

# ミジンコを用いた東郷池流入河川に含有される 化学物質による生物影響調査

【食品衛生室・環境化学室・水環境室】

福田武史 岩永千歳 西山泰司 奥田益算 畠山恵介 山根一城

Examination of the Biological Influence of Chemical Substances Found  
in the Togo Pond River Inflow Using *Daphnia Magna*

Takeshi FUKUTA, Chitose IWANAGA, Taiji NISHIYAMA, Masukazu OKUDA,  
Keisuke HATAKEYAMA, Kazuki YAMANE

## Abstract

We conducted a test that determined temporary exposure to river water causes reproductive damage to *Daphnia Magna*, thus discovering that the water does have an effect on living organisms. Although we did not fully investigate the cause, it is thought that a bioassay has indicated that it might be possible to detect a biological influence from some sort of primary factor.

## 1 はじめに

内分泌かく乱化学物質、いわゆる環境ホルモンはこれまでの有害物質と異なり、生体内で擬似ホルモンとして働くことで体内調節機能をかく乱するため、人間を含む生物の生殖機能などの生理作用に重大な影響を与える可能性があり、各種影響が危惧されている。鳥取県においても、内分泌かく乱作用の疑われるいくつかの物質について、環境中の濃度の測定を実施<sup>1)</sup>してきた。

現在、農薬などの化学物質の生物影響は個々の物質ごとに評価され、その化学物質を単独で生物に暴露したときの評価で使用基準等が設定されている。

一方、鳥取県の現状としては、農薬による水棲生物への悪影響の可能性が高い地域であるとの報告<sup>2)</sup>がある。個々の農薬成分による影響の懸念はもちろんのこと、環境中においては様々な種類の農薬の複合的な作用による生物への影響も懸念されている。

県内河川でこれらの実態は調べられていないので、鳥取県での化学物質による生物へ影響を把握し、必要であれば早期に原因物質の削減等汚染防止対策を講じる必要がある。

単独の化学物質の生物への影響・毒性の評価の手法と

して、ミジンコを用いたバイオアッセイは一般的な手法として用いられている。ミジンコは生態系の捕食者及び餌生物として重要であり、継代飼育や試験方法も確立されている。また、農薬がミジンコに対して幼若ホルモン様作用を示すという報告<sup>3)</sup>もあることから、本研究でもミジンコを用いた。ミジンコを用いたバイオアッセイとしては急性遊泳阻害試験と繁殖阻害試験があるが、世代間にまたがる影響が評価できる繁殖阻害試験を試験法として採用した。

なお、ミジンコバイオアッセイで環境水を評価することは国内では一般的ではないが、米国においてはWhole Effluent Toxicity(WET)規制という取り組みにおいて種々のバイオアッセイが用いられている<sup>4)</sup>。この考え方を参考に、鳥取県内の河川水についてミジンコへの影響評価を行った。

## 2 調査方法

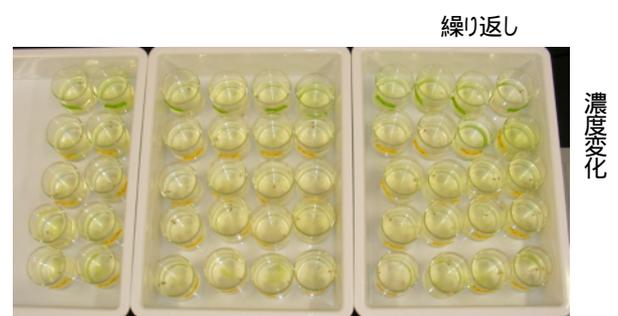


図1 繁殖阻害試験風景

ミジンコ繁殖阻害試験はOECDテストガイドライン211<sup>5)</sup>に従い実施した。試験はミジンコを生後21日間、試験対象水の中で継続飼育し、産出する仔ミジンコの数の評価の対象とした。

#### a 試験生物

試験生物は独立行政法人国立環境研究所から分譲いただいた*Daphnia magna* NIES系統を用いた。

*D. magna*は、和名はオオミジンコというヨーロッパ産のミジンコで日本には生息していない。親の大きさが4mmと大きく、仔虫の観察も容易で試験に適している。

#### b 試験対象河川水

対象とする河川は東郷池に流入する舎人川とした。当該河川は、湯梨浜町の南東部山地から東郷池南東部に注ぐもので、流域の土地利用は水田12%、畑地20%、山林64%、住居地2.4%などとなっている。平成15年度のPRTRデータを解析した報告<sup>6)</sup>によると、鳥取県の中でも旧東郷町が農薬による水棲生物に対するリスクが高いとされている。そこで、旧東郷町内を流れる河川のうち、農用地割合の多さと流域面積の大きさを以て舎人川を選定した。また、季節変動を見るために年間を通じて試験を実施した。河川水は週1回採取し、GF/Cのガラスフィルターでろ過したものを試験に供した。

#### c 試験条件

試験には生後24時間以内の幼体を使用した。一連の濃度区を設定した試験水を60mlのビーカーにとり、それぞれに同じ親から生まれた2頭の幼体を入れ、初回の換水時に1頭に減らした。この試験を別の親から生まれた幼体を用いて1濃度区につき10回繰り返した。飼育条件はインキュベーター若しくは室内空調を用いて水温を20±1とし、照明は明期16時間/暗期8時間に設定した。試験水は止水式とし、換水は週3回とした。また、換水時にpH、水温及び溶存酸素量を測定した。

ミジンコに与える餌は水洗濃縮クロレラを購入し、バクテリア計算盤で細胞濃度を計測して10<sup>6</sup>cell/mlとなるように与えた。

#### d 希釈水

継代飼育及び試料の希釈に使用する水は、当所の水道水をフィルターろ過及び活性炭ろ過し、1晩以上ばっ気したものをを用いた。

#### e 結果の解析

試験の結果は産仔数を元に判定した。判定はEcotox-Statics Ver2.6<sup>7)</sup>を用いてプロビット法によりEC50やNOECを求めた。

なお、試験の有効性を確認するため、対照物質として3,4-ジクロロアニリンを使用した並行試験を実施した。

### 3 調査結果及び考察

2006年6月、2006年10月、2007年5月、2007年6月、2007年7月、2007年9月、2008年2月の7回、試験を実施した。濃度区の設定は0,25,50,75,100%の5区とした。なお、2008年2月の試験では0,50,100%の3濃度区とし、湯梨浜町野花地区の水路の水もあわせて試験した。

試験結果は、7回のうち5回において繁殖阻害作用は見られなかった。しかし、2007年7月の試験では100%濃度区の親世代が試験開始後10から12日目にかけて全滅した。また、2008年2月の試験では、50%及び100%の濃度区で産仔数の減少や親世代の斃死が見られた。この2回の試験結果について、詳細を次に示す。

なお、並行試験で実施した3,4-ジクロロアニリンによる精度確認試験は、環境省の公表値よりやや高い値となったが、変動の範囲内であった。

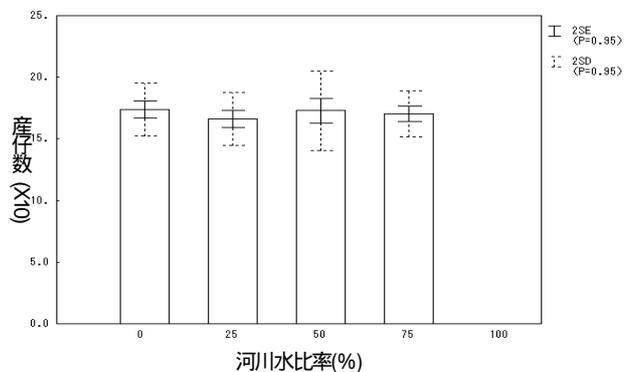


図2 繁殖阻害試験結果 (2007.7.25-8.15)

#### 1) 2007年7月の試験について

試験期間は2007年7月25日から8月15日まで。採水は7月24日、7月31日、8月4日の3回実施した。河川水100%の濃度区では、試験開始後10日目から親ミジンコの遊泳に異常が見られ、13日目にはすべて死亡した。試験に供した河川水をSep-Pak PS2で固相抽出し、メタノールで溶出して濃縮し、GC/MSを用いて有機化合物の検索を行ったが、目立った化学物質は検出されなかった。また、*D. magna*を用いた急性遊泳阻害試験<sup>8)</sup>も実施したが、こちらも全く影響なかった。

試験実施期間は盛夏であり、水田除草剤や果樹園の消毒など、農薬を多く使用する時期と重なっている。また、河川流域においては大きな事業場や人口密集地が無いことから、河川流域の3割以上を占める農地からの農薬の影響による繁殖阻害が疑われたが原因物質は不明であった。

#### 2) 2008年2月の試験について

試験期間は2008年2月27日から3月19日まで。河川

水100%の濃度区では試験開始直後から斃死が観察された。また、50%の濃度区でも1週間経過後から斃死が散見された。その他に、通常、ミジンコは脱皮をすと背中中の殻内に産卵するが、今回は脱皮した後も産卵しない個体が観察された。この試験は2地点の河川水を用いているが、2地点とも同様の傾向を示していた。なお、試験に用いた野花地区の水路の流域は、低地は果樹園、山地は山林となっており、人の居住はない地域である。

試験実施期間は雪解け時期であり、夏季と異なって農薬の使用はない。機器分析を実施していないため、原因の究明に至らなかった。

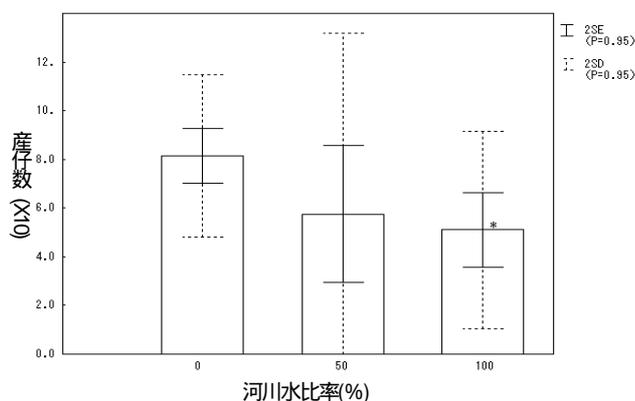


図3 繁殖阻害試験結果(舎人川 2008.2.27-3.19)

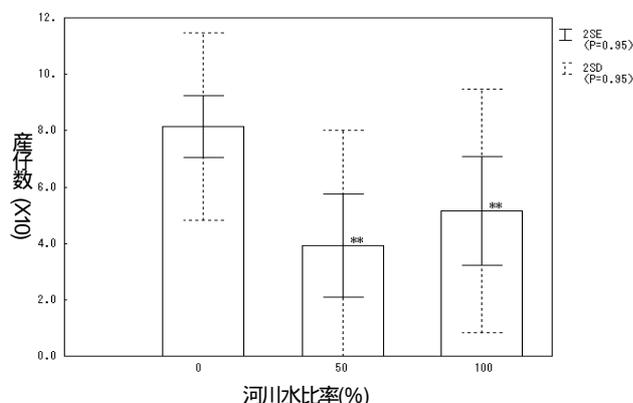


図4 繁殖阻害試験結果(野花 2008.2.27-3.19)

#### 4 まとめ

今回、河川水にミジンコを暴露して繁殖阻害試験を実施することで、一時的にはあるが生物に対して影響を与える水が流れていることが分かった。原因の究明には至らなかったものの、バイオアッセイにより何らかの要因による生物影響を検出できる可能性が示されたと考えられる。

#### 5 謝辞

*Daphnia magna*の継代飼育及び試験技術についてご教授いただいた、独立行政法人国立環境研究所 環境リスク

研究センター 鑑迫典久先生並びに環境暴露計測研究室の皆様へ深謝いたします。

#### 6 参考文献

- 1) 環境ホルモン/とりネット/鳥取県公式サイト  
<http://www.pref.tottori.lg.jp/dd.aspx?menuid=20426>
- 2) 高梨ルミ, 亀屋隆志, 小林剛, 糸山景子, 浦野紘平: 人の健康保護を考えた自主管理のための環境管理参考濃度の提案とPRTR対象物質への適用, 環境科学会誌, Vol.18 No.2 71-83(2005)
- 3) 鑑迫典久, 小田重人, 阿部良子, 森田昌敏, 井口泰泉: ミジンコを用いた甲殻類に対する内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法開発, 環境科学会誌, Vol.17 No.6 439-449(2004)
- 4) 鑑迫典久: 環境水のバイオアッセイ~Whole Effluent Toxicityの考え方~, 水環境学会誌, Vol.29 No.8 426-432(2006)
- 5) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test
- 6) 「農薬使用の水生生物に対する潜在危険度」の全国上位200市区町村と各市区町村での上位5物質:PRTR情報を調べる(平成15年度データ), 横浜国立大学大学院 環境安全管理学研究室 / エコケミストリー研究会  
<http://www.ecochemi.jp/PRTR2003/prtr-index.html>
- 7) 日本環境毒性学会  
<http://www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm>
- 8) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test