

## VII. 測量及び試験費による研究

# 1. 河川試料に適した原虫測定方法の開発

独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループリサイクル 上席研究員 鈴木 稔

研究員 北村 友一

## 1. はじめに

水系の微生物学的安全性を評価するためには、河川水中のクリプトスポリジウムの存在を確認することが重要である。特に、河川水が水道水源や親水として利用されている場合は、ヒトに対して重大な健康影響を及ぼす可能性がある。注意勧告などのクリプトスポリジウム対策を迅速に行うためには、河川水中のクリプトスポリジウムを常にモニタリングする必要があるが、クリプトスポリジウムの高感度測定方法は確立されていない。そこで、本研究では、河川水中のクリプトスポリジウムの濃縮、回収方法の検討と検出された原虫がクリプトスポリジウムであることを確定するための遺伝子検査方法を開発することを目的としている。

本年度は、河川水中のクリプトスポリジウムオーシストの濃縮法を検討した。

## 2. 実験方法

河川水中のオーシストの濃縮法をポリカーボネートフィルター法、カートリッジフィルター法、遠心浮遊法の3種類から検討した。濃縮液からのオーシストの回収は、免疫磁気ビーズ（DYNAL社製）法に統一し、各濃縮法は、添加回収実験から評価した。

### 2.1 ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験の方法

河川水約1Lに約1000個のオーシストを添加し、ポリカーボネートフィルター（ワットマン製サイクロポアメンブレン：孔径2 $\mu$ m）でオーシストを捕捉濃縮した。その後、フィルターから超音波でオーシストを剥離し、免疫磁気ビーズ法によりオーシストを回収した。回収したオーシストは顕微鏡観察により計数し、オーシストの回収率を調べた。

### 2.2 カートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の方法

オーシストの濃縮にカートリッジフィルターを使用すると、大水量（20～100L）の河川水を短時間でろ過でき、本法はオーシスト濃度の低い河川水からのオーシストの濃縮に有効であると考えられる。そこで、オーシストの濃縮にカートリッジフィルターを使用した場合の、回収率を調査した。

カートリッジフィルターは、IDEXX社製のFilter Maxを使用した。河川水20Lにオーシストを700個程度添加し、ペリスタポンプを用いてカートリッジフィルターに加圧ろ過した。ろ過後、カートリッジフィルターからフィルターを取り外し、界面活性剤添加リン酸緩衝液（以下溶出液という）中にフィルターを浸透し、攪拌操作によりフィルターからオーシストを剥離させた。その後、溶出液中のオーシストを遠心分離（2500rpm、10分間、ブレーキ解除）により濃縮した。その後、免疫磁気ビーズ法によりオーシストを回収し、顕微鏡観察から回収されたオーシストの個数を計数し、回収率を算出した。

### 2.3 遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の方法

遠心浮遊法によりどの程度オーシストが回収できるかを調査した。試験操作は次のとおりである。河川水4.2Lにオーシストを2000個程度添加し、この河川水を遠心分離（2500rpm、10分間、ブレーキ解除）し、沈査を残し、上澄み液を吸引除去した。沈査を50ml容量のチューブに移し、溶出液を加え試験管ミキサーを用いて攪拌し、沈査を十分に分散した。分散した沈査は、比重1.10のパーコール蔗糖液が入っているチューブに積層し、1050G、10分、ブレーキ解除の条件で遠心浮遊分離を行った。遠心浮遊分離終了後、チューブ

中の上澄み液および界面相の全量と界面下 5ml を別の 50ml チューブに移した。採取した試料に精製水を加え、50ml までメスアップし、試験管ミキサーにかけ攪拌し、その後、遠心分離（1050G、10 分、ブレーキ解除）を行い、沈査を残し、上澄み液を除去した。その後、免疫磁気ビーズ法によりオーシストを回収し、顕微鏡観察から回収されたオーシストの個数を計数した。

### 3. 実験結果

#### 3.1 ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果

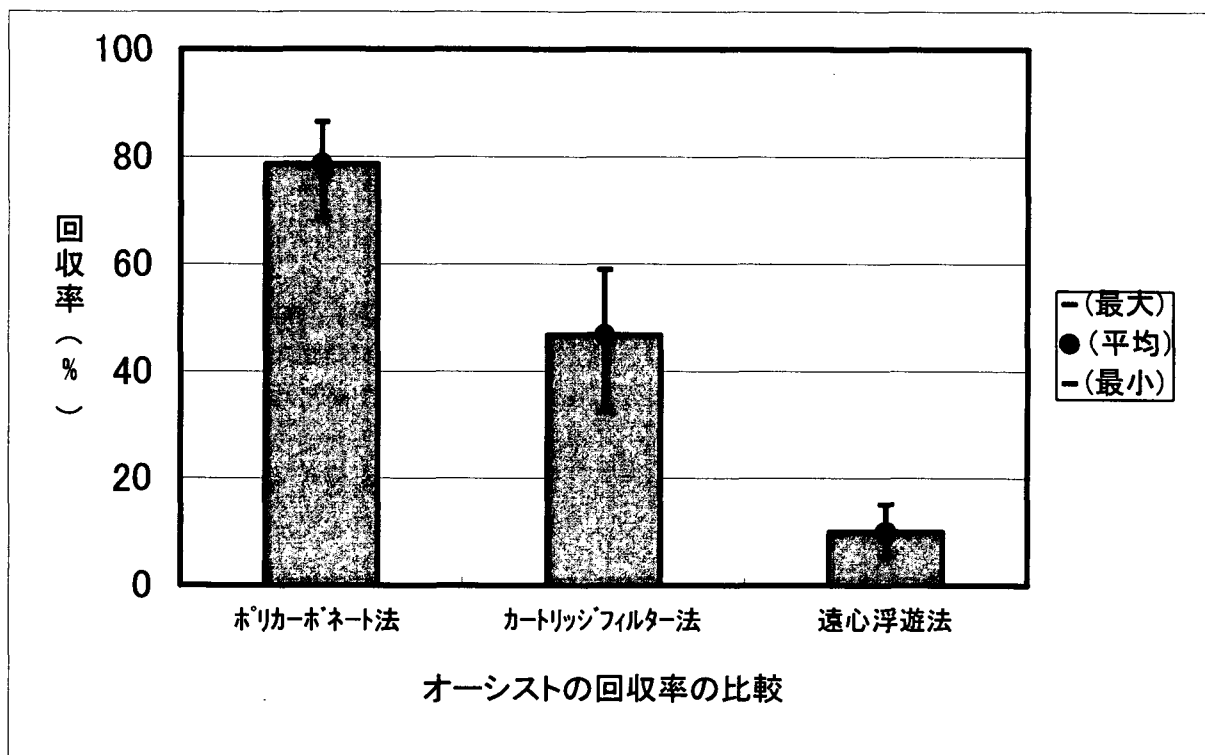
1 枚のポリカーボネートフィルターで 1000ml 程度の河川水をろ過することができた。本法のオーシストの回収率は 78.6% であった。ろ過水量を増加したい場合は、フィルターの使用枚数を増加することで対応可能である。

#### 3.2 カートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果

カートリッジフィルター法は、1 個のフィルターで河川水 20L 以上ろ過することができた。オーシストの回収率は、46.7% であった。ろ過可能量が多いことから試料の夾雑物が多い場合や検水量が多い場合には適していると考えられる。

#### 3.3 遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の結果

本法のオーシストの回収率は 10.0% と低かった。本法は河川水中のオーシストの検出には適していないことがわかった。



### 4. まとめ

河川水からのオーシストの回収率をポリカーボネートフィルター法、カートリッジフィルター法、遠心浮遊法により比較した結果、ポリカーボネートフィルター法の回収率が 80% と最も高かった。このことから、ポリカーボネートフィルター法を河川水からのオーシストの濃縮法に採用した。来年度は、回収した原虫を同定するための遺伝子解析法の検討を行う。

## 2. 河川水中のエストロゲン様物質に関する調査

水循環研究グループ水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
 研究員 玉本 博之  
 交流研究員 宮本 宣博

### 1. はじめに

国土交通省ではいわゆる環境ホルモン問題に対して、河川における実態を把握することを目的に全国109の一級河川において環境ホルモン物質の実態調査を行っている。環境中には人間活動に由来する多くの化学物質が存在すると考えられるが、実態調査において測定対象としている化学物質の種類は限られたものであり、またこれらが複合的に作用した場合の生物影響については考慮されていない。

エストロゲン様活性を総合的に把握するための *In vitro* の方法としては、乳がん細胞を使用する方法<sup>1)</sup> や遺伝子操作によりを測定する機構を組み込んだ酵母菌(組み換え酵母)を測定する方法<sup>2) 3)</sup> 等が報告されている。操作が簡易なこと、毒性物質に対する耐性が高いこと等の特徴から、組み換え酵母を用いた方法によってエストロゲン活性の前処理方法の検討、河川水への適応を検討してきた。13年度は全国一級河川においてエストロゲン様活性の測定を行い、全国一級河川におけるエストロゲン様活性の実態を整理した。

### 2. 調査方法

平成13年度に実施した国土交通省の河川における内分泌攪乱化学物質実態調査(秋期)の際に採取された106試料を用いた。河川水は固相抽出法により処理し、エストロゲン様物質を抽出した。操作フローを図-1に示す。

エストロゲン活性の測定に用いた酵母には、ヒトの女性ホルモン受容体合成遺伝子、エストロゲン様物質と結合し活性化した女性ホルモン受容体により酵素β-ガラクトシダーゼを合成するプラスミド等が遺伝子操作により組み込まれており、試料のエストロゲン活性を酵素の生成量として測定することができる。測定は Sumpter らの方法<sup>3)</sup> を改良した矢古宇らの方法<sup>5)</sup> に従った。

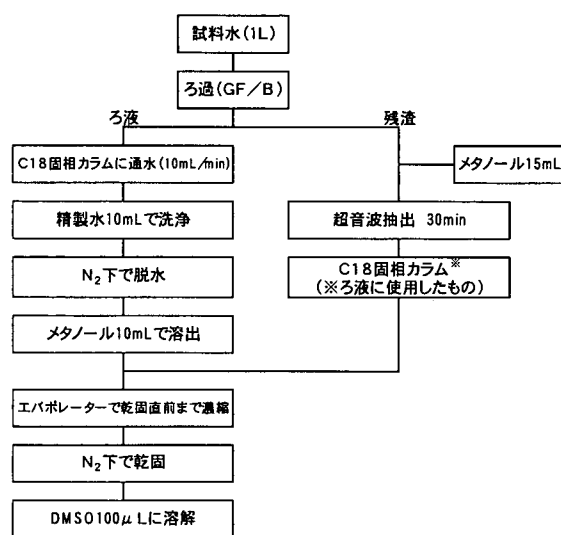


図-1 試料の前処理方法

### 3. 結果及び考察

全国一級河川106水系122地点でエストロゲン様活性の一斉調査を行い、類型毎のエストロゲン様活性の把握を行った。その分布状況を図-2に、類型別の基礎統計資料を表-1に示す。

この結果、類型がC、D、Eの水質汚濁の高い河川になるとエストロゲン様活性は高くなる傾向が確認されたが、A-B類型間、B-C類型間では類型の差(t-検定, 有意水準5%)では確認できなかった。一方、A-C類型については有意な差(t-検定, 有意水準5%)が確認されたが、明瞭な差とは言えないレベルであった。また本年の全地点の平均値は0.5ng/Lであり、平成11年、12年の平均値(H11:0.4ng/L, H12:0.8ng/L)とほぼ同じ結果であった。

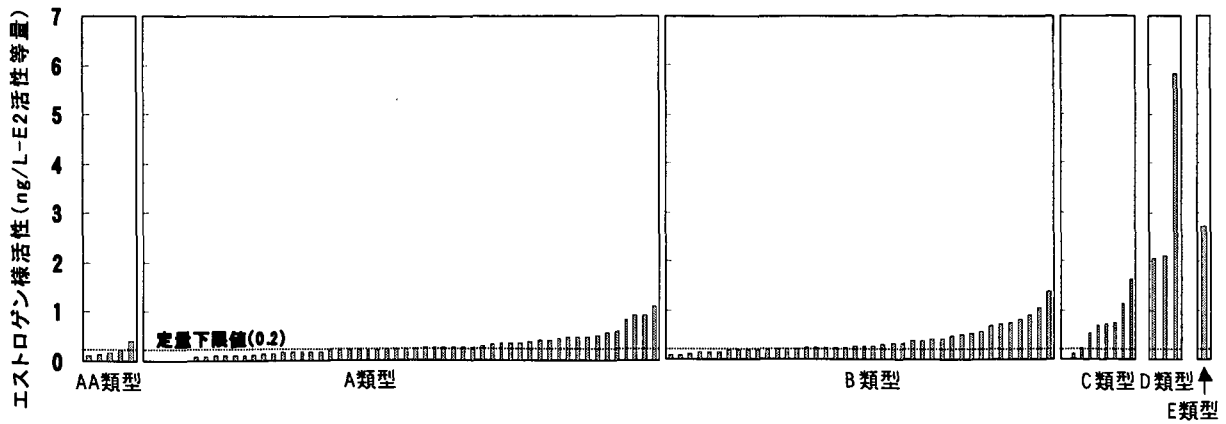


図-2 全国1級河川におけるエストロゲン様活性の類型別分布

表-1 類型別エストロゲン様活性の比較

	エストロゲン様活性(ng/L-E2活性等量)						全体
	AA	A	B	C	D	E	
試料数	5	54	40	9	3	1	112
最小値	0.2	0.2	0.2	0.2	2.1	-	0.2
最大値	0.4	1.1	1.4	1.7	5.8	-	5.8
平均値	0.2	0.3	0.4	0.7	3.3	2.7*	0.5
中央値	0.2	0.2	0.3	0.7	2.1	-	0.3

\*:E類型は試料数が1検体のため平均値の欄に結果を示した。

エストロゲン様活性が高かった地点は、過去調査時における検出濃度も高く、定期的なエストロゲン活性の測定、原因物質の検討および生物影響の調査等を行う必要性が高いと考えられる。

本調査により、環境基準が最も高いA A類型に指定されている河川においても、定量下限以下のレベルではあるがエストロゲン様活性が検出されていることが確認された。このことは、都市排水の影響のほとんど考慮されない水域での、エストロゲン様物質の存在を示しており、国内一級河川に存在するエストロゲン様活性が、下水処理水等の排水由来のものだけではなく、農地などに用いられている農薬等による可能性が示唆された。

今後は、エストロゲン様活性の成分分析手法を組み合わせることで、遺伝子組み換え酵母法で検出されているエストロゲン様活性の特性と由来を確認していく必要があるものと考えられる。

#### <参考文献>

- 1) Soto, A.M. et al; The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives.*, Vol. 103, 113-122, 1995.
- 2) Sumpter, J.P et al; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol.15, No.3, 241-248, 1996.
- 3) H. Takigami et al.; Detection of Estrogen-like Activity In Sewage Treatment Process Waters, *Environ. Sanit. Eng. Res.*, Vol. 12, No.3, 214-219, 1998.
- 4) 田中宏明, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 東谷忠, 斉藤正義: 河川水中のエストロゲン様物質に関する調査, 土木研究所資料 第3755号 平成11年度下水道関係調査研究年次報告書集, 305-306, 2000.
- 5) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol.36, 199-204, 1999.

### 3. 底泥—水間の物質移動に関する調査

水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
研究員 佐々木 稔

#### 1. はじめに

流域からの汚濁負荷の他に、底質からの汚染物質の溶出が水質改善の遅れの原因となっており、また、底質の改善の遅れが水質の他にも棲息する生物環境にも影響を与えている。効果的な底泥の対策を立てるため、また、将来の水質を予測するために、底質に含まれる栄養塩類等の汚染物質の変化機構を解明し、底泥が水質に与える影響を評価する手法の確立が求められている。本調査は対象物質として栄養塩類を中心とし、底泥からの溶出機構の解明、底泥からの溶出量推定のための試験法の提案、底泥が水質に与える影響の推定方法の提案を行うものである。

平成13年度は、試料として渡良瀬貯水池の底泥を採取、アクリル製カラム及びコニカルチューブを用いた嫌気条件での室内静置溶出試験を実施し、底泥直上水や間隙水中の栄養塩濃度の変化から、温度や試験容器内の底泥充填厚等の試験条件と溶出量の関係について調査を行った。

#### 2. 調査の内容

##### 2.1 採泥及び採取底泥の均質化

試験に用いた底泥は、栃木県下都賀郡の渡良瀬貯水池南ブロックのほぼ中心で、エクマンバージュ型採泥器を用いて採取を行った。採取した底泥は現地で観測（結果は表-1）を行った後、保冷状態で速やかに持ち帰り試験に供した。

今回調査においては、複数容器に封入して条件を変えて試験を行うことから、底泥試料間の差異を極力減ずるために底泥試料の均質化操作を行った。均質化操作は50Lポリバケツにいた底泥試料を攪拌機を用いて混合攪拌、攪拌の後に2mmメッシュのふるいを通して固形夾雑物を取り除くという手順で行った。

表-1 採泥時の観測結果

水深	1.42m
底泥の温度	10.5℃
気温	13.6℃
色相	黒褐色
臭気	腐敗土臭

##### 2.2 静置溶出による溶出速度試験

アクリルカラムは下側をゴム栓で塞ぎ、底泥を厚さ約30cm及び15cmとなるように3本ずつ計6本充填、直上水として窒素曝気によりほぼ無酸素状態とした蒸留水を壁面伝いに満水となるまで静かに注入、注入後に初期水質分析用の直上水を採取した後に、上側開口部をゴム栓で塞ぎ嫌気状態となるよう密閉、溶出試験に供した(図-1)。カラムは全て20℃恒温室内に静置し、3日後、7日後、14日後に泥厚の異なるカラムそれぞれ1本ずつを空け、直上水はサイホンを用いて底泥を巻き上げないように注意しながらほぼ全量を抜き取りGF/Bろ紙でろ過したものを分析試料とし、底泥は採水後に下面から採取、それぞれ分析を行った。底泥間隙水については、底泥試料を10,000rpmで10分間の遠心分離にかけた後、上澄み液をGF/Bろ紙でろ過したものを間

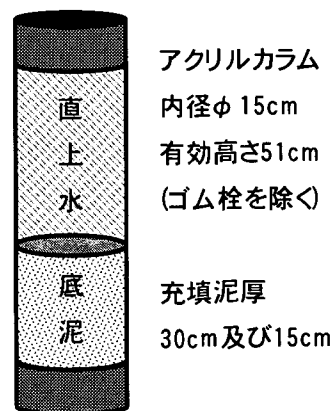


図-1 アクリルカラム

隙水試料とし、分析に供した。

直上水への各水質項目の溶出速度と充填した泥厚との関係を図-2～図-5に示す。泥厚を30cmとした場合の溶出速度と同15cmの場合の溶出結果にはカラム毎のバラツキがあり、有意な差はみられなかった。このバラツキが生じた原因は、試験中のカラムの目視観測から、底泥封入時のカラム内壁面への付着による誤差が生じたものと推察された。また、 $\text{NO}_x\text{-N}$ と $\text{NH}_4\text{-N}$ との濃度の推移と試験期間中の気泡の発生状況より、カラム内で脱窒が起こり直上水中の窒素各態項目の濃度変化に影響を与えている可能性が推察された。

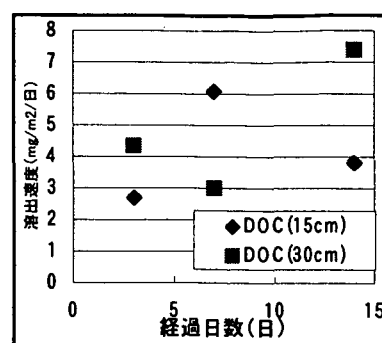


図-2 DOC溶出速度と泥厚

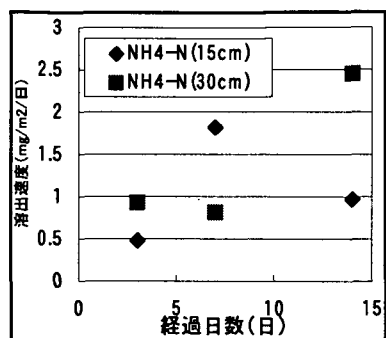


図-3  $\text{NH}_4\text{-N}$ 溶出速度と泥厚

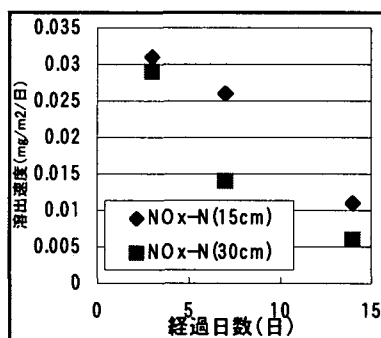


図-4  $\text{NO}_x\text{-N}$ 溶出速度と泥厚

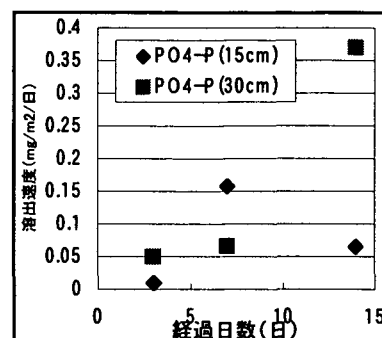


図-5  $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出速度と泥厚

### 2.3 間隙水中の栄養塩濃度変化に温度が与える影響

溶出試験に用いた同じ底泥試料を50gずつコニカルチューブに密封、10℃及び20℃の恒温室内で嫌気条件下での底泥間隙水中の栄養塩濃度変化を調べる試験を実施した。溶出試験同様に3日、7日、14日経過後の底泥間隙水の水質を分析した結果、 $\text{PO}_4\text{-P}$ は14日後まで一貫して20℃条件で10℃条件のほぼ倍の溶出がみられた。 $\text{NO}_x\text{-N}$ は3日及び7日経過時点では20℃条件の溶出量が10℃条件より多かったが、14日経過時点では差はみられなかった。 $\text{NH}_4\text{-N}$ に関しては濃度変化があまりみられず、日数、温度条件ともに溶出量との相関が明確には顕れなかった。

### 3. まとめ

平成13年度は、試料として渡良瀬貯水池の底泥を採取、アクリル製カラムやコニカルチューブを用いた室内溶出試験を実施し、底泥直上水や間隙水中の栄養塩濃度の変化を調査した。嫌気条件下で行った試験下での直上水の窒素濃度変動には、溶出だけでなく脱窒も影響を与えている可能性が推察された。また、試験容器内の充填泥厚に関しては、15cmと30cmで溶出速度に明確な差を観測することができなかった。

今後は、様々な試験条件下での溶出試験を実施し、栄養塩類の溶出量推定に有効な試験条件を整理するとともに、センサー類による連続的なモニタリングを併用した溶出試験を実施することで、溶出機構を解明する必要があると考えられる。

### 参考文献

- 1) 天野邦彦、李建華、木幡邦男、安田佳哉、鈴木宏幸、浅い貯水池における底泥からの栄養塩溶出の評価、土木学会第55回年次学術講演会講演概要集、第7部、pp.236-237、2000
- 2) Jianhua Li, K. Amano and Y. Yasuda, An experimental study of sediment resuspension effects on the phosphate release from sediment into water column., The 4th International Symposium on Sediment Quality Assessment, pp.104-106, 2000

## 4. 水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究

水循環研究グループ水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
 研究員 玉本 博之  
 交流研究員 宮本 宣博

### 1. はじめに

環境保全を目的とした下水道事業や河川整備が水生生態系に及ぼす影響は、河川水量等の物理的な要因については把握されているものの、水質等の質的な関係についての調査事例は少なくほとんど把握されていない。この理由として、従来の河川と水生生態系に関する知見は、河床材料、河床構造、及び河川水量等の物理的な要因について精力的におこなわれた研究に関するものであり、水質と水生生態系との関係については汚濁の進んだ河川で主に BOD との関係が過去に研究された程度となっていることが挙げられる。

この質的關係の把握のためには、水質等の変動が激しい都市部の河川を調査対象河川に選定し、そこに生息している水生生物と水質との関係についての基礎的情報を収集する必要がある。本調査では、下水処理水等の河川への放流に伴いその上下流域で空間的な水質の分布差が明確に生じている多摩川水系多摩大橋付近に焦点を当て、都市河川の水質と水生生物との関係を把握することを試みた。これに合わせて、都市型河川の影響因子として、水質、有機物量、栄養塩類等を選定し、これに伴う付着藻類、底生生物等の量と多様性等との関連性についても調査を行うこととした。平成13年度は、平成12年度調査に引き続き、下水処理場からの放流水を含む排水が放流先河川に流入した際の、水質混合特性の把握を行った。

### 2. 調査地区の概況

多摩大橋地区は、多摩川を挟んで右岸側の八王子市、左岸側の昭島市に接した約 2600m の区間である。この地区の上流には羽村取水堰があり、多摩川から水道原水として東京都東村山浄水場などに取水している他、下流域については約  $2\text{m}^3/\text{s}$  の流量を水質浄化対策として放流している。多摩大橋地区に、さらに秋川の加わった流量が多摩川本川となりこの地区に到達している。

多摩大橋地区の特徴は、この地区の上流域には大規模な下水処理施設がなく、この地区で初めて下水処理場からの放流水が排水樋管を經由して多摩川本川に流入し、河川流量だけでなく栄養塩類等の河川水質も大きく変化している地点であることがあげられる。本調査区域における現地調査は9月、及び翌年2月に実施し、下水処理水が多摩川河川に合流した際の混合状況を水質測定結果から把握するとともに、河川水中の栄養塩類等がどの程度の変化しているかを把握することとした。

### 3. 調査地点及び調査項目

調査地点の概略図を図-1に示す。調査地点として今回6ヶ所を選定した。下水処理場(A処理場)からの放流水を含む排水樋管の出口(St.2)、さらにこの流入に伴う多摩川本川の水質変化、混合状況を把握するため下流方向に4ヶ所の調査地点を設定した(St.3~St.6)。なお、St.3~St.6における本川合流点からの距離は、概ね100m(St.3)、500m(St.4)、800m(St.5)、1400m(St.6)である。St.4の下流からはB処理場からの放流水が排水樋管を經由して流入してくる。対照地点として、St.2より上流域の地点、St.1を設定した。

調査項目は、水深、流速(電磁流速計)の他に水質項目として、水温、pH、電気伝導度(現場測定)、CODMn、TOC、アン

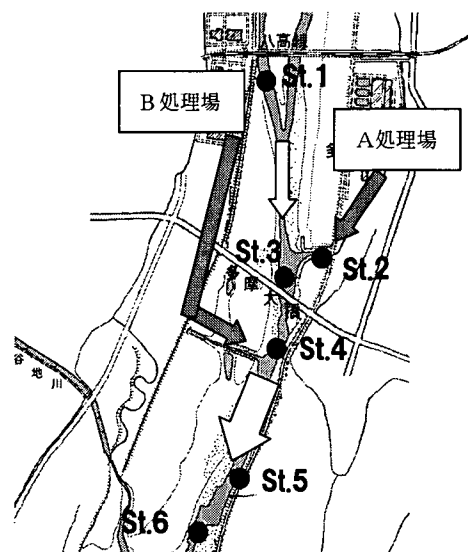


図-1 調査地点の概略図



モニア態窒素 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ )、亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ )、硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )、オルトリン酸態リン ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) である。

#### 4. 調査結果及び考察

##### 4.1 各調査地点の混合状況

調査の結果、A 処理場の下水処理水は St.2 の排水樋管を經由して多摩川本川に流入しているが、St.2 からの排水は多摩川本川に流入後直ちに混合しているわけではなく、さらに下流の St.3 (St.2 から約 100m 下流) 及び St.4 (St.2 から約 500m 下流) においても、余り混合されない状態であることが、横断面の水質分布から分かった (図-2)。St.4 までは、水温、栄養塩類濃度、電気伝導度等、殆どの水質項目において下水処理場 (A 処理場) からの放流水流入側である左岸側の値が高く、右岸側と比較すると大きな差が生じていた。また、これらの左右岸の差は、河川の水温の低下する冬期に顕著であり左右岸の水塊は殆ど混合されない状態となるため、本川の中央部付近で急激な栄養塩類濃度、電気伝導度等の濃度勾配を形成していた。この勾配は、流況や水温によって大きく異なっていることも確認された。

この St.4 よりもさらに約 900m 下流の St.6 (St.2 から約 1400m 下流) では、栄養塩類、電気伝導度は概ね横断方向に見ても左右岸に差はなく均一に混合していることが確認できた。このことから、多摩大橋付近にある 2 つの下水処理場 (A、B 処理場) の放流水はこの St.6 地点で多摩川本川と十分混合しているものと判断できた。

##### 4.2 混合特性の把握

詳細に水質測定結果を見ると測定項目によっては、St.2 で見られたパターンとは異なる濃度勾配が生じていることが確認できた。St.6 (St.2 から約 1400m 下流) では、9 月調査の右岸側、2 月調査時では左岸側でアンモニア性窒素が横断的に見ると高い傾向であった。9 月調査時に右岸側のアンモニア性窒素が高くなっているケースでは、排水樋管を經由して流入する B 処理場の放流水が右岸側上流から流入していることが要因と考えられた。

また St.6 の左岸側では、2 月にアンモニア性窒素が高くなったケースが見られた。これは排水量が少ないものの、St.6 の直上流地点にある排水樋管の影響であると考えられた。これらの結果は、排水量の少ない樋管からの流入負荷によっても、測定している水質項目によってはその下流地点で影響を受け、左右岸で濃度勾配が確認されるケースがあることを示唆している。

今回の調査で明らかになった点としては、都市排水が河川に流入した場合、均一化されるまでかなりの距離が必要であることであり、その混合状況は流況や季節によって大きく変化することが今回の調査結果から確認された。

<本研究の一部は、河川生態学術研究会の総合的な調査研究の一環として実施されたものである。>

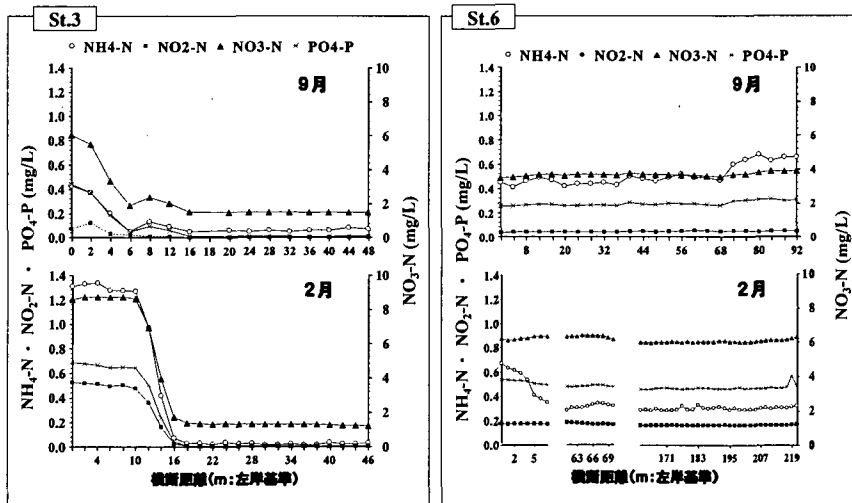


図-2 St.3、St.6地点における各態窒素・リンの横断分布

表-1 St.1、St.2、St.4、St.5地点における各態窒素・リンの調査結果

	St.1		St.2		St.4		St.5	
	9月	2月	9月	2月	9月	2月	9月	2月
$\text{NH}_4\text{-N}$	0.07	0.03	2.27	1.43	3.44	0.32	0.68	5.02
$\text{NO}_2\text{-N}$	<0.01	<0.01	0.10	0.32	0.17	0.08	0.02	0.01
$\text{NO}_3\text{-N}$	1.52	1.31	7.27	7.69	8.75	15.07	1.61	0.18
$\text{PO}_4\text{-P}$	0.01	0.01	0.74	0.61	1.53	1.59	0.20	1.09

## 5. 水環境の評価に関する調査

水循環研究グループ水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
研究員 玉本 博之  
交流研究員 宮本 宣博

### 1. はじめに

河川の流域から都市排水や農業排水等が河川へ流入するに伴い、排水中の内分泌攪乱化学物質によるヒトや生態系への影響が懸念されている。特に、河川水中に存在するこれらの化学物質が魚類等の水生生物に及ぼす影響の把握が求められている。

平成10年度から国土交通省（旧建設省）が実施した内分泌攪乱化学物質に関する魚類実態調査の結果では<sup>1~4)</sup>、ピテロジェニン（VTG；雌特異的な卵黄タンパク前駆物質）を合成している雄コイが河川に生息していることが確認されたため、河川のエストロゲン様物質によって魚類の雌性化が生じているものと考えられた。しかし、コイは履歴（養殖魚の放流）や移動性、体内での生理的な反応など不明確な要素が残されているため、雌性化を引き起こした影響要因の把握には至っていない。

河川における魚類の雌性化についてその要因を特定するには、①河川において魚類曝露試験を行い雌性化が発生するか否かを判定する、②雌性化を発生させた河川水を詳細に調べて原因物質を特定する、さらに③その疑わしい物質を用いた室内での魚類曝露試験を実施して最小作用濃度を明らかにすることが必要である。とくに河川での魚類曝露試験では、性状変化のない新鮮な河川水を用いることが必要となる。

そこで本試験では、水質自動監視所を活用して新鮮な河川水を用いる魚類試験装置の検討を行い、魚類試験を実施した。また、この試験結果から魚類曝露試験法を確立するための課題を抽出した。

### 2. 方法

#### 2.1 試験実施場所

新鮮な河川水を手でできる施設として、河川水質自動監視所が考えられた。自動監視所では、大型ポンプで河川水を汲み上げ水質自動測定装置に通水している。この河川水を分岐して魚類曝露水槽に導水することで、新鮮な河川水を用いた流水式の試験が可能と考えられた。

#### 2.2 試験対象魚

本試験では、土木研究所水質チームが継代飼育しているd-rR系メダカを用いることとした。メダカは卵発生の日目から性分化が始まるので、雌性化に関する研究では卵から曝露することが重要であり、卵から性成熟まで（およそ3ヶ月）を試験期間と設定した。

#### 2.3 生物指標

魚類の雌性化を判定する指標（バイオマーカー）として、この分野の一般的な研究では雄魚のピテロジェニン（VTG）が用いられている。VTGはエストロゲン（雌性ホルモン）あるいはエストロゲン様物質が肝臓のエストロゲン受容体に結合することによって肝臓で合成される卵黄タンパク前駆物質であり、雌では卵黄に蓄積されるが、雄では血中に滞留する<sup>5)</sup>。本試験でも雄メダカのVTGを影響指標とし<sup>6)</sup>、この測定はメダカVTG-ELISAキットを用いることとした。

#### 2.4 河川水のエストロゲン濃度

メダカの雌性化を引き起こす可能性のある物質として、天然エストロゲン及びエストロゲン様化学物質があげられる。本試験では、前者のうち17β-エストラジオール(E2)、エストロン(E1)を、後者のうちノニルフェノール(NP)、ノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)、ノニルフェノキシ酢酸(NPnEC)を対象とし

て、河川水に含まれるこれらの濃度を明らかにすることとした。さらに、エストロゲン様作用の総合的な強度を確認するため、Sumpter株<sup>7)</sup>を用いた組換え酵母法によるエストロゲン様活性を測定することとした。

## 2.5 魚類曝露試験の試験条件

一般に、魚類曝露試験では水温、流量、光周期（日長）、餌などの試験条件を制御することによって、水質による魚類への影響を判断することが可能であり、河川水の影響をみる場合にも、試験条件の制御可能な曝露装置が必要となる。一方、河川における生息環境を反映させた試験を実施することも可能である。

本試験では、餌は河川水とともに供給される藻類を用い、さらに、夏期の試験であるため水温の調節は行わないなど、当該監視所付近の河川の状況が反映される試験とした。

試験条件を表-1に示す。

表-1 河川水質自動監視所でのメダカ曝露試験 条件一覧

試験魚	d-rR系メダカ
試験個体数	100卵/区 ・5つの腰高シャーレに20卵ずつ入れ、水槽に静置する。
試験期間	胚体形成（受精後24時間）から性成熟まで ・メダカの性分化は受精後約4日から始まり、孵化後約2週間で完了するため、胚発生期から試験する。
試験水	河川水、流水式
流量	孵化後2週間まで：0.6L/min（10mL/s） これ以後：2.4L/min（40mL/s）
試験温度	室温26℃
日長条件	16時間－明、8時間－暗
餌	河川水とともに流入する藻類

## 2.6 曝露水槽

メダカを曝露する水槽は、市販の現場設置型ガラス水槽を利用することとした。水槽の概要を図-1に、また写真を写真-1に示す。

水槽のサイズは、縦400mm、横250mm、深さ200mmであり、有効水深140mmであることから、容積は20Lである。河川水はステンレスメッシュで砂泥を除去し曝露水槽へ供給した。

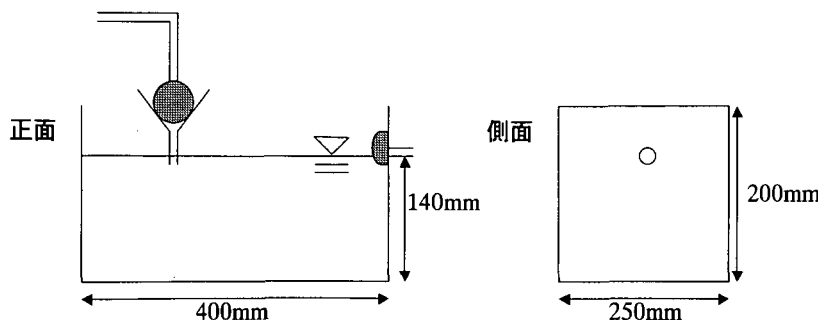


図-1 メダカ曝露水槽 模式図

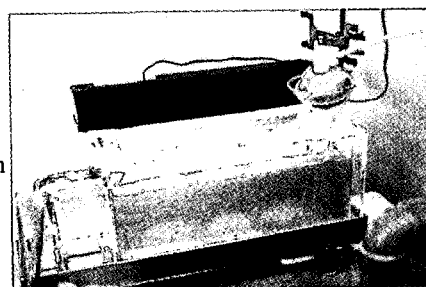


写真-1 メダカ曝露水槽

### 3. 試験結果及び考察

平成13年夏期にメダカ曝露試験を実施した。その結果、卵の孵化率は70%であり、稚魚は若干死亡する個体があったものの曝露試験を継続することができた。しかし、餌の供給が止まったため、3ヶ月の曝露飼育で体長10～22mmであり、成長は遅い傾向がみられた。

試験結果の一覧を表-2に示す。

VTGを測定した結果、雄のVTG生成は確認できなかった。雌のVTG生成も3個体で確認されたのみであり、性成熟に至るまでにはなお時間が必要であると考えられた。全国の河川実態調査の水質データ<sup>1-4)</sup>を参考に今回の水質測定結果をみると、この河川水のエストロゲン様作用は高いとは考えられなかった。

表-2 メダカ曝露試験結果 一覧表

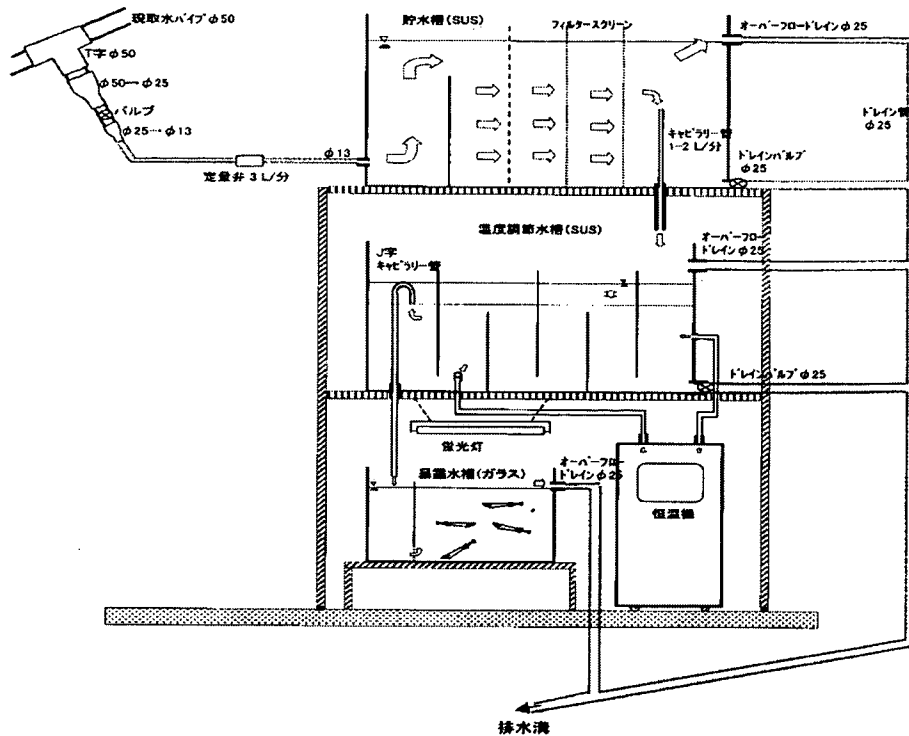
メダカ曝露試験結果			
最終個体数	雄21匹、雌20匹、不明3匹 (3ヶ月経過後)		
VTG測定結果	<0.4 $\mu$ g/g-wet : 雄21匹、雌17匹、不明3匹 0.4～1.0 $\mu$ g/g-wet : 雌2匹 1.0～10.0 $\mu$ g/g-wet : 雌1匹		
水質試験結果 ( $\mu$ g/L)	7月第1週	8月第1週	9月第1週
17 $\beta$ -エストラジオール(E2)	<0.00001	<0.00001	—
エストロン	0.00013	0.00025	—
ノルフェノール	0.07	0.06	0.17
ノルフェノールエキスレート	0.51	0.18	0.91
ノルフェノキシ酢酸	2.67	0.66	2.18
エストロゲン様活性(E2活性等量)	0.00023	0.00017	0.00071

### 4. 魚類曝露試験を確立するための課題

本試験の結果、魚類曝露試験を確立するため下記のとおり課題を抽出した<sup>8)</sup>。

- (1) 監視所によって取水状況（ポンプ稼動時間帯、取水量）が異なっていた。また、水位低下などによってポンプが停止し、取水が行われない場合があった。このため、どのような取水状況にも対応できる魚類試験装置を設計する必要があると考えられた。
- (2) 河川水とともに流入する砂泥が予想以上に多く、これが目詰まりの原因となった。砂泥の除去方法に工夫を要すると考えられた。
- (3) 予備通水では藻類の過剰供給が確認されたため、今回の試験では、この流入を抑えつつ一部を餌にすることとした。しかし、試験開始後はまったく藻類が供給されなかったため、メダカを順調に飼育することが不可能であった。今後の試験では、試験条件として餌を明確に定め、その種類や給餌量を規定する必要があると考えられた。
- (4) 本試験では水温や餌を規定せず河川の状況を反映させる試験とした。今後はこれらの条件を含めすべての曝露条件を統一し、水質自動監視所間で試験結果の比較検討が可能となるように試験法を確立すべきと考えられた。

また、これらの課題をもとに新たな魚類曝露試験装置を考案した。この曝露装置は3つの水槽から成り立っており、第1槽で砂泥の除去、第2槽で水温調節を行い、第3槽のメダカ曝露槽へと導水するものである。



図一2 改良型メダカ曝露試験水槽

<謝 辞>

メダカを用いた環境ホルモンの現場モニタリング及び評価手法の検討に関して、前国土交通省土木研究所水質研究室重点研究支援協力員 東谷忠氏に多大な技術協力を得ました。また、水質自動監視所を活用した河川水の魚類試験装置の検討に関しては、共同研究として、近畿地方整備局近畿技術事務所による試験実施監視所の管理及び水質測定に関して協力を得ました。ここに記して感謝の意を表します。

<参考文献>

- 1) 建設省：「平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果」について、  
[http://www.mlit.go.jp/river/press/9901\\_06/990330.html](http://www.mlit.go.jp/river/press/9901_06/990330.html),1999
- 2) 建設省：平成11年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(春期・夏期調査)について、  
[http://www.mlit.go.jp/river/press/9907\\_12/991119part2.html](http://www.mlit.go.jp/river/press/9907_12/991119part2.html),1999
- 3) 建設省：平成11年度水環境における内分泌かく乱物質及びダイオキシン類に関する実態調査結果について、  
[http://www.mlit.go.jp/river/press/200007\\_12/000721bindex.html](http://www.mlit.go.jp/river/press/200007_12/000721bindex.html),2000
- 4) 国土交通省：平成12年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果について、  
[http://www.mlit.go.jp/river/press/200107\\_12/010724b/010724.html](http://www.mlit.go.jp/river/press/200107_12/010724b/010724.html),2001
- 5) 岩松鷹司：メダカ学全書、大学教育出版、1997年
- 6) 環境庁：内分泌攪乱化学物質メダカ試験国際シンポジウム要旨集、2000年3月
- 7) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定、環境工学研究論文集、Vol.36, pp199-204, (1999)
- 8) 東谷忠、玉本博之、宮本宣博、田中宏明、田村くに江：河川水質自動観測所を利用したメダカ曝露試験法の検討、日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会要旨集 p237、2001年12月