

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656313

研究課題名(和文)藻類光合成阻害試験手法の確立とリアルタイム生態毒性モニタリング評価システムの構築

研究課題名(英文)Development and Application of Algae Photosynthesis Inhibition Assay

研究代表者

清水 芳久(Shimizu, Yoshihisa)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20226260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：環境中に排出される化学物質による汚染を防ぐために、個々の化学物質を規制する方法が行われてきた。しかしながら、化学物質は現在約7,000万種類が生産・登録されており、今もなお次々と新しい化学物質が日々生み出され、使用されている。それら全ての毒性を把握し、管理するのは容易なことではない。そこで、生物を用いて排水の毒性を直接評価するWET手法の考え方が近年注目されている。本研究では、生態系の一次生産者である藻類を用いた生態毒性試験の開発を試みた。光合成阻害試験は藻類の光合成に対する影響をほぼリアルタイムに観測でき、また、1 mL以下の少ないサンプル量での試験が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：For the proper management of effluents and environmental water bodies, the evaluation of their toxicity is essential. As a variety of chemicals may be contained, it is however difficult to come up with the overall toxicity of those samples with identifying the concentration and toxicity of individual chemicals. The specific objectives of this research were set to the development and actual application of algal photosynthesis inhibition assay for the detection of whole toxicity of water samples, which requires only small volume of test solution with being one of the fast and reliable bioassays. In this research, two useful photosynthetic algae were eventually selected, its appropriate and detail methodology was investigated and developed, and its applicability was confirmed with the effluent of a municipal wastewater treatment plant and the NOM (Natural Organic Matter) of Lake Biwa in Japan and Suwanee River in USA.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：光合成阻害 藻類 生態毒性 リアルタイム モニタリング

1. 研究開始当初の背景

これまで化学物質の規制については、個別の化学物質に注目して規制を行う方法が用いられてきたが、7000万もの種類の化学物質が存在していると言われる中で、それらの化学物質に対して個別に対応するのはただ数の問題だけでなく、複数の化学物質が関係しあって生まれる複合影響や毒性が未知である化学物質について考慮することも難しい。

そんな中、近年では WET (Whole Effluent Toxicity) 手法に注目が集まっている。WET 手法は、水生生物を用いたバイオアッセイにより、排水中の様々な化学物質の影響を総合的に評価することのできる生態毒性評価の方法である。WET 手法では、複数の化学物質による複合影響を評価することも可能となる。

本研究では、WET 手法でも用いられ、OECD テストガイドラインの生態毒性試験にも含まれている藻類を用いた新しい生態毒性試験の開発とその適用を試みた。藻類を用いた生態毒性試験は、OECD テストガイドラインにも示されている藻類の増殖速度に対する影響を評価する生長阻害試験が一般的である。しかし、藻類生長阻害試験は試験期間として少なくとも 72 時間を必要としており、現場での迅速な対応が求められる水質のモニタリングには適しているとは言いがたい。そこで、本研究では藻類の光合成（電子伝達）がどれだけ阻害されたか（光合成阻害率）に基づいた生態毒性評価である光合成阻害試験方法の開発を実施した。光合成阻害試験は藻類の光合成に対する影響をほぼリアルタイムに観測でき、また、1 mL 以下の少ないサンプル量での試験が可能である。さらに、測定パルス光と飽和パルス光を用いた特殊な蛍光測定により、非常に高い精度での生態毒性評価が可能となっている。一方で、光合成阻害試験は未だ実験、解析、評価方法が確立されておらず、適用例が少ないため、試験生物や化学物質による影響の違いなども明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では以下のような目的を設定した。

- 1) 光合成阻害試験について、より感受性の高い結果が得られるように試験の手順や条件について検討を行う。

- 2) 光合成阻害試験において、結果結果の安定性に影響を与えると考えられる条件について検討試験を行い、試験の安定性を確認する。
- 3) 数種類の藻類について光合成阻害作用を持つ化学物質を用いて光合成阻害試験を行い、光合成阻害への感受性が高い藻類を絞り込み、現場における水質モニタリングシステムの適用に向けた試験に用いる。
- 4) 排水としての排出や環境水中の存在が懸念される化学物質（農薬、重金属、医薬品）などに対して光合成阻害試験を行い、その化学物質による汚染の予防としての利用可能性について検討する。
- 5) 現場での適用を想定して、光合成阻害試験を様々な環境サンプルに対して適用し、利用の可能性を検討・評価する。

3. 研究の方法

本研究では、環境バイオ社（大韓民国）の水質モニタリング装置である WEMS (Water Ecotoxicological Monitoring System: 生物監視システム)のうち、測定部が独立した PAF (Portable Algae Fluorometer) を用いて光合成阻害試験を行った。PAF における蛍光量の測定方法は、光合成色素であるクロロフィルの励起波長が 440 nm 付近、蛍光波長が 680 nm 付近に存在することを利用して行った。Reference には超純水と藻類を、Sample には検水と藻類を注入し、Sample と Reference のそれぞれに 440 nm の測定パルス光を当て、藻類が発する蛍光を 680 nm で検出する。計測は数十秒ごとに行い、得られた蛍光量を数値化し、Sample および Reference について、次式により量子収率を算出した。

毒性指標は、Sample および Reference の量子収率を用いて、光合成阻害率 (%) で表わした。

本研究では、増殖速度と、化学物質に対する感受性を考慮した結果、水質モニタリングシステムとしての光合成阻害試験に適していると考えられる淡水藻類の *C. ehrenbergii*、*C. vulgaris*、*C. moewusii* の 3 種に加えて、光合成阻害試験に推奨される藻類として非常に多く用いられている海産珪藻の *P. tricornutum* の 4 種を用いることとした。

なお、本研究に用いた上記の藻類は、

C. ehrenbergii, *C. vulgaris*, *C. moewusii* の3種については独立行政法人国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された株を、*P. tricornutum*についてはUTEX The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin から分譲された株を用いた。

4. 研究成果

(1) 試験方法の決定

光合成阻害試験方法は OECD テストガイドラインにて方法が定められている生長阻害試験とは異なり、その試験方法が定められていない。したがって、より高い感受性と精度で毒性が検出できるための試験方法の検討を行った。

光合成阻害試験を水質モニタリングシステムとして用いる際には、信頼できる結果を得るために、試験で得られる結果が安定している必要があると考えられる。したがって、本研究では光合成阻害試験の安定性についても確認を行った。その結果、各試験で得られた結果に重大な影響を及ぼすほどばらついていないことを確認し、光合成阻害試験が他の生態毒性試験に比べて非常に安定した試験であることを確認した。

(2) 光合成阻害試験の水質モニタリングシステムとしての適用性評価

環境水中に比較的高濃度で含まれていることが多く、様々な作用機序を持つ農薬のうち、植物に対して様々な作用をもつ除草剤、多くの場面で利用される反面、様々な公害の原因にもなった重金属、環境水中での分解性や生物影響の懸念が高まっている医薬品について光合成阻害試験を行い、現場での検出可能性について検討した。エンドポイントとしては、化学物質の検出という観点から考えると、低濃度において有意な光合成阻害が観測されることが重要であると考えられるため、 EC_{10} (10%影響濃度) を求めて評価を行った。

この結果、*P. tricornutum* よりも *C. moewusii* の方が低い EC_{10} の値を示した物質が多く、化学物質の検出については *C. moewusii* の方がより適していることが分かった。

下水処理水は、様々な生活過程から使用される化学物質が含まれており、放流先の河川水を汚染するおそれがある。A 処理場にて採

水した下水二次処理水試料を凍結乾燥機 (EYELA, FDU-1200) を用いて粉末状にし、100 倍濃縮になるよう超純水で溶解させた。下水試料の暴露濃度の調整は、藻類と検水の注入比を調整することにより行った。この結果から、下水二次処理水試料に対しては、*C. moewusii* よりも *P. tricornutum* の方が感受性が高いことが明らかとなった。

近年、琵琶湖をはじめ多くの湖沼において難分解性有機物の増加・蓄積現象が懸念されているが、難分解性有機物自身の生態毒性影響についてはまだ明らかにされていない。1 mL 以下の少ないサンプル量での試験を短期間で行うことができるという光合成阻害試験の特徴を利用して、濃縮した琵琶湖水およびスワニー川の NOM 試料に対して光合成阻害試験を行い、生態毒性の有無が未知である試料の生態毒性評価を行った。

琵琶湖水に関しては、*C. moewusii* では 10 倍濃縮で光合成阻害が観られ、*P. tricornutum* では 5 倍濃縮で光合成阻害が観られた。この結果より、琵琶湖水は 5 倍から 10 倍近く濃縮することで初めて光合成に対する影響が観測されることが分かった。スワニー川 NOM についても同様に、原水に近い濃度では生態毒性はほとんど観られないが、原水の数倍の濃度で藻類の光合成に対する影響が観られることが分かった。

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0件)

[学会発表](計5件)

盛田悠平、三崎健太郎、日下部武敏、清水芳久、下水処理水中溶存有機物の藻類光合成阻害試験による生態毒性評価、京都大学環境衛生工学研究会第35回シンポジウム、2013/7/25-26、京都大学百年時計台記念館

早川和秀、岡本高弘、一瀬諭、古田世子、田中仁志、三崎健太郎、日下部武敏、清水芳久、琵琶湖水中のフルボ酸の生態影響評価手法について、日本陸士学会第78回大会(大津大会)、2013/9/10-13、龍谷大学瀬田キャンパス

早川和秀、岡本高弘、一瀬諭、古田世子、田中仁志、三崎健太郎、日下部武敏、清水芳久、藤嶽暢英、琵琶湖水中のフルボ酸の生態影響評価手法について、日本腐植物質学会第9回講演会、2013/11/21-22、

佐賀大学本庄キャンパス
早川和秀、廣瀬佳則、一瀬諭、古田世子、
岡本高弘、田中仁志、三崎健太郎、日下
部武敏、清水芳久、藤嶽暢英、琵琶湖水
中のフルボ酸が藻類と甲殻類に与える
影響について、第 48 回日本水環境学会
年会、2014/3/17-19、東北大学川内キャン
パス
三崎健太郎、日下部武敏、清水芳久、琵琶
湖水の藻類光合成阻害活性評価、第
48 回日本水環境学会年会、2014/3/17-19、
東北大学川内キャンパス

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 芳久 (SHIMIZU YOSHIHISA)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20226260