令和２年度経済産業省委託

令和２年度化学物質安全対策

（パッシブサンプラーを用いた化学物質の生物濃縮試験代替え法の検討）

調査報告書

令和 3 年 3 月

九州大学

目次

1. 目的.....3

2. 概要.....4

3. 実施体制.....4

4. 事業内容.....5

4.1 コイおよび SPMD 水暴露試験.....5

4.2 PE 蓄積・排泄試験（SPMD 膜への蓄積試験）.....28

4.3 SPMD の生物濃縮試験結果の検討.....33

5. 調査結果の公表.....36

6. 海外出張の内容.....37

7. 今後の課題.....38

8. 参考文献.....39

1. 目的

現在、化審法では新規化学物質の審査に蓄積性の試験データが必須要求されている。そのために 1-オクタノール水分配係数試験を行い、結果 log Pow が 3.5 以上の場合、魚類を用いた濃縮駆試験が行われる。しかし後者の試験法では、生物を使うために実施設備等が大がかりとなり、コストと時間を要する。また個体差、水温・水質等実験条件、魚の生理活性や代謝に起因する種差等で値が左右され易い。また動物愛護の立場からも、実験で用いる生物数を減らす必要がある。よって、生物濃縮試験を代替えする試験方法の開発が必要とされている。

近年、環境中の化学物質のモニタリングにパッシブサンプラー(PS)が使われ始めている。PS は、その中に脂質や高分子等を封入したもので、水中または空気中で対象の物質を濃縮する装置である。本研究ではポリエチレン製の半透膜チューブにトリオレインを封入した PS の一種である Semi permeable membrane device（SPMD）を用いた。SPMD は EPA が環境調査を目的に開発したものであり、SPMD 内に入ってきた物質をトリオレイン層に閉じ込めることによって疎水性物質の生体への蓄積を模倣したものである。疎水性の高い PAH や POPs の環境濃度と比例することが明らかになっており、既に様々な環境調査に用いられている。よって、logPow の高い化学物質の生物濃縮の評価について、生物濃縮試験の代わりに SPMD を用いることにより、実験にかかる期間や費用の軽減を計りながらも、代謝や個体差によるデータのばらつき等を抑え信頼性の高いデータの取得が期待できる。

本研究では化学物質の生物濃縮試験代替え法の開発として、環境中の化学物質のモニタリングに用いられているパッシブサンプラーの 1 種 SPMD を用い、log Pow 4 から 5 の範囲で異なる疎水性を示す 4 物質について、コイ（*Cyprinus carpio*） 及び SPMD を用いた取込・排泄試験を実施する。得られた魚体中および SPMD 中化学物質の濃度より、コイ及び SPMD における生物濃縮係数、排泄速度等を求めた。また化学物質の SPMD 表面のポリエチレンに対する蓄積・排泄試験を行い、得られたデータから魚体および SPMD における化学物質蓄積をモデル化する。生物濃縮法および SPMD 法から得られた 4 種化学物質の BCF を比較して SPMD 法の有用性を検討する。

2. 概要

供試魚としてコイ（平均体重約 5g）を用い、log Pow 3.5 から 6 を中心に基準物質として選んだ 4 物質 1,3,5-トリクロロベンゼン（略称 TrCB）、1,2,4,5-テトラクロロベンゼン（略称 TeCB）、ペンタクロロベンゼン（略称 PeCB）、ヘキサクロロベンゼン（略称 HeCB）を用い、OECDTG305 に準拠して流水式で取込・排泄試験を実施した。また SPMD を用いてコイと同様の条件で暴露して濃縮・排泄試験を実施した。魚から得られた脂質補正 BCF と SPMD 試験から得られた脂質補正 BCF の対数値($\log_{10}$)の関係を比較検討した結果、両者は非常に良い相関性を持つことが明らかになった。このことは被検物質の LogPow が 4 から 5 の間であれば、魚の試験に置き換えて SPMD で BCF を予測できる可能性が高いことを示している。今後さらなく検討が必要と思われる。

また、アントラセンについて SPMD の蓄積排泄実験を行った結果、アントラセンはトリオレインだけでなく、PE 膜にも蓄積していた。さらにその濃度変化より得られた吸収・排泄速度を求め、シミュレーションを行った結果、アントラセンは SPMD 膜に蓄積するが、膜にある穴(10Å)を介してトリオレインに蓄積していると考えられた。

3. 実施体制

実施主体：九州大学農学研究院　大嶋雄治

暴露実験外注先：化学物質評価研究機構久留米事業所

4. 事業内容

4.1 コイおよび SPMD 水暴露試験

実験方法

被験物質として以下の 4 種を用いた

1,3,5-トリクロロベンゼン（略称 TrCB）

CAS 番号　108-70-3
純　度　>99.0%
供給者　東京化成工業
ロット番号　RY7VM-IL
log Pow[*1]　4.19

1,2,4,5-テトラクロロベンゼン（略称 TeCB）

CAS 番号　95-94-3
純　度　>99.0%
供給者　東京化成工業
ロット番号　LSBGH-ED
log Pow[*1]　4.64

ペンタクロロベンゼン（略称 PeCB）

CAS 番号　608-93-5
純　度　>98.0%
供給者　東京化成工業
ロット番号　AQV3N-OC
log Pow[*1]　5.17

ヘキサクロロベンゼン（略称 HeCB）

CAS 番号　18-74-1
純　度　>99.0%
供給者　東京化成工業
ロット番号　FHC01-KTGM
log Pow[*1]　5.73

*1 Kowwin ver.1.68 (EPI Suite ver. 4.1)

溶解補助剤

試験原液の調製に、下記の溶剤を使用した。

テトラヒドロフラン
CAS 番号　109-99-9

供給者　　富士フイルム和光純薬
等　級　　和光一級
N,N-ジメチルホルムアミド
CAS 番号　68-12-2
供給者　　ナカライテスク
等　級　　EXTRA PURE REAGENT

試験魚

魚　種	コイ　*Cyprinus carpio*
選択理由	過去の知見との整合性を考慮するため及び大きさが扱いやすいため
供給源	一般財団法人化学物質評価研究機構　久留米事業所
じゅん化条件	水産用 OTC（塩酸オキシテトラサイクリン 10%含有共立製薬）及び食塩（塩事業センター）を用いて薬浴した後に、以下の条件でじゅん化した。じゅん化後、試験魚はじゅん化水槽（No. 6-6）から試験水槽へ移した。
期　間	地下水で 44 日間飼育した後、脱塩素水道水で 10 日間じゅん化した。
水　温	25±2℃未満 じゅん化期間中の全体の死亡率は 5%未満であった。
ロット	TFC-200520
体　重	取込期間開始時の魚体重の最小値は最大値の 2/3 以上であった。
全　長	6.4～8.9 cm（取込期間開始時　6.4～6.8 cm）
年　齢	当歳魚
餌　料	種　類　　錦鯉用飼料
組　成	たん白質含量　30%以上 脂質含量　4.0%以上
製造元	キョーリンフード工業
給餌方法	1 日 1～2 回給餌した。1 日当たりの給餌量は試験魚体重 2%相当量とした。採取前 24 時間は給餌を止めた。

半透膜デバイス（SPMD）

供給者	ENVIRONMENTAL SAMPLING TECHNOLOGIES
ロット	020320

SPMD は約 3 cm 幅にシーラーで圧着させたものを水槽に投入した。採取の際に圧着箇所を切断して分析試料とした。

濃縮度試験の実施

試験用水

脱塩素水道水［水道水を活性炭ろ過装置（オルガノ）で処理した水］

試験及び環境条件

試験水供給方法　　久留米事業所組立流水式装置

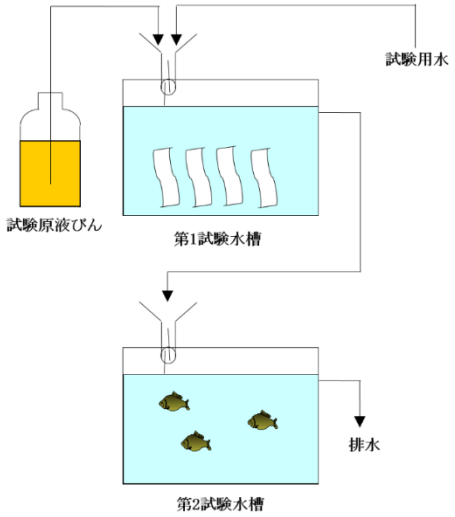
試験水槽　　ガラス製水槽

第 1 試験水槽 70 L 容（No. 6-4）

第 2 試験水槽 100 L 容（No. 6-5）

取込期間においては、各試験水槽を右図のとおり設置し、第 1 試験水槽に SPMD、第 2 試験水槽に試験魚を投入し、試験用水と試験原液を流水状態で水槽内に供給することにより、被験物質を SPMD 及びコイに暴露した。

排泄期間においては、各水槽に直接に試験用水を供給した。



＜取込期間の概略図＞

試験濃度　　5 μg/L

試験水流量　　取込期間

試験原液 0.04 mL/分及び試験用水 2000 mL/分の割合で 2880 L/日を供した。

排泄期間

試験用水 2000 mL/分で 2880 L/日を供した。

試験原液タンク　　1 L 容ガラス製褐色びん

調製頻度　　1～2 回/2 週

試験温度　　24.0～25.1℃

溶存酸素濃度　　5.9～7.2 mg/L

pH　　7.5～7.8

全有機炭素濃度　　取込期間中　10.1～11.1 mgC/L

排泄期間中　　<1.0 mgC/L

全硬度　　41.1～42.1 mg$CaCO_3$/L

ばっ気　　無し

照光時間　　14 時間明/10 時間暗（白色蛍光灯による人工照明）

試験魚数　　80 尾（取込期間開始時）

取込期間　　28 日間（2020 年 10 月 15 日～2020 年 11 月 12 日）

排泄期間　　28 日間（2020 年 11 月 12 日～2020 年 12 月 10 日）

実施場所　　アクアトロン室 A

試験原液調製法

供試試料（各 500 mg）をテトラヒドロフランに溶解して、被験物質濃度として 2500 mg/L の被験物質溶液を 200 mL 調製した。これを 100 mL 分取し、*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して被験物質濃度として 250 mg/L の試験原液を 1 L 調製した。

観察、測定及び清掃

各項目については、下記のとおり観察及び測定結果を記録した。さらに、必要に応じて SPMD 表面の付着物やコイの排泄物等を 1 日に 1 回程度除去した。

項目	頻度
観察	取込期間及び排泄期間中に 1 日 2 回観察した。ただし、休日は 1 回とした。
試験温度	取込期間開始前及び取込期間並びに排泄期間中に 1 日に 1 回測定した。
試験水流量	取込期間開始前及び取込期間並びに排泄期間中に 1 日に 1 回測定した。
溶存酸素濃度	取込期間開始前及び終了時、排泄開始時及び終了時に 1 回測定した。
pH	取込期間開始前及び終了時、排泄開始時及び終了時に 1 回測定した。
全有機炭素濃度	取込期間開始前及び終了時、排泄開始時及び終了時に 1 回測定した。
全硬度	取込期間中に 1 回測定した。

試験水、試験魚及び SPMD の分析

試験水、試験魚及び SPMD 中の被験物質分析はガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）により行った。

試験水の分析

取込期間

取込開始前、取込開始 3、7、14、21 及び 28 日後の計 6 回とした。

1 回当たりの分析試料は 1 点とした。

排泄期間

排泄期間終了時に行った。

1 回当たりの分析試料は 1 点とした。

試験魚の分析

取込期間

取込 3、7、14、21 及び 28 日後の計 5 回とした。

1 回当たりの採取尾数は 4 尾とし、2 群（2 尾 1 群）に分けて行った。

試験魚は 2 日間以上の測定間隔となるように採取し、最後の測定は 28 日後とした。

排泄期間

排泄 1、2、3、5、7、14、21 及び 28 日後の計 8 回とした。

1 回当たりの採取尾数は 4 尾とし、2 群（2 尾 1 群）に分けて行った。

SPMD

取込期間

取込 1 日後及び試験魚分析と同時の計 6 回とした。

1 回当たりの採取試料数は 2 点とした。

排泄期間

試験魚分析と同時の計 8 回とした。

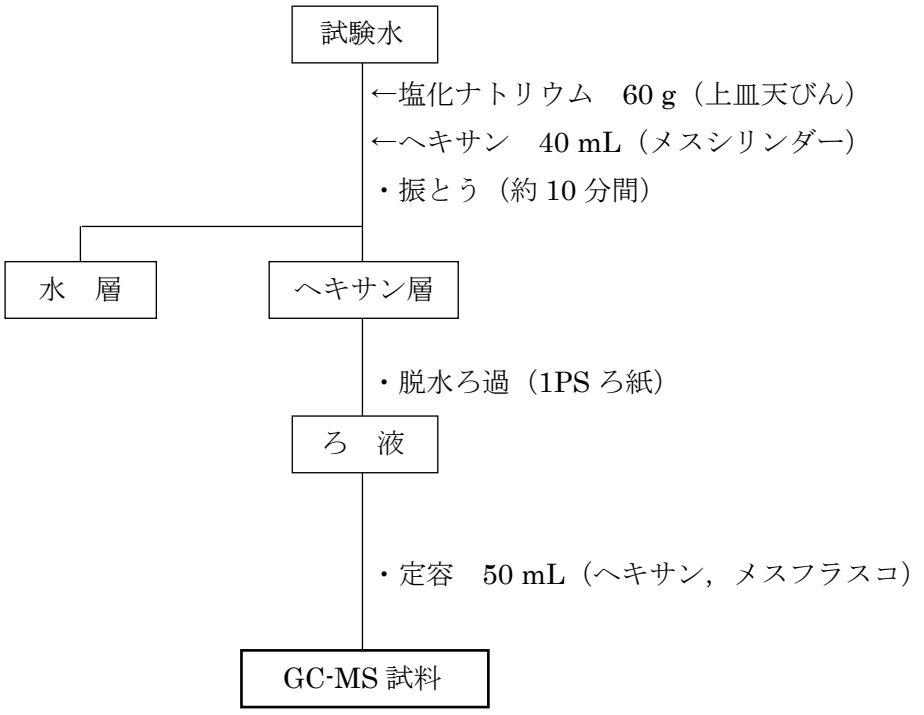
1 回当たりの採取試料数は 2 点とした。

分析試料の前処理法

試験水中の被験物質

試験水 200 mL（メスシリンダー）を試験水槽から採取し、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、GC-MS 試料とした。

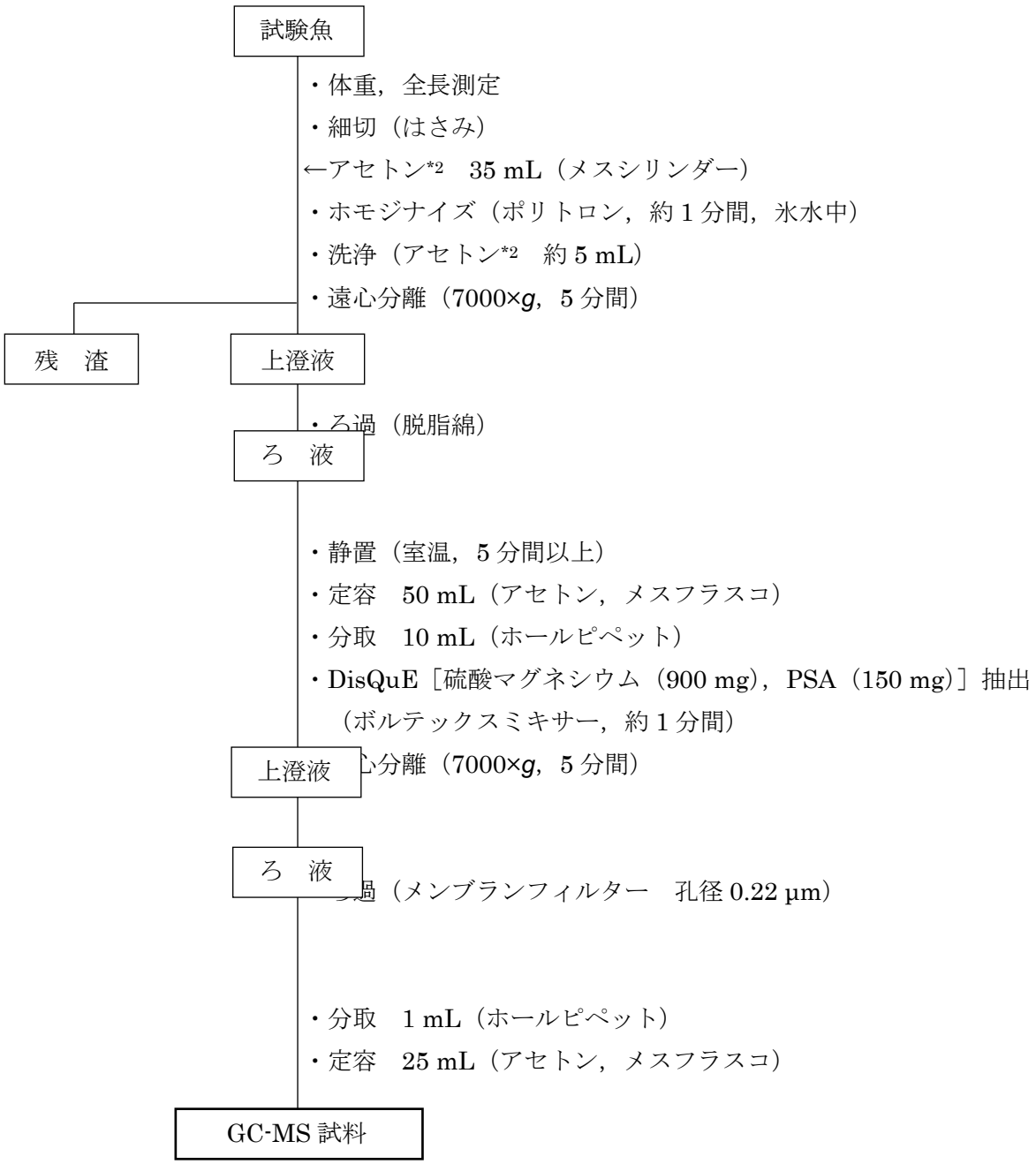
フロースキーム



試験魚中の被験物質

試験魚を試験水槽から採取し、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、GC-MS 試料とした。

フロースキーム

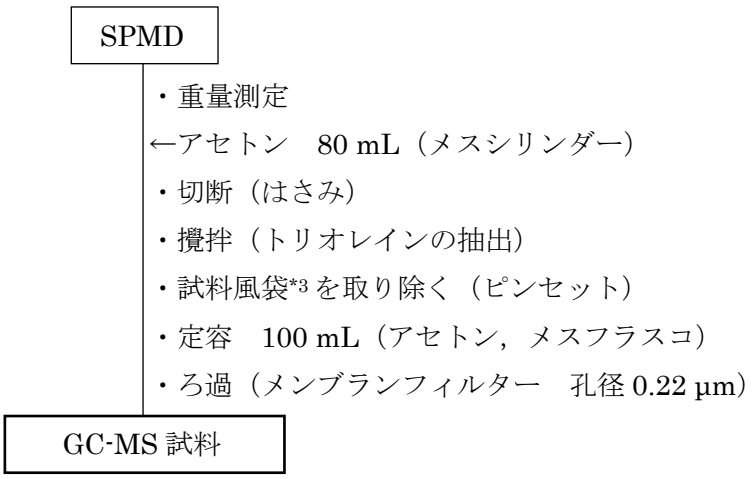


*2　あらかじめ冷却したものを用いた。

SPMD 中の被験物質

SPMD を試験水槽から採取し､以下のフロースキームにより前処理操作を行い、GC-MS 試料とした。

フロースキーム



*3　　取り除いた後に重量測定を行った。

被験物質の定量分析

定量方法

本定量方法の有効性を確認するため、1.00、10.0、20.0、100、200 及び 400 µg/L の 6 濃度の試験水及び試験魚分析用の標準溶液を用いて検量線（最小二乗法による回帰式：Y＝aX＋b，Y：応答量，X：被験物質濃度）を作成した。相関係数 *r* は 0.995 以上であり、切片 b の絶対値は応答量の最大値の 5%以内であったことから、検量線は原点を通過する直線とみなし、被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

分析条件

機　器	ガスクロマトグラフー質量分析計（機器番号 GCMS-004）
ガスクロマトグラフ	6890N　（Agilent Technologies）
質量分析計	5975B MSD （Agilent Technologies）

ガスクロマトグラフ条件

カラム	HP-5MS
（30 m × 0.25 mm I.D.，膜厚 0.25 µm，Agilent Technologies）	
カラム温度	50℃（1.0 min）→ 250℃（1.0 min）
昇温速度	20℃/min
制御モード	流量
カラム流量	1.2 mL/min
注入口温度	250℃

導入モード　　パルスドスプリットレス
（パルス圧：100 kPa，パルス時間：1.0 min）
パージ流量　　24 mL/min
パージ時間　　1 min
注入量　　1 μL
キャリアガス　　ヘリウム
質量分析計条件
イオン化法　　電子イオン化法（EI）
検出法　　選択イオンモニタリング（SIM）

被験物質	測定イオン（*m/z*）
TrCB	179.9
TeCB	215.9
PeCB	249.8
HeCB	283.9

インタフェース温度　230℃
イオン源温度　230℃
MS 四重極温度　150℃
イオン化電圧　70 V

標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

調製した 2500 mg/L の被験物質溶液をアセトンで希釈して 20.0 μg/L の標準溶液とした。

GC-MS 試料中の被験物質濃度は、20.0 μg/L の標準溶液及び GC-MS 試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた。なお、被験物質濃度が検量線の範囲を超えた場合は、その範囲にはいるようにアセトンで希釈し分析した。

クロマトグラム上における被験物質濃度の定量下限は、被験物質濃度として 1.00 μg/L の標準溶液を 5 回分析し、得られた被験物質濃度の標準偏差の 10 倍として以下のとおりとした。

TrCB　0.39 μg/L
TeCB　1.1 μg/L
PeCB　1.4 μg/L
HeCB　0.89 μg/L

回収試験

各試料の前処理操作における回収試験の結果は下表のとおりであった。

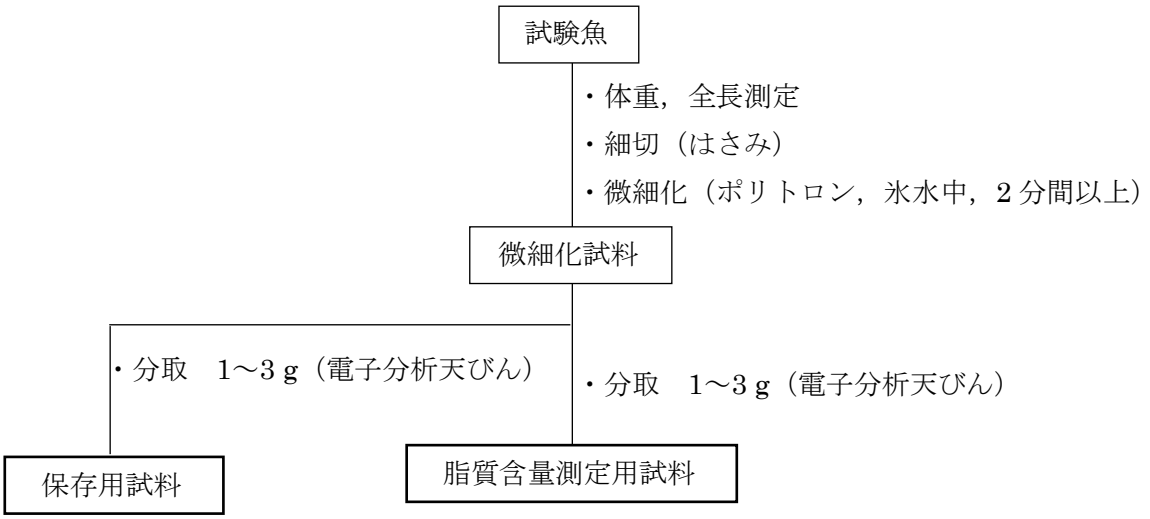
被験物質	試験水（1000 ng）	試験魚（25000 ng）	SPMD（2000 ng）
TrCB	94.2%	94.1%	97.5%
TeCB	72.3%	97.4%	99.9%
PeCB	92.1%	97.8%	98.9%
HeCB	92.6%	93.9%	99.8%

結果は試料 2 点の平均値、（ ）内は被験物質添加量である。

試験魚の脂質含量

取込期間開始前及び終了後、並びに排泄期間終了後の脂質含量を測定した。1 回当たりの採取尾数は 3 尾とした。採取した試験魚は以下のフロースキームにより前処理操作を行い、脂質含量測定用試料とした。測定はクロロホルム/メタノール抽出による重量法で行った。

フロースキーム



分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

試験水中の被験物質濃度の算出

以下の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字 3 桁に丸めて表示した。

試験水中被験物質濃度 ＝P × A(f) × C ÷ {A(std) × B × E} × {100 ÷ R}

P： 標準溶液の濃度

A(std)： 標準溶液のピーク面積

A(f)： 試料のピーク面積

B： 分取比

C： 最終液量

E： 試験水採取量

R： 回収率（%）

試験水中の被験物質定量下限濃度

上記で求めた被験物質濃度の定量下限より、試験水中の定量下限濃度[*4]はそれぞれ、

TrCB	0.10	μg/L
TeCB	0.38	μg/L
PeCB	0.38	μg/L
HeCB	0.24	μg/L

と算出される。計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度の算出

被験物質濃度の定量下限値以上の場合、以下の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字 3 桁に丸めて表示した。

試験魚及び SPMD 中被験物質濃度 $= P \times A(f) \times C \times D \div \{A(std) \times B \times E\} \times \{100 \div R\}$

P： 標準溶液の濃度

A(std)： 標準溶液のピーク面積

A(f)： 試料のピーク面積

D： 希釈倍率

B： 分取比

C： 最終液量

E： 試験魚体重或いはトリオレイン重量（g）

R： 回収率（%）

試験魚及び SPMD 中の被験物質定量下限濃度

被験物質濃度の定量下限より、試験魚及び SPMD 中の定量下限濃度[*4]は試験魚体重を 10 g、SPMD の媒体（トリオレイン）を 0.02 g としたとき、以下のとおり算出される。計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

試験魚

TrCB	52 ng/g
TeCB	140 ng/g
PeCB	180 ng/g
HeCB	120 ng/g

SPMD

TrCB	2000 ng/g
TeCB	5500 ng/g
PeCB	7000 ng/g
HeCB	4500 ng/g

$$*4 \quad \text{被験物質定量下限濃度（μg/L 又は ng/g）} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A： 分析試料の定量下限濃度（μg/L）

B： 回収率（%）

C： 試験水採取量（mL）又は試験魚体重或いはトリオレイン重量（g）

D： 最終液量（mL）

E： 分取比

試験結果の算出法

脂質含量の算出法

脂質含量は次式により求めた。計算結果は有効数字 3 桁に丸めて表示した。

脂質含量（%）=（T - T0）/ S × 100

T0： 容器の重量（g）

T： 10.5.5 の抽出操作後の試料（容器+脂質）の重量（g）

S： 試験魚微細化試料の分取量（g）

生物濃縮係数（BCF）の算出法

BCF は、以下の式に従って算出した。計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

$BCF = C_f / \overline{C_w}$

BCF： 生物濃縮係数（L/kg）

C_f： 試験魚及び SPMD 中被験物質濃度（ng/g）

$\overline{C_w}$： 取込期間における試験水中の平均被験物質濃度（μg/L）

定常状態に達したことの確認方法

定常状態に達したことの判断基準は、試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度に顕著な増加が認められず、2 日間以上の測定間隔で連続した 4 回の各測定における試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度の変動が被験物質濃度の平均に対して±20%以内とする。

定常状態に達したことの判断基準：V(m-3), V(m-2), V(m-1), V(m) ≦ 20（%）

$$V(m\text{-}3) = \frac{|C_f(m\text{-}3) - \overline{C_f}|}{\overline{C_f}} \times 100$$

$$V(m\text{-}2) = \frac{|C_f(m\text{-}2) - \overline{C_f}|}{\overline{C_f}} \times 100$$

$$V(m\text{-}1) = \frac{|C_f(m\text{-}1) - \overline{C_f}|}{\overline{C_f}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{|C_f(m) - \overline{C_f}|}{\overline{C_f}} \times 100$$

V(m-3), V(m-2), V(m-1), V(m)：試験魚及び SPMD 中被験物質濃度の平均値からの

乖離率（%）

C_f (m-3), C_f (m-2), C_f (m-1), C_f (m)：m-3, m-2, m-1, m 回目における試験魚及び SPMD 中被験物質濃度の平均値（ng/g）

$\overline{C_f}$：$\{C_f(m\text{-}3) + C_f(m\text{-}2) + C_f(m\text{-}1) + C_f(m)\} / 4$

定常状態における生物濃縮係数（BCF_{SS}）及び脂質含量標準化した定常状態における生物濃縮係数（BCF_{SSL}）の算出法

定常状態における試験魚及び SPMD 中の平均被験物質濃度の算出

$\overline{C_{fs}} = \{ C_f(m\text{-}3) + \overline{C_f}(m\text{-}2) + C_f(m\text{-}1) + C_f(m)\} / 4$

$\overline{C_{fs}}$： 連続した 4 回の測定における試験魚及び SPMD 中平均被験物質濃度（ng/g）

C_f (m)： m 回目の試験魚及び SPMD 中平均被験物質濃度（ng/g）

BCF_{SS} の算出

$BCF_{SS} = \overline{C_{fs}} / \overline{C_w}$

BCF_{SS}： 定常状態における生物濃縮係数（L/kg）

$\overline{C_{fs}}$： 定常状態における試験魚及び SPMD 中の平均被験物質濃度（ng/g）

$\overline{C_w}$ ： 取込期間における試験水中の平均被験物質濃度（μg/L）

BCF_{SSL} の算出

$BCF_{SSL} = BCF_{SS} \times 5 / L$

BCF_{SSL}： 脂質含量 5%で標準化した定常状態における生物濃縮係数（L/kg）

BCF_{SS}： 定常状態における生物濃縮係数（L/kg）

L： 試験魚　取込期間終了後における平均脂質含量（%）

SPMD　媒体はトリオレインのため、脂質含量は 100%とした。

速度論による生物濃縮係数（BCF_K）及び脂質含量標準化した速度論による生物濃縮係数（BCF_{KL}）の算出法

BCF_K の算出

$BCF_K = k_1 / k_2$

BCF_K： 速度論による生物濃縮係数（L/kg）

k_1： 取込速度定数（L/kg/day）

k_2： 排泄速度定数（/day）

BCF_{KL} の算出

$BCF_{KL} = BCF_K \times 5 / L$

BCF_{KL}： 脂質含量 5%で標準化した速度論による生物濃縮係数（L/kg）

BCF_K： 速度論による生物濃縮係数（L/kg）

L： 試験魚　　取込開始前、終了後及び排泄終了後における平均脂質含量（%）
SPMD　　媒体はトリオレインのため、脂質含量は 100%とした。

排泄半減期（$t_{1/2}$）の算出

$t_{1/2} = -\ln (0.50) / k_2 = 0.693 / k_2$

$t_{1/2}$： 排泄半減期（day）

k_2： 排泄速度定数（/day）

数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401：2019 規則 B の方法に従った。

試験水、試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度は有効数字 3 桁に丸め、BCF は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

試験結果及び考察

試験魚の外観

異常は認められなかった。

試験魚の脂質含量

試験魚の平均脂質含量は、取込期間開始前、3.71%；取込期間終了後、6.68%；排泄終了後、5.40%であり大きな変動はなかった。

取込期間中における試験水中の被験物質濃度

取込期間中における試験水中の被験物質濃度を Table 1 に示した。被験物質濃度は設定値の 73%以上であり、その変動は測定値の平均に対して±20%以内に保たれていたので、暴露濃度は良好に行われたと考えられる。なお、取込期間開始前の試験水中の被験物質濃度は以下のとおりであった。

TrCB	3.72 μg/L
TeCB	5.13 μg/L
PeCB	4.25 μg/L
HeCB	4.82 μg/L

Table 1　取込期間中における試験水中の被験物質濃度　単位 μg/L

被験物質	3 日後	7 日後	14 日後	21 日後	28 日後	平均試験水濃度
TrCB	3.82	3.66	4.18	3.89	3.94	3.90
TeCB	5.58	5.22	5.66	5.73	5.59	5.56
PeCB	4.59	4.14	4.79	4.67	4.22	4.48
HeCB	4.51	3.83	4.32	4.41	4.31	4.28

取込期間中における試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度

取込期間中における試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度を Table 2 及び 3 にそれぞれ示した。

Table 2 取込期間中における試験魚中の被験物質濃度　　単位 ng/g

被験物質	3 日後	7 日後	14 日後	21 日後	28 日後
TrCB	2020 2660	2650 3520	4450 3900	3440 5050	2980 4040
TeCB	5730	8270	12400	9770	10300

	7150	10400	11200	13700	12200
PeCB	12000	23200	35600	32300	31900
	13500	26700	32200	43700	36200
HeCB	14400	33700	56900	58400	60800
	14000	37700	52100	74900	67800

Table 3　取込期間中における SPMD 中の被験物質濃度 単位 ng/g

被験物質	1 日後	3 日後	7 日後	14 日後	21 日後	28 日後
TrCB	33400	73200	140000	86900	194000	140000
	34100	87500	79400	118000	190000	179000
TeCB	44800	129000	294000	261000	536000	440000
	46500	163000	152000	277000	514000	527000
PeCB	46800	140000	402000	800000	965000	952000
	51100	227000	191000	461000	992000	975000
HeCB	38000	134000	338000	1060000	1030000	1130000
	74900	260000	156000	463000	966000	1070000

排泄期間中における試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度

排泄期間中における試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度を Table 4 及び 5 にそれぞれ示した。

Table 4　排泄期間中における試験魚中の被験物質濃度　単位 ng/g

被験物質	1 日後	2 日後	3 日後	5 日後	7 日後	14 日後	21 日後	28 日後
TrCB	1810	892	256	91.5	124	<52	<52	<52
	1740	745	167	74.1	98.4	<52	<52	<52
TeCB	7740	6580	3210	1580	2380	147	<140	<140
	7480	5760	2020	1410	1950	<140	<140	<140
PeCB	29700	27700	22000	15400	19400	4430	1840	478
	27500	26400	15700	13300	16600	5910	1240	191
HeCB	63900	65400	66900	57900	55200	25600	16900	9600
	59400	66000	55100	49800	46400	26600	16200	3170

Table 5 排泄期間中における SPMD 中の被験物質濃度単位 ng/g

被験物質	1 日後	2 日後	3 日後	5 日後	7 日後	14 日後	21 日後	28 日後
TrCB	90200 95600	61700 61200	40900 59200	52000 17600	17700 16000	2740 3210	<2000 <2000	<2000 <2000
TeCB	352000 312000	337000 301000	229000 336000	167000 185000	162000 170000	68400 112000	33200 8160	41900 72500
PeCB	767000 619000	815000 657000	561000 885000	463000 722000	573000 648000	392000 732000	478000 359000	344000 312000
HeCB	875000 694000	906000 740000	651000 980000	569000 872000	776000 819000	658000 1150000	1030000 1230000	763000 639000

各種生物濃縮係数の算出

得られた結果を用いて各種生物濃縮係数を算出し、Table6 にそれぞれ示した。

Table 6-1　各種生物濃縮係数（TrCB）　　（ ）内は平均値　　単位 L/kg

	BCF_{SS}	BCF_{SSL}	28 日後 BCF	BCF_{K}	BCF_{KL}
試験魚	960	720	760, 1040 （900）	920	870
SPMD	-[*5]	-[*5]	36000, 46000 （41000）	36000	1800

Table 6-2　各種生物濃縮係数（TeCB）　　（ ）内は平均値　　単位 L/kg

	BCF_{SS}	BCF_{SSL}	28 日後 BCF	BCF_{K}	BCF_{KL}
試験魚	2000	1500	1900, 2200 （2000）	2000	1900
SPMD	-[*5]	-[*5]	7900, 9500 （8700）	79000	3900

Table 6-3　各生物濃縮種係数（PeCB）　　（ ）内は平均値　　単位 L/kg

	BCF_{SS}	BCF_{SSL}	28 日後 BCF	BCF_{K}	BCF_{KL}
試験魚	-[*5]	-[*5]	7100, 8100 （7600）	8100	7700
SPMD	-[*5]	-[*5]	210000, 220000 （210000）	280000	14000

Table 6-4　各種生物濃縮係数（HeCB）　　（ ）内は平均値　　単位 L/kg

	BCF_{SS}	BCF_{SSL}	28 日後 BCF	BCF_K	BCF_{KL}
試験魚	-*5	-*5	14000, 16000 (15000)	20000	19000
SPMD	-*5	-*5	260000, 250000 (260000)	-*6	-*6

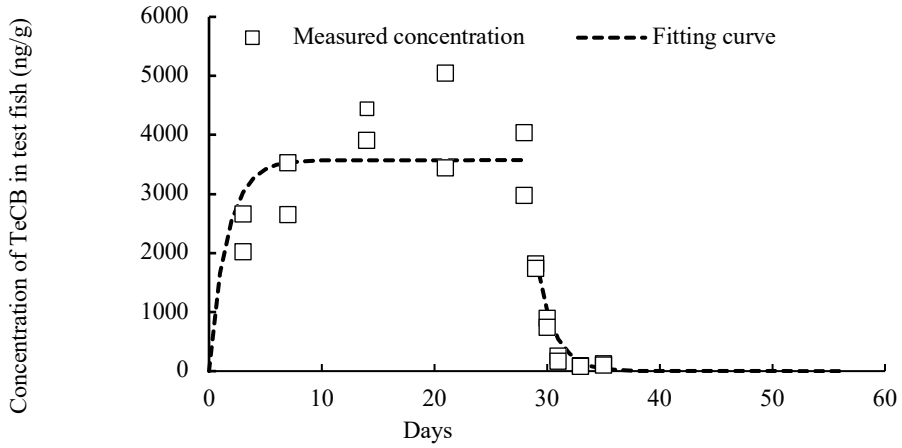
*5　7、14、21 及び 28 日後における試験魚及び SPMD 中の被験物質濃度（平均）はその 4 回の分析における被験物質濃度の平均値に対して変動が 20%を超えたため、BCF_{SS} 及び BCF_{SSL} は算出できなかった。

*6　試験期間中に半減期（$t_{1/2}$）及び排泄速度定数（k_2）が得られなかったため算出できなかった。

コイおよび SPMD を用いた CBs 吸収排泄試験結果と速度法によるフィッテイングの結果を以下に図示する。

TrCB の結果を Fig. 1 に示す。コイおよび SPMD 両方とも暴露 10 目以降濃度は飽和していた。また得られたデータから吸収、排泄速度定数を求めた結果、コイで 574,0.626、SPMD で 11100, 0.308 となった。

コイ



SPMD

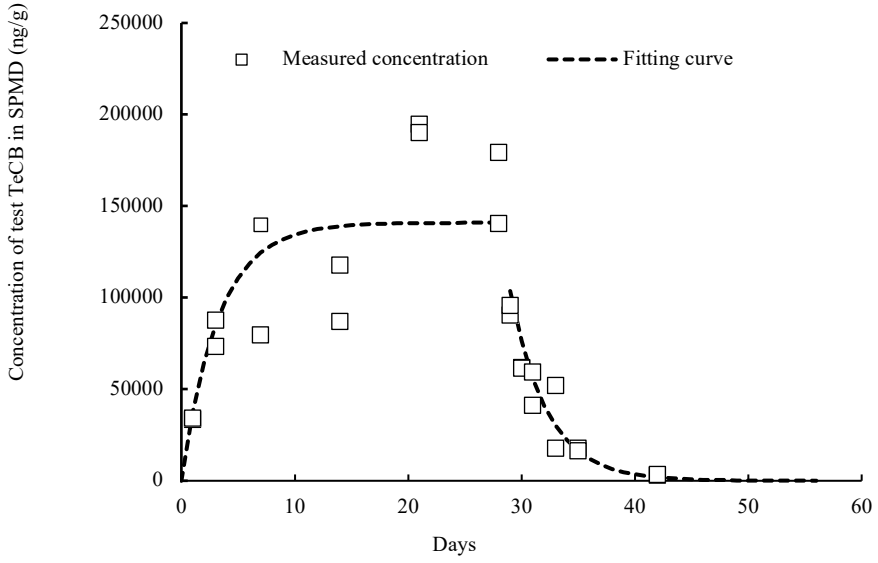
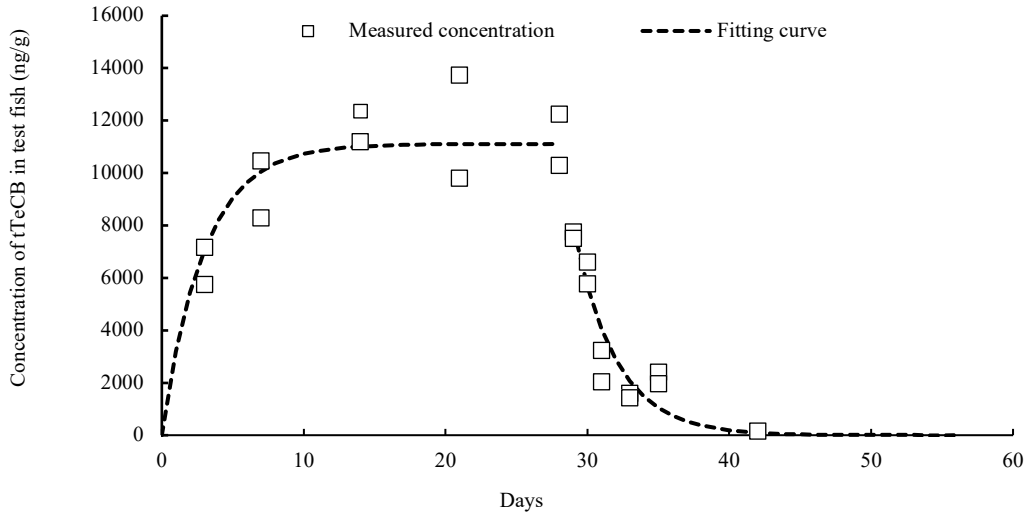


Fig. 1 コイおよび SPMD を用いた TrCB の吸収排泄試験結果と速度法によるフィッテイング

TeCB の結果を Fig. 2 に示す。コイで暴露 10 目以降飽和していたが、SPMD では暴露 28 日でも上昇傾向にあった。またフィッティングにより吸収、排泄速度定数を求めた結果、コイで 674, 0.337、SPMD で 9980, 0.127 であった。

コイ



SPMD

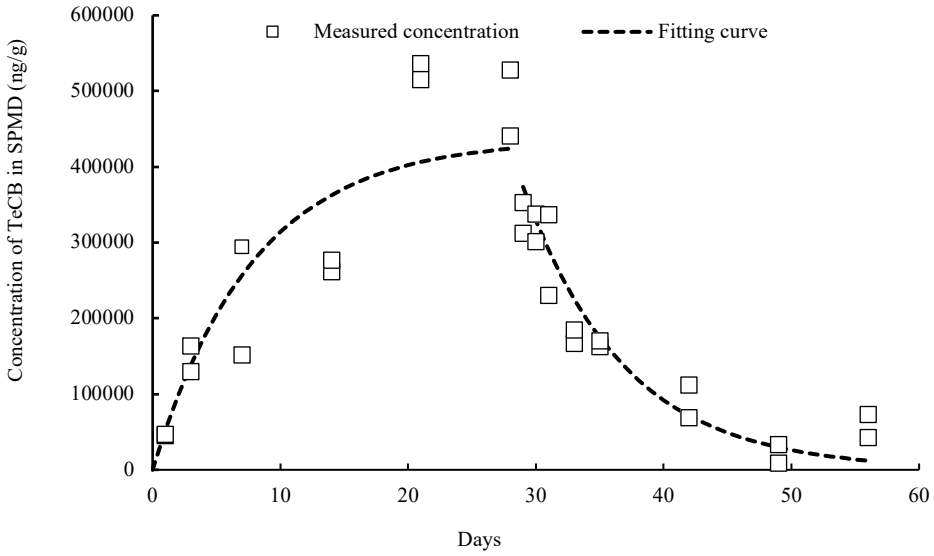
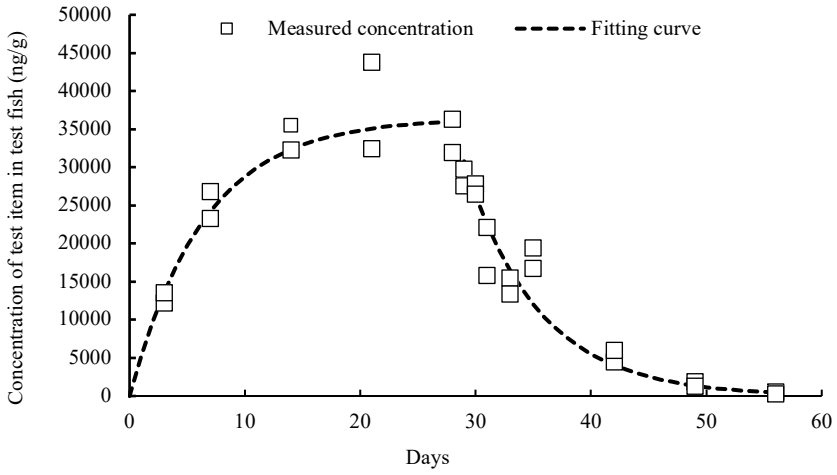


Fig. 2 コイおよび SPMD を用いた TeCB の吸収排泄試験結果と速度法によるフィッティング

PeCB の結果を Fig. 3 に示す。コイで暴露 20 目以降飽和していたが、SPMD では暴露 28 日でも上昇傾向にあった。またフィッティングにより吸収、排泄速度定数を求めた結果、コイで 1270, 0.156、SPMD で 12200, 0.0435 であった。

コイ



SPMD

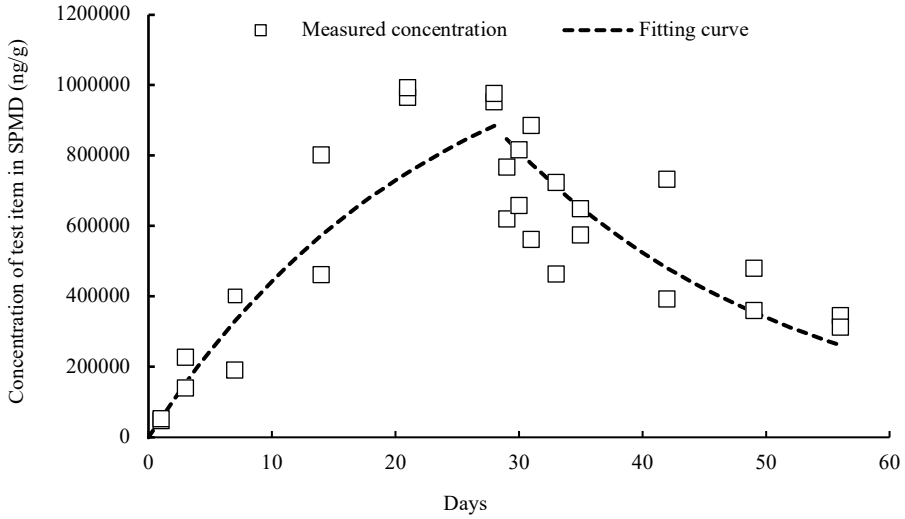
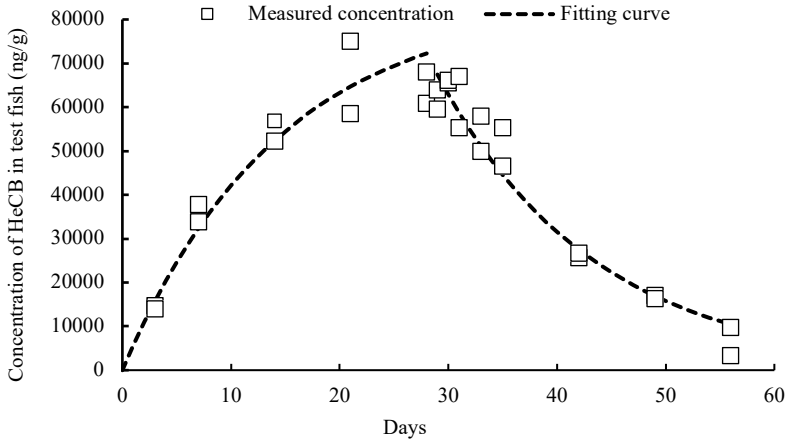


Fig. 3 コイおよび SPMD を用いた PeCB の吸収排泄試験結果と速度法によるフィッティング

HeCB の結果を Fig. 4 に示す。コイで暴露 28 目でも上昇傾向にあった。フィッティングにより吸収、排泄速度定数を求めた結果、コイで 1360, 0.0691 あった。SPMD では排泄速度は計算できなかった。

コイ



SPMD

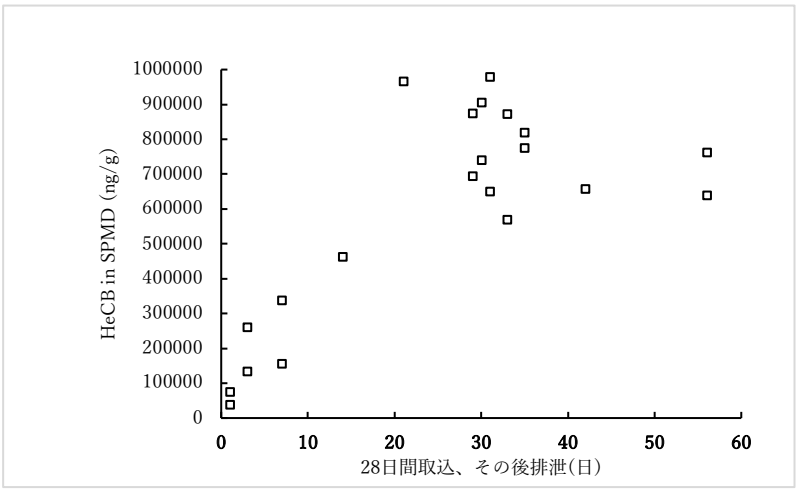


Fig. 4 コイおよび SPMD を用いた HeCB の吸収排泄試験結果と速度法によるフィッティング

速度法で得られた吸収速度定数(*ku*)および排泄速度定数(*ke*)を Table 7 に示す。LogPoww の増加とともに *ku* は増加し、*ke* は減少する傾向にあった。

Table 7 速度法からもとめた吸収速度定数(*ku*)および排泄速度定数(*ke*)

	TrCB	TeCB	PeCB	HeCB
ku(carp)	574	674	1270	1360
ke (carp)	0.626	0.337	0.156	0.0691
ku(SPMD)	11100	9980	12200	*7
ke (SPMD)	0.308	0.127	0.0435	*7

*7　　排泄速度定数（k_2）が得られたかったため算出できなかった。

さらに得られた排泄速度から、排泄半減期をもとめた。魚より SPMD が長く、また両者とも化学物質の LogPoww が増加すると排泄半減期も長くなることがわかった。(Table 8)

排泄半減期（$t_{1/2}$）

排泄速度定数（k_2）を用いて、$t_{1/2}$ を算出し、Table 8 にそれぞれ示した（Fig. 1 及び 2 参照）。

Table 8　排泄半減期　　単位 日

	TrCB	TeCB	PeCB	HeCB
試験魚	1.1	2.1	4.4	10.0
SPMD	2.3	5.5	15.9	-*7

*7　　排泄速度定数（k_2）が得られたかったため算出できなかった。

さらに、魚および SPMD から得られた脂質含量で補正した BCF で比較を行った。HeCB は SPMD では排泄速度定数 *k2* が得られなかったが、BCF を速度法から得られた TrCB、TeCB および PeCB の脂質含量で補正した値を求めた。さらに、魚試験から得られた脂質補正 BCF(BCFKL_F)と SPMD 試験から得られた脂質補正 BCF(BCFK_S)を Table 9 に示す。

Table 9　脂質含量で補正した BCF

	TrCB	TeCB	PeCB
logPow	4.19	4.64	5.17
BCFKL_F	871	1901	7727
BCFKL_S	1807	3928	14018

さらに、魚から得られた脂質補正 BCF(BCFKL_F)と SPMD 試験から得られた脂質補正 BCF(BCFK_S)の対数値(log_{10})の関係をプロットした（ Fig. 4）。その結果、両者は非常に良い相関性を持つことが明らかになった。この結果から、被検物質の LogPow が 4 から 5 の間であれば、SPMD が魚の試験に置き換えて BCF を予測できる可能性が高いことが示された。

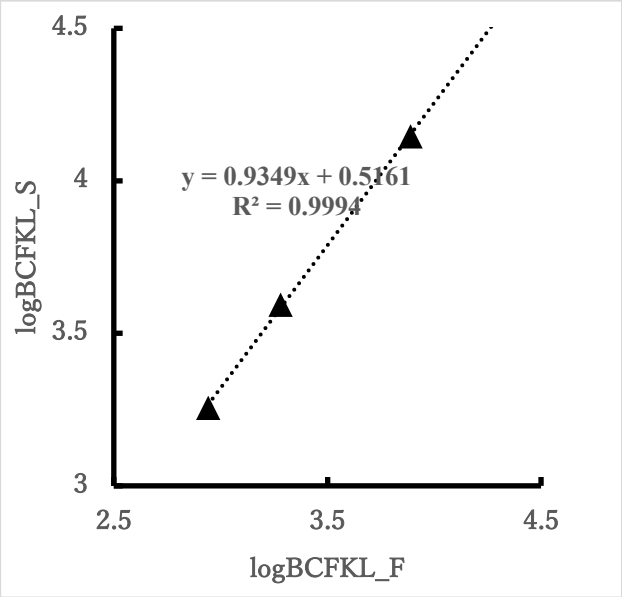


Fig. 4 魚から得られた脂質補正 BCF(BCFKL_F)と SPMD 試験から得られた脂質補正 BCF(BCFK_S)の対数値(log_{10})の関係

4.2 PE 蓄積・排泄試験

4.2.1 SPMD の PE 膜におけるアントラセン(ANT)の蓄積

試薬

ANT 原液	3000 µg/mL ジメチルホルムアミド（DMF） 30.0 mg の ANT を量り取り、10 mL DMF に溶解した
暴露水	ANT 原液 1 mL を 3 L 脱塩素水に溶解した
SPMD	12 cm の SPMD に Heat sealer で 1.0×1.2 cm の格子状に 切れ目を入れたもの

暴露条件

暴露濃度	アントラセン 1 mg/L
暴露水槽	3 L ビーカー
暴露期間	8 日
換水	1 日おき換水
サンプリング	暴露開始 2, 4, 8 日後
水	10 mL

水試料の処理

1 mL の水に対して 5 mL のアセトニトリル（ACN）と Q-sep 1 g を加えて攪拌後、3000 rpm で 10 分間遠心した。その上清を取り、Q-sep dSPE 抽出塩のチューブに移し、よく攪拌した後、3000 rpm で 10 分間遠心し上清をろ過してバイアルに移す。

SPMD

SPMD の表面を水、ACN で洗った後、ハサミで切断し切片 1 個の重さを量った。その後対角線上で切断、SPMD 中のトリオレインを 5 mL の ACN 中で洗い落としトリオレイン相(triolein)とした。また PE 膜(menbrane)を ACN 5 mL 中で抽出した。得られた ACN について Q-sep 抽出塩 0.5 g で Q-sep 処理を行った。

HPLC 分析条件

機器 高速液体クロマトグラフ

ポンプ	LC-10AD
紫外可視分光検出器	RF-10A
カラムオーブン	CTO-10AC
オートインジェクター	SIL-10AD
デガッサー	DGU-14A
カラム	Inertsil® ODS-P

分析カラム

(250 mm×4.6 mm, 粒子径 5 μm, GL science)
カラム温度　40°C
溶解液　　アセトニトリル/超純水　（4/1 v/v）
流量 0.7 mL/min
励起波長　360 nm
測定波長　430 nm
注入量　　10 μ

結果と考察

トリオレインと PE 膜 における ANT 量の比較

SPMD のトリオレインと PE 膜 における ANT 量の経時変化を Fig. 5 に示す。

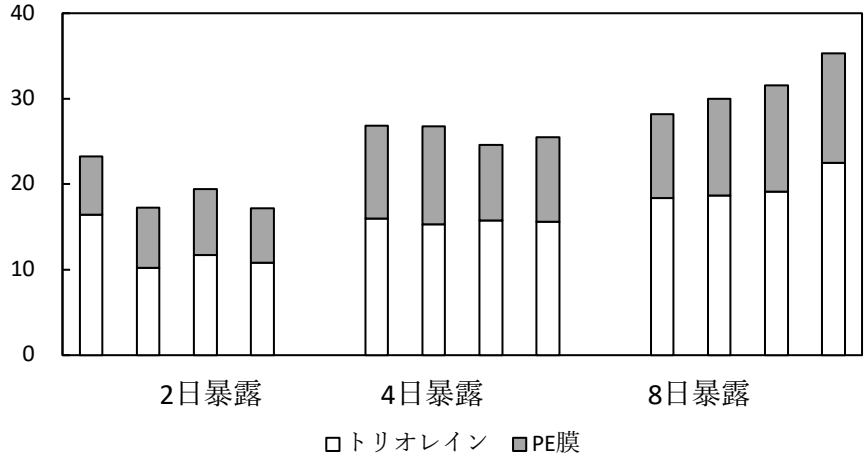


Fig. 5 SPMD のトリオレインと PE 膜 における ANT 量(μg)の経時変化

暴露 2 日目と比較すると 4、8 日目ではトリオレインと PE 膜では若干増加する傾向にあったがほぼ平衡状態にと考えられる。また 4 回の繰り返しでは殆ど差が無く再現性が高いと思われる。SPMD の PE 膜には全体の 29-41%が蓄積していた。トリオレインと PE 膜では吸収排泄速度が異なる可能性が高いので、吸収排泄試験を行い、それぞれの吸収排泄速度を求めた。

4.2.1 SPMD の PE 膜およびトリオレインにおける ANT の取込・排泄試験

試薬

AN 原液　3000 μg/mL DMF
30.0 mg の ANT を量り取り、10 mL DMF に溶解したもの
暴露水　ANT 原液 500 μL を 3 L 脱塩素水に溶解したもの

暴露条件

SPMD　12 cm の SPMD に Heat sealer で 1.0×1.2 cm の格子状に
切れ目を入れたもの
水槽　3 L ビーカー
期間　取込 8 日、排泄 14 日
暴露濃度　ANT 0.5 mg/L
換水　毎日換水
サンプリング　暴露開始 1, 2, 4, 6, 8 日後
排泄開始 1, 2, 4, 7, 10, 14 日後

サンプル処理方法

水試料

1 mL の水に対して 5mL の ACN と Q-sep 1 g を加えて攪拌後、3000 rpm で 10 分間遠心分離する。その上清を取り、Q-sep dSPE 抽出塩のチューブに移す。さらに 3000 rpm で 10 分間遠心分離して上清をろ過してバイアルに移した。

PE 膜

SPMD の表面を水、ACN で洗った後、ハサミで切断し切片 1 個の重さを量った。その後対角線上で切断、SPMD 中のトリオレインを 5 mL の ACN 中で洗い落としトリオレイン相とした。また SPMD 膜を ACN 5 mL 中で抽出した。得られた ACN について Q-sep 抽出塩 0.5 g で Q-sep 処理を行った。

HPLC

分析条件は前節と同じである。

結果・考察

SPMD 中トレイオレインと PE 膜における ANT の濃度変化

ANT を暴露排泄させた SPMD のトレイオレインと PE 膜における ANT 濃度 Fig. 6 以下に示す。暴露時間と共にトリオレイン中および PE 膜中の ANT 濃度は上昇し、また排泄させると減少した。

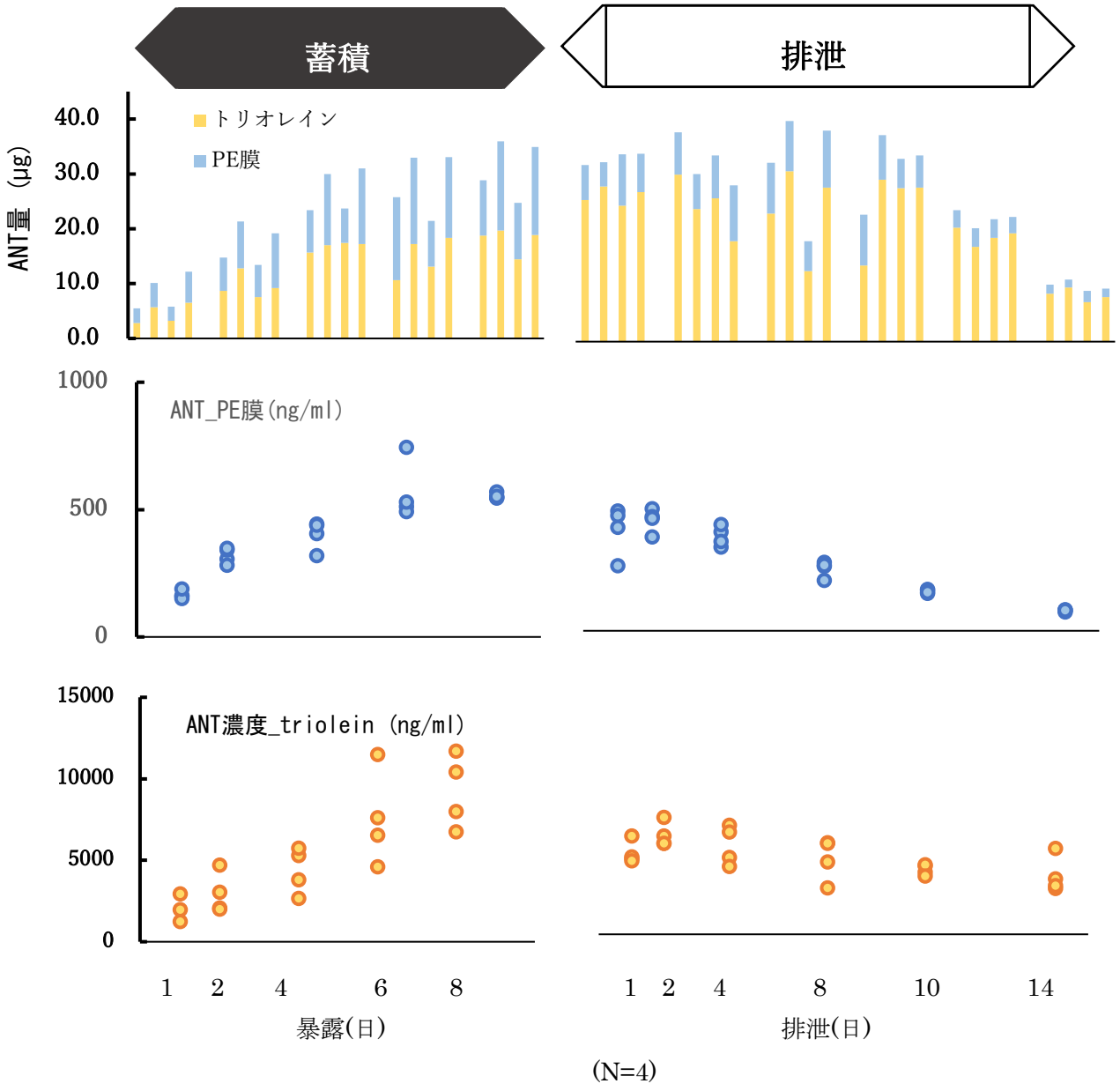


Fig. 6 ANT を暴露排泄させた SPMD のトレイオレインと PE 膜における ANT 濃度

暴露試験の結果から、グラフフィッテイング法によりトリオレイン、PE 膜および SPMD 全体での *ke* を求めた。さらに水中 ANT 濃度（設定）からそれぞれの BCF を求め、関係式より *ku* を算出した。その結果を Table 10 に示す。とトリオレインでは BCF が高く *ke* は低く、*ku* が高かった。これはトリオレインの疎水性が極めて高いことが原因だと思われる。また PE 膜でも ANT の蓄積と排泄が起こっていた。よって ANT が両相でどの様に挙動しているか解析が必要となる。

Table 10 ANT を暴露した SPMD における ANT の BCF および排泄(*ke*)、吸収(*ku*)係数

	濃度平均 (ng/mL)	BCF (設定濃度で計算)	*ke*	*ku*
トリオレイン	9240	18500	0.037	678
PE 膜	554	1110	0.129	143
全体	1230	2460	0.120	295

4.3 SPMD の生物濃縮試験結果の検討

得られた ANT の *ke*, *ku*,値を基に、Stella (isee system)を用いて 1-compartment model を作製した。その概念と結果を Fig. 7 に示す。実際のデータと近い結果が得られた。

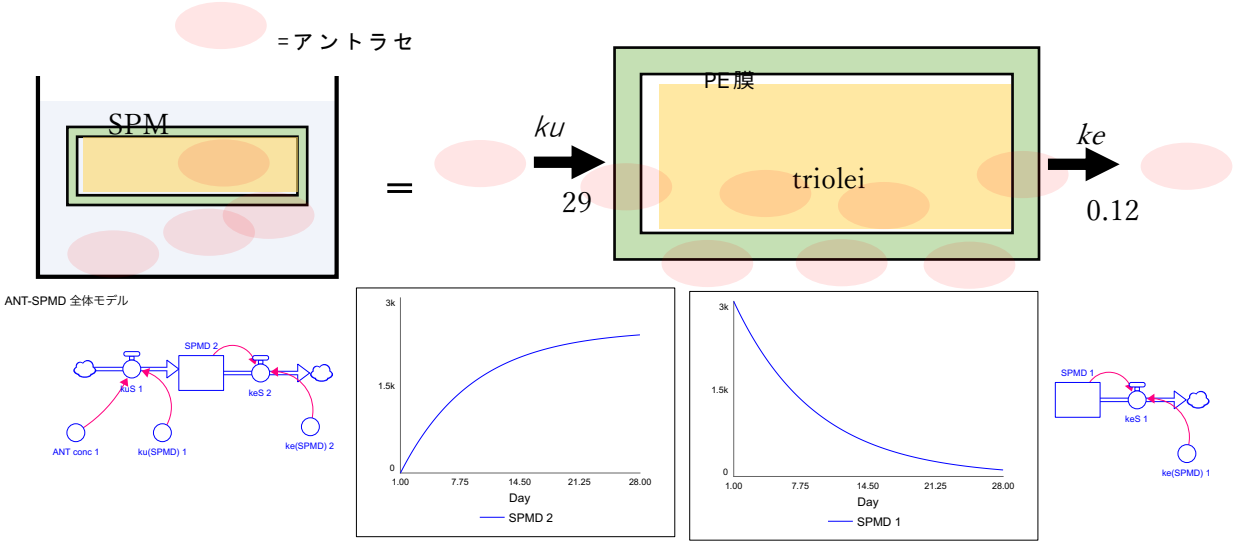


Fig. 7 ANT を暴露排泄させた SPMD における 1-compartment model とそのシミュレーション結果

SPMD 内のトリオレインと PE 膜における ANT の動態モデルを 2 種類検討した。まず ANT は PE 膜を介して ANT へ蓄積排泄するモデル（トリオレイン内包モデル）を考えた、そのシミュレーション結果を Fig. 8 に示す。シミュレーションの結果、トリオレイン中の ANT 濃度は暴露とともに増加するが、排泄は殆どされないことが予測された。この結果は実際の SPMD の濃度変化の傾向と大きく異なっていた（Fig. 6）。よって本モデルは妥当でないと結論された。

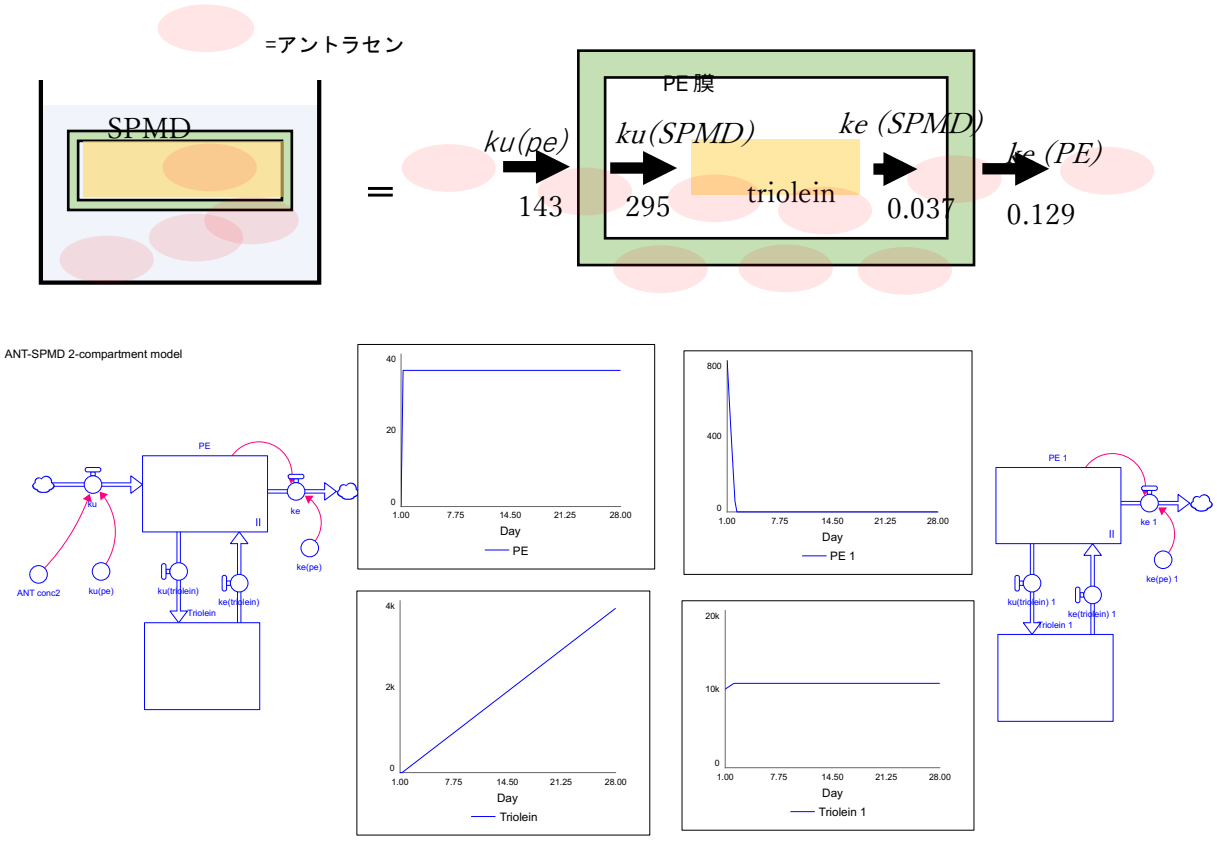


Fig. 8 ANT を暴露排泄させた SPMD の ANT 蓄積排泄モデル（トリオレイン内包モデル）とそのシミュレーション結果

次に ANT は PE 膜の細穴(孔径 10Å)を介して ANT へ蓄積排泄するモデル（PE 膜通過モデル）を仮定した。そのシミュレーション結果を Fig. 9 に示す。シミュレーションの結果、トリオレイン中の ANT 濃度は暴露とともに増加するが、清浄水に移すと排泄が起こると予見された。この結果は実際の SPMD の濃度変化の傾向と一致していた（Fig. 6）。よって本モデルは妥当であり、ANT の一部は PE 膜に直接蓄積排泄するが、主に SPMD PE 膜の細穴（孔径 10Å)を介してトリオレインに蓄積排泄するという経路が予想された。今後、性質の異なる化学物質を評価する場合、考慮する必要がある。

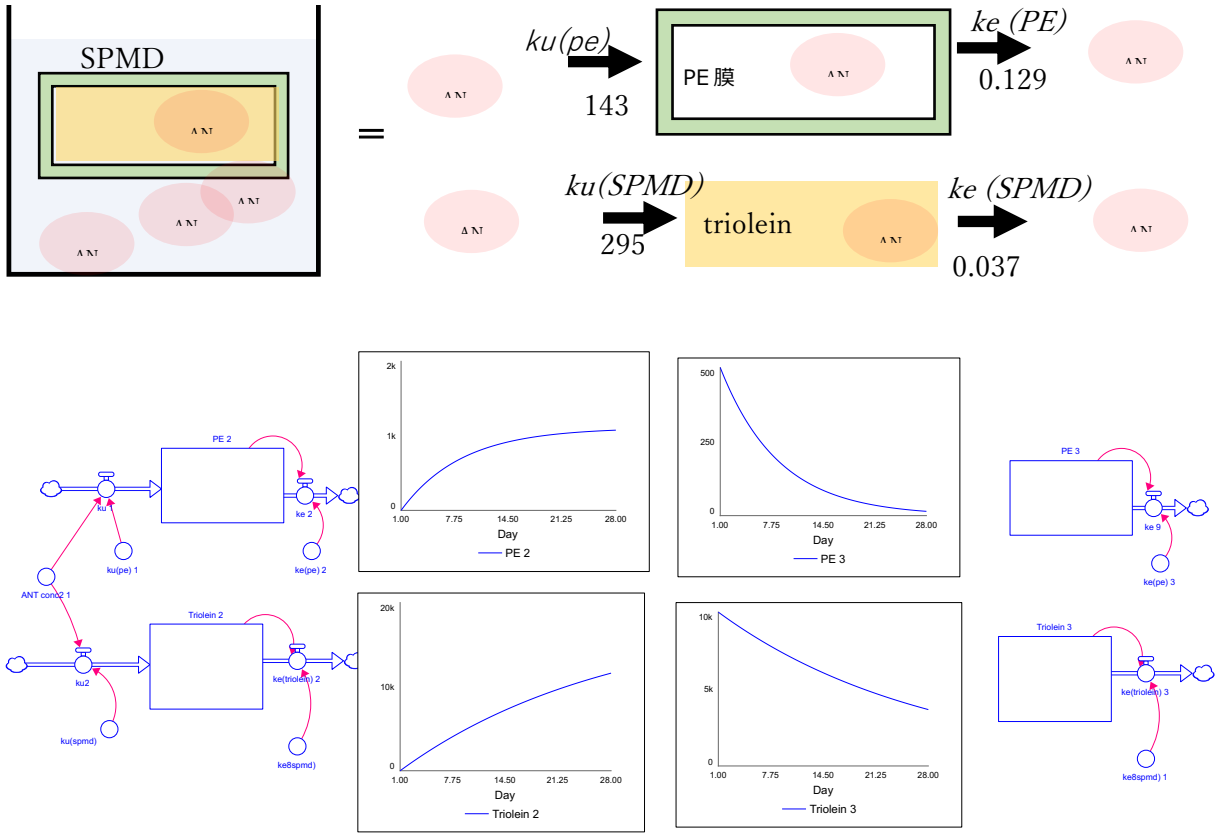


Fig. 9 ANT を暴露排泄させた SPMD の ANT 蓄積排泄モデル（PE 膜通過モデル）とそのシミュレーション結果

5．調査結果の公表：論文投稿等、本調査結果を公表した案件を記載してください。

学会発表： SPMD における 4 主種クロルベンゼンの蓄積機構．日本環境毒性学会　2021 年会発表予定

論文発表：”Accumulation of chlorinated benzenes to carp and SPMD and its avaiablity to substite to fish”（仮題）Chemosphere 投稿予定

6. 海外出張の内容：

海外出張はおこなっていない。

7. 今後の課題

本研究では、log Pow 3.5 から 6 を中心に基準物質として選んだ 4 物質 1,3,5-トリクロロベンゼン（略称 TrCB） 1,2,4,5-テトラクロロベンゼン（略称 TeCB） ペンタクロロベンゼン（略称 PeCB） ヘキサクロロベンゼン（略称 HeCB）を用い、SPMD およびコイと同様の条件で暴露して濃縮・排泄試験を実施した。得られた魚から得られた脂質補正 BCF と SPMD 試験から得られた脂質補正 BCF の対数値(log_{10})の関係を比較検討した結果、両者は非常に良い相関性を持つことが明らかになった。このことは被検物質の LogPow が 4 から 5 の間であれば、SPMD が魚の試験に置き換えて BCF を予測できる可能性が高いことを示している。

今後、特性の異なる logPow3−5 の間にある物質を使ってコイおよび SPMD 暴露試験を行い、本関係をさらに検証する必要がある。また既に魚で logPow が既知の化学物質について SPMD で蓄積試験を行い、検証を加える必要がある。

さらに、今回用いた SPMD は logPow3−5 の間では有効であるが、より logPow の高い物質に対する生物を使わない代替え試験法が必要とされている。現在、難水溶性物質については餌暴露試験が実施されているが、代替え法の開発が必要である。人工消化液―SPMD 暴露法は、エサ暴露試験代替法としての利用が考えられる。

ただし、SPMD ではトリオレインだけでなく PE 膜にもアントラセンが蓄積していることが明らかになった。よって、SPMD を活用するには PE 膜における化学物質の蓄積も注意する必要がある。

8. 参考文献

Allan, I.J., Booij, K., Paschke, A., Vrana, B., Mills, G.A., Greenwood, R., 2010. Short-term exposure testing of six different passive samplers for the monitoring of hydrophobic contaminants in water. J. Environ. Monit. 12, 696–703.

Amdany, R., Chimuka, L., Cukrowska, E., Kukučka, P., Kohoutek, J., Tölgyessy, P., Vrana, B., 2014. Assessment of bioavailable fraction of POPS in surface water bodies in Johannesburg City, South Africa, using passive samplers: an initial assessment. Environ. Monit. Assess. 186, 5639–53.

Balmer, M.E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.A., Muller, M.D., Buser, H.R., 2004. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. Environ. Sci. Technol. 38, 390–395.

Berge, J.A., Hylland, K., Schlabach, M., Ruus, A., 2011. Accumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans in Atlantic cod (Gadus morhua)–cage experiments in a Norwegian Fjord. J. Toxicol. Environ. Health A 74, 455–65.

Chęć, E., Podgórska, B., Węgrzyn, G., 2007. Comparison of the use of mussels and semipermeable membrane devices for monitoring and assessment of accumulation of mutagenic pollutants in marine environment in combination with a novel microbiological mutagenicity assay. Environ. Monit. Assess. 140, 83–90.

Esteve-Turrillas, F.A., Pastor, A., Yusà, V., de la Guardia, M., 2007. Using semi-permeable membrane devices as passive samplers. Trends Analyt. Chem. 26, 703–712.

Fiedler, S., Pfister, G., Schramm, K.-W., 2009. Partitioning of fluorotelomer alcohols (FTOH) to semipermeable membrane devices (SPMD). Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 17, 420–8.

Fontenelle, F.R., Taniguchi, S., da Silva, J., Lourenço, R.A., 2019. Environmental quality survey of an industrialized estuary and an Atlantic Forest Biosphere Reserve through a comparative appraisal of organic pollutants. Environ. Pollut. 248, 339–348.

Gourlay, C., Miège, C., Noir, A., Ravelet, C., Garric, J., Mouchel, J.-M., 2005. How accurately do semi-permeable membrane devices measure the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to Daphnia magna? Chemosphere 61, 1734–1739.

Harman, C., Bøyum, O., Thomas, K.V., Grung, M., 2009a. Small but different effect of fouling on the uptake rates of semipermeable membrane devices and polar organic chemical integrative samplers. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2324–32.

Harman, C., Bøyum, O., Tollefsen, K.E., Thomas, K., Grung, M., 2008. Uptake of some selected aquatic pollutants in semipermeable membrane devices (SPMDs) and the polar organic chemical integrative sampler (POCIS). J. Environ. Monit. 10, 239–247.

Harman, C., Brooks, S., Sundt, R.C., Meier, S., Grung, M., 2011. Field comparison of passive sampling and biological approaches for measuring exposure to PAH and alkylphenols from offshore produced water discharges. Mar. Pollut. Bull. 63, 141–8.

Harman, C., Holth, T.F., Hylland, K., Thomas, K., Grung, M., 2009b. Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in semipermeable membrane devices and PAH bile metabolite levels in Atlantic cod (Gadus morhua). J. Toxicol. Environ. Health A 72, 234–43.

Harman, C., Thomas, K.V., Tollefsen, K.E., Meier, S., Bøyum, O., Grung, M., 2009c. Monitoring the freely dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and alkylphenols (AP) around a Norwegian oil platform by holistic passive sampling. Mar. Pollut. Bull. 58, 1671–1679.

Harman, C., Tollefsen, K.-E., Bøyum, O., Thomas, K., Grung, M., 2008. Uptake rates of alkylphenols, PAHs and carbazoles in semipermeable membrane devices (SPMDs) and polar organic chemical integrative samplers (POCIS). Chemosphere 72, 1510–6.

Jacquet, R., Miège, C., Smedes, F., Tixier, C., Tronczynski, J., Togola, A., Berho, C., Valor, I., Llorca, J., Barillon, B., Marchand, P., Coquery, M., 2013. Comparison of five integrative samplers in laboratory for the monitoring of indicator and dioxin-like polychlorinated biphenyls in water. Chemosphere 98, 18–27.

Ke, R., Li, J., Qiao, M., Xu, Y., Wang, Z., 2007a. Using Semipermeable Membrane Devices, Bioassays, and Chemical Analysis for Evaluation of Bioavailable Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53, 313–320.

Ke, R., Xu, Y., Huang, S., Wang, Z., Huckins, J.N., 2007b. COMPARISON OF THE UPTAKE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND ORGANOCHLORINE PESTICIDES BY SEMIPERMEABLE MEMBRANE DEVICES AND CAGED FISH (CARASSIUS CARASSIUS) IN TAIHU LAKE, CHINA. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1258.

Levy, W., Henkelmann, B., Pfister, G., Kirchner, M., Jakobi, G., Niklaus, A., Kotalik, J., Bernhöft, S., Fischer, N., Schramm, K.-W., 2007. Monitoring of PCDD/Fs in a mountain forest by means of active and passive sampling. Environ. Res. 105, 300–306.

McLeod, P.B., Luoma, S.N., Luthy, R.G., 2008. Biodynamic modeling of PCB uptake by Macoma balthica and Corbicula fluminea from sediment amended with activated carbon. Environ. Sci. Technol. 42, 484–90.

Pickford, D.B., Jones, A., Velez-Pelez, A., Orton, F., Iguchi, T., Mitsui, N., Tooi, O., 2015. Screening breeding sites of the common toad (Bufo bufo) in England and Wales for evidence of endocrine disrupting activity. Ecotoxicol. Environ. Saf. 117, 7–19.

Richardson, B.J., Tse, E.S.-C., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Uptake and depuration of PAHs and chlorinated pesticides by semi-permeable membrane devices (SPMDs) and green-lipped mussels (Perna viridis). Mar. Pollut. Bull., 4th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology 51, 975–993.

Roach, A.C., Muller, R., Komarova, T., Symons, R., Stevenson, G.J., Mueller, J.F., 2009. Using SPMDs to monitor water column concentrations of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in Port Jackson (Sydney Harbour), Australia. Chemosphere 75, 1243–51.

Roig, N., Nadal, M., Sierra, J., Ginebreda, A., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2011. Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. Environ. Int. 37, 671–7.

Shen, H., Henkelmann, B., Levy, W., Zsolnay, A., Weiss, P., Jakobi, G., Kirchner, M., Moche, W., Braun, K., Schramm, K.-W., 2009. Altitudinal and chiral signature of persistent organochlorine pesticides in air, soil, and spruce needles (Picea abies) of the Alps. Environ. Sci. Technol. 43, 2450–5.

Springman, K.R., Short, J.W., Lindeberg, M.R., Maselko, J.M., Khan, C., Hodson, P.V., Rice, S.D., 2008. Semipermeable membrane devices link site-specific contaminants to effects: Part 1 - Induction of CYP1A in rainbow trout from contaminants in Prince William Sound, Alaska. Mar. Environ. Res. 66, 477–86.

Sun, H., Wang, C., Huo, C., Zhou, Z., 2008. SEMIPERMEABLE MEMBRANE DEVICE–ASSISTED DESORPTION OF PYRENE FROM SOILS AND ITS RELATIONSHIP TO BIOAVAILABILITY. Environ. Toxicol. Chem. 27, 103.

Tomaszewski, J.E., McLeod, P.B., Luthy, R.G., 2008. Measuring and modeling reduction of DDT availability to the water column and mussels following activated carbon amendment of contaminated sediment. Water Res. 42, 4348–4356.

Van Scoy, A.R., Voorhees, J., Anderson, B.S., Philips, B.M., Tjeerdema, R.S., 2013. Use of semipermeable membrane devices (SPMDs) to characterize dissolved hydrocarbon fractions of both dispersed and undispersed oil. Environ. Sci. Process. Impacts 15, 2016–22.

Wang, J., Bernhöft, S., Pfister, G., Schramm, K.-W., 2014. Water exposure assessment of aryl hydrocarbon receptor agonists in Three Gorges Reservoir, China using SPMD-based virtual organisms. Sci. Total Environ. 496, 26–34.

Wang, J., Bi, Y., Henkelmann, B., Pfister, G., Zhang, L., Schramm, K.-W., 2015a. PAHs and PCBs accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China. Sci. Total Environ. 542, 899–907.

Wang, J., Bi, Y., Pfister, G., Henkelmann, B., Zhu, K., Schramm, K.-W., 2013. Erratum to “Determination of PAH, PCB, and OCP in water from the Three Gorges Reservoir accumulated by semipermeable membrane devices (SPMD)” [Chemosphere 75 (2009) 1119–1127]. Chemosphere 90, 2483–2484.

Wang, J., Bi, Y., Pfister, G., Henkelmann, B., Zhu, K., Schramm, K.-W., 2009. Determination of PAH, PCB, and OCP in water from the Three Gorges Reservoir accumulated by semipermeable membrane devices (SPMD). Chemosphere 75, 1119–1127.

Wang, J., Liang, W., Henkelmann, B., Pfister, G., Schramm, K.-W., 2015b. Organochlorine pesticides accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China. Environ. Pollut. 202, 160–167.

Wu, X., Zhu, L., 2016. Evaluating bioavailability of organic pollutants in soils by sequential ultrasonic extraction procedure. Chemosphere 156, 21–29.

Yusà, V., Pastor, A., Guardia, M. de la, 2005. Microwave-assisted extraction of OCPs, PCBs and PAHs concentrated by semi-permeable membrane devices (SPMDs). Anal. Chim. Acta 540, 355–366.

Zhao, D., Zhang, P., Ge, L., Zheng, G.J., Wang, X., Liu, W., Yao, Z., 2018. The legacy of

organochlorinated pesticides (OCPs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in Chinese coastal seawater monitored by semi-permeable membrane devices (SPMDs). Mar. Pollut. Bull. 137, 222–230.

Zhao, Z., Zhang, L., Wu, J., Fan, C., 2013. Application of Semipermeable Membrane Devices (SPMDs) and Benthic Mussels to Evaluate the Bioavailability of Sediment-associated DDTs. Soil and Sediment Contamination: An International Journal 22, 351–364.