

オオミジンコ急性遊泳試験による無機化学物質の生態影響評価

高橋 峻*, 阿部 達雄

Environmental Evaluation of Inorganic Chemicals

by *Daphnia magna* Acute Immobilization Test

Shun TAKAHASHI*, and Tatsuo ABE

(Received on Feb. 12, 2013)

Abstract

Various inorganic chemicals exist in environment. They come from not only natural source but also artificial source. Recently the diffusions of cesium, strontium and iodine induced radioactive environmental pollution because of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station accident in the Great East Japan Earthquake which occurred on March 11, 2011. Of course radioactive compounds and element affect organisms and disrupt ecosystems. We expect that the metal ion also affects organisms (the metal ion itself). Since metal chloride is one of the forms which are stabilized as for a metal ion and exist. Therefore, the toxic strength of inorganic chemicals is investigated by *Daphnia magna* immobilization assay. Cesium chloride (CsCl) and lithium chloride (LiCl) are used as test reagent. *D. magna* immobilization test was carried out based on OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (TG202). 20 neonates, within 24 hours after the birth, were placed into constant temperature 20 ± 2 °C. The neonates were observed at 24 and 48 hours after exposure and the number of survived neonates was recorded. The EC₅₀ of CeCl was 67.0 mg/L and LiCl was 50.8 mg/L.

キーワード： オオミジンコ, 無機化学物質, 急性遊泳阻害試験, OECD テストガイドライン TG202

1. 緒言

環境水中には、様々な無機化学物質が存在している。海洋や岩石由来である天然のカリウム化合物やナトリウム化合物があり、産業革命以降に化学工業などにより人為的な要因によって、通常存在しないような環境において、淡水中や農作地においてリン

化合物やその他の金属化合物などが検出されるようになった。また、無機化学物質は、溶解するとイオンとなり、様々な形で環境中に存在しており、これらの環境中での影響を調べるのは容易ではない。

2011年3月11日に発生した福島第一原子力発電所の事故では、様々な無機化学物質が環境中へ放出されたと考えられる。放射性物質であるセシウム

*鶴岡工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻

137、ストロンチウム 90、ヨウ素 131 などが、環境に及ぼす影響については他の報告に譲るが、それ以外の元素（無機化学物質）も環境中に放出されていることを見逃してはならないだろう。

米国環境保護局(EPA)で公開している環境毒性データベース ECOTOX には、陸上および水圏の生物に対する化学物質の影響を調べた文献値がまとめられている。このなかには、オオミジンコ (*Daphnia magna*, Fig. 1) に対する既存影響データも数多く記載されている^{1)~5)}。しかし、有機化合物に比べ無機化学物質の既存データは非常に少なく、中には既存の影響データが存在しない物質もある。^{1,3)}

オオミジンコは、甲殻類鰓脚綱枝角亜目ミジンコ科ミジンコ属の大型なミジンコで、化学物質に対する感受性が高いことと、単為生殖であり繁殖が容易であることから化学物質の生態系への影響を評価する試験生物としてひろく用いられている。また、オオミジンコは、淡水生態系において、微細な植物プランクトンなどの一次生産者を捕食し、魚類等の餌となるような食物網の重要な位置を代表する生物である。食物網の重要な位置を占める生物が、環境中に流出した化学物質により影響を受けた場合、その影響は生態系全体に広がり、その環境に与える影響は無視できないものになる。このため、オオミジンコを用いた試験は生態学的にも重要である⁶⁾。

本研究では、オオミジンコを用いた急性遊泳阻害試験により、既存データが少ない無機化学物質のミジンコに対する影響を調べ、生態系への影響を評価する。

2. 実験方法

2.1 オオミジンコの飼育

オオミジンコの飼育は、OECD テストガイドライン TG202⁶⁾に準拠して、飼育水は Elendt-M4 培地（以下 M4 培地）、飼育密度は 20 頭/L、水温は 20 ± 2°C、餌はクロレラ (*Chlorella vulgaris*) で濃度は 1 × 10⁹ cells/mL、照明は蛍光灯で 16 時間明/8 時間暗として行った。毎日、オオミジンコの個体数・

水温を記録し、クロレラを 1 mL/L 与え、1 日おきに換水を行った。餌は、クロレラ V12 (クロレラ工業、福岡) を用い、その細胞数をカウンティングチャンバー（血球計数版、ビルケルチュルク）により顕微鏡を用いて観察し、細胞数を計算した。求めた濃度から給餌溶液が 1 × 10⁶ cells/mL となるようにクロレラを適量採り、M4 培地を用いて遠心分離により洗浄後、再び培地により調整した。



Fig. 1 *Daphnia magna*

2.2 急性遊泳阻害試験

試験に用いた無機化学物質は、塩化セシウム (CsCl、関東化学株式会社)、塩化リチウム (LiCl、関東化学株式会社、鹿特級)、塩化ナトリウム (NaCl、関東化学株式会社、特級)、塩化カリウム (KCl、関東化学株式会社、特級)、塩化ルビジウム (RbCl、関東化学株式会社) で、すべて白い結晶であった。各試験物質の物理化学的性状およびオオミジンコへの既存 EC₅₀ (ECOTOX 文献値) は、Table 1 に記した。

オオミジンコ急性遊泳阻害試験は、OECD ガイドライン TG202 に準拠して行った⁶⁾。M4 培地を入れた 100 mL ビーカーに試験原液を設定した濃度になるように加えて、5 濃度区と対照区を作成した。作成した各濃度区と対照区の水温、pH、溶存酸素量 (DO) は、試験開始時と試験終了時 (48 時間後) に測定した。試験には、24 時間以内に産まれたオオミジンコの仔を使用した (20 頭/濃度区)。このとき、初産個体の使用は避けた。24 時間後および 48 時間後にミジンコの状態および個体数を実体顕微鏡により観察して記録した。ビーカーを軽くゆすっても動かない個体と死亡個体を影響されたとみなした。影響の強さは、半数影響濃度 (EC₅₀) で評価した。

Table 1 Comparison of inorganic chemicals

	<i>D. magna</i>				Boiling point (°C)	Melting point (°C)	Density (g/mL)	Solubility in water (g/L)	ECOTOX	
	EC ₅₀ (mg/L)	CAS No.	Mw	log <i>K</i> _{ow}					Ref. No.	
CsCl	7.4*	7647-17-8	168.36	-	1303	626	3.99 (20°C)	643g (20°C)	5339	1)
LiCl	1.20	7447-41-8	42.39	-2.7	1360	614	2.07 (20°C)	450 (20°C)	2054	2)
NaCl	402.6	7647-14-5	58.44	-	1413	800	2.16 (20°C)	265 (20°C)	6631	3)
KCl	149	7447-40-7	74.55	-0.46	1500	776	1.98 (20°C)	204 (20°C)	2022	4)
RbCl	1000**	7791-11-9	120.92	-	1383	717	2.73 (0°C)	435 (0°C)	61194	5)

* *Daphnia hayalina*, LC₅₀** *D. magna*, EC₅₀ (AVO/STIM)

3. 結果と考察

オオミジンコ急性遊泳阻害試験の水質は、pH 7.5 – 8.8 および 7.7 – 10.5 DO mg/L (試験開始時)、pH 7.3 – 8.0 および 7.8 – 9.0 DO mg/L (試験終了時、48 時間後) の範囲だった。Fig.2 は、オオミジンコ急性遊泳阻害試験における無機化合物の用量反応曲線である。各サンプルの EC₅₀ 値は、それぞれ 67.0 CsCl mg/L、50.8 LiCl mg/L、800 KCl mg/L、4700 NaCl mg/L、88.4 RbCl mg/L であった。ミジンコに対する影響の強さで比較すると、LiCl > CsCl > RbCl > KCl > NaCl となり、水溶解度の高い物質がより影響する傾向にあった。ECOTOX データベースでは、毒性の強さは、LiCl > CsCl > KCl > NaCl > RbCl であり、CsCl を除けば分子量の高い物質ほど、ミジンコにあまり影響しない結果となっていた。

また、今回の実験で得られたオオミジンコへの試験物質の EC₅₀ 値と ECOTOX における EC₅₀ 値 (Table 1) の比較では、大きく異なる結果となった。例えば、本研究における LiCl の EC₅₀ 値と既存デー

タの EC₅₀ 値は 42.3 倍高い値となっている。これは、本研究において飼育水および試験水として M4 培地を使用していることに関係していると考えられる。この培地には、非意図的な重金属による影響を避けるため EDTA が含まれている (EDTA-2Na, 2.5mg/L)。EDTA により試験物質の毒性がマスクされた可能性がある。また、指標は異なるが、本研究における結果では、RbCl も比較的強くミジンコに影響する結果となっていた。

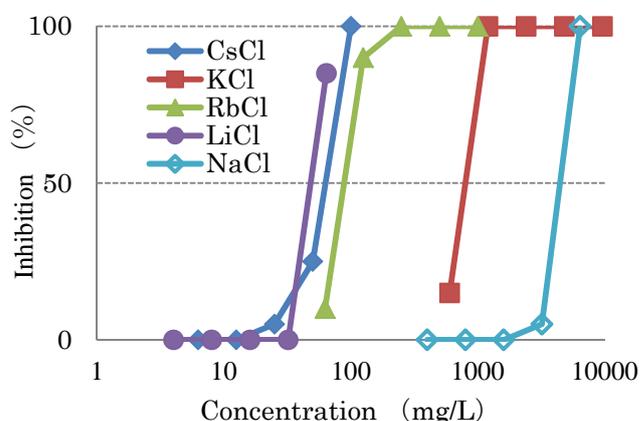


Fig. 2 Comparison of inorganic chemicals

4. 結論

本研究で試験を行った無機化学物質のうち、LiClが最も影響が強く EC₅₀ 値は 50.8 mg/L であった。この傾向は、以前の報告とほぼ同様であったが、その影響値は大きく異なっていた。これは、M4 培地に含まれるキレートによるものと示唆された。ミジンコの培地には、活性炭濾過した水道水や地下水など、本研究で用いた培地以外にも数多く存在する。無機化学物質の研究においては、石油化学物質や農薬などの有機化合物の影響試験で用いられる培地以外の異なるさまざまな培地について検討する必要がある。

無機化学物質の生物に対する影響は、まだ調査されていない物質および生物が多く、陸上や水圏を問わず生態系リスクおよび生態影響を調べる上で今後のさらなる研究が重要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、(独) 国立環境研究所 環境リスク研究センターおよび(株)三菱化学安全科学研究所（現在、三菱化学メディエンス（株）環境リスク評価センター）よりオオミジンコの供与を受けました。ご厚意を頂いた方々に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Baudouin, M.F. and P. Scoppa, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*12(6): 745-751 (1974)
- 2) Anderson, B.G. *Trans. Am. Fish. Soc.*78:96-113 (1984)
- 3) Khangarot, B.S. and P.K. Ray, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18(2): 109-120 (1989)
- 4) Biesinger, K.E. and G.M. Christensen, *J. Fish. Res. Board Can.* 29(12): 1691-1700 (1972)
- 5) Bringmann, G. and R. Kuhn, *Gesund.-Ing.* 80(4): 26 p. (1959)
- 6) 日本環境毒性学会編, 生態影響試験ハンドブック, 朝倉書店, (2003)