

## ミジンコ遊泳阻害試験法の簡素化に関する検討

清水涼子, 吉村忠与志, 高山勝己\*

福井工業高等専門学校物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

\*takayama@fukui-nct.ac.jp

### Simplification of a toxicity test using *Daphnia magna*

Ryoko SHIMIZU, Tadayosi YOSHIMURA, and Katsumi TAKAYAMA \*

Department of Chemistry & Biology Engineering, Fukui National College of Technology  
(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

(Received May 26, 2008; Accepted June 10, 2008)

#### Abstract

The inhibition of the mobility of *Daphnia magna* (EC<sub>50</sub>) was effectively used to estimate the toxicity value of chemical agents. However, the protocol for this method is quite complex due to the strict conditions required for the vessel and *Daphnia magna* using for the test. Therefore, we used a 6- or 96-well disposable plate instead of a glass vessel and simplified the analytical procedure. The EC<sub>50</sub> for potassium dichromic acid was estimated to range in concentration from 0.5 to 2.5 ppb. Although this EC<sub>50</sub> value disagrees with those (0.9 – 2.0 ppm) estimated by the traditional method (JIS K0229), our simplified method could still be useful to evaluate whether or not chemical agents have toxicity.

**Keywords:** *Daphnia magna*, Inhibition of the mobility, Toxicity test, 24h-EC, multi-well plate

#### 1. はじめに

オオミジンコ (*Daphnia magna*) は、ミジンコ亜綱 ミジンコ下綱 ミジンコ目 異脚亜目 ミジンコ科 ミジンコ属に属する甲殻類である。体長は 0.7 ~ 4 mm と大きく、後腹部の背面に 1 つの深いへこみがあり、肛刺列は前後 2 つの部分に分かれているのが特徴である (図 1)。

ミジンコ遊泳阻害試験 (生態毒性試験) は、このオオミジンコを対象として、化学物質に一定時間暴露した際のミジンコの遊泳に及ぼす影

響を把握する試験である。ミジンコは毒性物質に感受性が高く、安価で手に入りやすく、飼育が容易であるため生態毒性を示すテストガイドラインとして広く用いられている [1, 2]。

しかし、JIS 規格 K0229 「化学物質によるミジンコ類の遊泳阻害試験方法」により定められたミジンコ遊泳阻害試験法 [3] は、試験に用いる容器が最低でも 10 mL と定められていることからサンプル数の増加に伴って容器が嵩張るため、大型インキュベーターの確保が必然となる。また、試験で用いるミジンコの飼育条件や実際に

試験に用いる個体条件にも制限があり、厳密に実施するには煩雑な面が多くある。



図1 *Daphnia magna* の光学顕微鏡写真

JIS規格K0229に定められている化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験方法は以下のように要約される。

1. 試験器具 ガラス製の試験管又はビーカーで容量10～100 mLのものを使用する。
2. 試験装置 恒温設備で、試験容器の水温を $20 \pm 2$  °Cに保つことができるものを用いる。
3. 試験条件 ひとつの試験濃度区には最小20個体のミジンコ類（生後24時間以内の幼体）を4つの試験容器に等分して用いる。このとき密度が5個体/10 mLを超えないようにする。
4. 対照区 試験区の他に、希釈水だけで調整した対照区を設ける。対照区の遊泳阻害率は10%以下でなければならない。
5. 遊泳阻害の判定 容器内を穏やかにかき混ぜた後、15秒間の観察期間中に触角を動かすことができても、遊泳しないものを遊泳阻害とみなす。
6. 遊泳阻害率の計算 遊泳阻害された個体数をミジンコの全数で割り、各濃度に対する遊泳阻害率 $EC_{50}$ を算定する。(例えば24時間後の遊泳阻害率は $24-EC_{50}$ と表記する)

上記以外にも JIS 規格 K0229 には、試験を実施する上での細かい要求事項がある。これらは数値による正確かつ公正な評価を行うためには当然必要とされる規定であるが、大量のサンプルの中から毒性の是非のみを判定することのみを目的とするのであるならば、判定迅速化の妨げとなる。

そこで本試験では、恒温槽内でコンパクトに重ね置きができるポリスチレン製の多穴ウェルプレートを用いることにした。これにより、一台の小型インキュベーターで、同時に多くの毒性試験が可能となる。また、操作の簡略化のために JIS 規格 K0229 に定められているいくつかの条件を無視した。

## 2 実験

試験容器には市販の6ウェルプレートまたは96ウェルプレート(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製:縦8.5 cm、横12.5 cm、深さ1.6～2.0 cm)を採用した。実験条件は JIS 規格 K0229 に基づくべきであるが、1) 溶存酸素は飽和濃度の60%以上を保たねばならない、2) 試験には、累代飼育した生後2週間以上のミジンコ雌生体を試験前日に新しく用意した容器に移し、翌朝までに産卵した幼体を選別して供与生物としなければならないとあるがこの2点については実験条件から削除した。毒性試験対象物質として二クロム酸カリウムを選択した。

### 2.1 希釈水の選定

水道水、蒸留水、市販のミネラル水、イオン交換水、飼育水槽の水を10 mLずつ、6ウェルプレートに入れた。ミジンコ成体を5匹ずつ入れ、プレートを20 °C恒温槽内に静置した。4、12、30、48時間後に各ウェルを観察し、遊泳阻害率 $EC_{50}$ 値を計算した。

## 2.2 6 ウェルプレートでのミジンコ阻害試験

濃度の異なるニクロム酸カリウム水溶液を、6 ウェルプレートに 10 mL ずつ入れた後（最大で  $n = 6$ ）、各ウェルにミジンコ成体を 5 匹ずつ入れた（図 2）。プレートを 20 °C 恒温槽内に静置した。3、6、24 時間後にミジンコを観察し、各時間における  $EC_{50}$  値を見積もった。

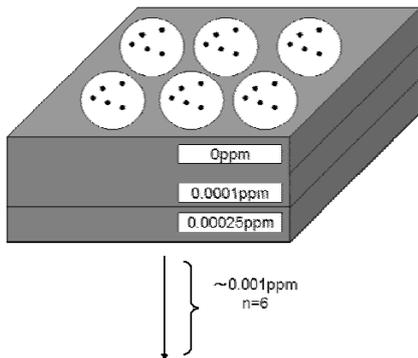


図 2 6 ウェルプレートミジンコ遊泳阻害試験

## 2.3 96 ウェルプレートでのミジンコ阻害試験

濃度の異なるニクロム酸カリウム水溶液を 96 ウェルプレートに 0.3 mL ずつ入れ、各ウェルにミジンコ成体を 1 匹ずつ入れた（図 3）。ただし、3 の条件を満たしていない。なお各濃度に対する  $n$  は最大 96 まで可能であるが、実質的には 6 ~ 8 程度（1 列分）とすれば、1 枚のプレートで全濃度範囲が検討できる。プレートを 20 °C 恒温槽内に静置した。3、6、24 時間後に観察し、各時間における  $EC_{50}$  値を見積もった。

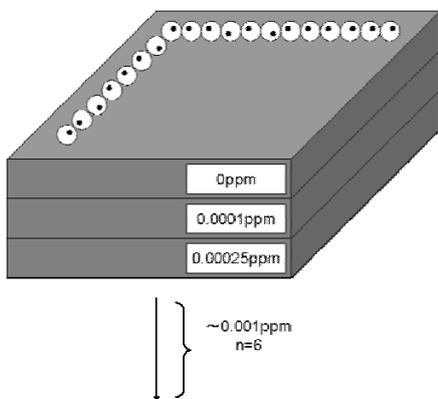


図 3 96 ウェルプレートミジンコ遊泳阻害試験

## 3 結果と考察

### 3.1 各種希釈水の毒性確認

JIS 規格 K0229 では、対照区の遊泳阻害率は 10 % 以下でなければならない。そこで、実験に用いるマトリックス（水）のミジンコに対する有害性の有無を検討したところ、水道水（一日放置）あるいは飼育水槽の水は、少なくとも 48 時間経過後もミジンコに毒性を示さなかった（遊泳阻害率数 10% 以下）。これは上記条件を満たしており、本試験では水道水又は飼育水のいずれかを希釈水として用いることとした。

### 3.2 6 ウェルプレートによる毒性試験

6 ウェルプレートを用いた試験の結果を図 4 に示す。ニクロム酸カリウムの 24h- $EC_{50}$  値は 0.0005 ~ 0.0025 ppm の範囲にあることがわかった。JIS 規格 K0229 に基くニクロム酸カリウムの 24h- $EC_{50}$  値は 0.9 ~ 2.0 ppm の範囲内と記載[1] されていることから、簡便化法はニクロム酸カリウムが極めて低濃度で毒性があると判定されてしまうが、JIS 規格に定められた条件に厳密に従っていないこと（JIS 規格 K0229 では 24 時間以内の幼体を用いなければならないとある）が大きな要因と考える。

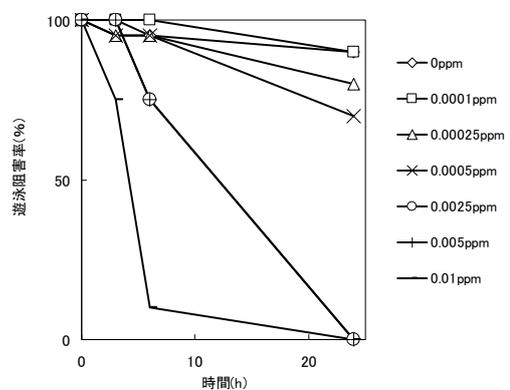


図 4 6 ウェルプレートミジンコ遊泳阻害試験の結果 ( $n = 6$ )

### 3.3 96 ウェルプレートによる毒性試験

96 ウェルプレートを用いた場合の試験結果を図5に示す。二クロム酸カリウムの24 h-EC<sub>50</sub>値は0.00025 ~ 0.0005 ppmの範囲内にある。このように6ウェル、96ウェル試験から見積もられた二クロム酸カリウムの24 h-EC<sub>50</sub>値は、両者ともほぼ一致した。

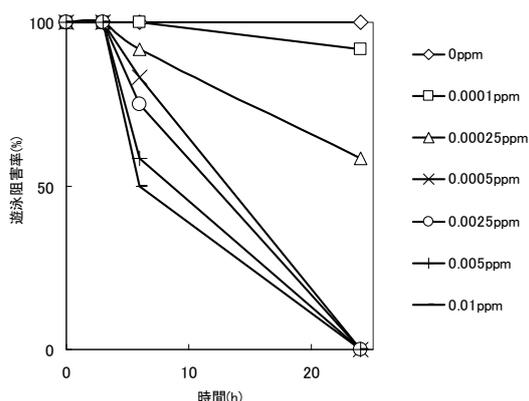


図5 96 ウェルプレートミジンコ遊泳阻害試験の結果 (n = 6 として1枚のプレートで試験)

### 4. 結論

いまのところ、ポリスチレン製のウェルプレートを用いたミジンコ阻害試験から得られるEC<sub>50</sub>値を公的なデータとするには問題があるようである。これは、測定法をJIS法に比べて大

きく簡素化しているためと考えている。従って、本簡略化試験法は、冒頭でも述べたように、化学物質に対するEC<sub>50</sub>値を見積もるための手段としてではなく、化学物質毒性の有無を迅速に判定するための手段（一次スクリーニング法）として位置づけるべきものと考えている。

ミジンコは、さまざまな水環境の変化（水温の変化や毒物の混入など）に鋭敏であることが報告されている[4]。例えば酸素不足での赤色化などがある。これらの特性を生かして、今後はウェル内のミジンコの挙動や形態をリアルタイムで動画解析できるシステムを構築することで、より短時間で毒性を判定（環境の変化を感知）できるバイオツールの開発を目指している。

### 引用文献

- 1) 豊倉義夫, ミジンコを用いた毒性試験の検討, 千葉県水保研年報, pp. 145-148 (1998).
- 2) 豊倉義夫, ミジンコを用いた毒性試験の検討 (その II), 千葉県水保研年報, pp. 149-152 (1999).
- 3) JIS 規格 K0229 化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験方法
- 4) 花里孝幸, ミジンコ先生の水環境ゼミ, 地人書館(2006); 花里孝幸, ミジンコ, 名古屋大学出版会(2008)