

水-底質システムにおける多環芳香族炭化水素類の底質毒性評価 —オオミジンコ(*Daphnia magna*)とヨコエビ(*Hyalella azteca*)を用いた実験的検討—

2019年3月 自然環境循環学分野 47-176611 谷和音

指導教員 准教授 山本裕史

キーワード:曝露経路、生物利用性、難水溶性物質、PAHs、水-底質平衡分配法

1.はじめに

水環境中において難水溶性の汚染化学物質は水中に留まるよりも、浮遊粒子や底質に収着・蓄積されやすい(Schwarzenbach et al., 1992)。底質の毒性評価をする際に、底生生物を用いて底質毒性を直接測定する試験が十分に普及していないため、代替法としてデータが比較的多い既存の水生生物を用いて水のみでの毒性値から水-底質平衡分配法を用いて底質の毒性値に換算してリスク評価する方法が国内外で広く利用されている(ECHA, 2017; 環境省ほか, 2014)。底生生物は水生生物とは摂餌形態や曝露経路などが異なるために評価が不正確である恐れがあるが、詳細な研究例が少ない。そこで、卒業研究では難水溶性汚染物質として代表的な多環芳香族炭化水素類(PAHs)のうち四環のPyreneについて水生生物オオミジンコ(*Daphnia magna*)と底生生物ヨコエビの一種(*Hyalella azteca*)を用い、水のみと水と底質を含む2つの試験系で毒性試験結果を比較した結果、底質が存在することで、より低い水相中のPyrene濃度で毒性影響を示す(毒性の増強)傾向が認められた(谷ほか, 2017)。そこで、修士論文研究では、より多様なPAHsについて底質の有無による生態毒性値の違いや底質への収脱着、および体内濃度の変化等の曝露経路に着目して検討することで、難水溶性の汚染化学物質の底質毒性の特性を明らかにすることを目的とした。

2.実験方法

2.1 対象物質と人工底質への収・脱着実験

水と底質を含む試験系である水-底質システムを作成するために、4環のPAHであるPyrene (Pyr)に加え、3環のPhenanthrene (Phe)、5環のBenzo[a]pyrene (BaP)、さらにPyrのアミン誘導体1-Aminopyrene (Apy)を用いて、人工底質への収・脱着実験を実施し、各物質の収着係数 K_d を求めた。人工底質は、OECD Test Guideline No.218の組成を用いた。

2.2 生態毒性試験

水のみでの曝露試験

オオミジンコに関してはOECD Test Guideline No.202のミジンコ急性遊泳阻害試験、ヨコエビに関してはEnvironment Canadaのヨコエビ96時間急性毒性試験に基づいて実施した。DMF 0.01%を助剤として用い、24時間毎に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で水相中の濃度測定を行った。オオミジンコについては48 h-EC₅₀(半数影響濃度)を、ヨコエビについては96 h-LC₅₀(半数致死濃度)を求めた。PyrおよびBaPに関しては試験終了時に供試個体の体内濃度を測定した。

水-底質システムでの曝露試験

K_d の値を参考に、底質に添加し水相へと移行させた水-底質システムと、水溶解度が比較的高いApyに関して水相に添加し底質へと移行させた水-底質システムにおいて、水のみでの曝露試験と同様にして生態毒性試験を実施した。底質と水の比は1:10とし、水中濃度と底質中濃度の実測値からEC₅₀およびLC₅₀を求めた。PyrおよびBaPに関しては試験終了時に供試個体の体内濃度を測定した。

3. 実験結果および考察

収着実験より得られた K_d (L/kg) はそれぞれ Phe では 3.4×10^2 、Pyr では 2.0×10^3 、BaP では 1.6×10^4 、Apy では 7.2×10^2 で、疎水性の高い五環 BaP が最も高かった。

図 1 にオオミジンコとヨコエビの濃度-影響関係を示す。Phe および Pyr は、オオミジンコ、ヨコエビともに水-底質システムでの曝露試験の方が水のみでの曝露試験よりも毒性が強くなった。一方で BaP に関する水-底質システムでの曝露試験では、最高濃度まで影響が観察されなかったほか、Apy に関する底質添加、水添加法による水-底質システムでの試験では、水のみでの試験と変化は観察されなかった。表 1 に体内濃度より求めた影響濃度を示す。Pyr に関しては両生物種ともに水-底質システムの方が水のみでの曝露試験より毒性値が小さくなり、底質の寄与が大きいことが分かった。一方で BaP に関しては、水-底質システムにおいて水のみでの曝露試験の半分程度の体内濃度しか検出ができなかったことより、底質に収着した BaP は生物体内において十分に利用されず、結果として底質の存在により毒性が弱くなったとも考えられる。

得られた結果から平衡分配法と底質毒性試験法の比較を行うと、Phe および Pye に関しては平衡分配法ではヨコエビへの影響を過小評価していた一方で、Apy に関しては過大評価となり、安全側に見積もっていた。 K_d が最も大きく、底質に収着されやすい BaP に関しては、底質の存在により毒性が弱くなるなど、物質や生物種に依存して大きく変化することが明らかになった。以上のことから、底質毒性の特性を解明にするにはより多くの物質について検討することや曝露経路の詳細な検討等、更なる検討が必要であると考えられる。

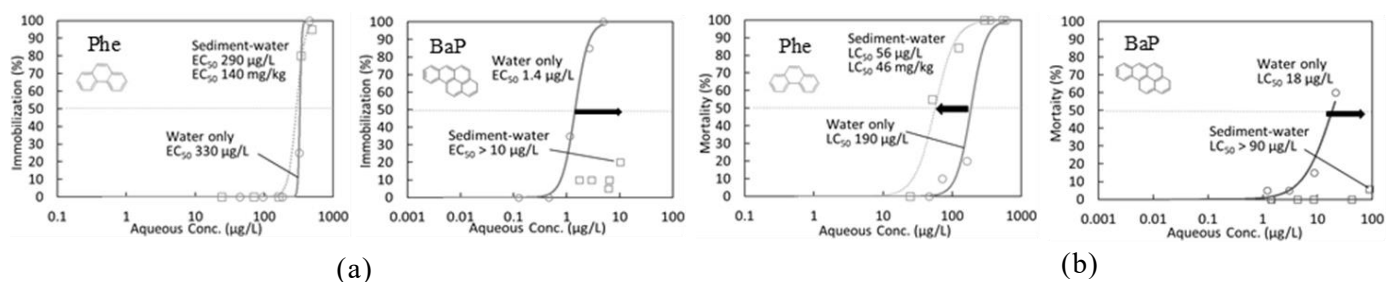


図 1 生態毒性試験での濃度-影響関係

(a:オオミジンコ、b:ヨコエビを示す。横軸の濃度は実測値、線は回帰曲線を示す。)

表 1 体内濃度から求めた影響濃度 (カッコ内は 95%信頼区間)

	オオミジンコ 体内濃度 48 h-EC ₅₀ ($\times 10^{-4}$ μg/μg-dry weight)		ヨコエビ 体内濃度 96 h-LC ₅₀ ($\times 10^{-4}$ μg/μg-dry weight)	
	水のみでの 曝露試験	水-底質システムで の曝露試験	水のみでの 曝露試験	水-底質システムで の曝露試験
Pyr	35 (27~44)	15 (11~19)	3.7 (3.1~4.4)	0.34 (0.26~0.42)
BaP	16 (12~20)	>8.7	8.0 (3.7~33)	>3.1

4. 参考文献

ECHA (2017): Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance Version 4.0.

Schwarzenbach R., Geschwend P.M., Imboden, D.M. (1992): Environmental Organic Chemistry.

厚生労働省・経済産業省・環境省(2014): 化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価の技術ガイダンス

谷 ほか(2017): 第 51 回日本水環境学会講演要旨集, 675.

Sediment toxicity assessment of the selected polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment-water system: experimental study using *Daphnia magna* and *Hyalella azteca*

Mar.2019, Material Cycling in the Environment 47-176611 Kazune Tani

Supervisor: Associate professor Hiroshi Yamamoto

Key words: Exposure pathway, bioavailability, poorly water-soluble chemicals, PAHs, equilibrium partitioning method

1. Introduction

Poorly water-soluble chemicals tend to be accumulated in the sediment due to their hydrophobicity. Equilibrium partitioning method (EP method) assuming sediment toxicity can be estimated from toxicity to the aquatic species is widely used both in Japan and in EU as an alternative (EU, 2003; Ministry of Environment et al., 2014.) mainly due to the lack of sediment toxicity tests using benthic organisms. Few studies had compared the sensitivity between the aquatic and benthic species, and among various exposure pathways in detail. In my bachelor thesis, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives had been selected as a model group of hydrophobic chemicals and acute toxicity tests using a popular aquatic crustacean species for ecological risk assessment *Daphnia magna* and a benthic species *Hyalella azteca* often used for sediment toxicity test in North America. The toxicity of a 4-ring PAH pyrene was found to be higher in the sediment-water toxicity test than in the water-only test for both *D. magna* and *H. azteca* (Tani et al., 2017). Thus, the toxicity of various PAHs should be clarified in sediment systems by considering the sorption and desorption to the sediment and focusing on the exposure pathway by measuring body concentration.

2. Materials and Methods

2.1 Sorption and desorption experiments for artificial sediment

Sorption and desorption experiments for an artificial sediment were conducted for a 3-ring PAH Phenanthrene (Phe), a 5-ring Benzo[a]pyrene (BaP), and an amine derivative of Pyrene 1-Aminopyrene (Apy) in addition to Pyrene (Pyr) itself. The sorption/desorption coefficient (K_d) for each substance was determined to establish appropriate sediment-water system containing sediment and water. The artificial sediment composition in OECD test guideline No. 218 was used.

2.2 Ecotoxicity test

Water-only acute toxicity test

Water-only acute toxicity test was conducted using *D. magna* according to OECD Test Guideline No. 202 *Daphnia* sp. Acute Immobilization test and *H. azteca* according to Test for Survival and Growth in Sediment Water Using the Freshwater Amphipod *H. azteca* published by Environment Canada. DMF 0.01% was used as a solvent. Actual concentrations in aqueous phase were monitored by a high performance liquid chromatography (HPLC) every 24 hours. 48 h-EC₅₀ (median effect concentration) for *D. magna* and 96 h-LC₅₀ (median lethal concentration) for *H. azteca* were obtained. Body concentrations were measured for Pyr and BaP at the end of the test.

Sediment-water acute toxicity test

Sediment-water acute toxicity tests using the spiked sediment were conducted for all the selected PAHs and a test using the spiked water was conducted for Apy based on each K_d in the same way as water only acute toxicity test. The ratio of sediment and water was set at 1:10, and EC₅₀ and LC₅₀ were determined from the measured concentrations in water and sediment. Body concentrations were measured for Pyr and BaP at the end of the test.

3. Results and discussions

K_d values (L/kg) were 3.4×10^2 for Phe, 2.0×10^3 for Pyr, 1.6×10^4 for BaP, and 7.2×10^2 for Apy. The highest K_d was found for BaP, the most hydrophobic PAH selected in this study.

Fig. 1. provides dose-response curves for *D. magna* and *H. azteca* for Phe and BaP. In sediment-water acute toxicity tests, the toxicity of Phe and Pyr was significantly higher than the water only system in both *D. magna* and *H. azteca*. In contrast, toxicity of BaP in the sediment-water toxicity test was lower than the water-only test both in *D. magna* and *H. azteca*. In addition, toxicity of Apy in both in the spiked water and spiked sediment showed no significant difference from the water-only test. Table 1. shows the effect concentration acquired from the measured body concentration. The body concentration-based toxicity value for Pyr in the sediment-water toxicity test was significantly lower than the water-only toxicity test, therefore the contribution of sediment could be large. Contrarily, the body concentration of BaP in sediment-water toxicity test could be approximately half of the one in water-only toxicity test. It means that BaP adsorbed in sediment might not fully bioavailable in organisms and as a result the toxicity became weak by the presence of sediment.

Comparing the EP method to the experimental results with sediment toxicity test, the risk of Phe and Pyr was underestimated by the EP method for *H. azteca*, while the effect of Apy was overestimated and protective. The presence of the sediment might lower the toxicity of BaP which had the relatively large K_d , which suggests the variation due to the compound. Further investigation is necessary to reveal the characteristics of sediment toxicity by examining some additional chemicals and focusing further on the exposure pathway for the accurate sediment risk assessment.

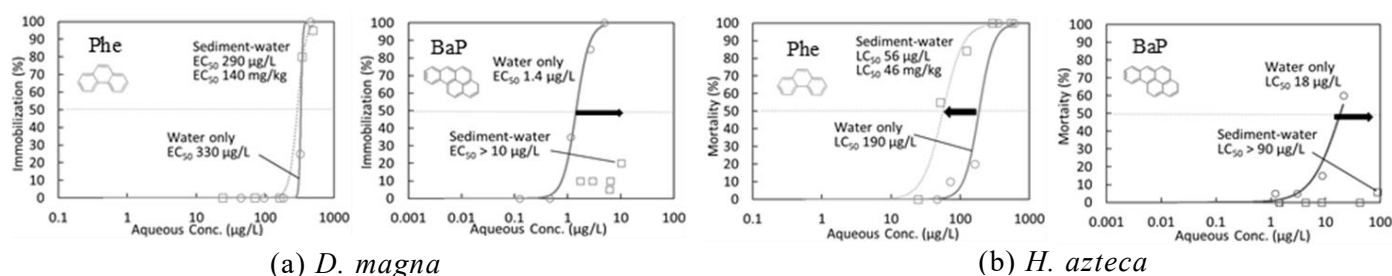


Fig. 1. Relationship between concentration and effect in the ecotoxicity test. (Concentrations on abscissa are measured values and lines are regression curves.)

Table 1. EC_{50} and LC_{50} acquired from body concentration (95% confidence interval in parentheses)

	<i>D. magna</i> Body Conc. 48 h- EC_{50} ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)		<i>H. azteca</i> Body Conc. 96 h- LC_{50} ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)	
	Water-only	Sediment-water	Water-only	Sediment-water
Pyr	35 (27~44)	15 (11~19)	3.7 (3.1~4.4)	0.34 (0.26~0.42)
BaP	16 (12~20)	>8.7	8.0 (3.7~33)	>3.1

4. References

- ECHA (2017): Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance Version 4.0.
- Schwarzenbach R., Geschwend P.M., Imboden, D.M. (1992): Environmental Organic Chemistry.
- MHLW, METI and MOE (2014): Technical guidance of risk assessment for priority evaluation chemical substance on CSCL.
- Tani K. et al. (2017): The 51th Japan Society on Water Environment annual meeting Abstracts, 675.