

ニセネコゼミジンコを使用したミジンコ繁殖試験方法

長谷川 絵理, 西 史江, 岡村 祐里子, 山守 英朋

Daphnia Reproductive Inhibition Test Method using *Ceriodaphnia dubia*

Eri Hasegawa, Humie Nishi, Yuriko Okamura, Hidetomo Yamamori

はじめに

名古屋市内の河川には、多くの事業場排水が排出されている。現在の化学物質の規制方法は、個々の物質濃度を定量し、基準値との適合性を評価しているが、環境中では、物質間の複合的な影響があると考えられ、解決すべき課題の一つとなっている。この課題の解決の一つとして、環境中に生息している水生生物への影響を直接かつ包括的に測る方法（バイオアッセイ）がある。

その中でも、最近注目されているのが WET (Whole Effluence Toxicity) 試験という手法があり、名古屋市では導入に向け、種々の検討を行っている。

WET とは、排水の毒性を、魚類、甲殻類、藻類という 3 種の水生生物を使用した毒性試験により、総合的に評価する試験方法である。日本版の WET が、環境省において検討されているが、その方法として提案されている手法として、生物の生死で毒性を判断するのではなく、生物が繁殖し次世代まで生き続けることができるかを見ており、より低濃度の毒性影響を評価できると期待されている¹⁾²⁾。欧米では 1990 年代に水質規制に導入され、アジアでは韓国が 2011 年に導入した。現在、日本でも導入に向けた検討会が行われており、名古屋市では、導入に向けミジンコの飼育や試験方法などの検討を行っている。今回、名古屋市で行っているニセネコゼミジンコの飼育、試験方法について検討をした結果を報告する。

飼育条件・方法

試験に使用する生物はニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) である。欧州、北米、アフリカなどに生息している外来種で、体長は約 1mm と小型のミジンコである (Fig. 1)。ニセネコゼミジンコ



Fig.1 ニセネコゼミジンコ

は、毒性の感度が高く、約三日で成熟するため、試験期間の短縮化が可能となり、毒性試験に用いられている。

1. 飼育水について

飼育に使用する水は、水道水を活性炭でろ過した水を使用した。当初は、活性炭ろ過後に一晩エアレーションを行った水を使用していたが、残留塩素の除去が不十分であると思われたため、ホーローの鍋で 3 日間エアレーションを行ったものを使用した。また、水をいれた鍋は常に 3 つ保存しておき、一週間を経過したものは廃棄した。

ニセネコゼミジンコは元来、硬水で飼育していたため、飼育には、コントレックス（硬度：1470）を前述の調整水にて 20 倍に希釈し、硬度を約 75 に調整した。これを飼育水とした。

2. 飼育方法について

ニセネコゼミジンコの飼育は、マスカルチャーとシングルカルチャーで行った。マスカルチャーは、

500ml のビーカーでは 40～50 匹の親ミジンコを、200ml のビーカーでは約 20 匹の仔ミジンコを飼育した。このマスカルチャーを 2 週間ごとの継代飼育をし、常に新しいミジンコを飼育・継代した。

シングルカルチャーは、生後間もない仔ミジンコを 50ml 容のスナップカップにて、一匹ずつ約 1 週間飼育し、個々のミジンコが産んだ仔ミジンコの数を記録した。そして、多産のミジンコの系統を試験に使用した。

当初は、マスカルチャー、シングルカルチャー共に、48 時間ごとに水交換を行っていたが、しばしば、水交換直後に仔ミジンコを生まなくなったため、水交換がストレスとなっていると考え、間隔を長くし、72 時間ごとに行うこととした。

一方で、水交換の頻度が少なくなり、飼育水の汚濁が懸念されたため、餌の量を約半分に減らして毎日給餌した。

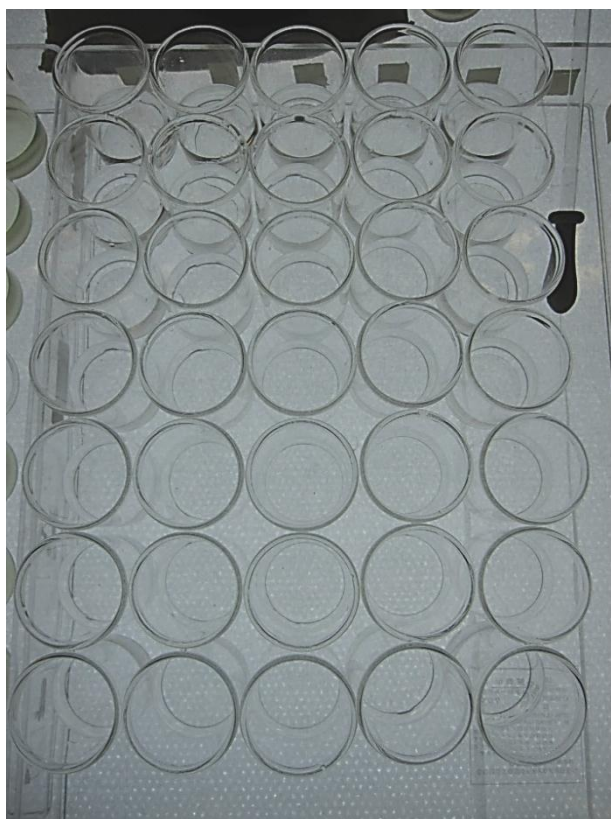


Fig.2 シングルカルチャーの飼育例

試験方法

試験条件は Table 1 に示す通りである。

試験に使用するミジンコは、生後一週間以上経過し、累計産仔数が 15 匹以上、且つ産仔回数が 3 回以上の親から生まれた仔虫を使用した。

本報告では、二種類の模擬排水を使用し、濃度は①80%(1.25 倍)②40% (2.5 倍) ③20%(5 倍)④10%(10 倍)⑤5%(20 倍)⑥対照区となるように 150ml 調整した。これらの調整水の DO、水温、pH を測定し、スナップカップ 10 個に 15ml ずつ分注した。

1 カップに 1 匹ずつ仔虫をいれ、表 1 の試験条件の下で飼育した。

試験の成立条件としては、①対照区のミジンコの 80% が生存していること②対照区のミジンコの 60% で産仔数が 15 匹以上且つ産仔回数が 3 回以上であること③対照区のミジンコにおいて、放出卵が確認されないことである。

試験期間は 8 日間とし、観察は毎日行い、親ミジンコの生死、放出卵の有無、仔ミジンコの数进行記録した。

3. 水質測定について

当初、試験水の水質測定は、分注前のビーカー内の水で行っていたが、全濃度区でミジンコが死亡したりまたは産仔が確認されなかった。同じ時期のシングルカルチャーでは、このような異常は見られなかったことから、試験でのみ使用する pH 電極の塩化カリウムの影響が考えられた。そのため、水質測定の際には、測定に必要な量の水を別の容器に移し、そこで水質測定を行った。この方法に変更してからは、対照区でミジンコの繁殖に異常がみられることはなくなった。

Table 1 試験条件

項目	方法及び条件
生物種	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (ニセネコゼミジンコ)
試験媒体	調整水
試験方式	半止水式(一週間に三回水換え)
試験期間	7～8日
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	10頭/濃度区
試験温度	25±1℃
照明	16時間明8時間暗の周期
給餌	毎日 クロレラ及びYCT
観測または測定	親ミジンコの生死と状態
	産仔数とその状態
	放出卵の有無
	DO、水温、pHの測定
結果の算出	NOEC (最大無作用濃度)

データ解析方法

データの解析は、環境毒性学会のサイトにて配布されている、解析ソフト ECOTOX³⁾ を使用した。

この解析ソフトの手順は、得られたデータで、まずパートレットの等分散性検定を行い、等分散性が認められた場合は、パラメトリック手法を用いて、一元配置分散分析と Dunnett の多重比較検定により対照区と各濃度区の有意差を検定した。また、等分散性が認められない場合はノンパラメトリック手法を用いた。

これらの解析により、対照区との有意差が認められた濃度区の最低濃度区を LOEC(最低影響濃度)とし、LOEC の一つ下の濃度区を NOEC(最大無作用濃度)とした。

データ評価例

模擬排水①の結果を Fig. 3 に示す。模擬排水①では、全 6 濃度区で産仔数が 20 匹以上あり、排水がミジンコの繁殖に大きな影響を及ぼすこともなく、良好な排水であるといえる。80%濃度区では、全く仔ミジンコを生まない個体もいたが、親ミジンコが死亡することなく産仔数も多く得られた。5%濃度区では、一部のミジンコで産仔数が 10 匹以下であったため、合計産仔数が低い値となったが、他の個体では産仔数が 30 匹前後であった。濃度区間の有意差はなく、模擬排水①は、ミジンコの繁殖に影響しないと考えられる。

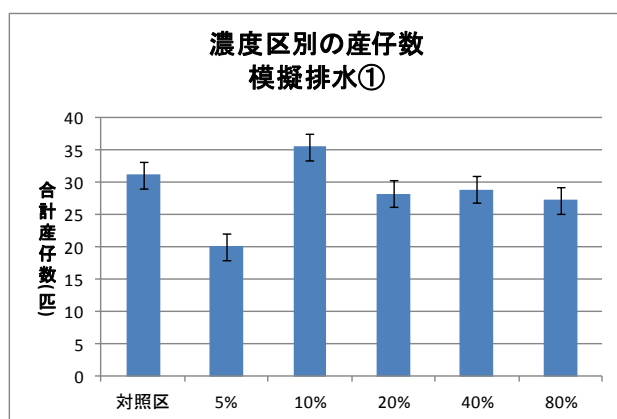


Fig.3 濃度区別の産仔数 模擬排水①

模擬排水②の結果を Fig. 4 に示す。模擬排水②では、排水濃度が高くなるにつれて産仔数は減少していった。5%濃度区では対照区と同程度の産仔数であったが、10%以上の濃度区では合計産仔数が 5 以下と、その差は顕著であった。また、80%濃度区では試験開始後、数日の間に全ての親ミジンコが死亡してしまった。

NOEC は 5%濃度以下となり、ミジンコの繁殖へ及ぼす排水の影響は大きいと考えられる。

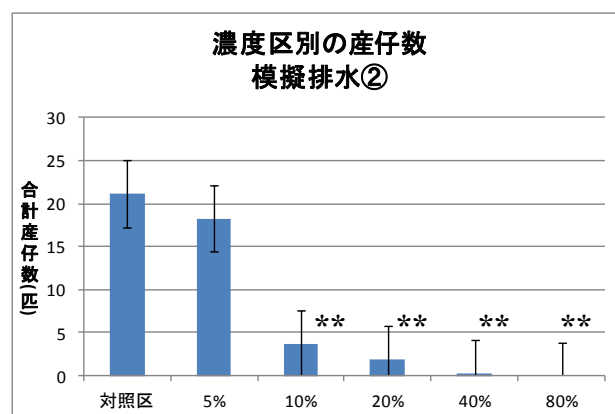


Fig.4 濃度区別の産仔数 模擬排水②

** : 1%で対照区との有意差がある

文 献

- 1) 独立行政法人 国立環境研究所：環境儀「No.38 バイオアッセイによって環境をはかる」
- 2) 鎌迫典久：バイオアッセイによる環境影響評価の実際，水環境学会誌，29，5，426-432（2006）
- 3) www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm