

2種のミジンコに対する化学物質の致死影響について

若林明子 紺野良子 西井戸敏夫

1 はじめに

種々の化学物質の水生生物に対する致死影響は、その生物の生息している水の性質、生物の種類や成長段階及び暴露日数によって大きく異なることが分かってきている。^{1,2,3)} 著者らは水生生物試験方法について検討してきているが、そのうち、生物の種類による違いについて、前報で魚の種類及び試験日数を変えていくつかの化学物質について致死影響を調べた^{1,3)}。今回は、実験生物として代表的な甲殻類である2種のミジンコを用い、①試験方法を検討するとともに、②種の違いによるいくつかの化学物質に対する感受性の違いを調べ、そして③感受性が魚類及び藻類のそれとどの程度異なるかについて比較検討する。

ミジンコはOECDの化学品テストガイドライン試験種である *Daphnia magna* (*D. magna*) と日本で最も代表的な種である *Daphnia pulex* (*D. pulex*) を用いた。化学物質としては魚類及び藻類についてデータの揃っている数種の界面活性剤、及びリン酸トリブチル (TBP) と銅 (Cu) を用いた。

2 実験

(1) 材料

ミジンコ：*D. magna* は働化学品検査協会から、*D. pulex* は働三菱安全科学研究所から供与を受けた。試験前約1ヶ月は20℃の恒温室内で脱塩素水中で飼育し、1日1回餌として緑藻類の *Chlorella pyrenoidosa* を与えた。試験の前日に親以外のミジンコをピペットを用いて水槽から除き、試験前24時間以内に生まれた仔ミジンコだけを試験に用いた。仔ミジンコはビーカーに集めて飼育水を下記の希釈水で数回置換し、出来るだけ高密度になるようにしておく。

供試化合物：直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナト

リウム (LAS) は花王株式会社提供のもので、純分は26.5%で、アルキル鎖長は炭素数が10のものが約8%、11のものが約38%、12のものが約30%、13のものが約24%、14のものが微量で、アルキル鎖の平均炭素数は11.7である。

硫酸アルキルポリオキシエチレン＝ナトリウム (AES) は日光ケミカルズ株式会社製で、純分は19.1%、NaCl 3.2%、アルキル鎖長は炭素数が12のものが約20%、13のものが約30%、14のものが約30%、15のものが約20%、直鎖率は78±2%、平均エチレンオキシド付加モル数は3である。

アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム (AOS) はライオン株式会社提供のものを常法により精製した。アルキル鎖の炭素数は16のものが58%、18のものが42%で、アルケニルとヒドロキシルの比は75.3 : 24.7で平均分子量は350.7である。

アルキル＝ポリオキシエチレン＝エーテル (AE) は花王株式会社製で、アルキル鎖の平均炭素数は12、エチレンオキシドの平均付加モル数は6.5である。

TBPは和光純薬株式会社製特級を用いた。

Cuは和光純薬株式会社製原子吸光分析用銅標準液を用いた。

希釈水：蒸留水1ℓ中にCaCl₂・2H₂O 26.1mg、MgSO₄・7H₂O 17.7mg、K₂SO₄ 1.1mg及びNaHCO₃ 25mgを含むように調製した。この希釈水の硬度は25mg/ℓである。²⁾

試験水：上記の化学物質の濃厚溶液を希釈水で所定の濃度に希釈して調製した。試験水の濃度は6～10段階とし、各濃度比は $\sqrt{2}$ とした。なお、対照の試験水には希釈水を用いた。試験水のpHは7.2～7.4に調節した。

試験容器：容量約40mℓの働エルマ製の表面無処理品のポリエチレン製カップを用いた。

(2) 方法

試験容器に全量を20mℓとした時正確に所定濃度になるように化学物質の濃厚溶液を正確に入れ、希釈水を加えて約18mℓとした。これに飼育水を希釈水で置換してある仔ミジンコ10頭を0.5mℓ程度の希釈水ごとピペットで加えた。次に、上皿天秤上で希釈水を加えて全量を20gとした。実験は20±1℃の恒温室中で明条件下(400~500ルクス)で行い、6時間及び24時間後に実体顕微鏡下で生死の確認を行った。対照及び各物質濃度区はすべて4連で行った。

実験終了後、片対数方眼紙に各化学物質の濃度とその時の死亡率とをプロットし、6時間及び24時間暴露時のLC50を求めた。

3 結果と考察

(1) 化学物質の致死影響濃度について

各種化学物質の *D. magna* と *D. pulex* に対するLC50を表1に示した。ミジンコに対する致死影響を24hrLC50と比較すると、用いた化学物質の中で、TBPは毒性が最も低く、次いでAOS、LAS、AESの順で強く、AEはかなり強かった。特に、Cuのミジンコに対する毒性は桁はずれに強く、24hrLC50はppbレベルであった。

表1 化学物質のミジンコに対するLC50

| 化学物質 | 暴露時間 | LC50, mg/ℓ | |
|------|-------|-----------------|-----------------|
| | | <i>D. magna</i> | <i>D. pulex</i> |
| LAS | 6 hr | 30 | 27 |
| | 24 hr | 17 | 18 |
| AES | 6 hr | >91 | >180 |
| | 24 hr | 14 | 15 |
| AOS | 6 hr | >64 | >130 |
| | 24 hr | 19 | 26 |
| AE | 6 hr | 9.5 | 12 |
| | 24 hr | 3.5 | 2.6 |
| TBP | 6 hr | 52 | 93 |
| | 24 hr | 35 | 68 |
| Cu | 6 hr | 0.021 | 0.0023 |
| | 24 hr | 0.0094 | 0.0013 |

(2) ミジンコを用いる試験方法について

ア 試験水の調製及び生死の観察方法について

試験容器にポリエチレン製カップを用い、重量によって最終濃度を調節することによって正確かつ迅速に試験水を調製し試験を開始できた。

ミジンコの毒性試験の判定は一般に肉眼による遊泳阻害あるいは15秒の静止によって行われているが、判定は非常に難しくまた、個人によるバラツキが大きい。この点は顕微鏡を用いることによってこの問題を解決することができた。

イ 試験時間について

D. magna でも *D. pulex* でも実験に用いたすべての化学物質で6hrLC50と比較して24hrLC50の方が小さかった。その程度は物質によって異なったが、時間経過と共に影響が強くなることを示した。

LASとTBPでは24hrLC50と6hrLC50との比は比較的大きく0.6~0.7で、Cuでは約0.5であった。これに対してAESやAOSではかなり小さく0.3~0.1以下であった。このようにAESやAOSで時間経過と共にLC50がかなり減少していく傾向は魚類の致死影響実験でも認められ、これらの物質はより長時間の暴露でミジンコへの致死影響が更に増す可能性が強いことが推定できる。

6hrLC50と24hrLC50の違いがいくつかの化学物質では大きいことから、ミジンコの致死影響試験の試験時間は、6時間より24時間の方が試験自体の意味を考えるとより好ましいと思われる。

ウ 試験に用いる種について

前述の化学物質の *D. magna* と *D. pulex* とに対する致死影響濃度を比較すると、LASとAESではほぼ同じであった。AOSとTBPでは *D. magna* に対するLC50の方が低く、AEとCuでは *D. pulex* に対するLC50の方が低かった。しかしながら、これらの違いはCu以外では余り大きくない。文献によると、いくつかの有機塩素系化合物に対する感受性も両種の間で余り大きな差は見られないという報告がある^{4,5)}。

一方、実験生物としての取扱いの面からみると、*D. magna* は *D. pulex* に比較してかなり形が大きく、選別及び観察の容易さの点で優れている。更に、他種のミジンコは殆ど実験に用いられていない点を考慮すると、ミジンコの試験には *D. magna* を用いるのが最も適当

であると思われる。

(3) 魚類及び藻類への感受性との比較

図1は試験に用いた化学物質のミジコに対する24 hr LC50をコイ (*Cyprinus carpio*, ふ化後15日齢, AESについてはふ化後1月齢) とニジマス (*Salmo gairdneri*, ふ化後19日齢) に対する96 hr LC50^{1,3,7)}、及び緑藻類の *Selenastrum capricornutum* の初期増殖に対する50%影響濃度と比較したものである。

全体的傾向としてはミジコに対するLC50は魚類の

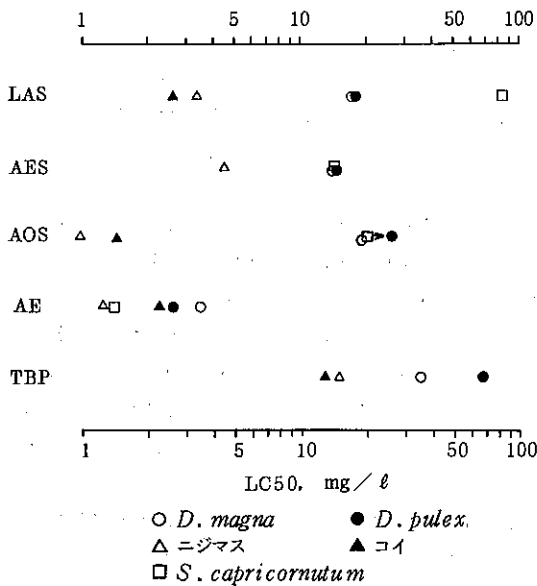


図1 魚類及び藻類とのLC50の比較

それに比較して大きく、これらの化学物質に対するミジコの感受性は魚類より低かった。また、藻類の増殖に対する阻害影響と比較すると、LASではミジコに対する影響が強かったが、AESでは同程度であり、AEでは逆に弱かった。

4 おわりに

以上、ミジコを用いる試験方法について基礎的な検

討を行ったところ、ミジコを用いた化学物質等の試験は *D. magna* を用い、24時間試験することが望ましいことが分かった。

また、2種のミジコに対する数種の化学物質のLC50を測定し、ミジコはどの程度の濃度レベルで致死影響を受けるか、また、その濃度は魚類のLC50や藻類の初期増殖に対する50%影響濃度と比較するとどのようなレベルにあるかを明らかにした。

5 謝辞

最後にミジコの供与を受けた(財)化学品検査協会及び三菱安全化学研究所に感謝します。

参考文献

- 1) 若林明子, 鬼塚聡: 魚類の急性毒性に影響を与えるいくつかの因子について, 東京都環境科学研究所年報, 1986, 102
- 2) 田端健二: ヒメダカを供試魚とするTLM標準試験方法の提案, 用水と廃水, 14, 1297 (1972)
- 3) 若林明子, 溝呂木昇: 界面活性剤のニジマスに対する亜急性毒性影響について, 東京都環境科学研究所年報, 1988, 129
- 4) Canton, J.H. and Adema D.M.M.: Reproductibility of short-term and reproduction toxicity experiments with *daphnia-magna* and comparison of the sensitivity of *daphnia-magna* and *daphnia-pulex* and *daphnia-cucullata* in short-term experiments, Neth. Hydrobiologia 59, 135 (1978)
- 5) Elnabarawy, M.T., et al.: Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals, Environ. Toxicol. Chem., 5, 393 (1986)
- 6) 紺野良子, 若林明子: 藻類の増殖に及ぼす化学物質の影響, 東京都環境科学研究所年報, 1987, 113
- 7) 若林明子: 未発表データ