

OECDのミジンコ繁殖試験に関するリングテスト

若林明子 菊地幹夫

要 旨

OECD (経済協力開発機構) は化学物質のテストガイドラインの一つであるミジンコ繁殖試験の改定を行うことになり、各国の関係機関によるリングテストを実施した。試験には15加盟国の48試験研究機関が参画し、また我が国からは3機関が参画した。当所を含めほとんどの機関でガイドライン(案)にそって試験が行われた。試験に用いたジクロロアニリン(3,4-DCA)の繁殖試験での半数影響濃度(EC50)は $12\mu\text{g}/\ell$ 、遊泳阻害試験のEC50は $320\mu\text{g}/\ell$ で急性/慢性毒性比は大きかった。各試験研究機関で得られた結果のバラツキも小さく、ガイドライン(案)はほぼ満足できるものであった。

OECD Ring Test on the *Daphnia magna* Reproduction Test

Meiko Wakabayashi and Mikio Kikuchi

Summary

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) Test Guidelines for testing of chemicals are periodically reviewed in the light of scientific progress. With respect to the Guideline 202, Part II, chronic *Daphnia* sp. reproduction test, the final ring test has been performed in 1994 by 48 organizations of 15 countries. We participated in the test with the other 2 organizations from Japan. The test was carried out in accordance with this Draft OECD Test Guideline, by almost all the organizations.

The median effective concentration (EC50) of 3,4-dichloroaniline for the reproduction was $12\mu\text{g}/\ell$ and the EC50 for the acute inhibition of the mobility was $320\mu\text{g}/\ell$. The rate of acute to chronic toxicity was large. The EC50 data obtained from this ring test were not varying and this Draft can be acceptable.

1 はじめに

化学物質については、人への健康影響だけではなく、生態系への影響も含め、総合的・体系的な対策が必要である。しかし、我が国では、化学物質を規制する際に、人への健康影響に対する配慮は十分とはいえないまでもなされてきているが、生態系を守るという視点はほとんどない。

今回、OECD (経済協力開発機構) は化学物質についてのテストガイドラインの一つであるミジンコ繁殖試験の改定を行うことになり、各国の関係機関によるリングテストを実施することとした。

著者らは水生生態系を保全する視点から、水生生物に与

える化学物質の影響についての研究を行ってきたので、当所は日本から参画する3機関の一つとしてこのリングテストを実施した。この背景、概要及び結果について報告する。

現在、ミジンコ繁殖試験については、改定案が出され最終的な検討がなされている。主な改定点は、①ミジンコを *Daphnia magna* クローン5 (Aとも表示する) に統一する、②試験期間を少なくとも14日から少なくとも21日に延長する、③各濃度区におけるミジンコの数を40頭(10頭づつ4連)から10頭(1頭づつ10連)にする、である。この改正案の適否を判断するためのリングテストが1994年1月から開始されている。

2 OECDのミジンコ繁殖試験の目的と概要

水生生物を用いた試験の供試生物としては、食物連鎖で重要な藻類、ミジンコ及び魚類がよく用いられる。OECDでも日本の環境庁でも、これらの生物が公定法に用いられている。

動物プランクトンであるミジンコ類は植物食性であるため、一次生産者と高次の食肉生物や捕食動物を結ぶ食物連鎖の中間に位置する生物として重要である。また、ライフサイクルが比較的短く、生後10日程度で最初の幼体を放出するため、繁殖試験に供することもできる。ミジンコ類は化学物質に対する感受性が高く、かつ、取扱いが比較的簡単で、個体が小さいため、試験が容易である。また、甲殻類に属するため、エビなど人間の食物として重要な生物への水質汚染の影響をミジンコ類を用いた試験によって予測することもできる。

3 試験方法

(1) 供試ミジンコ

試験には、オオミジンコ (*Daphnia magna* Straus クローン 5) を用いた。ミジンコは、病気にかかっていないものについて、試験開始前日に親を分離し産仔させた幼体で、試験開始時に生後24時間以内のものを用いた。餌として緑藻類の *Selenastrum capricornutum* を週に5回以上与えた。1回の給餌量はミジンコ1頭当たり炭素量に換算して約0.15mgC/日であった。

(2) 試験化合物

3,4-ジクロロアニリン (3,4-DCA、和光純薬製で純度98%以上) を用いた。

(3) 希釈水

地下水 (商品名: わか清水 株式会社菊水製) で、pH約7.6、硬度 (CaCO₃として) 約70mg/ℓ、塩化物イオン4 mg/ℓ、有機炭素 0.7mg/ℓのものを用いた。

(4) 方法

100mlのガラス製ビーカーに、3,4-DCA の2.5、5.0、10、20及び40μg/ℓ溶液を50mlづつ入れ、各濃度10連ずつ調製した。おのおのの容器にミジンコを1頭ずつ入れ、半止水式で3,4-DCA に曝露した。試験溶液は週3回以上交換した。照度は800ルクスで明暗の周期をつけ (16時間明条件)、19~20℃で21日間試験した。その間、親ミジンコの生死、幼体の数などを毎日観察した。試験水の3,4-DCA 濃度、pH及び溶存酸素を週1回測定した。試験終了後対照区と繁殖に有意差の認められない濃度 (NOEC: No Observable Effect Concentration) と産仔数を50%減少させる濃度 (EC50: Median Effective Concentration) を求めた。

遊泳阻害試験は20mlのガラス製容器を用い、3,4-DCA の56、100、180、320及び560μg/ℓ溶液を各濃度4連ずつ調製した。おのおのの容器にミジンコを5頭ずつ入れ、48時間3,4-DCA に曝露した。その他の条件は繁殖試験に準じた。24及び48時間後にミジンコの遊泳阻害や死亡の状況を観察し、対照区と遊泳に差の認められない濃度 (NOEC) と50%のミジンコで遊泳阻害が見られる濃度 (EC50) を求めた。

4 結果

試験溶液のpHは7.5から7.9の範囲で、溶存酸素は7.5 mg/ℓ以上でミジンコの繁殖に良好な条件であった。また、試験溶液交換時の3,4-DCA 濃度は40μg/ℓ区では溶液調整時の80%以上、20μg/ℓ区では60%以上であったが、10μg/ℓ以下の区では調整時の1/4以下に減少することもあった (表1)。この原因が3,4-DCA のミジンコへの取り込み或いは3,4-DCA の分解等にあるのかは明らかでない。そこで、EC50やNOECの算出には設定濃度を用いた。

表1 試験水の3,4-DCAの濃度 μg/ℓ

設定濃度	1週目		2週目		3週目	
	新 ^{a)}	旧 ^{b)}	新	旧	新	旧
0	0	0	0	0	0	0
2.5	1.7	0	2.7	0.6	2.0	0.5
5.0	3.8	2.1	4.9	2.1	5.0	1.6
10	8.7	4.1	9.9	7.1	10.1	5.7
20	19.8	19.0	21.0	14.8	21.1	12.0
40	39.7	37.9	39.0	31.4	39.9	34.9

^{a)} 曝露開始時、^{b)} 48時間曝露後

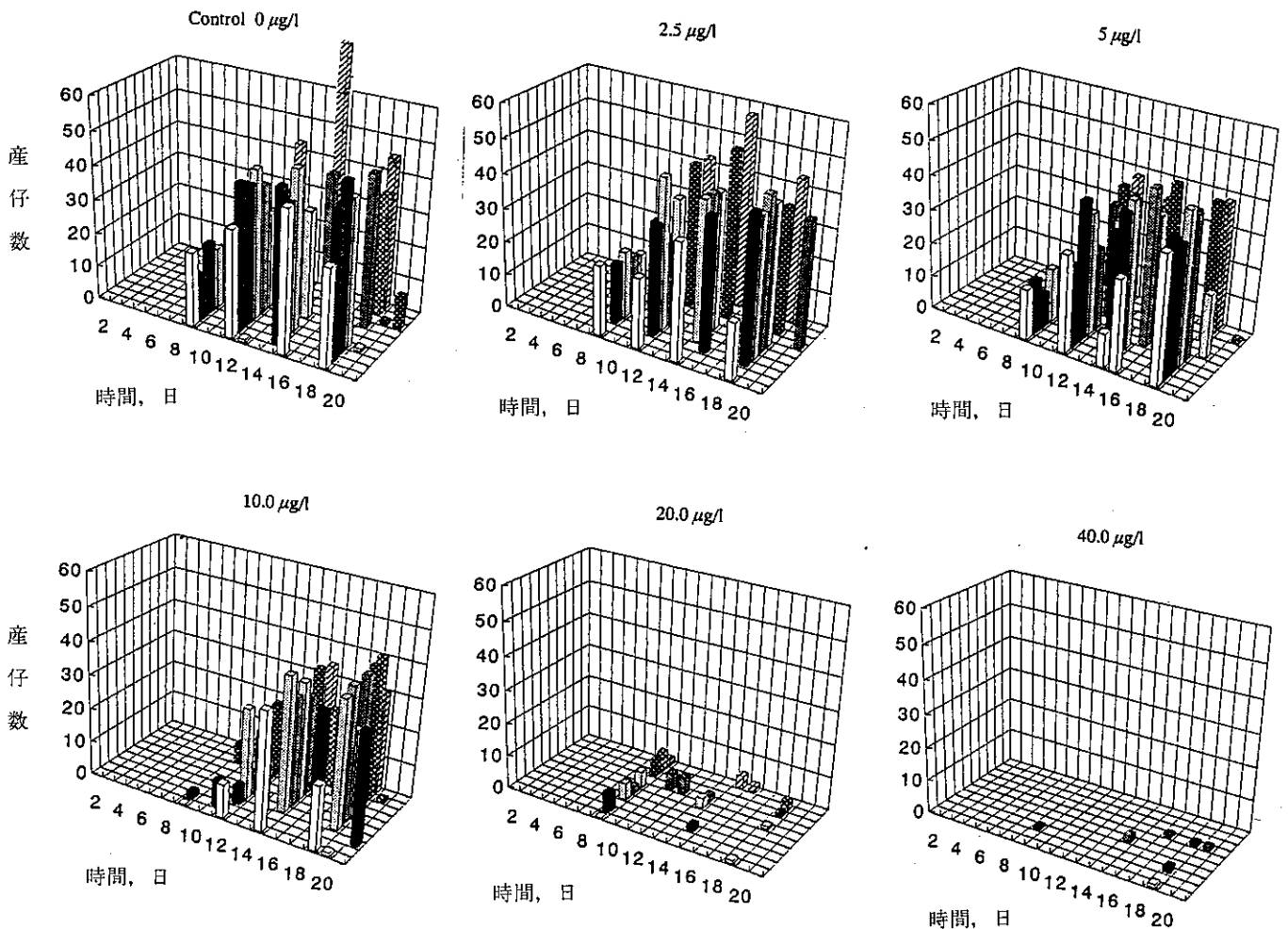


図1 3,4-DCAに21日間曝露したミジンコの各曝露区における個別産仔数

各濃度でのミジンコの産仔の様子を図1に示した。3,4-DCA を含まない対照の溶液中のミジンコの多くは9日目から産仔を始め、試験終了の21日までに4回産仔した。2.5及び5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ 曝露区でも産仔の間隔及び産仔数に対照と比較して違いは見られなかった。しかし、10 $\mu\text{g}/\text{l}$ 曝露区では産仔数が対照の60%強に減少した。20及び40 $\mu\text{g}/\text{l}$ 曝露区では産仔数は更に減少し、全く産仔しないものも見られた。

3,4-DCA 濃度と各濃度での平均産仔数の関係を図2に示した。図2から求めた繁殖試験でのEC50は12 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NOECは5.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ であった。

また、遊泳阻害試験におけるEC50は320 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NOECは100 $\mu\text{g}/\text{l}$ であった。

この結果から3,4-DCA が48時間後に遊泳阻害を起こす濃度の約1/30の濃度で繁殖に影響が出ることが分かっ

た。

5 考 察

(1) 試験方法案について

今回のリングテストには15のOECD加盟国の48試験研究機関が参画した。試験に用いた標準物質は3,4-DCA のほか塩化カドミウムとフェノールであった。

各機関からの結果の報告を受け、次のような結論が得られている。

① 各機関はガイドライン(案)の試験方法にほぼ従って試験した。

② ほとんどの機関は推薦される水質の基準を保つことができた。

③ ほとんどの機関は試験時に対照のミジンコが持つべき条件を維持しており、このため、このリングテスト

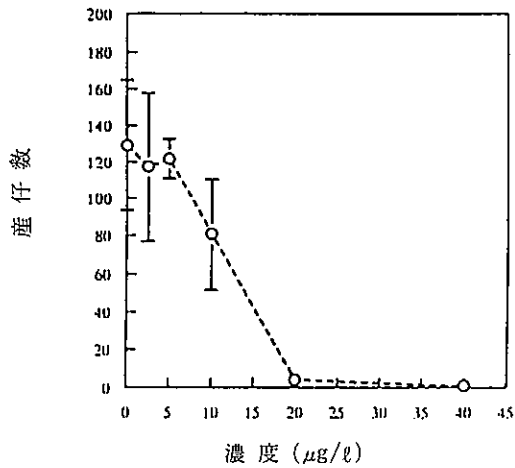


図2 3,4-DCAに21日間曝露時の曝露濃度とミジンコの産仔数(平均±標準偏差)の関係

が適切なレベルで実施されている。

④ 試験時の設定濃度と実際の試験時の濃度(実際には試験水の交換時)の相関を予備試験時に求めておけば、濃度分析を全検体について行う必要はないが、分解しやすい物質の場合には、水の交換の頻度を上げるか流水式で行う必要がある。

⑤ 試験機関内及び機関間の繁殖試験でのEC50等の報告値のバラツキは小さく、3,4-DCAについては約50%の試験期間で最大値と最小値の比は2、90%で8以内であった。

⑥ 成体の死亡率を補正して1個体当たりの幼体の数で影響濃度を算出するとEC50を高く評価することになるため、成体の死亡率は補正すべきでない。

また、今回の試験方法の改定によって、改定前に比較して1容器の個体数を10から1に減少することになり、産仔数の計測が容易になった。同時に、個体のバラツキに関する情報も得られ、結果の解析も行いやすくなった。

しかし、従来から指摘されているが、このガイドラインは生物試験と化学分析を同時に行うことが求められており、その体制づくりが課題となる。

(2) 繁殖試験の影響濃度について

図3と図4に38機関で行った繁殖試験でのNOECとEC50を示した。当所の求めた結果は、共に最も多くの機関が出した結果の群に属し、国際的に相互に比較できる精度のレベルであることが分かった。

(3) 急性/慢性毒性比について

3,4-DCAのミジンコへの繁殖試験のEC50と急性遊

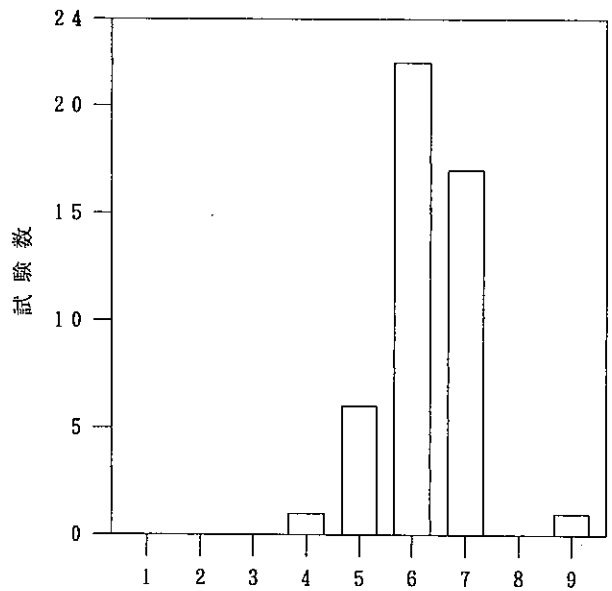


図3 各機関から出されたEC50の分布

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<0.6	0.6	1.2	2.5	5.0	10	20	40	>80
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	1.2	2.5	5.0	10	20	40	80	

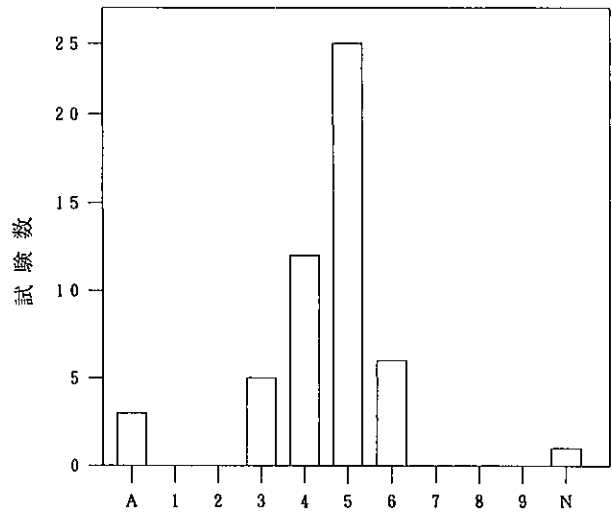


図4 各機関から出されたNOECの分布

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<0.6	0.6	1.2	2.5	5.0	10	20	40	>80
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	1.2	2.5	5.0	10	20	40	80	

A:すべて影響を受けた

N:すべて影響を受けなかった

泳阻害試験のEC50の比は0.038であった。表2に比較のために文献から集めた比を示した³⁾。これらの物質の中で今回用いた3,4-DCAの比は中程度に属し、急性毒性を示す濃度の数十分の一の濃度で繁殖が阻害される結果となっている。

表2 オオミジンコの急性/慢性毒性比

化学物質	急性毒性 A		慢性毒性 B		適用係数 B/A
3,4-DCA	0.32	48hr EC50	0.012		0.038
ヒ素	7.4	48hr LC50	0.52	3w 繁殖減	0.070
アルミニウム	3.9	48hr LC50	0.32	3w 繁殖減	0.082
スズ	55	48hr LC50	0.35	3w 繁殖減	0.0064
鉛	0.45	48hr LC50	0.030	3w 繁殖減	0.067
コバルト	1.62	48hr LC50	0.010	3w 繁殖減	0.006
ニッケル	1.12	48hr LC50	0.030	3w 繁殖減	0.027
がみん	0.065	48hr LC50	0.00017	3w 繁殖減	0.0026
NTA	145	48hr LC50	91	3w 繁殖減	0.63
アトラジン	6.9	48hr LC50	0.14-0.25	産出数	0.020-0.036
リンデン	0.485	48hr LC50	0.011-0.019	64日産出数	0.023-0.03

参考文献

- 1) Draft OECD test guideline 202 part II *Daphnia magna* reproduction test to be used in the final ring test (1994).
- 2) OECD test guideline program draft of the final ring test of the *Daphnia magna* reproduction study (1995).
- 3) 田端健二; Bull. Tokai Reg. Fish. Lab., No.98. March, 1979, pp.1-21.