

課題名 S2-09 マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

課題代表者名 稲森 悠平(福島大学共生システム理工学類環境システムマネジメント専攻・教授)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 71,630,千円(うち23年度 22,230千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) マイクロコズムを用いた各種化学物質の生態影響の総合解析評価およびマニュアル化
福島大学
- (2) マイクロコズムの構成微生物群と安定性確保のための操作条件の最適化及びモデル化
愛媛大学
- (3) マイクロコズムを用いた金属類の生態系システムに及ぼす解析評価
千葉工業大学
- (4) マイクロコズムを用いた農薬・有機物負荷等の生態系に及ぼす解析評価
東北大学
- (5) マイクロコズムを用いた微量汚染化学物質等の低減機能および生態系システムに及ぼす解析評価
横浜国立大学

研究協力機関

- (1) マイクロコズムを用いた各種化学物質の生態影響の総合解析評価およびマニュアル化
千葉県立中央博物館
- (2) マイクロコズムの構成微生物群と安定性確保のための操作条件の最適化及びモデル化
総合地球環境学研究所
放射線総合医学研究所
- (3) マイクロコズムを用いた金属類の生態系システムに及ぼす解析評価
相模女子大学

研究概要

本研究は、標準モデル生態系として活用が期待されるマイクロコズムを用いて、機能パラメータ（P/R比）と構造パラメータ（生物相）から、各種の化学物質の影響評価を行い、生態系リスク影響評価手法の開発に資する基礎的知見の集積を目的として検討しているものである。研究体制は国内におけるマイクロコズム研究の第一人者クラスから構成され、サブテーマ①～⑤を分担しながら相互に密な連携体制をとりつつ実施している。得られた成果については、国内外の従前の研究成果と比較検討を行い、OECD等の国際的な標準試験方法として採用されるよう精力的に検討を進めているところである。

1. はじめに

本研究ではマイクロコズムを用いた汎用化可能な水圏の生態リスク評価手法を開発することを目的とする。対象とするマイクロコズムは、水圏生態系に及ぼす化学物質の影響評価試験のツールとして位置づけられる生産者（藻類）、捕食者（微小動物）、分解者（細菌類）が存在し、単一種の純粋培養系のみでは得ることのできない、自然生態系に存在する微生物間相互作用、物質循環、エネルギーフローなどの生態系の要素を含んでいる。

水圏生態系は、生産者（藻類）、捕食者（微小動物）、分解者（細菌類）を主とする微生物ループを基盤とした高次捕食者の魚類等を含んだ生態系から構成されていることに着目することが必要であり、水圏生態系の水質浄化や物質循環には特に微生物ループが重要な役割を担っている。この微生物ループは、生産者としての光合成に基づく藻類、消費者としての繊毛虫類・輪虫類・貧毛類等の微小動物、分解者としての有機物等摂取細菌類等から構成され、窒素、リンの負荷、農薬、重金属等の化学物質の負荷による生態系の変動パラメータを考慮することが重要となる。したがって、環境変動と微生物・高次捕食者の水圏生態系の構成生物群との関係解析による生態系リスク管理手法の確立が重要な課題となる。

生態系システム評価解析の上では、水圏のモニタリングデータに基づいて構成したマイクロコズム（安定モデル生態系）を用いた微生物群集の動態解析を相補的に活用することが有効・効果的であり、これがマイクロコズムの重要な意義となる。単一生物を活用した研究は、従来より行われてきたが、多種の生物を活用した生態系リスク評価研究がなされていないのが現状である。マイクロコズムを活用した生態学的研究は、国際化が重視されているのが現状で、OECD試験法の検討においても、生態系システム評価の重要性が指摘されている。

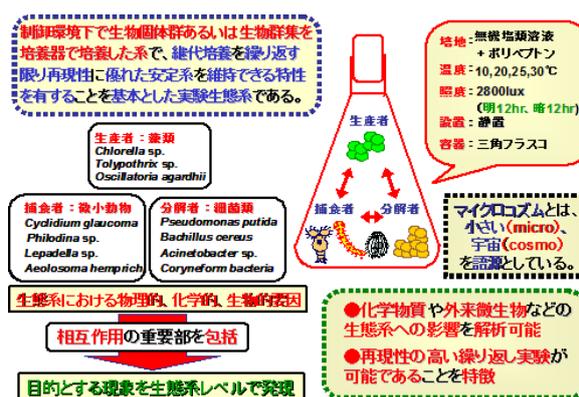


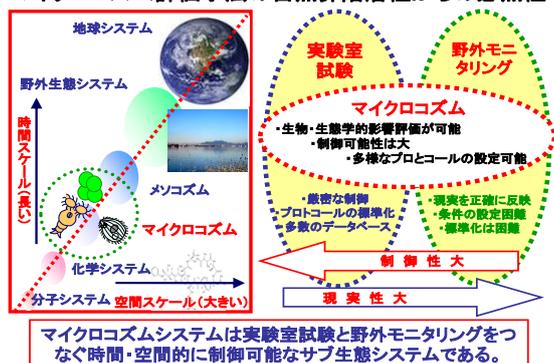
図1 本研究のツールとしてのマイクロコズム

2. 研究開発目的

本研究でツールとして用いるフラスコマイクロコズム（図1）は、分解者として4種の細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*Coryneform bacteria*、生産者として2種の緑藻類 *Chlorella* sp.、*Scenedesmus* sp.、1種の糸状藻類 *Tolyptothrix* sp.、捕食者として1種の原生動物繊毛虫類 *Cyclidium glaucoma*、2種の後生動物輪虫類 *Lecane* sp.、*Philodina erythrophthalma*、1種の後生動物貧毛類 *Aeolosoma hemprichi* の組合せからなる Gnotobiotic 型マイクロコズムである。定常期にあるこのマイクロコズムを種として新たな培地に植え継ぐと繰り返し同様な共存系の増殖曲線が得られるという高い安定性と再現性を有するモデル微生物生態系であり、統一規格としてデータを比較解析する上ではきわめて有効なツールとなる。従来より、このフラスコマイクロコズムを活用して、遺伝子組み換え細菌（GEM）、微生物農薬（BT菌等）、界面活性剤（LAS）、化学農薬（シマジン、チオベンカルブ）等の生態系影響評価をマイクロコズム構成生物の個体数から評価・解析してきた。しかしながら、システムとしての系全体に及ぼす影響を評価するためには生物個体数からの評価では不十分であり、P/R比（生産量／呼吸量の比）のような生態系機能に基づいた規格による評価・解析が必要である。フラスコマイクロコズムのP/R比は安定自然生態系のP/R比と同様に1となることが解明されており、すなわち、フラスコマイクロコズムのP/R比に及ぼす影響を把握できれば、自然生態系の生態系機能に及ぼす影響を及ぼすかが予測可能となる。

本研究では、上記の点に鑑み、生態系機能のモデルとしてのフラスコマイクロコズムを用いたリスク影響評価システムの確立化を図ることを目的とした（図2）。

マイクロコズム評価手法の自然界階層性からの必然性



本研究開発の主たる目標

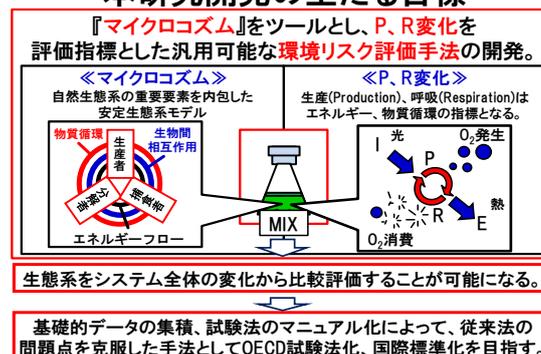


図2 マイクロコズムを活用したリスク評価システムの確立化

3. 研究開発の方法

(1) マイクロコズムを用いた各種化学物質の生態影響の総合解析評価およびマニュアル化

現在、最も使用されている界面活性剤であるポリオキシエチレンアルキルエーテル(AE)およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を対象物質とし、界面活性剤LASと同様に、AEやSDSのような生分解可能な物質であっても、P/R比等で影響評価可能であるか否かを明らかにすることを目的に行った。AEの添加量(負荷量)は、0(対照系)、2.5、10.0、25.0mg・L⁻¹の濃度になるように、マイクロコズム培養開始後16日目の安定期に添加した。また、本実験では、酸素濃度を連続測定しているため、平衡状態である濃度より高い場合には水から酸素が出ていく量、低い場合には大気から水に入ってくる量を補正しない限り、実際に微生物群の生成した酸素量、消費量を導く事はできないため、マイクロコズムにおける気液平衡特性の解析を同時に行った。また、生態系には何らかの攪乱に対して、生態系機能をそのままの状態に維持できる抵抗安定性と、一時的に攪乱を受けるが元の状態に回復する回復安定性があると考えられていることから、これらの機能を考慮し、抵抗安定性を呼吸、生産量、P/R比をそれぞれ枝分かれ型分散分析を用いて対照系と比較した。また、回復安定性を一日毎に呼吸、生産量をそれぞれt検定により回復日を評価した。

(2) マイクロコズムの構成微生物群と安定性確保のための操作条件の最適化及びモデル化

杉浦マイクロコズムよりも単純なマイクロコズムの生態毒性評価試験法としての妥当性を化学物質に対する感受性の観点から検証することとし、3者マイクロコズムとその単独培養系に金属類負荷実験を行い、3者マイクロコズムと単独培養系、単一生物種試験(現在一般的に行われている藻類、ミジンコ、魚類毒性評価試験など)、杉浦マイクロコズムの間で感受性を比較することにした。安定期の3者マイクロコズムにAl³⁺(0.27~27mg・L⁻¹)、Mn²⁺(5.5~550mg・L⁻¹)、Cu²⁺(0.064~6.4mg・L⁻¹)を負荷し、細胞数とP/Rに対する影響を解析評価した。MnとCuについては、単独培養系でも負荷実験を行い、細胞数に対する影響を解析評価した。また、本テーマでは数理モデルとマイクロコズムを用いた実証試験の双方から「化学物質→生態系個体群動態→溶存酸素動態」の間の関係を明らかにし、この手法の有効性を保証する理論的基盤を確立することを目的にした。具体的には以下の3つの課題を検討した。(課題1)数理モデルによる溶存酸素量(DO)の変動のメカニズムと予測。(課題2)数理モデルの解析結果の検証として、マイクロコズムの構成種の個体数や存在の有無がDO動態に及ぼす影響。(課題3)数理モデルの解析結果の検証として、2種系(細菌-藻類)のシミュレーションモデルを用いた毒物投与(3段階の強度)がDO変動動態に及ぼす影響。

(3) マイクロコズムを用いた金属類の生態系システムに及ぼす解析評価

本研究では、金属類の生態リスク影響評価に供するための基礎的知見の集積を目的として、昨年度のAl³⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ni²⁺およびCo²⁺の添加(負荷)がマイクロコズム生態系のP/R比の推移に如何なる影響を及ぼすかについて検討をおこなった。R、P、P/Rおよびマイクロコズム構成微生物個体数の経時変化を影響評価項目に選択し、測定結果を基に、金属イオンの実測最大無影響濃度(NOEC)(マイクロコズム無影響濃度:m-NOEC)を決定した。また、数理モデル(N88BASICによる杉浦モデル,1996)によるシミュレーション解析により、培養モデル(マイクロコズム)の実験結果を検証し、培養モデルと数理モデルのハイブリッド型生態系リスク影響評価解析システムの構築を試みた。さらに、また、Naturally derived型、Stress selected型、Gnotobiotic型のタイプの異なるマイクロコズムにおける系の安定性について検討した。

(4) マイクロコズムを用いた農薬・有機物負荷等の生態系に及ぼす解析評価

農薬として除草剤ベンチオカーブとシマジン、および殺虫剤フェニトロチオンの水界生態系へ及ぼすリスク影響評価のために、マイクロコズムを用いて、除草剤・殺虫剤が構成生物種の個体数に対する影響だけでなく、生態系機能の重要な指標である生産量や呼吸量におよぼす影響を解析することを目的とした。特に、除草剤ベンチオカーブとシマジンのマイクロコズムの生産量や呼吸量におよぼす影響については、繰り返し実験より統計的な解析を行った。また、除草剤シマジンのマイクロコズムの生産量や呼吸量におよぼす影響については、従来の結果を踏まえてより広い範囲の負荷量に対する影響を解析評価した。

(5) マイクロコズムを用いた微量汚染化学物質等の低減機能および生態系システムに及ぼす解析評価

湖沼生態系では、人為由来による各種微量化学物質等による汚染が大きな環境問題となっている。そこで、本サブテーマでは、微量汚染化学物質として抗生物質を対象として生態系への影響評価を行った。従来から、抗生物質の多様や乱用によりメチリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などの薬剤耐性菌の出現が問題になっており、2010年にはスーパー耐性菌と呼ばれる多剤耐性菌が出現するなど、社会的に大きな問題となっている。抗生物質は、医療のみならず畜産・養殖業でも使用されており、特に養殖業では餌に抗生物質を混合して養殖場に投げ込んで与える方法が採用されている。そのため、抗生物質が排泄物として排出されるだけでなく、餌から直接環境中に溶出し、環境に多大な影響を与えている可能性がある。従って、薬剤耐性菌の出現を含め、抗生物質の水圏生態系への影響を総合的に評価することが重要である。

本サブテーマでは、畜産・養殖業で最も多く使用されている抗生物質のオキシテトラサイクリン

(OTC) を被験物質とし、本マイクロコズムを用いて、抗生物質の生態系システムに及ぼす影響、及びOTC耐性菌の動態を解析・評価した。

なお、本研究における各サブテーマの実験方法は平成21年度に確立した「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発 共通マニュアル β2.2」に従った。

4. 結果および考察

(1) マイクロコズムを用いた各種化学物質の生態影響の総合解析評価およびマニュアル化

個体数密度の遷移の評価とP、Rからの評価は整合性が存在することが示唆された。また、P、R値を用いることで客観的に生態系機能の抵抗安定性と回復安定性の評価を行うことが可能であった。マイクロコズム試験とメソコズム試験には高い相関性があることが示唆された。本研究により、複雑な生物間相互作用が存在する生態系の中では、毒性影響が緩和されて単一種試験とは異なる毒性影響の発現が起こることが考えられ、また、生態系の無影響濃度と単一種試験において、藻類が最も影響を受けやすい化学物質の場合の予測無影響濃度では高い相関が存在するが、単一種試験において動物類が最も影響を受けやすい化学物質の場合の予測無影響濃度では、相関が低いことが報告されている。マイクロコズム試験は微生物生態系であり、生物種の数も自然生態系と比較すると圧倒的に少なく、大型生物への影響を考慮できていない等の問題点が上げられる。しかし、さらなる基礎的データを収集し、マイクロコズムと自然生態系に対する相関性が確かめられれば、マイクロコズムの結果を自然生態系の管理に使用可能であると考えられる。

従来の単一生物種試験では得ることの出来ないマイクロコズム試験の最も良い点は、生態系を構成する要素自体による原因の除去が困難な場合（難分解性物質への曝露・蓄積など）、自浄作用の及ばないような変化を与える可能性について評価が出来る点だと考えられる。そのため、マイクロコズム試験の位置づけとして、エネルギーや物質循環の遮断、バランスの崩れ、生物活性、生物間相互作用に対する強弱の変化等の影響評価。生態系内での化学物質の分解性、分解産物の影響、影響強度の判定、生態系の回復機能に対する影響評価を行うことが可能であり、自然生態系に対する基礎的知見を得ることが出来る、有用な試験であるといえる。また、AEについて（最大無影響濃度を $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と仮定）、杉浦により作成された、実験・自然生態系への実測無影響濃度（NOECs）の平均値とマイクロコズムへの実測無影響濃度（NOAEC）との関係についての相関図に代入し、解析評価したところ、他の研究者の実験結果と同等のlog関数に近似できる値となり、さらに自然生態系との良い相関関係があることを示すことができた。このことより、マイクロコズムに対する化学物質の影響の結果を、自然生態系への化学物質の影響を評価する上での良い相関関係を示す有効な環境リスク評価方法となる可能性を明らかにすることができた。

(2) マイクロコズムの構成微生物群と安定性確保のための操作条件の最適化及びモデル化

水環境モデル生態系としての3者マイクロコズムと杉浦マイクロコズムの感受性の比較は、金属類の添加濃度が高過ぎて3者マイクロコズムでNOECを確定できない場合が多かったため、今のところ困難である。ただ、アルミニウム負荷時のP/Rについては3者マイクロコズムの感受性の方が低かったのに対し、

銅負荷時のP/Rについては両マイクロコズムの感受性は同等であった。したがって、化学物質の種類によって両者の感受性に差異がある場合と同等な場合の両方があると考えられた。また、3者マイクロコズムと単一生物種試験の比較に関しては、細胞数または個体数に対する銅の影響に着目すると、3者マイクロコズムの感受性の方が大幅に低かった。この原因は、単独培養系についても同様に単一生物種試験より感受性が大幅に低かったことから、生物間相互作用によって3者マイクロコズムで銅の影響が緩和されたためではなく、3者マイクロコズムの構成生物種自体の銅に対する感受性が単一生物種試験の試験生物よりも低かったためと考えられた。以上より、まだデータが完全ではないものの、3者マイクロコズムは生物間相互作用に起因する間接影響を評価できるが、杉浦マイクロコズムや単一生物種試験とは感受性が異なる場合があるため、毒性データを推定するためには適当な安全係数を用いるなどの工夫が必要であることが示唆された。また、生態系の生産・消費構造（生産者、消費者、生産者及び生産者の量）および変化をD0値の極大値と極小値から定量的に評価できることが数理モデルと実験から明らかとなった。さらに、D0波形の極大値と極小値の変化を解析することにより、毒物が生態系の生産及び消費（呼吸）の量的構造に及ぼす効果とその程度を評価できることが明らかになった。特に、D0波形の極大値・極小値の変化の方向、程度及び回復までの時間を知ることにより、毒性が生態系の生産・消費構造のどこに作用するかという特性とその強さを評価できることが明らかになった。

（3）マイクロコズムを用いた金属類の生態系システムに及ぼす解析評価

マイクロコズムを用いた金属類の生態系システムに及ぼす解析評価の結果、1)標準試験法としてのマイクロコズムは、完全種構成既知のGnotobiotic型が適していること、2)各金属のマイクロコズム無影響濃度（m-NOEC）は、 Al^{3+} : $0.15mg \cdot L^{-1}$ 、 Cu^{2+} : $0.25mg \cdot L^{-1}$ 、 Zn^{2+} : $1.20mg \cdot L^{-1}$ 、 Cd^{2+} : $0.16mg \cdot L^{-1}$ 、 Mn^{2+} : $1.0mg \cdot L^{-1}$ 、 Mg^{2+} : $10mg \cdot L^{-1}$ 、 Ca^{2+} : $5.0mg \cdot L^{-1}$ 、 Ni^{2+} : $\leq 1.0mg \cdot L^{-1}$ 、 Co^{2+} : $1.5mg \cdot L^{-1}$ と見積もられること、3)Gnotobiotic型マイクロコズムにおけるP/R比からの評価と生物相からの評価は概ね一致すること、4)数理モデルと培養モデルはD0値において差が生じたが、経時変化における振幅は再現すること、5)Co $1mg \cdot L^{-1}$ および $2mg \cdot L^{-1}$ 添加系では、生産者の比増殖速度は対照系の $1 \sim 0.9$ 倍に、消費者の比増殖速度は $0.8 \sim 0.9$ 倍になり、Coの影響は生産機能 \leq 消費機能と考えられること、6)Co $4mg \cdot L^{-1}$ 添加系では、生産者の比増殖速度は対照系の $0.7 \sim 0.9$ 倍に、捕食者の比増殖速度は $0.1 \sim 0.2$ 倍になり、Coの影響は生産機能 \leq 消費機能と考えられること、7)Co $8mg \cdot L^{-1}$ および $10mg \cdot L^{-1}$ 添加系では、生産者の比増殖速度は対照系の 0.1 倍に、捕食者の比増殖速度は $0.1 \sim 0.3$ 倍になり、Coの影響は生産機能 $>$ 消費機能と考えられること、6)生産機能、消費機能を同時にかつ定量的に影響評価解析できることは、培養モデルにおけるD0測定や個体数測定では難しく、数理モデルのメリットといえるが、一方、数理モデルはCo添加濃度によって数日間、培養モデルのD0値と同じ挙動を示さなかったことから、数理モデルは添加後の数日間培養モデルを再現できず、今後検討が必要であることが示された。以上より、Co²⁺添加においては、低濃度負荷と高濃度負荷では生態系システムの生産機能と消費機能に及ぼす影響の度合い（強弱）が逆転することが示された。このように、培養モデルと数理モデルを組み合わせたハイブリッド型生態系リスク影響評価解析システムの構築のための基礎的知見を得ることができた。

（4）マイクロコズムを用いた農薬・有機物負荷等の生態系に及ぼす解析評価

マイクロコズムを用いた農薬類の影響評価において、殺虫剤のフェニトロチオンは動物の個体数が大きく減少したり消滅したりする負荷濃度で、生産量と呼吸量では影響がみられなかったのに対して、除草剤シマジンでは生物の個体数に全く影響がない負荷濃度においても、呼吸量が減少するため、P/R比も減少する影響が確認された。この農薬の種類による生態系への影響の違いは、フェニトロチオンが水生動物へ強い毒性を持つのに対し、シマジンは光合成阻害をする機構の違いによると考えられるため、農薬の生態系リスク影響評価を行う場合、生態系内の生物個体数変化のみを調査するのではなく、機能としての生産量と呼吸量の測定をあわせて行う必要があると考えられた。農薬等のリスク影響は、従来個々の生物種に対する毒性リスクなどで評価が行われてきたが、マイクロコズムを用いた本研究では、生物の個体数への影響を評価できるだけでなく、個体数変動には大きな影響が見られない場合でも、生産量と呼吸量を測定することにより、生態系機能への影響を検出することのできるようになった。また、本研究において、構成生物種の個体数に変動が現れない程度の農薬の負荷においても、生産量と呼吸量には大きな影響が観察されたことから、マイクロコズムを用いた生産量と呼吸量を測定する試験方法は、農薬だけでなく汎用化できるリスク影響評価法としての可能性を有していることが示された。ベンチオカーブの生物への毒性として、コイとミジンコの半数致死濃度はそれぞれ $3.6mg \cdot L^{-1}$ と $1.7mg \cdot L^{-1}$ であることが報告されているが、マイクロコズムの群集内の動物の致死濃度は $8.0mg \cdot L^{-1}$ とほぼ同レベルであった。しかしながら、ベンチオカーブは動物の個体数が消滅したりする負荷濃度において、生産量と呼吸量では影響が見られなかった。一方、シマジンの毒性は

ニジマスやブルーギルではそれぞれ $2.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と $16.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と報告されていて、今回マイクロコズムに負荷した濃度では、構成生物への個体数へ影響がみられなかった。このように生物の個体数に全く影響がないシマジン負荷濃度においても、生産量が有意に減少したため、P/R比も減少する影響が見られた。このように農薬の種類による生態系への影響の違いは、除草剤においても薬品によって異なる応答を示すことから、農薬の生態系リスク影響評価を行う場合、生態系内の生物個体数変化のみを調査するのではなく、機能としての生産量と呼吸量の測定をあわせて行う必要があるといえる。

(5) マイクロコズムを用いた微量汚染化学物質等の低減機能および生態系システムに及ぼす解析評価

生物個体数の変化および P/R 比の変化から判定された NOEC を従来法による値と比較した。米国環境保護局 (EPA) のレポートにあるオキシテトラサイクリンの単一生物種を用いた毒性評価と、本マイクロコズムを用いた影響評価結果を比較すると、生物個体数の変化による評価では、本マイクロコズムにおける藻類に対する NOEC ($7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ より大) は、従来法による値 ($0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 未満) と比較して 1 桁以上大きい。特に、本マイクロコズムにおいては、原生動物 (*Cyclidium* sp.) および後生動物 (*Lecane* sp.) に対する NOEC の値が $0.007 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 未満と極めて低い。これらの生物に対しては EPA による評価は行われていないが、本マイクロコズムで得られたこの値 ($0.007 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 未満) は EPA の単一生物種への影響から判定される NOEC 値 ($0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 未満) より 1 桁以上小さい。さらに、本マイクロコズムにおいて P/R 比から得られた NOEC も 0.007 ppm 未満であり、OTC に対して感受性の高い系であることが明らかとなった。これらのことより、本マイクロコズムから判定された NOEC 値 ($0.007 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 未満) は EPA による値 ($0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 未満) よりも十分小さく、これは EPA 試験では考慮されていない OTC に対する感受性の高い生物への直接的な影響と、生物間相互作用を通じた間接的な影響が評価されたためであると考えられる。

このように、抗生物質を用いて生態系リスク影響評価を行い、無影響濃度を従来法と比較することで、単一生物種を用いた評価では見られない生態系全体への影響評価が行えることが示唆された。すなわち、本手法は、生態系全体への影響評価を行えることが明らかとなった。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

従来、生態系リスクは生物種とその個体数の変動に基づく評価が行われていた。しかし、本手法は、生物機能である生産量 (P) と呼吸量 (R) に基づく生態系リスクの影響評価手法であり、対象とする生態系の個別性に左右されることなく統一的に生態系リスク評価を行うことができる点で、科学的意義は大きい。水圏生態系に及ぼす化学物質のリスクに対して、これまで評価方法が十分に確立されていなかったマイクロコズム試験に関して、P/R 比の測定精度の向上と各研究機関でのインターキャリブレーションや相互比較解析などによりマニュアル化を進め、試験法・評価法の標準化の確立化を図ることができた。また、従来より、様々な手法で行われてきた生態系への化学物質等の影響に関する NOEC についての文献調査およびマイクロコズムの試験結果との比較により、m-NOEC を明確化することができた。

(2) 環境政策への貢献

従来法の単一生物種を用いた評価においては見落とされる可能性のある生物間相互作用に起因する生態系への影響評価に有効であることが示された。特に、本マイクロコズムには従来法では用いられていない原生動物や後生動物が含まれており、それらの生物種の影響が微生物生態系に及ぼす影響を評価することが可能であった。水圏モデル生態系マイクロコズム導入による P/R 比評価法は、生態系への様々な化学物質の影響に対する基礎的な知見を得ることが可能であり、化学物質の適正な管理による自然生態系保護のための有用な基盤技法となるものである。本評価法は、実験方法、データの解析方法等が全てマニュアル化されており、日本発の新しい汎用化可能な生態系リスク評価手法として、OECD 試験標準化の可能性を有し、国際的環境政策としての意義は極めて大きい。また、生態リスク評価の重要性は、国際放射生態学連合のタスクグループ「環境防護への生態系アプローチ」の最終報告書案に採用され、この報告書は国際放射線防護委員会 (ICRP) や経済協力開発機構原子力機関 (OECD/NEA) などに大きな影響を与える可能性が高く、これら国際機関の勧告等を通して、我が国における環境の放射線防護政策を含めて大きく貢献し、波及効果は甚大であるものと考えられる。なお、OECD 化に向けたマイクロコズム試験の今後の展開としては、現在、リードラボ主導による試験法の開発および国内リングテストの初期段階にあり、試験方法 (プロトコール) の確立と統一、施設間再現性の検証 (リングテスト)、データベースの構築と適用領域の明確化を推進しているところである。この段階では、データベースの充実化、自然生態系 (メソコズム) との相関解析、既知毒性データとの関係性の評価を検証することが必要であり、これを経た後に、公的機関によるバリデーション (有用性評価)、ピアレビュー (国際審査) を経て、公定法として制定されることとなる。WET 試験法 (Whole Effluent Toxicity Test) に続き、本プロジェクトで得られた成果を最大限活用して OECD 試験標準法

化することで、技術立国としての日本から発信される新たな環境政策情報となることが期待される。

6. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<査読付論文>

1) S. FUMA, N. ISHII, H. TAKEDA, K. DOI, I. KAWAGUCHI, S. SHIKANO, N. TANAKA, Y. INAMORI : *J. Environ. Radioact.*, **101**(11), 915-922 (2010)

“Effects of Acute Gamma-Irradiation on Community Structure of the Aquatic Microbial Microcosm”

2) S. FUMA, I. KAWAGUCHI, Y. KUBOTA, S. YOSHIDA, Z. KAWABATA and G. G. POLIKARPOV: *J. Environ. Radioact.*, **104**, 81-86 (2012)

“Effects of Chronic Gamma-Irradiation on the Aquatic Microbial Microcosm: Equi-Dosimetric Comparison with Effects of Heavy Metals”

3) K. SUGIURA: *Jap. J. Environ. Toxicol.*, 2011

“Effects of Chemicals on Microcosms: Comparison with the NOECs in Experimental and Natural Ecosystems”

4) 村上和仁：環境情報科学論文集、24 巻、pp.399-404 (2010.11.)

「マイクロコズムシステムによるP/R比からみた金属類の生態リスク評価」

5) 村上和仁、林 秀明：環境情報科学論文集、25、221-226, 2011

「標準モデルとしての各種マイクロコズムにおける安定系構築可能性の比較解析」

6) K. MURAKAMI, H. HAYASHI, R. SHIMADA: *Journal of Water and Environmental Technology*, **9**, 4, 401-410, 2011

“Microcosm for Impact Risk Assessment of Sediment Remediation Materials on Aquatic Ecosystem”

<査読付論文に準ずる成果発表>

1) K. MURAKAMI, H. HAYASHI, Y. INAMORI, K. SUGIURA: *Proceedings of 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition*, CD-ROM, 2011

“Impact Risk Assessment of Metal Ions using Aquatic Model Microcosm System”

2) H. HAYASHI, R. SHIMADA, K. MURAKAMI: *Proceedings of 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition*, CD-ROM, 2011

“Development of Experimental Flask-size Microcosm System for Environmental Risk Assessment”

3) K. MURAKAMI: *Proceedings of 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition*, CD-ROM, 2011

“Effect of Metal Ions on Horizontal Plasmid Transfer under Microbial Interaction”

<その他誌上発表（査読なし）>

1) 村上和仁、林 秀明：千葉工業大学研究報告（理工編）、**58**、11-17 (2011.3.)

「栄養段階の異なる有機物負荷におけるマイクロコズム構成微生物群の応答」

2) 村上和仁、林 秀明：千葉工業大学研究報告（理工編）、**59**、27-31 (2012.3.)

「各種マイクロコズムにおける P/R 比に着目した生態系機能影響評価」

(2) 口頭発表（学会等）

1) 村上和仁、稲森悠平：日本水処理生物学会第 46 回大会 (2009.11.)

「栄養段階の異なる有機物負荷に対するマイクロコズム構成微生物群の応答」

2) 村上和仁、林 紀男、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：第 37 回土木学会関東支部技術研究発表会 (2010.3.)

「マイクロコズム生態系における底質改善材 (Mg・Ca) の P/R 比による影響解析」

3) 村上和仁、林 紀男、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：第 44 回日本水環境学会年会 (2010.3.)

「P/R 比によるマイクロコズム生態系における Mn の影響解析」

4) 村上和仁、杉浦 桂：環境バイオテクノロジー学会2010年度大会 (2010.6.)

「マイクロコズム生態系における金属負荷の影響解析」

5) K. MURAKAMI : *Water and Environmental Technology Conference 2010* (WET2010), Yokohama (2010.6.)

“Microcosm for Risk Assessment of Sediment Remediation Materials on Aquatic Ecosystem”

6) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：土木学会第65回年次学術講演会 (2010.9.)

「マイクロコズムを用いた底質改善材 (Mg) の生態リスク影響解析」

7) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂、鹿野秀一、川端善一郎、雨宮 隆：第13回日本水環境学会シンポジウム (2010.9.)

「水処理等における環境リスク評価のためのマイクロコズムを活用した解析技法」

- 8) 村上和仁、杉浦 桂：日本陸水学会第75回大会（2010.9.）
「水圏マイクロコズム生態系におけるP/R比からみた金属負荷の影響解析」
- 9) 村上和仁、林 紀男、稲森隆平、稲森悠平：第47回環境工学研究フォーラム（2010.11.）
「マイクロコズムを活用したP/R比による生態リスク評価システムの開発」
- 10) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：日本水処理生物学会第47回大会（2010.11.）
「マイクロコズム生態系における金属負荷に対するP/R比の応答」
- 11) 林 秀明、村上和仁：日本水処理生物学会第47回大会（2010.11.）
「各種マイクロコズムにおけるP/R比に着目した生態系機能の比較評価」
- 12) 村上和仁：第24回環境研究発表会（2010.11.）
「マイクロコズムシステムによるP/R比からみた金属類の生態リスク評価」
- 13) 村上和仁：第7回環境情報科学ポスターセッション（2010.11.）
「モデルエコシステムを用いた外来種生物の環境影響評価」
- 14) 村上和仁、林 秀明：第26回日本微生物生態学会大会（2010.11.）
「生態系機能を有する標準培養モデルシステムの検討」
- 15) 村上和仁：第13回千葉県環境教育研究会発表会（2011.1.）
「環境教育ツールとしてのマイクロコズムの活用—フラスコから地球環境問題を考える」
- 16) 村上和仁、稲森悠平、杉浦 桂：第38回土木学会関東支部技術研究発表会（2011.3.）
「マイクロコズムにおける金属負荷の生態系機能・構造に及ぼすリスク評価」
- 17) 林 秀明、村上和仁：第38回土木学会関東支部技術研究発表会（2011.3.）
「各種マイクロコズムにおけるP/R比に着目した生態系機能の比較評価」
- 18) 島田諒司、村上和仁：第38回土木学会関東支部技術研究発表会（2011.3.）
「マイクロコズムによる金属負荷の環境影響評価」
- 19) 村上和仁、林 秀明、島田諒司、稲森悠平、杉浦 桂：第45回日本水環境学会年会（2011.3.）
「異なるタイプのマイクロコズムにおける金属負荷影響の比較」
- 20) 村上和仁、林 秀明：環境バイオテクノロジー学会2011年度大会（2011.6.）
「各種マイクロコズムにおける安定系構築の比較解析」
- 21) 村上和仁、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：土木学会第66回年次学術講演会（2011.9.）
「マイクロコズムによるNiの生態系リスク評価」
- 22) 林 秀明、村上和仁：土木学会第66回年次学術講演会（2011.9.）
「P/R比および生物相に着目した各種マイクロコズムの生態系機能特性」
- 23) 村上和仁、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：第14回日本水環境学会シンポジウム（2011.9.）
「マイクロコズムによる生活関連化学物質（特に金属類）の環境影響評価」
- 24) 村上和仁、林 秀明、小浜暁子：日本陸水学会第76回大会（2011.9.）
「P/R比からみたマイクロコズムと実湖沼の相似性解析」
- 25) K. MURAKAMI, H. HAYASHI, Y. INAMORI, K. SUGIURA 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Tokyo(Japan) (2011.10.)
“Impact Risk Assessment of Metal Ions using Aquatic Model Microcosm System”
- 26) H. HAYASHI, R. SHIMADA, K. MURAKAMI : 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Tokyo(Japan) (2011.10.)
“Development of Experimental Flask-size Microcosm System for Environmental Risk Assessment”
- 27) K. MURAKAMI : 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Tokyo(Japan) (2011.10.)
“Effect of Metal Ions on Horizontal Plasmid Transfer under Microbial Interaction”
- 28) 村上和仁、小浜暁子：第27回日本微生物生態学会大会（2011.10.）
「多段階食物連鎖系における遺伝子組換え細菌の消長解析」
- 29) 村上和仁、箕浦英樹、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：日本水処理生物学会第48回大会（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズムによるコバルトの生態系リスク評価」
- 30) 林 秀明、村上和仁：日本水処理生物学会第48回大会（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズムにおけるバイオマニピュレーションの影響解析」
- 31) 三浦あかね、林 秀明、村上和仁、杉浦 桂、稲森悠平：日本水処理生物学会第48回大会（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズム検証のための数理モデルの構築」
- 32) 村上和仁、林 秀明、島田諒司、杉浦 桂、稲森悠平：第48回環境工学研究フォーラム（2011.11.）
「各種水系マイクロコズムによるニッケルの生態リスク評価」
- 33) 林 秀明、村上和仁：第48回環境工学研究フォーラム（2011.11.）

- 「水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた外来生物の生態系機能に及ぼす影響評価」
- 34) 村上和仁、林 秀明：第25回環境研究発表会（2011.11.）
「標準モデルとしての各種マイクロコズムにおける安定系構築可能性の比較解析」
- 35) 林 秀明、村上和仁：第8回環境情報科学ポスターセッション（2011.11.）
「バイオマニピュレーションのためのマイクロコズムによる導入生物の影響解析」
- 36) 村上和仁：第8回環境情報科学ポスターセッション（2011.11.）
「数理モデルによる水圏モデル生態系マイクロコズムの検証」
- 37) 村上和仁、林 秀明、吾妻咲季：第39回土木学会関東支部技術研究発表会（2012.3.）
「生態系機能（P/R比）からみたマイクロコズムと実湖沼の相似性解析」
- 38) 林 秀明、村上和仁：第39回土木学会関東支部技術研究発表会（2012.3.）
「水圏生態系マイクロコズムにおける食物連鎖上位種導入の生態系機能に及ぼす影響」
- 39) 三浦あかね、林 秀明、村上和仁、杉浦 桂、稲森悠平：第39回土木学会関東支部技術研究発表会（2012.3.）
「水圏モデル生態系マイクロコズムによる数理モデルと培養モデルの比較検証」
- 40) 箕浦英樹、林 秀明、村上和仁、杉浦 桂、稲森悠平：第39回土木学会関東支部技術研究発表会（2012.3.）
「マイクロコズムによるコバルトの生態系影響評価」
- 41) 林 秀明、村上和仁：第46回日本水環境学会年会（2012.3.）
「マイクロコズムを用いた食物連鎖上位種の導入によるバイオマニピュレーションの影響解析」
- 42) 林 秀明、村上和仁：第63回全国水道研究発表会（2012.5.）
「モデル生態系による移入生物種の影響シミュレーション」
- 43) 村上和仁、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：第63回全国水道研究発表会（2012.5.）
「マイクロコズムを活用した培養モデルと数理モデルによる金属類の生態系リスク評価」
- 44) H. HAYASHI, K. MURAKAMI：Water and Environmental Technology Conference 2012 (WET2012), Tokyo (2012.6.）
“Biomaniipulation Impact Analysis using Microcosm System for Top Predator Introduction”
- 45) 府馬正一、川口勇生、久保田善久、吉田聡、川端善一郎：日本放射線影響学会第54回大会（2011）
「ガンマ線の連続照射がモデル実験生態系に与える影響：重金属との比較」
- 46) 府馬 正一：日本生態学会第59回大会（2012）
「化学物質と放射線の生態影響の比較」
- 47) 賀数邦彦、鈴木範子、稲森隆平、林 紀男、稲森悠平：第44回水環境学会年会（2010）
「水圏モデル生態系マイクロコズムに及ぼすLASのP/R比による影響解析」
- 48) 賀数邦彦、熊田純、稲森隆平、林紀男、稲森悠平：第47回日本水処理生物学会（2010）
「微生物生態系マイクロコズムに及ぼすLASのP/R比による影響解析」
- 49) K. KAKAZU, K. MURAKAMI, K. SUGIURA, Y. INAMORI：National Advanced Forum on Chinese Water Environmental Pollution Control and Ecological Restoration Techniques 2010, China
“Development of Ecosystem Risk Impact Assessment System Methods using Microcosm Systems”
- 50) 賀数邦彦、熊田純、稲森隆平、林紀男、臼井秀人、稲森悠平：第48回大会日本水処理生物学会（2011）
「水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた界面活性剤のP/R比に着目したリスク評価手法の開発」
- 51) K. KAKAZU, J. KUMADA, R. INAMORI, N. HAYASHI, Y. INAMORI：Doctoral Forum of China and the 4th China-Japan Graduate Student Forum, 2011, Beijing, China
“Development of Ecosystem Risk Impact Assessment System Methods of Surfactant using Microcosm”
- 52) K. KAKAZU, J. KUMADA, R. INAMORI, K. SUGURA, K. XU, Y. INAMORI：14th World Lake Conference, 2011, U. S. A.
“Development of Ecosystem Risk Impact Assessment System Methods using Microcosm Systems”
- 53) 熊田純、賀数邦彦、稲森隆平、林紀男、徐開欽、臼井秀人、稲森悠平：第46回水環境学会（2012）
「水圏モデル生態系マイクロコズムのP/R比からの界面活性剤AEのリスク評価解析」
- 54) 賀数邦彦、熊田純、稲森隆平、林紀男、臼井秀人、稲森悠平：第46回水環境学会（2012）
「水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた界面活性剤SDSのP/R比からの影響評価解析」
- 55) 柴田賢一、雨宮隆、伊藤公紀：第16回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会（2010）
「マイクロコズムを用いた呼吸量と生産量によるマイクロシスチンLRの生態影響評価」

56) K. SHIBATA, Y. ITO, T. AMEMIYA, K. ITOH : JSME, Tsukuba, Japan, 2010.
 “Effects of the Antibiotic Oxytetracycline on a Freshwater Microcosm”

7. 研究者略歴

課題代表者：稲森悠平

1947年生まれ、鹿児島大学大学院農学研究科修士課程修了、理学博士、現在、福島大学理工学群共生システム理工学類教授

主要参画研究者

(1) 稲森隆平

1978年生まれ、筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程修了、学術博士、現在、福島大学理工学群共生システム理工学類研究員

(2) 川端善一郎

1946年生まれ、東北大学大学院理学研究科修士課程修了、理学博士、現在、大学共同利用機関法人人間文化研究機構総合地球環境学研究所教授

(3) 中島敏幸

1958年生まれ、東北大学大学院理学研究科修了、理学博士、現在、愛媛大学理工学研究科准教授

(4) 杉浦 桂

1944年生まれ、学習院大学大学院自然科学研究科博士課程修了、理学博士、現在、相模女子大学名誉教授

(5) 村上和仁

1965年生まれ、東邦大学大学院理学研究科博士課程修了、博士（理学）、現在、千葉工業大学教授

(6) 鹿野修一

1954年生まれ、東北大学大学院理学研究科博士課程修了、理学博士、現在、東北大学東北アジア研究センター基礎研究部門地域生態系研究分野准教授

(7) 雨宮 隆

1964年生まれ、東京大学大学院工学系研究科博士課程修了、博士（工学）、現在、横浜国立大学大学院環境情報研究院教授

研究協力者

- ・林 紀男 千葉県立中央博物館学芸員
- ・府馬正一 放射線医学総合研究所チームリーダー
- ・賀数邦彦 福島大学大学院博士課程
- ・熊田 純 福島大学大学院修士課程
- ・柴田賢一 横浜国立大学大学院博士課程
- ・林 秀明 千葉工業大学大学院修士課程
- ・島田諒司 千葉工業大学学部生
- ・三浦あかね 千葉工業大学学部生
- ・箕浦英樹 千葉工業大学学部生

S2-09 マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

(1) マイクロコズムを用いた各種化学物質の生態影響の総合解析評価およびマニュアル化

福島大学

理工学群共生システム理工学類

稲森 悠平・稲森 隆平

<研究協力者>

福島大学

理工学群共生システム理工学類

賀数 邦彦・熊田 純

千葉県立中央博物館

生態・環境研究部生態学研究科

林 紀男

平成21～23年度累計予算額 26,259千円

(うち、平成23年度予算額 8,755千円)

上記の予算額は、間接経費を含む。

[要旨] マイクロコズムシステムを用い、界面活性剤であるSDS、AE、LAS、SDSの鎖長違いであるSTS、SHS、SOSの生態系に及ぼす影響評価を個体数遷移と生産、呼吸量の両面から行った。その結果、全ての物質において、個体数遷移と生産、呼吸量の変化には関連性があることが示唆された。そして、生産、呼吸量の評価は統計処理を用いることで、生態系機能の抵抗安定性、回復安定性の客観的評価が行えた。これらのことから、生産量(P)、呼吸量(R)を測定することは、マイクロコズムの毒性評価として特徴的な回復過程の評価も可能であり、個体数変動を測定することと同等の評価を行えることが確認され、かつ、P/R比等を用いた生態系リスク評価手法の有効性が示された。

[キーワード] マイクロコズム、界面活性剤、生物個体数、溶存酸素、生産量、呼吸量

1. はじめに

界面活性剤 SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、AE(ポリオキシエチレンアルキルエーテル)、LAS(直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩)は、水生生物毒性が一定レベル以上および製造輸入量が年間100トン以上あるものとして、化管法の第一種指定化学物質として指定されている。SDSは親油基であるアルキル鎖長12に、硫酸ナトリウムを結合させた陰イオン界面活性剤である。AEは油になじみやすい性質をもった親油基(アルキル基)の炭素の数と、水になじみやすい性質をもった親水基EO(エチレンオキシサイド)の酸化エチレンの数が異なる物質の総称であり、高級アルコールに、酸化エチレンを付加重合させて作られる。水に溶けたときイオン化しない親水基を持つ非イオン性の界面活性剤である。LAS(直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム)はスルホン化されたフェニル基がアルキル基に結合した分子構造を有する陰イオン界面活性剤である。これらの界面活性剤は、下水処理場や合併浄化槽などの排水処理設

備が整っていない地域の家庭から排出されるものも多いと考えられ、その環境への悪影響が懸念されている。本研究では、マイクロコズムを用いて、SDS、AE、LAS、また、SDSの鎖長違いであるSHS（ヘキサデシル硫酸ナトリウム）、STS（テトラデシル硫酸ナトリウム）、SOS（オクタチル硫酸ナトリウム）に対する構成種の個体数変化に加え、生態系の重要な機能である生産量、呼吸量の測定を行った。

2. 研究開発目的

水環境としての湖沼などの保全を行っていく上では、流入する汚濁源となる物質が、湖沼の水質や生態系にいかなる影響を及ぼすか事前に評価する必要がある。このため、OECD試験法で用いられている魚類、藻類、甲殻類などでの急性毒性試験が行われているが、これらの試験は単一種に対する試験であるため、その種に対する影響しか明らかにできない。このため、生態系システムでの評価の重要性が指摘されており、従来より、マイクロコズムを用いた毒性試験が行われており、様々な角度からの検討が行われているが、影響評価の結果を一つ数値で評価することが困難であり、汎用的な評価指標の確立が必要である。

本研究で測定する酸素の生産・消費からみるProduction（生産量）、Respiration（呼吸量）は生物活性を表していると同時に、エネルギーの流れや物質循環が成り立っていることを表すものである。この一般生態系の有するP、Rのバランス等を評価指標とすることで、生態系を全体のシステムとして影響評価が可能であるといわれている。従来まで、生態系リスク評価は困難であったが、溶存酸素濃度を測ることは簡易であり、P/R比等を用いた生態系リスク評価を行う意義は、極めて大きいと考えられる。

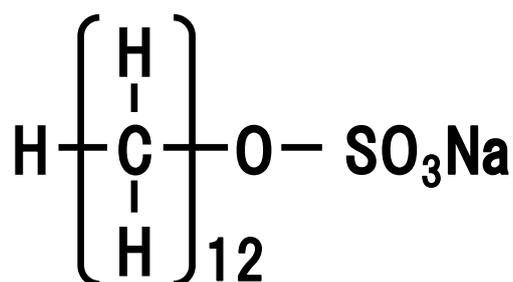
本研究では、これらの点を踏まえ、界面活性剤であるSDS、AE、LASを対象物質とし、生分解可能な物質であっても、P/R比等で影響評価可能であるか否かを明らかにすることを目的に行った。また、アルキル鎖長の違いによる毒性変化が、他の試験法と同様の傾向にあるかを確かめた。

3. 研究開発の方法

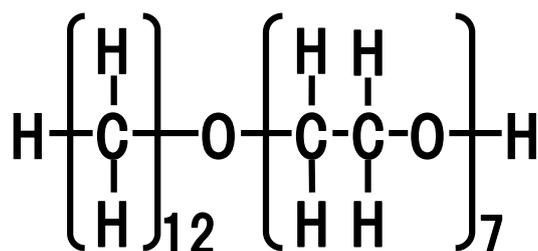
本研究にあたっての、平成21年度に確立した実験方法は「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発 共通マニュアル Ⅱ 2.2」に従った。

(1) 供試化学物質

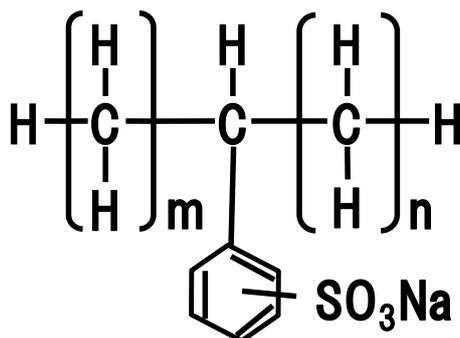
実験で使用したSDSの化学構造は図(1)-1に示す通り、アルキル鎖長が12であり、SHS、STS、SOS（のアルキル鎖長がそれぞれ16、14、8となる化学物質である。AEは炭素数12、EO数7のHeptaethylene Glycol Monododecyl Ether（ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテル）であり、化学構造は図(1)-2に示すとおりである。LASは図(1)-3に示す化学構造をしており、アルキル鎖長は平均 $m+n=11$ である。SDSの添加量（負荷量）は、0（対照系）、4、8、16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、AEの添加量は、0、2、10、25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、LASの添加量は、0、1、5、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、STSの添加量、0、4、8、16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、SHS、SOSの添加量、16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の濃度になるように、マイクロコズム培養開始後16日目の安定期に添加した。



図(1)-1 SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)



図(1)-2 AE(ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテル)

図(1)-3 LAS(直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム) 平均 $m+n=11$

(2) 統計解析

生態系には何らかの攪乱に対して、生態系機能をそのままの状態維持できる抵抗安定性と、一時的に攪乱を受けるが元の状態に回復する回復安定性があると考えられている(Harris H. White, 1984)。これらの機能を考慮し、抵抗安定性を呼吸、生産量、P/R比をそれぞれ枝分かれ型分散分析を用いて対照系と比較した。また、回復安定性を一日毎に呼吸、生産量をそれぞれt検定により回復日を評価した。

($p < 0.05$)

枝分かれ型分散分析のモデルは、

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + b_{j(i)} + \gamma_k + u_{ijk}$$

μ は一般平均、 α_i は群の主効果、つまり対照系、添加系の差、 $b_{j(i)}$ はフラスコ間差を確率変数と想定、 γ_k は添加後の経日変化の主効果、 u_{ijk} は誤差を表している。分散分析の問題点として、経日変化の順番を変更しても、検定結果は変わらない。その為、呼吸、生産量の添加後1~7、8~14日間に分けて検定を行った(高橋、2009)。また、t検定を各時点にて繰り返し検定を行っているため、検定の多重性の問題点

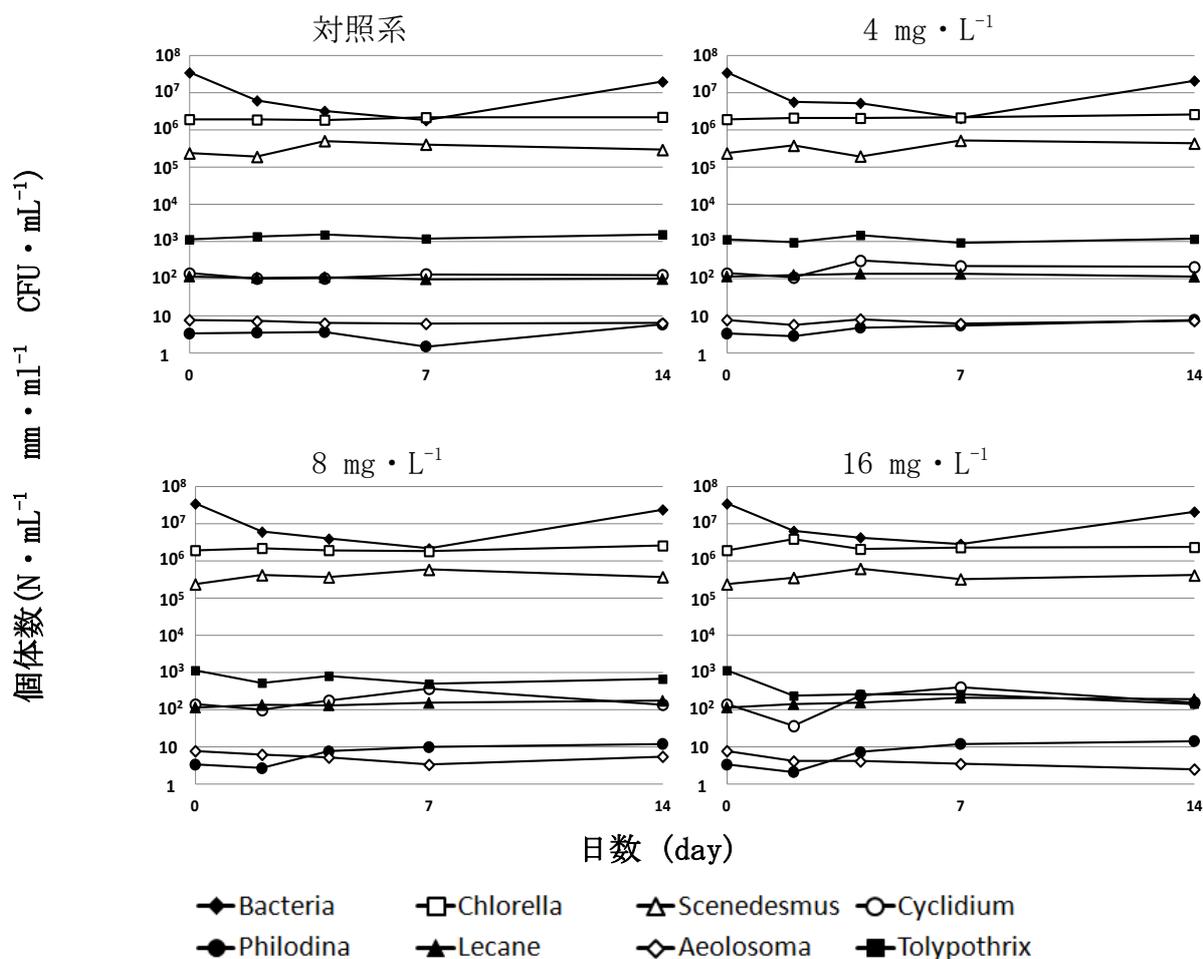
が上げられるが、t検定では回復日の判定を行うことを前提としており、t検定では影響判定は行わないため、多重検定の問題点は回避されていると考えられる。

4. 結果および考察

(1) - 1) SDS添加系における個体数の挙動パターンからの評価

安定期に達した16日目からの個体数密度の経日変化を図(1)-4に示した。対照系（非添加系）では安定期に達すると、ほぼ一定の個体数密度を維持したまま推移した。SDSの各濃度添加系における添加後14日間の各構成微生物の挙動パターンを対照系と比較して、SDSの生態影響を評価した。その結果、 $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系では*C. glaucoma*が4日目に対照系の2倍に増加した。 $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系では添加後徐々に*Lecane* sp.が増加し、14日目に最大の1.5倍になった。また、*C. glaucoma*も7日目に2倍に増加した。しかし、*Tolypothrix* sp.は8日目に最大で半分程度に減少したが、その後、増加傾向にあった。 $16\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系では、*C. glaucoma*は2日目に半分以下に減少後、8日目に3倍以上に増加、*Lecane* spは徐々に2倍にまで増加し、*A. hemprichi*が減少傾向にあり、*Tolypothrix* sp.が添加後から5分の1程度に減少し、回復の兆しは見られなかった。

以上の結果をまとめると、SDSは、動物類の増加要因であり、深刻な影響は与えず、*Tolypothrix* sp.にのみ何らかの影響を与える物質であると言える。これらのことから、 $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系は、無毒性濃度、 $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系は攪乱を受けるが、回復する濃度、 $16\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系は、攪乱後、元の個体数密度に回復できない濃度であることがわかった。

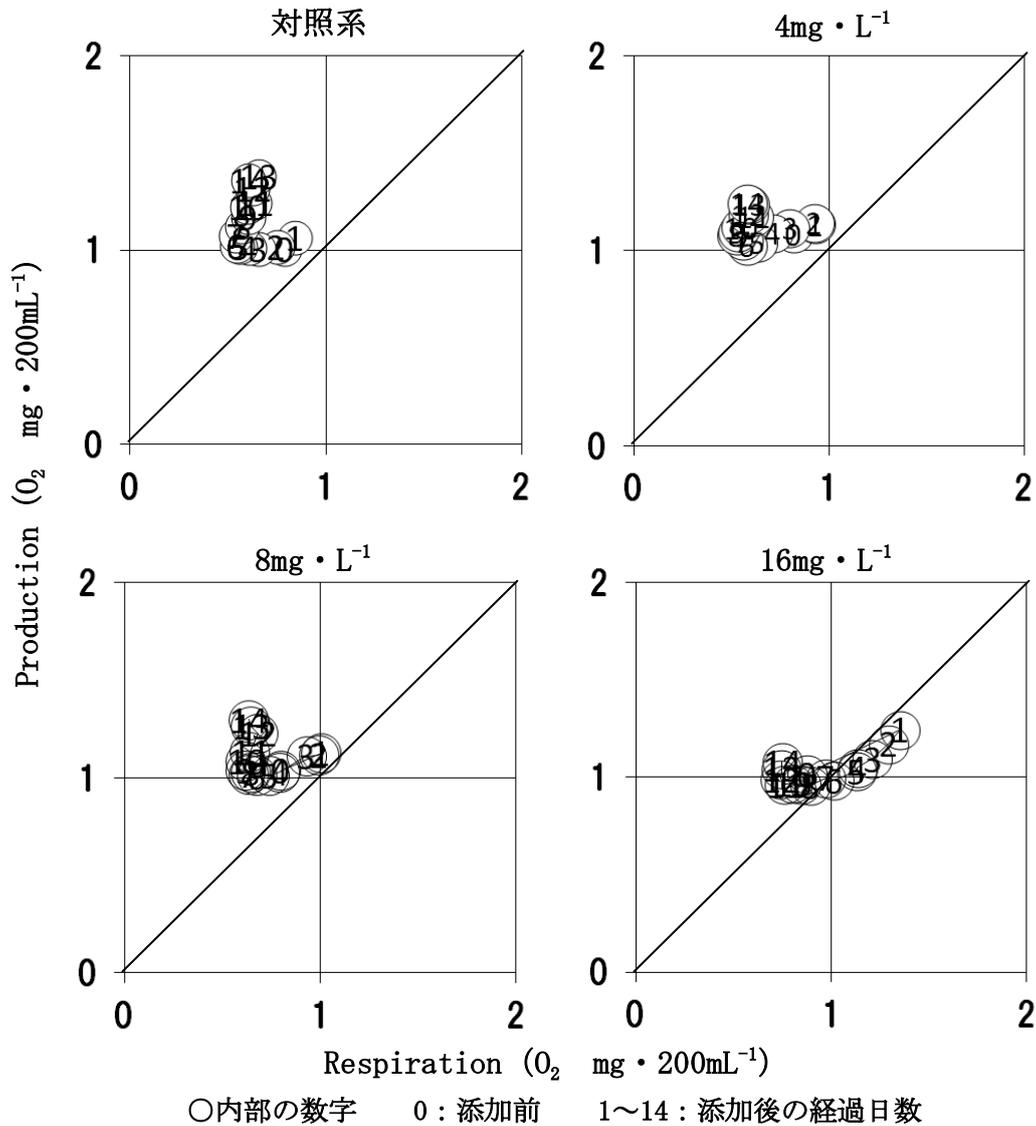


図(1)-4 SDS添加系における個体数遷移

(1) - 2) SDS添加系におけるP、R(生産量、呼吸量)からの評価

生産、呼吸量を見積もった結果を図(1)-5に示した。16 mg · L⁻¹添加系においては、添加直後に生産量、呼吸量共に増加するが、呼吸量の方がより増加し、P/R比は1以下まで減少した。これは、SDSの分解、通常状態より死骸が増加することでの、分解者達の活性増加、それに伴う栄養塩類の放出により、生産者の光合成活性の増加が考えられる。その後、SDSの分解により影響緩和、自己調節機能により、徐々に元の生産、呼吸量値に近づいていったと推察される。これらの結果を基に、SDS添加系後14日間のP、R値から、生態系機能の抵抗安定性を枝分かれ型分散分析を用いて、回復安定性である回復日は、t検定を用いて対照系(非添加系)と比較することでSDSの生態影響を評価した。その結果を表(1)-1に示す。濃度の項は期間中における値の全平均が対照系と差があるか、濃度×時間の項は、添加系の時間的変動が対照系と異なるかを表している。4 mg · L⁻¹添加系は、全日数において濃度の主効果も、時間×濃度の交互作用も有意ではなく無影響と判断できた。8 mg · L⁻¹添加系では、呼吸量の1~7日間にて、濃度の主効果に有意であるため、影響ありと判断された。16 mg · L⁻¹添加系においては呼吸量の1~7日間に、7~14日間で時間×濃度に有意差があった。生産量では、全日数にて時間×濃度に有意差がみられた。このことから、マイクロゾムの抵抗安定性が維持できる無影響濃度はSDS 4mg · L⁻¹ であると言える。次に影響ありと判断

した濃度が何日後に回復したかの判断を図(1)-6に示す。t検定の結果から、 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系では、R値にて添加後3日目から対照系の挙動パターンを外れその後、添加後8日目に回復したと判断した。 $16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加系のR値には添加直後から変化がみられ、その後、添加11日目に回復したと判断されるが、P値の後半にて対照系との差の生じ、回復日は14日目として評価される。

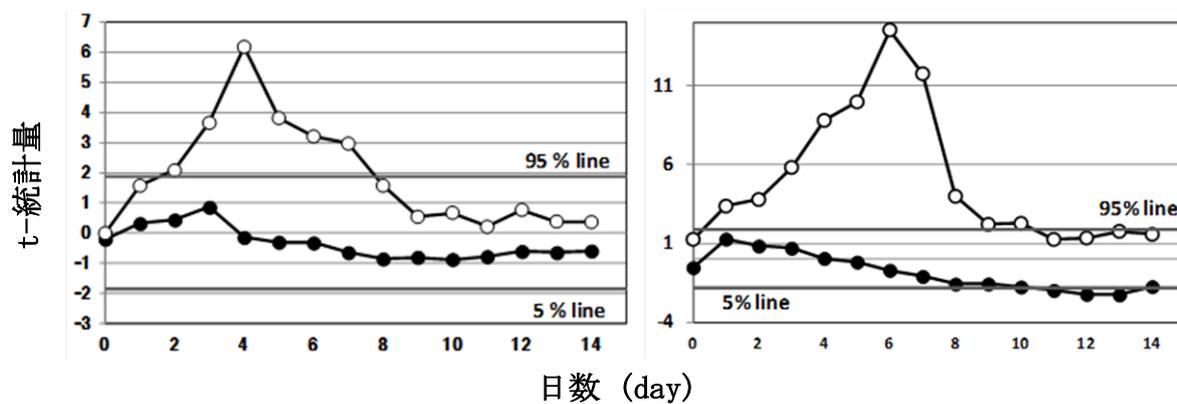


図(1)-5 SDS 添加系における P、R の経日変化

表(1)- 1 SDS 添加系における抵抗安定性の検定(分散分析)

濃度 (mg/L)	測定値	期間 (day)	濃度	濃度×時間
4	呼吸量	1～7	-	-
	生産量	8～14	-	-
8	呼吸量	1～7	**	-
	生産量	8～14	-	-
16	呼吸量	1～7	**	-
	生産量	8～14	-	*
				**

- > 0.05, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001



図(1)- 6 SDS 添加系における回復力の検定(t 検定)

○ ; 呼吸量、● ; 生産量

(2) - 1) AE添加系における個体数の挙動パターンからの評価

AE添加系における個体数の挙動は図(1)-7のとおりである。対照系では測定期間である14日間を通して安定した個体数を維持していることがわかる。AE添加系の挙動はAE2mg・L⁻¹では対照系と同程度を維持し、AE添加による影響は見られず、AE10mg・L⁻¹から個体数減少として影響が見られ始め、その程度は濃度上昇に伴い大きくなっていった。10、25mg・L⁻¹では微小動物の変動、特に*C. glaucoma*の減少が見られたが、10mg・L⁻¹では4日目に、25mg・L⁻¹では7日目に対照系と同程度の個体数まで回復した。50、100mg・L⁻¹では微小動物の大幅な変動に加えて藻類の減少も見られるようになり、50mg・L⁻¹では*Lecane sp.*や*C. glaucoma*といった小型の消費者動物の増加、*S. quadricauda*や*Tolypothrix sp.*といった藻類の減少が14日目でも見られ、対照系とは異なる構成バランスに変化した。100mg・L⁻¹では個体数の大幅な変動後、14日目には*A. hemprichi*や*P. erythrophthalma*といった大型の消費者動物が見られなくなり、小型の消費者動物の大幅な増加、藻類全般の減少が起き、対照系とは異なる構成バランスに変化した。

これらの結果から、個体数測定から求められた無影響濃度(NOEC)は2mg・L⁻¹であり、10、25mg・L⁻¹は影響を受けるが回復できる濃度であること、50、100mg・L⁻¹は影響を受けて対照系とは異なる生態系となることがわかった。

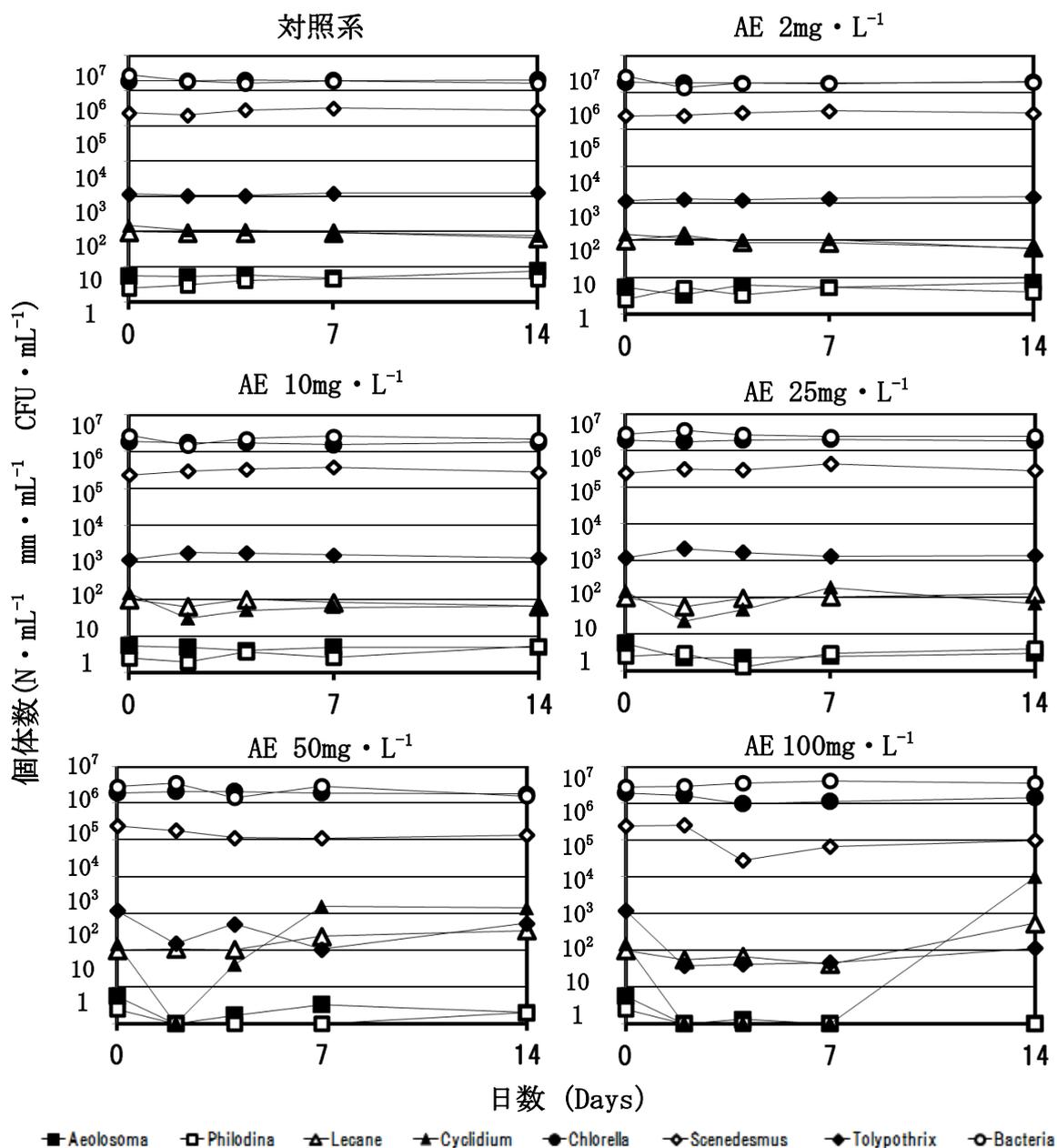


図 (1)-7 AE 添加系における個体数遷移

(2) - 2) AE 添加系におけるP、R(生産量、呼吸量)からの評価

AE 添加におけるP/R比の挙動は図(1)-8 に示す通りである。AE 添加系の挙動はAE 2mg \cdot L $^{-1}$ では対照系と同様の安定した生産・呼吸量を維持し、AE 添加による生産・呼吸量の攪乱は見られず、AE 10mg \cdot L $^{-1}$ から生産・呼吸量に対する攪乱が見られ始め、その程度は濃度上昇に伴い大きくなっていった。10、25mg \cdot L $^{-1}$ 添加系ではP/R比=1付近を保ちながら生産・呼吸量が増加した。50、100mg \cdot L $^{-1}$ では生産・呼吸量のバランスが崩れながら変動し、50mg \cdot L $^{-1}$ 添加系は測定期間の14日間では完全に回復しきらず、14日目のP/R比は0.62となった。100mg \cdot L $^{-1}$ 添加系は生産・呼吸量が減少して生産量がほぼゼロの状態となり、14日目のP/R比は0.12となった。

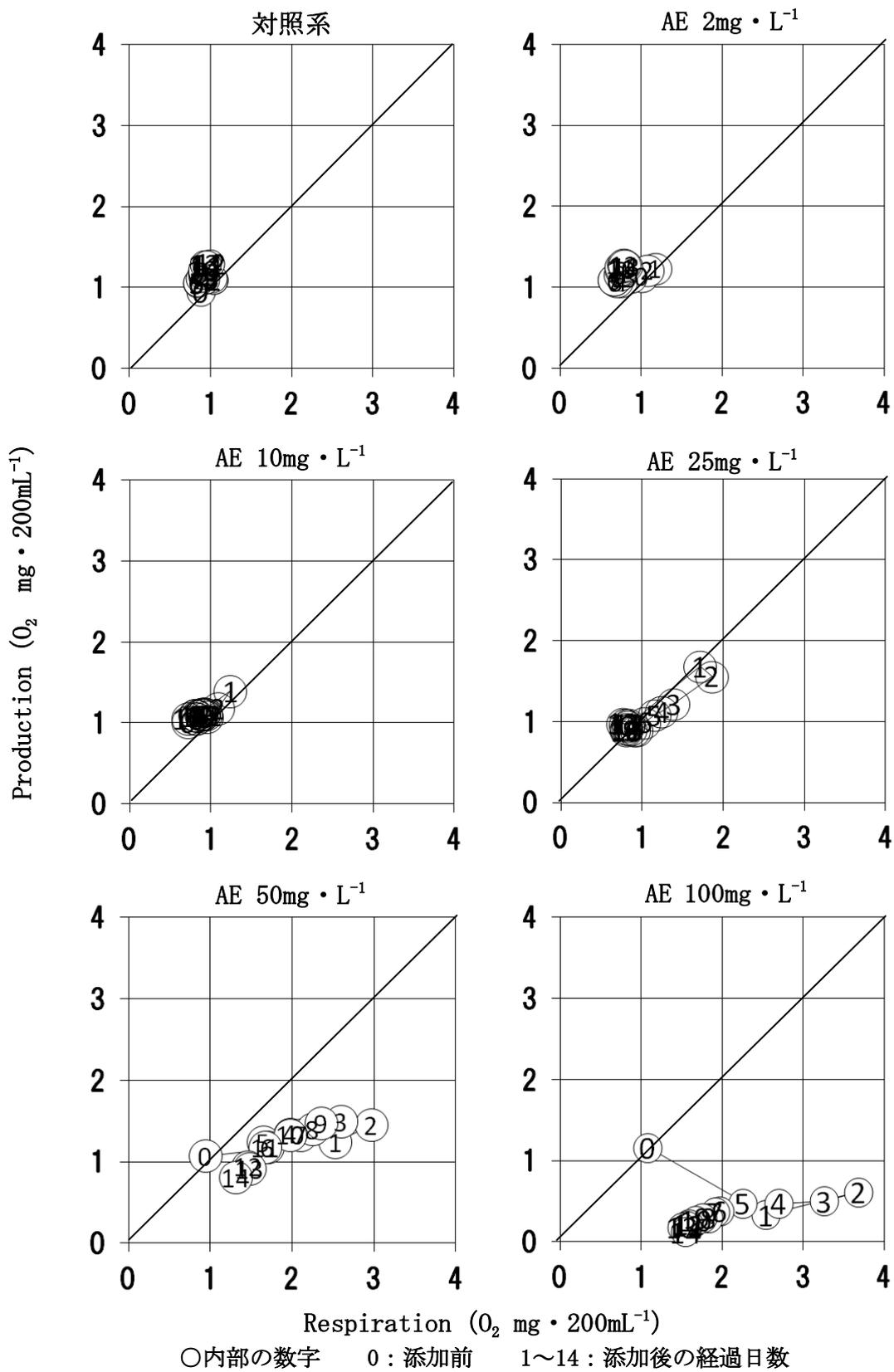


図 (1)-8 AE 添加系における P、R の経日変化

AE 2、10、25mg・L⁻¹添加系におけるP、R値の統計解析結果を表(1)-2に示す。2mg・L⁻¹添加系では分散分析から無影響濃度と判断できた。10 mg・L⁻¹添加系では、生産量の1～7日間にて、時間×濃度に有意であるため、影響ありと判断され、t検定の結果から、添加後2日目には回復した。25 mg・L⁻¹添加系においては、呼吸量において全日数で時間×濃度に有意差があり、生産量では、1～7日間にて時間×濃度に有意差がみられ、R値にて評価期間中の最終日まで対照系との差の生じ、元の生態系には回復出来ずと判断した。このことから、マイクロコズムの抵抗安定性が維持できる無影響濃度はAE 2mg・L⁻¹であると言える。

表 (1)-2 AE 添加系における抵抗安定性、回復力の検定(分散分析、t 検定)

濃度 (mg/L)	測定値	期間 (day)	濃度	濃度×時間	回復日
2	呼吸量	1～7	-	-	-
		8～14	-	-	-
	生産量	1～7	-	-	-
		8～14	-	-	-
10	呼吸量	1～7	-	-	-
		8～14	-	-	-
	生産量	1～7	-	***	2
		8～14	-	-	-
25	呼吸量	1～7	-	***	回復せず
		8～14	-	*	
	生産量	1～7	-	***	3
		8～14	-	-	

- > 0.05, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001

(3) - 1) LAS添加系における個体数の挙動パターンからの評価

安定期に達した16日目からの個体数密度の経日変化を図(1)-9に示した。他の試験と同様に、対照系では安定期に達すると、ほぼ一定の個体数密度を維持したまま推移した。LASの各濃度添加系における添加後14日間の各構成微生物の遷移は、1mg・L⁻¹添加系では対照系と同等の個体数を維持した。5 mg・L⁻¹添加系では、*Lecane* sp.、*C. glaucoma* の減少がみられるも、7日目には元の個体数に回復した。10 mg・L⁻¹添加系では、*C. glaucoma*は減少後、回復、*Lecane* sp.、*Tolypothrix* sp.は添加後から減少し、元の個体数には回復しなかった。

これらのことから、1 mg・L⁻¹添加系は無毒性濃度、5 mg・L⁻¹添加系は攪乱を受けるが、回復する濃度、10 mg・L⁻¹添加系は、攪乱後、元の個体数密度に回復できない濃度であることがわかった。

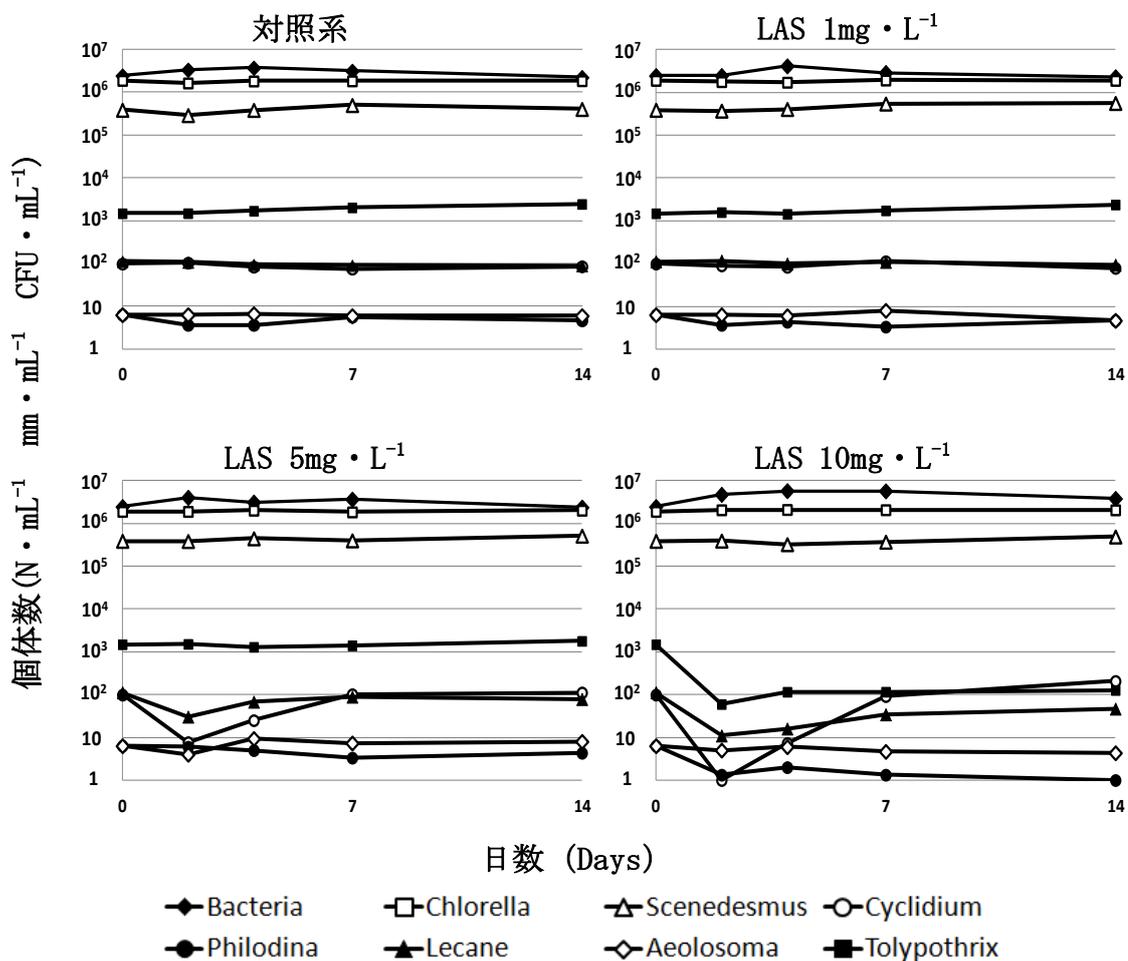


図 (1)-9 LAS 添加系における個体数遷移

(3) - 2) LAS 添加系におけるP、R(生産量、呼吸量)からの評価

LAS 添加におけるP、Rの挙動は図(1)-10に示す通りである。LAS 5mg · L⁻¹ 添加系からP/R比1以下に減少し始め、LAS10mg · L⁻¹ 添加系では生産・呼吸量共に上昇しながらP/R比1以下に減少後、P/R比1以上に回復した。

SDS、AEと同様に、抵抗安定性、回復安定性の評価を行い表(1)-3に示した。

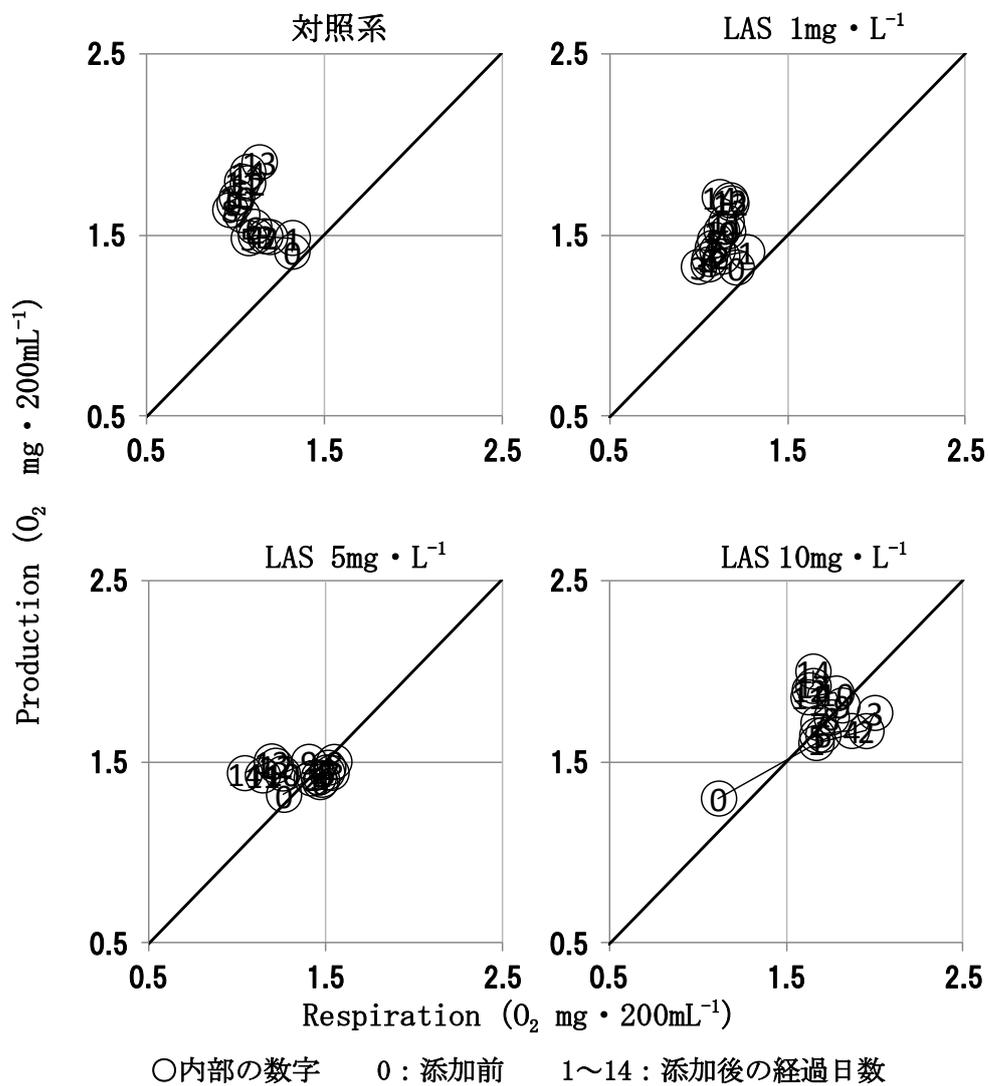


図 (1)-10 LAS 添加系における P、R の経日変化

表 (1)-3 LAS 添加系における抵抗安定性、回復力の検定(分散分析、t 検定)

濃度 (mg/L)	測定値	期間 (day)	平均差	時間変動差	回復力 (day)
1	呼吸量	1~7	-	-	-
		8~14	-	-	
	生産量	1~7	-	-	-
		8~14	-	-	
5	呼吸量	1~7	-	-	-
		8~14	-	-	
	生産量	1~7	-	-	-
		8~14	-	**	
10	呼吸量	1~7	*	-	14
		8~14	-	**	
	生産量	1~7	-	-	-
		8~14	-	-	

- > 0.05, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001

(4) - 1) STS、SHS、SOS添加系における個体数の挙動パターンからの評価

全てのデータがそろっていないが、個体数密度の経日変化を図(1)-1 1に示した。他の試験と同様に、対照系ではほぼ一定の個体数密度を維持したまま推移した。まず、STS 4 mg·L⁻¹添加系では、SDSと同様に上昇傾向の種も存在するが対照系と同等の個体数を維持した。STS 8 mg·L⁻¹添加系では、*Tolypothrix* sp.の減少がみられるが、回復傾向にあった。STS 16 mg·L⁻¹添加系では、*C. glaucoma*は減少後、回復、*Tolypothrix* sp.は添加後から減少し、元の個体数には回復しなかった。次にSHS、SOS 16 mg·L⁻¹添加系では*C. glaucoma*の増加がみられるが、他の生物種においては対照系と同等の個体数を維持した。これらのことから、STS 4 mg·L⁻¹添加系、SHS、SOS 16 mg·L⁻¹添加系は無毒性濃度、STS 8 mg·L⁻¹添加系は攪乱を受けるが、回復する濃度、STS 16 mg·L⁻¹添加系は、攪乱後、元の個体数密度に回復できない濃度であると評価した。

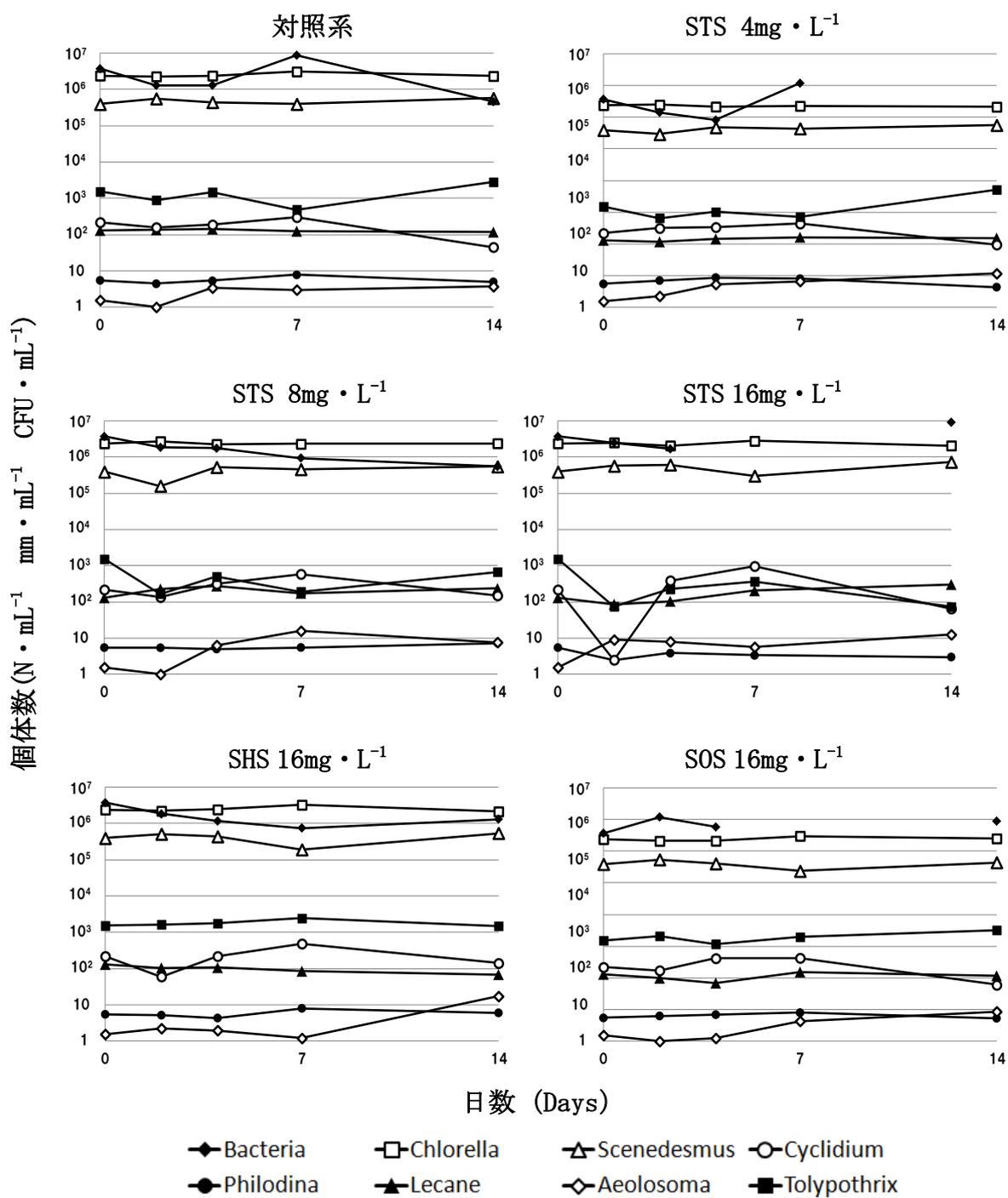


図 (1)-11 STS、SHS、SOS 添加系における個体数遷移

(4) - 2) STS、SHS、SOS 添加系におけるP、R(生産量、呼吸量)からの評価

STS、SHS、SOS 添加におけるP、Rの挙動は図(1)-12に示す通りである。この実験から蛍光式DO電極を使用し試験を始めた。対照系においてポーラログラフ式とは多少異なる挙動を示す結果となったが、安定した測定が可能であり影響評価として使用可能だと判断した。STS 16 mg \cdot L $^{-1}$ 添加系では大きくP/R比1

以下に減少するが、対照系と同等の値に戻っていった。抵抗安定性、回復安定性の評価を行い表(1)-4に示した。SHS、SOS添加系にも有意差が付き影響ありと判断された。一般的にアルキル鎖長が長いほど毒性が強くなることが知られている。STSはSDSより鎖長が長く、P、Rの結果においてSDSより大きく変動している。逆に鎖長の短いSOSでは、P、Rの変動が小さいことからSDSよりも毒性は低いと考えられる。SHSは、別途行ったマイクロコズムの培養液において、析出がみられ、溶けにくい物質であった。難溶解性の物質は、毒性が和らげられることが示唆された。しかし、SHSのP、Rの結果において添加直後よりも後半に有意差があり、難溶解性物質においての毒性は徐々に現れるものと考えられた。

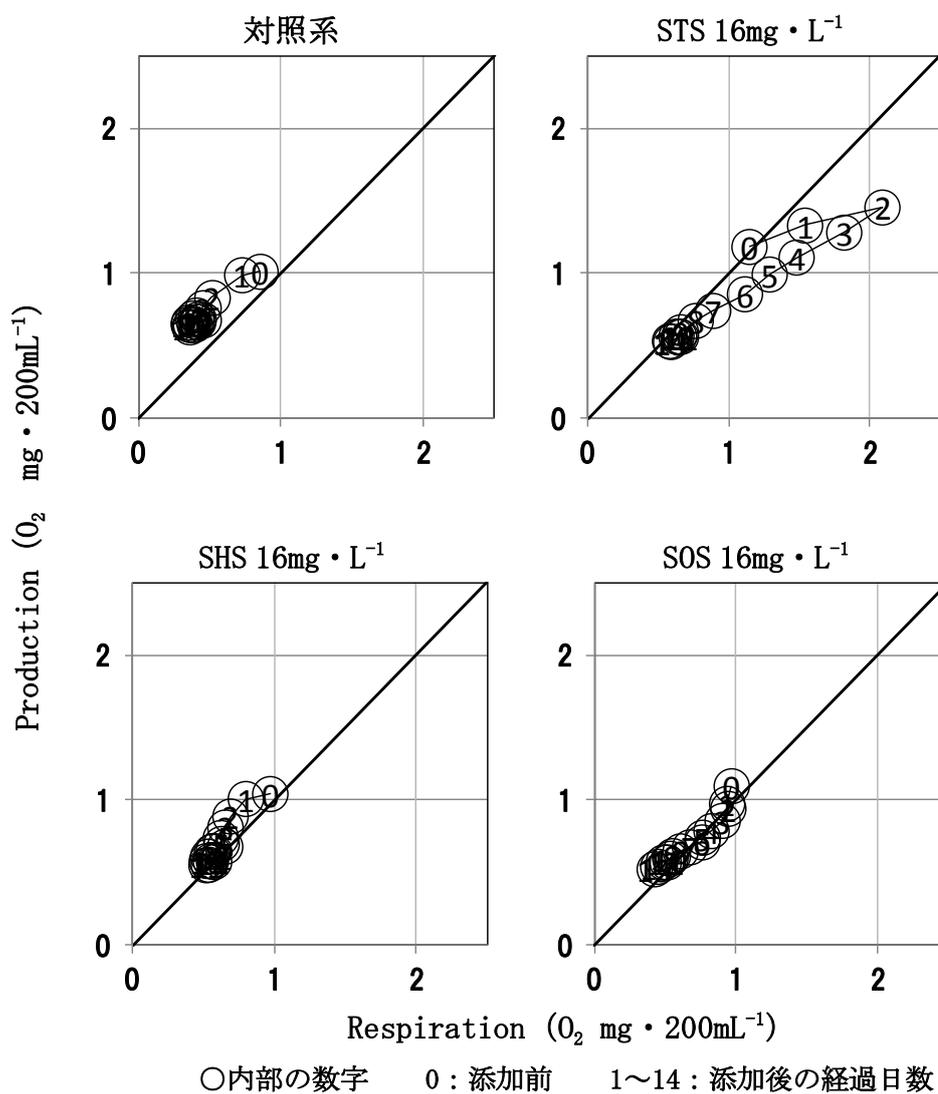


図 (1)-12 STS、SHS、SOS 添加系における P、R の経日変化

表 (1)-4 STS,SHS,SOS 添加系における抵抗安定性、回復力の検定(分散分析、t 検定)

界面 活性剤	濃度 (mg·L ⁻¹)	測定値	期間 (day)	濃度	濃度×時間	回復力 (day)
STS	16	呼吸量	1~7 8~14	* -	*** -	7
		生産量	1~7 8~14	- -	* **	-
SHS	16	呼吸量	1~7 8~14	- *	- -	回復せず
		生産量	1~7 8~14	- -	- -	-
SOS	16	呼吸量	1~7 8~14	* -	- **	11
		生産量	1~7 8~14	- -	- **	-

- > 0.05, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001

(5) 本マイクロコズム生態環境リスク試験からの総合評価

本研究は、生産者・捕食者・分解者が存在する物質循環の行われている水圏微生物生態系モデルシステムであるマイクロコズムを用いて、界面活性剤SDS、STS、SHS、SOS、AE、LASの生態系影響評価をP、R等で評価可能であるか否かを明らかにすることを目的として行った。

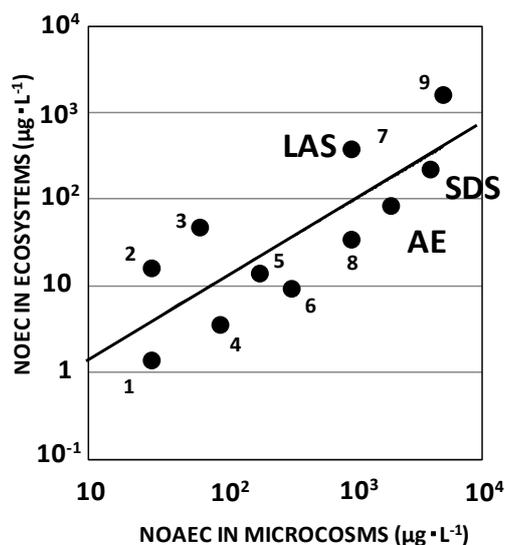
個体数計測による得られた毒性評価の結果をまとめると、AE 2 mg·L⁻¹、LAS 1 mg·L⁻¹、SDS 4 mg·L⁻¹添加系は無毒性濃度(NOAE)と判断できた。AE 10、25 mg·L⁻¹、LAS 5 mg·L⁻¹、SDS 8 mg·L⁻¹添加系は影響を受けるが元に回復する濃度、AE 50、100 mg·L⁻¹、LAS 10 mg·L⁻¹、SDS 16 mg·L⁻¹添加系は評価期間中には元の個体数に回復出来ない濃度と評価した。P、Rからの評価も個体数の評価と同様の結果が得られ、P、Rと個体数変動に関連性があることが示唆された。また、SDSの鎖長違いであるSTS、SHS、SOSの試験により、既存の試験と同様に、鎖長の長さが長いほど毒性が強いことが示唆された。

これらの結果の自然生態系との対応関係を調べるために、杉浦(2010)によって作成された、自然生態系(メソコズム試験)無影響濃度の平均(mean of NOEC)とマイクロコズム無毒性濃度(M_NOAEC)の相関式、

$$\log[\text{mean of NOEC}] = 1.08 \cdot \log[\text{M-NOAEC}] - 1.22$$

を用いて、SDSのメソコズム試験に対する無影響濃度、NOEC=0.224 (mg·L⁻¹) から(HERA, 2002)、M-NOAEC = 2.022 mg·L⁻¹ と計算される。同様にAEのメソコズム試験に対する無影響濃度の幾何平均、NOEC=0.113

(mg·L⁻¹) (E J. VAN DE PLASSCHE et al, 1999)、M_NOAEC = 1.790 mg·L⁻¹ と計算され、本研究で得られた無毒性濃度と近い値であることがいえる。本研究の結果を杉浦(2010)の作成した相関図に追加すると、図(1)-13のようになる。



1: Cd²⁺; 2: atrazine; 3: PCP; 4: Cu²⁺; 5: Zn²⁺; 6: ammonia; 7: LAS; 8: 3,4-DCA; 9: phenol; 10: Al³⁺

図 (1)-13 マイクロコズムへの NOAEC と実験・自然生態系への NOECs の平均値との関係

図(1)-13からわかるように本研究により、さらに自然生態系との良い相関関係があることを示すことが出来た。このことより、マイクロコズムに対する化学物質の影響の結果を、自然生態系への化学物質の影響を評価する上での良い相関関係を示す有効な環境リスク評価法となる可能性があるといえる。

5. 本研究により得られた成果

個体数密度の遷移の評価とP、Rからの評価は整合性が存在することが示唆された。また、P、R値を用いることで客観的に生態系機能の抵抗安定性と回復安定性の評価を行うことが可能であった。マイクロコズム試験とメソコズム試験には高い相関性があることが示唆された。

従来の単一生物種試験では得ることの出来ないマイクロコズム試験の有用な点は、生態系機能を総合的に評価可能である。それは、エネルギーや物質循環のバランス、生物活性、生物間相互作用に対する影響評価、さらに、生態系の回復機能に及ぼす、生態系内での化学物質の分解性、分解産物の影響など、自然生態系でおこる化学物質の影響の基礎的知見を得ることが出来ることであると考えられた。

6. 国際共同研究等の状況

中国環境科学研究院との水圏生態系モデルマイクロコズム試験の国際化を図る上での意見交換等を行い、マイクロコズム試験の重要性を明確化することができた。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（2）口頭発表（学会）

- 1) 賀数邦彦、鈴木範子、稲森隆平、林 紀男、稲森悠平：第44回水環境学会年会（2010）

「水圏モデル生態系マイクロコズムに及ぼすLASのP/R比による影響解析」

- 2) 賀数邦彦、熊田純、稲森隆平、林紀男、稲森悠平：第47回日本水処理生物学会（2010）

「微生物生態系マイクロコズムに及ぼすLASのP/R比による影響解析」

- 3) Kunihiro KAKAZU, Kazuhito MURAKAMI, Katsura SUGIURA, Yuhei INAMORI : National Advanced Forum on Chinese Water Environmental Pollution Control and Ecological Restoration Techniques 2010, China
“Development of Ecosystem Risk Impact Assessment System Methods using Microcosm Systems”

- 4) 賀数邦彦、熊田純、稲森隆平、林紀男、臼井秀人、稲森悠平：第48回大会日本水処理生物学会（2011）

「水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた界面活性剤のP/R比に着目したリスク評価手法の開発」

- 5) Kunihiro KAKAZU, Jyun KUMADA, Ryuhei INAMORI, Norio HAYASHI, Yuuhei INAMORI : Doctoral Forum of China and the 4th China-Japan Graduate Student Forum, 2011, Beijing, China

“Development of Ecosystem Risk Impact Assessment System Methods of surfactant using Microcosm”

- 6) Kunihiro KAKAZU, Jyun KUMADA, Ryuhei INAMORI, Katsura SUGURA, Kaiqin XU, Yuhei INAMORI : 14th World Lake Conference, 2011, U. S. A.

“Development of Ecosystem Risk Impact Assessment System Methods using Microcosm Systems”

- 7) 熊田純、賀数邦彦、稲森隆平、林紀男、徐開欽、臼井秀人、稲森悠平：第46回水環境学会（2012）

「水圏モデル生態系マイクロコズムのP/R比からの界面活性剤AEのリスク評価解析」

- 8) 賀数邦彦、熊田純、稲森隆平、林紀男、臼井秀人、稲森悠平：第46回水環境学会（2012）

「水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた界面活性剤SDSのP/R比からの影響評価解析」

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（4）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Beyers R. J. and Odum H. T. (1993). Ecological microcosm, Springer-Verlag, New York.

- 2) ERIK J. VAN DE PLASSCHE, JACK H.M. DE BRUIJN, RICHARD R. STEPHENSON, STUART J. MARSHALL, TOM C.J. FEIJTEL, and SCOTT E. BELANGER “PREDICTED NO-EFFECT CONCENTRATIONS AND RISK CHARACTERIZATION OF FOUR SURFACTANTS: LINEAR ALKYL BENZENE SULFONATE, ALCOHOL ETHOXYLATES, ALCOHOL ETHOXYLATED SULFATES, AND SOAP” *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18, No. 11, pp. 2653-2663, 1999
- 3) Harris H. White *Concepts in Marine Pollution Measurements* Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 1984
- 4) Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products Linear Alkylbenzene Sulphonate June 2009 Version 4.0 & Alcohol Ethoxylates Version 2.0 September 2009
- 5) Lorraine Maltby, Theo C. M. Brock and Paul J. van den Brink (2009) Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7556-7563.
- 6) McConnell W. J. (1962) Productivity relations in carbon microcosms. *Limnol. Oceanogr.*, 7, 335-343.
- 7) Odum E. P. (1983). *Basic Ecology*, CBS College Publishing, New York, U.S.A.
- 8) Sugiura K. (1996) The use of an aquatic microcosm for pollution effects assessment. *Water Research* Vol. 30, No. 8, pp. 1801-1812
- 9) Sugiura K. (2001) Effects of Al³⁺ Ions and Cu²⁺ Ions on Microcosms with Three Different Biological Complexities. *Aquatic Technol.*, 51, 405-417.
- 10) Sugiura K. (2009) Effects of chemicals and metal ions on microcosms: comparison of community metabolism to single species responses to toxicants. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 12, 41-53
- 11) Sugiura K. (2010) Effects of chemicals on microcosms: comparison with the NOECs in Experimental and Natural Ecosystems. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 13, 13-22
- 12) Y. Kurihara (1978) Studies of the interaction in a microcosm. *Sci. Rep. Tohoku Univ. IV (Biol.)*, 37, 161-177.
- 13) 稲森悠平、高松良江(1995) マイクロコズムにおける物質循環とその毒性および生態系影響評価試験における有効性、*水環境学会誌* Vol.18 No.8
- 14) *環境年報* Vol.34 (2010年度版) 日本石鹼洗剤工業会
- 15) 栗原康(1975), *有限の生態学-安定と共存のシステム-* 岩波新書
- 16) 高橋行雄 (2009) 薬理学研究における経時データ解析の考え方 - 血圧降下試験事例による解析 - *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* 133. 325~331
- 17) 高松良江、稲森悠平(1995)湖沼の水圏生態系に及ぼす界面活性剤のマイクロコズムシステムを用いた影響評価、*水環境学会誌*、第18巻 第10号 784-793

マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

(2) マイクロコズムの構成微生物群と安定性確保のための操作条件の最適化およびモデル化

大学共同利用機関法人 人間文化研究機構総合地球環境学研究所(地球研)

地球研プロジェクト「病原生物と人間の相互作用環」リーダー

川端 善一郎

(平成21、22年度)

国立大学法人 愛媛大学大学院理工学研究科

中島敏幸

(平成23年度)

<研究協力者>

(独)放射線医学総合研究所

放射線防護研究センター

府馬 正一 (平成21、22年度)

平成21～23年度累計予算額：10,665千円(うち、平成23年度予算額：3,120千円)
予算額は、間接経費を含む。

[要旨] マイクロコズムの構成微生物群と安定性確保のための操作条件の最適化について考察するため、まず本研究プロジェクトで共通に使われている杉浦マイクロコズムに放射線を照射し、その安定性を解析した。放射線により、一部の構成生物種の個体数が減少または増加するという構造面への影響が見られたが、生産量(P)/呼吸量(R)を指標とした機能面への影響は見られなかった。この結果は、マイクロコズムが構造的に影響を受ける場合であっても、個体群または群集レベルの冗長性により機能的には安定性が維持される場合があることを示唆している。次に、マイクロコズムの構成微生物群の複雑さと化学物質に対する感受性の関係について検討するため、生産者である鞭毛藻、消費者である繊毛虫、分解者である細菌から構成される3者マイクロコズムにアルミニウム、マンガン、銅を負荷し、細胞数とP/Rに対する無影響濃度(NOEC)を求めた。その結果、3者マイクロコズムは生物間相互作用に起因する間接影響を評価できるが、杉浦マイクロコズムや単一生物種試験とは感受性が異なる場合があるため、毒性データを推定するためには適当な安全係数を用いるなどの工夫が必要であることが示唆された。また、理論的解析により、生態系の生産・消費構造(生産者、消費者、生産者及び生産者の量)および変化をD0値の極大値と極小値から定量的に評価できることが数理モデルと実験から明らかとなった。さらに、D0波形の極大値と極小値の変化を解析することにより、毒物が生態系の生産及び消費(呼吸)の量的構造に及ぼす効果とその程度を評価できることが明らかになった。特に、D0波形の極大値・極小値の変化の方向、程度及び回復までの時間を知ることにより、毒性が生態系の生産・消費構造のどこに作用するかという特性とその強さを評価できることが明らかにされた。

[キーワード] 感受性、放射線、金属、数理モデル

1. はじめに

マイクロコズムを用いた生態毒性評価試験を再現性良く高精度に実施するためには、マイクロコズム構成微生物群の安定性を確保するための操作条件を最適化することが重要である。そこ

で、本研究プロジェクトで共通に使われている杉浦マイクロコズムを共通マニュアルに従って培養し、安定に培養できることを検証するとともに、杉浦マイクロコズムに放射線を照射した場合の構造的および機能的安定性への影響を調べた。

また、生態毒性評価試験でマイクロコズムを用いる際は、構成微生物群の複雑さ（例：構成生物種の多様性）が適切である必要がある。すなわち、一般的には、マイクロコズムが複雑になるほど実際の生態系に近づくので、得られる毒性データも正確になると考えられるが、一方で実験の再現性を維持することが困難になり、コストも高くなることが問題視されている。従って、これらの点をバランスよく満たすようにマイクロコズムの最適化を図る必要がある。そこで、系の複雑さと化学物質に対する感受性の関係を調べた。

さらに、マイクロコズムを用いた化学物質等の生態系リスク評価における知見をもとに、本手法を有効な評価手法として広く普及するために、その理論的基盤を確立することが重要な課題となっている。特に、D0変動パターンの計測から毒物の生態系影響を評価する手法の理論的根拠を実験モデルと数理モデルの双方から明らかにすることが課題である。

2. 研究開発目的

(1) 放射線の生態系への影響評価

まず、構造（個体数）と機能（生産量（P）/呼吸量（R））の関係に着目して、杉浦マイクロコズムの安定性に関して解析を行うことにした。マイクロコズムの安定性を攪乱する因子としては、分解を含む形態変化に伴って生物影響が変化する恐れがある化学物質ではなく、常に一定の生物影響を与えることが可能な放射線の一種である γ 線の外部照射を選択した。放射線は、原子力発電における最も重要なリスク因子である。原子力発電は発電時に二酸化炭素を放出しないため、東京電力福島第一原子力発電所事故以後も地球温暖化対策の重要な柱と位置付けている国も多く、今後国際的には需要の拡大が見込まれている。しかし、生態系の放射線防護に関しては、これまであまり考慮されてこなかった。最近になって国際放射線防護委員会（ICRP）などの国際機関がようやく検討を始め、初歩的な防護体系を示したものの^{1,2)}、生態系を対象にした化学物質規制に比べると取り組みが遅れているのが現状である。そこで、本サブテーマで、マイクロコズムに対する放射線の影響を調べることは、こうした課題にも貢献する意義があると考えられる。

(2) 3者マイクロコズムを用いた評価の有効性

杉浦マイクロコズムよりも単純なマイクロコズムを生態毒性評価試験に用いることの妥当性を化学物質に対する感受性の観点から検証した。そこで、生産者である鞭毛藻 *Euglena gracilis*、消費者である繊毛虫 *Tetrahymena thermophila*、分解者である細菌 *Escherichia coli* の3種類の微生物から構成される3者マイクロコズムを用いた³⁾。このマイクロコズムは単純であるが、水圏微生物群集の基本的な相互作用を有し⁴⁾、細胞数は1年以上にわたって安定に維持される。また、構成微生物種はマイクロコズムと同じ条件で単独培養することが可能である。そこで、3者マイクロコズムとその単独培養系に金属類負荷実験を行い、3者マイクロコズムと単独培養系、単一生物種試験（現在一般的に行われている藻類、ミジンコ、魚類毒性評価試験など）、杉浦マイクロコズムの間で感受性を比較した。

(3) マイクロコズムによる評価手法の有効性

マイクロコズムを用いた環境影響評価手法を信頼できる技術として確立するには、その手法の理論的裏付けとデータによる検証が必要である。本プロジェクトで行う化学物質等の生態系への影響評価の特徴は、マイクロコズム（モデル生態系）に問題となる化学物質等を投入し、その液相の溶存酸素濃度（D0）の変化を計測し、そのデータからPとRおよび比（P/R）を求め、それらの変化パターンからその影響を評価するものである。この評価における因果過程には、（1）化学物質等による直接/間接効果により生態系構成種の一部或いは全ての個体数に変化が生じる、（2）この個体数変化がD0の変動パターンに変化を生じる、という過程からなる（図(2)-1）。D0変化から化学物質等の生態系影響を推測するうえで、D0変化パターンがいかなる情報を持ち、その変化は何を示しているのかということが明確でなければならない。しかしながら、これまでD0変動、個体数変化、そして物質の毒性との間の因果関係が明確にされておらず、D0変動データから影響評価するという手法の妥当性についてその理論的基盤の整備が望まれている。そこで、本テーマではこの因果過程を数理モデルとマイクロコズムを用いた実証試験の双方から「化学物質→生態系個体群動態→溶存酸素動態」の間の関係を明らかにし、この手法の有効性を保証する理論的基盤を確立することを目的にした。具体的には以下の3つの課題を検討した。



図(2)-1 化学物質等（毒物）により引き起こされる生態系構成種の個体数変と生産量/呼吸量変化

- (1) 数理モデルによるD0の変動のメカニズムと予測の理論的基盤を確立する。
- (2) 3種及び多種マイクロコズムを用いて、マイクロコズムの構成種の個体数や存在の有無がD0動態に及ぼす影響を解析し、数理モデルの解析結果を検証する。
- (3) 2種系（細菌-藻類）のコンピューター・シミュレーションモデルを用いて、3段階の毒性の強度（毒性の強さ、或いは量の程度）に対する毒物投与がD0変動動態に及ぼす影響を解析し、数理モデルの解析結果を検証する。

3. 研究開発方法

(1) 放射線の生態系への影響評価

杉浦マイクロコズムの安定性に関しては、相模女子大学・杉浦桂教授（当時）よりマイクロコズムの分譲を受けた。本研究プロジェクトの共通マニュアルに従って、マイクロコズムの培養、構成生物種の個体数測定、P/R測定などを行った。杉浦マイクロコズムの安定性に対する放射線の影響については以下の手順で実験を行った。杉浦マイクロコズム6本を、個体数がほぼ一定となる安定期になるまで18日間培養した。その後、マイクロコズム2本ずつを、非照射対照区、 γ 線10 Gy/dayおよび23 Gy/day照射区として処理した。各処理区において、1本は個体数測定に、別の1本はP/R測定に用いた。培養開始18日目以降、照射区のマイクロコズムは、連続的に ^{137}Cs γ 線を各線量率で外部照射しながら培養した。対照区のマイクロコズムは、照射室内において、鉛

ブロックでγ線を遮蔽した照射野外の区画で培養した。照射開始後45日間にわたって個体数とD0を測定した。

(2) 3者マイクロコズムを用いた評価の有効性

3者マイクロコズムの化学物質に対する感受性に関しては、安定期にアルミニウム (Al^{3+} ; 0.27-27 ppm)、マンガン (Mn^{2+} ; 5.5-550 ppm)、銅 (Cu^{2+} ; 0.064-6.4 ppm) を負荷し、細胞数とP/Rに対する影響を調べた。マンガンと銅については、単独培養系でも負荷実験を行い、細胞数に対する影響を調べた。*E. gracilis*と*E. coli*単独培養系については安定期にマンガンおよび銅を添加し、安定期が存在しない*T. thermophila*単独培養系については培養開始時に添加した。*E. gracilis*と*E. coli*の細胞数はコロニー形数法で測定し、*T. thermophila*の細胞数は顕微鏡下で直接計数した。P/Rは、本研究プロジェクトの共通マニュアルに従って測定した。

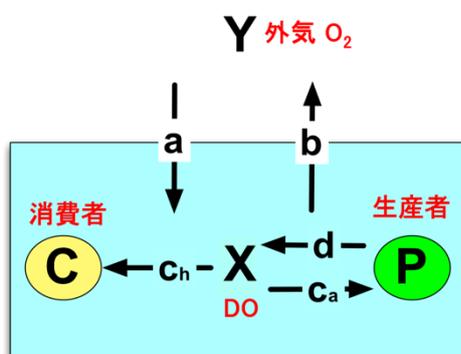
(3) マイクロコズムによる評価手法の有効性

(3)-1) 数理モデルによる溶存酸素濃度の変動のメカニズムと予測

自然水系及びマイクロコズムの水相におけるD0の時間変動の機構とこれに関与する変数を明らかにするために、図(2)-2に示すようなモデルを考えた。ここでは、溶存酸素は、消費者及び生産者による消費、外気への拡散により減少し、また生産者による酸素生成及び外気からの溶解により増加する。生理学的時間(すなわちD0(X)変化の1周期)では、個体数は変化しないと仮定し、消費者の量(C)と生産者の量(P)を定数として扱い、大気中酸素濃度Yも定数として扱った。また、個体数変化が生じる生態学的時間では、C, Pは変数(variable)として扱った。ただし、大気中酸素濃度Yは定数として扱った。このモデルに基づきD0の時間変動を記述する以下の微分方程式(1式)をたて、その一般解を求めた。その結果から各パラメータがD0変動にどう関与しているかを解析した。

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= (aY + dP) - (b + c_h C + c_a P) X \\ &= a - bX\end{aligned}\quad (1式)$$

ここで、 $a = aY + dP$, $b = b + c_h C + c_a P$.



図(2)-2 溶存酸素 (D0) の移動のモデル。Y: 大気中の酸素濃度; X: 液相の酸素濃度 (D0)、時間tの関数; C: 消費者のバイオマス(個体群密度); P: 生産者のバイオマス(個体群密度); a: 大気から液相への酸素の溶解係数; b: 液相から大気への酸素の遊離係数; c_h : 消費者の酸素消費係数; c_a : 生産者の酸素消費係数; d: 生産者の酸素放出係数

(3)-2) マイクロコズムの構成種の数や存在の有無がD0動態に及ぼす影響

(3)-1) で生産者や消費者の量やその変化がD0波形に及ぼす効果を数理モデルによって解析

したが、この結果を実験系において検証した。検証には、(a)3種系（クロレラ、大腸菌、テトラヒメナ）と(b)多種系（栗原・杉浦マイクロコズム）のマイクロコズムを用いた。具体的には、生物を段階的に投入し、D0波形（特に、山と谷の値）の変化を調べ、生産者及び消費者の存在やその量とD0波形のパターンとの関係を調べ、その結果を検討課題（1）で得られた数学的予測から考察した。

(a) 3種系マイクロコズム（“CET マイクロコズム”）

構成種として、藻類（*Chlorella vulgaris*）、細菌（*Escherichia coli*）、及び繊毛虫（*Tetrahymena thermophila*）を用い、番号順に順次接種し、D0波形（特に、山と谷の値）の変化を調べ、生産者及び消費者の存在やその量との関係を（3）-1）で得られた数学的予測との関係を解析した。培地として、MC培地（無機塩のみ）を用い、12L/12D, 3000lux（ $42\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）の光条件で、30°Cで培養を行った。P/Rは、本研究プロジェクトの共通マニュアルに従って測定した。

(b) 多種系マイクロコズム

栗原・杉浦マイクロコズムから分離した以下の4つの生物グループを番号順に日数において順次接種し、D0波形（特に、山と谷の値）の変化を調べ、生産者及び消費者の存在やその量との関係を検討課題（1）で得られた数学的予測と比較し、その検証を行った。(i)細菌（4種）、(ii)藻類（*Tolypothrix sp.*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*）、(iii)繊毛虫（*Cyclidium sp.*）、(iv)後生動物（*Lecane sp.* + *Aerosoma hemprichi*）

培地として、TP培地（無機塩+ペプトン0.01%含有）を用い、12L/12D, 2400luxの光条件で、25°Cで培養を行った。P/Rは、本研究プロジェクトの共通マニュアルに従って測定した。

(3)-3) コンピューター・シミュレーションモデルを用いた毒物とD0動態との関係の解析
化学物質の投与によるD0波形の変化から、生態系の生産者と消費者の量の変化が推定できることが(3)-1)の解析から明らかになった。これをシミュレーションモデル系で検証するために、解析の容易な2種系（細菌-藻類）のコンピューター・シミュレーションモデルを作成した。これを用いて、毒性（対細菌）の強さ（3段階の強度）とD0変動動態と関係を調べ、D0波形の変化から影響（毒性）の強さを推定できるかを検証した。なお、シミュレーション上では、化学物質の細菌-藻類系への投入は細菌の死亡率を高めることにより行い（化学物質の挙動を記述するモデルは定義されていない）。その毒性効果（死亡率増加）は一定であり消失しないものとした。

4. 結果および考察

(1) 杉浦マイクロコズムの安定性と放射線影響

(a) 構造への影響

杉浦マイクロコズムにおける構成生物種の個体数変化を図(2)-3に示した。対照区では、全ての生物種の個体数が、実験期間中ほぼ一定で安定していた。10 Gy/dayでは、細菌の細胞数（コロニー形成単位）が照射開始19日目以降に対照区よりも減少した。他の生物種には影響が見られ

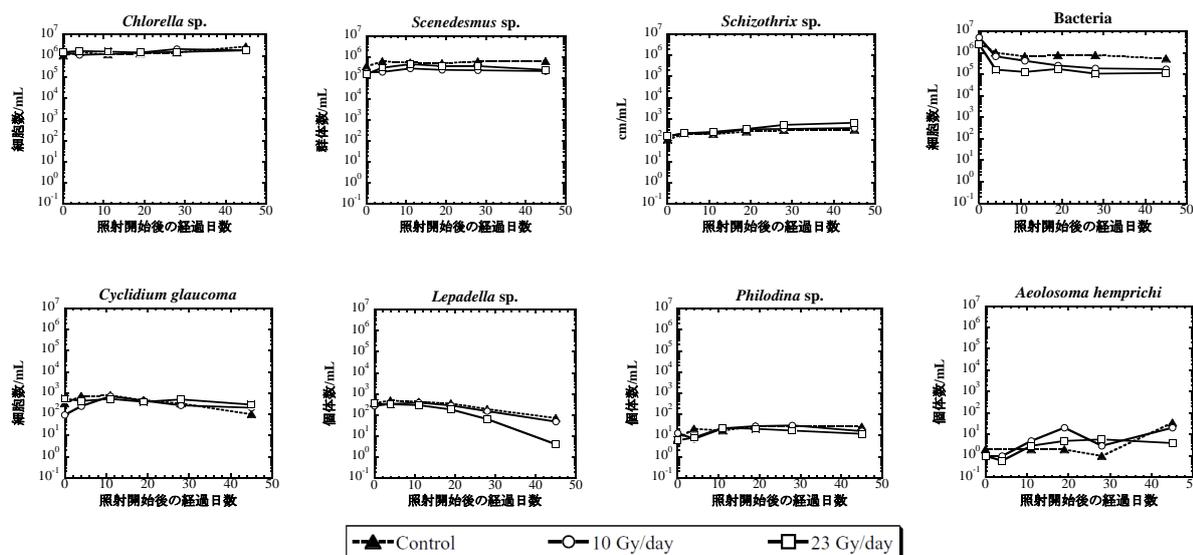
なかった。23 Gy/dayでは、糸状ラン藻 *Schizothrix* sp. の現存量（糸状体の長さ）が28日目以降に対照よりも増加した。細菌の細胞数は4日目以降、ワムシ *Lepadella* sp. の個体数は45日目に、それぞれ対照区よりも減少した。他の生物種には影響が見られなかった。

(b) 機能への影響

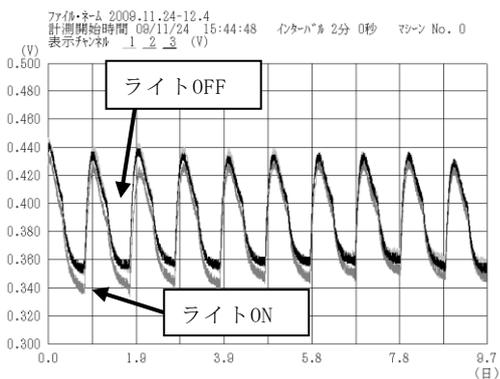
マイクロコズムのDOの日変化を図(2)-4に示した。マイクロコズムの培養は12時間明暗周期で行ったが、対照区と照射区ではともに、明期開始直後にDOが急速に上昇して最高値に達し、その後は徐々に低下した。明期が終了して暗期に入ると、DOの低下が促進された。やがて低下速度は鈍るものの、DO低下は継続し、暗期終了時に最低値となった。このようなDOの日変化が実験期間中規則正しく続いた。P/Rの値は、実験期間中、対照区と照射区ともに、ほぼ1で安定しており、明確な γ 線の影響は見られなかった（図(2)-5）。

(c) 安定性

本プロジェクトで作成した共通マニュアルに従ってマイクロコズムを培養したところ、対照区では60日以上にわたって構成生物種の個体数がほぼ一定であり（図(2)-3）、P/Rの値もほぼ1で一定だったので（図(2)-5）、このマニュアルの方法でマイクロコズムを安定に培養できることを構造面および機能面で確認できた。 γ 線の連続照射によってマイクロコズムは、一部の構成生物種の個体数が減少または増加するという構造面への影響を受けたが（図(2)-3）、P/Rを指標とした機能面への影響を受けなかった（図(2)-5）。このメカニズムとしては、個体数が増減しても、それに応じて個体の代謝活性が変化して個体群レベルの代謝活性は影響を受けなかった可能性が考えられる（例えば、個体数が減少した場合は、生き残った個体の代謝活性が上昇）。また、ある生物種の個体数が増減して個体群レベルの代謝活性も変化した場合は、それに応じて同様の生態学的機能を果たしている別の生物種の代謝活性が変化して、群集レベルの代謝活性は影響を受けなかった可能性も考えられる（例えば、ある生物種の個体数が減少し、代謝活性も低下して資源に余剰が出た場合、それを利用して別の生物種の代謝活性が上昇）。いずれのメカニズムにせよ、得られた実験結果は、マイクロコズムが構造的に影響を受ける場合であっても、個体群または群集レベルの冗長性により機能的にはマイクロコズムの安定性が維持される場合があることを示していると考えられる。



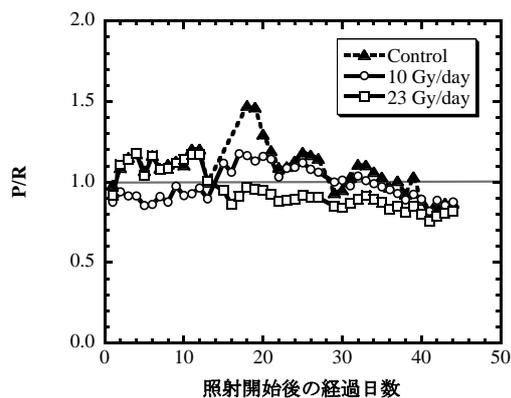
図(2)-3 γ 線の連続照射が杉浦マイクロゾムの個体数に与える影響



図(2)-4 杉浦マイクロゾムにおける溶存酸素濃度の日変化

照射開始4-14日目の測定結果を示した。
薄灰色線：対照 濃灰色線：10 Gy/day
黒線：23 Gy/day

縦軸：溶存酸素濃度（電圧；V）
横軸：D0測定開始後の経過日数



図(2)-5 γ 線の連続照射が杉浦マイクロゾムのP/Rに与える影響

(d) 水圏微生物生態系に対する放射線のリスク

本研究では10 Gy/dayおよび23 Gy/dayの放射線の影響を調べたが、実際の生態系が、これに相当する線量率で被曝する可能性は極めて低いと考えられる。これまでに深刻な原子力事故が発生したり、高レベル放射性廃棄物の不適切な廃棄が行われてきたが、その大部分の線量率は、本研究の値を下回っている。例えば、1986年に旧ソ連（現ウクライナ）で発生し、史上最悪の原子

力発電所事故といわれたチェルノブイリ原子力発電所事故でも、動物プランクトンと植物プランクトンの線量率は、それぞれ最高で0.009 Gy/dayと0.006 Gy/day程度に過ぎなかった⁵⁾。旧ソ連（現ロシア）南ウラルのMayak核複合施設関連では、1957年に発生したKyshtym事故で最高0.1 Gy/day⁶⁾、1950-1951年のテチャ川への放射性廃棄物の不適切な投棄で最高0.6 Gy/day⁷⁾の線量を魚が受けたとされている。また、福島第一原子力発電所事故では高濃度汚染水の直接流入によって近傍の海洋生物への影響が懸念されたが⁸⁾、動物プランクトンと植物プランクトンの線量率は、それぞれ最高で1.3 Gy/dayと0.003 Gy/day程度であったと考えられる（2011年3月30日における原発から330 mの海水中濃度I-131 180000 Bq/L、Cs-134 47000 Bq/L、Cs-137 47000 Bq/L⁹⁾ から、現在世界的に最もよく使われている線量計算コードERICA Assessment Tool version June 2011¹⁰⁾を用いて算出）。本研究で調べた線量率を越える唯一の被曝事例は、1951-1952年の南ウラル・カラチャイ湖への放射性廃棄物の不適切な大量投棄によるもので、水生生物の生存を仮定すれば線量率は300-800 Gy/dayに達していたと推定された⁶⁾。従って、本研究において、23 Gy/dayでもマイクロコズムのP/Rには影響が見られず（図(2)-5）、一部の構成生物種で個体数変化が見られただけなので（図(2)-3）、原子力施設事故や放射性廃棄物の不適切な廃棄を考慮しても放射線が水圏微生物生態系に深刻な影響を与えるリスクは低いと考えられる。

(2) 3者マイクロコズムの化学物質に対する感受性

結果の一例として、マンガンが3者マイクロコズムの細胞数およびP/R、単独培養系の細胞数に与える影響を図(2)-6、(2)-7、(2)-8に示した。3者マイクロコズムの細胞数に関しては、5.5 ppmでは、マンガン添加直後に*E. coli*が一時的に減少した以外、影響は見られなかった（図(2)-6）。27.5 ppmと55 ppmでは、*E. gracilis*が対照系よりも若干増加し、マンガン添加直後に*E. coli*が一時的に減少した以外、影響は見られなかった。550 ppmでは、まず*E. coli*が死滅し、次いで*T. thermophila*が死滅したが、*E. gracilis*は対照系よりも若干増加した。

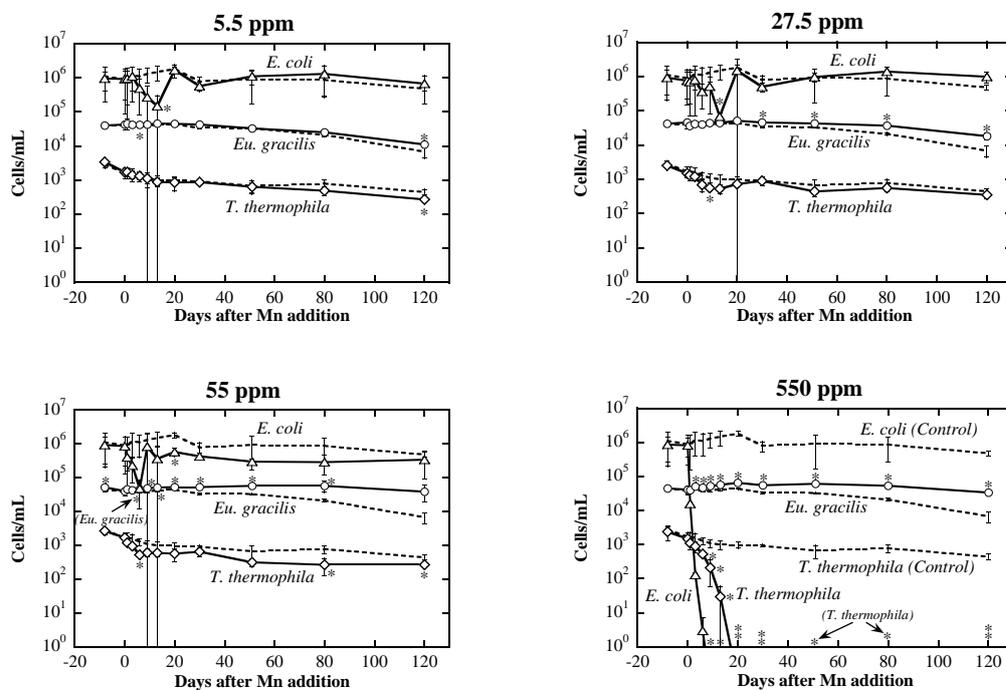
3者マイクロコズムのP/Rに関しては、5.5-550 ppmで、PとRが濃度依存的に対照系よりも減少し、その減少の程度がRよりもPで大きかったため、P/Rは1よりも小さくなった（図(2)-7）。

単独培養系に関しては、*E. gracilis*は55 ppmまで明らかな影響が見られなかったが、550 ppmでは細胞数が減少した（図(2)-8）。*T. thermophila*は、55 ppmまで明らかな影響が見られなかったが、550 ppmでは培養初期に一時的な増殖阻害が見られた。*E. coli*は、5.5-55 ppmで一時的な細胞数の減少が見られ、550 ppmでは死滅した。

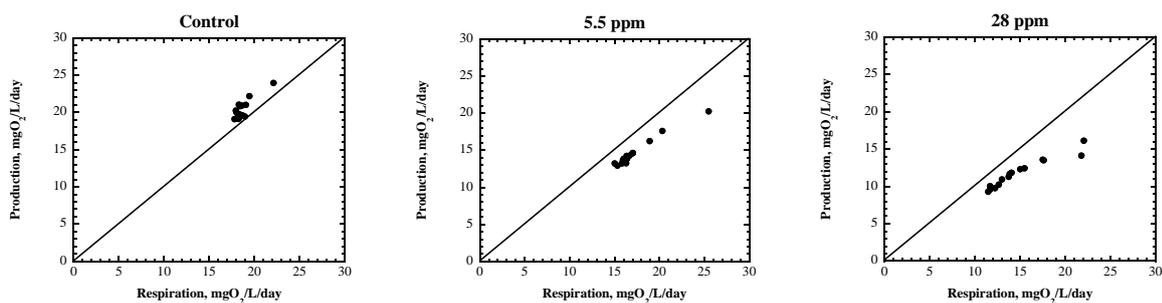
アルミニウムと銅についても同様の結果を得ることができた。これらの結果から、無影響濃度（NOEC）をまとめたものが表(2)-1、(2)-2、(2)-3である。これらの表には、比較のため、現在汎用されている単一生物種試験で求められたNOEC^{(11),(12)}とサブテーマ3で取得された杉浦マイクロコズムのNOECも付記した。

3者マイクロコズムと単独培養系の細胞数についてのNOECを個々の生物種に着目して比較すると、マンガン負荷時の*E. gracilis*や銅負荷時の*T. thermophila*のように、両者のNOECが異なる場合があった（表(2)-2、(2)-3）。これは、3者マイクロコズムでは生物間相互作用に起因する間接影響があったためと考えられる。例えば、銅6.4 ppm負荷時に、*T. thermophila*は単独培養系では影響を受けなかったが、3者マイクロコズムでは死滅した。これは、3者マイクロコズムでは銅によって*E. coli*が死滅したためエサ不足となった*T. thermophila*が間接的に死滅したた

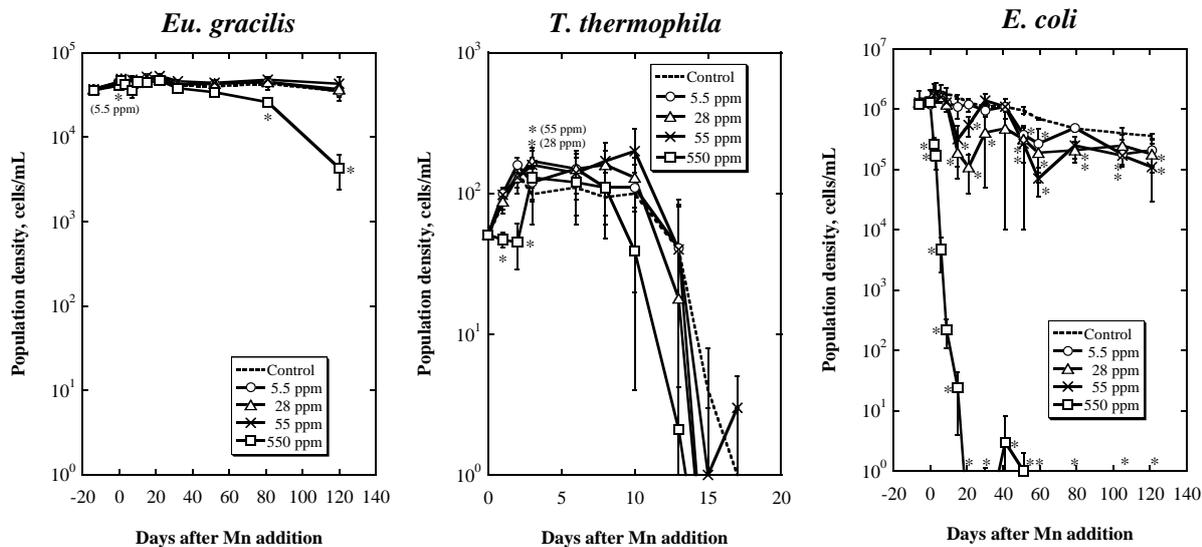
めと考えられる。このことは、単一生物種試験では生態系影響を完全には評価できず、マイクロコズム試験が必要なことを示唆している。ただ、全体を比較するため、各生物種のNOECのうち最も低いものに注目すると、3者マイクロコズムと単独培養系で差が見られなかった。



図(2)-6 マンガンが3者マイクロコズムの細胞数に与える影響
点線は対照系の細胞数を、実線はマンガン負荷系の細胞数を示す。



図(2)-7 マンガンが3者マイクロコズムのP/Rに与える影響



図(2)-8 マンガンが単独培養系の細胞数に与える影響

表(2)-1 アルミニウムのNOEC (ppm)

	細胞数				P	R	P/R
	<i>E. gracilis</i>	<i>T. thermophila</i>	<i>E. coli</i>	全体			
3者マイクロコズム	0.27	0.27	0.27	0.27	<0.27	<0.27	2.7
杉浦マイクロコズム	-	-	-	-	0.3	0.3	0.3

表(2)-2 マンガンのNOEC (ppm)

	細胞数または個体数				P	R	P/R
	<i>E. gracilis</i>	<i>T. thermophila</i>	<i>E. coli</i>	全体			
3者マイクロコズム	>550	55	<5.5	<5.5	<5.5	<5.5	<5.5
単独培養系	55	55	<5.5	<5.5	-	-	-
杉浦マイクロコズム	-	-	-	0.1	0.5	0.1	0.5

表(2)-3 銅のNOEC (ppm)

	細胞数または個体数				P	R	P/R
	<i>E. gracilis</i>	<i>T. thermophila</i>	<i>E. coli</i>	全体			
3者マイクロコズム	>6.4	0.64	0.64	0.64	<0.64	<0.64	0.64
単独培養系	>6.4	>6.4	0.64	0.64	-	-	-
単一生物種試験	-	-	-	HC5 ^a : 0.0002 3点セット ^b : 0.005	-	-	-
杉浦マイクロコズム	-	-	-	-	0.5	0.25	0.5

^a単一生物種試験の結果を種感受性分布 (SSD) によって解析して推定した、生態系の95%の種が保護される濃度¹¹⁾

^b藻類、ミジンコ、魚類の各生態毒性評価試験で求められたNOECのうち、最も低い濃度¹²⁾

3者マイクロコズムと杉浦マイクロコズムの感受性を比較すると、アルミニウム負荷時のP/Rについては3者マイクロコズムの感受性の方が低かったのに対し（表(2)-1）、銅負荷時のP/Rについては両マイクロコズムの感受性は同等であった（表(2)-3）。従って、化学物質の種類によって両者の感受性に差異がある場合と同等な場合の両方があると考えられる。3者マイクロコズムと単一生物種試験の比較に関しては、細胞数または個体数に対する銅の影響に着目すると、3者マイクロコズムの感受性の方が大幅に低かった（表(2)-3）。この原因は、単独培養系についても同様に単一生物種試験より感受性が大幅に低かったことから、生物間相互作用によって3者マイクロコズムで銅の影響が緩和されたためではなく、3者マイクロコズムの構成生物種自体の銅に対する感受性が単一生物種試験の試験生物よりも低かったためと考えられる。

以上より、3者マイクロコズムは生物間相互作用に起因する間接影響を評価できるが、杉浦マイクロコズムや単一生物種試験とは感受性が異なる場合があるため、毒性データを推定するためには適当な安全係数を用いるなどの工夫が必要であることが示唆された。

(3) マイクロコズムによる評価手法の有効性

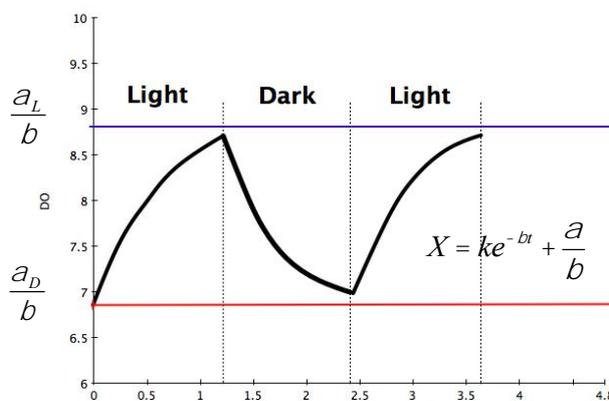
(3)-1) 数理モデルによる溶存酸素濃度の変動のメカニズムと予測

数理モデル（1式「研究開発方法」参照）を解くことにより、溶存酸素（X）の時間変化を予測する以下の式を得た。

$$X = (X_0 - \frac{a}{b})e^{-bt} + \frac{a}{b} \quad (2式)$$

ここで、 X_0 は $t=0$ のときのX値。

Xは時間が無限大で α/β に収束する。Xは α/β に収束するが、明期と暗期とでは α の値が異なるので、明暗の変化による溶存酸素濃度の平衡点は以下のように変化する。明期では、 $a = aY + dP$ （ a_L とする）、暗期では $d = 0$ となるので、 $a = aY$ （ a_D とする）となる。ただし、酸素消費量は明/暗いずれも同じである（ $b = b + c_h C + c_a P$ ）。このように、明暗の切り替



図(2)-9 溶存酸素濃度（X）の時間変化

えにより平衡点が $\frac{a_L}{b}$ と $\frac{a_D}{b}$ に変化するので、溶存酸素濃

度（X）はこの2つの平衡点の間を行き来する（図(2)-9）。

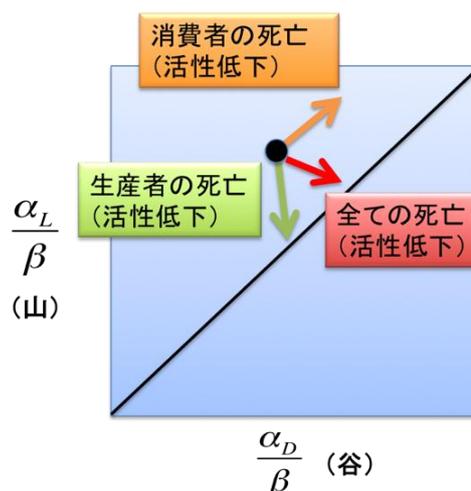
この波形はDO値の実測データに類似しており、このモデルがDO変動の機構をうまく表していることを示している。ただし、実データでは暗期に入る前にDO値が減少しはじめる結果がでており、これは、CO₂が不足することによる光合成低下のためと考えられる（(3)-2）の実験結果参照）。

このD0変化の上限（漸近線 $X = \frac{a_L}{b}$ ）と下限（漸近線

$X = \frac{a_D}{b}$ ）を実際のD0値の極大値（“山”， p ）と極小値

（“谷”， v ）で近似すると、 $p \approx \frac{a_L}{b}$ 、 $v \approx \frac{a_D}{b}$ となる。つ

まり、毒物により溶存酸素濃度の波形の山と谷の値が変化した場合、その変化の方向と程度を知れば、(i) 生産者の活性の低下（ a_L の減少）、(ii) 消費者の活性の低下（ β の減少）、(iii) 両者の活性の低下（ a_L と β の減少）が起こっていることを推定することができる（図(2)-10）。結論として、この方法により、生産者および消費者という生態系の機能的グループ単位での構成要素の量（生産者、消費者、生産者及び生産者の量）とおよび変化をD0波形の解析により定量的に推定できることが明らかである。また、図中のベクトルの逆向きは、構成種の活性化を意味する。これは、実験モデルで行う生物添加実験で検証する。活性化現象は、有機物や栄養塩類の導入による場合や外部からの生物の移入の場合もあるだろう。

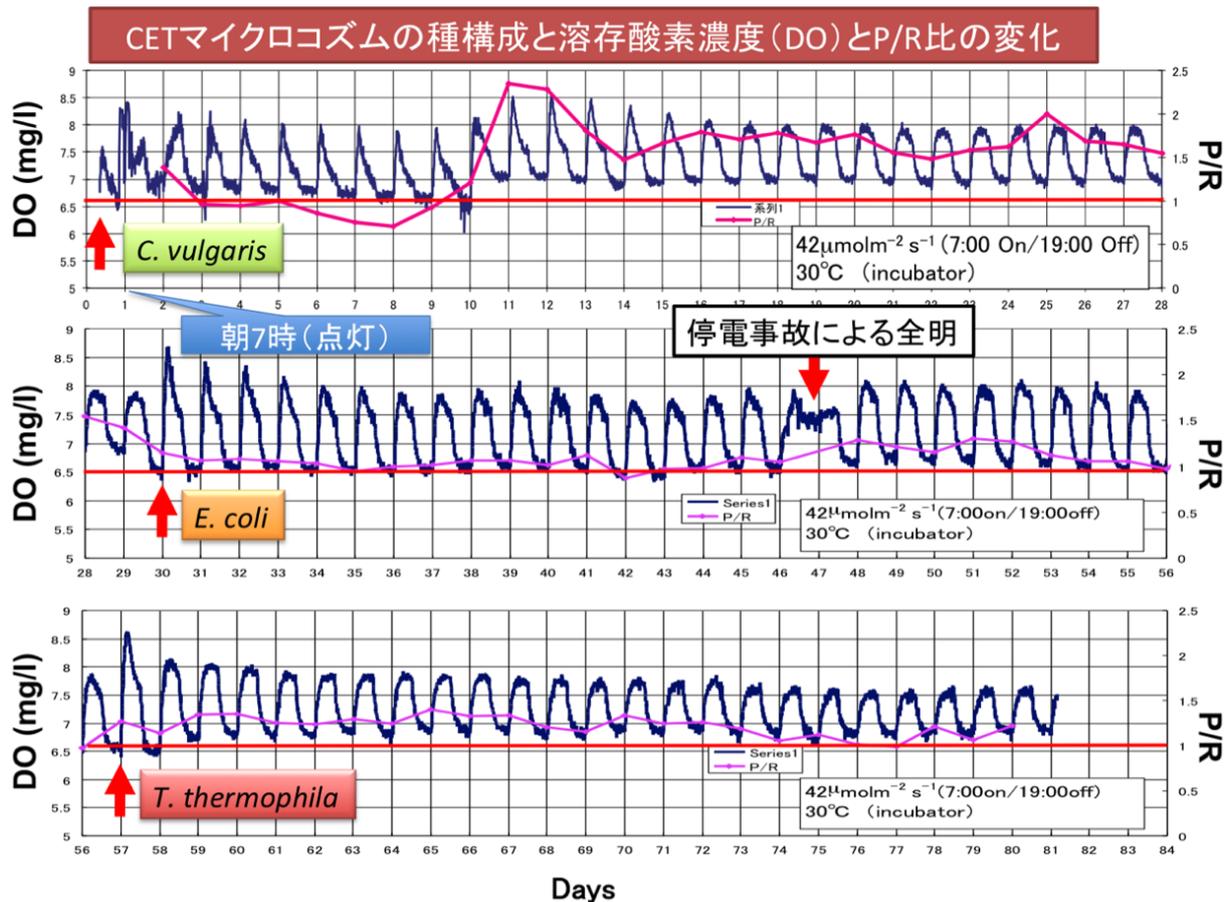


図(2)-10 化学物質（毒物）によるD0波形の山（極大値）と谷（極小値）の値の変化と生態系の生物活性の変化との関係

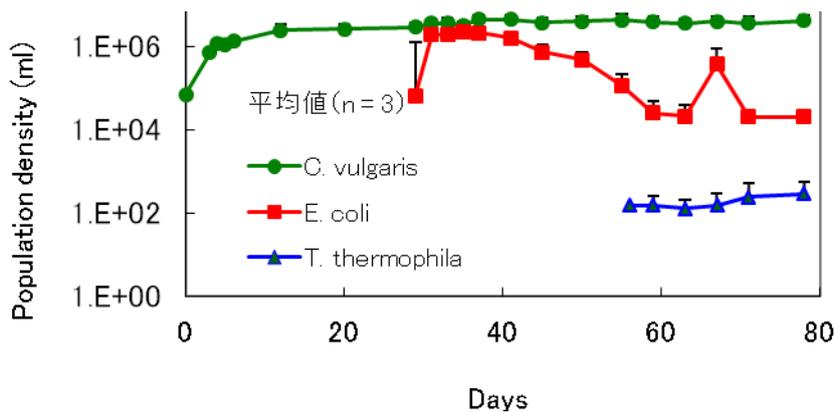
(3) -2) マイクロコズムの構成種の数や存在の有無がD0動態に及ぼす影響

(a) 3種系マイクロコズム (CET マイクロコズム)

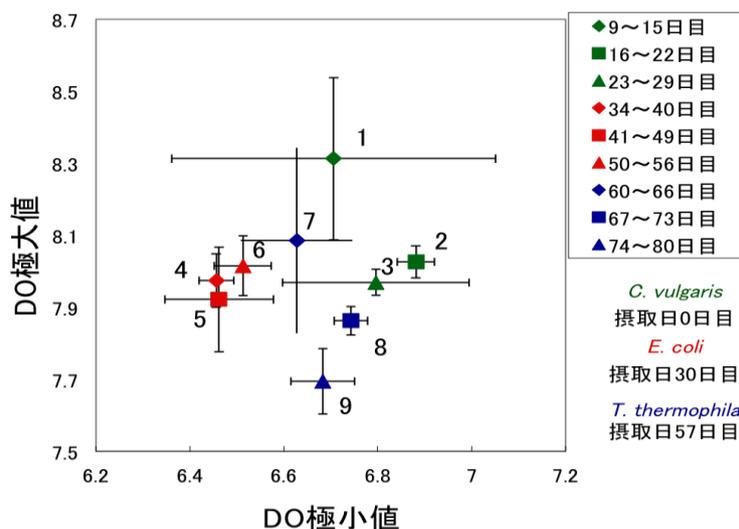
藻類をスタート時、細菌を30日目、繊毛虫を57日目に順次接種し、D0値の変動とP/R比を求めた（図(2)-11）。また、この過程の個体数変化を図(2)-12に示す。D0値の山と谷の値を7日間の時間区間で平均を取り、図(2)-10と同形式で表示したものを図(2)-13に示す。図(2)-13より、時間とともに藻類の活性低下が起こり、細菌添加によってD0の山（極大値）と谷（極小値）が減少し、さらに繊毛虫の添加直後（60～66日）は、山の増加と谷の増加が起こっている。これは、光合成活性の増加と消費者である細菌の減少により系全体の呼吸量が低下したことを示唆している。しかし、その後、山の値が下がり、谷の値がさらに増加していることから、光合成活性の低下と系全体の呼吸量が低下していることが示唆している。



図(2)-11 DO値の変動(紺色)とP/R比(ピンク色)の時間変化(赤線はP/R比=1を示す)。



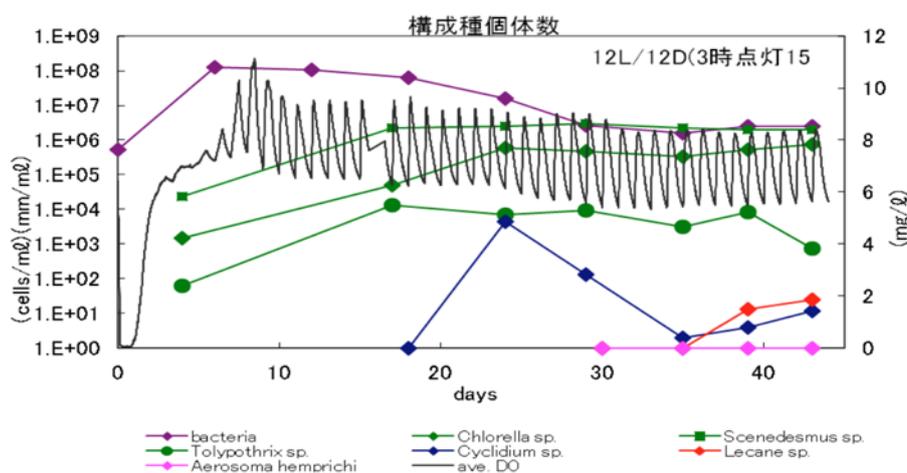
図(2)-12 CETマイクロゾムの構成種の個体数変化



図(2)-13 7日間の区間でのDO値の山と谷の平均値の時間推移。図中番号は区間の時間順序

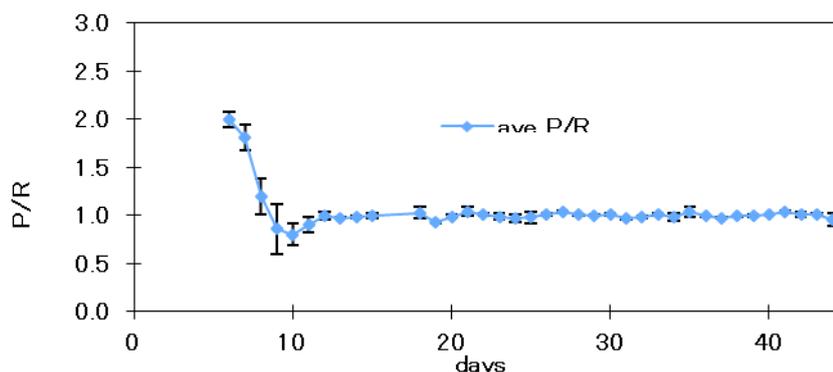
(b) 多種系マイクロコズム

0日に細菌、4日に藻類、17日に繊毛虫、29日に後生動物を接種した。細菌接種後、DO値は0まで減少するが、細菌の資源（ペプトン）の枯渇による酸素消費の減少で気相からの溶解込みによってDOが回復した（図(2)-14）。藻類の添加/増加によりDO値が上昇し、明暗の周期に同調してDO値の増減が見られた。その後は、消費者（繊毛虫）の添加によって、DO値の山の減少と谷の減少が見られた。これは、光合成活性の低下と消費活性の増加を示唆している。P/R比は12日あたりには1に収束しそのまま維持された（図(2)-15）。



図(2)-14 多種系マイクロコズムにおけるDO値及び個体数変化

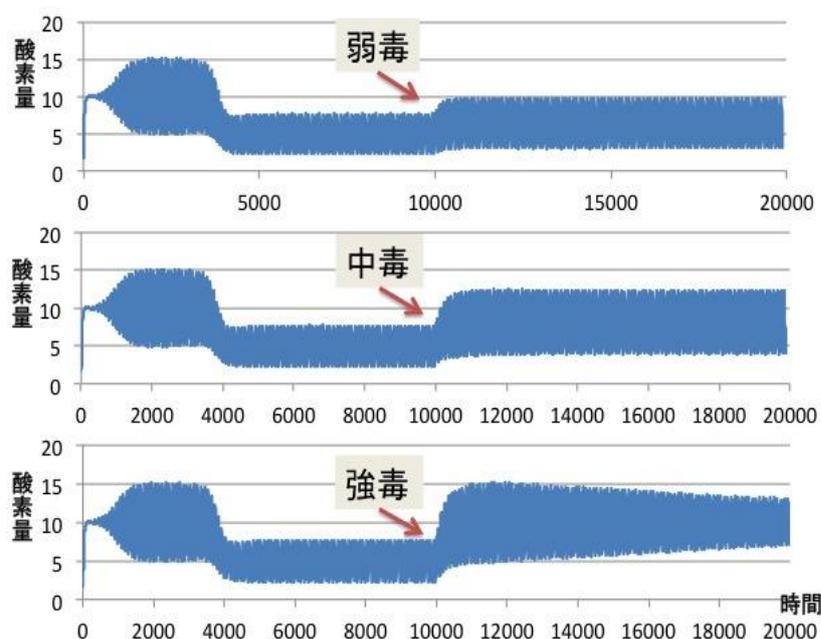
DO 及びP/R計測 : n = 3 ; 個体数計測 n = 1、*Tolythrix. sp*のみ体長合計 (mm) で表示



図(2)-15 多種系マイクロコズムにおけるP/R比の変化

(3) -3) コンピューター・シミュレーションモデルを用いた毒物とD0動態との関係の解析

細菌-藻類のシミュレーションモデルを用いた毒性（対細菌）の強さとD0変動動態と関係を解析した。t = 0 で藻類を、t = 3000 で細菌を投入し、t = 10000 で細菌に毒性を示す化学物質を投入した。この毒物投入は、計算上では、細菌の死亡率の増加という方法で実施した。この系のD0値の変化を図(2)-16に示す。t = 3000 で投入された細菌の増加によってt = 4000 過ぎまでにD0波形の山と谷がともに減少し安定する。t = 10000 で毒物の投入により、波形の山と谷は増加に転じるが、その度合いが毒性の強度に依存していることが示されている。以上の結果から、毒物の影響を受ける生物（細菌；消費者）の減少によるD0波形の変化（山と谷の増加）を検出できること、毒物による細菌の減少により、細菌から資源を受けている生産者（藻類）が減少することによってさらにD0波形の変化が生じることも明らかになった。これは、毒物が直接作用しない生物に及ぼす間接効果もD0波形の変化から検出できることを示している。



図(2)-16 細菌-藻類系における DO 変動と毒物投入の影響

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究により、マイクロコズムが構造的に影響を受ける場合であっても、個体群または群集レベルの冗長性により機能的には系の安定性が維持される場合があることが示唆された。このことは、生態系影響評価の際に、機能面に対する影響を重要視する場合は、現在一般的に測定が行われている構造に関するパラメータ（生物種組成、個体数など）を測定しても適切な評価ができず、機能に関するパラメータを直接測定する必要性を示しており、科学的意義は大きい。また、系の複雑さと化学物質など外的攪乱に対する感受性の関係は生態学や環境毒性学の重要な検討課題であり、3種類の微生物から構成される単純なマイクロコズムを使用して毒性データを推定するためには適当な安全係数を用いるなどの工夫が必要なことを示した本研究の科学的意義は大きい。

理論的側面からは、生態系の生産・消費構造（生産者、消費者、生産者及び生産者の量）および変化を DO 値の極大値と極小値から定量的に評価できることが数理モデルと実験から明らかとなった。さらに、DO波形の極大値と極小値の変化を解析することにより、毒物が生態系の生産及び消費（呼吸）の量的構造に及ぼす効果とその程度を評価できることが明らかになった。特に、DO波形の極大値・極小値の変化の方向、程度及び回復までの時間を知ることにより、毒性が生態系の生産・消費構造のどこに作用するかという特性とその強さを評価できることが明らかにされた。これらの結果は、本手法の有効性を理論的に裏打ちし、影響を定量的に評価する手法の基礎を与えるという点でその意義は大きい。

(2) 環境政策への貢献

国際放射生態学連合 (IUR) のタスクグループ「環境防護への生態系アプローチ」(代表: Dr. François Bréchnignac; IUR会長および国際放射線防護委員会 (ICRP) 第5委員会委員) に参画し、本研究プロジェクトで得られた知見を最終報告書案に反映させた。例えば、サブテーマ3で得られた杉浦マイクロコズムと単一生物種試験の感受性の比較結果¹³⁾や本サブテーマで得られた生物種間相互作用による間接影響の重要性に関する結果 (下記誌上発表の「査読あり論文」1) を引用) などを紹介した。この報告書は、放射線防護について各国行政機関が尊重しているICRP勧告や経済協力開発機構原子力機関 (OECD/NEA) 報告書などの内容に大きな影響を与える可能性が高い。従って、本研究プロジェクトの成果は、将来的には、ICRP勧告などを通して、我が国における環境の放射線防護政策に貢献するものと考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

本研究に密接に関連した課題「マイクロコズムを用いた放射線と他の有害因子の生態系影響の比較評価」についてProf. Gennady G. Polikarpov (ウクライナ The A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas) と共同研究を実施している。平成21年度 (S. FUMA, 他7名, Y. INAMORI and G. G. POLIKARPOV: J. Environ. Radioact. 100, 12, 1027-1033 (2009) “Effects of Acute γ -Irradiation on the Aquatic Microbial Microcosm in Comparison with Chemicals” ; 査読あり) と平成23年度 (下記誌上発表の「査読あり論文」2)) に、原著論文各1報を共同で発表した。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

- 1) S. FUMA, N. ISHII, H. TAKEDA, K. DOI, I. KAWAGUCHI, S. SHIKANO, N. TANAKA and Y. INAMORI: J. Environ. Radioact, 101, 11, 915-922 (2010)
“Effects of Acute Gamma-Irradiation on Community Structure of the Aquatic Microbial Microcosm”
- 2) S. FUMA, I. KAWAGUCHI, Y. KUBOTA, S. YOSHIDA, Z. KAWABATA and G. G. POLIKARPOV: J. Environ. Radioact, 104, 81-86 (2012)
“Effects of Chronic Gamma-Irradiation on the Aquatic Microbial Microcosm: Equi-Dosimetric Comparison with Effects of Heavy Metals”

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。)
特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表 (査読なし) >
特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 府馬正一、川口勇生、久保田善久、吉田聡、川端善一郎 : 日本放射線影響学会第54回大会 (2011)
「ガンマ線の連続照射がモデル実験生態系に与える影響 : 重金属との比較」
- 2) 府馬 正一 : 日本生態学会第59回大会 (2012)
「化学物質と放射線の生態影響の比較」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) ICRP: A framework for assessing the impact of ionising radiation on non-human species. ICRP Publication 91, 2003.
- 2) 酒井一夫: ICRP新勧告－新しい放射線防護の考え方と基準 第8回 (最終回) 環境の放射線防護, 日本原子力学会誌, 52, 748-752, 2010.
- 3) Kawabata, Z. et al.: Synthesis of a species-defined microcosm with protozoa. *J. Protozool. Res.* 5, 23-26, 1995.
- 4) Matsui, K. et al.: Direct and indirect interactions for coexistence in a species defined microcosm. *Hydrobiologia* 435, 109-116, 2000.
- 5) IAEA: Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert Group 'Environment', IAEA, Vienna, 2006.
- 6) Kryshev, I. I., Sazykina, T. G.: Radioecological effects on aquatic organisms in the areas with high levels of radioactive contamination: environmental protection criteria. *Radiat. Prot. Dosim.* 75, 187-191, 1998.
- 7) Kryshev, I. I. et al.: Radioecological consequences of radioactive discharges into the Techa River on the Southern Urals. *J. Environ. Radioact.* 38, 195-209, 1998.
- 8) Schiermeier, Q.: Radiation release will hit marine life. *Nature* 472, 145-146, 2011.
- 9) 東京電力: 福島第一原子力発電所付近の海水からの放射性物質の検出について (第十一報) 別紙4: 海水核種分析結果 (1 F 南放水口付近) 13時55分,

http://www.tepco.co.jp/cc/press/betull_j/images/110331d.pdf, 2011.

- 10) <http://www.ERICA-tool.com/>
- 11) Versteeg, D.J. et al. : Understanding single-species and model ecosystem sensitivity: data-based comparison. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1329-1346, 1999.
- 12) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC): The value of aquatic model ecosystem studies in ecotoxicology. Technical Report No. 73, Brussels, Belgium, 1997.
- 13) Sugiura, K. : Effects of chemicals and metal ions on microcosms; comparison of community metabolism to single species responses to toxicants. *Jpn. J. Environ. Toxicol.* 12, 41-53, 2009.

S2-09 マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

(3) マイクロコズムを用いた金属類の生態系システムに及ぼす解析評価

相模女子大学

栄養科学部健康栄養学科

杉浦 桂 (平成21年度)

千葉工業大学

工学部生命環境科学科

村上和仁 (平成22・23年度)

<研究協力者>

千葉工業大学工学部生命環境科学科 林 秀明・島田諒司・三浦あかね・箕浦英樹

平成21～23年度累計予算額 12,512千円 (うち、平成23年度予算額3,829千円)

上記の予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 金属類の生態リスク影響評価に供するための基礎的知見の集積を目的として、平成21年度の Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、平成22年度の Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、平成23年度の Co^{2+} の添加(負荷)がマイクロコズム生態系のP/R比の推移に如何なる影響を及ぼすかについて、培養実験および数値シミュレーションの双方から検討をおこなった。呼吸量(R)、生産量(P)、P/Rおよびマイクロコズム構成微生物個体数の経時変化を影響評価項目に選択し、測定結果を基に、金属イオンの実測最大無影響濃度(NOAE)C(マイクロコズム無影響濃度:m-NOEC)を決定し、培養モデルと数理モデルのハイブリッド型リスク影響評価システムの基盤を構築することができた。また、Naturally derived型、Stress selected型、Gnotobiotic型のタイプの異なるマイクロコズムにおける系の安定性について検討し、標準試験方法としてのマイクロコズムシステムには、完全種構成既知で高い再現性と系の安定性を有するGnotobiotic型マイクロコズムが適していることを明らかにすることができた。

[キーワード] 金属類、P/R比、生産量、呼吸量、m-NOEC、Gnotobiotic型マイクロコズム

1. はじめに

金属類の毒性評価は従来よりOECD法等の単一種生物試験によりなされてきた。例えば、HC5法は単一生物種の最大無影響濃度(NOEC)の分布曲線を基に個体数の95%を保護する濃度を予測する方法であり、ECETOC法は藻類、甲殻類、魚類の各NOECを求め、それらの最小値を1/10倍する方法である。しかしながら、HC5法とECETOC法で求めた予測無影響濃度(PNEC)は、マイクロコズム法・メソコズム法で求めた無毒性濃度(m-NOAE)Cと大きな差があることが明らかにされつつあり、生物間相互作用の効果を考慮することが必要不可欠となっている。また、金属類の生態リスクについては十分な知見が得られていないのが現状であり、個々の生物種に対する毒性リスク評価ではなく複雑な生物間相互作用を有する生態系システムに対する生態リスクを評価する上では、生産者・消費者・分解者からなるモデル微生物生態系であるマイクロコズムが有用なツールとなり得

る。

2. 研究開発目的

本研究では、金属類の生態リスク影響評価に供するための基礎的知見の集積を目的として、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} に加えて、 Co^{2+} 添加（負荷）がマイクロコズム生態系のP/R比の推移に如何なる影響を及ぼすかについて検討をおこなった。平成23年度は、呼吸量（R）、生産量（P）、生産量／呼吸量（P/R）およびマイクロコズム構成微生物個体数の経時変化を影響評価項目に選択して実験を行い、これらの測定結果を基に、金属イオンの実測最大無影響濃度（NOAEC）（マイクロコズム無影響濃度：m-NOEC）を決定した。また、数理モデル（N88BASICによる杉浦モデル, 1996）によるシミュレーション解析により、培養モデル（マイクロコズム）の実験結果を検証し、金属負荷が生態系機能に対して如何なる影響を及ぼすかについて検討した。また、Naturally derived型、Stress selected型、Gnotobiotic型のタイプの異なるマイクロコズムにおける系の安定性について検討した。

3. 研究開発方法

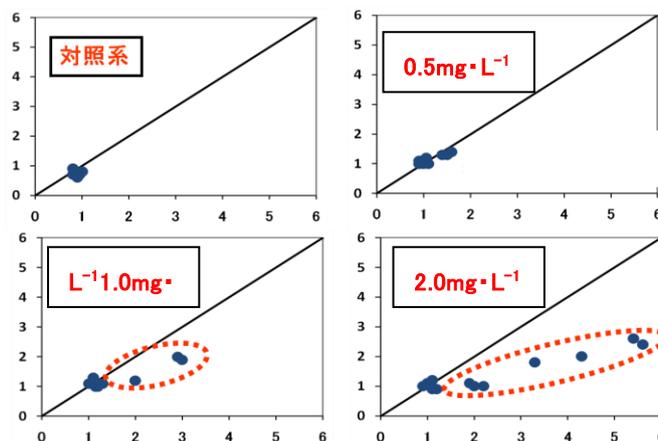
実験方法は「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響システム手法の開発 — 共通マニュアル（β版ver. 2.2）に準じておこなった。

4. 結果および考察

(1) Mnの生態リスク評価

Mn添加後14日間のP/R比の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して、Mnの生態リスク影響を評価した。

図(3)-1にMn添加がP/R比に及ぼす影響を示した。その結果、添加濃度 $1.0mg \cdot L^{-1}$ から徐々にP/R=1のラインから外れ始め、 $2.0mg \cdot L^{-1}$ 以上では完全に呼吸量（R）過多となり系が崩壊した。経日変化をみてみると、 $1.0mg \cdot L^{-1}$ で特に呼吸量に対して影響が生じ、P/R比が減少したが、その後、P/R比=1程度（安定系）に回復した。これより、Mn添加 $1.0mg \cdot L^{-1}$ は一時的に毒性を示すが、慢性的な毒性ではないと考えられた。また、Mn添加後14日間の各構成微生物の挙動パターンを対照系と比較して、Mnの生態リスク影響を評価した結果、マイクロコズムを構成する代表的な種の挙動を比較してみると、特に原生動物*C. glaucoma*がMn添加 $1.0mg \cdot L^{-1}$ で大きな影響を受けていること、すなわち、共存系においても生物種によって影響の大きさが異なることが示された。さらに、Mn添加後14日目（培養開始30日目）における各構成微生物の個体数（ N_{30} ）を対照系と比較して、Mnの生態リスク影響を評価した。その結果、対照系と添加系における生物個体数の比をとると、対照系に比べて個体数が増加している生物群（微細藻類）と減少している生物群（微小動物）に区分され

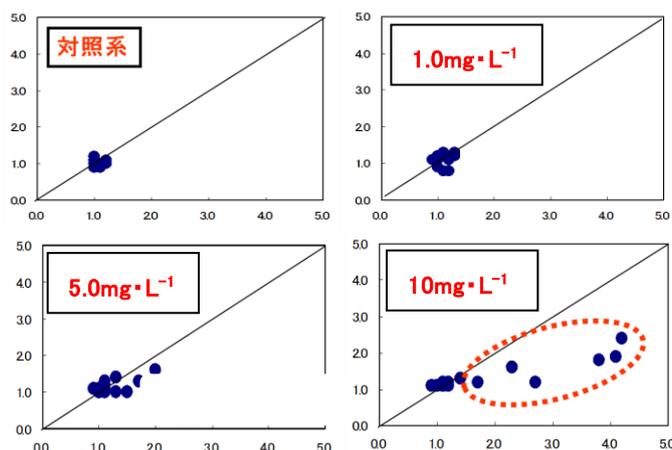


図(3)-1 Mn^{2+} のP/R比に及ぼす影響

ることがわかった。一方、Mn添加後14日間の各構成微生物の現存量（面積個体数密度）（ B_{16-30} ）を対照系と比較して、Mnの生態リスク影響を評価したところ、対照系と添加系における現存量（面積個体数）の比をとると、 N_{30} と同様に、生物群が二分された。

(2) Mgの生態リスク評価

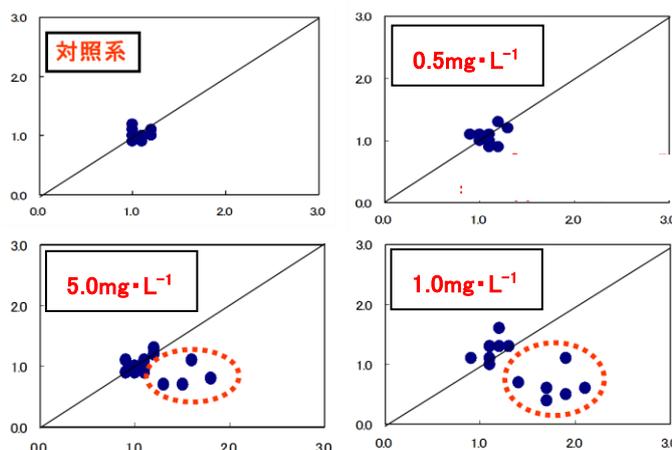
Mg添加後14日間のP/R比の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して、Mgの生態リスク影響を評価した。図(3)-2にMg添加がP/R比に及ぼす影響を示した。その結果、添加濃度 $5.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ から徐々にP/R=1のラインから外れ始め、 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ では完全に呼吸量(R)過多となり系が崩壊した。経日変化をみてみると、Mg添加 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ で特に呼吸量に対して影響が生じ、P/R比が減少したが、その後、P/R比=1程度（安定系）に回復した。これより、Mg添加 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ は一時的に毒性を示すが、慢性的な毒性ではないと考えられた。添加後の挙動パターンからの評価では、Mg添加後14日間の各構成微生物の挙動パターンを対照系と比較したところ、マイクロコズムを構成する代表的な種の挙動を比較してみると、特に原生動物*C. glaucoma*と水生ミミズ*A. hemprichi*がMg添加 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ で大きな影響を受けていること、すなわち、共存系においても生物種によって影響の大きさが異なることが示された。安定期の個体数（ N_{30} ）からの評価では、Mg添加後14日目（培養開始30日目）における各構成微生物の個体数を対照系と比較したところ、対照系と添加系における生物個体数の比をとると、対照系に比べて個体数が増加している生物群（微細藻類・細菌類）と減少している生物群（微小動物）に区分されることがわかった。添加後の現存量（ B_{16-30} ）からの評価では、Mg添加後14日間の各構成微生物の現存量（面積個体数密度）を対照系と比較したところ、対照系と添加系における現存量（面積個体数）の比をとると、 N_{30} と同様に、生物群が二分された。



図(3)-2 Mg^{2+} のP/R比に及ぼす影響

(3) Caの生態リスク評価

Ca添加後14日間のP/R比の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して、Caの生態リスク影響を評価した。図(3)-3にCa添加がP/R比に及ぼす影響を示した。その結果、添加濃度 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ から徐々にP/R=1のラインから外れ始め、 $5.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上では完全に呼吸量(R)過多となり系が崩壊する経日変化をみてみると、Ca添加 $5.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ で特に生産量に対して影響が生じ、P/R比が減少した。これより、Ca添加 $5.0\text{mg}/\text{l}$ によりマイクロ



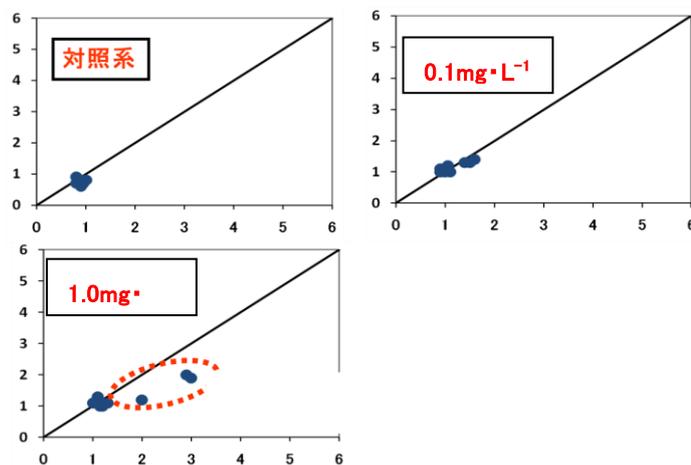
図(3)-3 Ca^{2+} のP/R比に及ぼす影響

ズム生態系は影響を受けることが示された。添加後の挙動パターンからの評価では、Ca添加後14日間の各構成微生物の挙動パターンを対照系と比較したところ、マイクロコズムを構成する代表的な種の挙動を比較してみると、原生動物*C. glaucoma*、後生動物*Lecane* sp.、*A. hemprichi*がCa添加 $5.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ で大きな影響を受けていることがわかる。安定期の個体数 (N_{30}) からの評価および添加後の現存量 (B_{16-30}) からの評価では、Mg添加系と同様に、対照系と添加系における生物個体数・現存量の比をとると、対照系に比べて個体数が増加している生物群と減少している生物群に区分されたが、生産者である微細藻類でも減少する種 (*Chlorella* sp.、*Scenedesmus* sp.) が観察された。これは、Ca添加による水中のリンの吸着除去に加えて、pHの急激な上昇による微小動物（特に水生ミミズ*A. hemprichi*）の増殖阻害や白濁による微細藻類の光合成阻害といった影響が生じたものと考えられた。以上より、底質改善材としてのMgとCaは、散布した際に生態系に及ぼす影響が異なり、Caの生態リスクはMgの2倍程度と評価された。

(4) マイクロコズムにおける各種タイプの安定性・再現性の比較解析

現場の環境下の群集をそのまま維持したNaturally derived型（手賀沼湖水）、自然群集をある条件下で培養しある特定の生物群集に維持発展させたStress selected型（手賀沼湖水）、および完全種構成既知で各種の個体数が単独に計測可能で各種の性質が単独に解析可能なGnotobiotic型（栗原type）のマイクロコズムを用いた。マイクロコズムの培養は、 25°C 、 $2,800\text{lux}$ (L/D= $12/12\text{hr.}$)、静置条件とした。Naturally derived型マイクロコズムは手賀沼湖水 200ml をそのまま 300ml 容三角フラスコに、Stress selected型とGnotobiotic型マイクロコズムはポリペプトン濃度を $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ となるよう調整したTP培地 200ml を 300ml 容三角フラスコに入れ、種を 10ml 接種して培養を開始した。マイクロコズム内のD0変化を連続測定し、P（生産量）、R（呼吸量）およびP/R比の推移を求めた。また、培養開始後、0、2、4、7、14、16、18、20、23、30日目にマイクロコズム構成微生物の個体数を計測した。

富栄養化湖沼であり、プランクトン量が豊富である手賀沼の湖水を充填したNaturally derived型マイクロコズムにNiを添加して生態リスク影響を評価したところ、対照系（非添加系）の生物相が安定せず、系ごとに構造パラメータである出現生物（＝生物相）が異なり、再現性が維持されないことが示された。また、手賀沼の湖水を種としてTP培地で培養したStress selected型マイクロコズムにNiを添加して生態リスク影響を評価したところ、対照系（非添加系）であっても作成した40系中7系しか安定系が構築されず、再現性・安定性のいずれも不十分であった。一方、3種の微細藻類（生産者）、4種の微小動物（消費者）、4種の細菌類（分解者）から構成される完全種構成既知のGnotobiotic型マイクロコズムにNiを添加して、機能パラメータとしてのP/R比の推移から生態リスク影響を評価（図(3)-4）したところ、Ni添加 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ では影響はみられなかったが、 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ではRが増大してP/R比は <1 となった。すなわち、添



図(3)-4 Ni^{2+} のP/R比に及ぼす影響

加濃度 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ から徐々に $P/R=1$ のラインから外れ始め、呼吸量 (R) 過多となり系が崩壊した。また、構造パラメータとしての生物個体数に着目すると、対照系に比べて個体数が増加している生物群 (微細藻類) と減少している生物群 (微小動物) に区分されることがわかった。これより、Niのマイクロコズム無影響濃度 (m-NOEC) は、 $0.1\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と見積もられた。

以上より、1) 標準試験法としてのマイクロコズムは、完全種構成既知で、高い安定性と再現性を示すGnotobiotic型が適していること、2) Niのマイクロコズム無影響濃度 (m-NOEC) は、 $0.1\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と見積もられること、3) マイクロコズムを活用したP/R比からの生態リスク評価は有効な手段となることが示された。

(5) 培養モデルと数理モデルのハイブリッド型リスク影響評価システムの構築

本研究では杉浦が Odum-Beyers を元に構築した N88BASIC を用いた数理モデルを使用した。本モデルは以下ようになっており、生物間相互作用とともに代謝産物を考慮したモデルである。

$$d(\text{CO}_2)/dt = k_1(\text{O}_2) \times (\text{MB}) \times (\text{C}) + k_2((\text{DCO}) - (\text{CO}_2)) / (\text{DCO}) - k_8(\text{CO}_2) \times (\text{C})$$

$$d(\text{MC})/dt = k_6 \times (\text{O}_2) \times (\text{MB}) \times (\text{C}) + k_{10} \times (\text{CO}_2) \times (\text{C})$$

$$d(\text{O}_2)/dt = k_{11} \times (\text{CO}_2) \times (\text{C}) + k_1((\text{DO}) - (\text{O}_2)) / (\text{DO}) - k_4 \times (\text{O}_2) \times (\text{MB}) \times (\text{C})$$

$$d(\text{C})/dt = k_5 \times (\text{O}_2) \times (\text{MB}) \times (\text{C}) + k_9 \times (\text{CO}_2) \times (\text{C}) - k_{12} \times (\text{C})$$

$$d(\text{MB})/dt = -k_3 \times (\text{O}_2) \times (\text{MB}) \times (\text{C})$$

ここで、 k_1 : 酸素の気液平衡 k_2 : 二酸化炭素の気液平衡 k_3 : バクテリアの代謝産物 k_4 : *Chlorella* が必要とする酸素 k_5 : *Chlorella* の呼吸量 k_6 : *Chlorella* の代謝産物 k_7 : *Chlorella* の呼吸量 k_8 : 光合成による二酸化炭素の吸収 (明 12 時間) k_9 : *Chlorella* の比増殖速度 k_{10} : *Chlorella* が増殖する際必要となる代謝産物 k_{11} : *Chlorella* が増殖する際必要となる二酸化炭素 k_{12} : *Chlorella* の死滅量 (現存量に比例)

数理モデルにおける想定種はマイクロコズムの構成種にも含まれている種とし、消費者として *Cyclidium*, *Philodina*、生産者として *Chlorella*、分解者として Bacteria を想定した。

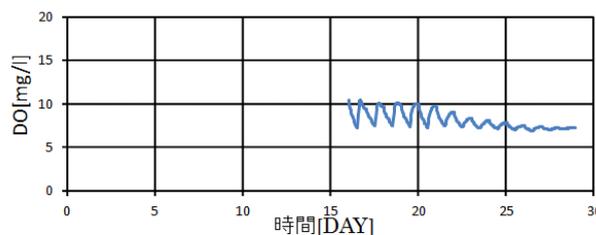
消費者 (*Cyclidium*, *Philodina*)、生産者 (*Chlorella*)、分解者 (Bacteria) の対照系の比増殖速度は既往の文献値を参考とし、それぞれ 0.003 , 0.012 , 0.686 , $2.0(\text{day}^{-1})$ とした。また、対照系の比増殖速度を 1 とし、比増殖速度係数を $1.0\sim 0.1$ の範囲で 0.1 刻みに変化させシミュレーションを行った。

Co 添加後の 14 日間を急性影響 ($0\sim 4$ 日) B_{16-20} 、亜急性影響 ($5\sim 7$ 日) B_{20-23} 、慢性影響 ($8\sim 14$ 日) B_{23-30} 、添加後 14 日間の生物現存量 B_{16-30} として評価を行った。その結果、急性影響時に生物は死滅しないが、亜急性影響時と慢性影響時には生物の死滅がみられた。また、現存量 (B_{16-30}) から、高濃度添加系で個体数が多く減少していることがわかる。一方、P/R 比をみると、 $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上の濃度で DO の振幅が減衰しており、系が崩壊しているものと考えられる。P/R 比はすべての系が 1 付近で安定していた。これらのことより、プランクトン個体数変動 (構造パラメータ) において、植物プランクトンには大きな変動がなく、動物プランクトンは Co 添加量が高濃度になるにつれて個体数が減少した。慢性影響時 Co 2ppm 以上で生物が死滅しているため、構造パラメータにおける m-NOEC (マイクロコズム最大無影響濃度) は $1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と評価された。P/R 比 (機能パラメータ) は 1 付近で安定していたため、マイクロコズム内の生態系は安定していると評価された。しかし、DO の推移から Co $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上では系が崩壊しているため、機能パラメータにおける m-NOEC は $6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と評価された。以上より、Co $1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下では無影響、2

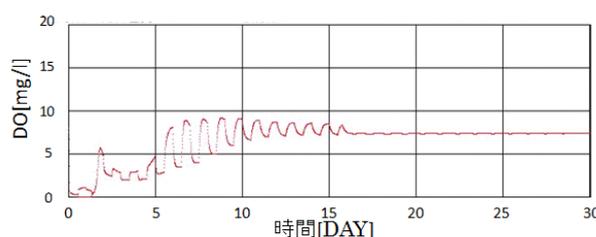
mg・L⁻¹以上 6 mg・L⁻¹以下では系の転移、8 mg・L⁻¹以下では系の転移、8 mg・L⁻¹以上では系が崩壊すると評価された。このことから、Coのm-NOECは1.5 mg・L⁻¹と評価された。

数理モデルのシミュレーション期間は30日間とし、対照系の数理モデルと培養モデルのDO値の経時変化を比較した。その結果、DO値は異なるものの経時変化におけるDOの変動は再現することができた。

培養モデルはCo 10 mg・L⁻¹を培養開始16日目に添加し、数理モデルは培養16日目以降の消費者と生産者の比増殖速度係数の条件を変えてシミュレーションを行った。図(3)-5にCo 10 mg・L⁻¹添加系の培養モデルのDO値経時変化結果、と数理モデルを比較すると、添加後20日以降のDO値の経時変化が類似していることがわかった。また、シミュレーション結果の生産者の比増殖速度が0.1倍、消費者の比増殖速度が0.1~0.3倍の時、培養モデルと類似しており、Coの影響が生じていることがわかった。また、このことより、Coの影響は生産者≧捕食者と考えられた。



図(3)-5 Co 10 mg・L⁻¹添加系の培養モデル結果



図(3)-6 Co 10 mg・L⁻¹添加系の数理モデル結果

図(3)-6に数理モデル(生産者の比増殖速度係数0.1、消費者の比増殖速度係数0.3)のDO値経時変化結果を示す。Co 10 mg・L⁻¹添加系の培養モデルと数理モデルの16日目以降のDO値の経時変化と照合し、生産者、捕食者にどの程度影響が生じているのかについて検証を行った。その結果、Co 10ppm添加系の培養モデルでは、16~20日目間はDO値の振幅に変化はなかった。しかし、20日目以降、DO値が徐々に減少し、27日目以降振幅がみられなくなった。数理モデルによるシミュレーション結果では、16日目以降直ちにDO値が減少し、28日目以降振幅がみられなくなった。

しかしながら、図5と図6を比較すると、16~20日間のDO値が同じ挙動を示しておらず、数理モデルは添加後0~4日間は培養モデルを再現できていないため、この点について今後検討が必要である。

本研究の成果をまとめると以下のように要約される。

- 1) 標準試験法としてのマイクロコズムは、完全種構成既知のGnotobiotic型が適していることが示された。
- 2) 各金属のマイクロコズム無影響濃度(m-NOEC)は、Al³⁺: 0.15mg・L⁻¹、Cu²⁺: 0.25mg・L⁻¹、Zn²⁺: 1.20mg・L⁻¹、Cd²⁺: 0.16mg・L⁻¹、Mn²⁺: 1.0mg・L⁻¹、Mg²⁺: 10mg・L⁻¹、Ca²⁺: 5.0mg・L⁻¹、Ni²⁺: ≤1.0mg・L⁻¹、Co²⁺: 1.5mg・L⁻¹と見積もられた。
- 3) Gnotobiotic型マイクロコズムにおけるP/R比からの評価と生物相からの評価は概ね一致することが示された。
- 4) 数理モデルと培養モデルはDO値において差が生じたが、経時変化における振幅は再現することができた。

- 5) Co $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ および $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加系では、生産者の比増殖速度は対照系の1~0.9倍に、消費者の比増殖速度は0.8~0.9倍になり、Coの影響は生産機能 \leq 消費機能と考えられた。
- 6) Co $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加系では、生産者の比増殖速度は対照系の0.7~0.9倍に、捕食者の比増殖速度は0.1~0.2倍になり、Coの影響は生産機能 \leq 消費機能と考えられた。
- 7) Co $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ および $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加系では、生産者の比増殖速度は対照系の0.1倍に、捕食者の比増殖速度は0.1~0.3倍になり、Coの影響は生産機能 $>$ 消費機能と考えられた。
- 6) 生産機能、消費機能を同時にかつ定量的に影響評価解析できることは、培養モデルにおけるDO測定や個体数測定では難しく、数理モデルのメリットといえるが、一方、数理モデルはCo添加濃度によって数日間、培養モデルのDO値と同じ挙動を示さなかったことから、数理モデルは添加後の数日間培養モデルを再現できず、今後検討が必要である。

以上より、 Co^{2+} 添加においては、低濃度負荷と高濃度負荷では生態系システムの生産機能と消費機能に及ぼす影響の度合い（強弱）が逆転することが示された。このように、培養モデルと数理モデルを組み合わせたハイブリッド型生態系リスク影響評価解析システムの構築のための基礎的知見を得ることができた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

金属類のリスク影響は、従来個々の生物種に対する毒性リスクなどで評価が行われてきたものの、マイクロコズムを用いた本研究では、生物の個体数変動には大きな影響がみられない場合でも、生産量/呼吸量比を測定することにより、生態系機能への影響が検出できた点で、科学的意義は大きいといえる。また、P/R比の挙動から、マイクロコズム無影響濃度（m-NOEC）を求め、既存の論文等で報告されているメソコズム実験における無影響濃度（NOEC）と比較した結果、両者の比がほぼ等しいことから、マイクロコズムでの実測最大無影響濃度（NOAEC）（マイクロコズム無影響濃度：m-NOEC）に安全係数を用いることで自然生態系での無影響濃度を予測できる可能性が示された。さらに、タイプの異なるマイクロコズムを相互に比較解析することで基礎的知見が集積され、標準試験法化の確立化がなされた。さらに、培養モデルと数理モデルを組み合わせたハイブリッド型生態系リスク影響評価解析システムの構築のための基礎的知見を得ることができた。

(2) 環境政策への貢献

本研究において、標準試験法としての整備に資する基礎的知見の集積も進行し、構成生物種の個体数に変動が現れない程度の化学物質の負荷においても、生産量/呼吸量比には大きな影響が観察されたことから、マイクロコズムを用いた生産量/呼吸量比の試験方法は、金属類だけでなく汎用化できるリスク影響評価法としての可能性を有しており、日本発の標準アセスメントツールとして、環境政策への貢献は極めて大きいといえる。

6. 国際共同研究等の状況

中国環境科学研究院との水圏生態系モデルマイクロコズム試験の国際化を図る上での意見交換

等を行い、マイクロコズム試験の重要性を明確化することができた。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 村上和仁：環境情報科学論文集、24巻、pp.399-404（2010.11.）
「マイクロコズムシステムによるP/R比からみた金属類の生態リスク評価」
- 2) Sugiura, K. : *Jpn. J. Environ. Toxicol.* **13**(1), 37-47（2010）
“Effects of Chemicals on Microcosms: Comparison with the NOECs in Experimental and Natural Ecosystems”
- 3) 村上和仁、林 秀明：環境情報科学論文集、25 巻、pp.221-226.（2011.11.）
「標準モデルとしての各種マイクロコズムにおける安定系構築可能性の比較解析」
- 4) K.Murakami, H.Hayashi, R.Shimada : *Journal of Water and Environmental Technology*,
Vol.9, No.4, pp.401-410（2011.12.）
“Microcosm for Impact Risk Assessment of Sediment Remediation Materials on Aquatic Ecosystem”

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 村上和仁、林 秀明：千葉工業大学研究報告（理工編）、No.58、pp.11-17（2011.3.）
「栄養段階の異なる有機物負荷におけるマイクロコズム構成微生物群の応答」
- 2) 村上和仁、林 秀明：千葉工業大学研究報告（理工編）、No.59、pp.27-31（2012.3.）
「各種マイクロコズムにおけるP/R比に着目した生態系機能影響評価」
- 3) K.Murakami, H.Hayashi, Y.Inamori, K.Sugiura : Proceedings of 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, CD-ROM（2011.10.）
“Impact Risk Assessment of Metal Ions using Aquatic Model Microcosm System”
- 4) H.Hayashi, R.Shimada, K.Murakami : Proceedings of 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, CD-ROM（2011.10.）
“Development of Experimental Flask-size Microcosm System for Environmental Risk Assessment”
- 5) K.Murakami : Proceedings of 4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, CD-ROM（2011.10.）
“Effect of Metal Ions on Horizontal Plasmid Transfer under Microbial Interaction”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会）

- 1) 村上和仁、稲森悠平：日本水処理生物学会第46回大会、高知（2009.11.）
「栄養段階の異なる有機物負荷に対するマイクロコズム構成微生物群の応答」
- 2) 村上和仁、林 紀男、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：第37回土木学会関東支部技術研究発表会、東京（2010.3.）

- 「マイクロコズム生態系における底質改善材 (Mg・Ca) の P/R 比による影響解析」
- 3) 村上和仁、林 紀男、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：第 44 回日本水環境学会年会、福岡 (2010. 3.)
- 「P/R 比によるマイクロコズム生態系における Mn の影響解析」
- 4) 村上和仁、杉浦 桂：環境バイオテクノロジー学会2010年度大会、仙台 (2010. 6.)
- 「マイクロコズム生態系における金属負荷の影響解析」
- 5) K. Murakami: *Water and Environmental Technology Conference 2010* (WET2010), Yokohama (2010. 6.)
- “Microcosm for Risk Assessment of Sediment Remediation Materials on Aquatic Ecosystem”
- 6) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：土木学会第65回年次学術講演会、札幌 (2010. 9.)
- 「マイクロコズムを用いた底質改善材 (Mg) の生態リスク影響解析」
- 7) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂、鹿野秀一、川端善一郎、雨宮 隆：第13回日本水環境学会シンポジウム、京都 (2010. 9.)
- 「水処理等における環境リスク評価のためのマイクロコズムを活用した解析技法」
- 8) 村上和仁、杉浦 桂：日本陸水学会第75回大会、弘前 (2010. 9.)
- 「水圏マイクロコズム生態系におけるP/R比からみた金属負荷の影響解析」
- 9) 村上和仁、林 紀男、稲森隆平、稲森悠平：第47回環境工学研究フォーラム、高知 (2010. 11.)
- 「マイクロコズムを活用したP/R比による生態リスク評価システムの開発」
- 10) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、杉浦 桂：日本水処理生物学会第47回大会、つくば (2010. 11.)
- 「マイクロコズム生態系における金属負荷に対するP/R比の応答」
- 11) 林 秀明、村上和仁：日本水処理生物学会第47回大会、つくば (2010. 11.)
- 「各種マイクロコズムにおけるP/R比に着目した生態系機能の比較評価」
- 12) 村上和仁：第24回環境研究発表会、東京 (2010. 11.)
- 「マイクロコズムシステムによるP/R比からみた金属類の生態リスク評価」
- 13) 村上和仁：第7回環境情報科学ポスターセッション、東京 (2010. 11.)
- 「モデルエコシステムを用いた外来種生物の環境影響評価」
- 14) 村上和仁、林 秀明：第26回日本微生物生態学会大会、つくば (2010. 11.)
- 「生態系機能を有する標準培養モデルシステムの検討」
- 15) 村上和仁：第13回千葉県環境教育研究会発表会、千葉 (2011. 1.)
- 「環境教育ツールとしてのマイクロコズムの活用—フラスコから地球環境問題を考える」
- 16) 村上和仁、稲森悠平、杉浦 桂：第38回土木学会関東支部技術研究発表会、東京 (2011. 3.)
- 「マイクロコズムにおける金属負荷の生態系機能・構造に及ぼすリスク評価」
- 17) 林 秀明、村上和仁：第38回土木学会関東支部技術研究発表会、東京 (2011. 3.)
- 「各種マイクロコズムにおけるP/R 比に着目した生態系機能の比較評価」
- 18) 島田諒司、村上和仁：第38回土木学会関東支部技術研究発表会、東京 (2011. 3.)
- 「マイクロコズムによる金属負荷の環境影響評価」
- 19) 村上和仁、林 秀明、島田諒司、稲森悠平、杉浦 桂：第45回日本水環境学会年会、札幌 (2011. 3.)
- 「異なるタイプのマイクロコズムにおける金属負荷影響の比較」
- 20) 村上和仁、林 秀明：環境バイオテクノロジー学会2011年度大会、東京 (2011. 6.)

- 「各種マイクロコズムにおける安定系構築の比較解析」
- 21) 村上和仁、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：土木学会第66回年次学術講演会、松山（2011.9.）
「マイクロコズムによるNiの生態系リスク評価」
- 22) 林 秀明、村上和仁：土木学会第66回年次学術講演会、松山（2011.9.）
「P/R比および生物相に着目した各種マイクロコズムの生態系機能特性」
- 23) 村上和仁、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：第14回日本水環境学会シンポジウム、仙台（2011.9.）
「マイクロコズムによる生活関連化学物質（特に金属類）の環境影響評価」
- 24) 村上和仁、林 秀明、小浜暁子：日本陸水学会第76回大会、松江（2011.9.）
「P/R比からみたマイクロコズムと実湖沼の相似性解析」
- 25) K. Murakami, H. Hayashi, Y. Inamori, K. Sugiura：4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Tokyo(Japan)（2011.10.）
“Impact Risk Assessment of Metal Ions using Aquatic Model Microcosm System”
- 26) H. Hayashi, R. Shimada, K. Murakami：4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Tokyo(Japan)（2011.10.）
“Development of Experimental Flask-size Microcosm System for Environmental Risk Assessment”
- 27) K. Murakami：4th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, Tokyo(Japan)（2011.10.）
“Effect of Metal Ions on Horizontal Plasmid Transfer under Microbial Interaction”
- 28) 村上和仁、小浜暁子：第27回日本微生物生態学会大会、京都（2011.10.）
「多段階食物連鎖系における遺伝子組換え細菌の消長解析」
- 29) 村上和仁、箕浦英樹、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂：日本水処理生物学会第48回大会、草津（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズムによるコバルトの生態系リスク評価」
- 30) 林 秀明、村上和仁：日本水処理生物学会第48回大会、草津（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズムにおけるバイオマニピュレーションの影響解析」
- 31) 三浦あかね、林 秀明、村上和仁、杉浦 桂、稲森悠平：日本水処理生物学会第48回大会、草津（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズム検証のための数理モデルの構築」
- 32) 村上和仁、林 秀明、島田諒司、杉浦 桂、稲森悠平：第48回環境工学研究フォーラム、名古屋（2011.11.）
「各種水系マイクロコズムによるニッケルの生態リスク評価」
- 33) 林 秀明、村上和仁：第48回環境工学研究フォーラム、名古屋（2011.11.）
「水圏モデル生態系マイクロコズムを用いた外来生物の生態系機能に及ぼす影響評価」
- 34) 村上和仁、林 秀明：第25回環境研究発表会、東京（2011.11.）
「標準モデルとしての各種マイクロコズムにおける安定系構築可能性の比較解析」
- 35) 林 秀明、村上和仁：第8回環境情報科学ポスターセッション、東京（2011.11.）
「バイオマニピュレーションのためのマイクロコズムによる導入生物の影響解析」
- 36) 村上和仁：第8回環境情報科学ポスターセッション、東京（2011.11.）
「数理モデルによる水圏モデル生態系マイクロコズムの検証」

- 37) 村上和仁、林 秀明、吾妻咲季 :第39回土木学会関東支部技術研究発表会、金沢八景 (2012. 3.)
「生態系機能 (P/R比) からみたマイクロコズムと実湖沼の相似性解析」
- 38) 林 秀明、村上和仁 :第39回土木学会関東支部技術研究発表会、金沢八景 (2012. 3.)
「水圏生態系マイクロコズムにおける食物連鎖上位種導入の生態系機能に及ぼす影響」
- 39) 三浦あかね、林 秀明、村上和仁、杉浦 桂、稲森悠平 :第39回土木学会関東支部技術研究発表会、金沢八景 (2012. 3.)
「水圏モデル生態系マイクロコズムによる数理モデルと培養モデルの比較検証」
- 40) 箕浦英樹、林 秀明、村上和仁、杉浦 桂、稲森悠平 :第39回土木学会関東支部技術研究発表会、金沢八景 (2012. 3.)
「マイクロコズムによるコバルトの生態系影響評価」
- 41) 林 秀明、村上和仁 :第46回日本水環境学会年会、東京 (2012. 3.)
「マイクロコズムを用いた食物連鎖上位種の導入によるバイオマニピュレーションの影響解析」
- 42) 林 秀明、村上和仁 :第63回全国水道研究発表会、松江 (2012. 5.)
「モデル生態系による移入生物種の影響シミュレーション」
- 43) 村上和仁、林 秀明、稲森悠平、杉浦 桂 :第63回全国水道研究発表会、松江 (2012. 5.)
「マイクロコズムを活用した培養モデルと数理モデルによる金属類の生態系リスク評価」
- 44) H. Hayashi, K. Murakami : Water and Environmental Technology Conference 2012 (WET2012), Tokyo (2012. 6.)
“Biomaniipulation Impact Analysis using Microcosm System for Top Predator Introduction”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

・林 秀明、村上和仁「各種マイクロコズムにおけるP/R 比に着目した生態系機能の比較評価 (第38回土木学会関東支部技術研究発表会、2011. 3.)」が第37回関東支部技術研究発表会優秀発表を受賞。

8. 引用文献

- 1) Beyers, R. J., Odum, H. T. : Ecological Microcosm, Springer-Verlag New York Inc, 1993.
- 2) 西条八束、坂本 充 : メソコズム 湖沼生態系の解析、名古屋大学出版会、1993.
- 3) 栗原 康 : 生態システムと人間、東北大学出版会、2008.

S2-09 マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

(4) マイクロコズムを用いた農薬・有機物負荷等の生態系に及ぼす解析評価

東北大学

東北アジア研究センター・基礎研究部門・地域生態系研究分野

鹿野秀一

平成21～23年度累計予算額：10,979千円（うち、平成23年度予算額：3,215千円）
予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 農薬・有機物負荷等の生態系に及ぼす影響を評価するために、生産者、消費者、分解者からなる水界マイクロコズムへ除草剤シマジンとベンチオカーブ、殺虫剤フェニトロチオンを負荷し、生物個体群の変化だけでなく、生体機能の指標である生産量と呼吸量への影響を解析した。水に不溶性の除草剤や殺虫剤の負荷のためには、メタノールやアセトンに有機溶媒に溶かして負荷する必要があるため、溶媒の添加有無の影響についても検討した。メタノール添加やアセトン添加ではマイクロコズムの生物個体数に影響は与えないが、これらの添加によって生産量と呼吸量が有意に増加することが明らかになった。ベンチオカーブやフェニトロチオンの負荷では、生物個体数が減少し、一部の動物が消失する負荷濃度においても、溶媒のみを添加した対照区と比べ生産量や呼吸量は有意に変化しなかった。一方、シマジン負荷では、生物個体数に影響が見られない負荷濃度においても、生産量(P)や生産量/呼吸量(R)比(P/R比)が溶媒のみを添加した対照区と比べて有意に減少する影響がみられた。このように、農薬負荷による生物個体群への影響だけでなく、生態系の生産量や呼吸量への影響を見る必要が示された。また、生産性についての影響は、農薬自体だけでなくそれを溶かす有機溶媒についても考慮しなければならないことも示された。

【キーワード】 除草剤、殺虫剤、生産量、呼吸量、水界生態系

1. はじめに

殺虫剤や除草剤などの農薬は田畑や森林、草原などの野外において直接使用されている化学物質であるため、散布された農薬はその集水域の水界生態系へ蓄積されてゆくと考えられる。農薬等の水界生態系への影響やその評価をするためには、従来は個々の単独生物種に対する半数致死濃度(LC₅₀)や無影響濃度NOEC(no observed effect concentration)などの毒性リスクが取り上げられてきた。しかし、生態系は生物種間や環境との間で相互作用を有しているため、生態系システムとしてのリスク評価をする必要がある。そのためには、生産者、消費者、分解者からなるモデル微生物生態システムであるマイクロコズムは、農薬等のリスク影響評価において有用なツールとなりえる。本研究では、マイクロコズムを用いて除草剤や殺虫剤の農薬に対する構成生物の個体数変化だけでなく、生態系の重要な指標である生産量や呼吸量への影響も評価対象として検討を行った。

本研究では、除草剤としてシマジンとベンチオカーブを、殺虫剤としてフェニトロチオンを用いた。シマジンは、トリアジン系の除草剤で、畑や果樹園だけでなく芝生等の除草にも用いられ、光合成阻害による除草機構を持ち、安定していて、分解が遅く、ニジマスやブルーギルの半数致死濃度 (LC₅₀) は、それぞれ2.8 mg・L⁻¹と16.0 mg・L⁻¹である。ベンチオカーブは、別名チオベンカーブとも呼ばれ、オーキシシン活性阻害剤やタンパク質合成阻害剤で、ミジンコの半数致死濃度 (LC₅₀) 0.75 mg・L⁻¹や藻類 *Selenasturm* による増殖半阻害濃度 (EC₅₀) 0.017 mg・L⁻¹などの毒性が報告されている¹⁾。フェニトロチオンは、商品名スミチオンとして知られている有機リン系殺虫剤で、農業や林業の害虫駆除だけでなく、ハエやカなどの駆除などにもちられている。フェニトロチオンは、甲殻類を中心に水生生物に強い毒性を示すが、光分解やアルカリによる加水分解で分解し、また微生物相によって分解が促進されることが知られている²⁾。フェニトロチオンの水生生物への毒性は、種によって大きく異なり、藻類やワムシの無影響濃度が 1.0 mg・L⁻¹であるのに対して、甲殻類のミジンコ (*Daphnia magna*) のNOECや半数致死濃度は、それぞれ 0.009 μg・L⁻¹ と 0.067 μg・L⁻¹ と藻類やワムシの約10,000分の1の濃度である³⁾

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、農薬の水界生態系へ及ぼすリスク影響評価のために、マイクロコズムを用いて、除草剤シマジンとベンチオカーブ、殺虫剤フェニトロチオンが構成生物種の個体数に対する影響だけでなく、生態系機能の重要指標であるマイクロコズムの生産量や呼吸量におよぼす影響を統計的に検討することを目的とした。

3. 研究開発方法

(1) マイクロコズムと農薬負荷

生態系リスク影響評価のモデルシステムとして用いたマイクロコズムは、生産者として *Chlorella* sp. (緑藻)、*Scenedesmus* spp. (緑藻)、*Tolypothrix* sp. (糸状ラン藻) の3種類、消費者として *Cyclidium glaucoma* (原生動物)、*Philodina* sp. (ワムシ)、*Lecana* sp. (ワムシ)、*Aeolosoma hemprichi* (環形動物) の4種、分解者としての細菌群集から構成されている。マイクロコズムの培養は、Taubの無機塩類溶液#36⁴⁾からNaNO₃を除いた溶液に、ポリペプトン (日本製薬株式会社製) を100 mg・L⁻¹になるように加えた溶液を用い、25℃、12時間暗条件-12時間明条件 (2400 lux) で行った。

除草剤の負荷実験は、シマジンとベンチオカーブ (ともに和光純薬、農薬標準品) を用いた。シマジンはメタノール300 (残留農薬試験用) で希釈して、培養液への負荷後にメタノール濃度が0.32%になるように調整した。シマジンの負荷濃度は、0.08, 0.16, 0.32と0.64 mg・L⁻¹ の4段階とした。ベンチオカーブもメタノール300 (残留農薬試験用) で希釈して、メタノール濃度が0.32%になるように調整した。ベンチオカーブの負荷濃度は、1.0, 2.0, 4.0と8.0 mg・L⁻¹ の4段階とした。シマジンとベンチオカーブの負荷は、それぞれマイクロコズムの培養16日目に行った。対照区として、メタノール300のみを加えたマイクロコズムと、メタノールの影響をみるためにメタノール無添加のマイクロコズムも作成した。

殺虫剤の負荷実験は、フェニトロチオン (和光純薬、農薬標準品) を用いた。フェニトロチオンはアセトンで希釈して、培養液への負荷後にアセトン濃度が 0.05%になるように調整した。

フェニトロチオンの負荷濃度は、0.01, 0.10, 1.00 と 10.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の4段階とした。フェニトロチオン負荷は、マイクロコズムの培養16日目に行った。対照区として、アセトンのみを加えたマイクロコズムと、アセトンの影響をみるためにアセトン無添加の対照区も作成した。

マイクロコズムの構成生物の密度は、光学顕微鏡を用いて計数した。また、ラン藻は、糸状の長さ ($\text{cm} \cdot \text{mL}^{-1}$) を測定した。細菌数は、PY培地を用いて、希釈平板法で生菌数を計測した。

(2) 溶存酸素濃度の測定

溶存酸素濃度は、DOメーター (YSI社製58型) で測定し、ロガー (AM-8000) で記録した。DOメーターの電極の先にキャップ (2箇所穴が空いて、培養液が循環できる) と攪拌子を設置して、培養液約200 mlが入った300 mlの三角フラスコに挿入して、三角フラスコをスターラに載せて、電極の先にある攪拌子を回転させ、培養液が循環するようにしてマイクロコズム内の酸素濃度を測定した。マイクロコズムを培養している三角フラスコの培養液と気相との間の酸素の拡散速度を測定するために、窒素ガスで酸素を追い出した蒸留水約200 mlが入った300 mlの三角フラスコと酸素ガスを吹き込んだ同様の三角フラスコに、DO電極を挿入して、溶存酸素濃度が低濃度からと過飽和状態から飽和状態に復帰する過程を測定した。

4. 結果および考察

(1) 農薬負荷に対する個体数変化

シマジン負荷後のマイクロコズムにおける各構成生物の個体数変化を図(4)-1に示す。対照区として、シマジンの溶媒として用いたメタノールを添加しなかったマイクロコズム (図(4)-1. A) とメタノール添加マイクロコズム (図(4)-1. B) の2つを比較すると、メタノール自体の個体数への影響はなかった。これらの対照区と比較して、シマジンを 0.16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、0.32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、および 0.64 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (それぞれ図(4)-1. の C, D, および E) 負荷したマイクロコズムも、負荷後2日目の 0.64 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 負荷マイクロコズムにおける細菌数の減少を除いては、各生物の個体数変化に大きな影響は見られなかった。

図(4)-2に、ベンチオカーブ負荷後のマイクロコズムの各構成生物の個体数変化を示す。ベンチオカーブ負荷についての実験では、対照区とメタノール添加対照区の間で個体数への影響は見られなかった。これらの対照区と比較して、ベンチオカーブを 1.0 ~ 4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C, D, E) 負荷したマイクロコズムも、各生物の個体数変化に大きな影響はなかったが、ベンチオカーブ負荷量が 8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (F) では、水生ミミズ *Aeolosoma hemprichii* とワムシ *Philodina sp.* が消失した。

フェニトロチオン負荷後のマイクロコズムの各構成生物の個体数変化を図(4)-3に示す。対照区としてのフェニトロチオンの溶媒として用いたアセトンを添加しなかったマイクロコズム (図(4)-3, A) とアセトン添加マイクロコズム (図(4)-3, B) の2つを比較すると、アセトン自体の個体数への影響はなかった。これらの対照区と比較して、フェニトロチオンを 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 負荷したマイクロコズムも、各生物の個体数変化に大きな影響はなかったが、フェニトロチオン負荷量が 0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ や 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と増えるにつれて水生ミミズ *Aeolosoma hemprichii* の個体数が減少した。しかし、これらのフェニトロチオンの負荷量では、水生ミミズ以外の生物個体数への影響はみられなかった。一方フェニトロチオン負荷量が 10.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の場合、水生ミミズ *Aeolosoma hemprichii*、ワムシ *Philodina sp.* と *Lecana sp.* はいずれも消失し、原生動物 *Cyclidium*

glaucoma も個体数がいったん大きく減少し、その後回復した。このように水生動物に大きな影響がみられた。これに対して、緑藻 (*Chlorella* sp と *Scenedesmus* spp.) や糸状ラン藻 *Tolypothrix* sp. は、 $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ のフェニトロチオン負荷まで個体数への影響は見られなかった。

(2) マイクロコズムの生産量と呼吸量の測定方法開発

溶存酸素濃度変化から生産量と呼吸量を求めるには、培養液中の酸素濃度変化だけでなく、培養液と気相との間の酸素の拡散速度を考慮する必要がある。酸素濃度が低い状況から平衡状態と高酸素濃度から平衡状態への溶存酸素濃度の変化を調べ、各溶存酸素濃度における1時間の溶存酸素濃度変化率を差分として求め、溶存酸素濃度に対してプロットしたグラフの回帰直線から、

$$(\text{拡散速度}) = -0.1243 \times (\text{溶存酸素濃度}) + 1.0293 \quad \text{式(1)}$$

が得られ、この式を用いて補正した。

マイクロコズム内の溶存酸素濃度の1時間毎の変化速度と式(1)の拡散速度からマイクロコズム1日当たりの生産量(P)と呼吸量(R)を求めた。

(3) 農薬負荷によるマイクロコズムの生産量と呼吸量の変化

図(4)-4に、シマジン負荷実験のマイクロコズムの呼吸量(R)横軸に、生産量(P)を縦軸にプロットした図を示す。この図では、プロット中の●(横に数字の”0”で示す)は、シマジン負荷前の培養15日目の生産量と呼吸量を示し、その後1日毎の生産量と呼吸量のプロットを○で繋げ、負荷後14日(一部11日)まで示している。なお、図(4)-4のプロットでは、3回の繰り返し実験例を、それぞれ黒○、赤○、青○で表示した。図(4)-4(A)の対照区(メタノール無添加)では呼吸量も生産量もあまり変化が見られなかったが、メタノールのみを添加した対照区(図(4)-4(B))では、呼吸量も生産量も増加したため、プロットは添加後右上に移行した。低負荷のシマジン負荷区では(図(4)-4(C)-(D))、メタノール添加対照区と同様の変化が見られたが、負荷量が増加するにしたがって(図(4)-4(E)-(F))、生産量の減少が見られた(統計処理については後述する)。

生産量と呼吸量のP/R比を図(4)-5.に示すと、メタノール無添加対照区やメタノール添加対照区では、 $P/R=1.6\sim 1.8$ の値で変化がなかったが、 $0.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ のシマジン負荷区ではP/R比が負荷後減少して、 $P/R=0.8$ 下がった。

図(4)-6に、ベンチオカーブ負荷後の呼吸量と生産量のプロットを示す。ベンチオカーブもシマジンと同様にメタノールを溶媒としてマイクロコズムに負荷しているため、メタノール無添加とメタノール添加の対照区の呼吸量と生産量も測定した。メタノール添加によって呼吸量と生産量がともに増加したが、ベンチオカーブ負荷の場合も溶媒で用いたメタノール添加の影響が見られなかっただけでなく、ベンチオカーブ 8.0 mg/L の高負荷においてもメタノール添加対照区と差はみられなかった。P/R比もベンチオカーブの負荷によって変化がなかった(図(4)-7)。

フェニトロチオン負荷後の呼吸量と生産量の変化を図(4)-8に示す。フェニトロチオン負荷実験では、溶媒としてアセトンを用いたため、アセトン無添加の対照区(図(4)-8(A))とアセトン添加対照区(図(4)-8(B))における呼吸量と生産量の変化も測定した。アセトンの添加によってもアセトン無添加区と比べて呼吸量と生産量が増加した。アセトンに溶解したフェニトロチオンを $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ から $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の範囲で負荷した場合も、アセトン添加の対照区との違いはみられなかった。P/R比もフェニトロチオンの負荷によって変化がなかった(図(4)-9)。

(4) メタノール、アセトン添加による生産量と呼吸量への影響についての統計検定

対照区と同時に測定したメタノール添加区またはアセトン添加区の呼吸量と生産量の測定数が統計処理可能な3回以上ある場合について、それぞれの変化を図(4)-10と図(4)-11に示し、それぞれの測定日の対照区と溶媒添加区の間で、呼吸量と生産量に差があるか分散分析を行った。

メタノール添加区では、対照区と比べ添加後6日目から生産量が、添加後3日後から呼吸量がそれぞれ有意に増加し、測定14日目まで続いた。また、アセトン添加の場合も、生産量では添加後7日目から9日目まで、呼吸量では添加後9日目に対照区より有意に高い値を示した。このように、農薬は水への溶解度が非常に低いために、メタノールやアセトンなどの有機溶媒に溶解する必要があるが、それ有機溶媒自体が生産量や呼吸量の増大を引き起こすことが明らかになった。

(5) 農薬負荷の生産量や呼吸量への影響についての統計検定

前項で示したように、メタノール添加によって生産量と呼吸量にそれぞれ有意に増加が見られた。そのため、シマジンとベンチオカーブの生産量と呼吸量への影響評価を行うには、添加したメタノールの影響を考慮する必要があるため、各農薬の負荷区とメタノール添加の対照区との間でTukeyの多重比較を行った。

シマジン負荷後の呼吸量と生産量の多重比較（0.08 mg・L⁻¹の負荷区は繰り返し実験例が2例のため除外した）では、メタノール添加区と0.64 mg/Lのシマジン負荷区の間では負荷後4日目から、また0.16 mg・L⁻¹の低負荷区と0.64 mg/Lの高負荷区の間では負荷後1日目から、生産量の有意な減少が見られた（表(4)-1）。この場合、呼吸量については有意差が見られなかったが、負荷量が高い場合にP/R比も有意に低下した（表(4)-2）。

表(4)-1 シマジン負荷後の生産量Pのマイクロコズム間のTukey多重比較

有意差のある組み合わせを示す。

Days after loading	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
メタノール添加区 vs. 0.64 mg・L ⁻¹	-	-	-	-	*	*	**	**	**	**	*
0.16 mg/L vs. 0.64 mg・L ⁻¹	-	*	*	*	*	*	**	**	**	*	*

p ; - : >0.05, * : <0.05, ** : < 0.01

表(4)-2 シマジン負荷後のP/R比のマイクロコズム間のTukey多重比較

有意差のある組み合わせを示す。

Days after loading	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
メタノール添加区 vs. 0.64 mg・L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	*	*	***	**
0.16 mg/L vs. 0.64 mg・L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	*	**	**
メタノール添加区 vs. 0.32 mg・L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-

p ; - : >0.05, * : <0.05, ** : < 0.01

一方、ベンチオカーブ負荷後の各測定日における生産量と呼吸量は、それぞれのメタノール添加区のそれらと比べて、分散分析による統計的な有意差は見られなかった。P/R比についても、メタノール添加区とベンチオカーブ負荷区との間で有意な差はみられなかった。

フェニトロチオン負荷の影響についても、アセトン添加区と各フェニトロチオン負荷区の間で、分散分析を行ったが、負荷後の各測地日における生産量と呼吸量、P/R比に有意な差は見られなかった。

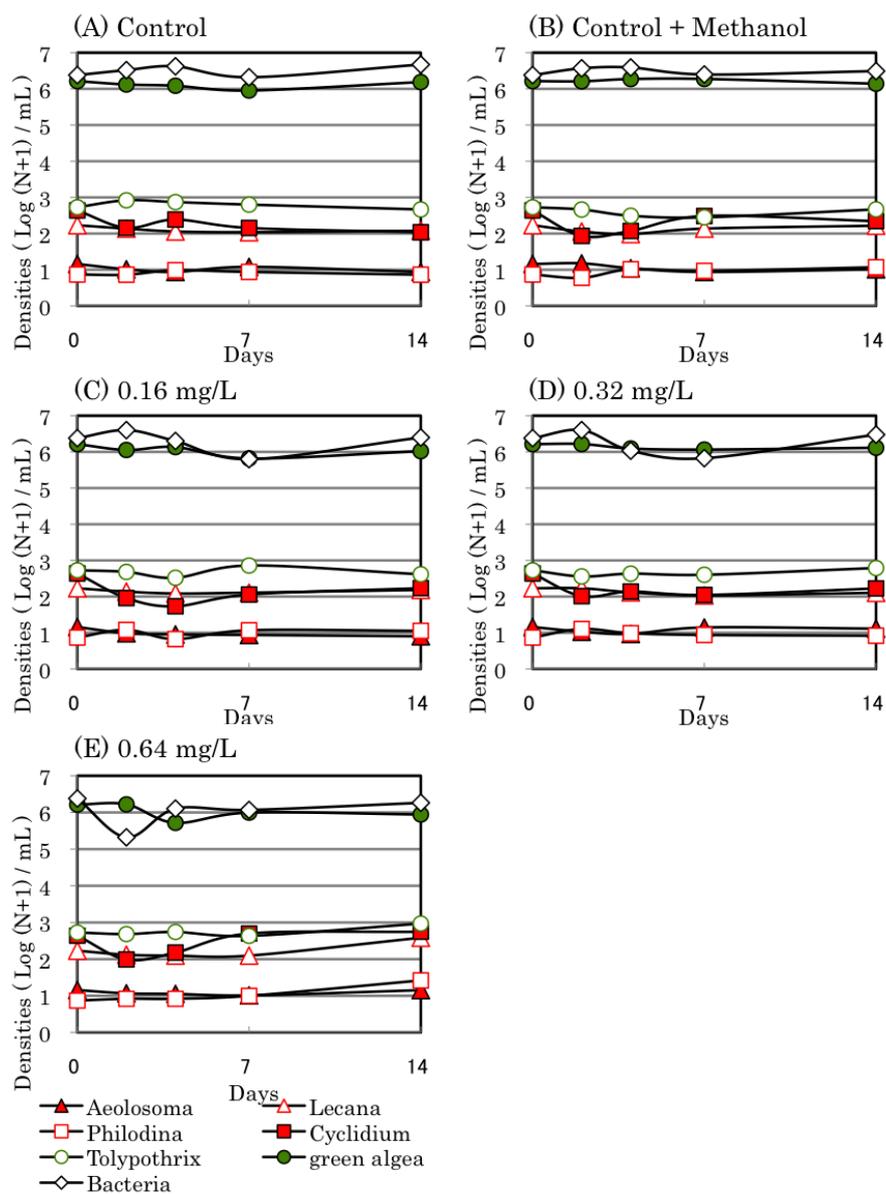
(6) 農薬の個体数と生産量・呼吸量に与える影響の比較

ベンチオカーブの生物への毒性として、コイとミジンコの半数致死濃度はそれぞれ $3.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であることが報告されているが、マイクロコズムの群集内の動物の致死濃度は $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ とほぼ同レベルであった。しかしながら、ベンチオカーブは動物の個体数が消滅したりする負荷濃度において、生産量と呼吸量ではベンチオカーブ自体の影響が見られなかった。

また、フェニトロチオンの無影響濃度は、生物種によって大きな幅があり、ミジンコ (*Daphnia magna*) では $0.009 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ と非常に微量で影響が現れるのに対して、藻類やワムシでは $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度である³⁾。マイクロコズムの構成動物に対しても、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ から水生ミミズ個体数の減少がみられ、 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ で水生ミミズ、ワムシ2種が消失したので、比較的耐性が強い水生動物と同程度の影響がみられたといえる。しかし、マイクロコズムの構成動物が死滅する負荷濃度においても、フェニトロチオン自体による呼吸量や生産量への影響は見られなかった。

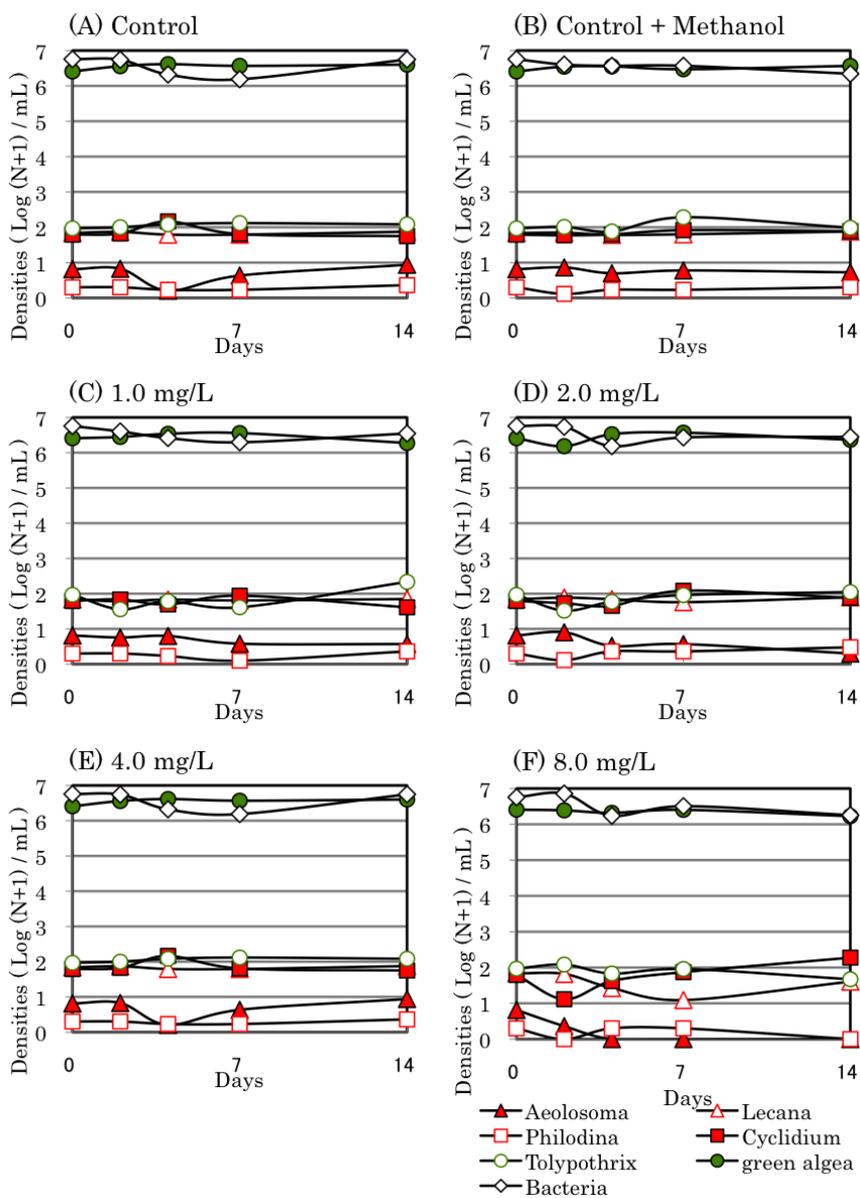
しかし、ベンチオカーブやフェニトロチオンを溶かすために用いたメタノールやアセトンは、構成生物の個体数には影響がなかったにもかかわらず、マイクロコズムの呼吸量や生産量へ有意に影響を与えたことから、これらの溶媒は長期的には生態系の生産構造を変化させることが示唆された。

一方、シマジンの毒性は、今回マイクロコズムに負荷した濃度範囲では、構成生物への個体数へ影響がみられなかった。このように生物の個体数に全く影響がないシマジン負荷濃度においても、シマジン自体によって生産量が有意に低下したため、P/R比も減少する影響が見られた。このように農薬の種類による生態系への影響の違いは、農薬の種類によって異なる応答を示すことから、農薬の生態系リスク影響評価を行う場合、生態系内の生物個体数変化のみを調査するのではなく、機能としての生産量と呼吸量の測定をあわせて行う必要があるといえる。



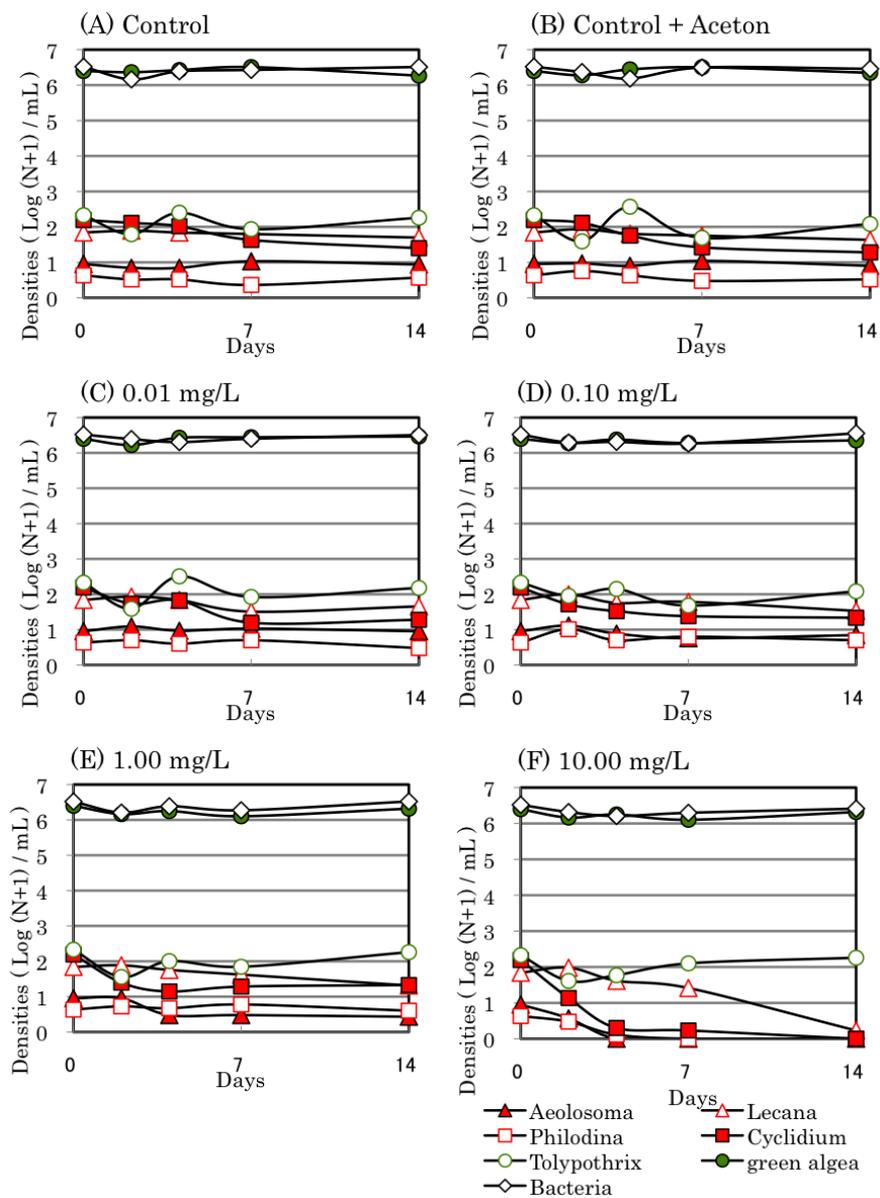
図(4)-1. シマジン負荷後のマイクロゾム構成生物の個体数変化

A: 対照区 (メタノール無添加)、B: 対照区 (メタノール添加) C: シマジン $0.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、D: シマジン $0.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、E: シマジン $0.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$



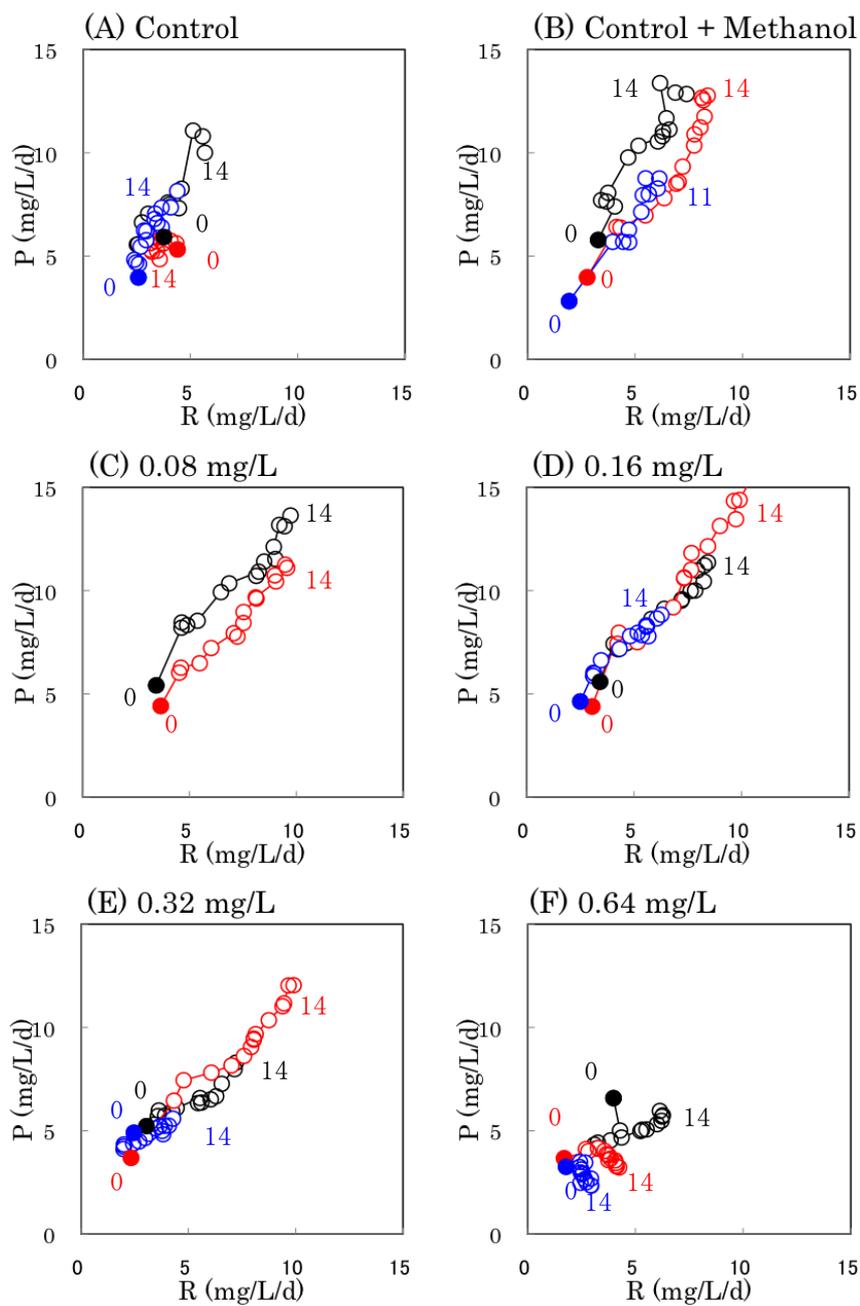
図(4)-2. ベンチオカーブ負荷後のマイクロゾム構成生物の個体数変化

A: 対照区 (メタノール無添加)、B: 対照区 (メタノール添加) C: ベンチオカーブ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、D: ベンチオカーブ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、E: ベンチオカーブ $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、F: ベンチオカーブ $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

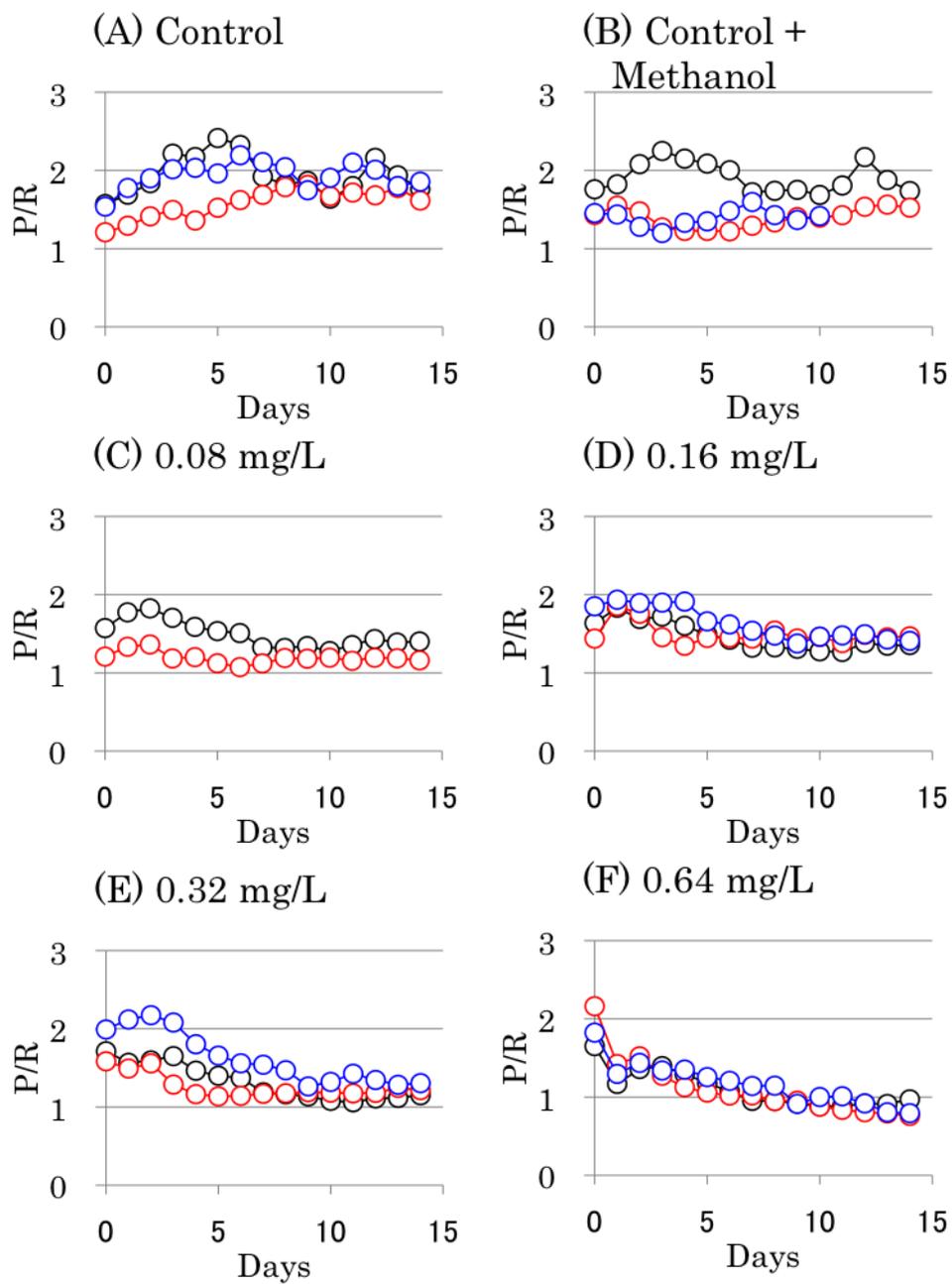


図(4)-3. フェニトロチオン負荷後のマイクロゾム構成生物の個体数変化

A: 対照区 (アセトン無添加)、B: 対照区 (アセトン添加) C: フェニトロチオン $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、D: フェニトロチオン $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、E: フェニトロチオン $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、F: フェニトロチオン $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

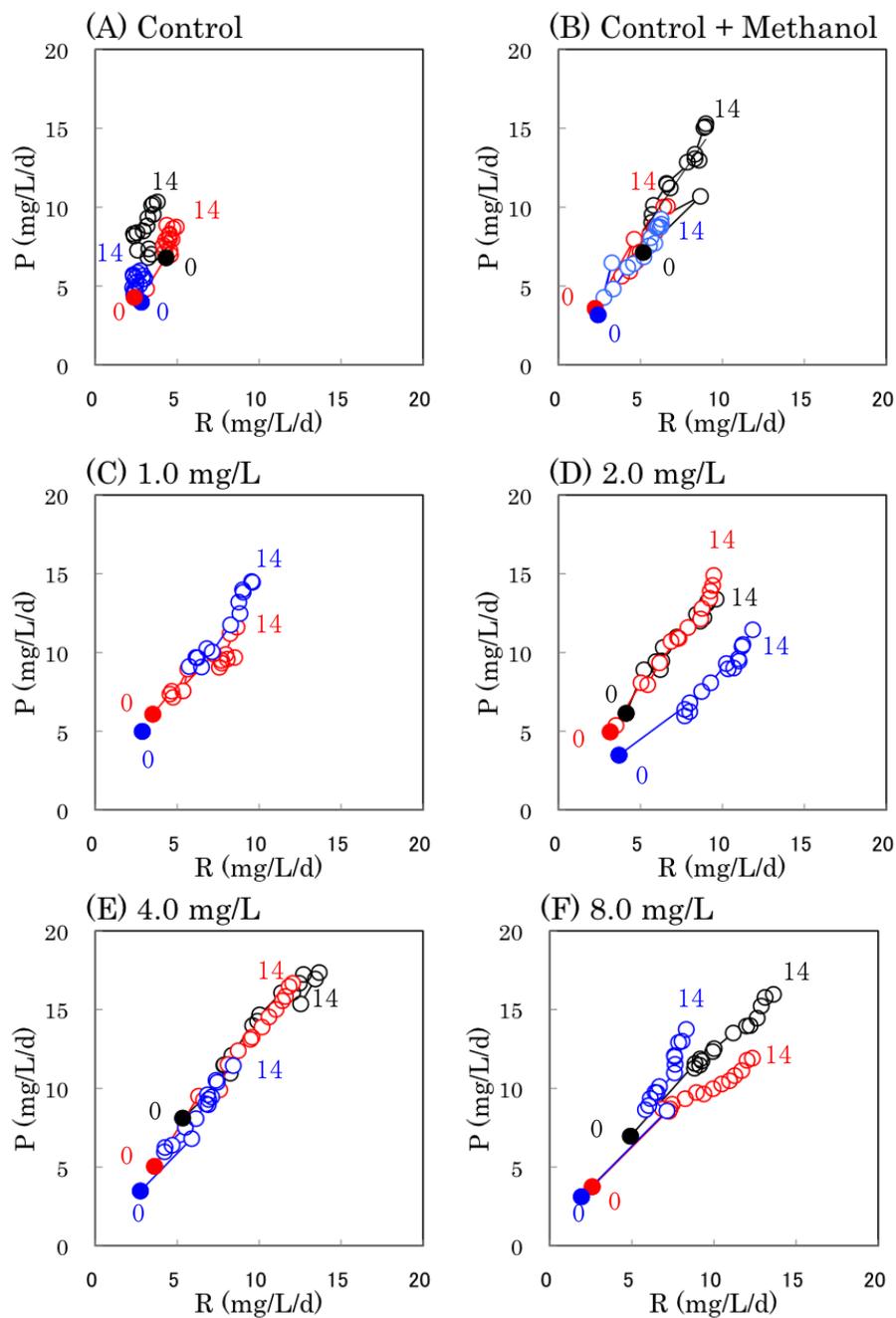


図(4)-4. シマジン負荷後の生産量 P と呼吸量 R の変化 負荷前(培養15日)のプロットを●で示し、3回負荷実験の測定をそれぞれ黒、赤、青色の○で示す。

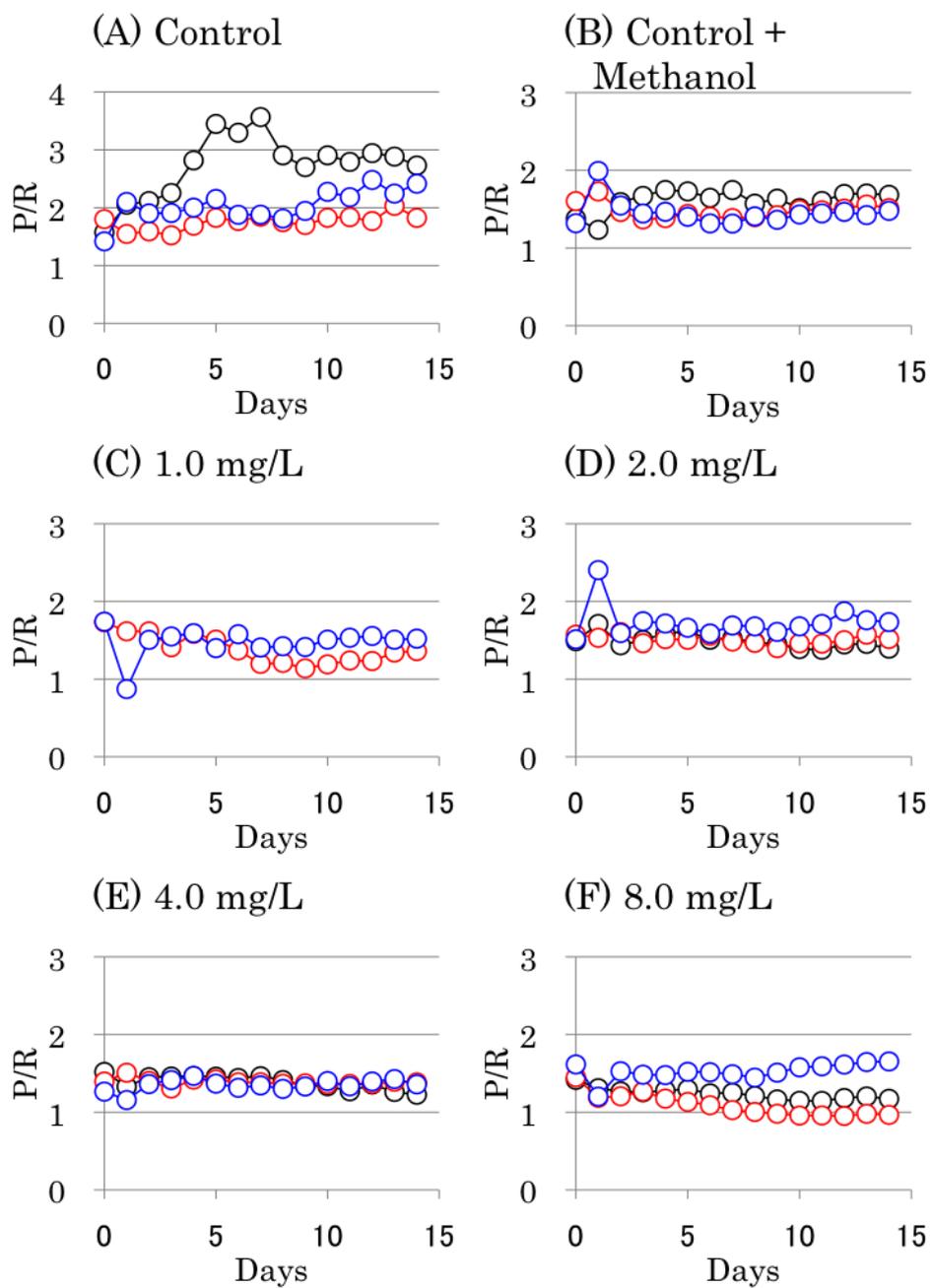


図(4)-5. シマジン負荷後のP/R比の変化

3回負荷実験のP/R比の変化をそれぞれ黒、赤、青色の○で示す。

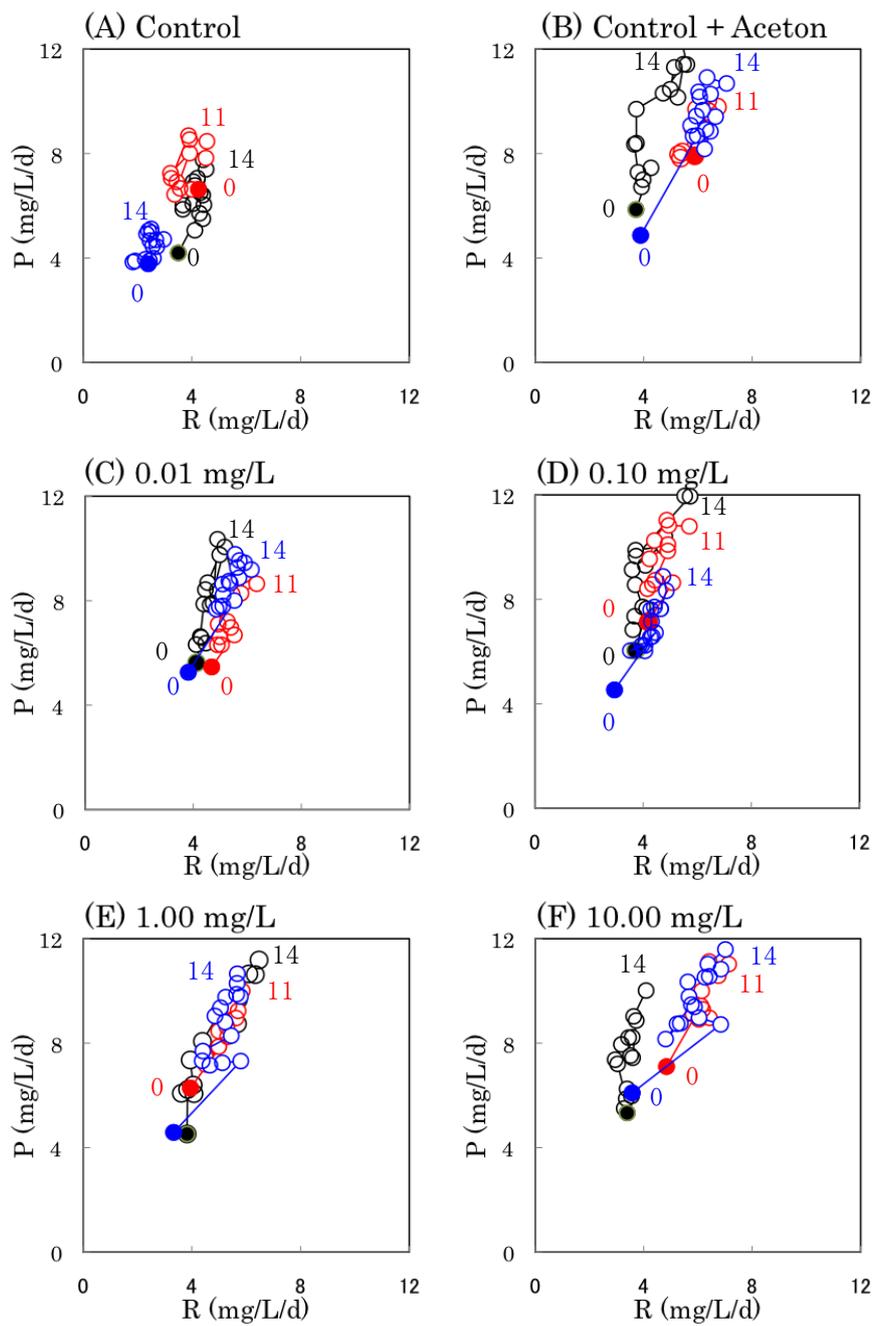


図(4)-6. ベンチオカーブ負荷後の生産量 P と呼吸量 R の変化 負荷前(培養15日)のプロットを●で示し、3回負荷実験の測定をそれぞれ黒、赤、青色の○で示す。

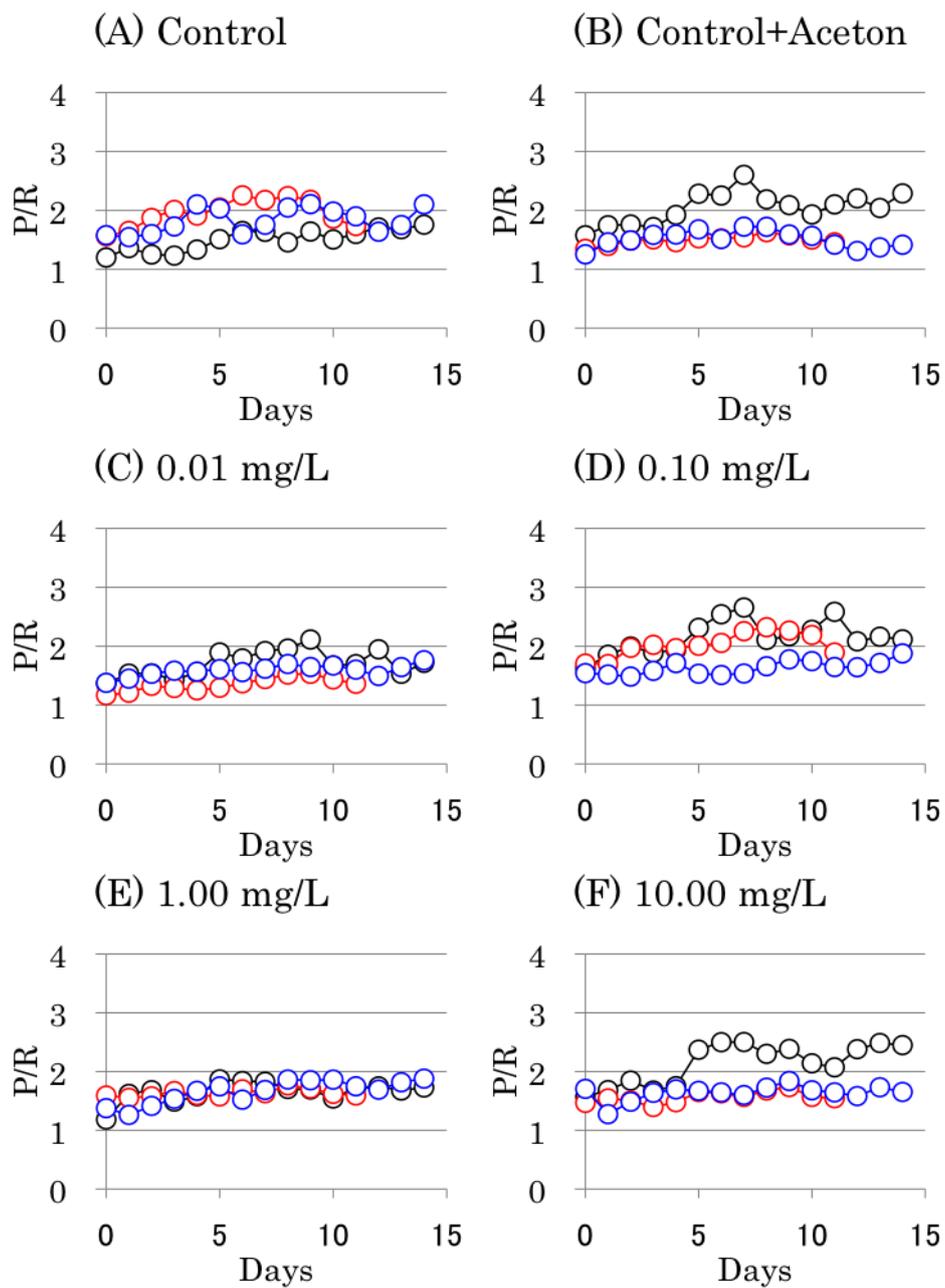


図(4)-7. ベンチオカーブ負荷後のP/R比の変化

3回負荷実験のP/R比の変化をそれぞれ黒、赤、青色の○で示す。

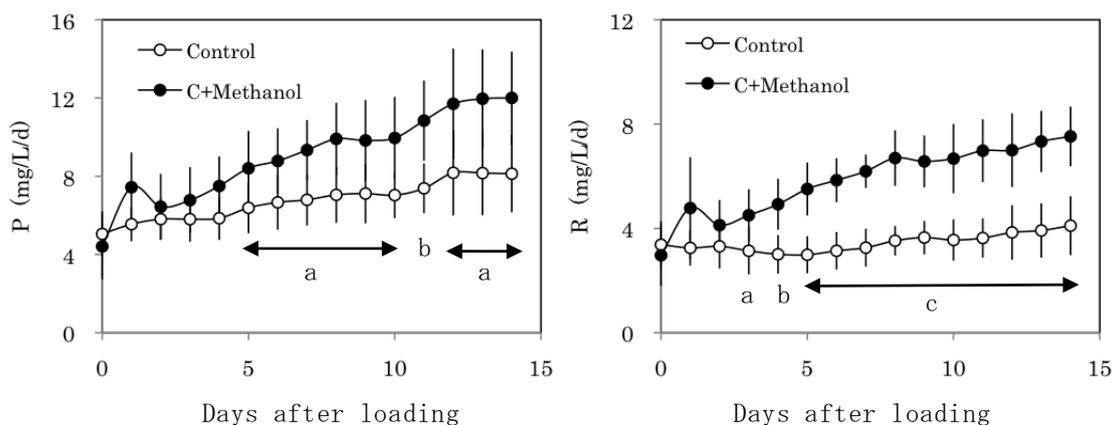


図(4)-8. フェニトロチオン負荷後の生産量Pと呼吸量Rの変化 負荷前（培養15日）のプロットを●で示し、3回負荷実験の測定をそれぞれ黒、赤、青色の○で示す。



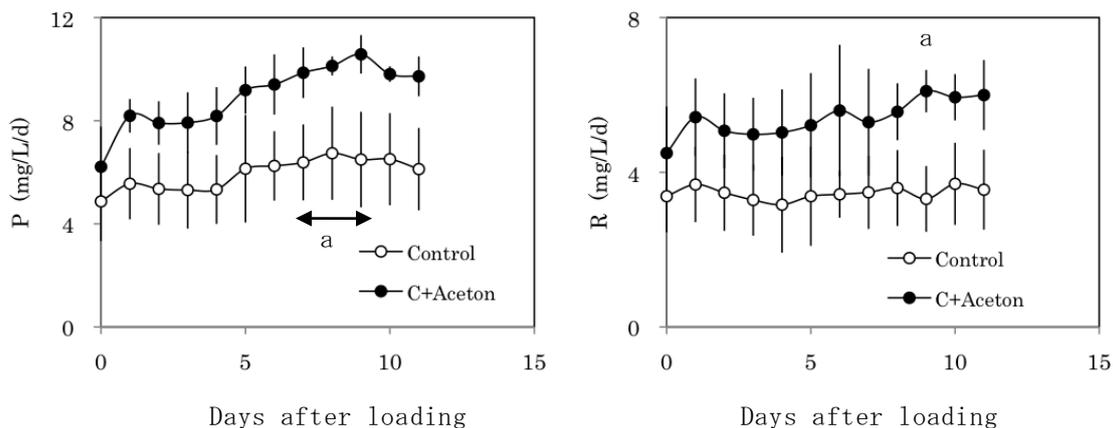
図(4)-9. フェニトロチオン負荷後のP/R比の変化

3回負荷実験のP/R比の変化をそれぞれ黒、赤、青色の○で示す。



図(4)-10. 対照区とメタノール添加区の生産量Pと呼吸量Rの変化

各点のバーは、標準偏差 ($n = 6$) を示す。各々の測定日の対照区とメタノール添加区に有意差がある場合は、次のアルファベットで示す ($a : p < 0.05$ 、 $b : p < 0.01$ 、 $c : p < 0.001$)



図(4)-11. 対照区とアセトン添加区生産量Pと呼吸量Rの変化

各点のバーは、標準偏差 ($n = 3$) を示す。各々の測定日の対照区とメタノール添加区に有意差 ($p < 0.05$) がある場合は、a で示す。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

農薬等のリスク影響は、従来個々の生物種に対する毒性リスクなどで評価が行われてきた。一方、マイクロコズムを用いた本研究では、生物の個体数への影響を評価できるだけでなく、個体数変動には大きな影響が見られない場合でも、生産量と呼吸量を測定することにより、生態系機能への影響が検出できた点で、科学的意義は大きい。また、農薬自体でなくそれを溶かすための有機溶媒自体が生態系の生産量に影響を与えることが示され、農薬と溶媒の影響について各々考慮する必要が明らかになった。

(2) 環境政策への貢献

本研究において、構成生物種の個体数に変動が現れない程度の農薬の負荷においても、生産量と呼吸量には大きな影響が観察されたことから、マイクロコズムを用いた生産量と呼吸量を測定する試験方法は、農薬だけでなく汎用化できるリスク影響評価法としての可能性を有しており、環境政策への貢献は大きい。

6. 国際共同研究等の状況

二国間交流事業共同研究（日本学術振興会）、チャニー湖における寄生者—宿主関係の安定同位体分別、ナターシャ・ユルロバ・ロシア科学アカデミーシベリア支部動物分類学生態学研究所・ロシア、共同研究、シベリアの水界生態系の寄生者を含む食物網構造に関する二国間の研究

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

〈論文（査読あり）〉

- 1) S. Fuma, N. Ishii, H. Takeda, K. Doi, I. Kawaguchi, S. Shikano, N. Tanaka and Y. Inamori. Journal of Environmental Radioactivity 101: 915-922. (2010) Effects of acute γ -irradiation on community structure of the aquatic microbial microcosm.

〈査読付論文に準ずる成果発表〉

特に記載すべき事項はない

〈その他誌上発表（査読なし）〉

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 畠山成久、福島悟、笠井文絵、白石克明、陸水学会誌、53、 327-340. (1992) 「河川の藻類生産に及ぼす除草剤の影響評価」
- 2) IPCS Environmental Health Criteria (EHC) (1992), No.133: Fenitrothion
- 3) Ferrando, M. D., E. Sancho and E. Andreu-Moliner. Ecotoxicology and Environmental Safety 35: 112-120. (1996) Chronic toxicity of Fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the Cladoceran (*Daphnia magna*).
- 4) Taub, F. B. and A. M. Dollar. Limnology and Oceanography 9: 61-74. (1964) A *Chlorella-Daphnia* food chain study: The design of compatible chemically defined culture medium.

S2-09 マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

(5) マイクロコズムを用いた微量汚染化学物質等の低減機能および生態系システムに及ぼす解析評価

横浜国立大学
大学院環境情報研究院
雨宮 隆

<研究協力者>
横浜国立大学
大学院環境情報学府
柴田 賢一

平成21～23年度累計予算額：11, 215千円
(うち、平成23年度予算額：3, 311千円)
予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 マイクロコズムシステムを用い、微量汚染物質である藍藻由来のミクロシスチン、及び、人為由来の抗生物質（OTC）の生態系リスク影響評価を行った。ミクロシスチンは、生物個体数およびP（生産量）/R（呼吸量）比を用いた結果からいずれもモデル生態系に対してコントロール系と比較して大きな影響を及ぼさないことが分かり、無影響濃度は1 ppm以上であることが明らかとなった。

また、人為由来の微量汚染物質である抗生物質（OTC）については、OTCの無影響濃度（NOEC）は、生物個体数変化及びP（生産量）/R（呼吸量）比を用いた結果からいずれも、0.007 ppm未満であることが確定した。尚、本マイクロコズムにおいてOTCによって生物個体数が大きく減少したのは原生動物（*Cyclidium* sp.）であり、一方、後生動物の*Lecane* sp. は個体数を増大させる傾向にあった。これは、共通の生物（細菌類）を餌とする食物網を介する間接的な効果であると考えられる。また、OTCは藻類や他の生物に対してはほとんど影響を及ぼすことはなかった。さらに、OTCの添加によって抗生物質耐性菌が出現することも明らかとなった。OTCに対する上記のNOECの値は、米国環境保護庁（EPA）が提示している単一生物種による値（0.11 ppm未満）と比較して1桁以上小さい。

以上の結果より、本マイクロコズムを用いることで、EPA試験では考慮されていない原生動物および後生動物への影響を評価することが可能であり、かつ、生物間相互作用を介してシステム全体に及ぼす影響を評価できることが明らかとなった。

【キーワード】 微量汚染物質、ミクロシスチン、抗生物質、オキシテトラサイクリン、P/R比

1. はじめに

湖沼生態系では、富栄養化により異常増殖した藍藻類が産生するマイクロシスチンや、人為由来による各種微量化学物質等による汚染が大きな環境問題となっている。富栄養化した湖沼では、毎年、夏季になるとマイクロキスティスなどの藍藻類が大量発生し、湖沼生態系の水質や生物相を大きく改変する¹⁾。特に、マイクロキスティスなどの藍藻類はマイクロシスチンなどの毒素を産生し、これらの毒素は自然由来の微量汚染化学物質として湖水に存在する。本研究分担者らは、今までに、富栄養化した湖沼生態系におけるマイクロキスティスなどの藍藻類の動態に関する数理解析^{2),3)}や、生物間相互作用を利用した藍藻類の効率的な低減手法に関する研究⁴⁾を行ってきた。しかし、藍藻類が産生するマイクロシスチンの湖沼生態系—特に微生物生態系—への影響評価はほとんど行われていない。そこで、毒素マイクロシスチンが生物間相互作用と物質循環を通して微生物生態系に及ぼす影響を評価し、微生物生態系における低減機能等を評価することが重要である。

一方、抗生物質の多様や乱用によりMRSAなどの薬剤耐性菌の出現が問題になっており、2010年にはスーパー耐性菌と呼ばれる多剤耐性菌が出現するなど、社会的に大きな問題となっている⁵⁾。抗生物質は、医療のみならず畜産・養殖業でも使用されており、特に養殖業では餌に抗生物質を混合して養殖場に投げ込んで与える方法が採用されている。そのため、抗生物質が排泄物として排出されるだけでなく、餌から直接環境中に溶出し、湖沼生態系においても多大な影響を与えている可能性がある。従って、薬剤耐性菌の出現を含め、抗生物質の水圏生態系への影響を総合的に評価する事が重要である。特に、本サブテーマで取り上げた抗生物質OTC (OTC)⁶⁾は、抗菌スペクトルが広く養殖業をはじめとする水産業で最も一般的に使用されており、耐性菌が野外で確認されている。しかし、OTCの生態系への影響評価はない。そこで本マイクロコズムを用いることで生態系への影響を評価・解析することが重要である。

2. 研究開発目的

本サブテーマにおいては、水域生態系に微量汚染物質として存在する自然由来および人為由来の化学物質が生態系に及ぼす影響を評価することを目的とした。すなわち、自然湖沼生態系に生息する藍藻類が産生する毒性物質であるマイクロシスチンおよび人為由来の抗生物質であるOTCを被験物質として、本マイクロコズムを用いて生態系に及ぼす影響を解析・評価することを目的とした。

3. 研究開発方法

(1) 培養

本マイクロコズムは、TP培地(ポリペプトンおよび各種無機塩類)で培養し、明暗周期=12H/12H、25℃、2400 luxで培養した。光源にはNational (=Panasonic) FL20SS-W/18を使用した。

(2) 生物個体数の計測

1) 藻類、繊毛虫類、輪虫類、貧毛類の各種生物は光学顕微鏡を用いて個体数を計測した。単位は、cells/mlまたはN/mlとした。

2) バクテリアは、サンプルを20秒間超音波処理した後、10倍希釈法により菌数を調整し、生菌数を計測した。PY平板寒天培地上にサンプルを塗布して、25℃で約5日間培養した。30~300 CFU/plateのプレートを選び、3枚計測した。単位はCFU/mlとした。

(3) 溶存酸素測定

溶存酸素濃度はYSI 58型DOメーターで測定した。DOメーターの電極は5750を、電極のメンブレンは5775スタンダード・メンブレンを用いた。溶存酸素濃度はAM-8000シリーズのデータロガーで記録し、データをPCに転送して解析した。YSI 58型DOメーターの出力電圧に19.99 (ppm/V)を乗じ溶存酸素濃度 (ppm) に換算した。約10日ごとに電極のメンテナンスを行った。

(4) 生産量 (P) /呼吸量 (R) 比の算出

呼吸量 (R) は暗期 (12H) における溶存酸素の減少量を2倍したもの、生産量 (P) は明期における溶存酸素の増加量にRの1/2を足したものとした。但し、光合成によって溶存酸素濃度が平衡濃度より濃くなると酸素が培養液から放出され、呼吸によって溶存酸素が平衡濃度より薄くなると酸素が培養液中に溶解するので、酸素の放出・溶解速度を求めて補正した。補正式は、酸素を蒸留水にバブリングし、実験と同じ条件で溶存酸素量の経時変化を測定した。測定結果の近似式を指数関数フィットにより求め、微分して各時間における放出・溶解速度を表す式を求めた。

(5) 微量汚染化学物質マイクロシスチンの添加方法

マイクロシスチンLRはメタノール溶液の状態ですべて培養開始後16日目に添加した。コントロールには同量のメタノールを添加した。マイクロシスチンLR添加後は、添加当日と、2、4、7、14、21日後に生物を測定した。サンプルを孔径0.22 μm のフィルタで濾過して、マイクロシスチンLRの濃度をHPLCによって測定した。マイクロシスチンLR添加当日と、2、4、7、14、21日後に測定した。

(6) 抗生物質OTCの添加方法

OTCは蒸留水に溶解し、孔径0.22 μm のフィルタで濾過除菌して、培養開始後16日目に添加した。コントロールには、孔径0.22 μm のフィルタで濾過除菌した蒸留水を添加した。添加当日と、2、4、7、14、17、21日後に生物を測定した。

(7) OTC耐性菌の測定方法

サンプルを20秒間超音波処理した後、10倍希釈法により菌数を調整し、OTC耐性菌数を計測した。PY培地を蒸気圧滅菌した後、50°Cまで冷却し、最終濃度が25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ となるように濾過除菌したOTC水溶液を加えた。このOTC添加PY平板寒天培地上にサンプルを塗布して、25°Cで約1週間培養した。30~300 CFU/plateのプレートを選び、3枚計測した。単位はCFU/mlとした。

4. 結果および考察

(1) ミクロシスチンの影響評価

1) 生物個体数の変化

マイクロシスチンを加えた2つの系 (0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ならびに1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) とマイクロシスチン無添加のコントロール系において、生物個体数の時間変化にほとんど差は見られなかった。図(5)-1にコントロール、図(5)-2にマイクロシスチンを1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 加えた系の結果を示す。藻類*Chlorella* sp. と*Scenedesmus* spp. の個体数は、マイクロシスチン添加後、 $10^5 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~ $10^6 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ の間で安定して遷移した。また、糸状藻類*Tolypothrix* sp. は $10^4 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~ $10^5 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ の間で安定していた。微小動物に関しては、*Cyclidium glaucoma*の個体数がマイクロシスチン添加後に減少していったが、この挙動はコントロール系でも観察されていたことから本マイクロコズムの自然変動と考えられ、 $10 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~ $10^2 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ で安定していた。また、*Philodina* sp. と*Aeolosoma hemprichi*については、

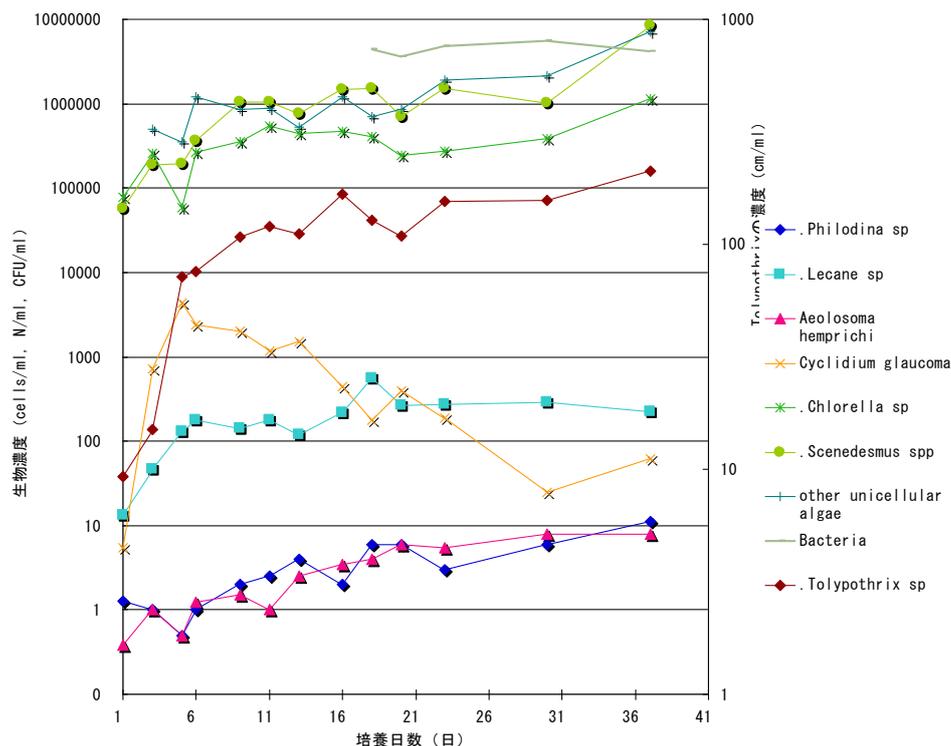
個体数が $1 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 10 \text{ N} \cdot \text{mL}^{-1}$ と少ないものの安定して推移した。以上より、マイクロシスチン $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及び $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加では、本マイクロコズムの生物個体数に顕著な変化は認められないことが明らかとなった。

2) P/R比の変化

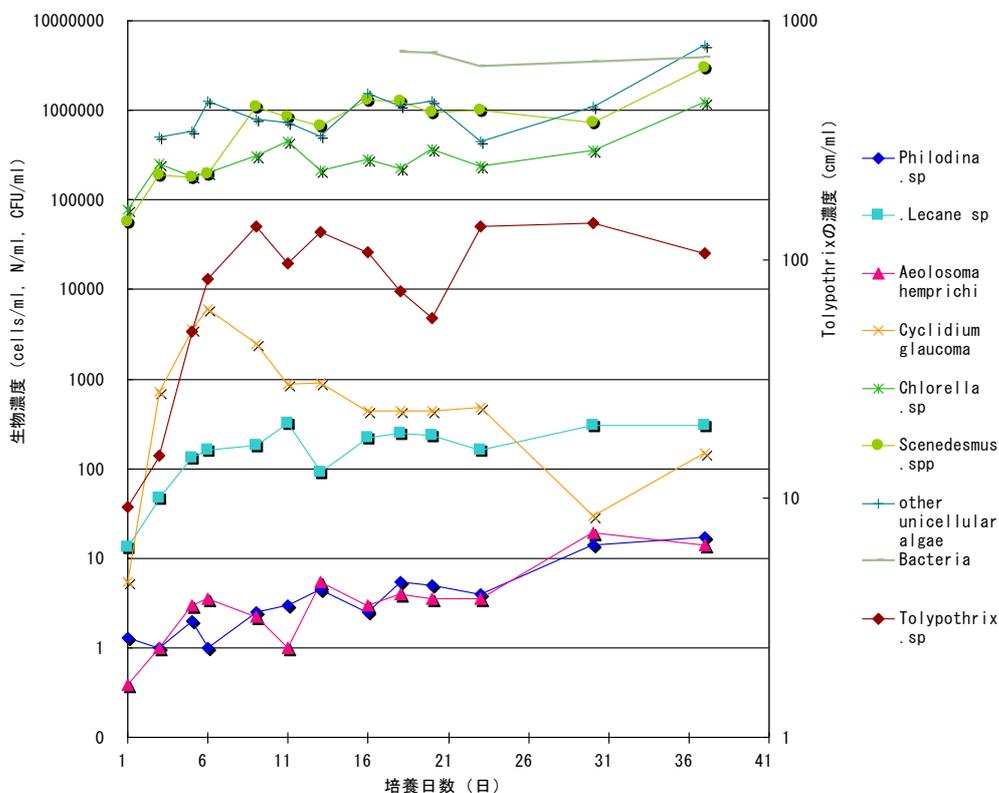
図(5)-3にマイクロシスチンのP/R比に及ぼす影響を示す。マイクロシスチンを加えた2つの系 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ならびに $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) のP/R比はメタノール480 ppmを加えたコントロール系と比較して大きな変化は見られなかった。但し、コントロール系は何も加えなかった無添加系と比較すると呼吸量が増大する傾向が見られたが、本実験の条件下においては、マイクロシスチンはP/R比に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

3) 生態系影響評価

上記の生物個体数変化およびP/R比の変化による結

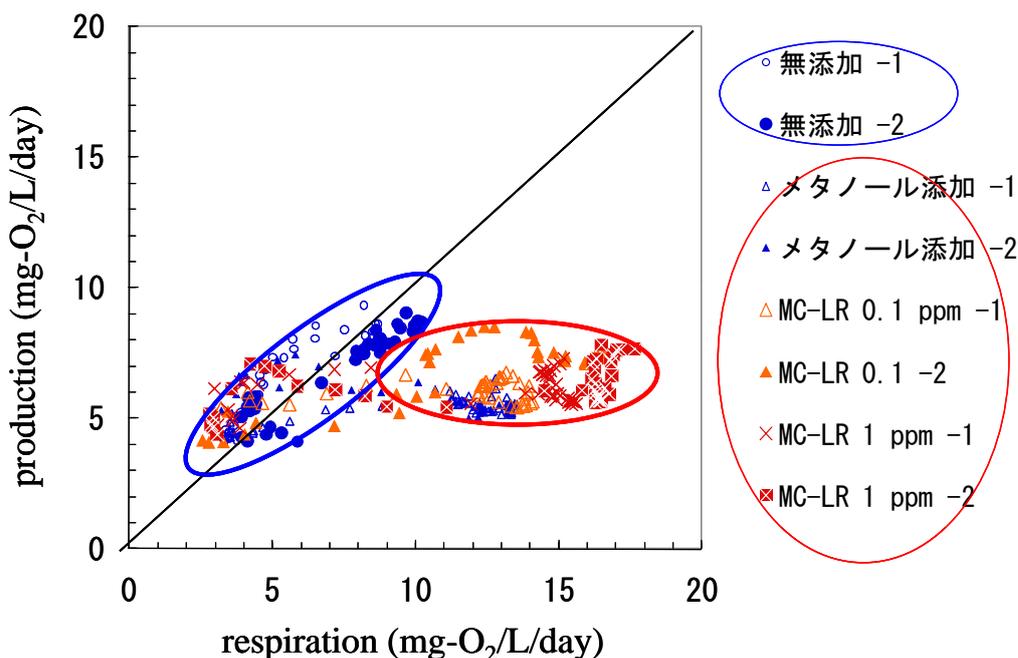


図(5)-1 コントロール系 (メタノール480 ppm) の生物個体数の経日変化



図(5)-2 ミクロシスチン1 mg/Lを加えた系の生物個体数の経日変化

果から、ミクロシスチンの無影響濃度 (NOEC) は1 ppm以上であると結論できる。この値は、世界保健機関 (WHO) の飲料水中濃度のガイドラインである1 ppbと比較して3桁以上も大きい。以上より、ミクロシスチンはモデル生態系に対して壊滅的な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

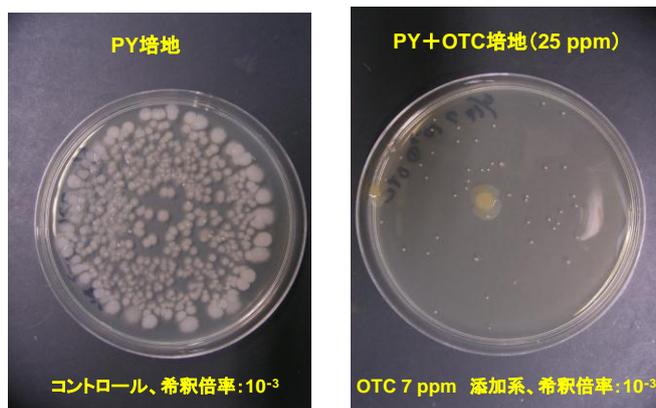


図(5)-3 ミクロシスチン1 mg/Lを加えた系のP/R比の変化

(2) OTCの影響評価

1) 耐性菌の出現

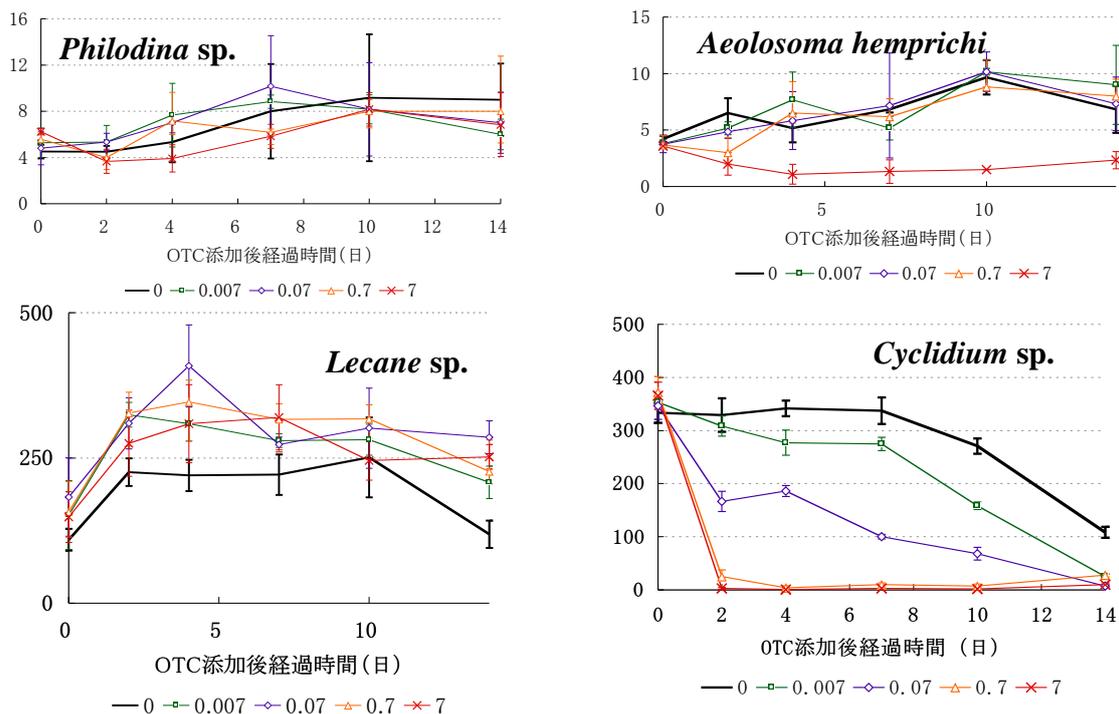
本マイクロコズムでは抗生物質であるOTCを加えることで耐性細菌が出現することが分かった。コントロール系をPY培地にて培養した細菌のコロニーの形状は、PY培地に25 ppmとなるようにOTCを添加した培地にて培養した細菌のコロニーの形態とは明らかに異なっていた。一例として、コントロール系のコロニーと7 ppmのOTCを添加した系のコロニーを培養した結果を図(5)-4に示す。前者のコロニーは全体に白っぽく、かつ、コロニーの境界は明瞭ではなかった。一方、後者では形状が大きく異なる2つのコロニーが出現した。



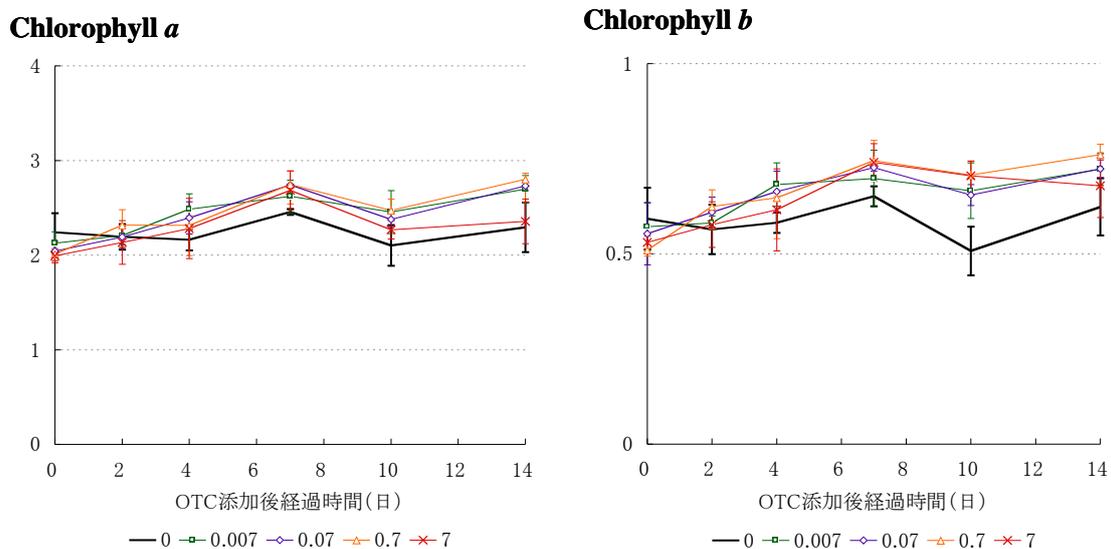
図(5)-4 コントロール系(左)とOTC添加系(右)にて出現したコロニーの形態の違い

1つ目のコロニーは全体的に薄黄色をしており粘性があり、2つ目のコロニーは白く境界が明瞭な粒状であった。後者のコロニーは、コントロール系をPY培地で培養した系においては出現しなかったことから、これらをOTC耐性細菌と判定した。以下の生物個体数の変化においては、後者のコロニー数を耐性細菌数としてカウントした。

2) 生物個体数の変化



図(5)-5 OTC添加による動物の個体数変化

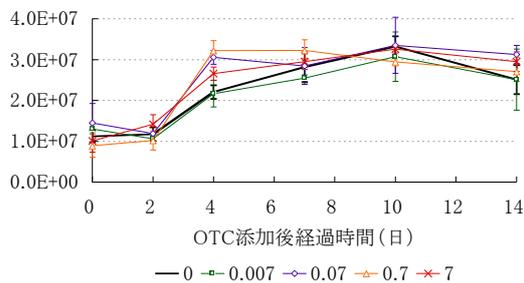


図(5)-6 OTC添加による藻類（光合成色素量）の変化

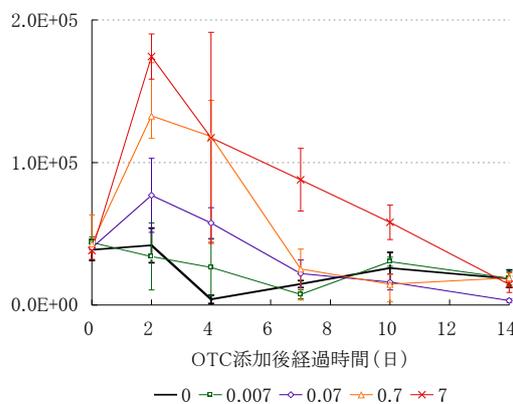
本マイクロゾムの生物組成は、OTC添加前は安定していた。OTCを0.007 ppmから7 ppmまで添加した系において添加後14日に渡り、全細菌数およびクロロフィル濃度から評価した藻類の個体数はコントロールと比較して差が見られなかった。また、後生動物である *Philodina* sp. の個体数も藻類と同様に影響を受けなかった。しかし、OTC耐性細菌数、原生動物 *Cyclidium* sp.、後生動物 *Lecane* sp.、*Aeolosoma* sp. の個体数は後述するようにOTC濃度および経過日数に応じて影響が

見られた。動物、藻類（光合成色素量）、細菌の個体数変化をそれぞれ、図(5)-5、図(5)-6、図

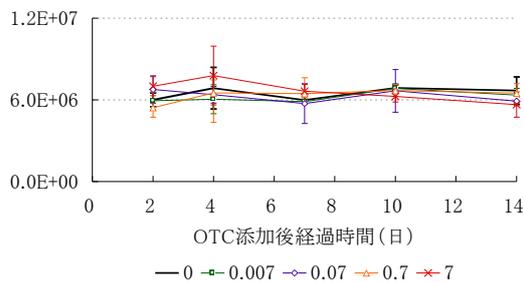
生菌数



OTC耐性細菌数



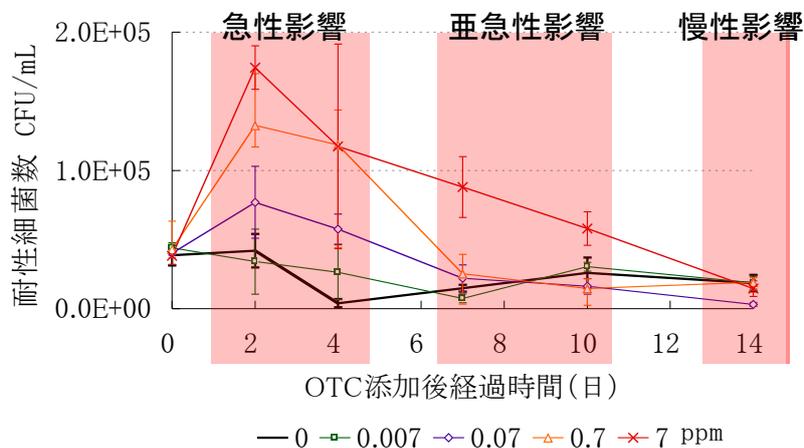
芽胞数



図(5)-7 OTC添加による細菌数の変化

(5)-7に示す。

次に、生物の個体数変化を詳しく見るために、OTC添加後14日間に見られた影響を急性影響（2～4日後）、亜急性影響（7日～10日後）、慢性影響（14日後）として整理した（図(5)-8）。影響の有無については、コントロールの個体数の変動幅よりも個体数が増減した場合に影響があったと判定した。



図(5)-8 OTC添加による耐性細菌数の経日変

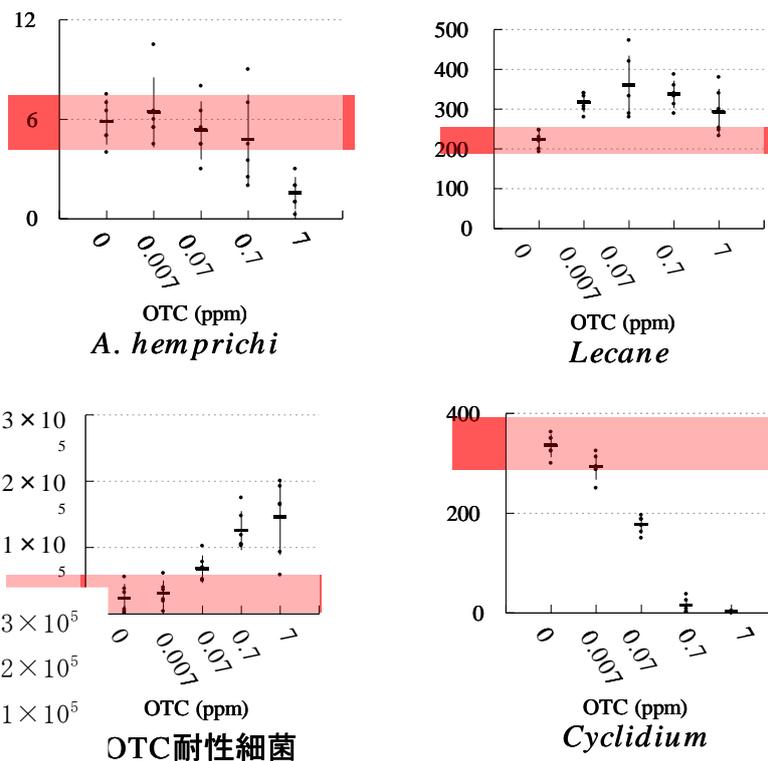
図(5)-9、図(5)-10、図(5)-11にそれぞれ、急性影響、亜急性影響、慢性影響の結果を示す。例えば、急性影響については、*Aeolosoma* sp. は、7 ppmのOTC添加により個体数が減少していることから、*Aeolosoma* sp. に対する無影響濃度（NOEC）は7 ppm未満と判定した。また、*Cyclidium* sp. と*Lecane* sp. は0.007 ppmのOTC添加により個体数に増減が見られたことから、それぞれの生物に対するNOECはいずれも0.007 ppm未満と判定した。尚、OTC添加によって*Cyclidium* sp. の個体数は増加し、一方、*Lecane* sp. の個体数は減少していた。これは、それぞれの生物が共通の生物（細菌類）を餌としていることから、本マイクロゾムシス

テムにおける競争的な生物間相互作用の現れであると考えられる。また、OTC耐性細菌においては、0.07 ppmのOTC添加により細菌数に増加が見られたことから、OTC耐性細菌に対するNOECは0.07 ppm未満と判定した。このように、亜急性、慢性影響についても同様にNOECを求めることができる。

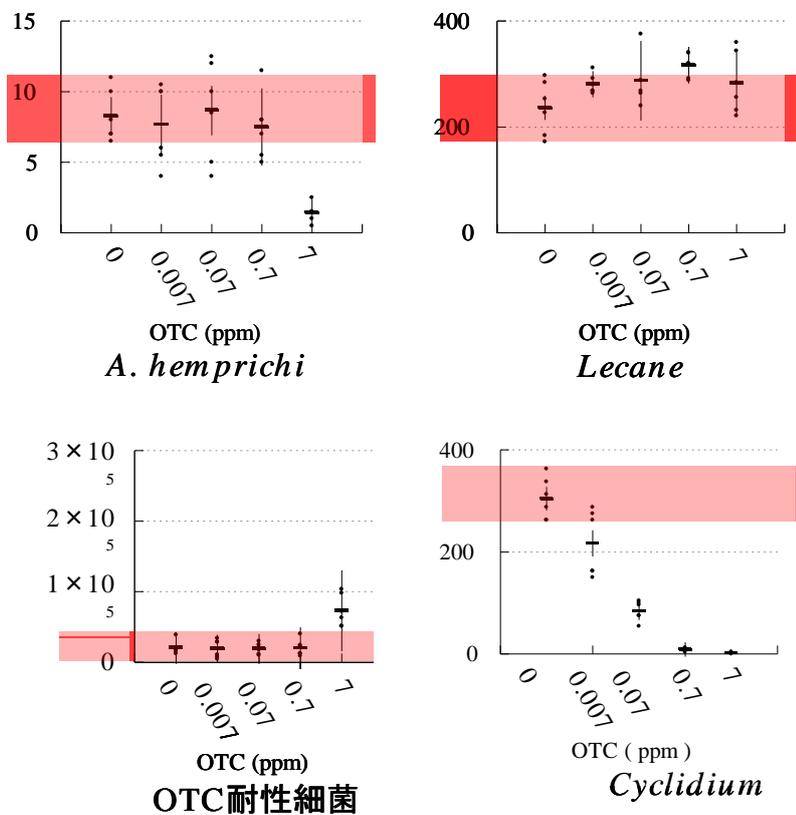
上記のように判定したOTCの無影響濃度（NOEC）の急性影響、亜急性影響、慢性影響について表(5)-1に示す。

藻類、全細菌、*Philodina* sp. に対するOTCの影響は小さく、それぞれの生物のNOECは急性影響、亜急性影響、慢性影響の全てにおいて7 ppmより高かった。一方、*Cyclidium* sp. と *Lecane* sp. はOTCに対する感受性が高く、これらの生物に対するNOECは *Lecane* sp. の亜急性影響（0.07 ppm以下）を除き全て0.007 ppm未満となった。以上より、本マイクロコズムにおいては生物の個体数変化から判定されるNOECは0.007 ppm未満であることが明らかとなった。

3) P/R比の変化

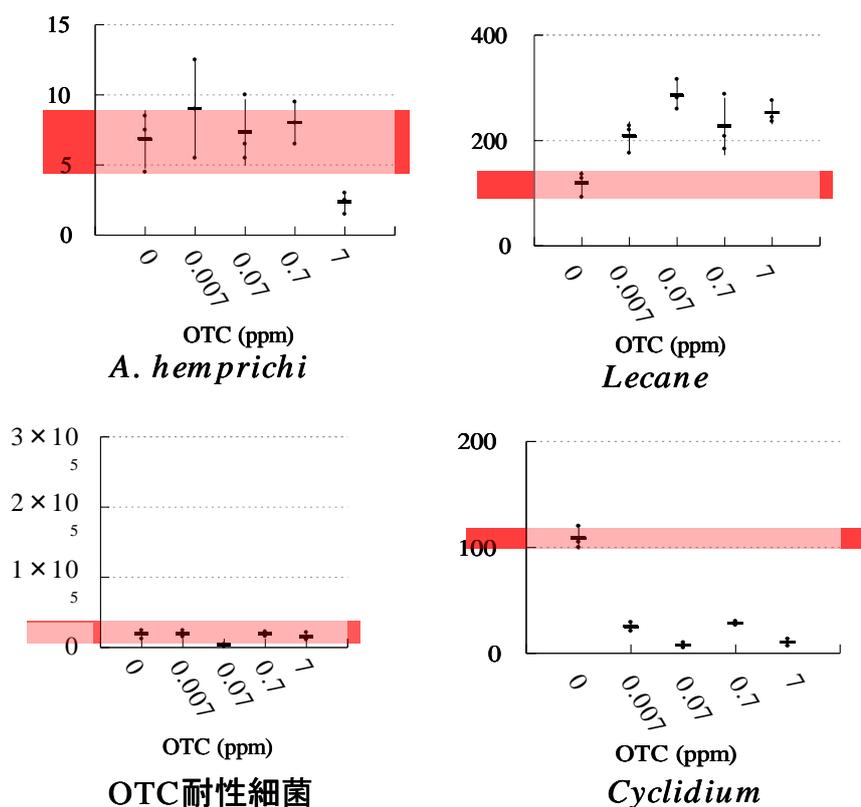


図(5)-9 OTC添加による急性影響（2～4日後）



図(5)-10 OTC添加による亜急性影響（7～10日後）

OTC添加による生産量(P)と呼吸量(R)の結果を図(5)-12および図(5)-13に示す。それぞれの図において、矢印の根元のプロットはOTC添加日のP/R値を示し、他の3プロットは上記の急性影響、亜急性影響、慢性影響を評価した日におけるP/R値の平均を示す。はじめに、図(5)-12に示すようにOTCを高濃度(7 ppm、0.7 ppm)添加すると、コントロール(0 ppm)と比較して生産量・呼吸量ともに経過日とともに減少したが、特に、呼吸量の減少が



図(5)-11 OTC添加による慢性影響(14日後)

大きかった。今のところOTCが呼吸量を減少させた理由については明らかではないが、おそらく、OTCが細胞内のリボソームに結合し、代謝活性が低下したためと考えている。

次に、図(5)-13に示すようにOTCを低濃度(0.07 ppm、0.007 ppm)添加した場合は、0.07 ppm添加した系において一時的な呼吸量の増加が観察されたが、高濃度添加した系の挙動と同様に生産量、呼吸量ともに減少する傾向を示した。しかし、高濃度添加の系に比べて減少量は少なかった。最も低濃度

(0.007 ppm)添加した系においてもコントロールと比較して生産量・呼吸量の減少は有意であり、P/R比の変化から見積もられる本マイクログラムのNOECは0.007 ppm未満であると判定された。

3) 生態系影響評価：従来法との比較

上記の生物個体数の変化およびP/R比の変化から判定されたNOECを従来法による値と比較した。表(5)-2に米国環境保護局(EPA)のレポートにあるOTCの単一生物種を用いた毒性評価を示す⁷⁾。

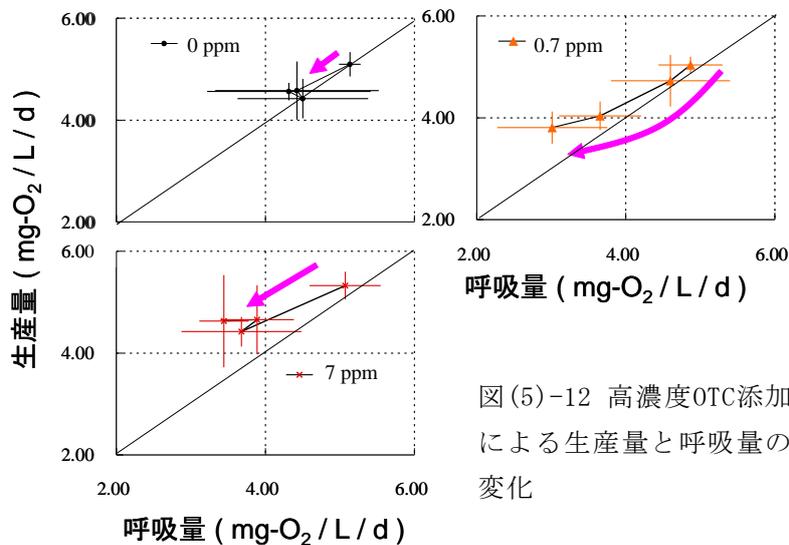
表(5)-1 OTC添加によるNOEC値の評価

	急性影響	亜急性影響	慢性影響
<i>A. hemprichi</i>		<7	
<i>Philodina</i> sp.		>7	
<i>Lecane</i> sp.	<0.007	≦ 0.07	<0.007
<i>Cyclidium</i> sp.	<0.007	<0.007	<0.007
クロロフィル a		>7	
クロロフィル b		>7	
生菌数		>7	
OTC耐性細菌数	<0.007	<7	>7

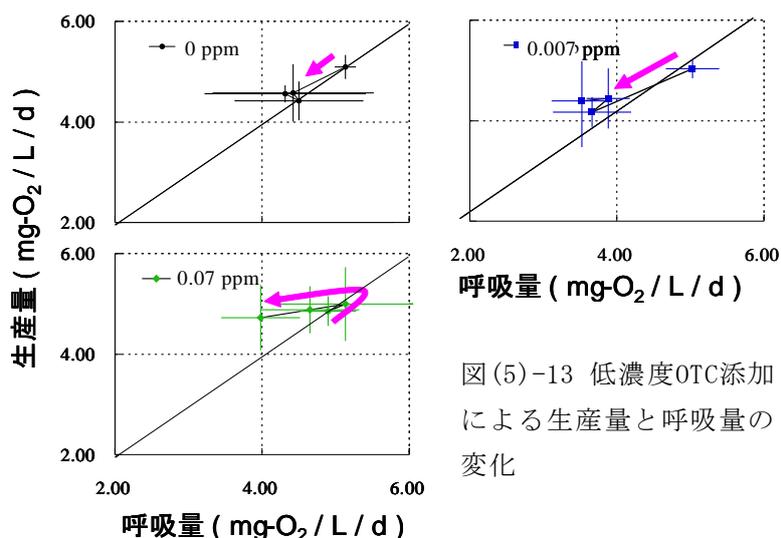
また、表(5)-3に本マイクロゾムを用いた影響評価結果を示す。生物個体数の変化による評価では、本マイクロゾムにおける藻類に対するNOEC (7 ppmより大) は、従来法による値 (0.11 ppm未満) と比較して1桁以上大きい。特に、本マイクロゾムにおいては、原生動物

(*Cyclidium* sp.) および後生動物 (*Lecane* sp.) に対するNOECの値が0.007 ppm未満と極めて低い。これらの生物に対してはEPAによる評価は行われていないが、本マイクロゾムで得られたこの値 (0.007 ppm未満) はEPAの単一生物種への影響から判定されるNOEC値 (0.11 ppm未満) より1桁以上小さい。さらに、本マイクロゾムにおいてP/R比から得られたNOECも0.007 ppm未満であり、OTCに対して感受性の高い系であることが明らかとなった。

以上より、本マイクロゾムから判定されたNOEC値 (0.007 ppm未満) はEPAによる値 (0.11 ppm未満) よりも十分小さく、これはEPA試験では考慮されていないOTCに対する感受性の高い生物への直接的な影響と、生物間相互作用を通じた間接的な影響が評価されたためであると考えられる。



図(5)-12 高濃度OTC添加による生産量と呼吸量の変化



図(5)-13 低濃度OTC添加による生産量と呼吸量の変化

(3) まとめ：微量汚染物質の生態系影響評価

本研究では、自然由来または人為由来の微量汚染物質による水域生態系影響を、生物個体数変化およびP/R比変化から評価・解析した。自然湖沼に生息する藍藻類が産生するマイクロシスチンについては、NOECは1 ppm以上

表(5)-2 OTCの単一生物種を用いた毒性評価

単一生物種		EC ₅₀ (ppm)	NOEC(ppm)
藻類	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Green Algae)	0.11 -0.25	(<0.11)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Green Algae)	3.9-4.5	(<3.9)
ミジンコ	<i>Daphnia magna</i> (Water Flea)	17 -30	
	<i>Daphnia magna</i> (Water Flea)	21-104	
魚類	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)		280

であり湖沼生態系にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、抗生物質OTCについては、NOECが0.007 ppm未満であり、水域生態系に影響が及ぼされる可能性が示唆された。特に、OTCに感受性の高い原生動物および後生動物への影響が生物間相互作用を通して生態系に広がる可能性が示された。

表(5)-3 OTCの本マイクロコズムを用いた影響評価

		EC ₅₀ (ppm)	NOEC(ppm)
藻類	<i>Chlorella</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Tolypothrix</i> sp.		>7
原生動物	<i>Cyclidium</i> sp.		<0.007
後生動物	<i>Lecane</i> sp. <i>Philodina</i> sp. <i>Aeolosoma</i> sp.		<0.007 >7 <7 <0.007
細菌類	<i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Acinetobacter</i> sp. Coryneform bacteria OTC-resistant bacteria		>7
P/R比による生態系影響評価			<0.007

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究により、従来法の単一生物種を用いた評価においては見落とされる可能性のある生物間相互作用に起因する生態系への影響評価に有効であることが示された。特に、本マイクロコズムには原生動物や後生動物が含まれており、それらの生物種の影響が微生物生態系に及ぼす影響を評価することが可能であった。また、従来、生態系リスクは生物種とその個体数の変動に基づく評価が行われていた。しかし、本手法は、生物機能である生産量(P)と呼吸量(R)に基づく生態系リスクの影響評価手法であり、対象とする生態系の個別性に左右されることなく統一的に生態系リスク評価を行うことができる点で、科学的意義は大きい。

(2) 環境政策への貢献

本影響評価手法は、実験方法、データの解析方法等が全てマニュアル化されており、国内外において広く利用される可能性を有しており、日本発の新しい生態系リスク評価手法として提言できれば、環境政策への貢献は極めて大きい。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 柴田賢一、雨宮隆、伊藤公紀：第16回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会(2010)

「マイクロコズムを用いた呼吸量と生産量によるミクロシステンLRの生態影響評価」

- K. Shibata, Y. Ito, T. Amemiya, K. Itoh : JSME, Tsukuba, Japan, 2010.

“Effects of the antibiotic oxytetracycline on a freshwater microcosm”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Sigeo, D. C., Freshwater Microbiology, Wiley, 2005, UK.
- 2) Amemiya, T., Enomoto, T., Rossberg, A. G., Yamamoto, T., Inomori, Y., Itoh K. 2007, Stability and dynamical behavior in a lake-model and implications for regime shifts in real lakes, Ecological Modelling, 206, 54-62.
- 3) Serizawa, H., Amemiya, T., Itoh, K. 2009, Patchiness and bistability in the comprehensive cyanobacterial model (CCM), Ecological Modelling, 220, 764-773.
- 4) 雨宮隆、比田井淳、伊藤公紀、アオコの除去方法、特願2009-105196、平成21年4月23日。
- 5) NORMARK, B. H., NORMARK, S. 2002, Evolution and spread of antibiotic resistance, Journal of Internal Medicine, 252, 91-106.
- 6) 二宮幾代治、動物の抗生物質、養賢堂、213-217 (1987).
- 7) US EPA, ECOTOX, Aquatic Report, <http://cfpub.epa.gov/ecotox/report.cfm?type=short>

Development of Ecosystem Risk Impact Assessment Method using Microcosm System

Principal Investigator: Yuhei INAMORI

Institution: Fukushima University

Kanayagawa 1, Fukushima-shi, Fukushima 960-1296 Japan

Tel:+81-24-548-5254 Fax:+81-24-548-5254

E-mail: ina0120@sss.fukushima-u.ac.jp

Cooperated by: Research Institute for Humanity and Nature, Chiba Institute of Technology, Tohoku University, Yokohama National University, National Institute of Radiological Sciences, Natural History Museum and Institute, Chiba, Sagami Women's University

[Abstract]

Key Words: Microcosm, Ecosystem risk assessment, Dissolved oxygen, Production/respiration ratio, m-NOEC

This research project was conducted with the aim of establishing a risk impact assessment system from the viewpoint of production/respiration (P/R) ratio using a flask microcosm which consisted of several species of bacteria (decomposer), three species of phytoplankton (producer), and four species of zooplankton (consumer), as a model for ecosystem function.

This theme is consisted of five subthemes, that is, 1) Impact risk assessment of chemicals to ecosystem using microcosm system and its standardization (conducted by Fukushima University), 2) Optimization of operating condition for microbiota and stability of microcosm system and its modeling (conducted by Research Institute for Humanity and Nature), 3) Impact risk assessment of metals to ecosystem using microcosm system (conducted by Chiba Institute of Technology), 4) Impact risk assessment of pesticides and organic loading to ecosystem using microcosm system (conducted by Tohoku University) and 5) Impact risk assessment of pollutants to ecosystem using microcosm system (Yokohama National University).

The outcomes can be concluded as follows; 1) m-NOEC (microcosm-NOEC) of AE (polyoxyethrenealkylethel) was determined as $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and a detailed investigation of gas-liquid equilibrium in microcosm system was conducted to establish the standard assessment method, 2) three species sub-microcosm system indicated a different response against the microcosm system with metal addition loading, and a investigation of safety factor is necessity to estimate toxic data, 3) m-NOEC of Ni (nickel) was determined as under $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the gnotobiotic type microcosm system is indicated more suitable for impact risk assessment tool than the stress selected type and/or the naturally derived type microcosm system, 4) m-NOEC of

fenitrothion (sumithione, MEP) was determined as under $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and a different mechanism of toxicity from simazine was suggested, and 5) m-NOEC of OTC (oxytetracycline) was determined as under $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the recovery of the system with a mutation of OTC resistant bacteria was observed.

Thus, this P/R ratio method can assess the state of recovery and transfer of an ecosystem by fragmentation, which is not shown by a single species test. This suggests that even when a microcosm receives a structural effect, the functional stability can be maintained by the redundancy of a population or community level.

(附録)

環境研究総合推進費 (S2-09)

マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

生態系リスク評価試験法マニュアル (案)

目次

目次.....	2
1. はじめに.....	4
1.1. 背景.....	4
1.2. 目的.....	4
1.3. 試験法の概要.....	4
2. N-SYSTEM の保守・維持管理.....	6
2.1. 器具・装置.....	6
2.2. 培養方法.....	6
3. 準備.....	8
3.1. 器具・装置.....	8
3.2. 溶存酸素計の準備.....	8
3.2.1. DO 測定時に水流が必要な酸素電極の場合.....	8
3.2.2. 電極から光が漏れる DO 計の場合.....	9
3.2.3. 溶存酸素計の校正.....	9
3.2.4. 酸素の溶解速度を求める.....	9
3.3. 繰り返しおよび対照群.....	13
3.4. N-SYSTEM の準備.....	13
4. 試験の手順.....	15
4.1. DO 電極の設置.....	15
4.2. 被験物質の準備と添加方法.....	15
4.2.1. 被験物質の準備.....	15
4.2.2. 被験物質の添加方法.....	15
4.3. 試験期間.....	15
4.4. 生物量の測定.....	16
4.4.1. <i>Philodina sp.</i> 及び <i>Aeolosoma hemprichi</i> の定量.....	16
4.4.2. <i>Lecane sp.</i> 及び <i>Cyclidium sp.</i> の定量.....	16
4.4.3. <i>Chlorella sp.</i> と、 <i>Scenedesmus sp.</i> の定量.....	16
4.4.4. <i>Tolypothrix sp.</i> の定量.....	16
4.4.5. <i>Chlorophyll a</i> 及び <i>b</i>	17
4.4.6. <i>Phycocyanin</i> と <i>Phycoerythrin</i> 、 <i>Allophycocyanin</i> の定量.....	17

4.4.7. 細菌	18
4.5. 呼吸量と総生産量の算出方法	18
4.5.1. 概要	18
4.5.2. 呼吸量と総生産量の算出	19
4.6. エンドポイント	22
4.6.1. 統計処理	22

1. はじめに

1.1. 背景

魚類等の高次捕食者を含んだ水圏生態系は、生産者(藻類)、低次捕食者(微小動物)、分解者(細菌)を主とする微生物生態系を基盤としていることが重要であり、水圏生態系の水質浄化や物質循環には特に微生物生態系が重要な役割を担っている。微生物生態系は、光合成を行う生産者としての藻類、消費者としての微小動物、分解者としての従属栄養細菌類等からなり、窒素、リン、農薬、重金属等の化学物質の負荷による生態系の変動パラメータを考慮することが重要である。

生態系システム評価解析の上では、水圏のモニタリングデータに基づいて構成したマイクロコズム(安定モデル生態系)を用いた微生物群集の動態解析を相補的に活用することが有効・効果的であり、これがマイクロコズムの重要な意義となる。従来より行われてきた単一生物を用いた手法は、生態系機能を含めた生態系リスク評価研究がなされていないのが現状である。マイクロコズムを活用した生態学的研究は、国際化が重視されているのが現状で、OECD 試験法の検討においても、生態系システム評価の重要性が指摘されている。

1.2. 目的

本試験法はマイクロコズムを用いた水圏の生態リスク評価を行うことを目的とする。対象とするマイクロコズム(N-system)には、水圏生態系に及ぼす化学物質の影響評価試験のツールとして位置づけられる生産者(藻類)、捕食者(微小動物)、分解者(細菌類)が存在し、単種培養系にはない、微生物間相互作用、物質循環、エネルギーフローなどの生態系機能を含んでいる。

N-system は、分解者として少なくとも 4 種の細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、coryneform bacteria、生産者として 2 種の緑藻類 *Chlorella* sp.、*Scenedesmus* sp.、1 種の糸状藻類 *Tolypothrix* sp.、捕食者として 1 種の原生動物繊毛虫類 *Cyclidium* sp.、2 種の後生動物輪虫類 *Lecane* sp.、*Philodina* sp.、1 種の後生動物貧毛類 *Aeolosoma hemprichi* の組合せからなるマイクロコズムである。定常期の N-system を種として新たな培地に植え継ぐと繰り返し同様な共存系の増殖曲線が得られるという高い安定性と再現性を有するモデル微生物生態系であり、統一規格としてデータを比較解析する上ではきわめて有効なツールである。本試験法は、上記の点に鑑み、生態系機能のモデルとしてのフラスコマイクロコズムである N-system を用いた生態系リスク評価を目的としたものである。

1.3. 試験法の概要

- (1) 定常期にある N-system を特定の培地に接種し、定常期に達するまで培養する。

- (2) 定常期の N-system に被験物質を添加して試験を開始する。
- (3) 添加 2 週間後の生物量と、溶存酸素 (DO) 濃度変化から算出した呼吸量 (R)、生産量 (P)、および P/R 比を対照群と比較することで無影響濃度 (NOEC) を求める。

2. N-system の保守・維持管理

2.1. 器具・装置

- 300 ml 三角フラスコ
- シリコセン(松浦製作所、品番 6-343-16、型番 C-40)
- インキュベーター(温度 25°C・明暗周期=12H/12H・照度 2400 lx(光合成光量子束密度 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)が実現可能なもの)

2.2. 培養方法

N-system の維持培養は必ず無菌的に行うこと。培地は TP 培地 (Table 1) を用いる。培地を調整後、300 ml フラスコに 200 ml ずつ分注してシリコ栓*¹をし、オートクレーブ(121°C、15 min)して滅菌する。室温まで冷ました後、30 ml の 2~8 週間培養した N-system をこれに加え、温度 25°C・明暗周期=12H/12H・照度 2400 lx(光合成光量子束密度 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)のインキュベーターで培養する。培養開始 1~3 日後は、毎日攪拌し、その後は静置培養する。継代培養は、2 ヶ月に 1 回行う。

2.2.1. Table 1 TP 培地 (Taub Polypepton Medium)

	Stock solutions	Volume
A	Polypepton* ^{2,3,4} 2.0 g / 100 ml	10.0 ml
B	MgSO ₄ ·7H ₂ O 4.93 g / 200 ml	2.0 ml
C	KH ₂ PO ₄ 2.72 g	
	NaOH 0.56 g / 200 ml	2.0 ml
D	CaCl ₂ ·2H ₂ O 7.35 g / 500 ml	40.0 ml
E	NaCl 2.92 g / 500 ml	60.0 ml
F	FeSO ₄ ·7H ₂ O 4.98 g	
	Na ₂ EDTA 2.72 g / 200 ml	0.375 ml
G	H ₃ BO ₄ 0.930 g	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.144 g	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.99 g	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0.012 g	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.025 g	
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O 0.145 g / 500 ml	1.0 ml
	蒸留水	Up to 2,000 ml

TN = 14.5 mg/l、TP = 1.0 (ペプトン) + 3.1 (KH₂PO₄) = 4.1 mg/l、TN / TP = 3.54

光源には National (=Panasonic) FL20SS-W/18 を使用する。3 ヶ月ごとにすべての蛍光灯を交換するか、1 ヶ月ごとに照度または光合成光量子束密度を測定して必要に応じて交換する。

- *1 株式会社 松浦製作所、品番 6-343-16、型番 C-40、300・500 ml 三角フラスコ用、通気量 2,000~4,500 ml/min。
- *2 Polypepton(和光コード(包装):394-00115(500 g)、390-00117(10 kg))を使用する。なお、日本製薬の Polypepton は、「牛乳カゼインを酵素分解後、精製し、乾燥した灰黄色の粉末である。…(中略)…BD 社製の Trypticase Peptone、Casitone に相当する」(日本製薬製品要覧より)。
- *3 Polypepton の添加方法は各人に任せる。e.g. ① その都度粉末で加える。② ペプトン溶液を作って、オートクレーブ(121℃、15 min)して冷蔵保存し、その都度オートクレーブ後に無菌的に加える。ただし、オートクレーブは品質の変化を伴うので、二重滅菌はしない。
- *4 窒素含有率 14.5%、リン含有率 1.0% (w/w)。測定方法:①ポリペプトン水溶液を正確に 10ppm に調整。②ペルオキソ二硫酸カリウム分解法で分解。窒素化合物およびリン化合物はすべて NO_3^- および PO_4^{3-} に分解される。④ NO_3^- を紫外線吸光光度法で、 PO_4^{3-} をモリブデン青吸光光度法で測定した。

3. 準備

3.1. 器具・装置

- 300 ml 三角フラスコ
- シリコセン(松浦製作所、品番 6-343-16、型番 C-40)
- インキュベーター(温度 25°C・明暗周期=12H/12H・照度 2400 lx(光合成光量子束密度 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)が実現可能なもの)
- 溶存酸素計(DO 計)
- 黒色ゴムチューブ(DO 計から光が漏れる場合のみ必要)
- スターラー(DO 計が静水測定可能なら不要)
- 回転子(DO 計が静水測定可能なら不要)
- 溶存酸素電極用穴あきキャップ(DO 計が静水測定可能なら不要)
- ビニールチューブ(DO 計が静水測定可能なら不要)
- 円形カバーガラス(DO 計が静水測定可能なら不要)
- 断熱材(e.g. シリコーンゴムスポンジシート(SR、片面スキン付き)(タイガースポリマー株式会社))および白紙、またはコの字型白色アクリル板(DO 計が静水測定可能なら不要)

3.2. 溶存酸素計の準備

3.2.1. DO 測定時に水流が必要な酸素電極の場合

ポーラログラフ式酸素電極など DO の測定に水流が必要な電極を用いる場合は、センサー部に回転子を入れた穴あきキャップをし、センサー付近のみ攪拌して DO を測定する。穴あきキャップの底に円形カバーガラスを敷き、その上に回転子を置くことで、回転子が滑らかに動くことができる。

YSI-5750 に攪拌系を取り付ける方法を Fig. 1 に示した。攪拌系を取り付けた電極を、300 ml 三角



Fig. 1 ①電極、穴あきキャップ、円形カバーガラス、ビニールチューブ、回転子を用意。②ビニールチューブを電極に取り付け、キャップとの間のガスケットとする。③円形カバーガラスと回転子を入れた穴あきキャップを、温度センサーに被さないように電極に取り付ける。

フラスコの底に接触するまで差し込み、ゴムやシリコンのガスケットやクリップなどで固定する。この時、フラスコの口を塞がないこと。

スターラーの上に断熱材と白紙を敷き、スターラーの熱がフラスコに伝わりにくくする。断熱材と白紙の代わりに、コの字型白色アクリル板(厚さ 5mm のアクリル板を加工して、下に 5mm の隙間ができるようにしたもの)を用いても良い。この上に電極を指したフラスコを載せ、攪拌して DO 測定に移る。

3.2.2. 電極から光が漏れる DO 計の場合

ProODO (YSI) などの蛍光式 DO 計は、電極側面から光が漏れるので、黒色ゴムチューブで光を遮断する (Fig. 2)。この電極を、300 ml 三角フラスコの底から 1 cm 程度の深さまで差し込み、ゴムやシリコンのガスケット、あるいはクリップなどで固定する (e.g. テーパージョイント用ケッククリップ KC24)。この時、フラスコの口を塞がないこと。攪拌は必要ない。

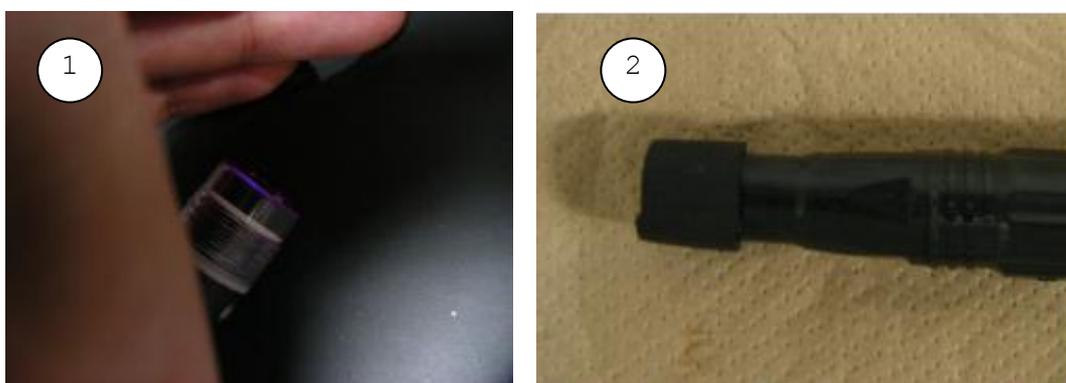


Fig. 2 ①センサー側面から光が漏れる(紫色)。②温度センサーなどに影響がない範囲で黒色ゴムチューブをかぶせて光を遮断する。

3.2.3. 溶存酸素計の校正

210 ml の蒸留水またはミリ Q 水を 300 ml 三角フラスコに入れ、3.2.1 および 3.2.2 の方法で DO 電極を取り付け、DO を 30 分おきに一晚連続測定する。溶存酸素データを取り出し、溶存酸素濃度が安定していることを確認してから、その時の溶存酸素濃度を 100%として校正する。なお、気圧による自動補正機能がある場合には、DO の校正の直前までに気圧の校正を済ませておくこと。

3.2.4. 酸素の溶解速度を求める

酸素が大気中から水中に溶解する速度 (δD) は、電極やインキュベーター、スターラーの状態、フラスコの口の開き具合などに影響されるため、セット(フラスコ、電極、スターラーなど一式)毎に実験して求め、個別に適用するか、平均を求めて一括して適用する。できれば、試験の直前と直後の 2 回測定し、DO 濃度の平均値を求めてから、以下の方法で δD を求めることが望ましい。

実験

三角フラスコ(300 ml)に水(蒸留水またはミリ Q 水)を 210 ml 入れ、酸素または窒素で曝気し、溶存酸素濃度を大気との平衡値よりも高く/低くしておく。フラスコの口に息を吹きかけるなどして、フラスコ内の気相の酸素または窒素を空気に置換し、3.2.3 と同様に溶存酸素を 24~48 h 測定する。以下、酸素を

曝気した場合のデータを基にして δD の求め方を示す。

解析方法1 (データ分析ソフトがある場合)

Origin や IGOR Pro などのデータ分析ソフトがある場合、測定データからそのまま近似式を求め、近似式から δDO を導出する。

例えば、水に酸素を曝気した場合のデータの解析例を Fig. 3 に示す。元データに対して、 $y = ae^{bt} + c$ の形に近似した。式における a は図中の $A1$ 、 b は $-1/t1$ 、 c は $y0$ に相当する。なお、 c の値は既知であり、大気と水の酸素濃度が平衡に達した時の DO 値 8.26 である。実際には実測値に従うこと。

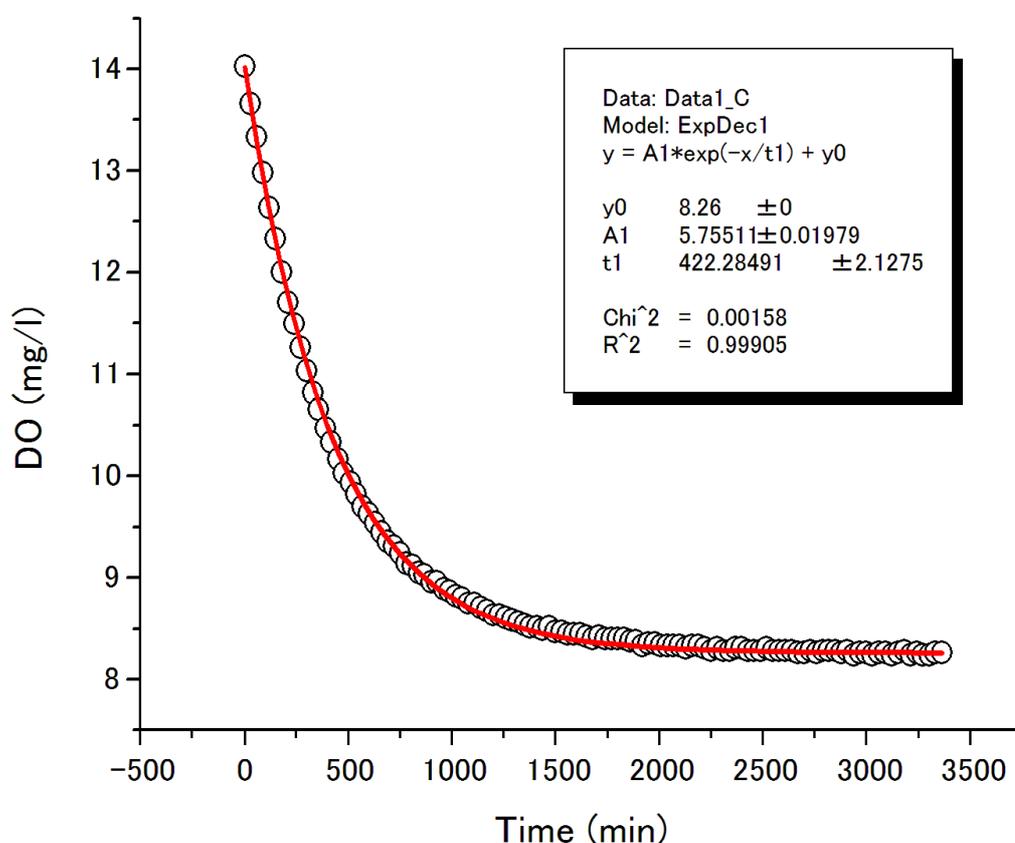


Fig. 3 酸素曝気した後の DO 変化

適切な関数と c 値を選択すれば、 R^2 値は 0.999 以上になるはずである。上記解析結果から、この近似式の各定数の値は、 $a = A1 = 5.755$ 、 $b = -1/t1 = -1/422$ 、 $c = y0 = 8.26$ である。この式を微分すると測定時間における DO の大気中への放出速度が求められる。元の式は、

$$y = ae^{bt} + c \dots\dots\dots (8)$$

である。これを微分すると、

$$\frac{dy}{dt} = abe^{bt} \dots\dots\dots (9)$$

となる。時間ではなく、任意の DO における δDO が知りたいから、 $\frac{dy}{dt}$ を y の関数として表すように変形すると、

$$\frac{dy}{dt} = ab e^{bt} = b(ae^{bt}) = b(ae^{bt} + c - c) = b(y - c) \dots \dots \dots (10)$$

となり、 $\frac{dy}{dt}$ は y の一次関数として表される。 $\frac{dy}{dt} = \delta DO$ と、 $y = DO$ 、 $b = -1/422$ 、 $c = 8.26$ を代入すると、

$$\delta DO = -\frac{1}{422}(DO - 8.26) \dots \dots \dots (11)$$

となる。最後に、 $DO > c$ の時 $\delta DO < 0$ となり、 $DO < c$ の時 $\delta DO > 0$ となることを確認する。なお、このデータは時間の単位が分であるため、 δDO の単位は、 $mg\ l^{-1}\ min^{-1}$ である。

解析方法 2 (一般的な表計算ソフトで解析する場合)

Excel などの一般的な表計算ソフトでは、線形近似はできるが、 $y = ae^{bt} + c$ の形に近似することはできない。そこで、対数を取ることで、線形近似できる形に変換し、 a と b を求める。

両辺から c をひくと、

$$y = ae^{bt} + c$$

$$\Leftrightarrow y - c = ae^{bt}$$

となる。両辺の自然対数を取ると、 $y > c$ において、

$$\Leftrightarrow \ln(y - c) = \ln ae^{bt}$$

$$= \ln a + \ln e^{bt}$$

$$= \ln a + bt \ln e$$

$$= \ln a + bt \dots \dots \dots (12)$$

となり、時間 t の一次関数になる。

例として、解析方法 1 と同じデータから δDO を求める。

元データから、平衡に達した時の DO を読み取ると 8.26 であるから、 $c = 8.26$ である。元データから

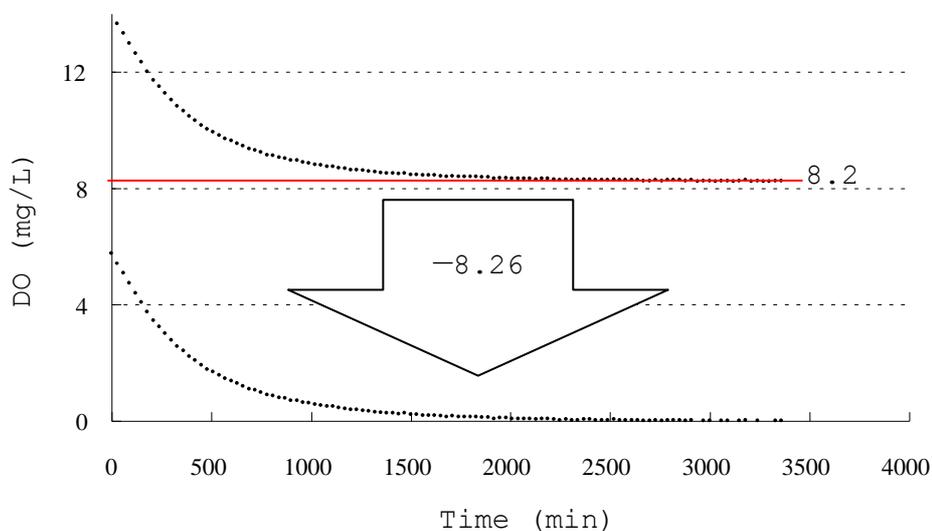


Fig. 4 元データから 8.26 を引いた図

8.26 を引くと、Fig. 4 のようになる。

8.26 をひいたデータ (> 0) について自然対数をとって線形近似すると、Fig. 5 のようになる。しかし、明らかに後半では誤差が大きく、うまく近似できていない。そこで、データ数ができるだけ多く、かつ $R^2 > 0.999$ となるように、適用するデータを時間の遅い方から削っていくと、Fig. 6 のようになる。

式 (12) と照らし合わせると、 $b = -0.00239$ 、 $\ln a = 1.74598$ である。以上から求められた b と c を式 (10) に代入すると、

$$\delta DO = -0.00239 (DO - 8.26) \dots \dots \dots (13)$$

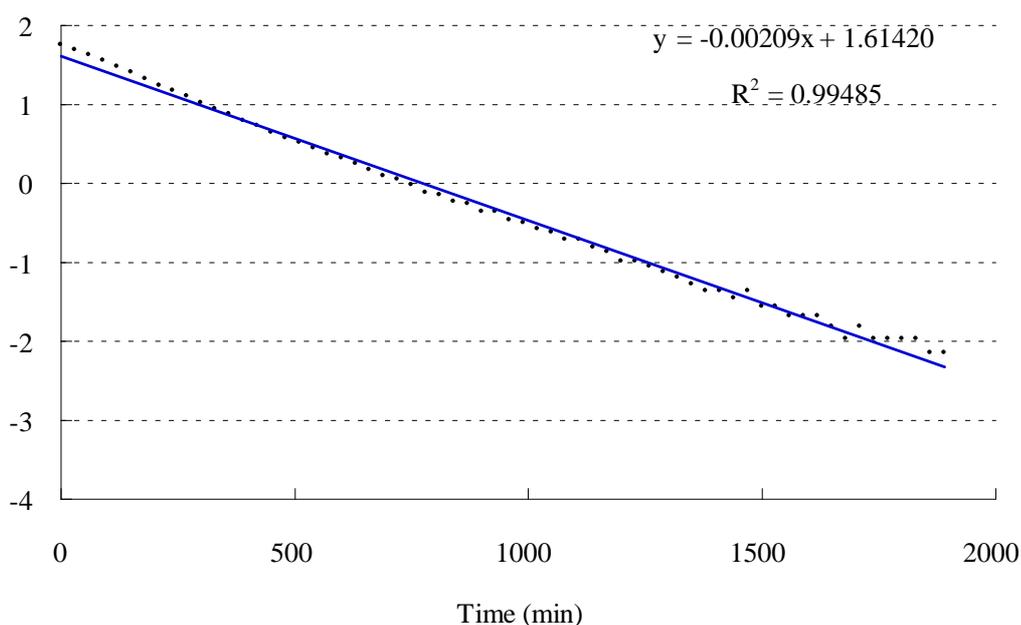


Fig. 5 元データから 8.26 を引き、自然対数をとって線形近似した図

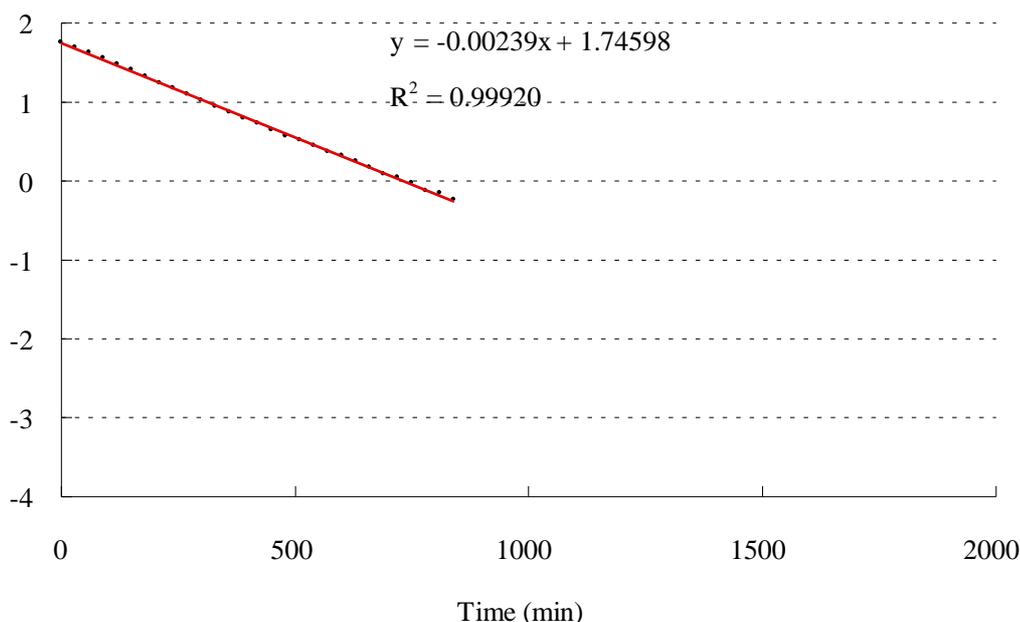


Fig. 6 測定誤差の分を取り除いて線形近似した図

となる。最後に、 $DO > c$ の時 $\delta DO < 0$ となり、 $DO < c$ の時 $\delta DO > 0$ となることを確認する。なお、このデータは時間の単位が分であるため、 δDO の単位は、 $\text{mg l}^{-1} \text{min}^{-1}$ である。

$$\text{解析方法 1 では } b = \frac{1}{422.28491 \pm 2.1275} \doteq -\frac{1}{422} = -0.00237 (-0.00236 \sim -0.00238)$$

で、解析方法 2 では $b = -0.00239$ だった。その差は 1% 未満であり、解析方法による差はないといえる。

3.3. 繰り返しおよび対照群

NOEC のスクリーニングのためには 1 回で良い。本試験では 3 回の繰り返しを行う。対照群には、試験群と同量の溶媒を添加する。溶媒に水以外の物質を使った場合には、水添加対照群と、溶媒添加対照群の両方をたてる。

3.4. N-system の準備

N-system の培養は無菌的に行う。試験用の培養も維持培養の方法準ずるが、種となる N-system の摂取量は 10 ml とする。すなわち以下の通りである。培地は TP 培地 (Table 1) を用いる。培地を調整後、300 ml フラスコに 200 ml ずつ分注してシリコ栓をし、オートクレーブ (121°C 、15 min) して滅菌する。室温まで冷ました後、10 ml の 2~8 週間培養した N-system をこれに加え、温度 25°C ・明暗周期 = 12H/12H・照度 2400 lx (光合成光量子束密度 $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) のインキュベーターで培養する。培養は明期の終了した直後から始める。培養開始 1~3 日後は、毎日攪拌し、その後は試験開始 (DO 電極取り付けまたは被験物質添加) まで静置培養する。

生物量や化学分析に使う分析用の N-system と、DO 測定用の N-system は別々に用意する。また、

DO 測定用の N-system は、電極を取り付けるまでは分析用のものと全く同じように培養する。

4. 試験の手順

4.1. DO 電極の設置

DO 電極は培養時間 14 日 (336 時間) で設置し、測定を開始する。電極の設置方法は 3.2.1 および 3.2.2 の方法に準ずる。電極は静かに設置し、生物の分布を崩さないようにすること。

電極を設置するときと、設置後は、無菌的に操作を行う必要はない。ただし、電極は、電極に支障が出ない範囲で、できるだけアルコール消毒し、匂いを嗅ぐなどしてアルコールが飛んでいることを十分に確認してから設置すること。

4.2. 被験物質の準備と添加方法

4.2.1. 被験物質の準備

被験物質は、原則的に蒸留水かミリ Q 水に溶解する。溶解しにくい場合には、超音波処理で分散させる。他に方法がない時に限り、超音波処理による分散もできないときは、HCl や NaOH などの無機酸・塩基、あるいは DMSO やメタノール、アセトンなどの有機溶媒を用いることができる。しかし、呼吸量への影響が非常に大きいので使用量は最小限にしなくてはならない。

4.2.2. 被験物質の添加方法

被験物質は、培養時間 15 日 (360 時間) に添加する。DO 測定用の N-system には、電極とフラスコの隙間からパストゥールピペット等のガラス管を差し込み、パストゥールピペット内に被験物質の溶液を静かに流して加える。その後、パストゥールピペット内を溶液の 3 倍量の溶媒を流して被験物質が全て N-system に加えられるようにする。この時、生物の分布を崩さないようにすること。攪拌はしない。この方法が難しい場合には、一旦電極を抜いて被験物質を加えることができる。電極の抜き差し及び被験物質を添加する過程で、DO 測定に影響がないように、また生物の分布を崩さないようにすること。

分析用の N-system にはシリコ栓を開けてピペットで静かに加え、生物の分布を崩さないようにすること。攪拌はしない。被験物質と溶媒の量は DO 測定用に揃える。

必ず水を添加した対照群を用意しなければならない。水以外の溶媒を使った場合には、水を添加した対照群とは別に、溶媒を添加した対照群を用意して溶媒の影響を確認しなければならない。

4.3. 試験期間

試験期間は、被験物質を添加した時点から 14 日 (336 時間) である。

4.4. 生物量の測定

被験物質を添加した時点から14日(336時間)後に、後述の方法で生物量を測定する。被験物質の量も同時に分析することが望ましい。

本マイクロゾムの構成種は、下記の通りである。

- *Aeolosoma hemprichi*(環形動物 貧毛類)
- *Philodina* sp.(輪形動物)
- *Lecane* sp.(輪形動物)
- *Cyclidium* sp.(繊毛虫)
- *Chlorella* sp.(緑藻)
- *Scenedesmus* sp.(緑藻)
- *Tolypothrix* sp.(糸状藻類)
- Bacteria (*Bacillus cereus* と、*Sinorhizobium* sp. または *Ensifer* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Dyella* sp. または *Luteibacter rhizovicinus* の存在が確認されている)

動物の *Aeolosoma hemprichi* と、*Philodina* sp.、*Lecane* sp.、*Cyclidium* sp.、及び藻類の *Chlorella* sp. と、*Scenedesmus* sp.、*Tolypothrix* sp. は測定しなければならない。ただし、藻類の生物量は Chlorophyll a 及び b で代用することができる。藻類の定量を Chlorophyll a と b で代用する場合は、Phycocyanin と Phycoerythrin、Allophycocyanin の定量も測定することが望ましい。

4.4.1. *Philodina* sp. 及び *Aeolosoma hemprichi* の定量

グリッド付き界線スライドグラスを用いて光学顕微鏡で計数する。独立した測定を3回以上行い、合計10匹以上、5 ml 以下を測定する。単位は N/ml とする。

4.4.2. *Lecane* sp. 及び *Cyclidium* sp. の定量

血球計算盤を用いて、位相差顕微鏡で計数する。独立した測定を3回以上行い、合計20匹以上、300 μ l 以下を測定する。単位は N/ml とする。

4.4.3. *Chlorella* sp. と、*Scenedesmus* sp. の定量

Chlorella sp. は単細胞や群体状で存在しているため、超音波処理(20 sec.)で群体を崩してから、血球計算盤を用いて、位相差顕微鏡で計数する。独立した測定を3回以上行い、数が多い方の藻類が合計400 cells に達するまで測定する。単位は cells/ml とする。

4.4.4. *Tolypothrix* sp. の定量

糸状藻類は一般的に超音波処理すると種の同定が困難になり、測定精度が僅かに低下するため、測定前に超音波処理をしない方が望ましい。*Tolypothrix* sp. が多く、絡まり合って測定が困難な場合に限

り、弱い出力で 10 sec 程度処理してから定量することができる。超音波処理の有無と出力及び時間は、試験毎に統一しなければならない。

必要に応じて超音波処理したサンプルの *Tolypothrix* sp. の長さを、血球計算盤を用いて顕微鏡で測定する。単位は cm/ml とする。顕微鏡のデジタル画面を通して長さを測定する。できない場合は、マイクロメーターを用いるか、スライドのマス目と比較しておよその長さを測定する。

4.4.5. Chlorophyll a 及び b

Chl a 及び b の抽出・定量方法は多種あるが、一般的に抽出効率が良く取り扱いの簡単なジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた抽出方法 (Burnison 1980) を紹介する。培養液を 1~2 ml 程度、 ϕ 25mm のガラスファイバーフィルター GF/F (Whatman, UK) または GF 75 (Advantec, 日本) でろ過する。濾紙を軽く丸め、1.5~2.0 ml の遠沈管に入れる。DMSO を加え、30 秒の超音波処理を 3 回行う。

一旦保存して後で測定する場合は、DMSO を加える前の状態で -20°C で保存または、DMSO を入れて超音波処理した状態あるいは完全に抽出した状態で 4°C で保存する。ただし、保存方法は全てのサンプルで統一しなくてはならない。

サンプルを冷凍または冷蔵していた場合は十分に室温に戻した後、 65°C で 10 分静置する。遠心分離 (e.g. 12,000 r.p.m で 10 分) してフィルターと細胞片を除去する。上澄みのスペクトルを分光光度計で測定し、下記の方程式 (Wellburn 1994) から Chl a 及び b の濃度を算出する。

$$A_{\lambda} = (\text{波長 } \lambda \text{ nm における吸光度}) - (\text{波長 } 750 \text{ nm における吸光度})$$

$$\text{Chl a} = 12.19 A_{665} - 3.45 A_{649}$$

$$\text{Chl b} = 21.99 A_{649} - 5.32 A_{665}$$

これに加えて、Phaeophytinization quotient (PQ 値 = A_{435} / A_{415}) をストレスの指標とすることができる。

参考文献

Burnison, B. K. (1980) Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, pp. 729-733.

Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, pp. 307-313.

4.4.6. Phycocyanin と Phycoerythrin、Allophycocyanin の定量

Phycocyanin (C-PC) と Phycoerythrin (C-PE)、Allophycocyanin (APC) の抽出・定量方法はいくつかあるが、簡便な方法 (Patel et al. 2005) を紹介する。

培養液を 5~10 ml 程度を遠心分離し、上澄み液を ϕ 25mm のガラスファイバーフィルター GF/F (Whatman, UK) または GF 75 (Advantec, 日本) でろ過する。濾紙を軽く丸め、下の遠沈管に戻し、沈殿と一緒にする。リン酸カリウムバッファー (0.1 M, pH 7.0) を加え、30 秒の超音波処理を 3 回行う。 -20°C で凍結し、室温で再融解する。

一旦保存して後で測定する場合は、沈殿とフィルターを一緒にした状態で -20°C 保存または、完全に抽出した状態で 4°C で遮光保存する。ただし、保存方法は全てのサンプルで統一しなくてはならない。

遠心分離(e.g. 12,000 r.p.m で 10 分)してフィルターと細胞片を除去するして上澄みのスペクトルを分光光度計で測定し、下記の方程式(Bennet and Bogorad 1973)から C-PC と C-PE、APC の濃度を算出する。

A_{λ} = 波長 λ nm における吸光度

$$\text{C-PC} = (A_{615} - 0.474 A_{652}) / 5.34$$

$$\text{APC} = (A_{652} - 0.208 A_{615}) / 5.09$$

$$\text{C-PE} = (A_{562} - 2.41 \text{ C-PC} - 0.849 \text{ APC}) / 9.62$$

参考文献

Patel, A. *et al.* (2005) Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat, *Protein Expr. Purif.*, **40**, pp. 248–255.

Bennet, A., and Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga, *J. Cell Biol.*, **58**, pp. 419-435.

4.4.7. 細菌

細菌は、試料 0.5～1 ml をとり、超音波処理(30 sec)を行った後、段階希釈法により菌数を調整し、生菌数(PY 培地培地を用いたコロニー計算法)を計測する。培養時間は 5 日以上。コロニー計算法では、30～300 CFU/plate(100 CFU/plate が理想的)のプレートを選び、2～3 枚計測する。単位は CFU/ml とする。

被験物質に抗生物質を用いる場合には、当該抗生物質に対する薬剤耐性細菌も定量することが望ましい。

PY 培地の組成

Polypepton	5 g
NaCl	4 g
Yeast extract	3 g
Agar	20 g
Distilled water	1 L

4.5. 呼吸量と総生産量の算出方法

4.5.1. 概要

被験物質添加後 312～336 時間の DO 濃度から呼吸量(R)と総生産量(P)を算出する。一般的に、溶存酸素濃度(DO)の変化から下記の式により呼吸量(R)と純生産量(Pn)、総生産量(Pg)を求めることができる。

$$\Delta \text{DO}_{D/L} = \text{暗期/明期での DO の増加量} \dots\dots\dots (1)$$

$$R = -2 \times \Delta \text{DO}_D \dots\dots\dots (2)$$

$$Pn = \Delta \text{DO}_L \dots\dots\dots (3)$$

$$Pg = Pn + \frac{1}{2} \dots\dots\dots (4)$$

実際には、生物活動とは無関係に、大気との酸素の交換があり、下記の式のように、その分の DO 変化を

補正する必要がある。

$$\delta DO_{D/L} = \text{暗期/明期での酸素が大気中から培養液中に溶解する速度} \dots\dots\dots (5)$$

$$R = -2 \times (\Delta DO_D - \delta DO_D) \dots\dots\dots (6)$$

$$P_n = \Delta DO_L - \delta DO_L \dots\dots\dots (7)$$

$$P_g = P_n + \frac{1}{2}R \dots\dots\dots (4)$$

なお、 δDO の求め方は 3.2.4 に示した。

4.5.2. 呼吸量と総生産量の算出

	時間	DO (mg/l)	ΔDO (mg/l)	$\Sigma \Delta DO$ (mg/l)
暗期	13	8.78		
	14	8.56	-0.220	} ΔDO_D -1.26
	15	8.32	-0.240	
	16	8.16	-0.160	
	17	8.00	-0.160	
	18	7.86	-0.140	
	19	7.78	-0.080	
	20	7.70	-0.080	
	21	7.64	-0.060	
	22	7.62	-0.020	
	23	7.58	-0.040	
24	7.56	-0.020		
明期	1	7.52	-0.040	
	2	8.70	1.179	} ΔDO_L 1.34
	3	9.60	0.900	
	4	10.03	0.440	
	5	10.05	0.020	
	6	9.86	-0.200	
	7	9.66	-0.200	
	8	9.48	-0.180	
	9	9.32	-0.160	
	10	9.18	-0.140	
11	9.06	-0.120		

表計算ソフトを使って、実際に呼吸量と総生産量を算出	12	8.94	-0.120
する方法を示す。	13	8.86	-0.080

例として、右表のような 1 日分のデータがあるとする。

13:00 から 1:00 が暗期で、1:00 から 13:00 が明期である。従って、13 時のデータは、ライトが消えた時の、1 時のデータはライトが点灯した時の DO である。

まず、各時間の ΔDO を算出する。例えば、13 時から 14 時の間の ΔDO は、(14 時の DO) - (13 時の DO) = 8.56 - 8.78 = -0.220 である。同様に 13 時~14 時、14 時~15 時というように、 ΔDO を計算する。

次に、暗期の ΔDO の合計と、明期の ΔDO の合計を算出する。次項では、 δDO の計算方法を説明する。

前項と同じ DO データから、 δDO の計算をする。

例えば、13時から14時における δDO は、13時のDOと14時のDOの平均を計算し、平均値を式(13)に代入して算出する。ただし、式(13)は分速であるため、60を乗じて時速に修正する必要がある。

$$\delta DO = -\frac{1}{422}(DO - 8.26) \text{mg/l/min}$$

⇔

$$\delta DO = -\frac{60}{422}(DO - 8.26) \text{mg/l/h}$$

これに13時のDOと14時のDOの平均値8.67を代入すると-0.0583になる。右の表では、DOの値に四捨五入されて表示されていない桁も含めて計算しているため、-0.0583ではなく-0.0577となっている。

以下、同様に13時～14時、14時～15時というように、 δDO を計算し、暗期の合計と明期の合計をそれぞれ算出する。

以上より、 $\Delta DO_D = -1.26$ 、 $\delta DO_D = 0.602$ 、 $\Delta DO_L = 1.34$ 、 $\delta DO_L = -1.84$ である。

式(6)、(7)、(4)より、呼吸量Rと、純生産量Pn、総生産量Pgが計算できる。

それぞれ計算すると、式(6)より、

$$R = -2 \times (\Delta DO_D - \delta DO_D) = -2 \times (-1.26 - 0.602) = 3.72 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

式(7)より、

$$P_n = \Delta DO_L - \delta DO_L = 1.34 - (-1.84) = 3.18 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

式(4)より、

$$P_g = P_n + \frac{1}{2}R = 3.18 + \frac{1}{2} \times 3.72 = 5.04 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

となる。

時間	DO	平均	δDO	$\Sigma \delta DO$
13	8.78			
14	8.56	8.67	-0.0577	} δDO_D 0.602
15	8.32	8.44	-0.0250	
16	8.16	8.24	0.0034	
17	8.00	8.08	0.0262	
18	7.86	7.93	0.0475	
19	7.78	7.82	0.0631	
20	7.70	7.74	0.0745	
21	7.64	7.67	0.0844	
22	7.62	7.63	0.0901	
23	7.58	7.60	0.0944	
24	7.56	7.57	0.0986	
1	7.52	7.54	0.1029	
2	8.70	8.11	0.0219	
3	9.60	9.15	-0.1259	
4	10.03	9.82	-0.2211	
5	10.05	10.04	-0.2538	
6	9.86	9.96	-0.2410	
7	9.66	9.76	-0.2126	
8	9.48	9.57	-0.1856	
9	9.32	9.40	-0.1614	
10	9.18	9.25	-0.1401	
11	9.06	9.12	-0.1216	
12	8.94	9.00	-0.1046	
13	8.86	8.90	-0.0904	

4.6. エンドポイント

本試験法のエンドポイントは、被験物質添加後 14 日における動物の *Aeolosoma hemprichi* と、*Philodina* sp.、*Lecane* sp.、*Cyclidium* sp. の個体数、藻類の *Chlorella* sp. と、*Scenedesmus* sp.、*Tolypothrix* sp. の生物量及び、被験物質添加後 312～336 時間における P と R と P/R 比である。

ただし、藻類の生物量を Ch1 a 及び b で代用した場合は、藻類に代わって Ch1 a と b をエンドポイントとする事ができる。

PQ 値と、C-PC、C-PE、APC 及び、細菌と薬剤耐性細菌も合わせて定量した場合は、エンドポイントに加えることができる。

4.6.1. 統計処理

各エンドポイントについて、それぞれ Tukey の方法または Tukey-Kramer の方法によって、多重比較をし、全てのエンドポイントについて対照群と有意差がなかった濃度のうち、最も高い濃度を無影響濃度 (NOEC) とする。しかし、今後も最適の統計モデルを模索し、検討していく必要がある。

(ポンチ絵)

