

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 11日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651011

研究課題名（和文） 重金属複合毒性予測モデルの構築及び生態影響評価手法の開発

研究課題名（英文） Developing a model predicting toxicities of metal mixture

研究代表者

加茂 将史（KAMO MASASHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・安全科学研究部門・研究員

研究者番号：90415662

研究成果の概要（和文）：重金属複合曝露の毒性予測モデルの構築を行った。藻類とオオミジンコを試験生物として、藻類では銅と亜鉛とカドミウム、ミジンコでは銅と亜鉛の曝露試験を行った。単独試験で半数影響濃度を求め、次いで複合曝露の毒性試験を行った。予測モデルを構築し結果を予測したところ、藻類では金属の組み合わせにもよるが、比較的高い精度で予測できることを確認できた。ミジンコでは、モデルによる予測と試験結果が一致せず、パラメータの再推定等、今後の課題が残された。

研究成果の概要（英文）：A Biotic Ligand Model (BLM) predicting toxicities of metal mixtures was developed. We conducted toxicity tests of copper, zinc and cadmium using algae, and zinc and copper using daphnia. We first determined the half effect concentrations of single metals, and then conducted mixture tests. We calibrated model parameters for algae, and found that the developed model well predicted the toxicity of metal mixtures. Whereas, in the case of daphnia, the predictability of the model was less accurate. The failure of the prediction may be attributed to the use of model parameters determined by previous toxicity tests conducted in the different test medium with different water quality. A refining of the model parameters suitable to our tests medium may be necessary, but is remaining as a future study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	3,000,000	540,000	3,540,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：Biotic Ligand Model、重金属、複合毒性、生態リスク評価

## 1. 研究開始当初の背景

金属は元素であり、自然界の至る所に存在している。金属が高濃度で存在している水域は世界中でいくつも存在しており、それら水域では、金属毒性による生態影響が無視できな

いとされている。金属による生態影響の程度を把握するには、生態リスク評価が必要となる。しかしながら、金属の毒性は水質に強く依存するため、河川や場所ごとにリスクが異なる。この「毒性の水質依存性」という不確

実性が大きすぎて、金属のリスク評価は困難ではないかと考えられてきた。近年、金属の毒性を予測するモデル(Biotic Ligand Model: BLM)が開発され、水質依存に由来する不確実性の大幅な低減がなされている。近年、欧米でなされた金属のリスク評価は、このモデルを用いて河川ごとにリスク評価を行っている。

## 2. 研究の目的

これまで開発された BLM は、個別の金属曝露による毒性の予測しか行えない。リスク評価は通常物質ごとに行うので、既存のリスク評価では、これで問題がなかった。しかしながら、金属汚染地域においては、単一の金属のみが高濃度であることは希で、複数の金属が同所的に高濃度で存在していることが多い。そのような複合汚染地域の生態リスクを適切に評価するには、複合曝露による毒性を適切に把握する必要がある。

複合曝露による毒性が予測できるよう BLM を拡張することは、幾つかの研究により試みられている。しかしながら、それらは多分に理論的な研究であり、リスク評価ツールへと応用するためには、それら理論の検証が必要となる。また、BLM は諸外国で発展したリスク評価ツールであり、そのため、水質が異なる我が国において、そのツールを活用するには、我が国の水質においてもそれが利用可能であることを示す必要がある。

そこで本研究では、我が国の水を用いて藻類とミジンコの毒性試験を行い、我が国におけるモデルの利用可能性を検証し、複合曝露への応用可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) モデルの理論的背景

BLM の基本仮定は、

- ① 金属の溶存態は水中で様々な存在形態を取るが、毒性に寄与するのはそれら存在形態の内、遊離イオンの状態にあるもののみである
- ② 金属は、リガンドと総称されるイオンチャンネルまたはポンプ、もしくはその他未知のイオン反応部位から生物体内に取り込まれる。カルシウムやマグネシウムなどの生物にとっての必須陽イオンもリガンドから取り込まれるが、金属がリガンドに吸着することで、必須陽イオンの取り込みが阻害される
- ③ 毒性値は水質により異なるが、金属が吸着しているリガンドの濃度は、同じ値(例えば半数致死濃度: LC50)の下では、どの水質でも一定である

である。

重金属の毒性は、水中の有機物濃度が高くなると弱くなる。水中の溶存有機物が金属イ

オンと結合することで複合体を形成するが、それら複合体は生物に吸収されない。つまり、溶存有機物は金属の濃度(生物利用可能濃度)を実質的に下げることで毒性を弱めるのである。この知見を表現したものが、上の仮定①である。なお、生物利用可能濃度を決定する主要因は、有機物濃度であると考えられているが、水温や pH 等も影響する。BLM による毒性値の推定では、各水質における生物利用可能濃度の把握が重要となるが、これは、既存の「金属スペシエーションモデル(例えば、WHAM)」で行うことが可能である。

重金属の毒性は、硬度にも影響を受け、硬度が高いほど毒性が下がる。硬度が高いということは、水中のカルシウムやマグネシウム等の陽イオンの濃度が高い、ということである。生物には水中のイオンを体内に取り込む部位(リガンドと総称される)が存在する。同じ陽イオンである金属もこの部位に結合すると考えられる。金属が結合することにより、カルシウム等の必須元素の取り込みが阻害される。この必須元素取り込み阻害が、金属の毒性、少なくとも急性毒性のメカニズムであると考えられている。このリガンドを巡る陽イオン間の競合を考慮したのが、上の仮定②である。

以上の仮定に基づき、リガンドに吸着する金属濃度を求めると、

$$v = \frac{K_M [M^{2+}]}{1 + K_M [M^{2+}] + K_{Ca} [Ca^{2+}]}$$

式 1

となる。ただし、 $M^{2+}$  は二価の金属イオンを表し、 $[M^{2+}]$  はその金属の「生物利用可能濃度」である。 $Ca^{2+}$  はカルシウムイオンで  $[Ca^{2+}]$  はカルシウムの生物利用可能濃度である。ここでは、簡単のため、リガンドを巡り金属と競合関係にあるイオンは、カルシウムのみとした。 $K_M$ 、 $K_{Ca}$  は親和定数と呼ばれ、それぞれ金属イオンとカルシウムイオンのリガンドへの吸着のしやすさを表す反応速度定数である。 $v$  は全リガンド中、金属が吸着しているリガンドの割合であり、毒性は  $v$  の大きさで決まる。 $v$  が高いほど(金属がたくさん吸着しているので)有害な影響も大きいと考えられている。また、この値は、同じ毒性の下(例えば半数致死)では、水質に関わらず同じ値になる。これが仮定の③である。

上の式は、金属種を一つしか考えていない。理論的には複数金属種へと拡張可能であり、

$$v = \frac{\sum_i K_{Mi} [M_i^{2+}]}{1 + \sum_i K_{Mi} [M_i^{2+}] + K_{Ca} [Ca^{2+}]}$$

式 2

とすればよい。この式は、リガンドー金属の複合体の濃度を全ての金属種で足し合わせただけである。ここで、複合曝露による毒性

を推定するのに都合が良い新たな課程を設ける。

④ ある影響下 (例えば半数致死) における  $v$  は、金属種 (さらに言えば金属が何種あっても) が異なっても不変

例えば、亜鉛の半数致死濃度の場合、 $v=0.2$  だとする。だとすると、銅でもカドミウムでも半数致死濃度の下では  $v=0.2$  となるという仮定である。さらに、金属が何種類リガンドに吸着しようとも、式2を用いて  $v=0.2$  となるところで死亡率は半分になる、という仮定である。仮定というより、むしろ予想に近い。これはもちろん未実証である。ただし、既存の毒性試験をメタ解析した結果からは、「正しそう」と言われている。いずれにしろ、式2は複合暴露への単なる理論的な拡張であって、この枠組みが正しいかどうか、特に、リスク評価へと援用するには、検証が必要である。そこで、毒性試験を行い結果を用いて検証を行う。特に、新たに設けた仮定④が正しいかどうか検証する。

(2) 各生物種における試験方法

①藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata*

藻類 (*P. subcapitata*) の増殖抑制を評価エンドポイントとし、亜鉛、銅、カドミウムを用いて試験を行った。

培養は3日間行い、細胞の増殖は毎日1度 in-vivo 蛍光により測定し、試験期間中の増殖速度を求めた。濃度を説明変数とし、増殖速度を従属変数として logit model で非線形回帰を行い、濃度反応関係を推定した。回帰モデルから、増殖速度を半減させる半数影響濃度を、金属ごとに求めた。さらに、各試験濃度区におけるフリーイオン濃度を化学平衡計算プログラムによって計算し、フリーイオンベースの半数影響濃度も算出した。

全濃度ベースで Toxic Unit が1となるよう金属濃度を調整し、複合暴露試験を行った。Toxic Unit が1であるため、毒性が加算的であると、複合暴露試験では、増殖率はどの試験区においても半減していると期待される。得られた複合暴露試験の結果と、モデルの推定結果を比較した。

②甲殻類 *Daphnia magna*

オオミジンコ (*D. magna*) を用いて、OECD ガイドラインに従った48時間急性毒性試験を行った。エンドポイントは半数致死とした。対象とする金属は、銅と亜鉛とした。

藻類同様、幾つかの濃度区を設定し、24時間、48時間後の死亡個体数を計測した。金属濃度を説明変数、48時間後の死亡個体数を従属変数とし、誤差項を2項分布とした一般線形モデルで回帰を行い、半数死亡率の推定を行った。

藻類同様、Toxic Unit が1となる比率で、

亜鉛と銅の複合暴露を行い、複合金属の比と死亡個体数の関係を調べた。

4. 研究成果

(1)藻類

① 半数影響濃度

水質を調整しない (Ca、Mg、Naの濃度変化させない)、毒性試験の結果を次に示す (図1)。

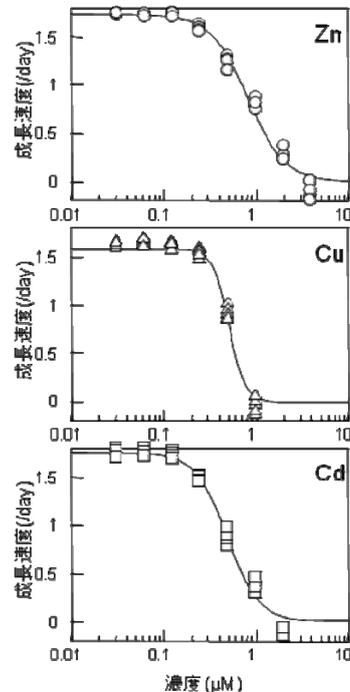


図1: 成長速度における金属の影響。回帰の結果から、増殖速度を半減させる金属濃度 (EC50) は、亜鉛、銅、カドミウムでそれぞれ、0.418、0.0188、0.238 ( $\mu\text{M}$ ) と推定された。

②パラメータ推定

図1の試験結果を用いて、BLMパラメータ (モデル式における親和定数と式2から推定される  $v$  の値) を推定した。 $v$  の値は、0.42 と推定された。つまり、藻類の場合、全リガンドの42%に金属が吸着すると、増殖速度が半減すると推定される。

図1の結果を、横軸に濃度ではなく、BLMから推定される全リガンド中の金属吸着割合の値 ( $v$ ) で表示すると次の図が得られる (図2)。

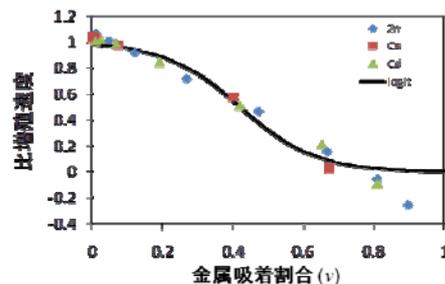


図2: BLMから推定される、金属の吸着割合 ( $v$ ) と比増殖率 (コントロールを1とした時

の減少率)の関係。

全濃度ではなく  $v$  で評価すると、全ての金属で比増殖速度はほぼ一致し、BLMの新たな仮定「ある影響下における  $v$  は、金属ごとに不変」は正しいことが示唆された。つまり、式2を用いれば複合毒性の予測が可能であることが示唆された。

### ③複合曝露試験

亜鉛と銅の結果を示す(図3)。

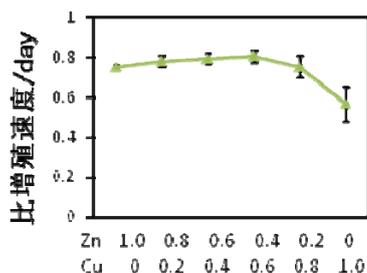


図3: 亜鉛と銅の複合曝露。横軸のラベルは、EC50の濃度比。毒性が加算であると、全範囲に渡り非増殖速度が0.5になると期待される。この結果では、亜鉛と銅の混合比が4:6で比増殖速度が最大であり、複合曝露は互いの毒性を打ち消す、拮抗作用があるが見取れる。

図3に加え、亜鉛とカドミウム、カドミウムと銅の複合曝露試験を行った結果、いずれの組においても、金属2種の複合曝露では、互いに毒性を弱めあう「拮抗作用」が観察された。

図3では、亜鉛の単独曝露である場合(図3の左端)、比増殖速度は75%程度であり、50%より高い値となっている。もしかしたら、亜鉛のEC50は若干過小評価になっている可能性がある。この点は今後確認が必要だろう。

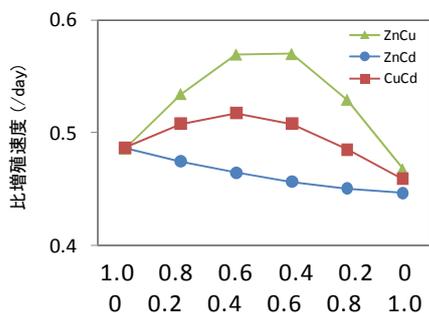


図4: モデルによる複合毒性の予測。横軸は金属の混合比。複合毒性は、拮抗的であると予測される。

### ④BLMによる複合毒性予測

BLMによる複合毒性の予測を図4に示す。モデルの予測においても、亜鉛とカドミウムの

複合曝露でははっきりとしないが、他の金属の複合曝露では増殖速度の減少率をより弱める拮抗的であることが予測され、定性的に実験結果と一致することが確認できた。このことにより、BLMの複合毒性への応用可能性が確認された。

### ⑤藻類まとめ

藻類に対する金属の複合曝露の毒性は、定性的には予測されており、本研究で開発したBLMは、複合毒性が予測可能であることが示唆される。今後、モデルの予測精度の確認を行っていく必要がある。

### (2)オオミジンコ

#### ①半数致死濃度

まず、48時間半数致死濃度(LC50)の推定を、銅と亜鉛で行った。結果を図5に示す。

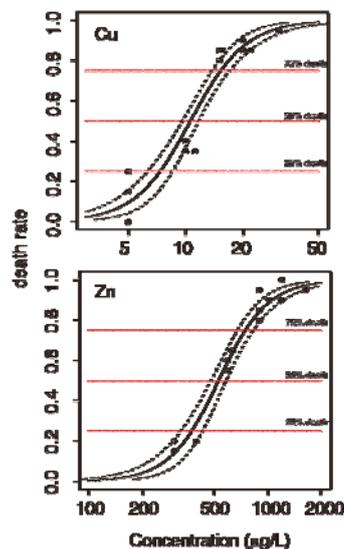


図5: 試験結果。48時間半数致死濃度は、銅と亜鉛でそれぞれ、10.6 µg/L、532.6 µg/Lと推定された。

### ②複合曝露試験

藻類同様、Toxic Unitが1になるよう、亜鉛と銅の濃度を調整し、複合毒性試験を行った。試験は各混合比で5回繰り返した。結果を図6に記す。

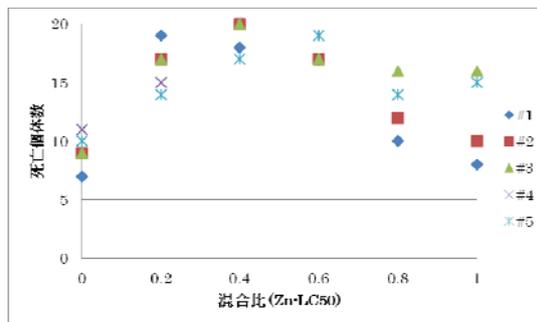


図6: 複合曝露試験結果。横軸の数字は、亜

鉛の LC50 の率 (Zn-LC50 = 0 なら Cu-LC50=1)。縦軸は、死亡個体数 (n=20)。

藻類とは異なり、銅と亜鉛の複合曝露では、死亡個体数が上昇し、毒性は相乗的になった。

### ③BLMによる予測

オオミジンコ BLM のモデルパラメータ (親和定数) は幾つかの先行研究で求められており、本研究ではそれらの値を用いた。

式 1 を用いて、本試験で得られた LC50 の下での  $v$  を計算してみたところ、亜鉛で 0.35、銅で 0.03 と一桁以上異なる値が得られた。つまり、複合毒性予測 BLM での基本仮定④を満たさず、ここで提案された複合毒性予測モデルは直接には援用可能でないことが示唆された。

なぜ、式 2 に基づいた基本仮定④を満たさないのかについては幾つか理由が考えられる。まずは、ミジンコは金属ごとに吸着割合 ( $v$ ) が異なるという可能性である。一方、パラメータの不整合も考えられる。本研究では海外の先行研究で推定された、パラメータを用いたが、そのパラメータが我が国の水質では適切では無い可能性も無視できないだろう。どちらがありそうかは改めて、パラメータを改めて推定する必要がある。残念ながら、プロジェクト期間中には行うことができず、今後の課題として残された。

### (3) 研究の概要とまとめ

藻類においては、亜鉛、銅、カドミウムの単独毒性試験を行った。BLM パラメータの推定を行った。複合曝露の毒性は、拮抗的であった。つまり 2 種の金属を混ぜることで、毒性が弱まることが示された。モデルによる予測も拮抗作用を示しており、定性的には毒性試験を正しく再現した。予測の定量性については、さらなる検討が必要である。

オオミジンコにおいては、亜鉛と銅の複合毒性試験を行い、毒性は相乗的になることが示された。既知のモデルパラメータでは、今回の試験結果が再現できなかった。今後パラメータ推定を行う必要がある、そのためのデータを整備する必要がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① M. Kamo, T.I. Hayashi and T. Akita, Potential effects of life-history

evolution on ecological risk assessment, Ecological Applications, 査読有、21 巻、2011、3191-3198、DOI:10.1890/01-5341

- ② 加茂将史、安田恭子、内藤航、査読有、生物リガンドモデルを用いた銅の生態リスク評価手法、環境毒性学会誌、査読有、14 巻、2011、127-139、なし
- ③ 加茂将史、林岳彦、金属の生態毒性予測モデル: Biotic Ligand Model の発展史と展望、環境毒性学会誌、査読有、14 巻、2011、25-38、なし
- ④ 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、査読有、14 巻、2011、13-23、なし

[学会発表] (計 3 件)

- ① M. Kamo, T.I. Hayashi and T. Akita, Effects of Life History Evolution on Ecological Risk Assessment, SETAC NA, 2011, Nov. 17th, Boston, MA, USA
- ② 多田満、小神野豊、オオミジンコ生態影響試験による環境水の評価、日本陸水学会、2011 年 9 月 24 日、島根大学
- ③ M. Kamo, M. Tada, W. Naito, Biotic Ligand Model for predictions of toxicity of copper, zinc and their mixture, SETAC North America 31st Annual Meeting, 2010, Nov. 10th, Portland, OR, USA

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

加茂 将史 (KAMO MASASHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・安全科学研究部門・研究員

研究者番号: 90415662

#### (2) 研究分担者

多田 満 (TADA MITSURU)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号: 00188252

永井 孝志 (NAGAI TAKASHI)

農業環境技術研究所・有機化学物質研究領域・研究員

研究者番号: 10391129

#### (3) 連携研究者

なし