

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340086

研究課題名(和文) 重金属の慢性毒性予測モデルの構築と適用性評価

研究課題名(英文) Establishment of predict model of chronic metal toxicity and its applicability

研究代表者

楠井 隆史 (Kusui, Takashi)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：60153293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：甲殻類、藻類の慢性影響におよぼす水質の影響を検討し、モデル化を検討した。甲殻類に対するニッケルの慢性毒性は硬度(カルシウム、マグネシウム)、pHの影響を受けることが明らかになった。モデルを構築し、実排水の結果を予測したが、EC50は3倍以内の誤差で予測できたが、EC20は誤差が大きかった。藻類にニッケルの慢性毒性は硬度(マグネシウム)、pHの影響を検討し、甲殻類同様の影響を受けることが明らかとなった。暴露中のNiの存在形態の変化、甲殻類・藻類のNi蓄積量と影響の関連についても検討した。

研究成果の概要(英文)：The effect of water quality on the chronic toxicity to crustacean and algae was studied and the model of this effect was established. The chronic toxicity of nickel to crustaceans was affected by hardness (calcium, magnesium) and pH. A model was constructed and the result of actual industrial effluents was predicted. EC 50 could be predicted with an error within 3 times, but EC 20 had a large error. Chronic toxicity of nickel to algae was also modified by hardness (magnesium) and pH in the same way as crustacean. Changes in the chemical form of Ni during exposure and the relationship between accumulated Ni in crustacean and algae and chronic effect were discussed.

研究分野：環境工学

キーワード：生態影響 重金属 甲殻類 藻類

1. 研究開始当初の背景

微量化学物質を含んだ事業場排水の影響を評価するために、わが国において全排水毒性の導入が検討されている。その試験法として OECD ガイドラインなどに準拠した短期慢性毒性試験三種（藻類、甲殻類、魚類）が提案されている（2013年3月）。しかし、多くの事業場排水に含有される重金属の毒性要因となる場合、生物利用可能性が共存する物質の影響を受けることが知られている。また、毒性試験においては培地中の成分（EDTA、緩衝能など）により金属の存在形態が変化し毒性が変化することが予想される。重金属の存在形態については、化学平衡計算ソフトなどを用いて推定可能であり、また、水中に存在する「生物利用可能な金属」をキレート樹脂などを用いて測定した結果との比較が報告されている（永井ら、2007）。さらにこうした要因を考慮して重金属の毒性を予測する BLM (Biotic Ligand Model) が Di Taro ら(2001)により提唱されている。しかし、本モデルは魚の鰓への金属の結合をシミュレートしているためその適用は Cu,Zn,Ni などの急性毒性に限定されている。現在では事業所排水による激甚な水質汚濁はなくなる一方、生物多様性の保全の観点から、慢性影響の防止に重点が移行しており、効果的に慢性影響を予測する技術が求められている。

2. 研究の目的

本研究においては、事業所排水などに含まれる重金属の慢性影響を予測する BLM をベースとした予測モデルの適用可能性を評価することを目的とする。具体的には、重金属の中でも事業所排水に毒性レベルで検出される Ni を対象とした。なお、対象生物種は藻類と甲殻類とした。

第一段階では、重金属溶液をモデル排水として、甲殻類繁殖阻害試験、藻類性著阻害試験を行う。あわせて、キレート樹脂などを用いて試験溶液中の遊離イオンの重金属濃度、生物への蓄積量（体内負荷量）を測定し、化学種形態予測ソフトとの予測結果と比較しながら、各試験の無影響濃度（NOEC または EC_x）を算出する。第二段階では、金属溶液の共存成分（硬度、有機物）および pH を操作して同様の実験を実施し、NOEC または EC_x を算出し、各因子の影響を検討する。モデルへの適用（パラメーターの設定）を試みる。第三段階では、実事業所排水をモデル排水とし、既知量の重金属を添加し、NOEC（または EC_x）を求め、モデルと予測値との比較を行う。

3. 研究の方法

カナダ環境省ガイドラインに準拠し、ニセコゼミジンコを用いた甲殻類繁殖試験を行った。ニッケルは塩化ニッケル六水和物（NiCl₂・6H₂O）を用いて対照区（Control）及び 5 濃度区（Ni : 1, 2, 4, 8, 16 μg/L）を用いた。水換えは 2 日ごとに行い、餌はクロレラ、セレナ及び YCT を用いて毎日与えた。最大無影響濃度（NOEC）及び影響濃度（X% Effect Concentration : EC_x）を日本環境毒性学会から配布されているソフトウェア（EcoTox-Statistics Version 2.615）を用いて算出した。

飼育水にカルシウム濃度（12.5, 25, 50mg/L 添加）、マグネシウム濃度（12.5, 25, 50mg/L 添加）及び pH（6, 7, 8, 9）を変化させ、それぞれの毒性（NOEC、EC_x）の変化を調べた。H6 と 7 の試験では 750mg/L の MOPS、pH8 と 9 の試験は 0.1mM の四ホウ酸ナトリウムを緩衝剤として用いた。

藻類成長阻害試験はムレミカズキモを用いた。pH、硬度の影響は甲殻類と同様の方法で行った。

試験溶液中の金属分布形態を明らかにするため、暴露前後の溶液を ICP-MS を用いて分析した。暴露後の水には固形物（主に餌の藻類）が含まれるため、0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したろ液を分析した。生物蓄積量を評価するために、甲殻類や藻類に蓄積・吸着したニッケルの測定も行った。

4. 研究成果

4.1 甲殻類の慢性毒性に及ぼす硬度の影響

ニッケルの毒性値（NOEC、EC₂₀、EC₅₀）はカルシウム濃度及びマグネシウム濃度があがるにつれて上昇し、毒性の緩和が認められる（図 1）。この緩和現象は急性毒性と同じ傾向である。BLM 理論では、生物リガンドへの結合において、ニッケル（Ni²⁺）と陽イオン（Ca²⁺、Mg²⁺）が競合し、毒性が減少したと説明される。慢性毒性の場合、毒性の作用機序が異なるが、同様の競合効果が作用したと推定される。

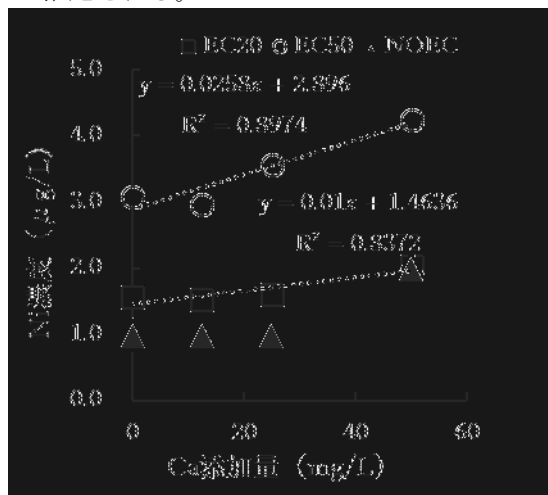


図 1 Ca が Ni 慢性毒性値に与える影響

4.2 甲殻類の慢性毒性に及ぼす pH の影響

pH と毒性値の関係を図-2 に示す。通常慢性値として用いられる NOEC で見た場合は値が離散的であるが、全般的には pH 増加とともに NOEC が増加する傾向（毒性が緩和する傾向）が認められる。慢性値と同等に用いられる EC20（20%阻害濃度）で評価すると、この傾向は明らかである。化学種予測ソフト Visual MINTEQ を用いて pH 別のニッケルの存在形態を予測した結果を図-3 に示す。pH が高いほどフリーイオン Ni^{2+} の割合が減少する。したがって毒性に関与する Ni^{2+} が減少するため、pH が高いほど毒性が緩和されるという結果と一致していた。

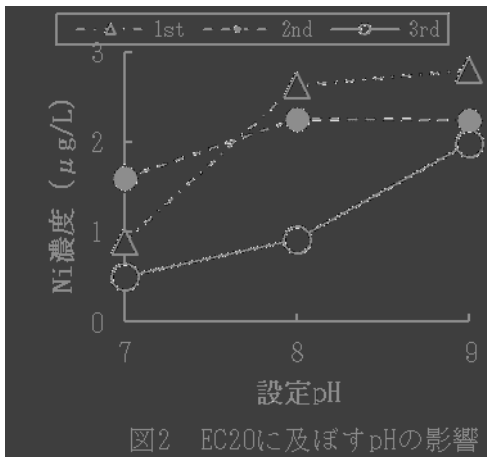


図2 EC20に及ぼすpHの影響

こうした pH による存在形態の違いを、実測で把握するためにキレート樹脂を用いて行った。しかし、全 pH においてキレート樹脂で回収された Ni^{2+} とソフトによる予測値を上回った。キレート樹脂で金属イオンを回収する際には、pH を 5.5 に調整すると回収率が最大になるとされており、この操作により試料中のニッケルの存在形態が変化し、実測値が予測値を上回った可能性がある。

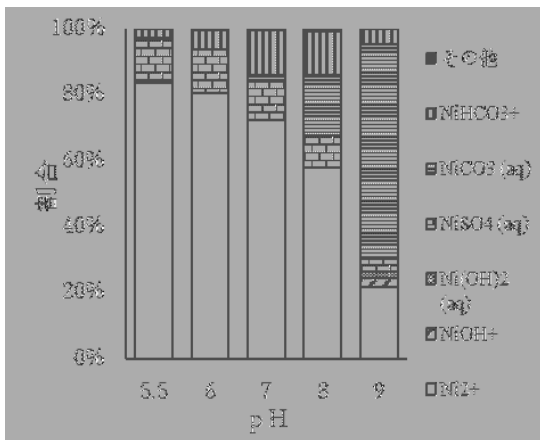


図-3 pH別のニッケルの存在形態（予測値）

4.3 暴露時のニッケル濃度の挙動

懸濁態へ金属が吸着することが確認できたため、溶液内のニッケル濃度の変化を調べ

た。設定濃度 $16 \mu\text{g/L}$ でミジンコのみを曝露したもの、餌（クロレラ+YCT）のみを曝露したものを用意し、ニッケル濃度を測定した。餌のみを曝露した試験水のニッケル濃度が減少し、ミジンコのみを曝露した試験水のニッケル濃度はあまり変化していないことがわかる。餌を入れてすぐにニッケル濃度が約 34%、1 日後で約 65%、2 日後で約 80% 減少することがわかった。ミジンコはニッケルを餌の摂取及び体表面との接触による吸収の両方が同時に作用して影響を受けていることがわかった。

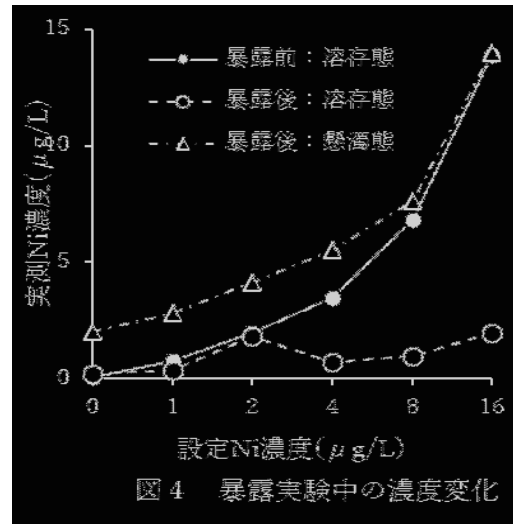


図4 暴露実験中の濃度変化

ミジンコのニッケルの蓄積量 (ng/頭) と毒性影響の関係を図 5 に示す。ニッケル蓄積量が高くなるにつれ死亡率が上がり、産仔数が減少した。蓄積量が 0.4ng-Ni/頭 を超えると有意な産仔数の減少をもたらした。しかし、同様の分析を他の試験で実施したが、必ずしも図に示すような設定濃度増加に伴い蓄積量が増加する傾向が認められない事例もあった。微量の蓄積量のため、溶液の残りやコンタミなどの影響が分析に影響を与えた可能性が推察された。そのため、正確な蓄積量の定量は今後の課題として、実測蓄積量と影響との関連についての検討は行わなかった。

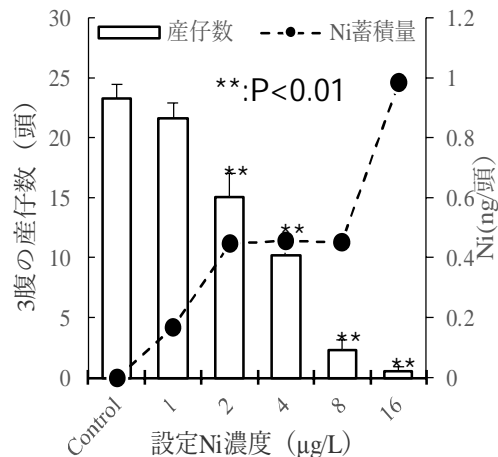


図5 ニッケル蓄積量と慢性影響

4.4 モデルによる予測

実験結果で得られた硬度、pH から予測式を求めた。EC20 は pH の影響を軽微と考え、硬度の影響のみを考慮した。一方、EC50 の場合は、カルシウム、マグネシウム、pH の影響を考慮したモデルを作成した。ニッケルが主要因子として甲殻類に毒性が認めらる3 実事業場排水の慢性毒性試験の結果に適用し、排水中のニッケル毒性値を予測し、実測値と比較した。EC50 は3 倍以内の誤差で予測できたが、EC20 は誤差が大きかった。

pH を考慮した EC50 モデルは pH を考慮しなかった EC20 モデルより誤差が少なかった。さらに、今回のモデルでは有機物による毒性の影響は考慮していないが、さらに有機物の影響を加味するばモデルの予測精度が向上する可能性がある。

4.4 藻類の生長阻害に及ぼす pH, Mg の影響

pH6~9 における Ni の影響濃度 (EC10, EC50) の変化を図6 に示す。ばらつきがあるが pH 増加により毒性値の上昇傾向 (毒性の緩和) が認められる。また、OECD 培地中の Mg 濃度 (2.88 mg/L) を基準に、Mg 濃度を2 倍、4 倍に増加した場合、EC10、EC50 とも増加する傾向が認められた。これは甲殻類への Ni の慢性毒性に対する pH、硬度の影響と同様に、生物リガンドへの結合の陽イオン (Ni²⁺ と Mg²⁺) の競合、Ni の存在形態の変化など影響が推察される。

甲殻類の体内蓄積量同様、藻類に蓄積 (摂取) された Ni が影響を与えている可能性がある。そこで、藻類に吸着した Ni 量との関連を検討した。EDTA により脱着が可能な Ni (表面結合 Ni) との関連を検討した。バラツキがあるものの、いずれも表面結合 Ni が約 10 fg Ni/cell を超過すると阻害率が増加する傾向が認められた。これは表面結合金属が甲殻類などの「体内負荷量」の指標として有用である可能性を示唆したものであり、今後の水質との関連で研究が必要である。

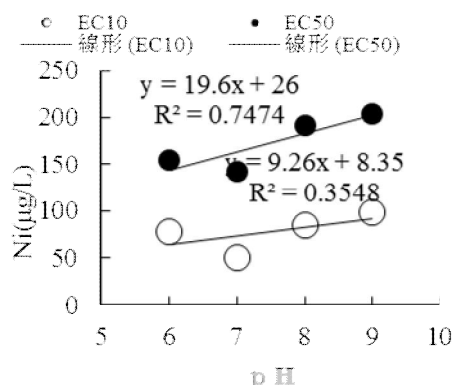


図6 pHの影響

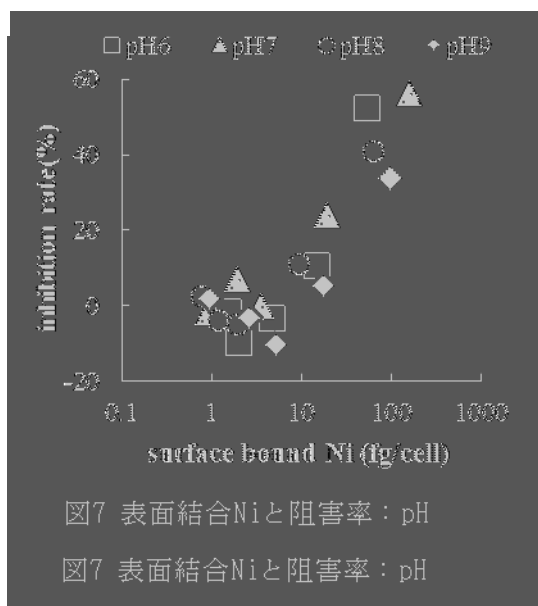


図7 表面結合Niと阻害率：pH

図7 表面結合Niと阻害率：pH

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 6 件)

- ① 平尾昇生、楠井隆史、甲殻類のニッケル慢性毒性試験における経口摂取の寄与の検討、第51回日本水環境学会年次講演会、2017.
- ② 森永健斗、楠井隆史、水質変化に伴う金属の甲殻類への慢性毒性の挙動、第50回日本水環境学会年次講演会、2016.
- ③ Yating Yu, Jun Jin, Tomohiro Yamazaki, Takashi Kusui, Effect of Water Parameters on Toxicity of Ni: Toward a BLM (Biotic Ligand Model) for Algae, 第49回日本水環境学会年次講演会、2015.
- ④ 山崎友裕、楠井隆史、ニッケルの慢性毒性に与える水質の影響、第49回日本水環境学会年次講演会、2015.
- ⑤ 山崎友裕、余雅婷、板津靖之、金俊、楠井隆史、水質がミジンコの慢性毒性へ与える影響、第20回日本環境毒性学会研究発表会、2014.
- ⑥ 余雅婷、山崎友裕、板津靖之、金俊、楠井隆史、水質が藻類の慢性毒性に与える影響、第20回日本環境毒性学会研究発表会、2014.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

楠井 隆史 (KUSUI, Takashi)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：60153293