

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560568

研究課題名（和文） 環境水質の長期毒性評価のための簡易・高感度バイオアッセイ系の開発と適用

研究課題名（英文） Development and application of a sensitive short-time bioassay method for evaluating long-term safety of environmental water

研究代表者

小松 俊哉（KOMATSU TOSHIYA）

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号：10234874

研究成果の概要（和文）：多数の河川水サンプルの水質健全性を評価するために、*Daphnia magna*（オオミジンコ）を用いて、繁殖試験、並びに河川水中有機物を濃縮して行う短期間の毒性試験を実施した。その結果、河川水の長期的な生態毒性評価手法として *D. magna* 繁殖試験が有用であることを示した。さらに、同一の河川水サンプルにおいて繁殖試験における産仔数減少率と新規試験における影響程度の間に関係が認められ、本短期試験が長期影響を短期間で評価するために適用可能なことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：For evaluating the ecotoxicity of various river water samples by using *D. magna*, both chronic test and an acute toxicity test using concentrated organics were conducted. As the results, chronic tests with *D. magna* can be used as a reliable method for evaluating long-term ecotoxicity of river waters. Moreover, a positive relationship was observed between the decrease ratio of offspring in chronic test and the inhibition effect in the acute test. Results of this study suggest that the acute toxicity test can be used for predicting long-term effect in a short term.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学，土木環境システム

キーワード：環境質評価，水質，バイオアッセイ，オオミジンコ，生態毒性，繁殖試験

1. 研究開始当初の背景

環境水、とりわけ河川水には種々多様な微量の有害物質が存在するため、生物検定（バイオアッセイ）を用いて複合毒性として水質リスクを評価する必要性が高まっている。特に、現在わが国においては、急性の影響よりも長期間の摂取で影響が現れる毒性の評価が重要であり、水生生態系保全の観点からは

魚類・甲殻類などの水生生物に対する長期的な生態毒性を定量的に評価することが有用と考えられる。

この生態系保全のための安全性評価は、欧米では以前から重要視されていたが、わが国でも2003年頃からようやく考慮がされるようになった。中でも生態系の一次消費者である甲殻類に属するオオミジンコ（*Daphnia*

magna) を用いたバイオアッセイが、高感度で再現性にも優れることから、経済協力開発機構 (OECD) において重要試験に位置づけられており、国内でも化審法などの種々の公定法に規定されている。とりわけ D. magna 繁殖試験は、長期毒性や生殖への影響を高感度で評価できる信頼性が高い方法である。しかし、試験期間が 21 日間と長期に渡り手間もかかるため、効率的なデータ取得が困難となっている。特に、河川水や排水などの環境水の評価への適用例は少ないのが現状である。

2. 研究の目的

以上のような背景から、河川水を対象として、D. magna 繁殖試験のデータを蓄積することが望まれる。さらに、本研究の独創的な点は、簡易かつ信頼性の高い D. magna を用いた新規の毒性試験技術を開発し、その有用性を評価することである。具体的には、吸着脱離法を用いて水中の疎水性有機物を濃縮して短期 (24~48 時間) の毒性試験として評価する。こうした有機物が長期的な影響を及ぼすと考えられるので、高感度で毒性を検出する繁殖試験と強い関連を持つことが期待できる。

本研究では期間内に以下の知見を得ることを目的とした。

1) 種々の河川水を対象として、D. magna 繁殖試験の手法を確立し、その適用可能性を評価する。

2) D. magna を用いた長期影響を評価する新規の簡易毒性試験技術を開発し、繁殖試験との関連性を明らかにする。

3) バイオアッセイ試験結果を適用した水質の定量評価方法を確立し、環境水の水質健全性レベルを提案する。

3. 研究の方法

(1) 試験生物

D. magna は (独) 国立環境研究所アクアトロンより入手し、大学研究室において飼育を行った。残留塩素を除去するために 24 時間以上曝気した水道水に無機塩類を加えたものを飼育水とし (硬度: 160 mg/L as CaCO₃ 程度)、洗浄済みクロレラ (株式会社エコジェノミクス) を給餌して飼育した。

(2) 河川水

最初の試験では、新潟県長岡市に位置する信濃川水系の河川水を 4 地点から 2009 年 7 月にサンプリングした。3 地点は信濃川本流に位置し (上流から S-1, S-2, S-3)、1 地点は支流に位置する (B-1)。河川水は孔径 1 μm のガラス繊維ろ紙でろ過し、水質測定と繁殖試験の試料とした。主な水質測定項目は、pH、電気伝導率 (EC) および DOC である。

試料は繁殖試験に用いるまでの間は 4°C で保存した。その後も、近郊の信濃川本流の地点、支流の地点 (上記と異なる地点も含まれる) から河川水をサンプリングして、水質測定および繁殖試験、新規毒性評価試験を実施した。

(3) 繁殖試験方法

河川水サンプルでは試験数を 10 連ではなく 5 連としたが、他は概ね OECD テストガイドライン No.211 (1998) に準拠して行った。生後 24 時間以内の幼体を 1 容器に 1 頭ずつ入れ、給餌は週 6 回、洗浄済みクロレラをミジンコ 1 頭当たり 0.15 mgC/日 投与した。液量を 50 ml とし、換水は週 3 回行った。対照区としては曝気水道水 (無機塩類無添加) を用いた。試験結果は、21 日間における親個体の生存数および累積の産仔数を中心に評価した。

(4) 新規毒性試験

水中の疎水性有機物を濃縮することを目的として、吸着脱離法を適用し、固相抽出カートリッジ Sep-Pak Plus PS-2 (Waters) を用いて濃縮した。カートリッジから水分除去後、メタノールによって溶出させ、メタノール除去後にジメチルスルホキシド (DMSO) に転溶させて濃縮サンプルを得た。

得られた濃縮サンプルを曝気水道水に溶解させたものを試験水とした。元の水中濃度に対する疎水性有機物の濃縮倍率は最大 40 倍である。毒性試験は、OECD テストガイドライン No.202、急性遊泳阻害試験の方法に準じて行った。生後 24 時間以内の幼体を 1 容器に 5 頭ずつ入れ、4 容器、20 頭を 1 群として試験を行った。給餌なしで 48 時間後の遊泳阻害率を求めた。

4. 研究成果

(1) 繁殖試験法の確立

表 1 に河川水の水質測定結果を示す。信濃川本流の 3 河川水の電気伝導率と DOC には大きな違いがなかったが、支流のサンプルは両者ともに本流と比べて高かった。図 1 に繁殖試験での累積産仔数の推移を、表 2 に繁殖試験の最終結果を示す。対照区において親個体の生存率が 80%以上 (100%)、平均産仔数が 60 頭以上 (62.2 頭) であり、OECD の試験成立条件を満たしている。河川水サンプルにおいても親個体の死亡は全く見られなかった。さらに、平均産仔数が 57.2~65.0 頭であり、対照区と同等であった。なお、有意差検定においては、S-1 では対照区と有意な差が認められる結果となったが ($p < 0.05$)、平均産仔数の低下率は 9%に過ぎず、その影響は小さいものと考えられる。さらに、全ての河川水サンプルにおいて、対照区と比較して親ミジンコの成長や挙動、初産日を含めた

表1 河川水の水質

| 地点 | pH | EC (μ S/cm) | DOC (mg/L) |
|-----|------|------------------|------------|
| S-1 | 7.43 | 131 | 1.07 |
| S-2 | 7.48 | 130 | 1.27 |
| S-3 | 7.52 | 131 | 1.11 |
| B-1 | 7.30 | 144 | 2.48 |

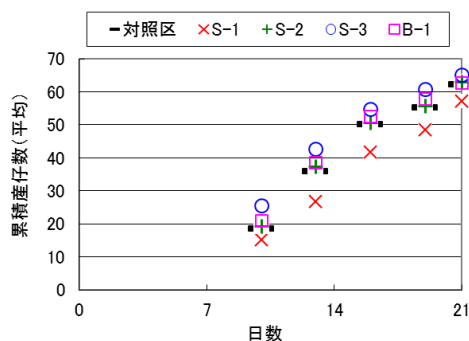


図1 累積産仔数の推移

表2 繁殖試験の結果-1

| サンプル | 生存率 (%) | 平均産仔数 | 有意差検定 |
|------|---------|-------------------------|--------|
| 対照区 | 100 | 62.2 (SD = 2.4, n = 10) | — |
| S-1 | 100 | 57.2 (SD = 3.4, n = 5) | p<0.05 |
| S-2 | 100 | 62.8 (SD = 6.1, n = 5) | p>0.05 |
| S-3 | 100 | 65.0 (SD = 9.4, n = 5) | p>0.05 |
| B-1 | 100 | 62.6 (SD = 6.7, n = 5) | p>0.05 |

産仔時期にも明確な違いはみられなかった。

今回の結果から、河川水の DOC が 1~3 mg/L のレベルにおいては、その値の変化によって産仔状況に影響を及ぼすことはないことが示された。また、予備的検討の結果、対照区において試験水の硬度および電気伝導率のレベルが大きく異なっても(硬度で 35, 160 mg/L as CaCO₃), 産仔状況に影響は殆どみられなかった。したがって、通常の水質特性を示す河川水に対する長期的な生態毒性評価手法としてオオミジンコ繁殖試験が適用できる可能性が示された。

(2) 繁殖試験データの蓄積と健全性評価

その後に行った、近郊の信濃川本流の地点、支流の地点の河川水サンプルによる実験について、繁殖試験の結果例として、同一のサンプルを用いて新規試験を同時に行った実験における結果を表 3、表 4 に示す。

表 3 に示した実験時では、対照区および河川水サンプルにおいて親個体の死亡は全く見られなかった。一方、平均産仔数では、本流の S-2 地点と支流の B-1 地点では対照区と有意差がみられなかったが、他の支流地点 B-2 では対照区と比べて 16%減少し有意差もみられたことから、明確な長期毒性を示すことが分かった。なお、親ミジンコの挙動の違いは確認できなかったが、試験終了時の平均体長は他サンプルでは 3.9~4.0mm であっ

表3 繁殖試験の結果-2

| サンプル | 生存率 (%) | 平均産仔数 | 有意差検定 |
|------|---------|------------------------|--------|
| 対照区 | 100 | 68.8 (SD = 3.6, n = 5) | — |
| S-2 | 100 | 65.0 (SD = 4.0, n = 5) | p>0.05 |
| B-1 | 100 | 62.0 (SD = 7.6, n = 5) | p>0.05 |
| B-2 | 100 | 57.6 (SD = 7.9, n = 5) | p<0.05 |

表4 繁殖試験の結果-3

| サンプル | 生存率 (%) | 平均産仔数 | 有意差検定 |
|------|---------|-------------------------|--------|
| 対照区 | 100 | 100.4 (SD = 9.0, n = 5) | — |
| S-2 | 100 | 95.0 (SD = 11.6, n = 5) | p>0.05 |
| B-2 | 100 | 90.2 (SD = 8.9, n = 5) | p<0.05 |
| B-3 | 100 | 92.6 (SD = 12.3, n = 5) | p>0.05 |

たのに対して、S-2 では 3.6mm と、成長も影響を受けたことが認められた。

次に、表 4 に示した実験時においても、親個体の死亡は全く見られなかった。平均産仔数は、本流の S-2 地点と支流の B-3 地点では対照区と有意差がみられなかったが、B-2 では今回も有意差がみられ 10%の減少率を示し、時期が異なっても(採水時期は 9 月および 7 月)長期毒性を示すことが分かった。一方、試験終了時の平均体長は 3.9mm と、他サンプル (3.8~4.0 mm) の範囲内であったことから、産仔数の低下と成長の抑制は必ずしも関連しないことが明らかとなった。

上記以外の時期に実施した繁殖試験の結果も含めての水質健全性の評価では、信濃川本流の河川水では地点・時期に関わりなく影響が小さかったことから、水質健全性が高いことが分かった。一方、支流の地点では、上記の B-2 地点では他の異なる時期にも影響がみられたが、他の地点では概ね影響が小さかった。水質項目との関連性については、支流の地点では本流よりも EC と DOC が高い場合が殆どであったが、支流において EC あるいは DOC と毒性の間に相関関係は認められなかった。

(3) 繁殖試験と新規毒性試験の結果比較

新規試験において、濃縮サンプルの実験系列は 20 倍、40 倍の 2 段階に設定した。その結果、6 サンプルの中の 3 サンプルでは 20 倍、40 倍ともに遊泳阻害率が 0%であったが(対照区についても全て 0%)、他の 3 サンプルでは濃縮倍率の増加に伴って遊泳阻害率が増加し、その量-反応関係から 40 倍における遊泳阻害率を算出した。一方、繁殖試験においては対照区と比較した産仔数減少率で毒性を評価した。図 2 に両者の関係を示す。表 3 に繁殖試験の結果を示した系列を実験 1、表 4 に繁殖試験の結果を示した系列を実験 2 としている。

両者の関係から、異なる時期の結果をまとめると明確ではないが、同一時期における実験結果からは、新規毒性試験における 48 時

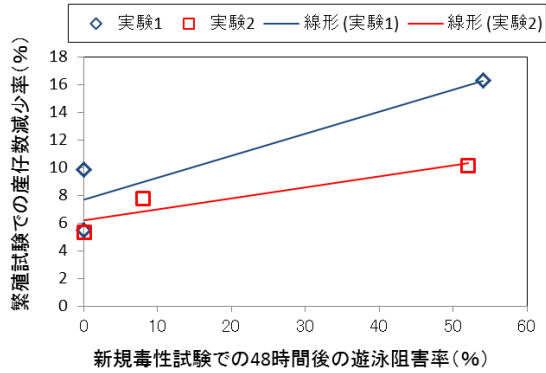


図2 繁殖試験と新規毒性試験の結果比較

間後の遊泳阻害率と繁殖試験における産仔数減少率の間に明確な正の相関関係が認められることが分かる。したがって、長期毒性を短期間で評価するための本短期試験の有用性が示された。また同時に、疎水性有機物が長期毒性に寄与していることも裏付けられたと考えられる。

今後、本短期試験を、特に生態系保全が求められている流域の河川水に適用して、河川水の水質健全性レベルのデータを蓄積していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) T. Komatsu, K. Kitazawa, S. Himeno, Ecotoxicity Evaluation of River Water by Chronic Tests with *Daphnia magna*, Proceedings of 7th IWA World Water Congress, Montreal, Canada, 査読有, 2010, CD-ROM

(2) 小松俊哉, 北澤敬介, 姫野修司, 原田新, 河川水の生態毒性評価へのオオミジンコ繁殖試験の適用, 第 44 回日本水環境学会年会講演集, 査読無, 2010, pp.647

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 俊哉 (KOMATSU TOSHIYA)
長岡技術科学大学・工学部・准教授
研究者番号：10234874

(2)研究分担者

姫野 修司 (HIMENO SHUJI)
長岡技術科学大学・工学部・准教授
研究者番号：60334695
(H23 年度：連携研究者)

(3)連携研究者

原田 新 (HARADA ARATA)
独立行政法人土木研究所・水環境研究グループ・専門研究員 (～H21.11)
独立行政法人国立環境研究所 (H21.12～H22.6)
株式会社クレハ分析センター (H22.7～)
研究者番号：10391616