾を参考にしておこなった。温度 25℃、照度 500~1000lx(明期 16・暗期 8 時間)とし、24 時間曝気をおこなった。餌は粉末状にした TetraMin®を週 2 回の水換え(半量)の後に与えた。石英砂(ハリオガラス, WS10-BR)と荒川で採取した底泥(強熱減量 4.3%)を混合して飼育槽の底に厚さ 2cm ほど敷き、飼育水として人工海水²⁾(塩分濃度 20~25‰)を用いた。荒川底泥は 2010 年 12 月に荒川・中川橋梁下で干潮時に干出した川岸より採取し、1mm のふるいにより捕食生物を除去した後、使用時まで 4℃で冷蔵保存した。

(2) 蛍光ビーズ投与時間と摂食量の関係

ヨコエビの成体(710µm のふるい上に残る個体)を飼育槽から取り出し、石英砂約 1cm と人工海水 10mL の入ったガラス容器(直径 3.5cm、高さ 6.5cm)に 1 個体ずつ移し、飼育時と同じ温度、光条件で 1 日間静置した後、TetraMin®を 10mg と蛍光ビーズ溶液(Spherotech, ポリスチレン製、直径 4.1µm 又は 20.6µm)を 25mg/L になるように与えた。ビーズ投与 3 時間後以降は、ビーズの排泄状況を確認するため、1 時間ごとに石英砂と人工海水のみを入れた新しい容器に移した。ビーズ投与後 0.5, 1, 1.5, 2, 3 時間後、さらにビーズを含まない水に移してから 1, 3

時間後に個体を回収した。TetraMin®のみを与えて1時間静置した個体を0時間投与として扱った。回収した個体は3.7%ホルムアルデヒド溶液で固定し、5%Tween80溶液とMilli-Q水で表面洗浄をしてから、Milli-Q水20mL中に1個体ずつ入れて、超音波破砕機 (IKA Labortechnik, U200S) で粉砕し、蛍光分光光度計 (日立, F4500) で蛍光強度 (励起波長 450nm・蛍光波長 500nm) の測定をおこなった (n=3)。

幼体 (500μm のふるいを通過し 250μm のふるい上に残る個体) を用いて成体と同様の測定をおこなった。ビーズ直径は4.1μm、投与時間は1時間とした。

(3) 自家蛍光の補正に関する検討

同一濃度のビーズ溶液に異なる数のヨコエビを加え、三次元励起・蛍光スペクトル法 (EEMS, Excitation Emission Matrix Spectroscopy) による測定をおこなった。ビーズのピーク位置 (励起波長 440nm・蛍光波長 495nm) におけるヨコエビを含む試料の蛍光強度からビーズのみの試料の蛍光強度を引いてヨコエビの自家蛍光を求め、スキャン範囲内の各波長における蛍光強度とのピアソンの積率相関係数を計算した。

飼育槽から取り出したヨコエビの亜成体 (710μm のふるいを通過し 500μm のふるい上に残る個体) を石英砂と人工海水を入れた(2)と同様の容器に移し、飼育環境下で1時間静置し、5mgのTetraMin®を与え再び1時間静置して、エタノールで固定し保存した。保存した個体を60℃で1時間乾燥させ、超音波破砕機で粉砕した後0~10個体を1mg/L 蛍光ビーズ溶液 (直径 20.6μm) 10mLに加えて測定用試料とした。EEMの測定は蛍光分光光度計 (日立, F4500) を用い、スキャン速度 12,000nm/min、

スリット幅及びサンプリング間隔を励起・蛍光ともに5nmとして、励起側200-600nm・蛍光側200-600nmの範囲をスキャンした。ブランクとして蛍光分析用蒸留水の測定をおこない、全ての測定値から差し引いた。10μg/L 硫酸キニーネ溶液 (0.1M 硫酸溶液) の励起波長 345nm・蛍光波長 450nmの蛍光強度を10QSU (Quinine Sulfate Unit) として、結果は相対蛍光強度で表した。

3. 結果及び考察

(1) 蛍光ビーズ投与時間と摂食量の関係

蛍光ビーズ投与時間と蛍光強度の関係を図-1に示す。直径4.1μm、20.6μmのいずれにおいても投与0~1時間の間には蛍光強度の増加が、1~1.5時間の間には減少が見られた。直径20.6μmでは2~3時間において若干の増加と、3時間以降において減少が見られたが、直径4.1μmでは1.5時間以降ほぼ一定だった。始めの1時間にビーズの摂食が盛んにおこなわれ、それ以降はビーズ溶液中であってもビーズの排出が起こり、次第に全てのビーズが排出されるか、もしくは摂食と排出の釣り合いが取れた状態になったと考えられる。今回は毒性影響が出た状態のヨコエビを試験に供していないため、本手法が実際に有害性を評価できる手法となるかは仮説の段階であるが、有効な手法であるとするれば、蛍光強度が最大となる1時間を試験時間とするのがよいのではないかと考えられる。なお、直径4.1μmのビーズでは、洗浄後でも一部が体表面に付着したままであることが蛍光顕微鏡による観察で確認されており、適用時には注意が必要である。

幼体での結果を成体の結果と併せて図-2に示す。ビーズ投与1時間後でも蛍光強度が増加しなかったことから、幼

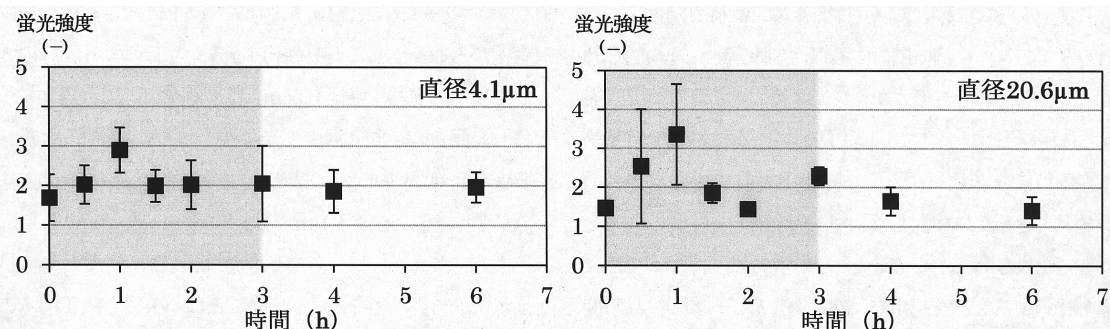


図-1: 蛍光ビーズ投与時間とヨコエビ成体1個体あたりの蛍光強度の関係 (左: ビーズ直径4.1μm 右: ビーズ直径20.6μm, エラーバーは標準偏差, 横軸の3時間より後は人工海水に移してから時間を示す)

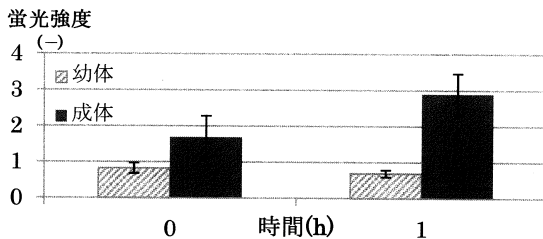


図-2：直径 4.1 μ m の蛍光ビーズ投与後の幼体と成体の 1 個体あたりの蛍光強度（エラーバーは標準偏差）

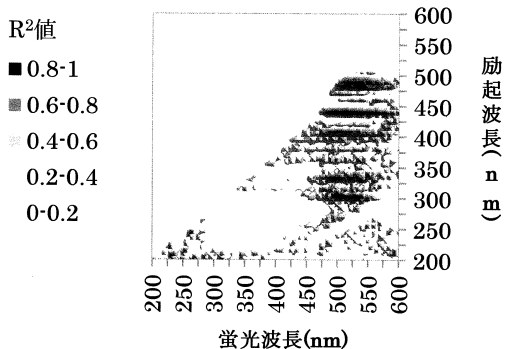


図-3：自家蛍光（励起 440nm・蛍光 495nm）と各波長における相対蛍光強度との R^2 値分布

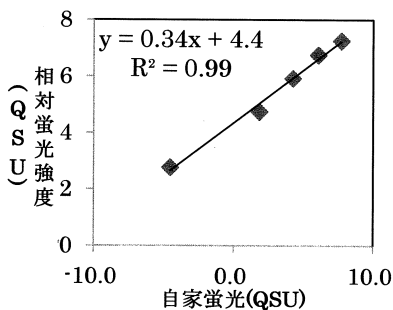


図-4：励起 305nm・蛍光 510nm における相対蛍光強度と自家蛍光（励起 440nm・蛍光 495nm）の関係

体は 4.1 μ m のビーズを摂食しないと考えられる。またビーズ投与前の幼体の蛍光強度は成体のそれよりも小さくなった。ヨコエビの破砕物由来の蛍光（自家蛍光）がビーズ検出の波長における蛍光強度測定に影響を与えたためと考えられ、自家蛍光補正の必要があることを示している。

(2) 自家蛍光の補正

EEM 測定の結果、蛍光ビーズのピークは励起波長 435~455nm、蛍光波長 490~510nm の範囲に、ヨコエビ破砕物のピークは励起波長 225~230nm・蛍光波長 330~340nm の範囲に見られた。自家蛍光を補正するため

には、ビーズ由来の蛍光の影響がなく、かつヨコエビの蛍光強度がある程度安定して検出できる波長域を選ぶ必要がある。

5 段階のヨコエビ破砕物量を添加したビーズ溶液における励起 440nm・蛍光 495nm における自家蛍光と各波長における蛍光強度との相関分析をおこない、得られた R^2 値の分布を図-3 に示す。ヨコエビ破砕物のピーク周辺では自家蛍光との相関は低かったが、蛍光ビーズのピーク周辺と、励起波長 305nm・蛍光波長 510~540nm とで高い相関が見られた。後者の波長域では R^2 値が 0.77~0.99 で、蛍光強度と自家蛍光は直線関係で近似できた（図-4）。この相関関係を用いて、特定の波長域における蛍光強度からヨコエビの自家蛍光を求められる可能性がある。一部の試料では蛍光ビーズのみの試料よりも蛍光強度が低く、自家蛍光値が負になることがあったが、これは低濃度の破砕物を含む場合の測定のばらつきによるものと考えられる。今後は、ヨコエビの健康状態や成長段階、試料中蛍光ビーズ濃度が変化しても同様の相関関係が得られるかどうかを検討する必要がある。

4. まとめ

ヨコエビの底質毒性試験における新規エンドポイントとして試験生物の摂食量を用いるための基礎的検討として、蛍光ビーズ摂食量の測定手法を検討した。蛍光ビーズを投与したところ 1 時間で摂食量の最大値が観測された。ヨコエビ破砕物の自家蛍光の影響は、励起波長 305nm・蛍光波長 510~540nm 周辺の波長における蛍光強度により補正できる可能性が示された。

参考文献

- 1) Lee J.S., Lee K.T. and Park G.S.: Acute toxicity of heavy metals, tributyltin, ammonia and polycyclic aromatic hydrocarbons to benthic amphipod *Grandidierella japonica*, *Ocean Science Journal*, Vol.40, No.2, pp.61-66, 2005.
- 2) USEPA: Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods, EPA 600/R-94/025, 1994.
- 3) Ginatullina E. and Kamaya M.: Toxicity test with *Daphnia magna* by ingestion of fluorescent microbeads, 第 44 回日本水環境学会年會講演集, p.658, 2010.