

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-1803 海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発
(JPMEERF20185003)

平成30年度～令和2年度

Development of Short-term Chronic Toxicity Tests Using
Marine and Estuarine Organisms

〈研究代表機関〉

国立研究開発法人国立環境研究所

〈研究分担機関〉

国立研究開発法人水産研究・教育機構
公益財団法人海洋生物環境研究所
国立大学法人 鹿児島大学

〈研究協力機関〉

いであ株式会社
浜松ホトニクス株式会社

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「0．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和3年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5－1. 成果の概要	
5－2. 環境政策等への貢献	
5－3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6－1. 査読付き論文	
6－2. 知的財産権	
6－3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II－1 海産藻類を用いた試験法開発およびリングテスト運営・試験法とりまとめ （国立研究開発法人国立環境研究所）	15
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II－2 海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発 （国立研究開発法人水産研究・教育機構）	29
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	

II－3 海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発 4 4
(公益財団法人海洋生物環境研究所)

要旨

- 1. 研究開発目的
- 2. 研究目標
- 3. 研究開発内容
- 4. 結果及び考察
- 5. 研究目標の達成状況
- 6. 引用文献

II－4 汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発 5 4
(国立大学法人鹿児島大学)

要旨

- 1. 研究開発目的
- 2. 研究目標
- 3. 研究開発内容
- 4. 結果及び考察
- 5. 研究目標の達成状況
- 6. 引用文献

III. 研究成果の発表状況の詳細 6 4

IV. 英文Abstract 6 6

I. 成果の概要

課題名 5-1803 海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発

課題代表者名 山本 裕史 (国立研究開発法人国立環境研究所環境リスク・健康研究センター副センター長)

重点課題 主：【重点課題⑮】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

副：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (5-10) 海産生物を用いた全排水毒性（WET）試験法の研究開発

研究実施期間 平成30年度～令和2年度

研究経費		(千円)
	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
平成30年度	32,394	32,394
令和元年度	35,966	35,966
令和2年度	35,940	35,940
合計額	104,300	104,300

本研究のキーワード 生物応答試験、慢性毒性、海産生物、試験法開発、リングテスト、藻類生長阻害試験、海産・汽水産甲殻類、胚・仔魚期短期毒性試験、Whole Effluent Toxicity

研究体制

(サブテーマ1) 海産藻類を用いた試験法開発およびリングテスト運営・試験法とりまとめ (国立研究開発法人国立環境研究所)

(サブテーマ2) 海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発 (国立研究開発法人水産研究・教育機構)

(サブテーマ3) 海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発 (公益財団法人海洋生物環境研究所)

(サブテーマ4) 汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発 (国立大学法人鹿児島大学)

研究協力機関

いであ株式会社

浜松ホトニクス株式会社

1. はじめに（研究背景等）

近年、多種多様な化学物質が製造・使用・廃棄されて、廃水処理施設や下水処理場などを通じて水環境中に排出されている。しかしながら、現状の環境基準や排水基準、PRTR（化学物質排出移動登録制度）対象の物質数ではそれらを全てカバーできていない。そのため、未知・未規制物質や複数化学物質が水生生物に及ぼす影響を包括的に評価・管理するには、既存の単一化学物質の化学分析およびリスク評価・管理をベースにした手法だけでは十分とはいえない。そこで、北米（米国、カナダ）、欧州（ドイツ、フランスなど）に加えて近年は韓国、台湾などでも、排水や環境水の生物への影響を直接の生物応答試験によって確認し、総体としてリスクの評価・管理を行う手法が実施され、単一化学物質をベースにした手法を補完する形で利用されてきた。そこで、環境省では、米国が1995年から導入している総排水毒性(Whole Effluent Toxicity, WET)の制度に着目し、2009年度から検討を開始した。その中で、実際の事業所排水を対象としたパイロット事業に利用するために、淡水生物(緑藻ムレミカヅキモ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュまたはメダカ)を用いる試験法の検討・開発を進め、2013年に国立環境研究所と共同して「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」を公開した。この試験法は、いずれも国内外の化学物質のリスク評価・管理の目標として主流となっている生活環境動植物の「個体群の維持」を目指した慢性毒性試験を、3日から14日の比較的短期で実施可能な手法となっている。ところが、この「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」に限らず、これまで一般工業化学物質を対象とした化学物質審査規制法（化審法）や農薬を対象とした農薬取締法などについて、その登録・審査に用いられてきた生態毒性試験の多くは、淡水生物を用いた急性試験が中心である。

しかしながら、我が国は海に囲まれており、多様な海洋生態系ならびに水産資源に恵まれている一方で、臨海部に事業所や居住地などが集中しており、化学物質による海洋の水産動植物ならびにそれを支える多様な生態系へのリスクを正しく把握し、管理をするためには、淡水生物に加えて海産・汽水生物の試験法を用意する重要性が非常に高い。そのため、2015年に環境省がとりまとめた「生物応答を利用した排水管理手法の活用について」に関する意見募集でも、海産生物を用いた試験法の整備の必要性については、最も多くの意見が寄せられた事項の1つであった。

これまで、海産生物を用いた国内の公的な試験法は、2010年に水産庁が取りまとめた海産生物毒性試験指針、2005年に国立環境研究所が取りまとめたマダイとクルマエビを用いた急性試験法などに限られており、十分に標準化・規格化が進んでいない。海洋生物の個体群の維持を目標とした場合は、致死などの急性的な影響だけでなく、初期発達段階における成長や変態などの脆弱な生活史を考慮したり、繁殖を直接測定したりする亜慢性ないし慢性の試験の開発が求められており、海産生物毒性試験指針では、魚類の初期生活段階試験やフルライフサイクル試験、甲殻類の繁殖試験など試験が提案されている。ところが、魚類や甲殻類などは生活史が長く、このようなライフサイクルの全体をカバーした試験では長期間(28日以上)を要する、つまり大幅なコスト増が考えられることと、排水や環境水などを対象とした場合は試料の劣化なども考慮して、「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」では、期間が14日間程度が上限と考えられてきたことから、慢性毒性を同様に比較的短期で評価できる試験のニーズがあった。

さらに、海域に放流される事業所排水を対象とするだけでなく、近年のバラスト水条約への批准に伴う処理水の排出問題や日本近海での海底鉱物の採掘計画の急速な進展に対応し、バラスト水、鉱物採掘時の揚鉱水等を評価対象として想定した海産生物を用いた高感度かつ短期間で実施可能な慢性試験法の研究開発の必要性が極めて高い状況にある。また、このような試験法が開発されれば、海域での水質環境基準策定や海域への排出が想定される化学物質のリスク評価への利用可能性が高いことは明らかであった。

2. 研究開発目的

そこで本研究では、海産および汽水を用いた短期の慢性毒性試験法を開発することを目的とした。開発の対象となる生物種は、これまでの化学物質管理や国内の水産有用資源、海洋生態系の各栄養段階を考慮し、微細藻類と大型藻類、甲殻類、貝類、魚類とし、魚類と甲殻類については、汽水種についても対象とした。作成した試験法については、各試験機関での検証後、複数試験機関が参加するリングテストを実施して課題を抽出し、試験法の改良に活用することとした。作成にあたっては、海洋環境への排出が想定される事業所排水や放流先の海水だけでなく、揚鉦水等の様々な排水ならびに水生生物基準策定、海域・汽水域に排出される化学物質の評価・管理にも利用可能な生態毒性試験法案を完成することを目的とした。

3. 研究目標

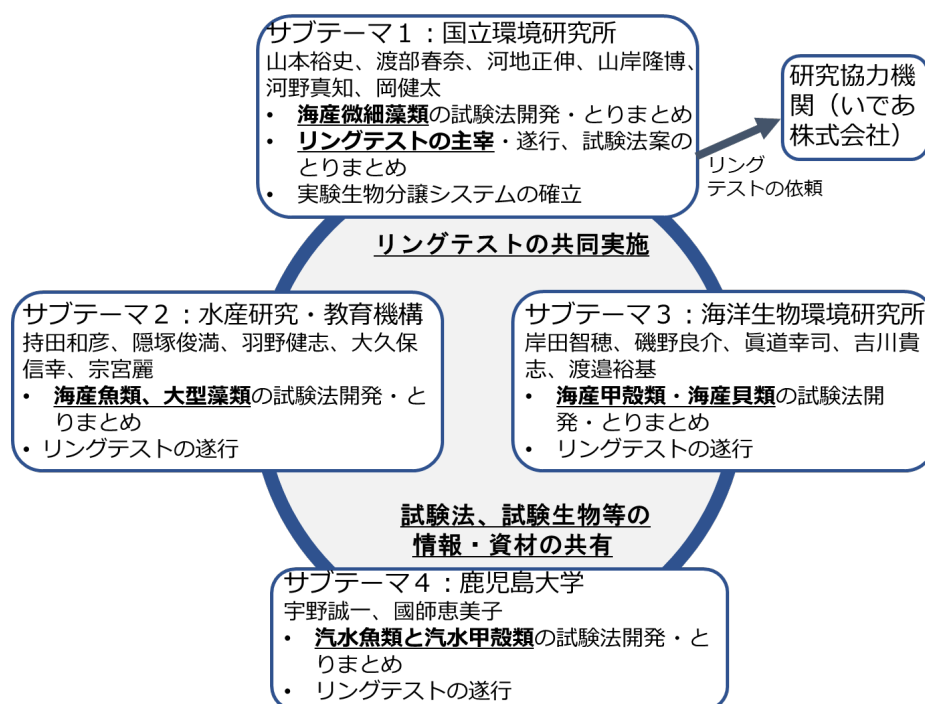
全体目標	海産・汽水生物を用いた魚類、無脊椎動物、藻類等を用いた（Ⅱ）慢性毒性の短期試験法を開発して、検証によって試験法案を作成し、リングテストを通じて検証・修正して試験法案を完成させる。この試験法案を用いて、環境水等でケーススタディを実施する。また、この試験法開発の成果によって、海域へ排水を放流する事業所の排水やバラスト水中の化学物質管理、そして海域における水生生物保全のための環境基準策定、さらには海洋鉦物資源の掘削時に発生する揚鉦水の評価などの環境政策の遂行にも利用可能となることが期待できる。
サブテーマ 1	海産藻類を用いた試験法開発およびリングテスト運営・試験法とりまとめ
サブテーマリーダー /所属機関	山本裕史／国立研究開発法人国立環境研究所
目標	海産藻類を用いた生長阻害試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施し、他のサブテーマと協力して、藻類以外の無脊椎動物、魚類などの試験法案も合わせて完成させる。
サブテーマ 2	海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発
サブテーマリーダー /所属機関	持田和彦／国立研究開発法人水産研究・教育機構
目標	海産魚類の胚・仔魚期ならびに大型藻類の短期の（Ⅱ）慢性毒性試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施してサブテーマ 1 と協力して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施する。
サブテーマ 3	海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発
サブテーマリーダー /所属機関	岸田智穂／公益財団法人海洋生物環境研究所
目標	海産甲殻類および貝類の短期の（Ⅱ）慢性毒性試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施して、サブテーマ 1 と協力して試験法案

	を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施する。
サブテーマ4	汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発
サブテーマリーダー /所属機関	宇野誠一／国立大学法人鹿児島大学
目標	汽水産の魚類・甲殻類を用いた短期の（亜）慢性毒性試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施して、サブテーマ1と協力して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施する。

4. 研究開発内容

これまで、海産生物を用いた試験法には、水産庁の海産生物毒性試験指針において示されている生態毒性試験法として、海産藻類（珪藻など）を用いた生長阻害試験、無脊椎動物はクルマエビ等の急性毒性試験とシオダマリミジンコの繁殖毒性試験、魚類は、マダイやヒラメを用いた急性毒性試験とマミチョグやジャワメダカを用いた初期発達段階試験などが記載されていた。しかし、個体群の維持の評価の観点からは、生態系で重要な役割を果たし、かつ比較的高感度の種を用いて、成長や繁殖などをエンドポイントとし、感受性の高いもしくは複数のライフステージに跨った慢性試験が必要と考えられる。その一方で、排水等の保存性や試験の長期化に伴う費用の観点から、短期で実施できる慢性毒性試験法を開発することとした。

対象とする生物種は淡水生物で利用されており、各栄養段階とも関係性の高い藻類（生産者）、甲殻類（一次消費者）、魚類（高次消費者）の3生物群を基本とするものの、水産資源ならびに海洋生態系としても重要な大型藻類や貝類なども検討対象に加えた。また、試験法の利用目的として、海域へ排水を放流する事業所の排水やバラスト水中の化学物質管理、そして海域における水生生物保全のための環境基準策定、さらには海洋鉱物資源の掘削時に発生する揚鉱水の評価などの環境政策の遂行を想定して、試験法開発を進めた。また、図(0)-1のように4つのサブテーマ構成として、サブテーマ1は全体のとりまとめと藻類を、サブテーマ2は海産魚類と大型藻類を、サブテーマ3は海産甲殻類を、サブテーマ4は汽水産魚類と甲殻類の取りまとめを担当することとした。



図(0)-1 研究体制・分担とサブテーマ構成

1年目は水産庁の「海産生物毒性試験指針」をはじめとした国内の各種試験法の開発事例、ISO（国際標準化機構）などの国際標準化された方法、米国環境保護庁のWET試験法（海産・汽水産生物）などの文献調査に基づいて予備的な検討を実施し、対象生物種の絞り込みをおこなった。また、慢性毒性短期試験法としての試験法開発において優先すべき事項について、十分な考え方が定まっていなかった魚類、甲殻類、大型藻類等について研究代表者、研究分担者、研究協力者で議論を重ね、生物種や試験機関、エンドポイントなどの基本的考え方の整理をおこなった。また、上記の既存の試験法の小規模な改訂で済む試験法について、標準物質を用いて試験法の検証をおこない、試験手順の草案を作成した。

2年目には、標準物質を用いて試験法の検証・改良を進めた。また、試験生物種や試験法案が定まったものから、順次、参画する4機関のほかに研究協力機関にも依頼して、標準的な参照物質として金属は硫酸銅またはニクロム酸カリウム（六価クロム）、有機物として3,5-ジクロロフェノール（3,5-DCP）の少なくとも2物質について、試験機関間比較を行うリングテストを実施した。このリングテストの結果を取りまとめ、課題の抽出、課題解決に向けた改訂を実施した。

3年目には、2年目と同様に参画する4機関および研究協力機関においてリングテストを継続実施し、抽出された課題の解決を行った。また、改訂を行った試験法について、微細藻類、大型藻類、甲殻類、貝類、魚類ごとに取りまとめて、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」を作成した。原案については、アドバイザーの査読・コメントを反映させるとともに、全体の編集を行い、同検討案の冊子を作成した。また、この試験法の一部を利用して、事業所排水が流れ込む海域から採取した試料を用いて、ケーススタディを行った。

研究代表者の所属するサブテーマ1では、国内外の文献調査や整理、慢性毒性短期試験法の作成にあたっての基本的考え方の整理を主導した。また、リングテストのための同一ロットの試薬調達や試験液中の濃度測定などを主導した。取りまとめを担当とする生物種は、微細藻類とした。対象生物種として、まずは、これまでの研究分担者らが中心で内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）の「次世代海洋資源調査技術 海のジパング計画」において選定し、藻類を用いた洋上バイオアッセイを開発したラン藻 *Cyanobium* sp. (NIES-981) を利用することとした。経済協力開発機構

(OECD)化学品テストガイドラインNo. 201（藻類生長阻害試験法）や環境省・国立環境研究所が取りまとめた「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」のいずれも淡水緑藻を用いた試験法（72時間、三角フラスコ内で連続照射、連続振とう）をベースに妥当性基準をみたすように培地などに改良を加えた。また、海域における藻類の生物学的な多様性を考慮して、ISO、ASTM（米国材料試験協会）やUSEPA（米国環境保護庁）などの試験法を参考に、試験法の妥当性基準を安定的に満たすことができる追加的な種として、ラン藻に加えて珪藻と緑藻各1種の選定をおこなうとともに、洋上バイオアッセイを参考として、同法の開発に協力した浜松ホトニクス株式会社の協力を得て、簡易法の開発も試みた。ラン藻については、サブテーマ2，3およびいであ株式会社の協力を経て、六価クロムと3,5-DCPを用いて、リングテストを実施して、結果を比較検討するとともに、その結果をもとにして、最終的な「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を完成させた。また、ケーススタディにおいても、ラン藻、珪藻、緑藻を用いた生長阻害試験を実施して、試験法の検証をおこなった。

サブテーマ2では、取りまとめを担当する生物種は、海産魚類と大型藻類とした。海産魚類は、水産庁の「海産生物毒性試験指針」に慢性毒性試験法として記載されているマミチョグ（*Fundulus heteroclitus*）について検討し、通年飼育と安定的な採卵のシステムの構築を行った。また、通年飼育は難しいが、急性試験での記載があり、有用な水産資源であるマダイ（*Pagrus major*）、ヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）、シロギス（*Paralichthys olivaceus*）などから、検証試験の結果、マダイを選定した。この2種について、胚期から仔魚期の初期生活段階の2ステージにまたがる9 ± 1日間および「卵黄吸収期までの無給餌期」における5日間の試験法を開発し、検証を進めた。サブテーマ2のほか、サブテーマ1，3，4のうち2機関の計3機関が参加し、六価クロムおよび3,5-DCPを用いたリングテストを実施して、試験法の検証を行った。リングテストの結果をもとに改良をおこない、最終的な「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を作成した。また、ケーススタディにおいては、記載した試験法のうち、マミチョグの胚・仔魚の試験を実施して、試験法の検証を行った。

また、大型藻類については、緑藻のアオサ（*Ulva aragoënsis*）の遊走子、褐藻のワカメ（*Undaria pinnatifida*）の幼芽、および細断したシオミドロ（*Ectocarpus siliculosus*）を用いて、慢性毒性を評価可能な短期試験法の確立を試みた。魚類と同様に六価クロムおよび3,5-DCPを用いて遊走子の発芽や幼芽などの藻体の生長阻害試験を実施し、試験期間や高感受性の指標について検討した。検討した試験法の中から、緑藻のアオサと褐藻のシオミドロを用いた生長阻害試験法を作成して試験法案として取りまとめ、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を作成した。

サブテーマ3では、取りまとめを担当する生物種は、海産甲殻類と海産貝類とした。海産甲殻類は水産庁の「海産生物毒性試験指針」に慢性毒性試験法として記載されており、飼育・繁殖が容易なシオダマリミジンコ（*Tigriopus japonica*）を選定し、ノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態をエンドポイントとした慢性の試験法案（5～8日間）を作成した。また、同様にノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態をエンドポイントとしたISOの慢性試験法（6日間程度）があるカイアシの一種、アカルチア（*Acartia tonsa*）の複数系統や類縁種についても検討を進めた。また、化学物質に対する感受性が低いとされるシオダマリミジンコに代わるエビ類の候補種としてアカシマモエビ（*Lysemata vittata*）を選定し、ゾエア幼生を用いた試験法の開発を検討した。シオダマリミジンコについては六価クロムおよび3,5-DCPを用いたリングテストを実施し、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を作成した。ケーススタディにおいては、記載した試験法のうち、シオダマリミジンコおよびアカルチアを用いた試験を実施して、試験法の検証を行った。

海産貝類では、当初は試験機関での飼育が可能なバイやアワビなども候補としたが、ISOや英国のDirect Toxicity Assessmentの試験法もあり、全国で養殖され人工受精で受精卵が得られるマガキ

(*Crassostrea gigas*)を選定した。胚からD型幼生への発生・変態（24時間）をエンドポイントとした慢性の試験法案を作成するとともに、六価クロムおよび 3,5-DCPを用いたリングテストによる検証を行った。その結果をもとに「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を作成した。

サブテーマ4では、取りまとめを担当する生物種は、汽水産魚類と甲殻類とした。汽水産魚類としては、マミチヨグとともに水産庁の「海産生物毒性試験指針」に慢性毒性試験法として記載されており、バラスト水処理装置の評価にも利用されているジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) を選定し、サブテーマ2とも十分な協議をしながら胚期から仔魚期の初期生活段階の2ステージにまたがる9 ± 1日間および「卵黄吸収期までの無給餌期」における5日間の試験法を開発し、検証を進めた。六価クロムおよび 3,5-DCPを用いたリングテストを実施し、その結果をもとに「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を作成した。

一方、汽水産甲殻類としては、USEPAのWETの短期慢性毒性試験法として記載のある汽水産アミ (*Americamysis bahia*) と、バラスト水処理装置の評価にも利用されているヨコエビの一種フサゲモクズ (*Ptilohyale barbicornis*) を選定した。アミについては、7日間の成長と成熟をエンドポイントとした試験法を、フサゲモクズについては14日間の成長をエンドポイントとした試験法を作成し、硫酸銅と3,5-DCPを用いたリングテストを実施し、その結果をもとに「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に記載する試験法を作成した。ケーススタディにおいては、記載した試験法のうち、ジャワメダカおよび汽水産アミを用いた試験を実施して、試験法の検証を行った。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

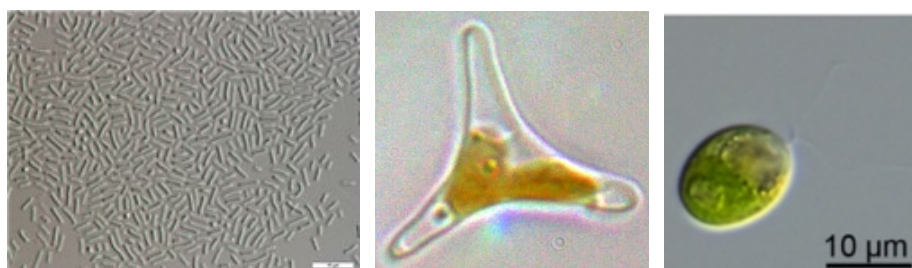
事業所排水および港湾や沿岸域などの環境水中の化学物質評価や、海域の水質環境基準設定などに利用可能な比較的高感度で再現性のよい短期の（亜）慢性毒性試験の試験法案の作成を目指して、水産庁の海産生物毒性試験指針などの既存の文献等で蓄積された知見を最大限活用して検討を行った。その結果として、表(0)-1に示す海産の微細藻類と大型藻類、海産および汽水産の甲殻類、海産貝類、海産および汽水産魚類それぞれについて、生物種・エンドポイント・試験期間などを絞り込んで試験法案を作成し、各サブテーマおよび研究協力機関とが共同でリングテストを継続実施して検証を進め、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」をとりまとめて冊子として完成させた。また、実際に海域で採水した試料を利用してケーススタディを実施し試験法の適用可能性を検証することができた。各サブテーマでの概要は以下に記す。

表(0)-1 海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）の概要と担当サブテーマ

担当	試験法（案）の名称	生物種	エンドポイント	試験期間
サブ1	海産微細藻類を用いた生長阻害試験法	藍藻 <i>Cyanobium</i> sp., 珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , 緑藻 <i>Dunaliella primolecta</i>	生長速度、生長阻害	72 h
サブ2	海産大型緑藻類を用いた生長阻害試験法	アオサ <i>Ulva aragoënsis</i>	遊走子のバイオマス	72 h
サブ2	海産大型褐藻類を用いた生長阻害試験法	シオミドロ <i>Ectocarpus siliculosus</i>	バイオマス	7 d
サブ3	海産甲殻類シオダマリミジンコを用いた慢性毒性短期試験法	シオダマリミジンコ <i>Tigriopus japonicus</i>	致死、変態	5-8 d
サブ1・3	海産カイアシ類 (<i>Acartia</i> sp.) を用いた生存、ふ化、変態試験法	アカルチア <i>Acartia sinjiensis</i> など	致死、変態	6 d
サブ1・4	汽水産アミを用いた慢性	汽水産アミ <i>Americamysis bahia</i>	致死、成長、	7 d

	毒性短期試験法		成熟	
サブ4	海産ヨコエビを用いた慢性毒性短期試験法	フサゲモクズ <i>Ptilohyale barbicornis</i>	致死、成長	14 d
サブ3	海産甲殻類アカシマモエビを用いた生存試験法	アカシマモエビ <i>Lyssmata vittata</i>	致死	24 h
サブ3	海産二枚貝マガキを用いた発生、変態試験法	マガキ <i>Crassostrea gigas</i>	発生	24 h
サブ2・3	胚・仔魚期のマダイを用いる胚・仔魚期短期毒性試験法	マダイ <i>Pegrus major</i>	致死・ふ化	5 d
サブ2・4	胚・仔魚期の汽水産魚類を用いる短期毒性試験法	マミチョグ <i>Fundulus heteroclitus</i> ジャワメダカ <i>Oryzias javanicus</i>	致死・ふ化	10 d
サブ1		全体のとりまとめ、編集		

サブテーマ1では、海産微細藻類を用いた生長阻害試験について、既存の試験法などの文献調査や予備的検討に基づいて、淡水藻類を用いた生長阻害試験（OECD化学品テストガイドラインNo. 201）に記載している試験の有効基準を満たすことができるような対象種の選定を行った。まず、これまでの研究分担者らの研究で完全人工海水培地ASW-SNを用いて試験実施可能であることがわかっていた藍藻 *Cyanobium* sp. (NIES-981) を選定し、先行的に試験法案を作成した。加えて他の微細藻類での試験法への適用可能性を検討し、図(0)-2に示す珪藻の *Phaeodactylum tricornutum* (NIES-4392)、緑藻の *Dunaliella primolecta* (NIES-2256) を用いて、生長速度（対照区と比較した際の生長阻害）をエンドポイントとしてOECD TG201の有効基準を満たすような生長阻害試験法が実施できることがわかった。そこで、培地などの試験状況の検討を行い、試験法の妥当性基準を満たすことのできる試験法案を作成することができた。また、排水や環境水を想定した実海水で試験実施可能性について検証したほか、試験縮小化を目指した遅延発光強度をバイオマスの代替として測定する検討についても合わせて実施した。



図(0)-2 選定した微細藻類(左から藍藻 *Cyanobium* sp.、珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*、緑藻 *Dunaliella primolecta*)

作成した試験法について、サブテーマ2および3、試験協力機関と協力して、参照物質として3,5-DCPおよび六価クロムを対象とした検証試験を実施したところ、それぞれの機関での藍藻、珪藻、緑藻は、六価クロムの藍藻の試験を除き、いずれの試験結果も2倍以内に入るなど近似しており、重大な差はなかった。検証結果をもとに試験法の修正を実施し、試験法案を完成させた。また、試験縮小化についても、10 mL程度の非常にわずかな量の試料を用いて、高感度の遅延発光強度を測定する手法を確立することができた。

また、サブテーマ2の海産大型藻類と魚類（マダイ）、サブテーマ3の海産甲殻類（カイアシ、シ

オダマリミジンコ)、海産貝類(マガキ)、サブテーマ4の汽水産魚類(ジャワメダカ)および汽水産甲殻類(アミ、ヨコエビ)について、試験法作成やリングテストに協力したほか、リングテストで使用了試験液中の濃度分析による確認も実施した。各サブテーマで作成した海産藻類、海産大型藻類、海産・汽水産甲殻類、海産貝類、海産・汽水産魚類を用いた試験法について、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法(検討案)」として編集をおこない、約100ページにわたる冊子を作成して発刊することで目標を達成した。

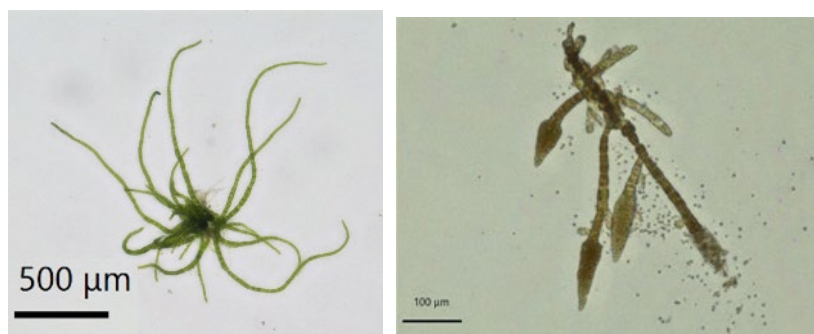
サブテーマ2では、海産魚類および大型藻類を用いた短期慢性毒性試験法の開発と検証を行った。海産魚類では、図(0)-3に示すマミチョグ(*Fundulus heteroclitus*)およびマダイ(*Pagrus major*)を選定し、それぞれ「胚から仔魚期」における9±1日間および「卵黄吸収期までの無給餌期」における5日間の試験法を開発を行い、3試験機関が参画して、被験物質として3,5-DCPおよび六価クロムを用いたリングテストを実施し、試験法の検証を行った。その結果、マミチョグおよびマダイの各試験研究機関の毒性値とその平均値、中央値の比較から、リングテストの妥当性が概ね確認された。また、マミチョグでは2地点において工場排水が流入する海域の海水を用いたケーススタディを実施した。その結果、対照区との間に有意差は認められず、マミチョグへの影響は観察されなかった。



図(0)-3 試験法案を作成したマダイ(左)およびマミチョグ(右)の成魚、胚、仔魚

大型藻類では緑藻*Ulva aragoënsis*(アオサ)の遊走子、褐藻ワカメ(*Undaria pinnatifida*)の幼芽、および細断したシオミドロ(*Ectocarpus siliculosus*)を用いた短期試験法の確立を目指し、3,5-DCPおよび六価クロムを用いて藻体の生長阻害試験を実施し、試験期間や高感受性の指標を検討した。その結果、アオサでは72時間の試験で発芽体の細胞数、長さ、面積、および周囲長を、ワカメおよびシオミドロでは7日間と10日間の比較により7日間の試験で面積をそれぞれ指標にする試験が適切であることが明らかになった。他の藻類種の毒性値と比較した結果、3,5-DCPに対しては比較的高い感受性を示し、大型藻類は藻類種の中で有機系の化学物質に対して比較的高い感受性を有する生物群である可能性が示唆された。検討した試験法の中から、図(0)-4に示す緑藻のアオサと褐藻のシオミドロを用いた生長阻害試験法を作成して試験法案として取りまとめた。

このように、海産魚類の候補種を用いた短期慢性毒性試験および大型藻類の候補種を用いた生長阻害試験法を作成して試験法案として取りまとめることができ、サブテーマとして研究目標を達成した。



図(0)-4 試験法案を作成したアオサ（左）およびシオミドロ（右）

サブテーマ3においては、海産及び汽水の甲殻類、海産の貝類を用いた慢性毒性短期試験法を開発した。海産甲殻類では飼育・繁殖が容易なシオダマリミジンコ(*Tigriopus japonicus*)を選定し、図(0)-5に示すノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態をエンドポイントとした5-8日間の比較的短期の慢性毒性試験法案を作成した。また、3,5-DCPおよび六価クロムについて、繰り返しの試験やサブテーマ1と協力してリングテストを実施したところ、算出された半数影響濃度(EC_{50})や無影響濃度($NOEC$)は2倍以内の比較的近似した値が得られた。また、ISOの試験法を参考にして海産カイアシ類の *Acartia* sp. について、試験可能な種や系統を検討したところ、国内で採取・単離・同定した *Acartia sinjiensis* のノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態（図(0)-5）をエンドポイントとした試験法では、6日間で繰り返し精度よく試験が実施できることがわかり、試験法案として記載した。さらに、化学物質に対する感受性が低いとされるシオダマリミジンコに代わる候補種として図(0)-5に示すアカシマモエビ(*Lysmata vittata*)を選定し、ゾエア幼生を用いた急性の試験法を開発した。アカシマモエビについては、幼生が稚エビになるまで約2ヶ月を要したことから急性毒性試験法の開発に留まった。

海産貝類では全国で養殖され人工受精で受精卵が得られるマガキ(*Crassostrea gigas*)を選定し、図(0)-5に示す胚からD型幼生への発生・変態をエンドポイントとした慢性毒性試験法案を作成し、サブテーマ1とのリングテストによる検証を行ったところ、顕著な差は検出されなかった。シオダマリミジンコ、アカルチア及びマガキについては、当初目標とした慢性毒性短期試験法案を完成させることができた。



図(0)-5 試験法案を作成した左から、シオダマリミジンコ（上がノープリウス幼生、左下がコペポダイト幼生）

イト幼生オス、右下がコペポダイト幼生オス）、左から2番目はアカルチア(*A. sinjiensis*)（上がノープリウス幼生、左下がコペポダイト幼生オス、右下がコペポダイト幼生オス）、左から3番目はアカシマモエビ（上が第1ゾエア幼生、下が第2ゾエア幼生）、一番右がマガキ（上が胚、下がD型幼生）

サブテーマ4においては、図(0)-6に示す汽水魚のジャワメダカ(*Oryzias javanicus*)を用いた胚・仔魚期短期毒性試験について、サブテーマ2とも協議してマミチョグと同様の試験法を作成した。作成した試験法については、3,5-DCPおよび六価クロムを用いてサブテーマ1, 2ならびに研究協力機関とのリングテストによって検証したところ、いずれの値も最小影響濃度(LOEC)が2~4 mg/L程度と2倍程度以内に近似していた。検証結果をもとに、試験法(検討案)を完成させた。

また、汽水産甲殻類のフサゲモクズ(図(0)-6)については、成長をエンドポイントとした14日間の慢性毒性試験法を確立し、サブテーマ1ならびに研究協力機関とのリングテストによって検証し、ジャワメダカ同様に近似した値を得た。図(0)-6に示す汽水産アミについては、米国WET試験法をベースにした成長、成熟をエンドポイントとした慢性毒性短期試験法について、サブテーマ1、研究協力機関とともに3,5-DCPと硫酸銅を用いて検証を行ったところ、硫酸銅の成長への影響についてはやや差が認められたが、他の成熟などのエンドポイントについては各試験機関の結果は近似していた。これらの結果をもとに修正を行い、フサゲモクズおよび汽水産アミの慢性毒性短期試験法案を完成させた。



図(0)-6 試験法案を作成した左からジャワメダカ（胚、仔魚、成魚）、フサゲモクズ（上：オス、下：メス）、汽水産アミ（上：オス、下：メス）

最後に、各サブテーマが共同で実施して地点A, Bの2カ所で採水した実海水試料（80%, 40%, 20%の3濃度に希釈して試験実施）について、完成した試験法を適用しケーススタディを実施した際の結果の概要（最大無影響濃度を試料の希釈率で示したもの）を表(0)-2に示す。表(0)-2に示すように、藍藻、珪藻、緑藻の3種を用いた試験では、事業所排水の影響を受ける地点Bの藍藻でわずかながら生長阻害が検出されたが、それ以外には有害影響は検出されなかった。大型藻類の2種（アオサおよびシオミドロ）についても試験を実施したが、2試料とも最大濃度の80%でも有害影響は確認されなかった。

甲殻類では、シオダマリミジンコについては、最高濃度区の80%でも2試料とも影響は確認されなかった。一方で、地点Bについては、アカルチアの最高濃度においてわずかながら生存率が低下したほか、アミについては、最高濃度区ですべての個体が死亡した。フサゲモクズについては、最高濃度区の80%でも2試料とも影響は確認されなかった。

魚類については、マミチョグはいずれの試料とも最高濃度区まで有意な度毒性影響が検出されな

ったが、ジャワメダカでは試料A、Bともに最高濃度区の80%で生存率や成長（重量）などに低下が認められた。

このように、実試料への適用可能性が検証できた。一方で、地点Bのアミでは溶存酸素の若干の低下も認められることから、エアレーションの可能性についても、検討を行う必要があることがわかった。

表(0)-2 ケーススタディの結果（最大無影響濃度）まとめ

生物種	地点A	地点B
藍藻	>80%	40%
珪藻	>80%	>80%
緑藻	>80%	>80%
アオサ	>80%	>80%
シオミドロ	>80%	>80%
シオダマリミジンコ	>80%	>80%
アカルチア	>80%	40%
フサゲモクズ	>80%	>80%
汽水産アミ	>80%	40%
マミチョグ	>80%	>80%
ジャワメダカ	40%	40%

注：“>80%”は最高濃度でも影響なし、40%は最高濃度区(80%)のみで有害影響が検出されたことを示す

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

環境省が2009年度から実施してきた生物応答を用いた排水・環境水の評価・管理手法に関する検討の中で、2013年3月に公表した淡水生物の魚類・甲殻類・藻類を用いた「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」ではカバーできておらず、臨海部への立地が多い事業所排水の評価・管理を想定した際に一般の意見募集での要望が多く、2019年3月に同課が取りまとめた「生物応答試験を用いた排水の評価手法（仮称）の活用の手引き 中間取りまとめ」でも課題として挙げられた海産・汽水生物を用いた「海産・汽水生物を用いた試験法（検討案）」を提示するものであり、事業所の自主管理への活用が期待される。

環境省が策定する海域への水質環境基準設定について、国内種（マダイなど）を用いた急性毒性試験法は提案されているものの、適切な慢性毒性試験法がない。本研究で開発された試験法の一部は、海産国内有用種を利用したものであり、より慢性的な影響を評価して適切な基準値設定に寄与することが期待される。

化審法では、国内で製造・輸入される工業化学物質の評価・管理に生分解性試験、蓄積性試験、ヒト健康影響試験に加え、生態影響試験結果が活用されている。工業化学物質の一部（船底防汚剤など）は明らかに海域への排出や海産生物への影響評価が求められており、詳細なリスク評価時での活用が期待される。また、農薬法では、生態毒性試験結果に基づいて農薬登録基準を設定し、環境中予測濃度がそれを上回らないことを確認しながら、管理が行われている。わが国では、農耕地が海域と十分に離れておらず、農薬類の海産資源生物への影響が懸念されることがあるため、試験法の一部は、農薬の評価の高度化や、安全性確認に利用可能である。

OECDやISOなどの国際機関では、様々な国際標準化した試験法の開発・提案・承認のプロセスが進んでいる。本研究事業で得られた海産・汽水生物を用いた試験法の開発・検証結果は、このような新たな

試験法の提案や試験生物種の追加などによる試験法の充実に伴う国際貢献や、国内生物種の国際試験法への導入に寄与することが期待される。

5-3. 研究目標の達成状況

全体目標とした、海産および汽水の植物（微細藻、大型藻類）、無脊椎動物（甲殻類、貝類）、魚類について、（Ⅱ）慢性毒性の短期試験法案を開発して、検証によって試験法案を作成することができた。この試験法案について、複数試験機関によるリングテストを通じて、検証・修正することで、試験法案を完成させることで、目標を達成することができた。また、実際の海域で採水した2試料の環境水を用いたケーススタディを実施し、作成した試験法の適用可能性も確認することができ、目標を達成した。

試験法案の作成にあたっては、既存の文献や蓄積された知見を最大限に活用して効率的に試験生物種の絞り込みを行うとともに、各サブテーマの取りまとめ担当にこだわらず、これまで蓄積された知見や施設整備状況を考慮して、試験法の作成と検証を優先した。各試験法案については、複数試験機関によるリングテストによって抽出した課題を考慮して、一部は修正して表(0)-1に記載する試験法（案）を取りまとめることができた。試験法の原案は、各サブテーマ機関による相互査読に加え、当該分野において見識が深いアドバイザー3名にレビューを依頼し、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」の冊子として発刊することで目標を達成することができた。また、リングテストやケーススタディを通じて、海域へ排水を放流する事業所の排水やバラスト水中の化学物質管理、そして海域における水生生物保全のための環境基準策定、さらには海洋鉱物資源の掘削時に発生する揚鉱水の評価などの環境政策の遂行にも利用可能となることを確認することができた。各サブテーマでの達成状況を以下に記す。

サブテーマ1では、本研究事業以前から開発を進めていた海産藻類の藍藻*Cyanobium* sp. で得た知見を踏まえ、珪藻*Phaeodactylum tricornutum*、緑藻*Dunaliella primolecta*の3種を用いた生長阻害試験法について、一部は確立された試験法の改善のためのリングテストをサブテーマ2、3、4の共同のもとに主宰・実施協力し、目標を達成した。また、既存の文献や知見の取りまとめを行うことで、生物種やエンドポイントの選定を主導するとともに、リングテストにおける参照物質の物質送付や分析、とりまとめを行なうとともに、藻類3種を用いて環境水2試料についてケーススタディを実施することで、利用可能性を検証することができた。さらに、研究代表者らを中心に「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」の編集・全体取りまとめを行うことで、期間内に発刊することができ、目標を達成した。

サブテーマ2では、海産魚類については主にサブテーマ3と共同してマダイやヒラメ、マミチョグ、シロギスなどの候補の中から、検証を実施してマダイとマミチョグに絞りこんだ。胚・仔魚期短期毒性試験における試験期間や胚の輸送手法についても十分に検討を行い、最長でも10日程度の（Ⅱ）慢性の試験法案を作成し、取りまとめを行った。また、大型の褐藻や紅藻、緑藻などの候補から緑藻のアオサと褐藻のワカメやシオミドロについて検討を行い、アオサとシオミドロに絞り込んで（Ⅱ）慢性の短期試験法を作成することで、目標を達成した。マミチョグを用いて環境水2試料についてケーススタディを実施することで、利用可能性を検証するという目標も達成した。

サブテーマ3では、サブテーマ1、2、4と共同して無脊椎動物のうち、既に試験法として確立されているシオダマリミジンコを用いた繁殖試験法を短期化するため、変態をエンドポイントとした手法について検討し、5-8日の試験法を作成した。他にもアカルチアの変態を調べる試験、アカシマモエビの慢性試験を見据えた急性試験法を開発した。貝類については、マガキのD型幼生を用いた短期慢性毒性試験法の開発を進めることで、目標をほぼ達成した。シオダマリミジンコおよびアカルチアを用いて環境水2試料についてケーススタディを実施することで、利用可能性を検証するという目標も達成した。

サブテーマ4では、汽水魚のジャワメダカを用いた胚・仔魚期短期毒性試験を開発したほか、海産

ヨコエビのフサゲモクズの成長を調べる試験法を開発した。また、サブテーマ1と共同で既に確立されている汽水産のアミの成長・成熟を調べる試験法案を作成して取りまとめることで、目標を達成した。ジャワメダカ、フサゲモクズ、アミを用いて環境水2試料についてケーススタディを実施することで、利用可能性を検証するという目標も達成した。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

1件

<主な査読付き論文>

1) 磯野良介, 大坂綾太(2020) 海産甲殻類アカシマモエビのゾエア幼生を用いた急性毒性試験法の開発

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	2件
口頭発表（学会等）	11件
「国民との科学・技術対話」の実施	7件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	0件

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

研究代表者

山本 裕史

テキサス大学オースチン校博士課程修了、Ph. D.、徳島大学大学院准教授、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康領域副領域長

研究分担者

1) 渡部 春奈

東京大学大学院工学研究科卒業、博士（工学）、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康領域 生態毒性研究室主任研究員

2) 河地 正伸

筑波大学大学院生物科学研究科卒業、博士（理学）、現在、国立環境研究所生物多様性領域生物多

様性資源保全研究推進室長

- 3) 持田 和彦
北海道大学大学院水産学研究科博士後期課程修了 博士（水産学）、現在、水産研究・教育機構
水産技術研究所 環境・応用部門 環境保全部長
- 4) 隠塚 俊満
鹿児島大学大学院水産学研究科卒業、博士（水産学）、現在、水産研究・教育機構 水産技術研究
所 環境・応用部門 主任研究員
- 5) 羽野 健志
九州大学大学院農学研究院卒業、博士（農学）、現在、水産研究・教育機構 水産技術研究所 環
境・応用部門 主任研究員
- 6) 岸田 智穂
東京水産大学水産学部卒業、学士（水産学）、現在、海洋生物環境研究所 中央研究所海洋生物グ
ループ 主任研究員
- 7) 磯野 良介
北海道大学大学院水産科学研究科卒業、修士（水産学）、現在、海洋生物環境研究所 中央研究所
海洋生物グループ 総括研究員
- 8) 眞道 幸司
東京水産大学大学院水産研究科卒業、博士（水産学）、現在、海洋生物環境研究所 事務局研究企
画調査グループ グループマネージャー
- 9) 吉川 貴志
長崎大学大学院水産科学研究科、博士（水産学）、現在、海洋生物環境研究所 実証試験場応用生
態グループ グループマネージャー
- 10) 宇野 誠一
東京水産大学大学院水産学研究科卒業、博士（水産学）、現在、鹿児島大学水産学部教授
- 11) 國師 恵美子
鹿児島大学大学院水産学研究科卒業、博士（水産学）、現在、鹿児島大学水産学部助教

II. 成果の詳細

II-1 海産藻類を用いた試験法開発およびリングテスト運営・試験法とりまとめ

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター 生態毒性研究室

山本裕史・渡部春奈

生物・生態系環境センター 生物多様性資源保全研究推進室

河地正伸

＜研究協力者＞

環境リスク・健康研究センター 生態毒性研究室・生態毒性標準拠点

山岸隆博

環境リスク・健康研究センター 生態毒性研究室

河野真知、岡健太

浜松ホトニクス株式会社

竹内彩乃、勝又政和

いであ株式会社

岡村哲郎

〔要旨〕

海産微細藻類を用いた生長阻害試験について、既存の試験法などの文献調査や予備的検討に基づいて、対象とする種の選定を行った。まず、これまでの研究で完全人工海水培地ASW-SNを用いて試験実施可能であることがわかっていた藍藻*Cyanobium* sp. (NIES-981)を選定し、先行的に試験法案を作成した。加えて他の微細藻類での試験法への適用可能性を検討し、珪藻*Phaeodactylum tricornutum* (NIES-2256)、緑藻*Dunaliella primolecta* (NIES-4392)を用いて生長阻害試験法が実施できることがわかった。そこで、培地などの試験状況の検討を行い、試験法の妥当性基準を満たすことのできる試験法案を作成することができた。また、排水や環境水を想定した実海水での検証を前もって実施したほか、試験縮小化を目指した遅延発光強度をバイオマスの代替とする検討も合わせて実施した。

作成した試験法について、サブテーマ2および3と協力して3,5-ジクロロフェノール(3,5-DCP)およびニクロム酸カリウム(六価クロム)を対象とした検証試験を実施したところ、それぞれの機関での藍藻、珪藻、緑藻のいずれの試験結果も2倍以内程度に入るなど近似していた。検証結果をもとに試験法の修正を実施し、試験法案を完成させた。また、サブテーマ2の海産大型藻類と魚類(マダイ)、サブテーマ3の海産甲殻類(カイアシ、シオダマリミジンコ)、サブテーマ4の汽水産魚類(ジャワメダカ)および汽水産甲殻類(アミ、ヨコエビ)について、試験法作成やリングテストに協力した。各サブテーマで作成した試験法について、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法(検討案)」として編集をおこない、約100ページにわたる冊子を作成して発刊することで目標を達成した。さらに、ケーススタディとして、環境水2試料(地点AおよびB)について、藍藻、珪藻、緑藻の3種を用いた試験を実施したところ、事業所排水の影響を受ける地点Bの藍藻でわずかながら生長阻害が検出されたが、それ以外には有害影響は検出されないなど、実試料への適用可能性が検証できた。

1. 研究開発目的

淡水藻類を用いた生長阻害試験(OECD化学品テストガイドラインNo. 201: OECD TG201)¹⁾や水産庁の海産生物試験指針²⁾のほか、国際的な試験法を参考にして、海産微細藻類を用いた生長阻害試験に適用可能な種を絞り込み、緑藻、珪藻、藍藻などから複数の試験法を作成する。作成した試験法について、他サブテーマとも共同で有機化学物質および金属各1物質について、試験機関間の比較を行うリングテストを行ない、試験法案を完成させることを目的とした。また、サブテーマ2～4が実施する各種リングテストにも主導的もしくは積極的に協力し、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性試験法(検討案)」を取りまとめることも目的とした。さらに、試験縮小化を目的とした遅延発光強度をバイオマスの代替とする生長阻害試験法の開発も行うこととした。

2. 研究目標

海産藻類を用いた生長阻害試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施し、他のサブテーマと協力して、藻類以外の無脊椎動物、魚類などの試験法案も合わせて完成させる。

3. 研究開発内容

3.1. 緑藻、珪藻、藍藻を対象としたOECD TG201に準ずる生長阻害試験法の開発

3.1.1 試験対象種の選定と試験法の検証

72時間程度で実施可能なOECD TG201は、藻類の生長速度の対照区からの減少（阻害）を調べる試験であり、短期間で個体群の維持とも関連性の高い慢性毒性試験が実施可能であるため、この試験法を基本として、海産微細藻類に適用可能であるかの検討を行った。培地組成が他の海産微細藻類の試験培地に比較して単純であることから、完全人工海水培地ASW-SN (Yamagishi et al. 2017)³⁾（表(1)-1）を共通の試験培地に選定し、表(1)-2で示す試験条件下でOECD TG201の試験成立条件である対照区の増殖率：>16倍、日間生長速度の平均変動係数：<35%、繰り返し間の生長速度の変動係数：<7% を満たす緑藻および珪藻を国立環境研究所微生物系統保存施設（NIES）の系統株から選定した。藍藻については、山岸ら（2017）³⁾においてASW-SN培地で安定した増殖が実証されている *Cyanobium* sp. (NIES-981) を用いることとした。

表(1)-1 ASW-SN培地の組成

ASW-SN	g	*Stock solution	g	**Stock solution	mg	***Stock solution	g
NaCl	25.0	NaNO ₃	75	Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	580	Tris	100
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	2.0	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	3.0	FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	422	Deionised water	1,000 mL
KCl	0.5	Deionised water	1,000 mL	ZnSO ₄ ·7(H ₂ O)	2.93		
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	0.5			CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	1.33		
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	3.5			MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	24.0		
Nutrients*	10 mL			Na ₂ SeO ₃	2.30		
Trace metal**	100 µL			Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0.839		
Tris***	10 mL			NiCl ₂ ·6(H ₂ O)	0.37		
Deionised water	1,000 mL			Deionised water	100 mL		
pH	8.2					pH	8.2

注： *D. primolecta* については、vitamin B12, Thiamin HCl, Biotinを最終濃度がそれぞれ2 µg/L、100 µg/L、1 µg/Lになるように追加で添加する。*P. tricornutum* については、メタケイ酸ナトリウム9水和物を最終濃度が20 mg/Lになるように追加で添加する。

表(1)-2 海産微細藻類（藍藻、緑藻、珪藻）を対象とした生長阻害試験条件

項目	試験条件
曝露方式	止水式
曝露期間	3日間
試験液量	100 mL／容器（300 mLガラス製三角フラスコ）
連数	対照区：6連、曝露区：3連
供試生物数	藍藻 <i>Cyanobium</i> . sp：10000細胞/mL 緑藻 <i>D. primolecta</i> ：5000細胞/mL 珪藻 <i>P. tricornutum</i> ：5000細胞/mL
供試生物の状態	継代培養により対数増殖を維持した株
培地	藍藻 <i>Cyanobium</i> . sp：ASW-SN培地 緑藻 <i>D. primolecta</i> ：ASW-SN培地+Vmix 珪藻 <i>P. tricornutum</i> ：ASW-SN培地+Na ₂ SiO ₃ ・9H ₂ O
滅菌法	濾過滅菌（ポアサイズ：0.22 μm）
試験温度	23±1℃
攪拌	100 rpm
照明	連続光
光強度	60 - 120 μmol m ⁻² s ⁻¹
計測	藍藻 <i>Cyanobium</i> . sp：濁度750nmの計測（細胞数を検量線を用いて算出） 緑藻 <i>D. primolecta</i> ：粒子計測装置CDA-1000（Sysmex）を用いた細胞数の計測 珪藻 <i>P. tricornutum</i> ：濁度750 nmの計測または粒子計測装置を用いた細胞数の計測
計測頻度	24時間毎
試験成立条件	対照区の増殖率：>16倍 日間生長速度の平均変動係数：<35% 繰り返し間の生長速度の変動係数：< 7%
エンドポイント	生長速度

3.1.2 リングテスト

開発した試験法については、3試験機関以上によるリングテスト（参照物質として3,5-DCPとニクロム酸カリウムを使用）を実施し、開発した試験法の問題点の抽出を行うとともに、試験法の改訂に役立てた。なお、リングテストに参加したのは、サブテーマ1（国立環境研究所）のほか、サブテーマ2（水産研究・教育機構）、サブテーマ3（海洋生物環境研究所）、ならびに研究協力機関（いであ株式会社）である。

表(1)-3 微細藻類を用いた試験のリングテスト参画機関

Laboratory Name	藍藻 <i>Cyanobium</i> . sp	緑藻 <i>D. primolecta</i>	珪藻 <i>P. tricornutum</i>
国立環境研究所	○	○	○
水産研究・教育機構	○	○	○
海洋生物環境研究所	○	○	○
いであ株式会社	○		

3.1.3 WET試験条件の検討

WET(Whole Effluent Toxicity)試験では、試験培地であるASW-SN培地が試験サンプルにより希釈されることから、実際のWET試験を想定した、試験サンプルによる培地の希釈が藻類の生長速度に与える影響を小笠原諸島沖のろ過海水（コンタミネーションがないことを想定）を用いて検証した。

3.1.4 ケーススタディ

サブテーマ2の所属機関である水産研究・教育機構水産技術研究所廿日市庁舎（広島県廿日市市）付近の比較的人為汚染の影響が少ないと考えられる地点Aと、事業所排水の影響が考えられる地点Bの2地点で採水した海水試料をろ過後、ASW-SN培地と等量の栄養塩（硝酸ナトリウムおよびリン酸水素カリウム）、Trace metal、Trisを試験ろ過海水に添加したものを供試海水とした。供試海水はASW-SN培地で20%、40%、80%に希釈して曝露に供した。

3.2 試験縮小化を目的とした遅延発光強度をバイオマスの代替とする生長阻害試験法の開発

遅延発光量をバイオマスの代替とした生長阻害試験のスモールスケール化（10 mL）を目的に、*Cyanobium* sp. における遅延発光量とバイオマス（細胞数）の相関についての検証とスモールスケール条件下（10 mL）で72時間の対照区の増殖率：>16倍、日間生長速度の平均変動係数：<35%、繰り返し間の生長速度の変動係数：<7% を満たす条件の検討を実施した。

3.2.1. 遅延発光量とバイオマス（細胞数）の相関についての検証

Cyanobium sp. の細胞径は、真核の藻類と比較して非常に小さいことから、ノイバウエル血球計測盤を用いて正立顕微鏡下で細胞数をカウントするとともに、浜松ホトニクス製超高感度ルミノメーター（TYPE-7600）により60秒間遅延発光量を計測した。

3.2.2 スモールスケール条件下（10 mL）で72時間の対照区の増殖率：>16倍、日間生長速度の平均変動係数：<35%、繰り返し間の生長速度の変動係数：<7% を満たす条件の検討

1×10^6 cells/mLを初期細胞密度として、培養管攪拌装置を用いて、昼白色LED連続照射下（ $50\text{--}60 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ）において、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件で72時間浸透培養を行なった。また、培養開始から培養開始後72時間後まで、24時間毎に浜松ホトニクス社製の高感度ルミのメーター（TYPE-7600）を用いて60秒間の遅延発光量を計測した。

3.3 結果の算出

1) 数値の取り扱い

分析値などの数値の処理は、JIS Z 8401:1999参考1規則Bに従った。有効数字は測定精度を考慮して、生存率は2桁とし、標準偏差の桁数は平均値の位に合わせた。

2) 統計処理

EC50算出のための統計手法はOECD TG 221に基づいた。EC_xは、logisticモデル（2パラメータ）（式1）を用いて回帰した濃度反応曲線から算出した。

$$f(x; A, B) = \frac{1}{1 - \exp[-(B + Ax)]} \quad \text{式(1)}$$

x : 濃度, A , B : パラメータ

3.4 分析法

3.4.1 3,5-DCP

1) コンディショニング

固相抽出カートリッジ (OASIS HLB Plus, Waters) をマニフォールドに設置し、メタノール10 mLをリザーバに注入し、ゆっくりとカラムに通した後、続けて純水10 mLを同様にカラムに通した。

2) サンプルの処理

サンプル各10 mLをリザーバに注入した後、純粋10 mLを注入し、カラムを洗浄した。リザーバにメタノール5 mLを注入し、サンプルを溶出させた。

3) LC-MS-MSを用いた分析

分析は高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LCMS-8060NX, 島津製作所) を用い、SIM 法 (ESI (-), モニタイオン: m/z 161.0) により行った。

3.4.2 六価クロム

9.9 mLの濾過試料 (曝露前の試料に関しては濾過不要) に0.1 mLの濃硝酸 (60-70%) を添加し、分析まで冷凍保存した。分析前にメンブレンフィルター (Advantec社製DISMIC 25HP045AN 0.45 μ m) でろ過後に硝酸100 μ Lを添加し、1%硝酸で100倍または400倍に希釈後、結合誘導プラズマ質量分析装置 (ICP-MS, Agilent 8900, Agilent Technologies) で ^{52}Cr 濃度を測定した。

4. 結果及び考察

4.1 緑藻、珪藻、藍藻を対象としたOECD TG201に準ずる生長阻害試験法の開発

4.1.1 試験対象種の選定と試験法の検証

ASW-SN培地 (表(1)-1) 下においてOECD TG201の試験成立条件を満たす緑藻および珪藻種を、国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES) で系統保存されている複数種の中から選定した。すでにこれまでの研究分担者らが中心で内閣府戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) の「次世代海洋資源調査技術海のジパング計画」において洋上バイオアッセイの開発時に、藍藻 *Cyanobium* sp. (NIES-981) が安定的な増殖を示すことが実証されている。本研究において、緑藻については *Dunaliella primolecta* (NIES-2256) (表(1)-4) が珪藻については *Phaeodactylum tricornutum* (NIES-4392) (表(1)-4) が安定かつ高い増殖性を有することが明らかになった。

表(1)-4 選定された系統株の情報

系統番号	NIES-981	NIES-2256	NIES-4392
学名	<i>Cyanobium</i> sp.	<i>Dunaliella primolecta</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
産地	日本：西表島	英国：デヴォン	英国 (イングランド)
生育環境	海域	海域	海域
状態	クローン、無菌	クローン、無菌	クローン、無菌
体制	単細胞性	単細胞性；鞭毛性	単細胞性
遺伝子情報	あり (Yamaguchi et al. 2018) ⁴⁾	なし	あり (Blowler et al. 2008) ⁵⁾

表(1)-5に3種の対照区の増殖率、繰り返し間の生長速度の変動係数、日間生長速度の平均変動係数を示す。*Cyanobium* sp. における72時間の対照区の増殖率、日間生長速度の平均変動係数および繰り返し間の生長速度の変動係数はそれぞれ、 43.7 ± 5.19 、 13.7 ± 8.15 、 1.63 ± 0.97 であり、すべてOECD TG201の試験成立条件を満たした (表(1)-5)。*D. primolecta* における72時間の対照区の増殖率、日間生長速度の平均変動係数および繰り返し間の生長速度の変動係数はそれぞれ、 33.8 ± 1.71 、 11.6 ± 0.68 、 0.99 ± 0.54 であり、すべてOECD TG201における試験成立条件を満たした (表(1)-5)。*P. tricornutum* における72時間の対照区の増殖率、日間生長速度の平均変動係数および繰り返し間の生長速度の変動係数はそ

れぞれ、 41.9 ± 8.21 、 22.7 ± 1.68 、 3.86 ± 1.46 であり、すべて試験成立条件を満たした（表(1)-5）。

表(1)-6に*Cyanobium* sp.、*D. primolecta*、*P. tricornutum*を用いた参照物質3,5-ジクロロフェノール（3,5-DCP）および六価クロム酸カリウム（六価クロム）の生長阻害試験結果を示す。*Cyanobium* sp.における3,5-DCPのNOEC、EC10、EC50値は、それぞれ 0.32 ± 0.18 、 0.68 ± 0.23 、 1.85 ± 0.21 mg/Lであり、六価クロムのNOEC、EC10、EC50値は、それぞれ 0.19 ± 0.23 、 0.35 ± 0.12 、 1.68 ± 0.32 mg/Lであった（表(1)-6）。*D. primolecta*における3,5-DCPのNOEC、EC10、EC50値は、それぞれ 0.60 ± 0.09 、 0.82 ± 0.12 、 1.40 ± 0.24 mg/Lであり、六価クロムのNOEC、EC10、EC50値は、それぞれ 0.13 ± 0.19 、 1.32 ± 0.21 、 8.21 ± 0.19 mg/Lであった（表(1)-6）。*P. tricornutum*における3,5-DCPのNOEC、EC10、EC50値は、それぞれ 0.48 ± 0.13 、 1.80 ± 0.20 、 2.85 ± 0.08 mg/Lであり、六価クロムのNOEC、EC10、EC50値は、それぞれ 1.85 ± 0.23 、 3.98 ± 0.32 、 11.2 ± 0.20 mg/Lであった（表(1)-6）。

本研究で得られたEC50値と文献値との比較結果を表(1)-7に示す。*Dunaliella*における3,5-DCPの毒性値データは非常に限られているが、*D. primolecta*を用いた本研究のEC50値は*D. tertiolecta* (Ertürk and Saçan, 2011)のEC50値に比較して5倍程度低かった（高感受性であった）（表(1)-7）。また、*D. primolecta*における六価クロムのEC50値は 8.21 ± 0.19 であり文献値の範値であった（表(1)-7）。*Phaeodactylum tricornutum*における3,5-DCPの毒性値データも非常に限られているが、*P. tricornutum* (NIES-4392)を用いた本研究のEC50値は*P. tricornutum*（同種であるが他系統）のEC50値と近似した（表(1)-6）。また、*P. tricornutum* (NIES-4392)における六価クロムのEC50値は 11.2 ± 0.20 mg/Lであり、Gabbasova et al. (2016)の結果とほぼ近似した（表(1)-7）。*Cyanobium* sp.に関しては、*Cyanobium*もしくは*Cyanobium*に近縁な海産藍藻を用いたデータがなく比較できなかった。

表(1)-5 藍藻、緑藻、珪藻における試験成立条件のまとめ

OECD TG201における試験成立条件	72時間の対照区の増殖率	日間生長速度の平均変動係数	繰り返し間の生長速度の変動係数
基準値	> 16倍	< 35%	< 7%
<i>Cyanobium</i> sp.	43.7 ± 5.19	13.7 ± 8.15	1.63 ± 0.97
<i>D. primolecta</i>	33.8 ± 1.71	11.6 ± 0.68	0.99 ± 0.54
<i>P. tricornutum</i>	41.9 ± 8.21	22.7 ± 1.68	3.86 ± 1.46

注：結果は6連を1試験とした、独立する3試験の平均値と標準偏差を示す。

表(1)-6 3,5-DCPおよび六価クロムを用いた生長阻害試験結果

	<i>Cyanobium</i> sp.			<i>D. primolecta</i>			<i>P. tricornutum</i>		
	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}
3,5-DCP	0.32 ± 0.18	0.68 ± 0.23	1.85 ± 0.21	0.60 ± 0.09	0.82 ± 0.12	1.40 ± 0.24	0.48 ± 0.13	1.80 ± 0.20	2.85 ± 0.08
Cr(VI)	0.19 ± 0.23	0.35 ± 0.12	1.68 ± 0.32	0.13 ± 0.19	1.32 ± 0.21	8.21 ± 0.19	1.85 ± 0.23	3.98 ± 0.32	11.2 ± 0.20

注：結果は独立する3試験の平均値と標準偏差を示す。

表(1)-7 本研究におけるEC50値と文献値との比較

	3, 5-DCP EC50 _{72h}	Cr(VI) EC50 _{72h}	参考文献
<i>Dunaliella primolecta</i> (NIES-2256)	1.40±0.24	8.21±0.19	本研究
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	8.0 (7.7-8.3)*		Ertürk and Saçan (2011) ⁶⁾
<i>D. tertiolecta</i>		12.0±1.71	Kim et al. (2020) ⁷⁾
<i>D. tertiolecta</i>		7.02-15.4	Prato et al. (2012) ⁸⁾
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (NIES-4392)	1.80±0.20	11.2±0.20	本研究
<i>P. tricornutum</i>	2.54±0.82		Bjornestad et al. (1993) ⁹⁾
<i>P. tricornutum</i>		5.0	Gabbasova et al. (2016) ¹⁰⁾
<i>Skeltonema costatum</i>	1.56±0.32		Bjornestad et al. (1993) ⁹⁾
<i>S. costatum</i>		1.4-3.6	ISO (2016)
<i>Skeltonema</i> sp.		2.56±0.38	Kim et al. (2020) ⁷⁾

*括弧内の数字は95%信頼区間

4.1.2 リングテスト

開発した試験法のリングテスト結果を表(1)-8、9に示す。*Cyanobium* sp.、*D. primolecta*、*P. tricornutum*における3, 5-DCPの結果は、試験機関ごとに算出されたNOEC、EC10、EC50値の値幅が3種すべてにおいて2倍以内であり、近似した(表(1)-8)。六価クロムの結果は、試験機関Aで実施された*Cyanobium* sp.の結果が他の3機関に比較して乖離したものの、重大な差ではなかった。*D. primolecta*と*P. tricornutum*の結果は、試験機関ごとに算出されたNOEC、EC10、EC50値の値幅が3倍以内であり、近似した(表(1)-9)。

表(1)-8 リングテスト結果のまとめ (3, 5-DCP、mg/L)

	<i>Cyanobium</i> sp.			<i>D. primolecta</i>			<i>P. tricornutum</i>		
	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}
国環研	0.45	0.67 (0.13- 1.25)	1.79 (1.15- 2.04)	0.52	1.98 (1.20- 2.35)	2.87 (2.35- 3.21)	0.69	0.80 (0.21- 1.43)	1.32 (0.98- 1.87)
A	0.43	0.76 (0.64- 0.87)	2.18 (2.02- 2.35)	0.40	1.39 (0.41- 2.38)	1.63 (1.56- 1.70)	0.79	0.84 (0.63- 1.04)	1.46 (1.32- 1.60)
B	0.41	0.97 (0.15- 1.54)	1.98 (1.23- 2.36)	0.73	1.37 (1.07- 1.65)	2.44 (2.18- 2.70)	0.42	0.64 (0.48- 0.81)	2.07 (1.78- 2.36)
C	<0.49	1.22 (1.09- 1.35)	2.88 (2.74- 3.02)	-	-	-	-	-	-
毒性値 幅(倍)	1.12	1.82	1.61	1.83	1.45	1.76	1.88	1.31	1.57

注：括弧内の数字は95%信頼区間

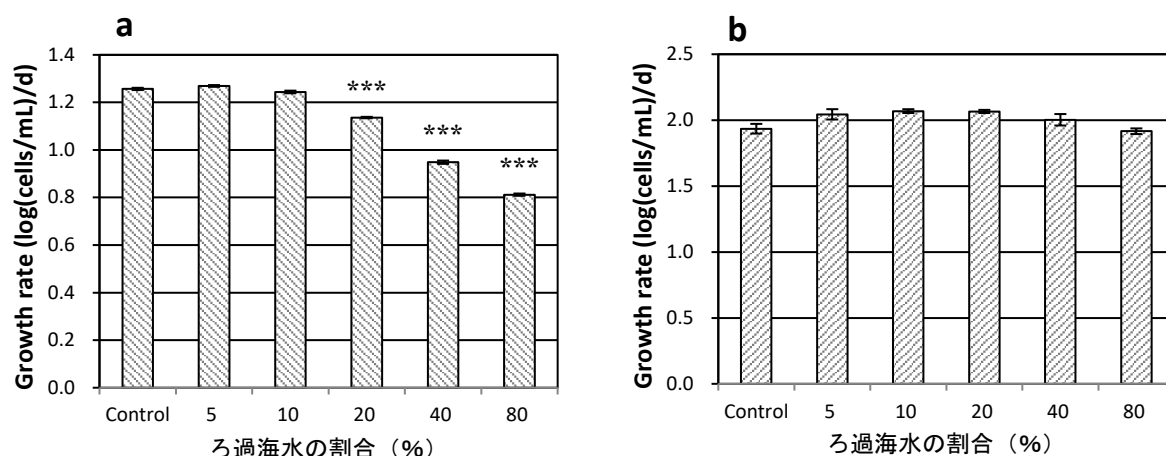
表(1)-9 リングテストの結果まとめ（六価クロム、mgCr/Lとして）

	<i>Cyanobium</i> sp.			<i>D. primolecta</i>			<i>P. tricornutum</i>		
	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}
国環研	0.21	0.32 (0.09- 0.64)	1.75 (1.13- 2.13)	1.95	4.03 (3.67- 4.44)	10.9 (9.87- 12.1)	0.98	1.43 (1.39- 1.58)	8.92 (8.59- 9.21)
A	0.11	0.15 (0.10- 0.20)	0.36 (0.30- 0.41)	2.16	4.82 (4.42- 5.22)	11.7 (11.3- 12.2)	1.00	1.59 (1.13- 1.66)	6.00 (5.29- 6.71)
B	0.42	0.92 (0.79- 1.05)	1.53 (1.45- 1.62)	1.83	2.29 (1.82- 2.76)	4.81 (4.42- 5.20)	0.88	1.39 (1.12- 0.81)	10.2 (8.57- 11.8)
C	0.48	1.15 (0.94- 1.36)	2.04 (1.92- 2.16)	-	-	-	-	-	-
毒性値 幅 (倍)	4.36	10.1	5.67	2.37	2.10	2.43	1.14	1.14	1.70

注：括弧内の数字は95%信頼区間

4.1.3 WET 試験条件の検討

ASW-SN 培地をろ過海水により 5、10、20、40、80%の割合で希釈し、72 時間後の生長速度を算出したところ、ろ過海水が 20%～80%の割合の区間では対照区（ASW-SN 培地のみ）と比較して生長速度が濃度依存的に有意に減少した（図(1)-1）。一方、ろ過海水の栄養塩および必須金属類を補強する目的で、あらかじめろ過海水に ASW-SN 培地と等量の硝酸ナトリウム、リン酸水素カリウム、Trace metal を添加した場合には、対照区と比較して有意な減少は認められなかった（図(1)-1）。したがって、実際の WET 試験では、試験サンプルのろ過後、ASW-SN 培地と等量の栄養塩と Trace metal を添加して試験に用いることとした（試験法（案）参照）。

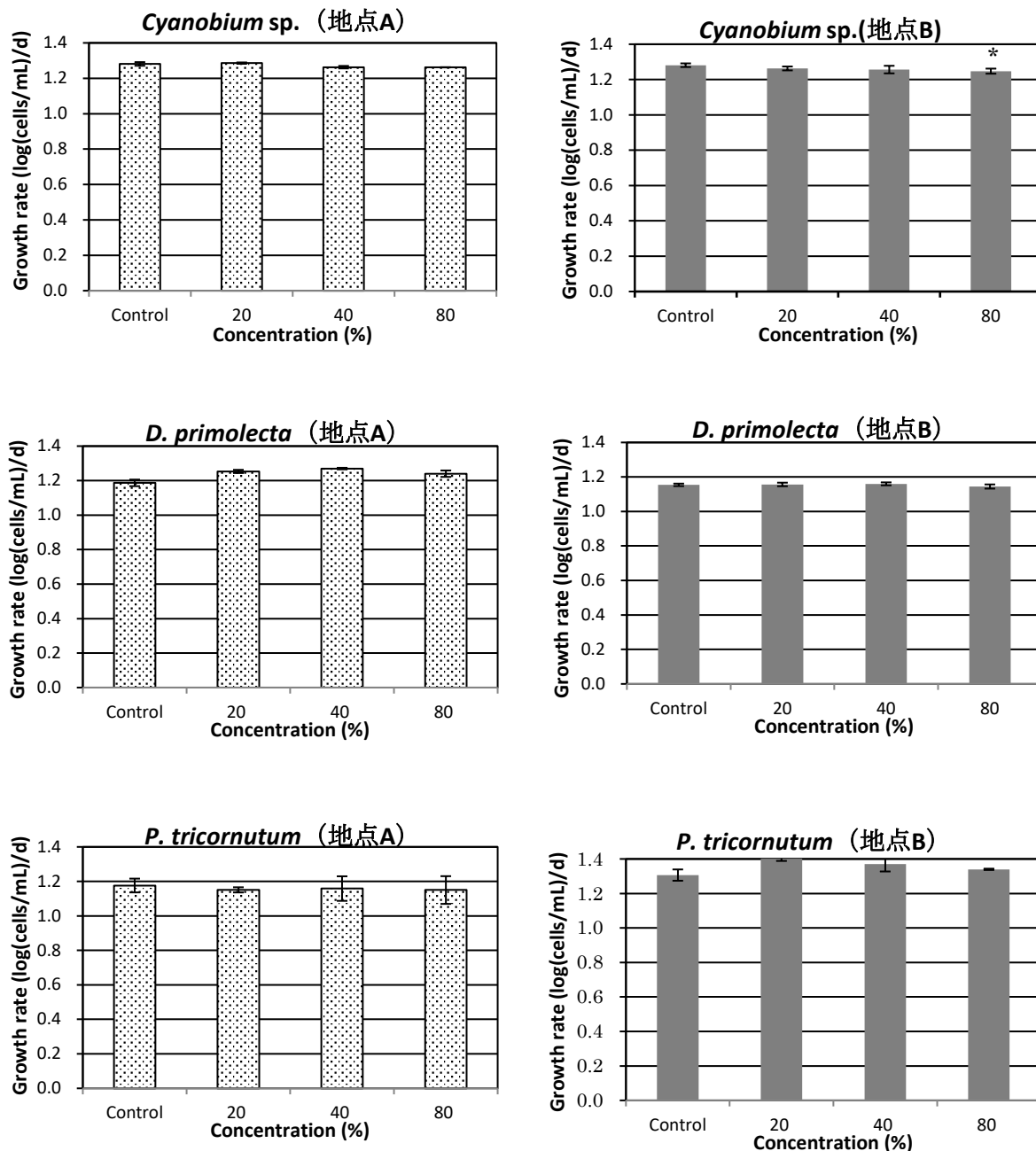


図(1)-1 ASW-SN培地のろ過海水希釈が藻類の生長速度に与える影響

a: ろ過海水で希釈した場合の72 h後平均生長速度、b: ろ過海水にASW-SN培地と等量の栄養塩とTrace metalを添加した場合の72 h後平均生長速度（Dunnet検定 ***p<0.001）

4.1.4 ケーススタディ

開発した試験法を用いた、ケーススタディを2地点（地点Aおよび地点B）について行なった（図4-2）。地点Aについては、実施した3種の藻類で影響は認められなかった（図(1)-2）。地点Bについては、*Cyanobium* sp. の80%区のみで対照区と比較して有意な減少が認められた（図(1)-2）。



図(1)-2 開発した試験法を用いたケーススタディ（地点A、B）の結果
(Dunnet検定 *p<0.05)

4.1.5 考察

海産微細藻類を用いた公定法もしくはそれに準ずる試験法は現在、ISO (International Organization for Standardization: 国際標準化機構)、U.S.EPA (United States Environmental Protection: 米国環境保護庁) およびASTM (American Society For Testing and Materials: 米国材料試験協会) が定める珪藻類 *Skeletonema costata* (ISOのみで対象) と *Phaeodactylum tricornutum* を用いた試験法に加え、

ASTMが定める緑藻*Dunaliella teriolecta*を用いた試験法のみである(表(1)-10)。特に沿岸域におけるバイオマスの観点から、緑藻および珪藻の供試種としての意義は非常に大きく、また、緑藻と珪藻は分類学上、その系統を大きく異にすることから(珪藻類はストラメノパイル系統群と呼ばれる分類群に属し、他の藻類とは大きく分類を異にする)(図(1)-3)、生物多様性の観点からも両種の供試種としての意義は大きい。沿岸域におけるバイオマスと生物多用性の観点では、緑藻や珪藻に加え藍藻類も重要な地位を占めるが、これまで藍藻類を用いた公定法もしくはそれに準ずる試験法は存在しない。また、これまで同一の試験法で複数の海産微細藻種を扱える試験法は、培地や増殖条件等の違いから存在しない。

このような背景から、本研究で開発した、緑藻、珪藻、藍藻を対象とした、同一の試験法で実施可能でありかつOECD (Organization for Economic Cooperation and Development: 経済協力開発機構) テストガイドライン No. 201 (OECD TG201) に準ずる生長阻害試験法の意義は大きいと考える。

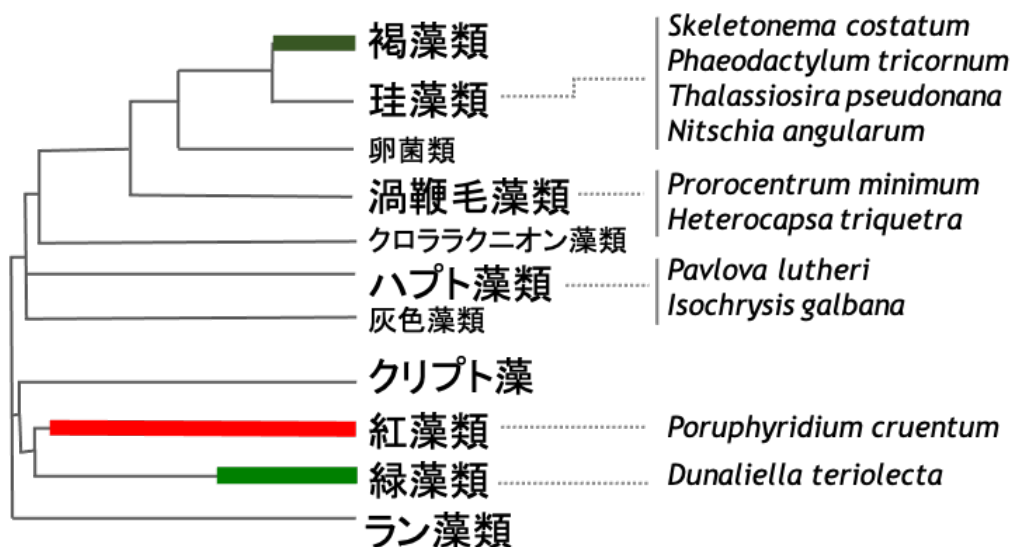
開発した3種の藻類の感受性については、*D. primolecta* (NIES-2256) の3, 5-DCPのEC50値がASTMの推奨種である*D. teriolecta*のものより5倍程度低く、高感受性であった。*P. tricornutum* (NIES-4392) については、NIES-4392と別系統である*P. tricornutum*と3, 5-DCPおよび六価クロムともに同等の感受性であった。海産藍藻の*Cyanobium* sp. に関しては、比較対象が無いものの、3, 5-DCPおよび六価クロムの感受性に関しては、*D. primolecta* (NIES-2256) および*P. tricornutum* (NIES-4392) と同等であった。しかしながら、藍藻類に属する*Cyanobium* sp. に関しては、抗生物質に対する感受性が真核藻類に属する*D. primolecta* (NIES-2256) や*P. tricornutum* (NIES-4392) に比較して格段に高いことが予測される。養殖業等による抗生物質の使用状況を鑑みると、*Cyanobium* sp. の供試種としての意義は大きく、今後は*Cyanobium* sp. における抗生物質の毒性データ蓄積が課題であると考ええる。

リングテストに関しては、実施した2物質(3, 5-DCPおよびニクロム酸カリウム)については概ね良好な結果が得られたと考えている。しかしながら、*Cyanobium* sp. におけるニクロム酸カリウムのリングテストについては、1試験機関の結果についてEC50値が他の試験機関と比較して5倍程度乖離した。再試験においても同様の結果であったため、試験法や試験手順になんらかの原因があると考えているが、本課題期間中に原因の特定には至らなかった。今後も試験法の質の向上を目指し、原因の特定を進める予定である。

ケーススタディの結果は、地点Bでは、最高濃度区の80%で*Cyanobium* sp. にわずかな生長阻害が検出されたが、それ以外は実施した2地点ともに強い影響は認められなかった。開発した試験法の検証という意味では不十分であり、今後も複数地点のサンプルを対象としたケーススタディを進めるべきであると考ええる。

表(1)-10 海産微細藻類を用いた試験法の現状

	OECD	ISO	U. S. EPA	ASTM	EU	日本国内		
試験名称	Guidelines for Testing of Chemicals	TC47 Water quality SC5 Biological methods	Ecological Effects Test Guideline OPPTS 850	ASTM Historical Standard	Reach Test Guideline	環境省水生生物の保全に関わる水質環境基準	水産庁海産生物毒性試験指針	日本工業排水試験法 JIS K00102
試験法		[急]ISO 10253 Algal Growth Inhibition Test	[急]850.5400 Algal Toxicity, Tiers I and II	[急]E1218-97a Static 96h Toxicity Test with Microalgae		ISO10253に準拠した藻類生長阻害試験	[急]生長阻害試験	
試験生物		<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i>				

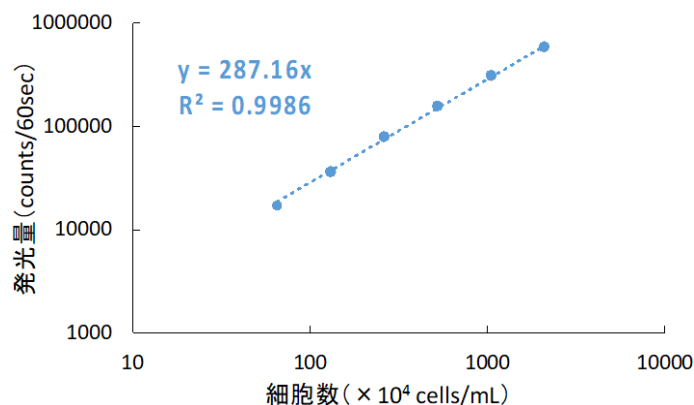


図(1)-3 藻類の大系統

4.2 試験縮小化を目的とした遅延発光強度をバイオマスの代替とする生長阻害試験法の開発

4.2.1 遅延発光量とバイオマス（細胞数）の相関についての検証

図(1)-4に細胞数に対する遅延発光量の相関グラフを示す。細胞数と遅延発光量の相関係数は $R^2=0.9986$ であり、細胞数と遅延発光量の高い相関を示し、遅延発光量は細胞数の代替として利用可能であることが明らかになった（図(1)-4）。

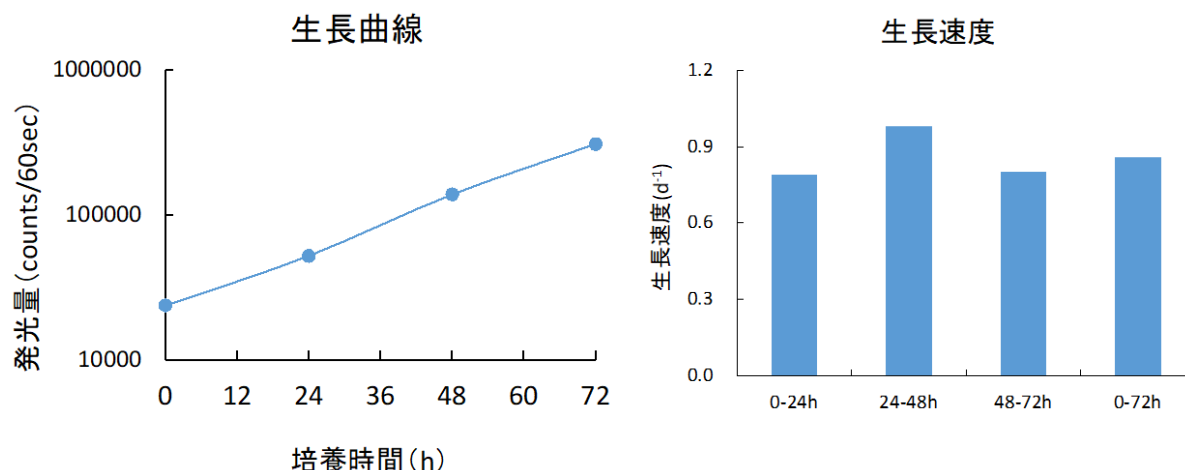


図(1)-4 細胞数と遅延発光量との相関関係

縦軸：60秒間の遅延発光量、横軸：細胞数（血球計測盤により計測）

4.2.2 スモールスケール条件下（10 mL）で72時間の対照区の増殖率：>16倍、日間生長速度の平均変動係数：<35%、繰り返し間の生長速度の変動係数：<7% を満たす条件の検討

図(1)-5に遅延発光量に基づく生長曲線と遅延発光量に基づく日間生長速度を示す。日間平均生長速度は0.86/dayであり、72時間の増殖率はわずかに16倍（0.92/day）に至らなかった。日間生長速度の平均変動係数と繰り返し間の生長速度の変動係数はOECD TG201が定める<35%と<7%を満たした。



図(1)-5 遅延発光量に基づく生長曲線と遅延発光量に基づく日間平均生長速度

4.2.3 まとめと考察

Cyanobium sp. の遅延発光量は細胞数の代替として利用可能であることが明らかになった。一方で、72時間後の増殖率（遅延発光量に基づく）はOECD TG201が定める試験成立条件の16倍を満たさなかった。しかしながら、増殖率の規定からの逸脱は僅かであり、*Cyanobium* sp. を用いたスモールスケール試験の信頼性は十分に高いものとする。また、今後、さらなる条件の検討により基準値を超える増殖率の達成も十分可能と考える。

4.3 海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）の編集

平成25年に環境省および国立環境研究所が設置した排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会が編集・発刊した「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」¹¹⁾を参考にして、「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」の編集を行った。その概要を表(1)-11に示す。表に示すように、予備的な急性毒性試験にとどまったアカシマモエビの試験法を除き、亜慢性もしくは慢性試験を14日以内の比較的短期間に測定可能な試験法案を作成することができた。試験法案はサブテーマ間の相互での確認の上、3名のアドバイザーのコメントを受けて修正を行い、最終的に2021年3月に約100ページの冊子として完成した。

表(1)-11 海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）の概要

試験法（案）の名称	生物種	エンドポイント	試験期間
海産微細藻類を用いた生長阻害試験法	藍藻 <i>Cyanobium</i> sp., 珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , 緑藻 <i>Dunaliella primolecta</i>	生長速度（生長阻害）	72 h
海産大型緑藻類を用いた生長阻害試験法	アオサ <i>Ulva aragoënsis</i>	遊走子のバイオマス	72 h
海産大型褐藻類を用いた生長阻害試験法	シオミドロ <i>Ectocarpus siliculosus</i>	バイオマス	7 d
海産甲殻類シオダマリミジンコを用いた慢性毒性短期試験法	シオダマリミジンコ <i>Tigriopus japonicus</i>	致死、変態	5-8 d
海産カイアシ類（ <i>Acartia</i> sp.）を用いた生存、ふ化、変態試験法	アカルチア <i>Acartia sinjiensis</i> など	致死、変態	6 d
汽水産アミを用いた慢性毒性短期試験法	汽水産アミ <i>Americamysis bahia</i>	致死、成長、成熟	7 d
海産ヨコエビを用いた慢性毒性短期試験法	フサゲモクズ <i>Ptilohyale barbicornis</i>	致死、成長	14 d
海産甲殻類アカシマモエビを用いた生存試験法	アカシマモエビ <i>Lysemata vittata</i>	致死	24 h
海産二枚貝マガキを用いた発生、変態試験法	マガキ <i>Crassostrea gigas</i>	発生	24 h
胚・仔魚期のマダイを用いる胚・仔魚期短期毒性試験法	マダイ <i>Pegrus major</i>	致死・ふ化	5 d
胚・仔魚期の汽水産魚類を用いる短期毒性試験法	マミチョグ <i>Fundulus heteroclitus</i> ジャワメダカ <i>Oryzias javanicus</i>	致死・ふ化	10 d

5. 研究目標の達成状況

- 海産藻類のうち珪藻、藍藻、緑藻の3種の藻類生長阻害試験法案を作成できた。
- 確立した試験法の改善を目的とした参照物質（3,5-DCPおよびニクロム酸カリウム）を用いた試験機関間比較を行うリングテストを、サブテーマ2, 3, 4（および研究協力機関）と共同で主宰・実施した。
- 「海産・汽水生物を用いた慢性毒性試験法（検討案）」の全体の編集・取りまとめを実施して完成し、発刊した。
- 実際の採取した海水を用いて海産藍藻、珪藻、緑藻によるケーススタディを実施し、試験法の適用可能性を検証した。

6. 参考文献

- 1) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Guideline for testing of chemical No. 201, (2012)
- 2) 水産庁：海産生物毒性試験指針、(2010)
- 3) Yamagishi T., Katsumata M., Yamaguchi H., Shimura Y., Kawachi M., Koshikawa H., Horie Y., Tatarazako N. (2016): Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the marine cyanobacterium *Cyanobium* sp. (NIES-981) Ecotoxicology
- 4) Yamaguchi H., Shimura Y., Suzuki S., Yamagishi T., Tatarazako N., Kawachi M. (2016): Complete genome sequence of *Cyanobium* sp. NIES-981, a marine strain potentially useful for ecotoxicological bioassays. Genome Announcements e00736-16.

- 5) Bowler C et al. (2008): The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456: 39-244.
- 6) Ertürk MD., and Saçan MT. (2012): First toxicity data of chlorophenols on marine alga *Dunaliella tertiolecta*: correlation of marine algal toxicity with hydrophobicity and interspecies toxicity relationships. *Env. Toxicol. Chem.* 31: 1113-1120.
- 7) Kim TW., Moon CH., Lee SJ. (2020): Comparative study on the characteristics of microalgae as standard species for marine ecotoxicity tests (*Skeletonema* sp., *Dunaliella tertiolecta*). *J. Korean Soc. Marine Environ.* 26: 2287-3341.
- 8) Prato E., Parlapiano I., Biandolino F. (2012) Evaluation of a bioassays battery for ecotoxicological screening of marine sediments from Ionian sea (Mediterranean sea, south Italy). *Environ. Monit. Assess.* 184: 5225-5238.
- 9) Bjørnstad E., Petersen G., Robson M., Reiersen L., Henriquez L., Massie L., Blackman R. (1993): Paris commission ring test: testing of offshore chemicals and drilling mud on selected marine organisms. *Sci. Total Environ.* 713-719.
- 10) Gabbasova DT., Matorin DN., Konyukhov IV., Seifullina NK., Zayadan BK. (2017) Effect of chromate ions on marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Microbiology* 86: 64-72.
- 11) 環境省・国立環境研究所 排水（環境水）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）

Ⅱ－２ 海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発

国立研究開発法人水産研究・教育機構

水産技術研究所

持田和彦、隠塚俊満、羽野健志、宗宮麗

＜研究協力者＞

水産技術研究所

大久保信幸

〔要旨〕

本研究では、海産魚類および大型藻類を用いた短期慢性毒性試験法の開発を目的とした。海産魚類では、マミチョグ (*Fundulus heteroclitus*) およびマダイ (*Pagrus major*) を選定し、それぞれ「胚から仔魚期」における9±1日間および「卵黄吸収期までの無給餌期」における5日間の試験法の開発を行い、3試験機関が参画し、被験物質として二クロム酸カリウム（六価クロム）および 3,5-ジクロロフェノール（3,5-DCP）を用いたリングテストを実施し、試験法の検証を行った。その結果、マミチョグおよびマダイの各試験研究機関の毒性値とその平均値、中央値の比較から、リングテストの妥当性が概ね確認された。また、マミチョグでは2地点において工場排水が流入する海域の海水を用いたケーススタディを実施した。その結果、対照区との間に有意差は認められず、マミチョグへの影響は観察されなかった。短期慢性毒性試験を確立するとともに、リングテストにより妥当性が概ね確認されたほか、ケーススタディにおいてもその適用妥当性が確認され、研究目標を達成した。

大型藻類については緑藻の *Ulva aragoënsis*（アオサ）の遊走子、褐藻のワカメ (*Undaria pinnatifida*) の幼芽、および細断したシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*) を用いた短期影響試験法の確立を目指し、被験物質として六価クロムおよび 3,5-DCP を用いて遊走子の発芽や幼芽などの藻体の生長阻害試験を実施し、試験期間や高感受性の指標を検討した。その結果、アオサでは72時間の試験で発芽体の細胞数、長さ、面積、および周囲長を、ワカメおよびシオミドロでは7日間の試験で面積をそれぞれ指標にする試験が適切である事を明らかにした。得られた毒性値を他の藻類種の毒性値と比較した結果、大型藻類はクロムに対する感受性は藻類の中では中程度であったものの、3,5-DCP に対しては比較的高い感受性を示し、大型藻類は藻類種の中で有機系の化学物質に対して比較的高い感受性を有する生物群である可能性が示唆された。検討した試験法の中から、緑藻のアオサと褐藻のシオミドロを用いた生長阻害試験法を作成して試験法案として取りまとめ、サブテーマとして研究目標を達成した。

1. 研究開発目的

本研究では、海産大型藻類および魚類を用いた短期慢性毒性試験法を開発するとともに、複数試験機関が参加したリングテストを実施して課題を抽出し、海洋環境への排出が想定される事業所排水、揚鉱水等の様々な排水ならびに水生生物基準策定に適した生態毒性試験法案を完成することを目的とした。

2. 研究目標

海産魚類の胚・仔魚期ならびに大型藻類の短期の（亜）慢性毒性試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施してサブテーマ1と協力して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施する。

3. 研究開発内容

3.1. 試験生物

3.1.1 海産魚類

国立研究開発法人水産研究・教育機構環境保全部（広島県廿日市市）において継代飼育されているマミチョグ (Arasaki strain, Shimizu, 1997) を用いた。2020年6月から9月に長日条件（明：暗＝14h：10h）で水温 20±2℃ の海水をかけ流した 50 L 水槽に1あるいは2歳魚の雌雄をペアリング（雄：雌＝6：12）し、採卵日の前日に水槽内に採卵カゴ（観賞魚用ネット（サイズ：5” /M 細目, サニー商事）；

蓋：目合い約 7 mm の網）を設置して受精卵を採卵した。採集した受精卵は、受精後 10-15 時間の卵を選別し、実験開始まで 20℃に設定した恒温機（CR-41C, 日立）内で 30 PSU に調整した人工海水（マリンアート SF1；富田製薬）に入れて曝気をしながら試験開始まで培養（1 回/2 日換水：半止水式）した。また、8 月から 9 月に実施したリングテストでは、受精 7 日後まで恒温機内で培養した胚を人工海水で湿らせたキムタオルに包み、20℃蓄熱剤（サーモストレージ 20；スギヤマゲン）と保冷剤を用いて 18.8 ± 0.6℃ に維持して各機関へ輸送した。

マダイについては海洋生物環境研究所中央研究所（以下、MERI）及び千葉県立大原高等学校（以下、大原高校）で生産し、その後海生研にて飼育されている親魚（海生研産は 3 歳、大原高校産は 5 歳）を用いて、2020年5月から8月において 5,000 L水槽に雌雄（海生研産は17尾、大原高校産は12尾）を収容し、水温17±2℃、自然日長下で産卵させた。試験二日前の夕方に親魚飼育水槽に付属した集卵槽内に数千粒以上の卵が確認され次第、1 Lのビーカーで海水ごと受精卵を採集した（約34PSUの海水で飼育）。採卵後、約 34PSU の海水中で浮上している受精卵の中から卵割が進んでいる胚を駒込ピペットで回収し、一定温度（16℃）のウォーターバス内に静置して試験開始まで培養した。また、5月から6月に実施したリングテストでは、ウォーターバス内で培養した受精1日後の胚を約 34PSU のろ過海水で満水にした 2 L ポリ容器に 250 粒を収容し、水温を16℃に維持して各機関へ輸送した（サーモストレージ16、16℃定温輸送容器、スギヤマゲン）。

3.1.2 大型藻類

神戸大学藻類コレクションからアオサ属の *Ulva aragoënsis* (KU-1532) を分譲頂き、PES 培地を用いて明：暗=12h：12h、温度 15℃の条件で継代培養した。この藻体を培養温度 20℃に変更して数日培養し、遊走子を形成させた後、細断ろ過してろ液に含まれる遊走子を採取した。採取した遊走子は、顕微鏡下で細胞密度を計測後、生長阻害試験に用いた。

ワカメ (*Undaria pinnatifida*) については遊走子を得るための培養が長期にわたる事が推測されるため、ワカメ配偶体から培養して得られる幼芽を用いた試験法を検討した。水産技術研究所の吉田吾郎博士から雌雄の配偶体を分譲頂き、PESI 培地を用いて明：暗= 12 h：12 h、温度 21℃の条件で継代培養した。

ワカメ卵や幼芽を効率的に生成させるため、水温および雌雄配偶体混合液の最適濃度を検討した。雄雌の配偶体をそれぞれ 150 mL の滅菌海水に加えブレンダーを用いてホモジナイズした。雄雌の懸濁液を混ぜ合わせ、滅菌海水で希釈して各配偶体濃度を、15℃の試験では 0.33、1.1、3.3、11、および 33 mg/L、20℃の試験では 0.27、0.81、2.7、8.1、および 27 mg/L に設定し、対照区（0 mg/L）を別途設け、一定面積にカットした GF/C ガラス繊維ろ紙（以降、GF/C）を 10-50 枚程度加えて 1 分間程度スターラーで攪拌し、GF/C に配偶体を付着させた。配偶体が付着した GF/C を PESI 培地に移し、それぞれ 15℃または 20℃、明：暗=15h：9h 条件で 20 日程度培養後、顕微鏡下で GF/C 上のワカメを写真撮影した。写真から萌芽を含めた卵および配偶体株数を計測し、ろ紙面積当たりの個数および株数を計算した。

幼芽を用いた生長阻害試験を行うため、ワカメの雄雌配偶体を PESI 培地に加えブレンダーを用いてホモジナイズ後、雄雌の配偶体濃度が 10 mg/L になるよう懸濁液を混ぜ合わせ、明：暗=12 h：12 h、温度 15℃の条件で 3 週間以上培養して、幼芽を形成させた。この培養液を PESI 培地で洗い込みながらろ過し、目開き 10 μm フィルター上に残った幼芽を採取した。採取した幼芽は、顕微鏡下で幼芽の密度を計測後、試験に用いた。

神戸大学藻類コレクションからシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*, KU-1372) を分譲頂き、PES 培地を用いて明：暗=12 h：12 h、温度 13℃の条件で継代培養した。この藻体を細断後、培地で洗い込みながらろ過し、ろ液に含まれる断片化した藻体を採取した。藻体は、顕微鏡下で密度を計測後、生長阻害試験に用いた。

3.2 被験物質および分析

試験物質には、二クロム酸カリウム ($K_2Cr_2O_7$; 和光純薬工業, CAS No. 7778-50-9) および 3,5-ジクロロフェノール (3,5-DCP, Alfa Aesar, CAS No. 591-35-5) の 2 物質を用いた。二クロム酸カリウムは全てクロム換算で試験液濃度を設定した (以下、六価クロム)。

六価クロム分析用試料は、採水後速やかに冷凍保存し、分析前にメンブレンフィルター (Advantec 社製 DISMIC 25HP045AN 0.45 μm) でろ過後に硝酸 100 mL を添加し、1% 硝酸で 100 倍または 400 倍に希釈後、結合誘導プラズマ質量分析装置 (ICP-MS, Agilent 8900, Agilent Technologies) で ^{52}Cr 濃度を測定した。3,5-DCP 分析用試料は、以下の手順で前処理を行った。固相カートリッジ (OASIS HLB Plus, Waters) をメタノール 10 mL、純水 10 mL で予めコンディショニングした後、試料 10 mL を通水し、純水 10 mL でカートリッジを洗浄した。1 時間通気してカートリッジを乾燥させた後、5 mL のメタノールで溶出し、メスアップして試料溶液とした。分析は、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LCMS-8060NX, 島津製作所) を用い、SIM 法 (ESI (-), モニタイオン: m/z 161.0) により行った。

3.3 曝露試験

マミチヨグおよびマダイを用い、2020 年 6 月から 10 月の間にそれぞれ 3 機関で曝露試験を実施した (表(2)-1)。マミチヨグの曝露試験は、ふ化 4 $\pm$ 1 日前からふ化 5 日後までの胚期-仔魚期の 10 $\pm$ 1 日間の期間を設定した。受精後 14 日前後にふ化するマミチヨグ (水温: 約 20°C) では受精 10 日後から曝露を開始した。仔魚期の試験期間は、対照区の供試卵数の半数以上がふ化した日をふ化日として、5 $\pm$ 1 日後を試験終了日とした。また、受精後 2 日前後にふ化するマダイ (水温約 20°C) では、受精 2 日目の胚期からふ化仔魚が開口する 5 日後までとし (表(2)-2)、それぞれの魚種において「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法 (検討案)」に基づきリングテストを実施した (表(2)-3)。

なお、試薬の調整には蒸留水で調整した人工海水 (マリンアート SF-1) を用いて、それぞれの機関においてクロム濃度および 3,5-DCP 濃度がそれぞれ 1600、400 mg/L になるように原液を作成し、それぞれ 16 mg/L および 4 mg/L を上限として公比 2 の濃度区で曝露試験を行った。被験物質の分析のための採水は、マダイでは試験開始時と終了時の計 2 回、マミチヨグでは胚期、仔魚期において換水の前後の計 4 回行った。

表(2)-1 リングテスト参画機関

Laboratory Name	マミチヨグ <i>Fundulus heteroclitus</i>	マダイ <i>Pagrus major</i>
水産研究・教育機構 (FRA)	○	○
海洋生物環境研究所 (MERI)	○	○ ^a
鹿児島大学 (Kagoshima Univ.)	○	
国立環境研究所 (NIES)		○

^a 2回試験を行った

表(2)-2 短期慢性毒性試験の概要 (白枠が胚期を、灰色部が仔魚期を示す。)

魚種(水温)	受精後日数 (dpf)																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
マミチヨグ(20℃)																					
マダイ(20℃)																					

表(2)-3 試験条件

	マミチヨグ	マダイ
曝露期間	9 ± 2 days	5 days
曝露様式	半止水式 ^a	止水式
試験液の換水	2ないし3日毎	しない
観察項目	生存率, ふ化率, 成長 (全長, 乾燥重量)	生存率, ふ化率
水温	20 ± 1℃	20 ± 1℃
塩分 (PSU)	30	34 ± 1
明暗周期	明期14時間, 暗期10時間	明期14時間, 暗期10時間
1容器当たりの胚数	10	9-13
1容器当たりの仔魚数	6	-
1試験区当たりの容器数	4	4
試験液量: 胚期	50-100 ml	200-300 ml
仔魚期	200-300 ml	
給餌	あり (ブラインシュリンプ24時間ふ化幼生)	なし
試験成立条件 (対照区)	生存率: ≥70% ふ化率: ≥80% 溶存酸素: ≥60 %	生存率: ≥70% ふ化率: ≥80% 溶存酸素: ≥60 %

^a 胚期には90 min⁻¹程度で緩やかに振とう

試験期間中、マダイでは生存率およびふ化率を算出した。マミチヨグでは生存率およびふ化率を算出する共に、成長指標（全長および乾重量）を測定した。試験開始時、終了時、および換水前後には、溶存酸素 (DO) および pH を測定した。マミチヨグの試験終了後には、各処理区の仔魚を氷冷して安楽死させ、70%エタノールで固定後、顕微鏡下で仔魚を撮影し、画像解析ソフト (ImageJ) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて全長を測定した。また、撮影後の仔魚を 24~48 時間 70%エタノール下で引き続いて静置した後、110℃、1 時間で乾燥させ各処理区の仔魚の重量を測定し、1 尾あたりの乾重量を算出した。被験物質濃度は、六価クロムは 1、2、4、8、および 16 mg/L で、3,5-DCP は 0.25、0.5、1、2、および 4 mg/L とし、対照区 (0 mg/L) を別途設け、両魚種とも同じ濃度で行った。

大型藻類を用いた曝露試験について、試験条件を表 (2)-4 に示した。

アオサ遊走子を用いた生長阻害試験は既報 (Hooten and Carr, 1998 ; Wendt et al., 2013) を参考にして実施した。被検物質濃度は、予備試験の結果を元に 3,5-DCP (0.25-4 mg/L、公比 2)、六価クロム (0.25-4 mg/L、公比 2) をろ過滅菌した人工海水のマリンアート SF-1 (富田製薬株式会社) に PES 培地の栄養成分を加えた完全人工培地 (マリンアート+PES 培地) で希釈して作製し、対照区を設けた。24 穴プレートで透明容器に収容してインキュベーター内で曝露試験を実施した。試験後、円形のスライドグラスを収容し、顕微鏡下で発芽体をランダムに 10 個体/well 写真撮影し、生長指標として各発芽体の細胞数、長さ、面積、および周囲長を計測した。

ワカメを用いた試験において、被検物質濃度は、3,5-DCP (0.25-4 または 0.5-8 mg/L、公比 2)、六価クロム (2.5-40 または 1-16 mg/L、公比 2) を PESI 培地で希釈して作成し、対照区を設けた。24 穴プレートを透明容器に収容してインキュベーター内で曝露試験を実施した。試験後、円形のスライドグラスを収容し、顕微鏡下で発芽体をランダムに 5 個体/well 写真撮影して幼芽の面積を計測した。

シオミドロを用いた試験において、被検物質濃度は、予備試験の結果を元に 3,5-DCP (0.25-4 mg/L、公比 2)、六価クロム (0.25-4 mg/L、公比 2) を PES 培地で希釈して作製した。別途 PES 培地のみの対照区を設けた。試験後、円形のスライドグラスを収容し、顕微鏡下で発芽体をランダムに 10 個体/well 写真撮影し、藻体の面積を計測した。

表 (2)-4 大型藻類を用いた試験法の試験条件

試験法	アオサ 生長阻害試験	ワカメ 生長阻害試験	シオミドロ 生長阻害試験
容器	24 穴マルチプレート		
試験液量	2.5 mL/well		
連数	4 連		
曝露方式	止水式		
培地	マリンアート+PES 培地	PESI 培地	PES 培地
温度	20℃	15℃	13℃
明暗周期	12L, 12D	9L, 15D	12L, 12D
試験期間	72 時間	7 日間	7 日間、10 日間
初期生物量 (/well)	遊走子 1.0 x 10 ⁵ 個	幼芽 200-300 個	細断藻体 50-150 個
検討指標	細胞数、長さ、 面積、周囲長	面積	面積
観察数(/well)	10 体以上	5 体	10 体以上

3.4 統計解析

魚類を用いた試験における影響の評価は、それぞれの試験における各処理区の繰り返し (n = 4) で最小影響濃度 (LOEC : Lowest observed effect concentration) および無影響濃度 (NOEC : No observed effect concentration) をエクセル統計 (BellCurve for Excel version 3.20) を用いて算出した。二値データである生存率およびふ化率では、対照区のデータの分散が極小になることが多いため等分散性を仮定できないことから、すべてノンパラメトリック手法の Steel の検定を使用した。また、成長における乾重量では Levene の等分散検定を行い、すべてのサンプルで等分散性が確認されたため、パラメトリック手法の多重比較検定 (Dunnett 検定) を行った。また、観察項目毎の 25%阻害濃度 (IC₂₅ : 25% inhibition concentration)、および半数致死濃度 (LC₅₀ : lethal concentration) を R パッケージ (R Development Core Team, 2019) の drc 関数を用いて対数ロジスティックモデルにより算出した。二値データである生存率およびふ化率では "type=binomial" を使用した (渡部ら, 2015)。成長のパラメータである乾重量および全長については、成長阻害率を式 (1) より算出した。死亡個体には測定値に 0 (すなわち 100%阻害) を代入し、IC₂₅ を算出した。

$$IC_x = (G_c - G_t) / G_c \quad (1)$$

IC_x : x%阻害濃度

G_c : 乾重量あるいは全長における対照区の平均値

G_t : 乾重量あるいは全長における各処理区の平均値

アオサ試験では細胞数、長さ、面積、および周囲長を、ワカメおよびシオミドロの試験では面積を生物指標とし、これらの生長指標および被験物質の設定濃度から log-logistic モデルにより半数影響濃度 (EC₅₀) を求めると共に、生長指標を対照区と比較した。統計解析はダネット検定を用いて $P < 0.05$ を統計的に有意と判断し、設定濃度から最低影響濃度 (LOEC) および無影響濃度 (NOEC) を算出した。なお、大型藻類の試験について、毒性値は全て設定濃度に基づいて算出した。

今回得られた大型藻類に対する EC₅₀ 値とアメリカ環境保護庁 EPA の毒性値データベース Ecotox から得られた藻類に対するクロムおよび 3,5-DCP の EC₅₀ 値などの急性毒性値を用いて種の感受性分布 (SSD) を作成した。データベースの毒性値は生長や発芽や生物量などの指標について選別し、光合成阻害や生化学的指標を基にした値は除いた。また毒性値が複数ある場合はそれらの幾何平均を求め、各生物種に対する毒性値とした。

3.5 ケーススタディ

魚類については、地点 A および B で採水した供試海水を、人工海水で適宜希釈し、供試海水が 0、20、40、および 80%の割合で含む試験液を調整し、3. 3 に準じてマミチヨグ胚・仔魚を用いた曝露試験を実施した。

藻類については、試験生物としてアオサ属の *Ulva aragoënsis* (KU-1532) およびシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*, KU-1372) を用い、前述の試験法で試験を実施した。A および B 地点で採水した試験水をろ過滅菌して PES 培地の栄養成分を同じ割合で加えた後、マリンアート+PES 培地で 20、40、および 80%に希釈して試験液を作製し、24 穴プレートで透明容器に収容してインキュベーター内で曝露試験を実施した。

4. 結果及び考察

4.1 毒性試験

4.1.1 魚類試験を実施した各機関の水質

試験期間中の DO、pH、塩分、および水温はほぼ一定で維持され、全ての試験で対照区における生存率、ふ化率、および、酸素飽和度において有効性条件を満たしていた (表(2)-5)。また、表(2)-6に被験物質の分析結果を示す。各物質の回収率は、クロムで概ね設定濃度の 70-120%の許容範囲内にあったが、3,5-DCP ではこの許容範囲を下回ることもあった。

表(2)-5 試験期間中の酸素飽和度 (DO %)、 pH、塩分濃度、および水温

被験物質	魚種	研究機関	DO (%) ^{a,b}		pH ^a		塩分 ^a		水温 (°C) ^c
			0h	48 or 72 h	0h	48 or 72 h	0h	48 or 72 h	
Cr(VI)	マミチヨグ	FRA	98.1 ± 2.8	80.9 ± 7.9	8.4 ± 0.1	7.9 ± 0.1	30.3 ± 0.1	31.7 ± 0.9	19.8 ± 0.3
		MERI	97.4 ± 1.7	97.2 ± 2.9	8.1 ± 0.1	8.0 ± 0.3	30.0 ± 0.1	31.9 ± 1.4	19.8 ± 0.3
		Kagoshima Univ.	72.4 ± 8.1	64.2 ± 8.3	8.2 ± 0.2	8.0 ± 0.1	30.2 ± 0.6	30.5 ± 0.5	20.2 ± 0.4
	マダイ	FRA	97.3 ± 0.7	83.7 ± 3.0	8.5 ± 0.05	8.1 ± 0.04	34.0 ± 0	34.9 ± 0.5	19.9 ± 0.1
		MERI 1	104 ± 0.3	102 ± 20	8.0 ± 0.2	8.0 ± 0.01	34.4 ± 0.1	34.6 ± 0.1	19.2 ± 0.04
		MERI 2	104 ± 0.2	101 ± 0.4	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.02	34.4 ± 0.05	34.6 ± 0.1	19.7 ± 0.1
		NIES	112 ± 0.6	112 ± 0.6	8.1 ± 0.03	8.2 ± 0.01	34.7 ± 0.6	33.6 ± 0.1	20.1 ± 0.1
	3,5-DCP	FRA	101 ± 2.1	76.7 ± 12	8.4 ± 0.04	7.9 ± 0.2	30.5 ± 0.2	31.4 ± 0.9	19.8 ± 0.1
		MERI	101 ± 0.8	82.2 ± 12	8.2 ± 0.01	7.8 ± 0.1	30.3 ± 0.2	31.6 ± 1.4	19.6 ± 0.2
		Kagoshima Univ.	70.9 ± 9.4	60.0 ± 5.5	8.2 ± 0.1	8.0 ± 0.1	30.6 ± 0.9	30.4 ± 0.6	20.2 ± 0.3
	マダイ	FRA	97.1 ± 0.1	80.1 ± 6.0	8.6 ± 0.02	8.0 ± 0.1	34.1 ± 0	34.7 ± 0.4	19.9 ± 0.1
		MERI 1	102 ± 0.3	99.5 ± 0.8	8.1 ± 0.01	8.1 ± 0.01	34.6 ± 0.01	34.7 ± 0.1	19.6 ± 0
		MERI 2	103 ± 0.5	101 ± 1.0	8.1 ± 0.01	8.1 ± 0.01	34.9 ± 0.03	34.4 ± 2.0	19.7 ± 0.1
		NIES	110 ± 0.2	110 ± 1.8	8.2 ± 0.01	8.2 ± 0.01	32.8 ± 0.2	33.6 ± 0.1	20.1 ± 0.1

^a Geomean ± standard deviation. ^b Oxygen saturation. ^c Average ± standard deviation.

表(2)-6 被験物質の実測値

魚種	被験物質	設定濃度 (mg/L)	実測濃度 (mg/L)	回収率 (%)	実測濃度 (mg/L)	回収率 (%)	実測濃度 (mg/L)	回収率 (%)	実測濃度 (mg/L)	回収率 (%)
マミチヨグ	Cr(VI) (mg/L)	control	N.D.		N.D.		N.D.			
		1	1.31	131%	1.00	100%	0.98	98%		
		2	2.90	145%	2.00	100%	2.02	101%		
		4	4.45	111%	3.97	99%	3.97	99%		
		8	8.84	111%	7.91	99%	7.89	99%		
		16	18.0	112%	15.8	99%	16.3	102%		
	3,5-DCP (mg/L)	control	N.D.		N.D.		N.D.			
		0.25	0.18	74%	0.15	59%	0.16	66%		
		0.5	0.42	83%	0.34	68%	0.34	68%		
		1	0.87	87%	0.56	56%	0.83	83%		
		2	1.86	93%	1.18	59%	1.95	98%		
		4	3.96	99%	2.59	65%	3.47	87%		

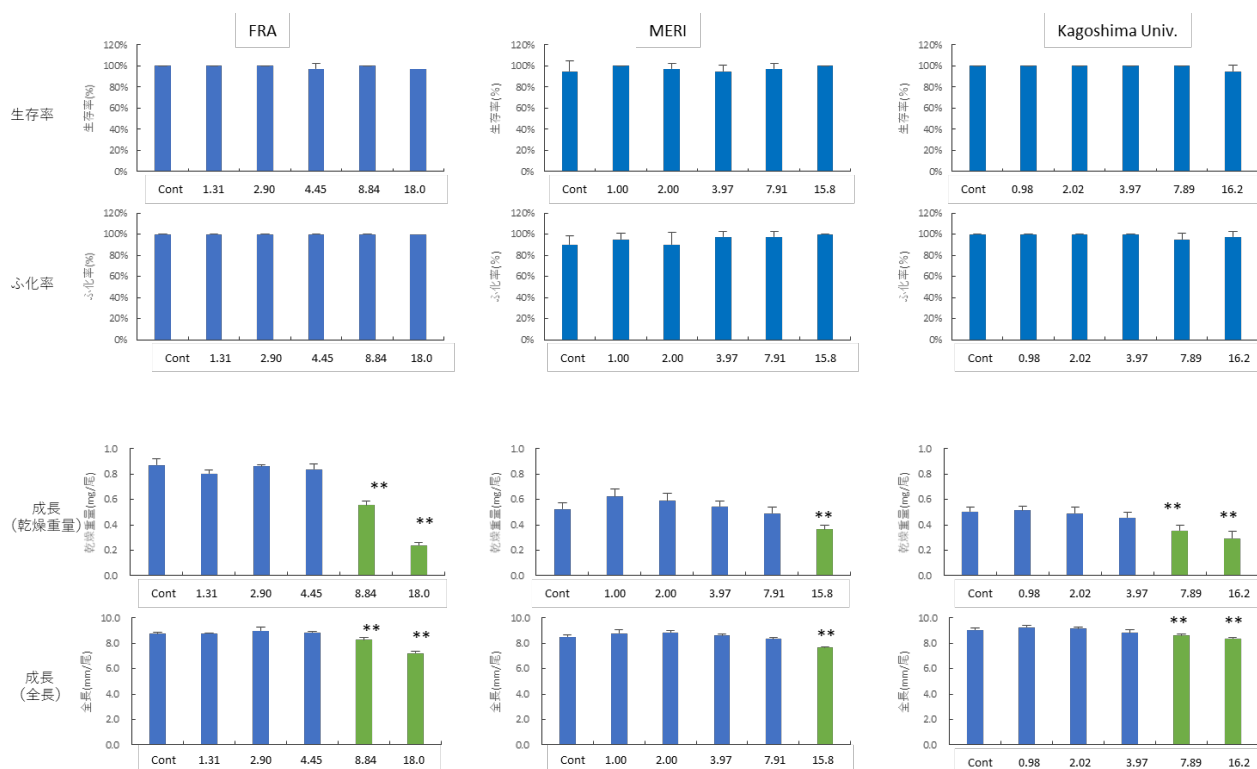
表(2)-6 被験物質の実測値 (つづき)

マダイ			FRA		MERI 1		MERI 2		NIES	
Cr(VI)	control		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
(mg/L)	1		1.19	119%	1.14	114%	1.63	163%	2.41	241%
	2		2.98	149%	2.25	113%	2.53	126%	3.38	169%
	4		5.02	125%	4.18	105%	4.47	112%	4.65	116%
	8		8.06	101%	9.14	114%	8.95	112%	9.34	117%
	16		17.3	108%	16.8	105%	17.2	108%	18.2	114%
3,5-DCP	control		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
(mg/L)	0.25		0.23	92%	0.18	73%	0.21	86%	0.17	68%
	0.5		0.45	89%	0.37	75%	0.47	95%	0.34	69%
	1		0.96	96%	0.81	81%	0.87	87%	0.69	69%
	2		1.90	95%	1.61	81%	1.74	87%	1.39	69%
	4		4.02	100%	3.21	80%	3.53	88%	2.66	66%

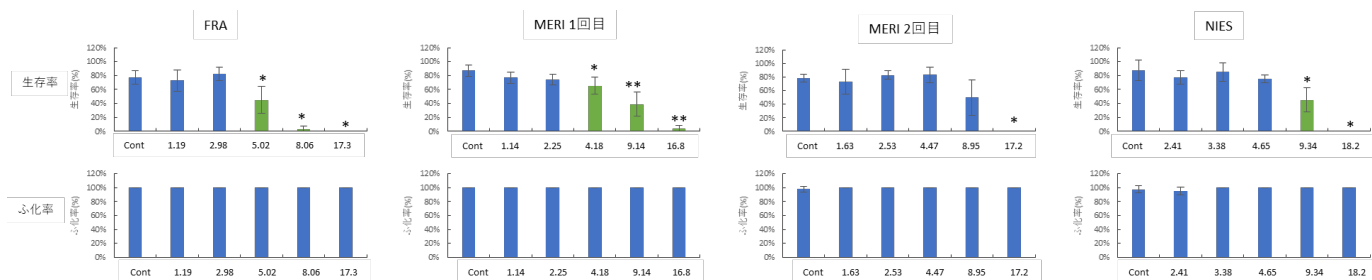
N.D., 未検出

4.1.2 クロムを被験物質とした魚類曝露試験

マミチヨグでは生存率およびふ化率で、マダイではふ化率で最高濃度区でも影響が検出されなかった（図(2)-1 および 2）。影響が観察された項目および LOEC は、マミチヨグでは成長（乾重量，全長）で 7.89-15.8 mg/L、マダイでは生存率で 4.38-17.2 mg/L であった（図(2)-1 および 2）。マダイ仔魚の先行研究では、24 および 48 時間 LC₅₀ 値は、全長 6-8 mm で 28 および 17 mg/L、7.3mm で 25 および 13 mg/L、8.9 mm で 25 および 14 mg/L と報告されている（環境省 2008a, 2008b；吉川および西村，2014）。また、Koyama et al., (2008) らは、全長 25 および 40 mm の稚魚に対する 96 時間 LC₅₀ 値は 11 および 12 mg/L と報告している。本試験における LC₅₀ 値は FRA、MERI-1、MERI-2、NIES でそれぞれ 4.6、5.2、7.6、および 7.3 mg/L であり、既報よりも低い傾向にあったが、これは曝露試験が感受性の高い胚～ふ化仔魚に行われていたためと推察される。



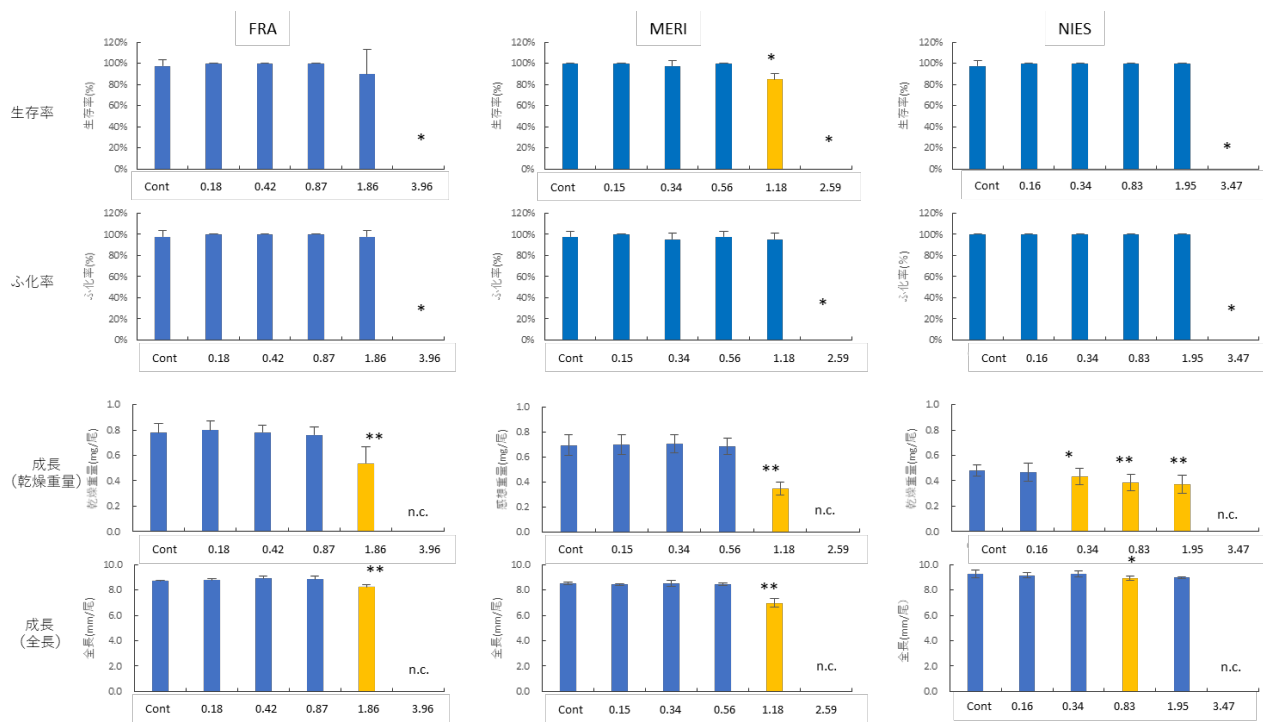
図(2)-1 ニクロム酸カリウム毒性試験結果(マミチヨグ)。**, 対照区 (Cont) との間に有意差 ($p < 0.01$) があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。



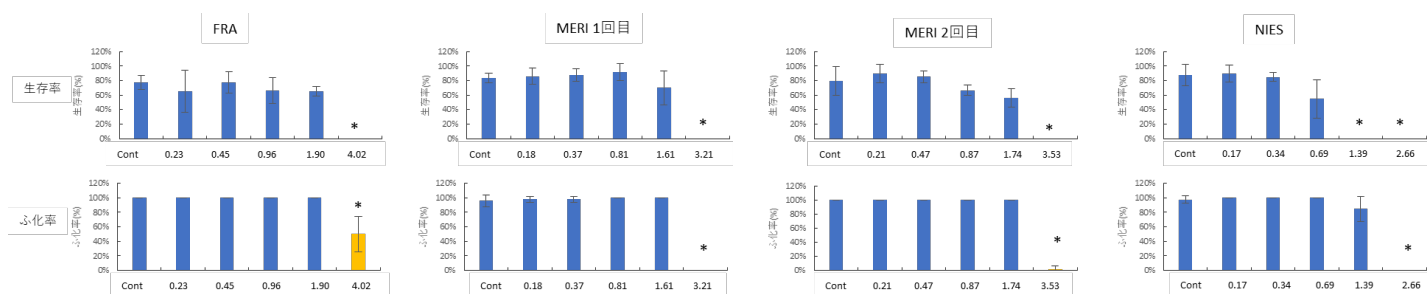
図(2)-2 ニクロム酸カリウム毒性試験結果 (マダイ)。* および ** は対照区 (Cont) との間に有意差 ($p < 0.05$ および $p < 0.01$) があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

4.1.3 3,5-DCP を被験物質とした魚類曝露試験

影響が観察されたエンドポイントおよび LOEC は、マミチヨグでは成長 (乾重量, 全長) で 0.34-1.86 mg/L、マダイでは生存率で 1.39-4.02 mg/L であった (図(2)-3 および 4)。過年度事業において、マミチヨグ胚の受精後 10 日目からふ化までの 4 日間、ふ化後の仔魚をさらに 5 日間、計 9 日間曝露して得られた LOEC は成長および生残をエンドポイントとした場合、それぞれ 1 mg/L および 3 mg/L であり、成長が感受性の高いエンドポイントであった。同様に、これらは今回の結果と概ね一致していた。



図(2)-3 3,5-ジクロロフェノール毒性試験結果 (マミチヨグ)。* および ** は対照区 (Cont) との間に有意差 ($p < 0.05$ および $p < 0.01$) があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。



図(2)-4 3,5-ジクロロフェノール毒性試験結果 (マダイ)。*, 対照区 (Cont) との間に有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

4.1.4 各魚種における試験機関間の変動

各試験研究機関の IC_{25} 値から平均値、中央値、および変動計数 (CV) を算出しリングテストの妥当性を考察した (US EPA, 2001 ; 渡部ら, 2015)。

4.1.4.1 マミチヨグ

六価クロムを被験物質とした試験では、重量および全長の IC_{25} は平均 10.0 および 32.4 mg/L であった (表 (2)-7)。ただし、全長は対照区に比べ 25% 以上の阻害が見られず (図 (2)-1)、最高濃度 (16 mg/L) 以上の外挿値での試算となり、それ故、変動係数も 43.6% と高い傾向にあった。3,5-DCP 試験では、生存率およびふ化率の IC_{25} は平均 1.93 および 2.04 mg/L で、変動係数は 26.5 および 23.3% であった。また、重量および全長の IC_{25} は平均 1.59 および 2.08 mg/L で、変動係数は 26.6 および 31.5% であった (表 (2)-7)。外挿値を用いた六価クロム試験の全長の結果を除き、平均値と中央値は概ね近接していた。

表 (2)-7 マミチヨグ試験における IC_{25} 値

被験物質	観察項目	試験研究機関			平均値	中央値	変動計数 (CV) (%)
		FRA	MERI	Kagoshima. Univ.			
Cr (VI) (mg/L)	生存率	NA	NA	NA	-	-	-
	ふ化率	NA	NA	NA	-	-	-
	成長 乾燥重量	7.56	14.2	8.31	10.0	8.31	29.7
	全長	22.3 ^a	22.6 ^a	52.4 ^a	32.4	22.6	43.6
3,5-DCP (mg/L)	生存率	2.05	1.25	2.48	1.93	2.05	26.5
	ふ化率	2.24	1.38	2.48	2.04	2.24	23.3
	成長 乾燥重量	1.79	1.00	1.98	1.59	1.79	26.6
	全長	2.81	1.22	2.20	2.08	2.20	31.5

^a, 外挿値; NA, 影響が見られず; “-”, 該当値なし。

4.1.4.2 マダイ

六価クロム試験では、生存率の IC_{25} は平均 3.67 mg/L、変動係数は 24.5% であった (Table 8)。3,5-DCP 試験では、生存率およびふ化率の IC_{25} の平均値は 0.84 および 2.41 であった。生存率においては、MERI-2 回目の IC_{25} 値が他機関の値に比べ 2-3 倍高く、変動係数 58.4% にまで押し上げる一因となった。この原因として、採卵親魚のロットの違いに由来する卵質の差異が考えられた。3,5-DCP の生存率の平均値と中央値では約 1.4 倍の開きが見られたが、その他の指標の平均値と中央値は概ね近接していた。

表 (2)-8 マダイ試験における IC_{25} 値

被験物質	観察項目	試験研究機関				平均値	中央値	変動計数 (CV) (%)
		FRA	MERI 1	MERI 2	NIES			
Cr (VI)	生存率	3.45	2.29	4.57	4.36	3.67	3.90	24.5
	ふ化率	NA	NA	NA	NA	-	-	-
3,5-DCP	生存率	0.47	0.71	1.67	0.50	0.84	0.61	58.4
	ふ化率	3.50	2.15	2.53	1.46	2.41	2.34	30.6

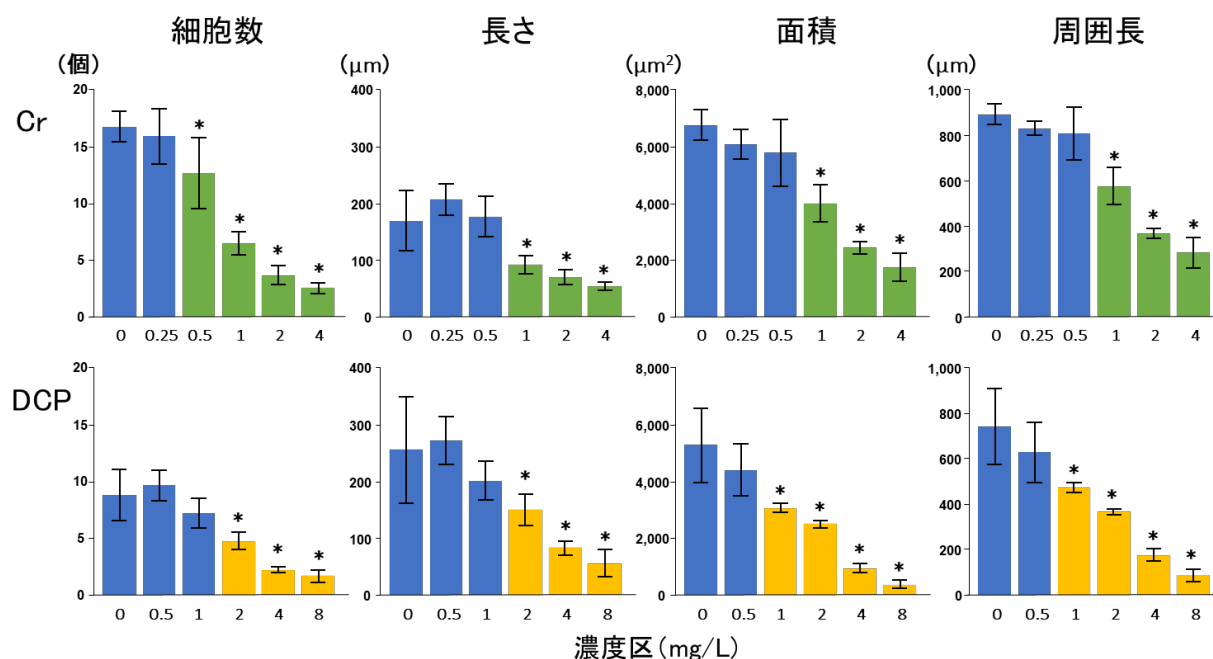
NA, 影響が見られず; “-”, 該当値なし。

今回のリングテストでは、海産魚を扱う実験ということもあり、試験研究機関およびその繰り返し実験の回数が 3~4 という限られた中での実施となった。参考までに、淡水生物のリングテストは 10 試験機関が参画してその妥当性評価が行われている (渡部ら, 2015)。試験の妥当性を示す変動係数の許容範囲は設定されていないが、マダイ 3,5-DCP 試験の生存率および外挿値を用いたマミチヨグのクロム試験での全長を除き、 IC_{25} の中央値と各試験研究機関の IC_{25} を比較すると、暫定的に妥当性の許容範囲とし

て定めた中央値 ± 1 濃度区以内の誤差（US EPA, 2001；渡部ら, 2015）に収まっていた。その時の変動係数は概ね 30%以内であり、30%が試験の妥当性を示す変動係数の許容範囲の目安と考えられた。以上の結果から、各試験研究機関の IC₂₅ 値とその平均値および中央値の比較から、リングテストの妥当性が概ね実証されたと考えられた。

4.1.5 アオサ

藻体の細胞数、長さ、面積、および周囲長と被験物質の設定濃度を基に 72 h-EC₅₀、72 h-LOEC および 72 h-NOEC を算出した結果、何れの指標を用いても両物質ともに毒性値に大きな差は認められなかった（図(2)-5、表(2)-9）。そのため、今回検討した指標を用いて生長阻害試験が実施可能と判断し、比較的測定しやすい細胞数と面積を指標にした試験法案を作成した。



図(2)-5 アオサ生長阻害試験における六価クロム (Cr) および 3,5-DCP 曝露による発芽体の各種エンドポイントに対する影響。*、対照区 (0 mg/L) との間に有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

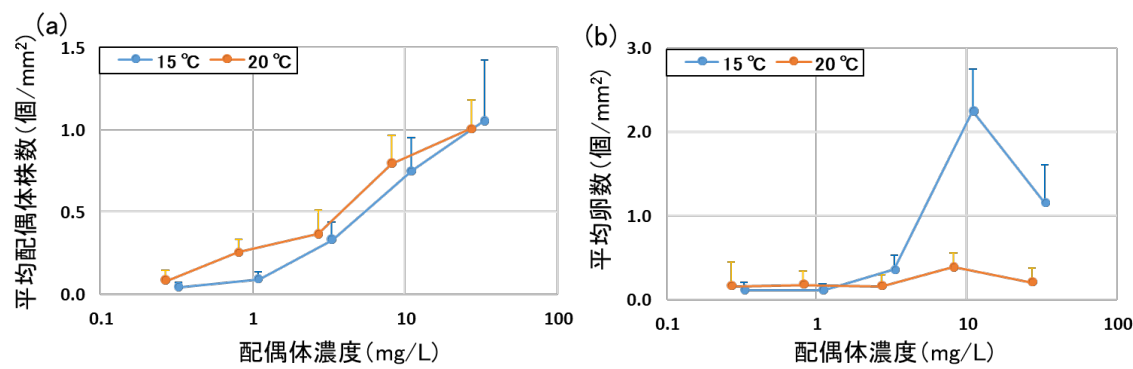
表(2)-9 アオサ生長阻害試験における細胞数、長さ、面積、および周囲長を指標とした六価クロムおよび 3,5-DCP の毒性値

	毒性値 (mg/L)					
	Cr(VI)			3,5-DCP		
	72 h-EC ₅₀	72 h-NOEC	72 h-LOEC	72 h-EC ₅₀	72 h-NOEC	72 h-LOEC
細胞数	0.73 (0.57-0.88)	0.25	0.50	1.92 (1.51-2.33)	1.0	2.0
長さ	0.90 (0.53-1.28)	0.50	1.0	2.15 (1.34-2.96)	1.0	2.0
面積	1.02 (0.70-1.34)	0.50	1.0	1.94 (0.80-3.08)	0.50	1.0
周囲長	1.04 (0.80-1.27)	0.50	1.0	1.99 (0.89-3.09)	0.50	1.0

カッコ内は 95%信頼区間を示す。

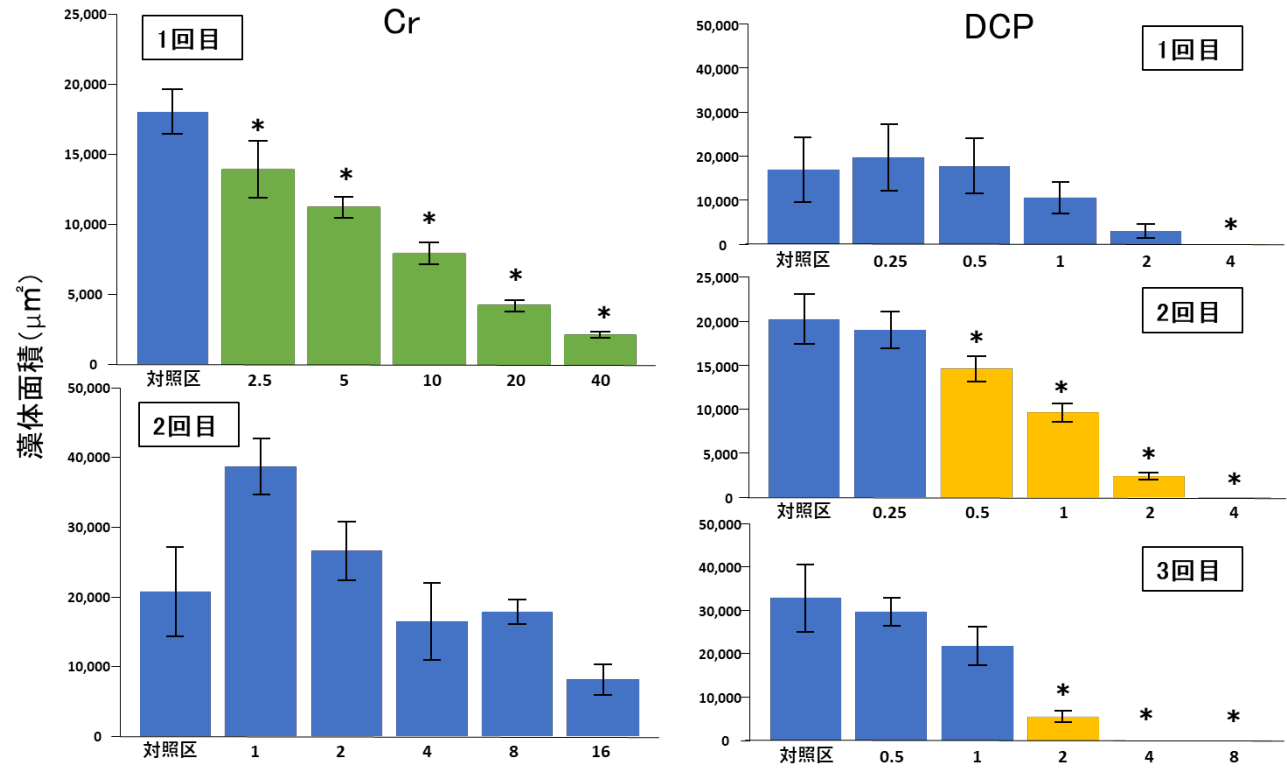
4.1.6 ワカメ

培養温度および初期配偶体濃度を変化させて 20 日程度培養した結果、何れの温度でも配偶体の株数は初期配偶体濃度と正の相関が認められた（図(2)-6a）。卵数は付加した配偶体濃度が概ね 3 mg/L を超えると、15℃よりも 20℃の方が得られる卵数は多くなった（図(2)-6b）。今回検討した条件の中で、最も卵を効率的に得ることができる培養条件は初期配偶体濃度 10 mg/L 程度、培養温度 15℃であった。



図(2)-6 ワカメ配偶体の初期濃度と培養基質上の (a) 平均配偶体数および (b) 平均卵株数の関係。エラーバーは標準偏差を示す。

藻体の面積および被験物質の設定濃度を基に 7-d EC₅₀、7-d LOEC、および 7-d NOEC を 2 回および 3 回算出した結果、両物質とも EC₅₀ 値は 2 倍以内の差に収まったものの、LOEC や NOEC は 4 倍以上の差が認められた (図(2)-7、表(2)-10)。この理由は、試験によって濃度区の間面積値のばらつきが異なり、有意差の出やすさに差が出るためと考えられた。今後、ワカメを用いた試験法案を確立するためには、試験間の面積値のばらつきを小さくする工夫が必要であると考えられた。



図(2)-7 ワカメ生長阻害試験における六価クロムおよび 3,5-DCP 曝露時の幼芽面積。*、対照区 (0 mg/L) との間に有意差 ($p<0.05$) があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

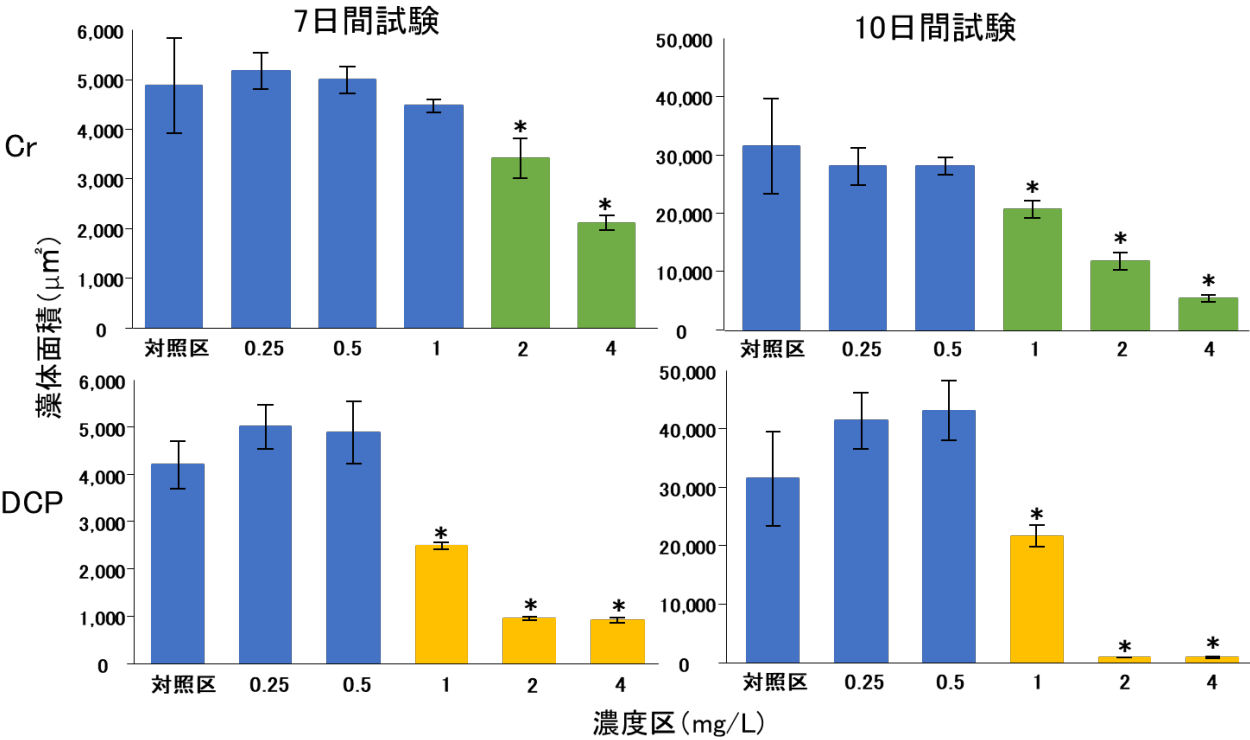
表(2)-10 ワカメ生長阻害試験における六価クロムおよび 3,5-DCP の毒性値

	毒性値 (mg/L)						
	Cr(VI)			3,5-DCP			
	72 h-EC ₅₀	72 h-NOEC	72 h-LOEC	72 h-EC ₅₀	72 h-NOEC	72 h-LOEC	
1 回目	7.5 (6.8-8.2)	<2.5	2.5	1.16 (0.81-1.51)	2.0	4.0	
2 回目	13.9 (8.1-20.0)	16	>16	0.86 (0.77-0.94)	0.25	0.5	
3 回目	-	-	-	1.20 (0.98-1.42)	1.0	2.0	

カッコ内は 95%信頼区間を示す。

4.1.7 シオミドロ

藻体の面積および被験物質の設定濃度を基に7日間および10日間曝露時のEC₅₀、LOEC、およびNOECを算出した結果、両物質とも毒性値は試験期間による大きな差が認められなかった(図(2)-8、表(2)-11)。そのため、試験期間は7日間で十分であると判断し、試験期間の短い7日間の試験として試験法案を作成した。



図(2)-8 シオミドロ生長阻害試験における六価クロムおよび3,5-DCP曝露時の藻体面積。*、対照区(0 mg/L)との間に有意差($p < 0.05$)があることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

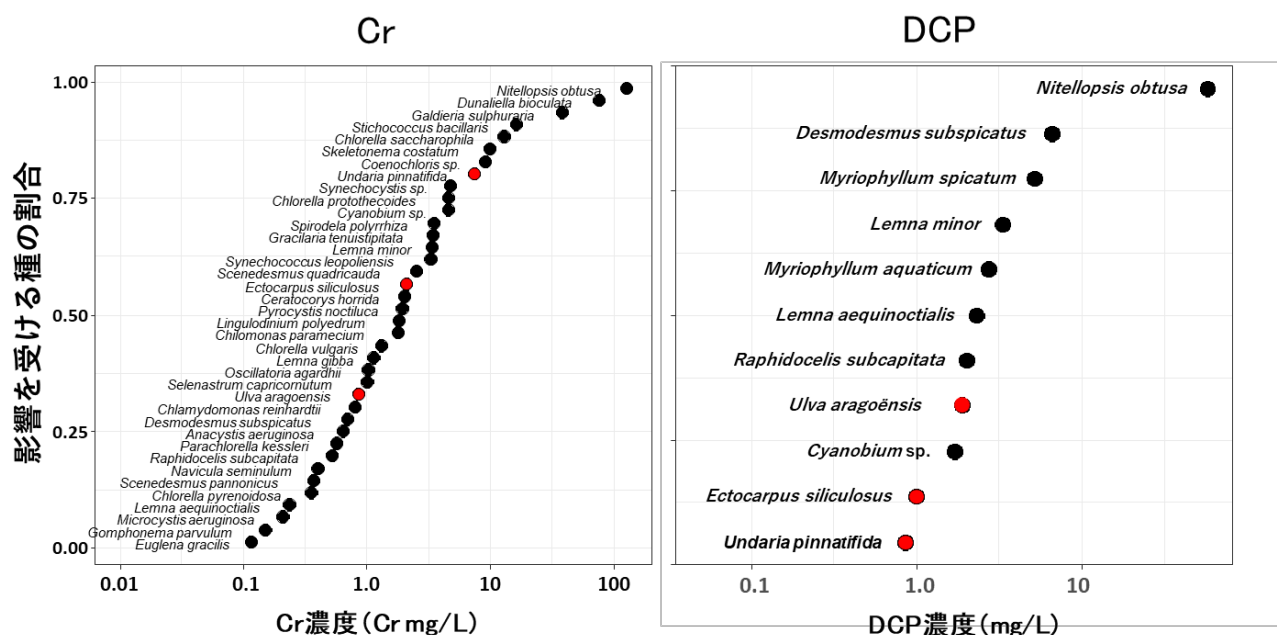
表(2)-11 シオミドロ生長阻害試験における7日間および10日間曝露による六価クロムおよび3,5-DCPの毒性値

試験期間	毒性値 (mg/L)					
	Cr (VI)			3,5-DCP		
	72 h-EC ₅₀	72 h-NOEC	72 h-LOEC	72 h-C ₅₀	72 h-NOEC	72 h-LOEC
7日間	2.1 (1.5-2.8)	1.0	2.0	1.0 (0.6-1.4)	0.5	1.0
10日間	1.4 (1.1-1.8)	0.5	1.0	1.1 (0.6-1.5)	0.5	1.0

カッコ内は95%信頼区間を示す。

4.1.8 他の藻類との感受性比較

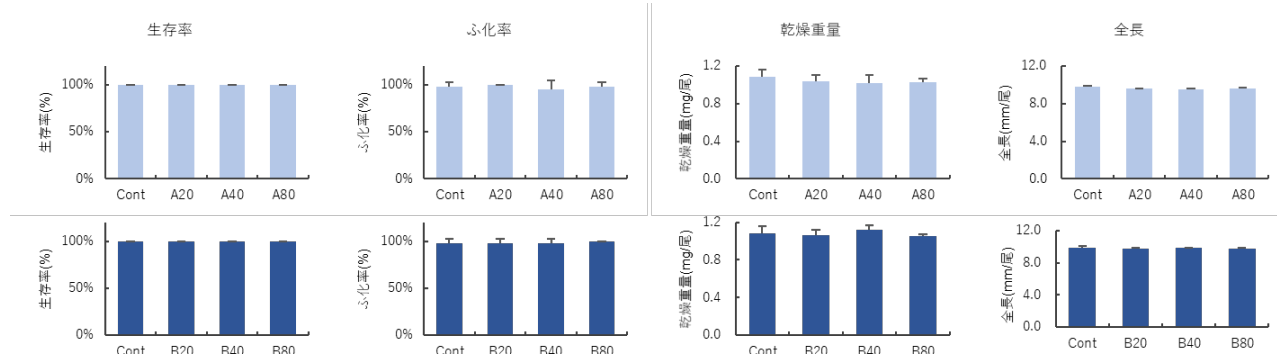
今回得られた大型藻類に対するEC₅₀値とアメリカ環境保護庁EPAの毒性値データベースから得られた藻類に対する六価クロムおよび3,5-DCPの急性毒性値を用いて種の感受性分布(SSD)を作成した(図(2)-9)。大型藻類は六価クロムに対しては概ね感受性は藻類の中では中程度であったものの、3,5-DCPに対しては比較的高い感受性を示した。この結果は、大型藻類は藻類種の中で3,5-DCPなど有機系の化学物質に対して比較的高い感受性を有する生物群である可能性を示すものであり、今後、微細藻類だけでなく大型藻類を用いた化学物質の影響を検討する必要があると考えられた。



図(2)-9 六価クロム (Cr) および 3, 5-DCP の急性毒性値を基にした種の感受性分布。毒性値を丸で示し、種名を丸の左側に示す。赤丸は今回得られた毒性値を示す。

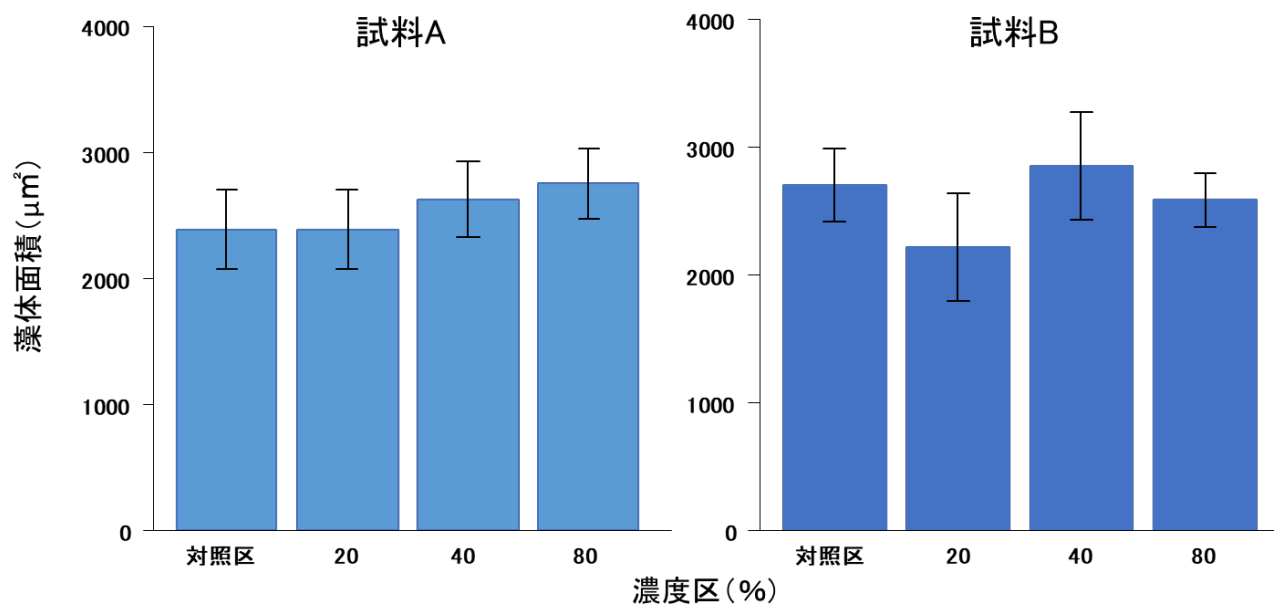
4.2 ケーススタディ試験

地点 A および B より採取した海水（海水試料 A および B）を用い、マミチヨグ胚および仔魚を曝露した試験結果を図(2)-10 に示す。いずれの地点で採取した海水においても、ふ化率、生存率、および成長指標に差は認められなかった。

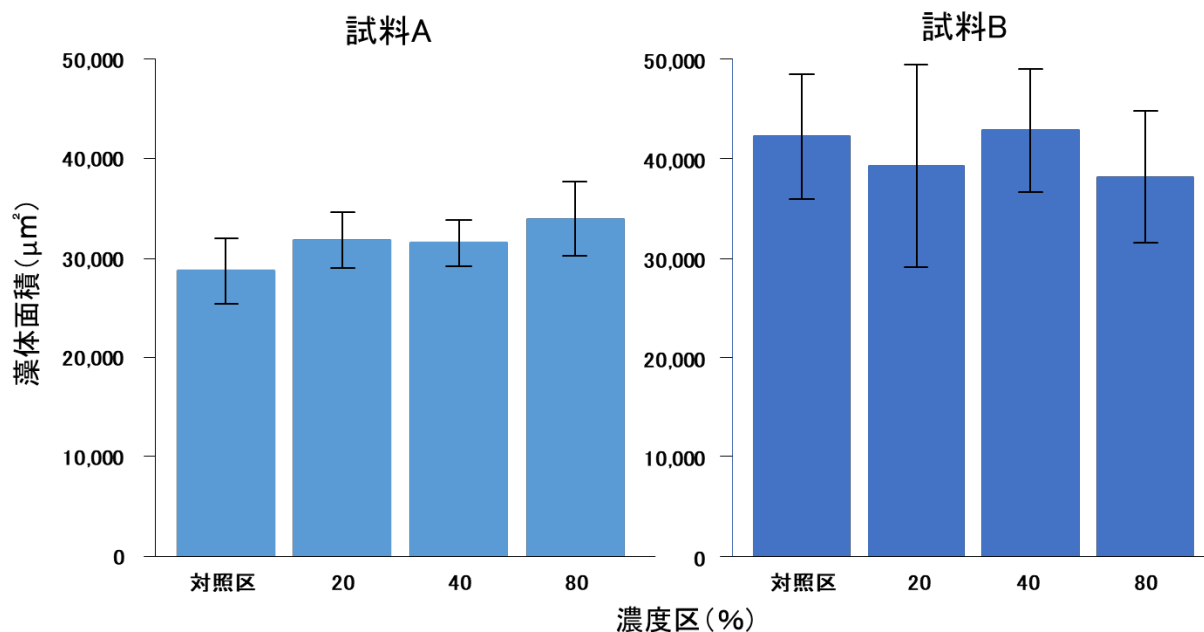


図(2)-10 海水試料 A（上段）および海水試料 B（下段）を用いた試験結果 20, 40, 80 は各海水の配合割合。

アオサおよびシオミドロを用いたケーススタディ試験では何れの濃度区においても対照区との間に有意差は認められなかった（図(2)-11, 12）。海水試料 A については何れの試験生物を用いても濃度依存的に成長が促進される傾向が認められた（図(2)-11, 12）。この試験結果は、一般的に海水の栄養添加培地の方が完全人工培地よりも生長が良い事を反映していると考えられた。



図(2)-11 実海水試料 A および B を用いたアオサ生長阻害試験結果。エラーバーは標準偏差を示す。



図(2)-12 実海水試料 A および B を用いたシオミドロ生長阻害試験結果。エラーバーは標準偏差を示す。

5. 研究目標の達成状況

海産魚類の候補種（マミチョグ、マダイ）を用いた短期慢性毒性試験を確立した。確立された手法をもとに、複数の研究機関で2種の被験物質（六価クロム、3,5-DCP）を用いたリングテストを実施し、その妥当性が概ね確認された。また、海水サンプルを用いたケーススタディにおいてもその適用妥当性が確認された。以上、海産魚類を用いた短期慢性毒性試験の研究目標は概ね達成された。

大型藻類の候補種を用いて試験法を検討し、緑藻のアオサ（*Ulva aragoënsis*）と褐藻のシオミドロ（*Ectocarpus siliculosus*）を用いた生長阻害試験法を作成して試験法案として取りまとめる事で、研究目標を達成した。

6. 引用文献

Hooten, R. L., Carr, R. S., 1998. Development and application of a marine sediment pore -

water toxicity test using *Ulva fasciata* zoospores. Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 932-940.

環境省 (2008a) 平成 19 年度水生生物への影響が懸念される有害物質情報収集等調査業務報告書 (第一分冊)

環境省 (2008b) 平成 19 年度水生生物魚類等毒性試験調査 (海域魚類) 業務報告書

吉川貴志, 西村真. (2014). マダイ *Pagrus major* 仔魚に対する六価クロムの急性致死影響. 水産増殖, 62(3), 229-234.

Koyama, J., Kawamata, M., Imai, S., Fukunaga, M., Uno, S., and Kakuno, A. (2008). Java medaka: a proposed new marine test fish for ecotoxicology. Environmental Toxicology: An International Journal, 23(4), 487-491.

R Development Core Team, (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org/>.

Shimizu, A. (1997). Reproductive cycles in a reared strain of the mummichog, a daily spawner. *Journal of Fish Biology*, 51(4), 724-737.

US EPA (2001). Final Report: Interlaboratory Variability Study of EPA Short-term Chronic and Acute Whole Effluent Toxicity Test Methods, Vol.1, EPA 821-B-01-004.

渡部春奈, 林岳彦, 田村生弥, 中村中, 阿部良子, 高信ひとみ, 荻野仁子, 小塩正朗, 鑑迫典久. (2015). 生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査. 環境化学, 25(1), 43-53.

Wendt, I., Arrhenius, Å., Backhaus, T., Hilvarsson, A., Holm, K., Langford, K., Tunovic, T., Blanck, H., 2013. Effects of five antifouling biocides on settlement and growth of zoospores from the marine macroalga *Ulva lactuca* L. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 91, 426-432.

Ⅱ－３ 海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発

公益財団法人海洋生物環境研究所

中央研究所、海洋生物グループ

事務局、研究企画調査グループ

実証試験場、海洋生物グループ

岸田智穂、磯野良介

眞道幸司

吉川貴志

<研究協力者>

中央研究所、海洋生物グループ

渡邊裕基

〔要旨〕

本研究では、海産及び汽水の甲殻類、海産の貝類を用いた慢性毒性短期試験法を開発することを目的とした。海産甲殻類では飼育・繁殖が容易なシオダマリミジンコを選定し、ノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態をエンドポイントとした慢性の試験法案を作成し、リングテストによる検証を行った後、ケーススタディを実施した。また、海産カイアシ類についても、ノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態をエンドポイントとした慢性の試験法案を作成した。さらに、化学物質に対する感受性が低いとされるシオダマリミジンコに代わる候補種としてアカシマモエビを選定し、ゾエア幼生を用いた急性の試験法を開発した。海産貝類では全国で養殖され人工受精で受精卵が得られるマガキを選定し、胚からD型幼生への発生・変態をエンドポイントとした慢性の試験法案を作成し、リングテストによる検証を行った。シオダマリミジンコ及びマガキについては、当初目標とした慢性毒性短期試験法案を完成させた。アカシマモエビについては、幼生が稚エビになるまで約2ヶ月を要したことから急性毒性試験法の開発に留まった。

1. 研究開発目的

本研究では、海産及び汽水の甲殻類、海産の貝類を用いた慢性毒性短期試験法について、生物種や試験条件、エンドポイントなどを考慮して開発することを目的とした。また、作成した試験法については、複数試験機関が参加したリングテストを実施して課題を抽出し、海洋環境への排出が想定される事業所排水、揚鉱水等の様々な排水ならびに水生生物基準策定に適した生態毒性試験法案として完成することを目的とした。

2. 研究目標

海産甲殻類および貝類の短期の（亜）慢性毒性試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施して、サブテーマ1と協力して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施する。

3. 研究開発内容

1年目はサブテーマ1、2、4と共同して、シオダマリミジンコ、カイアシ類、フサゲモクズなどの海産甲殻類について、変態・成長をエンドポイントとした慢性毒性短期試験法の開発を行った。さらに、海産貝類のマガキを用いた慢性毒性短期試験法の開発を行った。2年目には、他のサブテーマと共同で海産甲殻類・貝類を用いたリングテストのための試験法マニュアルを作成した。また、アカシマモエビについて、急性毒性試験法の開発を進めた。3年目には、他のサブテーマと共同してリングテストを実施して試験法の検証を進め、海産甲殻類及び海産貝類の試験法案を取りまとめた。海産甲殻類については、実海水試料を用いたケーススタディを実施した。

3-1. 海産甲殻類

1) シオダマリミジンコ

材料は海洋生物環境研究所において、海水を用いて23℃、平均照度約13,000 Lux、明期12時間：暗期12時間条件で継代飼育する個体群を使用した。同条件において約1 Lの容器を用いて微細藻類

(*Tetraselmis tetrathele*) を給餌し飼育した個体群からは、通年に渡りほぼ毎日、卵のうを有する雌が得られた。試験用のノープリウス幼生を得るため、ポリスチレン製ウェルプレート（12ウェル）の各ウェルに人工海水4 mLを入れ、卵のうを保持する雌を1ウェル当り1個体収容し、微細藻類0.4 mLを給餌し飼育した。人工海水は活性炭カートリッジフィルター（TCC-WL-SOCP, ADVANTEC社）を通して脱塩素した水道水25 Lにマリンアート1袋を溶解し調製した（他の飼育・試験でも同様に調製）。飼育中は午前と午後に1回、ウェルプレートを観察し幼生の有無を確認した。

表(3)-1に示すように、孵化後24時間以内のノープリウス幼生を用いて、毒性試験の標準物質（3,5-DCP（ジクロロフェノール）及びニクロム酸カリウム）に対し、幼生がコペポダイトに変態するまでの5～8日間曝露した。濃度区は両標準物質について0.3～10 mg/Lの範囲で、対照区を含め5段階を設定した。曝露容器はポリスチレン製24ウェルプレートとし、1濃度区につき1枚のプレートを用いた。供試数は1個体/ウェル、試験水は2 mL/ウェル、添加する微細藻類は0.1 mL/ウェルとし親世代と同じ条件で飼育した。同じ雌からの個体が各濃度区で同数となるように幼生を配分した。いずれの物質についても各濃度区の繰返し数は1とした。曝露開始後は24時間毎に生死数、コペポダイトに変態した個体数を確認した。変態率が9割を超えた濃度区が確認された時点において、変態をエンドポイントとしたEC₅₀（半数影響濃度）及びLC₅₀（半数致死濃度）を算出した。以上に示した試験法を用いて、当所と国立環境研究所においてリングテストを実施した。さらに、実海水試料（試料A、B）を用いたケーススタディを当所で実施した。ケーススタディにおける実海水試料の割合は20、40、80%とし、希釈には対照とした人工海水を用い、各濃度区の繰返し数は3とした。

表(3)-1 シオダマリミジンコを用いた慢性毒性短期試験の条件

項目	試験条件
生物種	シオダマリミジンコ <i>Tigriopus japonicus</i>
曝露方式	半止水式（3日毎に換水と給餌）
曝露期間	5-8日程度（幼生がノープリウスからコペポダイトに変態するまで）
試験液量	2 mL/ウェル
連数	少なくとも3容器/試験区
供試生物数	24個体/容器（1個体/ウェル）
試験温度	23±1℃
塩分	33±2 ‰
照明	明期12時間、暗期12時間、
光強度	10,000 lux程度 が推奨
餌	0.1 mL/ウェル (<i>Tetraselmis tetrathele</i> 、細胞数：1-2×10 ⁶ cells/mL)
エンドポイント	生存、変態

表(3)-2 シオダマリミジンコのリングテスト参画機関

Laboratory Name	シオダマリミジンコ <i>Tigriopus japonicus</i>
海洋生物環境研究所 (MERI)	○
国立環境研究所 (NIES)	○

2) アカシマモエビ

シオダマリミジンコは飼育・繁殖が容易であるが、化学物質に対する感受性が低いとされる。そこで、感受性が高いと考えられるエビ類のゾエア幼生を用いた試験法¹⁾について検討した。天然のアカシマモエビは、当所で取水する海水を受水する水槽内に網カゴを設置し採集した。また、採集したアカシマモエビ (F0) から孵出した幼生を成体 (F1) まで養成した。採集及び養成したアカシマモエビは100 Lパンライト水槽にそれぞれ収容し、各水槽には自然水温または25℃の海水を掛け流した。餌料はゴカイ類を細切したものを1日に2回を与えた。幼生は夜間に孵出するので、毎朝飼育水槽を観察して幼生の有無を確認した。

試験条件を表(3)-3に示す。養成した成体から孵出して24時間以内のゾエア幼生 (F1またはF2) を用いて、ニクロム酸カリウムに対する24時間曝露を実施した。対照区その他、濃度区として2.5、5.0、10、20、40 mg Cr/L (25℃) を設定した。曝露容器は容量200 mLのガラスびん、供試数は10個体/容器、試験水は150 mL/容器、各濃度区の繰返し数は3とした。LC₅₀は24時間経過時の死亡率を用いて算出した。

表(3)-3 アカシマモエビを用いた慢性毒性短期試験の条件

項目	試験条件
生物種	アカシマモエビ <i>Lysemata vittata</i>
曝露方式	止水式
曝露期間	24時間
試験液量	150 mL/容器
連数	少なくとも3容器/試験区
供試生物数	10個体/容器
試験温度	25±1℃
塩分	33±2 ‰
照明	ゾエア幼生を得た時期の日長程度
光強度	800 lux程度
餌	給餌なし
エンドポイント	生存

3) アカルチア

材料はカイアシ類の一種であるアカルチア属 (*Acartia* sp.) のうち、*Acartia tonsa* について検討を行ったが、対照区での生存、変態などが安定しなかった。そこで、*Acartia sinjiensis* を東京湾 (千葉県習志野市) において採取し、国立環境研究所において水温 26±1℃、室内光、16時間明期/8時間暗期の環境下で継代飼育している個体群を使用した。餌料は海産微細藻類の一種であるクリプト藻ロドモナス (*Rhodomonas salina* (Wislouch) D.R.A.Hill & R.Wetherbee (NIES-1375)) を国立環境研究所から入手して利用した。人工海水はイオン交換水 (クリボンバーKB-25) 25 Lにマリンアート1袋を溶解し調製した (他の飼育・試験でも同様に調製)。

毒性試験は、国際標準化機構（ISO）の初期発達段階試験法⁽²⁾を参考に、表(3)-4に示す条件とした。試験前日に100 μ mのプランクトンネットを用いて親個体のみを新しい飼育容器に移し、試験開始直前に親個体を海水ごと別の容器に移した。親個体を回収した飼育容器の底を新しい海水で洗浄し、40 μ mのプランクトンネットで卵を回収し、受精卵の選別を行った。

毒性試験の標準物質（3,5-DCP及び硫酸銅）についての曝露を、受精卵から6日間行った。曝露容器は10 mLガラス製ビーカーとし、各ビーカーに4 mLの濃度調整した試験水を分注した。対照区に加え、5濃度区をそれぞれ設定し、繰り返し数は4とし、受精卵を10個体ずつ試験容器に投入し。この時点を曝露開始とした。曝露期間中は、毎日、試験容器ごとに供試個体の生死の観察を行った。容器を揺らしたりピペットで吹いたりしても動かない個体を死亡と判定した。3日目の換水は供試個体の生死の観察後、新しい試験水4 mLを加えることで行った。このときにふ化しているノープリウス幼生を計数する。6日間の曝露終了後、上記の生死の観察とともに、ノープリウス幼生からコペポダイト幼生に変態した個体数を計数した。

実海水試料（試料A、B）を用いたケーススタディも実施した。ケーススタディにおける実海水試料の割合は20、40、80%とし、希釈には対照とした人工海水を用いた。

表(3)-4 アカルチアを用いた慢性毒性短期試験の条件

項目	試験条件
生物種	カイアシ類の一種アカルチア属 (<i>Acartia</i> sp.) のうち、 <i>Acartia sinjiensis</i> ないし <i>Acartia tonsa</i> が推奨
曝露方式	半止水式（3日目に1回換水）
曝露期間	6日間
試験液量	8 mL／容器
連数	4容器／試験区
供試生物数	10個体／容器
試験温度	26±1℃
塩分	20-30 ‰（±2 ‰の変動が推奨される、 <i>A. sinjiensis</i> は25 ‰以下が望ましい）
照明	室内光で明期16時間、暗期8時間
光強度	10-20 μ E/m ² /sが推奨
餌	ロドモナスを適量（たとえば、50×10 ³ cells/mL程度）
エンドポイント	生存、ふ化、変態

3-2. 海産貝類（マガキ）

供試材料：貝類を幼体から成体まで飼育しそれらから受精卵を得る一連の技術には困難な点が多く、試験機関が行える規模の技術は確立されていない。このような中で、マガキでは天然種苗の種付けによる養殖が北海道から九州で広く行われ、成熟個体から取り出した配偶子を人工受精することで受精卵が得られる。本研究では広島湾と気仙沼市地先の湾で養殖されるマガキを、それらの繁殖期である5～8月に冷蔵宅配便を用いて水揚げ後24時間以内に入手した。入手後、複数の雌雄それぞれの生殖腺から卵と精子を採取し、20℃の人工海水中で人工受精し受精卵を得た。人工受精から約2.5時間経過時に、発生率が60%を超えたもののなかから最も数値の大きな受精卵を選別した。

毒性試験：受精卵に対する曝露物質は3,5-DCP及び二クロム酸カリウムとし、24℃において24時間の曝露を実施した。曝露中の発生段階は2～16細胞期からD型幼生とした。濃度区は3,5-DCPでは0.3～10 mg/Lの範囲で、二クロム酸カリウムでは1～32 mg Cr/Lの範囲で、対照区を含め5段階をそれぞれ設定した。曝露容器はポリスチレン製6ウェルプレート（6のうち4ウェルを使用）、供試数は約300個体/ウ

エル、試験水は6 mL/ウェルとした。いずれの物質についても各濃度区の繰返し数は4とした。24時間経過時において、正常にD型幼生へ発生した割合を用いてEC₅₀を算出した。以上に示した試験法を用いて、3,5-DCPについてサブテーマ3（海洋生物環境研究所）とサブテーマ1（国立環境研究所）においてリングテストを実施した。また、ニクロム酸カリウムについて海洋生物環境研究所で検証試験を実施した。

表(3)-5 マガキを用いた慢性毒性短期試験の条件

項目	試験条件
生物種	マガキ <i>Crassostrea gigas</i>
曝露方式	止水式
曝露期間	24時間
試験液量	6 mL/ウェル
連数	4ウェル/試験区
供試生物数	300個体/ウェル
試験温度	24±1℃
塩分	33±2 ‰
照明	無（インキュベータの照明は無点灯）
光強度	0
餌	給餌無
エンドポイント	生存、発生

4. 結果及び考察

4-1. 海産甲殻類

1) シオダマリミジンコ

本研究で開発した試験法に基づき、各試験機関で実施したリングテストの結果を3,5-DCPについて表(3)-6に、ニクロム酸カリウムについて表(3)-7に示した。3,5-DCPでは各試験機関の曝露期間は6、7日であり、シオダマリミジンコ幼生が変態に要した日数は同程度であった。各試験機関で得られた幼生のEC₅₀及びLC₅₀はそれぞれ近似しており、その差はおおむね2倍以下であった。ニクロム酸カリウムでは各試験機関の曝露期間は5～8日の範囲であった。当所で得られたEC₅₀及びLC₅₀は曝露期間の長期化で低下傾向が認められた。6日の曝露期間で比較すると各試験機関で得られた幼生のEC₅₀は近似し、その差は2倍以下であった。

リングテストで抽出された課題の整理を他のサブテーマと行い、シオダマリミジンコの変態をエンドポイントとする慢性毒性短期試験法案を完成させた。

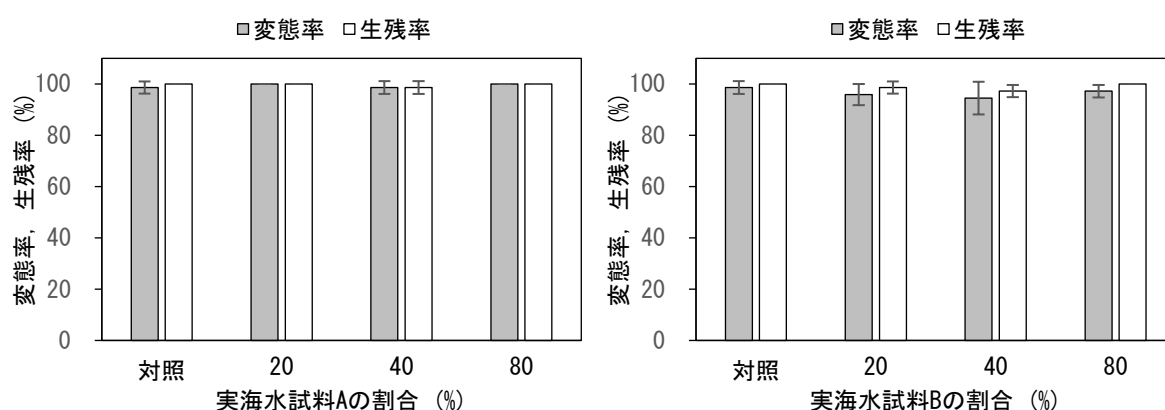
本研究で開発した試験法を実海域試料に適用したケーススタディについて、結果を図(3)-1に示した。実海水試料A及びBそれぞれについて、各希釈割合（20、40、80%）の海水における幼生の変態率及び生存率は、対照区と比較して有意差が確認されなかった（ $p>0.05$ 、ANOVA）。

表(3)-6 3,5-DCPに対するシオダリミジンコ幼生の毒性試験結果（リングテスト）

試験機関	試験番号	EC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)	曝露期間 (日)	設定濃度区 (mg/L)
国立環境 研究所	1	0.6	0.7	6	0.3, 1, 3, 10
	2	0.4	0.4	〃	〃
	3	0.6	0.9	〃	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2
海洋生物 環境研究所	1	0.6	0.8	7	0.3, 1, 3, 10
	2	0.9	1.3	6	〃
	3	1.3	1.6	6	0.125, 0.25, 0.5, 1, 2

表(3)-7 六価クロムに対するシオダリミジンコ幼生の毒性試験結果（リングテスト）

試験機関	試験番号	EC ₅₀ (mg Cr/L)	LC ₅₀ (mg Cr/L)	曝露期間 (日)	設定濃度区 (mg Cr /L)
国立環境 研究所	1	4.5	>10	6	0.3, 1, 3, 10
海洋生物 環境研究所	1	2.9	8.4	6	〃
	2	1.7	>10	5	〃
	3	0.8	4.4	8	〃
	4	1.1	4.9	8	〃



図(3)-1 実海水試料（試料A:左図、試料B:右図）に対するシオダリミジンコ幼生の毒性試験結果（ケーススタディ）。各棒グラフは平均値±標準偏差（n=3）で示す。

2) アカシマモエビ

採集した天然の2群および養成した1群のアカシマモエビでは、いずれも約2年の間に夏季を中心とする繁殖期が確認された（表(3)-8）。その水温範囲は15～28℃であったが、幼生数の顕著な増加は20℃以上で確認された。天然群は採集した年から翌年の繁殖期までに半数以上死亡したが、翌年まで生存した個体群（14、20個体）は多い時で1日に1,000個体以上の幼生を産出した。養成群は2年目に天然群と同程度の大きさに成長すると、天然群と同程度の幼生を産出した。毒性試験の候補種であるアシナガモエビモドキ及びスジエビモドキの寿命は1年程度である¹⁾。本研究のアシナガモエビは2年程度生存したことから、前出のコエビ類に比較し同一個体群から長期に渡り幼生が得られることが明らかとなった。

本研究で得られたアカシマモエビ幼生の24 h-LC₅₀はF1世代で13、16 mg Cr/L、F2世代で13 mg Cr/Lであった（表(3)-9）。海産甲殻類14種の六価クロムに対する急性毒性値は2.03 mg/L（96h-LC₅₀）から

83 mg/L (24 h-LC₅₀) の範囲にある³⁾。このうち本邦2種のLC₅₀は、アシナガモエビモドキの稚エビでは96 h曝露で17 mg/L⁴⁾、シオダマリミジンコのノープリウス幼生では24 h曝露で83 mg/L⁵⁾である。これらと比較するとアカシマモエビのゾエア幼生は感受性が高く、また、世代を経ても感受性は変化しなかった。

本研究で得られた結果について取りまとめを行い、アカシマモエビを用いた急性毒性試験法案を作成した。なお、ゾエア幼生が稚エビに変態するまで約2ヶ月を要したため、変態をエンドポイントとする慢性毒性試験法は開発できなかった。

表(3)-8 各飼育群で確認された幼生数とそれらが得られた期間と水温

飼育群	幼生の 確認期間	水温 (℃)	成体数 (個体)	成体の 平均体長 (mm)	確認期間の 総幼生数 (個体)	成体1個体 当りの幼生数 (個体/確認期間)
2016年天然	2017/6/1-11/18	16-28	20	28	52,000	2,600
	2018/3/26-10/3	25	11	36	8,700	790
2018年天然	2018/8/3-12/3	17-26	35	36	49,000	1,400
	2019/5/16-11/28	16-27	14	37	18,000	1,300
2018年養成	2018/8/24-11/2	25	43	19	1,900	44
	2019/5/11-12/9	15-27	18	34	32,000	1,800

表(3)-9 本邦海産甲殻類に対する六価クロムの毒性

種名	試験 番号	発生 段階	世代	LC ₅₀ (mg Cr/L)	曝露期間 (日)	備考
アカシマモエビ	1	ゾエア	F1	16	1	本研究
	2	〃	〃	13	〃	〃
	3	〃	F2	13	〃	〃
アシナガモエビモドキ		稚エビ		17	4	堀ら (2002) ⁴⁾
シオダマリミジンコ		ノープリウス		83	1	吉川・伊藤 (2010) ⁵⁾

3) アカルチア

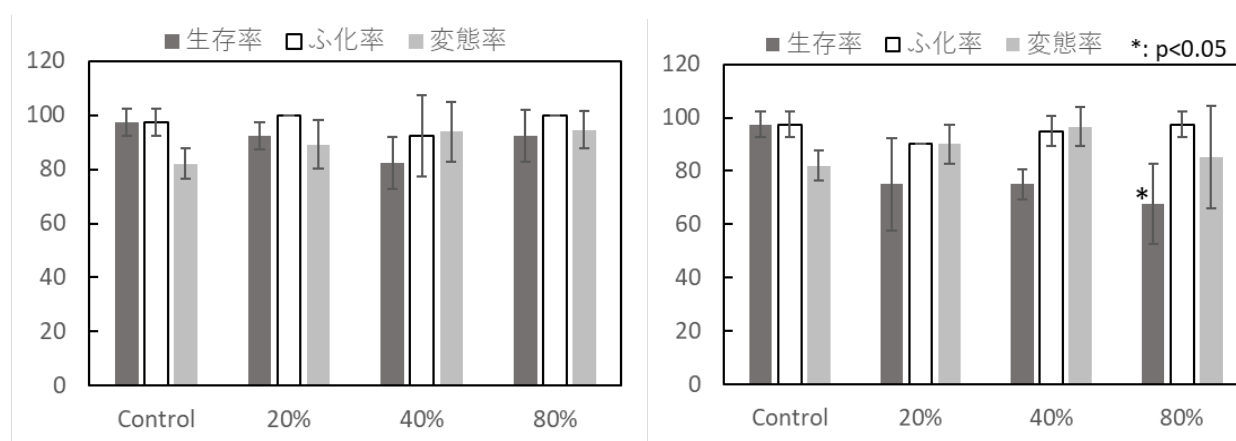
サブテーマ1と共同で、*Acartia sinjiensis*について、80%程度以上の十分利用可能な対照区の生存率が得られることを確認した。その後、3,5-DCPおよび硫酸銅の毒性試験について、検証のため、3回の繰り返しを実施した際の結果を表(3)-10に示した。表に示すように、LC₅₀、ふ化および変態のIC₅₀、そしてふ化および変態のNOECのいずれも、2倍（1濃度区）程度の狭い範囲の幅に収まった。

本研究で開発した試験法について、シオダマリミジンコと同様に、実海域試料に適用したケーススタディについて、結果を図(3)-2に示した。試料Aについては、各希釈割合（20、40、80%）の海水における幼生の変態率及び生残率は、対照区と比較して有意差が確認されなかった（ $p>0.05$ ）。一方で、試料Bについては、最高濃度区の80%で生残率は67.5%まで低下し、対照区と比較した際に有意な低下が検出された（ $p<0.05$ ）。

表(3)-10 国産カイアシの一種 *A. sinjiensis* に対する3,5-DCPと硫酸銅の試験検証結果

	生存LC ₅₀	ふ化IC ₅₀	変態IC ₅₀	ふ化NOEC	変態NOEC
3,5-Dichloro phenol (μg/L)	73 (43~100)	100 (59~150)	63 (39~86)	62.5	41.7 (31.3~62.5)
硫酸銅 (μg Cu/L)	150 (80~230)	160 (87~230)	110 (67~160)	83 (50~100)	133 (100~200)

注：値は幾何平均値で、カッコ内は3回の繰り返し試験の下限と上限の幅を示す



図(3)-2 実海水試料（試料A:左図、試料B:右図）に対する *A. sinjiensis* の毒性試験結果（ケーススタディ）。各棒グラフは平均値±標準偏差（n=4）で示す。

4-2. 海産貝類（マガキ）

本研究で開発した試験法に基づき、各試験機関で実施した3,5-DCPに対するリングテストの結果を表(3)-11に、当所で実施した二クロム酸カリウムに対する検証試験の結果を表(3)-12に示した。3,5-DCPについて各試験機関で得られたマガキ幼生の正常発生率は、3 mg/L以上の濃度区において対照区と比較し有意に低下した（ $p<0.05$ 、ANOVA）。各試験機関で得られた幼生のEC₅₀は何れも2~6 mg/Lで同じ値の範囲にあった。これらのEC₅₀は産地の異なる母貝に由来する幼生についても、違いが認められなかった。二クロム酸カリウムに対する幼生のEC₅₀は、5回の試験のいずれでも6 mg Cr/Lであった。この値は、本研究と同様、受精卵からD型幼生までの発生段階を曝露して得られた48 h-EC₅₀: 4.538 mg Cr/L (20℃)⁶⁾と同じオーダーであった。なお、本研究において宅配便到着日の母貝と、さらに1日間冷蔵した母貝に由来するそれぞれの幼生のEC₅₀に違いがほとんど認められなかったことから、母貝到着の翌日でも毒性試験に使用可能な受精卵が得られることが明らかとなった。

リングテストで抽出された課題の整理を他のサブテーマと行い、マガキの発生・変態をエンドポイントとする慢性毒性短期試験法案を完成させた。

表(3)-11 3,5-DCPに対するマガキ幼生の毒性試験結果（リングテスト）

試験機関	試験番号	母貝 産地	正常発生率（%, mean±s. d., n=4）					EC ₅₀ ^{*1} (mg/L)
			対照	0.3	1	3	10	
国立環境 研究所	1	広島	58±9	53±8	61±7	51±14	0±0*	6
	2	〃	82±7	82±5	72±10	64±7*	0±0*	2
海洋生物 環境研究所	1	〃	93±4	93±2	87±3	75±5*	0±0*	2
	2	〃	92±2	94±1	94±3	79±2*	0±0*	2
	3	〃	86±3	87±2	88±4	80±4*	0±0*	2
	4	〃	95±2	95±1	94±3	91±1	0±0*	6
	5	〃	79±4	86±11	76±7	79±5	0±0*	6
	6	気仙沼	95±2	95±3	95±1	89±6*	0±0*	2
	7	〃 ^{*2}	96±1	95±2	94±2	94±1	0±0*	6

*：対照区と比較して有意差有り（p<0.05、ANOVA）

*1：対照区と有意差が無い最高濃度と有意差有りの最低濃度との幾何平均（設定濃度）

*2：試験番号6と同一母貝を4℃に24時間保冷後、人工受精を実施

表(3)-12 六価クロムに対するマガキ幼生の毒性試験結果

試験 番号	母貝 産地	正常発生率（%, mean±s. d., n=4）					EC ₅₀ ^{*1} (mg Cr/L)
		対照	1	3	10	32	
1	気仙沼	94±1	94±2	93±2	47±5*	0±0*	6
2	〃	63±9	63±9	70±8	32±3*	0±0*	6
3	〃 ^{*2}	83±8	79±6	70±6	0±0*	0±0*	6
4	気仙沼	92±3	94±1	92±3	2±2*	0±0*	6
5	〃 ^{*3}	97±1	96±1	95±1	37±3*	0±0*	6

*：対照区と比較して有意差有り（p<0.05、ANOVA）

*1：対照区と有意差が無い最高濃度と有意差有りの最低濃度との幾何平均（設定濃度）

*2：試験番号2と同一母貝を4℃に24時間保冷後、人工受精を実施

*3：試験番号4と同一母貝を 〃

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ1と共同して海産甲殻類のシオダマリミジンコ及びアカシマモエビ、海産貝類のマガキについて試験法を検討した。シオダマリミジンコでは、ノープリウス幼生の変態・成長をエンドポイントとした慢性毒性短期試験法を開発した。アカシマモエビでは、ゾエア幼生を用いた急性毒性試験法の開発に留まったが、今後の慢性毒性試験法にむけた基礎知見が整理された。アカルチアでは、国内種の *Acartia sinjiensis* を用いて生存、ふ化、ノープリウス幼生からコペポダイト幼生への変態をエンドポイントとした慢性毒性短期試験法を開発し、繰り返し試験ならびにケーススタディによる検証を実施した。海産貝類のマガキでは、胚からD型幼生への発生・変態をエンドポイントとした慢性毒性短期試験法を開発した。これらの成果は研究計画書に沿ったものであり、本サブテーマ（海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発）の目標をほぼ達成した。なお、本課題で刊行した「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法(検討案)」には以下の試験法案を収録した。

- ・海産甲殻類シオダマリミジンコを用いた慢性毒性短期試験法 案
- ・海産カイアシ類 (*Acartia* sp.) を用いた生存、ふ化、変態試験法 案
- ・汽水産アミを用いた慢性毒性短期試験法 案
- ・海産ヨコエビを用いた慢性毒性短期試験法 案
- ・海産甲殻類アカシマモエビを用いた生存試験法 案
- ・海産二枚貝マガキを用いた発生、変態試験法 案

6. 引用文献

- 1) 水産庁：海産生物毒性試験指針、156pp. (2010)
- 2) ISO 16778:2015(2015) Water quality-Calanoid copepod early-life stage test with *Acartia tonsa*.
- 3) 中西準子，小野恭子：詳細リスク評価書シリーズ21 六価クロム，丸善，290pp. (2008)，別表Ⅷ章 無脊椎動物急性毒性試験（6価Cr），NEDO技術開発機構・産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター共編.
- 4) 堀英夫、立石晶浩、山田久：環境毒性学会誌、4，2，73-86（2001），海産動物プランクトンによる有害物質急性毒性試験法の開発
- 5) 吉川貴志，伊藤康男：Cancer、19，11-14（2010），シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* ノーブルウス幼生に対する六価クロムの急性致死影響
- 6) M. Martin, K. E. Osborn, P. Billig and N. Glickstein: Marine Poll. Bull., 12, 9 305-308 (1981), Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae.

Ⅱ－４ 汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発

国立大学法人鹿児島大学

水産学部 海洋資源環境教育研究センター

宇野誠一、國師恵美子

研究協力機関

いであ株式会社

【要旨】

本研究では、汽水魚類及び汽水甲殻類を用いた短期慢性毒性試験法の開発目的とした。汽水魚類ではジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) を選定して、「胚から仔魚期」における14±1日後から「卵黄吸収期の無給餌期」における5日間の試験法の開発を行った。さらに、3試験機関が参画し、被検物質として二クロム酸カリウム（六価クロム）及び3,5-ジクロロフェノール（3,5-DCP）を用いたリングテストを実施し、試験法の検証を行った。その結果、ジャワメダカの各試験研究機関の毒性値とその平均値、中央値の比較から、リングテストの妥当性が概ね確認された。また、ジャワメダカに対して工場排水が流入する海域2地点から得られた海水を用いたケーススタディを実施した。その結果、対象区との間で1地点（地点A）は孵化後5日までの成長、孵化後の生残率や暴露開始から孵化後5日目までの生残率に関して海水80%が混合した試験水において有意な低下が認められた。また、もう1地点で採水したもの（地点B）についても生存率、孵化率、孵化後の生残率、孵化後5日までの成長に有意な低下が見られた。

汽水産甲殻類については汽水産のアミ (*Americamysis bahia*) とフサゲモクズ (*Ptilohyale barbicornis*) などを用いて、これらの成長などを指標とした短期慢性毒性試験法の開発を目的とした。生後7日後のアミに対する1週間の試験、生後2～3日内のフサゲモクズに対する2週間の試験法の開発を行った。さらに被検物質として、硫酸銅と3,5-DCPを用いて3試験機関参画のもとリングテストを実施し、試験法の検証を行った。その結果、アミおよびフサゲモクズの各試験研究機関の毒性値とその平均値、中央値の比較から、リングテストの妥当性が概ね確認された。さらに、これら2種の甲殻類に対して工場排水が流入する海域2地点から得られた海水を用いたケーススタディを実施した。その結果、アミに関しては地点Aの試験水についてはその影響が確認できなかった。一方、地点Bの試験水ではBの水を80%混合した試験水において全死したが、これはD0低下などの要因も無視できず、試験水の影響で死に至ったのか判断が難しい。フサゲモクズのケーススタディではA、B両地点の試験水で影響が見られなかった。

1. 研究開発目的

本研究では汽水産の魚類及び甲殻類を用いた短期慢性毒性試験法を開発するとともに、複数試験機関が参画したリングテストを実施して、課題を抽出し、海洋環境への排出が想定される事業所排水、揚鉱水等の様々な排水ならびに水生生物基準策定に適した生態毒性試験法案を完成することを目的とした。

2. 研究目標

汽水産の魚類・甲殻類を用いた短期の（亜）慢性毒性試験法を開発し、検証後に試験法案を作成する。リングテストを実施して、サブテーマ1と協力して試験法案を完成させる。この試験法を用いて環境水等でケーススタディを実施する。

3. 研究開発内容

3－1. 汽水産魚類

鹿児島大学水産学部（鹿児島県鹿児島市）において継代飼育されているジャワメダカ（Kagoshima strain, Koyama et al., 2008）について、リングテストのための試験法案を作成し、リングテストを行った。

長日条件下（明14時間、暗10時間）水温を26℃に設定した60 L水槽に6から18ヶ月齢の雄7尾、雌14尾を収容し、受精卵を採取した。受精卵は発生段階をできる限り揃えるために、雌の腹部に付着しているものを主に集めた。得られた受精卵は、受精後6－8時間後に桑実期まで発生が進んでいるものを選別し、実験開始まで26℃に設定した恒温器（MIR-554、三洋電機）内で30PSUに調整した人工海水（マリンアー

ト SF1、富田製薬）により試験開始まで飼育した（毎日1回換水、半止水式）。得られた胚についてリングテストのための試験法案を作成して、リングテストを行った。リングテストでは受精後10日前後まで恒温器内で飼育した胚を人工海水で湿らせたキムタオルに包み、20℃蓄熱剤（サーモストレージ20、スギヤマゲン）と保冷剤を用いて21.6–24.9℃に維持して各機関に輸送した。

リングテストはサブテーマ4（鹿児島大学）、サブテーマ1（国立環境研究所）、サブテーマ3（国立研究開発法人水産研究・教育機構）、研究協力機関（いであ株式会社）の4機関間で行った（表(4)-1）。なお、いであで実施された試験のみ、鹿児島大学から輸送した胚ではなく、いであ内で継代飼育しているジャワメダカから得られた胚により試験を実施した。

暴露試験は14±1日後から仔魚期の5日間の10±1日間の期間を設定した。リングテストは「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に基づき実施した（Table 3）。なお、試験溶液の調製は以下の通り行った。クロム及び3,5-DCPの試験用に、人工海水を用いて、両物質濃度が16、8、4、2、1 mg/Lとなるように試験溶液を調製した。

表(4)-1 ジャワメダカを用いた試験のリングテスト参画機関

Laboratory Name	ジャワメダカ <i>Oryzias javanicus</i>
水産研究・教育機構（FRA）	○
国立環境研究所（NIES）	○
いであ株式会社（IDEA）	○
鹿児島大学（Kagoshima Univ.）	○

表(4)-2 ジャワメダカを用いた胚・仔魚期短期毒性試験のTime line
（白枠が胚期、灰色部が仔魚期を示す）

ジャワメダカ (25℃)	受精後日数 (dpf)																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
																		ふ化										

表(4)-3 ジャワメダカを用いた胚・仔魚期短期毒性試験の試験条件

項目	試験条件等
生物種	ジャワメダカ <i>Oryzias javanicus</i>
曝露期間	9±2 days
曝露様式	半止水式
試験液の換水	2ないし3日毎
観察項目	生存率，ふ化率，成長（全長，乾燥重量）
水温	26±1℃
塩分（PSU）	30
明暗周期	明期14時間，暗期10時間
1容器当たりの胚数	10
1容器当たりの仔数	6
1試験区当たりの容器数	4
試験液量：胚期	100 mL
仔魚期	100-300 mL
給餌	あり（ブラインシュリンプ24時間ふ化幼生）
試験成立条件（対照区）	生存率：≥70% ふ化率：≥80% 溶存酸素：≥60%

3-2. 汽水産甲殻類

1) フサゲモクズ

鹿児島大学水産学部で継代飼育しているフサゲモクズ (*Ptilohyale barbicornis* (旧属名: *Hyale*), Hiwatari and Kajihara, 1988) について、リングテストのための試験法案を作成し、リングテストを行った。

フサゲモクズは20℃の水温下で飼育した場合、約3ヶ月程度で成熟するため、試験に用いる少なくとも4ヶ月前から20℃に維持した、30PSU人工海水（マリンアート SF1、富田製薬）中で、飼育密度1個体/10 mL、16時間明期/8時間暗期の環境下で飼育した。各容器中には足場のためにスポンジを収容した。試験開始4日前に親子対を別容器に移し、容器内のスポンジを新しいものと交換し、容器内の幼体を完全に除いた。試験開始3日前に、親個体を飼育している容器に産仔された幼体をピペットにより採取した。なお、フサゲモクズは卵の時代がない卵胎生生物である。リングテストの際の他試験機関へは、少量の海水をビニール袋に入れ、成熟した雌雄数匹をそこに入れて高圧酸素を袋内に充填して密閉し、送付した。その後、送付された試験機関で上記と同じ方法で1～2日齢の幼体を得て、試験に用いた。

リングテストはサブテーマ4（鹿児島大学）、サブテーマ1（国立環境研究所）、研究協力機関（いであ株式会社）間で行った（表(4)-4）。なお、いであで実施された試験は、鹿児島大学から輸送したフサゲモクズではなく、いであ内で継代飼育しているものを用いて試験を実施した。

曝露試験は産仔後2～3日後の幼体を用いて14日間実施した。リングテストは「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」に基づき実施した（表(4)-5）。なお、試験溶液の調製は以下の通り行った。銅及び3,5-DCPともに蒸留水にて調製した人工海水を用いて、銅濃度が12、4、1.2、0.4、0.12 mg/L、3,5-DCPが0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001 mg/Lの各濃度になるように試験溶液を調製した。

表(4)-4 フサゲモクズを用いた試験のリングテスト参画機関

Laboratory Name		フサゲモクズ <i>Ptilohyale barbicornis</i>
国立環境研究所	(NIES)	○
いであ株式会社	(IDEA)	○
鹿児島大学	(Kagoshima Univ.)	○

表(4)-5 フサゲモクズを用いた慢性毒性短期試験法の試験条件

項目	試験条件等
生物種	フサゲモクズ <i>Ptilohyale barbicornis</i>
曝露期間	14 days
曝露様式	半止水式
試験液の換水	2ないし3日毎
観察項目	生存率、成長（全長、脱皮回数）
水温	20 ± 1℃
塩分（PSU）	30 ± 1
明暗周期	明期14時間、暗期10時間
1容器当たりの仔数	1
1試験区当たりの容器数	12
試験液量	4 mL（鹿児島大学）、10 mL（国立環境研究所、いであ）
給餌	あり（ハリオス）
足場	フッ素樹脂製網（4メッシュ）を容器底に収容
試験成立条件（対照区）	生存率: ≥80% 溶存酸素: ≥60 %

2) 汽水産アミ

米国EPAの海産・汽水生物を用いたWET試験法に短期慢性毒性試験法¹⁾を参考にして、国立環境研究所からも分譲を行っている汽水産のアミ (*Americamysis bahia*) について、リングテストのための試験法案を作成し、リングテストを行なった(表(4)-6、7)。生後24時間以内の仔虫を7日間馴致した7日齢の個体を用い、曝露期間は7日間とした。容器には200 mLガラスビーカーを用い、試験液量は150 mL/容器、5個体/連としたが、8連/濃度区であるために試験操作が煩雑であるため、国立環境研究所(3回の繰り返し実施)といであ株式会社では8連としたが、鹿児島大学での実施は4連とした。26±1℃、明:暗=16 h:8 h、20PSUの人工海水(マリンアートSF-1、富田製薬)で試験を実施した。対象物質は、試験標準物質として3,5-DCP(62.5、125、250、500、1000 µg/L)および硫酸銅(125、250、500、1000、2000 µg/L)とし、生存、成長、成熟をエンドポイントとした。濃度測定はそれぞれ、LC-MS/MS、ICP-MSを用いて定量した。

表(4)-6 汽水産アミを用いた試験のリングテスト参画機関

Laboratory Name		アミ <i>Americamysis bahia</i>
国立環境研究所	(NIES)	○
いであ株式会社	(IDEA)	○
鹿児島大学	(Kagoshima Univ.)	○

表(4)-7 汽水産アミを用いた慢性毒性短期試験法の試験条件

アミ	
ばく露期間	7 days
ばく露様式	半止水式
試験液の換水	毎日
観察項目	生存率, 成長(体長, 体重), 成熟(抱卵)
水温	26 ± 1℃
塩分 (PSU)	20 ± 1
明暗周期	明期16時間, 暗期8時間
1容器当たりの仔数	5
1試験区当たりの容器数	4
試験液量	150 mL
給餌	あり(ブラインシュリンプ24時間ふ化幼生)
試験成立条件(対照区)	生存率: ≥80%
	湿重量: ≥1.5mg
	メス成熟率: ≥50 %
	溶存酸素: ≥60 %

3. 3. ケーススタディ

地点 A および B で採水した供試海水を、人工海水で適宜希釈し、供試海水が 0、20、40、および 80%の割合で含む試験液を調製し、3. 1項、あるいは3. 2項に準じてジャワメダカ胚・仔魚、フサゲモクズ、アミに対する曝露試験を行った。

4. 結果及び考察

4-1. 汽水産魚類

ジャワメダカによるリングテストの結果について、3, 5-DCPを表(4)-8に、六価クロムを表(4)-9に示す。

4. 1. 1. 3, 5-DCP

鹿児島大学が行った試験については、生存率、孵化率、全長から見た成長率では4 mg/L（測定値ベース）のみで対照区との間に有意差が観察された（ $p < 0.01$ ）。生存率に関しては、胚期の暴露では死に至るまでの影響が観察されなかったが、孵化仔魚は強く毒性影響を受けて、4 mg/L区では全ての孵化稚魚が死亡した。乾重量ベースでの成長では2 mg/Lの暴露で有意差（ $p < 0.01$ ）が確認され、これが最も感受性の高い指標となった。

他機関においては、水産研究・教育機構では、2 mg/Lで生残率（ $p < 0.05$ ）と乾重量ベースでの成長（ $p < 0.01$ ）に有意な減少が確認されていた。国立環境研究所では全ての指標において、4 ppmのみ有意な減少が見られた。これらの影響値は鹿児島大学で得られたものと、概ね同程度のものであった。一方で、いであで得られたデータでは乾重量や全長における現象パターンは他機関とほぼ同様の傾向であったが、生存率、孵化率は0.5 mg/Lから、孵化率は1 mg/Lからそれぞれ有意な減少が見られ、明らかに他の3機関と影響パターンが異なっていた。各機関で得られたLOEC及びNOECの値をTable 8に示す。

いであのジャワメダカはその源は鹿児島大学から分譲されたものであり、子孫は同一である。しかし、両機関での飼育がそれぞれ長くなり、代の重ね方が異なる可能性が高く、化学物質の感受性も多少なりとも差が出始めているのかもしれない。

表(4)-8 ジャワメダカを用いた慢性毒性短期試験による4機関でのリングテスト結果（3, 5-DCP）

	LOEC (生存率)	NOEC (生存率)	LOEC (成長_乾重量)	NOEC (成長_乾重量)	LOEC (成長_全長)	NOEC (成長_全長)
国立環境研究所	2.95	1.44	2.95	1.44	2.95	1.44
いであ	0.46	0.24	1.95	1.01	3.84	1.95
水技研	1.97	0.91	1.97	0.91	4.30	1.97
鹿児島大学	2.79	1.68	1.68	0.78	2.79	1.68

単位はmg/L

4. 1. 2. 六価クロム

鹿児島大学が行った試験では生存率が16 mg/Lであったのに対して、全長ベースの成長率で4 mg/L、乾重量ベースで2 mg/Lから有意な低下が観察された（ $p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$ ）。よって、六価クロムに関しても乾重量ベースの有意差が最も感受性の高い指標であった。他の機関でもこの結果はそれほど変わるものではなく、水産研究・教育機構では乾重量ベースの成長率が2 mg/Lから、環境研では4 mg/Lで有意な低下が観察された。一方でいであの乾重量ベースの成長率は2及び4 mg/Lの曝露では低下する傾向はある程度見られるが、有意なものではなく、8 mg/Lから濃度が上の区で有意な低下が観察された。クロムについてもいであのデータは他の3機関と比べると毒性パターンや感受性が異なる点がわずかながらもあり、試験に供した両個体群の感受性差にはある程度差が生じている可能性が考えられた。各機関で得られたLOEC及びNOECの値を表(4)-9に示す。

表(4)-9 ジャワメダカを用いた慢性毒性短期試験による4機関でのリングテスト結果(六価クロム)

	LOEC (生存率)	NOEC (生存率)	LOEC (成長_乾重量)	NOEC (成長_乾重量)	LOEC (成長:全長)	NOEC (成長:全長)
国立環境研究所	18.75	9.35	9.35	4.62	9.35	4.62
いであ	15.73	8.03	8.03	3.83	8.03	3.83
水技研	15.87	7.96	2.30	1.01	4.06	2.30
鹿児島大学	15.84	7.99	1.98	0.92	4.05	1.98

単位はmg/L

4. 2. 汽水産甲殻類

4. 2. 1. フサゲモクズ

フサゲモクズによるリングテストの結果について、3,5-DCPを表(4)-10に、硫酸銅を表(4)-11に示す。

4. 2. 1. 1. 3,5-DCP

鹿児島大学では、フサゲモクズを用いた2週間曝露試験を2回実施した。1回目のLC50は0.00881 mg/L、2回目は0.0134 mg/L(共に測定値ベース)と概ね一致していた。0.3 mg/L(測定値)曝露区は2回の試験とも100%の個体が死亡した。また、平均脱皮回数は1回目の試験は2番目に高い濃度区(0.061 mg/L)が大きく下がる傾向を示したが対照区との有意差は観察されず、2回目の試験ではこの濃度区に有意な減少が見られた。背中(≒全長)から測定した成長率は2回とも2番目に高い濃度0.061 mg/Lで有意な減少が見られた。これらの結果から最も感受性の高い指標は成長率であり、そのLOECは0.061 mg/Lであった。

他機関と比較すると国立環境研究所では0.091 mg/L以上の曝露区は全て全個体が死亡していた。そのLC50は0.026 mg/Lであり、この値は鹿児島大学の試験と概ね一致していた。その他の成長率、脱皮回数は0.091 mg/L及び0.026 mg/L共に減少する傾向は見られたが、対照区との有意差は観察されなかった。また、いであの試験におけるLC50は0.080 mg/Lと他2機関とは多少離れた値であった。また、成長率、脱皮回数のLOECは0.021 mg/Lと鹿児島大学のLOECよりも半分以下の値となった。フサゲモクズに関しては鹿児島大学といであの個体群は起源が異なっており、この起源の違いが毒性パターンの違いとなって現れた可能性が考えられた。各機関で得られたLOEC及びNOECの値を表(4)-10に示す。

表(4)-10 フサゲモクズを用いた慢性毒性短期試験による3機関でのリングテスト結果(3,5-DCP)

	LC ₅₀	LOEC (成長:体長)	NOEC (成長:体長)	LOEC (脱皮回数)	NOEC (脱皮回数)
国立環境研究所	0.03	0.091	0.026	0.237	0.091
いであ	0.08	0.021	0.003	0.021	0.003
鹿児島大学	0.037-0.096	0.061	0.01	0.061	0.01

単位はmg/L

4. 2. 1・2. 銅

鹿児島大学が実施した試験では12.6 mg/L(銅換算実測濃度)以上の曝露区でフサゲモクズが全て死亡した。そのLC50は1.0 mg/Lであった。また、脱皮回数は0.185 mg/L以上、成長率は0.051 mg/L以上で有意な低下が観察された。

他機関と比較すると国立環境研究所のLC50は0.151 mg/L、成長率は影響が見られず、脱皮回数は0.237 mg/Lで影響が見られた。しかし、この濃度区は死亡率が92%と非常に高いため、脱皮影響の有無は判断しづらい。いであのLC50は1.71 mg/Lであり、成長率、脱皮とも.971 mg/L以上の区で有意な低下が見られた。フサゲモクズの各影響については機関内で多少ばらついた結果となった(表(4)-11)。硫酸銅を海

水に溶かすとき、は淡水に溶解させるよりもはるかに溶けにくく、低い濃度でも良く攪拌しないと完全に溶解させることは難しかった。この3機関の差は、対象物質の硫酸銅が海水に対して溶解しにくいことが、1つの要因となっているかもしれない。

表(4)-11 フサゲモクズを用いた慢性毒性短期試験による3機関でのリングテスト結果（硫酸銅）

	LC ₅₀	LOEC (成長)	NOEC (成長)	LOEC (脱皮回数)	NOEC (脱皮回数)
国立環境研究所	0.16	0.78	0.24	0.78	0.24
いであ	1.7	0.97	0.29	0.97	0.29
鹿児島大学	0.57	0.19	<0.19	0.50	0.19

単位はmg/L

4. 2. 2. 汽水産アミ

汽水産アミ *Americamysis bahia* を用いたリングテストの結果について、3,5-DCPを表(4)-12に、硫酸銅を表(4)-13に示す。表(4)-1に示すように、国立環境研究所で実施した3回の試験結果では、LC₅₀、EC₅₀ともに1.5倍以内のほぼ同様の結果が得られた。その一方で、いであでは硫酸銅と3,5-DCPの両方で、鹿児島大学では3,5-DCPについて、国立環境研究所よりもLC₅₀やEC₅₀の値に2倍以上の大きな差が検出された。3,5-DCPのNOEC（成熟）では250～1000 μg/L、NOEC（成長）では<125～250 μg/Lとなった。化学分析による濃度測定結果では、大きな減少が認められないことから、鹿児島大学におけるNOEC（成長）の違いについては、繰り返し数を4連と減じたことによる可能性がある。いであでの実施結果との違いについては、人工海水作成時に利用する純水（国立環境研究所は脱イオン水）の違いがその原因である可能性もある。一方で、表(4)-2に示すように、硫酸銅のNOEC（成熟）では250～500 μg/L、NOEC（成長）では62.5～500 μg/Lとなっていて、国立環境研究所での繰り返しの偏差はそれほど大きくない一方で、3,5-DCP同様に、機関の間で若干の感度の違いがあり、ICP-MSによる濃度測定結果では国立環境研究所で122～149%、いであで92～128%、鹿児島大学で73～99%とやや国立環境研究所が高いことも一因となっている。

表(4)-12 アミを用いた慢性毒性短期試験による3機関でのリングテスト結果（3,5-DCP）

	LC ₅₀	EC ₅₀ (成熟)	NOEC (成熟)	NOEC (成長)
国立環境研究所	633	395	—	—
	762	414	500	250
	748	504	250	125
いであ	> 2000	>2000	1000	125
鹿児島大学	> 2000	1018	1000	<125

単位は μg/L

表(4)-13 アミを用いた慢性毒性短期試験による3機関でのリングテスト結果（硫酸銅）

	LC ₅₀	EC ₅₀ (成熟)	NOEC (成熟)	NOEC (成長)
国立環境研究所	666	519	—	—
	633	341	250	62.5
	652	470	250	125
いであ	908	>1000	500	500
鹿児島大学	707	404	250	125

単位は μg/L

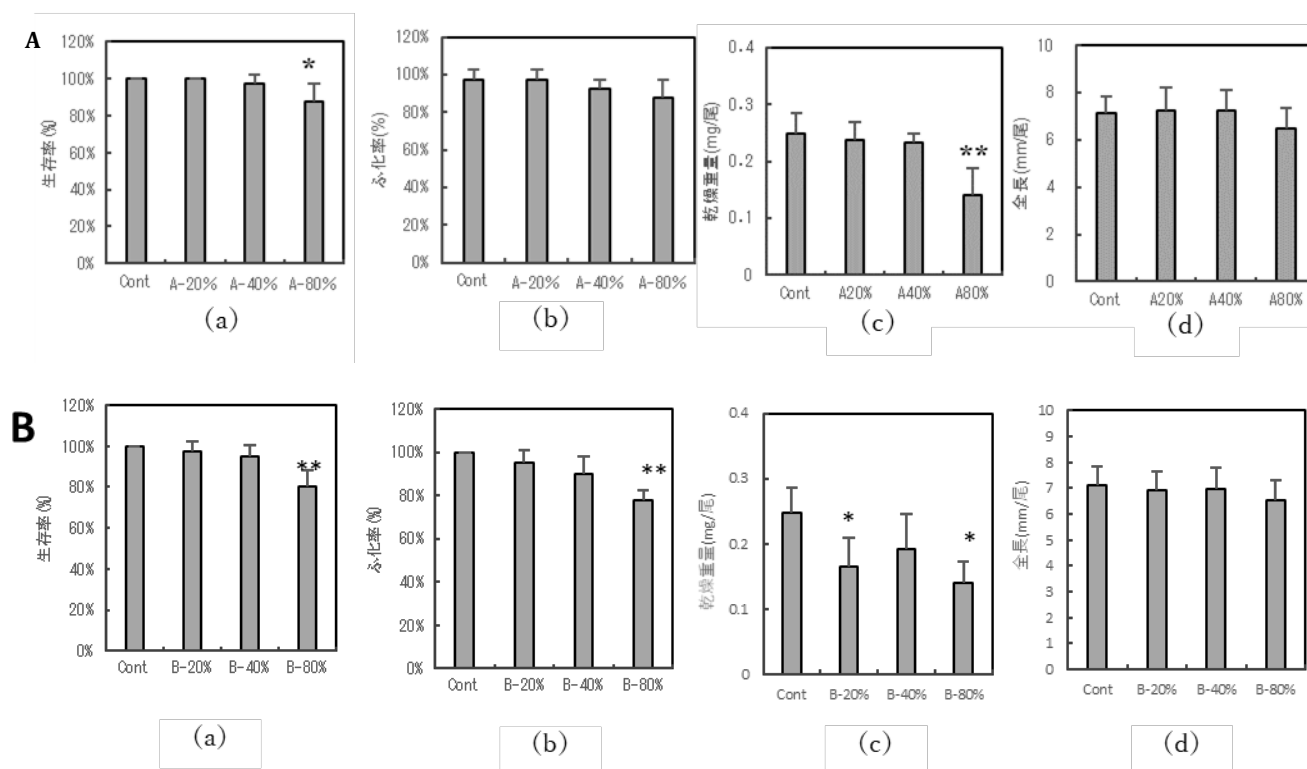
4-3. ケーススタディ試験

本研究で開発した試験法について、実海域試料に適用したケーススタディについて、結果を図(4)-1～4に示す。

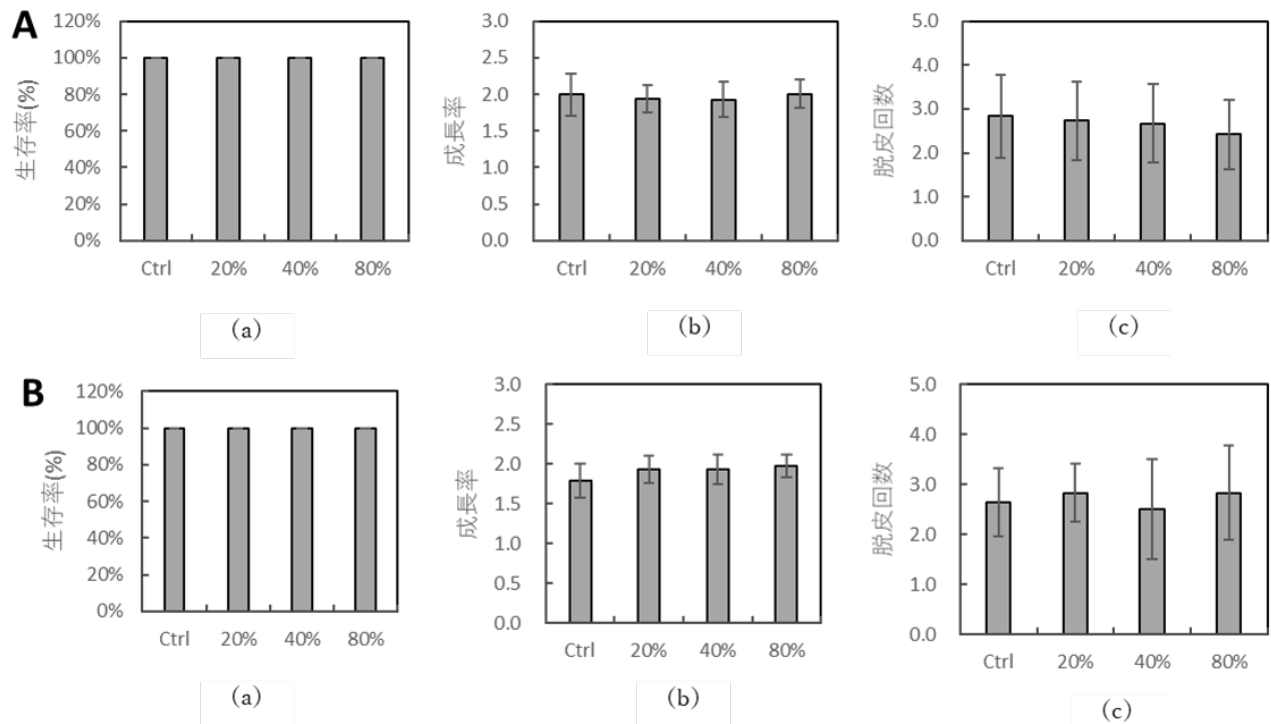
ジャワメダカについては試料Aを80%含む水に暴露されたジャワメダカ胚の生存率 ($p<0.05$) と重量ベースの成長率 ($p<0.01$) に他のグループよりも有意な低下が見られた(図(4)-1)。また、試料Bを80%含む水に曝露されたジャワメダカ胚も生存率、孵化率、重量ベースの成長率に有意な低下が見られた(図(4)-1)。この結果からジャワメダカ胚は実環境に放出される排水などに対しても一定の感受性を示し、その有用性は高いのではないかと考えられた。

フサゲモクズに関しては、溶液A、Bとも生存率、成長率、脱皮回数にはその影響が認められなかった(図(4)-2)。

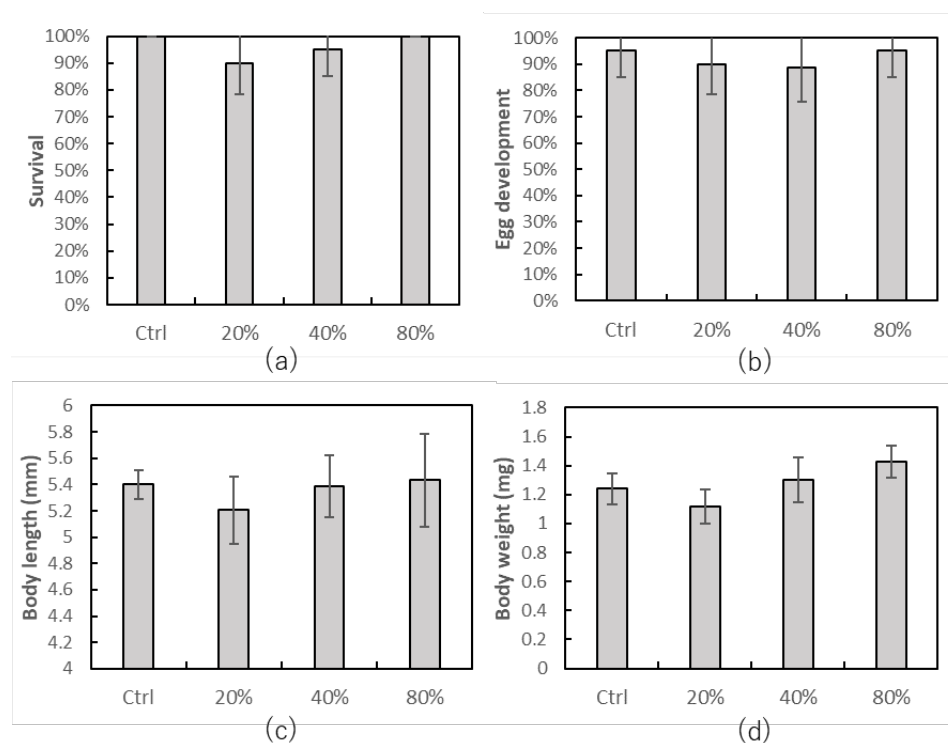
試料Aについては、各希釈割合(20、40、80%)の海水における幼生の変態率及び生残率は、対照区と比較して有意差が確認されなかった($p>0.05$)(図(4)-3)。一方で、試料Bについては、最高濃度区の80%では全個体が死亡する顕著な影響が検出された(図(4)-4)。高濃度側では溶解酸素の低下が顕著であり、80%では換水前には2.34 mg/L、40%では3.08 mg/Lまで低下することもあり、試料中の化学物質だけでなく、酸欠が生存に影響を及ぼした可能性がある。



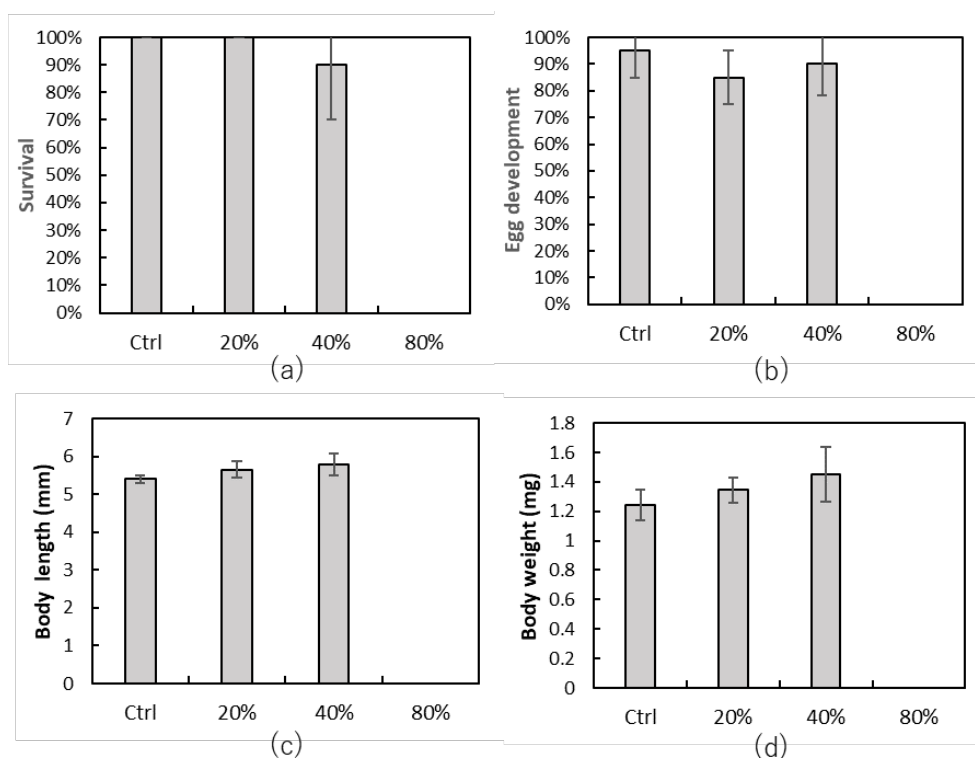
図(4)-1 実海水試料(試料A:上図、試料B:下図)に対するジャワメダカ胚の毒性試験結果(ケーススタディ)。(a)生存率、(b)成熟率、(c)が重量、(d)が全長。各棒グラフは平均値±標準偏差(n=3)。



図(4)-2 実海水試料（試料A：上図、試料B：下図）に対するフサゲモクズに対する毒性試験結果（ケーススタディ）。(a)生存率、(b)成熟率、(c)が重量、(d)が全長。各棒グラフは平均値±標準偏差 (n=12)。



図(4)-3 実海水試料（試料A）に対するアミの毒性試験結果（ケーススタディ）。(a)が生存率、(b)が成熟率、(c)が体長、(d)が体重。各棒グラフは平均値±標準偏差 (n=4)で示す。



図(4)-4 実海水試料（試料B）に対するアミの毒性試験結果（ケーススタディ）。(a)が生存率、(b)が成熟率、(c)が体長、(d)が体重。各棒グラフは平均値±標準偏差（n=4）で示す。

5. 研究目標の達成状況

汽水魚の候補種であるジャワメダカ、さらに甲殻類の候補種であるフサゲモクズとアミを各々用いた短期慢性毒性試験法を確立した。確立された手法をもとに、複数の研究機関で六価クロム及び3,5-DCPに関するリングテストを実施して、その妥当性が概ね確認された。また、海水サンプルを用いたケーススタディにおいても適用妥当性が確認された。以上、汽水魚及び汽水性甲殻類を用いた短期慢性毒性試験の研究目標は達成された。

6. 引用文献

- Hiwatari, T., Kajihara, T., 1988. Experimental Studies on the Growth and Breeding of *Hyale barbicornis* (Amphipoda, Crustacea) at Different Temperatures. Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Ed. 54, 39–43. <https://doi.org/10.2331/suisan.54.39>
- Koyama, J., Kawamata, M., Imai, S., Fukunaga, M., Uno, S., Kakuno, A., 2008. Java medaka: A proposed new marine test fish for ecotoxicology. Environ. Toxicol. 23. <https://doi.org/10.1002/tox.20367>

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ3】

1) 磯野良介, 大坂綾太(2020) 海産甲殻類アカシマモエビのゾエア幼生を用いた急性毒性試験法の開発

<査読付論文に準ずる成果発表>

「特に記載すべき事項はない。」

<その他誌上発表(査読なし)>

【サブテーマ1】

- 1) 河地正伸、越川海、山本裕史：環境儀No. 72 (2019)
うみの見張り番-植物プランクトンを使った海洋開発現場の水質監視
- 2) 山本裕史：国立環境研究所ニュース第39巻第6号(2021)
「生態影響の包括的・効率的評価について」

(2) 口頭発表(学会等)

【サブテーマ1】

- 1) 岡建太、小神野豊、山岸隆博、山本裕史、第24回日本環境毒性学会研究発表会(2018)
「国立環境研究所水環境実験施設における実験水生生物分譲業務の概要」
- 2) 山本裕史、渡部春奈、第21回日本水環境学会シンポジウム(2018)
「環境省の検討会の状況・排水改善ガイドライン(仮称)について」
- 3) Omagari R, Kawano M, Watanabe H, Yamagishi T, Kawachi M, Yamamoto H, SETAC Asia-Pacific 2018, Daegu, Korea (2018)
“Preliminary studies to develop short-term chronic toxicity tests using marine organisms.”
- 4) 大田修平、淵田茂司、山口晴代、山岸隆博、山本裕史、越川海、河地正伸、日本植物学会第83回大会(2019)
「フローサイトメトリーを利用した海底鉱物資源開発域における植物プランクトンへの影響評価技術の開発」
- 5) 河野真知、山岸隆博、岡健太、澤井淳、岡村哲郎、宗宮麗、隠塚俊満、山本裕史、第25回日本環境毒性学会研究発表会(2019)
「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発」
- 6) 山本裕史、第23回日本水環境学会シンポジウム、Web形式(2020)
「バイオアッセイの未来～環境行政利用の観点から」

【サブテーマ2】

- 1) 隠塚俊満、宗宮麗、羽野健志、令和3年度日本水産学会春季大会(2021)
「海産大型緑藻および褐藻類を用いた影響試験法の開発」

【サブテーマ4】

- 1) Seiichi Uno, Kiri Hayakawa, Taichi Mikami, Emiko Kokushi, SETAC North America 40th Annual Meeting (2019)
“Toxicity evaluations of chemicals in seawater using the hyalid amphipod,

Ptilohyale barbicornis”

2) 宇野誠一、第23回日本水環境学会シンポジウム(2020)

「バイオアッセイの未来～～底質汚染・メタボロミクスの観点から」

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 国立環境研究所、夏の大公開（2018年7月21日、参加者約6000名）にて成果紹介
- 2) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（平成30年度）（2019年2月12日、東京都イイノホール&カンファレンスセンター Room A、参加者約250名）試験法に係る最近の動向についての講演
- 3) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（平成30年度）（2019年2月25日、大阪市、新梅田研修センター 新館2階 グランドホール、参加者約120名）試験法に係る最近の動向についての講演
- 4) 国立環境研究所、夏の大公開（2019年7月20日、参加者約6000名）にて成果紹介
- 5) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（令和元年度）（2020年1月21日、フクラシア品川クリスタルスクエア Hall A、参加者約250名）試験法に係る最近の動向についての講演
- 6) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（令和元年度）（2020年2月3日、大阪市新梅田研修センター 本館2階 205ホール、参加者約100名）試験法に係る最近の動向についての講演
- 7) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（令和2年度）（2021年2月16日、ウェブセミナー、参加者約300名）試験法に係る最近の動向についての講演

(4) マスコミ等への公表・報道等>

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Development of Short-term Chronic Toxicity Tests Using Marine and Estuarine Organisms

Principal Investigator: Hiroshi YAMAMOTO

Institution: National Institute for Environmental Studies, Tsukuba City,
Ibaraki, JAPAN

Tel: +81-29-850-2754/ Fax: +81-29-850-2870

E-mail: yamamoto.hiroshi@nies.go.jp

Cooperated by: Japan Fisheries Research and Education Agency, Marine Ecology Research
Institute, and Kagoshima University

[Abstract]

Key Words: Bioassay, Chronic toxicity, Marine organisms, Development of testing
methods, Ring tests, Algal growth inhibition test, Marine and estuarine crustaceans,
Short term test using fish embryo and sac fry, Whole Effluent Toxicity

Based on the review of literatures such as "Guideline for toxicity methods using marine organisms" published by Fisheries Agency in 2010, we developed relatively sensitive and reproducible short-term (sub-)chronic toxicity tests using marine or estuarine organisms to assess the chemical mixtures in wastewater or to establish water quality standard in coastal area. We selected a marine cyanobacterium, *Cyanobium* sp. to develop algal growth inhibition tests (OECD guideline for testing of chemicals No. 201) and selected two other marine algae, a diatom, *Phaeodactylum tricornutum* and a green alga, *Dunaliella primolecta*, to be applicable to this method. We also developed short-term chronic toxicity test using sea lettuce, *Ulva aragoënsis* and a brown alga, *Ectocarpus siliculosus*. As for crustaceans, two copepod species, *Tigriopus japonicus* and *Acartia* sp., were selected to develop the short-term chronic toxicity test to observe metamorphosis from nauplius to copepod in 5 to 8 days. A mysid, *Americamysis bahia*, an amphipod, *Ptilohyale barbicornis*, and a shrimp, *Lysmata vittate* were also selected as crustaceans. Short-term chronic toxicity test methods were developed for the mysid (7 day) and the amphipod (14 day) observing growth (and sexual maturation for the mysid), while only the acute test for 24 h was developed for the shrimp. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, was selected as a shellfish, to develop short-term chronic toxicity test by observing the early stage development from embryo to D-shaped larvae in 24 h. As for fishes, we selected two of estuarine small fishes, mummichog and Javanese medaka, and developed short-term tests with embryos and sac fry stages in 9 ± 2 days to observe hatching and survival. Red sea bream (*Pegrus major*) was also selected but embryos need to be shipped at 16 degrees Celsius because of the short period of embryonic stage at 20-25 degrees Celsius if large scale rearing system is not available at the testing laboratory.

Interlaboratory ring tests were conducted at two to four laboratories including a cooperative testing laboratory (Idea Consultant Co.) to check the validity of the methods. The methods were slightly modified based on the ring tests and the final version of "Draft short-term chronic toxicity test methods using marine and estuarine organisms" was printed. A case study was conducted using selected tests methods for two ambient coastal sea water to

check the validity of the methods. Toxicity was observed for a few species at the highest concentration (80%) for one of the samples.