

B-18 カイミジンコの幼生期における 亜鉛曝露による繁殖能力への影響

○塚原 健太^{1*}・中島 典之²

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: tsukahara@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

底質は水相-固相間の相互作用が活発に起こる場所であり、栄養塩や重金属・有害化学物質の蓄積の場であるとともに溶出等によるそれらの供給の場として、生態系の中で重要な位置を占めている¹⁾。したがって、底質中の化学物質が生物に与える影響を評価する必要があるが、個別の化学物質について毒性を調査することは時間的にも費用的にも限界がある。そこで、底質中の多種の化学物質を未知物質も含めて包括的に評価するために、何らかの生物学的応答を指標としたバイオアッセイが有力な手段として期待される。

生物が環境中で化学物質等に曝露する場合には、事故等一過性のこともあるが、多くは長期にわたり曝露し続けるため、慢性毒性影響を知る必要があり²⁾、例えば水生生物保全のための環境基準は慢性毒性値をもとに設定されている³⁾。

2012年、底生カイミジンコ *Heterocypris incongruens* を使用した淡水底泥毒性試験法が国際標準化機構（ISO）で標準化された⁴⁾。この試験のエンドポイントは底質への曝露6日後の致死と成長阻害となっているが、次世代への影響が把握できず慢性毒性影響の評価にはなっていないと考えられる。底生カイミジンコを用いた慢性毒性影響試験に関する検討の例は限られており、Havel and Talbotの検討⁵⁾でも次世代への影響は報告していない。

そこで本研究では、新たに底質慢性毒性を評価する試験手法を確立することを長期的な課題として設定し、まずカイミジンコの生涯産卵数と有害物質濃度との関係を調べることを目的とした。具体的にはマイクロプレートを用いてカイミジンコを一個体ずつ個別に飼育し、個体ごとの寿命・産卵日・産卵数を観測し、亜鉛濃度により変化があるかを調査した。

2. 実験方法

(1) 試験種

毒性試験には、底生カイミジンコ *Heterocypris incongruens* を使用した。本種の成体の体長は1mm前後であり、単為生殖である。

(2) 試験溶液および試験個体数

a) 対照系(C0)

標準淡水（NaHCO₃ : 96.0mg/L, CaSO₄・2H₂O : 60.0 mg/L, MgSO₄ : 60.0mg/L, KCl : 4.0mg/L）⁶⁾を用いた。試験個体数はn=72とした。

b) 汚染系(C1,C2,C3)

水生生物保全のための環境基準に設定されている亜鉛を選び、対照系との比較を行った。標準淡水に硫酸亜鉛7水和物を溶解し、214 (C1), 477 (C2), 1280 (C3) μgZn/L（実測値）の3段階の汚染系を用意した。各試験区について、n=23, 24, 24とした。なお、実際の曝露濃度は餌の懸濁液により希釈され上記の1/2となる。本研究では非致死の影響を調査するため、既報のLC50値600 μgZn/L⁷⁾を目安に濃度設定を行った。

(3) 実験手順

a) 孵化

MicroBioTests社のOstracodtoxkit FTM 付属のcystをISO14371⁸⁾に従って孵化させて用いた。孵化期間52時間後の幼生を以下の曝露に供した。

b) 曝露

マイクロプレート（IWAKI培養用12穴プレート）の各ウェルに、(2)節の試験溶液1.5 mLと、標準淡水で希釈し1.5×10⁷ cell/mLに調整した藻類餌(*Scenedesmus acutus* NIES-94) 1.5mLを入れた。そこに1個体ずつカイミジン

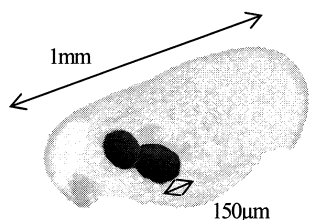


図-1 カイミジンコの卵

コの幼生を入れ、暗所 25℃で静置した。6 日後に生死を確認し、さらに4日間静置した。

本研究では次項の計測をより確実に行うために敢えて底質を入れない系での試験とした。また 10 日以降の成体期間（産卵期）は非汚染条件とした。

c) 計測

10 日間の幼生期の曝露期間後、3 日に 1 回カイミジンコの生死判定と産卵数の計測を行い、全ての個体が死亡するまで継続した。

実体顕微鏡下で生存を確認したカイミジンコを、新たに用意したマイクロプレート（各ウェルにテトラミン懸濁液 3mL を入れたもの）に一個体ずつ移動させ、暗所 25℃での飼育を継続した。テトラミン懸濁液は、200 mL の標準淡水に TetraMin®（テトラジャパン社：フレークをすりつぶして 250 μm のふるいを通したものを使用）30mg を分散させて調製した。

生残していたカイミジンコを移動後に各ウェルに存在していた卵を実体顕微鏡下で計数した。図-1 に示すように、カイミジンコの卵は直径 100~150 μm 程度であり、プレート上部から光を当てると観察が容易になる。卵が集塊状となっている場合には、針で少数に分割してから計数した。

エンドポイントとして、平均寿命、平均初回産卵日、平均産卵数を用いた。産卵した個体数を分母とした平均産卵数だけでなく、ISO14371法との比較のために6日生存個体数を分母とした平均産卵数も算出した。各指標について、異なる亜鉛濃度間での差異を確認するため有意水準5%でダネットの検定を行った。なお、寿命と産卵日の解析においては、観察を3日に1回としたため、観察日間の中央値を使用した(16日目に死亡/産卵が確認された場合、13日と16日の中央である14.5日を寿命/産卵日とみなした)。

3. 結果

各個体について、死亡するまでの累積産卵数をまとめた（データの例を図-2に示す）。その結果から、各エンドポイントを算出し、亜鉛濃度の影響を検討した。

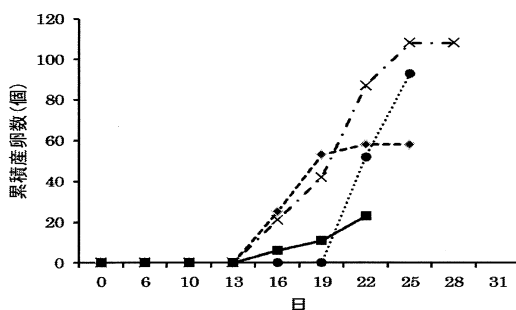


図-2 各個体の累積産卵数（例）

表-1 対照系における各指標まとめ。括弧内は標準偏差

6日生存率(%)	89
平均寿命(日)	16.5(8.1)
平均初回産卵日(日)	16.6(2.5)
6日生存個体産卵率(%)	45
6日生存個体平均産卵数(個)	14(25)
産卵個体平均産卵数(個)	30(29)

(1) 対照系について

対照系における各指標を表-1 にまとめた。対照系での全個体平均寿命は 16.5 日、産卵した個体の平均初回産卵日は 16.2 日であった。産卵した個体あたりの平均産卵数は 30 個、6 日生存個体では 1 個体あたり 14 個であった。

(2) 亜鉛濃度間の比較

各亜鉛濃度区における平均寿命、平均初回産卵日、平均産卵数を比較した。なお、最高濃度(C3)については 6 日生存率が 0%であったため、平均寿命は 3 日、産卵数は 0 個として図示し、ダネットの検定からは除外した。

a) 平均寿命・平均初回産卵日

平均寿命と平均初回産卵日を図-3 に示す。

平均寿命は C1 では 21.6 日、C2 では 20.6 日と対照系よりもやや上昇した。C1 については有意水準 5%で差異が確認されたが、他の濃度では差異が確認されなかった。

平均初回産卵日についても、やや変動がみられたが、ダネットの検定では有意差が確認されなかった。

b) 平均産卵数

平均産卵数を図-4 に示す。C1 は産卵個体当たりの平均産卵数は 30 個と対照系と変化がなかったが、6 日生存個体の平均産卵数は 18 個と増加した。C2 では産卵個体、6 日生存個体の平均産卵数がどちらも 1 個体あたり 20 個以上増加し、ダネットの検定で有意水準 5%で有意差が確認された。

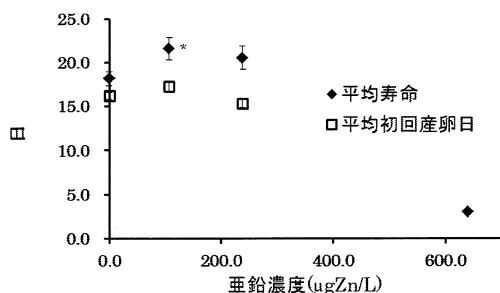


図-3 平均寿命と平均初回産卵日の亜鉛濃度間比較。
エラーバーは標準誤差。* $p<0.05$

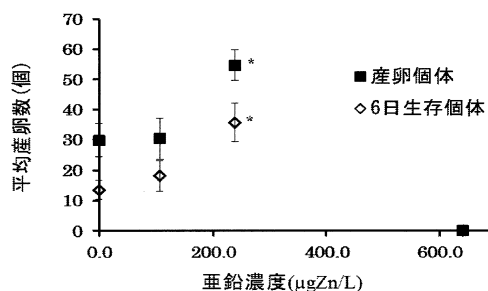


図-4 平均産卵数の亜鉛濃度間比較。エラーバーは標準誤差。* $p<0.05$

4. 考察

対照系での平均産卵数は Havel and Talbott⁹⁾の報告では 36 個であり、本研究での産卵数の方がやや少ない。Havel and Talbott の研究の方が給餌の回数が 1 個体 1 日あたり藻類細胞数として 5 から 10 倍程度多かったことが一因として考えられる。

各亜鉛濃度における平均寿命や平均産卵数について、亜鉛濃度によっては亜鉛を含まない場合よりも延長・増加するという結果が得られた。オオミジンコ (*Daphnia magna*) の場合では、溶存態亜鉛への曝露では、産卵数に大きな影響はなく、低濃度 (80 μgZn/L) では亜鉛が存在しない系と同等以上に成長するとする文献がある⁸⁾。227 μgZn/L の 6 日間の亜鉛曝露はカイミジンコに対する致死や成長阻害 (および促進) を生じないことを Sevilla らが報告⁷⁾しており、本研究の C2 系列で有意に産卵数が増加した結果は興味深い。幼生期に亜鉛に曝露されたことによる、産卵数の増加の機構は不明であり、今後の検討が必要である。

本研究での手法上の問題を二点あげておく必要がある。一つ目は、産卵数の増減が、実際の繁殖能力を示すとは限らないことである。すなわち、卵が孵化して次世代が生まれなければ、産卵数が多くても繁殖能力が高いとはいえない。しかし、カイミジンコの卵の孵化までの時間は、ばらつきが大きく 90 個の卵での試験では 1-157 日になり⁹⁾、孵化率に関する適切な評価手法の検討が必要である。

もう一つの問題は、卵の観察手法の技術的改善である。今回は初期の検討として底質なしで試験を行ったが、底質毒性試験という本来の目的を達成するためには死亡まで汚染底質の存在する条件下で試験をする必要がある。今後は底質存在下での卵の計数に関する技術開発が求められる。

5. まとめ

本研究では、幼生期のカイミジンコを亜鉛に曝露することにより寿命や産卵数に影響が現れるかを調査した。その結果、非致死レベルの低濃度の亜鉛によりカイミジンコの寿命や産卵数が延長・増加することが分かった。

参考文献

- 1) 茂庭竹男 (1993) 底質とは、水環境学会誌, 16(2), 70-73
- 2) 若林明子 (2000) 化学物質と生態毒性, 社団法人産業環境管理協会, 東京
- 3) 環境省 (2003) 水生生物の保全に係る水質環境基準の設定について (第一次報告)
- 4) ISO (2012) ISO14371: Water quality — Determination of fresh water sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda)
- 5) J.E. Havel and B.L. Talbott (1995) Life history characteristics of the freshwater ostracod *Cyprinotus incongruens* and their application to toxicity testing, *Ecotoxicology*, 4(3), 206-218
- 6) 奥谷喬司, 武田正倫, 今福道夫 (1997) 日本動物大百科 7 (無脊椎動物), 平凡社, 東京
- 7) USEPA (2002) Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, EPA-821-R-02-013
- 8) J.B. Sevilla, F. Nakajima and K. Yamamoto: Development of multispecies toxicity test using freshwater green algae *Scenedesmus acutus* and ostracod *Heterocypris incongruens*, 4th IWA-ASPIRE Conference
- 9) B. T. A. Muyssen, K. A.C. De Schampelaere, C. R. Janssen (2006) Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicology*, 77(4), 393-401