

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 市木 敦之

1. はじめに

琵琶湖南湖を中心とする都市系面源汚濁には、たとえば排気ガスやタイヤ摩耗片に含まれる自動車交通由来の PAHs（多環芳香族炭化水素）など発ガン性が認められている微量有機化合物があり、受水域への影響が懸念される。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が自動車から排出され、大気浮遊、沈着、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。こうした発生源周辺での調査研究は、近年いくつかの研究機関によって行われ¹⁾、これまで一定の知見が蓄積されつつある。筆者は、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排水溝や分流式雨水管において汚濁物流出の実態調査を実施することにより、都市系面源からの微量有機化合物の流出特性について検討してきた²⁾⁵⁾。しかしながら、都市系面源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、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ことから、筆者らは、これまでこうした都市環境堆積物の生態リスク評価を意図して、セスジユスリカ (*Chironomus yoshimatsui*、以下ユスリカ) に都市環境堆積物を暴露させる生態毒性試験を提案してきた⁶⁾。本報告は、さらにこれらが環境中に排出される動態と底生生物に及ぼす生態リスクを明らかにすることを目的として、(1)都市系面源の中で最も汚濁ポテンシャルが高いと考えられるもののひとつとして高速道路上の塵埃を採取し、それらに含有される微量有機化合物の実態を調べるとともに、(2)採取してきた底質をユスリカに暴露させることにより、その成長影響について検討したものである。ユスリカを用いた生態毒性試験により、道路塵埃に含まれる多種多様な化学物質の生態影響について検討するとともに、その生態影響に対する PAHs の寄与についても検討を行った。従来、琵琶湖流域における面源負荷については、農地、山林のウエイトが高いとして、富栄養化物質を主体に研究が進められている。しかし、都市系面源負荷については、合流式下水道の改善と関わって検討された以外、あまり研究が行われていない。本研究では、これまで行われていなかった都市系有機汚染について堆積実態と生態リスクについての調査・実験を行ったものである。

2. 研究の方法

2.1 研究の対象

自動車交通由来の汚染のみを抽出する意図で、高速道路上に堆積した道路塵埃を研究対象とした。道路塵埃は、名神高速道路において、西日本高速道路株式会社の路面清掃車両によって回収されたものである。回収区間は図 1 に示す京都東 I.C～八日市

I.C 間であり、この区間における自動車交通量はおおむね 7~9 万台/日である。回収された道路塵埃は、実験室に持ち帰って乾燥させた後、一部を粒径により分画した試料として化学分析に使用し、残りを後述する生体毒性の試験底質として使用した。なお、いずれの道路塵埃においても、降雨等の水理学的な影響を受けにくいと考えられる 500 μm 以上の粒子を除外した。

2.2 化学分析の概要

化学分析は、道路塵埃と毒性試験に用いた試験底質について行った。分析項目には、U.S.EPA の奨励する PAHs16 物質に加え、*TRIPHENYLENE*、*BENZO(E)OYRENE*、*PERYLENE* を加えた PAHs19 物質と重金属類 14 元素および TC である。PAHs の分析試料は、図 2 に示す方法により前処理（抽出、濃縮、クリーンアップ）を行った後、GC/MS（島津製作所 QP5000 ないし QP2010）により測定を行った。

2.3 生態毒性の試験概要

本研究では、生体毒性を調べる手法として、いずれも OECD（経済協力開発機構）の Chemical Test Guidelines Section2⁷⁾（以下、OECD テストガイドライン）をもとにした 2 種類の毒性試験（繁殖毒性試験および羽化毒性試験）を実施した。図 3 に繁殖毒性試験と羽化毒性試験の概要を示す。繁殖毒性試験は、ユスリカの卵からの孵化、羽化、産卵までの全生活史についての毒性が検討できる一方で、試験の時間的・空間的スケールが大きいために、OECD テストガイドラインに比べて試験の再現性や 1 回の試験で得られるデータ数の面で課題があった。羽化毒性試験は、ほぼ OECD テストガイドラインに準拠したものであり、試験のエンドポイントは羽化に特化しているものの、試験の再現性に優れており、結果を用いた詳細なリスク評価の検討が可能である。なお、道路塵埃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に沿った量の補助栄養餌をすべての水槽一律に与えた。

2.3.1 繁殖毒性試験

試験手順は以下の通りである。

- ① 試験底質には化学物質の影響を受けていない人工底質、道路塵埃、および道路塵埃

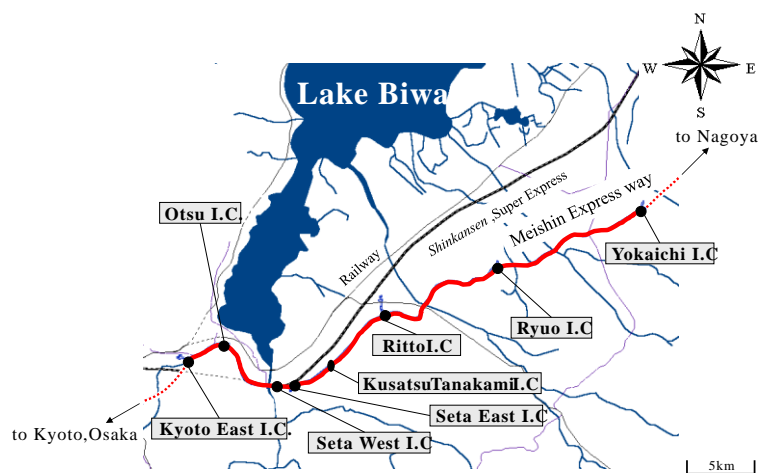


図 1 道路塵埃の回収区間

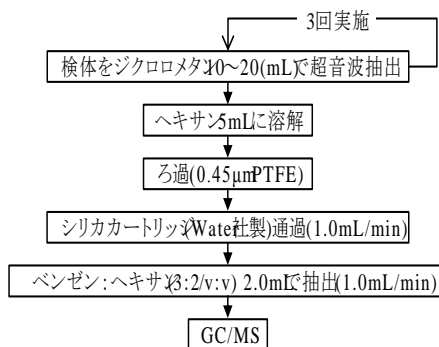


図 2 PAHs の抽出方法

- を希釈する意図で道路塵埃と人工底質を一定の割合で混合させた混合底質の 3 種類を使用している。試験底質を乱さないように上層水として 2 日間以上曝気を行った水道水をごくゆっくりと注いだ。その状態で 2 日以上放置し、通気を行った。
- ② 国立環境研究所により得たセスジユスリカの卵塊を継代飼育し、飼育より得られた 1 卵塊中の卵数を実態顕微鏡で測定する(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する。
 - ③ 幼虫期の間、孵化後 4,8,12 日目にそれぞれアンモニアの影響を回避するため上層水の交換を行う。さらにこれを採取し、pH,DO,NH₄,TOC,PAHs,重金属類の分析を行っている。
 - ④ ユスリカの羽化が始まると、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。
 - ⑤ 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、上層水を採取するとともに、試験底質をバルクで採取し、TOC,TC,PAHs,重金属類の測定を行った。
- それぞれのライフステージで測定した項目を用いて、試験としてのエンドポイントは、羽化率(=羽化数(b)/1 卵塊中の卵数(a))および産卵率(=産み付けられた卵塊数(d)/羽化中の雌数(c))とした。

2.3.2 羽化毒性試験

試験手順は以下のとおりである。

- ① 試験底質には人工底質、道路塵埃、混合底質に加え、人工底質に PAHs を添加した底質の 4 種類を使用している。上層水については繁殖毒性試験と同様である。
- ② 国立環境研究所により得たセスジユスリカの卵塊を継代飼育し、飼育より得られた卵塊から孵化したユスリカ 1 齢幼虫をすべての試験水槽に 20 個体(a)ずつ投入する。
- ③ 上層水の交換は行わない。
- ④ ユスリカの羽化が始まると、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。

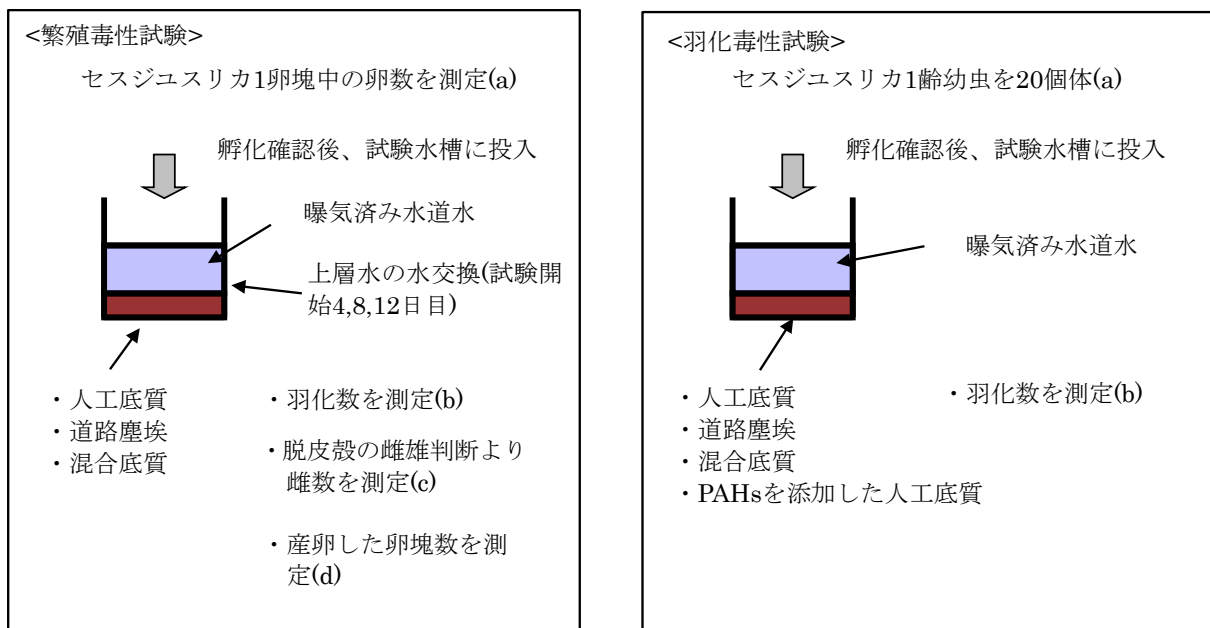


図 3 繁殖毒性試験と羽化毒性試験の概要

⑤試験はユスリカの羽化が終わる（孵化後 20 日目程度）と終了し、上層水を採取するとともに、試験底質をバルクで採取し、TOC、TC、PAHs、重金属類の測定を行った。

ここでは、羽化率（=羽化数(b)/1 卵塊中の卵数(a)）を試験としてのエンドポイントとした。

3. 道路塵埃を底質に用いた繁殖毒性試験からみた生態リスクの検討

試験底質に道路塵埃を用いて繁殖毒性試験を実施することにより、道路塵埃が羽化および産卵に及ぼす影響について検討した。実施した繁殖毒性試験の試験条件と試験結果をそれぞれ表 1 と図 4 に示す。ここに底質ΣPAHs 含有率は、道路塵埃を用いて作成した繁殖毒性試験における試験底質の単位乾燥重量あたりの PAHs19 物質の含有量を表している。試験結果にばらつきがあるものの、試験底質の PAHs 含有率が高くなると羽化率と産卵率がともに低減しており、その傾向は羽化率に比べて産卵率の方で明瞭に認められる。他の汚濁物が影響している可能性を排除できていないため、道路塵埃に含まれる PAHs が直接的に羽化や産卵に影響していることを示すわけではないが、道路塵埃におけるこうした汚染のレベルが高くなると、ユスリカの羽化や産卵に影響を及ぼしていることがわかる。

4. 道路塵埃を底質に用いた羽化毒性試験からみた生態リスクの検討

試験底質に道路塵埃を用いて羽化毒性試験を実施することで、道路塵埃の生態リスクの定量化を試みた。生態リスクの指標としては TU（毒性単位）を用いた。TU は、ある毒性を有する環境試料について、それが指標生物に対してリスクを発現させなくなるまで希釈した場合の希釈倍率を意味する。羽化毒性試験から TU を算定するまでの考え方をフロー図にして図 5 に示す。まず、試験底質に道路塵埃を用い、当該塵埃にリスクがあるかどうかスクリーニングを行う（Step1）。ここでリスクが発現した道路塵埃については、道路塵埃を人工底質で何段階かに希釈した混合底質を試験底質とした羽化毒性試験を再度行い、その結果から TU を算定する（Step2）。

表 1 道路塵埃を底質に用いた繁殖毒性試験の試験条件

試験条件	使用塵埃	道路塵埃割合 (%)
Control	人工底質	-
Mix	混合底質	25~90
Highway	道路塵埃	100

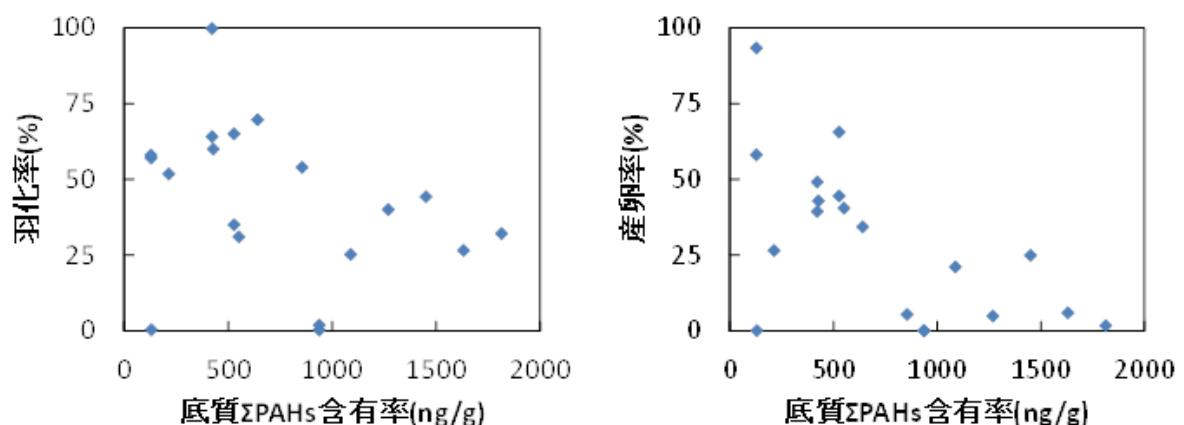


図 4 道路塵埃を底質に用いた繁殖毒性試験の結果（左：羽化率、右：産卵率）

4.1 道路塵埃のスクリーニング

Step1では、2012年2月20日～10月3日に回収された道路塵埃のうち、13塵埃を用いた。生態リスクの有無は、試験底質としてリスクが無いとみなせる人工底質を用いた対照区と道路塵埃を用いた塵埃区の羽化率について、それぞれの平均値の間でt検定（5%有意水準）を行い、羽化率に有意差があるかどうかで判定した。その結果、13塵埃のうち3塵埃（HW0220、HW0314、HW0905）について有意差が認められ、リスクがあると判定された。2月から10月に回収された13種類の塵埃のうち、3種類の塵埃について羽化への影響が認められた。対象とした高速道路では、路面清掃はおおむね2週間に1回の頻度で行われているため、確率的には2カ月に1回（2×13週間に1×3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る。

4.2 道路塵埃におけるTUの算定

Step1において生態リスクがあると判定された3塵埃について、Step2として、TUを算定するための羽化毒性試験を行った。Step2で行った羽化毒性試験の試験条件を表2に示す。濃度区としては、塵埃割合0%（人工底質100%）および塵埃割合25、50、75、100%の計5濃度区を設定した。羽化毒性試験の結果をそれぞれ図6に示す。それぞれの道路塵埃で、試験底質に占める塵埃割合がある値を超えると羽化率が下がることを見てとれる。

TUの算定は、次の手順により行った。x軸に塵埃割合(%）、y軸に羽化率(%)の散布図（図7）について、①対照区と塵埃区との羽化率の間で塵埃割合の小さい方からt検定行う。②初めて有意差の出た濃度区と対照区の平均羽化率の差の信頼区間を求める。③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する。④信頼区間の下限値と直線との交点を求め、このxをNOED(No-Observed-Effect Dilution、最大無影響塵埃割合)とする。⑤TUは、 $TU = 100 / NOED$ として算定した。各塵埃について算定したTUを表3に示す。TUは1.11～7.13となったことから、これらの道路塵埃は、ユスリカの羽化に影響を及ぼさなくなるには1.11～7.13倍に希釈する必要があるというレベルの生態リスクを有していることを示している。

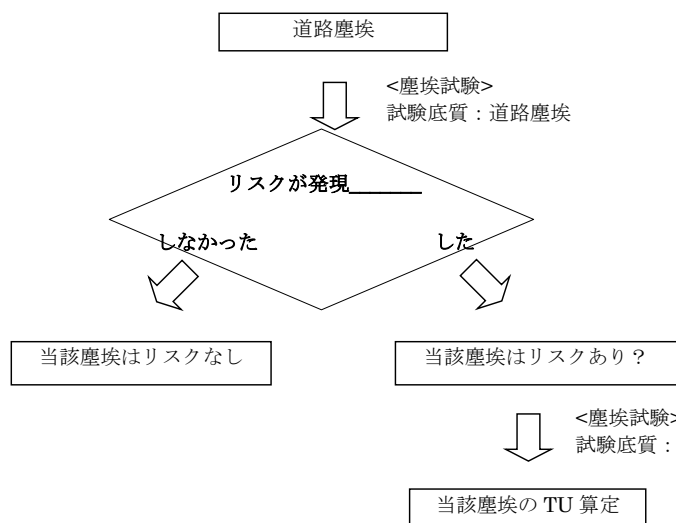


表2 道路塵埃を底質に用いた羽化毒性試験の試験条件

試験条件	使用塵埃	人工底質： 道路塵埃
Control	-	10:1
HW25	HW0220	3:1
HW50	HW0314	1:1
HW75	HW0905	1:3
HW100		0:10

図5 道路塵埃のTU算定フロー

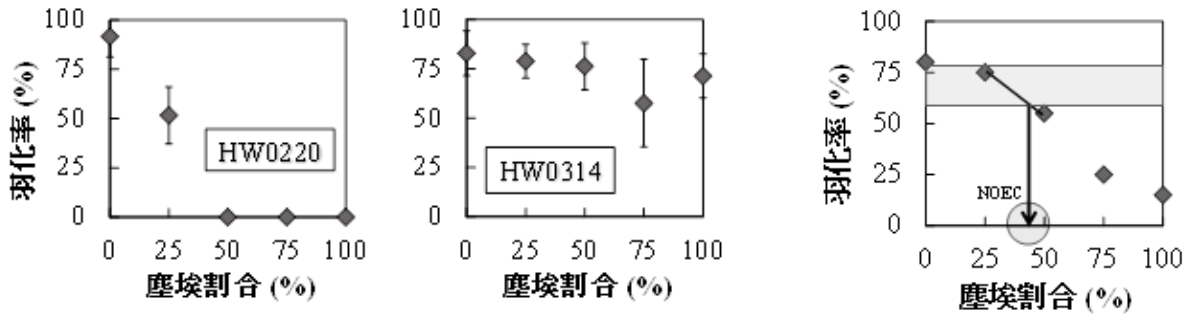


図 7 NOED 算定の概念図

表 3 道路塵埃の TU 算定結果

道路塵埃	TU
HW0220	7.13
HW0314	1.11
HW0905	1.26

5. PAHs を添加した人工底質を用いた羽化毒性試験からみた生態リスクの検討

道路塵埃の生態リスクにおける PAHs の寄与について検討を試みた。試験底質として PAHs を 1 物質ずつ添加した人工底質を用いて羽化毒性試験を行うことで、個別物質としての PAHs の羽化毒性を調べるとともに、道路塵埃の羽化毒性における PAHs の影響を算定して比較した。

5.1 PAHs の羽化毒性

PAHs を添加した人工底質を用いた羽化毒性試験の試験条件を表 4 に示す。添加する PAHs (被験物質) としては、U.S.EPA や IARC (International Agency for Research on Cancer) で示されているリスクレベルの高さと道路塵埃中の含有率の高さを勘案して、BaP (*Benzofa]pyrene*)、DP (*Dibenzo[a,h]anthracene*)、BP (*Benzofghi]perylene*) および IP (*Indeno[1,2,3-c,d]pyrene*) の計 4 物質を選定した。比塵埃添加倍率は、塵埃に含まれるおおよその PAHs 含有率に対して、被験物質としての PAHs 添加量を相対値で表したものである。ここでは、PAHs の羽化毒性を表すリスク指標として NOEC (No-Observed-Effect Concentration、最大無影響濃度) を用いた。羽化毒性試験の結果を図 8 に示し、この結果について NOED と同じ考え方で求めた NOEC の算定結果を表 5 に示す。NOEC すなわちユスリカに影響を及ぼさない最大の含有率は、BaP で $5.74 \times 10^3 \text{ng/g}$ 、DA で $22.3 \times 10^3 \text{ng/g}$ 、BP で $148 \times 10^3 \text{ng/g}$ 、IP で $45.4 \times 10^3 \text{ng/g}$ とそれぞれなった。これらはいずれも塵埃の含有率より 2~4 オーダー高い値である。

表 4 PAHs を添加した人工底質を用いた羽化毒性試験の試験条件

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

5.2 道路塵埃の羽化毒性における PAHs の影響

道路塵埃について求めた TU と個別の PAHs について求めた NOEC を用いて、道

路塵埃の羽化毒性における PAHs の影響を検討した。すべての化学物質のリスクは相加的に作用するものと仮定すると、塵埃に含まれる PAHs の生態リスクは TU と同じ考え方の毒性指標 tu として、式 1 で表すことができる。

$$tu = \sum \left(\frac{C_i}{NOEC_i} \right) \dots\dots\dots \text{式 1}$$

ここに、 tu は PAHs 毒性指標の総和、 C_i は物質 i の道路塵埃中含有率 (ng/g)、 $NOEC_i$ は物質 i の NOEC (ng/g) である。TU と tu を比較することにより、相加的な毒性影響を前提としたものではあるが、道路塵埃の羽化毒性における PAHs の寄与が類推できる。各道路塵埃における TU と tu を表 6 に整理した。TU に比べて tu は非常に小さいことから、今回発現した道路塵埃の生態リスクは、PAHs による単純な毒性の相加的影響だけでは説明できないことがわかる。

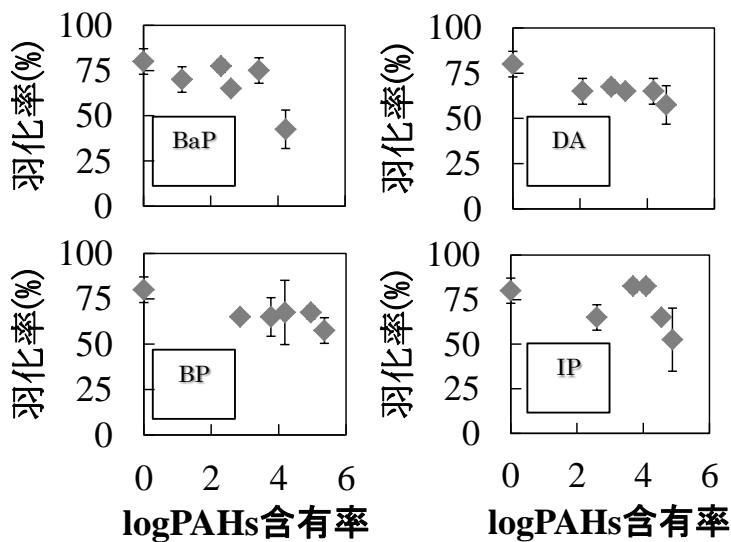


表 5 PAHs の NOEC 算定結果

PAHs	NOEC ($\times 10^3$ ng/g)
BaP	5.74
DA	22.3
BP	148
IP	45.4

図 8 PAHs を添加した人工底質を用いた羽化毒性試験の結果

表 6 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

6. まとめ

高速道路に堆積した道路塵埃をユスリカに暴露させる毒性試験を実施し、自動車交通由来の微量有害物質の生態リスクについて検討を試みた。加えて、個別に PAHs をユスリカに暴露させる毒性試験を実施し、道路塵埃の生態リスクにおける PAHs の影響について検討した。以下に結果をまとめる。

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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 $5.74 \times 10^3 \text{ng/g}$ 、DAで $22.3 \times 10^3 \text{ng/g}$ 、BPで $148 \times 10^3 \text{ng/g}$ 、IPで $45.4 \times 10^3 \text{ng/g}$ 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。
- 5) 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。

道路塵埃の生態リスクについては、①PAHs以外に重金属等の微量有害物質にも起因するか、あるいは、②いくつかの微量有害物質の複合的な毒性影響があることが示されたため、今後は毒性試験の改良を試み、これらの視点での生態リスク評価を図っていきたいと考えている。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Ichiki, A., Ido, F. and Minami T. (2008). Runoff characteristics of highway pollutants based on a long-term survey through a year. *Water Science and Technology*, 57(11), 1769-1776.
- 5) Ichiki, A., Ido, F. and Minami T. (2009). Comparison of Runoff Pollutants through Highway Drainage and Urban River Based on Annual Surveys. Proc. of 13th International Conference on Integrated Diffuse Pollution Management (IWA DIPCON 2009).
- 6) 市木敦之, 三浦陽介, 諏訪広樹: "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", 環境システム研究論文集, 土木学会, 35

(2007) pp.417-424.

7) OECD Chemicals Testing – Guidelines.

http://www.oecd.org/document/62/0,2340,en_2649_34377_2348862_1_1_1_37465,00.html.