

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560659

研究課題名(和文) 甲殻類(ニセネコゼミジンコ)多世代繁殖試験による環境水の生態リスク評価の深化

研究課題名(英文) Evaluation of environmental water by chronic and neurobehavioural toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia*

研究代表者

小松 俊哉 (Komatsu, Toshiya)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10234874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：2012年8月から16ヶ月間、1月に1回、信濃川水系の3地点の河川水でニセネコゼミジンコ(*C. dubia*)繁殖試験を実施し河川水の生態毒性を評価した。信濃川本流の河川水Aでは毒性が殆ど検出されなかったが、支流の河川水Bでは致死効果、河川水Cでは産仔数減少が見られることが多かった。TOC、アンモニア性窒素などの一般水質指標と毒性との関連性は見出せなかった。一方、亜鉛が河川水における産仔数減少の一要因となっていると考えられた。さらに、本研究で提案した多世代繁殖試験を実施した結果、一部サンプルにおいて致死は起きなかったが産仔数が有意に減少したことから本試験実施による安全性評価の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Seven-day chronic toxicity tests were performed using *Ceriodaphnia dubia* to assess the toxicity of river water. Water samples were collected once a month from three sampling points of the Shinano river systems from August 2012 to November 2013. One point (Sample A) is located in the main stream of the Shinano river, and the others (Sample B, C) in the branch. Water A samples were rarely toxic and the toxicity level was low. B samples often caused high mortality in the parent daphnia, indicating that they contained high toxicity levels. C samples usually did not cause mortality during the test but often significantly reduced the numbers of daphnia offspring. Zinc ion was suggested as a possible toxicant causing the offspring reduction. Moreover, a proposed neurobehavioural toxicity tests were conducted and the effectiveness was demonstrated.

研究分野：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 ニセネコゼミジンコ 生態毒性 繁殖試験

1. 研究開始当初の背景

環境水中には極めて多種類の化学物質が存在し、未規制化学物質ならびに複合的な生態悪影響が懸念される。この問題に対応するのは生物応答を用いて排水や環境水を評価・管理するバイオアッセイ法である。生物応答による排水管理は先行する米国では WET (Whole Effluent Toxicity, 全排水毒性) 規制として 1990 年代に法律化された。現在、日本でも環境省を中心として米国の WET システムに基づいて日本版の導入に向けた本格的な検討を行っている。WET 試験の中で、甲殻類であるミジンコを用いた繁殖阻害試験は最も強い毒性応答を示すことが多く重要な試験である。用いるミジンコは、欧米諸国では小型であるニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) が主流である。この試験は短期間で行え、必要な水量も少なく済む利点を有している。

2. 研究の目的

WET 等による水質管理の最終目標は実際の水生生物が生息する河川水等の水質保全であり、各種排水やノンポイント汚染の影響を総合的に受ける河川水の毒性レベルを *C.dubia* 繁殖試験によって評価することは重要であると考えられる。しかし、WET の手法をベースに河川水の生態毒性評価への適用を行った例は極めて少ない¹⁾。そこで本研究では信濃川水系の 3 河川水を対象として年間を通して *C.dubia* 繁殖試験を行い、河川水がどの程度の毒性影響を持つのかを明らかにすることを目的とした。さらに、さらに多世代影響を評価する繁殖試験を実施し、より厳しい種の保存の観点から水質の環境安全性を評価することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験生物

C.dubia は (独) 国立環境研究所より入手し、大学において飼育を行った。飼育水は、当初は 24 時間以上曝気した水道水に無機塩類を加えたものを用いていたが、繁殖試験において産仔数の基準満足が不安定であったので、その後、市販のミネラルウォーター (硬度約 30 mg/L) に無機塩類を添加

して硬度約 70 mg/L に調整して用いた。給餌には洗浄済みクロレラと YCT (株式会社エコジェノミクス) を用いた。

(2) 河川水及び水質測定項目

長岡市に位置する信濃川水系の 3 地点の河川水をサンプルとした。3 地点は、環境基準点(A 類型)である信濃川本流の A 地点、および支流河川の B 地点と C 地点である。採水は 2012 年 8 月~2013 年 11 月の期間、毎月 1 回、降雨の影響が少ない平日中を選んで行った。採水後、一般的な水質項目として、pH、DO、電気伝導率 (EC)、TOC、COD、アンモニア性窒素の測定を行った。COD とアンモニア性窒素は、パケット (共立理化学研究所) による簡易測定である。

(3) 繁殖試験方法

各濃度区において試験数は 10 連ではなく 5 連としたが、他は概ね生態影響試験ハンドブック²⁾に示された方法に従い、試験にはシングルカルチャーで得られた幼体を用いた。試験濃度区は A 地点が 100% と 50%、B 地点と C 地点は 100%、50%、25% を標準として行った (例外として 2012 年 9 月の C 地点は 100% と 50% のみ)。河川水は孔径 0.45 μm のメンブレン フィルターでろ過して用いた。対照区および希釈水には飼育水を用いた。試験結果は、7 (または 8) 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。

多世代影響試験は、最初に通常の繁殖試験を行い、対照系、および最大の無影響濃度 (NOEL) の希釈率で 3 腹目 (通常 6~7 日) に産出された仔虫を親個体に用いて実施した。この試験では、試験区においても対照系と同様に飼育水で試験を行った。

4. 研究成果

(1) 河川水の水質

表 1 に河川水の水質測定結果の平均値を示す。A 地点と B 地点の EC、TOC、COD、アンモニア性窒素は、B 地点の方がやや高めではあるが、同レベルであり、年間変動も少なかった。これら 2 地点は、一般水質項目の測定結果からは、比較的良好な水質と言える。一方、C 地点では、他の 2 地点よりも、EC 以下の全ての項目が高いことが分かる。特に夏季 (5~10 月) においては、EC とア

ンモニア性窒素が大幅に高い値を示した。

表 1. 2012 年 8 月～2013 年 11 月の平均水質

試料	pH	DO	EC	TOC	COD	NH ₄ ⁺ -N
		mgO ₂ / L	μS/c m	mgC/ L	mgO ₂ / L	
A	6.8	10.4	145	2.3	4.5	0.14
B	6.8	10.1	146	3.0	5.4	0.18
C	6.6	8.6	248	4.4	8.4	2.9

(2) 繁殖試験結果の例

実施した全ての繁殖試験において、対照区において試験成立条件を満足した。したがって、死亡率、および対照区の結果を基準とした産仔数低下率を定量的に評価することができる。繁殖試験の例として、図 1 に 2013 年 8 月の試験結果を示す。

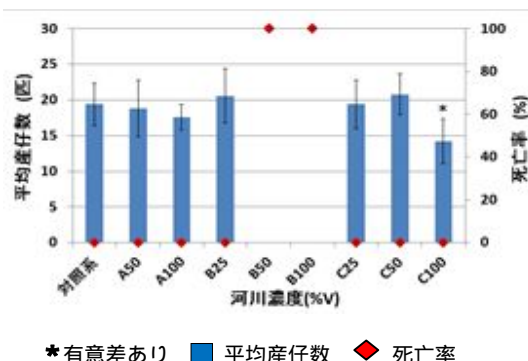


図 1. 河川水の繁殖試験結果の例 (2013 年 8 月)

A 地点の産仔数は対照区と有意な差はなく毒性を有しないことが確認された。B 地点では、100%,50%はそれぞれ 2 日、6 日に親ミジンコが全滅し、強い致死効果を有した。一方、C 地点では、親ミジンコの死亡 (致死効果) はなかったが、100%において産仔数が有意に減少した (t 検定, 有意水準 0.05)。また、EC25 (25%産仔数減少濃度, ECOTOX 毒性評価ソフト) は約 78%V であった。他の月においても、毒性が検出される場合、類似の傾向を示すことが多かった。

(3) 繁殖試験結果のまとめ

表 2 に 3 地点の河川水の繁殖試験結果のまとめ

を示す。死亡率および産仔数減少率をそれぞれ LC25 (25%致死濃度), EC25 で評価した。なお, EC25 は, 生存した親ミジンコの産仔数に基づいて算出している。

表 2. 繁殖試験結果 (LC25 及び EC25) のまとめ

採水月 /年	A		B		C	
	LC25	EC25	LC25	EC25	LC25	EC25
08/2012	>100%	>100%	<25%	<25%	>100%	>100%
09/2012	>100%	89%	<25%	<25%	<50%	<50%
10/2012	>100%	>100%	70%	>100%	>100%	87%
11/2012	>100%	76%	>100%	>100%	>100%	18%
12/2012	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	99%
01/2013	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
02/2013	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
03/2013	>100%	>100%	>100%	86%	>100%	71%
04/2013	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
05/2013	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
06/2013	>100%	>100%	<25%	<25%	>100%	>100%
07/2013	>100%	>100%	63%	63%	>100%	>100%
08/2013	>100%	>100%	31%	31%	>100%	78%
09/2013	>100%	>100%	44%	44%	>100%	>100%
10/2013	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
11/2013	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%

A 地点では、親ミジンコの死亡は 1 年間全く起きず、2012 年 9 月と 11 月のみ有意な産仔数減少が現れたが、強い毒性ではなかった。B 地点の河川水は、毒性は致死効果として多く現れた。特に、夏季の 6 月～9 月まで毒性が強く、25%の河川水濃度においても親ミジンコが全て死亡したことが多かった。C 地点の河川水は致死効果は 2012 年 9 月に見られただけであったが、産仔数の有意な低下が頻繁に現れた。特に 2012 年 11 月は EC25 が 18% (河川水濃度) であり、強い繁殖阻害を示した。

一般水質項目との関連性に関しては、例えば C 地点において一般水質項目が概して高い傾向にあった夏季 (5～10 月) において毒性が検出されない場合も多いことなど、一般的な汚濁指標として用いられる TOC, COD, アンモニア性窒素などと毒性との関連性は全く見出せなかった。したがって、C.dubia 繁殖試験を実施し、生態毒性レベルの指標を導入して環境水の評価することは有効と考

えられる。

(4) 毒性要因の検討

一部のサンプルにおいて、河川水中の亜鉛、銅、ニッケルの濃度を ICP により測定し、繁殖試験結果との関連性を検討した。その結果、致死効果があったサンプルを除いた場合、亜鉛濃度と産仔数減少率（対照系との産仔数比）との間に関連性があることがわかった(図 2)。相関係数は-0.78 と求められた。したがって、亜鉛は産仔数減少の一要因となっていると考えられた。一方、銅およびニッケルと繁殖試験結果には関連が見られなかった。

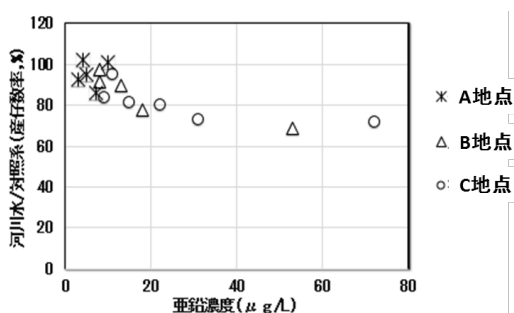


図 2. 亜鉛濃度と産仔数の関係

(5) 多世代繁殖試験

毒性が現れた河川水 B, C を中心に多世代繁殖試験を実施した。その結果、対照区と有意差がみられないことが多かったが、一部サンプルにおいて致死は起きなかったが産仔数が有意に減少したことから本試験実施による安全性評価の有用性が示された。

(6) 結論

全 16 回の試験のうち、毒性（致死効果または産仔数減少）が検出されたのは A 地点では 2 回、B 地点では 8 回、C 地点では 6 回であった。

毒性は夏季に現れることが多く、また B 地点では致死効果、C 地点では産仔数減少が見られることが多く、毒性の現れ方に特徴が確認できた。

TOC, COD, アンモニア性窒素などと毒性との関連性は見出せなかった。一方、亜鉛が河川水における産仔数減少の一要因となっていると考えられた。

引用文献

1) 安田侑右ほか：生活排水に汚染された河川水に対する短期慢性毒性試験，土木学会論文集 G(環境)，Vol.67，_249- 256，2011

2) 日本環境毒性学会編：Ceriodaphnia dubia を用いたミジンコ繁殖阻害試験、生態影響試験ハンドブック（朝倉書店），83-95、2003

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

T. Komatsu, Le Thi Lanh, S. Himeno : Chronic toxicity test with Ceriodaphnia dubia for the safety assessment of river water, Proceedings of IWA World Water Congress, Lisbon, Portugal, 2014.9.24

Le Thi Lanh, 小松俊哉, 姫野修司：河川水の生態毒性レベルに及ぼす採水地点と季節の影響, 第 41 回土木学会関東支部技術研究発表会, - 43, 長岡, 2014.3.13

Le Thi Lanh, 小松俊哉, 姫野修司：ニセネコゼミジンコ繁殖試験を用いた河川水の生態毒性レベルの調査, 第 50 回環境工学研究フォーラム講演集, pp163-165, 札幌, 2013.11.19

Le Thi Lanh, 小松俊哉, 姫野修司：Ceriodaphnia dubia (ニセネコゼミジンコ) 繁殖試験による河川水の水質安全性評価, 第 30 回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会論文集, 494-495, 新潟, 2012.10.30

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・工学研究科・准教授
研究者番号：10234874

(2) 研究分担者

高橋 優信 (TAKAHASHI MASANOBU)
東北大学・工学研究科・助教
研究者番号：30573688

(3) 連携研究者

姫野 修司 (HIMENO SHUJI)
長岡技術科学大学・工学研究科・准教授
研究者番号：60334695