特集・生物利用新技術研究シンポジウム（第4回）より

ミジンコの運動量解析による有害化学物質のモニタリング

青山 勲*・羅 栄*・岡村 秀雄*

1. はじめに

科学技術の著しい進展は新しい人工合成素材を生みだし、生活の利便性を高めることとなった。しかしその一方では様々な人間活動が起因して放出される化学物質による環境汚染は人間及び生態系に重大な影響を及ぼす可能性のある事が懸念されている。化学物質は登録される前、その毒性を評価することが義務付けられている。OECDでは1978年に化学物質を管理することを目的として、特別プログラムを設置し、化学物質が市場に出る前に、人と生態系に対する潜在的な危険性を評価するために、化学物質の安全性に関する試験や評価手法の開発を行ってきた。その中に生態毒性に関するさまざまな手法がガイドラインとして提起されている¹⁾。その一つとして、ミジンコの24時間後の生存率と2週間以上の繁殖試験は生態毒性の評価方法としてよく利用される方法である。現行のガイドラインでは曝露期間は24時間であるが、外国では48時間が一般的である。試験中は餌を与えないため、48時間まで試験をする場合には飢餓によって化学物質の影響を受けやすくなる可能性がある。また、遊泳阻害は正常な遊泳を阻害されたというより、遊泳できないか、あるいは動かない状態、つまり死亡に近い状態として定義されているようであるが、被験物質によっては人の目には判定が困難な場合もあるといった問題が指摘されている²⁻⁴⁾。水圏環境における化学物質の存在をより迅速に検出するシステムを開発することを目的として、我々は、化学物質の毒性評価指標として、ミジンコの運動量の変化に着目し、化学物質添加後のミジンコの運動量変化を経時的に観測することにより、短時間でのモニタリングへの利用可能性につい

て検討するための基礎的研究を行った⁵⁾。

2. 毒性試験条件の選定

本研究の目的は、できる限り簡便で、迅速に有害化学物質の存在をミジンコの運動量の変化から検出するシステムを確立することにある。本論文で提起する毒性試験法を確立するためには次の事項を明らかにすることが必要であると考えた。

(1)適正な供試生物（ミジンコ）の生後日数

ミジンコは遊泳阻害の毒性試験の供試生物として、その生育、繁殖習性がよく研究されている⁶⁻⁸⁾。しかし、ミジンコの各生育段階について、その運動量の変化に関する研究はまだ少ない⁹⁾。生後二日、四日、八日の各生育段階のミジンコについて、その運動量を測定し、生育段階による運動量のちがいとその分散について検討した。

(2)供試化学物質の存在もしくは毒性を検出するための適正な曝露時間

ミジンコは生育環境の変化によって、運動量が変化する可能性が考えられる。この運動量が安定するまでの時、つまり適切な馴致期間の検討が必要である。

(3)ミジンコの運動量の変化と化学物質の濃度－効果関係

ミジンコの運動量は化学物質の存在により減少するだけではなく、化学物質の処理濃度によって、刺激による増加と阻害による減少の二つの現象が起こる可能性が考えられる。それ故、濃度－効果関係の特徴を事前に評価しておくことが必要である。

(4)適正なデータの取り込み時間

ミジンコの単位時間当たりの運動量は一定でなく、ランダムに変動する。それ故、安定な運動量が

* 岡山大学資源生物科学研究所
Isao AOYAMA, Rong LUO, Hideo OKAMURA

得られるデータの取り込み時間を知る必要がある。

3. 実験材料と方法

3.1 運動量解析装置

本研究には、ケイオー電子工業（株）製運動解析システム“MAS”を用いた。この運動解析システムは図-1に示すように二次元動画画像解析装置の本体、パーソナルコンピュータ、モニタテレビとCCDカメラで構成される。

3.2 実験材料と方法

ガラスシャーレ（直径40mm）に化学物質を所定の濃度となるように調製した試験水10mlを注入し（水深約7mm）、それぞれ5匹のミジンコをいれ、その直後から図-1に示した運動解析システムを用いて、0.033秒間隔で5～30秒間の運動画像の取り込みを行い、総運動量を解析した。供試ミジンコはオオミジンコ（*Daphnia magna*）の生後24時間のものを用いた。供試したミジンコは（財）化学品検査協会（久留米研究所）より分譲されたものとベルギーCREACEL社より購入したミジンコの卵を孵化させたものである。化学物質は6価クロム、カドミウム、クロロフェノール、プロピザミド（除草剤）を用いた。

3.3 毒性評価指標

図-1に示した装置はCCDカメラから得られた運動量データを画像解析ソフトを用いて、対象物体の移動量、移動方向、移動速度など8項目のデータ解析ができる。本研究には、毒性評価指標として、一定時間のミジンコの移動量を用いた。即ち、単位時間当たりのミジンコの総運動量とコントロールに対する化学物質の添加によるミジンコの運動量の増加或いは減少量の比という二つの毒性評価指標を用いた。後者を毒性指標（Toxicity Index, TI）として次式で定義する。

図-1 運動量解析システム

$$TI = \frac{M_{con} - M_{tox}}{M_{con}} \times 100(\%) \quad \dots\dots\dots(1)$$

ここで、 M_{con} はコントロールの運動量、 M_{tox} は化学物質添加後の運動量である。

4. 実験結果及び考察

4.1 ミジンコの運動量

餌を与えず、化学物質をも添加しない状態で、それぞれ生後二日間、四日間、八日間経過したミジンコの運動量を観測した。その結果を図-2に示した。餌を与えない状態で、同じ生育段階のミジンコでは24時間以内の運動量の変化が小さく、それ以後は運動量の減少傾向が見られた。無投餌でミジンコの運動量変化を指標とした場合には実験を24時間以内に行った方がよいことが示唆された。また、生後八日のミジンコの運動量は生後二日と四日のものより小さかった。実験材料としてミジンコの生後日数の同一のものを多数準備することは大変な作業である。生後の日数によらず、ミジンコのコントロールの運動量が同じであれば、任意の生育段階のミジンコを供試できるので、供試材料の準備が容易になると考えたが、生育段階によって運動量が異なることがわかった。このことはミジンコを用いた化学物質のモニタリングにはどの生育段階でも利用できるが、生育段階によって単位時間の運動量は異なるので、同じ生育段階のものを使うべきであることを示唆している。生育時間が長くなると、ミジンコの運動量が減少していく傾向が見られた。また、運動量の個体差も大きくなる傾向があった。このことから生後二日間以内のミジンコを運動量の実験に供することが望ましい。また、図-3、4に示した実験結果から、ミジンコは飼育水からシャーレの実験区に移された

図-2 コントロール中のミジンコの運動量

図-3 ミジンコの運動量に対する6価クロムの影響

図-4 ミジンコの運動量に対するカドミウムの影響

直後、環境の変化の影響で、一時的な運動量の不安定な変化が生じた。しかし、処理後3時間前後以後約10時間は比較的安定な運動量が観測された。このことから、毒性の評価を行う時間は化学物質への曝露時間後3時間と設定した。

本装置で、データの取り込み時間を5秒～30秒と変えても、運動量の変化の分散値に大差は認められなかった。モニタリングの迅速性から5秒で十分であると判断した。

4.2 化学物質によるミジンコの運動量の変化

4.2.1 6価クロム

実験結果を図-3に示す。今回の運動量解析方法を用いた場合には、6価クロム0.35mg/lで、24時間後の運動量が50.7%まで減少した。しかし、低濃度の化学物質を投与した時、ミジンコの運動量は刺激により増加する現象が認められた。また、ある濃度までは、初期の刺激により運動量の増加が起こるが長時間の曝露により運動量が減少した。曝露時間が長くなると、化学物質の毒性が強く発現した。それ

以上の高濃度では初期の段階から運動量の阻害が認められた。これらのことから、運動量の阻害だけではなく、化学物質によって起こる刺激による運動量の増加を指標として、極めて短時間で化学物質の存在をモニタリングできる可能性があることが分かった。

4.2.2 カドミウム

同じ方法でカドミウムの運動量阻害試験を行った。結果を図-4に示した。カドミウムの添加によって、化学物質の投入直後には濃度三段階ともコントロールより運動量が増加したが、処理1時間後には、濃度三段階ともミジンコの運動量に阻害が認められた。ミジンコに対するカドミウムの毒性は6価クロムより強いことがミジンコの運動量変化の指標からも検証された。本実験に用いたカドミウムの濃度範囲では初期の刺激による運動量の増加は実験開始3時間後の0.01mg/lの濃度区を除き、他の実験区では認められなかった。被験生物に対する供試化学物質の曝露量はその物質の濃度と曝露時間とに関係があると6価クロムの実験結果からも考えられる。ミジンコの遊泳阻害あるいは死亡率のような毒性評価は24時間又は48時間後の状態を基準としており、このような今までの毒性評価方法は短い暴露時間で、低濃度の化学物質の毒性を検出するのは困難であった。本法のような運動量変化の毒性評価指標は数時間という極めて、短時間で低濃度の物質の毒性を検出することが可能である。さらに、拡大した濃度範囲(0.05～10mg/l)の6価クロムと0.01mg/l以下のカドミウムについて、毒性試験を行った。結果をそれぞれ、図-5と図-6に示している。縦軸に、式(1)を用いて計算した毒性指標(TI)を示した。0.05から2.5mg/lまでの低濃度範囲の6価クロム

図-5 ミジンコの運動量に対する6価クロム処理3時間後の影響

図-6 ミジンコの運動量に対するカドミウム処理3時間後の影響

図-8 ミジンコの運動量に対するプロピザミド処理3時間後の影響

図-7 ミジンコの運動量に対する三種 (o,m,p) モノクロフェノール処理3時間後の影響

は刺激により、ミジンコの運動量が増加したことから、6価クロムの存在を検出できた。一方、5mg/l以上の濃度処理区では、運動量の阻害が現れた。また、ミジンコの運動量に対する影響は6価クロムよりカドミウムの方が濃度範囲の狭いことがわかった。カドミウム濃度が0.001mg/l以下になると、ミジンコに対する運動量の影響は見られなくなった。

4.2.3 モノクロロフェノール

化学物質への曝露時間は3時間と設定し、モノクロロフェノールの三つの異性体について毒性実験を行い、結果を図-7に示した。コントロールに対して、*o*-モノクロロフェノールの添加により、ミジンコの運動量が増加した。一方、同じ濃度の*m*と*p*-モノクロロフェノールではミジンコの運動量に対して、*o*-モノクロロフェノールより運動量の増加が少なく、*m*-モノクロロフェノールの場合は実験に用いた濃度範囲内では運動量の大きな変化は見られなかった、*p*-モノクロロフェノールの場合、10

mg/lまで濃度が高くなると、一転して運動量の阻害が見られた。酵母を用いた増殖阻害試験による毒性の強さの順位は*p*-cp > *m*-cp > *o*-cpであった。もし、ミジンコの運動量に及ぼすこれらモノクロロフェノールの3異性体の毒性の強さと相関があるとすれば、低濃度域での刺激による運動量の増加は、毒性の弱い物質の方が多くなるという結果が得られた。この点のメカニズムについてはなお検討が必要であると思われる。また、運動量変化の毒性評価指標は重金属だけではなく、有機有害化学物質の評価も可能であることを示唆した。

4.2.4 プロピザミド (除草剤)

除草剤プロピザミドはゴルフ場でよく施用される農薬の一種である^{10,11)}。上水水質管理には要監視項目になっている。毒性は相対的に弱いと言われている。本研究の24時間のミジンコの遊泳阻害試験では、0.25から10mg/lまでの濃度範囲では死亡率が0で、毒性が検出されなかった(表1)。しかし、図-8に示すように、3時間の運動量変化試験では、0.5mg/lまでは刺激による運動量の増加が見られ、それ以上の濃度では明らかな運動量の阻害が検出された。このことからミジンコの死亡率では毒性もしくは化学物質の存在が検出されなくとも、運動量の変化を見

表1 ミジンコ (D.magna) の24時間の死亡率

濃度 (mg/l)	化学物質			濃度 (mg/l)	化学物質	
	<i>o</i> -CP	<i>m</i> -CP	<i>p</i> -CP		propyzamide	
10	0	0	100	10	0	
5	0	0	75	1	0	
2.5	0	0	75	0.5	0	
				0.25	0	

ることによってその存在が検出し得ることが明らかになった。

5. 結 論

今までのミジンコ遊泳阻害試験と違った立場から、ミジンコの運動量解析の毒性評価方法を開発し、この新しい毒性評価方法を用いた実験から、次のような結論が得られた。

1. ミジンコの運動量解析の毒性評価方法は新しい毒性評価方法として、化学物質のモニタリングに利用することが可能である。

2. 運動量解析装置で、データの取り込み時間は5秒で十分であり、モニタリングの迅速性を向上することができる。

3. ミジンコの生育段階によって、運動量の違いがあるので、供試生物は従来法と同様に生後日数の同一なものを使用する必要がある。

4. 化学物質の低線量曝露の場合、その刺激によって運動量が増加する現象が認められた。逆にこの運動量の増加を指標として化学物質の存在を検出することができる。

5. 実験室でのミジンコの運動量解析の最適時間は化学物質添加後3時間前後で、試験時間が短縮できる。

6. 化学物質の刺激により、ミジンコの運動量の増加を毒性評価指標として、短時間で低濃度の化学物質の存在をモニタリングできる。

参 考 文 献

- 1) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD
- 2) 青山 勲, 羅 栄, ミジンコの運動量による化学物質の毒性評価, 第2回バイオアッセイ研究会・エコトキシコロジー研究会合同研究発表会, 講演要旨集: P 40
- 3) 青山 勲, 羅 栄, 岡村秀雄, (1996) ミジンコの運動量解析による有害化学物質のモニタリング, 第4回 生物利用新技術研究シンポジウム, 論文集: P 59~62
- 4) C.R.Janssen and G.Persoone, Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1993 Vol.12, 711~717
- 5) C.E.W.Steinberg, R.Lorenz and O.H.spieser, Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *BRACH-DANIO RERIO*, *Wat.Res.Vol* 29, 1995, No.3, pp981~985
- 6) Caroline Naylor, Mairead C. Bradley, and Peter Calow, Freeze-dried *Chlorella Vulgaris* as food for *Daphnia magna* Straus in toxicity Testing, *Ecotoxicology and environmental safety*, 1993 Vol 25, 166~172
- 7) K.jung, G.Bitton and B.koopman, Assessment of urease inhibition assays for measuring toxicity of environmental samples, *Wat. Res.* 1995 Vol.29, No.8, 1929~1933
- 8) Aimo Oikari, Jussi Kukkonen and Virpi Virtanen, Acute toxicity of chemicals to *Daphnia magna* in humic waters, *The Science of the Total Environment*, 117/118 (1992) 367~377
- 9) Francois van Hoof, Evaluation of a biomonitor based on the phototactic behaviour of *Daphnia magna* using infrared detection and digital image processing, *Wat. Sci.Tech*, 1994 Vol.30 No10, 79~86
- 10) MD.Ferrando, E.andreu-Moliner and A.Fernandez-Casalderrey, Relative sensitivity of *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus* to five pesticides, *J.envi-ron.Sci.Health*, 1992 B27 (5) ,511~522
- 11) Rene Galli, Hans Waiter Rich, Rudolf Scholtz, Toxicity of organophosphate insecticides and their metabolites to the water flea *Daphnia magna*, the Microtox test and acetylcholinesterase inhibition test, *Aquatic Toxicology*, 1994 Vol.30, 259~269