過酸化水素の植物プランクトン, ワカメ配偶体, シオダマリミジンコ, タテジマフジツボ幼生に対する影響

小平雅之¹⁾・松本智彦²⁾・山田雄一郎³⁾・難波信由³⁾・加戸隆介^{3)*}

¹⁾ 株式会社片山化学工業研究所 〒533-0023 大阪府大阪市東淀川区東淡路1-6-7

²⁾ 片山ナルコ株式会社 〒533-0023 大阪府大阪市東淀川区東淡路1-6-7

³⁾ 北里大学海洋生命科学部 〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1

Effects of hydrogen peroxide on phytoplanktons, seaweed gametophytes, marine harpacticoid copepod and striped barnacle larvae

Masayuki Kohira,¹⁾ Tomohiko Matsumoto,²⁾ Yuichiro Yamada,³⁾ Nobuyoshi Nanba³⁾ and Ryusuke Kado^{3)*}

¹⁾ Katayama chemical, Inc., 1-6-7 Higashiawaji, Higashiyodogawa-ku, Osaka 533-0023, Japan

²⁾ Katayama Nalco Inc., 1-6-7 Higashiawaji, Higashiyodogawa-ku, Osaka 533-0023, Japan

³⁾ School of Marine Biosciences, Kitasato University, Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

* Corresponding author: Ryusuke Kado E-mail: rukado@kitasato-u.ac.jp

(Received May 13, 2014; Accepted August 16, 2016; Published Online February 10, 2017)

Abstract

Seawater is used as a readily available heat exchange medium in steam condensers and LNG regasifiers in coastal power plants and factories. Hydrogen peroxide is often used as an antifoulant in such systems or as a veterinary product for aquaculture. However, ecotoxicological studies of hydrogen peroxide on a variety of marine organisms, especially for common coastal marine species are insufficient unlike those of chlorine which is another antifoulant. Therefore, we studied the biological effect of hydrogen peroxide on five phytoplanktons (*Heterocapsa triquetra*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis* sp., *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex and *Chaetoceros didymus*), seaweed gametophytes (*Undaria pinnatifida*), and crustacean zooplanktons (marine harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* and larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*), and compared with that of residual chlorine. Test results indicated that the lowest no observed effect concentrations (NOEC) of hydrogen peroxide and residual chlorine were estimated to be 1.05 mg/L and less than 0.1 mg/L for all the organisms used in this study, respectively. The difference between the NOECs of hydrogen peroxide and residual chlorine was considered to be due to their different action mechanisms.

Keywords: hydrogen peroxide, marine ecotoxicity, seaweed gametophytes, phytoplankton, zooplankton

緒言

臨海コンビナートや火力発電所では、復水器において大量の海水が冷却水として一過式で通水されており、近年ではLNG気化促進のための加熱用途としての利用も増えている。このような環境下で、ムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* やタテジマフジツボ *Amphibalanus amphitrite* などの様々な海生生物が導水管や復水器などに付着し、通水障害による水頭損失や伝熱低下、配管や復水器細管の腐食の原因となっている。さらに海生生物の付着重量は1発電所当たり年間数トン～数百トンになり、それらに含まれる水分とともに塩分も多いため、その処分にも苦慮するという問題が生じている(清野, 2003)。

海生生物の付着対策としては、海水に添加した過酸化水素や海水電解によって生じる次亜塩素酸(および残留オキシダント)による処理、スポンジボールによる配管

や細管の物理的洗浄、防汚塗料塗布などが実施されている(坂口, 2003)。この中でも過酸化水素や残留塩素による処理は、取水口から大型の復水器や小型の熱交換器群を経て放流口に至るまでの全海水系への対策が可能ることから、有効な付着防除手法となっている。しかしながら水生生物保護のための水質基準である水産用水基準において、遊離および結合残留塩素の総和としての残留塩素(総残留オキシダント)は「検出されないこと」(日本水産資源保護協会, 2013)とされているため、放流口で不検出となる低濃度しか添加できず、十分な防汚効果が得られないことが報告されている(松本・市川, 2013)。また、トリハロメタンなど副生成物の問題も指摘されている(君塚・海老原, 2011)。

これに対し、過酸化水素はスズキ目魚類やフグ目魚類に対しての外部寄生虫駆除剤として、安全性評価のうえで動物用医薬品として農林水産大臣の承認も受けており

(農林水産省, 2016)、臨海コンビナートや独立系発電事業者 (IPP; Independent Power Producer) を中心に徐々にその使用例が増してきている。この過酸化水素はIPPの海生生物対策として、いわゆる環境アセスメントにおいて、放流時に0.7mg/L以下となるように使用することが認められている (資源エネルギー庁, 2000; 原子力安全・保安院, 2009)。

こうした状況を鑑みると、過酸化水素添加海水の放流時の環境影響性を把握しておく必要があると思われる。過酸化水素の海生生物に対する影響評価としては、海産魚ではたとえばアイゴ *Siganus fuscus*、シマハゼ *Tridentiger trigonocephalus*、およびマアジ *Trachurus japonicus* に対する24h-LC₅₀ (半数致死濃度) として、それぞれ224mg/L、155mg/L および89mg/L が (神田ら, 1989)、またクロダイ *Acanthopagrus schlegelii* の30日齢稚魚およびマダイ *Pagrus major* の18日齢稚魚に対する24h-LC₅₀ として7.9mg/L (シエルノンV-10評価研究会, 1987) が報告されている。甲殻類ではブラインシュリンブ *Artemia salina* のノープリウス幼生に対する24h-LC₅₀ として919mg/L (Matthews, 1995)、藻類では海産珪藻 *Nitzschia closterium* に対する72h-EC₅₀ (50%生長阻害濃度) として0.85mg/L (Florence et al., 1986)、あるいは海産珪藻 *Skeletonema costatum* に対する72h-NOEC (最大無影響濃度) として0.63mg/L (ECHA, 2016) が知られているが、沿岸生態系に一般的に見られる生物種に対する報告例は十分とは言えない状況にある。

そこで、日本の沿岸海域で一般的に見られる低次生産に関与する生物種に対して過酸化水素が及ぼす影響について有用な基礎的知見を収集することを目的として本研究を行い、興味深い結果が得られたので、以下報告する。本研究では生態系における基礎生産者および一次消費者から、浮遊性および固着性生物種を供試生物として選定した。すなわち、基礎生産者から浮遊性生物種として植物プランクトン5種、および固着性生物種としてワカメ *Undaria pinnatifida* の配偶体を、また一次消費者から浮遊性生物種として動物プランクトンであるシオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* を、また固着性生物種としてタテジマフジツボ *A. amphitrite* の幼生を用いた。ワカメは水産資源としても有用な大型植物であり、タテジマフジツボは海水冷却系の汚損生物としても重要な種であることから、本研究での評価対象とした。また参考として、同じく付着生物対策に用いられる海水電解によって生じる次亜塩素酸についても同様の検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 供試薬剤と濃度測定

過酸化水素として35%過酸化水素 (シエルノンV-10、株式会社片山化学工業研究所) を、次亜塩素酸として有効塩素12%低食塩次亜塩素酸ナトリウム溶液 (サンラックP、本町化学工業株式会社) を暴露試験に用いた。

過酸化水素の濃度は4-アミノアンチピリン比色法 (定量限界0.07mg/L) により測定した (慶田ら, 1981)。次亜塩素酸の濃度は遊離残留塩素測定キット (柴田科学株式会社) を用いてDPD法 (定量限界0.05mg as Cl₂/L、以下、単にmg/Lとする) により測定した。ここで次亜塩素酸を海水に添加すると速やかに臭化物イオンを酸化して次亜臭素酸を生成し、さらに海水中にアンモニア態窒素がある場合は引き続きブロマミン類が生成する (Taylor, 2006)。これらは上述のDPD法では遊離塩素として検出されることが知られており (山本ら, 1982)、本論文では以下、これらを総称して遊離オキシダント (Free oxidant) とする (古田ら, 2012)。

暴露試験の薬剤濃度は全て薬剤の添加濃度から算出した設定濃度であり、初期濃度は測定しなかった。後述する植物プランクトン5種の暴露試験における供試薬剤の残留率は、暴露開始後24時間ごとに暴露終了直後まで薬剤濃度を測定し、設定濃度を100%としたときの残留率として示した。

2. 供試生物

基礎生産者として、国立環境研究所より入手した植物プランクトン5種 (珪藻 *Skeletonema marinoi-dohnii* complex (NIES-324)、珪藻 *Chaetoceros didymus* (NIES-586)、渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* (NIES-235)、クリプト藻 *Rhodomonas salina* (NIES-1375)、プラシノ藻 *Tetraselmis* sp. (NIES-1429))、岩手県田老町産の褐藻ワカメ *U. pinnatifida* の配偶体、一次消費者として、岩手県大船渡市舟作海岸より入手した終生動物プランクトンであるシオダマリミジンコ *T. japonicus*、兵庫県姫路市沿岸で採集したタテジマフジツボ *A. amphitrite* の一時性動物プランクトンである幼生を用いた。

3. 薬剤への暴露

1) 植物プランクトン5種

国立環境研究所より入手した5種の藻類をTable 1の条件下で増殖させた後、試験に使用した。培養温度については種ごとに最適な培養温度が異なるため、株の分譲を受けた国立環境研究所で培養されている温度に合わせた。

培養チューブ (培養3号、株式会社マルエム) に、滅菌ろ過海水を用いて作成したF/2培地 (Guillard and Rytter, 1962) により濃度調整した供試薬剤溶液30mLを分注し、各植物プランクトンの培養液を所定の初期細胞密度となるように接種した。過酸化水素と遊離オキシダントで各6試験区、さらに薬剤を含まない対照区を設定し、Table 1に示す条件下で3回の暴露試験を実施した。試験期間中に換水は行わず、各試験区の細胞密度を毎日計数した。1回目の試験では細胞密度計数時に両薬剤の残留濃度を測定し、残留率を算出した。

各試験区の細胞密度は、培養チューブをボルテックスミキサーで攪拌後、蛍光光度計 (10AU、Turner Designs) で測定した *in vivo* クロロフィル蛍光強度の測定値から、以下に述べる方法で作成した各植物プランクト

Table 1. Experimental condition of exposure tests of the five phytoplanktons (*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex, *Chaetoceros didymus*, *Heterocapsa triquetra*, *Rhodomonas salina* and *Tetraselmis* sp.), the seaweed (*Undaria pinnatifida* gametophytes), the copepod (*Tigriopus japonicus*) and the barnacle (*Amphibalanus amphitrite*) larvae for hydrogen peroxide and free oxidant.

Species	Nominal antifoulant concentration (mg/L)		Temp. (°C)	Irradiance (μmol/m ² /s)	Photo period	Culture medium	Culture time (hr)
	Hydrogen peroxide	Free oxidant					
Phytoplankton							
<i>S. marinoi-dohrnii</i> complex	0.35, 1.05, 3.5, 10.5, 35, 105	0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5	15	161	14L: 10D	F/2 medium	96
<i>C. didymus</i>			15				
<i>H. triquetra</i>			20				
<i>R. salina</i>			20				
<i>Tetraselmis</i> sp.			25				
Seaweed							
<i>U. pinnatifida</i> gametophytes	0.35, 1.05, 3.5, 10.5, 35, 105, 350	0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5	20	20	12L: 12D	Seawater	72
Copepod							
<i>T. japonicus</i>	0.35, 1.05, 3.5, 10.5, 35, 105	0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5	25	Total darkness		Seawater	72 (72)
Barnacle larvae							
<i>A. amphitrite</i> Nauplius II–III	0.175, 0.35, 1.05, 3.5, 10.5	0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 2	20	Total darkness		Artificial seawater	24 (72)
Nauplius IV–V							
Cypris	0.35, 1.05, 3.5, 10.5, 35	0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 2					

Posttest culture times are indicated in parentheses.

ンの蛍光値–細胞密度の回帰式を用いて換算した。各植物プランクトンの培養株をF/2培地を用いて4段階の細胞密度に希釈し、*in vivo*クロロフィル蛍光値を測定した後に1mLをマイクロチューブ（容量1.5mL）に採取し、1%ルゴール溶液で固定した後に、血球計数板を用いて生物顕微鏡下で細胞数を計数した。これらの値より蛍光値–細胞密度の回帰直線を作成した。なお、3回実施した暴露試験における各植物プランクトンの初期細胞密度は、*S. marinoi-dohrnii* complex で 6813 ± 345 cells/mL、*C. didymus* では 3821 ± 251.7 cells/mL、*H. triquetra* で 958.7 ± 72.33 cells/mL、*R. salina* で 13015 ± 2417 cells/mL、*Tetraselmis* sp. で 22785 ± 789.0 cells/mLであった。

各植物プランクトンの生長速度は、次の式に従って試験区毎に求めた（OECD, 2006）。

$$\mu = (\ln X_4 - \ln X_0) / 4 \quad (1)$$

式中、 X_0 と X_4 は試験開始時と終了時（4日後）の細胞密度（cells/mL）、 μ は生長速度（/day）とし、全細胞死亡となった試験区は対数計算のため細胞密度を1 cell/mLとして解析した。

2) ワカメ配偶体

ワカメ *U. pinnatifida* の雌性・雄性配偶体（Nanba et al., 2009；難波ら, 2013）を、Table 1 の条件下で滅菌ろ過海水を用いて作成したESI培地（Tatewaki, 1966）中で増殖させた後、プロセスホモジナイザー（ph91、株式会社エスエムテ）により断片化し、滅菌ろ過海水中で2日間保存した後、試験に使用した。

15mL容遠沈管に、滅菌ろ過海水を用いて所定の初期配偶体断片密度となるように調整した雌性・雄性配偶体懸濁液1mLと供試薬剤溶液9mLを加えて攪拌し、遠心分離して上澄み9mLを廃棄した後に濃度調整した薬剤

9mLを加える操作を2回繰り返して、過酸化水素で7試験区、遊離オキシダントで各6試験区、さらに薬剤を含まない対照区を設定し、Table 1 に示す条件下で暴露試験を実施した。試験期間中、濃度試験区を設定した方法を用いて毎日換水し、試験終了時に各試験区の断片当りの細胞死亡率を算出した。この細胞死亡率は、0.05%エリスロシン海水溶液を用いて雌性・雄性配偶体各15断片の死細胞を赤色に染色した後（Saga et al., 1989）、生物顕微鏡下で生細胞数と死細胞数を測定して算出した。

なお、暴露試験は2回実施し、その初期配偶体断片密度と断片当りの細胞死亡率は対照区の配偶体を用いて算出した。そして、断片密度（各試験で3回測定）と断片当りの細胞死亡率（各試験で15断片測定）の平均値と標準誤差は、雌性配偶体で 2222 ± 16 、 2315 ± 245 fragments/mLと 28.7 ± 6.1 、 $21.2 \pm 4.4\%$ 、雄性配偶体で 2500 ± 424 、 2778 ± 578 fragments/mLと 9.3 ± 2.4 、 $15.1 \pm 3.6\%$ であった。また、2回目の試験に使用した雌性・雄性配偶体各50細胞の大きさ（投影面積）を測定し、*t*-testを用いて雌雄間の有意差の有無を解析した。

さらに、両供試薬剤がワカメ配偶体に及ぼす短時間での影響を明らかにするために、両薬剤の最も高い濃度試験区（過酸化水素で350mg/L、遊離オキシダントでは5mg/L）と、薬剤を含まない対照区において3時間の暴露試験を2回実施し、試験終了時に各試験区の断片当りの細胞死亡率を算出した。そして、雌性・雄性配偶体それぞれにおける各薬剤の濃度試験区と対照区との間の有意差の有無をunpaired *t*-testを用いて解析した。

3) シオダマリミジンコ

シオダマリミジンコ *T. japonicus* を、Table 1 の条件下で継代飼育した後、形態異常、行動異常の個体を除外した雌成体を試験に使用した。雌成体は他の成長段階や雄成体に比べて一番大きく、遊泳行動が観察しやすいとい

う利点があるため、本研究に使用した。

滅菌ろ過海水 10 mL を満たした 6 ウェルマイクロプレート の 1 ウェルに、雌成体を 10 個体ずつ実体顕微鏡を用いて分取した後、先端に目合い 40 μ m のナイロンメッシュを取り付けた駒込ピペットを用いてウェル内の海水と、滅菌ろ過海水を用いて濃度調整した供試薬剤溶液を入れ替えた。この操作を 2 回繰り返して、過酸化水素と遊離オキシダントで各 6 試験区、さらに薬剤を含まない対照区を設定し、Table 1 に示す条件下で 3 回の暴露試験を実施した。試験期間中、濃度試験区を設定した方法を用いて毎日換水した。

暴露試験終了時に実体顕微鏡下で、試験容器を穏やかに動かしても 15 秒間動かない個体を遊泳阻害のある影響個体として計数し、影響率を算出した。そして、対照区と、影響率に対照区と差のない濃度試験区では、暴露試験と同じ方法を用いて試験水を滅菌ろ過海水に換水し、72 時間の飼育試験 (posttest) を行った。飼育試験中は毎日換水し、飼育開始時と 48 時間後に *Tetraselmis* sp. を給餌した。飼育試験終了時には、暴露試験と同じ方法を用いて影響個体を計数し、影響率を算出した。

4) タテジマフジツボ幼生

本種幼生は、株式会社セシルリサーチで飼育されている複数のタテジマフジツボ成体から放出されたノープリウス幼生を、珪藻 *Chaetoceros calcitrans* を餌として Table 1 の条件下でノープリウス幼生 II~III 期、ノープリウス幼生 IV~V 期、キブリス幼生まで飼育した。各発生段階の幼生を 6.5°C で 1-2 日保管した後、室温に戻して試験に使用した。

GFC フィルター (Whatman) で濾過した水道水で塩分 32 に調製した人工海水 (インスタントオーシャンプレミアム、チャーム社) を満たした 6 ウェルマイクロプレート の 1 ウェルに各発生段階の幼生を、10 個体ずつ実体顕微鏡を用いて分取した。その後、先端に目合い 40 μ m のナイロンメッシュを取り付けた駒込ピペットを用いてウェル内の海水と、人工海水を用いて濃度調整した供試薬剤溶液を入れ替えた。この操作を 3 回繰り返して、過酸化水素と遊離オキシダントで各 5 試験区、さらに薬剤を含まない対照区を設定し、Table 1 に示す条件下で各発生段階の幼生に対して各 3 回の暴露試験を実施した。

暴露試験終了時に実体顕微鏡下で死亡および遊泳障害のある個体を影響個体として計数し、影響率を算出した。対照区と、影響率に対照区と差のない濃度試験区では、暴露試験と同じ方法を用いて試験水を人工海水に換水し、72 時間の飼育試験 (posttest) を実施した。飼育期間中は毎日換水し、キブリス幼生の試験区を除いて *C. calcitrans* を毎日給餌した。飼育試験終了時には、暴露試験と同じ方法を用いて影響個体を計数し、影響率を算出した。なお、遊離オキシダント暴露後の飼育試験は濃度 2 mg/L 以外の試験区で行った。なお、「死亡」は全く動かない個体、「遊泳障害」はウェル底に沈んで動きの

少ない個体とした。

4. 無影響濃度 (NOEC)

過酸化水素と遊離オキシダントに対する暴露試験において、植物プランクトン 5 種では生長速度、ワカメ雌性・雄性配偶体では暴露試験終了時の断片当りの細胞死亡率、シオダマリミジンコとタテジマフジツボ幼生では暴露試験終了時と飼育試験終了時の影響率について、過酸化水素と遊離オキシダントにおける試験区間の有意差の有無をそれぞれ一元配置分散分析で解析し、対照区と各濃度試験区との有意差の有無を Dunnett's Multiple Comparison Test または unpaired *t*-test を用いて検証した。なお、植物プランクトン 5 種において生長速度が負の濃度試験区、ワカメ配偶体において断片当りの細胞死亡率が 100% の濃度試験区、シオダマリミジンコとタテジマフジツボ幼生において影響率が 100% の濃度試験区は影響あり、シオダマリミジンコとタテジマフジツボ幼生において影響率が 0% の濃度試験区は無影響として統計解析から除外した。これらの解析結果に基づいて各供試生物に対する両薬剤の NOEC を求めた。

本研究では、2 回実施した暴露試験での合計配偶体断片数 30 断片を繰り返し数としたワカメ配偶体を除き、すべての解析における繰り返し数は各解析に用いた試験回数とした。Unpaired *t*-test を用いる前には *F* test、一元配置分散分析を用いる前には Bartlett's test によって等分散性を検証し、否定された場合には前者の代わりに unpaired *t*-test with Welch's correction、後者の代わりに Kruskal-Wallis test と Dunn's Multiple Comparison Test を用い、危険率 5% 未満 ($P < 0.05$) を有意差ありと判定した。

5. 半数影響濃度 (ErC₅₀、EC₅₀)、半数致死濃度 (LC₅₀)

過酸化水素と遊離オキシダントに対する植物プランクトン 5 種の暴露試験において、前出の (1) 式で算出した生長速度から、次の式に従って濃度試験区毎に生長阻害率を求めた (OECD, 2006)。

$$I_{\mu} = (\mu_C - \mu_T) / \mu_C \times 100 \quad (2)$$

式中、 μ_C および μ_T は、対照区および各濃度試験区の生長速度 (/day)、 I_{μ} は生長阻害率 (%) を示す。

次いで、両薬剤について生長阻害率の平均値が 50% を挟む前後 2 試験区の生長阻害率を薬剤濃度で対数回帰し、その回帰式において生長阻害率が 50% となる濃度を求めて各植物プランクトンの生長速度法による半数影響濃度 ErC₅₀ とした。

また、両薬剤に対する暴露試験でのワカメ雌性・雄性配偶体、シオダマリミジンコ、タテジマフジツボ幼生の EC₅₀ は、以下の濃度反応曲線 (De Lean et al., 1978) に従って求めた。

$$Y = a + (100 - a) / (1 + 10^{((\log LC_{50} - X) \times b)}) \quad (3)$$

式中、 X は薬剤濃度 (mg/L) の対数、 Y はワカメ雌性・

雄性配偶体では断片当りの細胞死亡率(%)、シオダマリミジンコとタテジマフジツボ幼生では影響率(%), aは自然影響率、すなわち各供試生物での対照区の値(%), bはヒル勾配(Hillslope)を示す。

なお、シオダマリミジンコとタテジマフジツボ幼生において(3)式が適用できなかった場合は、影響率100%と対照区の影響率との中央値を半数影響率値とし、両薬剤について影響率の平均値が半数影響率値を挟む前後2試験区の影響率の値を薬剤濃度で対数回帰し、その回帰式において影響率が半数影響率値となる薬剤濃度を求めてEC₅₀とした。

結果

1. 無影響濃度(NOEC)

1) 植物プランクトン5種

過酸化水素への暴露期間中、植物プランクトン5種の対照区と、*S. marinoi-dohrnii* complex、*C. didymus*、*R. salina*の濃度0.35~1.05 mg/L、*H. triquetra*、*Tetraselmis* sp.の0.35~3.5 mg/Lの試験区では細胞密度が増加したため正の生長速度を示した。一方、他のすべての濃度試験区では暴露期間中に細胞密度が減少したため生長速度は負の値を示し、*S. marinoi-dohrnii* complexの濃度105 mg/L、*C. didymus*の35~105 mg/L、*H. triquetra*と*Tetraselmis* sp.の10.5~105 mg/L、*R. salina*の3.5~105 mg/Lの試験区ですべての細胞が死亡した(Fig. 1)。*S. marinoi-dohrnii* complex (一元配置分散分析:

$F_{2,6}=0.6881$, $P=0.5382$)、*C. didymus* (一元配置分散分析: $F_{2,6}=2.468$, $P=0.1651$)、*R. salina* (一元配置分散分析: $F_{2,6}=0.09578$, $P=0.9100$)では正の生長速度を示した濃度試験区と対照区との間に有意差はなかったが、*H. triquetra* (一元配置分散分析: $F_{3,8}=17.53$, $P<0.001$; Dunnett's Multiple Comparison Test: $P=0.0007$)と*Tetraselmis* sp. (一元配置分散分析: $F_{3,8}=141.6$, $P<0.001$; Dunnett's Multiple Comparison Test: $P<0.0001$)では濃度3.5 mg/Lの試験区で対照区よりも低くなった。

遊離オキシダントへの暴露期間中、植物プランクトン5種の対照区と、*S. marinoi-dohrnii* complexの濃度0.1 mg/L、*C. didymus*の0.1~0.3 mg/L、*H. triquetra*、*R. salina*の0.1~0.5 mg/L、*Tetraselmis* sp.の0.1~1 mg/Lの試験区では細胞密度が増加したため正の生長速度を示したが、他のすべての濃度試験区では暴露期間中に細胞密度が減少したため生長速度は負の値を示し、*S. marinoi-dohrnii* complex、*Tetraselmis* sp.の濃度3~5 mg/L、*C. didymus*、*H. triquetra*および*R. salina*の1~5 mg/Lの試験区ですべての細胞が死亡した。*C. didymus* (一元配置分散分析: $F_{2,6}=0.1527$, $P=0.8616$)、*H. triquetra* (一元配置分散分析: $F_{3,8}=2.444$, $P=0.1388$)、*R. salina* (一元配置分散分析: $F_{3,8}=0.1443$, $P=0.9305$)では正の生長速度を示した濃度試験区と対照区との間に有意差はなかったが、*S. marinoi-dohrnii* complexでは濃度0.1 mg/Lの試験区で対照区よりも低く(unpaired *t*-test: $t_4=4.022$, $P=0.0158$)、*Tetraselmis* sp.では濃度0.1、0.5、1 mg/Lの

Fig. 1. Growth rates of the five phytoplanktons (*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex, *Chaetoceros didymus*, *Heterocapsa triquetra*, *Rhodomonas salina* and *Tetraselmis* sp.) after 96 hours of exposure to the two antifoulants. Data are shown as means $\pm$ S.E.M. ($n=3$). Treatments with asterisks (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$), except for those showing negative growth rates, were significantly different from the control by Dunnett's Multiple Comparison Test.

Table 2. No observed effect concentrations (NOECs) and E(L)C₅₀ of the five phytoplanktons, *Undaria pinnatifida* gametophytes, *Tigriopus japonicus* and *Amphibalanus amphitrite* larvae for the two antifoulants.

Species	Hydrogen peroxide		Free oxidant	
	NOEC (mg/L)	E(L)C ₅₀ (mg/L)	NOEC (mg/L)	E(L)C ₅₀ (mg/L)
<i>S. marinoi-dohrnii</i> complex	1.05	1.46 (1.27–1.63)	< 0.1	0.13 (0.10–0.15)
<i>C. didymus</i>	1.05	1.11 (0.01–1.90)	0.3	0.33 (0.19–0.39)
<i>H. triquetra</i>	1.05	2.10 (1.51–3.13)	0.5	0.52 (0.43–0.59)
<i>R. salina</i>	1.05	1.19 (0.97–1.38)	0.5	0.53 (0.48–0.58)
<i>Tetraselmis</i> sp.	1.05	3.72 (3.64–3.79)	< 0.1	1.08 (1.06–1.11)
<i>U. pinnatifida</i> Female gametophyte	3.5	13.28 (10.87–16.22)	0.1	0.31 (0.29–0.34)
Male gametophyte	3.5	6.13 (5.47–6.87)	0.1	0.18 (0.16–0.20)
<i>T. japonicus</i>	10.5	20.02 (17.74–22.65)	0.5	1.51 (1.34–1.69)
<i>A. amphitrite</i> Nauplius II–III	1.05	3.15 (2.41–5.05)	0.5	0.51 (0.41–0.62)
Nauplius IV–V	1.05	2.59 (2.22–3.03)	0.5	0.93 (0.81–1.05)
Cypris	3.5	9.87 (9.12–10.68)	> 2	> 2

E(L)C₅₀ in parentheses indicate 95 % confidence intervals.All of NOEC and E(L)C₅₀ values were derived from the nominal concentrations of the antifoulants.

試験区で対照区よりも低くなった（一元配置分散分析： $F_{4,10}=61.67$, $P<0.0001$ ；Dunnnett's Multiple Comparison Test： $P<0.001\sim0.05$ ）（Fig. 1）。

これらの解析結果から、過酸化水素の植物プランクトンに対するNOECはすべての種で1.05 mg/L、遊離オキシダントのNOECは*S. marinoi-dohrnii* complexと*Tetraselmis* sp.で0.1 mg/L未満、*C. didymus*で0.3 mg/L、*H. triquetra*と*R. salina*で0.5 mg/Lになった（Table 2）。

2) ワカメ配偶体

暴露試験（2回目）に使用した配偶体細胞の大きさ（投影面積の平均値と標準誤差）は、雌性配偶体で $247.4\pm6.7\mu\text{m}^2$ 、雄性配偶体では $53.1\pm1.0\mu\text{m}^2$ であり、前者は後者の4.7倍であった（unpaired *t*-test with Welch's correction: $t_{51}=28.83$, $P<0.0001$ ）。

過酸化水素へ暴露後のワカメ配偶体の断片当りの細胞死亡率は、雌雄ともに濃度10.5 mg/Lの試験区で対照区よりも高く（雌性配偶体、一元配置分散分析： $F_{4,145}=3.319$, $P=0.0124$ ；Dunnnett's Multiple Comparison Test： $P<0.01$ 、雄性配偶体、Kruskal–Wallis test： $H_5=73.22$, $P<0.0001$ ；Dunn's Multiple Comparison Test： $P<0.001$ ）、濃度35 mg/L以上の試験区ですべての細胞が死亡した。一方、遊離オキシダントへ暴露後の雌性配偶体の断片当りの細胞死亡率は0.3~0.5 mg/L（Kruskal–Wallis test: $H_4=60.49$, $P<0.0001$ ；Dunn's Multiple Comparison Test: $P<0.001$ ）、雄性配偶体では濃度0.3 mg/Lの試験区で対照区よりも高く（一元配置分散分析： $F_{2,87}=834.6$, $P<0.0001$ ；Dunnnett's Multiple Comparison Test： $P<0.001$ ）、これらの濃度以上の試験区ではすべての細胞が死亡した（Fig. 2）。従って、ワカメ配偶体に対する過酸化水素のNOECは雌雄ともに3.5 mg/L、遊離オキシダントのNOECは統計解析の結果、雌雄ともに0.1 mg/Lになった（Table 2）。

さらに、両供試薬剤がワカメ配偶体に及ぼす短時間での影響を明らかにするために実施した3時間の暴露

Fig. 2. Cell mortalities of the female and male *Undaria pinnatifida* gametophytes after 72 hours of exposure to the two antifoulants. Data are shown as means $\pm$ S.E.M. ($n=30$). Treatments with asterisks (** $P<0.01$ and *** $P<0.001$), except for those showing 100% of cell mortality, were significantly different from the control by Dunnnett's Multiple Comparison Test or Dunn's Multiple Comparison Test.

試験後には、過酸化水素試験区での細胞死亡率は雌雄ともに対照区より高くなったが、雌性配偶体で対照区の1.4倍の35.6%（unpaired *t*-test with Welch's correction: $t_{45}=2.419$, $P=0.0197$ ）、雄性配偶体では対照区の1.9倍の23.2%に留まった（unpaired *t*-test: $t_{58}=3.409$, $P=0.0012$ ）。一方、遊離オキシダント試験区では雌雄ともにすべての細胞が死亡した（Fig. 3）。

3) シオダマリミジンコ

過酸化水素暴露後の影響率0%と100%を除く濃度試験区（濃度1.05、35 mg/Lの試験区）と対照区との間では、濃度35 mg/Lの試験区の影響率が対照区より高くなった（Kruskal–Wallis test: $H_3=6.788$, $P=0.0336$ ；Dunn's Multiple

Fig. 3. Cell mortalities of the female and male *Undaria pinnatifida* gametophytes after 3 hours of exposure to the two antifoulants. Data are shown as means $\pm$ S.E.M. ($n=30$). Treatments with asterisks (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$), except for those showing 100% of cell mortality, were significantly different from the control by unpaired t -test or unpaired t -test with Welch's correction. HP and FO represent hydrogen peroxide and free oxidant, respectively.

Fig. 4. Effect rates of *Tigriopus japonicus* after 72 hours of exposure to the two antifoulants. Data are shown as means $\pm$ S.E.M. ($n=3$). The treatments with asterisks (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$), except for those showing 0 and 100% of effect rates, were significantly different from the control group by Dunn's Multiple Comparison Test.

Comparison Test: $P<0.05$). 一方、遊離オキシダント暴露後の影響率0%と100%を除く濃度試験区（濃度0.3、1 mg/Lの試験区）と対照区との間では、濃度1 mg/Lの試験区の影響率が対照区より高くなった（Kruskal-Wallis test: $H_3=6.168$, $P=0.0458$; Dunn's Multiple Comparison Test: $P<0.05$) (Fig. 4)。したがって、過酸化水素暴露後の飼育試験は対照区と濃度0.35~10.5 mg/Lの試験区、遊離オキシダント暴露後では対照区と濃度0.1~0.5 mg/Lの試験区で実施したが、飼育試験後の影響率はすべての試験区で0%であった。これら暴露試験と飼育試験の結果から、シオダマリミジンコに対する過酸化水素の

NOECは10.5 mg/L、遊離オキシダントのNOECは0.5 mg/Lになった（Table 2）。

4) タテジマフジツボ幼生

過酸化水素暴露後の影響率0%と100%を除く濃度試験区と対照区との間では、ノープリウス幼生II~III期における濃度3.5 mg/Lの試験区と（一元配置分散分析: $F_{2,6}=25.50$, $P=0.0012$; Dunnett's Multiple Comparison Test: $P<0.01$ ）、キプリス幼生期における濃度35 mg/Lの試験区の影響率が対照区より高くなったが（Kruskal-Wallis test: $H_3=7.579$, $P=0.0226$; Dunn's Multiple Comparison Test: $P<0.05$ ）、ノープリウス幼生IV~V期における対照区と濃度0.175~3.5 mg/Lの試験区間では有意差はなかった（Kruskal-Wallis test: $H_3=9.206$, $P=0.0562$ ）。従って、暴露試験後の飼育試験はノープリウス幼生II~III期で対照区と濃度0.175~1.05 mg/Lの試験区、ノープリウス幼生IV~V期で対照区と0.175~3.5 mg/Lの試験区、キプリス幼生期では対照区と0.35~10.5 mg/Lの試験区で実施した。飼育試験後の影響率0%を除く濃度試験区と対照区との間では、ノープリウス幼生II~III期における対照区と濃度0.175~1.05 mg/Lの試験区間で有意差はなかったが（一元配置分散分析: $F_{3,8}=1.142$, $P=0.3892$ ）、ノープリウス幼生IV~V期における濃度3.5 mg/Lの試験区と（一元配置分散分析: $F_{3,8}=33.26$, $P<0.0001$; Dunnett's Multiple Comparison Test: $P<0.001$ ）、キプリス幼生期における濃度10.5 mg/Lの試験区の影響率が対照区より高くなった（unpaired t -test with Welch's correction: $t_2=19.01$, $P=0.0028$) (Fig. 5)。これら暴露試験と飼育試験の解析結果から、タテジマフジツボ幼生に対する過酸化水素のNOECは、ノープリウス幼生II~III期とIV~V期で1.05 mg/L、キプリス幼生期では3.5 mg/Lになった（Table 2）。

遊離オキシダント暴露後の影響率0%と100%を除く濃度試験区と対照区との間では、ノープリウス幼生II~III期の対照区と濃度0.1~0.5 mg/Lの試験区間と（一元配置分散分析: $F_{3,8}=3.159$, $P=0.0859$ ）、ノープリウス幼生IV~V期の対照区と濃度0.5 mg/Lの試験区間の影響率に有意差はなく（unpaired t -test with Welch's correction: $t_2=1.732$, $P=0.2254$ ）、キプリス幼生期の影響率は対照区を含むすべての試験区で0%であった（Fig. 5）。従って、暴露試験後の飼育試験は全ての発生段階に対して対照区と濃度0.05~0.5 mg/Lの試験区で行った。飼育試験後の影響率0%を除く濃度試験区と対照区との間では、ノープリウス幼生II~III期の対照区と濃度0.05~0.5 mg/Lの試験区間（一元配置分散分析: $F_{4,10}=4.994$, $P=0.0179$; Dunnett's Multiple Comparison Test: $P>0.05$ ）、ノープリウス幼生IV~V期の対照区と濃度0.05~0.5 mg/Lの試験区間（一元配置分散分析: $F_{4,10}=0.604$, $P=0.6689$ ）、キプリス幼生期の対照区と濃度0.05 mg/L、0.5 mg/Lの試験区間の影響率に有意差はなかった（Kruskal-Wallis test: $H_3=2.127$, $P=0.3452$) (Fig. 5)。これら暴露試験と飼育試験の解析結果から、タテジマフジツボ幼生に対する遊離

Fig. 5. Effect rates of the *Amphibalanus amphitrite* larvae (nauplius II–III, nauplius IV–V, and cypris) after 24 hours of exposure to the two antifoulants, and after 72 hours of the posttest. After the exposure test, the control and unaffected treatments groups were used for the posttest. Data are shown as means $\pm$ S.E.M. ($n=3$). Treatments with asterisks (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$), except for those showing 0 and 100% of effect rates, were significantly different from the control by Dunnett's Multiple Comparison Test, Dunn's Multiple Comparison Test, or unpaired t -test with Welch's correction.

Fig. 6. Retention rates of the two antifoulants in exposure tests of the five phytoplanktons. Data for 15 and 20°C are shown as means ($n=2$ phytoplanktons). The temperature value shown in each figure indicates the experimental temperature.

オキシダントのNOECは、ノープリウス幼生II～III期とIV～V期で0.5mg/L、キブリス幼生期では2mg/L以上になった (Table 2)。

2. 半数影響濃度 (E_rC_{50} 、 EC_{50})、半数致死濃度 (LC_{50})

1) 植物プランクトン5種

過酸化水素と遊離オキシダントに対する植物プランクトン5種の暴露試験で得られた濃度試験区の生長速度 (Fig. 1) から算出した生長阻害率をTable 3に示す。生長阻害率50%を挟む前後2試験区の生長阻害率 (Table 3の太字) と薬剤濃度から求めた過酸化水素に対する E_rC_{50} は、*S. marinoi-dohrnii* complex で1.46mg/L、*C. didymus* で1.11mg/L、*H. triquetra* で2.10mg/L、*R. salina* で1.19mg/L、*Tetraselmis* sp. で3.72mg/Lであった。一方、遊離オキシダントに対する E_rC_{50} は *S. marinoi-dohrnii* complex で0.13mg/L、*C. didymus* で0.33mg/L、*H. triquetra* で0.52mg/L、*R. salina* で0.53mg/L、*Tetraselmis* sp. で1.08mg/Lであった (Table 2)。

2) ワカメ配偶体

前出 (3) 式の濃度反応曲線に従って求めた過酸化水素に対する LC_{50} は、ワカメ雌性・雄性配偶体でそれぞれ13.28mg/Lと6.13mg/L、ヒル勾配は3.29と5.45であった。一方、遊離オキシダントに対する LC_{50} はそれぞれ0.31mg/Lと0.18mg/L、ヒル勾配は3.52と6.45であった (Table 2)。

3) シオダマリミジンコ

過酸化水素と遊離オキシダントに対するシオダマリミジンコの EC_{50} には (3) 式の濃度反応曲線が適用できなかったため、影響率50%を挟む前後2試験区の影響率を用いて算出した。そして、濃度10.5mg/Lと35mg/Lの影響率 (Fig. 4) を用いて算出した過酸化水素に対する EC_{50} は20.02mg/L、濃度1mg/Lと3mg/Lの影響率 (Fig. 4) を用いて算出した遊離オキシダントに対する EC_{50} は1.51mg/Lであった (Table 2)。

4) タデジマフジツボ幼生

過酸化水素に対するノープリウス幼生IV～V期とキブリス幼生期、遊離オキシダントに対するノープリウス

幼生II～III期の EC_{50} は (3) 式の濃度反応曲線に従って算出したが、過酸化水素に対するノープリウス幼生II～III期と遊離オキシダントに対するノープリウス幼生IV～V期の EC_{50} には、この濃度反応曲線が適用できなかったため影響率50%を挟む前後2試験区の影響率を用いて算出した。

過酸化水素に対するノープリウス幼生IV～V期とキブリス幼生期の EC_{50} は、それぞれ2.59mg/Lと9.87mg/L、ヒル勾配は2.94と4.25、遊離オキシダントに対するノープリウス幼生II～III期の EC_{50} は0.51mg/L、ヒル勾配は2.92であった (Table 2)。一方、濃度1.05mg/Lと3.5mg/Lの影響率 (Fig. 5) を用いて算出した過酸化水素に対するノープリウス幼生II～III期の EC_{50} は3.15mg/L、濃度0.5mg/Lと2mg/Lの影響率 (Fig. 5) を用いて算出した遊離オキシダントに対するノープリウス幼生IV～V期の EC_{50} は0.93mg/Lであった (Table 2)。また、遊離オキシダントに対するキブリス幼生期の暴露試験では影響率50%以上の試験区がなく (Fig. 5)、 EC_{50} が算出できなかったため、最も高い試験濃度の2mg/Lより大きいと判断した (Table 2)。

3. 植物プランクトン5種の暴露試験における供試薬剤の残留率

植物プランクトン5種への暴露試験期間中の過酸化水素と遊離オキシダントの設定濃度を100%としたときの残留率をFig. 6に示す。なお、水温15℃の残留率は *S. marinoi-dohrnii* complex と *C. didymus*、20℃の残留率は *H. triquetra* と *R. salina* に対する暴露試験での測定値の平均、25℃の残留率は *Tetraselmis* sp. に対する暴露試験での測定値で表した。

過酸化水素の残留率は、水温15℃の濃度0.35～1.05mg/Lの試験区で72～96時間後、水温20℃と25℃の濃度0.35～3.5mg/Lの試験区では24～72時間後と24～48時間後に0%になった。そして、水温15℃の濃度3.5～105mg/Lの試験区で96時間後に57～76%、水温20℃と25℃の濃度10.5～105mg/Lの試験区では28～59%と8～51%に減少した。一方、遊離オキシダントの残留率は、

Table 3. Growth inhibition rates (%) of the five phytoplanktons (*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex, *Chaetoceros didymus*, *Heterocapsa triquetra*, *Rhodomonas salina* and *Tetraselmis* sp.) after 96 hours of exposure to the two antifoulants.

Antifoulant concentration (mg/L)	<i>S. marinoi-dohrnii</i> complex	<i>C. didymus</i>	<i>H. triquetra</i>	<i>R. salina</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.
Hydrogen peroxide					
0.35	2.0±3.4	-21.5±12.8	-3.9±8.5	-1.3±0.6	0.6±0.7
1.05	-2.1±5.0	11.1±9.4	11.2±9.4	3.7±0.4	0.3±0.7
3.5	190.1±11.7	814±255.6	78.4±8.0	461.3±36.4	28.6±1.1
10.5	414.9±106.7	871.5±287.4	593.8±63.2	461.3±36.4	417.4±3.7
35	526.3±9.8	1038.9±128.8	593.8±63.2	461.3±36.4	417.4±3.7
105	526.3±9.8	1038.9±128.8	593.8±63.2	461.3±36.4	417.4±3.7
Free oxidant					
0.1	11.6±1.1	-6.7±5.3	-6.8±9.9	0.4±1.4	7.7±0.1
0.3	173.3±16.7	12.6±33.4	0.0±10.6	0.6±2.0	3.2±0.4
0.5	201.6±3.5	239.6±48.7	19.3±12.6	6.6±1.6	4.6±0.5
1	414.9±106.7	1038.9±128.8	593.8±63.2	461.3±36.4	20.8±1.9
3	526.3±9.8	1038.9±128.8	593.8±63.2	461.3±36.4	417.4±3.7
5	526.3±9.8	1038.9±128.8	593.8±63.2	461.3±36.4	417.4±3.7

Data are shown as means±S.E.M. (n=3).

Growth inhibition rates used to calculate EC_{50} are written in bold.

水温15℃の濃度0.1~3mg/Lの試験区で24~72時間後に0%、濃度5mg/Lの試験区では96時間後に4%まで減少した。さらに、水温20℃と25℃では、すべての濃度試験区で24~48時間後に0%になった。

考察

過酸化水素

植物プランクトン5種に対する暴露試験の結果、本研究で用いた生物種全てで過酸化水素のNOECは1.05mg/Lであったのに対し、 ErC_{50} については1.11~3.72mg/Lとばらつきがあり、同じ植物プランクトンでも生物種によって感受性に違いがあることが分かった。

ワカメ配偶体における LC_{50} とNOECの解析結果から、ワカメ配偶体が影響を受けない濃度までは雌雄の間に薬剤感受性の差はないが、NOECを超えた範囲では雌性配偶体に比べて雄性配偶体の感受性が高かった。この雌雄差の要因の一つとして、細胞の投影面積の結果で示された雌雄間の細胞の大きさの違いが考えられた。また短時間暴露試験での細胞致死率は、過酸化水素暴露区では雌雄ともに50%未満であった。

シオダマリミジンコでは、過酸化水素のNOEC、 EC_{50} はともに本研究で供試した生物の中で最も大きく、感受性が低いことが分かった。

タテジマフジツボ幼生の場合、NOECや EC_{50} を発生段階別に比較した結果、キブリス幼生のほうが薬剤に対する耐性があると考えられた。

本研究において調査した海生生物のうち、ワカメ配偶体、シオダマリミジンコは過酸化水素に対する感受性が低く、飼育試験期間中に影響が大きくなることもなかった。タテジマフジツボの幼生では発生段階の初期（ノープリウス幼生）でNOECが低くなる傾向はあったが、1.05mg/Lを下回ることにはなかった。またノープリウス幼生IV~V期、およびキブリス幼生では飼育試験期間中に暴露試験よりNOECが低下したものの、本研究全体でのNOEC以下の濃度では暴露後に影響が大きくなる懸念はなかった。本研究で比較的感受性が高かったのは植物プランクトンであったが、供試した全植物プランクトンでNOECが1.05mg/Lを下回るものは見られなかった。

遊離オキシダント

植物プランクトン5種に対する遊離オキシダントの ErC_{50} は0.13~1.08mg/Lの範囲でばらついていた。同様のばらつきは界面活性剤の海産植物プランクトンへの暴露試験でも見られ、鞭毛の有無や細胞の容積といった形態学的特徴との相関はないことが報告されている（帰山・池田，2002）。また、淡水産植物プランクトンでも同様の報告がある（Yamane et al., 1984）。

ワカメ配偶体では LC_{50} とNOECの解析結果から、過酸化水素の場合と同様にワカメ配偶体が影響を受けない濃度までは雌雄の間に薬剤感受性の差はないが、NOECを超えた範囲では雌性配偶体に比べて雄性配偶体の感受性が高かった。また短時間暴露試験での細胞致死率は、遊

離オキシダント暴露区では雌雄ともに100%であった。

タテジマフジツボでは、キブリス幼生において、24時間暴露後に清浄な人工海水に移動した後の遊泳阻害を指標とした EC_{50} とNOECがともに2.0mg/L以上となった。古田ら（2012）は同じタテジマフジツボのキブリス幼生に対する塩素の影響を、15分間の暴露後に清浄海水に移動し、96時間経過後の生存率を指標とした LC_{50} とNOECにより評価している。それによると、前者は4.9mg/L以上、後者は2.0mg/L以上と報告されており、暴露時間に差はあるものの両研究において、同様の傾向が見られたことになる。幼生の発生段階間の違いに関して、さらに古田ら（2012）はキブリス幼生とノープリウスVI期幼生を用いて、塩素に15分間暴露中の運動の有無を指標とした IC_{50} を評価したところ、それぞれ0.79mg/Lおよび12mg/L以上であり、1.5mg/Lの塩素に暴露した際の運動率はノープリウス幼生よりキブリス幼生で著しく低いと述べている。一方、遊泳阻害状況を指標とした本研究の評価では、キブリス幼生のほうが高い耐性を示す結果になった。タテジマフジツボと同属のサラサフジツボ *Amphibalanus reticulatus* においては、ノープリウス幼生よりもキブリス幼生において塩素に対する耐性が高いことが報告されている（Venkatnarayanan et al., 2016）。その理由について彼らは、キブリス幼生がもつ厚い背甲、摂餌しない特性を挙げている。著者らはキブリス幼生が二枚貝のように背甲を閉じることにより、周囲の環境と背甲内部の環境を隔離して耐えることができることも関係していると考えている。このように、暴露中の運動の有無による IC_{50} の評価（古田ら，2012）と暴露後の運動性による評価（本研究）が異なった結果につながった可能性が推察される。

遊離オキシダントに対する感受性は動物プランクトンのシオダマリミジンコ、タテジマフジツボの幼生で低く、ワカメ配偶体、植物プランクトンで高くなる傾向があった。

過酸化水素と遊離オキシダントが及ぼす影響

両薬剤で共通した点は、過酸化水素に対する感受性が低い生物種ほど、遊離オキシダントに対しても感受性が低くなる傾向が観察されたことであった。一般に、過酸化水素の生物に対する毒性は、生体膜を容易に透過して細胞内に侵入し、細胞内の Fe^{2+} や Cu^{+} による一電子還元を受け、強力な酸化力を持つヒドロキシルラジカル（ $\cdot OH$ ）を生成し、これが核酸やタンパク質、脂質を酸化することによるものと考えられている（藤田，2002）。一方で次亜塩素酸ナトリウムなどの次亜塩素酸塩は、本研究のようにpHが8前後である海水中では非解離型HOClと解離型 OCI^- の平衡状態で存在し、非解離型が生体膜を容易に透過して核酸やタンパク質、脂質を塩素化あるいは酸化したり、酵素のチオール基を酸化したりして毒性を発現すると考えられている（福崎，2009）。一方で、過酸化水素と次亜塩素酸の作用機序における大きな違いは、とくに細菌や植物プランクトンのように細胞

壁を持つ生物に対して、過酸化水素は細胞壁を透過するのみであるのに対し、次亜塩素酸はイオン態でも細胞壁そのものとも反応してその構造を破壊する点にある。細胞壁の構造が破壊されるとバリア機能が低下して、より次亜塩素酸の細胞内流入が容易になると考えられる。

植物プランクトンでは、同じ海産藻類でありながら感受性が異なるのは、実験に供した珪藻、渦鞭毛藻、クリプト藻、プラシノ藻、褐藻でそれぞれ異なった細胞外被を持つことと上記の作用機序の違いが関係しているかもしれないが、今後実験種数を増やすことが必要である。

ワカメ配偶体では、短時間暴露試験での細胞致死率が過酸化水素 350 mg/L (10.3 mmol/L) 暴露区では雌雄ともに 50% 未満であったのに対して、遊離オキシダント 5 mg/L (0.07 mmol/L) 暴露区では雌雄ともに 100% であった。以上のことから、ワカメ配偶体に対する短時間での影響は、遊離オキシダントよりも過酸化水素のほうが穏和であることが示唆された。

フジツボ幼生では、ノープリウス幼生よりキブリス幼生のほうが耐性があると推察された。付着防除という観点から見れば、キブリス幼生に対して効果的な濃度を考慮する必要があると判断される。

供試薬剤の残留率については、両薬剤ともに初期濃度が低く、水温が高いほど速く分解して、残留率が低くなる傾向が認められた。また単純に比較することはできないものの、初期濃度や水温などの条件が同等であれば、遊離オキシダントのほうが過酸化水素に比べて速やかに残留率が減少すると考えられた。ただし、結合オキシダントも含む総残留オキシダントとしての残留率やその生物に対する影響については、さらに詳細な検討が求められると考えられた。

以上のように、過酸化水素が日本の沿岸海域で一般的に見られる生物種に対して及ぼす影響について、基礎的知見を収集することができた。また参考として、同様に付着生物対策に用いられる遊離オキシダントについても過酸化水素と比較しうる知見を得ることができた。今後も生態系の幅広い生物種に及ぼす過酸化水素の影響に関する知見をさらに集積することで、沿岸域に放流された場合の環境影響性をより科学的に評価することができるようになり、また効果的な生物汚損対策の確立にも資するものと考えられる。

謝辞

本論文の取りまとめに際し、情報提供、文献収集にご協力いただいた村岡伸啓氏、太田文清氏に感謝申し上げます。また、文献情報や適切な指摘をいただいたレフリーにも感謝申し上げます。

引用文献

De Lean, A., P. J. Munson and D. Rodbard (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves.

- Am. J. Physiol., 235, E97–E102.
- European Chemical Agency (2016). <http://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15701>, 2016 年 4 月 6 日.
- 藤田 直 (2002). 活性酸素、過酸化脂質、フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用. YAKUGAKU ZASSHI, 122, 203–218.
- 福岡智司 (2009). 次亜塩素酸による洗浄・殺菌機構と細胞の損傷. 日本食品微生物学会雑誌, 26, 76–80.
- 古田岳志・野方靖行・菊池弘太郎 (2012). 薬剤による付着生物防除—フジツボおよびイガイ類幼生に対する塩素の影響—電力中央研究所報告, V11009.
- 原子力安全・保安院 (2009). 株式会社トクヤマ徳山製造所東発電所第 3 号発電設備計画に係る環境影響性評価準備書審査書. http://www.meti.go.jp/policy/safety_security/industrial_safety/sangyo/electric/files/tokuyama/ju-toku3.pdf, 2014 年 4 月 1 日.
- Florence, T. M. and J. L. Stauber (1986). Toxicity of copper complexes to marine diatom *Nitzschia Closterium*. Aquat. Toxic., 8, 11–26.
- Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). Gran. Can. J. Microbiol., 8, 229–239.
- 埴山秀樹・池田 勉 (2002). 海産植物プランクトンの成長に及ぼす界面活性剤ノニルフェノールエトキシレートとその分解産物ノニルフェノールの急性毒性に関する予備的研究. 北海道大学水産科学研究報, 53, 63–67.
- 神田 猛・村田 寿・黒木 陽 (1989). 赤潮除去剤の魚類に対する毒性—特に過酸化水素、硫酸鉄 (II)、および塩化鉄 (III) の毒性—. 水産増殖, 37, 221–224.
- 慶田雅洋・伊藤誉志男・外海泰秀・鈴木英世・小川俊次郎・長谷川敬彦・田中慶一・近藤雅臣・藤井正美 (1981). 食品中の過酸化水素の微量測定法について—紫外吸光度法、蛍光法および 4-アミノアンチピリン比色法の比較—. 日本農芸化学会誌, 55, 483–489.
- 君塚健一・海老原孝 (2011). 海水域における次亜塩素酸塩と過酸化水素の使用とその影響. 用水と排水, 53, 72–76.
- 清野通康 (2003). 付着生物対策と電気事業—対策を実施する立場からみた課題—. Sessile Organisms, 20, 11–13.
- 松本智彦・市川精一 (2013). 低濃度残留塩素時の海生生物付着事例について. Sessile Organisms, 30, 1–4.
- Matthews, R. S. (1995). *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. Free Radic. Biol. Med., 18, 919–922.
- Nanba, N., T. Fujiwara, K. Kuwano, Y. Ishikawa, H. Ogawa and R. Kado (2009). Effect of pre-incubation irradiance on survival of cryopreserved gametophytes of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta) and morphology of sporophytes formed from the gametophytes. Aquat. Bot., 90, 101–104.
- 難波信由・藤原孝行・桑野和可・石川 豊・加戸隆介 (2013). 岩手県産ワカメ地方株の形態的変異. Sessile Organisms, 30, 37–41.
- 日本水産資源保護協会 (2013). 「水産用水基準第 7 版 (2012 年版)」. 日本水産資源保護協会, 東京, 104 pp.
- 農林水産省 (2016). 水産用医薬品の使用について第 29 報. http://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/pdf/29.pdf, 2016 年 4 月 1 日.
- OECD (2006). OECD guidelines for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 201, Freshwater alga and cyanobacteria, Growth Inhibition Test. pp. 1–25.
- Saga, N., Y. Sakanishi and T. Ogishima (1989). Method for quick evaluation of cell viability in marine macroalgae. Jpn. J. Phycol., 54, 722–724.
- 坂口 勇 (2003). 発電所の汚損生物対策技術の展望. Sessile Organisms, 20, 15–19.
- シェルノン V-10 評価研究会 (1987). 付着生物防止剤 (シェルノン V-10) に関する調査報告書, シェルノン V-10 評価研究会.

- 資源エネルギー庁 (2000). 株式会社ユービーイーパワーセンターユービーイーパワーセンター発電設備環境影響評価準備書に係る審査書. http://www.meti.go.jp/policy/safety_security/industrial_safety/sangyo/electric/files/yuubiih/shin-sasyo_2.pdf, 2014年4月1日.
- Tatewaki, M. (1966). Formation of a crustaceous sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia*, 6, 62–66.
- Taylor, C. J. L. (2006). The effects of biological fouling control at coastal and estuarine power stations. *Mar. Pollut. Bull.*, 53, 30–48.
- Venkatnarayanan, S., P. S. Murthy, R. Kirubakaran and V. P. Venugopalan (2016). Effect of chlorination on barnacle larval stages: Implications for biofouling control and environmental impact. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 109, 141–149.
- 山本耕司・鶴保謙四郎・山本 攻・山本 武・加藤敬香・近藤雅臣 (1982). アンモニア性窒素を含む海水の塩素処理. *衛生科学*, 28, 126–131.
- Yamane, A. N., M. Okada and R. Sudo (1984). The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents. *Wat. Res.*, 18, 1101–1105.