

水環境中の有害化学物質把握のためのバイオアッセイ と化学分析

佐々木 裕子 菊地 幹夫* 芳住 登紀子**
木瀬 晴美*** 松井 道子*** 渡辺 のぶ子****
志村 真理**** 大田黒 幹夫**** 若林 明子

(* 現神奈川工科大学、** 現大気保全部、*** 非常勤研究員、**** 水質保全部)

要 旨

都内の河川水を3年間に渡りバイオアッセイと化学分析を用いて調査し、バイオアッセイの化学物質汚染のスクリーニング法としての有効性と検出域を検討した。その結果、①ミジンコ遊泳阻害試験は有機リン農薬の感度の高い検出方法となり、都内河川はミジンコの生育に有害な場合がある。②変異原性試験からは、河川に強変異原物質が存在する、③藻類増殖阻害試験では、都内河川水には藻類の成長を阻害するレベルの農薬は存在しない、④マイクロトックス法からは、農薬、界面活性剤より高い一般毒性を示す化学物質が存在する、ことなどが分かった。特に、ミジンコ試験や変異原性試験は化学分析では困難な極く微量の化学物質を検出することができ、化学分析の有力な補完法となることが明らかとなった。

キーワード：化学分析、バイオアッセイ、ミジンコ遊泳阻害試験、変異原性試験、
藻類増殖阻害試験、マイクロトックス法

Bioassay and Chemical Analysis for the Detection and Evaluation of Chemicals in the Water Environment

Yuko Sasaki, Mikio Kikuchi*, Tokiko Yoshizumi**,
Harumi Kise***, Michiko Matsui****, Nobuko Watanabe****,
Makoto Shimura****, Mikio Ohtaguro****, Meiko Wakabayashi

* Kanagawa Institute of Technology, ** Air Quality Protection Division,
*** Associate Researcher, **** Water Quality Protection Division

Summary

Chemical contamination in the river waters in Tokyo was evaluated based on the chemical analysis of 35 pesticides and 4 surfactants, and four types of bioassays over a period of 3 years. The acute Daphnia toxicity test proved to be a highly sensitive and useful assay for organophosphorous pesticides. Potent mutagenic chemicals which were hardly traced were identified using Ames Salmonella mutation test. The Algal growth inhibition test indicates which herbicide in river water never reached the toxic level for algal. The Microtox test produced trace of unknown toxic chemicals along with the regular pesticides and surfactants. Each individual bioassay has a specific detective spectrum. The combination of these bioassays and chemical analysis is effective for the detection and evaluation of chemical contaminants.

Keywords: chemical analysis, bioassay, acute Daphnia toxicity test, mutation test,
Algal growth inhibition test, Microtox test

験、マイクロトックス試験用には、直ちにセップパック PS-2 (ウォーターズ社製) ないしエムポアディスク (GLサイエンス社製) を用いて固相抽出した。ミジニコ遊泳阻害試験には、採水直後に凍結し、試験時に解凍して使用した。

(2) 農薬分析

水質環境基準、要監視項目、公共用水域の水質評価指針の農薬のうちガスクロマトグラフ質量分析法で分析可能な35種(表1)を対象とした。既報⁴⁾に従って、ガスクロマトグラフ質量分析—選択イオン検出法で、0.1 $\mu\text{g}/\ell$ を検出限界として、同時一括分析を行った。

(3) 界面活性剤分析

LASは高速液体クロマトグラフィー光分析法で直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを標準として測定した。メチレンブルー活性物質 (MBAS) はJIS K0102 30.1.1に従い、ドデシル硫酸ナトリウムを標準として測定した。APE、非イオン界面活性剤は既報⁵⁾に詳細を記したが、APEは高速液体クロマトグラフィー光分析法で、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル及びポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルを標準として測定した。非イオン界面活性剤は、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルを標準としてトルエン抽出—吸光度法で測定した。

(4) ミジニコ遊泳阻害試験

既報^{1),3)}と同様に、JIS K0299「化学物質などによるミジニコ類の遊泳阻害試験」に準拠し、河川水にオオミジニコ *Daphnia magna* (以下、「ミジニコ」と言う。) の仔虫20個体を5個体ずつ入れ、24時間、48時間後の遊泳阻害状況を観察し、遊泳阻害比率を算出した。

(5) 変異原性試験

既報⁶⁾に詳細を記したが、サルモネラ TA98株と YG1024株を用い、更に一部検体は TA100株及び YG1021株、YG1024株、YG1026株、YG1029株を用いて試験を実施した。試験方法はS9mix添加、無添加の両条件で、プレインキュベーション法で行った。

(6) 藻類増殖阻害試験

固相抽出試料を元の河川水と同等な濃度となるようにC培地に添加し、前培養した淡水産単細胞緑藻類 *Selenastrum capricornutum* (以下、「藻類」と言う。) を、10000細胞/ ml となるように加えて培養した。温度21°C、明るさ4000 \pm 200ルクス24時間明条件で72

時間培養後、細胞数が培養開始から何倍に増殖しているかを指標として評価した。

(7) マイクロトックス法

固相抽出試料を2%NaClで段階的に希釈し、発光細菌 *Photobacterium phosphoreum* (Microbics社製) 液を加えた。15°Cで15分培養後発光量を測定し、添加前の発光量の50% (以下「EC₅₀」と言う。) となる河川水の濃縮倍率を求めた。

3 結果と考察

表1に3年間の35種の農薬検出状況、表2に採水日別の農薬検出状況を取りまとめた。農薬散布時期に重点を置いた調査であるが、調査地点ごとの農薬検出・不検出や汚染濃度の傾向は3年間大きく変わらなかった。地点ごとの検出状況では、中川潮止橋が最も農薬の検出頻度、検出農薬濃度が高く、江戸川新葛飾橋がこれに続いた。多摩川では、上流の羽村堰のみ全調査を通じて全農薬が検出されなかった。

ミジニコ遊泳阻害試験の結果を表3に示す。既報³⁾で報告した傾向はその後の調査でも変わらず、有機リン系殺虫剤が検出された中川や多摩川砦下取水点、調布取水点で遊泳阻害が見られた。また、遊泳阻害は有機リン農薬類の各検出濃度とそれぞれの毒性の強さの積の和が大きい場合におおむね発生した。ただし、有機リン農薬がほとんど検出されない時にも遊泳阻害が見られた例が若干存在した。これは、DDVPの様に定量下限値0.1 $\mu\text{g}/\ell$ 付近でかなりな毒性を示す農薬や、測定対象外の毒性の強い農薬やその分解代謝物 (DEPなど) が影響している可能性が考えられる。このことは、今後生態影響を与える最少濃度まで、分析の定量限界を下げる検討の必要性や分解代謝物の分析の必要性を示している。しかし一方では、通常の化学分析で捉えることが難しい微量の化学物質も、その毒性が強ければバイオアッセイによって検出出来るという有用性を示している。

このようにミジニコ遊泳阻害試験では、有機リン農薬を総合的に感度高く検出できた。有機リン系殺虫剤の遊泳阻害濃度は平均で0.8 $\mu\text{g}/\ell$ (0.10~2.6 $\mu\text{g}/\ell$ 、N=16) であることから、本試験でスクリーニングし遊泳阻害が認められない時は、化学分析を行わなくとも有機リン農薬類は基準値以下であると判断出来る。加えて、現在規制されていないなどにより、分析対象となっていな

表1 河川水の農薬別検出状況

	延べ検出数							
	江戸川 新葛飾橋	多摩川 羽村堰	多摩川 拝島源水補給点	多摩川 砧下取水点	多摩川 調布取水点	秋川 東秋川橋	成木川 両郡橋*	中川 潮止橋
イソプロチオン	4	0	0	0	0	0	0	15
イソキサチオン	2	0	0	0	1	0	0	0
イプロベンフォス	2	0	0	0	3	2	0	15
エスプロカルブ	0	0	0	0	0	0	0	4
NAC	1	0	0	0	0	0	0	0
ジクロロホス	0	0	1	6	6	0	1	6
シマジン	3	0	0	2	2	0	0	2
シメリン	2	0	0	0	0	0	0	14
ダイアジノン	3	0	0	1	1	0	1	10
ベンチオカーブ	2	0	0	1	1	0	0	12
ピリダフェンチオン	0	0	0	0	0	0	1	6
フサライト	0	0	0	0	0	0	0	1
プロプロフェジン	0	0	0	0	0	0	0	2
プレチラクロール	2	0	0	0	0	0	0	10
プロモブチド	8	0	0	0	0	0	0	12
フルトラニル	4	0	0	0	0	0	3	6
フェントロチオン	0	0	0	3	7	0	0	2
フェノカルブ	8	0	0	0	0	0	0	14
メフェナセット	9	0	0	1	1	0	0	14
モリネート	2	0	0	1	0	0	0	12
計	52	0	1	19	20	0	7	157

*1997.6以降 未測定

表2 河川水の採水日別検出農薬数

	江戸川 新葛飾橋	多摩川 羽村堰	多摩川 拝島源水補給点	多摩川 砧下取水点	多摩川 調布取水点	秋川 東秋川橋	成木川 両郡橋*	中川 潮止橋
1995年5月11日	0	0	0	0	1	0	0	6
5月25日	0	0	0	0	1	0	0	10
6月8日	3	0	0	0	0	0	1	15
6月22日	9	0	0	7	6	0	1	15
7月10日	5	0	0	1	1	0	0	10
7月20日	0	0	0	0	0	0	0	11
8月3日	3	0	0	4	2	0	2	7
8月17日	2	0	0	2	2	0	1	4
1996年6月14日	5	0	0	1	2	0	0	10
6月28日	2	0	0	1	0	0	0	12
7月16日	2	0	1	1	3	0	1	11
8月13日	3	0	0	0	0	0	0	5
10月25日	0	0	0	0	0	0	0	0
1997年2月7日	0	0	0	0	0	0	0	0
6月19日	6	0	0	1	2	0	—	11
6月26日	5	0	0	0	0	0	—	11
7月3日	2	0	0	1	1	0	—	10
8月12日	2	0	0	0	0	0	—	7
10月6日	0	0	0	0	0	0	—	1
1998年2月10日	0	0	0	0	0	0	—	1

表3 河川水のミジンコ遊泳阻害試験結果

	遊泳阻害 % (有機リン農薬検出数)							
	江戸川 新葛飾橋	多摩川 羽村堰	多摩川 拝島源水補給点	多摩川 砧下取水点	多摩川 調布取水点	秋川 東秋川橋	成木川 両郡橋*	中川 潮止橋
1995年5月11日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	75 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5月25日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	85 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6月8日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (3)
6月22日	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (3)	95 (3)	0 (0)	0 (0)	100 (3)
7月10日	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (2)
7月20日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)
8月3日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (2)	100 (2)	0 (0)	0 (1)	0 (1)
8月17日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	85 (2)	100 (2)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
1996年6月14日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6月28日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7月16日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
8月13日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10月25日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1997年2月7日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6月19日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	95 (2)	0 (0)	—	100 (2)
6月26日	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (0)	5 (0)	—	91 (2)
7月3日	0 (0)	5 (0)	5 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	52 (2)
8月12日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	0 (1)
10月6日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	0 (1)
1998年2月10日	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	80 (0)	—	0 (1)

* 1997.6以降未測定

い有機リン農薬が存在した場合も、本試験により検知できる可能性がある。

また、3年間のミジンコ遊泳阻害試験は、河川水を濃縮せずに行った結果であることから、都内には農薬散布時期には甲殻類の生育に有害となる濃度の農薬が含まれる河川水が存在することが強く示唆された。

次に変異原性試験については、既報⁴⁾や別報⁵⁾に記し

たように6菌株中では、フレームシフト型のTA98とそのアセチル転移酵素活性を高めたYG1024株の2株が河川水を評価する場合に、感度、検出域の面から推奨できることが分かった。本試験は現在用いられている農薬類のスクリーニング法とはならなかったが、変異原物質であり、発がん物質でもあるヘテロサイクリックアミン類を河川水から検出し、その発生源を明らかにすることが

表4 河川水の藻類増殖阻害試験結果

	細胞数増加率(培地比)							
	江戸川 新葛飾橋	多摩川 羽村堰	多摩川 拝島源水補給点	多摩川 砧下取水点	多摩川 調布取水点	秋川 東秋川橋	成木川 両郡橋*	中川 潮止橋
1996年6月14日	1.02	1.03	1.06	1.05	0.97	0.94	0.90	1.01
6月28日	1.01	0.99	1.03	1.10	1.06	1.98	1.21	0.98
7月16日	0.96	1.02	0.96	0.97	0.96	1.02	1.02	0.98
8月13日	0.98	0.95	0.90	1.01	1.00	0.97	0.98	1.01
10月25日	1.00	1.04	1.04	1.02	1.02	0.96	0.99	0.98
1997年2月7日	1.04	1.05	1.05	1.06	1.04	1.06	1.07	1.05
6月19日	0.96	1.03	1.04	1.02	1.00	0.97	—	1.02
6月26日	0.99	1.02	0.98	0.98	1.06	1.06	—	1.05
7月3日	1.05	1.08	1.09	1.08	1.08	1.05	—	1.02
8月12日	1.03	1.00	1.00	0.98	1.03	1.04	—	1.06
10月6日	1.03	1.03	1.03	1.03	1.09	1.09	—	1.08
1998年2月10日	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	—	0.97

* 1997.6以降未測定

表5 河川水のマイクロトックス試験結果 (EC50を示す河川水濃縮倍率)

	江戸川 新葛飾橋	多摩川 羽村堰	多摩川 拝島源水補給点	多摩川 砦下取水点	多摩川 調布取水点	秋川 東秋川橋	成木川 両郡橋*	中川 潮止橋
1995年5月11日	130	119	194	75		456	109	
5月25日	93	189	259	108	108	441	113	79
6月8日		165	203	60	103	278	158	60
6月22日	85	137	135	57		123	140	51
7月10日	65	184	302	92	136	314	166	85
7月20日	278	421	138	141	148	366	197	138
8月3日		180	165	51		193	99	111
8月17日	102	192	140	84		257	135	134
1996年6月1日	74	172	99	56		104	160	65
6月28日	65	62	63		61	64	112	54
7月16日	100	108	97	68	57	82	80	71
8月13日	81	105		114	171	133		85
10月25日	83	128	102	68		241	154	
1997年2月7日	100	473	318		95	128	98	
6月19日		329	106		59	170	—	52
6月26日	64	334	117	90	87	279	—	
7月3日	174	217	142	78	87	278	—	49
8月12日	79	295	279	98	113	476	—	66
10月6日	78	133	116	54	86	113	—	
1998年2月10日		454	162			394	—	
延検体 濃縮倍率50≥	4		1	4	7	0	1	7
延検体 濃縮倍率100≥	10	1	3	13	7	2	2	10

* 1997.6以降未測定

*延検体 濃縮倍率50≥

延検体 濃縮倍率100≥

出来た⁴⁾。

さらに、同定したヘテロサイクリックアミン類では説明できない強い直接変異原性が江戸川などで、時々検出されている。京都市の河川水から染料由来の新たな強変異原物質の検出が報告⁷⁾されたが、都内河川にも未知の変異原物質の存在が推測される。今後も発生源や原因物質を明らかにしていく必要がある。

また、変異原性で明らかになったヘテロサイクリックアミンの河川水中の濃度は100L程度の河川水を抽出し、化学分析した結果0.1~0.03ng/l程度であった⁴⁾。このことは、ミジンコ遊泳阻害試験同様に、化学分析ではむずかしい予想外の化学物質や分析の困難な極微量の化学物質の検出にバイオアッセイが有効であることを示している。

藻類増殖阻害試験は、細胞数の増加を指標として藻類の生長に対する影響を検討した。その結果、表4に示すように河川水中での増殖とプランクとしてのC培地の結果には数%しか違いが見られなかった。そのため、都内河川水中の除草剤等の化学物質は、藻類の増殖を阻害す

るレベルになっていないと推定された。しかし、藻類増殖阻害試験を除草剤等の化学物質のスクリーニング法として位置付ける場合は、検水の濃縮その他感度向上の検討も、今後必要と考えられる。

マイクロトックス試験の結果からは、中川、江戸川、多摩川の砦、調布の両取水点が一般毒性を示す化学物質による汚染が示唆された(表5)。しかし、検出時期が通年に渡り、農薬がまったく検出されない時もEC50が濃縮倍率50以下で認められるなどマイクロトックス試験

表6 界面活性剤のマイクロトックス試験 EC50値

	EC50 (15分) mg/l
陰イオン界面活性剤	
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.647
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS)	16.8
非イオン界面活性剤	
ポリオキシエチレンラウリルエーテル(AE)	11.0
ポリオキシエチレンオクタールフェニルエーテル (APE)	>100

* なお、上記データより各界面活性剤の濃度が0.01mg/lの場合、EC50が計測できる濃縮率を試算すると、SDS 65倍、LAS 1700倍、AE 1100倍、APE 10000倍以上となる。

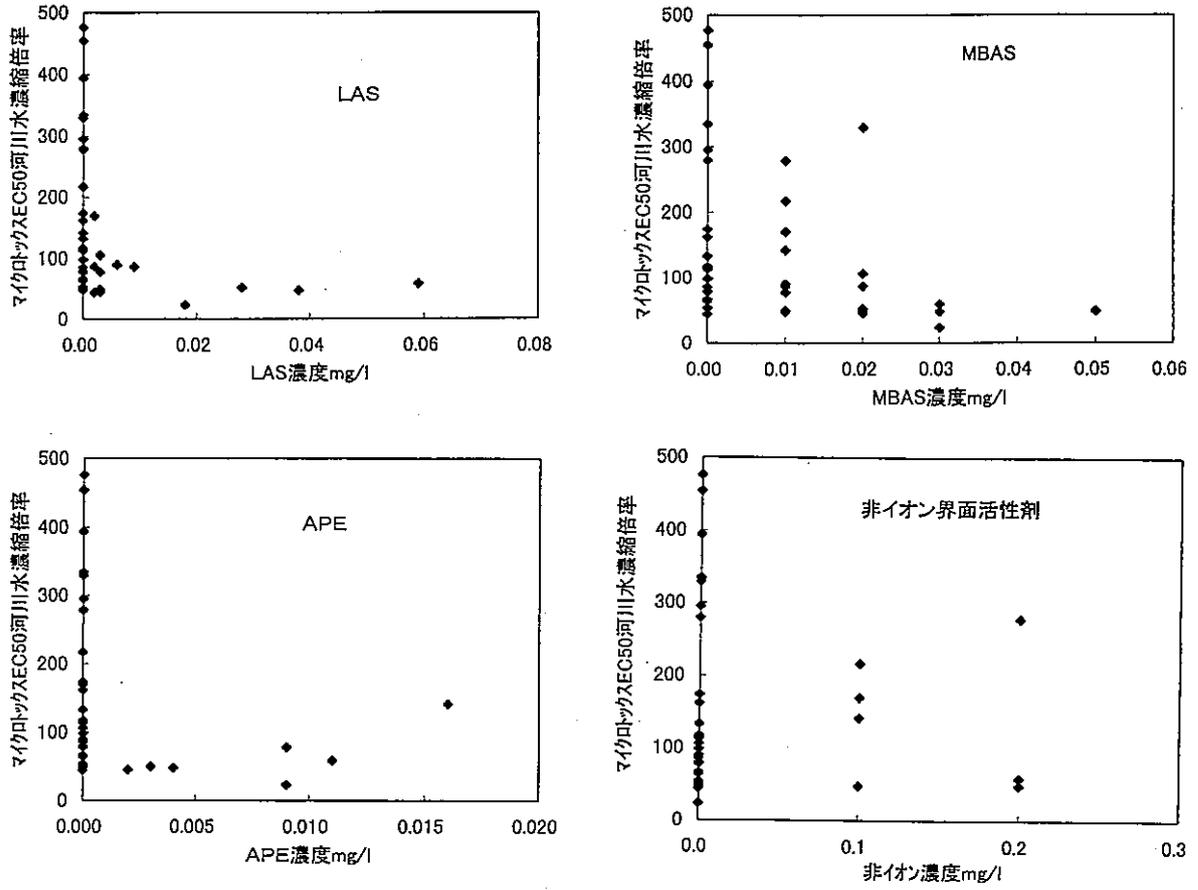


図2 界面活性剤のマイクロトックス試験

は農薬のスクリーニング法とはならないことが分かった。一方、BOD、COD⁸⁾とは比較的相関が認められたため、有機性の汚濁物質と発生源ないし挙動が類似する化学物質として、3年目に界面活性剤4種(APE、LAS、MBAS、非イオン)の河川水の分析並びに界面活性剤標準品のマイクロトックス試験を行った。その結果、表6、図2に見られるようにMBASなどが若干影響している可能性はあるものの、界面活性剤の間では強い関連性は認められなかった。そのため、EC50が濃縮倍率を100以下で示す河川水中の原因物質は他にあると推定された。

今回中川潮止橋をはじめ4地点で、化学物質の一般毒性が年間を通じて高かった。そのため、これら地点での化学分析を充実させる必要性が認められるものの、マイクロトックス試験は急性毒性全般を評価する方法であり、ミジンコや藻類による試験ほどターゲットとなる化学物質に特異性はない。マイクロトックス試験で示唆される

有害性に適切な対応をするためには、個々の化学物質のデータを一方では集積し、両者の比較検討から本試験の有効性を高めていく必要がある。

各バイオアッセイの関連性を検討するため、図3に変

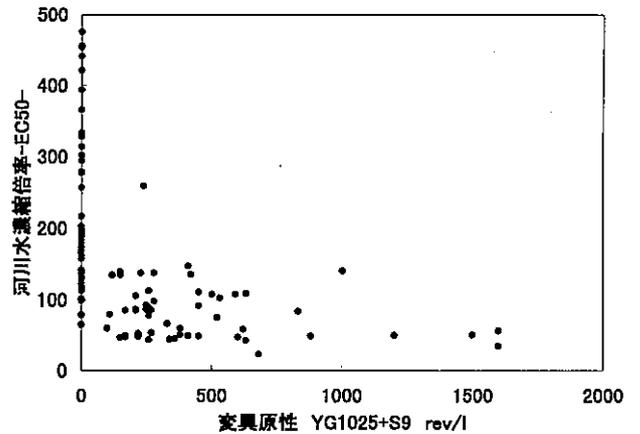


図3 変異原性とマイクロトックス試験結果

異原性 (YG1024+S9) とマイクロトックスのEC50の河川水濃縮倍率との相関の例を示した。高い変異原性を示す河川水の中にはマイクロトックス試験による一般毒性でも高い例が見られた。しかし一方では、一般毒性を示す化学物質の存在を示唆される河川水でも、変異原物質の存在を示さない例も見られた。すなわち、様々な化学物質が流入する汚染の進んだ河川では両試験で有害性を示す場合はあるものの、有害性を示す化学物質は同じ物質とは限らないと考えられる。

今回検討した他のバイオアッセイについても同様に相互の関連は認められなかった。そのため、検討した4種のバイオアッセイは異なる検出域を持ち、バイオアッセイを組み合わせる使用することがスクリーニング法として有害性のある化学物質を幅広く監視・検索することに繋がると期待できる。

4 おわりに

河川水の化学分析と4種類のバイオアッセイから、規制、監視項目のスクリーニング法としては、ミジンコ遊泳阻害試験のみが、有機リン農薬類の高感度検出法であることが分かった。

しかし、バイオアッセイは通常の化学分析では検出困難な微量物質でも、有害性が非常に高い物質であれば検出出来ること、予測していない未知物質を含めて検出、評価出来る特性を有している。

水域環境での化学物質によるリスクの低減へ向け、化学分析を補完し、総合的な評価や幅広い監視など、今後各バイオアッセイの特徴を生かした利用を進めていきたい。

5 謝辞

本調査を進めるにあたり、採水、分析等でご協力いただいた帝人エコサイエンス (株) に謝意を表します。

引用文献

- 1) 菊地幹夫、若林明子：ミジンコを用いた生態系リスク調査、東京都環境科学研究所年報、1996、p.88-92.
- 2) 東京都環境科学研究所：化学物質による環境汚染、1994、P199.
- 3) 菊地幹夫ら：ミジンコを用いたバイオアッセイによ

る農薬スクリーニング調査、東京都環境科学研究所年報、1996、p.93-98.

- 4) 佐々木裕子ら：河川水の変異原性と原因物質の検索について、東京都環境科学研究所年報、1996、p.80-87.
- 5) 芳住登紀子ら：都内河川水における農薬と変異原性試験、東京都環境科学研究所1998
- 6) 菊地ら：東京都内河川水中の非イオン界面活性剤濃度、東京都環境科学研究所年報、1994 p.71-74.
- 7) H.Nukaya *et al.* : Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakaseriver in Kyoto, Chem. Res. Toxicol, 1997, 10, 1061-1066.
- 8) 東京都環境保全局：公共用水域の水質測定結果、1995-1997.