

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360213

研究課題名(和文) 河口域での底生甲殻類の餌生物摂食に伴う重金属の生体移行性に与える溶存有機物の影響

研究課題名(英文) Effect of dissolved organic matter on dietary uptake of heavy metals by freshwater benthic crustaceans

研究代表者

中島 典之(Nakajima, Fumiya)

東京大学・工学系研究科・准教授

研究者番号：30292890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：都市周辺水域における重金属類の水生物への毒性影響を想定して、下水処理水中溶存有機物の水環境中での紫外線照射に伴う重金属の化学形態と毒性の変化に関する基礎実験を行い、元素ごとに錯形成能の増減(毒性の増減と関連)が異なることを示した。また、重金属の餌生物(藻類)への吸収過程を経た底生甲殻類カイミジンコへの毒性影響に関する用量反応関係を明らかにし、摂食による毒性も溶存重金属摂取と同程度に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on toxicity of heavy metals to aquatic organisms in urban water environment. A fundamental experiment was conducted on variation of heavy metal speciation with dissolved organic matter in domestic wastewater treatment plant effluent by UV irradiation in water environment. The result indicated that the variation of complexation characteristics by UV irradiation differed from one element to another. Dose-response relationships of dietary heavy metal uptake to benthic ostracod mortality were obtained by utilizing heavy metal contaminated green algae as food source. It suggests that the dietary exposure of heavy metals to the ostracod is of the same importance as the uptake of dissolved heavy metals in water.

研究分野：都市環境工学

キーワード：重金属 水環境 生態毒性 錯形成 底生生物

1. 研究開始当初の背景

重金属の管理については長い歴史があるが、その視点はヒトの健康影響や外観であり、水域生態系および水生生物の保全という観点ではなかった。平成15年に告示された全亜鉛の環境基準は水生生物保全を目的としたという点で画期的なものであったが、その基準値については、さまざまな点での現状の知見の不十分さを反映しており、行政施策上の現実的な妥協点に落ち着いたというべきである。例えば、化学物質が環境中でどのような化学形態を取り、水生生物にどのような影響を与えるのか、というような水質化学・毒性学的側面、また、生態系を構成する諸生物にそれぞれどのような影響が出て、その影響が定量的にどのように伝播・相殺されるのかというような生態学的な側面、さらに、それぞれの地域社会が身近な水環境における生態系としてどのようなものを求め、どのようなものを将来世代に残していくべきなのかというような社会的合意に関する検討などが、そのような不十分さの例として挙げられる。そもそも環境基本法に定めるとおり、環境基準は最新の科学的知見に基づいて常に見直されるべきものであるが、特にこの水生生物保全に関する環境基準については、多方面からより適切な目標や管理のあり方に資する知見を生み出し、蓄積していく努力が研究者に対して求められている。現在、全亜鉛に続く基準項目の検討段階に入っているが、銅・ニッケル・カドミウムについては直近の検討項目から外れている。元素の毒性については知見がありながら、依然として環境動態に関する知見が十分ではなく、適切な規制ができる見通しが立っていないと考えられる。また、規制と対策は表裏一体であるが、亜鉛に関する経済的な除去技術も確立していない。動態に関する知見は処理技術のシーズになる可能性を秘めており、単なる試験生物の生死ではない化学的側面の解析が重要である。

当研究組織では、特に水質研究に関わる者として、環境中での水質形成という側面からこの問題に貢献したいと考えた。問題意識の原点は、「全」亜鉛での管理でよいのか、ということにある。これは過剰な規制につながる可能性が極めて高いだけでなく、問題の本質をあいまいにしている。どのような場合に本当に問題が起きるのか、どういう場所で本当に問題なのか、という科学的理解を置き去りにしたまま、この基準が当然のものとして運用されていくことは避けなければならない。基準の根拠として重要な文献のひとつである Hatakeyama (1989)の論文ではあきらかにフリーの亜鉛イオンを投与しての実験であり、他の根拠論文である Nehring and Goettl (1974)では鉱山廃水で汚染された河川水を用いた実験であり、本当に亜鉛だけなのか(当時の分析技術での定量範囲で十分に把握できているのか)、その亜鉛の形態はどうであ

ったのか不明である。一方で、全亜鉛は安全側という解釈も一般に通用している。しかしながら、亜鉛が環境中に出た後にどのような形態変化をするか分からないという口実は、毒性がどう変化するかわからないということを示している。不確かな状況を改善していくための努力が必要であり、同時に亜鉛だけではなく他の金属についてはどのような対策が取られるべきなのか、例えば、亜鉛よりもより強い毒性で知られる銅は、同時に錯体を作りやすいことも知られているが、実際の環境中で、どのような起源のどのようなリガンドと錯体を作り、そのリガンドに対する他の陽イオンとの競合はどの程度なのか、水中から生物体内および底質への移行とその後の fate はどのように考えるべきなのか (aquatic exposure と dietary exposure の寄与の理解) など、環境中での水質形成に関して知るべきことは山積している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重金属類(特に亜鉛、銅、カドミウム、ニッケル)について、その水環境中での化学形態と毒性に関する理解を深め、水生生物保全に関する施策に資するようなものとするにある。全亜鉛の環境基準値の根拠となった毒性評価論文での亜鉛の形態と、実際の水環境中での亜鉛の化学種は異なるはずである。現実の場での種形成 (speciation) や重金属の fate の詳細を知ることが必要であり、そこで鍵となるのは、錯体を形成する溶存有機物の特性と、餌生物を介した変換、底質中での挙動の理解である。特に都市周辺の水域に着目し、溶存有機物との錯形成や複数の生物を介した移行特性、底質を含めた挙動について実験を行い、将来的には、水生生物保全のための基準・指標項目をより合理的にするための知見となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 底層水環境中での汚染物質の移行と生物影響評価

底生生物への曝露量評価手法の検討

有害物質の生体応答は用量反応 (dose-response) 関係で示されるが、水生生物の場合、水からの摂取量の評価が困難であるため、水中濃度と生体応答との関係で示すことが多い。底生生物では底質中濃度を用いることになるが、現実には底質の摂食/接触と水の摂取とがあり複雑な dose の評価が望ましい。本研究では摂食曝露量の評価手法を検討した。具体的には底生端脚類の二ホンドロソコエビ *Grandidierella japonica* を用いて蛍光ビーズの30分間の体内摂取量を測定する手法を試みた。

重金属類の餌生物細胞内分布の評価

底生甲殻類への重金属汚染餌による毒性影響を評価するにあたり、餌生物（緑藻類）中での重金属の細胞内分布を明らかにした。藻類用培地に重金属（亜鉛、銅）を添加して10日間培養し、細胞外のキレート剤交換画分、細胞破碎液の遠心分離非沈降画分・沈降画分の3つに分画した。なお、前2者が捕食者に移行しやすい画分であるとする先行研究がある。

底生生物の重金属類致死影響に対する曝露経路による比較

で記載した汚染藻類（種を追加）を底生甲殻類カイミジンコ *Heterocypris incongruens* に投与し、6日間での致死率を評価した。汚染レベル（藻類細胞中重金属濃度）を複数段階調製することで、餌由来曝露の dose-response 関係を明らかにした。

合わせて、非汚染藻類を餌とし、水中に重金属を添加した系（水系曝露）も試験し、曝露経路による差異を考察した。比較に当たっては、重金属汚染餌を調整した際の残存溶存態重金属濃度と、水系曝露濃度とを対応させた。

下水処理水中溶存有機物の存在による底生生物の重金属類致死影響の変化

と同様の実験を、銅汚染藻類調製時の藻類培地、およびカイミジンコ毒性試験の試験水に下水処理水を添加した系で行った。

（2）錯形成能特性評価

溶存有機物による錯形成解析手法の検討

溶存有機物の重金属錯形成に関する特性評価に、精密質量分析が可能な Orbitrap 型フーリエ変換質量分析計を利用することを試みた。有機物の前処理手法の検討と、重金属添加前後のマスマスペクトルの比較を行った。

下水処理水中溶存有機物の錯形成能と紫外線照射による変化

地上に到達する紫外線波長域の紫外線発光ダイオード（UV-LED）を用い、特定波長での溶存有機物の光変換と、それに伴う重金属錯形成能の変化について実験的に検証した。錯形成能評価にはキレート樹脂法を用いた。また、紫外線照射前後の溶存有機物の励起・蛍光スペクトルを測定し、有機物の光学的特性について調べた。

4. 研究成果

（1）底層水環境中での汚染物質の移行と生物影響評価

底生生物への曝露量評価手法の検討

底生端脚類ニホンドロソコエビの摂食量評価手法を検討した。短時間で計測可能な指標を目指し底質曝露開始1時間後に4.1 μm 蛍

光ピーズを25 mg/Lになるよう添加し、30分間ののち試験個体を回収して、体内のピーズ数を計数した。個体によるばらつきが大きく今後の更なる改善が必要であるが、ある程度の毒性傾向を検出することができた。さらにニホンドロソコエビの異なる塩分濃度下での試験法の検討を行い、毒性物質非存在下で5～35‰の範囲で致死率には統計的な有意差がないこと、摂食量については高塩分濃度（35‰）下で減少が認められることが分かった。

重金属類の餌生物細胞内分布の評価

甲殻類への餌となる藻類の細胞内重金属類分布について、緑藻 *Scenedesmus acutus* に異なる濃度の亜鉛・銅を投与して検討を行った。どちらの元素についても細胞内の超遠心分離による沈降画分の寄与が大きかったが、銅については細胞内の非沈降画分が亜鉛と比較して大きく、捕食者への食餌由来毒性影響に差異があることが推測される結果となった。

底生生物の重金属類致死影響に対する曝露経路による比較

緑藻 *Scenedesmus acutus* に加え、緑藻 *Chlorella vulgaris* を銅・亜鉛・カドミウムで汚染してカイミジンコ *Heterocypris incongruens* に投与した。これは固相由来の重金属に対する底生生物の用量反応関係という有用性の高い新規の基礎的データである。なお二種の緑藻類を用いたが、全体的にデータそのもののばらつきが大きく、種による差異は明確ではなかった。ニッケルを用いた同様の実験も実施したが、用いた濃度範囲では明確な毒性影響が認められなかった。

これらの重金属の餌由来曝露により、水系曝露と同等の致死毒性影響が示された。

下水処理水中溶存有機物の存在による底生生物の重金属類致死影響の変化

藻類の細胞内への重金属類の移行と捕食底生生物への移行性画分の評価について、下水処理水由来溶存有機物を添加した系での実験を行った。2箇所の都市下水処理水に0～1.3 mg/Lの範囲で5段階の濃度の銅を添加し、緑藻類 *Scenedesmus acutus* を10日間培養した。増殖に伴うpH上昇を緩和するためTrisバッファを添加した系も同様に実験を行った。培養末期の溶存態銅濃度と固相（藻類細胞）中銅濃度との関係は2つの下水処理水試料でほぼ同様であったが、バッファ添加により固相への移行が大きく低下した。

増殖した銅汚染藻類細胞を回収し、底生甲殻類 *Heterocypris incongruens* の餌とし投与して、6日間飼育後の致死率を定量した。餌中銅濃度と致死率との用量反応関係は、藻類培養時のバッファ添加の有無による差異よりも、下水処理水試料ごとの差異の方が顕著であった。一方の下水処理水を用いた際の用量

反応関係は下水処理水未添加時の関係とほぼ同様であったのに対し、もう一方は毒性影響が大幅に低い結果となった。この差異と、藻類細胞内の銅の分画結果との明確な関係性は認められなかった。

(2) 錯形成能特性評価

溶存有機物による錯形成解析手法の検討

異なる固相抽出カラムを組み合わせて用い、下水処理水中溶存有機物を分画する手法を確立した。EDTAによる亜鉛の錯形成については、m/z ピークのシフトを確認し、錯形成の状態を確認できた。一方、市販フミン酸に鉄と亜鉛を添加した系についても、錯形成前後のマスペクトルを比較したところ、錯形成によるピークシフトと推定される変化が観察された。錯形成特性の評価への応用のためには、測定可能な分子量に制約があることを理解した上で、下水処理水のような複雑な組成での多数の検出ピークの解釈手法の検討など今後の研究の必要性がある。

下水処理水中溶存有機物の錯形成能と紫外線照射による変化

下水処理水中溶存有機物の環境中での光反応に伴う錯形成能特性変化を、UV-LEDを用いて確認した。10 kJ/m²の線量で312 nmおよび340 nmの紫外線を下水処理水にそれぞれ照射し、照射前後の錯形成能を調べたところ、312 nmではニッケル錯形成能低下、カドミウム錯形成能上昇、340 nmではニッケル錯形成能低下、銅および亜鉛錯形成能上昇が統計的に有意であった。3次元励起蛍光分析からも波長による変化の差異が確認された。

別の時期に同一の処理場にて採取した処理水に340 nmの紫外線をより高線量(82.4 kJ/m²)で照射した場合でも、錯形成能変化の元素依存性の傾向は同様であった。

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3件)

Janice Beltran Sevilla, Fumiyuki Nakajima, Ikuro Kasuga: Comparison of aquatic and dietary exposure of heavy metals Cd, Cu and Zn to benthic ostracod *Heterocypris incongruens*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 査読有, Vol. 33, 2014, pp. 1624-1630, doi 10.1002/etc.2596

Janice Beltran Sevilla, Fumiyuki Nakajima, Kazuo Yamamoto: Effect of food and light on the sensitivity of copper and zinc of freshwater benthic ostracod *Heterocypris incongruens*, *Journal of Water and Environment Technology*, 査読有, Vol. 11, 2013, pp. 249-261, doi 10.2965/jwet.2013.249

G.G. Tushara Chaminda, Fumiyuki Nakajima, Hiroaki Furumai, Ikuro Kasuga and Futoshi Kurisu: Metal (Zn, Cu, Cd and Ni) complexation by dissolved organic matter (DOM) in waste water treatment plant effluent, *Journal of Water and Environment Technology*, 査読有, Vol. 11, 2013, pp. 153-161, doi 10.2965/jwet.2013.153

[学会発表](計14件)

Phanwatt Phungsai, Futoshi Kurisu, Ikuro Kasuga, Hiroaki Furumai: Analysis of low molecular weight dissolved organic matter in water reclamation processes by Orbitrap Mass Spectrometry, 第49回日本水環境学会年会, 2015.3.16-18, 金沢大学(石川県金沢市)

日置恭史郎, 中島典之, 飛野智宏, 山本和夫: ニホンドロソコエビを用いた底質毒性試験における人工参照底質の適用可能性, 第51回環境工学研究フォーラム, 2014.12.20-22, 山梨大学(山梨県甲府市)

倉鍵拓也, 中島典之, 飛野智宏: 紫外線照射による下水処理水中溶存有機物の重金属錯体形成能の変化, 第51回環境工学研究フォーラム, 2014.12.20-22, 山梨大学(山梨県甲府市)

Kyoshiro Hiki, Fumiyuki Nakajima: Toxicity of road dust under various salinities to an estuarine amphipod *Grandidierella japonica*, 13th International Conference on Urban Drainage, 2014.9.7-12, Kuching (Malaysia)

Janice Beltran Sevilla, Fumiyuki Nakajima, Ikuro Kasuga: Dose-response relationship of solid-phase metals to benthic ostracod *Heterocypris incongruens*, 13th International Conference on Urban Drainage, 2014.9.7-12, Kuching (Malaysia)

Kyoshiro Hiki, Fumiyuki Nakajima: Evaluation of road dust toxicity in an estuarine amphipod under various salinities based on microbead ingestion, DIPCON Asian Regional Conference in 2014, 2014.9.3-4, 京都大学(京都府京都市)

中島典之, Janice B. Sevilla, 春日郁朗: ISO底質毒性試験生物種 *Heterocypris incongruens* の致死率と餌由来重金属の用量反応関係, 第50回環境工学研究フォーラム, 2013.11.20, 北海道大学(北海道札幌市)(優秀ポスター発表賞)

中島典之: 生態系保全を考慮した水質環境について, 産業環境管理協会主催「生態系保全と水質環境保全対策に関するシンポジウム」, 2013.10.17, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)(招待講演) J.B. Sevilla, F. Nakajima and I. Kasuga: Comparison of aquatic and dietary exposure

of cadmium to benthic ostracod *Heterocypris incongruens*, 5th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, 2013.9.9, Daejeon (Korea)

Janice Beltran Sevilla, Fumiyuki Nakajima, Kazuo Yamamoto: The effect of dietary copper exposure to benthic ostracod *Heterocypris incongruens* using whole sediment toxicity test, NOVATECH 2013, 2013.6.26, Lyon (France)

Janice Beltran Sevilla, Fumiyuki Nakajima, Kazuo Yamamoto: Dietary toxicity of zinc from contaminated algae *Chlorella vulgaris* to benthic ostracod *Heterocypris incongruens*, 2013 International Environmental Engineering Conference, 2013.6.13, Seoul (Korea)

日置恭史郎, 中島典之: 異なる塩分濃度条件下でのニホンドロソコエビを用いた道路塵埃の毒性評価, 第47回日本水環境学会年会, 2013.3.11, 大阪工業大学 (大阪府大阪市)

Janice Beltran Sevilla, Fumiyuki Nakajima, Kazuo Yamamoto: Effect of dietary zinc exposure from microgreen algae *Chlorella vulgaris* to benthic ostracod *Heterocypris incongruens*, SETAC Asia Pacific 2012, 2012.9.26, 熊本全日空ホテルニュースカイ (熊本県熊本市)

G.G. Tushara Chaminda, Fumiyuki Nakajima, Hiroaki Furumai, Ikuro Kasuga and Futoshi Kurisu: Metal (Zn, Cu, Cd, Ni) complexation by dissolved organic matter (DOM) in wastewater treatment plant effluent, Water and Environment Technology Conference 2012 (WET2012), 2012.6.29, 東京大学 (東京都目黒区)

スリランカ国ルフナ大学・土木環境工学科・上級講師

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 典之 (NAKAJIMA, Fumiyuki)
東京大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号: 30292890

(2)研究分担者

春日 郁朗 (KASUGA, Ikuro)
東京大学・大学院工学系研究科・講師
研究者番号: 20431794

(3)連携研究者

Tushara Chaminda G.G