報　告

水生生物への生態毒性試験

菊地幹夫　宮垣　融　上野英世
若林明子　本波裕美
（水道局）　　（非常勤研究員）

1　はじめに

近年，水質汚濁対策の進展により河川の水質は改善されてきたが，必ずしも生物の豊かな川が戻ってきたわけではない。これは一つには従来の水質汚濁対策が人の健康の保護と生活環境の保全を主目的としており，水生生物の保護を重視していなかったからである。

しかし，OECDでは以前から化学物質の生態系への影響に着目してきた。そして，環境庁は生態系への影響についての試験方法の検討委員会を設置するとともに，OECDと協力して，生産量の多い化学物質について環境安全性点検事業を開始した。また化学物質環境リスク研究調査を開始した。一方，通産省は甲殻類のミジンコを用いる試験方法のJIS化を検討している。

このような状況の中で，著者らは河川等の水環境を汚染する化学物質が水生態系にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため，1990年度から6カ年計画で研究に着手した。

水生態系では，水生植物や藻類は無機物を原料として光合成による基礎生産を行い，そして甲殻類・魚類がその生産物を消費し，さらに生産者や消費者の遺骸はバクテリア等の分解者によりまた無機物へと戻っている。この水生態系を構成する生物の一つにでも大きな影響を与える濃度で汚染物質が流入すると，この物質循環の環は切られ，水生態系はゆがめられてしまう。

このため，水生態系の主な構成者である魚，ミジンコ，藻類，バクテリア等それぞれの生物に対する毒性試験方法を検討し，それを用いて化学物質等について試験を行うこととした。また合成洗剤原料として大量かつ広範囲に使われているLASの水環境での挙動を検討することとした。

この研究は，次のような事項を明らかにすることを目的にしている。

① 環境中にある化学物質が検出された場合，その化学物質が望ましい生態系に悪影響を与えるレベルにあるかどうか

② 水質に関する基準や目標値は，多くの場合，人の健康への視点のみで決められているが，その基準や目標値は望ましい生態系の保全という視点で許容されるレベルにあるかどうか

③ 魚が見られない河川がある場合，原因としては，水質が悪い，魚の住み場所がない，等が考えられるが，その河川では水質がキーポイントかどうか

の判断の一助とする。

この報告では初年度である1990年度の調査研究結果の概要について報告する。

2　海産藻類を用いる影響試験方法の検討

植物プランクトンは水生態系で基礎生産を担う重要な役割を果たしている。海産の植物プランクトンである *Skeletonema costatum* は，すでに油処理剤の生物毒性試験にヒメダカとともに使われており，油処理剤の毒性は *S. costatum* を死滅させる濃度で評価されている。本研究では，*S. costatum* の生長量あるいは生長速度の阻害から影響を評価する試験方法を検討した。その結果，

①培養条件としては，改変松平培地等を用いて振とうしながら21℃で4000ルックス（12時間毎の明暗）の照明とすること。

②生長量の指標としては，電気的な計数方法を用いる場合，*S. costatum* は群体をつくるため，数は指標として適切でなく，数と容積とから求めた全細胞容積を指標にすることがよいことが明らかになった。

3　バクテリアを用いる影響試験方法の検討

(1)はじめに

微生物に対して毒性影響を及ぼす化学物質のスクリーニングを目的として，現在までいくつかの試験方法が提案されている。これらは特定の１種類の微生物に限って影響を観察したものが多い。本報では実際に水生態系を構成する微生物を対象として，化学物質がこれらの微生物群に及ぼす致死的影響を評価するため，自然環境中の微生物群を用いた試験方法の検討を行った。

(2)検討結果

検討する試験方法については，①調査対象となる環境中に生息する微生物を用いること，②その場の栄養源を利用して生息するものを抽出する目的から，培養のための基質となる有機物は加えないこと，という二つの条件を満たすものを選択した。

この条件の下でいくつかの方法を試みた中から，大腸菌群数の測定などによく用いられるMPN法（最確数法）を応用して，化学物質を添加し細菌数の増殖量を測定する方法を詳しく検討することとした。試験方法は以下の通りである。

供試化学物質：塩化ベンザルコニウム，ジメチルスルホキシド

供試微生物：多摩川羽村地点及び小名木川進開橋地点から採取した試水を孔径５μmのミリポアフィルターで濾過したもの。

培養方法：試験管に孔径0.22μmミリポアフィルターで濾過した河川水８mℓを注ぎ高圧蒸気滅菌した。これに濾過滅菌した化学物質を各濃度段階ごとにそれぞれ１mℓ加え，最後に５μmのミリポアフィルターで濾過した河川水を10進法による希釈をして各段階毎に１mℓずつこれに接種した。これを遮光条件下20℃で30日間培養した。

細菌の計数：4',6- ジアミジノ-2- フェニルインドール（DAPI）により培養後の検水を染色し，蛍光顕微鏡により増殖の有無を観察した。その際１mℓ中に10^3細胞以上の細菌が確認されたものを陽性（増殖した）とみなした。

その結果，塩化ベンザルコニウムとジメチルスルホキシドについて，添加した量と細菌の増殖抑制量との間に明確な比例関係が得られた（図１）。このことから本法は化学物質の環境に対する毒性影響評価において定量的な推定値を与える可能性があると考えられる。

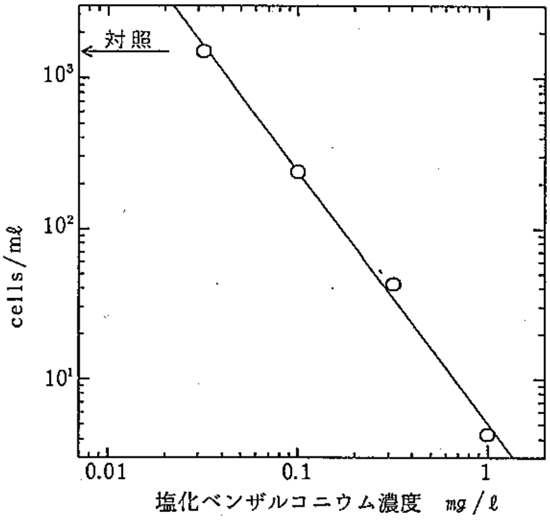

図１　塩化ベンザルコニウムによる細菌の増殖抑制作用

4　淡水産藻類を用いる影響試験

(1)はじめに

淡水産藻類を用いる試験方法についてはすでに検討結果[1)]があるが，農薬等の化学物質を試験対象とするに当たり，次の点を再検討した。

①培地にエチレンジアミンテトラ酢酸，クエン酸と河川水を入れることは避けたい。重金属イオンを試験対象とした場合，キレート剤の濃度が試験の結果を大きく左右するからである。また培地に河川水を用いると，水質が一定しないため，データの再現性が悪いと考えられる。

②被試験物質をアセトンに溶かして最大1.5mℓまで添加しているが，この場合アセトンによる藻類の生長阻害は許容範囲に入るか。

③藻類の生長阻害を把握するには，細胞数と全細胞容積のいずれを指標にすることがよいか。また，生長阻害を生長速度の低下から把握する際に，対数生長しない場合にはどう扱うか。

(2)試験方法

文献[1)]とOECDの方法を参考として，試験を以下の条件下で行った。

試薬：農薬はガスクロマトグラフ用標準試薬または原体を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

培地：表１の組成の培地をミリポアフィルター（0.45

μm)で濾過して用いた。pHは7.7～7.9に調整した。

試験：培地を500mℓの三角フラスコに100mℓ入れ，これに化学物質のアセトン溶液を加え，更に純粋培養した緑藻を接種し，以下の条件で培養した。

供試藻類：緑藻類　*Selenastrum capricornutum*

温　度：21℃

照　度：4000±200ルックス（12時間毎の明暗）

振とう：90回転／分

試　験：3連

初期藻類濃度：約5,000細胞／mℓ

細胞数及び全細胞容積の計測：㈱エルマ製パーティクルカウンター（特注品）による電気的方法。

影響の判定方法：目視観察または生長の指標として細胞数及び全細胞容積を用いて影響の判定方法を比較した。

(a)10日後に生長が見られるかどうかを目視により観察し，生長が見られない最低濃度を求める。

表1　培　　地

塩　　類	濃度 mg／ℓ
$NaNO_3$	99.2
K_2HPO_4	7.8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.2
Na_2CO_3	4.0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	11.6
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.97

(b)培養開始から3日後まで1日毎に細胞数及び全細胞容積を計測して生長曲線を描き，その生長曲線下の面積を求め，片対数紙にプロットして対照と比較し生長を50％阻害する濃度を求める。

(c)培養開始から3日後まで1日毎に細胞数及び全細胞容積を計測し，生長速度を求め，片対数紙にプロットして対照と比較して生長を50％阻害する濃度を求める。対数生長とはならないことが多いため，最小二乗法により生長速度を求めることはせず，①1日目と2日目における細胞数及び全細胞容積，または，②1日目と3日目における細胞数及び全細胞容積から生長速度を求めた。

(3)検討結果

表1の培地を用いることで，OECDが目安にしている「3日以内に16倍以上の生長」が達成でき，河川水とキレート剤を入れることは必要条件ではなかった。このため，以下の試験では全て表1の培地を用いた。

アセトンによる生長阻害について検討したところ，180μℓ／100mℓ培地まで阻害が観察されなかった。このため，アセトンを化学物質の溶剤として用いる場合，最大100μℓ／100mℓとした。

化学物質による生長阻害を上記の(a)～(c)の方法で観察した。その結果を表2に示す。生長の指標として藻類の細胞数を用いると，(b)，(c)の方法で求めた値と(a)法の値とが一致したので，細胞数を指標とする生長量あるいは生長速度の阻害から影響を評価することができた。

表2　藻類の生長への影響濃度と生長指標との関係

農　　薬	目視観察	生長の指標					
		全細胞容積			細胞数		
	(a)	(b)	(c)−①	(c)−②	(b)	(c)−①	(c)−②
ダイアジノン	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
トリクロルフォン	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
フェニトロチオン	3.1	2.6	1.8	2.2	1.6	1.7	2.1
オキシン銅	0.10	0.098	0.11	0.092	0.068	0.11	0.10
クロロタロニル	−	0.23	>1	0.82	0.18	0.25	0.27
チウラム	−	0.16	0.12	0.15	0.14	0.23	0.26
ブタミホス	0.054	0.31	>0.31	>0.31	0.026	0.032	0.032
ペンディメタリン	0.032	>0.1	>0.1	>0.1	0.023	0.026	0.025

（注）濃度の単位：mg／ℓ
(a)，(b)，(c)については、本文を参照のこと

5　ニジマスを用いる影響試験

(1)はじめに

環境庁は，1990年5月にゴルフ場で使用される農薬について排出水の暫定指導指針値を示した。この値は人の健康への観点から定められたものであり，水生生物の保護の視点はない。しかし，排出水が河川に流入することから，水生生物特に魚類への影響の視点からこの値を検討しておくことが重要である。農薬の魚類に対する急性毒性については既に温水魚についてコイを中心に多くの報告がある。しかし，ゴルフ場は冷水魚の生息する水域にも立地する例が見受けられることから，魚毒性がB，Cの農薬を中心にニジマスについて影響試験を行うこととした。

(2)試験方法

文献[1]に準拠し，以下の条件下で試験を行った。

試験水：硬度 25mg／ℓの人工河川水を用いた。

ニジマス：孵化後5～6日後の仔魚

農薬：原体及び市販の農薬を用い，影響濃度を原体換算で表した。

試験：試験水5 ℓにニジマスを10尾ずつ入れ，4日間曝露した。なお試験水は1日毎に全量を交換した。

水　温　：10℃

溶存酸素：9.1mg／ℓ以上

pH　　：7.0～7.6

照　明　：暗

生死の判定：体色が変化しかつガラス棒で触れても動かない個体を死亡魚とした。

半数致死濃度（LC50）の算出：片対数紙に濃度と生存率についてプロットし，LC50の前後の点を直線で結んでLC50を求めた。

(3)結果と考察

48時間及び96時間のLC50を表3に示した。

96hr－LC50は，魚毒性Bの農薬については1mg／ℓ以上の値となり，魚毒性Cの農薬では1mg／ℓ以下の値となった。環境庁が示した排出水の暫定指導指針値と比較してみると，魚毒性Cのキャプタンとチウラムの96hr－LC50は暫定指導指針値以下であることから，暫定指導指針値以下であっても排出水の流出状況によってはニジマスの生存に影響を与えることのあることがわかる。

なおフェニトロチオンについて，原体，乳剤，水和剤で毒性を比較してみると，各々のLC50は多少異なり，原体が最も毒性が低い。これはチウラムでも同様である。つまり製剤では原体の他に界面活性剤などが加えられているために毒性がやや強く現れたものと考えられる。

6　LASの底泥での分解

河川の底泥中にはLASが高濃度で検出される場合が

表3　数種の農薬のニジマスに対する48時間及び96時間半数致死濃度

農　薬		ニジマス 48hr－LC50	ニジマス 96hr－LC50	参考 魚毒性	参考 排出水の暫定指導指針値
イソキサチオン	乳　剤	1.4	1.3	B	0.08
ダイアジノン	乳　剤	7.5	6.2	Bs	0.05
トリクロルホン	乳　剤	＞10	9.1	B	0.3
フェニトロチオン	原　体	7.3	4.4	B	0.1
フェニトロチオン	乳　剤	4.1	2.6	B	0.1
フェニトロチオン	水和剤	7.0	4.1	B	0.1
イソプロチオラン	水和剤	8.5	8.1	B	0.4
キャプタン	水和剤	0.0085	0.0075	C	3
チウラム	原　体	0.18	0.12	C	0.06
チウラム	水和剤	0.091	0.048	C	0.06
フルトラニル	水和剤	＞10	＞10	B	2
ブタミホス	原　体	4.1	4.1	B	0.04

(注) 濃度の単位：mg／ℓ

ある。底生生物等への影響を考慮すると，いくつかの河川の底泥において濃度が経年的にはどう変化するか，また底泥でLASは速やかに分解をするかは重要な要素であることから，これらについて検討を開始した。

(1)底泥での濃度の測定

多摩川田園調布堰上，南浅川水無瀬橋下，白子川落合橋，野川天神森橋，空堀川三郷橋の5地点で1991年2月に採取した底泥について，陰イオン界面活性剤のLASと非イオン界面活性剤のポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（NPE）およびポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（OPE）の濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

濃度は地点により大きく異なり，LASの濃度は11～360mg／kg乾泥（5地点）であり，NPEは2.0～4.9mg／kg乾泥（3地点のみ），OPEは0.02未満～0.19mg／kg 乾泥（3地点のみ）であった。

なお本調査は水質保全部水質監視課と共同で実施した。

(2)底泥中での分解試験

底泥約10g（乾重量）を20mℓビーカーにとって約2cmの厚さとし，この上に水を2～3mmの厚さに乗せ，20℃に保ちながら，そのまま，または週4回程度かきまぜて，生分解させた。この条件下でLASの濃度は徐々に減少したが，生分解速度は水中とくらべて著しく遅かった。

参考文献

1）若林明子、紺野良子、西井戸敏夫：淡水産生物を用いた生態影響評価手法について，東京都環境科学研究所年報1990，p.129－130.