セスジユスリカを用いた都市域ノンポイント汚染の生態リスク評価に関する基礎的研究

市木 敦之¹・三浦 陽介²・諏訪 広樹³

¹正会員 工博 立命館大学准教授 理工学部環境システム工学科 (〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1)

Email: a-ichiki@se.ritsumei.ac.jp

²正会員 工修 株式会社建設技術研究所

³非会員 横浜国立大学大学院環境情報学府

雨天時に流出する汚濁物質には都市域ノンポイントソースに由来する微量有害物質が多く含まれており、中でも多環芳香族炭化水素類(PAHs)や重金属類の受水域への生態影響が懸念される。本研究では、こうした微量有害物質が底生生物に及ぼす生態リスクを評価するための基礎的な知見を得ることを目的とし、都市域ノンポイント汚染の影響を顕著に受けていると考えられる都市環境堆積物の現存調査を実施するとともに、それらにセスジユスリカを用いた生態毒性試験を実施した。その結果、都市域ノンポイントソースに由来する微量有害物質の流下過程における現存特性を明らかにするとともに、発生源に近い都市環境堆積物がセスジユスリカの羽化率や産卵率を大きく低下させるなどの生態毒性を明らかにした。

Key Words : *Chironomus yoshimatsui, ecological risk assessment, polycyclic aromatic hydrocarbons, sediment toxicity, urban nonpoint pollution*

1. はじめに

都市域ノンポイントソースに由来する汚濁物には、道路交通由来の有害物質などがあり、受水域への影響が懸念される。特に自動車からの排気ガスには、化石燃料の燃焼にともない発生する多環芳香族炭化水素類(PAHs)が含まれており、これらには発ガン性や環境ホルモン作用が指摘されているベンゾ(a)ピレン(BaP)などの物質がある。これらPAHsには難分解性であるものが多く、その化学的安定性から環境中に長く残留するため、環境に与えるインパクトは大きいと考えられる。これらの物質を含んだ粒子状物質(PM)が自動車から排出され、大気浮遊、堆積、流出していく過程で環境や人体に対して影響を及ぼす可能性があることから、筆者らは、これまでこうした汚濁のポテンシャルが高いと考えられる高速道路の近傍において実態調査を実施することにより、発生源周辺における微量有

害物質の挙動特性について検討してきた^{1,2)}。他にもこうした発生源周辺での調査研究³⁾は近年いくつかの研究機関によって行われ、これまで一定の知見が蓄積されつつある。

しかしながら都市域ノンポイントソースから発生した汚濁物が降雨等によって水域へ掃流されて後、環境中において生態系に与えるインパクトについては十分な知見がなく、現在のところ、生態影響が明確にはわからないまま議論されている現状にある。そうした中で、微量有害物質単体での水生生物や生態系への影響のみならず、多種多様な化学物質が存在する環境中でのインパクトを明らかにすることが求められている。

本研究は、こうした微量有害物質が底生生物に及ぼす生態リスクを評価するための基礎的な知見を得ることを目的としている。そこで、まず道路交通に由来する微量有害物質が環境中に排出されて後の動態を明らかにするために、発生源周辺から受水域への流下過程

比較したのが図4である。ここでは底質（あるいは降下物、SS、堆積物）あたりのPAHs含有率で表している。高速道路近傍における含有率は、流下過程のそれに比べて2~3桁オーダーが高いことがわかる。また、低環状の物質で高速道路近傍における含有率が高い傾向がみられることから、NAP~ANT(2~3環の6物質)、FLU~C+T(3~4環状の5物質)、BbF~BP(5~6環状の6物質)に区分して、それぞれ高速道路近傍と流下過程における含有率の平均値の比を求めたところ、順に63.0倍、48.1倍、54.0倍となった。st.01におけるPAHsと先行期間降雨量、降雨再起日数の関係を図5に示す。先行期間中の降雨量の減少や降雨再起日数の増加にともない、微細な粒径区分の含有率が増加傾向を示しており、微細粒径に含有された汚濁物の降雨に対する応答性が高いことがわかる。

4. 本研究における生態毒性試験の位置づけ

生態系への影響を評価する際には、指標となる生物を使用した毒性試験が行われることが多く、生態影響を対象とした試験には経済協力開発機構（OECD）の Chemical Test Guidelines Section2⁹やアメリカ環境保護庁（USEPA）の OPPTS Harmonized Test Guidelines Series 850⁹が代表的である。こうした毒性試験の中で、底生生物でその使用が認定されているのは、OECD ではユスリカのみ、USEPA ではユスリカ、ヨコエビ、貝類である。また、近年 OECD テストガイドラインを中心に各国の毒性試験手法が整備されつつあり、2004 年の OECD 会合において正式承認された TG218 および TG219 はともにユスリカを対象としたものであった。これらの中では、日本固有種であるセスジユスリカ（*Chironomus yoshimatsui*）も試験種として認められている。

ユスリカは底質毒性を評価するのに適した指標種であるが、それを用いた毒性評価は、OECD テストガイドラインのように、人工底質を対象とする微量有害物質を添加して行われるものであり、環境中の自然底質を用いて評価された例はほとんどない。たとえば、Ristola ら⁷はロシアの Ladoga 湖の表層底質の毒性について、ユスリカとミジンコを用いたバイオアッセイを行った。その結果、この湖の底質は、ユスリカの10日間の育成試験及び40日間の羽化試験で高い死亡率をもたらしたが、羽化の時期には有意な影響を及ぼさず、底質の溶出液や間隙水もミジンコに対し毒性を示さなかった。Benoit ら⁸はミシシッピ川の底質を使って、*Chironomus tentans* の孵化直後の幼虫を飼育し、底質の毒性評価のためのライフサイクル試験法を確立し

た。De Haas ら⁹は *Chironomus riparius* を用いて、自然底質に銅と食物を様々な濃度で組み合わせて試験した結果、銅濃度が200mg/kgに達するまでは食物増加が

図3 流下過程における底質含有率の変化

図4 各挙動ステージと流下過程における含有率の比較

図5 底質含有率に及ぼす影響要因の検討

幼生の乾燥重量も体長も増加させ、更にこの食物増加は幼虫の銅蓄積を低下させることを示した。しかし、同時に摂食により毒効果が隠れてしまうといった、バイオアッセイ手法としての課題も指摘した。

以上のように、自然底質を使用したユスリカによる毒性試験では、幼虫期や羽化といった生物個体レベルでの研究事例が多く、いまだ多くのことがわかっていないのが現状である。底質における微量有害物質の毒性評価をする際には底質に吸着した化学物質の多くは残留性を有することから、より長期的な毒性影響である生物群集レベルの影響を把握できる毒性試験を実施することも必要となる。そこで、本研究では、成長影響に関する生態毒性試験と繁殖影響に関する生態毒性試験の2種類の検討を行うこととした。これにより、ノンポイント汚染の生態毒性プロファイルを、他の有害化学物質と同列に評価・比較できることを意図している。

5. 生態毒性試験による成長影響の検討

(1) 試験の概要

流下過程における現存特性より、PAHs含有率は国道1号線を境に含有率が増加していたことから、国道1号線近傍(st.04)と道路面からの流出水の影響が考えられる分流式雨水管流出地点(st.05-06間)の底質を用いて底生生物であるユスリカの幼虫に対する生態毒性について検討を行った。使用したユスリカは独立行政法人国立環境研究所^{10,11)}において感受性比較されたユスリカをもらい受け、日本環境毒性学会の方法¹²⁾により継代飼育している。ユスリカ体内に摂取された底

質がユスリカの成長に及ぼす影響を把握するために、図6のフローに示すような無灰分乾燥重量法¹³⁾による生態毒性試験を実施した。試験区と対照区の差より、体内摂取底質量(c:有機物量+無機物量, d:無機物量, c-d:有機物量)を求めた。また、試験開始時の体長に個体差があったため、試験開始前の体長(a)と試験終了後の体長(b)により成長率(b/a)を算出し、これにより成長影響を検討することとした。

図6 成長影響に関する生態毒性試験の概要

(2) 結果と考察

体内摂取底質量のうち、全底質量、有機分量、無機分量と成長率の関係を図7に示す。体内摂取底質量は、それぞれ個体単位長さあたりの摂取量(mg/mm/indiv)として表し、成長率と直接的な関係があると考えた。しかしながら、体内摂取底質量と成長(阻害)の関係は明瞭ではなかった。体内に摂取された底質の大部分は有機分であったため、餌として成長を促進する効果と有害物質として成長を阻害する効果が相互に作用していることが推察される。また、無機分は極微量にしか存在しておらず、ユスリカ体内にはほとんど摂取されていないと考えられる。

体内摂取底質量と成長率の関係が明瞭でないため、成長に及ぼす影響要因の検討として、試験区で暴露した底質における物質含有率と成長率の関係について検

討した。TN, TC についての結果を図 8 に示す。TN, TC については、含有率の増加にともなってユスリカが成長していることがわかる。これは TN, TC がユスリカの餌として作用していることを示している。重金属類についての結果の一部を図 9 に示す。ユスリカの成長に関して、Mg や Ca で TN や TC と同じ傾向が見て取れる一方で、Cu や Cd では成長を阻害している可能性が推察される。Cu については、これまでも他種のユスリカにおいて負の影響を及ぼすとの報告⁹⁾がなされている。

PAHs についての結果を図 10 に示す。BENZO(A)PYRENE (BaP) のように含有率と成長率が負の相関を示す物質があるものの、FLUORANTHENE (FLU) や BENZO(A)ANTHRACENE (BaA) のように関係が必ずしも明瞭でない物質も認められた。一般に PAHs は毒性の強い物質であるが、本試験において、PAHs のユスリカに及ぼす成長影響を明瞭に把握することは困難であるため、さらに汚染レベルに幅のある試料を用いて長期間の暴露による繁殖影響の検討を行うこととした。

6. 生態毒性試験による繁殖影響の検討

(1) 試験の概要

都市河川の底質試料として str1a より底質を、また

図 8 TN, TC 底質含有率と成長率の関係

図 9 重金属類底質含有率と成長率の関係

図 7 体内摂取底質量と成長率の関係

図 10 PAHs 底質含有率と成長率の関係

図11 繁殖影響に関する生態毒性試験の概要

さらに汚染レベルの高い環境堆積物試料として幹線道路における道路塵埃 (st.RD) と雨水枡堆積物 (st.SI) を採取して乾燥させ、一部を化学分析に使用した残りを、採取時と同じ粒度分布になるように再度調整なおして繁殖試験に使用した。なお、使用した底質は水理学的な影響を受けないと考えられる 2000 μm 以上を除外した。図11に繁殖試験の概要を示す。試験手順は以下のとおりである。

- ①試験底質には環境堆積物 (自然底質) および環境堆積物に対象化学物質である PAHs19 物質を自然底質の X 倍 (X は試験ケースによって設定) となるように添加した底質 (PAHs 添加底質) を使用した。試験底質を乱さないように上層水として蒸留水をゆっくりと注いだ。その状態で2日以上放置し、通気を行った。
- ②継代飼育より得られたユスリカの1卵塊中の卵数を実顕顕微鏡で測定した (a)。孵化した個体を確認したら、1卵塊ごとすべて試験水槽へと投入した。
- ③幼虫期の間、孵化後4日目、8日目および12日目に、それぞれアンモニアの影響を回避するため、蒸留水により上層水の交換を行った。交換前には、上層水を採取し、pH, DO, NH_4 , TN, TOC, 重金属類の分析を行っている。
- ④試験開始から12日経過後、セスジユスリカをケージに移動させ、脱皮殻の数から羽化数 (b) を、さらに脱皮殻の大きさから雌雄判別を行い、雌数 (c) を測定した。また、水面近くに産み付けられた卵塊数 (d) を測定した。試験は孵化後28日目に終了した。

それぞれのライフステージで測定した項目を用いて以下に示すような試験としてのエンドポイントを2種類設定した。

- ・羽化率=羽化数(b)/1卵塊中の卵数(a)

- ・産卵率=産み付けられた卵塊数(d)/羽化した雌数(c)

ここでは、自然底質のみで毒性試験を実施すると餌となる有機物の量が少ないことにより、セスジユスリカの羽化の遅延が考えられたため、OECDテストガイドライン⁹⁾に沿った量の補助栄養食を与えている。本試験における底質の条件および羽化率、産卵率の結果を表2に示す。表2のPAHsはPAHs19物質の合計値を表している。

表2 繁殖影響に関する生態毒性試験の条件と結果

地点コード	使用底質	PAHs条件	PAHs含有率 (ng/g-dry)	羽化率 (%)	産卵率 (%)
st. rla	050120 自然底質	PAHs $\times$ 1	222.2	42.5	62.5
	050327 自然底質	PAHs $\times$ 1	709.1	37.0	81.4
	050424 自然底質	PAHs $\times$ 1	271.8	49.0	87.9
	050424 PAHs添加底質	PAHs $\times$ 5	1116.0	54.1	90.0
	050530 自然底質	PAHs $\times$ 1	225.8	59.8	86.7
	050530 PAHs添加底質	PAHs $\times$ 10	1825.7	48.0	44.4
	050604 自然底質	PAHs $\times$ 1	246.9	38.6	66.7
	050604 PAHs添加底質	PAHs $\times$ 20	3585.8	49.8	60.5
st. RD	050128 自然底質	PAHs $\times$ 1	1076.3	1.9	0.0
st. SI	050129 自然底質	PAHs $\times$ 1	388.4	0.3	—
				54.9	34.8
				12.8	80.4

(2) 結果と考察

本試験の結果について、試験底質のPAHs含有率と羽化率の関係を図12に、またPAHs含有率と産卵率の関係を図13にそれぞれ示す。

図12においては、都市河川を試験底質として用いた場合 (●), 羽化率はおおむね37.0~59.8%の範囲であるのに対して、雨水枡を用いた場合 (*) には、PAHs含有率が都市河川のそれと大差ないにも関わらず、12.8%まで低下するケースが見られた。道路塵埃のPAHs含有率は、都市河川や雨水枡に比べて1オーダー高く、これを試験底質に用いた場合 (▲) の羽化率は、0.3~1.9%と極めて小さくなる。都市河川底質にPAHsを添加して、道路塵埃と同程度ないしそれを上回るPAHs含有率にして同様の試験を行った場合 (○) でも、羽化率に変化はない。一方、図13においては、

都市河川を試験底質として用いた場合(●)の産卵率は、おおむね62.5～87.9%の範囲でまとまっているのに対して、雨水枡を用いる(*)と、34.8%に低下するものがある。都市河川底質にPAHsを添加する(○)と、産卵率にばらつきが出てくるものの、これと同程度以下のPAHs含有率である道路塵埃を試験底質に用いた場合には、ユスリカの産卵は認められなかった。

以上のように、PAHsを添加した都市河川底質にユスリカを暴露させても、羽化率や産卵率に道路塵埃や雨水枡堆積物ほどの違いが認められないことから、ユスリカの繁殖を阻害する要因として、PAHs以外にも都市域ノンポイントソース独特の顕著な汚染リスクのあることがわかる。

図12 PAHs底質含有率と羽化率の関係

図13 PAHs底質含有率と産卵率の関係

7. 結論

都市環境堆積物に関する実態調査をもとに、微量有害物質の流下過程における現存特性について検討した。また、採取した都市環境堆積物をユスリカに暴露させる生態毒性試験を実施し、底質含有成分のユスリカに対する成長阻害と繁殖阻害に関する基礎的な検討を試みた。以下に結果をまとめる。

- 1) 流下過程における全PAHs含有率では、国道1号線を境に含有量が増加し、またその後流下距離とともに漸減する傾向があった。また、微小粒径に存在するPAHsは比較的残留性を示さない傾向であることがわかった。
- 2) 高速道路近傍であるst01におけるPAHsと先行期間降雨量の関係より、先行期間中の降雨量の増加にともない含有率が増加傾向を示しており、特に微細粒径に含有された汚濁物の降雨に対する応答性が高いことがわかった。
- 3) 成長影響に関する生態毒性試験結果より、個別の底質含有成分がユスリカの成長に及ぼす影響は明瞭ではなかった。
- 4) 繁殖影響に関する生態毒性試験の結果、都市河川底質に暴露させた場合のユスリカの羽化率はおおむね37.0～59.8%、産卵率はおおむね62.5～87.9%であったのに対して、雨水枡堆積物に暴露させた場合には、羽化率・産卵率とも低下することがあり、道路塵埃に暴露させた場合には、羽化率・産卵率ともに極めて小さくなることがわかった。
- 5) PAHsを添加した都市河川底質にユスリカを暴露させても、道路塵埃や雨水枡堆積物ほどの繁殖阻害影響は認められなかったことから、PAHs以外にも都市域ノンポイントソース独特の顕著な汚染リスクのあることが示された。

本研究での繁殖試験は1世代のみの試験であったため、世代を介して及ぶ影響については検討が及ばなかった。今後さらに試験データが蓄積されることにより、詳細な影響特性が検討できるものとする。

謝辞：本研究で用いたセスジユスリカは独立行政法人国立環境研究所で継代飼育し、感受性を比較されたものを頂戴しました。厚く御礼申し上げます。また、調査、分析、飼育および試験にご協力頂きました皆様に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Ichiki, A., Nagata, Y., Naruse, T. and Ido, F.: Characteristics of Highway Pollutants around their Source and in Runoff Process - A Case Study around Meishin Expressway, Japan, CD Proceedings of 8th International Conference on Diffuse/Nonpoint Pollution, pp.119-124, 2004.
- 2) Ichiki, A., Nagata, Y., Yamashita, H., Ogi, H. and Miura, Y.: Characteristics of Particulate Micro Air Pollutants Around a Highway - Their Standing Stock and Behavior, CD Proceedings of 8th International Conference on Diffuse/Nonpoint Pollution, pp.733-738, 2004.
- 3) たとえば Murakami, M., Nakajima, F. and Furumai, H.: Modelling of Runoff Behaviour of Particle-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Roads and Roofs, Water Research, Vol. 38, pp.4475-4483, 2004.
- 4) 市木敦之, 成瀬貴雅, 長田恭典, 山下博之, 安随幸一郎: 高速道路に由来する微量有害物質の降雨時流出挙動特性の検討とその定式化, 第5回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.172-173, 2002.
- 5) OECD Chemicals Testing - Guidelines.
http://www.oecd.org/document/62/0,2340,en_2649_3437_7_2348862_1_1_1_37465,00.html
- 6) USEPA OPPTS Harmonized Test Guidelines.
http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/index.html
- 7) Ristola, T., Pellinen, J., Leppanen, M. and Kukkonen, J.: Characterization of Lake Ladoga Sediments. I. Toxicity to *Chironomus Riparius* and *Daphnia Magna*. Chemosphere, Vol.32, No.6, pp.1165-1178, 1996.
- 8) Benoit, D. A., Sibley, P. K., Juenemann, J. L. and Ankley, G. T.: *Chironomus Tentans* Life-Cycle Test: Design and Evaluation for Use in Assessing Toxicity of Contaminated Sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.16, No.6, pp.1165-1176, 1997
- 9) De Haas, E. M., Paumen, M. L., Kraak, M. H. S. and Koelmans, A. A.: Combined Effects of Copper and Food on the Midge *Chironomus Riparius* in Whole-sediment Bioassays. Environmental Pollution, Vol.127, No.1, pp.99-107, 2004.
- 10) 平成14年度底生生物試験法の検討調査報告書, 独立行政法人国立環境研究所, 2003.
- 11) 平成15年度底生生物等生態影響試験法検討調査報告書, 独立行政法人国立環境研究所, 2004.
- 12) 生態影響試験ハンドブック-化学物質の環境リスク評価-, 日本環境毒性学会編.
- 13) P. K. Sibley, P. D. Monson and G. T. Ankley: The Effect of Gut Contents on Dry Weight Estimates of *Chironomus Tentans* Larvae: Implications for Interpreting Toxicity in Freshwater Sediment Toxicity Tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.16, No.8, pp.1721-1726, 1997.

STUDY ON ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT OF URBAN NONPOINT POLLUTION USING *CHIRONOMUS YOSHIMATSUI*

Atsushi ICHIKI, Yosuke MIURA and Hiroki SUWA

Urban nonpoint pollutant sources are considered to have a great influence on receiving water, because micro toxic substances like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are exhausted from automobiles, etc. As most stormwater from the urban nonpoint sources is discharged into the receiving water through stormwater drainages, it is important to know pollutant behavior in runoff process and its impact on ecosystem in the water body. The objective of this study is to survey standing stock and behavior of urban nonpoint pollutants in their runoff process. It also aims at examining an ecological impact of the urban pollution on the receiving water. From the surveys on the standing stock and behavior, differences in content ratio of pollutants in urban sediments from their sources to receiving water were shown. And, from the examination on the ecological impacts, ecological toxicity of the urban sediments for *Chironomus yoshimatsui* was shown. As a result, some significant knowledge for the environmental management of urban pollution has been obtained.