

## ◆ 21世紀の新技術特集 ◆

# 21世紀型水環境センサスを目指したバイオモニタリング

田中宏明\* 矢古宇靖子\*\* 高橋明宏\*\*\* 東谷 忠\*\*\*\* 岡安祐司\*\*\*\*\*

## 1. はじめに

水は循環可能な限りある資源であり、生物の生命や人の暮らしに不可欠であるが、人の活動が水循環系全体に影響を及ぼしだしている。平成11年3月には河川審議会から、水循環系の現状把握と負荷・リスク評価のための水循環アセスメントを実施し、流域水マスター プランに反映させる必要性が答申された。また、同年10月には健全な水循環系構築に関する関係省庁連絡会議からも、水循環系の機構把握、評価を行い、関連情報を共有し、流域で生じてきている水量、水質、生態系等の問題を解決する必要性が唱えられている。

河川管理者や下水道管理者は、河川や下水の採水分析を中心とした水質モニタリングを行ってきた。しかし、必ずしも明確な判定基準が無い場合、得られた水質情報が水環境にどのような意味を持つのか、また増大する水質情報を総合的にどう判断すれば良いのか分かりにくくなっている。水量、水質、生態系等を含む健全な水循環、水環境管理を目指すため、物理化学型水質測定を中心とした20世紀型モニタリングから、より総合的な21世紀型水環境センサスのためのモニタリングへパラダイムシフトする必要がある。このため、微量かつ多様な化学物質のモニタリングとともに、生物材料を用い、ヒトを含む生物や生態系への影響評価を行うバイオモニタリングへの発展が必要である。

バイオモニタリングとは、生体材料を利用した分子識別技術、毒性としての生体への影響評価、バイオマーカー技術、生物群集の診断など生物材料あるいは生物そのものを利用した水環境の診断を行う技術の総称である<sup>1)</sup>。すでに、水質に関するISO等の国際規格では、物理・化学・生物化学的試験の他、生物系試験も既に1/3余りを占め、さらに大幅に増える傾向にある<sup>2)</sup>。水質の概念が、

汚染物質等の濃度を意味するだけでなく、水環境、特に生物や生態系も含む概念、あるいはそれへの影響に広がりつつある。

ここでは、主に水質研究室が現在取り組んでいる、バイオセンサ等によるバイオセンシング、水生生物を用いたバイオアッセイ技術、DNA組み換え微生物などを利用した毒性機構発現系アッセイ、生体内の生理学的变化を捕らえるバイオマーカー、さらに生物群集等による診断技術等の概要と将来展望を述べる。

## 2. 生物材料を用いた水質センシング技術

生物材料を用いて測定対象物質を識別するバイオセンサは、BOD、アンモニア、毒物などが水環境のモニタリング用途には実用レベルにある。当研究室が民間と共同開発した毒物センサは、アンモニアを亜硝酸に酸化する細菌 *Nitrosomonas europaea* を固定化して用いている。この細菌がアンモニアを酸化する速度は、溶存酸素の消費速度に対応しており、溶存酸素電極でとらえることで、連続的なモニタリングを行うことができる。この細菌はBODなど有機物を代謝する従属栄養細菌と比べ、より低濃度で様々な有害化学物質に対して影響を受けやすい。このため、環境水に何らかの毒性物質が存在していると、溶存酸素電極の出力に変化が見られるので、これをとらえる原理である。

このセンサの毒性物質に対する感受性の高さは、浄水場の取水口で原水の安全性のモニタリングに使われているコイなどの魚と同等以上であり、その上オンライン化できることから、水道事業者や河川での毒性物質による水質事故の検出用に導入され始めている。実用化試験で設置した河川で水質異常を実際に検出したが、化学分析では原因物質の特定は困難であった<sup>3)</sup>。早期警戒(early-warning)には水質異常の迅速な検出が可能なこのようなバイオセンシングが有効である。

今後、医学や薬学を中心に微生物の他、細胞の

部分的構成材料である酵素や免疫抗体、受容体などの様々な生体材料が、分子識別に用いられるであろう。この中で、水環境の分野にもターゲットとなる分子識別のためのバイオセンサが将来登場することになる。そこで免疫抗体法を用いた微量物質のセンシング技術を次に紹介する。

脊椎動物の免疫系は、異物を識別し、排除する機能であり、異物としての因子は抗原と呼ばれ、細胞、タンパク質等である。生体に侵入した抗原と特異的に結合する抗体と呼ばれるタンパク質が体内で作られる。抗原の構造の一部に抗体の構造の一部がぴったりと強く結合する機構は、鍵と鍵穴に例えられる。識別性の高い抗体、つまり鍵穴が得られれば、鍵に当たる抗原、つまり環境中に微量に存在するモニタリングしたい物質が検出可能である。医薬や食品分野などでは、このような化学物質や病原性微生物を比較的簡単かつ迅速に検出できるため、最近注目されている。水環境中の微量物質を測定するため、キット化した製品が一部で使われている。例えば、環境庁・建設省が実施している水環境での環境ホルモン実態調査でも使われ、人畜由来ホルモンである $17\beta$ エストラジオールがpptレベルという超低濃度で全国の河川、下水、下水処理水から検出された。

免疫系を用いた方法は、測定原理に汎用性もあることから、水環境での様々な物質の自動測定化に大きな可能性を秘めている。このため、当研究室では、現在、 $17\beta$ エストラジオール、ノニルフェノール、ダイオキシン類を現場や実験室で自動測定できる機器を民間7社と開発するとともに、精密分析との比較や改良方法も検討している。今後、各種の物質を識別する能力の優れた抗体の開発が進めば、様々な化学物質を超低濃度でオンライン的にもモニタリングできる可能性がある。

### 3. バイオアッセイによる水環境評価と管理

バイオアッセイは、生物を用いて化学物質の効果や環境影響を評価することから始まった。現在では、個々の化学物質についての安全性評価の他にも、環境水のように未知・既知を含めた様々な物質が混在した場合の生物影響を総合的に評価するツールとしての発展が期待されている。

影響評価の対象によって、微生物から脊椎動物までさまざま生物がバイオアッセイに用いられる。

ヒトへの健康影響の評価には、主としては乳類が用いられるが、水生生態系への影響評価の視点からは、生態系を代表すると考えられる魚類、両生類、ミジンコ、藻類等の種が用いられる。生物への影響は主に生死に関わる判定を行う急性毒性試験が多くなってきたが、低濃度で長期にわたって曝露されることで生じる影響、例えば成長性や繁殖性など慢性影響の評価も必要となってきている。バイオアッセイでは影響を受ける生物がどの程度の濃度でどの程度の割合で影響を受けるのかという定量的なリスク評価が可能である。

バイオアッセイは、人の健康に係わる環境基準を定める手段として一部が行政的に使われているが、生態系への影響がどの程度あるのかを評価するためにもバイオアッセイによる情報は有用である。米国等では、これらの情報をもとに各種の環境ストレスが生態系を構成する水生生物へ与える影響を定量的にリスク評価し、生態系を保護するための環境基準の設定などに利用し始めている<sup>4)</sup>。またバイオアッセイは、水環境では未知あるいは未規制の物質が混合して存在する場合でも、生物影響がどの程度あるかを評価できる。さらに個々の物質が規制されている場合でも、他の物質と共に存することで毒性の強さに変化がみられる場合があり、その総合的影响を把握することもできる。主としてこれらの理由から、米国、カナダ、ドイツ、フランス、スウェーデン、英国などで水環境管理、特に排水管理を行う行政的手段としてバイオアッセイが利用されている<sup>5)</sup>。

当研究室でも、細菌、藻類、甲殻類、両生類などを用いて下水の処理過程での毒性低減効果の把握を行ってきた。図-1は、下水、放流水、及びその放流先の河川水が、藻類に及ぼす毒性としてどの程度違うのかを調べた例である。ここでA、B2つの処理場の放流先河川aとbは、下水処理場を水源としたせせらぎである。A処理場は活性汚泥処理の後、放流先の親水利用の安全性を高めるため、消毒用に塩素注入量を高めている。一方、B処理場は活性汚泥処理の後、消毒にはオゾンを用いている。緑藻類を用いたバイオアッセイの結果<sup>6)</sup>、両処理場とも下水の生物処理で未処理下水に含まれていた毒性はほとんど見られなくなっていた。しかし、放流先の水域では、両者に大きな違いが見られ、塩素量の削減やオゾンの利用等の消

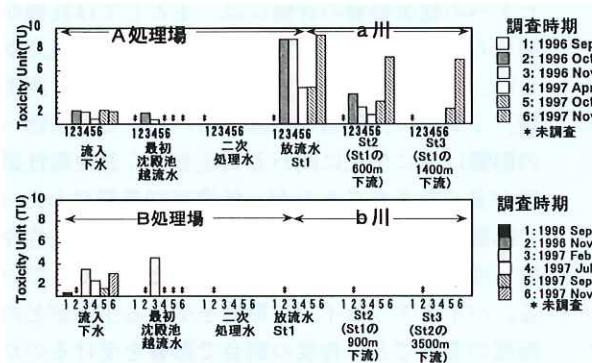


図-1 緑藻類を用いたバイオアッセイによる、A, B の下水処理場内での下水の毒性変化と放流先河川 a, b での流下方向への毒性変化

毒方法の配慮の必要性が示唆される。

#### 4. 試験管レベルでの毒性発現機構の評価

バイオアッセイには生物個体を用いて生体内レベルで行う *in vivo* 試験と、微生物・培養細胞等、生物等の毒性発現機構の一部を試験管レベルで行う *in vitro* 試験がある。問題となる毒性機構をより迅速に、簡便に、場合によっては高感度に検出することができ、水環境試料には都合がよい。

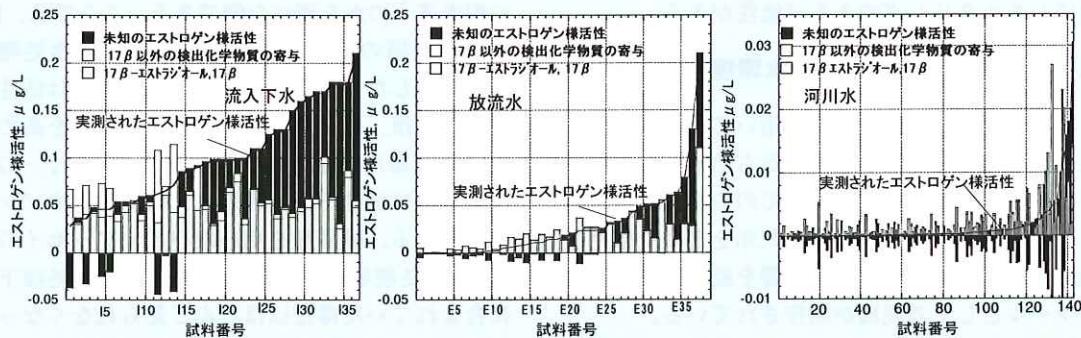
近年環境ホルモン作用が注目されているが、性ホルモン等のステロイドホルモンは細胞の核内に存在するホルモン受容体に結合することで、遺伝子の発現が起こり、性分化、代謝等内分泌系を制御する。環境ホルモンは、生体内のホルモンに代わって、それらの受容体に結合し、生物の内分泌系を攪乱する。

女性ホルモン作用の大きさを評価するため、当研究室では、組み換え酵母を用いてエストロゲン(女性ホルモン)様活性を測定し、環境水中で特に問題となる物質の絞り込みを検討している。エスト

ロゲン様活性の測定原理は、酵母の核にヒトエストロゲン受容体の遺伝子が組み込まれており、酵母をエストロゲン、もしくはエストロゲン様物質に曝露すると、受容体と結合する。その結合体はプラスミド(核外遺伝子)上の結合部位にさらに結合し、それによって発現する遺伝子により  $\beta$  ガラクトシダーゼという酵素が生成するので、発色によってその量を測定できる。エストロゲン様活性と発色の強度には相関がみられることから、陽性対照である  $17\beta$  エストラジオールとの比較により活性強度が求められる。

建設省の実態調査で対象とした環境ホルモン物質のうち、最も強いエストロゲン作用を持つと考えられる  $17\beta$  エストラジオールとを比べ、さらに建設省の河川、下水道の実態調査での化学物質濃度を比べた<sup>7),8)</sup>。この結果、水環境では  $17\beta$  エストラジオール、アルキルフェノール、ビスフェノールAが、他の調査対象化学物質と比べ、大きなエストロゲン様活性を持つと考えられる。

また、図-2に示すように、流入下水、放流水の測定を行うと、エストロゲン様活性は、流入下水では女性ホルモンを含め測定した物質以外にも、大きなエストロゲン作用を持つ物質の存在が示唆されている。一方、放流水や河川水では、女性ホルモンそのものが大きな割合を示しているが、この女性ホルモンやその他の調査物質がもつと推定されるエストロゲン様活性よりも、実際に酵母を用いて測定したエストロゲン様活性の方が大きくなる傾向にあった。この原因は現在究明中であるが、女性ホルモンそのものの測定が抗原抗体反応による簡易分析を行っているため、機器分析よりも過大である可能性が出てきている<sup>9)</sup>。このよう



注) 実測されたエストロゲン様活性が、環境ホルモン濃度から推定されたエストロゲン様活性を下回る場合は、負と表示

図-2 流入下水、下水処理水、河川水のエストロゲン様活性と環境ホルモンの濃度から推定されるエストロゲン様活性の比較

に、バイオアッセイと化学分析とを組み合わせることで、化学的な測定を行うことの重要性を判断したり、化学的な測定精度に問題はないかを点検したりすることができるほか、分画操作などを組み合わせることで問題となる物質群の絞り込みが可能となるなど、極めて有用であることが分かつてきた。

当研究室では、環境ホルモンに限らず、遺伝子の損傷を起こす変異原の環境水での探索などにもバイオアッセイの利用を始めている。また、遺伝子操作によって、微生物あるいは細胞にヒトの受容体を加えるなど、毒性物質への感受性を高めるための開発を行うことが期待される。従って、今後、様々な水環境のモニタリングにこれらの生体材料を利用し、高感度な毒性物質の検出技術の開発が行われることになるであろう。

## 5. バイオマーカーによる診断

バイオアッセイは、室内での生物の飼育、曝露が基本であるが、最近新たに注目されている水環境診断技術の一つに、バイオマーカーを用いた方法がある。バイオマーカーとは、外的環境の因子が引き金となって生じる生物体内での生体反応の変化をとらえる指標物質である。環境に棲息する野生生物のバイオマーカーを調べることで、環境汚染の問題をとらえることができ、従来は困難であった環境中の生物を用いた生態影響の把握も可能となってきている。ヒトの健康診断で本格的な内臓疾患のスクリーニング試験としてγグロブリンを測るようなものであるが、個々の生物の健康診断をすることではなく、その棲息環境の問題点を探ることを目的としている。もともと細胞内の病理的、生理学的な生化学現象の解明から発展してきたため、どのような化学物質が個々の生物にどのような濃度レベルでどのような生化学的な影響を与えるのか分かっているバイオマーカーがある。このため、表-1に示すように、モニタリング対象となる水域に棲息する水生生物の体内で生理的に産生される生化学物質、例えばある環境汚染物質により誘導される解毒酵素などのタンパク質等を測定することで、水環境での化学

表-1 汚染物質が誘導する生化学的バイオマーカーの例<sup>10)</sup>

バイオマーカー	反応を起こす汚染物質の例
チトクロム P <sub>450</sub>	多環芳香族化合物(PAH), ダイオキシン類
メタロチオネン	Cd, Cu, Zn, Hg, Co, Ni, Bi, Ag
ストレスタンパク質	熱, TBT, 銅等の金属, PAH, 紫外線
グルタチオントランスファラーゼ	PAH, PCB
脂質ペルオキシダーゼ	Cd, PCB
ヘム・ポリフェリン	Pb, As, Hg, PCB, ダイオキシン, HCB

物質などの生態系へのストレッサーを明らかにできる可能性がある。

すでに環境エストロゲンによる魚類への影響を把握するために建設省が行った実態調査でも、この方法が用いられている。雌の魚は、体内にある卵巣が、季節によって脳下垂体から刺激を受け、女性ホルモンを血中に分泌する。女性ホルモンは、肝細胞に作用して、産卵に必要な卵黄タンパク質を合成させるため、その前駆体のタンパク質を合成するように信号を与える。このタンパク質の一つはビテロゲニンと呼ばれ、肝臓から血中に分泌され、卵巣に移行し、卵巣で卵黄タンパクとなる。雄は体内に卵巣を持たないので、女性ホルモンによって肝臓でビテロゲニンは作られないため、本来雄の血中にビテロゲニンは存在しないはずである。しかし、水環境に女性ホルモンと同じ働きをする物質、例えばノニルフェノールなどがある濃度で存在し、雄の体内に取り込まれた場合、女性ホルモンと同じような働きをするため、雄であっても肝臓でビテロゲニンが産生されることが確認されている。そこで、建設省では全国の代表的な一級河川で、コイを対象に調査を実施した。この結果、全国で捕らえられた雄コイのうち、約1/4にビテロゲニンが見つかり、雄であっても体内で何らかのエストロゲンの影響を受けた生理現象が生じていることが分かった。しかし、まだ捕獲されたサンプルが少なく、河川や地点ごとで際だった差が見られないことから、現時点での結果から環境エストロゲンによる影響が明確であるとは判断できない。当研究室では、ビテロゲニン誘導の個体差が大きい懼れがあることから、現在都市排水を対象に、魚類のビテロゲニン誘導が起るかどうか、コイやメダカの飼育調査による実験<sup>11)</sup>の方法確立に取り組んでいる。

水環境に有害な化学物質が存在する場合、これらのバイオマーカーなど生化学物質を産生し、解

毒するプロセスは、その生物が持つ解毒に関わる遺伝子の一部が発現することから始まる。従って、どのような遺伝子が発現されるのかを把握し、生物に問題を起こす化学物質の存在を探知するという水環境診断技術も、発展が期待される。例えば、遺伝子配列が全て分かっている酵母のDNAチップがすでに開発されている。酵母を各種の毒性物質に暴露した際に発現する遺伝子であるmRNAを抽出し、DNAチップにハイブリダイゼーションすることで、どの毒性物質に対してはどの遺伝子が作用するのかが分かり始めている。今後さまざまな毒性物質に対して発現する遺伝子が分かると、未知の物質が含まれる環境水に、酵母を曝露した際に発現した遺伝子を同様に求めてことで、未知の毒性物質が何であったのかが分かる可能性がある。酵母だけではなく、ヒトを含む様々な生物の遺伝子が今後解読されると、同様な方法で、これらの生物に影響を与える原因物質の同定が可能となるであろう。従って、水環境に含まれるヒトや水生生物の遺伝子発現を起こす物質の探索と毒性発現要素としての総合化が、今後の研究開発の焦点になっていくであろう。

## 6. 水生生態系の構造と群集解析での診断技術

バイオアッセイは、基本的には実験として行われるバイオモニタリングであるが、現実の生態系で起こる現象と一致するのかまだよく分かっていない。現実の水環境に棲息する水生生物を調べ、出現している生物の種や量、さらに構造が、何らかの人為的な影響を受けていないのかを診断する方法は、過去から河川等でも行われてきた。

例えば、図-3, 4は前述した図-1と同じA、B処理場の放流先である河川に、季節的に出現した付着藻類の種の数と、河床の単位面積当た

りに出現した付着藻類の細胞数の変化である<sup>12)</sup>。両者を比べると塩素消毒の量の多いA下水処理場の放流河川では、放流地点ばかりでなく、下流まで出現している付着藻類の種の数が、オゾン消毒を行っているB処理場に比べて、極端に少ない。これは、藻類の毒性試験を行った結果とも傾向が類似しており、実際に残留する塩素の影響に耐えられる種しか出てきていない。一方、付着藻類の密度は、放流地点を含めてA下水処理場の放流河川の方が、生息密度では高くなっています。B処理場が高度処理で栄養塩除去を行っていることを反映している可能性がある。a河川の方が、b河川より限られた種が多量に出現していることの生態学的な意義は、十分には分からぬが、多様性においてはb河川の方が優れているとも考えられる。付着藻類の上位にある底生動物でも、Aの放流地点ではBよりも多様性と生息密度ともに極めて小さくなっているが、下流では両者の差は目立っていない。藻類や底生動物の他、魚類などさらに上位にある生態系の構成者も含めて、種の数、量、さらに多様性など様々な指標を検討し、より使いやすく、的確な診断指標の開発が必要である。

米国では、水環境診断としての利用にとどまらず、水生生態系の回復・保護のための目標としてバイオクライテリア(biocriteria)と呼ばれる生物学的基準が用いられ始めている。人の活動による影響が最小である水域で生物健全性(integrity)がどの程度あるかを推定し、現状との乖離がある場合、本来あるべき状態を目標とし、回復・保護を図るためにプログラムを実施している。生態地域(ecoregion)ごとに人の活動により乱されていない生態系の健全性がどの程度あるのかを、魚類や底生動物などを対象に、生物健全性指数(ICI)や無脊椎動物群集指数(ICI)と呼ばれる指標により

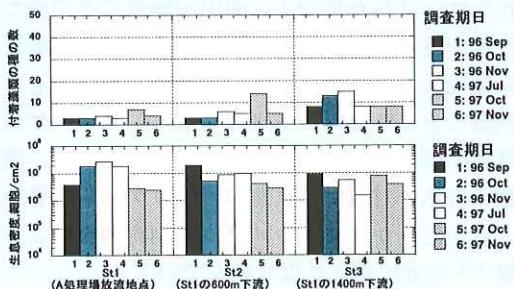


図-3 A下水処理場放流水が水源となるa河川の付着藻類の種の数と生息密度の流下方向の変化

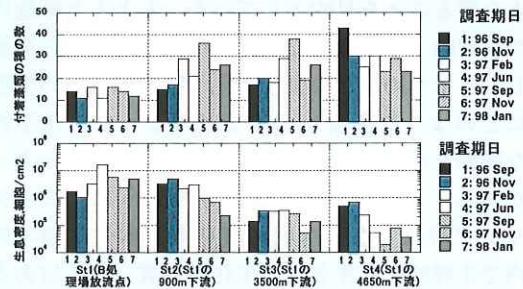


図-4 B下水処理場放流水が水源となるb河川の付着藻類の種の数と生息密度の流下方向の変化

数量化し、本来どの程度の健全性を反映した指標が対象地域にあるべきかを健全度で診断する州が出はじめている<sup>13)</sup>。これらの生物学的基準は、流量やハビタットの環境条件に何か生態系にとって問題となる課題がないかを診断するために用いられるが、主たる利用目的は水質環境の管理への適用にあり、総合的な水環境目標設定にも使われることが推薦されている。今後、我が国においても行政的なツールとしても使いうるこのような指標作りと、生態系復元のための目標設定を開発研究していく必要性があろう。

## 7. 今後の技術開発に向けて

このように、バイオモニタリングでは、物質レベルの検出を行うバイオアッセイ、主としてラボベースで生物あるいは生体機構を利用したバイオアッセイ、さらに環境に棲息する生物の体内の生理的变化を捕らえるバイオマーカー、さらに生態系そのものを調べ、判断するバイオクライテリアなど様々な段階の手法がある。これらにはそれぞれ長所と短所もあり、迅速性・簡便性・再現性・現象面での理解が必要である。このため、分子レベルから細胞内の反応レベル、さらには細胞レベル、組織や細胞間相互作用、生物個体、生物間の相互作用を含めた生態系レベルと相互の方法を組み合わせて、水環境でのさまざまなストレスが、生物・生態系にもたらしている影響を、総合的に診断する必要があろう。また、自動化、連続化、省力化、可視化などの技術開発も必要で、周辺領域の学際的連携が今後も必要となる。

## 参考文献

- 1) Zimmer, R., : Biomonitoring in the water environment, a special publication, Water Environment Federation, 1997.
- 2) 田中、高橋 : ISO 水質規格制定と我が国の水質規格の国際整合化, 下水道協会誌, 第 37 卷, 第 449 号, pp.8-13, 2000.
- 3) Tanaka, H. et al., : Development of a toxicity monitor using nitrifying bacteria, Proceedings of 71th Annual Conference, Water Environment Federation, 1998.
- 4) Marcy, S.K.M., : Comparative risk and integrated ecosystem management: Potential application for risk management of sewerage systems, Proceedings of 7th WEF/JSWA Joint Technical Seminar on Sewage Treatment Technology, pp.179-198, Japan Sewage Works Agency, 1998.
- 5) 楠井 : 諸外国におけるバイオアッセイの動向, 第 34 回日本水環境学会セミナー講演資料集, pp.12-26, 1998.
- 6) 松原他, 藻類増殖阻害試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試料への適用, 水環境学会誌, 第 20 卷, 第 11 号, pp.768-775, 1997.
- 7) 矢古宇他 : 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, 第 36 卷, pp.199-208, 1999.
- 8) Tanaka, H. et al., : Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment, 1st World Water Congress of the International Water Association Conference Preprint book1, pp.423-430, 2000.
- 9) 高橋他 : 下水試料の女性ホルモン測定の課題—LC/MS/MS と ELISA の比較から, 第 3 回日本水環境学会シンポジウム講演集, p175, 2000.
- 10) Depledge, M.H. & S.P. Hopkin, : Methods to assess effects on brackish, estuarine, and near-coastal water organisms, in Linthrust, R.A. et al. (Eds.), Method to Assess the Effects of Chemicals on Ecosystems, John Wiley & Sons, 1995.
- 11) 東谷 : メダカを用いた環境ホルモンの検出, 土木技術資料, 第 41 卷, 第 7 号, pp.4-5, 1999.
- 12) Minamiyama et al., : Evaluation of the effects of treated wastewater on aquatic organisms, Proceedings of 7th WEF/JSWA Joint Technical Seminar on Sewage Treatment Technology, pp.179-198, Japan Sewage Works Agency, 1998.
- 13) Davis, W.S. & T.P. Simon (Eds), : Biological Assessment and Criteria, Tools for Water Resources Planning and Decision Making, Lewis Publisher, 1995.

田中宏明\*



建設省土木研究所下  
水道部水質研究室長  
Hiroaki TANAKA

矢古宇靖子\*\*



同 水質研究室重点  
研究支援協力員  
Yasuko YAKOU

高橋明宏\*\*\*



同 水質研究室研究員  
Akihiro TAKAHASHI

東谷 忠\*\*\*\*



同 水質研究室重点  
研究支援協力員  
Tadashi HIGASHITANI

岡安祐司\*\*\*\*\*



同 水質研究室研究員  
Yuji OKAYASU