

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「呼吸活性を阻害する被験物質の濃度が
生分解性試験と QSAR 予測信頼性に与える影響の調査」

報告書(公表用)

令和3年3月

静岡大学大学院 総合科学技術研究科

調査課題名:呼吸活性を阻害する被験物質の濃度が生分解性試験と QSAR 予測信頼性に与える影響の調査

研究代表者:金原 和秀

職名:教授

所属:静岡大学大学院 総合科学技術研究科

所属機関住所:〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

調査体制:

調査代表者	金原和秀 静岡大学大学院工学領域 教授	分解対象物の選定と呼吸阻害の評価
実施者	武田和宏 静岡大学大学院工学領域 准教授	分解性データの QSAR への導入と解析
	新谷政己 静岡大学大学院工学領域 准教授	呼吸阻害の濃度依存性の評価

(共同研究)	櫻谷祐企 製品評価技術基盤機構 主査	QSAR による分解性の予測
	竹内健祐 製品評価技術基盤機構	分解対象物の選定

(外注先)	茅島孝和 化学物質評価研究機構 課長	生分解性の変化の評価
	吉田智彦 化学物質評価研究機構 課長	中間代謝産物の解析
	鍋岡良介 化学物質評価研究機構 副長	生分解性試験の実施

1. はじめに

化学品の開発や化学物質管理において、生分解性の評価は重要な指標の一つである。良分解性と判断されると、法第4条第1項第5号に該当すると判定され、第1種特定化学物質に該当しない物質となり、産業利用に特に重要である。現状では、OECDテストガイドライン301Cに基づく生物化学的酸素要求量(BOD)を指標として生分解性を評価している。しかし、汚泥中の微生物の呼吸活性が301Cの規定する被験物質濃度100 mg/Lで阻害を受ける場合、当該物質は生分解されない物質として評価されてしまう、という問題点を持つ。

現在、新規化学物質は多種多様になっており、複雑かつ特殊な構造になる傾向にある。その中には、活性汚泥中の微生物の呼吸活性を阻害する物質も含まれ、301C適用の可否も含めて今後検討が必要である。申請者は、これまでの調査研究で、現状の301Cでは生分解性を評価できない物質を、微生物の生命活動に伴って生成するRNA量を指標として迅速に検出・計測する手法の開発に成功した。

近年化審法にTG301Fが導入され、阻害がある場合、初期濃度を30 mg/Lとすることが可能である。しかし、その科学的根拠は乏しい。そこで本調査では、濃度変化による分解性の変化と変化物の生成に与える影響を明らかにし、生分解性試験に対する濃度依存性と、QSAR適用に対する考え方の指標となるデータを取得する。最終的には、TG301Fの適用を推進する基礎データを取得することで、化学物質の判定の合理化につなげることを目的として行う。

2. 分解対象物の選定と QSAR による分解性の予測

分解対象物を選定するにあたり、以下の条件に該当する物質を選定した。

- ① NITE にて OECD TG301C 試験結果を保有している物質 (4276 物質)
- ② TG301C 以外の OECD TG 易生分解性試験結果が存在する物質
- ③ TG301C で難分解性であり、かつその他の易生分解性試験で易生分解性の結果が得られている物質
- ④ OECD TG209、ISO8192、European Union method C.11、US Environmental Protection Agency OPPTS 850.6800 などの微生物毒性試験の結果がある物質

なお、選定に当たっては、QSAR ソフトウェアでの計算精度が悪い構造群から優先的に選定作業を実施中した。特に精度が悪く、微生物への毒性が予想される多級アミンについてまずは検討した。

次にイミダゾール系、ピリジン系を検討し、表2. 1に示すフェノール系を詳細に検討した。検討結果は以下の通りである。

- ・ピリジン系は毒性があるか疑問であるという結果となった。3789 のアルデヒドは毒性がある可能性はあるが、濃度による可能性も考えられた。
- ・アミン系は毒性がある可能性は少ないと考えられた。また、10 mg/L などの低濃度は、分析が難しい。4 級アミンは分解が難しいことが知られている。また、窒素含有の物質で分解性悪くなるのは、分解産物による影響もあり、その見極めが難しいと思われた。
- ・濃度により分解性が異なるのは、毒性なのか？単に分解速度が遅いためなのか？判別するのは難しいと思われた。
- ・リン酸エステル系は一般的に毒性が認められない。
- ・イミダゾールは毒性があり、分解性が低いと思われる。差が認められる可能性もあるが、濃度が低いと変化物を追うのは難しいことが考えられた。イミダゾールの類似物がデータベースにあるか探す方向で検索した。
- ・ECHA などのデータベースにリスト化されている物質の情報の中に、毒性があるという情報があるのか？ある場合、毒性が認められる物質で、低濃度で分解可能な物質から選定するという方向性も考えられた。微生物毒性試験として、OECD TG209、ISO8192、European Union method C.11、US Environmental Protection Agency OPPTS 850.6800 などがあり、その毒性試験の結果があるものについても検討した。
- ・OECD TG301 では、EC50 が 300mg/l を超える物質は毒性影響が出る可能性が低いこと、また、EC50 が 20 mg/l 未満だと分解度試験が困難とされていることから、 $20 < EC50 < 300$ の物質を確認したところ、物質 No.2993 が該当していた。

また、追加で、以下の条件に該当する物質をピックアップすると、

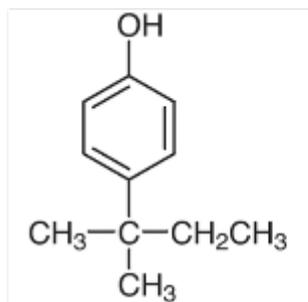
- ① NITE 保有のデータで BOD 分解度が 0 以下
- ② ECHA に良分解の 301 試験結果がある
- ③ 毒性試験結果があり、 $20 < EC50 < 300$ の物質

①～③すべてに該当する物質は6物質、1と2にのみ該当する物質は9物質だった。
 ・基礎呼吸が低くなるもの、例えば「汚泥のみと比較して、対象物質があるとマイナスになるもの」の
 場合は、呼吸阻害があると考えられることから、NITE 保有データでBOD 分解度が0以下のものを選定した。

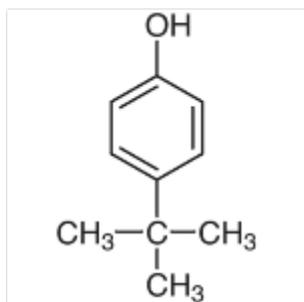
表2.1 毒性試験の情報がある物質-フェノール系-
 (リンクは本文に付属する添付図参照)

CAS	NAME	SMILES	301C実測値	試験法 (301C以外)	試験濃度 (分解度)	URI	毒性試験法
89-83-8	チモール 941	 <chem>CC(C)(C=CC(C)=C1)=C1</chem>	0 (30mg/Lで分解する結果がある)	301D	0.8, 2.4 61, 57	https://ec	TG209
89-72-5	2-sec-ブチルフェノール 1038	 <chem>Oc1ccccc1C(C)CC</chem>	0(良分解性)	301D	1.5, 3	63 https://ec	TG209
80-46-6	4-t-アミルフェノール 1368	 <chem>OC1=CC=C(C(C)(CC)C)C=C1</chem>	0	301B	20	73 https://ec	n
98-54-4	4-t-ブチルフェノール https://wv	 <chem>CC(C)(C)C1=CC=C(O)C=C1</chem>	0	301F	13.8, 25.1 60, 42	https://ec	TG209
585-34-2	https://wv	 <chem>CC(C)(C)C1=CC(O)=CC=C1</chem>	0	-			-
88-18-6	https://wv	 <chem>CC(C)(C)C1=C(O)C=C(C)C=C1</chem>	-4	EU Method C.4-A	9.59	98 https://echa.europa.eu	

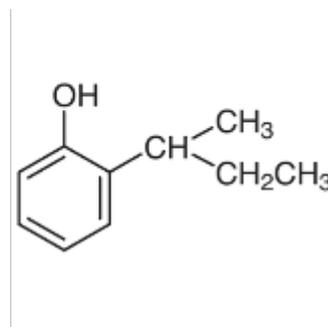
・イミダゾール系、ピリジン系、毒性が認められているフェノール系の物質を購入して、予備的に増殖を検討した結果、以下の物質を検討候補とした。



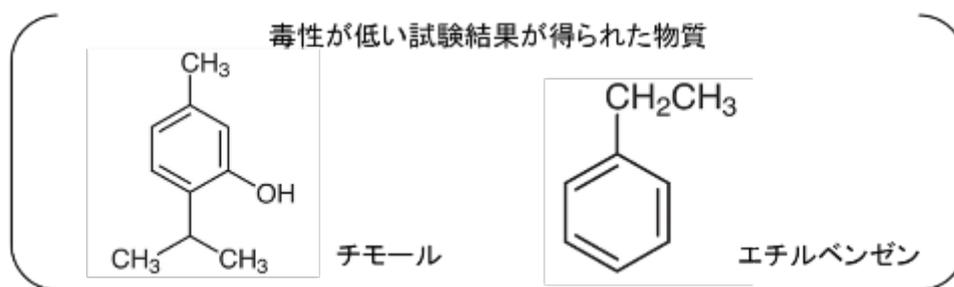
4-t-アミルフェノール



4-t-ブチルフェノール



2-sec-ブチルフェノール



3. 対象物質の微生物細胞に対する呼吸阻害の濃度依存性の評価

3.1 測定方法の確立

3.1.1 材料と方法

<使用材料・機器>

実験に使用した試薬は全て市販品特級を使用し、特に記載のない限りはそのまま使用した。

- ・吸光度計: Shimadzu 製 UV-1800
- ・プレートリーダー: Molecular Devices 製 SpectraMax i3x

3.1.2 使用菌株

増殖測定には、*Pseudomonas putida* KT2440 株を用いた。-80℃で凍結保存したストック LB 寒天培地に塗布し、増殖したコロニーを使用した。前培養は 1/3 に希釈した LB (1/3LB) 液体培地にコロニーを植菌した。本培養は、50 mL の 1/3LB 液体培地が入った 200 mL の三角フラスコに 0.1% シードで植菌した。150rpm、30℃で振盪培養を行った。培地の組成を表 3. 1 に示す。

表 3. 1 希釈 LB 培地の組成

	LB	1/3LB
バクトトリプトン [g/L]	10	3.3
酵母エキス [g/L]	5	1.7
NaCl [g/L]	5	5

3.1.3 増殖の測定

増殖試験の予備実験を行った結果、以下の測定法を採用した。

- 0h 本培養開始 50 mL の 1/3LB 液体培地 0.1%植菌
↓
2.5hr OD 測定後、各種物質添加
↓
4.5, 6.0, 9.0hr OD 測定
↓
12hr OD 測定後、10 mL を 50 mL 容三角フラスコに分注し静置
↓
26hr OD 測定、ヨウ化プロピジウム(PI)で死菌を染色し菌数測定

3.1.4 ThT の測定

培養液 4 mL から集菌 12000 rpm 1 min

- ↓
PBS で 1 回洗浄 12000 rpm 1 min
↓

菌体の湿重量を計測

↓

2.3 mg の菌体当たり、600 μ L PBS (25 μ M ThT 入り) で懸濁

↓

希釈系列の作製

↓

室温で 5~15 分静置

↓

プレートリーダーで測定 励起波長 438 nm 蛍光波長 450-650 nm

3. 1. 4 呼吸阻害試験

0h 本培養開始 50 mL の 1/3LB 液体培地 0.1%植菌

↓

2.5hr OD 測定後、各種物質添加

↓

4.5, 6.0, 9.0hr OD 測定

↓

12hr OD 測定後、10 mL を 50 mL 容三角フラスコに分注し静置

↓

26hr OD 測定、DAPI で生菌を、CTC 染色で呼吸活性を計測

3. 1. 5 初期濃度の違いによる生分解性の変化と中間代謝産物の解析

< OECD テストガイドライン 301F のプレテストの培養条件 >

以下の条件で、プレテストを実施した。

試験系	試験懸濁液						植種源ブランク
	4-tert-アミルフェノール		4-tert-ブチルフェノール		2-sec-ブチルフェノール		
被験物質	4-tert-アミルフェノール		4-tert-ブチルフェノール		2-sec-ブチルフェノール		—
被験物質濃度	100 mg/L	30 mg/L	100 mg/L	30 mg/L	100 mg/L	30 mg/L	—
連数	2	2	2	2	2	2	1
植種源	福岡県久留米市の下水処理場の好気性反応槽汚泥						
植種源濃度	30 mg/L						
培養温度	22°C±1°C						
培養期間	28日間						

3. 2 基礎データの収集

標準化に必要なデータを収集するため、抗生物質ならびに微生物に対する呼吸活性阻害が確認されている 3,5-dichlorophenol (3,5-DCP) を添加してその影響を解析した。

3. 2. 1 抗生物質クロラムフェニコール (Cm) の影響

Cm は抗生物質の一つで、タンパク質合成阻害剤として用いられる。 *P. putida* に作用することが確認されているため、100 mg/L 添加時の増殖と蛍光の変化を観察した。

3. 2. 2 抗生物質リファンピシン (Rif) による大腸菌への影響

Rif は抗生物質の一つで、RNA 合成阻害剤として用いられている。本研究で蛍光発光のターゲットとしている mRNA 量の変動が、蛍光量に与える変化を観察した。30 mg/L の Rif を添加し測定した。

3. 2. 3 毒性物質 3,5-ジクロロフェノール (3,5-DCP) による大腸菌への影響

3,5-DCP は一般毒性物質の一つで、毒性試験の標準毒性物質として用いられる。大腸菌に作用することが確認されているが、 *Pseudomonas putida* への影響は知られていない。そこで、100 mg/L の 3,5-DCP を添加し増殖を測定した。

3.3 基礎データの収集—結果と考察

抗生物質 Cm, Rif を用いて、増殖と ThT の傾向の関係を調べたところ、Cm では増殖が低下、Rif では増殖が停止したにもかかわらず、ThT に由来する蛍光は、増殖との相関が認められなかった。ThT の蛍光強度は、mRNA の生成量と相関があることが報告されているが、同時に増殖のステージによって蛍光強度が大きく異なることも報告されている。このことから、抗生物質の影響による増殖ステージの違いが、ThT の蛍光強度に大きく影響を及ぼしたものと考えられた。従って ThT の蛍光強度により評価するには、同じ増殖状態の菌体を用いて毒性物質を同時に入れ、蛍光強度の変化を計測する方法が考えられた。

抗生物質ならびに呼吸阻害物質を添加して増殖を比較した結果を図3.1に示す。呼吸阻害剤である3,5-ジクロロフェノール(3,5-DCP)を添加すると、Rifと同様に増殖が停止してことから、増殖試験により、阻害活性を検出することが可能であると考えられた。Cmで増殖が低下したのは、Cmにはタンパク質合成を阻害する働きがあるため、微生物のタンパク質合成が低下して、mRNA合成が停止し、増殖が低下したものと考えられた。Rifの場合はmRNA合成を阻害する働きがあるため、Rifを入れた直後からmRNA合成が停止して、速やかに増殖が呈したからであると考えられた。3,5-ジクロロフェノールには強い呼吸活性を阻害する効果が報告されていることから、Rifと同様な結果が得られたと考えられた。

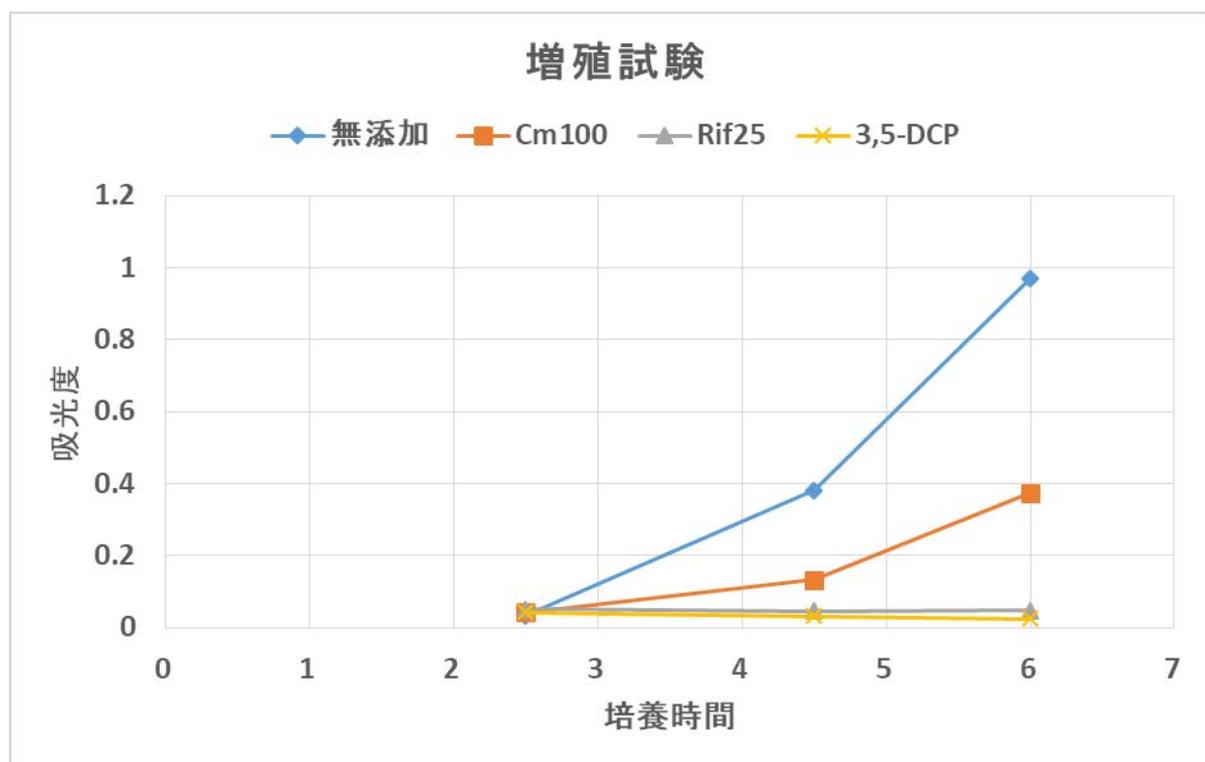
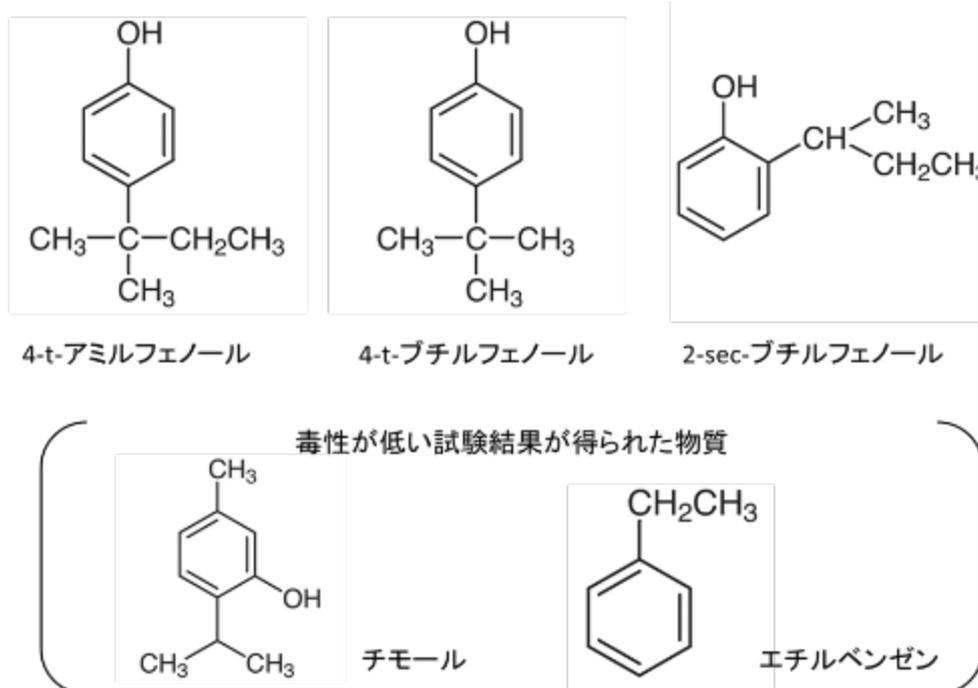


図3.1 抗生物質・呼吸阻害物質の添加による増殖の比較

3. 4 増殖ならびに呼吸阻害の濃度依存性の評価の結果と考察

3. 4. 1 増殖試験



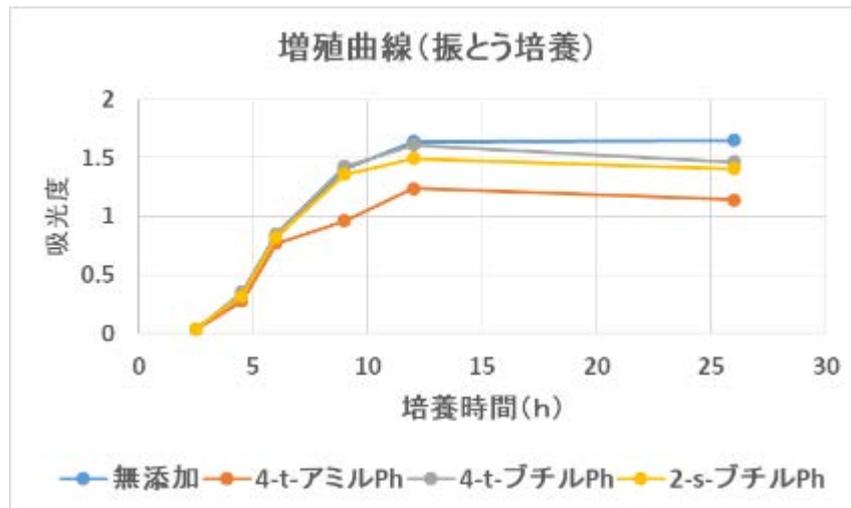
上記の物質に関して影響を解析した。

増殖試験の結果、チモールとエチルベンゼンは増殖阻害が認められなかった。

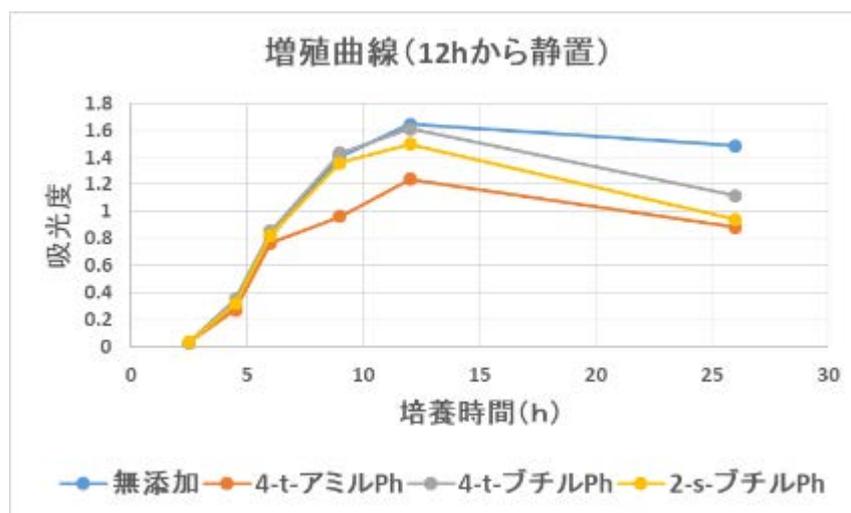
4-t-アミルフェノール、4-t-ブチルフェノール、2-sec-ブチルフェノールを基質とした増殖と相対死菌数の比較を図3. 2に示す。4-t-アミルフェノールは添加6時間後から増殖への影響が観察された。また、26 時間後の相対死菌数は、無添加と比較して 10 倍という結果であった。4-t-ブチルフェノールと 2-sec-ブチルフェノールについては、強い増殖への影響は認められなかった。

しかし、12 時間後から振とうしないで静置培養した系では、4-t-ブチルフェノールと 2-sec-ブチルフェノールでの増殖の低下と相対死菌数の増加が観察された。この原因に関しては不明であるが、静置培養による酸素供給の不足が、添加した物質の分解性に影響を与え、分解産物が毒性を示した結果であると推察された。

以上の結果から 4-t-アミルフェノールを対象として、呼吸阻害の濃度依存性の評価を行うことにした。



	無添加	4-t-アミル Ph	4-t-ブチル Ph	2-s-ブチル Ph
相対死菌数	1	10	1	1.5

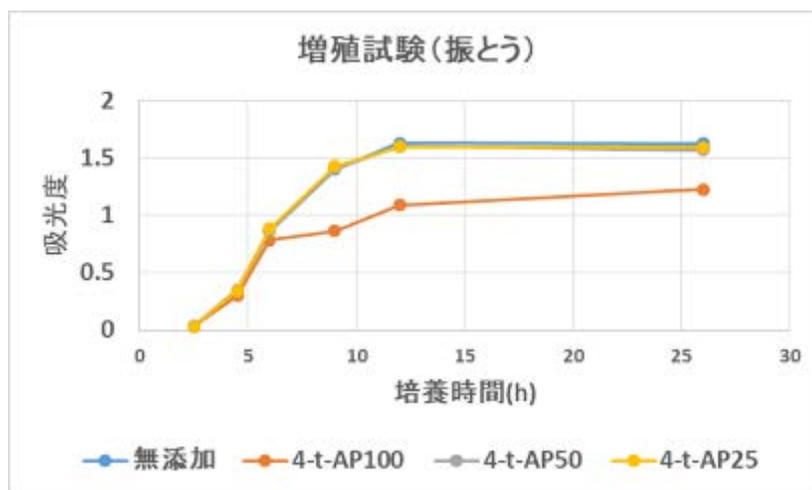


	無添加	4-t-アミル Ph	4-t-ブチル Ph	2-s-ブチル Ph
相対死菌数	1	18	15	17

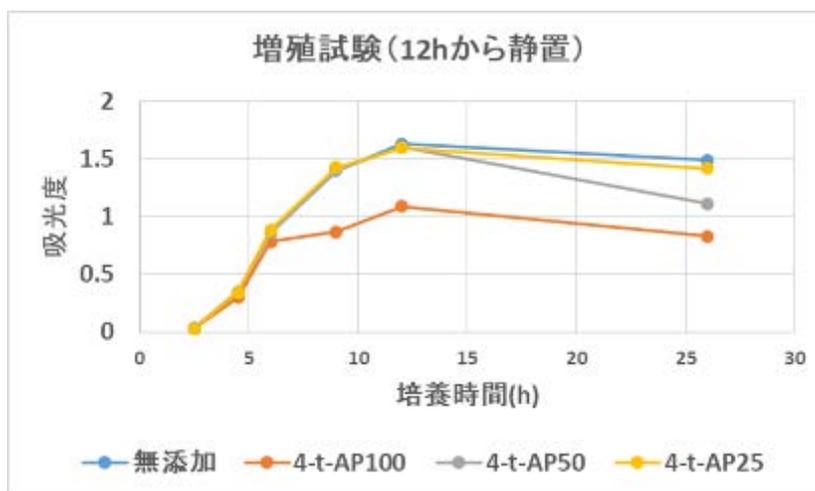
図3. 2 増殖と相対死菌数の比較

3. 4. 2 呼吸阻害の濃度依存性の評価

4-t-アミルフェノールの濃度を 25, 50, 100 mg/L として、呼吸阻害の濃度依存性を評価した。増殖の経時変化と相対呼吸活性の変動を図3. 3に示す。100 mg/L では増殖阻害と呼吸活性の低下が認められたが、50, 25 mg/L では阻害は認められなかった。また、12 時間後に振とう停止し、酸素供給の悪い条件にしたところ呼吸活性の低下と、濃度依存性が認められたことから、中間代謝産物による阻害の可能性が考えられた。



基質	無添加	4-t-アミルPh		
濃度(mg/L)		100	50	25
相対呼吸活性	1.0	0.3	1.0	0.9



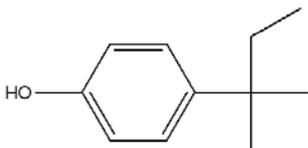
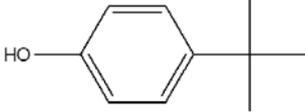
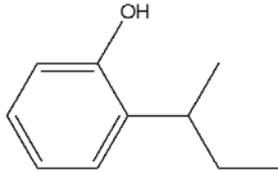
基質	無添加	4-t-アミルPh		
濃度(mg/L)		100	50	25
相対呼吸活性	0.8	0.2	0.4	0.7

図3. 3 増殖と呼吸活性の比較

3. 4. 3 初期濃度の違いによる生分解性の変化と中間代謝産物の解析

< OECD テストガイドライン 301F の予備試験 >

増殖と呼吸阻害試験の結果を基に、下記の 3 物質を対象に、閉鎖呼吸系(オキシメーター)を用いて予備試験を行った。

名 称	4- <i>tert</i> -アミルフェノール	4- <i>tert</i> -ブチルフェノール	2- <i>sec</i> -ブチルフェノール
CAS 番号	80-46-6	98-54-4	89-72-5
構造式			
分子式	C ₁₁ H ₁₆ O	C ₁₀ H ₁₄ O	C ₁₀ H ₁₄ O
分子量	164.25	150.22	150.22
理論的酸素 要求量	2.83 mgO ₂ /mg	2.77 mgO ₂ /mg	2.77 mgO ₂ /mg
純 度	99.7%	99.9%	98.0%
購入先	東京化成工業株式会社	東京化成工業株式会社	東京化成工業株式会社
ロット番号	FP6EH	HOUWM	XKJ5G
微生物阻害性	<i>Tetrahymena thermophila</i> に対する 24 時間ばく露後の半数影響濃度は 4.5 mg/L	100 mg/L での 3 時間ばく露後の活性汚泥に対する呼吸阻害率は 56% ^{*3}	100 mg/L での 3 時間ばく露後の活性汚泥に対する呼吸阻害率は 78% ^{*3}

3 物質ともに 100 mg/L ではほぼ生分解されなかった。ただし、2-*sec*-ブチルフェノールは 2 点中 1 点で生分解された。

30 mg/L では 4-*tert*-ブチルフェノール及び 2-*sec*-ブチルフェノールが顕著に生分解された。4-*tert*-ブチルフェノールが最も生分解しており、生分解の開始は培養 7 日目付近で、最終的な分解度は約 80%に達した。

予備試験の結果、100 mg/L と 30 mg/L の濃度差が比較的明確であった 4-*tert*-ブチルフェノールを本試験の被験物質に選定した。

< OECD テストガイドライン 301F の本培養条件 >

プレテストの結果を踏まえ、4-*tert*-ブチルフェノールを対象物質として、以下の条件で本培養を行うこととした。

試験系	試験懸濁液		操作ブランク	植種源ブランク
被験物質	4- <i>tert</i> -ブチルフェノール		安息香酸Na	—
被験物質濃度	100 mg/L	30 mg/L	100 mg/L	—
連数	4(3)	4(3)	1(0)	3(2)
	括弧内に示した試験容器は適宜容器を開けて、試験液を一部分取し、機器分析に供する。試験懸濁液、操作ブランク、植種源ブランクの各1点は28日間、容器を開けることなく培養する。			
植種源	福岡県久留米市の下水処理場の好気性反応槽汚泥			
植種源濃度	30 mg/L			
培養温度	22°C ± 1°C			
培養期間	28日間			
サンプリングのタイミング	8日目ごろ(分解度約30%)、10日目ごろ(分解度約50%)、14日目ごろ(分解度約70%) (試験液を数mL分取してマイナス20°Cの冷凍庫で一時的保管)			
分析	培養14～15日目ごろに被験物質の定量分析(HPLC-PDA)及び変化物の定性分析(LC-MS) (操作ブランクは実施しない)			

3.5 301F 試験の結果と考察

3.5.1 予備試験結果

予備試験におけるBOD分解度の結果を表3.2に示す。なお、(汚泥+被験物質)系の試験液2点の内1点は被験物質分析を実施するため、培養22日後にBOD測定を中断した。

予備試験条件下において、4-*tert*-アミルフェノールは100 mg/L及び30 mg/Lのいずれの試験液においても生分解は認められなかった。4-*tert*-ブチルフェノールは100 mg/Lの試験液では生分解は認められなかったが、30 mg/Lの試験液では生分解が認められた。2-*sec*-ブチルフェノールは100 mg/Lの試験液2点の内1点で生分解が認められ、30 mg/Lの試験液では生分解が認められた。以上の結果を踏まえ、100 mg/Lと30 mg/Lの濃度差が比較的明確であった4-*tert*-ブチルフェノールを本試験の被験物質に選定した。

培養期間中のBOD分解度曲線は、それぞれ図3.4～図3.6に示す。

表3. 2 予備試験におけるBOD 分解度

		(汚泥+被験物質)系	
		1	2
培養 22 日後の被験物質分解度			
4- <i>tert</i> -アミルフェノール 被験物質分解度 (%)	100 mg/L	-6	-
	30 mg/L	-13	-
4- <i>tert</i> -ブチルフェノール 被験物質分解度 (%)	100 mg/L	8	-
	30 mg/L	100	-
2- <i>sec</i> -ブチルフェノール 被験物質分解度 (%)	100 mg/L	100	-
	30 mg/L	100	-
培養 28 日後の BOD 分解度			
4- <i>tert</i> -アミルフェノール BOD 分解度 (%)	100 mg/L	-	-5
	30 mg/L	-	-18
4- <i>tert</i> -ブチルフェノール BOD 分解度 (%)	100 mg/L	-	-5
	30 mg/L	-	87
2- <i>sec</i> -ブチルフェノール BOD 分解度 (%)	100 mg/L	-	-4
	30 mg/L	-	69

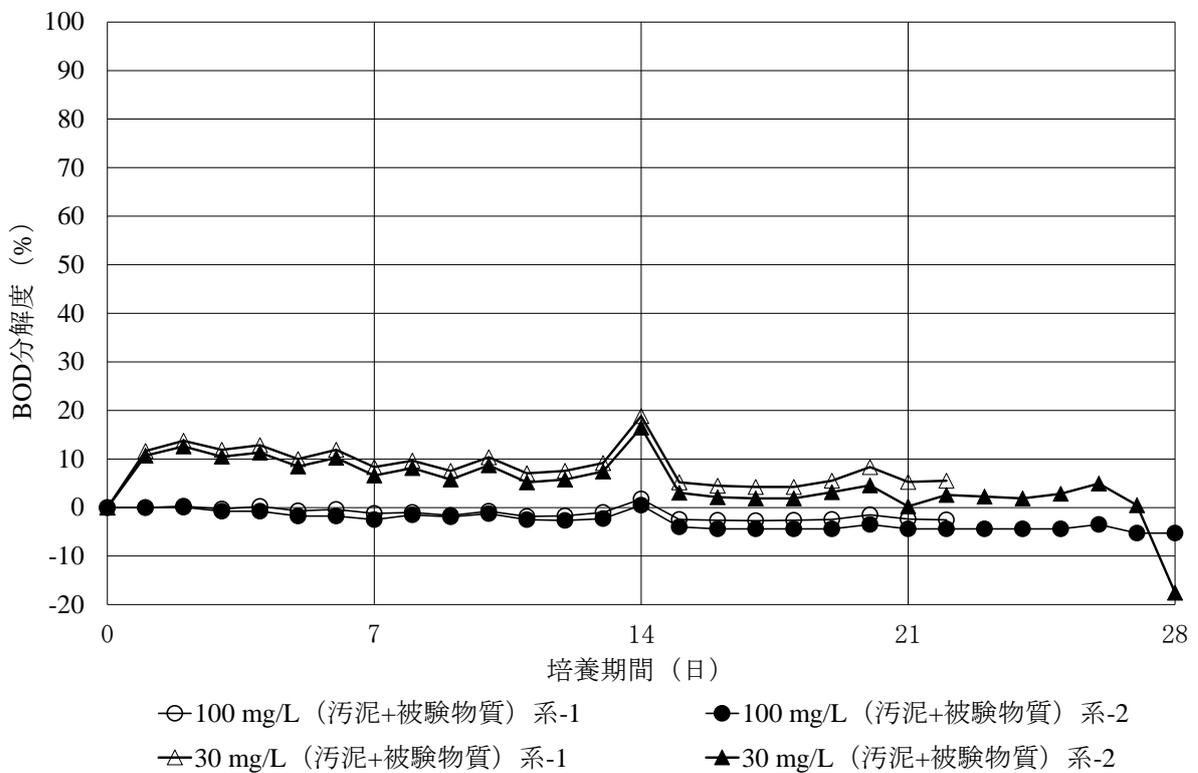


図3. 4 予備試験におけるBOD 分解度曲線(4-*tert*-アミルフェノール)

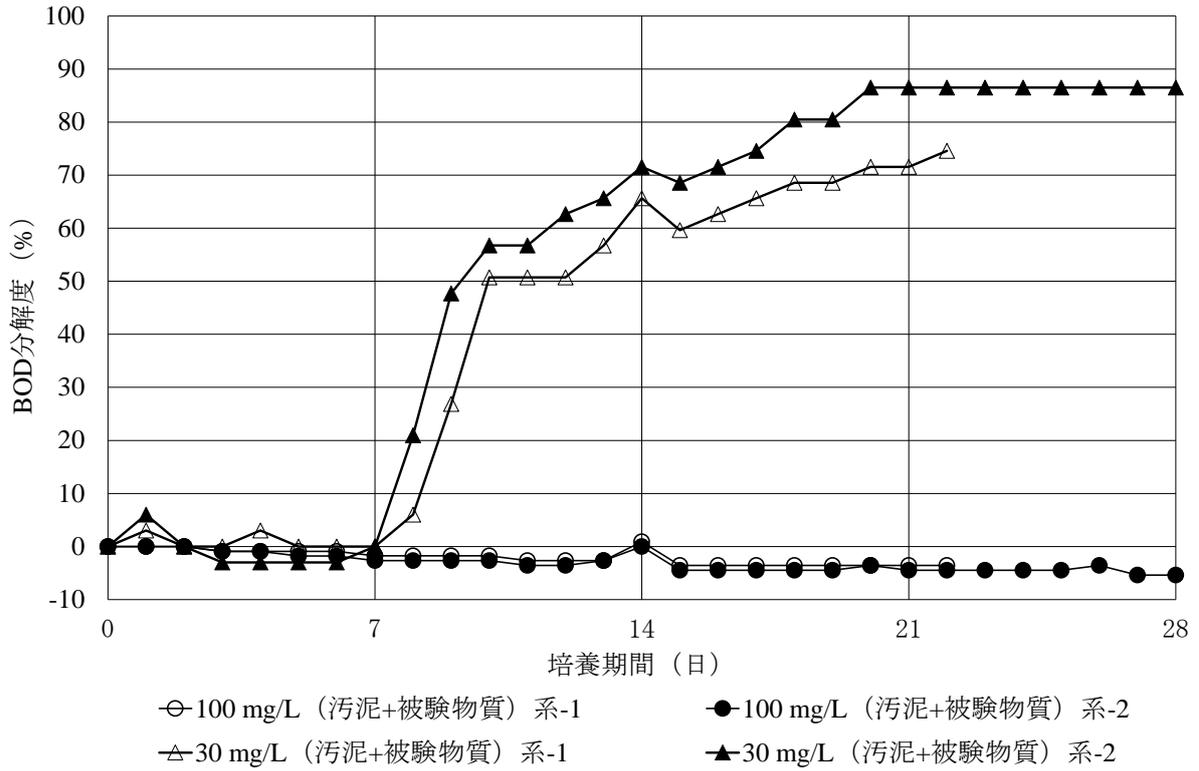


図3.5 予備試験における BOD 分解度曲線(4-*tert*-ブチルフェノール)

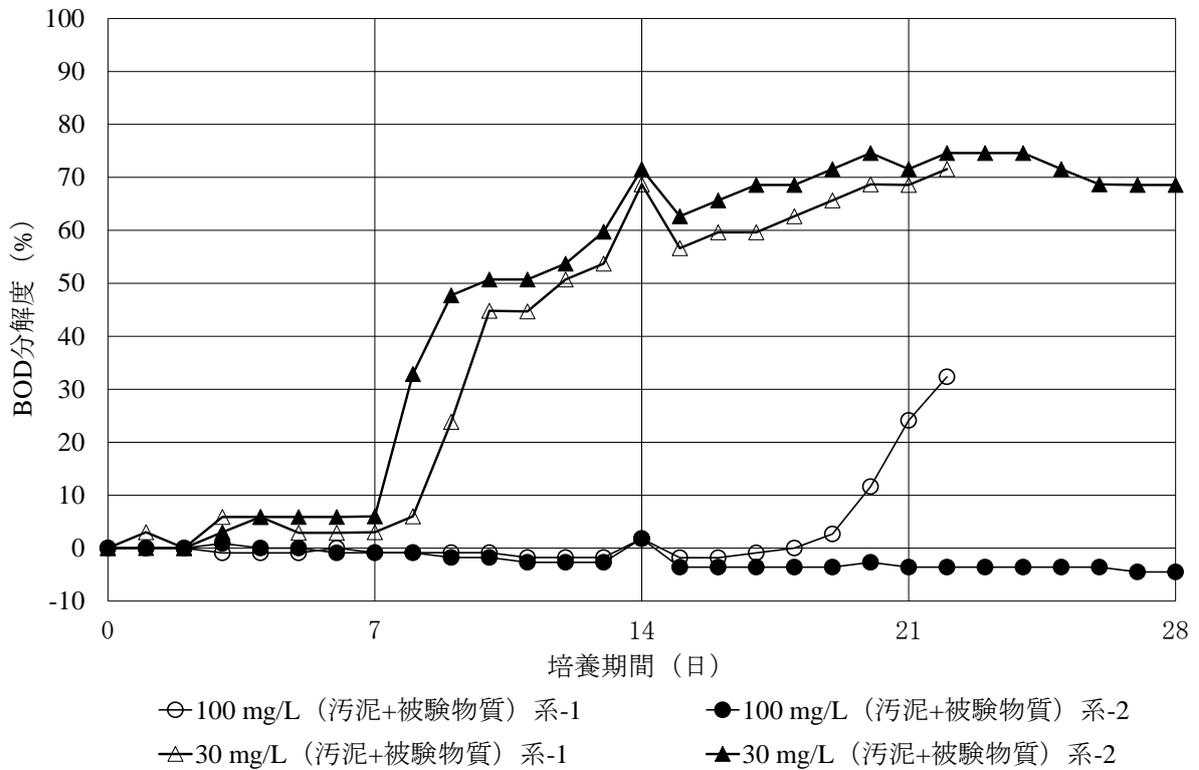


図3.6 予備試験における BOD 分解度曲線(2-*sec*-ブチルフェノール)

3. 5. 2 本試験結果

分解度

本試験におけるBOD分解度の結果を表3. 3に示す。なお、培養期間中のBOD分解度曲線は図3. 7に示した。

本試験における100 mg/L(汚泥+被験物質)系の試験液-1、2及び3の培養28日後のBOD分解度はそれぞれ-6%、54%及び-7%であった。被験物質及び変化物の分析を実施しなかった試験液-4のBOD分解度は-6%であり、試験液-1及び3と同程度であったことから、機器分析のための試験液の分取操作に伴う微生物への悪影響は無視できるものであったことが示された。

培養27日後の試験液-1、2及び3の被験物質分解度はそれぞれ3%、100%及び4%であり、HPLCクロマトグラム上に変化物ピークが認められた。これらの結果から、一部の被験物質は生分解され、変化物が生成したことが示された。変化物の定性分析において、BOD分解度が高かった試験液-2では変化物D1～9が検出され、試験液-1及び3では、それぞれ1成分(D4)又は2成分(D4及び6)が検出された。

試験液のBODは、生分解が始まる培養18日後まで汚泥ブランク系のBODより低かった。したがって、100 mg/Lの被験物質濃度では被験物質による微生物への阻害があったことが示唆された。

表3. 3 本試験におけるBOD分解度

		(汚泥+被験物質)系				
		1	2	3	4*11	平均 (1～3)
培養16日後の被験物質分解度						
4-tert-ブチルフェノール 被験物質分解度(%)	100 mg/L	2	43	2	-	15
	30 mg/L	3	4	2	-	3
培養18日後の被験物質分解度						
4-tert-ブチルフェノール 被験物質分解度(%)	100 mg/L	2	100	1	-	34
	30 mg/L	91	80	27	-	66
培養27日後の被験物質分解度						
4-tert-ブチルフェノール 被験物質分解度(%)	100 mg/L	3	100	4	-	36
	30 mg/L	100	100	100	-	100
培養28日後のBOD分解度						
4-tert-ブチルフェノール BOD分解度(%)	100 mg/L	-6	54	-7	-6	14
	30 mg/L	45	46	42	53	44

*11 培養期間中に被験物質及び変化物の分析を実施しなかったもの

本試験における30 mg/L(汚泥+被験物質)系の試験液-1、2及び3の培養28日後のBOD分解度はそれぞれ45%、46%及び42%であった。被験物質及び変化物の分析を実施しなかった試験液-4のBOD分解度は53%であり、試験液-1～3よりやや高かった。しかしながら、BOD分解度曲線はすべて似たよう

なグラフであり、機器分析のための試験液の分取操作による生分解性評価への悪影響はほとんどないことが示唆された。

培養 27 日後の試験液-1、2 及び 3 被験物質分解度は 3 点ともに 100%であった。HPLC クロマトグラム上に変化物ピークは認められなかったが、BOD 分解度と被験物質分解度の差から、全ての試験液で変化物の存在が示唆された。変化物の定性分析において、変化物がそれぞれ最大で 7 成分 (D1, 2, 3, 5, 6, 7 及び 9)、9 成分 (D1~9) 及び 8 成分 (D1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 及び 9) が検出された。

試験液の BOD は、生分解が始まる培養 17 日後までは汚泥ブランク系の BOD より低かった。したがって、本試験における 30 mg/L の被験物質濃度では被験物質及び/又は変化物による微生物への阻害があったことが示唆された。予備試験では 30 mg/L で強い阻害は認められなかったことから、使用する汚泥の活性が日間で変動しており、30 mg/L でも微生物が阻害を受ける可能性があることが示唆された。

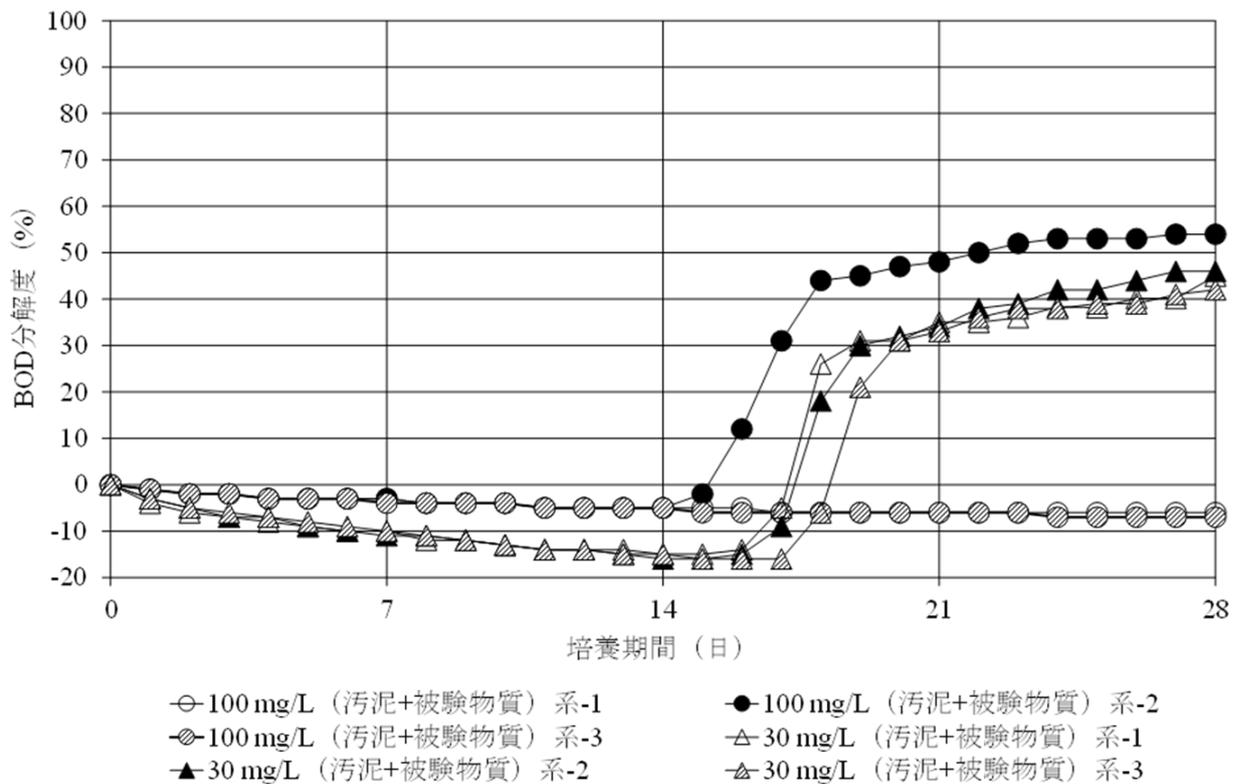
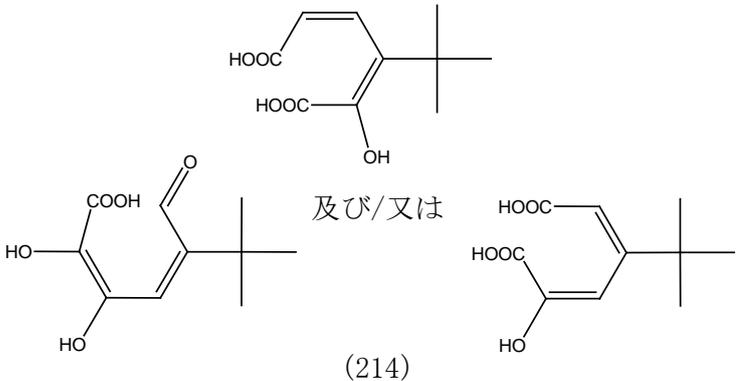
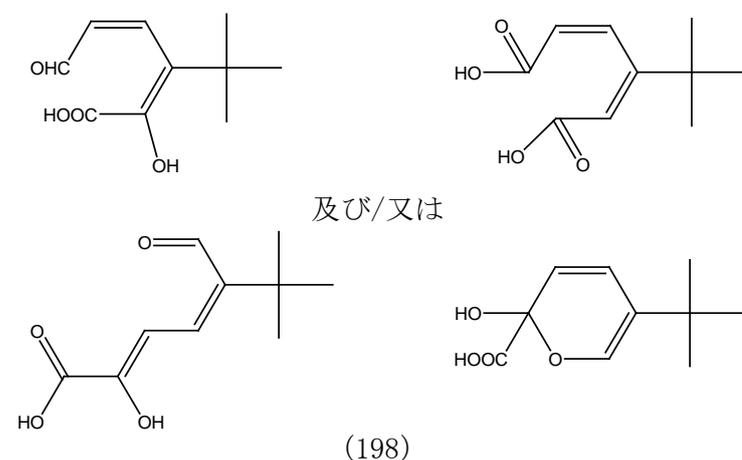
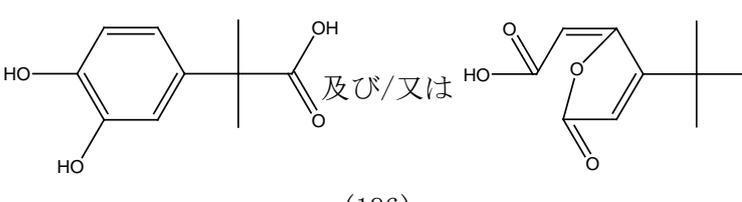


図3.7 本試験における BOD 分解度曲線(4-tert-ブチルフェノール)

<変化物の定性分析結果>

変化物について LC-MS[フォトダイオードアレイ(PDA)検出器連結]による定性分析を実施した結果、検出された変化物及びそれらの推定構造式の一覧を表3. 4に示す。また、分析した試験液ごとの検出結果を表3. 5に示す。100 mg/L の(汚泥+被験物質)系及び 30 mg/L の(汚泥+被験物質)系ともに変化物 D1~D9 の 9 成分が検出された。

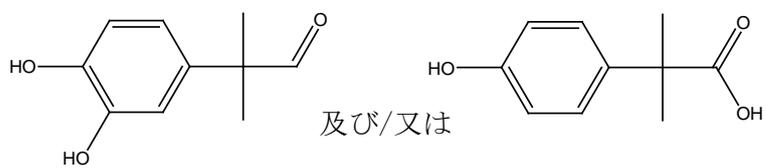
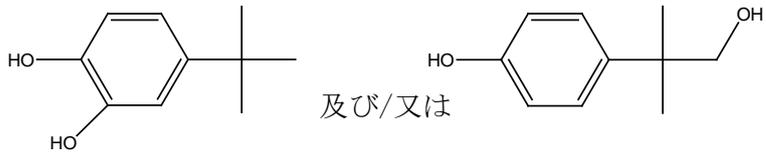
表3. 4 検出された変化物一覧表

変化物	保持時間 ^{*12} (分)	検出イオン ^{*13} (<i>m/z</i>) 及び推定帰属	推定構造式 ^{*14} (推定分子量:M)
D1	2.8~ 2.9	145 [M+H] ⁺ 162 [M+NH ₄] ⁺ 167 [M+Na] ⁺ 143 [M-H] ⁻	構造不明 (144)
D2	2.8~ 2.9	215 [M+H] ⁺ 232 [M+NH ₄] ⁺ 169 [M-CO ₂ -H] ⁻ 213 [M-H] ⁻	 (214)
D3	2.9~ 3.0	199 [M+H] ⁺ 153 [M-CO ₂ -H] ⁻	 (198)
D4	3.1~ 3.2	197 [M+H] ⁺ 214 [M+NH ₄] ⁺ 151 [M-CO ₂ -H] ⁻ 195 [M-H] ⁻	 (196)

*12 図 11 参照 *13 上段:正イオン、下段:負イオン

*14 被験物質の酸化は化学構造中の複数の場所で起こりうるため、変化物は構造異性体を含むと考えられる。

表3.4 検出された変化物一覧表(続き)

変化物	保持時間 ^{*12} (分)	検出イオン ^{*13} (<i>m/z</i>) 及び推定帰属	推定構造式 ^{*14} (推定分子量:M)
D5	3.3~ 3.4	181 [M+H] ⁺	 <p>及び/又は</p> <p>(180)</p> <p>ただし、推定分子量 198 の成分(D3 の推定構造式のいずれか)に該当する可能性もある(181 [M- H₂O+H]⁺及び 197 [M-H]⁻)。</p>
		125 帰属不明 197 [M+H ₂ O-H] ⁻	
D6	3.8~ 3.9	正イオン不検出	構造不明 (分子量不明)
		289 帰属不明 317 帰属不明	
D7	4.1~ 4.2	正イオン不検出	 <p>及び/又は</p> <p>(166)</p>
		165 [M-H] ⁻ 331 [2M-H] ⁻	
D8	4.3~ 4.4	正イオン不検出	構造不明 (分子量不明)
		287 帰属不明 315 帰属不明	
D9	4.4 4.9	263 [M-H ₂ O+H] ⁺ 281 [M+H] ⁺ 298 [M+NH ₄] ⁺ 303 [M+Na] ⁺ 319 [M+K] ⁺	<p>構造不明(異性体含む)</p> <p>(280)</p>
		負イオン不検出	

*12 図 11 参照

*13 上段:正イオン、下段:負イオン

*14 被験物質の酸化は化学構造中の複数の場所で起こりうるため、変化物は構造異性体を含むと考えられる。

表3.5 変化物の検出・不検出

変化物	100 mg/L(汚泥+被験物質)系								
	1			2			3		
	16日後	18日後	27日後	16日後	18日後	27日後	16日後	18日後	27日後
D1	-	-	-	検出	検出	検出	-	-	-
D2	-	-	-	検出	検出	検出	-	-	-
D3	-	-	-	検出	検出	検出	-	-	-
D4	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出
D5	-	-	-	検出	検出	検出	-	-	-
D6	-	-	-	検出	検出	検出	-	検出	-
D7	-	-	-	検出	-	-	-	-	-
D8	-	-	-	検出	検出	検出	-	-	-
D9	-	-	-	検出	検出	検出	-	-	-

表3.5 変化物の検出・不検出(続き)

変化物	30 mg/L(汚泥+被験物質)系								
	1			2			3		
	16日後	18日後	27日後	16日後	18日後	27日後	16日後	18日後	27日後
D1	検出	検出	-	検出	検出	-	検出	検出	検出
D2	検出	検出	-	検出	検出	-	-	検出	-
D3	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出
D4	-	-	-	検出	検出	-	検出	検出	-
D5	検出	検出	検出	-	検出	検出	-	-	検出
D6	-	検出	検出	-	検出	検出	-	検出	検出
D7	検出	検出	-	検出	検出	-	検出	検出	-
D8	-	-	-	-	検出	-	-	検出	-
D9	-	検出	-	-	検出	-	-	検出	-

100 mg/L では、D4 がすべての試験系から検出された。生分解が認められた一つの系では、多くの変化物が検出された。

30 mg/L では、D1-D9 のすべての変化物が検出された。D3 は全てのサンプルから検出された。D2, D4, D7,D8,D9 は、27 日後には検出されなかった。

4. 考察

4.1 分解経路の推定

推定した分解経路を図3. 8に示す。

初期濃度 100 mg/L の系では、主として経路 2 で分解が進行し D4 を生成したと考えられた。また、D7 から経路 3 で分解が進行し D4 を生成した可能性も考えられた。

初期濃度 30 mg/L の系では、主として経路 1 で分解が進行したと考えられ、D7 から経路 4 に進行し、D3 を生成した可能性も考えられた。

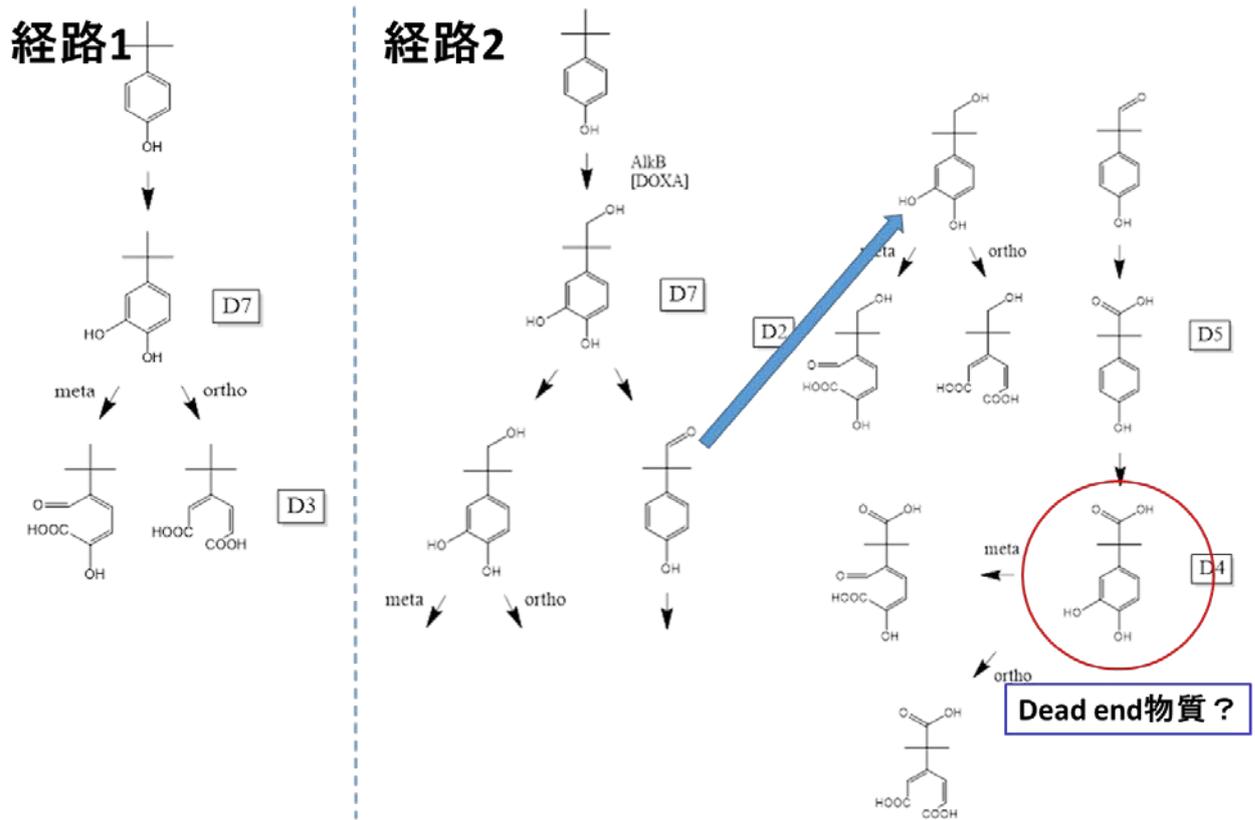
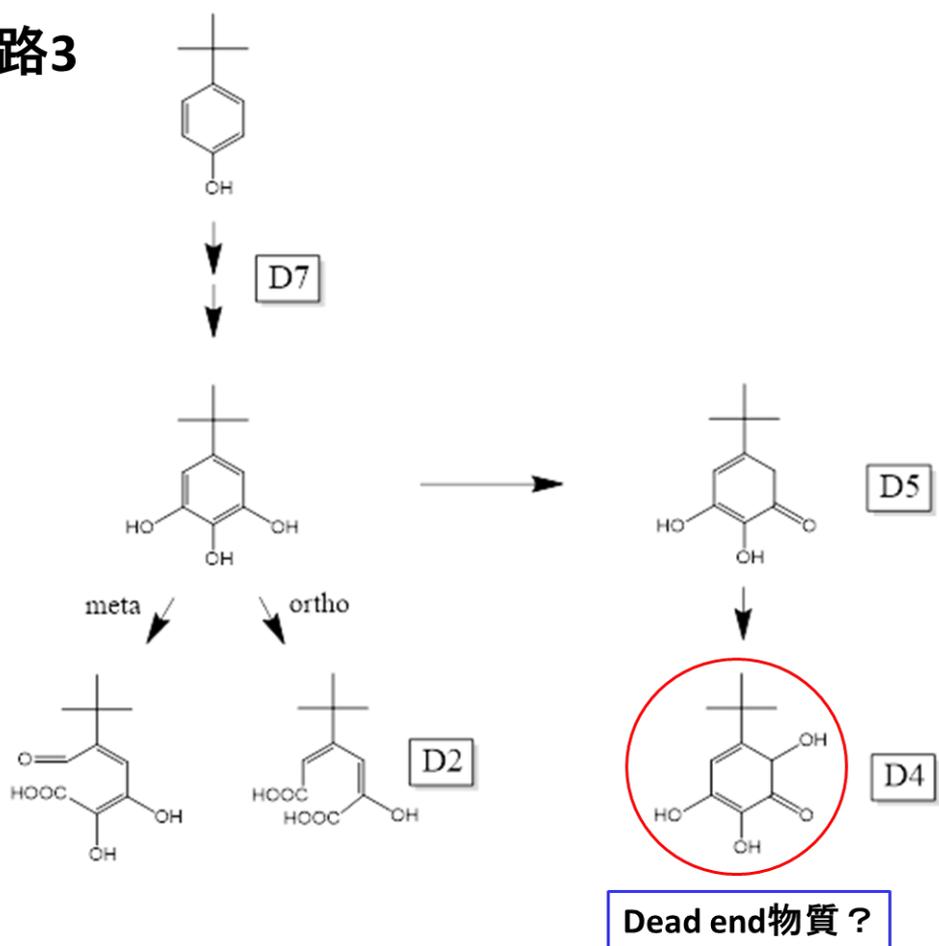


図3. 8 分解経路の推定

経路3



経路4

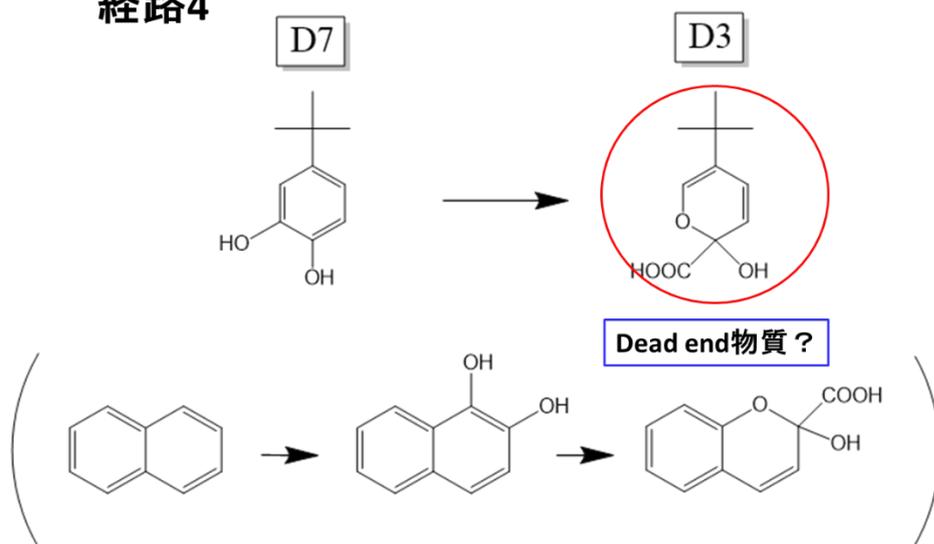


図3.8 分解経路の推定(続き)

4. 2 濃度の違いによる分解性の違い

100 mg/L で検出された D4 は、その物質の蓄積で呼吸阻害が生じる Dead end 物質と考えられ、経路 2、もしくは経路 3 の結果であると推測された。また、30 mg/L のすべてのサンプルで検出された D3 も、Dead end 物質と考えられ、経路 4 の結果であると推測された。

100 mg/L と 30 mg/L で変化物が異なるのは、初期の分解経路が経路 1 か経路 2 となるかの違い、もしくは D7 から分岐する経路 3 の結果である可能性が考えられた。

100 mg/L と 30 mg/L で見られる、異なる Dead end 物質の蓄積は、初期濃度が異なると、分解経路の違いが生じる可能性を示すものである。

5. 結論

①分解対象物の選定と QSAR による分解性の予測

・選定した物質の分解経路を予測し、QSAR による分解性の予測を行った結果、対象物質の制定に成功した。

②対象物質の微生物細胞に対する呼吸阻害の濃度依存性の評価

①で選定した物質に関して、初期濃度を変えて呼吸阻害試験を行った結果、呼吸阻害の濃度依存性を評価することができた。

③初期濃度の違いによる生分解性の変化と中間代謝産物の解析

②で選定した物質に関して、TG301F を用いて初期濃度 100 mg/L、30 mg/L における生分解性試験を行った。また、生分解性試験の途中ならびに最終サンプルにおける変化物の解析を行った。その結果、初期濃度の違いが、分解経路に影響するという、これまでにない重要な知見が得られた。

6. 今後の課題

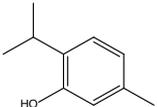
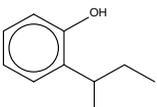
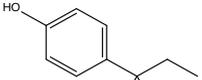
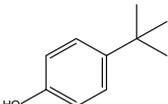
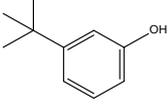
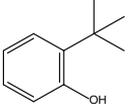
今後の課題として、初期濃度が異なると、分解経路の違いが生じるメカニズムを詳細に検討し、TG301 の適用の科学的根拠を提示するとともに、QSAR 適用の指標となる考え方を示す必要がある。

<参考資料>

- 1) Sanchez, Z., Tani, A., Suzuki, N., Kariyama, R., Kumon, H., and Kimbara, K., Assessment of Change in Biofilm Architecture by Nutrient Concentration Using a Multichannel Microdevice Flow System, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 326-331 (2013).
- 2) Sanchez, Z., Tani, A., and Kimbara, K., Extensive reduction of Cell Viability and Enhanced Matrix Production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Flow Biofilms Treated with D-amino Acid Mixture, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 1396-1399 (2013).
- 3) Yamada, T., Shimomura, Y., Hiraoka, Y., and Kimbara, K.: Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 452-457(2006).
- 4) Shimomura, Y., Ohno, R., Kawai, F., and Kimbara, K.: Method for assessment of viability and morphological changes of bacteria in the early stage of colony formation on a simulated natural environment. *Appl Environ Microbiol.* 72, 5037-5042(2006).

- 5) Sugimoto S, Arita-Morioka K, Mizunoe Y, Yamanaka K, Ogura T.: Thioflavin T as a fluorescence probe for monitoring RNA metabolism at molecular and cellular levels. *Nucleic Acids Res.* 43(14):e92(2015).

表 2. 1 毒性試験の情報がある物質—フェノール系—（リンク有）

CAS	NAME	SMILES	301C実測値	試験法 (301C以外)	試験濃度 (mg/L)	分解度	URL	毒性試験 法	毒性試験エ ンドポイン ト	毒性試験結 果(mg/L)	毒性URL
89-83-8	941	 <chem>CC(C=C(C)=C1)C=C1O)C</chem>	0 (30mg/L で分解する 結果があ る)	301D	0.8、2.4	61、 57	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu	TG209	EC50	39.6	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu
89-72-5	1038	 <chem>Oc1cccc1C(C)CC</chem>	0(良分解性)	301D	1.5、3	63	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu	TG209	EC50	>10	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu
80-46-6	1368	 <chem>OC1=CC=C(C(C)(C)C)C=C1</chem>	0	301B		20	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu	n			https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu
98-54-4		 <chem>CC(C)(C)C1=CC=C(O)C=C1</chem>	0	301F	13.8 , 25.1	60 , 42	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu	TG209		> 10	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu
585-34-2		 <chem>CC(C)(C)C1=CC(O)=CC=C1</chem>	0	-				-			
88-18-6		 <chem>CC(C)(C)C1=C(O)C=CC=C1</chem>	-4	EU Method C.4-A	9.59	98	https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu				https://ecna.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-ecna.eu