

河川水における溶存態有機物の粒径画分の特性解析と 生体・生態影響評価

中央大学 正会員 ○山村寛、原宏江
土木研究所 對馬育夫、真野浩行、岡本誠一郎

1. はじめに

近年、河川や湖沼などの環境水中から様々な人的由来の微量汚染物質が検出されており、これら成分による健康・生態リスクの把握および制御技術の開発が求められている。特に、ナノテクノロジーの目覚ましい技術発展に伴い、近年、ナノ粒子成分による環境汚染が危惧されるようになってきている。ナノ粒子は0.1 μmの粒径を持つ成分全般を指し、炭素等の有機系とシリカや金・銀などの無機系に分類される。これらのナノ粒子は医療やエレクトロニクス分野、環境エネルギー分野において既に実用的に利用されており、製造工場や家庭排水処理場から流出していることが過去の研究により報告されている。また、全般的に、ナノ粒子は生態毒性が極めて高いことが明らかになっており、既存の微量汚染物質に加えて、注意を要する成分とされる。

既往の研究では、あるナノ粒子成分に着目し、各浄水プロセスでの処理性や下水処理場内での挙動に着目した研究が多く見られる。それらの研究の多くは、ナノ粒子を添加し、その増減を調査しているが、自然環境中に存在するナノ粒子の形態と大きく異なるため、これらの研究により得られた結果では、実環境を反映していないことが予想される。実環境下では、ナノ粒子の存在濃度が極めて低いことに加え、塩や有機・無機コロイドなどが存在することから、ナノ粒子の挙動解明は極めて難しいとされる。そのため、これまでに自然水中に存在するナノ粒子の挙動を検討した例は一例も存在しない。過去のラボ実験によるスパイク実験の結果から、自然水中でナノ粒子は、有機物の総称である Natural Organic Matter (NOM) と共存することで、安定化していると考えられている。NOMは、広い分子量分布を示し、複雑な分子構造、かつ多くの官能基を有することから有機・無機物のキャリアとして機能する。よって、ナノ粒子の自然界での挙動を明らかにするためには、ナノ粒子が共存しやすい NOM の粒径画分や有機物特性を明らかにする必要があると考える。

自然界に存在するナノ粒子の毒性について、既往の研究では、単独のナノ粒子による毒性評価に関する研究が多く

見られる。一方で、2種以上の微量汚染物質による複合作用や夾雑物と微量汚染物質の相互作用により、毒性の強度や効果が変化することが Escher ら (2011) の研究により明らかになっている。したがって、自然環境水中では、ナノ粒子はおそらく NOM と共存していることが予想されるため、ナノ粒子の毒性を評価するにあたっては、単独のナノ粒子ではなく、NOM と共存した状態で毒性を評価することが重要になると考える。

以上より、本研究では河川水中に含まれる微量なナノ粒子成分の定量・定性方法を確立し、これらのナノ粒子がヒト細胞および水生生物に与える影響を評価することを目的とする。平成26年度は、利根川を対象として、河川水を濃縮することによるナノ粒子分析を実施した他、濃縮サンプルを用いた生体毒性試験および水生生物毒性評価試験を実施した。また、利根川河川中の NOM を粒径毎に分画し、各分画について生体影響を評価するとともに、重金属成分・有機物特性を解析した。

2. 実験方法

2.1 採水地点

図1に示す8箇所のサンプリングポイントで20 Lのサンプルを採水し、TOC、UV および蛍光特性が大きく変化する点を事前に調査した。その結果、4箇所 (St. 1: 広瀬橋、St. 2: 渡船場、St. 3: 利根橋、St. 4: 若草大橋) において河川水質が大きく変化することが明らかになったため、本研究でのサンプリングポイントとして選択した。採水は平成26年8月3-4日に行い、各サンプリングポイントで約200 Lの河川水を採取した。



図1 サンプリングポイント

キーワード ナノ物質、河川水、影響評価、ヒト細胞、水生生物

連絡先 〒112-8551 東京都文京区春日 1-13-27 中央大学理工学部 TEL. 03-3817-7257 E-mail : yamamura.10x@g.chuo-u.ac.jp

2.2 濃縮・分画

St. 1~4 (St.1:広瀬橋、St. 2:渡船場、St. 3:利根橋、St. 4:若草大橋) から各 200 L 採水した後に、0.45 μm の膜により懸濁質を除去したサンプルを、RO 膜 (DOW 製, SW 膜) により 30 倍以上に濃縮した。濃縮の際には、RO 膜のファウリングが進行しないように、クロスフロー流速を 1 m/s 以上に設定すると共に、有機物が膜から溶出しないように、膜ろ過液の TOC を on-line で連続的にモニタリングした。膜ろ過液の TOC が 0.5 mg/L を超えた際に、濃縮運転を停止した。濃縮後に、有機物の回収率を算出することで、本研究により用いた濃縮方法の妥当性を判断した。濃縮したサンプルは続いて、吸引ろ過装置 (図 2) を用いて、0.22 μm の PES 製 MF 膜、200 kDa の Polysulfone 製 UF 膜、50 kDa の Polysulfone 製 UF 膜に順次ろ過することで、有機物の大きさに応じて分画した。各膜によりろ過したサンプルは、細胞毒性試験及び水質分析に供した。また、これらのサンプルについて、蛍光分光光度計による有機物特性解析を行った。

2.3 有機物特性解析

有機物分析は、蛍光分光光度計を用いて、3 次元励起蛍光スペクトル分析を行うことで分析した。3 次元励起蛍光分光スペクトルは、蛍光により検出される有機物を網羅的に高感度に検出し得る優れた方法である。本研究では、励起・蛍光バンド幅 5 nm に設定し、220 nm から 550 nm の幅でスペクトルを取得し、有機物を推定した。

2.4 ヒト細胞を用いた毒性評価

本実験にはヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) を用いた。細胞は、MEM 培地 (10%FBS、0.1 mM NEAA、0.03% L-グルタミン、0.2%炭酸水素ナトリウム添加) を用い、飽和水蒸気、CO₂ 5%、37°C 条件下で培養した。ろ過試料と 10 倍濃縮 MEM 培地を体積比 9:1 の割合で混合 (FBS 1%) し、pH を 7.2~7.5 に調整した。本液を細胞の培養液と置換し、48 時間暴露後、各試料につき 3 枚のディッシュを用い、トリパンプル一染色により生細胞を計数した。

2.5 水生生物を用いた毒性評価

本研究では、水生生物として、ムレミカヅキモ、オオミジンコ、ゼブラフィッシュを用いた。St. 2 の濃縮サンプルを適宜希釈し、実験に供した。ムレミカヅキモを用いた藻類試験では、試験水に 72 時間暴露させ、個体増殖速度を比較した。オオミジンコを用いた試験では、試験水に 8 日間暴露させ、正常遊泳個体数を比較した。ゼブラフィッシュを用いた魚類試験では、試験水に 8-14 日間暴露させ、孵化率、生存率、生存仔魚率等の生物応答を比較した。

3. 結果と考察

3.1 毒性試験

3.2.1 ヒト細胞を用いた毒性試験

図 2 に利根川河川水濃縮試料の細胞毒性試験結果を示す。最大暴露濃度 (濃縮倍率) が St. 2 でやや低くなってしまったものの、同程度の DOC レベル (例えば 40 mg/L) で比較すると、St. 1 の細胞生存率が 10% 以下であるのに対し、St. 2 および St. 3 が約 50% と同程度、St. 4 では生存率の低下が確認されない結果となった。したがって、利根川河川水を用いた評価によれば、利根川河川水の細胞毒性は最上流部で最も高く、流下に伴って減少することが明らかとなった。一方で、St. 4 においては、40 mg/L 以下の暴露濃度領域において細胞生存率が増加していることから、毒性作用と断定することはできないものの、St. 4 の河川水も HepG2 に何らかのアブノーマルな影響を及ぼす可能性が示唆された。

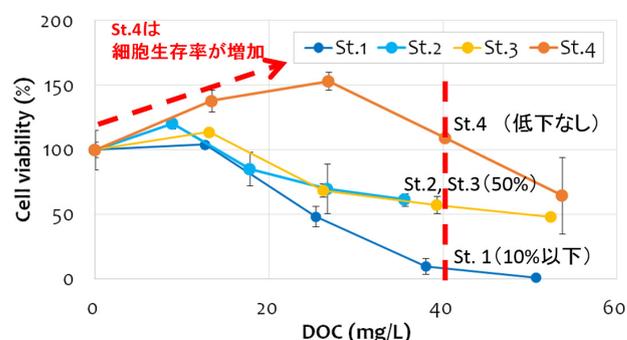


図 2 河川水濃縮試料の細胞毒性試験結果

今回検討した河川水試料の水質分析結果を図 3 に示す。St. 1 の DOC を除き、DOC および窒素類は下流になるほど濃度が高くなった。ICP による元素一斉分析の結果、Fe、Mn (および Zn) は採水サンプルでは St. 1 のみで検出され、自然由来の成分と推察される。また、上記元素を除き、地点間で検出される元素の種類に大差はなく、ピーク強度は下流になるほど強くなっていった。

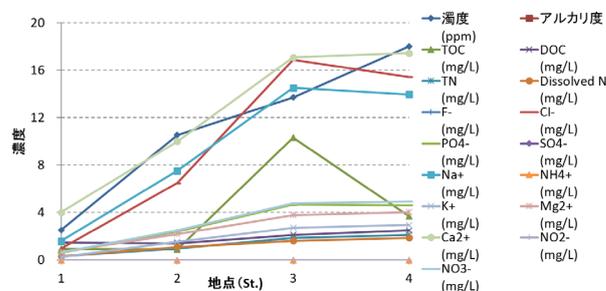


図 3 河川水試料の水質分析結果

3.2.2 水生生物を用いた毒性試験

ムレミカヅキモを用いた毒性試験の結果を図 4 に示す。その結果、濃縮倍率が 10 倍以上になる実験系では、対照区

の生長速度と比較し、有意な差が見られた。オオミジンコを用いた毒性試験では、濃縮倍率が 20 倍までの範囲では、遊泳異常を引き起こすことは観察されなかった (図 5)。ゼブラフィッシュを用いた毒性試験では、孵化率、生存率、生存仔魚率に大きな差はみられなかった (図 6-8)。

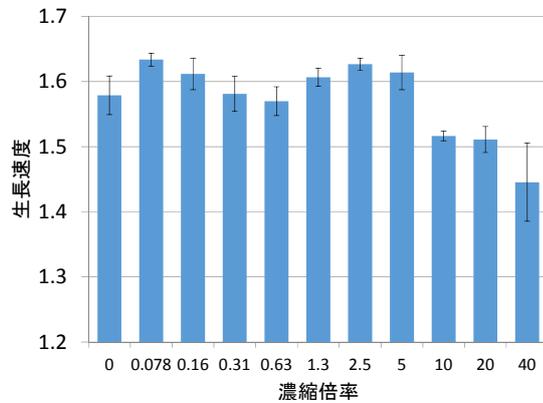


図 4 ムレミカツキモを用いた毒性試験

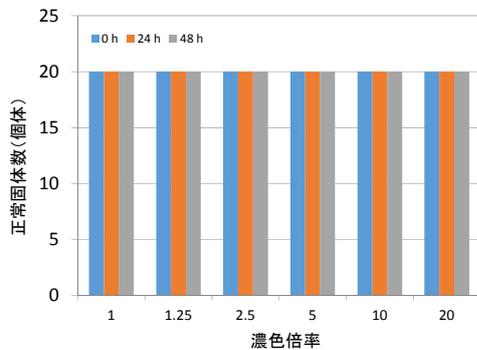


図 5 オオミジンコを用いた毒性試験

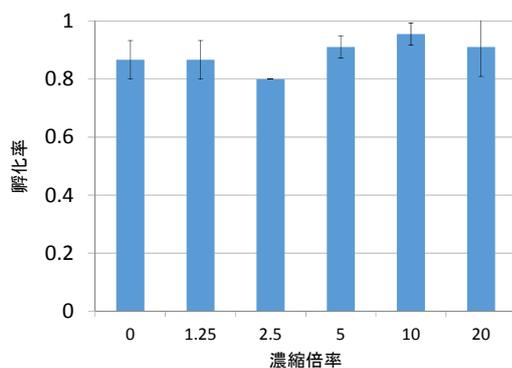


図 6 ゼブラフィッシュを用いた毒性試験 (孵化率)

3.4 分画試験

図 9 に利根川河水濃縮試料を段階的にろ過した際の細胞毒性の変化を示す。0.22 μm 膜のろ液における細胞死滅率 (1-細胞生存率) を 1 とし、それに対する 200 kDa 膜および 50 kDa 膜のろ液における細胞死滅率を相対毒性値 (以下、毒性値) として表わしている。St. 1 および St.4 における毒性値は 200 kDa 膜によるろ過で 20%以上低下し、50 kDa 膜のろ過後には当初の約 50%か、それ以下となっていた。200 kDa 膜ろ過、50kDa 膜ろ過における毒性値の減少幅は、St. 2

ではそれぞれ 35%、30%であったのに対し、St. 4 では 22%、27%であった。本結果より、St. 1 および St. 4 の利根川河水では 0.22 μm ~ 200 kDa、200 kDa ~ 50 kDa それぞれの画分に細胞毒性の由来する成分が存在していることが示唆された。一方、St. 2 および St. 3 では、200 kDa 膜ろ過で毒性値の顕著な変化は確認されなかった上、St. 2 では 50 kDa 膜ろ過後に毒性値が 30%増加する結果となった。このことは、50 kDa 膜ろ過によって、何らかの形で細胞毒性の原因物質をマスクしていた成分 (ある種のタンパク質や NOM など) が取り除かれたためではないかと推察する。

3.5 水質分析

ろ過試験により取得した水試料の水質を分析した結果、

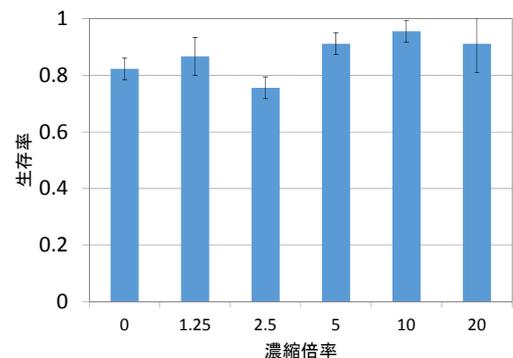


図 7 ゼブラフィッシュを用いた毒性試験 (生存率)

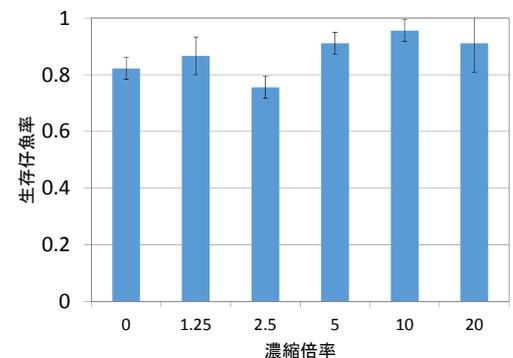


図 8 ゼブラフィッシュを用いた毒性試験 (生存仔魚率)

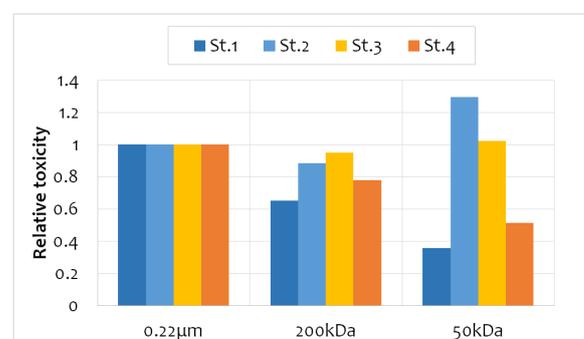


図 9 利根川河水濃縮試料を段階的にろ過した際の細胞毒性の変化

3.6 有機物特性解析

図 10 および図 11 に、それぞれ 200 kDa および 50 kDa 膜ろ過で除去された有機物の EEM スペクトルを示す。St. 1 と St. 4 のスペクトルパターンは比較的類似しており、いずれのろ過段階においてもタンパク質由来のピーク（位置 A）が出現していた。加えて、50 kDa 膜ろ過ではフミン質由来のピーク（位置 B）も確認された。一方、St. 2 の 200 kDa ろ過および St. 3 の 50 kDa ろ過では、タンパク質及びフミン質由来のピークと、それらピークの裾野に埋もれているより小さなピークの存在も推察され、除去された有機物中により多様な NOM を含有する可能性が示唆された。

以上、観察された St. 1 および St. 4 の EEM スペクトルの類似性が細胞毒性の変化に対応していることから、NOM それ自体もしくはマトリクスとしての NOM が直接的もしくは間接的に細胞毒性に影響を与えているのではないかと考える。今回採水した水に含まれる有機物は、EEM によりある程度判別出来たものの、より詳細な検討が必要と考える。今後は、FTIR や NMR 等のより詳細な化学構造を判別する化学分析手法を取り入れて、有機物特性を明かにする必要があると考える

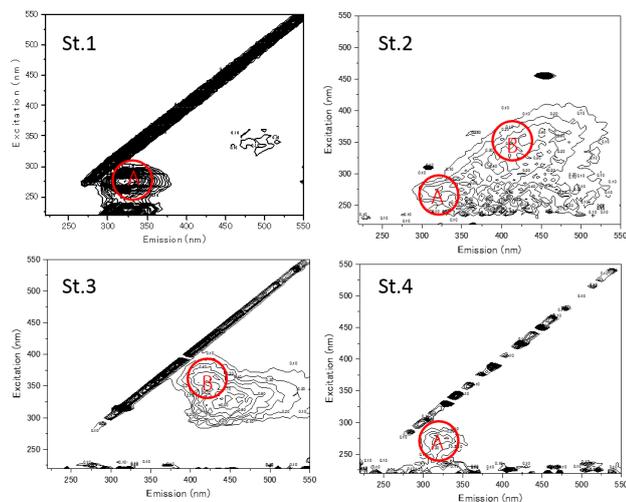


図-10 200kDa の膜で透過した有機物の 3 次元励起スペクトル分析結果

4 まとめ

本研究では、自然環境中に存在するナノ物質の挙動、毒性を把握するため、利根川河水を濃縮し、生体毒性試験および水生生物毒性評価試験を実施した。その結果、以下の知見が得られた。

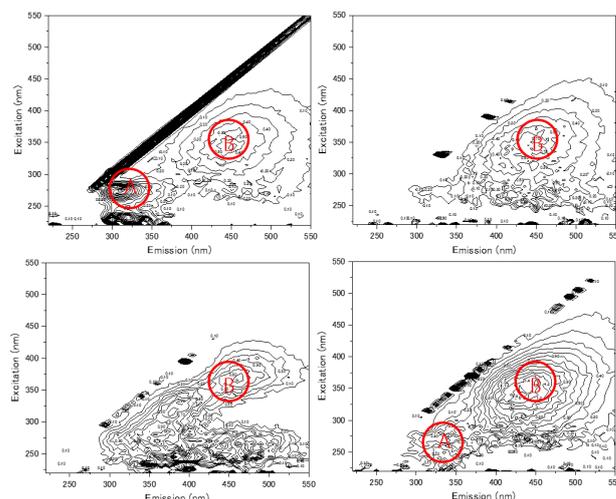


図-11 50kDa の膜を透過した有機物の 3 次元励起スペクトル分析結果

- 有機物の回収率 72% を達成し、RO 膜を使った有機物の濃縮に成功した。
 - Pt や Ti のような金属ナノ粒子は、利根川流域では検出されなかった。
 - 全体的に、細胞毒性は河川上流部で最も高く、流下に伴って減少した。上流部に、何か毒性作用を示す成分が混入していたことを示しているが、通常の水質分析では、St1 に特別な差異は見当たらなかった。
 - 粒径毎に毒性を比較した結果、St. 1 および St. 4 に共通点が観察され、毒性値は 200 kDa 膜ろ過で 20% 以上低下し、50 kDa 膜ろ過で約 50% 以下に低下することが明らかになった。これにより、St. 1 および St. 4 は、0.22 μm ~ 200 kDa および 200 kDa ~ 50 kDa の画分に細胞毒性の由来する成分が存在していることが示唆された。
 - St. 2 および St. 3 に共通点が観察され、200 kDa 膜ろ過で変化せず、St. 2 では 50 kDa 膜ろ過後に毒性値が 30% 増加した。これは、50 kDa 膜ろ過によって、何らかの形で細胞毒性の原因物質をマスクしていた成分（ある種のタンパク質や NOM など）が取り除かれたためではないかと推察する。
 - 各粒径画分に含まれる有機物特性を分析した結果、St. 1 と St. 4 に共通点が見られたことから、NOM 自体もしくはマトリクスとしての NOM が直接的・間接的に毒性に影響していることが示唆された。
- 今後は、粒径画分の解像度の向上や別の有機物特性の評価手法を用い、検討を進めていく予定である。