

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12212

研究課題名（和文）化学物質による個体群・群集レベルの生態影響を評価する室内試験方法の開発

研究課題名（英文）Development of laboratory test methods to evaluate the ecological effects of chemicals at the population and community levels

研究代表者

眞野 浩行（眞野）（Mano, Hiroyuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：40462494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、化学物質の生態影響試験のモデル生物であるオオミジンコを用いた密度効果および種間相互作用を考慮した簡便な室内試験方法を開発することを目的として、亜鉛とLASを対象にオオミジンコを用いた研究を実施した。オオミジンコの個体数密度や餌密度を変えた試験を実施し、それらの結果から、密度効果を考慮した時の個体群増加率に対する亜鉛やLASの毒性影響や餌資源を巡る種間競争に係る閾値餌濃度への毒性影響を把握することができた。得られた知見は、密度効果および種間相互作用を考慮した簡便な室内試験方法の開発をさらに進める上で役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体群・群集への生態影響評価を実施する上で、密度効果や種間相互作用を考慮して化学物質の影響を評価することが重要である。本研究では、室内試験により、密度効果が生じている時の亜鉛とLASの個体群増加率への影響を明らかにするとともに、ミジンコ種間での餌資源を巡る競争の結果を決定する要因の1つである閾値餌密度への亜鉛とLASの影響を示すことができた。得られた知見と本研究で実施した試験の方法は、今後、小規模・短期間で個体群および群集レベルでの化学物質の生態影響データを収集するための試験方法の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted for the purpose of developing laboratory test methods that takes into account density effects and interspecific ecological interactions by using *Daphnia magna*, which is a model organism for testing the ecological effects of chemical substances. Results from ecotoxicity tests of zinc and LAS at different densities of tested individuals and food concentrations showed adverse effects of zinc and LAS on the population growth rate of *D. magna* with considering density effects, and their effects on the threshold food concentration of *D. magna*. The findings are expected to be useful for further development of simple laboratory testing methods that take density effects and interspecific interactions into account.

研究分野：生態毒性学、生態リスク学

キーワード：生態毒性学 個体群 生物群集 密度効果 種間相互作用 種間競争 金属 界面活性剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学物質による生態系へのリスクを管理し、生態系を保全するためには、生物個体群や群集への化学物質の影響を評価することが求められる。生物個体群への影響を評価する上で、従来の試験方法に欠けている重要な要因は、密度効果である。化学物質の曝露は、密度効果の反応（個体数密度に対する個体群増加率の反応）を攪乱し、個体群の存続に影響する。また、生物群集への影響を評価する上で、重要な要因の1つとして種間相互作用がある。実環境での生物は、食う-食われる関係や餌資源を巡る競争などの生物種間相互作用をしながら存在している。近年の研究から、ある生物種への化学物質曝露の影響は種間相互作用を介して他の生物種に波及することが指摘されている。そのため、密度効果及び種間相互作用を考慮して化学物質の生態影響を評価する試験方法の開発は、生物個体群や群集への化学物質の影響を評価する上で有用な方法となりうる。また、密度効果及び種間相互作用を考慮した化学物質の生態影響試験から得られた結果は、生物個体群や群集への化学物質の影響を理解するための有用な知見となりうる。

2. 研究の目的

本研究は、密度効果および種間相互作用を考慮した簡便な室内試験方法を開発することを目的に、化審法等で化学物質の生態影響試験に使用されているオオミジンコを用いた試験方法に関する研究を行った。

(1) 密度効果を考慮した試験方法による生態影響評価

試験区（対照区と5濃度区）ごとに、50 mLの試験溶液とオオミジンコ1個体を入れた100 mLポリプロピレン製（PP）カップを10連用意し、21日間繁殖試験を実施した。対象化学物質ごとに、この試験を3回、異なる時期に実施した。また、試験区ごとに試験溶液50 mLとオオミジンコ2, 4, 8個体を入れた100 mLポリプロピレン（PP）カップ、21日間繁殖試験を実施した。対照区で6連、濃度区で3連の繰り返し連を用意した。個体数密度が2, 4, 8個体の試験を、亜鉛について2回、LASについて1回実施した。各カップに、餌として 5×10^8 cells/mLのクロレラ50 μ Lを毎日添加した。試験結果をもとに、個体数密度が1の場合は各試験回の試験区ごと、個体数密度が2, 4, 8個体の場合は繰り返し連ごとに、試験結果からレスリー-行列またはオイラー-ロトカ方程式により個体群増加率を求めた。個体数密度ごとに対照区と濃度区間で個体群増加率を比較した。

(2) 種間競争を考慮した試験方法による生態影響評価

オオミジンコの閾値餌濃度に対するLASと亜鉛の影響を調査するとともに、オオミジンコの競争種として、マギレミジンコの閾値餌濃度に対する亜鉛の影響を調査し、ミジンコ2種の種間競争の結果に対する亜鉛の影響を検討するために、以下の実験を実施した。

試験区（対照区と4濃度区）ごとに100mLのPPカップに入れた50mLの試験溶液に、24時間以内に産まれたミジンコ1個体を入れて曝露を開始した。試験区ごとに、毎日カップに添加する 5×10^8 cells/mLのクロレラ溶液の量を変えて、4種類の餌濃度区を設定した。また、亜鉛の試験では、試験溶液のpHを一定に保つため、pH緩衝剤としてMOPSを使用した。試験溶液の作成時に、試験溶液中のMOPS濃度が600mg/Lになるように添加するとともに、NaOHを用いて試験溶液のpHを8.0に調製した。各試験区において、餌濃度区ごとに、繰り返し連数を5連とした。16h明期8h暗期の光周期、 21 ± 1 の水温下で、オオミジンコは21日間、マギレミジンコは14日間曝露した。試験期間中に、2日に1回換水を行い、試験個体の生存及び産仔数の観察を毎日実施した。ミジンコ種ごと化学物質ごとに上記の試験を4回実施した。

試験区ごとに、各試験区で、 $\rho = 1$ となる餌濃度を餌閾値濃度として求めた。まず、各試験区の餌濃度区ごとに、試験結果からレスリー-行列またはオイラー-ロトカ方程式により個体群増加率を求めた。次に、各試験区の餌濃度に対する ρ の応答に対して、べき関数を適用し、個体群増加率を餌濃度の関数とし、非線形最小二乗法により、 $\rho = 1$ となる餌濃度を示すパラメータを閾値餌濃度として推定した。推定した餌閾値濃度が、曝露濃度とともにどのように変化するかを調査した。

3. 研究の方法

国立環境研究所より分譲されたオオミジンコを用いて、OECDテストガイドライン No.211のオオミジンコ慢性毒性試験と同程度の試験期間（3週間程度）で、100mL程度のピーカーにおいて試験培地に溶かした化学物質にミジンコを曝露する試験を行い、密度効果が働いている条件下での個体群増加率や種間相互作用に係るミジンコ個体の特性への化学物質の影響を評価した。本研究では、生物種間相互作用として、餌資源を巡る種間競争に注目し、ミジンコ種間の餌資源競争の結果を決定する形質の1つである餌閾値濃度（個体群が維持される最低の餌濃度）へ

の化学物質の影響を室内試験により調査した。また、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) 及び亜鉛 (Zn) を試験対象化学物質として使用した。

4. 研究成果

(1) 密度効果を考慮した試験方法による生態影響評価

異なる初期密度ごとの LAS の設定曝露濃度に対する個体群増加率の応答を図 1 に示す。対照区において、個体数密度の増加とともに λ の値が減少し、設定した個体数密度の範囲で個体数増加率への密度効果を示した。個体数密度が 1, 2, 4 個体の場合に、4.3 mg/L 以上の設定濃度区において個体群増加率の統計的に有意な低下が検出され、個体数密度 8 のときには設定濃度 2.2 mg/L 以上の濃度区において個体群増加率の統計的に有意な低下がみられた。

異なる初期密度ごとの亜鉛設定曝露濃度に対する個体群増加率の応答を図 2 に示す。対照区において、個体数密度の増加とともに λ の値が減少し、設定した個体数密度の範囲で個体数増加率への密度効果を示した。個体数密度が 2, 4 個体の場合に、個体群増加率が統計的に有意な低下する濃度区がみられた。2 回の試験で、個体数密度が 8 の場合に、個体群増加率の有意な低下はみられなかった。この原因として、亜鉛による試験個体への影響が試験個体の死亡による生存個体への密度効果の低下により相殺された可能性が考えられた。

亜鉛および界面活性剤の LAS を対象に、個体数密度を操作して、オオミジンコの繁殖試験を実施し、異なる個体数密度での個体群増加率に対する亜鉛と LAS の影響を検出することができた。得られた結果は、本研究で検討した試験方法により、密度効果を考慮して個体群への化学物質の影響を評価できる可能性を示した。

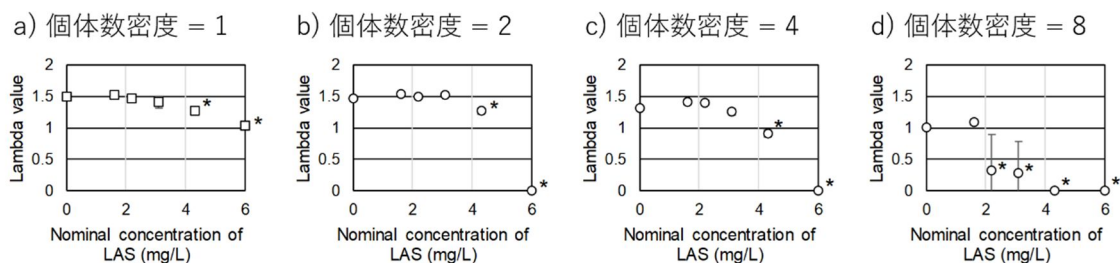


図 1 初期個体数密度が 1, 2, 4, 8 の時の LAS の設定曝露濃度に対する個体群増加率の応答。*は、対照区に比べて濃度区の λ 値が統計的に有意に低いことを示す。

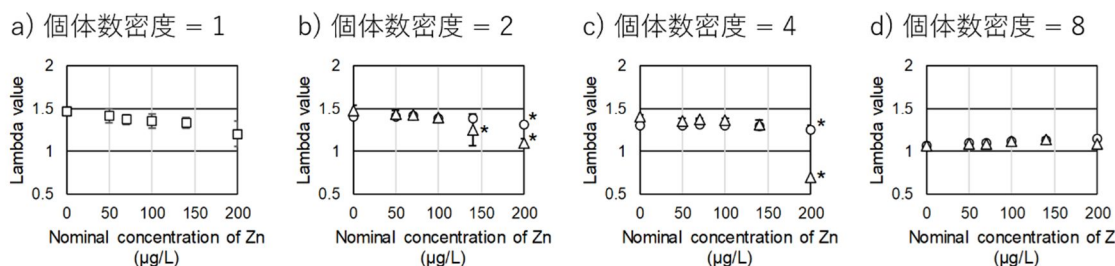


図 2 初期個体数密度が 1, 2, 4, 8 の時の亜鉛 (Zn) の設定曝露濃度に対する個体群増加率の応答。b) - d) における記号○と △ は 1 回目と 2 回目の試験結果を示す。*は、対照区に比べて濃度区の λ 値が統計的に有意に低いことを示す。

(2) 種間競争を考慮した試験方法による生態影響評価

図 3 は、LAS の設定曝露濃度に対する閾値餌濃度の応答を示す。LAS の曝露濃度の増加とともに閾値餌濃度が増加する傾向がみられ、LAS の曝露環境下において、個体群を維持するために、餌が多く必要になることが示唆された。

3.1 と 4.3 mg/L の LAS 濃度区と 0.3 mg/L の低濃度区において、試験期間内で個体が産仔せず、閾値餌濃度を算出できない試験回があった。これらの結果から、より詳細に LAS を曝露した時の閾値餌濃度を算出する場合、餌濃度区を追加や試験期間の延長等が必要であることが示唆された。

図 4 は、亜鉛の設定曝露濃度に対するオオミジンコ及びマギレミジンコの閾値餌濃度の応答を示す。ミジンコ 2 種ともに、亜鉛の濃度が増加するとともに閾値餌濃度が増加したことから、Zn の曝露環境下において、個体群を維持するために餌が多く必要になることが示唆された。

また、亜鉛曝露濃度 100 µg/L を境に、オオミジンコとマギレミジンコの閾値餌濃度値が逆転していた。亜鉛の曝露濃度が 100 µg/L よりも低い環境下では、マギレミジンコの餌閾値濃度はオオミジンコに比べて低い値を示し、マギレミジンコはオオミジンコよりも低い餌濃度で個体群を維持可能であり、2 種が餌資源競争をした場合、マギレミジンコが優占する可能性が示唆された。一方で、亜鉛の曝露濃度が 100 µg/L よりも高い環境下では、オオミジンコの餌閾値濃度はマギレミジンコに比べて低い値を示し、オオミジンコはマギレミジンコよりも低い餌濃度で

個体群を維持可能であり、2種が餌資源競争をした場合、オオミジンコが優占する可能性が示唆された。これらのことから、オオミジンコとマギレミジンコの餌資源を巡る種間競争の結果に亜鉛の曝露濃度が影響する可能性が示唆された。

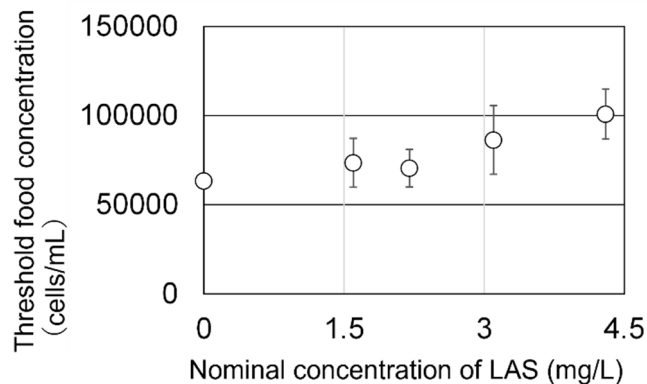


図 3 LAS の設定曝露濃度に対するオオミジンコの閾値餌濃度の応答

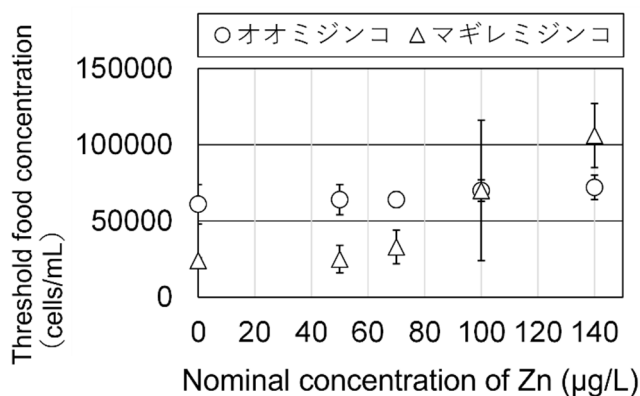


図 4 亜鉛の設定曝露濃度に対するオオミジンコとマギレミジンコの閾値餌濃度の応答

試験結果から、LAS 及び亜鉛の曝露濃度の増加と共にオオミジンコの閾値餌濃度が高くなることを明らかにすることができた。得られた結果は、本研究で実施した閾値餌濃度への影響評価によって、生物群集への化学物質の影響を評価できる可能性を示した。オオミジンコ及びマギレミジンコを用いた亜鉛の毒性試験結果から、亜鉛の曝露濃度によって、2種の種間競争の結果が影響される可能性が示唆された。今後、ミジンコ2種の競争実験を実施して亜鉛による種間競争結果への影響を調査し、群集レベルの影響評価としての閾値餌濃度への影響評価の有効性を検証することが求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞野浩行、篠原直秀
2. 発表標題 Daphnia属ミジンコ種の個体群増加率の餌閾値濃度に対する化学物質の影響に関する研究
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 眞野浩行、篠原直秀
2. 発表標題 密度効果を考慮したオオミジンコ個体群増加率への垂鉛とLASの生態影響評価
3. 学会等名 環境化学物質3学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞野浩行、篠原直秀
2. 発表標題 密度効果と種間競争を考慮した化学物質の生態影響評価に関する研究
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠原 直秀 (Shinohara Naohide) (50415692)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------