

原著論文

養殖マガキの受精卵と人工海水を用いた毒性試験の有効性

磯野良介^{*1§}・河野真知^{*2}・山本裕史^{*2}

Validation of Toxicity Bioassay using Fertilized Eggs and Artificial Seawater
from Cultured Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae)

Ryosuke S. Isono^{*1§}, Machi Kawano^{*2} and Hiroshi Yamamoto^{*2}

要約: 海産生物を対象としたWET (Whole Effluent Toxicity) 試験法を開発するため、養殖マガキの利用可能性を調べた。宅配便で広島と気仙沼から輸送した成熟マガキを海水及び人工海水で人工受精し受精卵を得た。六価クロムと3,5-dichlorophenolの影響を、受精卵(2~8細胞期)からD型幼生への24時間における正常発生率で評価した。正常発生率による半数影響濃度(EC₅₀)は六価クロムで3.9mg/L、3,5-dichlorophenolで3.3mg/Lであった。各化学物質の半数影響濃度は、海水と人工海水で違いが認められなかった。六価クロムのEC₅₀を海産二枚貝の生態毒性既報値と比較すると極めて低い値であったことから、マガキの検出感度は高いと判断された。今後、より多くの化学物質にも適用することにより本試験法の有用性が明らかになると期待される。

キーワード: WET, 海産二枚貝, 養殖マガキ, 受精率, 人工海水, 宅配便

Abstract: In order to develop the Whole Effluent Toxicity (WET) test for marine organisms, the utility of cultured *Crassostrea gigas* was investigated. Mature *C. gigas* was transported from Hiroshima and Kesenuma by a courier service, and fertilized eggs were obtained by artificial fertilization in both seawater and artificial seawater. The effects of hexavalent chromium and 3,5-dichlorophenol were evaluated by the ratio of normal development from fertilized eggs (2-8 cell stage) to D-shaped larvae in 24 h. The median effective concentration (EC₅₀) of hexavalent chromium and 3,5-dichlorophenol was 3.9 mg/L and 3.3 mg/L, respectively. The EC₅₀ of each chemical was not different (ANOVA, $p > 0.05$) between fertilization in seawater and artificial seawater. The EC₅₀ of hexavalent chromium was extremely low compared to previously reported ecotoxicity values for marine bivalve, indicating that the sensitivity of *C. gigas* was high. Further examination by using other chemicals will verify the validity of this method.

Key words: WET, marine bivalve, cultured oyster, artificial fertilization, artificial seawater, courier service

まえがき

現代の産業活動や日常生活は、様々な化学物質の恩恵を受けて営まれている。化学物質の中には、人の健康に加え生態系に有害な影響を及ぼすおそれのあるものが存在するため、環境汚染防止の観点から法規制が行われている。化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律または農薬取締法で

は、化学物質の有害性を事前審査することで環境への放出を回避または抑制を図り、特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律のPRTR制度では、462種類の化学物質について排出量の届出を義務付けることで、これらの排出量の自主的な管理を促している。一方、使用される化学物質の種類は年々増加しており、有害性の情報が得られない未知のものや排水規制

(2022年11月25日受付, 2023年1月12日受理)

*1 公益財団法人海洋生物環境研究所 中央研究所 (〒299-5105 千葉県夷隅郡御宿町岩和田300番地)

§ E-mail: isono@kaiseiken.or.jp

*2 国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康領域 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番地2)

の対象に至らない化学物質について、水生生物に影響を与える懸念が増している。そこで、このような未知物質や規制対象外の物質も網羅した形で有害性を評価する手法の一つとして、排水そのものを用いたバイオアッセイとしての総排水毒性 (Whole Effluent Toxicity : WET) が諸外国では実施されている。WETではこれまでスクリーニング的な分析手法で対応が難しかった化学物質同士の相加、相乗といった複合影響についても検出が期待される (山本ら, 2015)。

国内では初めに淡水の藻類、甲殻類、魚類を対象とした「生物応答を用いた排水試験法(検討案)」が開発され (国立環境研究所・環境省, 2013)、陸域の排水を用いて同試験法の実用性が検証されている (渡部ら, 2015)。淡水種と海産種では化学物質に対する感受性に相違があること、また化学物質の溶解度や存在形態が淡水または海水で異なることで毒性が変化する (Wheeler *et al.*, 2002) ことを考慮すると、海域で生じる排水の有害性は海産種で評価する必要がある。しかし、国内では海産種を用いた試験法は海産生物毒性試験指針に限られ (水産庁, 2010)、海産種を想定したWETは見当たらない。そこで、国立環境研究所 (以後、国環研) は環境研究総合推進費「海産・汽水生物を用いた慢性毒性短期試験法の開発」によりWETに準じる試験法の開発を主導した。これに参画した研究機関は栄養段階別に藻類、甲殻類及び魚類を主な対象種とし、甲殻類や魚類では化学物質に対する感受性が高い受精卵から幼生期の初期発育段階を用いた試験法を検討した。一般に海産種は淡水種と比べ生物の飼育・繁殖が困難で、さらに飼育設備も大掛かりとなり管理に費用を要する。なお、発生時期を特定できない排水の毒性評価に対応するには、試験生物を常時保持することが求められる。従って、WETに対応して初期発生段階の材料をいつでも利用できるようにするには飼育・繁殖を自前で行うか、あるいは入手できる外部機関を複数確保することが必要となる。海洋生物環境研究所 (以後、海生研) ではWETの供試種としてアカシマモエビ *Lysmata vittata* (磯野・大坂, 2020)、マダイ *Pagrus major* (宗宮ら, 2021) 及びシオダマリミジンコ *Tigriopus japonicus* (磯野ら, 2022) を検討し、これらを自前で育成した。

マガキは北海道から九州で広く養殖が行われており、夏季を中心として産卵し、受精卵は水温23℃以上、比重1.017以上の海水中で胚形成が行

われ、受精後約20時間でD型幼生に発生する (田中, 1996)。マガキの人工受精は組織から切り出した卵を直接用いる (切開浸出法) ので、他の二枚貝に比べ材料の取り扱いが容易である (田中, 1996)。以上の理由により、本研究では外部より入手したマガキを使って実施した。マガキ卵を対象とする試験法についてはLeverett and Thain (2013)の方法に準拠し、これにマガキの宅配便による入手、冷蔵保存及び飼育について改良を加えた。また、海水の入手や保管は手間と場所を要することから、人工海水を用いる試験法を海水と併せて検討した。

方法

母貝の入手及び飼育 本研究で用いた海水は海生研の前面海域から取水された天然海水 (以後、海水) である。取水後、砂ろ過された海水の水質は塩分が32.3~35.0 (34.1 ± 0.5 , 平均値±標準偏差), pHが7.93~8.23 (8.05 ± 0.05) であった。また、人工海水はEDTA及び塩素中和剤が含まれていない人工海水の素 (マリンアートSF-1, 富田製薬) であり、この1袋(956g)を活性炭カートリッジフィルター (TCC-WL-SOCP, ADVANTEC) を通した水道水25Lに溶解した。用いた人工海水の水質は塩分が32.0~33.9 (32.8 ± 0.4), pHが8.16~8.23 (8.19 ± 0.02) であった。塩分はSeven2Go (METTLER TOLEDO), pHはSeven2GoPro (METTLER TOLEDO) を使って測定した。

2018~2020年に広島湾 (5~6月) と気仙沼市地先 (6~7月) で養殖されるマガキをそれぞれ高田水産、宮城県漁業協同組合唐桑支所から入手した。水揚げされた翌日に冷蔵宅配便で受け取り、到着時に殻に付着する泥や生物をタワシで擦り水道水で洗い流した後、試験用水 (ろ過海水または人工海水) で濯いだ。ろ過海水は、砂ろ過海水をカートリッジフィルター (TCG-045-S1FN, ADVANTEC) でろ過し作成した。濯ぎを行ったマガキは直ちに人工受精に供するか、もしくは試験用水で湿らせたタオルで包みビニール袋へ収容後、約4℃の冷蔵庫内に静置した。静置期間は24時間とし、到着翌日の人工受精でも受精卵が得られるかを検討した。この他、一部のマガキは成熟状態を長期間維持した後に受精卵が得られるかを確認するため、砂ろ過海水へ再び戻し飼育を開始した。飼育には200L角型水槽を用い、15℃に調

温した海水を流量3L/minで注水した。水槽内に散気管（ユニホース FAL00, アクアテックジャパン）により通気し、鉛直的な循環流が発生するようにした。給餌は 5×10^6 cells/mL 程度に増殖したハプト藻 *Pavlova lutheri* を1日に2回（9:00, 13:00）、1回当たり5Lを与え、サイフォンにより約1時間で全量が角型水槽へ滴下するようにした。飼育期間中、定期的にマガキを取出し人工受精を実施した。

餌料の培養には恒温室に設置した100Lパンライト水槽を用い、紫外線（FLONLIZER FDS-1, 千代田工販）で滅菌したろ過海水で満たした後、所定量の f/2 培地（Guillard and Ryther, 1962; 水産庁, 2010）を添加した。培養条件は20°C, 24時間明期, 通気流量は15L/minとした。

雌雄選別 試験用水で濯ぐ操作を行ったマガキあるいは飼育中のマガキそれぞれで無作為に8~10個体を選び、試験用水約10Lを入れた30cmガラス水槽へ収容した。ガラス水槽は予め20°C に調温した恒温槽内へ設置して試験用水にはエアレーションを施した。マガキは水槽に収容して2時間後から1個体ずつ取り出し、次の操作により雌雄を選別した。平らな右殻を取り去り軟体部を露出させ、乳白色を呈する軟体部から生殖腺組織の一部をメスで採取してスライドガラスに移し、試験用水を数滴滴下後に生物顕微鏡下で卵または精子の確認を直ちに行った。成熟した卵は洋梨型、活性が高い精子は活発に運動することから（Leverett and Thain, 2013）、このような配偶子が観察されたマガキは、20°Cの試験用水を入れた2個の別容器に雌雄を分けてそれぞれ移した。

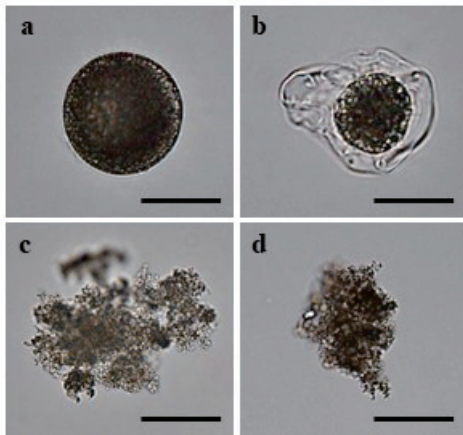
配偶子懸濁液の調製 別容器から1個体ずつ取り出したマガキから残る左殻を取り去り、軟体部生殖腺の肥厚した乳白色部へメスで切れ込みを入れた後、20°Cの試験用水約1Lを入れたビーカー内で上下に振って配偶子を懸濁させた。夾雑物を除くため卵懸濁液では100 μ m, 精子懸濁液では50 μ mのプランクトンネットを通して新たなビーカーへ移し入れた。その際、ネットはあらかじめ20°Cの試験用水を約200mL入れた新しいビーカーに浸るように設置し、懸濁液中の配偶子がネット通過する際に空気と接触しないように努めた。これら配偶子懸濁液の採取は雌から開始し雄は最後とした。

供試卵の決定と調製 人工受精は夾雑物を除いた卵懸濁液が入ったビーカーに対し、精子の懸濁液約1mLを駒込ピペットで添加して行った。人工受精には雄1個体の精子を用い、雌は成熟卵を有する複数の個体を用いた。添加直後、卵を収容するビーカー内の試験用水を駒込ピペットを用いて緩やかに攪拌した。最初のマガキの開殻から人工受精終了までの操作時間は、30分以内を目途とした。人工受精後の各ビーカーは黒色のプラスチック製シートで遮光し、24°Cに調温した恒温室に静置した。24°Cでは受精後2時間程度で第1卵割が開始されるので、この時間をもって24°Cへの馴化時間とした。

人工受精から約2.5時間後、受精を行った各ビーカーの卵について発生率（卵割が確認された卵の割合）を測定し、最も発生率が高い卵を供試卵とした。供試卵としたビーカーから、底に沈下した受精卵を駒込ピペットで静かに吸い取り、100mL三角フラスコに移し替えた。供試卵は卵密度が0.1mL当たり100個体程度になるように受精卵を追加または試験用水で希釈し、フラスコ内での全量が100mL程度になるように調製した。

卵を用いた毒性試験 対象とした標準物質は二クロム酸カリウム（CAS No. 7778-50-9, 富士フィルム和光純薬）及び3,5-dichlorophenol（CAS No. 591-35-5, 富士フィルム和光純薬, 以後3,5-DCP）とした。標準物質の溶解に助剤は用いなかった。濃度区は二クロム酸カリウムについて0.95~31mg/L（六価クロム換算, Cr(IV)), 3,5-DCPについて0.31~9.5mg/Lの範囲でそれぞれ対照区を含め5段階を設定し、人工受精と同じ試験用水に溶解し試験水とした。試験容器はポリスチレン製6ウェルプレート（Costar Product Number3516, CORNING）とし、1濃度区につき1枚のプレートを用いた。全てのウェルへ試験水6mLをそれぞれ分注した後、各ウェルに三角フラスコに調製した供試卵を0.3mL（約300個の供試卵）を投入した。6つのウェルのうち4つを幼生の計数、2つを終了時の水質測定に用いた。暴露開始時の卵の発生段階は2~8細胞期であった。この後、各濃度区のウェルプレートはチャック付のビニール袋へ収容し、インキュベータへ静置した。インキュベータの設定条件は24°C, 照明は24Dとした。暴露時間は24時間とし給餌は行わなかった。暴露終了時、計数用のウェルへ中性ホルマリン120 μ Lを添加し

(Leverett and Thain, 2013), マガキの発生を停止させた。計数には容積1mLの計数盤(境界入計数盤 Cat. No.5608, 離合社)を用いた。各ウェルから試験水を駒込ピペットで計数盤に分取し, 正常発生したD型幼生, 異常な胚及び異常な幼生に分けて計数した。このときLeverett and Thain (2013) に準じ未受精卵, 異常な未受精卵, 卵または個体として判別できない細胞片は計数の対象外とした(第1図)。計数はウェル1つ当たり3回繰り返し, 3回分の計数値を正常, 異常それぞれについて合計した。正常の3回分, 異常の3回分を合わせた合計は100個体程度を基準としたが, 毒性影響が大きくなる高濃区では100個体に満たない場合があった。



第1図 暴露試験終了時の計数から除外した卵の形態。未受精卵(a), 異常な未受精卵(b), 細胞片(c, d) スケールバーは50 μ m。

EC₅₀の推定 試験のエンドポイントとした卵からD型幼生への正常発生率は次の式で算出した。

正常発生率 (%) =

正常なD型幼生数 / (正常なD型幼生と異常な胚と幼生の合計) × 100

正常発生率を指標とするEC₅₀ (半数影響濃度) は濃度区間における正常発生率の有意差を検定(ANOVA)した後, Leverett and Thain (2013) に準じ対照区と有意差が無い最高濃度と有意差有りの最低濃度との幾何平均で算出した。

標準物質及び水質の測定は, 試験の前後で以下のように実施した。測定用の試験水は, 開始時は各ウェルへ配分する前に採水, 終了時は各濃度区

において2つのウェルの試験水を集め分析試料とした。六価クロム濃度はジフェニルカルバジド吸光光度法(日本工業標準調査会, 1998)で測定した。3,5-DCP濃度は, 分析用試料を固相抽出(OASIS HLB Plus, Waters)した後, 高速液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS-8060NX, 島津製作所)により, SIM法(ESI(ネガティブモード), モニターイオン: m/z 161.0)で測定した。暴露期間における各試験物質の実濃度は, 開始時及び終了時の濃度の幾何平均値とした。水質は酸素飽和度及び塩分はSeven2Go(METTLER TOLEDO), pHはSeven2GoPro(METTLER TOLEDO)を使って測定した。水温はインキュベータ内に設置した水温測定用に別途用意した6ウェルプレート(各ウェルに人工海水6.3mL)に挿入した白金抵抗体センサー(R003, チノー)で測定した。

結果

人工受精 2018~2020年に実施した人工受精と卵の発生率, 母貝の飼育条件及び受精海水の水質を第1表に示した。海水, 人工海水の何れでも受精後に卵割が確認され発生が進行した。マガキ卵の最大発生率の範囲とその平均値は, 広島産では26.5~96.9%及び71.5%, 気仙沼産では47.7~97.9%及び69.9%であった。

宅配便到着日(8例)のマガキの卵の最大発生率は55.2~97.9%であった。一方, 到着後に約4℃に24時間おいたマガキ卵(5例)の最大発生率は73.1~94.1%であった。到着後に15℃海水で飼育したマガキの最大発生率を飼育日数で比較すると, 広島産マガキでは2018年6月15日から飼育4日目で71.8%, 飼育27日目で73.7%, 2019年6月7日から飼育10日目で38.8%, 20日目で26.5%であった。気仙沼産マガキでは2018年7月11日の到着日で68.8%, 飼育34日目で72.6%, 2019年6月28日から飼育12日目で50.5%, 飼育39日目で69.7%であった。これらより, 24時間の保管による大幅な受精率低下は認められなかった。また, いずれの産地についても飼育期間が20日目以降であっても26.5~72.6%の受精率が得られ, 入手した母貝によっては飼育開始初期より高い発生率が確認された。

磯野ら：養殖マガキの卵を用いた毒性試験法

第1表 2018～2020年における広島産及び気仙沼産マガキの到着日とその後の飼育に伴うマガキ人工受精卵の発生率と水質

産地	母貝		人工受精日	発生率*1 (%)			雌数 (n)	軟体部*2 湿重量 (g)	人工受精直前の母貝の飼育条件	受精海水の種類・水質			試験番号*3	
	到着日	飼育日数		最小	最大	平均				種類	pH	塩分		
広島	2018/ 6/15	4	6/19	9.1	71.8	32.8	4	11.4	15℃海水	天然	7.9	33.7	-	
		12	6/27	-*4	-	92.0	1	11.1	15℃海水	天然	8.0	33.9	-	
		18	7/3	-	-	83.8	1	13.6	15℃海水	天然	8.0	34.1	Cr-1	
		27	7/12	3.7	73.7	43.4	4	11.1	15℃海水	天然	8.0	34.2	Cr-2	
	2019/ 5/29	6	6/4	26.1	60.3	38.8	3	32.2	15℃海水	天然	8.1	34.4	-	
		8	6/6	41.3	82.4	64.8	4	34.8	15℃海水	天然	8.1	34.5	-	
		6/7	10	6/17	15.5	38.8	29.2	4	17.1	15℃海水	天然	8.0	34.6	-
			12	6/19	-	-	49.8	1	17.7	15℃海水	天然	8.0	34.1	DCP-1
	2020/ 5/27	17	6/24	35.7	69.9	50.9	4	16.7	15℃海水	天然	8.1	34.1	DCP-2	
		20	6/27	9.1	26.5	17.7	4	13.4	15℃海水	天然	8.1	34.2	-	
		0	5/27	18.5	60.7	35.6	5	30.7	到着後直ちに使用	人工	8.0	33.0	DCP-3	
		6/3	0	6/3	41.3	87.1	61.9	5	32.8	到着後直ちに使用	人工	8.1	33.0	DCP-4
	0		6/3	-	-	-	-	-	到着後直ちに使用	人工	-	-	NIES-1*5	
	1*6		6/4	49.6	84.5	71.3	5	35.0	到着後4℃, 24h	人工	8.2	33.0	-	
	6/10	0	6/10	36.0	96.9	73.9	5	29.2	到着後直ちに使用	人工	8.1	32.0	DCP-5	
		0	6/10	-	-	-	-	-	到着後直ちに使用	人工	-	-	NIES-2*5	
1*6		6/11	18.5	94.1	69.9	5	24.0	到着後4℃, 24h	人工	8.2	32.0	-		
0		6/11	18.5	94.1	69.9	5	24.0	到着後4℃, 24h	人工	8.2	32.0	-		
気仙沼	2018/ 7/11	0	7/11	22.2	68.8	49.3	3	30.0	到着後直ちに使用	天然	8.0	34.1	-	
		4	7/15	45.9	76.5	63.8	3	30.2	15℃海水	天然	8.1	34.0	Cr-3	
		8	7/19	11.6	47.7	32.1	3	35.1	15℃海水	天然	8.1	34.0	Cr-4	
		34	8/14	37.3	72.6	59.8	4	34.5	15℃海水	天然	8.0	33.1	Cr-5	
	7/25	0	7/25	65.9	91.2	78.0	4	32.7	到着後直ちに使用	天然	8.1	34.0	-	
		1	7/26	-	-	91.6	1	43.6	15℃海水	天然	8.1	34.1	Cr-6	
	2019/ 6/28	12	7/10	2.4	50.5	33.3	4	23.3	15℃海水	天然	8.0	32.8	DCP-6	
		19	7/17	39.2	71.6	58.3	4	24.6	15℃海水	人工	8.2	32.0	DCP-7	
		27	7/25	55.8	67.1	61.6	4	20.9	15℃海水→4℃, 24h	人工	8.1	32.0	DCP-8	
		39	8/6	37.2	69.7	51.6	4	26.5	15℃海水→4℃, 24h	人工	8.1	33.0	-	
	2020/ 7/1	0	7/1	86.8	97.9	90.1	4	25.9	到着後直ちに使用	人工	8.1	33.0	Cr-7, DCP-9	
		1*6	7/2	14.7	73.1	45.6	4	25.2	到着後4℃, 24h	人工	8.2	32.0	-	
7/8		0	7/8	14.3	85.2	46.7	4	26.6	到着後直ちに使用	人工	8.1	33.0	Cr-8, DCP-10	
		1*6	7/9	4.3	77.9	23.9	4	24.1	到着後4℃, 24h	人工	8.2	32.0	Cr-9	
7/15		0	7/15	35.0	55.2	45.3	2	15.5	到着後直ちに使用	人工	8.1	32.0	Cr-10, DCP-11	
		1*6	7/16	22.4	91.0	50.3	3	23.8	到着後4℃, 24h	人工	8.2	32.0	Cr-11, DCP-12	

*1：人工受精後、約2.5時間経過時の測定値、*2：雌雄を合わせた個体の平均値、雄はいずれも1個体、*3：第2表の試験番号に対応

*4：数値無しまたは試験の実施無し、*5：人工受精および暴露試験は国立環境研究所で実施。この他は海洋生物環境研究所で実施

*6：保冷日数

卵を用いた毒性試験 毒性試験には発生率が最大の卵を用いた。毒性試験の総数は六価クロムでは11回、3,5-DCPでは14回であった。全試験のうち標準物質及び水質を測定した試験について結果を第2表に示した。各標準物質のそれぞれの濃度区において水温、酸素飽和度及びpHは試験期間中に大きな違いが認められなかった。各標準物質の回収率（設定濃度に対する測定濃度の割合）は、六価クロムでは開始時に82~100%（平均値：92%）、終了時に85~106%（平均値：95%）であり試験期間中の濃度がほぼ維持されていた。一方、3,5-DCPでは開始時に67~92%（平均値：83%）、終了時に42~72%（平均値：55%）であり終了時に濃度低下がみられた。

各標準物質について算出したEC₅₀を第3表に示した。対照区における正常発生率の範囲とその平均値は、天然海水では55.7~95.9%及び77.9%、人工海水では57.9~97.0%及び84.5%であり、いずれの海水についても正常発生率は同程度であった。六価クロムのEC₅₀は設定濃度では1.7~5.4mg/L（平均値：4.8mg/L, n=11）、測定濃度では1.5~5.2mg/L（平均値：3.9 mg/L, n=6）であった。3,5-DCPのEC₅₀は設定濃度では1.7~5.4mg/L（平均値：3.3mg/L, n=14）、測定濃度では3.3mg/Lであった。設定濃度によるEC₅₀について海水及び人工海水と比較すると、それぞれの標準物質において違いが認められなかった（ANOVA, $p > 0.05$ ）。

第2表 マガキ受精卵の暴露試験下における六価クロム及び3,5-DCP濃度と水質環境の変化

対象物質	試験番号*1	対象物質濃度*2 (mg/L)				酸素		pH		塩分		水温 (°C)	
		設定	測定			飽和度 (%)	終了	開始	終了	開始	終了	平均	標準偏差
			開始*3	終了	幾何平均								
Cr(IV)	Cr-1	対照	<0.05	<0.05	-*4	100	98	7.9	8.0	34.6	-	23.8	0.2
		0.95	0.78	0.81	0.79	99	99	7.9	8.0	-	-		
		3.1	2.7	2.8	2.8	97	99	7.9	8.0	-	-		
		9.5	8.9	9.6	9.2	97	98	7.8	8.0	-	-		
		31	29	29	29	98	97	7.6	8.0	-	-		
	Cr-2	対照	<0.05	<0.05	-	99	97	8.0	8.1	34.6	-	23.9	0.1
		0.95	0.92	0.94	0.93	99	97	8.0	8.1	-	-		
		3.1	2.9	2.8	2.9	100	98	8.0	8.1	-	-		
		9.5	9.3	9.5	9.4	100	98	7.9	8.1	-	-		
		31	30	30	30	100	98	7.7	8.0	-	-		
	Cr-3	対照	<0.05	<0.05	-	101	100	8.0	8.1	34.5	-	23.6	0.2
		0.95	0.78	0.84	0.81	101	100	8.0	8.1	-	-		
		3.1	2.52	2.7	2.6	101	99	7.9	8.1	-	-		
		9.5	8.8	9.3	9.1	98	99	7.8	8.1	-	-		
		31	28	28	28	97	99	7.5	8.0	-	-		
	Cr-4	対照	<0.05	<0.05	-	101	99	8.0	8.0	34.5	-	23.5	0.1
		0.95	0.88	0.93	0.90	101	98	8.0	8.0	-	-		
		3.1	2.8	3.1	2.9	97	97	8.0	8.0	-	-		
		9.5	8.8	9.3	9.0	98	98	7.8	8.0	-	-		
		31	28	29	28	97	98	7.7	8.0	-	-		
	Cr-5	対照	<0.05	<0.05	-	99	99	8.0	8.1	33.9	-	23.9	0.1
		0.95	0.95	1.0	1.0	99	99	8.0	8.1	-	-		
		3.1	2.9	3.0	3.0	99	99	7.9	8.1	-	-		
		9.5	9.3	9.8	9.5	98	99	7.9	8.1	-	-		
31		28	29	29	98	99	7.7	8.0	-	-			
Cr-6	対照	<0.05	<0.05	-	98	96	8.1	8.1	34.6	-	23.5	0.1	
	0.95	0.84	0.86	0.85	97	97	8.1	8.1	-	-			
	3.1	2.8	3.0	2.9	98	97	8.0	8.1	-	-			
	9.5	8.8	9.1	9.0	97	97	7.9	8.1	-	-			
	31	27	28	28	96	98	7.6	8.0	-	-			
3,5-DCP	NIES-1	対照	-	-	-	99	98	8.2	8.1	33.9	34.1	24.9	0.1
		0.31	-	-	-	99	99	8.2	8.1	33.9	34.0		
		0.95	-	-	-	99	99	8.2	8.1	33.9	34.0		
		3.1	-	-	-	99	98	8.2	8.1	33.8	34.0		
		9.5	-	-	-	100	98	8.2	8.1	33.8	34.0		
	NIES-2	対照	<0.001	<0.001	-	99	99	8.2	8.2	33.5	33.8	24.9	0.1
		0.31	0.28	0.22	0.25	99	99	8.2	8.2	33.5	33.8		
		0.95	0.80	0.49	0.63	100	99	8.2	8.2	33.4	33.8		
		3.1	2.1	1.3	1.7	100	98	8.2	8.1	33.4	33.8		
		9.5	8.0	5.0	6.4	99	99	8.2	8.2	33.6	34.0		

*1：第1表の試験番号に対応、*2：二クロム酸カリウムはクロム換算の濃度

*3：追加した供試卵液0.3mLを加味して調製時の濃度を補正（調製濃度×6/6.3）

*4：数値無しまたは測定無し

第3表 六価クロム及び3,5-DCPを用いた暴露試験下におけるマガキ受精卵の正常発生率とEC₅₀

対象物質	試験番号 ^{*1}	正常発生率 (% , 平均±標準偏差, n=4)								EC ₅₀ ^{*3} (mg/L)		供試海水
		設定濃度 (mg/L)	対照	0.95		3.1		9.5		設定	測定	
Cr (IV)	設定濃度 (mg/L)			0.95		3.1		9.5		31		
	Cr-1	95.9 ± 1.0	95.9 ± 1.8	88.2 ± 5.5 ^{*2}	2.9 ± 3.3 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	1.5	天然			
	Cr-2	87.4 ± 1.6	88.2 ± 6.4	83.2 ± 11.0	18.1 ± 3.2 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	5.2	天然			
	Cr-3	72.8 ± 11.2	73.2 ± 9.8	70.0 ± 10.7	50.8 ± 7.3 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	4.9	天然			
	Cr-4	67.2 ± 4.0	73.6 ± 2.7	68.5 ± 7.4	18.8 ± 5.5 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	5.1	天然			
	Cr-5	55.7 ± 10.5	44.4 ± 8.5	34.4 ± 7.6 ^{*2}	3.6 ± 2.1 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	1.7	天然			
	Cr-6	91.9 ± 3.7	93.7 ± 4.1	91.0 ± 3.5	14.0 ± 7.2 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	5.1	天然			
	Cr-7	94.0 ± 0.7	94.0 ± 2.3	92.6 ± 2.2	46.7 ± 5.4 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	- ^{*4}	人工			
	Cr-8	62.9 ± 9.2	62.7 ± 8.7	69.9 ± 8.1	31.8 ± 2.7 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
	Cr-9	82.8 ± 8.4	78.6 ± 5.8	70.1 ± 5.9	0.0 ± 0.0 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
	Cr-10	91.8 ± 3.3	93.9 ± 1.1	91.7 ± 2.8	2.0 ± 2.4 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
Cr-11	97.0 ± 1.0	95.8 ± 1.3	95.2 ± 1.4	36.5 ± 3.0 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工				
3, 5-DCP	設定濃度 (mg/L)			0.31		0.95		3.1		9.5		
	DCP-1	80.6 ± 4.1	86.2 ± 4.6	77.9 ± 5.6	74.9 ± 2.9 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	天然			
	DCP-2	79.3 ± 5.2	82.1 ± 3.5	87.5 ± 2.9	84.4 ± 3.4	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	天然			
	DCP-3	92.9 ± 4.1	92.7 ± 2.4	87.4 ± 2.9	74.9 ± 5.2 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	人工			
	DCP-4	91.9 ± 1.5	94.4 ± 1.4	94.3 ± 2.9	79.2 ± 2.1 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	人工			
	DCP-5	86.4 ± 2.7	87.2 ± 2.1	87.8 ± 3.8	80.4 ± 3.7 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	人工			
	DCP-6	69.9 ± 7.5	67.1 ± 12.1	74.0 ± 11.3	43.7 ± 13.2 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	天然			
	DCP-7	81.6 ± 4.0	81.2 ± 2.7	83.4 ± 6.0	68.4 ± 8.5 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	人工			
	DCP-8	64.1 ± 6.8	60.8 ± 11.2	67.4 ± 5.6	63.1 ± 1.0	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
	DCP-9	95.1 ± 2.4	94.8 ± 0.2	93.9 ± 2.9	91.4 ± 1.4	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
	DCP-10	79.4 ± 4.2	85.6 ± 11.2	75.8 ± 6.6	78.8 ± 5.0	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
	DCP-11	95.4 ± 1.8	94.5 ± 2.5	95.4 ± 1.2	88.9 ± 6.0 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	人工			
	DCP-12	96.2 ± 1.0	95.2 ± 2.1	93.6 ± 2.3	94.3 ± 1.1	0 ± 0 ^{*2}	5.4	-	人工			
NIES-1	57.9 ± 8.7	52.7 ± 8.5	60.9 ± 6.7	50.6 ± 13.6 ^{*2}	0 ± 0 ^{*2}	1.7	-	人工				
NIES-2	82.0 ± 6.7	82.1 ± 4.8	71.9 ± 10.0	63.6 ± 7.1	0 ± 0 ^{*2}	5.4	3.3	人工				

*1: 第1表の試験番号に対応, *2: 対照と比較して有意差有り (ANOVA, p<0.05)

*3: 対照と有意差が無い最高濃度と有意差有りの最低濃度との幾何平均値(二クロム酸カリウムはクロム換算の濃度), 算出に用いた各対象物質濃度は設定濃度または第2表に示す測定濃度による, *4: 対象物質未測定のため数値無し

考 察

多くの海産二枚貝では切開浸出法が人工受精に適用できないものの, 成熟した母貝をそのまま高水温や紫外線照射海水に曝すことで放卵や放精を誘発し, 受精卵を得ることが可能である(鳥羽・深山, 1992)。しかし, これらの方法では成熟度が不明な母貝を使用するため, 成熟が充分でない場合には誘発操作を行っても試験が実施するのに足る受精卵が得られない可能性がある。一方, 本研究では成熟の進んだ母貝を5~6月は広島, 6~7月は気仙沼から入手し, その中の10個体程度から受精可能な卵, 精子を有する個体を選別しそれら配偶子を使って受精卵を安定して得ることができた。このことから, 養殖マガキでは試験計画に即して6~7月中旬であれば受精卵を用意できると考えられる。なお, マガキは全国で養殖されており, 宅配便を用いることで研究室に居ながらにして母貝の入手が可能である。本研究では成熟の

進んだ母貝を5~6月は広島, 6~7月は気仙沼から入手し受精卵が経年的に安定して得られることを確認した。マガキの成熟は水温上昇に対応して進行するので(大泉ら, 1976), 例えば5月より早い時期は九州, 7月より遅い時期は北海道から母貝を入手することで受精卵が得られる期間を長期化できる可能性がある。今後この点については確認が必要である。また, 入手したマガキを15℃で飼育すると成熟状態が1ヶ月程度維持されたことから, 更なる期間の延長が可能と考えられる。

海産二枚貝の卵からD型幼生への発生をエンドポイントとする六価クロムのEC₅₀既報値(設定濃度による算出)はマガキ及び*Mytilus edulis*ではそれぞれ4.538mg/L (20℃), 4.469mg/L (17℃)であり(Martin *et al.*, 1981), *Chlamys asperrima*では1.35mg/L (18℃)である(Krassoi *et al.*, 1997)。本研究の測定濃度に基づくEC₅₀は平均3.9 mg/L (24℃)であり, 往知知見と同じオーダーであった。なお, Martin *et al.* (1981)におけるマガキは

Johnsons Oyster Companyから入手されており、地理的に大きく異なる養殖マガキであっても、同様のEC₅₀値が得られることを示している。3,5-DCPでは同じエンドポイントに対する報告は確認されず、*Mya arenaria*成体に対するLC₅₀（半数致死濃度、測定濃度による算出）が9.8mg/L（10℃）と報告されるのみである（McLeese *et al.*, 1979）。本研究の測定濃度によるEC₅₀は3.3mg/L（24℃）であり、供試材料を卵とすることで3,5-DCPに対する検出感度の向上が図られていると推察される。

二枚貝全般の影響濃度において、本研究で得たマガキの感受性がどの程度であるかを比較するため、米国環境保護庁（USEPA）のECOTOXデータベース（米国環境保護庁, 2022）による検索を行い、生態毒性データを手に入れた。用いたパラメータはChromium, Aquatic, Molluscs, Salt Water及びFresh Waterである。なお、使用された標準物質の濃度は全て六価クロム換算である。得られたEC₅₀またはLC₅₀は海産種では51個が全て設定濃度、淡水種では11個が設定濃度で4個が測定濃度による算出値であった。これらと本研究の結果から種の感受性分布を作成したところ（第2図）、海産種において本研究のEC₅₀は2番目に位置し感受性が高かった。図に示される影響濃度は、異なる発育段階（卵、幼生、成体）及び暴露期間（1～16日間、平均6日間）から得られている。マガキより感受性の高い二枚貝は*C. asperrima*（幼生）であり、暴露は2日間である（Krassoi *et al.*, 1997）。

本研究は1日間暴露であり*C. asperrima*と比べ半分の暴露期間、また卵を用いていることから他の成体による試験と比べ小規模の試験装置で結果が得られる試験法といえる。なお、第2図に示す影響濃度は海産種に比べ淡水種で低い。これは、六価クロム等の重金属は水中の硬度成分と反応して、錯体を形成することで毒性が緩和されるためと考えられている（西川・田畑, 1969）。

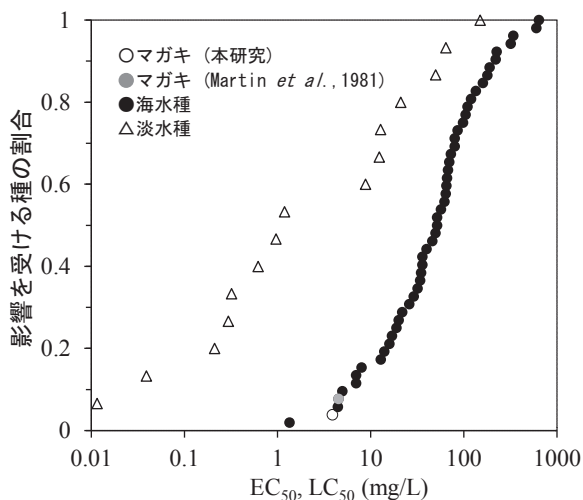
海産種では淡水種と比較すると飼育・繁殖に大がかりな設備が必要となり、自前での育成が困難な状況にある。さらに、二枚貝の飼育には餌料である植物プランクトンが大量に必要なことから、この培養を合わせ二重の手間を要する。一方、マガキは全国で養殖され宅配便でいつでも入手可能な状況にあり、これを試験材料に用いることには多くの利点があると考えられる。また、人工海水におけるマガキの受精率及びD型幼生への正常発生率、標準物質に対する影響濃度は海水と同程度であった。人工海水の素は市販されており、これを用いることで試験用水の再現性確保や調製の簡便さが図られると考えられる。海産二枚貝に対する化学物質の毒性データは非常に少ない。今後、本研究の手法によりマガキの毒性データが蓄積されれば、毒性機序に関する藻類、甲殻類、魚類との類似点、相違点が見えてくるとともに、養殖マガキをWETに用いる利点が明らかになると推察される。

謝 辞

本研究は、（独）環境再生保全機構の環境研究総合推進費（JPMEERF20185003）により実施した。本研究を遂行するにあたり、植物プランクトン培養とマガキの飼育管理で大坂綾太氏及び関根あずさ氏、マガキの購入に際し高田水産及び宮城県漁業協同組合唐桑支所の皆様にご協力頂いた。本稿を御校閲された北里大学名誉教授 加戸隆介博士並びに東京大学名誉教授 古谷 研博士から大変重要な御意見を賜った。記して心より感謝する。

引用文献

米国環境保護庁（2022）. ECOTOX Knowledgebase. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>（2022年8月22日アクセス）。



第2図 六価クロムの二枚貝に対する影響濃度（EC₅₀, LC₅₀）に基づく種の感受性分布。本研究以外の値は米国環境保護庁(2022)による。

- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- 磯野良介・岡 健太・山本裕史 (2022). 海産甲殻類シオダマリミジンコのノープリウス幼生を用いた毒性試験法の開発. *環境毒性学会誌*, **25**, 10-17.
- 磯野良介・大坂綾太 (2020). 海産甲殻類アカシマモエビのゾエア幼生を用いた急性毒性試験法の開発. *環境毒性学会誌*, **23**, 1-9.
- 国立環境研究所・環境省 (2013). 生物応答手法を用いた排水試験法 (検討案), 排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会.
- Krassoi, R., Anderson, I. and Everett, D. (1997). Larval abnormalities in doughboy scallops *Chlamys (Mimachlamys) asperrima* L. in response to test conditions and six reference toxicants. *Australas. J. Ecotoxicol.*, **3**, 65-74.
- Leverett, D. and Thain, J. (2013). Oyster embryo-larval bioassay (Revised). *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No.54*, 1-34.
- Martin, M., Osborn K. E., Billig, P. and Glickstein, N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, **12**, 305-308.
- McLeese, D. W., Zitko, V. and Peterson, M. R. (1979). Structure-lethality relationships for phenols, anilines and other aromatic compounds in shrimp and clams. *Chemosphere*, **8**, 53-57.
- 日本工業標準調査会 (1998). 65.2.1 ジフェニルカルバジド吸光光度法. 「工場排水試験方法 JIS K 0102:1998」, 日本規格協会, 東京, 269.
- 西川克夫・田畑健二 (1969). 水産動物に及ぼす重金属の毒性とその緩和要因に関する研究—III, 数種金属錯体の低毒性. *東海水研報*, **58**, 233-241.
- 大泉重一・伊藤 進・小金沢昭光・酒井誠一・佐藤隆平・菅野 尚 (1976). 第2章 カキ養殖の技術. 「改訂版浅海完全養殖」(今井丈夫監修), 恒星社厚生閣, 東京, 153-189.
- 宗宮 麗・羽野健志・岸田智穂・國師恵美子・宇野誠一・山本裕史・岡 健太・河野真知・持田和彦 (2021). 海産3魚種を用いた胚-仔魚期における短期毒性試験法の検討. *環境毒性学会誌*, **24**, 79-90.
- 水産庁 (2010). 海産生物毒性試験指針, 水産庁, 東京, 1-156.
- 田中彌太郎 (1996). 16. マガキ. 「動物発生段階図譜」(石原勝敏編著), 共立出版株式会社, 東京, 138-143.
- 鳥羽光晴・深山義文 (1992). アサリ産卵誘発方法の比較. *水産増殖*, **40**, 303-311.
- 渡部春奈・林 岳彦・田村生弥・中村 中・阿部良子・高信ひとみ・荻野仁子・小塩正朗・鏑迫典久 (2015). 生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査. *環境化学*, **25**, 43-53.
- Wheeler, J. R., Leung, K. M. Y., Morrill, D., Sorokin, N., Rogers, H., Toy, R., Holt, M., Whitehouse, P. and Crane, M. (2002). Freshwater to saltwater toxicity extrapolation using species sensitivity distributions. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 2459-2467.
- 山本裕史・新野竜大・鏑迫典久 (2015). 生物応答を用いた排水評価・管理の動向と今後の展望. *環境化学*, **25**, 3-10.