琵琶湖流域における都市系面源由来の微量有機化合物に関する生態リスク評価

立命館大学理工学部
市木　敦之

RITSUMEIKAN

研究背景と目的

背景

道路堆積物の流れ　<雨天時>

* 排気ガス
* タイヤ摩耗
* 道路粉塵

道路　琵琶湖

道路堆積物に含まれる主な微量有害物質

- PAHs
- 重金属
- 界面活性剤

など

目的

セスジユスリカを用いてバイオアッセイを行うことで、琵琶湖流域における都市系面源とりわけ自動車交通由来の微量有機化合物による生態リスクを明らかにする

研究対象

名神高速道路
京都東I.C.-八日市I.C.区間

<道路塵埃>

研究対象

名神高速道路
京都東I.C.-八日市I.C.区間

<道路塵埃>

路面清掃車により回収された道路塵埃の一部

回収頻度は月2回程度

500μm以下の分画を使用

RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

STEP 3　PAHsのリスクの高さは？

STEP 4　リスクに対するPAHsの寄与は？

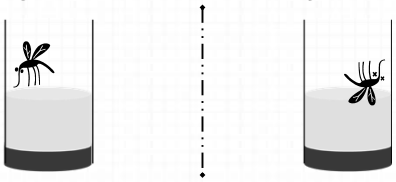
RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

<どのように調べるのか？>

リスクの ない 塵埃の存在下　　リスクの ある 塵埃の存在下



なんらかの影響が現れるか否かを観察する

RITSUMEIKAN

A. 繁殖毒性試験

毒性試験の流れ

暴露区　対照区

羽化率　30% ⇔ 75%

産卵率　20% ⇔ 80%

有意差あれば
リスクあり

①試験水槽の準備
暴露区 ➡ 道路塵埃(有害)
対照区 ➡ 人工底質(無害)

②ユスリカの投入
卵塊 ➡ 幼虫 ➡ 成虫 ➡ 産卵
孵化　羽化

③エンドポイントの算出
羽化率 ＝ 羽化個体数/投入個体数
産卵率 ＝ 産卵塊数/雌羽化個体数

＜課題＞
対照区の羽化率や産卵率がばらつく ⇒ 試験結果の信頼性が低い
１度にできる試験の数が限られる ⇒ 標本数が少ない

B. 羽化毒性試験

より単純な試験水槽を用いて再現性のよい試験結果を目指す

i. 水槽の小型化　繁　羽　底質量　300g ➡ 60g

ii. 幼虫を投入　繁　羽　1卵塊(約300個体)　20個体

iii. 試験は羽化まで　繁　羽　幼虫　羽化　羽化　成虫　産卵　--> 試験終了　試験終了<---

評価のエンドポイントを指標生物の全生活史から羽化に絞ることにより、空間的・時間的にスケールを小さくした

試験条件の概要

A. 繁殖毒性試験

曝気済み水道水

	道路塵埃比率(%)	試験数
人工底質(Control)	0	17
混合底質(Mix)	25~90	10
道路塵埃(Highway)	100	7

上層水

底質

B. 羽化毒性試験

曝気済み水道水

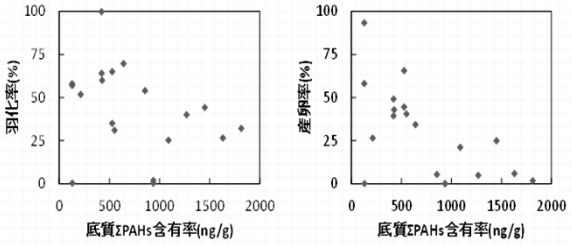
	道路塵埃比率(%)	試験数
人工底質(Control)	0	14
混合底質(Mix)	10~50	12
道路塵埃(Highway)	100	12

道路塵埃：別日に高速道路で回収された複数の塵埃

人工底質：石英砂／カオリン／ピートモス

混合底質：人工底質＋道路塵埃

A. 繁殖毒性試験の結果



RITSUMEIKAN

A. 繁殖毒性試験の結果

分散分析

2元配置の分散分析

目的変数：羽化率

説明変数：〈PAHs含有率〉 High / Low

	p値	判定
低環PAHs	0.096	*
中環PAHs	0.058	*
高環PAHs	0.019	**

*** 1%有意　** 5%有意　* 10%有意

低環PAHs：<40(ng/g) / ≧40(ng/g)

中環PAHs：<150(ng/g) / ≧150(ng/g)

高環PAHs：<600(ng/g) / ≧600(ng/g)

RITSUMEIKAN

B. 羽化毒性試験

より単純な試験水槽を用いて再現性のよい試験結果を目指す

i. 水槽の小型化　繁　羽　底質量　300g ➡ 60g

ii. 幼虫を投入　繁　羽　1卵塊(約300個体)　20個体

iii. 試験は羽化まで　繁　羽　幼虫　羽化　羽化　成虫　産卵　--> 試験終了　試験終了<---

評価のエンドポイントを指標生物の全生活史から羽化に絞ることにより、空間的・時間的にスケールを小さくした

研究手法

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

Pick Up!!

試験条件1

試験生物種	*Chironomus Yoshimatsui*
試験法	OECD TG218
試験期間	20日間+α
生物数	20個体/1連
繰り返し数	3連/1濃度区
濃度区	1
試験底質	道路塵埃 人工底質
影響指標	羽化

試験底質
道路塵埃　無害?　有害?　暴露区
人工底質　無害!!　対照区
対照試験
影響指標
羽化できるかどうか
1齢幼虫　成虫

研究手法

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

対照区　暴露区

別日に回収された3種類の塵埃

使用底質	人工底質	塵埃A	塵埃B	塵埃C
羽化率	80%	75%	15%	72%
対照区との有意差	―	無し	有り	無し

RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

High Risk!!

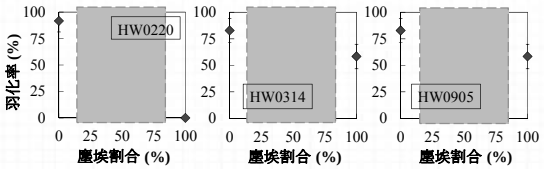
塵埃B
15%
有り

STEP 2

RITSUMEIKAN

結果と考察

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？



RITSUMEIKAN

結果

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

2012/2/20～10/03回収分の塵埃

3 塵埃 / 13 塵埃中

リスク発現

2/20，3/14，9/5回収分の塵埃で
リスクあり

STEP 2 へ

RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

<どのように調べるのか？>

人工底質　道路塵埃

少 ← 道路塵埃の使用割合 → 多

どの希釈倍率で影響が現れだすのかを観察する

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

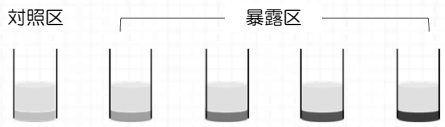
Pick Up!!

試験条件2

試験生物種	*Chironomus Yoshimatsui*
試験法	OECD TG218
試験期間	20日間+α
生物数	20個体/1連
繰り返し数	3連/1濃度区
濃度区	4(25,50,75,100%)
試験底質	道路塵埃,人工底質および混合底質
影響指標	羽化

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？



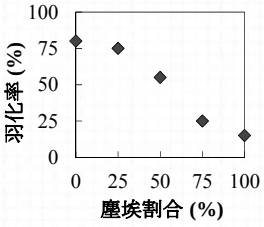
使用底質	人工底質	← 塵埃B →			
塵埃割合	0%	25%	50%	75%	100%
羽化率	80%	75%	55%	25%	15%
対照区との有意差	－	無し	有り	有り	有り

この結果より、影響が見られなくなるために必要な希釈倍率である
毒性単位(TU)　を求める

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

<毒性単位(TU)の算出の仕方>



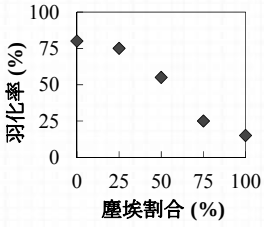
RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

<毒性単位(TU)の算出の仕方>

対照区と塵埃区との
羽化率の間でt検定を行う
(塵埃割合の小さい方から)



RITSUMEIKAN

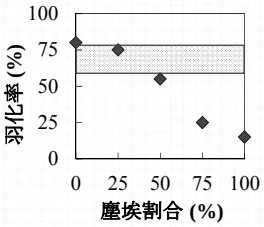
研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

<毒性単位(TU)の算出の仕方>

対照区と塵埃区との
羽化率の間でt検定を行う
(塵埃割合の小さい方から)

初めて有意差の出た濃度区と
Controlの平均羽化率の差
の信頼区間を求める



RITSUMEIKAN

研究手法

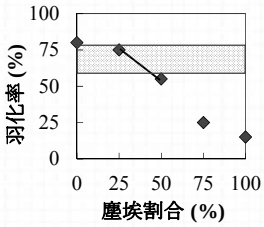
STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

<毒性単位(TU)の算出の仕方>

対照区と塵埃区との
羽化率の間でt検定を行う
(塵埃割合の小さい方から)

初めて有意差の出た濃度区と
Controlの平均羽化率の差
の信頼区間を求める

初めて有意差の出た濃度区と
その直前の濃度区の羽化率を直線補間



RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

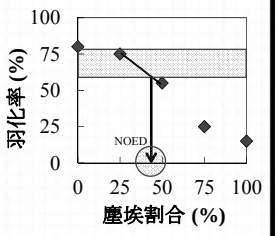
<毒性単位(TU)の算出の仕方>

対照区と塵埃区との
羽化率の間でt検定を行う
(塵埃割合の小さい方から)

初めて有意差の出た濃度区と
Controlの平均羽化率の差
の信頼区間を求める

初めて有意差の出た濃度区と
その直前の濃度区の羽化率を直線補間

信頼区間の下限値と直線との交点を求め
このｘをNOEDとする



RITSUMEIKAN

研究手法

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？

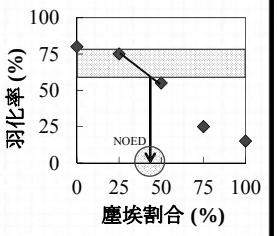
<毒性単位(TU)の算出の仕方>

対照区と塵埃区との
羽化率の間でt検定を行う
(塵埃割合の小さい方から)

初めて有意差の出た濃度区と
Controlの平均羽化率の差
の信頼区間を求める

初めて有意差の出た濃度区と
その直前の濃度区の羽化率を直線補間

信頼区間の下限値と直線との交点を求め
このｘをNOEDとする



TU = 100/NOED

例えば、ある塵埃の　TU = 3　であった時、
その塵埃は 3倍希釈 することで、影響がみられない濃度となる

結果と考察

STEP 1　道路塵埃にリスクはあるのか？

2/20～10/03回収分の塵埃

3 塵埃 / 13 塵埃中

リスク発現

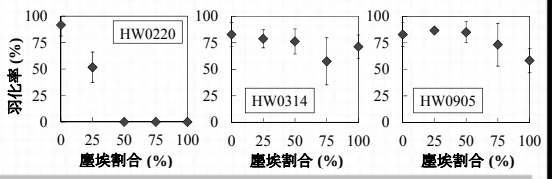
2/20，3/14，9/5回収分の塵埃で
リスクあり

STEP 2 へ

RITSUMEIKAN

結果と考察

STEP 2　道路塵埃のリスクの高さは？



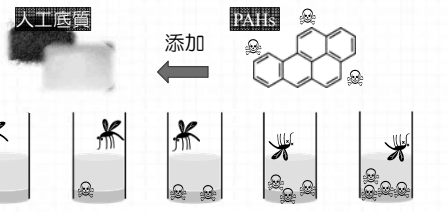
NOED (%)	14.0	89.8	79.2
TU	7.13	1.11	1.26

道路塵埃は 1.11～7.13倍 希釈すれば
ユスリカの羽化に影響を与えない程度のリスクがある

研究手法

STEP 3　PAHsのリスクの高さは？

<どのように調べるのか？>



低 ⟵ PAHsの添加濃度 ⟶ 高

どの濃度で影響が現れだすのかを観察する

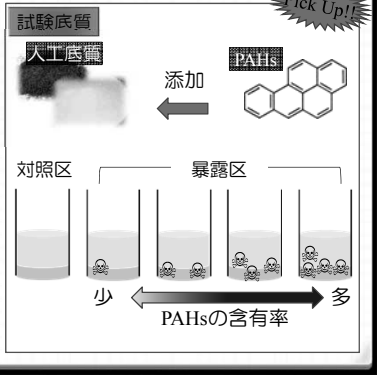
研究手法

STEP 3　PAHsのリスクの高さは？

Pick Up!!

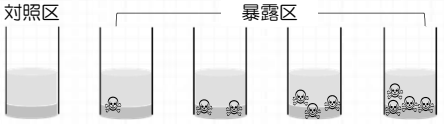
試験条件3

試験生物種	*Chironomus Yoshimatsui*
試験法	OECD TG218
試験期間	20日間+α
生物数	20個体/1連
繰り返し数	3連/1濃度区
濃度区	5
試験底質	人工底質 (PAHs添加)
影響指標	羽化



研究手法

STEP 3　PAHsのリスクの高さは？



PAHs含有率 (ng/g)	0	200	1000	2000	10000
羽化率	80%	75%	55%	25%	0%
対照区との有意差	－	無し	有り	有り	有り

この結果より、影響が見られなくなる濃度である
無影響濃度(NOEC)　を求める

研究手法

STEP 3　PAHsのリスクの高さは？

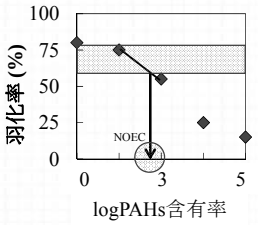
<NOECの算出の仕方>

対照区と添加区との
羽化率の間でt検定を行う
(添加濃度の小さい方から)

初めて有意差の出た濃度区と
Controlの平均羽化率の差
の信頼区間を求める

初めて有意差の出た濃度区と
その直前の濃度区の羽化率を直線補間

信頼区間の下限値と直線との交点を求め
このｘを真数になおした値をNOECとする



RITSUMEIKAN

研究手法

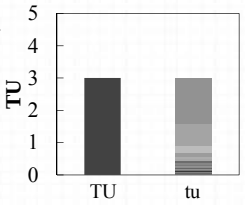
STEP 4　リスクに対するPAHsの寄与は？

<塵埃のリスクとは？>

塵埃のリスクとは、塵埃に含まれるすべての化学物質のリスクの総和と考えると

$$tu = \Sigma\, tu_i = \Sigma(MEC_i / NOEC_i) = (MEC_{物質a} / NOEC_{物質a}) + (MEC_{物質b} / NOEC_{物質b}) + \cdots$$

※ MEC：実環境濃度 (ng/g)
NOEC：無影響濃度 (ng/g)



RITSUMEIKAN

結果と考察

STEP 3　リスクに対するPAHsの寄与は？

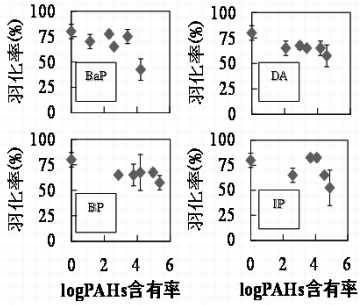
PAHsのうち、毒性が強い物質および塵埃中の含有割合が多い4物質のリスクを調べる

Benzo[a]pyrene, Indeno[1,2,3-c,d]pyrene, Dibenzh[a,h]anthracene, Benzo[g,h,i]perylene

試験条件	被験物質	比塵埃添加倍率（倍）
Control	－	－
AD1.0	BaP,DA,BP,IP 計4物質	1
AD5.0		5
AD10		10
AD50		50
AD100		100

結果と考察

STEP 3　リスクに対するPAHsの寄与は？



PAHsを添加した人工底質を用いた羽化毒性試験の結果

PAHsのNOEC算定結果

PAHs	NOEC（×10³ng/g）
BaP	5.74
DA	22.3
BP	148
IP	45.4

結果と考察

STEP 3　リスクに対するPAHsの寄与は？

道路塵埃におけるTUとtuの比較

道路塵埃	TU	tu
HW0220	7.13	0.031
HW0314	1.11	0.009
HW0905	1.26	0.026

PAHsのNOEC算定結果

PAHs	NOEC（×10³ng/g）
BaP	5.74
DA	22.3
BP	148
IP	45.4

RITSUMEIKAN

まとめ

- 道路塵埃は、ユスリカの羽化および産卵に影響を与える汚染レベルにあることを明らかにした。羽化よりも産卵への影響の方が顕著に発現しており、成長阻害だけでなく繁殖阻害も示された。
- 2012年2月～10月に路面清掃車両によって回収された13種類の道路塵埃のうち、3種類の塵埃について羽化毒性が認められた。路面清掃の頻度を考慮すると、おおむね2カ月に1回程度の頻度でリスクのある塵埃が回収されていることが示唆された。
- 道路塵埃の生態リスクをユスリカの羽化に対するTU（毒性単位）で表したところ、道路塵埃は1.11～7.13倍程度希釈すると羽化毒性が発現しなくなる程度のリスクであることが明らかとなった。
- PAHsの生態リスクをユスリカの羽化に対するNOEC（最大無影響濃度）で表したところ、BaPで5.74×103ng/g、DAで 22.3×103ng/g、BPで148×103ng/g、IPで45.4×103ng/gとそれぞれなった。これは道路塵埃の含有率に比べ、2～4オーダー高い値であった。
- 道路塵埃とPAHsそれぞれの生態リスクをTUとtuという指標を用いて比較したところ、TUの方がかなり大きな値となり、道路塵埃の羽化毒性はPAHsの相加的な毒性だけでは説明できないことがわかった。

RITSUMEIKAN

ご清聴ありがとうございました

RITSUMEIKAN