

博士論文

**Ecotoxic Effects of Nanomaterials
and the other Emerging Chemicals of Concern
to Aquatic Organisms**

(ナノマテリアルなど新規環境影響懸念物質の
水生生物に対する影響評価)

中 村 中

目次

第1章	序論	1
1.1.	研究背景と目的	1
1.2.	本論文の構成	2
第2章	化学物質の環境リスク評価と管理：現状と課題及びその打開策	4
2.1.	概要	4
2.2.	環境リスク評価の既存概念と枠組み	5
2.3.	既存試験法の具体的手法	10
2.4.	既存手法の課題：新規環境影響懸念物質の取扱い	20
2.5.	液中における微粒子の粒径測定手法	25
2.6.	ナノマテリアルの環境影響に関する既存研究と課題	30
2.7.	課題のまとめとその打開策	36
第3章	ナノマテリアルの粒径測定手法に関する検討と開発	37
3.1.	背景と目的	37
3.2.	材料と方法	41
3.3.	結果	44
3.4.	考察	54
3.5.	まとめ	55
第4章	水環境中におけるナノマテリアルの様態解析	57
4.1.	背景と目的	57
4.2.	材料と方法	60
4.3.	結果	62
4.4.	考察	69
4.5.	まとめ	70
第5章	水生生物に対するナノマテリアルの曝露試験評価	71
5.1.	背景と目的	71
5.2.	材料と方法	73
5.3.	結果	78
5.4.	考察	83
5.5.	まとめ	84
第6章	新規環境影響懸念物質の繁殖・多世代影響評価手法開発	85
6.1.	序論	85
6.2.	魚類短期繁殖試験の改良と検証	86
6.2.1	背景と目的	86
6.2.2	材料と方法	87

6.2.3	結果	92
6.2.4	考察	100
6.2.5	まとめ	101
6.3.	魚類多世代試験の開発と検証.....	102
6.3.1	背景と目的.....	102
6.3.2	材料と方法.....	103
6.3.3	結果	111
6.3.4	考察	135
6.3.5	まとめ	140
第7章	結論	141
7.1.	総括	141
7.2.	今後の課題と展望.....	142
引用文献	144
謝辞	161

第1章 序論

1.1. 研究背景と目的

我々の身の回りには多種多様な化学物質が溢れており、その数は 7500 万種以上に及ぶ (American Chemical Society, 2013)。現代社会はこのような化学物質の恩恵なしには成立し得ないと言って過言ではない。しかし、一方で自然環境中へ廃棄・排出された化学物質は時として野生生物に対して悪影響を与える恐れがあり、更にその影響が人間に回帰しヒト健康に悪影響を与えることも少なくない。特に 20 世紀中頃には、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) や DDT など残留性有機汚染物質 (POPs) と総称される一連の化学物質による野生生物の衰退 (Colborn et al., 1996, Harrad, 2010)、除草剤などが原因とされる水生植物生態系の崩壊 (Yamamuro, 2012)、更に工場廃液由来のメチル水銀による水俣病 (Harada, 1995) など、化学物質によって野生生物の生態やヒト健康が害される事象が次々と引き起こされ、その後も現在に至るまで常に新たな問題が露見・懸念され続けている。従って、そのような化学物質の利便性と環境に対するリスク (環境リスク) とを十分に把握・評価した上で、適切な管理・利用がなされる必要がある。その際、化学物質の環境リスク把握・評価のための有効なツールの一つとしてバイオアッセイが挙げられる。

ここでいうバイオアッセイとは、室内実験によって化学物質に対する生物の様々な応答を定量化する手法を指す。例えば、魚類・甲殻類・藻類など水生生物を用いた曝露試験手法は 20 世紀の半ばより開発が進められ、現在ではこれらの手法は OECD などの国際的組織によってガイドライン化されている (OECD, 2006a, OECD, 1992b, OECD, 1998a, OECD, 2004b, OECD, 2009b, OECD, 2009c, OECD, 2011b, OECD, 2012d, OECD, 2012c, OECD, 2011a)。このような生物そのものを供しその応答を定量するいわゆる *in vivo* の手法は、培養細胞や細胞内の器官や物質 (DNA やタンパク質など) などを用いる *in vitro* の手法に比べて現実の影響をより正確に判断でき、かつフィールド調査に比べて意図した条件での実験が可能で一般に高い再現性も期待出来るなど、様々な優位性を持つ。そのため、これらの手法から得られた成果は、国際条約や各国の規制などに反映され、環境リスクの適切な把握・管理に役立てられている。しかし、化学物質は 5 秒に 1 種類と言われる急速なペースで日々新たに合成・開発され増え続けており、その中には既存の手法では対処できない物質も存在する。それらを総称して、新規環境影響懸念物質と呼ぶ (U.S. Environmental Protection Agency, 2013)。その代表として挙げられるのは、内分泌かく乱物質、特殊な医薬品類、ナノマテリアルなどである。特にナノマテリアルのリスク評価は、次の 3 つの理由により喫緊の課題とされている；①幅広く・大量に用いられつつある、②強い毒性が懸念されている、③評価方法が特に困難である (U.S. Environmental Protection Agency, 2007)。

ナノマテリアルについては様々な定義が存在するが、一般には、少なくとも一次元のサイズが 1~100 nm の範囲にある素材の総称とされている (Scientific Committee on Emerging

and Newly Identified Health Risks, 2007, U.S. Environmental Protection Agency, 2007)。ナノマテリアルは、①サイズが小さい、②それに伴って単位体積辺りの表面積が大きい、③炭素系素材においては軽さと強度・弾性を兼備する、などの特性を有する事から幅広い分野への活用が期待され、その一部はパーソナル・ケア製品など身近な分野でも既に応用されつつある。一方で、2004年頃よりヒトの健康や野生生物に対して悪影響を与えとの懸念がされるようになり (Oberdörster, 2004, Poland et al., 2008), ナノ毒性学として近年盛んに研究が進められている。しかし、水生生物に対する影響については現在十分な知見が得られていない。特に、ナノマテリアルが既存の枠組みで対応しきれない新規環境影響物質でありながら多くの既存研究がその評価に既存の試験法をそのまま適用していることは、その影響の過少・過大評価に繋がっていると考えられる。ナノマテリアルの生態影響評価には、先ず水中における素材の様態を正しく計測・把握した上で、それを踏まえた適切な曝露試験とその評価がなされなければならない。また、他の新規環境影響物質も含め、先ず短期慢性影響を確実に評価する事が先決である一方、より複雑な影響、例えば二次性徴、繁殖、多世代に亘る影響などを評価する試験法の確立も求められる。

そこで本論文は、新規環境影響懸念物質、特にナノマテリアルの水生生物に対する生態影響について過不足なく適切に評価する手法の確立を目的として、次節に示すような構成によって研究を行った。

1.2. 本論文の構成

本論文の構成を図 1-1 に示す。

第1章である本章では、研究背景と目的、及び本論文の構成について概要を示した。

第2章にて、化学物質のリスク管理に関する経緯と現状を纏めその課題を整理した上で、その打開策について論じた。

第3章では、水中におけるナノマテリアルの粒径測定について既存の手法を俯瞰した上で、主に動的光散乱法を用いたより適切な測定手法に関する検討を行った。

第4章では、前章で得られた知見を基に、水環境中におけるナノマテリアルの様態を測定・解析し、各種水質との関係やバイオアッセイにおける応用方法などについて考察した。

第5章では、既存のバイオアッセイ手法に第3・4章の成果を組み込んで試験法を構築し、ナノ素材及び非ナノ素材の金属微粒子が魚類に対して及ぼす影響を、短期慢性毒性試験により評価した。また、それを基に粒子の様々な性状・様態と魚類に対する影響とを比較し、両者の相関関係や因果関係を考察した。

第6章では、内分泌攪乱物質や医薬品類など、ナノマテリアル以外の新規環境影響物質を材料として、二次性徴・繁殖・多世代に亘る影響など、より複雑な影響の試験法について検討した。

以上を基に、第7章で本論文の成果を総括し結論を論じた上で、今後の課題について述べた。

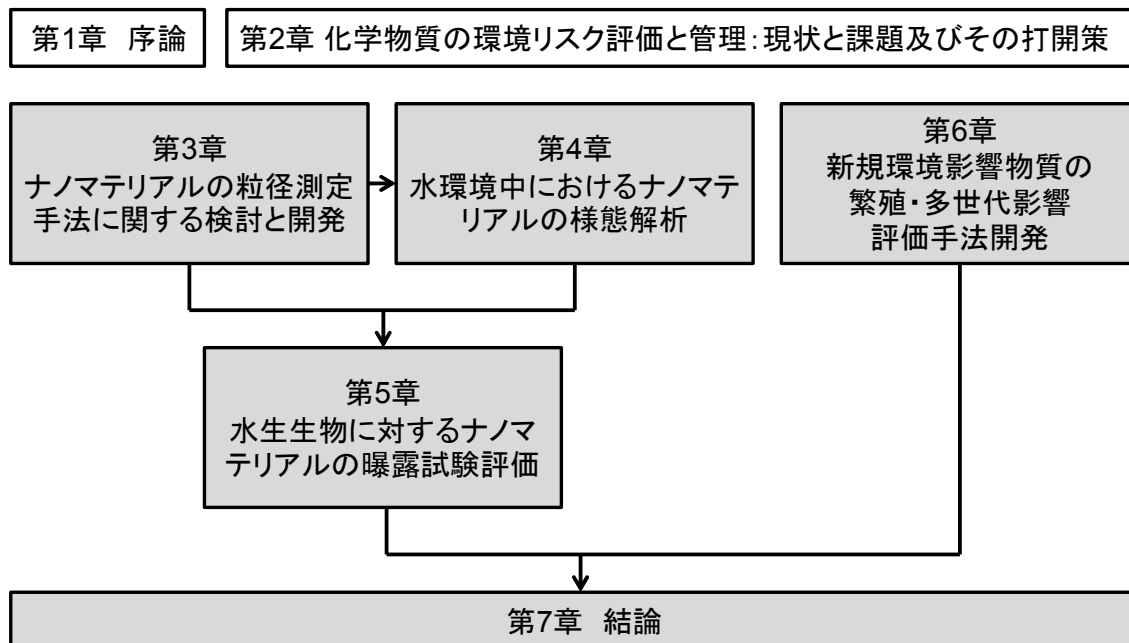


図 1-1 本論文の構成

第2章 化学物質の環境リスク評価と管理：現状と課題及びその打開策

2.1. 概要

新規環境影響懸念物質（Emerging Chemicals of Concern）とは、既存の環境毒性学における知見や手法では対応出来ず、そのため当該物質が自然環境中に流出した場合の影響の多寡が評価困難なものの総称である(U.S. Environmental Protection Agency, 2013)。その代表として、下記の3つが挙げられる

- (1) 内分泌かく乱物質
- (2) 医薬品及びパーソナル・ケア製品 (PPCPs, Pharmaceuticals and Personal Care Products)
- (3) ナノマテリアル

特に、ナノマテリアルの環境リスク評価は、次の3つの理由から新規環境影響物質の中でも喫緊の課題であるといえる(U.S. Environmental Protection Agency, 2007)。

- ① 幅広く・大量に用いられつつある
- ② 強い毒性が懸念されている
- ③ 評価方法が特に困難である

但し、ナノマテリアルをはじめとした新規環境影響懸念物質について考慮する際には、先ず既存の化学物質の環境リスク評価・管理に対する十分な理解が求められる。そこで、次節以降で既存研究について概念・枠組み・具体的手法を体系的に論じた上で、その課題としての新規環境影響物質の存在について述べる。

2.2. 環境リスク評価の既存概念と枠組み

(1) 環境リスク評価の概念と必要性

リスクという言葉は、1621 年には英単語の”risqué”として記載が見られ(Simpson and Weiner, 1989), 主に「損失や悪い状況が引き起こされる可能性」との意味合いで用いられてきた。また、現代的な意味でのリスクの概念及びその評価・管理手法は、20 世紀に経済学・社会学の分野を主として確立されたとされている(McNeil et al., 2010)。即ち、リスク (risk) とは様々なハザード (hazard: 潜在的な危険の要因) の連関からペリル (peril: 脅威となる事象) が引き起こされ、ロス (loss: 損失) が発生するに至るまでの可能性や程度の大きさの総体であり、リスク評価とはハザードやロスの各要素やその組み合わせを分析する事で論理的にリスク全体を把握・制御するものである。

化学物質に係る環境リスクの概念や評価も、基本的にはこれに倣う (図 2-1)。化学物質は、製造・使用・廃棄といった各プロセスで水・大気・土壌へと流入した後、その物理化学的性状によって自然環境中の各所へと輸送・分配される。例えば、下水中に含まれる化学物質は、放流先の河川等へ直接的に流入するだけでなく、下水処理施設で沈殿し汚泥として処理された後に肥料として田畑へ散布され、降雨により土壌を通じて地下水へ侵出してその流達先である河川等へ到達することもある。こうした過程には、化学物質の物理化学的性状、特に水溶解度、土壌吸着性、各相への分配性などが大きく関与する。同時に、化学物質は微生物によって分解を受ける一方で、各種生物に取り込まれて蓄積する事がある。そのような生物による分解性・蓄積性は物質によって大きく異なり、例え排出量が少量であっても、生分解性が低く蓄積性が高いと局所的には高い濃度で存在しかねない。以上のような物質循環を辿る中で、時として様々な生物に対しての毒性・悪影響が発現することがあり、これが生態影響となる。従って、フィールド研究によって自然環境中における化学物質の動態・影響を直接的に調査する一方で、室内実験によって①物理化学的性状、②生物分解性及び生物濃縮性、③生態影響(毒性)、といったハザードを要因毎に分解して、精密に評価・管理する事も不可欠である。

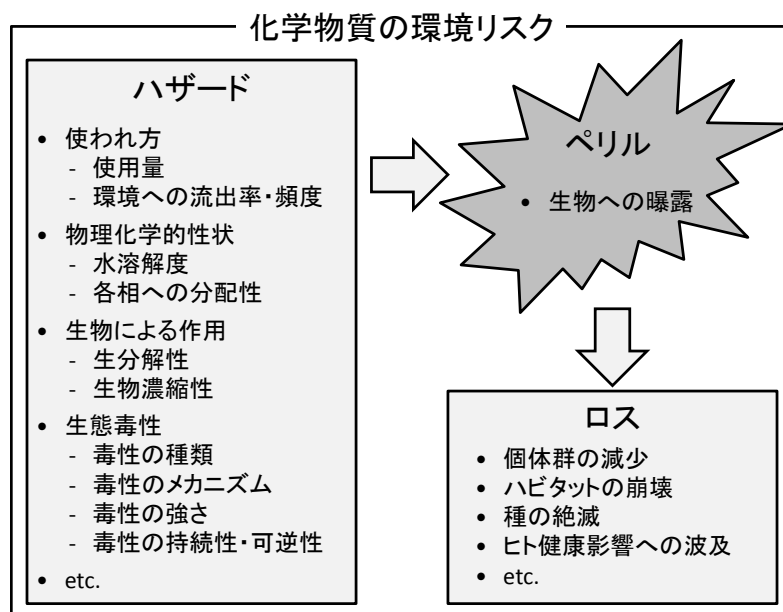


図 2-1 化学物質の環境リスクの概念

(2) OECD による既存研究の取り纏めと標準化

上述の考えに基づき、化学物質の環境リスク評価に関する既存研究を整理しその手法を国際的に標準化する取り組みが、OECD（経済協力開発機構）によって 1980 年代より行われて来た(OECD, 2006a)。これにより、多様な環境リスク評価手法が OECD テストガイドラインとしてヒト健康影響のための手法と共に纏められ諸研究・調査等のリファレンスとなっている他、各国における法律や規制、例えば日本における化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」）等にも反映されている(日本国法律, 1973)。テストガイドライン (TG) は 5 つのセクションから成っており、セクション 1～3 が環境リスク評価に係るセクションである（表 2-1）。

前述した環境リスク評価に重要な要素のうち、化学物質の基本的な物理化学的性状については、セクション 1 で規定されている。主な項目として、融点 (MP)、沸点 (BP)、蒸気圧 (VP)、水溶解度 (WS)、酸解離定数 (pK_a)、土壌吸着度 (K_d , K_{oc})、n-オクタノール/水分配係数 (K_{ow}) などがある(OECD, 1995a, OECD, 1995b, OECD, 1995c, OECD, 2000a, OECD, 1995d, OECD, 1981, OECD, 2004a)。特に水溶解度、土壌吸着係数、n-オクタノール/水分配係数などは、環境中での動態を考慮する上で重要な要素である。生物分解及び生物濃縮については、セクション 3 で規定されている。そして、生態影響、即ち各種生物に対する毒性については、OECD テストガイドラインではセクション 2 として規定されており、種々の被験生物・評価手法による試験法が現在計 37 種存在する。この他、正式なガイドラインとは別に、ガイダンスドキュメントとして各試験に対する補足的な事項の文書化もされている。

表 2-1 化学物質試験法のための OECD テストガイドライン

セクション	名 称	ガイドライン数 (廃止分を除く)
1	物理化学的性状	21
2	生態影響	37
3	生物分解・生物濃縮	17
4	ヒト健康影響	84
5	その他	9

(3) 生態影響に関する各種試験法の位置付けと解釈

生物に対する化学物質の影響には様々な要素が考えられ、これを総体的に把握するために各試験法はそれぞれの目的に適した試験条件を設定している。例えば、被験生物の種類や生息圏、曝露の期間や方法、影響の指標（エンドポイント）などである（表 2-2）。一般に、生態影響試験は被験生物種自体に対する影響を評価することが目的であると捉えられがちである。また、様々な生物を用いる意義は、生態系における食物網の各栄養段階や生物分類に対応するため、更には具体的ハビタットに対応するためであると考えられがちである（例 1：「生産者である藻類、一次消費者であるミジンコ、高次消費者である魚類」、例 2：「魚類であるメダカ、両生類であるカエル」、例 3：「日本の水環境を考慮してのニホンメダカ」、など）（日本環境毒性学会, 2003）。実際に、上記の事項は多くの場合各試験法における推奨被験種選定の一因となっている。また、「小型魚による試験では大型肉食魚への影響は明らかに出来ない」、「外来種を用いた試験で日本の環境影響を評価するのは不適切である」といった主張も、理想的・究極的な意味では間違いではない。しかし、被験生物種選定の最も本質的な理由は、「一定条件下で、化学物質の様々な作用を最大限幅広くかつ高精度で検出するため」、と言える。

例えば、脊椎動物は魚類から鳥類・哺乳類に至るまで基本的な構造・生理メカニズムは似通っており、化学物質に対するレスポンスも共通する部分が少なくない。一方、節足動物や環形動物などの無脊椎動物と脊椎動物とでは、その生物としてのシステムが大きく異なっているため、同一の化学物質に対しても影響の作用機序や度合いが異なる可能性が高い(Harvey et al., 1999)。従って、仮に 4 種の生物を用いるのであれば、魚類を 4 種用いるよりも、バクテリア・藻類・甲殻類・魚類のように生理メカニズムが大きく異なる種を組み合わせた方がリスク管理上理に適っていると判断される。

また、共通する構造を持つ生物種群の中でも、想定する作用を最も高効率・高精度で検出できる種を選定することが重要である。例えば、ニホンメダカは脊椎動物の中でも①小

型である、②生活史が短い、②飼育・繁殖・系統維持が容易である、などの実験生物に概して求められる諸条件を最も満足する種の一つであり、また種としての特性及び既存研究の膨大な蓄積から、化学物質への応答を幅広く詳細に検出可能である(Nakamura et al., 2013b)。従って、仮に実験生物として不適なある生物 A について化学物質の影響を評価する場合、当該生物 A 自体を強引に試験に供するよりは、むしろ①ニホンメダカによる毒性データ、②当該生物 A とニホンメダカとの生物学的な相違、③対象化学物質の物理化学的・生物化学的性状、を総合して類推する方がより科学的に妥当な検証が出来る可能性が高い。また、甲状腺ホルモンの作用は、魚類では鱗の発達、鳥類や哺乳類では季節による体毛の生え替わりなど、脊椎動物に共通して発達に深く関わっているが、アフリカツメガエルの幼生（所謂「おたまじゃくし」）の変態に伴う四肢出現を指標とするのが最も容易で確実なことから、同法が甲状腺ホルモン作用の健全性を評価する試験法として確立されている(Harvey et al., 1999)。同様に、オオミジンコを用いた試験による毒性データは、オオミジンコに対する影響を示すのみでなく、共通した生理メカニズムを持つ他の水生甲殻類や、延いては陸生も含めた脊椎動物全体に対してのリファレンスともなり得る。その際、底質や土壌を用いた試験法に比べ、液体のみを用いた本試験法は曝露を定義・制御する上で優位性を持つ。

以上のように、生態影響に関する個々の試験法は環境リスク評価全体の枠組みの中のある一部分を担うものである。また、メカニズムの解明には分子生物学的手法、実際の自然環境中での影響解明にはフィールド研究等、他分野との連携によって真に総体的な理解・対処を目指す事が肝要と考えられる。

表 2-2 セクション2：生態影響試験法の一覧

番号	名 称	生物分類	試験期間 (日)	主なエンドポイント
TG201	藻類生長阻害試験	水生 藻類	3	生長
TG202	ミジンコ類急性遊泳阻害試験	水生 無脊椎動物	2	生死(遊泳の有無)
TG203	魚類急性毒性試験	水生 脊椎動物	4	生死
TG204	魚類延長毒性試験	水生 脊椎動物	14	生死, 成長
TG205	鳥類摂餌毒性試験	陸生 脊椎動物	8	生死
TG206	鳥類繁殖試験	陸生 脊椎動物	<140	生死, 繁殖, 成長
TG207	ミミズ急性毒性試験	陸生 無脊椎動物	2 or 14	生死
TG208	陸生植物生長試験	陸生 維管束植物	14-28	発芽, 生長
TG209	活性汚泥呼吸阻害試験	水生 微生物	<1	活性(酸素消費)
TG210	魚類初期生活段階毒性試験	水生 脊椎動物	30-60	生死, 成長
TG211	ミジンコ類繁殖試験	水生 無脊椎動物	21	生死, 繁殖, 性別
TG212	魚類胚・仔魚期短期毒性試験	水生 脊椎動物	9-16	生死, ふ化
TG213	ミツバチ急性経口毒性試験	陸生 無脊椎動物	3	生死
TG214	ミツバチ急性接触毒性試験	陸生 無脊椎動物	2-3	生死
TG215	魚類稚魚成長毒性試験	水生 脊椎動物	>28	生死, 成長
TG216	土壌微生物窒素無機化試験	陸生 微生物	>28	活性(硝酸生成)
TG217	土壌微生物炭素無機化試験	陸生 微生物	>28	活性(炭素無機化)
TG218	ユスリカに対する底質/水系毒性試験(底質添加法)	水生 無脊椎動物	28	羽化
TG219	ユスリカに対する底質/水系毒性試験(水添加法)	水生 無脊椎動物	28	羽化
TG220	ヒメミズコ繁殖試験	陸生 無脊椎動物	42	生死
TG221	ウキクサ生長阻害試験	水生 維管束植物	7	葉状体増殖
TG222	ミミズ繁殖試験	陸生 無脊椎動物	56	繁殖
TG223	鳥類急性経口試験	陸生 脊椎動物	14	生死
TG224	嫌気性バクテリア活動阻害試験	水生 微生物	3	活性(メタン等生成)
TG225	オヨギミズに対する底質/水系毒性試験(底質添加法)	水生 無脊椎動物	10-14	生死
TG226	土壌中捕食性ダニ繁殖試験	陸生 無脊椎動物	14	繁殖
TG227	陸生植物栄養生長試験	陸生 維管束植物	21-28	生長
TG228	ハエ・イエバエ発達毒性試験	陸生 無脊椎動物	>13	羽化, 性別
TG229	魚類短期繁殖試験	水生 脊椎動物	21	生死, 繁殖, 内分泌系
TG230	魚類21日間試験	水生 脊椎動物	21	生死, 繁殖, 内分泌系
TG231	両棲類変態試験	水生 脊椎動物	21	生死, 変態, 内分泌系
TG232	土壌中トビムシ繁殖試験	陸生 無脊椎動物	21-28	繁殖
TG233	ユスリカのライフサイクルに対する底質/水系毒性試験	水生 無脊椎動物	44 or 65	生死, 繁殖
TG234	魚類二次性徴試験	水生 脊椎動物	60	生死, 成長, 内分泌系
TG235	ユスリカ属急性活動阻害試験	水生 無脊椎動物	2	生死(活動の有無)
TG236	魚類胚急性毒性試験	水生 脊椎動物	2	生死, 発達
TG237	ミツバチ幼虫毒性試験	陸生 無脊椎動物	3	死亡

2.3. 既存試験法の具体的手法

各試験法について、具体的な概要及び特に根幹となる手法の手順について下記に示す。

(1) 物理化学的性状

① 水溶解度

水溶解度は、後述する生態影響評価を行う上で、最も直接的に関連する要素である。その定量方法は、"OECD Test No. 105: Water Solubility"(OECD, 1995c)にて定められている。これは、プレ試験と本試験からなり、プレテストの結果により本試験はフラスコ法及びカラム溶出法の何れかが選択される。

まず、プレ試験として、およそ 0.1 g の被験物質を 10 mL のガラス製蓋付きメスシリンダーに量り取り、ここに 0.1 mL の水を加え 10 分間振盪する。その後、目視により不溶解物の有無を確認する。不溶解物が確認された場合、同様の操作を 0.5, 0.5, 1, 2, 10 mL と不溶解物が消失するまで水を追加しながら繰り返してゆく。10 mL に至っても不溶解物が確認される場合、100 mL のガラス製蓋付きメスシリンダーにて、水量を 100 mL として同様の操作を行う。以上の結果から、簡易的に推定溶解度を求め、10 mg/L 以上である場合はフラスコ法により、それ以下である場合はカラム溶出法により、本試験を実施する。

フラスコ法は、初期平衡化・再平衡化・定量の3つのプロセスから成る。まず、プレ試験で求められた推定溶解度の5倍以上の濃度で被験物質と水とをフラスコ内で混和した上で、初期平衡化として試験温度+10℃で24時間攪拌する。次に、再平衡化として試験温度で24時間攪拌し、上澄み液を分取し機器分析で定量する。同様に、初期平衡化時間を48時間、72時間と24時間ずつ延長して定量を行い、連続する2サンプルの定量値が15%未満になる事を試験成立条件として、これを繰り返す。

カラム溶出法は、容量 12.5 mL のマイクロカラムに被験物質をコーティングした石英ビーズ 2.5 mL を充填する。これに、25 mL/h の流速で通水をし、フラクションコレクターによって溶出画分を連続的に 12.5 mL×5 個採取する。これら 5 個の被験物質濃度が±30%以内である必要がある。次に、流速を 1/2 の 12.5 mL/h にして同様の操作を行い、2 つの流速において濃度平均値の差が±30%以内であれば有効とする。また、これを満たさなかった場合には、更に流速を 1/2 にして、有効となるまで同様の操作を繰り返す。

② 土壌吸着度

土壌への吸着度は、"OECD Test No. 106: Adsorption -- Desorption Using a Batch Equilibrium Method"(OECD, 2000a)にて定められている。これは、水相と土壌粒子相における化学物質の吸脱着が平衡状態になった際の固相－水相間分配係数(K_d)及び有機炭素吸着係数(K_{oc})を求める事が目的である。

具体的な試験手順は次の通りである。まず、被験物質、0.01 M の CaCl_2 溶液中、土壌を

コニカルチューブ内に投入し、室温で平衡状態（水相・固相の被験物質の濃度に継時的変化がみられなくなった状態。本試験の前に予め求める）になるまで攪拌を行う。ここで、異なる2タイプの土壌について、3つの異なる土壌/水割合を設定する。その上で、機器分析を行い両相における被験物質濃度を求める。 K_d は、分析結果から下式によって求められる。従って、値が大きいほど固相への分配が大きいことを示す。

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \text{ (cm}^3\text{/g)}$$

$C_s^{ads}(eq)$: 平衡状態の固相中化学物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)

$C_s^{ads}(eq)$: 平衡状態の水相中化学物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)

$m_s^{ads}(eq)$: 平衡状態の固相中化学物質質量 (μg)

$m_s^{ads}(eq)$: 平衡状態の水相中化学物質質量 (μg)

m_{soil} : 固相の乾燥重量 (g)

V_0 : 水相の被験当初量 (cm^3)

また、化学物質の吸着は固相中の有機炭素へのものが殆どであるため、 K_d は下式によって有機炭素含有率で補正し、 K_{oc} として有機炭素吸着係数に変換される。尚、簡易法として、HPLCを用いて K_{oc} 推定する手法もガイドライン化されている(OECD, 2001)。

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3\text{/g)}$$

$\%oc$: 固相土壌中の有機炭素含有率 (cm^3)

有機炭素吸着係数が小さい物質は、土壌から水相へ流出しやすく、地下水への浸透や河川水や湖水中への到達など、環境中で拡散しやすい傾向にある。一方、この値が大きい物質は土壌への吸着度が高いため、例えば土壌の地表面付近などで残留しやすい傾向がある。但し、そのように物質が固相に吸着された状態では、水相に溶解した際に比べ生分解・化学分解・光分解・揮発等の作用はより起こりにくい事が多い。また、大雨時などには、土壌粒子に吸着したままの水環境へ移行も考えられる。

③ n-オクタノール/水分配係数

n-オクタノール/水分配係数 (K_{ow} , P_{ow}) は、化学物質の疎水性のうち、脂質への溶けやすさを示す最も代表的な指標として用いられている。主な測定手法には、フラスコ振盪法 (OECD Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method) (OECD,

1995d)と HPLC 法 (OECD Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method) (OECD, 2004a)がある。フラスコ法は、構造が未知でも使用でき適用範囲が広い一方で、平衡に達するまでに時間を要し、両方の溶媒に溶解する物質にしか適用できない欠点がある。一方で、HPLC 法は、不純物等の影響が少なく混合物も測定できるが、構造が大きく異なる化合物では比較しにくい。

フラスコ振盪法の試験手順は次の通りである。まず、n-オクタノールと蒸留水を混合し相互に飽和させた後、静置し分離する。次に、蒸留水もしくはn-オクタノールに被験物質を 0.01 mol/L 以下の濃度で溶解し、これに n-オクタノールもしくは蒸留水を加える。ここで、両液の容積比が 0.5:1:2 となる 3 条件で各 2 連調製する。これを 5 分間で 100 回振盪し、遠心分離機によって相分離させる。その上で、機器分析を行い n-オクタノール中及び蒸留水中の被験物質濃度を測定し、下式によって K_{ow} を求める。これを常用対数化して、 $\log K_{ow}$ の形で示される事が多い。

$$K_{ow} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{water}}$$

C_{water} : 蒸留水中の化学物質濃度

$C_{n-octanol}$: n-オクタノール中の化学物質濃度

HPLC 法は、炭化水素固定相カラムを用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析の結果から、分配係数を推計する方法である。HPLC の固定相には長鎖アルキル基で修飾した逆相カラムを、移動相には蒸留水などを使用する。試料は固定相と移動相間で分配しながら移動していくため、保持時間と K_{ow} の間には強い相関がある。このことを利用して、予め分配係数が既知の物質で保持時間と $\log K_{ow}$ との相関を求め、これを基に被験物質の保持時間から $\log K_{ow}$ を推測する。

n-オクタノール/水分配係数は、土壌・地下水中での移動や生体内吸収・蓄積性を予測するために用いられる。化審法では、 $\log K_{ow}=3.5$ を基準として、それ以上を高濃縮性と判断する。

(2) 生物分解・生物濃縮

① 生分解性

生分解性については、例えば好気性条件下での生分解のしやすさを調べる試験として、“OECD Test No. 301: Ready Biodegradability”(OECD, 1992c)がある。これは、このガイドラインには 301A から 301F まで 6 種類の試験方法が記載されており、いずれも易分解性のスクリーニング試験と位置付けられている。

- 301A：DOC Die-Away 試験
- 301B：CO₂ 発生試験（修正 Sturm 試験）
- 301C：修正 MITI（I）試験
- 301D：Closed Bottle 試験
- 301E：修正 OECD スクリーニング試験
- 301F：Manometric Respirometry 試験

中でも 301C は日本の化審法が元となった試験法であり、広い用途に用いられている。これは、被験物質 100 mg/L、標準活性汚泥 30 mg/L からなる培地 300 mL を 25±1℃にて攪拌し続け、28 日間 BOD（生物化学的酸素要求量）を連続的に測定するものである。ここで、下式により求まる分解度が 60%を超える場合、易分解性と判定される。

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{BOD}{ThOD} \times 100$$

BOD : 生物化学的酸素要求量

ThOD : 理論的酸素要求量

但し、この 301C を含め上述の 6 種類の試験は、特定の流入経路や媒体などを想定しない易分解性のスクリーニング手法として位置付けられている。従って、これらの試験により易分解性でないとの結果が得られた場合も被験物質が難分解性であると判断されるわけではなく、より実体に即した次段階の検証が必要とある。例えば、”OECD Test No. 314: Simulation Tests to Assess the Biodegradability of Chemicals Discharged in Wastewater”(OECD, 2008c)では、廃水の各種プロセス（下水道、下水処理施設での好氣的処理・嫌氣的処理、処理後の河川等への排出、及び下水を介さない直接流出）を想定した生分解性試験法が定められており、より本質的な評価方法と言える。

但し、何れの試験法でも、活性汚泥・廃水・表層水・土壌類は特定のものが定められておらず、これらに含まれる有機物・無機物・微生物やその酸化力により、化学物質の分解性は大きく異なると考えられる。従って、同一の試験方法によって行われた結果でも、上述の要因によりその結果が大きく異なる事が予想され、むしろこれらの寄与が各種試験条件より大きいとの指摘もある(一般財団法人 化学物質評価研究機構, 2005)。

② 生物濃縮性

生物濃縮とは、被験物質が生物体内に取り込まれ、その取込み速度が消失（排泄）速度を上回り、生物体内に蓄積する現象の事である。生物濃縮性は、上述した *n*-オクタノール/水分配係数からある程度は推測可能であるが、正しく把握するためには生物を用いた濃縮

性試験を行う必要がある。その手法としては”OECD Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure”(OECD, 2012e)が国内外で広く用いられている。濃縮性試験の目的は、被験物質を一定濃度に保った水中で水生生物を飼育する、もしくは、飼料中に一定濃度の被験物質を混ぜ込んで給餌することにより、生体内に蓄積した被験物質の濃度を測定し、BCF (Bioaccumulation Factor) などの生物濃縮係数を求める事にある。

具体的な試験手順として、流水式曝露試験の例を示す。用いる魚種としてはゼブラフィッシュ (*Danio rerio*), ファットヘッドミノー (*Pimephales promelas*), コイ (*Cyprinus carpio*), ニホンメダカ (*Oryzias latipes*), グッピー (*Poecilia reticulata*), ブルーギル (*Lepomis macrochirus*), ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*), イトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) が推奨されている。このうち、欧米ではニジマスが、日本ではコイが多く用いられている。試験濃度は、魚類に対して毒性が現れない濃度にする必要があり、急性毒性試験の結果等を基に少なくとも2濃度及び対照区を設定しなければならない。例えば、半数致死濃度 (LC₅₀) の 1/100・1/1000 の濃度、及び対照区、などと設定される。定量ポンプ等を用いて、試験用水と被験物質原液を連続的に供給・希釈し、被験物質の水中濃度が設定値の近傍を安定的に維持するよう制御する。ここに、魚類を投入して給餌を行い、一定の水質範囲内で飼育を行う。これにより、取込期間として魚体への曝露を行う。取込期間は、後述する魚体のサンプリングにより魚体中濃度が平衡状態であると確認されるまでとし、最長で60日間とする。次に、排泄期間として、魚体中の被験物質が95%消失するまでを目安として曝露を中止した状態で飼育を継続する。この間、取込期間中に少なくとも5回、排泄期間中に4回、それぞれ被験魚をサンプリングして化学分析を行う。ここから、試験期間を通じた魚体中被験物質濃度の推移を求め、下式から生物濃縮係数 (BCF_{ss}, BCF_k) を得る。

$$BCF_{ss} = \frac{C_B}{C_W}$$

$$BCF_k = \frac{k_1}{k_2}$$

C_B : 平衡状態における魚体中被験物質濃度の平均

C_W : 平衡状態における試験液中被験物質濃度の平均

k_1 : 取込速度定数

k_2 : 排泄速度係数

試験結果から、BCF の値が 5000 以上の場合は、高濃縮性と判断されることが多い。また、5000 未満の場合も、例えば欧州の化学物質規制である REACH では 2000 以上で

Persistence, Bioaccumulation and Toxicity 基準に該当する。1000 未満では、高濃縮性ではないと判断される場合が多い(一般財団法人 化学物質評価研究機構, 2005)。

(3) 生態影響（毒性）

生態影響のための各試験は、その試験条件や評価方法に共通する面が多い。例えば、試験に際しては被験物質を任意の用量で曝露する曝露区が1区以上設けられ、複数の場合には段階的（多くは等比的）に設定される。同時に、曝露を行わずにそれ以外の条件を同一とした対照区が設けられる。また、試験の均一性確認や統計学的な検定を可能にするために同一区が複数設けられ、これを連などと呼ぶ。死亡をはじめ様々な指標（エンドポイント）に対する影響の多寡は主に NOEC, LOEC, LC_x, EC_x, IC_x 等で表される。NOEC (No Observed Effect Concentration, 最大無影響濃度) とは、曝露区のうち対照区と比べて統計学的検定によって有意差が確認されなかった最も高濃度な区であり、同様に LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, 最小影響濃度) は有意差の確認された最も低濃度な区を指す。LC_x (Lethal Concentration x%, x%致死濃度) は被験生物の x% が死亡する濃度であり、死亡以外のエンドポイントについては EC_x (Effective Concentration x%, x%影響濃度) や IC_x (Inhibitory Concentration x%, x%阻害濃度) で表される。上記は接触・吸入曝露の際の表現であり、経口曝露（対象物質が口から摂取され消化器から吸収される形での曝露）の際にはそれぞれ NOEL (No Observed Effect Level, 最大無影響量), LOEL (Lowest Observed Effect Level, 最小影響量), LD_x (Lethal Dose x%, x%致死量), ED_x (Effective Dose x%, x%影響量), ID_x (Inhibitory Dose x%, x%阻害量) となる。

① 水生植物

水生植物に対する影響については、淡水性藻類を用いた短期の生長阻害試験が最も広く用いられており、“OECD Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test”(OECD, 2011a)でその手法が纏められている。これは、緑藻のムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) をはじめ、珪藻、及び真性細菌のシアノバクテリアを被験生物として、72 時間の曝露を行い、対照区と被験物質曝露区との細胞増殖数を比較するものである。また、水草を用いた試験として、被子植物のアオウキクサ属 (*Lemna spp.*) を用いて 7 日間で葉状体の増殖数を比較する“OECD Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test”(OECD, 2006c)がある。但し、TG221 については未だ試験の妥当性・適用性が各国で検証されている段階にあり、手法として確立するには至っていない。

② 水生無脊椎動物

水生の無脊椎動物としては、小型で生活史が短く感受性も高い等の理由から、古くから甲殻類のミジンコ（特記無き場合、広義にミジンコ科全体を指す）が広く用いられてきた。

それに伴って試験技術の改善・発達が更に進み、ミジンコ、特にオオミジンコ (*Daphnia magna*) とニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) の2種は生態影響における最も代表的な実験生物の一つとして認識されている。急性毒性としては”OECD Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test”(OECD, 2004b)が、繁殖に対する影響としては”Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test”(OECD, 2012c)があり、既存研究の蓄積も多い。更に、通常産雌単為生殖であるミジンコが幼若ホルモン作用を受けてオス個体を産出する事が発見された事から(Tatarazako et al., 2003), 内分泌かく乱作用の検出法としても利用されている。

ミジンコ以外には、主に底質における影響評価を目的として、昆虫類のユスリカ (*Chironomus spp.*) や貧毛類のオヨギミミズ (*Lumbriculus spp.*) を用いた試験法が開発途上にある。ユスリカでは、急性活動阻害試験である”OECD Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test”(OECD, 2011c), 一齢幼虫から28日間の曝露によって羽化率などをエンドポイントとする”OECD Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment”(OECD, 2004c)及び”OECD Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water”(OECD, 2004d), 多世代試験として1世代目の一齢幼虫から2世代目の羽化までの各所をエンドポイントとする”OECD Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment“(OECD, 2010d)がガイドライン化されている。オヨギミミズでは、10~14日間の曝露によって生死をエンドポイントとする”OECD Test No. 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment”(OECD, 2007b)がガイドライン化されている。但し、底質や後述する土壌は不均一であり曝露のされ方やプロセスも定義・制御し難いことから(一般財団法人 化学物質評価研究機構, 2005), 高精度な試験系の確立には至っていないのが現状である。

③ 水生脊椎動物（魚類・両棲類）

水生の脊椎動物としては魚類及び両棲類を用いた試験法が多く開発されている。特に、魚類に対する急性毒性試験”OECD Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test”(OECD, 1992a)は生態影響試験として最も古くから行われてきたものの一つである。その他にも、生活史の各部分の影響を評価する手法が確立されている。胚から仔魚にかけてのふ化や生存など短期慢性影響をエンドポイントとする”OECD Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages”(OECD, 1998a), より長期に幼魚として種としての外見的特徴が出揃うまでの成長をエンドポイントとする”OECD Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test”(OECD, 1992b), 更に二次性徴の発現までを確認する”OECD Test No. 234: Fish Sexual Development Test”(OECD, 2011b), 成魚を3週間曝露し繁殖をエンドポイントとする”OECD Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay”(OECD, 2012d)などは、多くの既存研究で用いられている。被験生物種としては、ニジマス、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュ、ニホンメダカ等の淡水魚が多く用いられている。特にTG229とTG234に

については、繁殖や成長に加え、複数の内分泌系と関連するエンドポイントを設けており、これらを基に種々の内分泌かく乱作用の検出系としても機能する。例えば、女性ホルモン支配の卵生タンパクであるビテロジェニンは通常雄個体から殆ど検出されないが、環境中の女性ホルモン様物質の影響を受けると雄個体がこれを高濃度で産生する(Sumpter, 1997)。また、ニホンメダカの雄成体は臀鰭に男性ホルモン支配である乳頭状小突起と呼ばれる突起を有するが、環境中の男性ホルモン様物質の影響を受けて雌個体がこれを有したり、女性ホルモン様物質もしくは抗男性ホルモン様物質の影響を受けて雄個体で出現が阻害されたりする(Nakamura et al., 2013a)。

両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を主に用いた”OECD Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay”(OECD, 2009c)は、21 日間の曝露での変態(幼生である「おたまじゃくし」からの後肢・前肢の出現)を主なエンドポイントとしている点でユニークである。脊椎動物の変態は主に甲状腺ホルモン支配に依っており(Harvey et al., 1999)、本試験により甲状腺ホルモンの健全性やかく乱を確認・検出する事が出来る。

④ 微生物

微生物を用いた試験は、水圏を想定したもの・地圏を想定したものの2つに分けられる。水圏を想定したものとしては2種の試験法があり、好気性の活性汚泥の酸素消費量の変化を呼吸阻害として定量する”OECD Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)”(OECD, 2010b)、及び、嫌気性の消化汚泥のメタン・CO₂ 産生量を活性阻害として定量する”OECD Test No. 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria”(OECD, 2007a)がこれにあたる。

地圏を想定したものとしては、土壌微生物の分解活性を用いた2種があり、土壌の分解活性を硝酸生成能で定量する”OECD Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test”(OECD, 2000b)、及び、炭素の無機化で定量する”OECD Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test”(OECD, 2000c)がある。

これらの試験は、被験生物を厳密に特定・制御せず汚泥・土壌総体として試験に供するため、あくまでも微生物群の活性に対する影響を大まかなに把握するためのツールとして用いられている(OECD, 2006a)。

⑤ 陸生植物

陸生植物を用いた試験として OECD でガイドライン化されているのは、”OECD Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test”(OECD, 2006b)と”OECD Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test”(OECD, 2007c)である。両試験とも、双子葉植物であるカブラ (*Brassica rapa*)・キュウリ (*Cucumis sativus*)・エンドウ (*Pisum sativum*)・トマト (*Solanum lycopersicum*)、単子葉植物であるタマネギ (*Allium cepa*)・イネ

(*Oryza sativa*)・小麦 (*Triticum aestivum*)・トウモロコシ (*Zea mays*) などを被験種として推奨している、曝露方法は、TG208 が被験物質を土壤に添加して出芽から 14～21 日後まで曝露を行うのに対し、TG227 は本葉 2～4 枚に生育した供試植物に対して被験物質の溶液を直接散布して 21～28 日間曝露する。試験終了後に根部・地上部それぞれの長さや乾燥重量を求め、生長阻害のエンドポイントとして評価する。

一般に、高等植物は生活史が長く、環境因子に対する反応も多様であるとされている (Reece, 2011)。また、媒体として依存する土壤はそもそも不均一であり、更に種によって適正も大きく異なる。従って、陸生植物を用いた試験法は開発が困難であり、現状は比較的评价が容易な発芽や幼苗の初期成長をエンドポイントとするに留まっている。

⑥ 陸生無脊椎動物

陸生の無脊椎動物を用いた試験としては、昆虫類のセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を用いた急性毒性試験が 3 種ガイドライン化されている。ショ糖溶液に混和した被験物質を餌として与え経口毒性を確認する”OECD Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test”(OECD, 1998b)、胸部背面に被験物質を塗布して接触毒性を確認する”OECD Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test”(OECD, 1998c)、幼虫をマイクロプレート (底部に被験物質を染み込ませた脱脂綿を置いたもの) 内で 3 日間曝露する”OECD Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure”(OECD, 2013b)である。また、土壤中の無脊椎動物への影響を想定した試験として、貧毛類のシマミミズ (*Eisenia spp.*) やヒメミミズ (*Enchytraeus spp.*)、昆虫類のヒメフンバエ (*Scathophaga stercoraria*)・イエバエ (*Musca autumnalis*)、クモ綱のトゲダニ (*Hypoaspis aculeifer*)、内顎綱のオオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*)・フォルソムトビムシ (*Folsomia fimetaria*) を用いた試験法が複数存在する。これらは、何れも人工土壤中 (後述の TG228 のみ牛糞中) に被験物質を混和して曝露する形態を採る。急性毒性試験としてはシマミミズの”OECD Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests”(OECD, 1984c)、発達毒性試験としてはハエの”OECD Test No. 228: Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies(*Scathophaga stercoraria* L. (*Scathophagidae*), *Musca autumnalis* De Geer (*Muscidae*))”(OECD, 2008b)が、繁殖影響試験としては 4 種があり、ヒメミミズの”OECD Test No. 220: Enchytraeid Reproduction Test”(OECD, 2004e)、シマミミズの”OECD Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)”(OECD, 2004f)、ダニの”OECD Test No. 226: Predatory mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) reproduction test in soil”(OECD, 2008a)、及び、トビムシの”OECD Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil”(OECD, 2009d)である。これらは、何れも試験期間中の幼生ふ化数をエンドポイントとしている。これら土壤を経由した曝露試験方法は、前述の底質同様に曝露の定義や制御が困難であることから(一般財団法人 化学物質評価研究機構, 2005)、ガイドライン化はされているもの

の充分に確立されているとは言い難い。

⑦ 陸生脊椎動物

陸生の脊椎動物としては、鳥類を用いた経口の急性試験が2種、経口の短期繁殖試験が1種ガイドライン化されており、特にウズラ属(*Coturnix spp.*)の種が多く用いられている。急性試験の2種については、”OECD Test No. 205: Avian Dietary Toxicity Test”(OECD, 1984a)が幼鳥を用いて試験期間が計8日間(曝露期間:5日間+曝露を停止した回復期間:3日間)であるのに対し、”OECD Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test”(OECD, 2010c)は成鳥を用いて14日間の曝露のみを行う。短期繁殖試験の”OECD Test No. 206: Avian Reproduction Test”(OECD, 1984b)は、先ず非繁殖期として短日条件で成鳥に8週間の経口投与を行った上で、長日条件に変え繁殖期へ移行させる。産卵開始後から少なくとも8週間卵を観察し、ふ化した雛も14日間観察を行う。これによって、親鳥の死亡や体重、産卵数、ふ化数や雛の生残数等をエンドポイントとして評価する。

哺乳類については、ヒト健康影響への外挿を目的としてマウス・ラット・モルモット・ウサギなどの齧歯類を用いた試験法が数多く開発されセクション4に纏められている。そのため、生態影響のための試験としては別途設けられていない。

2.4. 既存手法の課題：新規環境影響懸念物質の取扱い

前節までに示したような手法に基づき、既存の物質はその環境リスクが評価され、また新規な化学物質を製造・販売する際には、各国の定める方法で環境リスク評価を調査し届け出る事が求められる。しかし、化学物質は5秒に1種類と言われる急速なペースで日々新たに合成・開発され増え続けており(American Chemical Society, 2013)、前述の新規環境影響懸念物質のように、既存の知見・手法では対処が困難な物質も存在する。下記に、代表的な環境影響懸念物質について概要を述べる。

(1) 内分泌かく乱物質

内分泌かく乱物質とは、「内分泌の機能に変化を与え、それによって個体やその子孫あるいは集団（一部の亜集団）に有害な影響を引き起こす外因性の化学物質あるいは混合物」と定義されている(Harvey et al., 1999)。生物の各種ステロイドホルモン、例えば脊椎動物の性ホルモンや甲状腺ホルモン、昆虫等の幼若ホルモンや脱皮ホルモンなどは、分泌の時期と量が厳密に制御されており、それらの受容体を介して脳の性分化や生殖腺の分化・発達・生殖に中心的な役割を果たしている。内分泌かく乱作用を持つ環境中の化学物質は、下記のような作用によってこれをかく乱すると考えられている(Colborn et al., 1996, McLachlan et al., 2002)。

- ホルモンのように振る舞い、受容体に結合する
- 受容体に結合して、ホルモンの受容体への結合を阻害する
- ホルモンの生合成、代謝を促進/阻害する
- 受容体の数を増減させる
- ホルモン量の調節（フィードバック）を混乱させる

内分泌かく乱作用は、例えば神経毒性など他の一般的な毒性と異なり、極微量であっても影響を及ぼす恐れがある。1980年代以降、フィールド研究から特に脊椎動物に対するエストロゲン作用の事例が複数報告されてきた(Tyler et al., 1998)。例えば、英国・米国・日本の下水処理施設下流域でのローチ (*Ruditilus rutilus*) やニジマス、コイといった魚類における精巢の異常(Harries et al., 1996, Jobling and Sumpter, 1993, Jobling et al., 1998, Purdom et al., 1994, Folmar et al., 1996, Goodbred et al., 1997, Hashimoto et al., 2000)、米国・フロリダにおけるアメリカアリゲーターの生殖器の異常(Guillette et al., 1996, Guillette et al., 1994)、バルト海周辺のオジロワシや米国・シアトルのワシカモメなど鳥類における卵殻薄化(Fry and Toone, 1981, Helander et al., 1982)、米国のフロリダパンサーにおけるメスの不妊化(Facemire et al., 1995)などである。こうした報告を受けて、2000年前後より前節の生態影響試験法で述べたような室内実験による内分泌かく乱作用の評価手法が開発されてきた。従って、新規環境影響懸念物質の中では最も研究が進みつつある項目であるといえる。

しかし、既存の手法には①内分泌かく乱作用中でもエストロゲン作用など一部の作用に偏っている、②長期・多世代に亘る影響を評価する手法が未確立である、などの課題がある。1点目については、昆虫等の幼若ホルモンや脱皮ホルモン等については未解明な面が多いのみならず、最も実害が懸念・指摘されている脊椎動物の性ホルモンにおいてもエストロゲン作用以外の側面については対応する試験法が存在しない事が挙げられる。従って、抗アンドロゲン作用などについて高い精度で検出可能な試験法が必要である。2点目については、国際的なガイドラインや各国の法規制ではそれぞれ内分泌かく乱作用の評価のための枠組みを設けている(OECD, 2012b)。しかし、それらの枠組みで最上位に位置する確定試験的な試験法については、未だ十分に確立されていない。例えば、OECDでは内分泌かく乱作用の生態影響評価を5つのレベルに分けているが、このうちレベル5にあたる試験法は存在しない。

- レベル1：既存データの取り纏め
- レベル2：*in vitro*による内分泌かく乱作用のアッセイ
- レベル3：*in vivo*による内分泌かく乱作用のスクリーニング
- レベル4：*in vivo*による生物への悪影響の確認
- レベル5：*in vivo*による生物の生活史を通じたより広範囲な悪影響の確認

従って、長期・多世代に亘って生物やその個体群維持能力に関する影響を調査可能な試験法が必要である。日本ではメダカを用いたフルライフサイクル試験が、米国ではファットヘッドミノーを用いた2世代試験が開発されてきたが、両者には一長一短があり、それらを統一・改善した試験法の確立が望まれている(OECD, 2013a)。

(2) PPCPs

PPCPs との呼称は飽くまでも用途による便宜上のカテゴリーであり、化学的には幅広い特性のものを包含する(U.S. Environmental Protection Agency, 2013)。また、PPCPsの中には内分泌かく乱物質や次項で述べるナノマテリアルに該当するものもあるが、ここではそれらは除外する。PPCPsはその用途上強い生理活性を持つものが多く、特殊な作用を有するものも少なくない(Cunningham et al., 2006)。また、生分解性は意図的に高く制御されたものから非常に低いものまで様々であるが、下水処理施設で90%以上の除去が期待できるものはごく少量であると言われている(浦瀬, 2008)。従って、特に人間が服用した後にそのままあるいは代謝物として排泄され、下水道を経由して河川等へ流入した場合の生態影響が懸念される。

こうしたPPCPsは、後述するナノマテリアル等のように試験の実施自体が困難であるわけではない場合が多いが、その評価・管理が困難である。つまり、急性毒性が弱い場合も慢性的に様々な悪影響を及ぼす可能性が高く、しかもそれぞれの特性に適したエンドポイントで影響を確認する必要がある。これに伴って、各国における法規制も遅れており、例

例えば日本では一般の化学物質については前述の化審法、農薬については農薬取締法で環境リスクを考慮しているのに対し、薬事法では環境への影響評価は規制対象としておらず、現在その法規制化に向けたガイドラインの検討が進められている段階にある。

(3) ナノマテリアル

ナノマテリアルについては様々な定義が存在する。最も広く用いられているのは、米国 EPA などによる「少なくとも一次元のサイズが 1~100 nm の範囲にある素材の総称」であるが（図 2-2）、他にも EU の RoHS 指令における「比表面積が 60 m²/cm³ 以上の素材」なども重要視されている(Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2007, U.S. Environmental Protection Agency, 2007)。代表的なナノマテリアルとして、チタンや銀などの金属ナノ粒子・ロッド・ワイヤー、フラーレンやカーボンナノチューブなどの炭素系ナノ粒子・繊維が挙げられる（表 2-3）。ナノマテリアルは、①サイズが小さい、②それに伴って単位体積辺りの表面積が大きい、③炭素系素材においては軽さと強度・弾性を兼備する、などの特性を有する事から幅広い分野への活用が期待され、その一部は身近な分野でも既に応用されつつある。例えば、ナノ二酸化チタン粒子はその紫外線散乱効果から日焼け止めに利用される他、顔料としての白さとサイズの小ささに伴う滑らかさから食品添加物（着色料）としても用いられている。一方で、その光触媒効果（紫外光を吸収した際に強い還元作用及び超親水作用を発現する）を利用して、防汚・抗菌・抗ウイルス作用を持つ塗料などへの応用が期待されている。

一方で、2004 年頃よりヒトの健康や野生生物に対して悪影響を与えるとの懸念がされるようになり(Oberdörster, 2004, Poland et al., 2008)、ナノ毒性学として近年盛んに研究が進められている。しかし、特に水生生物に対する影響については、量的には多くの報告があるものの、十分な知見が得られているとは言い難い。また、水環境中でのナノマテリアルの挙動についても、殆ど把握されていない。以上より、ナノマテリアルの環境リスク評価は、次の 3 つの理由から新規環境影響物質の中でも喫緊の課題であるといえる(U.S. Environmental Protection Agency, 2007)。

- ① 幅広く・大量に用いられつつある
- ② 強い毒性が懸念されている
- ③ 評価方法が特に困難である

そこで、次節に既存研究と課題について詳しく述べる。

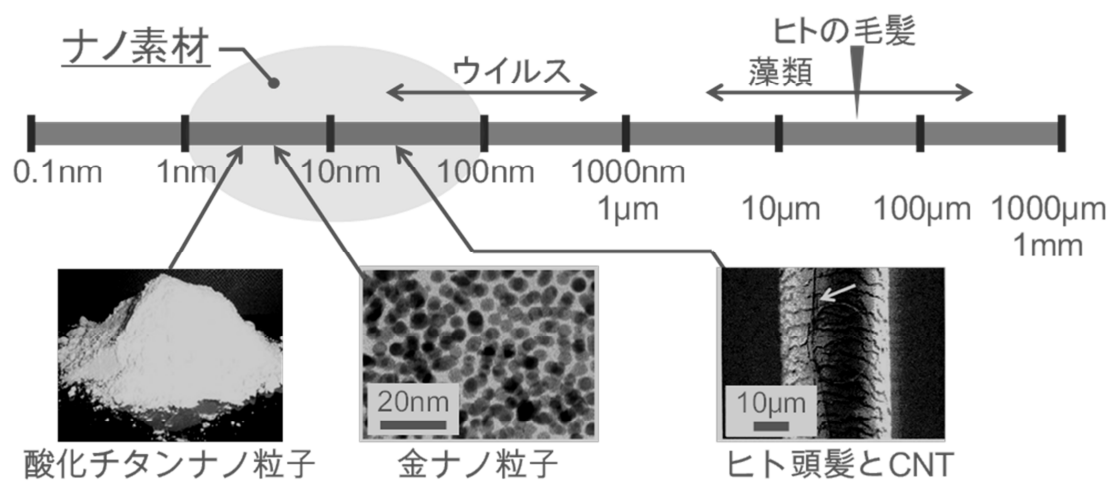


図 2-2 ナノマテリアルの定義とサイズの比較

表 2-3 主なナノマテリアルと日本国内生産量（2007 年）

素 材 名	分 類	日本国内 生産量 (トン／年)
酸化チタン	金属	1,450
酸化亜鉛	金属	480
金	金属	<1
銀	金属	<1
酸化銅	金属	<1
酸化鉄	金属	<1
酸化アルミニウム	金属	<1
酸化マグネシウム	金属	<1
酸化セリウム	金属	<1
酸化ニッケル	金属	<1
タングステン	金属	<1
酸化カルシウム	金属	<1
酸化コバルト	金属	<1
酸化ジルコニウム	金属	<1
カーボンナノチューブ	炭素	140
フラーレン	炭素	2
ダイヤモンド	炭素	<1
グラフェン	炭素	<1
デンドリマー	有機ポリマー	<1
シリカ	セラミック	<1
クレイ	セラミック	<1

2.5. 液中における微粒子の粒径測定手法

液中における微粒子の粒径測定については、多様な手法が古くから開発・確立されてきた。測定原理で大別すると、篩い分け法や沈降法が最も古典的な手法として挙げられ、細胞数の計測を基として開発・確立された電気抵抗法、粒子を直接画像観察する顕微鏡法などが既に確立されている。更に、より小さなサイズかつ広いサイズ領域での定量を行うことを目的として、光散乱法や流動場分画法などが近年盛んに開発され、既に実用化されている（表 2-4）。このうち、ナノ・サイズの粒子に対しては、顕微鏡法、光散乱法、流動場分画法が多く用いられている(Mahler and Jiskoot, 2012)。

表 2-4 液中における主な粒径測定手法の一覧

測定原理	主な測定法・装置	測定範囲	粒径表示
篩い分け法	標準篩い	20 μm —	篩い径
沈降法	重力沈降	100 nm —	ストークス径
	遠心沈降	100 nm —	ストークス径
電気抵抗法	コールターカウンター	1 μm —	球相当径
顕微鏡法	光学顕微鏡	100 nm —	短軸径など
	走査型電子顕微鏡	1 nm —	短軸径など
	透過型電子顕微鏡	1 nm —	短軸径など
光散乱法	動的光散乱	0.5 nm — 3 μm	光散乱径
	静的光散乱	10 nm — 500 μm	光散乱径
	レーザー回折散乱	10 nm — 3 mm	球相当径
流動場分画法	非対称流動場分画法	0.5 nm —	ストークス径
	沈降流動場分画法	0.5 nm —	ストークス径
	熱流動場分画法	0.5 nm —	ストークス径

(1) 顕微鏡法

顕微鏡法では、電子顕微鏡の2種、即ち走査型電子顕微鏡及び透過型電子顕微鏡の何れかを用いる場合が殆どである。

① 走査型電子顕微鏡

走査型電子顕微鏡は、真空中において細く絞った電子線で試料表面を走査し、試料から放出される二次電子や反射電子、特性X線などを検出してモニター上に試料表面の拡大像を表示する仕組みを持つ。ここで、二次電子は試料の表面近くから発生する電子であり、それを検出して得られた像（二次電子像）は試料の微細な凹凸を反映する。反射電子は試

料を構成している原子に当たって跳ね返された電子であり、反射電子の数は試料の組成(平均原子番号や結晶方位など)に依存する。更に、走査電子顕微鏡にX線検出器を装着して元素分析を行う事も出来る。

以上より、走査型電子顕微鏡は試料形状の観察に加え、その試料に含まれる元素の質や割合などの解析も可能である。但し、液中ナノ粒子の測定においては、前処理として試料をガラスなどの試料台上で乾固させた上で観察することが必要であり、水中で分散している状態をそのまま観察する事が出来ない。従って、前処理による様態の変化を可能性として考慮する事が必要である。また、乾固は多くの場合徐々に分散媒の容積が減少する事から一様にはならず、試料を代表する適切な観察箇所を無作為的に選定する事は困難である場合が多い。更に、X線を用いた元素等の解析においても、分解能に対して測定対象となる粒子(群)が小さ過ぎる場合が多く、解析結果の妥当性を慎重に検討する事が求められる。

② 透過型電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡は、試料に電子線を当ててこれを透過した電子を拡大して観察する電子顕微鏡仕組みを持つ。試料の構造や構成成分の違いにより透過する電子の密度が変わるため、これが顕微鏡像となる。このような試料を透かして観察する特性上、試料の形状や表面構造に加え試料内部の情報である凝集度合い、結晶パターン、格子欠陥の存在及び結晶の配向方位などについて調査することが可能である。

液中ナノ粒子の測定では、走査型電子顕微鏡に比べ10 nm未満の粒子についてもより高い解像度で観察可能である事から、使用例が多い。但し、測定に際しては、前処理として電子を透過する薄膜に被験液を塗布した上で脱水させる必要がある。従って、走査型電子顕微鏡以上に前処理に伴う様態の変化が考えられ、また脱水の手法によって特定の性状の粒子のみを選択的に薄膜上から除去してしまう恐れも指摘されている。

③ その他の顕微鏡法

上記に示したような電子顕微鏡を用いた手法に対し、光学顕微鏡を他の手法例えば後述する光散乱法などにおける測定原理と組み合わせた製品も複数開発・販売されている。これらの多くは、顕微鏡法の長所である画像による直接的な観察性を確保した上で、分散状態にある粒子をそのまま観察する事をその開発目的としている。例えば、照明装置を強化した光学顕微鏡によってナノ分散系を観察し、ブラウン運動の状態を検出・解析した上で粒径に換算する手法などが実用化されている。本手法は、蛍光試料や光反射の強い金属系素材に対しては優位性を持つ一方、炭素系素材などには比較的不向きであり、またそうした光反射に応じた適切な分散濃度である事が求められる。他の同様であり、限られた条件下では有用性が確認されているものの、現時点では測定対象・条件に対する汎用性が確保されておらず、主流な測定手法と認識されるには至っていない。

(2) 光散乱法

光散乱法は、分散系に対して光や電波を照射し、そこから発せられる回折・散乱光（電波）の特性から計算によって二次的に粒径や粒径分布を求める手法である。液中ナノ粒子の粒径測定手法としては最も一般的な測定原理であり、これを用いた主な測定手法として、動的光散乱法、静的光散乱法、レーザー回折散乱法、パルス磁場勾配核磁気共鳴法などが広く実用化されている。

① 動的光散乱法

動的光散乱法は、液中に分散している粒子にレーザー光を照射し、粒子のブラウン運動に伴って発生した散乱光の揺らぎを観測し、数学的な解析を行う事で粒子の粒径を求める手法である（）。具体的には、液中に分散しているナノ粒子にレーザー光が照射されると、互いに干渉しあう散乱光が発生する。その際、散乱光には粒子のブラウン運動に伴う拡散係数に応じた揺らぎが生じる。大きな粒子はブラウン運動の動きが遅いので散乱光強度の揺らぎは緩やかであり、一方、小さな粒子はブラウン運動の動きが速いので散乱光強度の揺らぎは急激に変化する。そこで、ピンホールや光ファイバー系の光学系をもちいることによって、このブラウン運動の様子を散乱光強度の揺らぎとして観測する。観測される散乱光の時間的な揺らぎの変動は粒子の大きさによって変化するため、この散乱強度の揺らぎをある時間内における散乱強度の変化として観測し、光子相関法により自己相関関数を求め、拡散係数が算出される。ここで、粒子の拡散係数、分散媒の温度・分散媒の粘度により定まるとの Stokes-Einstein 仮定を用いる事で、粒径が算出される。但し、分散系中粒子の粒径が均一な場合は実際には稀であり、殆どの場合粒径はばらつきを持つため、ポアソン分布を仮定した Cumulant 法などに代表される数学的なアルゴリズムを用いて、粒径分布を算出する。

動的光散乱法は、金属・炭素をはじめ殆どのナノ素材に対して測定可能であり、測定範囲も 1 nm 未満から数 μm までと幅広い。またコンポーネント化された測定システムが数多く市販されており、測定のための操作が簡易であり、1 サンプルあたりの測定時間が短く低コストであるという特徴も持つ。これらの要因から、ナノ粒子における液中粒径・粒径分布計測装置として最も汎用的な手法であると言える。しかしながら、現実の系は単純な粒径分布を持つ試料だけではなく複雑な組成である場合も多く、各解析手法の特性との兼ね合いから無視できない誤差・誤検出が生じる可能性がある。また、計測される散乱強度は粒径の 6 乗に比例するため、小さな粒径粒子の存在が大きな粒径粒子の散乱に隠されてしまう傾向がある。このような弱点は、材料として用いられる比較的均一な分散系においては大きな障害とならない場合が多いものの、特に水環境中のナノ粒子を測定に適用する場合においては測定結果に対して致命的な誤りを生じさせる恐れがある。しかし、そうした影響の可能性については殆ど検討されないまま使用されているのが現状であり、既存研究における測定結果の妥当性は不明な面が多い。

② 静的光散乱法

静的光散乱法は、粒子の散乱光において粒径に応じた散乱強度の角度依存性が生じる事を利用し、散乱光の角度分布を測定することで粒径を算出する手法である。粒子にレーザー光を照射すると粒子における遷移的な振動双極子が誘起され、入射光の振動数に等しく光を周りに放射する。このとき照射されたレーザー光が粒子の粒径よりも小さければ Rayleigh 散乱として観測される。このとき、Rayleigh 散乱の散乱角度は、粒子の粒径、レーザー光の波長、分散媒の屈折率に依存する事から、これらを解析することで平均粒径が算出される。

静的光散乱法は、分子の絶対量を算出可能である事から、特に高分子の測定に多く用いられている。また、粒子のダイナミクスを粒径算出に使用しないことから流動場における粒径測定に適しており、オンライン計測装置として応用されている。一方で、Rayleigh 散乱を測定原理として使用することから測定範囲が 10~500 nm 程度と狭く、また算出可能な粒径値は平均値のみであり粒径分布を得ることが出来ないなどの欠点を持つ。液中ナノ粒子においては、動的光散乱法に比べ際だった優位性を持たないため、適用事例は多くない。

③ レーザー回折散乱法

前項に挙げた静的光散乱法が、Rayleigh 散乱、即ち照射する光の波長に対し粒子サイズが小さい場合の散乱を利用するのに対し、レーザー回折散乱法は、照射する光の波長に対し同程度以上の場合における散乱現象である Mie 散乱、及び光回折を用いる手法である。Mie 散乱においても、散乱角度は粒子の粒径、レーザー光の波長、分散媒の屈折率に依存する。但し、各パラメータから粒径を算出するためには複雑な計算を必要とするため、予め用意されたパラメータテーブルから解を呼び出すか、近似式として Fraunhofer の回折理論を用いて近似的に求める場合が多い。液中に分散する粒子により回折した光をレンズで集光すると、レンズの焦点面に回折パターンが観察できる。このときの光の回折角度は粒径の小さいものほど大きく、粒径の大きいものほど小さい。このためにレンズ焦点面での光強度分布はさまざまな大きさの粒子からの回折光が混ざり合った結果となり、粒子サイズが小さくなるにつれて角度に対する回折パターンの変化が小さくなっていく。このことを利用して、Fraunhofer の回折理論では回折光強度分布から粒径分布、平均粒径を算出する。粒子群から生じる光強度分布パターンはそれぞれの粒子からの回折・散乱光の重ね合わせとなるため、計算によって各粒径の粒子の存在割合を解析することで粒径分布解析を行うことができる。この粒径分布解析では規格化した体積基準粒子径分布を使用するため、粒子径分布の基準濃度が体積濃度で表される粒子径分布を求めることになる。

レーザー回折散乱法は、静的光散乱法と同様、粒子のダイナミクスを粒径算出に使用し

ないため、分散状態を維持しにくい分散系も攪拌しながら粒子径測定を行う事が出来る。また、湿式・乾式測定を同一装置で可能である点で優れている。一方で、動的光散乱法と同様に粒径分布は数学的解析法を用いて算出しているため、測定結果が解析装置に大きく依存する。また解析には測定粒子自身の屈折率を必要とし、サブ・ミクロンの粒子においては Mie 散乱の角度依存性がなくなるため測定精度が落ちるという欠点がある。従って、ナノ粒子の測定においては、粒子が全体的に大きく凝集している場合を除き、高い精度での測定は困難である場合が多い。

(3) 流動場分画法

流動場分画法は、分散状態にある粒子を外力の作用したカラム内で粒子径別に分離・分画する手法であり、一相クロマトグラフィーに分類される。超高分子の分子量分画を目的に当初開発された後、各方面で応用のために分離方法が発達し、現在では粉体の粒子径分布を計測する有力な手法として注目されている。本手法の最大の特徴は、上述した何れの手法とも異なり、平均粒径や解析的手法で求められた粒径分布ではなく、直接分級した粒径分布を求めることが可能である点にある。分画のために外部から与える力としては、流れ、遠心力、熱などが挙げられ、これら外力の性質により分散する粒子は異なった分画を生じる。

非対称流動場分画法では、まず横方向に進行方向を持つカラム内で様々な粒径サイズを持つ集合体を一箇所にフォーカスする。この集合体において粒径の大きいものは自己拡散速度が小さく、粒径の小さな試料の自己拡散速度が大きい特性を利用し、分離セル内において粒度分布を縦方向に作成する。さらに粒子の拡散方向と逆に外部場を加える。この外部場はクロスフロー（交叉流）となる。このような流れの不均一さを利用して粒子の配置に依存した流出時間の違いが現れ、横方向に粒径分級することができる。また、沈降流動場分画法では、カラム内で分散液が単一方向に流れる状態で、流向と垂直方向に遠心力を与える。これにより、質量の大きな粒子の拡散が抑えられることとなり、質量に応じた分画が行われる。同様に、熱では、熱拡散の弱い粒子の自己拡散減少が低下するため、熱拡散に応じた分画が行われる。

流動場分画法によって分画した粒子は、粒子流出時間から粒子径へ変換される他、動的光散乱法や顕微鏡法、更には質量分析計などと組み合わせる事も可能である。これにより、組み合わせの対象となる各技術の欠点をキャンセルする事が理論上想定される。こうした特性は、特に複雑な粒径分布を持つ分散液において信頼性の高い測定を可能にし得る事から今後大きな期待が掛けられている。一方で、測定の対象物質やその状態に応じて機器の設定を最適にチューニングする必要があり、現段階では汎用性が高いとは言えない。また、装置の開発も他の手法に比べ発展途上であり、実際の測定が高精度で実施可能であるかは十分に検証されておらず、今後の進展が待たれる。

2.6. ナノマテリアルの環境影響に関する既存研究と課題

(1) 生態毒性について

① 二酸化チタンナノ粒子

ナノマテリアルの生態毒性について、最も既存研究例が多いのは二酸化チタンナノ粒子を対象としたものであり、しばしば金属ナノ粒子のモデル的素材として位置付けられている(Zhu et al., 2008)。一般に、二酸化チタンは化学的に安定であり、生物に対する毒性は極めて限定的である(Berg, 1994)。二酸化チタンナノ粒子においても、既存研究の多くは試験実施最高濃度で影響がないか、影響濃度が 100 mg/L 以上であったとしている。例えば、急性毒性試験としては、オオミジンコ、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュを用いた Griffitt et al. (2008)、ゼブラフィッシュを用いた Zhu et al. (2008)、ファットヘッドミノーを用いた Jovanovic et al. (2011)、ニジマスを用いた Warheit et al. (2007)、ユスリカを用いた Lee et al. (2009)、アルテミアを用いた Ates et al. (2013)などの報告が挙げられる。短期的な慢性影響についても、例えばゼブラフィッシュの胚・仔魚期を対象とした Griffitt et al. (2009)、アフリカツメガエルの初期生活段階を対象とした Nations et al. (2011)などによって、試験実施最高濃度でも顕著な影響が確認されなかった事が報告されている。また、Kulacki and Cardinale (2012)や Kulacki et al. (2012)は、10 種前後の植物・動物プランクトンを混在させたメソコスム的実験系を構築して 1 ヶ月程度の試験を行い、二酸化チタンナノ粒子を 1 mg/L で曝露しても生物群の種数やバイオマス量に对照区と比べ顕著な変化が生じなかったことを報告している。一方で、二酸化チタンナノ粒子には顕著な毒性があったとする既存研究事例も少なくない。それらは、特定の条件下に限定して毒性が確認されたとするものと、そうでないものとに大別される。前者として、Wiench et al. (2009)はオオミジンコを対象とした急性毒性試験及び繁殖試験を行い、急性毒性はみられないものの繁殖に対する影響が 66 mg/L で確認されたと報告している。Fan et al. (2011)は、オオミジンコを用いて急性毒性試験を行い、二酸化チタンナノ粒子の存在が銅イオンの毒性を増強すると報告している。また、二酸化チタンは前述したように光触媒効果を有していることから、紫外線量を室内光よりも高めた状態で毒性試験を行った事例も少なくない。例えば、Hund-Rinke and Simon (2006)は屋外における太陽光と同程度の紫外線条件下でオオミジンコと藻類に対して急性毒性試験を行った結果、何れも EC_{50} の値が 44-50 mg/L であったと報告している。同様に、Ma and Diamond (2013)も紫外線を補強した室内でオオミジンコとメダカを用いて急性毒性試験を行い、場合によっては 1 mg/L 未満でも顕著な致死率上昇が観察されたと報告している。何ら特殊な条件を設定していないにも拘わらず強い影響が確認されたと主張する報告も少数ながら存在する。例えば、Lovern et al. (2007)は、オオミジンコを用いた外見・行動異常が 2 mg/L で観察されたと報告している他、Dabrunz et al. (2011a)に至っては、オオミジンコを用いた急性毒性試験結果として、遊泳阻害の EC_{50} が 0.24 mg/L であったとしている。但し、これらの報告では、粒子が脳に選択的かつ直接的に移行するなどといっ

た仮説を引用して考察が行なわれているが、科学的な根拠に基づくものではない。また、そもそもナノマテリアル中に含まれる不純物や溶媒の影響を誤認しているとの指摘もある (Ma and Diamond, 2013)。

このように、二酸化チタンナノ粒子の生態毒性については数多くの既存研究があり、また他の素材に比べてより慢性的・複雑なメカニズムの影響についての検討も試されている。しかし、それら一つ一つの信頼性は必ずしも高いとは言えず、また同様の素材を同様の試験法に基づいて実施したにも拘わらず全く相反する結果を報告している例も少なくない。その要因として、試験法に問題があるために被験物質の影響を正しく検出出来ず、フォルスポジティブ/フォルスネガティブを招いている可能性が考えられる。特に、既存研究における試験法の問題点として、大きく下記の3点が挙げられる（尚、これらの事柄は、二酸化チタンナノ粒子のみならず他のナノ素材についても共通して言及できる）。

- 1) ナノ粒子の被験液内における様態を十分に測定・把握しておらず、どのような状況で曝露が行われたのか、もしくは曝露と呼ぶに相応しくないのかが不明である
- 2) 意図的/非意図的な分散剤の使用や不純物の混入による外乱の可能性を十分に考慮・排除していない
- 3) 適切なエンドポイントを設定していない。つまり、観察すべき指標を見落としていたり、影響と直接的に結びつかない指標を用いていたりする

② 銀ナノ粒子

銀ナノ粒子は、二酸化チタンナノ粒子に次いで生態毒性の既存研究が多いナノマテリアルである。銀はイオン化することにより生物に対して強い毒性を示すが、銀ナノ粒子を用いた研究でも他のナノマテリアルに比べより強い毒性を示唆する例が多い。特に、Gao et al. (2011)は、公称サイズが 14-45 nm の複数の銀ナノ粒子をニセネコゼミジンコに曝露して急性毒性試験及び繁殖試験を行った結果、EC₅₀は 0.7-6.18 µg/L であったと報告している。また、Chae et al. (2009) はニホンメダカの胚・仔魚期に対して 30-60 nm の銀ナノ粒子を曝露した結果、発生異常の EC₅₀は 62.5 µg/L であったと報告している。但し、銀ナノ粒子は水中において一定度溶解し銀イオン化すると考えられるが、上述のような毒性がナノ粒子によるものなのかそれが単に溶解した結果であるのか、という疑問については明らかにされていない。そうした中であって、銀ナノ粒子と硝酸銀等のナノ粒子でない銀の毒性とを比較した報告も徐々に増えている (Asharani et al. (2008), Bar-Ilan et al. (2009), Choi et al. (2010))。それらの多くは、銀ナノ粒子の毒性が通常の銀よりも重篤であるとし、その原因として *in vitro* 研究におけるトロイの木馬仮説（ナノ粒子の状態で細胞内に取り込まれた後、溶解して細胞の内部から毒性を発現する） (Lee et al., 2007, Lok et al., 2007)などを支持している。一方で、Allen et al. (2010)は、オオミジンコの急性毒性試験により銀ナノ粒子と硝酸銀とを比較した結果、EC₅₀の値が硝酸銀では 1 µg/L 程度であったのに対し、銀ナノ粒子では 14-176

μg/L とより毒性が弱かったことを報告している。また、Jin et al. (2010)は、銀ナノ粒子と硝酸銀とをバクテリアに対して曝露した結果、溶解した銀の量が同程度の場合、銀ナノ粒子分散液の抗菌作用は硝酸銀溶液に比べ顕著に低いと報告している。これらの報告は、銀ナノ粒子を用いた曝露試験の毒性要因は、単に一部のイオン化に伴うものであるとの仮説を支持する。但し、試験の供された銀ナノ粒子全体のうち、どの程度が溶解し残りがどのような状態で存在したか、という様態について精密に測定した事例はなく、原理的にも困難である。従って上述の銀ナノ粒子の毒性に関する仮説は何れも十分に検証されていない。

③ その他の金属

二酸化チタン及び銀以外の金属ナノ粒子については、Gao et al. (2011)や Zhu et al. (2008)が酸化銅の甲殻類や魚類・両棲類に対する短期的な毒性を、Wiench et al. (2009)などが酸化亜鉛の甲殻類・魚類に対する急性毒性を報告しているが、何れも数十～数百 mg/L の濃度での影響である。また、Zhu et al. (2008)は、酸化アルミニウムをゼブラフィッシュの胚に対して曝露し、発生異常の EC₅₀ が 1.8 mg/L であったとしている。これらの素材については、何れも二酸化チタンや銀の抱える問題を包含しており、毒性の多寡について論じられる段階とは言い難い。

④ 炭素系ナノ粒子・ナノ繊維

Oberdörster (2004)は、オオクチバスの幼魚に対してフラーレン (C₆₀) を曝露し、その結果、脳や鰓で酸化ストレスが引き起こされたと報告した。これは、ナノマテリアルの毒性をはじめて *in vivo* で示唆した報告として盛んに注目され数多くの研究がこれに続き、ヒト健康影響・環境影響の双方においてナノ毒性学が一大カテゴリーとして認識される嚆矢となった。一方で、この実験結果に疑問を呈する声も当初から存在した。そうした反論の中でも、Henry et al. (2007)は、Oberdörster (2004)には致命的欠陥があると下記の実験から指摘した。

- 下記の3種の曝露区+対照区について、ゼブラフィッシュの胚を用いた72時間の曝露試験を実施
 - 1) THF-C60 : Oberdörster (2004)と同様に、THF を用いて調製したフラーレン分散液
 - 2) THF-水 : 上記と同じプロセスをフラーレン抜きで行った被験液
 - 3) 水-C60 : フラーレンを、水に直接分散させたフラーレン分散液
- 結果、THF-C60 と THF-水の両曝露区の毒性は共通しており、また両試験区のみから THF の分解産物である γ-ブチロラクトンが検出された。
- つまり、THF-C60 曝露区の毒性は、フラーレンによるものではなく、γ-ブチロラクトンによるものであると考えられる。

このような指摘により、Oberdörster (2004)は有機溶媒の毒性に伴うフォールスポジティブの

事例として認識されているが、本研究は一般にも大きく報道されてナノテクノロジーに対する懸念が社会に広がるきっかけとなった。この他にも Kennedy et al. (2009)は単層カーボンナノチューブがニセネコゼミジンコに対して 5 mg/L で顕著な遊泳阻害を及ぼすと報告するなど、強い生態影響を示唆する研究は現在に至るまで報告され続けている。しかしながら、そもそも現状は水生生物に対して炭素系ナノ粒子・ナノ繊維を真の意味で曝露させる事が困難であり、その定量や確認も不可能である事から、現段階でのリスク評価はナンセンスであるとの主張も少なくない(Zhang et al., 2012)。

(2) 環境中での挙動について

ナノマテリアルは、自然環境中へ流出された際、その多くが水環境中に到達すると考えられている。また、その挙動には水中に含まれる溶解物や懸濁物など不純物の影響が多いであろう事がコロイド化学の理論から推測されている。そのような環境中でのナノマテリアルについては、科学的に妥当なフィールド調査が行える段階にはなく、大半は室内実験やモデル分析に依っている。

特に、①水中の電解質がナノ粒子の凝集を促進する、②フミン酸やフルボ酸などの腐植質の存在が凝集を阻害・遅延させている、との報告例は多い。特に Shih et al. (2012)は、二酸化チタンナノ粒子の凝集について無機イオンが及ぼす影響について種々の条件下で実験を行い動的光散乱法・ゼータ電位測定システムを用いて確認した。その結果、無機イオン濃度が高い程粒子径が大きくなる傾向にあり、その強度は $\text{NaCl} < \text{CaCl}_2 < \text{Na}_2\text{SO}_4$ の順であると報告している。但し、ゼータ電位の測定結果についてはこの結果と整合しない面も多く、ゼータ電位がゼロに近づいたからといって必ずしも凝集が顕著になるわけではないとしている。また、Ottofuelling et al. (2011)は、自然水及び人工水中に二酸化チタンナノ粒子を分散させ、その上澄みを濃度測定した。その結果、pH が高い・電解質濃度が低い・腐植質が多いなどの条件は上澄みのチタン濃度を高くすることに寄与したと報告している。こうした傾向は、Mudunkotuwa et al. (2012)でも示された。同報告は、酸化亜鉛ナノ粒子の凝集について pH、イオン強度、フミン酸の添加が及ぼす影響を動的光散乱法・ゼータ電位測定システムを用いて調査したものである。結果、①イオン強度が大きいか程ゼータ電位が低下し、粒子の沈降量が増大する、②フミン酸の添加に伴って、pH が高い場合のみ溶解量が増大する、と報告している。同様に、Diegoli et al. (2008)は、金ナノ粒子の凝集にフミン酸が及ぼす影響を調べ、その結果電解質濃度が 0.1 mM 以上では凝集が激しいが、フミン酸の添加によって安定性が増すと報告している。Domingos et al. (2009b)は、二酸化チタンナノ粒子の凝集についてフルボ酸の与える影響を調べ、その結果、pH が 7 付近で凝集性は最大になったが、フルボ酸によって凝集度が低下したと報告している。一方で、上述の結果とは矛盾する報告も少なくない。例えば、Chae et al. (2012)は、フラーレン及びカーボンナノチューブの水中における凝集について、フミン酸の添加との関係を調べ、フミン酸の

添加に伴う凝集の変化は、水中のイオン強度によってまちまちであると報告している。また、Piccapietra et al. (2012)は、銀ナノ粒子の凝集についてフミン酸が及ぼす影響を確認し、フミン酸の存在による凝集状況の変化は認められなかったと報告している。以上のように、水中の電解質や腐植質がナノ素材の挙動に与える影響は、電解質が凝集を促進させ、腐植質はこれを阻害するとの主張が大勢を占めるものの、相反する結果も複数存在している状況にある。

また、ナノ粒子とその他の懸濁物等とが混合・付着した場合の挙動についても、いくつかの報告がある。Zhou et al. (2012)は、二酸化チタンナノ粒子と銀ナノ粒子について、ナノクレイが混合した際の安定性を確認した。その結果、DLVO 理論上とは異なり、①二酸化チタンナノ粒子の安定性は電気二重層の多寡と整合しなかった、②銀ナノ粒子では、ナノクレイの存在による吸着度の目立った変化はなかったと報告している。Tripathi et al. (2012)は、ポリスチレンナノ粒子について、バイオフィルムが付着した場合の凝集について観察した。その結果、バイオフィルムが付着することで凝集度が増し、またその強弱はゼータ電位とは無関係である事が示唆されたと報告している。Zhang et al. (2012)は、高分子で修飾した銀ナノ粒子の安定性について確認した。その結果、高分子で修飾した銀ナノ粒子は、未処理のものに比べ安定性がより高かったと報告している。更に、Hong et al. (2009)は、磁性体である鉄ナノ粒子の凝集について、様々な磁性の水中において観察した。その結果、鉄ナノ粒子の凝集は他のナノ粒子よりも顕著であり、また水中の磁性が弱い程凝集が更に強かったと報告している。

このようなナノマテリアルの水中での様態については、動的光散乱法をその測定手法として用いているケースが一般である(Bai et al., 2010a, Bai et al., 2010b, Brar and Verma, 2011, Darkow et al., 1999, Domingos et al., 2009a, Franklin et al., 2007, Johnston et al., 2010, Park et al., 2010, Petushkov et al., 2009, Tso et al., 2010, Van Hoecke et al., 2009, Manabe et al., 2011, Dabrunz et al., 2011b, Bundschuh et al., 2012a, Dalai et al., 2013, Adams et al., 2006, Braydich-Stolle et al., 2010, Gao et al., 2011, Kim et al., 2010, Pycke et al., 2011, Schulze et al., 2008, Warheit, 2008, Warheit et al., 2007, Zhu et al., 2010)。しかし、前節に挙げた生態毒性の既存研究と同様に、その測定手法・条件について詳細を記載したものは少数である。また、電子顕微鏡を用いて観察・写真撮影を行ったものも多いが、前節で述べたように①被験液を乾固処理させるため、水中での挙動を把握する上で妥当とは言えない面がある、②粒子の状態は場所によって様々である可能性が高いが、観察範囲は基本的にはごく一部の箇所のみである、などの点から、正しく定量しているとは言い難い。2012 年以降は動的光散乱法に代わる手法として、非対称流動場分画法 (Flow-Field Flow Fraction; FI-FFF) と ICP-MS とを組み合わせた手法について優位性を主張する報告もある。例えば Hagendorfer et al. (2012)は、非対称流動場分画法と光分散粒子計、ICP-MS を組み合わせて銀ナノ粒子の測定を行い、その結果、動的光散乱法など既存手法に比べてより高い精度で分散試料を直接計

測出来る点で有効であると報告している。しかし、手法そのものに技術的優位性があったとしても、その測定手法・条件について抜本的な改善は図られておらず、単に新規な技術を用いたのみともいえる。従って、水中におけるナノマテリアルの挙動を把握する上で、現状には①測定技術が不適切である、又は測定技術の選択・考慮・記載等が不十分である、②測定の実施方法が不適切又は不十分である、の2面から問題があり、これらは既存研究量が年々増加する中にあっても必ずしも解決に向かっていないと考えられる（表 2-5）。

また、実際のナノマテリアルの環境中への流出についても、いくつかの検討結果が報告されている。Kaegi et al. (2008)は、二酸化チタンナノ粒子を混合した塗料が塗布された外壁を対象に、その流出液を採取してこれを顕微鏡観察と濃度測定に供した。その結果、20-300 nm の二酸化チタンナノ粒子が観察され、濃度も最大で 600 µg/L であったと報告している。Botta et al. (2011)は、市販の日焼け止めに含まれる二酸化チタンナノ粒子の使用における水環境中への流出について実験的に調査した。その結果、特に海水浴などによりナノ粒子が多く水環境中へ流出することが示唆されると報告している。また、Fabrega et al. (2011)は、銀ナノ粒子の水環境中での挙動について既存のデータを取り纏めた。その結果、モデル計算から水環境中での銀ナノ粒子の PEC/PNEC は 1 を超える場合もあり、大気圏・地圏に比べ極めて高いと報告している。但し、飽くまでも既存研究の断片的な結果を寄せ集め的に連結・解釈した結果であり、その妥当性については疑問が残る。また、概してナノ粒子の自然環境中へ流出は極めて複雑であり、現段階ではこれを検証する有効な術もなく、これらの結果はそれぞれの仮定の上に成立した一考察である事に留意すべきであろう。

表 2-5 既存研究におけるナノマテリアルの様態把握の状況

使用した手法	合計件数 (重複含む)	測定条件を 明記(内数)	実験開始後も 計測実施(内数)
動的光散乱法	96	4	1
静的光散乱法	2	0	0
多角度光散乱	1	0	0
透過型電子顕微鏡	24	10	0
走査型電子顕微鏡	10	3	0
ゼータ電位	6	0	1
ガス吸着法	4	0	0
非対称流動場分画法	2	1	0
不明	5	—	—
計	150	18	2

2.7. 課題のまとめとその打開策

以上より、新規環境影響懸念物質の中でも、特にナノマテリアルの環境リスク評価が急務であり、適切な手法が十分に検討・確立が必要である。

ナノマテリアルの生態影響を過不足なく適切に評価するためには、先ず水中における素材の様態を正しく計測・把握した上で、それを踏まえた適切な曝露試験とその評価がなされなければならない。そのためには、先ず液中微粒子のサイズを測定する代表的な手法である動的光散乱法について、生態影響試験に特化した測定手法を検討・開発することが有効であると考ええる。また、その手法を用いて水環境中におけるナノマテリアルの様態の継続的变化やその条件について検証する事で、生態影響試験のどのプロセスでどのように様態の計測を行うべきであるのかについて論理的な考察が可能になる。これらを踏まえて、既存の生態影響試験法を修正したナノマテリアルのための試験系を構築し、曝露試験を実施すべきである。その際、先ずは短期的な試験を確実に実施・評価することが先決であるが、一方でより複雑な影響、例えば繁殖や生活史、更には多世代に亘る影響などを評価する試験法の確立も将来的には求められる。従って、他の新規環境影響物質、特に試験法開発が進んでいる内分泌かく乱物質などを用いて、そのような試験系の構築に向けた検討を並行して実施することは有効であり、それらはナノマテリアル以外の化学物質の評価系としてもフィードバックが可能であると期待される。

以上を踏まえた各種実験と考察について、次章以降にその詳細を述べる。

第3章 ナノマテリアルの粒径測定手法に関する検討と開発

3.1. 背景と目的

ナノテクノロジーの発展に伴い主に材料工学やコロイド化学などの分野で既存技術の適用・新技術の開発が進められてきた。代表的な手法として、動的光散乱法、静的光散乱法、超音波スペクトロスコーピー、非対称流動場分画法、各種画像解析（走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡）などが挙げられる(Mahler and Jiskoot, 2012)。

中でも、動的光散乱法は最も一般に用いられている。動的光散乱法は、液中に分散している粒子にレーザー光を照射し、粒子のブラウン運動に伴って発生した散乱光の揺らぎを光子検出器で観測し、数学的な解析を行う事で粒子の粒径を求める手法である()。この手法は、広範な素材・粒径の分散系に対応可能であり分散媒も選ばないことから、液中に分散するナノマテリアルの粒径・粒径分布測定手法として最も一般に用いられている。一方で、散乱光の測定データを数学的に解析して二次的に数値を算出する特性上、複数存在する解析手法のうち被験分散液に適したものをを用いる事が、妥当な値を得る上で重要である(Berne and Pecora, 1976, Brown, 1993)。解析手法は、大きく二つの要素の組み合わせで決定する。一つは質量換算や個数換算といった換算基準であり、もう一つは解析の際のアルゴリズムである(Schatzel, 1987)。各アルゴリズムはそれぞれ目的を持って開発されており、下記のような特徴を持つ(Berne and Pecora, 1976, Brown, 1993)。

- Cumulant 法 : 粒径分布がポアソン分布であることを仮定して解析する為、均一な粒子を測定する際には誤検知の可能性が低く有用な、最も一般的なアルゴリズムである、
- Marquardt 法 : 解析にヒストグラム法を用いており、多分散系試料の測定に適しているとされる
- NNLS 法 : 解析に非線形最小自乗法を用いており、Marquardt 法同様、多分散系試料の測定に適しているとされる
- Contin 法 : 解析に逆ラプラス変換を用いており、高分子など連続的な拡散係数を持つ試料に適しているとされる

上述の解析手法の中でも、現在最も汎用的に用いられているのはアルゴリズムに Cumulant 法を用いた手法であり、各メーカーの計測システムでもデフォルトの手法として設定されている場合が多い。均一な粒子の測定に適した Cumulant 法が多く用いられている一因として、動的光散乱法が材料工学等の分野で主に発展してきたため、同分野の主な対象である有機分散媒等に拡散させた比較的均一な分散系の測定に最適化されたことが挙げられる。

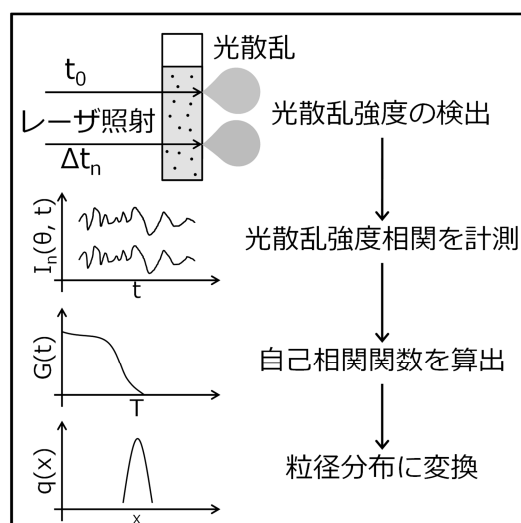


図 3-1 動的光散乱法による微粒子測定概念

<div>換算基準</div> <div>アルゴリズム</div>	散乱強度換算	質量換算	個数換算
Cumulant法			
Marquardt法			
NNLS法			
Contin法			

図 3-2 動的光散乱法の代表的な解析手法：換算基準として3種，アルゴリズムとして4種，代表例を示す。従って，ここでは計12種類の解析手法が存在する。

-
-
-

•

ナノマテリアルの生態影響試験に関する多くの既存研究においても、諸分野に倣い動的
光散乱法を用いたものは多い。その際、前章で示したように、その際、換算法やアルゴ
リズムといった解析手法の詳細については明記されている事は稀であり（表 2-5）、恐らく
は、測定システムのデフォルトの設定を。想像される。しかし、水生生物の生息する水環
境中には様々な溶解物・夾雑物が含まれており、そのような条件下では、ナノ素材は安定
的な分散状態を維持できない恐れがコロイド化学における DLVO 理論(Verwey et al., 1999,
Ninham, 1999)などから考え得る。また、そのような粒径分布の不均一な分散系の場合、
Cumulant 法では妥当な測定結果が得られない可能性が種々の観点から指摘されている；物
理化学における理論的考察(Aragon and Pecora, 1976, Flamberg and Pecora, 1984, Koppel, 1972,
Morrison et al., 1985, Provencher et al., 1978, Provencher, 1979, Provencher, 1982a, Provencher,
1982b, Ruf, 1989, Ruf et al., 1989, Ruf et al., 1992, Hallett et al., 1991, Frisken, 2001, Hassan and
Kulshreshtha, 2006), 材料工学等の分野での用途に応じた分析条件などの検討 (Hughes et al.,
1973, Kojro et al., 1989, Kojro, 1990), 多分散系試料の測定手法の検討(Weiner and Tschamuter,
1987), 凝集プロセス把握の試み(Nicolai and Cocard, 2001)など。にもかかわらず、水中・水
環境中においてナノマテリアルの粒径を測定する場合、解析手法によってどの程度差異が
生じうるのか、どの解析手法を用いるのが適切であるか、などといった事について現状殆
ど検討されていない。また、既存研究は被験液の状態を適切に把握・定量化出来ていない
恐れがあり、そのような結果が正しいことを前提に誤った議論が展開されていることが懸
念される。

そこで、本研究では動的光散乱法による水環境中ナノ粒子の適切な粒径測定手法につい
て検討することを目的とし、ナノ粒子分散液を複数の異なる手法で測定・解析し、値の差
異や妥当性について考察を行った。具体的には、種々の金属ナノ粒子を対象として、①水
環境中への流入前を想定した、出来る限り均一に拡散させた分散系、②水環境に流入し不
均一になった状態を想定した、敢えて複数サイズの粒子を混在させた分散系、の2つのタ
イプの分散系を調製し、各換算基準・アルゴリズムの妥当性を検討した。

3.2. 材料と方法

(1) ナノ粒子分散液の調製

代表的な各種金属ナノ粒子（及び非ナノサイズ粒子）を 20 種類選択した（表 3-1）。内訳は、二酸化チタン 9 種、金 3 種、銀 3 種、及び下記各 1 種である；酸化銅(II)・酸化鉄(III)・酸化アルミニウム・酸化亜鉛・酸化マグネシウム。何れも、分散媒は含んで居らず、表面も未処理である。これらを、それぞれ 50 mg/mL の分散濃度で 0.1 mol/L リン酸緩衝液（和光純薬株式会社製）と混和し、超音波破砕機（VibraCell 130-PB, 米 Sonics & Material 社）にて 10W/0W:10 秒/5 秒の周期で 10 分間超音波処理し分散させた。次に速やかに 0.1 mol/L リン酸緩衝液により 200 mg/L に希釈し、温度が $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で安定するようウォーターバスを用いて調節した。これを単分散系と呼ぶ。二酸化チタン・金については、サイズの異なる複数の単分散系を混合した多分散系を 1 種ずつも調製した。以上から、計 22 種類の金属ナノ粒子分散液を得た（表 3-2）。

表 3-1 単分散系使用した金属粒子の一覧

番号	素材名	公称粒径 (nm)	純度 (%)	メーカー	備考
1	二酸化チタン	5	>99.9	テイカ株式会社	アナターズ型
2	二酸化チタン	15	>99.9	テイカ株式会社	アナターズ型
3	二酸化チタン	35	>99.9	テイカ株式会社	アナターズ型
4	二酸化チタン	35	>99.9	テイカ株式会社	ルチル型
5	二酸化チタン	100	>99.9	テイカ株式会社	アナターズ型
6	二酸化チタン	180	>99	テイカ株式会社	アナターズ型
7	二酸化チタン	300	>99	テイカ株式会社	ルチル型
8	二酸化チタン	300	>99	テイカ株式会社	アナターズ型
9	二酸化チタン	4000	>99	テイカ株式会社	ルチル型
10	金	10	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
11	金	50	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
12	金	100	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
13	銀	10	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
14	銀	40	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
15	銀	100	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
16	酸化銅(II)	<50	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
17	酸化鉄(III)	50-100	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
18	酸化アルミニウム	<100	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
19	酸化亜鉛	<100	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	
20	酸化マグネシウム	50	>99	米・シグマ-アルドリッチ社	

表 3-2 多分散系試料の一覧

番号	素材名	公称粒径(nm) ・混合比率	使用粒子
21	二酸化チタン	5 nm : 100 nm : 4000 nm = 10 : 3 : 1	No.1, 8, 9
22	金	10 nm : 100 nm = 3 : 1	No.10, 12

(2) 計測・解析

各分散液は、調製後速やかに 1 mL を採取し、動的光散乱法を用いた粒径測定システム (ELS-Z2, 大塚電子) を用いて平均粒径及び粒径分布の測定に供した。同システムによって、まずヘリウムネオンレーザーを 2.53 mW の出力に固定して試料へ照射し、光散乱強度相関を計測、これを 80 回繰返した。次のその値を下式に従って光子相関法により自己相関関数化した。

$$G_2(\tau) = \frac{\{I(t) \cdot I(t + \tau)\}}{\{I(t)\}^2} = \{g_1(\tau)\}^2 + 1$$

$G_2(\tau)$: 散乱光強度の自己相関関数

$I(t)$: 時間 t における散乱光強度

τ : 遅延時間

$g_1(\tau)$: 散乱光電場の自己相関関数

ここで、粒子が完全な単分散状態である場合、 g_1 を拡散係数に依存する単一減衰の指数関数の形で表せる。

$$g_1(\tau) = B \exp \{-D(\tau)q^2\}$$

D : 拡散係数

B : システムに依存する定数

但し、実際には完全な単分散状態ではあり得ないため、下記とした。

$$g_1(\tau) = B \sum_i [A_i \cdot \exp \{-D(\tau)q^2\}]$$

A_i : 総体散乱強度

ここから、粒径は Stokes-Einstein 式に従って求められる。

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

d : 粒径

k : ボルツマン定数

T : 絶対温度

η : 粘度

上記を基に、4 種類のアプローチ、①Cumulant 法、②Marquardt 法、③NNLS 法、④Contin 法、を用い、それぞれ 3 種の換算基準、①散乱強度換算、②質量換算、③個数換算によって平均粒径・粒径分布を求めた。即ち、1 試料あたりについて 12 の解析手法で測定を行った。またサンプル毎の繰返し回数は、4 回とした。

(3) 電子顕微鏡による観察

多分散系試料 5 種については、動的光散乱法での測定に供したサンプルを用い、走査型電子顕微鏡による観察を併せて行った。サンプル 0.1 mL をガラス製試料台上へ滴下し、12 h 自然乾燥後に蒸着装置による金蒸着処理（JFC-1600, 日本電子株式会社製, スパッタリング電流: 30mA, 処理時間: 45 秒）をした。これを、走査型電子顕微鏡（JSM - 6510LA, 日本電子株式会社製）によって観察し、代表的箇所の撮影を行った。また、同顕微鏡のエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて、試料表面の組成分析を行った。

3.3. 結果

(1) 単分散系サンプルの測定結果

単分散系サンプルの測定結果を表 3-3～表 3-5 に示す。換算基準毎の値を比較すると、何れのサンプルについても、個数換算による平均値が最も小さい値を取り、次いで光散乱強度換算、質量換算の順となる傾向にあった。個数換算と比べた平均値の値は、光散乱強度換算で約 1.42 倍 (S.D. : 0.12)、質量換算では約 2.05 倍 (S.D. : 0.30) と、素材の材質や大きさを問わず一貫性が見られた。また、アルゴリズム間を比較すると、各アルゴリズムによる同一サンプルの平均値の差異は、最大でも 2 倍弱であった。個々のアルゴリズム又はアルゴリズム間について、その値に目立った傾向は確認されなかった。

各素材についてみると、二酸化チタンは公称粒径に比べ凝集が顕著であり、特に公称粒径が小さい程その傾向が強かった。例えば、公称粒径が 5 nm のサンプル 1 では、平均値の値はおおよそ 50～170 倍であった。一方、金は凝集が被験素材中では最も穏やかであり、最大でもおおよそ 3.2 倍程度、平均値が公称値を下回るケースも多く確認された。この他の素材の凝集率は、金以上二酸化チタン未満であった。中でも酸化マグネシウムは比較的凝集が穏やかであり最大でも 6 倍未満、酸化銅・酸化鉄・酸化アルミニウム・酸化亜鉛については概ね 5～10 倍程度の範囲にあった。

(2) 多分散系サンプルの測定結果

金多分散系サンプルについて各換算基準・アルゴリズムによる平均粒径測定結果を表 3-6 に、同じく二酸化チタン多分散系サンプルについて表 3-7 に示す。Cumulant 法では、ピーク数が 1 であり、即ち単分散系として処理された。他のアルゴリズムではピークが複数に分かれる多分散系サンプルとして処理され、ピーク数は Marquardt 法で 4、NNLS 法で 3、Contin 法で 2 であった。各ピークについてみると (換算基準による差異が殆ど観察されなかったため、便宜上光散乱強度換算の値で統一する)、Marquardt 法におけるピークは最小で平均 94.0 nm、最大で平均 3190 nm と、分散系のサイズを反映しなかった。同様に、NNLS 法でも、最小のピークが平均 81.2 nm、最大で平均 3100 nm であった。一方、Contin 法については、小ピークの平均値が 12.9 nm、大ピークの平均値が 97.0 nm と、混合前の基材である各単分散系サンプル (サンプル 10 及び 12) の公称値・実測値と整合した。二酸化チタン多分散系サンプルについては、Cumulant 法・Marquardt 法・NNLS 法の 3 種ではピーク数が 1 であり単分散系として処理された。一方、Contin 法ではピーク数が 3 であり、何れの換算基準でも小ピーク側からそれぞれ約 80 nm、約 800 nm、約 4000 nm であった。

二酸化チタン多分散系サンプルの粒径分布算出結果を図 3-3 に示す。Cumulant 法・Marquardt 法・NNLS 法の 3 種は、何れも平均値としては 10%以内の偏差で近似していたが、粒径の範囲としては大きく異なっていた。また、Contin 法では何れの換算基準でも 3 のピークを検出し平均値も 10%以内の偏差で近似していたが、各ピークの分布の割合は換算基

準によって異なり、個数換算が最も小粒子を多く捉えており、逆に質量換算が最も大粒子を多く捉えていた。

金多分散系サンプルの走査型電子顕微鏡写真を図 3-4 に示す。サンプルは良好な観察が困難であったが、20 nm 前後及び 100 nm 以上の粒子が観察され、それぞれサンプル 10 及び 12 に由来するものと推測される。但し、X 線解析については、照射面積に対し当該粒子が小さすぎるため、有効ではなかった。二酸化チタン多分散系サンプルの走査型電子顕微鏡写真を図 3-5 に示す。50 nm 前後, 1 μm 前後, 4 μm 以上の各粒子がそれぞれ観察され、それぞれサンプル 1, 8, 9 に由来するものと推測される。X 線解析からも粒子の密集する場所でチタンの検出が確認された。但し、これについても粒子群のある一帯に対して X 線照射が行われた状態であり、良好な解析条件は確保されなかった。

表 3-3 各アルゴリズムによる単分散系の平均粒径測定結果：光散乱強度換算

番号	素材名	公称粒径 (nm)	光散乱強度換算の実測粒径 (nm, mean \pm S.D.)			
			Cumulant法	Marquardt法	NNLS法	Contin法
1	二酸化チタン	5	358 \pm 87	537 \pm 73	411 \pm 63	364 \pm 87
2	二酸化チタン	15	619 \pm 85	662 \pm 89	765 \pm 140	896 \pm 110
3	二酸化チタン	35	936 \pm 100	741 \pm 110	729 \pm 110	799 \pm 80
4	二酸化チタン	35	1130 \pm 110	917 \pm 110	1070 \pm 120	917 \pm 100
5	二酸化チタン	100	1200 \pm 120	882 \pm 130	873 \pm 170	822 \pm 120
6	二酸化チタン	180	1120 \pm 130	1260 \pm 110	1040 \pm 110	927 \pm 110
7	二酸化チタン	300	1110 \pm 110	1450 \pm 150	1510 \pm 140	1210 \pm 160
8	二酸化チタン	300	1350 \pm 110	1690 \pm 140	1460 \pm 150	1300 \pm 120
9	二酸化チタン	4000	6510 \pm 280	7100 \pm 290	8740 \pm 250	6940 \pm 200
10	金	10	22.2 \pm 8.7	25.8 \pm 9.4	32.0 \pm 6.3	18.4 \pm 5.9
11	金	50	92.1 \pm 13	86.7 \pm 17	88.1 \pm 24	98.7 \pm 13
12	金	100	133 \pm 24	119 \pm 20	94.6 \pm 20	108 \pm 18
13	銀	10	107 \pm 80	129 \pm 70	110 \pm 49	118 \pm 49
14	銀	40	197 \pm 130	223 \pm 96	201 \pm 98	196 \pm 69
15	銀	100	459 \pm 100	344 \pm 89	327 \pm 130	421 \pm 77
16	酸化銅(II)	<50	210 \pm 97	725 \pm 75	243 \pm 71	280 \pm 87
17	酸化鉄(III)	50-100	760 \pm 140	1020 \pm 160	792 \pm 140	1120 \pm 120
18	酸化アルミニウム	<100	571 \pm 190	716 \pm 89	556 \pm 120	590 \pm 99
19	酸化亜鉛	<100	853 \pm 110	855 \pm 98	772 \pm 160	626 \pm 120
20	酸化マグネシウム	50	202 \pm 82	194 \pm 120	197 \pm 84	183 \pm 64

表 3-4 各アルゴリズムによる単分散系の平均粒径測定結果：個数換算

番号	素材名	公称粒径 (nm)	個数換算の実測粒径 (nm, mean \pm S.D.)			
			Cumulant法	Marquardt法	NNLS法	Contint法
1	二酸化チタン	5	247 \pm 76	336 \pm 71	275 \pm 63	265 \pm 62
2	二酸化チタン	15	457 \pm 78	502 \pm 82	470 \pm 110	544 \pm 100
3	二酸化チタン	35	699 \pm 82	543 \pm 81	497 \pm 99	616 \pm 78
4	二酸化チタン	35	771 \pm 88	733 \pm 75	707 \pm 92	706 \pm 100
5	二酸化チタン	100	692 \pm 110	670 \pm 120	648 \pm 120	627 \pm 100
6	二酸化チタン	180	877 \pm 120	843 \pm 94	758 \pm 110	733 \pm 110
7	二酸化チタン	300	874 \pm 95	910 \pm 110	968 \pm 120	955 \pm 110
8	二酸化チタン	300	961 \pm 95	1150 \pm 130	896 \pm 140	1000 \pm 110
9	二酸化チタン	4000	5120 \pm 210	5430 \pm 200	5390 \pm 170	5200 \pm 180
10	金	10	16.8 \pm 7.4	19.2 \pm 2.9	22.3 \pm 2.8	14.7 \pm 4.3
11	金	50	56.1 \pm 12	61.2 \pm 17	69.5 \pm 20	66.0 \pm 11
12	金	100	90.0 \pm 18	94.1 \pm 14	71.8 \pm 17	68.9 \pm 17
13	銀	10	73.6 \pm 59	81.0 \pm 62	75.5 \pm 36	76.4 \pm 43
14	銀	40	139 \pm 92	151.5 \pm 96	143 \pm 69	130 \pm 63
15	銀	100	291 \pm 96	268 \pm 80	254 \pm 87	305 \pm 74
16	酸化銅(II)	<50	160 \pm 94	495 \pm 56	179 \pm 72	206 \pm 63
17	酸化鉄(III)	50-100	530 \pm 106	767 \pm 120	550 \pm 120	694 \pm 110
18	酸化アルミニウム	<100	426 \pm 126	457 \pm 88	428 \pm 110	445 \pm 93
19	酸化亜鉛	<100	537 \pm 102	655 \pm 86	613 \pm 130	500 \pm 120
20	酸化マグネシウム	50	132 \pm 80	144 \pm 93	125 \pm 77	119 \pm 63

表 3-5 各アルゴリズムによる単分散系の平均粒径測定結果：質量換算

番号	素材名	公称粒径 (nm)	質量換算の実測粒径 (nm, mean \pm S.D.)			
			Cumulant法	Marquardt法	NNLS法	Contint法
1	二酸化チタン	5	504 \pm 100	826 \pm 90	547 \pm 75	527 \pm 98
2	二酸化チタン	15	816 \pm 96	1020 \pm 130	986 \pm 150	1240 \pm 110
3	二酸化チタン	35	1390 \pm 120	984 \pm 140	1070 \pm 140	1120 \pm 120
4	二酸化チタン	35	1750 \pm 140	1450 \pm 150	1410 \pm 150	1390 \pm 110
5	二酸化チタン	100	1650 \pm 120	1230 \pm 170	1190 \pm 240	1260 \pm 170
6	二酸化チタン	180	1520 \pm 150	1600 \pm 130	1590 \pm 120	1210 \pm 140
7	二酸化チタン	300	1780 \pm 130	1860 \pm 210	2580 \pm 150	1710 \pm 220
8	二酸化チタン	300	1840 \pm 150	2400 \pm 190	1910 \pm 160	2030 \pm 140
9	二酸化チタン	4000	10400 \pm 280	9160 \pm 360	12400 \pm 330	8920 \pm 230
10	金	10	28.1 \pm 12	34.2 \pm 5.1	51.6 \pm 11	24.0 \pm 7.0
11	金	50	122 \pm 17	135 \pm 18	134 \pm 30	147 \pm 16
12	金	100	198 \pm 26	177 \pm 21	155 \pm 23	143 \pm 19
13	銀	10	137 \pm 84	167 \pm 72	167 \pm 49	159 \pm 65
14	銀	40	251 \pm 130	359 \pm 100	318 \pm 100	282 \pm 83
15	銀	100	715 \pm 120	503 \pm 92	459 \pm 150	679 \pm 89
16	酸化銅(II)	<50	291 \pm 120	915 \pm 76	395 \pm 100	359 \pm 110
17	酸化鉄(III)	50-100	1160 \pm 200	1300 \pm 210	1160 \pm 200	1640 \pm 180
18	酸化アルミニウム	<100	873 \pm 240	1030 \pm 110	817 \pm 170	924 \pm 120
19	酸化亜鉛	<100	1220 \pm 130	1270 \pm 130	1150 \pm 200	2020 \pm 170
20	酸化マグネシウム	50	278 \pm 100	248 \pm 150	278 \pm 130	243 \pm 65

表 3-6 各解析手法による金多分散系サンプルの平均粒径測定結果

換算基準	ピーク	実測粒径 (nm, mean \pm S.D.)			
		Cumulant法	Marquardt法	NNLS法	Contint法
光散乱強度	1	71.5 \pm 27	94.0 \pm 14	81.2 \pm 31	12.9 \pm 4.2
	2	\pm	519 \pm 0.13	1020 \pm 130	97 \pm 19
	3	\pm	781 \pm 0.12	3100 \pm 400	\pm
	4	\pm	3190 \pm 210	\pm	\pm
	計	71.5 \pm 23	530 \pm 1000	244 \pm 730	91.4 \pm 23
個数	1	59.4 \pm 27	91.3 \pm 14	74.0 \pm 15	12.7 \pm 4.8
	2	\pm	518 \pm 0.22	2290 \pm 91	95.8 \pm 19
	3	\pm	780 \pm 0.24	3070 \pm 380	\pm
	4	\pm	3170 \pm 200	\pm	\pm
	計	59.4 \pm 23	91.3 \pm 16	74.0 \pm 16	12.9 \pm 5.1
質量	1	89.5 \pm 27	98.2 \pm 16	86.4 \pm 25	12.9 \pm 4.2
	2	\pm	519 \pm 0.13	230 \pm 77	97 \pm 19
	3	\pm	781 \pm 0.12	3230 \pm 420	\pm
	4	\pm	3210 \pm 220	\pm	\pm
	計	89.5 \pm 34	550 \pm 1100	445 \pm 970	91.4 \pm 23

表 3-7 各解析手法による二酸化チタン多分散系サンプルの平均粒径測定結果

換算基準	ピーク	実測粒径 (nm, mean \pm S.D.)			
		Cumulant法	Marquardt法	NNLS法	Contin法
光散乱強度	1	540 \pm 160	593 \pm 62	575 \pm 60	77.0 \pm 10
	2	\pm	\pm	\pm	799 \pm 17
	3	\pm	\pm	\pm	4410 \pm 310
	計	540 \pm 160	593 \pm 62	575 \pm 60	3560 \pm 450
個数	1	381 \pm 110	422 \pm 55	416 \pm 47	76.1 \pm 11
	2	\pm	\pm	\pm	791 \pm 20
	3	\pm	\pm	\pm	3780 \pm 190
	計	381 \pm 110	422 \pm 55	416 \pm 47	387 \pm 310
質量	1	805 \pm 140	837 \pm 68	820 \pm 60	78.5 \pm 9.4
	2	\pm	\pm	\pm	803 \pm 17
	3	\pm	\pm	\pm	4560 \pm 240
	計	805 \pm 140	837 \pm 68	820 \pm 60	4100 \pm 390

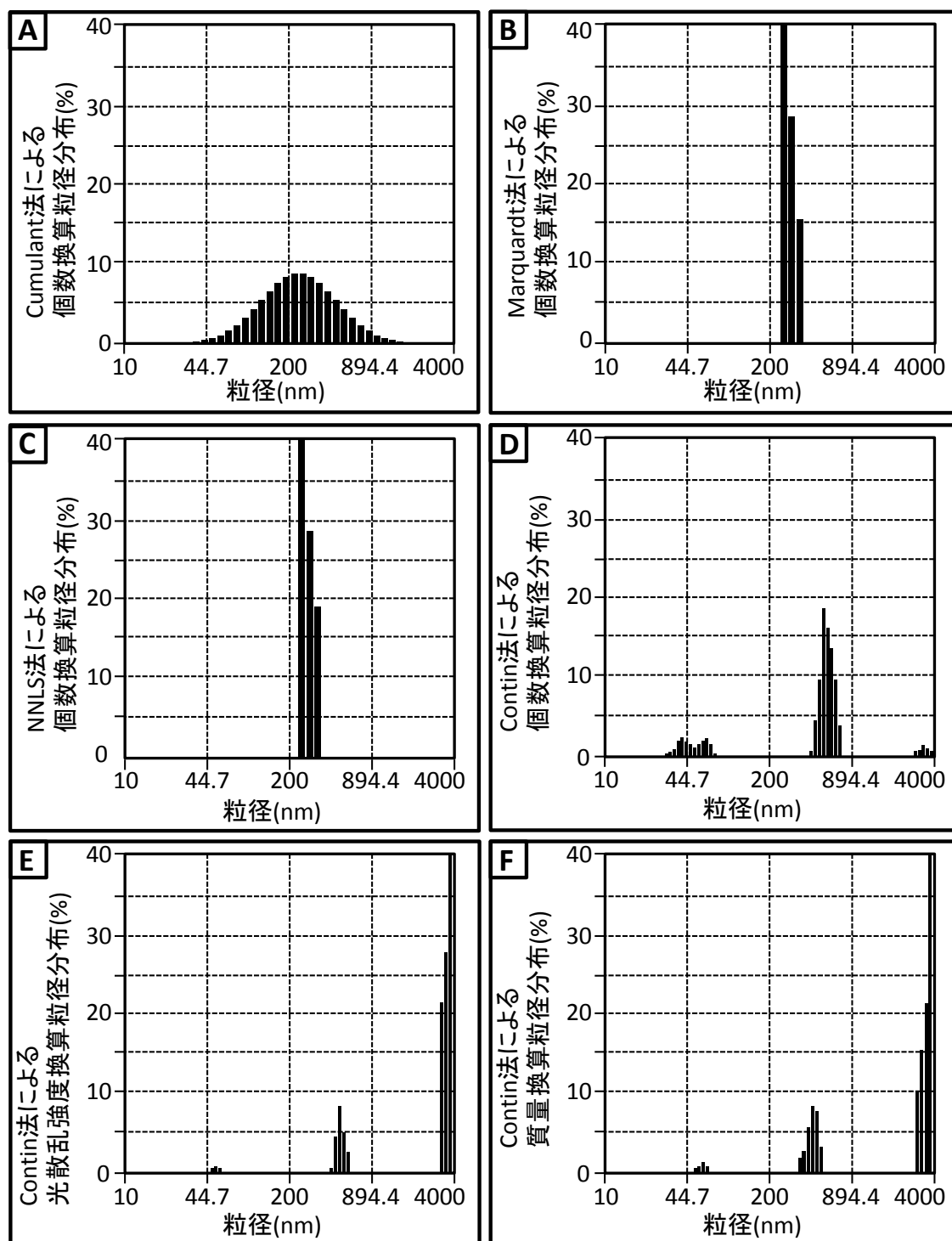


図 3-3 二酸化チタン多分散系サンプルの粒径分布算出結果:(A) Cumulant 法・個数換算, (B) Marquardt 法・個数換算, (C) NNLS 法・個数換算, (D) Contin 法・個数換算, (E) Contin 法・光散乱強度換算, (F) Contin 法・質量換算.

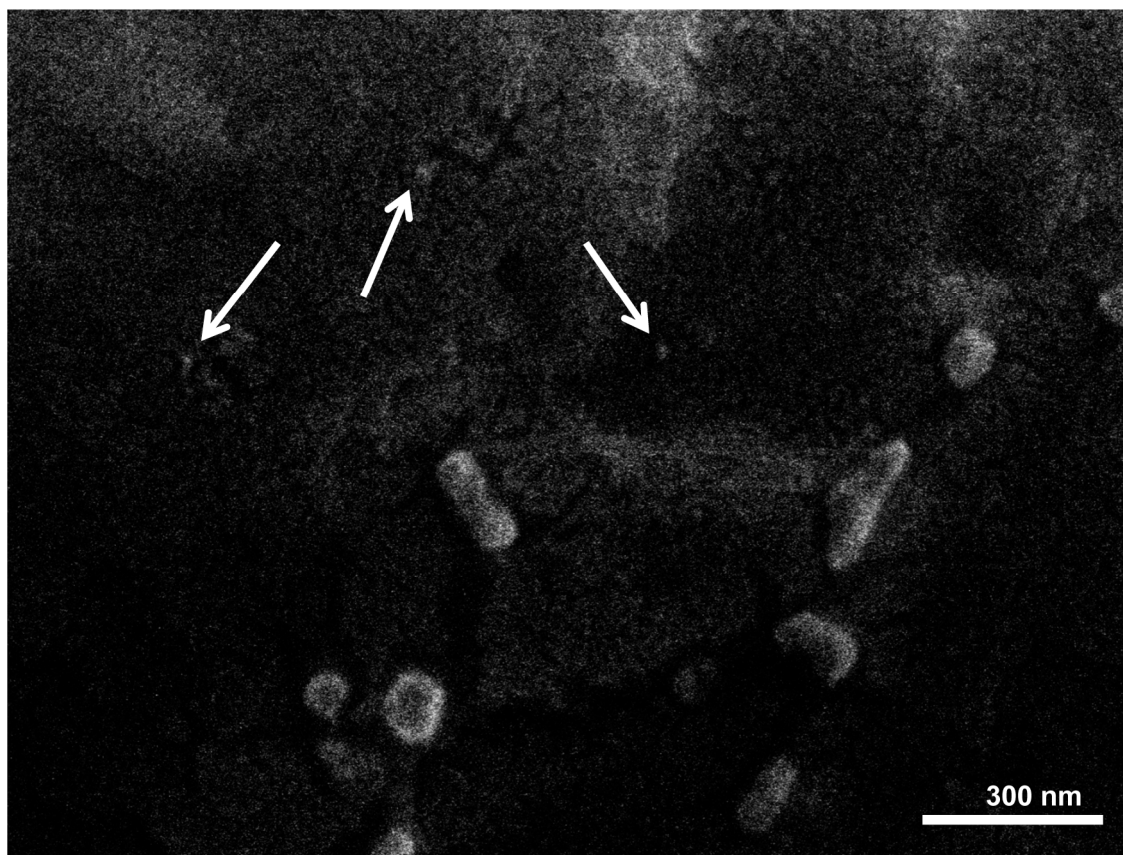


図 3-4 金多分散系サンプルの走査型電子顕微鏡写真，矢印は 100 nm 未満の粒子を示す

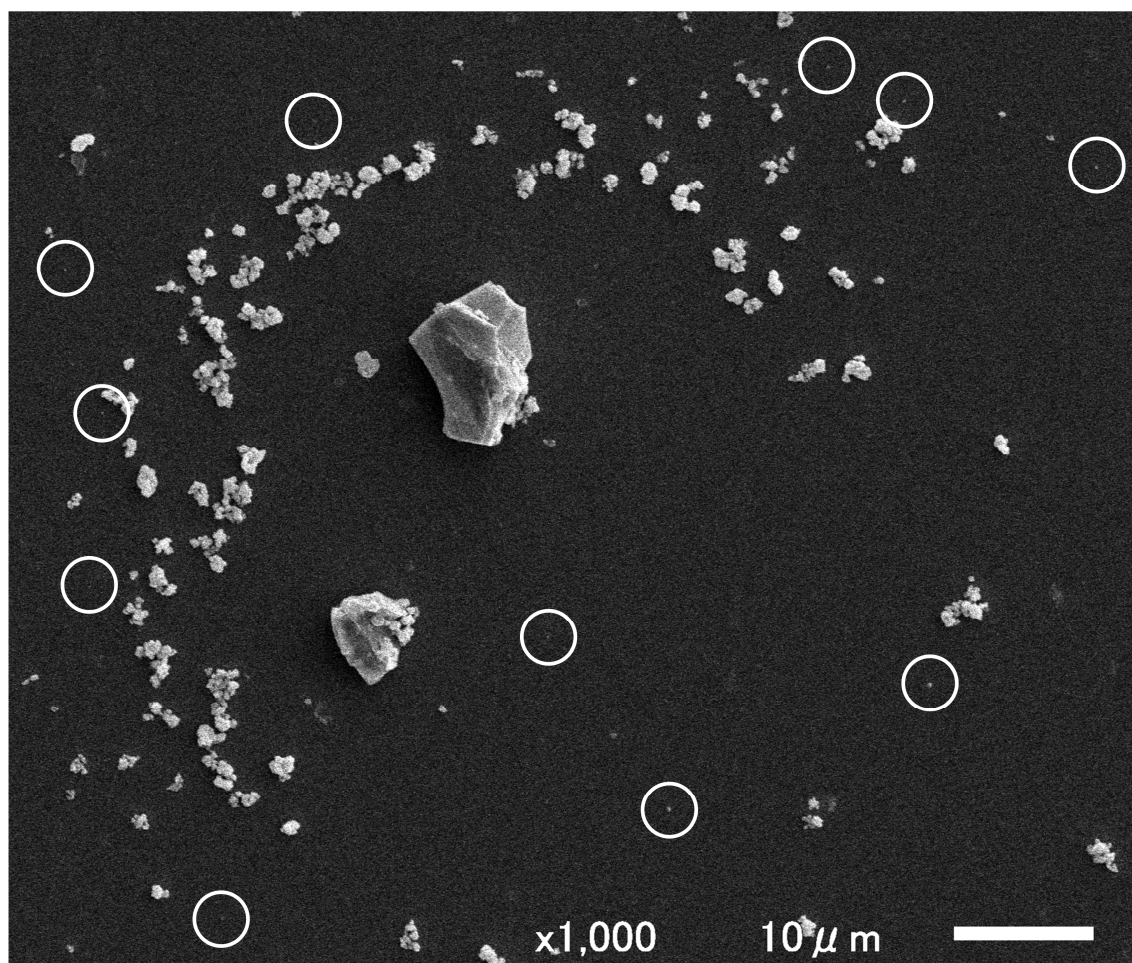


図 3-5 二酸化チタン多分散系サンプルの走査型電子顕微鏡写真，丸印内は，100 nm 未満の粒子を示す

3.4. 考察

単分散系サンプルにおける各種金属ナノ粒子分散液の測定結果から、ある程度均一に調製された粒子であれば、何れのアルゴリズムでも大差なく平均値が産出される事が示された。また、換算基準による傾向は一貫しており、最も小さい値を取るのが個数換算であり、質量換算が最大値を取った。理論上、個数基準はより小さな粒子の影響を受けやすく、逆に質量換算はより大きな粒子の影響を受けやすい^{130,131}。従って、本結果は各換算基準の理論的な位置付けと整合すると言える。

一方、多分散系サンプルにおいては、金・二酸化チタンの何れについても Contin 法以外の3つのアルゴリズムでは、意図しない結果が算出された。Cumulant 法は、粒径分布がポアソン分布であるとの仮定に基づいた解析手法であるため、不均一な分散液の測定に対して不適であることは従前から知られている(Mahler and Jiskoot, 2012, Berne and Pecora, 1976, Koppel, 1972)。一方、NNLS 法や Marquardt 法は、複数のピークを持つ多分散系試料の解析に適しているとされてきた(Roig and Alessandrini, 2007, Aragon and Pecora, 1976, Brown, 1993)。しかし、金多分散系サンプルでは、両アルゴリズムとも実際には存在しないはずの大粒子を誤検知し、一方で存在するはずの公称 10 nm の粒子は不検知であった。一方、二酸化チタン多分散系サンプルでは、実際には存在するはずのより小さい粒子・より大きい粒子を検出せず、単分散系として処理された。一方、Contin 法については、Marquardt 法や NNLS 法に比べると複数のピークを検出する感度が低いとの指摘もある (Garidel and Kebbel, 2010)が、今回実際の水環境中での状態を想定して調製した多分散系サンプルにおいては、最も妥当な解析結果を示した。

金の多分散系サンプルにおいて、Marquardt 法や NNLS 法で存在しないはずのマイクロ・サイズの粒子が検出された原因として、粒径の異なる粒子の光散乱が交雑した事に伴うノイズを誤検知した可能性が考えられる。ラテックスビーズなどを用いた既存の解析手法でも、一般の材料レベルよりも粒子密度が低い場合にノイズの影響が強くなる事が示されており、本結果とも整合する(Harding et al., 1992, Garidel and Kebbel, 2010)。一方で、両アルゴリズムの二酸化チタン多分散系サンプルに対する測定結果はまた傾向が異なり、単一ピークしか検出出来ずその粒径の範囲も Cumulant 法に比べ顕著に狭かった。現状、Marquardt 法や NNLS 法は Contin 法以上に鋭敏であると認識されて、同様の傾向を示す既存研究例は存在しない(Okubo and Kiriyama, 1996, Roig and Alessandrini, 2007)。本実験結果からはそのメカニズムを明らかに出来ないが、生態影響試験を念頭に置いて聴視した本実験のサンプルが、一般の材料を想定した既存研究のサンプルに比べより希薄であった事が要因の可能性として考えられる。

ナノマテリアルの生態影響を考察する際に、平均粒径を何れの換算基準で示すべきであるかは、実験のコンセプトや検証する仮説によって異なる。例えば、素材としての絶対量が影響の強弱と直結すると考えるならば質量換算で示すべきであるし、微量であっても真

にナノ・サイズであることが重篤であると考えられる場合には個数換算で示すべきであろう。その際、測定対象が不均一である場合、どちらの換算基準で示すかによって値が大きく変化するため留意が必要であることは自明である(Brown, 1993)。それに加えて、多分散系サンプルにおける Marquardt 法や NNLS 法による質量換算値からは、誤検知が与える影響がクリティカルになる場合があることが示された。従って、①個数換算では僅かな小粒子の存在もしくは誤検知が平均粒径を小さくさせること、②質量換算では僅かな大粒子の存在もしくは誤検知が平均粒径を大きくさせること、の各側面を考慮して換算基準を考慮・解釈することが必要であろう。但し、ナノ・サイズの粒子に対する検出精度を考慮に含むと、多くのケースにおいて個数換算がより実用的であるものと想定される。

その他の試験条件例えばノイズカットや測定の積算回数、粘度や温度の入力値などについて本稿では具体的検証を行わなかったが、解析結果を左右する重要な要素であると考えられる。特に、Marquardt 法や NNLS 法を用いた解析結果からは、ノイズの存在とその取扱いが極めて重要である可能性が示唆された。材料工学やコロイド化学の分野においてはこうした諸条件を検討した事例があるが(Weiner and Tscharnuter, 1987, Ruf et al., 1992)、生態影響試験用のサンプルへはそのまま適用できないため、より詳細な考察が必要であろう。粘度と水温は、解析に必要な入力値として結果に大きく影響を与える。特に生体へ曝露した被験液を測定する際には、夾雑物などによって粘度が高くなる恐れがある。従って、本来は粘度を測定した上で実数を入力することが望ましいが、測定精度によっては却って誤差要因を増やす懸念もあるため、注意が必要であろう。

DLS 法に限らず、水中ナノ粒子の測定には一長一短があり、特に水生生物への曝露試験に際しては上述のようなボトルネックが存在する。従って、単一の方法では様態を誤検出・誤解する危険性が高い。アプローチの異なる複数の手法を組み合わせるダブルチェックを行い、双方の欠点を補完する事が望ましい。その際、動的光散乱法と走査型顕微鏡の関係(動的光散乱法は定量的に測定できる長所を持つが、間接的・二次的な計算に依る点が難点である、一方走査型顕微鏡は定性的な観察ではあるものの、直接的に状態を確認出来る強みを持つ)のように、相互の長所・短所を補完し合う手法を選択する事は有効であろう。但し、本実験からは、電子顕微鏡による金属ナノ粒子分散液の観察・撮影は、良好な観察条件が成立しにくい事が示唆されており、飽くまでも参考としての位置付けが相応しいものと考えられる。

3.5. まとめ

本結果から、水中・水環境中のナノ粒子を動的光散乱法によって測定する際には、主流である Cumulant 法は不適であり、Contin 法を用い個数換算で表す事が最も望ましいと結論付けられる。また、これまで材料工学などの分野において多分散系の解析に適しているとされてきた Marquardt 法や NNLS 法は、水環境中のナノ粒子の粒径測定では正しく解析で

きない場合があることが示された。但し、Contin 法であっても原理上ノイズなど外乱の影響を受けやすい事には変わらず、誤検出の可能性が排除出来ない。また、動的光散乱法に限らず、どの手法もそれぞれが長所と短所を内包しており、単一の手法のみでは様態を誤検出・誤解する危険性が高い。従って、水環境中ナノ粒子の様態を適切に把握するためには、次の3点が重要であろう。即ち、①対象分散液の特性に留意した測定条件・手法の検討・選択、②複数の測定・解析手法の併用による、双方の弱点の補完とそれぞれ比較による多角的な様態の把握、③報告に際する、諸情報（DLS 法においては、測定条件・換算基準・解析アルゴリズム・解析に関する諸設定値など）や特記事項の明記である。

第4章 水環境中におけるナノマテリアルの様態解析

4.1. 背景と目的

自然環境中に流入したナノマテリアルが物理化学的・生物学的にどのような挙動を示すか把握することは、ナノマテリアルの環境リスクを考慮する上で極めて大きな課題である。しかしながら、主として計測・分析手法の制約から、実環境中における調査は殆ど行われておらず、水圏単体での時間的・空間的な挙動の変化についてすら明らかになっていない。従って、既存研究の多くは、前章までに示したような理論的考察、もしくは室内実験の何れかに依っている(Ninham, 1999)。

近年、室内実験では、特に、①水中の電解質がナノ粒子の凝集を促進する、②フミン酸やフルボ酸などの腐植質の存在が凝集を阻害・遅延させている、との報告例は多い。特に Shih et al. (2012)は、二酸化チタンナノ粒子の凝集について無機イオンが及ぼす影響について種々の条件下で実験を行い動的光散乱法・ゼータ電子測定システムを用いて確認した。その結果、無機イオン濃度が高い程粒子径が大きくなる傾向にあり、その強度は $\text{NaCl} < \text{CaCl}_2 < \text{Na}_2\text{SO}_4$ の順であると報告している。但し、ゼータ電位の測定結果についてはこの結果と整合しない面も多く、ゼータ電位がゼロに近づいたからといって必ずしも凝集が顕著になるわけではないとしている。また、Ottofuelling et al. (2011)は、自然水及び人工水中に二酸化チタンナノ粒子を分散させ、その上澄みを濃度測定した。その結果、pHが高い・電解質濃度が低い・腐植質が多いなどの条件は上澄みのチタン濃度を高くすることに寄与したと報告している。こうした傾向は、Mudunkotuwa et al. (2012)でも示された。同報告は、酸化亜鉛ナノ粒子の凝集について pH、イオン強度、フミン酸の添加が及ぼす影響を動的光散乱法・ゼータ電位測定システムを用いて調査したものである。結果、①イオン強度が大きい程ゼータ電位が低下し、粒子の沈降量が増大する、②フミン酸の添加に伴って、pHが高い場合のみ溶解量が増大する、と報告している。同様に、Diegoli et al. (2008)は、金ナノ粒子の凝集にフミン酸が及ぼす影響を調べ、その結果電解質濃度が 0.1 mM 以上では凝集が激しいが、フミン酸の添加によって安定性が増すと報告している。Domingos et al. (2009b)は、二酸化チタンナノ粒子の凝集についてフルボ酸の与える影響を調べ、その結果、pHが7付近で凝集性は最大になったが、フルボ酸によって凝集度が低下したと報告している。一方で、上述の結果とは矛盾する報告も少なくない。例えば、Chae et al. (2012)は、フラーレン及びカーボンナノチューブの水中における凝集について、フミン酸の添加との関係を調べ、フミン酸の添加に伴う凝集の変化は、水中のイオン強度によってまちまちであると報告している。また、Piccapietra et al. (2012)は、銀ナノ粒子の凝集についてフミン酸が及ぼす影響を確認し、フミン酸の存在による凝集状況の変化は認められなかったと報告している。以上のように、水中の電解質や腐植質がナノ素材の挙動に与える影響は、電解質が凝集を促進させ、腐植質はこれを阻害するとの主張が大勢を占めるものの、相反する結果

も複数存在している状況にある。

また、ナノ粒子とその他の懸濁物等とが混合・付着した場合の挙動についても、いくつかの報告がある。Zhou et al. (2012)は、二酸化チタンナノ粒子と銀ナノ粒子について、ナノクレイが混合した際の安定性を確認した。その結果、DLVO 理論上とは異なり、①二酸化チタンナノ粒子の安定性は電気二重層の多寡と整合しなかった、②銀ナノ粒子では、ナノクレイの存在による吸着度の目立った変化はなかったと報告している。Tripathi et al. (2012)は、ポリスチレンナノ粒子について、バイオフィルムが付着した場合の凝集について観察した。その結果、バイオフィルムが付着することで凝集度が増し、またその強弱はゼータ電位とは無関係である事が示唆されたと報告している。Zhang et al. (2012)は、高分子で修飾した銀ナノ粒子の安定性について確認した。その結果、高分子で修飾した銀ナノ粒子は、未処理に物に比べ安定性がより高かったと報告している。更に、Hong et al. (2009)は、磁性体である鉄ナノ粒子の凝集について、様々な磁性の水中において観察した。その結果、鉄ナノ粒子の凝集は他のナノ粒子よりも顕著であり、また水中の磁性が弱い程凝集が更に強かったと報告している。

また、実際のナノマテリアルの環境中への流出についても、いくつかの検討結果が報告されている。Kaegi et al. (2008)は、二酸化チタンナノ粒子を混合した塗料が塗布された外壁を対象に、その流出液を採取してこれを顕微鏡観察と濃度測定に供した。その結果、20-300 nm の二酸化チタンナノ粒子が観察され、濃度も最大で 600 µg/L であったと報告している。Botta et al. (2011)は、市販の日焼け止めに含まれる二酸化チタンナノ粒子の使用における水環境中への流出について実験的に調査した。その結果、特に海水浴などによりナノ粒子が多く水環境中へ流出することが示唆されると報告している。また、Fabrega et al. (2011)は、銀ナノ粒子の水環境中での挙動について既存のデータを取り纏めた。その結果、モデル計算から水環境中での銀ナノ粒子の PEC/PNEC は 1 を超える場合もあり、大気圏・地圏に比べ極めて高いと報告している。但し、飽くまでも既存研究の断片的な結果を寄せ集め的に連結・解釈した結果であり、その妥当性については疑問が残る。また、概してナノ粒子の自然環境中へ流出は極めて複雑であり、現段階ではこれを検証する有効な術もなく、これらの結果はそれぞれの仮定の上に成立した一考察である事に留意すべきであろう。

以上によって、実環境中の種々の要素、特にフルボ酸やフミン酸などの腐食物質、シルトや粘土などの無機碎屑物、水中に溶解する電解質などが及ぼす影響について、相反する知見も少ないものの、一定の知見が得られてきた。

しかし、現状には大きく 2 つの課題があると考ええる。1 点目は、測定結果の信頼性についてである。既述のように既存研究におけるナノ粒子の粒径測定には動的光散乱法を用いた物が多いが、その殆どは解析手法の詳細を明記しておらず、Cumulant 法など測定装置のデフォルトの測定条件として採用されているアルゴリズムを使用した可能性が想定される。しかし、これら他分野において主流となっている解析手法は、前章の実験結果から水環境

中ナノ粒子の測定には適さないと考えられ、測定結果が実際の様態を正しく反映していない恐れがある。従って、適切な解析手法を用いた再検証が必要である。2点目は、生物を用いた毒性試験への応用可能性についてである。既存研究の多くは、物理化学的性状そのものや実環境中での挙動の解明を目的としているが、得られた知見の毒性試験への応用・反映を考慮していない。例えば、毒性試験に際しては、実影響を与える可能性を明らかにする前段階として被験物質の毒性そのものをハザードとして評価することが重要であり、外乱となる要素を排除するために、フィルターでろ過した自然環境水、脱塩素水道水、純水に電解質等を溶解された培地などを被験水として用いる。従って、腐食物質や砕屑物の影響は無視できる。しかし、既存研究の多くは、腐食物質や砕屑物の存在を前提としており、これらが存在しない場合のナノ粒子の挙動については却って知見が少ない。また、毒性試験においては、自然環境中に比べて単位容積あたりの生物量が多くなる事が不可避であり、従って生物由来のタンパク質が比較的高濃度（時として数 mg/L 以上）で含まれることが多い。この影響は、ナノマテリアル以外の化学物質でも無視できないケースが少なくない。しかし、タンパク質がナノマテリアルの挙動に対して与える影響については殆ど報告されていない。

これらの要因から、ナノマテリアルの水生生物に対する毒性に関する既存研究は、水環境中におけるナノマテリアルの様態に関する知見を十分に反映出来ていないのが現状である。結果、ほぼ全ての報告では、被験対象とするナノ分散液の粒径等をサンプル調製直後に測定した上で曝露試験を行っており、曝露後については調製直後の状態が維持されるとの仮定の基に結果の導出・考察を行っている。しかし、実際にはナノマテリアルは毒性試験における曝露環境下でも時間経過に伴って凝集・沈降などを生じている事が想定され、従って、ナノマテリアルの生態毒性に関する既存研究の結果の解釈には誤謬が生じている恐れがある。

そこで本章では、①電解質及びタンパク質の存在とナノマテリアルの水中における挙動との関係性を明らかにすること、②得られた知見を水生生物に対する毒性試験へ適用すること、を目的として、次に示すような実験を行った。即ち、二酸化チタンナノ粒子を総硬度・タンパク質濃度の異なる複数の分散媒へ分散させた後に静置し、インターバル測定により様態の変化及び水質との関係、測定技術の諸問題等を検討した。

4.2. 材料と方法

(1) 分散質：二酸化チタンナノ粒子

分散質には、二酸化チタンナノ粒子を選択した。その理由として、①、②金属ナノ粒子の水中における挙動が最も鋭敏であると判断されたため、の2点が挙げられる。中でも、最も公称粒径が小さくかつ挙動が顕著であった公称粒径 5 nm のアナタース型二酸化チタンナノ粒子（テイカ株式会社，第3章における No. 1 と同素材）を用いた。

(2) 分散媒

分散媒には、①Milli-Q 水，②総硬度の異なる5種のナチュラルウォーター，③等比的な濃度の4種のタンパク質溶液，の計10種を用いた。これは、水環境中においてナノ粒子の様態に影響与えると予想される電解質及び生物由来のタンパク質を想定したものである。

① ナチュラルウォーター

下記の5種類を選択した。最も電解質の少ないクリスタルガイザーで総硬度 38.1 mg/L，最も多いコントレックスで 1475.5 mg/L である。

表 4-1 使用したナチュラルウォーターの一覧

番号	製品名	原産国	総硬度 (mg/L)
1	クリスタルガイザー™	米	38.1
2	ボルヴィック™	仏	61.6
3	エヴィアン™	仏	306.6
4	サンジェミニ™	伊	894.7
5	コントレックス™	仏	1475.5

② タンパク質溶液

ウシ血清由来アルブミン（和光純薬工業製）を，1.56，6.25，25.0，100 mg/L の各濃度で Milli-Q 水と混和し溶解させ，タンパク質溶液4種を得た。

(3) 分散系の調製

二酸化チタンナノ粒子を 50 mg/mL の分散濃度で Milli-Q 水と混和し，超音波破碎機（VibraCell 130-PB，米 Sonics & Material 社）にて 10W/0W：10 秒/5 秒の周期で 10 分間超音波処理し分散させた。次に速やかに各分散媒により 200 mg/L に希釈し，各 1 L の分散液を胴径 101 mm のねじ口瓶内で静置した。これを，各温度が $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で安定するようウォー

ターバスを用いて調節した。

(4) 様態の測定・解析

各分散液は、調製直後、及び24時間毎に調製120時間後まで、ねじ口瓶の中央から1 mLを採取し、動的光散乱法を用いた粒径測定システム（ELS-Z2，大塚電子）を用いて平均粒径及び粒径分布の測定に供した。同システムによって、まずヘリウムネオンレーザーを2.53 mWの出力に固定して試料へ照射し、光散乱強度相関を計測、これを80回繰返した。また、光散乱強度は粒子の絶対値を総体的に示す指標としても用いた。次に、第3章で示した手法により、Contin法を用いて解析を行い、個数換算の値を算出した。サンプル毎の繰返し回数は、8回とした。

(5) 電子顕微鏡による観察

動的光散乱法での測定に供したサンプルを用い、走査型電子顕微鏡による観察を併せて行った。サンプル0.1 mLをガラス製試料台上へ滴下し、12 h自然乾燥後に蒸着装置による金蒸着処理（JFC-1600，日本電子株式会社製，スパッタリング電流：30mA，処理時間：45秒）をした。これを、走査型電子顕微鏡（JSM - 6510LA，日本電子株式会社製）によって観察し、代表的箇所の撮影を行った。また、同顕微鏡のエネルギー分散型X線分析装置を用いて、試料表面の組成分析を行った。

(6) 結果の算出と統計処理

分析値などの数値の処理は、JIS Z 8401:1999 参考1 規則Bに従った。各データは、平均値±標準偏差で示した。Bartlett 検定によって等分散性を有意水準5%で確認し、等分散性が棄却されない場合はDunnett法による多重比較を、等分散性が棄却された場合はSteel法による多重比較の検定を行った。統計解析にはR言語を用い、パッケージにはmvtnorm及びEZRを使用した。**及び*は、対照区と比較して有意差（** $p<0.01$ 及び* $p<0.05$ ）が認められたことを示す。

4.3. 結果

ナチュラルウォーター5種と Milli-Q 水の結果について、平均粒径の推移を図 4-1 に、光散乱強度の推移を図 4-2 に示す。Milli-Q 水において、平均粒径は調製直後の時点で公称粒径の 100 倍以上にまで凝集していた。その後、時間経過に伴って若干の変動はあったものの、概ね 500~1000 nm で推移した。一方、ナチュラルウォーターについて見ると、調製直後より Milli-Q 水よりも更に凝集が顕著であり、その度合いは総硬度に対して濃度依存的であった。一方、調製 24 時間後には、平均粒径は小さくなり、総硬度が高くなる程顕著な傾向にあった。この状態は 120 時間後まで概ね維持された。光散乱強度については、調製直後では一部のナチュラルウォーターで Milli-Q 水と有意な差があった観察されたものの、概ね同程度であり濃度依存的な傾向も確認されなかった。一方、調製 24 時間後には Milli-Q 水で強度がおおよそ 10 分の 1 にまで減衰していた。減衰はナチュラルウォーターでは更に顕著であり、総硬度が高い程大きく減衰する傾向にあった。この傾向は 120 時間後まで概ね維持された。タンパク質溶液 4 種と Milli-Q 水の結果について、平均粒径の推移を図 4-3 に、光散乱強度の推移を図 4-4 に示す。ナチュラルウォーター同様に、調製直後では Milli-Q 水に比べ凝集が顕著であり、その度合いは濃度依存的であった。また、調製 24 時間後についてもナチュラルウォーターと同様の傾向を示し、タンパク質濃度が高くなる程顕著に平均粒径が小さくシフトした。この状態は 120 時間後まで概ね維持された。光散乱強度についてもナチュラルウォーターと同傾向であり、調製直後は Milli-Q 水と大きく差がなかったものの、時間経過に伴ってタンパク質濃度が高い程顕著に減衰してゆく傾向にあった。

粒径分布について、クリスタルガイザーの調製直後及び 120 時間後の典型例を図 4-5 に示す。調製直後は一つのピークで分散していたが、120 時間後には 100 nm の小粒子と 3 μm 以上の大粒子、2 つのピークに分離していた。この傾向は、他の分散媒、他の経過時間でも同様であり、時間経過に従ってピークが複数に分離するケースが増加した。走査型電子顕微鏡による観察では、視認・定量が困難であるケースが複数存在したが、良好な観察が出来た場合では、動的光散乱法による解析結果を支持する結果が得られた。例えば、図 4-5 に示したクリスタルガイザー調製 120 時間後のサンプルについては、100 nm の粒子が実際に確認された（図 4-6）。但し、X 線解析については、照射面積に対し当該粒子が小さすぎるため有効ではないケースが多く、粒子の密集する場所でのみチタンの検出が確認された。

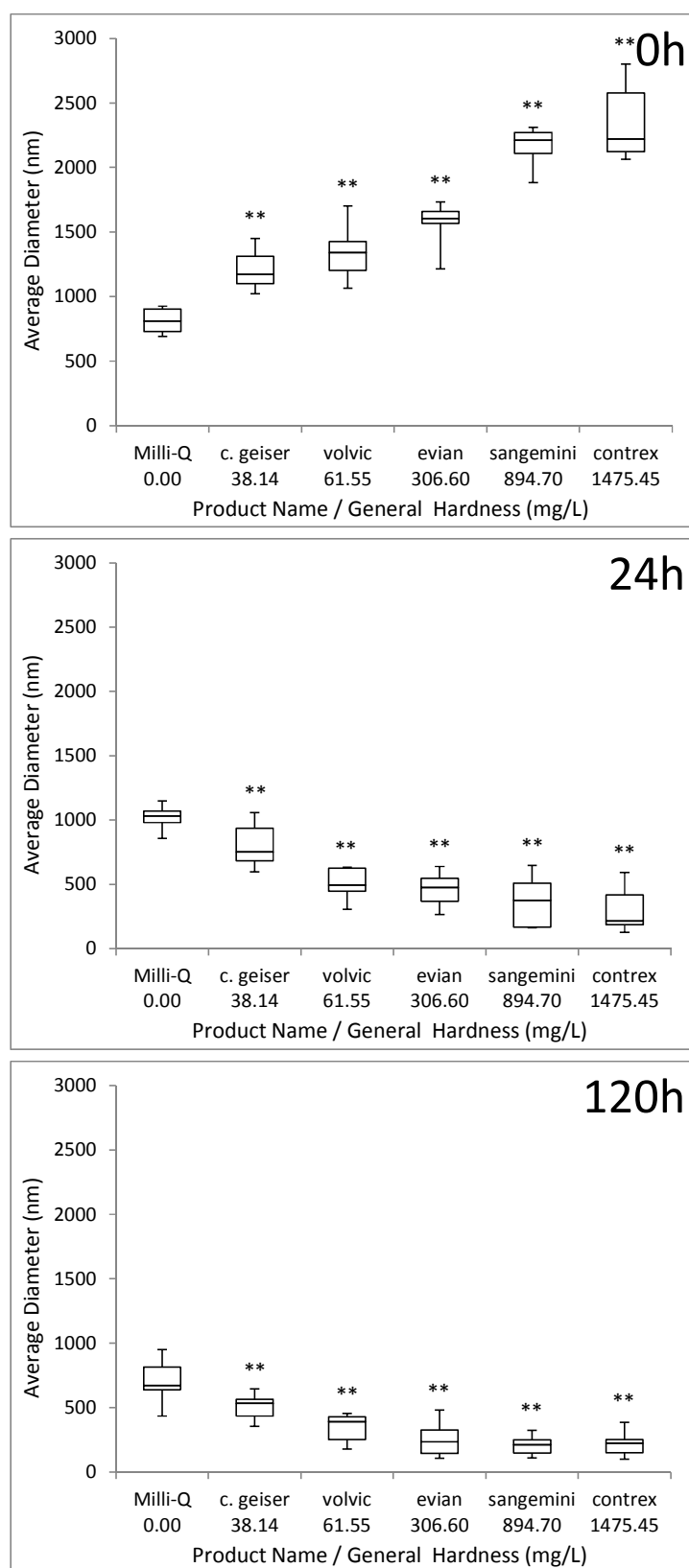


図 4-1 Milli-Q 水及び 5 種のナチュラルウォーターに分散させた二酸化チタンナノ粒子の平均粒径の変化, 0h : 調製直後, 24h : 調製 24 時間後, 120h : 調製 120 時間後

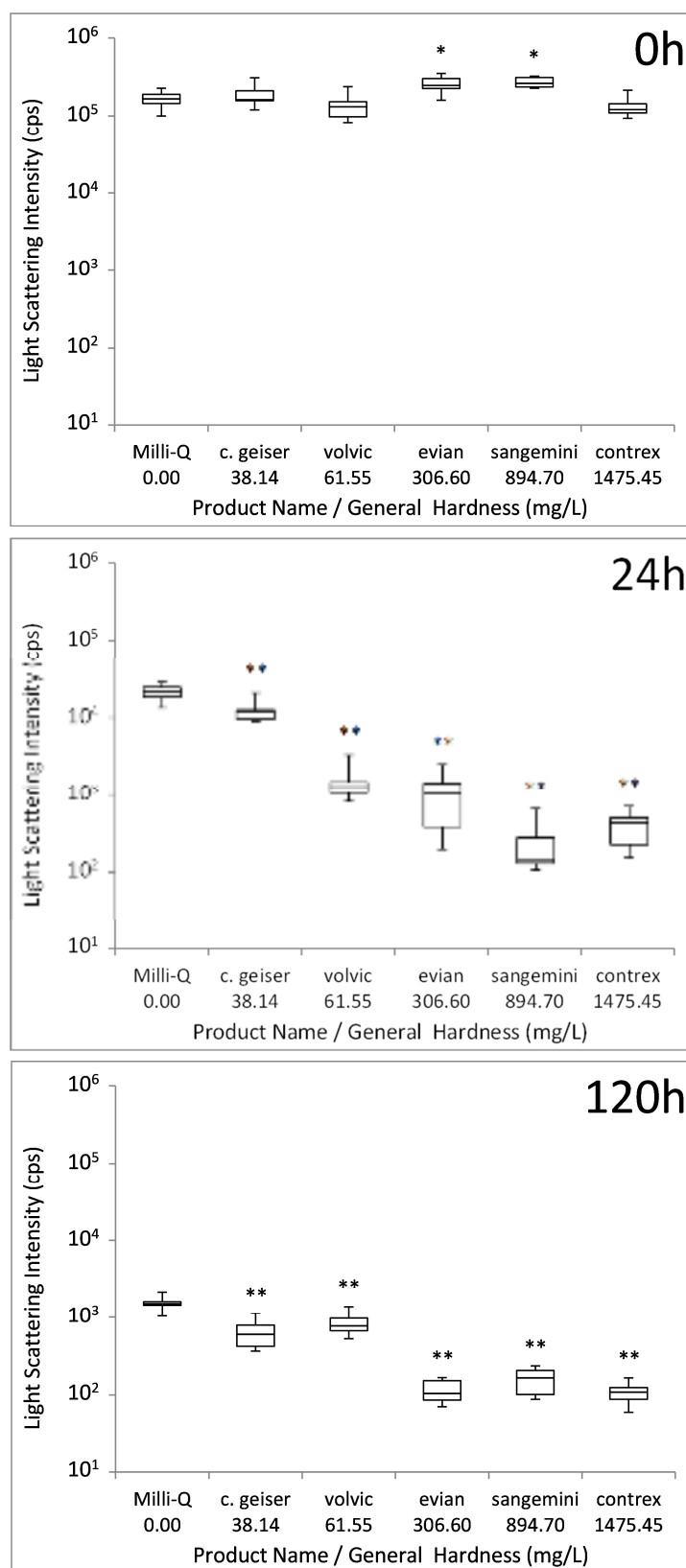


図 4-2 Milli-Q 水及び 5 種のナチュラルウォーターに分散させた二酸化チタンナノ粒子の光散乱強度の変化, 0h : 調製直後, 24h : 調製 24 時間後, 120h : 調製 120 時間後

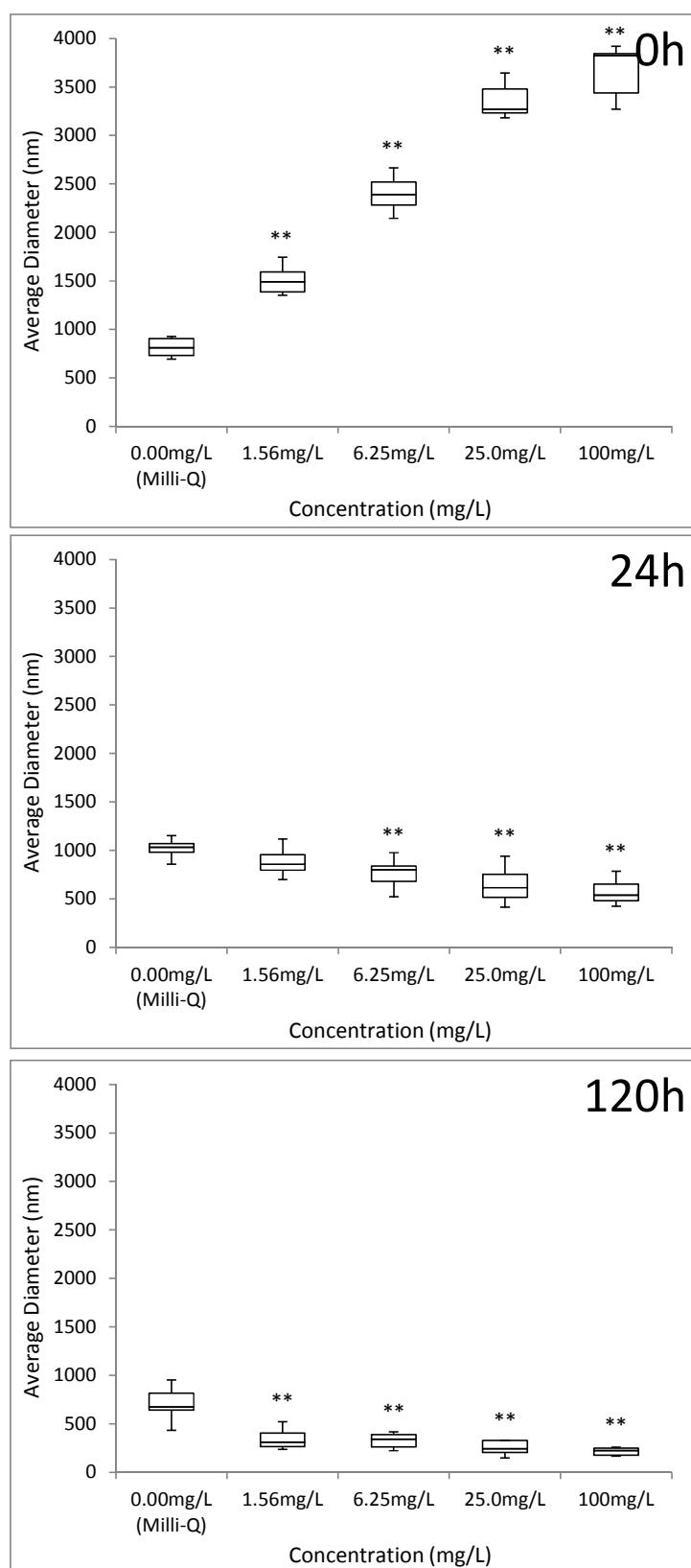


図 4-3 Milli-Q 水及び 4 濃度のタンパク質溶液に分散させた二酸化チタンナノ粒子の平均粒径の変化, 0h : 調製直後, 24h : 調製 24 時間後, 120h : 調製 120 時間後

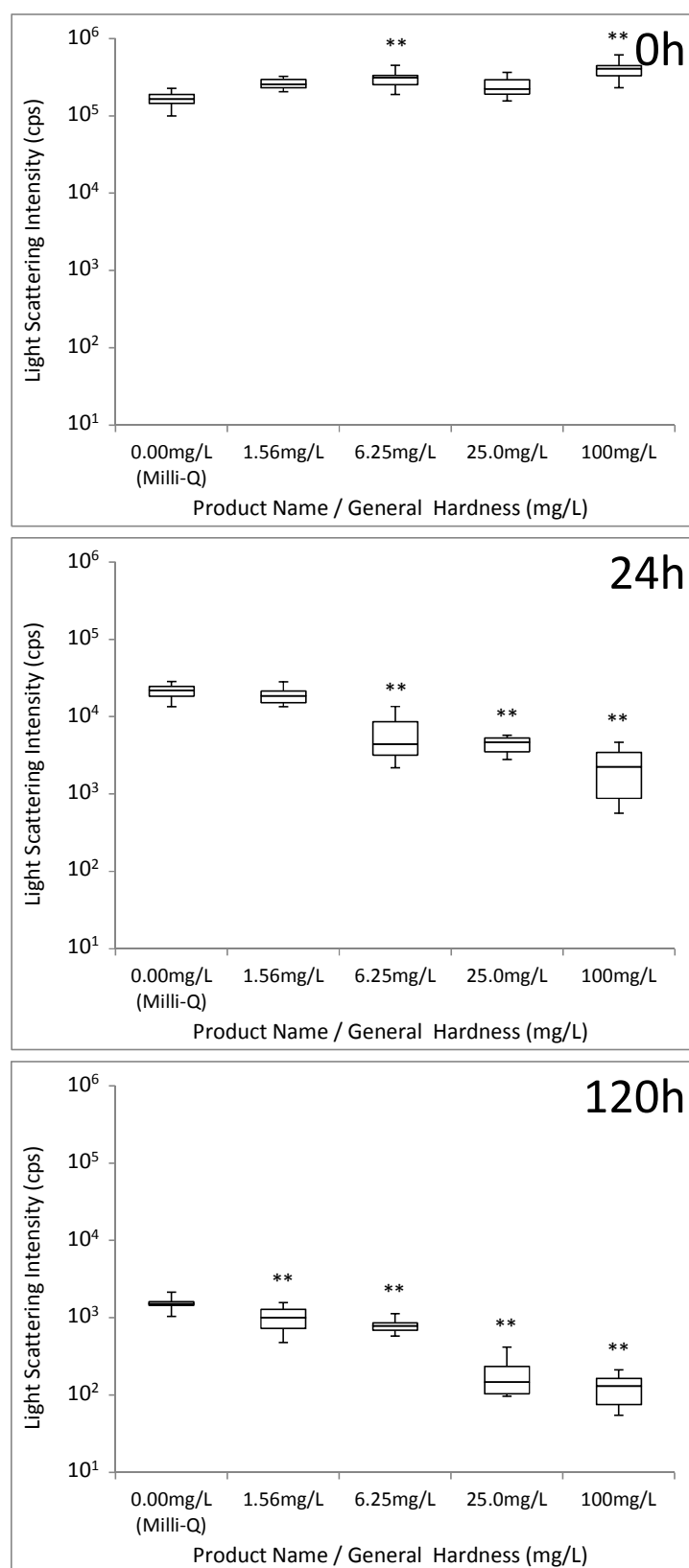


図 4-4 Milli-Q 水及び 4 濃度のタンパク質溶液に分散させた二酸化チタンナノ粒子の光散乱強度の変化, 0h : 調製直後, 24h : 調製 24 時間後, 120h : 調製 120 時間後

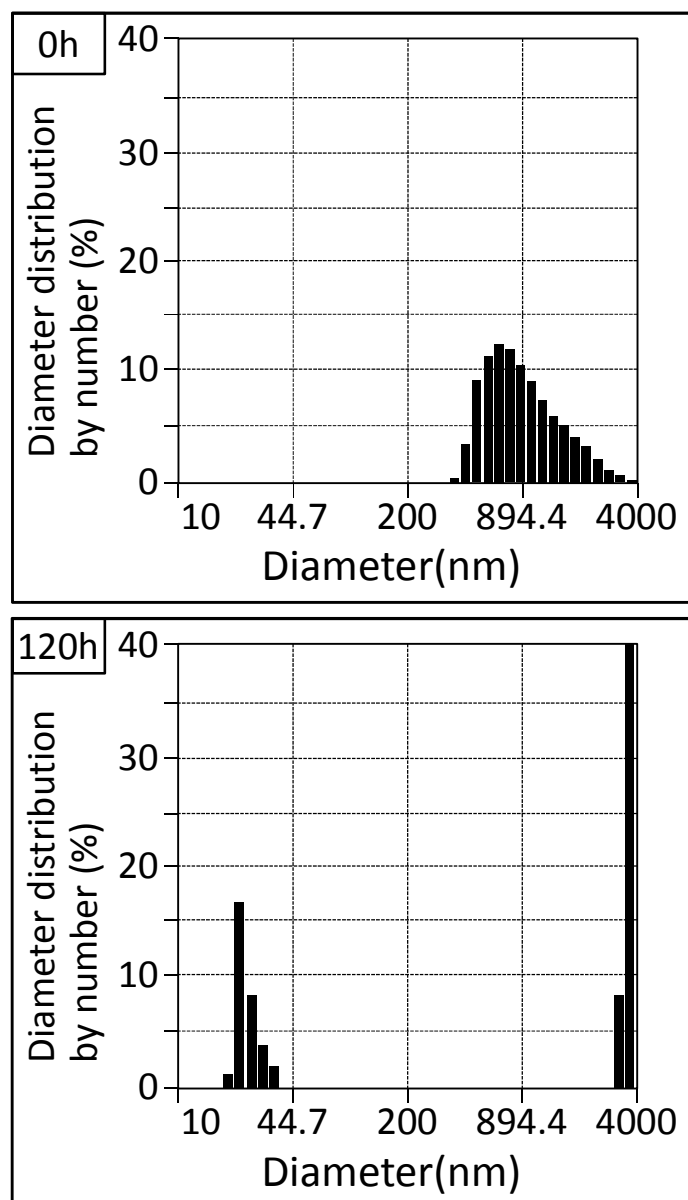


図 4-5 クリスタルガイザーに分散させた二酸化チタンナノ粒子の粒径分布典型例, 0h : 調製直後, 120h : 調製 120 時間後

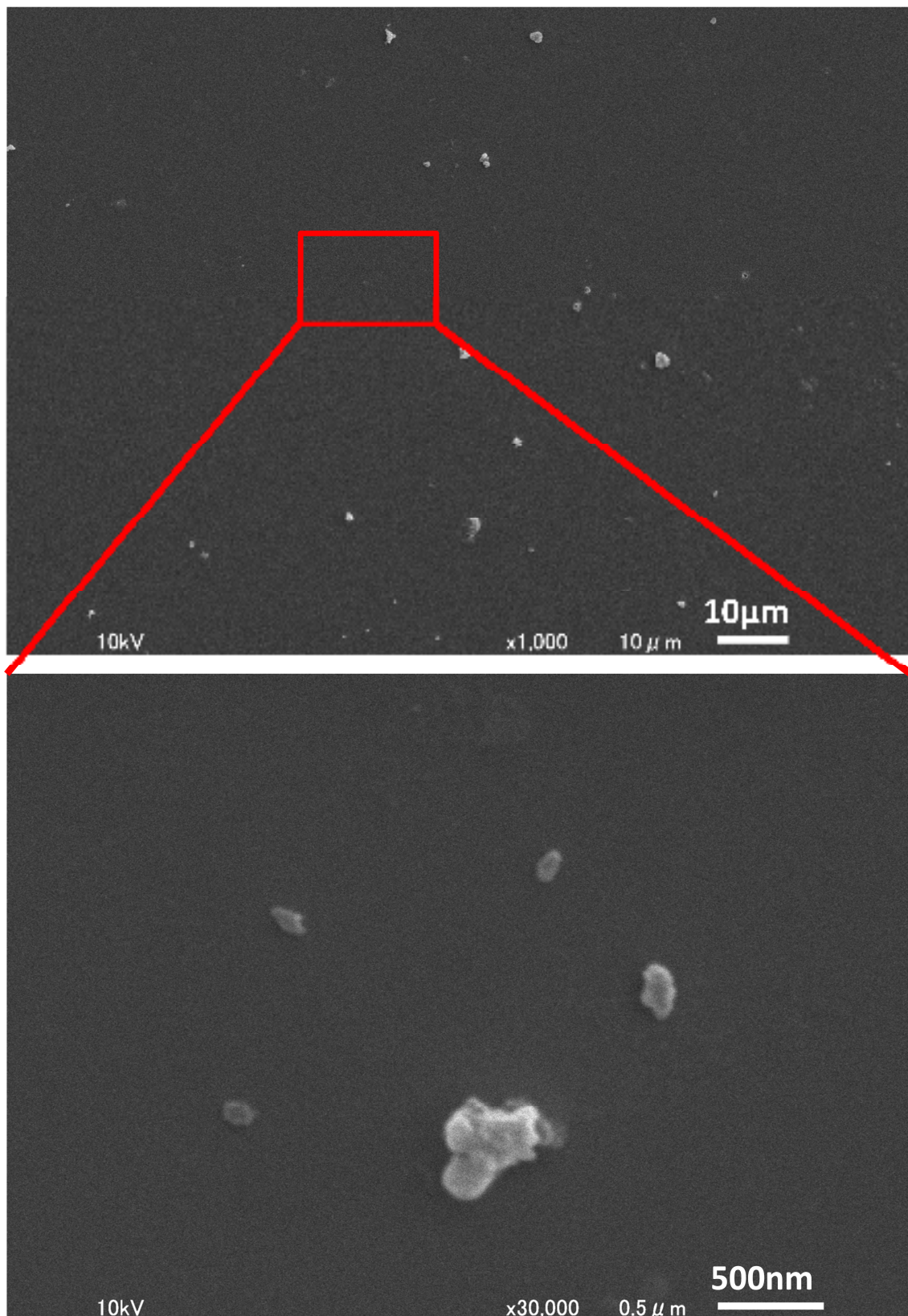


図 4-6 クリスタルガイザーに分散させた二酸化チタンナノ粒子の走査型電子顕微鏡写真：調製 120 時間後

4.4. 考察

調製直後において、各分散液の平均粒径は公称粒径に比べ著しく大きな値(150~550 倍)を取ったこと、並びに電解質・タンパク質に対して濃度依存的に凝集が顕著であったことについては、先行分野での理論(Ninham, 1999)や電解質における実験結果(Weiner and Tschamuter, 1987, Ruf et al., 1992)と整合する。但し、時間経過に伴って、総硬度やタンパク質濃度が高い程むしろ平均粒径が顕著に小さくシフトした事は、平均粒径の結果のみでは説明できない。ここで、光散乱強度の推移を見ると、平均粒径の値の変化に連動して急激に減衰しており、ここから粒子の絶対量が減少している事が推測される。また、本実験では被験液は調製直後以降攪拌などを行わず静置したため、分散後に再分散した可能性は考えられない。従って、ナノ粒子は水中に分散した直後から大きく凝集する傾向にあり、そのため調製直後の測定において既に平均粒径の値は公称粒径に比べ大きな値をとるものの、そのように凝集した粒子は分散状態を維持できなくなり沈降するため、一定時間経過後には分散状態を維持できるより小さな粒子が相対量としては大きな割合を占めるようになり、その結果平均粒径の値としては小さくシフトしたものと考えられる。また、このような推移は、電解質やタンパク質に対して濃度依存的に急速であることが示唆される。

一方で、粒径分布を見ると、調製直後には一切検出されることのなかった 100 nm 未満の粒子が 24 時間以上経過後になって検出され始めたことは、前述の通り被験液は一貫して静置したことを考慮すると、一見不自然である。しかし、電子顕微鏡写真においても実際に 100 nm の粒子が確認されていることから、動的光散乱法による解析結果が実際の様態を反映している可能性は高いと考えられる。ここから、①100 nm の粒子は調製直後から一定の割合で存在していたものの、分散直後においては大きく凝集した粒子由来の光散乱強度に妨害され検出不可能であった、②大粒子が沈降して微粒子由来の光散乱が相対的な強度を増すにつれて、徐々に各分散液中から検出されるようになった、と推測される。

これまで、ナノ素材の水環境中での様態については凝集や沈降などが注目され、一様に粒径が大きくなっていくことを前提とした様態の探究が進められてきた。しかし、本結果から、大部分の粒子が凝集・沈降することは事実であるが、一方で一部の粒子については分散直後から一貫してナノ・サイズを維持しており、少なくとも 120 時間以上と、長期間に亘ってコロイド状態を維持することが明らかになった。しかも、そのような挙動は Milli-Q 水のような不純物がほぼ存在しない分散媒のみならず、コントレックスのように電解質濃度が極めて高い水中においても同様であり、ここから実環境中においても、これまで考えられてきたように急速に凝集し尽くすのではなく、想像以上に長期に亘って分散し続けている可能性が考え得る。更に、本実験では分散濃度が 200 mg/L と非常に高濃度であったため、分散する粒子における浸透圧は高くなり、このことは分子間力に伴う凝集を促進する要素として働いた事が推測される。翻ると、実環境中で想定されるように分散濃度がより希薄である場合、本実験ほどの凝集・沈降が引き起こされず、従って分散状態を維

持する粒子の相対的な割合はより多くなる可能性が考えられる。但し、本実験では腐食物質や碎屑物と接触・混合した場合の影響は確認していないことから、上述のような現象がそうした成分の多い実環境中においても起こりうるのかどうかは未確認であり、今後の検討が必要であろう。

現状、ナノマテリアルの生態影響試験では曝露前の被験液をクオリティ・チェックとして測定するのみで、曝露中はその状態を維持するとの仮定のもと試験を実施・解釈する例がするケースが殆どである（表 2-5）。しかし、これらの結果から、ナノ粒子の様態は時間経過に伴って急激に変化し、しかもどのように変化するかは分散媒の水質や生物の活動に大きく依存するため妥当に推測・制御することは困難であるものと考えられる。更に、調製直後の粒径測定結果（特に、分散濃度の高いストック分散液を用いて平均粒径を求めた場合など）は、実際の分散状態を把握する上で必ずしも正確な情報ではない一面もある。従って、既存研究は2つの意味で曝露試験状況を正しく把握していなかった可能性が低くない、即ち、実在する粒子を検出出来なかった可能性と、曝露後の様態変化によりクオリティ・チェックの結果が実際の様態と解離していた可能性である。また、仮に誤って様態を把握していた場合、それを基に導き出された結論や解釈は、フォルスポジティブ、フォルスネガティブの両方を招いている恐れが考えられる。

4.5. まとめ

ナノ粒子の様態は、時間経過に伴って急速に変化し、その傾向は、硬度・タンパク質濃度が高いほど顕著であった。また、一定時間経過後も、各サンプルで 100 nm 未満の微粒子が検出された。ここから、水環境中においてナノ素材は数十時間のオーダーで大半が凝集・沈降するが、その後も 100 nm の粒子が少量ながら依然水中に拡散し続けることが示唆された。また、このような様態の変化は、流入前の状態からは判断が難しいと考えられる。従って、生態影響試験においては、試験開始時のクオリティ・チェックだけでは誤った評価・判断を下してしまう危険性が高く、試験期間中も継時的に粒子の様態を測定することが望ましい。

第5章 水生生物に対するナノマテリアルの曝露試験評価

5.1. 背景と目的

第2章で述べたように、現在ナノマテリアルの水生生物に対する生態影響については、様々な報告・仮説が存在する。特に二酸化チタンナノ粒子は、ナノマテリアルの中でも最も生産量が多く、紫外線照射条件下で光触媒効果による毒性を示すことも知られていると同時に、取り分けて影響に関して様々な主張が混在している素材でもある。その中には、例えば直接脳内へ移行するなど、既存の材料とは抜本的に異なるメカニズムを主張するものも少なくない。一方で、ナノマテリアル特有の毒性は存在せず、通常の二酸化チタン粒子と何ら変わらないとの試験結果も多い。第3・4章の実験結果から、このような両極端な結果が混在する大きな要因として、既存研究では試験系・試験デザインが未確立のまま生態影響試験を行ってきたため、フォルスポジティブ（例えば、溶媒など）、もしくはフォルスネガティブ可能性が考えられる。

そこで、前章までに得られた知見・技術によって既存の生態影響試験手法を改良した上で、魚類を用いた生態影響評価を行った。とはいえ、水中におけるナノ素材の様態把握は容易でなく、また種々の定量・定性的指標やその測定手法のうち何れが重要であるかは一概に判断できない為、論理的な影響要因の探究が困難であるのも事実である。真にナノ素材特有の影響要因が存在すると仮定した場合、事前に手法を絞り込むのではなく、多数のエンドポイントや様態に関する指標から頻出するパターンや特徴的な構造を抽出することで、何らかの傍証となり得る情報を洗い出すことは可能であろう。よって、本研究では、結晶型・サイズの異なる8種類の二酸化チタン粒子（ナノ粒子5種、及び非ナノ粒子3種）を用いて紫外線照射条件下における魚類胚・仔魚期に対する短期慢性毒性試験を行い、エンドポイントや被験分散液の様態に関する指標群をこれまで検討されてこなかったものも含め網羅的に測定・解析した上で、特徴的な傾向を示した要素を選び取り考察を行った。

魚類を対象種とした背景には、下記がある。まず、試験系が確立され既存知見の蓄積も豊富であることから、藻類・ミジンコ・魚類を候補として挙げた。但し、①藻類では、被験粒子の分散・懸濁に伴う光照射量の減少で光合成が阻害され、本来観察したい毒性要因を被覆してしまう可能性が高い、②ミジンコの繁殖試験では、エサとして藻類を被験液中に分散させる必要があり、ナノ粒子の分散との干渉に繋がる、等の理由から、先ず魚類で安定した曝露を可能にする事が望ましいと判断した。また、第2章で述べた通り魚類を用いた試験にも種々の手法が存在する（図 5-1）。その中でも、①試験期間が短期（9日程度）で、②慢性影響（生態影響における慢性影響は、ヒト健康影響と異なる概念に基づく：表 5-1 参照）を確認出来、③魚類の生活史の中でも、胚・仔魚期は最も化学物質に対して鋭敏な時期である、などの理由から、魚類胚・仔魚期に対する短期慢性毒性試験（OECD TG212）をベースとして用いた。

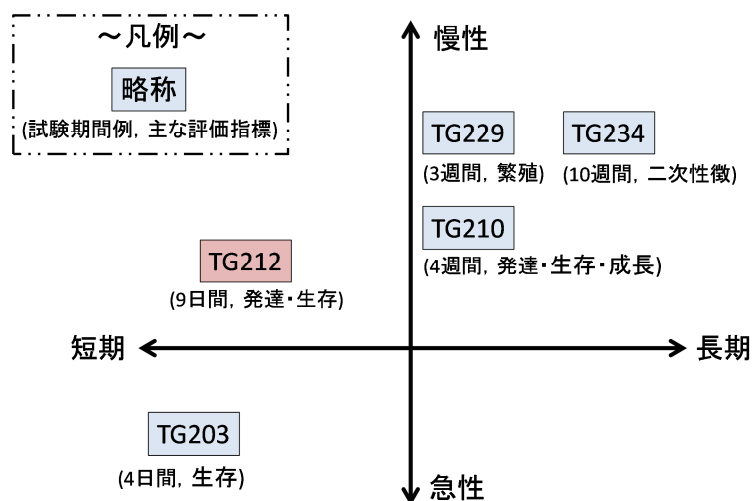


図 5-1 魚類試験法における試験期間と対象とする影響の関係図

表 5-1 生態影響における急性影響及び慢性影響の概念

項目	急性影響	慢性影響
定義	生物寿命を考慮した, 比較的短期間に生じる 個体の生存 に関わる影響	世代交代を考慮した, 個体群存続 への影響
主な指標	死亡, 孵化阻害, 遊泳阻害, 増殖阻害, 成長遅延等	成熟, 繁殖, 増殖, 交尾, 胚と稚仔の生存・死亡, 成長等
試験期間	<ul style="list-style-type: none"> ・魚類: 48~96時間, 及びそれ以上 ・ミジンコ類: 同上 ・藻類: 72~96時間 	<ul style="list-style-type: none"> ・魚類: 胚から稚魚, 未成熟から成熟・産卵に至る期間以上 ・ミジンコ類: 繁殖への影響が認められる期間以上 ・藻類: 急性影響と同様とする
試験例	<ul style="list-style-type: none"> ・魚類急性毒性試験(OECD TG203) ・ミジンコ急性遊泳阻害試験(OECD TG202) ・藻類生長阻害試験(OECD TG201) 	<ul style="list-style-type: none"> ・魚類胚・魚期短期毒性試験(OECD TG212) ・ミジンコ繁殖試験(OECD TG211)

5.2. 材料と方法

(1) 被験生物

被験生物種は、コイ科の小型魚であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) とした。親魚には、(独)国立環境研究所で生態影響評価用として累代されている、意図しない化学物質のコンタミネーションを排除して飼育された個体群を用いた。飼育条件等は下記の通りである。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽 (600W×300D×360H, 55 L)
- ・飼育数：雌雄を別水槽で飼育, 雌個体：約 10 尾/水槽, 雄個体：約 15 尾/水槽
- ・飼育水：活性炭処理により脱塩素処理した水道水
- ・飼育方法：流水式
- ・水温・pH：25±2℃, pH 7.5±0.5
- ・光周期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：あり (1 L/min 程度)
- ・飼料：ブラインシュリンプのふ化後 24 時間以内の幼生を, 1 日 2 回
(休日は 1 回) 飽食量を給餌

(2) 二酸化チタン分散液

計 8 種の工業用二酸化チタン粒子 (CAS : 13463-67-7, 何れも表面処理なし・焼成法で製造) を用いた。うち, 5 種が「ナノ素材」として結晶子粒径が 100 nm 未満となるよう製造された粒子 (ルチル型 2 種：公称平均粒径 50, 35 nm, アナタース型 3 種：公称平均粒径 35, 15, 5 nm, 何れもテイカ株式会社製, 純度>99.9%), 3 種が「バルク材」と呼ばれる一次粒径が 100nm 以上の微粒子 (ルチル型 1 種：公称平均粒径 300 nm, アナタース型 2 種：公称平均粒径 300, 180 nm, 何れも純度>99%) である (表 5-2)。各粒子 1000 mg を電子天秤 (AG204, Mettler Toledo 社製) によって秤量し, 50 mL 容のコニカルチューブ内で Milli-Q 水 20 mg と混和した。これを, 超音波破碎機 (VibraCell 130-PB, 米 Sonics & Material 社製) にて 10W/0W : 10 秒/5 秒の周期で 10 分間超音波処理し, 1 時間静置した後に再度同様の超音波処理を行う事で 50 mg/mL の分散液 20 mL を得た。これを, 活性炭にて濾過処理した水道水にて速やかに希釈し, それぞれ 400, 200, 100, 50, 25 mg/L の二酸化チタン分散液を得た。

表 5-2 使用した二酸化チタン粒子の一覧

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	純度 (%)
1	ナノマテリアル	アナターズ型	5	>99.9
2	ナノマテリアル	アナターズ型	15	>99.9
3	ナノマテリアル	アナターズ型	35	>99.9
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	>99.9
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	>99.9
6	非ナノマテリアル	アナターズ型	180	>99
7	非ナノマテリアル	アナターズ型	300	>99
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	>99

(3) 試験操作

① 試験の開始

採卵用水層として 10 L 容のオールガラス水槽を用いた。底面に直径 1 cm のガラスビーズを敷き詰め、飼育水を 8 L を投入してヒーターで 27℃程度に加温した。ここに、ゼブラフィッシュの親個体を雌 3 尾・雄 6 尾程度を投入し、産卵行動を開始させた。約 1 時間後、十分に卵が産出されたことを確認して親個体を飼育水槽へ戻し、内径 4 mm のテフロン製チューブで卵を吸い出して採取した。次に、飼育水を張った直径 15 cm のシャーレに卵を移し、実体顕微鏡 (MZ16, Leica 社製) 下で正常かつ発生段階が同程度の受精卵のみを 500 粒程度選別し、被験卵を得た。

被験卵を、下記に示すような条件で曝露した。

- ・試験容器：石英ガラス製円柱状カップ（直径 50 mm）
- ・希釈水：活性炭処理により脱塩素した水道水
- ・曝露期間：10 日間
- ・試験液量：50 mL/カップ
- ・曝露方式：半止水式（換水頻度：48 時間）
- ・試験区数：被験物質曝露区 5 濃度（400, 200, 100, 50, 25 mg/L），対照区，紫外線を追加照射しない被験物質曝露区（400 mg/L）
- ・連数：4 連/濃度区
- ・供試生物数：20 粒/連
- ・供試生物齢：受精 4 時間以内の胚（受精卵）
- ・水温：25±1℃
- ・pH：pH 7.5±0.5

- ・溶存酸素飽和度: 60%以上
- ・光 周 期: 明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション: なし
- ・飼 料: なし
- ・試 験 繰 返 し: 4 回/被験分散液

まず、各被験濃度及び対照区の被験液 50 mL を入れた一斉曝露用カップに被験卵を 80 粒強ランダムに投入し、被験液への曝露を開始した。ここまでの作業は、産卵行動の開始から 4 時間以内とするよう速やかに行った。次に、各試験用カップへ 20 粒ずつランダムに取り分け、試験装置へ配置した。装置は、屋外における夏期の紫外線照射量に即した光条件を満たすため、底面に紫外線発光ダイオード（NSPU510CS、定格ピーク波長：375 nm、定格光出力：7.5 mW、日亜化学工業株式会社製）を備えている。照射は、カップ底面 3 cm の距離より 1 カップあたり 2 灯にて行った（図 5-2）。

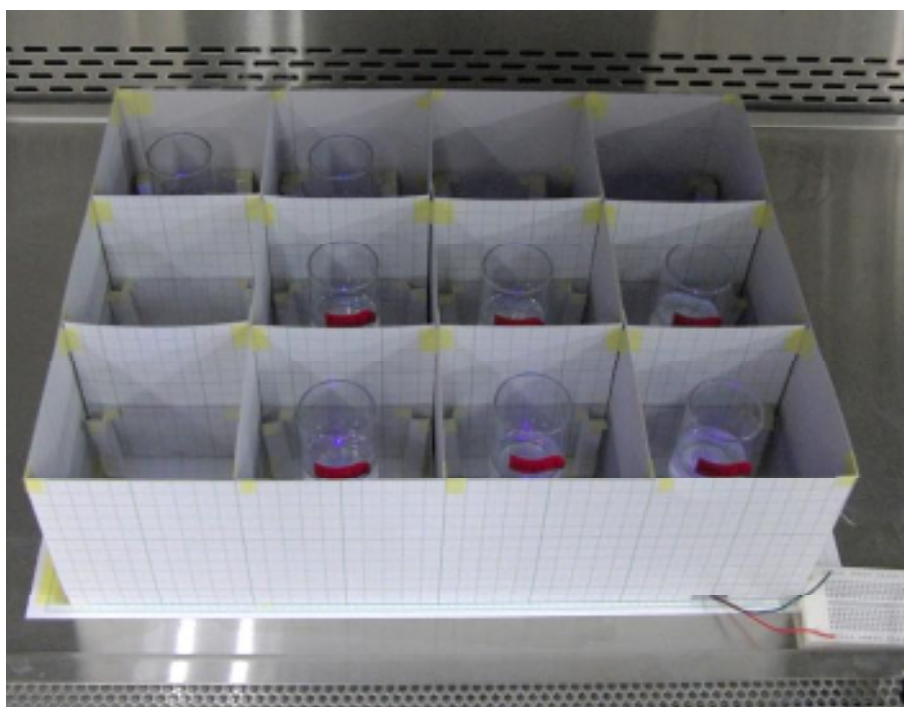


図 5-2 試験装置の外観

② 観察

試験開始 24 時間毎に、実体顕微鏡（MZ16, Leica 社製）下で観察を行い、生存・死亡、ふ化の有無、その他外観・行動の異常を記録した。その際、死亡の判別は下記に従った。

- ・心臓形成前の胚：全体の透明性が消失して白濁したものを死亡と見なす
 - ・心臓形成後の胚及び仔魚：心拍の停止（観察が不可能な場合は、心臓形成前に準ずる）
- また、ふ化は卵膜から魚体が完全に離脱した時点とした。外観・行動の異常については、

下記について対照区と比較・所見を記録した。観察後、死亡した胚・仔魚、及びふ化後の卵膜はガラスピペットで吸取り除去した。ここで生存指標とは、死亡しなかったもののふ化が遅延した個体が存在する場合、これを影響として包含するためのエンドポイントである。

1) 行動観察項目

心拍の過多・過少，不整脈，横転，平衡喪失，表層集中，活動度低下，過運動など

2) 外観観察項目

体幹湾曲，眼球突出，腹部膨満，体色異常など

③ 換水

48 時間毎に，被験液の交換を行った。まず，前節に示した調製法にて，各種・各濃度の被験分散液を予め用意した。その上で，ガラスピペットを用いて，容器内の被験分散液を約 5 mL 残して除去した。その後，新調した被験分散液を約 45 mL 静かに投入した。

④ 水質の測定，粒子様態の解析

試験開始時及び換水時，新調・除去した被験液について，水温・pH・溶存酸素量を測定した。それぞれの測定には，以下の機器を用いた。

- ・ 水 温 計：CT-430WP，株式会社カスタム製
- ・ p H 計：D-55，株式会社堀場製作所製
- ・ 分 析 項 目：HQ30d，HACH 社製

また，各被験液について，下記の 2 つの手法でナノ粒子の様態把握を行った。

1) 動的光散乱法による解析

- ・ 分 析 対 象：曝露前・曝露後の全被験液
- ・ 分 析 手 法：動的光散乱法
- ・ 換 算 基 準：2 種（個数換算，質量換算）
- ・ アルゴリズム：Contin 法
- ・ 結 果 の 算 出：第 3 章の手法に基づき，下記を算出した
 - ・ 粒子の平均値
 - ・ 粒子の中央値
 - ・ 粒子の最頻値
 - ・ 理論上の粒子数
 - ・ 理論上の表面積

2) 走査型電子顕微鏡写真による観察・撮影

サンプル 0.1mL をガラス製試料台上へ滴下し、12h 自然乾燥後に蒸着装置による金蒸着処理（JFC-1600，日本電子株式会社製，スパッタリング電流：30mA，処理時間：45秒）した上で走査型電子顕微鏡（JSM - 6510LA，日本電子株式会社製）により観察・撮影した。

(4) 結果の算出

試験期間終了後，観察記録から下記をエンドポイントとして算出した。

- 1) ふ化率 : 供試卵数に対する，5日後までにふ化した卵数の割合（%）
- 2) 平均ふ化日数 : 曝露終了時までにはふ化した胚の平均ふ化日数（日）
- 3) ふ化後生存率 : ふ化仔魚数に対する，曝露終了時に生存した仔魚数の割合（%）
- 4) 全生存率 : 供試卵数に対する，曝露終了時に生存した胚・仔魚数の割合（%）
- 5) 生存指標 : ふ化率とふ化後生存率を乗じたもの（%）

次に，各エンドポイントについて，NOEC（No Observed Effect Concentration，最大無影響濃度），及び IC₂₅（Inhibiting Concentration 25%，25%影響濃度）を算出した。ここで，NOEC とは，対照区と比較して統計学的に有意な差異が認められなかった最も低い試験濃度であり，LOEC とはその一つ下の試験濃度である。また，IC₂₅ は Newton-Raphson 法によるプロビット分析により算出された濃度である。

分析値などの数値の処理は，JIS Z 8401:1999 参考 1 規則 B に従った。各データは，平均値±標準偏差で示した。Bartlett 検定によって等分散性を有意水準 5%で確認し，等分散性が棄却されない場合は Dunnett 法による多重比較を，等分散性が棄却された場合は Steel 法による多重比較の検定を行った。統計解析には R 言語を用い，パッケージには mvtnorm 及び EZR を使用した。**及び*は，対照区と比較して有意差 (** $p<0.01$ 及び* $p<0.05$) が認められたことを示す。

5.3. 結果

(1) 水質測定及びナノ様態の解析結果

動的光散乱法によるナノ様態の解析結果を表 5-3 に示す。各粒子はナノマテリアル・非ナノマテリアル共に 200 nm 以上に凝集していた。その際、試験期間を通じての変動は変動率がナノマテリアルで 8.1～17.9 %，非ナノマテリアルで 8.2～15.5 %と、一定の安定性が確認された。走査型電子顕微鏡による観察は観察箇所による差異が大きく妥当性の確認として必ずしも機能しなかったが、均一なサンプル調製がされたケースにおいては、動的光散乱法の解析結果と概ね整合した。

表 5-3 各試験における粒子様態の測定結果

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	実測粒径			
				個数換算 (nm)		質量換算 (nm)	
				mean ± S.D.	(CV)	mean ± S.D.	(CV)
1	ナノマテリアル	アナタース型	5	319 ± 46	(14.4)	400 ± 71	(17.9)
2	ナノマテリアル	アナタース型	15	224 ± 38	(17.1)	436 ± 60	(13.7)
3	ナノマテリアル	アナタース型	35	309 ± 39	(12.5)	417 ± 35	(8.5)
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	511 ± 41	(8.1)	576 ± 52	(9.1)
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	540 ± 46	(8.5)	646 ± 67	(10.3)
6	非ナノマテリアル	アナタース型	180	233 ± 36	(15.5)	466 ± 57	(12.3)
7	非ナノマテリアル	アナタース型	300	469 ± 55	(11.7)	629 ± 52	(8.2)
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	389 ± 36	(9.3)	547 ± 53	(9.6)

(2) 各エンドポイントの結果

各エンドポイントの NOEC 及び IC₂₅ を表 5-4～表 5-8 に示す。ふ化率及び平均ふ化日数については、全てのサンプルで対照区と比べ有意な影響は観察されず、IC₂₅ も算出不可能であった。一方、ふ化後生存率については、ルチル型の各粒子では影響が観察されなかったのに対し、アナタース型の各粒子では、何れも IC₂₅ が 400 mg/L 未満と影響が観察された。その際、非ナノ素材の 2 種よりもナノ素材の 3 種の方がより影響が強く、また公称結晶子粒径が小さい程影響が強くなる傾向にあった。ふ化せずに最終日まで生存した胚が存在しなかった関係上、全生存率及び生存指標は全て同一の値を取った。また、影響はふ化後生存率と同様の傾向であった。尚、紫外線の追加照射をしなかった区については、全て試験で一切の影響が確認されなかった。

表 5-4 ふ化率への影響

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	ふ化率への影響	
				NOEC (mg/L)	IC ₂₅ (mg/L)
1	ナノマテリアル	アナターズ型	5	>400	—
2	ナノマテリアル	アナターズ型	15	>400	—
3	ナノマテリアル	アナターズ型	35	>400	—
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	>400	—
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	>400	—
6	非ナノマテリアル	アナターズ型	180	>400	—
7	非ナノマテリアル	アナターズ型	300	>400	—
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	>400	—

表 5-5 平均ふ化日数への影響

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	平均ふ化日数への影響	
				NOEC (mg/L)	IC ₂₅ (mg/L)
1	ナノマテリアル	アナターズ型	5	>400	—
2	ナノマテリアル	アナターズ型	15	>400	—
3	ナノマテリアル	アナターズ型	35	>400	—
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	>400	—
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	>400	—
6	非ナノマテリアル	アナターズ型	180	>400	—
7	非ナノマテリアル	アナターズ型	300	>400	—
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	>400	—

表 5-6 ふ化後生存率

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	ふ化後生存率への影響	
				NOEC (mg/L)	IC ₂₅ (mg/L)
1	ナノマテリアル	アナターズ型	5	37.5	54.5
2	ナノマテリアル	アナターズ型	15	50.0	70.4
3	ナノマテリアル	アナターズ型	35	113	146
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	>400	—
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	>400	—
6	非ナノマテリアル	アナターズ型	180	175	250
7	非ナノマテリアル	アナターズ型	300	175	294
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	>400	—

表 5-7 全生存率

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	全生存率への影響	
				NOEC (mg/L)	IC ₂₅ (mg/L)
1	ナノマテリアル	アナタース型	5	43.8	72.3
2	ナノマテリアル	アナタース型	15	50.0	81.5
3	ナノマテリアル	アナタース型	35	125	149
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	>400	—
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	>400	—
6	非ナノマテリアル	アナタース型	180	250	281
7	非ナノマテリアル	アナタース型	300	250	319
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	>400	—

表 5-8 生存指標

番号	分類	結晶型	公称粒径 (nm)	生存指標への影響	
				NOEC (mg/L)	IC ₂₅ (mg/L)
1	ナノマテリアル	アナタース型	5	43.8	72.3
2	ナノマテリアル	アナタース型	15	50.0	81.5
3	ナノマテリアル	アナタース型	35	125	149
4	ナノマテリアル	ルチル型	35	>400	—
5	ナノマテリアル	ルチル型	50	>400	—
6	非ナノマテリアル	アナタース型	180	250	281
7	非ナノマテリアル	アナタース型	300	250	319
8	非ナノマテリアル	ルチル型	300	>400	—

これらを基に、影響の観察されたアナタース型の5素材について、最も影響が顕著なエンドポイントであったふ化後生存率と粒子の様態との相関を算出した。質量換算の平均粒径との相関を図 5-3 に示す。平均粒径と影響との間に相関は観察されなかった。一方、粒子数（図 5-4）や表面積（図 5-5）と同じく生存指標の IC₂₅ とを比較すると、両者には一定の相関関係が見られた。粒子数では、相関係数 $r = -0.63$ 、無相関検定は $p < 0.01$ 、表面積では、相関係数 $r = -0.45$ 、無相関検定は $p < 0.05$ であった。従って、粒子数や表面積が増加するほど影響が強くなる傾向にあったと言える。

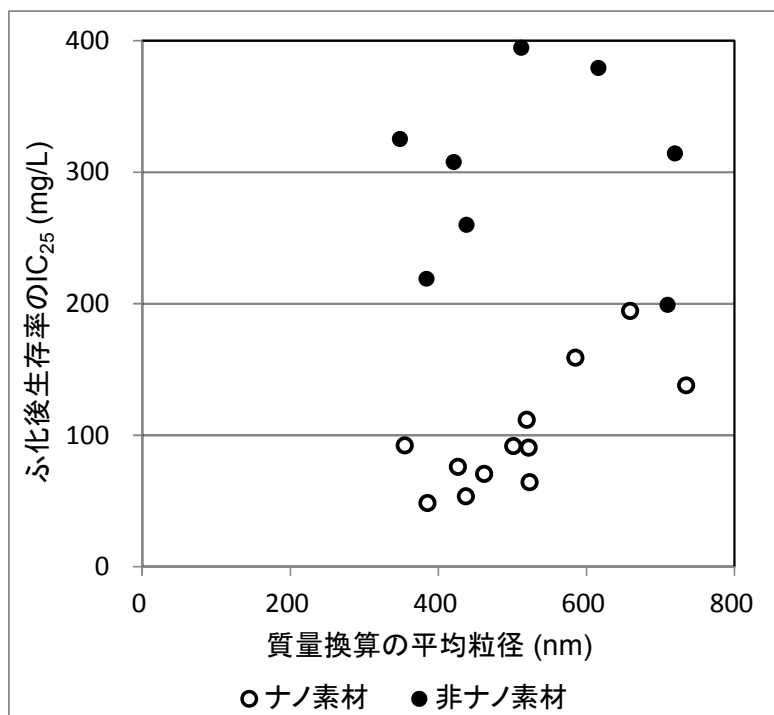


図 5-3 アナタース型の各素材における平均粒径とふ化後生存率の IC₂₅ との相間図

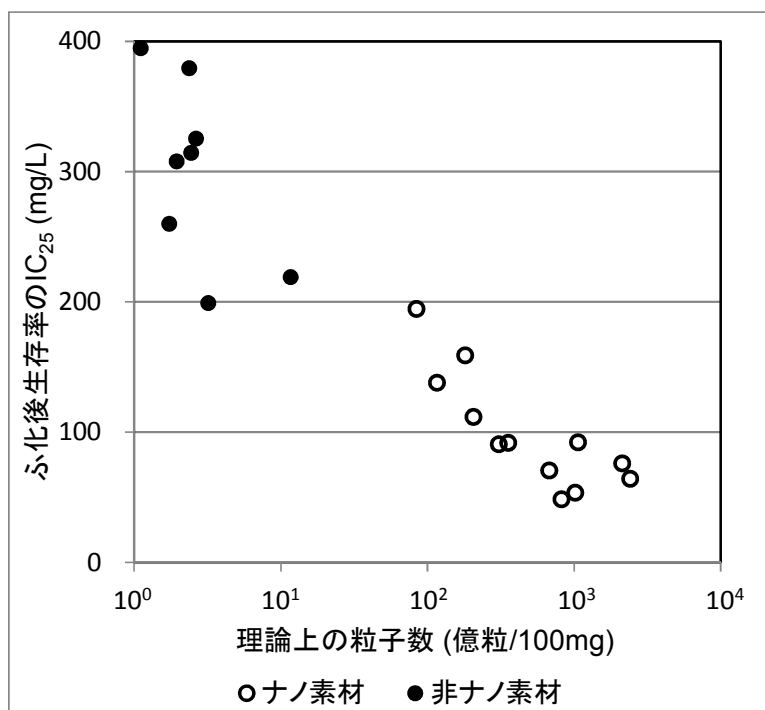


図 5-4 アナタース型の各素材における粒子数とふ化後生存率の IC₂₅ との相間図

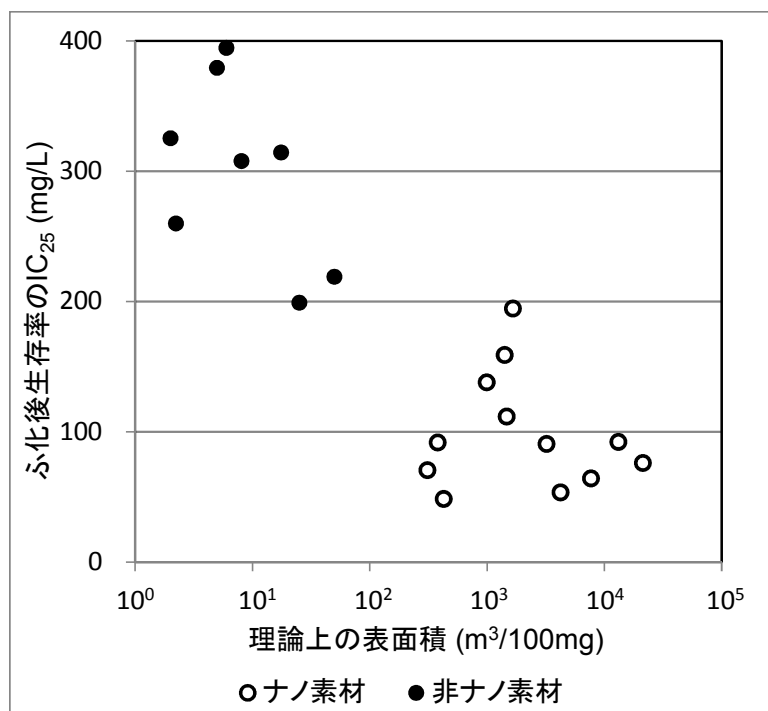


図 5-5 アナタース型の各素材における表面積とふ化後生存率の IC_{25} との相間図

5.4. 考察

生態影響試験において、試験期間中の曝露状態を確認する事は必須である。しかし、ナノマテリアルについては、これまで曝露前の被験液をクオリティ・チェックとして測定するものが殆どであり、実際の被験液の測定結果を報告した事例は皆無であった（表 2-5）。本研究では、第3・4章の結果から試験法を構築した上で、試験期間中の新調・換水後の被験液について全検体を測定した。結果、試験期間を通じての変動率は最大でも17.9%に抑えられており、この種の試験としては十分に安定であったと判断される。平均粒径で見ると、ナノマテリアルは当然非ナノマテリアルに比べ公称粒径が小さいが、実測粒径では非ナノマテリアルとの間に顕著な差異はなく、公称粒径と実測粒径の間にも明確な関係が確認されなかった。即ち、イニシャルサイズが小さな粒子程、より顕著に凝集したと考えられる。

毒性については、紫外線を追加照射しなかった区では一切の影響が確認されず、また紫外線を追加照射した一連の区でも毒性が観察されたのはアナタース型の素材のみであり、ルチル型では統計学的に有意な影響は確認されなかった。ここから、毒性の直接的な要因が光触媒効果に伴うものであると判断され、従って光触媒効果の弱いルチル型では影響が観察されなかった事も妥当といえる。また、何れの素材においてもふ化に対する影響は殆ど観察されず、専らふ化後の生存に対して影響を与えた事については、本研究のみからでは要因が特定できない。即ち、①胚期に対しては影響そのものが及ばなかった、②影響の蓄積が仔魚期になって発現した、など複数の可能性があり得る。今後、胚期の長さの違う魚種（例えば、メダカ等）を用いて生活史における発達段階と曝露時間の積算とで何れがクリティカルであるかを検証する必要があるだろう。

ナノマテリアルと非ナノマテリアルとを比較すると、ほぼ全ての試験においてナノマテリアルの方が非ナノマテリアルに比してより強い毒性を示した。また、傾向としては公称粒径が小さい程影響が強かった。これは、いくつかの既存研究とも整合する(Ma and Diamond, 2013, Li et al., 2014)。但し、毒性と実測した平均粒径との間には明確な関係が観察されなかった。いくつかの既存研究では、同様の試験結果を受けてナノマテリアルの毒性を既存の材料とは抜本的に異なると考察している(Bundschuh et al., 2012b)。しかし、毒性と粒子数・表面積などとを比較すると、ナノマテリアルであるか否かを問わず、一定の相関関係が観察された。即ち、粒子数が多くなる程もしくは表面積が広くなる程、より毒性は強くなった。粒子の比表面積はサイズが小さくなる程大きくなり、光触媒効果のような化学的反応はそれに伴って同一容積ではより効率的に生じる。ナノマテリアルが素材として優れていると判断される理由として、このような化学反応の効率性が大きな要因の一つと成っている。本結果で、特に毒性と表面積との相関関係が認められた事は、このようなナノマテリアルの素材としての効率性の面からリーズナブルであると考えられる。

5.5. まとめ

前章までの成果を基に既存の生態影響試験法を改良し、魚類に対するナノマテリアルの曝露試験を行った。その結果、ナノマテリアルを安定して試験に供する事が出来た。また試験結果から、ナノマテリアルは非ナノマテリアルに比べて影響が強かったが、その違いは性質が異なるというよりも、シンプルに比表面積の広さに応じて効率的に光触媒効果が働いたためであると説明できる。

但し、現状は飽くまでも曝露試験結果と様態の解析から相関を考察している段階であり、因果についてここから推定・特性できるものではない。環境毒性において、毒性要因のメカニズムを解明する事は容易ではないが、本試験結果から酸化ストレス等に関する相応しいバイオマーカーやエンドポイントを設け、追試験する事が有効であろう。

第6章 新規環境影響懸念物質の繁殖・多世代影響評価手法開発

6.1. 序論

前章までに述べたように、化学物質の生態影響を包括的に評価するためには、二次性徴や繁殖、更には継世代など、長期的で個体群維持に直結する影響までを明らかにする事が必要である。新規環境影響懸念物質におけるこうした作用・影響については、内分泌かく乱物質を中心として試験法の開発・標準化が進められてきた。例えば、性ホルモンかく乱・生殖腺軸への作用・アロマターゼ阻害についてのスクリーニング手法としては、ファットヘッドミノーやメダカ等の魚類を用いた OECD Test Guideline No.229 (TG229): Fish Short Term Reproduction Assay(OECD, 2012a)や TG230: 21-days Fish Assay(OECD, 2009a)が、甲状腺ホルモンや甲状腺軸については、アフリカツメガエルを用いた OECD TG231: Amphibian Metamorphosis Assay(OECD, 2009c)が、幼若ホルモンや脱皮ホルモンについては、ミジンコを用いた OECD TG211: Daphnia magna Reproduction Test(OECD, 2012c)が、それぞれ用いられている。性ホルモンかく乱のうち、エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン作用については、OECD TG229 や TG230 によるスクリーニングが有効であると報告されている(Arcand-Hoy and Benson, 1998, Hill and Janz, 2003, Kang et al., 2002, Kime et al., 1999, Orn et al., 2003, Ankley et al., 2009, Ankley et al., 2011, Ankley et al., 2001, Ankley et al., 2002, Ankley et al., 2003, Kahl et al., 2001)。

しかし、①抗アンドロゲン様作用の検出について、何れのスクリーニング手法でも有効性が十分に確認されていない、②多世代への影響については、OECD における化学物質管理のフレームワークにおける確定試験に該当するが、現状国際的に合意された試験法は存在せず、既存研究も極めて限定的である、などの課題がある。1 点目について、抗アンドロゲン作用の検出に特化した手法として、イトヨを用いる Androgenized Female Stickleback Screen (OECD, 2010a)が OECD のガイダンスドキュメント化され、検討されている。但し、この試験法には、技術的な課題が多い事が指摘されている；被験生物を安定的に確保する事が難しい、被験物質とアンドロゲナイズのためのテストステロンを複合的に曝露するという手法上、均一な試験条件の確保が困難であり結果の評価も難しい、など。2 点目について、OECD TG234: Fish Sexual Development Test(OECD, 2011b)は魚類の胚から成熟に至るまでの期間について有害性評価が可能であるが(Bayley et al., 2002)、継世代的な影響については明らかに出来ない。

そこで、ナノマテリアル以外の新規環境影響懸念物質として、内分泌かく乱作用が知られている陽性対象物質 (PPCPs を含む) を用い、①魚類短期繁殖試験の改良と検証、② 魚類多世代試験の開発と検証、を行った。

6.2. 魚類短期繁殖試験の改良と検証

6.2.1 背景と目的

抗アンドロゲン作用検出の指標になり得る要素として、ニホンメダカの乳頭状小突起がある。乳頭状小突起は、通常成熟した雄メダカの臀鰭軟条上に特徴的に認められ、その出現や消失はアンドロゲン支配による(Oka, 1931, Okada and Yamashita, 1944)。従って、雌であってもアンドロゲンに曝露されることで出現する、また雄であっても生殖腺の摘出により出現しない、などの現象が知られている(Okada and Yamashita, 1944, Kawamoto, 1969, Hishida and Kawamoto, 1970, 永田, 1934, 永田, 1936, 増田, 1952)。既存の OECD TG229 や TG230 でも、ニホンメダカを用いた場合に乳頭状小突起を二次性徴の指標とすることが認められてきたが、これらの手法の場合、既に成熟し乳頭状小突起が出現した段階で曝露を開始する為、それらが試験期間である 21 日のうちに消失に至らない限り検出する事が出来ない、という問題があった。一方で、二次性徴の見られない未成魚からの曝露を行えば、出現阻害を指標とすることで、適切に検出出来る可能性がある。

そこで、抗アンドロゲン作用物質を用いて、ニホンメダカに対する複数の異なる手法による曝露試験を行い、乳頭状小突起を含めた各種の指標から抗アンドロゲン様作用の検出について検討を行った。

6.2.2 材料と方法

(1) 試験デザイン

2 試験の抗アンドロゲン作用物質(Vinclozolin 及び Flutamide)を用いて、それぞれについて 2 種類の曝露試験、即ち OECD TG229 に基づく成熟段階からの曝露試験(アダルト試験)と、同試験法に準じながらも曝露開始魚齢を早めた未成熟段階からの曝露試験(サブアダルト試験)を、計 4 試験行った。

(2) 試験生物

生物種はヒメダカ (*Oryzias latipes*) とした。試験に用いたヒメダカは、財団法人化学物質評価研究機構より供与された個体を、(独)国立環境研究所環境リスク研究センターの飼育馴化室において飼育繁殖させて使用した。飼育水には、同施設の淡水処理装置で製造された「調温清浄濾過水」を使用した。

- ・飼 育 水 槽：オールガラス水槽 (5 L)
- ・飼 育 水：調温清浄濾過水
- ・飼 育 方 法：流水式
- ・水 温 ・ p H：25±2℃, pH 7.5±0.5
- ・光 周 期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼 料：ブラインシュリンプのふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回
(休日は 1 回) 飽食量を給餌

(3) 被験物質の調製

① ビンクロゾリン

ビンクロゾリン (CAS No. 50471-44-8, 純度>99.5%, シグマ・アルドリッチ・ジャパン株式会社) を 1,000 mg/L の濃度でアセトン (CAS No. 67-64-1, 純度>99.5%, 和光純薬工業株式会社) に溶解させた。これを容量 5L のねじ口瓶に 10 mL 投入して風乾させ、活性炭処理した水道水を 5L 投入し、超音波処理 15 分・攪拌 8 時間を行って溶解させる事ことで、1 日に 1 回の頻度でストックソリューション (2 mg/L) を調製した。これを、設定濃度を 640, 200, 64 µg/L として、活性炭処理した水道水と混合・希釈して被験液を得た。混合・希釈は、流水式曝露装置 (SIS-1F, 柴田科学株式会社製、以下も同様) により連続的に行われた。

② フルタミド

フルタミド (CAS No. 13311-84-7, 純度>99%, シグマ・アルドリッチ・ジャパン株式会社) を 5 mg/L の濃度で活性炭処理した水道水に 8 時間攪拌して溶解させることで、1 日に

1回の頻度でストックソリューションを調製した。その上で、1000, 500, 250, 125 µg/L を設定濃度として、活性炭処理した水道水と混合・希釈して被験液を得た。混合・希釈は、流水式曝露装置により連続的に行われた。

(4) 曝露試験

試験は全て(独)国立環境研究所環境リスク研究センターの魚類・両棲類試験室で行った。流水式魚類試験装置 (SIS-24F, 柴田科学株式会社製) を使用した。

① アダルト試験の実施条件

- ・飼育水槽：オールガラス水槽
- ・希釈水：調温清浄濾過水
- ・曝露期間：21 日間
- ・試験液量：5 L/連
- ・曝露方式：流水式（換水率 5 回/日以上）
- ・試験区数：ビンクロゾリン：曝露区 5 濃度（640, 200, 64 µg/L），対照区
フルタミド：曝露区 4 濃度（1000, 500, 250, 125 µg/L），対照区
- ・連数：4 連/曝露区
- ・供試生物数：メス 3 個体・オス 3 個体/連
- ・供試生物齢：14 週齢
- ・水温：25±1℃
- ・pH：pH 7.5±0.5
- ・溶存酸素飽和度：60%以上
- ・光周期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼料：ブラインシュリンプのふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回
（休日は 1 回）飽食量を給餌

② サブアダルト試験の実施条件（太字部はアダルト期と異なる箇所を示す）

- ・飼育水槽：オールガラス水槽
- ・希釈水：調温清浄濾過水
- ・曝露期間：**28 日間**
- ・試験液量：5 L/連
- ・曝露方式：流水式（換水率 5 回/日以上）
- ・試験区数：ビンクロゾリン：曝露区 5 濃度（640, 200, 64 µg/L），対照区
フルタミド：曝露区 4 濃度（1000, 500, 250, 125 µg/L），対照区

- ・連 数：4 連/曝露区
- ・供 試 生 物 数：7 個体（雌雄不明）/連
- ・供 試 生 物 齢：6 週齢
- ・水 温：25±1℃
- ・p H：pH 7.5±0.5
- ・溶存酸素飽和度：60%以上
- ・光 周 期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼 料：ブラインシュリンプのふ化後 24 時間以内の幼生を，1 日 2 回
(休日は 1 回) 飽食量を給餌

③ 試験操作

曝露開始魚齢 1 週間前のヒメダカを，試験条件と同一の飼育数で各水槽へ投入して 7 日間の馴化を行った。その際，外観に異常が認められた個体や極端に成長差がある個体は除去した。馴化終了後，被験物質の濃度が適正值であることを確認してから，供試ヒメダカを各水槽に投入して試験開始した。週に 1 回程度，水温・pH，溶存酸素飽和量を試験区毎に測定した。曝露水槽への藻類付着を防ぐため，週に 1 回程度水槽交換を行った。交換後の水槽は実験器具用自動洗浄機（G7887, Miele 社製）を用いて洗浄し乾燥の上再使用した。尚，曝露・洗浄に用いた廃水は，環境リスク研究棟内排水処理装置に通水し，試験排水中の被験物質を吸着処理させた上で処理した。

曝露期間中は水槽内の産出卵を毎日採取し，メス 1 個体あたりの産卵数，受精卵数，受精率を計測した。また，死亡個体の有無及び行動・外見の異常を，毎日目視によって観察した。死亡個体は，発見後速やかに取り除き外見上の雌雄を確認した。行動・外見の異常は，下記について対照区と比較した。

1) 行動観察項目

摂餌活動の低下，横転，平衡喪失，表層集中，活動度低下，過運動など

2) 外観観察項目

体幹湾曲，眼球突出，腹部膨満，体色異常，出血，粘液の異常，立鱗など

曝露期間終了後，試験期間終了後，生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し，下記項目について測定した。

1) 全長・体長及び湿重量の測定

全長・体長はノギス（CD-S10C，株式会社ミットヨ製）を用いて，湿重量は電子天秤（AG204，Mettler Toledo 社製）を用いて測定した。

2) 二次性徴指標の計測

メダカの臀鰭を切断し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、臀鰭軟条上に認められる乳頭状小突起を実体顕微鏡（MZ16, Leica 社製）の下で観察し、突起を有する節板数を計測し、対照区と比較した。

3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定

解剖により肝臓を摘出し電子天秤（AG204, Mettler Toledo 社製）によって秤量した。

計測した肝臓重量を基に肝臓体指数（肝臓重量/湿重量）を算出した。

また、肝臓中のビテロジェニン量を調べるため、摘出した肝臓をホモジナイズし、ELISA 法で測定した。ELISA は EnBioMedaka Vitellogenin ELISA system（株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ製）を用い、付属のマニュアルに従い実施した。測定は以下のように行った。

- a) 肝臓を回収したテストチューブに冷却した検体希釈用バッファー200 μ L を加える。
- b) 肝臓をホモジナイズし、4℃、9000 g、10 分間の遠心分離にかける。
- c) 分離した上清を 500 μ L マイクロテストチューブに回収し、直ちに氷冷し、続けてビテロジェニン測定に供することができない場合は-80℃で保存した。

この上清を ELISA（Enzyme Linked Immuno Solvent Assay）法によるビテロジェニン測定に供した。測定にはこのホモジネート上清をさらに 10 倍希釈したものを使用した。ホモジネート上清中に含まれるビテロジェニンの分析にはエンバイオ社製のメダカビテロジェニン測定用 ELISA キットを使用した。操作は以下の通りである。

- a) Wash Buffer で洗浄した抗体固層化マイクロプレートの各 well に、測定サンプルを 50 μ L 添加し、室温で 1 時間インキュベートする。
- b) 溶液を捨て、well 内を wash buffer で 3 回洗浄し、HRP-抗メダカビテロジェニン抗体溶液を、各 well に 50 μ L ずつ添加し、室温で 1 時間インキュベートする。
- c) 溶液を捨て、洗浄した後、発色液を各 well に 50 μ L ずつ添加し、室温で正確に 20 分間反応させ、反応停止液を 50 μ L ずつ添加して反応を停止させる。
- d) マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定する。

各サンプルについて 2 well を使用し、デュプリケーションで測定を行った。検量線にはキットに付属のメダカビテロジェニン標準液を使用した。標準液（100 ng/mL）を希釈し、50, 20, 10, 5 ng/mL 溶液を調製し、上記と同様の手順によって測定した吸

光度より検量線を作成した。検量線はマイクロプレートごとに作成した。測定サンプルの吸光度より、検量線を使用して測定試料中のビテロジェニン濃度を算出し、これに希釈率を乗じることでホモジナイズ上清中のビテロジェニン濃度を求めた。さらに、この濃度を各個体の肝臓の重量で除算することにより、肝臓重量あたりのビテロジェニン含量 (ng/mg) を求めた。

4) 生殖腺の観察・測定

解剖後、胴体から生殖腺を摘出せずに形態から雌雄について観察した。その後、胴体ごと Davidson 固定液中に浸漬し固定した。

(5) 試験環境測定と被験物質の濃度測定

① 水温, pH, 溶存酸素の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・ 水 温 計 : CT-430WP, 株式会社カスタム製
- ・ p H 計 : D-55, 株式会社堀場製作所製
- ・ 溶 存 酸 素 計 : HQ30d, HACH 社製

② 被験物質の濃度測定

各試験区の被験水は、週に 1 回採取して化学分析に供した。Vinclozolin は、被験液を固相カートリッジ (Sep-Pak Plus C18 cartridges, Waters 社製) に通水した後にアセトンで溶出し、得られた溶出液を GC/MS (GCMS-QP2010, 島津製作所製) にて定量した。Flutamide は、被験液を LC/MS (LCMS-2010EV, 島津製作所製) にて定量した。

(6) 結果の算出と統計処理

分析値などの数値の処理は、JIS Z 8401:1999 参考 1 規則 B に従った。各データは、平均値±標準偏差で示した。Bartlett 検定によって等分散性を有意水準 5%で確認し、等分散性が棄却されない場合は Dunnett 法による多重比較を、等分散性が棄却された場合は Steel 法による多重比較の検定を行った。統計解析には R 言語を用い、パッケージには mvtnorm 及び EZR を使用した。**及び*は、対照区と比較して有意差 (** $p<0.01$ 及び* $p<0.05$) が認められたことを示す。

6.2.3 結果

(1) 試験環境と被験物質濃度

各試験における被験液濃度を表 6-1・表 6-2 に示す。ピンクロゾリン・フルタミドともに濃度は安定的であり、設定値に近接していた。全試験において、対照区から被験物質は検出されなかった。

表 6-1 試験液中の被験物質濃度（ピンクロゾリン）

試験種	設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	実測値 ($\mu\text{g/L}$)				
		曝露週				平均 (S.D.)
		1	2	3	4	
アダルト試験	対照区	N.D.	N.D.	N.D.	-	-
	64.0	60.42	63.11	61.40	-	61.64 (1.11)
	200	191.8	180.3	195.7	-	189.3 (6.54)
	640	594.8	620.0	603.1	-	606.0 (10.5)
サブアダルト試験	Control	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
	64.0	60.96	66.81	60.39	60.35	62.13 (2.72)
	200	197.6	191.4	189.8	194.0	193.2 (2.96)
	640	630.5	605.5	624.7	642.3	625.8 (13.3)

表 6-2 試験液中の被験物質濃度（フルタミド）

試験種	設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	実測値 ($\mu\text{g/L}$)				
		曝露週				平均 (S.D.)
		1	2	3	4	
アダルト試験	Control	N.D.	N.D.	N.D.	-	-
	125	117.6	123.0	114.5	-	118.4 (3.51)
	250	255.3	234.8	237.7	-	242.6 (9.05)
	500	461.5	496.8	473.1	-	477.1 (14.7)
	1000	1038	953.5	954.6	-	982.1 (39.6)
サブアダルト試験	Control	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
	125	130.6	131.0	115.4	128.5	126.4 (7.26)
	250	256.4	245.9	237.9	244.2	246.1 (7.58)
	500	537.6	487.5	507.7	517.6	512.6 (20.6)
	1000	1042	1015	1034	1040	1033 (11.3)

(2) 生物指標

① 試験期間中の死亡・成長及び行動・外観の異常

何れの試験においても、曝露期間中の死亡個体はなく、対照区と比べ全長・質重量の統

計学的な有意差は確認されなかった。外観・行動についても、対照区と比べ顕著な異常は認められなかった。

② 産卵数・受精卵数・受精率

各試験期間中の産卵数・受精卵数・受精率を図 6-1 に示す。産卵数及び受精卵数は共に、全ての試験の濃度区で対照区との間に有意な上昇・低下は確認されなかった。受精率では、ビンクロゾリンのアダルト試験において、最高濃度区である 640 µg/L 曝露区で対照区に比べ有意な低下が確認された。同様にビンクロゾリンのサブアダルト試験でも受精率は濃度依存的に低下する傾向にあったが、統計学的有意差は確認されなかった。フルタミドを用いた両試験では、顕著な上昇・低下はみられなかった。サブアダルト露試験において、初めて産卵が確認された日を試験区毎にみると、ビンクロゾリンでは対照区が曝露 18 日後(受精 58 日後)・最高濃度区が曝露 20 日後(受精 60 日後)、フルタミドでは対照区が曝露 16 日後(受精 56 日後)・最高濃度区が曝露 17 日後(受精 57 日後)であり、濃度依存性も顕著な差もみられなかった。

③ 肝臓中ビテロジェニン濃度

肝臓中ビテロジェニン濃度を示す。オスでは、全ての試験において有意な上昇・低下は確認されなかった(図 6-2)。メスでは、ビンクロゾリンのアダルト期曝露試験において、最高濃度区でビテロジェニン濃度が有意に低下したが、それ以外では有意な上昇・低下は確認されなかった(図 6-3)。

④ 生殖腺体指数

生殖腺体指数(GSI)の測定結果を図 6-4 に示す。オス・メス共に、何れの試験においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

⑤ 乳頭状小突起

乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を図 6-5 に、典型例の顕微鏡写真を図 6-6 に、それぞれ示す。アダルト試験ではビンクロゾリン、フルタミドともに有意な上昇・低下は確認されなかった。一方、サブアダルト試験では、濃度依存的に低下がみられ、ビンクロゾリン、フルタミドともに、最高濃度区において対照区に比べ有意な低下が確認された。メスでは、全ての被験個体で乳頭状小突起は確認されなかった。

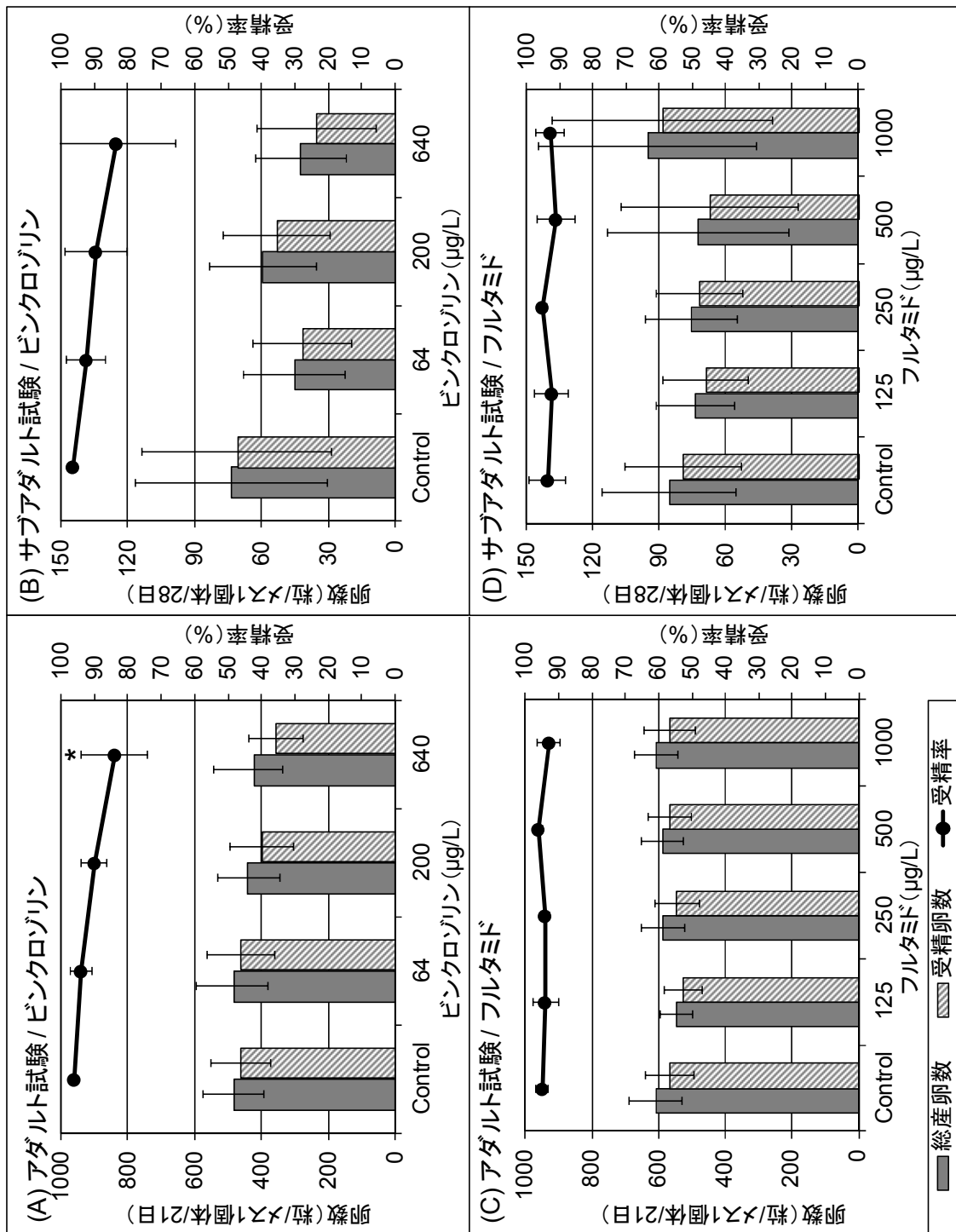


図 6-1 各試験期間中の産卵数・受精卵数・受精率（メス1個体・1日あたり）

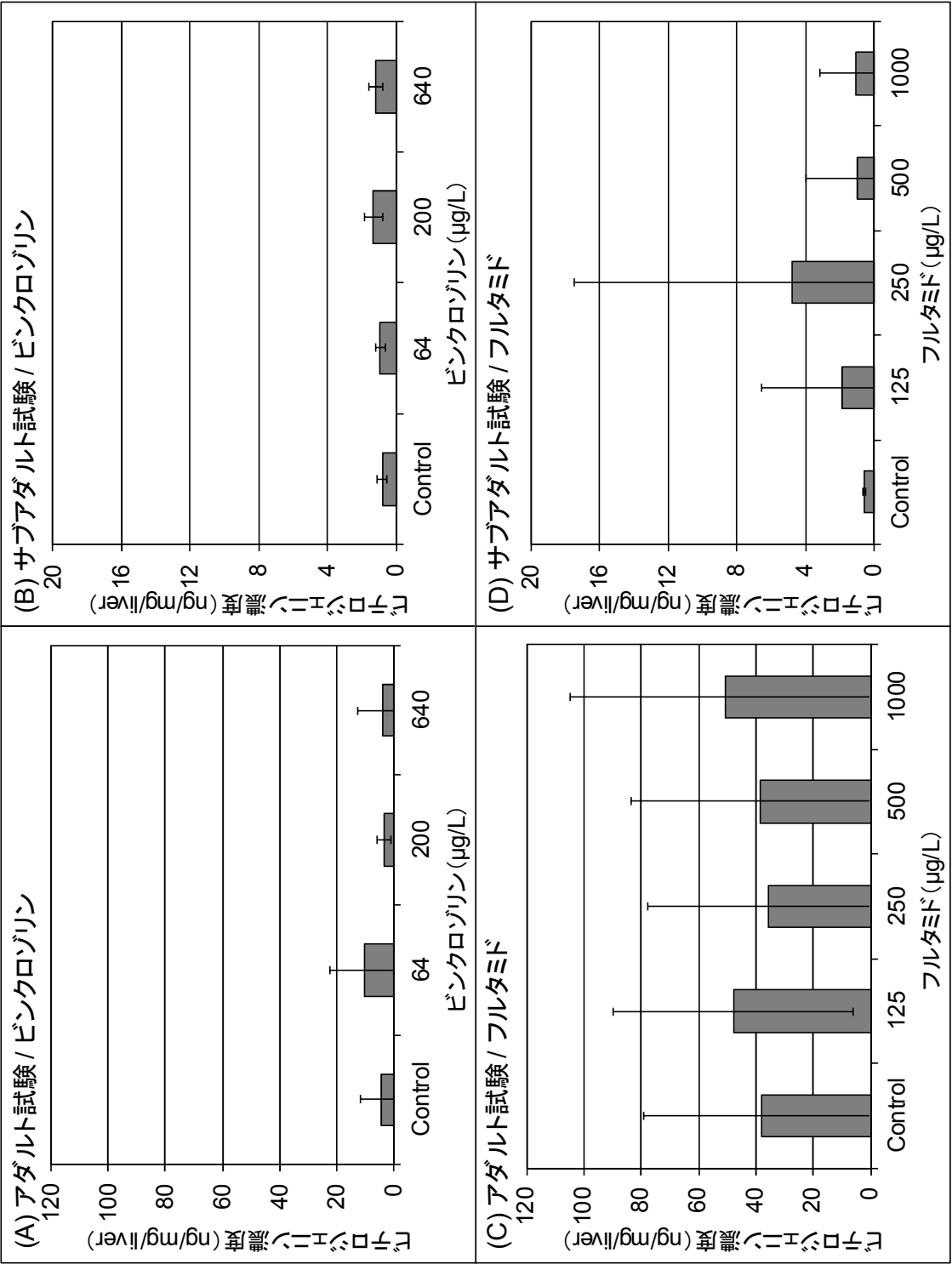


図 6-2 オス個体の肝臓中ピテロジェニン濃度

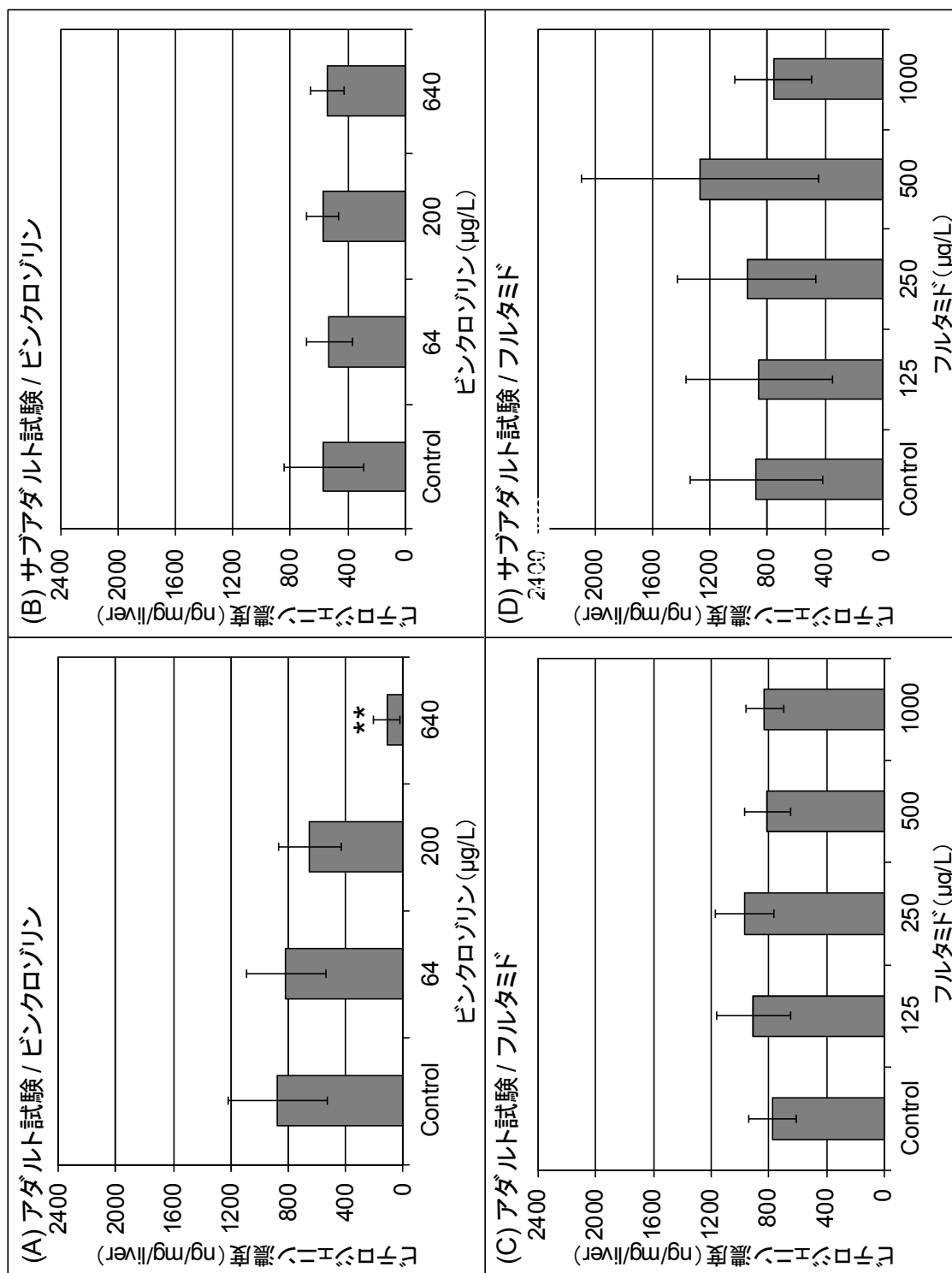


図 6-3 メス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

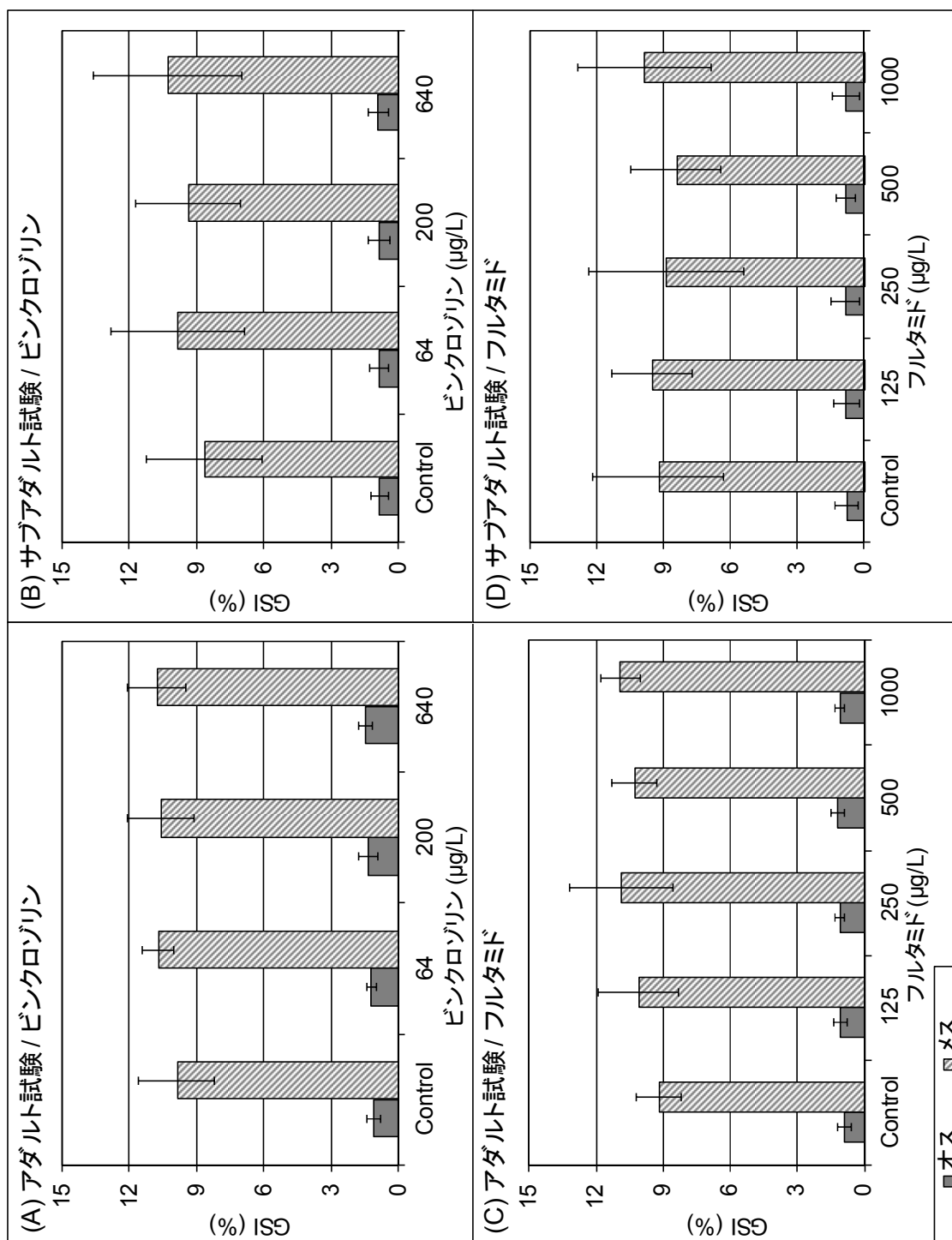


図 6-4 オス及びメス個体の生殖腺体指数(GSI)

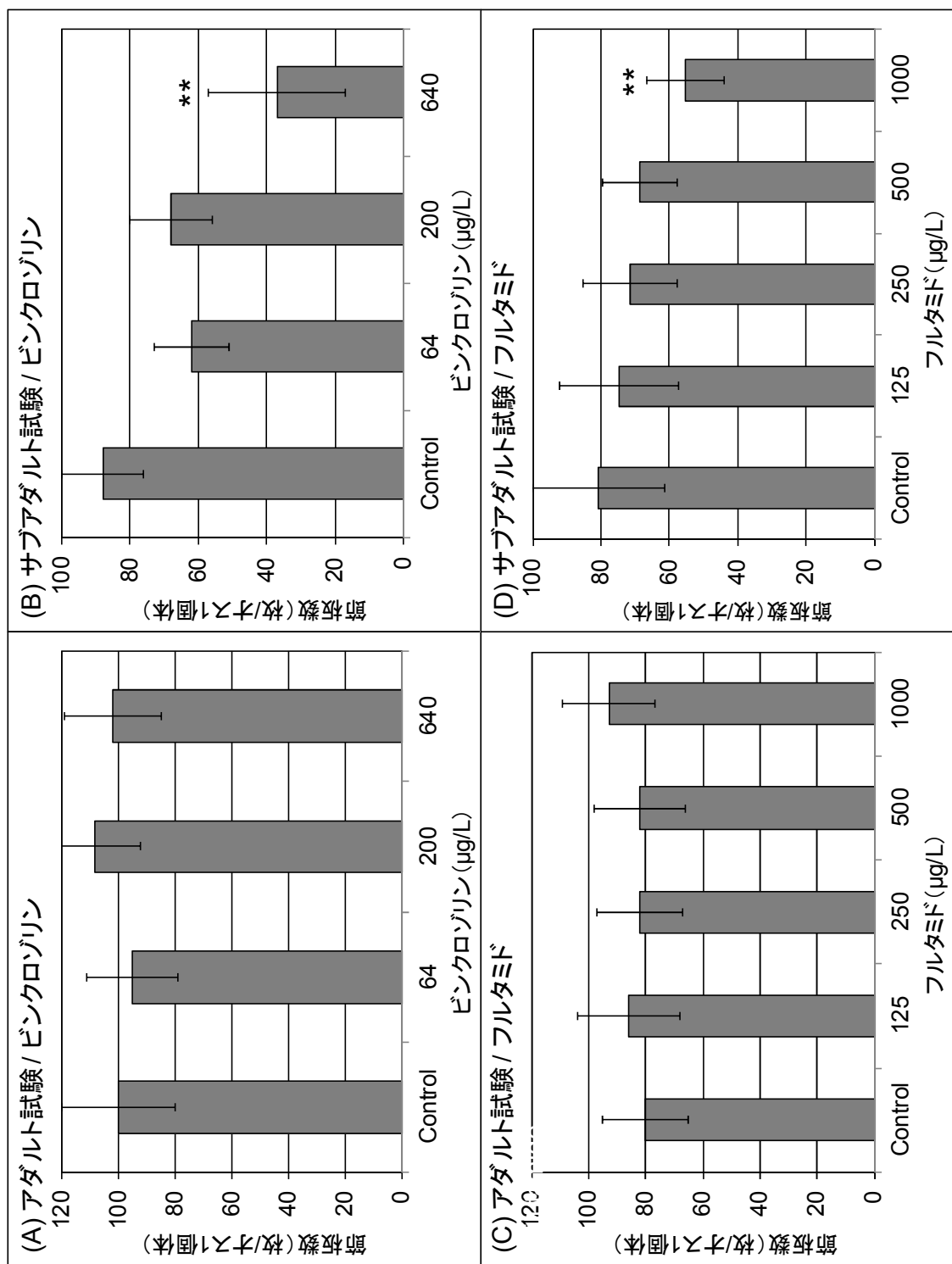


図 6-5 オス個体の乳頭状小突起を有する節板数

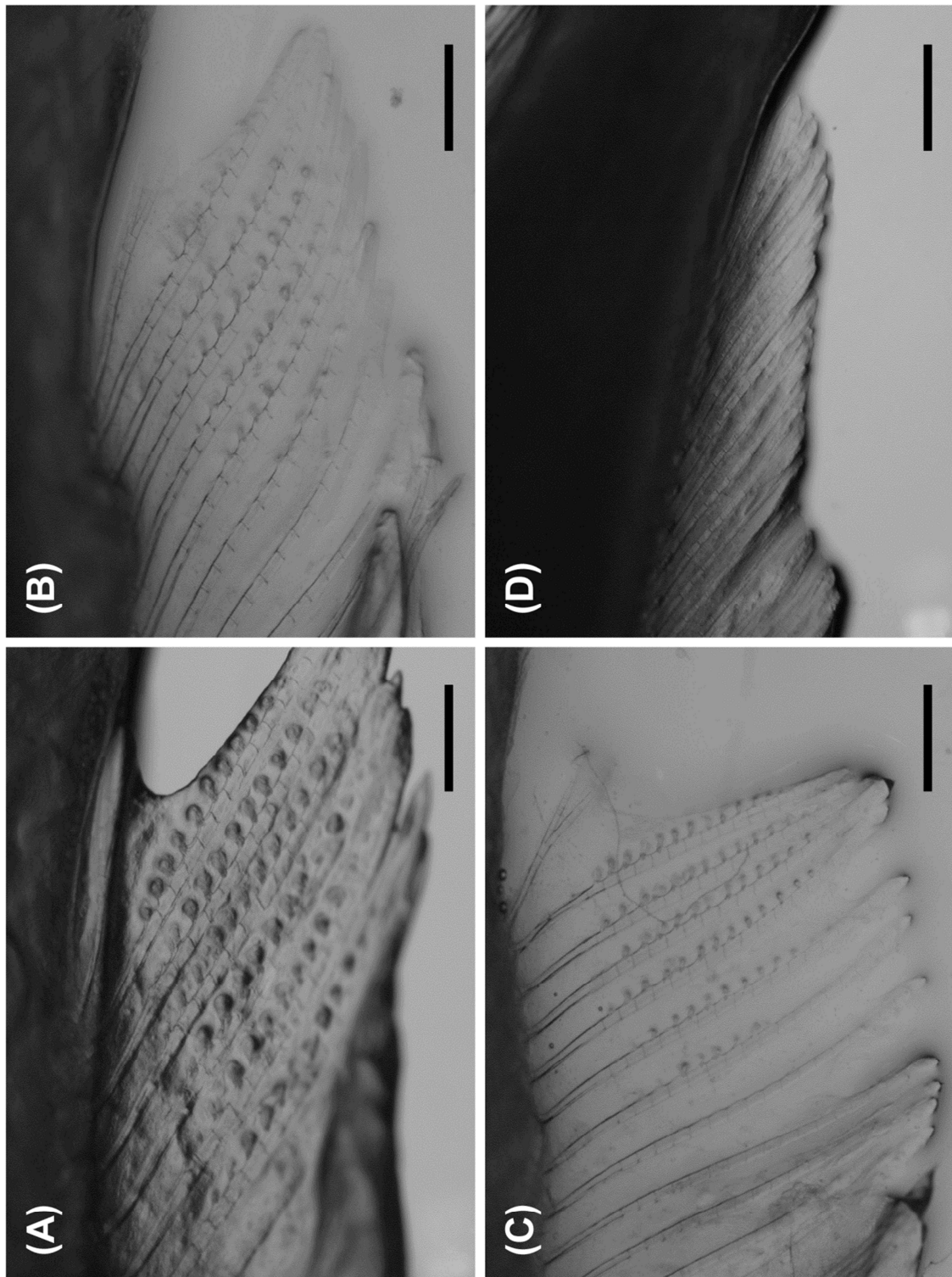


図 6-6 典型的オス及びメス個体の実体電子顕微鏡写真：(A) 対照区オス個体，(B) ピンクロゾリン 640 $\mu\text{g/L}$ 曝露区オス個体，(C) フルタミド 1000 $\mu\text{g/L}$ 曝露区オス個体，(D) 対照区メス個体．バー：2 mm.

6.2.4 考察

乳頭状小突起を有する節板数について、アダルト期試験では有意差が確認出来なかったのに対し、サブアダルト期試験では濃度依存的に減少し、ビンクロゾリン・フルタミド共に最高濃度区で有意差が確認された。既存研究から、生殖器を摘出した場合、3週間前後で乳頭状小突起が消失することが知られている(永田, 1936)が、抗アンドロゲン作用物質での消失については報告されていない。本結果からは、内分泌かく乱に伴う乳頭状小突起の出現阻害は、消失に比べよりセンシティブである可能性が考えられる。その場合、抗アンドロゲン作用の検出には出現阻害を確認出来るサブアダルト期からの曝露が有効であろう。

抗アンドロゲン作用物質によって魚類の繁殖に悪影響がみられたとする報告として、ファットヘッドミノーやグッピーを用いた事例がある(Makynen et al., 2000, Baatrup and Junge, 2001)。本稿の Vinclozolin によるアダルト期・サブアダルト期曝露試験において受精率が減少傾向にあったことも、これらの既存研究に整合する。但し、抗アンドロゲン作用そのものに起因するものであるかは明らかではなく、内分泌かく乱以外の毒性による可能性も考えられる。

Jensen et al. (2004)は、ファットヘッドミノーにフルタミドを曝露した結果、血中ビテロジェニンが雌雄ともに上昇したと報告している。一方で、Ankley et al. (2004)は、ファットヘッドミノーに対するフルタミド及びトレンボロンの曝露試験から、雌の肝臓中ビテロジェニン濃度低下が確認されたと報告している。本稿で行った4つの曝露試験では、肝臓中ビテロジェニン濃度を測定したが、Vinclozolin のアダルト期曝露試験のみ最高濃度区で有意な低下が確認され、その他試験では対照区との有意差は確認されなかった。このような不整合が、個体差や種の違いによるものなのか、その他の試験条件によるものなのかは、不明である。抗アンドロゲン物質曝露によってビテロジェニンが上昇する原因の仮説として、抗アンドロゲン作用によってアンドロゲン不足になるため、11-ketotestosterone のプレカーサーであるテストステロンが過剰生産され、そのテストステロンが P450 アロマターゼによってエストロゲンに変換されたためにビテロジェニンが誘導された、との可能性が推測される。一方で、何らかの要因でテストステロンが過剰に作られなかった、もしくは P450 アロマターゼが働かなかったなどの場合、本稿のようにビテロジェニン濃度が上昇しないであろう。フィードバック制御がどのタイミングでどこに働くのか等については、種差・個体差・種々の環境要因に左右されるものと思われる。従って、体内ホルモン濃度の測定や、各種ホルモン合成酵素動きの解明など、今後の検証が必要である。但し、何れにしてもビテロジェニン濃度の上昇はエストロゲン作用においてもみられるものであり、抗アンドロゲン作用検出のエンドポイントとしてはそもそも不適であろう。

以上から、二次性徴前のニホンメダカを曝露試験の被験魚とした場合、乳頭状小突起は抗アンドロゲン作用物質検出のための優れたエンドポイントになり得ると考えられる。但し、現状ではいくつかの課題・懸念が残る。サブアダルト期曝露試験は被験魚が二次性徴

前で雌雄不明の段階から曝露を開始するため、個体による成熟のばらつきが産卵数に大きく影響すること、各連・各試験区の雌雄比率がランダムに決定すること、の2点からアダルト期曝露試験に比べデータの精度を確保する上でより困難であると考えられる。また、常に想定する成熟段階で試験を行い、試験毎に結果を比較可能とする為には、被験魚の成長を同一条件で安定させる事が求められる。また、他の内分泌かく乱作用についても本手法で検出出来るかどうかは明らかでない。OECD TG229に基づいていることから、エストロゲン作用・アンドロゲン作用・アンチエストロゲン作用などその他の検出も可能であると思われるが、今後の検証が必要であろう。

6.2.5 まとめ

二次性徴前のニホンメダカを曝露試験の被験魚とした場合、乳頭状小突起は抗アンドロゲン作用物質検出のための優れたエンドポイントになり得ると考えられる。一方で、曝露手法の安定性確保や汎用性などについて課題が残る。今後、曝露開始時期・曝露期間・生物数などについて妥当性を検証するとともに、抗アンドロゲン作用以外の内分泌かく乱作用の検出可否を確認することが有意義である。

6.3. 魚類多世代試験の開発と検証

6.3.1 背景と目的

化学物質の魚類に対する多世代影響については、日本での「メダカ・フルライフサイクル試験」や、米国での”Fathead minnow two-generation test”を用いた報告が既存研究として知られている(Nakamura et al., 2013b)。また、それぞれの一長一短を踏まえ、試験法を標準化する試みも進められている(OECD, 2013a)。しかし、実施例は極めて限定的であり、技術的な課題も残されている。そこで、これらの手法を基に、メダカを用いて3世代・27週に亘る多世代試験法を構築・実施した。

モデル物質には、新規環境影響懸念物質の中でも最も曝露試験技術が確立されていることから、女性ホルモン作用物質のエストロンを用いる事とした。下水中に含まれるヒト由来の各種エストロゲンは、放流先の河川等に生息する野生生物にとって重要な内分泌かく乱要因となり得る。その中でも、このうちエストロンは、エストラジオールやノニルフェノールに比べそのリスクが看過されてきた。しかし、特に都市部の環境中から 100 ng/L を超える濃度での検出例が複数報告されており、実際の環境影響を明らかにする上でも重要である。

6.3.2 材料と方法

(1) 試験生物

生物種はヒメダカ (*Oryzias latipes*) とした。試験に用いたヒメダカは、財団法人化学物質評価研究機構より供与された個体を、(独)国立環境研究所環境リスク研究センターの飼育馴化室において飼育繁殖させて使用した。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽（5 L）
- ・飼育水：調温清浄濾過水
- ・飼育方法：流水式
- ・水温・pH：25±2℃，pH 7.5±0.5
- ・光周期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼料：ブラインシュリンプのふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回
（休日 は 1 回）飽食量を給餌

(2) 被験物質の調製

エストロン（CAS: 53-16-7，和光純薬工業株式会社，大阪，日本，純度：>98%）被験物質 50 mg を電子天秤（AG204，Mettler Toledo 社製）によって秤量し，アセトン 500 mL に溶解させ，100 mg/L のストックソリューション A を得た。これを，容量 1 L のねじ口瓶に 1 mL 投入し，乾固させた後に超純水 1 L を投入，30 分の超音波処理及び 12 時間のスターラーによる攪拌によって混合し，100 µg/L のストックソリューション B を得た。これを，各曝露区設定濃度の 100 倍になるよう超純水によって希釈し，これをストックソリューション C とした。各曝露区用のストックソリューション C を流水式魚類試験装置（SIS-24F，柴田科学株式会社製，以下同様）にセットし，調温清浄濾過水による 100 倍希釈を連続的に行い，調製直後の試験液を各水槽へ滴下した。ストックソリューション A は全試験工程において同一のものを扱い，ストックソリューション B 及び C の調製は，3 日に 1 度の頻度で行った。

(3) 曝露試験

試験のプロトコル概要を図 3-5 に示す。試験は全て(独)国立環境研究所環境リスク研究センターの魚類・両棲類試験室にて，以下の条件で行った。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽
- ・希釈水：調温清浄濾過水
- ・曝露期間：P（親）世代から F2 世代の受精後 10 週まで計 27 週
- ・試験液量：5 L/連（各世代受精後 0～10 週目）
2 L/連（各世代受精後 11～15 週目）

- ・曝露方式：流水式（換水率5回/日以上）
- ・試験区数：被験物質曝露区5濃度（100, 50, 25, 12.5, 6.25 ng/L），対照区
 上記濃度は，予備試験として実施した短期繁殖試験（OECD TG229）の試験結果（繁殖のLOEC：1000 ng/L）を踏まえ，環境中での検出濃度報告値と整合するよう設定した。
- ・連数：8連/対照区，4連/曝露区
 16連/対照区，8連/曝露区
- ・供試生物数：雌雄混合で最大15個体/連（各世代受精後0～10週目）
 メス1個体・オス1個体/連（各世代受精後11～15週目）
- ・供試生物齢：12週齢（P世代の曝露開始時）
- ・水温：25±1℃
- ・pH：pH 7.5±0.5
- ・溶存酸素飽和度：60%以上
- ・光周期：明期16時間・暗期8時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼料：ブラインシュリンプのふ化後24時間以内の幼生を，1日2回（休日は1回）飽食量を給餌

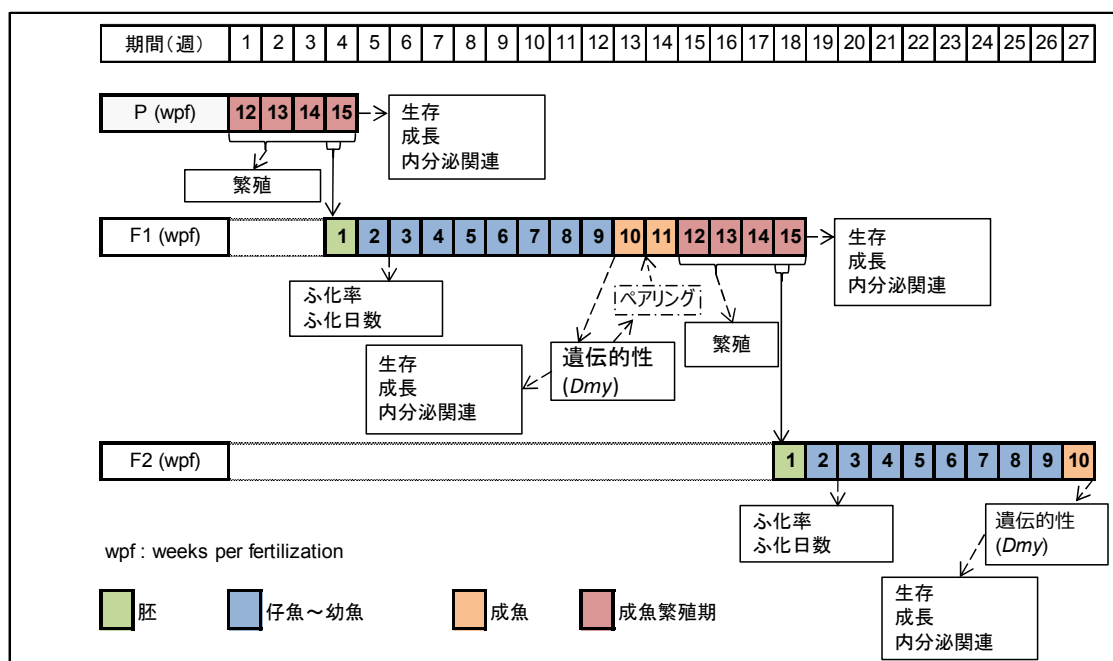


図 3-5 魚類多世代試験のプロトコール概要

① P（親）世代

生後 11 週齢のヒメダカを雌雄選別し、1 水槽あたりにメス 1 個体・オス 1 個体を投入して 7 日間の馴化を行った。その際、外観に異常が認められた個体や極端に成長差がある個体は除去した。馴化終了後、被験物質の濃度が適正值であることを確認してから、供試ヒメダカを各水槽に投入して試験開始した。週に 1 回程度、水温・pH、溶存酸素飽和量を試験区毎に測定した。曝露水槽への藻類付着を防ぐため、週に 1 回程度水槽交換を行った。交換後の水槽は実験器具用自動洗浄機（G7887, Miele 社製）を用いて洗浄し乾燥の上再使用した。尚、曝露・洗浄に用いた廃水は、環境リスク研究棟内排水処理装置に通水し、試験排水中の被験物質を吸着処理させた上で処理した。

曝露期間中は水槽内の産出卵を毎日採取し、メス 1 個体あたりの産卵数、受精卵数、受精率を計測した。また、死亡個体の有無及び行動・外見の異常を、毎日目視によって観察した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄を確認した。行動・外見の異常は、下記について対照区と比較した。

1) 行動観察項目

摂餌活動の低下、横転、平衡喪失、表層集中、活動度低下、過運動など

2) 外観観察項目

体幹湾曲、眼球突出、腹部膨満、体色異常、出血、粘液の異常、立鱗など

曝露 4 週目の第 1 日に各ペアの産出した受精卵 15 粒を、観察・計測終了後に F1 試験に供した。その際、受精卵数が 15 粒を超える場合は無作為に 15 粒を選択し、15 粒よりも少ない場合には、第 2 日に産出した受精卵を無作為に追加し 15 粒となるよう調整した。

4 週間の曝露期間終了後、試験期間終了後、生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。

1) 全長・体長及び湿重量の測定

全長・体長はノギス（CD-S10C, 株式会社ミットヨ製）を用いて、湿重量は電子天秤（AG204, Mettler Toledo 社製）を用いて測定した。

2) 二次性徴指標の計測

メダカの臀鰭を切断し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、臀鰭軟条上に認められる乳頭状小突起を実体顕微鏡（MZ16, Leica 社製）の下で観察し、突起を有する節板数を計測し、対照区と比較した。

3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定

解剖により肝臓を摘出し電子天秤（AG204, Mettler Toledo 社製）によって秤量した。計測した肝臓重量を基に肝臓体指数（肝臓重量/湿重量）を算出した。

また、肝臓中のビテロジェニン量を調べるため、摘出した肝臓をホモジナイズし、ELISA 法で測定した。ELISA は EnBioMedaka Vitellogenin ELISA system（株式会社

エンバイオテック・ラボラトリーズ製)を用い、付属のマニュアルに従い実施した。測定は以下のように行った。

- a) 肝臓を回収したテストチューブに冷却した検体希釈用バッファー200 μL を加える。
- b) 肝臓をホモジナイズし、4℃、9000 g、10 分間の遠心分離にかける。
- c) 分離した上清を 500 μL マイクロテストチューブに回収し、直ちに氷冷し、続けてビテロジェニン測定に供することができない場合は-80℃で保存した。

この上清を ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) 法によるビテロジェニン測定に供した。測定にはこのホモジネート上清をさらに 10 倍希釈したものを使用した。ホモジネート上清中に含まれるビテロジェニンの分析にはエンバイオ社製のメダカビテロジェニン測定用 ELISA キットを使用した。操作は以下の通りである。

- a) Wash Buffer で洗浄した抗体固層化マイクロプレートの各 well に、測定サンプルを 50 μL 添加し、室温で 1 時間インキュベートする。
- b) 溶液を捨て、well 内を wash buffer で 3 回洗浄し、HRP-抗メダカビテロジェニン抗体溶液を、各 well に 50 μL ずつ添加し、室温で 1 時間インキュベートする。
- c) 溶液を捨て、洗浄した後、発色液を各 well に 50 μL ずつ添加し、室温で正確に 20 分間反応させ、反応停止液を 50 μL ずつ添加して反応を停止させる。
- d) マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定する。

各サンプルについて 2 well を使用し、デュプリケーションで測定を行った。検量線にはキットに付属のメダカビテロジェニン標準液を使用した。標準液 (100 ng/mL) を希釈し、50, 20, 10, 5 ng/mL 溶液を調製し、上記と同様の手順によって測定した吸光度より検量線を作成した。検量線はマイクロプレートごとに作成した。測定サンプルの吸光度より、検量線を使用して測定試料中のビテロジェニン濃度を算出し、これに希釈率を乗じることでホモジナイズ上清中のビテロジェニン濃度を求めた。さらに、この濃度を各個体の肝臓の重量で除算することにより、肝臓重量あたりのビテロジェニン含量 (ng/mg) を求めた。

4) 生殖腺の観察・測定

解剖後、胴体から生殖腺を摘出せずに形態から雌雄について観察した。その後、胴体ごと Davidson 固定液中に浸漬し固定した。

5) 生殖腺の病理組織学的観察

対照区及び 100 ng/L・50 ng/L 曝露区の各個体について、生殖腺の組織切片を作成し、精巣卵など異常の有無を観察した。切片の作成及び観察は、以下のように行った。

- a) 固定した試料中の生殖腺を冠状方向で 10 枚程度に切断する。
- b) 切断した切片を H&E 染色した上で、スライドガラス上に伸展させ、封入剤及

びカバーガラスにて永久標本化する。

- c) 作成した標本を組織像の確認出来る倍率に顕微し，写真撮影する。

② F1 世代

P 世代より採取した受精卵は，水槽内に設置したふ化用シリンダーに投入し P 世代と同一条件で曝露を継続した。ふ化用シリンダーは，底面をステンレスメッシュ（No. 32）で覆った円筒状のガラス管（内径 5 cm，高さ 10 cm）であり，卵上下機構（柴田科学株式会社製）によってゆっくりと振とうさせた。ふ化後の仔魚は，ピペットを用いてシリンダー外に移動し，曝露を継続した。水質の測定，水槽の交換と洗浄，廃水の処理などは，P 世代と同一である。曝露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・外見の異常を，毎日目視によって観察した。卵の生死は心拍の有無によって判別した。死亡個体は，発見後速やかに取り除き外見上の雌雄（もしくは未成熟）を確認した。行動・外見の異常は，P 世代と同様の基準で対照区と比較した。

受精後 10 週目に，生存した全個体についてメダカの性決定遺伝子である DMY の保有有無を解析する事で，各個体の遺伝的な性別を判別した。方法は以下の通りである。

- 1) 各個体を，尾部の一部を鋭利な剃刀で切断した。これを試料として DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社製）を用い，マニュアルに従って DNA を抽出した。
- 2) PCR はプライマーとして PG17.5 (CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG), PG17.6 (GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA) を使用した。PCR は，95℃・5 分の条件で 1 サイクル，その後，96℃・20 秒，55℃・30 秒，72℃・30 秒の条件を 38 サイクル繰り返して行った。
- 3) この後，増幅産物を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し，EtBr 染色によりバンドを確認して遺伝的な性別を判別した。

判別結果を基に，遺伝的なメスとオスを無作為に各連から 2 尾ずつ選別し，2 ペアのペアリングを行った。これらを 1 ペア毎に水槽に投入し，繁殖用個体曝露を継続した。繁殖用に用いなかった個体については，10 週間の曝露期間終了後に氷麻酔処理した上で解剖し，下記項目について測定した。各計測・測定方法は，P 世代と同一である。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察
- 5) 生殖腺の病理組織学的観察

各ペアについて，受精後 12～15 週の期間，水槽内の産出卵を毎日採取し，1 ペアあたりの産卵数，受精卵数，受精率を計測した。

曝露 15 週目の第 1 日に各ペアの産出した受精卵粒を、観察・計測終了後に F2 試験に供した。その際、同一個体を親とする 2 ペアが産出した受精卵を混合し、それが 15 粒を超える場合は無作為に 15 粒を選択し、15 粒よりも少ない場合には、第 2 日に産出した受精卵を同様に混合した後に無作為に追加し 15 粒となるよう調整した。

15 週間の曝露期間終了後、生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。その他の観察についても、各計測・測定方法は、P 世代・F1 世代 10 週と同一である。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察
- 5) 生殖腺の病理組織学的観察

③ F2 世代

F1 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ化用シリンダーに投入し F1 世代と同一条件で曝露を継続した。ふ化用シリンダーは、F1 世代に用いたものと同一であるふ化後の仔魚は、ピペットを用いてシリンダー外に移動し、曝露を継続した。

水質の測定、水槽の交換と洗浄、廃水の処理などは、P 世代・F1 世代と同一である。

曝露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・外見の異常を、毎日目視によって観察した。卵の生死は心拍の有無によって判別した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄（もしくは未成熟）を確認した。行動・外見の異常は、P 世代・F1 世代と同様の基準で対照区と比較した。

受精後 10 週目に、生存した全個体についてメダカの性決定遺伝子である DMY の保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別した。

10 週間の曝露期間終了後に氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。各計測・測定方法は、P 世代・F1 世代と同一である。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察
- 5) 生殖腺の病理組織学的観察

(4) 試験環境測定と被験物質の濃度測定

① 水温、pH、溶存酸素の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

・ 水 温 計：CT-430WP、株式会社カスタム製

- ・p H 計：D-55，株式会社堀場製作所製
- ・溶存酸素計：HQ30d，HACH 社製

② 被験物質の濃度測定

1) 試薬

- ・標準品 エストロン：和光純薬工業株式会社製
- ・内部標準 エストロン 13C：Canbrige Isotop Labratories Inc.製
- ・メタノール：残留農薬・PCB 試験用 和光純薬工業株式会社製
- ・アセトニトリル：残留農薬・PCB 試験用 和光純薬工業株式会社製
- ・ギ酸：試薬特級 和光純薬工業株式会社製
- ・固相カートリッジ：Oasis HLB Plus LP Extraction Cartridge Waters 社製
- ・精製水：日本ミリポア製純粋製造装置 Elix10 と超純水製造装置 Milli-Q Gradient を組み合わせたシステムにより処理したもの。

2) 標準原液

- ・エストロン標準原液：100 mL 容メスフラスコに精密に秤量したエストロン 10 mg を入れ，アセトニトリルで溶解させ 10 mg/100 mL とした。
- ・内部標準原液：エストロン 13C のアンプル (100 mg/L) から，200 μ L 量り取り 20 mL 容メスフラスコに入れアセトニトリルでメスアップした。

3) 標準液

- ・エストロン標準液：エストロン標準原液をアセトニトリル：精製水=1：1 (v/v) で 10 倍希釈した。
- ・内部標準液：エストロン 13C 標準原液をアセトニトリルで 100 倍希釈した。

4) 検量線の作成

- ・エストロン標準液をアセトニトリル：精製水=1：1 (v/v) で希釈し，0, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 mg/L となるように作成し，バイアル内で 200 μ g/L になるように内部標準液を添加した。

5) 試験水の前処理および試験水の調整

- ・試験水を 500 mL メスシリンダーで量り取り，ギ酸を 500 μ L，内部標準液 200 μ L を添加した。
- ・メタノール 10 mL，精製水 10 mL でコンディショニングした固相カートリッジに試験水を 20 mL/min.の流速で通水させた。通水後の固相カートリッジに精製水を 10 mL 通し，約 1 時間吸引乾燥させ，メタノール 8 mL で溶出した。
- ・溶出液に窒素ガスを吹き付け，乾固直前まで濃縮した。これをアセトニトリル 250 μ l で溶解させ，精製水 250 μ l で溶解し全量 1 mL とした。

6) 分析機器

- LC

コントローラー：島津製作所製 CMB-20A

ポンプ：島津製作所 LC-20AD

オートインジェクター：島津製作所製 SIL-20A

オーブン：島津製作所製 CTO-20A

- MS

AB SCIEX 社製 API2000 LC/MS/MS system

7) 測定条件

- LC

カラム：Xterra MS C18 3.5 μm 2.1 \times 150 nm column Waters 社製

移動相：A：精製水 B：アセトニトリル (50 : 50, v/v)

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

注入量：1 μL

- MS/MS

イオン化法：ESI (-)

イオンスプレー電圧：-4500V

ターボガス温度：300 $^{\circ}\text{C}$

(5) 結果の算出と統計処理

分析値などの数値の処理は、JIS Z 8401:1999 参考1 規則 B に従った。各データは、平均値 \pm 標準偏差で示した。Bartlett 検定によって等分散性を有意水準 5%で確認し、等分散性が棄却されない場合は Dunnett 法による多重比較を、等分散性が棄却された場合は Steel 法による多重比較の検定を行った。統計解析には R 言語を用い、パッケージには mvtnorm 及び EZR を使用した。**及び*は、対照区と比較して有意差 (** $p<0.01$ 及び* $p<0.05$) が認められたことを示す。

6.3.3 結果

試験環境と被験物質濃度

試験期間中，試験液の水溫，pH，溶存酸素飽和度は全ての試験区において前述の試験条件の範囲内であった。

試験期間中の計 27 回の測定において，試験液中の被験物質濃度は何れの曝露区も設定濃度の 80～120%の範囲内であり，対照区は検出下限以下であった（表 6-3）。

表 6-3 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	<i>N</i>	平均測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
対照区	27	N.D.	—	—
6.25	27	5.74	91.8	7.42
12.5	27	11.4	91.0	7.78
25.0	27	24.0	96.2	7.02
50.0	27	47.1	94.2	6.73
100	27	91.4	91.4	5.41

生物指標

(1) P 世代

① 試験期間中の死亡及び行動・外観の異常

P 世代試験期間中の死亡個体数を表 6-4 に示す。何れの試験区においても，曝露終了時まで全個体が生存した。また，何れの試験区においても，行動・外観の異常は認められなかった。

表 6-4 P 世代試験期間中の死亡個体数

試験濃度 ($\mu\text{g/L}$)	オス			メス		
	供試数 (ind.)	死亡数 (ind.)	死亡率 (%)	供試数 (ind.)	死亡数 (ind.)	死亡率 (%)
対照区	8	0	0.0	8	0	0.0
5.74	4	0	0.0	4	0	0.0
11.4	4	0	0.0	4	0	0.0
24.0	4	0	0.0	4	0	0.0
47.1	4	0	0.0	4	0	0.0
91.4	4	0	0.0	4	0	0.0

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

② P 世代の産卵数・受精卵数・受精率

P 世代各試験区におけるメス 1 個体 1 日あたりの産卵数・受精卵数・受精率を表 6-5, 図 6-7 に, メス 1 個体あたりの積算受精卵数を図 6-8 に示す。産卵数・受精卵数・受精率の全てについて, 何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-5 P 世代試験期間中の産卵数・受精卵数・受精率 (メス 1 個体 1 日あたり)

試験濃度 (ng/L)	産卵数 (eggs/female/day)	受精卵数 (eggs/female/day)	受精率 (%)
対照区	26.5 \pm 3.8	25.2 \pm 4.0	94.9 \pm 5.0
5.74	26.7 \pm 2.9	25.9 \pm 2.9	96.9 \pm 2.2
11.4	25.8 \pm 2.8	22.8 \pm 3.3	88.7 \pm 10
24.0	26.5 \pm 5.1	25.8 \pm 4.5	97.5 \pm 1.9
47.1	27.3 \pm 1.8	26.5 \pm 2.3	97.3 \pm 2.6
91.4	25.8 \pm 4.0	24.4 \pm 5.5	93.2 \pm 9.0

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均 \pm 標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

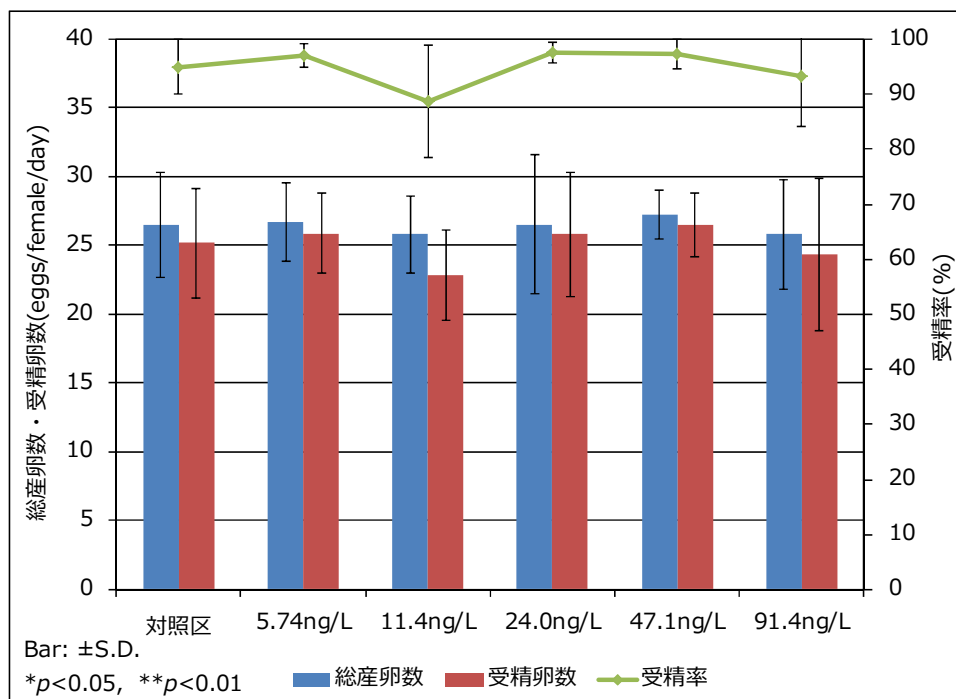


図 6-7 P 世代の産卵数・受精卵数・受精率（メス 1 個体・1 日あたり）

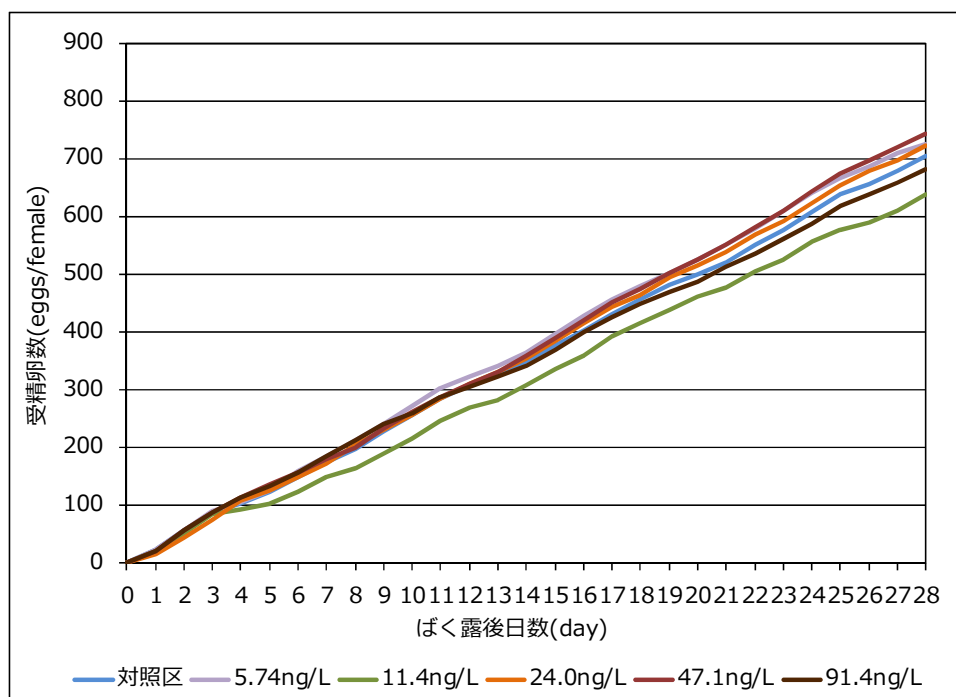


図 6-8 P 世代の積算受精卵数（メス 1 個体あたり）

③ P世代の全長・湿重量

P世代の全長及び湿重量の測定結果を表6-6・表6-7に示す。オス・メス共に、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-6 P世代の全長

試験濃度 (ng/L)	全長(mm)	
	オス	メス
対照区	36.7 ± 0.96	35.6 ± 0.99
5.74	36.4 ± 1.0	36.8 ± 0.90
11.4	35.3 ± 1.1	36.2 ± 0.88
24.0	37.3 ± 0.59	35.0 ± 0.80
47.1	36.6 ± 0.85	35.4 ± 0.63
91.4	36.8 ± 0.59	34.5 ± 0.89

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

表 6-7 P世代の湿重量

試験濃度 (ng/L)	湿重量(mg)	
	オス	メス
対照区	449 ± 21	453 ± 21
5.74	442 ± 30	529 ± 42
11.4	396 ± 50	483 ± 32
24.0	459 ± 51	451 ± 31
47.1	404 ± 13	474 ± 36
91.4	484 ± 38	429 ± 20

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

④ P世代の肝臓体指数

P世代の肝臓体指数の測定結果を表6-8に示す。オス・メス共に、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-8 P 世代の肝臓体指数

試験濃度 (ng/L)	肝臓体指数(%)	
	オス	メス
対照区	1.9 ± 0.19	3.9 ± 0.90
5.74	1.7 ± 0.15	3.0 ± 0.81
11.4	1.6 ± 0.10	4.1 ± 1.1
24.0	1.4 ± 0.16	4.3 ± 0.33
47.1	1.7 ± 0.37	4.2 ± 0.92
91.4	2.2 ± 0.54	3.5 ± 1.4

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑤ P 世代の二次性徴指標

二次性徴の指標として、P 世代における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 6-9 に示す。オスでは、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、メスでは何れの曝露区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 6-9 P 世代における乳頭状小突起を有する節板数

試験濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数(plates)	
	オス	メス
対照区	95 ± 19	0 ± 0
5.74	82 ± 9.3	0 ± 0
11.4	91 ± 12	0 ± 0
24.0	91 ± 17	0 ± 0
47.1	97 ± 8.5	0 ± 0
91.4	110 ± 4.7	0 ± 0

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑥ P 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による P 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 6-10 に示す。オスで

は、91.4 ng/L・47.1 ng/L の両曝露区において対照区に比べ有意な上昇がみられた。一方、メスでは何れの曝露区においても、対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-10 P 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

試験濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度(ng/mg)	
	オス	メス
対照区	1.1 ± 0.3	720 ± 235
5.74	0.9 ± 0.3	837 ± 526
11.4	20.7 ± 32.2	740 ± 279
24.0	25.5 ± 20.2	541 ± 28.2
47.1	35.2 ± 30.4*	567 ± 97.3
91.4	295 ± 135*	648 ± 231

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑦ P 世代の間性又は性転換

P 世代における表現型性別・生殖腺形態の比較を表 6-11 に示す。何れの試験区においても、表現型性別・生殖腺形態とも明確で、かつ両者は一致しており、間性や性転換は認められなかった。

表 6-11 P 世代における表現型性別・生殖腺形態の比較

試験濃度 (ng/L)	N	表現型			生殖腺形態			DMY	
		オス	不明	メス	精巣	不明	卵巣	+	-
対照区	16	8	0	8	8	0	8	-	-
5.74	8	4	0	4	4	0	4	-	-
11.4	8	4	0	4	4	0	4	-	-
24.0	8	4	0	4	4	0	4	-	-
47.1	8	4	0	4	4	0	4	-	-
91.4	8	4	0	4	4	0	4	-	-

⑧ P 世代における生殖腺の病理組織学的観察

P 世代における生殖腺の病理組織学的観察結果を表 6-12 に示す。対照区及び 47.1 ng/L・91.4 ng/L の両曝露区における各個体について生殖腺組織を観察した結果、何れの試験区に

においても組織の異常は確認されなかった（図 6-9）。

表 6-12 P 世代における生殖腺の病理組織学的観察結果

試験濃度 (ng/L)	N	生殖腺組織			
		精巣	精巣卵	不明	卵巣
対照区	16	8	0	0	8
5.74	8	-	-	-	-
11.4	8	-	-	-	-
24.0	8	-	-	-	-
47.1	8	4	0	0	4
91.4	8	4	0	0	4

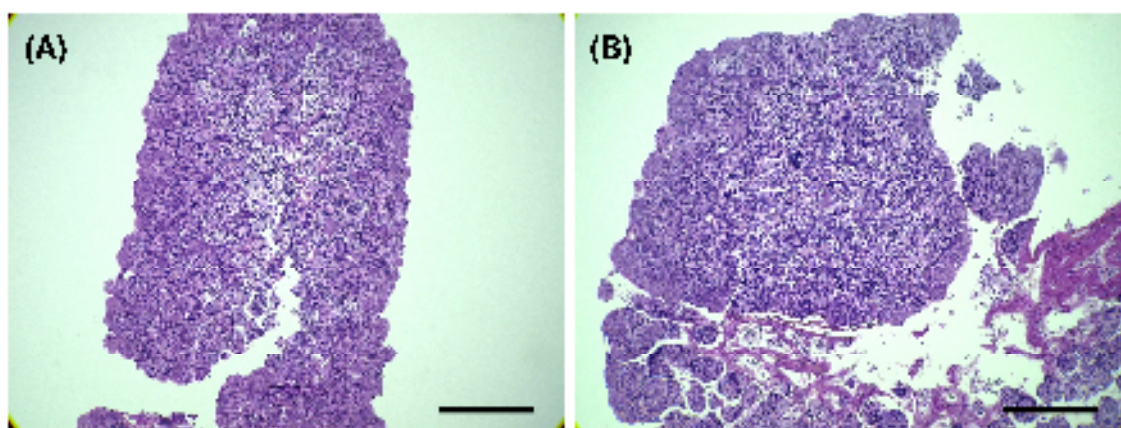


図 6-9 F0 世代（受精後 15 週齢）の生殖腺組織切片像（H&E 染色），画像右下のバーは 200 μ m を示す．（A）：対照区における遺伝的オス個体の精巣，正常な一連の精子形成過程が観察される．（B）91.4 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巣．対照区と同様に正常な一連の精子形成過程が観察される．

（2） F1 世代

① F1 世代胚期のふ化率・ふ化日数及び F1 世代仔魚期のふ化後生存率

F1 世代胚期のふ化率・ふ化日数及び F1 世代仔魚期のふ化後生存率を表 6-13 に示す。ふ化率・ふ化日数，ふ化後生存率の全てについて，何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-13 F1 世代胚期のふ化率・ふ化日数及び F1 世代仔魚期のふ化後生存率

試験濃度 (ng/L)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	ふ化後生存率 (%)
対照区	91.7 ± 5.8	10.7 ± 0.39	81.7 ± 5.3
5.74	95.0 ± 6.4	10.3 ± 0.41	93.0 ± 0.49
11.4	88.3 ± 10	10.4 ± 0.33	92.4 ± 6.9
24.0	90.0 ± 8.6	10.3 ± 0.34	81.1 ± 14
47.1	88.3 ± 15	11.9 ± 0.29	89.3 ± 12
91.4	90.0 ± 16	11.2 ± 1.3	76.7 ± 26

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

② F1 世代受精 10 週後解剖個体の全長・湿重量

F1 世代の全長及び湿重量の測定結果を表 6-14・表 6-15 に示す。オス・メス共に、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-14 F1 世代受精 10 週後解剖個体の全長

試験濃度 (ng/L)	全長(mm)	
	オス	メス
対照区	27.2 ± 2.7	28.6 ± 1.6
5.74	28.2 ± 0.9	28.8 ± 2.1
11.4	27.6 ± 1.6	29.2 ± 1.3
24.0	29.7 ± 1.7	28.5 ± 2.8
47.1	29.1 ± 1.8	29.7 ± 1.5
91.4	28.8 ± 0.81	28.1 ± 0.05

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

表 6-15 F1 世代受精 10 週後解剖個体の湿重量

試験濃度 (ng/L)	湿重量(mg)	
	オス	メス
対照区	234 ± 51	309 ± 57
5.74	232 ± 11	306 ± 72
11.4	223 ± 48	306 ± 34
24.0	262 ± 39	292 ± 110
47.1	253 ± 48	326 ± 54
91.4	245 ± 33	251 ± 19

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

③ F1 世代受精 10 週後解剖個体の肝臓体指数

F1 世代受精 10 週後解剖個体の肝臓体指数の測定結果を表 6-16 に示す。オスでは、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。一方で、メスでは、91.4 ng/L・47.1 ng/L の両曝露区で対照区に比べ有意な低下が確認された。

表 6-16 F1 世代受精 10 週後解剖個体の肝臓体指数

試験濃度 (ng/L)	肝臓体指数(%)	
	オス	メス
対照区	2.9 ± 0.48	5.0 ± 0.35
5.74	2.4 ± 0.24	4.5 ± 0.43
11.4	2.6 ± 0.41	4.7 ± 0.93
24.0	2.0 ± 0.05	5.3 ± 0.49
47.1	2.2 ± 0.54	3.5 ± 0.78*
91.4	2.1 ± 0.30	2.9 ± 0.24**

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

④ F1 世代受精 10 週後解剖個体の二次性徴指標

二次性徴の指標として、F1 世代受精 10 週後解剖個体における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 6-17 に示す。オスでは、91.4 ng/L の曝露区において対照区に比べ有意な減少が確認された。また、メスでは何れの試験区においても、乳頭状小突起を有する

個体は確認されなかった。

表 6-17 F1 世代受精 10 週後解剖個体における乳頭状小突起を有する節板数

試験濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数(plates)	
	オス	メス
対照区	87 ± 6.5	0 ± 0
5.74	90 ± 9.3	0 ± 0
11.4	87 ± 16.8	0 ± 0
24.0	86 ± 6.3	0 ± 0
47.1	72 ± 36.6	0 ± 0
91.4	43 ± 14.8*	0 ± 0

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑤ F1 世代受精 10 週後解剖個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による P 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 6-18 に示す。オスでは、91.4 ng/L の曝露区において対照区に比べ有意な上昇がみられた。一方、メスでは何れの曝露においても、対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-18 F1 世代受精 10 週後解剖個体のビテロジェニン濃度

試験濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度(ng/mg)	
	オス	メス
対照区	8.56 ± 6.2	1000 ± 167
5.74	13.1 ± 7.7	1040 ± 423
11.4	20.2 ± 26.3	808 ± 190
24.0	2.08 ± 1.1	905 ± 338
47.1	73.1 ± 55.5	929 ± 444
91.4	420 ± 92.0*	1237 ± 839

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑥ F1 世代受精 10 週後解剖個体の間性又は性転換

F1 世代受精 10 週後解剖個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較を

表 6-19 に示す。何れの試験区においても、未成熟個体を除いて表現型性別・生殖腺形態とも明確で、かつ DMY を含めた 3 つの性判別結果は整合していた。以上から、間性や性転換は認められなかった。

表 6-19 F1 世代受精 10 週後解剖個体の表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無比較

試験濃度 (ng/L)	N	表現型			生殖腺形態			DMY	
		オス	不明	メス	精巢	不明	卵巢	+	-
対照区	58	18	6	34	18	5	35	22	36
5.74	37	23	1	13	23	1	13	23	14
11.4	33	15	1	17	15	1	17	15	18
24.0	30	17	2	11	17	2	11	18	12
47.1	30	19	1	10	19	1	10	19	11
91.4	28	17	3	8	17	3	8	19	9

⑦ F1 世代受精 10 週後解剖個体における生殖腺の病理組織学的観察

F1 世代受精 10 週後解剖個体における生殖腺の病理組織学的観察結果を表 6-20 に示す。対照区及び 47.1 ng/L・91.4 ng/L の両曝露区における各個体について生殖腺組織を観察した結果、91.4 ng/L 曝露区における計 19 個体の精巢のうち、2 個体において精巢卵が確認された。対照区及び 47.1 ng/L 曝露区においては、組織の異常は確認されなかった（図 6-10）。

表 6-20 F1 世代受精 10 週後解剖個体における生殖腺の病理組織学的観察結果

試験濃度 (ng/L)	N	生殖腺組織			
		精巢	精巢卵	不明	卵巢
対照区	58	22	0	0	36
5.74	37	-	-	-	-
11.4	33	-	-	-	-
24.0	30	-	-	-	-
47.1	30	19	0	0	11
91.4	28	17	2	0	9

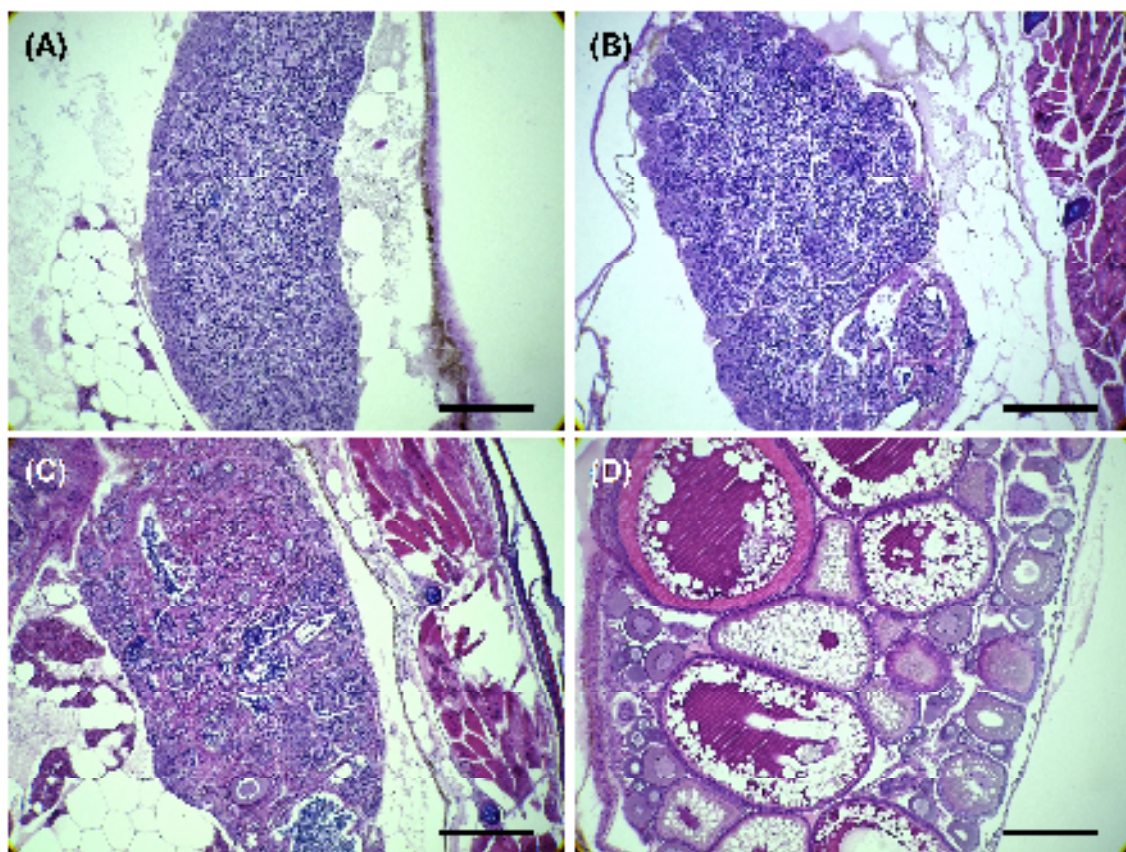


図 6-10 F1 世代受精後 10 週齢の生殖腺組織切片像 (H&E 染色)，画像右下のバーは 200 μm を示す。(A)：対照区における遺伝的オス個体の精巢，正常な一連の精子形成過程が観察される。(B) 47.1 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巢，対照区と同様に正常な一連の精子形成過程が観察される。(C) 91.4 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巢卵，組織中にステージ I ～ II に相当する卵母細胞が複数存在している。(D) 対照区における遺伝的メス個体の卵巢，ステージ I ～ VI の発達段階にある正常な卵母細胞が観察される。

⑧ F1 世代ペアリング後の死亡及び行動・外観の異常

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 6-21 に示す。何れの試験区においても，曝露終了時まで全個体が生存した。また，何れの試験区においても，行動・外観の異常は認められなかった。

表 6-21 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

試験濃度 ($\mu\text{g/L}$)	オス			メス		
	供試数 (ind.)	死亡数 (ind.)	死亡率 (%)	供試数 (ind.)	死亡数 (ind.)	死亡率 (%)
対照区	16	0	0.0	16	0	0.0
5.74	8	0	0.0	8	0	0.0
11.4	8	0	0.0	8	0	0.0
24.0	8	0	0.0	8	0	0.0
47.1	8	0	0.0	8	0	0.0
91.4	8	0	0.0	8	0	0.0

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑨ F1 世代の産卵数・受精卵数・受精率

F1 世代各試験区におけるメス 1 個体 1 日あたりの産卵数・受精卵数・受精率を表 6-22, 図 6-11 に, メス 1 個体あたりの積算受精卵数を図 6-12 に示す。91.4 ng/L 曝露区において, 対照区に比べ産卵数・受精卵数の有意な減少が確認された。受精率については, 何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-22 F1 世代の産卵数・受精卵数・受精率 (メス 1 個体 1 日あたり)

試験濃度 (ng/L)	産卵数 (eggs/female/day)	受精卵数 (eggs/female/day)	受精率 (%)
対照区	25.4 \pm 2.8	24.5 \pm 3.1	96.4 \pm 3.4
5.74	26.8 \pm 4.1	25.4 \pm 4.6	94.5 \pm 4.6
11.4	27.8 \pm 2.5	27.0 \pm 3.5	96.8 \pm 4.9
24.0	31.3 \pm 2.5*	30.8 \pm 2.6*	98.5 \pm 1.7
47.1	26.4 \pm 3.6	26.0 \pm 3.6	98.3 \pm 0.75
91.4	17.7 \pm 8.4*	16.2 \pm 9.7*	74.6 \pm 39

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均 \pm 標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

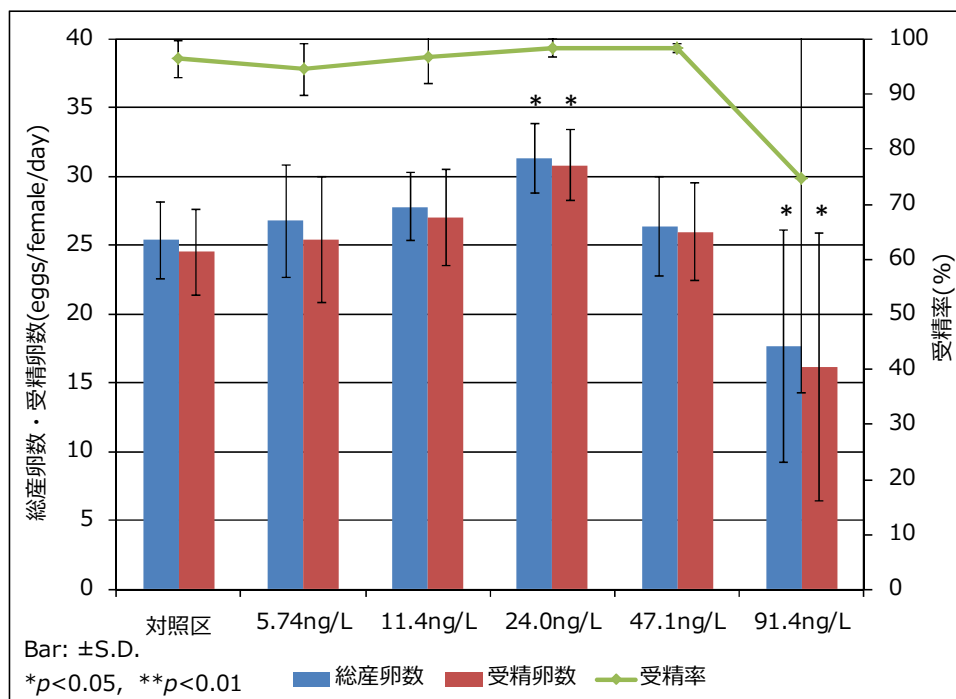


図 6-11 F1 世代繁殖用個体の産卵数・受精卵数・受精率（メス 1 個体・1 日あたり）

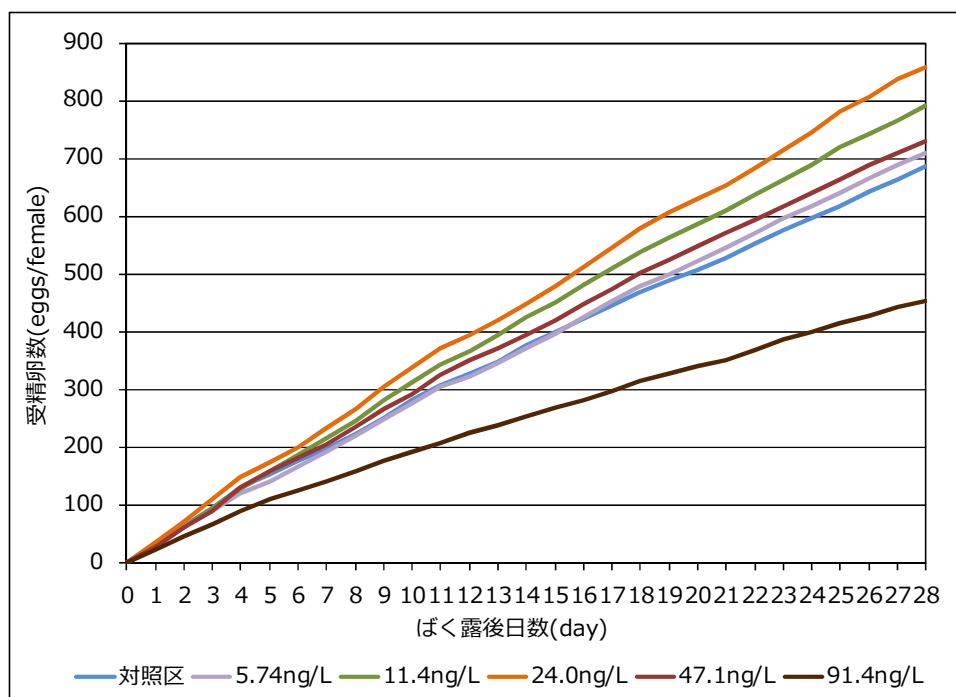


図 6-12 F1 世代繁殖用個体の積算受精卵数（メス 1 個体あたり）

⑩ F1世代繁殖用個体の全長・湿重量

F1世代繁殖用個体の全長及び湿重量の測定結果を表 6-23・表 6-24 に示す。全長については、オス・メス共に 91.4 ng/L・47.1 ng/L の両曝露区において対照区に比べ有意な伸長がみられた。湿重量については、オスでは 91.4 ng/L 曝露区で対照区に比べ有意な増加が確認された一方で、メスでは何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-23 F1世代繁殖用個体の全長

試験濃度 (ng/L)	全長(mm)	
	オス	メス
対照区	34.1 ± 1.4	32.9 ± 0.72
5.74	34.6 ± 1.5	33.6 ± 0.92
11.4	33.8 ± 1.1	32.8 ± 0.82
24.0	34.3 ± 1.3	33.3 ± 1.0
47.1	35.1 ± 1.8	33.4 ± 1.0
91.4	38.4 ± 1.5**	31.7 ± 0.85*

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

表 6-24 F1世代繁殖用個体の湿重量

試験濃度 (ng/L)	湿重量(mg)	
	オス	メス
対照区	381 ± 27	379 ± 44
5.74	403 ± 47	417 ± 31
11.4	361 ± 33	397 ± 24
24.0	377 ± 32	414 ± 40
47.1	397 ± 72	414 ± 40
91.4	556 ± 86**	360 ± 33

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑪ F1世代繁殖用個体の肝臓体指数

F1世代繁殖用個体の肝臓体指数の測定結果を表 6-25 に示す。オス・メス共に、何れの

曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-25 F1 世代繁殖用個体の肝臓体指数

試験濃度 (ng/L)	肝臓体指数(%)	
	オス	メス
対照区	1.6 ± 0.11	4.2 ± 1.1
5.74	1.6 ± 0.32	4.2 ± 0.43
11.4	1.5 ± 0.40	4.8 ± 0.86
24.0	1.5 ± 0.29	4.6 ± 0.70
47.1	1.5 ± 0.33	4.8 ± 1.1
91.4	1.7 ± 0.42	4.4 ± 0.79

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑫ F1 世代繁殖用個体の二次性徴指標

二次性徴の指標として、F1 世代繁殖用個体における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 6-26 に示す。オスでは、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、メスにおいては何れの試験区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 6-26 F1 世代繁殖用個体における乳頭状小突起を有する節板数

試験濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数(plates)	
	オス	メス
対照区	99 ± 8.0	0 ± 0
5.74	111 ± 16.1	0 ± 0
11.4	109 ± 3.1	0 ± 0
24.0	112 ± 6.4	0 ± 0
47.1	96 ± 7.9	0 ± 0
91.4	84 ± 22.1	0 ± 0

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑬ F1 世代繁殖用個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による F1 世代繁殖用個体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 6-27 に示す。オスでは、91.4 ng/L・47.1 ng/L の両曝露区において対照区に比べ有意な上昇がみられた。また、メスにおいても 91.4 ng/L 曝露区において対照区に比べ有意な上昇がみられた。

表 6-27 F1 世代繁殖用個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

試験濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度(ng/mg)	
	オス	メス
対照区	5.6 ± 3.5	686.2 ± 73.41
5.74	2.2 ± 2.8	653.4 ± 105.72
11.4	14.3 ± 21.4	671.27 ± 109.19
24.0	26.2 ± 25.0	555.54 ± 91.7
47.1	48.6 ± 27.8**	693.28 ± 216.75
91.4	540 ± 171**	877.9 ± 167.6*

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑭ F1 世代繁殖用個体の間性又は性転換

F1 世代繁殖用個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較を表 6-28 に示す。何れの試験区においても、表現型性別・生殖腺形態とも明確で、かつ DMY を含めた 3 つの性判別結果は一致しており、間性や性転換は認められなかった。

表 6-28 F1 世代繁殖用個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較

試験濃度 (ng/L)	N	表現型			生殖腺形態			DMY	
		オス	不明	メス	精巢	不明	卵巢	+	-
対照区	32	16	0	16	16	0	16	16	16
5.74	16	8	0	8	8	0	8	8	8
11.4	16	8	0	8	8	0	8	8	8
24.0	16	8	0	8	8	0	8	8	8
47.1	16	8	0	8	8	0	8	8	8
91.4	16	8	0	8	8	0	8	8	8

⑮ F1 世代繁殖用個体における生殖腺の病理組織学的観察結果

F1 世代繁殖用個体における生殖腺の病理組織学的観察結果を表 6-29 に示す。対照区及び 47.1 ng/L・91.4 ng/L の両曝露区における各個体について生殖腺組織を観察した結果, 91.4 ng/L 曝露区における計 8 個体の精巣のうち, 6 個体において精巣卵が確認された。対照区及び 47.1 ng/L 曝露区においては, 組織の異常は確認されなかった (図 6-13)。

表 6-29 F1 世代繁殖用個体における生殖腺の病理組織学的観察結果

試験濃度 (ng/L)	N	生殖腺組織			
		精巣	精巣卵	不明	卵巣
対照区	32	16	0	0	16
5.74	16	-	-	-	-
11.4	16	-	-	-	-
24.0	16	-	-	-	-
47.1	16	8	0	0	8
91.4	16	2	6	0	8

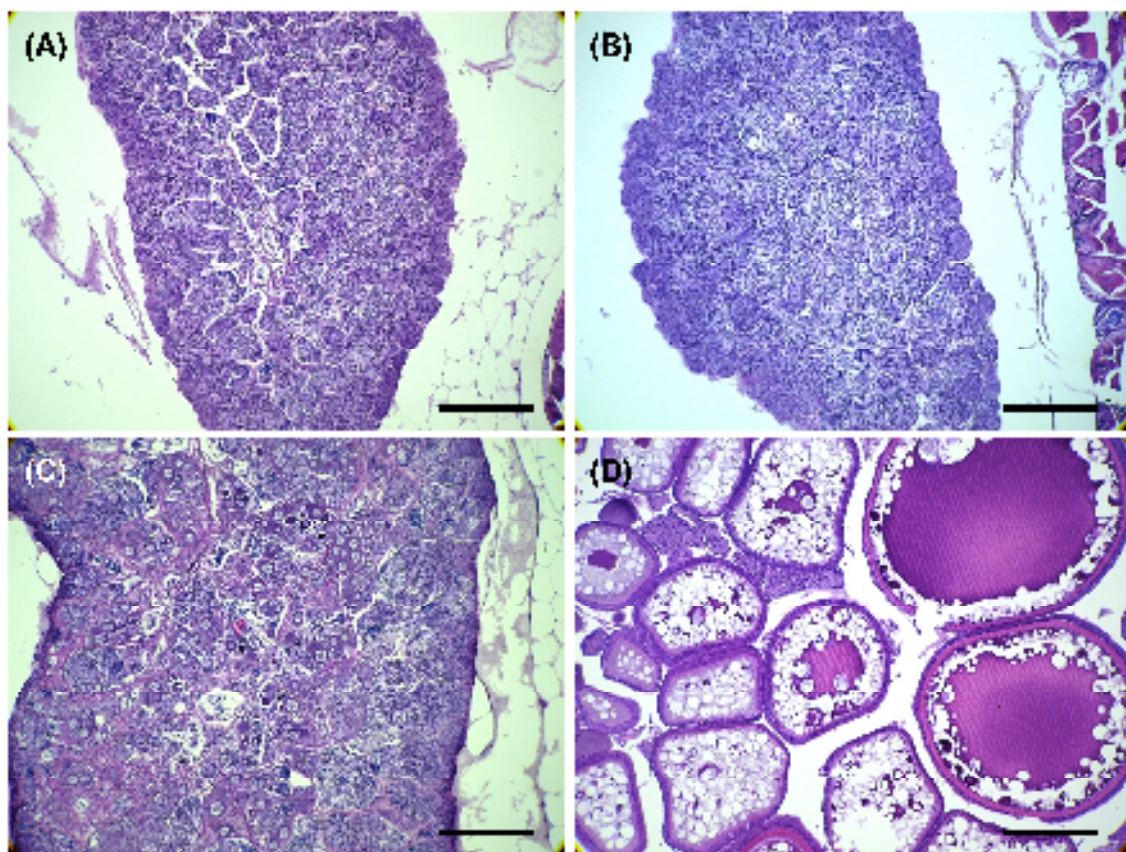


図 6-13 F1 世代繁殖用個体（受精後 15 週齢）の生殖腺組織切片像（H&E 染色），画像右下のバーは $200\mu\text{m}$ を示す．（A）：対照区における遺伝的オス個体の精巣，正常な一連の精子形成過程が観察される．（B）47.1 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巣，対照区と同様に正常な一連の精子形成過程が観察される．（C）91.4 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巣卵，組織中にステージ I に相当する卵母細胞が無数に存在している．（D）対照区における遺伝的メス個体の卵巣，ステージ V～VII の発達段階にある正常な卵母細胞が観察される．

(3) F2 世代

① F2 世代胚期のふ化率・ふ化日数及び F2 世代仔魚期のふ化後生存率

F2 世代胚期のふ化率・ふ化日数及び F2 世代仔魚期のふ化後生存率を表 6-30 に示す。ふ化率・ふ化日数，ふ化後生存率の全てについて，何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-30 F2 世代胚期のふ化率・ふ化日数及び F2 世代仔魚期のふ化後生存率

試験濃度 (ng/L)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	ふ化後生存率 (%)
対照区	85.8 ± 3.2	10.6 ± 0.42	92.1 ± 5.6
5.74	86.7 ± 5.4	10.2 ± 0.35	82.8 ± 20
11.4	85.0 ± 3.3	10.0 ± 0.54	77.7 ± 25
24.0	81.7 ± 14	10.3 ± 0.29	86.7 ± 16
47.1	86.7 ± 7.7	10.7 ± 0.87	78.6 ± 8.5
91.4	86.7 ± 9.4	10.6 ± 0.4	93.8 ± 13

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

② F2 世代の全長・湿重量

F2 世代の全長及び湿重量の測定結果を表 6-31・表 6-32 に示す。全長については、オスでは 91.4 ng/L 曝露区で対照区に比べ有意に全長の伸長が確認されたが、メスでは何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。湿重量については、オス・メス共に、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-31 F2 世代の全長

試験濃度 (ng/L)	全長(mm)	
	オス	メス
対照区	27.4 ± 0.83	27.5 ± 0.92
5.74	27.1 ± 1.3	29.1 ± 1.2
11.4	27.4 ± 0.51	28.6 ± 1.4
24.0	28.3 ± 0.56	27.2 ± 1.5
47.1	28.8 ± 0.65	27.5 ± 0.88
91.4	29.2 ± 1.0**	27.5 ± 1.3

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

表 6-32 F2 世代の湿重量

試験濃度 (ng/L)	湿重量(mg)	
	オス	メス
対照区	210 ± 7.2	251 ± 32
5.74	210 ± 23	306 ± 43
11.4	208 ± 13	289 ± 38
24.0	224 ± 14	246 ± 42
47.1	247 ± 22	254 ± 27
91.4	248 ± 20	247 ± 48

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

③ F2 世代の肝臓体指数

F2 世代繁殖用個体の肝臓体指数の測定結果を表 6-33 に示す。オス・メス共に、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-33 F2 世代の肝臓体指数

試験濃度 (ng/L)	肝臓体指数(%)	
	オス	メス
対照区	1.6 ± 0.11	4.2 ± 1.1
5.74	1.6 ± 0.32	4.2 ± 0.43
11.4	1.5 ± 0.40	4.8 ± 0.86
24.0	1.5 ± 0.29	4.6 ± 0.70
47.1	1.5 ± 0.33	4.8 ± 1.1
91.4	1.7 ± 0.42	4.4 ± 0.79

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

④ F2 世代の二次性徴指標

二次性徴の指標として、F2 世代における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 6-34 に示す。オスでは、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、メスにおいては何れの試験区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 6-34 F2 世代における乳頭状小突起を有する節板数

試験濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数(plates)	
	オス	メス
対照区	98 ± 6.6	0 ± 0
5.74	80 ± 13.3	0 ± 0
11.4	78 ± 11.5	0 ± 0
24.0	92 ± 9.5	0 ± 0
47.1	75 ± 9.9	0 ± 0
91.4	73 ± 30.8	0 ± 0

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑤ F2 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による F2 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 6-35 に示す。オスでは、91.4 ng/L 曝露区において対照区に比べ有意な上昇がみられた。メスにおいては、何れの曝露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 6-35 F2 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

試験濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度(ng/mg)	
	オス	メス
対照区	0.6 ± 0.0	561.89 ± 119
5.74	1.5 ± 1.6	459.65 ± 36.9
11.4	0.6 ± 0.1	621.87 ± 190
24.0	1.5 ± 0.5	565.46 ± 43.1
47.1	2.3 ± 1.1	543.52 ± 96.0
91.4	133 ± 57.9*	727.15 ± 153

値は、連平均値を基に算出した各試験区における平均±標準偏差を示す。

*及び** は対照区に比べ統計学的な有意差(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)が認められたことを示す。

⑥ F2 世代の間性又は性転換

F2 世代における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較を表 6-36 に示す。何れの試験区においても、未成熟個体を除き表現型性別・生殖腺形態とも明確で、かつ DMY

を含めた3つの性判別結果は整合していた。以上から、間性や性転換は認められなかった。

表 6-36 F2 世代における表現型性別・生殖腺形態・DMY の比較

試験濃度 (ng/L)	N	表現型			生殖腺形態			DMY	
		オス	不明	メス	精巢	不明	卵巢	+	-
対照区	95	46	2	47	46	2	47	46	49
5.74	43	21	1	21	21	1	21	21	22
11.4	40	18	1	21	18	1	21	18	22
24.0	43	24	4	15	24	4	15	26	17
47.1	41	25	0	16	25	0	16	25	16
91.4	49	21	5	23	24	2	23	25	24

⑦ F2 世代における生殖腺の病理組織学的観察

F2 世代における生殖腺の病理組織学的観察結果を表 6-37 に示す。対照区及び 47.1 ng/L・91.4 ng/L の両曝露区における各個体について生殖腺組織を観察した結果、91.4 ng/L 曝露区における計 25 個体の精巢のうち、明確な精巢卵は確認されなかった。但し、組織の粗相化や円状の空所がしばしば観察された。また 1 個体は未成熟のため精巢/卵巢の判別が不可能であった。対照区及び 47.1 ng/L 曝露区においては、組織の異常は確認されなかった（図 6-14）。

表 6-37 F2 世代における生殖腺の病理組織学的観察結果

試験濃度 (ng/L)	N	生殖腺組織			
		精巢	精巢卵	不明	卵巢
対照区	95	0	0	0	0
5.74	43	-	-	-	-
11.4	40	-	-	-	-
24.0	43	-	-	-	-
47.1	41	25	0	0	16
91.4	49	24	0	1	24

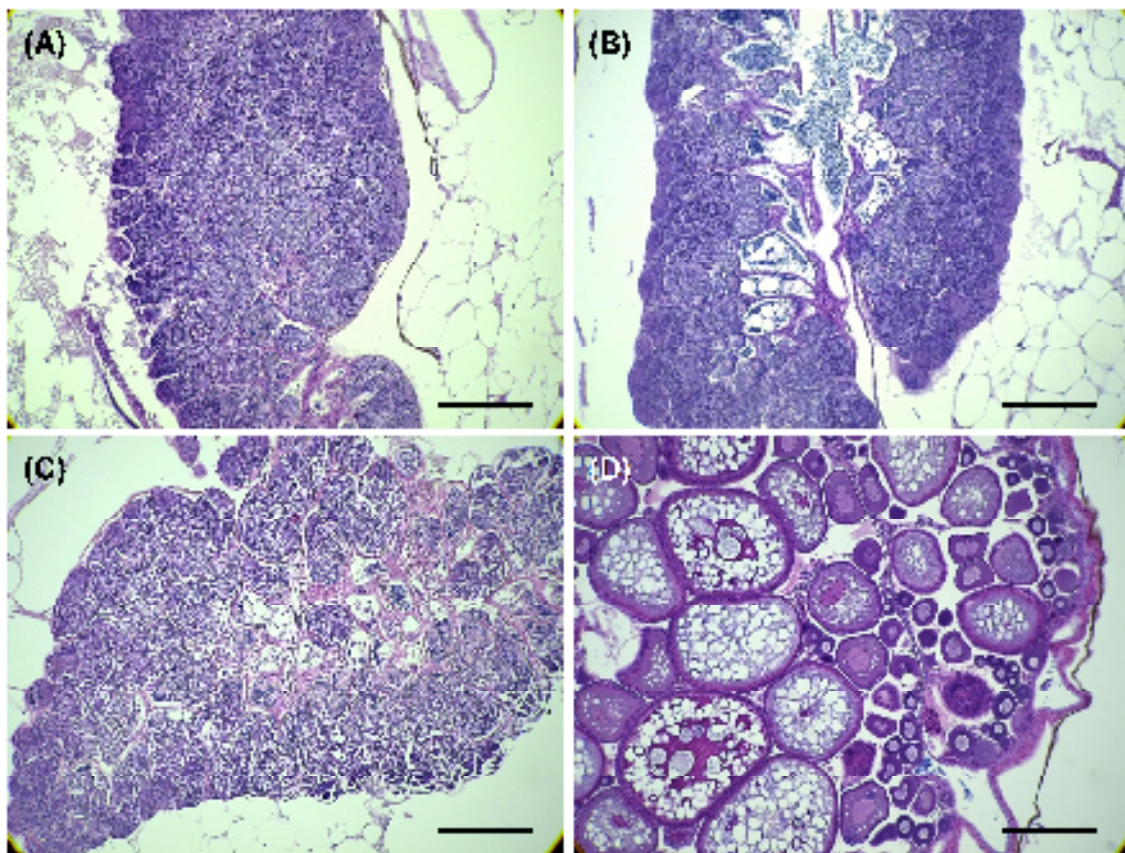


図 6-14 F2 世代受精後 10 週齢の生殖腺組織切片像 (H&E 染色)，画像右下のバーは 200 μm を示す。(A)：対照区における遺伝的オス個体の精巣，正常な一連の精子形成過程が観察される。(B) 47.1 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巣，正常な一連の精子形成過程が観察され明確な卵母細胞もみられないが，組織の粗相化や円状の空所が観察される。

(C) 91.4 ng/L 曝露区における遺伝的オス個体の精巣，47.1 ng/L 曝露区同様に，組織の粗相化や円状の空所が観察される。(D) 対照区における遺伝的メス個体の卵巢，ステージ II ～VI の発達段階にある正常な卵母細胞が観察される。

6.3.4 考察

予備試験として実施したエストロン短期繁殖試験 (OECD TG229) の結果 (繁殖の LOEC : 1000 ng/L) は, Thorpe et al. (2003)におけるファットヘッドミノーへの影響 (産卵数の LOEC : 781 ng/L) と近似し, 生体応答の整合性が示された。各世代・各ステージにおけるエンドポイントの一覧を表 6-38 に示す。2 世代目 (F1 世代) の繁殖への影響は 91.4 ng/L と, 1 世代目 (OECD TG229) に比べ 10 分の 1 以下の濃度で影響が発現した。更に, 3 世代目 (F2 世代) については繁殖への影響を確認しなかったものの, 2 世代目で繁殖に影響のあった個体と共通する生殖腺の病理組織学的異常が 47.1 ng/L でも観察されており, より低い濃度で繁殖に対して悪影響が生じた可能性が高い。環境中からのエストロン検出値と比較すると, F1 世代における繁殖の LOEC (91.4 ng/L) は, 複数の報告と同程度かよりも低い値である。例えば, 日本では 134 ng/L (Tokyo Metropolitan Government Bureau of Sewerage, 2005), 米国では 112 ng/L (Kolpin et al., 2002), 英国では 82.1 ng/L (Baronti et al., 2000)などの環境中濃度が報告されている (図 6-15)。ここから予測環境濃度 (PEC) / 予測無影響濃度 (PNEC) を求めると, 安全係数を一切考慮せずとも 2.85 となり, 1 を上回る。エストロンは, エストラジオールやノニルフェニール等に比べ内分泌かく乱物質としてそれ程重要視されてきたわけではないが, 本結果から, 環境中濃度でも生息する魚類に対して長期的に悪影響を与える恐れが示唆された。従って, ナノマテリアルや PPCPs などこの他の新規環境影響懸念物質についても, 短期的には毒性が低い場合でも長期的には実害性が強い可能性を考慮する事が必要である。

F1 世代で繁殖に対して影響の見られた 91.4 ng/L 曝露区について, 計 8 ペアのエンドポイントの詳細を図 6-16 及び図 6-17 示す。計 8 ペアのうち, No. 1~6 については対照区と遜色ない繁殖成績であったのに対し, No. 7・8 では産卵数・受精卵数・受精率の何れもが顕著に減少・低下していた。その際, メスの 8 個体については何れもペアリング前に正常な繁殖能力を有する事が確認されていたため, 繁殖への影響はオス個体に起因するものと考えられる。そこで, オス個体のエンドポイントをみると, 肝臓中ビテロジェニン濃度については, No. 7・8 以上に高濃度な個体が複数存在し, 繁殖成績と整合するとは言えなかった。同様に精巣卵についても, 精巣卵が確認された 6 個体のうち 5 個体は対照区と遜色ない繁殖成績を残しており, 精巣卵の有無は繁殖成績と一致しなかった。一方で, オス臀鰭上の乳頭状小突起数は, 繁殖成績との整合性が高い傾向にあり, エンドポイントとしての有用性が確認された。また, 繁殖行動の減退や精巣の病理組織学的観察も, 繁殖成績の結果と一致しており, このような定性的な観察の重要性が示唆された。これまで, ビテロジェニン濃度の上昇や精巣卵の存在は内分泌かく乱のキーエビデンスであると考えられてきた。しかし, これらの結果は, ビテロジェニン濃度の絶対値や単純な精巣卵の有無からは実際の繁殖影響を推測し得ないことを示しており, 定量的・定性的の両側面からの詳細な観察・考察が重要であろう。

表 6-38 エンドポイントの一覧

ステージ	受精後 週 齢	エンドポイント		LOEC(ng/L)		
				P(親)世代	F1世代	F2世代
胚	0wpf～	ふ化率			> 91.4	> 91.4
		ふ化日数			> 91.4	> 91.4
仔魚～幼魚	～10wpf	ふ化後生存率			> 91.4	> 91.4
成魚	10wpf	全長	(オス)		> 91.4	↑ 91.4
			(メス)		> 91.4	> 91.4
		体長	(オス)		> 91.4	↑ 91.4
			(メス)		> 91.4	> 91.4
		湿重量	(オス)		> 91.4	> 91.4
			(メス)		> 91.4	> 91.4
		肝臓体指数	(オス)		> 91.4	> 91.4
			(メス)		↓ 47.1	> 91.4
		二次性徴 (乳頭状小突起)	(オス)		↓ 91.4	> 91.4
			(メス)		> 91.4	> 91.4
		肝臓中ビテロジェニ ン濃度	(オス)		↑ 91.4	↑ 91.4
			(メス)		> 91.4	> 91.4
		間性・性転換・性の不整合			> 91.4	> 91.4
		精巣卵の確認			↑ 91.4	> 91.4
		病理組織学的観察に よる異常	(オス)		↑ 91.4	↑ 47.1
			(メス)		> 91.4	> 91.4
成魚繁殖期	12～15wpf	産卵数		> 91.4	↓ 91.4	
		受精卵数		> 91.4	↓ 91.4	
		受精率		> 91.4	> 91.4	
	15wpf	全長	(オス)	> 91.4	↑ 91.4	
			(メス)	> 91.4	↑ 91.4	
		体長	(オス)	> 91.4	↑ 91.4	
			(メス)	> 91.4	> 91.4	
		湿重量	(オス)	> 91.4	↑ 91.4	
			(メス)	> 91.4	> 91.4	
		肝臓体指数	(オス)	> 91.4	> 91.4	
			(メス)	> 91.4	> 91.4	
		二次性徴 (乳頭状小突起)	(オス)	> 91.4	> 91.4	
			(メス)	> 91.4	> 91.4	
		肝臓中ビテロジェニ ン濃度	(オス)	↑ 47.1	↑ 47.1	
			(メス)	> 91.4	↑ 91.4	
		間性・性転換・性の不整合		> 91.4	> 91.4	
		精巣卵の確認		> 91.4	↑ 91.4	
		病理組織学的観察に よる精巣卵の確認	(オス)	> 91.4	↑ 91.4	
			(メス)	> 91.4	> 91.4	

↑ : 対照区に比べ、値が統計学的に有意に上昇した

↓ : 対照区に比べ、値が統計学的に有意に低下した

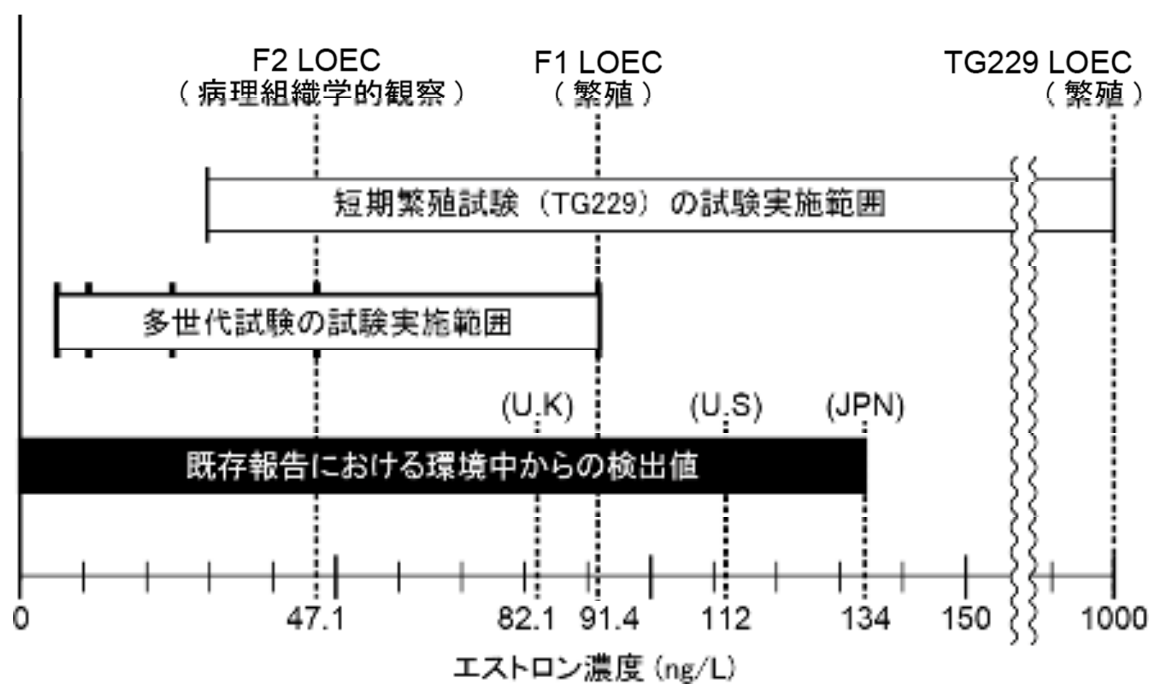


図 6-15 エストロンの環境中検出濃度と多世代試験結果の比較：(U.K.) 英国における最高値 (Baronti et al., 2000), (U.S.) 米国における最高値 (Kolpin et al., 2002), (JPN) 日本における最高値 (Tokyo Metropolitan Government, 2005).

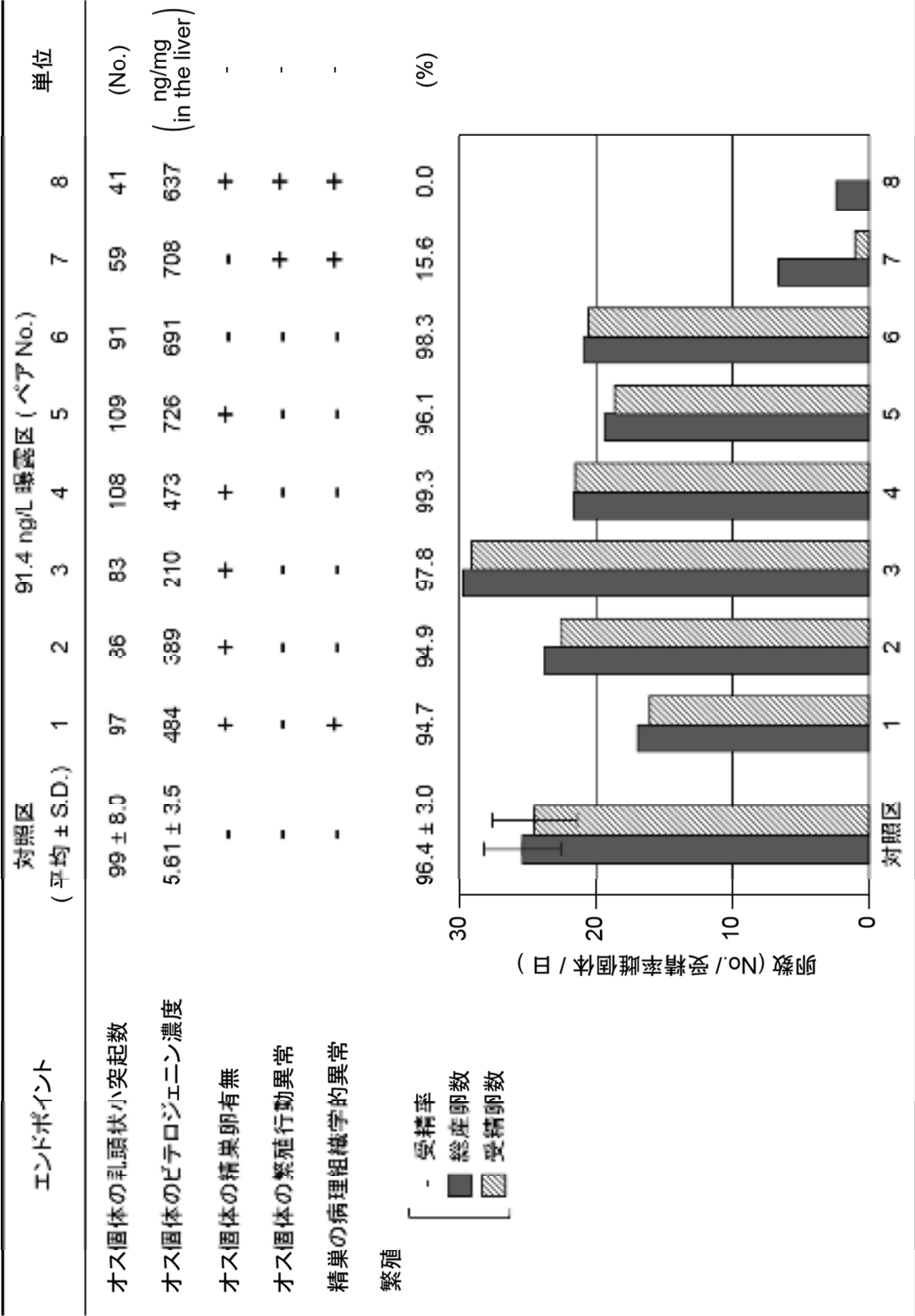


図 6-16 F1 世代 91.4 ng/L 曝露区の 8 ペアにおける各エンドポイントの比較

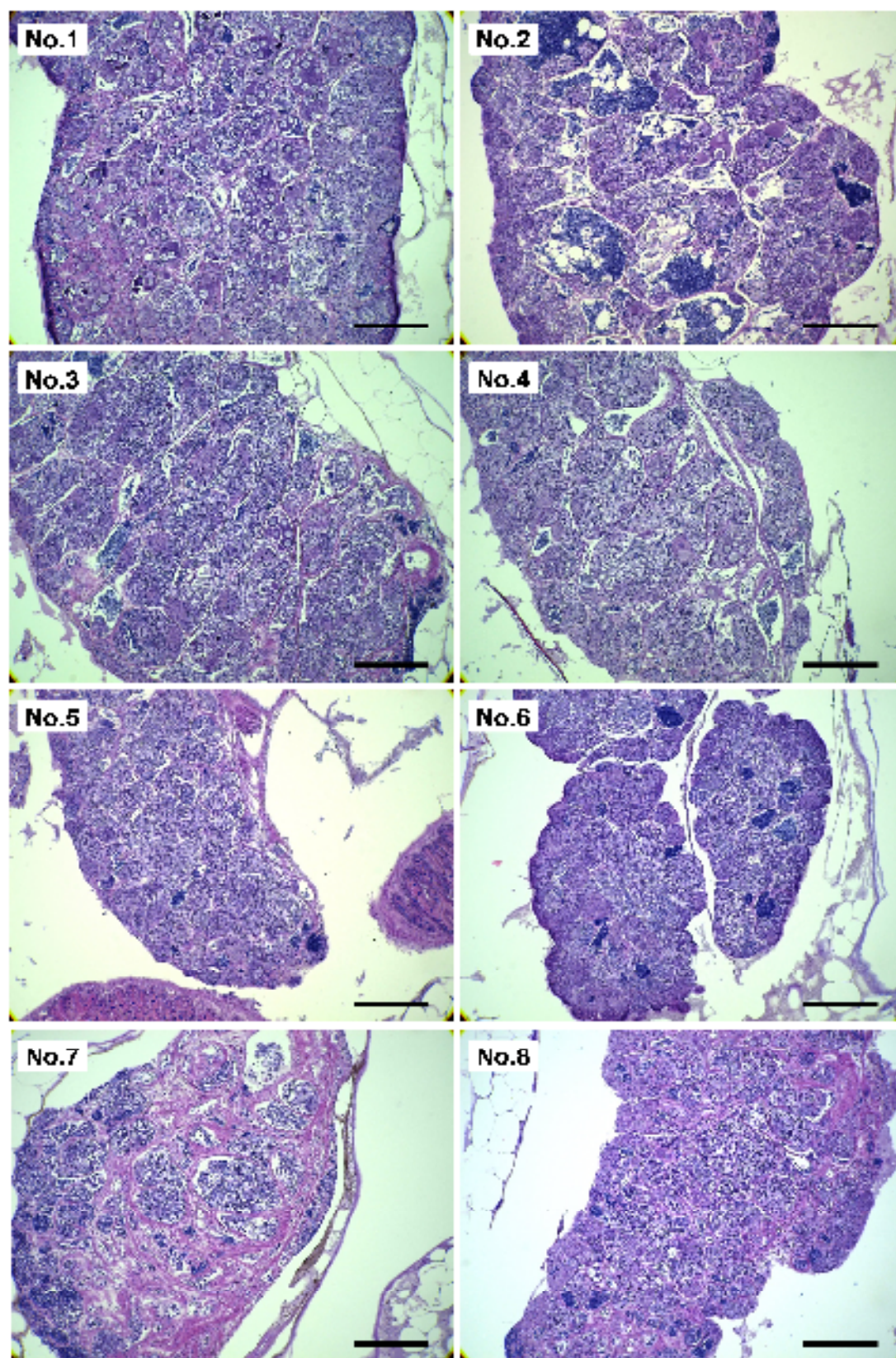


図 6-17 F1 世代 91.4 ng/L 曝露区の雄 8 個体における精巣組織切片の実体顕微鏡写真、スケールバー：200 μm.

6.3.5 まとめ

エストロンをメダカに対し多世代に亘って曝露した結果、悪影響を及ぼす濃度は世代を経るに従って急激に低くなる事が示された。また、2 世代目以降の繁殖影響濃度は、複数の環境中からの検出報告濃度よりも低い値であった。従って、ナノマテリアルや PPCPs などこの他の新規環境影響懸念物質についても、短期的には毒性が低い場合でも長期的には実害性が強い可能性を考慮する事が必要である。

また、これまでビテロジェニン濃度の上昇や精巣卵の存在は内分泌かく乱のキーエビデンスであると考えられてきたが、これらの結果はビテロジェニン濃度の絶対値や単純な精巣卵の有無からは実際の繁殖影響を推測し得ないことが示された。一方で、繁殖行動の減退や精巣の病理組織学的観察も、繁殖成績の結果と一致していた。従って、今後は既存の定量的エンドポイントに加え、定性的な観察も交えて詳細に観察・考察することが重要である。

第7章 結論

7.1. 総括

(1) ナノマテリアルの粒径測定手法に関する検討と開発

水中におけるナノマテリアルの粒径測定について既存の手法を俯瞰した上で、より適切な測定手法に関する検討を主に動的光散乱法を用いて行った。具体的には、種々の金属ナノ粒子を対象として、①水環境中への流入前を想定した、出来る限り均一に拡散させた分散系、②水環境に流入し不均一になった状態を想定した、敢えて複数サイズの粒子を混在させた分散系、の2つのタイプの分散系を調製し、各換算基準・アルゴリズムの妥当性を検討した。

その結果、特に複数の異なるサイズの粒子を混在させた分散液において、粒径分布を正しく検出出来たのは Contin 法のみであり、Cumulant 法含めその他の手法では単分散系として誤算出された。また、同じ Contin 法であっても、個数換算では小粒子を高感度で検出出来るのに対し、質量換算では大粒子の影響が過多に反映されやすかった。従って、水中・水環境中のナノ粒子を動的光散乱法によって測定する際には、主流である Cumulant 法は不適であり、Contin 法を用い個数換算で表す事が最も望ましいと判断された。但し、同手法はノイズなど外乱の影響を受けやすいため、誤検出の可能性が排除出来ない。従って、例えば電子顕微鏡による観察を併せて行うなど、当該手法の欠点を補完する手法を組み合わせたダブルチェックが望ましいと考えられた。

(2) 水環境中におけるナノマテリアルの様態把握

前章で得られた知見を基に、水環境中におけるナノマテリアルの様態を測定し、各種水質との関係やバイオアッセイにおける応用方法などについて考察した。

ナノ二酸化チタン分散液を様々な水質の水へ分散させ、インターバル測定により様態の変化及び水質との関係を調査した。その結果、ナノ粒子の様態は時間経過に伴って急速に変化し、その傾向は、硬度やタンパク質濃度が高いほど顕著であった。また、一定時間経過後も、各サンプルで 100 nm 未満の微粒子が検出された。ここから、水環境中においてナノ素材は数十時間のオーダーで大半が凝集・沈降するが、その後も 100 nm の粒子が少量ながら依然水中に拡散し続けることが示唆された。また、このような様態の変化は、流入前の状態からは判断出来ず、水環境中での様態を把握するためには継続的な測定が必要であると考えられた。

(3) 水生生物に対するナノマテリアルの曝露試験評価

以上の成果を基に、既存のバイオアッセイ手法を改良し、ナノマテリアルに対応した魚類短期慢性毒性試験法を構築した。本試験法により、ナノマテリアル及び非ナノマテリア

ルの二酸化チタン微粒子計8種を用い、魚類に対する影響を評価した。また、それを基に粒子の様々な性状・様態と魚類に対する影響とを比較し、両者の相関関係や因果関係を考察した。その結果、ナノマテリアルは非ナノマテリアルに比べより強い毒性を示した。但しその度合いは、非ナノマテリアルの IC_{25} が約200~400 mg/Lであるのに対しナノマテリアルでは約40~200 mg/Lであり、一部の既存研究で懸念されているような絶対的及び非ナノマテリアルとの相対的に著しく劇しいものではなかった。また、ナノマテリアル・非ナノマテリアルを問わず、影響の強さは例えば各粒子の比表面積の広さなど、化学反応の効率性に関する指標と有意な正の相関関係にあった。以上から、二酸化チタンにおいて、ナノマテリアルの毒性の強さは、素材としての化学活性の強さに対しリーズナブルであると考えられた。

(4) 新規環境影響物質の繁殖・多世代影響評価手法開発

更に、新規環境影響懸念物質に共通する課題である、より複雑な影響、例えば二次性徴・繁殖・多世代に亘る影響など、を評価する手法について検討した。その結果、既存の魚類短期繁殖試験について、被験生物の試験開始時期を二次性徴前とすることで、より広範な作用・影響の検出が可能であることが確かめられた。また、ニホンメダカを用いた魚類多世代(3世代)試験法を構築し、内分泌かく乱物質のエストロンを用いて試験を実施した結果、悪影響を及ぼす濃度は世代を経るに従ってより低くなる事を示している。その際、2世代目以降の繁殖に対する最低影響濃度は、複数の環境中からのエストロン検出報告値よりも低い濃度であった。従って、ナノマテリアルやPPCPsなどその他の新規環境影響懸念物質についても、短期的には毒性が低い場合でも長期的には実害性が強い可能性を考慮する事が重要である。

7.2. 今後の課題と展望

これまでナノマテリアルの生態影響については適切な評価手法が存在しなかったが、本研究によってナノマテリアル特に非溶解性の金属素材については一定の安定性・妥当性を持ったバイオアッセイが可能になった。但し、下記のような課題があり、今後更に検討を重ねる必要がある。

まず、水中における粒径測定手法については、動的光散乱法は今後も主な手法として使用されるべきであると考えるが、一方で流動場分画法など新たな技術の発展も目覚ましい。新技術による測定可能性を検証すると共に、そこから得られた成果を活かし、動的光散乱法の特長である簡便さや汎用性を確保したままより高い精度での測定が可能となるよう、解析手法の開発を継続する事が求められる。

水環境中におけるナノマテリアルの様態把握に関しては、OECDにおける標準化が協議されている。但し、本研究で実施したような生態毒性試験への適用性を考慮した検討は依

然として重視されていない。標準化が協議されている手法と本研究で検討した手法との兼合いを精査し、技術的な検討を進めたい。

ナノマテリアル生態影響試験については、よりエンドポイントの設定が直近の課題となる。本研究では、ナノマテリアルの様態が魚類に対する毒性に大きく関わっている可能性が示唆されたが、その評価指標について抜本的な改善策を見出すには至っておらず、今後より適切な評価のための指標を探究する事が不可欠である。また、現状の影響評価は慢性とはいえ飽くまでも短期的な段階に留まっている。一方で、第6章における繁殖や多世代に亘る影響評価手法の構築・実施より、曝露が多世代に亘った際に最低影響濃度が急激に低下する、即ち毒性が強くなる事が明らかになったことから、ナノマテリアルやその他の新規環境影響懸念物質においても同様の効果が懸念される。今後、今回検討した多世代試験法などをナノマテリアルについても対応出来るよう更に改良することで、より包括的な評価が可能になるものと考ええる。更に言えば、その際対象物質の物理的な蓄積・影響の蓄積の両面をそれぞれ考慮しなければならない。従って、毒性の生むとは別に、世代間でナノマテリアルが物質な移行をするかどうかについても検討を行うべきである。

また、本研究では炭素系素材、繊維状のナノマテリアルについては水生生物に対する影響について実用的な手法を検討する段階には至っていないため考慮の対象外としたが、今後カーボンナノチューブの実用化が進むにつれて、炭素系素材の影響は無視できないものとなる事が予想される。これらについても、金属ナノ粒子などと同様に水中での様態、生物に対する毒性のポテンシャル、の双方を検討することが将来的な課題となろう。

引用文献

- ADAMS, L. K., LYON, D. Y. & ALVAREZ, P. J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res*, 40, 3527-32.
- ALLEN, H. J., IMPELLITTERI, C. A., MACKE, D. A., HECKMAN, J. L., POYNTON, H. C., LAZORCHAK, J. M., GOVINDASWAMY, S., ROOSE, D. L. & NADAGOUDA, M. N. 2010. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*, 29, 2742-50.
- AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. 2013. *CAS, Chemical Abstracts Service Home Page* [Online]. Available: <https://www.cas.org/>.
- ANKLEY, G. T., BENCIC, D. C., CAVALLIN, J. E., JENSEN, K. M., KAHL, M. D., MAKYNEN, E. A., MARTINOVIC, D., MUELLER, N. D., WEHMAS, L. C. & VILLENEUVE, D. L. 2009. Dynamic Nature of Alterations in the Endocrine System of Fathead Minnows Exposed to the Fungicide Prochloraz. *Toxicological Sciences*, 112, 344-353.
- ANKLEY, G. T., CAVALLIN, J. E., DURHAN, E. J., JENSEN, K. M., KAHL, M. D., MAKYNEN, E. A., MARTINOVIC-WEIGELT, D., WEHMAS, L. C. & VILLENEUVE, D. L. 2011. Temporal evaluation of effects of a model 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor on endocrine function in the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 2094-2102.
- ANKLEY, G. T., DEFOE, D. L., KAHL, M. D., JENSEN, K. M., MIRACLE, A., HARTIG, P., GRAY, L. E., CARDON, M. & WILSON, V. 2004. Evaluation of the model anti-androgen flutamide for assessing the mechanistic basis of responses to an androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*, 38, 6322-6327.
- ANKLEY, G. T., JENSEN, K. M., KAHL, M. D., KORTE, J. J. & MAKYNEN, E. A. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1276-1290.
- ANKLEY, G. T., JENSEN, K. M., MAKYNEN, E. A., KAHL, M. D., KORTE, J. J., HORNUNG, M. W., HENRY, T. R., DENNY, J. S., LEINO, R. L., WILSON, V. S., CARDON, M. C., HARTIG, P. C. & GRAY, L. E. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1350-1360.

- ANKLEY, G. T., KAHL, M. D., JENSEN, K. M., HORNUNG, M. W., KORTE, J. J., MAKYNEN, E. A. & LEINO, R. L. 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67, 121-130.
- ARAGON, S. R. & PECORA, R. 1976. THEORY OF DYNAMIC LIGHT-SCATTERING FROM POLYDISPERSE SYSTEMS. *Journal of Chemical Physics*, 64, 2395-2404.
- ARCAND-HOY, L. D. & BENSON, W. H. 1998. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 49-57.
- ASHARANI, P. V., WU, Y. L., GONG, Z. Y. & VALIYAVEETIL, S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19.
- ATES, M., DANIELS, J., ARSLAN, Z. & FARAH, I. O. 2013. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environ Monit Assess*, 185, 3339-48.
- BAATRUP, E. & JUNG, M. 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environ Health Perspect.* United States.
- BAI, W., TIAN, W. J., ZHANG, Z. Y., HE, X. A., MA, Y. H., LIU, N. Q. & CHAI, Z. F. 2010a. Effects of Copper Nanoparticles on the Development of Zebrafish Embryos. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10, 8670-8676.
- BAI, W., ZHANG, Z. Y., TIAN, W. J., HE, X., MA, Y. H., ZHAO, Y. L. & CHAI, Z. F. 2010b. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1645-1654.
- BAR-ILAN, O., ALBRECHT, R. M., FAKO, V. E. & FURGESON, D. Y. 2009. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Small*, 5, 1897-1910.
- BARONTI, C., CURINI, R., D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A. & SAMPERI, R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*, 34, 5059-5066.
- BAYLEY, M., JUNG, M. & BAATRUP, E. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquatic Toxicology*, 56, 227-239.
- BERG, J. M. 1994. *Principles of bioinorganic chemistry*, University Science Books.
- BERNE, B. & PECORA, R. 1976. *Dynamic Light Scattering: With Applications to*

- Chemistry, Biology, and Physics*, New York, Wiley.
- BOTTA, C., LABILLE, J., AUFFAN, M., BORSCHNECK, D., MICHE, H., CABIE, M., MASION, A., ROSE, J. & BOTTERO, J. Y. 2011. TiO₂-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: structures and quantities. *Environ Pollut*, 159, 1543-50.
- BRAR, S. K. & VERMA, M. 2011. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30.
- BRAYDICH-STOLLE, L. K., LUCAS, B., SCHRAND, A., MURDOCK, R. C., LEE, T., SCHLAGER, J. J., HUSSAIN, S. M. & HOFMANN, M. C. 2010. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci*, 116, 577-89.
- BROWN, W. E. 1993. *Dynamic light scattering: the method and some applications*, Oxford, Clarendon Press.
- BUNDSCHUH, M., SEITZ, F., ROSENFELDT, R. R. & SCHULZ, R. 2012a. Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Sensitivity in the Next Generation of the Water Flea *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 7, e48956.
- BUNDSCHUH, M., SEITZ, F., ROSENFELDT, R. R. & SCHULZ, R. 2012b. Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Sensitivity in the Next Generation of the Water Flea *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 7, e48956.
- CHAE, S. R., XIAO, Y., LIN, S., NOEIAGHAEI, T., KIM, J. O. & WIESNER, M. R. 2012. Effects of humic acid and electrolytes on photocatalytic reactivity and transport of carbon nanoparticle aggregates in water. *Water Res*, 46, 4053-62.
- CHAE, Y. J., PHAM, C. H., LEE, J., BAE, E., YI, J. & GU, M. B. 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*, 94, 320-7.
- CHOI, J. E., KIM, S., AHN, J. H., YOUN, P., KANG, J. S., PARK, K., YI, J. & RYU, D.-Y. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology (Amsterdam)*, 100.
- COLBORN, T., DUMANOSKI, D. & MEYERS, J. P. 1996. *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival? A Scientific Detective Story*, Dutton Adult.
- CUNNINGHAM, V. L., BUZBY, M., HUTCHINSON, T., MASTROCCO, F., PARKE, N. & RODEN, N. 2006. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environ Sci Technol*, 40, 3456-62.
- DABRUNZ, A., DUESTER, L., PRASSE, C., SEITZ, F., ROSENFELDT, R., SCHILDE, C.,

- SCHAUMANN, G. E. & SCHULZ, R. 2011a. Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 6, e20112.
- DABRUNZ, A., DUESTER, L., PRASSE, C., SEITZ, F., ROSENFELDT, R., SCHILDE, C., SCHAUMANN, G. E. & SCHULZ, R. 2011b. Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, 6, e20112.
- DALAI, S., PAKRASHI, S., CHANDRASEKARAN, N. & MUKHERJEE, A. 2013. Acute Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System. *PLoS ONE*, 8, e62970.
- DARKOW, R., GROTH, T., ALBRECHT, W., LUTZOW, K. & PAUL, D. 1999. Functionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions. *Biomaterials*, 20.
- DIEGOLI, S., MANCIULEA, A. L., BEGUM, S., JONES, I. P., LEAD, J. R. & PREECE, J. A. 2008. Interaction between manufactured gold nanoparticles and naturally occurring organic macromolecules. *Sci Total Environ*, 402, 51-61.
- DOMINGOS, R. F., BAALOUSHA, M. A., JU-NAM, Y., REID, M. M., TUFENKJI, N., LEAD, J. R., LEPPARD, G. G. & WILKINSON, K. J. 2009a. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology*, 43.
- DOMINGOS, R. F., TUFENKJI, N. & WILKINSON, K. I. 2009b. Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: role of a fulvic acid. *Environ Sci Technol*, 43, 1282-6.
- FABREGA, J., LUOMA, S. N., TYLER, C. R., GALLOWAY, T. S. & LEAD, J. R. 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int*, 37, 517-31.
- FACEMIRE, C. F., GROSS, T. S. & GUILLETTE JR, L. J. 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environmental Health Perspectives*, 103, 79.
- FAN, W., CUI, M., LIU, H., WANG, C., SHI, Z., TAN, C. & YANG, X. 2011. Nano-TiO₂ enhances the toxicity of copper in natural water to *Daphnia magna*. *Environ Pollut*, 159, 729-34.
- FLAMBERG, A. & PECORA, R. 1984. DYNAMIC LIGHT-SCATTERING STUDY OF MICELLES IN A HIGH IONIC-STRENGTH SOLUTION. *Journal of Physical Chemistry*, 88, 3026-3033.
- FOLMAR, L. C., DENSLOW, N. D., RAO, V., CHOW, M., CRAIN, D. A., ENBLUM, J.,

- MARCINO, J. & GUILLETTE, L. J. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect*, 104, 1096-101.
- FRANKLIN, N. M., ROGERS, N. J., APTE, S. C., BATLEY, G. E., GADD, G. E. & CASEY, P. S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41.
- FRISKEN, B. J. 2001. Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data. *Appl. Opt.*, 40, 4087-4091.
- FRY, D. M. & TOONE, C. K. 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, 213, 922-924.
- GAO, J., WANG, Y., HOVSEPYAN, A. & BONZONGO, J.-C. J. 2011. Effects of engineered nanomaterials on microbial catalyzed biogeochemical processes in sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 940-945.
- GARIDEL, P. & KEBBEL, F. 2010. Protein Therapeutics and Aggregates Characterized By Photon Correlation Spectroscopy. *BioProcess International*, 8, 38-46.
- GOODBRED, S. L., GILLIOM, R. J., GROSS, T. S., DENSLOW, N. P., BRYANT, W. L. & SCHOEB, T. R. 1997. Reconnaissance of 17 β -estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United States streams—Potential for contaminant-induced endocrine disruption. *US Geological Survey Open-File Report*, 96, 47.
- GRIFFITT, R. J., HYNDMAN, K., DENSLOW, N. D. & BARBER, D. S. 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 107, 404-415.
- GRIFFITT, R. J., LUO, J., GAO, J., BONZONGO, J. C. & BARBER, D. S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1972-1978.
- GUILLETTE, L. J., GROSS, T. S., MASSON, G. R., MATTER, J. M., PERCIVAL, H. F. & WOODWARD, A. R. 1994. DEVELOPMENTAL ABNORMALITIES OF THE GONAD AND ABNORMAL SEX-HORMONE CONCENTRATIONS IN JUVENILE ALLIGATORS FROM CONTAMINATED AND CONTROL LAKES IN FLORIDA. *Environmental Health Perspectives*, 102, 680-688.
- GUILLETTE, L. J., PICKFORD, D. B., CRAIN, D. A., ROONEY, A. A. & PERCIVAL, H. F. 1996. Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile

- Alligators Living in a Contaminated Environment. *General and Comparative Endocrinology*, 101, 32-42.
- HAGENDORFER, H., KAEGLI, R., PARLINSKA, M., SINNET, B., LUDWIG, C. & ULRICH, A. 2012. Characterization of silver nanoparticle products using asymmetric flow field flow fractionation with a multidetector approach--a comparison to transmission electron microscopy and batch dynamic light scattering. *Anal Chem*, 84, 2678-85.
- HALLETT, F. R., WATTON, J. & KRYGSMAN, P. 1991. VESICLE SIZING - NUMBER DISTRIBUTIONS BY DYNAMIC LIGHT-SCATTERING. *Biophysical Journal*, 59, 357-362.
- HARADA, M. 1995. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25, 1-24.
- HARDING, S. E., SATTELLE, D. B. & BLOOMFIELD, V. A. 1992. *Laser Light Scattering in Biochemistry*, Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- HARRAD, S. 2010. *Persistent organic pollutants*, Wiley Online Library.
- HARRIES, J. E., SHEAHAN, D. A., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., RYCROFT, R., TYLOR, T., JOBLING, S., ROUTLEDGE, E. J. & SUMPTER, J. P. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 1993-2002.
- HARVEY, P. W., RUSH, K. C. & COCKBURN, A. 1999. *Endocrine and hormonal toxicology*, John Wiley & Sons.
- HASHIMOTO, S., BESSHO, H., HARA, A., NAKAMURA, M., IGUCHI, T. & FUJITA, K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research*, 49, 37-53.
- HASSAN, P. A. & KULSHRESHTHA, S. K. 2006. Modification to the cumulant analysis of polydispersity in quasielastic light scattering data. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300, 744-748.
- HELANDER, B., OLSSON, M. & REUTERG RDH, L. 1982. Residue levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs and the relationships to breeding success in white - tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* in Sweden. *Ecography*, 5, 349-366.
- HENRY, T. B., MENN, F. M., FLEMING, J. T., WILGUS, J., COMPTON, R. N. & SAYLER, G. S. 2007. Attributing effects of aqueous C60 nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression.

- Environ Health Perspect*, 115, 1059-65.
- HILL, R. L. & JANZ, D. M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology*, 63, 417-429.
- HISHIDA, T. & KAWAMOTO, N. 1970. Androgenic and male-inducing effects of 11-ketotestosterone on a teleost, the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology*, 173, 279-283.
- HONG, Y., HONDA, R. J., MYUNG, N. V. & WALKER, S. L. 2009. Transport of iron-based nanoparticles: role of magnetic properties. *Environ Sci Technol*, 43, 8834-9.
- HUGHES, A. J., JAKEMAN, E., OLIVER, C. J. & PIKE, E. R. 1973. PHOTON-CORRELATION SPECTROSCOPY - DEPENDENCE OF LINEWIDTH ERROR ON NORMALIZATION, CLIP LEVEL, DETECTOR AREA, SAMPLE TIME AND COUNT RATE. *Journal of Physics a-Mathematical and General*, 6, 1327-1336.
- HUND-RINKE, K. & SIMON, M. 2006. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research - International*, 13, 225-232.
- JENSEN, K. M., KAHL, M. D., MAKYNEN, E. A., KORTE, J. J., LEINO, R. L., BUTTERWORTH, B. C. & ANKLEY, G. T. 2004. Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 70, 99-110.
- JIN, X., LI, M., WANG, J., MARAMBIO-JONES, C., PENG, F., HUANG, X., DAMOISEAUX, R. & HOEK, E. M. 2010. High-throughput screening of silver nanoparticle stability and bacterial inactivation in aquatic media: influence of specific ions. *Environ Sci Technol*, 44, 7321-8.
- JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G. & SUMPTER, J. P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, 32, 2498-2506.
- JOBLING, S. & SUMPTER, J. P. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.
- JOHNSTON, B. D., SCOWN, T. M., MOGER, J., CUMBERLAND, S. A., BAALOUSHA, M., LINGE, K., VAN AERLE, R., JARVIS, K., LEAD, J. R. & TYLER, C. R. 2010. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. *Environmental Science & Technology*, 44, 1144-1151.
- JOVANOVIĆ, B., ANASTASOVA, L., ROWE, E. W., ZHANG, Y., CLAPP, A. R. & PALIC, D.

2011. Effects of nanosized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Ecotoxicol Environ Saf*, 74, 675-83.
- KAEGI, R., ULRICH, A., SINNET, B., VONBANK, R., WICHSER, A., ZULEEG, S., SIMMLER, H., BRUNNER, S., VONMONT, H., BURKHARDT, M. & BOLLER, M. 2008. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ Pollut*, 156, 233-9.
- KAHL, M. D., JENSEN, K. M., KORTE, J. J. & ANKLEY, G. T. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *Journal of Fish Biology*, 59, 515-523.
- KANG, I. J., YOKOTA, H., OSHIMA, Y., TSURUDA, Y., YAMAGUCHI, T., MAEDA, M., IMADA, N., TADOKORO, H. & HONJO, T. 2002. Effect of 17 beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 47, 71-80.
- KAWAMOTO, N. 1969. Effects of Androgens on the Secondary Sex Characters of the Medaka. *Zoological Magazine*, 78, 31.
- KENNEDY, A. J., GUNTER, J. C., CHAPPELL, M. A., GOSS, J. D., HULL, M. S., KIRGAN, R. A. & STEEVENS, J. A. 2009. Influence of nanotube preparation in aquatic bioassays. *Environ Toxicol Chem*, 28, 1930-8.
- KIM, K. T., KLAINE, S. J., CHO, J., KIM, S. H. & KIM, S. D. 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci Total Environ*, 408, 2268-72.
- KIME, D. E., NASH, J. P. & SCOTT, A. P. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 177, 345-352.
- KOJRO, Z. 1990. INFLUENCE OF STATISTICAL ERRORS ON SIZE DISTRIBUTIONS OBTAINED FROM DYNAMIC LIGHT-SCATTERING DATA - EXPERIMENTAL LIMITATIONS IN SIZE DISTRIBUTION DETERMINATION. *Journal of Physics a-Mathematical and General*, 23, 1363-1383.
- KOJRO, Z., LIN, S. Q., GRELL, E. & RUF, H. 1989. DETERMINATION OF INTERNAL VOLUME AND VOLUME DISTRIBUTION OF LIPID VESICLES FROM DYNAMIC LIGHT-SCATTERING DATA. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 985, 1-8.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B. & BUXTON, H. T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36, 1202-1211.
- KOPPEL, D. E. 1972. ANALYSIS OF MACROMOLECULAR POLYDISPERSITY IN

- INTENSITY CORRELATION SPECTROSCOPY - METHOD OF CUMULANTS.
Journal of Chemical Physics, 57, 4814-&.
- KULACKI, K. J. & CARDINALE, B. J. 2012. Effects of nano-titanium dioxide on freshwater algal population dynamics. *PLoS One*, 7, e47130.
- KULACKI, K. J., CARDINALE, B. J., KELLER, A. A., BIER, R. & DICKSON, H. 2012. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. *Environ Toxicol Chem*, 31, 2414-22.
- LEE, K. J., NALLATHAMBY, P. D., BROWNING, L. M., OSGOOD, C. J. & XU, X. H. N. 2007. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *Acs Nano*, 1, 133-143.
- LEE, S. W., KIM, S. M. & CHOI, J. 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environ Toxicol Pharmacol*, 28, 86-91.
- LI, S., WALLIS, L. K., MA, H. & DIAMOND, S. A. 2014. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles to a freshwater benthic amphipod: Are benthic systems at risk? *Sci Total Environ*, 466-467, 800-8.
- LOK, C.-N., HO, C.-M., CHEN, R., HE, Q.-Y., YU, W.-Y., SUN, H., TAM, P. K.-H., CHIU, J.-F. & CHE, C.-M. 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, 527-534.
- LOVERN, S. B., STRICKLER, J. R. & KLAPER, R. 2007. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ Sci Technol*, 41, 4465-70.
- MA, H. & DIAMOND, S. A. 2013. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) is dependent on life stage. *Environ Toxicol Chem*, 32, 2139-43.
- MAHLER, H. C. & JISKOOT, W. 2012. *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*, New York, Wiley.
- MAKYNEN, E. A., KAHL, M. D., JENSEN, K. M., TIETGE, J. E., WELLS, K. L., VAN DER KRAAK, G. & ANKLEY, G. T. 2000. Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 48, 461-475.
- MANABE, M., TATARAZAKO, N. & KINOSHITA, M. 2011. Uptake, excretion and toxicity of nano-sized latex particles on medaka (*Oryzias latipes*) embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*, 105, 576-581.

- MCLACHLAN, J. A., GUILLETTE JR., L. J. & IGUCHI, T. 2002. *Environmental Hormones: The Scientific Basis of Endocrine Disruption*, New York Academy of Sciences.
- MCNEIL, A. J., FREY, R. & EMBRECHTS, P. 2010. *Quantitative risk management: concepts, techniques, and tools*, Princeton university press.
- MORRISON, I. D., GRABOWSKI, E. F. & HERB, C. A. 1985. IMPROVED TECHNIQUES FOR PARTICLE-SIZE DETERMINATION BY QUASI-ELASTIC LIGHT-SCATTERING. *Langmuir*, 1, 496-501.
- MUDUNKOTUWA, I. A., RUPASINGHE, T., WU, C. M. & GRASSIAN, V. H. 2012. Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: a study of size effects in the presence and absence of citric acid. *Langmuir*, 28, 396-403.
- NAKAMURA, A., TAKANOBU, H., TAMURA, I., YAMAMURO, M., IGUCHI, T. & TATARAZAKO, N. 2013a. Verification of responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to anti-androgens, vinclozolin and flutamide, in short-term assays. *Journal of Applied Toxicology*, n/a-n/a.
- NAKAMURA, A., TAMURA, I., TAKANOBU, H., YAMAMURO, M., IGUCHI, T. & TATARAZAKO, N. 2013b. Fish multi-generation test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Applied Toxicology*, n/a-n/a.
- NATIONS, S., WAGES, M., CANAS, J. E., MAUL, J., THEODORAKIS, C. & COBB, G. P. 2011. Acute effects of Fe(2)O(3), TiO(2), ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 83, 1053-61.
- NICOLAI, T. & COCARD, S. 2001. Dynamic Light-Scattering Study of Aggregating and Gelling Colloidal Disks. *Journal of Colloid and Interface Science*, 244, 51-57.
- NINHAM, B. W. 1999. On progress in forces since the DLVO theory. *Advances in Colloid and Interface Science*, 83, 1-17.
- OBERRISTER, E. 2004. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1058-1062.
- OECD 1981. *Test No. 112: Dissociation Constants in Water*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1984a. *Test No. 205: Avian Dietary Toxicity Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1984b. *Test No. 206: Avian Reproduction Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1984c. *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1992a. *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1992b. *Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*, Paris, OECD Publishing.

- OECD 1992c. *Test No. 301: Ready Biodegradability*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1995a. *Test No. 102: Melting Point/ Melting Range*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1995b. *Test No. 103: Boiling Point*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1995c. *Test No. 105: Water Solubility*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1995d. *Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1998a. *Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1998b. *Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 1998c. *Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2000a. *Test No. 106: Adsorption -- Desorption Using a Batch Equilibrium Method*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2000b. *Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2000c. *Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2001. *Test No. 121: Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{oc}) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2004a. *Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2004b. *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2004c. *Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2004d. *Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2004e. *Test No. 220: Enchytraeid Reproduction Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2004f. *Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2006a. *Summary of Considerations in the Report from the OECD Expert Group on Ecotoxicology*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2006b. *Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*, Paris, OECD Publishing.

- OECD 2006c. *Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2007a. *Test No. 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2007b. *Test No. 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2007c. *Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2008a. *Test No. 226: Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2008b. *Test No. 228: Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies(Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae))*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2008c. *Test No. 314: Simulation Tests to Assess the Biodegradability of Chemicals Discharged in Wastewater*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2009a. *Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition*, OECD Publishing.
- OECD 2009b. *Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2009c. *Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2009d. *Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2010a. *Draft Guidance Document: Androgenized Female Stickleback Screen*, OECD Publishing.
- OECD 2010b. *Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2010c. *Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2010d. *Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2011a. *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2011b. *Test No. 234: Fish Sexual Development Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2011c. *Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2012a. *Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 229: Fish Short Term*

- Reproduction Assay*, OECD Publishing.
- OECD 2012b. *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2012c. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2012d. *Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2012e. *Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2013a. *Draft Guideline for the Testing of Chemicals: Medaka Multi-Generation Test*, Paris, OECD Publishing.
- OECD 2013b. *Test No. 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure*, Paris, OECD Publishing.
- OKA, T. B. 1931. On the Processed on the Fin-rays of the Male of *Oryzias latipes* and Other Sex Characters off This Fish. *Journal of the Faculty of Science, Imperial University of Tokyo. Sect. IV, Zoology*, 2, 209-217.
- OKADA, Y. K. & YAMASHITA, H. 1944. Experimental Investigation of the Manifestation of Secondary Sexual Characters in Fish, Using the Medaka, *Oryzias Latipes* (Temminck & Schlegel) as Material. *Journal of the Faculty of Science, Imperial University of Tokyo. Sect. IV, Zoology* = 東京帝國大學理學部紀要. 第4類, 動物學, 6, 383-437.
- OKUBO, T. & KIRIYAMA, K. 1996. Static and dynamic light-scattering of colloidal crystals of monodispersed polystyrene spheres. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, 100, 849-856.
- ORN, S., HOLBECH, H., MADSEN, T. H., NORRGREN, L. & PETERSEN, G. I. 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology*, 65, 397-411.
- OTTOFUELLING, S., VON DER KAMMER, F. & HOFMANN, T. 2011. Commercial titanium dioxide nanoparticles in both natural and synthetic water: comprehensive multidimensional testing and prediction of aggregation behavior. *Environ Sci Technol*, 45, 10045-52.
- PARK, J. W., HENRY, T. B., MENN, F. M., COMPTON, R. N. & SAYLER, G. 2010. No bioavailability of 17 alpha-ethinylestradiol when associated with nC(60) aggregates during dietary exposure in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 81, 1227-1232.
- PETUSHKOV, A., INTRA, J., GRAHAM, J. B., LARSEN, S. C. & SALEM, A. K. 2009. Effect of Crystal Size and Surface Functionalization on the Cytotoxicity of

- Silicalite-1 Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 22.
- PICCAPIETRA, F., SIGG, L. & BEHRA, R. 2012. Colloidal stability of carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater. *Environ Sci Technol*, 46, 818-25.
- POLAND, C. A., DUFFIN, R., KINLOCH, I., MAYNARD, A., WALLACE, W. A., SEATON, A., STONE, V., BROWN, S., MACNEE, W. & DONALDSON, K. 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*, 3, 423-8.
- PROVENCHER, S. W. 1979. INVERSE PROBLEMS IN POLYMER CHARACTERIZATION - DIRECT ANALYSIS OF POLYDISPERSITY WITH PHOTON CORRELATION SPECTROSCOPY. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics*, 180, 201-209.
- PROVENCHER, S. W. 1982a. A CONSTRAINED REGULARIZATION METHOD FOR INVERTING DATA REPRESENTED BY LINEAR ALGEBRAIC OR INTEGRAL-EQUATIONS. *Computer Physics Communications*, 27, 213-227.
- PROVENCHER, S. W. 1982b. CONTIN - A GENERAL-PURPOSE CONSTRAINED REGULARIZATION PROGRAM FOR INVERTING NOISY LINEAR ALGEBRAIC AND INTEGRAL-EQUATIONS. *Computer Physics Communications*, 27, 229-242.
- PROVENCHER, S. W., HENDRIX, J., DEMAAYER, L. & PAULUSSEN, N. 1978. DIRECT DETERMINATION OF MOLECULAR-WEIGHT DISTRIBUTIONS OF POLYSTYRENE IN CYCLOHEXANE WITH PHOTON CORRELATION SPECTROSCOPY. *Journal of Chemical Physics*, 69, 4273-4276.
- PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R. & SUMPTER, J. P. 1994. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*, 8, 275-285.
- PYCKE, B. F., BENN, T. M., HERCKES, P., WESTERHOFF, P. & HALDEN, R. U. 2011. Strategies for quantifying C(60) fullerenes in environmental and biological samples and implications for studies in environmental health and ecotoxicology. *Trends Analyt Chem*, 30, 44-57.
- REECE, J. B. 2011. *Campbell biology*, Benjamin Cummings/Pearson.
- ROIG, A. R. & ALESSANDRINI, J. L. 2007. Particle size distributions from static light scattering with regularized non-negative least squares constraints. *Particle & Particle Systems Characterization*, 23, 431-437.
- RUF, H. 1989. EFFECTS OF NORMALIZATION ERRORS ON SIZE DISTRIBUTIONS OBTAINED FROM DYNAMIC LIGHT-SCATTERING DATA. *Biophysical Journal*,

- 56, 67-78.
- RUF, H., GEORGALIS, Y. & GRELL, E. 1989. DYNAMIC LASER-LIGHT SCATTERING TO DETERMINE SIZE DISTRIBUTIONS OF VESICLES. *Methods in Enzymology*, 172, 364-390.
- RUF, H., GRELL, E. & STELZER, E. H. K. 1992. SIZE DISTRIBUTION OF SUBMICRON PARTICLES BY DYNAMIC LIGHT-SCATTERING MEASUREMENTS - ANALYSES CONSIDERING NORMALIZATION ERRORS. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 21, 21-28.
- SCHATZEL, K. 1987. CORRELATION TECHNIQUES IN DYNAMIC LIGHT-SCATTERING. *Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry*, 42, 193-213.
- SCHULZE, C., SCHULZE, C., KROLL, A., SCHULZE, C., KROLL, A., LEHR, C.-M., SCHFER, U. F., BECKER, K., SCHNEKENBURGER, J., SCHULZE ISFORT, C., LANDSIEDEL, R. & WOHLLEBEN, W. 2008. Not ready to use – overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2, 51-61.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS 2007. *The Scientific Aspects Of The Existing And Proposed Definitions Relating To Products Of Nanoscience And Nanotechnologies*, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks.
- SHIH, Y. H., LIU, W. S. & SU, Y. F. 2012. Aggregation of stabilized TiO₂ nanoparticle suspensions in the presence of inorganic ions. *Environ Toxicol Chem*, 31, 1693-8.
- SIMPSON, J. & WEINER, E. 1989. *The Oxford english dictionary*, Clarendon Press.
- SUMPTER, J. P. 1997. Environmental control of fish reproduction: a different perspective. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17, 25-31.
- TATARAZAKO, N., ODA, S., WATANABE, H., MORITA, M. & IGUCHI, T. 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male Daphnia. *Chemosphere*, 53, 827-33.
- THORPE, K. L., BENSTEAD, R., HUTCHINSON, T. H., CUMMINGS, R. I. & TYLER, C. R. 2003. Reproductive effects of exposure to oestrone in the fathead minnow. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 451-452.
- TOKYO METROPOLITAN GOVERNMENT BUREAU OF SEWERAGE 2005. *Annual Reports of Technical Research*, Tokyo, Tokyo Metropolitan Government Bureau of Sewerage.
- TRIPATHI, S., CHAMPAGNE, D. & TUFENKJI, N. 2012. Transport behavior of selected nanoparticles with different surface coatings in granular porous media coated with

- Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Environ Sci Technol*, 46, 6942-9.
- TSO, C.-P., ZHUNG, C.-M., SHIH, Y.-H., TSENG, Y.-M., WU, S.-C. & DOONG, R.-A. 2010. Stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions. *Water Science and Technology*, 61.
- TYLER, C. R., JOBLING, S. & SUMPTER, J. P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 319-361.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2007. *Nanotechnology White Paper*, Washington D.C., Science Policy Council U.S. Environmental Protection Agency.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2013. *Emerging Chemicals of Concern* [Online]. Available: http://www.dtsc.ca.gov/assessingrisk/emergingcontaminants.cfm#Emerging_Chemicals_of_Concern.
- VAN HOECKE, K., QUIK, J. T. K., MANKIEWICZ-BOCZEK, J., DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., ELSAESSER, A., VAN DER MEEREN, P., BARNES, C., MCKERR, G., HOWARD, C. V., VAN DE MEENT, D., RYDZYNSKI, K., DAWSON, K. A., SALVATI, A., LESNIAK, A., LYNCH, I., SILVERSMIT, G., DE SAMBER, B., VINCZE, L. & JANSSEN, C. R. 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environmental Science & Technology*, 43, 4537-4546.
- VERWEY, E. J. E. J. W., OVERBEEK, J. T. G. & OVERBEEK, J. T. J. T. G. 1999. *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Dover publications.
- WARHEIT, D. B. 2008. How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicological Sciences*, 101, 183-185.
- WARHEIT, D. B., HOKE, R. A., FINLAY, C., DONNER, E. M., REED, K. L. & SAYES, C. M. 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett*, 171, 99-110.
- WEINER, B. B. & TSCHARNUTER, W. W. 1987. USES AND ABUSES OF PHOTON-CORRELATION SPECTROSCOPY IN PARTICLE SIZING. *Acs Symposium Series*, 332, 48-61.
- WIENCH, K., WOHLLEBEN, W., HISGEN, V., RADKE, K., SALINAS, E., ZOK, S. & LANDSIEDEL, R. 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76, 1356-1365.
- YAMAMURO, M. 2012. Herbicide-induced macrophyte-to-phytoplankton shifts in Japanese lagoons during the last 50 years: consequences for ecosystem services and

- fisheries. *Hydrobiologia*, 699, 5-19.
- ZHANG, H., SMITH, J. A. & OYANEDEL-CRAVER, V. 2012. The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. *Water Res*, 46, 691-9.
- ZHOU, D., ABDEL-FATTAH, A. I. & KELLER, A. A. 2012. Clay particles destabilize engineered nanoparticles in aqueous environments. *Environ Sci Technol*, 46, 7520-6.
- ZHU, X., WANG, J., ZHANG, X., CHANG, Y. & CHEN, Y. 2010. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from Daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, 79, 928-33.
- ZHU, X., ZHU, L., DUAN, Z., QI, R., LI, Y. & LANG, Y. 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 43, 278-84.
- 一般財団法人 化学物質評価研究機構 2005. 平成 23 年度経済産業省環境対応技術開発等 国内外の化学物質管理に関する試験法及び規制状況の調査等 成果報告書.
- 浦瀬, 太. 2008. 医薬品類の下水処理プロセスにおける除去特性 (特集 医薬品類・化粧品類 (PPCPs) による水環境汚染). *用水と廃水*, 50, 65-71.
- 永田, 義. 1934. メダカに於ける生殖腺剔出実験. *動物学雑誌*, 46, 293-294.
- 永田, 義. 1936. メダカに於ける第一次及び第二次性特徴の関係 : II. 卵巣を除去せるメダカに精巣の移植実験. *動物学雑誌*, 48, 102-108.
- 増田, 晃. 1952. メダカの第二次性徴に関する研究(1)-第二次性徴消失と塩分濃度の関係. *高知大学学術研究報告*, 1, 1-15.
- 日本環境毒性学会 2003. 生態影響試験ハンドブック —化学物質の環境リスク評価—, 朝倉書店.
- 日本国法律 1973. 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律.

謝辞

本研究を進めるにあたり、たくさんの方々から多大なご指導・ご支援を賜りました。

はじめに、本論文は主査として鑑迫典久客員教授、副査として山室真澄教授、小島茂明教授、三谷啓志教授、尾田正二准教授、滝上英孝客員教授、平野靖史郎先生（(独)国立環境研究所）に審査頂きました。その際、小島茂明先生には全体の構成から細部に至るまで、改善のための方策を懇切にご教示頂きました。また、三谷啓志先生、尾田正二先生からは、メダカなど小型魚類に関する詳細なご助言を頂戴しました。滝上英孝先生からは、実験結果の解釈や研究成果の位置付け、今後の展望について考察することの重要性をご教示頂きました。平野靖史郎先生には、ナノマテリアルの毒性研究について幅広い観点からのご指導を賜ると共に、実験装置のご提供やセミナーの開催などを通じて研究を全面的にご支援頂きました。先生方に、深謝申し上げます。

指導教員の鑑迫典久先生には、3年間に亘って環境リスク管理や生態影響試験の基礎から真髓に至るまでご指導を賜ると共に、国内外における研究の最前線を知り更にそうしたプロジェクトに参加する機会を頂きました。副指導教員の山室真澄先生には、入学の1年前より博士課程への進学についてご相談させて頂き、最高の研究環境をコーディネートして頂きました。また、入学後は博士研究そのものから人生についてまで、示唆に富んだご指導を賜りました。両先生のご指導なくしては、3年間の充実した研究生活を送る事は不可能でした。心より感謝致しております。

また、本研究の実験は全て(独)国立環境研究所環境リスク研究センターにて実施しました。リサーチアシスタントの齊藤和代さん、高橋裕子さんをはじめスタッフの皆様からは日々の実務で多々ご教示・ご協力頂きました。心より御礼申し上げます。

最後に、陸水学研究室の皆様には、公私に亘って種々お世話になりました。先輩である小室隆さん、谷口無我さん、堀誠さん、片山美祐子さん、同期入学である下田研人さん、中村隆宏さん、加茂川優紀さん、印文瑛さん、同期修了である Gregory King さん、宮澤雅光さん、中村佑希さん、上原達弥さん、阿部良子さん、現 D1 の松神秀徳さん、現 M1 の安部雄大さん、実川大海さん、岡本暁さん、本当にありがとうございました。また、他研究室の皆様からも直接またはコースゼミのコメントペーパーなどを通じてご助言や励ましのお言葉を頂戴しました。皆様と交流させて頂いたお陰で、モチベーションを維持し、研究の行き詰まりを解消することが出来ました。

この3年間を振り返ると、至らない点が多々あり反省点は尽きないのですが、失敗や落度を糧にして今後有意義な研究成果を出していく事で皆様から頂戴した御恩に少しでも報いられるよう、精一杯努める所存です。今後とも、何卒よろしくお願い申し上げます。

平成 26 年 2 月 中村 中