

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5RF-1801 化学物質の複合曝露による野外生態リスク評価方法の開発：
水質及び底生動物調査と環境水を用いた生物応答試験の活用
(JPMEERF20185R01)
平成30年度～令和2年度

Toward Development of Methods for Assessing Ecological Risks of Exposure to Chemical Mixtures in
the Field: Use of Water-Quality and Benthic Invertebrate Surveys and Effect-Based Monitoring

<研究代表機関>

国立研究開発法人産業技術総合研究所

<研究協力機関>

横浜国立大学

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和3年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	9
II-1 水質及び底生動物調査による生態影響評価 （国立研究開発法人産業技術総合研究所）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 河川水の生物応答試験による生態影響評価 （国立研究開発法人産業技術総合研究所）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	27
IV. 英文Abstract	29

I. 成果の概要

課題名 5RF-1801 化学物質の複合曝露による野外生態リスク評価方法の開発：水質及び底生動物調査と環境水を用いた生物応答試験の活用

課題代表者名 岩崎 雄一（国立研究開発法人産業技術総合研究所 安全科学研究部門 主任研究員）

重点課題 主：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 非該当

研究実施期間 平成30年度～令和2年度

研究経費

(千円)

	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
平成30年度	5,387	5,387
令和元年度	5,681	5,572
令和2年度	4,446	4,428
合計額	15,514	15,387

本研究のキーワード 化学物質、微量金属、複合影響、水生昆虫、河川、生物応答試験、ミジンコ、毒性試験、WET、生態リスク評価

研究体制

（サブテーマ1）水質及び底生動物調査による生態影響評価（産業技術総合研究所）

（サブテーマ2）河川水の生物応答試験による生態影響評価（産業技術総合研究所）

研究協力機関

横浜国立大学

1. はじめに（研究背景等）

我が国の水環境における化学物質の生態リスク規制は、大気や土壌環境基準と同様に、水生生物の保全に係る水質環境基準（例えば、亜鉛は淡水域で0.03 mg/L）として物質毎にその値が設定されている。一方、多様な排水が流れ込む都市河川や鉱山地域の河川などの水環境中では、複数の化学物質や金属が同時に存在しており、実河川で採取した環境水を用いた毒性試験研究でも、藻類やミジンコ類への毒性影響が実際に検出されている。しかし、我が国の生態リスク規制では、化学物質の複合曝露による影響を考慮しておらず、早急に適切なリスク評価に基づいた合理的な管理方策の構築が望まれる。

実環境での複合曝露による生態リスク評価方法には、化学物質個別の環境中濃度と生態毒性情報から影響を予測する方法、と環境水を用いた生物応答試験の2つがある。前者については、個別化学物質のハザード比（HQ：環境中濃度を予測無影響濃度（PNEC）等で除した値）の和を用いることが、データ要求量の面でも安全側の評価に繋がるという意味でも最も有望である。当該評価では、HQの和が1を超えるとリスクの懸念ありと結論づけられるが、対象物質数が増加するほど、当然HQの和は1を超過する可能性が高くなるため、リスクを過大評価する可能性がある。さらに、これら2つ評価方法を

複合曝露の管理に活用するためには、HQ比の和や生物応答試験の結果と実環境において観測される影響レベル（野外影響レベル）の関係を事前に把握しておくことが不可欠であるが、関連する知見は日本国内及び国際的にも極めて限定的である。

2. 研究開発目的

化学物質の複合曝露による野外生態リスクを適切に見積もることは、合理的な化学物質の生態リスク管理方策を検討・実施する上で必要不可欠な第一ステップである。本研究では、金属以外の汚濁負荷がほとんどない鉱山地域の上流河川を対象として、水質（金属濃度）に基づく生態リスク評価とミジンコ類を用いた環境水の生物応答試験による評価に加えて、河川底生動物を対象とした野外影響評価を実施することで、以下の目的を設定した（図0.1）。

1. 金属濃度から計算したハザード比の和（HQの和：環境中濃度を予測無影響濃度（PNEC）等で除した値の和）及び生物応答試験での影響レベルと、底生動物調査結果から得られる野外影響レベルの関係を評価し、各影響評価方法間の整合性を明らかにする
2. 特に、複合曝露による生態リスク評価を実施する際の閾値として用いられることが多いHQの和が1前後において野外で観測される影響レベルや生物応答試験で影響が観察された場合の野外影響レベルを明らかにする

以上より、得られた研究結果を統合的に解析・考察することによって、水質測定に基づく生態リスク評価（ここでは、HQの和）、生物応答試験及び河川底生動物調査を活用した化学物質複合曝露の野外生態リスク評価方法を提案する。水質に基づく生態リスク評価や環境水を用いた生物応答試験と野外影響レベルの関係を評価し、それら評価方法の“使いどころ”を明らかにする本研究は、化学物質の生態リスク管理方策を検討する上で貴重な基盤情報を提供できる。さらに、複合曝露による生態リスク評価だけでなく、個別の化学物質に着目しても、予測無影響濃度（PNEC）や水質環境基準を超過する地点における実際の生態影響を解釈する上で本研究の成果は活用できると考えられる。

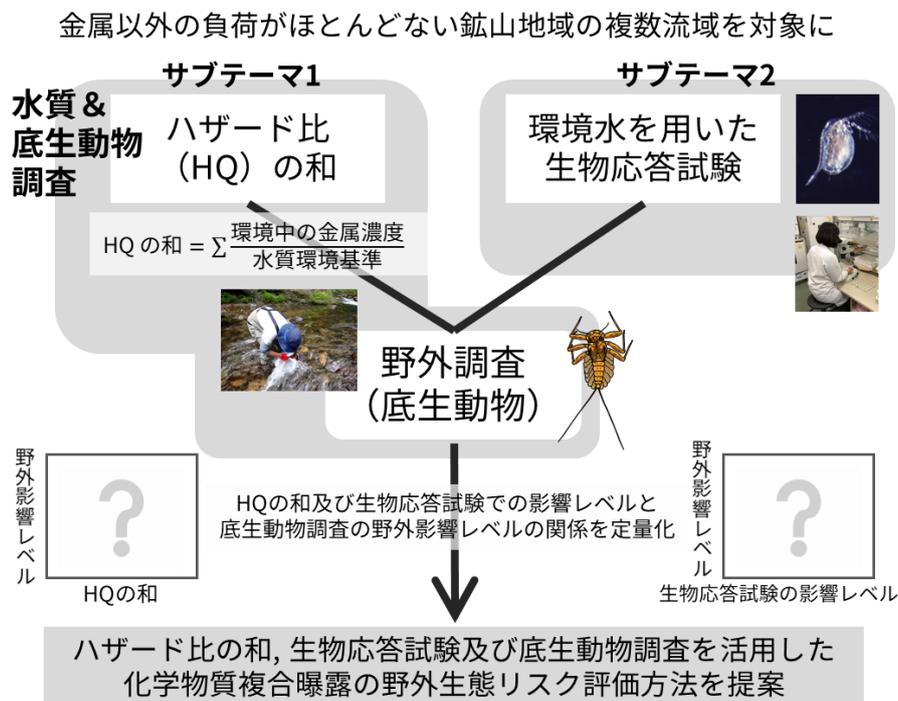


図0.1 本研究のアプローチ

3. 研究目標

全体目標	休廃止鉱山周辺の河川を対象に、底生動物調査と水質調査（金属濃度に基づくハザード比の和）及び環境水を用いた生物応答試験による影響評価結果の関係を明らかにし、その関係をもとに、実環境において化学物質の複合曝露による生態リスクを適切に見積もるための野外影響評価方法を提案する。
サブテーマ1	水質及び底生動物調査による生態影響評価
サブテーマリーダー/所属機関	岩崎雄一/産業技術総合研究所
目標	休廃止鉱山周辺の河川を対象に合計25～30地点程度の調査地点を設定し、水質及び底生動物調査を実施する。金属濃度に基づくハザード比の和と底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を示すとともに、その関係に基づいて野外影響を推定する上でのハザード比の和の活用方法や有用性を評価する。
サブテーマ2	河川水の生物応答試験による生態影響評価
サブテーマリーダー/所属機関	眞野浩行/産業技術総合研究所
目標	サブテーマ1で設定した合計25～30地点程度の調査地点で採取した河川水について、ミジンコ類を用いた生物応答試験を実施する。試験結果から得られるミジンコ類への河川水の影響レベルと底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を示すとともに、その関係に基づいて野外影響を推定する上での生物応答試験の活用方法や有用性を評価する。

4. 研究開発内容

北海道、兵庫県、岐阜県、岩手県にある4流域を対象にして、休廃止鉱山が上流に位置する河川および比較対照河川に、鉱山廃水の影響をうける評価地点（13地点）とリファレンス（比較対照）地点（13地点）をそれぞれ設定し、合計26地点で金属濃度を含む水質、底生動物調査を実施した。微量金属は、亜鉛（Zn）、銅（Cu）、カドミウム（Cd）、鉛（Pb）を対象として分析を行い、硬度で補正した米国の水質クライテリアで除して、HQの和を計算した。また、野外調査時に河川水を採取し、無希釈の河川水のオオミジンコ遊泳阻害試験および繁殖試験、ニセネコゼミジンコの短期慢性毒性試験を実施し、河川水によるミジンコへの影響の有無を調査し、その結果に基づき3段階の影響レベルに分類した（影響レベル0：影響不検出、1：有意な繁殖低下あり&遊泳阻害なし、2：リファレンス地点および対照区と比べて有意な繁殖低下及び遊泳阻害あり）。なお、研究計画書では、エンドポイントとしてオオミジンコの死亡を調査することとしていたが、短期曝露によるオオミジンコへの化学物質の影響を調査する試験では遊泳阻害をエンドポイントにすることが多いため、遊泳阻害をエンドポイントとして使用することとした。また、オオミジンコの遊泳阻害が検出された河川水について、遊泳阻害を引き起こす原因となる金属の特定を試みた。底生動物調査結果に基づく野外影響レベルは、金属感受性の高いヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科を含むカゲロウ目で観察された影響に基づき、4段階（野外影響レベル0：影響不検出、1：ヒラタカゲロウ科またはマダラカゲロウ科の個体数の減少、2：カゲロウ目種数の減少、4：コカゲロウ科のみ出現またはカゲロウ目不出現）に分類し、HQの和や生物応答試験から得られた影響レベルとの関係を評価した。

中間ヒアリングの際に、底生動物だけでなく魚類を用いた調査の必要性や金属の生態影響調査における底生動物の位置づけに関するコメントがあった。そのため、補足的に、河川での金属の生態影響評価における底生動物の位置づけを明らかにすることを目的として、関連する既往研究のシステマティックレビューを行った。具体的には、河川の水生生物調査における代表的な生物学的グループである付着藻類、底生動物、魚類を対象として、これまで実施された河川での金属の生態影響評価研究において(1)どの生物学的グループが調査に用いられているか、(2)これらの生物学的グループ間で指標の応答は類似するか、(3)金属汚染に対して応答性の高い生物学的グループはどれか、の3つの問いを立てて調査を行った。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

4流域の合計26地点で実施した水質及び底生動物調査結果から、4つの金属の濃度(Cu、Zn、Cd、Pb)を対象に米国の硬度補正の水質クライテリアに基づきハザード比(HQ)の和を計算し、カゲロウ目で観察された影響に基づき分類した4段階の野外影響レベルとの関係性を評価した。その結果、HQの和が1~5程度では、野外影響レベル0(影響不検出)の場合がほとんどであったのに対し、HQの和が5~10以上で金属感受性の高いヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科の個体数の減少(野外影響レベル1)やカゲロウ目種数の減少(野外影響レベル2)が観察された(図0.2の左)。HQの和が40を超えた地点では、カゲロウ目では金属濃度が高い地点でも出現するコカゲロウ科のみが採集された(野外影響レベル3)。以上より、水質(本研究では金属濃度)から計算されたHQの和と底生動物調査結果に基づく野外影響レベルとの関係を明らかにし、多少の不確実性は残るものの、水質(金属濃度)から計算されたHQの和から野外影響レベルをある程度推測可能であることを示すことができた(サブテーマ1の目的に対応)。また、上述したHQの和に関する閾値は、計算に用いる水質ベンチマークに依存して多少変化する。日本では、2021年5月時点で、金属では亜鉛のみに水質環境基準が設定されており、銅などの他の金属については水質環境基準が設定されていない。これらの金属について水質環境基準が設定されれば、本研究で収集した金属濃度及び底生動物データを用いて、日本の水質環境基準に基づくHQの和と野外影響レベルの関係を評価することも可能である。日本では、本研究で取得した野外調査データはほとんどなく、HQの和と野外影響レベルとの関係性の評価に活用できるデータを本研究により取得できたこと自体にも価値があると考えられる。また、既往研究のシステマティックレビューの結果から、河川における金属の生態影響調査研究では、付着藻類や魚類と比較して、国際的に底生動物が最も選択される生物学的グループであり、一般的に用いられる底生動物の個体数や種数が他のグループの生物指標と比較して金属汚染に対して比較的高い応答性を示すことが示唆された。

オオミジンコ及びニセネコゼミジンコを用いた生物応答試験についても、得られた試験結果からミジンコへの影響を3段階に区分し、上述した底生動物調査結果に基づく4段階の野外影響レベルとの関係を調査した。いずれの生物応答試験でも影響が検出されなかった(影響レベル0)の地点では野外影響レベルは1(ヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科の減少)以下となり、有意な繁殖低下及び遊泳阻害が観測された(影響レベル3の)地点では、野外影響レベルは2(カゲロウ目の種数の減少)以上になる関係がみられた(図0.2の右)。このことは、オオミジンコ等を用いた繁殖試験の結果によって、野外影響レベルが1以下かどうかを判別できる可能性や、オオミジンコの遊泳阻害試験の結果から野外影響レベルが2以上かどうかを判別できる可能性が示唆された。

本調査結果は、金属濃度に基づくHQの和及びミジンコ類を用いた河川水の水質生物応答試験から得られる影響レベルと、底生動物調査結果に基づく野外影響レベルとの関係を明らかにし、HQの和や生物応答試験の影響レベルから野外影響レベルをある程度推測することができることを示している。したがって、当該成果は、実環境において化学物質の複合曝露による生態リスクを見積もる上で、水質調査に基づくHQの和や生物応答試験が有効な野外影響評価方法であることを示唆している。一方で、これらの手法に

よる野外影響レベルの予測にはある程度の不確実性があり、より適切に野外影響を見積もるために底生動物調査が有効である。底生動物調査では、観測された影響に寄与する要因の特定は難しいが、底生動物調査に水質調査に基づくHQの和や生物応答試験を併用することで、影響要因（例：金属濃度が影響しているのか、それ以外の水質要因なのか）に関する考察も可能になる（詳しくは、「II-1の4. 結果と考察」を参照）。以上まとめると、本研究では亜鉛等の金属濃度が高い休廃止鉱山下流の河川において、化学物質（本研究では金属）の複合曝露による生態リスクを適切に見積もるための野外影響評価方法として、①水質調査に基づくHQの和による簡易的な評価やミジンコ類を用いた生物応答試験による影響評価から野外影響レベルを推測可能であり、これらの手法が有効であること、②ただし、これら2つの手法による評価には一定の不確実性があり、よりの確かな影響レベルの推定や把握には底生動物調査が有用であること、③底生動物調査に水質調査や生物応答試験を併用することで影響要因に関する考察が可能になること、を示した。化学物質の複合曝露による生態リスクを適切に見積もるためには、評価目的（例：評価に求められる精度）や対象河川の特長（例：複数の影響要因の存在）などによって、これらの手法を組み合わせることで評価することが有用である。本研究では、HQの和をできるだけ的確に推定するために、金属負荷が明らかな休廃止鉱山下流の河川を対象としたが、人為的な負荷が大きい都市河川等では河川中に無数の化学物質が存在していると想定される。本研究の成果はこのような河川でもミジンコ類を用いた生物応答試験を活用することで、水質に起因する野外影響レベルの大きさを推測できる可能性を示しているが、都市河川等への応用にはさらなる調査検証が必要である。

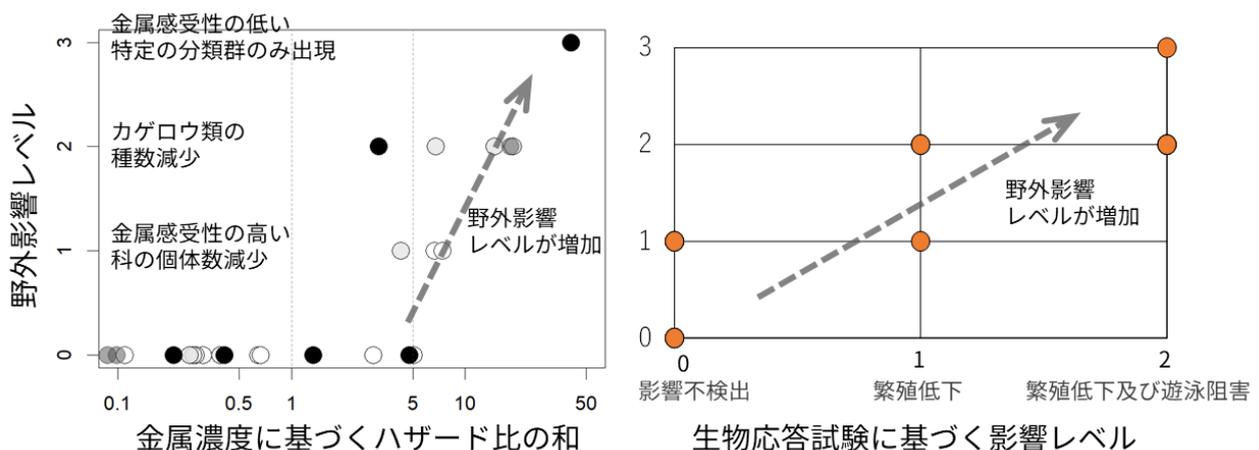


図0.2 金属濃度に基づくハザード比の和及び生物応答試験に基づく影響レベルと底生動物調査結果に基づく野外影響レベルとの関係。左図及び右図の詳細はそれぞれ図1.2及び図2.4を参照された。なお、これらの結果は、[Iwasaki et al. \(2023\)](#)として論文公開済み。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

経済産業省 産業保安グループ 鉱山・火薬類監理官付が発行した「休廃止鉱山の坑廃水が流入する河川における生態影響評価ガイダンス（案）」において、本研究の成果である水質及び底生動物調査結果やシステムティックレビューの結果が複数回引用されており、特に、各影響評価方法（水質調査、生物応答試験、水生生物調査）の実施方法や生態影響評価における役割などについて、ガイダンス（案）の作成に貢献した。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

・予測無影響濃度や水質環境基準の超過と野外影響との関係

室内での毒性試験結果に基づく予測無影響濃度（PNEC）や水質環境基準は、一般的に安全側に設定されている。一方で、それらの超過は、詳細なリスク評価やさらなる規制が必要かどうかの判断材料となる。したがって、それらの超過が実環境における生態影響とどのような関係にあるかを明らかにすることが適切な判断には必要となるが、そのような情報は国内ではほとんどない。本研究では、4つの金属（銅、亜鉛、カドミウム、鉛）を対象に、水質環境基準の代替として米国の水質クライテリアを参照しているが、それらの超過度の総和が5倍程度の河川地点のほとんどで、底生動物の種数や個体数がリファレンス（比較対照）地点と同様であり、金属感受性の高いヒラタカゲロウ科等の個体数の減少は観察されなかった。すなわち、本研究結果は、任意の物質の環境中濃度がPNECや水質環境基準を多少超過したとしても、野外影響が観測されるとは限らないことを示している。当該研究成果は、生態リスク評価におけるPEC/PNEC比が1を超過する地点や水質環境基準を超過する地点における実際の生態影響を解釈する上で活用できると考えられる。また、亜鉛以外の水質環境基準が設定されていない他の金属（銅等）による野外での影響への寄与も推測されたため、野外調査及び生物応答試験による本研究の成果は、これらの金属について環境基準を検討する際にも有用な知見を提供すると期待される。

・生物応答試験結果と野外影響の関係及び低硬度の河川水への生物応答試験の適用可能性

化学物質の複合曝露による実環境での生態リスクを評価する際に環境水の生物応答試験を使用するためには、生物応答試験の結果と野外調査結果の関係を把握する必要がある。本研究のこれまでの成果によって、金属の生態影響が懸念される河川において生物応答試験結果と野外調査結果が定性的に一致した事例を例示することができた。これは、化学物質の複合曝露の管理における生物応答試験の活用の可能性を示唆するものであり、環境省が検討中の「生物応答試験を用いた排水の評価手法（仮称）とその活用の手引き」（中間とりまとめ）において今後の課題とされている、公共用水域への生物応答試験の適用とその有用性の検討に貴重な基礎知見を提供すると考える。

また、実環境での化学物質の生態リスク評価等に生物応答試験を広く活用する上で、さまざまな水質の環境水に対する生物応答試験の適用性を検討する必要がある。本研究の成果により、低硬度の環境水に対してオオミジンコ及びニセネコゼミジンコの繁殖試験を適用可能であることを示すことができた。

5-3. 研究目標の達成状況

新型コロナウイルス感染症の拡大防止のために、最終年度に予定していた野外調査が一部実施できなかったが、合計26地点において水質及び底生動物調査を実施し、一部のリファレンス（比較対照）地点を除く24地点でミジンコ類を用いた生物応答試験を実施した。当該調査結果から、金属濃度に基づくハザード比（HQ）の和及びミジンコ類を用いた生物応答試験結果から得られる影響レベルと底生動物調査結果に基づく野外影響レベルの関係を明らかにすることができた（図0.2）。このような研究成果は国内ではこれまでに例がなく国際的にも限られている。また、例えば、HQの和が1～5程度では金属に対して感受性の高い底生動物（科）の個体数の減少も検出されない「野外影響レベル0」の場合がほとんどであることなどから、HQの和の大きさや生物応答試験で観測された影響レベルから、底生動物調査結果に基づく野外影響レベルをある程度推測できることが可能であることを示している。したがって、本研究結果から、化学物質（本研究では金属）の複合曝露による生態リスクを適切に見積もるための野外影響評価方法として、①水質調査に基づくハザード比の和による簡易的な評価やミジンコ類を用いた生物応答試験による影響評価が有効であること（これらの手法から野外影響レベルを推測可能であること）、②ただし、これら2つの手法による評価には一定の不確実性があり、よりの確かな影響レベルの推定や把握には底生動物調査が有用であること、③底生動物調査に水質調査や生物応答試験を併用することで影響要

因に関する考察が可能になること、を示した。さらに、化学物質の複合曝露による生態リスクを適切に見積もるためには、評価目的（例：評価に求められる精度）や対象河川の特長（例：複数の影響要因の存在）などによって、これらの手法を組み合わせることを提案した。これらの成果に加えて、河川において金属の生態影響調査を実施する上での基礎的な情報として、底生動物の国際的な利活用状況や底生動物を用いることの利点及び留意点をシステムティックレビューにより整理し、国際誌に論文化することができた。この成果は、水質及び底生動物調査結果とともに、経済産業省の「休廃止鉱山の坑廃水が流入する河川における生態影響評価ガイドライン（案）」に引用され、すでに行政に活用されている。したがって、当初の研究目標を達成し、それを上回る成果が得られたと考える。

本研究遂行における肝の一つは、本研究の問いを評価できる調査対象河川及び地点の設定である。本研究では、対象鉱山を最もよく知る管理者である自治体や企業と積極的に情報交換することで、鉱山廃水等の負荷源、河川中濃度、リファレンス候補地点などに関する情報を綿密に収集し、調査対象河川や地点を選出した。風評被害を防ぐために、本報告書では匿名化しているが、この場を借りてご協力頂いた関係者各位に謝意を表したい。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

3件

<主な査読付き論文>

- 1) Hiroki Namba*, Yuichi Iwasaki*, Kentaro Morita, Tagiru Ogino, Hiroyuki Mano, Naohide Shinohara, Tetsuo Yasutaka, Hiroyuki Matsuda, Masashi Kamo (2021) Comparing impacts of metal contamination on macroinvertebrate and fish assemblages in a northern Japanese river. *PeerJ*. 9:e10808. (*これらの著者は本研究に等しく貢献した：IF = 2.38)
- 2) Hiroki Namba*, Yuichi Iwasaki*, Jani Heino, Hiroyuki Matsuda (2020) What to survey? A systematic review of the choice of biological groups in assessing ecological impacts of metals in running waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 39(10): 1964-1972. (*これらの著者は本研究に等しく貢献した：IF = 3.15)
- 3) Yuichi Iwasaki, Megumi Fujisawa, Tagiru Ogino, Hiroyuki Mano, Naohide Shinohara, Shigeki Masunaga, and Masashi Kamo (2020) Does a sum of toxic units exceeding 1 imply adverse impacts on macroinvertebrate assemblages? A field study in a Northern Japanese river receiving treated mine discharge. *Environmental Monitoring and Assessment*. 192(2): 83 (IF = 1.90)

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	3件
その他誌上発表（査読なし）	1件
口頭発表（学会等）	13件
「国民との科学・技術対話」の実施	0件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	0件

7. 国際共同研究等の状況

海外研究機関：Finnish Environment Institute

国際共同研究計画名：A Systematic Review of the Choice of Biological Groups in Assessing Ecological Impacts of Metals in Running Waters

協力案件名：金属の生態影響評価に関するシステムティックレビューの実施及び議論

カウンターパート氏名：Dr. Jani Heino

所属：Freshwater Center, Finnish Environment Institute

国名：フィンランド

連携内容及び当該連携が本研究成果にもたらす効果：

河川における金属の生態影響評価に関するシステムティックレビューを実施するにあたり、既往知見の整理や方針の決定等の研究実施段階から議論し、その結果のまとめや論文化まで協働して行った。その成果はすでに、Namba et al. (2020)として公開済みである。なお、Heino博士は世界的にも著名な河川生態学の研究者であり、当該システムティックレビューの先行研究にあたる論文の著者である。

8. 研究者略歴

研究代表者

岩崎 雄一

横浜国立大学大学院環境情報学府修了、博士（環境学）、現在、産業技術総合研究所主任研究員

研究分担者

眞野 浩行

筑波大学大学院生命環境科学研究科修了、博士（理学）、現在、産業技術総合研究所主任研究員

II. 成果の詳細

II-1 水質及び底生動物調査による生態影響評価

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

エネルギー・環境領域 安全科学研究部門

岩崎 雄一

<研究協力者>

横浜国立大学 大学院環境情報学府

難波 広樹

松田 裕之

[要旨]

本研究は、化学物質の野外生態影響を推定する上で、水質に基づく生態リスク評価の活用方法や有用性を検討するために、金属以外の汚濁負荷がほとんどない休廃止鉱山周辺流域を対象に、金属濃度 (Cu、Zn、Cd、Pb) から計算したハザード比 (HQ) の和と底生動物調査結果から得られる野外影響レベルの関係を評価し、これらの影響評価方法間の整合性を明らかにすることを目的とした。また、補足的に、河川での金属の生態影響評価における底生動物の位置づけを明らかにすることを目的として、関連する既往研究のシステマティックレビューを行った。当該システマティックレビューの結果、河川における金属の生態影響調査研究では、付着藻類や魚類と比較して、国際的に底生動物が最も選択される生物学的グループであり、一般的に用いられる底生動物の個体数や種数が他のグループの生物指標と比較して金属汚染に対して比較的高い応答性を示すことが示唆された。水質及び底生動物調査は、4流域の合計26地点（うち、13地点が金属濃度の低いリファレンス地点）で実施した。当該調査結果から、測定したCu、Zn、Cd、Pb濃度について米国水質クライテリアの超過度合いから計算したHQの和と、金属感受性の高いヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科を含むカゲロウ目で観察された影響に基づき分類した4段階の野外影響レベルとの関係を評価した。HQの和が1～5程度では、野外影響レベル0（影響なし）の場合がほとんどであったのに対し、HQの和が5～10以上でヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科の個体数の減少（野外影響レベル1）やカゲロウ目の種数の減少（野外影響レベル2）が観察された。HQの和が40を超えた地点では、ヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科はほとんど出現せず、カゲロウ目では金属濃度が高い地点でも出現するコカゲロウ科が出現していた（野外影響レベル3）。上述したHQの和の閾値は計算に用いる水質ベンチマークに依存して多少変化するが、他の水質ベンチマーク基準でも同様な傾向が観察された。以上、本サブテーマ1の調査結果から、水質（金属濃度）から計算されたHQの和と底生動物調査結果に基づく野外影響レベルとの関係を明らかにすることができた。このことは、多少の不確実性は残るものの、水質（金属濃度）から計算されたHQの和から野外影響レベルをある程度推測可能であることを示しており、サブテーマ1の研究目標を達成することができたと考える。

1. 研究開発目的

多種多様の化学物質を含む排水が流入する河川等の水環境において、化学物質の複合曝露による野外生態リスクを適切に見積もることは、合理的な化学物質の生態リスク管理方策を検討・実施する上で必要不可欠な第一ステップである。環境中の化学物質濃度を水質環境基準等の水質ベンチマークで除した値の和であるハザード (HQ) の和は、化学物質の複合曝露による生態リスクや影響を推測する上で有効な手法の一つである。しかし、このHQの和と実環境において観測される影響レベル（野外影響レベル）の関係に関する情報は国内外でほとんどなく、両影響評価結果にどの程度の整合性があるのか不明確である。そこで、野外影響を推定する上でのHQの和の活用方法や有用性を検討するため、金属以外の汚濁負荷がほとんどない休廃止鉱山周辺流域を対象に、金属濃度に基づくHQの和と底生動物調査結果から得

られる野外影響レベルの関係、特に複合曝露による生態リスク評価を実施する際の閾値として用いられることが多いHQの和が1前後における野外影響レベルを明らかにすることを目的とした。

2. 研究目標

休廃止鉱山周辺の河川を対象に合計25～30地点程度の調査地点を設定し、水質及び底生動物調査を実施する。金属濃度に基づくハザード比の和と底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を示すとともに、その関係に基づいて野外影響を推定する上でのハザード比の和の活用方法や有用性を評価する。

3. 研究開発内容

・水質及び底生動物調査による生態影響評価

【調査地点の設定及び野外調査の実施】

北海道、兵庫県、岐阜県及び岩手県に位置する、金属以外の汚濁負荷がほとんどない休廃止鉱山周辺の4流域（それぞれA、B、C、Dとする）の合計26地点で、水質及び底生動物調査を実施した。調査時期は、多くの水生昆虫が羽化前で河川内に存在している春先から初夏（雪解けによる増水が見られる場所については、できるだけその増水がおさまった直後）として、それぞれ、2018年6月、2019年3月、2019年6月、2020年6月に実施した。調査地点は、岩手県の流域D（リファレンス3地点を含む合計6地点）は図1.1の方法A、北海道の流域A（リファレンス4地点を含む合計9地点）と兵庫県の流域B（リファレンス3地点を含む合計7地点）は方法B、岐阜県の流域C（リファレンス3地点を含む合計4地点）については方法Cの方法を参照して、鉱山廃水（処理水または未処理水）の影響を受ける調査対象地点（以下、評価地点）とリファレンス地点（比較対照地点）の物理化学的環境ができるだけ類似するように設定した。なお、流域A及びBに設定した2地点（地点名はいずれもS1a：後述の表1.2参照）は鉱山廃水（処理水）の流入前ではあるが、他のリファレンス地点と比較して金属濃度が高かったため、ここでは評価地点として扱った。

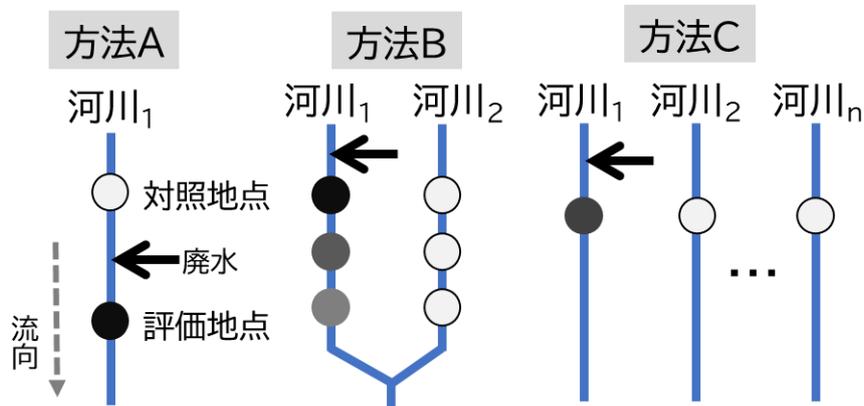


図1.1 本研究で用いた調査地点の設定方法

黒丸の色の濃さは、金属濃度の高さを意味し、方法Bでは、下流に行くほど希釈等によって金属濃度が減少することを例として示している。

【水質、物理環境、底生動物の調査内容】

調査地点の水温、pH、溶存酸素、電気伝導度は、マルチ水質測定器（WTW社、Multi 3630IDS）を用いて、現地調査時で測定した。金属濃度（Cu、Zn、Cd、Pb）は、採取した河川水を孔径0.45 μmのメンブレンフィルターを用いて現地でろ過し、採水当日に硝酸を用いて酸固定した試料を冷蔵保存した。金属濃度（溶存態）は、誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS、Thermo Scientific、ELEMENT XR）により実験室で分析した。溶存有機炭素（DOC、Dissolved Organic Carbon）は金属濃度分析用試料と同様に、現地でろ過後に冷蔵保存し、実験室においてTOC計（島津製作所、TOC-L CPH）で分析した。カルシウム及びマグネシウム濃度は、イオンクロマトグラフ（Thermo Fisher Scientific、DIONEX ICS-1100/2100）また

は日立ハイテクノロジーズ、日立 Z-2000) を用いて分析し、硬度を計算した ($2.497 \times [\text{Ca}] + 4.118 \times [\text{Mg}]$)。また、物理環境項目として、各調査地点において川幅を測定し、底生動物を採集した早瀬において、瀬幅、最大水深、最大流速 (流速計: KENEK, VR-301) を測定した。最大水深及び最大流速は、底生動物を採集した早瀬の10~20箇所まで測定し、その最大値を記録した。また、底生動物を採集した礫ごとに水深及び6割水深における流速を計測した。

金属濃度に基づくHQの和は、以下の式に基づき、測定された各金属濃度 (Cu, Zn, Cd, Pb) を対応する米国の水質クライテリア (水生生物保全のための慢性のクライテリア) で除し、それらの和を求めることで計算した。米国の水質クライテリアは硬度に依存して変化するため、本研究では、各地点で測定された硬度を用いて水質クライテリアを導出した¹⁾。なお、本研究では、金属分析の際にAg, Al, Mn, Cr, Fe, Ni, Asも測定したが、定量下限未満または生態影響が懸念されるレベルではなかったため、本計算には利用しなかった。

$$\text{ハザード比の和} = \sum \frac{\text{各金属濃度}}{\text{米国の水質クライテリア}}$$

底生動物は、各調査地点の早瀬よりランダムに選定した5個の礫 (最大径: 15-25cm程度) より、サーバーネット (メッシュサイズ0.375 mm) で採集した (礫単位採集法)。各地点5個の礫から採集したサンプルは混合せずに、99%エタノールを用いて現地で固定した。各底生動物サンプルは室内で目合い0.5 mmのふるいで漉し、ソーティング後に種または属レベルまで同定し、分類群ごとに個体数を計数した。

【野外影響レベルの評価】

ハザード比 (HQ) の和と底生動物調査結果から得られる野外影響レベルの関係を評価するためには、本来生息する底生動物が異なる調査流域間における野外影響を統一的に比較する必要がある。例えば、金属汚染に応答性の高いカゲロウ目の種数は、リファレンス地点でも礫当たり6.4~12.6分類群と一定のばらつきがある (平均±標準偏差は 9.9 ± 1.9 : 後述の表1.2参照)。そのために、本研究では、各評価地点に対応するリファレンス地点と比較して、金属感受性の高いヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科²⁾を含むカゲロウ目の個体数や種数で検出された影響から、坑廃水 (処理水) が流入する評価地点における野外影響レベルを表1.1に示した4段階に分類した。具体的には、図1.1の方法Aで調査した流域Dについては評価地点と鉱山廃水流入前のリファレンス地点との間での比較、方法BまたはCで調査した流域A~Cについては、評価地点と同様の標高及び流程に設定したリファレンス地点との比較について、多重比較 (single-step P-value adjustment³⁾) によって統計学的に有意な差異の有無を調査し (有意水準は0.05: 方法の詳細は、Namba et al. 2021⁴⁾ も参照)、各評価地点に野外影響レベルを割り当てた。

表1.1 底生動物調査結果に基づく野外影響レベル

野外影響レベル	定性的評価	判断基準
0	影響なし	影響を不検出 (リファレンス地点含む)
1	小	ヒラタカゲロウ科またはマダラカゲロウ科の個体数の減少
2	中	カゲロウ目種数の減少
3	大	コカゲロウ科のみ出現またはカゲロウ目不出現

・河川での金属の生態影響調査における底生動物の活用状況と応答性の評価

中間ヒアリングの際、底生動物だけでなく魚類を用いた調査の必要があるかどうかや金属の生態影響調査における底生動物の位置づけについて、コメントがあった。そのため、本研究では、河川での金属の生態影響評価における底生動物 (主に、カゲロウ類などの水生昆虫) の位置づけを明らかにするために、関連する既往研究のシステムティックレビューを行った。具体的には、河川の水生生物調査にお

る代表的な生物学的グループである付着藻類、底生動物、魚類を対象として、これまで実施された河川での金属の生態影響評価研究において(1)どの生物学的グループが調査に用いられているか、(2)これらの生物学的グループ間で指標の応答は類似するか、(3)金属汚染に対して応答性の高い生物学的グループはどれか、の3つの問いを立てて調査を行った。

これらの問いについて調査を行うために、Web of Science core collectionを用いて、1991年から2015年までに出版され、以下のキーワード (metal* AND (stream* OR river*) AND (bryophyte* OR alga* OR diatom* OR periphyton* OR macroinvertebrate* OR invertebrate* OR benthos* OR “aquatic insect*” OR fish*) AND (population* OR communit* OR assemblage* OR abundance* OR densit* OR richness OR diversit* OR biomass OR metric* OR index* OR indices)) に該当する論文 (Article) を検索した。得られた1506件の論文のうち、金属汚染河川または酸性河川において、付着藻類、底生動物、または魚類を対象とした生態影響調査を実施した合計202件の論文 (以下、研究) を選出し、原文を収集した。この際、例えば、金属蓄積のみを調査した研究は分析の対象外とした。

まず、選出された202件の研究において、付着藻類、底生動物、魚類のそれぞれが調査対象として選ばれた数を計数した。また、同時に単一または複数の生物学的グループを調査対象にした研究の数についても計数した。次に、生物学的グループ間における生物指標の相関性を定量的に評価するために、複数の生物学的グループを調査した8つの研究から、調査結果の生データ (密度、種数、多様度指数などの生物指標値) を取得した。複数の生物学的グループを調査した研究は、「主に1回の調査で多地点における金属濃度の空間的な変化」と「限られた地点における金属濃度の時間的な変化 (と生物相の回復)」に着目した2つの研究群に分けられた (以下、空間的变化と時間的变化と呼ぶ)。そのため、それぞれの研究群ごとに分けて、後者については地点ごとに異なる生物学的グループにおける生物指標間のピアソンの積率相関係数 (r) を総当たりで算出した。さらに、金属汚染に対してより応答性の高い生物学的グループを明らかにするために、金属汚染指標の生データ (金属濃度またはpH) が取得できた8つの研究を対象に、金属汚染指標と生物指標間の相関 (r) を総当たりで算出し、3つの生物学的グループ間で比較した。なお、個体数や生物量といった生物指標や金属濃度などの金属汚染指標は対数変換して相関係数を計算した。本解析に関するさらなる詳細については、Namba et al. (2020)⁵⁾を参照されたい。

4. 結果及び考察

・水質及び底生動物調査による生態影響評価

水質及び底生動物調査から得られた金属濃度及びHQの和、カゲロウ目の種数、野外影響レベルは、表1.2の通りであった。合計13箇所の評価地点において、4つの金属 (Cu、Zn、Cd、Pb) の米国の水質クライテリアに基づき計算したHQの和は3~41の範囲にあり、HQの和が最大の41であった流域Dの評価地点S1では、金属に対して感受性が高いヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科²⁾がほとんど出現せず (カゲロウ目では他にコカゲロウ科のみ出現)、カゲロウ目の種数もリファレンス地点に比べて88%も減少していた (表1.2: 当該地点は、野外影響レベルは3と判断された)。リファレンス地点のHQの和は、流域DのR2地点を除いて、すべてで1未満であった。流域DのR2地点におけるHQの和は1.3と若干1を超過していたが、ヒラタカゲロウ科などの金属感受性の高いグループが他のリファレンス地点と比べて十分に生息していたこと、及び流域Aでの調査結果からHQの和が少なくとも3程度までではこれらの分類群の個体数の減少は観測されなかったこと⁴⁾から、本研究ではR2地点をS2地点のリファレンス地点として扱った。一方、流域CのR3地点は、HQの和は1未満で、金属による影響は懸念されなかったが、同流域のリファレンス地点R1及びR2に比べて、カゲロウ目の種数や個体数も統計学的に有意に少なかった (カゲロウ目の種数については表1.2を参照)。したがって、当該R3地点はリファレンス地点とするには適さないと判断し、以下の解析からは除外した。

リファレンス地点との比較により、野外影響レベルを各評価地点に割りあてた結果、上述した流域DのS1地点を除いて、野外影響レベル0~3に割り当てられた (表1.2)。米国の水質クライテリアに基づくHQの和と野外影響レベルの関係を調べたところ、HQの和が1~5程度では、野外影響レベル0 (影響を不検出)

の場合がほとんどであり、HQの和が5～10以上で、野外影響レベル1または2の影響が検出されていた（図1.2）。HQの和と野外影響レベル間の相関（スピアマンの順位相関係数）は、0.84 ($r < 0.001$) であり、両者に明瞭な関係が認められた。ただし、評価地点のうち、流域BのS1a地点及び流域DのM2地点では、HQの和が5程度でも野外影響レベル2(カゲロウ目種数の減少)に相当する影響が観察された地点であった。流域BのS1a地点は、鉱山廃水流入前の地点であり、4つの金属の濃度は同流域のS1bやS2地点よりも明確に低かったものの、生物応答試験（オオミジンコ繁殖試験やニセネコゼミジンコ短期慢性毒性試験）ではS1bやS2地点と同様に繁殖影響が検出された（図2.1及び図2.2）。したがって、流域BのS1a地点は金属濃度に基づくHQの和では捉えられない水質の影響を受けていた可能性が考えられる。流域DのS3地点については、HQの和は同流域のS2地点よりも低かったものの（ただし、銅及び亜鉛濃度はS2地点よりも高かった）、オオミジンコ繁殖試験では有意な繁殖の減少が検出された（図2.1）。明確な結論を得るためには、さらなる調査が必要ではあるが、銅や亜鉛などの金属濃度に基づくHQの和から野外影響レベルを推定する上で一定の限界がある可能性も考えられる。また、直上のリファレンス地点であるR3地点と比べて、S3地点では水温が約2℃ほど高かったこと及び2020年4月から5月末までの緊急事態宣言の発出のため調査時期が6月と当初の予定より遅くなったことを鑑みると、両地点間でカゲロウ類の羽化タイミング等が異なり、種数や個体数に差異が生まれた可能性も排除できない。

表1.2 各調査地点における金属濃度等の水質調査結果と野外影響レベル

流域	鉱山ID	地点	Cu μg/L	Zn μg/L	Cd μg/L	Pb μg/L	硬度 mg/L	HQの和	カゲロウ目種数 種数/礫	野外影響レベル
A	1	S1a	0.98	24.0	0.129	0.689	12.9	6.7	5.4	1
A	1	S1b	1.08	27.5	0.158	0.706	13.1	7.4	4.4	1
A	1	S2	0.76	25.9	0.165	0.248	14.3	5.1	5.0	0
A	1	S3	0.54	11.5	0.074	0.231	13.4	3.0	7.6	0
A	1	S4	0.32	4.8	<0.005	0.052	13.7	0.6	9.0	0
A	1	R1	0.07	1.0	<0.005	0.089	9.5	0.7	6.4	0
A	1	R2	0.06	0.1	<0.005	<0.005	11.0	0.1	9.2	0
A	1	R3	0.07	0.1	<0.005	0.044	11.2	0.3	8.2	0
A	1	R4	0.09	0.3	<0.005	0.034	11.6	0.3	9.2	0
B	2	S1a	0.42	43.9	0.168	0.551	14.3	6.8	7.0	2
B	2	S1b	2.58	194.4	1.277	0.673	29.3	18.7	6.6	2
B	2	S2	2.56	143.2	0.878	0.294	25.0	14.8	8.0	2
B	2	S3	1.10	33.9	0.180	<0.025	17.7	4.3	8.8	1
B	2	R1	0.20	<2.5	0.008	<0.025	12.1	0.4	12.0	0
B	2	R2	0.19	<2.5	<0.005	<0.025	13.1	0.3	10.4	0
B	2	R3	0.18	<2.5	<0.005	<0.025	13.4	0.3	12.6	0
C	3	S1	2.37	170.5	0.894	0.168	20.0	18.3	5.0	2
C	3	R1	<0.1	<2.5	<0.001	<0.001	13.5	0.1	10.2	0
C	3	R2	<0.1	<2.5	<0.001	<0.001	15.6	0.1	8.2	0
C	3	R3	<0.1	<2.5	<0.001	<0.001	25.5	0.1	4.4	NA
D	4	R1	0.30	0.9	<0.001	<0.025	18.7	0.2	11.4	0
D	4	S1	34.48	69.0	1.606	0.067	18.1	40.8	1.4	3
D	5	R2	0.78	4.9	0.039	0.086	17.6	1.3	9.4	0
D	5	S2	6.08	9.9	0.073	0.142	17.5	4.8	7.6	0
D	6	R3	0.85	1.7	0.007	<0.025	27.9	0.4	12.0	0
D	6	S3	7.71	12.5	0.024	<0.025	27.3	3.2	6.6	2

R1～R4はリファレンス地点、それ以外は鉱山廃水の影響を受ける評価地点を意味する（ただし、流域A及びBのS1a地点は鉱山廃水（処理水）流入前の地点）。<は、定量下限未満の測定値であることを示す。HQの和は、米国の水質クラリテリアを基に計算されたハザード比の和を意味する。

以上より、本研究によって、金属濃度 (Cu、Zn、Cd、Pb) 及び米国の水質クライテリア¹⁾に基づき、計算されたHQの和と底生動物調査結果に基づく野外影響レベルとの関係を明らかにした (図1.2)。その結果、上述した例外があり注意は必要であるものの、HQの和が1~5程度では、金属感受性の高いヒラタカゲロウ科やマダラカゲロウ科の個体数に減少が観察されない (野外影響レベル0) の場合がほとんどであり、HQの和が5~10以上で、これらの科の個体数の減少 (野外影響レベル1) やカゲロウ目種数の減少 (野外影響レベル2) が検出されることが示唆された。HQの和の値は、計算に用いる水質ベンチマークに依存するため、これらの閾値となる数値は前後するが、オーストラリアのデフォルトガイドライン値 (<https://www.waterquality.gov.au/anz-guidelines/guideline-values/default/water-quality-toxicants/search>)などの他の水質ベンチマークでも図1.2と同様の関係が得られている (詳細は省略)。日本では、2021年5月時点で、金属では亜鉛のみに水質環境基準が設定されているが、銅などの他の金属についても水質環境基準が設定されれば、本研究で収集した金属濃度及び底生動物データを用いて、HQの和と野外影響レベルの関係を評価することも可能である。上述で示したHQの和と野外影響レベルの関係に加えて、このような評価に活用できる野外調査データを取得できたこと自体にも価値があると考えられる。

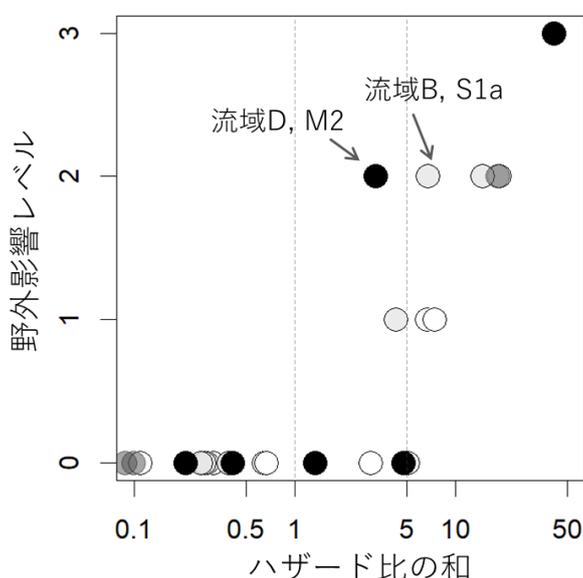


図1.2 ハザード比の和と野外影響レベルの関係。異なる色は異なる流域を示す (流域A: ○、流域B ●、流域C: ●、流域D: ●)。ハザード比の和は、4つの金属 (Cu、Zn、Cd、Pb) を対象に米国の水質クライテリア¹⁾を用いて計算した。野外影響レベルについては、表1.1を参照。

なお、これらの結果は、[Iwasaki et al. \(2023\)](#)として論文公開済み。

・河川での金属の生態影響調査における底生動物の活用状況と応答性の評価

選出された合計202件のうち、付着藻類、底生動物、魚類を調査対象とした研究はそれぞれ23%、62%、15%であり、全期間を通して、水生昆虫を主とする底生動物が最も頻繁に調査対象として選出されていた (図1.3)。また、複数の生物学的グループを調査対象とした研究は、202件のうち、わずか10%と極めて少なかった。異なる生物学的グループにおける生物指標間の相関を調査した結果、高相関 ($r > 0.7$ と定義)であった組み合わせの割合は、金属濃度の空間的変化の研究群で11% (5/44)、時間的変化の研究群で22% (13/58)であった (図1.4)。さらに、付着藻類と底生動物間及び底生動物と魚類間で、金属汚染指標との相関係数の大小を比較した場合、ほとんどの場合で (88%) 底生動物指標が金属汚染指標とより高い相関を示した (図1.5)。これらの結果から、付着藻類及び底生動物、魚類調査から求められた生物指標間の応答の類似性は、多くの場合低く、3つの生物学的グループの中では、底生動物指標 (種数

や個体数)の応答性が相対的に高い場合が多いことが示された。以上より、金属汚染による河川生態系への影響をより包括的に理解するためには複数の生物学的グループを調査対象とすることが望ましいが、金属汚染に対する応答性の高さという観点からは底生動物の種数や個体数を対象とすることが有効である可能性が示唆され、実際に底生動物が河川における金属の生態影響調査に最もよく用いられていることが示された。

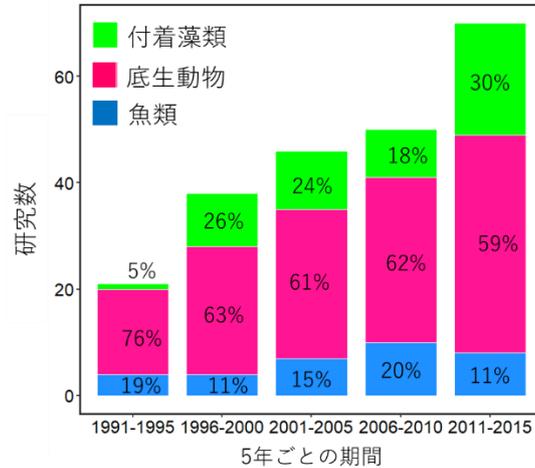


図1.3 付着藻類、底生動物または魚類を対象として河川での金属の生態影響調査を実施した研究の数の経時変化。図中の数字は、各期間に付着藻類、底生動物、または魚類を調査した研究の割合を示す。

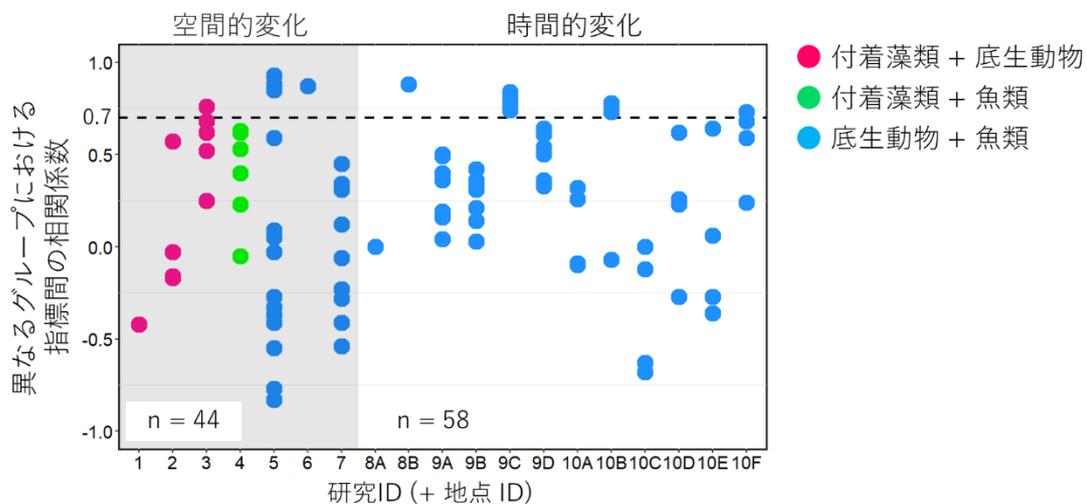


図1.4 空間的変化(研究ID:1~7)及び時間的変化(研究ID:8~10)の研究において、異なる生物学的グループにおける生物指標間で計算されたピアソンの積率相関係数。図中の数字は、各期間に付着藻類、底生動物、または魚類を調査した研究の割合を示す。A~Fは、個々の研究IDにおける地点番号を示す。

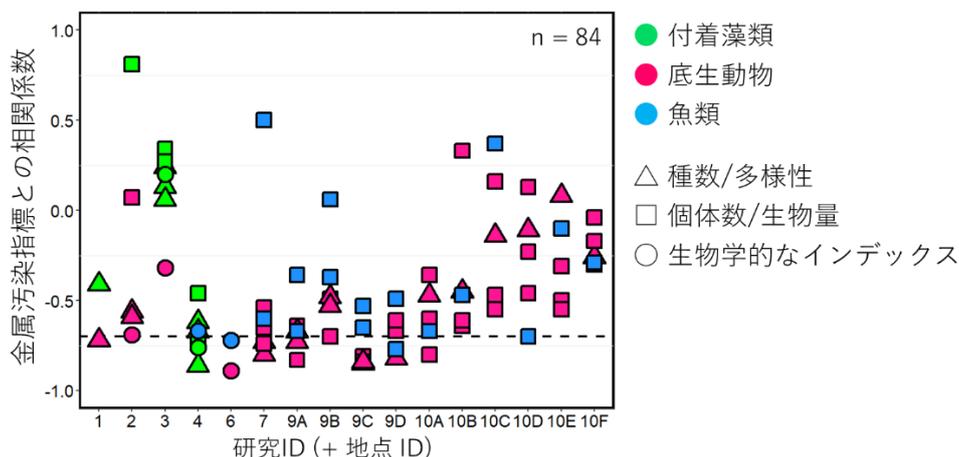


図1.5 空間的変化（研究ID：1～7）及び時間的変化（研究ID：9及び10）における生物指標と金属汚染の指標の相関（ピアソンの積率相関係数）。用いた金属汚染指標は、Zn濃度（研究ID：1）、pH（研究ID：2～6）、ハザード比の和（研究ID：7及び9）、銅濃度（研究ID：10）であった。A～Fは、個々の研究IDにおける地点番号を示す。

5. 研究目標の達成状況

新型コロナウイルス感染症の拡大防止のため、最終年度に予定していた野外調査が一部実施できなかったが、合計26地点において水質及び底生動物調査を実施できた（目標としていた調査地点数は25～30地点程度）。図1.2に示したように、金属濃度に基づくHQの和と底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を明らかにすることができたことから、これらの関係を示すという目標は達成できたと考ええる。また、金属濃度に基づくHQの和から野外影響レベルをある程度推測できることを示すことができたことをもって、当該手法を用いて野外影響を推定することの有用性を評価することができ、図2.1に示したように、HQの和が1～5程度では金属に対して感受性の高い底生動物の個体数の減少も検出されないことなど、HQの和を用いて化学物質の（複合）曝露による野外影響を評価する上での具体的な活用方法を評価・提示することができたと考ええる。上述したHQの和に関する閾値は、「4. 結果と考察」でも述べた通り、HQの計算に用いる水質ベンチマークに依存して多少変化する。日本では、2021年5月時点で、金属では亜鉛のみに水質環境基準が設定されているが、本研究で対象とした銅などの他の金属について水質環境基準は設定されていない。これらの金属を対象とした水質環境基準が設定された際には、本研究で収集した金属濃度及び底生動物データを用いて、日本の水質環境基準に基づくHQの和と野外影響レベルの関係を評価することも可能である。日本では、このような金属濃度に基づくHQの和と野外影響レベルの関係を評価できる調査データはこれまでにほとんどなく、このようなデータを収集できたこと自体にも大きな意義があると考ええる。

加えて、当初の目標にはなかったが、河川において金属の生態影響調査を実施する上で、底生動物の国際的な利活用状況、利点や留意点もシステマティックレビューによって整理し、国際誌に論文として掲載された。本研究で実施した野外調査結果も含めたこれらの成果は、経済産業省 産業保安グループ 鉱山・火薬類監理官付が発行した「休廃止鉱山の坑廃水が流入する河川における生態影響評価ガイダンス（案）」において引用され、当該ガイダンス案の作成に活用された。ゆえに、サブテーマ1の当初の研究目標を上回る成果を得られたと考ええる。

6. 引用文献

- 1) U. S. Environmental Protection Agency (2002) National Recommended Water Quality Criteria: EPA822-R-02-047

- 2) Iwasaki Y, Schmidt TS, and Clements WH. 2018. Quantifying differences in responses of aquatic insects to trace metal exposure in field studies and short-term stream mesocosm experiments. *Environmental Science & Technology* 52:4378-4384. 10.1021/acs.est.7b06628
- 3) Bretz F, Hothorn T, Westfall P. 2010. *Multiple comparisons using R*. Boca Raton: CRC press.
- 4) Namba H, Iwasaki Y, Morita K, Ogino T, Mano H, Shinohara N, Yasutaka T, Matsuda H, and Kamo M (2021) Comparing impacts of metal contamination on macroinvertebrate and fish assemblages in a northern Japanese river. *PeerJ* 9:e10808.
- 5) Namba H, Iwasaki Y, Heino J, and Matsuda H. 2020. What to survey? A systematic review of the choice of biological groups in assessing ecological impacts of metals in running waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39:1964-1972. 10.1002/etc.4810

II-2 河川水の生物応答試験による生態影響評価

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

エネルギー・環境領域 安全科学研究部門

眞野 浩行

[要旨]

本研究は、野外影響を推定する上での生物応答試験の活用方法や有用性を検討するために、金属以外の汚濁負荷がほとんどない休廃止鉱山周辺流域を対象に、生物応答試験での影響レベルと底生動物調査結果から得られる野外影響レベルの関係を評価し、影響評価方法間の整合性を明らかにすることを目的とした。4流域の合計24地点で河川水を採取し、無希釈の河川水のオオミジンコ遊泳阻害試験および繁殖試験、ニセネコゼミジンコの短期慢性毒性試験を実施し、河川水によるミジンコへの影響の有無を調査した。また、オオミジンコの遊泳阻害が検出された河川水について、遊泳阻害を引き起こす原因となる金属の特定を試みた。また、生物応答試験結果からミジンコへの影響を4段階に区分化し、サブテーマ1の野外調査結果から推定された野外影響レベルとの関係を調査した。生物応答試験により、ミジンコの遊泳行動および繁殖に負の影響を引き起こす河川水を明らかにすることができた。また、遊泳阻害を検出した河川水について、遊泳阻害を引き起こす原因となる金属を推定した。生物応答試験結果をもとに求めた影響レベルと野外調査結果から推定された影響レベルの関係から、ミジンコの遊泳行動や繁殖の応答を調査することで、野外影響レベルをある程度推定できる可能性が示唆された。以上の成果から、サブテーマ2の研究目標を達成することができたと考える。

1. 研究開発目的

多種多様の化学物質を含む排水が流入する水環境において化学物質による生態影響が懸念される場合、化学物質の影響を評価する手法が求められる。採取した環境水に曝露した試験生物の応答を室内で調査する生物応答試験は、流入する化学物質の生態影響評価の有効な手法の1つとして考えられる。しかしながら、我が国において、室内で実施される環境水の生物応答試験の結果が、野外の水環境でみられる化学物質の影響をどの程度整合性があるのか不明確である。そこで、野外影響を推定する上での生物応答試験の活用方法や有用性を検討するため、金属以外の汚濁負荷がほとんどない休廃止鉱山周辺流域を対象に、生物応答試験での影響レベルと底生動物調査結果から得られる野外影響レベルの関係を評価し、影響評価方法間の整合性を明らかにすることを目的とした。

2. 研究目標

サブテーマ1で設定した合計25～30地点程度の調査地点で採取した河川水について、ミジンコ類を用いた生物応答試験を実施する。試験結果から得られるミジンコ類への河川水の影響レベルと底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を示すとともに、その関係に基づいて野外影響を推定する上での生物応答試験の活用方法や有用性を評価する。

3. 研究開発内容

サブテーマ1で設定した北海道、兵庫県、岐阜県および岩手県に位置する、金属以外の汚濁負荷がほとんどない休廃止鉱山周辺の4流域（それぞれA、B、C、Dとする）の合計24地点で河川水を採取した。採水した水を10Lのポリタンクに入れて実験室に持ち帰り、孔径60 μ mのメッシュでろ過し、試験を実施するまで、10Lポリタンクに入れて4℃の冷暗所で保管した。

無希釈の河川水試料に対して、OECD テストガイドラインNo. 202¹⁾およびNo. 211²⁾、生物応答を用いた排水試験法（検討案）³⁾を参考に、オオミジンコの48時間遊泳阻害試験、21日間繁殖試験およびニセネコゼミジンコの短期慢性毒性試験を実施した。また、採取した河川水試料の生物応答試験に併せて、対

照区として飼育水の生物応答試験を実施した。研究計画書では、エンドポイントとしてオオミジンコの死亡を調査することとしていたが、短期曝露によるオオミジンコへの化学物質の影響を調査する試験では遊泳阻害をエンドポイントにすることが多いため、遊泳阻害をエンドポイントとして使用することとした。試験に使用した試験個体の飼育および生物応答試験は以下の方法に従って実施した。

【試験生物】

本研究では、国立環境研究所より分譲されたオオミジンコ (*Daphnia magna*) およびニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を飼育し、試験に供した。

遊泳阻害試験のためのオオミジンコのストックカルチャーの飼育には、USEPAが公表している中硬度の人工調整水と活性炭でろ過した脱塩素水道水を9:1で混合した水（総硬度は約80mg-CaCO₃/L）を飼育水として使用した。未成熟個体40個体を500mLビーカーに入れて飼育した後、成熟した35個体を1Lビーカーに入れて飼育した。餌として、クロレラ (*Chlorella vulgaris*)（リーセンテック社）を使用した。5×10⁸cells/mLのクロレラ溶液を1Lビーカーに1mL、500mLビーカーに0.5mL毎日添加した。照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は21±1℃とした。

採取した河川水の硬度は、一般的にオオミジンコを飼育する水の硬度よりも低かったため、飼育と試験における硬度の違いが試験期間の長い繁殖試験の結果に影響する可能性が考えられた。そのため、河川水の繁殖試験を実施する前に、低硬度の飼育水を用いてオオミジンコおよびニセネコゼミジンコのストックカルチャーを2世代以上順化した。

オオミジンコの順化には、USEPAが公表している低硬度の人工調整水と活性炭でろ過した脱塩素水道水を8:2で混合した水（総硬度は20~30mg-CaCO₃/L）を飼育水として使用した。また、照明、水温、餌および個体数密度は、遊泳阻害試験のオオミジンコのストックカルチャーと同一の条件とした。繁殖試験の実施前に、以降に示す繁殖試験と同様の試験条件で飼育水を用いて、21日間の累積産仔数を調査したところ、126±5匹（3反復の平均±標準偏差）であった。順化したストックカルチャーから産まれたオオミジンコ個体は、低硬度の水でも試験を実施する上で十分な繁殖を示すことが確認できた。また、飼育水はオオミジンコの繁殖試験の対照区に使用した。

また、短期慢性毒性試験のためのニセネコゼミジンコのストックカルチャーは、USEPAが公表している低硬度の人工調整水と中硬度の人工調整水を8:2で混合した水400mLにニセネコゼミジンコ30匹程度を入れた500mLのガラスビーカーで2世代以上飼育した。餌として、クロレラおよびYCT（リーセンテック社）を使用した。ビーカーごとに1×10⁸cells/mLのクロレラ溶液400μLおよびYCT 400μLを毎日添加した。マスカルチャーの順化後に、マスカルチャーから24時間以内に生まれた仔虫を、15mLの飼育水が入った50mLのガラスビーカーに1匹ずつ入れたシングルカルチャーを2世代以上飼育した。シングルカルチャーは1世代ごとに最低40個用意し、1日おきに水替えをした。照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は25±1℃とした。餌として、クロレラおよびYCTを使用した。ビーカーごとに1×10⁸cells/mLのクロレラ溶液50μLおよびYCT 50μLを毎日添加した。繁殖試験の実施前に、以降に示す繁殖試験と同様の試験条件で飼育水を用いて、10反復の生存率と3腹分の累積産仔数を調査した。生存率は100%で、3腹分の累積産仔数は17.0匹であった。この結果は、環境省の生物応答を用いた排水試験法（検討案）で示されている試験成立条件を満たした。そのため、順化したシングルカルチャーから産まれたニセネコゼミジンコ個体は、低硬度の水でも試験を実施する上で十分な繁殖を示すことを確認できた。

【オオミジンコ遊泳阻害試験】

オオミジンコの遊泳阻害試験は、OECDテストガイドライン No. 202¹⁾を参考に行った。すなわち、各地点の水試料50mLの入ったビーカーに24時間以内に産まれたオオミジンコの仔虫5個体を入れ、4反復で試験を行った（水試料ごとに計20個体の仔虫を曝露）。対照区として、飼育水を使用した試験も合わせて実施した。照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は21±1℃とした。48時間後に、各ビーカーの遊泳阻害個体数を記録し、水試料ごとに遊泳阻害率を記録した。

【オオミジンコ繁殖試験】

オオミジンコを用いた繁殖試験は、OECDテストガイドラインNo. 211²⁾および環境省の生物応答を用いた排水試験法（検討案）³⁾を参考に行った。各調査地点の水試料40mLが入った100mLポリプロピレンビーカーに24時間以内に産まれたオオミジンコを1個体ずつ入れ、10反復で試験を行った（水試料ごとに計10個体を曝露）。対照区として、飼育水を使用した試験も併せて実施した。曝露方式は半止水式（1日または2日おきに水替え）とし、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は21±1℃とした。餌として、クロレラ（リーセンテック社）を使用した。ビーカーごとに5×10⁸cells/mLのクロレラ溶液60μLを毎日添加した。試験開始から21日間、試験個体の生存と繁殖数を毎日記録し、評価項目として、試験個体ごとに累積産仔数を算出した。

【ニセネコゼミジンコ繁殖試験】

ニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験は、環境省の生物応答を用いた排水試験法（検討案）³⁾を参考にして行った。各調査地点の水試料15mLが入った50mLガラスビーカーに24時間以内に産まれたニセネコゼミジンコを1個体ずつ入れ、10反復で試験を行った（水試料ごとに計10個体を曝露）。対照区として、シングルカルチャーの飼育水を使用した試験も併せて実施した。曝露方式は半止水式（1日おきに水替え）とし、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は25±1℃とした。餌として、クロレラ（リーセンテック社）およびYCT（リーセンテック社）を使用した。ビーカーごとに1×10⁸cells/mLのクロレラ溶液50μLおよびYCT 50μLを毎日添加した。最大8日間、毎日試験個体の生存と繁殖数を記録し、試験個体ごとに産仔3腹分の累積産仔数を算出した。

生物応答試験から得られた試験結果をもとに、河川水試料を曝露したときの応答を対照区での応答と比較し、河川水によるミジンコへの影響の有無を調査した。また、鉱山廃水またはその処理水が流入することによるオオミジンコおよびニセネコゼミジンコの繁殖への影響の有無を調査するため、対象流域ごとに鉱山廃水またはその処理水が流入する河川調査地点（流入河川地点）と、当該鉱山の影響を受けていない金属濃度の低い河川調査地点（リファレンス地点）を比較した。

また、オオミジンコの遊泳阻害が検出された河川水について、影響の原因物質が金属であることを確認するために、EDTAを添加した後に遊泳阻害試験を実施し、遊泳を阻害される個体の頻度が低減するかどうかを確認した。試験は以下の方法に従って実施した。

【EDTAを添加したオオミジンコ遊泳阻害試験】

米国の毒性同定評価の方法⁴⁾を参考に、河川水試料ごとに、EDTAを添加して3種類のEDTA濃度（0、3、8mg/L）の試験水を用意した。各試験水50mLが入った100mLポリビーカーに24時間以内に産まれたオオミジンコの仔虫10個体を入れ、2反復で試験を行った（水試料ごとに計20個体の仔虫を曝露）。また、対照区として、飼育水を使用した試験も併せて実施した。

さらに、金属が生態影響の原因物質であると確認された河川水について、河川水中の金属濃度と個別金属の毒性試験から求めた個別金属の毒性値を比較し、汚染地点の河川水による遊泳阻害への寄与が高い金属の同定を試みた。

これまでに得られた流入河川地点から採取した河川水によるミジンコへの影響レベルを、検出された影響に基づいて区分化し、野外調査結果から得られた影響レベルと比較し、両者の関係性を調査した。

4. 結果及び考察

遊泳阻害試験の結果を表2.1に示す。Fisherの正確確率検定により、流域Bの地点S1bおよびS2、流域CのS1および流域DのS1において、対照区と比べて有意な遊泳阻害が検出された。この結果から、オオミジンコの遊泳行動に影響する河川水を特定することができた。なお、生物応答試験の結果は、[Mano et al. \(2023\)](#)として論文公開済み。

表2.1 オオミジンコ遊泳阻害試験の結果

流域	調査地点	正常個体数	遊泳阻害個体数	遊泳阻害率 (%)
A	Control	20	0	0
	R3	20	0	0
	R4	20	0	0
	S1a	20	0	0
	S1b	20	0	0
	S2	20	0	0
	S3	19	1	5
	S4	20	0	0
B	Control	20	0	0
	R1	20	0	0
	R2	20	0	0
	R3	20	0	0
	S1a	18	2	10
	S1b	0	20	100*
	S2	1	19	95*
	S3	20	0	0
C	Control	20	0	0
	R1	20	0	0
	R2	20	0	0
	R3	20	0	0
	S1	0	20	100*
D	Control	20	0	0
	R1	20	0	0
	S1	0	20	100*
	R2	20	0	0
	S2	20	0	0
	R3	20	0	0
	S3	19	1	5

*はFisherの正確確率検定により対照区と比べて遊泳阻害を示した個体の頻度が有意に高かった河川水を示す ($P < 0.05$)

各水試料に曝露したオオミジンコ繁殖試験から得られたオオミジンコ個体の累積産仔数を図2.1に示す。流域Aの全ての調査地点では、河川水曝露によるオオミジンコの繁殖への影響は検出されなかった。流域Bの全ての流入河川地点、流域Cの流入河川地点S1およびリファレンス地点R2、および流域DのS1、S3において、河川水の曝露によるオオミジンコの繁殖への影響が検出された。

各水試料に曝露したニセネコゼミジンコ短期慢性毒性試験から得られたニセネコゼミジンコ個体の累積産仔数を図2.2に示す。流域Aの全ての調査地点では、河川水曝露によるオオミジンコの繁殖への影響は検出されなかった。流域Bの全ての流入河川地点、流域Cの流入河川地点S1、および流域DのS1において、河川水の曝露によるオオミジンコの繁殖への影響が検出された。

2種類のみジンコの繁殖に係る生物応答は、流域Cにおけるリファレンス地点R2および流域Dの流入河川地点S3を除き、同様の結果を示した。

オオミジンコの遊泳行動に影響した河川水にEDTAを添加した後にオオミジンコに曝露した遊泳阻害試験の結果を表2.2に示す。試験した全ての河川水でEDTAの添加により遊泳阻害が改善された。これらの結果により、金属が遊泳阻害を引き起こした河川水中の原因物質であることが示唆された。

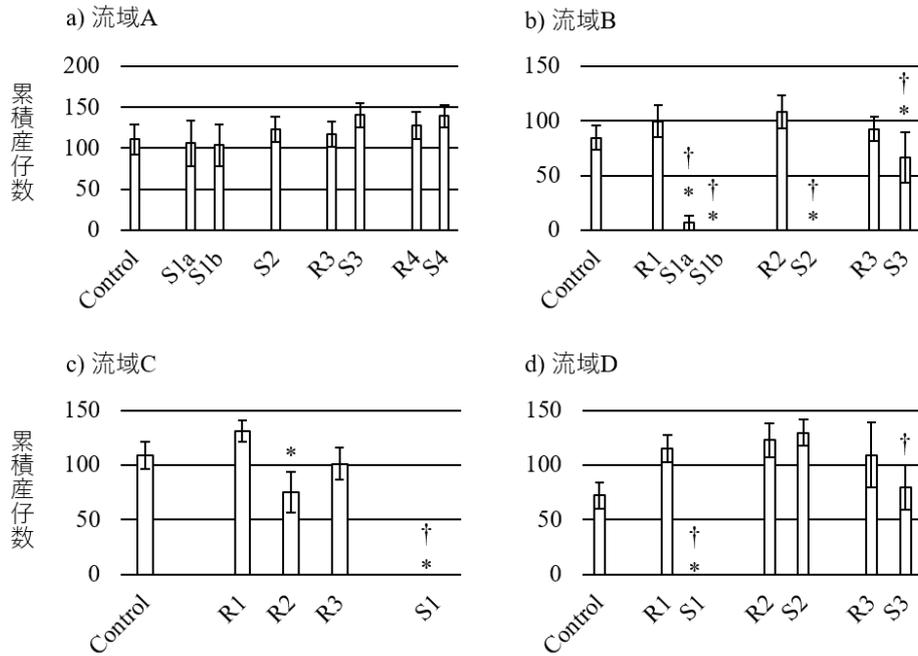


図2.1 無希釈の河川水を曝露したオオミジンコ繁殖試験の結果

流入河川地点と対応するリファレンス地点および対照区間で多重比較を実施して累積産仔数を比較した。流域AのS1a、S1bおよびS2に対応するリファレンス地点で河川水を採取しなかったため、これらの地点はリファレンス地点R3およびR4および対照区と比較した。*は対照区と比較して累積産仔数が有意に低かった河川水を示す。†はリファレンス地点と比較して累積産仔数が有意に低かった流入河川地点の河川水を示す。有意水準は0.05とした

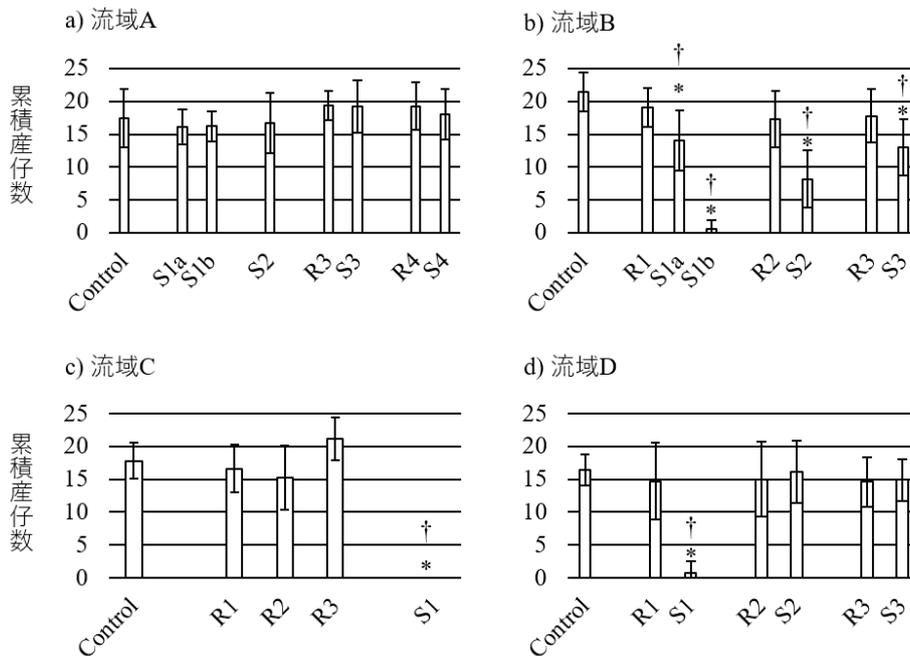


図2.2 無希釈の河川水を曝露したニセネコゼミジンコ短期慢性毒性試験の結果
統計解析方法および解析結果を示す記号は図2.1を参照

表2.2 河川水にEDTAを添加して実施したオオミジンコ遊泳阻害試験

流域	調査地点	EDTA濃度 (mg/L)	正常個体数	遊泳阻害個体数	遊泳阻害率(%)
B	Control	-	20	0	0
	S1b	0	2	18	90*
		3	20	0	0
		8	20	0	0
	S2	0	7	13	65*
		3	20	0	0
8		20	0	0	
C	Control	-	20	0	0
	S1	0	1	19	95*
		3	20	0	0
		8	20	0	0
D	Control	-	20	0	0
	S1	0	0	20	0
		3	20	0	100*
		8	20	0	0

*はFisherの正確確率検定により対照区と比べて遊泳阻害個体の頻度が有意に高かったことを示す ($P < 0.05$)

遊泳阻害を引き起こした河川水について、遊泳阻害への寄与が高い金属を調査するため、金属のToxic unit (TU) を求めた。TUは以下の式から計算した。

$$TU_{\text{金属}i} = \text{河川水中濃度}_{\text{金属}i} / EC_{x, \text{金属}i}$$

河川水中濃度_{金属i}は、対象とする河川水中の金属iの濃度を示す。本研究では、カドミウム (Cd)、銅 (Cu)、鉛 (Pb) および亜鉛 (Zn) を対象とした。金属の毒性は、存在形態に依存し、特にフリーイオン態金属の毒性が高いことが知られている。そのため、サブテーマ1で測定された河川水中の金属濃度およびTOC、陽イオンおよび陰イオンの水質データをもとに、化学平衡計算ソフトウェアWHAM 6を用いてフリーイオン態の金属濃度を推定した。また、 $EC_{x, \text{金属}i}$ は、金属iのx%影響濃度であり、その金属の毒性を示す。Cd、Cu、PbおよびZnについて、オオミジンコの遊泳行動に対する影響濃度を調査するため、各金属のオオミジンコ遊泳阻害試験を実施した。試験培地のTOC、陽イオンおよび陰イオンの水質データと曝露した金属の溶存態濃度から化学平衡計算ソフトウェアWHAM 6を用いて試験溶液中のフリーイオン態濃度を推定した後、10%影響濃度 (EC_{10})、半数影響濃度 (EC_{50})、90%影響濃度 (EC_{90}) を求めた。表2.3は対象金属について毒性試験の結果から算出したフリーイオン態の影響濃度を示す。河川水中濃度が影響濃度よりも高い場合、TU値は1よりも高くなる。また、より大きな影響を引き起こす濃度を分母にしたときにTU値が1を超える金属ほど、河川水による遊泳阻害への寄与が高いと考えた。

対象金属について推定したTUの値を図2.3に示す。対象とした全ての河川水において、亜鉛と銅による遊泳阻害への寄与が高いことが示唆された。流域Bの調査地点S1b、S2および流域Cの調査地点S1では、 EC_{50} 値を用いた亜鉛のTU値が1を超えたのに対して、 EC_{50} 値を用いた銅のTU値は1を超えなかったことから、銅よりも亜鉛による遊泳阻害への寄与が高いことが示唆された。一方で、流域Dの調査地点S1では、 EC_{90} 値を用いた銅のTU値が1を超えたのに対して、亜鉛のTU値が1を超えたのは EC_{10} 値を用いたときだけであったことから、亜鉛よりも銅による遊泳阻害への寄与が高いことが示唆された。以上のように、遊泳阻害に寄与すると考えられる金属を示すことができた。亜鉛は環境基準が設定されており、ただし、本研究では、金属の複合影響を考慮せずに、個別金属の毒性から金属の河川水の有害性への寄与を調査した。今後は、複合影響を考慮して河川水の有害性への金属の寄与について調査する必要がある。

表2.3 毒性試験から求めたオオミジンコの遊泳行動に対するフリーイオン態のカドミウム (Cd)、銅 (Cu)、鉛 (Pb)、亜鉛 (Zn) の10%影響濃度 (EC₁₀)、半数影響濃度 (EC₅₀) および90%影響濃度 (EC₉₀)

対象金属	毒性値 (mM)		
	EC ₁₀ (95%信頼区間)	EC ₅₀ (95%信頼区間)	EC ₉₀ (95%信頼区間)
Cd	6.70×10^{-5} ($4.43 \times 10^{-5} - 8.97 \times 10^{-5}$)	1.70×10^{-4} ($1.40 \times 10^{-4} - 2.01 \times 10^{-4}$)	4.32×10^{-4} ($2.79 \times 10^{-4} - 5.85 \times 10^{-4}$)
Cu	1.19×10^{-6} ($4.47 \times 10^{-7} - 1.94 \times 10^{-6}$)	4.75×10^{-6} ($3.23 \times 10^{-6} - 6.27 \times 10^{-6}$)	1.89×10^{-5} ($8.40 \times 10^{-6} - 2.95 \times 10^{-5}$)
Pb	1.72×10^{-4} ($1.49 \times 10^{-4} - 1.96 \times 10^{-4}$)	2.18×10^{-4} ($1.97 \times 10^{-4} - 2.39 \times 10^{-4}$)	2.76×10^{-4} ($2.30 \times 10^{-4} - 3.23 \times 10^{-4}$)
Zn	7.51×10^{-4} ($4.97 \times 10^{-4} - 1.00 \times 10^{-3}$)	1.60×10^{-3} ($1.34 \times 10^{-3} - 1.87 \times 10^{-3}$)	3.42×10^{-3} ($2.26 \times 10^{-3} - 4.58 \times 10^{-3}$)

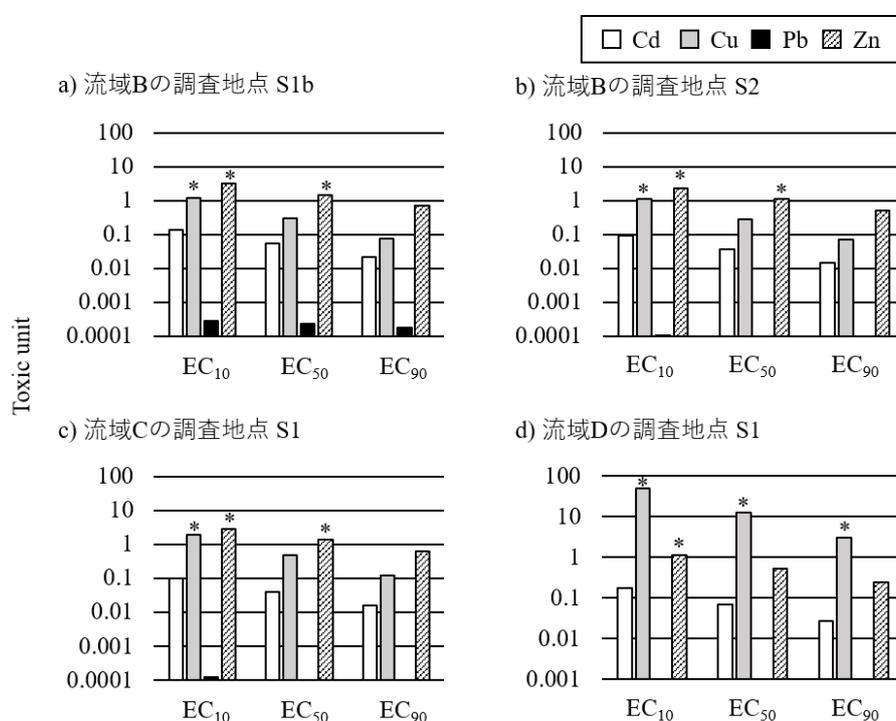


図2.3 遊泳阻害を引き起こした河川水に含まれるカドミウム (Cd)、銅 (Cu)、鉛 (Pb) および亜鉛 (Zn) のToxic unit
*は1を超えたToxic unitを示す

流入河川地点から採取した河川水のミジンコに対する影響について判定基準を表2.4の通り設定し、影響を3段階に区分化した。その結果を生物応答試験の結果とともに表2.5に示す。各河川水の影響レベルとサブテーマ1の野外調査結果から求めた野外影響レベルの関係をみたところ、影響レベル0の地点では野外影響レベルが1以下となり、影響レベル3の地点では野外影響レベルが2以上になる関係がみられた (図2.4)。生物応答試験結果から求めた影響レベルが0の流入河川地点では、野外影響レベルが1以下であったことから、ミジンコの繁殖試験の結果によって、野外影響レベルが1以下かどうかを判別できる可能性が示唆される。また、生物応答試験結果から求めた影響レベルが3の流入河川地点では、野外影響レベルが2以上であったことから、オオミジンコの遊泳阻害試験の結果によって、野外影響レベルが2以上かどうかを判別できる可能性が示唆される。以上のように、生物応答試験の結果と野外調査結果の関係性から、野外影響レベルの推定に生物応答試験は活用可能であり、有用であることを示すこ

とができた。

表2.4 流入河川地点の影響レベルと判定基準

影響レベル	判定基準
0	影響がみられない
1	有意な繁殖低下あり&遊泳阻害なし
2	リファレンス地点および対照区と比べて有意な繁殖低下&遊泳阻害あり

表2.5 生物応答試験結果に基づく各河川水のみジンコへの影響の有無と影響レベル

流域	調査地点	遊泳阻害		繁殖				影響レベル
		オオ	対照河川地点と比較	オオみジンコ		ニセネコゼみジンコ		
				対照区と比較	対照河川地点と比較	対照区と比較		
A	S1a	無	無	無	無	無	無	0
A	S1b	無	無	無	無	無	無	0
A	S2	無	無	無	無	無	無	0
A	S3	無	無	無	無	無	無	0
A	S4	無	無	無	無	無	無	0
B	S1a	無	有	有	有	有	有	1
B	S1b	有	有	有	有	有	有	2
B	S2	有	有	有	有	有	有	2
B	S3	無	有	有	有	有	有	1
C	S1	有	有	有	有	有	有	2
D	S1	有	有	有	有	有	有	2
D	S2	無	無	無	無	無	無	0
D	S3	無	有	無	無	無	無	1

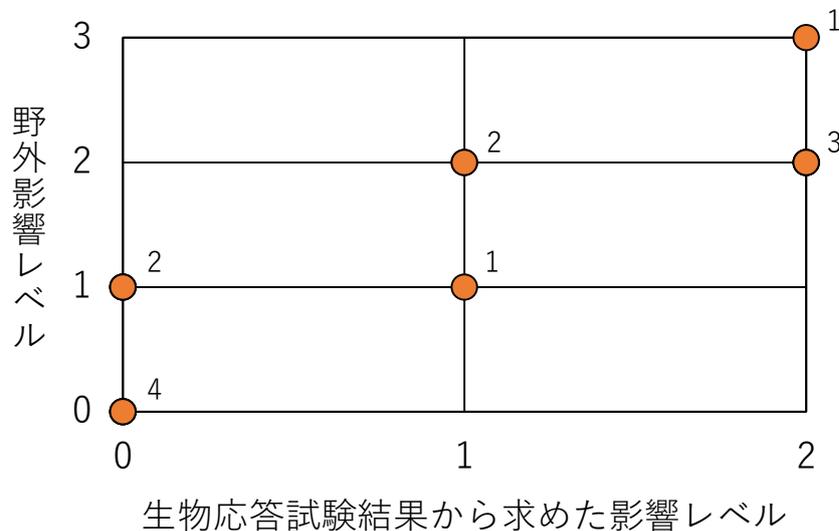


図2.4 生物応答試験結果から求めた影響レベルと野外調査結果から求めた影響レベルの関係。

記号右横の数字はサンプル数を示す。

なお、これらの結果は、[Iwasaki et al. \(2023\)](#)として論文公開済み。

5. 研究目標の達成状況

新型コロナウイルス感染症の拡大防止のため、最終年度に予定していた野外調査が一部実施できなかったため、目標としていた合計25~30地点よりも調査対象地点数が少なくなったが（4流域合計24地点）、生物応答試験の試験数は目標数をおおむね達成できた。

表2.1、図2.1および図2.2に示した生物応答試験の結果をもとに、ミジンコ類への河川水の影響レベルと底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を図2.4に示すように明らかにすることができたことから、試験結果から得られるミジンコ類への河川水の影響レベルと底生動物調査から得られる野外影響レベルの関係を示すという研究目標を達成できたと考える。

また、図2.4に示した関係をもとにミジンコ類を用いた生物応答試験の結果から野外影響レベルを推測できる可能性を示すことにより、野外影響の推定にミジンコ類を用いた生物応答試験は活用可能であり、有用であることを示すことができたことをもって、野外影響を推定する上での生物応答試験の活用方法や有用性を評価するという研究目標を達成できたと考える。

ゆえに、サブテーマ2の研究目標を達成することができたと考える。特に、生物応答試験における影響レベルと野外影響レベルの関係を示した研究は国内ではこれまでになく、本研究成果は、環境行政において生物応答試験の今後の活用を検討する上で貴重な知見を取得することができたと考える。

6. 引用文献

- 1) OECD TG No. 202, 2004
- 2) OECD TG No. 211, 2012
- 3) (独)国立環境研究所 生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナーテキスト、2013
- 4) USEPA EPA/600/6-91/003, 1991

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) Hiroki Namba*, Yuichi Iwasaki*, Kentaro Morita, Tagiru Ogino, Hiroyuki Mano, Naohide Shinohara, Tetsuo Yasutaka, Hiroyuki Matsuda, Masashi Kamo (2021) Comparing impacts of metal contamination on macroinvertebrate and fish assemblages in a northern Japanese river. PeerJ. 9:e10808. (*これらの著者は本研究に等しく貢献した：IF = 2.38)
- 2) Hiroki Namba*, Yuichi Iwasaki*, Jani Heino, Hiroyuki Matsuda (2020) What to survey? A systematic review of the choice of biological groups in assessing ecological impacts of metals in running waters. Environmental Toxicology and Chemistry. 39(10): 1964-1972. (*これらの著者は本研究に等しく貢献した：IF = 3.15)
- 3) Yuichi Iwasaki, Megumi Fujisawa, Tagiru Ogino, Hiroyuki Mano, Naohide Shinohara, Shigeki Masunaga, and Masashi Kamo (2020) Does a sum of toxic units exceeding 1 imply adverse impacts on macroinvertebrate assemblages? A field study in a Northern Japanese river receiving treated mine discharge. Environmental Monitoring and Assessment. 192(2): 83 (IF = 1.90)

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

- 1) Yuichi Iwasaki, Hiroyuki Matsuda (2021) Chapter 4. How to Assess Ecological Risks of Trace Metals in Environment. In: Matsuda H. (eds) Ecological Risk Management. Ecological Research Monographs. pp51-65. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-33-6934-4_4

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) 岩崎雄一，眞野浩行，篠原直秀（2021）水質調査・底生動物調査・生物応答試験を用いた金属複合曝露の生態リスク評価，第55回日本水環境学会年会（国内），オンライン開催
- 2) 難波広樹，岩崎雄一，Jani Heino，松田裕之（2021）河川生態系への金属影響を評価する上で，付着藻類，底生動物，魚類のどれを調査すべきか？，令和2年度日本環境毒性学会オンライン研究発表会（国内），オンライン開催
- 3) 難波広樹，岩崎雄一，Jani Heino，松田裕之（2020），河川生態系への金属影響を評価する上で，付着藻類，底生動物，魚類のどれを調査すべきか？，応用生態工学会2020年度（令和2年度）Web研究発表会（国内），オンライン開催
- 4) Yuichi Iwasaki, Hiroki Namba, Jani Heino, Hiroyuki Matsuda (2020) What to survey? A systematic review of the choice of biological groups in assessing ecological impacts

- of metals in running waters. SETAC North America 41st Annual Meeting (国外), オンライン開催
- 5) 岩崎雄一, 難波広樹, 眞野浩行, 篠原直秀, 松田裕之 (2020) 金属濃度に基づくハザード比の和が1を超える地点で影響は観測されるか? : 休廃止鉱山周辺3河川での底生動物調査. 第54回日本水環境学会年会 (国内), 岩手大学 (岩手県盛岡市)
 - 6) 岩崎雄一 (2020) 野外調査から生態影響を探索する立場から. 第22回日本水環境学会シンポジウム (国内), 水質環境基準(指針)値はバイオアッセイの結果から設定可能か? (バイオアッセイによる安全性評価研究委員会), 北海学園大学 (北海道札幌市)
 - 7) Yuichi Iwasaki, Hiroki Namba, Kentaro Morita, Tagiru Ogino, Hiroyuki Mano, Naohide Shinohara, Hiroyuki Matsuda, Masashi Kamo (2019) How protective is protective enough? A field study of metal impacts on river macroinvertebrate and fish assemblages, SETAC Australasian Chapter Conference (国外), ダーウィン (オーストラリア) .
 - 8) Yuichi Iwasaki, Hiroki Namba, Kentaro Morita, Tagiru Ogino, Hiroyuki Mano, Naohide Shinohara, Hiroyuki Matsuda, Masashi Kamo (2019) Does a sum of toxic units exceeding 1.0 imply any ecological effects? A field study of metal impacts on river macroinvertebrate and fish assemblages, SETAC Europe 29th Annual meeting (国外), ヘルシンキ (フィンランド) .
 - 9) 難波広樹, 岩崎雄一, 松田裕之 (2020) 河川生態系への金属影響を評価する上で, 付着藻類, 底生動物, 魚類のどれを調査すべきか? 約200論文のメタアナリシス, 第54回日本水環境学会年会 (国内), 岩手大学 (岩手県盛岡市)
 - 10) 難波広樹, 岩崎雄一, 森田健太郎, 荻野激, 眞野浩行, 篠原直秀, 松田裕之, 加茂将史 (2019) 君は見分けられるか: 鉱山廃水流入河川と対照河川における底生動物及び魚類相の比較, 第66回日本生態学会大会 (国内), 神戸国際会議場・神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

【サブテーマ2】

- 1) 眞野浩行, 岩崎雄一, 篠原直秀 (2021) 休廃止鉱山周辺の河川を対象とした複数のミジンコ生物応答試験結果の比較, 第55回日本水環境学会年会 (国内)、オンライン開催
- 2) 眞野浩行, 岩崎雄一, 篠原直秀 (2020) 休廃止鉱山周辺の河川を対象としたミジンコの生物応答試験に関する研究, 第54回日本水環境学会年会 (国内), 岩手大学 (岩手県盛岡市)
- 3) 眞野浩行, 岩崎雄一, 篠原直秀, 加茂将史, 内藤航 (2019) 鉱山廃水処理水が流入する河川の水質評価のためのバイオモニタリングに関する研究 (国内), 第53回日本水環境学会年会 (国内), 山梨大学 (山梨県甲府市)

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(4) マスコミ等への公表・報道等>

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Toward Development of Methods for Assessing Ecological Risks of Exposure to Chemical Mixtures in The Field: Use of Water-Quality and Benthic Invertebrate Surveys and Effect-Based Monitoring

Principal Investigator: Yuichi IWASAKI

Institution: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
Tsukuba, Ibaraki, JAPAN

Tel: +81-29-861-4263

E-mail: yuichi-iwasaki@aist.go.jp

Cooperated by: Yokohama National University

[Abstract]

Key Words: Trace metals, Legacy mines, Toxic Units, Hardness, Aquatic insects

Based on the results of field surveys at a total of 26 sites (13 contaminated and 13 reference sites) in four river basins where legacy mines are located upstream, we aimed to examine the relationships of the field-effect levels evaluated based on benthic macroinvertebrate surveys to the sum of hazard quotients (HQs) calculated based on dissolved concentrations of four trace metals (Cu, Zn, Cd, and Pb) and the hardness-adjusted U.S. EPA water quality criteria, and to the acute and chronic toxicity of field-collected river water to cladocerans (*Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*). The field-effect levels were qualitatively assessed based on the impacts on the abundances of metal-sensitive mayflies (Heptageniidae and Ephemeridae) and the richness of mayflies by comparing those at the corresponding reference site(s). Our results showed that if the sum of HQs was below 5 at a contaminated site, no impacts were generally detected, but if the sum of HQs was between 5 and 10, the reductions in the abundances of metal-sensitive mayflies and, in worse cases, the reduction in mayfly richness were observed. Similarly, the results of the toxicity tests with cladocerans were qualitatively associated with the field-effect levels. If no effects were detected in any of the toxicity tests, no field effect was observed or the reductions in the abundances of metal-sensitive mayflies were detected. If significant effects were observed in acute and chronic toxicity tests which evaluated reproduction and immobilization, respectively, the reduction in mayfly richness or more severe impacts were observed. These results clearly show that the sum of HQs based on water quality measurements and the acute and chronic toxicity of field-collected river water to cladocerans are both useful in predicting the ecological effects of exposure to metal mixtures in the natural environment. Because the individual approaches have advantages and disadvantages (e.g., in general, it is difficult to identify the factors responsible for the field effects), the integrated approaches like this study would be beneficial to infer the responsible factors and thereby to enable us more accurate impact assessments.