

# ヒメダカ仔魚を用いた濃縮毒性試験による河川水の毒性起源の推定

山口大学 学生会員 ○吉村弥奈美、山下ひろえ、Riyanto Haribowo  
山口大学大学院理工学研究科 正会員 関根雅彦、神野有生、山本浩一、樋口隆哉、今井剛

## 1. 研究背景と目的

近年、水質汚染による生態系への影響に対する関心が高まったことにより、微量有害物質の個々の毒性データは多数蓄積されている。しかし、毒性物質はアンモニアなどの単純な化学物質から、重金属、農薬、有機塩素化合物、外因性内分泌攪乱化学物質まで多様な物質がある。「水生生物の保全に係る水質目標について」(環境省 02 年)では、国内外の法律に基づく規制対象物質と専門家の意見を合わせた 787 物質を有害性の考えられる物質として選定している。これだけ多くの化学物質をモニタリングすることは多大な労力と時間がかかる。また、微量環境有害物質は環境中では急性毒性を引き起こすほどの濃度レベルにないことが多いが、それらの複合的な毒性も考えられるため、河川の汚染状況を確認するには、化学物質の濃度をモニタリングするだけでは十分ではない。

筆者の所属する研究室では、こうした微量化学物質が水生生物の生息状況に与える影響を把握することを目的に、100 倍濃縮した環境水の急性毒性(以下、濃縮毒性試験と呼ぶ)と水生生物の生息状況の関係を調査し、一定の相関性を見出した。

また、種々の水域で濃縮毒性試験を実施すると同時に、GC/MS 一斉分析を行うことで、毒性の原因物質は場所によって異なることを示した。

本研究では、比較的高い毒性が検出された河川において、その流域内複数地点の濃縮毒性を測定することで、毒性の発生源を明らかにすることを試みる。同時に、GC/MS 一斉分析や BOD などの一般的な水質項目の分析結果と照査することで、環境中での毒性物質の挙動を考察する。

## 2. 研究方法

図2はN川における採水地点を示している。

### 2.1 濃縮毒性試験

#### (1)河川水の濃縮

- 採取した試料水 5L をろ過後、微量有機化合物に対する吸着性能に優れた多孔質ポリスチレン樹

脂に通水し、河川水に含まれる有機物を吸着させる。

- アセトン 10mL で脱離を行い、窒素気流下で 200 $\mu$ L(25000 倍)まで濃縮。
- 活性炭処理水で 50mL(100 倍)まで希釈したものを試験水とする。
- 結果、5L の試料水を 100 倍濃縮した、50ml の試験水が出来上がる。

#### (2)ヒメダカ仔魚を用いた毒性試験方法

- 100 倍濃縮した試験水 50mL をガラスシャーレに 25mL ずつ入れ 2 系列にする。
- ヒメダカの仔魚を 10 尾ずつガラスシャーレに入れ、1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 時間後に観察を行い、死亡数、遊泳障害数を記録する。

#### (3)評価方法

試験で得られた遊泳障害率・死亡率と経過時間の関係から、供試魚の 50%が死亡または遊泳障害を引き起こす時間を、半数致死時間(LT<sub>50</sub>)・半数障害時間(ET<sub>50</sub>)とし、数値定量化のため、これらの逆数(LT<sub>50</sub><sup>-1</sup>, ET<sub>50</sub><sup>-1</sup>)を評価指標とした。

半数障害時間、半数致死時間は、遊泳障害率および死亡率を用いて最小二乗法により求めた。

## 2.2 GC/MS 一斉分析

- 1L の試料水を毒性試験と同様にろ過し PS-2 に通水する。
- アセトン 20ml で脱離を行い、窒素でアセトンを完全に蒸発させる。
- ヘキサン 1ml に有機物を溶解し、これを GC/MS 分析装置に注入した。

毒性指数は検出された各物質の毒性値と濃度を掛けて算出した。毒性値は文献のヒメダカ LC<sub>50</sub>を用いた。

## 2.3 水質測定

pH, 電気伝導率, DO, 濁度, 水温, 塩分は HORIBA U-10を用いて測定した。BODはウィンクラー法を用いて測定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 毒性試験

表1は毒性試験結果を示している。下流のサンプルN6と上流のN7は高い毒性を示した。N7がN6の汚濁原因であると考えられる。N2はN4から約52m下流にもかかわらず高い毒性N6が混入した後も毒性が低くなっている。希釈または分解の効果と見られるが、我々の毒性指標は濃度としての取り扱いができないため、物質収支的な観点から議論ができないが、N7からN6間の毒性の減少から見ても、毒性の分解速度は速い可能性がある。

#### 3.2 GC/MS 分析

表2はN4, N6, N2におけるGC/MS一斉分析結果を示している。サンプルN4とN6では多くの毒性原因物質が検出されているがN2では検出されていない。毒性試験結果でも述べたが、毒性原因物質は分解されやすいということがこの結果からも示唆される。

#### 3.3 水質測定

図1はBODと $LT_{50}^{-1}$ の関係を示している。図1に示されているN7のBODはサンプルを3倍希釈して測定を行った。無希釈のN7のBODは0.5mg/Lと低くなった。これはN7の高い毒性がBOD物質の分解を抑制したと考える。N6のBODの値もN7と同様の値であるが、2倍希釈で測定可能であった。つまりN7からN6の間で毒性物質が分解され、その結果BODの分解が可能になったと考えられる。

### 4. 結論

- 毒性試験結果から N 川での毒性起源を推定することができた。
- N 川の BOD 物質と毒性物質は異なる分解挙動を示し、毒性物質がまず分解されることが示された。
- GC/MS 一斉分析でも N 川の毒性物質は環境中で分解されやすいことが支持された。

表 1. N 川における毒性試験結果 (N1~N7)

Sampling date	2011/9/8				2011/9/15		2012/1/17
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
ET <sub>50</sub> <sup>-1</sup>	0.026	0.016	0.021	0.032	0.036	1.2	2.0
LT <sub>50</sub> <sup>-1</sup>	0.022	0.017	0.017	0.023	0.018	0.594	2.0
Flow rate(m <sup>3</sup> /sec)	0.404	0.114	0.291	0.107	0.005	0.002	0.0008

表 2. GC/MS 分析結果 (サンプル N4,N6,N2)

Name	N4	N6	N2
	Index Number		
1,3-Dimethylnaphthalene		0.002	
1-Nonanol	0.008		0.008
2-Methyl-2,4-pentandiol	0.000		
2-Methylnaphthalene	0.020	0.020	0.026
4-tert-Octylphenol		0.015	
Benzyl alcohol	0.001	0.000	0.000
Bis(2-ethylhexyl)phthalate	0.064	0.123	0.085
Butyl benzyl phthalate		0.051	0.100
Di(2-ethylhexyl)adipate	0.001	0.002	0.001
Dicyclohexyl phthalate	1.762	3.829	
Diethyltoluamide	0.003	0.000	0.003
Diisobutyl phthalate	0.046	0.093	0.140
Dimethametryn	10.2	10.2	
Di-n-butyl phthalate	0.348	0.413	0.998
e-Caprolactam		0.000	
Fenobucarb	0.003		0.003
Nicotine		0.040	
Phenol	0.003	0.003	0.003
Thiocyclam		22.2	
Tributyl phosphate	0.003	0.006	0.004
Tris(2-chloroethyl) phosphate	0.002	0.001	0.002
Tris(2-ethylhexyl) phosphate		0.001	
Toxicity (LT <sub>50</sub> <sup>-1</sup> )	0.023	0.594	0.017

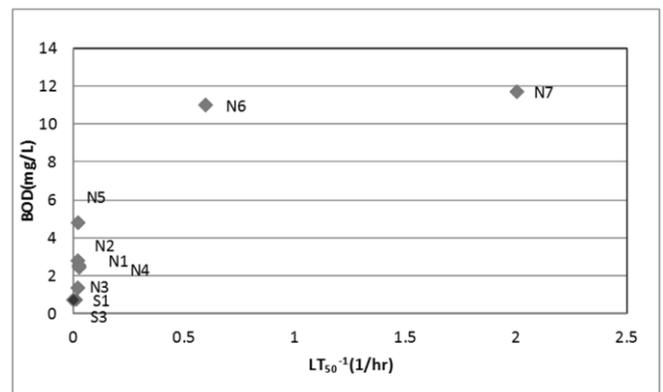


図 1. BOD and  $LT_{50}^{-1}$  の相関

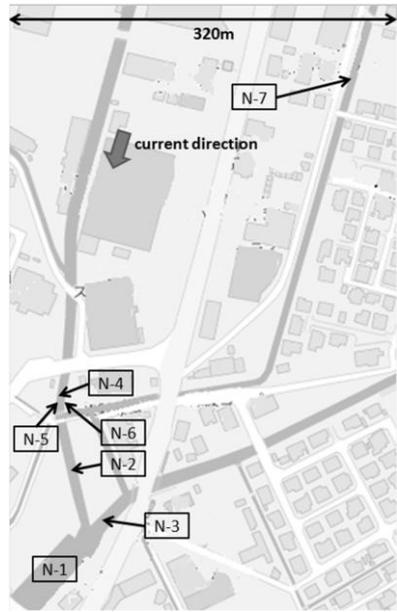


図 2. N 川における採水地点