

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学研究系自然環境学専攻
自然環境循環学分野

平成 30 年度 修士論文

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—

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

2019 年 1 月 25 日提出

2018 年度 3 月修了

指導教員 山本裕史 准教授

47-176611 谷和音

目次

第1章 緒論

- 1.1 背景
- 1.2 卒業研究で得られた結果
- 1.3 目的

第2章 既存研究

- 2.1 PAHsの発生源と化学構造
- 2.2 PAHsの環境中濃度
- 2.3 PAHsの土壌・底質への収着
- 2.4 水-底質システムでの曝露試験

第3章 実験方法

- 3.1 被験物質と材料
 - 3.1.1 被験物質
 - 3.1.2 測定条件
 - 3.1.3 試験生物
- 3.2 水のみでの曝露系での生態毒性試験
- 3.3 水-底質システムでの曝露試験
 - 3.3.1 水相から底質への収着実験
 - 3.3.2 底質から水相への脱着実験
 - 3.3.3 水-底質システムの作成

第4章 結果および考察

- 4.1 水のみでの曝露試験
- 4.2 水-底質システムでの曝露試験
 - 4.2.1 水相から底質への収着実験
 - 4.2.2 底質から水相への脱着実験
 - 4.2.3 水-底質システムでの生態毒性試験
- 4.3 平衡分配法による推定値と水-底質システムでの毒性試験結果との比較
- 4.4 今後の課題

第5章 結論

- 5.1 本研究のまとめ
- 5.2 今後の課題

参考文献

謝辞

Appendix

第1章 緒論

1.1 背景

科学技術の進歩に伴い多種多様な化学物質が製造・使用されており、米国化学会の Chemical Abstracts Service に登録されている化学物質数は約 1 億 4000 万にのぼる(平成 31 年 1 月現在)(Chemical Abstracts Service, 2019)。我々はこのような多種多様な化学物質による便益を享受している一方で、使用・廃棄して自然環境に排出した後にはヒトだけでなく野生生物に有害影響を及ぼす恐れがある。このような化学物質の環境リスク(ヒトや野生生物への危険有害性の期待値)を適切に評価するためには、機器を用いた化学分析によるモニタリングだけでなく、生物を用いた毒性試験(バイオアッセイ)や現地での野外生物の実態調査などを組合せることで、総合的に化学物質の生態系へのインパクトを把握することが必要である。これまで諸外国同様に、わが国でも化学物質審査規制法(以下、化審法と呼ぶ)や農薬取締法などの化学物質の管理に関する規制の中でも、変異原性試験やげっ歯類等の哺乳類を用いた毒性評価を利用した人健康リスクの評価が実施されてきた。それに加え野生生物への影響を把握するために、魚類やミジンコ、藻類といった水生生物を用いてバイオアッセイによって有害性影響評価が行われてきた。

しかしながら、化学物質のうち、生物体内に取り込まれやすく毒性が強いとされる難水溶性の汚染化学物質は、水環境中で水中に留まるよりも、浮遊粒子や底質に吸着・蓄積されやすい(Schwarzenbach et al., 1992)ため、水生生物に対する有害影響だけでなく、底質への蓄積の影響を考慮した「底質毒性評価」が必要である(菅谷, 2005)とされている。そのため、欧州化学品庁(ECHA, 2017)では疎水性の化学物質のリスク評価の技術ガイダンスに、疎水性の指標である 1-オクタノール/水分配係数 $\log K_{ow}$ が 3 以上の場合、底質に分布し残留しやすいと分類しており、底質毒性試験による底生生物の有害性データが得られない場合、代替的な方法として平衡分配(底質-水平衡分配法)による毒性値の導出を実施することとしている。わが国の化審法でも、化審法において一定のリスクがあつて詳細なリスク評価の対象となってい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(2014)でも、欧州の手法を踏襲して ECHA のガイダンスを参照して、評価 II の詳細リスク評価の段階でリスク評価手法として利用している。

なお、ここで底質毒性試験とは底生生物を用いて底質と水を含む試験系に直接曝露させる方法であり、国際的な標準試験法である OECD 化学品テストガイドラインではユスリカ幼虫を用いた試験(OECD TG218, TG219)が採用されている(OECD, 2004 a,b)。国内においても化審法の試験としてセスジユスリカを用いた OECD TG218 が採用されているほか、農薬取締法でも同じ試験法の導入が検討されている。しかしながら、セスジユスリカの幼虫は底質への潜行行動がみられるものの、摂餌行動は水中で行う。そこで、欧州連合(ECHA, 2017)では、ユスリカに加えてより底質の摂餌曝露が多い種として、底質上層の動植物の死骸などのデトリタスを摂餌するヨコエビ類や、水中を遊泳するが底質に潜って摂餌するオヨギミズ類など、摂餌形態の異なる 3 種を合わせて底質毒性評価に利用することが推奨されている。

一方で、底質-水平衡分配法は、水のみでの曝露系である水生生物の生態毒性試験の毒性値から底

質-水分配係数を用いて底質中の毒性値へと換算する手法である。この手法では、底生生物と水生生物は化学物質に対する感受性が同等であり、底質(粒子)中濃度、間隙水濃度、底生生物の体内濃度は平衡状態にあると仮定している。この仮定のもと、図 1-1 のように底質粒子と水間の分配係数を用いて底質中濃度を換算する。無極性で難水溶性・高疎水性の化学物質の場合、底質中の有機炭素分に大部分が収着(sorption)することが 1980 年代から知られている(Karickhoff et al., 1978, Chiou et al., 1938)。Karickhoff et al. (1978) は、多環芳香族炭化水素類(PAHs)やその誘導体に関して疎水性の指標である $\log K_{ow}$ と有機炭素量当たりの収着係数 K_{oc} (L/kgC) ($K_{oc} = K_d / f_{oc}$, K_d : 収着係数、 f_{oc} : 底質中の有機炭素重量比) の対数値である $\log K_{oc}$ との相関を調べ、以下の式のような線形近似式を導出した。

$$\log K_{oc} = 1.00 \log K_{ow} - 0.21 \quad (1.1)$$

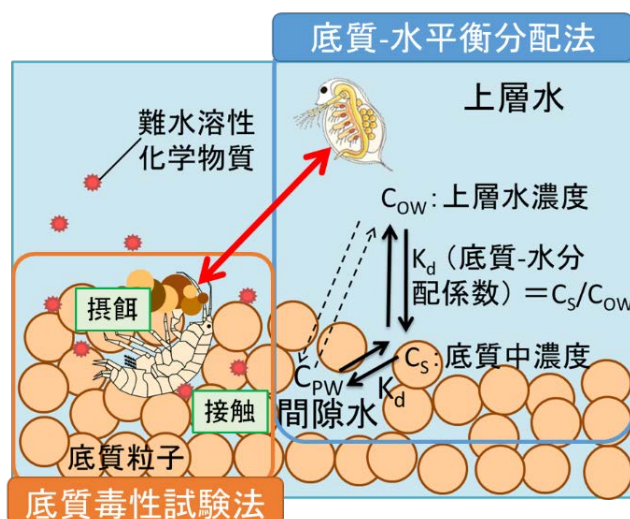


図 1-1 底質-水平衡分配法と底質毒性試験法の概要

詳細は 2 章の文献考察で考察を行うが、その後、様々な研究者が様々な化学物質ならびに底質について $\log K_{ow}$ と $\log K_{oc}$ との直線関係を示す式を提案しており、収着係数の推定に用いられている。ここで K_{oc} を算出するための根拠となる底質-水分配係数 K_d は、化学物質の濃度が底質に比べて十分に低い環境中において、水相(上層水および間隙水)中の PAHs 等の化学物質の濃度 C_w (上層水は C_{ow} 、間隙水は C_{pw}) と底質中の PAHs 等の化学物質濃度 C_s との分配が一定である(Henry 型の収着等温線)ことが知られている。

$$K_d = C_s / C_w \quad (1.2)$$

なお、 K_d : 底質-水分配係数($K_d = K_{oc} \times f_{oc}$)、 C_s : 底質中の化学物質濃度、 C_w : 上層水の濃度(間隙水の濃度と同じと仮定)を表す。

しかし、底質-水平衡分配法で前提とされているように水生生物と底生生物の化学物質の感受性が同等であるとは限らない。また、底生生物は水生生物とは異なり、水から鰓などを介して化学物質に曝露されるだけでなく、デトリタスや底泥の摂餌、体表面と底質粒子との接触という曝露が考えられる。しかし、このような曝露経路は底質-水平衡分配法では考慮されていないため、底生生物への影響を適切に評価できない恐れがある。また、間隙水が重要であるとの指摘に関しても様々な議論がなされている。Chapman et al. (2002) は、間隙水は底生生物にとって重要な曝露経路となりえるが、抽出法により目的成分が変質する可能性があり、間隙水は化学的および生物学的には実態とかけ離れていることに加え、実験者の操作や実験装置により無意味となりうると述べている。

底質中の化学物質の評価方法として以上のような方法が提案されているものの、水生生物と底生生物の感受性差や曝露経路による違いを定量的に比較した研究は限られている。そこで卒業研究(谷ほか、2017)では難水溶性物質として研究例の多い PAHs のうち、3 環の Anthracene、4 環の Fluoranthene、Pyrene、5 環の Benzo[a]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene を選定し、無脊椎動物として生態影響評価に最も広く用いられているオオミジンコ(水生生物)と、北米を中心に研究例の多いヨコエビ(底生生物)を対象として、以下を目的として研究を行った。

1. モデルとする難水溶性の PAHs に関して、オオミジンコ(水生生物)とヨコエビ(底生生物)に対する水中での曝露による毒性試験を実施し、生態毒性値の違いを明らかにする。
2. 底質の有無による当該化学物質の両種への毒性影響の違いを検証する。

次節に卒業研究で得られた結果の概要を示す。

1.2 卒業研究で得られた結果

オオミジンコとヨコエビの生態毒性値の違いを検証するため、水のみでの曝露系での生態毒性試験を実施した結果を図 1-2、生態毒性値を表 1-1 に示す。Anthracene、Dibenzo[a,h]anthracene の 2 種の PAHs はオオミジンコ、ヨコエビともに最高濃度まで影響が観察されなかった。また、影響のあった物質のうち Fluoranthene、Pyrene はヨコエビが、Benzo[a]pyrene はオオミジンコの方が毒性は強くなるなど、物質により生態毒性値に違いが認められた。

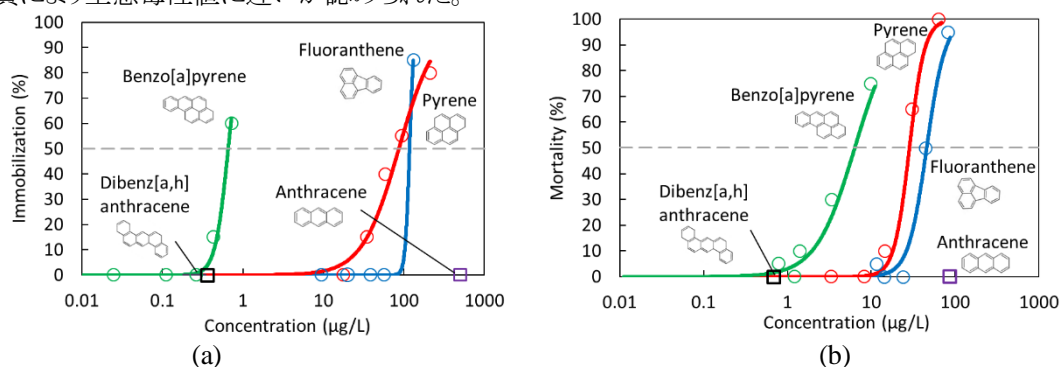


図 1-2 水のみでの曝露系での濃度-影響関係

((a)はオオミジンコ、(b)はヨコエビを示す。プロットは実測値、線は回帰曲線を示す。)

表 1-1 水のみでの曝露系での生態毒性値（カッコ内は 95%信頼区間）

	オオミジンコ	ヨコエビ
	48 h-EC ₅₀ (μg/L)	96 h-LC ₅₀ (μg/L)
Anthracene	>500	>86
Fluoranthene	120 (86~150)	46 (39~55)
Pyrene	87 (67~120)	29 (24~35)
Benzo[a]pyrene	0.66 (0.58~0.77)	6.4 (4.7~9.4)
Dibenzo[a,h]anthracene	>11	>8.6

選定した PAHs のうち、水溶解度などの物理化学的性質が選定した物質の中でほぼ中間的な四環 PAH の Pyrene に関して、水-底質システムでの曝露試験を実施した。その結果を図 1-3 に示す。オオミジンコ、ヨコエビともに水のみでの曝露試験より影響濃度が低く（オオミジンコは 87 μg/L、底質があると 41 μg/L に変化、ヨコエビは 29 μg/L、底質があると 6.8 μg/L に変化）、毒性が強くなった。特にヨコエビについて、その影響濃度の差は大きかった。オオミジンコに関しては化学物質により弱った個体が底層付近を遊泳することで底質と接触する機会が多くなり、底質が体に付着して死亡している個体も多く観察された（図 1-4）。そのため、オオミジンコについては Pyrene による毒性影響だけでなく、底質との接触による物理化学的作用により、水のみでの曝露試験よりも影響濃度が低くなったと考えられた。ヨコエビに関しては底質上を移動したり、底質に潜ったりする個体や腸管に底質粒子が詰まった状態の個体が観察された（図 1-5）。このことから、ヨコエビが Pyrene を含む底質と接触し、皮膚経由でも曝露されたことや、底質粒子を摂餌したことで、水のみでの曝露試験より曝露経路が増えたことが水-底質システムでの曝露試験で毒性が強くなった原因の一つとして考えられた。以上のことから水生生物の毒性値から平衡分配により底質の毒性値を換算する底質-水平衡分配法では底生生物への影響を適切に評価できない恐れがあることが示唆された。

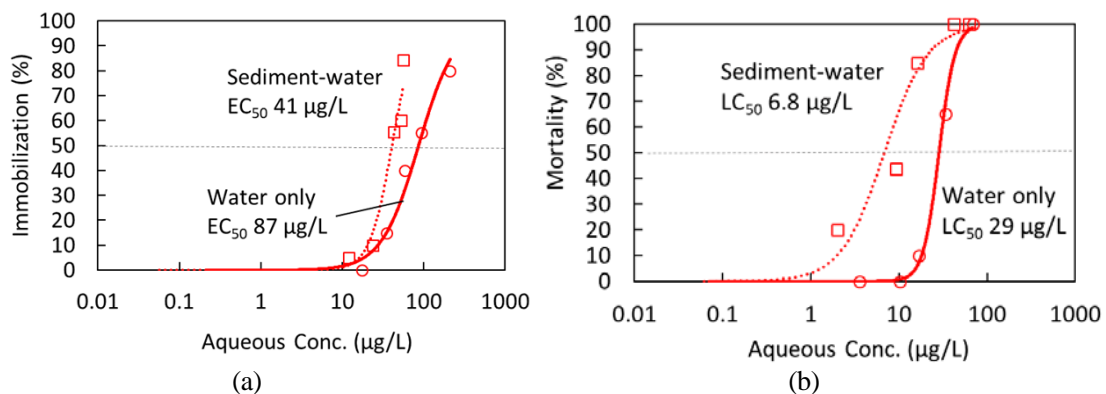


図 1-3 Pyrene の水のみおよび水-底質システムでの濃度-影響関係

((a)はオオミジンコ、(b)はヨコエビを示す。プロットは実測値、線は回帰曲線を示す。)



図 1-4 底質が付着したオオミジンコ



(a)



(b)

図 1-5 (a) ヨコエビが底質上を移動した軌跡および(b)腸管に底質が詰まった状態のヨコエビ個体

1.3 卒業研究から得られた課題

卒業研究で得られた結果より、オオミジンコとヨコエビには対象とした物質によって、毒性値の大小に違いがあることが明らかとなった。また、4 環の PAH である Pyrene に関しては底質の存在により毒性が強くなる傾向が得られた。底質の存在が何らかの要因となっていることは示唆されたものの、これらの要因を明らかにするための詳細な検討を実施することはできず、底質-水平分配法の妥当性等を考察するには底質中濃度等の情報が不完全であった。また、底質への収着・脱着に関する検討や他の PAHs に関する検討は実施しておらず、多種多様で幅広い物理化学的性質を有する PAHs の底質毒性を総合的に評価するには不十分であった。

1.4 目的

そこで本研究では、谷ほか(2017)をさらに発展させて以下の目的を設定し、多様な PAHs の底質毒性やリスクに関して明らかにすることとした。

1. 4 環の PAH である Pyrene よりも難水溶性の PAHs や底質に収着しやすい Pyrene 誘導体に関して、オオミジンコ (水生生物) とヨコエビ (底生生物) の水中での曝露による毒性試験を実施し生態毒性値の違いを明らかにする。
2. 底質の有無による当該化学物質の毒性影響の違いを両種で検証する。
3. 底質への収・脱着に着目し、水中濃度(上層水中濃度)だけでなく底質中濃度や生物体内濃度等にも関しても検討する。

第2章 既存研究

2.1 PAHs の発生源と化学構造

化学物質は製造・使用・廃棄後に、太陽光や微生物による分解、加水分解等の化学反応によって分解されるほか、移流・拡散など様々な過程を経て、大気、水、底質、土壌、ならびに生物体内にも分配される。その様子を下記の図 2-1 に示す。



図 2-1 環境中における化学物質の動態・分配に関する模式図(国立環境研究所, 2013)

多環芳香族炭化水素類(Polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) は石炭などの化石燃料に含まれるほか、自動車や工場などでの石油等の化石燃料の燃焼家庭で発生して大気に排出される。これらの物質は、5 環や 6 環などベンゼン環の数が多いほど疎水性が高く(水溶性が低く)、逆に 2 環や 3 環などベンゼン環の数が多いほど水溶性は高くなり、揮発性も高いことが知られている。図 2-1 に示すように乾性沈着によって陸上に到達後、あるいは降水に溶解しての湿性沈着によって水域に到達する。また、自動車排ガスの一部は道路塵埃として蓄積し、雨天時に流出することでも水域に排出される(Boxall and Maltby, 1997)。米国環境保護庁(USEPA)では、次の 16 物質の PAHs を石油製品に含まれる優先評価すべき PAHs として定めている (Violet et al., 2010)。PAHs は発がん性の恐れのある化学物質として、欧米をはじめ世界各国で規制の動きがある。

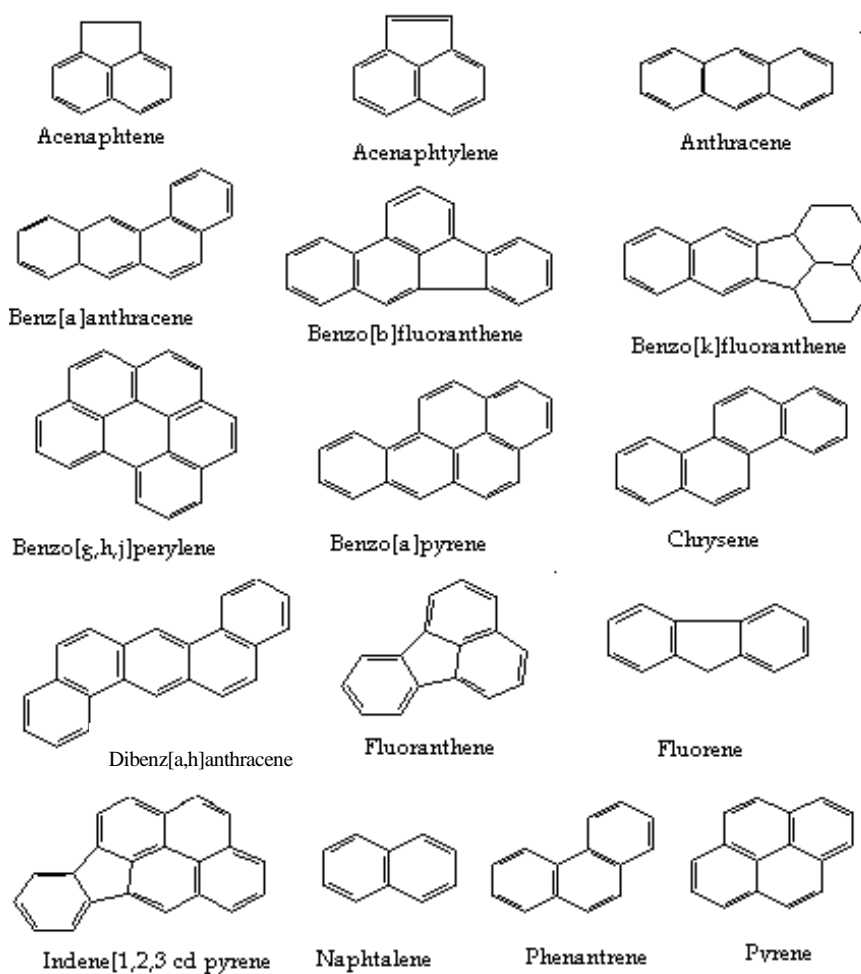


図 2-2 EPA 指定 PAHs 16 種 (Violet et al., 2010)

2.2 PAHs の環境中濃度

環境省が公表している化学物質環境実態調査結果(化学物質と環境, 2016)より、主要な PAHs の日本全国の河川および沿岸域の環境基準点等で環境中から検出された濃度を表 2-1 にまとめる。水相から検出されなかった地点においても底質から検出された地点が多く存在しており、水中濃度と比べて底質中濃度の方が 2~7 オーダー程高いほか、生物にも移行されていることがわかる。このことから底質に蓄積しやすく、生物体内にも取り込まれる恐れのある PAHs の底質毒性を評価する重要性が明らかである。

表 2-1 選定した PAHs の日本全国の河川や沿岸域の環境基準点からの検出濃度

物質名	実施年 西暦	水質 (µg/L)			底質 (µg/kg-dry)			生物 (µg/kg-wet)		
		検出頻度		検出範囲	検出頻度		検出範囲	検出頻度		検出範囲
		検体	地点		検体	地点		検体	地点	
Phenanthrene	1977	0/9	0/3	—	9/9	3/3	9~2800			
	1999	0/36	0/12	—	38/39	13/13	5.8~260	魚 25/39	魚 10/13	魚 0.72~3.7
	2006							魚 9/9	魚 3/3	魚 1.2~3.0
	2007	13/22	6/9	0.0015~0.055	30/30	10/10	3.9~690			
Pyrene	1989	8/69	3/23	0.01~0.065	68/71	23/24	20~3900	魚 10/63	魚 6/21	魚 1.3~9.6
	1999	4/36	2/12	0.006~0.012	39/39	13/13	6.6~540	魚 8/37	魚 4/13	魚 0.37~1.6
Benzo[a]pyrene	1989	0/138	0/46	—	122/134	41/45	5~3700	魚 1/123	魚 1/41	魚 8
	1991		0/18	—		16/18	1.5~1500			
	1992		0/18	—		17/18	3.0~2200			
	1993		1/19	0.017		17/19	3.3~1600			
	1994		0/17	—		15/17	7.3~1600			
	1995		0/18	—		15/18	8.8~1700			
	1996		0/18	—		16/18	6.16~1400			
	1997		0/18	—		15/18	2.67~1500			
	1998		0/18	—		15/18	4.6~2100			
	1999					14/18	3.1~1700			
	2000					12/17	2.4~2300			
	2001					16/20	2.4~1700			
	2002	12/114	7/38	0.00063~0.0021	167/186	57/62	0.34~1200	魚 0/30	魚 0/10	魚 —

国際がん研究機関(IARC)の発がん性リスク一覧では、古くからコールタールや煙突掃除などの主として PAHs に由来する発がん性がグループ 1 (ヒトに対する発癌性が認められる)に分類されている 5 環の PAH であるベンゾ(a)ピレンや、4 環の PAH であるベンズ(a)アントラセン、4 環の PAH のピレンのニトロ化体の 1-ニトロピレンなどが同グループ 2A (ヒトに対する発癌性がおそらくある)に分類されている (IARC, 2018)。そのため、近年 PAHs は全般的に発がん性の恐れがある物質として欧州をはじめ世界各国にてこれを規制する動きがあり、特に EU では REACH 規制 (Registration Evaluation Authorization and Restriction of Chemicals, 化学物質に関する登録、評価、認可および制限)においてタイヤおよびその部品中の伸展油に関する PAHs の含有量の規制等、厳しい規制が実施されている (イー・アール・エム日本株式会社, 2015)。このような状況において日本においても、PAHs に関する適切な対応を検討するための基礎的な情報を収集・整理する重要性が高まっている。

2.3 PAHs の土壌・底質への吸着

吸着とは界面現象であり、ある成分の界面における濃度の相が内部の濃度と異なる時吸着が起きているという (北原, 1994)。このように、水相や気相などのある相と固定相 (環境中であれば底質・生物) などの別の相との界面に化学物質等が蓄積する現象のことを吸着 (Adsorption) と言う。その一方で、化学物質等がある相から界面を通過して別の相の内部に移行する現象が吸収 (Absorption)、吸着と吸収の両方の概念を合わせたものが吸着 (Sorption) と呼ばれている。ある吸着媒 (固定相) に吸着質 (化学物質等) を添加したとき、吸着質が吸着媒に吸着した際に吸着が平衡に達したときの水相中濃度 C_w (µg/L)、固相中濃度 C_s (µg/kg) を測定し、横軸に C_w 、縦軸に C_s を取ってプロットした際の両者の関係を線で結んだものを吸着等温線という。吸着等温線は図 2-3 に示したような形状となる。吸着等温線には大きく分けると左側の Langmuir 型、右側の Freundlich 型の 2 つの型がある。

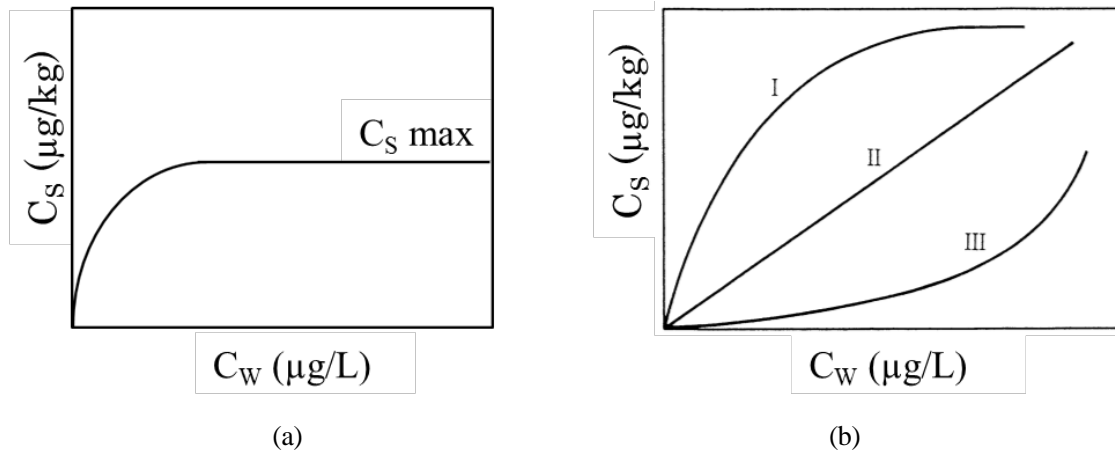


図 2-3 化学物質の水中での固定相への吸着等温線の例 (a)Langmuir 型、(b)Freundlich 型

Langmuir 型の吸着等温線では、吸着媒における吸着質が吸着するサイトが一定であり、吸着質が吸着していない空サイトの量が吸着速度に比例すると仮定している。この仮定から導出された C_s と C_w との間には、

$$C_s = \frac{C_s \max \times K \times C_w}{(1 + K \times C_w)} \quad (2.1)$$

という等式が成り立つ。ここで $C_s \max$ ($\mu\text{g/kg}$) は吸着媒 (固相) に吸着することのできる限界濃度 (吸着サイトが全部埋まった場合) である。この式は、酵素反応の平衡定数を表す Michaelis-Menten 式と対比される。この式を変形すると、

$$\frac{1}{C_s} = \left(\frac{1}{C_s \max K} \right) \times \frac{1}{C_w} + \frac{1}{C_s \max} \quad (2.2)$$

となるため、 C_s と C_w の逆数をプロット (Lineweaver-Burk プロットと呼ばれる) した際の $C_s \max$ は切片から、 K は勾配から求められる。

一方、吸着媒が均一でなく、吸着サイトへの吸着定数 (化学物質等の吸着の強さ) が一定でない場合には、経験的に Freundlich 型がよく用いられる。この式では、水相中濃度を C_w ($\mu\text{g/L}$)、固相中濃度を C_s ($\mu\text{g/kg}$)、吸着係数を K_F (L/kg) とすると、

$$C_s = K_F \times C_w^{1/n} \quad (2.3)$$

で表される。ここで、 n は定数であり、 $1/n$ は収着媒(固体)と収着質(収着する分子またはイオン)の親和力を意味する。 $n>1$ のとき、I型となり、収着質に対して収着サイトが十分にある場合に起こる。収着サイトとは、収着媒の表面が収着質と結合する場所のことを示す。 $n=1$ のとき、II型のような直線になり、収着媒が収着質に対して過剰に存在するときに起こる。 $n<1$ のとき、III型となり、収着サイトが満たされた場合に起こる。

なお、Freundlich 型、Langmuir 型いずれも C_w が十分に小さい場合は

$$C_s = K_d \times C_w \quad (2.4)$$

の線形の Henry 型になる。環境中での汚染化学物質濃度は底質の収着サイトに比べて十分に少ないことから C_w が十分に小さいと仮定でき、Henry 型の式で表すことができることが多い。

そのうち、1章に示した Karickhoff et al. (1979) や、Schwarzenbach et al. (1981) および Chiou et al. (1983) に代表される研究により、PAHs などの疎水性化学物質の底質への収着は、底質中の腐植物質等の有機物への疎水性吸着でほぼ説明することができる。つまり、ヘンリー型の収着定数 K_d に関しては、有機炭素/水分配係数 (K_{oc}) と有機炭素量重量比 (f_{oc}) を乗じて推測できることが明らかとなっている。Schwarzenbach et al. (1981) は、ハロゲン化アルケンやベンゼンの非極性化合物の収着について解明し、 f_{oc} が 0.001 より大きい場合、以下の関係が成り立つと導いた。

$$\log K_d = 0.72 \log K_{ow} + \log f_{oc} + 0.49$$

また Chiou et al. (1983) は、塩素化ベンゼンや PCB に関して、以下の式を導出した。

$$\log K_{oc} = 0.904 \log K_{ow} - 0.543$$

なお本研究では、PAHs に関して検討を行ったため、Karickhoff et al. (1979) の経験式を用いて考察することとした。

欧州化学品庁 (ECHA, 2017) では底質のリスク評価のガイダンスにおいて、水中の懸濁物質が沈降して底質になったとし、 f_{oc} を 0.1 と設定していることから、化審法のガイダンス (2015) においても同様の推定式を提示している。しかしながら、環境省の化学物質環境実態調査結果 (化学物質と環境, 2016) における全国の河川の底質 62 地点のうち、強熱減量が 10% を超えるのはたった 11 地点であり、実際の環境中の底質に含まれる f_{oc} は 0.1 より少ないと予想される。 f_{oc} を 0.1 と仮定した場合、第 1 章に示した底質-水平衡分配法により換算される底質中濃度は実際より高くなると考えられ、リスク評価では危険側に評価される。また f_{oc} はあくまでも底質中の有機炭素重量比という量を表す指標であり、底質に含まれる有機物の質など別の要素により化学物質の分配性は異なる可能性が高い。そのため、底質の影響を適切に評価するには、対象とする底質に関して収着実験や溶出試験を実施し、

実験値の K_d を得ることが重要であると考えられる。

2.3 水-底質システムでの曝露試験

PAHs などの化学物質の水のみの曝露によるオオミジンコやヨコエビといった甲殻類を用いた曝露試験結果は一定程度報告があるが、水と底質の両方を含む水-底質システムでの曝露試験は限られている。その理由として、試験操作が煩雑になるほか、どのような生物と底質を用いるかによって結果が大きく異なる。底質を含む試験系を作成することで様々な要因が加わり、結果の解釈が難しいためなどがあげられる。

Cesnaitis et al. (2014) は、REACH 規制において提出された底質毒性試験結果がどの試験生物を用い、どのガイドラインに基づいたものであるか解析を実施した。その結果、海産ヨコエビの *Corophium volutator* が最も多い 35.1%、次いでオヨギミズ *Lumbriculus variegatus* の 7.4%、ユスリカ *Chironomus dilutes* の 6.9%、ヨコエビ *Hyalella azteca* の 5.9%であった(図 2-4)。また用いたテストガイドラインを見ると、海産ヨコエビ *Corophium volutator* の試験法である OSPARCOM(オスロパリ委員会:ヨーロッパ地域における北海に関する地域海洋管理を実施している) guidelines が 37.2%、次いでユスリカの OECD TG218 で 13.2%、オヨギミズの OECD TG225 の 3.9%であった(表 2-2)。このように底生生物として多様な生物種および試験法が用いられているが、第 1 章に記したように摂餌形態や潜行行動の違いがあるため、試験結果の単純比較は困難である。

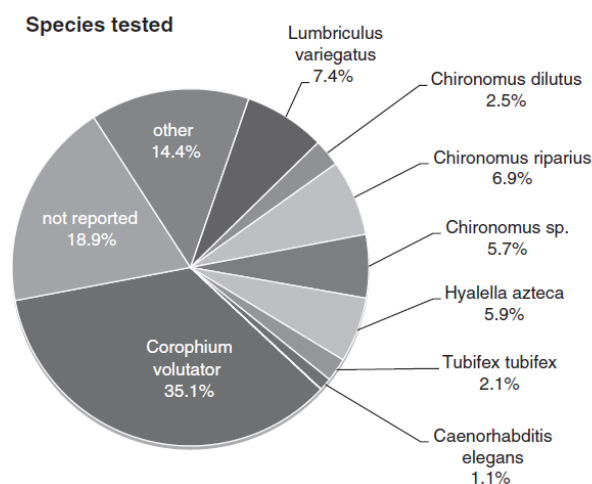


Fig. 1. Distribution of the organisms species reported for toxicity studies to sediment organisms used for the testing of substances registered under the first deadline of REACH Regulation.

図 2-4 REACH 規制の登録に用いられた底質毒性試験の試験生物種の内訳

表 2-2 REACH 規制の登録に用いられた試験法の分布

Table 2
Distribution of the test guidelines addressing toxicity of sediment organisms used for the testing of substances registered under the first deadline of the REACH Regulation. [%].

Test guidelines	Percentage of substances
OSPARCOM guidelines	37.2
OECD 218	13.2
OECD 225	3.9
EPA OPPTS 850.1735	3.0
ASTM E1 525-94a	2.1
OECD 219	1.6
ASTM E1 383-94	1.6
ASTM E1 706-95b	1.3
ASTM E1 706-04	0.5
ASTM E1 367-92	0.5
EPA OPPTS 850.1740	0.3
EPA OPPTS 850.1800/EPA OTS 797.1995	0.3
ASTM E1 611-94	0.2
ASTM E1 688-96	0.2
EPA OPPTS 850.1790	0.2
other	9.5
method not reported	24.6

Ingersoll et al. (2000) は、室内実験にて野外採取した底質を使用し、底質を含む系と上層水のみ系でヨコエビを用いた毒性試験を実施し、その毒性を評価した。10 日間の曝露により、底質を含む系では生存に対する 5~63%の影響が観察された一方で、上層水のみ系では毒性影響は観察されなかった。しかしながら採取した環境底質に含まれている化学物質は特定されておらず、毒性要因となったものに関しては言及されていない。

オオミジンコとヨコエビを用いた底質を含む曝露系での毒性試験の報告値についてはあまり例がないが、ユスリカも含めて類似した研究報告を検索して得られた文献に記載されている毒性値を以下の表 2-3 にまとめる。このような従来の毒性試験の報告値は、どのような化学物質を含んでいるのかわからない環境底質を使用しているものや、上層水および底質中濃度を測定していないものなどもあり、底質毒性を適切に評価できていない可能性がある。以下に、各文献の詳細についてまとめるとともに考察する。

Nebeker et al. (1986) は、オオミジンコとヨコエビ用いて重金属として毒性が強いカドミウム(Cd)に関して、水のみ曝露系と底質を含む曝露系での影響を比較した。金属は、PAHs のような難水溶性の有機汚染物質とは異なり、底質に対して静電気作用によって収着していることが考えられる点では、本研究とは大きく異なる。また、生物体内の仮想的な毒性作用に寄与する部位(リガンドと受容体の結合反応)を想定した、Biotic Ligand Model で説明されるように塩分や水の硬度、水中の有機炭素により、他の金属陽イオンと競合したり、有機物と結合したりすることで、生物体内へ取り込みや毒性が低減することも知られている(加茂・林, 2011)。Nebeker et al. (1986) において、底質を含む曝露系の方が水のみ曝露系よりも毒性が弱くなった原因として、底質の存在により多くの Cd が底質粒子や溶解物質と結合し、毒性作用を及ぼさなかったと述べている。

Suedel et al. (1992) はオオミジンコ、ヨコエビ、ユスリカの 3 種の無脊椎動物を用いて 4 環 PAH である Fluoranthene に関して 3 種類の環境底質を使用した底質を含む曝露系での影響を比較した。野

外採取した wet-sediment に Fluoranthene のアセトンストックを添加し、2 分間揮発させた後、試験溶液を加える前に 60 秒間混合した。250 mL ビーカーに底質：水=40 mL：160 mL 加え、各生物種に対し 10 日間の毒性試験を実施した。ヨコエビおよびユスリカの感受性はオオミジンコより高く、平衡分配法により底質中濃度を適切に予測できた環境底質もあれば、そうでないものもあり、平衡分配法ではいくつかの底質に対して過度に保護的となる恐れがあると結論付けている。

Verrhiest at al. (2001) は、底質中の Phenanthrene、Fluoranthene、Benzo[k]fluoranthene について単体および複合影響をオオミジンコ、ヨコエビ、ユスリカを用いて評価した。底質には 65%の砂(粒径 500 μm 以下の石英砂と 2 mm 以下のカオリン)、30%のカオリン粘土、4.85%の α -セルロース、0.15%のテトラミン、0.1%の炭酸カルシウムからなる人工底質(TOC は 2%)を用いた。アセトンに溶解させた Phenanthrene、Fluoranthene のストックを 2 L 瓶に 0, 10, 30, 100 および 300 mg/kg となるように添加し、暗条件下で揮発させた。23%の水を含む wet-sediment 800 g を加え、10 rpm で 24 時間の暗所にて振とうさせた。20 $^{\circ}\text{C}$ の暗所にて 24 時間の平衡期間後、250 mL のガラス容器に底質：水=100 g：200 mL となるよう分配した。ここに 24 時間以内齢の *D. magna* を 10 匹投入し、24、48 時間ごとに遊泳阻害を観察した。さらに *D. magna* に関しては暗条件下および明条件下で 2 時間紫外線を照射したときの毒性についても検討している。また 2~3 週間齢の *H. azteca* を 10 匹入れ、14 日間の曝露後生存と成長(湿重量と乾燥重量)を求めた。*D. magna* に関しては、底質を含む曝露試験の方が水のみ試験よりも毒性が強くなった。これは水中から化学物質を摂取するだけでなく、底質との接触および汚染された餌や粒子を摂取したことによるとしている。*H. azteca* に関しては、成長に対する毒性は観察されず、生存に対する毒性は以下の表 2-3 に示すように、Phenanthrene で 21 mg/kg、Fluoranthrene で 5.2 mg/kg(測定濃度に基づく)のようになった。

表 2-3 オオミジンコとヨコエビを用いた底質を含む曝露系での毒性値

(*: 環境底質を用いて試験を実施)

	<i>D. magna</i> 既存生態毒性データ	<i>H. azteca</i> 既存生態毒性データ	<i>Chironomus</i> 属 既存生態毒性データ
Phenanthrene (Verrhiest et al., 2001)	200 µg/L, 49 mg/kg (Sediment-water toxicity test, 48-h)	21 mg/kg (Sediment-water toxicity test, 14-d)	15 mg/kg (<i>C. riparius</i>) (Sediment-water toxicity test, 10-d)
Fluoranthene (Verrhiest et al., 2001)	13 µg/L, 9.6 mg/kg (Sediment-water toxicity test, 48-h)	5.2 mg/kg (Sediment-water toxicity test, 14-d)	15 mg/kg (<i>C. riparius</i>) (Sediment-water toxicity test, 10-d)
(Suedel et al., 1992)	103 µg/L (Water-only toxicity test, 10-d)	45 µg/L (Water-only toxicity test, 10-d)	32 µg/L (<i>C. tentans</i>) (Water-only toxicity test, 10-d)
	92 µg/L, 15 mg/kg (0.46% OC) *	45 µg/L, 2.3 mg/kg (0.46% OC) *	61 µg/L, 7.3 mg/kg (0.46% OC) *
	64 µg/L, 12 mg/kg (0.50% OC) *	54 µg/L, 7.4 mg/kg (0.50% OC) *	51 µg/L, 8.7 mg/kg (0.50% OC) *
	43 µg/L, 4.2 mg/kg (0.44% OC) *	32 µg/L, 5.5 mg/kg (0.44% OC) *	30 µg/L, 3.0 mg/kg (0.44% OC) *
	(Whole-sediment toxicity test, 10-d, overlying water)	(Whole-sediment toxicity test, 10-d, overlying water)	(Whole-sediment toxicity test, 10-d, overlying water)
Total Cd (Nebeker et al., 1986)	36, 33, 24, 40 µg/L (Water-only toxicity test, 48-h)	8 µg/L (Water-only toxicity test, 96-h)	
	252, 69, 122* µg/L (Whole-sediment toxicity test, 48-h, overlying water)	74* µg/L (Whole-sediment toxicity test, 96-h, overlying water)	

第3章 実験手順

3.1 被験物質と材料

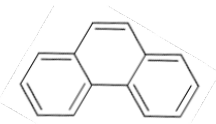
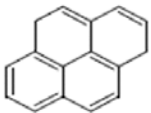
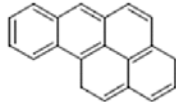
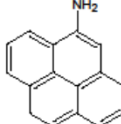
3.1.1 被験物質

前述したように、水環境中に排出される微量汚染化学物質のうち、底質に蓄積し底生生物への有害影響が懸念される物質として、難水溶性・無極性の疎水性化学物質が挙げられる。その典型例として、ダイオキシンや PCB などの残留性有機汚染物質(Persistent Organic Pollutants: POPs)のほかに、化石燃料その他の燃焼や原油の漏出等に由来する多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が知られている。本研究では、都市部での道路からの流出水などに比較的多く含まれ (Krein and Schorer. (2000), Zhang et al. (2008))、POPs などより取り扱いが容易で蛍光を有することから比較的高感度で定量が可能な PAHs を被験物質とした。第2章に示した米国 EPA に指定されている PAHs 16 種のうち、卒業研究で選定した3環の Anthracene (Ant)、4環の Fluoranthene (Flu)、Pyrene (Pyr)、5環の Benzo[a]pyrene (BaP)、Dibenz[a,h]anthracene (DahA)に加え、3環の Phenanthrene (Phe)、Pyr と同様の基本骨格を有するアミンとして底質への収着性が高く (Yamamoto et al. (2009, 2018))、甲殻類などに強い毒性が予測される芳香族アミンの一種である 1-Aminopyrene (Apy)を用いた。

Phenanthrene、Pyrene および Benzo[a]pyrene は、富士フィルム和光純薬株式会社から購入したそれぞれ純度 97.0%、97.0%、93.0%のものを使用した。1-Aminopyrene は東京化成工業株式会社から購入した。これらの物質の物理化学的性質と構造を表 3-1 に示す。

底質中濃度の測定のためにサロゲート物質として重水素でラベル化された (以下 d 体と表記する) Phenanthrene-d₁₀、Pyrene-d₁₀ および Benzo[a]pyrene-d₁₂ は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。それぞれ純度 98%、98%および 98%のものを使用した。1-Aminopyrene-d₉は C/D/N isotopes 社製の純度 98%のものを使用した。

表 3-1 被験物質の情報(*: 水溶解度は EPISuite PhysProp DB の実測値を、log K_{ow} は EPISuite Kowwin v1.68 の予測値を引用)

	Phenanthrene (Phe)	Pyrene (Pyr)	Benzo[a]pyrene (BaP)	1-Aminopyrene (Apy)
CAS	85-01-8	129-00-0	50-32-8	1606-67-3
Chemical formula (Molar mass)	C ₁₄ H ₁₀ (178.23)	C ₁₆ H ₁₀ (202.25)	C ₂₀ H ₁₂ (252.31)	C ₁₆ H ₁₁ N (217.27)
Chemical structure				
Purity (%)	95.0	98.0	97.0	98.0
Water solubility (μg/L)*	1150	135	1.62	2410
log K _{ow} *	4.35	4.93	6.11	4.02

3.1.2 測定条件

水中の被験物質の濃度測定には、島津製作所社製の蛍光・吸光光度検出器付き高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography: HPLC）を用いた。その構成を表 3-2 に示す。標準溶液は、ガラスバイアルへの吸着を防ぐためアセトニトリルで作成し、測定直前に移動相の比率に近くするためアセトニトリル：MilliQ Water =50：50 (v/v %)としたものを用いた。水のみでの曝露試験においてオオミジンコの試験溶液の測定については、無給餌であり浮遊粒子が存在しないため、ろ過せずにそのまま HPLC を用いて測定した。一方、ヨコエビの試験溶液および水-底質システムでの曝露試験、収・脱着実験の水相中濃度の測定に関しては、餌である YCT (Yeast Cerophyll and Trout chow, リーセンテック株式会社) の微粒子や底質粒子が含まれているため、アセトニトリルで 2 倍希釈を行った後、ジーエルサイエンス社製除粒子用シリンジフィルターユニット GL クロマトディスク (孔径 0.45 μm、ポリテトラフルオロエチレン製、5040-28540) でろ過後に、HPLC で測定した。

表 3-2 分析に利用した島津製作所社製 HPLC の構成

ユニット	機種名
システムコントローラー	SLC-10A VP
ポンプ	LC-10AD VP
デガッサ	DGU-12A
オートサンプラー	SIL-10AD VP
カラムオープン	CTO-10AS VP
メインカラム	Shim-pack C18
ガードカラム	Shim-pack C18
検出器	紫外吸光検出器：SPD-10A VP 蛍光検出器：RF-10A XL

測定条件は表 3-3 に示すように設定した。Phenanthrene, Pyrene および Benzo[a]pyrene の移動相にはアセトニトリル (残留農薬・PCB 試験用濃縮 5000、富士フィルム和光純薬株式会社製) および MilliQ water を、1-Aminopyrene はアセトニトリルおよびリン酸緩衝溶液 (pH 7, 0.01 M) を用いた。注入量はサンプル量と検出感度を考慮しながら、100~300 μL とした。

表 3-3 各物質の測定条件

	吸収/ 励起/ 蛍光波長 (いずれも nm)	移動相 (アセトニトリル：MilliQ Water、 Apy はアセトニトリル：リン酸緩衝溶液)	保持時間
Phe	254/ 250/ 350	80：20 (v/v %)	7.2 min
Pyr	254/ 320/ 391	80：20 (v/v %)	7.1 min
BaP	254/ 365/ 410	85：15 (v/v %)	9.2 min
Apy	254/ 355/ 440	60：40 (v/v %)	8.5 min

底質中の被験物質濃度の測定には、島津製作所製のガスクロマトグラフ質量分析計（Gas Chromatograph Mass Spectrometry: GC-MS）を用いた。標準溶液はヘキサン（残留農薬・PCB試験用濃縮 5000、富士フィルム和光純薬株式会社製）で作成し、内標準法にて検量線を作成した。底質中の被験物質の抽出方法を以下に示す。

- ① サロゲート物質として各 PAHs の重水素標識体を添加した底質を凍結乾燥後、1 g 以上採取し、50 mL 褐色遠沈管に加えた。このとき Blank として、試料の入っていない遠沈管も用意し、サロゲート物質を添加した。
- ② Phenanthrene, Pyrene, および Benzo[a]pyrene の抽出にはヘキサン 5 mL、1-Aminopyrene の抽出にはジクロロメタン 5 mL を加え、100 W, 45 kHz の超音波洗浄機にて 15 分間分散させた。
- ③ 遠心分離機を用いて 5 分間 3000 rpm (1860G) で遠心分離を行い、固液分離した。
- ④ パスツールピペットを用いて、溶媒層を清浄な 10 mL 褐色試験管に移した。
- ⑤ ②～④の操作を再度行った。
- ⑥ 窒素を吹き付け 4～5 mL に濃縮後、ヘキサンのコンディショニングした Sep-Pak Silica Plus Long Cartridge で脱水を行った。
- ⑦ 通液した溶媒を検量線に応じて希釈し、GC-MS 用バイアルにて保存した。

その後、GC-MS を用いて定量を行った。GC-MS の構成および測定条件を以下の表 3-4 に示す。

表 3-4 分析に利用した島津製作所社製 GC-MS の構成および測定条件

構成もしくは手法	機種名もしくは条件
GC	Shimadzu GC2010
MS	Shimadzu GCMS-QP 2010
メインカラム	Agilent J&W DB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)
注入口温度	280 °C
インターフェース温度	300 °C
キャリアガス	He
注入方法	スプリットレス
イオン源温度	200 °C
イオン化法	EI
イオン化電圧	70 eV

なお、カラムオープンの温度条件は、Phenanthrene では 120 °C（ホールド 1 min）、200 °C（20 °C/min）、250 °C（5 °C/min、ホールド 3 min）、Pyrene では 120 °C（ホールド 1 min）、210 °C（20 °C/min）、250 °C（5 °C/min、ホールド 1 min）、Benzo[a]pyrene では 120 °C（ホールド 1 min）、270 °C（30 °C/min）、300 °C（5 °C/min、ホールド 1 min）、1-Aminopyrene では 150 °C（ホールド 1 min）、245 °C（30 °C/min）、285 °C（5 °C/min、ホールド 1 min）

とした。注入量はすべて1 μ Lで測定を実施した。各物質のモニタリングイオンの質量数(m/z)は表 3-5 に示す。

表 3-5 各物質の設定質量数

Compound	m/z (定量用)	m/z (確認用)	m/z (サロゲート)
Phenanthrene	178	152	188
Pyrene	202	201	212
Benzo[a]pyrene	252	253	264
1-Aminopyrene	217	218	226

3.1.3 試験生物

水生生物としては、無脊椎動物の代表として国内外において広く化学物質の生態毒性試験に利用されているオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いた。オオミジンコは世界で最も大きなミジンコであり、成体の体長は最大 5 mm となるため観察が容易である。また、飼育が容易であり化学物質に対する感受性が高い。寿命は数か月であり、生後約 1 週間で成熟し、産仔を開始する。2, 3 日に一度産仔を行い、約 21 日齢前後で産仔数のピークを迎え、1 頭当たり一回の産仔で 50~60 頭産仔する。単為生殖によって増殖するが、餌不足や低温、過密条件下など環境要因の変化によりオスが生まれると、交尾し耐久卵を作る。研究を実施した国立環境研究所環境リスク棟の実験室では、1 L ビーカーに 40 頭程度の密度で、1~3 週齢目の個体群 (マスカルチャー) をそれぞれ 3 または 4 つずつ飼育、継代している。餌はクロレラ工業株式会社製の単細胞緑藻クロレラを遠心分離によって培地を除いたものを 1 日あたり 0.098 mg C/individual 与えている。照明は室内光で 16 時間明、8 時間暗条件、水温は 18~22 $^{\circ}$ C で、週 3 回つくば市の水道水を活性炭ろ過した飼育水で水換えを実施している。試験に用いる仔虫は、2 週齢 (12~18 日齢) の親から生まれた生後 24 時間以内のものを用いた。

底生生物としては、米国やカナダなどで広く利用されている淡水性ヨコエビ属の一種である *Hyalella azteca* を用いた。この淡水性ヨコエビ属は、日本には生息しないが、北米や欧州ではユスリカとともに底質試験の代表的な試験生物として位置づけ、化学物質で汚染された底質の毒性評価に用いている。成熟個体の体長は約 5~6 mm であり、動植物破片 (死骸や落葉など) を食し、生態学的には腐葉食者としての機能を有する。またそれ自身はハゼ類など底生魚類の好適な餌となっている。水温 23 \pm 1 $^{\circ}$ C、光周期 14 時間明、10 時間暗、照度 2000~3000 lx で飼育した場合、孵化から初回抱卵までに要する日数は平均 1.6 ヶ月であり、産仔周期は平均 11.4 日、1 回の平均産仔数は 29.3 個体であったとの報告もある (27 生態影響試験ハンドブック, 2003)。研究を実施した国立環境研究所環境リスク棟の実験室では、5 L 水槽に成体 100 匹程度と隠れ場所となるナイロンメッシュ (目開き 500 μ m、NYTAL、38GG-500) を入れ、週 1 回換水を行っている。週 2 回フィード・ワン株式会社製の混合飼料ハリオスを給餌している。照明は室内光で 16 時間明、8 時間暗条件、水温は 18~22 $^{\circ}$ C で、1 秒間に 3 泡程度の曝気を行っている。

3.2 水のみでの曝露系での生態毒性試験

オオミジンコとヨコエビの生態毒性値の違いを検証するため、水のみでの曝露系での生態毒性試験を実施した。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(OECD, 2004 c)、ヨコエビに関しては Environment Canada (2013)のヨコエビ 96 時間水相試験(Environment Canada, 2013)に基づいて実施した。試験条件の概要を以下の表 3-6 に示す。

表 3-6 生態毒性試験条件

	ミジンコ急性遊泳阻害試験	ヨコエビ 96 時間水相試験
供試生物	オオミジンコの生後 24 時間以内のメス仔虫	ヨコエビの生後 1~3 日の仔虫を 2 日間給餌し馴化したもの
曝露期間	48 時間 (観察は 24 時間ごと)	96 時間 (観察は 24 時間ごと)
濃度区	対照区、助剤対照区、5 濃度区	対照区、助剤対照区、5 濃度区
試験生物数	5 頭/1 容器、4 連	10 頭/1 容器、2 連
試験溶液	脱塩素水 (pH 6.8~8.5)	同左
試験液量	50 mL	200 mL、約 3 cm 平方のナイロンメッシュ 1 枚
試験容器	80 mL ガラス製スナップカップ	300 mL トールビーカー
明暗周期	16 時間明、8 時間暗	同左
水温	22 °C±1 °C	23 °C±1 °C
換水	なし	同左
給餌	なし	試験開始前と 48 時間後に YCT0.5 mL/容器
エンドポイント	遊泳阻害 (15 秒間容器を揺らして) EC ₅₀ (半数影響濃度)	生死 (生存) LC ₅₀ (半数致死濃度)
解析手法	対数ロジスティック法	同左
助剤	ジメチルホルムアミド (DMF) 0.01%	ジメチルホルムアミド (DMF) 0.01%
試験成立条件	対照区に 10%を超過した遊泳阻害が認められないこと	対照区に 10% (底質導入時は 20%) を超過した致死が認められないこと
濃度測定	蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で 24 時間ごとに測定	同左

3.3 水-底質システムでの曝露試験

水と底質を含む系である水-底質システムを作成するために、卒業研究で選定した PAHs のうち物理化学的性質がほぼ中間の四環の Pyrene に加え、Pyrene より疎水性の小さい三環の Phenanthrene、Pyrene より疎水性が大きく底質により吸着することが想定される Benzo[a]pyrene、および Pyrene と同じ基本骨格を持ち、アミノ基を有することで水溶解度の高い 1-Aminopyrene に関して水相から底質への収着実験、底質から水相への脱着実験を行った。得られた収着係数を参考にして水-底質システムを設定し、生態毒性試験を実施した。

3.3.1 水相から底質への収着実験

OECD Test Guideline No.106 (OECD, 2000)を参考に、収着実験を行った。以下にその手順を示す。

(1)飽和水溶液の調製

- ① 褐色のガラス瓶に各物質のアセトンストック 1000 mg/L を水溶解度付近の濃度となるよう適量添加し、空気を1時間以上吹きあてアセトンを揮発させた。
- ② MilliQ water を加え、スターラーで3日以上攪拌させた。

(2)人工底質の組成

OECD テストガイドライン No.218 に記載されている(OECD, 2004)の人工底質の組成を用いた。その組成を表 3-7 に示す。

表 3-7 人工底質の組成(OECD, 2004)

物質名	乾燥重量比	材料
ピートモス	4%	園芸用に市販されている株式会社みどり、北海道産ピートモス短繊維状をフードプロセッサーにかけ、250 μm のふるいに通したもの
カオリン	20%	Wako
石英砂	76%	Merck 社製 Quartz

・ピートモスの調製

- ① 表 3-7 に示すピートモスをプラスチックバット上に敷いたアルミホイルの上に広げ、2日間以上乾燥させた。
- ② 乾燥したピートモスを孔径 2 mm のふるいに通し、フードプロセッサーで粉砕した後、孔径 250 μm のふるいに通した。
- ③ 孔径 250 μm のふるいに残ったピートモスは、再度フードプロセッサーで粉砕し、孔径 250 μm のふるいに通した。

(3)予備実験：水相中濃度の収着質が約 50%収着する収着媒量の検討

- ① 10 mL 共栓付き褐色遠沈管 (BaP は 50 mL 褐色遠沈管) に Blank および 5 濃度区 10, 30, 50, 100, 200 mg の人工底質を各 2 連用意した。
- ② 各物質の飽和溶液 3 mL (BaP は 45 mL)、pH 調節のためのリン酸緩衝溶液 (pH 7, 0.1 M) 1 mL (BaP は 2.5 mL)、微生物による分解を防ぐためのアジ化ナトリウム水溶液 (0.1 M) 1 mL (BaP は 2.5 mL) を加えた。
- ③ 振とう機を用いて 100 rpm で 24 時間往復振とうした。
- ④ 遠心分離機を用い、15 分間、3000 rpm (1860G)で遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄みを取り、アセトニトリルで 2 倍希釈した後、3.1.2 節で示すジーエルサイエンス社製クロマトディスク(孔径 0.45 μm、ポリテトラフルオロエチレン製)でろ過し、水相中濃度を 3.1.2 節で示す方法で島津製作所製 HPLC を用いて測定した。

(4)本実験 収着係数 K_d の算出

- ① 予備実験で求めた収着率が約 50%収着する収着媒を 10 mL 褐色遠沈管に入れ、リン酸緩衝溶液 (pH 7, 0.1 M) 1 mL (BaP は 2.5 mL)、アジ化ナトリウム水溶液 (0.1 M) 1 mL (BaP は 2.5 mL) および各物質の飽和溶液と MilliQ water の合計量が 3 mL となるように 5 濃度区作成した。各濃度区あたり 2 連用意し、底質を含まない Blank も作成した。
- ② 振とう機を用いて 100 rpm で 24 時間往復振とうした。25 °C のインキュベーター内で実施した。
- ③ 遠心分離機を用い、15 分間、3000 rpm (1860G) で遠心分離を行った。
- ④ 上澄みを取り、アセトニトリルで 2 倍希釈した後、前実験と同じクロマトディスクでろ過し、水相中濃度を前実験と同様に 3.1.2 に示す方法を用いて HPLC で測定した。
- ⑤ Blank から水相中濃度を差し引いた量が底質に移行した量であるとみなし、 K_d を算出した。

3.3.2 底質から水相への脱着実験

(1)人工底質の調製

人工底質の組成、ピートモスの調製は 3.3.1 節に示した手順と同様にした。

・石英砂の調製

底質中の被験物質の濃度が 100 mg/kg となるように石英砂に各物質を添加した。

- ① 各物質の 1000 mg/L アセトニトリル溶液を作成し、100 mg/kg となるように 1 mL (2 連分) ガラスシャーレにとり、少し蒸発させてから石英砂 7.6 g を入れ、葉さじでよく混合させた。
- ② ドラフトで 2 時間乾燥させ、小さな塊ができていないことを確認してから、人工底質に混合した。

(2) 底質に添加した Pyrene の水相への移行実験

- ① 2 本の 50 mL ガラス製遠沈管にそれぞれ人工底質 5 g (ピートモス 0.2 g、カオリン 1 g、石英砂 3.8 g) を、2 本の 50 mL ガラス製遠沈管にそれぞれ被験物質を含む人工底質 5 g (ピートモス 0.2 g、カオリン 1 g、被験物質を添加した石英砂 3.8 g) 入れた。
- ② 4 本の遠沈管には MilliQ water 50 mL を加え、振とう機で 1 時間振とうした。
- ③ 振とう後、遠心分離機を用いて 3000 rpm (1860G) で 15 分間遠心分離を行った。
- ④ 分離後、上澄みを取り、アセトニトリルで 2 倍希釈した後、使い捨て除粒子用シリンジフィルター (孔径 0.45 μm 、ポリテトラフルオロエチレン製) クロマトディスクでろ過し、収着実験同様に 3.1.2 に示す方法を用いて HPLC で測定した。
- ⑤ 3、6 および 24~192 時間まで振とうし、③、④の操作を繰り返し行った。24 時間後以降は 24 時間おきに濃度測定を実施した。

3.3.3 水-底質システムの作成

(1)オオミジンコの水-底質システムでの生態毒性試験（底質添加）

Phenanthrene, Benzo[a]pyrene および 1-Aminopyrene に関して実施した。

- ① 人工底質への収着実験により求めた K_d を参考にして、水のみでの曝露試験と同じ水相濃度になると推定される量の各物質の 1000 mg/L または 10,000 mg/L アセトンストック溶液をガラスシャーレにとり、少し蒸発させてから石英砂を入れ、薬さじでよく混合した。
- ② 均一に混合させるため、①の石英砂にアセトンを 5 mL 回しかけ、薬さじでよく混合した。この操作を 2 回繰り返した。
- ③ ドラフト内で 2 時間以上乾燥させ、大きな塊がないことを確認した。
- ④ 重量既知の 500 mL ステンレス製遠沈管にピートモス 1.2 g、カオリン 6 g、石英砂 12.8 g をあらかじめ用意しておき、そこに被験物質を添加した石英砂 10 g を加え全量 30 g となるようにし、脱塩素水 300 mL を加えた。
- ⑤ 遠沈管のふたがしっかり閉まっているのを確認し、往復振とう機で 6 時間 100 rpm で振とうさせた。
- ⑥ 振とう後、pH を調整するために炭酸カルシウム 0.3 g を加え、よく混合させた。
- ⑦ 遠心分離機を用い、6300 rpm (7190 G) で 20 分間遠心分離を行った。
- ⑧ 上澄みを抜き取り、遠沈管に残った人工底質の重量を測定した。
- ⑨ 人工底質の重量より、人工底質に含まれる水の量を計算した。
- ⑩ 調製した人工底質を乾燥重量で 5 g を試験の 1 連とするために、水を含んだ人工底質の 1/6 の量を 50 mL スナップカップに量り取った。これを 4 連用意した。
- ⑪ 巻き上げを防ぐため人工底質に不活性のナフロンシート (TOMBO 9001、ニチアス株式会社) を敷き、底質の含水率を見込んで抜き取った水を 50 mL となるように加えた。
- ⑫ 遠沈管に残った人工底質 (乾燥重量で 10 g) にサロゲートである各物質の d 体を適量添加し、よく混合した後、ガラスバイアルに移して冷凍保存した。
- ⑬ 保存した底質は予備凍結後、凍結乾燥機にて一晩静置し、凍結乾燥させた。
- ⑭ 人工底質と水を含むスナップカップは、アルミホイルをかぶせて遮光し、一晩静置した。
- ⑮ オオミジンコと底質との接触を防ぐため、MERCK MILLIPORE 社製メンブレンフィルター (ポアサイズ : 0.45 μm 、材質 : 親水性 PEFE) を試験開始 2 時間前に敷いた。
- ⑯ 作製した水-底質システムを用いて、水のみでの曝露試験と同様にしてミジンコ急性遊泳阻害試験を実施した。

(2)オオミジンコの水-底質システムでの生態毒性試験（水添加）

比較的水溶解度の高い 1-Aminopyrene に関して実施した。試験操作は(1)のオオミジンコ水-底質システムでの生態毒性試験（底質添加）とほぼ同じであるが、異なる点について以下に示す。

- ① 3.3.1 に記載した方法と同様にして 1-Aminopyrene の飽和水溶液を作成した。
- ② 重量既知の 500 mL ステンレス製遠沈管にピートモス 1.2 g、カオリン 6 g、石英砂 22.8

g をあらかじめ用意しておき、そこに飽和水溶液 300 mL を加えた。

- ③ 遠沈管のふたがしっかり閉まっているのを確認し、往復振とう機で 1 時間振とうさせた。
 - ④ 遠心分離機を用い、6300 rpm (7190 G) で 20 分間遠心分離を行った。
 - ⑤ 上澄みを抜き取り、新たな飽和水溶液を加え水のみの曝露試験と同じ曝露濃度となるまで②から④の操作を水のみの曝露試験と同様の水中濃度となるように濃度区に合わせて 2~7 回繰り返し実施した。
 - ⑥ 設定した水中濃度がほぼ達成されたところで pH を調整するために炭酸カルシウム 0.3 g を加え、よく混合させ 6300 rpm (7190 G) で 20 分間遠心分離を行った。
- (1)のオオミジンコ水-底質システムでの生態毒性試験（底質添加）⑧~⑩の操作を同様に実施した。

(3)ヨコエビの水-底質システムでの生態毒性試験（底質添加）

Phenanthrene, Benzo[a]pyrene および 1-Aminopyrene に関して実施した。卒業研究では Environment Canada (2013)のヨコエビ 96 時間水相試験に準拠し、生後 1~3 日のヨコエビ個体を 2 日間馴化し、生後 3~5 日となった個体を用いたが、人工底質と同様の体色をしており、個体サイズも小さいため試験終了時に曝露した個体を見つけることが容易ではなく、行方不明となった個体が生じた。そこで本研究では、ASTM Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (ASTM, 2005)の試験条件である生後 7~14 日の個体（産仔日のばらつきは 2 日以内）を参考に、生後 1~3 日の個体を生後 11~13 日となるように馴化した個体を使用した。底質の有無による影響を見るために、水のみの試験に関しても生後 11~13 日の個体を用いて実施し、それらの毒性値と比較した。卒業研究で実施した Pyrene に関しても、生後 11~13 日の個体を用いて再検討を行った。試験操作は(1)のオオミジンコとほぼ同じであるが、異なる点について以下に示す。

- ④ 重量既知の 500 mL ステンレス製遠沈管にピートモス 2 g、カオリン 10 g、石英砂 28 g をあらかじめ用意しておき、そこに被験物質を添加した石英砂 10 g を加え全量 50 g となるようにし、脱塩素水 400 mL を加えた。
- ⑥ 振とう後、pH を調整するために炭酸カルシウム 0.5 g を加え、よく混合させた。
- ⑩ 調製した人工底質を乾燥重量で 20 g をヨコエビ試験の 1 連とするために、水を含んだ人工底質の 2/5 の量を 300 mL トールビーカーに量り取った。これを 2 連用意した。
- ⑪ 巻き上げを防ぐため人工底質に不活性のナフロンシートを敷き、底質の含水率を見込んで抜き取った水を 200 mL となるように加えた。
- ⑮ 作製した水-底質システムを用いてメッシュを入れずに、水のみの曝露試験と同様にしてヨコエビ 96 時間水相試験を実施した。

(4)ヨコエビの水-底質システムでの生態毒性試験（水添加）

比較的水溶解度の高い 1-Aminopyrene に関して実施した。試験手順は(2)のオオミジンコとほぼ同じであるが、異なる点について以下に示す。

- ② 重量既知の 500 mL ステンレス製遠沈管にピートモス 2 g、カオリン 10 g、石英砂 38 g をあらかじめ用意しておき、そこに飽和水溶液 400 mL を加えた。
- ⑩ 調製した人工底質を乾燥重量で 20 g をヨコエビ試験の 1 連とするために、水を含んだ人工底質の 2/5 の量を 300 mL トールビーカーに量り取った。これを 2 連用意した。
- ⑪ 巻き上げを防ぐため人工底質に不活性のナフロンシートを敷き、底質の含水率を見込んで抜き取った水を 200 mL となるように加えた。
- ⑮ 人工底質と水を含むスナップカップは、アルミホイルをかぶせて遮光し、一晚静置した。作製した水-底質システムを用いてメッシュを入れずに、水のみ曝露試験と同様にしヨコエビ 96 時間水相試験を実施した。

第4章 結果および考察

4.1 水のみでの曝露系での生態毒性試験

卒業研究で選定した PAHs 5 物質 (Pyrene, Fluoranthene, Anthracene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene) に加え、Phenanthrene および 1-Aminopyrene に関して実施した。濃度変化とオオミジンコでは遊泳阻害数を、ヨコエビでは死亡数を付録 (表 A-1~A-4) に示す。図 4-1 に水相中濃度 (測定値の時間加重平均濃度) とオオミジンコは 48 時間後の遊泳阻害率を、ヨコエビは 96 時間後の致死率との関係を回帰曲線とあわせて示す。また、オオミジンコの 48 時間後の遊泳阻害の半数影響濃度 (48 h-EC₅₀)、ヨコエビの 96 時間後の半数致死濃度 (96 h-LC₅₀) をまとめ、卒業研究の結果 (谷ほか、2017) とともに表 4-1 に示す。

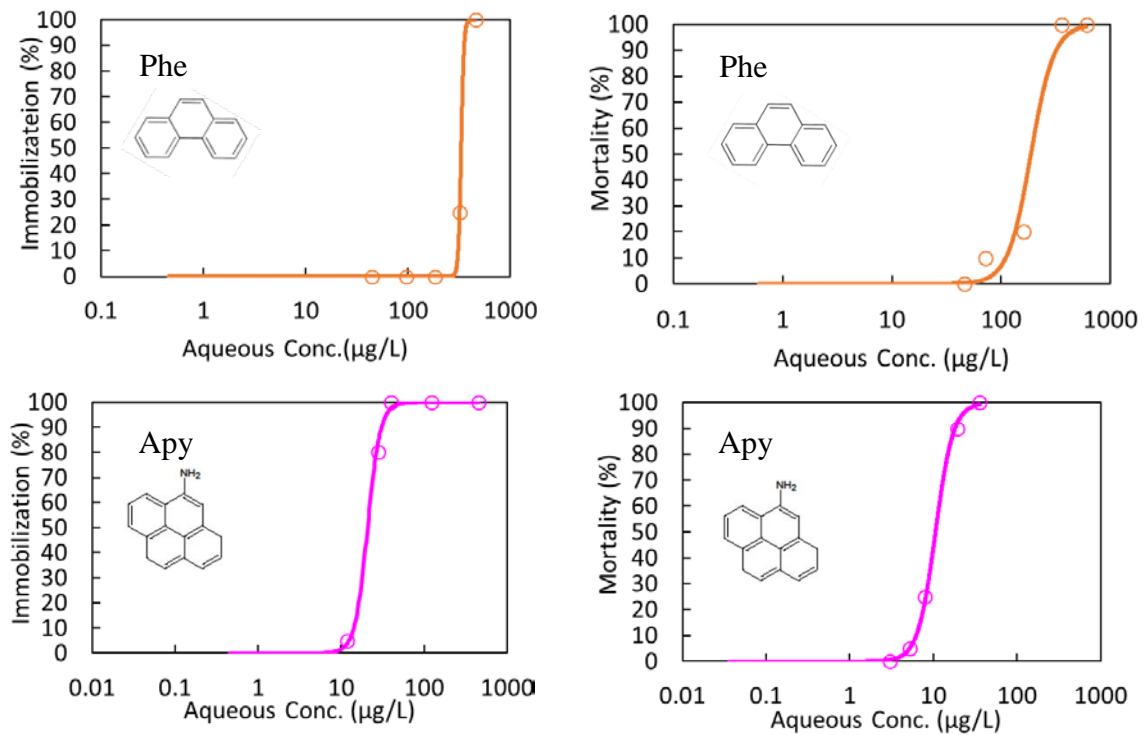


図 4-1 水のみでの曝露系での濃度-影響関係

(左図はオオミジンコ、右図はヨコエビを示す。プロットは実測値、線は回帰曲線を示す。)

表 4-1 水のみでの曝露系での生態毒性値（カッコ内は 95%信頼区間、*: 谷ほか, 2017）

		オオミジンコ 48 h-EC ₅₀ (μg/L)	ヨコエビ 96 h-LC ₅₀ (μg/L)
3 環	Anthracene*	>500	>86
	Phenanthrene	330 (300~380)	180 (160~230)
4 環	Fluoranthene*	120 (86~150)	46 (39~55)
	Pyrene*	87 (67~120)	29 (24~35)
5 環	Benzo[a]pyrene*	0.66 (0.58~0.77)	6.4 (4.7~9.4)
	Dibenz[a,h]anthracene*	>11	>8.6
Amino 誘導体	1-Aminopyrene	21 (17~24)	11 (9.0~13)

表 4-1 より、Phenanthrene, 1-Aminopyrene とともにオオミジンコよりヨコエビの方が感受性が高いことが分かった。卒業研究の結果と比較すると、3 環の Phenanthrene はより環数が多く水溶解度の低い Fluoranthene や Pyrene、Benzo[a]pyrene よりも毒性が弱かった。1-Aminopyrene に関しては、アミノ基を有しない Pyrene より両生物種ともに毒性が強くなった。Phenanthrene および 1-Aminopyrene のオオミジンコに対する EC₅₀、ヨコエビに対する LC₅₀ の毒性試験の報告値について、米国環境保護庁(USEPA)の生態毒性データベースである ECOTOX (<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>) を用いて文献の検索を行った。オオミジンコとヨコエビを用いた試験は数多く実施されているものの、曝露時間や試験のエンドポイント(オオミジンコが遊泳阻害、ヨコエビは致死)について本研究と一致しているもので、原典が入手可能なもののみを抽出した。その結果を表 4-2 に示す。

表 4-2 Phenanthrene および 1-Aminopyrene のオオミジンコ、ヨコエビに対する毒性値

	<i>D. magna</i> 既存生態毒性データ 48 h-EC ₅₀ (μg/L)	<i>H. azteca</i> 既存生態毒性データ 96 h-LC ₅₀ (μg/L)
Phenanthrene	700 (Lampi et al., 2005)*	560 (Isherwood, 2009)*
1-Aminopyrene	データなし	データなし

*: ジメチルスルホキシド(0.1%)を助剤として使用しており、測定濃度ではなく設定濃度で算出

本研究ではジメチルホルムアミド (DMF) を助剤として 0.01%使用しており、オオミジンコ、ヨコエビともに助剤対照区において影響は認められなかった。Cesnaitis et al. (2014) によるとオオミジンコの DMF の 48 h-EC₅₀ は 1000 mg/L 以上であり、本研究で利用した 0.01% (約 94 mg/L) であれば PAHs の毒性影響を大きく増強させることはないと考えられる。Lampi et al. (2005) では、助剤としてジメチルスルホキシド (DMSO) を 0.1%使用しており、この濃度レベルではオオミジンコにおいて影響が認められなかったとしている。DMSO については、環境省環境リスク初期評価による文献調査および追加試験の結果(環境省, 2016)

より、より低い濃度で影響を及ぼす可能性が指摘されている。そのため、DMSO と PAHs との複合的毒性作用により、より毒性が強くなる恐れがあるため、リスク評価には条件付き採用とされている。

また、文献では濃度測定を実施していなかった。本研究では、表 A-1~A-4 に示した 24 時間ごとの測定濃度のように Phenanthrene, 1-Aminopyrene とともに水相中濃度が試験終了時まで維持されておらず、設定濃度の半分以下になっている場合もあった。卒業研究において実施した他の PAHs についても同様の傾向が得られており、中には検出限界以下となった物質も存在した。ガラスへの吸着に関して溶媒抽出により確認したが、その割合は比較的低かった（おおよそ初期濃度の 1%以内であり、最大でも 10%を超過しないことを確認している）ことから、光分解や揮発、供試生物への吸着などが濃度減少の原因として考えられる。設定濃度より毒性値を算出している文献値では、実際に残存している濃度より高く見積もっていることが考えられ、有害影響を過小評価している可能性がある。一方で、水相中濃度が維持されていないことより、時間加重平均濃度を用いて毒性値を算出したが、水相中濃度は徐々に減少していることから、実際の影響との関連性が高い水相中濃度が必ずしも毒性値産出に利用されているかどうか確かではない。今後は、対象とする化学物質をシリコン樹脂に保持させて徐々に水中に移行させることによって水相中濃度を維持する Passive Dosing 手法の利用等（Mayer and Holmstrup., 2008, Smith et al.,2010）によって結果を比較検討するなど、より詳細な検討が必要である。

4.2 水-底質システムでの曝露試験

4.2.1 水相から底質への収着実験

予備実験により得られた水相中濃度の収着質(PAHs)が約 50%収着する収着媒(底質)量はそれぞれ Phenanthrene では 30 mg、Pyrene では 10 mg、Benzo[a]pyrene では 10 mg、1-Aminopyrene では 10 mg であった。これらの収着媒量を用いて実施した本実験の結果を付録(表 A-5~A-8)に示す。底質を含む遠沈管の水相中濃度(Replicate)から底質を含まない遠沈管の水相中濃度(Blank)を差し引いた量が底質に移行した量であるとみなし、収着等温線を作成した(図 4-2)。水中の $\mu\text{g/L}$ レベルの濃度の PAHs 等の汚染化学物質が数十 mg(遠沈管内の底質濃度は 1000 mg/L レベル)入った本研究の系のように収着媒に比べて水相中濃度が十分に低いとき、Yamamoto et al. (2009)が医薬品や Pyrene 類の土壌・底質への収着でほぼ線形である結果を示していることから、Henry 型の収着等温線が十分に当てはまると考えられる。

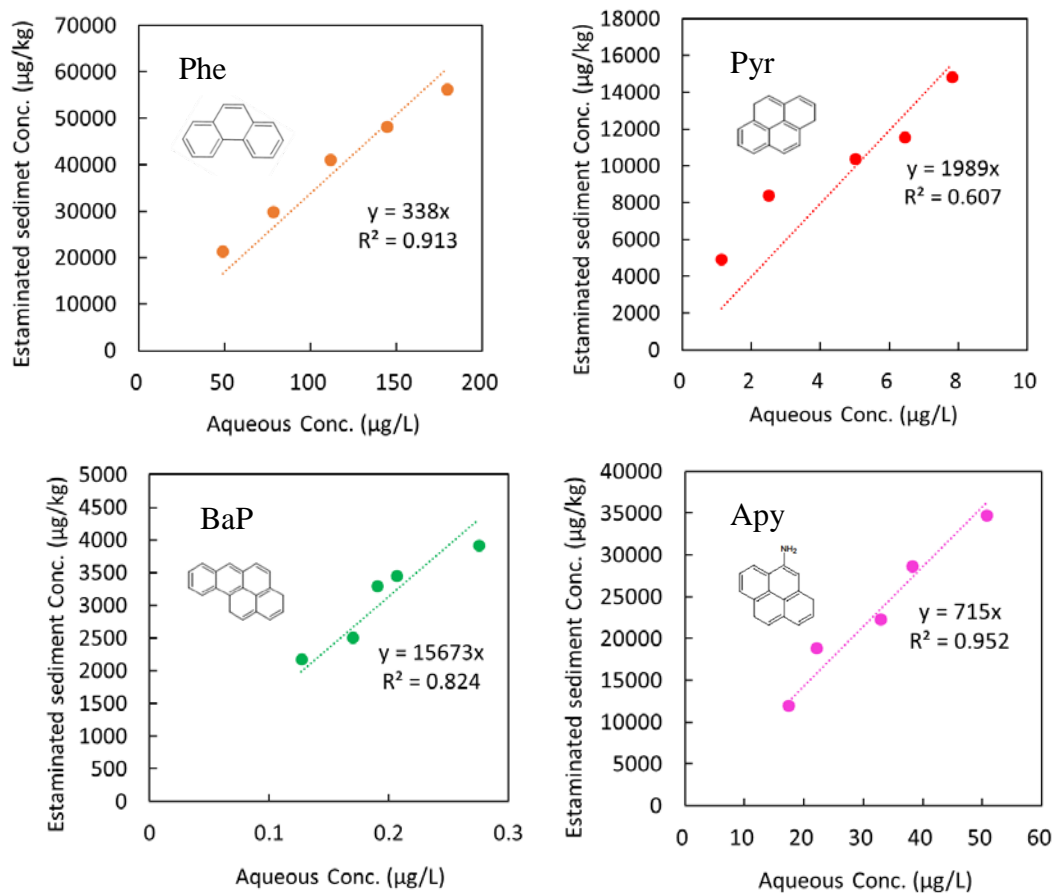


図 4-2 Phenanthrene, Pyrene, Benzo[a]pyrene および 1-Aminopyrene の収着等温線

収着係数 K_d は、 $K_d = C_s / C_w$ (C_s : 底質中の化学物質濃度、 C_w : 水相中濃度) で表されることから、収着等温線の傾き(分配係数)を K_d とした。 K_d (L/kg) はそれぞれ Phenanthrene では 3.4×10^2 、Pyrene では 2.0×10^3 、Benzo[a]pyrene では 1.6×10^4 、1-Aminopyrene では 7.2×10^2 となった。

実測により人工底質中の有機炭素分は 1.4% であったため、有機炭素含有量 $f_{oc} = 0.014$ を用いて収着係数 K_d から有機炭素/水分配係数である K_{oc} を求めると、Phenanthrene は 2.4×10^4 、Pyrene は 1.4×10^5 、Benzo[a]pyrene は 1.1×10^6 、1-Aminopyrene は 5.1×10^4 となる。Karickhoff et al. (1979) が PAHs や PCB、DDT などの無極性物質の底質への収着係数とオクタノール水分配係数との相関から導いた経験式 $\log K_{oc} = \log K_{ow} - 0.21$ と各物質の K_{oc} 、 K_{ow} の関係をみると図 4-3 のようになる。Yamamoto et al. (2009) と同様に 1-Aminopyrene に関しては直線より上部に位置し、その他の物質は直線とほぼ一致する結果となった。1-Aminopyrene はアニリンと同様の芳香族アミンであるため、 pK_a の値は 4.5 程度であり、収着実験を実施した pH 7 ではプロトンが付加された共役酸が多く存在しているわけではない。しかしながら、アミノ基は電子供与基であることが知られており、やや正に帯電している部分が存在するため、表面が負に帯電しているとされる底質との間に静電引力がはたらき、収着が促進されたことが考えられる (Yamamoto et al, 2018)。

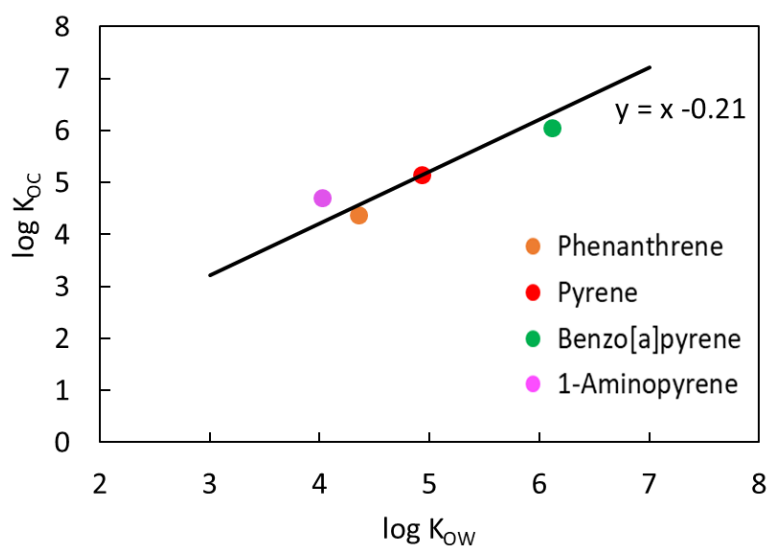


図 4-3 log K_{ow} と log K_{oc} の関係

4.2.2 底質から水相への脱着実験

底質から水相への脱着実験における水相中濃度の変化を付録(表 A-9~A-12)および図 4-4 に示す。なお、BaP に関しては 48 時間後水中濃度のデータが欠損している。

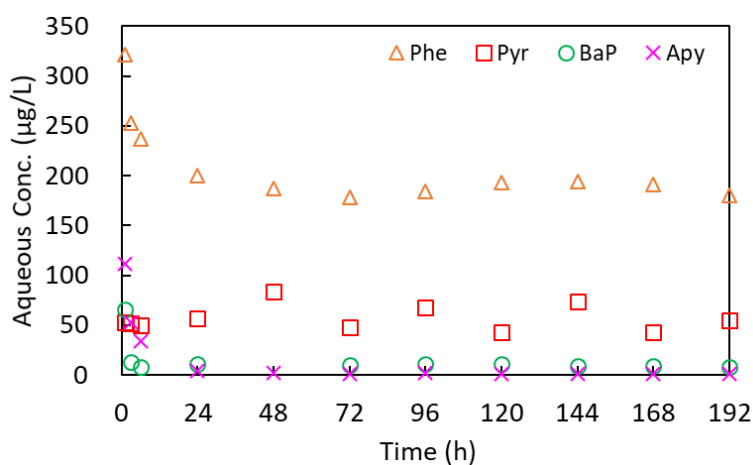


図 4-4 脱着実験における経時変化

試験を実施した全ての物質において、振とう開始 24 時間後以降は水中濃度がほぼ一定となり、24 時間以内に平衡状態に達していたと考えられる。収着実験により得られた Phenanthrene の収着係数 $K_d = 3.4 \times 10^2$ を用いて底質中濃度 C_s が 100 mg/kg のとき、水相中濃度 C_w を求めると、

$$C_w = C_s / K_d = 290 \mu\text{g/L}$$

と計算できる。同様にして Pyrene に関しては $C_w = 50 \mu\text{g/L}$ 、Benzo[a]pyrene に関しては $C_w = 6.25 \mu\text{g/L}$ 、1-Aminopyrene に関しては $C_w = 140 \mu\text{g/L}$ と計算できる。これらと脱着実験での水中濃度を比較すると、1-Aminopyrene 以外は収着係数より求めた値に近い値となった。収着実験と同様に他の PAHs が疎水性相互作用による収着が重要であるのに対して、1-Aminopyrene に関しては静電引力のような電気化学的相互作用が考えられる。また、底質中濃度の検討を実施した際にも、1-Aminopyrene 以外の物質はヘキサンを用いることで回収できたが、1-Aminopyrene はより極性の高いジクロロメタンの方が回収率は高かった。このことから、1-Aminopyrene は疎水性相互作用の寄与が他の無極性の PAHs に比べて小さいと考えられる。

4.2.3 水-底質システムでの生態毒性試験

Phenanthrene, Pyrene, Benzo[a]pyrene および 1-Aminopyrene に関して水-底質システムを作成し、生態毒性試験を実施した結果について、それぞれの各濃度での濃度-応答関係を付録(表 A-13 ~A-28)および図 4-5 に、毒性値である EC_{50} および LC_{50} 値のまとめを表 4-3 に示す。底質の有無による影響を見るために水のみでの曝露系でも生態毒性試験を実施したが、Phenanthrene および 1-Aminopyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験は 4.1 節の水のみでの曝露系での生態毒性試験に示した結果を用いた。ヨコエビに関する曝露試験においては、水のみでの曝露系では試験容器の上部から生死確認が可能であったが、水-底質システムでの曝露試験ではヨコエビの個体サイズが小さいことに加え、体色が底質とよく似ているため観察が容易ではなく、明らかに死亡している(体色が薄い赤色に変化する)と判断できない個体は試験最終日の 96 時間後に取り出し、確認することとした。

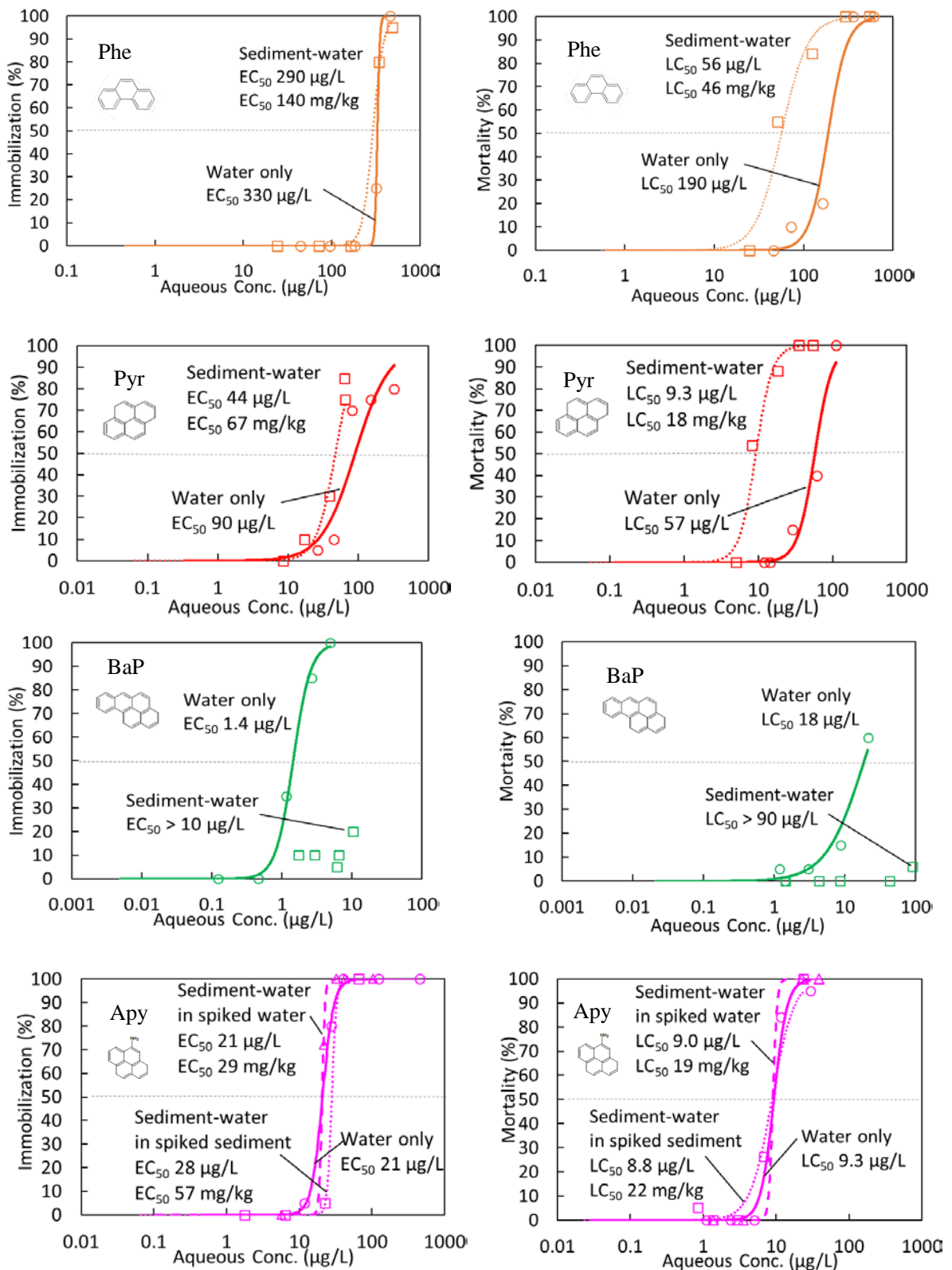


図 4-5 水-底質システムでの濃度-影響関係
(左図はオオミジンコ、右図はヨコエビを示す。プロットは実測値、線は回帰曲線を示す。)

表 4-3 水のみでの曝露試験および水-底質システムでの曝露試験の生態毒性値
(カッコ内は 95%信頼区間)

	オオミジンコ 48 h-EC ₅₀			ヨコエビ 96 h-LC ₅₀		
	水のみでの 曝露試験 (μg/L)	水-底質システムでの 曝露試験		水のみでの 曝露試験 (μg/L)	水-底質システムでの 曝露試験	
		水相中濃度 (μg/L)	底質中濃度 (mg/kg)		水相中濃 度(μg/L)	底質中濃度 (mg/kg)
Phenanthrene	330 (300~380)	290 (250~330)	140 (110~160)	190 (160~230)	56 (44~72)	46 (35~59)
Pyrene	90 (69~120)	44 (36~52)	67 (48~96)	58 (48~70)	9.2 (7.5~12)	18 (14~22)
Benzo[a] pyrene	1.4 (1.2~1.8)	>10	>240	19 (13~33)	>90	>740
1-Amino pyrene (底質添加)		28 (23~71)	140 (77~200)		8.8 (6.8~12)	54 (44~68)
1-Amino pyrene (水添加)	21 (17~24)	21 (17~24)	72 (58~88)	9.3 (7.7~11)	9.0 (5.8~14)	48 (37~62)

表 4-3 において、水のみでの曝露試験と水-底質システムでの曝露試験の 95%信頼区間が重なり合っていない(統計的に有意な差があると示唆される)のは、オオミジンコでは Pyrene および Benzo[a]pyrene、ヨコエビでは Phenanthrene、Pyrene および Benzo[a]pyrene であった。Phenanthrene および Pyrene に関しては、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値が低く(毒性が強くなった)。一方で Benzo[a]pyrene に関する水-底質システムでの曝露試験では、オオミジンコ、ヨコエビともに最高濃度まで影響が観察されなかった。さらに底質添加、水添加法を用いた 1-Aminopyrene に関する水-底質システムでの曝露試験では、水のみでの曝露試験と比べて変化は観察されなかった。

水-底質システムでの曝露試験では Benzo[a]pyrene に関しては、オオミジンコ、ヨコエビともに水のみでの曝露試験より毒性が弱くなった。McCarthy (1983)は Benzo[a]pyrene と Anthracene に関して浮遊粒子が存在する際のオオミジンコによる取り込みを調べている。その結果、Benzo[a]pyrene の浮遊粒子への収着係数は 2.2×10^5 であり、Anthracene の収着係数 5.4×10^3 と比べても約 200 倍も大きいことがわかった。McCarty(1983) は PAHs の他物質(フミン酸やミジンコの餌である酵母)への収着により、オオミジンコの生物利用性を減少させることを述べており、Benzo[a]pyrene の結果はこれを支持した。

逆に、Phenanthrene(および Pyrene の再実験)に関しては、卒業研究で Pyrene について示したのと同様に水-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。Zhang

et al (2015)によると、浮遊底質粒子(0-50, 50-100, 100-250 μm)に Pyrene を付着させオオミジンコに曝露させると、何も含まない Control に比べて毒性が強くなった。本研究で用いた人工底質に含まれるピートモス、カオリン、石英砂の粒径はそれぞれ 0.1-4 μm , 250 μm 以下, 200-800 μm であり、Zheng et al(2015) の用いた浮遊粒子の粒径と一部は一致する。また、ヨコエビに関しては底質上を移動した軌跡や、底質が腸管に詰まった状態の個体を観察した(図 4.6)。このことからオオミジンコよりもヨコエビの方が底質との接触や摂餌の機会が増えたために、オオミジンコよりも底質の寄与が大きくなったのではないかと考えられる。



(a)



(b)

図 4-6 (a)ヨコエビが底質上を移動した軌跡(谷ほか、2017 より引用)
および(b)腸管に底質が詰まった状態のヨコエビ個体

Pyrene および Benzo[a]pyrene に関しては、水のみでの曝露試験、水-底質システムでの曝露試験において体内濃度に関して検討した。試験終了時(オオミジンコでは試験開始 48 時間後、ヨコエビでは 96 時間後)、濃度区ごとにポリプロピレン(PP)製スクリーチューブに曝露個体を移し、できる限り溶液を除去した後アセトニトリル 0.5 mL とジルコニアビーズ(粒径 $3 \pm 0.2 \mu\text{m}$)3 粒をそれぞれ加えた。なお、このときの PP 製スクリーチューブへの被験物質の吸着は無視できるレベルであることは、予備実験により確認している。ビーズ破砕機(タイテック株式会社製: $\mu\text{T-12}$)を用いて 3000 rpm で 2 分間破砕操作後、15000 rpm (21130 g) で 5 分間、遠心分離(ependorf Centrifuge 5424R)を行った。清浄なガラス試験管に溶媒層を移した後、チューブにアセトニトリル 0.5 mL を加え同様の操作を行った。計 1 mL の抽出溶媒をジューエルサイエンス社製除粒子用シリンジフィルターユニット GL クロマトディスク (孔径 0.45 μm 、ポリテトラフルオロエチレン製)でろ過し、HPLC にて測定を行った。測定結果の詳細を付録(表 A-29~A-32) および図 4-7 に示す。

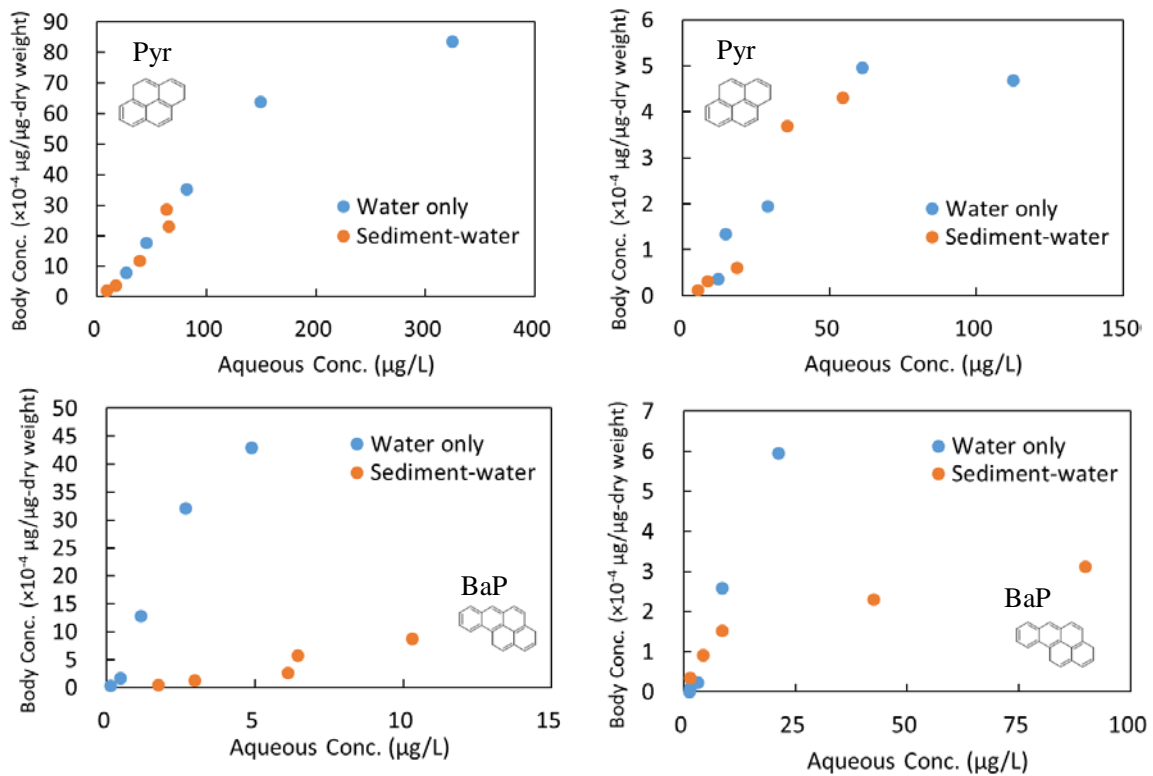


図 4-7 水相中濃度と体内濃度の関係
(左図はオオミジンコ、右図はヨコエビを示す。)

Pyrene に関しては、両生物種ともに水のみの曝露試験と水-底質システムでの曝露試験において水相中濃度と体内濃度には比例関係が確認できる。一方で Benzo[a]pyrene に関しては、比例関係が明確でなかったことに加え、水-底質システムでの曝露試験において水相中濃度が高くなっているにもかかわらず、体内濃度は非常に低いままでとどまっている。体内濃度-影響関係を図 4-8 に、体内濃度と求めた体内濃度より算出したオオミジンコの 48 h-EC₅₀ およびヨコエビの 96 h-LC₅₀ を以下の表 4-4 に示す。

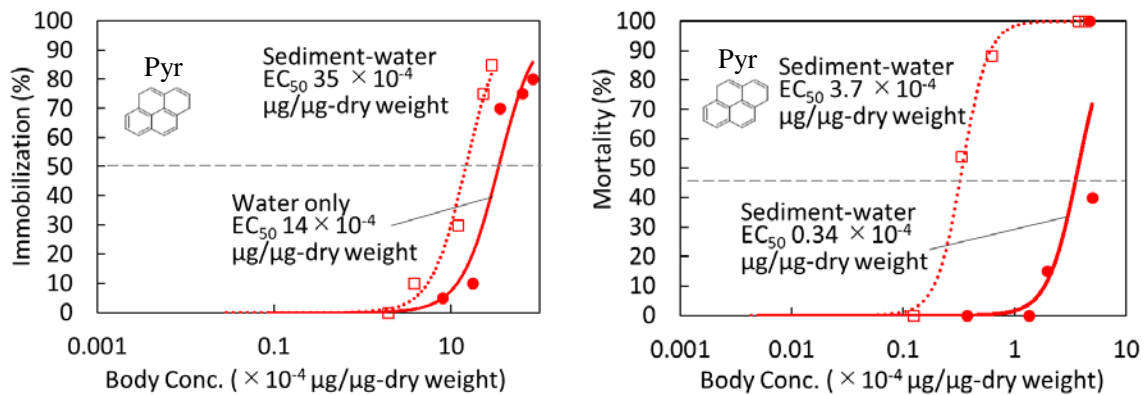


図 4-8 体内濃度-影響関係
(左図はオオミジンコ、右図はヨコエビを示す。プロットは実測値、線は回帰曲線を示す。)

表 4-4 体内濃度より求めた水-底質システムでの毒性値

	オオミジンコ 体内濃度 48 h-EC ₅₀ (×10 ⁻⁴ μg/μg-dry weight)		ヨコエビ 体内濃度 96 h-LC ₅₀ (×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
Pyrene	35 (27~44)	15 (11~19)	3.7 (3.1~4.4)	0.34 (0.26~0.42)
Benzo[a]pyrene	16 (12~20)	>8.7	8.0 (3.7~33)	>3.1

オオミジンコ、ヨコエビともに疎水性の高い(水溶性が低い)Benzo[a]pyreneの方がPyreneよりも体内に蓄積されやすいことが改めて確認できた。またPyreneに関しては、両生物種ともに水-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毒性値が小さくなり、より低濃度の蓄積量で影響を及ぼすことが明らかとなった。体内濃度は上昇させない別の何らかの経路が毒性に寄与していると考えられる。一方でBenzo[a]pyreneに関しては、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。底質に収着したBenzo[a]pyrene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。これは、詳細は後述するが、ECHAのガイダンス(2017)において、平衡分配法ではlog Kowが5を超える高疎水性のBenzo[a]pyreneのような物質は、底質の摂餌の効果が大きいためにリスクが10倍になるという、従来の考え方を否定する新たな知見と言える。

また他の生物種においても、本研究と同様にBenzo[a]pyreneの体内への蓄積が他のPAHsより少なかった例がある。Liang et al. (2007)によれば、底質にBenzo[a]pyrene等のPAHsが含まれ、それらを摂取できる環境下にあるにもかかわらず、スズキ目の魚類であるティラピア(*Oreochromis niloticus*)の体内にはBenzo[a]pyreneが蓄積されず、より分子量の少ないPhenanthrene、Anthracene、FluorantheneおよびPyreneは蓄積されていたことを報告している。Cheikyula et al. (2008)は、海産魚のマダイ(*Pagrus major*)および汽水魚のジャワメダカ(*Oryzias javanicus*)を用いてPhenanthrene、Pyrene、ChryseneおよびBenzo[a]pyreneを餌経路で曝露した際の生物体内への蓄積を調べている。マダイに関しては、Phenanthrene、Pyrene、Chryseneは肝臓と筋肉から検出されたが、Benzo[a]pyreneに関しては筋肉のみから検出された。ジャワメダカに関しては体サイズが小さいため、whole-bodyとして測定しているが、曝露開始2、5日目にはBenzo[a]pyreneは検出されたがその蓄積量は他物質より少なく、曝露10~21日間においては検出されなかった。

Pyreneに関しては、第1相反応の代謝産物である1-Hydroxypyreneに関して検討を実施した。生物体内での代謝は二つの相、第1相と第2相に分けられることが知られている。第1相は元の外来物質の変化であり、第2相の抱合反応が起こり、官能基を付け加えられる(藤田、1991)。Sigma-Aldrich社より購入した1-Hydroxypyrene(純度98%)を用いて標準試料を作製し、HPLCにて測定を行った。測定条件は、吸収波長254 nm、励起波長341 nm、蛍光波長387 nm、移動相にはアセトニトリル: MilliQ water = 60:40 (v/v%)とした。標準試料は保持時間約7.8分でピークが得られたが、オオミジンコ、ヨコエビともに抽出溶媒からはピークが検出されず検出限界(0.10 μg/L)未満であった。これは代謝が第2相まで進んでおり、硫酸抱合物、グルクロン酸抱合物またはグルタチオン抱合物となっていたことが考えられる。Ikenaka et al. (2006)は、オオミジンコの異物代謝に

に関して同様に Pyrene をモデルとし、24 時間曝露を行ったところ Pyrene は 1-Hydroxypyrene を形成した後、硫酸抱合を受け 1-Hydroxypyrenesulfate に変換されると考えられ、代謝された Pyrene のうち 52% が 1-Hydroxypyrenesulfate に、73% 以上が 1-Hydroxypyrene 複合体に生体内変換されたと述べている。

McCarthy et al. (1985) は Benzo[a]pyrene のほかに 4 環の Benzanthracene、3 環の Anthracene に関して溶存腐植物質 (DHM) への結合および解離について調べ、それぞれの結合親和力 (P_a) は DHM 濃度の減少につれてわずかに減少すると述べている。特に DHM への Benzo[a]pyrene の結合に関しては可逆的であり、その可逆性の程度は収着時間とは無関係であるとしている。2.5 mg C/L の DHM へ結合した Benzo[a]pyrene と結合していない Benzo[a]pyrene の比から求められた Benzo[a]pyrene の収着係数は、 1.8×10^6 、脱着係数は 2.2×10^6 であった。また DHM への収着係数 ($K_{DHM} = F_0/F$, F_0 : 水中に溶存した割合, F : DHM へ収着した割合) と K_{OW} には次の経験式が成り立つとしている。

$$\log K_{OW} = 0.48 + 0.97 \log K_{DHM}$$

Benzo[a]pyrene の $\log K_{OW} = 6.11$ より、 K_{DHM} は表 4-5 のように計算できる (K_d と単位はそろえている) 同様にして Phenanthrene、Pyrene に関して求めた。 K_{DHM} との差は Phenanthrene では約 29 倍、Pyrene では約 20 倍であり、Benzo[a]pyrene の 390 倍ほど大きくない。

表 4-5 K_d および K_{DHM} の関係

	K_d (L/kg: 人工底質への収着係数)	K_{DHM} (L/kg C: 溶存腐植物質への収着係数)	K_{DHM} / K_d
Phenanthrene	3.4×10^2	9.8×10^3	29
Pyrene	2.0×10^3	3.9×10^4	20
Benzo[a]pyrene	1.6×10^4	6.2×10^5	39
1-Aminopyrene	7.2×10^2	4.5×10^3	6.3

また、DHM に収着した PAHs を C_{bind} 、水相中に溶存した PAHs を C_{free} とすると、

$$K_{DHM} = \frac{[C_{bind}]}{[C_{free}][DHM]}$$

で表される。また DHM に収着した割合は、

$$\text{DHM に収着した比率 (\%)} = \frac{[C_{bind}]}{[C_{free}] + [C_{bind}]} \times 100$$

と示されることより、以下の式が導き出せる。

$$\text{DHM に収着した比率 (\%)} = \frac{K_{DHM}[DHM]}{1 + K_{DHM}[DHM]} \times 100$$

島津製作所製全有機炭素計 (TOC) を用いて、オオミジンコおよびヨコエビの水-底質システムでの曝露試験の溶存有機炭素 (DOC) を測定したところ、オオミジンコでは 10 mg C/L、ヨコエビでは 8.0 mg C/L であった。なお、物質による DOC の変化は認められなかった。DOC の測定は、550 °C のオープンで 1 時間加熱したグラスファイバー (GF/F, Whatman 社製) で上層水をろ過し、そのろ液を DOC が含まれると仮定し、測定を行った。DOC が上記の式において DHM に値すると仮定し、DOC に収着した割合を求めると、表 4-6 のようになる。両生物種ともに Benzo[a]pyrene において DOC への収着割合が高くなっていることがわかる。

底質存在下において水中に溶存した Benzo[a]pyrene の割合は他物質より少ないと推測され、水中に溶存した Benzo[a]pyrene が多く存在していた水のみでの曝露試験より、底質の存在により毒性が低減したとも考えられる。さらに溶存有機物に収着した Benzo[a]pyrene を生物が摂取したとしても、浮遊粒子に強く吸着しているために、Phenanthrene や Pyrene よりも生物体内での利用が抑制されたと考えられる。しかしながら、McCarthy et al. (1985) の用いた溶存腐植物質は Aldrich Chemical Co. から入手された泥炭由来の疎水性・芳香性の高いフミン酸であり、本研究とは性質等が異なるため一概には言えないが、疎水性が強く K_d も大きかった Benzo[a]pyrene が他の PAHs より溶存有機物への吸着が大きくなることは明確に示している。

表 4-6 DOC へ収着した割合

	オオミジンコの水-底質システムに おける (DOC 10 mg C/L) DOC への収着割合 (%)	ヨコエビの水-底質システムに おける (DOC 8 mg C/L) DOC への収着割合 (%)
Phenanthrene	8.9	7.2
Pyrene	28	24
Benzo[a]pyrene	86	84
1-Aminopyrene	4.3	3.4

4.3 平衡分配法による推定値と水-底質システムでの毒性試験結果との比較

水生生物の毒性値より換算する底質-水平衡分配法では、以下の基本式を用いて底質中濃度が換算される。

$$C_s = C_w \times K_d = C_w \times K_{oc} \times f_{oc}$$

(K_d : 底質/水分配係数 K_{oc} : 有機炭素/水分配係数 f_{oc} : 底質中の有機炭素量)

Phenanthrene に関して、オオミジンコの水のみでの曝露試験によって得られた 48-h EC_{50} =330 μ g/L、

収着実験により得られた $K_d=3.4 \times 10^2$ 、Karickhoff et al. (1979) が導いた経験式 $\log K_{oc}=\log K_{ow}-0.21=4.1$ 、 $f_{oc}=0.014$ を用いて換算すると、実測した K_d より算出した場合は $C_s=110$ mg/kg、予測した K_{oc} 、 f_{oc} より求めた場合 $C_s=64$ mg/kg と計算できる。一方で水-底質システムでの曝露試験により得られた Phenanthrene に関するヨコエビの底質中 96 h-LC₅₀=46 mg/kg であった。同様に Pyrene、Benzo[a]pyrene および 1-Aminopyrene に関しても算出した(表 4-7)。Phenanthrene、Pyrene どちらにおいても水-底質システムでの曝露試験により得られたヨコエビの底質中の毒性値よりも平衡分配法より求めた値の方が大きな値となった。このことから底質-水平衡分配法では Phenanthrene、Pyrene のヨコエビへの影響を過小評価する恐れがあることが考えられる。

底質の存在により毒性が弱くなった Benzo[a]pyrene は、 $\log K_{ow}$ が 5 以上であるため、平衡分配法より求めた値を 10 で除すること求められる。平衡分配法より求めた値の方がヨコエビの底質中の毒性値よりも小さな値となった。このことから底質-水平衡分配法では Benzo[a]pyrene のヨコエビへの影響を過大評価する恐れがあることが考えられるが、これは安全側(厳しい毒性値により環境保全側の保守的な値)に見積もっているため十分にヨコエビを保護できると考えられる。Benzo[a]pyrene に関しては水のみでの曝露試験において、ヨコエビよりオオミジンコの方が感受性が約 10 倍高かったため、ヨコエビの毒性値よりも低く見積もることが可能であったと考えられる。

底質の有無による毒性値に変化が観察されなかった 1-Aminopyrene に関しても、ヨコエビの底質中の毒性値よりも平衡分配法より求めた値の方が小さな値となり、Benzo[a]pyrene と同様に説明できる。

表 4-7 底質-水平衡分配法により算出した毒性値と
水-底質システムでの曝露試験より得られた毒性値の比較

	底質-水平衡分配法より算出 C_s (mg/kg)	水-底質システムでの曝露試験より 得られたヨコエビの毒性値 C_s (mg/kg)
Phenanthrene	K_d より算出: 110 K_{oc} , f_{oc} より算出: 64	46
Pyrene	K_d より算出: 180 K_{oc} , f_{oc} より算出: 66	18
Benzo[a]pyrene	K_d より算出: 220 K_{oc} , f_{oc} より算出: 160	>720
1-Aminopyrene	K_d より算出: 15 K_{oc} , f_{oc} より算出: 1.9	54 (底質添加法) 48 (水添加法)

4.4 今後の課題

化学物質の平衡分配を仮定して水生生物の毒性値から底質毒性を推定する底質-水平衡分配法が国内外で広く使用されている。しかしながら、Phenanthrene や Pyrene のように平衡分配法では過小評価となり、適切に評価できない物質が存在する一方で、1-Aminopyrene のように過大評価となり、安全側に見積もる物質も存在した。さらに疎水性の高い Benzo[a]pyrene に関しては Phenanthrene や Pyrene より底質に吸着されることより、底質の存在により毒性が強くなると予測されるが、得られた結果では底質の存在により毒性が弱くなるという異なる結果が得られた。ECHA の

ガイダンス (2017) やそれを模範としている化審法の有害性評価(2014)において、 $\log K_{ow}$ が 5 以上の高疎水性物質は平衡分配法より求めた値を 10 で除して(底質からの曝露の寄与が 10 倍増大すると推定される) 導出することが求められている。このように、底質-水平衡分配法の適用可能な化学物質の領域については限界があり、一部では誤解されている恐れがある。そのため、この適用範囲特定のための検討が必要があると考えられる。

近年、シリコン樹脂であるポリジメチルシロキサン(PDMS)製の Passive dosing デバイスを用いて、PAHs 等の難水溶性物質の水生生物への毒性試験に利用可能性を検討する議論がなされ、OECD の有害性評価困難物質の水中での毒性試験に関するガイダンス文書 No. 23 (OECD, 2018) にも新たに記載された。Smith et al. (2010) は PDMS 製 Passive dosing デバイスは 10 週間以上にわたって安定した濃度を維持することを明らかにし、48 時間オオミジンコ急性遊泳阻害試験への適用可能性を検討したところ、PAHs の水相中濃度は水溶解度付近まで達することを証明した。Noguchi et al. (2017) は、Passive dosing 手法を用いて 4 環 PAH である Pyrene に関して 48 時間水相中濃度の維持と、オオミジンコ遊泳阻害試験への有用性を検討している。Passive dosing 手法を用いた場合、オオミジンコ遊泳阻害試験の試験終了時には試験開始時の 85~97% の水相中濃度が維持されていた。本研究において Pyrene に注目すると、水のみでの曝露系でのオオミジンコ遊泳阻害試験の試験開始時から試験終了後までの濃度維持率は 46~67%、ヨコエビ 96 時間水相試験では 19~33% (試験開始 48 時間後では 44~57%) であった。水相中濃度の維持率に関しては、DMF を用いた従来の助剤添加法よりも Passive dosing 手法の方が優れているが、Passive dosing 手法では試験容器底面に付着させた PDMS 樹脂にミジンコが張り付き死亡するという物理的影響も観察されているため、更なる検証が必要であると考えられる。

第5章 結論

5.1 本研究のまとめ

本研究では、難水溶性の環境汚染化学物質として研究例の多い多環芳香族炭化水素類 (PAHs)のうち、3環の Phenanthrene、4環の Pyrene、5環の Benzo[a]pyrene および Pyrene のアミノ誘導体である 1-Aminopyrene の4種類について、水生生物であるオオミジンコと底生生物であるヨコエビの生態毒性値の違いや、収・脱着や生物体内濃度に着目した底質の有無による毒性影響の違いを検証した。

水のみでの曝露試験では Phenanthrene および 1-Aminopyrene とともにオオミジンコよりヨコエビの方が影響濃度は低くなった。谷ほか (2017) の結果と比較すると、3環の Phenanthrene はより環数が多く水溶解度の低い4環の Fluoranthene や Pyrene、5環の Benzo[a]pyrene よりも毒性が弱かった。アミノ基を有する 1-Aminopyrene に関しては、Pyrene より両生物種ともに毒性が強くなった。

底質と水を含む水-底質システムでの曝露試験では、Phenanthrene、Pyrene に関してはオオミジンコ、ヨコエビともに水のみでの曝露試験より影響濃度が低く毒性が増強する傾向が認められ、特にヨコエビについてその影響が大きく、Phenanthrene では3.4倍、Pyrene では6.1倍の増強がみられた。ヨコエビに関しては底質上を移動した軌跡や、底質が腸管に詰まった状態の個体を観察したことから、オオミジンコよりもヨコエビの方が底質との接触や摂餌の機会が増えたために、オオミジンコよりも底質の寄与が大きくなったのではないかと考えられる。一方で、疎水性が高く収着係数が最も大きかった Benzo[a]pyrene に関しては、両生物種ともに影響が観察されなかった。さらに 1-Aminopyrene に関して底質添加法、水添加法を用いた水-底質システムでの曝露試験では、水のみでの曝露試験と比べて変化は観察されなかった。

Pyrene と Benzo[a]pyrene について体内濃度から毒性値を求めると、Pyrene に関しては両生物種ともに水-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有意に毒性値が小さくなり、底質の寄与が大きかったことが分かった。一方で Benzo[a]pyrene に関しては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。このことから、底質に収着した Benzo[a]pyrene 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逆に毒性が弱くなったとも考えられ、従来の極端に高疎水性の log Kow が5を超える物質については、底質からの摂餌の影響が極端に高くなることを想定した欧州の底質リスク評価のガイダンスでの平衡分配法での仮定に反する結果が示唆された。

水生生物の毒性値から平衡分配を用いて底質中の毒性値を換算する底質-水平衡分配法では、Phenanthrene、Pyrene に関してはヨコエビへの影響を過小評価していた一方で、Benzo[a]pyrene、1-Aminopyrene については影響を過大評価することで安全側に見積もっていた。ただし Benzo[a]pyrene については、オオミジンコの方がヨコエビより感受性が高かったことや、底質の存在によって毒性が逆に低減したために、このように安全側に見積もることが可能であったと推定される。このように底質-水平衡分配法で適切に評価できる物質とできない物質が存在し、その妥当性を判断するためには更なる検証が必要である。

5.2 今後の課題

水中で生物を用いた毒性試験を実施する際には、水のみでの曝露系では光分解や生物への吸着、揮発等により難水溶性物質である PAHs の水相中濃度を維持することは容易ではなく、底生生物はおろか水生生物への影響を正しく判断することも容易ではない。今後、対象とする難水溶性化学物質をシリコン樹脂に保持させて徐々に水中に移行させることによって水相中濃度を維持する Passive Dosing 手法 の利用等を比較検討することで、水中濃度維持をはかり、この不確実性をなくすなど、PAHs の水中での有害性を正しく把握するための工夫や検証が必要である。

水-底質システムでの曝露試験では、底生生物であるヨコエビが底質上を移動・仙窟するだけでなく、腸管に底質が詰まった状態の個体(底質を摂餌した)を確認したが、水生生物とは異なる曝露経路である底質との接触および摂餌が、それぞれヨコエビにどの程度寄与したのかを定量的に明らかにすることはできなかった。曝露経路の寄与率が確かとなることで、化学物質の水・底質間の動態や、生物利用性が明らかになると期待される。放射性同位元素や蛍光色素・ビーズ等の利用によって、難水溶性物質の水-底質システムでの挙動運命の解明や、底生生物への曝露経路をより明確化することが求められる。

PAH のうち、3 環の Phenanthrene や 4 環の Pyrene のように、平衡分配法では底質毒性が過小評価となり、適切に評価できない物質が存在する一方で、1-Aminopyrene のように過大評価となり、安全側に見積もる物質も存在した。さらに疎水性の高い Benzo[a]pyrene に関しては、Phenanthrene や Pyrene より底質に強く吸着されることにより、底質を介して底生生物に取り込まれやすくなることで毒性が強くなると予測されたものの、本研究で得られた結果では底質の存在により毒性が逆に弱くなるという異なる結果が得られた。このように底質-水平衡分配法により評価可能である化学物質の範囲は限定的であり、高疎水性物質が必ずしも底質毒性が増強されるというわけでもない。この平衡分配法の妥当性を判断するには、更なる検討が必要である。また K_{oc} および f_{oc} より算出する底質中の毒性値と、実測した K_d より算出した底質中の毒性値は大きく異なっていた。これは、底質分配法で仮定している底質と実際の底質の組成が異なることに起因している。そのため、底質の物理化学的な性質が化学物質の底質への取着性に大きく影響することから、生物利用可能性や毒性を支配する重要な要因を見出し、補正をおこなう手法を確立することが非常に重要となってくる。

以上のことから、底質リスク評価には物質や曝露経路等、更なる検討が必要な事項が多く残っており、継続した調査研究が求められる。

参考文献

- ASTM (2005): Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates.
- Boxall A.B.A., Maltby L (1997): The Effects of Motorway Runoff on Freshwater Ecosystems: 3. Toxicant Confirmation., *Environ. Contam. Toxicol.* 33, 9-16.
- Cesnaitis R., Sobanska M. A., Versonnen B., Bonnomet V., Tarazona J. and Coen W. D. (2014): Analysis of the Ecotoxicity Data Submitted within the Framework of the REACH Regulation. Part 3. Experimental Sediment Toxicity Assays., *Science of the Total Environment*, 475, 116-122.
- Chapman P.M., Wang F., Germano J.D. and Batley G. (2002): Pore Water Testing and Analysis: the Good, the Bad, and the Ugly., *Marine Pollution Bulletin*, 44, 359-366.
- Cheikyula J.O., Koyama J., Uno S. (2008): Bioaccumulation of dietary polycyclic aromatic hydrocarbons and EROD induction in the red sea bream and Java medaka., *Japan Environ. Toxicol.*, 11, 99-115.
- Chemical Abstract Service, <https://www.cas.org/products/scifinder>
- Chiou C.T., Porter P.E., Schmedding D.V. (1983): Partition Equilibria of Nonionic Organic Compounds between Soil Organic matter and Water., *Environ. Sci. Technol.*, 17, 231-237.
- ECHA (2017): Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance Version 4.0
- Environment Canada (2013): Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment and Water Using the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca*.
- Ikenaka Y., Eun H., Ishizaka M., and Miyabara Y. (2006): Metabolism of Pyrene by Aquatic Crustacean, *Daphnia magna*., *Aquatic Toxicol.*, 80, 158-165.
- Ingersoll C.G., Ivey C.D., Brunson E.L., Hardesty D.K. and Kemble N.E. (2000): Evaluation of Toxicity: Whole-sediment Versus Overlying-water Exposures with Amphipod *Hyalella azteca*., *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2906-2910.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (2018): <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> (checked on January 25, 2019)
- Isherwood D. M. (2009): Photoinduced Toxicity of Metals and PAHs to *Hyalella azteca*: UV-Mediated Toxicity and Effects of Their Photoproducts., *Univ. of Waterloo*.
- Karickhoff S.W., Brown D.S., Scott T.S. (1978): Sorption of Hydrophobic Pollutants on Natural Sediment., *Water Res.*, 13, 241-248.
- Krein A. and Schorer M. (2000): Road Runoff Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and its Contribution to River Sediments. *Elsevier Sci.*, 34, 4100-4115.
- Lampi M.A., Gurska J., McDonald K.I.C., Xie F., Huang X., Dixon D., Greenberg B.M. (2005): Photoinduced Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to *Daphnia magna*: Ultraviolet-mediated Effects and the Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Photoproducts., *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 1079-1087.
- Liang Y., Tes M.F., Young L., Wong M.H. (2007): Distribution Patterns of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Sediments and Fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong.,

Water Res., 41, 1303-1311.

Mayer P., Holmstrup M. (2008): Passive Dosing of Soil Invertebrates with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Limited Chemical Activity Explains Toxicity Cutoff., Environ. Sci. Technol., 42, 7516-7521.

McCarthy J.F and Jimenez B.D. (1985): Interactions between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dissolved Humic Material: Binding and Dissociation., Environ. Sci. Technol., 19, 11, 1072-1076.

McCarthy J.F. (1983): Role of Particulate Organic Matter in Decreasing Accumulation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by *Daphnia magna*., Environ. Contam. Toxicol., 12, 559-568.

Nebeker A.V., Onjukka S.T., Cairns M.A. and Krawczyk D.F. (1986) Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment., Environ. Toxicol. Chem., 5, 933-938.

Noguchi M., Watanabe H., Tani K., Tatarazako N., Yamamoto H. (2017): Can Passive Dosing be the Alternative to Carrier Solvent or Water-soluble Fraction Method in Testing Poorly Water-soluble Substances? , Society of Environ. Toxicol. and Chem. North America 38th Annual meeting, Poster presentation

OECD (2000): OECD Guidelines for The Testing of Chemicals No.106. Adsorption-Desorption using a batch equilibrium method.

OECD (2004, a): OECD Guidelines for The Testing of Chemicals No.218 Sediment-Water *Chironomid* Toxicity Test Using Spiked Sediment.

OECD (2004, b): OECD Guidelines for The Testing of Chemicals No.219 Sediment-Water *Chironomid* Toxicity Test Using Spiked Water.

OECD (2004, c): OECD Guidelines for The Testing of Chemicals No.202. *Daphnia* sp. Acute immobilisation test.

OECD (2018): OECD Series on testing and assessment No.23 Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures.

Schwarzenbach R.P., Geschwend P.M., Imboden D.M. (1992): Environmental Organic Chemistry., Wiley Interscience, 255-262.

Schwarzenbach R.P., Wesrall J. (1981): Transport of Nonpolar Organic Compounds from Surface Water to Groundwater. Laboratory Sorption Studies., Environ. Sci. Technol., 15, 1360-1367.

Smith K., Dom N., Blust R., Mayer P. (2010): Controlling and Maintaining Exposure of Hydrophobic Organic Compounds in Aquatic Toxicity Tests by Passive Dosing., Aquatic Toxicol. 98, 15-24.

Suedel B.C., Rodgers J.H. and Clifford P. (1992): Bioavailability of Fluoranthene in Freshwater Sediment Toxicity Tests., Environ. Toxicol. Chem., 12, 155-165.

Verrhiest G., Clement B. and Blake G. (2001): Single and Combined Effects of Sediment-associated PAHs on Three Species of Freshwater Macroinvertebrates., Ecotoxicol., 10, 363-372.

Violet M., Miguel T., Erika S., Mirella G., Garcia R. (2010): Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Urban Atmosphere of Mexico City., Air Pollution, 17, 75-98.

Yamamoto H., Nakamura Y., Moriguchi S., Nakamura Y., Honda Yuta., Tamura I., Hirata Y., Hayash,

A., Sekizawa J. (2009): Persistence and Partitioning of Eight Selected Pharmaceuticals in Aquatic Environment: Laboratory Photolysis, Biodegradation, and Sorption Experiments., *Water Res.*, 43, 351-362.

Yamamoto H., Takemoto K., Tamura I., Shin-oka N., Nakano T., Nishida M., Moriguchi S. and Nakamura Y. (2018): Contribution of Inorganic and Organic Components to Sorption of Neutral and Ionizable Pharmaceuticals by Sediment/soil., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 7250-7261.

Zhang W, Zhang S, Wan C, Yue D, Ye Y, Wang X. (2008): Source Diagnostics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Road Runoff, Dust, Rain and Canopy Throughfall., *Environ. Pollution.*, 153, 594-601.

Zhang X., Xia X., Li H., Zhu B., and Dong J. (2015): Bioavailability of Pyrene Associated with Suspended Sediment of Different Grain Sizes to *Daphnia magna* as Investigated by Passive Dosing Devices., *Environ. Sci. Technol.*, 49, 10127-10135.

イー・アール・エム株式会社 (2014) : 化学物質安全対策「諸外国における多環芳香族炭化水素規制に関する動向調査」報告書

藤田正一 (1991) : 毒性学入門 毒性発現機構への生化学的アプローチ、技報堂出版株式会社、39-51.

加茂将史、林岳彦 (2011) : 金属の生態毒性予測モデル : Biotic Ligand Model の発展史と展望、環境毒性学会誌、14 (1) 、25-23.

環境省 (2016) : 化学物質の環境リスク評価 第14巻

環境省 (2016) : 化学物質環境実態調査—化学物質と環境

北原文雄 (1994): 界面・コロイド化学の基礎、講談社、68-79.

国立環境研究所 (2013) : 環境儀 No.50, 4.

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 III. 生態影響に関する有害性評価 Ver.1.0

生態影響試験ハンドブック (2003)、日本環境毒性学会、朝倉書店、107-109.

菅谷芳雄 (2005) : ユスリカを用いた底質毒性試験法に関する国内での検討、環境毒性学会誌、8(2), 49-54.

谷和音、渡部春奈、野口愛、鎌迫典久、山本裕史 (2017) : 水・底質システムにおけるオオミジンコ (*Daphnia magna*) とヨコエビ (*Hyalella azteca*) を用いた生態毒性試験の感受性比較、第51回日本水環境学会講演要旨集、675.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々に多大なご支援とご協力を賜りました。

指導教官の山本裕史准教授にはご多忙の中、ゼミや研究報告に関して、熱心かつ丁寧にご指導していただきました。私の振る舞いからたくさんのご迷惑をおかけしたにもかかわらず、日々励ましてくださり、学部時代から現在に至るまで4年間やり遂げることができました。様々な学会に参加したり、国立環境研究所にてたくさんの方々と交流したりと、とても貴重な経験をたくさんさせていただいたと同時に、山本先生の人望の厚さを実感いたしました。山本先生が居なければ、今の私は存在しておらず、山本先生の学生として研究に邁進できたことを誇りに思います。心から感謝申し上げます。

副査の奈良一秀教授には本論文をご精読いただき有用なコメントを頂きました。深く感謝いたします。

自然環境学専攻の先生方には、様々なアイデアやこれからの研究課題についてご指摘いただきました。感謝致します。同研究室の山田陽希さんとは、たわいもない話をし、元気づけられました。ありがとうございました。

国立環境研究所の皆様には、研究に関して多くのことをご教授いただきました。また心身ともに相談に乗っていただき、苦しい時も立ち向かうことができました。ありがとうございました。

つくばで研究をすることを応援し、いつも見守ってくれた家族に心より感謝します。

本研究をやり遂げることができたのは、このように多くの方々の支えがあったおかげです。ここに深い感謝の意を示します。

Appendix

表 A-1 Phenanthrene に関するオオミジンコ 48 時間急性遊泳阻害試験の
濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h			24 h	48 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0
DMF	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0
100	77.9	38.6	26.5	44.1	20	0	0
200	173	87.3	49.9	96.0	20	0	0
400	345	156	101	182	20	0	0
800	536	317	147	319	20	4	5
1600	942	340	310	458	20	15	20

表 A-2 Phenanthrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	死亡数(匹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			24 h	48 h	72 h	96 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0	0	0
DMF	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	1	1	1
100	84.2	54.2	30.3	23.2	17.1	39.0	20	0	0	0	0
200	156	106.0	62.7	48.1	33.4	76.8	20	0	0	1	1
400	292	208	131	106	72.0	155	20	0	4	4	5
800	782	449	275	218	145	400	20	1	14	20	20
1600	1129	743	398	398	265	738	20	5	20	20	20

表 A-3 1-Aminopyrene に関するオオミジンコ 48 時間急性遊泳阻害試験の
濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h			24 h	48 h
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	20	0	0
DMF	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	20	0	1
12.5	45.1	6.48	2.04	11.9	20	0	1
25	95.5	17.5	4.36	27.7	20	0	16
50	49.0	55.7	11.1	40.0	20	12	20
100	94.6	161	90.8	124	20	20	20
200	711	437	273	456	20	20	20

表 A-4 1-Aminopyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	死亡数(匹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			24 h	48 h	72 h	96 h
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	20	0	0	0	1
DMF	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	20	0	1	1	1
6.25	7.09	3.04	3.02	1.95	1.57	3.00	21	0	0	0	0
12.5	14.7	4.47	6.40	3.11	1.96	5.25	20	0	1	1	1
25	24.3	7.05	8.92	4.36	2.68	7.92	20	1	1	1	5
50	49.0	18.2	21.2	13.2	5.82	19.2	20	1	7	17	18
100	94.6	33.2	43.5	21.3	10.5	35.8	20	4	15	20	20

表 A-5 Phenanthrene に関する収着実験前後の水相中濃度と底質中濃度

水相中濃度 ($\mu\text{g/L}$)					
初期濃度	181	272	362	453	543
24 h Blank	177	258	358	434	517
24 h Replicate-1	49.3	78.2	115	147	181
24 h Replicate-2	48.3	78.3	108	142	178
底質中濃度 ($\times 10^3 \mu\text{g/kg}$)					
24 h Replicate-1	21.3	30.0	40.6	47.9	56.0
24 h Replicate-2	21.5	29.9	41.6	48.6	56.5

表 A-6 Pyrene に関する収着実験前後の水相中濃度と底質中濃度

水相中濃度 ($\mu\text{g/L}$)					
初期濃度	23.6	35.4	47.2	58.9	70.7
24 h Blank	11.0	19.3	25.8	29.6	37.4
24 h Replicate-1	1.10	2.43	4.99	7.23	7.39
24 h Replicate-2	1.16	2.56	5.02	5.68	8.22
底質中濃度 ($\times 10^3 \mu\text{g/kg}$)					
24 h Replicate-1	4.95	8.43	10.4	11.2	15.0
24 h Replicate-2	4.92	8.37	10.4	12.0	14.6

表 A-7 Benzo[a]pyrene に関する収着実験前後の水相中濃度と底質中濃度

水相中濃度 (µg/L)					
初期濃度	0.749	0.899	1.05	1.20	1.35
24 h Blank	0.563	0.672	0.850	0.897	1.06
24 h Replicate-1	0.183	0.170	0.210	0.213	0.275
24 h Replicate-2	0.127	0.189	0.190	0.207	0.378
底質中濃度 ($\times 10^3$ µg/kg)					
24 h Replicate-1	1.9	2.51	3.20	3.42	3.92
24 h Replicate-2	2.18	2.41	3.30	3.45	3.41

表 A-8 1-Aminopyrene に関する収着実験前後の水相中濃度と底質中濃度

水相中濃度 (µg/L)					
初期濃度	403	604	805	1000	1210
24 h Blank	40.3	59.5	78.8	99.1	120
24 h Replicate-1	21.5	21.9	35.0	37.3	53.3
24 h Replicate-2	13.4	22.4	30.7	38.9	48.2
底質中濃度 ($\times 10^3$ µg/kg)					
24 h Replicate-1	9.97	19.0	21.3	29.1	33.5
24 h Replicate-2	14.0	18.7	23.5	28.3	36.0

表 A-9 Phenanthrene に関する脱着実験における経時変化

時間 (h)		1	3	6	24	48	72	96	120	144	168	192
水中濃度 (µg/L)	Replicate1	386	242	233	196	171	183	183	217	184	185	168
	Replicate2	256	264	241	204	204	173	186	170	203	197	192
	平均	321	253	237	200	187	178	184	193	194	191	180

表 A-10 Pyrene に関する脱着実験における経時変化

時間 (h)		1	3	6	24	48	72	96	120	144	168	192
水中濃度 (µg/L)	Replicate1	39.0	46.0	46.6	54.4	85.9	47.8	54.2	38.5	61.3	36.5	64.5
	Replicate2	66.2	56.7	53.2	58.7	81.9	48.2	81.4	47.9	85.5	49.2	45.2
	平均	52.6	51.4	49.9	56.5	83.9	48.0	67.8	43.2	73.4	42.9	54.8

表 A-11 Benzo[a]pyrene に関する脱着実験における経時変化

時間 (h)		1	3	6	24	72	96	120	144	168	192
水中濃度 (µg/L)	Replicate1	69.1	18.0	10.3	12.3	8.02	13.2	9.18	7.88	9.22	8.88
	Replicate2	61.5	7.80	5.38	9.01	12.5	8.12	13.2	9.20	9.40	7.28
	平均	65.3	12.9	7.84	10.7	10.3	10.6	11.2	8.54	9.31	8.08

表 A-12 1-Aminopyrene に関する脱着実験における経時変化

時間 (h)		1	3	6	24	48	72	96	120	144	168	192
水中濃度 ($\mu\text{g/L}$)	Replicate1	109	59.1	25.3	4.15	2.33	0.89	1.80	1.29	1.63	1.09	0.84
	Replicate2	113	46.3	41.5	4.00	2.44	1.27	1.33	1.03	1.08	1.18	1.33
	平均	111	52.7	33.4	4.07	2.38	1.08	1.57	1.16	1.35	1.14	1.09

表 A-13 水-底質システムでの Phenanthrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h				24 h	48 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	N.D.	20	0	0
100	34.1	20.9	22.4	24.3	27.0	20	0	0
200	115	58.7	59.2	71.3	54.0	20	0	0
400	250	148	118	163	108	20	0	0
800	498	345	204	343	216	20	16	16
1600	653	444	430	490	432	20	18	19

表 A-14 生後 11~13 日個体を用いた水のみでの曝露系での Phenanthrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	死亡数(匹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			24 h	48 h	72 h	96 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0	0	0
DMF	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	1	1	1
100	84.2	54.2	30.3	23.2	17.1	39.0	20	0	0	0	0
200	156	106.0	62.7	48.1	33.4	76.8	20	0	0	1	1
400	292	208	131	106	72.0	155	20	0	4	4	5
800	782	449	275	218	145	400	20	1	14	20	20
1600	1129	743	398	398	265	738	20	5	20	20	20

表 A-15 水-底質システムでの Phenanthrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	死亡数(匹) 96 h
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h				
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	1.09	16	0
100	37.9	24.6	19.3	23.5	24.7	24.5	18.3	16	0
200	75	50.4	43.6	48.3	51.5	51.2	40.8	20	11
400	203	128	106	110	113	125	110	19	16
800	324	263	209	176	255	293	276	19	19
1600	608	487	478	474	599	545	544	20	20

表 A-16 水のみでの曝露系での Pyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の
濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h			24 h	48 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0
DMF	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0
25	28.4	27.7	22.0	26.4	20	0	1
50	56.0	44.6	35.3	44.9	20	0	2
100	106	81.6	60.9	82.0	20	4	14
200	175	145	133	149	20	7	15
400	362	321	296	325	20	4	16

表 A-17 水-底質システムでの Pyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の
濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h				24 h	48 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	N.D.	18	0	1
25	15.8	6.30	7.34	8.57	10.2	21	0	0
50	22.3	16.5	13.8	17.2	16.8	19	0	2
100	49.5	40.2	27.3	39.0	47.8	18	1	6
200	93.7	57.1	55.5	65.1	179	17	2	15
400	94.4	50.6	63.3	63.4	348	18	1	17

表 A-18 生後 11~13 日個体を用いた水のみでの曝露系での
Pyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	死亡数(匹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			24 h	48 h	72 h	96 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	20	0	0	0	0
DMF	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	21	0	0	0	0
12.5	14.7	9.71	6.38	3.92	2.81	12.0	20	0	0	0	0
25	28.8	19.7	13.0	8.54	5.93	14.5	20	0	0	0	0
50	54.6	41.7	24.5	16.7	13.2	28.8	20	1	1	2	3
100	103	77.5	57.3	42.5	34.2	61.0	20	1	2	5	8
200	187	147	106	75.6	60.6	112	20	2	3	17	20

表 A-19 水-底質システムでの Pyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数
(設定濃度 100 µg/L は試験開始 72 時間後、200 µg/L は 48 時間後に全個体の死亡を確認したため、濃度測定を実施しなかった。)

設定濃度 (µg/L)	水中測定濃度 (µg/L)					時間加重平均 濃度 (µg/L)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	死亡数(匹)
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h				96 h
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	N.D.	13	0
12.5	7.48	3.21	2.17	1.78	1.89	5.05	7.71	13	0
25	13.1	8.71	7.21	7.49	6.66	8.28	16.6	13	7
50	23.8	24.5	15.4	14.7	14.6	18.4	35.1	17	15
100	46	35.0	31.7	33.9		35.4	68.7	21	21
200	64.1	49.1	55.9			54.3	180	20	20

表 A-20 水のみでの曝露系での Benzo[a]pyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の
濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 (µg/L)	測定濃度 (µg/L)			時間加重平均 濃度 (µg/L)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h			24 h	48 h
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	20	0	0
DMF	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	20	0	0
0.5	0.29	0.08	0.03	0.12	20	0	0
1	0.72	0.37	0.10	0.45	20	0	0
2	1.34	0.89	0.40	1.14	20	0	7
4	3.32	2.01	1.53	2.66	20	2	17
8	7.39	4.42	3.56	4.88	20	4	20

表 A-21 水-底質システムでの Benzo[a]pyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の
濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 (µg/L)	水中測定濃度 (µg/L)			時間加重平均 濃度 (µg/L)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	遊泳阻害数(匹)	
	0 h	24 h	48 h				24 h	48 h
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	N.D.	18	0	1
0.5	4.16	1.40	0.46	1.69	8.00	20	0	2
1	7.58	2.82	1.31	3.39	16.0	20	0	2
2	13.7	4.76	2.77	6.07	32.0	19	0	1
4	20.2	4.23	3.77	7.10	64.0	20	0	2
8	21.5	8.78	4.43	10.3	128	20	0	4

表 A-22 生後 11~13 日個体を用いた水のみでの曝露系での
Benzo[a]pyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	死亡数 (匹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			24 h	48 h	72 h	96 h
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.10	20	0	0	0	0
DMF	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.10	21	0	0	0	0
2	1.59	0.87	0.53	0.20	0.34	1.20	20	0	0	0	1
4	3.23	1.86	1.09	0.54	1.42	1.41	21	0	0	0	0
8	6.75	3.75	2.54	1.26	3.18	3.03	20	0	1	1	1
16	13.3	10.1	7.01	4.61	14.5	8.61	20	0	0	3	4
32	27.0	21.9	17.5	13.3	43.7	21.2	20	0	0	1	12

表 A-23 水-底質システムでの Benzo[a]pyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の
濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	死亡数 (匹)
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h				96 h
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	N.D.	19	0
2	7.88	0.96	0.71	0.95	0.68	1.44	64.3	19	0
4	21.3	1.48	2.18	2.81	9.47	4.30	121	18	0
8	28.4	2.89	4.43	7.35	22.9	8.56	176	18	0
16	50.8	4.4	32.7	53.1	155	42.5	450	17	0
32	99.3	5.5	18.3	157	377	89.8	739	17	1

表 A-24 底質添加法を用いた水-底質システムでの
1-Aminopyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	遊泳阻害数 (匹)	
	0 h	24 h	48 h				24 h	48 h
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	N.D.	20	0	0
12.5	2.39	0.91	0.80	1.20	2.94	20	1	3
25	3.58	1.33	1.16	1.76	6.29	20	0	0
50	12.7	5.09	3.92	6.40	17.5	20	0	0
100	41.0	18.8	15.4	22.7	47.7	20	1	1
200	114	58.3	39.9	65.7	62.1	20	17	20

表 A-25 水添加法を用いた水-底質システムでの
1-Aminopyrene に関するオオミジンコ遊泳阻害試験の濃度変化と遊泳阻害数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)			時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	遊泳阻害数 (匹)	
	0 h	24 h	48 h				24 h	48 h
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	N.D.	20	1	1
12.5	16.07	3.46	2.74	5.65	15.6	20	0	0
25	46.2	17.2	10.7	21.5	30.3	18	1	13
50	75.1	23.3	18.2	32.5	58.5	19	11	19
100	103	26.3	29.3	42.0	77.9	20	19	20
200	199	83.8	66.3	104	98.4	20	20	20

表 A-26 生後 11~13 日個体を用いた水のみでの曝露系での
1-Aminopyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	個体数 (匹)	死亡数 (匹)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h			24 h	48 h	72 h	96 h
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	20	0	0	0	0
DMF	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	20	0	0	0	0
6.25	5.76	1.17	0.49	0.37	0.32	1.11	20	0	0	0	0
12.5	11.2	2.74	1.46	0.57	0.43	2.37	20	0	0	0	0
25	22.2	6.77	2.40	1.29	0.78	5.01	20	0	0	0	0
50	45.0	15.8	6.92	3.55	2.18	11.6	19	0	0	10	15
100	90.4	43.7	21.8	9.42	5.02	29.4	20	0	15	18	19

表 A-27 底質添加法を用いた水-底質システムでの
1-Aminopyrene に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	死亡数 (匹)
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h				96 h
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	N.D.	20	0
6.25	3.96	0.65	0.55	0.51	0.33	0.84	1.97	19	1
12.5	3.6	1.57	1.10	0.81	0.56	1.35	4.13	19	0
25	7.1	3.71	2.30	1.63	1.49	2.92	8.02	19	0
50	15.3	8.7	5.7	3.9	3.26	6.79	20.1	19	5
100	53.6	33.2	18.8	12.6	9.7	23.6	39.1	19	19

表 A-28 水添加法を用いた水-底質システムでの
Apy に関するヨコエビ 96 時間水相試験の濃度変化と死亡数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水中測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	底質中測定 濃度 (mg/kg)	個体数 (匹)	死亡数(匹) 96 h
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h				
Control	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	<0.30	N.D.	20	1
6.25	3.85	1.67	1.00	0.72	0.67	1.36	1.97	20	0
12.5	11.6	3.93	2.60	1.88	1.63	3.57	4.13	16	0
25	63.9	30.8	17.5	10.2	6.56	22.7	8.02	20	18
50	48.6	26.6	20.1	14.1	12.2	22.4	20.1	19	19
100	93.6	44.9	32.9	23.4	20.1	38.6	39.1	18	18

表 A-29 Pyrene を曝露した際のオオミジンコの体内濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水だけの曝露試験		水-底質システムでの曝露試験	
	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
DMF	<0.10	<0.10		
12.5			8.57	1.95
25	26.4	8.01	17.2	3.83
50	44.9	17.6	39.0	11.9
100	82.0	35.3	65.1	23.2
200	149	63.9	63.4	28.8
400	325	83.8		

表 A-30 Pyrene を曝露した際のヨコエビの体内濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水だけの曝露試験		水-底質システムでの曝露試験	
	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)
Control	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
DMF	<0.10	<0.10		
6.25			5.05	0.123
12.5	12.0	0.372	8.28	0.331
25	14.5	1.35	18.4	0.625
50	28.8	1.95	35.4	3.70
100	61.0	4.96	54.3	4.32
200	112	4.69		

表 A-31 Benzo[a]pyrene を曝露した際のミジンコの体内濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水のみでの曝露試験		水-底質システムでの曝露試験	
	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
DMF	<0.03	<0.03		
0.5	0.12	0.432	1.73	0.490
1	0.45	1.77	2.95	1.38
2	1.14	12.8	6.09	2.65
4	2.66	32.2	6.43	5.79
8	4.88	43.0	10.3	8.72

表 A-32 Benzo[a]pyrene を曝露した際のヨコエビの体内濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水のみでの曝露試験		水-底質システムでの曝露試験	
	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)	時間加重平均 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	体内濃度 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{g-dry weight}$)
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03
DMF	<0.03	<0.03		
2	1.20	0.00477	1.44	0.346
4	1.41	0.103	4.30	0.927
8	3.03	0.235	8.56	1.52
16	8.61	2.60	42.5	2.31
32	21.2	5.95	89.8	3.13