

10. 水環境中の化学物質が及ぼす生態影響に関する研究

水循環研究グループ水質チーム

上席研究員	鈴木 穰
主任研究員	小森行也
主任研究員	宮島 潔
専門研究員	山下尚之

1. はじめに

近年、産業活動の拡大発展に伴い、様々な化学物質が広範囲に使用されており、排水や河川水中にも多種多様な化学物質が存在することが明らかになっている。下水処理水からも環境ホルモン様物質等に代表される様々な化学物質の存在が報告されており^{1,2)}、その生物への影響が懸念される。このことから、水環境中に放出された化学物質が、水域に生息する生物にどのような影響を与えるかを明らかにすることは重要である。

化学物質による生態系への影響を探る学問分野としては、生態毒性学 (Ecotoxicology) がある。これは、生態学 (Ecology) と毒性学 (Toxicology) を組み合わせた造語であり、一般的には、「生態系における毒性のある物質の運命と生態系への影響に関する研究」と定義されている³⁾。欧米では、生態毒性関連の研究は盛んに行われており、研究者の数も多く層も厚い。我が国において、生態毒性の研究者は少数ではあるが、農村地帯の河川水、下水、廃棄物浸出水等に関していくつかの報告がなされている^{4,9)}。畠山らは、つくば市とその周辺を流れる農村地帯の河川水について、水生生物への影響を調べている^{4,5)}。採取した河川水について、藻類および甲殻類の試験を実施した結果、試験水中の *Selenastrum capricornutum* の増殖阻害は5月初旬から始まり、5月中旬にはほぼ完全に増殖が阻害されたこと、阻害の原因は除草剤の影響であったことを報告している。また、その河川水をヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) に曝露した結果、ヌカエビの死亡率は、5月中旬から6月上旬にかけて高く、この原因はこの時期に散布された殺菌剤、殺虫剤の影響であることを報告している。また、松原らは、マイクロトックス、藻類、カエル胚を用いて、下水および環境水について毒性試験を実施している⁷⁾。その結果、マイクロトックス、藻類、カエル胚試験とも、流入下水からは毒性を検出しているが、その毒性は、下水の生物処理後には検出されなくなったことを報告している。一方、下水処理において、生物処理後の塩素添加量が多い処理場については、マイクロトックスおよび藻類による試験で毒性が上昇する可能性があることを報告している。

本調査は、水環境中の化学物質が及ぼす生態影響について明らかにすることを目的としている。本年度は、環境中に放出された医薬品類が及ぼす生態影響を明らかにすることを目的としてバイオアッセイを実施した。医薬品類としては、抗生物質のレボフロキサシンおよびクラリスロマイシンを取り上げた。抗生物質は、その利用上細菌を殺すようにデザインされているため、抗生物質が河川などの水域に放流された場合には、放流水域に生息する水生生物に影響を及ぼす可能性がある。本調査では、日本において販売量の多い抗生物質であるレボフロキサシンおよびクラリスロマイシンを取り上げて藻類生長阻害試験を実施し、抗生物質の水生生態系への影響に関して考察を加えた。

2. 試験方法

2.1 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験の供試藻類としては、緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35) を用いた。*P. subcapitata* は、藻類培養用の AAP 培地¹⁰⁾ を用いて継代培養を行い、植え継ぎ後 3~5 日経過した対数増殖期のものを試験に用いた。試験では、継代培養を行っている *P. subcapitata* を滅菌した濃度 15mg/L の

NaHCO₃溶液で洗い、培地成分を除いた後に使用した。

藻類生長阻害試験については、Blaiseらの方法^{11,12)}を参考にして、マイクロプレートを用いて実施した。マイクロプレートの各ウェルには、200 μ Lのサンプルと20 μ Lの*P. subcapitata*細胞懸濁液および20 μ Lの培地を入れ、培養温度24 $^{\circ}$ C、120rpmの振とう条件で96時間培養を行った。光条件は、照度4000Luxの連続照射とし、藻類の初期細胞濃度は1 \times 10⁴ cells/mLとした。培養期間中、マイクロプレートリーダー(Wallac社製、ARVO SX-1420)を用いて吸光度(波長450nm)を測定し、藻類増殖量をモニタリングした。藻類生長曲線下の面積から、コントロールと比較した場合の藻類生長阻害率を算出した。

2.2 試薬等

藻類生長阻害試験については、抗生物質のレボフロキサシン(LVFX)およびクラリスロマイシン(CAM)について実施した。それぞれの化学構造式を図-1に示す。試験用の試薬としては、LVFX(Laboratories INC, 純度90.2%)については精製水, CAM(和光純薬, 純度90%以上)についてはジメチルスルホキシド(和光純薬製生化学用, DMSO)に溶かして標準溶液を作成した。LVFXは水に比較的良好に溶けるが、CAMを精製水に溶かしたところ、ほとんど溶解しなかったため、標準物質をDMSOに溶解させた。LVFX, CAMそれぞれについて、2倍希釈の希釈系列を作成し、藻類生長阻害試験を実施した。

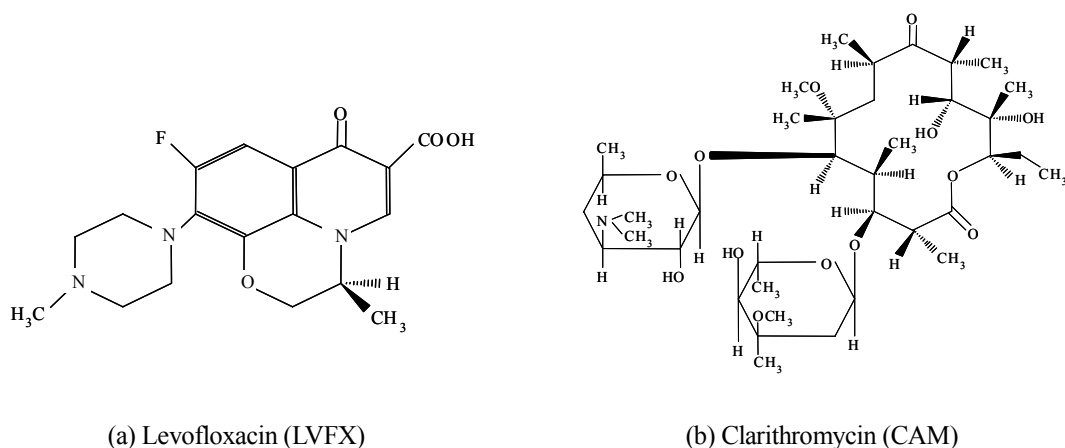


図-1 レボフロキサシン(LVFX)およびクラリスロマイシン(CAM)の化学構造式

3. 結果および考察

3.1 LVFX および CAM に関する藻類生長阻害試験

図-2にLVFXおよびCAMに関する藻類生長阻害試験の結果を示す。LVFXについては、630 μ g/L以上の濃度で藻類の生長阻害が観察され、2,500 μ g/L以上の濃度ではほぼ100%の阻害率となった。一方、CAMでは6.3 μ g/L以上の濃度で阻害が見られ、25 μ g/L以上の濃度ではほぼ100%の阻害率となり、藻類の増殖が観察されなかった。LVFXのEC₅₀, LOECおよびNOECは、それぞれ1,200 μ g/L, 630 μ g/L, 310 μ g/Lであった。同様にCAMのEC₅₀, LOECおよびNOECは、それぞれ11 μ g/L, 6.3 μ g/L, 3.1 μ g/Lであった(表-1)。両者のEC₅₀を比較するとCAMはLVFXの100倍程度であり、CAMはLVFXに比べて毒性が高かった。

ウキクサ毒性試験によるLVFXの湿重量から見た生長阻害およびChl.aから見た光合成阻害のEC₅₀は、それぞれ185 μ g/L, 942 μ g/Lと報告されている¹³⁾。これらのEC₅₀は、本研究の藻類生長阻害のEC₅₀と比較

して低濃度で毒性が認められているが、その原因としては、藻類とウキクサの感受性の違いなどが考えられる。また、両者のEC50に差があることは、異なった種での生態影響試験の必要性を示唆している。

また、オクタノール水分配係数とEC50の間には関連があり、両者の間には負の相関があることが知られている¹⁴⁾。即ち、オクタノール水分配係数の値が大きいものほど、その毒性が高くなる傾向がある。これは、化学物質の細胞膜への透過性が毒性の発現に大きく関わっていることを示している。LVFX, CAMのオクタノール水分配係数はそれぞれ0.553, 7.18であり¹⁵⁾、この性質の違いから、物質の細胞膜への透過性が大きく異なってくることになり、両者の毒性に差が出た可能性が考えられる。

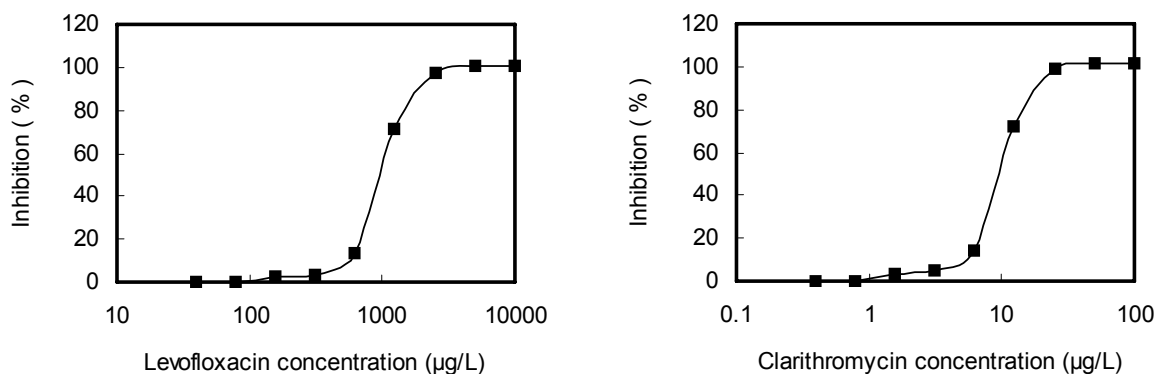


図-2 レボフロキサシン(LVFX)およびクラリスロマイシン(CAM)に関する藻類生長阻害試験結果

表-1 レボフロキサシン(LVFX)およびクラリスロマイシン(CAM)に関するEC50, LOEC, NOEC (µg/L)

Substance	EC50	LOEC	NOEC
Levofloxacin	1,200	630	310
Clarithromycin	11.0	6.3	3.1

3.2 LVFXおよびCAMによる水生生物への影響評価

下水道には、生活排水が流れ込むことから、各家庭から排出された抗生物質が流入すると推察される。流入した抗生物質が下水道で十分に処理しきれずに河川等に放流された場合、水環境の汚染が懸念される。日本国内にある5ヶ所の下水処理場を対象として2次処理水の分析を行ったところ、処理水からLVFXおよびCAMが検出された¹⁶⁾。図-3にその分析結果を示す。分析の結果、LVFXは152~323 ng/L, CAMは303~567 ng/Lの濃度範囲で検出された(図-3)。

検出されたLVFXおよびCAMの濃度レベルが、放流先河川の水生生態系に与える影響について、藻類生長阻害試験の結果より評価を行った。まず、*P. subcapitata*に対する2次処理水で検出されたLVFX, CAMの影響を把握するために、NOECとLOECの幾何平均により求めた無影響濃度(No-Effect Concentration: NEC)と検出濃度を比較した。LVFX, CAMのNECはそれぞれ440 µg/L, 4.4 µg/Lであり、検出濃度に比べて十分に高いことからLVFX, CAMともに影響無しと判断される。また、NOECを藻類の種間の安全係数10で除して藻類への影響を評価すると、LVFXは影響無し、CAMは希釈倍率2倍以下で影響有りと判

断される。

さらに、生態リスクの初期評価¹⁷⁾を行った。予測無影響濃度 (Predicted No-Effect Concentration: PNEC) については、藻類、甲殻類、魚類のうち1~2種の生物群の結果しか得られていないため、安全係数は100¹⁷⁾を用いた。安全係数100でNOECを除するとLVFX、CAMのPNECはそれぞれ3,100 ng/L、31 ng/Lとなる。予測環境中濃度 (Predicted Environmental Concentration: PEC) については、実測値をあてはめることができないため、調査した下水処理場の放流先での希釈倍率を考慮したPECを考えた。その結果、最大濃度のLVFX (323 ng/L) については希釈倍率に関わらずPECはPNECより小さくなった。また、最大濃度のCAM (567 ng/L) については、希釈倍率20倍以上でなければPECがPNECより大きくなる。ハザード比PEC/PNECを考えると、LVFXについてはリスク無し、CAMについては放流先河川での希釈倍率によってはリスク有りと判定される。一方、CAMのオクタノール水分配係数は7.18であり、生物濃縮の可能性もあることから、水生生物への影響を考慮した場合、CAMは注目すべき物質であると考えられる。

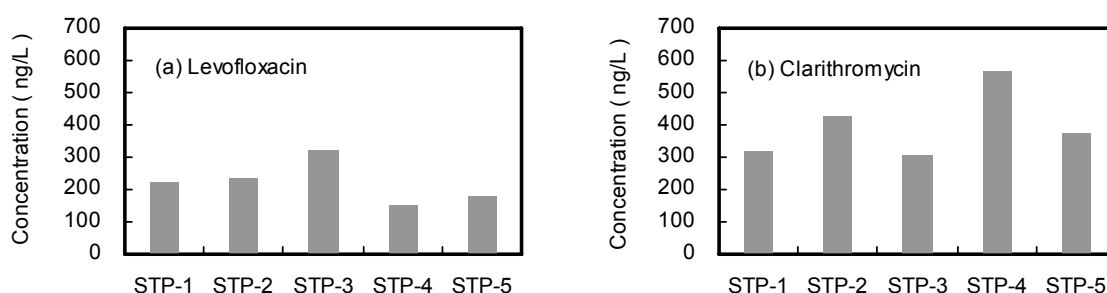


図-3 下水2次処理水中のレボフロキサシン(LVFX)およびクラリスロマイシン(CAM)濃度¹⁶⁾

4. まとめ

本調査は、環境中に放出された医薬品類が及ぼす生態影響を明らかにすることを目的としてバイオアッセイを実施した。医薬品類としては、抗生物質 LVFX および CAM を取り上げて藻類生長阻害試験を実施し、抗生物質の水生生態系への影響に関して考察を加えた。

その結果、LVFX の EC50, LOEC および NOEC は、それぞれ 1,200 µg/L, 630 µg/L, 310 µg/L となり、CAM の EC50, LOEC および NOEC は、それぞれ 11 µg/L, 6.3 µg/L, 3.1 µg/L となった。両者の EC50 を比較すると CAM は LVFX の 100 倍程度であり、CAM は LVFX に比べて毒性が高かった。また、LVFX および CAM に関して生態リスク評価を行ったところ、LVFX についてはリスク無し、CAM については放流先河川での希釈倍率によってはリスク有りと判定された。これらの結果から、水生生物への影響を考慮した場合、CAM は注目すべき物質であると考えられた。

<参考文献>

- 1) 田中宏明：水環境における内分泌攪乱化学物質の実態調査，水環境学会誌，22，629-632，1999
- 2) 田中宏明，小森行也，岡安祐司：下水道における微量化学物質の評価に関する調査，平成14年度下水道関係調査研究年次報告書集，129-132，2002
- 3) 若林明子：化学物質と生態影響，p.1，丸善，2003
- 4) 畠山成久，白石寛明，浜田篤信：霞ヶ浦水系河川のヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) 生物試験による農薬毒性の季節変動，水質汚濁研究，14，460-468，1991

- 5) 畠山成久, 福嶋悟, 笠井文絵, 白石寛明 : 河川の藻類生産に及ぼす除草剤の影響評価, 陸水学雑誌, 53, 327-340, 1992
- 6) Okamura, H., Omori, M., Luo, R., Aoyama, I., Liu, D. : Application of short-term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land runoff, *Sci. Total Environ.*, 234, 223-231, 1999
- 7) 松原正明, 原田新, 田中宏明 : 藻類増殖阻害試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試験への適用, 水環境学会誌, 20, 768-775, 1997
- 8) 岡村秀雄, 青山勲, 羅榮, D. Liu, G. Persoone : 産業廃棄物埋立地浸出水の生態毒性評価および毒性のキャラクター化, 環境毒性学会誌, 1, 43-50, 1998
- 9) 岡村秀美, 豊田智子, 市川大介, 吉本祥子, 岡村秀雄, 井上雄三, 毛利紫乃, 山田正人, 国本学 : 藻類増殖阻害試験の簡易化と埋立処分場浸出水の有害性評価への適用, 水環境学会誌, 765-768, 26, 2003
- 10) 日本下水道協会 : AGP 試験, 下水試験方法 上巻 (1997年版), 554-562, 1997
- 11) Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., Van Coillie, R., Vasseur, P. : A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, *Toxicity Assessment*, 1, 261-281, 1986
- 12) St-laurent, D., Blaise, C., Macquarrie, P., Scroggins, R., Trottier, B. : Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedure, *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 7, 35-48, 1992
- 13) Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R.: Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 371-382, 2004
- 14) 菊池幹夫 : 藻類生長阻害試験によるいくつかのゴルフ場農薬の毒性評価, 水環境学会誌, 16, 704-710, 1993
- 15) 医療薬学研究会 : 2004年版薬剤師のための常用医薬品情報集, 1253pp, 廣川書店, 東京, 2003
- 16) 八十島誠, 山下尚之, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明 : 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン, クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響, 水環境学会誌, 11, 707-714, 2004
- 17) 日本環境毒性学会 : 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー, pp.318, 朝倉書店, 東京, 2003