発光バクテリアを用いた重金属等の土壤汚染簡易評価手法の開発 2 —メッキ金属に関する急性毒性評価—*

杉田 創**・駒井 武***・井本由香利**・原 淳子**

Development of simplified evaluation method on heavy metals soil pollution using luminous bacteria 2 — Acute toxicity evaluation of plating metals —

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

Abstract

Cd, Pb and Cr^{6+} have been categorized into Class II Specified Chemical Substances in The Soil Contamination Countermeasures Act of Japan, which have generally been used as plating metals. Fe, Ni, Cu, Zn, Ag and Sn also have widely been used as plating metals. In this study, these 9 plating metals were examined by an acute toxicity test using luminous bacteria (*Vibrio fischeri*). In the results, it was shown that this bioassay method is available as the screening method for soil pollution based on several legal reference values such as the soil content reference values. In addition, the correlation with the degree of acute toxicity effects on the luminous bacteria with each concentration of plating metals were found and quantified. It could allow the quantitative evaluation of the soil pollution by each of the plating metals.

Key Words: Plating metals, Acute toxicity evaluation, Luminous bacteria, Soil pollution evaluation method, Soil Contamination Countermeasures Act

要 旨

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 Cd, Pb 及び Cr^{6+} はメッキ金属としても一般に使用されている物質であるが, Fe, Ni, Cu, Zn, Ag 及び Sn もメッキ金属として広く使用されている。本研究では, これら 9 種のメッキ金属に対する発光バクテリアによる急性毒性試験を実施した。その結果, これらメッキ金属について, 種々の基準値に基づく土壤汚染のスクリーニング手法

* 平成24年度資源・素材関係学協会合同秋季大会にて一部発表 (2012年9月11日)

日本地下水学会2012年秋季講演会にて一部発表 (2012年9月27日)

第23回 廃棄物資源循環学会研究発表会にて一部発表 (2012年10月23日)

** 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 地質調査総合センター 地圏資源環境研究部門 (〒305-8567 茨城県つくば市東1-1-1 産総研 第七事業所)

Institute for Geo-Resources and Environment, Geological Survey of Japan, 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

として本バイオアッセイ手法を利用できる可能性が示された。さらに、各メッキ金属濃度と急性毒性影響の大きさと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、これらメッキ金属に関する土壤汚染の定量評価を可能とした。

キーワード：メッキ金属，急性毒性評価，発光バクテリア，土壤汚染評価，土壤汚染対策法

1. はじめに

地金属の腐食や摩耗を防ぐ工業的な目的あるいは色彩や光沢など装飾的な目的で、多種にわたる金属によるメッキ処理が行われている。メッキ金属として一般に使用されている金属種としては、Au, Ag, Ptなどの貴金属類、Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Sn及びPbなどの重金属等が挙げられる。また、メッキ液にはAsやCN等溶剤として使われる有害物質が含まれている場合も多い。メッキ工場やその跡地などでは、メッキ液あるいはこれらの廃液等の漏洩による土壤汚染の懸念がある。また、廃棄物として埋立処理された電化製品等に含まれるメッキ金属の溶出による周辺土壤の汚染のリスクも考えられる。

日本では、重金属等による土壤汚染については、土壤汚染対策法(2002年5月29日法律第53号)によって規制されている。この法律では、Cd, Cr⁶⁺, CN, Hg, Se, Pb, As, F, Bの9物質が第二種有害物質として指定されており、一般にこれらを指して「重金属等」と呼んでいる。しかしながら、第二種特定有害物質以外にも、メッキ金属として使用されている重金属等の中には、過剰に摂取すれば人体に対して有害となり得る物質もあり、第二種特定有害物質同様にリスク評価等を行う必要があると考えられる。例えば、産業技術総合研究所 化学物質リスク管理研究センターは、新エネルギー・産業技術総合開発機構委託プロジェクトとして実施した各種化学物質に関するヒト健康リスク評価や生態リスク評価の結果を「詳細リスク評価書シリーズ」として出版するとともに、Web上で公開しており、メッキ金属としては、Pb, Cd, Ni, Zn, Cr⁶⁺の毒性等について詳細にまとめている。なお、Cuについては、防汚塗料として使用されている銅ピリチオンに関してのみを報告している。また、環境省においても多くの化学物質について環境リスク評価が行

われ、「化学物質の環境リスク評価」としてWeb上で公開しており、メッキ金属としては、Pb, Cr⁶⁺, Cuについて詳細にまとめられている。なお、Snについてはジブチルスズ化合物に関してのみ報告されている。また、ZnとNiについては、環境省の中央環境審議会で審議された「亜鉛に係る対策の基本的な考え方」と「ニッケル化合物に係る健康リスク評価について」の資料が別途Web上に公開されている。その他、食品産業センターもWeb上でHACCP関連情報データベースを公開しており、Zn, Cd, Sn, Cu, Pb, Crの毒性等について記載している。Agについては、近年抗菌作用を利用した用途が増えているが、銀イオン及び銀ナノ粒子による生体影響に関する報告もある(例えば、宮山ほか, 2012)。Feについては、他のメッキ金属ほどの毒性に関するデータは少ないが、水谷ほか(2013)による急性鉄中毒の報告やMerck Sharp and Dohme corporationなど製薬会社のオンラインデータベースなどで毒性及び症例が紹介されている。

上記したように、多くの研究者の努力によって、メッキ金属についても、その毒性影響による生態リスク及び健康リスクについて明らかになりつつあるが、土壤汚染を対象とした評価手法は確立されていないのが現状である。

一方、著者らは、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、本法の土壤汚染評価手法としての有効性を検討した結果を報告した(杉田ほか, 2013)。そして、6物質(Cd, Pb, Hg, Cr⁶⁺, As及びSe)について、これら重金属等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、土壤汚染の定量評価を可能とした。

発光バクテリアに及ぼす急性毒性影響の大きさ

から土壤中の汚染濃度を推定する本手法は、他のメッキ金属に対しても有効である可能性が高いと予想される。そこで、本研究では土壤汚染対策法で規制されているCr、Cd及びPb以外にもメッキ金属として広く一般に使われているFe、Ni、Cu、Zn、Ag及びSnに着目し、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た。そして、得られたデータを基に各メッキ金属濃度と急性毒性の強さとの相関関係の定量化を試みた。なお、本研究も前報同様に、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などの公的溶出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。土壤汚染浄化モニタリングにおけるメリットとしては、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ことや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。

2. 実験方法

本研究で使用した実験試薬及び試験方法は杉田ほか(2013)とほぼ同様である。その概略を下記する。

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1g(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

各メッキ金属を含む検液の作成には、和光純薬工業株式会社から購入したSnCl₂及びAgNO₃の粉末試薬、並びにFe、Ni、Cu、Znの各硝酸溶液試薬を使用した。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、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した。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。この予備試験の結果は、参考として後述の2.4項に記述している。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 発光強度の測定方法

本研究における発光バクテリアによる急性毒性試験手順の概略を図1に示す(杉田ほか(2013)から引用)。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（同一条件で試験したときの測定値の平均値からの差）は概ね5 %以内であった。

2.3 急性毒性の評価方法

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、その値をそのセルの発光強度の初期値 I_{Blank0} とした。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 I_{Blank0} で割った値 ($I_{\text{Blank}} / I_{\text{Blank0}}$) 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、各試験物質の急性毒性影響の強さは、次式で表される発光バクテリアの相対発光強度比 $S[\%]$ の値として表され、 S の値が小さいほど毒性影響が大きいことを意味する。

$$S = (I_X / I_{X0}) / (I_{\text{Blank}} / I_{\text{Blank0}}) \times 100 \quad (1)$$

注) 杉田ほか (2013) から引用

図1 発光バクテリアによる急性毒性試験の手順

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

なお、前述したように、それぞれの発光強度 I の測定誤差(平均値からの差)は概ね5 %以内であった。

2.4 予備試験の結果について

発光バクテリアの発光強度に及ぼす検液のpHの影響について調べた予備試験の結果の一部を図2に示す。検液のpHが4～9の範囲では、いずれの S の値もほぼ100 %付近であり、pHの影響は見られない。また、検液のpHと測定試料(検液添加直後の発光バクテリア溶液)のpHの対応値を表1に示す。検液のpHが4～9の範囲は、検液添加後の発光バクテリア溶液では、pH5.2～7.7に対応する。ISO 11348では、発光バクテリア溶液の望ましいpH範囲は6.0～8.5とされているが、本試験結果では、pH8.5ではややブランクよりも高い値を示している。以上の結果から、本測定手法における適切な検液のpH範囲は4～9であると見なした。

図2 発光バクテリアの相対発光強度比に及ぼす検液のpHの影響

Fig. 2 Effects of pH of sample solution on relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria.

3. 急性毒性試験結果

3.1 メッキ金属の種類ごとの急性毒性試験の結果

本試験で得られた Fe, Ni, Cu, Zn, Ag 及び Sn に関する試験結果を杉田ほか (2013) で報告した Cr^{6+} , Cd 及び Pb の試験結果とともに図 3 (a) ～ (i) に元素番号の小さい順に示す。これらの図は、横軸に反応時間 t [min], 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。なお、クロムのメッキ工程では一般的に CrO_3 を溶解させたものをメッキ液として使用することが多いため、下記の反応により CrO_4^{2-} が生じると考えられる。

そこで、杉田ほか (2013) で報告した Cr^{6+} に関する 2 種類のデータ (CrO_4^{2-} 及び $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) のうち、 CrO_4^{2-} についてのデータを引用・比較するこ

ととした。

メッキ金属溶液を発光バクテリア溶液に添加した場合、全体的には、時間の経過に伴い S は減少し、また S の減少度合いは各メッキ金属濃度が高くなるほど大きくなっている。つまり、本研究で対象としたメッキ金属は全て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明らかになった。

3.2 メッキ金属の種類による急性毒性影響の比較

メッキ金属の種類による急性毒性影響の大きさを比較するため、代表として検液中のメッキ金属濃度が 10 mg/L 及び 100 mg/L に関するものを図 4 (a) 及び (b) にそれぞれ示す。なお、これら二つの濃度を代表として示した理由は、全ての試験物質について試験を行った濃度であり、かつ、それぞれのデータを図に落とし込んだときに、プロットが図中で重なりすぎず比較的個々のプロットが見やすく、また、濃度が 10 倍異なるというわかりやすい条件で比較できるためである。また、それぞれの図における反応時間 15 分及び 60 分における急性毒性影響の大きさの比較を表 2 に示す。図 4 及び表 2 から濃度だけでなく、反応時間によっても急性毒性影響の大きさの順位が変わっていることがわかる。しかしながら、全体的な傾向としては、発光バクテリアに対する急性毒性影響の大きさは Cu, Zn, Ag, Sn 及び Pb が大きく、 Cr^{6+} , Fe, Ni 及び Cd は小さい。

3.3 発光バクテリアによるメッキ金属の検出性及び急性毒性影響の閾値

(1) 本試験条件でのメッキ金属の検出限界値

本試験条件での検出限界値は、各メッキ金属に関して、発光バクテリアに急性毒性影響を与えた最も低い濃度であると見なした。表 3 に本試験結果に基づく本試験条件における各メッキ金属の検出限界値を示す。なお、これらの値は反応時間 60 分を基準として判断したものである。検出限界値が低いほど検出性が高いと見なすならば、表 3 からメッキ金属の検出性の高さは下記の順となる。

表 1 検液の pH と測定試料の pH の対応表

Table 1 Correspondence table between pH of sample solution and pH of measurement solution.

検液の pH	測定試料の pH
3.0	4.3
3.3	4.6
4.0	5.2
5.8	6.0
9.0	7.7
9.8	8.5
10.3	9.0
10.8	9.5
11.0	9.7

注) Cr^{6+} , Cd 及び Pb に関するデータは杉田ほか (2013) から引用

図3 発光細菌の相対発光強度比の経時変化：(a) Cr^{6+} , (b) Fe, (c) Ni, (d) Cu, (e) Zn, (f) Ag, (g) Cd, (h) Sn, (i) Pb

Fig. 3 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time: (a) Cr^{6+} , (b) Fe, (c) Ni, (d) Cu, (e) Zn, (f) Ag, (g) Cd, (h) Sn, (i) Pb.

図4 発光バクテリアの相対発光強度比の経時変化：(a) 10 mg/L, (b) 100 mg/L

Fig. 4 Change of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria with time: (a) 10 mg/L, (b) 100 mg/L.

表2 発光バクテリアに及ぼすメッキ金属の急性毒性影響の大きさの比較

Table 2 Comparison of acute toxicity strength of plating metals on luminous bacteria.

比較条件		急性毒性影響の大きさ
検液中の 各メッキ金属濃度	反応時間	
10 mg/L	15 分	Cu > Pb > Sn, Ag > Fe, Ni, Zn, Cr ⁶⁺ , Cd
10 mg/L	60 分	Pb, Cu > Sn, Ag > Zn > Fe, Ni > Cd > Cr ⁶⁺
100 mg/L	15 分	Cu > Pb > Sn > Zn > Ag > Cd, Fe > Cr ⁶⁺ , Ni
100 mg/L	60 分	Ag > Cu, Zn > Pb, Sn > Ni > Cr ⁶⁺ , Fe > Cd

なお、この急性毒性の強さの大小関係には検出性の高さと原子番号あるいは価数による特別な傾向は見られない。

(2) 発光バクテリアに及ぼすメッキ金属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メッキ金属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メッキ金属の「閾値」でもある。「閾値 (いきち)」とは、ある値以下であれば影響を与えない最大の暴露量のことである (経産省, 2007)。表 3 の値の 21 分の 1 の値を本試験結果から得られた発光バクテリアに及ぼすメッキ金属の急性毒性影響の閾値と見なし、メッキ金属種ごと

に対応する閾値を表 4 に示す。また、「土壤汚染対策法」の「土壤含有量基準」、「水質汚濁防止法 (1970 年 12 月 25 日法律第 138 号)」の「排水基準」、「金属等を含む産業廃棄物に係る判定基準を定める省令 (1973 年 2 月 17 日総理府令第 5 号)」の「産業廃棄物の海洋投入処分に係る判定基準」についても表 4 に併記した。なお、通常、土壤含有量基準の値は、土壤単位重量 [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、抽出液中の汚染物質濃度として換算した値を載せている。ここで、土壤含有量試験における固液比は、3 : 100 であるので、汚染物質 X の土壤含有量 γ [mg/kg] と溶出試験で得られる抽出液中の汚染物質 X の濃度 ε [mg/L] との関係は下式で表される。

$$\varepsilon = \gamma \times (3/1000) \div (100/1000)$$

表3 本試験条件における発光バクテリアによる各メッキ金属の検出限界値

Table 3 Detection limits of plating metals on luminous bacteria in the present test conditions.

対象物質	検出限界値 ($t = 60 \text{ min}$) ^{注)}
Cr ⁶⁺	50～75 mg/L
Fe	10 mg/L
Ni	5～10 mg/L
Cu	2～5 mg/L
Zn	5 mg/L
Ag	5～10 mg/L
Cd	50～100 mg/L
Sn	2～5 mg/L
Pb	2～5 mg/L

注) 発光バクテリア溶液 1 mL に対し検液 50 μ L の場合の検液中の濃度の値である。

また、水質汚濁防止法に Ni の排水基準がないため、代わりに「海洋汚染等及び海上災害の防止に関する法律施行令(1971年6月22日政令第201号)」で定められている値を参考として載せた。これらの基準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本手法が適用可能であると考えられる。Cr⁶⁺、Cd 及び Pb は、土壤汚染対策法の土壤含有量基準値をほぼクリアできる。また、Fe、Cu 及び Zn は、水質汚濁防止法の排水基準をクリアできる。加えて、Ni は海洋汚染等及び海上災害の防止に関する法律の基準値をクリアできる。したがって、発光バクテリア溶液と検液の混合割合あるいは抽出時の土壌と溶媒の割合を調整する等の工夫によって、各メッキ金属について特定の法律の基準値に照らした汚染評価を下すことが可能であると考えられる。Ag 及び Sn については参考となる適当な基準値が存在しないが、他のメッキ金属と比べても検出性が高く、必要があれば本手法によって汚染評価を行うことは十分可能であると考えられる。

表4 発光バクテリアに及ぼすメッキ金属の急性毒性影響の閾値及び各種基準値
Table 4 Threshold values for acute toxicity effect of plating metals on luminous bacteria and legal reference values.

対象物質	閾値 ($t = 60 \text{ min}$) ^{注1)}	土壤汚染対策法 土壤含有量基準 ^{注2)}	水質汚濁防止法 排水基準	産業廃棄物の 海洋投入処分に 係る判定基準
Cr ⁶⁺	2.4～3.6 mg/L	7.5 mg/L	0.5 mg/L	0.05 mg/L
Fe	0.48 mg/L	—	10 mg/L	—
Ni	0.24～0.48 mg/L	—	1.2 mg/L ^{注3)}	0.12 mg/L
Cu	0.095～0.24 mg/L	—	3 mg/L	0.14 mg/L
Zn	0.24 mg/L	—	2 mg/L	0.8 mg/L
Ag	0.24～0.48 mg/L	—	—	—
Cd	2.4～4.8 mg/L	4.5 mg/L	0.03 mg/L	0.01 mg/L
Sn	0.095～0.24 mg/L	—	—	—
Pb	0.095～0.24 mg/L	4.5 mg/L	0.1 mg/L	0.01 mg/L

注1) 反応時間 60 分を基準とした場合の測定試料中の濃度の値。

注2) 土壤含有量試験における抽出液中の濃度として換算した値。

注3) 海洋汚染等及び海上災害の防止に関する法律施行令より抜粋。

4. 解析及び考察

4.1 メッキ金属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反応時間としては、Microtox® (McFeters et al., 1983; Codina et al., 1994; McCloskey et al., 1996; Gellert, 2000; Mowat and Bundy, 2002; Hseih et al., 2004; Fulladosa et al., 2005) では15分、ISO (ISO 11348-1, 2007; 11348-2, 2007; 11348-3, 2007; 21338, 2010) では、5分、15分、30分の3つが推奨されている。図3に示した本試験結果を見る限り、反応時間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、Cu, Zn, Cd, Sn 及び Pb に関しては反応時間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、Cr, Fe, Ni 及び Ag に関しては反応時間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と思われる。そこで、各試験で得られた反応時間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メッキ金属の濃度 C^* [mg/L] に対して片対数プロットしたものを図5 (a) ～ (i) 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、1つの近似曲線上にプロットされと思われるデータを黒塗りのシンボルで示している)。なお、図中に示されている近似曲線は、直線関係があるように見える範囲のデータを用いて下式によって求めたものである。

$$S_{t(60)} = \alpha_{t(60)} - \beta_{t(60)} \log C^* \quad (2)$$

ここで、 $\alpha_{t(60)}$ 及び $\beta_{t(60)}$ は式 (2) 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 (2) に適合できると考えられる各メッキ金属の濃度範囲と、これら試験データの近似式 (2) への適用によって得られたパラメータ $\alpha_{t(60)}$, $\beta_{t(60)}$ の値及び相関係数 R を表5に記す。このパラメータ $\alpha_{t(60)}$ 及び $\beta_{t(60)}$ の値を用いれば、実測した $S_{t(60)}$ の値を近似式 (2) に代入することによって汚染物質の濃度を概算することが可能である。

4.2 メッキ金属の急性毒性影響の評価

表5のパラメータ値と近似式 (2) を用いて、 $S_{t(60)}$ の値が100, 80, 50及び0%になるときの各メッキ金属の濃度 $C^*_{s(100)}$, $C^*_{s(80)}$, $C^*_{s(50)}$ 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。また、比較しやすいように、 $C^*_{s(100)}$, $C^*_{s(80)}$, $C^*_{s(50)}$ 及び $C^*_{s(0)}$ をそれぞれ基準としたときのメッキ金属の急性毒性の強さの順を表7に示す。

$C^*_{s(100)}$ 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、検出限界濃度の目安にもなる。表7に示されている $C^*_{s(100)}$ を基準とした急性毒性影響の大きさの順は、前項3.3 (1) 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、Pb, Cu, Sn の検出性が高く、Cd 及び Cr^{6+} の検出性が低いという傾向は一致している。

一方、 $C^*_{s(0)}$ も仮想的なものではあるが、試験生物群が全て死滅するときのメッキ金属濃度である。ただし、 S がおよそ10%以下になると、 S が低くなるほど近似式 (2) から求められる近似曲線から大きく外れるようになるため、 $C^*_{s(0)}$ はあくまで外挿して求めた値であり、 $C^*_{s(0)}$ の絶対値自体に有効性はほとんどないと思われる。

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。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る。また、 $C^*_{s(50)}$ 同様に、本研究の $C^*_{s(80)}$ は EC_{20} に対応するものであり、急性毒性影響の大きさを評価するためのひとつの指標として利用することができる。Fulladosa et al. (2005) は Microtox® を使用して pH6あるいは7において反応時間15分での EC_{20} を報告している。彼らが試験した物質で本研究と重なる物質は Pb^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 及び Cr^{6+} であり、pH6～7での EC_{20} の値として、それぞれ 0.04～0.06, 0.11, 0.18～0.26, 0.32～0.46, 3.7～

図5 メッキ金属濃度に対する相対発光強度比の片対数プロット：(a) Cr, (b) Fe, (c) Ni, (d) Cu, (e) Zn, (f) Ag, (g) Cd, (h) Sn, (i) Pb

Fig. 5 Plot of relative luminescence intensity ratio of luminous bacteria against logarithm of plating metal concentration: (a) Cr, (b) Fe, (c) Ni, (d) Cu, (e) Zn, (f) Ag, (g) Cd, (h) Sn, (i) Pb.

3.9及び50.5～205 mg/Lを報告している。つまり、急性毒性の強さは下記ようになる。

この傾向は、本研究で得られた $C^*_{S(80)}$ を基準と

した急性毒性の強さの傾向とは若干異なっており、むしろ $C^*_{S(100)}$ を基準としたものに近いものである（表7）。加えて、Fulladosa et al. (2005) が報告した EC_{20} の値自体も、 Cr^{6+} を除けば、本研究で報告した $C^*_{S(100)}$ の値に非常に近い値であった（表6）。Fulladosa et al. (2005) は閾値

表 5 式 (2) 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 (2).

対象物質	適用濃度範囲 C^* [mg/L]	$S_{t(X)} = \alpha_{t(X)} - \beta_{t(X)} \log C^*$		
		$\alpha_{t(X)}$	$\beta_{t(X)}$	R
Cr^{6+}	2.38~23.8	126.59	74.08	0.996
Fe	0.48~19.0	89.59	15.56	0.997
Ni	0.95~23.8	91.63	31.46	0.999
Cu	0.24~4.76	61.13	58.78	0.972
Zn	0.48~3.57	64.99	90.70	0.993
Ag	0.48~2.38	51.23	96.04	0.992
Cd	2.38~23.8	112.26	39.51	0.992
Sn	0.24~23.8	71.49	30.97	0.996
Pb	0.095~23.8	69.87	28.31	0.995

表 6 $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(80)}$, $C^*_{S(50)}$, $C^*_{S(0)}$ の計算値

Table 6 Calculated values of $C^*_{S(100)}$, $C^*_{S(80)}$, $C^*_{S(50)}$ and $C^*_{S(0)}$.

対象物質	適用濃度範囲 C^* [mg/L]	$C^*_{S(100)}$ [mg/L]	$C^*_{S(80)}$ [mg/L]	$C^*_{S(50)}$ [mg/L]	$C^*_{S(0)}$ [mg/L]
Cr^{6+}	2.38~23.8	2.29	4.26	10.8	51.2
Fe	0.48~19.0	0.21	4.13	350	572000
Ni	0.95~23.8	0.54	2.34	21.0	817
Cu	0.24~4.76	0.22	0.48	1.55	11.0
Zn	0.48~3.57	0.41	0.68	1.46	5.21
Ag	0.48~2.38	0.31	0.50	1.03	3.42
Cd	2.38~23.8	2.04	6.55	37.7	694
Sn	0.24~23.8	0.12	0.53	4.94	203
Pb	0.095~23.8	0.09	0.44	5.03	294

表 7 $C^*_{S(X)}$ に基づくメッキ金属の急性毒性影響の大きさの比較

Table 7 Comparison of acute toxicity strength of plating metals on luminous bacteria based on $C^*_{S(X)}$.

$C^*_{S(X)}$	急性毒性影響の大きさ
$C^*_{S(100)}$	$\text{Pb, Sn} > \text{Fe, Cu} > \text{Ag} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Cr}^{6+}$
$C^*_{S(80)}$	$\text{Pb, Cu, Ag, Sn} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Fe, Cr}^{6+} > \text{Cd}$
$C^*_{S(50)}$	$\text{Ag} > \text{Zn, Cu} > \text{Sn, Pb} > \text{Cr}^{6+} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Fe}$
$C^*_{S(0)}$	$\text{Ag} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr}^{6+} > \text{Sn} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Fe}$

としてEC₂₀の値を採用することを提唱しているが、これらの値が本研究で求めたC*_{s(100)}の値に近い値であったことから、本研究ではC*_{s(100)}の値を閾値と見なし、評価指標として使用することが妥当であると考えられる。また、反応時間についてもFulladosa et al. (2005)では15分を、ISOでは5分、15分及び30分を推奨しているが、本研究で採用した60分でも問題は無く、むしろ急性毒性の影響が急激に生じている途中である30分以内の測定では、わずかな測定時間の違いでも測定値の誤差が大きくなることが予想されるため、毒性影響が幾分緩やかになる30分以降の測定値を用いて評価する方が望ましいと考えられる。

4.3 第二種特定有害物質との比較

本研究で得られたメッキ金属に関するデータに杉田ほか(2013)で報告した第二種特定有害物質に関するデータを加えて、急性毒性影響についてC*_{s(100)}とC*_{s(50)}を基準に比較すると下記の様になる。

C*_{s(100)} 基準: As³⁺, As⁵⁺ > Pb, Sn, Hg > Fe, Cu > Ag > Zn > Ni > Cr⁶⁺ (as Cr₂O₇²⁻) > Se⁴⁺ > Cd > Cr⁶⁺ (as CrO₄²⁻) > Se⁶⁺

C*_{s(50)} 基準: Hg > As³⁺ > As⁵⁺ > Ag > Zn, Cu > Sn, Pb > Se⁴⁺ > Cr⁶⁺ (as Cr₂O₇²⁻) > Cr⁶⁺ (as CrO₄²⁻) > Ni > Cd > Fe > Se⁶⁺

一般的に生物群への影響が大きい化学物質として知られているAgやZn及びCuは、本試験においてもかなり高い急性毒性影響を持つことが示されている。一方、人体への毒性影響が比較的小さいと言われているSnについても、少なくとも発光バクテリアに対しては、Pbに匹敵する急性毒性影響を持つことが明らかにされた。また、Niの急性毒性影響は他のメッキ金属と比べると比較的小さいが、おおよそCr程度であると見なせる。Feについては、閾値は低い、C*_{s(50)}の値は極めて高いため、急性毒性影響はかなり小さいと考えられる。

以上、これまで述べてきたように、土壤汚染対策法の対象となっていないメッキ金属についても

発光バクテリアに対して急性毒性影響を示すことから、第二種特定有害物質同様に本手法によって土壤汚染評価を行うことが可能であると考えられる。

5. まとめ

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Cd, Pb及びCr⁶⁺は、メッキ金属としても広く使用されている物質であるが、これら以外にも多種の重金属等がメッキ金属として使用されている。本研究では、杉田ほか(2013)で報告したCr, Cd, Pbを含め、メッキ金属として一般に使われているFe, Ni, Cu, Zn, Ag及びSnに着目し、これら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。その結果、杉田ほか(2013)において土壌含有量基準のあるCd, Pb及びCr⁶⁺について本法が十分に適合できる可能性があることを報告したが、他のメッキ金属についても水質汚濁防止法の排出基準や産業廃棄物の海洋投入処分に係る判定基準等に準じたスクリーニングを含めた汚染評価を行える可能性が本研究によって示された。さらに、本研究ではメッキ金属9種(Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Sn, Pb)の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。得られたパラメータ値と相関式を適用することによって、前述のメッキ金属9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、個々のメッキ金属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。そのため、今後は複数のメッキ重金属あるいはメッキ金属以外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

- 環境省 (2003)：ニッケル化合物に係る健康リスク評価について。中央環境審議会 大気環境部会 健康リスク総合専門委員会 (第3回)。https://www.env.go.jp/council/toshin/t07-h1503/mat_02-4.pdf. (2016.5.26閲覧)。
- 環境省 (2005)：亜鉛に係る対策の基本的な考え方。中央環境審議会 水環境部会 水生生物保全排水規制等専門委員会 (第3回)。https://www.env.go.jp/council/09water/y099-03/mat06.pdf. (2016.5.26閲覧)。
- 環境省 (2010)：ジブチルスズ化合物、化学物質の環境リスク評価8。http://www.env.go.jp/chemi/report/h22-01/pdf/chpt1/1-2-2-05.pdf. (2016.5.26閲覧)。
- 環境省 (2010)：鉛及びその化合物、化学物質の環境リスク評価8。https://www.env.go.jp/chemi/report/h22-01/pdf/chpt1/1-2-3-03.pdf. (2016.5.26閲覧)。
- 環境省 (2014)：6価クロム化合物、化学物質の環境リスク評価10。http://www.env.go.jp/chemi/report/h24-01/pdf/chpt1/1-2-3-02.pdf. (2016.5.26閲覧)。
- 環境省 (2015)：銅及びその化合物、化学物質の環境リスク評価13。https://www.env.go.jp/chemi/report/h27-01/pdf/chpt1/1-2-2-10.pdf. (2016.5.26閲覧)。
- 経済産業省 (2007)：化学物質のリスク評価のためのガイドブック 実践編。http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/pdf/guidebook_jissen.pdf. (2016.3.11閲覧)。
- 杉田 創・駒井 武・井本由香利・原 淳子・今泉博之 (2013)：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－。地下水学会誌, 55 (4), 329-347。
- (一財) 食品産業センター:HACCP 関連情報データベース。https://haccp.shokusan.or.jp/information/other/chemical/chemical_factor/metal/. (2016.11.8閲覧)
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構・産総研 化学物質リスク管理研究センター (2006)：詳細リスク評価書シリーズ9 鉛。https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/1-25.html. (2016.5.26閲覧)。
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構・産総研 化学物質リスク管理研究センター (2007)：詳細リスク評価書シリーズ10 銅ピリチオン。https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/1-14.html. (2016.5.26閲覧)
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構・産総研 化学物質リスク管理研究センター (2008)：詳細リスク評価書シリーズ13 カドミウム。https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/1-17.html. (2016.5.26閲覧)。
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構・産総研 化学物質リスク管理研究センター (2008)：詳細リスク評価書シリーズ19 ニッケル。https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/1-23.html. (2016.5.26閲覧)。
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構・産総研 化学物質リスク管理研究センター (2008)：詳細リスク評価書シリーズ20 亜鉛。https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/1-24.html. (2016.5.26閲覧)。
- 新エネルギー・産業技術総合開発機構・産総研 化学物質リスク管理研究センター (2008)：詳細リスク評価書シリーズ21 六価クロム。https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/1-25.html. (2016.5.26閲覧)。
- 水谷敦史・加藤俊哉・中山禎司・本城裕美子・影山富士人・森 弘樹・小澤享史・吉野篤人 (2013)：急性鉄中毒に起因する急性肝不全により死亡した一例。日本集中治療医学会雑誌, 20, 75-79。
- 宮山貴光・新井祐太・平野靖史郎 (2012)：生活環境における銀曝露とその健康影響評価。日本衛生学雑誌, 67, 383-389。
- 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. Martinez and 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. Science of the Total Environment, 320, 37-50.

- ISO 11348-1 (2007): 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 11348-2 (2007): Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 2: Method using liquid-dried bacteria.
- ISO 11348-3 (2007): Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)-Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO 21338 (2010): 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).
- 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.
- Merck Sharp & Dohme Corp. (2005): 鉄中毒, メルク マニュアル医学百科 家庭版 (日本語オンライン版). <http://merckmanual.jp/mmpej/print/sec21/ch326/ch326i.html>. (2016.5.27閲覧)
- 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: 2016年3月14日, 受理: 2016年7月7日)