

# 水質汚濁の生物学的判定法の研究 ウニ卵発生期を利用する生物試験

香西 倅行, 岡崎 秀信, 別所 元茂

Studdles on the Bio - Assay Method of the Evaluation of  
Water Pollution

Use of the Fertilized Eggs of Sea Urchins

Toshiyuki KOZAI, Hidenobu OKAZAKI, and Motoshige BESSYO

## I 緒 言

重金属は一般に生物組織内に蓄積する傾向をもち、この中には生体に有毒なものが多い、また重金属による河川や土壌の汚染は環境汚染の中で古くから知られている。

赤汐の発生等最近の海洋は工場排水、生活廃水で非常に汚染されているが、特に重金属汚染は多くの問題を残している。この汚染海水の海洋生物に対する有害度は生物試験によって行われなければならない、その生物学的判定法として、魚貝類を用いた方法や、ウニ受精卵を用いた、生物試験報告<sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>は数多く発表されている。

著者等は簡便かつ鋭便な判定法としてウニ受精卵を用い、重金属の影響濃度について検討を行ったので報告する。

## II 実 験 材 料

### 1 ウ ニ

昭和51年1月、昭和52年1月、高松市沖、男木島海岸にて大量に採取した、バフィンウニ *Hemicentrotus Pulcherrimus* を、香川県水産試験場の大型飼育水槽に入れ、新鮮海水を流入循環し、エアレーションを行い、自然状態とほとんど変わらない状態として、1月より3月末迄蓄養し、その都度槽内より採取して、直ちに実験室に持ち帰り実験に使用した。

### 2 海 水

香川県三豊郡、荘内半島西側の詫間町大浜港外の海水を用いた。

採水月日 昭和51年1月12日  
昭和52年1月11日

## 3 供試重金属

- 1) カドミウム Cd( $\text{CdCl}_2$  塩化カドミウム)
- 2) シアン CN( $\text{KCN}$  シアン化カリウム)
- 3) 鉛 Pb( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  硝酸鉛)
- 4) 水銀 Hg( $\text{HgCl}_2$  昇永)
- 5) PCB (PCB-KC600)
- 6) 6価クロム Cr(VI)( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  重クロム酸加里)
- 7) 3価クロム Cr(III)( $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  塩化第2クロム)
- 8) 砒素 As( $\text{Na}_2\text{AsO}_4$  亜砒酸ソーダ)
- 9) 有機燐 ダイアジノン(Or-P)

## III 実 験 方 法

### 1 ウニの採卵、採精および受精

濾過海水中に0.5M KCl 刺激法によって採卵、採精し、卵はガーゼ濾過後自然沈澱をまって、3回洗滌し、40倍液10mlを径1.5cmの硝子シャーレ中に入れ、精子は50mlの濾過海水中に採精し、ガーゼ濾過後シャーレ1枚当たり1mlを受精に用いた。尚シャーレ中の海水量は200ml。

ウニ卵は1回の実験に10~12個用意し、それぞれから採卵、採精しその少量をクロス受精テストを行い、受精膜形成率98%以上の1個体卵を1実験に使用した。

### 2 使用重金属

9種の重金属の稀釈濃度はPCB及び有機燐を除いて、いずれも濾過海水にて稀釈し、重炭酸ナトリウム( $\text{NaHCO}_3$ )でPH8.1に補正して使用した。PCB及び有機燐の稀釈は低濃度アルコールにて稀釈し、濾過海水にて使用濃度を設定した。

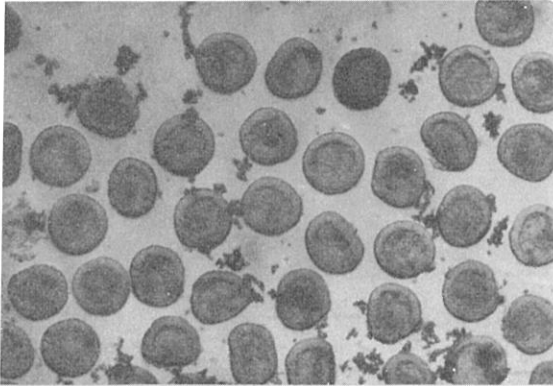
- 1) カドミウム 0.01 0.1 1.0 ppm
- 2) シアン 0.01 0.1 1.0 ppm

3) 鉛								
4) 水銀	0.0005	0.005	0.05	ppm				
5) P C B	0.005	0.05	0.5	ppm				
6) 砒素	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75	ppm	
7) 6価クロム	0.05	0.5	5.0	10.0	ppm			
8) 3価クロム	0.05	0.5	5.0	10.0	ppm			
9) 有機燐	0.001	0.01	0.1	ppm				

#### IV 実験成績

##### 1 カドミウム

###### 1) 受精膜形成



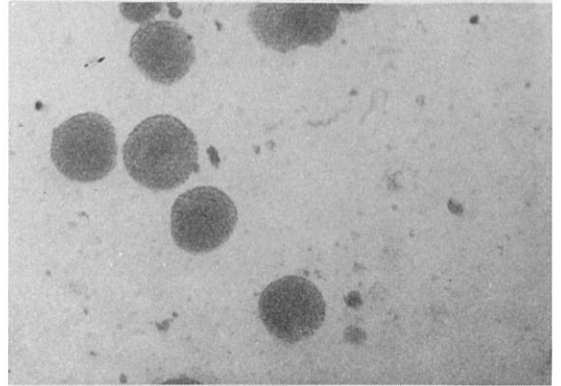
写1. Cd 1.0 ppm 嚢胚期変形

表1 カドミウム・シアン

表1に示す様にカドミウム稀釈海水 0.0 1 0.1 ppm は対照海水と同様の成績を示し、1.0 ppm においては形成率がやや劣っている。

###### 2) 細胞分割期

表1の様に0.0 1 0.1 ppm 稀釈海水は対照海水と同様であるが、1.0 ppm 海水は、2細胞期50%となり、4細胞期15%、8細胞並びに桑実期は10%と細胞分割に遅れを生じ、写真1、2様に嚢胚期には全例変形して永久胞胚となり、対照海水のプルテウス期には、全例崩壊をきたした。



写2. Cd 1.0 ppm プルテウス期崩壊

温度 16℃  
湿度 76%

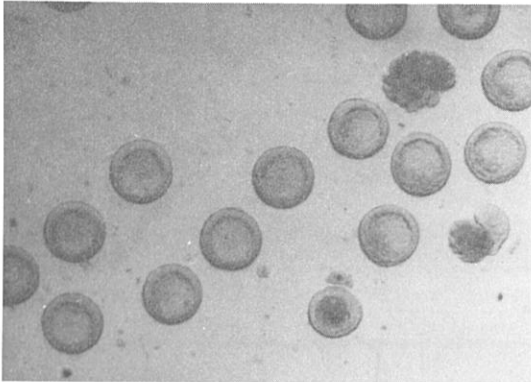
経過時間			0.0 3	2.0 0	2.4 5	3.3 0	4.5 0	21.0 0	52.0 0
試料			受精膜形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	嚢胚期	プルテウス期
品名	濃度 ppm	PH							
対照海水		8.1	99%	99%	97%	97%	97%	97%	97%
Cd	0.0 1	8.1	99	99	97	97	97	97	97
	0.1	8.1	99	99	97	97	97	97	97
	1.0	8.1	98	50	15	10	10	全例変形	全例崩壊
CN	0.0 1	8.1	95	95	92	92	92	92	92
	0.1	8.1	95	95	92	92	92	92	92
	1.0	8.1	70	70*	70*	70*	70*	65*	永久胞 (円形)

\* 異常分割卵混在

## 2 シアン

### 1) 受精膜形成

表1に示す様に稀釈海水0.01 0.1 ppmは対照海水の成績よりやや劣る成績を示したが、1.0 ppm稀釈海水においては、70%の形成率と対照海水に比べて30%の形成率の低下を示した。

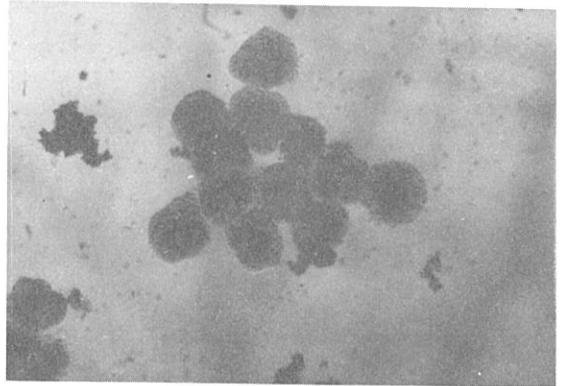


写3. CN 1.0 ppm 裏胚期永久胞胚混在

### 2) 細胞分割期

表1の様に稀釈海水0.01 0.1 ppmは対照海水の成績よりやや劣るが、1.0 ppm海水においては、2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実期の各期は対照海水に比べて70%分割と遅れて、異常分割期が混在している。

写真3、4に示す様に裏胚期において円形細胞に変形し、65%と分割が遅れている、対照海水のプルテウス期には全例永久胞胚となった。



写4. CN 1.0 ppm プルテウス期 崩壊

## 3 鉛

### 1) 受精膜形成

表2および表7に示す様に稀釈海水0.005, 0.01 0.025 0.05 0.075 0.1 0.125 1.0 10.0 ppm 海水いずれも受精膜形成は対照海水と同様な成績を示し、形成率に差は認められない。

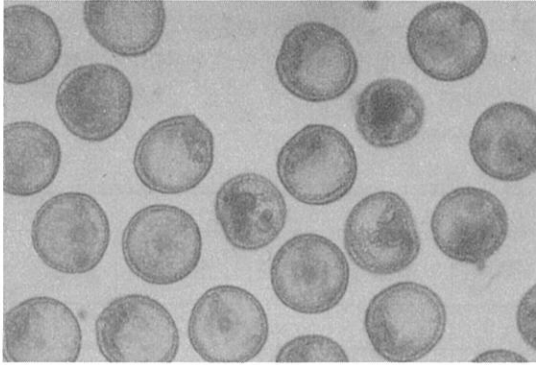
### 2) 細胞分割期

表2および表6、表7の様に稀釈海水0.005 0.01 0.025の各稀釈海水は対照海水とまったく同様の成績を示した。稀釈海水0.05 0.075 0.1 0.125 1.0 ppm

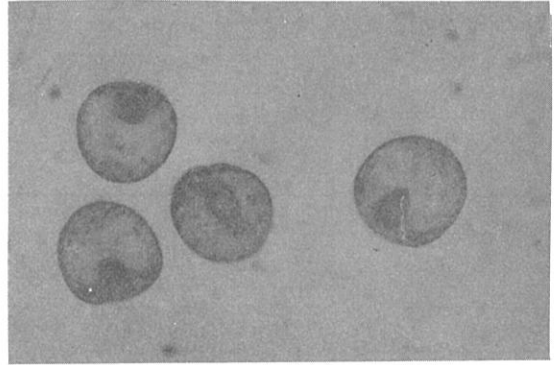
表2. 鉛・水銀

温度 14℃  
湿度 55%

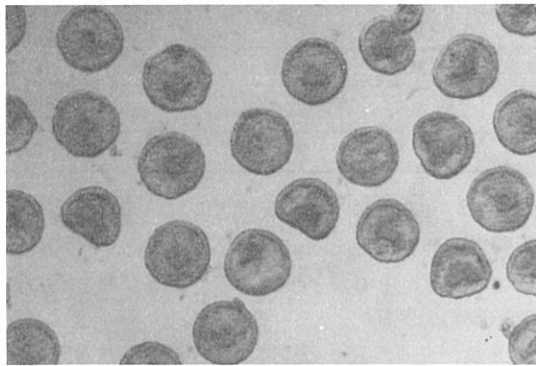
経過時間			0.03	2.10	3.20	4.30	5.50	26.00	66.00
試料			受精膜形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	裏胚期	プルテウス期
品名	濃度ppm	PH							
対照海水		8.1	99%	98%	97%	97%	97%	98%	98%
Pb	0.1	8.1	99	98	96	96	96	98円形	永久胞
	1.0	8.1	99	98	96	96	96	98円形	永久胞
	10.0	8.1	99	50	1	1	89	94変形細胞	崩壊
Hg	0.0005	8.1	99	98	96	96	96	98	98
	0.005	8.1	99	98	96	96	96	98	98遅
	0.05	8.1	99	20	1	1	崩壊		



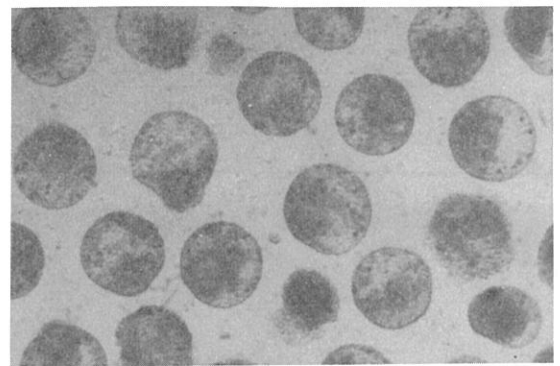
写5 Pb 0.1 ppm 嚢胚期



写6 Pb 0.1 ppm プルテウス期



写7 Pb 10.0 ppm 嚢胚期変形



写8 Pb 10.0 ppm プルテウス期崩壊

#### 4 水 銀

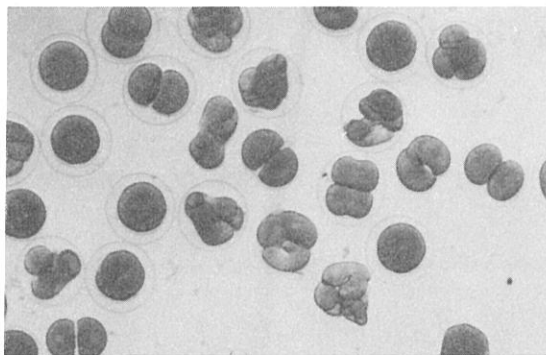
##### 1) 受精膜形成

表2に示す様に稀釈海水0.0005 0.005 0.05 ppm はいずれも対照海水と同様の成績を示した。

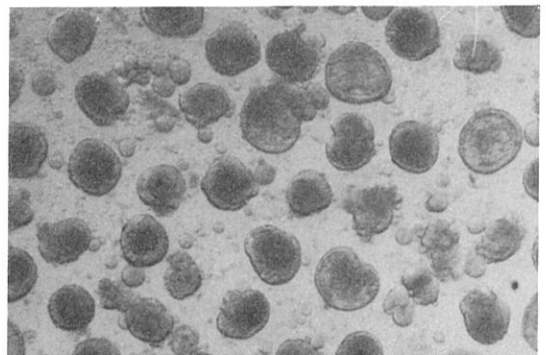
##### 2) 細胞分割期

表2に示す様に稀釈海水0.0005及び0.005 ppmは2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実期及び嚢胚期、プ

ルテウス期に対照海水との差は認められず、0.005 ppm 稀釈海水において、やや発育の遅れを生じた。これに対して、0.05 ppm 稀釈海水は、2細胞期で20%、写9、10に示す様に、4細胞期および8細胞期で1%の分割しか示さず、激しい遅れを生じ、嚢胚期において崩壊をきたした。



写9 Hg 0.05 ppm 4分割期変形並びに遅れ



写10 Hg 0.05 ppm 嚢胚期崩壊

5 PCB

1) 受精膜形成

表3に示す様に稀釈海水 0.005 0.05 ppmにおいては、99%と対照海水とまったく同様の成績を得た、0.5 ppm海水においては形成率95%と少しの遅れと、やや崩壊の細胞が見られた。

表3 PCB・砒素

温度 13℃ 湿度 52%

経過時間			0.03	2.00	3.10	4.30	5.50	25.30	72.00
試料			受精膜形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	囊胚期	ブルテウス期
品名	濃度ppm	PH							
対照海水		8.1	99%	98%	98%	98%	98%	98%	98%
PCB	0.005	8.1	99	98	98	98	98	98	98
	0.05	8.1	99	98	98	98	98	98	98
	0.5	8.1	95 やや崩壊	全例崩壊	/	/	/	/	/
AS	0.05	8.1	99	98	98	98	98	98	98
	0.5	8.1	99	96	94	94	94	94 やや変形	永久胞
	5.0	8.1	90	0	0	0	85%*	85%*	全例崩壊

2) 細胞分割期

表3の様に稀釈海水 0.005 0.05 ppmにおいては、2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実期及びブルテウス期、の各期共に対照海水と同様の成績を示した。写真11に示す様に0.5 ppm海水においては、2細胞期においてすでに全例崩壊した。

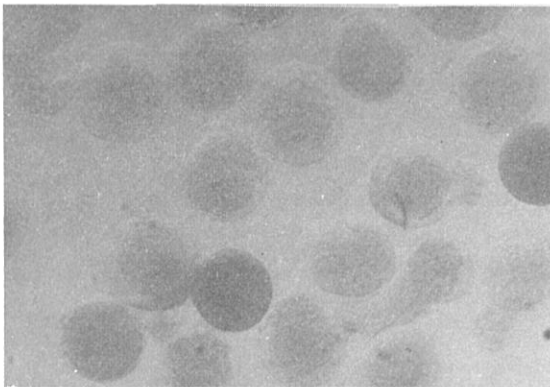


写真11 PCB 0.5 ppm 2細胞期崩壊

6 砒素

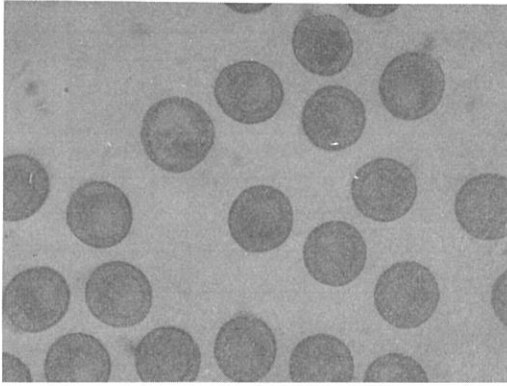
1) 受精膜形成

表3及び表6、表7に示す様に0.01 0.05 0.075

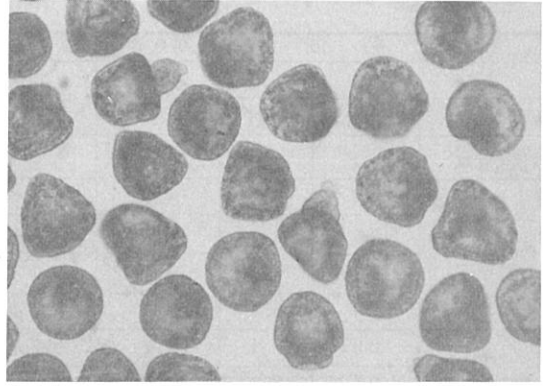
0.1 0.25 0.5 0.75 ppm稀釈海水においては対照海水の形成率と同様の成績を得た。5.0 ppm稀釈海水においては、90%と形成率にやや遅れを生じた。

2) 細胞分割期

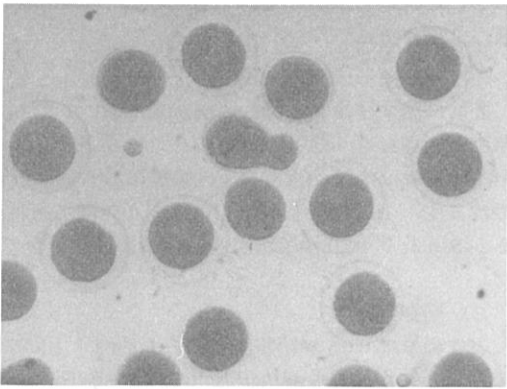
表3及び表6、表7の様に5.0 ppm稀釈海水を除く、各稀釈海水共に2細胞期、4細胞期、8細胞期、桑実期の各期は対照海水と同様の成績を示した。0.25 0.5 0.75 ppm 稀釈海水において写真12、13の様に囊胚期およびブルテウス期において変形を生じ、円形細胞及び永久胚が多数出現した。5.0 ppm稀釈海水では、写真14の様に、2細胞期、4細胞期及び8細胞期において、分割が完全に遅れ、写真15の様に桑実期及び囊胚期では85%となったが大部分が異常分割卵で、写真16の様に対照海水のブルテウス期には全例崩壊をきたした。



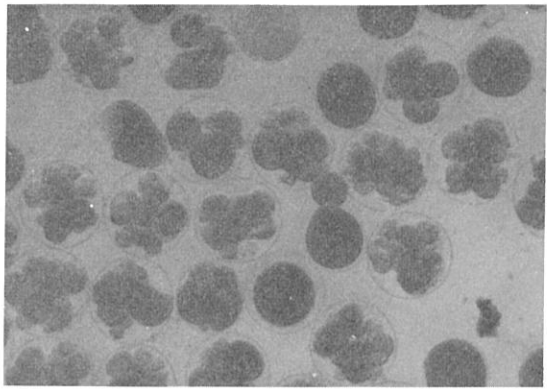
写 12 AS 0.75 ppm 囊胚期



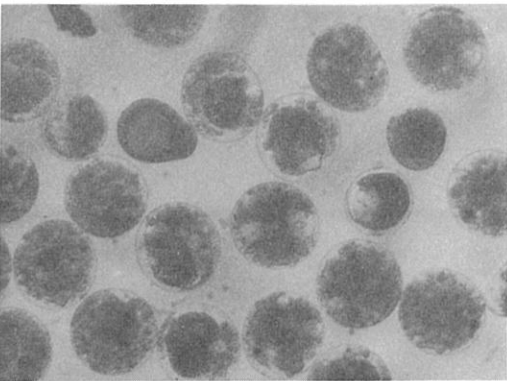
写 13 AS 0.75 ppm ブルテウス期変形



写 14 AS 5.0 ppm 8分割期 分割の遅れ



写 15. AS 5.0 ppm 囊胚期 異常分割卵



写 16. AS 5.0 ppm ブルテウス期 崩壊

## 7 6価クロム

### 1) 受精膜形成

表 4 に示す様に 0.05 0.5 5.0 10.0 ppm 稀釈海水の受精膜形成率は対照海水とまったく同様の成績を得た。

### 2) 細胞分割期

表 4 の様に 0.05 0.5 5.0 10.0 ppm 稀釈海水の 2 細胞, 4 細胞, 8 細胞及び桑実期の分割は対照海水と同様の成績を示したが, 囊胚期の 5.0 10.0 ppm 稀釈海水では円形細胞が出現し, 写真 17 の様にブルテウス期においては全例永久胞胚になった。

表4 6価クロム・3価クロム

温度 15℃  
湿度 54%

経過時間			0.03	2.15	3.10	4.20	5.30	25.00	52.00
試料			受精膜形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	囊胚期	ブルテウス期
品名	濃度ppm	PH							
対照海水		8.1	99%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
Cr(VI)	0.05	8.1	99	97	97	97	97	97	97
	0.5	8.1	99	97	97	97	97	97	97
	5.0	8.1	99	97	97	97	97	97円形	永久胞
	10.0	8.1	99	97	97	97	97	97円形	永久胞
Cr(III)	0.05	8.1	99	97	97	97	97	97	97
	0.5	8.1	98	92	92	92	95	95円形	永久胞
	5.0	8.1	5	0	0	0	0	0	0
	10.0	8.1	3	0	0	0	0	0	0

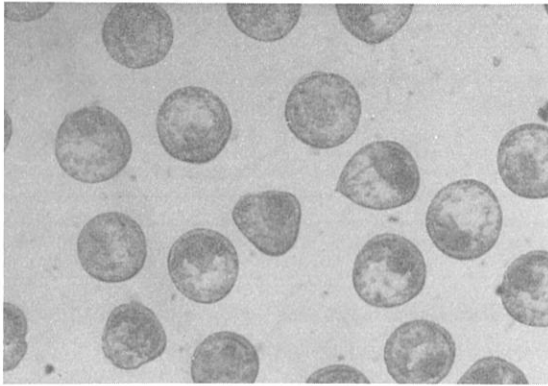
8 3価クロム

1) 受精膜形成

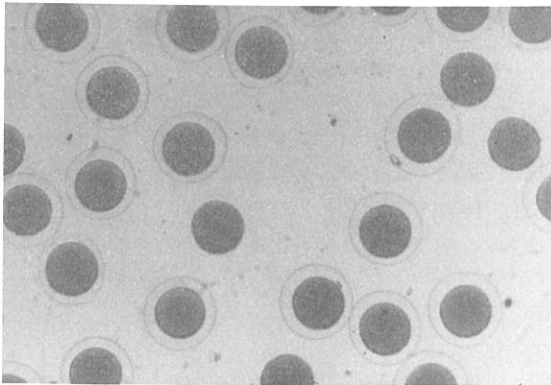
表4に示す様に0.05ppm稀釈海水においてのみ対照海水と同様な99%という成績を示したが、0.5ppm稀釈海水では98%、写真18,19の様に5.0ppm稀釈海水では5%、10.0ppm稀釈海水では3%が分割に遅れを生じ、5.0及び10.0ppm稀釈海水は受精膜形成不全であった。

2) 細胞分割期

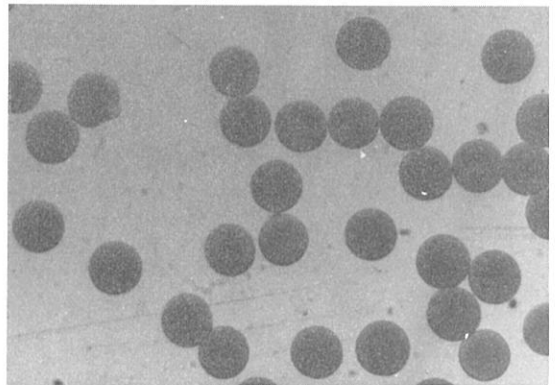
表4の様に0.05ppm稀釈海水のみ対照海水と同様な成績を示したが、0.5ppm稀釈海水では2細胞期、4細胞期、8細胞期及び桑実期において分割にやや遅れを生じ、写真20の様に囊胚期には円形細胞が出現し、対照海水のブルテウス期においては、単細胞より分割はなく、不受精のまま終わった。(写真21)



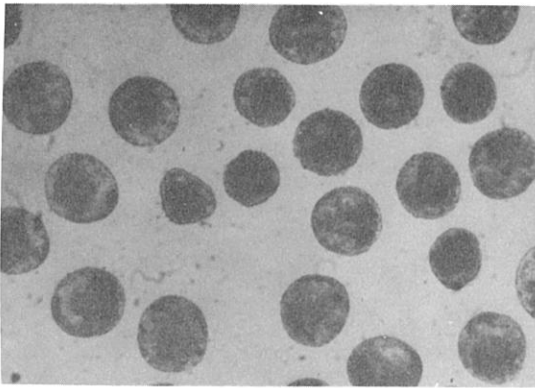
写17. Cr(VI) 5.0 ppm ブルテウス期 永久胞胚



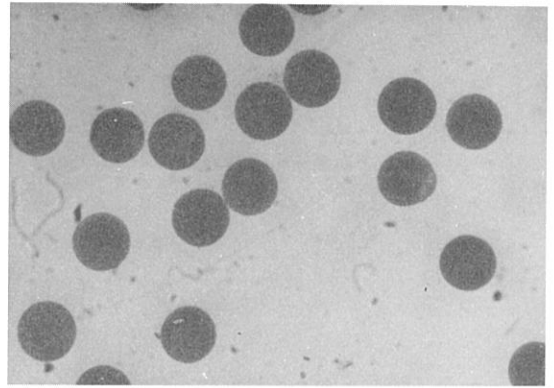
写18. Cr(III) 0.05 ppm 受精膜形成



写19. Cr(III) 5.0 ppm 受精膜形成期 形成不全



写 20. Cr (Ⅲ) 0.5 ppm 囊胚期 円形細胞



写 21. Cr (Ⅲ) 10.0 ppm 52時間後不受精

## 9 有機燐

### 1) 受精膜形成

表 5 に示す様に 0.001 0.01 ppm 稀釈海水においては対照海水と同様の成績を得た。0.1 ppm 稀釈海水は 99% という対照海水と同様の受精膜形成率であるが、写真 22 の様に外胚腸形成が多数認められた。

### 2) 細胞分割期

表 5 の様に 0.001 0.01 ppm 稀釈海水においては対

照海水とまったく同様の成績を得た、しかし 0.1 ppm 稀釈海水においては 2 細胞期、4 細胞期の各期には 20% の分割とかなり遅れ、写真 23 に示す様に外胚腸形成も多数認められ、写真 24 の様に 8 細胞期及び桑実期、囊胚期の各期は 15% 分割とますます遅れを生じ、外胚腸形成も多数出現し、対照海水のブルテウス期には全例崩壊をきたした。

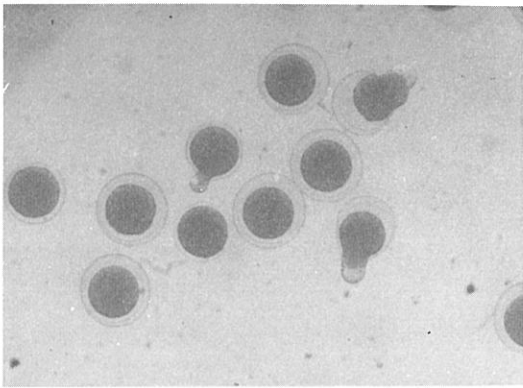
表 5 有機燐

温度 15℃ 湿度 70%

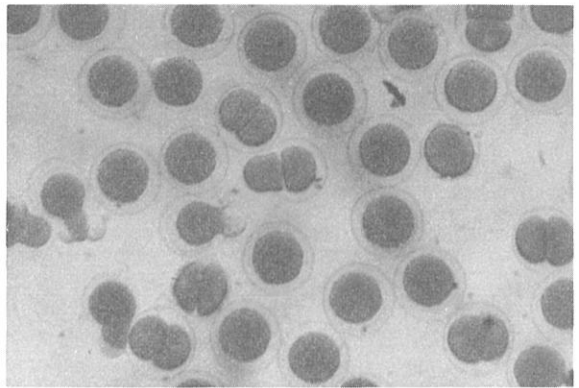
経過時間			0.03	2.15	3.10	4.20	5.30	25.00	67.00
試料			受精膜形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	囊胚期	ブルテウス期
品名	濃度 ppm	PH							
対照海水		8.1	99%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
有機燐 (ダイアジノン)	0.001	8.1	99	97	97	97	97	97	97
	0.01	8.1	99	97	97	97	97	97	97
	0.1	8.1	99※	20※	20※	15※	15※	15※	崩壊

※ 外胚腸多数

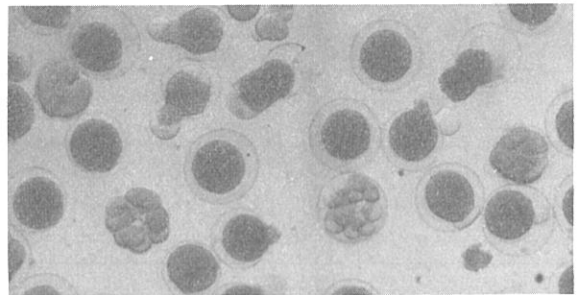




写 22. 有機燐, 0.1 ppm受精膜形成, 外胚腸形成



写 23. 有機燐, 0.1 ppm 2分割期, 分割の遅れ  
外胚腸形成



写 24. 有機燐, 0.1 ppm桑実期, 分割の遅れ  
外胚腸形成

表 6 鉛・砒素

温度 20℃ 湿度 50%

経過時間			0.03	1.40	2.50	3.37	5.52	21.00	49.00
試料			受精膜 形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	嚢胚期	ブルテ ウス期
品名	濃度ppm	PH							
対照海水		8.1	98%	96%	96%	93%	93%	93%	93%
Pb	0.005	8.1	98	96	96	93	93	93	93
Pb	0.01	8.1	98	96	96	93	93	93	93
Pb	0.05	8.1	98	96	96	93	93	93 やや円形	93 遅 (やや円)
Pb	0.1	8.1	98	96	96	93	93	93円形	永久胞
As	0.01	8.1	98	96	96	93	93	93	93
As	0.05	8.1	98	96	96	93	93	93	93
As	0.1	8.1	98	96	96	93	93	93	93
As	0.5	8.1	98	96	96	93	93	93円形	永久胞

表7 鉛・砒素

温度 20℃ 湿度 42%

経過時間			0.03	1.40	2.30	3.10	5.40	19.30	43.50
試料			受精膜形成	2細胞	4細胞	8細胞	桑実期	囊胚期	ブルテウス期
品名	濃度ppm	PH							
対照海水		8.1	98	93	93	93	90	90	90
Pb	0.025	8.1	98	93	93	93	90	90	90
Pb	0.05	8.1	98	93	93	93	90	90やや円形	90やや円形
Pb	0.075	8.1	98	93	93	93	90	90	90
Pb	0.1	8.1	98	93	93	93	90	90	15(遅)円形・永久胞混在
Pb	0.125	8.1	98	93	93	93	90	90	7(遅)円形・変形・永久胞(膨満)
AS	0.075	8.1	98	93	93	93	90	90	90
AS	0.1	8.1	98	93	93	93	90	90	90
AS	0.25	8.1	98	93	93	93	90	90やや円形	15(遅)円形・変形・永久胞
AS	0.5	8.1	98	93	93	93	90	90	7(遅)円形・変形・永久胞(細長)
AS	0.75	8.1	98	93	93	93	90	90円形	永久胞

## V 考 察

## 1 受精膜形成

9種の重金属の受精膜形成は表1～表7に示す様に、3価クロムの5.0 10.0ppm海水において受精膜形成を認めることは出来なかった。しかしその他の重金属においては、重金属濃度海水に、やや影響の出たものがあるが、その大部分が対照海水の成績に近く70～99%の受精膜形成を示した。

ウニ卵の受精膜形成は重金属の高濃度海水においても、ある程度の形成は出来るものと考えられる。

## 2 細胞分割期

表1～表7に示す様に各種重金属稀釈海水ではカドミウム1.0ppm以上、シアン1.0ppm以上、鉛0.05ppm以上、水銀0.05ppm以上、PCB0.5ppm以上、砒素0.25ppm以上、6価クロム5.0ppm以上、3価クロム0.5ppm以上、有機燐0.1ppm以上に細胞分割異常が認められ、円形細胞、永久胞胚、崩壊等が出現した。この様に受精膜形成で正常形成を行ったウニ卵でも細胞分割に異常分割が出て来る重金属含有海水が多く認められた。

この様に高濃度重金属稀釈海水においては、受精膜形成が正常を示しても、細胞分割において異常を示して来るので、基準以上の重金属高濃度稀釈海水では、

その他の海洋生物にも非常に影響があると思われる。

上記濃度以下の重金属稀釈海水においては対照海水と同様の成績を得たので、この稀釈濃度を基として、安全基準値を作ることが出来た。

## VI 総 括

バフンウニの卵発生に影響を与えない、重金属含有海水の安全濃度は大久保等<sup>4)</sup>の報告がある。著者等は人の健康保護に関する環境基準値を基にして、各種稀釈濃度を設定して次の様な安全濃度を得た、表8に示す様に、カドミウム0.1ppm、シアン0.1ppm、鉛0.025ppm、水銀0.0005ppm、PCB0.05ppm、砒素0.1ppm、6価クロム0.5ppm、3価クロム0.05ppm、有機燐0.01ppm、という稀釈濃度であり、人の健康保護に関する環境基準値と近似した成績を得た。

このバフンウニ卵使用の有害海水の検定は生物試験としては短期間で成績を得ることが出来、しかも判定が容易で個人差が少い、又この測定法の鋭敏度はかなり高く、急性毒性物質の生物試験法として、今後極めて有利な方法と思われる。

表 8. 各種重金属のバフンウニの卵発生に対する影響濃度

	バフンウニ(10~20℃)		人の健康保護に関する環境基準値
	影響あり	影響なし	
塩化カドミウム CdCl <sub>2</sub> (Cd ppm)	1.0	0.1	0.01
シアニ化カリウム KCN (CN ppm)	1.0	0.1	検出されないこと
硝酸鉛 Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Pb ppm)	0.05	0.025	0.1
昇 汞 HgCl <sub>2</sub> (Hg ppm)	0.005	0.0005	0.0005
P C B PCB-KC600 ( ppm)	0.5	0.05	検出されないこと
亜砒酸ソーダ NaAsO <sub>2</sub> (As ppm)	0.25	0.1	0.05
重クロム酸加里 K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (Cr(VI) ppm)	5.0	0.5	0.05
塩化第2クロム CrCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Cr(III) ppm)	0.5	0.05	
有機燐 ダイアジノン ( ppm)	0.1	0.01	検出されないこと

## VII 結 論

## 文 献

1. 重金属類のウニ卵発育の安全濃度は次の通りである。

- |          |        |     |
|----------|--------|-----|
| 1) カドミウム | 0.1    | ppm |
| 2) シア ン  | 0.1    | ppm |
| 3) 鉛     | 0.025  | ppm |
| 4) 水 銀   | 0.0005 | ppm |
| 5) P C B | 0.05   | ppm |
| 6) 砒 素   | 0.1    | ppm |
| 7) 6価クロム | 0.5    | ppm |
| 8) 3価クロム | 0.05   | ppm |
| 9) 有機燐   | 0.01   | ppm |

2. 各種重金属のウニ卵発育の安全濃度は人の健康保護に関する環境基準値とほぼ近似している。

3. ウニ卵使用の有害海水の検定は生物試験法として適している。

謝辞；本実験の薬品調製に御援助戴いた、県公害研究センター、天津技師、並びに、実験用ウニの飼育に御援助戴いた県水産試験場、大林主任研究員に心から謝意を表します。

本論文の要旨は昭和53年第23回四国公衆衛生学会で発表した。

1) 小林直正；ウニ受精による海水汚濁の判定，海洋科学，Vol 2. 649~655 1970

2) 沢田允明・大津晴男；ウニ卵を指標とする海水汚染の研究，瀬戸内海の汚染と指標，生物の動態に関するシンポジウム，7~17 1974

3) 岡崎秀信・香西 行・別所元茂；流出油漂着海岸海水および界面活性剤のウニ発生におよぼす影響について，四国公衆衛生学会雑誌 Vol 21, No 1, 134~142 1976

4) 大久保勝夫・大久保章子；ウニ類および斧足類の卵発生期を利用する生物試験法について，東海区水産試験所研究報告，第32刷，131~140 1957

5) 日本海難防止協会；ウニ類およびケガキによる毒性試験法の考察，環境保全研究成果集，70~79 1973

6) 相山正雄；受精より発生へ，河出書房，東京1949

7) 香西 行・岡崎秀信・別所元茂；流出油漂着海岸海水のウニ発生におよぼす影響について，香川県衛生研究所報，第5号，46~48 1976