

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

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

課題代表者・サブテーマ 1 代表：山本裕史（国立環境研究所）

サブテーマ 2 代表：持田和彦（水産研究・教育機構）

サブテーマ 3 代表：岸田智穂（海洋生物環境研究所）

サブテーマ 4 代表：宇野誠一（鹿児島大学）

背景・目的

- 環境省が検討中の「生物を用いた排水・環境水の評価・管理（全排水毒性：WET）」や水生生物保全のための水質環境基準の設定、化学物質の生態影響評価（化審法、農取法など）の試験法の多くは淡水生物を用いた手法で、海産・汽水生物を用いた標準的試験法開発が必要
- 「海産（および汽水）の藻類（・大型藻類類）、甲殻類（・貝類）、魚類を用いた短期慢性毒性試験法を開発し、海洋環境への排出が想定される事業所排水、揚鉦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作成すること」を目的とした

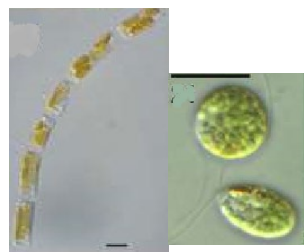
研究開発内容

サブテーマ1：山本裕史、渡部春奈、河地正伸、山岸隆博、河野真知（国立環境研究所）

- **海産微細藻類**の試験法開発・とりまとめ
- **リングテストの主宰**・遂行、試験法案のとりまとめ
- 実験生物分譲システムの確立

外部
機関

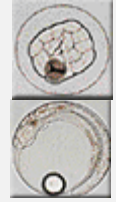
リング
テストの依頼



リングテストの共同実施

サブテーマ2：持田和彦、隠塚俊満、羽野健志、大久保信幸、宗宮麗（瀬戸内海区水産研究所）

- **海産魚類、大型藻類**の試験法開発・とりまとめ
- リングテストの遂行



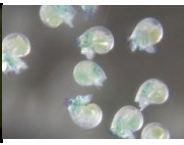
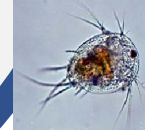
サブテーマ3：岸田智穂、磯野良介、眞道幸司、吉川貴志、渡邊（海洋生物環境研究所）

- **海産甲殻類・海産貝類**の試験法開発・とりまとめ
- リングテストの遂行

試験法、試験生物等の 情報・資材の共有

サブテーマ4：宇野誠一、國師恵美子（鹿児島大学）

- **汽水魚類と汽水甲殻類**の試験法開発・とりまとめ
- リングテストの遂行



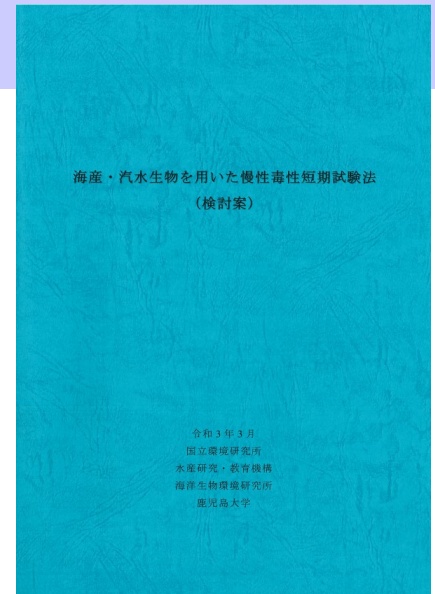
研究目標

- 海産・汽水生物を用いた魚類、無脊椎動物、藻類等を用いた（亜）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が期待できる。

研究目標の達成状況

- リングテスト結果を踏まえて、海産・汽水産の微細藻類、大型藻類、複数の無脊椎動物、魚類について試験法案が完成し、目標を達成した。
- 開発した試験法を用いて、環境水を利用したWET試験のケーススタディ（2地点）を行うことで、目標を達成した。

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Cyanobium sp., 珪藻Phaeodactylum tricornutum、 緑藻Dunaliella primolecta	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Ulva aragoënsis	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Ectocarpus siliculosus	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Tigriopus japonicus	致死、変態	5-8 d
海産カイアシ類（Acartia sp.）を用いた生存、ふ化、変態試験法	アカルチアAcartia sinjiensis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Americamysis bahia	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Ptilohyale barbicornis	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Lysmata vittata	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Crassostrea gigas	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Pegrus major	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	マミチヨグFundulus heteroclitus ジャワメダカOryzias javanicus	致死・ふ化	10 d



海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案），100p，2021

サブテーマ 1

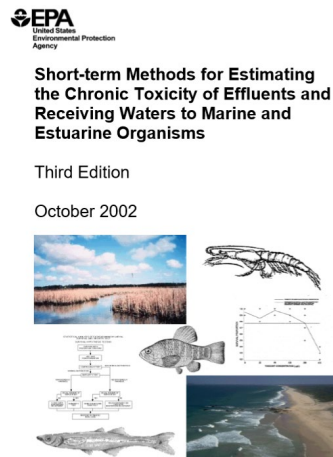
「海産藻類を用いた試験法開発およびリングテスト運営・試験法とりまとめ」

試験法（検討案）の編集・とりまとめ

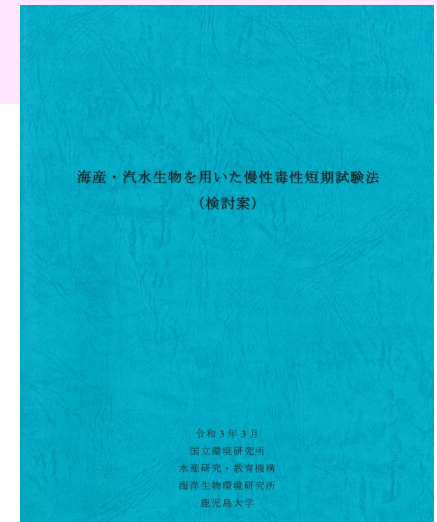
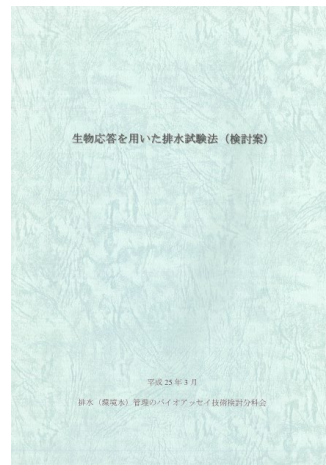
- 水産庁の海産生物毒性試験指針、米国環境保護庁のWET試験法、「生物を用いた排水試験法（検討案）」を参考に「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」を取りまとめ



水産庁、「海産生物毒性試験指針」、2010



USEPA, WET Test Methods, 「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」、2013



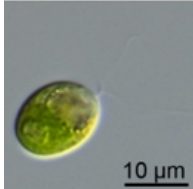


海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）, 100p, 2021

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」

藻類試験

・ 藍藻、珪藻、緑藻を用いた試験法作成とリングテストの実施

	藍藻	珪藻	緑藻
供試生物	 <i>Cyanobium</i> sp. (NIES-981)	 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (NIES-4392)	 <i>Dunaliella salina</i> (NIES-2256)
初期細胞数	10 ⁶ cells/mL	10 ⁴ cells/mL	10 ⁴ cells/mL
エンドポイント	生長阻害	生長阻害	生長阻害
計測項目	細胞数 (バイオマスの指標)	総細胞数 (バイオマスの指標)	総細胞数 (バイオマスの指標)
試験条件	無菌 温度：23±2°C 光強度：60-120 μE ⁻² S ⁻² 光周期：なし 静置培養	無菌 温度：20±2°C 光強度：60-120 μE ⁻² S ⁻² 光周期：なし 静置培養	無菌 温度：23±2°C 光強度：100-150 μE ⁻² S ⁻² 光周期：16h : 8h 静置培養
培地	ASW-SN培地	ISO人工海水	検討中
試験容器	100 mL/300 mL フラスコ	100 mL/300 mL フラスコ	100 mL/300 mL フラスコ
ばく露方法	止水	<p>培地の修正、珪藻・緑藻の種の比較検討により、OECDテストガイドラインNo. 201に相当する試験実施可能であることを確認</p>	
ばく露期間	3日		
培地交換	なし		
試験成立条件	増殖： 日間生長速度の平均CV：<35% 連間の生長速度CV：<7%	日間生長速度の平均CV：<35% 連間の生長速度CV：<7%	日間生長速度の平均CV：<35% 連間の生長速度CV：<7%

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」

3,5-DCPのリングテスト結果

	藍藻 <i>Cyanobium sp.</i>			緑藻 <i>D. primolecta</i>			珪藻 <i>P. tricurnutum</i>		
	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}
国環研	0.45	0.67	1.79	0.52	1.98	2.87	0.69	0.80	1.32
A	0.43	0.76	2.18	0.40	1.39	1.63	0.79	0.84	1.46
B	0.41	0.97	1.98	0.73	1.37	2.44	0.42	0.64	2.07
C	<0.49	1.22	2.88	-	-	-	-	-	-
毒性値幅(倍)	1.12	1.82	1.61	1.83	1.45	1.76	1.88	1.31	1.57

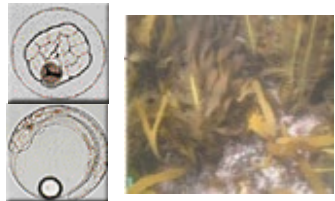
K₂Cr₂O₇のリングテスト結果

	藍藻 <i>Cyanobium sp.</i>			緑藻 <i>D. primolecta</i>			珪藻 <i>P. tricurnutum</i>		
	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}	NOEC	EC10 _{72h}	EC50 _{72h}
国環研	0.21	0.32	1.75	1.95	4.03	10.9	0.98	1.43	8.92
A	0.11	0.15	0.36	2.16	4.82	11.7	1.00	1.59	6.00
B	0.42	0.92	1.53	1.83	2.29	4.81	0.88	1.39	10.2
C	0.48	1.15	2.04	-	-	-	-	-	-
毒性値幅(倍)	4.36	10.1	5.67	2.37	2.10	2.43	1.14	1.14	1.70

藍藻の六価クロムを除き、2倍程度以内であり、複数試験機関で実施可能であることが確認できた

「海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発」

○ 持田和彦、隠塚俊満、羽野健志（瀬戸内海区水産研究所）



- 海産魚類の（亜）慢性試験法の開発・とりまとめ
- 大型藻類の（亜）慢性試験法の開発・とりまとめ
- 各サブテーマと共同してリングテストの遂行

サブテーマ2 「海産魚類・大型藻類を用いた試験法開発」

海産魚類2種を用いた胚・仔魚を用いた試験法を開発

1. 国産種 マダイ *Pagrus major*



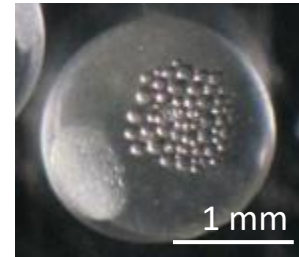
- 卵：浮遊性、直径約0.5 mm程度
- 胚発生：約2日（17℃）
- 産卵期：5～7月初旬



2. 外国産種 マミチヨグ *Fundulus heteroclitus*



- 卵：沈降性、直径約2 mm程度
- 胚発生：約14日（20℃）
- 産卵期：5～9月
20℃調温時・・・通年



サブテーマ2 「海産魚類・大型藻類を用いた試験法開発」

各3機関でリングテストを実施し、試験法案の妥当性を検討

3,5-DCP まとめ

- ・リングテストの妥当性：試験研究機関間で大きな差は認められず。
- ・感受性：魚種間で大きな差は認められず。

魚種	実施機関	感受性の高い エンドポイント	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0 ppm
 マダイ	海生研	・生存率 ・ふ化率	-	-	-	-	*
	国環研	・生存率	-	-	-	*	*
	水技研	・生存率 ・ふ化率	-	-	-	-	*
 マミチヨグ	海生研	・生存率 ・成長（乾重量・全長）	-	-	-	* **	* N.C.
	鹿大	・成長（乾重量）	-	*	**	**	N.C.
	水技研	・成長（乾重量・全長）	-	-	-	**	N.C.

クロム まとめ

- ・リングテストの妥当性：試験研究機関間で大きな差は認められず。
- ・感受性：魚種間で大きな差は認められず。
- ・マダイ：影響濃度に若干の差が生じた（ロット間の卵質差と推測）。

魚種	実施機関	感受性の高い エンドポイント	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0 ppm
 マダイ	海生研	・生存率	-	-	*	**	**
	国環研	・生存率	-	-	-	**	*
	水技研	・生存率	-	-	*	*	*
 マミチヨグ	海生研	・成長（乾重量・全長）	-	-	-	**	**
	鹿大	・成長（乾重量・全長）	-	-	-	**	**
	水技研	・成長（乾重量・全長）	-	-	-	**	**

- ・リングテストの妥当性：★★★☆☆ 3試験研究機関間で大きな差は認められず。
- ・感受性：★★★☆☆ 魚種間で大きな差は認められず。

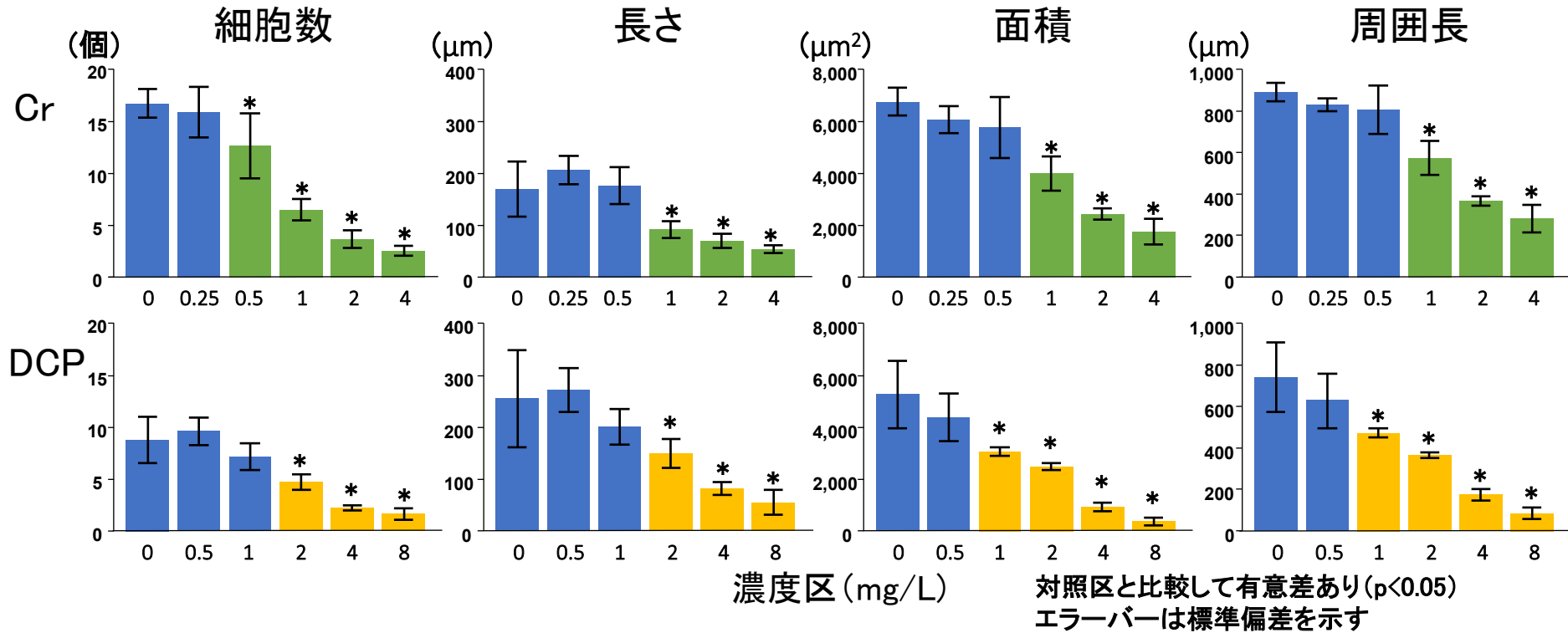
魚種	卵サイズ	産卵	試験期間	餌	換水	エンドポイント
 マダイ	国産種 約0.5 mm	5月～ 7月初旬	5日 120h 短い	無	無	・生存率 ・ふ化率
 マミチヨグ	外国産 約2 mm (扱いやすい)	通年 (20℃) + 光周期	10日間	有	有	・生存率 ・ふ化率 ・成長（乾燥重） ・成長（全長） ・ふ化後生存率 ・生存指標

魚種それぞれでメリットがある (赤字)

サブテーマ2 「海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発」

大型藻類

• 緑藻アオサ (*Ulva aragoënsis*) の遊走子発芽体の細胞数、長さ、面積、周囲長を指標にした試験法を開発

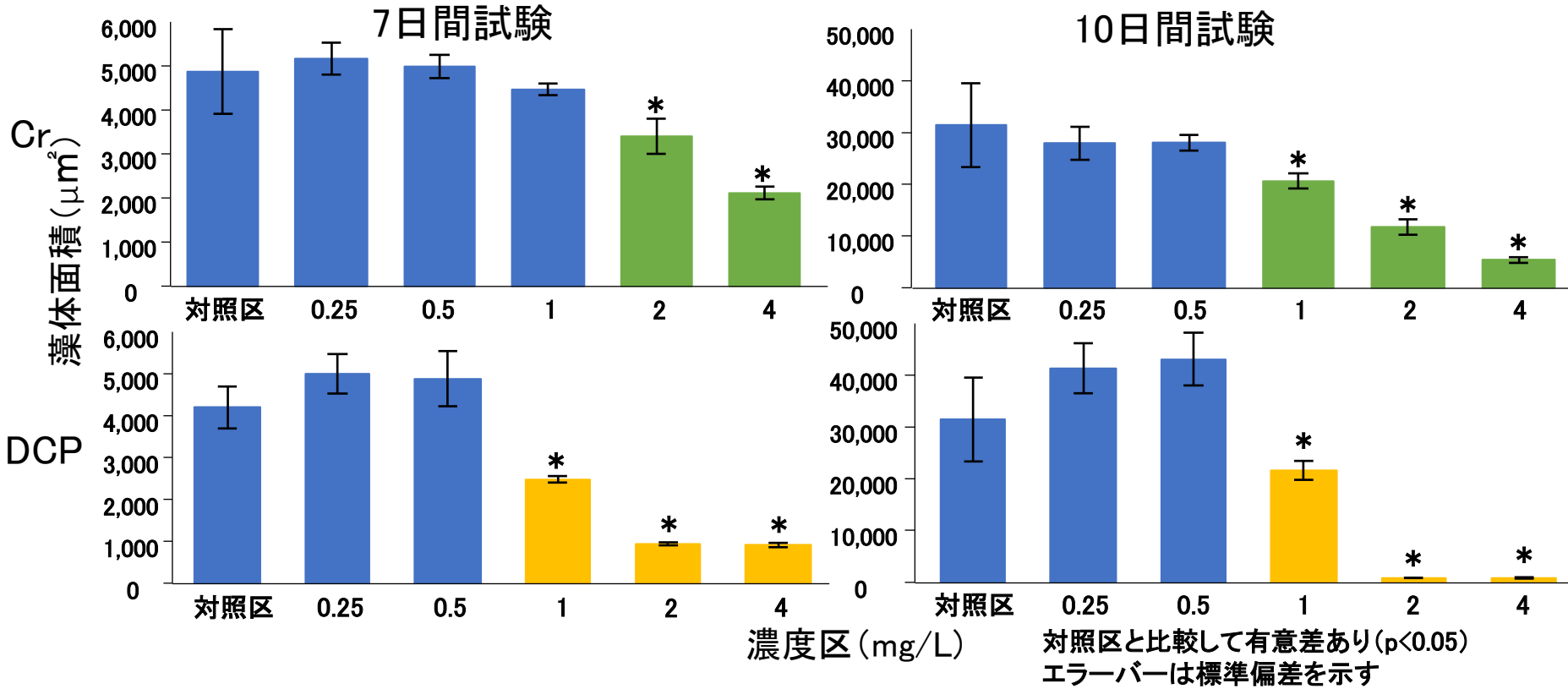


感受性: 細胞数 ≒ 長さ ≒ 面積 ≒ 周囲長
 検討した4指標を用いて72時間の試験可能、試験法案を作成

サブテーマ2 「海産魚類・大型藻類等を用いた試験法開発」

大型藻類

・褐藻シオミドロ(*Ectocarpus siliculosus*)の細断藻体の面積を指標にした試験法を開発



感受性: 7日間試験 ≒ 10日間試験
7日間の試験で生長を指標にする試験可能、試験法案作成

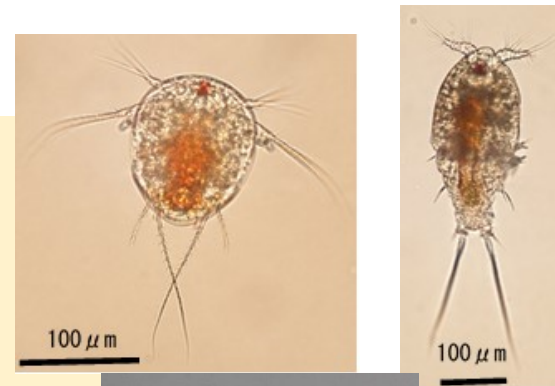
サブテーマ 3

「海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発」

海産甲殻類

試験種と発生段階の設定

1. シオダマリミジンコ (*Tigriopus japonicus*)
ノープリウス → コペポダイト (5-8日間暴露)
➤ 成長・変態を指標とした(亜)慢性試験法
2. アカルチア (*Tigriopus japonicus*)
ノープリウス → コペポダイト (6日間暴露)
➤ 成長・変態を指標とした(亜)慢性試験法
3. アカシマモエビ (*Lysmata vittata*) (本研究で新規開発)
ゾエア幼生 (24時間暴露)
➤ 急性毒性試験の候補種 (甲殻類の毒性値情報少)



サブテーマ3 「海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発」

海産甲殻類：シオダマリミジンコを用いたリングテスト

3,5-DCP

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

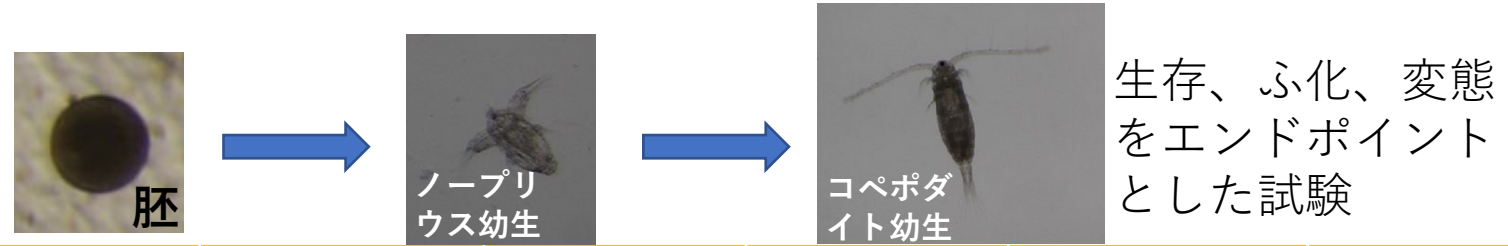
K₂Cr₂O₇

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	//

結果は2倍程度以内であり、試験法の妥当性が確認できた

サブテーマ3 「海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発」

- 国内産カイアシ (*Acartia sinjiensis*) を用いた初期発達段階試験に関する検討を実施



	生存LC ₅₀	ふ化IC ₅₀	変態IC ₅₀	ふ化NOEC	変態NOEC
3,5-Dichlorophenol (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)

国内種で、シオダマリミジンコとほぼ同等のプロトコルで、感度高く測定可能であることが確認できた

サブテーマ 3 「海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発」

海産貝類

試験種と発生段階の設定

マガキ(*Crassostrea gigas*)

○本邦の広域で養殖（北海道～九州）

◎宅配便による入手可能

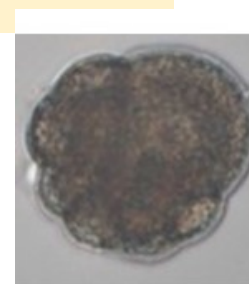
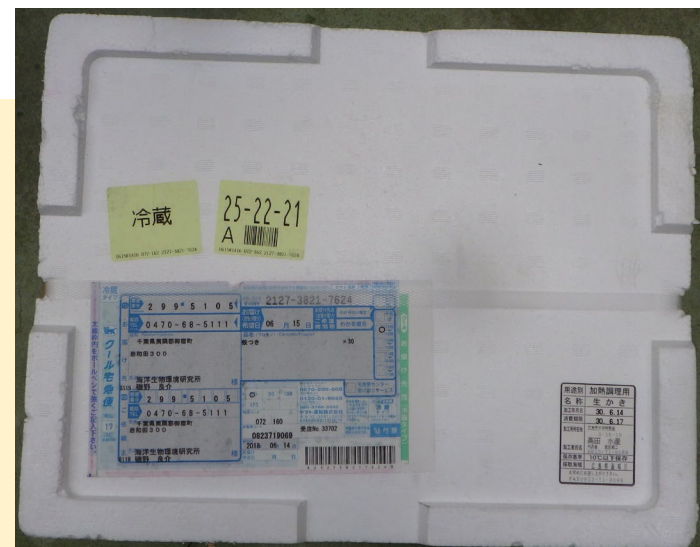
◎切開法による人工受精が可能

△産卵期限定

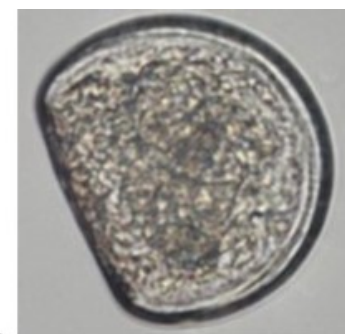
例：広島は5～6月，気仙沼は7～8月

卵割期の受精卵 → D型幼生（1日間暴露）

➤ 成長・変態を指標とした(亜)慢性試験法



50 μm



サブテーマ 3 「海産甲殻類・貝類を用いた試験法開発」

海産貝類(マガキ)：検証試験結果

3,5-DCP

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

K₂Cr₂O₇

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

再現性よく実施可能であることが確認できた

サブテーマ 4

「汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発」

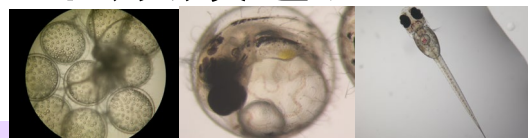
○宇野誠一、國師恵美子（鹿児島大学）

- 汽水魚類（ジャワメダカ等）の試験法開発・とりまとめ
- 汽水甲殻類（汽水性アミ・フサゲモクズ等）の試験法開発・とりまとめ
- 各サブテーマと共同してリングテストの遂行



サブテーマ4 「汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発」

汽水産魚類



・ ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の胚・仔魚試験法

リングテスト結果 (mg/L) 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 水技研	0.46	0.24	1.95	1.01	3.84	1.95
鹿見島大学	1.97	0.91	1.97	0.91	4.30	1.97
鹿見島大学	2.79	1.68	1.68	0.78	2.79	1.68

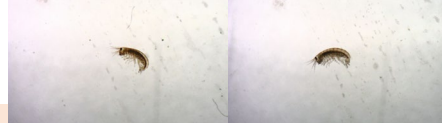
K₂Cr₂O₇

	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 水技研	15.73	8.03	8.03	3.83	8.03	3.83
鹿見島大学	15.87	7.96	2.30	1.01	4.06	2.30
鹿見島大学	15.84	7.99	1.98	0.92	4.05	1.98

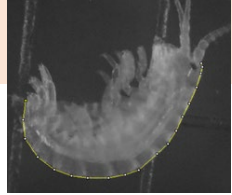
結果は2倍程度以内であり、試験法の妥当性が確認できた

サブテーマ 4 「汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発」

汽水産甲殻類



- 汽水産ヨコエビのフサゲモクズ (*Ptilohyale barbicornis*) の慢性毒性短期試験法 (14日間の成長・脱皮を測定)



リングテスト結果 (mg/L)

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

K₂Cr₂O₇

	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	0.16	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

結果はエンドポイントによって多少の違いはあるが、全体としては、NOECは同程度であり、試験法の妥当性が確認できた

サブテーマ 4 「汽水魚・汽水甲殻類を用いた試験法開発」

汽水産甲殻類

- 汽水産アミ (*Americamysis bahia*) の慢性毒性短期試験法の検証 (7日間の成熟・成長を測定)



リングテスト結果 (mg/L)
3,5-DCP

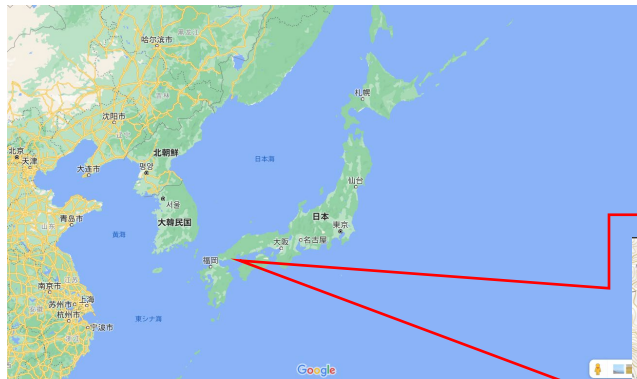
	LC ₅₀	EC ₅₀ (成熟)	NOEC(成熟)	NOEC (成長)
国立環境研究所	633	395	—	
	762	414	500	250
	748	504	250	125
いであ	> 2000	>2000	1000	125
鹿児島大学	> 2000	1018	1000	< 125

K₂Cr₂O₇

	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

フサゲモクズ同様に、結果は多少の違いはあるが、全体としてはNOECの値はほぼ同等であり、試験法の妥当性が確認できた

実環境水を用いたケーススタディ（対象地点）



広島県（瀬戸内海）の
事業所排水の影響が少
ない地点Aと事業所近傍
の地点Bで採取



地点B

実環境水を用いたケーススタディ (結果概要)

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%
フサゲモクス	>80%	>80%
汽水産アミ	>80%	40%
マミチョグ	>80%	>80%
ジャワメダカ	40%	40%



地点Bの採水の一部の生物への影響が確認された
 ケーススタディを通じて、試験法の環境水への適用可能性を検証できた

環境政策等への貢献

- 「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）」は、環境省が実施してきた生物を用いた排水・環境水の評価・管理のために既に作成・公表された淡水生物による「生物を用いた排水試験法（検討案）」を補完する
- 海域における環境基準設定、化審法・農取法の試験法としても利用可能

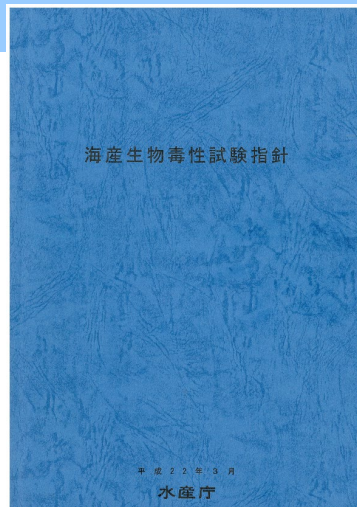
研究成果の発表状況

- 査読付論文 1 報を発行し、加えて 2 報を準備中である。
- 学会発表や一般向けの講演会、研究所の一般公開などで積極的に広く情報発信した。

補足資料

背景

- わが国は海に囲まれ豊富な海洋生態系や水産資源に恵まれている一方、各種事業所や船舶などの化学物質の発生源も臨海部・海洋に多く存在するものの、海産・汽水生物を用いた試験法は国内では水産庁の海産生物毒性試験指針（平成22年）、国立環境研究所から公表した急性毒性試験法案（平成17年、マダイ・クルマエビの2種）など限られている



Google mapより

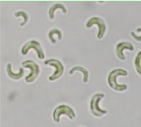


行政ニーズへの適合性

- 環境省が検討中の「生物を用いた排水・環境水の評価・管理（全排水毒性：WET）」、水生生物保全のための水質環境基準の設定への利用、化審法における工業化学物質の評価いずれも淡水生物の試験法に限られる
- バラスト水条約の発効(平成29年9月)もあり、海産・汽水生物を用いた試験法の開発・標準化が必要
- 名古屋議定書対応のためのABS指針（平成29年8月施行）がまとめられて試験生物の移動が制限されることもあり、過去に確立した試験生物種もしくは国産種を用いた試験法の策定が重要

科学的・技術的意義

- 国内外において、海産・汽水の魚類や無脊椎動物（特に貝類）や大型藻類を用いた短期の慢性試験開発については検討例は少なく、試験法開発としての新規性は高い
- 藻類については、凍結保存の可否やハンドリングの容易さに関する選抜を行い、10門以上の分類群に所属する600株以上の保存株から選抜する点、多様な分類群の所属する試験株の確保を目指す点で、独創的なアプローチと言える
- 後半には開発した試験法を用いたWET試験等のケーススタディおよびリングテストを実施予定で、その点では技術的意義が高い

淡水3生物を用いた排水試験法（検討案）

試験条件	OECD TG201	Environment Canada EPS1/RM/21	OECD TG212
供試生物	ムレミカツキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) 	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) 	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) 
試験期間	72時間	最大8日間	ふ化日+5日間（8日間）
水温 (°C)	23±2°C	25±1°C	26±1°C
試験容器	300 mL容ガラス製三角フラスコ	50 mL容ガラス製カップ	80 mL容ガラス製カップ
試料量／容器	100 mL	15 mL	50 mL
繰り返し	6連（対照区）3連（濃度区）5000 cells/mL	1個体×10連	15個体×4連
供試生物の齢	2-4日前培養した指数増殖期の細胞	生後24時間以内の幼体	受精後4時間以内の受精卵
エンドポイント	生長速度	産仔数、供試個体の死亡率	ふ化率、ふ化後生存率、生存指標

国立環境研究所・環境省 「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」、平成25年3月

水産庁海産生物毒性試験指針に提案 されている試験法

試験法名	試験区分	生物種(分類)	生物種(種名)	試験期間	エンドポイント	試験容器	備考
植物プランクトン生長阻害試験法	急性	藻類が基本、ほか緑藻、ハプト藻、渦鞭毛藻	<i>Skeletonema costatum</i> (スケルトネマ) が基本、ほか <i>Dunaliella tertiolecta</i> (緑藻) <i>Thalassiostrira pseudonana</i> (緑藻) <i>Phaeodactylum tricoratum</i> (緑藻) <i>Heterostigma akashiwo</i> (ラフィド藻) <i>Pavlova lutheri</i> (ハプト藻) <i>Isochrysis galbana</i> (ハプト藻) <i>Prorocentrum minimum</i> (渦鞭毛藻)	72時間	生長 (in vivo蛍光、クロロフィルaや細胞数を測定)	ネジロ試験管 (φ24mm×200mm、容量64mL)	対数増殖期、22℃、f/2培地(滅菌海水に金属・栄養塩などを添加)、照明付きインキュベーター内で培養(14時間明/10時間暗)
シオダマリミジンコ幼生の遊泳阻害試験法	急性	カイアシ類	<i>Tigriopus japonicus</i> (シオダマリミジンコ)	24時間	遊泳阻害(致死)	ガラスシャーレ (φ25×26mm)、1容器あたり5個体、5個体/2mL、20個体試験	ふ化後24時間未満のノープリウス幼生、20-25℃、16時間明/8時間暗、32-35psu
エビ類ゾエア幼生の遊泳阻害試験法	急性	エビ類	<i>Palaeomon serrifer</i> (スジエビモドキ)	48時間	遊泳阻害(致死)	不活性で吸着しにくい試験容器、1個体/10mL、10個体試験	第1ゾエア幼生(ふ化幼生)、20-25℃、16時間明/8時間暗、32-35psu
稚エビの急性毒性試験	急性	エビ類	<i>Marsupenaeus japonicus</i> (クルマエビ) <i>Heptacarpus fullirostris</i> (アシナガモエビモドキ)	96時間	致死	1個体ずつ隔離できる容器(もしくはガラスビーカー)、収容密度は0.3g/L以下	全長25-35mm(クルマエビ)、8-10mm(アシナガモエビモドキ)、20-25℃、33-35psu
海産魚類急性毒性試験法	急性	魚類	<i>Pagrus major</i> (マダイ) <i>Sillago japonica</i> (シロギス)	96時間	致死	水槽、収容密度は0.28g/L以下(マダイ)、0.12g/L以下	20℃程度(マダイ)、23-26℃(シロギス)、29-35psu
シオダマリミジンコの繁殖阻害試験法	慢性	カイアシ類	<i>Tigriopus japonicus</i> (シオダマリミジンコ)	21日間	繁殖の可否、繁殖までの日数、親の生存率、繁殖	ウェルプレートもしくはガラスビーカー、1mL/1個体で20個体試験(8日目以降は合して10mL、産卵した雌は隔離)	20-25℃、16時間明/8時間暗、32psu程度
魚類—マミチヨグの初期生活段階毒性試験法	慢性	魚類	<i>Fundulus heteroclitus</i> (マミチヨグ)	受精後8-10週間	ふ化率、生存率、成長(全長、体重、肥満)	50L程度のガラス製試験水槽(流水式、500mL/分、5回転以上/日)	受精期、16-22℃、31-35psu
魚類—マミチヨグの成熟・再生産阻害試験法	慢性	魚類	<i>Fundulus heteroclitus</i> (マミチヨグ)	3か月間程度	産卵数、放卵・受精、GSI(生殖腺の組織学的検討、血漿ステロイドホルモン)	50L程度のガラス製試験水槽(流水式、水量40L、300mL/分、5回転以上/日)	雌雄判別できる未成熟の成魚、16-22℃、31-35psu
魚類全生活段階毒性試験法	慢性	魚類	<i>Oryzias latipes</i> (ジャワメダカ) <i>Fundulus heteroclitus</i> (マミチヨグ)	約100日間	受精期(F0)のふ化率・生存率、一部はGSI、産卵数、Fi0の受精率、ふ化率	流水式で5回転以上/日、25L程度のガラス製試験水槽(200mL/分、ジャワメダカ)、40L程度のガラス製試験水槽(300mL/分、マミチヨグ)	受精期、23-26℃(ジャワメダカ)、16-22℃(マミチヨグ)、明期14-16時間、31-35psu

米国WETの海産・汽水生物試験法

その1：魚類

	仔魚生存・成長試験 Method 1006.0	仔魚生存・成長試験 Method 1004.0	胚・仔魚生存・催奇形性 試験 Method 1005.0
供試生物	インランドシルバーサイド (<i>Menidia beryllina</i>) 	シーブスヘッドミノー (<i>Cyprinodon variegatus</i>) 写真出典：USGS	
供試齢	生後 7-11 日齢（ふ化後 24-96 時間齢？）、個体差 24 時間以内	ふ化後 24 時間齢未満	受精後 24 時間未満
供試個体の準備	飼育機関より受精卵またはふ化仔魚（8-10 日齢）を入手し、飼育して生後 7-11 日齢の仔魚を得る ^a	飼育機関より受精卵 ^b を入手し、飼育してふ化仔魚を得る（受精後 48 時間後に発生段階と生存率を確認すること）	飼育親魚より自然産卵（水温 25°C に上げる）または人工受精により受精後 24 時間以内の受精卵を得る ^c
試験期間	7 日間	7 日間	9 日間またはふ化後 4 日間（どちらか早い方）
エンドポイント	生存、成長（重量）	生存、成長（重量）	生存（発生異常）
試験成立条件	対照区において生存率 80% 以上、1 個体あたりの乾燥重量 0.50 mg 以上 ^d	対照区において生存率 80% 以上、1 個体あたりの乾燥重量 0.60 mg 以上 ^d	対照区において生存率 80%
対照区・希釈水		自然海水、人工海水	
塩分濃度	5-32‰	20-32‰	5-32‰
換水	毎日	毎日	毎日
試料量／容器	500-750 mL	500-750 mL	250-400 mL（推奨）
生物数／容器	10（最小）	10（最小）	10（最小）、15（推奨）
繰り返し	4（最小）	4（最小）	3（最小）、4（推奨）
試験濃度		排水：公比 2、5 濃度＋対照区 環境水：100%濃度区（または 5 濃度区）＋対照区	
必要試料量	一日 6 L	一日 6 L	一日 5 L
試験温度	25±1°C	25±1°C	25±1°C
光条件	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s	16 時間明：8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s
給餌	アルテミア	アルテミア	なし

環境省「生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会（第5回）」（平成29年3月）参考資料5より

a: 生後7週間（ふ化直後）は感受性が高いため輸送は避ける。ふ化前か、ふ化後（8-10日齢）でアルテミアをしっかりと食べる段階のものを輸送する。
 b: 自然産卵（24時間回収）または人工受精（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを与えて抱卵させ、メスの腹部から卵をベトリ皿に押し出す。オス3-5匹から精巢を取り出し精液を得て、受精させる）により受精卵を得る。受精後4時間後に粘着糸を除去して、流水式または半止水式（毎日換水）で飼育する。
 c: 外部機関からの輸送は推奨しない。外部機関より一晩かけて輸送する場合、発送時に受精後8時間以内であること
 d: 固定液保存前の場合、4%ホルマリンまたは70%エタノールで7日間保存後はSheepshead minnowは0.43mg以上、Siversideは0.50mg以上

米国WETの海産・汽水生物試験法

その2：無脊椎動物・植物

	アミ生存・成長・繁殖試験 Method 1007.0	ウニ胚受精試験 Method 1008.0	紅藻類有性生殖試験 Method 1009.0
供試生物	アミ属 (<i>Mysidopsis bahia</i> , 現 <i>Americamysis bahia</i>)  出典：Marinco bioassay laboratory, Inc.	アスナロウニ属 (<i>Arbacia punctulata</i>)  出典：NOAA	ワツナギソウ (<i>Champia parvula</i>)  出典：algaeBASE
供試齢	7日齢	精子と卵子	配偶体
供試個体の準備	試験開始 8 日前に抱卵したメスを一晩隔離し仔虫を回収 ^e 、試験前まで塩分順化しながら飼育する	飼育機関または野外より成熟個体入手し、精子および卵子をそれぞれ得る ^f	雌雄別々の飼育容器よりそれぞれ配偶体の先端を鉗子で切る
試験期間	7日間	精子 1 時間+卵子を加えて受精 20 分	2 日間+5-7 日間回復期 (繁殖観測)
エンドポイント	生存、成長 (必須) 繁殖 (抱卵) (推奨)	受精率	繁殖 (子実体数)
試験成立条件	対照区において生存率 80% 以上、乾燥重量 0.2 mg 以上、50% 以上のメスが抱卵する	対照区において受精率 70-90%	対照区において生存率 80% 以上、1 個体あたり平均子実体数 10 個以上
対照区・希釈水		自然海水、人工海水	
塩分濃度	20-30‰	30‰	30‰
換水	毎日	なし	なし
試料量/容器	150 mL	5 mL (推奨)	100 mL (最小)
生物数/容器	5 (最小)	精子 500 万細胞、卵 200 (推奨)	メス配偶体の枝先端 5 個、オス配偶体 1 個体
繰り返し	8 (最小)	4 (最小)	3 (最小)、4 (推奨)
試験濃度		排水：公比 2、5 濃度+対照区 環境水：100%濃度区 (または 5 濃度区) +対照区	
必要試料量	一日 3 L	1 試験 1 L	1 試験 2 L
試験温度	26±1℃	20±1℃	23±1℃
光条件	16 時間明: 8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s	16 時間明: 8 時間暗、 10-20 μmol/m ² /s	16 時間明: 8 時間暗、 75 μmol/m ² /s
給餌	アルテミア	なし	なし

環境省「生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会 (第5回)」(平成29年3月) 参考資料5より

e: 必要個体数の倍のメス親個体を別の水槽に移し、翌日、1000 μmメッシュのついた容器で親個体を分離する。

f: 1試験当たりオス4個体、メス4個体から電流刺激を与えてそれぞれ精子、卵をプールの得る。

Cyanobium sp. (NIES-981)

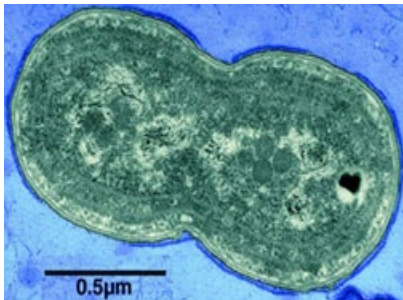
株番号: NIES-981

学名: *Cyanobium* sp.

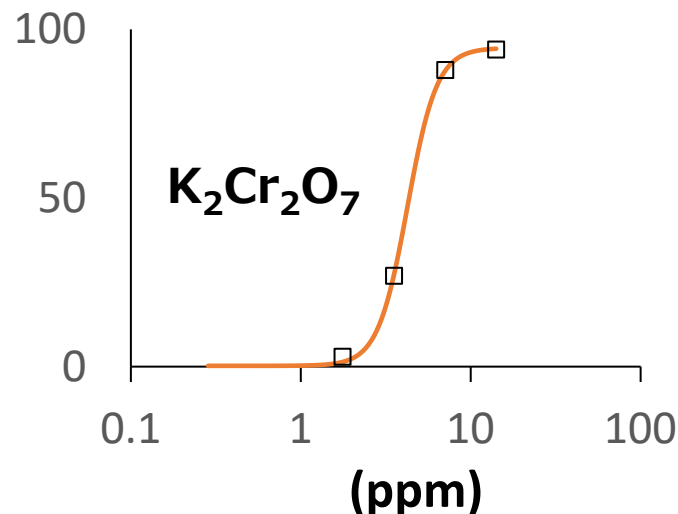
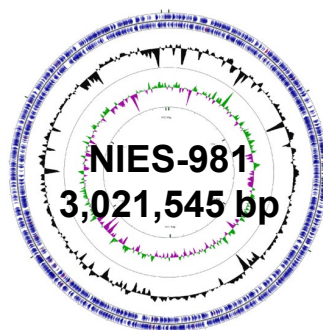
産地: 沖縄県、西表島

生育環境: 海域

株の状態: 無菌、単藻、クローン



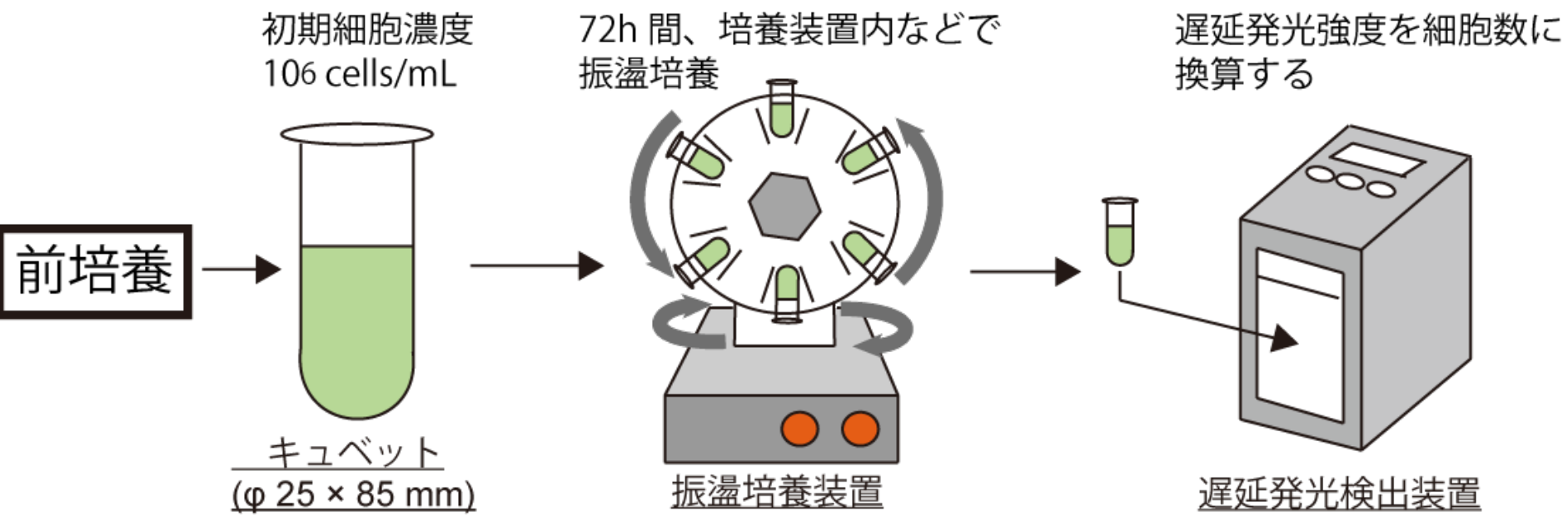
Cyanobium sp. (NIES-981)については、すでに、各種標準物質(3,4-DCP, $K_2Cr_2O_7$ 等)による試験により感受性が確認済



Cyanobium sp. (NIES-981)の培地

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

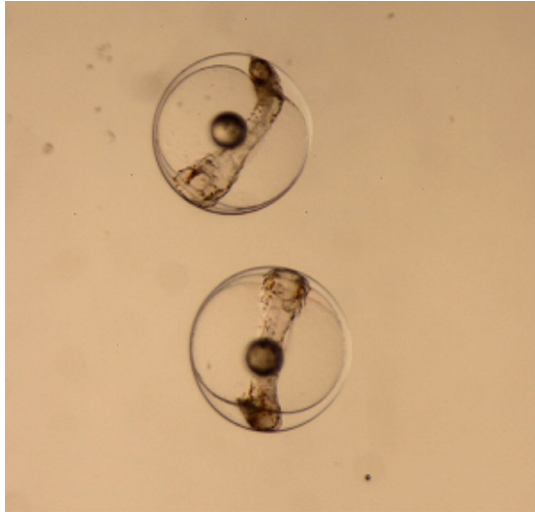
藻類遅延発光を利用した省スケール法



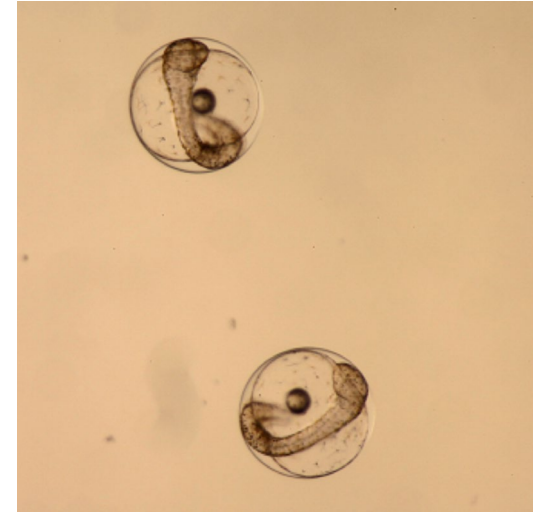
魚類胚の輸送検討

水温16°Cの状態 で輸送し、発生を遅延
胚体期に到着し、開口後まで暴露する試験を検討中

マダイ



ヒラメ



到着時の
魚類胚の様子



暴露後
24時間目



マミチヨグ 周年採卵システム

●飼育密度の検討(各3水槽)

- ・高密度区 (♂:♀ = 8:16)
- ・低密度区 (♂:♀ = 4:8)

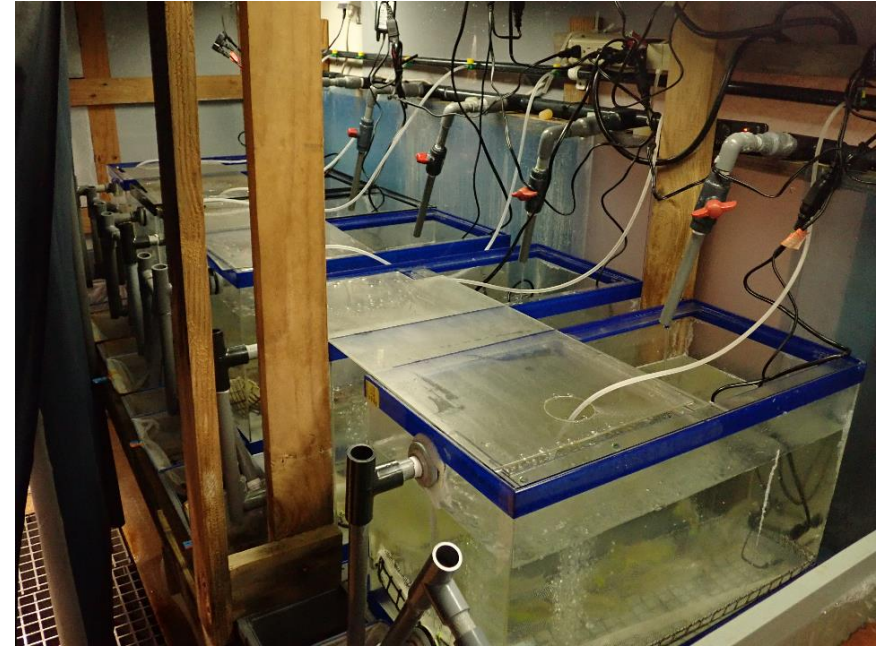
⇒2か月以上飼育した場合、
低密度区で1個体あたりの卵収量が大

●水温の調整

20°Cの調温海水をかけ流し

●照明の調整

14時間明、10時間暗



飼育環境

結果：
密度・水温・照明の調節により、周年採卵システムが確立できる見通し

マミチヨグ 胚

分割なし

2分割
2.5 h

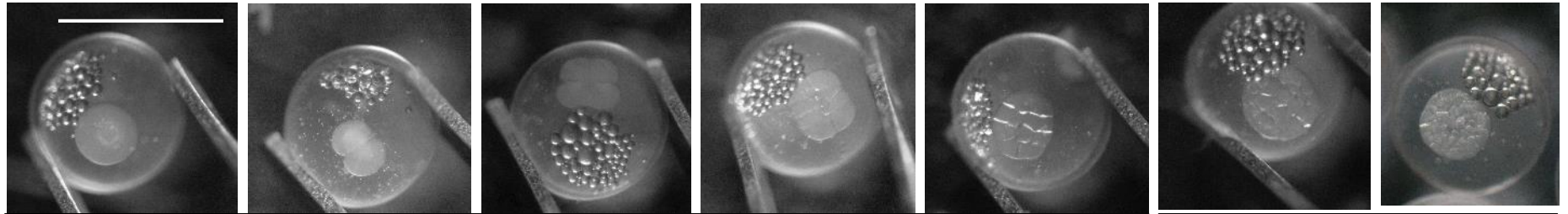
4分割
3.25 h

8分割
4.25 h

16分割
5 h

6 h

7.5 h



卵割期

細胞増殖期

10 h

15 h

24 h

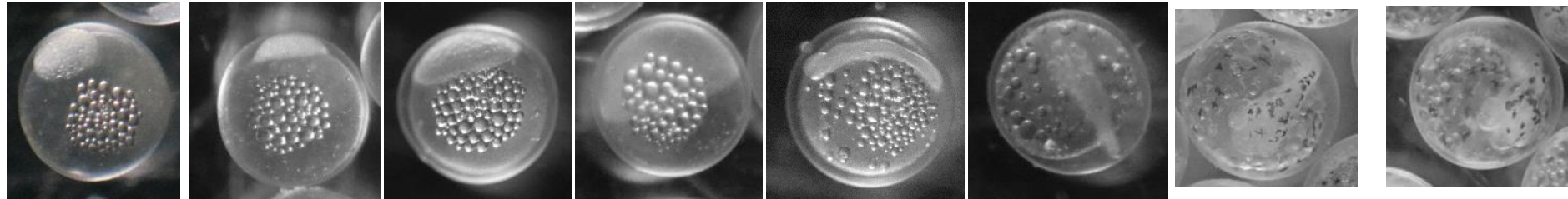
33 h

40 h

3日目

6日目

7日目



胞胚期

原腸胚期

神経胚期

尾芽胚期

8日目

9日目

10日目

13日目

14日目



尾芽胚期

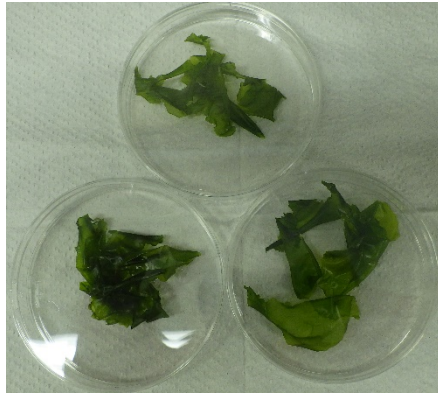
ふ化仔魚

1 mm

アオサ遊走子採取方法



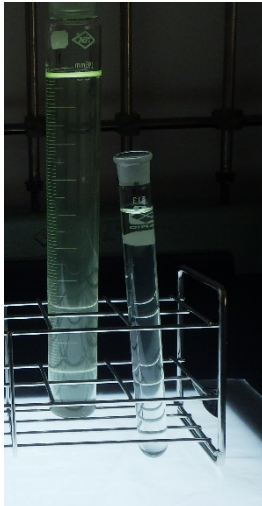
滅菌海水で洗浄
表面を紙タオルで擦り
付着珪藻を除去



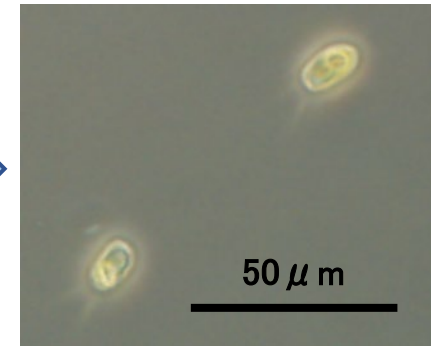
シャーレに入れ
20°C、一晩乾燥



+滅菌海水約30mL
顕微鏡下で観察し、
遊走子発生を確認



遊走子を含んだ海水に
光を下から照射
界面付近の海水を採取



遊走子を観察、カウント
→速やかに試験に用いる

アミの成熟の見分け方

未成熟



オス



メス



海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法（検討案）

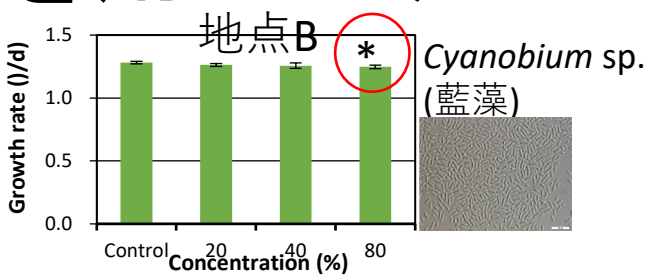
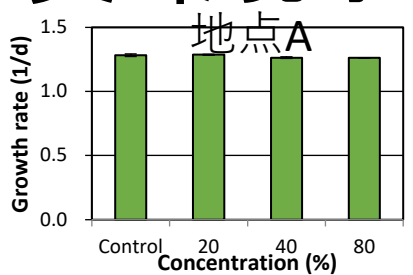
試験法（案）の名称	生物種	エンドポイント	試験期間
海産微細藻類を用いた生長阻害試験法	藍藻 <i>Cyanobium</i> sp., 珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> 、 緑藻 <i>Dunaliella primolecta</i>	生長速度（生長阻害）	72 h
海産大型緑藻類を用いた生長阻害試験法	アオサ <i>Ulva aragoënsis</i>	遊走子のバイオマス	72 h
海産大型褐藻類を用いた生長阻害試験法	シオミドロ <i>Ectocarpus siliculosus</i>	バイオマス	7 d
海産甲殻類シオダマリミジンコを用いた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>Lysmata 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	マミチヨグ <i>Fundulus heteroclitus</i> ジャワメダカ <i>Oryzias javanicus</i>	致死・ふ化	10 d

海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法
（検討案）

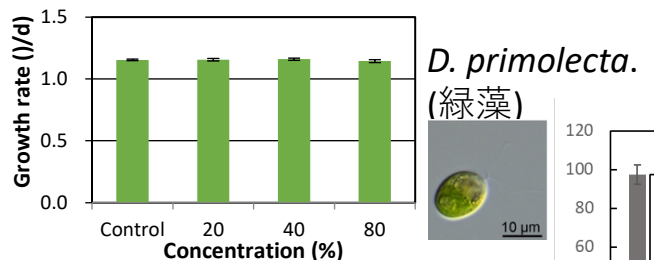
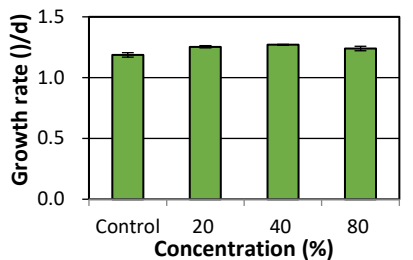
令和3年3月
国立環境研究所
水産研究・教育機構
海洋生物環境研究所
鹿児島大学

海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法
（検討案），100p，2021
年3月発刊

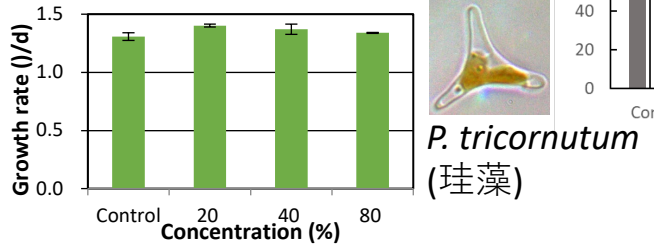
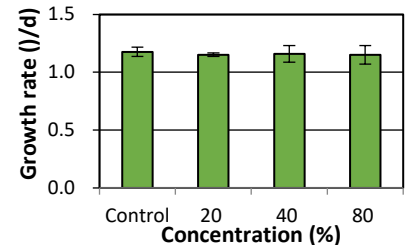
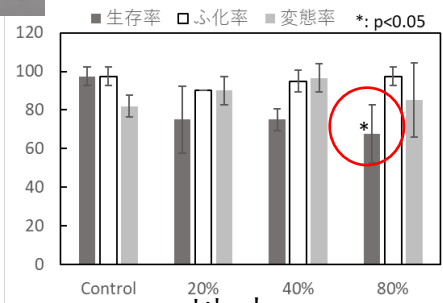
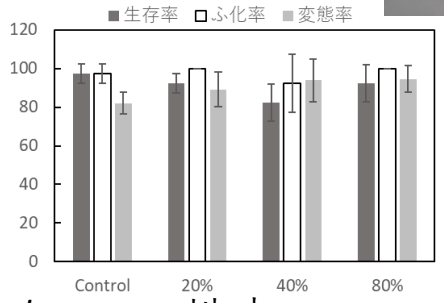
実環境水を用いたケーススタディ (結果1)



藍藻、アミ、カイアシで
地点B(80%)から有害影響
を検出

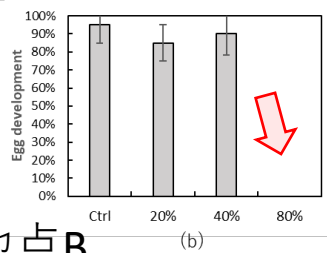
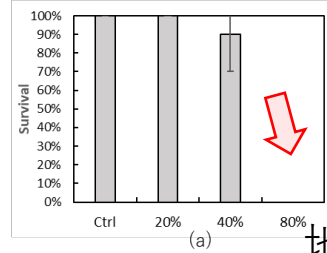
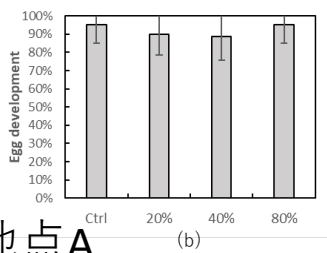
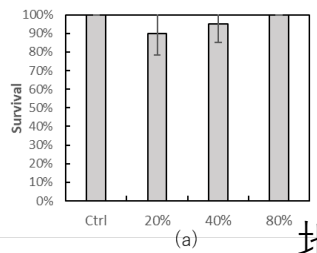


カイアシ

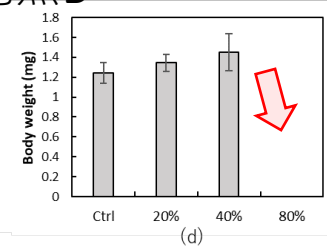
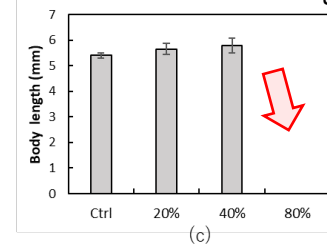
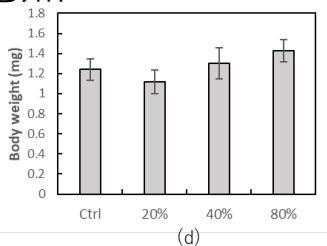
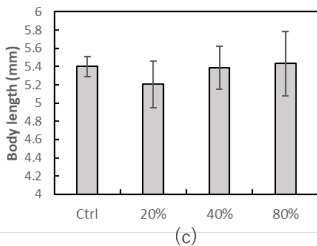


地点A

地点B



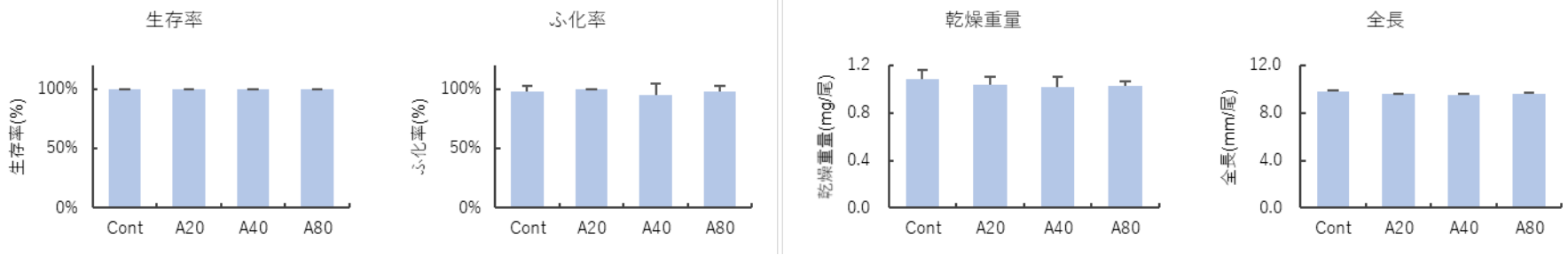
汽水産アミ



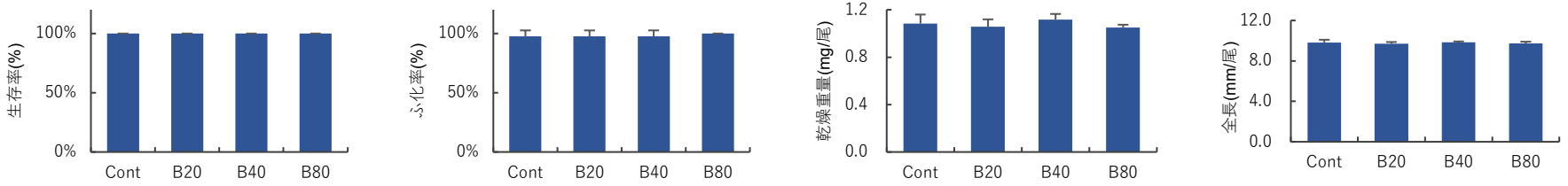
実環境水を用いたケーススタディ（結果2）

マミチヨグを用いてケーススタディを実施し、適用妥当性を検討

試料A



試料B

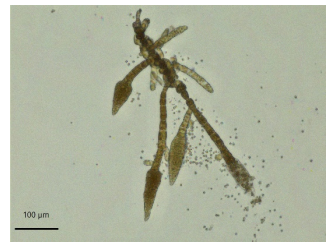



いずれの地点で採取した海水においても、
ふ化率、生存率、および成長指標に差は認められなかった。

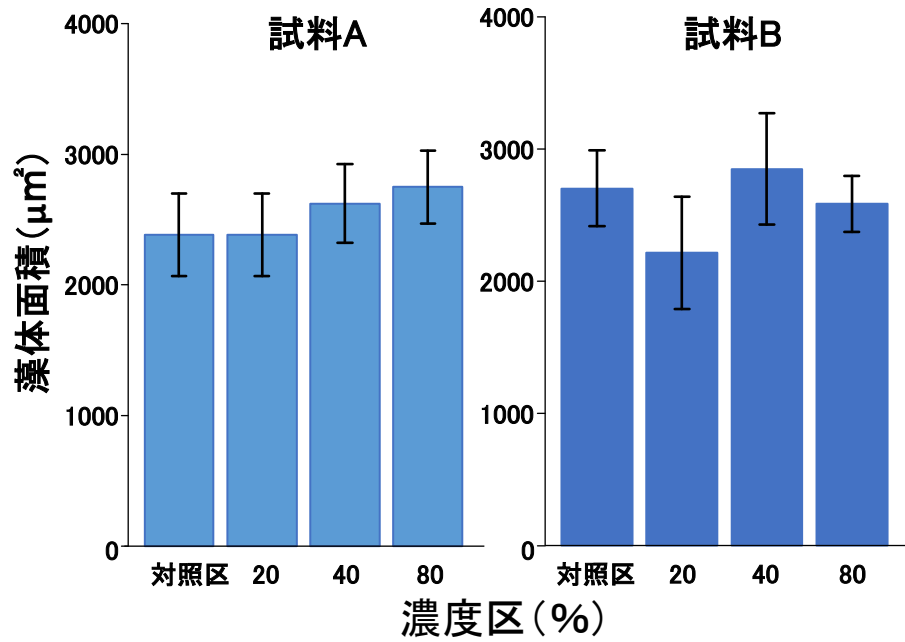
実環境水を用いたケーススタディ (結果3)

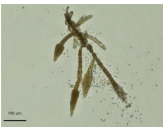
大型藻類

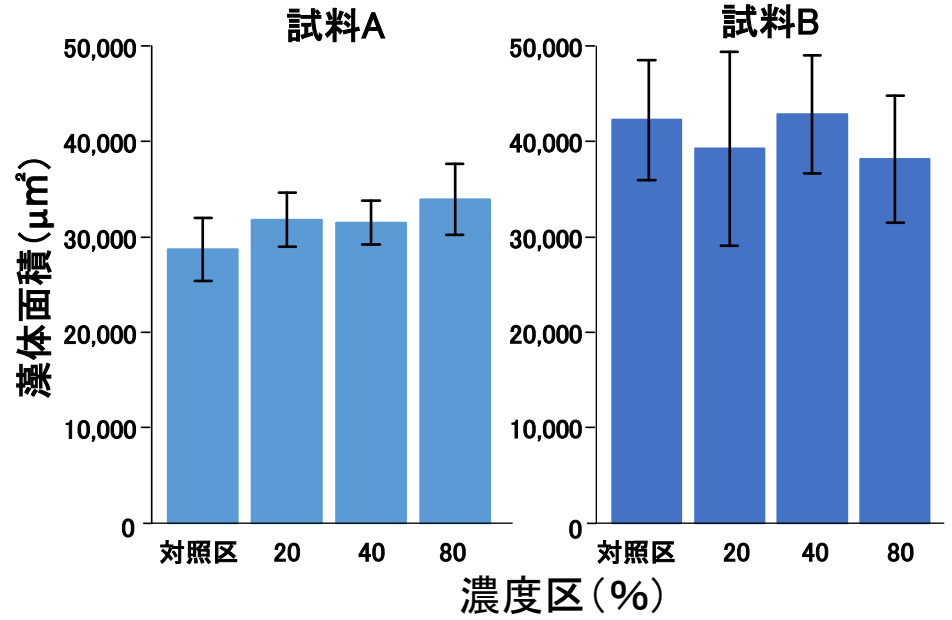
・アオサおよびシオミドロを用いた
ケーススタディ試験を実施



アオサ 



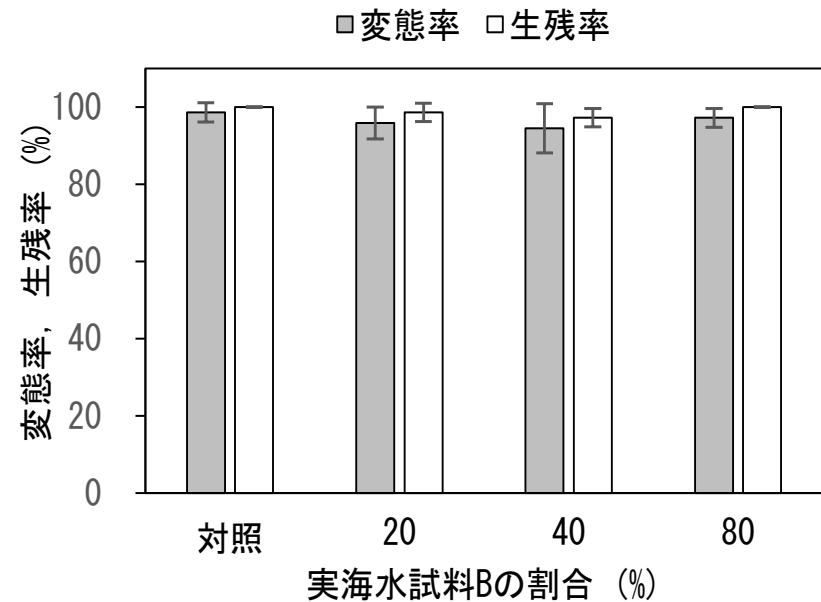
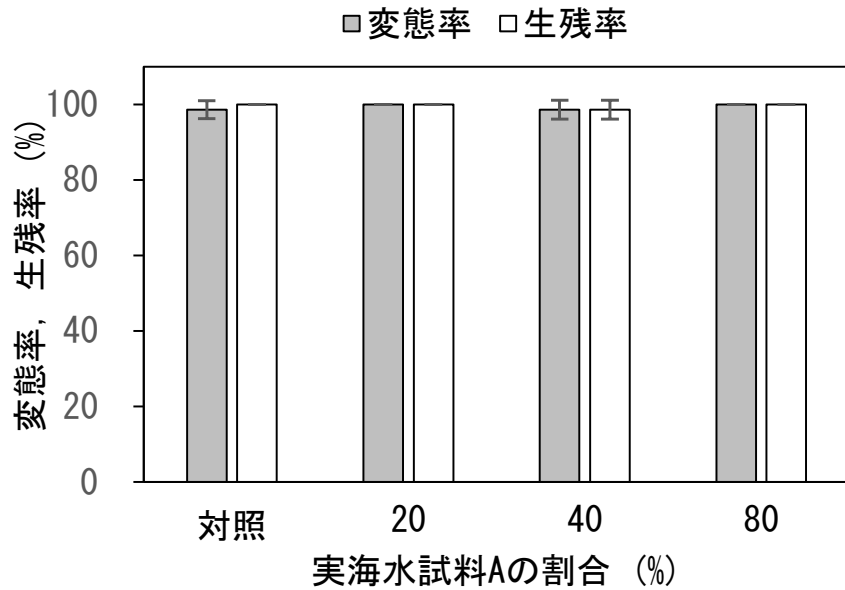
シオミドロ 



対照区と比較して有意差あり(p<0.05)、エラーバーは標準偏差を示す

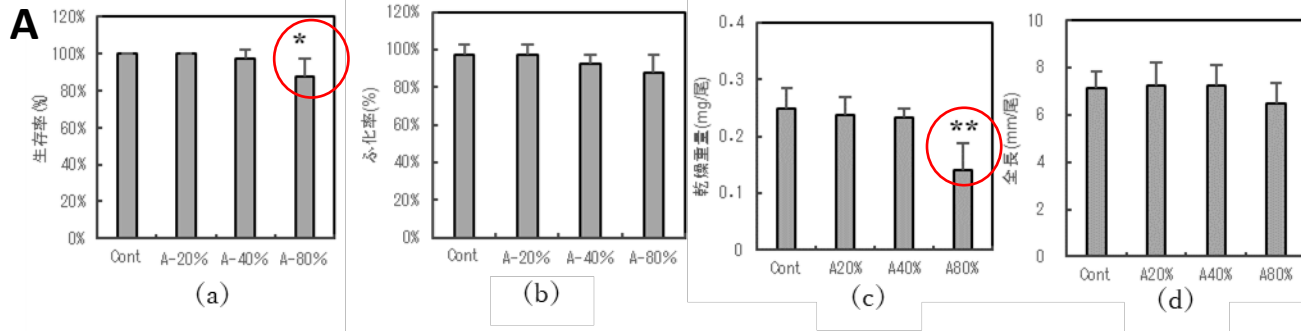
何れの試料においても有意差は認められなかった

実環境水を用いたケーススタディ (結果4)

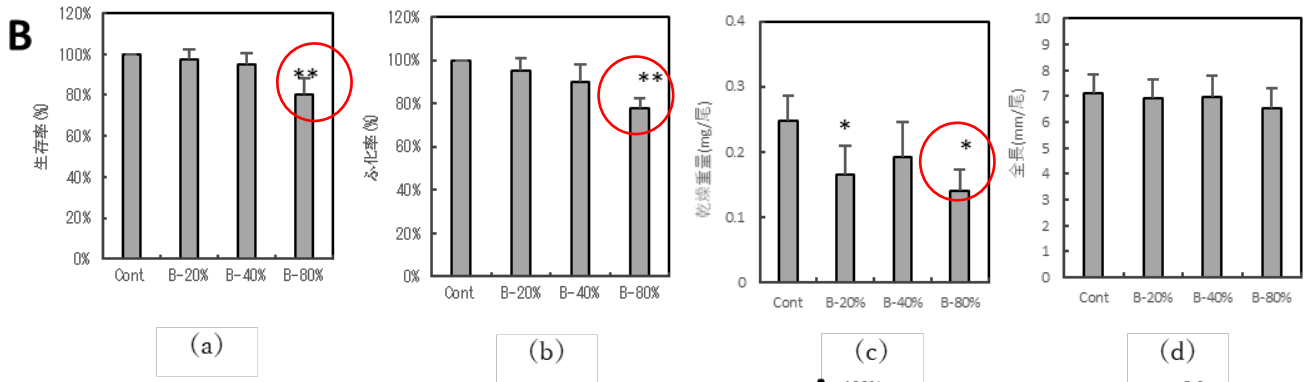


シオダマリミジンコの変態への影響はいずれの試料も確認されなかった

実環境水を用いたケーススタディ (結果5)



ジャワメダカでは、試料AおよびBともに最高濃度区で有害影響が検出



ヨコエビ・フサゲモクズには有害影響検出されず

