海産生物を用いた化学物質の生態毒性試験法の開発* -防汚剤の生態影響評価を目指して

眞 道 幸 司** 岸 田 智 穂**
吉 川 貴 志*** 伊 藤 康 男****

Development of Toxicity Tests for Marine Organisms and Refinement of the Ecological Hazard Assessment Process for Anti-fouling Agents in the Marine Environment.

Koji SHINDO, Chiho KISHIDA, Takashi KIKKAWA, Yasuo ITOH

This paper reviews the authors' ongoing research activities for the development of toxicity tests for marine organisms and the ecological hazard assessment process for anti-fouling agents in the marine environment. Some test protocols based on the response of marine organisms have been standardized by governmental agencies and international organizations. However, in Japan there are still only a few standardized test protocols for domestic marine organisms. The accurate prediction of the No Effect Concentration for anti-fouling agents requires the standardization of (i) a toxicity test method with a toxicant-sensitive organism, (ii) a simple and easy chronic-toxicity test protocol with domestic species, (iii) the toxicity test method for easily decomposable chemicals, and (iv) the cumulative-toxicity test method for a mixture of chemicals.

1. はじめに

近年、海域環境の保全や持続的な漁業生産への関心が高まっており、海域生態系に対する化学物質の影響評価の充実が求められている。海外での毒性試験法開発の動向を見ると、海産生物に対する急性および慢性毒性試験法が海域生態系の多種多様な生物種を用いて提案され、その多くが公定法として標準化されている¹⁾。一方、日本国内では、試験生物となり得る海産生物種の検討が進められているが、日本周辺の海域生態系やその多様な生物群に即して実用的な毒性試験法は未だ数少なく、公定法としての選択肢も乏しい。環境省では、「水生生物の保全に係る水質環境基準」の導出に際して信頼性の保証された試験法を用いた毒性データが不可欠であるため、海産生物を用いたテストガイドラインの整備を進め、海産魚類及び海産エビ類の急性毒性試験法(案)を公表している²⁾。また、水産庁では、漁場環境の保全と持続的な水産魚介類の利用を目的として、日本の沿岸域に生息する海産生物を用いた「海産生物毒性試験指針」をとりまとめた³⁾。しかし、

化学物質の生態毒性を評価するためには、異なる栄養段階の生物種である藻類、甲殻類および魚類を組み合わせることで簡便に試験を行い、信頼性の高い毒性データを得る必要がある^{2), 4)}。試験生物に求められる条件を充足し、実用的な毒性試験を実施可能な海産生物種は未だ少ない。

我々は、海産生物毒性試験指針の作成に参画したほか、多種多様な海産生物種を用いた実用的な毒性試験法の開発を進めている。その成果の一部を報告するとともに、防汚剤等の新規化学物質の生態影響評価を進めるために必要な検討事項について考察した。

2. 海産生物を用いた毒性試験法の開発

2.1 試験生物の検討 試験生物に求められる適性として①国内の海域に生息する、②国内で安定的に入手でき、飼育管理がしやすい、③化学物質に対する感受性が高いと推測される、等に着目し、藻類、甲殻類(動物プランクトン)および魚類についてそれぞれ候補種を検討した。当研究所では、飼育水温、飼育環境の光量や日長を調整することによって、多くの海産生物種について産卵・成熟などの時期的な制約を受けずに、数世代を継代飼育する技術を確立している^{5), 6)}。これまでの飼育実績から候補種として藻類にハプト藻 *Pavlova lutheri* および珪藻 *Chaetoceros gracilis*

*原稿受付 平成 24 年 6 月 20 日。

**公益財団法人海洋生物環境研究所 実証試験場(新潟県柏崎市荒浜4-7-17)。

***東京大学大学院農学生命科学研究科(東京都文京区弥生1-1-1)

****公益財団法人海洋生物環境研究所 中央研究所(千葉県夷隅郡御宿町岩和田300)

(図 1), 甲殻類にシオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* (図 2), 魚類にシロギス *Sillago japonica* の稚魚(孵化後 32-42 日, 体長 15-25mm 程度; 図 3)を選定した. これらの候補種は水産増養殖現場における飼育実績も比較的多い種と考えられる.

図 1 ハプト藻 *Pavlova lutheri* (左), 珪藻 *Chaetoceros gracilis* (右) [画像は The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin より引用⁷⁾]

図 2 シオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* の雌成体 (尾部に卵のうを持っている)

図 3 シロギス *Sillago japonica* 孵化後約 40 日, 体長約 20mm の稚魚

2.2 毒性試験法の検討 毒性試験法として①既存の試験法の原理から大きく逸脱しない, ②迅速に再現性のある結果が得られる, ③試験に要する設備が小型かつ簡便である, ④試験コストが妥当である, 等の視点から実用的に実施可能な試験法を検討した. すなわち, 既存の OECD テストガイドライン, 化審法生態毒性試験および海産生物毒性試験指針などに準じた試験法を構築し, ハプト藻 *P. lutheri*, 珪藻 *C. gracilis*, シオダマリミジンコ幼生・成体ならびにシロギス稚魚に対する急性毒性値および慢性毒性値の導出を試みて, 候補となる生物種の適性, 実施規模, 実験操作の難易度, 汎用的な機材の利用度および試験海水の採取量等を評価した. また, 化学物質に対する感受性を既存の

試験法による結果と比較することによって試験法の鋭敏さを検討した. なお, 毒性試験の被験物質には, 水溶解度と海水中でのイオン解離の異なる, 六価クロム (Cr(VI)), トリブチルスズ化合物 (TBT), γ -ヘキサクロシクロヘキサン (γ -HCH) の 3 種を選定した.

3. 海産生物を用いた試験法の開発状況

検討した試験方法を表 1 に示した. 試験法の原理は既存の試験法に従いつつ, 以下の変更や改良を行った.

3.1 藻類の毒性試験法 試験生物を珪藻 *Skeletonema costatum* complex のような連鎖状の群体を形成しないハプト藻 *P. lutheri* および珪藻 *C. gracilis* に変更した. また, 試験海水中の微量な被験物質も実測できるように試験容器一つの試験海水量を 300mL とした (図 4). 海産生物毒性試験指針では 96 時間暴露の前後に藻類の現存量 (クロロフィル量換算) をターナーデザイン蛍光光度計によって測定するが, この蛍光光度計は特定用途の特殊な機器であり, 市販品の改造も伴う. 我々が検討した試験方法では, 連鎖状の群体を形成しない藻類を試験生物に選び, より汎用性が高く安価なコールターカウンターを用いて藻類の細胞密度 (個体数換算) を測定することによって暴露濃度と生長量の関係を解析することが可能になった.

図 4 藻類生長阻害試験の実施

3.2 甲殻類の毒性試験法 試験容器を変更して実験操作の簡便化を図るとともに, 試験海水中の微量な被験物質も実測できるように試験容器一つの試験海水量を増量した. 遊泳阻害試験では 20mL 容の平底ガラスカップを, 繁殖阻害試験では 80mL 容の腰高シャーレを採用した (図 5). 雌の育房で卵がふ化して体外に仔虫を産仔する淡水産オオミジンコを想定した OECD テストガイドライン TG211⁸⁾ は, 交尾後に産出した卵のうからノープリウス幼生がふ化するシオダマリミジンコの繁殖生態に適合しない. 我々は, 継代飼育する個体群からふ化直前の卵のうを保持した雌を採取し, 実体顕

顕微鏡下で微針を用いて付属肢から卵のうを分離することによって、試験開始時のノープリウス幼生の個体数を正確に把握し、個体が幼生から成体へ生育する過程を観察する手法を提案した。その成果として幼生や成体に対する Cr (VI) の急性毒性値を報告した^{9)~11)}。また、ノープリウス幼生がコペポティド幼生に変態するまでに要する日数、試験期間中における雌 1 個体の産卵総数、試験開始から初産卵までに要した日数等の定量的な毒性の判断基準を複数計測し、被験物質の応答に合わせて感度の高い判断基準に絞ることによって信頼性の高い毒性データが得られるようになった。なお、これらの改良については、すでに海産生物毒性試験指針に取り入れられている³⁾。

図5 シオダマリミジンコを用いた繁殖阻害試験の実施

3.3 魚類の毒性試験法 試験期間中の試験生物の健全な飼育に必要な溶存酸素の要求量、試験海水中の微量な被験物質も実測できる海水量、共食いを防止するための個別飼育等を考慮して、適切な容量に変更した。また、急性毒性試験では、1200mL 容のガラス容器を用いた止水式暴露および無給餌への変更によって試験操作の簡便化を図った(図6)。

海産生物毒性試験指針では、慢性毒性試験として広塩性の汽水魚であるマミチョグ *Fundulus heteroclitus* あるいはジャワメダカ *Oryzias javanicus* を用いた初期生活段階毒性試験法や成熟・再生産阻害試験法が提案されている。これら広塩性の汽水魚では、マダイやシロギスを用いた場合に比べ小規模で簡易な試験法が可能であるが、成熟・産卵の人

工的な制御が困難なため試験の実施時期が限られる³⁾。また、化学物質によっては淡水中と海水中とで挙動が異なることや、同じ化学物質に対して淡水魚と海産魚では感受性が必ずしも一致しないことが知られている^{12), 13)}。このため我々は、海産魚一般に対する化学物質の毒性評価に用いる試験生物として広塩性ではない海産魚種シロギスを選定した。その結果、稚魚を用いた急性毒性試験では、化学物質に対して感受性が高く、再現性のある毒性データが得られ、試験法を確立することができた¹¹⁾。一方、慢性毒性試験では、健全な卵稚仔魚を育成するために大規模な設備と高度な飼育技術が必要であった。また、卵サイズが直径 0.5~0.7mm と小さいため顕微鏡下での煩雑な実験操作を要することや、ふ化後に開口して自発的な摂餌を開始するまでの体制が未発達な時期(胚期-仔魚期)に減耗が多く、対照区の生残率が試験の成立条件である 80%以上を満たすことが困難であった。これらの理由により、シロギスを用いた慢性毒性試験について実用的なレベルで実施可能な試験法を確立することはできなかった。

現在、卵径が大きく、口腔内で卵を保育することによって発生初期の減耗が少ないスズキ目テンジクダイ科 *Pterapogon kauderni* を試験生物とした慢性毒性試験法の検討を進めている¹⁴⁾。

図6 シロギスを用いた魚類急性毒性試験の実施

表1 検討した試験方法に関する概要

試験対象		急性毒性試験の方法		慢性毒性試験の方法	
藻類 (<i>P. lutheri</i> , <i>C. gracilis</i>)	生長阻害試験	96 時間暴露の生長に対する半数影響濃度を計測	生長阻害試験	96 時間暴露の生長に対する無影響濃度を推定	
甲殻類 (シオダマリ ミジンコ)	遊泳阻害試験	24 時間暴露でのノープリウス幼生の遊泳阻害に対する半数影響濃度を計測	繁殖阻害試験	21 日間での個体の成熟と再生産阻害に対する無影響濃度を推定	
魚類 (シロギス稚魚)	急性毒性試験	96 時間暴露での稚魚に対する半数致死濃度を計測	初期生活段階毒性試験	卵からふ化後 30 日までの暴露における胚や仔魚の生残、成長および行動に対する無影響濃度を推定	

表2 検討した試験方法を用いて得られたCr(VI), TBTおよび γ -HCHの毒性データ

物質	Cr(VI) [mg/L]		TBT [ng/L]		γ -HCH [μ g/L]	
	急性	慢性	急性	慢性	急性	慢性
<i>P. lutheri</i>	6.0	0.6	890	120	>2700	820
<i>C. gracilis</i>	7.5	0.6	2100	410	>2700	>2700
シオダマリミジンコ	43	0.8	5200	720	>4000	<17
シロギス稚魚	13	—	2400	—	25	—

- ・慢性毒性値である無影響濃度は、対照区に対して有意な応答の認められない試験区の最大濃度に基づき算出
- ・甲殻類の慢性毒性値は「コペポティド幼生に変態するまでに要する日数の遅延」を指標とした
- ・魚類の慢性毒性値は技術的に算定困難であった

3.4 既存の試験法との毒性データの比較 魚類の慢性毒性試験を除き、検討した試験方法に技術的な問題も無く、それぞれの試験生物に関して再現性の高い試験結果が得られた。また、Probit 法等の常法を用いてCr(VI), TBT および γ -HCHに関する毒性データ(急性毒性値として半数影響濃度: EC_{50} あるいは半数致死濃度: LC_{50} , 慢性毒性値として無影響濃度: NOEC)を得ることができた(表2)。

次に、既存の試験法を用いて得られた毒性データ¹⁵⁾と我々が今回検討した試験方法を用いて得られた毒性データとを比較することによって、化学物質の毒性評価に対する試験法の鋭敏さを検証した。図7にTBTの急性毒性評価に対する試験法の鋭敏さを比較した結果を示した。ハプト藻 *P. lutheri*, 珪藻 *C. gracilis* およびシロギス稚魚を用いた試験方法では、3つの被験物質に対して既存の試験法と同等か、より鋭敏な毒性データが得られた。一方、シオダマリミジンコを用いた試験方法では、他の甲殻類を用いた試験法に比べ LC_{50} やNOECの値が高い傾向を示し、ふ化直後の幼生期と成体では化学物質に対する感受性が異なり、毒性値が大きく変動する可能性が示唆された。

図7 海産生物を用いた毒性試験によるTBTの急性毒性の評価結果の比較

3.5 今後の課題 急性毒性試験については、既存の試験法も含め、実用的に実施可能な試験法が整い、多種多様な化学物質の急性毒性データを蓄積する段階になったと考えられる。一方、慢性毒性試験については、魚類の試験法に海産魚を用いた実用的に実施可能な試験法の確立が不十分であり、早急な検討が必要と思われる。

また、海域の生態系は陸水域以上に複雑な系であり、生物の多様性も富んでいることから、従来の藻類、甲殻類、魚類等の限られた生物種を用いた毒性試験だけでなく、水産業上重要な軟体動物や海藻類、多毛類などの底泥に潜る生物種など、他の動植物群を用いた試験法についても手法を確立し、様々な海産生物に対して各種の化学物質が持つ有害性の強さを網羅的に把握することが必要と考えられる。

我々が培ってきた多種多様な海産生物種の飼育技術を新しい試験生物種の開拓に役立て、「誰でも、何処でも、何時でも実施可能」な試験法の選択肢を増やすために、実用的な毒性試験法の開発を継続して行くとともに、海産生物毒性試験指針の更新に参画して行く予定である。

4. 防汚剤の生態影響評価を目指して

海産生物種を用いた毒性試験法による被験物質の毒性データ取得の側面から有機スズ化合物の代替防汚物質の生態毒性評価における課題を検討した。

張野は、環境影響を緩和するために易分解性の物質を有効成分とした防汚剤が増える傾向にあるが、そのような易分解性物質については実測値で評価しなければ過大評価を犯す可能性があり、易分解性物質の環境影響評価手法の構築が必要であると指摘している¹⁶⁾。また、Okamuraらは、易分解性防汚物質の一部に、分解産物が親化合物と同等もしくはそれ以上の毒性を持つことを報告している¹⁷⁾。一方、代替防汚物質の使用実態を見ると、多くの代替防汚剤では、有効成分とし

て亜酸化銅と代替防汚物質あるいは複数の代替防汚物質が併用されることが多い¹⁸⁾。また、亜鉛ピリチオンが環境中で銅との相互作用により銅ピリチオンに変化して毒性が高まることも確認されている¹⁹⁾。しかし、既存の毒性試験法では、試験期間中に分解され濃度低下・消失するような易分解性物質の毒性評価を想定していない。また、2つ以上の物質の複合的影響を評価する手順は示されていない。

今後、代替防汚物質の生態影響評価を進めるにあたって、毒性試験では、①試験中に濃度が低下・消失した場合、暴露濃度の算出をどうするか、②評価対象は親化合物のみとするか分解産物も含めるのか、③含めるならば、分解産物の毒性をどのように評価するのか、④併用する複数の化学物質に起因する複合的な毒性をどう評価するべきか、⑤使用実態に即して「個々の代替防汚物質」と「製品としての防汚剤」の毒性評価は個別に評価すべきか、等について、過大な、あるいは過小な評価とならないように統一見解が必要と考えられる。

5. まとめ

本稿では、当研究所における海産生物種を用いた毒性試験法の開発状況についてご紹介した。

日本国内では、海産生物を用いた毒性試験法は未だ数少なく、公定法としての選択肢も乏しい。海域生態系に対する化学物質の影響を正確に評価するためには、①化学物質に対する感受性の高い海産生物を用い、②簡易で実用的な毒性試験法が求められている。急性毒性試験については、藻類、甲殻類および魚類に対して実用的に実施可能な試験法が整い、多種多様な化学物質の急性毒性データを蓄積する段階になったと考えられる。一方、慢性毒性試験については実用的に実施可能な試験法の確立が不十分である。特に、汽水魚ではない海産魚を用いた慢性毒性試験法について早急な検討が必要である。

防汚物質としての有機スズ化合物の使用が世界的に規制された現状において、易分解性の物質を有効成分とした代替防汚剤が増えつつある。製品としての代替防汚剤に複数の有効成分を含有する使用実態が認められるため、代替防汚物質の毒性データを求める毒性試験では、③試験期間中に分解され濃度低下・消失するような易分解性物質の取り扱い、④2つ以上の物質の複合的な毒性の評価方法、等について手法の標準化が必要と考えられる。

謝辞

本稿は、水産庁委託事業「平成22年度漁場環境・生物多様性保全総合対策委託事業(漁場環境化学物質影響総合評価事業)」の一環として実施した調査について公表するものであり、関係各位に謝意を表します。

参考文献

- (1) 眞道幸司, 海生研研究報告, 第15号(平24-3), 41-62.
- (2) 中央環境審議会水環境部会 水生生物保全環境基準専門委員会, 第1回水生生物保全環境基準専門委員会, (平23), 資料6-1 水生生物保全に係る環境基準等設定の考え方の見直しについて, http://www.env.go.jp/council/09water/y094-08/mat06_1.pdf. (平成24年3月1日ダウンロードで入手)
- (3) 水産庁, 海産生物毒性試験指針, (平22-3), 水産庁増殖推進部.
- (4) 浦野紘平, 化学物質と環境, 91(平20), 10-12.
- (5) 高久 浩ほか6名, 海生研研究報告, 第12号(平21-3), 9-24.
- (6) 木下秀明ほか2名, 月刊「水」, 38-12(平8-10), 16-27.
- (7) The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin, <http://web.biosci.utexas.edu/utex/default.aspx> にてダウンロードで入手可能
- (8) OECD OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 Effects on Biotic Systems, Test No. 211 : *Daphnia magna* Reproduction Test, (2008), OECD Publishing.
- (9) 吉川貴志, 伊藤康男, 日本プランクトン学会報 58-1(平23), 12-17.
- (10) 吉川貴志, 伊藤康男, *Cancer*, 19(平22), 11-14.
- (11) 喜田潤ほか4名, 環境毒性学会誌, 13-2(平22), 117-129.
- (12) Leung, K. et al., *Mar. Poll. Bull.*, 42-11(2001-11), 1007-1013.
- (13) 若林明子, 試験時の水質変化と毒性, 若林明子 著 化学物質と生態毒性(改訂版), (平15), 75-110, 丸善.
- (14) 岸田智穂ほか5名, 実用的な海産魚類毒性試験法の検討 -スズキ目テンジクダイ科 *Pterapogon kauderni* を用いた毒性試験-, 日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会 合同研究発表会, 平成23年9月3-4日, 鹿児島大学, 鹿児島.

- (15) 中西準子, 堀口文男, 海産生物に対する TBT の影響, 詳細リスク評価書シリーズ 8 トリブチルスズ, (平 18), 99-104, 丸善.
- (16) 張野宏也, 瀬戸内海, 57(平 21), 14-18.
- (17) Okamura, H. *et al.*, *Chemosphere*, 74(2009), 1275-1278.
- (18) 社団法人日本塗料工業会, 日塗工登録非有機スズ防汚方法リスト, (平 24), <http://www.toryo.or.jp/jp/anzen/imo/files/49J.pdf>, (平成 24 年 6 月 10 日ダウンロードで入手)
- (19) 中西準子, 堀口文男, ZnPT から CuPT への変換, 詳細リスク評価書シリーズ 10 銅ピリチオン, (平 19), 28-30, 丸善.

著者紹介

眞道 幸司

- ・ 1970 年生.
- ・ 所属. 公益財団法人海洋生物環境研究所 実証試験場
- ・ 最終学歴. 東京水産大学大学院 海洋生産学専攻 博士課程修了
- ・ 専門分野. 環境毒性学, 分析化学