

B-26 ニホンドロソコエビを用いた底質毒性試験 における人工参照底質の適用可能性

○日置 恭史郎^{1*}・中島 典之¹・飛野 智宏²・山本 和夫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: hikik@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

底質に生息するヨコエビは、蓄積した有害物質の曝露に対する感受性の高さや¹⁾、底質の粒径などの物理的性質に対する幅広い耐性から底質毒性評価の試験生物種として用いられている^{2),3)}。ヨコエビを使用する底質毒性試験では、参照底質に非汚染の環境底質を用いることが一般的である^{2),3)}。非汚染条件下における試験生物の応答を確認するための対照系であれば、環境底質を使用することに問題はない。しかし毒性値(LC₅₀など)を得る目的などで有害物質をスパイクする試験では、環境底質の使用は解釈を困難にする。環境底質は組成が複雑で、有機物含量や有害物質の吸脱着能などは時空間的に大きく変動する^{4),5)}。したがって有害物質を同一濃度添加した場合でも、底質によって有害物質の bioavailability や曝露経路が変化し、毒性試験の結果が異なる場合がある⁶⁾。一方、人工底質では有害物質の吸脱着などの特性を制御及び再現しやすいため^{7),8)}、スパイク試験においても不確実な要因を排した結果を得ることが可能だと考えられる。

そこで本研究では、汽水域・海域の底質毒性試験に使用されているニホンドロソコエビ (*Grandidierella japonica*)^{2),9)}を用いた毒性試験系に、人工底質を適用するための基礎知見の収集を目的として、有害物質非添加の人工底質にて本種の生育試験を行い、底質ごとの応答を明らかにした。さらに餌投与条件による応答の違いを評価した。

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⁹⁾を参考にした。温度25°C、明期16時間・暗期8時間の水槽に、塩分30‰の人工海水¹⁰⁾と河川底質(厚さ約2cm)を入れ、粉末状のTetraMin (Tetra, Tropical Flakes)を週3回餌として与えた。

(2) 底質試料の作成

本研究で用いた底質試料の組成及び前処理方法の概要を表-1に示す。石英砂はHARIO (WS-10BR)、ドロマイトは吉沢石灰工業(肥料用)、 α セルロースとフミンはSigma Aldrich (C8002, 53680)から購入した。カオリンはA社、B社及びC社から購入した3製品を用いた。ピートモスは園芸品店で購入した *Sphagnum* spp.を用いた。

人工底質の作成は、OECD テストガイドライン 218¹¹⁾と Kemble ら (1999)¹²⁾を参考にした。OECD 準拠底質¹¹⁾(表-1; b)は、前処理済みのピートモスと石英砂、カオリンを、全成分の合計乾燥重量が30gになるように混合して作成した。ピートモスの前処理は、250 μ m以下の乾燥ピートモスを純水でペースト状にした後、30‰人工海水を加えてpH8.0 \pm 0.5の下2日間攪拌することで行った。底質c2(表-1)の作成では、カオリンに30‰人工海水を添加し、1時間後の上層水を除去することで、カオリンの沈降画分のみを用いた。その他の人工底質は(表-1; c1-c5, d-h)、合計乾燥重量が30gになるように各成分を乾燥させたまま混合して作成した。対照系には、荒川中川橋梁下で2013年2月に採取した荒川底質(600°C 強熱減量: 4.1 \pm 0.1%)を用いた(表-1; a1, a2)。底質a2は荒川底質をオートクレーブ(121°C, 20分)で滅菌処理して作成した。

(3) 人工底質を用いた 10 日間生存試験

上記のニホンドロソコエビおよび底質試料を用いて、USEPA のガイドライン²⁾に準拠して 10 日間の生存試験を実施した。亜成体 (710 μm のふるいを通し、500 μm のふるい上に残る個体) を飼育槽から取り出し、乾燥重量 30 g の底質試料と 30%人工海水 (底質 c3 では飼育槽海水) 120 mL を含む 150 mL ビーカー (直径 54 mm) に、10 個体ずつ移し、10 日間静置した。試験期間中は常に曝気し、各ビーカーに 20 mg ずつの粉末状 TetraMin を 1 日おきに与えた。溶存酸素濃度は毎日測定し、測定値が飽和値の 60%未満であった系列の結果は棄却した。曝露開始 10 日後に底質ごと 250 μm ふるいにかけて、生存個体を数え、致死率を求めた。

(4) 人工底質下での餌投与条件の検討

検討した餌投与条件は、YCT (Yeast Cerophyl Trout chow; エコジェノミクス) の投与量と TetraMin の投与量である。YCT は淡水産ヨコエビ *Hyaella azteca* などの飼育に用いられている補助的な餌である¹³⁾。各容器に、1 日おきに TetraMin 20 mg と毎日 YCT 0, 1, 2, 5 mL を与え、YCT 投与量による応答の違いを比較した。TetraMin 投与は各容器に 1 日おきに 10, 20, 40, 80 mg の 4 段階を行った。なお生存試験の手法は (3) と同様だが、曝露容器のサイズを変更した。石英砂とカオリンの混合底質 h (表-1) 200 g と人工海水 775 mL を加えた 1 L ビーカー (直径 11.2 cm) に、亜成体 20 匹を加えて試験を行った。試験終了時には、生存個体をエタノールで固定し、60°C での乾燥重量を測定した。

3. 結果と考察

(1) 人工底質の種類の検討

異なる人工底質下でのニホンドロソコエビの 10 日間生存試験結果を図-1 に示す。荒川底質 (a1) での致死率が 7.5%であったのに対し、OECD ガイドライン¹¹⁾と Kemble ら (1999)¹²⁾に準拠して作成した底質 (順に b, c1) は致死率が 90%以上を示した (図-1A)。

人工底質における高致死率の原因は i) 付着微生物群の組成・量の違い、ii) カオリン細粒子による窒息死、iii) カオリンやドロマイトなどの特定成分の有無および品質の違いであると仮説を立て、i) 滅菌した荒川底質 (a2)、飼育槽海水を上層水に用いた人工底質 (c3)、ii) カオリンの浮遊画分を除去した人工底質 (c2)、iii) 異なる製造会社より購入したカオリンで作成した人工底質 (c4, c5)、

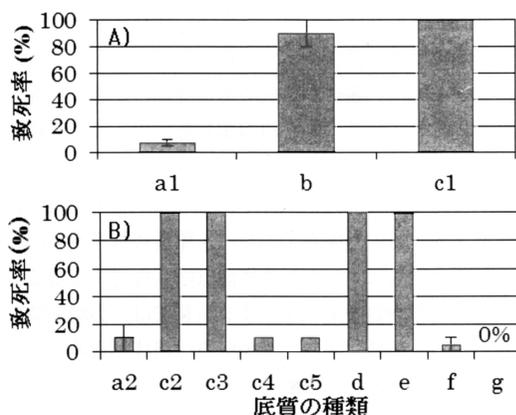


図-1: 異なる底質試料下での 10 日間生存試験結果 (底質の記号 a-g は表 1 参照, A: Run1; B: Run2, エラーバーは標準誤差, n=1-4)

表-1: 10 日間生存試験に用いた底質の組成 (dry-w/w %) 及び前処理方法

底質の種類	a1	a2	b ¹¹⁾	c1 ¹²⁾	c2 ¹²⁾	c3 ¹²⁾	c4 ¹²⁾	c5 ¹²⁾	d	e	f	g	h
荒川底質	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
石英砂	—	75.0	—	—	80.3	—	—	—	80.3	80.7	93.6	100	95.7
ピートモス	—	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
カオリン	A 社	—	5.0	14.2	14.2**	14.2	—	—	14.2	14.3	—	—	—
	B 社	—	—	—	—	—	14.2	—	—	—	—	—	4.3
	C 社	—	—	—	—	—	—	14.2	—	—	—	—	—
αセルロース	—	—	—	—	5.0	—	—	—	5.0	5.0	5.8	—	—
ドロマイト	—	—	—	—	0.5	—	—	—	0.5	—	0.6	—	—
フミン	—	—	—	—	0.01	—	—	—	—	0.01	0.01	—	—
前処理	—	滅菌	ピートモス前処理*	—	浮遊カオリン除去	飼育海水添加	—	—	—	—	—	—	—

* ピートモスは OECD TG218 に従い¹¹⁾、試験海水に浸漬し、攪拌したものをを使用した (詳細は本文参照)。

表中の重量割合は、馴致前の乾燥重量から求めた値を表す。

** 重量割合は、浮遊画分除去前の乾燥重量から求めた値を表す。

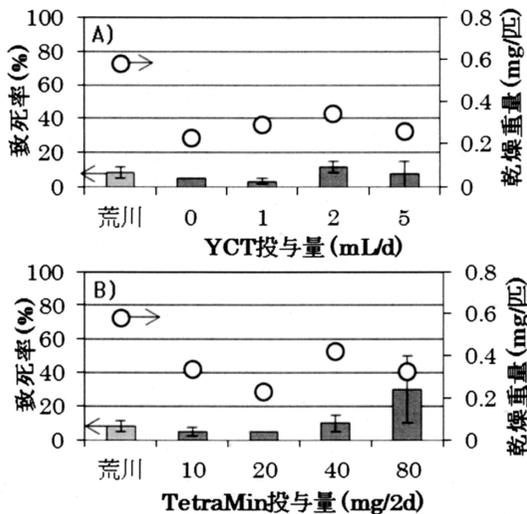


図-2：10日間生存試験における餌投与条件の検討
(A: TetraMin 20 mg/2d に加え YCT 投与; B: TetraMin のみ投与, 荒川底質では TetraMin 20 mg/2d を投与, エラーバーは標準誤差, n=3)

フミン・ドロマイト・カオリンのそれぞれを除去して作成した人工底質（順に d, e, f), そして石英砂のみの底質 (g) を用いて再び 10 日間生存試験を行った。結果を図-1B に示す。ヨコエビの底質毒性試験において USEPA が定める試験要件は対照系の致死率が 10% 以下であることだが²⁾, その要件を満たしたのは a2, c4, c5, f, g だった。a2 を除くこれらの人工底質は、ニホンドロコエビを用いたスパイク試験の参照底質として使用できる可能性が示された。一方、他の底質 (c2, c3, d, e) での致死率は 100% だった。以上の結果から、人工底質 b と c1 における高致死率の原因は、付着微生物群の違いやカオリンの浮遊画分、フミン、ドロマイトではなく、使用したカオリンの品質にあったと考えられる。致死原因の詳細は不明だが、人工底質を作成する際に成分の購入先、製品を考慮することの重要性が示された。

(2) 人工底質下での餌投与条件の検討

人工底質 h を用いた 10 日間生存試験における餌投与条件の検討結果を図 2 に示す。YCT 投与量の違いによって致死率に差は見られなかったが、乾燥重量は YCT 2 mL/d において最大となった (図 2A)。統計的に有意ではなかったが ($p > 0.05$), TetraMin 投与量の増加に伴い致死率は増加した (図 2B)。過剰の餌供給により、TetraMin 80 mg 投与時には溶解酸素濃度が低下したためと思われる。乾燥重量は TetraMin 40 mg 投与時に最大の 0.42 mg/匹となったが、荒川底質における 0.58 mg/匹には及ばな

かった。

以上の結果から、ニホンドロコエビの底質毒性試験に本研究で試験した人工底質及び餌の投与条件を適用することは、10 日間の致死率を指標とする際には有効である可能性が示された。しかし人工底質使用時のヨコエビ乾燥重量が環境底質使用時よりも明らかに低かったため、成長率や慢性影響を指標とするためには、底質成分や餌投与条件、底質の前処理条件¹⁴⁾などを更に検討する必要がある。例えば Kemble ら (1999) は、上層水に井戸水を使用した際、環境底質と同程度の成長率・繁殖能を人工底質において再現できたと報告している¹²⁾。

4. まとめ

底生生物のニホンドロコエビを用いて、有害物質を添加しない人工底質下での 10 日間生存試験を行った。石英砂やカオリン, α セルロース, ドロマイト, フミンで作成した人工底質で環境底質と同程度の致死率 (10% 以下) を示すことができた。本成果は、ニホンドロコエビを用いる汽水域・海域の底質毒性評価において、スパイク試験を行う際の基礎的な知見となり得る。またカオリンの製品による致死応答の違いや人工底質下での成長率の低さなど、今後検討すべき課題が示された。

参考文献

- 1) Swartz et al., 1982, *Mar. Pollut. Bull.*, 13 (10), 359-364.
- 2) USEPA, 1994, EPA/600/R-94/025.
- 3) USEPA, 2007, EPA/600/R-07/080.
- 4) Ankley et al., 1994, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 (4), 627-635.
- 5) Ingersoll et al., 1995, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 (11), 1885-1894.
- 6) Campana et al., 2012, *Environ. Sci. Technol.*, 46 (12), 6835-6842.
- 7) Gonzalez, 2012, *Ann. Environ. Sci.*, 6, 101-122.
- 8) Suedel et al., 1994, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 (7), 1163-1175.
- 9) Nipper et al., 1989, *Environ. Toxicol. Chem.*, 8 (12), 1191-1200.
- 10) USEPA, 1993, EPA/600/4-90/027F.
- 11) OECD, 2004, Test No. 218, OECD Publishing.
- 12) Kemble et al., 1999, *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 (2), 222-230.
- 13) ASTM, 2005, E1706-05.
- 14) Verhiest et al., 2002, *Chemosphere*, 46 (7), 961-974.