

川崎市におけるバイオアッセイの取組 (第2報)

The Works for the Ecotoxicity in Kawasaki City (2)

小林 弘明 Hiroaki KOBAYASHI 堀井 朋子 Tomoko HORII 古川 功二 Koji FURUKAWA

要旨

本市では、市民の化学物質に対するさらなる安全・安心の確保を目指し、環境汚染の未然防止・環境リスク低減に向けた化学物質対策を進めている。本研究所では、科学的に環境リスクを把握することを目的として、生物応答を利用した生態影響試験の導入に向け、2009年度から環境省排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会が示す「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」に基づき、生物を用いた化学物質の影響を評価するため、生物応答を利用した生態影響試験に向けた取組を行ってきた。

今回、供試生物であるゼブラフィッシュ受精卵、ニセネコゼミジンコ、ムレミカヅキモの感受性試験を行うことにより、品質・精度が確保され、再現性も概ね確認できたことから、バイオアッセイの実施体制は概ね確立した。また、ケーススタディとして実施した、塩化ナトリウム等の各種化学物質を用いた生態影響試験では、単物質での曝露と比較し、複数の物質が混在する場合、影響が促進されることや環境水を用いた生態影響試験を行ったところ一部影響が見られた。

キーワード：生態影響試験、魚類、甲殻類、藻類

Key words: Ecotoxicity, Fish, Crabs, Algae

1 はじめに

現在、国内で流通している化学物質は5～10万種とも言われており、私たちの生活を豊かにする一方、人の健康や生態系に有害な影響を及ぼすおそれのあるものが存在する。これらの化学物質による環境汚染を防止するため、国及び自治体では、化学物質の製造・使用・廃棄時に適切な管理を行うための様々な法規制が行われている。

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」や「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律」では、化学物質による環境汚染の未然防止のための審査・規制や事業者の自主的な管理が図られてきた。

本市は、京浜工業地帯の中核として発展し、化学物質を取り扱う事業所が多く、化学物質対策の推進を川崎市環境基本計画（2011年3月改訂）の重点分野に掲げ、市独自の対策を進めている。本市は、これまでに社会的に問題となったダイオキシン類やベンゼンなどの有害性が確認されている化学物質に対する濃度規制や、化学物質全体の排出量を一律に削減する対策等を実施し、川崎市環境基本計画に掲げる削減目標を前倒しで達成するなど大きな成果を上げてきている。一方で、特定第一種指定化学物質などの有害性の高い化学物質の排出量は他都市に比べ多い状況にあることから、市民の化学物質に対するさらなる安全・安心の確保など環境汚染の未然防止・環境リスク低減に向けて、今後は排出量管理に加え、未規制化学物質についても着目し、環境リスク低減の視点に立った化学物質対策を推進している。

本研究所では科学的に環境リスクを把握することを目的とし、2009年より生物応答を利用した生態影響試験（以下、バイオアッセイ）の導入に向けた取組を推進してい

る。

バイオアッセイとは、試験試料を生物に曝露し、生死や行動異常等を観察することで試料の毒性を評価する手法であり、新規化学物質の審査、環境モニタリングとして古くから用いられてきた手法である。試験に用いられる生物は魚類や甲殻類、植物や昆虫など多岐にわたり、各々の生物の感受性や生活段階により影響は異なる。さらに影響は生死を伴う急性毒性や不妊などの慢性毒性など影響の度合いも異なるため、試験方法も多岐にわたる。

米国、カナダ等では、各種化学物質の個別規制を補完する形で排水規制に導入されており、バイオアッセイで示された排水毒性によって受水域の水生生物が影響を受けるかどうか予測するツールとして用いられている。また、欧州のフランス、スウェーデン、ノルウェー、北アイルランドでは、規制的な手法として導入されており、水生生物が影響を受けない水環境を目指すなど、バイオアッセイによる排水・環境評価の重要性が国際的にも高まっている。こうした中、環境省では、2009年12月に今後の水環境の保全のあり方について検討会にて現行の排水規制を補完する手法として、「生物応答を利用した排水管理手法 Whole Effluent Toxicity :WET 手法）」の有効性についての検討がなされ、その後の2013年3月には、生物応答を利用した水環境管理手法に関する検討会のバイオアッセイ技術検討分科会より「生物応答を用いた排水試験法（以下、環境省試験法¹⁾）」として、試験法がまとめられた。

本研究所でのこれまでのバイオアッセイについての取組は、前報²⁾のとおりであるが、今回は、①試験に用いる供試生物の精度・品質、試験の再現性の確保を目的として標準物質を用いたバイオアッセイを実施するとともに、

②ケーススタディとして各種化学物質、環境水を用いてバイオアッセイを実施したので報告する。

2 供試生物及び飼育条件

2.1 供試生物

試験には、環境省試験法に示されるゼブラフィッシュ、ニセネコゼミジンコ、ムレミカヅキモの3種の生物(表1)を用いた。

試験に用いられるゼブラフィッシュは、既存の化学物質を対象とした試験ガイドライン³⁾やOECD(経済協力開発機構)テストガイドライン等の国際規格などで用いられている魚種である。試験方法には、成体を用いる急性毒性試験や延長毒性試験、受精卵から仔魚期のゼブラフィッシュを用いる胚・仔魚期短期慢性毒性試験などが知られている。ニセネコゼミジンコは、カナダ環境省(Environment Canada)や米国環境保護庁(以下、U.S.EPA)、米国試験材料協会(ASTM)の試験法などの国際規格でも指定されており、寿命が短いことから短期慢性毒性試験に多く用いられている甲殻類である。ムレミカヅキモは、古くから化学物質の評価・審査に用いられている種であり、OECDや国際標準化機構(ISO)、U.S.EPAの試験法⁴⁾などの国際規格でも指定される藻類である。

表1 供試生物一覧

生物種	名称
魚類	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)
甲殻類	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)
藻類	ムレミカヅキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)

2.2 飼育条件

環境省試験法に基づき、以下のとおり飼育管理及び培養を行った。

2.2.1 ゼブラフィッシュ

国立研究開発法人国立環境研究所(以下、国環研)から入手したゼブラフィッシュを飼育に用いた。ゼブラフィッシュの飼育には脱塩素水道水を用い、明暗周期16:8、水温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ とし、朝夕に一日2回、テトラミン及び孵化後24時間以内のアルテミア(*Artemia sp. Nauplii*)を適量与えた。

試験には、上記のゼブラフィッシュから採卵した受精後4時間以内の受精卵を用いた。ゼブラフィッシュは、雌雄別々の水槽で飼育し、採卵する場合のみ当日の朝から混泳させた。

2.2.2 ニセネコゼミジンコ

国環研から入手したニセネコゼミジンコを飼育に用いた。ニセネコゼミジンコの飼育には、脱塩素水道水を用い、明暗周期16:8、水温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ とし、朝に一日1度、クロレラ及びYCT(Yeast, Cerophyll and Trout Chou)を適量与えた。

試験には、上記のニセネコゼミジンコから産後24時間

以内の仔虫を用いた。

2.2.3 ムレミカヅキモ

国環研から入手したムレミカヅキモ(NIES-35株)を継代し用いた。ムレミカヅキモは、関東化学製OECD培地を用い、連続明期、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50%、照度5,000Lux以上の照明付インキュベーター内で培養を行った。

実験には、試験実施日の前4日間の前培養を行い、細胞数が少なくとも16倍以上に増加したものを用いた。細胞数の計測には、Cysmex社製生物量計測装置を用いた。

3 試験方法

3.1 バイオアッセイの手法

試験方法は、環境省試験法を用いて実施した。環境省試験法の概要を以下に示す。

3.1.1 ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュを用いて胚・仔魚期短期慢性毒性試験を実施した。当試験は、魚類の受精卵を試料に受精直後から孵化後の卵黄吸収完了の直前まで曝露し、孵化率や生存率、発生異常などを調べ、対照区と比較することにより、胚・仔魚期の魚類に対する試料の致死影響(急性毒性)及び亜致死的影響(亜慢性毒性)を明らかにするものである。なお、評価には、平均孵化率、平均生存率を用いて評価を行った。今回実施した試験条件を以下に示した。

- ・曝露方式：半止水式(少なくとも週3回、2日または3日ごとに換水)
- ・曝露期間：孵化日から5日後まで
- ・繰返し数：4容器以上/濃度区
- ・供試卵数：15粒/容器
- ・試験溶液量：50mL/容器
- ・試験温度： $26 \pm 1^\circ\text{C}$
- ・照明：室内光で明期16時間、暗期8時間
- ・給餌：なし
- ・通気：なし

3.1.2 ニセネコゼミジンコ

ニセネコゼミジンコを用いて繁殖試験を実施した。当試験は、産後24時間以内のニセネコゼミジンコを試料に7日前後(最大8日間)曝露し、曝露中の死亡及び生まれた仔虫の数(産仔数)を調べ、対照区と比較することにより、ニセネコゼミジンコの繁殖に対する試料の影響(短期慢性毒性)を明らかにするものである。なお、評価方法は、24時間後の生存率により急性毒性、8日後の平均産仔数から短期慢性毒性を評価した。今回実施した試験条件を以下に示した。

- ・曝露方式：半止水式(少なくとも週3回、2日または3日ごとに換水)
- ・曝露期間：最長8日間(対照区で60%以上の個体が3腹以上産仔するまで)
- ・繰返し数：10容器/濃度

- ・供試生物数：10 個体/濃度区（1 個体/容器）
- ・試験溶液量：15mL/容器
- ・試験温度：25±1℃
- ・照明：室内光で明期 16 時間、暗期 8 時間
- ・給餌：1.0×10⁸cell/ml に調整したクロレラ 100 μL、YCT50 μL を毎日与えた。

3.1.3 ムレミカヅキモ

ムレミカヅキモを用いて生長阻害試験を実施した。当該試験は、指数増殖期のムレミカヅキモを試料に添加して 72 時間曝露し、曝露中及び曝露終了時に生物量（細胞濃度）を調べ、対照区と比較することにより、ムレミカヅキモの生長に対する試料の影響を明らかにするものである。なお、評価方法は、生長阻害率及び EC50 を用いた。今回実施した試験条件を以下に示した。

- ・曝露方式：止水式（1 日に 3 回フラスコを振盪し、攪拌した。）
- ・曝露期間：72 時間
- ・繰返し数：3 容器/濃度区、6 容器/対照区
- ・初期生物量：5×10³cell/ml
- ・試験溶液量：100mL/容器
- ・試験温度：21～24℃の範囲
- ・照明：白色蛍光灯光、24 時間明期、5000Lux

3.2 試験試料

バイオアッセイに用いる供試生物の精度・品質管理及び試験の再現性を目的として標準物質を用いたバイオアッセイ、ケーススタディとして各種化学物質及び環境水を用いたバイオアッセイを実施した。

3.2.1 標準物質を用いたバイオアッセイ

環境省試験法では、標準物質を用いた供試生物の精度管理として、環境省試験法第 5 部「試験結果の信頼性評価 4. 標準物質を用いた感受性試験」に「定期的に試験生物の感受性を確認することが推奨される」とされている。標準物質は、生物毎に指定されており、試験機関毎におおよその無影響濃度（以下、NOEC）及び最小影響濃度（以下、LOEC）を算出する。標準物質として用いられる物質は、これまで多くの試験がなされており、文献等で NOEC 等が示されているものである。各試験機関でこの標準物質を用いて感受性試験を実施することで供試生物の品質管理を行うことが出来るとされている。各試験は、再現性や精度、結果のばらつきを検証するため、5 回から 6 回、同一の濃度で実施した。供試生物とそれに対応する標準物質を表 2 に示した。

表 2 供試生物と標準物質

供試生物	標準物質
ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	硫酸銅 (CuSO ₄)
ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	塩化ナトリウム (NaCl)
ムレミカヅキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	重クロム酸カリウム (K ₂ Cr ₂ O ₇)

3.2.2 各種化学物質を用いたバイオアッセイ

環境水及び排水中には多くの化学物質が存在しており、

イオン等の様々な状態で存在している。バイオアッセイを用いた環境水評価を行う際、カチオン又は、アニオンの違い、また、複数の化学物質が混在した場合、供試生物にどのような影響があるかを確認するため、塩化ナトリウム (NaCl)、硫酸ナトリウム (Na₂SO₄)、塩化カリウム (KCl)、硫酸カリウム (K₂SO₄) を用いてバイオアッセイを行った。さらに、上記化学物質が混在した場合どのような影響があるかを確認するため、塩化ナトリウムと硫酸ナトリウム、又は、塩化カリウムと硫酸カリウムを表 3 に示す濃度になるように混在させた溶液 (NaMix、KMix) を調製し、バイオアッセイを実施した。なお、混在させた溶液中では、今回はイオンが完全解離しているものとし、電離解離定数及び平衡定数を 1 として扱った。

表 3 混在させた化学物質の調製濃度

	(mmol/L)				
カチオンイオン濃度	20.0	10.0	5.0	2.5	1.25
塩化物イオン濃度	13.30	6.70	3.35	1.67	0.84
硫酸イオン濃度	6.70	3.35	1.67	0.84	0.42

3.2.3 環境水

環境水を用いたケーススタディとして、市内河川の多摩川水系 6 地点、鶴見川水系 6 地点で 4 月と 6 月に採取した河川水等を検体としてバイオアッセイを実施した。

ゼブラフィッシュ及びニセネコゼミジンコでは、河川水を飼育水で 80%、40%、20%、10%となるよう調製し、ムレミカヅキモは、河川水を培地で 80%、40%、20%となるよう調製したものをを用いた。

4 結果

4.1 有意差の検定

試験結果の評価に際し LOEC 及び NOEC の算出には、コントロール（以下、BL）との有意差の検定を行うことで算出した。有意差検定には、t 検定を用い、t>0.05 を優位とした。

4.2 標準物質を用いたバイオアッセイ

4.2.1 ゼブラフィッシュ

標準物質である硫酸銅を用いたバイオアッセイを実施した結果の一例を図 1 に示した。硫酸銅濃度を 25mg/L～800mg/L の間で濃度の公比 2 となるよう調製し、これにゼブラフィッシュの受精卵を曝露し、LOEC を算出した。また、同試験を 6 回実施し（表 4）、平均・標準偏差の算出を行ったところ、平均は 58.3mg/L、標準偏差は 20.4、LOEC は約 50mg/L であった。当結果は、既存の報告である生態毒性学会編・生態影響試験ガイドブック⁵⁾（以下、生態影響試験ガイドブック）に記載のある 50mg/L 程度と同じ結果となった。このことから試験に用いる受精卵としての品質が概ね確保されていることが確認された。

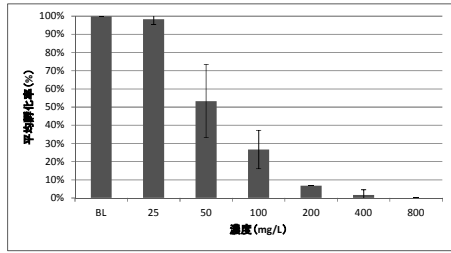


図1 硫酸銅を用いた胚・仔魚期短期慢性毒性試験の一例

表4 標準物質を用いたゼブラフィッシュのLOEC

LOEC (mg/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	標準偏差
	50	100	50	50	50	50	58	20

4.2.2 ニセネコゼミジンコ

塩化ナトリウムを標準物質としたバイオアッセイの結果の一例を図2に示した。塩化ナトリウム濃度を0.35g/L～2.8g/Lの間で濃度の公比2となるよう調製し、試験を実施したところ、LOECは0.7g/Lとなった。

さらに同試験を5回連続で実施したLOECの平均及び標準偏差は、平均0.6g/L、標準偏差0.26であった(表5)。生態影響試験ガイドブックで示される塩化ナトリウムのLOECは、0.5～1.5g/Lとされていることから、試験に用いるニセネコゼミジンコとしての品質・精度は概ね確保されていることが確認された。

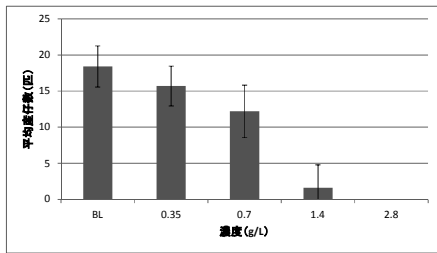


図2 塩化ナトリウムを用いた繁殖試験の一例

表5 標準物質を用いたニセネコゼミジンコのLOEC

LOEC (g/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均	標準偏差
	0.7	1.0	0.5	0.5	0.3	0.6	0.3

4.2.3 ムレミカヅキモ

重クロム酸カリウムを標準物質としたバイオアッセイを実施した結果の一例を図3に示した。重クロム酸カリウム濃度は、0.125mg/L～4.0mg/Lの間で濃度の公比2となるよう調製した。

生長阻害率と標準物質濃度から単回帰式を作成したところ、 $y=7.6452X+54.51$ となった。ムレミカヅキモの細胞数増加率がBLに対して半数になる影響濃度である半数影響濃度(以下、EC50)を上式から求めたところ0.23mg/Lとなった。生態影響試験ガイドブック等の既存の文献で示されている、0.4～0.5mg/Lと比較すると低い濃度であることから、本研究所でバイオアッセイに用いるムレミカヅキモは、ガイドブック等で示されているものと比較してより高感度であることが確認された。さらに、同試験を4回実施し、LOEC、細胞生長速度の平均・標準偏差・変動計数の算出を行ったところ(表6)、LOECは、0.19mg/L、細胞生長速度平均は、5.68cell/h、標準偏差0.35、変動

係数は、6.30となっていること、高感度であるが、LOECは5回を通じてほぼ同濃度であることから、試験の再現性が概ね確保されていることが確認された。

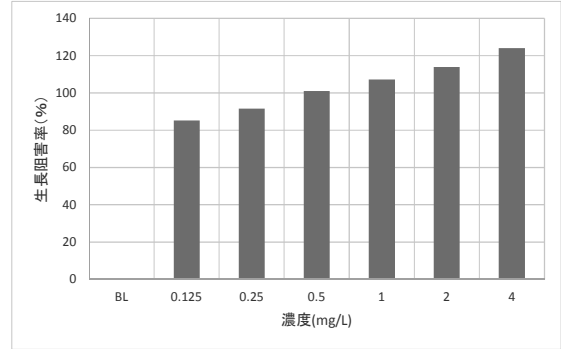


図3 重クロム酸カリウムを用いた生長阻害試験の一例

表6 標準物質を用いたムレミカヅキモのLOEC等

LOEC (mg/L)	1回目	2回目	3回目	4回目	平均	標準偏差
	0.25	0.125	0.125	0.25	0.19	0.07
細胞生長速度平均(cell/h)	5.71	6.66	4.21	6.15	5.68	0.91
標準偏差	0.57	0.31	0.32	0.18	0.35	-
変動係数	10.03	4.71	7.52	2.95	6.30	6.30

4.3 各種化学物質を用いたバイオアッセイ

4.3.1 ゼブラフィッシュ

各種化学物質を用いたバイオアッセイの結果を図4に平均孵化率、図5に平均生存率を示した。また、平均孵化率、平均生存率の影響濃度一覧を表7、8に示した。

塩化ナトリウムと硫酸ナトリウムで比較すると、平均孵化率では塩化ナトリウムは100mmol/L以上でも平均孵化率に影響はなかったが、硫酸ナトリウムでは50mmol/Lで影響が確認された。

平均生存率でみると塩化ナトリウムでは、25mmol/Lで影響が確認されたが、硫酸ナトリウムでは半分の濃度である12.5mmol/Lで影響が確認された。

塩化カリウムと硫酸カリウムで比較をすると、平均孵化率は塩化カリウム、硫酸カリウムともに影響は確認されていなかったが、平均生存率では塩化カリウム、硫酸カリウムともに12.5mmol/Lでも影響を受けていることが確認できた。

塩化ナトリウムと塩化カリウムで比較すると平均孵化率ではともに100mmol/Lまでの濃度では、影響が確認されていなかったが、平均生存率では、塩化ナトリウムでは25mmol/Lで影響を受けていたが、塩化カリウムでは、6.25mmol/Lでも生存することが出来なかった。

硫酸ナトリウムと硫酸カリウムで比較をすると、平均孵化率では、影響を確認できなかったが、平均生存率では、硫酸ナトリウムでは12.5mmol/Lで一部影響が確認できるものの、硫酸カリウムでは、12.5mmol/Lでは影響を大きく受け、生存率は0%であった。

また、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウムを表3に示す通り調製し、混在させた検体を用いた結果を平均孵化率は図6、平均生存率は図7に示した。平均孵化率では、20mmol/Lで影響が確認され、平均生存率では10mmol/Lで影響が確認された。単物質での試験では、硫酸ナトリ

ウムは、25mmol/L で平均生存率に影響が確認されていたが、塩化ナトリウムなどの複数物質が混在することで影響が確認される濃度が低くなっていた。ナトリウムをカチオンとした場合は、複数のアニオンが存在することで影響が促進されることが示唆された。

更に、塩化カリウム、硫酸カリウムの濃度を表3に示す通り調製し、混在させた検体を用いた結果を平均孵化率は図8、平均生存率は図9に示した。平均孵化率では、1.25mmol/L 以上で影響が確認された。塩化カリウム、硫酸カリウム単体では、平均孵化率に影響が確認されていなかったが、混合されることで孵化にかかる影響濃度の低下（促進）が確認された。平均生存率でも、塩化カリウム、硫酸カリウム単体では12.5mmol/L、6.25mmol/L で生存に影響を与える結果を得ていたが、両物質存在下では、1.25mmol/L で影響が確認された。

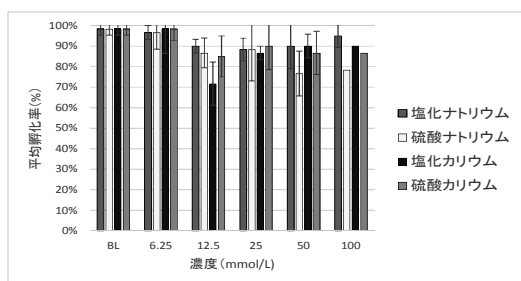


図4 平均孵化率

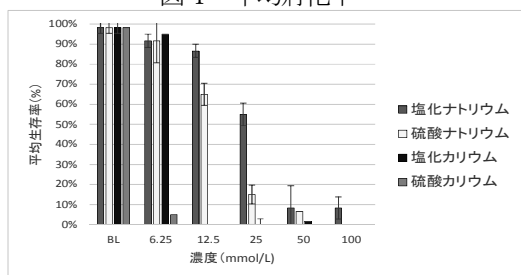


図5 平均生存率

表7 各影響濃度一覧 (平均孵化率)

濃度 (mmol/L)	6.25	12.5	25	50	100
塩化ナトリウム	-	-	-	-	-
硫酸ナトリウム	-	-	-	○	○
塩化カリウム	-	-	-	-	-
硫酸カリウム	-	-	-	-	-

表8 各影響濃度一覧 (平均生存率)

濃度 (mmol/L)	6.25	12.5	25	50	100
塩化ナトリウム	-	-	○	○	○
硫酸ナトリウム	-	○	○	○	○
塩化カリウム	-	○	○	○	○
硫酸カリウム	○	○	○	○	○

○は、影響があった濃度を示す。

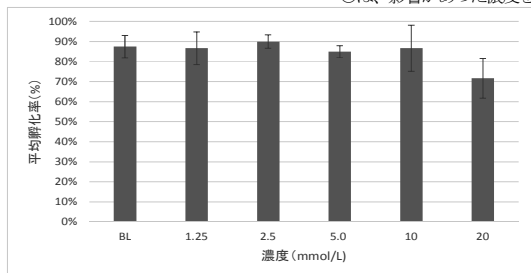


図6 ナトリウム塩混合結果 (平均孵化率)

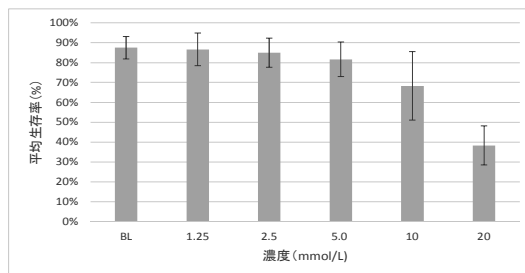


図7 ナトリウム塩混合結果 (平均生存率)

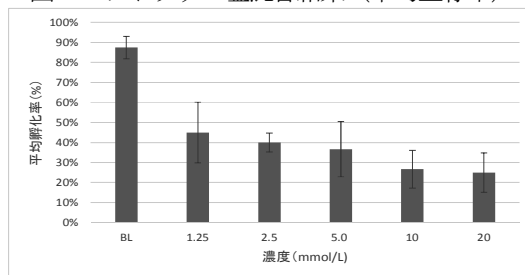


図8 カリウム塩混合結果 (平均孵化率)

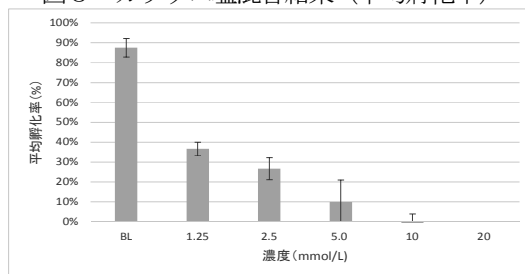


図9 カリウム塩混合結果 (平均生存率)

4.3.2 ニセネコゼミジコ

4.3.2.1 急性毒性試験

各種化学物質を用いたバイオアッセイの急性毒性試験結果を図10に示した。また、試験を行った化学物質単物質の急性毒性影響濃度一覧を表9に示した。

急性毒性では、塩化ナトリウムでは5mmol/L で影響が確認され、塩化カリウムでは、10mmol/L で影響が確認された。硫酸ナトリウムでは、影響が確認されなかったが、硫酸カリウムでは、2.5mmol/L で影響が確認された。

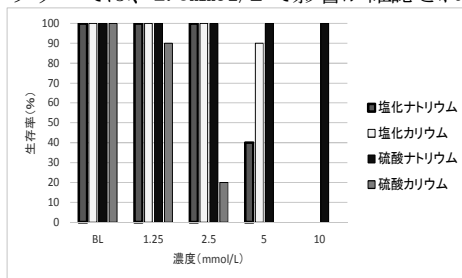


図10 各物質の急性毒性結果

表9 各影響濃度一覧 (急性毒性)

濃度 (mmol/L)	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00
塩化ナトリウム	-	-	-	-	○	○
硫酸ナトリウム	-	-	-	-	-	-
塩化カリウム	-	-	-	-	-	○
硫酸カリウム	-	-	-	○	○	○

○は、影響があった濃度を示す。

4.2.2.2 短期慢性毒性試験

各種化学物質の短期慢性毒性結果を図11に示した。塩化ナトリウムでは5.0mmol/L 以上で影響が確認されてお

り、硫酸ナトリウムでは、10mmol/Lで影響が確認された。塩化カリウムでは、5.0mmol/L以上で影響が確認され、硫酸カリウムでは、1.25mmol/L以上のすべての濃度で影響が確認された。試験を行った化学物質単物質の慢性毒性影響濃度の一覧を表10に示した。

また、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウムが表3の濃度となるよう調整し、混在したものに曝露した結果を図12に示した。塩化ナトリウムでは、5.0mmol/Lで影響が確認されており、硫酸ナトリウムでは10mmol/Lで影響が確認されていたが、混合した溶液ではナトリウムイオン濃度が2.5mmol/Lで影響が確認された。つまり、ナトリウムの存在下では、複数のアニオンが存在することで影響が促進されることが示唆された。

さらに塩化カリウム、硫酸カリウムを同じく表3に示す通り調製し、曝露した結果を図13に示した。塩化カリウムは5.0mmol/Lで影響が確認されており、硫酸カリウムは1.25mmol/Lで影響が確認されていたが、混和した検体では、カリウムイオン濃度が1.25mmol/Lで影響が確認され、ナトリウムイオンの場合と同じく、複数のアニオンにより影響が促進されることが示唆された。

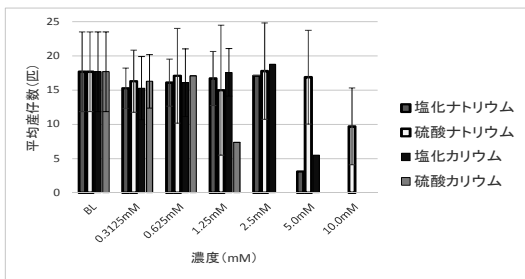


図11 各物質の短期慢性毒性結果

表10 各影響濃度一覧 (慢性毒性)

濃度 (mmol/L)	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00
塩化ナトリウム	-	-	-	-	○	○
硫酸ナトリウム	-	-	-	-	-	○
塩化カリウム	-	-	-	-	○	○
硫酸カリウム	-	-	○	○	○	○

○は、影響があった濃度を示す。

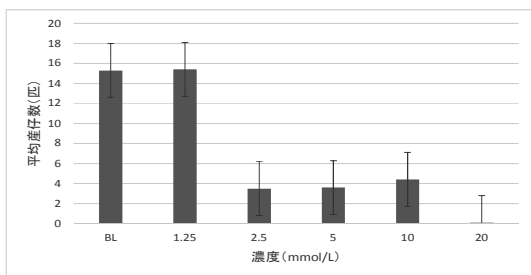


図12 ナトリウム塩混合結果 短期慢性毒性

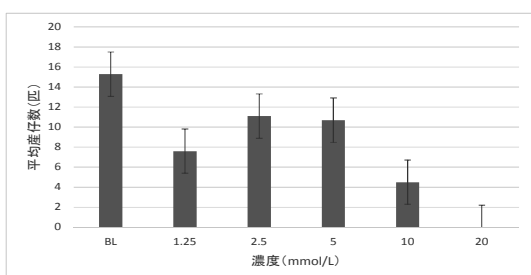


図13 カリウム塩混合結果 短期慢性毒性

4.3.3 ムレミカツキモ

ゼブラフィッシュ及びニセネコゼミジンコと同じく、各種化学物質を用いたバイオアッセイを実施した結果を図14に示した。グラフは、横軸を各物質の濃度、縦軸をブランクの生長率を100とした場合の生長阻害率を示した。

塩化ナトリウムでは、2.5mmol/L以上で影響が確認され、硫酸ナトリウムでは、10mmol/L以上で影響が確認された。塩化カリウムでは、5.0mmol/L以上で影響が確認され、硫酸カリウムでは、2.5mmol/L以上で影響が確認された。

さらに塩化ナトリウム、硫酸ナトリウムを表3に示す通り調製し、混在した検体を曝露した結果を図15に示した。塩化ナトリウムでは、2.5mmol/Lで影響があり、硫酸ナトリウムでは10mmol/Lで影響があったが、ナトリウム混合では、20mmol/Lで影響があったことから、生長阻害が抑制される傾向が確認された。

また、カリウムイオンを表3に示す通り調製した検体を曝露した結果を図16に示した。塩化カリウムでは、5.0mmol/Lで影響があり、硫酸カリウムでは、2.5mmol/Lで影響があったが、カリウム混合では、1.25mmol/Lで影響があったことから生長阻害が促進される傾向が確認された。

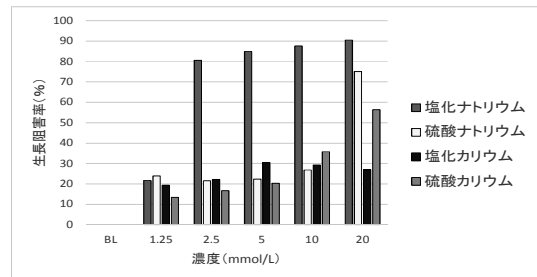


図14 各物質の生長阻害結果

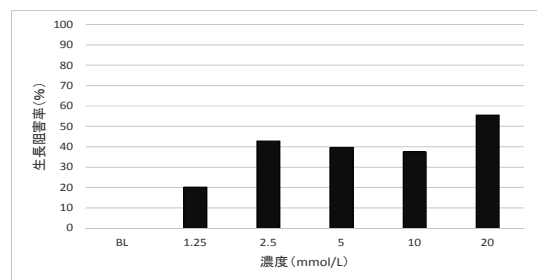


図15 ナトリウム塩混合結果 生長阻害試験

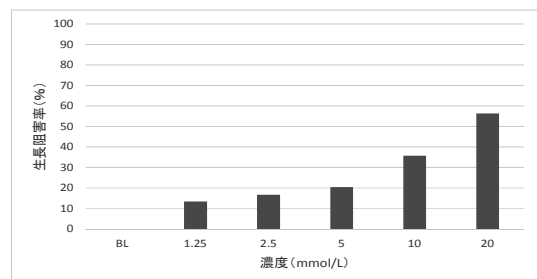


図16 カリウム塩混合結果 生長阻害試験

4.4 環境水を用いたケーススタディ

環境省では、バイオアッセイを公共用水域等の河川水

に用いる事で生態系保全として利用することも検討されていることから、環境水を用いたバイオアッセイを実施した。

4.4.1 ゼブラフィッシュ

多摩川水系6地点、鶴見川水系6地点で採水した環境水を80%、40%、20%、10%となるように飼育水を用いて希釈したものを検体とし、バイオアッセイを実施したところ、多摩川水系、鶴見川水系ともにゼブラフィッシュの平均孵化率、平均生存率に影響を与える地点はなかった。

4.4.2 ニセネコゼミジンコ

ゼブラフィッシュと同じく、ニセネコゼミジンコを用いてバイオアッセイを行ったところ、鶴見川水系では、4月に行った1回目の試験で、6地点中1地点でニセネコゼミジンコの繁殖に影響が確認されたが、6月に行った2回目の試験では、全ての地点で影響は確認されなかった。影響が確認された地点については、引き続き注視をしていく。

多摩川水系で採取した環境水は、全て影響は確認されなかった。

4.4.3 ムレミカツキモ

ムレミカツキモは、あらかじめ影響が確認されている環境水を用いてバイオアッセイを実施した結果を図17に示した。検体である環境水を80%、40%、20%となるように培地で希釈し、生長阻害試験を実施したところ、80%の濃度で影響が確認された。一方、40%以下では、負の生長阻害率（つまり生長促進）が確認された。

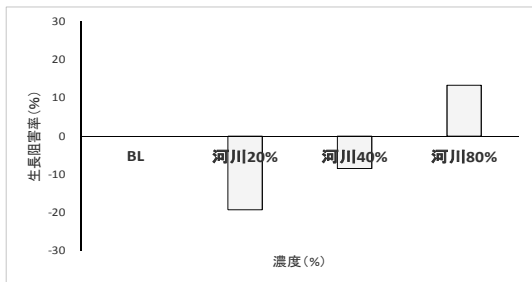


図17 環境水を用いた生長阻害試験（環境水）

5 まとめ

本市では2009年度から生物応答を利用したバイオアッセイの実施に向けた取組を進めており、供試生物の飼育、設備及び管理方法が概ね確立し、各種化学物質及びケーススタディとして環境水を用いたバイオアッセイを実施してきた。

- (1) 供試生物であるゼブラフィッシュ受精卵、ニセネコゼミジンコ、ムレミカツキモの品質・精度が確保され、また、再現性も概ね確認できていることから、本研究所において、バイオアッセイの実施体制は概ね確立した。今後は、試験対象とする検体の拡充等バイオアッセイの更なる取組を進めていく。
- (2) ゼブラフィッシュ、ニセネコゼミジンコを用いたバ

イオアッセイでは、今回の試験に使用した化学物質が複数混合されている場合、単物質の影響と比較し、抑制又は、促進する可能性が確認されたことから、単物質評価だけでなく、複数の物質が混在した場合の評価についても調査研究を行っていく必要がある。今後は、曝露する物質の溶液中での動態等をより詳細に把握し、各種の生物に与える影響について検討を行うため、曝露開始前後の溶存イオン等についてイオンクロマトグラフ等の機器分析による分析結果と併せてバイオアッセイを進めていく必要がある。

- (3) ケーススタディとして河川水を用いた場合、ニセネコゼミジンコの繁殖に影響が確認された。三島らの報告^{6)~8)}では、全国的にも影響が見られる河川があるとされていることから、バイオアッセイのみならず、水質分析、化学物質の実態調査等と併せて様々なフィールドで試行的に試験を続けることで、ノウハウを蓄積し、より詳細な環境リスク評価やリスクの把握を行うことが可能となる。

今後も市民の安全と安心を確保するため、環境汚染の未然防止、環境リスク低減に向けて、環境モニタリングや環境リスク評価と共にバイオアッセイを進めていく必要がある。

謝辞

本研究は、2013 度川崎市任期付研究員川原志郎様の協力及びI型共同研究の手法を一部用いて実施しました。本研究の推進にあたり、川原様、国立環境研究所環境リスク研究センター環境リスク研究推進室長鎌田典久様に多大なる御指導及び御鞭撻を賜りましたことをここに深謝いたします。

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、岩淵美香、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) OECD:OECD テストガイドライン、OECD Guidelines for the Testing of chemicals、<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>、
- 4) USEPA: Harmonized Test Guidelines、<https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances>
- 5) 日本環境毒性学会：生態影響試験ハンドブック—化学物質の環境リスク評価—、第2版、朝倉書店(2004)
- 6) 三島聡子、大塚知泰、齋藤和久：バイオアッセイによる河川水の生態影響評価、第34回神奈川県市環境・公害研究合同発表会（2010年6月4日開催）

[http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/gakka
i/kensi10.html](http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/gakka
i/kensi10.html)

- 7) 三島聡子、大塚知泰、長谷川敦子、齋藤和久：河川
水中化学物質による生態影響の評価、神奈川県環境
科学センター研究報告、35、1-7
- 8) 大塚知泰、石割隼人、三島聡子、長谷川敦子：バイ
オアッセイによる目久尻川の水質評価、第38回神奈
川縣市環境・公害研究合同発表会（2014年6月6日
開催）

[http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/tyous
a-kenkyu/28ken-2si.html#38th](http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/center/tyous
a-kenkyu/28ken-2si.html#38th)