

疎水性化合物の濃縮性に及ぼす分子の立体的かさ高さの影響について

平成 15 年 11 月 21 日

財団法人 化学物質評価研究機構

目次

緒言	3
調査結果	3
Ⅰ．生体膜透過の機序	3
1．流れによる輸送 (Solvent drag)	4
2．単純拡散	4
1) 膜における分配-拡散	4
2) 非攪拌水層の影響	7
Ⅱ．魚の生体膜の構造と透過性	9
1．鰓の構造	10
2．鰓における物質の透過経路	12
Ⅲ．立体的かさ高さに着目した閾値定義の事例	15
1．立体効果の記述子	15
2．具体的事例	16
1) 分子量 (MW)	16
2) 分子容 (MV)	22
3) Effective cross sectional diameter (Deff)	24
4) Maximum diameter (Dmax)	25
Ⅳ．国際機関および規制当局が提案している閾値の事例	26
考察	28
参考文献	30
参考資料 1 イオンおよび解離性物質の生体膜の透過について	35
参考資料 2 魚の消化管および皮膚の構造	37
参考資料 3 魚の消化管経由の取り込みに対する閾値定義の事例	39
参考資料 4 立体的かさ高さと膜透過に関する一般知見	41
参考資料 5 主要参考文献要約	43

緒言

ここでは化審法で測定が求められる外来性化合物 (Xenobiotics) の水から魚への直接濃縮性に的を絞り、その濃縮過程に及ぼす化合物分子の立体的かさ高さの影響について調査を行った。

直接濃縮性は一般に化合物の疎水性の支配を受けるとされているが、一方で疎水性と分子の立体的かさ高さの間には共相関性 (Co-linearity) が存在するため、疎水性の高い場合でも立体効果に起因する生体膜透過の制約により低濃縮性を示すことが予想される。

ここではこの立体効果に関する閾値定義の可能性を探るため、生体膜透過の機序 (I 章)、主要取り込み経路と考えられる鰓の構造と透過性 (II 章)、立体的かさ高さに着目した閾値定義の事例 (III 章)、そして国際機関および規制当局が提案している閾値の事例 (IV 章) について調査し考察したので報告する。

調査結果

I. 生体膜透過の機序

生体膜における化合物の透過機序としては下記のものが考えられている (古賀 1964、McKim ら 1985、ゲニス 1990、山口 1991、Petty 1993)。なお、透過する経路により、経細胞輸送 (Transcellular transport) と傍細胞輸送 (Paracellular pathway) と区分する場合もある。

ここで特に水から魚への直接濃縮性が問題となる疎水性の外来性化合物 (Xenobiotics) の取り込みに大きく関わるのは以下の「A」と「B-1」と考えられており (西原ら 1993)、ここではこれら 2 つの機序に関する理論や経験則について次に記す。

A : 流れによる輸送 (Solvent drag)

B : 濃度勾配による輸送 (Diffusional transport)

B-1 : 単純拡散 (Simple diffusion)

B-2：促進拡散 (Facilitated diffusion)

B-2-a：チャネル輸送 (Channel transport)

B-2-b：担体輸送 (Carrier transport)

C: エネルギー依存輸送 (Energy-dependent transport)

C-1：共輸送、逆輸送 (Cotransport, antiport)

C-2：能動輸送 (Active transport)

C-2-a：一次性能動輸送 (Primary active transport)

C-2-b：二次性能動輸送 (Secondary active transport)

D：膜動輸送 (Cytosis)

D-1：飲作用 (Pinocytosis)

D-2：食作用 (Phagocytosis)

1. 流れによる輸送 (Solvent drag)

生体膜には細孔 (pore) や経路 (channel) が存在し、化合物は膜を横切る圧力差に比例した水の流れと共に、膜を透過すると考えるものである。このような透過機構では流体力学的な解析が可能であり、球形の化合物の透過係数 P_s は次式で与えられる (橋本 1976)。

$$P_s = (N d p^2 / (12 N_A \eta d c d m)) \cdot (1 - d c / d p)^2 \cdot \left\{ \int_0^1 2 \pi \beta d \beta \cdot \int_0^1 1 / F(d c / d p, \beta) 2 \pi \beta d \beta \right\} \quad [1]$$

ここで $d p$: 細孔の直径、 $d c$: 化合物の直径、 $d m$: 膜の厚さ、 N_A : Avogadro 数、 N : 細孔の数、 η : 粘度、 $F(d c / d p, r)$: 球の大きさの補正式、 β : 積分変数(区間 $[0, (d p - d c) / 2]$)

右辺第 1 項は Stokes-Einstein の、第 2 項は化合物分子および細孔の直径に基づく立体制約の、第 3 項は細孔と球形粒子の流体力学的な相互作用 (摩擦作用) を表す。この式によって、化合物の立体的なかさ高さが P_s の大小を決定すること、および化合物の直径が細孔の直径と比べて大きい場合には、取り込みは認められなくなることが示される。

2. 単純拡散

1) 膜における分配-拡散

分子が脂質二重膜を通過するには、まず、(1) 境界面における抵抗または自由エネルギーの障壁に打ち勝って水中から膜の中に入り、(2) 脂質二重層を拡散し、(3) 再び境界面での抵抗に打ち勝って膜の反対側 (すなわち生体内) に出なければならない。一般に、非電解質の脂質二重膜にお

ける透過性は、次の分配-拡散モデルで説明可能とされている (図 1)。

まず、分配係数 (K_m) は以下のように定義される。

$$K_m = C_{m1}/C_{w1} = C_{m2}/C_{w2} \quad [2]$$

ここで、 C_{m1}, C_{m2} : 外側 (1)、内側 (2) の膜境界面近傍の膜中化合物濃度

C_{w1}, C_{w2} : 外側 (1)、内側 (2) の膜境界面近傍の水中化合物濃度

化合物の流れ F は Fick の第 1 法則より、この K_m と化合物の膜中の拡散係数 D_m を用いて以下の式で表すことができる (Hayton 1990)。

$$F = -D_m (C_{m2} - C_{m1})/dm = D_m \cdot A \cdot K_m \cdot (C_{w1} - C_{w2})/dm = D_m \cdot A \cdot K_m \cdot \Delta C/dm \quad [3]$$

ここで、 A : 膜の有効吸収面積、 K_m : 化合物の膜相/水相間の局所での分配係数、 D_m : 化合物の膜中の拡散係数、 dm : 膜の厚さ、 ΔC : 膜の両側の濃度差

従って、膜透過性係数 P_m は次の式で表される。

$$P_m = D_m \cdot K_m/dm \quad [4]$$

すなわち、化合物の単純拡散による膜透過係数 P_m は分配係数 K_m と拡散係数 D_m の関数となる。

ここで、拡散係数は化合物の立体的かさ高さと形状に依存するとされ、連続液体中における半径 r の球体の拡散係数 D は Stokes-Einstein 式を適用すると以下のように表される。この式は、球体の D がその容積の $1/3$ 乗の逆数に比例することを示す。なお、球形以外の分子の拡散係数は[5]式で表されるものより低値となる。

$$D = kT/(6\pi\eta r) \quad [5]$$

ここで、 k : ボルツマン定数、 T : 絶対温度、 η : 粘度、 r : 球体半径

そしてこの[5]式に基づき化合物の水中での拡散係数 D_w を記述する次の経験式が報告されている (Barber 1988)。

$$D_w = 1.326 \times 10^{-4} / (\eta^{1.4} \nu^{0.598}) \quad [6]$$

ここで、 η : 水の粘度、 ν : 化合物の分子容 (cm^3/mol)

同様に膜中の化合物の拡散係数 D_m についても分子の立体的かさ高さが影響することが確認されており、例えば、古賀 (1964) は記述子として分子量 M を用い、[7]式の関係を経験的に導き出した。Gobas ら (2000) も D_m は分子量 M の 0.33~0.50 乗の逆数に比例するとしている。

$$D_m \propto 1/M^{1/2} \quad [7]$$

一方で、生体膜の脂質二重層における化合物の拡散挙動は連続液体中の拡散とは異なり Stokes-Einstein 式が適用できないとする報告もあり、分子の立体的かさ高さの増加に伴い急激に D_m が減少するとしている。例えば、ポリマー中では D_m は分子量の 1.1~3.8 乗の逆数に、Dipalmitoylphosphatidylcholine の人工脂質二重膜中の D_m は分子量の 0.83 乗の逆数に、各種生物膜では膜透過性係数 P_m は分子量の 2.9~6.0 乗の逆数に比例することが報告されている (Lieb ら 1969)。Lieb ら (1986) はこの理由を、生体膜中の化合物の拡散が、ポリマー中での並進拡散の場合のような、自発的なゆらぎにより形成される隣接孔への連続的な移動現象であるためと説明している。また、人工脂質膜と比べると生体膜の方が分子の立体的かさ高さによる D_m の抑制がより顕著であるのは、生体膜を構成する脂質成分が密に充填されて分子間の空隙がより小さいためと考えられている (Xiang ら 1998、Oppenhuizen ら 1990)。

なお、この取り込み機序において化合物がイオン性を有する場合には、生体膜中で水和エネルギーを失うことによる不安定化などが起こり、膜中での単純拡散はより困難になると考えられる (参考資料 1 を参照のこと)。

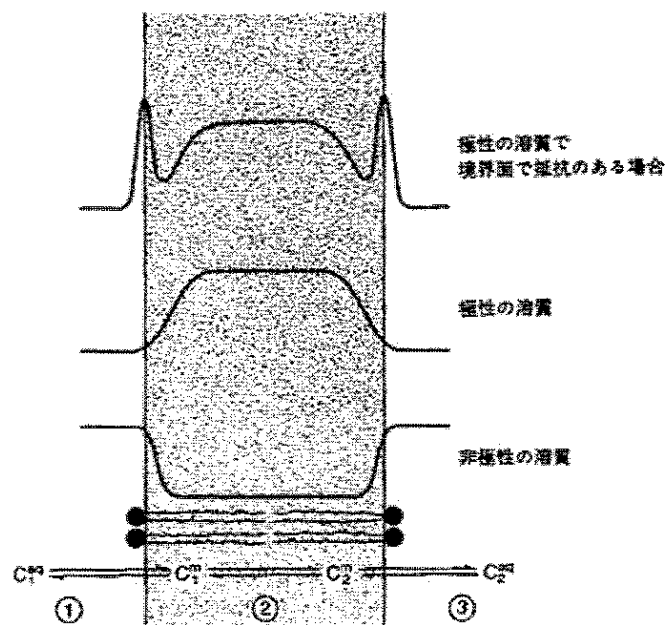


図1 脂質二重膜を通過する極性、非極性溶質に対する自由エネルギー障壁の形を示す模式図。膜中(m)と水相(aq)での溶質濃度も示す。(ゲニス 1990)

2) 非攪拌水層の影響

上記の膜における分配-拡散の関係を更に微視的に捉えると、膜透過係数が比較的大きい化合物においては、膜表層に存在する非攪拌水層 (Unstirred water layer、Boundary layer、Stagnant layer) の影響が現れる。非拡散水層は流動性の抑えられた水相であるが、実際の生体膜ではこの部分に膜成分である糖脂質や糖タンパク質などの糖鎖部分が存在して流動性をさらに抑え、最大で厚さ $100\mu\text{m}$ にまで達して疎水性物質を通し難くしている。このため、全体として観察される単純拡散による透過係数 P_{obs} は以下のように表される (山口 1991)。

$$P_{obs} = 1/(1/P_m + 1/P_aq) = D_m \cdot D_{aq} \cdot K_m / (d_m \cdot D_{aq} + 2d_{aq} \cdot K_m \cdot D_m) \quad [8]$$

ここで、 P_{aq} は非拡散層の透過係数、 D_{aq} : 化合物の水中の拡散係数、 d_{aq} : 非拡散水層の厚さ

ここで、疎水性の低い化合物の場合は $d_m \cdot D_{aq} \gg 2d_{aq} \cdot K_m \cdot D_m$ となるので、 P_{obs} は[4]式と同様に表される。

一方、疎水性の高い化合物の場合は $d_m \cdot D_{aq} \ll 2d_{aq} \cdot K_m \cdot D_m$ であり、透過係数は[9]式で表される。すなわち、非攪拌水層での拡散が取り込みの障害となりうる (Saarikoski ら 1986、Hayton ら 1990)。この場合も、[6]式などの経験式を踏まえると、分子量などの分子の立体的かさ高さが取り込みの制約要因になり得ることを示している。

$$P_{obs} = D_{aq} / (2d_{aq}) \quad [9]$$

さらに、Yalkowsky ら (1980) は、これら[8]式の関係に「1」で述べた流れによる輸送機序の支配下にある Aqueous pore の寄与を含めて、透過係数 P_{obs} を記述する [10]式の関係を報告している。これより ① K_m (すなわち $\log P$) が極めて小さい極性物質では Aqueous pore の透過により P_{obs} が決定され、② K_m がこれより増大すると P_{obs} と K_m との間に比例関係 ([4]式) が成立し、そして、③ K_m がさらに増加すると D_w の制約により P_{obs} が決定されるとしている (図 2)。

$$P_{obs} = 1 / (1 / (1/P_m + 1/P_{aq}) + 1/P_p) \quad [10]$$

ここで、 P_p : 細孔による透過係数

この「①～③」の各領域においても分子の立体的かさ高さが膜透過の制約要因となることが明らかであり、例えば、 $MW > 200$ の化合物は「①」の Aqueous pore は透過できないとされている (Yalkowsky ら 1980)。

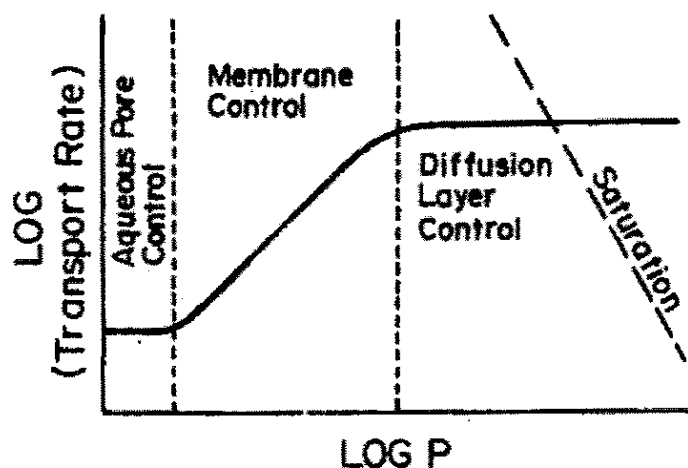


図2 Pore の通過が無視できない場合の膜透過速度と分配係数の関係 (McKim 1985)
logP : オクタノール／水系の分配係数の対数値

II. 魚の生体膜の構造と透過性

このように疎水性化合物の直接濃縮を支配すると考えられる「流れによる輸送」と「単純拡散」の取り込み機序に対しては、化合物分子の立体的な高さとその制約因子として働くことが明らかである。

次に、実際の取り込みの場となる鰓の構造について述べ、さらに、その構造と透過機序との関係について整理した。なお、外来性化合物 (Xenobiotics) の取り込みは鰓以外にも皮膚や消化管からも起こり得るが、皮膚は組織の密度が高く、疎水性と親水性の複数の層で構成されているため透過性は相対的に低いとされている (Spacie ら 1985)。また、Randall (1998) や Yang ら (2000) は消化管を介した取り込みよりも鰓を介した直接取り込みの経路が重要としており、化審法の試験系も後者に着目したものである。特に淡水魚では浸透圧調節のため消化管からの水の吸収は殆ど無いと考えられることから鰓が最も重要な取り込み経路と考えられる。鰓は膜が薄く、体表面の 2~10 倍の面積を持ち、拡散効率が高い構造であることから、特に化合物を取り込みやすい部位と考えら

れる。なお、消化管および皮膚の構造については参考までに参考資料2に記した。

1. 鰓の構造

水生生物である魚は一般に水を呼吸媒質として水呼吸 (Water breathing) を行っているが、鰓は突起やひだの形成によって表面積を増大した薄い上皮と、水流とは逆に血液を流す方法 (Counter current) で多量の血液を供給できる発達した毛細血管床 (Capillary bed) を備えることによってガス交換を効率よく行う主要な呼吸器である (図 3)。咽頭と外界との開口部である鰓裂の前後の壁に並んで列生する粘膜の扁平なひだ状のものが鰓弁 (Gill filament、Gill lamella) であり、その鰓弁の両面に突出したさらに多数のひだを二次鰓弁 (Secondary gill lamella) という (板沢 1987、難波 2002)。二次鰓弁の表面は薄い上皮細胞、基底膜および内腔を支える壁柱細胞 (Pillar cell) によって構成され、これらを合わせた厚さは魚種によって異なるが $0.2 \sim 44.3 \mu\text{m}$ (平均値は $0.5 \sim 11.3 \mu\text{m}$) と報告されている (岩井 1985)。二次鰓弁には毛細血管が網目状に発達し、これらの上皮細胞は呼吸細胞 (Respiratory cells) と呼ばれ、主にガス交換が行われる。魚と外部環境の接触箇所のほとんどはこの長い平面状の呼吸細胞の層であり、外部環境と鰓との間の主な拡散障壁はこの細胞層の外側の膜である (Sardet 1979)。二次鰓弁の上皮 (呼吸細胞) は細胞間が Tight junction で繋がっており、その薄さの割にはイオン、水、有機炭素は単純拡散では相対的に透過しにくいと考えられている。二次鰓弁の組織にはこの他に非呼吸細胞の塩類細胞 (Chloride cell) と少数の粘液細胞 (Mucous cell) が存在する。塩類細胞は淡水魚では腎臓から失われる NaCl を外界から吸収し、海水魚では腸管から取り込まれた塩を排泄する。この塩類細胞は、淡水魚では1つの細胞で存在し、隣接する呼吸細胞との間は同様な Tight junction で繋がっているが、海水魚では複数の塩類細胞が開口部を共有して鉗合 (互いに絡み合った状態) し、短くかつ浅い Tight junction (Leaky junction) で繋がった複合体となる (図 4)。これによって外界の媒体と血液が実質的にこの junction 部位で接し、leaky な深い空洞が形成され、海水魚において水分と共に腸管から吸収された Na^+ などの 1 価イオンが鰓から排出されるために有利な構造となっている。淡水魚では塩類細胞の Leaky junction は存在しないが、魚を淡水から海水に適応させると塩類細胞の数は増加し、この Leaky junction が形成される。また、この塩類細胞には、淡水魚、海水魚とも、体内側の細胞膜が複雑に細胞内に陥入した直径約 50nm の管状構造の細網腔が存在する。さらに、塩類細胞は粘膜側の細胞膜にも内側に陥入した開口部 (Apical pit) を形成する。この粘膜側の開口部と体内側の細網腔の間には、液胞に類似した構造の管状小胞系 (Tubulovesicular) が形成され、内部環境と外部

環境が一過的に接する経路となっている。この塩類細胞の細胞内腔および外界に接する側の細胞膜には各種のイオン輸送タンパクが存在し、これらがイオン、グルコース、アミノ酸のように生命維持に必要な物質を、イオンの能動輸送を駆動力として細胞内、体内および外界間で輸送し、また、体内の浸透圧を調整している (Sardet, 1979、Isaia 1984、金子 2002)。一方、粘液細胞は糖タンパク質の粘液を分泌して二次鰓弁の表面に薄い粘膜層 (Mucous layer) を作る。

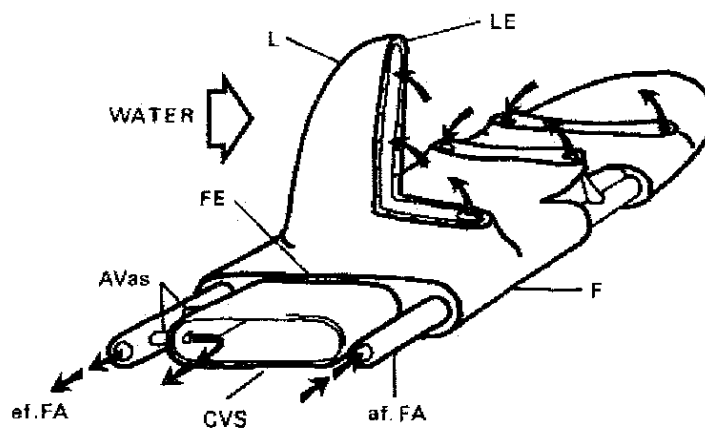


図3 鰓における血流の模式図 (Payan 1984)

af.FA, afferent filamental artery; AVas, arteriovenous anastomosis; ef.FA, efferent filamental artery; F, filament; FE, filamental epithelium; CVS, central venous sinus; L, lamella epithelium

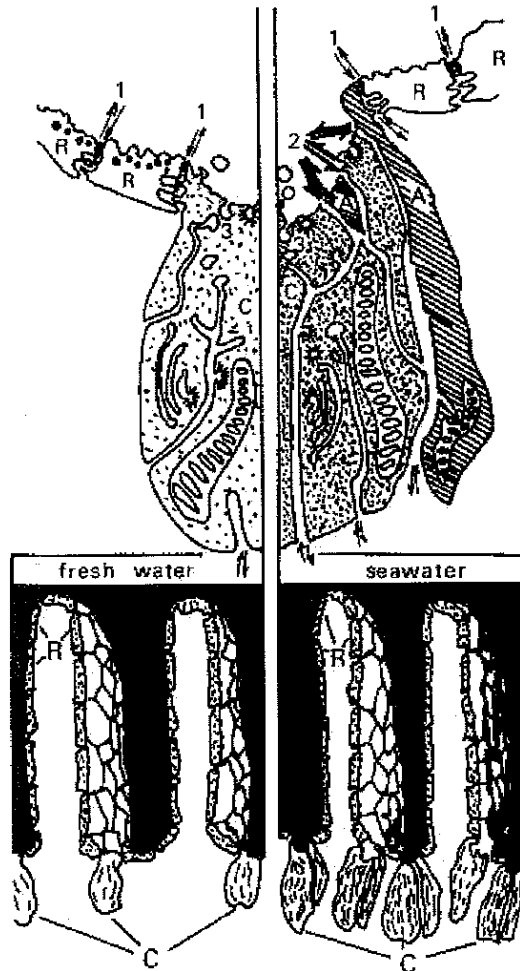


図4 海水魚と淡水魚の塩類細胞
(Payan 1984).

上皮を透過する可能性がある3つ経路を示す(1,2,3). 淡水中では呼吸細胞(R)と塩類細胞(C)はtight junctionで繋がっている(1). 海水中では発達した塩類細胞とその腕(A)が管状の細網腔のleaky junctionを通して外部環境と繋がっている(2). そしてこれらは淡水魚と海水魚でともに認められている管状小胞系(3)に繋がっている.

2. 鰓における物質の透過経路

上記の構造を踏まえると、水中の化合物が魚体内に取り込まれるためには、次のいずれかの経路を通らなければならない(Isaia 1984)。

- a) 鰓表面積の96%を占める呼吸細胞の膜を通した経細胞経路 (Transcellular pathway)
- b) 鰓表面積の4%を占める塩類細胞の膜を通した経細胞経路 (Transcellular pathway)
- c) 細胞接合部を通した傍細胞経路 (Paracellular pathway)

ここで外来性化合物についてはその殆どが経細胞経路で取り込まれると考えられている (Hayton ら 1990)。Isaia ら (1982、1984) は、呼吸細胞と塩類細胞における化合物の取り込みを個別に評価して、化合物の特性によって両者の寄与の割合が大きく異なることを報告した。すなわち、①疎水性および親水性の低分子は二次鰓弁の呼吸細胞を通る経細胞経路 (Isaia の分類の a)、②多糖類は非呼吸細胞である塩類細胞を通る経細胞経路 (同 b)、③マンニトールなどの六炭糖は傍細胞経路 (同 c) によってそれぞれ取り込まれることを示した (図 5)。また、Sardet ら (1979) は、電顕による鰓の構造評価により、海水魚の塩類細胞の Leaky junction ではイオンや低分子は透過するが、他の表皮細胞間の結合部では、海水魚、淡水魚とも電解質や高分子は透過しないと結論している。

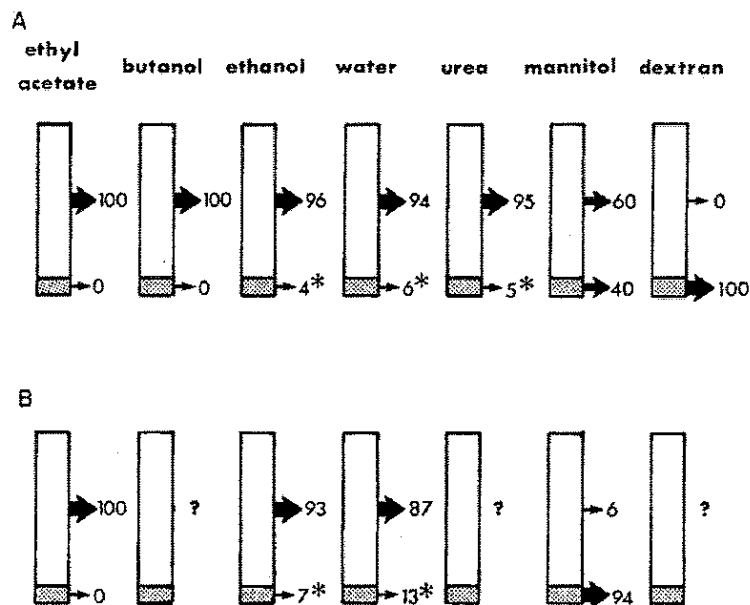


図 5 淡水マス (A) および海水馴化マス (B) の非電解質の取り込みにおいて呼吸細胞 (白色部) および塩類細胞 (網掛け部) を経由する割合 (Isaia 1982、1984)。

デキストランの取り込みおよび排泄は塩類細胞による。マンニトールの取り込みは、海水魚では主として塩類細胞より、淡水魚では呼吸細胞と塩類細胞の両者による。

*:有意差なし

以上のこれまでに判っている知見を整理すると表 1 が得られよう。ここでは「I」で述べた透過機序との関係付けも試みた。

表 1 鰓の構造を踏まえた透過経路の整理

	呼吸細胞経由	非呼吸細胞 (塩類細胞など) 経由
経細胞経路 (Transcellular pathway)	Isaia の分類の a) - 対象となる化合物：低分子 (疎水性、親水性) - 予想される支配機序：呼吸細胞膜における単純拡散 - 予想される制約要因：疎水性および分子の立体的かさ高さ	同 b) - 対象となる化合物：親水性高分子 - 予想される支配機序：塩類細胞の管状小胞系 (Tubulovesicular system) におけるエネルギー依存の能動輸送、または小胞輸送) - 予想される制約要因：不明
傍細胞経路 (Paracellular pathway)	同 c) - 対象となる化合物：親水性低分子 (イオンは除く) - 予想される支配機序：呼吸細胞間の Deep tight junction における流れによる輸送／水中拡散 - 予想される制約要因：分子の立体的かさ高さ	同 c) - 対象となる化合物：親水性低分子 (イオンを含む) および親水性高分子 - 予想される支配機序：塩類細胞の Shallow tight junction (Leaky junction)、あるいは管状細網腔 (Tubular reticulum) における流れによる輸送／水中拡散

このように非呼吸細胞である塩類細胞を経由する取り込みでは、経細胞経路と傍細胞経路のいずれにおいても高分子が取り込まれ得ることが示唆される。しかし、これら高分子はいずれも多糖類などの親水性のものに限られ、特に、経細胞経路はエネルギーを必要とする能動輸送によるものである。

水からの直接濃縮性が懸念される疎水性の外来性物質は全て呼吸細胞を経由した経細胞経路で取り込まれるものと考えられ、「I」で述べたとおり単純拡散の制約を受けるものと考えられる。

Ⅲ. 立体的かさ高さに着目した閾値定義の事例

主に水から魚への直接濃縮に対する閾値定義の事例を以下に示す。なお、消化管経由の濃縮に対する閾値も基本的にこれに一致するものであった (参考資料 3 を参照のこと)。また、魚以外の生物材料を用いて定義された閾値の事例も参考までに参考資料 4 に示した。

1. 立体効果の記述子

閾値定義に用いられた分子の立体的かさ高さの記述子の代表的なものを表 2 に示した。

表 2 分子サイズに関する代表的な記述子

記述子名	特徴
分子量 (MW)	分子 1 モル当たりの重量。分子サイズに関連する最も簡便なパラメータであり、化合物の凡そのかさ高さを見積もることができる。
分子容 (MV)	分子 1 モル当たりの体積。1 分子当たりの体積で示される場合もある
Effective cross sectional diameter (Deff)	分子動力学法などで最適化した 3 次元構造が入る円柱の最小直径。あるいはその 3 次元構造が入る最小の大きさの直方体 (Box) の (縦、横、高さのうち) 2 番目に小さい長さに相当する。Minimal internal cross section と表記される。
Maximum diameter (Dmax)	分子動力学法などで最適化した 3 次元構造に外接する球の最小直径。あるいはその構造が入る最小の大きさの直方体 (Box) の (縦、横、高さのうち) 最も大きい長さに相当する。

その他の関連するパラメータとして、Cross-sectional area (Xiang ら 1998)、Parachor (Tulp ら 1978)、Molar refractivity (Tulp ら 1978)、Steric effect coefficient (Shaw ら 1984)、Molecular surface area などがある。

2. 具体的事例

1) 分子量 (MW)

Zitko ら (1976) はサケを用いて Halogenated biphenyl 類など 13 化合物の濃縮性を評価し、MW 546 の Hexabromobenzene が水および餌のいずれの経路でも取り込まれないことを明らかにし、これらの観察結果から、取り込み制約の閾値として MW 600 を提案している (表 3 の No.1)。また、Anliker ら (1988) は、分散染料や Halogenated aromatic hydrocarbon 類など 43 化合物の水から魚への直接濃縮倍率 (以下 BCF) を解析し、MW 500 以上の化合物では低濃縮となることを報告している (表 3 の No.2、図 6)。一方、Dimitrov ら (2003) は 694 の多様な化合物の種々の魚種に対する BCF を解析し、取り込み制約の閾値として MW 700 を得た (表 3 の No.3、図 7)。そして、MW は $Deff$ や $Dmax$ に比べて極めて安全サイドの閾値となることが示された。

一方、これに反し、Martin ら (2003) は Perfluorinated acid 類 7 化合物の BCF をニジマスで測定し、MW 600~700 でも BCF は 18000~23000 と極めて高くなることを示した (表 3 の No.4、図 8)。しかしながら、この試験においては (1) Perfluorocarboxylate 類と Perfluorosulfonate 類 の混合物 (魚中に検出されなかった 4 化合物を含めて全 11 化合物) を用いて暴露を行っており、このような界面活性作用を有する物質の BCF を混合物で正確に測定できるのか (すなわち分配則を適用できるのか) 疑問が持たれると共に、BCF は速度論を適用して取り込み速度定数と排泄速度定数の比で求めているが、(2) 長鎖成分になるほど水中濃度は極めて低値となり、また、その変動も大きい (RSD は $\pm 30\%$) ため、或いは (3) 長鎖から短鎖の全成分に対して一律同じ取り込み期間 (288hr) を設定しているが、長鎖成分の取り込み期間終了時の魚体中濃度は定常状態のその約 $1/3$ にしか達していないため、評価された BCF の精度もかなり低いものと推察される。なお、MW700 を超えてもある程度の濃縮が起こり得る理由としては、後述のとおりフッ素原子の密度の高さに起因して MW が立体的かさ高さを過大評価するためと考察される。

その他にも、明確な閾値は示されていないものの Brooke ら (1986) の Chlorohydrocarbon 類約 30 化合物での解析事例があり (表 3 の No.5、図 9)、BCF が MW 300 付近で最大となり、MW がこれを超えると BCF の低下傾向が認められることを報告している。同様に、Yakata ら (2003) はコイで測定された Aryl fluoroalkyl ether 類 7 化合物の BCF が MW 300~430 付近で最大となり、これよりも分子量の大きい領域では $\log BCF$ が MW に依存して一次的に減少する傾向を報告している (表 3 の No.6、図 10)。

また、Anliker ら (1988) は先に挙げた 43 化合物の BCF と $\log P$ 、MW の間に下記の関係を見出

した。MW を加味することで相関性が向上し、また、MW の偏回帰係数は負であることから立体効果に起因する取り込み制約の存在が示唆される。

$$\log BCF = -2.38 (\pm 1.05) + 1.44 (\pm 0.39) \log P - 0.11 (\pm 0.03) (\log P)^2$$

(分子量による制約を考慮しない回帰式：n=42, s=1.17, r=0.48)

$$\log BCF = 0.88 (\pm 1.26) + 0.82 (\pm 0.37) \log P - 0.054 (\pm 0.03) (\log P)^2 - 0.0048 (\pm 0.001) MW$$

(分子量による制約を考慮した回帰式：n=42, s=1.01, r=0.65)

なお、Saito ら (1990) は農薬 (MW 420、logP 6.4) とオリゴマー (MW 範囲 2000～50000、logP 範囲 14 以上) のコイ鰓での取り込み挙動を電頭オートラジオグラフィーで観察し、分子サイズが小さい農薬は鰓全体 (特に膜部分) に取り込まれる一方で、分子サイズが大きいオリゴマーでは外界に接する上皮細胞にも取り込みが認められないことを報告している。

表 3 MW での解析事例

No.	研究者 (年度)	対象化合物	BCF 測定魚種	閾値
1	Zitko ら (1976)	Halogenated biphenyl 類 11 化合物および Halogenated benzene 類 2 化合物 (MW 範囲 223~546)	サケ	MW 600
2	Anliker ら (1988)	分散染料 23 化合物、Halogenated aromatic hydrocarbon 類 16 化合物、有機色素 2 化合物、増白剤 1 化合物、除草剤 1 化合物 (MW 範囲 147~944、logP 範囲 1.77~11.20)	不明	MW 500
3	Dimitrov ら (2003)	非イオン性 610 種、イオン性 84 種 (MW 範囲は不明、logP 範囲 -3.98~13.98)	多種 (詳細は不明)	MW 700
4	Martin ら (2003)	Perfluorocarboxylate 類 5 化合物、Perfluorosulfonate 類 2 化合物 (MW 範囲 400~714、フッ素原子数 13~27、炭素鎖数 6~13)	ニジマス	不明 (MW >700)
5	Brooke ら (1986)	Chlorohydrocarbon 類 約 30 化合物 (MW 範囲 : 約 100~約 400)	不明	不明 (MW 300 付近 で最大)
6	Yakata ら (2003)	Aryl fluoroalkyl ether 類 7 化合物 (MW 範囲 292~498)	コイ	不明 (MW300 ~ 430 付近で最大)

「閾値 不明」について：閾値の提案を当該研究者が積極的に行っているわけではないが、観察事例として引用すべきと考えた。() 内はその報告内容から読みとれる閾値相当の MW 値または取り込み指標と MW の関係を示す。

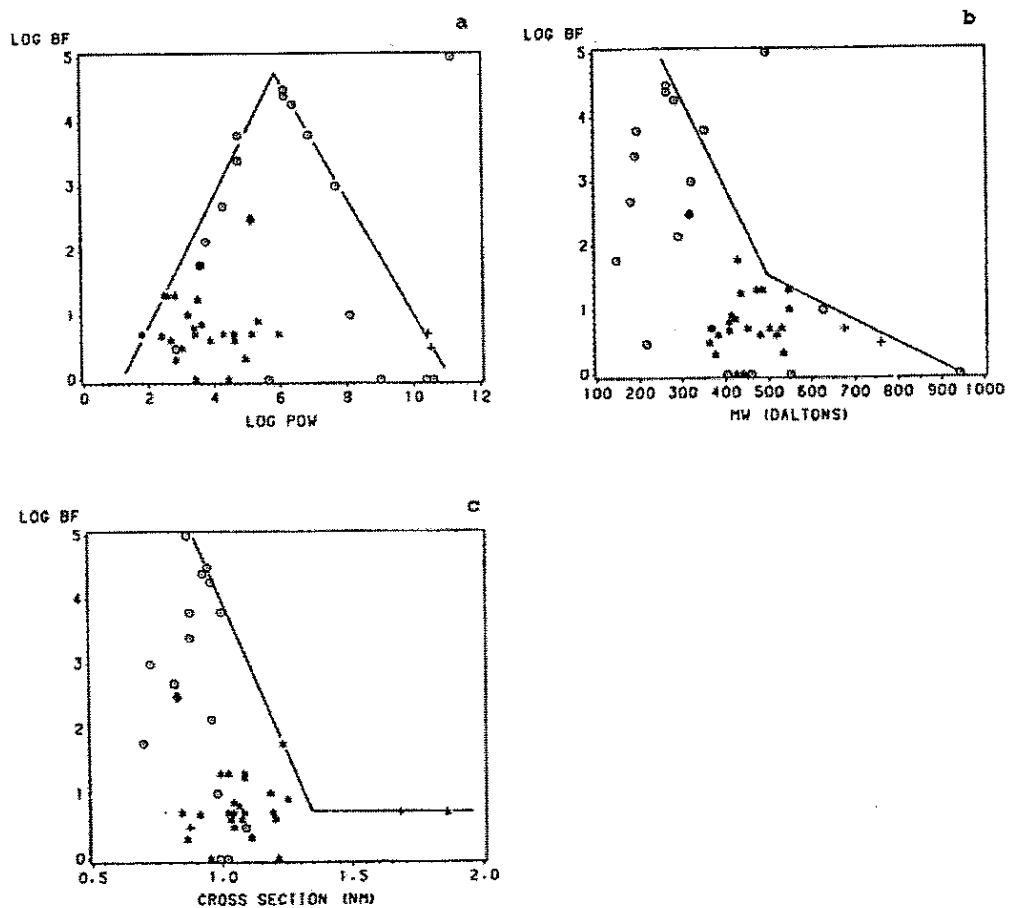


図 6 $\log BCF$ と a) $\log P$ 、b) 分子量、c) Effective cross sectional diameter の関係 (Alinker ら、1988)
Disperse dyes (asterisks) , Pigments (crosses) , Atrazine and Optical brightener (clubs) ,
Halogenated hydrocarbons (circles)

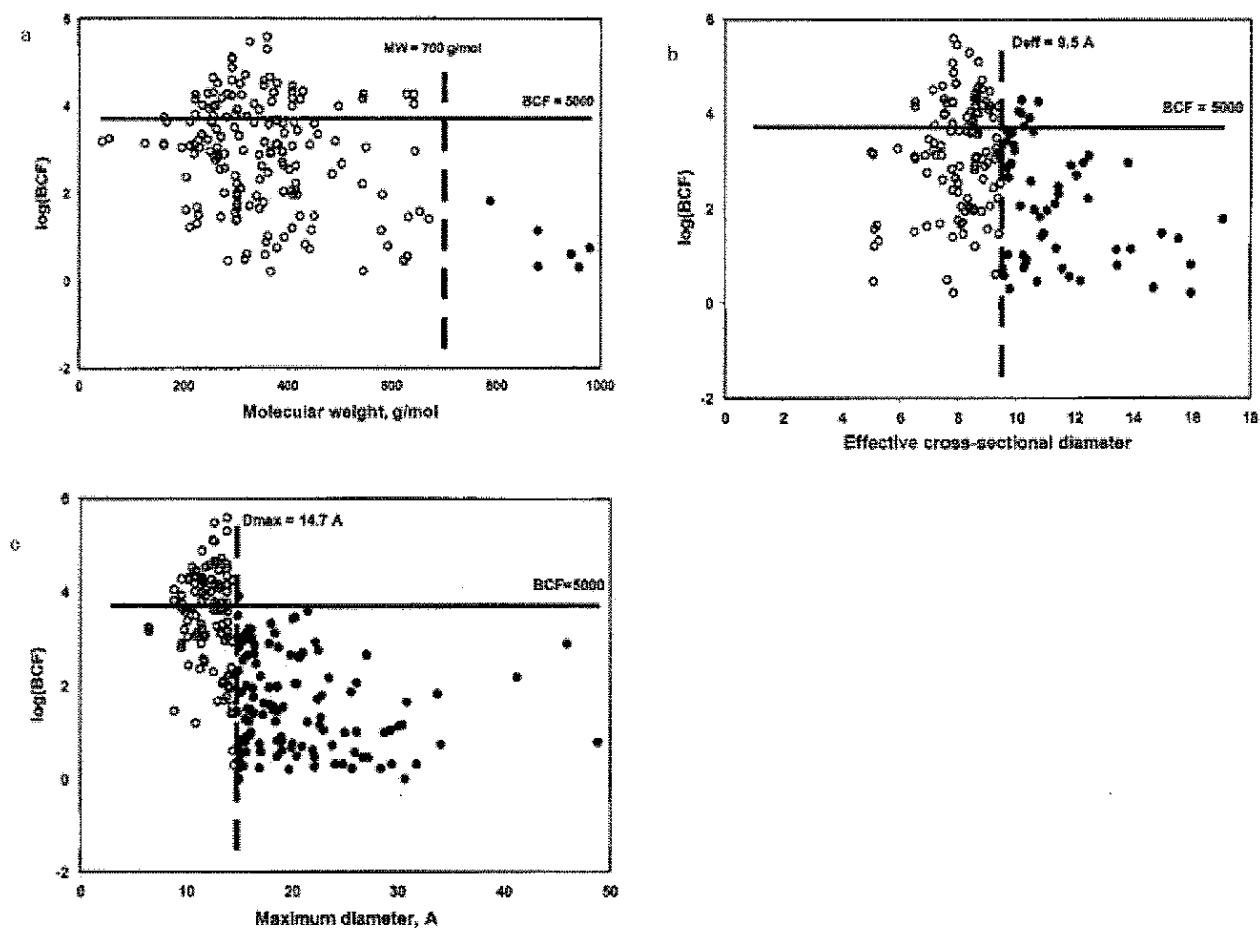


図 7 $\log \text{BCF}$ と分子立体効果の関係 (Dimitrov 2003)

- a. Molecular weight
 - $MW < 700$ 、● $MW \geq 700$
- b. Effective cross-sectional diameter
 - $D_{\text{eff}} < 9.5 \text{ \AA}$ 、● $D_{\text{eff}} \geq 9.5 \text{ \AA}$
- c. Maximum diameter
 - $D_{\text{max}} < 14.7 \text{ \AA}$ 、● $D_{\text{max}} \geq 14.7 \text{ \AA}$

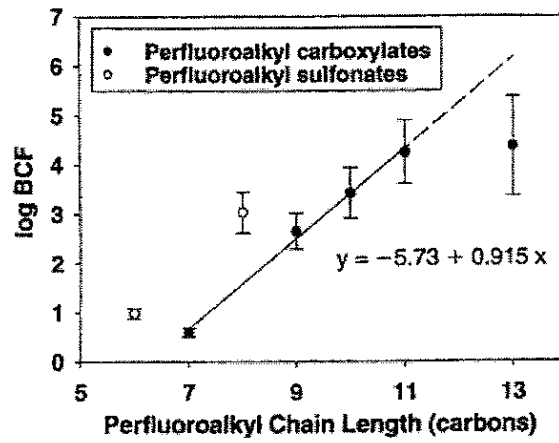


図 8 Perfluoroalkyl 鎖の長さと logBCF の関係 (Martin 2003)

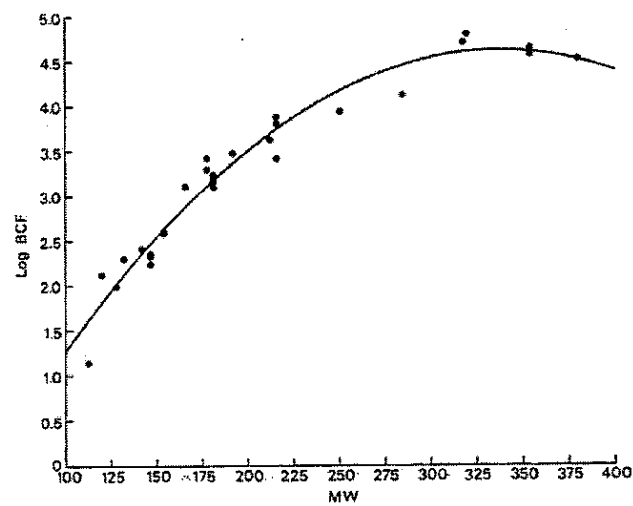


図 9 Chlorohydrocarbon 類の logBCF と分子量の関係 (Brooke 1986)

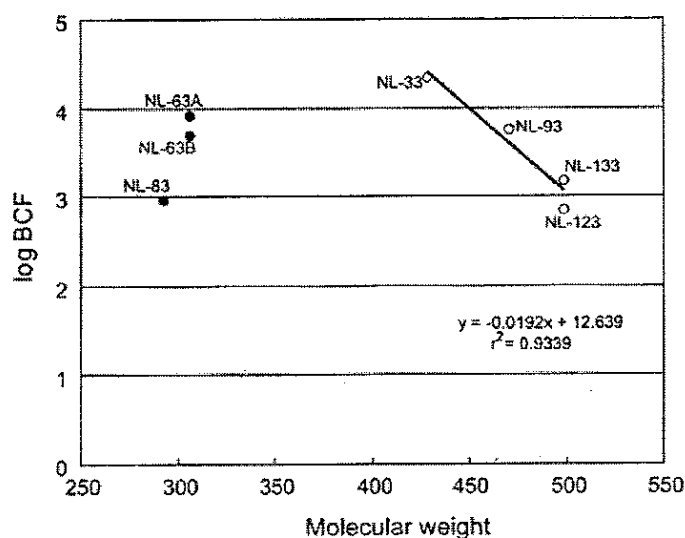


図 10 Aryl fluoroalkyl ether 類の logBCF と分子量の関係 (Yakata ら 2003)

2) 分子容 (MV)

西原ら (1993) は 14 種の魚種で測定された多様な構造の 128 化合物の BCF を解析し、MV の増加に伴い BCF が低下する傾向を示し、取り込み制約の閾値が MV 400~500cm³/mol 付近にあると推測している (表 4 の No.1、図 11)。また、Niimi ら (1998) は消化管からの取り込みに関して評価した報告の中で、McKim ら (1985) が行ったニジマスに対する直鎖エステル類などの 14 化合物の鰓からの取り込みデータについて考察を加えており、MV と取り込み率の関係がベル型曲線になることを示している (表 4 の No.2)。しかし、明確な閾値は提案されていない。

表4 MVでの解析事例

No.	研究者 (年度)	対象化合物	BCF/ 取込率	MV 計算方法	魚種	閾値
1	西原ら (1993)	多様な構造の 128 化合物	BCF	Le Bas の沸点分 子容	14 種	MV 400~500 (cm^3/mol)
2	Niimi ら (1988)	直鎖エステル類、Chlorinated aromatic hydrocarbon 類他、14 化合物 (MV 範囲 0.07~0.3 nm^3 、MW 範囲 74 ~546、logP 範囲 0.23~7.5) (McKim ら 1985 の文献より)	取り込 み率	Bondi の Van der Waals 容積	ニジマ ス	不明 (ベル型曲線)

「閾値 不明」について：閾値の提案を当該研究者が積極的に行っているわけではないが、観察事例として引用すべきと考えた。() 内はその報告内容から読みとれる取り込み指標と MV の関係を示す。

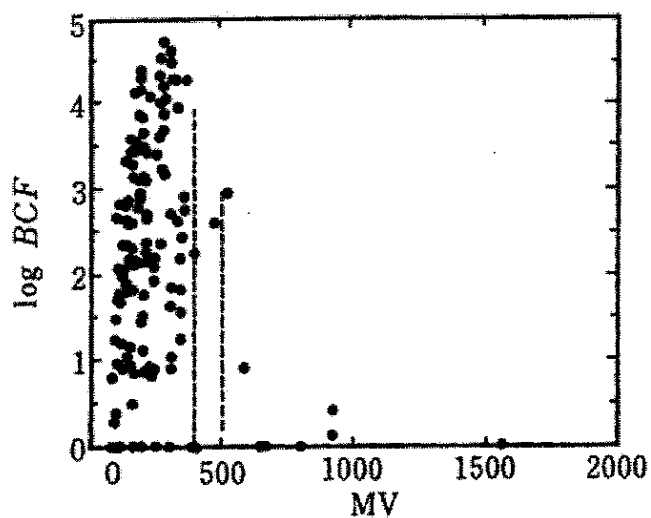


図 11 logBCF と分子容 (MV) の関係 (西原ら 1993)

3) Effective cross sectional diameter (Deff)

Opperhuizen ら (1985) はグッピーを用いて Halogenated aromatic hydrocarbon 類 13 化合物の BCF を測定し、Deff が 0.95nm を超える化合物は生体膜を透過し得ないと結論した (表 5 の No.1)。一方、Gobas ら (2000) は、Gobas ら (1989) が行った Halogenated aromatic hydrocarbon 類 10 化合物のグッピーに対する BCF や、Muir ら (1986) が行った Chlorinated dioxin 異性体 2 化合物のニジマスとファットヘッドミノーに対する BCF の測定結果に基づき、Deff の閾値は 0.95nm を超えるとしている (表 5 の No.2)。Sijm ら (1993) はニジマス鰓において Deff 0.96nm の Hexabromobenzene でも取り込みが認められること、また、その取り込みは低温度 (5°C) では高温度 (12°C、18°C) に比べて低下することを確認し、一方、Deff が 0.98nm の 2 化合物 (Octachloronaphthalene、Octachlorodibenzo-p-dioxin) では取り込みが認められないことを報告している (表 5 の No.3)。

さらに、Anliker ら (1988) は、分散染料や Halogenated aromatic hydrocarbon 類など 43 化合物の BCF を解析し、Deff が 1.05nm 以上であれば低濃縮と判定できると報告している (表 5 の No.4、図 6)。しかし、Dimitrov ら (2003) は 694 の多様な化合物の種々の魚種に対する BCF の解析から、Deff 9.5~10.8 Å (最大値はグラフからの読み取り値、図 7) でも高濃縮 (BCF>5000) となる化合物を数例示した (表 5 の No.5)。

Yakata ら (2003) も Aryl fluoroalkyl ether 類 7 化合物についてのコイに対する BCF 評価に基づき、Deff が約 1.45nm の化合物でも取り込みがみられることを報告している (表 5 の No.6)。

このように Deff については様々な閾値が報告されているが、魚種や測定温度の違いがこれに関係し得ると共に化合物の 3 次元構造の最適化に用いられた手法は各報告で異なっており、この計算手法の違いによる誤差が含まれることに注意する必要がある。

表5 Deff での解析事例

No.	研究者 (年度)	対象化合物	BCF/ 取込率	三次元構造最 適化法 / Deff 計算方法	魚種	閾値
1	Opperhuizen ら (1985)	Halogenated aromatic hydrocarbon 類 13 化合物 (Deff 範囲 0.76~0.98nm、logP 範囲 4.4~>6)	BCF	不明/ van der Waals 半径と 結合角より算 出	グッピー	Deff 0.95nm
2	Gobas ら (2000)	Halogenated aromatic hydrocarbon 類 10 化合物 (Deff の最大値 >0.95nm、 logP 範囲 3.89~8.26) (Gobas ら 1989 の文献より)	BCF	不明/ van der Waals 半径と 結合角より算 出	グッピー	不明 (Deff >0.95nm)
		Chlorinated dioxin 異性体 2 化合物 (Deff の最大値 >0.95nm) (Muir ら 1986 の文献より)	BCF	不明/ van der Waals 半径と 結合角より算 出	ニジマス、 フアット ヘットミ ノー	
3	Sijm ら (1993)	Halogenated aromatic hydrocarbon 類 および phenol、8 化合物 (Deff 範囲 0.66~0.98nm)	取り込 み率*	不明/ van der Waals 半径と 結合角より算 出	ニジ マス	Deff 0.98nm 付 近
4	Anliker ら (1988)	分散染料 23 化合物、Halogenated aromatic hydrocarbon 類 16 化合物、 有機色素 2 化合物、増白剤 1 化合物、 除草剤 1 化合物 (MW 範囲 147~944、 logP 範囲 1.77~11.20))	BCF	分子動力学法 / MacroModel software	不明	Deff 1.05nm
5	Dimitrov ら (2003)	非イオン性 610 種、イオン性 84 種 (MW 範囲は不明、logP 範囲 -3.98~ 13.98)	BCF	分子力場法/ OASIS software	多種 (詳細は 不明)	不明 (Deff >10.8Å)
6	Yakata ら (2003)	Aryl fluoroalkyl ether 類 7 化合物 (Deff 範囲 約 0.87~約 1.45nm、MW 範囲 292~498、フッ素原子数: 4~ 8)	BCF	不明/ Molecular Operating Environment software	コイ	不明 (Deff >1.45nm)

*: 3 温度条件で測定 (5℃、12℃、18℃)

「閾値 不明」について：閾値の提案を当該研究者が積極的に行っているわけではないが、観察事例として引用すべきと考えた。() 内はその報告内容から読みとれる閾値相当の Deff 値を示す。

4) Maximum diameter (Dmax)

Dimitrov ら (2003) は 694 の多様な化合物の種々の魚種に対する BCF を解析し、Dmax 14.7 Å

以上の化合物は高濃縮 (BCF>5000) にならないことを報告している (図 7)。そして生体膜透過時の分子にランダムな配向を許容して定義される D_{max} の方が D_{eff} と比べてより精緻な閾値を与え得ると考察した。しかし、膜透過過程を脂質二重層の自発的ゆらぎで形成される隣接孔への連続的な移動過程とする仮説を踏まえると本当にランダムな配向が許容され得るのかについて、さらに検討が必要である。

IV. 国際機関および規制当局が提案している閾値の事例

各国際機関や規制当局が提案している立体効果に関する閾値の例を表 6 に挙げる。実際の規制場面における適用実態については種々の公表情報を調査したが不明であった。

閾値の定義はその殆どが分子量によるものであった。各機関によりその値は異なり、UNECE (United Nations Economic Council of Europe) や EU の新規物質および既存物質の Risk Assessment のために作成された技術指針 (Technical Guidance Document) では MW 700、また、USEPA (United States Environmental Protection Agency) の PBT category の規定や UNEP (United Nations Environment Programme) では MW 1000 となっている。これら各数値の科学的根拠については明確には論じられていないが、「Ⅲ. 2. 1」の事例から明らかなようにフッ素含有率の高い化合物を除いては MW 700 付近が閾値と考えられることから、いずれもこの既知見をベースにしていることは明らかである。そしてフッ素系化合物などの逸脱事例に対してどれだけの担保をとるかによって数値が異なっているものと推察される。なお、USEPA の PBT category では D_{eff} の規定もなされており、その値は 20 Å であるが、「Ⅲ. 2. 3)」を踏まえるとかなり安全サイドに設定されているものとする。

表 6 国際機関および規制当局が提案している閾値

機関名	閾値	出典
UNECE (United Nations Economic Council of Europe)	MW 700	Review of the methodology for selection of the initial list of POPs for the proposed UNECE protocol, 1996
EC (European Commission)	MW 700	Technical Guidance Document on Risk Assessment, 2003
USEPA (United States Environmental Protection Agency)	MW 1000 Deff 20 Å	Persistent Bioaccumulative and Toxic (PBT) Chemical Program , Federal Register, 1998
UNEP (United Nations Environment Programme)	MW 1000	Guidance document for the collection, assembly and evaluation of data on sources, environmental levels and impacts of persistent toxic substances, 2000

考察

以上の調査から、疎水性化合物の水から魚への取り込みは主に鰓を介して行われ、単純拡散の機序の支配下にあることが確認された。そしてこのことから化合物分子の立体的かさ高さが取り込み制約要因として働き得ること、従って、この立体的かさ高さに着目した閾値を定義し得ることが理論的に予見できた。

事実、調査の結果、様々な立体効果の記述子を用いた閾値の解析事例が見出された。立体配座の自由度の小さい **rigid** な化合物とこれがより大きい **flexible** な化合物の存在を考慮すると、どの記述子が原理上最適であるかを判断することは容易ではないが、これら記述子の間には相互に相関性があると期待できることや、算出の容易さと再現性の高さを考慮すると、分子量は非常に有効な記述子であると言える。

そして分子量 (MW) に基づく解析事例を検討した結果、**Perfluorinated acid** 類のような特殊な事例を除いては、MW 700 付近に閾値が存在し得ることが明らかとなった。国際機関や欧米の規制当局が提案している閾値と比較したところ、いずれもこれらの知見に基づき設定されていることが示唆された。さらに、この MW 700 の閾値としての妥当性を化審法の既存点検データおよび新規化学物質の届出データにより確認した結果を図 12、13 に示す。いずれも MW 700 を超える化合物の BCF は 1000 以下であり、化審法の試験条件で測定された BCF にも良好に適用できる。

なお、**Perfluorinated acid** 類をはじめとするフッ素含有率の高い化合物では MW 700 を超えても BCF が高くなる可能性を示唆する報告が確認された。その最大の理由としては、フッ素原子の密度の大きさが挙げられ、すなわち、ファンデルワールス半径を基準に水素と比較するとその密度は約 14 倍であることから (石川 1987)、分子量を指標とした場合には分子の立体的かさ高さをかなり過大評価するためと考察された。また、フッ素を多く含有する化合物は極めて代謝され難いこと、さらには **Perfluorinated acid** 類のような直鎖状の化合物は立体配座的には **flexible** であることも逸脱傾向に少なからず関係しているものと思われる。したがってこのような特性を有する化合物に対しては分子容 (MV) などのより直接的な立体効果の記述子の併用が必要と思われるが、これ以外の化合物に対しては、分子量に基づく上記の閾値は幅広い化合物に良好に適用できるものと結論される。

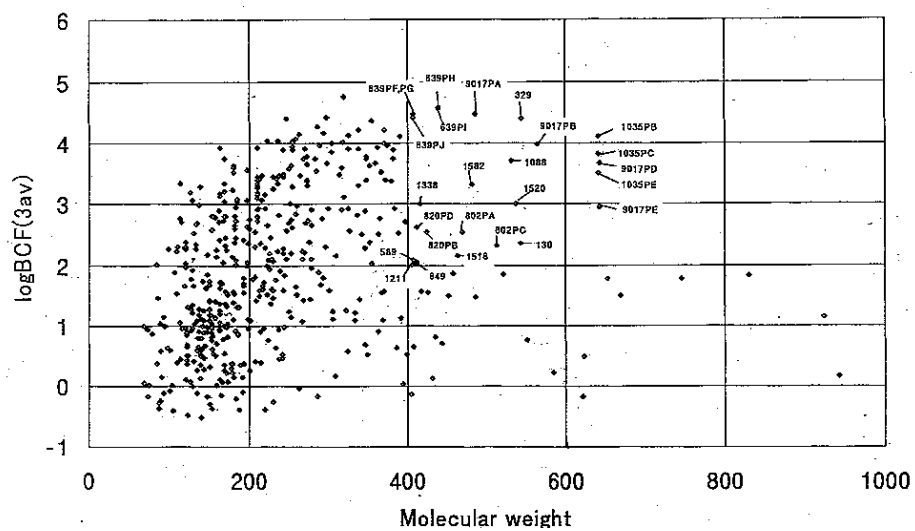


図 12 化審法既存点検物質の分子量と濃縮度との関係 (671 物質より解析)
(経済産業省化学物質安全室, 2003.2.27)

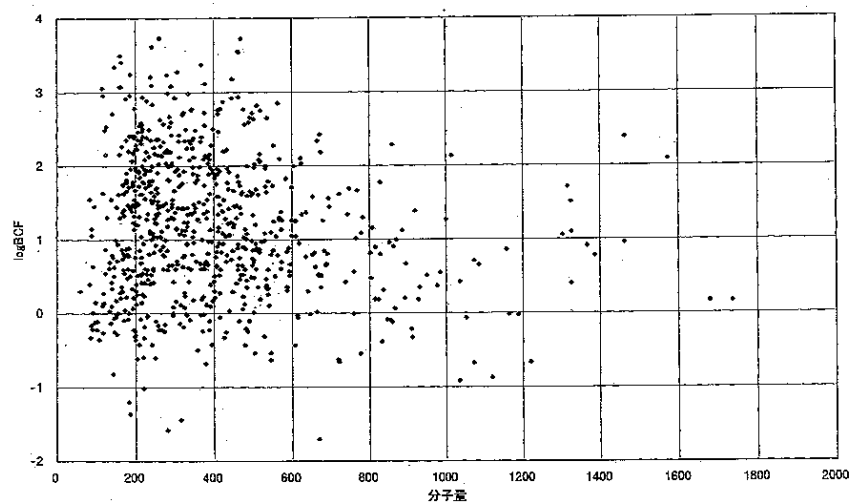


図 13 化審法新規届出物質の分子量と濃縮度との関係 (504 物質より解析)
(経済産業省化学物質安全室, 2003.2.27)

参考文献

- 赤崎正人、1987、消化器系、*魚類解剖学* (落合明 編)、pp73-100、緑書房
- 石川延男、1987、フルオロカーボンの物性、機能と合成、*フッ素化合物の合成と機能*、pp1-14、シーエムシー
- 板沢靖男、1987、呼吸器官、*魚類解剖学* (落合明 編)、pp113-135、緑書房
- 岩井保、1985、水産脊椎動物Ⅱ魚類、pp96-129、恒星社厚生閣
- 落合明、1987、皮膚系、*魚類解剖学* (落合明 編)、pp7-22、緑書房
- 金子豊二、2002、浸透圧調節・回遊、*魚類生理学の基礎* (会田勝美 編)、pp215-232、恒星社厚生閣
- 加茂直樹、1991、脂溶性イオンと生体膜および高分子膜との相互作用、*生物物理工学* (須貝新太郎 編)、pp187-251、アイピーシー
- 経済産業省 製造産業局 化学物質安全室、2003、分子量と濃縮倍率の関係、第6回 化審法に係る試験方法検討会 資料6.
- ゲニス R. B. 著、西島正弘他共訳、1990、生体膜 分子構造と機能、pp235-267、シュプリンガー・フェアラーク東京
- 古賀直文、1964、膜透過の生体物理化学、*生体膜と膜透過* (中垣正幸編)、pp46-65、南江堂
- 鈴木譲、2002、生体防御、*魚類生理学の基礎* (会田勝美 編)、pp233-250、恒星社厚生閣
- 妹尾学、1987、膜の化学、日本化学会編新化学ライブラリー、pp113-180、大日本図書
- 難波憲二、2002、呼吸・循環、*魚類生理学の基礎* (会田勝美 編)、pp45-66、恒星社厚生閣
- 西原力、斎藤昇二、松尾昌とし、1993、化学物質の生物濃縮機構とその構造活性相関、*衛生化学*、39、494-508.
- 橋本光一、1976、膜 (Membrane)、1、39-45
- 三輪理、2002、消化・吸収、*魚類生理学の基礎* (会田勝美 編)、pp193-203、恒星社厚生閣
- 山口明人、1991、物質の膜輸送形式、*続医薬品の開発4、薬物の生体膜輸送と組織標的化Ⅰ* (寺田弘、辻彰 編)、pp29-44、廣川書店
- Anliker R., Moser P. and Doppinger D., 1988, Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish. Relationships to hydrophobicity and steric factors, *Chemosphere*, 17, 1631-1644.
- Barber M. C., Suarez L. A. and Lassiter R. R., 1988, Modeling bioconcentration of nonpolar organic pollutants by fish, *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 545-558.
- Brooke D. N., Dobbs A. J. and Williams N., 1986, Octanol:water partition coefficients (P):

- Measurement, estimation, and interpretation for chemicals with $p > 10^5$, *Ecotoxicol. Environ. Safty*, **11**, 251-260.
- Dimitrov S. D., Dimitrova N. C., Walker J. D., Veith G. D. and Mekenyan O. G., 2003, Bioconcentration potential predictions based on molecular attributes-an early warning approach for chemicals found in humans, birds, fish and wildlife, *QSAR Comb. Sci.*, **22**, 58-68.
- European Commission, 2003, Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Part II, pp121-128
- Gobas F. A. P. C. and Clark K. E., 1989, Bioconcentration of polybrominated benzenes and biphenyls and related superhydrophobic chemicals in fish: Role of bioavailability and elimination into the feces, *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, 231-245.
- Gobas F. A. P. C. and Morrison H. A., 2000, Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, *In Handbook of property estimation methods for chemicals, Environmental and health sciences* (R. S. Boethling and D. Mackay ed), pp189-231, CRC Press LLC.
- Hayton W. L. and Barron M. G., 1990, Rate-limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill, *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 151-157.
- Isaia J., 1982, Effects of environmental salinity on branchial permeability of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *J. Physiol.* **326**, 297-307.
- Isaia J., 1984, Water and nonelectrolyte permeation, *In Fish physiology Vol. X, Gills Part B* (W.S.Hoar and D. J. Randall ed) , pp1-38, Academic Press.
- Lieb W. R. and Stein W. D., 1969, Biological membranes behave as non-porous polymeric sheets with respect to the diffusion of non-electrolytes, *Nature*, **224**, 240-243.
- Lieb W. R. and Stein W. D., 1986, Non-Stokesian Nature of transverse diffusion within human red cell membranes. *J. Membrane Biol.* **92**, 111-119.
- MacDonald D., Breton R., Sutcliffe R. and Walker J., 2002, Uses and limitations of quantitative structure-activity relationships (QSARS) to categorize substances on the Canadian domestic substance list as persistent and/or bioaccumulative, and inherently toxic to non-human organisms, *SAR QSAR Environ. Res.* **13**, 43-55.

- Martin J. W., Mabury S. A., Solomon K. R. and Muir D. C. G., 2003, Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*), *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 196-204.
- McKim J., Schmieder P. and Veith G., 1985, Absorption dynamics of organic chemical transport across trout gills as related to octanol-water partition coefficient. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **77**, 1-10.
- Muir D. C. G., Yarechewski A. L. and Knoll A., 1986, Bioconcentration and disposition of 1,3,6,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and octachlorodibenzo-p-dioxin by rainbow trout and fathead minnows, *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**, 261-272.
- Niimi A. J. and Oiver B. G., 1988, Influence of molecular weight and molecular volume on dietary absorption efficiency of chemicals by fishes, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **45**, 222-227.
- Nishihara T., Saito S. and Matsuo M., 1997, Bioconcentration of organic chemicals in fish mechanism and structure activity relationship (SAR), in *Ecological issues and environmental impact assessment* (P. N. Cheremisinoff ed), pp.707-741, Gulf publ.
- Opperhuizen A., Veide E. W. v. d., Gobas F. A. P. C. Liem D. A. K., Steen J. M. D. v. d., 1985, Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals, *Chemosphere*, **14**, 1871-1896.
- Opperhuizen A. and Sijm D. T. H. M., 1990, Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fish, *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 175-186.
- Oprea T. I., 2002, Virtual screening in lead discovery: A view point, *Molecules*, **7**, 51-62.
- Pade V. and Stavchansky S., 1997, Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model, *Pharm. Res.*, **14**, 1210-1215.
- Payan P., Girard J.P. and Mayer-Gostan N., 1984, Branchial ion movements in teleoste: The roles of respiratory and chloride cells, In *Fish physiology Vol. X, Gills Part B* (W.S.Hoar and D. J. Randall ed) , pp39-63, Academic Press.
- Petty H., 1993, Transport across membranes, In *Molecular biology of membranes*, pp189-222, Plenum Press.

- Poznansky M., Tong S., White P. C., Milgram J. M. and Solomon A. K., 1976, Nonelectrolyte diffusion across lipid bilayer systems. *J. Gen. Physiol.* **67**:45-66.
- Randall D. J., Connell D. W., Yang R. and Wu S.S., 1998, Concentrations of persistent lipophilic compounds in fish are determined by exchange across the gills, not through the food chain, *Chemosphere*, **37**, 1263-1270.
- Saarikoski J., Lindstrom R., Tyynela M., and Viluksela M., 1986, Factors affecting the absorption of phenolics and carboxylic acids in the guppy (*Poecilia reticulata*), *Ecotoxicol. Environ. Safty*, **11**, 158-173.
- Saito S, Tanoue A. and Matsuda T., 1990, Electron microscope autoradiographic examination of uptake behavior of lipophilic chemicals into fish gill, *Ecotoxicol. Environ. Safty*, **19**, 184-191.
- Sardet C., Pisam M. and Maetz J., 1979, The surface epithelium of teleostean fish gills, cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation, *J. Cell Biol.*, **80**, 96-117.
- Shaw G. R. and Connell D. W., 1984, Physicochemical properties controlling polychlorinated biphenyl (PCB) concentrations in aquatic organisms, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 18-23.
- Sijm D. T. H. M., Part P. and Opperhuizen, 1993, The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicol.*, **25**, 1-14.
- Spacie A. and Hamelink J. L., 1985, Bioconcentration, *In Fundamentals of aquatic toxicology* (R. Petrocelli and S. M. Petrocelli, ed), pp495-525, McGraw-Hill
- Tanabe S., Maruyama K. and Tatsukawa R., 1982, Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in carp (*Cyprinus carpio*) orally exposed to kanechlor products, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 891-898.
- Tulp M. T. M. and Hutzinger O., 1978, Some thought on aquatic solubilities and partition coefficient of PCB, and the mathematical correlation between bioaccumulation and physico-chemical properties, *Chemosphere*, **7**, 849-860.
- UNECE, 1996, Review of the methodology for selection of the initial list of POPs for the proposed UNECE protocol.
- UNEP Chemicals, 2000, Guidance document for the collection, assembly and evaluation of data on sources, environmental levels and impacts of persistent toxic substances, GEF: Regionally based assessment of persistent toxic substances.

- USEPA, 1998, Persistent Bioaccumulative and Toxic (PBT) Chemical Program, *Federal Register* **63** (192, October 5).
- Xiang T.-X. and Anderson B. D., 1998, Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape, *Biophys. J.*, **75**, 2658-2671.
- Yakata N., Sudo Y., Yakabe Y., Tadokoro H., Fukui H., Sanechika K. and Ikeda M., 2003, Unique bioconcentration characteristics of new aryl fluoroalkyl ethers in common carp (*Cyprinus carpio*), *Chemosphere*, **51**, 153-161.
- Yalkowsky S. H and Morozowich W., 1980, A physical chemical basis for the design of orally active prodrugs. In *Drug Design* (E. J. Ariens, ed), Vol IX, pp121-185, Academic Press.
- Yang R., Thurston V., Neuman J. Ranall D. J., 2000, A physiological model to predict xenobiotic concentration in fish, *Aquat. Toxicol.* **48**, 109-117.
- Zitko V., 1974, Uptake of chlorinated paraffins and PCB from suspended solids and food by juvenile atlantic salmon, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 406-412
- Zitko V. and Hutzinger O., 1976, Uptake of chloro-and bromobiphenyls, hexachloro- and hexabromobenzene by fish, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 665-673.

参考資料 1

イオンおよび解離性物質の生体膜の透過について

1. イオンの膜透過

イオンの脂質二重膜の透過についても、(1) 境界面で水中から膜の中に入り、(2) 脂質二重層を拡散し、(3) 再び境界面で膜の反対側に出る、の3つの過程が考えられる。水中のイオンは水の水和エネルギーにより安定化されており、このイオンを水から取り除き、膜の中心部に置くことはこの水和エネルギーを失うために不安定化を招く。このため、イオンが脂質二重膜を通る速度は一般に極めて遅い。イオンを誘電率 ϵ_2 の溶媒から誘電率 ϵ_1 の溶媒へ移動させる場合に要するエネルギー W は Born の充電エネルギーと呼ばれ、以下のように表される。

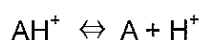
$$W = q^2 / (2r) \cdot (1/\epsilon_1 - 1/\epsilon_2) \quad [9]$$

ここで、 q : イオンの電荷、 r : イオン半径

すなわち、水の誘電率を 80、膜内部の誘電率を炭化水素の 2 とすると電荷 Z のイオンに対しては $W = 81Z^2/r$ (kcal/mol) となる。このように脂質二重膜はイオンの透過に対して大きな透過障壁となる。ただし、通常の低分子イオンに対する脂質二重膜の透過係数は非常に小さいものの、分子サイズに関しては半径の大きなイオンほど W は小さくなるため、イオノフォア複合体のようなある種のイオン (電荷が非極性基で囲まれた疎水性イオンなど) は脂質二重膜の透過性は比較的高い (ゲニス 1990、山口 1991)。なお、単純拡散以外の経路を含め、イオンが膜輸送される場合には、その膜輸送が膜電位にどのような影響を与えるかについて考慮する必要がある。

2. 解離性物質の膜透過

解離性物質の膜透過性は化合物の疎水性に支配されるとみなすことができる。例えばカチオン性化合物 AH^+ では以下の酸解離反応により、中性分子種の A を生成し、 A はその疎水性に応じて膜中へ移行する。



化合物が弱塩基および弱酸の場合は、疎水性の高い非イオン型の分子として脂質二重膜を透過するため、その透過係数は化合物の解離度に逆比例する。したがって、膜表面近傍の pH については、弱塩基ではそれが高いほど、弱酸ではそれが低いほど透過性が大きくなる。しかし、解離抑制された非イオン型の分子が両親媒性であれば、その大部分は膜表面の脂質極性基の部分にトラップされる。一方、解離抑制されていないイオン型の分子種は、上記「1」の支配を受けるとともに、その疎水性が小さい場合は膜表面に局在し、また、その疎水性が大きい場合は膜に移行する場合もあるとされる (堀江 1991、山口 1991)。

3. 脂質二重膜の表面電位の影響

脂質二重膜表面は酸性リン脂質やタンパク質のような成分により固定されたアニオン残基の存在により、通常は負に荷電している。さらに、それら是对イオン (カチオン) によって電氣的に中性化される。一般にこの対イオン (カチオン) は移動相にあり、膜表面に固定されているわけではなく、膜表面からいくらか離れて存在し、いわゆる拡散二重層を形成する。これにより、膜表面の局所的 pH を低下させている。特に、価数の大きいカチオンは膜表面近くで濃縮されることになる。また、金属イオンについては Na^+ などの 1 価イオンは酸性リン脂質との親和性は小さいが、 Ca^{2+} などの 2 価イオンは酸性リン脂質と両性リン脂質に対する親和性が大きいため、表面での局所濃度が高くなる。さらに親和性の大きいポリカチオンは酸性リン脂質の二重膜の表面に強く結合する。一方、アニオンはカチオンの場合とは異なり、このように負に帯電した膜表面近傍では水相中での濃度が減少する (ゲニス 1990)。

また、脂質二重膜の疎水性の中核部分では膜表面に配向した双極子により静電的なポテンシャル (約 240mV、内側が+) が形成される。これは約 5.5kcal/mol の自由エネルギーに相当し、膜内部でアニオンを安定化し、一方、カチオンを不安定化させる効果がある。低分子アニオンやカチオンでは「1」に記したとおり透過性障壁は非常に大きく、この双極子の効果の透過性への寄与は小さいが、疎水性アニオンは同じような構造を持っている疎水性カチオンよりも膜中で安定となるため、相対的に透過しやすい。一方、疎水性カチオンでは膜の中心部の自由エネルギーが高く、したがって膜表面の最も自由エネルギーの低い部位にイオンが吸着される (ゲニス 1990、加茂 1991)。

参考資料 2

魚の消化管および皮膚の構造

1. 消化管

魚の消化管は基本的に口、口腔、鰓腔、食道、胃、腸、肛門からなり、概ね一定の共通した構造を有する。ただし、その一般構造は高等動物の消化管に比べると未発達であり、魚種が多いことから変異に富んでいる（例えばコイは無胃魚である）。消化管組織は内面から粘膜、筋層および漿膜から成り、その粘膜は表面から順に粘膜上皮、粘膜固有層、粘膜筋板および粘膜下組織から成る。粘膜上皮は器官と部位によって構造が異なるが、重層扁平上皮または単層円柱上皮から成り、多数の粘液細胞が並んでムコ糖タンパク質を主体とする粘液を出し、その粘液が消化管を覆っている。粘膜固有層は細胞の比較的多い緊密な結合組織で微細な血管網とともに、腺やリンパ節を有する。筋層は 2 層の平滑筋が取り巻く。魚種によっては粘膜下層と平滑筋の間に緻密層と呼ばれる密なコラーゲンの層が存在する（赤崎 1987、三輪 2002）。

腸では内腔に面する粘膜の表面にはひだが発達し、表面積を広くしている。粘膜上皮は単層円柱状上皮とその中に混在する杯状細胞とによって構成される。円柱上皮細胞は消化・吸収に関与するが、その遊離縁には微絨毛が密生し、いわゆる条紋縁を形成する。これら密生する微絨毛は栄養吸収を担っており、間隙を経て細胞内に吸収される（岩井、1984）。また、タンパク質が未消化のまま腸まで運ばれると、上皮細胞は飲作用（pinocytosis）によりこれを取り込み、食胞を基底側から放出することで血液中まで運搬されることが知られている。特に胃のないコイ科の魚に顕著で血中にタンパク質由来の抗体ができる場合もある。このような機構の意義については充分解明されていない（鈴木 2002）。

海水魚は浸透圧調節のため海水を飲んで腸から吸収し、余分な塩類を鰓の塩類細胞から外界に捨てて水分だけを体内に留めている（金子 2002）。

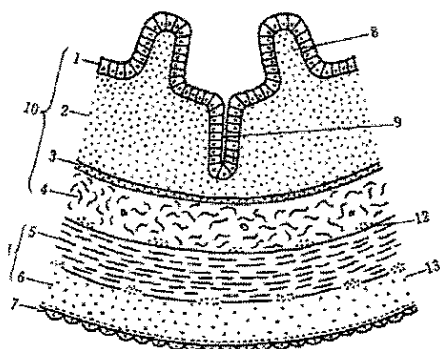


図 1. 消化管の一般構造模式図（赤崎 1987）

1. 粘膜上皮、2. 粘膜固有層、3. 粘膜筋板、
4. 粘膜下組織、5. 輪筋層、6. 縦筋層、
7. 漿膜、8. 絨毛、9. 腺、10. 粘膜、
11. 筋層、12. 粘膜下神経叢、
13. 筋層間神経叢

2. 皮膚

魚の体表は皮膚によって覆われており、外面から表皮 (Epidermis)、真皮 (Dermis または Corium) および皮下組織 (Subcutaneous または Hypodermis) の順に配置し、疎水性と親水性の多層からなる高密度の膜構造を形成している (Spacie ら 1985)。表皮は上皮細胞 (平均長さ $250\mu\text{m}$) が 10～30 層 (陸上高等動物では数層) に重なり合い、表層に至るまで全て生きた細胞から成り、他の高等動物で見られるような角質化した細胞はない。水面に接する扁平上皮細胞の表面には小皮縁 (Microvilli) と呼ばれる微小突起が多数ある。なお、表皮には血管は存在しない。表皮中には粘液細胞または粘液腺があり、糖タンパクから成る粘液を出し、この粘液は体表に広がる。表皮の直下にある真皮は表皮に比べて厚く、線維性の結合組織や膠原組織が発達する他、鱗、血管などが存在する。表皮と真皮の間には基底膜があるが、魚類では他の高等動物で見られるような厚い皮下組織は普通形成されない。皮下組織は真皮と筋肉層に挟まれる (落合 1987)。

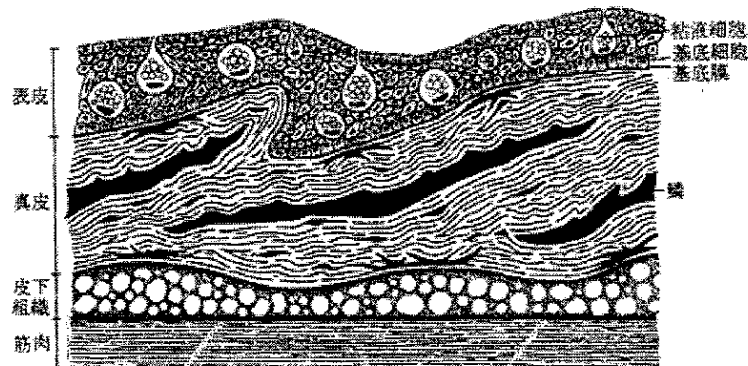


図2 魚類皮膚の模式図 (三輪 2002)

参考資料 3

魚の消化管経由の取り込みに対する閾値定義の事例

外来性化合物の消化管経由の魚への取り込みに対する閾値定義の事例を以下に示す。報告されている閾値は水からの直接濃縮のそれと基本的に一致するものであった。

1. 分子量 (MW)

Zitko ら (1974, 1976) はサケを用いて Chlorinated paraffin 類および Polychlorobiphenyl の 3 化合物 (注 1) ならびに Halogenated biphenyl 類などの 13 化合物 (注 2) の消化管からの取り込みを評価し、MW 546 以上の化合物は取り込みが制約されることを報告している。なお、彼らは水からの直接濃縮の試験も併行して実施しており、取り込み制約の傾向はいずれの経路ともほぼ同様であったと報告している。

一方、Niimi ら (1988) は種々の魚に対する Halogenated organic chemical 類などの 45 化合物 (注 3) ならびにニジマスに対する同 17 化合物 (注 4) の消化管からの取り込みを評価し、MW 627 の Hexabromobiphenyl で取り込みがみられるものの、分子量の増加とともにその程度が減少する傾向を報告している。

また、Tanabe ら (1982) はコイを用いて Polychlorobiphenyl の 2-8 置換の異性体の 71 化合物 (注 5) の消化管からの取り込み率を評価し、取り込み率と MW の平方根の積 (取り込み率 $\times$ (MW)^{1/2}) が一定となることを示している。これより、コイ消化管の細胞壁を通した PCB 異性体の取り込みは MW の影響を受けていると結論づけている。

2. 分子容 (MV)

Niimi ら (1988) は種々の魚に対する Halogenated organic chemicals などの 45 化合物 (注 3) ならびにニジマスに対する同 17 化合物 (注 4) の消化管からの取り込みを評価し、MV 0.25nm³ 以下の化合物は取り込み率が高く、一方、MV 0.25nm³ 以上では MV の増加と共に取り込み率が全般に低下する傾向を報告している。減少傾向に対する MV と取り込み率の相関性は MW のそれよりも明確であった。また、彼らは、Squalane (注 6) のような直鎖状の化合物は同程度の MV を有する環状化合物に比べ、取り込み率が高くなることを報告している。

3. Effective cross sectional diameter (Deff)

Gobas (2000) は、Muir ら (1986、1988) が Chlorinated dioxin 異性体 6 化合物 (注 7) を用いて測定したニジマスとファットヘッドミノーの消化管からの取り込み率を解析し、Deff の閾値は 0.95nm を超えるとしている。ただし、化合物の三次元構造の最適化に用いられた手法の一般性については不明である。

注 1) Chlorinated paraffin 類 2 種 (平均 MW 範囲 579~922) および Polychlorobiphenyl (平均 MW 327)

注 2) Halogenated biphenyl 類 11 化合物および Halogenated benzene 類 2 化合物 (MW 範囲 223~546)

注 3) Halogenated organic chemical 類 38 化合物 (MW 範囲 182~713、MV 範囲 0.13~0.44nm³)、Alkane 類 6 化合物 (MW 範囲 252~903、MV 範囲 0.31~0.61nm³)、Tetracycline 類 1 化合物 (MW 460、MV 0.38nm³)

注 4) Halogenated organic chemicals 17 化合物 (MW 範囲 266~627、MV 範囲 0.14~0.30nm³)

注 5) Polychlorobiphenyl の 2-8 置換の異性体 71 化合物 (MW 範囲 223~430)

注 6) Squalane (MW 423、MV 0.37nm³)

注 7) Chlorinated dioxin 異性体 6 化合物 (Deff の最大値>0.95nm)

参考資料 4

立体的かさ高さと膜透過に関する一般知見

取り込み制約に関する魚以外での一般的な知見を以下にまとめた。

1. 分子容 (MV)

Ponzansky ら (1976) らは卵 Lecithin 膜を用いて Amide 同族列の 4 化合物 (注 1) の膜透過性を評価し、(1) 膜透過係数が分配係数と分子容の影響を受けること、および (2) 拡散係数に関連する Ps/Km (透過係数/分配係数) の対数値が分子容の増加と共に一次的に減少することから、膜透過が分子容による制約を受けていると報告している。

同様に Lieb ら (1986) はヒト赤血球膜を用いた Alcohol 類や尿素類など 10 化合物 (注 2) の膜透過性データを解析し、(1) 膜透過係数が分配係数と分子容の影響を受けること、(2) 拡散係数の対数値が分子容の増加と共に一次的に減少すること、(3) 分子容の効果を考慮した場合の膜透過性と分配係数の相関性は、それを考慮しない場合に比べて改善されることを報告している。彼らは、ヒト赤血球膜中に自発的なゆらぎにより形成される間隙の体積を $8 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と算出し、これを超える体積を有する化合物は透過しにくいと考察している。

2. その他

Collander ら (1947) はシャジクモ (*Chara*) の膜を用いた中性分子の透過性と油/水分配係数の関係を調べ、分子量 50~300 の化合物では分配係数と透過係数に良好な相関性があることを報告した。一方でこれよりも低分子性の溶質の透過性は、その油/水分配係数から予測される透過性よりも全般に 2~15 倍高く、細孔経由の取り込み経路の存在を示唆した (ゲニス 1990)。

Xiang ら (1998) は Dipalmitoylphosphatidylcholine の脂質二重膜を用いた 7 化合物 (注 3) の膜透過性の解析から、分子容よりも断面積 (Minimum crosssectional area) が膜透過性との間に良好な相関性を示したことから、化合物の長軸が二重膜の垂線に沿って透過すると推測している。

Pade ら (1997) は Caco-2 培養細胞モデル (ヒト結腸癌由来細胞の融合性単層膜) を用いた 9 化合物 (塩基性または酸性物質、注 4) の膜透過性の解析から、(1) 解離性物質の取り込みは主に解離抑制された非解離分画が取り込まれていること、(2) 疎水性物質では傍細胞経路よりも経細胞経路による取り込みの占める割合が高いこと、(3) 傍細胞経路の取り込みは分子半径が大きくなる

ほど低下すること、(4) 傍細胞経路では、塩基性物質の方が酸性物質よりも透過率が高く、傍細胞経路の環境がアニオン性を帯びていると考えられることを報告している。

また、経口医薬品の候補物質を選別するために Lipinski's rules (または Rule of five) と呼ばれる経験則が提唱されており、ヒトにおける腸管からの化合物の吸収性を判断する指標として使用されている (Oprea 2002)。すなわち、(1) 分子量が 500 以上、(2) 構造中の水素結合供与体が 5 個以上、(3) 構造中の水素結合受容体が 10 個以上、(4) logP が 5 以上、の基準の中で 2 つ以上が当てはまれば、ほとんど経口的には取り込まれないと判定されている。

注 1) Amide 同族列 4 化合物 (MV 範囲：約 40～100cm³/mol)

注 2) Alcohol 類 7 化合物、尿素類 2 化合物、水 (MV 範囲：10.6～72.9cm³/mol)

注 3) Monocarboxylic acid 類 7 化合物 (MV 範囲 0.04～0.11 nm³)

注 4) 塩基性または酸性物質 9 化合物 (MW 範囲：138～415, logP 範囲：-0.8～3.6、分子半径：0.30～0.46nm)

参考資料 5

主要参考文献要約

分類	MW
タイトル	Uptake of chloro-and bromobiphenyls, hexachloro- and hexabromobenzene by fish
出典	<i>Bull. Environ. Contam. Toxicol.</i> , 16 , 665-673, 1976
著者	Zitko V. and Hutzinger O.
所属	Environmental Canada, University of Amsterdam
目的	樹脂の防燃剤として使用される臭素化ビフェニールおよびHexabromobenzeneの水および餌からの濃縮挙動をPCBのそれと比較しながら評価する。
化合物	Halogenated biphenyl 類 11 化合物および Halogenated benzene 類 2 化合物 (MW 範囲 223~546) ・ 臭素化化合物の混合物: Bromobiphenyl 類 (2,4-di-, 2,6-di-, 3,4-di-, 2,5,4'-tri-, 2,4,2',5'-tetra-, 2,5,3',4'-tetra-) および Hexabromobenzene ・ 塩素化化合物の混合物: Chlorobiphenyl 類 (2,4-di-, 2,6-di-, 3,4-di-, 2,4,2',5'-tetra-, 2,5,3',4'-tetra-) および Hexachlorobenzene (ただし、濃縮の再現性確認のため 2,5,4'-tribromobiphenyl も含む)
方法	取り込み評価指標: 水および餌からの濃縮性 (1) 水からの濃縮性試験: 各混合物の Hexane 溶液 3mL (臭素化物=1.163mg, 塩素化物=1.717mg) を 4L 容三角フラスコに添加して Hexane を留去し、脱塩素した水道水 3L を添加して弱い曝気を行い、そこに魚 (平均体重=6.24g, 脂肪含有率=2.31%, 3 尾) を入れ 96 時間暴露 (止水系、15°C)。 (2) 餌からの濃縮性試験: Dry fish food に 11.44 μ g/g の塩素化物および 7.75 μ g/g の臭素化物をそれぞれ添加し、魚 (平均体重 6.77g, 脂肪含有率=3.54%, 20 尾) に 40 日間投与した (15°C)。 (3) 分析: 水、魚共に Hexane 抽出し、必要に応じてアルミナカラム精製を行い GC/MS で定量。
供試魚	Atlantic salmon (<i>Salp salar</i>) 稚魚
結果	(1) 水からの濃縮性試験: ・ 水中濃度の実測値は以下のとおり経時的に減少; 塩素化物=暴露 24 時間目で 50.6~1.24 μ g/L、96 時間目で 18.2~0.22 μ g/L 臭素化物=暴露 24 時間目で 41.8~5.20 μ g/L、96 時間目で 13.1~0.91 μ g/L 目視観察では油滴などは認められず溶解状態にあると考えられた。 ・ 毒性影響; いずれの混合物についても暴露 96 時間で死亡はみられなかった。 ・ 96 時間目の魚体中濃度; 塩素化物=0.580~13.65 μ g/g、臭素化物=ND~3.58 μ g/g Hexabromobenzene は ND であった。 ・ 48 時間時点における濃縮倍率; 塩素化物= 919 (2,6-) ~358 (3,4-) 臭素化物=1343 (2,4-) ~0 (Hexabromobenzene) (2) 餌からの濃縮性試験: ・ 毒性影響; 明確な結果は報告されていない (42 日後に水の脱塩素処理装置の一時的な不良により、臭化物暴露区は全数死亡した。塩素化物暴露区はこの後 30 日経過時点まで死亡はなし)。 ・ 平衡時の魚体中濃度; 塩素化物=1.30 (2,4,2',5'-) ~ND (3,4-) 臭素化物=0.658 (2,5,3',4'-) ~ND (3,4-および Hexabromobenzene) ・ 餌濃度をベースに計算される濃縮倍率; 塩素化物= 0.586 (2,5,3',4'-) ~0 (3,4-) 臭素化物=0.587 (2,4,2',5'-) ~0 (3,4-および Hexabromobenzene) (3) 結論: 分子量の最も大きい MW 546 の Hexabromobenzene では水および餌経由とも取り込みは認められなかった。 Chlorinated paraffin 類での魚への取り込み (Zitko 1974, <i>Bull. Environ. Contam. Toxicol.</i> , 12 , 406-412) の結果を踏まえると、取り込み制約を受ける MW の閾値は約 600 と考えられる。なお、水からと餌からの取り込みの傾向はほぼ同様であったが、水からの取込の方が魚中濃度は高かった。
閾値	MW 約 600
評価/備考	・ かなり古い文献であり、実験の質も現在の科学レベルからすると必ずしも高いものではない。 ・ Hexabromobenzene の水中濃度の実測値は 41.8~8.76 μ g/L となっているが、一方で例えば EPI-WIN (v3.05) に掲載されている水溶解度の実測値は 0.16 μ g/L、また、推算値は 2.2 μ g/L である。従って、過飽和状態であったことが懸念される (Bioavailability 低下の可能性が懸念される。これは Gobas (2000) も指摘しているところ)。 ・ 水からの直接濃縮倍率は塩素化物も臭素化物も置換数が増すに従い低下の傾向を示した。これは暴露期間が 96 時間と短く、特に疎水性の高いこれら高置換物では濃縮平衡に到達していないためかもしれない。 ・ しかし上記の点を加味しても、分子量が生体膜中の化合物の拡散係数を低減し、取り込み制約要因となり得ることは明らかであり、MW の閾値を提案した歴史的に重要な文献に位置づけられるため、報告書に取り上げた。 ・ なお、Br 元素の比重の大きさを考慮すると、Hexabromobenzene の低濃縮性の記述には、分子量よりも Deff の方がより適しているものと考えられる。

分類	MW、Deff
タイトル	Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish. Relationships to hydrophobicity and steric factors
出典	<i>Chemosphere</i> , 17, 1631-1644, 1988.
著者	Anliker R., Moser P. and Doppinger D.
所属	Dyestuffs manufacturing industry, CIBA-GEIGY
目的	分散染料、有機顔料、蛍光増白剤の濃縮性予測における MW と Deff の有効性を確認する。
化合物	全 43 化合物 (MW 範囲 147~944, logP 範囲 1.77~11.20) 分散染料 23 化合物、Halogenated aromatic hydrocarbon 類 16 化合物、有機色素 2 化合物、増白剤 1 化合物、Triazine 系除草剤 1 化合物
方法	取り込み評価指標: BCF 分散染料、有機色素、増白剤、除草剤のデータは関連企業が実施した日本の化審法試験条件のものを、その他の Halogenated aromatic hydrocarbon 類は Oppenhuizen (1985) のものを使用 三次元構造最適化法: 分子動力学法 (Extended MM2 molecular mechanics methods) により全ての相互作用 (結合と角度のひずみ、van der Waals 斥力、静電相互作用、水素結合) を考慮して構造的な変数 (結合長、結合角、ねじれ角) を最適化。 Deff 計算方法: 分子の 3 次元構造を MacroModel software で作成。
供試魚	詳細は不明 (Oppenhuizen のデータはグッピーであり、その他はコイと思われるが詳細は不明。)
結果	- logBCF と logP の相関: Decachlorobiphenyl を除いては Plot の外輪線は Bilinear で表記できた。外輪線周辺は Halogenated aromatics で占められ、分散染料の BCF はこれより低値を示した。 - logBCF と MW の相関: Outlier の傾向を示した Decachlorobiphenyl も含めて MW 500 を超えれば低濃縮性になる傾向が示された。高濃縮性となる化合物はいずれも MW<400 であり、MW 450 を超える化合物は Decachlorobiphenyl を除けばいずれも低濃縮性であった。Decachlorobiphenyl (MW499, Deff 0.87nm) のような細長い分子は MW が比較的大きいものの高濃縮性であった。 なお、Decachlorobiphenyl を除く 42 物質を対象に、logP と MW を記述子に用いて相関解析した結果 ($r=0.65$) は、logP のみを記述子に用いた場合 ($r=0.48$) に比べて良好であった。MW の偏回帰係数は負であり、立体効果に起因する取り込み制約の可能性が示唆された。 - logBCF と Deff の相関: Decachlorobiphenyl を含めて閾値の存在を示唆する結果が得られた。Oppenhuizen らは取り込みの閾値として Deff 0.95nm を報告しているが、DDT (Deff 1.00nm) でも取込がみられるため、配座の自由度が大きい化合物は rigid な化合物 (Oppenhuizen らの報告している化合物) よりも生物膜を通過しやすいと考えられた。閾値としては 1.05nm が提案されているが、統計学的な計算が行われているわけではない。
閾値	MW 500, Deff 1.05nm (または MW>450 かつ Deff 1.05nm)
評価/備考	- 分散染料、有機色素、増白剤は化審法試験条件下の BCF データ (コイで実施?) であり、一方、各プロットの外輪線部分の殆どを占める Halogenated aromatics 他の化合物の BCF は Oppenhuizen ら (1985) がグッピーで測定したものであるなど、BCF 測定の方法や条件が異なっている。また、水中の化合物の Bioavailability の状態も不明である。従って、あくまでも粗評価に位置づけられる解析事例である。 - しかしながら、これら雑多なデータにおいても MW>500 の化合物の低濃縮性は明らかであり、理論の妥当性を示唆するものである。 - Oppenhuizen らの計算した化合物について Deff を検証し、その報告値と計算値の差が 0.05nm 以内であることを確認しているが、立体配座の自由度の高い化合物についても一般的な手法であるかどうかは不明。 - 報告書においては Deff および MW の閾値を積極的に提言している事例として取り扱うことにする。

分類	MW, Deff, Dmax, (Dmin)
タイトル	Bioconcentration potential predictions based on molecular attributes-an early warning approach for chemicals found in humans, birds, fish and wildlife
著者	Dimitrov S. D., Dimitrova N. C., Walker J. D., Veith G. D. and Mekenyan O. G.
出典	QSAR Comb. Sci., 22, 58-68, 2003
所属	Bourgas University (Bulgaria), USEPA
目的	生物濃縮性の精度の高い予測手法の開発。694の物質について分子の立体効果が濃縮性に及ぼす影響について解析。1つの目的は Connell&Hawker, Meylan, Dimitrov の各モデルの検証、もう一つは立体効果の生物濃縮に及ぼす影響の正確な記述手法の確立である。
化合物	非イオン性 610 種、イオン性 84 種 (MW 範囲は不明、logP 範囲 -3.98~13.98)
方法	取り込み評価指標: BCF。Meylan ら (1999) が収集した 694 化合物の BCF および BAF のデータを使用。logBCF 範囲 -1.43~5.59 濃縮度予測手法: logP を記述子とした BCF を予測する既存の 3 モデル (Modified Connell, Meylan, Dimitrov のモデル) と BCF ポテンシャルの最大値について推定する新規の 1 モデル (BCFmax モデル)。BCFmax モデルは logBCF と logP の相関プロットで比較的高い BCF データを抽出して求めたもの (logP 値を 0.5 単位に区切り、各区画の最大の logBCF 値から 0.5 以内にある logBCF データのみを使用して解析)。 三次元構造最適化法: 分子力場法 Deff, Dmax の計算方法: OASIS software package (Mekenyan らが 1990 に開発、①3D Model builder, ②Integrated molecular force-field optimizer, ③MOPAC interface を含む) を使用して分子構造を最適化。これより、分子の最大直径 (Dmax, 最適化分子を囲む球の最小直径)、Effective cross diameter (Deff, 最適化分子を収める筒の最小半径)、分子の最小直径 (Dmin, 最適化分子を挟む 2 つの面の最小距離) を計算する。
供試魚	多種 (詳細は不明)
結果	(1) logP を記述子としたモデルの適用性: - 既存モデル; 3 つの QSAR モデルの中で、Modified Connell は logP 範囲 4-10 の化合物の BCF の予測値を最も高めに算出するモデルであるが、vB (BCF>5000) である化合物をより予防的に (誤って低濃縮と判定することを少なくして) 識別できる。しかし、このモデルでは実際は低濃縮である化合物も vB に誤って分類する可能性がある。 - Maximum Potential of Bioaccumulation (BCFmax) モデル; vB 化合物選定のための BCFmax を推定するモデル構築を Dimitrov らのモデルをベースに試み、次式を得た (既存 Dimitrov モデルの logBCF 軸が 0.5 だけ上方にシフトしたもの)。本モデルは実際は低濃縮である化合物の BCF が過大評価される場合も多数含まれるものの、実際に vB である化合物を全て正確に vB と予測する。 $\log BCF_{max} = a_1 + a_2 \times \exp\{[\log P - \log(P^0)]^2/a_3\} \quad (n=81, r^2=0.96, S=0.20)$ (2) 分子の立体効果の影響に関する解析: 上記 BCFmax モデルは vB 化合物を正確に識別したものの、BCF が過大評価される物質も多数含まれた。これを改善するため分子の立体効果の記述子を用いて、logP>5 の物質を対象に解析を試みた。 - 分子量 (MW); 700 以上の化合物は確かに logBCF<3.5 であった。しかし、161 の vB と過大評価された化合物のうち MW>700 は 6 つのみであり、かつ、そのうち 2 つは logP>10 で Superhydrophobicity によってその低濃縮性が説明できるものである。MW は過大評価を改善するために有効な記述子とは言えない。 - Effective cross section diameter (Deff); Deff を用いると、9.5 Å を超えても一部の物質 (6 個程度) は logBCF>3.5 となった (これらの物質の Deff の最大値をグラフから読み取ると 10.8 Å)。これは分子が (膜に対して長軸が垂直になるように) 緻密な配向の下で生体膜を透過するという仮定に無理があるためと予想される。実際には Entropy の要因 (分子の chaotic movement) により分子の配向はランダムであると考えられる。 - Maximum Diameter (Dmax); 一方、Dmax 14.7 Å を用いれば、膜中での化合物分子のランダムな配向を考慮できることになるが、これにより正確に logBCF<3.5 の化合物の濃縮性を判別でき、過大評価となる物質数も 161 から 88 に低減した (ただし、イオン性化合物およびフェノール (2 またはそれ以上のハロゲン置換物) は除く)。なお、この閾値はあくまでも経験則に位置づけられ、生体膜の構造や理論から導き出された値ではない。
閾値	MW 700、Dmax 14.7 Å、Deff については閾値は不明 (Deff>10.8 Å)
評価/備考	- 雑多なデータ群に基づく粗評価である。 - 分子サイズによる取り込み制約の閾値の存在を示唆する文献。著者らは分子量は感度が不十分で有効ではないと考察しているが、MW>700 の分子は確かに低濃縮であり、正確に予測結果を与えている。なお、分子の 3 次元構造に関する記述子としては Maximum Diameter が最も有効としているが、計算モデルの妥当性検証も含めさらに知見の集積が必要である。 - この報告は Dmax の有用性を特に強調したものであるが、Deff, MW にも言及され、閾値に相当する値も示されていることから、報告書ではそれぞれ該当する閾値を記すこととした。

分類	MW
タイトル	Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>)
出典	<i>Environ. Toxicol. Chem.</i> , 22 , 196-204, 2003
著者	Martin J. W., Mabury S. A., Solomon K. R. and Muir D. C. G.
所属	University of Guelph, Canada, University of Toronto, Environmental Canada
目的	Perfluorinated acids (carboxylates & sulfonates) のニジマスにおける濃縮挙動を連続流水下で測定し、物理化学性や分子構造との関係を考察する。
化合物	Perfluorocarboxylate 類 5 化合物、Perfluorosulfonate 類 2 化合物; (MW 範囲 400~714、フッ素原子数 13~27、炭素鎖数 6~13, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n\text{COOH}$, $n=6\sim12$ および $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, $n=5, 7$) なお、魚中に検出されなかった 4 化合物 (MW 範囲 264~364, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n\text{COOH}$ ($n=3, 4, 5$), $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, $n=3$) を含めると全 11 化合物で検討されている
方法	取り込み評価指標: BCF、体内分布 濃縮性試験: - 全化合物の混合物を少量の MeOH に溶解しそれに 30L の逆浸透水を添加して 3 日間攪拌。数時間静置後、Glass microfiber filter でろ過して暴露用の原液を調製。 - この原液の 1000 倍希釈水にニジマス稚魚 (体重 5~10g) を連続流水下 (12°C) で 12 日間暴露し、さらに 33 日間の排泄試験を実施。生物の Loading rate は 8g/L~2.5g/L。流水系の流速は暴露期間で 500mL/min、排泄期間で 3L/min。 - 魚のサンプリングは暴露期間=4.5, 9, 18, 36, 72, 144, および 288 時間、排泄期間=4.5, 9, 18, 36, 72, 144, 456, および 792 時間。各回 3 尾 (暴露区) および 1 尾 (無処理区) 採取。魚は解剖し、血液、肝臓、Carcass (消化管は除く) に解剖して分析実施。 - 水のサンプリングは暴露期間=0.25, 4.5, 12, 18, 36, 72, 144, 197, 244, および 288 時間、排泄期間=48, および 96 時間。各回 1L 採取。 - BCF の評価は 1 Compartment モデルに基づく速度論的解析によって実施。 体内分布試験 - ニジマス未成魚 (30~48g) を 12 日間別の水槽で暴露し、脾臓、心臓、肝臓、胆嚢、生殖腺、鰓、脂肪組織、消化管、腎臓、筋肉に解剖して分析を実施。 分析 - 各組織サンプルに Na_2CO_3 とイオンペア試薬 Tetrabutylammonium hydrogensulfate および内部標準 PFNA (Perfluoronanoic acid) を添加し、Methyl-tert-butyl ether にて抽出。溶媒留去後 MeOH:水=50:50 にて定容し Vortex 処理後 0.2 μm の Nylon filter でろ過して分析に供した。水サンプルは、2 化合物 (分子量の大きい Carboxylate の $n=10, 12$) の取り込みの 3 時点と全化合物の排泄の時点では組織と同様に抽出処理し、それ以外は Nylon filter 処理して分析した。定量は LC-MS-MS で実施。
供試魚	ニジマス
結果	濃縮性試験: - 水中濃度の実測平均値は炭素鎖の短いものは設定値付近 (1.5~1.7 $\mu\text{g/L}$) であったが、炭素鎖 n が 7~8 を超えると設定値を下回り、例えば Carboxylate の $n=12$ の PFTA では 0.014 $\mu\text{g/L}$ と極めて低値であった (薬液調製時にろ過により除去されたか、或いは生物に取り込まれたためと考えられる)。 - 炭素鎖の炭素数 6 以上の Carboxylate、および 4 以上の Sulfonate のみが魚体中に検出された。 - 排泄速度定数は炭素鎖が長いほど小さく、半減期は 3.9~28 日であった。Sulfonate は Carboxylate に比べて半減期は大きい傾向を示した。腸肝循環の再吸収率が Sulfonate で大きいためと推察された。 - 取り込み速度定数も炭素鎖が長いほど大きく、0.53~1700L/kg/d であった。ここでも Sulfonate の方が Carboxylate よりも大きい傾向を示した。C13 の PFTA は予想に比べて低い速度定数を示し、分子サイズによる取り込み制約や水中での Bioavailability の低下が原因と考えられた。 - 濃縮平衡時の Carcass の BCF は 4.0~23000 であった。炭素鎖が長いほど高い BCF が認められた。しかし、C13 の PFTA の BCF は疎水性から予想されるよりも低値を示した (但し、それでも BCF は 23000)。 - Carboxylates では CMC が低下するほど BCF が増大する傾向が示されたが、CMC からは上記の Carboxylate と Sulfonate の BCF の差を説明することはできなかった。 体内分布: - PFA 全般に血液>腎臓>肝臓>胆嚢>生殖腺>脂肪>筋肉の順の濃度であった (心臓、脾臓中濃度は回収率が低いため定量できなかった)。胆嚢濃度は他の界面活性物質の場合に比べて低く (毎日給餌しており胆汁濃度が低い)、また、疎脂性のため脂肪中濃度も低かった。血中アルブミンとの親和性が高く、従って、血中および腎臓中のレベルが高値を示したものと思われる。
閾値	不明 (MW の閾値は >700)

評価/備考	• MW が 714 の PFTA (Perfluorotetradecanoic acid) において立体効果に起因する取り込み制約の影響の存在が示唆されたものの、その BCF は 23000 という高値であった。 • しかしながら、この試験では (1) Perfluorocarboxylate 類と Perfluorosulfonate 類 の混合物 (魚中に検出されなかった 4 化合物を含めて全 11 化合物) の暴露を行っており、このような界面活性作用を有する物質の BCF を混合物で正確に測定できるのか (すなわち分配則を適用できるのか) 疑問が持たれると共に、BCF は速度論を適用して取り込み速度定数と排泄速度定数の比で求めているが、(2) 長鎖成分になるほど水中濃度は極めて低値となり、また、その変動も大きい (RSD は±30%) ため、或いは (3) 長鎖から短鎖の全成分に対して一律同じ取り込み期間 (288hr) を設定しているが、長鎖成分の取り込み期間終了時の魚体中濃度は定常状態のその約 1/3 にしか達していないため、評価された BCF の精度もかなり低いものと推察される。報告されている BCF の妥当性に関してはさらに検討が必要と考える。なお、MW700 を超えてもある程度の濃縮が起こり得る理由としては、フッ素原子の密度の高さに起因して MW が立体的かさ高さを過大評価するためと考察される。 • MW の閾値の提言を積極的に行っているわけではないが、フッ素系の化合物では MW>700 でも取り込みが起こり得ることを示す事例として報告書に載せることにする。
-------	---

分類	MW
タイトル	Octanol:water partition coefficients (P): Measurement, estimation, and interpretation for chemicals with $p > 10^5$
出典	<i>Ecotoxicol. Environ. Safty</i> , 11, 251-260, 1986.
著者	Brooke D. N., Dobbs A. J. and Williams N.
所属	Princes Risborough Laboratory, UK
目的	高疎水性 ($\log P > 5$) 化合物の分配係数評価法について考察し、魚介類における生物濃縮性と高疎水性の関係について考察する。
化合物	Chlorohydrocarbon 類 約 30 化合物 (MW 範囲: 約 100~約 400) なお、濃縮性解析には Chlorohydrocarbons を含む多様な有機化合物 151 物質のデータが用いられているが、具体的な名称や数値などは示されていない。
方法	取り込み評価指標: BCF (方法の詳細は不明)
供試魚	不明
結果	分配係数測定法: - 高疎水性物質の $\log P$ 評価法として Slow stirring method、水溶解度からの評価、HPLC 法および構造からの推算法について考察。明確な結論は述べられていない。 高疎水性化合物の濃縮性: $\log BCF$ と Molecular connectivity (χ_0, χ_2): 全化合物 (151 物質) を対象にした場合には明確な相関関係は得られなかったが、Chlorohydrocarbons に限定すると相関が認められた。この傾向は χ_2 でも同様であったが、相関性は χ_0 のそれに比べて劣るものであった。 - Chlorohydrocarbons に限定すると MW と BCF の間に (χ_0 と同様に) Parabolic な相関関係が確認できた。しかし、全化合物を対象にするとその関係は明確ではなかった。 - 高分子領域での膜透過性の低下は皮膚透過性や腸管からの取り込みで同様な現象がみられることから類推される。ただし、疎水性の高い化合物では濃縮平衡に到達していない BCF が用いられている可能性についても言及。
閾値	不明 (MW 300 付近で最大)
評価/備考	- 化合物名や BCF, MW などの具体的なデータが示されておらず総説的な報告である。高疎水性による Bioavailability の低下の有無は不明である。 - しかし、示されたプロットを見ると MW 700 を超えれば $BCF < 10$ となることが明らかであり、立体効果が取り込み制約要因として働き得るという理論を踏まえれば、分子量の閾値に関する 1 つの解析事例に位置づけられる。 - したがって、MW に関する閾値が積極的に提案されているわけではないが、一つの関連事例として報告書に載せることとする。

分類	MW、Deff
タイトル	Unique bioconcentration characteristics of new aryl fluoroalkyl ethers in common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)
出典	<i>Chemosphere</i> , 51, 153-161, 2003
著者	Yakata N., Sudo Y., Yakabe Y., Tadokoro H., Fukui H., Sanechika K. and Ikeda M.
所属	化評研、旭化成
目的	新規 Aryl fluoroalkyl ether 類 (Mono および Bis-Phenol Type のフッ素系化合物) の濃縮性を測定し、logP や MW などの立体効果の記述子との関係を解析する。
化合物	Aryl fluoroalkyl ether 類 全 7 化合物。 Bis-phenol type (フッ素原子 8 個) 4 物質および Mono-phenol type (フッ素原子 4 個) 3 物質。 (MW 範囲 292~498, Deff 範囲 約 0.87~約 1.45nm)
方法	取り込み評価指標: BCF 濃縮度試験方法: - OECD ガイドライン(1981)に準拠。 - 化合物の 20-30 倍量の HCO-40 で分散して試験を実施。100L 試験水槽を用い、換水速度 800mL/min の連続流水系で 4-16 週間 (魚中濃度が平衡になるまで) の暴露実施。試験温度 25℃。 - 化合物の暴露濃度は 0.1~10 μg/l であり、それぞれの物質の水溶解度未満を設定。2 週間に 1 回水中濃度を測定。 - Bis-phenol type 1 物質 (NL-93) および Mono-phenol type 2 物質 (NL-63A,B) については排泄試験も実施。魚体中濃度を 2 週間に 1 回測定。また、同 3 物質については暴露終了時に表皮、頭部、内臓、その他の部位別分析も実施。 三次元構造最適化法: 不明 Deff 計算方法: Molecular Operating Environment software その他: logP は CLOGP, KOWWIN で推算すると共に HPLC 法で実測。
供試魚	コイ (開始時 21.0-22.7g、脂質含量 3.6-4.0%)
結果	- 水中濃度: 設定の 50-100%に維持された。平均に対する変動は 14%以内であった。 - 毒性影響: 供試魚に毒性影響や死亡は認められなかった。 - BCF および半減期: 4 化合物 (NL-33, 93, 63A, 63B) で BCF が 5000 を超えた。Bis-phenol type (NL-33, 93, 133, 123) の BCF (716~22600) は DDT のそれ (25600) に比べて小さかったが、DDT が濃縮平衡に 8 週間で到達したのに対して、Bis-phenol type の被験物質は 8 週間以降も魚体中濃度の増加がみられた。また、DDT の排泄半減期が 11.5 日であったのに対して NL-93 は 14 日後も残留率は 100%を維持した (全く排泄されなかった)。濃縮性の高い物質ほど濃縮平衡到達時間が長いという一般的知見に矛盾するものであった。Mono-phenol type の BCF は 922~8400 であったが、こちらは 8 週間の暴露期間において平衡到達が確認された。NL-63A,B の排泄半減期は 3.9-4.3 日であった。 - 体内分布: Bis-phenol type (NL-93) および Mono-phenol type (NL-63A,B) の体内分布を見たところ、これらフッ素系の化合物は内臓に分布し易い傾向を示した。 - logP と logBCF の関係: Bis-phenol type である NL-33 はその logP で予測されるよりも高い BCF を示した。また、今回のフッ素系の化合物では logBCF と logP の間には負の直線相関が成立する (logP が HPLC で測定された 5 化合物について解析) ようであった。 - MW と logBCF の関係: MW の大きい Bis-phenol type (NL-33, 93, 133, 123: MW=428~498) で負の直線関係が確認された。分子の立体効果を取り込み制約要因として寄与している可能性が示された。MW と logBCF の負の相関性から外挿すると BCF が 0 となるのは MW650 となったが、Zitko (1976) や Niimi (1988) らが報告している閾値 MW 600 と一致する結果であった。 - Deff と logBCF の関係: Bis-phenol type では MW 同様、負の直線関係が認められた。ただし、Deff 0.95nm が 1.4nm を超えても BCF は 1000 のオーダーであることから、MW の方が立体効果をより適切に記述するものと思われた。 - logP の実測値と推算値の相関性: フッ素含有率の高い Bis-phenol type では推算値に過大評価の傾向が認められた。
閾値	不明 (MW300~430 付近で BCF は最大となり、BCF が 0 となる外挿値は MW650 である。Deff の閾値は明確ではなく 1.45nm 以上である。)
評価/備考	- フッ素系の化合物の濃縮挙動は特異的であり、さらなるデータの収集が必要である。 - Deff はあまり有効でなかったと考察しているが、ここで取り扱った被験物質の立体配座は比較的 Flexible であり、3 次元構造最適化に用いられた計算手法の違いも考慮する必要がある。 - 被験物質の MW は最大でも <500 であり、さらに F の比重の大きさを考慮すると取り込み制約は完全でなかったと解釈できる。 - ここでは MW や Deff に関して明確な閾値が提案されているわけではないが、これらに関連した閾値の存在を示す一つの解析事例として報告書に記載することにする。

分類	MV
タイトル	化学物質の生物濃縮機構とその構造活性相関
出典	衛生化学, 39, 494-508, 1993
著者	西原力、斎藤昇二、松尾昌とし
所属	大阪大学、住友化学
目的	生物濃縮の機構を明らかにし、関連する構造活性相関研究の現状と、熱力学的機構等に着眼した新たな理論式について概説する。
化合物	多様な構造の 128 化合物
方法	取り込み評価指標: BCF (化審法既存点検データ等) MV 計算方法: Le Bas の沸点分子容
供試魚	14 種
結果	化学物質の膜透過の理論: 水の流れによる輸送や拡散による透過過程に関する理論からは分子サイズの増大が取り込み制約として働くことが示される。 $\Sigma V S O$ による生物濃縮の構造活性相関: 高疎水性 (superhydrophobicity) による取り込み制約が示され、その一部については分子量 600 を超えていることから立体効果に起因する取り込み制約があると説明される。 logBCF と MV の関係: MV が増加するに従って logBCF が低下する傾向が示され、取り込み制約の閾値は MV 400~500 (cm^3/mol) 付近にあるものと考えられた。
閾値	MV 400~500 (cm^3/mol)
評価/備考	- 化合物名や BCF, MV などの具体的なデータや高疎水性による Bioavailability の低下の有無は示されておらず、総説的な報告である。 - しかし、示されたプロットを見ると MV に関する取り込みの閾値の存在は明らかであり、立体効果が取り込み制約要因として働き得るという理論を踏まえれば、MV に関する閾値の存在を積極的に主張する 1 つの解析事例に位置づけられる。

分類	MW、MV
タイトル	Influence of molecular weight and molecular volume on dietary absorption efficiency of chemicals by fishes
出典	Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45, 222-227, 1988.
著者	Niimi A. J. and Oliver B. G.
所属	Canada Centre for Inland Waters
目的	- この論文そのものは17種類のHalogenated organic chemicalsのニジマスでの餌からの取り込み（以下①）に及ぼされる分子量（MW）と分子容（MV）の関係を解析しようとするものである。 - この論文の考察の中で、彼らはMcKimら（1985）およびBoese（1984）の水から魚への取り込み率と分子容の関係を解析したデータ（以下それぞれ②、③）を引用して、“$MV=0.07-0.3 \text{ nm}^3$においてbell-shaped curveが成立する”ことを述べている（相関解析そのものはNiimiらが報告しているものであり、今回の調査ではこの部分を引用した）。
化合物	① 餌からの取り込み検討 Halogenated organic chemicals 17化合物（MW範囲 266～627、MV範囲 $0.14 \sim 0.30 \text{ nm}^3$） およびHalogenated organic chemical類 38化合物（MW範囲 182～713、MV範囲 $0.13 \sim 0.44 \text{ nm}^3$）、Alkane類 6化合物（MW範囲 252～903、MV範囲 $0.31 \sim 0.61 \text{ nm}^3$）、Tetracycline類 1化合物（MW 460、MV 0.38 nm^3） ② 鰓からの取り込み率（McKimら（1985）の文献より引用、Toxicol. Appl. Pharmacol. 77, 1-10）： 直鎖エステル類、Chlorinated aromatic hydrocarbon類他、全14化合物 （MV範囲 $0.07 \sim 0.3 \text{ nm}^3$、MW範囲 74～546、logP範囲 0.23～7.5） ③ 鰓からの取り込み率（Boese（1984）の文献より引用、Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41, 1713-1718.）： Phthalate類 4化合物（MV範囲 $0.2 \sim 0.4 \text{ nm}^3$、logP範囲 3.2～9.2） Diethyl phthalate (DEP)、Butylbenzyl phthalate (BBP)、Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、di-n-Octyl phthalate (DOC)
方法	取り込み評価指標：餌からの取り込み率（①）、鰓からの取り込み率（②③） ① ニジマス（約300g）30尾を250L水槽、温度13℃で飼育。3つの化合物群（いずれも混合物）にわけて麻酔した魚にゼラチンカプセルをガラス管を用いて胃内に単回経口注入（各化合物 $54-66 \mu\text{g}$ 投与）。投与数時間後および毎日餌（体重の1%のdry diet）を与えた。暴露後5、14、28、48、85日に各暴露水槽から6尾を採取。 ② 供試魚（1化合物につき4尾、11-12℃で馴化）にLatex rubber oral membraneを口付近に装着し、鰓流水と流出水が分かれるように処理後、Respirometer-metabolism chamberに固定し、2～4日の期間Ventilation volume, Ventilation rate, Oxygen uptake efficiencyを測定。その後、96h-LC50の10～100倍希釈濃度（かつ水溶解度以下）の被験物質（^{14}C標識体を使用）に2～6時間暴露して、鰓流水と流出水中の化合物濃度を定量して、取り込み率（抽出率）を測定。水中の化合物濃度の測定は暴露水を直接LSCでカウントするか、或いは、Hexane抽出してカウントした。なお、分散助剤の有無は不明。 ③ DEP、BBP、DEHPについては、20-300 $\mu\text{g/L}$の間の3濃度を、また、DOCについては30-40 $\mu\text{g/L}$の1濃度を用いてCannulation（ガラスカニューレを魚の口に挿入して250mlビーカーで鰓からの排出される液を回収）を実施。分散助剤はアセトニトリルを使用。エラ通過前後の水中の化合物濃度の測定により取り込み率を評価。（海水中での溶解度はDEHPでは0.6g/L、DOCでは1.0g/Lと試験濃度を下回る。） MV計算方法：BondiのVan der Waals容積
供試魚	① 種々の魚およびニジマス、②ニジマス、③English sole
結果	① 餌からの取り込み率： MW 627のHexabromobiphenylで取り込みがみられるものの、分子量の増加とともにその程度が減少する傾向を示した。MV 0.25 nm^3以下の化合物は取り込み率が高く、一方、MV 0.25 nm^3以上ではMVの増加と共に取り込み率が全般に低下した。減少傾向に対するMVと取り込み率の相関性はMWのそれよりも明確であった。また、Squalane（MW 423、MV 0.37 nm^3）のような直鎖状の化合物は同程度のMVを有する環状化合物に比べ、取り込み率は高く、分子サイズのみでなく、分子の形状も取り込みに関与すると考えられた。 ② McKimらが報告している14物質の水からマスへの直接濃縮のデータの解析では、$MV=0.07 \sim 0.6 \text{ nm}^3$の範囲において、MVとBCFの間にBell-shaped curveが成立した。 ③ Boeseが報告している4つのPhthalate類の水からEnglish soleへの直接濃縮のデータの解析でも、同様の関係が確認されたとしている（但し、Boeseは大きな置換基を有するPhthalateの吸収率の低下はBioavailability低下に起因すると考察している）。
閾値	不明（①MV 0.25 nm^3 以上でMVの増加と共に取り込み率が低下、②③MVについてベル型曲線）
評価/備考	- 溶解度以下の暴露で観察されたMcKimらの取り込み率を用いた解析結果（②）は、分子サイズの取り込み制約への寄与を示した一つの事例として取り扱える。 - 一方、NiimiはBoeseの取り込み率に基づく解析結果（③）からも同様の考察を行っているが、Boeseの考察はあくまでもBioavailabilityの低下と関係付けられるものであり、従って、調査報告書にはMcKimらのデータに基づく解析結果のみを引用するのが望ましい。 - 閾値が積極的に提案されているわけではないが、一つの関連事例として報告書に載せることとする。

分類	Deff
タイトル	Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals
出典	<i>Chemosphere</i> , 14, 1871-1896, 1985
著者	Oppenhuizen A., Veide E. W. v. d., Gobas F. A. P. C. Liem D. A. K., Steen J. M. D. v. d.
所属	Univ. of Amsterdam, Netherland, Univ. of Bayreuth, West Germany
目的	疎水性が非常に高い場合は logP と生物濃縮度との相関がなくなり、生物への取り込みが低下するが、これは溶解度が極端に低いことによる bioavailability の低下や立体因子の効果が関与すると考えられる。Chloronaphthalen 類などを用いて生物濃縮度と立体因子の関係について解析した。
化合物	(1) Deff の閾値の解析に用いられた化合物 Halogenated aromatic hydrocarbon 類 全 13 化合物 Chloronaphthalen 類 6 化合物 (1,2-di-, 1,4-di-, 1,2,3,4-tetra-, 1,3,5,7-tetra-, 1,3,5,8-tetra-, octa-) 、 Chlorodibenzo-p-dioxin 類 2 化合物 (2,3,7,8-tetra-, octachloro-)、Hexachlorobenzene、Hexabromobenzene、Biphenyl 類 3 化合物 (decachloro-, 2,2',3,3',4,4'-hexabromo-, decabromo-) (Deff 範囲 7.6~9.8 Å, logP 範囲 4.4~>6, MW 範囲 197-944) (2) 濃縮度試験を行った化合物 Chloronaphthalen 類, Pentachlorobenzene および 2,3',4',5-Tetrachlorobiphenyl
方法	取り込み評価指標: BCF 濃縮度試験: ①Chloronaphthalen 類異性体、Pentachlorobenzene および 2,3',4',5-Tetrachlorobiphenyl の混合物または② Halowax1051 (1,2,3,4,5,6,7-hepta-, 1,2,3,4,5,6,8-hepta-, および octachloronaphthalene の混合物) を使用。①5g の Chromosorb W と各化合物 25mg (in 200ml n-ペンタン) を混合して溶媒を留去し、これを漏斗状のカラムに加え、40L の水 (脱塩処理水と水道水 1:1) を再循環させて化合物を飽和させた (温度 22°C)。この連続流水系を開始して 10 日後に、73 尾のグッピーを試験水に入れた。暴露後 1,2,3,4,7 日に魚を採取し、7 日以降は残りの 23 尾を清水に移し、3,8,18,43,74,84 日後の水および魚を分析した。または、②3g の Chromosorb W と Halowax 1051 を 93mg (in 200ml n-ペンタン) を混合して溶媒を留去して漏斗状カラムに加え、25L の水を再循環し、この連続流水系を開始して 3 日後に、35 尾のグッピーを試験水に入れた。暴露後 7 日まで毎日試験水および魚を採取した。魚はホモジナイズ後に水/ヘキサン (1:1) または水/トルエン (1:1) で抽出し、有機溶媒層を Silica-sulphuric acid および Silica-sodium hydroxide カラムで精製後に濃縮し、GC-ECD で分析した。試験水は 100~500ml を有機溶媒 25~50ml で 2 回抽出後、GC-ECD 分析。BCF は速度論モデルで解析した。 三次元構造最適化法: 不明 Deff 計算方法: van der Waals 半径と結合角より算出
供試魚	グッピー (雌、平均体重 330-370mg)
結果	- 水溶性: 1-4 個の塩素置換 Chloronaphthalen 類の水中濃度の測定値は報告値や計算値と一致するものであった。hepta-または octa-置換体は計算値から予測されるよりも高い測定値であった (微粒子やミセルの形成によると考えられた)。 - 毒性影響: Chloronaphthalen 類の暴露ではグッピーに平衡失調が見られ、暴露 7 日後までに 50%以上が死亡した。Halowax では平衡失調はみられず、暴露 7 日後までの死亡率は 10%以下であった。 - 濃縮パラメータと logP の関係: Chloronaphthalen 類の k1 は logP>4 で相関性はみられなかった。k2 は logP と負の相関を示したが、1,2,3,4-tetrachloronaphthalene のみ比較的高く、代謝の要因が考えられたが詳細は不明であった。k2 は superlipophilic 化合物で極端に小さい値であった。 - 疎水性化合物の取り込み: hepta- および octachloronaphthalene (MW 404) には取り込みはみられなかった。MW の閾値 500-600 と合致するようであるが、octachlorobenzo-p-dioxin (MW 400) で取り込まれず、decachlorobiphenyl (MW499) で取り込まれるとの報告があることから MW のみでは説明できない。 2 番目に小さい断面の長さ (Deff) が透過孔の径を決定していると考えられ、Deff 9.5 Å より小さい化合物では取り込みが認められる。
閾値	Deff 9.5 Å
評価/備考	高疎水性による Bioavailability の低下が起こっている可能性がある点を考慮しても、Deff が取り込み制約要因となり得ることを主張する報告であり、閾値に相当する値も提案されていることから、報告書に取り上げた。

分類	Deff
タイトル	Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, <i>In Handbook of property estimation methods for chemicals</i>
出典	<i>Environmental and health sciences</i> (R. S. Boethling and D. Mackay ed), pp189-231, CRC Press LLC, 2000
著者	Gobas F. A. P. C. and Morrison H. A.
所属	University of Toront
目的	生物濃縮性（直接濃縮、食物連鎖を通じた間接濃縮）についての理論、測定法、予測手法などに関する総説
化合物	① Opperhuizen ら(1985)の引用 (別資料参照) ② Gobas(1989)の文献からの引用 Halogenated aromatic hydrocarbon 類 10 化合物 (Deff の最大値 >0.95nm、logP 範囲 3.89~8.26) ③ Muir ら(1986)の文献からの引用 Chlorinated dioxin 異性体 2 化合物 (Deff の最大値 >0.95nm) 1,3,6,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, Octachlorodibenzo-p-dioxin (文献 Environmental Toxicol. Chem. 1986, 261-272) (Muir ら(1988)の文献は Chlorinated dioxin 異性体 4 化合物の餌からの取り込みの評価に関するもののためここでは省略。)
方法	取り込み評価指標: BCF 三次元構造最適化法: 不明 Deff 計算方法: van der Waals 半径と結合角より算出 (③の文献中では Deff の計算はされておらず、Gobas が算出して評価を加えている)
供試魚	① Opperhuizen ら(1985)の引用 グッピー ② Gobas(1989)の引用 グッピー ③ Muir ら(1986, 1988)の引用 ニジマス、ファットヘッドミノー
結果	・分子量 (MW) による取り込み制約 化合物の拡散係数は MW (の 0.33~0.51 乗) の逆数に比例し、MW の増大は生体膜における化学物質の拡散性低下に寄与し得ることから、MW が取り込み制約になり得ると考察している。ただし、疎水性高分子でも脂質二重層を通過するという知見もあり、また、MW の大きな化学物質は疎水性も高く、したがって水中濃度も極低濃度になることから、膜透過の Kinetics において評価される速度も見かけ上小さくなったのではないかと考察。 ・分子サイズ (Deff) による取り込み制約 Deff に起因する取り込み制約は存在し得るであろうと考察している。しかし、Deff の閾値は 0.95nm 以上であり、明確な cut-off が存在するとは考えにくいとしている。 ① Opperhuizen ら(1985)の引用 Deff >0.95nm では取り込まれない ② Gobas(1989)の引用 Deff >0.95nm でも取り込まれる ③ Muir ら(1986, 1988)の引用 Deff >0.95nm でも取り込まれる
閾値	不明 (Deff >0.95nm)
評価/備考	- あくまでも関連した知見がまとめられた総説である。立体効果に起因する閾値の存在は支持しているものの、その値の妥当性に関しては疑問を呈している。 - しかしながら、3 次元構造の最適化手法の違いについては言及されておらず、真の閾値が本当に彼らの主張のとおり Deff 0.95nm を上回るのか定かではない。 - MW についても理論から取り込み制約要因になり得ることが明らかであり、単に Bioavailability 低下に結びつけば良いというものではない。各国当局も MW>700 付近を一つの閾値に提案している。 - 閾値が積極的に提案されているわけではないが、特に Deff に関する一つの解析事例として報告書に載せることとする。

分類	Deff
タイトル	The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
出典	<i>Aquatic Toxicol.</i> , 25, 1-14, 1993
著者	Sijm D. T. H. M., Part P. and Opperhuizen
所属	Univ. of Utrecht, Netherland, Uppsala Univ., Sweden
目的	ニジマスの Perfused gill を用いて疎水性の異なる化合物の取り込み挙動を評価する。取り込み速度の温度依存性ならびに分子の立体効果による取り込み制約についても検討する。
化合物	Halogenated aromatic hydrocarbon 類および phenol、全 8 化合物 (MW 範囲 94~552, Deff 範囲 0.66~0.98nm, logP 範囲 1.8~8.5) Hexachlorobenzene (HxCBz), Hexabromobenzene (HxBBz), 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (2255), Decachlorobiphenyl (DCB), Octachloronaphthalene (OCN), Octachlorodibenzo-p-dioxin (OCDD), Tetrachloroveratrole (TCV), Phenol
方法	取り込み評価指標: 鰓からの取り込み率 試験方法: 4000ml の水を被験物質 (HxCBz, HxBBz, 2255, DCB, OCDD) を吸着させた Chromsorb GAW カラムを 200nl/hr で灌流して暴露用試験液を調製した。さらにこの試験液に、所定量の Phenol を直接添加、およびあらかじめ三角フラスコ底面に所定量吸着させた TCV を加えて攪拌することで化合物混合溶液とした。鰓に速度約 2ml/100g-fish/min で試験液を灌流。暴露水は 1L/min で流した。3 温度条件で測定 (5°C、12°C、18°C、一群 1 回 5-8 尾)。灌流液の pH は 7.8、暴露水の pH は 6.8-7.0 であった。灌流液は暴露開始後 15, 30, 45, 75, 90min に、暴露水は 0, 45, 90min まで採取し、濃度を GC-ECD または LSC で測定して鰓への取込速度を評価した。 ・取り込み速度定数 (k) = $(C_p/C_w) \times F$ で計算評価した (C_p : 灌流液中の化合物濃度、 C_w : 水中の化合物濃度、 F : 灌流液の流速)。 ・HxCBz, 2255, HxBBz, DCB, OCN および OCDDn については 12°C 下において in vivo での暴露実験も行った (筋肉中濃度を測定)。 三次元構造最適化法: 不明 Deff 計算方法: van der Waals 半径と結合角より算出
供試魚	ニジマス (平均体重 54g)
結果	(1) 灌流鰓: ・ HxCBz の取り込み率 (C_p/C_w) は経時的に増加傾向を示し、30 分経過した時点でほぼ平衡に到達した。 ・ 水中の化合物濃度は HxBBz を除いては溶解度以下であった。 ・ DCB, OCN, OCDD の取り込み速度定数は評価できなかった (DCB, OCN の水中濃度はいずれの濃度においてもわずかながら検出されたにも拘わらず)。 ・ HxCBz, HxBBz, 2255, TCV はいずれも鰓に取り込まれたが、12°C の取り込み速度定数は化合物間で有意差は認められなかった。Phenol の値は低値を示した。ない、HxBBz を除いては 12°C と 18°C の間の有意差は認められなかったが、5°C の取り込み速度定数は有意に低下した。温度依存性から取り込みが拡散によって制御されているものと推察される。 (2) in vivo ・ 0-1.5 時間の筋肉中の化合物濃度の経時変化に基づいて取り込み速度定数を評価した。HxCBz, 2255, HxBBz, DCB の評価された値は同等であった。OCN, OCDD の取り込み速度定数は水中あるいは筋肉中の濃度が検出できなかったため評価しなかった。 (3) 分子の立体的かさ高さと取り込み制約 ・ MW 最大の HxBBz (MW 552, Deff 0.96nm) では取り込みがみられたが、Deff がこれより大きい 2 化合物 (Deff はともに 0.98nm, MW 404 および 460) では取り込みはみられなかった。Hexabromobenzene は低温度 (5°C) で取り込みが低下した。閾値は種と温度に依存すると考えられた。Hexabromobenzene はグッピーやサケでは取り込みがみられておらず、種差がみられた。低温での取り込み低下は、膜の充填密度の増加や、膜中の孔が小さくなるためと考えている。
閾値	Deff 0.98nm 付近 (明確な値は出していない。閾値は種と温度に依存するため)
評価/備考	・ Deff=0.98nm とする一つの報告事例である。また、魚種や温度の違いによって閾値に幅が存在し得る可能性が考察されている。 ・ Deff として 0.98nm を提案する一つの解析事例に位置づけることができる。

分類	Deff
タイトル	Bioconcentration of polybrominated benzenes and biphenyls and related superhydrophobic chemicals in fish: Role of bioavailability and elimination into the feces
出典	<i>Environ. Toxicol. Chem.</i> , 8, 231-245, 1989
著者	Gobas F. A. P. C. and Clark K. E.
所属	University of Tront
目的	ハロゲン化化合物を主体とした Superhydrophobic な化合物のグッピーにおける BCF を測定し、logP と BCF の間の直線相関からの逸脱要因について考察する。すなわち、①濃縮平衡到達までの暴露時間の問題、②糞に分配されての排泄の寄与、③Bioavailability 低下の問題、④生体膜低下の問題などとの関わりについて考察する。
化合物	Halogenated aromatic hydrocarbon 類 10 化合物 Bromobenzene 類 (1,4-di-, 1,3,5-tri-)、Bromobiphenyl 類 (4,4'-di-, 2,4,6-tri-, 2,2',5,5'-tetra-, 2,2',4,4', 6,6'-hexa-)、Chlorobiphenyl 類 (2,4,5-tri-, 2,2',5,5'-tetra-, deca-)、Mirex、series of dibenzo-p-dioxins (Deff の最大値 >0.95nm、logP 範囲 3.89~8.26) 実験 1 : 1,4-di-, 1,3,5-tri-bromobenzene、4,4'-di-, 2,4,6-tri-, 2,2',5,5'-tetra-, 2,2',4,4', 6,6'-hexa-bromobiphenyl、2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl の混合物を使用 実験 2 : 2,4,5-tri-, deca-chlorobiphenyl、Mirex、series of dibenzo-p-dioxins の混合物を使用
方法	取り込み評価指標: BCF 濃縮度試験: 脱塩素水 35L を 40L 容の試験水層に入れ、一日 50L の流速で各混合物を吸着させた generator column (50 μ m mesh glass filter, Chromosorb W) を灌流させた。灌流を開始してから 5 日間水を循環させて溶解平衡を達成した後、魚 (95 または 117 尾) を入れ、さらに、4 日間 (実験 1) または 16 日間 (実験 2) 試験水を灌流した。水温 22°C。暴露終了後、魚を静水 10L の水槽に移し、排泄挙動を評価した。水中の溶存酸素を 8ppm に保つために弱くエアレーションした。 実験 1 では暴露期間中は 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12 日目に、実験 2 では 2, 5, 10, 12, 16, 20, 24, 26, 28, 30, 31 日目に魚を分析した。排泄期間中は実験 1 では 0.7, 1.7, .7, 4.7, 7.7, 15.7, 22.7, 68, 106, 180 日に、実験 2 では 2, 6, 14, 30, 42, 66, 98, 124, 160, 198 日目に分析を実施した。サンプルは 3-4 尾を pool して Hexane 抽出し、シリカゲルカラム精製後 GC-ECD で分析した。 三次元構造最適化法: 不明 Deff 計算方法: van der Waals 半径と結合角より算出 (Oppehuizen らの方法と同じ)
供試魚	グッピー (雄、当歳魚、初期体重 0.098g、脂質含有率 6.5%)
結果	濃縮度: 脂質重量当たりの logBCF は 4.12~6.92 毒性影響: 実験 1 では 8 日間の暴露において魚の活性低下が認められ、12 尾が死亡した。実験 2 では供試魚に毒性影響は認められなかった。 BCF と logP の関係: 脂質含有率で補正した BCF (Kl) の対数値と logP の間には正の直線相関が成立した。しかし、logP を頂点に BCF 低下の傾向が確認された。この理由としては超疎水性物質の糞への排泄の寄与、あるいは水中での bioavailability の低下が考えられた。そして彼らは実験結果を基に水中の bioavailable fraction を算出し、さらにそれで補正した BCF は logP と直線相関を示すと考察した。 排泄速度定数 (Kt) の対数値と logP の関係: これらの相関は理論的に non-linear になるはずであるが、実験結果からは直線相関成立の傾向が認められた。これは代謝要因や糞への排泄の関与が大きいためと推察された。 取り込み速度定数 (K1) の対数値と logP の関係: これらの間には理論どおりの関係が認められた。1 logP が 6.5 付近を超えると見かけの取り込み速度定数は低下した。 Deff と BCF の関係: 明確な Deff と BCF の関係の解析結果は示されていないが、Deff 0.96nm の Bromobiphenyl 類 (2,4,6-tri-, 2,2',5,5'-tetra-, 2,2',4,4', 6,6'-hexa-)でも取り込みがみられたことが報告されている。 溶解度: 疎水性が高く MV が 300cm ³ /mol を超える化合物は bioavailability が低下する。Bioavailable な溶質画分を基にして logBCF を算出した場合、logP と logBCF の相関性は良好となる。
閾値	不明 (Deff >0.95nm)
評価/備考	- Oppehuizen らの提案した取り込み制約に関する Deff の閾値をそのまま採用することに対する注意を述べた文献であるが、閾値の存在自体を否定するものではない。 - 彼らが積極的に Deff の閾値を提案しているわけではないが、関連する解析事例としてここでは報告書に引用することとする。

分類	取り込み機構
タイトル	Effects of environmental salinity on branchial permeability of rainbow trout, <i>Salmo gairdneri</i>
出典	<i>J. Physiol.</i> 326 , 297-307, 1982
著者	Isaia J.
所属	Universite de Nice, France
目的	非電解質の鰓透過を最新の形態学的知見を踏まえて検証する。
化合物	Glucose, Butanol, Ethanol, Ethylacetate, Dextran, Urea の ^{14}C 標識体および H_2O 、Mannitol の ^3H 標識体
方法	取り込み評価指標：鰓の呼吸細胞と塩類細胞における化合物の取り込み 試験方法：供試魚の海水馴化は Lahlou ら (1976) の方法によった。灌流液（電解質組成は淡水馴化魚は Payan ら (1975)、塩水馴化魚では Girard (1976) の方法に準じた）に標識化合物を $30\mu\text{Ci/L}$ (^{14}C 標識体) または $150\mu\text{Ci/L}$ (^3H 標識体) を加えた。供試魚（曝気した水道水または海水で馴化）より分離させた頭部に試験液を 15°C で一定圧または一定速度 (250ml/hr) で灌流した。1-2mm 経のカテーテルを背部大動脈に挿入して鰓血管から流れ出る動脈と静脈部分の濃度を把握できるようにした。 （解剖学的には鰓の血液は腹部大動脈側（入鰓動脈）から、二次鰓弁の呼吸細胞を通過して背部大動脈側（出鰓動脈）へ流れ出る経路、あるいは呼吸細胞からさらに塩類細胞を通過して鰓静脈側へ流れ出る経路に分別できる。すなわち、出鰓動脈中の化合物濃度は呼吸細胞経由の、また鰓静脈中のそれは塩類細胞経由の取り込みに関係づけられる。傍細胞経路については直接的には評価されていない。） 入鰓動脈、出鰓動脈、鰓静脈および外部灌流液についてそれぞれの部位に存在する放射能（Qaa, Qae, Qve, Qext）や流量を測定し、鰓全部、二次鰓弁および一次鰓弁における外/内向きフラックス量を算出した。
供試魚	ニジマス（雄雌、150-200g）
結果	鰓は複雑な構造を有するものの、鰓での透過は①呼吸細胞膜、②塩類細胞膜、③細胞間結合部の3経路に分類可能であるとみなされる。鰓上皮の構造と機能の関係は複雑であり、(1) 海水魚の塩類細胞間の shallow junction などでは他の上皮と比べて非常に透過性が低く、(2) 淡水から塩水に馴化する過程で鰓透過性は水で減少、マンニトールは増加、デキストランは一定となる。これらは、化合物の物理化学性状によって透過経路が異なることを示唆している（この点および構造的な知見から傍細胞経路の存在が示唆される）。 非電解質の透過：各化合物の鰓における外/内向き透過係数より、(1) 尿素と同等かそれ以上の疎水性の低分子は主に呼吸細胞を（塩類細胞経由は0と有意差なし）、(2) デキストランは主に塩類細胞を経由して透過していることが確認された。この結果は Isaia ら (1978) が報告している以下の仮説に一致するものであった。 ①親水性および疎水性の低分子は二次鰓弁の呼吸細胞を通る経細胞経路、②多糖類（イヌリン、デキストラン）は非呼吸細胞である塩類細胞を通る経細胞経路、③マンニトールなどの六炭糖の大きさの分子は傍細胞経路によってそれぞれ取り込まれる）。 透過係数：透過係数はデキストランを除いて外/内の両方向とも同等の大きさであったが、デキストランは排泄方向の速度が取り込み方向の速度に比べて10倍高かった。また、デキストランの透過係数はより小さな分子と比べると大きな値であった。これは、漿膜側で低分子が選択的に保持されることや、管状小胞系（Tubulovesicular reticulum）での低分子の再吸収や高分子の血漿側から外部環境への経細胞経路での排泄によるものと推察される。 呼吸細胞での透過：非電解質のオリーブ油/水分配係数（Koil）と膜透過係数（Ps）には相関性がみられ、膜中での拡散性が取り込みの制約要因になり得ることが示唆された。 塩類細胞での透過：低分子、高分子化合物が塩類細胞に取り込まれた場合、高分子化合物の方がより速やかに透過することから、(1) 低分子を選択的に保持する細胞膜の存在や、(2) 管状小胞系による直接的な高分子の輸送が考えられる。デキストランが塩類細胞の細胞質内で認められないことからこの推察の妥当性が示唆される。
閾値	—
評価/備考	・取り込みの閾値に関する文献ではない。 ・鰓の構造等に注目して鰓透過機構について詳細な検討がなされている。