

## 短報

# ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いた全排水毒性試験の検証 と事業場排水への適用

古閑豊和、柏原学、志水信弘、石橋融子

ニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)を用いた飼育の検討、感受性試験及び排水を用いた繁殖試験を実施した。恒温槽は試薬類等を使用していない実験室に設置することで親ミジンコの死亡率が低下した。また、飼育水を市販のミネラルウォーターにすることで産仔数が安定した。この飼育条件下でマスカルチャー（集団飼育）からシングルカルチャー（個別飼育）に移行後、5週間程度で平均産仔数が試験開始条件に達した。塩化ナトリウムを用いた感受性試験の結果、NOEC及びIC<sub>25</sub>がそれぞれ、0.77 g/L、0.88 g/Lとなった。今回得られたIC<sub>25</sub>は国内試験機関で試験した結果の範囲内であった。排水を用いた試験では、PMSDが27%となりUS EPAが基準とする試験精度が確認された。

[キーワード： *Ceriodaphnia dubia*、全排水毒性試験]

## 1 はじめに

近年、水環境中に排出される化学物質の管理手法として生物応答を用いた排水管理が注目されている<sup>1)</sup>。生物応答を活用した指標の利点は、従来の機器分析で把握することのできない複数の化学物質の影響を評価できることであり、欧米では生物応答を用い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。我が国では、2010年度より環境省が新しい排水管理手法として全排水毒性試験(Whole Effluent Toxicity、略称；WET)の導入について検討を行っている<sup>2)</sup>。WET手法で用いられる生物は、藻類、甲殻類、魚類の3種類の水生生物であり、これらを用いて排水の毒性影響を網羅的に検知する。WET手法において甲殻類はニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験を行うこととなっている<sup>2)</sup>。

ミジンコ繁殖試験では産仔数を評価に用いるが、ニセネコゼミジンコの産仔数は飼育水等の影響を受けることが多い。長谷川ら<sup>3)</sup>や小林ら<sup>4)</sup>によるとニセネコゼミジンコの飼育水は硬度が重要であることを報告しており、市販のミネラルウォーターを水道水で希釈して飼育水としている。一方、杉山らは活性炭を通した水道水を使用し飼育を行っている<sup>5)</sup>。そこで今回、当研究所におけるニセネコゼミジンコの飼育水をはじめとする飼育条件を検討し、さらに試験の有効性を検証するために感受性試験及び排水を用いたミジンコ繁殖試験を実施し、試験体制を確立したの

で報告する。

## 2 実験方法

### 2・1 試験生物

試験生物として『生物応答を用いた排水試験法(検討案)』<sup>6)</sup>(以下、試験法(案))に従い、国立研究開発法人国立環境研究所アクアトロン分譲センターより分譲されたニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)<sup>6)</sup>を用いた(図1)。

### 2・2 恒温装置の設置場所

飼育及びミジンコ繁殖試験に使用した恒温槽(MTI-201、東京理化器械株式会社製)は外気を取り入れる構造になっていることから、設置場所によるミジンコの生存率への影響を検討した。設置場所は有機溶媒等の試薬類を使用する実験室と試薬類を使用しない実験室を選択した。

### 2・3 飼育容器

ニセネコゼミジンコを飼育する容器として300 mLガラス製ビーカーと50 mLガラス製スナップカップを用いた。容器はアルカリ性洗剤で超音波洗浄後に硝酸洗浄とアセトン洗浄を行ってから使用した。

### 2・4 飼育水

飼育水は、長谷川ら<sup>3)</sup>や小林ら<sup>4)</sup>を参考にコントレック

ス (Nestle 製) を硬度が 80 mg/L となるように水道水で希釈した飼育水と廣瀬らの報告<sup>7)</sup>を参考に飛騨の水 (飛騨名水株式会社製、硬度: 85.9 mg/L) を使用した。水道水は活性炭に通水後、紫外線殺菌及びエアレーションしたものを使用した。

## 2・5 飼育条件

ニセネコゼミジンの飼育は、マスカルチャー (集団飼育) で行い、その後シングルカルチャー (個別飼育) を行った。マスカルチャーは 300 mL ガラス製ビーカーに飼育水 200 mL を入れて 10-20 匹の親ミジンコを飼育した。

マスカルチャーは 1 週間に 3 回水替え (月・水・金) を行った。仔ミジンコの採取は、原則として毎日行った。また、2 週間ごとに新しいマスカルチャーを作成した。

シングルカルチャーは、親ミジンコが産仔した後 24 時間以内の仔ミジンコを飼育水 15 mL を入れた 50 mL ガラス製スナップカップに一匹ずつ分け、合計 35 匹飼育した。シングルカルチャーの継代は 7 日間ごとに産仔数が多い親ミジンコから行った。水替えは 1 週間に 3 回 (月・水・金) 行った。

餌は、 $1.00 \times 10^8$  個/mL となるように希釈したクロレラ (Recenttek 製) をマスカルチャーでは 200  $\mu$ L、シングルカルチャーでは 50  $\mu$ L を毎日給餌した。さらに YCT (Yeast Cerophyll and Trout Chow, Recenttek 製) をマスカルチャーでは 200  $\mu$ L、シングルカルチャーでは 50  $\mu$ L 毎日給餌した。

水温は試験法 (案) に従い  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  とした。光条件は明暗時間がそれぞれ 16 時間及び 8 時間の長日条件とした。

マスカルチャーからシングルカルチャーへ移行後の産仔数の変化を継代毎に記録し、平均産仔数が試験開始条件である 15 匹以上を満たすまでの回数を検討した。

## 2・6 標準物質を用いた感受性試験

試験法 (案) に従い、塩化ナトリウム (和光純薬工業製、水質試験用、純度 99.5%) を標準物質として感受性試験を行った。試験濃度は、公比 1.4 の 5 濃度区 (0.390-1.50 g/L) で実施した。試験に用いたミジンコは、シングルカルチャーにて親ミジンコの死亡率が 10% 以下で三腹分の合計産仔数が 15 匹以上かつ三腹目が 8 匹以上の親ミジンコから得られた仔ミジンコを用いた。水温、光条件及び試験成立条件は試験法 (案) に従った。

## 2・7 排水を用いたミジンコ繁殖試験

藻類生長阻害試験で影響が確認された事業場排水 (1 試料) を用いたミジンコ繁殖試験を行った。排水試料は 40  $\mu$ m ナイロンフィルター (メルク社製) でろ過後、試験に使用するまで冷蔵庫 ( $4^\circ\text{C}$ ) にて保存した。試験濃度区は、公

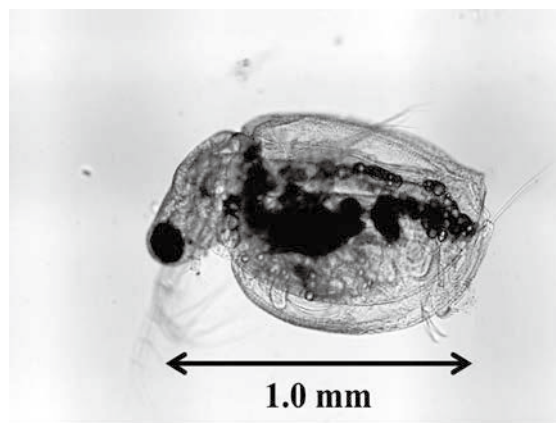


図 1 ニセネコゼミジンコ

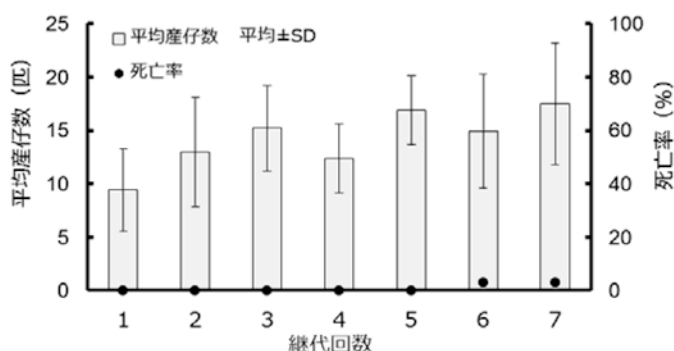


図 2 継代毎の平均産仔数の変化

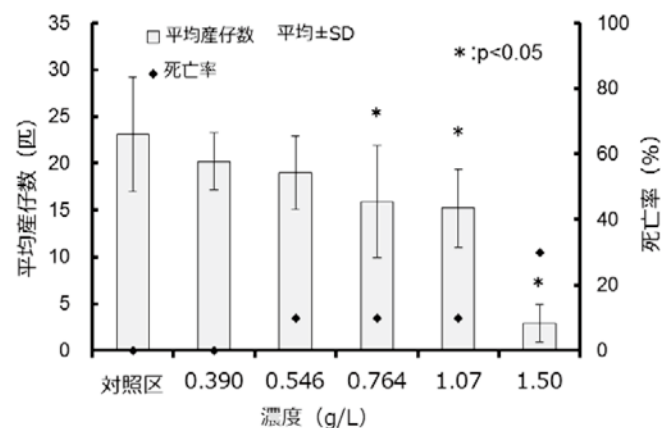


図 3 感受性試験結果

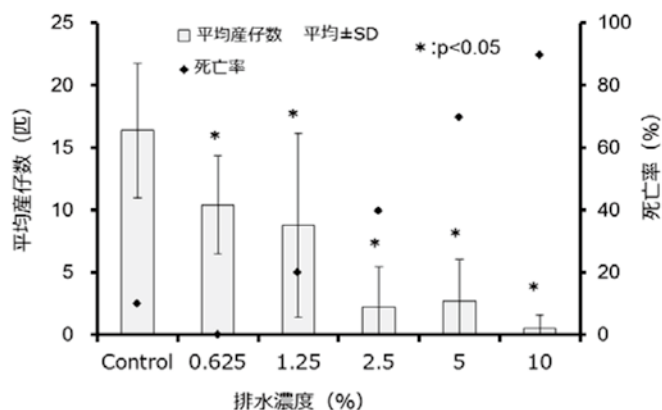


図 4 排水を用いたミジンコ繁殖試験結果

比2の0.63-10%で行った。水温、光条件及び試験成立条件は試験法(案)に従った。また、排水試験の有効性を、最小有意差の影響値であるPMSD(Percent of MSD)<sup>8-10)</sup>を算出することによって行った。

## 2・8 統計解析方法

各試験のエンドポイント(産仔数)について最大無影響濃度NOEC(No observed effect concentration)及びx%阻害濃度IC<sub>x</sub>(x% inhibition concentration)を統計解析ソフトR<sup>11)</sup>を用いて算出した。このときRの計算に用いる関数等は渡部ら<sup>8)</sup>の方法を参考とし、統計処理手法は試験法(案)に従って行った。

## 3 結果及び考察

### 3・1 恒温槽の設置場所における室内環境の影響

試薬類を使用している実験室に恒温槽を設置した場合にマスカルチャーでは親ミジンコの死亡が頻繁に確認された。またシングルカルチャーにおいて1週間飼育した親ミジンコの死亡率が80%以上であった。

一方、試薬類を使用していない実験室に恒温槽を設置した場合には、マスカルチャーにおける親ミジンコの死亡がほとんど確認されなかった。また、シングルカルチャーにおいても1週間飼育した親ミジンコの死亡率は10%以下であった。実験室内の雰囲気は親ミジンコの状態に影響を与える可能性が示唆されたため、恒温槽は試薬類を使用していない実験室に設置することとした。

### 3・2 飼育水の影響

コントレックスを水道水で希釈した飼育水で飼育した場合にシングルカルチャーで継代を繰り返しても3腹目の平均産仔数が15匹以上とならなかった。その詳しい原因は判らなかつた。

一方、飛驒の水を用いた場合には、後述するようにシングルカルチャーの産仔数が継代を繰り返すことで15匹以上となったことから、飼育水として飛驒の水を使用することとした。

### 3・3 産仔数の変化

マスカルチャーから移行後のシングルカルチャーの産仔数及び死亡率の変化を図2に示す。移行後、継代4回目(4週目)までは産仔数が試験開始条件である平均産仔数15匹を満たさない場合があった。しかし、継代5回目(5週目)以降は産仔数の平均が連続して15匹以上となった。親ミジンコの死亡率については全て試験開始条件(試験前7日間の平均死亡率が20%を超えないこと)を満たした。

当研究所の飼育環境においてマスカルチャーからシン

グルカルチャーへ移行後は5週間程度で試験開始条件の産仔数に達することが分かった。

## 3・4 感受性試験結果

塩化ナトリウムを用いた感受性試験における産仔数の変化を図3に示す。死亡率は、最高濃度区である1.5 g/Lで30%となった。NOECは0.77 g/L、IC<sub>25</sub>は0.88 g/Lとなり、文献値<sup>11)</sup>のIC<sub>25</sub>である0.47-1.48 g/L(平均0.87 g/L)の範囲内であった。よって、本研究所の飼育管理条件で試験精度が確認された。

## 3・5 排水を用いたミジンコ繁殖試験結果

排水を用いたミジンコ繁殖試験結果を図4に示す。死亡率は、最高濃度区である10%濃度区で90%となった。IC<sub>25</sub>は1.5%、IC<sub>50</sub>は5.3%となり、PMSDは27%となった。US EPAではPMSDの上限値<sup>8-9)</sup>を超えたデータについては再試験を推奨しているが、今回の結果は27%で、US EPAのPMSDの上限値<sup>8-9)</sup>である37%以下であった。今回の排水試験結果により本研究所の飼育条件で試験精度が確認された。

## 4 まとめ

ニセネコゼミジンコを用いたミジンコ繁殖試験について恒温槽の設置場所と飼育水について検討し、感受性試験及び排水を用いたミジンコ繁殖試験を行った。恒温槽は試薬類を使用していない実験室に設置することで親ミジンコの死亡率が低下し、飼育水は飛驒の水を使用することで産仔数が安定した。マスカルチャーからシングルカルチャーへ移行後、試験開始条件に達するまで5週間程度かかった。塩化ナトリウムを標準物質とした感受性試験の結果、IC<sub>25</sub>は0.88 g/Lとなり問題なく試験できていた。また、排水を用いたミジンコ繁殖試験では、PMSDが27%となり、問題なく試験できていた。今回の検討で本研究所の飼育条件を決定し、全排水毒性試験におけるミジンコ繁殖試験を実施できる体制を確立した。

## 文献

- 1) 鎌迫典久：生物応答を用いた排水評価・管理手法の国内外最新動向，株式会社エヌ・ティー・エス，156，2014。
- 2) 環境省，生物応答を利用した排水管理手法について，<https://www.env.go.jp/press/files/jp/28556.pdf>，2015。
- 3) 長谷川絵里ら：名古屋市環境科学調査センター年報，81-83，2012。
- 4) 小林弘明ら：川崎市環境総合研究所年報，87-92，2014。
- 5) 杉山 寛ら：千葉県環境研究センター年報，2015。
- 6) 排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），  
<https://www.env.go.jp/press/files/jp/28557.pdf>, 2013.
- 7) 廣瀬佳則ら：第40回環境保全・公害防止研究発表会  
講演要旨集，106-107，2013.
- 8) 渡部春奈ら：環境化学，25，43-53，2015.
- 9) US EPA: Short-term methods for estimating the chronic  
toxicity of effluents and receiving waters to freshwater  
organisms, Fourth edition. EPA-821-R-02-013, 269-275,  
2002.
- 10) US EPA: Understanding and Accounting for Method  
Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under  
the National Pollutant Discharge Elimination System, EPA  
833-R-00-003, 7.1-7.2, 2000.
- 11) R Core Team: R: Language and Environment for  
Statistical Computing. R Foundation for Statistical  
Computing. Vienna, Austria. Available at  
<http://www.R-project.org>, 2015.

(英文要旨)

## **Validation of *Ceriodaphnia dubia* Reproduction Test For Whole Effluent Toxicity and Application to Industrial Effluent**

**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 reproduction tests using industrial wastewater samples and sensitivity tests and breeding methods using *Ceriodaphnia dubia*. The mortality of parent daphnia decreased in a thermostat chamber placed in a laboratory without reagents. The number of neonates increased with the use of commercial mineral water. The average number of neonates of *Ceriodaphnia dubia* increased to the number of neonates of test start conditions at 5 weeks after switching from mass-culture to single-culture. In the sensitivity test using sodium chloride, the NOEC was 0.77 g/L and the IC<sub>25</sub> was 0.88 g/L. The results of the sensitivity test were within the range of the IC<sub>25</sub> of the Japanese ecotoxicological tests laboratory. In the *Ceriodaphnia dubia* reproduction test using industrial wastewater, the PMSD was 27%. There were no significant differences between the results of the developed tests and those obtained using the USEPA PMSD criteria (upper limit: 37%).

[Key words ; *Ceriodaphnia dubia*, whole effluent toxicity]