

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24241014

研究課題名(和文) 金属特異性を考慮した包括的な生態リスク評価手法の開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive ecological risk assessment of metals based on their bioavailability

研究代表者

加茂 将史 (KAMO, MASASHI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・安全科学研究部門・主任研究員

研究者番号：90415662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：金属の生態リスク評価法の開発を行った。旧来では、環境中に存在する金属の全量で評価を行ってきた。近年、金属の有害性に対する研究が進み、現在では金属は環境中で様々な存在形態を取り、幾つかの存在形態、例えば環境中に存在する有機物と結合した金属は生物にとって有害ではないと考えられている。この形態は利用可能な形態と呼ばれ、生態リスク評価は利用可能量に基づいたなされる。欧米ではこの評価方法が標準となりつつあるが、わが国では用いられていない。わが国の土壌や水の性質、生息生物が欧米とは異なるため、本手法を直接援用することはできない。本研究の目的は、利用可能量に基づいた評価手法をわが国に应用することである。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to develop a technique for the risk assessment of metals. Historically, the ecological risk assessment of metals was carried out based on the total concentration of metals in environmental medium. Recent researches revealed that the total metal is less responsible for the risk of metals on living organisms, but some forms of metals which are called bioavailable forms of metals are, and hence the risk assessments are carried out based on the bioavailability in the united states and European countries. Because soil and water quality are different in Japan, the direct application of the methodologies developed in other countries are difficult; hence, we aim to customize the methodologies to be applicable to Japanese cases.

研究分野：生態リスク評価

キーワード：生物利用可能量 DGT 生態リスク 生物リガンドモデル カドミウム 銅

1. 研究開始当初の背景

金属は元素であり、人の産業活動を支える重要な物質である。幾つかの金属は生物にとって必須の元素であるが、いずれの金属も濃度が高いと生物にとって有害性を発揮する。昨世紀の末から、化学物質の生態リスク評価が実施され、多くの地点で、金属のリスクは無視できないレベルにあるとの結果になり、何らかの対策が必要だと考えられている。一方、金属は元素であり代替が難しいことからむやみな規制は産業活動を阻害するとの意見がある。さらに、通常のリスク評価手法では、自然由来の濃度であってもリスクが懸念されるとの判断がなされることもあり、その他の一般化学物質と同等のリスク評価手法を適用すべきでないとの意見も見られている。

このような問題から、欧米では金属の特有のリスク評価手法が発展した。従来の評価手法は、金属全量に基づいて評価をするものであったが、自然界では様々な形で存在する金属の形態から、生物にとって有害な形態のみに基づいて評価しようというものである。生物に利用可能な金属の形態の量は、生物利用可能量と呼ばれる。利用可能量から有害性を推定するモデルが、生物リガンドモデル (Biotic Ligand Model: BLM) と呼ばれ、このモデルが新たなリスク評価方法の主要ツールであり、現在欧米ではこのツールを用いた評価が主流となりつつある。

一方我が国では、利用可能量に基づいた評価は未だなされていない。BLM は生物種に特異的なモデルであるが、我が国の生物で金属毒性を予測できるモデルは開発されていない。そこで、欧米で開発された手法を我が国に応用するために必要な研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、欧米で開発された BLM を用いた評価手法を、我が国に応用することである。BLM には、金属全量ではなく生物にとって有害性を持つ画分 (利用可能量) の把握が極めて重要となる。利用可能量は、土壌の性質や水質によって変わることが知られている。我が国の土壌は一般に酸性に偏っており、水は軟水であるなど、欧米とは異なった特徴を持つ。このような、特徴的な土壌、水において利用可能量を把握することが必要となる。利用可能量に基づいて、金属の有害性を予測するのが BLM であるが、モデルパラメータは生物種に依存して変わる物であり、我が国に生息する生物で金属の有害性を予測するには、新たにパラメータを取得しなければならない。これら新規パラメータの取得も本研究の目的である。

3. 研究の方法

3.1 土壌での利用可能量把握と有害性試験

土壌についてはカドミウムの利用可能量について調べた。土壌は、砂質土、黒ボク土、森林褐色土、灰色低地土を各地より採取し、

カドミウムを添加した。

カドミウム全量のうちいくつかは土壌中に存在する有機物に吸着し、利用可能性を失うと考えられる。利用可能量の測定には、Diffusive Gradient in Thin-Film (DGT) を用いた。詳しい説明は省くが、DGT は利用可能量を検出するために頻りに用いられている簡易キットである。DGT を用いて、カドミウムの添加量と利用可能量との関係を調べた。

有害性試験については、ミミズ (*Eiseina andrei*) およびトビムシ (*Folsomia candida*) の半数致死濃度を求めた。

3.2 水中での利用可能量と有害性試験

水生生物については、銅について調べた。野外から水を採取し、銅を添加して、DGT を用いて利用可能量を推定した。同時に、水質の分析結果をもとに、利用可能量を推定するモデル、金属スペシエーションモデルを利用して利用可能量を推定し、結果を比較した。

メダカ (*Orizyas latipes*) およびカプトミジンコ (*Daphnia galeata*) で BLM のパラメータを推定した。BLM による LC50 の推定は以下の式でなされる。

$$LC50 = (1 + K_{Ca}[Ca^{2+}] + K_{Mg}[Mg^{2+}]) \quad (eq.1)$$

ここで、 $[Ca^{2+}]$ と $[Mg^{2+}]$ は、溶液中のカルシウムとマグネシウム濃度である。注意する点は、これらも全濃度ではなく、利用可能な状態にある濃度であり、スペシエーションモデルで推定される物である。 K_{Ca} K_{Mg} はカルシウムとマグネシウムの吸着係数であり、これらを有害性試験を実施することで推定する。この式から、 $[Ca^{2+}]$ と $[Mg^{2+}]$ が高いほど LC50 が高くなることがわかるが、これはカルシウムやマグネシウムは金属の毒性は下げる役割があることを意味している。一方、 $[Ca^{2+}]$ と $[Mg^{2+}]$ が 0 の極限で、 $[Ca^{2+}]$ と $[Mg^{2+}]$ による金属の有害性への保護効果が全くなくなる。そのときの LC50 が eq.1 の である。このモデルは $[Ca^{2+}]$ と $[Mg^{2+}]$ の線型モデルなので、 $[Ca^{2+}]$ と $[Mg^{2+}]$ を様々に変えて、線形回帰を行えば、吸着係数が推定できる。

このように吸着係数を推定することで、メダカ、ミジンコの BLM モデルを開発した。

3.3 野外水での利用可能量の把握

BLM は実験室で調整された試験水を用いて実施する。室内の試験水は、溶存有機物 (DOC) の濃度が低ことが一般的である。DOC のいくつかは金属と結合能を持ち、DOC に結合した金属は利用可能性を失うと考えられている。野外では DOC の濃度が実験室の水よりも高いと考えられている、DOC の影響を考慮した利用可能量の把握が必須である。そこで、河川から水を採取し、採取した水に銅を添加し DGT 試験を実施することで、利用可能量の把握を行った。加えて、水質の分析を行い、スペシエーションモデルを利用して、利用可能量の推定も実施した。DGT による

利用可能量の推定値とスペシエーションモデルによる推定値の比較を行い、開発したBLMの野外適応性について検討した。

4. 研究成果

4.1 土壌での利用可能量把握と有害性試験

DGTで推定した土壌中におけるカドミウムの利用可能量を図1に示す。添加濃度は同じであっても、土壌ごとに利用可能量は異なり、砂質土と森林褐色土がほぼ同じ程度で高い。次いで灰色低地土が高く、黒ボク土が一番低い (Yasutaka et al. 投稿中)。

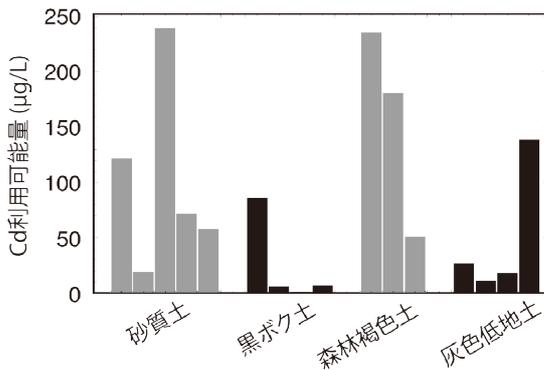


図1: カドミウムを5mg/kg添加した土壌とDGTで推定した利用可能量の関係。

ミミズとトビムシの半数致死濃度 (LC50) を図2に示す (Nakamori et al. 投稿中)。

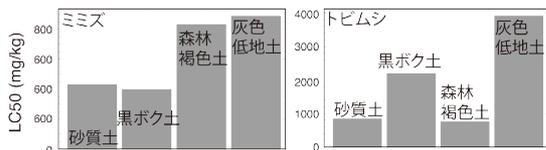


図2: 土壌と半数致死濃度の関係。

ミミズではそれほど明らかでないが、トビムシでは、利用可能量が多い土壌ほどLC50は低いという関係が見取れる。砂質土や森林褐色土では、金属と結合能を持つ有機物が少ないため、利用可能量が多くなり、結果として低いLC50になると推測される。このように、土壌中濃度が同じであっても、生物への影響は異なる可能性があり、金属の管理に関してより詳細な評価の必要性が示された。

4.2 水中での利用可能量と有害性試験

水生生物でのBLMは研究が進んでおり、推定精度が良いとされている。本研究でも、先行研究と同じ方法で、メダカとカプトミジンコのモデルパラメータの推定を行った。カプトミジンコの図3に示す。

この結果から、BLMパラメータは $\alpha=3.0 \times 10^{-8}$ (M), $\log(K_{Ca})=3.14$, $\log(K_{Mg})=2.29$ と推定された (Ha et al. 2016)。このモデルを用いた、予測と観測結果を比較したものが次の図である。2点を除き、推定値と観測値は1/2~2倍の範囲にあり、推定精度は良いと言える。

同様の試験をメダカについてもを行い、モデルパラメータを推定した (Pelle et al. 2016)。

推定されたパラメータは $\alpha=2.0 \times 10^{-7}$ (M), $\log(K_{Ca})=3.99$, $\log(K_{Mg})=3.19$ であった。このBLMを用いて予測したLC50と観測値の比較を図5に示す。いずれも、推定値と観測値が1/2~2倍の範囲に入っており、推定精度が高いBLMが開発できた。

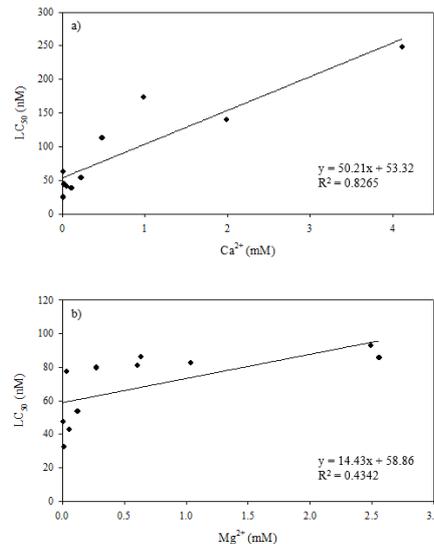


図3: 陽イオン濃度と銅のLC50の関係。上がカルシウムで下がマグネシウムの結果。

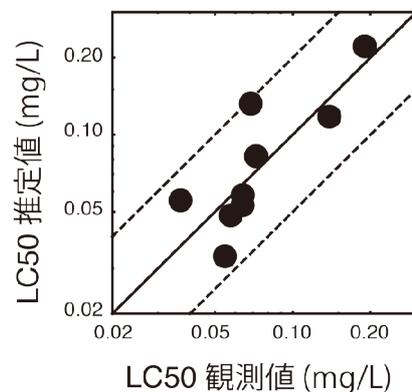


図4: 観測値とモデルを用いた推定値の比較。破線は1/2~2倍で、推定精度の目安を表す。

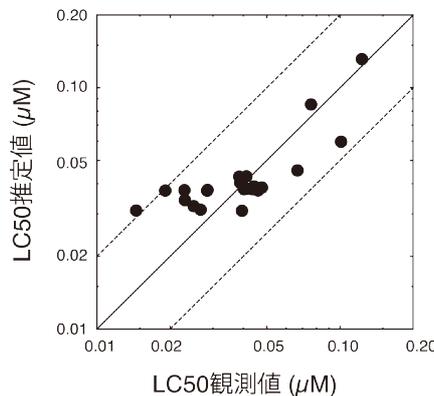


図5: 観測値とモデルを用いた推定値の比較。破線は1/2~2倍で、推定精度の目安を表す。

カルシウムとマグネシウムを調整していない対照区における、ミジンコとメダカのLC50は、それぞれ、3.4、54.6 μ g/L (total Cu)

であり、ミジンコはメダカより感受性が一桁高いことがわかった。

4.3 野外水における利用可能量の把握

BLM は室内の調整された試験水を用いて構築されている。室内の試験水は、溶存有機物(DOC)の濃度が低く、金属の利用可能量が比較的高いと考えられる。開発されたモデルの野外への応用を考える場合、DOC による利用可能量の変化について検討が必要である。野外での利用可能量を確認するため、幾つかの河川から水を採取し、銅を添加して、DGT およびスペシエーションモデルを用いて、推定された利用可能量の比較を行った。結果を次の図 6 に示す。

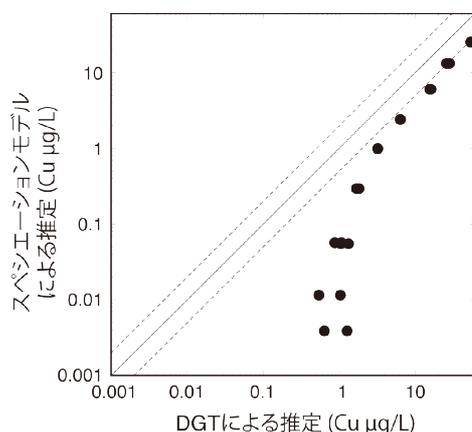


図 6: 河川水に銅を添加し、利用可能量を DGT とスペシエーションモデルで比較した結果。

図から明らかなように、銅の濃度が高い領域 (DGT による推定濃度で 10µg/L 程度) であれば、スペシエーションモデルと DGT による推定の差はおおよそ 2 倍であるが、低い領域であればずれはかなり大きい。DGT による推定値が 1µg/L ではモデル予測はおおよそ 0.05µg/L で、20 倍程度の差があることがわかる。同様の試験を幾つかの河川で実施したが、濃度が低ければスペシエーションモデルが利用可能量を大幅に低く推定するという傾向は共通であった。一方 DOC が低い実験室の水では、DGT とスペシエーションモデルの推定値はほぼ一致しており(Pelle et al. 2016)、野外水に含まれる DOC がなんらかの影響を及ぼしていることが考えられるが、理由については定かでない。スペシエーションモデルが利用可能量を過少推定していると考えられるが、DGT とスペシエーションモデルともに利用可能量を不適切に推定している可能性もあり、今後精査が必要である。

BLM による金属の有害性の推定では、利用可能量の推定にスペシエーションモデルが利用されている。そのため、スペシエーションモデルの推定値が利用可能量を過小推定しているのだとすると、BLM を用いたリスク評価では金属によるリスクは過小推定されてしまう。メダカのように LC50(=54.6 µg/L) がある程度高い生物であれば、DGT もスペシ

エーションモデルもほぼ同じ推定値を与えるので大きな問題にはならないが、ミジンコのように LC50 が低い (=3.4 µg/L) 生物では大きな問題になるだろう。より、精緻な研究が必要である。さらに、図 6 に見られるようなずれは、他の金属でも観測されるのかどうかは未検討である。より精緻なリスク評価手法の構築に向けて、早急に確認すべき問題であると考えている。

参考文献

- Ha, JY., Kamo, M., Sakamoto, M. (2016) Acute toxicity of copper to *Daphia galeata* under different magnesium and calcium conditions. *Limnology* 印刷中
- Pelle, WE., Kamo, M., Hayashi, IT., Kimura, T., Shimasaki, K., Oshima, Y. (2015) A biotic ligand model for predicting toxicity of copper to medaka (*Oryzias latipes*) *環境毒性学会誌* 18: 59-71
- Yanagisawa, Y., Hou, L-B., Nakamori, T., Kaneko, N., Fujii, Y., Kamitani, T., Ono, K., Yasutaka, T. Species-specific effects of soil properties on cadmium lethal toxicity to *Eisenia Andrei* and *Folsomia candida* in natural soils. 投稿中
- Yasutaka, T., Hayashi, IT., Ono, K., Kamo, M., Iwasaki, Y., Nakamori, T., Fujii, Y., Kamitani, T. Estimating cadmium bioavailability in 17 soils from physical and chemical properties. 投稿中

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 8 件)

Hou, L.-B., Yanagisawa, Y., Yachi, S., Kaneko, N., Nakamori, T. (2014) Biomass estimation of the terrestrial ecotoxicological species *Folsomia candida* (Collembola) using a real-time polymerase chain reaction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 101: 59-63

坂本正樹、河鎮龍 (2013) 食物網を考慮したリスク評価 *環境毒性学会誌*. 16: 49-57

加茂将史、岩崎雄一 (2014) 金属の生態リスク評価を零にして今後の生態リスク評価を考える *環境毒性学会誌*. 16: 59-68

永井孝志、加茂将史(2014) 藻類に対する金属複合毒性のモデリング: Biotic Ligand Model, 濃度加算、独立作用の比較 *環境毒性学会誌* 17: 57-68

Wilmy Etwil Pelle, Masashi Kamo, Takehiko I Hayashi, Takeshi Kimura, Kohei Shimasaki, Yuji Oshima (2015) A biotic ligand model for predicting toxicity of copper to medaka (*Oryzias latipes*) *環境毒性学会誌* 18: 59-71

Takashi Nagai, Karel AC De Schampelaere (in press) The effect of binary mixtures of Zn, Cu, Cd and Ni on the growth of the freshwater diatom *Navicula peloculosa* and comparisons with mixture toxicity model predictions Environmental Toxicology and Chemistry
Kawaue, T., Nakamori, T., Iwasaki, Y., Potapov, M. (2016) Comparison of sampling methods for *Collembola* on a cobble-dominated riverbank. *Edaphologia* 98: 21-27
Jin-Yong Ha, Masashi Kamo, Masaki Sakamoto (2016) Acute toxicity of copper to *Daphnia galeata* under different magnesium and calcium conditions. *Limnology* 印刷中

[学会発表](計 25 件)

柳澤幸成, Libo Hou, 中森泰三, 金子信博, 藤井芳一, 神谷貴文, 小野恭子, 保高徹生 土壤動物の金属応答性遺伝子を用いた重金属暴露評価 日本生態学会第 60 回全国大会 2013 年 03 月 06 日~2013 年 03 月 06 日 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡市)
加茂将史, 内藤航 Overview of a project for a comprehensive ecological risk assessment of metals in Japan The Biotic Ligand Model: Technical Basis and Application for Environmental Quality Guidelines for Metals (Cu, Zn, Ni)(招待講演) 2013 年 03 月 05 日~2013 年 03 月 05 日 Hanoi, Viet Nam
Wilmy Etwil Pelle, Masashi Kamo, Takashi Kimura, Yuji Oshima Effect of cadmium on copper toxicity to Japanese medaka (*Orizyas latipes*). The 7th International Symposium on the East Asian Environmental Problem. 2013 年 11 月 13 日 Kyushu University Fukuoka (福岡市)
河鎮龍, 坂本正樹, 加茂将史 水圏生態系への重金属の影響評価: メソコスム実験と BLM (Biotic Ligand Model) 日本陸水学会 2013 年 9 月 10 日~2013 年 9 月 13 日 龍谷大学 (京都市)
河鎮龍, 坂本正樹, 加茂将史 「日本の水環境」での金属リスク評価: ミジンコ急性遊泳阻害試験とメソコスム実験 日本環境毒性学会 2013 年 9 月 7 日 東洋大学(東京都文京区)
柳澤幸成, Libo Hou, 中森泰三, 金子信博, 神谷貴文, 小野恭子, 保高徹生 生態学的特性が異なる土壤動物(ミミズとトビムシ)における重金属曝露量の比較 環境科学会 2013 年 9 月 3 日 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡市)
Hou, L.-B., Yanagisawa, Y., Yachi, S., Kaneko, N., Nakamori, T. Biomass estimation of *Folsomia candida*

(*Collembola*) using real-time polymerase chain reaction of DNA barcode. 日本土壤動物学会 2013 年 5 月 25 日 福岡教育大学 (福岡県宗像市)
柳澤幸成, Libo Hou, 中森泰三, 藤井芳一, 神谷貴文 土壤中のカドミウムの生物利用可能量と溶出特性に関する基礎的検討 第 19 回地下水・土壤汚染とその防止に関する研究集会, 2013 年 6 月 13 日 京都大学 (京都市)
加茂将史 金属評価の考え方加えて個体群評価の考え方 環境毒性学会 2013 年 9 月 8 日 東洋大学(東京都文京区)
Ha, J.Y., Kamo M. and Sakamoto M. Ecological risk assessment of waterborne copper to freshwater zooplankton community by mesocosms experiment using DGT (gel sampler) 16th International Symposium on River and Lake Environment 2014 年 8 月 24 日-2014 年 8 月 27 日, Chuncheon (South Korea)
河鎮龍, 加茂将史, 坂本正樹 硬度の違いによる銅の形態とミジンコへの毒性の関係 環境毒性学会 2014 年 9 月 10 日-2014 年 9 月 11 日 富山国際会議場 (富山市)
河鎮龍, 加茂将史, 坂本正樹 水質の違いによる金属形態とミジンコへの毒性の関係 日本陸水学会 2014 年 9 月 10 日-2014 年 9 月 13 日 つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
大浦達郎, 中野将和, Li-Bo Hou, 金子信博, 中森泰三 土壤動物において Ca イオンと Mg イオンがカドミウムによる毒性に及ぼす影響 日本整体学会 2015 年 3 月 19 日-2015 年 3 月 19 日 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
Wilmy Etwil Pelle, Masashi Kamo, Takeshi Kimura, Yohei Shimazaki, Yuji Oshima Copper toxicity test of Japanese medaka (*Orizyal latipes*) and establishment a Biotic Ligand Model 環境毒性学会 2014 年 9 月 10 日-2014 年 9 月 11 日 富山国際会議場 (富山市)
Kamo, M., Ha, J.Y., Pelle, W., Sakamoto, M., Oshima, Y. Development of BLM for Japanese Domestic Species. SETAC/NA 2014 年 11 月 9 日 Vancouver, Canada
加茂将史 Biotic Ligand Model の我が国における応用 水環境学会シンポジウム 2014 年 9 月 9 日-2014 年 9 月 9 日 滋賀県立大学 (滋賀県彦根市)
加茂将史, 沿岸水域における銅の生態リスク評価と環境管理 海洋環境研究委員会 2014 年 11 月 18 日 東京農業大学(東京都世田谷区)
保高徹生, 中村謙吾, 星鉄也, 高橋真子, 肴倉宏史 重金属等の溶出特性評価方法に関する一考察・上方流カラム試験と

環告 46 号試験の比較 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 2014 年 7 月 15 日 和歌山県民文化会館 (和歌山市)

保高徹生、中村謙吾、星鉄也、三浦俊彦、井手一貴、肴倉宏史 重金属汚染土壌の溶出特性評価・カラム試験と各種溶出試験による累積溶出用の比較 地盤工学研究集会 2014 年 7 月 15 日-2014 年 7 月 17 日 北九州国際会議場(福岡県北九州市)

永井孝志、De Schampelaere KAC, van Regenmortel T. Biotic Ligand Model を用いた日本の水質における金属の生態影響 第 21 回日本環境毒性学会 2015 年 9 月 3 日 東洋大学(東京都文京区)

- 21 Takashi Nagai, Karel AC, De Schampelaere. Mixture toxicity of zinc and copper on the growth of the diatom and comparisons with concentration additive and independent action predictions. SETAC Europe 25th Annual Meeting. Barcelona (Spain), 2015 年 5 月 3 日-2015 年 5 月 7 日

- 22 河鎮龍、加茂将史、坂本正樹 水質(硬度, pH)の違いによる銅の急性毒性への影響 カプトミジンコとオオミジンコの比較 第 21 回日本環境毒性学会 2015 年 9 月 2 日 東洋大学(東京都文京区)

- 23 保高徹生、黒澤暁彦 10 分割カラムを用いた重金属等の汚染土壌発生リスクの評価方法 第 50 回地盤工学研究発表会 2015 年 9 月 2 日 北海道科学大学 (北海道札幌市)

- 24 河鎮龍、加茂将史、坂本正樹 水質(硬度, pH)の違いによる銅の急性毒性への影響 カプトミジンコとオオミジンコの比較 日本陸水学会 2015 年 9 月 26 日-2015 年 9 月 29 日 北海道大学(北海道札幌市)

- 25 坂本正樹 ミジンコ類に対する金属毒性と水質、金属形態の関係 東洋大学生命環境科学研究センター公開シンポジウム 2015 年 11 月 28 日 東洋大学(群馬県邑楽郡板倉町)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加茂 将史 (MASASHI, Kamo)
産業技術総合研究所・安全科学研究部門・主任研究員
研究者番号：90415662

(2)研究分担者

内藤 航 (NAITO, Wataru)
産業技術総合研究所・安全科学研究部門・主任研究員
研究者番号：10357593
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・主任研究員
研究者番号：10391129
坂本 正樹 (SAKAMOTO, Masaki)
富山県立大学・工学部・講師
研究者番号：20580070
中森 泰三 (NAKAMORI, Taizo)
横浜国立大学・環境情報研究科・講師
研究者番号：50443081
保高 徹生 (YASUTAKA, Tetsuo)
産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・主任研究員
60610417
研究者番号：大嶋 雄治 (OAHIMA, Yuji)
九州大学・農学研究科・教授
研究者番号：70176874
小野 恭子 (ONO, Kyoko)
産業技術総合研究所・安全科学研究部門・主任研究員
研究者番号：90356738
林 岳彦 (HAYASHI, Takehiko)
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：90534157

(3)連携研究者

()

研究者番号：