

川崎市におけるバイオアッセイの取組（第3報）

The Works for the Ecotoxicity in Kawasaki City (3)

財原 宏一 小林 弘明 井上 雄一	Koichi SAIHARA Hiroaki KOBAYASHI Takekazu INOUE	佐々田 丈瑠 豊田 恵子	Takeru SASADA Keiko TOYODA
-------------------------	---	-----------------	-------------------------------

要旨

本市では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おり、科学的に環境リスクを把握することを目的として、生物応答を用いた生態影響試験の導入に向けた取組を行ってきた。今回、ゼブラフィッシュ、ニセネコゼミジンコ及びムレミカヅキモについて標準物質を用いた感受性試験を行い、飼育・培養を行っている供試生物が適正に維持管理されていることを確認した。また、河川水を対象に市内2地点において年4回の調査を実施した結果、全ての供試生物において河川水の影響は確認されなかった。

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、毒性情報について未知のものや排水規制の対象外の物質について、水環境中で水生生物に影響を及ぼす恐れが懸念されている。このような状況の中、環境省では2011年に今後の水環境保全の在り方についてまとめ^①、生物応答を利用した排水管理手法の有効性について言及した。2016年からは、専門家、産業界、地方自治体及びNPO等幅広い関係者を委員とした「生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会」(以下、検討会)を設置し^②、本手法の有効性や活用方法について議論されている。また、模擬排水を用いた精度管理試験(生態影響試験チャレンジテスト)や事業所排水を用いた生態影響試験及び排水改善等を行うパイロット事業等が公募により実施されており、技術的な有効性や課題等の整理についても検討されている。

本市では既報のとおり^{③,④}、国内の動向を踏まえ、2009年から生物応答を用いた生態影響試験の導入に向けた取組を推進しており、現在参画している国立環境研究所及び地方環境研究所との共同研究においても重要な役割を果たしてきた。

本報では、これまでの維持管理によって確立した供試生物の飼育・培養方法及び2017年度に河川水を用いて実施した生態影響試験についてとりまとめたので、その結果を報告する。

2 供試生物及び飼育・培養条件

2.1 供試生物

試験に使用する生物は、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)」^⑤(以下、環境省試験法)に提示されている魚類(ゼブラフィッシュ)、甲殻類(ニセネコ

ゼミジンコ)、藻類(ムレミカヅキモ)の3種を選定した(表1)。本生物は、経済協力開発機構や米国環境保護庁の試験法^{⑥,⑦}でも採用されており、試験実績や毒性に関する情報の蓄積がある。各生物種は、国立環境研究所から分譲購入し、後述する飼育条件で飼育、培養及び継代を行った。

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>Raphidocelis subcapitata</i>)

2.2 飼育・培養条件

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 ゼブラフィッシュの飼育条件

発育段階や大きさに応じて適切な条件下で飼育を行った。飼育条件を表2に示す。

表2 ゼブラフィッシュ飼育条件

水温	26±1°C
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

飼育水には、有機成分及び塩素除去を目的として活性炭フィルターに通水させ、ステンレスタンク内で曝気した水道水を使用した。なお、使用時はポリプロピレン製

手付きビーカーに汲み取り、 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に加温しながらエアレーションを行った。

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日曝気を行うことでふ化させた。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。

6か月齢以降に交尾、産卵及び受精が可能になるため、この時期から雌雄を別水層で飼育した。ふ化後1年以降、雌雄を産卵用水槽で交配させ、継代をした。

2.2.2 ニセネコゼミジンコの飼育条件

飼育密度が異なる集団飼育及び個別飼育を行った。飼育条件を表3に示す。

表3 ニセネコゼミジンコ飼育条件

水温	$25 \pm 1^{\circ}\text{C}$
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

飼育水には、有機成分及び塩素除去を目的として活性炭フィルターに通水させ2Lガラスピーカーに採り、恒温槽内で1~2日エアレーションした水道水を使用した。

個別飼育のうち、産まれた仔虫の数（以下、産仔数）の多い親の3腹目または4腹目の仔虫を使用し、継代した。

2.2.3 ムレミカヅキモの培養条件

照明付きインキュベータ内で培養を行った。培養条件を表4に示す。

培地は和光純薬社製OECD培地を使用した。

表4 ムレミカヅキモ培養条件

培養温度	$23 \pm 1^{\circ}\text{C}$
照明	5000Lux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。

3 試験方法

環境省試験法に基づき、以下のとおり生態影響試験を実施した。なお、水温及び照明条件については、飼育条件と同様である。

3.1 ゼブラフィッシュの試験方法

胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験を実施した。

本試験は、魚類の胚を試験水に受精直後からふ化後の卵黄吸収完了の直前まで曝露し、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。ゼブラフィッシュの試験条件を表5に示す。

表5 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
供試生物数	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

試験期間中は、曝露開始から24時間毎に、全ての試験容器について供試生物の観察を行い、ふ化の有無、仔魚の生死を確認した。また、試験溶液は2~3日毎に換水を行った。

3.2 ニセネコゼミジンコの試験方法

ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験を実施した。本試験は、ふ化後24時間以内のミジンコを試験水に7日前後（最大8日間）曝露し、曝露中の死亡及び産仔数を調べ、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影響（慢性毒性）を明らかにするものである。ニセネコゼミジンコの試験条件を表6に示す。

表6 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
供試生物数	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

試験期間中は、毎日、試験容器毎に供試生物の生死の確認及び産まれた仔虫の計数を行った。産まれた仔虫のうち、計数時に死亡していた個体は産仔数に含めず、パステルピペットを用いて除去した。計数終了後、毎日給餌を行い、2~3日毎に試験溶液を換水した。

3.4 ムレミカヅキモの試験方法

淡水藻類を用いた生長阻害試験を実施した。本試験は、指数増殖期の藻類を試験水に添加して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、藻類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、本試験における生長とは、曝露期間中の生物量の増加を指す。ムレミカヅキモの試験条件を表7に示す。

表7 ムレミカヅキモ試験条件

ばく露方式	止水式（1日に2回フラスコを振拌）
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	曝露開始から72時間まで

指数増殖期の藻類細胞を得るために、試験開始前に前培養を行い、生長速度を確認した。また、試験期間中の同調分裂を避けるため、前培養開始前に培養を行った。

試験期間中は24時間毎に細胞数を計測した。

4 試験結果

4.1 標準物質による感受性試験

感受性試験は、環境省試験法において生態影響試験の精度管理として位置付けられており、飼育・培養している各生物に対して定期的に確認することが推奨されている。供試生物の標準物質に対する感受性が以前と大きく変動していないことを確認するため、標準物質として無機化合物を使用し、感受性試験を実施した。表8に各供試生物に使用した標準物質を示す。試験結果を図1～3に示す。

表8 感受性試験に用いる標準物質

供試生物	標準物質
ゼブラフィッシュ	硫酸銅
ニセネコゼミジンコ	塩化ナトリウム
ムレミカヅキモ	二クロム酸カリウム

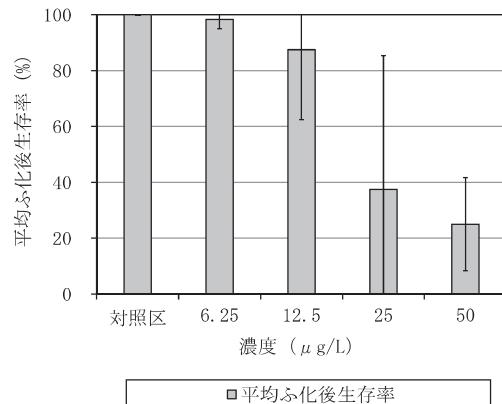


図1 ゼブラフィッシュ感受性試験結果

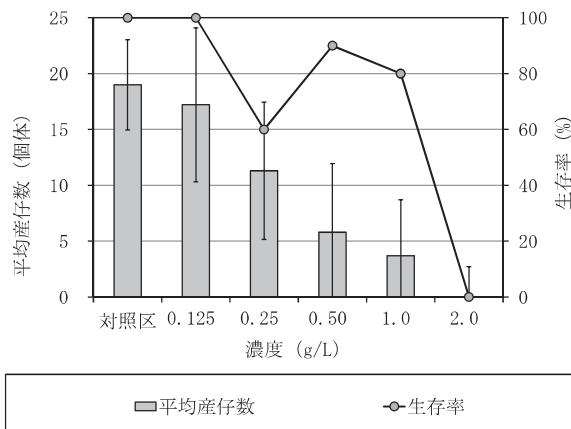


図2 ニセネコゼミジンコ感受性試験結果

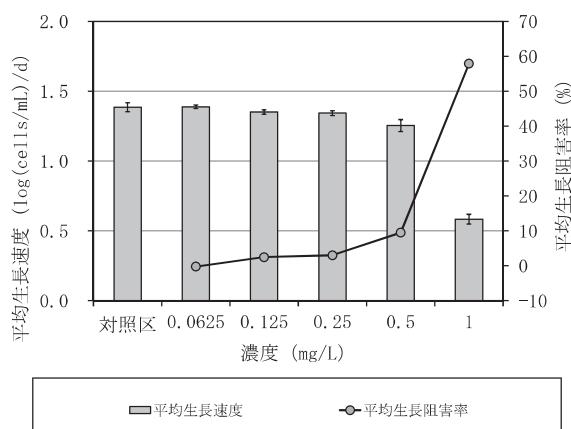


図3 ムレミカヅキモ感受性試験結果

生態影響試験において、指標値が対象区と比較して統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度 (Lowest Observed Effect Concentration) (以下、LOEC) とし、各生物のLOECを過去に実施した試験結果と比較することで感受性の変動を確認した。なお、すべての試験濃度において、いずれの影響指標値も対象区と有意差が認められない場合、LOECは最も高い試験濃度以上とした。

感受性試験の結果から、各生物のLOECは、ゼブラフィッシュ $12.5 \mu\text{g/L}$ 、ニセネコゼミジンコ 0.25g/L 、ムレミカヅキモ 0.5mg/L となった。過去に実施した感受性試験の結果から求めた各生物のLOECはゼブラフィッシュ $12.5\sim100 \mu\text{g/L}$ 、ニセネコゼミジンコ $0.25\sim0.5\text{g/L}$ 、ムレミカヅキモ $0.38\sim3.1\text{mg/L}$ であるため、本市で飼育・培養している3生物の感受性に大きな変動はなく、飼育している供試生物を試験に使用できることが確認できた。

4.2 公共用水域における生態影響試験

環境省では、本手法の適用対象として工場排水だけでなく、公共用水域についても検討を行っていることから、本市におけるケーススタディーとして、河川水を用いた生態影響試験を実施した。

4.2.1 採水地点

採水地点を図4に示す。採水地点は五反田川追分橋(①)及び二ヶ領用水円筒分水下流今井仲橋(②)の2地点とした。



図4 採水地点

4.2.2 採水日及び試験期間

表9に示すとおり、年4回採水し生態影響試験を実施した。

表9 採水日及び試験期間

	1回目	2回目	3回目	4回目
採水日	2017年7月12日	2017年9月14日	2017年11月10日	2018年1月10日
試験期間	2017年7月13日～ 2017年7月21日	2017年9月15日～ 2017年9月22日	2017年11月10日～ 2017年11月17日	2018年1月15日～ 2018年1月22日
ゼブラフィッシュ				
ニセネコゼミンコ	2017年7月13日～ 2017年7月20日	2017年9月15日～ 2017年9月22日	2017年11月10日～ 2017年11月17日	2018年1月11日～ 2018年1月18日
ムレミカツキモ	2017年7月13日～ 2017年7月16日	2017年9月14日～ 2017年9月17日	2017年11月11日～ 2017年11月14日	2018年1月11日～ 2018年1月14日

4.2.3 試験項目

環境省試験法に準拠し、生態影響試験実施した。また、河川水を採水し、水質分析を行った。試験項目及び測定方法を表10に示す。

表10 試験項目及び測定方法

項目	測定方法
水温	多項目水質計による計測
臭気	嗅覚による確認
色相	目視による確認
pH	多項目水質計による計測
溶存酸素	多項目水質計による計測
電気伝導率	多項目水質計による計測
全亜鉛	JIS K0102 ICP発光分光分析法
カドミウム	JIS K0102 ICP発光分光分析法
鉛	JIS K0102 ICP発光分光分析法
銅	JIS K0102 ICP発光分光分析法
溶解性鉄	JIS K0102 ICP発光分光分析法
溶解性マンガン	JIS K0102 ICP発光分光分析法
クロム	JIS K0102 ICP発光分光分析法
ニッケル	JIS K0102 ICP発光分光分析法

4.2.4 結果

水質分析結果を表11に示す。

表11 水質分析結果

	1回目	2回目	3回目	4回目
追分橋	今井仲橋	追分橋	今井仲橋	追分橋
水温(℃)	27.6	27.8	23.4	25.1
臭気	無臭	無臭	無臭	無臭
色相	淡黄色	淡黄色	無黒	淡黄色
pH	8.41	8.62	8.67	8.6
溶存酸素(mg/L)	14.44	8.69	12.8	11.87
電気伝導率(μS/cm)	<0.008	<0.010	<0.008	<0.016
カドミウム(mg/L)	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
鉛(mg/L)	<0.008	<0.008	<0.005	<0.008
銅(mg/L)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.02
溶解性鉄(mg/L)	<0.008	0.08	0.53	0.26
溶解性マンガン(mg/L)	<0.008	<0.008	0.02	0.01
クロム(mg/L)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
ニッケル(mg/L)	<0.008	<0.008	0.009	<0.008

* 報告下限値がある項目については報告下限値を記載し、分析結果をこれと比較した。

* 有効数字2桁以下または報告下限値を下回る析については切り捨てる。

* 検査結果の一一番低い濃度の方が環境基準報告下限値より濃度が高い項目、または報告下限値が無い項目については今回の報告下限値を検査結果の一一番低い濃度で算出した。

環境省試験法では、pHが6.5未満あるいは8.5以上である場合には、水酸化ナトリウム水溶液または塩酸を使用しpH調整すると記載されているが、採水時の水素イオン濃度が試験条件から外れている試料があった。国立環境研究所ではpH調整による化学物質の影響が変わることを避けるため、原則pH調整を行わないことを推奨している⁸⁾。本市においても酸や塩基の添加による影響の変化を考慮し、河川水はpH調整を行わず生態影響試験に用いることにした。

4.2.4.1 ゼブラフィッシュの試験結果

ゼブラフィッシュの試験結果を図5～20に示す。

ゼブラフィッシュを用いた試験結果では、1回目、2回目及び3回目の試験で河川水の影響は確認されなかった。なお、4回目の試験では採水から試験開始まで36時間以上経過しているため、参考値として掲載した。

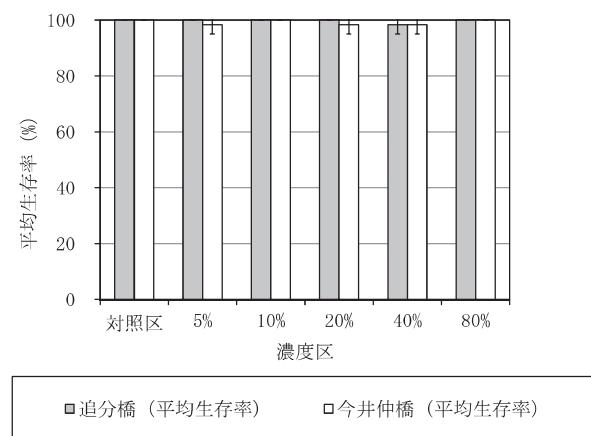


図5 ゼブラフィッシュ試験結果（1回目）
平均生存率

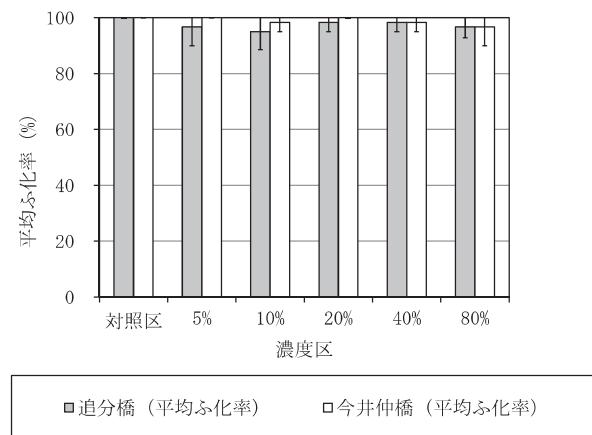


図6 ゼブラフィッシュ試験結果（1回目）
平均ふ化率

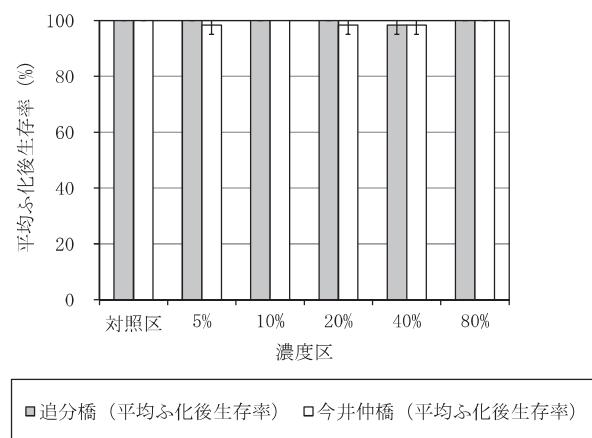


図7 ゼブラフィッシュ試験結果（1回目）
平均ふ化後生存率

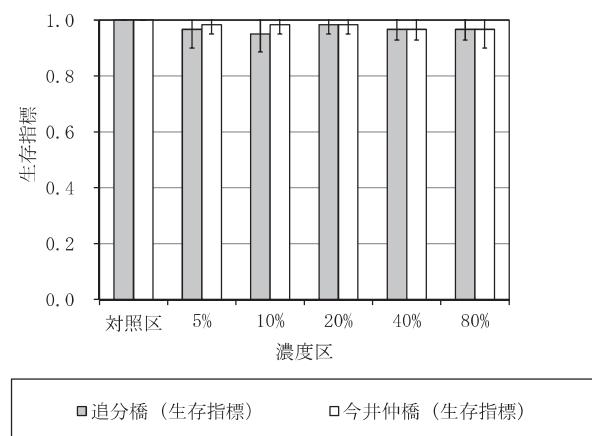


図8 ゼブラフィッシュ試験結果（1回目）
生存指標

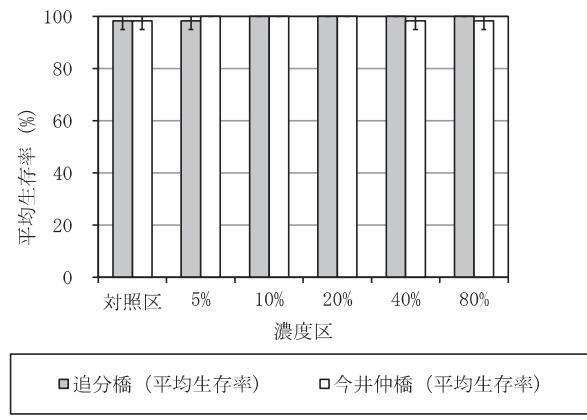


図9 ゼブラフィッシュ試験結果（2回目）
平均生存率

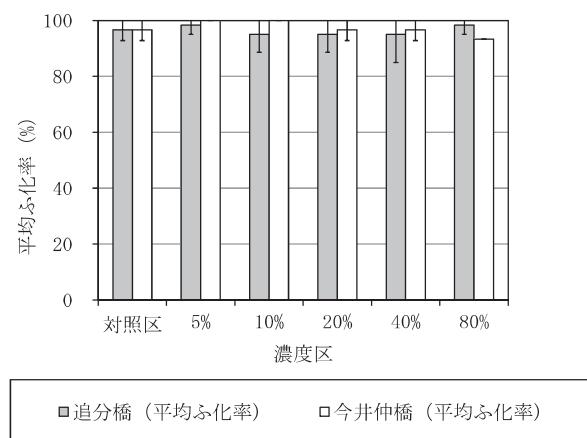


図10 ゼブラフィッシュ試験結果（2回目）
平均ふ化率

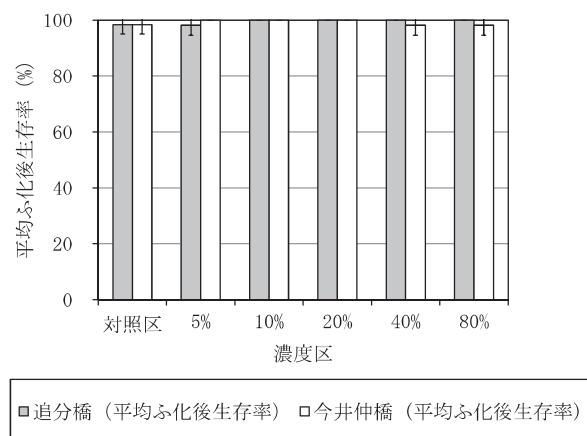


図11 ゼブラフィッシュ試験結果（2回目）
平均ふ化後生存率

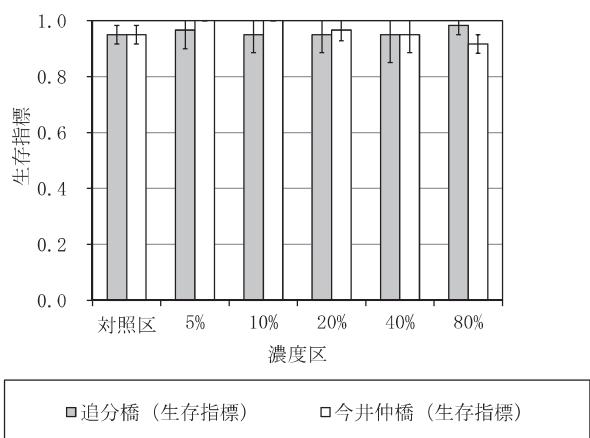


図12 ゼブラフィッシュ試験結果（2回目）
生存指標

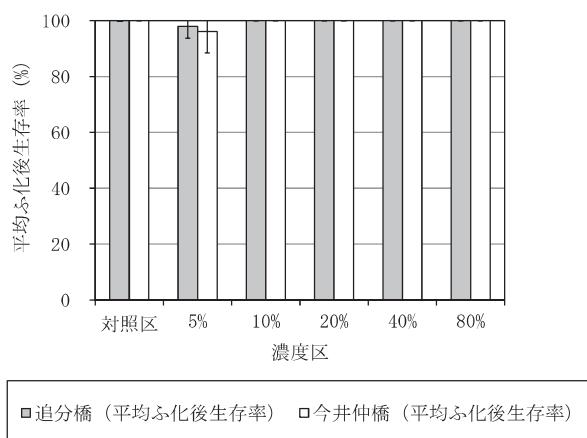


図15 ゼブラフィッシュ試験結果（3回目）
平均ふ化後生存率

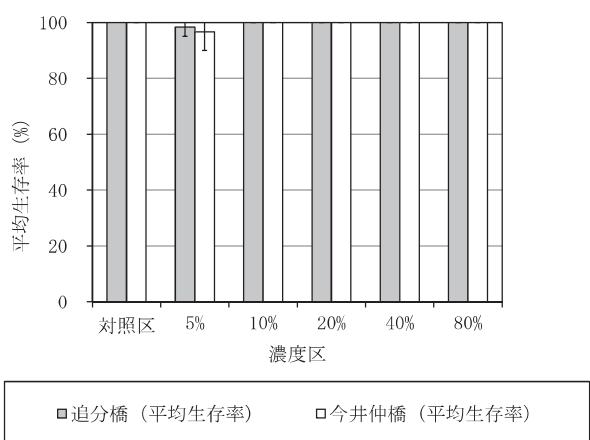


図13 ゼブラフィッシュ試験結果（3回目）
平均生存率

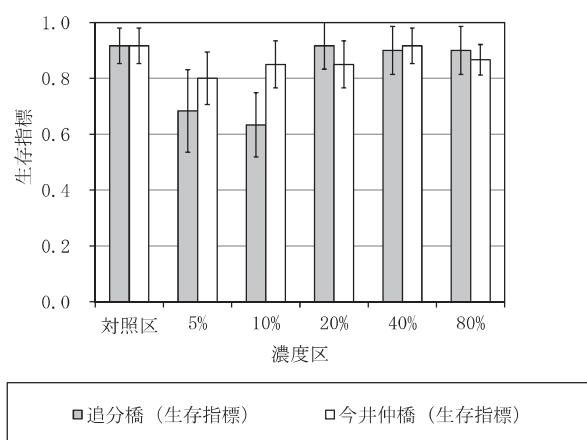


図16 ゼブラフィッシュ試験結果（3回目）
生存指標

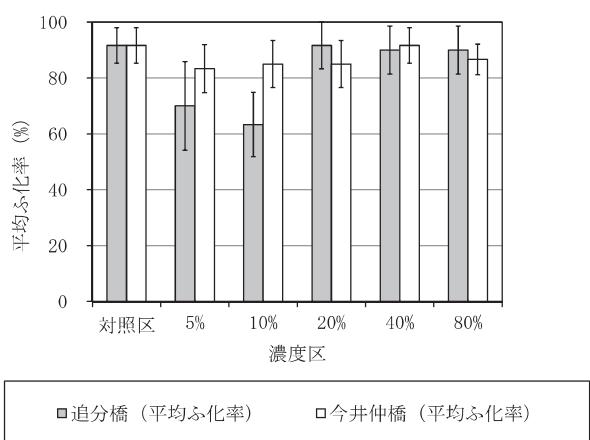


図14 ゼブラフィッシュ試験結果（3回目）
平均ふ化率

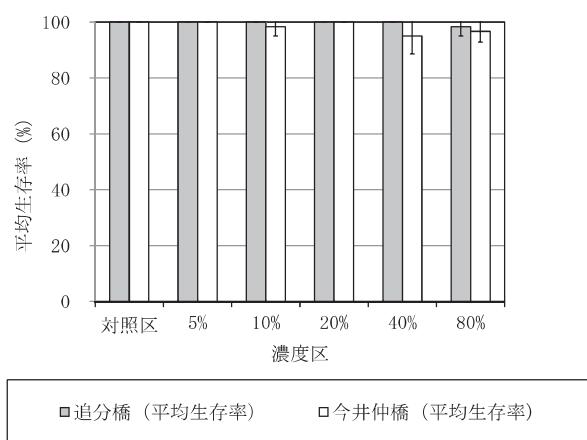
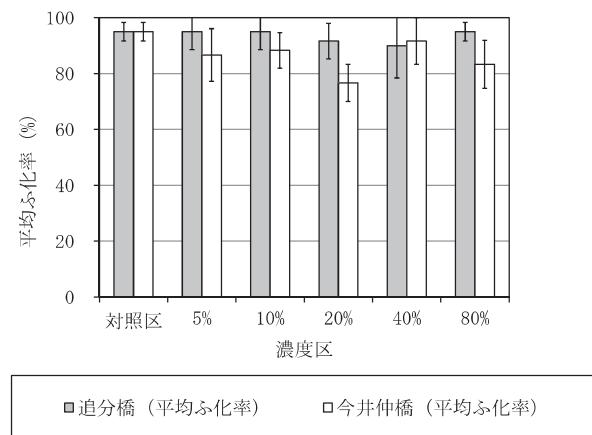
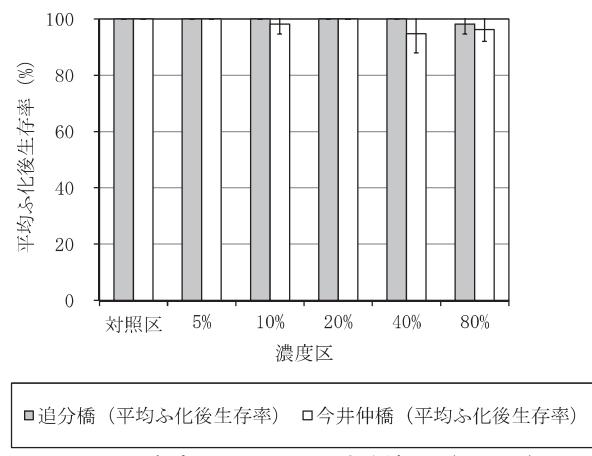
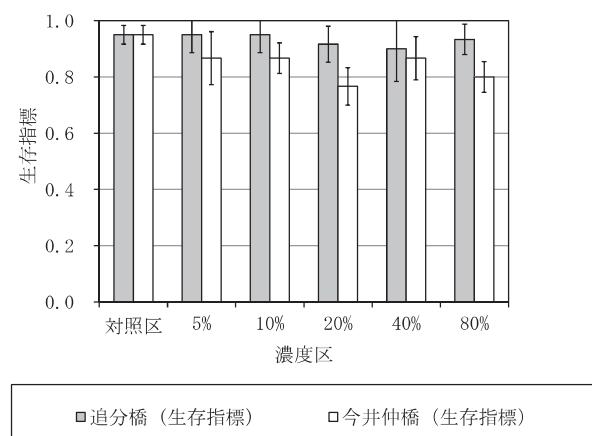


図17 ゼブラフィッシュ試験結果（4回目）
平均生存率（参考値）

図18 ゼブラフィッシュ試験結果（4回目）
平均ふ化率（参考値）図19 ゼブラフィッシュ試験結果（4回目）
平均ふ化後生存率（参考値）図20 ゼブラフィッシュ試験結果（4回目）
生存指標（参考値）

掲載した。

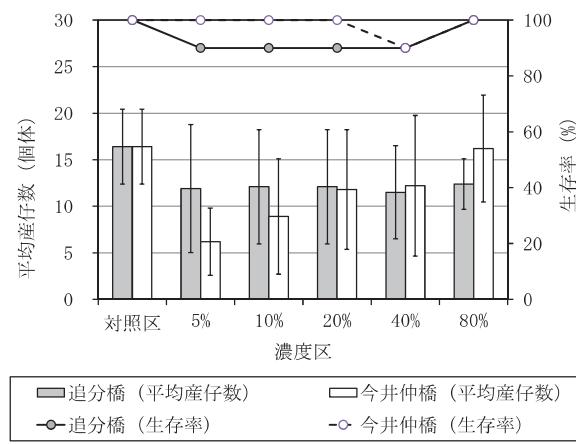
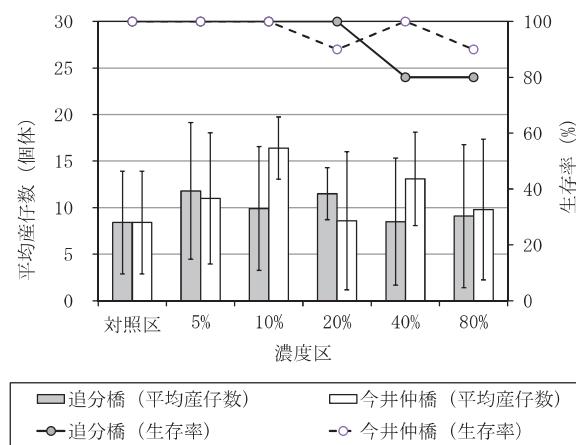
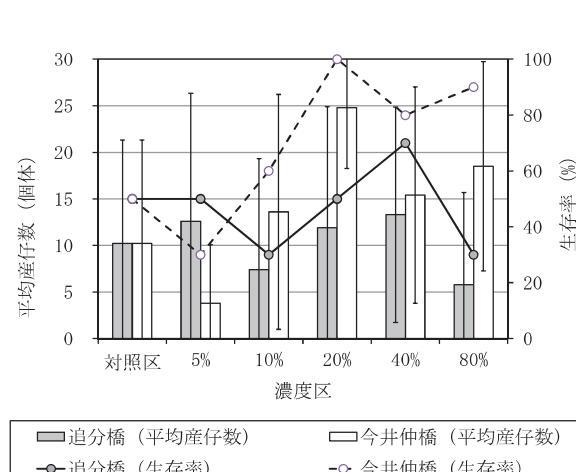


図21 ニセネコゼミジンコ試験結果（1回目）

図22 ニセネコゼミジンコ試験結果（2回目）
(参考値)図23 ニセネコゼミジンコ試験結果（3回目）
(参考値)

4.2.4.2 ニセネコゼミジンコの試験結果

ニセネコゼミジンコの試験結果を図21～24に示す。

ニセネコゼミジンコを用いた試験結果では、河川水の影響は確認されなかった。なお、2回目及び3回目の試験では試験成立条件を満たさなかつたが、参考値として

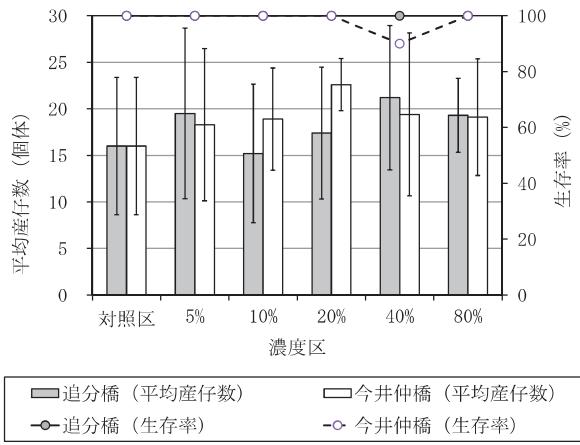


図24 ニセネコゼミジンコ試験結果（4回目）

4.2.4.3 ムレミカヅキモの試験結果

ムレミカヅキモの試験結果を図25～28に示す。

ムレミカヅキモを用いた試験結果からは、河川水の影響は確認されなかった。なお、全ての結果において負の生長阻害、すなわち生長促進が確認されており、対照区に含まれない栄養塩等の影響によるものと考えられる。

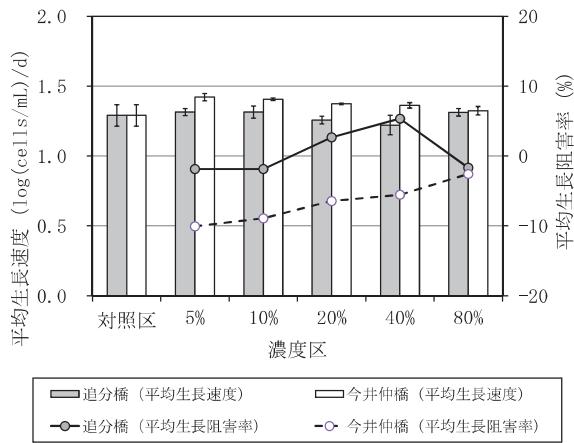


図25 ムレミカヅキモ試験結果（1回目）

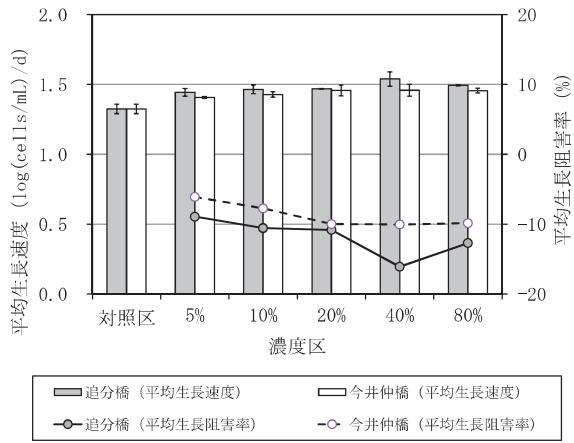


図26 ムレミカヅキモ試験結果（2回目）

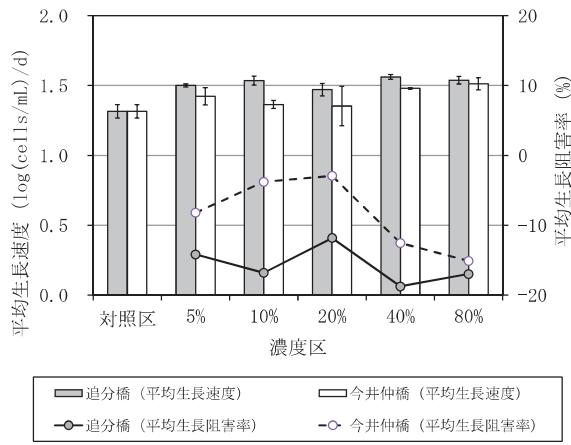


図27 ムレミカヅキモ試験結果（3回目）

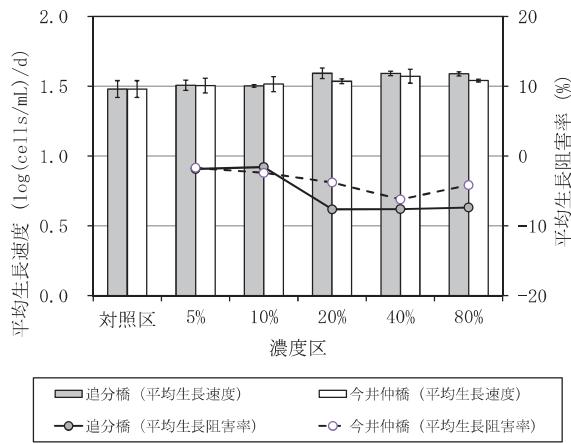


図28 ムレミカヅキモ試験結果（4回目）

5 まとめ

本市で取扱っている3生物について、標準物質を用いた感受性試験を行うことで、飼育・培養を行っている供試生物が適正に維持管理されていることを確認した。また、市内2地点において年4回の調査を実施した結果、参考値となることもあったが、全ての供試生物において河川水の影響は確認されなかった。しかし、国内において甲殻類に対して影響が見られる河川が存在するという報告もあることから⁹⁾、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における生態影響試験の知見や情報の集積が必要であると考えられる。

また、検討会において、本手法が事業者の自主管理手法として位置づけられる方向で検討されていることから²⁾、今後は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を進めていくとともに、バイオアッセイについては市内事業者等が本手法を導入する際の一助となるよう、本市で蓄積した技術やノウハウをとりまとめ、広く情報発信することが必要であると考えられる。

文献

- 1) 環境省：今後の水環境保全の在り方について（取りまとめ）(2011)
<https://www.env.go.jp/water/confs/fpwq/torimatom2.html>
- 2) 環境省：生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会
<http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf.html>
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD Guidelines for the Testing of Chemicals
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
- 7) United States Environmental Protection Agency : Test Guidelines for Pesticides and Toxic Substances
<https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances>
- 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
- 9) 大塚知泰、石割隼人、三島聰子、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回神奈川県市環境・公害研究合同発表会 (2014年6月6日)
<http://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/cyousakenkyu/seika/kenshi-happyoukai/documents/kensi2014-3.pdf>