発光バクテリアを用いた重金属等の土壌汚染簡易評価手法の開発 —急性毒性評価による土壌汚染濃度のスクリーニング—*

杉田 創**・駒井 武***・井本由香利**・原 淳子**・今泉博之****

Development of simplified evaluation method on heavy metals soil pollution using luminous bacteria —Screening method for soil pollution concentration utilizing acute toxicity evaluation—

Hajime SUGITA**, Takeshi KOMAI***, Yukari IMOTO**,
Junko HARA** and Hiroyuki IMAIZUMI****

Abstract

In Japan, 9 heavy metals (Cd, Pb, Hg, Se, Cr⁶⁺, As, F, B, CN) have been regulated as Class II Specified Chemical Substances in the Soil Contamination Countermeasures Act. In this study, these 9 heavy metals were examined by an acute toxicity test using luminous bacteria (*Vibrio fischeri*). Then the availability of the method proposed by us as soil pollution evaluation method was considered empirically. In the result, it was shown that the method is available as the screening method for soil pollution based on the soil content reference values as for 7 heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr⁶⁺, As, Se, B). Also, the correlation between the degree of acute toxicity effects on the luminous bacteria and each concentration of heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr⁶⁺, As, Se) was clarified and quantified. It could allow the quantitative evaluation of the soil pollution by each of these 6 heavy metals.

Key Words: soil pollution evaluation method, bioassay, luminous bacteria, heavy metals, Soil Contamination Countermeasures Act

* 本論文の一部は、第46回地盤工学研究発表会、第20回環境化学討論会、第21回環境化学討論会、平成24年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、日本地下水学会2012年秋季講演会において発表した。

** (独)産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 (〒305-8567 茨城県つくば市東1-1-1)

Institute for Geo-Resources and Environment, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

*** 東北大学大学院 環境科学研究科

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

**** (独)産業技術総合研究所 企画本部

Planning Headquarters, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

要 旨

本研究では、土壤汚染対策法の第二種特定有害物質として指定されている重金属等9物質 (Cd, Pb, Hg, Se, Cr⁶⁺, As, F, B, CN) に対して発光バクテリア (*Vibrio fischeri*) による急性毒性試験を実施し、本手法の土壤汚染評価手法としての有効性を検討した。Cd, Pb, Hg, Cr⁶⁺, As, Se 及び B について、本手法が土壤含有量基準値に基づく土壤汚染のスクリーニングに利用できることを示した。さらに、Cd, Pb, Hg, Cr⁶⁺, As 及び Se の各濃度と急性毒性影響との間に相関性を見出し、その定量化を行うことによって、これら6種による個々の土壤汚染の定量評価を可能とした。

キーワード：土壤汚染評価, バイオアッセイ, 発光バクテリア, 重金属等, 土壤汚染対策法

1. はじめに

近年、先進諸国をはじめ、アジアや南アメリカなどの発展途上国でも重金属等や揮発有機塩素化合物等による土壤汚染が顕在化しており、社会的にも土壤汚染の調査・対策等が求められている。日本国内においても、「土壤汚染対策法」が平成14年に制定されており、この法律によって規制されている汚染物質は「水質汚濁防止法」によって規制されたものに準じている。この法律の中で汚染物質は、3種類に区分されており、第一種特定有害物質として揮発性有機化合物、第二種特定有害物質として重金属等、第三種特定有害物質として PCB・農薬等が指定されている。なお、第二種有害物質として指定されている物質は表1に記載されている9物質 (カドミウム Cd, 六価クロム Cr⁶⁺, シアン CN, 水銀 Hg, セレン Se, 鉛 Pb, 砒素 As, ふっ素 F, ほう素 B) である。これらを総称して「重金属類」と呼称する場合も多いが、本

研究においては土壤汚染対策法の用語に合わせるために、第二種特定有害物質を「重金属等」と表記する。

一方、水質分野では、有害物質の毒性を総合的に判断する方法として、メダカやミジンコ等微小生物を用いたバイオアッセイ (生物学的毒性試験) がこれまでも行われてきたが、最近では、発光バクテリアを用いたバイオアッセイが、有害物質の急性毒性評価や汚染物質の簡易検出技術として注目されている。これは代謝によって発光する特殊なバクテリアの性質を利用して、その発光強度の減少量あるいは減少速度によって汚染物質の毒性を検知・評価する手法である。日本国内においても発光バクテリアを用いて毒性評価を行った実施例が報告されている (例えば、国立環境研究所, 1998, 2001, 2006; 山川ほか, 1998; 北橋, 2000, 2001; 笹島ほか, 2005, 2006; 荒川ほか, 2007a, 2007b)。特に海洋性発光バクテリアの一種である「*Vibrio fischeri* (ビブリオ・フィッシュェリ)」は急性毒性試験等に広く使われており、国際標準化機構 (International Organization for Standardization, 略称 ISO) によって、ISO 11348-1: 2007, ISO 11348-2: 2007, ISO 11348-3: 2007, ISO 21338: 2010として規格化されている。さらに、Microtox[®] など急性毒性試験キットも販売され、McFeters et al. (1983) や Codina et al. (1994), McCloskey et al. (1996), Gallert (1999), Mowat and Bundy (2002), Heseih et al. (2004), Fulladosa et al. (2005) など多くの研究者によって Microtox[®] を使用した重金属等の急性毒性試験の結果が報告されている。また、多くの有害物質の毒性値を概略的にまとめたデータインデックスも報告されている (Kaiser and Palabrica, 1991)。しかしながら、有害物質に暴露されてからの発光

表1 土壤汚染対策法における第二種特定有害物質の指定基準値

Table 1 Specified reference values of Class II Specified Chemical Substances in the Soil Contamination Countermeasures Act

第二種特定有害物質	土壤溶出量基準	土壤含有量基準
カドミウム及びその化合物	0.01 mg/L 以下	150 mg/kg 以下
六価クロム化合物	0.05 mg/L 以下	250 mg/kg 以下
シアン化合物	検出されないこと	遊離シアンとして 50 mg/kg 以下
水銀及びその化合物	0.0005 mg/L 以下、かつ、アルキル水銀が検出されないこと	15 mg/kg 以下
セレン及びその化合物	0.01 mg/L 以下	150 mg/kg 以下
鉛及びその化合物	0.01 mg/L 以下	150 mg/kg 以下
砒素及びその化合物	0.01 mg/L 以下	150 mg/kg 以下
ふっ素及びその化合物	0.8 mg/L 以下	4,000 mg/kg 以下
ほう素及びその化合物	1 mg/L 以下	4,000 mg/kg 以下

バクテリアの発光強度の経時変化に関する詳細な研究報告はほとんどなく、また、有害物質の種類やその濃度と発光バクテリアに及ぼす急性毒性の強さの相関関係について定量的にまとめた信頼性の高い試験データ自体が極めて少ないため、実際に定量評価を行うに足るデータベース等は整備されていないのが現状である。それゆえ、発光バクテリアに及ぼす各種有害物質の急性毒性の強さを定量評価し、急性毒性の強さから有害物質の濃度を概算することを可能にするための各種パラメータ値の取得が望まれている。

また、水質分野で注目されている発光バクテリアによる有害物質の急性毒性評価試験を土壤汚染分野へ応用するためには、土壤抽出液を検液とした試験方法を想定した評価手法の確立が必要であり、種々の汚染物質に対する急性毒性影響の閾値、つまり定量下限値の確認や、急性毒性影響の大きさから土壤の汚染濃度を逆推算するために、急性毒性影響と汚染物質の濃度との相関性に関する詳細な検討が必要不可欠である。

そこで、本研究では、第二種有害物質として指定されている重金属等9種に着目して、発光バクテリア (*Vibrio fischeri*) を用いて、系統的なバイオアッセイ試験を実施し、得られたデータを基に詳細な解析を行い、これら重金属等の検出性についての検討や各種重金属等の濃度と急性毒性の強さとの相関関係の定量化を試み、さらに現場での本手法の適用方法についても詳細に論じた。

2. 実験方法

2.1 実験試薬

(1) 発光バクテリア

本研究に用いた発光バクテリアの種類は、*Vibrio fischeri* であり、日立化成株式会社から提供を受けたものである。試験1回分の試薬として、この発光バクテリアがプラスチック容器に約1 g (塩溶液を含む) 入れられて冷凍保存されている。なお、「*Vibrio fischeri*」は Urbanczyk et al. (2007) の研究によって「*Aliivibrio fischeri*」として再分類されているが、現在でも一般的な呼称としては「*Vibrio fischeri*」の方が広く普及しているため、本研究でも「*Aliivibrio fischeri*」ではなく、「*Vibrio*

fischeri」の呼称を使用することとする。

(2) 再活性化溶液

再活性化溶液として NaCl 溶液 (約0.3 mol/L) を所定量 (25 mL) 添加して発光バクテリアを解凍することにより、発光バクテリアは再活性化し発光する。室温 (20±5℃) による解凍では、再活性化溶液添加後、30分程度で発光バクテリアの発光強度は最大値を取り、検液を添加しない場合には約2時間程度そのまま高い発光強度値を維持した。

(3) 検液の調製

各重金属等を含む検液の作成には、表2に記した和光純薬工業株式会社から購入した試薬を用いた。なお、六価クロムについては、溶存形態の違いによる影響を調べるためにクロム酸塩と二クロム酸塩の2種類の試薬を用いた。また、砒素及びセレンについては価数の違いによる影響を調べるために、砒素については三価及び五価、セレンについては四価及び六価の試薬をそれぞれ用いた。

これら粉末試薬及び液体試薬をイオン交換水で溶解・希釈して任意の濃度の検液を準備した。なお、これらの検液は水酸化ナトリウム溶液または塩酸を適量加えて pH を4～9の間になるように調整されている。これは、検液の pH が4～9の範囲ならば、本試験条件では pH の違いによる発光バクテリアの発光強度への影響がほとんどないことが予備試験によって確認されているためである。なお、ISO11348によれば、発光バクテリア溶

表2 検液の調製用試薬及び調整 pH
Table 2 Reagents for preparing test solutions and examples of pH of test solutions

対象物質	検液調製用試薬	pH 調整液	検液の pH の実測値の例
Cd	Cd(NO ₃) ₂ in HNO ₃	NaOH and HCl	pH of 500 mg/L was 6.8
Pb	Pb(NO ₃) ₂ in HNO ₃		pH of 500 mg/L was 7.0
Hg	HgCl ₂ in HNO ₃		pH of 10 mg/L was 5.5
CN	NaCN in Water		pH of 10 mg/L was 5.5
F	NaF in Water		pH of 500 mg/L was 6.9
B	H ₃ BO ₃ in Water		pH of 500 mg/L was 5.4
Cr ⁶⁺	CaCrO ₄ in Water		pH of 500 mg/L was 6.3
	K ₂ Cr ₂ O ₇ in HNO ₃		pH of 500 mg/L was 5.0
As ³⁺	NaAsO ₂ in Water		pH of 10 mg/L was 6.3
As ⁵⁺	Na ₂ HAsO ₄ · 7H ₂ O in Water		pH of 10 mg/L was 7.1
Se ⁴⁺	H ₂ SeO ₃ in HNO ₃		pH of 500 mg/L was 7.2
Se ⁶⁺	Na ₂ SeO ₄ in Water		pH of 500 mg/L was 6.5

液の望ましい pH 範囲は6.0～8.5とされており、後述するように、本研究では発光バクテリア溶液 1 mL に対して検液 50 μ L を添加しているため、発光バクテリア溶液へ添加した検液は21倍希釈されることになるため、検液添加による pH の変動による発光強度への影響はなかったと推測される。また、ナトリウムイオン、塩化物イオン、硝酸イオン及び硫酸イオンについても検液中の濃度がそれぞれ 1 mol/L 程度までならば発光バクテリアの発光強度にほとんど影響を及ぼさないことも同様に予備試験によって確認している。つまり、検液調製用の試薬としてナトリウム塩、塩化物、硝酸塩、硫酸塩を使用した場合、試験対象物質以外の不純物として検液中にナトリウムイオン、塩化物イオン、硝酸イオンあるいは硫酸イオンが存在するが、これら諸溶存イオンによる発光バクテリアの発光強度に及ぼす影響は無視できる。

2.2 測定方法

本研究における発光バクテリアによる急性毒性試験フローの概略を図1に示す。24試料を同時測定可能なルミノメーター (RT01, 日立化成株式会社) で発光バクテリアの発光強度を測定した。再活性化約45分後の発光バクテリア溶液を各セルに1 mL ずつ取り、発光強度を測定し、その値を初期値とした。そして、各セルに検液を50 μ L ずつ添加し、直ちに発光強度を連続測定して経時変化を記録した。この測定開始時刻を検液と発光バク

テリアとの反応開始時間と見なすこととする。また、同一検液を3つのセルに添加し、その平均値をデータ解析に使用した。なお、本試験における測定誤差は概ね5%以内であった。

2.3 毒性評価方法

ブランクとしてイオン交換水を加えたセルの発光バクテリアのある時間での発光強度 I_{Blank} をそのセルの発光強度の初期値 $I_{\text{Blank}0}$ で割った値 ($I_{\text{Blank}}/I_{\text{Blank}0}$) を基準として、物質 X を含む検液を加えたセルの発光バクテリアのある時間での発光強度 I_X をそのセルの発光強度の初期値 I_{X0} で割った値 (I_X/I_{X0}) を相対評価することによって、その物質 X の発光バクテリアに及ぼす影響力を評価する。つまり、次式で表される発光バクテリアの相対発光強度比 S [%] の値を指標とする。

$$S = (I_X/I_{X0}) / (I_{\text{Blank}}/I_{\text{Blank}0}) \times 100 \quad (1)$$

したがって、 S の値が小さいほど毒性影響が大きいことになる。

3. 急性毒性試験結果

3.1 Cd, Pb, Hg, CN, F, B に関する急性毒性試験の結果

Cd, Pb, Hg, CN, F, B に関する試験結果を図2 (a) ～ (f) にそれぞれ示す。なお、溶液中では

図1 発光バクテリアによる急性毒性試験フロー

Fig. 1 Experimental flow for acute toxicity test using luminous bacteria

それぞれ主として Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , CN^- , F^- , $\text{B}(\text{OH})_3$ の形で溶存していると考えられる。これらの図は、横軸に曝露時間 t 、縦軸に検液添加後の発光バクテリアの相対発光強度比 S を示したものである。

Cd , Pb , Hg を発光バクテリア溶液に添加した試験では、ほとんどの場合、時間の経過に伴い S は減少し、また S の減少度合いは各重金属等の濃度が高くなるほど大きくなっている (図 2 (a), (b), (c))。つまり、 Cd , Pb , Hg は発光バクテリ

アに対して急性毒性を示し、その毒性の強さには濃度依存性があることがわかる。 CN を発光バクテリア溶液に添加した場合、前述の重金属等とは逆に、添加した検液中の CN 濃度が高いものほど S の値も高くなっている (図 2 (d))。このことから、 CN は発光バクテリアを活性化する作用があると考えられる。一方、 F は本試験の濃度範囲 (検液中の濃度として 1～500 mg/L) では、発光バクテリアの発光強度に全く影響を及ぼさず、測定時間内において S の値はほぼ 100% のままであった

図 2 発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化 : (a) Cd, (b) Pb, (c) Hg, (d) CN, (e) F, (f) B

Fig. 2 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time: (a) Cd, (b) Pb, (c) Hg, (d) CN, (e) F and (f) B

(図2(e))。Bも500 mg/Lという極めて高い濃度を持つ検液を添加した場合にはSに若干の低下が認められるが、100 mg/Lまで発光バクテリアの発光強度に全く影響を及ぼさなかった(図2(f))。したがって、F及びBは発光バクテリアに急性毒性影響をほとんど与えないと考えてよいと思われる。

3.2 六価クロム Cr^{6+} に関する急性毒性試験の結果

六価クロム Cr^{6+} に関する試験結果を図3に示す。図3(a)及び(b)は、クロム酸塩及び二クロム酸塩から作成した溶液を検液とした試験結果をそれぞれ示している。日本化学会(2004)によると、クロム酸 H_2CrO_4 の解離定数は $\text{pK}_{\text{a}1}=1.67$, $\text{pK}_{\text{a}2}=6.02$ であることから、図3(a)における主要な溶存クロム種は HCrO_4^- 及び CrO_4^{2-} であると考えられる。また、図3(a)及び(b)の検液はそれぞれクロム酸塩及び二クロム酸塩から作成されているが、下記の反応により、溶液中でクロム酸イオン種と二クロム酸イオン種は化学平衡状態にあると考えられる。なお、当該論文で使用した pK_{a} の各値は、日本化学会(2004)の表11.1からの引用である。

上記の式から明らかなように、クロム酸イオン種と二クロム酸イオン種の濃度は、pHとCr濃度に依存するが、pH調整後のクロム酸検液及び二クロム酸検液の色相は、それぞれ薄黄色及び薄橙赤のままであったことから、実際には図3(a)に示した試験ではクロム酸イオン種が、図3(b)に示した試験では二クロム酸イオン種が優勢であったと思われる。このことから、便宜上、図3(a)はクロム酸イオン(CrO_4^{2-})の影響を、図3(b)は二クロム酸イオン($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)の影響をそれぞれ示していると見なすこととする。

図3から、クロム酸イオン及び二クロム酸イオンともに検液濃度が10 mg/L程度まで発光バクテリアに対して急性毒性影響を与えないが、50 mg/L以上では曝露時間60分でSは95%以下となっており、測定誤差を加味しても明らかな急性毒性影響を示している。また、その毒性の強さには濃度依存性があることがわかる。そして、図3(a)と(b)において同じCr濃度におけるSの値を比較すると、おおよその全体的な傾向としてはクロム酸イオンよりも二クロム酸イオンの方が低くなっており、特に反応初期のSの減少速度は、クロム酸イオンよりも二クロム酸イオンの方が顕著に高いように見える。しかしながら、二クロム酸イオンを添加した発光バクテリア溶液では、反応初期の減少速度は高いが、時間の経過に伴いSの減少は極めて緩やかになり、曝露時間30分と60分におけるSの値にはほとんど差異は認

図3 発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化：(a) CrO_4^{2-} 、(b) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$

Fig. 3 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time: (a) CrO_4^{2-} and (b) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$

められない。一方、クロム酸イオンを添加した発光バクテリア溶液では、反応初期の減少速度は低い、時間が経過しても S の減少は続き、曝露時間30分と60分における S の値に大きな差異が認められる。これらの結果から、曝露時間がさらに長くなれば、 Cr 濃度が同じ場合、クロム酸イオンと二クロム酸イオンの間で S の値に大きな差異は無くなることが予想される。これは、前述したようにクロム酸イオンと二クロム酸イオンが溶液中において化学平衡状態で共存するが、実際には平衡に達するまでにある程度の時間を要し、平衡状態になったときの存在比は、 pH と初期 Cr 濃度に依存するためと考えられる。

3.3 砒素 As に関する急性毒性試験の結果

砒素 As に関する試験結果を図4に示す。図4(a)及び(b)は、三価砒素(亜ヒ酸塩)及び五価砒素(ヒ酸塩)の影響をそれぞれ示している。なお、亜ヒ酸の第一酸解離定数 $\text{pK}_{\text{a}1}$ が9.14であることから、本試験条件では、図4(a)における三価砒素の支配的な溶存形態としては、 $\text{As}(\text{OH})_3$ が予想される。一方、ヒ酸の酸解離定数が $\text{pK}_{\text{a}1}=2.24$, $\text{pK}_{\text{a}2}=6.94$, $\text{pK}_{\text{a}3}=11.50$ であることから、図4(b)における五価砒素の支配的な溶存形態としては、ヒ酸二水素イオン $\text{H}_2\text{AsO}_4^{2-}$ あるいはヒ酸水素イオン HAsO_4^{2-} が予想される。なお、本試験は特殊な好気・嫌気条件下での実験ではなく、また、酸化剤や還元剤として働く特別な物質も存在していないので、砒素の価数の変化を伴う迅速な酸化還元反応が生じるとは考えにくい。そのため、本試験における砒素の価数の変化は無視でき

るものとする。

図4から、三価砒素及び五価砒素ともに検液濃度が0.1 mg/L程度まで発光バクテリアに対して急性毒性影響を与えないが、1 mg/L以上で明らかな急性毒性影響を示し、その毒性の強さには濃度依存性があることがわかる。全体的な傾向としては、三価砒素を添加した発光バクテリア溶液では、曝露時間0～10分程度までの減少速度は五価砒素の場合と比較して幾分低いが、曝露時間が20分以上経過しても S の減少は続き、曝露時間30分と60分における S の値には明らかな差異が認められる。一方、五価砒素を添加した発光バクテリア溶液では、曝露時間0～10分程度までの減少速度は三価砒素を添加した場合よりも幾分高いが、曝露時間20分以降 S はほとんど変動していない。一般に、ヒ酸(五価砒素)よりも亜ヒ酸(三価砒素)の方が毒性が高いとされているが、図4(a)と(b)における同じ As 濃度における S の値の比較からは、一概にどちらの毒性が高いとは判断できない。しかしながら、 S の初期(曝露時間0～10分程度)の減少速度に着目するならば、発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響は、亜ヒ酸(三価砒素)よりもヒ酸(五価砒素)の方が大きいように見える。

3.4 セレン Se に関する急性毒性試験の結果

セレン Se に関する試験結果を図5に示す。図5(a)及び(b)は、四価セレン(亜セレン酸塩)及び六価セレン(セレン酸塩)の影響をそれぞれ示している。なお、亜セレン酸の酸解離定数が $\text{pK}_{\text{a}1}=2.61$, $\text{pK}_{\text{a}2}=8.05$ であることから、図5

図4 発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化：(a) As^{3+} , (b) As^{5+}

Fig. 4 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time: (a) As^{3+} and (b) As^{5+}

図5 発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化：(a) Se^{4+} ，(b) Se^{6+}

Fig. 5 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time: (a) Se^{4+} and (b) Se^{6+}

(a) における四価セレンの支配的な溶存形態としては、亜セレン酸水素イオン HSeO_3^- が予想される。一方、セレン酸は強酸であり、第二酸解離定数 pK_{a2} が1.7程度であることから、図5 (b) における六価セレンの支配的な溶存形態としては、セレン酸イオン SeO_4^{2-} が予想される。また、本試験条件では、砒素の場合と同様にセレンの価数の変化を伴う迅速な酸化還元反応が生じるとは考えにくいため、当該急性毒性試験におけるセレンの価数の変化は無視できるものとする。

図5から明らかなように、四価セレンは発光バクテリアに対して急性毒性を示し、濃度が高くなるほど毒性も高くなっているが、六価セレンは発光バクテリアに対して急性毒性を全く示さなかった。2. 1 (3) で述べたように、予備試験によって硫酸イオンは発光バクテリアに対して急性毒性影響を与えないことが確認されている。硫酸イオンの化学構造は、硫黄原子Sを中心とし、4つの酸素原子Oを各頂点とする四面体構造であるが、セレン酸イオンも硫酸イオン同様にセレン原子Seを中心とした4つの酸素原子Oを各頂点とする四面体構造であり、このことが無毒性に関係しているかもしれないが、明確な理由は不明である。

3. 5 発光バクテリアによる重金属等の検出性

(1) 本試験条件での重金属等の検出限界値

本研究では、土壤汚染対策法の土壤溶出量試験あるいは土壤含有量試験に準じて作成した土壤抽出液を用いて、発光バクテリアによる急性毒性試験を実施することにより、汚染サイトのスクリー

表3 本試験条件での重金属等の検出限界値*

Table 3 Detection limits of heavy metals in the present test conditions

対象物質	予想される検出反応種の主形態	t = 60 min	土壌含有量基準相当値 (重量体積比3%)
Cd	カドミウムイオン： Cd^{2+}	50～100 mg/L	4.5 mg/L
Pb	鉛イオン： Pb^{2+}	2～5 mg/L	4.5 mg/L
Hg	水銀イオン： Hg^{2+}	2～3 mg/L	0.45 mg/L
CN	シアニドイオン： CN^-	検出不能	1.5 mg/L
F	フッ素イオン： F^-	検出不能	120 mg/L
B	ホウ酸イオン： $\text{B}(\text{OH})_4^-$	500 mg/L	120 mg/L
Cr^{6+}	クロム酸イオン： CrO_4^{2-}	50～75 mg/L	7.5 mg/L
	二クロム酸イオン： $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	20～50 mg/L	
As^{3+}	亜ヒ酸イオン： H_2AsO_3^-	0.2～0.5 mg/L	4.5 mg/L
As^{5+}	ヒ酸イオン： HAsO_4^{2-}	0.2～0.5 mg/L	
Se^{4+}	亜セレン酸イオン： HSeO_3^-	10～50 mg/L	4.5 mg/L
Se^{6+}	セレン酸イオン： SeO_4^{2-}	検出不能	

* 発光バクテリア溶液1 mL に対し検液50 μL の場合の値である。

ニングや汚染浄化過程における浄化の進行状況の簡易評価に用いることを想定している。表3に本試験結果に基づいた重金属等の検出限界値を示す。通常、土壌含有量基準の基準値は、土壌単位重量[kg]あたりに含まれる汚染物質の重量[mg]で示されているが、比較を容易にするために、抽出水中の汚染物質濃度として換算した値である土壌含有量基準相当値を表3に併せて記載した。この土壌含有量基準相当値よりも検出限界値が低ければ、汚染サイトのスクリーニングにも適用可能であると考えられるが、確実に適合するのはAsのみで、他の重金属等については、表1に示されている土壌溶出量基準値をクリアできるほど検出性の高い物質は無かった。

(2) 発光バクテリアに及ぼす重金属等の急性毒性影響の閾値

本研究では、発光バクテリア溶液1 mLに対して検液50 μ Lを添加しているため、実際に発光強度を測定している試料中の重金属等の濃度は検液中の濃度の21分の1の値である。それゆえ、検出性の限界値を真に評価するには、表3に記載されている濃度値の21分の1の値で議論すべきである。また、この濃度は発光バクテリアに急性毒性影響を及ぼす各重金属等の閾値でもある。表4に本試験結果から得られた発光バクテリアに及ぼす重金属等の急性毒性影響の閾値を示す。重金属等の発光バクテリアに及ぼす急性毒性の閾値は、Cd, CN, F及び Se^{6+} を除けば土壌含有量基準相当値を十分に下回っていることがわかる。つまり、発光バクテリア溶液と検液の混合割合を調整する等の工夫によって、Cd, CN, F及び Se^{6+} 以外の重金属等を検出することが可能であると考えられる。また、表3及び表4から重金属等の検出性の高さは下記の順となる。

表4 発光バクテリアに及ぼす重金属等の急性毒性影響の閾値*

Table 4 Threshold values for acute toxicity effect of heavy metals on the luminous bacteria

対象物質	予想される検出反応の主形態	t = 60 min	土壌含有量基準相当値 (重量体積比3%)
Cd	カドミウムイオン: Cd^{2+}	2.4~4.8 mg/L	4.5 mg/L
Pb	鉛イオン: Pb^{2+}	0.095~0.24 mg/L	4.5 mg/L
Hg	水銀イオン: Hg^{2+}	0.095~0.14 mg/L	0.45 mg/L
CN	シアニドイオン: CN^-	急性毒性影響なし**	1.5 mg/L
F	フッ素イオン: F^-	急性毒性影響なし	120 mg/L
B	ホウ酸イオン: $\text{B}(\text{OH})_4^-$	24 mg/L	120 mg/L
Cr^{6+}	クロム酸イオン: CrO_4^{2-}	2.4~3.6 mg/L	7.5 mg/L
	二クロム酸イオン: $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	0.95~2.4 mg/L	
As^{3+}	亜ヒ酸イオン: H_2AsO_3^-	0.0095~0.024 mg/L	4.5 mg/L
As^{5+}	ヒ酸イオン: HAsO_4^{2-}	0.0095~0.024 mg/L	
Se^{6+}	亜セレン酸イオン: HSeO_3^-	0.48~2.4 mg/L	4.5 mg/L
Se^{6+}	セレン酸イオン: SeO_4^{2-}	急性毒性影響なし	

* 発光バクテリア溶液1 mLに対して検液50 μ Lであるので、実際の測定試料中の重金属等の濃度は表3で示されている値の21分の1の値となる。

**CNについては急性毒性影響ではなく、発光バクテリアに対して活性化影響を示す。

4. 解析及び考察

4.1 重金属等の急性毒性影響に関する定量化

発光バクテリアを用いた急性毒性試験における曝露時間としては、Microtox[®]では15分、ISO 11348では、5分、15分、30分の3つが推奨されている。図2～5に示した本試験結果を見る限り、曝露時間5分及び15分ではSの値が急速に減少している途中にあるものが多く、時間的な測定誤差の影響が大きいと考えられる。また、大部分のデータは曝露時間30分と60分でSの値に大きな差異はないように見えるが、Cdや Cr^{6+} 、 As^{3+} 、 Se^{4+} では曝露時間は30分では十分とは言えず、60分のデータを用いる方が望ましいように思われる。本研究の本質的な目的は、土壌汚染の評価を行うための信頼性の高いデータの取得であることから、本研究では、曝露時間60分でのSの値を用いて、各重金属等による急性毒性影響について解析及び考察を行うこととした。なお、前述したように、CN, F, Se^{6+} については、発光バクテリアに対して急性毒性を示さなかったため、また、Bについては、定量化に必要なデータの不足のため、定量化に関する検討を行わなかった。

(1) Cd, Pb, Hg, Se^{4+} の急性毒性に関する定量化

Cd, Pb, Hg, Se^{4+} に関する各試験で得られた曝露時間60分における発光バクテリアの相対発光強度比の値 $S_{t(60)}$ を、発光強度測定試料中の各重金属等の濃度 C^* [mg/L]に対して片対数プロットしたものを図6(a)～(d)にそれぞれ示す。いずれの図においても、ある濃度範囲において $S_{t(60)}$ と C^* の対数値の間に直線関係が認められる(各図において、ひとつの近似曲線上にプロットされると思われるデータを●で示した)。この近似曲線は、近似式(5)として表わされる。

$$S_{t(60)} = \alpha - \beta \log C^* \quad (5)$$

ここで、 α 及び β は式(5)のパラメータ値である。本試験で得られたデータの中で近似式(5)に適合できると考えられる各重金属等の濃度範囲と、これら試験データの近似式(5)への適用によって得られたパラメータ α 、 β の値及び相関係数 R を表

図6 重金属濃度に対する反応時間60分での相対発光強度比の片対数プロット：(a) Cd, (b) Pb, (c) Hg, (d) Se^{4+}

Fig. 6 Plot of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria against logarithm of heavy metals concentration: (a) Cd, (b) Pb, (c) Hg and (d) Se^{4+}

5に記載している。このパラメータ α 及び β の値を用いれば、実測した $S_{t(60)}$ の値から汚染物質の濃度を求めることが可能である。

(2) 六価クロム Cr^{6+} の急性毒性に関する定量化

クロム酸イオン及び二クロム酸イオンに関する各試験で得られた曝露時間60分における発光バクテリアの相対発光強度比の値 $S_{t(60)}$ を、発光強度測定試料中のクロム濃度 C^* [mg/L] に対して片対数プロットしたものを図7 (a) 及び (b) にそれぞれ示す。両図ともに、ある濃度範囲において $S_{t(60)}$ と C^* の対数値の間に良好な直線関係が認められる。近似式 (5) の適用によって得られたパラメータ α , β の値及び相関係数 R を表5に記載している。相関係数は両者ともに0.99以上と良好である。また、パラメータ α 及び β ともにクロム酸イオンの方が二クロム酸イオンの値よりも大きい。

(3) 砒素 As の急性毒性に関する定量化

As^{3+} 及び As^{5+} に関する各試験で得られた曝露時間60分における発光バクテリアの相対発光強度比の値 $S_{t(60)}$ を、発光強度測定試料中の砒素濃度 C^* [mg/L] に対して片対数プロットしたものを図8 (a) 及び (b) にそれぞれ示す。また、近似式 (5) から得られたパラメータ α , β の値及び相関係数 R を表5に記載している。得られたパラメータ α 及び β の値を比較すると、 As^{3+} と As^{5+} ではほとんど差が見られない。しかし、 R の値が As^{3+} では0.994であるのに対して、 As^{5+} では0.972であり、かなり低くなっている。これは、本試験では検液のpHを中性付近に調整しているが、前節3.3でも述べたように、ヒ酸の第二酸解離定数 pK_{a2} が6.94という中性付近であるため、わずかなpHの違いによっても溶液中のヒ酸二水素イオン H_2AsO_4^-

図7 六価クロム濃度に対する反応時間60分での相対発光強度比の片対数プロット：(a) CrO_4^{2-} and (b) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$

Fig. 7 Plot of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria against logarithm of hexavalent chromium concentration: (a) CrO_4^{2-} and (b) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$

図8 砒素濃度に対する反応時間60分での相対発光強度比の片対数プロット：(a) As^{3+} and (b) As^{5+}

Fig. 8 Plot of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria against logarithm of arsenic concentration: (a) As^{3+} and (b) As^{5+}

とヒ酸水素イオン HAsO_4^{2-} の割合が変化し、この溶存形態の違いが発光バクテリアの発光強度に影響を及ぼした可能性がある。本研究では発光強度測定試料の実際の pH は測定していないため、実際の測定試料中の H_2AsO_4^- と HAsO_4^{2-} の割合を求めることはできないので、両者を区別せずに、 As^{5+} の急性毒性を総括的に反映しているものとして取り扱うこととする。

4. 2 重金属等の急性毒性影響の大きさの比較

(1) 暴露時間60分を基準とした比較

表5のパラメータ値と近似式(5)を用いて、 $S_{t(60)}$ の値が100, 50及び0%になる時の各重金属等の濃度 $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$ 及び $C^*_{S(0)}$ [mg/L] を求め、得られたそれらの値を表6に記載した。表6に記載されている $C^*_{S(100)}$ は、仮想的なものではあるが、発光バクテリアに急性毒性影響を及ぼす各重金属等の閾値であり、本急性毒性試験での検出限界濃度の目安にもなる。なお、 $C^*_{S(100)}$ を基準とした検出性の高さは下記の順となる。

上記は前項3.5(2)に示した実際の試験結果に基づく検出性の高さの順とはやや異なる部分もあるが、各重金属等の $C^*_{S(100)}$ の値自体は、表4に記載されている各閾値の濃度範囲にほぼ含まれている。したがって、汚染サイトのスクリーニングを行う際の指標として表6に記載されている $C^*_{S(100)}$ の値を用いることは妥当であると考えられる。なお、 As^{3+} と As^{5+} の $C^*_{S(100)}$ の間にはほとんど差異はなかった。

一方、表6に記載している $C^*_{S(0)}$ もまた、仮想的なものではあるが、試験生物群が全て死滅する重金属等の濃度を意味している。 $C^*_{S(0)}$ を基準とした急性毒性の強さは下記の順となる。

砒素については、 $C^*_{S(100)}$ と同様に価数の違いによる $C^*_{S(0)}$ の違いはわずかであり、六価クロムについてもクロム酸塩と二クロム酸塩の $C^*_{S(0)}$ の値にはそれほど大きな差はなかった。

一般に急性毒性を評価する指標として、試験生物群の50%に影響を与える試験物質の濃度を意味する EC_{50} (Median effect concentration) や試験生物群の50%が死滅する試験物質の濃度を意味す

る LC_{50} (Median lethal concentration) が使用されているが、発光バクテリアの代謝による発光量が50%低下する試験物質の濃度を意味する本研究で使用した $C^*_{S(50)}$ も本質的にはそれらと同等の指標となるものであり、 $C^*_{S(50)}$ を基準とした急性毒性の強さは下記の順となる。

(2) 暴露時間15分を基準とした比較

土壌汚染評価を想定しない有害物質の急性毒性影響の強さのみに着目した水質分野で行われている急性毒性試験では、暴露時間15分における急性毒性値を指標とする場合が比較的多い。そこで、本研究でも暴露時間15分におけるデータを用いた解析を行った。まず、Cd, Pb, Hg, Se^{4+} , Cr^{6+} (CrO_4^{2-} 及び $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), As (As^{3+} 及び As^{5+}) に関する各試験で得られた暴露時間15分における発光バクテリアの相対発光強度比の値 $S_{t(15)}$ を、発光強度測定試料中の各重金属等の濃度 C^* [mg/L] に対して片対数プロットしたものを図9(a)～(h)にそれぞれ示す。いずれの図においても、暴露時間60分のデータと同様に、ある濃度範囲において $S_{t(15)}$ と C^* の対数値の間に直線関係が認められ

表5 式(5)のパラメータ値及び相関係数の値
Table 5 Data on parameters and correlation coefficients in equation (5)

対象物質	適用濃度範囲 C^* [mg/L]	$S_{t(60)} = \alpha - \beta \log C^*$		
		α	β	R
Cd^{2+}	2.38～23.8	112.26	39.51	0.992
Pb^{2+}	0.095～23.8	69.87	28.31	0.995
Hg^{2+}	0.143～2.38	31.40	77.36	0.992
Se^{4+}	2.38～23.8	113.76	71.60	0.999
Cr^{6+} (CrO_4^{2-})	2.38～23.8	126.59	74.08	0.996
Cr^{6+} ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)	2.38～23.8	105.72	59.72	0.997
As^{3+}	0.024～4.76	46.53	32.01	0.994
As^{5+}	0.024～4.76	47.99	32.29	0.972

表6 暴露時間60分における $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$, $C^*_{S(0)}$ の計算値

Table 6 Calculated values of $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$ and $C^*_{S(0)}$ in 60 minutes of exposure time

対象物質	$C^*_{S(100)}$	$C^*_{S(50)}$	$C^*_{S(0)}$
	[mg/L]		
Cd^{2+}	2.04	37.7	694
Pb^{2+}	0.09	5.03	294
Hg^{2+}	0.13	0.57	2.55
Se^{4+}	1.56	7.77	38.8
Cr^{6+} (CrO_4^{2-})	2.29	10.8	51.2
Cr^{6+} ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)	1.25	8.57	58.9
As^{3+}	0.02	0.78	28.4
As^{5+}	0.02	0.87	30.6

る。この近似曲線は、近似式 (6) として表わされる。

$$S_{t(15)} = \gamma - \delta \log C^* \quad (6)$$

図9 重金属濃度に対する暴露時間15分での相対発光強度比の片対数プロット：(a) Cd, (b) Pb, (c) Hg, (d) Se^{4+} , (e) CrO_4^{2-} , (f) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, (g) As^{3+} , (h) As^{5+}

Fig. 9 Plot of relative luminescence intensity ratio in 15 minutes of exposure time against logarithm of heavy metals concentration: (a) Cd, (b) Pb, (c) Hg, (d) Se^{4+} , (e) CrO_4^{2-} , (f) $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, (g) As^{3+} and (h) As^{5+}

ここで、 γ 及び δ は式 (6) のパラメータ値である。本試験で得られたデータの中で近似式 (6) に適合できるとされる各重金属等の濃度範囲と、これら試験データの近似式 (6) への適用によって得られたパラメータ γ , δ の値及び相関係数 R を表7に記載する。また、表7のパラメータ値と近似式 (6) を用いて、 $S_{t(15)}$ の値が100, 50及び0%になるときの各重金属等の濃度 $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$ 及び $C^*_{S(0)}$ [mg/L] を求め、得られたそれらの値を表8に記載した。さらに、 $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$ 及び $C^*_{S(0)}$

表7 式 (6) のパラメータ値及び相関係数の値
Table 7 Data on parameters and correlation coefficients in equation (6)

対象物質	適用濃度範囲 C^* [mg/L]	$S_{t(15)} = \gamma - \delta \log C^*$		
		γ	δ	R
Cd^{2+}	2.38～23.8	109.63	27.56	0.998
Pb^{2+}	0.095～23.8	73.60	23.69	0.998
Hg^{2+}	0.143～2.38	36.34	73.64	0.992
Se^{4+}	2.38～23.8	112.764	59.22	0.999
Cr^{6+} (CrO_4^{2-})	4.76～23.8	127.547	46.81	0.997
Cr^{6+} ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)	2.38～23.8	108.48	50.68	0.999
As^{3+}	0.024～4.76	59.66	26.87	0.993
As^{5+}	0.024～4.76	49.96	32.56	0.992

表8 暴露時間15分における $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$, $C^*_{S(0)}$ の計算値

Table 8 Calculated values of $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(50)}$ and $C^*_{S(0)}$ in 15 minutes of exposure time

対象物質	$C^*_{S(100)}$	$C^*_{S(50)}$	$C^*_{S(0)}$
	[mg/L]		
Cd^{2+}	2.24	145	9509
Pb^{2+}	0.08	9.92	1280
Hg^{2+}	0.14	0.65	3.12
Se^{4+}	1.63	11.4	79.8
Cr^{6+} (CrO_4^{2-})	3.86	45.2	529
Cr^{6+} ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)	1.47	14.3	138
As^{3+}	0.03	2.29	166
As^{5+}	0.03	1.00	34.2

を基準とした重金属等の急性毒性の強さの大小関係を表9に示す。また、比較を容易にするために、暴露時間60についても表9に併記した。発光バクテリアに及ぼす重金属等の急性毒性の強さの大小関係は $C^*_{S(100)}$ については暴露時間15分と60分で差異は見られない。また、 $C^*_{S(50)}$ については、暴露時間15分と60分で As^{5+} と As^{3+} の大小関係が入れ替わっているが、 As^{5+} と As^{3+} に関する急性毒性値の値自体に大きな差はない（表6及び8参照）。一方、 $C^*_{S(0)}$ については、急性毒性は Hg が最も強く、 Pb 及び Cd が弱いことは一致しているが、その他の重金属等の急性毒性の強さの大小関係についてはかなりの差異が見られる。

また、暴露時間60分（表6）と15分（表8）の値を比較すると $C^*_{S(100)}$ については大きな違いはないが、 $C^*_{S(50)}$ 及び $C^*_{S(0)}$ [mg/L] については Hg^{2+} と As^{5+} を除く重金属等で大きな違いがあることがわかる。以上の結果からも、バイオアッセイによって有害物質の急性毒性の強さを判断する場合、暴露時間の設定が非常に重要であることは明らかである。

(3) 文献値との比較

他の研究者による既往の研究において、本研究と同様に *Vibrio fischeri* を用いたバイオアッセイによって調べられた重金属等の急性毒性値が報告されている。報告されている EC_{50} の値のいくつかの例を表10に示す。なお、それぞれの研究における暴露時間は Codina et al. (1994), McCloskey et al. (1996), Mowat and Bundy (2002) では15分, McFeters et al. (1983) では5分, Gallert (1999) は6時間, Heseih et al. (2004) では22時間となっている。表10の暴露時間15分の EC_{50} （本研究では $C^*_{S(50)}$ が相当）の文献値の比較から研究者によっ

て報告している値が大きく異なっていることがわかる。このように、バイオアッセイにおいては報告される値に大きな隔たりがあることがしばしば見受けられる。これは発光バクテリアの培養方法や薬品の調製方法、試験手順等に関してそれぞれの論文に記述されていない部分で何らかの違いがあることが予想され、それらの違いが要因となって試験結果に違いが生じているものと推測される。

一般的には暴露時間が長いものほど EC_{50} の値は小さくなるはずであるが、表9に載せた暴露時間5分～22時間の文献値の比較では、必ずしもそのような結果にはなっていない。このことから、異なる研究者間のデータの相互利用の難しさが浮き彫りになっている。なお、本研究では、表6と表8の比較から明らかなように、 Pb^{2+} の $C^*_{S(100)}$ を除けば暴露時間60分での値（表6）の方が暴露時間15分での値（表8）よりも小さくなっており、確立された一定条件下で行われた試験から得られた値ならば、矛盾せずに相互利用できると考えられる。

4. 3 第二種特定有害物質に関する汚染評価手法としての適合性

本研究によって得られた急性毒性試験結果及び解析結果から、第二種特定有害物質に指定されている重金属等のうち、シアン、ふっ素の2種については発光バクテリアに対して急性毒性影響を及ぼさないため、本手法による土壌汚染評価を行うことができないが、カドミウム、鉛、水銀、六価クロム、砒素、セレンの6種については本手法によって土壌汚染評価を簡便かつ効果的に行える可能性が見出された。なお、ほう素については、有

表9 ビブリオフィッシャーリに関する重金属等の急性毒性の強さの比較
Table 9 Comparison of acute toxicity strength of heavy metals for *Vibrio fischeri*

急性毒性値	暴露時間	重金属等の急性毒性の強さの比較
$C^*_{S(100)}$	15 min	$As^{3+}, As^{5+} > Pb^{2+} > Hg^{2+} > Cr^{6+}$ (as $Cr_2O_7^{2-}$) $> Se^{4+} > Cd^{2+} > Cr^{6+}$ (as CrO_4^{2-})
	60 min	$As^{3+}, As^{5+} > Pb^{2+} > Hg^{2+} > Cr^{6+}$ (as $Cr_2O_7^{2-}$) $> Se^{4+} > Cd^{2+} > Cr^{6+}$ (as CrO_4^{2-})
$C^*_{S(50)}$	15 min	$Hg^{2+} > As^{5+} > As^{3+} > Pb^{2+} > Se^{4+} > Cr^{6+}$ (as $Cr_2O_7^{2-}$) $> Cr^{6+}$ (as CrO_4^{2-}) $> Cd^{2+}$
	60 min	$Hg^{2+} > As^{5+} > As^{3+} > Pb^{2+} > Se^{4+} > Cr^{6+}$ (as $Cr_2O_7^{2-}$) $> Cr^{6+}$ (as CrO_4^{2-}) $> Cd^{2+}$
$C^*_{S(0)}$	15 min	$Hg^{2+} > As^{5+} > Se^{4+} > Cr^{6+}$ (as $Cr_2O_7^{2-}$) $> As^{3+} > Cr^{6+}$ (as CrO_4^{2-}) $> Pb^{2+} > Cd^{2+}$
	60 min	$Hg^{2+} > As^{5+} > As^{3+} > Se^{4+} > Cr^{6+}$ (as CrO_4^{2-}) $> Cr^{6+}$ (as $Cr_2O_7^{2-}$) $> Pb^{2+} > Cd^{2+}$

表 10 ビブリオフィッシュェリに関する重金属等の急性毒性値 EC_{50} に関する文献値Table 10 Literature values for EC_{50} of heavy metals for *Vibrio fischeri*

文献	This work	Codina et al. (1994)	McCloskey et al. (1996)	Mowat and Bundy (2002)	McFeters et al. (1983) ^{注2)}	Gellert (1999)	Hsieh et al. (2004)
暴露時間	15 min	15 min	15 min	15 min	5 min	6 h	22 h
急性毒性値	EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}
濃度単位	mg/L	mg/L	mg/L ^{注1)}	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Cd^{2+}	146	34.7	3.04	59.3	255	28.9	504
Pb^{2+}	9.92		0.24	0.427		272	669
Hg^{2+}	0.65	0.2	0.18	0.103	0.04	0.12	33.8
Se^{4+}	11.42						114
Cr^{6+} (CrO_4^{2-})	45.2				64.7		
Cr^{6+} ($Cr_2O_7^{2-}$)	14.3	339.6		66.4		15.9	12.4
As^{3+}	2.29			8.68			821
As^{5+}	1.00			22.1			

注 1) McCloskey et al. (1996)での濃度単位は μ M/L であったので、mg/L に換算した値を記載した。

注 2) McFeters et al. (1983)では化合物の濃度であったので、元素濃度に換算した値を記載した。

効な急性毒性試験データの不足のため、定量性については不明であるが、表 4 に記載している値から汚染サイトのスクリーニング手法としては利用できる可能性がある。また、本手法では、六価セレン Se^{6+} についても検出することができないが、土壤環境下が還元雰囲気であることを考慮すれば、土壤中では六価セレン Se^{6+} よりも四価セレン Se^{4+} の方が存在形態としては優勢であると考えられるため、本手法によって Se についても汚染評価を行うことが可能であると考えられる。一方、六価クロム及び砒素については、図 3 及び図 4 に示されているように、溶存形態や価数の違いによって発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響に違いがあることは明白であるが、急性毒性評価の指標として $S_{t(60)}$ を採用することによって、表 6 を見てもわかるように、 $C^*_{S(100)}$ 、 $C^*_{S(50)}$ 及び $C^*_{S(0)}$ のいずれを比較しても、溶存形態や価数の違いによる差異は大きいものではなく、むしろ As^{3+} と As^{5+} についてはほとんど差異が認められなかった（ただし、 As^{5+} の相関係数が低いことは考慮すべきかもしれない）。これらの結果から、六価クロム及び砒素についても、 $S_{t(60)}$ を用いることによって溶存形態や価数を気にせずに土壤汚染評価を行うこと

が可能であると考えられる。

以上から、本手法は、第二種特定有害物質に指定されている重金属等のうち、鉛 Pb 、水銀 Hg 、六価クロム Cr^{6+} 、砒素 As 、セレン Se の 5 種に対して、土壤含有量基準値を指標とした土壤汚染評価を行うことが十分に可能であると考えられる。また、カドミウム Cd についても土壤含有量基準値に極めて近い濃度範囲まで定量性が確認されているため、本手法はカドミウム汚染土壤の簡易評価手法としても役立てることができると考えられる。

5. 土壤汚染サイトへの適用方法

本手法では汚染物質の種類の判別を行うことは原理的に不可能であるため、土地の利用履歴が既知であり、検出される可能性がある汚染物質が明らかである場合に最も有効であると考えられるが、汚染物質が未知である場合にも、汚染物質が発光バクテリアに対して急性毒性影響を示す物質であるならば適用可能である。本手法の基本的な適用方法としては、大きくは、(a) 土壤汚染サイトのスクリーニングと (b) 土壤汚染浄化モニタ

リングの2つが考えられる。従来のICP等精密分析機器を用いた分析と比較してそれぞれ以下の大きなメリットがある。

(a) 土壤汚染サイトのスクリーニングにおけるメリット

- ① 土壤汚染の疑いのあるサイトにおいて、当該手法による急性毒性試験を実施することによって、オンサイトで汚染の可能性の有無を知ることができる。
- ② 土壤汚染の疑いのあるサイトにおいて、複数の場所から採取した土壤試料を用いてそれぞれ検液を作成し、同時測定することによってその場で汚染源をある程度絞り込むことができる。

(b) 土壤汚染浄化モニタリングにおけるメリット

- ① 汚染浄化実施期間において本手法による急性毒性試験を定期的に実施することによって汚染浄化状況をほぼオンタイム・オンサイトで把握することができる。
- ② 公定法に準じた精密な分析は基本的には浄化前と浄化完了時の計2回で済ませることができるため、ICP等による室内分析回数や分析費用を大幅に削減できることが期待される。

以下に汚染サイトで行うスクリーニングテストの具体的な適用方法例を紹介する。

5.1 一次スクリーニングテスト

公定法に準ずる場合、土壤試料と1 mol/L塩酸を重量体積比3%で混合(例えば30g:1L)して1時間の振盪を行った後、孔径0.45 μmのフィルターでろ過し、抽出液を検液の原液として回収する。回収した抽出液を所定量(例えば、100 mL)分取して水酸化ナトリウム溶液で中和してpHが中性付近になるように調整する。データ解析の際に、この中和工程により容量増加した分についても希釈率として濃度補正することを忘れてはならない。また、中和過程で析出物が生じていないか確認することも重要である。なお、未中和の残りの抽出液は実験室に持ち帰り、ICP等で定性及び

定量分析用の試料とする。一次スクリーニングテストでは、この中和した抽出水をそのまま検液として、本手法と同じ方法で発光バクテリアによる急性毒性試験を行い、汚染物質の急性毒性影響の有無を確認する。

一次スクリーニングテストでは、ブランク試料として以下の2種類を用いる。

- ・第一ブランク試料：イオン交換水
- ・第二ブランク試料：抽出液として使用したものと同じ1 mol/L塩酸を水酸化ナトリウム溶液で中和したもの。

さらに、この二つのブランク試料の他、比較のため試料無添加で発光バクテリア溶液のみの測定も同時に行う。そのため、本研究で使用した測定用プレートに24個のセルがあるルミノメーターの場合、一度の試験で判定できる土壤は最大で5つということになる。つまり、24個のセルに対して、①試料無添加、②第一ブランク試料、③第二ブランク試料、④検液1、⑤検液2、⑥検液3、⑦検液4、⑧検液5を各3セルずつ割り当てることになる。

通常①、②、③で測定される発光強度の変動はほぼ同じ挙動を示すが、まれに③が①あるいは②と異なる挙動を示す場合がある。その場合、相対発光強度比の算出に使用するブランク値としては③の値を採用する。

5.2 一次スクリーニングテストのアレンジ

スクリーニング実施サイトにおいて、汚染物質があることが明らかであるにも関わらず、一次スクリーニングテストにおいて汚染物質による急性毒性影響が検知されなかった場合は、発光バクテリア溶液に添加する検液の量を増やして急性毒性影響の有無を再確認する。また、汚染濃度が低いと予想されるとき、あるいは重量体積比3%では急性毒性影響を検知できなかった場合には、検液量を増やす以外にも、あらかじめ抽出工程で土壤試料の割合を増やす、あるいは発光バクテリア溶液中の発光バクテリア濃度を高くするなどの調整を行う。なお、発光バクテリア濃度を高くする場合、ルミノメーターの検出上限を考慮し、オーバーレンジしないように調整しなければならない。そのため、例えば、発光バクテリア濃度を通

常の2倍にしたのなら、セルに分取する発光バクテリア溶液の量を通常の2分の1（つまり、1 mLではなく0.5 mL）とし、検液の添加量を50 μ Lではなく550 μ Lに変更するなどすれば、発光強度の上限は通常の試験の場合と同じであるにも関わらず、検出感度は実質的に通常の11倍にすることができる。

なお、現場で十分な時間が取れない場合は振とう時間を短縮してもよいが、以降のモニタリング測定等における連続性を持たせるために振とう時間は一定の時間に固定するなど細かな配慮が必要である。

5.3 二次スクリーニングテスト

発光バクテリアに対していずれかの検液に急性毒性影響が確認された場合、現場において十分な時間が確保されるならば、一次スクリーニングテストに続いて、次の二次スクリーニングテストを行うことが望ましい。

この二次スクリーニングテストでは、一次スクリーニングテストにおいて急性毒性影響が最も強かった試料を用いる。一次スクリーニングテストで残った抽出液から所定量（例えば、100 mL）分取して一次スクリーニングテスト同様の手順で中和し、中和完了後の抽出液を原液として、所定の希釈率になるようにイオン交換水を加え希釈率の3～7つの異なる検液を作成する。希釈率は一次スクリーニングテストで確認した急性毒性影響の大きさを考慮して任意に決定する。例えば、一次スクリーニングでの急性毒性影響が比較的大きかった場合（ $S_{t(60)}$ が20%程度）には、検液は無希釈、2倍希釈、5倍希釈、10倍希釈、20倍希釈、50倍希釈、100倍希釈とし、急性毒性影響が比較的小さかった場合（ $S_{t(60)}$ が60%程度）には、検液は無希釈、1.2倍希釈、1.5倍希釈、2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、10倍希釈とすれば、それぞれブランク試料を足すと8種類となる。各3セルずつ同じ試料の測定を行うので計24セルが必要であるが、本研究で使用しているルミノメーターは24セル付プレートを採用しているため、一連の測定は1回の試験で済む。なお、二次スクリーニングテストのブランク試料としては、通常は章5.1で述べた第二ブランク試料を用いるが、一次スク

リーニングテストにおいて第一ブランク試料と第二ブランク試料の測定結果がほぼ同じだった場合は第一ブランク試料、つまりイオン交換水を二次スクリーニングテストのブランク試料としても良い。

二次スクリーニングテストで得られた相対発光強度比のデータと、後日、ICP等で得られた定量分析値を組み合わせることによって汚染サイトに適合した検量線を作成することができる。また、この検量線と本試験で報告した表5のパラメータ値を比較することによって主汚染物質以外の副成分の影響などその汚染サイト固有の特徴を知ることができる。

5.4 土壌汚染浄化モニタリング

最初に前述の一次及び二次スクリーニングテストと同様の試験を実施し、土壌汚染サイトにおける急性毒性影響の大きさと汚染物質濃度との相関性を把握する。そして、土壌汚染浄化実施期間において、定期的に現場にて発光バクテリアによる急性毒性試験を実施し、急性毒性影響の大きさの変動をモニタリングする。最終的に、本手法によって急性毒性影響がほぼ無くなったと判断された段階、つまり汚染物質が完全に浄化されたと推測された段階で改めて土壌試料を実験室に持ち帰り、公定法に準じた分析を行い、汚染物質が浄化されたことを確認する。

以上は本手法の土壌汚染サイトへの基本的な適用方法であるが、各汚染サイトの特性や試験目的に応じて適切なアレンジを施すことが望ましい。

6. まとめ

土壌汚染対策法の第二種特定有害物質に指定されている重金属等9種について発光バクテリア（*Vibrio fischeri*）による急性毒性試験を実施した結果、以下のことが明らかになった。

- 1) Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} , As^{3+} , As^{5+} , Se^{4+} は、発光バクテリアに対して濃度依存性のある急性毒性影響を示した。
- 2) シアンは発光バクテリアに対して毒性影響を示さず、逆に発光強度の増加が認められた。

- 3) ふっ素は発光バクテリアに対して急性毒性を持たない。
- 4) ほう素は発光バクテリアに対する急性毒性が非常に小さいため、定量評価は困難であるが、急性毒性影響の閾値は土壌含有量基準値以下であるため、スクリーニングには利用可能であると思われる。
- 5) 六価クロムについては、溶存形態の違い(CrO_4^{2-} 及び $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$)によって発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響に反応速度的な差が見られたが、曝露時間が長くなるにしたがって急性毒性影響の大きさ自体の差は小さくなった。
- 6) 砒素の価数(3価及び5価)の違いによる急性毒性影響の違いは比較的小さいことがわかった。
- 7) セレンは価数の違いによって発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響が大きく異なり、4価セレン(亜セレン酸)が極めて強い急性毒性を示したのに対して、6価セレン(セレン酸)は急性毒性を全く示さなかった。

当該手法によって土壌汚染のスクリーニングを行う場合、土壌溶出量基準を満たせないが、土壌含有量基準に関しては、Pb, Hg, Cr^{6+} , As, Se及びBについて十分に適合できる可能性があることが示された。さらに、Cd, Pb, Hg, Cr^{6+} , As及びSeについて発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響の定量化を行い、各パラメータ値を取得した。本研究の結果から確立された一定条件下で行われた試験から得られた値ならば、矛盾せずに相互利用できると考えられるため、取得したパラメータ値と相関式を適用することによって、前述の重金属等6種個々によって汚染された土壌について汚染濃度を定量評価することが可能であると考えられる。しかしながら、本研究では、個々の重金属等による汚染については評価可能であるが、複数の汚染物質によって汚染された複合汚染の評価には現状では適用できないと思われるため、今後は複数の重金属等によって汚染された複合汚染についても評価可能なようにさらなるデータの蓄積が望まれる。

謝 辞

本研究にあたり、試料及び試験装置のご提供並びに適切なご助言をいただきました日立化成株式会社の皆様には、たいへんお世話になりました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 荒川 豊・野々村誠・栗田恵子・杉森博和(2007a): 海洋性発光バクテリアを用いた簡易毒性試験方法. 東京都立産業技術研究センター研究報告, 2, 110-111.
- 荒川 豊・野々村誠・栗田恵子(2007b): 発光バクテリアを用いたバイオアッセイによる工場排水中の有害物質のスクリーニング. 東京都立産業技術研究センター平成19年度研究発表会要旨集, <http://www.iri-tokyo.jp/research/present/19/bio/bi02.pdf> (2013.4.22閲覧).
- 北橋伸一(2000): マイクロトックスによる最終処分場浸出水の毒性評価. 千葉県環境研究センター1999年度発表資料, http://www.wit.pref.chiba.jp/bank/rd/file/k_repo.pdf (2013.4.22閲覧).
- 北橋伸一(2001): マイクロトックスによる最終処分場浸出水の毒性評価(2). 千葉県環境研究センター2000年度発表資料, <http://www.wit.pref.chiba.jp/bank/rd/file/11-8.pdf> (2013.4.22閲覧).
- 国立環境研究所(1998): 環境中の有機塩素化合物の暴露量評価と複合健康評価に関する研究(平成4年度～8年度). 国立環境研究所特別研究報告書, SR-25-1998.
- 国立環境研究所(2001): 環境中の化学物質総リスク評価のための毒性試験系の開発に関する研究(平成10～12年度). 国立環境研究所特別研究報告書, SR-41-2001.
- 国立環境研究所(2006): 化学物質環境リスクに関する調査・研究(平成13～17年度). 国立環境研究所特別研究報告書, SR-76-2006.
- 笹島武司・川崎清人・土原義弘・森 友子・楠井隆史・佐伯真由美・橋本隆志(2005): 産業廃棄物最終処分場浸出水のバイオアッセイに関する研究(第1報). 平成17年度富山県環境科学センター年報, 33, 49-58.
- 笹島武司・出口 修・平野千里・楠井隆史・橋本隆司・

- 荒井章寛 (2006): 産業廃棄物最終処分場浸出水のバ
イオアッセイに関する研究 (第2報). 平成18年度富
山県環境科学センター年報, 34, 114-119.
- 土壌汚染対策法 (2002): 平成十四年五月二十九日法律
第五十三号
- 日本化学会 (2004): 化学便覧 基礎編 改訂5版 II.
丸善, 332-333.
- 山川雅弘・水谷博和・前田雅也・早川修二・伊藤友夫・
高桑三明・中谷純夫 (1998): バイオアッセイを用
いた毒性評価について (第3報) —工場排水の評価
について—. 三重県環境科学センター研究報告, 18,
9-16.
- Codina, J. C., A. P.-Garcia and A. de Vicente (1994):
Detection of heavy metal toxicity and genotoxicity
in wastewaters by microbial assay. *Water Science
Technology*, 30, 145-151.
- Fulladosa, E., J.C. Murat, M. Martínez, I. Villaescusa
(2005): Patterns of metals and arsenic poisoning in
Vibrio fischeri bacteria. *Chemosphere*, 60, 43-48.
- Gellert, G. (2000): Sensitivity and significance of
luminescent bacteria in chronic toxicity testing based
on growth and bioluminescence. *Ecotoxicology and
Environmental Safety*, 45, 87-91.
- Hsieh, C.-Y., M.-H. Tsai, D. K. Ryan and O. C. Pancorbo
(2004): Toxicity of the 13 priority pollutant metals to
Vibrio fischeri in the Microtox® chronic toxicity test,
The Science of the Total Environment, 320, 37-50.
- ISO (2007): ISO 11348-1 Water quality-Determination
of the inhibitory effect of water samples on the light
emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-
Part 1: Method using freshly prepared bacteria.
- ISO (2007): ISO 11348-2 Water quality-Determination
of the inhibitory effect of water samples on the light
emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-
Part 1: Method using liquid-dried bacteria.
- ISO (2007): ISO 11348-3 Water quality-Determination
of the inhibitory effect of water samples on the light
emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-
Part 1: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO (2010): ISO 21338 Water quality-Kinetic
determination of the inhibitory effects of sediment,
other soils and coloured samples on the light emission
of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test).
- Kaiser, K. L. E. and V. Palabrica (1991): Photobacteria
phosphoreum Toxicity Data Index. *Water Pollution
Research Journal of Canada*, 26, 361-431.
- McCloskey, J. T., M. C. Newman and S. B. Clark (1996):
Predicting the relative toxicity of metal ions using ion
characteristics: Microtox® bioluminescence assay.
Environmental Toxicology and Chemistry, 15, 1730-
1737.
- McFeters, G. A., P. J. Bond, S. B. Olson and Y. T. Tchan
(1983): A comparison of microbial bioassays for the
detection of aquatic toxicants. *Water Research*, 17,
1757-1762.
- Mowat, F.S. and K.J. Bundy (2002): Experimental and
mathematical computational assessment of the acute
toxicity of chemical mixtures from the Microtox®
assay. *Advances in Environmental Research*, 6, 547-
558.
- Urbanczyk, H., J. C. Ast, M. J. Higgins, J. Carson and P.
V. Dunlap (2007): Reclassification of *Vibrio fischeri*,
Vibrio logei, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis*
as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio
logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and
Aliivibrio wodanis comb. nov., *International Journal of
Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2823-
2829.

(受付: 2013年4月22日, 受理: 2013年8月29日)