

## II-3. 海産動物プランクトン遊泳阻害試験法

### 1. 動物プランクトン遊泳阻害試験の概要

動物プランクトンを用いた毒性試験方法の公定法は、国内においては日本工業規格(JIS K0229)<sup>1)</sup>、農薬取締法<sup>2)</sup>のように淡水産のミジンコ類を用いた試験方法である。一方海産動物プランクトンを用いる毒性試験法は確立されていない。有害物質が我が国海域の生態系を構成する生物に対してどのような影響を及ぼすか明らかにするためには、沿岸域に普通に生息する動物プランクトンを用いた毒性試験を行う必要がある。本節では室内飼育技術が確立された海産動物プランクトン<sup>3)</sup>、カイアシ類の一種 *Tigriopus japonicus* を用いた遊泳阻害試験法を提案する。

遊泳阻害試験法について 2. で述べ、次いで 3. で試験法の解説を行う。そのために 2. で解説に必要な箇所に数字を付け、それぞれについて 3. で解説を行う。

### 2. 試験方法

#### 1) 試験法の原理

本試験は、JIS K0229<sup>1)</sup>を基にし、試験生物を数段階に希釈した被験物質に暴露し、経時的な遊泳阻害率並びに死亡率の観察を行う。試験生物の半数を遊泳阻害させる初期設定濃度(試験開始時設定した被験物質の濃度)、すなわち遊泳阻害濃度(EC<sub>50</sub>)を求めるものである。また可能であれば試験生物の半数を死亡させる初期設定濃度、すなわち半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)も求める。

#### 2) 試験の準備

##### (1) 試験生物

*Tigriopus japonicus*(以下チグリオプス)(注 1)、孵化後 24 時間未満のノープリウス幼生を用いる(注 2)。

試験開始数日前に継代培養しているストックカルチャーの中から卵嚢を保有している雌をパスツールピペットでストレスを与えないように注意しながら集め、テトラセルミスが繁殖した t/2 培養液を入れた幼生採集用の容器に收容し飼育する(注 3)(注 4)(注 5)。試験開始 24 時間前に飼育水を全量交換し、この間に孵化した幼生を除去する。試験開始当日飼育水を 50 μm のプランクトンネットで静かに濾過し、孵化後 24 時間未満のノープリウス幼生を得る。さらに得られた幼生はネット上で濾過海水で慎重に洗浄した後、濾過海水中に放し試験に用いる(注 6)。

##### (2) 試験に用いる海水

希釈水および飼育水など試験に用いる海水は、自然海水を活性炭およびフィルター(0.45 μm)で濾過して用いる(注 7)。

##### (3) 器具および装置

###### ① 試験容器

内径 25 ~ 26mm 程度のガラスシャーレを用いる。

###### ② 恒温装置

蛍光灯照明付き恒温装置を用いる(注 8)。

##### 3) 試験条件

###### (1) 水温

20 ~ 25 °C の範囲(注 9)。

###### (2) 照明

照度約 1200lx に調整。照明時間は 16 時間/8 時間の明暗周期(注 9)。

###### (3) 塩分

32 ~ 35 の範囲(注 9)。

###### (4) 酸素飽和度

60%以上(注 10)。

###### (5) 收容密度

1 濃度区あたりの試験個体数を最小 20 とする。1 容器あたり 5 個体收容し、これを 4 つ用意する。この時の密度は 5 個体/2mL とする。

###### (6) 試験濃度

必要に応じて本試験で実施する試験濃度範囲を予備試験で決める。予備試験では濃度間隔を広くとり、EC<sub>50</sub>(可能であれば LC<sub>50</sub>)の概略値を得る。本試験では、これを参考にして大部分が阻害を受けない濃度と大部分が阻害を受ける濃度を推測し、それらの両濃度間で等比級数的(濃度公比 2 以下)に 5 濃度区以上設定する。

試験溶液は、溶解助剤を用いずに調製することが望ましい。しかし水への溶解度の低い被験物質の場合、必要に応じてチグリオプスに対して低毒性の有機溶媒あるいは界面活性剤等の溶解助剤を用いて試験溶液を調製する(注 11)。

###### (7) 試験期間

24 時間とする(注 12)。

###### (8) 排水処理

試験に用いた海水は排水処理装置で処理するか、もしくは業者に委託し処理する。

##### 4) 試験操作

希釈水にあらかじめ調製した被験物質の原液を加え

各種濃度の試験溶液(5濃度区以上)を調整する。試験溶液を試験容器にそれぞれ2mLずつ入れ、1区画に供試個体を5個体ずつ計20個体になるように収容する。試験区の外に、希釈水だけで調整した対照区を設ける。原液の調整に溶解助剤を用いた場合には、溶解助剤が最高となった試験区と同濃度の助剤対照区を設ける。恒温装置内に試験容器を収容し24時間試験を行う。24時間後に実体顕微鏡下(×60)で各容器中の遊泳(活動)が阻害されている個体数及びへい死した個体数を測定する。遊泳阻害の判定は、容器内を穏やかにかき混ぜた後、たとえ15秒間の観察中に付属肢を動かすことができても、遊泳しないものを遊泳阻害と見なす。また斃死の判定は体内の微細鼓動が停止することにより斃死と見なす。なお、対照区におけるチグリオプスの遊泳阻害率が10%を越えた試験はデータとして採用しない。

### 5) 結果とりまとめ

試験終了後において遊泳阻害もしくは斃死とみなされた個体数から各濃度に対する遊泳阻害率及び斃死率を計算し、適切な統計手法等によってEC<sub>50</sub>(可能であればLC<sub>50</sub>)を決定する(注13)(注14)。

## 3. 試験法の解説

注1 チグリオプスは、ハルパクチス目(ツツガタケンミジンコ)に属するカイアシ類である。和名がシオダマリミジンコと言うように日本温帯域の沿岸満潮線より上の潮溜まりに生息し<sup>9)</sup>、付着性や匍匐性が強い種であり<sup>9)</sup>、飼育が容易で実験材料として広く用いられている<sup>9)</sup>。チグリオプスの幼生期はノープリウス6期、コペポダイト6期(第6期は成体)とされている<sup>9)</sup>。またチグリオプスは量産規模での培養が可能な種で、多くの栽培漁業種の種苗生産にとって優れた餌料である<sup>9)</sup>。したがってチグリオプスは、有害物質の影響を受けやすい沿岸域に生息し、食物連鎖の低位に位置し、飼育が容易であるため、有害物質の海域生態系に対する影響を評価するための試験生物として適すると考えられる。

注2 ふ化後24時間未満のノープリウス幼生は、古賀<sup>9)</sup>や木下<sup>9)</sup>の報告から判断して、ノープリウスI~II期であると考えられる。

注3 チグリオプスは、f/2培養液(表II-3-1)<sup>10)</sup>で10<sup>5</sup>cells/mLの濃度に培養した*Tetraselmis tetraathele*(以下テトラセルミス)を餌料として飼育する。この時テトラセルミス濃度は血球計算盤等を用いて管理する。

表II-3-1 f/2培養液の組成及び培養<sup>10)</sup>

試薬重量及び調整法		
保存原液 I	NaNO <sub>3</sub>	7.5g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O	0.5g
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ・9H <sub>2</sub> O	1.5 ~ 3.0g
	蒸留水を加えて100mLにする。	
保存原液 II	CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.98g
	ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	2.2g
	CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	1.0g
	MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	18.0g
	NaMoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.63g
	それぞれを蒸留水100mLずつに溶かす。	
	保存原液 III	FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O
NaEDTA		4.63g
蒸留水900mLに溶かし、これにII液を各1mLずつ加えた後、蒸留水を加えて1Lとする。		
培養	I液1mL、III液1mLにビタミン類としてThiamine-HCl0.1mg、Biotin0.5μg、B <sub>12</sub> 0.5μgを添加し、海水を加えて1Lとする。	

注4 卵嚢を保有している雌をパスツールピペット(長さ9インチ, 1K-PAS-9P, 岩城硝子(株))で分離する際、傷ついたり卵嚢が脱落したりしないよう細心の注意を払って操作を行う。もしそのような個体が出た場合は取り除く。分離後第1回目の産仔数はそれ以降の産仔数と比較して有意に少ないので、試験開始数日前に卵嚢を保有している雌の分離操作を行い、分離後第2回以降の幼生を採集し用いる(表II-3-2)。

表II-3-2 分離後第1回目と第2回以降の孵化個体数

平均孵化個体数		
実験1 <sup>1)</sup>	第1回目	11.8 ± 12.1
	第2回以降	24.4 ± 7.5
実験2 <sup>2)</sup>	第1回目	23.3 ± 8.0
	第2回以降	36.1 ± 8.1

\*1:飼育期間10日間, 4個体平均, \*2:飼育期間14日間, 5個体平均

注5 筆者は以下に示すような構造の幼生採集用容器を作成し用いた(図II-3-1)<sup>11)</sup>。この幼生採集用容器は、塩ビ管(VP30)を6~7cmに切断し、片側0.5~1cmの位置に200μmのプランクトンネットを取り付けたものである。作成した容器は2~3日流水

下で海水にさらして後に使用した。

これをテトラセルミスが繁殖した f/2 培地を満した 50mL もしくは 100mL のガラスビーカーに挿入し、容器上部に卵嚢を持った雌を 10 ~ 20 個体収容する。孵化したノープリウス幼生はメッシュを通過して容器下部に落ちる。そして容器を取り去るとビーカーの中にはノープリウス幼生のみが分離される仕組みである(図 II-3-1)。ほぼ 1 週間は毎日繰り返し幼生が得られる。

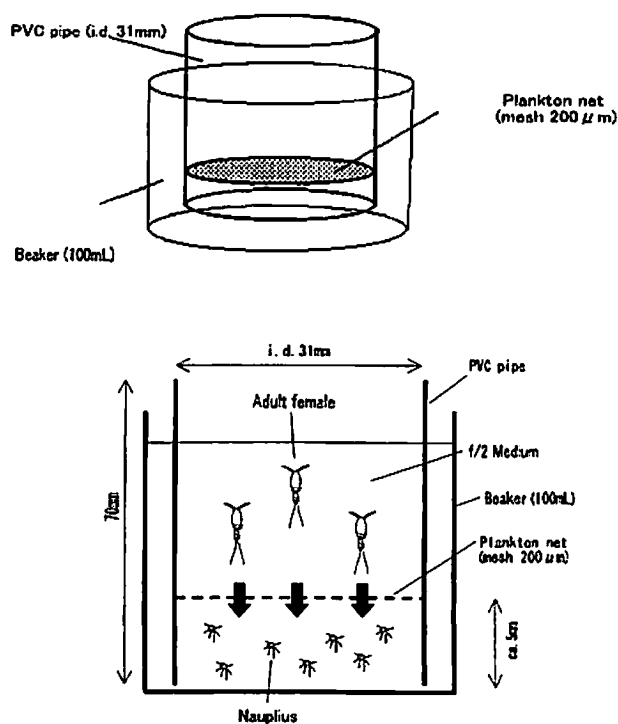


図 II-3-1 幼生採集用容器<sup>\*)</sup>

注 6 50 μm のプランクトンネット上で幼生を濾過海水で洗浄する場合は、試験溶液中にテトラセルミスや培地の成分が混入することを防ぐためである。

注 7 活性炭およびフィルターで濾過した海水は一昼夜エアレーションを行いながら、試験水温を調節する。

注 8 温度、照度ならびに照明時間が制御できる恒温実験室または恒温槽。例えば植物培養用インキュベータ、人工気象器等。

注 9 チグリオプスは環境変化に強く、生存しうる水温および塩分の範囲はきわめて広いが、塩分 32 で出生個体の成長と生残が良いということがわかっている<sup>\*)</sup>。また飼育実験によって、水温 20 ~ 25 °C、照度約

1200lx で比較的容易に飼育できると報告している<sup>\*)</sup>。したがって急性遊泳阻害試験に適した水温及び塩分は、それら正常に増殖しうる条件、水温 20 ~ 25 °C、塩分 32 前後であるといえる。なお明暗の周期は JIS<sup>1)</sup>の方法に準拠した。チグリオプスノープリウス幼生に対する 6 価クロム(Cr(VI))およびペンタクロロフェノールナトリウム塩(PCP-Na)の遊泳阻害試験における水温と塩分の影響を表 II-3-3 に示す<sup>\*)</sup>。

注 10 OECD<sup>1)</sup>および JIS<sup>1)</sup>の方法に準拠し 60%とした。

注 11 溶解助剤の試験溶液中の濃度は 100mg/L を越えないことが望ましい。溶解助剤のチグリオプスに対する毒性<sup>\*)</sup>は表 II-3-4 に示す。

表 II-3-3 チグリオプスノープリウス幼生に対する Cr(VI)および PCP-Na の遊泳阻害試験における水温及び塩分の影響<sup>\*)</sup>

Hazardous chemical	Temperature (°C)	Salinity	EC <sub>50</sub> (mg/L) <sup>*)</sup>	LC <sub>50</sub> (mg/L) <sup>*)</sup>
Cr(VI)	20	34	49 ± 7.4	>71
		26	>35	>71
		20	46 ± 22	>71
	25	34	39 ± 5.3	>71
		26	35 ± 3.5	60
		20	23 ± 11	>35
PCP-Na	20	34	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.06
		26	0.89 ± 0.06	1.2 ± 0.15
		20	0.64 ± 0.04	0.95 ± 0.25
	25	34	1.1 ± 0.06	1.5 ± 0.17
		26	1.3 ± 0.15	1.6 ± 0.26
		20	1.2 ± 0.17	1.6 ± 0.26

\*1: Mean ± SD (n=3)

LC<sub>50</sub> は図解法で算出、EC<sub>50</sub> はプロビット法もしくは Van der Waerden で算出。

表 II-3-4 チグリオプスに対する溶解助剤の影響

	EC <sub>50</sub> (mg/L)	LC <sub>50</sub> (mg/L)
アセトン	>10000	>10000
エタノール	>10000	>10000
メタノール	>10000	>10000
DMSO	8400 ± 1300 <sup>*)</sup>	>10000
HCO100	>10000	>10000
Tween 80	>10000	>10000

\*:プロビット法で算出、Mean ± SD(n=3)

注 12 ノープリウスを絶食条件下で飼育したとこ

ろ 24 時間後までは活発に活動していたが、48 時間後以降明らかに活性が低下し斃死する個体が観察されたため、試験期間を 24 時間とした。

注 13 SPSS や SAS 等の市販の統計ソフトを使うと便利である。手法としては、プロビット法 (probit method)、リッチフィールド・ウィルコクソン (Litchfield-Wilcoxon) 法、ファン・デア・ウェルデン (Van Der Waerden) 法、非線型最小二乗法等がある<sup>12-14)</sup>。

注 14 最後に Cr(VI)、PCP-Na および有機スズ化合物 (塩化トリブチルスズ (TBTCI) および塩化トリフェニルスズ (TPTCI) のチグリオプスに対する EC<sub>50</sub> および LC<sub>50</sub> を表 II-3-5 に示す<sup>9)</sup>。

表 II-3-5 Cr(VI)、PCP-Na、TBTCI 及び TPTCI のチグリオプスノープリウス幼生に対する 24 時間 EC<sub>50</sub> および LC<sub>50</sub><sup>9)</sup>

Hazardous chemicals	EC <sub>50</sub> <sup>*1</sup>	LC <sub>50</sub> <sup>*1</sup>
	(mg/L)	(mg/L)
Cr(VI)	49 ± 7.4	>71
PCP-Na	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.06
	(μg/L)	(μg/L)
TBTCI	5.2 ± 0.5	6.0 ± 0.5
TPTCI	1.7 ± 0.0	4.0 ± 0.4

\*1: Mean ± SD (n=3)

Water temperature and salinity was 20 °C and 34, respectively.

チグリオプスと同じハルパクチス目の海産カイアシ類 *Tisbe longicornis*<sup>15)</sup>, *Tisbe battagliai*<sup>16)</sup> および *Nitocra spinipes*<sup>17)</sup>, カラヌス目の海産カイアシ類 *Acartia clausi*<sup>18)</sup>, *Acartia tonsa*<sup>19)</sup> および *Eurytemora affinis*<sup>20)</sup> を用いた Cr(VI)、PCP-Na ならびに有機スズ化合物の急性毒性が報告されているが、発育段階、試験条件が異なるため単純に比較できない。したがって以下に試験条件 (ふ化後 24 時間未満の幼生、曝露時間: 24 時間) が近いミジンコ類の報告とチグリオプスノープリウス幼生との感受性の比較を行った。

オオミジンコ幼生に対する Cr(VI) の急性毒性が Stepheson and Watts<sup>21)</sup> により研究され、遊泳阻害を指標にした急性毒性、すなわち 24-h EC<sub>50</sub> は 0.26 ~ 0.54 mg/L と報告している。チグリオプスに対する Cr(VI) の EC<sub>50</sub> は、オオミジンコに比較して約 120 倍大きい値であった。すなわち、Cr(VI) の急性毒性は、オオミジンコに比べてチグリオプスに対して弱い傾向である。一般的に重金属元素の水生生物に対する

毒性は試験用水の硬度に依存し、硬度が大きくなるにしたがって毒性が低下することが報告されている<sup>22,23)</sup>。これは硬度成分と重金属元素が反応して錯体を形成するために、重金属元素の毒性が緩和されると考えられている<sup>24)</sup>。田端<sup>25)</sup> は 6.25 mg/L から 400 mg/L の硬度におけるミジンコに対する重金属元素の急性毒性の変化を研究し、Cr(VI) の LC<sub>50</sub> は硬度 6.25 mg/L での 0.06 mg/L から硬度 400 mg/L での 0.6 mg/L と約 10 倍の変動を示すことを明らかにした。チグリオプスとオオミジンコの急性毒性の差異 (約 120 倍) は試験用水の硬度により引き起こされる変動に比べて大きい。したがって、両種の急性毒性の差異は硬度による変動の他に両種の Cr(VI) に対する感受性の差異も考えられる。すなわち、チグリオプスの Cr(VI) に対する感受性はオオミジンコに比較して低いことが推察される。

PCP-Na のオオミジンコに対する 24-h EC<sub>50</sub> は 0.8 mg/L<sup>26)</sup> と報告されている。これらの値に比較すると、本研究で得られた 24-h EC<sub>50</sub> はオオミジンコの遊泳阻害を引き起こす毒性値と大差なかった。したがって、チグリオプスは PCP-Na に対してオオミジンコと同様な感受性を有すると考えられる。

TBTCI のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の遊泳阻害に対する毒性値は明らかではないが、酸化トリブチルスズ (TBTO) のオオミジンコ幼生に対する 24-h LC<sub>50</sub> は、8.58 μg/L (5.48 ~ 13.40 μg/L) と報告されている<sup>27)</sup>。チグリオプスノープリウス幼生に対する TBTCI の急性毒性は、同じトリブチルスズ化合物である TBTO のオオミジンコ幼生に対する毒性と概ね一致する。

一方、TPTCI と同じトリフェニルスズ化合物である水酸化トリフェニルスズ (TPTOH) のミジンコ類の幼生に対する急性毒性が研究されている。すなわちネコゼミジンコ属の一種 (*Ceriodaphnia dubia*)、ミジンコ (*Daphnia pulex*) およびオオミジンコに対する TPTOH の 48-h EC<sub>50</sub> はそれぞれ 11.3 μg/L、14.5 μg/L および 16.5 μg/L と報告されている<sup>28)</sup>。チグリオプスノープリウス幼生に対する TPTCI の急性毒性値は、TPTOH のミジンコ類の幼生に対する数値より明らかに低いと推察される。

以上、Cr(VI)、PCP-Na、TBTCI および TPTCI の限られた有害物質に対する試験結果ではあるが、これら有害物質に対するチグリオプスとミジンコ類の感受性の差異を比較すると、有害物質の種類によって異なることがわかったが、チグリオプスノープリウスの有害物質に対する感受性はミジンコ類に比べて著しく低いとは考えられない。したがって本種は動物プランクトンの毒性試験の試験生物として用いる

ことができると考えられる。

## 引用文献

- 1) 日本規格協会. 1997. 化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験法 JIS K0229(1992), JIS ハンドブック環境測定, 日本規格協会. pp. 1354-1361.
- 2) 農林水産省. 1965. 農薬取締法(農林省農政局長通達 B 第 2735 号).
- 3) 木下秀明. 1996. 試験生物の飼育(及び繁殖)技術の確立, 平成 7 年度有害物質漁業影響調査報告書(魚介類水質環境基準検討調査事業), 水産庁. 11-51.
- 4) 山路 勇. 1980. 日本海洋プランクトン図鑑(増補改訂版), 保育社. pp. 387-388.
- 5) 北島 力. 1985. 生物餌料, 養魚飼料-基礎と応用, 米 康夫編, 恒星社厚生閣. pp. 82-83.
- 6) 高野秀昭. 1968. かわった養殖 シオダマリミジンコ. 養殖, 5, 105-108.
- 7) 古賀文洋. 1970. *Tigriopus japonicus* Mori かいあし類の生活史について. 日本海洋学会誌, 26, 11-21.
- 8) 大森 信, 池田 勉. 1976. 動物プランクトン生態研究法, 共立出版. pp. 229.
- 9) 堀 英夫, 立石晶浩, 山田 久. 海産動物プランクトンによる有害物質急性毒性試験法の開発. 環境毒性学会誌(印刷中).
- 10) Hagiwara, A., SC. Lee, DJ. Shiraiishi. 1995. Some reproductive characteristics of the broods of the Harpacticoid copepode *Tigriopus japonicus* cultured in the different salinities. *Fisheries Science*, 61, 618-622.
- 11) (財)化学品検査協会. 1981. ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験, OECD 化学品テストガイドライン第 1 巻(通商産業省基礎産業局化学品安全課監修), 第一法規出版. pp. 843-855.
- 12) 吉村功編. 1987. 毒性・薬効データの統計解析, サイエントリスト社. pp. 232.
- 13) 吉村 功, 大橋靖雄編. 1992. LD<sub>50</sub> などの推定, 毒性試験データの統計解析(毒性試験講座 14), 地人書館. pp. 135-145.
- 14) 木村 都, 砂田久一, 辻 和男. 1997. 50%反応値(LD50, ED50 など), 生物検定のための応用推計学, 廣川書店. pp. 139-161.
- 15) Larrain, A., E. Soto, J. Silva, E. Bay-Schmith. 1998. Sensitivity of the meiofaunal copepod *Tisbe longicornis* to K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> under varying temperature regimes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 391-396.
- 16) Hutchinson, T. H., T. D. Williams, G. J. Eales. 1994. Toxicity of cadmium, hexavalent chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*). *Mar. Environ. Res.*, 38, 275-290.
- 17) Linden, E., B-E. Bengtsson, O. Svanberg, G. Sundstrom. 1979. The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organism, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the Harpacticoid *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, 11/12, 843-851.
- 18) Maraitou-Apostolopoulou, M., G. Verriopoulos. 1982. Toxicity of chromium to the marine planktonic copepod *Acartia clausi*, Giesbrecht. *Hydrobiologia*, 96, 121-127.
- 19) Kusk, KO., S. Petersen. 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1629-1633.
- 20) Bushong, SJ., LW. Hall Jr., WS. Hall, WE. Johnson, RL. Herman, 1988. Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake bay fish and invertebrates. *Wat. Res.*, 22, 1027-1032.
- 21) Stephenson, RR., SA. Watts. 1984. Chronic toxicity test with *Daphnia magna*, the effects of different food and temperature regimes on survival, reproduction and growth. *Environmental Pollution*, 36, 95-107.
- 22) 西川克夫, 田端健二. 1969. 水産動物に及ぼす重金属の毒性とその緩和要因に関する研究 - III, 数種金属錯体の低毒性. 東海水研報, 58, 233-241.
- 23) 田端健二. 1968. 水産動物に及ぼす重金属の毒性とその緩和要因に関する研究 - II, 重金属イオンの毒性に及ぼす水中硬度成分の拮抗作用. 東海区水研報, 58, 614-622.
- 24) WHO, UNEP, ILO. 1987. Effects on organisms in the environment, Pentachlorophenol, Environmental Health Criteria 71, Geneva, 114-135.
- 25) URL, <http://www.epa.gov/ecotox/>
- 26) Kline, E. R., A. W. Jarvinen, M. L. Knuth. 1989. Acute toxicity of triphenyltin hydroxide to three cladoceran species. *Environ. Pollut.* 56, 11-17.

< 堀 英夫, 山田 久 >