

短報

ムレミカズキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いた複合影響試験の検討

古閑豊和・柏原学・志水信弘・石橋融子

ムレミカズキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いて塩化亜鉛とドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(DBS)の単独ばく露試験及び複合影響試験を実施した。単独ばく露試験の結果、塩化亜鉛の72h-EC₅₀は0.083 mg/L (亜鉛換算)、DBSの72h-EC₅₀は120 mg/Lとなった。等効果線法による複合影響試験の結果、塩化亜鉛とDBSの混合物は相加効果の可能性が示唆された。しかし、水環境中の亜鉛とDBS濃度は低いいため藻類に対して相加的影響をもたらす可能性は低いと考えられる。

[キーワード: *Pseudokirchneriella subcapitata*、複合影響、全排水毒性]

1 はじめに

多くの化学物質は人間活動にとってかかせないが、その全ての化学物質を分析し、リスクを管理することは困難である。そのため欧米では魚類や甲殻類、藻類による生物応答を活用した指標によって化学物質を含む事業場排水等の規制を行っている。生物応答を活用した指標の利点は、従来の機器分析では把握できない複数の化学物質による影響を評価できることである。

また、生物応答を用いた排水試験法(検討案)¹⁾による藻類試験は試験期間が72時間であり、ミジンコ繁殖試験(最長8日間)や、胚・仔魚期を用いる魚類短期毒性試験(ゼブラフィッシュ、8~10日間)と比較して短い。さらに、藻類試験はミジンコ急性遊泳障害試験(48時間)や魚類急性毒性試験(96時間)のような試験期間が短い急性毒性試験と比較しても、試験生物を維持するコストや労力がかからない利点がある。そのため、本研究では藻類を用いて複数の化学物質の複合影響について検討した。

2 実験方法

2・1 被験物質

モデルとなる被験物質として亜鉛及び直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(以下、LAS)を選択した。この2物質は近年、水生生物保全環境基準項目に設定され^{2,3)}、単独ばく露による毒性試験が報告されており、データの比較が可能である^{4,8)}。ただし、亜鉛は塩化亜鉛(和光純薬工業製、純度98%)を使用し、LASについてはドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(以下、DBS)(関東化学工業製、純度90%)を使用した。

2・2 藻類生長阻害試験(単独ばく露試験)

複合影響試験を実施するにあたり、被験物質のEC₅₀値を参考にばく露濃度を決定するため、本研究の藻類培養条件における被験物質の単独ばく露試験を実施した。

用いた藻類は国立環境研究所微生物系統保存施設から入手したムレミカズキモ(*Pseudokirchneriella subcapitata*(NIES-35))を用いた。これらをC培地により継代培養し、試験にはOECD培地に接種してから約3日後の細胞密度が $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mLに達したものを使用した。

単独ばく露試験の条件は平成15年11月21日薬食発第11210002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号通知の別添の方法に従い実施した。試験期間は72時間とした。水温は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光強度は $100 \pm 15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (連続照射)の条件下で維持した。培地は市販のOECD培地濃縮液(和光純薬工業製)を超純水で希釈して使用した。塩化亜鉛の濃度区はコントロール試験+6濃度区(設定濃度: 0.010~0.32 mg/L、公比2)とし、DBSはコントロール試験+6濃度区(設定濃度: 6.3~200 mg/L、公比2)で実施した。対照区は6連、その他濃度区は3連で実施した。

生物量は24時間毎に試験液を0.1~1 mL採取し粒子計測装置(CDA-1000、シスメックス社製)にて細胞数を測定した。なお、試験終了時に各試験で試験成立条件⁹⁾を満たしていることを確認した。

2・3 藻類生長阻害試験(複合影響試験)

複合影響試験は千坂ら¹⁰⁾、朴ら¹¹⁾、鏑迫ら¹²⁾の方法を参考に等効果線法(Isobole design)試験で実施した。単独ばく露試験で得られた試験開始後72時間の生長阻害半数影響濃度(以下72h-EC₅₀)を参考に複合影響試験のばく露濃度を設定した。背景物質としてDBSを選択し、主物質として塩化亜鉛を選択した。ばく露濃度については表1に示すように試験No.1~6まで設定した。試験の設定上、試験No.1と

No.6は塩化亜鉛とDBSの単独ばく露試験となっている。

なお、ばく露条件等は上記の2・2単独ばく露試験と同様に実施した。

2・4 被験物質分析方法

単独ばく露試験及び複合影響試験の被験物質濃度を試験前及び試験終了後に測定した。塩化亜鉛は亜鉛としてJISK 0102、53・4、ICP質量分析法にて測定した。DBSは平成15年厚生労働省告示第261号の陰イオン界面活性剤、別表第28号に定める方法にて測定した。各被験物質の試験開始前と試験終了後の測定濃度を幾何平均値として算出し、実測濃度として結果の解析を実施した。

2・5 統計解析方法

各試験のエンドポイント(成長速度)について最大無影響濃度NOEC(No observed effect concentration)及びx%阻害濃度ICx(x% inhibition concentration)を統計解析ソフトR¹³⁾を用いて算出した。統計処理の手法に関しては生物応答を用いた排水試験法(検討案)¹⁾に従った。Rの計算に用いる関数等は渡部¹⁴⁾の方法を参考にした。

3 結果及び考察

3・1 単独ばく露試験結果

塩化亜鉛とDBSの単独ばく露試験における細胞密度の経時変化と生長阻害率をそれぞれ図1と図2に示す。また各試験から求めた72h-EC₅₀、72h-EC₁₀、72h-EC₅、NOECを表2に示す。塩化亜鉛(亜鉛換算)の72h-EC₅₀は0.087 mg/L、DBSの72h-EC₅₀は130 mg/Lであった。DBSのNOECについて今回、最低試験濃度でも対照区と比較して有意差(p>0.05%)がなかったため算出できなかった。

単独ばく露試験で得られた72h-EC₅₀を文献^{4,8)}から得られた値と比較すると、塩化亜鉛(亜鉛換算)の72h-EC₅₀は0.061-0.11 mg/Lであり、今回の結果はその範囲内であった。また、DBSの72h-EC₅₀は83-103 mg/Lの範囲であり、今回の結果は文献値よりも高い値であったが、大きく値を外れておらず、結果に問題はないものと考えた。これら単独ばく露試験で得られた72h-EC₅₀を基に複合影響試験を実施した。

表2 単独ばく露試験結果

Chemical	Test concentration						72-h EC ₅₀ (95% confidence limit)	72-h EC ₁₀ (95% confidence limit)	72-h EC ₅ (95% confidence limit)	NOEC
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6				
Zn (mg/L)	Nominal concentration (mg/L)	0.0048	0.01	0.019	0.038	0.077	0.15			
	Actual concentration (mg/L)	0.005	0.009	0.016	0.029	0.063	0.11	0.083 (0.079-0.087)	0.042 (0.037-0.048)	0.033 (0.028-0.039)
DBS (mg/L)	Nominal concentration (mg/L)	6.2	12	25	50	100	200			
	Actual concentration (mg/L)	6.1	12	25	53	110	210	120 (110-140)	9.5 (6.4-12)	3.9 (2.2-5.6)

表1 複合影響試験のばく露濃度設定表

	(Background substance) DBS (mg/L)			(Main substance) ZnCl ₂ (mg/L)		
	No.1	0			0.08	0.16
No.2	10			0.08	0.16	0.32
No.3	40			0.08	0.16	0.32
No.4	80			0.08	0.16	0.32
No.5	120			0.08	0.16	0.32
No.6	Single exposure test DBS(mg/L)			0		
	50	100	200			

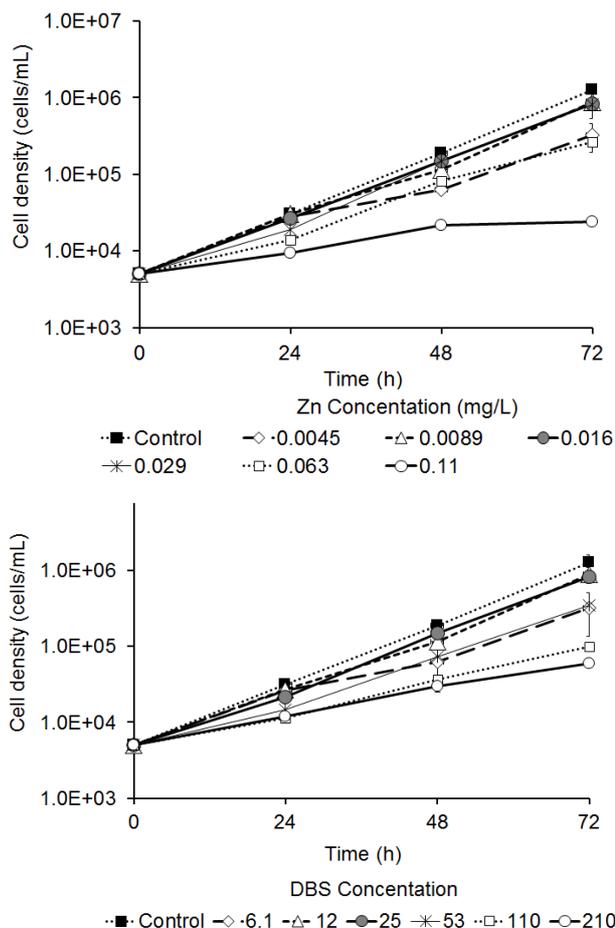


図1 細胞密度の経時変化(単独ばく露試験)

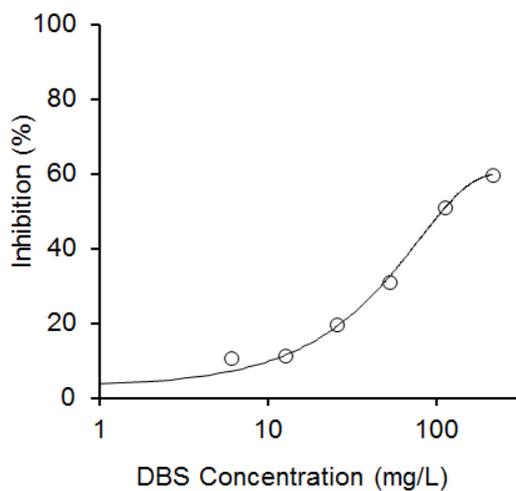
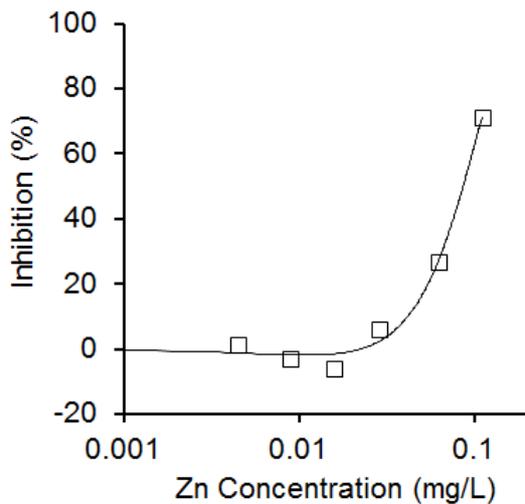


図2 生長阻害率（単独ばく露試験）

表3 複合影響試験結果（TU）

	TU (Zn)	: TU (DBS)
No.1	1.00	: 0
No.2	1.03	: 0.0617
No.3	0.701	: 0.247
No.4	0.471	: 0.494
No.5	0.374	: 0.741
No.6	0	: 1.00

3・2 複合影響試験結果

試験①～⑥で得られた結果はToxic Unit (TU)に変換した。背景物質であるDBSのTUは(式1)から求められる。試験①～⑤におけるDBS濃度を(式1)の【1】に代入し、試験⑥で得られた単独ばく露試験の72h-EC₅₀を式1の【2】に代入する。

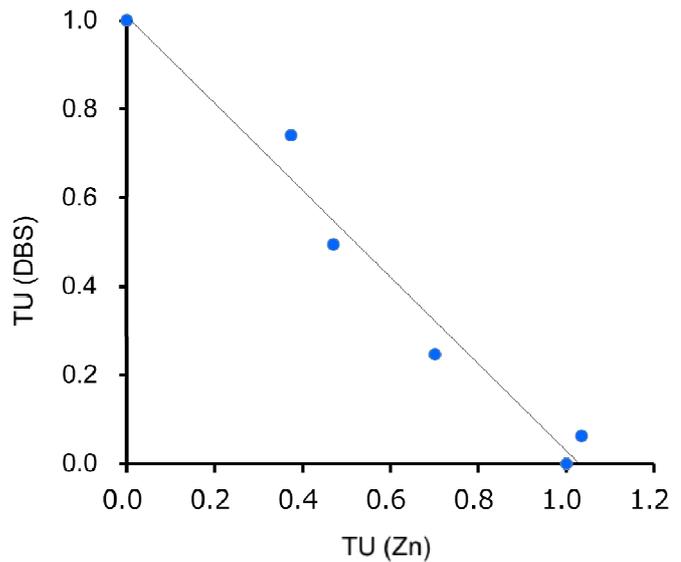


図3 塩化亜鉛とDBSの等効果線法試験結果

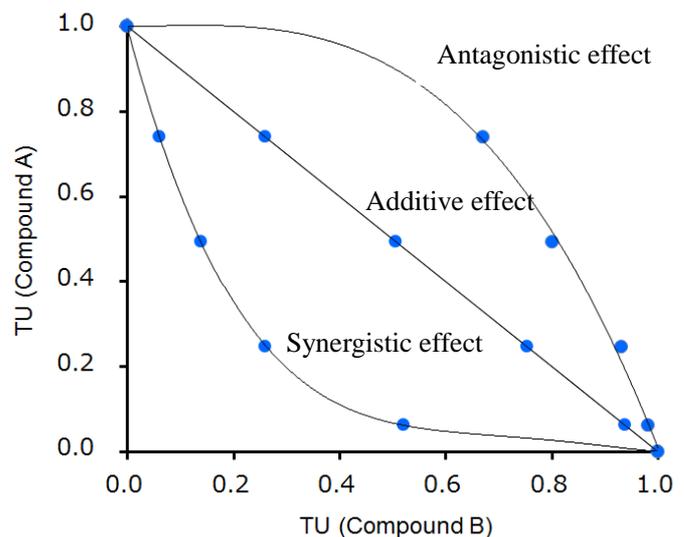


図4 等効果線法試験による相互作用の概念図

$$TU_{(No.1\sim6)} = \frac{【1】Conc_{.(DBS,No.1\sim6)}}{【2】EC_{50(No.6)}} \quad (式1)$$

$$TU_{(No.1\sim6)} = \frac{【1】EC_{50(Zn, No.1\sim6)}}{【2】EC_{50(No.1)}} \quad (式2)$$

また、主物質である塩化亜鉛のTUは(式2)から求められる。試験No.1～5における塩化亜鉛(亜鉛換算)の72h-EC₅₀を(式2)の【1】に代入し、試験①で得られた単独ばく露試験の72h-EC₅₀を(式2)の【2】に代入する。

なお(式1)と(式2)における【2】に用いるEC₅₀は単独ばく露試験として設定した試験No.1及びNo.6の値を

用いるため試験No.1及びNo.6のZnとDBSのTU値は0もしくは1となる。

各試験のTU値及び等効果線法試験結果をそれぞれ表3と図3に示す。千坂ら¹⁰⁾、朴ら¹¹⁾、鑓迫ら¹²⁾の報告を元に等効果線法試験結果における拮抗作用、相加作用、相乗作用の概念図を図4に示す。

図3と図4を比較すると相加作用を示す直線とほぼ同じ場所に結果がプロットでき、塩化亜鉛(亜鉛)とDBS(LAS)の混合物は相加作用を持つ可能性が考えられた。

また、環境水中の亜鉛とDBS濃度が藻類に与える複合影響を比較するため、平成27年度の福岡県内の河川水(類型指定河川)の亜鉛濃度とDBS(LASとして)濃度を文献調査した¹⁵⁾。その結果、亜鉛の平均値は0.001~0.005 mg/L、LASの平均値は<0.0006~0.0008 mg/Lであった。今回の研究で得られた亜鉛及びDBSのNOECや72h-EC₅₀は、環境水中濃度より高い。そのため、福岡県内河川水中において藻類に対して相加的影響により生長阻害をもたらす可能性は低いと考えられる。

4 まとめ

ムレミカズキモを利用した単独ばく露試験及び複合影響試験を検討した。単独ばく露試験で得られた72h-EC₅₀を基にばく露濃度を決定した結果、塩化亜鉛とDBSは相加作用を持つことが示唆された。また、水環境中の亜鉛とDBS(LASとして)濃度は低いため藻類に対して相加的影響をもたらす可能性は低いと考えられる。

(英文要旨)

Interaction of Chemicals in *Pseudokirchneriella subcapitata* Toyokazu KOGA, Manabu KASHIWABARA, Nobuhiro SHIMIZU and Yuko ISHIBASHI

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

We investigated exposure of *Pseudokirchneriella subcapitata* to zinc chloride and sodium dodecylbenzenesulfonate (DBS), both in single exposure tests and with exposure to both chemicals at the same time. In the single exposure tests, the half maximal effective concentration of zinc chloride at 72h was 0.083 mg/L (as Zn) and that of DBS was 120 mg/L. The results of the isobole method suggested that a mixture of zinc and DBS had an additive effect. However, based on the low concentrations of Zn (0.001-0.005 mg/L) and LAS (<0.0006-0.0008 mg/L) in river water in Fukuoka Prefecture in 2015. There is no possibility of a mixture of zinc and DBS having this additive effect on algae in the environment.

[Key words ; *Pseudokirchneriella subcapitata*, Interactive effect, whole effluent toxicity]

文献

- 1) 排水(環境水)管理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), 2014.
- 2) 環境省, 環境省通知環水企発031105001号・環水管発031105001号, 2003.
- 3) 環境省:環境省通知環水大水1303272号, 2013.
- 4) Pascal Radix *et al.*: *Ecotox. Environ. Safe.*, 47, 186-194 2000.
- 5) Michael A. Lewis: *Wat. Res.*, 25, 101-113, 1991.
- 6) Natasha M. Franklin: *Environ. Sci. Technol.*, 41, 8484-8490, 2007.
- 7) 浦野紘平ら: *水環境学会誌*, 39, 121-125, 2016.
- 8) 環境省, 化学物質の環境リスク評価, <https://www.env.go.jp/chemi/report/h19-03/pdf/chpt1/1-2-3-01.pdf>
- 9) 厚生労働省・経済産業省・環境省, 薬食発第11210002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号, 2003.
- 10) 千坂英雄: *雑草研究*, 31, 91-95, 1986.
- 11) 朴 明玉ら: *環境毒性学会誌*, 3, 23-32, 2000.
- 12) 鑓迫典久:平成25年度化学物質の複合影響評価に関するシンポジウム資料, 2014.
- 13) R development core team: *R:Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>
- 14) 渡部春奈ら: *環境化学*, 25, 43-55, 2015.
- 15) 環境省, 平成27年度公共用水域水質測定結果, <http://www.env.go.jp/press/files/jp/104390.pdf>