

毒性同定評価（TIE）手法を用いた北潟湖流入河川水の 藍藻生長阻害要因の同定

保月勇志・蔦原仁平・吉舎直輝・田中宏和

Identification of Factors Inhibiting the Growth of Cyanobacteria
in the Inflowing River Water of Lake Kitagata

Takeshi HOZUKI, Jinpei TSUTAHARA, Naoki KISA, Hirokazu TANAKA

藍藻生長阻害試験で毒性が確認された北潟湖流入河川水を対象とし、毒性同定評価手法（TIE）を用いた毒性原因の同定を試みた。特に毒性が高かった河川水試料を対象に TIE を実施したところ、Phase1 では毒性原因が金属類と推定され、Phase2 ではさらに 4 種類の金属にまで絞り込むことができ、Phase3 ではニッケル、銅および亜鉛の毒性が強いことが確認された。また、銅と亜鉛の EC₅ は既存情報よりも高い毒性が確認された。しかしながら、本研究で求めた EC₅ を用いて計算した金属類による予測毒性値の総和については、評価した 4 試料中 3 試料でリスクが懸念されるレベルには到達せず、金属類のみでは生長阻害の原因を説明することができなかった。

1. はじめに

福井県あわら市に位置する北潟湖は、有機汚濁指標や栄養塩類の環境基準が超過している汽水湖である。また、漁業をはじめとした利水、観光やカヌースポーツ等による親水に活用され、渡り鳥の飛来地としても生物多様性の保全が求められている湖でもある。これらのことから、湖水中の有機汚濁の低減と水生生物の保全が共に求められ、そのために着目すべき点として湖水に生きる藻類がある。なぜなら、藻類は水中の二酸化炭素から有機物を生産する一次生産者であることから、生態系の上位の生物にとっては重要な生物であるとともに、異常増殖すると溶存酸素量の低下やアオコ等を発生する原因となる。そのため、藻類の種構成やバイオマスは湖の健全な水環境を保全するうえで重要な情報である。

特に北潟湖は河川の最末端に位置する地理的条件から、流域の汚濁負荷が集中するため、湖内の藻類は流域の影響を受けやすい。著者らは、2022 年度に北潟湖の代表的な流入河川である観音川の河川水を対象とし、藍藻生長阻害試験を実施した¹⁾。その結果、春季から夏季にかけて採取した一部の試料で非常に強い毒性を確認したが（図 1）、各種イオン成分や金属類、農薬類等の分析濃度からは毒性原因を特定することはできなかった。そこで今回、毒性同定評価手法（TIE：Toxicity Identification Evaluation）を用いて毒性原因の探索を試みた。TIE は、全排水毒性（WET：Whole Effluent Toxicity）を中心とした排水管理を行う際に排水の毒性を削減するための毒性削減評価（TRE：Toxicity Reduction Evaluation）に含まれるプロセスの一部であり^{2,3)}、米国等で導入されている。TIE は毒性原因の特徴化、同定、確認の 3 段階の手順で構成される。今回の試行では次のとおり実施した。

Phase1（特徴化）では、2 種類の固相カラムにより有機化学物質または金属類を除去した試料をそれぞれ生長阻害試験に供することで毒性原因の特徴づけを行った。また、Phase2（同定）では、カラムによる除去率や既存の毒性情報から対象物を絞り込んだ。最後の Phase3（確認）では、絞り込んだ物質を個別に生長阻害試験に供し、5%影響濃

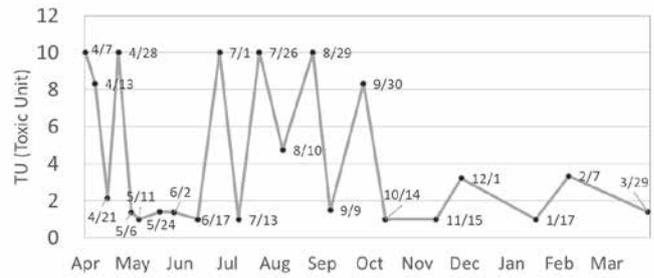


図 1 北潟湖流入河川（観音川）の TU 推移（2022 年度）
度（EC₅）を求めるとともに河川水濃度と比較した。本報では藍藻（*Microcystis aeruginosa*）に対する毒性原因の推定について得られた知見を報告する。

2. 方法

2022 年度に実施した生長阻害試験で毒性単位（TU：Toxic Unit）が高かった試料を対象として TIE を実施した。

2.1 試料

試料は観音川の崎田橋付近で 2022 年 4 月 7 日、4 月 28 日、8 月 29 日、9 月 30 日に採取したもの（計 4 試料）を冷凍保存し、試験開始前に解凍して使用した。

2.2 TIE

2.2.1 Phase1（特徴化）

各試料を逆相カラム（GL Science 社製 PLS-2（250mg））または金属キレートカラム（GL Science 社製 ME-2（250mg））に通水し、通液を生長阻害試験^{4,5)}に供した（表 1、図 2）。試験生物には国立環境研究所から分与された *Microcystis aeruginosa*（NIES-843）を用いた。試験は各濃度区 3 並行で実施し、平均値を求めた。また、無処理試料（以下、「Whole」と呼ぶ。）の生長阻害試験結果と比較し、式 1 により各画分の阻害率を求めた。ここで Control とは試料水を添加しなかった場合（濃度区 0%）を指す。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{各濃度区の生長速度}}{\text{Control の生長速度}} \right] \times 100 \text{ (式 1)}$$

2. 2. 2 Phase2 (同定)

同定対象は金属類とし、Phase1 においてカラム処理を実施した試料および Whole 中の各金属類濃度を ICP-MS にて測定し、式 2 によりカラム処理による除去率を求めた。

$$\text{除去率 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{カラム処理試料の濃度}}{\text{Whole の濃度}} \right] \times 100 \text{ (式 2)}$$

また、各金属類について、環境省ホームページ等を参考に、EC₅ または無影響濃度 (NOEC: No Observed Effect Concentration) 毒性情報を取得し、式 3 によりハザード比 (HQ: Hazard Quotient) を計算し、毒性に作用しうる金属類を予測した。

$$\text{HQ} = \frac{\text{試料濃度}}{\text{EC}_5 \text{ または NOEC}} \text{ (式 3)}$$

2. 2. 3 Phase3 (確認)

Phase2 において候補として絞り込んだ原因物質について生長阻害試験を実施し、濃度反応曲線を求めて EC₅ を算出した。さらに、求めた EC₅ から HQ を算出し、生長阻害への影響を評価した。なお、添加した金属については、ICP 分析用として市販されている標準溶液を使用したため添加剤の硝酸を含むが、今回の試験系の培養液中の濃度は最大 1.3 mg/L (NO₃-N) であり、生長阻害試験には影響しないことを確認している (表 2)。

3. 結果と考察

3. 1 Phase1 (特徴化)

Phase1 の結果を図 3 に示した。ここで、エラーバーは最大値および最小値を示している。また、Control と比較し、有意差がある濃度区 (p<0.05) は、*と阻害率を併記した。

いずれの試料も Whole において、80%濃度区での生長阻害が確認された。ただし、4月28日の試料は、他の試料と比べて生長阻害の程度が弱かった。また、逆相カラム処理区では、いずれも 80%濃度区での生長阻害が確認されたが、4月28日は Whole と比較して生長阻害率が 56% から 33% となり、僅かな回復傾向がみられた。一方、金属キレートカラム処理区では、いずれの試料も Whole と比較して 80%濃度区での生長阻害が明らかに回復した。このことから、いずれの試料の生長阻害についても金属類が強く影響していることが推察された。

3. 2 Phase2 (同定)

各カラム処理による各金属類の除去率について、試験に供した 4 試料の平均値を図 4 に示した。また、毒性情報が得られた金属類について、カラム処理試料の HQ を図 5 に示した。

図 4 に示したとおり、金属キレートカラムについてはカルシウム (Ca)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、ニッケル

表 1 藻類生長阻害試験条件

試験生物	藍藻 <i>Microcystis aeruginosa</i> (NIES-843)
培地	OECD 培地 ・ OECD 培地濃縮液 I、III、IV (富士フィルム和光純薬株式会社製) ・ OECD 培地濃縮液 II (用時調整後フィルターろ過滅菌、FeCl ₃ ・6H ₂ O 64 mg/L、Na ₂ EDTA・2H ₂ O 100 mg/L)
温度	25°C
初期濃度	100,000 cell/mL
照明条件	明期 10 時間、暗期 14 時間
照度	20 μ photons/m ² /s
振とう	50 rpm
培養容器	γ滅菌済み PS 製 6 穴ウェルプレート (Corning 社製)
濃度区	Control (0%)、20%、40%、80%
容量	5 mL

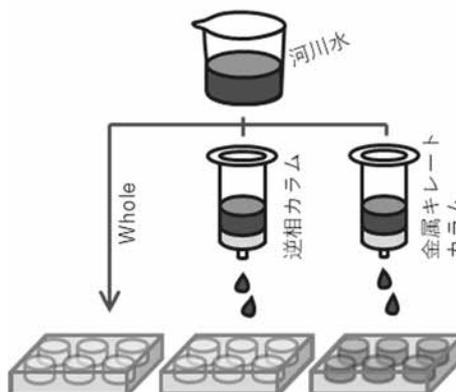


図 2 Phase1 の概略図

表 2 添加した金属標準溶液

試薬	濃度範囲 (mg/L)
クロム (Cr)	0.0002~0.048
ニッケル (Ni)	0.0002~0.024
銅 (Cu)	0.0002~0.048
亜鉛 (Zn)	0.0004~0.91

(Ni)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ヒ素 (As)、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb) の除去率が高く、通水処理により効率よく除去できることが分かった。一方これらの金属について、逆相カラムでは金属キレートカラムに比べて除去されにくいことが分かった。一方これらの金属について HQ を算出すると Cr、Ni、Cu、Zn の HQ が高かったことから (図 5)、この 4 種の金属が生長阻害に作用していることが推察された。

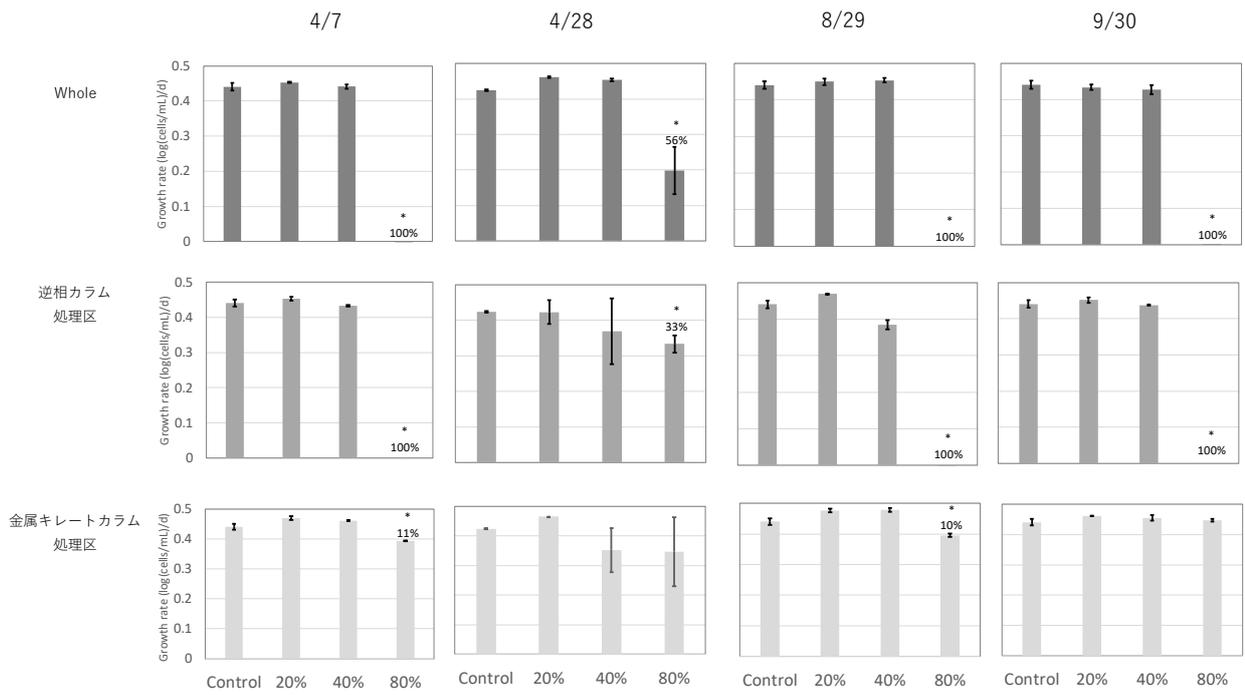


図3 Whole および各カラム処理区の藍藻生長阻害試験の結果

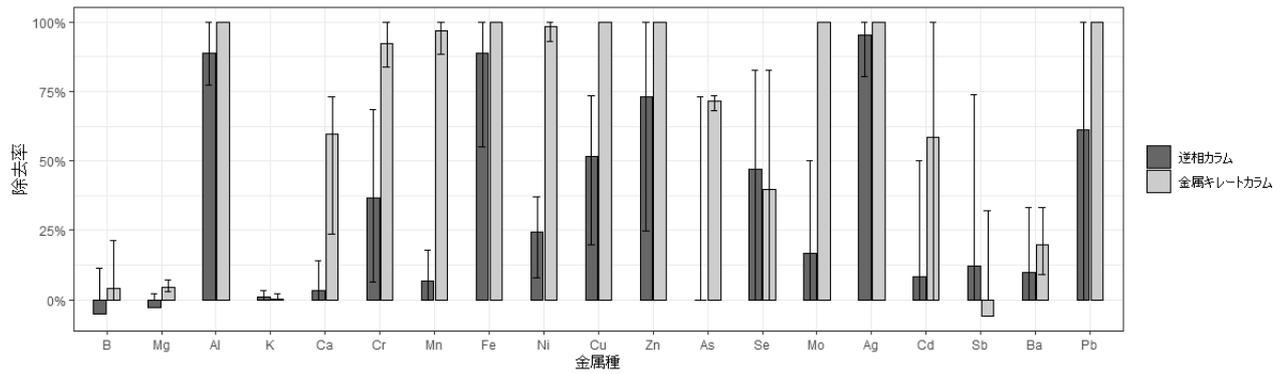


図4 各カラム処理による金属類の除去率

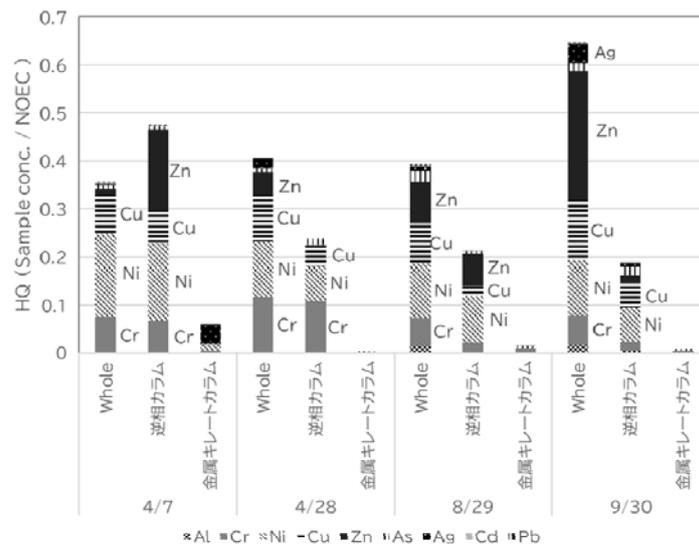


図5 既存毒性情報から算出した各カラム処理試料のHQ

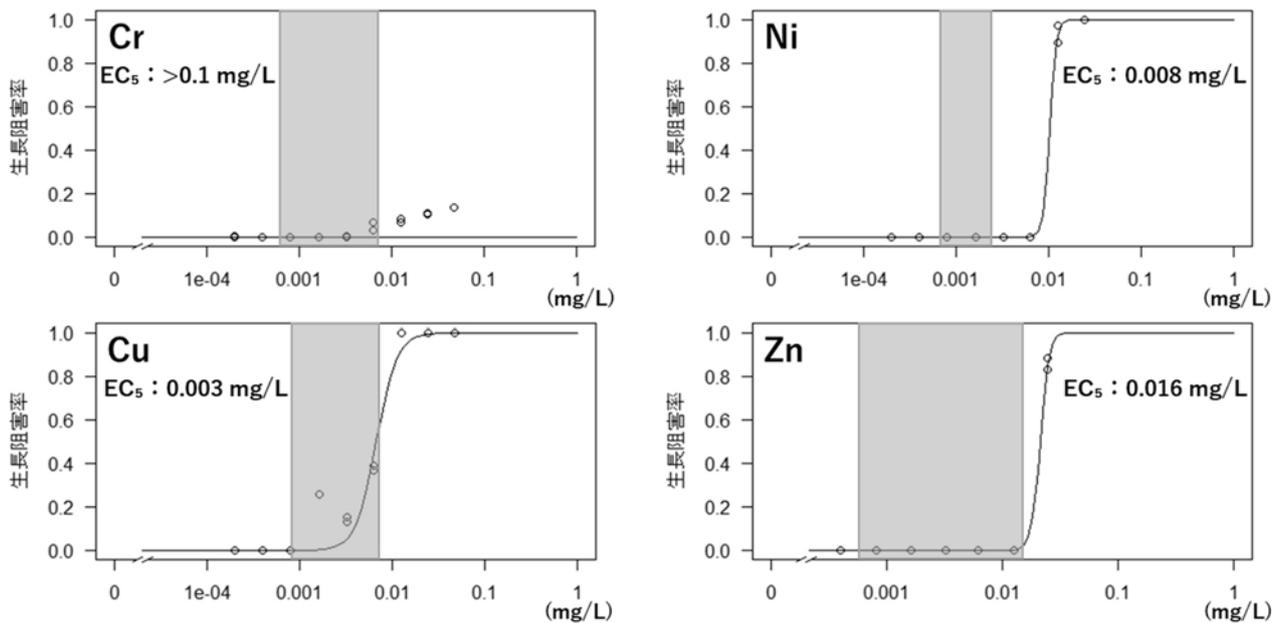


図6 Cr、Ni、Cu、Znの藍藻に対する濃度反応曲線

3. 3 Phase3 (確認)

Cr、Ni、Cu、Znの藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) に対する濃度反応曲線およびEC₅₀を図6に示した。EC₅₀は、Niが0.008 mg/L、Cuが0.003 mg/L、Znが0.016 mg/Lであった。なお、図中の網掛け部は、2022年度に調査した試料の各金属の濃度範囲を示している¹⁾。Crは河川水濃度程度では生長阻害率が低く、EC₅₀を算出できなかった。一方、CuとZnは、既存情報⁶⁾よりも高い毒性が示された。

本研究で求めたEC₅₀からWholeの金属濃度のHQを算出し、図7に示した。その結果、Cu、ZnおよびNiの占める割合が大きいことが分かった。しかしながら、4試料中3試料で予測毒性値の総和(ΣHQ)が1よりも低値であり、金属類のみでは生長阻害の原因を説明できなかった。

なお、先述したとおりPhase1において、4月28日の試料が逆相カラム処理区で僅かな回復傾向を示したことから、一斉分析で検出された農薬のうち、特にHQが高かったブタクロール¹⁾を対象として、金属と同様に濃度反応曲線を求め、図8に示した。その結果、河川水中に含まれる濃度程度では藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) への生長阻害は確認されなかった。このことから、Phase1でみられた逆相カラム処理区による生長阻害の僅かな回復傾向の原因物質はブタクロールではないことが判明した。このように、特定の農薬を想定した検証を行っても原因物質の特定は困難であり、他の有機化学物質や複数の有機化学物質の複合的な作用、もしくは逆相カラムで除去可能な何らかの物質の影響が考えられたが、本研究では原因物質を解明することはできなかった。

4. 総論

今回、Ni、CuおよびZnのEC₅₀が河川水中に存在する濃度でも藻類に作用する可能性が考えられたが、Wholeの金属類濃度から求めたΣHQは4試料中3試料で1よりも低く、金属類のみで生長阻害の原因を説明できなかった。ただし、実際の河川水中の金属類は、荷電により毒性が異

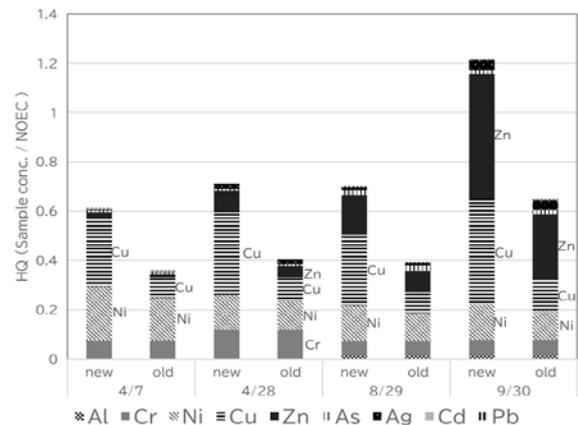


図7 本研究で求めたEC₅₀から算出したHQ(new)と、既存情報から算出したHQ(old)

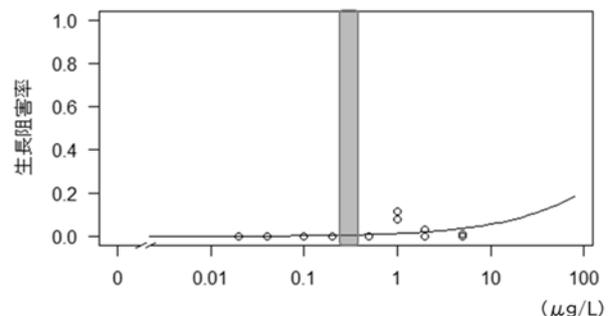


図8 藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) に対するブタクロールの濃度反応曲線

なるだけでなく、溶存態有機物(DOC)成分との錯形成作用やイオンバランスによる荷電の変化等、複雑な毒性作用機構(相加・相乗・拮抗)⁷⁾が働く。つまり、Phase3で求めたEC₅₀はフリー態イオンによる毒性値であるため、実際の河川水中の金属による毒性が今回算出した予測毒性と乖離があっても不思議ではない。

本研究で求めた EC₅を用いて 2022 年度に調査した観音川試料水の金属類濃度から ΣHQ を求めると図 9 のとおりであり、年間を通してほとんどの試料で 1 を超える予測毒性が示された。今回の TIE に供した 4 試料は TU の高いものを選定したが、それ以外の試料の ΣHQ の方が高値を示したことは注視すべきである。一般的に、錯形成した金属はフリー態のものに比べて毒性が弱まるが、汽水湖の高塩分により錯体から離れてフリー態として溶出される場合がある⁸⁾。つまり、河川水中で錯形成していた金属が湖内でフリー態となった場合には図 9 に示したような高い毒性に変換される可能性があり、藻類の生長に影響する可能性は十分に考えられる。

今回の試験で EC₅ が求められた Ni、Cu および Zn は、河川の上流でも検出されることから、山林からの流出も発生源の一つと考えられる。さらに加えて、河川水中の DOC が高い時期に併せてこれらの金属が高濃度に検出されやすい報告¹⁾や農業濁水にもこれらの金属が高濃度で含まれている報告⁹⁾があることから、農繁期においては農排水由来の Ni、Cu および Zn が、下流の河川水中の金属濃度を上昇させる大きな原因とも考えられる。特に、重金属は土壌に吸着した形態で存在しやすい。そのため、河川から汽水湖に供給される金属量を低減させるためには農排水の管理が重要であり、特に落水の際に濁水の排出を抑える工夫が有効であると思われる。

5. まとめ

本研究では観音川河川水の生長阻害試験調査において毒性が高かった試料を対象とし、TIE による原因物質の探索を実施した。その結果、以下の知見を得た。

- ・ Phase1 では金属類が毒性原因であることが推察され、Phase2 ではさらに Cr、Ni、Cu および Zn に毒性要因が絞り込まれ、Phase3 では Ni、Cu および Zn の毒性が強いことが確認された。
- ・ 本研究で求めた Cu と Zn の EC₅ は既存情報よりも高い毒性を示した。そのため、調査した 4 試料について金属類の ΣHQ を再計算したが 3 試料については 1 未満であり、金属類のみでは生長阻害の原因を説明できなかった。
- ・ 本研究で求めた EC₅ を用い、年間を通じた観音川河川水中の金属類による ΣHQ を計算したところ、1 を超える予測毒性が多く確認された。このことから、汽水湖中では金属が錯体から離れてフリー態となり毒性が上昇することを考慮すると、河川水中の金属が湖沼の藻類の生長に影響を及ぼす可能性があると考えられた。

謝辞

本研究は、文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により実施したものである。また、国立研究開発法人国立環境研究所と地方環境研究所等のⅡ型共同研究課題「多様な水環境の管理に対応した生物応答の活用に関する研究」の参加機関の皆様には多大なご助言をいただいた。関係者の皆様に深謝申し上げる。

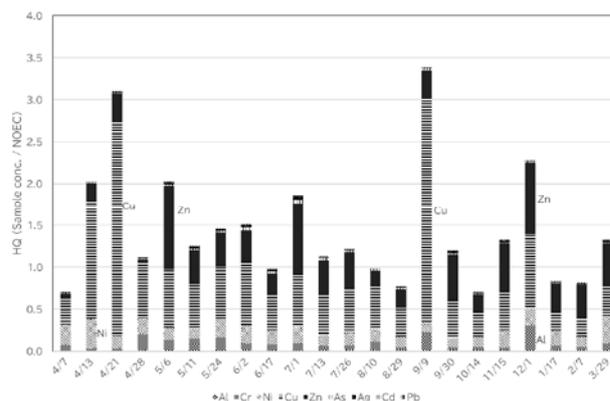


図 9 観音川河川水の HQ の推移 (2022 年度)

参考文献

- 1) 保月勇志, 吉舎直輝, 蔦原仁平, 田中宏和 : 藻類生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験による北潟湖流入河川水の評価. 福井県衛生環境研究センター所報, 22 (2024)
- 2) 山本裕史, 池幡佳織, 安田侑右, 田村生弥, 鎌迫典久 : 徳島県内の事業所排水を対象にした TIE の事例. 環境化学 Vol.25, No.1(2015)
- 3) 渡部春奈 : 生物応答試験による事業場排水の複合影響評価と毒性原因物質の同定. 環境毒性学会誌, 27 (S1), S76-S92 (2024)
- 4) 保月勇志, 吉舎直輝 : 藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験方法の構築. 福井県衛生環境研究センター所報, 21 (2023)
- 5) OECD : Fresh Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Guidelines for the Testing of Chemicals NO.201(2006)
- 6) European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.028.326>
- 7) 鎌迫典久 : 水生生物における化学物質の複合作用-相加・相乗・拮抗作用. 環境毒性学会誌, 27(S1), S3-S1(2024)
- 8) 永井孝志 : 環境水中重金属のスペシエーションと生物利用性. 環境毒性学会誌, 14(1), 13-23(2011)
- 9) 保月勇志 : 福井県の湖沼における有機物の新たな指標による評価による評価と浄化に関する研究(第 3 報)-北潟湖に流入する有機物の特性評価-. 福井県衛生環境研究センター所報, 19 (2021)