

1-23 水環境中の化学物質が及ぼす生態影響に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 15 年度～平 17 年度

担当チーム：水質チーム

研究担当者：鈴木穰，宮島潔

【要旨】

本研究は、環境中に存在する化学物質が水生生態系に及ぼす影響について、バイオアッセイ手法を用いて評価するための試験系の検討を目的とした。対象とする生物としては、メダカ、ミジンコ、緑藻類を扱うこととし、それぞれ河川水等の環境水に適した試験手法を選択して適用した。

メダカについては、現地で河川水を直接汲み上げて試験水槽に供給し、水質変化を踏まえて連続して曝露することで、卵から稚魚、また成魚に対する毒性を把握する試験手法について検討を行い、実際の河川において曝露試験を実施した。

ミジンコについては、サンプリングの頻度が不定期で、試水量も少ない環境水に対応して、毒性試験を実施する前の事前準備に掛かる負担の小さい試験手法について検討を行い、実際の環境水中で存在の確認された化学物質（医薬品）について、標準物質を用いた試験を実施した。

緑藻類については、試水量が少なく、一度に多数の試料を処理する必要のある環境水に対応できる小容量での試験方法について検討を行い、実際の河川水及び医薬品についての試験を実施した。また、併せて実際の河川水については、含まれる物質の分画及び濃縮手法についても試験を行い、毒性発現状態について検討を行った。

これらの研究により、以下のような成果が得られた。①魚類に対する環境水に含まれる化学物質の毒性作用について、試水を連続的に通水して曝露する手法を取り入れることで、水質変動のある河川水等の環境水についても、現地で試験することが可能となった。②甲殻類や藻類への毒性について、サンプリングの頻度や採取量に制限のある環境水に対応した試験手法を取り入れることで、少量の試料水で迅速に試験が可能となった。③水環境中に存在する個別の化学物質についての毒性試験を行い、藻類生長阻害の試験結果からは抗生物質 2 種についてリスク評価を行うことができた。④固相抽出手法の導入によって、多様な物質を含む環境水の成分を分画、濃縮することができ、原水のままで検出できなかった毒性を検出できるようになった。

キーワード：水環境，化学物質，生態影響，バイオアッセイ，医薬品

1. はじめに

近年、産業活動の拡大発展に伴い、様々な化学物質が広範囲に使用されており、排水や河川水中にも多種多様な化学物質が存在することが明らかになっている。下水処理水からも環境ホルモン様物質等に代表される多種にわたる化学物質の存在が報告されており^{1, 2)}、それらの生物への影響が懸念される。このことから、水環境中に放出された化学物質が、水域に生息する生物にどのような影響を与えるかを明らかにすることは重要である。

化学物質による生態系への影響を探る学問分野としては、生態毒性学 (Ecotoxicology) がある。これは、生態学 (Ecology) と毒性学 (Toxicology) を組

み合わせた造語であり、一般的には、「生態系における毒性のある物質の運命と生態系への影響に関する研究」と定義されている³⁾。欧米では、生態毒性関連の研究は盛んに行われており、研究者の数も多く層も厚い。我が国において、生態毒性の研究者は少数ではあるが、農村地帯の河川水、下水、廃棄物浸出水等に関していくつかの報告がなされている^{4, 5)}。畠山らは、つくば市とその周辺を流れる農村地帯の河川水について、水生生物への影響を調べている^{4, 5)}。採取した河川水について、藻類および甲殻類の試験を実施した結果、試験水中の *Selenastrum capricornutum* の増殖阻害は 5 月初旬から始まり、5 月中旬にはほぼ完全に増殖が阻害されたこと、阻害

の原因は除草剤の影響であったことを報告している。また、その河川水をヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) に曝露した結果、ヌカエビの死亡率は、5月中旬から6月上旬にかけて高く、この原因はこの時期に散布された殺菌剤、殺虫剤の影響であることを報告している。また、松原らは、マイクロトックス、藻類、カエル胚を用いて、下水および環境水について毒性試験を実施している⁷⁾。その結果、マイクロトックス、藻類、カエル胚試験とも、流入下水からは毒性を検出しているが、その毒性は、下水の生物処理後には検出されなくなったことを報告している。一方、下水処理において、生物処理後の塩素添加量が多い処理場については、マイクロトックスおよび藻類による試験で毒性が上昇する場合があることを報告している。

一方、近年において河川水や下水道等の水環境中における、PPCP (Pharmaceuticals and Personal Care Products) の存在に国内外で関心が集まりつつあり、河川表流水や下水処理水中から抗生物質等の医薬品が実際に検出される報告がなされてきている。医薬品等の物質は、その本来の目的において生体作用を持つため、環境中に存在するこれらの物質が水域の生態系にも何らかの影響を及ぼすことが懸念される。しかし、化審法による生態影響試験を課せられている化学物質と異なり、医薬品はそのような評価対象とはなっていないため、これらの物質の持つ生態影響に関するデータは未だ十分とはいえない状況にある。

そこで、本研究においては環境中に存在する化学物質が水生生態系に及ぼす影響について、バイオアッセイ手法を用いて評価するための試験系の検討を目的とした。

2. 研究方法

2.1. バイオアッセイに適用する生物種

この研究におけるバイオアッセイに適用する生物は、以下のものを用いることとした。

(1) 魚類

魚類は、水圏生態系の食物連鎖網の中で上位に位置し、最も重要な生物群の一つである。また、魚類は神経系、内分泌系、代謝系など、人間を含めた哺乳類とも比較的共通する特性を有しており、人間への影響を推測する上でも重要な情報源となり得る可能性がある。

そこで、魚類の中でも、急性毒性試験対象生物と

して試験方法の標準化が進んでいるため後に他の類似情報との比較ができること、また魚体も小さく飼育が比較的容易である「メダカ(*Oryzias latipes*)」を対象生物種として選定した。

(2) 甲殻類

水圏生態系における甲殻類としては、エビやカニ、カイアシ類やミジンコなど様々な種が存在する。このうち「ミジンコ」は特に生態学的にも特徴的な生物である。湖等の水界において、ミジンコは一次生産者である植物プランクトンを食べ、自らはより高次の魚などに補食される。このことから、植物によって作られた有機物を高次の生物に受け渡すため、食物連鎖における重要な部分を担っている。

また、メダカと同様に毒性試験対象生物として試験方法の標準化も進んでいる。

そこで、広く試験生物として利用されている「オオミジンコ(*Daphnia magna*)」を対象生物種として選定することとした。

(3) 藻類

藻類は水圏生態系における主な一次生産者である。そのため、多くの水生動物の餌となり、水中における食物連鎖の起点となる重要な生物群である。

また、上記二種と同様に、毒性試験対象生物として試験方法の標準化も進んでいる。

そこで、広く試験生物として利用されている「緑藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata* [旧学名：*Selenastrum capricornutum*])」を対象生物種として選定することとした。

2.2. バイオアッセイ手法

2.2.1. 魚類

メダカを用いたバイオアッセイ手法としては、OECD やアメリカ EPA、JIS¹⁰⁾などにより、急性毒性試験や延長毒性試験などいくつかの試験方法が提示されている。

しかし、環境水を対象として扱う場合には、水塊の同一性や試験室に搬送するまでのタイムラグによる水質変化等の変動要因をできるだけ小さくする必要がある。

そこで、本研究においては継続的かつ連続して曝露が行えるよう、実河川から河川水を試験水槽に引き込んで曝露させる装置を適用することとした。

(1) 稚魚期に対する毒性

河川水中に含まれる化学物質は多種多様であり、それらが生物に与える影響も、短期的な影響から長

期的な影響まで様々である。そこで、多くの有害物質の作用に対してより感受性が高く、また生態系のシステムの中での生物の生活サイクルの中において重要な時期である、卵から成魚に至るまでの発育段階を対象とすることとした。

ここでは、メダカの受精卵を水槽に入れ、試水となる河川水中で発生・孵化させることで、環境水に曝露された状況下での魚類に対する影響を、死亡率をエンドポイントとして評価する手法で行った。

水質に起因する魚類への影響を検出するためには、影響要因である水質を除いて、水温、流量、エサなどのその他の試験条件を一定に保つ曝露試験装置が必要である。さらに、用いる試験水は新鮮であることが望ましい。そこで、河川での曝露試験は、国土交通省が河川水質をモニタリングしている水質自動監視所において流水式メダカ曝露試験を実施することとした。

水質自動監視所では、河川から水をポンプアップして、一時間ごとに水温、pH、溶存酸素、電気伝導度、濁度等を自動測定している。この測定にあたって河川水は30分間大量にポンプアップされ、ヘッドタンクに貯水されて砂利やゴミが除去されるとともに、測定に必要な水量が安定して供給される仕組みとなっている。このとき、余剰水はヘッドタンクの上部から直接排水される仕組みとなっている。そこで、この余剰水をメダカ曝露試験に適用することとした。

魚類試験装置への導水は、監視所のヘッドタンクにフロートセンサーを取り付け、水がタンクに流入してくると魚類試験装置へ吸引する自吸式ポンプが作動する仕組みとした。この仕組みによって、監視所ヘッドタンクが空の時間帯には自吸式ポンプは停止している。自吸式ポンプで導水した河川水は、曝露試験装置の最上部に設けたステンレス製第1槽に送られる。

魚類試験装置の第1槽は、貯水およびゴミや砂泥の除去を目的とするとともに、第2槽へ滴下させるキャピラリーの内径を調整することによって、システム全体の単位時間当たりの流量を制御することとした。流量等のメダカ曝露試験条件の一覧を表1に示す。

ステンレス製第2槽は水温調節機に接続しており、曝露試験水が両者を循環して水温が一定に保たれる仕組みとした。続いて、水温調節された試験水はサイフォンによってガラス製の曝露水槽へと滴下させ

た。なお、第1槽および第2槽の余剰水、および曝露水槽の排水は、排水管にまとめて排出することとした。

水温および流量はそれぞれ26℃および30L/hourとした。日長周期に相当する照明の点灯時間はプログラムタイマーで16時間明-8時間暗に調節した。孵化後のエサは自動給餌器を用いて1日に4回、市販の粉末餌を給餌した。

表1 メダカ現地曝露試験条件

項目	条件
試験魚	ヒメダカ <i>Oryzias latipes</i>
試験水	間欠流水式
流量	0.5 L/min (30 L/h)
試験温度	水温 26℃
日長条件	16時間一明, 8時間一暗
餌	粉末餌、一日あたり3回の給餌

(2) 成魚期に対する毒性

河川に流入した化学物質等による水質変化をメダカへの影響から判定する方法について検討を行った。

既存の化学分析によるモニタリングでは、多様な化学物質の全てを把握することは困難である。そこで、魚類への影響を監視して包括的に水質汚染の検出を行うことで、化学物質等の種類によって検出手法を換える必要がなく幅広く利用(多種に対応可能)できることが期待できる。

また、人間と比較して脆弱なメダカを監視して化学物質等(毒物)の影響を検出するため水質汚染を早期発見し人的事故の再発防止や処置が可能となることも期待できる。また急性毒性により短時間に検出するため、水質事故の発生を早期に警告する事が可能となることも期待できる。

ここでは、水質の異常によって引き起こされる特異な魚の行動をカメラで画像処理により位置データ及び活動(速度)データとして取込み、蓄積された正常時の行動データと比較することで水質異常を検知する手法を対象とした。

魚の行動をカメラで撮影し、その行動パターンの変化を解析することで毒性物質の流入を検知しようとするシステムは、これまでもいくつかのものが提示されている。しかし、その多くは魚体の動きを二次元で捉えるもので、詳細な行動の変化を捉えるには不十分な部分もある。そこで、魚体の動きを疑似三次元として捉えて解析する技術を持つ株式会社正興電機及び九州大学と共同研究を行った。

正興電機の開発したシステムは一匹のメダカの動きの変化を二台の CCD カメラで把握し、化学物質等(毒物)に暴露されたメダカの行動(X・Y・Z位置情報/サンプリング時間毎)情報より行動量(速度)や狂奔行動(回数・頻度)により通常では起こりえない現象を抽出しデータ化することにより化学物質等のメダカへの影響を検出するものである。

ただし、この場合魚の個体差や行動の単一性により、低濃度曝露等による弱い反応等については検出できない場合もある。

そこで、複数の個体を同時に解析するシステムに発展させることで、情報解析から群行動の乱れ等によって毒性物質の混入を検出できるかを検討した。

2.2.2. 甲殻類

ミジンコ(写真1)を用いたバイオアッセイ手法としては、OECDやJIS¹¹⁾によって標準化された手法があり、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」による届出における生態影響試験法としても規定されている。

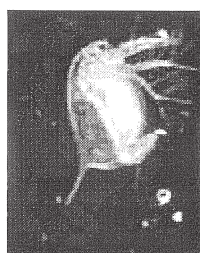


写真1 ミジンコ

試験の内容は、遊泳阻害を視点とする急性毒性物質、繁殖阻害を視点とする慢性毒性試験など、様々なものがあるが、いずれも供試生物を試験前から飼育・順化し、齢数を揃える等の準備が必要となる。この事前準備には飼育装置や飼育水の交換作業、発生子個体の隔離等に多大な費用と労力が掛かり、限られた施設と人員によって安定した試験を行うことは困難である。

そこで、事前の大掛かりな準備を必要としない手法として、ミジンコを用いた毒性試験のキットを用いることとした。このキットはベルギーのMicroBioTests社から供給されている、急性毒性試験システム(DAPHTOXKIT F MAGNATM)である。

試験は冷蔵状態で保存したキット付属のミジンコの卵(耐久卵)を試験開始直前に孵化させ、孵った個体を試験に供する。

ミジンコは、試験対象物質の濃度を段階的に変化させた試水中で24及び48時間曝露した後に、水中で泳いで動き回ることができるかどうかによって、遊泳阻害を判定し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。

2.2.3. 藻類

藻類を用いたバイオアッセイについても OECD や

EPA によって標準化された手法があり、「化審法」における生態影響試験法としても規定されている。

これらの試験法はいずれもフラスコを用いた培養方法を採用しているが、フラスコを用いると1検体あたりの培養容量が大きくなるため、結果の誤差を小さくすることができる利点がある反面、大量の試料が必要となるうえ、培養装置の容量面からの制限があることから、一度に処理できる試料数に限界が生じる。

そこで、本研究では Blaise らの方法^{12,13)}を参考にして、96孔のマイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験(写真2)を適用することとした。

試験における培養温度は24°C、照度4000Lux、120rpmの振とう条件で培養を行い、培養期間中マイクロプレートリーダー(Wallac社製、ARVO SX-1420:写真3)を用いて藻類増殖量の変化をモニタリングし、吸光度から細胞数を換算する方法で、96時間曝露した後に藻類の増殖量から生長阻害率を計算し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。また、一部の物質については最小影響濃度(LOEC)と無影響濃度(NOEC)についても計算を行った。

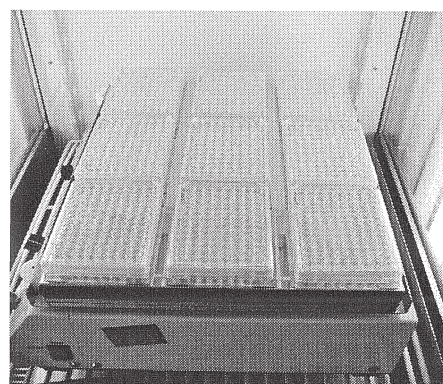


写真2 マイクロプレートによる培養

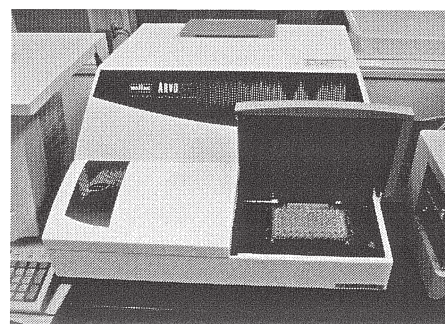


写真3 マイクロプレートリーダー

2.3. 対象とする試水及び物質

対象とする試験水(試験物質)は、下記の通りと

した。

2.3.1. 魚類

実河川における現場設置を前提としている装置であることから、利根川水系中川の八条橋（図 1）にある国土交通省の水質自動監視所に環境水による毒性作用を調べるための装置を設置した。



図 1 中川八条橋近辺図

ここで、2005年4月27日から6月8日までの期間において、中川からの河川水をポンプで試験装置へ供給し、曝露試験に供した。

また、同形式の曝露装置を、多摩川の拝島橋水質監視所に設置した。ここは、下水処理水等の大規模

な排水が流入していない地点であり、清浄な水質における影響を把握するためのコントロール地点として設定した。

2.3.2. 甲殻類

甲殻類の試験における対象物質は、近年、河川水や下水道等の水環境中における PPCP (Pharmaceuticals and Personal Care Products) の存在として国内外で関心が集まりつつある医薬品とした。医薬品は河川表流水や下水処理水中から抗生物質等の医薬品が実際に検出される報告がなされてきている。これらの物質は、その本来の目的において生体作用を持つため、環境中に存在するこれらの物質が水域の生態系にも何らかの影響を及ぼすことが懸念される。しかし、化審法による生態影響試験を義務づけられている化学物質と異なり、医薬品はそのような評価対象とはなっていないため、これらの物質の持つ生態影響に関するデータは未だ十分とはいえない状況にある。

そこで、試験に用いる医薬品は、下水処理水等の環境中で検出された物を中心に選定し、表 2 に示す 9 物質とした。これらの医薬品の環境水中の存在量

表 2 対象医薬品の化学構造

医薬品名	構造	医薬品名	構造
Aspirin		Levofloxacin (LVFX)	
Fenoprofen		Clarithromycin (CAM)	
Thymol			
Triclosan		Azythromysin (AZM)	
Diethyltoluamide			
Crotamiton			

の例として、下水処理水中に確認された濃度を表 3 に示した。

物質ごとに存在濃度に幅があるが、いずれも ng/L のレベルであった。

なお、これらの物質の構造については、表 2 に示す通りである。

また、曝露濃度については、次節の表 4 に示す。

表 3 対象医薬品と検出濃度例

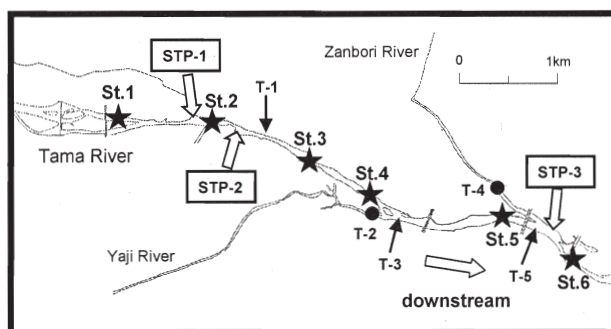
医薬品名	用途	下水処理水中濃度例 (ng/L)	参考文献
アスピリン	解熱鎮痛剤	194~290	14)
フェブプロフェン	解熱鎮痛剤	1.5~7.7	14)
チモール	殺菌剤	0.3~2.4	14)
トリクロサン	殺菌剤	63~301	14),15)
ジエチルトルアミド	昆虫忌避薬	52~935	14),15)
クロタミトン	鎮痒剤	502~1569	14),15)
レボフロキサシン	抗生物質	189~400	16)
クラリスロマイシン	抗生物質	266~444	16)
アジスロマイシン	抗生物質	88~219	16)

2.3.3. 藻類

(1) 河川水

a) 多摩川における調査

多摩川におけるサンプリングは 2003 年 2 月に実施した。調査地点を図 2 に示す。サンプリングでは、多摩川河川水、多摩川へ流入する下水処理水および支川の水についてサンプル採取を行った。採取したサンプルは、直ちに実験室に持ち帰り、ガラスファイバーフィルター (GF/B, Whatman) およびメンブレンフィルター (孔径 0.2 μ m, Advantec) によりろ過を行った後、試験に供するまでの間-30 $^{\circ}$ Cにて凍結保存を行った。試験は、凍結保存しているサンプルを融解した後、希釈系列を作成して行った。



St.1-St.6: Sampling stations in the Tama River
STP-1, STP-2, STP-3: Sewage treatment plant effluents
T1-T5: Tributaries flowing into the Tama River

図 2 多摩川調査地点

b) 中川における調査

中川における調査は、倉田橋 (17.7kp) 及び庄内橋

(23.0kp) の 2 地点で行った。試験サンプルは平成 16 年 4 月~6 月の期間に採取し、試験室に持ち帰ったのち試験に供した。

試水の前処理については、多摩川の場合と同様に行った。

c) 固相抽出カートリッジを用いた試料の分画濃縮

多摩川河川水および下水処理水の数サンプルについては、固相抽出カートリッジにより濃縮を行った。固相抽出カートリッジとしては、GL-Pak PLS-2 (GL-Sciences, 以下 PLS-2 と表記) を用いた。PLS-2 をメタノールおよび精製水各 10mL によりコンディショニングを行った後、サンプルのろ液 500mL を固相に通水した。サンプルの通水後、窒素ガスによりパージを行い、メタノール 10mL により、固相に保持された成分について溶出を行った。溶出に用いたメタノールを DMSO (ジメチルスルホキシド) に置換した後、藻類生長阻害試験に供した。

(2) 化学物質

試験対象とする物質はミジニコと同様の医薬品に加えて、水生生物への標準毒性物質として頻繁に用いられ、近年において環境基準にもなった亜鉛を用いた。

亜鉛については、硫酸亜鉛 (ZnSO₄) を亜鉛濃度換算で 3.1~800 μ g/L となるよう藻類培養液で希釈した。

また、医薬品を試験に供する際には、まず DMSO を溶媒として 10,000mg/L の溶液を調製してから、各試験の飼育溶液や培養液に希釈溶解させた。

試験曝露濃度は表 4 のように設定した。なお、前述のミジニコの試験における曝露濃度範囲も併せて示す。

なお、いずれの生物種、試験濃度区においても溶媒の DMSO 濃度が 0.1%(v/v)を超えない範囲で設定を行った。

表 4 試験濃度範囲

医薬品名	藻類生長阻害	ミジニコ遊泳阻害
アスピリン	10~0.0195	10~0.625
フェブプロフェン	10~0.0195	10~0.625
チモール	10~0.0195	10~0.625
トリクロサン	10~0.0195	10~0.0315
ジエチルトルアミド	10~0.0195	10~0.625
クロタミトン	10~0.0195	10~0.625
レボフロキサシン	10~0.0195	10~0.625
クラリスロマイシン	0.1~0.000195	10~0.625
アジスロマイシン	0.625~0.00122	10~0.625

(mg/L)

3. 研究結果

3. 研究結果

3.1. 魚類

(1) 稚魚に対する急性毒性

多摩川の拝島橋に設置した試験系においては、卵からの孵化は80%強の割合で正常に孵化し、その後の試験期間中においてもほとんど死亡する個体はみられなかった。

一方、中川に設置した試験系においては、孵化した個体の多くが、試験期間終了までに死亡したことが確認された。

ここから、正常な河川水としてコントロールとした多摩川上流域の河川水と、流域からの様々な排水が含まれる中川の河川水とを比較すると、稚魚期に対する死亡率に明確な違いが生じ、中川における死亡率が高いことが確認された。

(2) 成魚に対する急性毒性

今回のシステムにおける特徴として、比較対象となる正常時の行動パターン（行動エリア）を定期的に特定し、供試生物の雌雄や種類、個体差に影響されない固有の三次元行動パターンを特定する点にある。このため、10分ごとに20分間分のデータベースを作成、更新し、最新の正常行動エリアを入手するプログラムとなっている。

今回、解析対象とする魚を1匹から6匹に増やすことで、個体別の行動パターンに加えて、生物群としての行動パターンについて解析することを目指した。

しかし、個体数を増やすことで新たに個体識別の手順が必要となり、さらに各個体の行動パターン情報を同時に検知、蓄積、解析する必要があることから、その情報処理量が膨大なものとなった。このため、1個体用に開発されていたプログラムでは対応できず、さらに新たな解析アルゴリズムの開発には膨大な労力と時間、費用が必要なことが判明した。

3.2. 甲殻類

ミジンコに対する医薬品の影響については、ほとんどの物質で急性毒性は確認できなかったが、殺菌剤であるチモールとトリクロサンでのみ急性毒性が確認された。図3に曝露濃度と阻害率の関係を示す。

ここから、チモールについてのEC50値は24時間で5.1(mg/L)、48時間で4.4(mg/L)となり、トリクロサンについてのEC50値は24時間で0.50(mg/L)、48時間で0.42(mg/L)となった。他の生物種と同様にチ

モールと比べてトリクロサンの方が毒性は高くなったが、曝露時間による差はみられなかった。

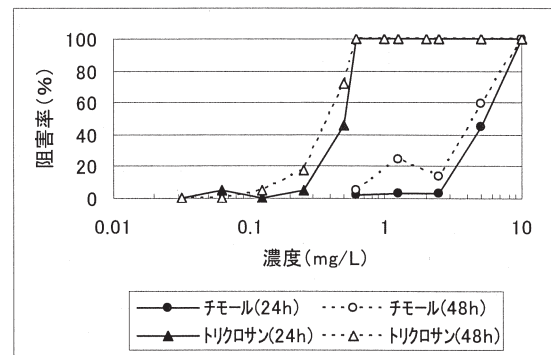


図3 ミジンコに対する医薬品の影響

3.3. 藻類

3.3.1. 河川水

(1) 多摩川河川水

多摩川から採取したサンプルについて、藻類生長阻害試験を実施した。表5に藻類生長阻害試験を行った結果を示す。試験の結果、多摩川河川水および下水処理水について、コントロールと比較と比較した場合に藻類増殖量の低下は見られず、藻類の生長阻害は観察されなかった。

表5 多摩川試料に対する藻類生長阻害

地点名	阻害率 (%)
St. 1	—
St. 2	—
St. 3	—
St. 4	—
St. 5	—
St. 6	—
STP-1	—
STP-2	—
STP-3	—
T-1	19.2
T-2	—
T-3	—
T-4	—
T-5	—

—: 阻害なし

一方、多摩川へ流入する支川に関しては、ほとんどの支川について藻類の生長阻害は観察されなかったが、T-1の排水樋管から採取した水についてのみ、藻類への生長阻害が見られた。その毒性は、コントロールと比較した場合、約20%の阻害率であり、強い毒性は見られなかったが、この結果は何らかの毒性物質が含有されていることを示している。T-1の

排水樋管の水は、多摩川本川に流入しているが、流入後の多摩川河川水については、藻類への生長阻害は観察されなかった。藻類の生長阻害を引き起こした原因物質については、今後検討が必要である。

(2) 中川河川水

倉田橋および庄内橋で採水した試料についての藻類生長阻害試験の結果を図4に示す。倉田橋、庄内橋いずれの地点においても、4月30日から5月14日に採水した試料では40%~80%以上の阻害率が認められた。

5月末以降に採水した試料では、阻害の認められるものは4試料と少なかった。また、その阻害率は5月前半の試料と比べると比較的小さく、同一採水日に両地点で阻害が認められることもなかった。このことは、5月の前半が農繁期にあたることから、除草剤等の散布により藻類に有害な化学物質の河川への流出が継続して起こっていた可能性が考えられた。

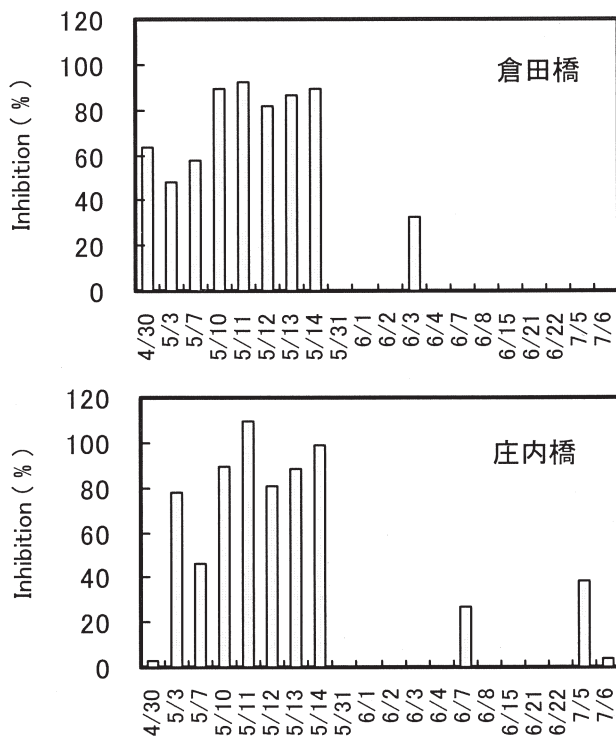


図4 藻類生長阻害試験結果(中川)

(3) 河川水分画濃縮試料

図5に下水処理水のSTP-1サンプルに関する濃縮倍率と阻害率との関係を示す。

濃縮倍率が1.6以下ではほとんど阻害が見られませんが、3.1以上の値になると阻害が観察されはじめ、25以上の濃縮倍率では、ほぼ100%の阻害率であった。この濃縮倍率-阻害率の関係よりEC50を計算す

ると、EC50=6.6となった。

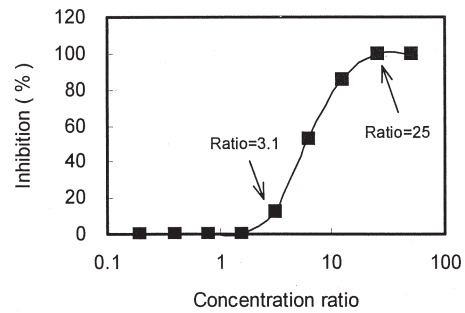


図5 濃縮試料に対する藻類の成長阻害

同様に、他のサンプルについてEC50値を計算した結果を表6に示す。EC50の値は、河川水については14~17、下水処理水については5.4~9.1となり、下水処理水のほうが河川水と比較してEC50の値が低い傾向にあった。

表6 多摩川河川水および下水処理放流水の毒性値

地点名	EC50値	TU
St.3	14.0	0.07
St.4	16.5	0.06
St.5	17.0	0.06
STP-1	6.6	0.15
STP-2	5.4	0.18
STP-3	9.1	0.11

ここで、EC50の値は、数値が小さいほど毒性が強いことを意味する。また環境水では阻害が確認できないことも多いが、その場合EC50は計算不能なため数値化できず、他の毒性値との比較が困難である。そこで、毒性の強弱を直感的に把握しやすくするため、EC50の逆数である毒性単位(TU=100/EC50)の指標を取り入れ、計算した結果も表8に併せて示した。

毒性単位の値は、河川水については0.06~0.07、下水処理水については0.11~0.18となり、下水処理水の方が河川水と比較して高い傾向にあった。毒性単位は、その値が高いほど毒性が強いことから、下水処理水の方が河川水と比較して数倍強い毒性を持つことが示された。

3.3.2. 化学物質

(1) 医薬品

藻類に対する医薬品の影響は、チモール等の殺菌剤に加えて、抗生物質についても生長阻害が確認された。他の医薬品については生長阻害は確認されな

かった。図 6 に生長阻害がみられた医薬品についての曝露濃度と生長阻害率の関係を示す。

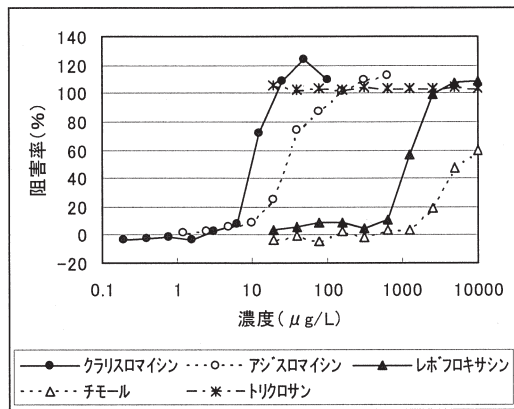


図 6 藻類生長に対する医薬品影響

ここから、各物質について計算された EC50 値は、クラリスロマイシン：0.011(mg/L)、アジスロマイシン：0.034(mg/L)、レボフロキサシン：1.435(mg/L)、チモール：6.56(mg/L)[外挿値]、トリクロサン：0.0195 未満(mg/L)となった。トリクロサンについては、設定した濃度範囲では最低濃度でも阻害率が大きく EC50 値が計算できず、さらに濃度範囲を下げる必要が確認された。

また、抗生物質については同じマクロライド系のクラリスロマイシンとアジスロマイシンが同程度の阻害を示し、キノロン系のレボフロキサシンはマクロライド系と比較して毒性は弱かった。

次に、医薬品が藻類の生長に影響を及ぼす最低濃度(LOEC)および生長阻害がみられなくなる濃度(NOEC)を求める試験を行った。

表 7 LVFX と CAM の藻類生長阻害 (μg/L)

Substance	EC50	LOEC	NOEC
Levofloxacin	1,200	630	310
Clarithromycin	11.0	6.3	3.1

その結果、表 7 に示すように、LVFX の EC50、LOEC および NOEC は、それぞれ 1,200 μg/L、630 μg/L、310 μg/L であった。同様に CAM の EC50、LOEC および NOEC は、それぞれ 11 μg/L、6.3 μg/L、3.1 μg/L であった。

両者の各指標値を比較すると、CAM は LVFX の 1/100 程度の値を示しており、CAM は LVFX に比べて毒性が高いことが示された。

(2) 藻類生長阻害試験に対する亜鉛の影響

図 7 に亜鉛標準液に関する藻類生長阻害試験の結果について示す。

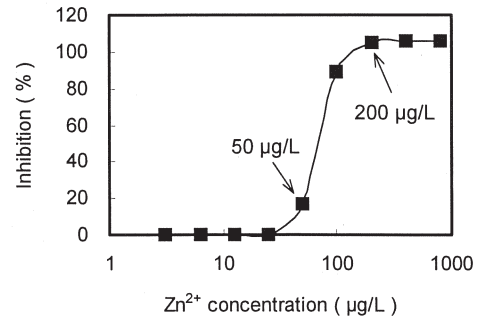


図 7 亜鉛濃度と藻類生長阻害率

亜鉛濃度を 3.1~800 μg/L の間で変化させ、藻類生長阻害試験を行った結果、亜鉛濃度が 50 μg/L 以上になると影響が見られはじめ、200 μg/L 以上の濃度では、阻害率はほぼ 100%となった。また、この結果から亜鉛に関する 50%影響濃度 (EC50) を求めた結果、その値は 67 μg/L となり、他の文献値¹³⁾に近い値となった。このことから、マイクロプレートを用いて少量の試料で実施した試験手法によって、当研究室においても同様の精度で毒性を検出解析することが可能なことが示された。

4. 考察

4.1. 魚類

卵から稚魚に至る発生過程における河川水の影響調査においては、排水の含まれる比率の高い中川における死亡率が、清浄と考えられる多摩川上流部における死亡率と比べて高くなっていた。この要因として、中川における藻類の生長阻害試験の結果において農薬等の流入が示唆される結果が得られたこともあり、このような流域からの農業系排水の影響が考えられるほか、工場や下水処理場などからの排水の影響も想定される。

ただし、今回の試験では 1 つの水槽に多数の個体が同時に飼育されているうえ、遠隔地の現場に設置されているため、生物のメンテナンスの間隔が一週間毎と長くなった。このため、何らかの理由により死亡した個体が水槽中で腐敗等を起こし、河川水に本来含まれる物質とは異なる要因によって他の個体への影響が生じる可能性も無視できないことが判明した。

また、清浄な水としてコントロールに使用した多摩川の調査地点においても、流域からの人為的な汚

濁の影響を完全に排除することもできないため、他のコントロール系列を検討する必要も考えられた。

以上のことから、個体間の影響やコントロールの設定等について再度検討を行うことで、より精度の高い評価手法として確立できる可能性が示された。

一方、成魚を用いた急性毒性を検出するシステムについては、その解析の自動化が想像以上に困難であった。しかし、急性毒性物質の混入を連続的に監視することは、水質事故等による取水停止など、人間の社会生活に直結する点でも重要である。また、連続通水のシステム内に供試生物を留めたまま曝露するためには、藻類やミジンコなどの微小な生物よりも、魚類のようにある程度のサイズを持つものが適しており、このようなシステムの必要性は高いと思われる。そこで、今後は大量のデータを効率よく処理するためのアルゴリズムの開発や、より少ないデータ量で行動の特徴をつかむための観察点の設定などの課題を解決する必要がある。

4.2. 甲殻類

今回用いた、キットによるミジンコの試験手法は、耐久卵を用いる手法であったが、安定してデータを得ることができ、事前の培養に必要となる労力と時間を大幅に節約できた。従って、今回は標準化学物質による試験のみであったが、採水時期が不定期で、再試験が困難な環境水を対象とする試験としても、適した方法と考えられる。

また、藻類生長阻害の結果と比較すると、殺菌剤のチモールはミジンコと藻類で同程度の阻害率を示したが、同じく殺菌剤のトリクロサンはミジンコよりも藻類の方が強い阻害を受け、抗生物質については藻類でのみ阻害がみられた。このように、生物種によって各化学物質に対する感受性が異なることから、多様な化学物質に対応した評価を行うためには、複数の生物種を組み合わせた試験を行うことが必要である。

4.3. 藻類

試験の結果、河川水の分画濃縮を行わない原水においては、多摩川河川水および下水処理水について藻類への毒性は検出されなかった。

しかし、農業系の排水との影響を受けていると考えられる中川においては、調査時期によって生長阻害が確認された。ただし、この調査と同時にを行った中川サンプルに対する農薬分析（21項目：表8）では、いずれも定量下限値未満であり、阻害の要因となる物質は特定できなかった。このことから、生物

影響は化学分析では検出できない低濃度での影響や、分析対象とならない有害物質の存在、複数の物質による複合影響など、化学分析結果からでは推測できない場合があることが示され、生物試験の重要性が示唆された。

表8 中川における分析対象農薬

MCC	プロミザミド	トリクロピル
ジチオピル	ペンシロト	アシュラム
シマジソ	ペンデイメタリン	グルホシネート
テルブカルブ	ペンソフルリン	シテュロン
ナプロバミド	メチルダィムロン	ハロスフロメチル
ピリブチカルブ	MCCPP	フラザスフロロン
ブタミホ	2,4-PA-Na	グリホサート

また、固相抽出による分画濃縮を行ったところ、原水では毒性が検出できないサンプルについても毒性が検出できるようになり、分画濃縮を行うことによって、毒性値を基準にサンプル間の相互比較を行うことが可能であるということが示された。

一方、医薬品の試験において、CAMなどのマクロライド系抗生物質と、LVFXなどのキノロン系抗生物質との間で毒性に差がみられたことには、次のような要因が考えられる。

すなわち、オクタノールー水分分配係数とEC50の間には関連があり、両者の間には負の相関があることが知られている¹⁷⁾。即ち、オクタノールー水分分配係数の値が大きいものほど、その毒性が高くなる傾向がある。これは、化学物質の細胞膜への透過性が毒性の発現に大きく関わっていることを示している。LVFX、CAMのオクタノールー水分分配係数はそれぞれ0.553、7.18であり¹⁸⁾、この性質の違いから、物質の細胞膜への透過性が大きく異なってくることであり、両者の毒性に差が出た可能性が考えられる。

一方、LVFXおよびCAMについては、NOECとLOECの値を得た。そこで、これらの抗生物質による水生生物への影響評価を以下に試みた。

下水道には、生活排水や事業系排水が流れ込むことから、各家庭や病院等から排出された抗生物質が流入すると推察される。流入した抗生物質が下水道で十分に処理できずに河川等に放流された場合、水環境の汚染が懸念される。そこで、日本国内にある5ヶ所の下水処理場を対象として2次処理水の分析を行ったところ、処理水からLVFXおよびCAMが検出された¹⁹⁾。図8にその分析結果を示す。分析の結果、LVFXは152~323 ng/L、CAMは303~567

ng/L の濃度範囲で検出された。

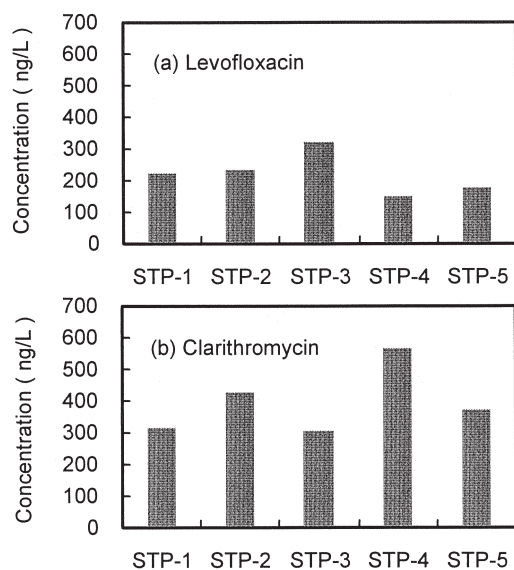


図 8 下水 2 次処理水中の LVFX および CAM 濃度

検出された LVFX および CAM の濃度レベルが、放流先河川の水生生態系に与える影響について、藻類生長阻害試験の結果より評価を行った。まず、*P. subcapitata* に対する 2 次処理水で検出された LVFX、CAM の影響を把握するために、NOEC と LOEC の幾何平均により求めた無影響濃度 (No-Effect Concentration: NEC) と検出濃度を比較した。LVFX、CAM の NOEC はそれぞれ $440 \mu\text{g/L}$ 、 $4.4 \mu\text{g/L}$ であり、検出濃度に比べて十分に高いことから LVFX、CAM とともに影響無しと判断される。また、NOEC を藻類の種間の安全係数 10 で除して藻類への影響を評価すると、LVFX は影響無し、CAM は希釈倍率 2 倍以下で影響有り と判断される。

さらに、生態リスクの初期評価²⁰⁾を行った。予測無影響濃度 (Predicted No-Effect Concentration: PNEC) については、藻類、甲殻類、魚類のうち 1 種の生物群の結果しか得られていないため、安全係数は $100^{17)}$ を用いた。安全係数 100 で NOEC を除すると LVFX、CAM の PNEC はそれぞれ $3,100 \text{ ng/L}$ 、 31 ng/L となる。予測環境中濃度 (Predicted Environmental Concentration: PEC) については、実測値をあてはめることができないため、調査した下水処理場の放流先での希釈倍率を考慮した PEC を考えた。その結果、最大濃度の LVFX (323 ng/L) については希釈倍率に関わらず PEC は PNEC より小さくなった。また、最大濃度の CAM (567 ng/L) については、希釈倍率 20 倍以上でなければ PEC が PNEC より大きくなる。ハザード比 PEC/PNEC を考えると、LVFX については

リスク無し、CAM については放流先河川での希釈倍率によってはリスク有り と判定される。一方、CAM のオクタノール-水分配係数は 7.18 であり、生物濃縮の可能性もあることから、水生生物への影響を考慮した場合、CAM は注目すべき物質であると考えられた。

5. まとめと課題

以下に、本研究の主な結果をまとめた。

- 魚類に対する急性毒性作用について、試水を連続的に通水して曝露する手法を取り入れ、稚魚の死亡率からみた場合に河川中に含まれる化学物質によると思われる影響が確認された。また、いくつかの課題を解決することで、より精度の高い試験系として確立できる可能性を示すことができた。
 - 甲殻類や藻類への毒性について、サンプリングの頻度や採取量に制限のある環境水に対応した試験手法を取り入れることで、少量の試料水で迅速に試験が可能となった
 - 水環境中に存在する個別の化学物質についての毒性試験を行い、藻類生長阻害の試験結果からは抗生物質 2 種についてリスク評価を行うことができた
 - 固相抽出手法の導入によって、多様な物質を含む環境水の成分を分画、濃縮することができ、原水のままでは検出できなかった毒性を検出できるようになった
- また、今後は以下のような点が課題となると考えられる。
- 実際のサンプルに多く適用してデータを集め、それぞれの試験手法の精度を高める
 - 生物種間の感受性の違いを考慮し、対象生物種の幅を広げる
 - 個別の化学物質の毒性データを多く集めるとともに、複合作用についてのデータを検討する
 - 個別の化学物質に対して、より低い濃度で反応を確認できる別のエンドポイントを検討する

参考文献

- 1) 田中宏明：水環境における内分泌攪乱化学物質の実態調査，水環境学会誌，22，629-632，1999
- 2) 田中宏明，小森行也，岡安祐司：下水道における微量化学物質の評価に関する調査，平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集，129-132，2002

- 3) 若林明子：化学物質と生態影響, p.1, 丸善, 2003
- 4) 畠山成久, 白石寛明, 浜田篤信：霞ヶ浦水系河川のヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) 生物試験による農薬毒性の季節変動, 水質汚濁研究, 14, 460-468, 1991
- 5) 畠山成久, 福嶋悟, 笠井文絵, 白石寛明：河川の藻類生産に及ぼす除草剤の影響評価, 陸水学雑誌, 53, 327-340, 1992
- 6) Okamura, H., Omori, M., Luo, R., Aoyama, I., Liu, D. : Application of short-term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land runoff, *Sci. Total Environ.*, 234, 223-231, 1999
- 7) 松原正明, 原田新, 田中宏明：藻類増殖阻害試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試料への適用, 水環境学会誌, 20, 768-775, 1997
- 8) 岡村秀雄, 青山勲, 羅榮, D. Liu, G Persoone：産業廃棄物埋立地浸出水の生態毒性評価および毒性のキャラクタリゼーション, 環境毒性学会誌, 1, 43-50, 1998
- 9) 岡村美美, 豊田智子, 市川大介, 吉本祥子, 岡村秀雄, 井上雄三, 毛利紫乃, 山田正人, 国本学：藻類増殖阻害試験の簡易化と埋立処分場浸出水の有害性評価への適用, 水環境学会誌, 765-768, 26, 2003
- 10) 日本工業標準調査会, 工場排水試験方法, JIS K 0102,
- 11) 日本工業標準調査会, 化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験方法, JIS K 0229, 1992
- 12) Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., VanCoillie, R., Vasseur, P. : A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, *Toxicity Assessment*, 1, 261-281, 1986
- 13) St-laurent, D., Blaise, C., Macquarrie, P., Scroggins, R., Trottier, B. : Comparative assessment of herbicide phyto toxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedure, *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 7, 35-48, 1992
- 14) 谷島利勝, 高田秀重：下水処理法流水中の医薬品期限化学物質の分析, 第11回環境化学討論会講演要旨集, pp130-131, 2002
- 15) 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 八十島誠, 田中宏明：下水処理過程における解熱鎮痛剤、抗てんかん薬等医薬品の動態, 第39回日本水環境学会年会講演集, p57, 2005
- 16) 八十島誠, 小林義和, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明：下水処理場における人用抗生物質の挙動, 環境工学研究論文集・第42巻, pp.357-368, 2005
- 17) 菊池幹夫：藻類生長阻害試験によるいくつかのゴルフ場農薬の毒性評価, 水環境学会誌, 16, 704-710, 1993
- 18) 医療薬学研究会：2004年版薬剤師のための常用医薬品情報集, 1253pp, 廣川書店, 東京, 2003
- 19) 八十島誠, 山下尚之, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明：下水処理水中に含まれるレボフロキサシン, クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響, 水環境学会誌, 11, 707-714, 2004
- 20) 日本環境毒性学会：生態影響試験ハンドブッカー—化学物質の環境リスク評価—, pp.318, 朝倉書店, 東京, 2003