

令和3年度化学物質安全対策

大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業

(パッシブサンプラーを用いた蓄積特性の異なる化学物質の
生物濃縮試験代替え法の検討)

調査報告書

令和4年3月

金沢大学

目次

1. 目的	2
2. 概要	3
3. 実施体制	3
4. 事業内容	4
4-1. コイおよび SPMD での濃縮試験	4
4-2. 検体分析	9
4-3. 濃縮試験結果	18
4-4. 試験結果の検討	25
5. 調査結果の公表	27
6. 海外出張の内容	27
7. 今後の課題	27
8. 参考文献	28

1. 目的

現在製造輸入量が 1 トン/年超の新規化学物質について、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) の審査には、蓄積性に関する試験データが必須要件とされている。この要件において、疎水性の強さを示す 1-オクタノール/水分配係数($\log P_{ow}$) が 3.5 以上の場合、魚類を用いた濃縮度試験が行われる。しかし従来の魚類を用いた濃縮度試験では、生物を取り扱うため大規模な実験施設などの費用と時間を要する。また個体差、実験条件、魚の種差等で試験値が左右され易く、動物愛護の観点からも試験生物数を減らす必要がある。これらの点から、生物を用いた濃縮度試験に代替する試験方法の開発が必要とされている。

先行研究として九州大学大嶋雄治教授らは、化学物質の環境調査にも用いられている Semi permeable membrane device (SPMD)を用いた生物を用いない代替法の検討を行った。SPMD は半透膜チューブ中にトリオレインを封入した装置であり、疎水性化学物質を SPMD 内のトリオレインに環境濃度と比例して濃縮するため、生体への蓄積を模倣することが可能である。したがって、 $\log P_{ow}$ の高い化学物質の生物濃縮性の評価において、生物の代わりに SPMD を用いる事で、費用等の軽減を計りつつばらつきを抑えた信頼性の高いデータの取得が期待される。先行研究において、大嶋らはクロロベンゼン類 4 種を用いて従来試験と SPMD 試験のデータを比較した結果、両者は良好な相関性を持つことが明らかになり、被験物質の $\log P_{ow}$ が 4 から 5 の間であれば、従来試験に置き換えて SPMD で生物濃縮係数(BCF)を予測できる可能性が示された。しかし今後の課題として、蓄積特性および $\log P_{ow}$ の異なる物質を使つての検証が必要であるとされた。

そこで本研究では、先行研究で示された化学物質の生物濃縮度試験の代替法として SPMD を用いた濃縮度試験の更なる有用性の検討を行った。一般的な汚染物質であり、 $\log P_{ow}$ が 3 から 6 の範囲にある多環芳香族炭化水素類(PAHs)について、コイ(*Cyprinus carpio*)および SPMD を用いた取込・排泄試験を実施した。得られた魚体中および SPMD 中化学物質の濃度変化より、各媒体における取込速度・排泄速度等を求めた。そこから化学物質蓄積をモデル化し、従来法および SPMD 法から得られた各被験物質の BCF を比較して SPMD 法の有用性を検討した。

2. 概要

試験対象魚として、先行研究に引き続き過去の知見が比較的豊富でありかつ取り扱いの容易なコイ(*Cyprinus carpio*)を用い、同時に Semi permeable membrane device (SPMD) を用いて、流水条件下での水暴露を行い、各媒体での取込・排泄試験を実施した。化学物質評価研究機構(CERI)久留米事業所にて、OECD TG305に準拠して流水式で取込・排泄試験を実施した(試験期間 2021 年 9 月 14 日-11 月 9 日：取込期間 28 日間、排泄期間 28 日間)。試験で得られた試験水、試験魚及び SPMD 中の被験物質分析を実施し、取込・排泄速度定数 (k_1 、 k_2)、生物濃縮係数(BCF)などを算出し、有用性を検討した。

コイおよび SPMD の脂質補正 BCF の関係を比較検討した結果、 $\log P_{ow}$ 4-5 の間で比較的良好な相関性を持つことが明らかになった。一方で、Benz[a]anthracene や Benzo[a]pyrene 等高 $\log P_{ow}$ (>5)の物質では SPMD とコイの間で算出された BCF の値に乖離があり、この原因として生体内の代謝を受けた、もしくは被験物質の一部が SPMD のポリエチレン膜へ吸着・脱着した影響と考えられた。

これらの結果から、試験化学物質($3.5 < \log P_{ow} < 5$)に対して、代謝などの影響や分析手法を更に検証していく事で、魚の試験に代替して SPMD で BCF を予測できる可能性が高いことを示された。

3. 実施体制

実施主体：金沢大学 環日本海域環境研究センター

実施担当者：本田匡人

研究協力：九州大学 農学研究院

実施担当者：大嶋雄治、早稻田真未

暴露試験外注先：一般財団法人化学物質評価研究機構(CERI)

実施担当者：井上義之、古賀由香

4. 事業内容

4-1. コイおよび SPMD での濃縮試験

試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

所在地 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

試験法

以下の試験法に準拠して実施した。

"305-I : Aqueous Exposure Bioconcentration Fish Test" stipulated in the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 305, October 2, 2012, "Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure"

試験日程

実験開始日 2021 年 9 月 14 日

実験終了日 2021 年 11 月 9 日

被験物質

被験物質として以下の 4 種を用いた。

アントラセン (Anthracene、略称 : Ant)

CAS 番号	120-12-7
純 度	>97.0%
供給者	東京化成工業
ロット番号	T5JKI
水溶解度	1290 µg/L (25°C)
log P _{ow}	4.45

ピレン (Pyrene、略称 : Pyr)

CAS 番号	129-00-0
純 度	>97.0%
供給者	東京化成工業
ロット番号	6Y77D
水溶解度	130~160 µg/L (25°C)
log P _{ow}	5.18

ベンゾ[a]アントラセン (Benz[a]anthracene、略称 : BaA)

CAS 番号	56-55-3
純 度	>98.0%
供給者	東京化成工業
ロット番号	J5UZN

水溶解度	9.4 µg/L (25°C)
log P _{ow}	5.91
ベンゾ[a]ピレン (Benzo[a]pyrene、略称：BaP)	
CAS 番号	50-32-8
純 度	>95.0%
供給者	東京化成工業
ロット番号	SRLQD
水溶解度	1.61 µg/L (25°C)
log P _{ow}	6.04

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 <i>Cyprinus carpio</i>
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)および食塩(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. 7-7)から試験水槽へ移した。
期間	地下水で 24 日間飼育した後、脱塩素水道水で 14 日間じゅん化した。
水温	25±2°C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-210608
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	6.8～8.7 cm (取込期間開始時 6.8～7.5 cm)
年齢	1 才魚
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。試験魚の採取前 24 時間は給餌を止めた。

半透膜デバイス (Semi permeable membrane device、略称：SPMD)

製造元 Environmental Sampling Technologies, Inc.
ロット 071420

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
試験第 1 水槽 70 L 容 (No. 1-5)
試験第 2 水槽 100 L 容 (No. 1-6)

取込期間においては、各試験水槽を設置し (Fig. 1)、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、各水槽に直接試験用水を供給した。

試験濃度 1 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 1000 mL/分の割合で 1440 L/日を試験水槽に供した。

排泄期間：試験用水 1000 mL/分で 1440 L/日を試験水槽に供した。

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 24.0～25.0°C

溶存酸素濃度 6.8～8.3 mg/L

pH 7.4～7.8

全有機炭素濃度

取込期間中 19.5～19.9 mgC/L

排泄期間中 <1.0 mgC/L

全硬度 47.3～48.7 mgCaCO₃/L

ばっ気	試験第2水槽については、連続してエアレーションを行った。
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 (2021 年 9 月 14 日～2021 年 10 月 12 日)
排泄期間	28 日間 (2021 年 10 月 12 日～2021 年 11 月 9 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 100 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 1000 mg/L の被験物質溶液を 100 mL 調製した。これを 25 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 25.0 mg/L の試験原液を 1 L 調製した。被験物質濃度は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

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。

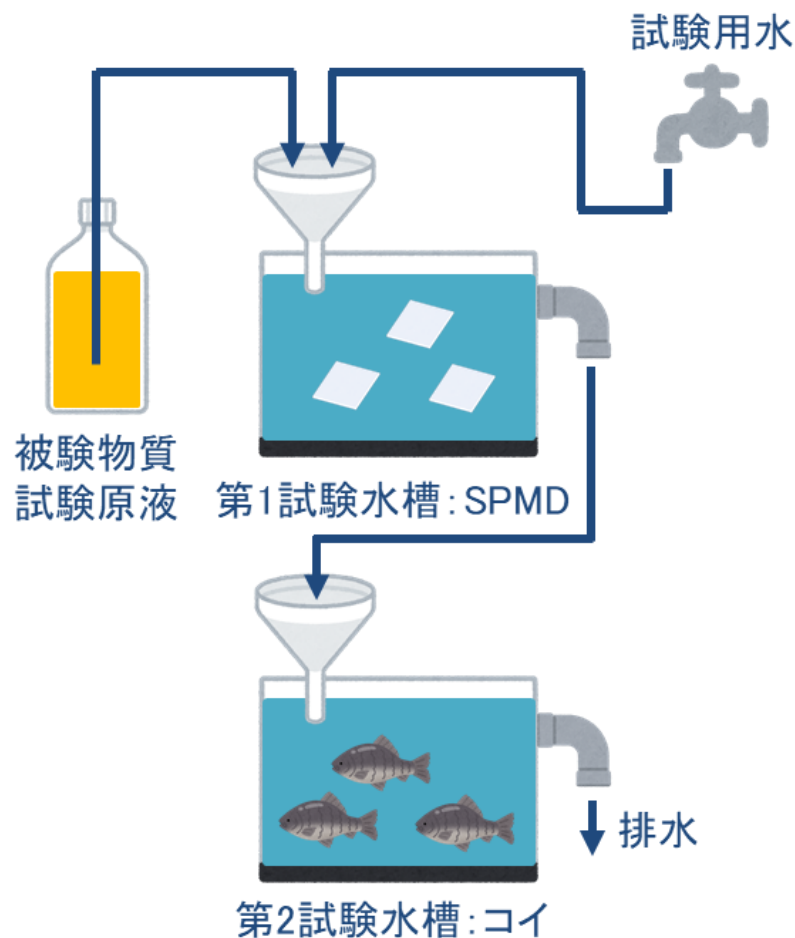


Fig. 1 試験水槽概略図 (取込期間)

Table 1 観察および測定項目

項目	頻度
試験魚の観察	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	取込期間開始前に 1 回、取込期間及び排泄期間中に週 1 回測定した。
pH	取込期間開始前に 2 回、取込期間及び排泄期間中にそれぞれ 2 回測定した。
全有機炭素濃度	取込期間開始前及び終了時、排泄期間終了時に 1 回測定した。
全硬度	取込期間中に 1 回測定した。

4-2. 検体分析

試験水、試験魚及び SPMD の分析

試験水、試験魚及び SPMD 中の被験物質の濃度分析は内部標準物質を添加後に、ガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)により行った。

分析回数

試験水

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 2 点とし、1 点を分析に供した。

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 2 点とし、1 点を分析に供した。

試験魚

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 回行い、1 回当たりの採取試料数は 4 点とし、うち 2 点を分析に供した。

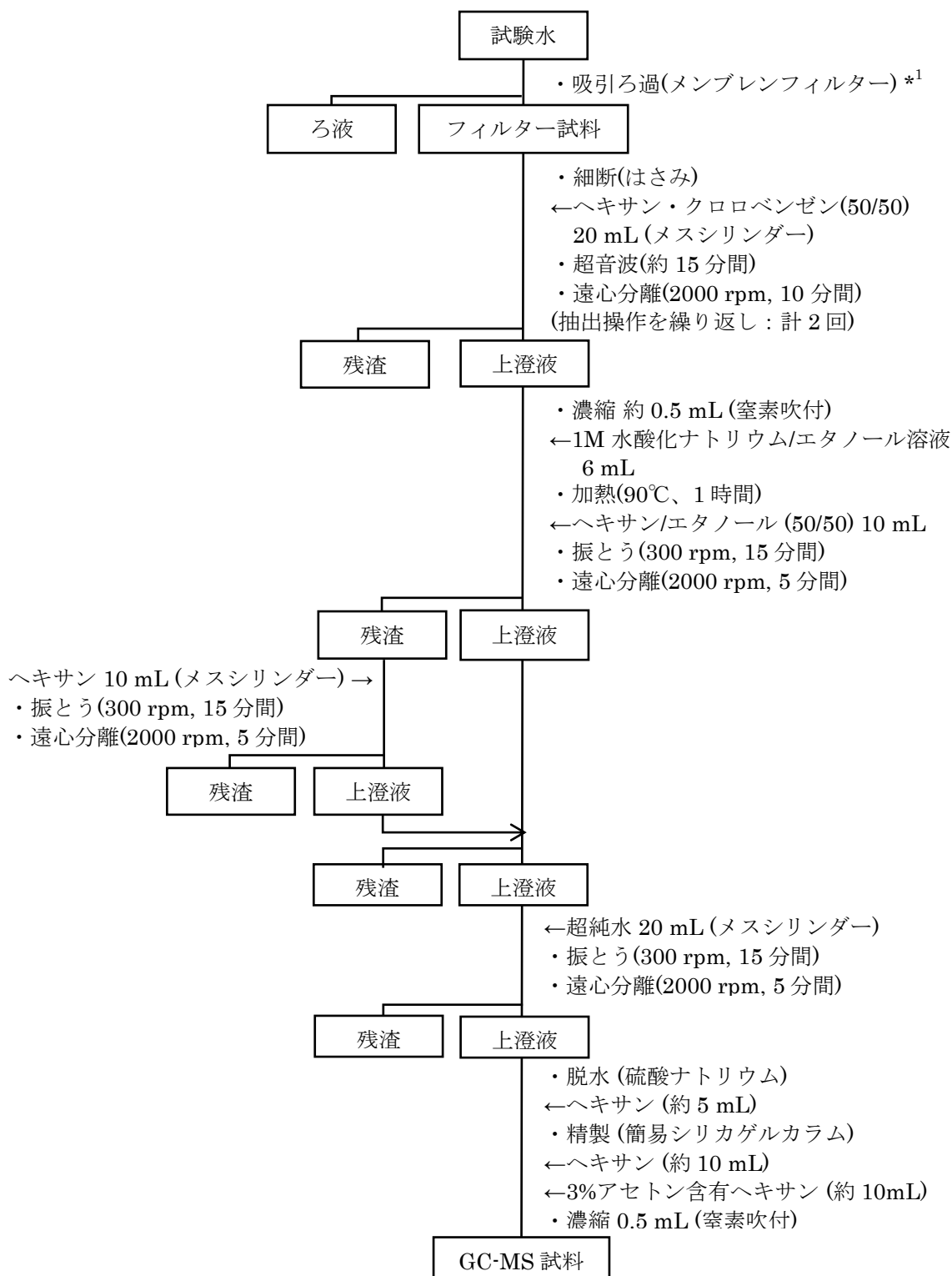
排泄期間：試験魚分析と同時の計 8 回行い、1 回当たりの採取試料数は 4 点とし、うち 2 点を分析に供した。

分析試料の前処理法

試験水中の被験物質

試験水 1000 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ろ過までの前処理操作を行い、以降の前処理操作までフィルター試料を冷凍保管(約-30℃)した。解凍後、以下のフロースキームに従い前処理操作を行い試験水分析試料とした。

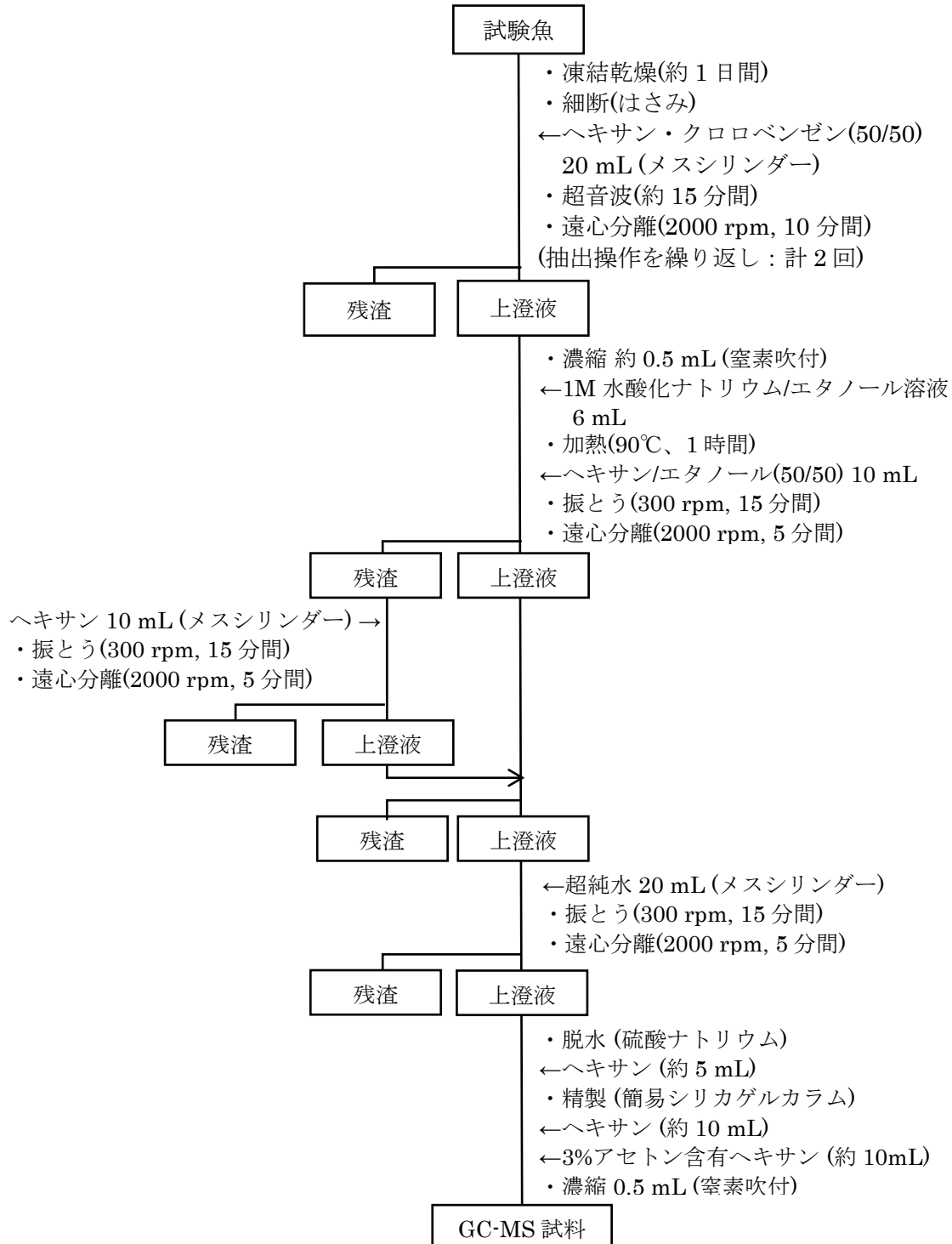
フロースキーム



*1 Empore 2315-C₁₈ (Octadecyl) 90 mm Solid Phase Extraction Disk : メンブレンフィルターは、メタノール及び超純水各 100 mL で洗浄した。

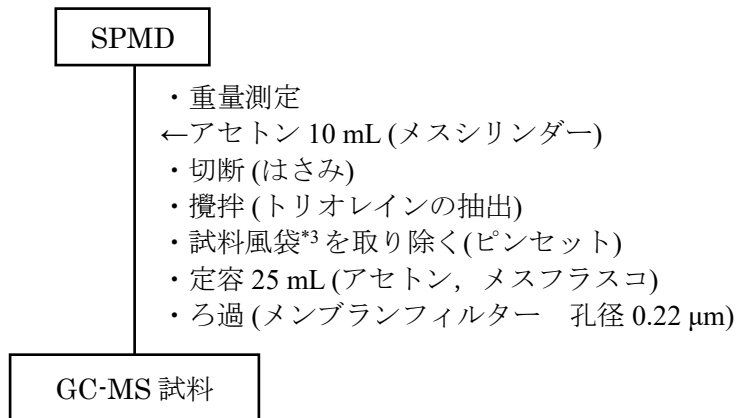
試験魚中の被験物質

試験魚を試験水槽から採取し、水道水で魚体表面を洗浄後、イオン交換水で洗浄した。その後、ろ紙等で魚体表面の水を吸い取り、体重及び全長測定後、1尾ずつ冷凍(約-30℃)し前処理操作まで保管した。解凍後、以下のフロースキームに従い前処理操作を行い試験魚分析試料とした。



SPMD 中の被験物質

SPMD を試験水槽から採取し、水道水で SPMD 表面を洗浄後、イオン交換水で洗浄した。その後、ろ紙等で SPMD 表面の水を吸い取り、冷凍保管(約-30℃)した。解凍後、以下のフロースキームに従い前処理操作を行い SPMD 分析試料とした。



被験物質の定量分析

定量方法

被験物質の定量は内部標準法により行った。Ant に対して Phenanthrene d-10 (Phe d-10)、Pyr および BaA に対して Pyrene d-10 (Pyr d-10)、BaP に対して Benzo[a]pyrene d-12 (BaP d-12)を内部標準として使用した。試料分析の都度 5 段階以上の検量線作成用標準溶液を分析し、濃度比と応答比から検量線を作成した。このとき、検量線から算出した標準溶液の濃度と設定濃度の誤差が 20%以内に収まる濃度 4 点以上からなる検量線を被験物質の定量に用いた。

分析条件

機器 ガスクロマトグラフー質量分析計

GC 部 HP 6890 (Agilent Technologies)

MS 部 HP 5973 (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)

DB-5MS

(30 m × 0.25 mm I.D., 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies)

カラム温度プログラム

	昇温速度(℃/min)	最終温度(℃)	保持 (min)	合計(min)
初期温度		60	1.00	1.00
Step1	15.00	190	3.00	12.67
Step2	2.00	220	1.00	28.67
Step3	5.00	300	20.00	64.67

制御モード 流量
 カラム流量 1.2 mL/min
 注入口温度 270°C
 導入モード スプリットレス
 注入量 1 µL
 パージ流量 50.0 mL
 パージ時間 2.00 min
 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)

	定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z)
Ant	178	176
Pyr	202	201
BaA	228	226
BaP	252	253
Phe d-10	188	184
Pyr d-10	212	211
BaP d-12	264	263

インタフェース温度 270°C
 イオン源温度 280°C
 MS 四重極温度 150°C
 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

GC-MS 試料にはエタノールで希釈した内部標準溶液を水：40 ng/mL、魚：200 ng/mL、SPMD：20 ng/mL の濃度で添加し、同様の内部標準物質濃度で検量線作成用標準溶液を分析の都度作成した。ピーク面積比と濃度比から検量線を作成し、GC-MS 試料中の被験物質濃度を内部標準物質との比例計算により算出した。クロマトグラム上における被験物質濃度の検出下限は、被験物質濃度として 5.00 ng/mL または 10.0 ng/mL の標準溶液を 4 回分析し、得られた被験物質濃度の標準偏差の 3 倍として以下のとおりとした。

Ant 0.36 ng/mL
 Pyr 1.1 ng/mL
 BaA 2.8 ng/mL
 BaP 4.4 ng/mL

添加回収試験

魚試料の前処理操作における回収試験の結果は下表(Table 2)のとおりであった。

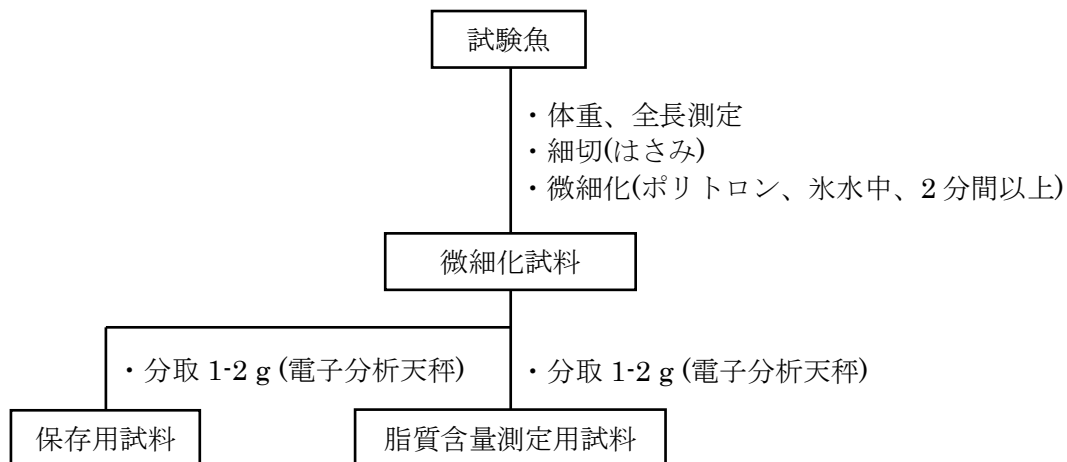
Table 2 魚試料における添加回収試験結果

被験物質	回収率 (100 ng 添加)
Ant	86-125%
Pyr	85-96%
BaA	128-142%
BaP	96-119%

試験魚の脂質含量

取込期間開始前および終了後、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検出下限

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2桁に丸めて表示した。

$$\text{試験水中被験物質濃度} = \frac{A \times B}{C}$$

A : GC-MS 試料中濃度

B : 最終液量

C : 試験水採取量

試験水中の被験物質検出下限濃度

上記で求めた被験物質濃度の検出下限より、試験水中の検出下限濃度*2 はそれぞれ以下のように算出された。計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

Ant	0.00018 µg/L
Pyr	0.00054 µg/L
BaA	0.0014 µg/L
BaP	0.0022 µg/L

試験魚の被験物質濃度の算出

被験物質濃度の検出下限値以上の場合、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。

$$\text{試験魚中被験物質濃度} = \frac{A \times B}{C \times D}$$

- A : GC-MS 試料中濃度 (ng/mL)
- B : 最終液量 (mL)
- C : 分取比
- D : 試験魚重量 (g)

試験魚中の被験物質検出下限濃度

被験物質濃度の検出下限より、試験魚中の検出下限濃度*2 は試験魚体重を 10 g としたとき、以下のとおり算出された。計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

Ant	0.14 ng/g
Pyr	0.43 ng/g
BaA	1.1 ng/g
BaP	1.8 ng/g

*2 被験物質検出下限濃度 (ng/g) = $\frac{A \times B}{C \times D}$

- A : 分析試料の検出下限濃度 (ng/mL)
- B : 最終液量 (mL)
- C : 分取比
- D : 試験水水量 (L) または試験魚重量 (g)

SPMD 中の被験物質濃度の算出

被験物質濃度の検出下限値以上の場合、以下の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

$$\text{SPMD 中被験物質濃度} = \frac{A \times B}{C}$$

A : GC-MS 試料中濃度

B : 最終液量

C : トリオレイン重量 (g)

SPMD 中の被験物質検出下限濃度

被験物質濃度の検出下限より、SPMD 中の検出下限濃度*3 は 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た。計算結果は有効数字 2 桁に丸めて表示した。

Ant 0.45 µg/g

Pyr 1.4 µg/g

BaA 3.5 µg/g

BaP 5.5 µg/g

*3 被験物質検出下限濃度 (µg/g) = $\frac{A \times B}{C}$

A : 分析試料の検出下限濃度 (µg/mL)

B : 最終液量

C : トリオレイン重量 (g)

試験結果の算出法

成長速度定数(k_g)の算出

試験魚の体重の自然対数とサンプリング日数から成長速度定数(k_g)を算出した。 k_g を算出するための試験魚体重のデータについては以下のとおりとした。また、排泄期間開始時の試験魚体重については、取込期間終了後の試験魚体重のデータを用いた(Table 3)。計算結果は有効数字 3 桁に丸めて表示した。

Table 3 成長速度算出および脂質測定用試験魚の採取

	取込期間開始前	取込期間終了後 (排泄期間開始時)	排泄期間終了後
試験区	取込期間開始前の脂質 含量測定用試験魚 3 尾+ 追加 3 尾	最後の測定日の試験区 の試験魚分析 4 尾+脂質 含量測定用試験魚 3 尾	最後の測定日の試験区 の試験魚分析 4 尾+脂質 含量測定用試験魚 3 尾

脂質含量の算出法

脂質含量は次式により算出した。計算結果は有効数字 3 桁に丸めて表示した。

$$\text{脂質含量 (\%)} = (T - T_0) / S \times 100$$

T_0 : 容器の重量 (g)

T : 10.5.3 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)

取込速度定数 (k_1) および排泄速度定数 (k_2) の算出

Barkey Madonna v10.2.8 を用いて、フィッティングにより算出した。

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)

4-3. 濃縮試験結果

試験魚の外観観察等

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以下のとおりであった。

取込期間開始前 4.65%

取込期間終了後 4.95%

排泄終了後 4.01%

成長速度定数 (k_g)

試験区の k_g は以下のとおりであった。

取込期間 0.00475 /day

排泄期間 0.00714 /day

取込期間中における試験水中の被験物質濃度

取込期間開始前および期間中における試験水中の被験物質濃度を Table 4 に示した。

Table 4 取込期間中における試験水中の被験物質濃度 (単位: $\mu\text{g/L}$)

被験物質	Ant	Pyr	BaA	BaP
3 日後	0.49	0.48	0.41	0.42
7 日後	0.52	0.51	0.50	0.47
14 日後	0.51	0.49	0.43	0.38
21 日後	0.76	0.47	0.53	0.49
28 日後	0.52	0.49	0.67	0.57
期間平均	0.56	0.49	0.51	0.47

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 5 および 6 にそれぞれ示した。

Table 5 取込期間中における試験魚中の被験物質濃度 (単位: ng/g)

	Ant	Pyr	BaA	BaP
3 日後	342	85.8	4.51	1.50* ⁴
7 日後	341	83.2	3.55	0.72* ⁴
14 日後	263	75.8	3.17	0.23* ⁴
21 日後	281	71.6	5.93	1.49* ⁴
28 日後	255	74.4	4.19	0.92* ⁴

*4 検出下限値以下

Table 6 取込期間中における SPMD 中の被験物質濃度 (単位 : ng/g)

	Ant	Pyr	BaA	BaP
1 日後	7635	4683	25916	17581
3 日後	31565	16247	76103	69364
7 日後	45097	29069	65100	43977
14 日後	75841	55865	103540	40329
21 日後	110122	97775	179950	77365
28 日後	98606	98029	207981	104685

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 7 および 8 にそれぞれ示した。

Table 7 排泄期間中における試験魚中の被験物質濃度 (単位 : ng/g)

	Ant	Pyr	BaA	BaP
1 日後	117	29.6	1.46	0.09* ⁵
2 日後	58.5	14.7	0.95* ⁵	0.03* ⁵
3 日後	16.9	10.4	0.61* ⁵	0.01* ⁵
5 日後	12.2	8.82	0.57* ⁵	0.00* ⁵
7 日後	1.31	2.98	0.44* ⁵	0.00* ⁵
14 日後	0.85	5.93	0.37* ⁵	0.02* ⁵
21 日後	0.67	5.07	0.28* ⁵	0.09* ⁵
28 日後	0.29	6.96	0.39* ⁵	0.00* ⁵

*5 検出下限値以下

Table 8 排泄期間中における SPMD 中の被験物質濃度 (単位 : ng/g)

	Ant	Pyr	BaA	BaP
1 日後	103599	146608	249205	167288
2 日後	69861	108497	173959	129178
3 日後	58811	88244	145984	91236
5 日後	53793	96926	153631	74089
7 日後	45503	92520	140124	78054
14 日後	20792	100891	208351	111824
21 日後	10440	75920	152248	81212
28 日後	4700	101604	219186	108998

各種係数の算出

得られた結果を用いて各種係数を算出し、Table 9 にそれぞれ示した。なお BaA と BaP の試験魚での各種係数に関しては、試験魚中濃度が検出下限値以下であったため参考値として算出した。

Table 9-1 各種係数 (Ant)

	k_1	k_2	$t_{1/2}$	BCF_K	BCF_{KL}
試験魚	543	1.012	0.69	537	542
SPMD	13591	0.114	6.10	119639	5982

Table 9-2 各種係数 (Pyr)

	k_1	k_2	$t_{1/2}$	BCF_K	BCF_{KL}
試験魚	155	0.957	0.72	162	164
SPMD	9166	0.009	74.2	981370	49069

Table 9-3 各種係数 (BaA)

	k_1	k_2	$t_{1/2}$	BCF_K	BCF_{KL}
試験魚	7.86	0.924	0.75	8.51	8.59
SPMD	14169	0.003	226	4615309	230766

Table 9-4 各種係数 (BaP)

	k_1	k_2	$t_{1/2}$	BCF_K	BCF_{KL}
試験魚	5.12	2.459	0.28	2.08	2.10
SPMD	9539	0.008	89.0	1224519	61226

コイおよび SPMD を用いた取込・排泄試験結果と速度法によるフィッティングの結果を以下に図示する。

Ant の結果を Fig. 2-1 および 2-2 に示す。取込期間において、コイでは暴露 7 日目以降濃度は飽和していたが、SPMD では 28 日目でも濃度の上昇傾向が見られた。排泄期間において、コイでは急激な濃度の減少が見られ 3 日目には排泄開始時の 10%以下まで減少し、SPMD ではコイと比較して緩やかな濃度の減少が見られ 21 日目頃には排泄(溶出)開始時の約 10%まで減少した。

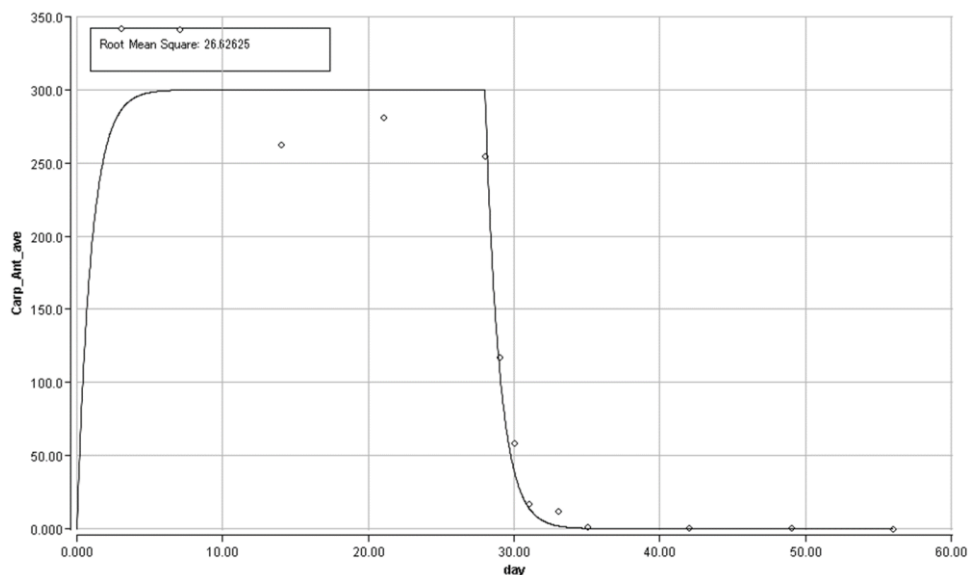


Fig. 2-1 コイにおける Ant の濃度変化

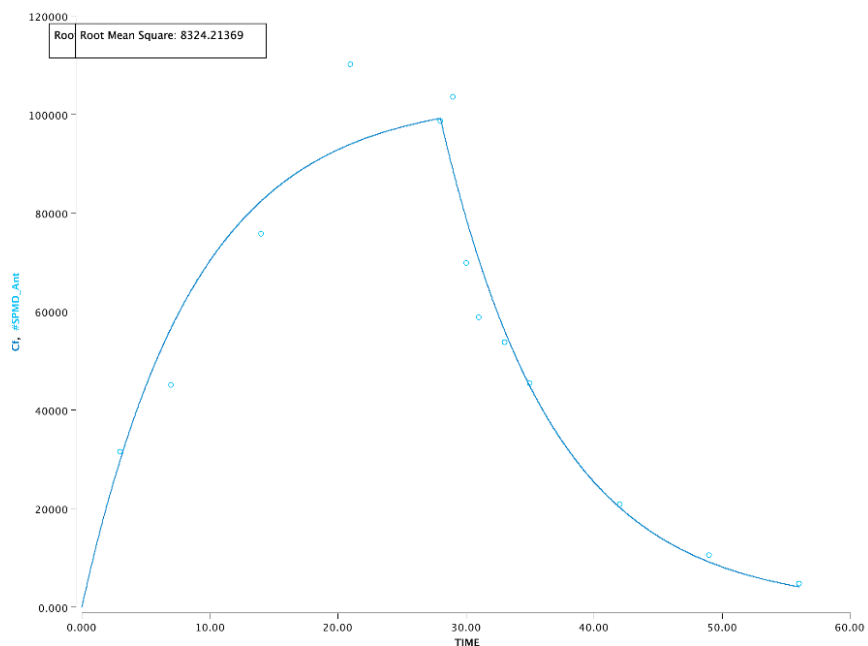


Fig. 2-2 SPMD における Ant の濃度変化

Pyr の結果を Fig. 3-1 および 3-1 に示す。取込期間において、コイでは暴露 7 日目以降濃度は飽和していたが、SPMD では 28 日目でも濃度の上昇傾向が見られた。排泄期間において、コイでは急激な濃度の減少が見られ 5 日目には排泄開始時の約 10% まで減少していたが、SPMD では非常に緩やかな排泄(溶出)の傾向が見られ定常状態まで達しなかった。

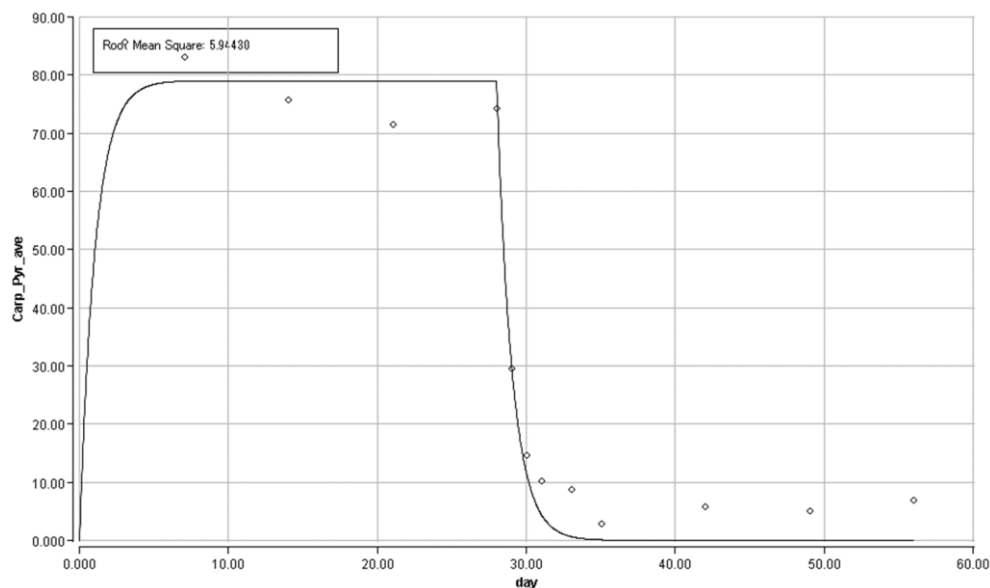


Fig. 3-1 コイにおける Pyr の濃度変化

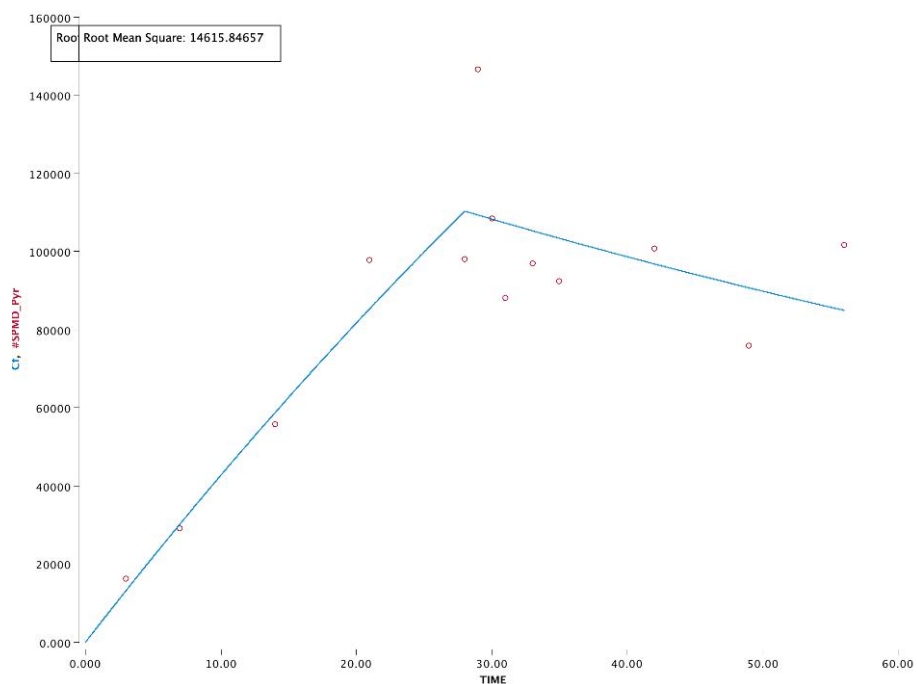


Fig. 3-2 SPMD における Pyr の濃度変化

BaA の結果を Fig. 4-1 および 4-2 に示す。試験魚中濃度が検出下限値以下であったため、コイでの解析は参考値として算出した。取込期間において、コイでは暴露 7 日目以降濃度は飽和していたが、SPMD では 28 日目でも濃度の上昇傾向が見られた。排泄期間において、コイでは急激な濃度の減少が見られ 7 日目には排泄開始時の約 10% まで減少していたが、SPMD では非常に緩やかな排泄(溶出)の傾向が見られ定常状態まで達しなかった。

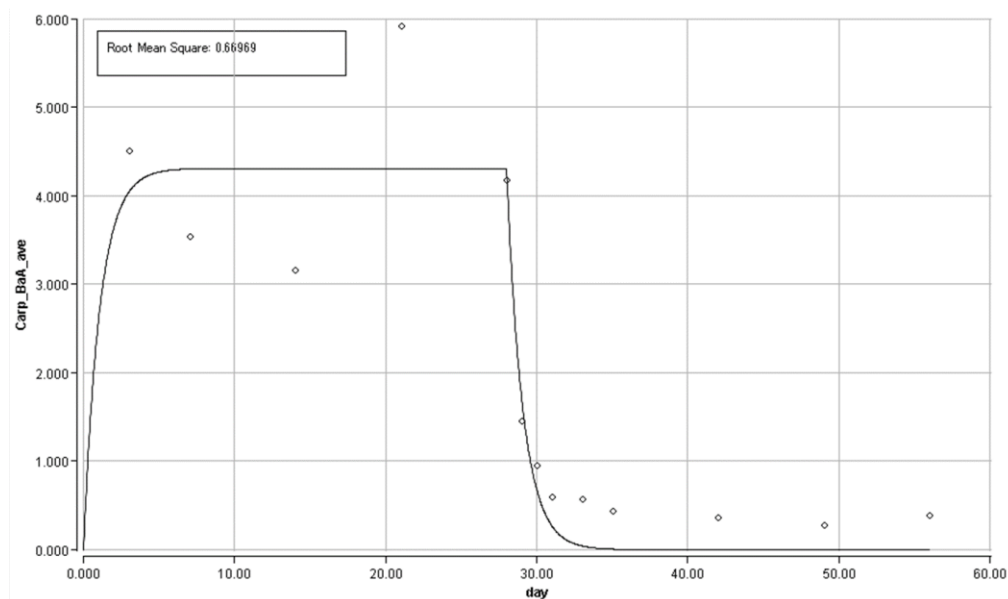


Fig. 4-1 コイにおける BaA の濃度変化

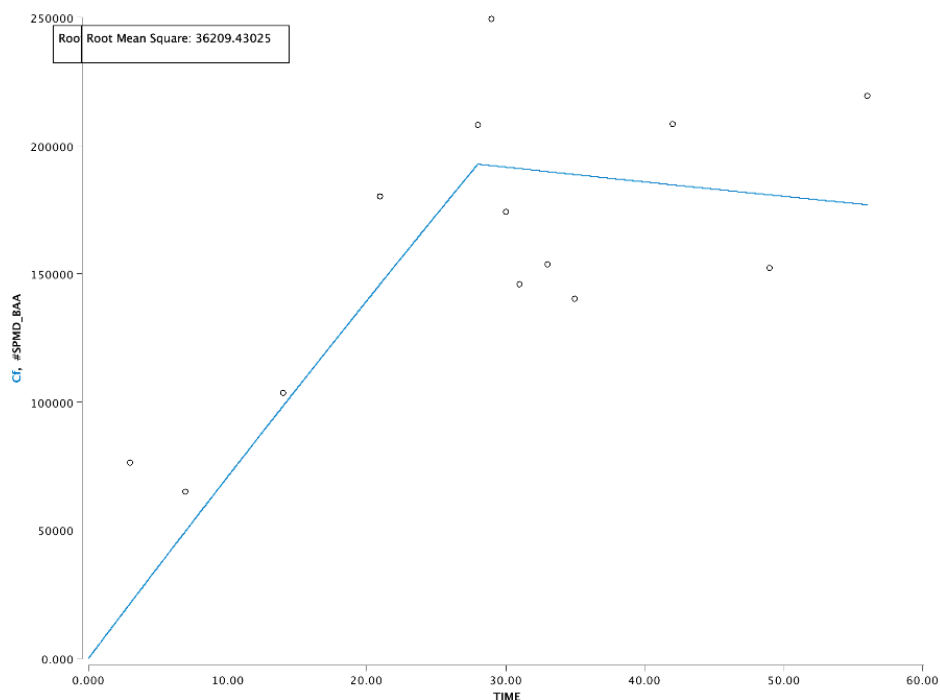


Fig. 4-2 SPMD における BaA の濃度変化

BaP の結果を Fig. 5-1 および 5-2 に示す。試験魚中濃度が検出下限値以下であったため、コイでの解析は参考値として算出した。取込期間において、コイでは低濃度ではあるが暴露 7 日目以降濃度は飽和していたが、SPMD では 28 日目でも濃度の上昇傾向が見られた。排泄期間において、コイでは急激な濃度の減少が見られ 5 日目には排泄開始時の 10%以下まで減少していたが、SPMD では非常に緩やかな排泄(溶出)の傾向が見られ定常状態まで達しなかった。

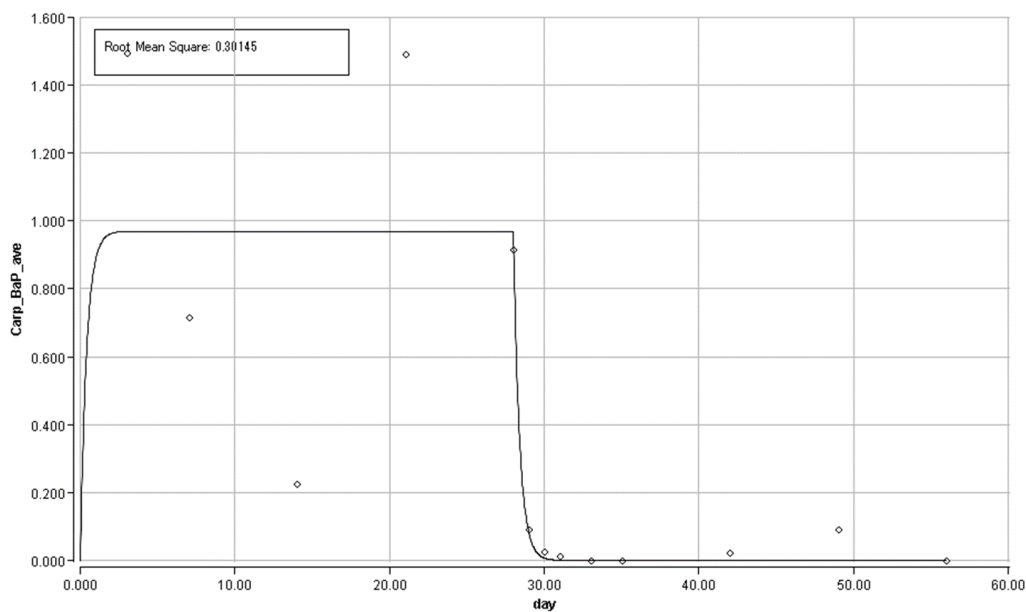


Fig. 5-1 コイにおける BaP の濃度変化

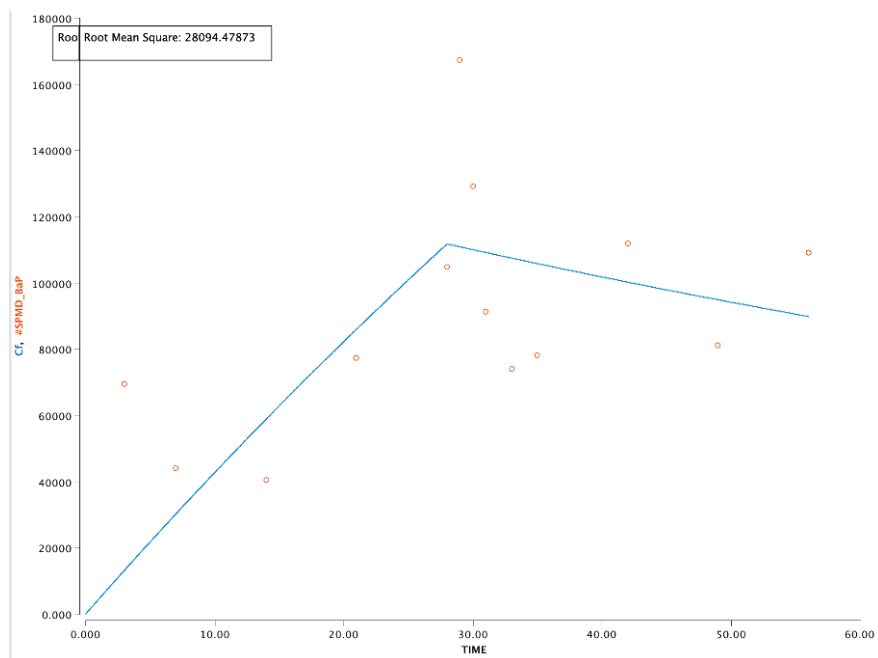


Fig. 5-2 SPMD における BaP の濃度変化

4-4. 試験結果の検討

フィッティングによって算出された取込速度定数(k_1)、排泄速度定数(k_2)、排泄半減期($t_{1/2}$)、および $\log P_{ow}$ を Table 10 に示す。なお BaA と BaP の試験魚での各種係数に関しては、試験魚中濃度が検出下限値以下であったため参考値として算出した。コイでは $\log P_{ow}$ の増加とともに k_1 は減少する傾向が見られたが、 k_2 と $t_{1/2}$ では明瞭な傾向は見られなかった。SPMD では $\log P_{ow}$ の増加とともに k_1 では明瞭な傾向は見られなかったが、BaP を除いて k_2 では減少し $t_{1/2}$ では増加する傾向が見られた。

Table 10 フィッティングから算出された各種係数

	Ant	Pyr	BaA	BaP
k_1 (コイ)	543	155	7.86	5.12
k_2 (コイ)	1.01	0.957	0.924	2.46
k_1 (SPMD)	13591	9166	14169	9539
k_2 (SPMD)	0.114	0.009	0.003	0.008
$t_{1/2}$ (コイ)	0.685	0.724	0.750	0.282
$t_{1/2}$ (SPMD)	6.100	74.20	225.7	88.96
$\log P_{ow}$	4.45	5.18	5.91	6.04

さらに、魚および SPMD から得られた脂質含量で補正した BCF を算出し(BCF_{KL})、 $\log P_{ow}$ と比較を行った(Table 11)。なお BaA と BaP の試験魚での BCF_{KL} に関しては、試験魚中濃度が検出下限値以下であったため参考値として算出した。 $\log P_{ow}$ の増加とともにコイでは減少し、SPMD では BaP を除いて増加する傾向が見られた。

Table 11 脂質含量で補正した生物濃縮係数

	Ant	Pyr	BaA	BaP
BCF_{KL} (コイ)	537	162	8.51	2.08
BCF_{KL} (SPMD)	5982	49069	230766	61226
$\log P_{ow}$	4.45	5.18	5.91	6.04

取込・排泄試験から得られた魚および SPMD での脂質補正 BCF (BCF_{KL})の対数値 ($\log_{10}$)と $\log P_{ow}$ の関係をプロットした (Fig. 6)。その結果、両者は異なる増加減少の傾向を示した。SPMD では BCF と $\log P_{ow}$ は正の相関を示し、 $y = 0.7849x + 0.4198$, $R^2 = 0.7731$, $P = 0.121$ であった。これに対して、コイでは BCF と $\log P_{ow}$ は負の相関を示し、 $y =$

$-1.4626x + 9.442$, $R^2 = 0.93$, $P = 0.036$ であった。PAH 類において、BCF と $\log P_{ow}$ が負の相関を示した原因として、PAH 類の取り込み経路の違いと生体内の代謝の影響が大きく寄与していると考えられた。一般に $\log P_{ow}$ が 1 から 7 の範囲にある化学物質では、BCF と正の相関があることが知られている。本研究で用いたコイを含む魚類においては PAH 類、特に BaP は水酸化体などに比較的代謝されやすいと考えられ、このため魚体内において BaP などの濃度が上昇しなかったものと推測された。また $\log P_{ow}$ が 5.5 を超える疎水性の強い物質(BaA および BaP)においては、SPMD のポリエチレン膜への吸着も寄与していると考えられた。

しかし、 $\log P_{ow}$ が 5 以下である Ant では $\log P_{ow}$ と $\log BCF_{KL}$ の間で比較的良好な正の相関関係が保たれている事が、先行研究の結果と比較して示唆された。

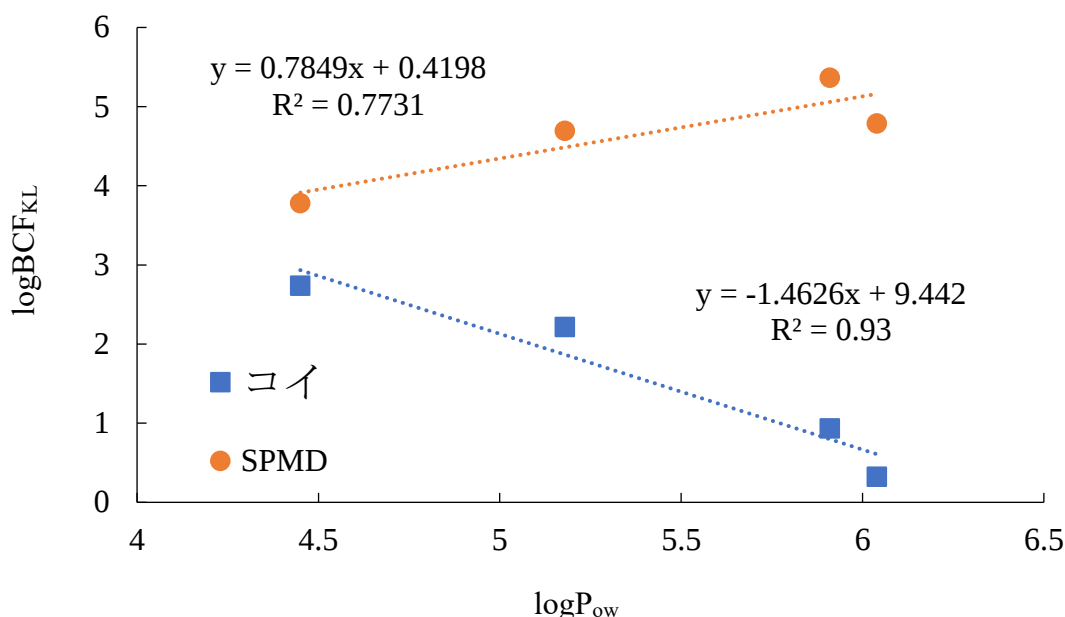


Fig. 6 各試験媒体での脂質補正-生物濃縮係数(BCF_{KL})と $\log P_{ow}$ の関係

以上、本研究および先行研究での結果から被験物質 (クロロベンゼン類および多環芳香族炭化水素類)の $\log P_{ow}$ が 4 から 5 の間であれば、SPMD を魚に代替して試験を行い BCF を予測できる可能性が示された。一方で SPMD のポリエチレン膜への吸着・脱着による影響も考慮する必要がある、ポリエチレン膜への吸脱着を考慮したモデル構築を行い、今後代謝などの影響や分析手法を更に検証していく必要がある。

5. 調査結果の公表

口頭発表予定

第 28 回 (2022 年) 日本環境毒性学会研究発表会

SETAC North America 43rd Annual Meeting

論文発表

Ecotoxicology and Environmental Safety (投稿予定)

6. 海外出張の内容

海外出張は実施していない。

7. 今後の課題

取込・排泄試験から得られた魚および SPMD での脂質補正 BCF (BCF_{KL})の対数値 ($\log_{10}$)と $\log P_{ow}$ の関係を検討した結果、両者は異なる増加減少の傾向を示した。今回の結果は、先行研究においてクロロベンゼン類では $\log P_{ow}$ が 4 から 5 の間であれば両者に非常に良好な相関性が得られた結果と異なる。これはまず PAH 類の取り込み経路の違いと生体内の代謝の影響が大きく寄与していると考えられた。また $\log P_{ow}$ が 5.5 を超える疎水性の強い物質(BaA および BaP)においては、先行研究で示唆された SPMD のポリエチレン膜への吸着が大きく寄与している事が考えられた。

本研究および先行研究での結果から、被験物質の $\log P_{ow}$ 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示された。一方で主に疎水性の強さ($\log P_{ow}$)に依存すると予想される SPMD のポリエチレン膜への吸着・脱着による影響を考慮し、吸着および脱着を数値モデル化する必要もある。また今後代謝などの影響や分析手法を更に検証していかねばならず、化学物質の代謝や蓄積に関与する酵素や結合タンパク質を SPMD 中に添加するなどによって手法を改良していくことが必要である。

8. 参考文献

- 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. *Environmental monitoring and assessment*, 186(9), 5639-5653.
- Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2004). Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental science & technology*, 38(2), 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. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(7-9), 455-465.
- Bleeker, E. A. J., Verbruggen, E.M.J. (2009). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. RIVM report 601779002/2009
- Chęć, E., Podgórska, B., & Węgrzyn, G. (2008). 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. *Environmental monitoring and assessment*, 140(1), 83-90.
- Chizhova, T., Hayakawa, K., Tishchenko, P., Nakase, H., & Koudryashova, Y. (2013). Distribution of PAHs in the northwestern part of the Japan Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 86, 19-24.
- Esteve-Turrillas, F. A., Pastor, A., Yusà, V., & de la Guardia, M. (2007). Using semi-permeable membrane devices as passive samplers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 703-712.
- 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. *Environmental Pollution*, 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(11), 1734-1739.
- Han, X., Nabb, D. L., Mingoia, R. T., & Yang, C. H. (2007). Determination of xenobiotic intrinsic clearance in freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat and its application in bioaccumulation assessment. *Environmental science & technology*, 41(9), 3269-3276.
- Harman, C., Bøyum, O., Thomas, K. V., & Grung, M. (2009). Small but different effect of fouling on the uptake rates of semipermeable membrane devices and polar organic chemical

- integrative samplers. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(11), 2324-2332.
- 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. *Marine pollution bulletin*, 63(5-12), 141-148.
- Harman, C., Holth, T. F., Hylland, K., Thomas, K., & Grung, M. (2009). Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in semipermeable membrane devices and PAH bile metabolite levels in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(3-4), 234-243.
- Harman, C., Thomas, K. V., Tollefsen, K. E., Meier, S., Bøyum, O., & Grung, M. (2009). Monitoring the freely dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and alkylphenols (AP) around a Norwegian oil platform by holistic passive sampling. *Marine Pollution Bulletin*, 58(11), 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(10), 1510-1516.
- Jimenez, B. D., Cirino, C. P., & McCarthy, J. F. (1987). Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo (a) pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic toxicology*, 10(1), 41-57.
- Ke, R., Li, J., Qiao, M., Xu, Y., & Wang, Z. (2007). Using semipermeable membrane devices, bioassays, and chemical analysis for evaluation of bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53(3), 313-320.
- Ke, R., Xu, Y., Huang, S., Wang, Z., & Huckins, J. N. (2007). Comparison of the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides by semipermeable membrane devices and caged fish (*Carassius carassius*) in Taihu Lake, China. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(6), 1258-1264.
- Koudryashova, Y., Chizhova, T., Tishchenko, P., & Hayakawa, K. (2019). Seasonal variability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coastal marine area in the northwestern region of the Sea of Japan/East Sea (Possiet Bay). *Ocean Science Journal*, 54(4), 635-655.
- Levine, S. L., Czosnyka, H., & Oris, J. T. (1997). Effect of the fungicide clotrimazole on the bioconcentration of benzo [a] pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*): in vivo and in vitro inhibition of cytochrome P4501A activity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(2), 306-311.
- McCarthy, J. F., & Jimenez, B. D. (1985). Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 4(4), 511-521.

- 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. *Environmental Science & Technology*, 42(2), 484-490.
- Richardson, B. J., Tse, E. S. C., De Luca-Abbott, S. B., Martin, M., & Lam, P. K. (2005). Uptake and depuration of PAHs and chlorinated pesticides by semi-permeable membrane devices (SPMDs) and green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Marine pollution bulletin*, 51(8-12), 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(9), 1243-1251.
- 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. *Marine Environmental Research*, 66(5), 477-486.
- Sun, H., Wang, C., Huo, C., & Zhou, Z. (2008). Semipermeable membrane device-assisted desorption of pyrene from soils and its relationship to bioavailability. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(1), 103-111.
- 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 Research*, 42(16), 4348-4356.
- 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. *Science of The Total Environment*, 496, 26-34.
- Wang, J., Bi, Y., Henkelmann, B., Pfister, G., Zhang, L., & Schramm, K. W. (2016). PAHs and PCBs accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China. *Science of the Total Environment*, 542, 899-907.
- 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(8), 1119-1127.
- Wang, J., Liang, W., Henkelmann, B., Pfister, G., & Schramm, K. W. (2015). Organochlorine pesticides accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China. *Environmental pollution*, 202, 160-167.
- 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). *Marine pollution bulletin*, 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(3), 351-364.

加茂 将史 (著). (2017). 生態学と化学物質とリスク評価. 共立出版.

小泉和夫 (監修), 化審法規研究会 (編集), 團野浩 (著). (2013). 逐条解説 化審法. ぎょうせい.

佐藤温重 (著). (1993). 毒性試験動物代替法. 栄光堂.

日本環境化学会 (編集, 著). (2019). 地球をめぐる不都合な物質 拡散する化学物質がもたらすもの. 講談社.

松本淳 (著). (2015). はじめての大気環境化学. コロナ社.

水川薫子, 高田秀重 (著). (2015). 環境汚染化学 有機汚染物質の動態から探る. 丸善出版.

Rachel Carson (原著), 青樹築一 (翻訳). (1974). 沈黙の春. 新潮社.