

資料

生物応答を利用した排水水質評価手法の導入に向けた精度管理（比較）について

古閑豊和・柏原学・志水信弘・石橋融子

日本版WETの導入を目指し、ムレミカズキモを用いた藻類成長阻害試験及び胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いた魚類短期毒性試験法について検討を行った。藻類の培養や魚類飼育を円滑に進めるために培養チャンバーと魚類集合水槽を作成した。当所における標準物質を用いた感受性試験の結果を文献値と比較した結果、本研究所の試験体制で問題ないことを確認した。

[キーワード：全排水毒性、ムレミカズキモ、ゼブラフィッシュ]

1 はじめに

洗剤・農薬・医薬品類など人間活動に必要な化学物質の数は年々増加し、アメリカ化学会の Chemical Abstract Service(CAS)に登録されている化学物質は1億2900万種(2017年2月現在)を超えている¹⁾。これら化学物質の多くは大気環境や水環境中に排出されるが、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事業場排水の規制(全排水毒性、通称; WET)を行っている。我が国においても平成21年度より生物応答を用いた排水試験法(以下; 日本版 WET)について技術面と制度面で検討され、事業者へ自主管理制度として法制化の動きがある。しかしながら、日本版 WET の導入にあたっては環境調査を含めた科学的知見が不足していることが指摘されている^{2,3)}。福岡県内についても日本版 WET による水質評価の事例は無い。

そのため、本研究では日本版WETによる水質改善への活用方法を検討するため試験体制の確立を目的とし、当所における感受性試験結果と文献値との比較を行った。

2 検討内容

2・1 試験生物

『生物応答を用いた排水試験法(検討案)』⁴⁾(以下、試験法(案))によると、藻類、甲殻類、魚類の3種の水生生物を用いて排水評価を行う。また推奨生物は、藻類がムレミカズキモ(*Pseudokirchneriella subcapitata*)、魚類がゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)、甲殻類がニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)である。本研究所では藻類や魚類試験に関連する研究事例があることから^{5,6)}、藻類と魚類の試験体制を確立することとした。試験生物種は国立環境研究所から分譲されたムレミカズキモ(NIES-351、図1)及びゼブラフィッシュ(NIES系統、図2)を用いた。

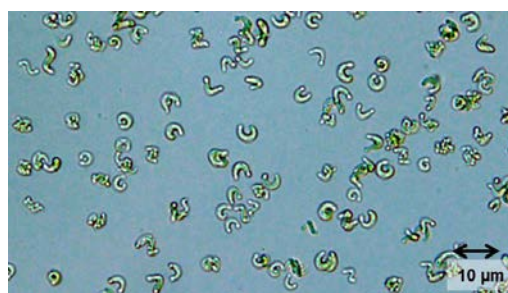


図1 ムレミカズキモ



図2 ゼブラフィッシュ

2・2 藻類培養方法

① 藻類の継代培養

藻類保存株の継代培養はC培地のスラント⁷⁾を用いた。スラントはガラス容器に液体C培地500 mLにつき7.5 gの寒天を加えオートクレーブ後、試験管に分注し、傾けて作製した。作製したスラントは使用するまで冷蔵庫(4℃)にて保存した。藻類の継代は生育状態の良い保存株を選び、1つのスラントから3つの新しいスラントへ接種した。接種等の操作はクリーンベンチ内で無菌的に実施した。継代した保存株の維持は温度勾配恒温器(MTI-201、東京理化学器械株式会社)で行った。維持温度は23±1℃、光強度は80~100 μmol/m²/sとして、十分に増殖させたのち、光強度を弱くして2~3週間維持するものと冷蔵庫(4℃)にて維持するものに分け継代保存した。なお、用いたガラス容器等は乾熱滅菌(160℃、3時間程度)もしくはオートクレー

ブ処理後使用した。

② 試験株の培養

試験法（案）では藻類生長阻害試験の条件は温度21～24℃の範囲内を維持（変動幅±2℃以内）すること、さらに光強度は60～120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とし、100 rpmで振とう培養することとなっている。今回この条件を満たすため図3に示すように恒温室内に藻類培養チャンバーを制作した。チャンバー内の温度管理のため小型ファン（アクアクールファン、GEX製）6個と専用サーモスタット（FE-101、GEX）をとりつけた。さらに温度変化を確認するため防水温度ロガー（ティドビット v2、CLIMATEC社）にて温度を測定した。測定結果を図4に示す。チャンバー内の温度変化範囲は23～24℃であった。

また、照明装置として白色蛍光灯T5HO（Sunbaster）を取り付けチャンバー内の光強度は $100 \pm 15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ となるように調整した。振とう機はオービタルシェイカー（AS-MOR、As One製）を使用した。

藻類生長阻害試験に使用する試験株の培養にはOECD培地⁴⁾を使用した。ただし、保存状態から試験条件に移すと順調に増殖を開始するまでに遅延が生じる恐れがあるため⁸⁾試験に用いるまで以下【1】～【4】に示すように前々培養及び前培養を実施した。

【1】 スラントから液体C培地へ接種

300mLフラスコに100 mLのC培地を分注しスラントから接種し、96時間培養した。96時間培養後、粒子計測装置CDA-1000（シスメック社）で細胞濃度を測定した。

【2】 前々培養

300 mLフラスコに100 mLのOECD培地を分注し、増殖の良好な【1】の培養液を $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように添加し72時間培養後、粒子計測装置CDA-1000（シスメック社）で細胞濃度を測定した。

【3】 前培養

前述【2】と同様に300 mLフラスコに100 mLのOECD培地を分注し、増殖の良好な【2】の培養液を $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように添加し48～72時間培養後、細胞濃度を測定した。

【4】 本試験

300 mLフラスコに100 mLのOECD培地を分注し、増殖の良好な【3】の培養液を $5 \times 10^3 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように添加し試験に用いた。当研究所の培養条件における藻類の成長速度を図5に生物量の変化を図6に示す。細胞倍加時間は約10.2時間であった。



図3 藻類培養チャンバー

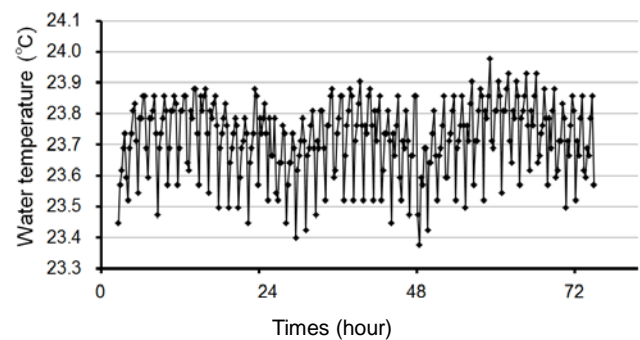


図4 チャンバー内の温度変化

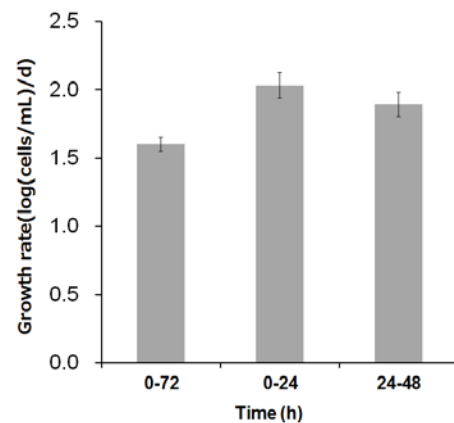


図5 ムレミカズキモの成長速度

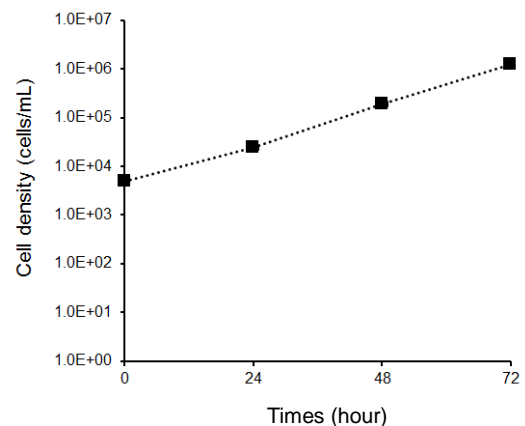


図6 ムレミカズキモの細胞数の変化

2・3 ゼブラフィッシュ飼育条件

ゼブラフィッシュの飼育条件は試験法（案）に従った。水温は $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ で照明16時間/8時間（明/暗）とした。飼料はふ化直後のアルテミアを1日につき2回（午前9時と午後16時）給餌した。

飼育当初はアクリル製水槽（幅60cm）で親魚を飼育していた（止水式）。しかし、換水など飼育管理が煩雑となるために集合飼育装置（半止水式）を制作した。飼育装置の製作にあたっては、名古屋市環境科学調査センター⁹⁾や国立環境研究所環境リスク・健康研究センターの流水式飼育装置を参考とした。飼育装置の外観図を図7に示す。配管は可能な限りテフロン製を使用し、循環ろ過槽等はステンレス製を用いた。また配管の途中で殺菌のため紫外線照射装置（ターボツイストZ、カミハタ）を取り付けた。飼育用のガラス水槽は、接着剤等を使用していない一体成形のガラス水槽（8Lと14L）を使用した。

また、飼育水は活性炭通水ろ過後の水道水を投げ込み式の紫外線ランプとエアープンプで通気しているステンレス貯水槽に貯めておき、一日で飼育装置の半分程度の水が替わるように循環ろ過槽に通水させた。

なお、温度管理はチタンヒーター（SHI型、IWAKI）とサーモコントローラー（TC-101、IWAKI）にて実施し、市販の熱帯魚用ヒーターを補助的に使用した。

試験に使用する受精卵は受精率が高い雌（4ヶ月齢以上）が産卵したものをを用いた。雌はガラス水槽に2~3匹づつ分けて飼育した。

受精卵は採卵前日に直系2cm程度のガラスビーズを敷き詰めたガラス水槽（14L）にメス2~3匹を入れておき、採卵日の朝にオス6~9匹を投入し産卵させ採取した。その後、双眼実体顕微鏡（ST-302、As One）で受精卵の選定し、卵割が正常に進んでいる受精卵のみ試験に使用した。

なお、常に状態の良い受精卵を得るために採卵は試験の実施に関係無く約7日間おきに実施する必要がある。

3 感受性試験

3・1 藻類生長阻害試験

標準物質として試験法（案）で推奨されている重クロム酸カリウム($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、和光純薬工業、純度99.5%)を用いて感受性試験を実施した。濃度区は公比2で6濃度区設定した（濃度範囲：0.08~2.56 mg/L）。試験条件等は試験法（案）に従った。試験のエンドポイント（成長速度）については最大無影響濃度NOEC(No observed effect concentration)及びx%阻害濃度 IC_x (x% inhibition concentration)を統計解析ソフトR¹⁰⁾を用いて算出した。表1に結果を示す。得られた IC_{25} の値は0.87 mg/Lであり、文献値¹¹⁾0.45~1.01 mg/Lの範囲内となった。よって、本研究所の培養条件等で問題な

いことを確認した。

3・2 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

標準物質に試験法（案）で推奨されている塩化ナトリウム（NaCl、和光純薬工業、水質試験用、純度99.5%）を用いて感受性試験を実施した。濃度区は公比2で5濃度区設定した（濃度範囲：312.5~5000 mg/L）。試験条件等は試験法（案）のとおりとした。試験のエンドポイント（ふ化率、ふ化後生存率、生存率、生存指標）については無影響

表1 藻類成長阻害試験結果

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (mg/L)	成長速度
NOEC	0.16
IC_{10}	0.53
IC_{25}	0.87
IC_{50}	1.42
IC_{25} ^{a)}	0.45-1.01

a) Data were obtained from reference¹⁰⁾

表2 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験結果

NaCl (g/L)	H	P	S	T
NOEC	1.25	1.25	1.25	1.25
IC_{10}	0.81	2.00	1.34	1.34
IC_{25}	1.65	3.50	1.93	1.89
IC_{50}	3.37	5.92	2.76	2.68
IC_{25} ^{a)}	1.21-8.29	1.55-5.95	0.67-5.02	0.72-4.10

H:Hatchability, P:Post-hatch survival, S:Survival, T: Total index

a) Data were obtained from reference¹⁰⁾



図7 集合飼育装置

濃度NOEC(No observed effect concentration)及びx%阻害濃度IC_x(x% inhibition concentration)をフリーの統計解析ソフトR¹⁰⁾を用いて算出した。表2に結果を示す。文献値¹¹⁾との比較の結果、全てのエンドポイントで文献値の範囲内であり、本研究所の飼育条件等で試験が実施できることを確認した。

4 まとめ

藻類成長阻害試験及び胚・仔魚期の魚類を用いた短期毒性試験法について検討を行った。藻類の培養や魚類飼育を円滑に進めるために培養チャンバーと魚類集合水槽を作成し、生物応答試験を実施する体制を確立した。また、標準物質を用いた感受性試験を行い、他機関の結果と比較した結果、当所の試験条件は妥当であった。今後、排水や河川水等を用いた生物応答試験を実施する予定である。

文献

- 1) Chemical Abstracts Service, <http://www.cas.org/>
- 2) 環境省：生物応答を利用した排水管理手法の活用について（検討会報告書）。
- 3) 一般社団法人日本経済団体連合会ホームページ, <http://www.keidanren.or.jp/policy/2016/007.html>
- 4) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討文科会：生物応答を用いた排水試験法（検討案），2014.
- 5) 田中義人ら：福岡県保健環境研究所年報第42号，74-79，2015.
- 6) 馬場義輝：福岡県保健環境研究所年報第39号，104-106,2012.
- 7) 国立環境研究所ホームページ, <http://mcc.nies.go.jp/02medium.html>
- 8) 国立環境研究所：藻類成長阻害試験（平成18年11月版）。
- 9) 長谷川絵里ら：名古屋市環境科学調査センター年報，64-66，2014.
- 10) R development core team: R:Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>
- 11) 渡部春奈ら：環境化学，25，43-55，2015.