生物応答を用いた生態影響試験方法について

１　はじめに

本市の生物応答を用いた生態影響試験は、平成 25 年３月に環境省が提示した「生物応答を用いた排水試験法」（検討案）[1)]（以下、検討案）をもとに実施してきた[2～3)]。本報告書は、環境省の検討案に記載された内容に加え、これまで培った具体的かつ技術的な内容を掲載することで、生態影響試験に係る一連の操作について整理を行ったものである。なお、試験結果の解析については、検討案記載の内容や専門書に詳しく記載されているため、そちらを参照されたい。

生態影響試験は「飼育」「試験（精度管理を含む）」「解析」の工程で行い、排水改善を含めた一連の試験は Whole Effeluent Toxicity 法と呼ばれ、米国において個別物質の規制と併用して利用されている。本報告書では生態影響試験の導入を検討している市内企業等の技術的な支援を目的として、これまで本市で蓄積した具体的な飼育方法や試験方法に関する技術や知見等を提示する。なお、本市で提示する内容はあくまでも試験を執り行う上での一例に過ぎず、本報告書及び検討案に記載のない事項については、試験機関において検討し、問題があれば解決する必要がある。

２　供試生物

検討案では、より感度が高くかつ生物の生長や繁殖等の個体群の維持の指標としての信頼度が高い慢性毒性試験が採用されており、表１及び図１に掲載した３生物に関する試験法が提示されている。本市においても３生物を取扱い、試験を実施してきた。なお、試験機関によっては１生物のみ取扱う場合もある。検討案は米国 EPA の試験法[4～6)]や経済協力開発機構のテストガイドライン[7)]等を参考に作られた試験法であるため、記載のない事項等については、そちらも併せて参照されたい。

表１　供試生物一覧

生物種	名称	試験法
魚類	ゼブラフィッシュ （*Danio rerio*）	魚類胚・仔魚期短期毒性試験
甲殻類	ニセネコゼミジンコ （*Ceriodaphnia dubia*）	ミジンコ繁殖試験
藻類	ムレミカヅキモ （*Raphidocelis subcapitata*）	藻類生長阻害試験



図１　供試生物（左：ゼブラフィッシュ、中：ニセネコゼミジンコ、右：ムレミカヅキモ）

３　供試生物の飼育及び培養方法

3-1　ゼブラフィッシュ

国立環境研究所（水環境実験施設）から有償分譲を受け、検討案に従い飼育及び継代した個体を試験に使用した。図２に示すように発達段階に応じて、受精卵～稚魚期（約４週間）はシャーレで、１か月（４週間）～約４か月はビーカーで、４か月以降は水槽で飼育した。なお、生後５か月を過ぎると雄雌の区別がつくので、それぞれ別の水槽に分けて飼育した。飼育条件は表２に示した。



図２　ゼブラフィッシュ飼育設備

（大型インキュベーター寸法：幅 150cm×奥行 60cm×高さ 100cm）

（水槽寸法：幅 30cm×奥行 17cm×高さ 24cm）

表２　ゼブラフィッシュ飼育条件

水温	26±１℃
照明	16時間明期／８時間暗期（室内光）
飼育密度	胚・仔魚期：飼育水100mLあたり50個体未満 幼魚期　　：飼育水300mLあたり５個体未満 成魚期　　：飼育水１Lあたり１個体未満
飼料	胚・仔魚期：乾燥ブラインシュリンプを飼育水で溶いたもの （ふ化１週間後から） 幼魚期　　：卵からふ化させたブラインシュリンプ 成魚期　　：乾燥ブラインシュリンプ

3-1-1　飼育水

図３に示すような活性炭フィルターに通水した水道水をペール缶に貯留し、１晩以上エアレーションし温度調整した水を飼育水とした。



図３　飼育水（左：活性炭フィルター、右：ペール缶）
（ペール缶寸法：高さ 47cm×内径 47cm）

3-1-2　照明

市販の LED 照明及びタイマー付き電源を使用し、明期 16 時間／暗期８時間を厳密に制御した。

3-1-3　給餌

胚及び生後１週間までの仔魚は餌を必要としないが、１週間を越えた頃から卵黄嚢が消失するため、摂食する必要がある。この時期の仔魚は捕食する機能が未発達であるため、成魚に与えている乾燥したブラインシュリンプを粉末状にし、水に溶いたものを餌として用いた。ふ化後２週間を越えた頃から捕食する能力が発達してくるため、卵からふ化させたブラインシュリンプを生餌として与えた。ブラインシュリンプは、海水を模した塩水に卵を適量投入し、恒温器の中で１～２日爆気を行うことでふ化させた（図４）。ふ化した生餌はろ紙を用いて分離し、飼育水で２回以上洗浄することにより塩水を取り除いた。ふ化後４か月を越えた成魚には乾燥したブラインシュリンプを適量与えた。

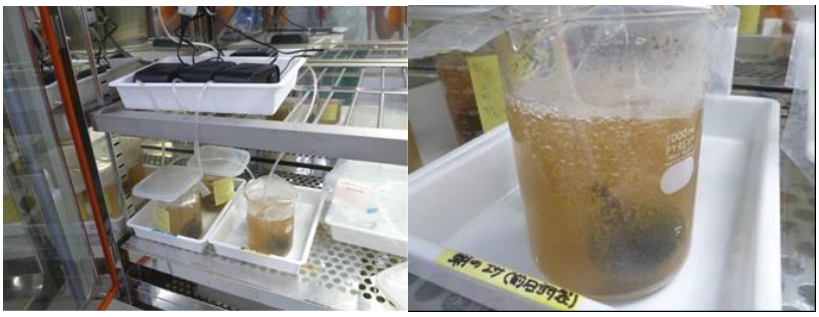


図４　ブラインシュリンプ曝気装置

3-1-4　換水

シャーレ及びビーカーは駒込ピペットやパスツールピペット等の先端を加工したガラス器具（図５）を用いて不溶物及び古い飼育水を除去し、容器を洗浄して毎日新しい飼育水に移し替えた。水槽は１週間に１回程度水槽内を清掃し、新しい飼育水に移し替えた。

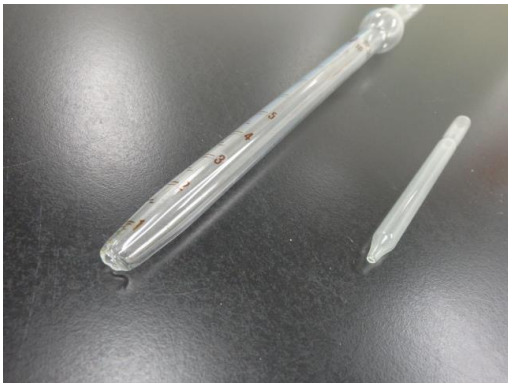


図５　加工したガラス器具（左：駒込ピペット、右：パスツールピペット）

3-1-5　継代

産まれ月毎、雄雌毎に飼育を行い、試験開始前にペアリングを行った。このとき、受精卵の数及びふ化率を記録し、正常な受精卵が得られるか確認した。

産卵の前日にメス個体を産卵用水槽に移し、当日朝にメス個体の入った産卵用水槽にオス個体を入れると同時に産卵誘発用のライト（300W）を点灯させる。産卵用水槽は雌の産卵後に水槽の底に沈んだ卵を親魚が食べるのを防ぐため、また卵の回収を容易にするために図６に示すようにガラスビーズ（1.5cmφ）をネット(目合３㎜)に入れて水槽の底に敷き詰めた。



水槽寸法：
幅 30cm×奥行 17cm×高さ 24cm
ガラスビーズ：1.5cmφ
ネット：目合３㎜
ライト：300W

図６　産卵用水槽

ペアリングするまでの一連の操作は暗期のうちに行い、明期に点灯する光による刺激を与えないように留意する。ペアリング後 1.5 時間で受精卵を得ることが可能であり、受精卵は顕微鏡で観察し、卵割が均一で凝固班がないもの、また卵黄の色が均一であるものを選別した。図７に受精卵の一例を示す。左が正常な受精卵であり、右の受精卵は全体が白濁しているため試験には使用しない。なお、ペアリング後の個体は雄雌別の水槽に戻し、個体の状態に応じて再度産卵させた。

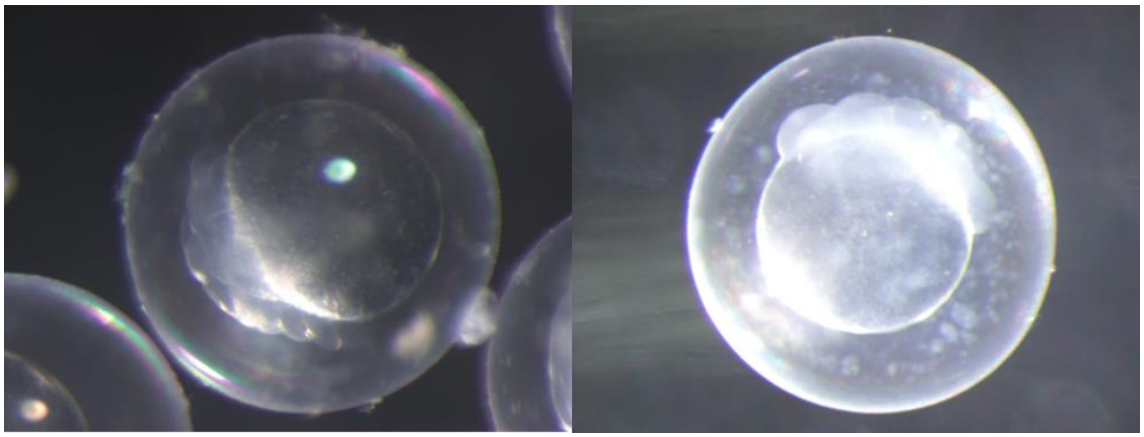


図７　受精卵の一例（左：正常、右：死亡）

3-2　ニセネコゼミジンコ

国立環境研究所（水環境実験施設）から有償分譲を受け、検討案に従い飼育及び継代した個体を試験に使用した。集団飼育及び個別飼育を行った。ニセネコゼミジンコの飼育条件を表３に示す。集団飼育は 300mL ビーカーに親ミジンコが 40 個体程度の密度になるように飼育した。個別飼育はガラス製容器に 15mL の飼育水を入れ１個体毎に飼育した。ビーカー及びガラス容器内の飼育水が蒸発することを防ぐため、インキュベーター内は容器等に入れた水で加湿し、ビーカー及びガラス容器は図８のようにバット等に並べた後、上から光を透過するフィルムで覆った。どちらも毎日仔虫を除去し、２日に１回換水を行った。

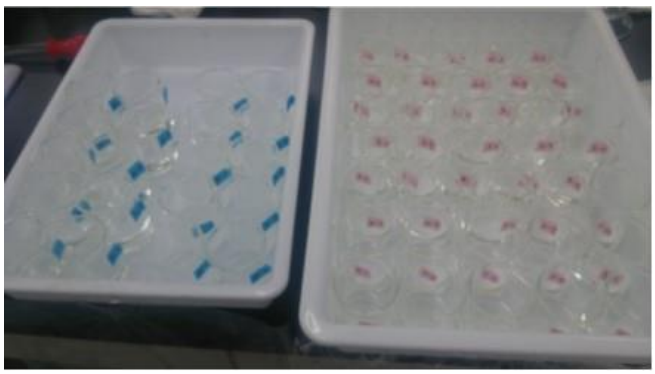


図８　ミジンコ飼育容器

表３　ニセネコゼミジンコ飼育条件

水温	25±１℃
照明	16時間明期／８時間暗期（室内光）
飼育密度	集団飼育：約40個体／300mLビーカー 個別飼育：１個体／50mLスナップカップ
給餌	クロレラ：有機炭素換算量で0.02～0.05mgC／日／個体 YCT（Yest Cerophyll Trout chow）：50μL／日／個体

3-2-1　飼育水

水道水を活性炭ろ過した水を用いた。検討案では人工調整水や市販のミネラルウォーター等の記載もあるが、市環境総合研究所で比較検討したところ、水道水を活性炭ろ過した水でも十分に飼育及び試験が可能であった。

pH は 6.5～8.5 が望ましい。検討案に「pH の値が範囲を外れる場合には水酸化ナトリウム水溶液または塩酸で調整する。」と記載されているが、調整に用いた試薬由来の溶存イオンの影響を受ける可能性もあり、国立環境研究所等ではあえて調整せず使用する場合もあるため、本市においても同様の扱いとした[8)]。

3-2-2　照明

市販の LED 照明を使用し、紙等を貼って 200Lx 程度になるよう調整した。また、タイマー付き電源を使用し、明期 16 時間／暗期８時間を厳密に制御した。

3-2-3　給餌

適当量の YCT 及び単細胞緑藻類（クロレラ等）を毎日与える。市販の YCT 及び単細胞緑藻類を購入し、単細胞緑藻類は濃度１×10^8cells/mL に希釈した。それぞれ１週間分を小分けにして保存しておき、毎週適温まで戻してから使用した。　給餌量はミジンコ１個体あたり YCT を 50μL、藻類濃縮液を有機炭素換算量で 0.02～0.05mgC とした。ミジンコの個別飼育の数は多いため、連続分注器等を用いると効率的に作業を行える。

3-2-4　換水

飼育容器と同じガラス容器に新しい飼育水を準備し、先端を加工したパスツールピペット等を用いてミジンコがパスツールピペットの先端で傷つかないように慎重に吸い上げ、新しい飼育水へ移し替えた。

3-2-5　日常観察

ライト板等を用いて飼育用ガラス容器の下から光を照射し、ミジンコを観察する（図９）。このとき、見やすいようにライト板等を使用するが、照度が強すぎないように注意し、速やかに作業を完了させた。仔虫が産まれていた場合は、先の細いパスツールピペット等で除去する。ニセネコゼミジンコは非常に小さな個体であるため、固定式のルーペ等を使用すると作業効率が上がる。



図９　ライト板による観察の様子

3-2-6　継代

個別飼育個体から３～４腹目に産まれた仔虫を次世代の個別飼育として継代した。このとき、試験成立条件（表４）を満たしている親個体から継代すると安定した産仔が期待できるため、仔虫は目視でカウントし、個別飼育している個体のうち条件の良い親から産まれた仔虫のみを継代した。ここで対照区とは個別飼育している個体群として考える。
集団飼育は当日に産まれた個体を継代した。

個別飼育の立ち上げは、前日に水換えを行った集団飼育から産まれた仔虫を容器に１個体ずつ移す。立ち上げは年末年始等の長期休暇明けや個別飼育の産仔が不安定になった場合とし、試験開始の３週間以上前に行うものとした。

表４　ニセネコゼミジンコ試験成立条件

対照区における親個体の死亡率が20%以下であること。
対照区における供試個体の60%以上が最大8日間で3腹分の産仔をすること。
対照区における3腹分の合計産仔数が平均して15個体以上であること。
対照区において休眠卵の生産が確認されないこと。

3-3　ムレミカヅキモ

国立環境研究所（微生物系統保存施設）から有償分譲を受け、検討案に従い培養及び継代を繰り返した個体を使用する。表５にムレミカヅキモの培養条件を、図 10 に培養装置を示した。

表５　ムレミカヅキモ培養条件

培養温度	23± １℃
照明	5000Lx以上
培養量	培地100mLに対して生物量が約5,000cells/mLとなるように添加。ただし、藻類懸濁液の添加量は５mL以内。

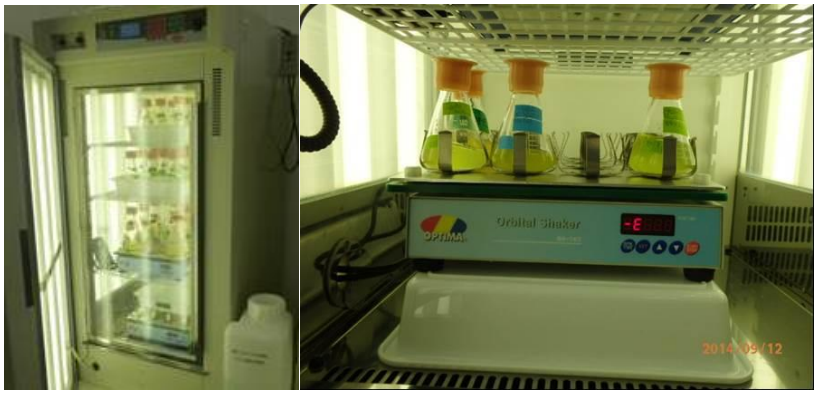


図 10　ムレミカヅキモ培養装置（左：照明付きインキュベーター、右：振とう器）

3-3-1　培地

市販の OECD 培地濃縮液を用いて培地を調製した。調製後の各成分は表６のとおり。

表６　OECD 培地成分

薬品名	容量
塩化アンモニウム	15 mg/L
塩化マグネシウム	12 mg/L
塩化カルシウム二水和物	18 mg/L
硫酸マグネシウム七水和物	15 mg/L
リン酸二水素カリウム	1.6 mg/L
塩化鉄(Ⅲ)六水和物	0.064 mg/L
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物	0.1 mg/L
ホウ酸	0.185 mg/L
塩化マンガン四水和物	0.415 mg/L
塩化亜鉛	0.003 mg/L
塩化コバルト六水和物	0.0015 mg/L
塩化銅二水和物	0.00001 mg/L
モリブデン酸二ナトリウム二水和物	0.007 mg/L
炭酸水素ナトリウム	50 mg/L

3-3-2　培養及び継代

三角フラスコに OECD 培地 100mL を加え、23℃連続照明下で培養し、週に１度の培地交換を行った。培地交換の際は三角フラスコの蓋及び入口を火炎滅菌（図 11）した後、作業を行った。また、不要な汚染を防ぐため溶液の移し替えは滅菌済みの使い捨てピペット等を用いた。上記とは別に OECD 培地に 0.8%のアガロースを加えた寒天傾斜培地で保存した。寒天傾斜培地は少なくとも２か月に１度新しい培地に交換した。寒天培地の継代は、ガスバーナーで滅菌した白金耳でムレミカヅキモを掻き取り、新しい寒天培地の上になすりつけることで行った。



図 11　ガスバーナーによる火炎滅菌の様子（左：蓋の滅菌、右：入口の滅菌）

４　試験方法

生態影響試験では対象となる水試料（環境水や排水）で行う試験の他に精度管理を目的とした感受性試験を実施する。両者とも基本的な試験操作は同様である。ここでは標準物質を用いた感受性試験を例に記述する。

4-1　ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュの試験条件を表７に示す。ゼブラフィッシュの胚を受精直後からふ化後の卵黄吸収完了の直前まで試料にばく露し、ふ化率や生存率、発生異常等を調べ、対照区と比較することにより、胚・仔魚期の個体に対する試料の急性毒性及び亜慢性毒性を明らかにすることを目的としている。感受性試験は標準物質として硫酸銅五水和物を使用し、年１回以上実施した。当研究所の試験環境における LOEC は 12.5～100μg/L であった。

表７　ゼブラフィッシュ試験条件

ばく露方式	半止水式（少なくとも週３回または２日毎に換水）
ばく露期間	最長10日間
試験区	５濃度区（公比２）
繰り返し数	４容器／試験区
供試卵数	15粒／容器
容器	50mLガラスカップ
試験容量	50mL／容器
給餌	なし
観察項目	胚のふ化及び胚または稚魚の生死
エンドポイント	対照区の50%以上の胚がふ化した日を０日とし、５日後まで

4-1-1　試験準備

継代時と同様の操作を行い、試験用の受精卵を得た。

4-1-2　試験溶液の調製

硫酸銅五水和物を飼育水用いて段階的（公比２）に希釈し、５濃度の水溶液を調製した。500mL メスシリンダーを用いて各溶液を 250mL ずつ調製し、200mL は生物応答試験に残りは水質測定に使用した。なお、対照区は飼育水とした。

4-1-3　試験開始時

各濃度４個の容器を用意し、試験溶液を 50mL 分注したガラス製容器１個あたり受精卵を加工したパスツールピペット等を用いて 15 粒ずつ入れた。なお、受精から試験開始まで４

時間以内に一連の操作を完了させる必要がある。

4-1-4　試験期間中の操作

試験開始から 24 時間毎に観察を行い、死亡卵及び死亡個体は速やかに除去し、生存数及び死亡数を記録した。また、２日に１回換水を行った。なお、試験期間中に給餌は行わず、換水時に調製した溶液と換水後の溶液の水質測定を行った。

4-1-5　試験終了時

対照区において 50%を超える受精卵がふ化した日をふ化日（０日後）として、ふ化日から５日後まで試験を行った。通常、試験を開始した日から８～10 日後となる。

試験で使用し、ふ化した個体は以降の試験で使用できない。また、供試生物は外来種であるため、試験終了後は適正に処理した。

4-2　ニセネコゼミジンコ

ニセネコゼミジンコの試験条件を表８に示す。ふ化後 24 時間以内のミジンコを試料に７日前後ばく露し、ばく露中の死亡及び産まれた仔虫の数を調べ、対照区と比較することにより、ミジンコの繁殖に対する試料の慢性毒性を明らかにすることを目的としている。感受性試験は標準物質として塩化ナトリウムを使用し、年１回以上実施した。当研究所の試験環境における LOEC は 0.25～0.5g/L であった。

表８　ニセネコゼミジンコ試験条件

ばく露方式	半止水式（少なくとも週３回または２日毎に換水）
ばく露期間	最長８日間
試験区	５濃度区（公比２）
繰り返し数	10容器／試験区
供試卵数	１個体／容器
容器	50mLスナップカップ
試験容量	15mL／容器
給餌	クロレラ：有機炭素換算量で0.02～0.05mgC／日／個体 YCT（Yest Cerophyll Trout chow）：50μL／日／個体
観察項目	親ミジンコの生死及び産仔数
エンドポイント	対照区の60%以上が最大８日間で３腹分の産仔をするまで

4-2-1　試験準備

個別飼育の継代を繰り返し、試験２週間前の時点で試験成立条件を満たす親個体から産まれた仔虫を個別飼育しておき、試験開始日に試験成立条件を満たす親個体から産まれた仔虫のみを試験に使用した。

4-2-2　試験溶液の調製

塩化ナトリウムを飼育水用いて段階的（公比２）に希釈し、５濃度の水溶液を調製した。500mL メスシリンダーを用いて各溶液を 250mL ずつ調製し、150mL は生物応答試験に残りは水質測定に使用した。なお、対照区は飼育水とした。

4-2-3　試験開始時

試験溶液を 15mL 分注したガラス製容器に個別飼育で産まれた生後 24 時間以内の仔虫を加工パスツールピペット等を用いて１個体ずつ入れた。１濃度あたり 10 容器を用意した。このとき、個別飼育を試験溶液で汚染しない様、対照区→低濃度試験溶液→高濃度試験溶液の順に移し替えるとよい。

なお、準備した仔虫の数に余裕がある場合は、開始時に１容器あたり２個体ずつ仔虫を入れておき、１回目の産仔の前に状態のよい個体どちらか一方を選別して試験に供することも可能である。

4-2-4　試験期間中の操作

ばく露期間中は毎日給餌、仔虫の計数及び個体観察を行い、２日に１回換水を行った。また、計数の際に仔虫は除去した。換水時に調製した溶液と換水後の溶液の水質測定を行った。

4-2-5　試験終了時

対照区における 60%以上の個体で３腹以上の産仔が確認された日をもって試験を終了する。ただし、上記によらず試験期間は最長８日間とした。

供試生物は外来種であるため、試験終了後は適正に処理した。

4-3　ムレミカヅキモ

ムレミカヅキモの試験条件を表９に示す。指数繁殖期の藻類を試料に添加して 72 時間ばく露し、ばく露中及びばく露終了時に生物量を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生長に対する試料の影響を明らかにすることを目的としている。感受性試験は標準物質として二クロム酸カリウムを使用し、年１回以上実施した。当研究所の試験環境における LOEC は 0.38～3.1mg/L であった。

表９　ムレミカヅキモ試験条件

ばく露方式	止水式（１日に２回フラスコを撹拌）
ばく露期間	72日間
試験区	５濃度区（公比２）
繰り返し数	３容器／試験区、６容器／対照区
初期生物量	5,000cells／mL
容器	250mLビーカー
試験容量	100mL／容器
観察項目	生物量（細胞数計による測定）
エンドポイント	ばく露開始から72時間まで

4-3-1　前培養

生長速度が試験に必要とされる基準以内にあることを確かめること及び試験期間中の同調分裂を避けることから二度の前培養を行った。前培養は OECD 培地で培養を行い、生物量が 0.5～１×10^6cells/mL に達した時点で本試験に使用した。

4-3-2　試験溶液の調製

二クロム酸カリウムを飼育水用いて段階的(公比２)に希釈し、５濃度を調製する。1000mL メスシリンダーを用いて各溶液を 400mL ずつ調製し、300mL は生物応答試験に残りは水質測定に使用した。対象区は OECD 培地とした。

4-3-3　試験開始時

試験溶液を 100 mL 分注した三角フラスコへ 0.5×10^4cells/mL となるようにムレミカヅキモを分注した。ムレミカヅキモを入れた各試験液から試験溶液を適量採取し、粒子計数装置を用いて生物量を測定した。計測を終えた試験溶液は試験条件に設定したインキュベーターに保管した。また、調製した試験溶液の pH を測定した。

4-3-4　試験期間中の操作

試験開始から 24、48、72 時間後に試験容器から試験溶液を適量採取し、粒子計数装置を用いて生物量を測定した。

4-3-5　試験終了時

試験開始から 72 時間後とした。試験終了後、試験液の pH を測定した。

５　試験結果

試験結果については検討案に従い解析した。なお、解析方法については、検討案に詳細が記載されている。

６　まとめ

生態影響試験は事業場等から排出される排水や環境水等の組成が変動する水に対して用いることで、生物に対する水総体としての影響を評価することが可能である。本手法は事業場等における自主的な排水改善方法として有用であり、環境省は、自主的な評価や試験を契機とした排水改善やその他の自主的な化学物質管理が行われることで、公共用水域への負荷低減に寄与する可能性について言及している。本市では、生態影響試験の導入に向け、環境水を用いて技術的な知見を集積してきた。本報告書がこれから生態影響試験を始める本市事業者等の一助となれば幸いである。

参考文献

1) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案）(2013)
2) 小林弘明、川原志郎、永山恵、岩渕美香、中村弘造：川崎市におけるバイオアッセイの取組み、川崎市環境総合研究所年報、第２号、87～92（2014）
3) 小林弘明、堀井朋子、古川功二：川崎市におけるバイオアッセイの取組み（第２報)、川崎市環境総合研究所年報、第４号、58～65（2016）

4) US EPA : Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations、EPA/600/2-88/070 (1989)
5) US EPA : Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants、EPA/833B-99/002 (1999)

6) US EPA : Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program 、http://water.epa.gov/polwaste/npdes/basics/upload/owmfinaltretie.pdf (2001)
7) OECD : OECD Test Guidelines for the Chemicals http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm
8) 国立環境研究所：第 11 回生態影響試験実習セミナー配布資料