

II-5. 石油類生態毒性試験

石油などが流出した際、石油が水中に懸濁した状態で存在し生物に影響を及ぼす場合と、石油成分の一部が水中に溶解し生物に影響を及ぼす場合とが考えられる。懸濁した石油と溶解した石油を厳密に区分できない場合があるが、ここでは溶解した成分（以下、水溶性画分）を中心にその生物に対する毒性を評価するための方法を示す。なお、大規模な石油流出事故の多くが海域で起こっていることから、ここでは海産生物に対する毒性評価法を解説する。

5.1 水溶性画分の調製方法

1) 水溶性画分

水溶性画分とは、石油と海水を混合して海水中に石油成分が十分溶解した状態の海水部分のことをいう。しかし、この海水部分には微粒子で懸濁している油滴を含むことが多いことを念頭に置いておく必要がある。この水溶性画分の調製方法は、主に Anderson *et al.* (1974) の方法に準拠した。ここで用いる器具はできる限りガラスあるいはステンレスの様な表面が不活性のものを用いる。

(1) 調製方法

石油と海水を 1:9 の割合で混合する。この際、原油などの比較的粘性の低い石油では混合割合を容量で 1:9 とすることができるが、粘性の高い C 重油など（ナホトカ号流出重油もこれに相当）では容量ではなく重量で調製せざるを得ない。このことから重量で混合割合を 1:9 となるようにする。この割合で混合した石油と海水にテフロン製攪拌子を入れ、室温で 20 時間、ゆっくりと攪拌する。Anderson *et al.* (1974) によれば、攪拌回転数は攪拌の結果生じる渦の深さが水深の 25% 以下になるようにする、となっているが、粘性の高い C 重油の場合このような渦を生じさせるためには回転数を相当速くする必要があり、過剰な回転数となる可能性がある。このような場合、生じた渦に重油が巻き込まれる程度の回転数に調整する。20 時間の攪拌の後、石油と海水が分離するまで最低 1 時間静置する。石油と分離した海水を、石油が混合しないようサイホンで抜き取り、ガラスウールでろ過したものを水溶性画分とし、必要に応じてろ過海水で希釈して以下の生態毒性試験に用いる。

2) 油処理剤混合水溶性画分

石油類が流出した場合、海上での拡散を促進する目的でしばしば油処理剤が散布されることがある。例えば 1997 年 7 月、東京湾でのダイヤモンドグレース号の原油流出事故では多量の処理剤が散布された。処理剤を散布した場合、水中に存在する石油の状態の変化することが考えられ、その結果、石油の対生物毒性が変化する可能性がある

(小山他, 1998)。このため、油処理剤混合水溶性画分を別に調製してその対生物毒性を明らかにする必要がある。

(1) 調製方法

目的とする石油類とその処理剤を一定の割合（処理剤の使用方法に石油類に対する散布量が表示されている）で添加し、十分に混合した後、この混合物と海水を 1:9 の割合で混合する。その後は上述の方法と同様に調製を行う。なお、処理剤が共存していることで海水と石油類は分離し難いため、静置時間は 1 時間程度では不十分であり、必要に応じて時間を延長する。また、処理剤で乳化して微粒子となった石油類が海水中に多く懸濁しているため、ろ過のためのガラスウールの量を多くして油処理剤混合水溶性画分を調製する。

3) 水溶性画分の油分測定

水溶性画分の油分を測定する方法はいくつかあるが、ここでは対生物毒性が強いとされる芳香族炭化水素（以下 PAH）(Anderson *et al.*, 1974, Thomas and Budiatara, 1995) の総濃度を比較的簡便に測定できる IGOSS 法（詳細は II-6, 6.1 を参照）によって油分を測定すること

表 II.5.1 流出油水溶性画分の油分経時変化（48 h 後に全量換水）

設定濃度 (%) [*]	0 hr	48 hr (換水前)	48 hr (換水後)	96 hr
Control	0.007 mg/l	0.007	0.007	nd
1.5625	0.012	0.006	0.010	0.004
3.125	0.022	0.009	0.020	0.009
6.25	0.044	0.013	0.036	0.065
12.5	0.086	0.021	0.065	0.046
25	0.18	0.059	0.14	0.096
50	0.34	0.098	0.28	0.18
100	0.68	0.22	0.56	0.41

^{*}: 水溶性画分原液の濃度を 100% とした場合の相対濃度 (nd < 0.005)

表 II.5.2 油処理剤混合水溶性画分の油分経時変化（換水なし）

設定濃度 (%)	0 hr	48 hr	96 hr
Control	0.007 mg/l	0.007	nd
1.5625	2.3	1.0	0.87
3.125	4.5	2.3	1.2
6.25	10 6.3	1.9	
12.5	22 14	7.9	
25	44 26	—	
50	83 63	—	
100	160	170	—

(nd < 0.005)

とした。この方法で油分を測定した例(ナホトカ号 C 重油水溶性画分)を表 II.5.1 及び II.5.2 に示す。

この測定例から明らかなように、水溶性画分及び油処理剤混合水溶性画分から調製した試験水中の油分は時間と共に減少している。これは石油成分の微生物分解、光分解及び揮発によるものがその一部であるが、水中に懸濁していた石油類の微粒子の水面への分離もその一部である。特に油処理剤混合水溶性画分での油分減少は、後者による部分が多いと考えられる。油分が大きく変動する場合、流水式試験(油分一定の試験水が常時流入)が理想的であるが、油分一定の試験水を多量に調製することが難しいため、一定期間で試験水の一部あるいは全部を交換する半止水式試験あるいは試験水の交換を行わない止水式試験を実施する例が最も多い。いずれの場合も試験水中の油分は複数回測定し、その平均値を求める。

5.2 生態毒性試験法

ここでいう生態毒性試験は、生態系を構成する各栄養段階の代表的生物、つまり植物プランクトン、動物プランクトン及び魚類、に対する石油成分の影響を評価するものである。さらにこの試験法では、流出した石油が海岸に漂着した場合、大きく影響されると考えられる甲殻類及び貝類に対する影響評価も行う。

1) 植物プランクトン

植物プランクトンによる生態毒性試験法は、水溶性画分及び油処理剤混合水溶性画分を適当な割合で希釈した試験水にプランクトンを植種し、その生長が対照区のも

れの50%になる濃度 (median effective concentration, EC50) を求めるものである。

試験生物種は、供試物質に対する感受性が高い、飼育しやすい、常時入手できる、などの選定条件を満足する必要がある。一方、石油成分に対する感受性の判明している我が国沿岸の生物種はほとんどいないことから、現時点では飼育しやすく常時入手できる(実験室で継代飼育が可能)種を中心に試験種を選定した。植物プランクトン以外の試験生物についても同様に選定した。

(1) 試験種

我が国近海に分布し、その培養が比較的容易な植物プランクトン種を表 II.5.3 に示す。

表 II.5.3 植物プランクトン試験種リスト

緑 藻	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
ブラシナ藻	<i>Tetraselmis tetraethela</i>
ユーグレナ藻	<i>Eutreptiella</i> sp.
珪 藻	<i>Skeletonema costatum</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>
ハプト藻	<i>Pavlova lutheri</i> <i>Isochrysis galbana</i>
渦鞭毛藻	<i>Prorocentrum minimum</i>

これらの種類の中で、*T. tetraethela* 及び *S. costatum* はしばしば生態毒性試験で用いられる種であるが、植物プランクトン生長に対する PAH の毒性 (EC50) を検討した我々の研究(奥村・小山, 1998)によれば、図 II.5.1 に示すとおり前2者より *P. lutheri* の PAH に対する感受性の高いことが明らかになった。石油流出現場

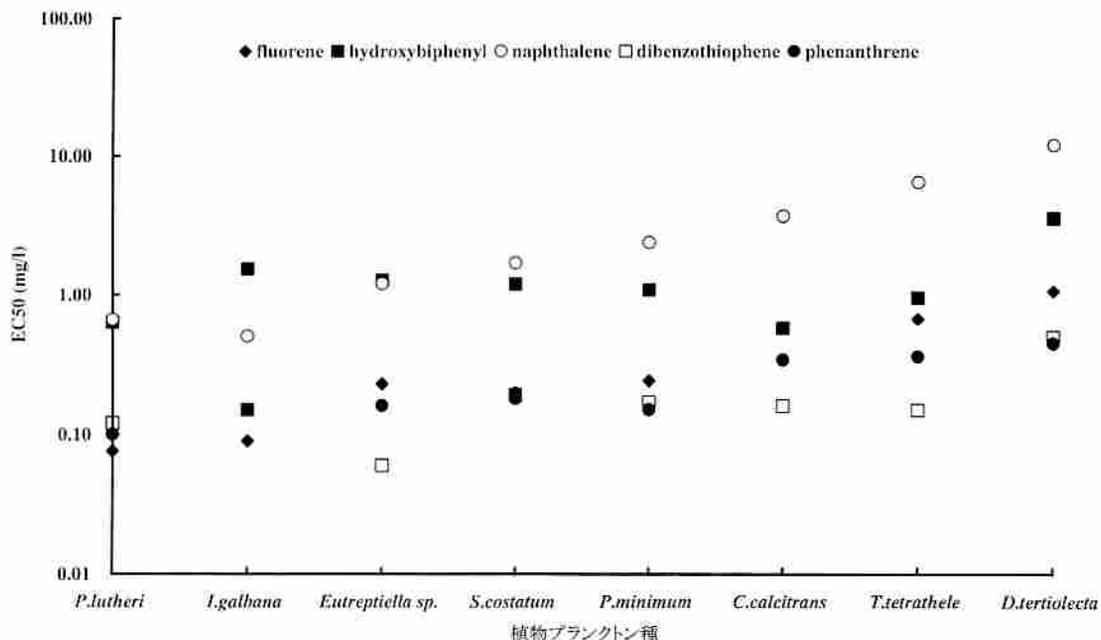


図 II.5.1 植物プランクトンに対する PAH の EC50

に分布するプランクトン種及びそれぞれの種の石油成分に対する感受性を考慮の上、試験種を選択するのが望ましい。

(2) プランクトン培養法

① 培地

試験種となる植物プランクトンの継代培養は、表 II.5.4 に示す F/2 培地で可能である。

表 II.5.4 F/2 培地の組成

F/2 培地		*: f/2 metal の組成	
NaNO ₃	75 mg	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4.4 g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	6 mg	CoSO ₄ 7H ₂ O	12 mg
Vitamin B ₁₂	0.5 µg	ZnSO ₄ 7H ₂ O	21 mg
Biotin	0.5 µg	MnCl ₂ 4H ₂ O	180 mg
Thiamine HCl	100 µg	CuSO ₄ 5H ₂ O	7 mg
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	10 mg	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	7 mg
f/2 metal*	1 ml	海水	1 l
80%海水	1000 ml		
(海水 800 ml+蒸留水 200 ml)			

② 培養条件

照度 3500~5000 lux, 14時間明・8時間暗周期, 温度 20°C のインキュベータ内で培養する。

(3) 毒性試験

試験は、試験期間中換水を行わない止水式試験法で実施する。

① 試験水調製

「5.1 水溶性画分の調製方法」で調製した水溶性画分及び油処理剤混合水溶性画分にオートクレーブした濾過海水を加え、希望濃度の水溶性画分濃度を調製する。なお、隣接する試験区の濃度比は 2 以下とする。次に各濃度区 80 ml に対し、20 ml の割合で F/2 培地の栄養塩濃縮液を加えて作成した培地を 30 ml ずつキャップ付き試験管に分注する。したがって元の水溶性画分及び油処理剤混合水溶性画分の相対濃度を 100% とすると、F/2 添加培地の相対濃度は 80% となる。石油成分暴露区の他に、対照区として水溶性画分及び油処理剤混合水溶性画分を含まない培地を作成する。

各濃度区は 3~5 本の繰り返しからなり、各試験管に前培養して対数増殖期に達したプランクトン培養液を加える。添加する植物プランクトンは、試験水中の初期細胞数が約 10⁴ cells/ml となるのが望ましいが、対数増殖期に達した培養液を試験液（この場合 30 ml）の 1/50 添加してもよい。

② 培養条件

照度 3500~5000 lux, 14時間明・8時間暗周期, 温度 20°C のインキュベータ内で培養する。

③ 実験期間

実験期間は 96 時間とする。

④ 生長測定法

植物プランクトンの生長測定には、濁度測定、クロロフィル測定、細胞数測定、in vivo クロロフィル蛍光測定などの方法がある。in vivo クロロフィル蛍光測定法は、蛍光光度計（例えば Turner design model 10-005R）が必要となるが、測定法が簡便であり 1 本の試験管の in vivo クロロフィル蛍光を経時的に繰り返し測定できる利点がある。したがって in vivo クロロフィル蛍光測定法では各濃度区で繰り返し数と同数の試験管（3~5 本）を準備する。その他の測定法では特別な測定機器を必要としないが、測定する回数（例えば 24, 48, 72 及び 96 時間の 4 回）と同数の試験管が必要、あるいは測定に時間がかかる、などの問題点がある。各測定時間の繰り返し測定値の平均値を求め、これをそれぞれの時間の測定値とする。

⑤ EC50 の計算方法 (in vivo クロロフィル蛍光測定法を例にして説明)

実験終了後、以下に示した OECD ガイドライン（化学品検査協会, 1984）に従い、植物プランクトンに対する水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の EC50 を求める。

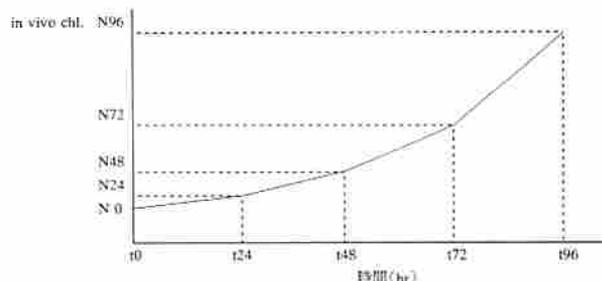


図 II.5.2 植物プランクトン生長曲線

図 II.5.2 に示すように、各測定時間における in vivo クロロフィル蛍光測定値から植物プランクトンの生長曲線を求める。各濃度区の生長曲線の下側の面積を求め、その濃度との関係から EC50 を求める。生長曲線下の面積 (A) は、次式により計算する。

$$A = (N_1 - N_0) / 2 \times t_1 + (N_1 + N_2 - 2N_0) / 2 \times (t_2 - t_1) + \dots + (N_n - 1 + N_n - 2N_0) \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで、

A = 面積

N₀ = 試験開始時 (t₀) の in vivo クロロフィル蛍光

N₁ = t₁ 時の in vivo クロロフィル蛍光

N_n = t_n 時の in vivo クロロフィル蛍光

t₁ = 試験開始後最初に in vivo クロロフィル蛍光を測定した時間

t_n = 試験開始後 n 回目に in vivo クロロフィル蛍光

を測定した時間

である。

各実験濃度区における植物プランクトンの生長阻害率 (I_A) は次式により計算する。

$$I_A = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

ここで、

A_c = 対照区の生長曲線下の面積

A_t = 各実験濃度区の生長曲線下の面積

である。

自然数軸に生長阻害率、対数軸に油分をとった片対数グラフ上に各濃度区の測定値をプロットし、直線になる部分について回帰直線を求め、 $I_A = 50$ となる濃度を EC_{50} とする。

2) 動物プランクトン

動物プランクトンによる生態毒性試験法は、水溶性画分及び油処理剤混合水溶性画分を適当な割合で希釈した試験水にプランクトンを入れ、その生残率が50%になる濃度 (median lethal concentration, LC_{50}) を求めるものである。また、供試生物の50%の行動 (例えば遊泳行動など) が阻害される濃度 (EC_{50}) を求めることもできる。

(1) 試験種

我が国沿岸に生息する動物プランクトンの石油成分に対する感受性は明らかではないが、実験室での継代飼育が可能な種として、*Tigriopus japonicus* 及び *Acartia omorii* が挙げられる。

(2) 飼育法

供試個体は、試験に供するまで以下の条件で1週間以上予備飼育する。

① 餌料

Tigriopus japonicus はブラシナ藻 *Tetraselmis tetrahela* で、*Acartia omorii* はノープリウス期をハプト藻 *Pavlova lutheri* で、コペポダイト期を渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* でそれぞれ飼育が可能である。(木下・高久, 1998)

② 飼育条件

水温を 20°C に保つ。

Tigriopus japonicus は、照度 1000 lux 程度、12時間明暗周期で飼育する。

Acartia omorii は、照度 1000 lux 以下、12時間明暗周期で飼育する。

(3) 毒性試験

一定期間 (多くの場合24あるいは48時間) で換水を行う半止水式試験法あるいは換水を行わない止水式試験法で試験を実施する。

① 試験水調製

「5.1 水溶性画分の調製方法」で調製した水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の相対濃度を100%としてこれを順次ろ過海水で希釈し、所定の濃度の試験水を調製する。なお、隣接する試験区の濃度比は2以下とする。また、交換する試験水の油分が、前の試験水の油分と近似していることを換水前に確認し、必要があれば試験水の希釈割合を変えるなどして試験水の油分調整を行う。

② 試験条件

水温を 20°C に保つ。

Tigriopus japonicus は、照度 1000 lux 程度、12時間明暗周期で飼育する。

Acartia omorii は、照度 1000 lux 以下、12時間明暗周期で飼育する。

酸素飽和度は60%以上とする。試験中、石油成分の分解などにより、水中溶存酸素濃度の著しい低下が予想されるため、試験水にごく微量の酸素を通気して酸素飽和度を60%以上にすることが必要である。空気を通気してこの条件を達成するには相当量の通気が必要となり、石油成分中の揮発成分が急速に揮発する恐れがあり、これを避けねばならない。

③ 試験期間

成体を用いた場合、48~96時間とする。ただし、ノープリウス幼生を用いた場合は24時間とする。

④ 試験法

調製した試験水を入れたガラス容器に、供試生物を10~20個体入れる。供試個体はできる限りサイズを揃える。

試験水中油分は表 II.5.1 あるいは II.5.2 に示したとおり、経時的に減少することが考えられることから、ピーカーには適当な蓋をすると共に、24時間あるいは48時間後に試験水の一部あるいは全量を換水する。この際、供試プランクトンは、痛めないようピペットなどで新たに調製した試験水に移し替える。

96時間の試験期間中、換水を行わない (止水式試験) 場合でも、水中溶存酸素濃度の著しい低下及び油分の低下を可能な限り防ぐ必要がある。このため、試験管に試験水、供試プランクトン及び酸素を入れ、密栓した後試験終了まで観察する。

24, 48, 72及び96時間後に供試個体の生死の判定を行い、各濃度区の累積死亡数を算出する。供試個体の生死判定が肉眼では困難な場合には、実体顕微鏡などを用いて行う。なお、試験中は植物プランクトンの添加を行わないため、絶食による死亡も生じる。このような死亡個体が多くなると正しい結果が得られないため、絶食による対照区の死亡率が10%を越えた場合、そのデータは用いない。(甲殻類、貝類及び魚類でも同様)

止水、半止水式試験いずれの場合も、一濃度区当たり2個以上の複数のガラス容器で試験を行うことが望ましい。試験水中油分の測定は試験開始直前（あるいは換水直後）と試験終了時（あるいは換水直前）に行う。

⑤ LC50の計算方法

実験終了後、各濃度区の平均累積死亡数を算出する。次に、以下に示した OECD ガイドライン（化学品検査協会 1984）に従い、動物プランクトンに対する水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の LC50（または EC50）を求める。

LC50 はグラフ法、プロビット法などの計算方法によって求めるが、プロビット法では LC50 の信頼限界も同時に算出可能である。一方、グラフ法では図 II.5.3 に示す毒性曲線のように、片対数グラフを用いて各測定時間における累積死亡率及び水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の油分から LC50 を求める。遊泳阻害などを指標にした場合、図 II.5.3 に示した毒性曲線の累積死亡率を累積遊泳阻害率に変え、EC50 を求める。

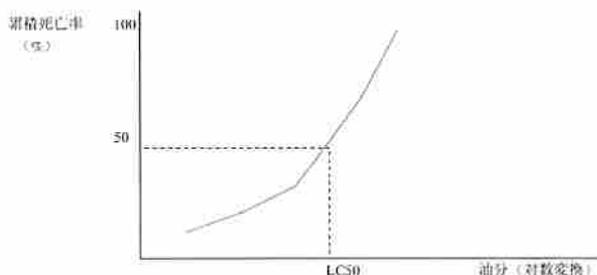


図 II.5.3 動物プランクトンなどの供試生物に対する毒性曲線例

3) 甲殻類

(1) 試験種

我が国沿岸に生息し、毒性試験などに使用されている代表的甲殻類として、クルマエビ (*Penaeus japonicus*) が挙げられる。また種苗生産が可能となったアシナガモエビモドキ (*Heptacarpus fuliurostris*) も試験種として挙げられる。しかしクルマエビは実験室での継代飼育が難しく、入手可能な時期が限られている。さらに試験中に脱皮した個体の化学物質に対する感受性が著しく変動するため、未脱皮個体との間に感受性差が生じることが報告されている。（立石・堀，1997）

アシナガモエビモドキは、種苗生産が可能となり、年間を通して入手できる可能性がある。（下城他，1998）また、化学物質に対する感受性に影響する可能性のある脱皮は、本種親個体で16～18日に1回とその間隔が永く（千原他，1997）、脱皮による感受性差が生じにくいことから、生態毒性試験に適しているものと考えられる。

(2) 飼育法

供試個体は、試験に供するまで以下の条件で1週間以

上予備飼育する。

① 餌料

エビ用配合飼料あるいは冷凍アミを、毎日適量投与する。ただし、試験開始前日から試験中にかけて給餌は行わない。

② 飼育条件

いずれも流水式水槽で飼育する。

クルマエビ飼育適水温が20～28℃（日本水産資源保護協会，1980）であることから、その飼育水温は25℃前後とする。また、小砂利を水槽底部に敷いておくことストレスが少ないようである。

アシナガモエビモドキは、飼育水温19.5～22.6℃で再生産が行われることが明らかとなっており（千原他，1997）、その飼育水温は20℃前後とする。

(3) 毒性試験

一定期間（多くの場合24あるいは48時間）で換水を行う半止水式試験法あるいは換水を行わない止水式試験法で試験を実施する。

① 試験水調製

「5.1 水溶性画分の調製方法」で調製した水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の相対濃度を100%としてこれを順次ろ過海水で希釈し、所定の濃度の試験水を調製する。なお、隣接する濃度区の比は2以下とする。また、動物プランクトンと同様に、換水時には油分調整を行う。

② 試験条件

クルマエビ及びアシナガモエビモドキの試験水温は、それぞれ25及び20℃程度とする。

酸素飽和度を60%以上に保つ。試験中、石油成分の分解などにより、水中溶存酸素濃度の著しい低下が予想されるため、試験水にごく微量の酸素を通気して酸素飽和度を60%以上にする。

収容密度は、体重0.6gまでのクルマエビで0.2g/l以下、体重0.03gまでのアシナガモエビモドキで0.3g/l以下が適当と考えられる。

③ 試験期間

48～96時間とする。

④ 試験法

調製した試験水をそれぞれガラスビーカーに入れ、サイズの揃った供試個体を10個体以上これに入れる。以下、動物プランクトン試験とはほぼ同様であるが、換水時の移し替えはタモアミなどにより、供試個体を傷つけないよう行う。

アシナガモエビ、クルマエビなどの供試生物の中でできる限り小型の個体を選別し、試験に供する。

急性毒性試験中は給餌しない。全長23mm（体重0.06g）以上のクルマエビ、全長10mmのアシナガモエビモドキでは96時間無給餌でも対照区は全く死亡しな

いことが確認されており（立石他，1998，1999），これらのサイズ以上の個体を用いることにより，96時間までの無給餌での試験は可能である。

エビ類は脱皮を行うが，脱皮した個体の化学物質に対する感受性の高まることが報告（立石他，1998）されており，脱皮個体と未脱皮個体の死亡率を分割して考える（例えば1個体/容器）などの工夫が必要である。

⑤ LC50 の計算方法

動物プランクトンと同様の方法で算出する。

4) 貝類など

(1) 試験種

貝類は，実験室での継代飼育は難しいため，養殖業者から購入できる種類を用いる。

巻き貝ではクロアワビ，二枚貝ではアコヤガイ及びヒオウギガイが養殖されており，入手が容易である。また，アサリは通年販売されており，入手は容易である。なお，アワビは水槽壁面に付着したまま死亡するため生死判定が難しく，アサリは飼育環境の急激な変動時に長時間閉殻してしまうため，水中の供試物質の影響を受け難いなどの問題点があるが，ここでは試験種として選定する。この他にベントスであるイシイソゴカイも試験生物として利用されつつある。（藤井他，1998）

(2) 飼育法

供試個体は，試験に供するまで以下の条件で1週間以上予備飼育する。

① 運搬方法

試験に用いる貝類及びゴカイは業者から購入するため，その運搬方法を以下の通りとする。

ヒオウギガイ，クロアワビ，アコヤガイ及びアサリは，保冷剤などで20°C以下に保った海水に酸素を封入あるいは通気しながら運搬する。（藤井他，1998）また，ヒオウギガイを除く他の貝類は，海水を含ませたスポンジで挟み，クーラーボックスなどの保温容器に入れて保冷剤で20°C以下に保ち，輸送することもできる。

ゴカイは養殖業者が実施するように，おがくず中にゴカイを入れ，輸送する。

② 蓄養方法

業者から購入，運搬した供試個体は，試験に供するまで以下の条件で蓄養する。

水温22°C程度に保った循環あるいは流水海水中で16時間明・8時間暗条件で飼育する。

アワビの餌は生ワカメ及び市販アワビ用ベレットとする。ヒオウギガイ及びアサリは，餌を除いて前述の条件で生海水中で飼育する。

ゴカイは，砂利を敷いた循環式水槽（底面ろ過）あるいは底面から排水する流水式水槽で，市販ゴカイ用餌を投与して蓄養する。

いずれの種類も試験開始前日から試験中にかけて給餌は行わない。

(3) 毒性試験

一定期間（多くの場合24あるいは48時間）で換水を行う半止水式試験法あるいは換水を行わない止水式試験法で試験を実施する。

① 試験水調製

「5.1 水溶性画分の調製方法」で調製した水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の相対濃度を100%としてこれを順次ろ過海水で希釈し，所定の濃度の試験水を調製する。なお，隣接する濃度区の比は2以下とする。また，動物プランクトンと同様に，換水時には油分調整を行う。

② 試験期間

48～96時間とする。

③ 試験条件

試験水は50 lとし，16時間明・8時間暗条件で水温22°C程度で試験を行う。

酸素飽和度を60%以上に保つ。試験中，石油成分の分解などにより，水中溶存酸素濃度の著しい低下が予想されるため，試験水にごく微量の酸素を通気して酸素飽和度を60%以上にする。

各水槽に供試生物を10個体ずつ入れる。ただし，収容密度をクロアワビで0.8 g/l以下，アコヤガイで1.2 g/l以下，ヒオウギガイで1.3 g/l以下とする。

④ LC50 の計算方法

動物プランクトンと同様の方法で算出する。

5) 魚類

(1) 試験魚類

① 魚種

我が国沿岸に生息する海産魚で種苗生産などによる供給が行われ，生態毒性試験に利用可能な魚種は，マダイ，シロギス及びアマメハギが挙げられる。さらに沿岸域で採取が容易なボラなども試験魚として挙げられる。これらの魚種の化学物質に対する感受性の高いことが報告（小山他，1992；立石・堀，1995）されており，飼育あるいは入手の容易さのみならず，化学物質に対する感受性からも生態毒性試験魚として適しているものと考えられる。

さらに日本近海に生息する魚種ではないが，仔稚魚期の飼育が容易で実験室内で容易に数世代の飼育が可能な魚種としてマミチョグ（清水，1999）及びジャワメダカが挙げられる。また，産業的に重要である，上述の試験魚が入手できない等の理由でこの他の魚種を用いることも可能である。

② 試験魚の大きさ

一般に化学物質に対する感受性は，試験生物の初期生

活段階（魚類では稚仔魚期）が最も高いといわれており、石油類に対する試験でもこの時期の生物を用いることが望ましい。ただし、96時間程度の急性毒性試験では試験中に給餌しないため、絶食による死亡が起こらない程度の大きさの試験生物を用いる。例えば、マダイは0.18 g以上、シロギスは0.11 g以上、アミメハギは0.3 g以上でできる限り小形の個体を用いる。

(2) 飼育法

供試個体は、試験に供するまで以下の条件で1週間以上予備飼育する。

① 餌料

海産魚稚魚用配合飼料を、毎日適量投与する。ジャワメダカにはアルテミアあるいはテトラミンを投与する。ただし、試験開始前日から試験中にかけて給餌は行わない。

② 飼育条件

マダイは水温 20°C 程度で、流水式水槽で飼育する。シロギス及びアミメハギは水温 23~26°C とする。さらにマミチヨグ及びジャワメダカは、それぞれ水温 20°C 程度及び 26°C 程度で飼育する。

いずれの魚種も16時間明・8時間暗条件で飼育する。

(3) 毒性試験

① 試験水調製

「5.1 水溶性画分の調製方法」で調製した水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の相対濃度を100%としてこれを順次ろ過海水で希釈し、所定の濃度の試験水を調製する。なお、隣接する濃度区の比は2以下とする。調製した試験水をそれぞれガラスビーカーあるいはガラス水槽に入れ、供試生物を10個体以上これに入れる。以下、動物プランクトン試験とほぼ同様であるが、換水時の移し替えはタモアミなどにより、供試個体を傷つけないよう行う。

魚類を用いた試験の場合、密閉容器での試験が困難であり油分の著しい低下を防げないことから半止水式試験は行わず、開放的容器（ガラス水槽）を用いて半止水式試験を行う。なお、流水式試験の場合、油分を一定にする方法が確立してはいないため、ここでは半止水式試験を推奨する。半止水式試験では、24あるいは48時間毎に試験水の一部あるいは全部を交換する。

可能であれば一濃度区当たり2個以上の複数の水槽で試験を行うことが望ましい。試験水中油分の測定は試験開始直前（あるいは換水直後）と試験終了時（あるいは換水直前）に行う。

② 試験条件

試験水温は、飼育条件と同様とする。

酸素飽和度を60%以上に保つ。試験中、石油成分の分解などにより、水中溶存酸素濃度の著しい低下が予想されるため、試験水にごく微量の酸素を通気して酸素飽和

度を60%以上にする。

いずれの魚種も16時間明・8時間暗条件で試験する。

③ 収容密度

試験魚の適正密度は、マダイで0.25 g/l、シロギスで0.12 g/l、アミメハギで0.23 g/lである。したがって、体重0.5 gの試験魚をそれぞれ各濃度区に10個体収容するとすると、マダイで20 l以上、シロギスで40 l以上、アミメハギで20 l以上の試験水が必要となる。マミチヨグ及びジャワメダカの収容密度については明らかにされていないが、マダイと同程度でよいと考えられる。

④ 試験期間

48~96時間とする。

⑤ LC50の計算方法

動物プランクトンと同様の方法で算出する。

ただし、石油成分の中にはPAHのように麻酔作用を有するものがあり、その生死判定には慎重を要する。判定が非常に困難な場合には対象となる個体を清浄海水中に移し、数時間放置した後蘇生するかどうかで生死判定を行うことも可能である。なお、もしこの個体が蘇生したら直ちに試験水に戻す。

6) 魚卵

流出油の影響評価に生態毒性試験を適用した例（小山他、1998）では、ヒラメ卵で高い感受性が報告されており、入手が可能であれば魚卵を用いることも考える。

(1) 試験種

石油類生態毒性試験にいずれの魚種の卵が適しているか明らかなではないが、前述のとおりヒラメ卵の感受性が高いことは既に確かめられており、ヒラメ卵を供試魚卵とする。また、ヒラメ卵が入手できず、他の魚卵が入手可能であればそれを用いる。

(2) 毒性試験

魚卵は傷つきやすいため、慎重に取り扱い、入手後直ちに試験を開始する。また、それぞれの魚卵の孵化に要する時間と産卵してから何時間後に試験を開始したかを明らかにしておく。

① 試験水の調製

「5.1 水溶性画分の調製方法」で調製した水溶性画分あるいは油処理剤混合水溶性画分の相対濃度を100%としてこれを順次ろ過海水で希釈し、所定の濃度の試験水を調製する。なお、隣接する濃度区の比は2以下とする。調製した試験水の入ったガラスビーカーあるいはガラス水槽にヒラメ卵などの魚卵を入れ、孵化するまでの観察を行う。試験開始時の卵は、産出後できる限り早期に試験水に暴露する。なお、換水などのストレスが魚卵の発生に影響を及ぼすかどうか不明な場合、換水を行わない。

② 試験期間

孵化終了後48~72時間までとする。ヒラメ卵であれば

約48時間で孵化が終了するため、その後48時間の仔魚観察を行い、その死亡率を求める。また、マダイの場合、孵化後48～72時間で開口し鰓呼吸を始めるため、孵化後72時間後まで観察を続け、仔魚の死亡率を求める。

③ 試験条件

魚卵によって異なるが、ヒラメ卵であれば15°C程度、マダイ卵であれば20°C程度とする。

酸素飽和度を60%以上に保つ。試験中、石油成分の分解などにより、水中溶存酸素濃度の著しい低下が予想されるため、試験水にごく微量の酸素を通気して酸素飽和度を60%以上にする。ただし、種々のストレスが魚卵の発生に影響を及ぼす可能性があるため、通気は可能な限り微量とする。

ヒラメあるいはマダイのようにその卵が浮遊卵の場合、試験中試験液を攪拌する必要はないが、マミチヨグあるいはジャワメダカの卵のように沈性卵の場合、卵が試験容器の底面に常時接していること避けるため、時々試験液を攪拌する。

④ LC50 および EC50 の計算方法

卵の孵化率が50%に低下する濃度 (EC50) を LC50 と同様の方法で算出する。また、動物プランクトンと同様の方法で孵化仔魚に対する LC50 を算出する。さらに孵化仔魚の奇形も観察し、奇形率と油分との関係から奇形が有意に増加する油分を求める。

引用文献

Anderson, J. W., J. M. Neff, B. A. Cox, H. E. Tatem and G. M. Hightower, 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustacean and fish. *Marine Biol.*, 27, 75-88.

千原 到・床嶋純孝・横須賀幸正, 1997. 試験魚介類の適正供給時期と供給方法の解明 (有害物質漁業影響調査報告書,

水産庁), 31-54.

藤井雄二・時松靖之・吉川 淳, 1998. 貝類及び多毛類の飼育及び急性毒性試験方法の検討有害物質漁業影響調査報告書, (水産庁), 67-84.

(財)化学品検査協会, 1984. OECD Guidline for Testing of Chemicals. (日本語版), (株)第一法規出版, 東京, 2400 pp.

木下秀明・高久 浩, 1998. 動物プランクトンの飼育及び繁殖技術の確立 (有害物質漁業影響調査報告書, 水産庁), 11-33.

小山次朗・角埜 彰・奥村 裕・池田久美子・清水昭男・山田久, 1998. 流出油の海洋生物に対する毒性 (総特集—沿岸油濁の生態系の負荷とその影響), 月刊海洋, 30, 622-630.

小山次朗・黒島良介・石松 惇, 1992. 汚染物質毒性評価のための指標海産魚選定, 水環境学会誌, 15, 804-813.

日本水産資源保護協会, 1980. 水産生物適水温図, pp. 31.

奥村 裕・小山次朗, 1998. 植物プランクトンに対する影響試験の開発 (有害物質漁業影響調査報告書, 水産庁), 122-143.

清水昭男, 1999. マミチヨグによる慢性毒性試験法の開発 (沿岸生物に及ぼす汚染物質の慢性影響評価手法の開発に関する研究成果報告書, 農林水産技術会議事務局), 5-22.

下城宏之・床嶋純孝・横須賀幸正, 1998. 試験魚介類の適正供給時期と供給方法の解明 (有害物質漁業影響調査報告書, 水産庁), 34-66.

立石晶浩・堀 英夫, 1995. 海産魚短期毒性試験法確立事業総合報告書 (水産庁編), pp. 50-58.

立石晶浩・堀 英夫, 1997. クルマエビの室内飼育とクルマエビに対する急性毒性試験 (有害物質漁業影響調査報告書, 水産庁), 78-95.

立石晶浩・堀 英夫, 1998. アシナガモエビモドキの室内飼育とクルマエビに対する急性毒性試験 (有害物質漁業影響調査報告書, 水産庁), 85-111.

立石晶浩・堀 英夫, 1999. アシナガモエビモドキ及びクルマエビに対する急性毒性試験とクルマエビに対する生物濃縮試験 (有害物質漁業影響調査報告書, 水産庁), (印刷中.)

Thomas, P. and L. Budiantara, 1995. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in Atlantic croaker, *Marine Environ. Res.*, 39, 147-150.

<小山 次朗>