

II-5. 海産魚類慢性毒性試験法（初期生活段階毒性試験法）

1. 初期生活段階毒性試験法の概要

魚類の慢性毒性試験は、稚魚期から成熟・産卵に至るまでを試験する部分生活環毒性試験と、より長期間の受精卵から成熟産卵に至るまでの試験を行う全生活環毒性試験に分類される。これらにより、最大許容濃度(MATC、Maximum acceptable toxicant concentration)を推測する。しかし、これらの試験は長期間に及ぶため、より短時間で結果が得られる簡便な試験法として、汚染物質に対する感受性が高い時期を試験する初期生活段階毒性試験があげられる。この初期生活段階毒性試験は、受精卵からふ化仔稚魚期にかけて2ヶ月程度の暴露試験を行うもので、最大許容濃度を正確に推測することができる。しかし、我が国に沿岸域に生息する海産魚では、ふ化後の飼育等の問題があるため、初期生活段階毒性試験に供することが難しい。そこで、受精卵から仔稚魚の飼育の容易な海産魚であるアメリカ原産のメダカ目広塩魚、マミチヨグ(*Fundulus heteroclitus*)を用いた初期生活段階毒性試験法について述べる。

本試験によりまず、マミチヨグの最小影響濃度(LOEC、lowest observed effect concentration)を求め、それによって無影響濃度(NOEC、no observed effect concentration)を決定する。これと平行し、マミチヨグの急性毒性試験を行って急性毒性値を求める。無影響濃度と急性毒性値から急性慢性毒性比(ACR、acute-to-chronic toxicity ratio)を算出する。ここで算出された急性慢性毒性比は、汚染物質によって異なるが、魚種による差異は少ないとされている^{1,2)}。そこで、マミチヨグで求めた急性慢性毒性比を用いて、日本沿岸域の各種海産魚の急性毒性値を求めておけば、以下の式によりそれら海産魚の無影響濃度が推測される。

$$\frac{\text{マミチヨグ急性毒性値}}{\text{マミチヨグ無影響濃度}} = \frac{\text{メダカ急性毒性値}}{\text{メダカ無影響濃度}}$$

本節では、小型水槽内でのマミチヨグ初期生活段階毒性試験法(受精卵から仔稚魚の時期までの毒性試験)について2. 試験法で述べ、ついで3. 試験法の解説でこの試験法についての解説を行う。そのために2. 試験法で解説の必要な箇所に注を付け、それぞれについて3. 試験法の解説で解説を行う。さらに、実際の試験に結果について、4. マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験法の実例で述べる。

2. 試験法

魚類初期生活段階毒性試験法については、OECD化学品テストガイドライン³⁾にその手法が述べられており、淡水魚のファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*)等の数種の魚種が推奨されている⁴⁾。しかし、淡水魚と海産魚の有害化学物質の毒性に対する感受性は異なることが報告⁵⁾されており、海産魚を用いた初期生活段階毒性試験の開発が望まれている。現在、海産魚で各種毒性試験に用いら

れている魚種にはマダイ、ヒラメ、シロギス等があるが、いずれも卵が小さい、ふ化仔魚の餌料確保が難しい等の問題があるため、小型水槽中で受精卵から仔稚魚までの暴露試験は容易ではない。そこで、本試験では海産魚を用いた試験法について、前述のOECD化学品テストガイドラインの手法に準じながら、供試魚として水槽内での繁殖が可能で、受精卵から仔稚魚の飼育の容易な海産魚であるアメリカ原産のメダカ目広塩魚、マミチヨグ(図II-5-1)を用いた初期生活段階毒性試験法について述べる。

1) 試験法の原理

本試験はマミチヨグ受精卵から少なくとも対照区全てのふ化仔魚が自由に摂餌できるようになるまでを被験物質に暴露し、致死(ふ化率、生残率など)、成長、運動能などへの影響を観察し、対照区の値と比較することにより、最小影響濃度(LOEC)を求め、それによって無影響濃度(NOEC)を決定する。試験は流水条件下で行うのが望ましい。

* LOECは対照区と比較したときに被験物質の有意な影響が($p < 0.05$)観察される被験物質の最も低い濃度である。しかし、LOEC以上の全ての試験濃度ではLOECで観察されたものに等しいかあるいはそれ以上の有害な影響がなければならぬ。

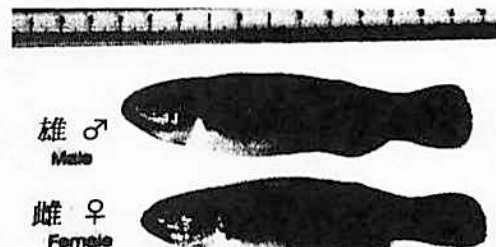
** NOECはLOECのすぐ下の試験濃度である。

2) 試験の準備

あらかじめ急性毒性試験(注1)を行い、その試験で用いた供試魚と同種魚種を用いる。本試験ではマミチヨグを用いてあらかじめ急性毒性試験を実施する。ここで得られた急性毒性値に基づき初期生活段階毒性試験における濃度範囲(例えば96時間 LC_{50} の1/100-1/10000で濃度段階を $10^{1/2}$ でとる)を決定する。

(1) 供試魚等

マミチヨグ受精卵を用いる(注2)。



マミチヨグ

Mummichog (*Fundulus heteroclitus*)

図II-5-1 マミチヨグ成魚

(2) 試験用水

塩分を満足する沿岸水を使用する。沿岸水が入りできない場合、市販の黒潮海水も使用できる(注3)。

(3) 器具および装置

①試験水槽

後述する供試魚受精卵を収容できるようなガラス製水槽を用いる。

②流量

24時間当たり少なくとも試験水槽容量の5倍に相当する流量が適切であることが知られており、これ以上の流量にする。マミチヨグの試験例では、毎分500mlとした。このときの24時間当りの流量は試験水槽(60cm水槽、容積50L)の14.4倍に相当する。

③温度調節器

上記の流量を満たし、なおかつ試験水の温度を±1℃の範囲に保つことができる温度調節器を用いる。

④流水式装置

微量定量ポンプ(図Ⅱ-5-2)によって、被験物質を試験用水に連続的に添加する定濃度流水式試験装置を用いる。

⑤助剤

適切な濃度の保存溶液の調製には分散剤(可溶化剤)等の助剤が必要な場合もあり、このときは助剤のみ添加した助剤対照区を設ける。この助剤対照区にも定濃度流水式試験装置を用いる。

⑥試験排水

暴露後の試験物質を含む試験後の排水は、排水処理施設で処理した後に放流しなければならない。

3) 試験条件

(1) 水温

16~22℃とする(注4)。

(2) 塩分

31以上35以下(注5)。

(3) 酸素飽和度

60%以上とする(注5)。

(4) 収容密度

試験開始時の受精卵は、1濃度区当たり80~100個以上を用いる。卵は処理区の間で無作為に配分し、通常の毒性試験に用いる60cmガラス水槽中に大型の目の細かい観賞魚用ネットを利用した孵化槽を設け、その中に受精卵を収容する(図Ⅱ-5-3参照)。

(5) 試験濃度

急性毒性試験におけるLC₅₀値と暴露期間との関係を参考にして試験濃度範囲を決め(注6)、5濃度区を設定する。96時間LC₅₀値あるいは10mg/Lのどちらか低い方の被験物質濃度以上で試験する必要はない。また、助剤を用いる場合には希釈海水の対照区に加え助剤を含む対照区をも設け、その濃度は0.1ml/Lを超えないようにする(注6)。

4) 操作

流水式の試験装置(図Ⅱ-5-4)をセットし、試験物質を各濃度区の所定の濃度となるように準備する。さらに分散剤として有機溶剤等の助剤を用いた場合には助剤対照区も準備する。

試験は卵の受精後可能な限り早く始める。試験期間は

受精卵から8週~10週程度とする。

孵化仔稚魚に対する餌料と給餌はきわめて重要であり、各成長段階に対し適切な餌料を、適切な時期から正常な成長の維持に十分な量を与えることが必須である。餌は飽食量を与えるが、残餌はできるだけ少なくする。残餌や糞は1日1回以上できるだけ頻りに除去し、排泄物が蓄積しないようにする。マミチヨグでは、大型の観賞魚用ネット(目の細かいもの)を利用した孵化槽を設け、その中に受精卵を収容する。仔魚が孵化してもそのまま飼育を続け、孵化後24時間以内のアルテミア幼生を孵化仔魚に与える。ネットによって海水の流通と仔魚の流失防止を両立させることができ、また、アルテミア幼生の流出もある程度防げるので、1日2回の投餌で24時間にわたって十分なアルテミア幼生を飼育槽内に保つことができる。孵化4週後にネットを取り除き、同時に餌を市販の初期飼料に切り替える。

試験期間中は溶存酸素、pH、塩分、水温を1日1回以上測定する。

ふ化と生残に関する観察は1日に1回行う。死亡した胚、仔稚魚は速やかに取り除く。また、異常な生物は死亡したときのみ取り除く。

死亡の判断基準は成長段階により異なり、以下の項目により判定する。

卵 - 半透明性の顕著な消失や白濁。

胚 - 体の動きや心拍の欠如。

仔稚魚 - 遊泳停止、呼吸運動や心拍の欠如、機械的刺激に対する反応の欠如など。

さらに、体形の異常な仔稚魚の数、過度の鰓蓋運動、異常な遊泳等の行動異常等についての観察を行い、試験終了時の全ての生残魚について体重・体長の測定も併せて行う。

これらの観察により累積死亡率、試験終了時の健常魚数、孵化開始から終了までの期間、各日に孵化した仔魚数、奇形魚数、異常な行動の認められた個体数、生残した個体の体重・体長に関するデータを得る。

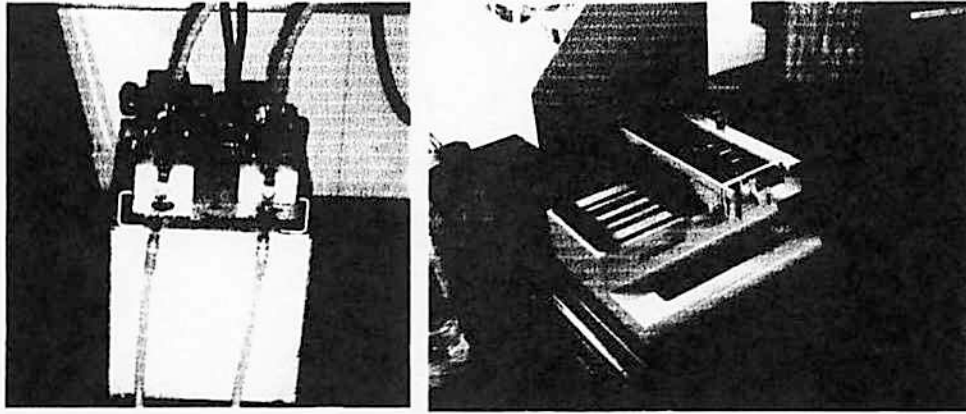
5) 結果の解析およびとりまとめ

得られたデータからどの濃度で影響が表れたかを比較検討し、影響の認められなかった濃度(NOEC)およびそれのすぐ上の濃度(LOEC)を求めらる。

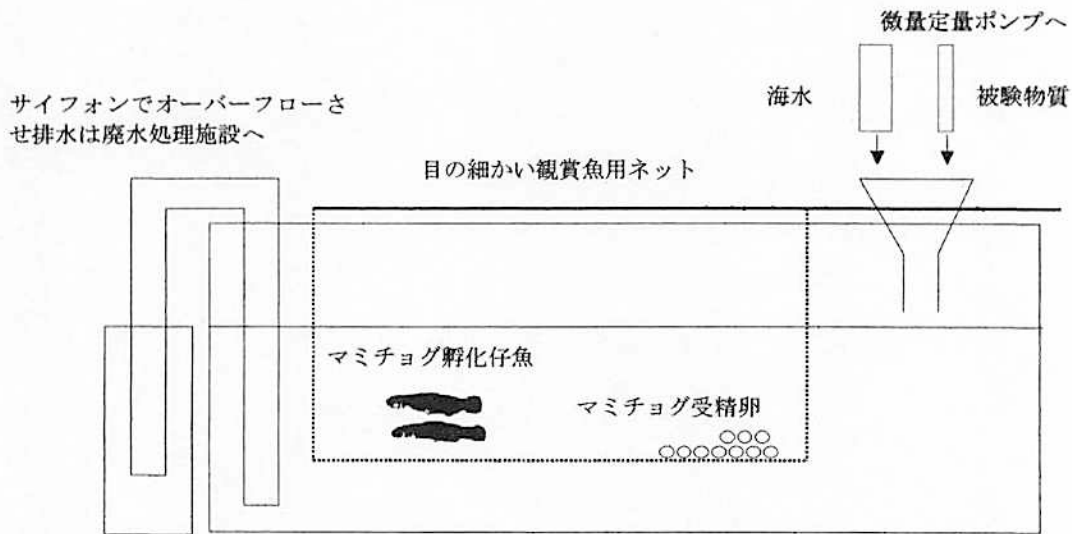
3. 試験法の解説

注1 急性毒性試験法は、OECD化学品テストガイドライン 魚類急性毒性試験⁶⁾に記載されている手法および本書のⅡ-4で解説した方法に準じて行う。用いるマミチヨグは体重1g程度の小型の個体(孵化後10週以内のもの)を用いる。

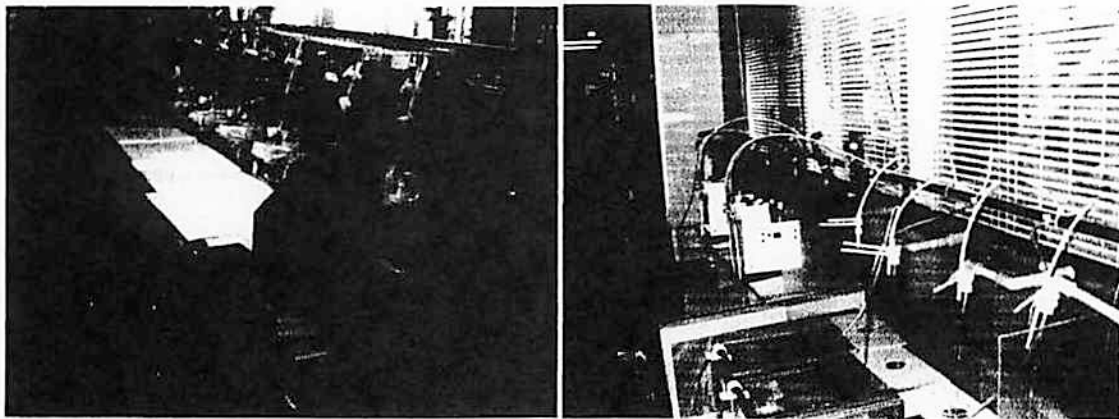
注2 マミチヨグの産卵期は自然日長下では3月下旬ころから8月までである。したがって、この時期に試験を行わなければならない。ただし、2月ころであれば16Lの長日処理により4週ほどで成熟させることができるので、3月初旬ころには試験を開始できる。しかし、不応期である9月から11月にかけては日長による刺激を受け付けないため、長日処理により成熟を促進することはできないので、この時期に試験を行うことは困難である。マミチヨグ雌は体重の約5%程度を毎日産卵する。受



図II-5-2 暴露試験に用いる微量ポンプの一例(左:ガラスポンプ、右:シリンジポンプ)

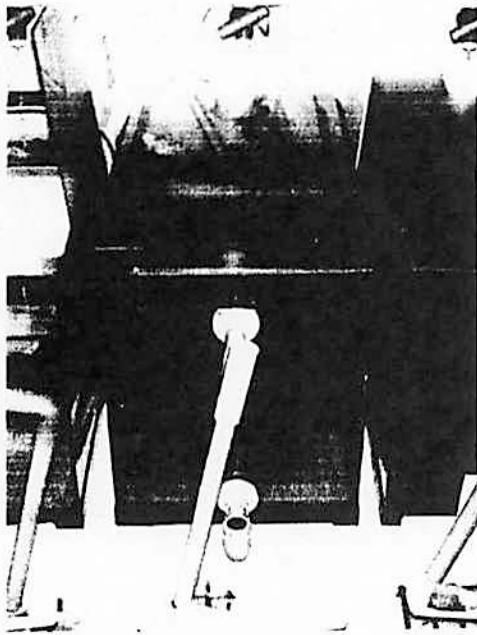


図II-5-3 マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験法の実験装置例



図II-5-4 流水式実験装置の例

精卵1個は約7mgであるから、産卵数は体重30g程度の雌1尾で日に約200粒の卵を産卵することになる。マミチヨグ受精卵は軽い粘着性のある沈性卵である。容量50L程度の水槽に雌雄を同居させておくと容易に産卵するが、そのままでは親が卵を食べてしまうので、底に目合い2~3mmのプラスチック製スクリーンを敷いて捕食できないようにする(図II-5-5)。スクリーンをはずして底をネットでさらうことにより受精卵を安定して得ることができる。試験には、同一の親魚から同日に得られた受精卵を直ちに用いる。受精卵の採取時期が異なるとふ化率や生残率に差異が生じ、被験物質の影響を正確に評価することができない。



図II-5-5 マミチヨグ受精卵と親魚とを隔離するスクリーンの例

注3 使用する海水中に試験物質の毒性を変化させる物質が含まれている可能性もあるため、活性炭ろ過海水を使用するのが望ましい。

注4 孵化水温は16~22℃の範囲が適当と思われる。なお、25℃以上の高水温で孵化させると雄の割合が高くなることが確認されている。

注5 マミチヨグは広塩性であり、成魚は淡水でも海水でも飼育することができる。しかし、孵化仔魚の生残は淡水では観察されていないことから、試験に用いる海水は日本近海の沿岸水(塩分31~35)が適当と思われる。

マミチヨグのふ化についての酸素飽和度の影響は不明であるが、マダイの急性毒性試験では70%以上の飽和度を推奨しているため、これに準じた。

注6 初期生活段階毒性試験の濃度設定は、同一魚種を用いた急性毒性試験の結果を参考にし、例えば96時間LC₅₀の1/100から1/10000の範囲で公比3.2を超えないように濃度区を設定する。

被験物質の濃度は設定濃度の80%以上に維持されるこ

とが望ましいが、揮発性物質、吸着性のある物質または分解しやすい物質等濃度低下が生じやすい物質の試験等も行うことを合わせて考えると、試験期間中、被験物質の濃度を一定間隔で測定する必要がある。測定の回数は1週間に1回を目安にする。

4. マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験法の実例

試験法の一例として、実際に数種の試験物質について暴露方法も含め、マミチヨグの受精卵の発眼率、ふ化率、孵化仔魚の生残成長率、仔稚魚の形態異常等の各測定項目に影響を与える濃度を検討した結果を記載する。

1) 各種汚染物質の初期生活段階毒性試験の実例

(1) 初期生活段階毒性試験法

上記の方法でマミチヨグのTBTO、TBTC1、カドミウム(以下Cdと略す)およびナフタレンに対する初期生活段階毒性試験を行った。濃度区については、TBTOの試験区は対照区(C)、低濃度区(L)、中低濃度区(ML)、中濃度区(M)、中高濃度区(MH)、高濃度区(H)および高高濃度区(HH)の7区を、TPTC1の試験は対照区(C)、低濃度区(L)、中低濃度区(ML)、中高濃度区(MH)および高濃度区(H)の5区を、Cdの試験は対照区を2区(C1およびC2)、低濃度区(L)、中低濃度区(ML)、中濃度区(M)、中高濃度区(MH)および高濃度区(H)の7区を、ナフタレンの試験は対照区(C)、低濃度区(L)、中濃度区(M)および高濃度区(H)の4区をそれぞれ設けた。TBTOおよびTPTC1原液はアセトン溶液、Cd原液は塩化カドミウム水溶液、ナフタレン原液はHCO40およびアセトン溶液とした。これらの原液を脱塩素した水道水に添加した試験液を各濃度区に添加した。産卵後1日以内の受精卵を各水槽に約80個ずつ収容し、水温20℃の流水式試験とした。供試魚は一定期間ごとに取り上げ、MS222で麻酔した後に全長をノギスで測定し、ペーパータオルの上で海水を除去してから各個体の体重を測定した。また、試験区ごとに肉眼的な形態異常の認められる個体を記録した。また、本書II-4で解説した方法に準じ平均体重約1gの稚魚を用いて、TBTO、TBTC1、Cdは水温20℃の24時間換水の半止水式で、ナフタレンは水温20℃の流水式でそれぞれ急性毒性試験を行った。

2) マミチヨグを用いた各種汚染物質に関する初期生活段階毒性試験の結果

(1) TBTOに対する初期生活段階毒性試験の結果

TBTOのLC₅₀は24時間値が53μg/L、48時間値が32μg/L、72時間値が19μg/L、96時間値が13μg/Lであった。

初期生活段階毒性試験海水中のTBTO平均実測濃度(ガスクロマトグラフ法で測定)はL区が0.01、LM区が0.09、M区が0.27、MH区が0.83、H区が2.3、HH区が9.1μg/Lであった。

各試験区におけるふ化率と、孵化直後から4週目、および孵化後4週目から8週目までの生残率を

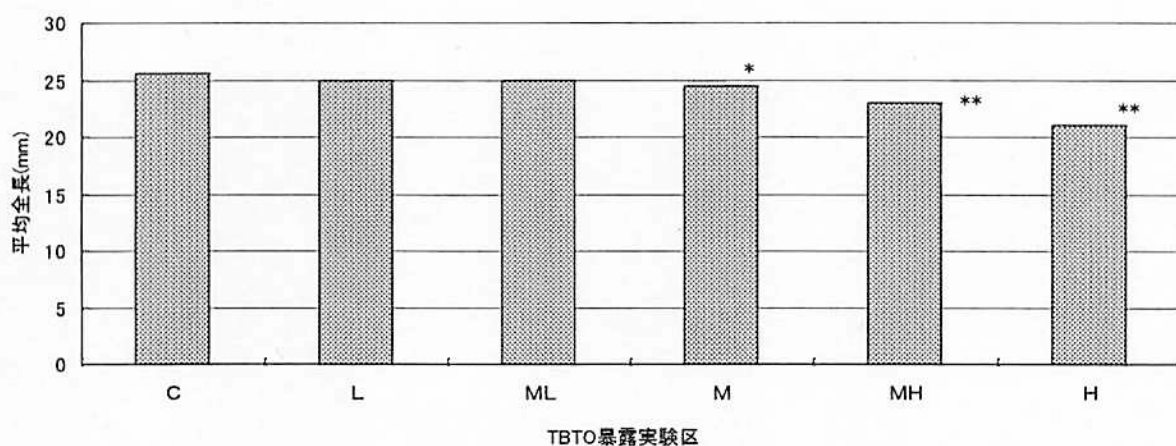
表II-5-1に示す。対照区のふ化率は87%と高く、L区からH区にかけての暴露区でもほぼ80%以上を示したが、HH区では約50%と著しく低かった。孵化直後から4週目にかけての生残率は対照区とL区からMH区にかけての暴露区ではほぼ95%以上を示したが、H区では約90%とわずかに低

く、HH区では30%と著しく低かった。4週目から8週目にかけての生残率は対照区、L区からH区にわたる暴露区はほぼ100%であり、HH区のみ約60%と明らかに低かった。肉眼的な形態異常は4週目のL区で1個体(眼球異常)、8週目のL区で2個体(眼球異常と骨曲り)、8週目のML区で3個体(骨曲り2個体と短軀1個体)が認められた。他の区では異常は認められなかった。

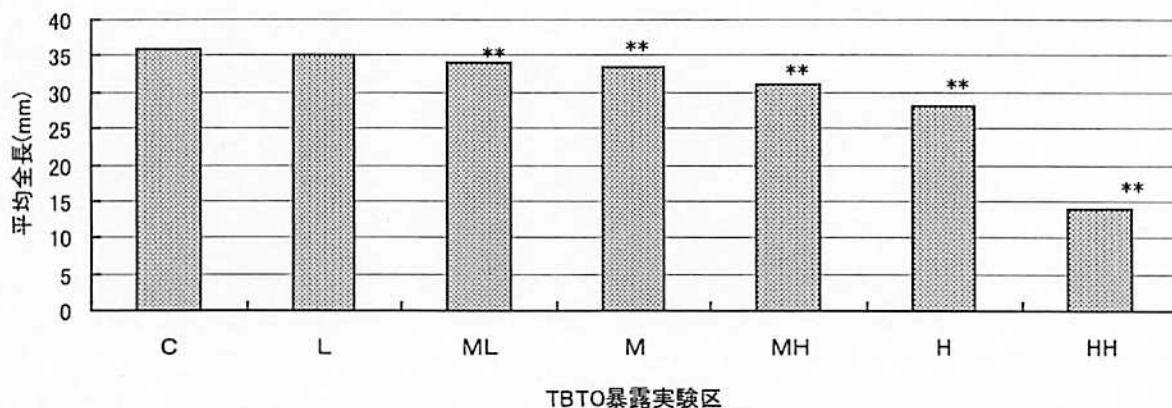
孵化後4週目サンプリングにおける各区個体の全長の測定結果を図Ⅱ-5-6に、8週目のサンプリングにおける全長の測定結果を図Ⅱ-5-7に示す。4週目では、M区、H区およびHH区において平均全長が対照区よりも有意に小さかった。8週目では、暴露区はL区を除き全て対照区よりも平均全長が有意に小さくなっていた。

孵化後4週目のサンプリングにおける各区個体の体重を図Ⅱ-5-8に、8週目のサンプリングにおける体重の測定結果を図Ⅱ-5-9に示す。4週目ではH区およびHH区において平均体重が対照区よりも有意に小さかった。8週目ではHH区の平均体重は他の区に比べて著しく小さく、また、L区を除いた全ての暴露区で平均体重が対照区よりも有意に小さくなっていた。

孵化後4週目における各区の肥満度を図Ⅱ-5-10に、8週目における各区の肥満度を図Ⅱ-5-11に示す。4週目ではML区を除いた全ての暴露区で肥満度が対照区よりも有意に大きかった。また、8週目ではM区、MH区、H区およびHH区において肥満度が対照区よりも有意に大きかった。



図Ⅱ-5-6 受精卵からTBTOに孵化後4週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均全長の比較 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



図Ⅱ-5-7 受精卵からTBTOに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均全長の比較 (** $p < 0.01$)

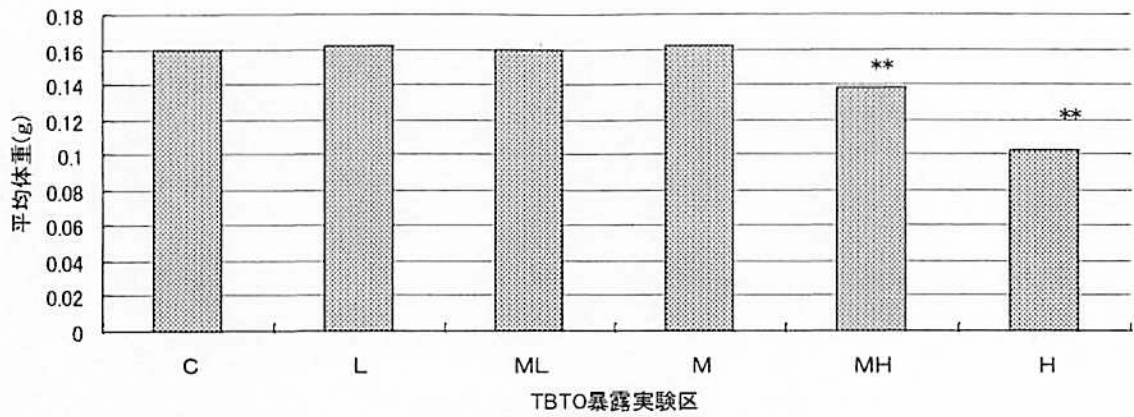


図 II-5-8 受精卵からTBTOに孵化後4週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均体重の比較(**p<0.01)

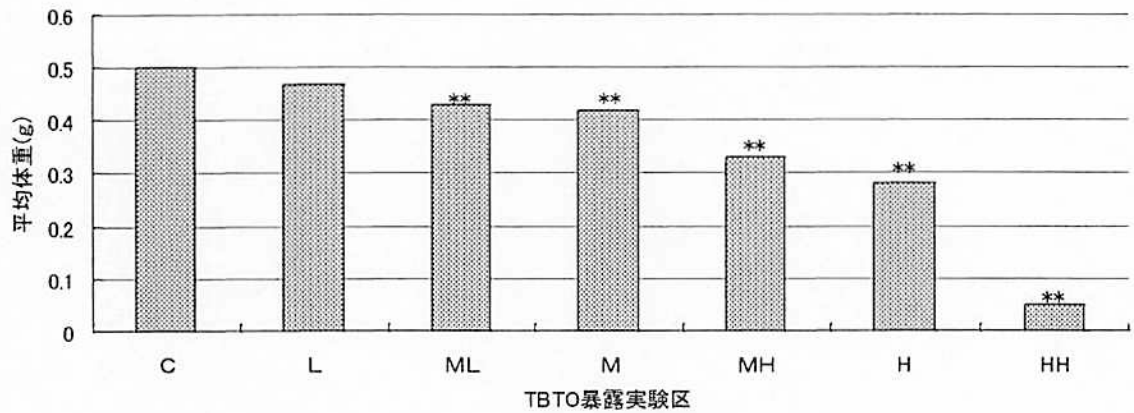


図 II-5-9 受精卵からTBTOに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均体重の比較(**p<0.01)

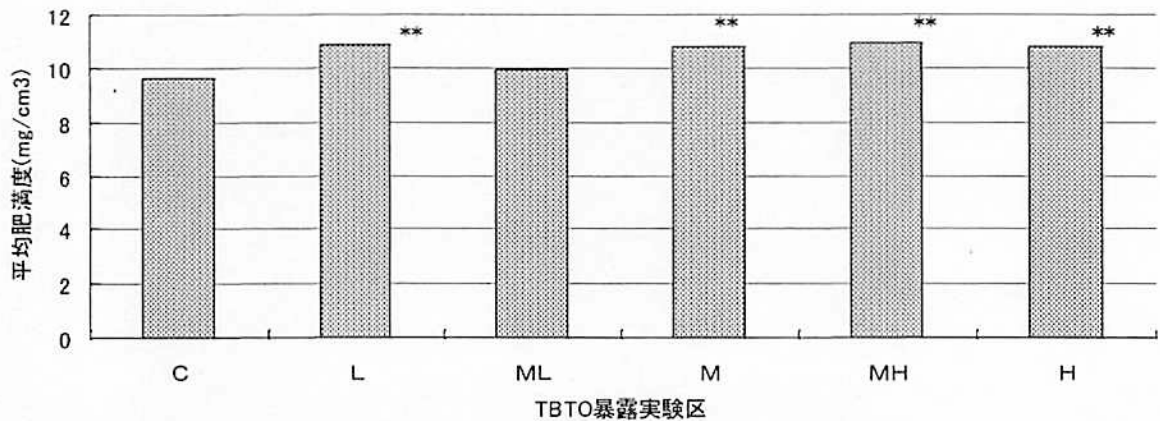
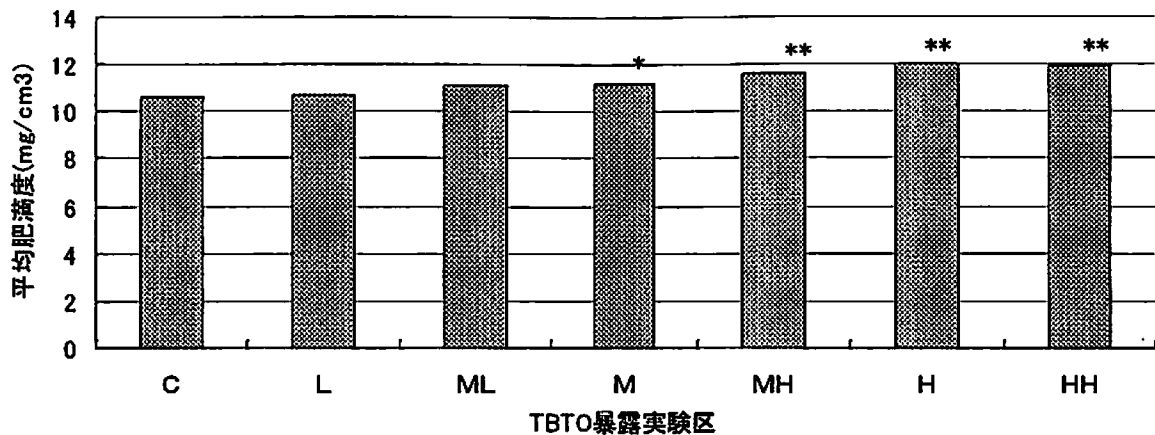


図 II-5-10 受精卵からTBTOに孵化後4週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均肥満度の比較(**p<0.01)



図Ⅱ-5-11 受精卵からTBTOに8週間暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均肥満度の比較(*:p<0.05, **:p<0.01)

(2) TPTClに対する初期生活段階毒性試験の結果

急性毒性試験によって得られたTPTClのLC₅₀はTPTに換算して48時間値が101 μg/L、72時間値が67 μg/L、96時間値が67 μg/Lであった。

ガスクロマトグラフ法で測定した初期生活段階毒性試験海水中のTPTの平均実測濃度はL区が0.16、ML区が0.70、MH区が2.2、H区が3.7 μg/Lであった。

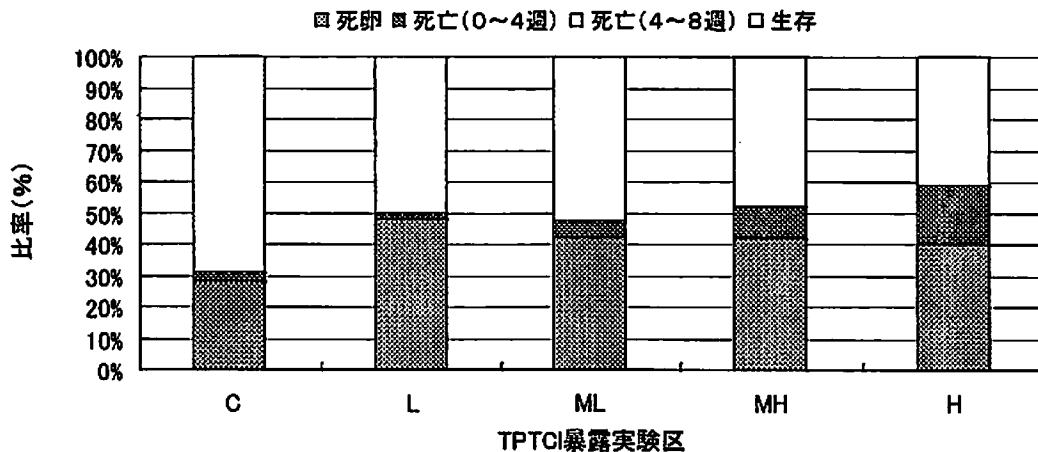
各試験区における死卵の割合と孵化直後から4週目、および4週目から8週目までの死亡率、さらに最終的な生残率を図Ⅱ-5-12に示す。対照区のふ化率は約70%で、ほかの試験区ではやや低く50~60%であった。暴露区の間ではふ化率に特に差はなかった。孵化直後から4週目にかけての死亡率は対照区、L区およびML区では5%以下であったが、MH区では10%とやや高く、H区では18%と明らか

かに高かった。4週目から8週目にかけての死亡魚は、対照区、L区、ML区、MH区では見られなかったが、H区では全ての魚が死亡した。

肉眼的な形態異常の割合は少なく、対照区で短軀が、MH区で骨曲りが、それぞれ1尾ずつ認められたのみであった。

孵化後8週目のサンプリングにおける体重の測定結果を図Ⅱ-5-13に、全長の測定結果を図Ⅱ-5-14に示す。L区、およびML区では対照区と比べて体重に有意差はなかったが、MH区では対照区よりも有意に低かった。全長も同様にMH区のみ対照区と比べて有意に小さかった。

孵化後8週目のサンプリングにおける肥満度の測定結果を図Ⅱ-5-15に示す。全ての試験区において肥満度に有意差は認められなかった。



図Ⅱ-5-12 受精卵からTPTClに8週間暴露した場合のマミチヨグの孵化率と生残率に及ぼす影響

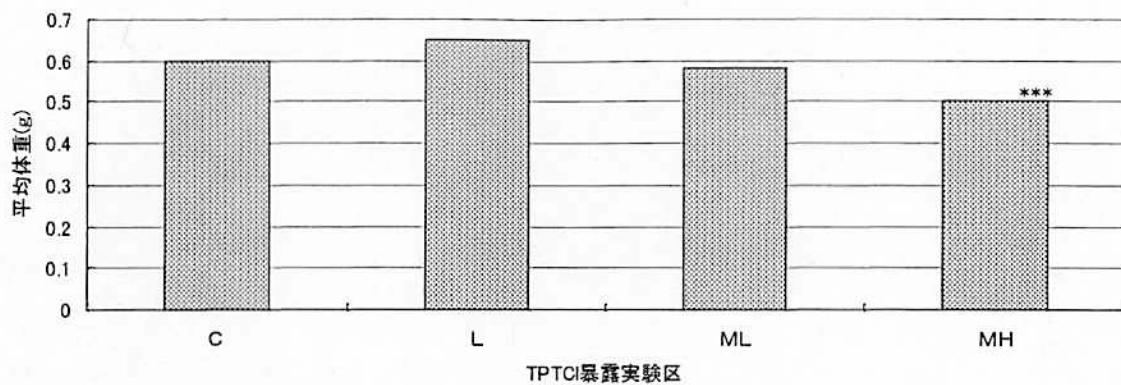


図 II-5-13 受精卵からTPTCIに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均体重の比較 (***) $p < 0.001$)

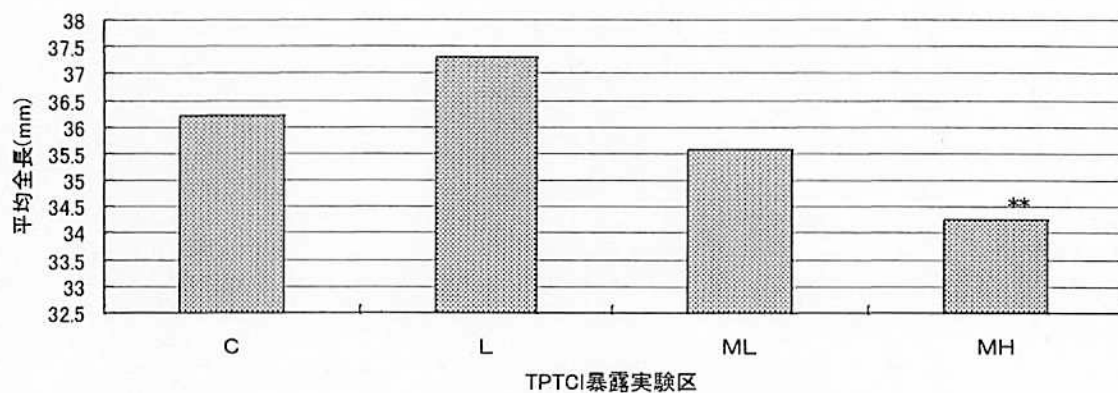


図 II-5-14 受精卵からTPTCIに8週間暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均全長の比較 (**) $p < 0.01$)

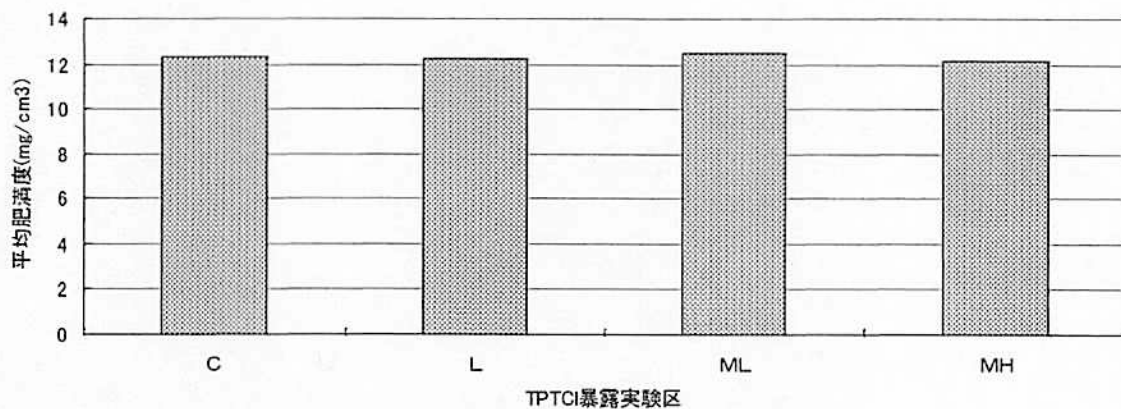


図 II-5-15 受精卵からTPTCIに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均肥満度の比較

(3) カドミウムに対する初期生活段階毒性試験の結果
カドミウムのLC₅₀は24時間値が99 mg/L、48時間値が43 mg/L、72時間値が33mg/L、96時間値が32 mg/Lであった。

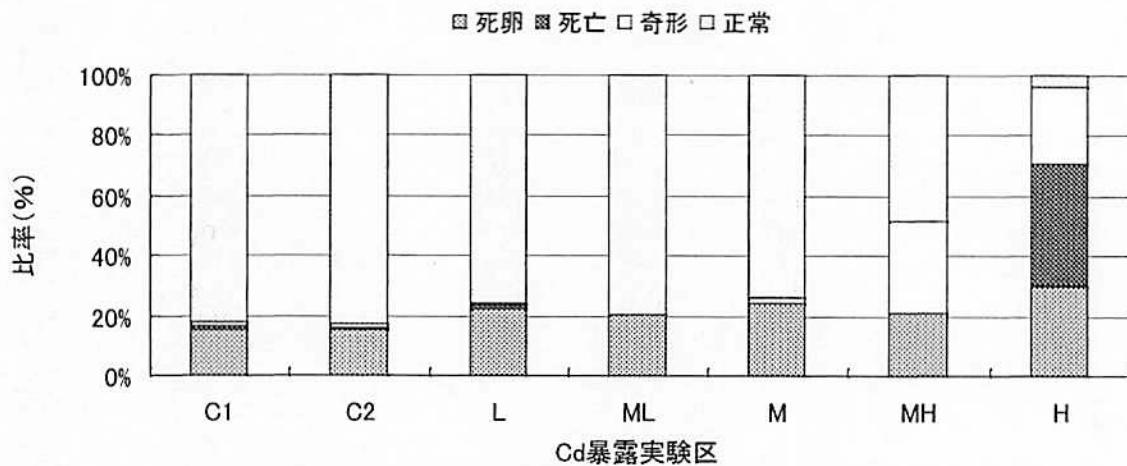
原子吸光法で測定した初期生活段階毒性試験海水中的カドミウムの平均実測濃度はL区が0.016、ML区が0.06、M区が0.15、MH区が0.53、H区が2.0 mg/Lであった。

各試験区における死卵の割合と孵化直後から8週目までの死亡魚の割合、生残した奇形魚の割合、さらに最終的に生残した正常魚の割合を図Ⅱ-5-16に示す。対照区のふ化率はともに約80%で、L区からMH区にかけての暴露区ではほとんど対照区と差がなかったが、H区のみ約70%とわずかに低かった。孵化直後から8週目にかけての死亡率は対照区とL区からM区にかけての暴露区では非常に低かったが、H区では高く、孵化仔魚の60%にも達した。対照区とL区からM区にかけての暴露区では奇形発生率も

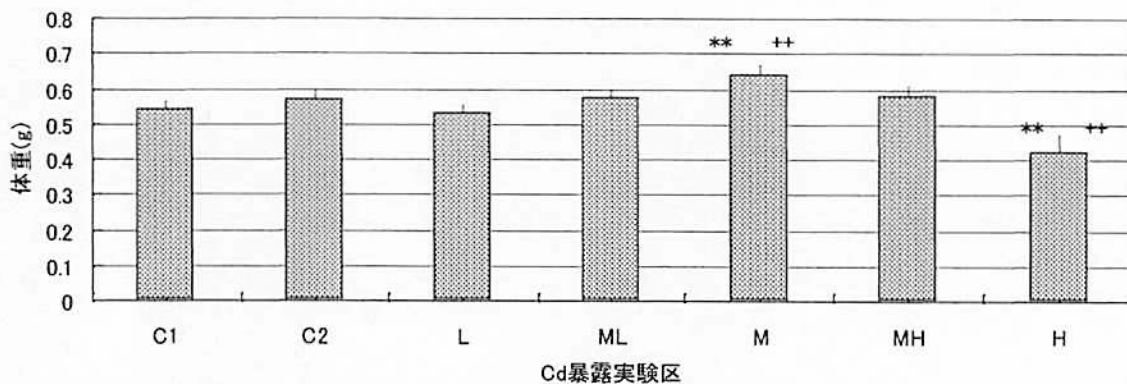
非常に低かったが、H区ではほとんどの生残魚が形態異常(骨曲り)を呈しており、MH区でも奇形魚の割合が明らかに多かった。

孵化後8週目のサンプリングにおける体重の測定結果を図Ⅱ-5-17、全長の測定結果を図Ⅱ-5-18に示す。対照区の2区の間には全長、体重とも有意差はなく、L区からMH区にかけての暴露区では対照区と比べて体重および全長がやや大きい区はあったが、有意に低い区はなかった。H区では全長、体重とも両方の対照区よりも有意に低かった。

孵化後8週目のサンプリングにおける肥満度の測定結果を図Ⅱ-5-19に示す。対照区の2区の間には肥満度に有意差はなかった。L区とML区では対照区よりも肥満度がやや低く、H区では逆に対照区よりも著しく高かった。



図Ⅱ-5-16 受精卵からCdに8週間暴露した場合のマミチヨグの孵化率と生残率に及ぼす影響



図Ⅱ-5-17 受精卵からCdに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均体重の比較(**:C1と比較して $p < 0.01$, ++:C2と比較して $p < 0.01$)

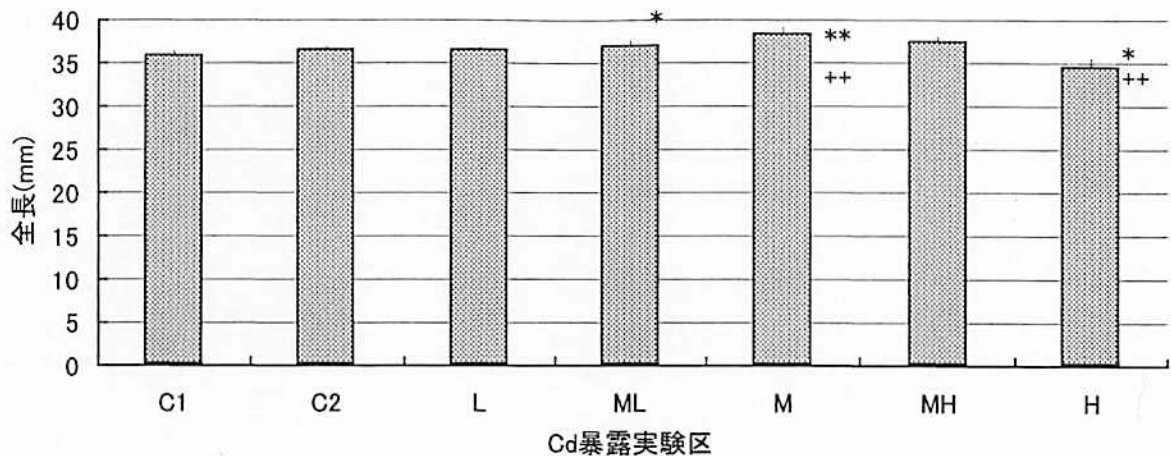


図 II-5-18 受精卵からCdに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均全長の比較(*:C1と比較して $p<0.05$, **:C1と比較して $p<0.01$, ++:C2と比較して $p<0.01$)

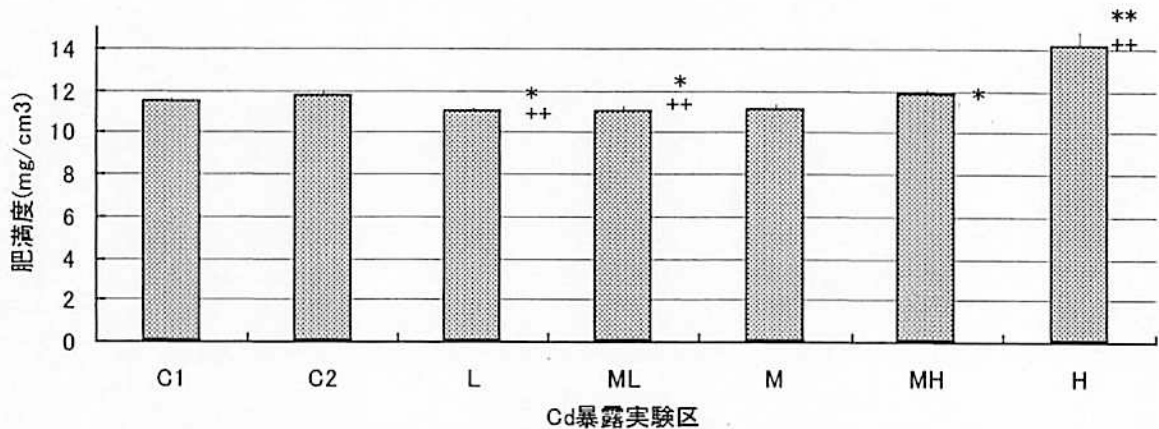


図 II-5-19 受精卵からCdに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の肥満度の比較(*:C1と比較して $p<0.05$, **:C1と比較して $p<0.01$, ++:C2と比較して $p<0.01$)

(4) ナフタレンに対する初期生活段階毒性試験の結果
ナフタレンの96時間 LC_{50} の実測値は5.86 mg/Lであった。

紫外部比色法で測定した初期生活段階毒性試験海水中のナフタレンの平均実測濃度はL区が0.048、M区が0.12、H区が0.48 mg/Lであった。

死卵の割合と孵化直後から8週目までの死亡魚の割合および最終的な生残魚の割合を図 II-5-20に示す。対照区のふ化率は約70%であり、L区からM区にかけての暴露区ではほとんど対照区と差がなかったが、H区のみ60%以下でやや低かった。孵化直後から8週目にかけての死亡

率は対照区とL区では非常に低かったが、M区とH区ではやや高かった。肉眼的な奇形はM区で2個体認められたのみであった。

孵化後8週目のサンプリングにおける体重の測定結果を図 II-5-21に、全長の測定結果を図 II-5-22に示す。L区は全長および体重とも対照区と比べて差がなかったが、M区およびH区では全長および体重とも対照区より有意に低かった。

孵化後8週目のサンプリングにおける肥満度の測定結果を図 II-5-23に示す。L区およびM区は対照区と比べて差がなかったが、H区は有意に低かった。

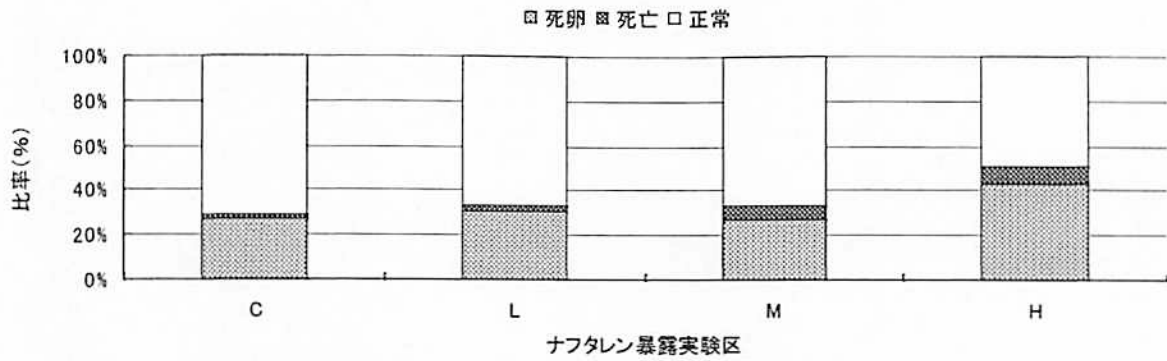


図 II-5-20 受精卵からナフタレン8週間暴露した場合のマミチヨグの孵化率と生残率に及ぼす影響

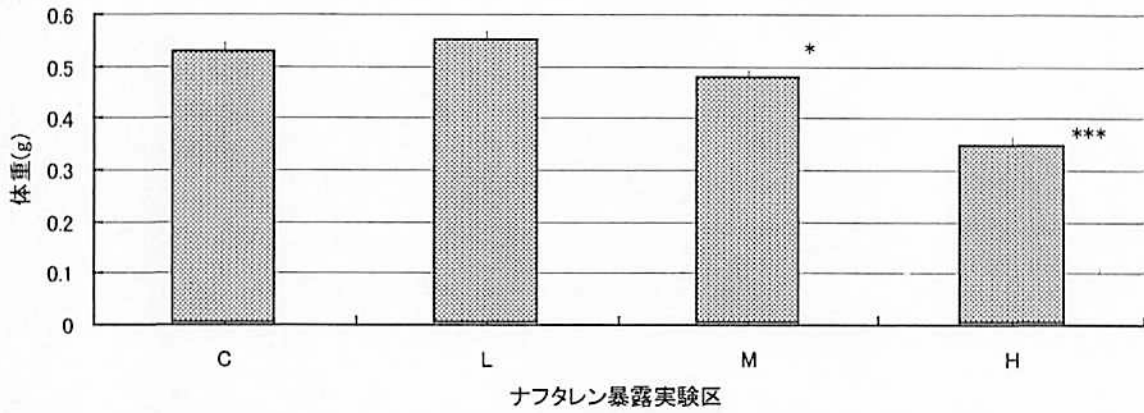


図 II-5-21 受精卵からナフタレンに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均体重の比較 (*:p<0.05, **:p<0.001)

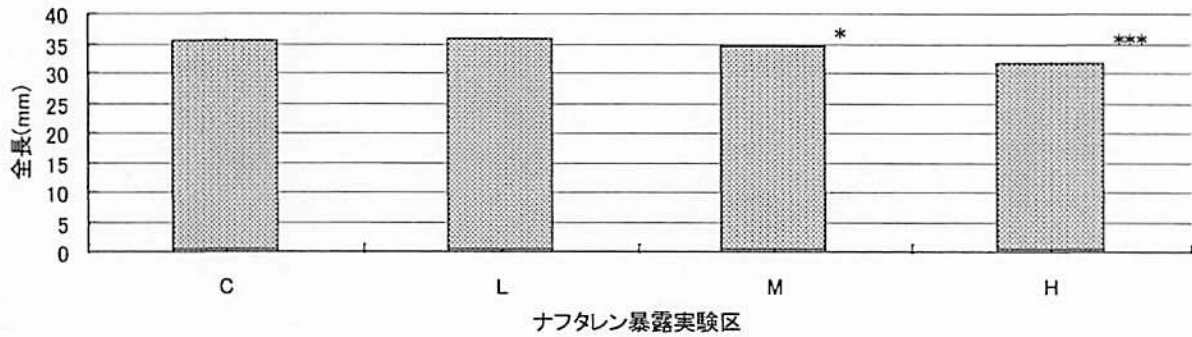


図 II-5-22 受精卵からナフタレンに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の平均全長の比較 (*:p<0.05, **:p<0.001)

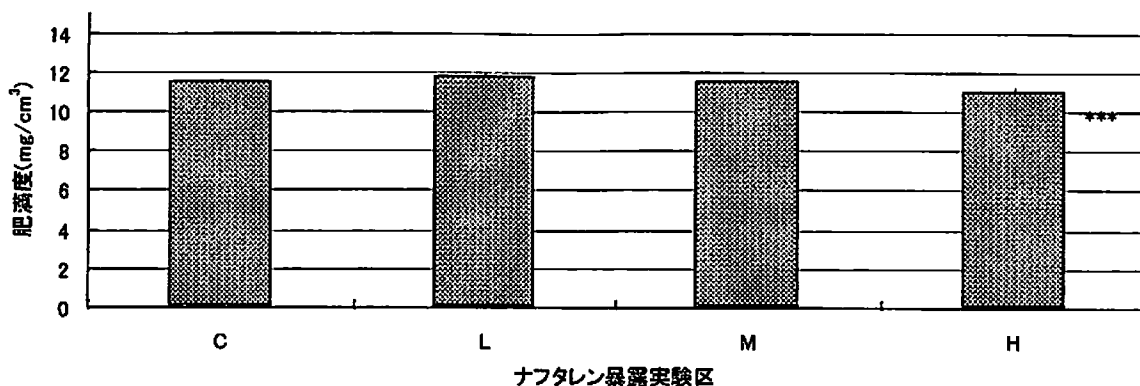


図 II-5-23 受精卵からナフタレンに孵化後8週間目まで暴露した場合のマミチヨグ孵化仔魚の肥満度の比較 (***) $p < 0.001$)

表 II-5-2 マミチヨグ初期生活段階毒性試験法によって得られた各項目ごとの無影響濃度

被験物質	孵化率	生残	成長	肥満度	奇形
TBT	2.3 μ g/L	2.3 μ g/L	0.01 μ g/L	0.01 μ g/L	-
TPT	-	2.2 μ g/L	0.7 μ g/L	-	-
カドミウム	0.53mg/L	0.53mg/L	0.53mg/L	0.53mg/L	0.15mg/L
ナフタレン	0.12mg/L	0.048mg/L	0.048mg/L	0.12mg/L	-

表 II-5-3 マミチヨグの急性毒性値および無影響濃度から算出した急性慢性比と、マダイの急性毒性値から推定したマダイの推定無影響濃度

被験物質	マミチヨグ 急性毒性値	マミチヨグ 無影響濃度	マミチヨグ 急性慢性比	マダイ 急性毒性値	マダイ 推定無影響濃度
TBT	13 μ g/L	0.01 μ g/L	1300	19.6 μ g/L	0.015 μ g/L
TPT	67 μ g/L	0.7 μ g/L	96	289 μ g/L	3.0 μ g/L
カドミウム	32mg/L	0.15mg/L	210	31.6mg/L	0.15mg/L
ナフタレン	5.86mg/L	0.048mg/L	120	1.7mg/L	0.015mg/L

3) 試験結果の取り扱いの実際

(1) TBTの無影響濃度と急性慢性比

初期生活段階毒性試験の結果から、TBTがマミチヨグの初期生活段階に及ぼす影響は、肉眼的奇形発生率に関しては明瞭ではなく、ふ化率や生残率に関してはきわめて高濃度に限られることが明らかであった。一方、成長に及ぼす影響は全長、体重ともに明確で、0.01 μ g/Lでは影響が認められないが、0.09 μ g/Lでは対照区と比べて有意に成長が劣っていた。したがって、成長を指標とした無影響濃度は0.01 μ g/Lであると考えられる。TBTの96時間LC₅₀値13 μ g/Lとこの値から急性慢性毒性比を推定すると1300となった。

(2) TPTの無影響濃度と急性慢性比

初期生活段階毒性試験の結果から考察すると、TPTが

マミチヨグの初期生活段階に及ぼす影響は、ふ化率や肉眼的奇形発生率に関しては顕著でなく、ふ化後の生残率に関しては高濃度(3.7 μ g/L)においてのみきわめて顕著であって、他の区では不明瞭であった。成長に及ぼす影響は体重、全長ともML区(2.2 μ g/L)では明らかであったが、L区(0.7 μ g/L)では認められなかった。したがって、成長を指標とした無影響濃度は0.7 μ g/Lであると結論される。L区のTPT実測濃度は96時間LC₅₀値(67 μ g/L)なので、マミチヨグにおけるこの物質の急性慢性比は96となる。

(3) Cdの無影響濃度と急性慢性比

初期生活段階毒性試験の結果から考察すると、Cdがマミチヨグの初期生活段階に及ぼす影響はふ化率に関しては顕著でなく、ふ化後の生残率、成長、および肥満度に関

しては高濃度(2.0 mg/L)においてのみ顕著であった。奇形発生率に関してはより低い濃度(0.53 mg/L)においても明らかな影響があり、0.15 mg/Lの濃度では影響が認められなかった。したがって、本種の初期生活段階におけるカドミウムの無影響濃度は0.15 mg/Lであると結論される。Cdの96時間 LC_{50} 値は32 mg/Lであるので、マミチヨグにおけるこの物質の急性慢性比は210となる。

(4) ナフタレンの無影響濃度と急性慢性比

初期生活段階毒性試験の結果から考察すると、ナフタレンがマミチヨグの初期生活段階に及ぼす影響はふ化率に関しては高濃度(0.48 mg/L)のみで影響があり、ふ化後の生残率に関しては、0.12 mg/L以上の濃度でわずかな影響があった。成長に関しては0.12 mg/L以上の濃度において明らかな影響があり、0.048 mg/Lの濃度では影響が認められなかった。したがって、本種の初期生活段階におけるナフタレンの無影響濃度は0.048 mg/Lであると結論される。ナフタレンの96時間 LC_{50} 値は5.86 mg/Lであるので、マミチヨグにおけるこの物質の急性慢性比は120となる。

(5) 汚染物質間の比較と判定基準

本課題の研究によって得られた、初期生活段階毒性試験における判定基準ごとの各種汚染物質の最小影響濃度(NOEC)を示したものが先に示した表Ⅱ-5-2である。さらに、マミチヨグの急性毒性値、成長を指標としたNOECおよび急性慢性d毒性比、マダイにおける急性毒性値およびマミチヨグ急性慢性比から推定したマダイの推定NOECの例を表Ⅱ-5-3において示す。

この表から明らかなように、初期生活段階毒性試験においては成長に対して最も低い濃度で影響の出ることが多いと考えられる。成長率の測定は簡便であり、飼育条件を良好に保てば変動も少ないと考えられるので、初期生活段階毒性試験においては最も重要な判定項目である。しかし、本課題でのCdにおける結果を見てわかるとおり、奇形発生率において最も低い濃度で影響が出る物質もあるので外部形態の観察も重要である。ふ化前の初期胚は生活段階の最も初期に位置することから、汚染物質に対する感受性も高くなる可能性が考えられるが、本課題の試験結果では、汚染物質がふ化率に及ぼす影響は小さく、最小影響濃度はふ化後の生残率への影響濃度と同じかそれ以上であった。この理由として、受精卵が物質の透過を制限する厚い卵膜で囲まれていること等が考えられるが、詳細は不明である。

引用文献

- 1) 田端健二：水生生物に対する各種水質汚染物質の半数致死濃度と長期影響限界濃度との関係。東海水研報, 98, 1-21(1979).
- 2) 田端健二：水生生物に及ぼす各種水質汚染物質の亜急性・慢性毒性について。水処理技術, 21(6), 541-560(1980).
- 3) 通商産業省基礎産業局化学品安全課監修：210魚類の初期生活段階毒性試験。「OECD化学品テストガイドラインデータ解釈指針」, P931-950, 追録第6号, 平成5年3月15日
- 4) Benoit, D. A., Puglisi, F. A., and Olson, D. L. : A fathead minnow *Pimephales promelas*

early stage toxicity test method evaluation and exposure to four organic chemicals.

Environ. Pollut. Ser. A, 28, 189-197 (1982).

- 5) 広瀬慶二・橘川宗彦：農薬の海産魚類に対する急性毒、特にTL_m値と脊椎骨異常について。東海水研報, 84, 11-20(1976).
- 6) 通商産業省基礎産業局化学品安全課監修：203魚類急性階毒性試験。「OECD化学品テストガイドラインデータ解釈指針」, P857-874, 1984.4.4.

<角埜 彰, 清水昭男>