

令和2年度 化学物質安全対策

化学物質の蓄積・濃縮性に関する生物種間差の検証

調査報告書

令和3年3月

国立大学法人 鹿児島大学 水産学部

## 目次

1. 概要と目的 .....	1
1.1 研究目的 .....	1
1.2 研究概要 .....	1
1.2.1 コイに対する化学物質蓄積実験～①フェナントレン .....	1
1.2.2 コイに対する化学物質蓄積実験～②クリセン .....	1
1.2.3 コイに対する化学物質蓄積試験～③チオベンカルブ .....	1
1.2.4 ヒメダカへの簡易暴露試験 .....	2
1.2.5 過去に得られた他魚種の BCF データとの比較 .....	2
1.2.6 人材育成 .....	2
1.3 実施体制 .....	2
2. 本研究のバックグラウンド～化審法における化学物質の生物濃縮とその問題点 .....	3
3. 方法 .....	5
3.1 対象物質 .....	5
3.2 試験魚 .....	5
3.3 暴露水槽 .....	6
3.4 試薬 .....	8
3.5 蓄積性試験の水中濃度設定のための毒性試験 .....	8
3.5.1 フェナントレン .....	8
3.5.2 クリセン .....	9
3.5.3 チオベンカルブ .....	9
3.6 蓄積試験 .....	10
3.7 水中濃度分析 .....	10
3.7.1 フェナントレンおよびクリセン .....	10
3.7.2 チオベンカルブ .....	12
3.8 魚体中濃度分析 .....	14
3.8.1 フェナントレンおよびクリセン .....	14
3.8.2 チオベンカルブ .....	15
3.9 生物濃縮係数の算出 .....	16
4. 結果と考察 .....	17
4.1 水中濃度 .....	17
4.2 コイとヒメダカの蓄積濃度と化学物質生物濃縮性、魚種間差 .....	18
4.2.1 フェナントレン .....	18
4.2.2 クリセン .....	19
4.2.3 チオベンカルブ .....	20
4.3 コイの BCF は多くの魚種を代表するものか～現在の蓄積性研究の問題点 .....	22
4.4 人材育成 .....	23

5. 魚類の化学物質蓄積に関する今後の課題と実施すべきテーマ .....	25
6. 参考文献 .....	27

# 1. 概要と目的

## 1.1 研究目的

化学物質の生物濃縮や蓄積性は、物質によっては大きな生物種間差があることが分かっている。日本の化審法では、化学物質管理を行う上でその蓄積性を、コイ (*Cyprinus carpio*) に対象物質を暴露したときに得られる BCF をもとに判別している。しかし、化学物質の蓄積性において、コイが水生生物の中でも特異的に化学物質を蓄積するのか、あるいは、日本の水生生物と比べても平均的な蓄積性を持っておりその BCF が全てを代表しているのか、といった疑問に答えられるような情報はあまりない。今後、生物多様性保全の観点から、化審法が発展して多くの生物を網羅することが社会から要求されたときに、これまでの化審法で積み上げた蓄積性のデータを活用し続けるためにも、コイとその他の水生生物との蓄積性の種間差レベル、その BCF の範囲などをある程度知っておく必要がある。

そこで、本研究では、これまで申請者が過去に行った蓄積実験において、ある種の生物に特異的な蓄積性が認められた 3 種類の既存化学物質を対象物質として、化審法の対象魚であるコイによる蓄積試験を行った。さらに、多くの化学物質影響試験などに用いられているヒメダカも対象として、簡易的な暴露試験により同じ対象物質を暴露し、蓄積データを得て、コイとの種間差を調べた。さらに文献値なども併せてコイやヒメダカと他魚種間の BCF の魚種間差を調べることを目的とした。

## 1.2 研究概要

### 1.2.1 コイに対する化学物質蓄積実験～①フェナントレン

本研究の対象物質の 1 つとしてフェナントレンを選んだ。フェナントレンは多環芳香族炭化水素類の 1 種であり、石油構成成分の 1 つである。また、排気ガス中などにも含まれることが知られている。水環境中や大気中で普遍的に存在しており、過去には魚類に対する影響研究が数多く実施されている。野外調査であるが、我々が実施したフィリピンの石油流出時での調査 (Uno et al., 2010, 2017) では、他の PAH 類と比べると魚体中で最も蓄積されている傾向が見られた。

### 1.2.2 コイに対する化学物質蓄積実験～②クリセン

本研究の 2 つ目の対象物質としてクリセンを選んだ。クリセンも PAH の一種であり、石油中、排気ガス中などに主として存在する。クリセンは上記フィリピンの調査で得られた数種の魚体中からいずれもほとんど検出されなかった。しかし、同調査で得られた貝類体内からは PAH の中で最も高濃度で蓄積されていた。少なくとも魚類と貝類間では BCF の大きな生物種間差がある可能性が高い。

### 1.2.3 コイに対する化学物質蓄積試験～③チオベンカルブ

本研究の 3 つ目の対象物質としてチオベンカルブを選んだ。チオベンカルブはチオベンカーブ、あるいはベンチオカーブとも呼ばれる除草剤である。我々の過去の研究では淡水性

の二枚貝のマシジミに比較的高濃縮され、そのとき得られた BCF は 2850 であった (Uno et al., 1997)。しかし、同時に暴露した巻貝のマルタニシの BCF は 127 とマシジミとはかなり異なっていた。そのため、この除草剤は水生生物の中でも BCF の種間差が大きい可能性がある。

#### 1.2.4 ヒメダカへの簡易暴露試験

上記対象物質①～③を対象として、コイほど厳格な試験ではないが簡易暴露試験を実施して、その BCF を算出し、コイの BCF と比較し魚種間差を検証した。

#### 1.2.5 過去に得られた他魚種の BCF データとの比較

対象物質①～③ について、過去に報告された他魚種のデータを調べて、これらの値と今回得られた BCF の魚種間差を検証し、コイの化学物質蓄積性の位置付けを検証した。

#### 1.2.6 人材育成

近年、化学物質影響評価を行う産業、研究の分野では人材不足や若手の参入が少ないために、この分野の衰退が懸念されている。そのため、この分野での人材育成は急務とされている。本研究では試行として、我々の研究室の学生に試験の一部を担当させると共に、人材育成を行う上でのプロセスと今後の問題点などを検証した。

### 1.3 実施体制

以下に実施体制を示す。

宇野 誠一 鹿児島大学、教授：調査研究代表者、暴露水槽作成、研究の総括

國師 恵美子 鹿児島大学、助教：分担者、暴露と化学分析の検証

本 佳高 鹿児島大学、4 年生：分担者、暴露と化学分析の実施

川上 泰佑 鹿児島大学、修士 1 年生：分担者、生物飼育補助、分析・蓄積試験補助

松尾 順平 鹿児島大学、修士 1 年生：分担者、生物飼育補助、分析・蓄積試験補助

今村 和樹 鹿児島大学、学部 4 年生：分担者、生物飼育補助、分析・蓄積試験補助

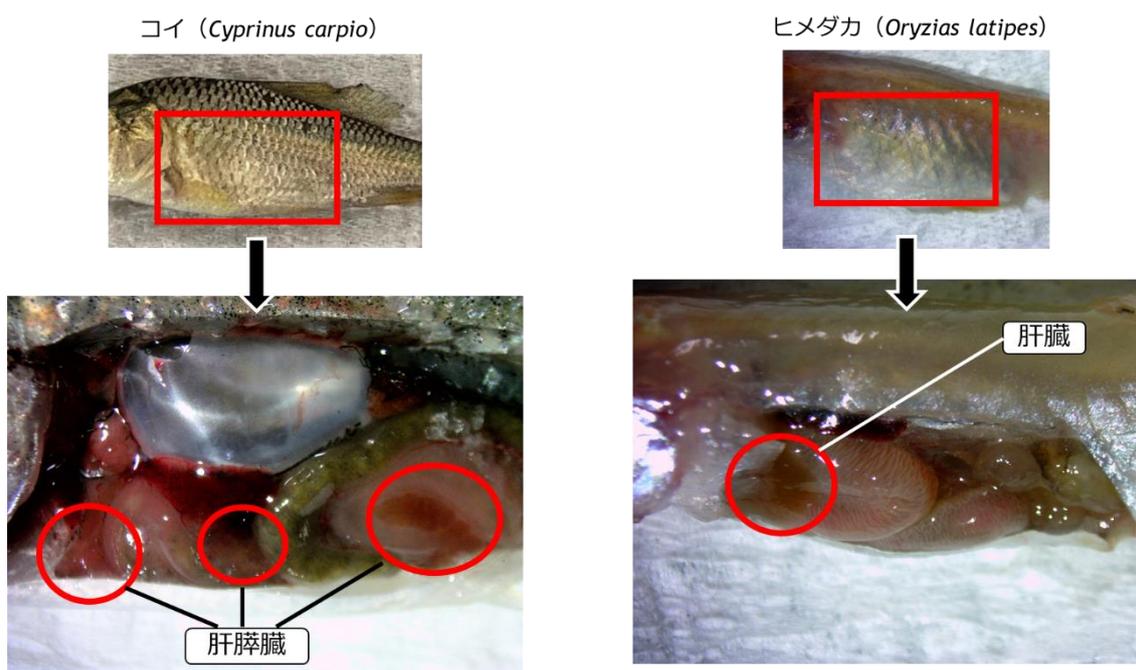
## 2. 本研究のバックグラウンド～化審法における化学物質の生物濃縮と

### その問題点

日本の化審法で管理する化学物質の生物濃縮性は、OECDのTG305をベースにそのほとんどがコイの生物濃縮試験のデータに基づいて検証されている。コイを化審法で対象とすることが多いのは、恐らく、1) 日本の淡水域に広く分布する、2) 養殖などが古くから行われており、その飼育法が既に確立されているため、比較的容易に必要なサイズの魚が手に入りやすい、3) 飼育しやすい、といった点が主な理由だと想像されるが、蓄積性試験における汎用的な利用に至る経緯が記された記録等は今となってはあまり知られていない。

化学物質の生物濃縮や蓄積性は、物質によっては大きな生物種間差があることが分かっている。コイについて考えてみると、コイが水生生物の中でも特異的に化学物質を蓄積する、あるいは日本の水生生物と比べても平均的な蓄積性を持っておりそのBCFが全ての生物種を代表している、という確固たる研究例やデータはほとんどないと思われる。魚類の臓器やその機能は哺乳類などと比べると未発達であったり、独特な発達をしているものが多い。たとえば、コイは肝臓と膵臓が融合した肝膵臓を有しており、メダカやニジマスのような肝臓が独立している種とは、臓器形態の違いから薬物代謝能力が異なる可能性がある(図1)。また、魚類の腎臓はその浸透圧維持の方法の関係上、淡水魚に比べると海産魚は発達しておらず、その形状と機能には大きな種間差があることが知られている。さらに、淡水魚の血液、体液は周囲の淡水よりも浸透圧が高いために、皮膚吸収などを通じて大量の水が取り込まれてしまうが、そのままでは体液が薄くなってしまうため、浸透圧調整のために盛んに薄い

図1 コイの肝膵臓とヒメダカの肝臓



に、体内の水が体表面から連続的に出て行ってしまうため、大量の水を飲み、尿として排出

尿を大量に体外に排出している。一方で海産魚は体液の浸透圧が海水の浸透圧よりも小さいため水分を減らして濃い尿を排出することが知られている。これらの体内構造や機能の種間差は生息環境に適応した結果であると考えられるが、一方で、化学物質の吸収にも大いに関連していることが多く、その種間差が化学物質蓄積性の種間差に直結する要因となり得るだろう。これら、様々な機能を有した魚種を揃えて化学物質の蓄積試験を行えば、恐らくかなりの幅の BCF が得られるのかもしれない。また、魚以外の水生生物まで対象を広げると、水生生物の多くは無脊椎動物であり、進化の過程からその薬物代謝能力は一般的に薬物代謝能力や臓器の発達などは魚類に比べると劣る。実際、野外などで得られた生物試料を比較すると魚類よりも無脊椎動物の方が化学物質濃度が高いことが多い。

生物蓄積データはこれまで数多く報告されており、野外で得られた生物試料から算出されたものと、室内実験で得られたものとに大別される。野外で得られた BCF はそのほとんどが 1 回のみのサンプリングで得られ、生物中体内濃度と水中濃度の比から算出された概算値である。これらの BCF としての精度は疑わしく、室内実験データと比べるべきではないとする研究者は多い。一方、室内実験で流水式水槽などを用いるなど、ある程度精度良く行われた実験データにより化学物質蓄積性を探究した研究は、大規模な設備と大量の飼育水を必要とし、大量に排出される廃液を処理する必要がある、数多くの生物を用意する必要があるなどの理由からか、近年は大学や研究機関での実施例は非常に少ないと思われる。しかし、化審法で扱われる化学物質は一定の使用量以上が見込まれるものに限定され、新規で開発される化学物質の全てが対象とはならない。さらに、POPs 系物質などを除き、学術論文などで発表された、多くの既存物質に関する、室内実験下における生物濃縮性試験データは限定的であり、かつ、日本の研究機関や GLP 認証機関がそれを常に補っていることもない。SDGs の採択などにより、持続的な生物資源の維持や生物多様性保全は今まで以上に重視される時代になった。これらを犯す可能性のある化学物質の使用を含む管理全般が、今後一層厳格に求められる可能性が高い。多くの生物を網羅するよう発展的な化審法における化学物質の安全性評価が社会から要求されたときに、従来の化審法で積み上げた蓄積性のデータを生かし、かつ、比較的短時間でそのニーズに応えるためにも、コイとその他の生物の化学物質蓄積性の相違、その BCF の範囲などをある程度知っておく必要がある。

本研究では、現在およびこれからの化審法を改めて考える上で、現在化審法で取り扱っている化学物質蓄積性はどれくらい代表性があるか、という点を改めて考えるために、蓄積性評価をする上で知っておくべき生物種間差を明らかにすることを主たる目的とし、以下の研究を実施した。

### 3. 方法

#### 3.1 対象物質

本研究の対象物質として、PAH の一種のフェナントレンとクリセン、そしてカーバメート系除草剤であるチオベンカルブを選別した (図 2)。

フェナントレンとクリセンは石油構成成分として知られる他、燃焼を伴っても排出され、特に排気ガス中での濃度が高い。フェナントレンは水溶解度が 1150 mg/L であるのに対し、クリセンはかなり疎水性が強く、その水溶解度は 4 µg/L とあまり大きくない。フェナントレンは、過去に我々が実施したフィリピンの石油流出現場の汚染モニタリング調査において、魚類から検出された PAH 類の中でも最も高濃度で検出されたものである。このとき、クリセンは貝類からは PAH 類の中で最も高濃度で検出されたものの、数種の魚体中からはほとんど検出することができなかった (Uno et al., 2010, 2017)。フェナントレン、クリセン共に LogKow は比較的大きく、この値だけ見れば魚でもある程度大きな BCF が得られる可能性がある。また、環境省データによれば、US EPA の BCFBAF によるクリセンの BCF の計算値は 3200 という値が掲げられている (環境省環境リスク評価室. 化学物質の環境リスク評価 第 9 巻)。

チオベンカルブは水田などで広く用いられる除草剤である。我々の過去の研究では淡水性の二枚貝のマシジミに比較的高濃縮され、そのとき得られた BCF は 2850 であった (Uno et al., 1997)。しかし、同時に暴露した巻貝のマルタニシの BCF は 127 とマシジミとはかなり異なっていた。比較的古くから用いられている農薬であるが、その蓄積データは限定的であり、過去のデータを見ると BCF の生物種間差は大きい可能性がある。

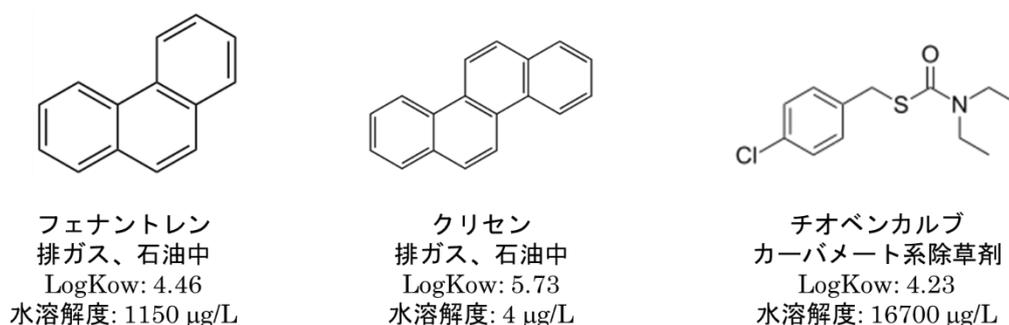


図 2 本研究における対象物質

#### 3.2 試験魚

本研究で用いたコイは山口県下関市にある国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校から当歳魚を供与して頂いた。コイを入手後、約 2 ヶ月間実験室内の 200 L ポリカーバネート製タンク内で馴致した。飼育水は水道水を 1 日曝気し、脱塩素したものをを用いた。馴致期間中、水温は調温せず、フィード・ワン株式会社製の新観賞魚用ペレット錦鯉用フードを毎日給餌した。

ヒメダカは鹿児島大学水産学部環境保全学研究室で、10年以上にわたり継体飼育をしているものを用いた。蓄積試験には6~8ヶ月齢のものを用いた。試験実施前までは25℃設定の空調装置を備えた室内に設置した水槽内で飼育し、毎日テトラミンフレーク（スペクトラム ブランズ ジャパン株式会社）とアルテミア乾燥卵を25℃下の海水中で1昼夜エアレーション循環させた容器内で孵化させたアルテミア幼体を与えた。アルテミアは孵化後24時間以上経過したものは用いなかった。

蓄積試験に用いたコイ、およびヒメダカの雌雄判別は特に行わなかった。

### 3.3 暴露水槽

精度の良い生物蓄積データを得る上で、流水式水槽を用いることは欠かせない。生物蓄積を調べる研究では、静止式水槽が採用されている例も多い。しかし、静止式水槽下で化学物質濃度の経時的変化が少ないのは、比較的水溶性の高い物質に限られ、それ以外の物質は経時的な濃度減少が観察されることが多い。一方流水式水槽を採用すれば、ある程度その濃度減少を抑えることができ、比較的安定した濃度が連続的に維持できる。しかし、静止式水槽に比べると、流水式水槽は装置の規模が大きくなり、管理が難しくなる。さらに、大量の飼育水を用いることから大量の化学物質を含む廃液を生じるため、その処理も難しい。本研究では、まず、化学物質を含む標準原液にはジメチルスルホオキシド（DMSO）やHCO-40を混合し、水溶解度の小さな物質も水に溶解しやすい状態にした上で、魚が収容されている水槽中の水交換率をできる限り減らすことにした。また、この流水式水槽では一定量の飼育水を常に飼育水槽に注ぎ続ける必要があるが、大学の研究室などではこの連続注水における適した装置の入手が難しい。実験開始当初、実験器具カタログで入手可能なペリスタポンプや電磁弁ポンプを試したが、下手をすると1週間もしないうちに故障して、連続試験に耐え得るものではなかった。そのため、飼育水槽の上に貯水タンク（図3の1）を置き、そこからサイフォンで水を連続的に暴露水槽に注ぐことを試みたが、これは貯水タンクの水位に応じて流速が変化することが分かった。これらの問題点を解決して一定の流速を得るために、最終的には、①貯水タンクをさらにもう1つ用意し（図3の4が該当）、一定の水位以下になると注水タンクに自動的に水を追加するポンプと水位検知装置（図3の1）を設置し、貯水タンクの水位を管理して流速を安定させた。加えて、②一定流速注水を達成する装置として、工業用の液体充填機（図3の6）を入手し、これを使用した。万が一この装置が止まっても、補助的にサイフォンで水が流せるようにしておき、管理する人間が実験室内に不在でもある程度連続的な実験が可能であるようにした（ $50 \pm 3 \text{ mL/min}$ 、各水槽中の水は1日に約1.2回交換）。特に②の液体充填機は工業用で作られているため、耐久性が高く、連続使用にも耐える上に、流速も自由に変えられるため、本研究での流速維持にはかなり有用であった。本研究で用いた装置の写真を図3に示す。

図3に示す通り、貯水水槽の直下にはコイの暴露水槽（図3の2）が設置され、そこに約40Lの飼育水が維持されるように設定した。その下部にはヒメダカの暴露水槽を設置し、やはり約40Lの飼育水（図3の3）が維持されるように設定した。コイの水槽からサイフ

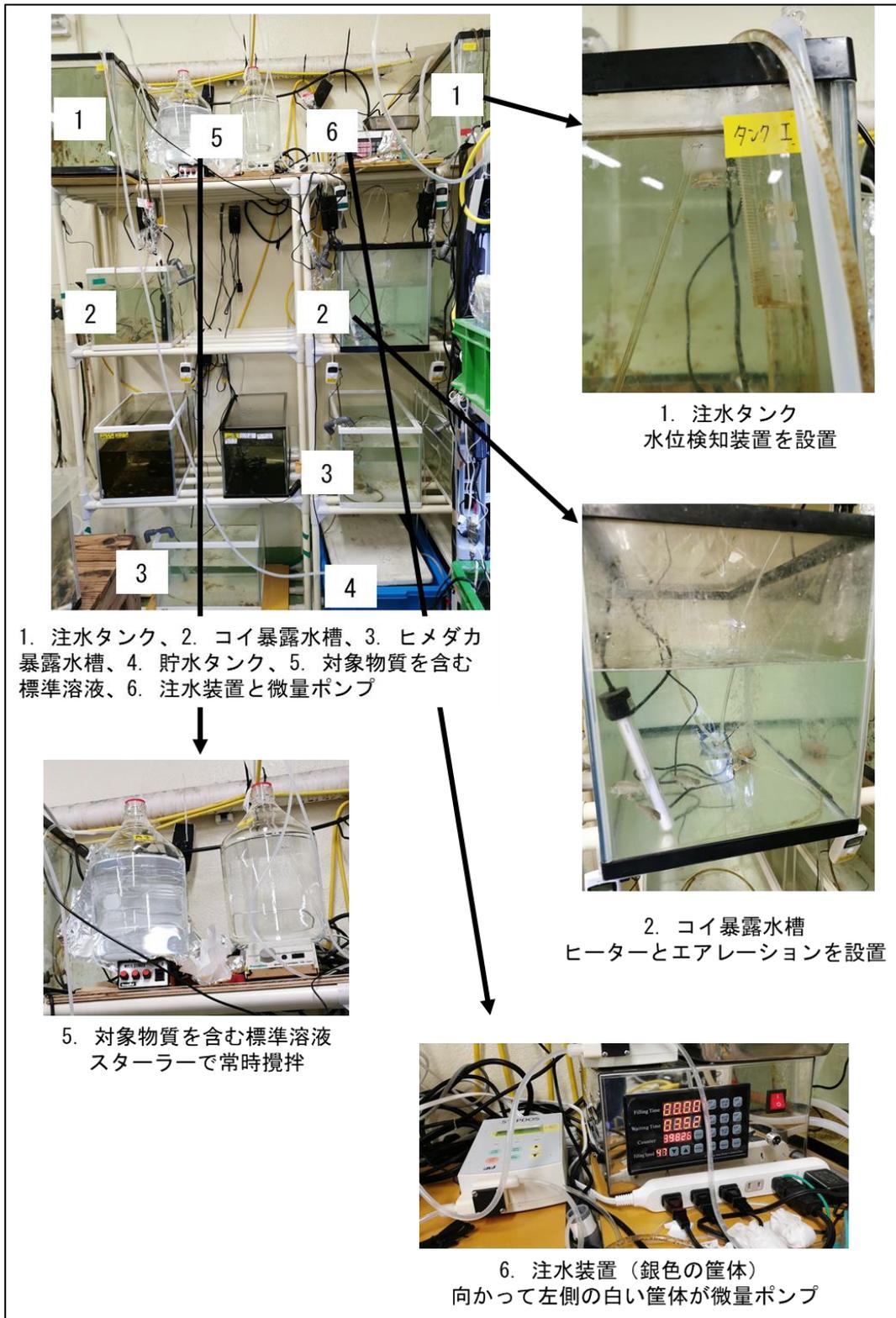


図 3. 本研究で用いた流水式水槽

オンのみでヒメダカの暴露水槽に飼育水を連続的に採取、注水した。よってコイ水槽で対象物質の大きな濃度変動がなければ、ヒメダカ水槽でも一定の濃度維持が期待される。本研究では水を運ぶためのチューブ類にはシリコン製のものをを用いたため、ここに化学物質がかなり吸着することを避けることができず、結果として設定濃度から大きく濃度が低下してしまった。

本流水システムにおいて、溶存酸素濃度 (DO) を一定レベルに保つために、エアレーションを貯水槽に水を注ぐ貯水槽、貯水槽、そして魚が入った水槽の全てにエアレーションを施した。さらに、冬場に試験を実施する場面が多かったために、試験期間を通して、ヒーターとサーモスタットを用いて、水温を約 25°C に維持するようにした。また、対象物質を含む標準溶液は HCO40 と DMSO をそれぞれ一定量混合して設定濃度になるように調製し、この溶液を収容した瓶は遮光して、常にスターラーで攪拌した。そこから微量ポンプを用いて 1 mL/min の流速で水槽に注入した。

### 3.4 試薬

フェナントレン (>97.0%)、クリセン (>98.0%) は東京化成工業株式会社製のものをを用いた。また、チオベンカルブは富士フィルム和光純薬株式会社製の残留農薬試験用のもの (98.0+%) を用いた。化学分析で用いたヘキサン、アセトンについては残留農薬・PCB 分析用、エタノールは HPLC 分析用、無水硫酸ナトリウム、水酸化カリウム、ジメチルスルホオキシドは特級、ワコーゲル (C-300) はカラムクロマトグラフ用、フロリジル PR は残留農薬用で、全て富士フィルム和光純薬株式会社製のものをを用いた。蓄積試験用の薬液調製に用いた HCO-40 は NIKKOL HCO-40 (日光ケミカルズ株式会社) を用いた。化学分析および蓄積試験用薬液調製用の水は超純水 (Milli-Q) を用いた。また、GC/MS 分析で用いたアントラセン-d10 (98.0+%) は有機合成用、クリセン-d12 は 98.0+% のものを、それぞれ富士フィルム和光純薬株式会社から購入して用いた。

### 3.5 蓄積性試験の水中濃度設定のための毒性試験

蓄積試験の水中濃度決定のために、ヒメダカを用いて以下のように半止水式水槽による簡易毒性試験を行った。なお、各試験水は 1 日曝気して脱塩素した水道水を用いて調製した。各容器には 2 L の水を注ぎ、24 時間ごとに換水した。容器はガラス製のものをを用いた。水温は 25°C になるように調温し、また DO を維持するために各水槽にはエアレーションを施した。毒性試験に用いたヒメダカは約 12 ヶ月齢のものをを用い、雌雄の区別はしなかった。暴露時間は 96 時間とし、24 時間ごとに各暴露区のヒメダカの死亡数を確認した。また、暴露中、ときどき水槽を観察し、ヒメダカの泳ぎなどに異常が見られないかを観察した。

#### 3.5.1 フェナントレン

フェナントレンを DMSO に溶解し、標準原液とした。試験水中のフェナントレンが設定濃度になるように、かつ DMSO 濃度が 100  $\mu$ L/L になるように標準原液を DMSO により希釈して、各暴露区用の標準溶液を調製した。ただし、以下に示す 1060  $\mu$ g/L は飽和溶解度に

近いために、DMSO 濃度を 500  $\mu\text{L/L}$  になるように調製した。これらを脱塩素水が注がれた各暴露水槽に添加した。試験水中のフェナントレン設定濃度は、1060、212、43、8.35  $\mu\text{g/L}$  とした。また DMSO のみ 100  $\mu\text{L/L}$  を添加したコントロール区も設けた。本設定濃度はフェナントレンの飽和水溶解度に近いものを最も濃度の高い区に設定し、そこから公比 5 で濃度が減少するようにした。毒性試験の試験水は 24 時間ごとに交換し、その都度、フェナントレン標準溶液を新たに添加した。

フェナントレンの暴露試験の結果、コントロール区、および全暴露濃度区で死亡個体は観察されなかった。よって、 $\text{LC}_{50} > 1060 \mu\text{g/L}$  と見積もられた。ただし、1060  $\mu\text{g/L}$  暴露区では全てのヒメダカが麻酔作用と思われる症状を暴露期間中を通して呈していた。これはフェナントレン暴露による影響と思われた。この毒性試験の結果から、蓄積試験の高濃度区の設定水中濃度を 100  $\mu\text{g/L}$ 、低濃度区を 10  $\mu\text{g/L}$  とした。

### 3.5.2 クリセン

クリセンを DMSO に溶解し、標準原液とした。なお、クリセンの毒性試験は、過去の様々な毒性試験データから、ヒメダカが死亡する濃度は水溶解度を超えると予想されたため、各水槽の DMSO 濃度は 500  $\mu\text{L/L}$  になるように、各暴露区用の標準溶液を調製した。試験水中のクリセン設定濃度は、2、0.4、0.08  $\text{mg/L}$  とした。また DMSO のみ 500  $\mu\text{L/L}$  を添加したコントロール区も設けた。毒性試験の試験水は 24 時間ごとに交換し、その都度、クリセン標準溶液を新たに添加した。

クリセンの毒性試験の結果、全濃度区で死亡個体は観察されなかった。また、フェナントレンの 1060  $\mu\text{g/L}$  暴露区で観察されたような麻酔作用のような影響も見られなかった。クリセンの毒性試験の結果、水溶解度も考慮して  $\text{LC}_{50} > 4 \mu\text{g/L}$  と見積もられた。毒性試験の結果から考えて、蓄積試験では高濃度区を飽和溶解度に近い 2  $\mu\text{g/L}$ 、低濃度区 0.2  $\mu\text{g/L}$  に設定することにした。

### 3.5.3 チオベンカルブ

チオベンカルブを DMSO に溶解し、標準原液とした。試験水中のチオベンカルブが設定濃度になるように、かつ DMSO 濃度が 100  $\mu\text{L/L}$  になるように標準原液を DMSO により希釈して、各暴露区用の標準溶液を調製した。これらを脱塩素水が注がれた各暴露水槽に添加した。試験水中のチオベンカルブ設定濃度は、2000、400、80  $\mu\text{g/L}$  とした。また DMSO のみ 100  $\mu\text{L/L}$  を添加したコントロール区も設けた。本濃度設定は、環境省のヒメダカの毒性情報を参照したが、その  $\text{LC}_{50}$  が 80  $\mu\text{g/L}$  以下になることがない、と判断し、それ以下の濃度区は設けなかった。毒性試験の試験水は 24 時間ごとに交換し、その都度、チオベンカルブ標準溶液を新たに添加した。

チオベンカルブの毒性試験の結果、 $\text{LC}_{50}$  は 1200  $\mu\text{g/L}$  と見積もられた。この結果から、蓄積試験の設定濃度を高濃度区 120  $\mu\text{g/L}$ 、低濃度区 12  $\mu\text{g/L}$  にすることにした。

### 3.6 蓄積試験

3.3 項で述べた流水式水槽を用いて暴露試験を実施した。各物質の低濃度区、高濃度区の設定水中濃度は3.5 項の毒性試験の結果から設定した。また、各暴露期間中、曝気水道水のみ注水するコントロール区も設けた。各蓄積試験において、コイはコントロール水槽には24尾、低濃度区および高濃度区にはそれぞれ28尾、ヒメダカはコントロール水槽には30尾、低濃度区および高濃度区にはそれぞれ45尾ずつ導入した。暴露開始日からコイにはフィード・ワン株式会社製の新観賞魚用ペレット錦鯉用フード、ヒメダカにはスペクトラム ブランド ジャパン株式会社製のテトラミンフレックを朝、夕給餌した。1日の給餌量は試験魚の体重の2%とした。コイにはヒーターを入れて水温を $25.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に維持した。ヒメダカ水槽はヒーターを用いず、水温は $22.3 \pm 1.3^\circ\text{C}$ であった。また、溶存酸素(DO)維持のために全ての水槽にエアレーションを施した。コイ水槽のpHは $6.71 \pm 0.42$ 、ヒメダカ水槽は $6.64 \pm 0.45$ 、コイ水槽のDOは $6.62 \pm 0.44 \text{ mg/L}$ 、ヒメダカ水槽では $6.83 \pm 0.36 \text{ mg/L}$ であった。

各暴露水槽に注ぐ、対象物質を含む標準溶液を調製するために、DMSOを溶媒とした標準原液を調製した。この標準原液を低濃度区、高濃度区共に10 mLずつ取り、さらにHCO-40を10gを加え、Milli-Qで4Lにメスアップした標準溶液を用意した。暴露試験中、標準溶液容器中で対象物質が均一に拡散するようにスターラーで常時攪拌した。この標準溶液を微量ポンプで1 mL/minの流速で暴露水槽に注水した。標準溶液は3日に1回ずつ新しいものを設置した。また、注水水槽内の脱塩素水道水のコイ水槽への注入流速は約50 mL/minに設定した。1日の水交換量は約1.2回/日とした。ヒメダカ水槽からの廃液は活性炭を敷き詰めた水槽に送液し、その容器内で一定時間滞留させて活性炭に対象物質を吸着させて水中から除去した。各対象物質への暴露期間は14日間としたが、ある程度BCFが算出できるところでデータ採取を止めた。また、暴露期間中3回各対象物質の水中濃度も測定した。

暴露期間中、コイは4尾採取し、2尾を1サンプルとした。また、ヒメダカは6尾採取し、3尾を1サンプルとした。コイ、ヒメダカとも、サンプリング後、体長、全長、体重を計測し、直ちに液体窒素で凍結した。その後、24時間凍結乾燥処理し、以下の分析に供した。試験に用いたコイの体長は $4.75 \pm 1.85 \text{ cm}$ 、ヒメダカは $2.69 \pm 1.70 \text{ cm}$ 、全長はコイが $6.12 \pm 3.76 \text{ cm}$ 、ヒメダカが $3.28 \pm 1.98 \text{ cm}$ 、体重はコイが $3.20 \pm 0.64 \text{ g}$ 、ヒメダカが $0.338 \pm 0.07 \text{ g}$ であった。

### 3.7 水中濃度分析

#### 3.7.1 フェナントレンおよびクリセン

試験水中のフェナントレンおよびクリセンの抽出などの分析操作は環境省の要調査項目等調査マニュアルを参照し、これを改変して実施した。各暴露水槽から水をそれぞれ10 mLずつ採取した。これにヘキサン5 mLを添加し、15分間振とう器により振とうし、2000 rpm、 $4^\circ\text{C}$ 下で10分間、遠心分離を行った。上層のヘキサン相を採取し、水層には新たにヘキサン5 mLを採取し、振とう機で15分間振とうした。上記と同条件で遠心分離を行った後、ヘキサン相を採取し、先のヘキサン相と合わせた。このヘキサン溶液を9インチのパスツールピペットに詰めた無水硫酸ナトリウムに通して脱水した。これを水中設定濃度とGC/MSの感

度に応じて濃縮あるいは希釈をして、フェナントレン分析の際はアントラセン-d10 を、クリセン分析の際はクリセン-d12 を内部標準として添加し、GC/MS により濃度測定を行った。両物質の水中分析の概略を図 4 に示した。

GC/MS による分析は株式会社島津製作所製の GCMS-QP2020-NX により行った。また、オートサンプラーは島津製の AOC-20s Plus、オートインジェクションは島津製の AOC-20i Plus を用いた。フェナントレンおよびクリセンの GC/MS 測定条件は以下の通り。

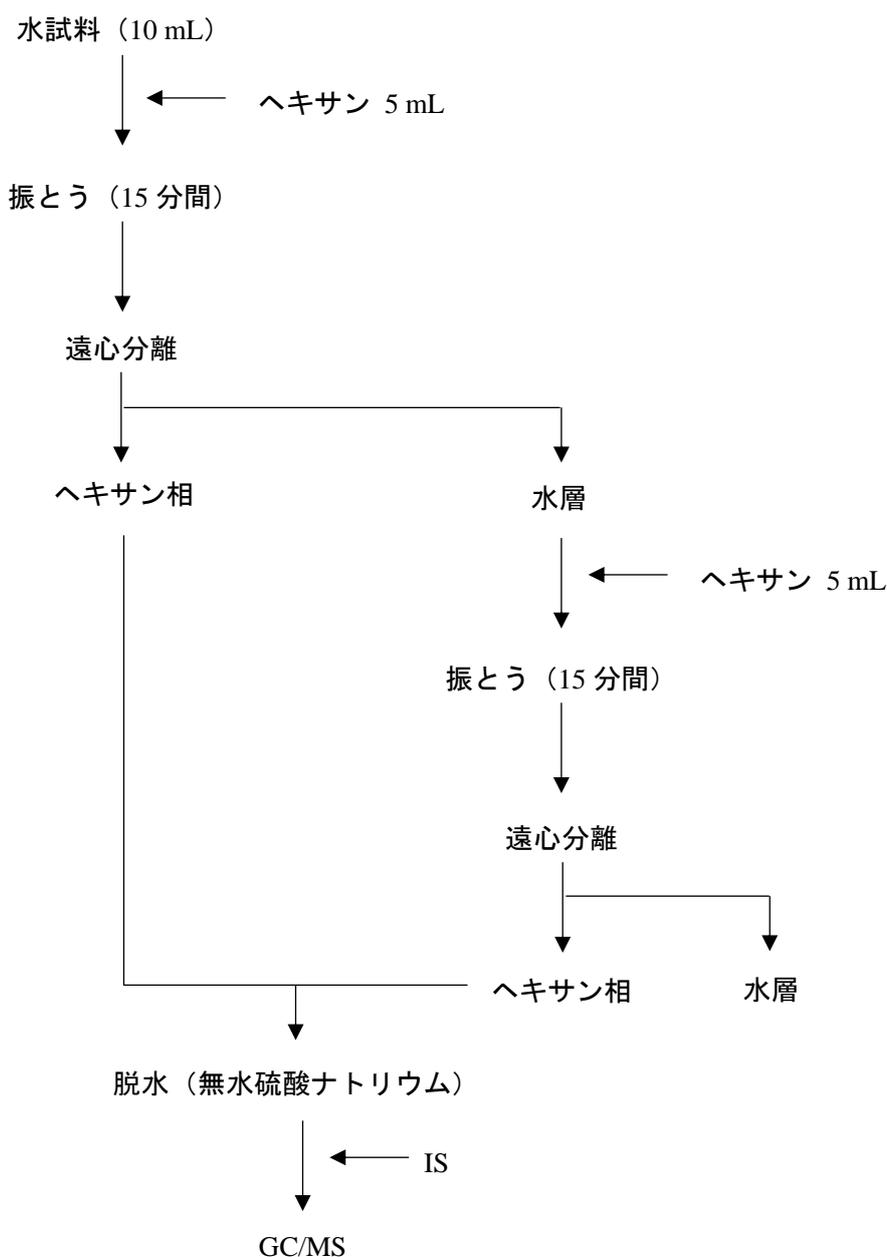


図 4 試験水中のフェナントレンおよびクリセンの分析手順の概略

注入口温度：280℃  
イオン限温度 230℃  
注入量：1 μL  
注入モード：スプリットレス  
カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5 MS（長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm、  
アジレント・テクノロジー株式会社）  
昇温条件：60℃（1 分間保持）→30℃/min で昇温→180℃（5 分間保持）→30℃/min で  
昇温→300℃（2 分間保持）  
分析時間：16 分間  
分析モード：SIM モード  
モニターイオン：フェナントレン（m/z: 178、177）、クリセン（m/z: 228、227）、アン  
トラセン-d10（m/z: 188）、クリセン-d12（m/z: 240）

### 3.7.2 チオベンカルブ

試験水中のチオベンカルブの分析方法は、Uno et al (1997) の方法を改変して行った。C18 カートリッジ (Bond Elut C18、100 mg、アジレント・テクノロジー) をアセトンで洗浄し、さらに Milli-Q でコンディショニングした。このカラムに各暴露水槽から採取した試験水 10 mL を通水し、チオベンカルブを固相に吸着させた。吸着したチオベンカルブをアセトン 5 mL で溶出した後、得た溶液に Milli-Q を 2 mL、ヘキサン 2 mL を加え、1 分間激しく振とうした。2000 rpm、4℃下で 10 分間遠心分離してヘキサン相を採取した。再度ヘキサン 2 mL を水層に加えて再び 1 分間激しく振とうし、遠心分離して得たヘキサン相を前のヘキサン相と合わせた。これを、ロートに詰めた無水硫酸ナトリウムを通して脱水した後、内部標準としてアントラセン-d10 を加えて、濃縮し、GC/MS 分析に供した。GC/MS は 3.7.1 項と同様の GCMS-QP2020-NX により行った。分析の概略を図 5 に示した。

GC/MS 測定条件は以下の通りであった。

注入口温度：250℃  
イオン限温度 230℃  
注入量：1 μL  
注入モード：スプリットレス  
カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5 MS（長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm、  
アジレント・テクノロジー株式会社）  
昇温条件：60℃（1 分間保持）→20℃/min で昇温→220℃（2 分間保持）→30℃/min で昇  
温→300℃（5 分間保持）  
分析時間：19 分間  
分析モード：SIM モード  
モニターイオン：チオベンカルブ（m/z: 100、125、257）、アントラセン-d10（m/z: 188）

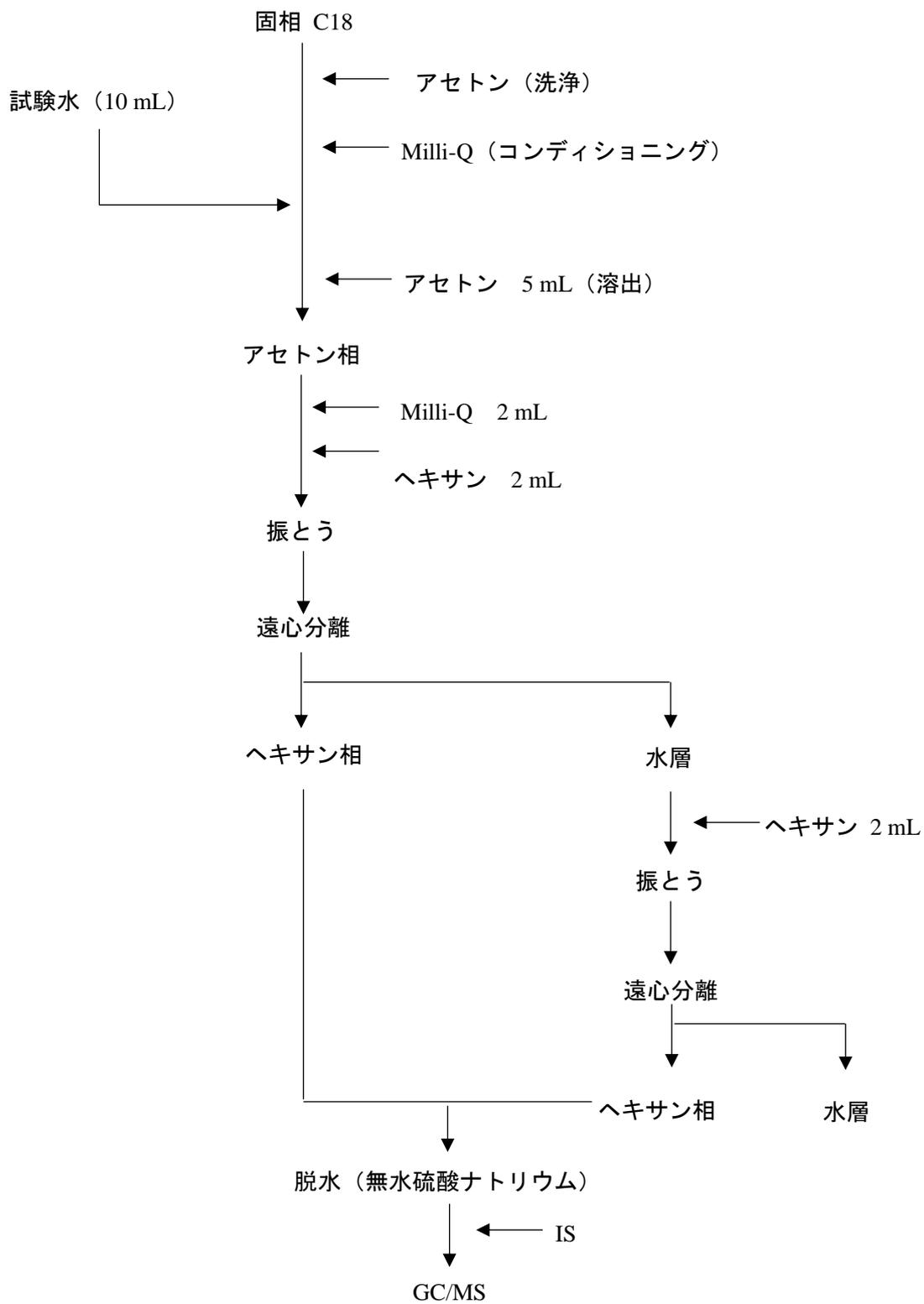


図5 試験水中のチオベンカルブの分析手順の概略

### 3.8 魚体中濃度分析

#### 3.8.1 フェナントレンおよびクリセン

魚体中フェナントレンおよびクリセンの分析は Uno et al (2010) で使用した方法を改変して実施した (図 6)。3.6 項で得られた魚サンプルを 24 時間凍結乾燥した。凍結乾燥試料を

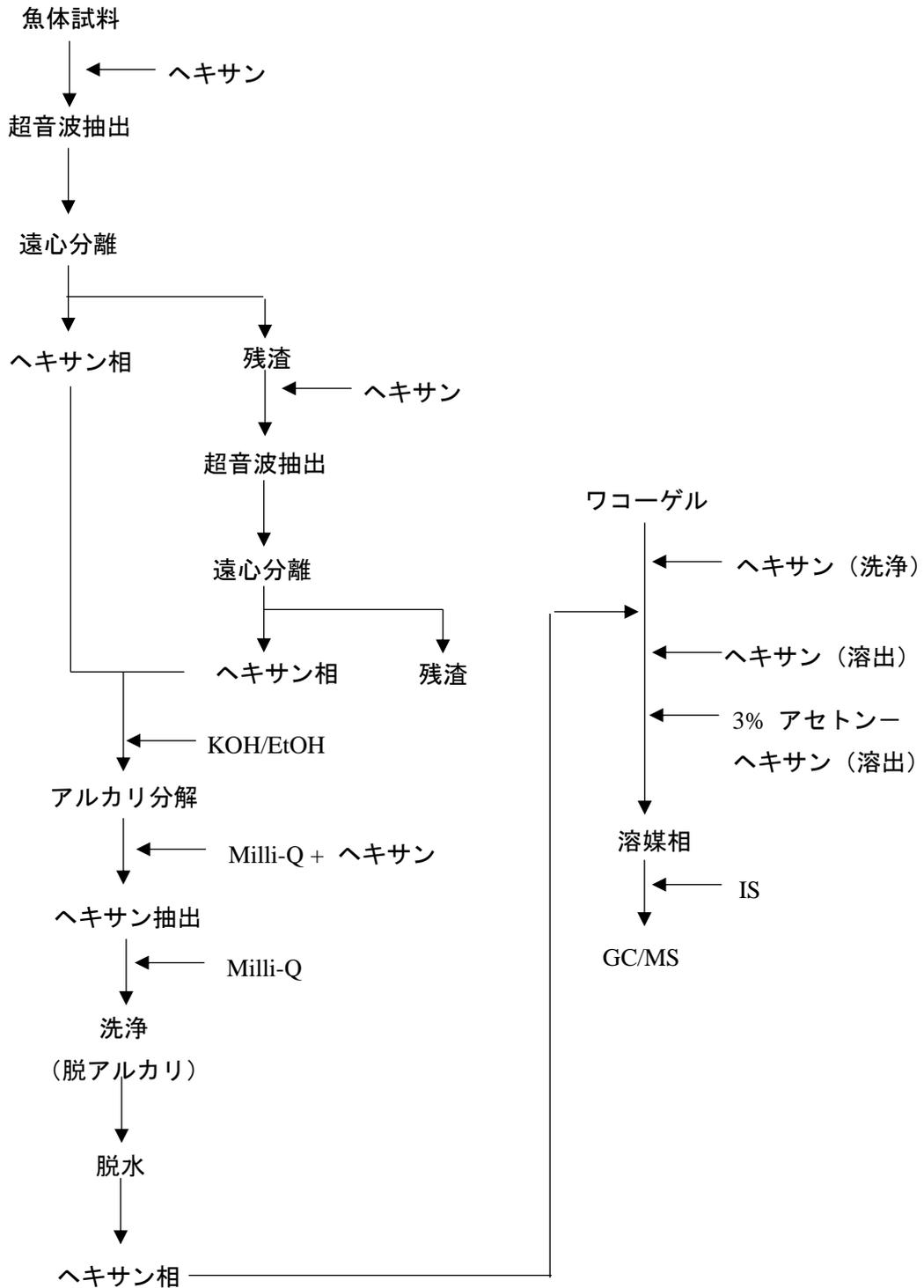


図 6 魚体中フェナントレンおよびクリセンの分析手順の概略

湿重量あたり 0.5 g ずつ 50 mL のガラス遠沈管に量り取った。ここにヘキサンを 10 mL 加えて、15 分間超音波照射して魚体中のフェナントレンあるいはクリセンを抽出した。その後、2000 rpm、4℃下で 10 分間遠心分離して、ヘキサン相を採取した。残渣に再びヘキサン 10 mL を加えて、超音波照射、遠心分離を行い、得られたヘキサン相を先のヘキサン相と合わせた。その後、このヘキサン溶液に窒素を吹き付け、約 1 mL まで濃縮した。濃縮液に 1 M 水酸化カリウム-エタノール溶液 6 mL を加えて 90℃下に 1 時間放置し、アルカリ分解をして脂質などの夾雑物を分解した。アルカリ分解後、ヘキサン 10 mL と Milli-Q を 10 mL 加えて振とうし、ヘキサン相を採取した。この操作をもう一度繰り返し、ヘキサン相を合わせた。得られたヘキサン相に Milli-Q を加え、激しく振とうしてヘキサン相を洗浄した。ヘキサン相を集め、無水硫酸ナトリウムでヘキサン相中の水分を除去した。その後、このヘキサン溶液を窒素により 0.5 mL まで濃縮し、クリーンアップに供した。クリーンアップはワコーゲルを活性化し、3%の含水に調整したものをを用いて行った。このワコーゲルをパスツールピペットに充填し、ヘキサン 10 mL で洗浄した後、先のヘキサン溶液を負荷した。その後、ヘキサン 10 mL、3%アセトン-ヘキサン 10 mL で各 PAH を溶出した。これらを合わせ、アントラセン-d10 あるいはクリセン-d12 を内部標準物質として加えた後、窒素ガスで濃縮し、GC/MS により測定した。GC/MS の測定条件などは 3.7.1 項と同様とした。

### 3.8.2 チオベンカルブ

魚体中チオベンカルブの分析は Añasco et al (2010) で使用した方法を改変して実施した (図 7)。3.6 項で得られた魚サンプルを 24 時間凍結乾燥した。凍結乾燥試料を湿重量あたり 0.5 g ずつ 50 mL のガラス遠沈管に量り取った。ここにアセトン 10 mL を加えて 20 分間超音波抽出を行った。3000 rpm、4℃下で 10 分間遠心分離を行い、アセトン相を採取した。残渣に再びアセトンを 10 mL を加えて、超音波抽出、遠心分離を行った。アセトン相を採取し、上記で採取した者と合わせた後、4 mL まで窒素ガスを吹き付けて濃縮し、Milli-Q 2 mL、ヘキサン 2 mL を加えて、1 分間激しく振とうし、ヘキサン相を採取した。残った水層にヘキサン 2 mL を再び加えて、振とうした。ヘキサン相を採取し、先のヘキサン相に合わせて、無水硫酸ナトリウムで脱水した。脱水したヘキサン溶液に窒素ガスを吹き付けて 1 mL まで濃縮後、フロリジル PR によりクリーンアップした。活性化したフロリジルに 3%含水となるように調整したものを 9 インチのパスツールピペットに充填した。このカラムをヘキサンで洗浄後、濃縮したヘキサン溶液を負荷し、10%アセトン-ヘキサン溶液で溶出した。溶出液に内部標準物質としてアントラセン-d10 を加えて、GC/MS 測定で適した濃度となるように、濃縮あるいは希釈し、GC/MS 測定に供した。GC/MS での測定条件などは 3.7.2 項と同様とした。

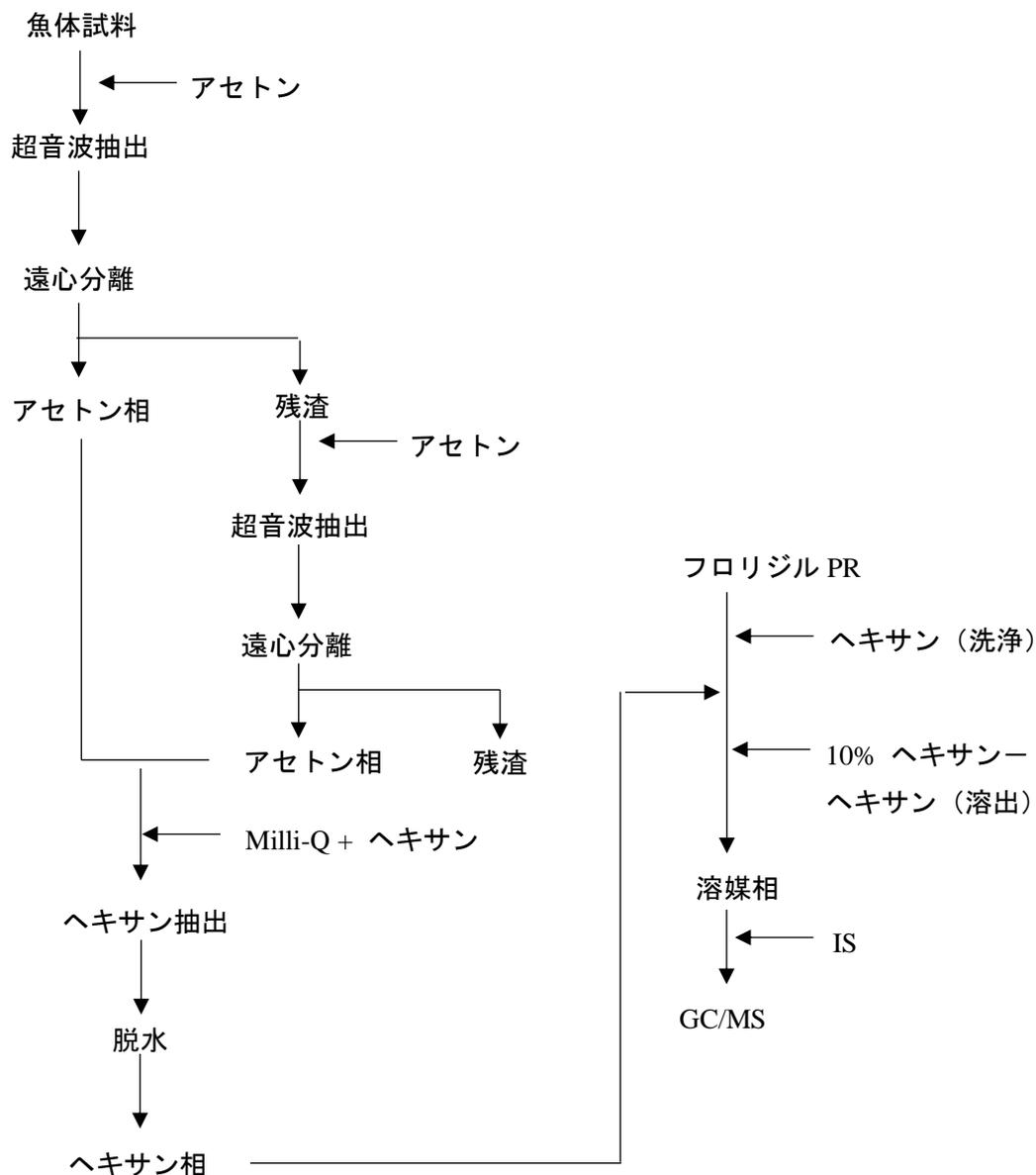


図7 魚体中チオベンカルブの分析手順の概略

### 3.9 生物濃縮係数の算出

本研究では、暴露期間中の魚体中濃度が平衡状態、あるいはこれ以上体内濃度が上昇しないと見込まれたときの、魚体中濃度と水中濃度の比、すなわち、

$$BCF = C_f / C_w$$

の式により算出した。ここで BCF は生物濃縮係数、C<sub>f</sub> は魚体中濃度、C<sub>w</sub> は水中濃度を示す。

## 4. 結果と考察

### 4.1 水中濃度

本研究の暴露期間中、暴露水槽の試験水中対象物質の濃度測定を3回実施した。その結果、フェナントレン暴露のコイ水槽の低濃度区の水中濃度は  $4.16 \pm 0.53 \mu\text{g/L}$ 、高濃度区は  $33.0 \pm 1.13 \mu\text{g/L}$  となった。一方、ヒメダカ水槽では、低濃度区  $2.82 \pm 0.13 \mu\text{g/L}$ 、高濃度区  $28.1 \pm 3.29 \mu\text{g/L}$  であった。当初、設定濃度を高濃度区  $100 \mu\text{g/L}$ 、低濃度区  $10 \mu\text{g/L}$  としていたが、それぞれ、1/3 程度の実測値になった。また、コイ水槽と比べると、ヒメダカ暴露水槽中フェナントレン濃度の方が若干低くなったが、その差は両魚種間の BCF の差を生む要因に成り得るほどの差ではないと考えられた。

クリセン暴露のコイ水槽の低濃度区の水中濃度は  $0.104 \pm 0.021 \mu\text{g/L}$ 、高濃度区は  $0.665 \pm 0.042 \mu\text{g/L}$  となった。一方、メダカ水槽では、低濃度区  $0.104 \pm 0.009 \mu\text{g/L}$ 、高濃度区  $0.707 \pm 0.123 \mu\text{g/L}$  であった。クリセンの設定濃度は2 および  $0.2 \mu\text{g/L}$  であったが高濃度区は約1/3、低濃度区は1/2 程度の実測値となった。コイとヒメダカ暴露水槽間の濃度差はさほどないと判断された。

コントロール水槽からはわずかながらフェナントレンとクリセンが水中から検出された。これは両物質が排ガスなどを由来として、大気中に恒常的に存在しているためだと考えられた。この濃度はかなり低く、コントロールの魚からの検出濃度も低かったため、後に述べる生物濃縮試験の結果に特に影響を及ぼさないと判断した。

チオベンカルブ暴露ではコイ水槽の低濃度区は  $6.55 \pm 1.25 \mu\text{g/L}$ 、高濃度区は  $46.8 \pm 7.17 \mu\text{g/L}$ 、ヒメダカ低濃度区は  $5.53 \pm 1.33 \mu\text{g/L}$ 、高濃度区は  $34.4 \pm 5.29 \mu\text{g/L}$  であった。チオベンカルブの設定濃度は高濃度区  $120 \mu\text{g/L}$ 、低濃度区  $12 \mu\text{g/L}$  であったために、高濃度区では1/3~1/4 程度、低濃度区では1/2 程度の実測値となった。また、コイ水槽からヒメダカ水槽への移動中に水中チオベンカルブ濃度は若干の低下が認められたが、これも両魚種間の BCF の差を生む要因にはならないと判断した。コントロール水槽からはチオベンカルブは検出されなかった。

今回対象とした3物質とも水中濃度において設定濃度からかなり減少していることが認められた。、いずれの対象物質も Log Kow が4以上で比較的大きく、本研究では対象物質を含む溶液の水槽への送液にはシリコンチューブを用いたため、このチューブ内でかなり大きな吸着があり、結果的に水槽に到達する前に濃度が減少していたと予想された。また、物質の Log Kow が大きくなるとガラス容器表面などの吸着も大きくなると考えられる。我々の研究室では廃液の処理能力と注水する水量の確保が問題となり、1水槽の水交換率  $w p 1.2$  回/日とかなり小さい量に設定した。しかし、今回のように Log Know のある程度大きな物質を設定濃度近くに水中濃度を保つためには、その水交換率をかなり増やさないと達成できないと考えられる。また、そのためにはかなり大量に、かつ連続して試験水を注ぐことが可能なポンプも必要となる。大学などの小規模試験を強いられる施設において、このような条件下で暴露試験をするのはなかなか難しいといえる。

本研究では実測濃度が設定濃度からかなり低くなることが確認されたが、各水槽中の対

象物質の水中濃度は比較的安定していた、と考えられたため、この条件下で暴露試験を実施し、魚体中 BCF を算出することにした。

## 4.2 コイとヒメダカの蓄積濃度と化学物質生物濃縮性、魚種間差

### 4.2.1 フェナントレン

コイとヒメダカの低濃度区および高濃度区の暴露期間中のフェナントレン濃度変動を図 8 に示した。

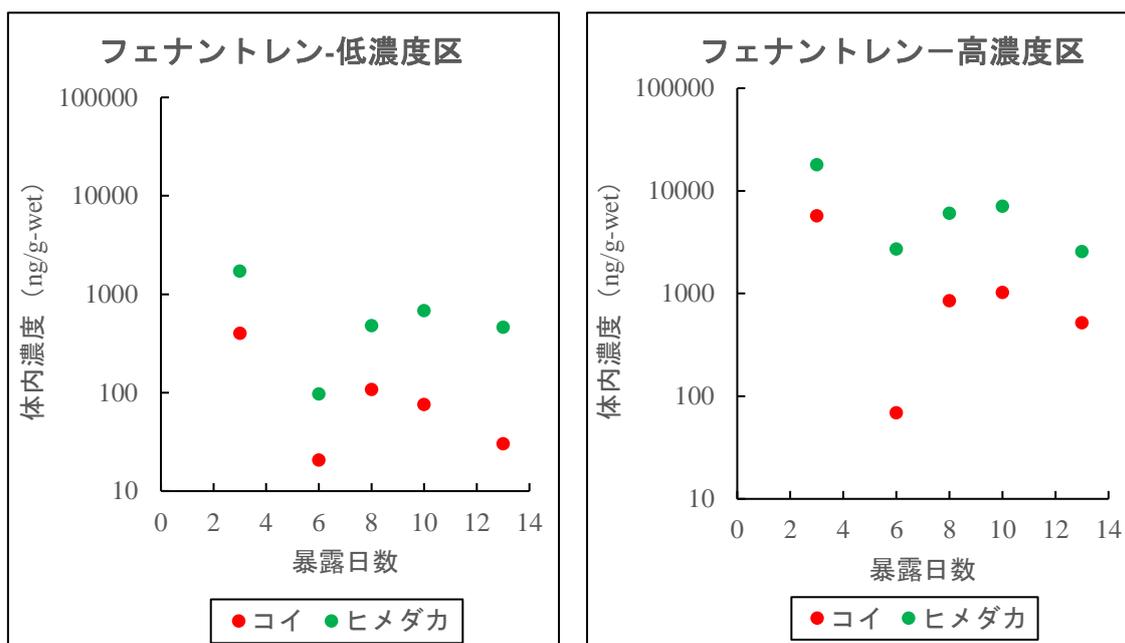


図 8 フェナントレンの魚体内中濃度変動

低濃度区、高濃度区共に、コイおよびヒメダカ両魚の 3 日目の濃度が最も高く（コイ—低濃度区：393 ng/g-wet、高濃度区：5726 ng/g-wet；ヒメダカ—低濃度区：1706 ng/g-wet、高濃度区：17967 ng/g-wet）、6 日目に大きく低下（コイ—低濃度区：20.7 ng/g-wet、高濃度区：66.7 ng/g-wet；ヒメダカ—低濃度区：97.7 ng/g-wet、高濃度区：2711 ng/g-wet）、再び 8 日目には上昇し、ほぼ平衡に近い状態になったと考えられた。3 日目にコイおよびヒメダカ体内で体内濃度が高くなったのは、おそらく魚体中でフェナントレンという生体外異物に対して、薬物代謝などの排泄能が十分に発揮（準備）されていなかったことが反映されたと考えられた。また、6 日目の大きな低下は、代謝・排泄能の準備が体内中で整えられ、それが働いた結果であろう。その後、取り込み速度と排泄速度が拮抗し、8 日目以降の平衡状態に近い体内変動になったと考えられた。8 日目から 13 日目におけるフェナントレン低濃度区の BCF はコイ 7~26 L/kg、ヒメダカ 163~242 L/kg とその差が 7 倍~22 倍あり、高濃度区ではコイ 16~31 L/kg、ヒメダカ 91~254 と 5 倍~8 倍程度の差があった。低濃度区、高濃度区のコイおよびヒメダカ共にフェナントレンの経時的体内変動は濃度レベルこそ異なるもの

の、変動の仕方は類似している。そのため、フェナントレン代謝および排泄機能はほぼ同様ではないかと予想され、その能力の差が体内濃度の差になったのかもしれない。

過去のフェナントレンの蓄積研究例と本研究で得られた BCF を以下に比較する。Jonsson et al (2004) は流水式水槽でフェナントレン暴露をし、シープヘッドミノーの BCF が 700~1623 L/kg であったとしている。また、Petersen と Kristensen (1998) は半止水式水槽により C14 体のフェナントレンを暴露したときの BCF を掲げており、ゼブラフィッシュ稚魚の BCF が 7943 L/kg、タラ稚魚が 10715 L/kg、ニシン稚魚が 20893 L/kg、イシビラメ稚魚が 11220 L/kg であった。なお、原著では対数表記になっていたため、これらの各稚魚の BCF 値はこの報告書内では整数表記とするために概算してここに掲げた。Petersen らの研究は止水式で行われているが、止水式水槽下において水中のフェナントレン濃度は経時的にかなり低下するものと予想され、濃度の低下に伴って各魚種の BCF は流水式水槽下の暴露時よりも高くなる可能性がある。また、稚魚と親魚はその薬物代謝能などが大きく異なり、稚魚の方が親魚よりも高くなると思われる。Petersen らの研究で、淡水魚のゼブラフィッシュの BCF よりも海産魚のタラ、ニシン、イシビラメ各稚魚方が大きくなることが注目される。ただし、我々が過去に行った流水式水槽を用いた海産魚に対する暴露試験では、10 日暴露の時点でマダイが約 180 L/kg、ジャワメダカが約 150 L/kg、マコガレイが約 70 L/kg であった (Cheikyula et al, 2008)。この暴露試験を行ったときには水中濃度が安定せず、その精度はさほど良いものではなかったが、このときの BCF のおおよその目安にはなるだろう。なお、このときのジャワメダカは成魚サイズであり、マダイとマコガレイは 5 cm 強の仔魚サイズであった。

フェナントレンの魚類の蓄積性は過去の文献値で見てもかなり魚種間差があることが予想される。上記 Petersen らの研究例は稚魚を用いているなど、多少条件が特殊ではあるが、それを除き、本研究のデータや過去のデータを合わせて考えると、その幅は数十~2000 倍程度なのかもしれない。

#### 4.2.2 クリセン

コイとヒメダカの低濃度区および高濃度区の暴露期間中のクリセン濃度変動を図 9 に示した。

クリセンもフェナントレンと同様にコイの高濃度区を除き、暴露初期である 2 日目の濃度が最も高く、6 日目に一度濃度が低下して、9 日目に上昇、ほぼ平衡化したと考えられた。特に暴露初期から 6 日目にかけての体内変動は、フェナントレン同様に薬物代謝能の発現までに時間がかかったことに起因すると思われる。コイの高濃度区だけは暴露初期から終わりまでのその濃度変動は小さい結果になったがこの理由は分からない。

クリセンは暴露濃度の違いはあるものの、その体内濃度と BCF は非常に低い結果となった。そもそもクリセン自体はこれまでの石油汚染現場での調査などにおいて魚体から検出される濃度が低いこともあり (Uno et al, 2010)、他の無脊椎動物はともかくとして、魚類にはあまり取り込まれないのではないかと予想していた。取り込まれない理由として、クリセンの立体構造が大きくなり、たとえばフェナントレンなどが通過した鰓の鰓孔を、クリセンはその体積が多すぎてわずかしかならぬ通過できない、あるいはフェナントレンなどよりも薬物

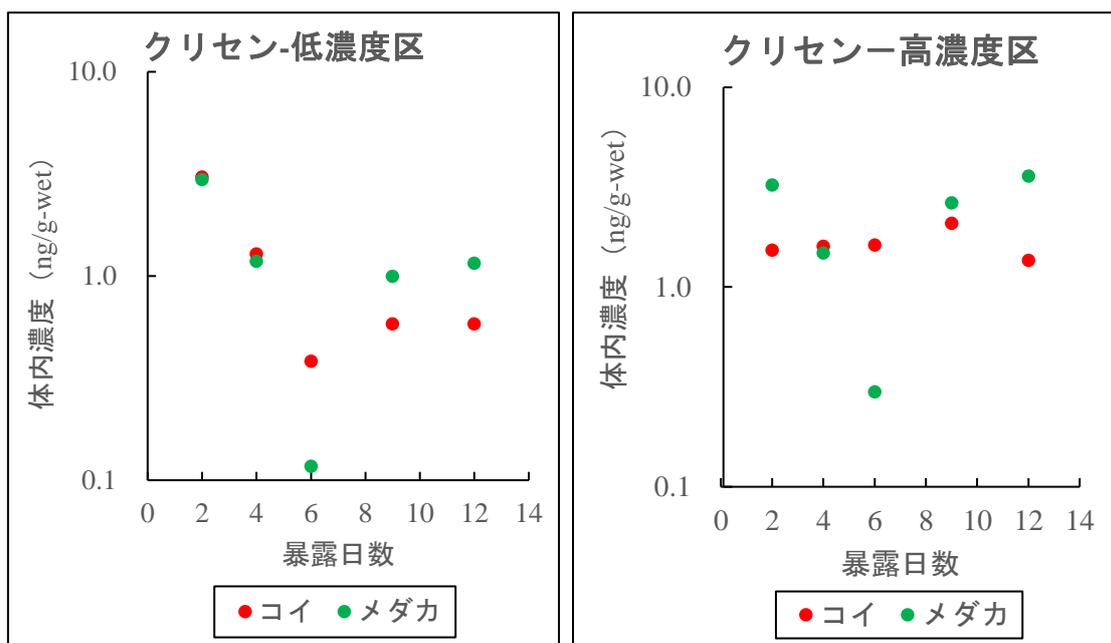


図9 クリセシンの魚体内中濃度変動

代謝される速度が速く、短時間で代謝され、速やかに体外に排泄されてしまう可能性もある。4.2.1項でも述べた Cheikyula et al (2008) の調査では、マダイの肝臓から水中濃度のクリセシンは10倍程度の濃度で検出されたものの、筋肉からは検出されなかった。また、マコガレイ、ジャワメダカからは両部位からクリセシンは検出されなかった。これらのデータからも、魚はクリセシンを体内に蓄積しにくいと考えられる。一方で、環境省データでは US EPA の BCFBAF による計算値として 3200 という数値が掲げられている（環境省、化学物質の環境リスク評価）。本研究の結果などから考察すると、魚に限って言えば、恐らくこのレベルで蓄積する魚種はかなり限定的だと思われる（無脊椎動物の貝類などはかなり蓄積すると考えられる）。

9日目以降のデータをもとに、個々の BCF を求めるとコイは低濃度区が4~6 L/kg、高濃度区が2~3 L/kg、ヒメダカは低濃度区10~12、高濃度区は4~5であった。コイとヒメダカ間のクリセシンの BCF の差はせいぜい2倍程度であり、フェナントレンと比べるとかなり小さい結果となった。上記環境省のデータなどから QSAR などでは比較的高濃縮性として扱われる可能性もあるが、実際の実験データと QSAR データとの乖離の原因は、QSAR の BCF 判定の有用活用を考えるためにも、今後探求されるべきかもしれない。

#### 4.2.3 チオベンカルブ

コイとヒメダカの低濃度区および高濃度区の暴露期間中のチオベンカルブ濃度変動を図10に示した。

チオベンカルブは上述の2つの PAH とは異なり、その体内変動は暴露開始直後からあまり変動はなかった。コイの低濃度区の BCF は76~123 L/kg、高濃度区は338~61 L/kg であ

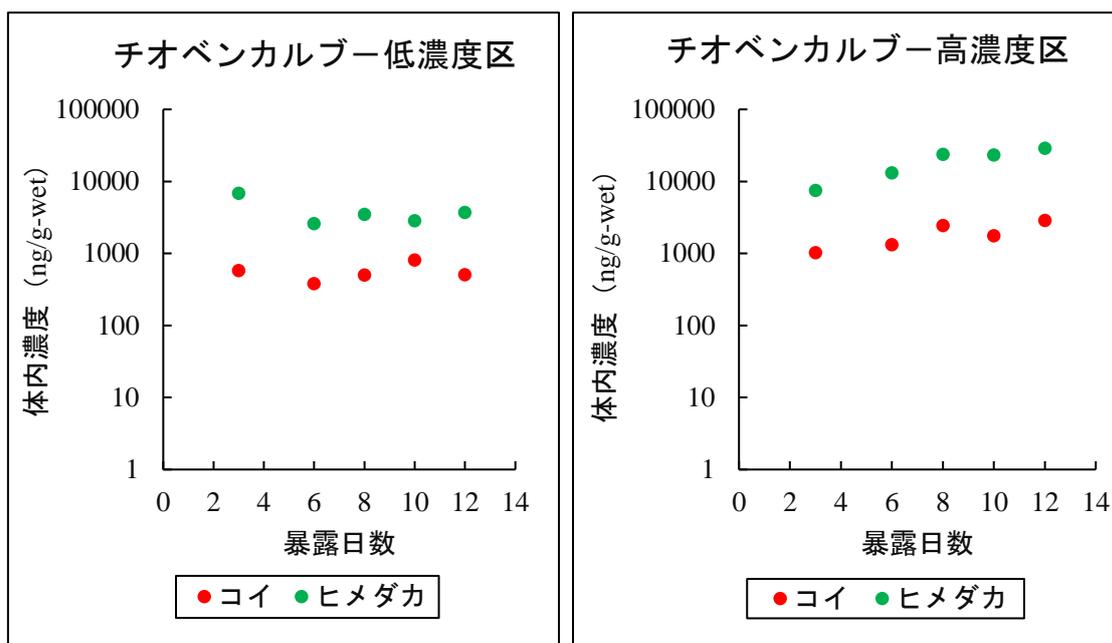


図 10 チオベンカルブの魚体内中濃度変動

った。ヒメダカは低濃度、高濃度両区の最後の3回のサンプリングで平衡状態に達したことが確認され、低濃度区のBCFssは604 L/kg、高濃度区のBCFssは733 L/kgであった。これらの結果からヒメダカはフェナントレンと同様にコイよりもBCFが大きく、その差は5倍～10倍程度であった。

過去のチオベンカルブ蓄積研究においては Kanazawa (1981) がモツゴを流水式水槽で暴露し、そのときのBCFは170としている。また、Tsuda et al (1989) は流水式水槽でコイの部位別の暴露168時間目の濃縮率 (BCFと表記) を調べており、筋肉では25.5 L/kg、肝臓62.7 L/kg、腎臓72.7 L/kg、胆嚢63.3 L/kgと見積もった。個体としてのBCFについては述べられていないため、我々の蓄積試験と単純に比較できないかもしれないが、これらの値は100 L/kgを各臓器で超えることもなく、我々の蓄積試験の濃縮レベルとほぼ変わらなかったのではないかと考えられる。また Tsuda et al (1997) はメダカのBCFも流水式水槽暴露により見積もっており、24時間で231 L/kg、48時間で291 L/kg、96時間で298 L/kgであった。この値は今回の我々のBCFから1/2～1/4程度低いものであったが、それほど大きな相違ではない。Lin et al (1997) はコイ科のコクレンを対象として流水式水槽によりチオベンカルブを14日間暴露した。このときのBCFは1772.1であった。Wany et al (1992) はチオベンカルブを半静止式水槽で様々な魚種に暴露し、そのときのBCFは以下の通りであった。コイ39～58、ティラピア10～24、ドジョウ13.5～31、ソウギョ8.3～12、ウナギ16～18、コクレン375～874。チオベンカルブの水溶解度はフェナントレンやクリセンと比べるとかなり大きいので、半止水式水槽内でも経時的変動は小さい可能性がある。WanyのBCFはLinのものとはかなり差があるものの、コクレンはチオベンカルブをより高濃度で蓄積する傾向が伺えた。Tsudaらや我々のメダカのBCFデータから考えるとヒメダカはチオベンカル

ブをコクレン同様、高濃度で蓄積する魚であると示唆された。一方で Tsuda ら、Wany ら、そして我々の結果から考えるとコイのチオベンカルブの蓄積性はそれほど大きくないと考えられ、ティラピア、ドジョウ、ソウギョ、ウナギといった魚とそれほど変わらない BCF レベルであったといえる。

### 4.3 コイの BCF は多くの魚種を代表するものか～現在の蓄積性研究の問題点

4.2.1～4.2.3 項で、本研究で得られたコイおよびヒメダカの対象物質の BCF、加えてこれらの物質の過去の文献値を比較のために掲げた。多少なりとも BCF に関するデータは過去にあるものの、もう少しデータを重ねなければ、コイの BCF が多くの魚種を代表しているか、判断することは難しい。POPs や重金属など、あきらかに人間を初めとする哺乳類に影響が懸念されている化学物質はその蓄積試験や影響試験が多く実施されているものの、一般化学物質のデータは、その物質が強い毒性を持つか、深刻な汚染が問題になる、普遍的に高濃度で実環境で残留している、などの特殊な事情でもない限り、人々の関心は大きくはなく、結果として単独の蓄積試験は実施されない、というのが実際であろう。そのため、一般化学物質の BCF データは限定的なものしかない、ということがほとんどである。また、上記にいくつかの BCF データを掲げたが、そのほとんどが 1980 年代～1990 年代のものであり、2000 年以降の論文はほとんどないことが分かる。1980 年代頃は急速に FPD や ECD を検出器に持つガスクロマトグラフィーの機器とその測定法が発達した。さらに、1990 年代は GC/MS による測定が必須の分析公定法が環境省で幾つか作られたこともあり、GC/MS が急速に普及した時代である。現在、環境汚染物質に関連した化学分析は LC/MS (/MS) に主役が移りつつあるが、LC/MS は GC/MS に比べるとかなり高額で、独自にこれを所有している大学の研究室はあまり多くないと予想される。結果として、大学の多くの研究室で測定できない物質が多くなった。測定することは必須である蓄積試験において、この事態は少なからず影響しているだろう。

また、2000 年代に入ってから、化学物質の蓄積性のみを扱った研究論文は、インパクトファクターの高い欧文誌にはなかなか受理されない時代になったようで、ほとんど目にするのがなくなった。論文にならない研究では研究費が獲得できないため、結果として日本では流水式水槽を使った蓄積試験を大学の研究室で実施しなくなり、それが実施できる研究室も急速に減少したと感じる。大学は基盤経費があまり付与されない時代になり、論文になりやすい研究を実施して研究費を獲得することに目を向ける研究者がほとんどである。このような状況の中、新たな化学物質の蓄積研究を促すようなトレンドを作り出さない限り、その未来はあまり明るくないかもしれない。

化審法は化学物質影響と蓄積の審査が分かれて行われている。しかし、生物の化学物質影響は、一定の蓄積量を超えて初めて発現する、と毒性学では論じられている。以下、今の行政のあり方では難しいのは重々承知しているが、将来、今のような化審法の形ではなく、水生生物の蓄積と影響はセットで審査するような形ができれば、新たな研究の展開が起こることが期待され、これが新たに化審法を大きく発展させるきっかけになる、と考えている環境汚染研究者は多い。

#### 4.4 人材育成

最近、環境研究に携わる学生、および若い研究者数は明らかに減っている。例えば、令和3年3月に行われる「環境毒性学会第1回オンライン研究発表会」では日本人の大学生、あるいは大学院生の発表は9題しかない。これは今年に限ったわけではなく、ここ数年あまり変化がない。その理由の1つとして、環境研究が職に結びつく、という意識が若者には薄かったり、あるいは、この分野に携わってもあまり魅力がある職が提供されていない、ということの裏返しかもしれない、学生の魅力ある選択肢にはなっていないのが現状である。

我々大学教育に携わる者にとって、学生にまずは環境汚染研究の魅力と重要性、さらには将来の展望と職について、様々なことを講義内などで伝える努力はするが、少なくとも我々の大学ではあまり学生の関心は高くはない。また、4.3項に掲げたような問題点を学生も感じるためか、蓄積試験の卒論・修論テーマを学生に提供しても、それを選ぶ学生は非常に少ない。そこで、本研究で実施する実験全てを我々の研究室の1人の学部生の卒論テーマに据えて、その学生に蓄積試験をおこなうための実験所作、手順、その内容と重要性のレクチャー、といったことを随時行った。これを通して、今のこの分野の人材育成の難しさと将来あるべき展開を考察した。

ここでは化学物質の蓄積試験について従事する（即戦力の）学生を育成する、という観点からその問題点を列挙する。

1. 魚のBCFを求める際には機器分析が必須であるが、魚体中の化学物質の分析は、分析の中でも最も難しいものの1つである。そのため、複雑で繊細な操作を長時間強いられ、かつ、ある程度の化学的な知識を身につける必要がある。これにはかなり多大な時間が必要である。分析法の開発から行った場合、大学レベルの貧弱な分析設備では分析法の開発だけで1年が終了する可能性がある。
2. 上記1の化学分析に加えて、魚の飼育、管理、暴露を実施する必要がある。結果として、生物学のおよび化学的な両アプローチが必須となり、実験量が膨大な量となる。今回、このテーマに取り組んだ卒論生は11月からほぼ土日もなく、ずっと実験室に籠もって実験をしていた。学生にとっては、これは過酷に感じるに違いない。その割に得られる結果は多くない。
3. 2の両方を身につけ、蓄積試験を実施してもなかなか論文発表ができない。この蓄積データの上にさらに影響試験データがあれば論文として耐え得ると思うが、それを学生に告げると、もっと実験量が少なくて論文にできるテーマが多くあるため、そちらを選ぶことがほとんどである。
4. 魚の管理や流水式水槽の管理などで土日も研究室に来る必要が多々生じる。休みがない状況が生じることが多いと、その研究体制を学生は嫌う。また、今回の約2週間の暴露試験を実施した場合、その間は私生活を犠牲にして、実験にのみ従事せざるを得ないくらいやることが多い。
5. GLP機関が有している最新の機械がほとんどの大学にはない。結果として、大学側が大学が有している機器を利用して化学分析の教育をしたとしても、それが就職して役に立

つとは限らない。

他にも色々あると思うが大きな問題点は上記の 5 点であった。講義をするだけではあまり身につくことは多くないため、実際に実験を体験する、ということは必須である。その上で 1~4 の問題点を考えると、大学の研究室で 1 年限定で生物濃縮試験を卒論テーマにする、というのは現実的にはかなり勇気がいる。下手をすれば何も結果を出すことができずに、卒業する学生も多く出ることが懸念される。また、高額機器を学生に扱わせることができる大学は限定される。また、これを購入することができるような研究公募は、我々が従事する化学物質のリスク管理分野や環境汚染研究分野では実際にほとんどないのが現状である。

上記に掲げた種々の問題の明瞭な解決法は見い出せない。1~4 については GLP 機関と人材育成プログラムなどを作り、大学と GLP 機関を行き来して、効率良く実験をするような体制を作り、それを通して 1 年間蓄積研究などに携わらせるようなシステムを作ると解決されるかもしれない。実際に GLP 機関で実験に従事する時間を有することは将来の就職も意識できる。しかし、実験の性質上、短期間のインターンシップなどではあまり意味がなく、それなりに覚悟を決めて、数ヶ月にわたる GLP 機関の協力が必要となるだろう。また、5 については省庁などにそのような研究公募を増やして頂くことや、ある程度人材育成を目論んだ高額機器購入もできるような人材育成資金などの創生などを期待したい。いずれにしても短期間で結論が出る話ではない。莫大な金がかかることも否めない。それをどれくらい本気でやるべきか、実際、大学にいる限りはあまり分からないのも事実である。産官と学の間の認識のこの溝も問題なのかもしれないが、大学には期待に応えるためのものの全てがあまりにも何も無いのが現状かもしれない。

来年度以降も、卒論生の希望も取りつつ、角度を変えながら将来、化学物質評価や環境研究に携わる人材育成のあり方を模索していく予定である。

## 5. 魚類の化学物質蓄積に関する今後の課題と実施すべきテーマ

本研究では、化審法の蓄積性の審査で広く用いられているコイの化学物質蓄積性について、その魚種間差を調べることを目的とした。今回はほぼ同じ実験系でヒメダカにも同時に暴露試験を行って BCF を比較したが、コイの BCF はヒメダカと比べると 5~10 倍程度低いことが明らかとなった。実験開始前には、薬物代謝を担う肝臓が、肝臓という形になっていて、肝臓が独立して備わっているヒメダカのような魚種よりもその代謝・排泄能力が劣り、化学物質がコイの方が濃縮されるのではないかと予測していた。しかし、本研究では、その予想とは全く逆の結果になった。

本件結果を受けて、今後課題となる事項を列挙する。

### ①コイの蓄積性は多くの水生生物を代表するものか

コイの化学物質蓄積性は他の水生生物と比較して、中心的な位置にあるのか否かを知ることが、今後、さらに厳格な化学物質管理を行う上で非常に重要なことだと考えている。化審法の将来のあり方はここでは他に譲るが、それにしても化審法で数多く蓄積したコイの蓄積データの位置づけは現状、良く分からない。一部海外のデータなどではブルーギルなどを用いた試験などを見ることがあるが、このような他魚種の蓄積性データをコイと横並びにして見て良いかは現状判断できる専門家は皆無ではないだろうか。

上述したが、POPs や重金属を除き、多くの水生生物に対する、実験室内で得られた化学物質蓄積性データは一般的にそれほど多くない。また、流水式水槽の使用は様々な点で労力とコストがかかるため、さらに限定的になり、特に 2000 年以降は蓄積性に関する学術論文も激減している。論文に関しては影響データを合わせる、蓄積・排泄メカニズムまで探求する、などを最近では求められることが多いが、学術論文に受け入れられる内容は、時代ごとに異なるため、蓄積性データだけで昔のように投稿できなくなった現状は仕方がないととらえるしかない。

人材育成と継続的な技術者の確保、という点を度外視すれば、特に大学などがこのような試験をする必要はないと思われる。それこそ GLP 機関には設備とノウハウがあるため、これら機関で実施できるような体制作りを経済産業省主導で行い、多くの水生生物種の蓄積データを集めるシステム作りをしていけば、コイの蓄積性の位置づけの判断は容易であるかもしれない。また、継続的に既存化学物質の蓄積性の判断などもエキスパートジャッジして、新たな化学物質管理なども行っていければ良いのかもしれない。

### ②蓄積性の魚種間差を生む要因は何か

本研究で示した通り、コイとヒメダカの化学物質蓄積性は 5~10 倍程度の差があるケースが多いと予想された。蓄積性について、ある程度種間差の有無のデータを構築した後は、その種間差を生じる要因を追うべきである。その要因を理解しないと、全ての生物について蓄積性を調べないと何も判断できない事態に陥りかねない。

魚を例に取って考えると、体内に取り込まれた化学物質は、酸化→還元という薬物代謝を受けて、その後、胆嚢に運ばれて体外に排泄される。よって、この酸化→還元の薬物代謝システムの能力がより優れた魚種が速やかに体外に化学物質を排泄できると考えられている。しかし、薬物代謝能力の魚種間差とそれを作用する決定的要因を探求した研究例は魚類については最近ほとんどない。実は、2000年以前までは比較的多く行われていたのだが、今、これらに関する論文を読んでもその内容の古さは否めず、今の時代では通用しない内容のものも多い。最近、特に遺伝子などを利用した技術が発達したため、現在の方が遙かに高度なデータをもとに、詳細に薬物代謝メカニズムが明らかにできる可能性が高い。実際、医薬品分野を中心に、哺乳類の薬物動態学、代謝学はかなり発展している。魚類についても今後、哺乳類で用いているような手法を用いた発展的な研究が展開されることが期待される。

他、蓄積性を左右する要因としては、魚の体積（体重）あたりの呼吸量の種間差は蓄積差になり得る。また、古くから知られているように脂質には疎水性が強い物質を中心に吸着、残留性が高いため、脂質含量の種間差が蓄積性種間差と直結すると考えられている。ただし、これには例外的な物質も多くある。これらと蓄積性種間差との関連性を明らかにするのはかなり難しく、もし、取り組んだとしても時間がかかるかもしれない。

最後に生息環境も蓄積性を左右する要因となり得る。特に海産魚と淡水魚ではその蓄積性に大きな差が生じる可能性があると考えている研究者が多い。淡水魚は体の中のミネラル成分濃度がその魚が暮らす周囲の水よりも高いため、物理的な浸透圧に応じた移動が起こり、皮膚を通じて大量の水が体内に入り込む。そのままと魚の恒常性を維持するために蓄えられている様々な生化学的な成分が希釈されるため、淡水魚は大量の薄い尿を常時排泄して、体内の浸透圧維持を行っている。一方、海産魚は海水の方が体内よりもミネラル濃度が高いため、体からどんどん水が排出されてしまう。そのため、海産魚は大量の水を飲み、同時に体内に入ってしまう海水中の必要ないミネラル分を凝集し尿として排出する。しかし、淡水魚のように大量の尿を排泄するとせっかく取り入れた水分も失ってしまうため、濃い尿をごく少量排泄することが知られている。このような浸透圧維持のメカニズムの違いは生息域の水に同じような濃度で化学物質が溶存していたとしても、その蓄積濃度が淡水、海水魚間では大きく異なる要因と成り得る。水生生物は陸上動物にはない、独特な生理機構のもと、水環境中で生活している。その機構も種によって大きく異なり、特徴的なものも多い。水生生物がこのような特殊な生物だからこそ、生理的機能と化学物質蓄積性の関係も今後、探求されるべき1つのテーマだと考えられる。これらのことが分かれば、将来、蓄積性を判断する上で、QSARなどが広く利用されるきっかけにもなるかもしれない。

他にも多く、生物種間差を左右する要因はあると思われるが、今後はこのような点にも目を向けて、将来、効率良く化学物質の蓄積性が判断できることが望ましいと考える。

## 6. 参考文献

Añasco, N., Uno, S., Koyama, J., Matsuoka, T., Kuwahara, N. Assessment of pesticide residues in freshwater areas affected by rice paddy effluents in southern Japan. *Environ. Monit. Assess.* 2010. 160. 371-383.

Cheikyula, J. O., Koyama, J., Uno, S. Comparative study of bioconcentration and EROD activity induction in the Japanese flounder, red sea bream, and Java medaka exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* 2008. 23. 354-362.

環境省環境管理局水環境部企画課. 要調査項目等調査マニュアル (水質、底質、水生生物). 平成 15 年.

環境省環境リスク評価室. 化学物質の環境リスク評価 第 9 巻. [5] クリセン. 平成 23 年.

Jonsson, G., Bechmann, R. K., Bamber, S. D., Baussant. Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater *Environ. Toxicol. Chem.* 2004. 23. 1538-1548.

Kanazawa, J. Measurement of the bioconcentration factors of pesticides by freshwater fish and their correlation with physicochemical properties or acute toxicities. *Pest. Sci.* 1981. 12. 417-424.

Lin, K. H., Yen, J. H., Wang, Y. S. Accumulation and elimination kinetics of herbicides butachlor, thiobencarb and chlomethoxyfen by *Aristichthys nobilis*. *Pestic. Sci.* 1997. 49. 178-184.

Petersen, G. I., Kristensen, K. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998. 17. 1385-1395.

Tsuda, T., Aoki, S., Kojima, M., Harada, H. Bioconcentration and excretion of benthocarb and simetryne by carp. *Water Res.* 1989. 23. 529-531.

Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A., Aoki, S. Acute toxicity, accumulation, and excretion of benthocarb and its degradation products in Killifish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1997. 58. 603-610.

Uno S., Shiraishi H., Hatakeyama S., Otsuki, A. Uptake and depuration kinetics and BCFs several pesticides in three species of shellfish (*Corbicula leana*, *Corbicula japonica*, and *Cipangopludina chinensis*): Comparison between field and laboratory experiment. *Aquat. Toxicol.* 1997. 39. 23-43.

Uno, S., Koyama, J., Kokushi, E., Monteclaro, H., Santander, S., Cheikyula, J. O., Miki, S., Añasco, N., Pahila, I. G., Taberna Jr., H. S., Matsuoka, T. Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after one month from Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines. *Environ. Monit. Assess.* 2010. 165. 501-515.

Uno, S., Kokushi, E., Añasco, N. C., Iwai, T., Ito, K., Koyama, J. Oil spill off the coast of Guimaras island, Philippines: distributions and changes of polycyclic aromatic hydrocarbons in shellfish. *Mar. Pollut. Bull.* 2017. 124. 962-973.

Wany, Y. S., Jaw, C. G., Tang, H. C., Lin, T. S., Chen, Y. L. Accumulation and release of herbicides butachlor, thiobencarb, and chlomethoxyfen by fish, clam, and shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1992. 48. 474-480.