

B-39 ISO底質毒性試験生物種*Heterocypris incongruens*の致死率と餌由来重金属の用量反応関係

○中島 典之*・Janice B. SEVILLA・春日 郁朗

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)

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

1. はじめに

カイミジンコ*Heterocypris incongruens*を用いた底質毒性試験手法はISO14371として2012年に標準化¹⁾され、水環境中の底質だけではなく、汚泥や土壌、粉塵など様々な固体試料の有害性評価に用いられてきている²⁾。この試験系においてカイミジンコは、固相から脱着した有害物質の水系曝露に加えて、固相自体の摂食による有害物質の曝露も受ける。しかしながら、前者に関する基礎データは報告例がある³⁾ものの、後者の曝露経路に関する基礎データはこれまでに報告例がない。ISO14371法を用いた調査事例では、並行して固相中の有害物質含有量を測定している事例が多いものの、その実測値と毒性影響とを結びつける基礎データが存在しないことは、試験結果の解釈を困難なものとしている。

そこで本研究では、亜鉛、銅、カドミウムで汚染した2種の緑藻類を実験室内で調製し、それをカイミジンコに投与した際の致死毒性に関する用量反応関係を明らかにした。さらに、水系でこれらの重金属類を曝露させた場合の用量反応関係と比較した。

2. 実験方法

(1) 重金属汚染藻類の調製

C培地に所定の濃度の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を添加し、オートクレーブ滅菌 (121℃, 15分) したのち、*Scenedesmus acutus* (NIES-94) または *Chlorella vulgaris* (NIES-2170)を植種し、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、明暗条件 16h:8hで10日間培養した。培養開始時の重金属濃度範囲 (実測値) は、 $14 \sim 2170 \mu\text{gZn/L}$ 、 $1.2 \sim 1300 \mu\text{gCu/L}$ 、 $0 \sim 152 \mu\text{gCd/L}$ とした。

得られた重金属汚染藻類は、遠心分離 (3500rpm, 15

分) により沈降させ、上澄みの培地を捨てたのち、標準淡水⁹⁾中で分散/遠心分離を2~3回繰り返して洗浄し、最終的に藻類密度 $3.0 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ になるように標準淡水中に分散させた。

藻類中の重金属濃度は、培養前後の溶存態重金属濃度の差と培養後の藻類密度 (乾重) から計算した。

(2) カイミジンコ毒性試験

カイミジンコ*H. incongruens*を用いた毒性試験はISO14371¹⁾に従って行った。カイミジンコのシストおよびpre-feeding用のスピルリナはMicroBioTests社より購入した。非汚染底質として石英砂を使用した。各試験は $n=6$ で実施し、エンドポイントは6日間致死率のみを用いた。

固相に含まれる重金属のカイミジンコへの毒性は、(1)で調製した重金属汚染藻類を投与することで評価した。藻類からの重金属の溶出を確認するため、毒性試験後の上層水中のZn, Cu, Cdの濃度を実測した。

溶存態重金属の毒性評価は、標準淡水に $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を添加して行った。餌として添加する藻類は、C培地で培養したものを用いた。この非汚染藻類が、液相に添加したZn, Cu, Cdを摂取し、結果的にカイミジンコが固相経由で重金属を摂取する可能性がある。しかし、毒性試験は暗所で行うため、藻類の重金属摂取は受動的な細胞表面への吸着等に限定されると考えられ、上述の汚染藻類を用いた毒性試験とは異なる曝露経路・曝露形態になっていると想定した。

(3) 重金属分析

水中の重金属濃度は、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のPTFEフィルター (ADVANTEC 25HP045AN) でろ過した後、ICP-MS (Agilent 7500cx) で定量した。分析用の試料はすべて硝酸濃度1.2% (v/v)に調製し、内標準物質 (Y) により回収率を補正した。

3. 結果と考察

(1) 餌由来重金属によるカイミジンコ致死毒性

図-1に重金属汚染藻類によるカイミジンコの致死率を示した。二種の緑藻類を用いたが、全体的にデータそのもののばらつきが大きく、種による差異は明確ではなかった。なお、6日間の毒性試験後の上層水中の重金属濃度はどの系でも十分に低く（52～133 $\mu\text{gZn/L}$, 0.8～19 $\mu\text{gCu/L}$, <0.1～2.7 $\mu\text{gCd/L}$ ），後述の溶存態重金属による毒性試験結果と比較すると、液相由来の曝露によって致死毒性をもたらした結果とは考えられない。

従来、*H. incongruens*に対して溶存態重金属の用量反応関係⁸⁾しか報告されていなかったが、本成果はISO14371法を用いる際の有効な基礎データになると考えられる。例えば、Watanabeら⁷⁾は道路塵埃の毒性試験結果とともに塵埃中の重金属濃度を示しているが、それらを結びつける基礎データが存在しなかったため塵埃自体を摂食する場合の個々の重金属による致死毒性の可能性を検討できていない。この文献で毒性が高かった塵埃中の重金属濃度は1300～2980 $\mu\text{gZn/g}$, 279～1200 $\mu\text{gCu/g}$, 0.64～2.0 $\mu\text{gCd/g}$ であり、図-1を

参照すると、Zn, Cuはカイミジンコに対し50%程度以上の高い致死毒性を示すと考えられ、一方Cdは明確な致死毒性を示すレベルではないと考えられる。ただしカイミジンコの消化過程での摂取特性という観点で、道路塵埃中の重金属と藻類細胞中の重金属とが同等であるかは不明であり、今後は固相中の重金属類の毒性影響を念頭に置いた分画手法を検討する必要がある。

(2) 曝露経路による影響の比較

餌由来の重金属（図-1）と溶存態重金属とのカイミジンコに対する用量反応関係を比較するため、以下のように換算した。図-1に示した藻類細胞中の重金属濃度（ $\mu\text{g/g}$ ）を汚染藻類を調製した際の培養最終日（10日目）の培地中残存濃度（ $\mu\text{g/L}$ ）（図-2）に置き換えて、汚染藻類による致死率を図-3上にプロットした。図-3には溶存態重金属（試験開始時の設定濃度）による用量反応関係も図示した。この換算は、この濃度の溶存態重金属が存在する環境において、生成される汚染餌の曝露による致死毒性と、溶存態重金属による直接的な致死毒性とを比較しようとするものである。

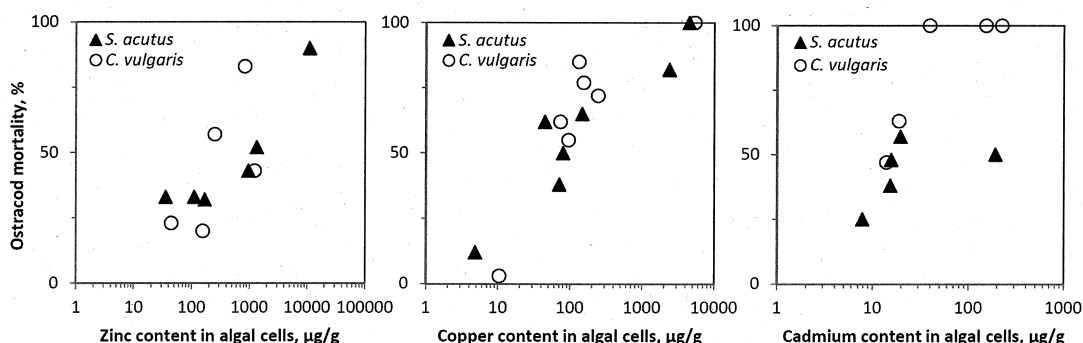


図-1 亜鉛・銅・カドミウム汚染緑藻類 (*Scenedesmus acutus* および *Chlorella vulgaris*) を投与した際のカイミジンコ *Heterocypris incongruens* の6日間致死率

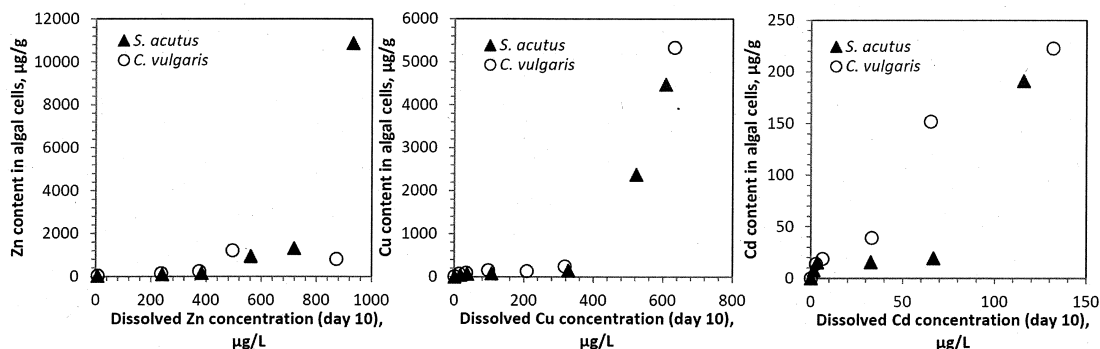


図-2 亜鉛・銅・カドミウム含有C培地で10日間培養した藻類 (*Scenedesmus acutus* および *Chlorella vulgaris*) の重金属含有濃度と培地中残存重金属濃度の関係

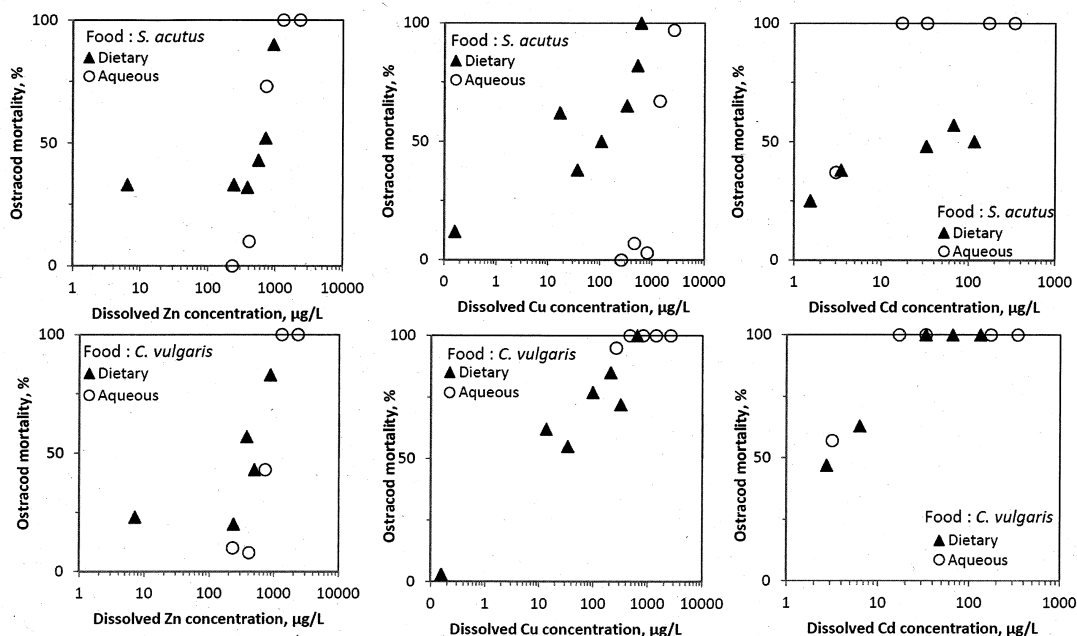


図-3 カイミジンコ *H. incongruens* に対する亜鉛・銅・カドミウムの水系曝露と餌由来曝露*の影響の比較

*汚染餌調製時の重金属濃度から換算した。詳細は本文を参照。

亜鉛はどちらの曝露経路も同等の致死毒性があることが分かる。銅の場合は、*S. acutus*を餌として用いた場合には、餌由来の毒性の方が高くなっている。*C. vulgaris*の場合は直接比較できる濃度範囲となっていないため結論は出せない。カドミウムについては、*C. vulgaris*の場合は二つの曝露経路が同程度の致死毒性となっているが、*S. acutus*の場合は高濃度では餌由来の致死毒性が抑制される結果となっている。この機構は不明であるが、藻類種による異なる解毒作用などにより、細胞内での重金属類の存在形態が異なり、結果的に捕食生物への毒性影響が異なった可能性が考えられる。

図-3は、本底質毒性試験を用いた際にZn, Cu, Cdに対してどちらの曝露経路も無視できないことが示されており、毒性要因解析には試験系で溶出する濃度と試験対象固相中含有量の両方のデータを考慮すべきであると言える。

4. まとめ

本研究では、重金属で汚染した緑藻類を調製し、それをISOの底質毒性試験種であるカイミジンコに投与した際の致死毒性に関する用量反応関係を明らかにした。この結果により、水系曝露と同等の餌由来曝露の影響が示された。従来、溶存態の用量反応関係しか報告されていなかったが、本成果はISO14371法を用いる際の有効な基礎データになると考えられる。

謝辞：本研究の一部は、科学研究費補助金・基盤研究(B) 24360213および(公財)鉄鋼環境基金による助成研究の成果である。

参考文献

- 1) International Standards Organisation. 2012. ISO 14371 (E): Water quality – Determination of freshwater sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda).
- 2) Chial B, Persoone G. 2003. Cyst-based toxicity tests XV - Application of ostracod solid-phase microbioassay for toxicity monitoring of contaminated soils. *Environ. Toxicol.*, 18, 347-352.
- 3) Chial B, Persoone G. 2002. Cyst-based toxicity tests XIV - Application of the ostracod solid-phase microbioassay for toxicity monitoring of river sediments in Flanders (Belgium). *Environ. Toxicol.*, 17, 533-537.
- 4) Tsakovski S, Kudlak B, Simeonov V, Wolska L, Garcia G, Namiesnik J. 2012. Relationship between heavy metal distribution in sediment samples and their ecotoxicity by the use of the Hasse diagram technique. *Anal. Chim. Acta.*, 719, 16-23.
- 5) 渡部春奈, 中島典之, 春日郁朗, 古米弘明. 2008. カイミジンコを用いたバイオアッセイによる都市河川底泥の毒性要因の推定. 水環境学会誌, 31(11), 671-676.
- 6) Santorufo L, Carotenut R, Rocco A, De Luca Picione F, Maisto G. 2012. *Orthonychiurus pseudostachianus* (collembola) as a toxicity test organism and selection of an ecotoxicological test battery to assess soil quality. *Appl. Soil Ecol.*, 54, 49-54.
- 7) Watanabe H, Nakajima F, Kasuga I, Furumai H. 2011. Toxicity evaluation of road dust in the runoff process using benthic ostracod *Heterocypris incongruens*. *Sci. Tot. Environ.*, 409, 2366-2372.
- 8) Kudlak B, Wolska L, Namiesnik J. 2011. Determination of EC50 toxicity data of selected heavy metals toward *Heterocypris incongruens* and their comparison to “direct-contact” and microbioassays. *Environ. Monit. Assess.*, 174, 509-516.
- 9) US EPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5th Ed. NW Washington, DC. EPA-821-R-02-012.