

II-1. 化学物質の生態系影響評価試験の開発動向 -試験キットを用いた毒性試験法とその適用-

1. はじめに

この数年、ダイオキシンに代表される内分泌攪乱化学物質をはじめとした微量有害化学物質による環境汚染問題が、社会的にクローズアップされている。化学物質が生物に及ぼす影響を評価する手法はバイオアッセイと呼ばれ、古くは化学物質の濃度を生物を用いて測定するための方法であった。現在では、バイオアッセイは毒性試験と同義に用いられることが多い。新たに開発された化学物質が市場に出回る前には、物理化学的性質、生態系に及ぼす影響、分解や蓄積、健康影響に関する情報等、膨大なデータが必要である。このように事前の徹しい審査を通過して上市された化学物質と言えども、使用された後には何らかの経路で環境に入り込み、その化学物質自身は変化を受けながら生態系に対して何らかの影響を及ぼしているものと予想される。このような生態系における化学物質の運命と生態系への影響に関する研究は生態毒性学の大きな課題であり、ヒト以外の生物に対する化学物質の影響を論じた初めての日本語での成書「化学物質と生態毒性」が、最近、若林によって上梓された¹⁾。本稿では、化学物質が生態系に及ぼす影響を評価するための手法-生態系影響評価試験-について概説し、近年開発されている迅速、簡便な毒性試験キットの現状を概観すると共に研究開発の動向について述べる。そして複数の生態系影響評価試験(テストバッテリー)を適用して新規防汚剤等の化学物質や汚染環境質の毒性を評価した事例について、我々の実験結果を中心に紹介する。

2. 標準的な生態系影響評価試験

化学物質が生態系に及ぼす影響を定量的に評価するために、生態系における栄養段階の異なる種々の生物種を用いた試験が APHA (American Public Health Association)、ASTM (American Society for Testing and Materials)、ISO (International Organization for Standardization)、OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) 等の国際的な機関によって提案されている。OECD 化学品テストガイドライン²⁾では、化学物質の生態系影響評価のために、以下に示すような生物種を用いた汎用試験(conventional test)がそれぞれ標準化されている(カッコ内に供試生物、採用年を示す)。

201 Alga, Growth Inhibition Test (微細藻類, 1984)

202 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test (ミジンコ, 1984)

203 Fish, Acute Toxicity Test (魚類, 1992)

204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study (魚類, 1984)

205 Avian Dietary Toxicity Test (鳥類, 1984)

206 Avian Reproduction Test (鳥類, 1984)

207 Earthworm, Acute Toxicity Tests (ミミズ, 1984)

208 Terrestrial Plants, Growth Test (陸生植物, 1984)

209 Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (活性汚泥, 1984)

210 Fish, Early-Life Stage Toxicity Test (魚類, 1992)

211 Daphnia magna Reproduction Test (オオミジンコ, 1998)

212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages (魚類, 1998)

213 Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (ミツバチ, 1998)

214 Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (ミツバチ, 1998)

215 Fish, Juvenile Growth Test (魚類, 2000)

216 Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test (土壌微生物, 2000)

217 Soil Microorganisms, Carbon Transformation Test (土壌微生物, 2000)

次に、今後採用される可能性の高い試験ドラフトを以下に示す。

202 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test (ミジンコ, 2000)

208 Terrestrial (Non target)- Plant Test (陸生植物, 2000)

218 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment (ユスリカ, 2001)

219 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water (ユスリカ, 2001)

220 *Enchytraeidae* Reproduction Test (ヒメミミズ, 2000)

221 *Lemna* sp. Growth Inhibition Test (ウキクサ, 2000)

? Avian Reproduction Toxicity Test in the Japanese Quail or Northern Bobwhite (鳥類, 2000)

? Earthworm Reproduction test (ミミズ, 2000)

これらのガイドライン(およびドラフト)にはそれぞれ、原理、検証のための基準、試験方法(装置、供試生物、培地、供試溶液、試験法など)、データ解析と報告等が記されており、国際的に通用する試験ガイドラインとして認知されている。生物種としては食物連鎖で重要な藻類、甲殻類、魚類がよく用いられ、これらの OECD ガイドラインと共に環境庁ガイドラインが前記の成書²⁾に付録として記載されている。

3. 毒性スクリーニングのための試験キット³⁾

上に述べた汎用毒性試験を実施する場合には、設備や装置がそろっており、また供試生物の維持管理ができていただけでなく、実験者に相応の専門知識が要求される。また、試験を実施する研究室での供試生物の培養・飼育条件の違いによってテスト結果に変動が生じるかも知れないし、試験したいときに直ちに供試生物を準備できるとは限らない。特に、魚類や甲殻類を用いた水生生物毒性試験では、飼育および試験の実施に長時間を要すること、広い実験スペースが必要であることなどのために、コストが高くなる等の欠点がある。したがって、この問題を克服するために、毒性試験を日常的に行なえるよう、簡便な試験法で代替する試みが行われてきた。化学物質の毒性を評価するための汎用試験に代替可能な、より小さなスケールで実施できる試験法は、当初、マイクロバイオテスト(microbiotest)と呼ばれていた。この用語は「単細胞生物および小さな多細胞生物を液体試料に暴露して毒性影響を測定する方法」として Blaise が提唱した³⁾。ところが、一連の Toxkit を開発してきた Creasel 社が 2001 年に Microbiotest 社に社名を変更したため、ここでは従前から使用してきた「マイクロバイオテスト」を「小スケールテスト」と呼ぶこととしたい。小スケールテストでは、供試生物として細菌、微細藻類、原生動物、無脊椎動物、魚類、両生類等を用いた試験法がそれぞれ報告されている⁴⁾。また、1998 年にチェコで行われた、ルーチン毒性試験とバイオモニタリングのための新しいマイクロバイオテストに関する国際シンポジウムでの発表内容が成書となっている⁵⁾。これら 2 冊の成書は、現在、世界中で開発・実施されつつある小スケールテストの概観および詳細を知るための情報源である。小スケールテストでは、一般に、小型の生物が用いられ、迅速、簡便に試験を実施できるように開発されており、汎用試験に比較すれば低コストである。また、試験キットによっては供試生物が供給され、飼育・培養の苦勞から開放されることは大きな利点であろう。この内、生態系影響評価に最もよく用いられる生物種(細菌、藻類、無脊椎動物)を用いた汎用試験および試験キットについて述べる(表 II-1-1)³⁾。

1) 細菌を用いた試験

汎用試験では *Pseudomonas fluorescence* および *P. putida* が供試生物としてよく用いられ、エンドポイントとしては細胞数や増殖速度等のバイオマス指標、および呼吸、ATP 濃度、酵素活性(ATPase, dehydrogenase, phosphatase, urease, esterase)等の生化学的指標が用いられる。

Microtox 試験はおそらく最も頻繁に用いられている小スケールテストであり、多くの研究成果が報告されている。この方法が世界に広まった理由は供試細菌 *Vibrio fischeri* を凍結乾燥菌体として供給した点である。この海産発光細菌は有害物質に暴露されると発光量を減少させるので、これに基づ

いて 50%影響濃度(EC₅₀)が算出される。暴露時間 30 分以内の極めて短時間で毒性を検出することができる。有害化学物質を用い、Microtox 試験による結果と他の細菌、ミジンコ、魚を用いた試験結果は多くの研究者によって比較、解析されている。底質毒性を評価するための試験法は同じ測定原理を用いた Microtox solid-phase test として開発されている。同様の原理に基づき、酸素が欠乏した環境下でも生存できる海産発光細菌 *Vibrio harveyi* を用いた 2 種類の試験が報告されている。

ATP-tox system では *E. coli*(K12 PQ37)を用い、これを有害物質に 5 時間暴露した後に細胞内の ATP 含有量を測定することにより EC₅₀を算出する。*E. coli* 以外にも他の細菌や藻類、酵母が供試されている。

Toxi-chromotest では凍結乾燥した *E. coli* の変異株を用いており、有害物質による β -galactosidase の合成阻害をエンドポイントとしている。底質毒性を評価するために、同様の原理に基づいた Sediment-chromotest が開発されている。

MetPAD は水溶液中の重金属を検出するために開発され、Toxi-chromotest と同様に凍結乾燥した *E. coli* の変異株を用いており、化学物質による β -galactosidase の活性阻害をエンドポイントとしている。本酵素は金属イオンによって特異的に阻害を受けるが、多くの有機物質に対しては感度が低い。試験結果を定量化するためにマイクロプレートを用いた MetPLATE が開発されている。

ECHA biomonitor は最もシンプルな試験法である。細菌 *Bacillus* sp. と色素 tetrazolium をあらかじめ塗拭した dipstick を、試験溶液あるいは底質に 10 秒間暴露した後に 24 時間インキュベートして、発色の程度をカラーカードにより比較する。細菌が増殖するとパッドが赤色に変わるので、有害物質の存在を判定できる。

Laser-microbe assay では *Bacillus subtilis* を用いており、化学物質存在下での細菌の光散乱の変化をレーザー光を用いて解析する。散乱光強度は細胞数に比例しているため、これから EC₅₀が算出される。

2) 藻類を用いた試験

微細藻類を用いた汎用試験は多くの公的機関によって標準化されている。いずれの試験法でも、有害物質を含む培養液に藻類を接種し、3 から 4 日間後まで毎日藻類濃度を測定し、得られた増殖曲線から比増殖速度あるいは増殖曲線の下側の面積値(バイオマス)を求め、これに基づいて EC₅₀が算出される。この試験は(亜)慢性試験と位置づけられる。通常、三角フラスコが用いられ、連続照明のもとで培養が行なわれる。

Selenastrum capricornutum を用いた藻類増殖阻害試験は Blaise らによってミニチュア化され、小スケールテストの先駆けとなった。この方法では 96 穴のマイクロプレートが用いられ、試験中の培養液の蒸発を抑えるためにポリエチレンバ

ッグに密封され、暴露終了時に藻類の細胞濃度が測定される。この方法の利点として、少量の試料で測定可能、小さなベンチスケール、使い捨ての機材の利用、繰り返し数を多くすることが容易、試験のセットアップや計測をオートメーションで行なえることなどがあげられている。

藻類を用いた小スケールテストのもう一つのタイプは、Algaltoxkit Fである。このキットはOECD guideline-201に基づいて開発されている。供試藻類 *S. capricornutum* はアルギン酸に固定化されたビーズとして供給されるので前培養が不要である。また、光路長が 10 cm のディスポーザブルキューベット(容量約 30 mL)を試験培養器および計測容器として用いていることも特長である。

慢性の汎用試験が多く、公的機関によって標準化されている。急性試験では生後 24 時間以内の個体が用いられ、有害物質を含む飼育水中に 24 時間から 48 時間暴露される。経時的に死亡あるいは遊泳を休止した個体数が計数され、これに基づいて LC₅₀あるいは EC₅₀が算出される。

甲殻類を用いた小スケールテストの一つのタイプは一連の Toxkit である。それぞれの Toxkit では供試生物のシスト(cyst)あるいは休眠卵(ephippia)が供給され、これを飼育水中で適切な温度と光条件のもとに静置すると、一定時間後に齢の揃った数百の試験生物個体を一度に得ることができる。したがって、この方法では供試生物の継代飼育が不要である。淡水の毒性を評価するために、*Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*

表 II.1.1 細菌、藻類、甲殻類を用いた小スケールテスト

試験名	供試生物種	暴露時間	生物の供給#	エンドポイント	培養器
細菌を用いた試験					
Microtox*	<i>Vibrio fischeri</i>	5-30min	A	生物化学発光	チューブ
Microtox-solid phase test*	<i>Vibrio fischeri</i>	5-30min	A	生物化学発光	チューブ
Vibrio harveyi-direct & growth	<i>Vibrio harveyi</i>	60 min	E	生物化学発光	チューブ
ATP-tox system	<i>Escherichia coli</i>	5 h	E	ATP含有量	チューブ
TOXI-chromotest*	<i>Escherichia coli</i>	60 min	A	酵素合成	マイクロプレート
Sediment-chromotest*	<i>Escherichia coli</i>	60 min	A	酵素合成	パッド
MetPAD*	<i>Escherichia coli</i>	2 h	A	酵素活性	パッド
MetPLATE*	<i>Escherichia coli</i>	2 h	A	酵素活性	マイクロプレート
ECHA biomonitor*	<i>Bacillus sp.</i>	24 h	B	酵素活性	ディップスティック
laser-microbe assay	<i>Bacillus subtilis</i>	66 min	A	細胞数	チューブ
藻類を用いた試験					
Selenastrum microplate	<i>Selenastrum capricornutum</i>	72 h	E	細胞増殖	マイクロプレート
Algaltoxkit F*	<i>Selenastrum capricornutum</i>	72 h	C	細胞増殖	キューベット
Selenastrum ATP	<i>Selenastrum capricornutum</i>	4 h	E	ATP含有量	チューブ
甲殻類を用いた試験					
Rotoxkit F*	<i>Brachionus calyciflorus</i>	24 h	D	致死	マルチウエル
Thanmotoxkit F*	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24 h	D	致死	マルチウエル
Daphtoxkit F*	<i>Daphnia magna</i> , <i>D.pulex</i>	24-48h	D	致死	マルチウエル
Prottoxkit F*	<i>Tetrahymena thermophila</i> [‡]	24 h	D	摂食阻害	キューベット
Artoxkit M* (海水試験用)	<i>Artemia salina</i>	24 h	D	致死	マルチウエル
Rotoxkit M* (海水試験用)	<i>Brachionus plicatilis</i>	24 h	D	致死	マルチウエル
IQ test*	<i>Daphnia magna etc.</i>	60 min	E	酵素活性	バイアル
CerioFAST	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	60 min	E	摂食阻害	バイアル

#A: 凍結乾燥, B: ディップスティック, C: 固定化細胞, D: 休眠卵, E: 別途、培養/飼育を必要とする

‡ 市販されているマイクロバイオテスト、[‡]原生動物

Microtox: AZUR Environmental, Inc., USA; TOXI chromotest: EBPI-Beak, Canada; MetPAD/PLATE: Group 206 Technologies, Inc., USA; ECHA biomonitor: ECHA microbiology Ltd., UK; Toxkit: Microbiotest Inc., Belgium; IQ test: Aqua Survey, Inc., USA

3) 無脊椎動物を用いた試験

水生生物を用いた毒性評価には、無脊椎動物を用いた急性毒性試験が頻繁に行なわれている。甲殻類の内淡水種としてはミジンコ類の使用が最も多く、これを用いた急性および

を用いたキットがそれぞれ開発されている。海水評価のために、海産種である *Brachionus plicatilis*, *Artemia salina* を用いたキットもそれぞれ開発されている。この内、Rotoxkit は ASTM の標準ガイドラインとして採用されている

(ASTM-E-1440, 1991)。また、Daphtoxkit F magna は OECD guideline- 202 に基づいて開発されている。

甲殻類を用いたもう一つのタイプは、*in vivo* 酵素活性阻害に基づいた迅速な毒性スクリーニング法である。これら一連の試験は IQ test として開発されている。この方法では供試個体を有害物質に暴露した後に蛍光基質を加え、長波長紫外線ランプのもとで蛍光を発する個体を計数することにより EC_{50} を算出する。有害物質により影響を受けた個体は、基質を取り込んで代謝することができないので蛍光を発しない。この方法には淡水種として *Ceriodaphnia dubia*, *D. magna*, *Hyalella azteca*, 海産種では *A. salina*, *Mysidopsis bahia* が供試されている。また、蛍光強度の測定にマイクロプレートリーダーを用いた試験の自動化も試みられている。また、摂食阻害に基づいた急性毒性試験に *C. dubia* が用いられ、この試験法は CerioFAST として報告されている。この方法では *C. dubia* を有害物質に暴露した後に蛍光物質で染色された酵母細胞を加え、各個体の腸管の蛍光を顕微鏡で観察する。同様の摂食阻害に基づく試験が *Brachionus* および *D. magna* を用いて報告されている。

4. テストバッテリーによる新規防汚剤の毒性評価

1) 研究の背景

沿岸海域では、発電所等の冷却水系、海洋構造物、船舶、漁網等への海洋生物の付着を防止するために、防汚塗料が用いられてきた。我が国では 1920 年代には防汚剤として亜酸化銅、酸化水銀の使用が一般的であり、1950 年代には塩化ビニール塗料が普及し始めた。1970 年代以降には、有機スズをアクリルポリマーに結合させたスズポリマーが、加水分解機能による塗膜更新性とスズの優れた防汚性によって防汚塗料の主流となった。ところが、防汚塗料として使用されてきた有機スズ化合物による環境汚染が世界的にクローズアップされるようになり、我が国でも 1980 年代後半から有機スズ化合物の使用が厳しく制限されるに至った。2001 年 10 月には、国際海事機関(IMO)において「船舶についての有害な防汚方法の管理に関する国際条約(仮称)」が採択され、TBT 船舶塗料の使用は世界的に禁止されることとなった。我が国では、1991 年から 3 年間にわたり、日本造船研究協会の専門部会によって有機スズ代替物質に関する研究が行われ、17 種類の化学物質がより安全性の高い防汚剤としてノミネートされた⁶⁾。従って、我が国では現在、これらの化学物質が有機スズ剤の代替品として使用されていると考えられるが、その情報は公表されておらず、また市販塗料製品には防汚成分は明記されていないので、実際に用いられている防汚剤の種類や量に関する情報を入手することは極めて困難な状況にある。このように有機スズ剤に替わる新規防汚剤が生態系に及ぼす影響に関するオープンな情報は極めて少ないので、我々は試験キット等を活用して新規防汚剤の生態系への影響評価を試みた。以

下に、今までに得た実験結果を中心に述べる。

2) 供試防汚剤

防汚剤としてノミネートされた化合物を含む 10 化合物 Copper-pyrithione (CuPT), Diuron, Disulfiram, Irgarol 1051 (イルガロール), Irgarol 1051 由来の分解産物である M1, Sea-Nine 211, Thiram, Triphenylborane-pyridine (KH 101), Zinc-pyrithione (ZnPT), Ziram を供試した。

3) イルガロールが生態系に及ぼす影響評価

新規防汚剤イルガロール(2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-cyclopropylamino-*s*-triazine)は、除草剤として使用される *s*-triazine 系化合物に属する。1993 年以降、地中海北部・西部沿岸、イギリス東部・南部沿岸、スイス、スウェーデン、ドイツ、スペイン、ポルトガル等ヨーロッパを中心として、海水、湖水、底質、生物等の環境試料中の残留分析が報告されている。2000 年には瀬戸内海^{7,8)} およびオーストラリア北東部沿岸においても残留が報告され、ヨーロッパ以外での使用が示唆された。イルガロールに関する研究の多くは、環境試料中の残留分析および新しい分析法の開発に向けられている一方、本物質の分解性や生態系への影響評価に関する知見は、我々の報告(分解性⁹⁻¹¹⁾、生態系影響評価^{8, 12, 13)}を除けば少ない。そこで、種々の生物を専門とする研究者との共同研究によって、細菌、甲殻類、海藻、微細藻類、浮葉植物、陸生植物に対する、イルガロールおよびその分解産物 M1 の影響を評価した(図 II-1-1)^{8, 12)}。両化合物は共に、海産発光細菌 *Vibrio fischeri* および海産甲殻類アルテミア *Artemia salina* に対して有意な阻害を示さなかった。

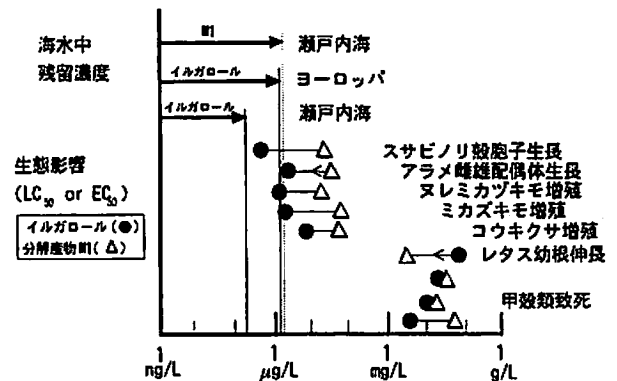


図 II-1-1 イルガロールの生態系影響

3 種類の淡水産甲殻類 (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Thamnocephalus platyurus*) に対する 50% 致死濃度 (LC_{50}) は、M1 よりもイルガロールの方が低かったものの、水生植物に対する 50% 影響濃度 (EC_{50}) に比較すると、1000 倍程度高かった。紅藻類スサビノリ *Porphyra yezoensis* (conchospore)、褐藻

類アラム *Eisenia bicyclis* (gamatephyte)、淡水産緑藻類ヌレミカツキモ *Selenastrum capricornutum* およびミカツキモ *Chrosterium ehrenbergii*、淡水産浮葉植物アオウキクサ (イボウキクサ *Lemna gibba* G3 およびコウキクサ *Lemna minor* 1769) を用いたバイオアッセイの結果から、両化合物は極めて低濃度で阻害を示し、親化合物の毒性は分解産物よりも強かった。スサビノリに対しては、殻胞子の発芽よりも生長に対する毒性が強く、それぞれの化学物質の EC₅₀ は供試生物種の中で最も低い値であった。イルガロールの EC₅₀ は、アラム、ヌレミカツキモ、ミカツキモに対しては 2-4 μg/L であり、2 種のウキクサに対する EC₅₀ は有意に高かった。M1 は供試生物の内、スサビノリおよびヌレミカツキモに対して強い阻害を示した。一方、陸生植物レタス *Lactuca sativa*、ゴボウ *Arctium* の幼根伸長に対しては、M1 は比較的高濃度で幼根伸長を阻害を示したが、親化合物は阻害を示さなかった。

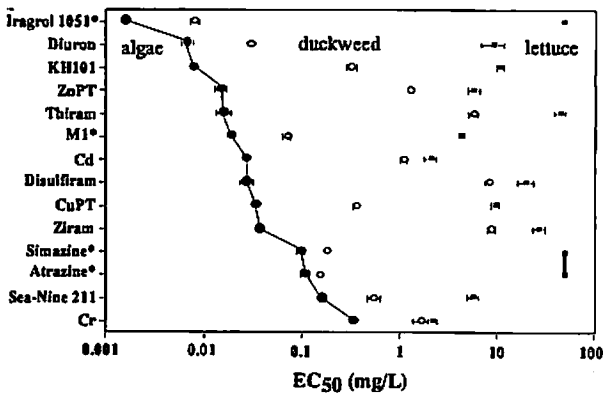


図 II-1-2 植物に対する新規防汚剤の影響

4) 植物に対する新規防汚剤の影響評価

新規防汚剤のいくつかは除草剤関連化合物であるので、植物に対する影響が強い。そこで、小スケールテストを用いて、3 種類の植物(淡水産藻類、ウキクサ、レタス)に及ぼす影響を評価した(II-1-2)。

藻類 *S. capricornutum* 試験では増殖量を指標として 72-hour EC₅₀ を、コウキクサ *L. minor* 試験では葉状体増殖を指標として 7-day EC₅₀ を、レタス *L. sativa* 試験では幼根伸長を指標として 5-day EC₅₀ をそれぞれ算出した。縦軸は、藻類に対する毒性が強い順に化学物質を並べた。図中に*印をつけた化学物質はトリアジン系化合物であり、シマジンとアトラジンは我が国で使用されている除草剤、イルガロールは我が国では農薬として登録されていない。いずれの供試化学物質も藻類に対する阻害が最も強く、次いで、ウキクサ、レタスの順であった。藻類に対しては、供試した新規防汚剤の中でイルガロールの毒性が最も強く、Sea-Nine 211 の毒性が最も弱かったが、すべての防汚剤はクロムよりも毒性が強かった。ウキクサに対しては、4 種類のトリアジン系化合物は他の防

汚剤に比較すると比較的強い毒性を示した。イルガロールおよびその分解産物 M1 は、3 種の生物に対して、市販農薬であるシマジンやアトラジンよりも強い毒性を有することは明らかである。

5) 魚類に対する新規防汚剤の影響¹³⁾

魚類個体を用いた汎用試験を行うためには相応の専門知識と設備が必要である。汎用試験を魚類細胞を用いた簡便な方法で代替する試みが行われているが、魚類細胞の多くは接着性細胞であるため、細胞の取り扱いに慣れていない人にとっては操作は煩雑である。これに対し、魚類浮遊培養細胞は培地中に細胞が浮遊しているので、この細胞を収穫して直ちに毒性試験に供試できる。そこで、魚類浮遊培養細胞を用いた毒性試験法を開発し、汎用試験による結果と比較することにより、細胞試験の有用性を評価した。実験方法の詳細は文献¹³⁾に詳しいが、以下に簡単に述べる。

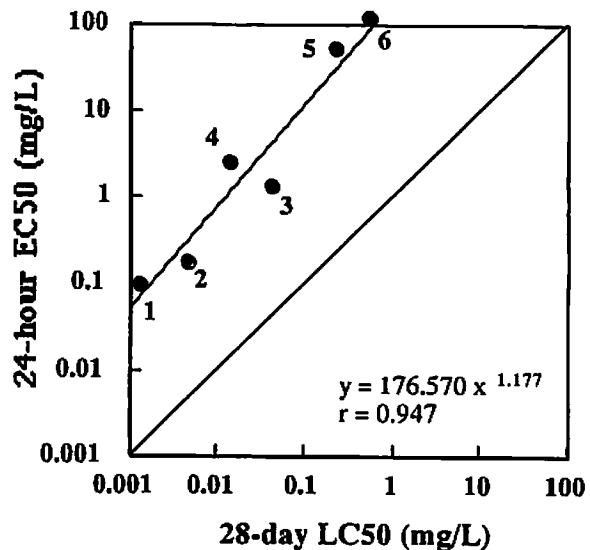


図 II-1-3 魚類に対する新規防汚剤の影響

1: CuPT, 2: ZnPT, 3: KH101, 4: Sea-Nine 211, 5: Diuron, 6: Irgarol 1051

供試細胞として、キングサーモン *Oncorhynchus tshawytscha* 胚由来の浮遊培養細胞 CHSE-sp を供給する ALPS 培養細胞キットを使用した。この浮遊培養細胞は、東京水産大学の羽曾部正彦博士が魚類培養細胞としてはじめて樹立した株細胞であり、魚病ウイルス研究のために用いられている。まず、毒性試験の方法を開発するため、初期細胞数、細胞活性を測定するためのアラマブルーとの反応時間、有害化学物質への暴露時間について最適な試験条件を検討した。その後、最適化した試験法に従い、6 種類の新規防汚剤についてそれぞれ 50% 影響濃度(24-hour EC₅₀)を算出した。

魚類初期生活段階試験にはニジマス *Oncorhynchus mykiss* の発眼卵を用い、脱塩素した水道水中、水温 10 °C の暗所で孵化した個体を毒性試験に供した。24 時間以内に孵化した個体 20 匹を 1 L の試験水に入れて実験を開始し、水温 10 °C の暗所で 28 日間の暴露試験を行った。1 日毎に供試魚の観察を行い、魚の生死を記録するとともに死亡魚を取り出した。試験水は 2-3 日毎に新たに調製し、全量を交換した。各濃度区における死亡率から、供試防汚剤の半数致死濃度 (28-day LC₅₀) を算出した。OECD による魚類初期生活段階試験方法では、受精直後の胚期から自由に餌を食べるようになるまでの試験期間が定められているが、本研究では無給餌とし、前期仔魚期だけの試験を行った。

新規防汚剤が魚類に及ぼす毒性を両対数グラフ上にプロットしたところ (図 II-1-3)、両試験結果には高い相関が得られた。今後さらに多くの供試化学物質を供試して検証する必要があるが、ここで供試した 5 化合物については細胞試験を個体試験に代替できると考えた。このように、魚類浮遊培養細胞 CHISE-sp を用いた毒性試験は、小スケールテストとしてさらに実績を積み重ねることにより、今後用途が広がることを期待される。

5. 試験キットの応用と問題点

現在までに我々は、試験キットを含むバイオアッセイを新規防汚剤の他に、染料¹⁴⁾や界面活性剤¹⁵⁾の生態系影響評価に適用してきた。これらのバイオアッセイは有害化学物質の毒性評価だけでなく、汚染環境の評価ツールとしても用いることが可能である。1997 年には香川県豊島の産業廃棄物埋立地からの浸出水¹⁶⁾に適用し、浸出水を濃縮することなく 7 種の生物に対する毒性を評価した。5 種類の浸出水は微生物に対する毒性は弱く、甲殻類や高等植物への毒性が強いことを報告した。現在、当地での環境浄化が進められているところであり、浄化する前と後の浸出水の毒性を比較することにより、浄化の進行程度を評価することができると思われる。一方、河川水等の環境水の毒性を評価するためには、そのままでは毒性を検出できることが少ないので、通常は濃縮操作を必要とする。我々は藻類、甲殻類、陸生植物等を用いた試験を、岡山県児島湖周辺の農業地帯の河川水^{17,18)}、琵琶湖赤野井湾周辺の農業地帯の河川水¹⁹⁾、道路路面排水²⁰⁾の毒性評価に適用してきた。この場合には、濃縮操作を行うことによって有害物質濃度が高められたと考えられるが、試料に元来含まれていた化学物質を回収できなかつたり、化学変化によって新たな生成物が生じた可能性は否定できない。一方、濃縮操作を行わない場合にも、試料が元来有する要因 (pH、アンモニア、亜硝酸、塩素等) による有害影響を、いわゆる有害化学物質による影響と明確に区別することは困難な場合がある。したがって、このようなバイオアッセイによる環境試料の毒性試験結果をより正確に解釈するためには、化学分析に

よる個別化学物質の濃度測定結果をあわせて用いることが重要である。

海水の汚染評価では文献^{4,5)}に示すような小スケールテストが開発され、また表 II-1-1 に示すようにいくつかの試験キットが開発されている。これとは別に、我が国ではウニ卵を用いた海水の汚染評価法が小林によって開発されている²¹⁾。この方法はカナダ、アメリカでは公定法として採用されているが、我が国では未だ採用されていない。おそらく我が国での適用例が少ないことがその理由であろうが、最近、豊島周辺海域での生物への影響評価がこのウニ卵を用いた生物検定法により進められていることが紹介されている²²⁾。今後、この方法を小スケールテストとして開発することにより、その用途はいっそう広がり、本法の有用性が高まるものと考えられる。

本稿では、主として化学物質が生態系に及ぼす影響を評価するための毒性試験、特に小スケールテストについて概観し、複数の試験を用いた化学物質および汚染環境質の毒性評価について、我々が得た実験結果を中心に述べた。試験法の開発について、諸外国では膨大な量の研究が行われているが、我が国での研究報告は少ないことを述べた。化学物質 (および汚染環境質) の生態系影響を評価するためには単一の生物種による評価では不十分であり、複数の生物種に対する影響を評価すべきことは誰の目にも明らかであるが、この目的のために、全ての試料に対して手間とコストのかかる汎用試験を実施することは得策ではない。簡便・迅速な試験キットを活用して毒性のスクリーニングを行った後に、さらに必要な場合には汎用試験を実施するという、試験キットの使い方を工夫することが必要であろう。このことにより、どのような試験キットを開発すべきか、そのニーズが明らかとなろう。環境を保全することを目的として、環境を診断し、必要な場合には治療する作業を通じて、だれでも、いつでも、簡単に使える、種々のバイオアッセイの開発が望まれる。ただし、試験キットを開発する際には、試験結果の検証が十分に、しかも慎重に行われるべきである。

引用文献

- 1) 若林明子. 2000. "化学物質と生態毒性", 産業環境管理協会, pp. 486.
- 2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, <http://www1.oecd.org/ehs/test/testlist.htm>
- 3) 岡村秀雄, 青山勲. 1998. バイオモニタリングによる水環境の汚染評価. 日本農業学会誌, 23, 166-173.
- 4) Wells, P.G., L. Lee and C. Blaise. 1998. "Microscale testing in Aquatic Toxicology", pp. 679. CRC Press, Boca Raton.
- 5) Persoone, G., C. Janssen, W. DeCoen. 1998. "New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and

- Biomonitoring". pp. 550. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- 6) 米原洋一. 2000. 防汚塗料の最近の動向. 日本海水学会誌, 54, 7-12.
 - 7) Liu, D., G. J. Pacepavicius, R. J. Maguire, Y. L. Lau, H. Okamura, and I. Aoyama. 1999. Survey for the occurrence of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.*, 33, 2833-2843.
 - 8) Okamura, H., I. Aoyama, Liu, D., R. J. Maguire, G. J. Pacepavicius, Y. L. Lau. 2000 Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.*, 34, 3523-3530.
 - 9) Liu, D., R. J. Maguire, Y. L. Lau, G. Pacepavicius, H. Okamura, and I. Aoyama. 1997. Transformation of the new antifouling compound Irgarol 1051 by *Phanerochate chrysosporium*. *Water Res.*, 31, 2363-2369.
 - 10) Liu, D., G. Pacepavicius, R. J. Maguire, Y. L. Lau, H. Okamura, and I. Aoyama. 1999. Mercuric chloride-catalyzed hydrolysis of the new antifouling compound Irgarol 1051. *Water Res.*, 33, 155-163.
 - 11) Okamura, H., I. Aoyama, D. Liu, R. J. Maguire, G. J. Pacepavicius, and Y. L. Lau. 1999. Photodegradation of Irgarol 1051 in water. *J. Environ. Sci. Health B34*, 225-238.
 - 12) Okamura, H., I. Aoyama, T. Takami, T. Maruyama, Y. Suzuki, M. Matsumoto, I. Katsuyama, J. Hamada, T. Beppu, O. Tanaka, R. J. Maguire, D. Liu, Y. L. Lau, and G. J. Pacepavicius. 2000. Phytotoxicity of the antifouling compound Irgarol 1051 and a major degradation product. *Marine Pollut. Bull.*, 40, 743-752.
 - 13) Okamura, H., T. Watanabe, I. Aoyama, M. Hasobe. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* (in press)
 - 14) 西田友昭, 堤祐司, 毛見誠, 羽田崇, 岡村秀雄. 1999. 白色腐朽菌によるアントラキノン系染料の脱色とそれに関与する酵素. 水環境学会誌, 22, 465-471.
 - 15) Maki, H., H. Okamura, I. Aoyama, and M. Fujita. 1998. Halogenation and toxicity of the biodegradation products of a nonionic surfactant, nonylphenol ethoxylate. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 650-654.
 - 16) 岡村秀雄, 青山勲, 羅栄, D. Liu, and G. Persoone. 1998. 産業廃棄物埋立地浸出水の生態毒性評価および毒性のキャラクタリゼーション. 環境毒性学会誌, 1, 43-50.
 - 17) Okamura, H., R. Luo, I. Aoyama, D. Liu. 1996. Ecotoxicity assessment of the aquatic environment around lake Kojima, Japan. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 11, 213-221.
 - 18) Okamura, H., M. Omori, R. Luo, I. Aoyama, and D. Liu. 1999. Application of short-term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land runoff. *Sci. Total Environ.*, 34, 223-231.
 - 19) Okamura, H., M. Piao, I. Aoyama, M. Sudo, T. Okubo, M. Nakamura. Algal growth inhibition of river water pollutants in the agricultural area around Lake Biwa, Japan. *Environ. Pollut.* (in press)
 - 20) 小野芳朗, 岡村秀雄, 河原長美, 青山勲, 小田美光. 1999. 雨天時路面排水中塵埃の遺伝毒性・生態毒性評価. 水環境学会誌, 22, 561-567.
 - 21) 小林直正. 1997. "環境汚染を調べる-ウニ卵による海水の生物検定-水汚染の生物検定-", サイエンティスト社. pp. 83
 - 22) 岡市友利. 2001. 閉鎖系海域の環境保全と豊島にみる島嶼問題. 瀬戸内海, 27, 58-65.

< 岡村秀雄 >