

ゼブラフィッシュの胚・仔魚期における短期毒性試験方法

長谷川 絵理, 大畑 史江, 岡村 祐里子, 山守 英朋

The Short-term Toxicity Test Method in Embryo-larval Stage using *Danio rerio*

Eri Hasegawa, Fumie Ohata, Yuriko Okamura, Hidetomo Yamamori

はじめに

生物応答を用いた排水試験方法は、魚類、甲殻類、藻類の3種の水生生物を用いて、排水が水生生物に与える繁殖影響を測る手法である。

当センターでは、平成23年度からこれらの水生生物の飼育を始め、23年度は甲殻類であるニセネコゼミジンコの飼育試験方法を確立した。その後、魚類と藻類の試験方法の検討も行い、手法を確立した。

今回、魚類を用いた飼育試験方法を示すとともに、実際に模擬排水を用いて試験を行った結果を報告する。

試験方法

魚類を用いた試験では、魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験法を用いる。この試験法は、産卵後間もない受精卵を試験水にばく露し、その後の成長の様子を観察する。死亡、孵化の遅れ、遊泳阻害等の影響を指標とし、試験水の生物影響を評価する手法である。

1 供試生物

試験に使用する生物は、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) である。インド原産の外来種で、体長は5 cmほどの小型の魚である(図1)。受精卵は透明で観察しやすく、孵化所要日数が約3日と短いことから試験期間の短縮につながる。

また、成熟まで約3~4か月と早く、多くの卵を産むことも、本試験に適している。

2 飼育方法

本試験法では、試験に先立ち、順化のため、約15匹の成魚を30 cmのガラス水槽にて飼育する(半止水式)。試験開始当初、ろ過器を使用することで水槽の水換えや清掃の手間を省こうと試みたが、ろ過器の水流により弱る個体や、ろ過器に吸い込まれる個体が現れた。水槽壁面に藻の繁茂も見られ、管理が煩雑になってし



図1 ゼブラフィッシュ

上: オス 下: メス

まったため、流水式へ移行した。

流水装置に使用する素材は、テフロン、ガラス、ステンレスのみとし、ホームセンターや既存の機材を使用し自作した。水道水を緩やかに活性炭濾過槽に通し、水槽棚上部のステンレスバットにてエアレーションを行うことで残留塩素を取り除き、テフロンチューブを通し、流速約50mL/minで水槽に滴下した。ガラス水槽の上部に穴をあけて、過剰の水は、オーバーフローさせ排水できるようにした(図2)。

3 採卵方法

十分な広さの個室に水槽棚を設置し、暗幕等で外部からの光を遮り、室温は25°Cに保った。

魚は朝産卵するので、前日の夕方に産卵用水槽にガラスビーズを敷き詰め、水温を26°Cに調整してメスのみをいれておいた。試験当日の朝、5L水槽にメス4匹オス8匹の割合で入れ約30分間~1時間の間産卵を行なわせた。ゼブラフィッシュの卵は沈降性があり、産み落とされた卵はガラスビーズの隙間に入ること、親魚に食べられることなく採卵が可能となった。

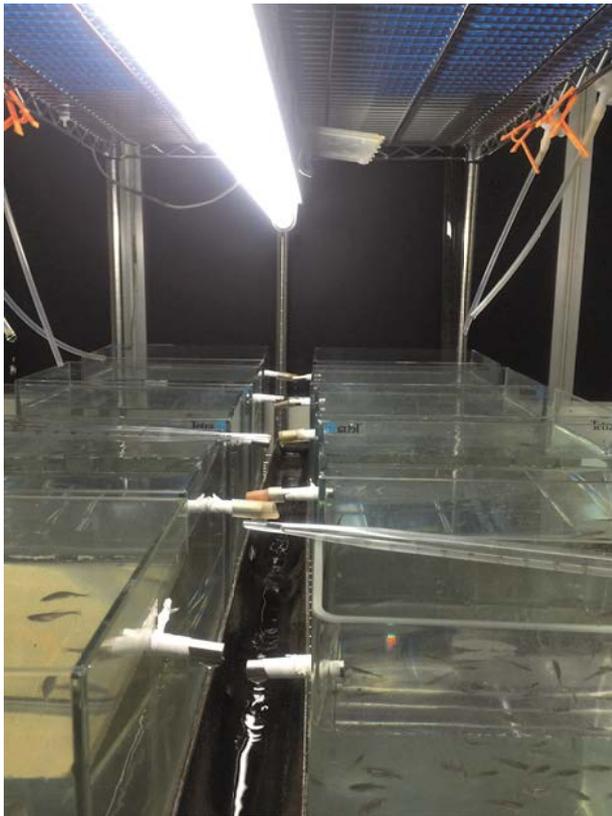


図2 ゼブラフィッシュの飼育設備

4 試験条件

試験条件を表1に示した。

採卵した受精卵を実態顕微鏡にて観察し、適切な卵割が行われているものを選別し、試験に使用した(図3)。

5 試験溶液の調整方法

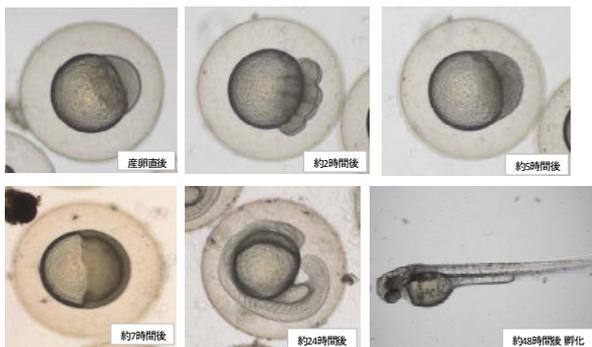


図3 ゼブラフィッシュの受精卵の卵割の様子

本報告では、二種類の模擬排水を使用し試験を行った。試験溶液の濃度は排水の割合が80% (1.25倍希釈) 以下順次希釈し、40% (2.5倍), 20% (5倍), 10% (10倍), 5% (20倍) および対照区となるように200mLずつ作成した。次に、DO,水温, pHを測定し、4つのスナップカップに50mLずつ分注した。

1カップに選別した受精卵を15個入れ、表1の試験条件の下で飼育した。

表1 試験条件

項目	方法及び条件
試験名	魚類の胚・仔魚期の短期毒性試験
生物種	<i>Danio rerio</i> (ゼブラフィッシュ)
試験媒体	調整水
試験方式	止水式
試験期間	約9日間
試験濃度	公比2 少なくとも5濃度区 (希釈倍率: 1.25倍, 2.5倍, 5倍, 10倍, 20倍)
生物数	60卵/濃度区
試験温度	25±1°C
照明	16時間明8時間暗の周期
給餌	なし
観測または測定	受精卵の生死
	孵化した仔魚の数
	仔魚の生死
	仔魚の奇形、遊泳阻害
結果の算出	NOEC (最大無影響濃度)

試験の成立条件としては、①対照区における孵化率が80%以上であること②対照区におけるばく露終了時の生存率が70%以上であること③対照区における溶存酸素がばく露期間を通して飽和酸素濃度の60%以上であることである。

試験期間は9日間とし、観察は毎日行い、受精卵の生死、孵化に要した日数、稚魚の生死等を記録した。

評価方法

本試験法では、試験から得られたデータをもとに、以下に定義される4つの影響指標値を算出する。データの解析は、日本環境毒性学会のウェブサイトにて配布されている生態影響試験のEC50, LC50, NOEC等を求める解析ソフトECOTOX²⁾を使用した。対照区と比較して、統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度を最少影響濃度(LOEC)、その一つ下の試験濃度を最大無影響濃度(NOEC)とした。

- 1) 生存率
供試卵数に対するばく露終了時に生存した胚体または仔魚数の割合。
- 2) 孵化率
供試卵数に対する最大孵化所要日数(5日後)までに孵化した卵数の割合。
- 3) 孵化後生存率
ばく露期間中に孵化した仔魚数に対するばく露終

了時に生存した仔魚数の割合。

4) 生存指標

孵化に対する遅延の影響も加味した。胚期から孵化後の仔魚に対する影響の指標。

試験結果

模擬排水 1 の試験結果を図 4 に示す。それぞれの指標の NOEC は以下の通りであった。

- ・生存率：排水濃度 5%
- ・孵化後生存率：排水濃度 5%
- ・孵化率：排水濃度 5%
- ・生存指標：排水濃度 5%以下

排水濃度が高くなるとともに、対照区との差が大きくなっており、特に生存指標では排水濃度 5%においても有意な差が認められ、全ての指標において、排水が胚・仔魚期の魚に与える影響は大きかった。

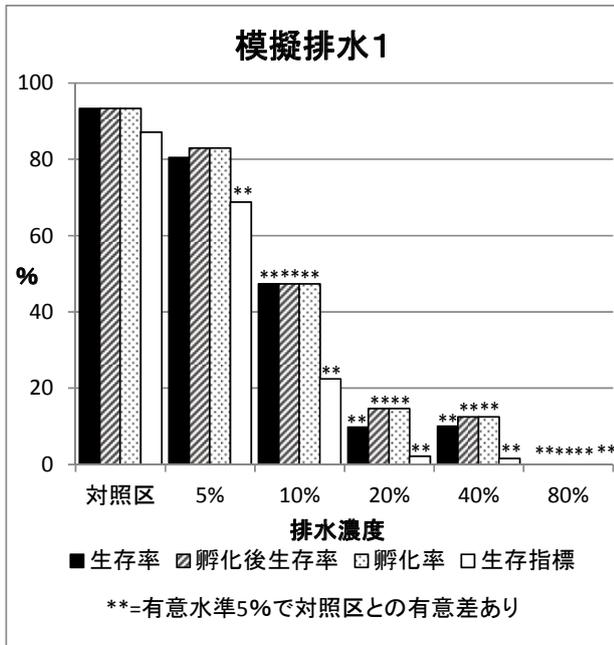


図 4 模擬排水 1 試験結果

模擬排水 2 の試験結果を図 5 に示す。それぞれの指標の NOEC は以下の通りであった。

- ・生存率：排水濃度 10%
- ・孵化後生存率：排水濃度 80%
- ・孵化率：排水濃度 80%
- ・生存指標：排水濃度 80%

模擬排水 2 では、10%、40%濃度区の生存指標に対照区との有意差が認められたが、80%濃度区では対照区との有意差が認められず、有意差が認められない最大濃度区を NOEC とするため、生存指標での NOEC は 80%濃度区が適切であると考えられる。

全ての濃度区において孵化は正常であったが、排水

濃度 10%濃度区では、孵化後の稚魚の死亡率が高かったため、生存率において有意差が認められた。他の指標では排水濃度 80%濃度区でも排水による影響はなく、比較的良好な排水であった。

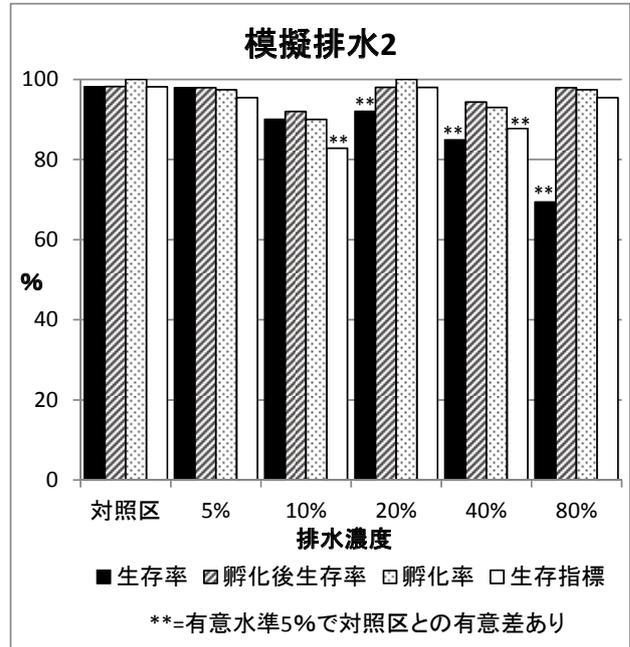


図 5 模擬排水 2 試験結果

まとめ

今回行った模擬排水の試験では、併せて化学分析も行ったが、どちらの排水も排水基準値を超過する物質は認められなかった。しかしながら、模擬排水 1 では、ゼブラフィッシュの胚・仔魚期に対して特に強い毒性が認められ、この試験法が、排水による生物への影響をより包括的に評価することができると考えられる。

欧米諸国では、国によって生物種や規制方法は異なるものの、すでに生物応答を用いた排水試験方法が導入されており、現在、日本においても、導入について、検討されているところである。

しかし、生物を用いる試験では、試験生物や飼育環境の整備が難しく、試験生物の健康状態に注意し、常に最適な状態で飼育することが重要である。健康状態の悪い試験生物を使用した試験では、試験結果の信頼性が損なわれる恐れがあるため、生物試験の精度管理が重要な課題である。

文献

- 1) 排水(環境水)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)
- 2) 日本環境毒性学会ホームページ,
<http://www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm>