

令和 5 年度 化学物質規制対策

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

経口暴露による化学物質蓄積性の生物種間差に関するデータ構築
調査報告書

令和 6 年 3 月

国立大学法人 鹿児島大学

調査課題名：経口暴露による化学物質蓄積性の生物種間差に関するデータ構築

研究代表者： 國師 恵美子

職名：助教

所属：鹿児島大学 水産学部

所属機関住所：〒890-0056 鹿児島県鹿児島市下荒田4丁目50-20

調査体制：以下に実施体制を示す

調査代表者：	國師 恵美子	鹿児島大学水産学部水圏環境保全分野	助教
研究協力者：	宇野 誠一	鹿児島大学水産学部水圏環境保全分野	教授
研究協力者：	山崎 雅俊	鹿児島大学水産学部水圏環境保全分野	助教
実施者：	竹下 諒	鹿児島大学水産学部水圏環境保全分野	修士2年
	内村 未来	鹿児島大学水産学部水圏環境保全分野	修士2年
	北條 裕也	鹿児島大学水産学部水圏環境保全分野	修士1年
	今村 和貴	農林水産学研究科 水産資源科学専攻	博士1年

目次

1. 概要と目的.....	4
1. 1 これまでの研究の概要	4
1. 2 研究の背景と目的.....	4
2. 実験方法.....	6
2. 1 対象物質及び試薬類.....	6
2. 3 試験魚の畜養及び馴化	10
2. 4 飼育水及び水質測定	10
2. 5 試験餌料の調整	11
2. 6 給餌.....	11
2. 7 試料採取および前処理	11
2. 8 各試験物質の分析方法（テルフェニル類混合物試験）	12
2. 8. 1 餌料及び魚体中のテルフェニル類混合物分析方法.....	12
2. 9 魚体中テルフェニル類測定時の GC/MS の測定条件	13
2. 10 各試験物質の分析方法（紫外線吸収剤類混合物試験）	14
2. 10. 1 餌料及び魚体中の紫外線吸収剤類混合物分析方法及び測定条件	14
2. 10. 2 魚体中紫外線吸収剤測定時の LC/MS/MS 定条件.....	15
3. 結果と考察.....	16
3. 1 テルフェニル類混合物餌料投与法試験の結果と考察.....	16
3. 1. 1 ヒメダカを用いた毒性試験	16
3. 1. 2 餌中濃度	16
3. 1. 3 水中濃度.....	16
3. 1. 4 芳香族炭化水素類混合物餌料の経口暴露によるヒメダカの生物濃縮性...16	
3. 1. 5 コイとヒメダカの BMF における生物種間差.....	17
3. 2 紫外線吸収剤類混合物餌料投与法試験の結果と考察.....	18
3. 2. 1 ヒメダカを用いた毒性試験	18
3. 2. 2 餌中濃度	18
3. 2. 3 水中濃度.....	18
3. 2. 4 紫外線吸収剤類混合物添加餌料の経口暴露によるヒメダカの生物濃縮性	18
3. 2. 5 コイとヒメダカの BMF における生物種間差	18
4. 魚類の化学物質蓄積性に関する今後の課題と実地すべきテーマ	20
5. 人材育成.....	22
6. 参考文献.....	23

1. 概要と目的

1. 1 これまでの研究の概要

本研究は令和 3 年度に本事業で実施した「餌料投与法を用いた難水溶性物質の蓄積性を評価するためのデータ構築」と令和 4 年度に本事業で実施した「経口暴露による魚類の化学物質蓄積性と経鰓暴露との関連性」の後継研究にあたる。前研究では logKow5 以上の難水溶性物質の経口濃縮性を調べたが、令和 4 年度ではそれよりも logKow が低い物質の経口濃縮性を検証した。主に logKow5 以下の物質を対象とし、コイに餌料投与法による暴露試験を行った。その結果、多環芳香族炭化水素類のフェナントレンとその派生物、メチルフェナントレンに関して多少高い蓄積性が観察されたものの、その他の物質に関しては、高蓄積性のものはなかった。また、以下に示す今回対象とした物質では、logKow、あるいは BCF と BMF 間で明瞭な相関は観察されなかった。

1. 2 研究の背景と目的

水生生物の化学物質に対する蓄積性、分解能力や感受性の種間差はかなり大きい、その情報は十分ではない。水環境中では無脊椎動物から脊椎動物まで食物連鎖において密接な関係を保っており、その中の 1 種類でも欠けた場合、それを餌とした生物にも大きく影響を与え、さらに連鎖的に複数の生物種の存続危機を招く可能性もある。このように水環境中では絶妙なバランスの上で生物多様性が維持されているが、化学物質汚染はこのバランスを容易に崩す可能性がある。そのため、健全な多様性維持のためにも厳格な化学物質管理が求められる。

一方、化学物質の製造、輸入、使用の実態は常に変動しており、それに伴って有害性に関する新たな知見も得られている。このような状況を随時反映し、我が国の経済の状態や産業の発展等を考慮しつつ、時代に即した化学物質管理制度の見直しを一定期間ごとに行うことが求められている。令和 2 年 8 月の化学物質審議会物質選定小委員会報告書で示された主な中長期的課題の中には特に「有害性の評価」に関するいくつかの問題点があげられており、今後、これらの問題点を解決する必要がある。

化審法における化学物質蓄積性評価は、濃縮度試験（OECD TG305）により得られた結果について行われている。しかし、TG305 のみでは実環境における化学物質挙動をカバーしきれないという指摘もある。例えば、難水溶性物質などは呼吸を介して自ら魚体中へと

取り込まれているとは実際には考えにくく、このような物質への TG305 試験の適用は限界がある。難水溶性物質の問題を解決するため、近年、日本では餌料投与法による評価が化審法に加えられた。餌料投与法の蓄積性評価例は増えてきたが、一方で本法を実施する上で、問題点も指摘されてきた。特に化審法では経口濃縮係数 (BMF) が 0.007 という基準値が設けられており、それ以下である場合は高蓄積性ではないと判断されている。BMF 0.007 という数値は、BCF に換算した値から考えるとかなり安全性を考慮したものであることが、インターネットなどで公開されている協議資料からも窺える。ただし、BMF 基準値の見直しは随時行う、とされており、今後、大きく見直される可能性があるが、それにはより広範囲な化学物質に対する経口濃縮性データを得て、さらには経鰓濃縮との関係なども広い物性のもと、検証されるべきであると考えられる。

我々は本事業の過去 2 年間にわたり、logKow5 以上の物質群 18 種類と LogKow3.5~5 程度の物質群 18 種類のコイに対する経口投与試験を行い、BMF を求めた。一部の物質はコイ体内に特異的に蓄積する傾向がみられたが、いずれの BMF も高濃縮性に至るほどではなかった。しかし、これらの結果はコイのみであり種間差を考えた場合の蓄積性は不明である。我々の過去の研究では、コイとヒメダカの水暴露試験を行った場合の BCF が数倍~20 倍程度異なることを確認しており、恐らく広く水生生物種の蓄積性を検証すれば、さらに大きな種間差が見出されるだろう。化審法の生物影響リスク評価では感受性の種間差を考慮して、その評価に不確実係数 (UF) を導入している。蓄積性評価でも、実環境における生物多様性を意識した化学物質管理を行うべく、コイの蓄積性の性質を把握した上で、種間差を考慮した UF を導入して、水生生物全体の安全性を担保するような新しい評価法の構築を計ること今後求められる可能性が高い。今後生物濃縮性を考えていくうえで、これらの種間差を考慮することは必要であると考えられるが、魚類に関してはある程度試験の手法は定まっているものの、貝類や甲殻類についての手法は様々な検討が必要な状況である。そこで、本研究では、コイと同じ臓器構造をもつヒメダカを用いて、コイの経口濃縮性とのデータ比較を行うことを目的とする。さらに、魚類以外の水生生物に関しての経口蓄積試験を行うための試験法の検討も行うことで、将来生物種間差の検討する際へのデータ提供を行うことを目的とする。

2. 実験方法

2. 1 対象物質及び試薬類

本年度の対象物質は、これまでコイの餌料投与試験で検討した物質群から比較的高い蓄積性が認められた物質群と蓄積性が低かった物質群を選定した。比較的高い蓄積性が認められた物質群は芳香族炭化水素類であり、logKow5 以上になる物質群である。このような物質は、一般的には腸管吸収して肝臓に運ばれ、血流と共に体内循環するまでにかなりの部分が代謝・分解を生体内で受けることが期待され、結果として経口濃縮性は低いとされる。対象物質群は機器分析を実施する上で同時分析が可能な物質群ごとに2つのグループに分け、それぞれの物質群ごとに添加した餌による経口暴露試験を行った。1つ目のグループは、コイでの暴露試験で体内から高頻度かつある程度の濃度が検出されたフェニル基が3つ連なった芳香族炭化水素類である。まず、餌料投与法の基準物質にもなっている *o*-テルフェニル、さらにその異性体である *m*-テルフェニルや *p*-テルフェニル、またフェニル基が2個連なったビフェニルを対象とした。また、このグループにはトリフェニルメタン、トリフェニルベンゼンなども対象物質に加えた。

試薬は芳香族炭化水素類では、ビフェニル、*o*-テルフェニル、トリフェニルメタン、1,3,5-トリフェニルベンゼンは東京化成工業株式会社（TCL）製、*m*-テルフェニル、*p*-テルフェニル、は和光純薬株式会社（Wako）製を用いた。紫外線吸収剤は、オキシベンゾン（ベンゾフェノン-3）、ジオキシベンゾン（ベンゾフェノン-8）、DHDMBP（ベンゾフェノン-6）、ドロメトリゾール、サリチル酸フェニル、サリチル酸ベンジル、エトクリレン、アポベンゾンは東京化成工業株式会社製を用いた。内部標準物質のナフタレン- d_8 、ピレン- d_{10} 、クリセン- d_{12} 、ペリレン- d_{12} 、は Cambridge Isotope Laboratories Inc のものを使用した。分析で用いたヘキサン、アセトン、アセトニトリルは残留農薬・PCB 分析用、エタノールは HPLC 分析用、無水硫酸ナトリウム、水酸化カリウム、ワコーゲル（C-300）はカラムクロマトグラフ用、フロリジル PR は残留農薬用ですべて富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。

表 1. 本研究で用いた試験対象物質（ビフェニル類）

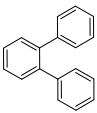
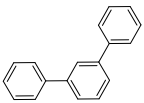
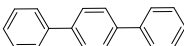
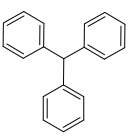
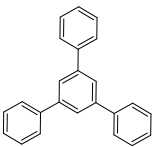
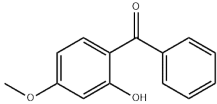
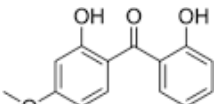
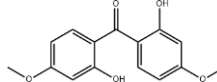
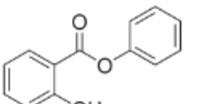
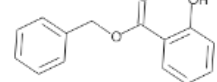
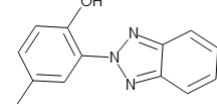
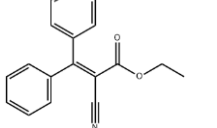
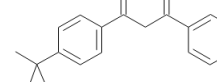
物質名	LogKow	水溶解度	構造式
<i>o</i> -テルフェニル	5.5	不溶	
<i>m</i> -テルフェニル	5.52	不溶	
<i>p</i> -テルフェニル	6.03	不溶	
トリフェニルメタン	5.7	不溶	
1,3,5-トリフェニルベンゼン	7.59	不溶	

表 2. 本研究で用いた試験対象物質（紫外線吸収剤類）

物質名	LogKow	水溶解度	構造式
オキシベンゾン	3.79	3.7 mg/L	
ジオキシベンゾン	3.82	162 mg/L	
DHDMBP	3.90		
サリチル酸フェニル	3.82	不溶	
サリチル酸ベンジル	4.31	不溶	
ドロメトリゾール	3.42	不溶	
エトクリレン	4.01	不溶	
アボベンゾン	4.51	2.2 mg/L	

2. 2 経口暴露試験の実験装置

生物蓄積を調べる研究では、経鰓蓄積性を求める水暴露試験であっても1日1回の換水で行う半止水式水槽が採用されている例が多い。しかし、半止水式では化学物質濃度の経時的变化が少ないのは、比較的水溶性の高い物質に限られ、それ以外の物質では経時的な濃度減少が観察されることが多い。そのため、流水式水槽での暴露試験を行えば、水中濃度減少を抑えることができ、安定した濃度を連続的に維持できる。一方、餌料投与試験では試験物質を添加した餌を試験魚に与えて行うため、飼育水中濃度を厳格にモニターする必要はない。しかし、試験魚が十分に遊泳できるだけの密度と溶存酸素の確保することと、餌を投与時に残餌が残ってしまった場合や糞などから水中に餌が溶解してしまっても速やかに除去されるように、本研究では流水式水槽を用いた。この装置はコイの試験に用いたものと同一のものである。我々がこの流水式水槽を動かすにあたり、基本的にサイフオンの利用を念頭に水槽を設置した。飼育水槽の上に貯水槽（図1の2）を置き、貯水タンクをさらにもう1つ用意し（図1の4の貯水槽1が該当）、一定の水位以下になると注水タンクに自動的に水を追加するポンプと水位検知装置を設置して、貯水槽2の水位を常に一定に保ち、水位の高さの減少に伴った水流速の低下を防いだ。また、各水槽へのさらなる安定した流速での注水を達成するために、工業用の液体充填機（図1の1）を入手し、これを常時使用した。この充填機の使用により、万が一この装置が止まっても補助的にサイフオンで水が流せるようなシステムにし、管理する人間が実験室内に常時滞在しなくてもある程度システムの自動化が達成された（ 50 ± 3 mL/min、各水槽中の水は1日に約1.2回交換）。特に②の液体充填機は工業用で作られているため、耐久性が高く、連続使用にも耐える上に、流速も自由に変えられるため、本研究での流速維持にはかなり有用であった。暴露試験期間中は2.7L/hに設定を行い、換水した。

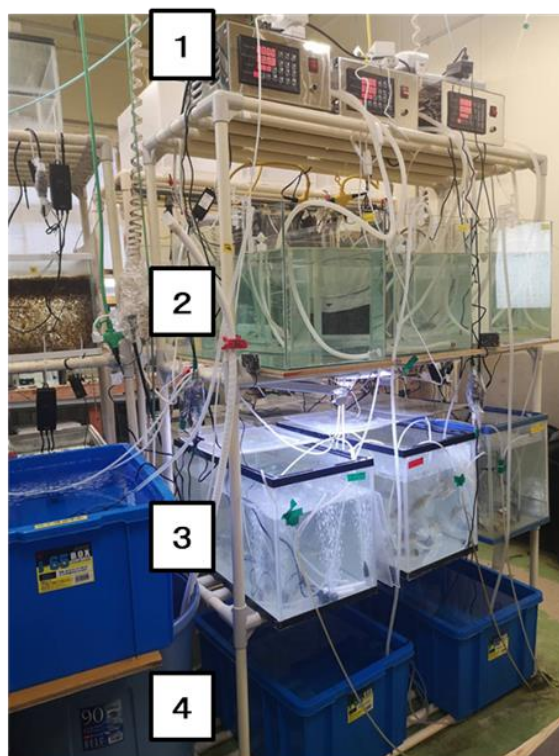
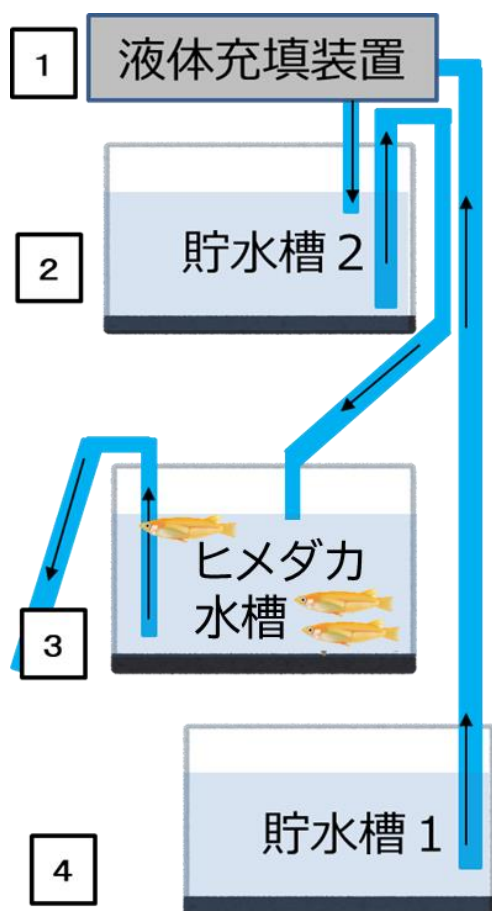


図1 経口暴露試験装置の概念図及び実際の暴露試験の写真

1：液体充填装置、2：貯水槽、3：試験魚のいる水槽、4：予備貯水槽

2. 3 試験魚の畜養及び馴化

試験で用いたヒメダカは鹿児島大学水産学部環境保全学研究室で、10年以上にわたり継体飼育をしているものを用いた。毒性試験には6～10ヶ月齢のものを用いた。飼育水は水道水を1日曝気し、脱塩素したものを用いた。試験実施前までは25℃設定の空調装置を備えた室内に設置した水槽内で飼育し、毎日テトラミン（スペクトラム ブランズ ジャパン株式会社）とアルテミア幼体を与えた。アルテミアは孵化後24時間以内のものを与えた。蓄積試験及び毒性試験に用いたヒメダカの雌雄判別は特に行わなかった。

2. 4 飼育水及び水質測定

飼育水は24時間以上曝気により脱塩素した水道水を用いた。試験に使用する飼育水は馴化時に使用した水質であり、馴化及び試験期間中も異常な外観や挙動は示さず斃死魚もいなかった。試験期間中は毎日すべての水槽の水温、pH、溶存酸素を測定し、飼育水の水質

が試験結果に影響を与えないように確認を行った。

2. 5 試験餌料の調整

餌の脂質含有量は餌料投与試験において蓄積性に関わってくる恐れがあるため、脂質含有量をコイの試験で使用した餌の脂質含有量と揃えるように調整を行った。また、餌に試験物質を添加する際には、餌料中の試験物質が均一になるように適宜有機溶媒（ジエチルエーテル、アセトンなどの揮発性を有する溶剤）に溶解させて餌に混合した。この際、添加する溶剤が多くなると、餌が型崩れを起こしてしまうことや、餌中の成分が溶出してしまうことも考えられたため、使用する有機溶剤は最小限になるようにした。

2. 6 給餌

馴化期間中一定量の餌（ヒメダカの魚体中 1–2%（湿重量）程度）を給餌し、餌や給餌する実験担当者への忌避行動が起こらないように馴化させた。試験期間中の給餌量は試験魚の急速な成長や給餌不足が起こらないようにするためにも、試験中の魚体採取時に体重を測定し、適宜給餌量の調整を行い、試験期間を通して一定の給餌量を保つこととした。給餌は全ての試験魚が摂餌できるように、一度に投与せず、少量を小まめに分けて投与した。給餌後 30 分から 1 時間以内にすべての水槽から糞や残餌を除去するためにサイフォンで水換えを行った。

2. 7 試料採取および前処理

餌料投与試験の期間は 28 日間とし、試験餌料を最初に給餌する前を 0 日目とし、以降給餌開始した次の日から暴露 1 日目とした。魚体内濃度中の試験物質を測定する日程は試験開始から 0、5、7、14、21 及び 28 日目とし、低濃度区及び高濃度区からそれぞれランダムに 5 尾ずつ採取した。コントロール区は 0、7、14、21 及び 28 日目に水槽からランダムに 5 尾ずつ採取した。採取した魚は全長、体長、総湿重量、腸管を除去した湿重量を記録し、すみやかに液体窒素で凍結後、ガラス瓶に保管し 24 時間の凍結乾燥を行った。凍結乾燥後は乾燥重量を測定し、はさみやフードプロセッサを用いて細かく粉碎し、全ての部位が均一に混ざるように攪拌を行い分析まで冷凍庫にて保管した。

2. 8 各試験物質の分析方法（テルフェニル類混合物試験）

2. 8. 1 餌料及び魚体中のテルフェニル類混合物分析方法

魚体中の各テルフェニル類の分析は Uno et al (2010) を改変して実施した（図 2）。

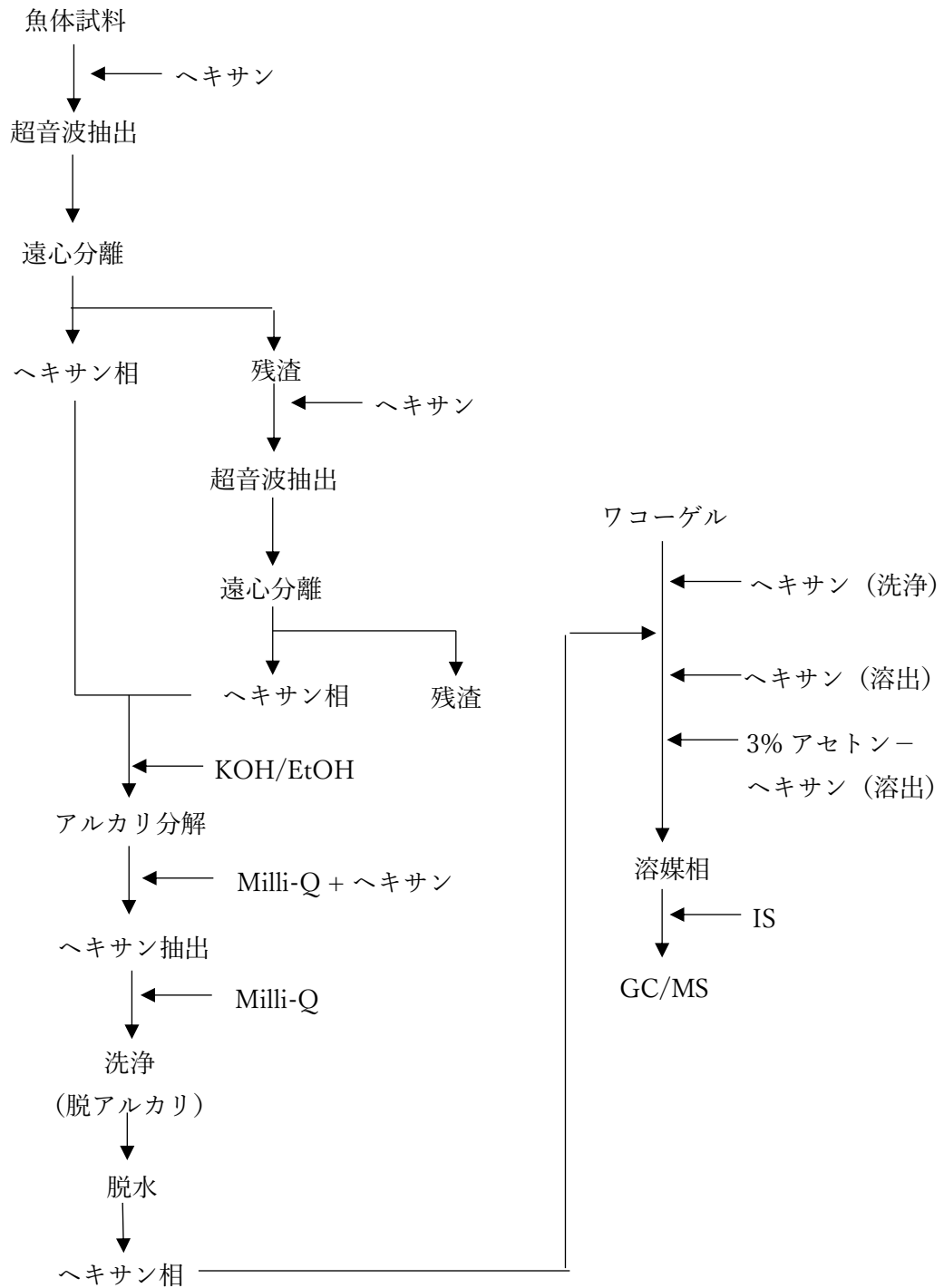


図 2 魚体中テルフェニル類の分析手順の概略

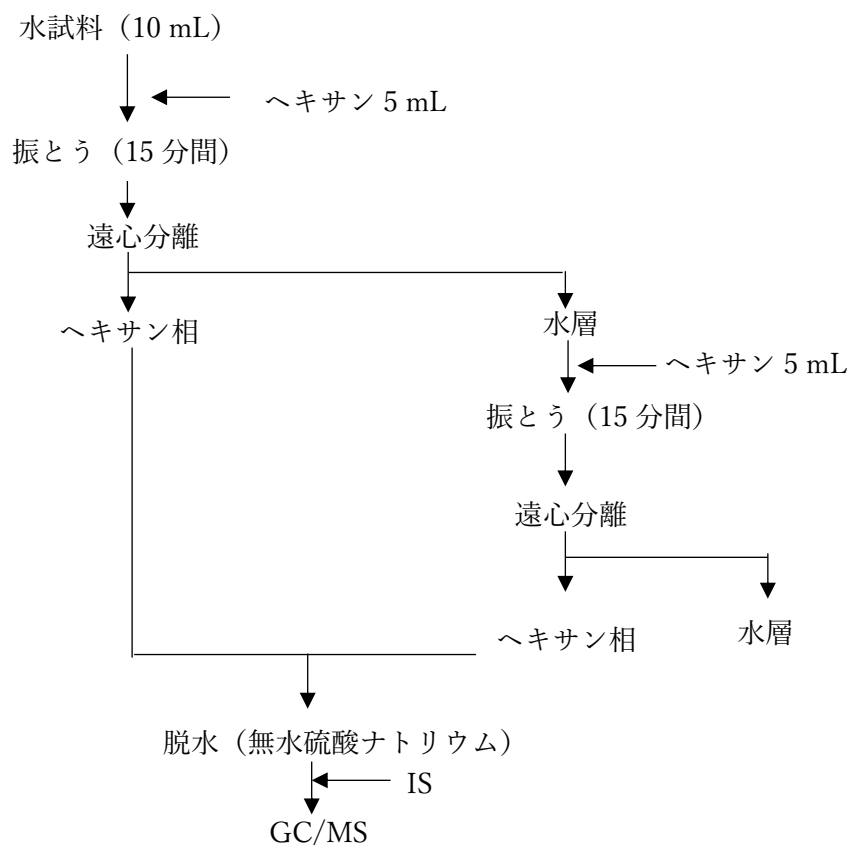


図3 水中テルフェニル類の分析手順の概略

2. 9 魚体中テルフェニル類測定時の GC/MS の測定条件

魚体中のビフェニル類の分析は Uno et al (2010) で使用した PAHs 類の方法と同様の手法を用いて、クリーンアップの際にヘキサン相と 3%アセトンヘキサン相は合わせずにそれぞれに内部標準物質を添加し、濃縮を行い、GC/MS 測定をした。GC/MS の測定条件などは以下の通りとした。

また、飼育水中の各ビフェニル、トリフェニル類も PAHs と同様の手法で抽出し、脱水、濃縮の後、GC/MS にて分析を行った。分析条件は以下の通りとした。

注入口温度：400℃

イオン限温度 230℃

注入量：1 mL

注入モード：スプリットレス

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-1 HT（長さ 30 m、内径 0.25 μm 、膜厚 0.1 μm 、アジレント・テクノロジー株式会社）

昇温条件：60°C（1 分間保持）→15°C/min で昇温→350°C（3 分間保持）

分析時間：23 分間

分析モード：SIM モード分析時間：16 分間

分析モード：SIM モード

2. 1 0 各試験物質の分析方法（紫外線吸収剤類混合物試験）

2. 1 0. 1 餌料及び魚体中の紫外線吸収剤類混合物分析方法及び測定条件

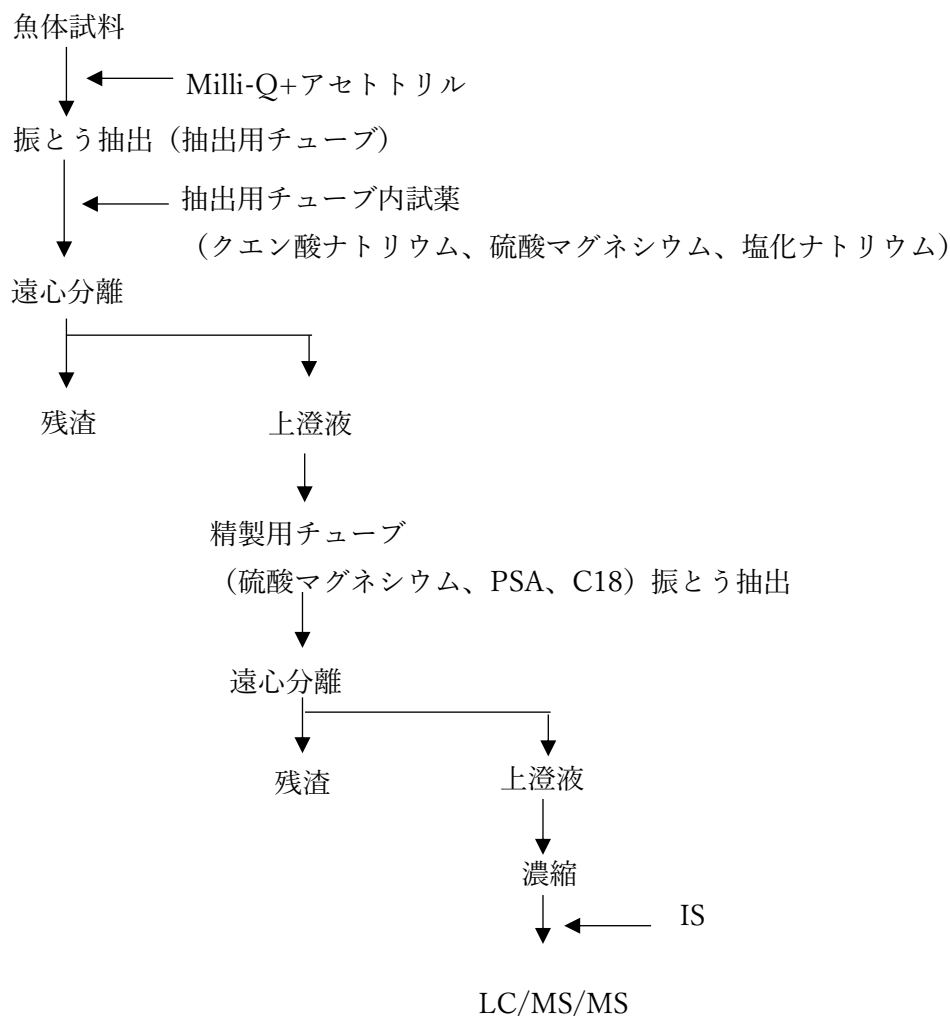


図 4 魚体中紫外線吸収剤類の分析手順の概略

2. 10. 2 魚体中紫外線吸収剤測定時の LC/MS/MS 定条件

測定は株式会社 SCIEX 製の LC/MS/MS-QTRAP4500 を用いた。測定条件は以下の通りとした。

カラム：Inertsil HP 3 μm （内径 2.1 mm、長さ 100 mm）、GL サイエンス製

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：A 液－メタノール、B 液－超純水

グラジエント条件：0-2 分（B: 70 %）→2-7 分（B: 98 %）→7-12 分（B: 98 %）
→12-17 分（B: 70 %）

流速：0.2 mL/min

注入量：5 μL

分析時間：17 分間

分析モード：ESI Positive と Negative 同時測定

3. 結果と考察

3. 1 テルフェニル類混合物餌料投与法試験の結果と考察

3. 1. 1 ヒメダカを用いた毒性試験

餌料投与試験での餌中濃度を決定するために、ヒメダカを用いた経口暴露による毒性試験を予備試験として行った。テルフェニルの混合物を 1 mg/g、10 mg/g、100mg/g の設定で餌に混合し、ヒメダカに体重 1%相当を与える経口投与試験を 2 週間行った。その結果、暴露による斃死は確認されなかったため、テルフェニルの暴露濃度は 10 mg/g、100 mg/g とした。

3. 1. 2 餌中濃度

本研究のビフェニル類混合物暴露試験で使用する餌中の対象物質の濃度測定を行った。その結果、コントロール区ではいずれの芳香族炭化水素類は検出されなかった。また、ビフェニルは生物由来の夾雑物による影響を受け測定結果でも精度に問題があると考えられたため、本研究の生物濃縮性を調べる項目からは除外した。それ以外の各物質の餌中濃度は低濃度区と高濃度区の餌中濃度ともに概ね設定値の 90%以上の近い値であった。

3. 1. 3 水中濃度

暴露試験期間中に、数回暴露水槽の試験水中対象物質濃度の測定を行った。試験水中からはすべてのテルフェニル類は検出されなかった。

3. 1. 4 芳香族炭化水素類混合物餌料の経口暴露によるヒメダカの生物濃縮性

ヒメダカの芳香族炭化水素類の混合物添加餌料による経口暴露試験により、BMF を得た。芳香族炭化水素類のうち、コイの経口暴露試験において使用したビフェニルは生物由来の夾雑物による影響を除去できなかったため、ヒメダカの試験においては除外をした。*o*-テルフェニルと異性体である *m*-テルフェニル、*p*-テルフェニルは低濃度区では魚体への取り込みは暴露 3 日目で平衡に達し、*o*-テルフェニルは 21 日目、*m*-テルフェニルは 14 日目以降では減少するという変動であった。各物質の BMF は *o*-テルフェニルが一番高く、*m*-テルフェニルと *p*-テルフェニルよりも 10 倍程度高い値を示した。高濃度区では、*o*-テルフェニルは 3 日目までに平衡に達した後、14 日目以降で減少する傾向を示した。*m*-テルフェニルと *p*-テルフェニルの BMF も 3 日目で平衡に達し、21 日目から 28 日目に

かけて減少した。高濃度区も低濃度区同様、BMF は *o*-テルフェニルが一番高く、*m*-テルフェニルと *p*-テルフェニルよりも 10 倍程度高い値を示した。

トリフェニルベンゼンでは、低濃度区では 7 日目に平衡に達し、21 日目から 28 日目にかけてやや減少傾向を示した。一方、高濃度区では 14 日目で平衡に達し、暴露終了時まで同様の BMF を示した。また、他の芳香族炭化水素類と比べると、低濃度区も高濃度区も *o*-テルフェニルと同様の BMF であった。トリフェニルメタンは、低濃度も高濃度区も 7 日目で平衡に達し、暴露終了の 28 日目までほぼ変動を見せず、BMF も低濃度区と高濃度区はほぼ同じであった。トリフェニルメタンの BMF は 0.04~0.09 であり、1 以下ではあったが、暴露対象物質の芳香族炭化水素類の中でも最も大きい BMF であった。

3. 1. 5 コイとヒメダカの BMF における生物種間差

芳香族炭化水素類のうち、*o*-テルフェニルは現行の餌料投与試験において餌の取り込みを確認する基準物質として使用されているため、令和 3 年度でのコイの経口暴露試験では芳香族炭化水素類を暴露物質とした。暴露試験物質の中でも最も取り込みが確認されたため、ヒメダカでも暴露試験を行い、種間差を比較した。コイの BMF については、BMF の値はトリフェニルメタンに次いで *o*-テルフェニル、トリフェニルベンゼン、次いで *m*-テルフェニルと *p*-テルフェニルが同程度であった。コイの *m*-テルフェニル、*p*-テルフェニル、トリフェニルメタン及びトリフェニルベンゼンの BMF に濃度依存性が確認されたが、ヒメダカには明瞭な濃度依存性は確認されなかった。ヒメダカの *o*-テルフェニル、トリフェニルメタン及びトリフェニルベンゼンの BMF はコイの BMF より 10 倍程度大きい種間があり、その他の物質に関しては明瞭な差は認めらなかった。

種間差の有無は物質依存的である可能性がある。

3. 2 紫外線吸収剤類混合物餌料投与法試験の結果と考察

3. 2. 1 ヒメダカを用いた毒性試験

毒性試験は PAHs のときと同様に行い、餌中農薬類濃度は 0.1 mg/g、1 mg/g、10 mg/g とした（設定値）。その結果、斃死は確認されなかったため、暴露濃度を 1 mg/g、10 mg/g とした。

3. 2. 2 餌中濃度

本研究の紫外線吸収剤混合物暴露試験で使用する対象物質の濃度測定を行った。その結果、コントロール区からは対象物質は全て検出されなかった。低濃度区と高濃度区の餌中濃度はエトクリレンが設定濃度に対して 40% 弱の検出濃度であったが、その他の物質に関しては概ね設定濃度に近い値であった。

3. 2. 3 水中濃度

暴露試験期間中に、数回暴露水槽の試験水中対象物質濃度の測定を行った。試験水中からはすべての紫外線吸収剤類は検出されなかった。

3. 2. 4 紫外線吸収剤類混合物添加餌料の経口暴露によるヒメダカの生物濃縮性

紫外線吸収剤類のうち、DHDMBP、サリチル酸フェニル、エトクリレンは低濃度区からも高濃度区からも検出されなかった。また、サリチル酸ベンジルとジオオキシベンゾンは高濃度区では検出されず、低濃度区では取り込みが確認できたが、BMF は低いものであった。オキシベンゾンは低濃度区では 7 日目に平衡に達し、高濃度区では 3 日目で平衡に達していた。低濃度区及び高濃度区の BMF は近似した値を示した。アポベンゾンは低濃度区と高濃度区で体内濃度変動が経時的に真逆の変動を示したが、いずれの暴露濃度区でも BMF は大きな差は認められなかった。ドロメトリゾールは低濃度区と高濃度区共に暴露 7 日目で平衡に達し、その後も似た変動をしていたが、低濃度区に比べて高濃度区の BMF が約 10 倍程度高い値であった。

3. 2. 5 コイとヒメダカの BMF における生物種間差

紫外線吸収剤のヒメダカとコイの BMF を比較するとコイではヒメダカで検出されなかったエトクリレンが体内から検出されたものの、BMF は非常に低く、経口蓄積性は高く

ないと考えられた。いずれの物質もコイの BMF に対してヒメダカは 10 倍程度高い傾向が見られた。

4. 魚類の化学物質蓄積性に関する今後の課題と実地すべきテーマ

将来の化審法における化学物質蓄積性試験を再検討する際に参考となるような経口濃縮データの構築を、現在市場に流通している物質や、野外環境で検出されるような既存化学物質の経口濃縮性を検証することを目的とし、2021年度より3年間の継続研究を行ってきた。令和3年度はlogKow5以上の物質のうちPAHs類と農薬類及びテルフェニル類から各6物質、合計18種を選定し、コイの経口暴露試験を行った。その結果、試験対象としたlogKowが高い物質でも、BMFが高くないことが確認された。しかし、logKowが5以下の物質でも、5以上のものよりもさらにBMFに関するデータは不足しており、logKowとBMFとの相関関係を調べる上でもそのデータを得ることは必須であると考えられた。そのため、令和4年度はlogKow3~5の物質中から、PAHs類、農薬類及び紫外線吸収剤類を合計18種選定し、昨年度同様の経口暴露試験をコイに実施した。その結果、PAHs類のフェントレンやその派生物の蓄積性が多少高くなり、濃度依存性も見られた。低濃度区では高蓄積性の指標とされている $BMF=0.007$ を超えるものも散見されたが、令和3年度から行ってきた他のPAHs類ではこのような傾向はみられなかったことから、フェントレン骨格をもつ化学物質は経口蓄積性が高い可能性が示唆された。一方、農薬類の経口蓄積はほぼ全てBMFが検出されなかったことから、現在、農地などで使用されている農薬類の経口蓄積性は低いと考えられる。経口蓄積試験では体内濃度が検出限界以下であるものが多く、BMFの算出ができないものが多かった。そのため、BCFとBMFの間には明瞭な関係性が見出すことができなかった。さらに、logKowとBMFとの相関性も見られなかったことから、経口濃縮性に影響を与えるのは物質構造や体内での分解性や被薬物代謝などの要因も強く関わっている可能性が考えられた。しかし、いずれの結果もコイを用いた試験結果のみであるため、臓器構造の異なる魚類あるいは栄養段階や脂質含有量の異なる水生生物などの種間差の有無については既存のデータは限定されており、その詳細はほとんど知られていない。そのため、複数生物種のBMFを得て、その値を比較することにより、化学物質の経口濃縮性の理解が深まることが期待できるため、本年度の研究ではヒメダカを用いてコイの暴露物質同様の経口暴露試験を行う事で化学物質の生物種間差を調べることを目的として行った。その結果、ヒメダカに経口取込させたときに、芳香族炭化水素類の中では、トリフェニルメタン、トリフェニルベンゼン、*o*-トリフェニルのBMFが大きく、これらはBMFが0.007を超えていた。また、ヒメダカに経口取込をさせた紫外線吸収剤はドロメトリゾールの低濃度区で、BMFが0.007を超えていたが、それ以外の物質の

経口蓄積性はそれほど大きくなく、芳香族炭化水素類よりも蓄積性は小さい傾向が見られた。しかしながら、ヒメダカの BMF と $\log K_{ow}$ の相関はあまり見られず、魚類の BMF と $\log K_{ow}$ の相関はあまりない可能性が考えられた。ヒメダカとコイ間の BMF は芳香族炭化水素類では、*o*-テルフェニル、トリフェニルメタン、トリフェニルベンゼンのヒメダカ BMF がコイと比べると 10 倍以上大きかったが、その他のものは明瞭な種間差は見られなかった。一方で、紫外線吸収剤はいずれもヒメダカの BMF の方が 10 倍以上高い傾向が見られた。その差異の大小は $\log K_{ow}$ に依存するものではなく、今後種間差の要因を探る必要があることが課題として確認できた。本研究では 2 種類の魚類の BMF を比較したが、その差異が大きいものもあり、複数魚種間差はかなり大きくなる可能性がある。BMF の魚種間差を考えると、化審法の基準の 1 つであるコイの BMF0.007 は、安全サイドから考えると、ある程度妥当な数字であると考えられる。

5. 人材育成

化学物質影響評価を担う業界を目指す若者は減少しつつある、と言われている。その原因をはっきりと言及することはできないが、どのような業務に携わるかが余り知られておらず、先入観ありきで敬遠されている面もあるかもしれない。そのため、代表者が所属する研究室の学生を中心として、化審法に携わったときに触れるような実験、その評価法など、学生を実際に実験に参加させて、その一端に触れるような機会を一定期間設けている。この取り組みは昨年度も実施しており、内容としては余り変わらないため、同様の内容を以下、再掲する。

例えば、近年の環境汚染物質研究では蓄積のみを扱った研究は少なくなっているのは事実である。しかし、生物における毒性発現メカニズムを考えると、化学物質は生物体内に入った後、一定濃度まで体内濃度上昇があり、影響発現閾値を超えたとき、初めて個体に影響が現れる。そのため、個々の化学物質の蓄積性を知ることは極めて重要であり、かつ、生物影響リスク評価を実施する上での最初の一步といえる。しかし、反面、蓄積試験の特殊性は学生などの若者がその内容を理解するまでに時間を必要とし、また生物中化学物質の分析技術は高度なものが要求される、生物の飼育技術も高いものが要求される、など、高度な実験テクニックが随所に要求される。そのため、我々の研究室では本改題の採択に伴い、定期的な勉強会を行い、学生間での蓄積試験全般の知識と技術の定着を図った。この試みを通して、実験なども試験担当者以外も飼育実験の組み立てや解剖にも加わり、手を動かして経験を積ませる機会を得ることができた。勉強会や実験など知識や経験に乏しい部分は研究協力者であるベテラン研究者にアドバイスを適宜受けるようにし、知識と技術の継承を行っていった。なお、本研究で得られた研究結果は本研究に携わった学生が学会発表、および投稿論文化する予定である。

6. 参考文献

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

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

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

環境省環境リスク評価室. 化学物質の環境リスク評価 第 4 巻. [13]フェナントレン. 平成 23 年.

環境省環境リスク評価室. 化学物質の環境リスク評価 第 5 巻. [2]アントラセン. 平成 23 年.

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

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

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

Sayed A, Chys M, De Rop J, Goeteyn L, Spanoghe P, Sampers I. Pesticide residues in treated wastewater and products of Belgian vegetable- and potato processing companies. *Chemosphere*. 2021. 280.