

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-1902 底生生物に対する曝露経路と生物利用性を考慮した
包括的な底質リスク評価手法の構築

(JPMEERF20195002)

令和元年度～令和3年度

Developing Risk Assessment Methods for Chemicals in
Sediment That Consider Exposure Routes and Bioavailability to
Benthic Organisms

〈研究代表機関〉

東京大学

〈研究分担機関〉

国立研究開発法人 国立環境研究所

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	9
II-1 底生生物を用いた底質-水曝露による有害化学物質の毒性評価 （東京大学、国立研究開発法人国立環境研究所）	9
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 底質中有害化学物質の分配挙動と生物利用性の評価 （国立研究開発法人国立環境研究所）	23
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-3 平衡分配法の最適化と包括的な底質リスク評価手法の構築 （国立研究開発法人国立環境研究所）	35
要旨	

7. 研究開発目的	
8. 研究目標	
9. 研究開発内容	
10. 結果及び考察	
11. 研究目標の達成状況	
12. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細 51
IV. 英文 Abstract 55

I. 成果の概要

課題名 5-1902 底生生物に対する曝露経路と生物利用性を考慮した包括的な底質リスク評価手法の構築

課題代表者名 中島 典之 (東京大学 教授)

重点課題 主：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副：【重点課題⑮】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 非該当

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

研究経費

107,628千円（合計額）

（各年度の内訳：令和元年度：35,915千円、令和2年度35,798千円、令和3年度：35,915千円）

研究体制

（サブテーマ1）底生生物を用いた底質-水曝露による有害化学物質の毒性評価（東京大学）

（サブテーマ2）底質中有害化学物質の分配挙動と生物利用性の評価（国立研究開発法人 国立環境研究所）

（サブテーマ3）平衡分配法の最適化と包括的な底質リスク評価手法の構築（国立研究開発法人 国立環境研究所）

研究協力機関

研究協力機関はない

本研究のキーワード 包括的底質リスク評価、底生生物、底質毒性、平衡分配法、生物利用性、パッシブサンプリング

1. はじめに（研究背景等）

化学物質審査規制法（以下、化審法）の詳細リスク評価や化学物質の環境リスク初期評価において、底質への移行が懸念される物質（ $\log K_{ow} > 3$ など）は底質リスク評価が必要とされているが、底質中化学物質の分配挙動や底生生物に対する曝露経路は複雑であり、専門家ワーキングにおいて多くの技術的課題が指摘されている。有害性評価の問題点として、①国内の公定試験法はセスジユスリカを用いた底質毒性試験のみで底質毒性試験データが限られているため、②ほとんどの物質の底質中無影響濃度 $PNEC_{sed}$ は、化学物質は底質-水分配係数 K_d に従い平衡に分配しているとし、遊泳水生生物に対する水中の無影響濃度 $PNEC_{water}$ から平衡分配式に基づき推定している（平衡分配法という）点が挙

げられる。しかし③平衡分配法は、底生生物と遊泳水生生物の感受性は同じと仮定している、難水溶性物質で遊泳水生生物に毒性がみられない場合には適用できない、水経由を主たる曝露経路としている、有機物含有量などのパラメーター設定に検討の余地がある等の問題点がある。また、④底質毒性試験データがあったとしても、現行のユスリカ底質毒性試験では、人工底泥に化学物質をスパイクして試験するため、環境底泥とは底質性状（粒径分布、有機物含有量など）が大きく異なる。よって、底質固相全濃度 C_{total} が同じであっても化学物質の吸着・分配挙動は異なり、底生生物への曝露量、体内に吸収される生物利用性（bioavailability）、ひいては毒性も異なると考えられ、 C_{total} で毒性値と環境濃度を直接比較するのは有効ではないと多くの既存研究で指摘されている。

2. 研究開発目的

本研究課題では、国内で底質リスク評価が必要とされている物質について底生生物を用いた底質毒性試験を実施し、試験中の化学物質の分配挙動や生物利用性をパッシブサンプラーなどによって評価する。これによって、複数の曝露経由や生物利用性を考慮した、人工底泥を用いた室内試験結果を底質性状の異なる環境底泥に外挿することができる影響濃度の算出方法を確立し、化審法や初期リスク評価に活用できる包括的な底質リスク評価手法を構築することを目的とする。

3. 研究目標

全体目標	底質毒性試験の方法を検討し、曝露経路や生物利用性、化学物質の吸着特性や分配挙動を考慮に入れた包括的な底質リスク評価手法を提案する
サブテーマ1	底生生物を用いた底質-水曝露による有害化学物質の毒性評価
サブテマリーダー/所属機関	中島典之/東京大学
目標	平衡分配法を用いた暫定的な底質リスク評価により選定されたリスクの高い10物質程度を対象に、人工底泥を用いて淡水産および海産のヨコエビの底質毒性試験を実施し毒性値を求める。平衡分配法による推定毒性値より毒性の高かった物質3物質程度については、曝露経路別の試験を行い、各曝露経路の毒性への寄与を推定する。さらに、底質性状の異なる2種類以上の環境底泥を用いて底質毒性試験を実施し、人工底泥を用いた結果と比較する。
サブテーマ2	底質中有害化学物質の分配挙動と生物利用性の評価
サブテマリーダー/所属機関	遠藤智司/国立研究開発法人 国立環境研究所
目標	パッシブサンプリングを用いた底質毒性試験系における有機化学物質のフリー溶存濃度測定法を確立する。また2種類以上の物質について、底質毒性試験系におけるすべての相（上層水、間隙水、溶存有機物、底質粒子、生物）の物質濃度を測定し、物質の分布を包括的に把握する。さらに人工底泥・環境底泥合わせて8種類以上について吸着試験を行い、分配挙動が異なる要因を抽出する。
サブテーマ3	平衡分配法の最適化と包括的な底質リスク評価手法の構築
サブテマリーダー/所属機関	渡部春奈/国立研究開発法人 国立環境研究所
目標	化審法の優先評価化学物質や環境リスク初期評価対象物質などから底質への移

	<p>行性が懸念される物質（log Kow >3など）を対象に、平衡分配法による予測毒性値PNECを用いてリスク評価（PEC/PNEC）を実施し、吸着特性や分配挙動が異なると考えられる①疎水性有機化合物、②アミン類、③金属から数種類ずつ、試験候補物質を選定する。そして、サブテーマ1の毒性試験結果およびサブテーマ2の分配挙動解析結果を踏まえ、平衡分配式で用いるパラメーターなどの最適化や性状の異なる底泥間で互換性のある濃度単位の指標の考案など、包括的な底質リスク評価手法を提案する。</p>
--	--

4. 研究開発内容

本研究課題では、底生生物に対する曝露経路と生物利用性を考慮した包括的な底質リスク評価手法の構築を目的とし、（1）曝露経路を制御可能な底質-水曝露試験系を構築し、毒性値を取得、（2）パッシブサンプリングによるフリー溶存濃度の測定方法を確立し、系内の様々な相における毒性物質の分布・分配データを取得、（3）平衡分配法に基づくリスク評価の位置づけを整理し、（1）（2）の結果をもとに性状の異なる底質間で換算可能な毒性濃度単位を考案、の3つを実施した。

サブテーマ1では、1）サブテーマ3で選定した疎水性有機物質を試験物質として人工底泥を用いて淡水産ヨコエビ*Hyalella azteca*と海産ヨコエビ*Grandidierella japonica*の10日間の毒性試験の実施、2）多様な曝露経路の寄与を解釈できるよう曝露経路別の毒性試験を実施、さらに3）人工底泥と性状の異なる環境底泥を用いた毒性試験を実施した。人工底泥を用いた毒性試験の試験物質は、淡水産ヨコエビを用いた試験ではクロルピリホス（CPS）、フルオランテン（Flu）、ベンゾ[a]ピレン（BaP）、トリクロカルバン（TCC）、4-ノニルフェノール（4-NP）、ベンジルドデシルジメチルアンモニウム（C12-BAC）の6種、海産ヨコエビを用いた試験ではBaP、4-NP、CPS、Flu、TCC、2-メチルチオベンゾチアゾール（MTBT）、2-メルカプトベンゾチアゾール（MBT）、2-ヒドロキシベンゾチアゾール（OHBT）、ベンゾチアゾール（BT）の9種で、両ヨコエビ種の試験を合わせて10種を対象とした。曝露経路別の毒性試験では淡水産ヨコエビでCPS、C12-BACの2種、海産ヨコエビでFluの1種、環境底泥を用いた検討では淡水産ヨコエビでCPSの1種、海産ヨコエビでFluの1種を試験対象とした。環境底泥は淡水産ヨコエビで3箇所、海産ヨコエビで2箇所（うち1箇所は共通）のものを用いた。毒性試験と同時にサブテーマ2の分配挙動と生物利用性の評価に関わる様々な濃度測定を実施し、その結果を毒性評価に活用した。

サブテーマ2では、1）底質毒性試験系におけるパッシブサンプリング手法の検討、2）底質毒性試験系における分配・分布挙動の測定、3）環境底泥及び人工底泥を用いた収着試験を行った。パッシブサンプリング手法は底質毒性試験系における C_{free} の測定を目的とし、底質毒性試験系におけるファイバー/水分配平衡の到達期間やパッシブサンプラー中の濃度を C_{free} に換算する方法について検討を行った。確立した方法を用いて底質毒性試験系における C_{free} を測定するとともに、底質固体や試験生物などその他の相の濃度も測定することにより系内の物質の分配・分布挙動を実測し、平衡分配法による推定と比較した。さらに収着・拡散などの挙動を考慮した物質輸送モデルを用い、底質毒性試験系における物質輸送のシミュレーションを行い、実測データと比較した。収着試験は性状の異なる環境底泥及び人工底泥をスパイクして行い、収着係数（ K_d ）と有機炭素/水分配係数（ K_{oc} ）を測定のうえ、収着挙動が異なる要因を抽出した。またアミン類に属する陽イオン界面活性剤についてもパッシブサンプリング手法の検討、底質毒性試験系における分配・分布の測定、人工底泥を用いた収着試験を行った。

サブテーマ3では、1）平衡分配法による試験候補物質の選定、2）平衡分配法と底質毒性試験の比較と平衡分配法モデルの最適化、3）底質毒性試験結果に影響する試験条件の検討、4）性状の異なる底泥間で互換性のある濃度指標の検討、5）包括的な底質リスク評価手法の提案を行った。平衡分配法による試験候補物質の選定では、化審法優先評価化学物質や環境リスク初期評価物質を対象に、黒本調査等により環境底質濃度が入手できた142物質を対象にPEC/PNECを算出した。PEC/PNECに基づき中性疎水性有機化学物質、アミン類、金属類の試験候補物質を選定した。平衡分配法と底質毒性試験の比較

では、サブテーマ1で得られた底質毒性試験結果との比較に加え、文献データを用いて平衡分配法および底質毒性試験データからそれぞれ種の感受性分布を作成して比較を行った。平衡分配式のパラメータの最適化では国内底泥の有機炭素含有量 (f_{oc}) の分布などを調査した。さらに底質毒性試験結果のばらつきに影響する試験条件を明らかにするため、文献データのメタ解析を実施した。そしてサブテーマ1と2の検討結果を踏まえて、性状の異なる底泥間で互換性のある濃度指標の検討を行った。最後に、本研究結果から包括的な底質リスク評価手法に対して提言できる事項を整理し、環境リスク初期評価および化審法リスク評価に対し、包括的な底質リスク評価手法案を作成した。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

サブテーマ1では、底生生物であるヨコエビを用いた底質-水曝露による有害化学物質の毒性評価を行った。淡水ヨコエビについては、6物質を対象に人工底質へのスパイク試験を実施し、新たな毒性値を得た。底質毒性試験の結果を水のみ毒性試験の結果と比較することで、間隙水中のフリー溶存濃度が淡水産ヨコエビの毒性および生物蓄積を説明、予測するための適当な指標であることが明らかになった。同時に、非常に疎水性の高いBaPの生物蓄積に対しては溶存有機物への収着態が寄与していることも示唆された。環境底泥を用いた毒性試験によって、性状の異なる底泥間でも間隙水中のフリー溶存濃度から求めた毒性値がおおむね一致することが確認できた。一方で、有機炭素含有量が著しく低い底泥では間隙水濃度から想定される毒性は認められなかった。海産ヨコエビを用いた試験については、人工底質へのスパイク試験の報告事例がなかったことから止水式および流水式での試験手法の確立を行ったうえで、9物質を対象に人工底質へのスパイク試験を実施し、新たな毒性値を得た。底質スパイク試験と水スパイク試験を比較した場合、上層水溶存濃度に基づく用量反応曲線が近接しており、上層水溶存濃度が曝露指標の一つとして有効であることが示唆された。一方で、この用量反応曲線と底質スパイク試験時の間隙水中のフリー溶存濃度の関係も類似しており、淡水産ヨコエビで得られた知見と整合している可能性もある。

サブテーマ2では、まず5種類の有機化学物質について、ポリマー被覆ガラスマイクロファイバーを用いたパッシブサンプリング手法を確立した。アミン類の界面活性剤であるC12-ベンザルコニウム (C12-BAC) についてはファイバー/水分配係数のpH依存性、 Ca^{2+} 濃度依存性、C12-BAC濃度依存性を検証し、成果を底質毒性試験系における C_{free} の測定に適用した。また同じ5種類の物質について上層水・間隙水の C_{free} 及び総溶存濃度、底質固体濃度を測定し、底質毒性試験系における物質分布を明らかにした。その結果、試験系内の物質濃度が底質間隙水と上層水とで大きく異なり、底質-上層水界面付近に急激な濃度勾配があることがわかった。また上層水濃度は時間変動することを示した。2種類の物質についてはさらに生物体内濃度も測定し、生物濃縮係数を算出した。加えて、モデルを用いた物質輸送のシミュレーションを行い、実測濃度が計算結果と概ね一致することを確認した。これにより底質毒性試験系における物質の分布が拡散、収着、混合などの基本的なプロセスにより説明できることが示唆された。また疎水性の高い物質については溶存有機物による促進輸送がおきることがうかがわれた。収着試験では国内15地点の環境底泥を用いることにより、中性有機物質の収着係数 (K_d) が底泥の有機炭素含有量と正比例の関係にあることを示した。有機炭素/水分配係数 (K_{oc}) はどの環境底泥試料でも概ね一定であった。ピートモスをモデル有機物として調製した人工底泥の K_{oc} は環境底泥の K_{oc} とよく一致した。一方、セルロースを用いて作製した人工底泥の K_{oc} は他より3桁程度低く、人工底泥はセルロースではなくピートモスを用いて作製するほうがよいことがわかった。アミン類については同じ底泥でも水質条件によって K_d が大きく変動し、さらなる検討の必要性が示唆された。

サブテーマ3の平衡分配法による暫定的なリスク評価では、化審法の優先評価化学物質および環境リスク初期評価対象物質等のうち底質移行性が懸念され、かつ環境中底質濃度データが入手できた計142物質についてPEC/PNECを算出した結果、58物質でPEC/PNEC > 1となり底質リスクが懸念されることが分かった。58物質の中から、PEC/PNEC値や物性等を踏まえて疎水性有機化合物11物質、アミン類4物質、

金属2物質を試験候補物質として選定した。平衡分配法の最適化では、まず現行の平衡分配法とサブテーマ1で得られた底質毒性試験結果の比較、さらに既存文献データを用いた平衡分配法および底質毒性試験結果による種の感受性分布（SSD）の比較を行ったところ、水生生物の毒性値には底生生物と生物分類が近い甲殻類や昆虫の毒性値を用いることや、環境底泥に近い有機炭素含有量（ f_{oc} ）や K_{oc} を用いることで平衡分配法による評価の信頼性が上がり、スクリーニング評価として平衡分配法は活用可能であることが示された。また、 f_{oc} の最適化のため国内底泥の f_{oc} 分布を調査した結果、中央値は約2%であり、現行のデフォルト値10%では毒性を過小評価していることが分かった。性状の異なる底泥間で互換性のある濃度単位の指標として、サブテーマ1および2より間隙水の C_{free} が挙げられた。さらに、試験物質や曝露条件および試験生物の生息位置に応じて、適切な位置での曝露濃度を測定することが重要であると考えられた。最後に本研究結果および諸外国制度の最新情報を踏まえて、包括的な底質リスク評価手法に対する提言事項を整理し、環境リスク初期評価および化審法リスク評価に対し、包括的な底質リスク評価手法案を提案した。評価は段階的なものとし、平衡分配法をスクリーニング評価として活用する、イオン性有機化学物質についても K_d をトリガー値として評価対象とする、平衡分配法による評価の信頼性を上げるためには水生生物の毒性値に甲殻類等を含める、底質毒性試験を用いた高次のリスク評価の際に、 C_{free} を用いてPNECやPECの精緻化を行うといった提言を組み入れた。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

環境省の環境リスク初期評価の生態リスク分科会において本研究結果を報告し、サブテーマ3で検討した包括的な底質リスク評価手法に対する提言に基づき、Ⅲ-3の図3.7を提示し、「底質の生態リスク評価手法（暫定案）」の修正案の作成に貢献した。本修正案に基づき、来年度以降、底質リスク評価のケーススタディが実施される予定である。

化審法所管官庁（環境省・経産省・厚労省）が参加するOECDの試験法開発・提案・承認プログラムにおいて、日本が提案中のヨコエビを用いた底質毒性試験法案に対し、サブテーマ1で得られた底質毒性試験に関する基礎的情報を提供した。作成した試験法案は、2021年11月にフランスと共同で新規テストガイドライン化のプロジェクトとして提出され、2022年4月に承認された。今後、本研究で得られた知見を活用し、承認に向けた検証プロセスを進める予定である。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

化審法における底質リスク評価についても、サブテーマ3で検討した包括的な底質リスク評価手法に対する提言に基づき、Ⅲ-3の図3.8の包括的な底質リスク評価手法案を提示する予定である。関係部局と行政的な観点や実行可能性の面などからも本案の検討とブラッシュアップを行い、化審法におけるリスク評価の技術ガイダンスの改訂に向けて必要な情報を提供する予定である。

サブテーマ1およびサブテーマ2で底質環境での高リスクが懸念される有機物質について、人工底泥と環境底泥を用いて底質毒性試験および試験中の分配挙動評価を行ったところ、間隙水中の C_{free} が物理化学的性状の異なる底泥間で互換性のある濃度指標として活用でき、底泥の f_{oc} も底質中濃度の標準化に重要であることが示唆された。これらの数値を利用することで、実験室内での有害性評価結果を補正して、多種多様な実環境底泥中での有害性（リスク）評価に当てはめることが可能であることを示しており、今後、底質リスクが高い化学物質について、底質環境基準値や要監視項目の指針値などを検討する際には、基礎的情報として役立つと考えられる。また、本研究で得られた底質毒性データやリスク評価結果などは、化学物質環境実態調査の底質モニタリングにおいて、新たな調査対象物質や地点選定、必要測定項目（ f_{oc} など）の見直しについての議論に活用されることが期待される。

5-3. 研究目標の達成状況

全体として目標を上回る成果をあげたと考えている。サブテーマ1で底質毒性試験方法を検討し、サブテーマ2で開発した手法でその詳細な濃度分布を測定するとともに、当初計画にないモデル解析も実施し新たな知見を得た。それに基づきサブテーマ3で包括的な底質リスク評価手法案を提案した。現時点で6編の学術論文が掲載され、また、今後は環境省環境リスク初期評価の分科会にてケーススタディが実施予定であり、成果を活用する見通しがある。

サブテーマごとの達成状況としては、サブテーマ2は目標を大きく上回る成果をあげ、サブテーマ1、3は目標通りの成果をあげたと評価している。当初計画した通りに、サブテーマ1では10物質について底質毒性試験を実施しこれまでに報告されていない毒性値を得た。また曝露経路別の試験および環境底泥を用いた試験を実施し、間隙水中のフリー溶存濃度の寄与の重要性を確認した。サブテーマ2では、当初計画通りにフリー溶存濃度測定法を確立し、サブテーマ1の毒性試験系での詳細測定を実施した。加えて、当初計画よりさらに踏み込んで物質輸送モデルによるシミュレーションで底質毒性試験系の物質分布を物質の物性や底質の性状と関連付けて示した。さらに当初計画よりも約2倍の数の環境底泥を対象に収着試験を実施し、今後の化学物質管理において引用しうる基礎データを得た。サブテーマ3では、当初計画通り、サブテーマ1・2で試験する物質の選定を行った後、サブテーマ1・2の結果と既存データと合わせて、日本の化学物質管理における平衡分配法の信頼性を上げる方法の提案、性状の異なる底泥での毒性の差異を説明する方法を整理した。それらを踏まえて環境リスク初期評価および化審法リスク評価に対する提言の整理と、底質リスク評価の手順の案をまとめた。

なお本研究の遂行に当たり、コロナ禍以前よりオンライン会議を活用し、効率的な情報交換・意見交換に努めた。サブテーマ間には常に緊密な連携があり、サブテーマをまたぐ内容での学術論文投稿や学会発表を積極的に行った。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

6件

<主な査読付き論文>

- 1) K. Tani, H. Watanabe, M. Noguchi, K. Hiki, T. Yamagishi, N. Tatarazako, and H. Yamamoto: *Sci. Total Environ.*, 784, 147156 (2021), Toxicity assessment of typical polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in water-only and sediment–water exposure systems. (IF: 8.0)
- 2) K. Hiki, C.F. Fischer, T. Nishimori, H. Watanabe, H. Yamamoto, and S. Endo: *Environ. Toxicol. Chem.*, 40, 11, 2995-2996 (2021), Spatiotemporal distribution of hydrophobic organic contaminants in spiked-sediment toxicity tests: Measuring total and freely dissolved concentrations in pore and overlying water. (IF: 3.7)
- 3) C.F. Fischer, K. Hiki, K. Soetaert, and S. Endo: *Environ. Science Technol.*, 55, 7, 11885-11893 (2021), Mind the exposure gaps – Modeling chemical transport in sediment toxicity tests. (IF: 9.0)
- 4) K. Hiki, H. Watanabe, and H. Yamamoto: *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 17, 5, 1003-1013 (2021), Sources of variation in sediment toxicity of hydrophobic organic chemicals: Meta-analysis of 10–14 day spiked-sediment tests with *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus*. (IF: 3.0)
- 5) K. Hiki, Y. Iwasaki, H. Watanabe, and H. Yamamoto: *Environ. Toxicol. Chem.*, 41, 2, 462-473 (2022), Comparison of species sensitivity distributions for sediment-associated nonionic organic chemicals through equilibrium partitioning theory and spiked-sediment toxicity tests with invertebrates. (IF: 3.7)
- 6) S. Lee, T. Tobino, and F. Nakajima: *Sci. Total Environ.*, 823, 153808 (2022), Selection of formulated

sediment and feeding condition for 10-day spiked-sediment toxicity test with estuarine amphipod *Grandidierella japonica*. (IF: 8.0)

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	1件
口頭発表（学会等）	24件
「国民との科学・技術対話」の実施	5件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	1件

7. 国際共同研究等の状況

研究代表者・中島典之（東京大学）がフィリピン大学ロスバニョス校のJanice B. Sevilla-Nastor講師が研究代表を務めるフィリピンでの水生生物保全に係る有機フッ素化合物の環境基準設定に関する基礎的研究のForeign Collaboratorとして参画。2020年4月より2年間、フィリピン大学の競争的資金（総額250万ペソ＝約530万円）。当初は東京大学において毒性試験手法を習得、実施予定であったが、新型コロナウイルス感染症拡大のため来日が不可能となり、オンラインでの議論のみとなった。研究成果は2022年5月のフィリピン国内学会にて発表予定。

研究代表者・中島典之（東京大学）が主指導教員を務める東京大学大学院博士後期課程の留学生（LEE Soyong氏）を令和元年11月よりRAとして雇用した。

研究分担者・遠藤智司（国立環境研究所）がドイツ・UFZ Helmholtz Centre for Environmental Researchの研究員であったFabian C. Fischer氏を本課題専属の特別研究員（ポストドク）として招聘、令和元年12月から4月まで雇用した（令和2年5月からはJSPS外国人特別研究員として研究に引き続き協力）。またR-Package ReacTranの開発者であるProf. Karline Soetaert（Utrecht University）と底質試験モデルについて検討し、共著論文を執筆した。

研究分担者・山本裕史・渡部春奈（国立環境研究所）が2019年4月に開催されたOECD WNT会合においてヨコエビを用いた底質試験法のテストガイドライン化について提案を行い、その後、OECD VMG会合での発表や各国の専門家へ底質試験法案に関するヒアリングを実施した後、研究協力者の日置恭史郎や共同提案国のフランスの国立産業環境災害研究所（INERIS）のPandard博士らとともに試験法案を作成し、2021年11月に共同で提案書を提出、2022年4月に開催されたOECD WNT会合にて承認された。今後、国際リングテストなどの検証を行い、OECDテストガイドラインとして承認を目指す予定。

8. 研究者略歴

研究代表者：中島 典之

東京大学大学院工学系研究科博士課程修了、博士（工学）、現在、東京大学環境安全研究センター 教授

研究分担者：

サブテーマ1

1) 飛野 智宏

東京大学大学院工学系研究科博士課程修了、博士（工学）、現在、東京大学大学院工学系研究科 講師

2) 上田 紘司（令和2年5月～令和4年3月）

岩手大学大学院連合農学研究科博士課程修了、博士（農学）、現在、東京大学環境安全研究センター 特任研究員

3) 西森 敬晃（令和2年4月～令和4年3月）

広島大学大学院生物圏科学研究科博士課程修了、博士（学術）、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康領域 特別研究員

サブテーマ2

4) 遠藤 智司

ドイツ・Tübingen大学大学院博士課程修了、博士（自然科学）、大阪市立大学大学院工学研究科准教授（平成30年度まで）、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康健康領域 主任研究員

5) Fabian Christoph Fischer（令和元年12月～令和2年4月）

ドイツ・Tübingen大学大学院博士課程修了、博士（自然科学）、UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research 研究員、国立環境研究所 環境リスク・健康領域 特別研究員

6) 吉井 咲夢（令和2年10月～令和4年3月）

群馬大学理工学府博士課程修了、理工学博士、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康領域 特別研究員

サブテーマ3

7) 渡部 春奈

東京大学大学院工学系研究科博士課程修了、博士（工学）、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康領域 主任研究員、東京大学大学院創成科学研究科自然環境学専攻客員准教授

8) 山本 裕史

米国・テキサス大学大学院工学研究科卒業、Ph.D、徳島大学総合科学部准教授、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康研究健康領域 副領域長（生態毒性研究室長 兼務）、東京大学大学院創成科学研究科自然環境学専攻客員教授

II. 成果の詳細

II-1 底生生物を用いた底質-水曝露による有害化学物質の毒性評価

東京大学

環境安全研究センター

環境安全研究センター

大学院工学系研究科都市工学専攻

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康領域 生態毒性研究室

環境リスク・健康領域 生態毒性研究室

<研究協力者>

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康領域

中島典之

上田紘司 (令和2～3年度)

飛野智宏

渡部春奈

西森敬晃 (令和2～3年度)

LEE Soyoun

日置恭史郎

[要旨]

サブテーマ1ではサブテーマ3で選定した疎水性有機物質を試験物質として人工底泥を用いて淡水産ヨコエビ*H. azteca*と海産ヨコエビ*G. japonica*の毒性試験を実施し毒性値を求めること、多様な曝露経路の寄与を解釈できるよう曝露経路別の毒性試験を実施すること、さらに人工底泥と性状の異なる環境底泥を用いた毒性試験を実施し毒性値を求め、人工底泥の毒性値と比較し互換性のある濃度を検討することを目的とした。

サブテーマ3で選定した疎水性有機物質を試験物質として人工底泥を用いて毒性試験を実施した。これまでに報告例がない新規性の高い底質毒性試験結果を得ることができた。さらに、水のみ試験あるいはスパイク水の底質毒性試験との比較による曝露経路の寄与の検討を行った。淡水産ヨコエビを用いた底質毒性試験の結果を水のみ毒性試験の結果と比較することで間隙水中のフリー溶存濃度がヨコエビの毒性および生物蓄積を説明、予測するための適当な指標であることが明らかになった。同時に、非常に疎水性の高いBaPの生物蓄積に対しては溶存有機物への収着態が寄与していることも示唆された。環境底泥を用いた毒性試験により、性状が異なる底泥でも間隙水中のフリー溶存濃度に基づく毒性値がおおむね一致することが示された。海産ヨコエビを用いたFluの底質スパイクおよび水スパイク試験の比較では、上層水溶存濃度がヨコエビの致死毒性との用量反応関係で整合性が高かった。この用量反応関係と底質スパイク試験での間隙水中のフリー溶存濃度と致死率の関係には大きな乖離はなく、淡水産ヨコエビで得られた知見が海産ヨコエビにも適用される可能性もある。

サブテーマ1で掲げた目標は全て達成されたと評価する。

1. 研究開発目的

サブテーマ1では、サブテーマ3で選定した疎水性有機物質を試験物質として人工底泥を用いて毒性試験を実施し毒性値を求めること、多様な曝露経路の寄与を解釈できるよう曝露経路別の毒性試験を実施すること、さらに人工底泥と性状の異なる環境底泥を用いた毒性試験を実施し毒性値を求め、人工底泥の毒性値と比較し互換性のある濃度を検討することを目的とした。

2. 研究目標

平衡分配法を用いた暫定的な底質リスク評価により選定されたリスクの高い10物質程度を対象に、

人工底泥を用いて淡水産および海産のヨコエビの底質毒性試験を実施し毒性値を求める。平衡分配法による推定毒性値より毒性の高かった物質3物質程度については、曝露経路別の試験を行い、各曝露経路の毒性への寄与を推定する。さらに、底質性状の異なる2種類以上の環境底泥を用いて底質毒性試験を実施し、人工底泥を用いた結果と比較する。

3. 研究開発内容

3. 1. 淡水産ヨコエビを用いた毒性試験

サブテーマ3で選定した疎水性有機物質を試験物質として、*H. azteca*を用いた10日間の底質毒性試験を実施した。上記の研究目標を達成するため、1) 6種の化学物質を対象に人工底泥を用いた底質毒性試験の実施、2) 水のみ試験との比較による曝露経路の寄与の検討、3) 人工底泥とは性状の異なる環境底泥を用いた底質毒性試験の実施を行った。試験物質は、1) 人工底泥を用いた検討ではクロルピリホス(CPS)、フルオランテン(Flu)、ベンゾ[a]ピレン(BaP)、トリクロカルバン(TCC)、4-ノニルフェノール(4-NP)、ベンジルドデシルジメチルアンモニウム(C12-BAC)の6種、2) 水のみ試験はCPS、C12-BACの2種、3) 環境底泥を用いた検討ではCPSの1種を対象とした。いずれの検討においても、毒性試験と同時にサブテーマ2の分配挙動と生物利用性の評価に関わる様々な濃度測定を実施し、その結果を毒性評価に活用した。

3. 1. 1. 人工底泥を用いた淡水産ヨコエビの底質毒性試験

ユスリカを用いた底質毒性試験法であるOECD(経済協力開発機構)テストガイドライン218¹⁾を参考にして、人工底泥(以下OECD底泥)を作成した。試験物質を溶かしたアセトン溶液を石英砂に添加し、アセトンを完全に揮発させてから、カオリン(20% w/w)およびピートモス(5% w/w、北海道産を使用)、pH調整用の炭酸カルシウム(<0.1% w/w)と混合することで、スパイクOECD底泥を調製した。OECD底泥の有機物含有量(f_{oc})は約2%、含水率は約30%に設定した。底質毒性試験に用いるスパイク底泥は、間隙水と底泥中の試験物質の濃度が平衡状態に達するまで十分な時間を置く(aging)ことが推奨されている²⁾。試験物質によって異なるagingの期間を設け(4-14日間)、aging期間中は底泥を常時回転させながら振とうすることでよく混合した。試験物質の濃度は予備試験の結果を元に、対照区を含め6濃度区(繰り返し数2-6)に設定した。ただしBaPと4-NPはそれぞれ5と4濃度区で試験した。

*H. azteca*を用いた10日間の底質毒性試験は、既存の試験法^{2),3)}を参考にして流水式曝露装置(図1.1)によって実施した。換水用の穴を上部に開けた300 mLビーカーに約55 mLのスパイクOECD底泥を入れ、約220 mLの活性炭処理済みの水道水を、底泥を巻き上げないように流水式曝露装置の注射針を通じて静かに滴下した。さらに、底泥から容易に溶出する試験物質および浮上・懸濁する微粒子をなるべく除去するため、試験開始前日より4回転分(220 mL×4)の換水をおこなった。翌日、国立環境研究所にて継代飼育している4-9日齢の*H. azteca*を10個体ずつ添加し、10日後の生存率と成長を評価した。成長は乾燥重量と体長により評価した。曝露中は、23°Cで毎日2回転分(440 mL相当)の清浄な水をビーカーに滴下し、週3回餌(YCTおよび水産飼料ハリオス)を与えた。底質毒性試験においては、上層水および間隙水中の試験物質の総溶存濃度(C_{diss})とフリー溶存濃度(C_{freec})、底質濃度(C_{sed})、ヨコエビ体内濃度(C_{amp})を測定した。それぞれの濃度の測定法の詳細はサブテーマ2(II-2 3. 2)で述べる。

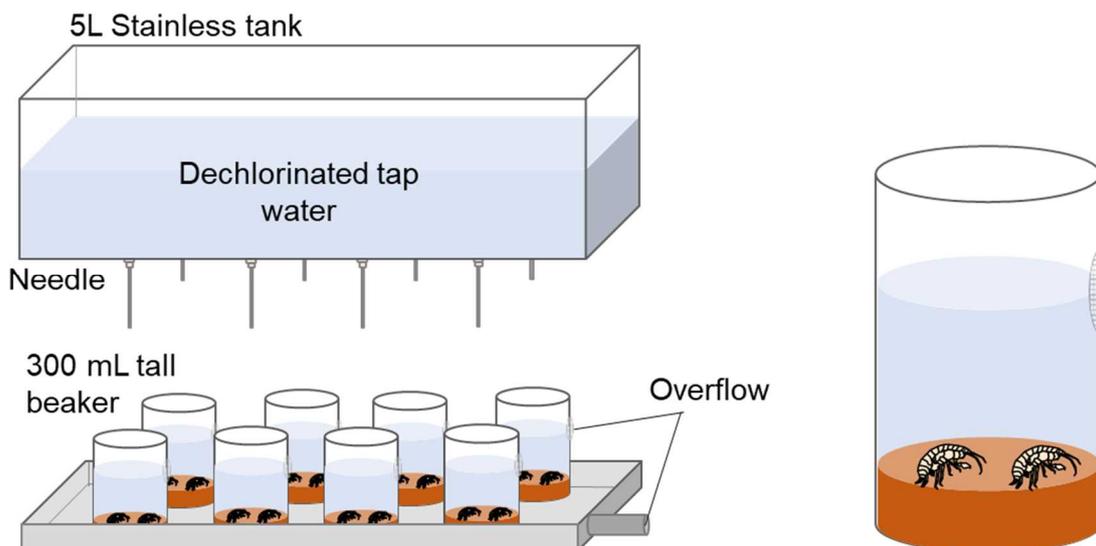


図1.1 *H. azteca*を用いた底質-水曝露システムの概略図

Hiki, K., Fischer, F.C.; Nishimori, T., Watanabe, H., Yamamoto, H., Endo, S., *Environmental Toxicology and Chemistry* **2021**, *40*, (11), 3148-3158⁴⁾, Figure 1から一部改変。

3. 1. 2. 淡水産ヨコエビの水のみ毒性試験

底質毒性試験における多様な曝露経路の毒性または生物蓄積への寄与を推定するため、既存の試験法³⁾を参考にして*H. azteca*を用いた水のみ毒性試験を実施した。300 mLビーカーにヨコエビの足場となる5gの石英砂と試験物質を添加した約220 mLの活性炭処理済みの水道水を入れ、7-9日齢の*H. azteca*を10個体ずつ添加し、10日後の生存率と成長を評価した。CPSの試験では対照区を含め5濃度区、C12-BACでは対照区を含め6濃度区を設定した。CPSでは週に3回手動で試験水の90%以上を換水し、C12-BACでは流水式曝露装置（図1.1）を用いて毎日2回転分の換水を実施した。底質毒性試験と同様に、サブテーマ2と共同で試験物質の C_{diss} と C_{free} を測定した。

3. 1. 3. 環境底泥を用いた淡水産ヨコエビの底質毒性試験

上記3. 1. 1および3. 1. 2で検討した濃度指標が、性状の異なる環境底泥においてもヨコエビに対する毒性または生物蓄積を評価、予測する指標として適用可能かを調べるため、複数の環境底泥を用いた底質毒性試験を実施した。環境底泥は霞ヶ浦、茨城県つくば市近郊河川、国立環境研究所内の池からそれぞれ1試料ずつ採取（計3試料、B-D）した。底泥試料は大型の夾雑物を除去するため2 mmのステンレス製ふるいを通過した画分のみを、4°C、暗所で保管してから使用した。底泥試料の粒径分布と f_{oc} を表1.1に示す。スパイク底泥は、試験物質を溶かしたアセトン溶液を褐色瓶の壁面に添加し、アセトンを完全に揮発させてから湿底泥を加え、4-6日間暗所で回転、振とうすることで調製した。底質毒性試験は、上記（3. 1. 1）で述べた方法で実施し、曝露10日後の生存率と成長を評価した。

表1.1 底質毒性試験に供した環境底泥の性状

Code	Site	Water content (% w/w)	f_{oc} (%)	Particle size distribution (% w/w)			
				< 63 μm	63-250 μm	250-1000 μm	> 1000 μm
B	Lake Kasumigaura	84	6.4	87	12	1	0
C	Kokai River	27	0.14	1	4	94	1
D	Pond at NIES (Akitsu Pond)	75	9.1	85	12	3	1

3. 2. 海産ヨコエビを用いた毒性試験

日本に広く生息する海産端脚類*G. japonica*を用いた底質-水曝露システムによって、3.1.1と同様に1) 9種の化学物質を対象にスパイク人工底泥の毒性試験を実施、2) スパイク水の毒性試験との比較による曝露経路の寄与の検討、3) 人工底泥とは性状の異なる環境底泥を用いたスパイク環境底泥の毒性試験の実施を行った。試験手法としてUS-EPA⁵⁾、Hiki et al.⁶⁾を参考にしたが、本試験手法を用いた環境底泥毒性評価事例は多く報告されているものの、スパイク人工底泥を用いた報告の前例がないことから、まず止水条件において3種類の人工底泥使用下での異なる給餌条件による試験生物生育特性について評価し、試験手法の確立を進めた。また、3.1.1.1の流水条件における淡水産ヨコエビの毒性値と比較するため、淡水産ヨコエビの毒性試験と同じ人工底泥と餌を用いて給餌条件の検討を行った。それらの結果を踏まえスパイク人工底泥を用いた毒性試験を実施しLC50を算出した。試験物質は、スパイク人工底泥の毒性試験ではBaP、4-NP、CPS、Flu、TCC、2-メチルチオベンゾチアゾール (MTBT)、2-メルカプトベンゾチアゾール (MBT)、2-ヒドロキシベンゾチアゾール (OHBT)、ベンゾチアゾール (BT) の9種、スパイク水およびスパイク環境底泥の毒性試験ではFluの1種を対象とした。Fluを対象とした毒性試験ではサブテーマ2の分配挙動の評価に関わる様々な濃度測定を実施し、その結果を毒性評価に活用した。

3. 2. 1. 人工底泥を用いた海産ヨコエビのスパイク底泥による底質毒性試験手法の確立

試験生物種は2009年に千葉県にて採取したものを東京大学の実験室にて継代飼育してきたものを用いた。

止水条件における人工底泥使用下での異なる給餌条件検討には、以下の人工底泥および餌を用い、Control条件下での*G. japonica*の10日間致死率から評価した。人工底泥は3.1.1記載のOECDテストガイドライン218に基づく底泥（以下OECD底泥）、Kemble et al.⁷⁾の底泥（以下Kemble底泥）、石英砂の3種である。石英砂はOECD底泥およびKemble底泥の主成分であり、有機物を含まない比較対照として用いた。OECD底泥の調製は試験生物の生育条件に合わせるため3.1.1より一部変更した（人工海水使用、pH7.5-8.5に調整）。Kemble底泥は石英砂、カオリン、 α セルロース、ドロマイト、フミン酸（微量）から構成される。いずれも淡水生物用に開発されたものであり、海産生物への適用性は確認が必要である。給餌は、東京大学で10年以上に渡り*G. japonica*の飼育に用いてきたTetraMin (20 mg/2dおよび10 mg/2d)と、3.1.1で淡水産*H. azteca*に用いたYCT 1.75 mL+ハリオス3.15 mgとを比較した。試験は繰り返し数3または5で行い、特にTetraMin 20 mg/2dの場合については複数回の試験を実施した。

並行して、図3.1.1に示した流水式曝露装置の海水環境での適用可能性について検討し、塩分による詰まりがない方法への改良を図った。3.1.1の流水式の淡水産*H. azteca*の毒性値と比較するため、定量ポンプ（ペリスタポンプ）を用いた流水式でFluのスパイクOECD底泥の毒性試験を行った。特に予備試験で給餌後に上層水中のDOの低下が確認されたため、給餌頻度の違いが水質と*G. japonica*への毒性に及ぼす影響を検討した。給餌頻度の異なるYCT0.875 mL+ハリオス1.55 mgを1日1回とYCT1.75 mL+ハリオス3.1 mgを2日に1回とを比較した。3.1.1記載の方法に準じて14日間のagingを行い、スパイクOECD底泥を調製した。遠心分離により固液分離をすることで溶解性成分を除去した後、約60 gを換水用の穴を上部に開けた300 mLトルビーカー（以下穴あきビーカー）に入れ、240 mLの人工海水を入れた。さらに、底泥から容易に溶出する試験物質および有機物質（着色成分）をなるべく除去するため、毎日2回転分（480 mL相当）の人工海水を6日間換水した。6日間の換水後、10個体ずつ*G. japonica*を投入し毒性試験を開始した。10日後に生存個体数を計数し致死率を求めた。また、試験開始時から終了時までの体長の増加量を対照区と比較することにより成長阻害を評価した。試験容器は25°Cの恒温室（16h明8h暗）に設置し、毎日2回転分（480 mL相当）の人工海水をビーカーに滴下した。DOおよび塩分濃度は毎日計測した。さらに、底質濃度 (C_{sed})、上層水中の総溶存濃度 ($C_{diss, over}$)、間隙水中の総溶存濃度 ($C_{diss, pore}$)、フリー溶存濃度 ($C_{free, pore}$) を測定した。

3. 2. 2. 海産ヨコエビのスパイク底泥による底質毒性試験

3.2.1の止水式の毒性試験の方法で、BaP、4-NP、Flu、MTBT、MBT、OHBT、BTのスパイク人工底泥（5濃度区、繰り返し数5）の毒性試験を行った。人工底泥にはKemble底泥を用いたが、4-NPのみOECD底泥を使用した。3.1.1記載の方法に準じて14日間のagingを行い、スパイク人工底泥を調製した。遠心分離により固液分離をすることで溶解性成分を除去した後、約30 gを150 mLトルビーカーに入れ、120mLの人工海水を入れて1日間曝気したのち、10個体ずつ*G. japonica*を投入し毒性試験を開始した。試験容器は25°Cの光照射インキュベーター（16h明8h暗）に設置し、常時エアポンプにより上層水のエアレーションを行った。給餌は試験開始時および2日ごとに計5回行い、溶存酸素濃度（以下DO）、pH、塩分濃度は毎日計測した。10日後に生存個体数を計数し致死率を求めた。

3.2.1の流水式の毒性試験の方法で、CPSおよびTCCのスパイク人工底泥（5濃度区、繰り返し数5）の毒性試験を行った。給餌頻度は、CPSではYCT0.875 mL+ハリオス1.55 mgを1日1回与え、TCCではYCT0.437 mL+ハリオス0.775 mgを1日2回与えた。

人工底泥とは性状の異なる環境底泥を用いたFluのスパイク環境底泥の流水式毒性試験を行った。環境底泥は東京都江戸川区近郊河川の小松川干潟（35° 41' 16" N、139° 51' 06" E）および国立環境研究所内の秋津の池（36° 02' 57" N、139° 07' 09" E）からそれぞれ1試料ずつ採取した。底泥試料は大型の夾雑物を除去するため2 mmのステンレス製ふるいを通した画分のみを、4°C、暗所で保管してから使用した。有機炭素含有率は、小松川干潟が1.2%、秋津の池が9.2%であった。スパイク環境底泥は、試験物質を溶かしたアセトン溶液を褐色瓶の壁面に添加し、アセトンを完全に揮発させてから底泥中の水を人工海水に置換した湿底泥を加え、14日間のagingを行った。穴あきビーカーに約60 mLのスパイク環境底泥を入れ、240 mLの人工海水を入れ、2回転分（480 mL相当）の人工海水を1日間換水した。換水後、10個体ずつ*G. japonica*を投入し毒性試験を開始した。10日後に致死率と成長阻害を評価した。試験容器は25°Cの恒温室（16h明8h暗）に設置し、毎日2回転分（480 mL相当）の人工海水をビーカーに滴下した。給餌はYCT0.875 mL+ハリオス1.55 mgを1日1回与えた。Fluの底質濃度（ C_{sed} ）、上層水中の総溶存濃度（ C_{cover} ）、間隙水中の総溶存濃度（ C_{pore} ）、フリー溶存濃度（ $C_{free, pore}$ ）を測定した。

3. 2. 3. 海産ヨコエビのスパイク水による底質毒性試験

底質毒性試験における多様な曝露経路の寄与について検討するため、スパイク水による流水式底質毒性試験を行った。試験期間中にFluのスパイク水から底泥への移動を極力抑えるため、穴あきビーカーに60 gのOECD底泥と240 mLのFluを添加した人工海水を入れ2日間静置後、毎日2回転分（240 mL×2）のFluを添加した人工海水を3日間換水した。換水後、10個体ずつ*G. japonica*を投入し毒性試験を開始した。10日後に致死率と成長阻害を評価した。試験容器は25°Cの恒温室（16 h明8 h暗）に設置し、毎日2回転分（480mL相当）の人工海水をビーカーに滴下した。給餌はYCT0.875 mL+ハリオス1.55 mgを1日1回与えた。Fluの C_{sed} 、 C_{cover} 、 C_{pore} 、 $C_{free, pore}$ を測定した。

4. 結果及び考察

4. 1. 淡水産ヨコエビを用いた毒性試験

4. 1. 1. 人工底泥を用いた淡水産ヨコエビの底質毒性試験

OECD底泥を用いた*H. azteca*の底質毒性試験における生存率の結果を図1.2に示す。4-NPを除く5物質について用量反応曲線が得られ、表1.2に示す10日間のLC50値が得られた。LC50値の算出には実測濃度を用いたが、4-NPとC12-BACは設定濃度を使用した。なお4-NPは、最大濃度区（ 3.0×10^3 mg/kg-oc）においても有意な生存率の低下が確認されなかった。これらの底質毒性試験では、底質濃度だけでなく水中の様々な濃度を測定したが、底質試験系内の試験物質の分配挙動などの測定結果の詳細はサブテーマ2で述べる（II-4. 2）。

これら試験物質については、CPSとFluを除き、ヨコエビ*H. azteca*を用いた底質毒性試験の毒性値が報告されておらず、新規性の高い結果を得ることができた。CPSのLC50値については、*H. azteca*を用いた既往文献値（1.8 mg/kg-oc⁸⁾、3.0 mg/kg-oc⁹⁾、4.4 mg/kg-oc¹⁰⁾）と同程度であり、本試験系で得られた毒性値は他研究機関の試験結果と比較可能なものであると考えられた。またFluについても、得られたLC50値は同様に既往文献値（ 8.1×10^3 – 8.5×10^3 mg/kg-oc⁸⁾）と同程度の値であった。

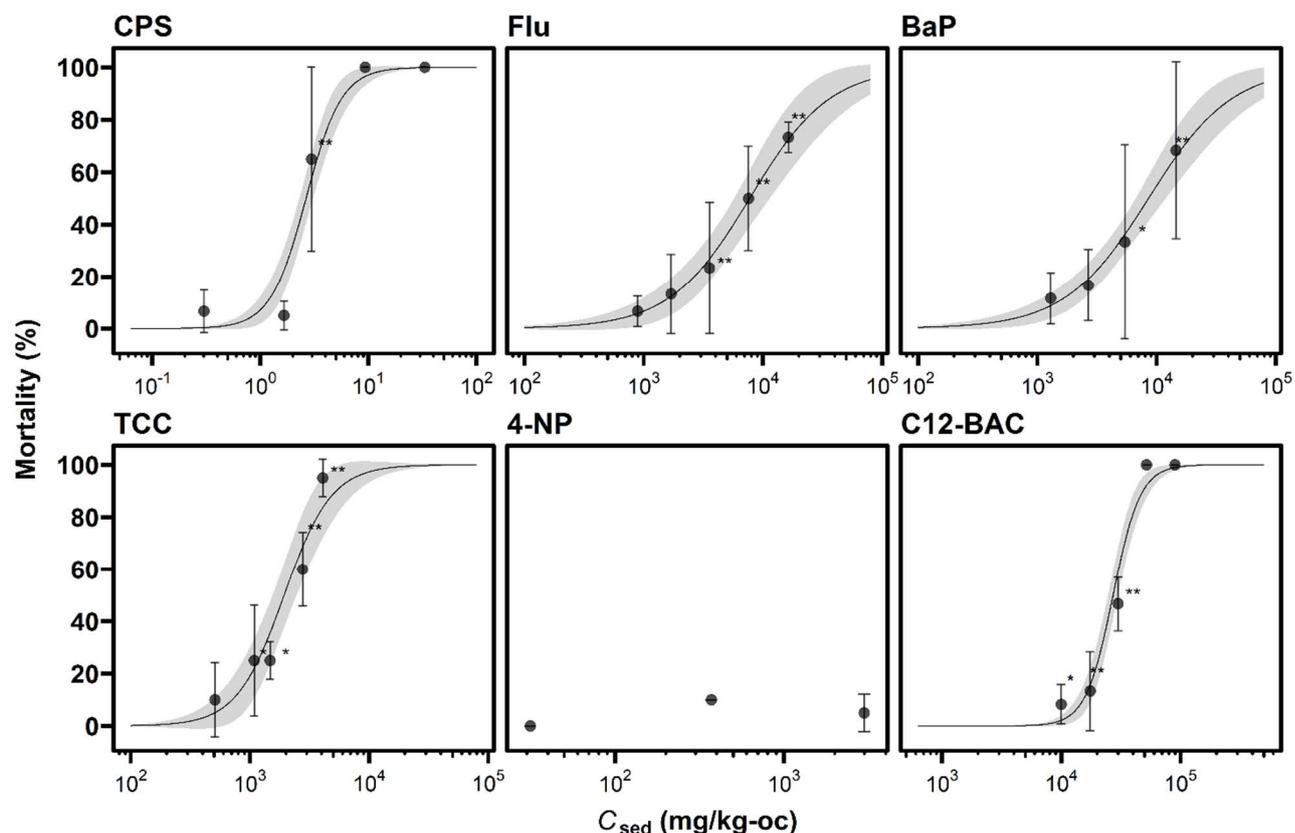


図1.2 人工底泥を用いた*H. azteca*の底質毒性試験の結果
横軸は実測濃度に基づく。ただし4-NPは f_{oc} の実測値と設定濃度、C12-BACは f_{oc} の設定値（2%）と設定濃度に基づく。

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ (Dunnnett検定)

表1.2 OECD底泥を用いた*H. azteca*の底質毒性試験の底質濃度に基づくLC50値

Chemical	LC50 (mg/kg)	95%信頼区間 (mg/kg)	LC50 (mg/kg-oc)	95%信頼区間 (mg/kg-oc)
CPS	4.6×10^{-2}	3.9×10^{-2} – 5.4×10^{-2}	2.6	2.2–3.0
Flu	1.2×10^2	8.1×10 – 1.7×10^2	8.0×10^3	5.2×10^3 – 1.1×10^4
BaP	1.4×10^2	1.0×10^2 – 1.8×10^2	1.0×10^4	5.7×10^3 – 1.5×10^4
TCC	4.9×10	3.8×10 – 5.9×10	1.9×10^3	1.5×10^3 – 2.4×10^3
4-NP*	$> 5.0 \times 10$	Not available	$> 3.0 \times 10^3$	Not available
C12-BAC**	5.4×10^2	4.9×10^2 – 6.0×10^2	2.7×10^4	2.5×10^4 – 3.0×10^4

* based on measured f_{oc} and nominal 4-NP concentrations. ** based on nominal concentrations.

底質毒性試験の生存個体について乾燥重量と体長を測定した結果、CPSとFlu、4-NPでは濃度依存的な影響が見られなかったが、その他の物質（BaP、TCC、12C-BAC）については濃度依存的な影響が確認された。体長または乾燥重量を指標とした際の最大無影響濃度（NOEC）は $<1.3 \times 10^3$ mg/kg-oc（BaP）、 4.9×10^2 mg/kg-oc（TCC）、 1.0×10^4 mg/kg-oc（C12-BAC）であった（C12-BACのみ設定濃度）。これらの結果から対象とした試験物質については、10日間の成長の感受性は生存率とおおむね同程度またはやや低いと考えられる。

4. 1. 2. 淡水産ヨコエビの水のみ毒性試験

底質毒性試験における*H. azteca*への毒性または生物蓄積に対する多様な曝露経路の寄与について検討するために、CPSとC12-BACの水のみ試験を実施した。

CPSの結果は、環境底泥を用いた試験結果と併せて次節（4. 1. 3）で図示するが（図1.4）、水のみ毒性試験の C_{free} に基づく用量反応曲線は、OECD底泥を用いた底質毒性試験における間隙水の C_{free} （ $C_{free,pore}$ ）に基づく用量反応曲線と近接しており、 $C_{free,pore}$ が*H. azteca*に対する毒性指標として適当であることが示唆された。一方、水のみ毒性試験の C_{diss} に基づくLC50と底質毒性試験の $C_{free,pore}$ に基づくLC50は、1.5倍ほど異なっていた。この結果は、間隙水中の溶存有機物（DOM）に収着した画分が毒性に寄与しないために $C_{free,pore}$ が底生生物の毒性指標として適当であるという既存の知見^{11), 12)}と一致しているが、スパイク底質毒性試験でパッシブサンプリング手法を活用してその知見を検証した例は非常に限られているという点で本研究の結果は重要である。

C12-BACの結果を、底質毒性試験の結果と併せて図1.3に示す。水のみ毒性試験の10日間LC50は、 C_{diss} と C_{free} を指標にした際、それぞれ41 $\mu\text{g/L}$ （95%CI : 36–47 $\mu\text{g/L}$ ）と23 $\mu\text{g/L}$ （95%CI : 21–25 $\mu\text{g/L}$ ）であった。OECD底泥を用いた底質毒性試験のLC50と比較すると、水のみ毒性試験の用量反応曲線は $C_{free,pore}$ に基づく曲線（LC50 : 49 $\mu\text{g/L}$ ）と底質-上層水の境界面の C_{free} （ $C_{free,intf}$ ）に基づく曲線（LC50 : 6.4 $\mu\text{g/L}$ ）との中間に位置していた。この結果は、 $C_{free,pore}$ が中性有機物質だけでなく知見の少ない陽イオン性有機物に対しても底生生物の毒性指標として適用できる可能性を支持している。

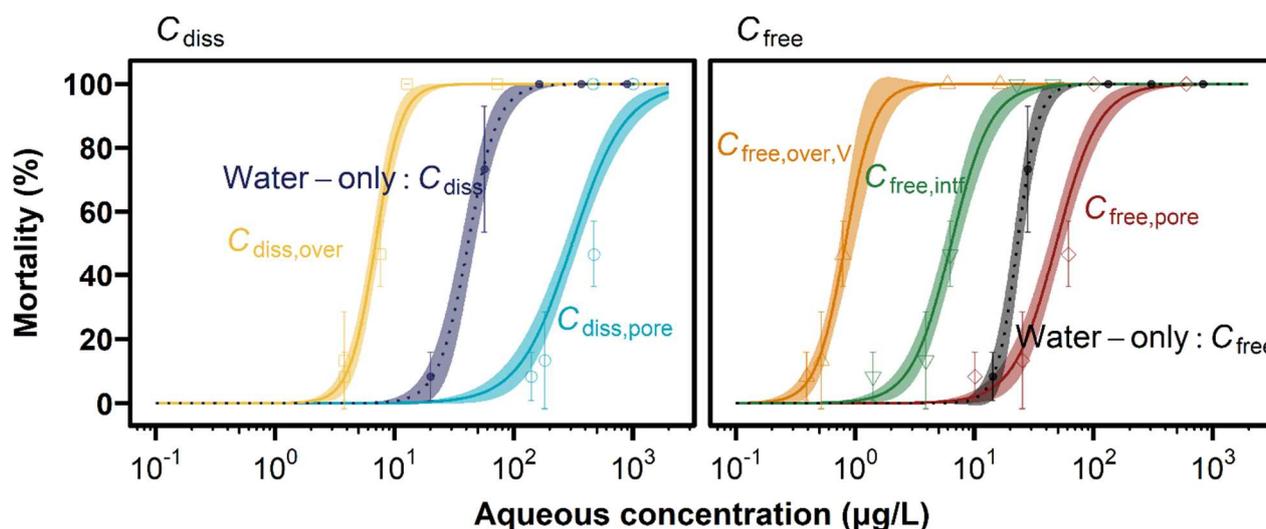


図1.3 C12-BACの水のみ毒性試験と人工底泥を用いた底質毒性試験の比較
横軸は実測濃度の時間平均値（ C_{diss} ）または曝露10日目の値（ C_{free} ）に基づく。

FluとBaP、C12-BACについては、毒性だけでなく生物蓄積に関しても水のみ試験と底質試験の比較を行った。FluとBaPは水のみ試験の生物濃縮係数（bioconcentration factor, BCF）を既存文献^{13), 14)}から取得し、C12-BACは上記の水のみ試験時の生存個体内の濃度と C_{free} から求めた。FluとC12-BACに関しては水のみ試験から求めたBCFは、底質試験の $C_{free,pore}$ に基づいて求めたBCFと最も近かった（表1.3）。この結

果は、前述した致死率に基づく比較と符合しており、底生生物への蓄積の指標としての $C_{\text{free,pore}}$ の有用性を支持している。ただし最も疎水性が高くDOMとの結合が強いBaP ($\log K_{\text{OW}} : 6.1$) については、水のみ試験のBCFは $C_{\text{free,pore}}$ に基づくBCFよりやや低く、フリー溶存態だけでなくDOM吸着態がヨコエビの体内蓄積に寄与していることが示唆された。

表1.3 様々な濃度指標に基づくBCFの比較

	Spiked-sediment test using OECD sediment			Water-only test
	$C_{\text{diss,over}}$	$C_{\text{diss,pore}}$	$C_{\text{free,pore}}$	C_{free}
Flu	4.2 ± 0.0	2.6 ± 0.1	3.4 ± 0.0	$3.4 \pm 0.2^{14)}$
log BCF (L/kg-wet)	BaP*	3.0 ± 0.5	2.2 ± 0.3	3.5 ± 0.1 (Male) ¹³⁾ 3.5 ± 0.4 (Mixture of male and female) ¹³⁾
	C12-BAC**	2.7 ± 0.1	1.1 ± 0.0	2.3 ± 0.1

* Taken from Hiki, K., Fischer, F.C., Nishimori, T., Watanabe, H., Yamamoto, H., Endo, S., *Environmental Toxicology and Chemistry* **2021**, *40*, (11), 3148-3158⁴⁾, Supporting Information.

** BCF values were estimated from data at 250 mg/kg, 350 mg/kg (sediment test), and 50 µg/L (water-only test).

4. 1. 3. 環境底泥を用いた淡水産ヨコエビの底質毒性試験

人工底泥と性状の異なる環境底泥3種を用いて、CPSの底質毒性試験を実施した(図1.4)。泥状の底泥BとDでは致死率が濃度依存的に増加したが、砂状の底泥Cでは最高濃度区でも致死率が10%未満であった。水のみ毒性試験の用量反応曲線と比較すると、 C_{diss} 、 C_{free} にかかわらず、いずれの底泥においても上層水濃度は有意な致死影響を引き起こすほど高くなく、間隙水の寄与が推測された。一方、間隙水濃度に基づく用量反応曲線と比較すると、底質毒性試験での致死率は水のみ毒性試験の同程度の濃度における致死率よりも低く、特に底泥Cでその傾向が顕著であった。底泥Cは有機物含有量 f_{oc} が低く(表1.1)、底泥表面から鉛直方向のCPSの溶脱の程度が大きかった。環境底泥では間隙水濃度から予測されるほどの致死影響が見られなかった原因として、(1) *H. azteca*が底泥中から底泥表面、上層水を行き来したために、間隙水より低濃度の場所での曝露が増加したこと、(2) 底泥Cでは鉛直方向の濃度勾配が大きいため、底泥表面の濃度が間隙水濃度よりも著しく低下していたことなどが考えられる。なお砂状底泥では*H. azteca*の潜掘行動が低下し、底泥表面で観察されやすくなるという、前者の仮説を支持する知見¹⁵⁾が報告されている。

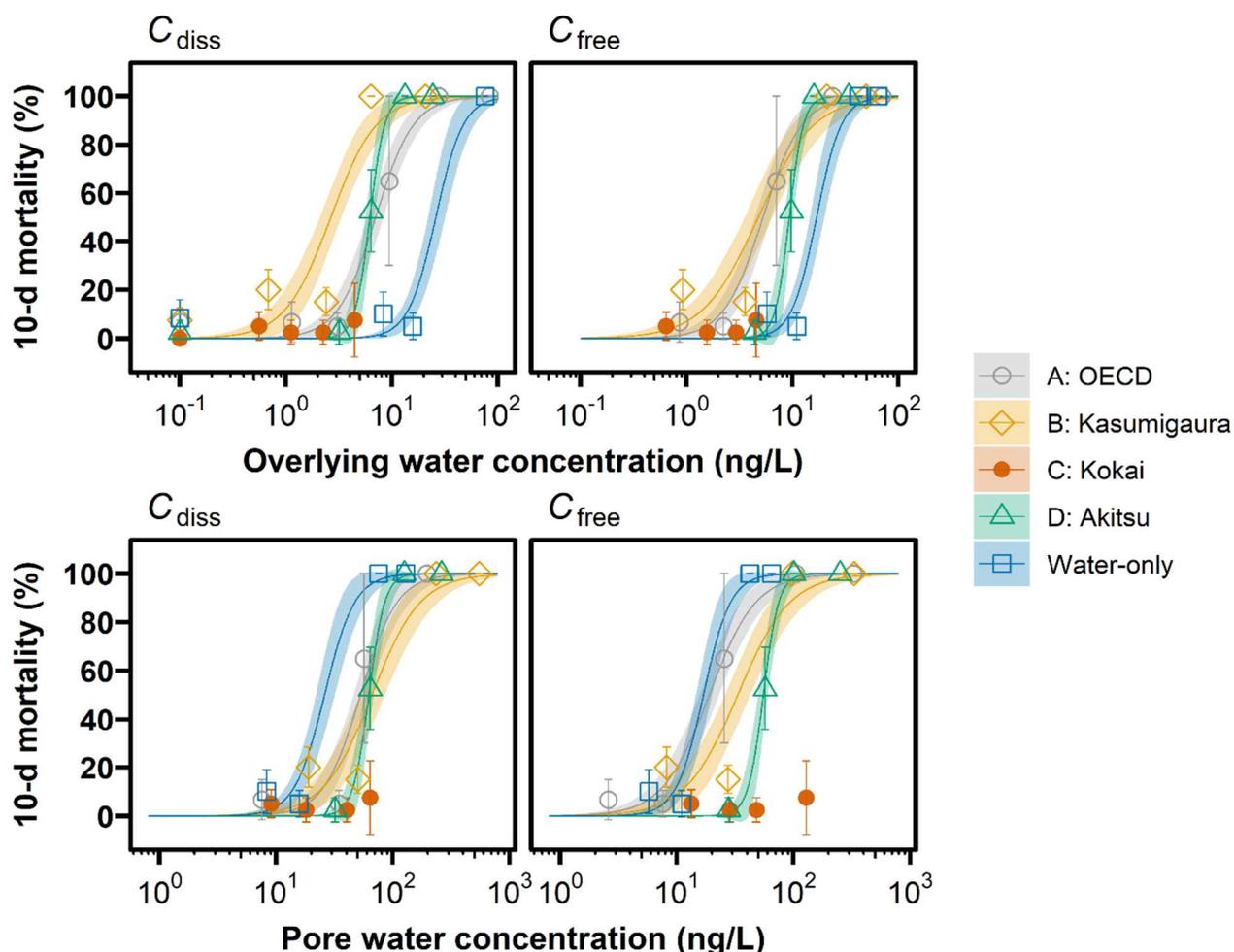


図1.4 環境底泥と人工底泥を用いたCPS底質毒性試験の比較

上段は上層水濃度、下段は間隙水濃度を横軸としている。底質Cは最高濃度区でも>50%の致死率が観察されなかったため、回帰曲線を示していない。

4. 2. 海産ヨコエビを用いた底質毒性試験

4. 2. 1. 人工底泥を用いた海産ヨコエビのスパイク底質毒性試験手法の確立

海産端脚類*G. japonica*を用いたスパイク人工底泥による毒性試験報告の前例がないことから、まず3種類の人工底泥使用下での異なる給餌条件による試験生物生育特性について評価し、試験手法の確立を行った。図1.5に、OECD底泥、Kemble底泥、石英砂の3種の人工底泥と、TetraMin (20 mg/2d、10 mg/2d)、YCT+ハリオスの3種の給餌条件の組合せの結果を示す。OECD底泥はYCT+ハリオスを用いた際には致死率17%と良好な結果であったものの、TetraMinの場合には20%を超える致死率となり、化学物質をスパイクして毒性試験に用いるには更なる条件検討が必要である。一方、Kemble底泥は餌の量および種類によらず致死率が20%以下となり、安定して良好な結果が得られた。この2つの人工底泥の違いは共存する有機物であり、OECD底泥はピートモス、Kemble底泥は α セルロースが主である。前者は自然由来であるため製品ごとの同一性に課題があるが、本研究課題における*H. azteca*の試験をはじめ淡水産生物の底質毒性試験には広く用いられ、有効性が確認されている。しかしながら、今回の海水での検討においてはピートモスからの有機物溶出（着色成分）が顕著であり*G. japonica*の生育に何らかの影響を及ぼした可能性がある。一方でKemble底泥に用いる α セルロースは品質の同一性を確保しやすい点が大きな利点であり、今回の検討でも餌による差異も小さかったことから、スパイク人工底泥による毒性試験を*G. japonica*により行う際にはKemble底泥の使用が適している。なお、石英砂を用いた際の餌による差異は大きくないが、YCT+ハリオスでの結果がやや良好であり、他の人工底質の場合にも安定して良好な結果が得られていることから、活用が可能である。特に*H. azteca*等の淡水産生物の試験結果（化学物質動

態を含む) との比較を行うにあたり OECD底泥と YCT+ハリオスを用いることの意義は高い。

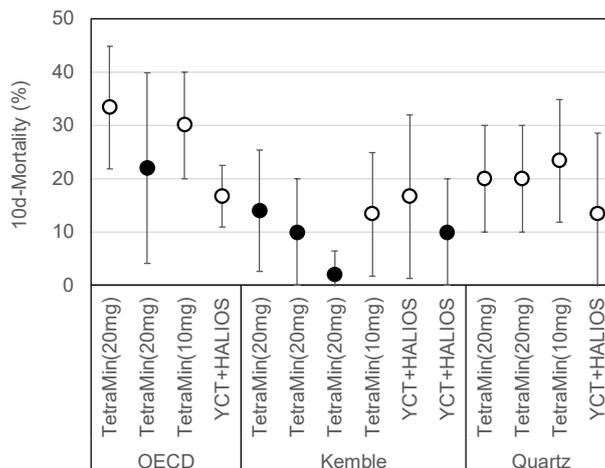


図1.5 *G. japonica*の人工底泥環境下での異なる給餌による10日間致死率
(平均値±標準偏差、○:n=3、●:n=5)

人工底泥 OECD : OECDテストガイドライン218に準じた底泥、Kemble : Kemble et al.⁷⁾による底泥、
Quartz : 石英砂

上述の試験はすべて止水式装置にて行い、並行して図1.1に示した流水式曝露装置(上部の貯水槽より8つのビーカーに対し重力による自然流下で送液)の海水環境での適用可能性について検討した。予備的検討として、飼育槽用の環境底泥を入れたビーカーに*G. japonica*を投入し、10日間人工海水を通水した。10日後にすべての個体が生存していることが確認されたものの、塩分析出により流量の低下が継続的に認められ、本装置では安定した試験条件を確保できないことが明らかとなった。そこで、定量ポンプ(ペリスタポンプ)を用い、8つのビーカーに分岐させて送液する装置を開発した。分岐部分での圧力損失によりビーカー間の送液量のばらつきの程度について定量したところ、5時間積算流量でCV値16%であった。

FluをスパイクしたOECD底泥を用いた定量ポンプによる流水式毒性試験を行った。予備試験において1回の給餌で2日分の餌を2日ごと与えると、給餌後に上層水中のDOが低下したため、給餌条件の違いが試験期間中の水質および試験終了時の*G. japonica*の致死率と成長阻害に及ぼす影響を検討した。

試験期間中の上層水中のDOの経時変化を図1.6に示す。試験期間中のDOは溶存酸素飽和度50%以上を維持することが推奨されている¹⁶⁾。しかし、1度に2日分の餌を与えると濃度区に関わらず飽和度50%を下回る日が10日間の試験期間中に5日あった。一方1日分の餌を毎日与えるとDOの低下が抑えられた。少量を毎日給餌することで食べ残しが少なくなり、DOの減少が緩和された可能性がある。そのため、OECD底泥を用いた流水式毒性試験の給餌は、少量を毎日行うことが適していると考えられる。*G. japonica*の毒性評価については4.2.2.で述べる。

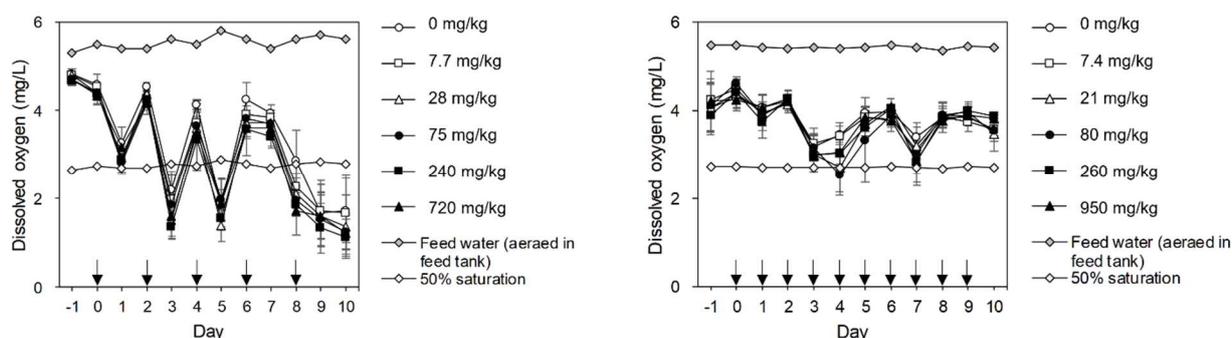


図1.6 給餌頻度が2日に1回(左)と1日1回(右)の溶存酸素濃度の経時変化の比較
矢印は給餌を示す

以上のように、これまでに試験報告例がない*G. japonica*を用いたスパイク人工底泥での毒性評価を実施するため、人工底泥及び給餌に関する検討と流水式曝露装置の海水用の改良と給餌頻度に関する改良を行った。前者の検討によりKemble底泥を用いることでControl条件下での生残率を満足した。後者の検討により、定量ポンプを用いた送液を導入することで塩分析出による流量の低下がなく安定した流水環境を構築することができた。また、給餌後のDOの低下は少量を毎日給餌することで改善された。

4. 2. 2. 人工底泥を用いた海産ヨコエビのスパイク底質毒性試験

人工底泥を用いた*G. japonica*の底質毒性試験の底質濃度に基づくLC50を表1.4に示す。これらの毒性物質については*G. japonica*を用いた底質毒性試験の毒性値が報告されておらず、新規性の高い結果を得ることができた。

FluをOECD人工底泥にスパイクし、定量ポンプを用いた流水式で行った毒性試験のLC50は、給餌条件が2日に1回では4.1.1の*H. azteca*の結果と同程度であったが、1日1回では毒性が低くなった。また、底質毒性試験の生存個体について体長に基づいた成長阻害を求めた。EC50（2日に1回： 1.6×10^4 mg/kg-oc、1日1回： 4.7×10^4 mg/kg-oc）はLC50と比べ同等あるいは高い（感受性が低い）値であった。

表1.4 人工底泥を用いた*G. japonica*の底質毒性試験の底質濃度に基づくLC50

試験物質	LC50 (mg/kg)	95%信頼区間 (mg/kg)	LC50 (mg/kg-oc)	95%信頼区間 (mg/kg-oc)	備考 試験方式、人工底泥組成 給餌頻度
BaP	2.0×10^2	1.6×10^2 - 2.5×10^2	9.1×10^3	7.3×10^3 - 1.1×10^4	止水、Kemble底泥 2日に1回
4-NP*	3.9×10^2	3.2×10^2 - 4.5×10^2	1.8×10^4	1.5×10^4 - 2.0×10^4	止水、OECD底泥 2日に1回
CPS*	1.0×10^0	7.9×10^{-1} - 1.3×10^0	5.2×10^1	3.9×10^1 - 6.4×10^1	流水、OECD底泥 1日1回
Flu	1.3×10^1	1.0×10^1 - 1.5×10^1	5.9×10^2	4.5×10^2 - 6.8×10^2	止水、Kemble底泥 2日に1回
	1.2×10^2	5.9×10^1 - 1.7×10^2	5.8×10^3	2.9×10^3 - 8.7×10^3	流水、OECD底泥 2日に1回
	$>9.5 \times 10^1$		$>4.7 \times 10^4$		流水、OECD底泥 1日に1回
TCC*	3.9×10^2	-3.9×10^2 - 1.1×10^3	1.9×10^4	-1.9×10^4 - 5.6×10^4	流水、OECD底泥 1日2回
MBT	2.6×10^1	2.2×10^1 - 3.1×10^1	1.2×10^3	1.0×10^3 - 1.4×10^3	止水、Kemble底泥 2日に1回
MTBT	6.8×10^0	6.1×10^0 - 7.6×10^0	3.1×10^2	3.0×10^2 - 3.5×10^2	止水、Kemble底泥 2日に1回
BT	3.8×10^1	3.0×10^1 - 4.7×10^1	1.7×10^3	1.4×10^3 - 2.1×10^3	止水、Kemble底泥 2日に1回
OHBT	1.9×10^1	1.4×10^1 - 2.4×10^1	8.6×10^2	6.4×10^2 - 1.1×10^3	止水、Kemble底泥 2日に1回

* 設定濃度に基づく

*G. japonica*の流水式底質毒性試験におけるFluの様々な媒体中の濃度と致死率、成長阻害の関係に関する結果を図1.7に示す。 C_{pore} に基づいたLC50（2日に1回： 1.3×10^1 $\mu\text{g/L}$ 、1日1回： $>1.3 \times 10^2$ $\mu\text{g/L}$ ）は C_{sed} と同様に2日に1回の給餌条件で低くなった。一方、 C_{cover} に基づいたLC50（2日に1回： 1.8×10^1 $\mu\text{g/L}$ 、1日1回： 4.1×10^1 $\mu\text{g/L}$ ）は給餌条件に関わらず既往文献（ 3.6×10 $\mu\text{g/L}$ ¹⁷⁾、 7.4×10 $\mu\text{g/L}$ ¹⁸⁾）と同程度の値であった。成長阻害による C_{cover} および C_{pore} に基づいたEC50（ C_{cover} 2日に1回： 3.0×10^1 $\mu\text{g/L}$ 、1日1回： 2.6×10^1 $\mu\text{g/L}$ ； C_{pore} 2日に1回： 2.2×10^1 $\mu\text{g/L}$ 、1日1回： $>1.3 \times 10^2$ $\mu\text{g/L}$ ）はそれぞれのLC50と同程度の値であった。これらの結

果から、特に致死率で評価する場合には給餌頻度またはDOの変化が結果に影響を与えることが示唆された。

OECD底泥と性状の異なる環境底泥2種を用いて、給餌条件が1日1回でFluのスパイク底泥による底質毒性試験を行った(図1.8)。環境底泥では致死率および成長阻害の両方で濃度依存的な増加が確認されなかったため、LC50値が得られなかった(小松川干潟 LC50: $>4.7 \times 10^4$ mg/kg-oc; 秋津の池 LC50: $>1.0 \times 10^4$ mg/kg-oc)。

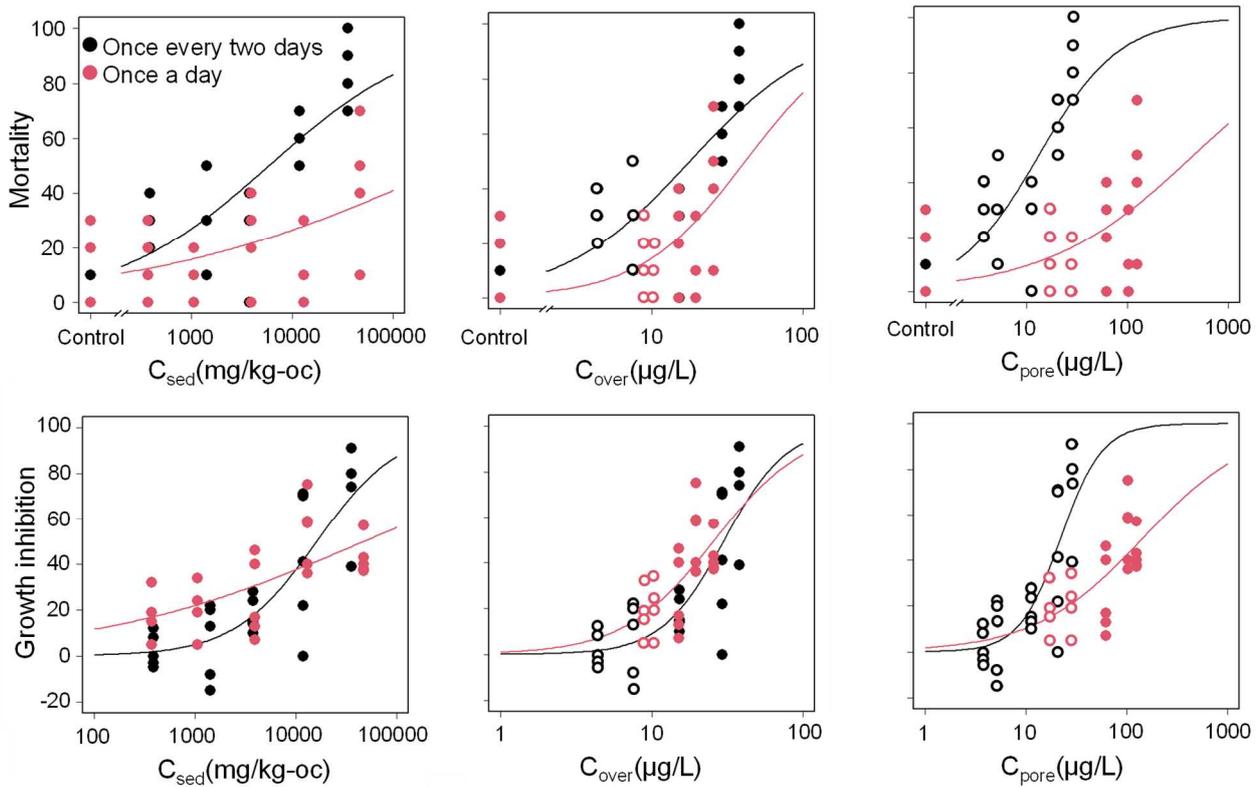


図1.7 FluのOECD底泥を用いた底質毒性試験での底質中濃度 C_{sed} 、上層水中濃度 C_{over} 、間隙水中濃度 C_{pore} と $G. japonica$ の致死率(上)と成長阻害(下)の関係
白抜きのプロットは測定濃度の値が $<LOQ$ であることを示す。

4. 2. 3. 人工底泥を用いた海産ヨコエビのスパイク水による底質毒性試験

底質毒性試験における $G. japonica$ への毒性に対する多様な曝露経路の寄与について検討するために、OECD底泥を用い、上層水にFluを添加し流水式で曝露する底質毒性試験を行った。結果は、環境底泥を用いた試験結果と併せて図1.8に示す。スパイク水による底質毒性試験において C_{pore} および $C_{free, pore}$ は最大濃度区でも C_{over} に比べて低く、ほぼ検出下限値未満であった。これらの結果は、スパイク水中のFluの泥側への移動が少なかったことを示す。一方、 C_{over} に基づく致死率の用量反応曲線は、スパイク底泥による底質毒性試験における C_{over} に基づく用量反応曲線と近接しており、 C_{over} が $G. japonica$ の致死率に対して有効な曝露指標の1つであることが示唆された。なお、この C_{over} に基づく用量反応曲線に対し、スパイク底泥による底質毒性試験における $C_{free, pore}$ のデータは大きな乖離はないことから、汚染底質における間隙水中のフリー溶存濃度が海産ヨコエビの試験系でも重要である可能性がある。今後より多くの同様の試験結果が蓄積されることが望ましい。

また、高濃度区における $G. japonica$ の巣は、視覚的に低濃度区に比べ小さかった。この原因として、泥表面がFluに汚染されており営巣が忌避された、あるいはストレスにより営巣できなかった可能性が挙げられる。このような行動の変化が、結果的に C_{over} と致死毒性との関係性として現れた可能性も考えられる。

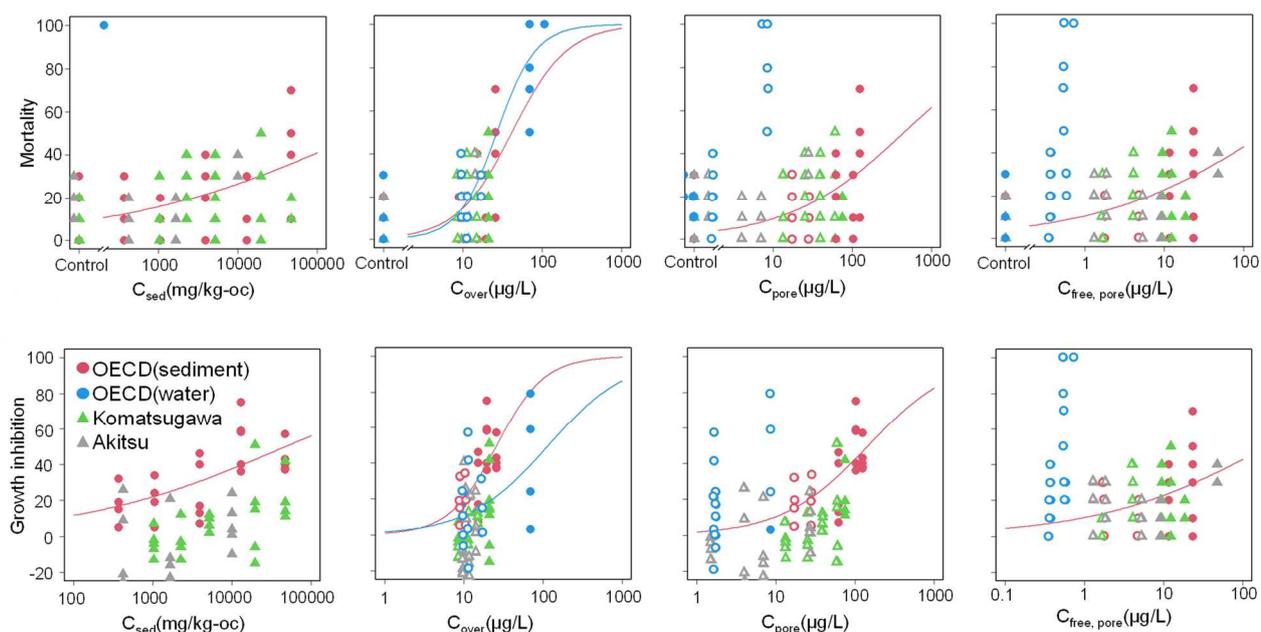


図1.8 環境底泥とOECD底泥を用いたFlu底質毒性試験の比較
白抜きのプロットは測定濃度の値が<LOQであることを示す。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ1では、底生生物であるヨコエビを用いた底質-水曝露による有害化学物質の毒性評価を行った。淡水産ヨコエビでは6物質、海産ヨコエビでは9物質を対象(5物質が共通であり全体で10物質)に、人工底質へのスパイク試験を実施し、新たな毒性値を得た。また、曝露経路別の試験として、水スパイク試験(淡水2物質、海水1物質の計3物質)も実施し、底質スパイク試験と比較した。毒性試験系の化学物質濃度はサブテーマ2で確立した手法を用いて分析した。水スパイクおよび底質スパイク毒性試験の結果の比較より、間隙水中のフリー溶存濃度が淡水産ヨコエビの毒性および生物蓄積を説明、予測するための適当な指標であることが明らかになった。同時に、非常に疎水性の高いBaPの生物蓄積に対しては溶存有機物への収着態が寄与していることも示唆された。海産ヨコエビでは上層水溶存濃度に基づく用量反応曲線が近接しており、上層水溶存濃度が曝露指標の一つとして有効であることが示唆されたが、この用量反応曲線と底質スパイク試験時の間隙水中のフリー溶存濃度の関係も類似しており、淡水産ヨコエビで得られた知見と整合している可能性も示唆された。さらに、環境底泥を用いた毒性試験によって、性状の異なる底泥間でも間隙水中のフリー溶存濃度から求めた毒性値がおおむね一致することが確認できた。サブテーマ1の成果は英文国際学術誌に3報の原著論文として掲載された(1報はサブテーマ2との共同成果)。以上よりサブテーマ1で掲げた目標は全て達成されたと評価する。

6. 引用文献

- 1) Organisation for Economic Cooperation and Development. (2004). Test No. 218: Sediment-water chironomid toxicity using spiked sediment. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 2) US Environmental Protection Agency. (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/R-99/064.
- 3) Environment and Climate Change Canada. (2017). Biological test method: Test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. RM/33.
- 4) Hiki, K., Fischer, F. C., Nishimori, T., Watanabe, H., Yamamoto, H., Endo, S. (2021) Spatiotemporal

- distribution of hydrophobic organic contaminants in spiked-sediment toxicity tests. *Environ Toxicol Chem.* 40, (11), 3148-3158
- 5) US Environmental Protection Agency. (1994). Methods for assessing the toxicity of sediment - associated contaminants with estuarine and marine amphipods.
 - 6) Hiki, K., Nakajima, F., Tobino, T. (2017). Causes of highway road dust toxicity to an estuarine amphipod: Evaluating the effects of nicotine. *Chemosphere* 168, 1365-1374.
 - 7) Kemble, N.E., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G., Dawson, T.D., Norberg - King, T.J. (1999). Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole - sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, (2), 222-230.
 - 8) Amweg, E., Weston, D. (2007) Whole-sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: I. Piperonyl butoxide addition. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, (11), 2389-2396.
 - 9) Weston, D., Amweg, E. (2007) Whole-sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: II. Esterase addition. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, (11), 2397-2404.
 - 10) Hintzen, E., Lydy, M., Belden J. (2009) Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas. *Environ. Pollut.* 157, (1), 110-116.
 - 11) Lydy, M. et al. (2014) Passive sampling methods for contaminated sediments: State of the science for organic contaminants. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, (2), 167-178.
 - 12) Xu, Y., Spurlock, F., Wang, Z., Jay, G. (2007) Comparison of five methods for measuring sediment toxicity of hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 41, (24), 8394-8399.
 - 13) Schlechtriem, C., Kampe, S., Bruckert, H-J., Bischof, I., Ebersbach, I., Kosfeld, V., Kotthoff, M., Schäfers, C., L'Haridon J. (2019) Bioconcentration studies with the freshwater amphipod *Hyaella azteca*: are the results predictive of bioconcentration in fish? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, (2), 1628–1641.
 - 14) Wilcoxon, S., Meier, G.P., Landrum, F.P. (2003). The toxicity of fluoranthene to *Hyaella azteca* in sediment and water-only exposures under varying light spectra. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 54, 105–117.
 - 15) Doig, L., Liber, L.(2010) An assessment of *Hyaella azteca* burrowing activity under laboratory sediment toxicity testing conditions. *Chemosphere* 81, (2), 261-265.
 - 16) US Environmental Protection Agency. (2016). Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1740: Spiked Whole Sediment 10-Day Toxicity Test, Saltwater Invertebrates
 - 17) Boese, B. L., Lamberson, J. O., Swartz, R. C., Ozretich, R. J. (1997). Photoinduced toxicity of fluoranthene to seven marine benthic crustaceans. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, (4), 389-393.
 - 18) Lee, J. S., Lee, K. T., Park, G. S. (2005). Acute toxicity of heavy metals, tributyltin, ammonia and polycyclic aromatic hydrocarbons to benthic amphipod *Grandidierella japonica*. *Ocean Sci. J.* 40, (2), 61-66.

II-2 底質中有害化学物質の分配挙動と生物利用性の評価

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康領域	曝露影響計測研究室	遠藤 智司
環境リスク・健康領域	曝露影響計測研究室	FISCHER, Fabian Christoph (令和元～2年度)
環境リスク・健康領域	曝露影響計測研究室	吉井 咲夢 (令和2～3年度)

[要旨]

サブテーマ2では底質毒性試験系における化学物質の分配挙動をパッシブサンプリング手法等を用いて測定し、サブテーマ1における毒性試験の結果を曝露経路の観点から解釈できるよう基礎データを蓄積すること、さらに化学物質分配・収着への影響要因となる環境底泥の性状を抽出して、底質に存在する化学物質の生物利用性の評価法について検討することを目的とした。目的を達成するため、1) パッシブサンプリング手法を用いた底質毒性試験系における有機化学物質のフリー溶存濃度 (C_{free}) 測定法の確立、2) 底質毒性試験系における各相の濃度測定による、物質分布の包括的な把握、3) 環境底泥及び人工底泥を用いた収着試験による収着に影響を与える底質性状の抽出、の3つを目標に研究を実施した。

パッシブサンプリング手法はポリマー被覆ガラスマイクロファイバーを用いた方法を検討した。方法の確立に必要な情報である、底質毒性試験系におけるファイバー/水分配平衡の到達期間及びサンプラー中の濃度を C_{free} に換算するための換算係数について検証した。その結果、アミン類1種類を含む5種類の有機化学物質について方法を確立し、底質毒性試験において C_{free} の測定に適用した。底質毒性試験系における分配・分布挙動については、同じ5種類の物質について上層水・間隙水の C_{free} 及び総溶存濃度などを測定し、試験系内の水中濃度に急激な勾配があること、また上層水濃度は時間変動することを明らかにした。2種類の物質についてはさらに生物体内濃度も測定し、底質毒性試験系における物質分布を包括的に把握した。さらに収着・拡散などの挙動を考慮した物質輸送モデルを用い、底質毒性試験系における物質輸送のシミュレーションを行い、実測濃度が計算結果と概ね一致することを確認した。収着試験では国内15地点の環境底泥を用いることにより、中性有機物質の収着係数が底泥の有機炭素含量と正比例の関係にあることを示した。有機炭素/水分配係数 (K_{oc}) は環境底泥試料間で概ね一致し、ピートモス含有人工底泥の K_{oc} もよく一致したことから、ピートモスが環境底泥の有機物と同等な収着性状をもつことが示唆された。一方、セルロース含有人工底泥の K_{oc} は環境底泥の K_{oc} より3桁程度低く、収着性が大きく異なることがわかった。アミン類の陽イオン界面活性剤については同じ底泥でも水質条件によって収着係数が大きく変動し、さらなる検討の必要性が示唆された。収着性状に関する以上の知見はサブテーマ3における平衡分配法の最適化や生物利用性の議論のために提供した。

以上よりサブテーマ2で掲げた目標はすべて達成され、さらに追加の成果をあげたことから、サブテーマ2では当初目標を大きく越えた成果が得られたと評価する。

1. 研究開発目的

サブテーマ2では底質毒性試験系での化学物質の分配挙動をパッシブサンプリング手法等を用いて測定し、サブテーマ1における毒性試験の結果を曝露経路の観点から解釈できるよう基礎データを蓄積すること、さらに化学物質分配・収着への影響要因となる環境底泥の性状を抽出して、底質に存在する化学物質の生物利用性の評価法について検討し、サブテーマ3における底質リスク評価手法の構築に資する知見を提供することを目的とした。

2. 研究目標

パッシブサンプリングを用いた底質毒性試験系における有機化学物質のフリー溶存濃度測定法を確立する。また2種類以上の物質について、底質毒性試験系におけるすべての相（上層水、間隙水、溶存

有機物、底質粒子、生物)の物質濃度を測定し、物質の分布を包括的に把握する。さらに人工底泥・環境底泥合わせて8種類以上について吸着試験を行い、分配挙動が異なる要因を抽出する。

3. 研究開発内容

サブテーマ2では上記の研究目標を達成するため、1)底質毒性試験系におけるフリー溶存濃度(C_{free})測定のためのパッシブサンプリング手法の検討、2)底質毒性試験系における分配・分布挙動の測定・解析、3)環境底泥及び人工底泥を用いた収着試験による収着係数(K_d)と有機炭素/水分分配係数(K_{oc})の測定及び平衡分配法との比較を行った。対象物質にはサブテーマ1の毒性試験に合わせて、ベンゾ[a]ピレン(BaP)、クロルピリホス(CPS)、ベンジルドデシルジメチルアンモニウム(C12-BAC)を用いた。C12-BACはアミン類の陽イオン界面活性剤である塩化ベンザルコニウムの主要成分である。またパッシブサンプリングの検討試験や底泥を用いた収着試験ではBaPと同じく多環芳香族炭化水素類(PAH)に属する物質(フェナントレン(Phe)、フルオランテン(Flu)、ピレン(Pyr)、ベンズ[a]アントラセン(BaA))も比較のために用いた。

3.1 パッシブサンプリング手法の検討

サブテーマ1で行う底質毒性試験の試験系において化学物質の C_{free} を測定するため、パッシブサンプリング手法を検討した。 C_{free} は底質-水系における底生生物の化学物質曝露を評価する際に有効な指標と考えられている¹⁾が、本研究で実施するようなスパイク底質毒性試験で測定された例は少ない²⁾。

本研究ではパッシブサンプラーとして、中性有機物質(PAH、CPS)にはポリジメチルシロキサンで被覆されたガラスマイクロファイバー(PDMSファイバー)を用いた。4級アミン類のC12-BACについてはPDMSファイバーの濃縮性が低く、パッシブサンプラーとしての使用に適さないことが初期の実験で明らかとなったため、別の複数のサンプラーを検討した。その結果、C12-BACにはポリアクリレート被覆マイクロファイバー(PAファイバー)を用いることとした。

パッシブサンプリング手法による C_{free} の測定では、物質がサンプラーと水の間で分配平衡に達していることが前提となる。底質毒性試験の実施期間中にファイバー/水分分配平衡に到達するかを検討するため、以下に記す予備試験を行った。Phe、Pyr、BaPの混合スパイク底泥を調製し、ビーカーの底に敷き詰め、試験生物を入れずに半流水式底質試験系に供試した。PDMSファイバーは2-7 cmの薄片に切り、有機溶媒及び水で洗浄してから使用した。間隙水中 C_{free} の測定のため、ファイバーを底質に埋め込んだ。また上層水 C_{free} の測定のため、ファイバーを底質直上に立てて設置した(図2.1)。複製試料を多数用意し、1, 3, 5, 7, 10日目にファイバーを回収した。ファイバーは回収後、キムワイプで付着物を除去し、溶媒抽出をした。抽出液を機器分析(3.4参照)により分析し、被膜PDMS中の濃度(C_{PDMS})の経時変化を測定した。

分配平衡到達に加え、サンプラー中の濃度を C_{free} に換算するためには換算係数が必要である。 C_{PDMS} は分配係数の定義から、PDMS/水分分配係数($K_{PDMS/w}$)を換算係数とし、 C_{free} に換算することができる(つまり、 $C_{free} = C_{PDMS}/K_{PDMS/w}$)。中性有機物質の $K_{PDMS/w}$ はpH、塩類濃度、物質濃度の影響を受けにくいことが報告されている³⁻⁵⁾。Phe、Flu、Pyr、BaA、BaPの $K_{PDMS/w}$ は文献中に測定値が報告されているため⁶⁾、その値を用いた。CPSの $K_{PDMS/w}$ は実測値が文献になかったため、本研究で測定した。測定ではバイアルにPDMSファイバーと水を入れ、溶媒に溶解したCPSをマイクロシリンジで少量添加し、2-12日間振とうした。その後ファイバーと水を採取、 C_{PDMS} と C_{free} を測定し、 $K_{PDMS/w}$ を算出した。得られた $K_{PDMS/w} = 10^{4.43}$ ($n = 9$)をCPSの値として用いた。C12-BACの $K_{PA/w}$ についても同様な実験を行った。C12-BACにおける C_{PA} から C_{free} への換算については4.1に記載した。

3.2 底質毒性試験系における物質の分布・分配挙動の解析

サブテーマ1で用いた半流水式底質毒性試験系における物質の分布・分配挙動を明らかにするため、上層水、間隙水、底質固体等さまざまな相の物質濃度を測定した。

間隙水及び上層水の C_{free} は3.1に記述した通り、PDMSファイバーまたはPAファイバーを用いたパ

ッシブサンプリングにより測定した。すべての試験で底質にファイバーを埋め込み、間隙水の C_{free} を測定した。上層水は試験によって異なる位置にファイバーを設置し、底質直上や底質表面（底質—上層水の界面）、上層水上部の C_{free} を測定した（図2.1）。

上層水の総溶存濃度（ $C_{\text{diss}} = C_{\text{free}} + \text{溶存結合態濃度}$ ）の測定は10日間の底質毒性試験期間中、4、5回行った。 C_{diss} の測定のため、底質表面から約1-2 cm上方の上層水をガラスシリンジで採取し、ガラス繊維ろ紙（0.4 μm 孔径, GB-140, Advantec）によりろ過した。PAH及びC12-BACの測定ではろ液をアセトニトリルで希釈し、CPSの測定ではろ液をヘキサンで液液抽出し、それぞれ機器分析により測定した（3.4参照）。

間隙水の C_{diss} の測定は、10日間の毒性試験後、底質をビーカーから回収し、遠心分離（10,000g, 30分, CR21, 日立工機）で生じた上澄みを上述の上層水 C_{diss} と同様にろ過、希釈あるいは抽出することにより行った。初期の実験によりCPSの上層水はろ過試料と未ろ過試料との間に濃度の差がないことが確認されたため、以後はろ過をせずに分析し、 C_{diss} とみなした。

底質試料は凍結乾燥後、CPS及びPAHは50 vol% アセトン/ヘキサンにより超音波抽出し、CPSの場合はシリカゲルにより精製して分析に供試した。PAHの場合は抽出液をアセトニトリルで希釈し、直接、機器分析により測定した。C12-BACの抽出は1 M塩酸/メタノールを用いた超音波抽出により行った。抽出液はクエン酸ナトリウム水溶液で中和した後、固相抽出カートリッジ（InertSep WCX FF 60mg, ジーエルサイエンス）で精製し、機器分析により測定した。

ヨコエビは乾燥、重量測定後、BaPはアセトニトリルで、C12-BACは1 M塩酸/メタノールで抽出した。抽出液は、BaP測定の場合はPTFEフィルターによるろ過、C12-BACの場合は上述の固相抽出カートリッジにより精製し、機器分析により分析した。

底質毒性試験系における物質の分布・分配挙動について物理科学的プロセスに基づいた知見を得るため、濃度の測定に加え、物質輸送モデルを用いたシミュレーションを行った。このモデルは底質毒性試験系における拡散、収着、希釈、溶存有機物（DOM）による促進輸送を考慮しており、物質の物性を入力することで底質毒性試験系内の各位置、時間における濃度を計算することができる。モデルの詳細については文献7に記載した。本研究ではモデル計算により得られた物質の上層水中濃度の時間変動を実測濃度と比較した。

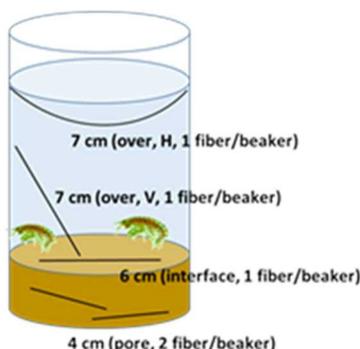


図2.1 C_{free} 測定のために設置したポリマー被覆ガラスファイバーの位置
（すべての実験ですべての位置にファイバーを設置したわけではない）

3.3 環境底泥及び人工底泥を用いた収着試験

底質性状と収着挙動の関係を調べるため、環境底泥と人工底泥を用いて収着試験を行った。環境底泥は霞ヶ浦西浦8か所、茨城県つくば市近郊河川5か所、国立環境研究所内の池1か所、荒川河口干潟1か所の計15か所から採取した（図2.2）。底泥試料は4°C、暗所で保管し、有機炭素含量（ f_{oc} ）と粒径分布を測定した。人工底泥はOECDガイドラインに準拠した方法で作製した試料（以下、OECD底泥。成分は前章を参照）及びKembleら⁸⁾の方法で作製した試料（以下、Kemble底泥）を用いた。

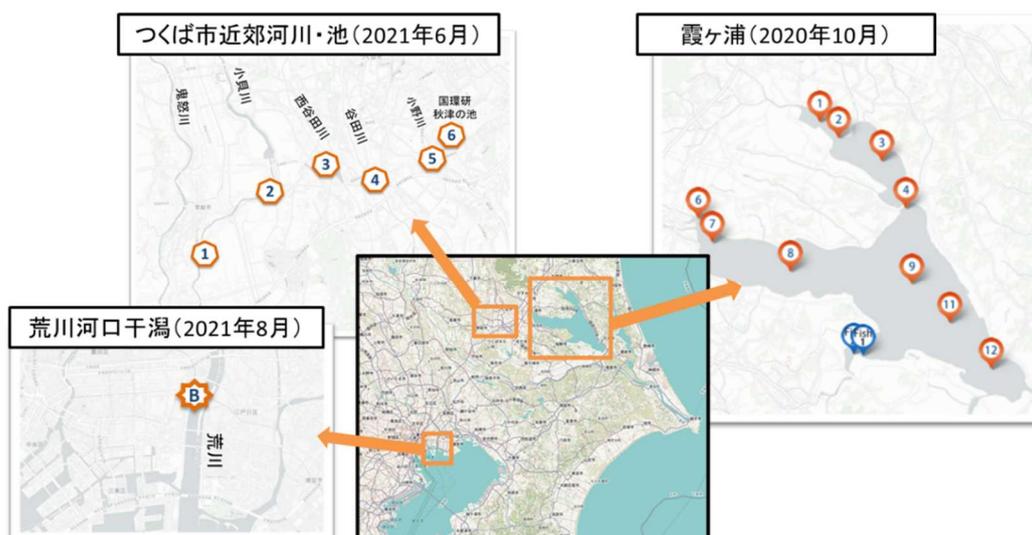


図2.2 環境底泥の採取地点

収着試験ではまず、底泥試料15 g (湿重量) を20 mLバイアルにとり、4 cm PDMSファイバー3本、1 g/L NaN_3 水溶液5 mLを加え底質懸濁液を作成した。この懸濁液にメタノールに溶解した対象物質を少量添加し、25°C恒温槽内で水平振とうした。28日後、PDMSファイバーを回収し、溶媒抽出の上、機器分析により濃度を測定した (3. 4 参照)。各底質につき2つの複製試料を作製し、計6本のPDMSファイバーを分析した。得られた C_{PDMS} から C_{free} を算出し、マスバランスから K_d を計算した。また K_d を f_{oc} で除すことにより、 K_{oc} を算出した。収着試験後の底質はアセトンで抽出し、添加した物質の回収率を確認した。

研究初期の検討段階ではCPS、ノニルフェノール、ヘキサクロロベンゼン、ヘキサブロモベンゼンについても収着試験を行ったが、これらの物質は回収率 (添加量に対する28日後の残存量) が50%以下と低かった。これは28日間の試験中に一部が分解や揮発により消失したためと考えられる。一方、PAHについてはどの底質でも60%以上の回収率が得られた。したがって底質試料間の収着性の比較はPAHを用いて行うこととした。PAHはPhe、Flu、Pyr、BaA、BaP、BghiPの6種類を対象としたが、BghiPについては28日と84日の振とう時間で結果に違いが見られ、28日間では収着平衡に達しない可能性が示唆されたため、BghiPを除いた5種類のPAHを考察の対象とすることとした。

陽イオン性のC12-BACではpHや共存イオンなど水質要因が底泥による収着に影響を与えることが予想されたため、異なるpH、 Ca^{2+} 濃度下における K_d を測定した。OECD底泥100 mg-wetをガラス遠沈管にとり、10 mLの純水、飼育水、飼育水+ CaCl_2 (Ca , 100 mg/L)、または1 mM NaOHで2回ずつコンディショニングした (表2.1)。コンディショニングではコンディショニング用水溶液とともに1晩、遠沈管内で振とう懸濁し、遠心分離の後、上澄みを除去した。その後、表2.1に記載の収着試験用水溶液を10 mL入れ、C12-BACの初期濃度が2.5 mg/Lとなるよう、メタノールのストック溶液でスパイクした。ふたをして24時間振とう後、PAファイバーを投入した。さらに72時間振とう後、PAファイバーを回収し、0.1%ギ酸/アセトニトリルで抽出し、C12-BAC濃度を測定した。

表2.1 C12-BACを収着試験で用いた水溶液

	Pure water	Test water	Test water + 100 mg/L Ca^{2+}	Test water (NaOH-conditioned)
遠沈管	$n = 4$	$n = 4$	$n = 4$	$n = 4$
OECD底泥	100 mg-wet	100 mg-wet	100 mg-wet	100 mg-wet
コンディショニング用水溶液	純水	飼育水	飼育水+100 mg/L Ca^{2+}	1 mM NaOH
収着試験用水溶液	純水	飼育水	飼育水+100 mg/L Ca^{2+}	飼育水

3.4 機器分析

PAHは蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（Prominence LC system、島津製作所）により同定・定量した。CPSは重水素化CPSをサロゲートとして試料に添加し、大容量注入機能を有するオートサンプラー・注入口（MPS2/CIS4、Gerstel）及びガスクロマトグラフ・質量分析計（7890A/5975C GC-MS, Agilent Technology）を用いて同定・定量した。C12-BACは重水素化C12-BACをサロゲートとして試料に添加し、高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（6460 Triple Quad LC-MS, Agilent Technology）により同定・定量した。

4. 結果及び考察

4.1 パッシブサンプリング手法の検討

PDMSファイバー中の濃度（ C_{PDMS} ）の経時変化を測定し、平衡の到達について評価した（図2.3）。3種類のPAH（Phe、Pyr、BaP）について、上層水・間隙水とも5–10日で C_{PDMS} の上昇が起きなくなることが確認でき、底質毒性試験の期間である10日以内には平衡に達することが示唆された。一般にパッシブサンプリングではサンプラー/水分配係数が高いほど平衡到達に時間がかかるため、 $K_{PDMS/w}$ がBaPの値（ $10^{5.2}$ ）より低いCPSも10日以内に平衡に達すると考えられる。

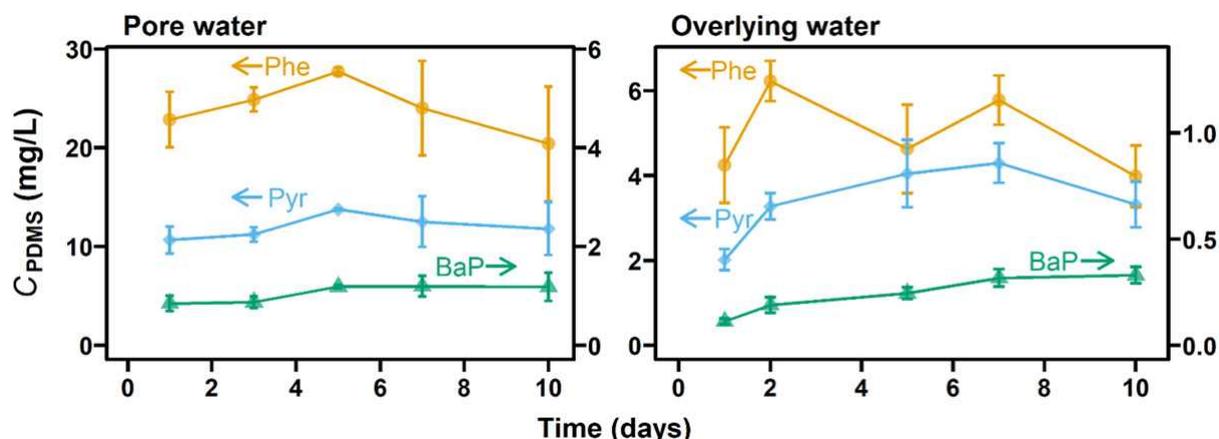


図2.3 PDMSファイバー中の物質濃度の経時変化

（左）間隙水、（右）底質直上の上層水。Phe、フェナントレン；Pyr、ピレン；BaP、ベンゾ[a]ピレン。底質は各物質5 mg/kg-dryに調製、半流水式底質試験系で実験を実施。Hiki, K.; Fischer, F. C.; Nishimori, T.; Watanabe, H.; Yamamoto, H.; Endo, S., *Environmental Toxicology and Chemistry* **2021**, *40*, (11), 3148–3158⁹⁾, Figure 2から転載。

C12-BACについてはPAファイバーを用いたパッシブサンプリング手法を検討した。既報¹⁰⁾からC12-BACの $K_{PA/w}$ はpH、 Ca^{2+} 濃度、C12-BAC濃度に依存する可能性があると考えられたため、様々な水質条件で C_{PA} と C_{free} の関係（収着等温線）を調べた。純水に $CaCl_2$ を溶解し、 Ca^{2+} 濃度を10, 30, 100 mg/Lに設定し収着実験を行ったところ、PAによる収着等温線は大きく変わらず、PAによる収着の Ca^{2+} 濃度依存性は比較的弱いことがわかった（図2.4A）。特にC12-BACが高濃度の場合、 C_{PA} と C_{free} の関係はほぼ一定であった。飼育水にHClを添加し、pHを変動させた実験では、pH 5.7–7.4の範囲では収着等温線の差が比較的大きかったが、pH 7.4と8.0の収着等温線は近接していた（図2.4B）。サブテーマ1の底質毒性試験では上層水、間隙水のどちらにおいてもpHは7–8程度であったが、この範囲でのPAファイバー収着のpH依存性は低いと考えられる。図2.4BからpH 7.3–8.1における測定データを抽出し、新たに収着等温線を作成した（図2.4C）。収着等温線は直線ではなかったため、データの内挿には次のフロイントリッヒラングミュア式を用いた。

$$C_{PA} = \frac{C_{max} K C_{free}^n}{1 + K C_{free}^n}$$

上式を図2.4Cのデータに当てはめ、 C_{PA} から C_{free} への換算につかった。

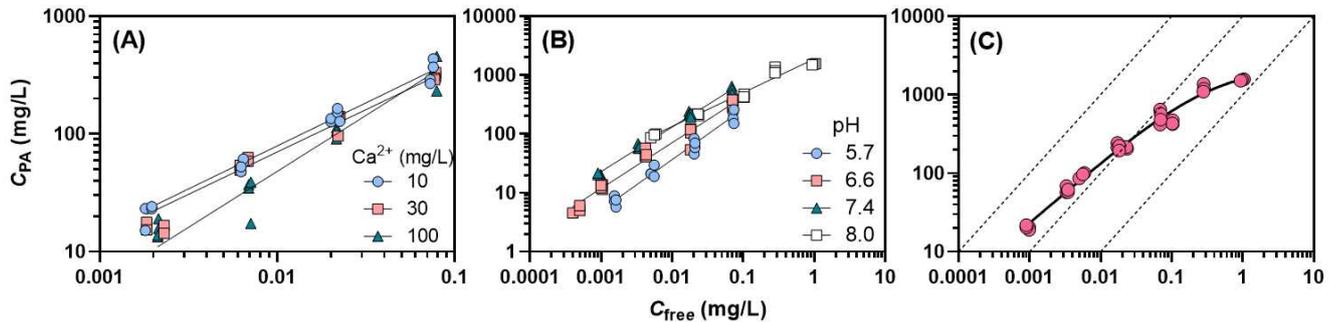


図2.4 PAによるC12-BACの収着等温線の Ca^{2+} 濃度依存性 (A)、pH依存性 (B)、及びBから抜粋したpH7.3–8.1のデータ (C) (C) の点線は傾き1を表す。

4.2 底質毒性試験系における物質の分配挙動

PAH及びCPSの上層水総溶存濃度 ($C_{diss,over}$)の経時変化を図2.5に示す。Phe、Pyr、CPSでは実験開始後1日目から濃度が低下していき、10日目には最大到達濃度のおよそ半分程度となった。本研究で採用した半流水式の底質毒性試験系は清浄な水を滴下し上層水を置換するため、物質の系外への排出により上層水の濃度が低下した可能性が考えられる。10日間の実験期間中に濃度が一定ではないことは毒性試験の結果を解釈する上で留意すべき点である。一方、BaPについては $C_{diss,over}$ の測定値のばらつきが大きく、濃度低下の傾向は確認できなかった。BaPのばらつきの原因は、BaPが他の物質と比較して疎水性が高く、 $C_{diss,over}$ の測定の際にDOMを含むコロイド粒子による影響を強く受けていたことだと考えられる。

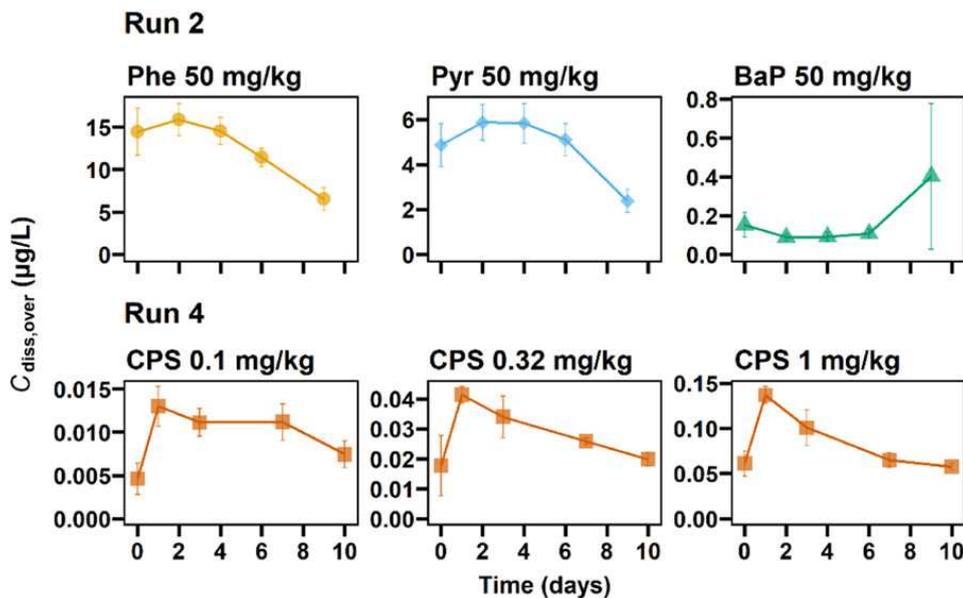


図2.5 底質毒性試験における上層水中総溶存濃度 $C_{diss,over}$ の経時変化

Hiki, K.; Fischer, F. C.; Nishimori, T.; Watanabe, H.; Yamamoto, H.; Endo, S., *Environmental Toxicology and Chemistry* **2021**, *40*, (11), 3148-3158⁹⁾, Figure 2から転載。Run 2がPhe、Pyr、BaPを用いた予備試験、Run 4がCPSを用いたヨコエビ底質毒性試験の結果。

底質毒性試験系におけるPhe、Pyr、BaP、CPSの間隙水及び上層水中 C_{free} 、 C_{diss} を比較した（図2.6）。すべての物質について間隙水 C_{free} >上層水 C_{free} 、及び間隙水 C_{diss} >上層水 C_{diss} の関係が見られた。間隙水と上層水の間には10倍以上の濃度差があることもあった。つまり系全体の濃度は均一ではなく、全体を分配平衡の状態とみなすこともできないことがわかる。これまでの検討から上層水は比較的よく混合している（濃度勾配がない）ことがわかっているため、間隙水と上層水の濃度差は底質—上層水界面周辺に急激な濃度勾配があることを示唆している。毒性試験系内の水中濃度が均一でないことは、底生生物の存在位置によって化学物質曝露の程度が異なることを意味している。底生生物はその習性や底質の性状によって、底質に潜る場合もあれば、底質表層を歩行したり上層水を遊泳したりする場合もあるため、試験生物の行動に即した位置での曝露濃度が把握できれば理想的であると言える。

上層水、間隙水のどちらにおいても $C_{diss} \geq C_{free}$ であった。 C_{diss} （総溶存濃度）は C_{free} （フリー溶存濃度）+溶存結合態濃度であるため、この結果は妥当である。BaPでは特に C_{diss} が C_{free} に比して大きく、間隙水では100倍程度の違いがあった。疎水性の高いBaPではDOMによる結合が強く、結合態のBaPが高い割合で存在するため $C_{diss} \gg C_{free}$ であったと考えられる。BaPより疎水性の低いCPSでは、DOM濃度の高い間隙水では $C_{diss} > C_{free}$ であったが、DOM濃度の低い上層水では概ね $C_{diss} = C_{free}$ であった。

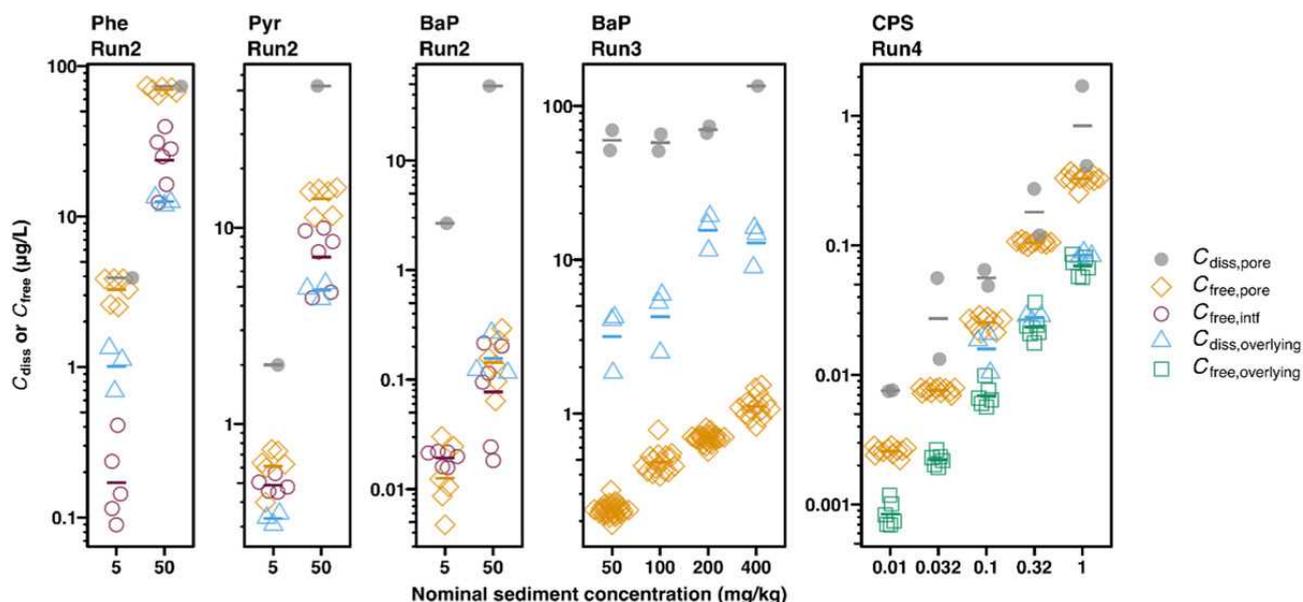


図2.6 底質毒性試験系における濃度の比較

Hiki, K.; Fischer, F. C.; Nishimori, T.; Watanabe, H.; Yamamoto, H.; Endo, S., *Environmental Toxicology and Chemistry* **2021**, *40*, (11), 3148-3158⁹⁾, Figure 3から転載。Run 2がPhe、Pyr、BaPを用いた予備試験、Run 3がBaPを用いたヨコエビ底質毒性試験、Run 4がCPSを用いたヨコエビ底質毒性試験の結果。 $C_{free,intf}$ は底質—上層水の界面、 $C_{diss,overlying}$ は底質直上におけるフリー溶存濃度（図2.1参照）

C12-BACの底質毒性試験時にも同様な測定を行い、上層水及び間隙水の C_{free} と C_{diss} を測定した。パッシブサンプリング手法により得られた間隙水、底質—上層水界面、上層水下部、上層水上部の C_{free} の測定結果を図2.7に示す。上層水上部（ $C_{free,over,H}$ ）及び下部のフリー濃度（ $C_{free,over,L}$ ）は、間隙水中の濃度（ $C_{free,pore}$ ）と比較してそれぞれ19–320倍及び22–67倍低い値であった。C12-BACの C_{free} は底泥から離れるにつれ低下し、その低下の程度は上述の中性物質と比べて著しかった。C12-BACでは底質から上層水への物質輸送が比較的遅いことがうかがえる。上層水及び間隙水中の C_{diss} と C_{free} とを比較したところ、上層水、間隙水のどちらにおいても $C_{diss} > C_{free}$ であった。つまりC12-BACは主に溶液中の微粒子やDOMなどに吸着して存在していることがわかった。

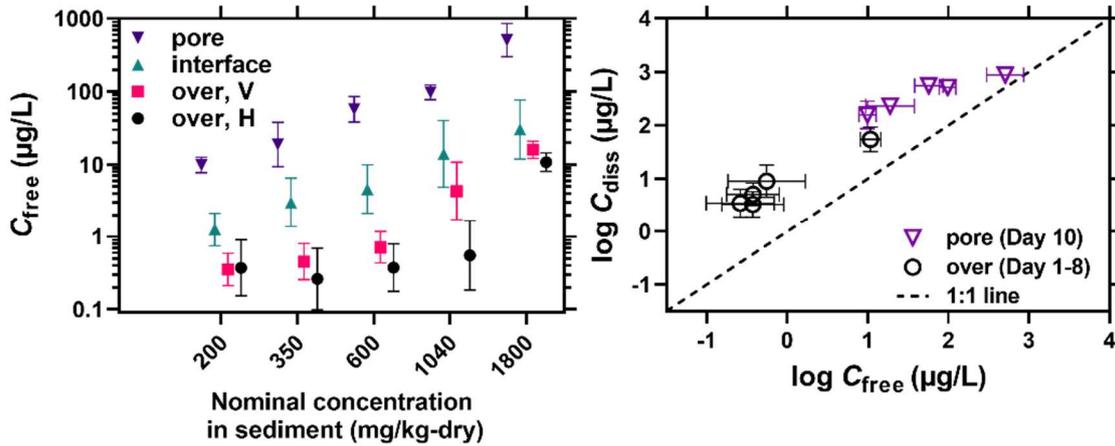


図2.7 底質毒性試験系におけるC12-BACの C_{free} の分布（左）及び C_{diss} と C_{free} の比較（右）
測定位置については図2.1参照

物質輸送モデルによるシミュレーションの結果と実際の上層水の C_{diss} の測定値を図2.8に比較した。モデルシミュレーションの結果は実験値をやや過小評価する場合もあったが、概ねよく一致していた。BaPは上述の通り実験値のばらつきが非常に大きかったが、モデルは測定濃度のオーダーは的確にとらえていた。モデルは底質毒性試験系での収着、拡散、混合、DOM輸送の過程をシミュレーションしており、測定濃度との一致はこれらのプロセスが底質毒性試験系における物質分布を支配していることを示唆する。特に、疎水性の高いBaPが上層水で比較的高い濃度で検出されたことはDOMによる輸送をモデルに組み込まなければ再現できず、高疎水性物質の物質輸送ではDOMが重要な役割を果たすと考えられる。

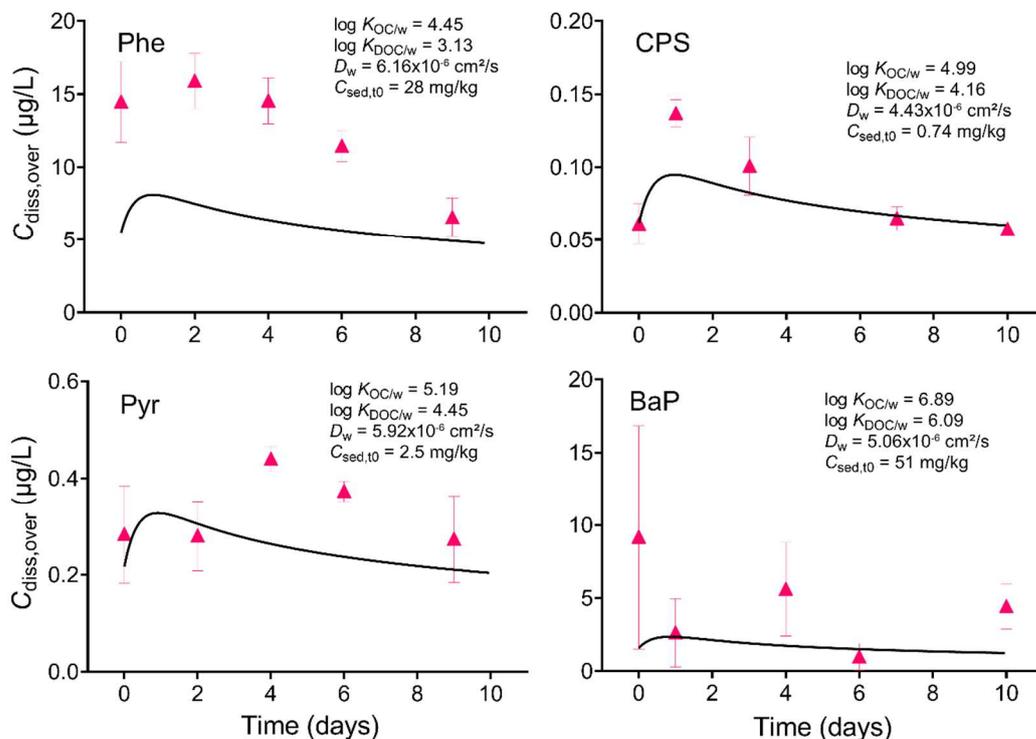


図2.8 半流水式底質毒性試験系における上層水 C_{diss} ($C_{diss,over}$)の実験値と物質輸送モデルによるシミュレーション結果の比較
データ点は実測値（平均±標準偏差）、実線はシミュレーション結果

10日間の底質毒性試験後、ビーカーに残った底質試料を採取し、底質固体中の物質濃度 (C_{sed}) を測定した。 C_{sed} は底質毒性試験開始時の値と変わらず、10日の試験期間中、ほぼ一定に保たれていることがわかった。つまり分解や上層水の置換による物質の系外への流亡は、底質中の物質存在量に比べて少ないといえる。

底質毒性試験後に測定した C_{sed} は、平衡分配法の考え方にに基づき、 $C_{free,pore} = C_{sed}/(K_{oc}f_{oc})$ の関係を用いて $C_{free,pore}$ に換算した。一般的な平衡分配法に従い、換算式中の K_{oc} には K_{ow} から推定した値を用いた¹¹⁾。 C_{sed} を換算して得られた $C_{free,pore}$ は、パッシブサンプリングによる実測値と比較した(図2.9)。Phe、CPSについては、推算値は実測値の2-3倍の範囲で概ね一致した。しかしPyr、BaPについては推算値が実験値の3-30倍となり、過大推定となった。これは平衡分配法で用いる K_{oc} の値が実際の値よりも低いことに起因する。以上の結果から、底質毒性試験により毒性値を算出する場合、 $C_{free,pore}$ の値は平衡分配法により推定するのではなく、パッシブサンプリングなどにより実際に測定すべきであるといえる。また平衡分配法により推算した $C_{free,pore}$ が過大となる傾向があることは、平衡分配法が底質中物質からの曝露を過大に見積る傾向にあることを意味し、リスク評価の際には留意すべきである。なお本研究ではC12-BACの C_{sed} も測定したが、陽イオン性のC12-BACは一般的な平衡分配法の適用範囲外なので、ここでは考察の対象としなかった。

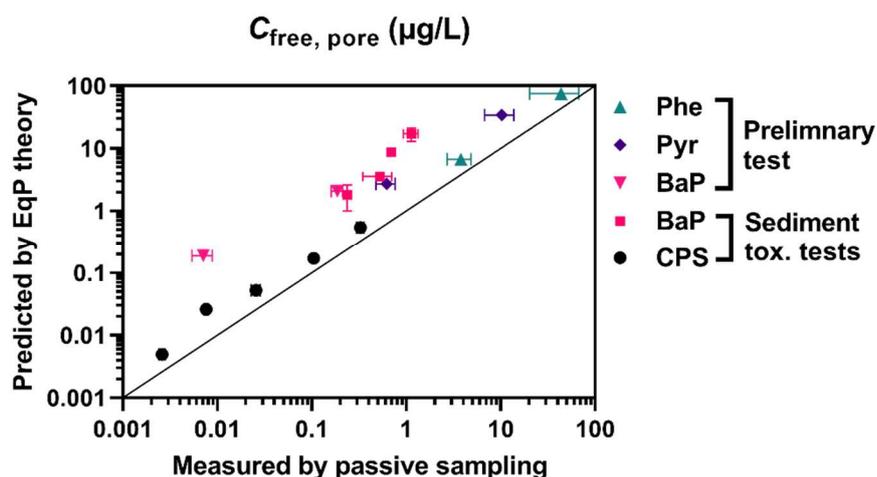


図2.9 半流水式底質毒性試験系における間隙水 C_{free} ($C_{free,pore}$) のパッシブサンプリングによる実測値 (横軸) と平衡分配法 (EqP theory) に基づく予測値 (縦軸) の比較
実線は1 : 1の関係を示す

BaPとC12-BACについては底質毒性試験実施後、ヨコエビ生残個体の体内濃度 (C_{body}) の測定を行った。 C_{body} から算出した生物濃縮係数 (BCF) についてはサブテーマ1で議論した。

4.3 収着試験による収着係数 K_d と有機炭素/水分配係数 K_{oc} の測定

15地点から採取した環境底泥を用いて測定したPAHの K_d を、底泥の f_{oc} と比較した(図2.10)。 K_d と f_{oc} の間には正比例の関係があった。この結果は中性有機化合物の底質粒子収着においては有機物が支配的な役割を担うことを示し、諸外国からのこれまでの報告に沿う結果である^{11,12)}。本研究は K_d と f_{oc} の比例関係が国内河川、湖沼にも適用できる可能性を示したといえる。

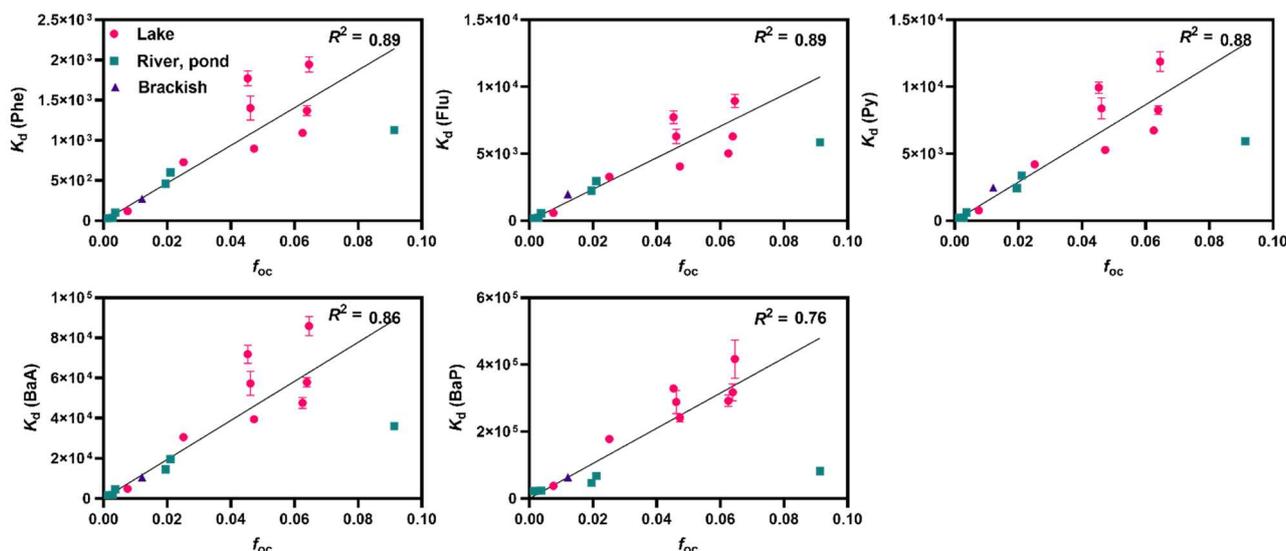


図2.10 環境底泥による収着係数 K_d と有機炭素含量 f_{oc} の関係
直線は原点を通過する回帰直線、誤差バーは複製試料の標準偏差 ($n = 6$) を示す

測定した環境底泥の $\log K_{oc}$ と人工底泥2種類の $\log K_{oc}$ を図2.11で比較した。環境底泥15試料の $\log K_{oc}$ の標準偏差は0.3程度と小さく、採取地点間の有機物の収着性状に大きな違いがないことがわかった。OECD底泥の $\log K_{oc}$ は環境底泥の $\log K_{oc}$ と近く、平均値同士の差は最大でも0.3 log値であった。OECD底泥の作製に用いるピートモスが環境底泥中の有機物の収着性状をよく模しているものと考えられる。一方、Kemble底泥の $\log K_{oc}$ は環境底泥やOECD底泥の $\log K_{oc}$ よりlog値で3程度低く（つまり K_{oc} が約1/1000）、Kemble底泥による収着が非常に弱いことがわかった。これはKemble底泥の作製に用いるセルロースの収着が非常に弱いことが原因であると考えられる¹³⁾。以上の結果から、人工底泥を用いて底質毒性試験を実施する際、中性有機化合物に対する収着性状の観点からはKemble底泥よりもOECD底泥が適しているといえる。

図2.11では $\log K_{ow}$ の値から推算した $\log K_{oc}$ の値も示した。ここで用いた $\log K_{oc}$ の推算法は図2.9の平衡分配法による計算で使用した方法と同じである。 $\log K_{oc}$ の推算値は環境底泥やOECD底泥を用いて測定した $\log K_{oc}$ の値と同程度か、やや低かった（1 log値以内）。これは図2.9の結果に沿う結果である。 $\log K_{oc}$ の推算値と実測値の間には差があることから、リスク評価においては実測の $\log K_{oc}$ があればより望ましいと考えられる。しかし $\log K_{oc}$ を低く見積もることはリスク評価では安全側の評価となるため、初期評価においては誤差に留意しつつ平衡分配法による推算値を用いることも可能であると考えられる。

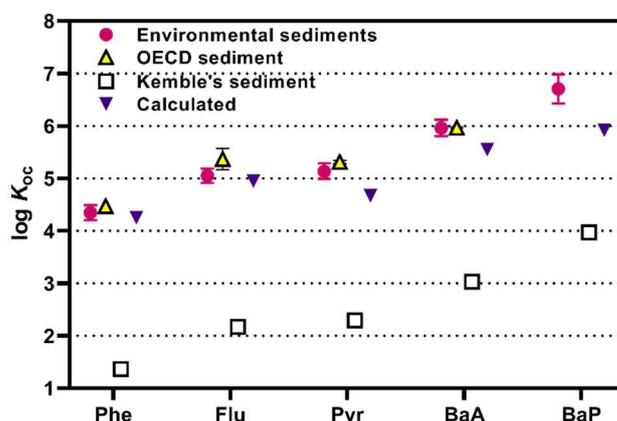


図2.11 環境底泥の $\log K_{oc}$ （底泥15種類の平均±標準偏差）と人工底泥2種類の $\log K_{oc}$ （複製試料($n = 6$)の平均±標準偏差）。計算値はKarickhoff¹¹⁾の関係式 $\log K_{oc} = 1.00 \log K_{ow} - 0.21$ を用いて算出した。

図2.12にC12-BACを用いた収着試験の結果を示した。 K_d は純水でコンディショニング及び収着試験をした場合に最も高かった。飼育水でコンディショニング及び収着試験をした場合、 K_d は約1/3になった。飼育水では、純水よりもイオン交換サイトで競合する Ca^{2+} イオンの濃度が高かったことが原因だと考えられる。pHは7.7まで上昇したが、一般的にpHの上昇は、底泥の陽イオン交換容量を増加させC12-BACの K_d を高める方向に作用すると考えられるため、純水より K_d が低値であった理由とは考えられない。しかしながら、 CaCl_2 100 mg/Lの添加は K_d に影響を与えなかった。1 mM NaOHで底泥をコンディショニングした場合、飼育水でコンディショニングをした場合に比べ、 K_d はさらに低値であった。pHの上昇が K_d を低下させることは考えにくいので、1 mM NaOH洗浄により底泥から有機物が溶出した可能性などが原因と考えられる。以上の結果から、陽イオン界面活性剤であるC12-BACにおいては収着試験における底質のコンディショニング、水質条件が K_d に大きな影響を与えることがわかった。 K_d の一般的な傾向を知るためにはより多くの条件での検討が必要である。

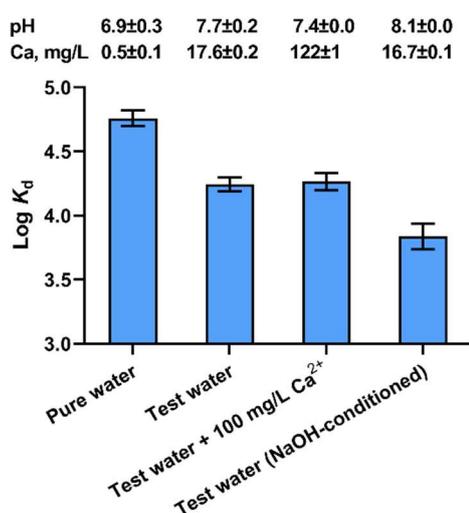


図2.12 収着試験により測定したC12-BACのlog K_d
試験にはOECD底泥を用いた。誤差バーは複製試料の標準偏差 ($n = 4$)。

5. 研究目標の達成状況

パッシブサンプリング手法によるフリー溶存濃度の測定法を5種類の物質 (Phe, Pyr, BaP, CPS, C12-BAC) について確立し、底質毒性試験系において実施した。また2種類の物質 (BaP, C12-BAC) については底質毒性試験系におけるすべての相の物質濃度を測定し、物質の分布を包括的に把握した。さらに環境底泥15種類を用いて収着試験を行い、収着係数は主に底質の有機炭素含量により決まることを示した。さらにOECD底泥の有機炭素/水分係数 K_{oc} が環境底泥と同程度であることを示した。追加の成果として、物質輸送モデルを用いて底質毒性試験系における物質の分布・分配を物質物性・底質性状と関連付けて示した。アミン類に属するC12-BACについても収着試験を行い、pHや塩濃度の影響について考察した。サブテーマ2の成果は英文国際学術誌に2報の原著論文として掲載された。以上よりサブテーマ2で掲げた目標はすべて達成され、さらに追加の成果をあげたことから、サブテーマ2では当初目標を大きく越えた成果が得られたと評価する。

6. 引用文献

- 1) Mayer, P.; Parkerton, T. F.; Adams, R. G.; Cargill, J. G.; Gan, J.; Gouin, T.; Gschwend, P. M.; Hawthorne, S. B.; Helm, P.; Witt, G.; You, J.; Escher, B. I., Passive sampling methods for contaminated sediments: Scientific rationale supporting use of freely dissolved concentrations. *Integr. Environ. Assess. Manage.*

- 2014, 10, (2), 197-209.
- 2) Xu, Y.; Spurlock, F.; Wang, Z.; Gan, J., Comparison of five methods for measuring sediment toxicity of hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, (24), 8394-8399.
 - 3) Jonker, M. T. O.; Muijs, B., Using solid phase micro extraction to determine salting-out (Setschenow) constants for hydrophobic organic chemicals. *Chemosphere* 2010, 80, (3), 223-227.
 - 4) Mayer, P.; Tolls, H.; Hermens, J. L. M.; Mackay, D., Equilibrium sampling devices. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, (9), 185A-191A.
 - 5) Niu, L.; Henneberger, L.; Huchthausen, J.; Krauss, M.; Ogefere, A.; Escher, B. I., pH-Dependent Partitioning of Ionizable Organic Chemicals between the Silicone Polymer Polydimethylsiloxane (PDMS) and Water. *ACS Environ. Au* 2022.
 - 6) Muijs, B.; Jonker, M. T. O., Temperature-Dependent Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, (12), 4517-4523.
 - 7) Fischer, F. C.; Hiki, K.; Soetaert, K.; Endo, S., Mind the Exposure Gaps-Modeling Chemical Transport in Sediment Toxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.* 2021, 55, (17), 11885-11893.
 - 8) Kemble, N. E.; Dwyer, F. J.; Ingersoll, C. G.; Dawson, T. D.; Norberg-King, T. J., Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 1999, 18, (2), 222-230.
 - 9) Hiki, K.; Fischer, F. C.; Nishimori, T.; Watanabe, H.; Yamamoto, H.; Endo, S., Spatiotemporal Distribution of Hydrophobic Organic Contaminants in Spiked-Sediment Toxicity Tests: Measuring Total and Freely Dissolved Concentrations in Porewater and Overlying Water. *Environ. Toxicol. Chem.* 2021, 40, (11), 3148-3158.
 - 10) Chen, Y.; Droge, S. T. J.; Hermens, J. L. M., Analyzing freely dissolved concentrations of cationic surfactant utilizing ion-exchange capability of polyacrylate coated solid-phase microextraction fibers. *J. Chromatogr. A* 2012, 1252, (0), 15-22.
 - 11) Karickhoff, S. W., Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere* 1981, 10, (8), 833-846.
 - 12) Nguyen, T. H.; Goss, K.-U.; Ball, W. P., Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, (4), 913-924.
 - 13) Jonker, M. T. O., Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to cellulose. *Chemosphere* 2008, 70, (5), 778-782.

II-3 平衡分配法の最適化と包括的な底質リスク評価手法の構築

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康領域	生態毒性研究室	渡部春奈
環境リスク・健康領域	生態毒性研究室	山本裕史

<研究協力者>

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康領域	生態毒性研究室	日置恭史郎
環境リスク・健康領域	環境リスク科学研究推進室	松崎加奈恵
環境リスク・健康領域	曝露影響計測研究室	遠藤智司

東京大学

環境安全研究センター	中島典之
------------	------

[要旨]

サブテーマ3では、現行の平衡分配法に基づき暫定的な底質リスク評価を行い、サブテーマ1の底質毒性試験およびサブテーマ2の試験物質の分配挙動評価の対象とする化学物質の選定を行うこと、次サブテーマ1およびサブテーマ2の試験結果を踏まえて平衡分配法モデルの最適化や性状の異なる底泥間で換算可能な濃度単位の指標の検討を行い、最後に包括的な底質リスク評価手法を構築することを目的とした。

平衡分配法による暫定的なリスク評価では、化審法の優先評価化学物質および環境リスク初期評価対象物質等のうち底質移行性が懸念され、かつPECが入手できた計142物質についてECHAガイダンス文書に基づきPNECを算出し、黒本調査等の環境中最大濃度をPECとしてPEC/PNECを算出した結果、58物質(41%)でPEC/PNEC > 1となり底質リスクが懸念されることが分かった。58物質の中から、PEC/PNEC値や物性等を踏まえて疎水性有機化合物11物質、アミン類4物質、金属2物質を試験候補物質として選定した。

平衡分配法の最適化では、まず現行の平衡分配法とサブテーマ1で得られた底質毒性試験結果の比較、さらに既存文献データを用いた平衡分配法および底質毒性試験結果による種の感受性分布(SSD)の比較を行ったところ、底生生物と生物分類が近い甲殻類や昆虫の毒性値、環境底泥(試験底泥)に近い有機物含有量(f_{oc})や有機炭素/水分分配係数(K_{oc})を用いることで平衡分配法による評価の信頼性が上がり、スクリーニング評価として平衡分配法は活用可能であることが示された。平衡分配式のパラメータとして f_{oc} の最適化のため国内底泥の f_{oc} 分布を調査した結果、中央値は約2%であり、現行のデフォルト値10%では毒性を過小評価していることを明らかにした。性状の異なる底泥間で互換性のある濃度単位の指標として、サブテーマ1および2より間隙水の C_{free} が挙げられた。さらに、試験物質や曝露条件および試験生物の生息位置に応じて、適切な位置での曝露濃度を測定することが重要であると考えられた。

最後にすべての検討結果および諸外国制度の最新情報を踏まえて本研究から包括的な底質リスク評価手法に対する提言事項を整理し、環境リスク初期評価および化審法リスク評価に対し、包括的な底質リスク評価手法案を提案した。評価は段階的なものとし、平衡分配法をスクリーニング評価として活用する、イオン性有機化学物質についても K_a をトリガー値として評価対象とする、平衡分配法による評価の信頼性を上げるためには水生生物の毒性値に甲殻類等を含める、底質毒性試験を用いた高次のリスク評価の際に、 C_{free} を用いてPNECやPECの精緻化を行うといった提言を組み入れた。

1. 研究開発目的

サブテーマ3では、現行の平衡分配法に基づき暫定的な底質リスク評価を行い、サブテーマ1の底質毒性試験およびサブテーマ2の試験物質の分配挙動評価の対象とする化学物質の選定を行うこと、さらに、サブテーマ1およびサブテーマ2の試験結果を踏まえて平衡分配法のパラメーター等の最適化を

行い、性状の異なる底泥間で換算可能な濃度単位の指標の検討および包括的な底質リスク評価手法を構築することを目的とした。

2. 研究目標

化審法の優先評価化学物質や環境リスク初期評価対象物質などから底質への移行性が懸念される物質 ($\log K_{ow} > 3$ など) を対象に、平衡分配法による予測毒性値PNECを用いてリスク評価 (PEC/PNEC) を実施し、吸着特性や分配挙動が異なると考えられる①疎水性有機化合物、②アミン類、③金属から数種類ずつ、試験候補物質を選定する。そして、サブテーマ1の毒性試験結果およびサブテーマ2の分配挙動解析結果を踏まえ、平衡分配式で用いるパラメーターなどの最適化や性状の異なる底泥間で互換性のある濃度単位の指標の考案など、包括的な底質リスク評価手法を提案する。

3. 研究開発内容

3. 1 試験候補物質の選定

サブテーマ1の底質毒性試験、サブテーマ2の試験中の分配挙動評価の対象とする試験物質を選定するため、化審法の優先評価化学物質 (令和元年度4月時点233物質) や環境省の環境リスク初期評価1~17巻 (平成30年度) において生態リスク評価が実施された308物質 (優先評価物質との重複あり)、その他環境底泥中の検出物質のうち、底質への移行性が懸念される物質 ($\log K_{ow} > 3$ など) を対象に、既存の平衡分配法に基づき予測無影響濃度PNECを算出し、環境中予測底質濃度PECとの比PEC/PNECによって暫定リスク評価を行った。PEC/PNEC > 1となった物質から、吸着特性や分配挙動が異なると考えられる①疎水性有機化合物、②アミン類、③金属から数種類ずつ、試験候補物質を選定した。

3. 1. 1 平衡分配法によるPNEC_{sed}の算出

平衡分配法とは、対象物質が底質粒子と水の間で平衡分配式に従って分配していると仮定し、水生生物に対する水中の予測無影響濃度 (PNEC_{water}) から、平衡分配式に基づき底質のPNEC (PNEC_{sed}) を推定する方法である。EUの化学物質管理・規制を所管するECHA (欧州化学機関) のガイダンス文書¹⁾では底質粒子の起源は浮遊物質であるとして、PNEC_{water} (mg/L) から浮遊物質/水分配係数 ($K_{susp-water}$) を用い、次式に基づいてPNEC_{sed}を算出する。

$$PNEC_{sed}(mg/kg\ dwt) = \frac{K_{susp-water}}{RHO_{susp}} \cdot PNEC_{water} \cdot 1000 \cdot CONV_{susp} \quad (式1)$$

$$K_{susp-water} = F_{water\ susp} + F_{solid\ susp} \cdot \frac{F_{oc} K_{oc}}{1000} \cdot RHO_{solid} \quad (式2)$$

$K_{susp-water}$: 浮遊物質/水分配係数 (m^3/m^3), RHO_{susp} : 浮遊物質のかさ密度 (kg_{wwt}/m^3) (デフォルト値=1,150), $CONV_{susp}$: 湿重換算係数 (デフォルト値=4.6), $F_{water\ susp}$: 浮遊物質の液相率 (デフォルト値=0.9), $F_{solid\ susp}$: 浮遊物質の固相率 (デフォルト値=0.1), F_{oc} : 有機炭素重量比 (デフォルト値=0.1), K_{oc} : 有機炭素/水分配係数, RHO_{solid} : 固体密度 (デフォルト値=2,500 kg/m^3)

デフォルト値に基づき式1と式2を整理すると、式3となる。

$$PNEC_{sed}(mg/kg\ dwt) = (3.6 + 0.1K_{oc}) \cdot PNEC_{water} \quad (式3)$$

PNEC_{water}は、化審法の詳細リスク評価や化学物質の環境リスク初期評価において、水生生物の毒性試験の収集・信頼性評価および不確実係数の適用によって算出された値を用いた。 K_{oc} の信頼できる測定値が得られていない物質については、US EPAのKOCWIN (EPI Suiteに含まれる) を用いて、構造情報から推計するMCI (Molecular Connectivity Index: 一次分子結合指数) 法で求めた推定値を使用した。 $\log K_{ow} > 5$ の物質は底質に強く吸着するため、底質粒子摂取等による曝露影響があるとして、求めたPNEC_{sed}をさらに10で割った¹⁾ (ガイダンス文書では、正確にはPEC/PNECを10倍にする)。

3. 1. 2 底質環境中予測濃度 PEC_{sed}

PEC_{sed} は化審法の詳細リスク評価や化学物質の環境リスク初期評価時に収集されたデータ（環境省化学物質環境実態調査（黒本調査）など）に加えて、門上らの「自動同定・定量データベースシステム（AIQS-DB）」を用いたGC/MSによる洞海湾の底質スクリーニング調査²⁾などの論文報告値も用いた。淡水域と海水域、複数年のデータがある場合は、過去10年（2008～2018年）の最大値を使用した。ただし2008年以前のデータしかない場合はなるべく新しい最大データを用いた。

3. 2 平衡分配法モデルの最適化

3. 2. 1 平衡分配法と底質毒性試験結果の比較

3. 1で算出した平衡分配法による $PNEC_{sed}$ と底質毒性試験結果による $PNEC_{sed}$ の比較を行った。底質毒性試験は環境省試験データ（セスジユスリカ底質添加試験）およびSpiked Sediment Toxicity Database³⁾、その他学術論文より収集した。 $PNEC_{sed}$ の導出は、化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価の技術ガイダンス⁴⁾（ECHAガイダンス文書¹⁾に準拠）に基づき、異なる生息・食餌形態をもつ底生生物種数に応じて、表3.1に示すアセスメント係数（AF）を適用した。また、AFを適用せずに直接毒性値を比較するため、式4により水生生物の毒性値 C_{water} から底質毒性値 C_{sed} に変換して比較を行った。

$$C_{sed}(mg/kg\ dwt) = K_{oc} \cdot f_{oc} \cdot C_{water}(mg/L) \quad (式4)$$

表3.1 底質毒性試験による $PNEC_{sed}$ 導出のためのアセスメント係数

入手可能な試験結果	アセスメント係数
急性毒性値がある（LC50）	1000
1生物種の慢性毒性値がある（NOEC）	100
生息・食餌条件が異なる2生物種の慢性毒性値がある（NOEC）	50
生息・食餌条件が異なる3生物種の慢性毒性値がある（NOEC）	10

3. 2. 2 平衡分配法と底質毒性試験による種の感受性分布の比較

平衡分配法による毒性値と底質毒性試験による毒性値を、種の感受性分布（SSD）を用いて比較した。平衡分配法における水のみ試験データはEnvironTox ver 1.3.0 (<https://envirotoxdatabase.org>)より取得し、底質毒性試験データはSpiked Sediment Toxicity Database³⁾とその他学術論文より収集した。ともにLC50を指標とする試験データと $\log K_{OW} > 3$ の物質のみを対象とした。水のみ試験データは式5の平衡分配式によって底質毒性値 $C_{sed,EqP}$ （mg/kg-oc）に変換した。

$$C_{sed,EqP} = C_{water} \cdot K_{oc} \quad (式5)$$

さらに多くの水のみ試験の期間が24-96時間であるのに対し、底質毒性試験は10-14日間で実施されているため、式6、7を用いて試験期間の補正をおこなった。なお式6、7における $C_{sed,EqP}$ の添え字は試験期間（日）を示しており、式は既往文献¹²⁾と収集したデータの解析によって取得した。

$$C_{sed,EqP,10} = C_{sed,EqP,t} \div \{(0.0988 \cdot \log K_{OW} + 0.981) \cdot 2.56\} \quad t < 4 \quad (式6)$$

$$C_{sed,EqP,10} = C_{sed,EqP,t} \div 2.56 \quad 4 \leq t < 10 \quad (式7)$$

試験期間補正済みの平衡分配法の毒性値と底質毒性試験の毒性値に関して、それぞれ3生物種以上のデータを有する物質の対数正規分布に従うSSDを求め、HC50およびHC5（50%および5%の種が影響を受ける濃度）を比較した。

3. 2. 3 国内底泥の有機炭素含有量

サブテーマ2の収着試験による収着係数 K_d と有機炭素/水分配係数 K_{oc} の測定結果（II-2の4. 3）により、中性有機化合物の底質粒子収着においては有機物が支配的な役割を担うことを示された。収着試験に用いた霞ヶ浦、荒川河口、つくば市近郊河川や池の底泥の f_{oc} は0.14～9.1%（II-1の表1.1、II-2の

図2.10) と大きく幅があったが、ECHAガイダンス文書のデフォルト値である10%が使用されている。 f_{oc} が10%というのは閉鎖的な水域で植物の堆積や人為的有機汚染などで有機物が堆積している泥状底泥のレベルであり、上記の通り、国内底泥を代表しているとは言い難い。式1、2に示す通り、 f_{oc} が高いほど $PNEC_{sed}$ は高くなるため、安全側の評価にはならなくなる。そこで国内底質調査データにより国内底泥の f_{oc} のレベルを調査した。調査対象は環境省の黒本調査（平成27年度～令和元年度）、国土交通省の平成12年全国一級河川におけるダイオキシン類に関する実態調査等の結果、九都府市首脳会議環境問題対策委員会水質改善専門部会による東京湾の底質調査（平成27年度～令和元年度）とした。また、 f_{oc} を測定した試料は限られていることから強熱減量との相関関係を評価した。

3. 2. 4 有機炭素/水分配係数 K_{oc}

3. 2. 1の平衡分配法と底質毒性試験結果との比較や、サブテーマ2で実施された人工底泥を用いた底質毒性試験中の分配挙動解析より得られた K_{oc} と推定値による K_{oc} の比較(II-2の4.3)を踏まえ、適切な K_{oc} の選択について考察を行った。

3. 3 底質毒性試験結果に影響する試験条件の検討

淡水産ヨコエビ*H. azteca*とユスリカ*Chironomus dilutus*の既存の底質毒性試験データを用いて、毒性値のばらつきに影響する試験条件を検討した。底質毒性試験データはSpiked Sediment Toxicity Database³⁾とその他学術論文より収集し、同一物質・同一生物種の組み合わせに対して複数回の試験データが存在するデータを対象にした。さらに、底質濃度を試験前後に一度でも実測していないデータと、極端な試験条件（水温18℃以下や底泥のaging中に凍結するなど）のデータを除外した。収集した有機物含有量で補正した毒性値LC50 (mg/kg-oc) は式8の線形回帰モデルで解析し、補正済み赤池情報量基準 (AICc) を用いて最も予測力の高いモデル群を選択した。

$$\log LC50 = \beta_0 + \beta_{1,i} \cdot Species_i + \beta_{2,j} \cdot Chemical_j + \beta_{3,k} \cdot Sediment\ type_k + \beta_4 \cdot Aging\ period + \beta_{5,l} \cdot Spiking\ method_l + \beta_{6,m} \cdot Water\ renewal_m + \beta_{7,n} \cdot Feeding_n + \beta_8 \cdot Sediment-water\ ratio + r_n \quad (式8)$$

なお式8の β は回帰係数を示し、Species、Chemical、Sediment type（環境底泥/人工底泥）、Spiking method（溶媒添加法/シェルコーティング法/砂コーティング法/水スパイク法）、Water renewal（換水あり/なし）、Feeding（給餌あり/なし）は0/1の値をとるダミー変数、Aging periodとSediment-water ratioは連続変数を示し、 r_n は試験機関の違いを考慮したランダム効果を示している。式7の回帰モデルは、全データ、*H. azteca*のみのデータ、最も試験数の多いピフェントリンのみのデータの3セットで解析し、推定結果の頑健性を検証した。

3. 4 性状の異なる底泥間で換算可能な濃度単位の指標の検討

サブテーマ1で実施された底質毒性試験と水のみ試験の比較、人工底泥と環境底泥を用いた底質毒性試験の比較(II-1の4.1)およびサブテーマ2の性状の異なる底泥間での K_{oc} の比較(II-2の4.3)を踏まえて、性状の異なる底泥間で換算可能な濃度単位の指標の検討を行った。

3. 5 包括的な底質リスク評価手法の検討

まず本研究結果から包括的な底質リスク評価手法に対し提言できることを整理した。さらに諸外国の底質リスク評価手法¹⁵⁾⁶⁾を参考に、現在、国内で底質リスク評価が施行されている、化審法の優先評価化学物質のリスク評価ガイダンス⁴⁾および環境リスク初期評価の底質の生態リスク評価手法（暫定案）に対し、包括的な底質リスク評価手法案を作成した。

4. 結果及び考察

4. 1 試験候補物質の選定

4. 1. 1 平衡分配法による暫定的なリスク評価

環境リスク初期評価の1～17巻で生態リスク評価が実施された308物質および化審法の優先評価化学物質232物質（平成31年度時点）のうち、 $\log K_{ow} > 3$ またはその他の吸着メカニズムによって底質への移行性が懸念される物質（金属や界面活性剤など）に対し平衡分配法により $PNEC_{est}$ を算出し、このうちPECが入手できた計142物質（ $\log K_{ow} > 3$ は105物質、その他は37物質）についてPEC/ $PNEC_{est}$ を算出した。なお、環境リスク初期評価と化審法で重複して評価されている15物質については、主に化審法によるリスク評価結果を採用した。PECが測定下限値のため、不等号付きで0.1以上となった物質も図3.1の度数分布図に分けて示した。142物質中58物質（41%）で $PEC/PNEC_{est} > 1$ となり、高いものは1000を超えた。 $\log K_{ow}$ とPEC/ $PNEC_{est}$ の関係を図3.2に図示すると、 $\log K_{ow} > 3$ の71物質（PEC/ $PNEC_{est}$ が未満値のものや金属類などは除く）のうち約半分の35物質が $PEC/PNEC_{est} > 1$ となった。 $\log K_{ow} > 3$ の物質のうちPEC/ $PNEC_{est}$ の上位10物質を表3.2に示す。なお、令和2年度以降に入手できた毒性情報や環境中濃度等を用いて再計算を行ったため、中間評価報告書とは順位が異なっている。上位10物質中6物質がフェニトロチオン（MEP）、クロルピリホス（CPS）などの殺虫剤、3物質がPAHsであった。殺虫剤は甲殻類に対する感受性が高いため $PNEC_{sed}$ が低くなり、高いリスクが示されたが、CPSは最近の測定データがなく1990年の黒本調査結果を採用したため、過大評価されている可能性がある。PAHsのPECは主に洞海湾のデータであり²⁾、クリセンやフルオランテン（Flu）以外のPAHsもPEC/ $PNEC_{est}$ が高いものが多かった。ノニルフェノール（NP）は、化審法の詳細リスク評価書の暫定案（平成30年度時点）の $PNEC_{water}$ としてメダカ多世代試験結果が用いられたため、甲殻類や多毛類が多い底生生物とは感受性が異なる可能性が懸念される。

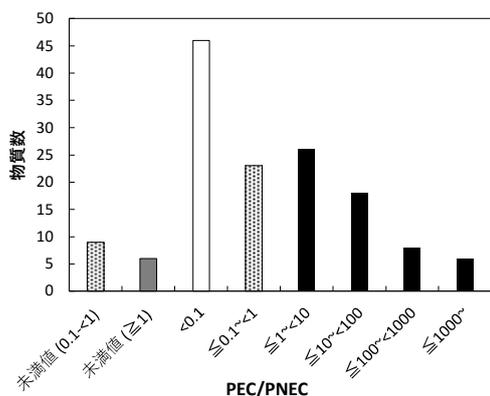


図3.1 PEC/PNECの度数分布

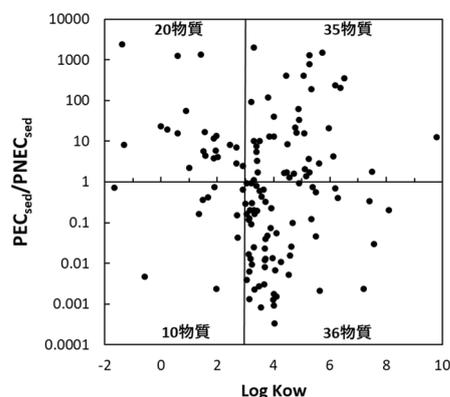


図3.2 $\log K_{ow}$ とPEC/PNECの散布図

表3.2 PEC/PNEC上位10物質（ $\log K_{ow} > 3$ ）

巻	優	CAS	物質名	$\log K_{ow}$	$PNEC_{water}$ ($\mu\text{g/L}$)	生物群	不確実係数	Koc	$PNEC_{sed}$ ($\mu\text{g/g dw}$)	PEC ($\mu\text{g/g}$)	水域	調査年度	PEC/PNEC
2		122-14-5	フェニトロチオン	3.3	2.1.E-04	ミジンコ慢	100	1194	2.6.E-05	0.051	海水	2012	2000
9		218-01-9	クリセン	5.73	6.3.E-03	藻類急	100	400000	2.5.E-02	38	淡水	2008	1500
8		2921-88-2	クロルピリホス	5.27	3.5.E-04	ミジンコ急	100	7170	2.5.E-05	0.033	淡水・海水	1990	1300
2	86	25154-5-3, 84852-15-3など	ノニルフェノール	5.28	6.3.E-02	魚類慢	10	10000	6.3.E-03	5	淡水	2004	790
8		206-44-0	フルオランテン	5.07	6.0.E-03	アミ慢	100	93300	5.6.E-03	2.3	海水	2017	410
5		120-12-7	アントラセン	4.45	2.8.E-03	魚類急	1000	30000	8.4.E-03	3.42	海水	2007	410
8		52645-53-1	ペルメトリン	6.5	2.0.E-04	アミ急	100	1815	3.7.E-06	0.0013	淡水	2000	350
1		118-74-1	ヘキサクロロベンゼン	6.2	2.0.E-03	藻類慢	1000	6195	1.2.E-04	0.03	海水	2009	240
1		50-29-3	p,p'-DDT	6.38	2.0.E-03	魚類急	100	168600	3.4.E-03	0.7	海水	2009	210
1		72-20-8	エンドリン	5.34	1.0.E-03	魚類急	100	20090	2.0.E-04	0.038	海水	2008	190

巻は環境リスク初期評価の巻号、優は化審法優先評価化学物質の通し番号

また、 $\log K_{ow} \leq 3$ または $\log K_{ow}$ 未算出でも $PEC/PNEC_{est} > 1$ となった物質は21物質あり（図3.2）、ヒドラジン、ジクロロポス、ヒドロキノン、アニリン類やアミン類が挙げられた。これらの物質の中には K_{oc} の推定値を用いたために $PNEC_{sed}$ が小さくなり、リスクが過大評価された可能性もあることに留意する。しかし暫定的には、現行の底質リスク評価手法に基づき評価対象種を $\log K_{ow} > 3$ の物質だけにすると、36%の物質の底質リスクを見落とす可能性があることが分かった。

4.1.2 試験候補物質の選定

4.1.1のPEC/PNECを参考に、分配挙動が複雑な揮発性物質や酸性物質、実験室におけるバックグラウンド汚染が懸念されるフタル酸エステル類やPOPs規制物質は除外して、試験候補物質の選定を行った結果、疎水性有機化合物として、殺虫剤よりMEP、CPS、フェノール類よりNP、4-t-オクチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール、PAHsとその誘導体よりFlu、ピレン(Pyr)、ベンゾ[a]ピレン(BaP)、アントラキノンなどの計11物質が候補として挙げられた（表3.3）。MEPとCPSでは、近年使用量が増加傾向にあるCPSを試験物質とした。殺菌剤のトリクロカルバン(TCC)は環境省による生態リスク評価は未実施であるが、類似用途のトリクロサン(TCS)の底質リスクが高かったため、環境省データから暫定的に算出したところ、 $PEC/PNEC_{est}$ は34と19番目に高かった。徳島の河川底泥では実際にユスリカに対し、TCSやTCCに由来する影響が示唆されたが⁷⁾、ヨコエビの既存試験データがないためTCCを試験物質とした。

K_{ow} だけでは底質への吸着性がうまく予測できないアミン類としては、ジフェニルアミン、優先評価化学物質でカチオン界面活性剤のN-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアルアミドが挙げられた。なお、後者は環境測定データが得られなかったため、化審法のリスク評価（一次）評価IIから、曝露シナリオによる推計モデル（G-CIEMS）の最大値をPECに用いた。同じく、現時点でPECが得られていないが、PNECが小さい物質として、4級アミンの塩化ベンザルコニウム（アルキル（C=12~16）（ベンジル）（ジメチル）アンモニウムの塩、以下BAC）やN,N-ジメチルドデシルアミンも将来的にリスクが懸念される物質として優先度が高いと考えられた。特にBACは消毒剤の有効成分として約半数の製品に含まれており、新型コロナウイルスの流行に伴い世界的に製造量が急増しているため⁸⁾、今後のリスク増加が特に懸念される物質として採用した。

表3.3 試験候補物質の暫定リスク評価結果

巻	優	分類	CAS	物質名	logKow	$PNEC_{water}$ ($\mu\text{g/L}$)	生物群	不確実 係数	K_{oc}	$PNEC_{sed}$ ($\mu\text{g/g dw}$)	PEC ($\mu\text{g/g}$)	水域	調査 年度	PEC/ PNEC
2	-		122-14-5	フェニトロチオン	3.3	0.00021	ミジンコ慢	100	1194	2.6.E-05	0.051	海水	1990	2000
8	-		2921-88-2	クロルピリホス	5.27	0.00035	ミジンコ急	100	7170	2.5.E-05	0.033	淡水・海水	1974	1300
2	86		25154-5-3, 84852-15-3など	ノルフェノール	5.28	0.063	魚類慢	10	10000	6.3.E-03	5.0	淡水	2004	790
8	-		206-44-0	フルオランテン	5.07	0.006	アミ慢	100	93300	5.6.E-03	1.1	淡水	2017	200
-	-		101-20-2	トリクロカルバン	4.90	0.014	藻類慢	100	62800	8.8.E-02	3.0	海水	2008	34
6	64		128-37-0	2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール	5.1	5.3	魚類慢	10	8183	4.4.E-01	6.9	海水	2007	16
5	-		50-32-8	ベンゾ[a]ピレン	5.97	0.005	ミジンコ急	1000	11800000	5.9.E-01	12.3	海水	2007	21
7	-		129-00-0	ピレン	4.88	0.04	ミジンコ急	100	77600	3.1.E-01	19	海水	2007	62
9	-		84-65-1	アントラキノン	3.39	0.94	アミ急	100	5207	4.9.E-01	3.7	淡水	1988	7.5
2	157		140-66-9	4-t-オクチルフェノール	4.46	0.14	魚類慢	50	3500	5.0.E-02	0.086	淡水	2010	1.7
16	-		132-65-0	ジベンゾ[b,d]チオフェン	4.38	0.6	藻類急	100	1380	8.5.E-02	0.14	海水	2008	1.6
5	-		122-39-4	ジフェニルアミン	3.5	0.27	藻類慢	100	417	1.2.E-02	0.12	海水	2002	9.8
-	153		7651-02-7	N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアルアミド	2.01 (7.35)	0.002	ミジンコ慢	100	152000	3.0.E+00	12 ^b	淡水	-	4.1
	184	ア ミ ン	68424-85-1など	アルキル(C=12~16)(ベンジル)(ジメチル)アンモニウムの塩(塩化ベンザルコニウム)	2.93	0.084	ミジンコ慢	50	271700	2.3.E+00	-	-	-	-
14	165		112-18-5	N,N-ジメチルドデシルアミン	4.50	<0.052	藻類慢	50	7400	< 3.9.E-02	-	-	-	-
15	15	金 属	7440-28-0	タリウム及びその化合物	-	0.081	ヨコエビ急	1000	Kd=2000	1.6.E-01	0.51	淡水	-	3.1
15	15		13494-80-9	テルル及びその化合物	-	12	ミジンコ急	100	Kd=79433	9.5.E+02	0.70	海水	2003	7.E-04

赤字は中間評価報告書からの修正・見直し箇所

金属類として中間評価報告書では、タリウムやテルルをPEC/PNECが高い物質として挙げたが、用いた K_{oc} の推定値に課題があった。 K_{oc} の推定に用いたUS EPAのKOCWINは、無機化学物質は適用範囲外であり、過小な K_{oc} (13.22) によりPNECが低くなり、リスクが過大評価された可能性がある。タリウムは有機物や鉄への吸着性は低く、粘土鉱物やマンガン酸化物等に吸着しやすいとされ⁹⁾、テルルも底質中で、有機物画分より酸抽出画分の方が多いことが報告されている¹⁰⁾。よって式3のような有機物 (f_{oc}) への吸着に基づく式は有効ではないため、水-底質分配定数 K_d によるシンプルな平衡分配式 $PNEC_{sed} = K_d \times PNEC_{water}$ を用いて再計算を行った。底泥を用いた収着実験から算出された K_d (タリウムは2000 L/kg⁹⁾、テルルは約79433 ($\log K_{oc} = 4.9$ ¹⁰⁾) を用いて $PNEC_{sed}$ を算出すると、タリウムは0.16、テルルは950となり、PEC/PNECもタリウムは1300から3.1、テルルは10から 7.3×10^{-4} と低くなった。ただし K_d も底泥中の粘土鉱物やマンガンなどの含有量によって変化するため、文献値の底泥と成分が異なる場合は、過大あるいは過小評価となっている可能性に留意する必要がある。また金属は、疎水性中性物質やアミン類とは測定方法も生物利用性画分に関するアプローチも大きく異なるため、本研究では疎水性中性物質とアミン類より炭素鎖長12のBACのみ対象とすることとした。

4. 2 平衡分配法モデルの最適化

4. 2. 1 平衡分配法と底質毒性試験の比較

サブテーマ1の底質毒性試験で算出された毒性値(LC50)と他の底生生物の文献値から表3.1に基づき導出した $PNEC_{sed}(exp)$ と、表3.3の平衡分配法による $PNEC_{sed}(est)$ を図3.3(a)に示した。NPとFluは $PNEC_{sed}(est)$ の方が2桁以上低くなり、平衡分配法の方が安全側の評価となった。NPの場合、前項で述べた通り、キーデータとしてメダカ多世代試験のNOECが用いられており、毒性を過大評価している可能性がある。Fluの場合はアミの慢性毒性値にアセスメント係数(AF) = 100を適用し、Fluが $\log K_{ow} > 5$ のためさらに10で除したことで小さな値になった。一方、BaPは底質毒性試験による $PNEC_{sed}(exp)$ の方が3桁以上低い値となった。底質毒性試験は本研究よりヨコエビの急性毒性値(LC50)および文献よりユスリカ属*C. dilutus*の慢性毒性値(NOEC = 0.03 mg/kg)が得られており、ユスリカの慢性毒性値にAF = 100を適用し 3.0×10^{-4} mg/kgと低くなった。平衡分配法ではAF = 10000を適用した上で0.59 mg/kgであり、BaPの場合は平衡分配法が必ずしも安全側の評価にならないことが示された。

PNECの場合、キーデータとなる水生生物と底生生物の感受性差、入手可能なデータ数によって変わるAFの影響を大きく受ける。そこで、水生生物の既存のキーデータではなく甲殻類の急性毒性値を用い、直接毒性値を比較するため、式4より甲殻類の急性毒性値に K_{oc} および f_{oc} (底質毒性試験時の値とする)をかけて予測毒性値 $C_{sed}(est)$ を算出し、本研究で得られたヨコエビの実験毒性値LC50と比較したところ、BaP、MBTとその変化物でその差は10倍以内に収まり、BaPは同程度になった(図3.3(b))。BaPの平衡分配法に用いたミジンコ*D. pulex*の急性毒性値は同じであることから、PNECでの差は $PNEC_{sed}(exp)$ でキーデータに用いたユスリカ属の感受性が本研究で用いたヨコエビの感受性より著しく高かったことが原因とみられる。CPSは淡水産の*H. azteca*は平衡分配法との差が約10倍以内であったが、海産の*G. japonica*とは2桁以上異なった。*G. japonica*のLC50は設定値であることから、淡水産と海産の感受性差を論じるには更なるデータの蓄積が必要である。NP、Flu、TCC、BACは平衡分配法の方がまだ1桁以上小さいことから、さらに水生生物の毒性値を*H. azteca*の急性毒性値(CPSとBACはサブテーマ1で実施した10日間水のみ試験のLC50)とすると、ほぼすべて10倍以内の差に収まった。すなわちヨコエビの底質毒性値は、平衡分配法で水生生物の毒性値として感受性が同等な生物種のデータを用いると、ある程度予測可能であることが分かった。また、平衡分配法はよく「底生生物は主に間隙水から曝露を受けている」と仮定していると言われるが¹⁾、正確には「底質濃度と間隙水濃度と底生生物が平衡状態にあり、底生生物は水からの曝露、任意の平衡状態にある相(間隙水または底質)からの曝露(呼吸や摂餌、接触による)、またはその両方から同等の曝露を受けている」と仮定しており⁹⁾¹¹⁾、間隙水を主要な曝露経路と限定しているわけではない。実際サブテーマ1の表1.3よりBaPではDOM収着態の寄与が示唆されたが、*H. azteca*の96h-LC50を用いた平衡分配法による予測毒性値は実験毒性値の約3倍程度であり、スクリーニング評

価としては許容範囲内であると考えられる。

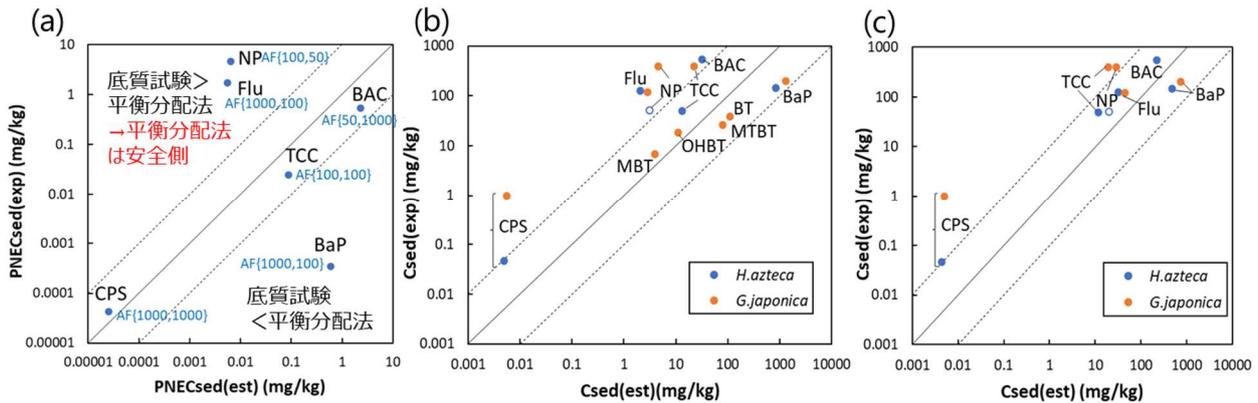


図3.3 平衡分配法 (X軸) と底質毒性試験 (Y軸) の比較 : (a) $PNEC_{sed}$ 、(b)(c) 急性毒性値 C_{sed}
 (a)の青字は適用した不確か係数{平衡分配法, 底質毒性試験}、(b)の平衡分配法は甲殻類のLC50またはEC50より算出、(c)の平衡分配法はヨコエビのLC50から算出 (f_{oc} は底質毒性試験と同じに設定)、底質毒性試験は(b)(c)ともに本研究のLC50

4. 2. 2 平衡分配法と底質毒性試験による種の感受性分布の比較¹²⁾

前項の比較は限られた物質や毒性試験データに基づく比較であり、より多くの物質について感受性差も踏まえて比較する必要がある。そこで既存文献から農薬やPAHsなど10物質について平衡分配法と底質毒性試験データでそれぞれSSDを作成し、HC50およびHC5を比較したところ、10物質中7物質でHC50およびHC5の差は10倍以内であった(図3.4)。残り3物質は最大で129倍の差(硫酸エンドサルファンのHC5)があり、平衡分配法の方が毒性を過小評価する結果であった。これらの物質は平衡分配法のSSDに用いられた種数が5以下と少なかったことも影響したと考えられる。また、平衡分配法による推定は、水生生物試験データを試験期間により補正すると、より底質毒性試験の結果に近くなった。よって平衡分配法は適切な水生生物(甲殻類および昆虫類)の毒性値を選択すれば、スクリーニング評価として十分使用可能であることが示された。

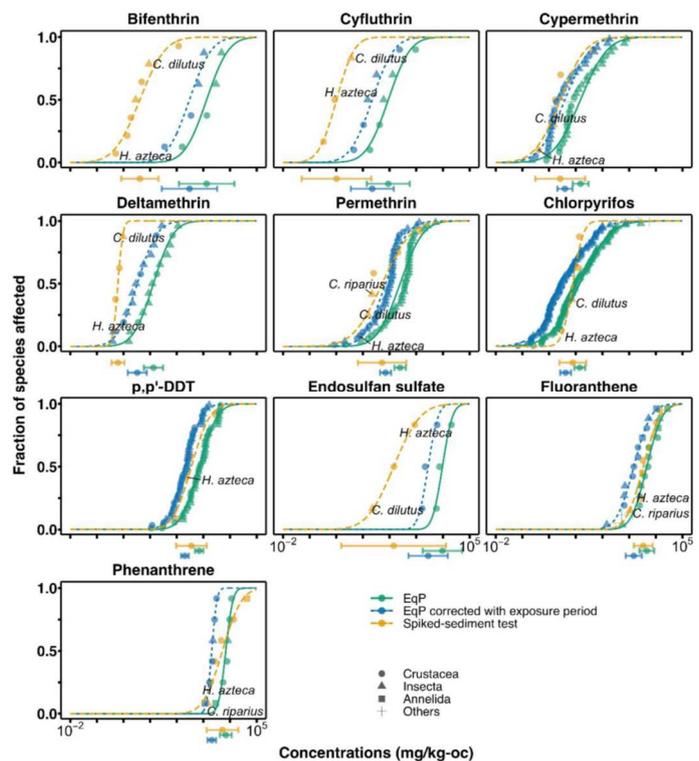


図3.4 平衡分配法および底質毒性試験によるSSD
 (文献12 Figure 2から転載)

4. 2. 3 国内底泥の有機炭素含有量

国内文献調査による底泥の全有機炭素濃度TOCのヒストグラムを図3.5に示す。淡水域の52データの範囲は0.07~6.20%、中央値2.19%、平均値2.16%、海水域の180データの範囲は0.09~4.38%で、中央値1.71%、平均値1.81%であった。それぞれ0.5%以下の底泥も多く全体の20%を占め、一方、5%超のデータは約4%、海水域は0%であった。すなわちECHAガイドラインのデフォルト値である10%は国内底泥に対しては過大であることが示された。これらのデータは23~24地点で重複して採取されているため、より広範囲の

底泥のデータを評価する必要である。そこで、黒本調査でより多くの地点で測定されている強熱減量ILとTOCの相関を調べると正の相関が示され（図3.6）、式9、10の近似直線が得られた。

$$\text{淡水域： TOC [\%] = 3.08 \times \text{強熱減量IL [\%]} + 1.97 \quad (n=52, r^2=0.89) \quad (\text{式9})$$

$$\text{海水域： TOC [\%] = 3.04 \times \text{強熱減量IL [\%]} + 2.85 \quad (n=180, r^2=0.78) \quad (\text{式10})$$

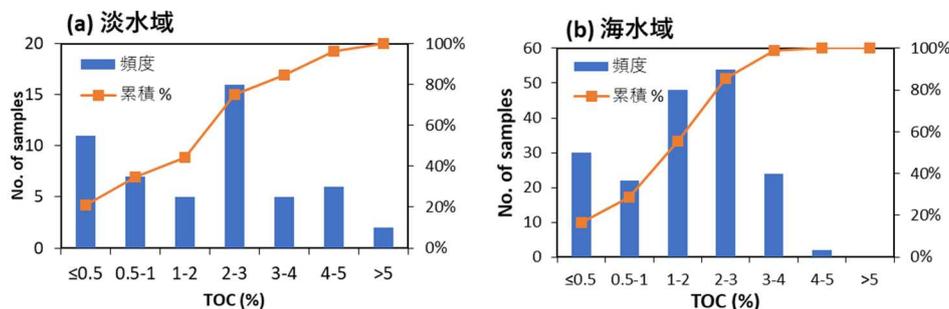


図3.5 (a) 淡水域および(b) 海水域底泥中の有機炭素濃度TOCのヒストグラム

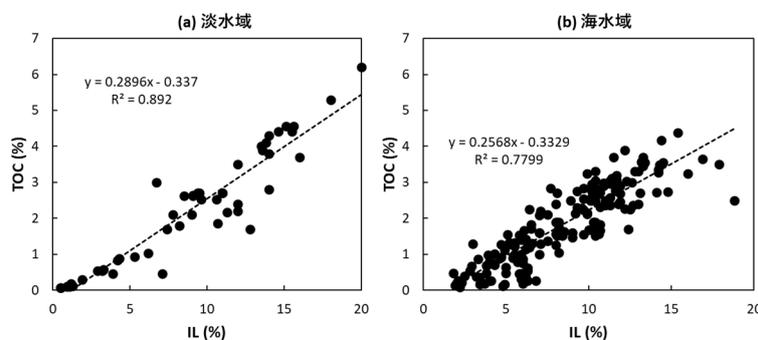


図3.6 (a) 淡水域および(b) 海水域底泥中の強熱減量ILと有機炭素濃度TOCの相関

式8、9より、黒本調査のILをTOCに換算し集計に含めると、淡水域は631データより0.01~4.64%、中央値1.14%、平均値1.44%と図3.5より中央値と平均値が低くなった。海水域は605データより0.001~7.11%、中央値1.90%、平均値1.90%と図3.5より中央値と平均値が高くなった。淡水域はILの低い河口以外の地点、海水域はILの高い閉鎖性水域のデータが追加されたためと考えられる。データを追加してもデフォルト値の10%は過大評価であることが示された。ただし、海水域の式10は淡水域と比べて r^2 が低いため、今後、 f_{oc} を実測する代わりにILを活用するためには、ILの高い地点でのTOC実測値を収集し、推定精度を上げる必要がある。

また、国内底泥のTOC、もとい f_{oc} の幅は広く、デフォルト値を1つにすることは適切ではないことも示唆される。米国では農薬の底質リスク評価を異なる3つの f_{oc} で評価している⁹⁾。よって国内底泥の場合、図3.5から、例えば0.5%、2%、5%の3パターンで評価するのが適当ではないかと考えられる。

4. 2. 4 有機炭素/水分配係数 K_{oc}

平衡分配式は f_{oc} で補正すると式5の通り、水生生物の毒性値と K_{oc} のみで求まるため、予測の信頼性を上げるには適切な水生生物の毒性値（4. 2. 2参照）と K_{oc} を用いることが重要である。サブテーマ2の4. 3収着試験により、国内15地点の環境底泥の K_{oc} は概ね一定で、ピートモスをモデル有機物として調製したOECD人工底泥の K_{oc} は環境底泥の K_{oc} とよく一致していることが示された。一方、セルロースを用いて作製したKemble人工底泥の K_{oc} は他より3桁程度低く、平衡分配法においてKemble人工底泥により求めた K_{oc} を用いる毒性を過大評価することが示唆された。サブテーマ2で述べた通り、 K_{oc} は実測値（特にパッシブサンプラー法により測定したもの）を用いることが望ましいが、 $\text{Log } K_{ow}$ からの推定 K_{oc} は環境底泥およびOECD人工底泥の K_{oc} と同程度かやや低い（1 log値以内）程度であり、安全側の評価となる

ためスクリーニング評価としては推定 K_{oc} を平衡分配式に用いてもよいと考えられる。ただし、 K_{oc} の推定値も、US EPAのKOWWINのMCI法とLog K_{ow} 法で2桁の差がある物質もあるため、誤差に留意しつつ使用することが重要である。また、今回検証した環境底泥はすべて関東県内であり、土壌特性が異なる他の地域の環境底泥を用いた検証も今後必要であると考えられる。

4. 3 底質毒性試験結果に影響する試験条件の検討¹³⁾

4. 2では平衡分配法による評価の妥当性について検討したが、底質毒性試験もサブテーマ1で示した通り、試験条件や生物種によって試験結果にばらつきがみられる。そこで淡水産ヨコエビ*H. azteca*とユスリカ*C. dilutus*の既存の底質毒性試験データを用いて、毒性値のばらつきに影響する試験条件を検討した結果、最も重要な条件は底泥のタイプ（環境底泥、人工底泥）であり、 f_{oc} で補正しても、人工底泥を用いた毒性値の方が環境底泥の毒性値より小さい傾向が示された。原因として人工底泥に用いた有機物成分の違い、もとい K_{oc} の違いが挙げられる。人工底泥のデータ数が少ないことにも留意する必要があるが、サブテーマ2および前項でも述べた通り、北海道産ピートモスを用いた人工底泥の K_{oc} は国内底泥と同程度かやや低い程度であったため、主に落ち葉やセルロースを用いた人工底泥の毒性値が過大に低くなっていたと考えられる。一方、底泥のaging期間やスパイク方法を含めた他の要因は大きく影響していない、あるいは特定の物質にのみ影響することが分かった。

4. 4 性状の異なる底泥間で換算可能な濃度単位の指標の検討

サブテーマ1で実施された底質毒性試験と水のみ試験の比較、人工底泥と環境底泥を用いた底質毒性試験の比較（II-1の4. 1）およびサブテーマ2のパッシブサンプラーを用いた性状の異なる底泥の収着実験結果（II-2の4. 3）より、異なる曝露経路や性状の異なる底泥間で換算可能な濃度単位として間隙水フリー溶存態 C_{free} の有効性が示された。ただしBaPでは間隙水 C_{free} だけでなくDOM結合態の影響が示唆されたことにも留意する必要がある。また、*H. azteca*を用いたCPSの環境底泥と水のみ試験の比較では、 f_{oc} が0.12%と著しく低い砂状底泥では、間隙水 C_{free} から予測されるほどの致死影響がみられず、原因としてヨコエビの生息位置（底泥表面付近）では、鉛直方向の濃度勾配が大きく、底泥表面の濃度が間隙水濃度よりも著しく低下していたことが挙げられた。さらに*G. japonica*に対しては上層水の寄与も示唆された。よって間隙水 C_{free} を基本としつつ、試験物質や曝露条件および試験生物種の生息条件に応じて、適切な位置にパッシブサンプラーを設置して C_{free} を実測することが推奨される。ただし、底泥表面での局所濃度は実測が難しいため、上層水や間隙水の濃度測定とともに、サブテーマ2で確立した物質輸送モデルにより、物質の溶脱や濃度勾配の程度を推定することことも試験結果の解釈に有用であると考えられる。いずれも更なる物質や異なる生息条件をもつ生物種を用いた検証が必要である。

4. 5 包括的な底質リスク評価手法の検討

4. 5. 1 本研究の実験的検討から提言される事項

底生物に対する曝露経路と生物利用性を考慮した包括的な底質リスク評価を検討するにあたり、サブテーマ1および2の実験的検討および上記4. 1～4. 4の検討を踏まえて、以下の点が提言される。

【流水式・底質スパイク曝露によるヨコエビを用いた底質毒性試験について】

- ① 試験中の化学物質濃度には経時的および空間的な変動があるため、上層水や間隙水濃度を少なくとも試験開始時と終了時に測定することが重要。

鉛直方向では濃度が間隙水>上層水となり、疎水性が低い物質ほど底泥表面からの溶脱が大きく、フリー態 C_{free} の濃度差が大きくなる。*H. azteca*では上層水濃度だけでは毒性を説明できないため、間隙水の寄与が大きいと示唆され、特に間隙水の測定は重要である。また、流水式のため、上層水濃度は経時的に減少する傾向があるが、間隙水の経時的な変動は小さい点からも曝露濃度指標として有効で

ある。一方、水スパイク曝露の場合は、上層水>間隙水となり、上層水の寄与が大きいと推測されるため、上層水の測定が重要になる。

- ② 底泥-上層水界面周辺に急激な濃度勾配があることが示唆されるため、試験生物の存在位置に応じた位置で曝露濃度を把握することが望ましい。

*H. azteca*の場合、濃度勾配の大きい表層底泥中に主に生息しているとみられるが、底泥の質や試験物質の曝露影響によっても生息場所は変化するため、試験ごとに主要な曝露経路は異なる可能性があることに注意する。*G. japonica*は底泥中に棲管を作って生息しているため、上層水との交換が生じることで、*H. azteca*より局所的な曝露濃度は低くなっている可能性がある。底泥表面での局所濃度は実測が難しいため、上層水や間隙水の濃度測定とともに、物性、底質性状を考慮した物質輸送モデルにより溶脱や濃度勾配の程度を推定することが試験結果の解釈に有用であると考えられる。

- ③ 総溶存態濃度 C_{diss} よりフリー態濃度 C_{free} の方が、ヨコエビの毒性や生物蓄積性との関連性が高い。

異なる曝露形式（水のみ、底質-水）による試験結果の比較から、間隙水の C_{free} は他の曝露指標よりヨコエビの毒性や生物蓄積性との関連性が高いことが示唆された。 C_{free} の測定は、PDMSファイバーを用いたパッシブサンプリング手法によって、高疎水性・低溶解度物質について、高感度・高再現性で測定が可能である。上層水、間隙水のいずれも総溶存態 $C_{diss} \geq$ フリー溶存態 C_{free} となり、特にDOM濃度の高い間隙水中で濃度差が大きくなる。 $\log K_{OC/W}$ が高い物質ほど濃度差は大きくなり、 C_{diss} では毒性や生物蓄積性を過大評価してしまう可能性がある。

- ④ $\log K_{OC/W} > 6$ 程度の疎水性が高い中性物質（BaPなど）の場合は、 C_{free} だけでなくDOM結合態も寄与していることが示唆されるため、間隙水の C_{diss} またはDOM濃度の測定も推奨される。

- ⑤ ピートモスを有機成分としたOECD人工底泥の K_{OC} は環境底泥と同程度であり、試験底泥として有効である。一方、Kembleらによる人工底泥は K_{OC} が低く、推奨されない。

OECD人工底泥に用いた北海道産ピートモスは、今回試験した環境底泥の有機物の収着性状と近く、代替として有効であった。一方、Kemble人工底泥の α セルロースは収着が弱く、毒性を過大評価してしまう可能性がある。ただし、海水を用いた試験の場合、ピートモスを用いるとDOが著しく低下し、致死率が上がるなど試験成立条件の維持が困難となり、給餌条件等の改良が必要であった。

【室内実験から野外環境への外挿（性状の異なる底泥間での比較）について】

- ⑥ 疎水性中性物質の場合、有機炭素濃度 f_{oc} による底質濃度補正は重要だが、有機物成分等が大きく異なると、 f_{oc} だけでは底泥間の違いを補正しきれない場合がある。

f_{oc} は底質中の疎水性中性物質の分配挙動や生物利用性に影響する重要な因子であり、 f_{oc} による底質濃度補正により底質間の違いを平準化することができるかとされている。しかし、例えば α セルロースを用いた人工底泥のように K_{OC} が異なると、 f_{oc} だけでは分配挙動や生物利用性の違いを補正しきれない場合がある。

- ⑦ 間隙水 C_{free} は、性状の異なる底泥間でも互換性がある濃度として有効である。

③で述べた通り、間隙水 C_{free} は毒性との関連性が高く、⑥の f_{oc} だけでは底泥間の違いを補正しきれないような、性状の異なる底泥間でも互換性がある濃度として有効であると考えられる。ただし、様々な性状の環境底泥を用いたCPSの底質毒性試験の比較では、間隙水 C_{free} のLC50は完全には一致しなかった。 f_{oc} が著しく低い砂状底泥の場合、底泥表面からの溶脱が大きく、またヨコエビの行動様式も泥状底泥の場合と比べて変わる可能性があるため、間隙水の C_{free} を測定しても底質による毒性の違いを完全には補正できない可能性があることに注意が必要である。

- ⑧ 陽イオン界面活性剤（BAC）の場合、 f_{oc} だけでなく、他のカチオンやpHなどが収着に影響することが示唆され、更なる検討が必要である。

【環境底質調査（曝露評価）について】

⑨ ヨコエビに対する曝露評価のためには、なるべく表層底泥の採取することが望ましい。

H. azteca、*G. japonica*ともに表層数cm以内に存在していると考えられる。

⑩ f_{oc} を測定（または強熱減量から換算）し、底質濃度を補正すべき。粒径分布の測定も望ましい。

⑥で述べた通り、異なる底泥間の比較では f_{oc} による濃度補正が必要である。 f_{oc} の実測値を使うことが望ましいが、ない場合は強熱減量から換算する。粒径分布は⑦で述べた通り、ヨコエビの行動様式にも影響するため、高次のリスク評価では測定が望ましい。

【底質リスク評価について】

⑪ 平衡分配法はスクリーニング評価として有効（ただし、難水溶性で水生生物に対する毒性値の信頼性が低い物質¹は除く）。以下の点に留意すると評価の信頼性が向上する。

- PNEC_{water}は底生生物の生物分類に近い甲殻類等の毒性値から設定する。
- K_{oc} は推定値よりも実測値の方が望ましい。イオン性物質の場合、代わりに底質組成や水質に応じた K_d の実測値を用いることが望ましい。
- f_{oc} はECHA推奨の10%よりも、PECに用いる底泥の実測値か、国内底泥中央値の2%を用いる。

⑫ 高次のリスク評価ではPNECおよびPECの精緻化のため、底質毒性試験や環境モニタリングにおいて間隙水 C_{free} を測定することが推奨される。

平衡分配法によるスクリーニング評価や、 f_{oc} 補正した底質毒性試験によるリスク評価でリスクが懸念された場合、より高次のリスク評価では野外環境に即した評価の精緻化が必要である。PNECの精緻化としては、人工底泥を用いた底質毒性試験時に、様々な曝露条件（底質含む）間において互換性の高い曝露指標である間隙水 C_{free} による毒性値を算出する。PECの精緻化では、環境底泥の間隙水 C_{free} をパッシブサンプリング手法により現場（in situ）または採取した環境底泥を用いて実験室で測定（ex situ）することが推奨される。そして、地点ごとに間隙水 C_{free} によるPEC/PNECを算出して評価する。

4. 5. 2 環境リスク初期評価における底質リスク評価手法

前項の提言を踏まえて、環境リスク初期評価における底質リスク評価手順を図3.7に示した。まず、評価対象とする物質として、これまでは「底質や浮遊物質に吸着等し、残留する物質」として $\log K_{ow} \geq 3$ の物質のみ対象としていたが、サブテーマ2の収着実験結果に基づき、底質中での分配をより正確に評価するためには K_{oc} の実測値を用いることが望ましいことから、「 $K_{oc} \geq 1000 \text{ L/kg-oc}$ 」も判定基準として追加する。さらにBACなどのイオン性物質や界面活性剤は、底質への吸着・収着が $\log K_{ow}$ だけでは判断できないため、吸着実験に基づく K_d より「 $K_d \geq 50 \text{ L/kg-solid}$ 」を基準とする。これらのトリガー値は、USEPAの米国連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（Federal Insecticide, Fungicide, Rodenticide Act: FIFRA）の条件（US EPA, 2014; CFR40. Part 158, subpart G⁶⁾）に準拠した。また、これらの基準に該当していなくとも、環境中モニタリング調査において、複数地点で検出されている物質は評価対象とする。具体的にはヒドラジン（ $\log K_{ow} = -0.16$ 、 $K_d = 4.4 \sim 25.7$ ）などが該当する。

評価は「Tier 1: 平衡分配法による評価」と「Tier 2: 底質毒性試験による評価」の2段階でStep 1～Step 4から構成される手順により段階的な評価を実施する。まずStep 1では実施済みの生態リスク評価データに基づきPNEC_{sed(est1)}を算出する。算出には、これまで化審法と同じくECHAガイダンス文書¹⁾に準拠し、式1の浮遊物質への吸着と沈降を仮定したモデル式を用いていたが、浮遊物質のかさ密度や固相率など多くのデフォルト値の妥当性が示されていないこと、環境リスク初期評価では環境中化学物質のリスク評価を対象としているため、直接底質と水との分配を仮定すればよいこと、デフォルト値を入れて整理すると、以下のシンプルな平衡分配式とほぼ同じであることから、これを基本式とする。

¹ 助剤を用いて水溶解度以上で曝露しなければ水生生物に対し影響がない物質や、水溶解度レベルの限度試験で影響がない物質など。

$$PNEC_{sed(est)}[mg/kg\ dwt] = f_{oc} \times K_{oc} \times PNEC_{water}[mg/L] \quad (式11)$$

$$PNEC_{sed(est)}[mg/kg\ dwt] = K_d \times PNEC_{water}[mg/L] \quad (式12) \quad (K_d = f_{oc} \times K_{oc})$$

式11は f_{oc} 換算すると $K_{oc} \times PNEC_{water}$ となるが、対するPECも f_{oc} 換算する必要がある。検出地点の実測値または式9、10に基づき強熱減量からの換算値を用いることが望ましいが、入手できない場合は2%を用いる。また、ECHAガイダンス文書¹⁾で推奨されている通り、試験物質が $\log K_{ow} > 5$ の場合、DOM結合態の寄与が示唆されることから、式11で算出された $PNEC_{sed(est1)}$ をさらに10で割る。なお、難水溶性物質で水溶解度レベルの限度試験で水生生物に対し影響がない物質に平衡分配法は適用できないことから、物質の製造輸入量や用途、作用機序を考慮した上で、専門家判断により底質リスク評価が必要とされる場合は、直接底質毒性試験によるTier 2へ移行する。

Step 1で $PEC/PNEC > 0.1$ となった場合、Step 2に進み $PNEC_{sed(est1)}$ の精緻化を図る。前項の提言⑩に基づき、 $PNEC_{water}$ の算出に用いるキーデータの見直しを行い、対象種に無脊椎動物を含め、アセスメント係数をできるだけ下げたものを用いる。これは古い評価書の再評価にも繋がり、水生生物に対する生態リスク評価にとっても意義がある。

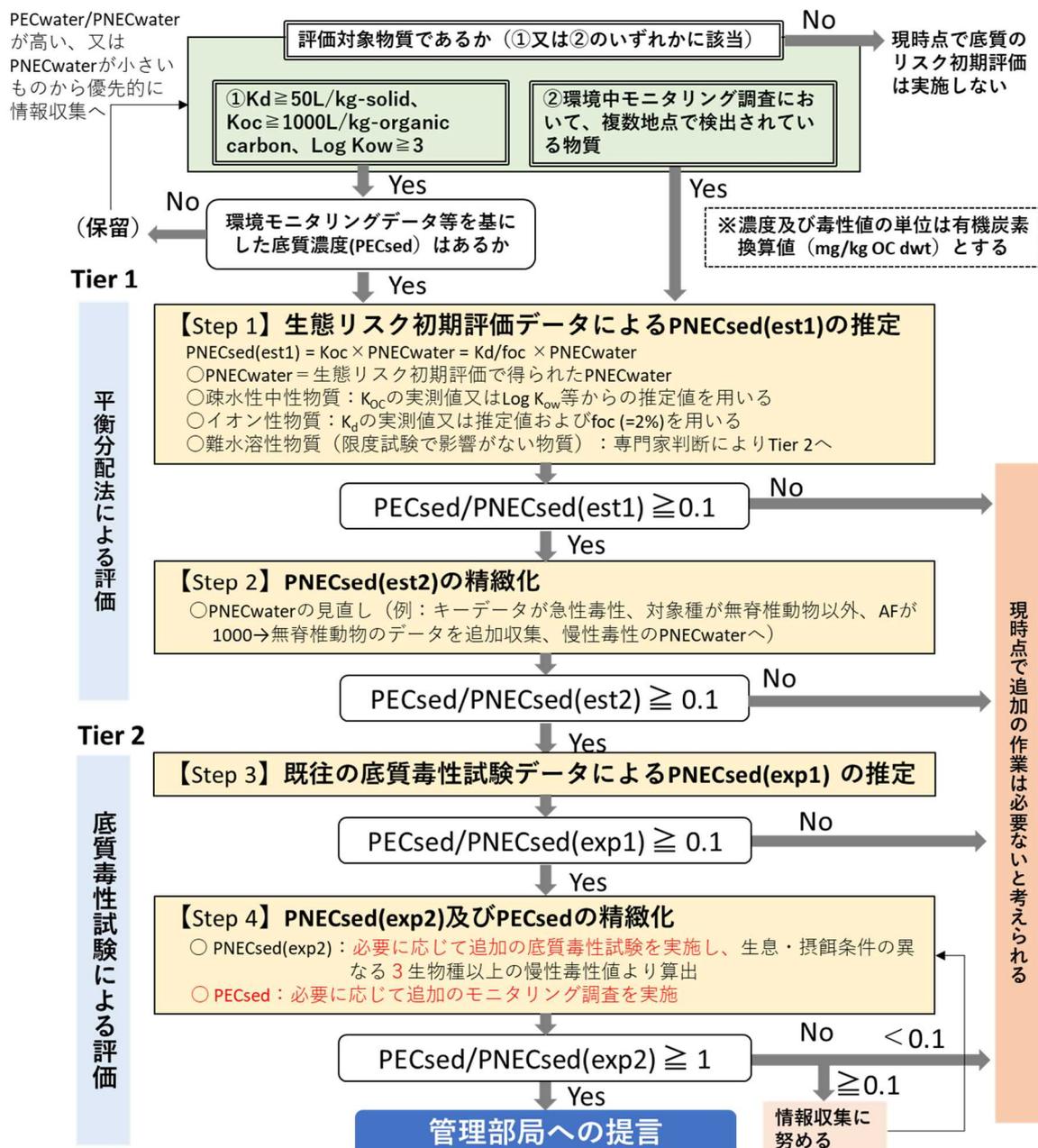


図 3.7 環境リスク初期評価における底質リスク評価作業の手順 (案)

Step 2でPEC/PNEC > 0.1となった場合、Tier 2のStep 3に進み、底質毒性試験によりPNEC_{sed(exp)}を算出する。「異なる生息・食餌条件をもつ生物種」により、不確実アセスメント係数を設定して求めるのは暫定案と同様で、ECHAでは淡水域と海水域を分けて評価されるが、底生生物の毒性試験データは限られており、本研究の試験結果および文献調査でも淡水産種と海産種で大きな感受性差は示されなかったこと¹²⁾から、当面は水域を分けずに評価を行う。また、暫定案では慢性毒性値と急性毒性値を分けてAFを適用し、急性毒性値が2種以上で1000、1種しかない場合は10000と大きなAFが用いられる¹⁾。ECHAガイダンス文書では試験期間が28日間より短い底質毒性試験データは急性毒性値として扱われているが、多くの試験法で試験期間は1週間前後で、成長や増殖などの慢性エンドポイントの評価している。特に毒性データの多いユスリカおよびヨコエビの10日間底質毒性試験は、エンドポイントには成長も含まれており、USEPAでは亜慢性毒性試験とみなされている⁶⁾。さらにBrockら(2013)は農薬101種類の10日間底質試験と28～65日間の慢性底質毒性試験結果を比較したところ、10日間のL(E)C50値と慢性試験のNOEC値の差は5倍未満であること示している¹⁴⁾。本研究で試験したフルオランテンも10日試験と28日試験で比較した結果、毒性値はほぼ同じであった(西森ら、投稿中)。よって28日間以下の試験法による毒性値についても、試験法を精査した上で、NOECを慢性毒性値として扱うことを提案する。

最後にStep 4まで進んだ場合、リスク評価の精緻化を行う。PNEC_{sed(exp)}およびPEC_{sed}の精緻化は前項の提言⑩で述べた通り、パッシブサンプラー法により間隙水C_{free}に基づくデータを算出することが望ましいが、本手法を用いて実施する底質毒性試験や環境底質濃度測定にかかるリソース(PDMSファイバーの入手やK_{PDMS}の検討なども含まれる)を踏まえると、環境リスク初期評価の範囲と目的(化学物質に係る環境保全対策の推進の根拠として環境リスクを評価し、対策部局における対応の基礎資料を提供の促進に寄与する)を超えていると考えられる。そこでStep 4では、底質毒性試験データがユスリカ1種しかない場合はヨコエビを用いた試験を実施するなど生息・食餌条件が異なる3種以上の毒性データを収集したり、PEC_{sed}の出典が古い場合は最新の環境モニタリング調査を実施するなどして、PNEC_{sed(exp)}およびPEC_{sed}の精緻化を行う。

そしてStep 4でPEC/PNEC > 1となった場合は、管理部局へ黒本調査や要監視項目の候補物質として提言するなど、対応の基礎資料を提供する。

4. 5. 3 化審法リスク評価における底質リスク評価手法の提案

図3.8に化審法リスク評価における底質リスク評価手順案を示す。前項と同様に対象化学物質のトリガー値としてK_{oc}およびK_dを追加する。さらに、現在は優先評価化学物質の評価IIで初めて底質リスク評価が実施されるが、ECHAのリスク評価では最初から底質移行性のある化学物質を対象に、61%の物質で平衡分配法が活用されていたことを踏まえ¹⁵⁾、スクリーニング評価から平衡分配法を活用して底質リスク評価を実施する。ここで課題となるのはPNEC_{sed(est)}の有害性クラスおよび曝露クラスの設定方法である。特に曝露クラスは、通常、製造輸入量に用途に応じた排出係数をかけて算出されるが(単位は重量)、底質への移行性(K_{oc}やK_d)を考慮した底質用の曝露クラスを設定することが望ましく、今後検討が必要である。

有害性クラスおよび曝露クラスによる優先度マトリックスおよびイオン性物質や難水溶性物質の専門家判断(前項参照)により底質リスクが懸念される物質については優先評価化学物質に指定し、リスク評価一次に進む。評価Iでは、PNEC_{water}の見直しによる平衡分配法のPNEC_{sed(est)}の精緻化や、モニタリングデータかG-CIEMSによる推定値によってPECを算出し、PEC/PNECにより優先順位付けを行う。PEC/PNECが1を超過した地点が多く、優先順位が高い物質は評価IIに進み、ここでは底質毒性試験によるリスク評価を行う。現行手法⁴⁾では底質毒性試験データがない場合は平衡分配法が用いられているが、「有害性情報の提出の求め」により底質毒性試験による有害性評価を行う。また、PECもモニタリングデータを収集して算出する。評価IIの結果判断に基づく措置を経て、評価IIIまで進む場合は、C_{free}の測定によるPNECおよびPECの精緻化を行う。ここでもリスクが懸念される場合は、第二種特定化学物質の指定の検討や有害性調査指示が実施され、最後にリスク評価二次に進む。

評価IIIおよびリスク評価二次で「リスク懸念なし」となった場合、現行では優先取消（一般化学物質）となるが、物質の有害性や用途、今後の製造輸入量の見込みによっては将来的にリスクが懸念される可能性がある。そこで、そのような物質については「監視化学物質（仮称）」として定期モニタリングを行い、必要に応じて再評価を行う。

なお、本案はあくまで本研究の提言事項に基づく最善案であり、今後、化審室などの関係部署との協議を経て、行政的な観点や実行可能性の面からも検討・精査していく必要があるだろう。

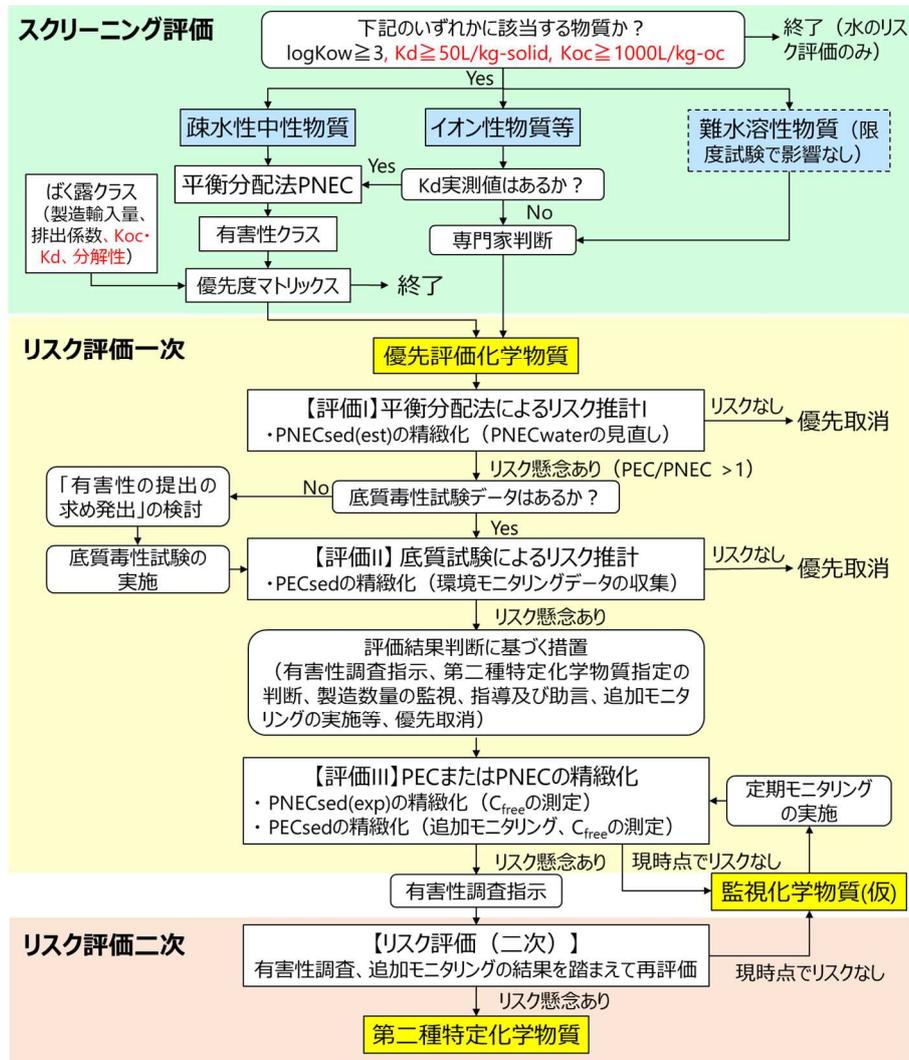


図3.8 化審法リスク評価における底質の底質リスク評価作業の手順（案）

5. 研究目標の達成状況

化審法の優先評価化学物質および環境リスク初期評価対象物質等のうち底質移行性が懸念され、かつPECが入手できた計142物質について平衡分配法を用いた暫定的リスク評価を行い、サブテーマ1および2の試験候補物質を選定した。平衡分配法モデルの最適化では、サブテーマ1の底質毒性試験結果との比較に加えて、既存文献データによるSSDの比較から、底生生物と生物分類が近い甲殻類や昆虫の毒性値、環境底泥（試験底泥）に近い f_{oc} や K_{oc} を用いることで平衡分配法による評価の信頼性が上がり、スクリーニング評価として活用可能であることを示した。性状の異なる底泥間で互換性のある濃度単位の指標として、サブテーマ1および2より間隙水 C_{free} の有効性が示された。さらに、試験生物の生息位置や試験物質、曝露条件によって、適切な位置での曝露濃度を測定することが重要であると考えられた。最後にすべての検討結果を踏まえて本研究から包括的な底質リスク評価手法に対する提言事項を整理し、環境リスク初期評価および化審法リスク評価に対し、包括的な底質リスク評価手法案を提案した。環境

リスク初期評価における底質リスク評価手法案は、生態リスク評価分科会で提案し、来年度から本案を基にケーススタディを進めることになった。サブテーマ2の成果は英文国際学術誌に2報の原著論文として掲載された。以上によりサブテーマ3で掲げた目標はすべて達成された。

6. 引用文献

- 1) ECHA (2017) Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance Version 4.0.
- 2) Kadokami, K., Li, X., Pan, S., Ueda, N., Hamada, K., Jinya, D., Iwamura, T. (2013) Screening Analysis of Hundreds of Sediment Pollutants and Evaluation of Their Effects on Benthic Organisms in Dokai Bay, Japan. *Chemosphere*, 90 (2), 721–728.
- 3) SETAC Sediment Advisory Group (SEDAG) and Southern California Coastal Water Research Project (SCCWRP) (2016) Spiked Sediment Toxicity Database, <https://data.sccwrp.org/sedag/>.
- 4) 厚生労働省・経済産業省・環境省 (2016) 化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価の技術ガイダンス III. 生態影響に関する有害性評価Ver.1.0.
- 5) USEPA (2012) Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Procedures for the Determination of the Freely Dissolved Interstitial Water Concentrations of Nonionic Organics, EPA/600/R-02/012
- 6) USEPA (2014) Toxicity Testing and Ecological Risk Assessment Guidance for Benthic Invertebrates, Memorandum from Donald J. Brady, Director, Environmental Fate and Effects Division, dated April 10, 2014. (<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/toxicity-testing-and-ecological-risk-assessment>)
- 7) Tamura, I., Kimura, K., Kameda, Y., Nakada, N., Yamamoto, H. (2013) Ecological risk assessment of urban creek sediments contaminated by untreated domestic wastewater: potential contribution of antimicrobials and a musk fragrance, *Environ. Technol.*, 34(9-12):1567-75.
- 8) Hora, P. I., Pati, S. G., McNamara, P. J., Arnold W. A. (2020) Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 7, 622–631.
- 9) Turner, A., Cabon, A., Glegg, G. A., Fisher, A. S. (2010) Sediment-water interactions of thallium under simulated estuarine conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 6779-6787.
- 10) Gil-Díaz, T., Schäfer, J., Keller, V. Eiche, E., Dutruch L. et al.(2020) Tellurium and selenium sorption kinetics and solid fractionation under contrasting estuarine salinity and turbidity conditions. *Chemical Geology*, 532, 119370.
- 11) Di Toro, D.M., McGrath, J.A., Hansen, D.J. (2000). Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environ, Toxicol. Chem.*, 19(8), 1951–1970.
- 12) K. Hiki, Y. Iwasaki, H. Watanabe, and H. Yamamoto: *Environ. Toxicol. Chem.*, 41, 2, 462-473 (2022), Comparison of species sensitivity distributions for sediment-associated nonionic organic chemicals through equilibrium partitioning theory and spiked-sediment toxicity tests with invertebrates.
- 13) K. Hiki, H. Watanabe, and H. Yamamoto: *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 17, 5, 1003-1013 (2021), Sources of variation in sediment toxicity of hydrophobic organic chemicals: Meta-analysis of 10–14 day spiked-sediment tests with *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus*.
- 14) Brock Theo C M (2013) Sediment toxicity data for benthic organisms and plant protection products: A literature review
- 15) ECETOC (2020) Sufficiency of aquatic hazard data for environmental risk assessment in sediment and soil, Technical Report No.134, ISSN-2079-1526-134.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) K. Tani, H. Watanabe, M. Noguchi, K. Hiki, T. Yamagishi, N. Tatarazako, and H. Yamamoto: *Sci. Total Environ.*, 784, 147156 (2021), Toxicity assessment of typical polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna* and *Hyalomma azteca* in water-only and sediment–water exposure systems. (IF: 8.0)
- 2) S. Lee, T. Tobino, and F. Nakajima: *Sci. Total Environ.*, 823, 153808 (2022), Selection of formulated sediment and feeding condition for 10-day spiked-sediment toxicity test with estuarine amphipod *Grandidierella japonica*. (IF: 8.0)

【サブテーマ1・2共通】

- 1) K. Hiki, C.F. Fischer, T. Nishimori, H. Watanabe, H. Yamamoto, and S. Endo: *Environ. Toxicol. Chem.*, 40, 11, 2995-2996 (2021), Spatiotemporal distribution of hydrophobic organic contaminants in spiked-sediment toxicity tests: Measuring total and freely dissolved concentrations in pore and overlying water. (IF: 3.7)

【サブテーマ2】

- 1) C.F. Fischer, K. Hiki, K. Soetaert, and S. Endo: *Environ. Science Technol.*, 55, 7, 11885-11893 (2021), Mind the exposure gaps – Modeling chemical transport in sediment toxicity tests. (IF: 9.0)

【サブテーマ3】

- 1) K. Hiki, H. Watanabe, and H. Yamamoto: *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 17, 5, 1003-1013 (2021), Sources of variation in sediment toxicity of hydrophobic organic chemicals: Meta-analysis of 10–14 day spiked-sediment tests with *Hyalomma azteca* and *Chironomus dilutus*. (IF: 3.0)
- 2) K. Hiki, Y. Iwasaki, H. Watanabe, and H. Yamamoto: *Environ. Toxicol. Chem.*, 41, 2, 462-473 (2022), Comparison of species sensitivity distributions for sediment-associated nonionic organic chemicals through equilibrium partitioning theory and spiked-sediment toxicity tests with invertebrates. (IF: 3.7)

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ2】

- 1) 遠藤智司、国立環境研究所ニュース、40, 7-9 (2021)
「フリー溶存濃度による化学物質汚染と曝露の評価」

【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) 稲積良彦、中島典之、飛野智宏、柳原未奈：第54回日本水環境学会年会（2020）
「底質汚染物質の生態毒性に基づく優先順位付けに関する検討」
- 2) Soyoung Lee, Tomohiro Tobino and Fumiya Nakajima: SETAC North America 41st Annual Meeting (2020)
“Applicability of Freshwater Formulated Sediment to Seawater Using Estuarine Amphipod *Grandidierella japonica* by Evaluation of Survival Rate”

- 3) Soyoung Lee, Tomohiro Tobino and Fumiyuki Nakajima: SETAC Europe 31st Annual Meeting (2021)
“Toxicity assessment of tire-related chemicals by spiked-sediment toxicity test”
- 4) Soyoung Lee, Tomohiro Tobino and Fumiyuki Nakajima: Water and Environment Technology Conference 2021 (2021)
“Toxicity evaluation of 2-mercaptobenzothiazole and its degradation products by spiked sediment test”
- 5) Koji Ueda, Tomohiro Tobino, Fumiyuki Nakajima: 4th International Forum on Asian Water Environment Technology (2021)
“Toxicity comparison of fluoranthene in formulated sediment and environmental sediments by 10-day spiked sediment toxicity test with an estuarine amphipod *Grandidierella japonica*”

【サブテーマ 1・2 共通】

- 1) 日置恭史郎、遠藤智司、Fischer Fabian、渡部春奈、山本裕史、中島典之：環境化学オンライン研究発表会（2020）
「流水式ヨコエビ底質毒性試験系における難水溶性物質の毒性指標比較」
- 2) Fischer Fabian、日置恭史郎、遠藤智司：環境化学オンライン研究発表会（2020）
“Mind the gap: Simulating pore and overlying water concentrations in sediment contact assays using kinetic chemical fate modelling”
- 3) 日置恭史郎、遠藤智司、渡部春奈、山本裕史、中島典之：第 54 回日本水環境学会年会（2020）
「流水式ヨコエビ底質毒性試験系における難水溶性物質の分配挙動と毒性」
- 4) 西森敬晃、日置恭史郎、遠藤智司、Fischer Fabian、渡部春奈、山本裕史、中島典之：第 55 回日本水環境学会年会（2021）
「流水式ヨコエビ底質毒性試験系におけるトリクロカルバンの分配挙動と毒性」
- 5) 西森敬晃、日置恭史郎、Fischer Fabian、遠藤智司、渡部春奈、山本裕史：令和 3 年度日本環境毒性学会オンライン研究発表会（2021）
「ヨコエビを用いた流水式底質試験系におけるフルオランテンの分配挙動の経時変化」
- 6) 西森敬晃、日置恭史郎、Fischer Fabian、吉井咲夢、遠藤智司、渡部春奈、山本裕史：第 55 回日本水環境学会年会（2022）
「底質性状がクロルピリホスの分配挙動とヨコエビに対する毒性に与える影響」
- 7) Fischer Fabian、日置恭史郎、遠藤智司：環境化学物質 3 学会合同大会（2022）
「溶存有機物が疎水性有機化学物質の水生生物毒性に与える影響」（アブストラクト提出済み）
- 8) 吉井咲夢、日置恭史郎、渡部春奈、山本裕史、遠藤智司：環境化学物質 3 学会合同大会（2022）
「パッシブサンプリング法を用いた陽イオン性界面活性剤の底質毒性評価」（アブストラクト提出済み）
- 9) Yoshii Sakura, Hiki Kyoshiro, Watanabe Haruna, Endo Satoshi : SETAC Europe 32nd Annual Meeting (2022)
“Freely dissolved concentration analysis of cationic surfactant benzalkonium in sediment toxicity test using passive sampling method”（アブストラクト提出済み、オンライン参加予定）
- 10) Hiki Kyoshiro, Fischer Fabian, Nishimori Takahiro, Endo Satoshi, Watanabe Haruna, Yamamoto Hiroshi : SETAC Europe 32nd Annual Meeting (2022)
“Effect of Water Exchange Rate in Spiked-Sediment Toxicity Tests With *Hyalella azteca* on Behavior and Bioaccumulation of Hydrophobic Organic Chemicals”（アブストラクト提出済み、オンライン参加予定）

【サブテーマ 2】

- 1) 遠藤智司、Fischer Fabian、日置恭史郎、渡部春奈：第 54 回日本水環境学会年会（2020）
「固相マイクロ抽出（SPME）ファイバーを用いた底質毒性試験系におけるフリー溶存濃度の測

定」

- 2) Endo Satoshi, Hiki Kyoshiro, Fischer Fabian, Watanabe Haruna, Yamamoto Hiroshi, Nakajima Fumiyuki : SETAC North America 41st Annual Meeting (2020)
“Does the Pore Water Free Concentration Explain Everything in Sediment Contact Assays With Hydrophobic Organic Chemicals?”
- 3) Fischer Fabian, Hiki Kyoshiro, Endo Satoshi : SETAC North America 41st Annual Meeting (2020)
“Mind the Gap: Modelling Pore and Overlying Water Concentrations in Sediment Contact Assays Using Kinetic Chemical Fate Modelling”
- 4) Fischer Fabian、日置恭史郎、遠藤智司 : 第 29 回環境化学討論会 (2021)
“Revealing the mechanisms underlying temporal and spatial exposure variability in sediment toxicity tests”
- 5) 吉井咲夢、渡部春奈、遠藤智司 : 令和 3 年度日本環境毒性学会オンライン研究発表会 (2021)
「底質毒性試験における陽イオン性界面活性剤のパッシブサンプリング分析へ向けた検討」
- 6) Fischer Fabian, Hiki Kyoshiro, Endo Satoshi : SETAC North America 42nd Annual Meeting (2021)
“Passive Dosing with Biocompatible Polyethylene Meshes to Control Exposure and to Measure Toxicity and Bioaccumulation in *H. azteca* Water-Only Tests”

【サブテーマ 3】

- 1) 日置恭史郎、遠藤智司、渡部春奈、山本裕史、中島典之 : 第 54 回日本水環境学会年会 (2020)
「流水式ヨコエビ底質毒性試験系における難水溶性物質の分配挙動と毒性」
- 2) 渡部春奈、松崎加奈恵、山本裕史、日置恭史郎、遠藤智司、中島典之 : 第 23 回日本水環境学会シンポジウム (2020)
「底質中有機汚染物質の生態リスクと対策の優先順位付け」
- 3) 日置恭史郎、渡部春奈、山本裕史 : 第 55 回日本水環境学会年会 (2021)
「底質毒性試験における試験条件が結果に及ぼす影響 : 既存報告のメタ解析による考察」

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【課題全体 (サブテーマ共通)】

- 1) 国立環境研究所一般公開 (2019年7月20日、参加者計約6000名) にて「底生生物を用いた底質中化学物質のリスク評価～複数のばく露経路と生物利用性を考慮する～」として成果紹介
- 2) 山本裕史、生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (令和元年度) (2020年1月21日東京、2月3日大阪) OECD試験法に係る最近の動向について
- 3) 山本裕史、生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (令和2年度) (2021年2月16日オンライン開催) OECD試験法に係る最近の動向について
- 4) 国立環境研究所公開シンポジウム2022 (令和4年6月23日、オンライン開催) にて本研究課題についてポスター発表予定、「汚染と非汚染の線引き? 底質毒性試験法の開発」(遠藤智司)

【サブテーマ 3】

- 1) 令和3年度化学物質の安全管理に関するシンポジウム「新規技術による化学物質リスク評価・管理の高度化」(主催: 化学物質の安全管理に関するシンポジウム実行委員会、2021年12月15日、オンライン開催) にて講演

(4) マスコミ等への公表・報道等>

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

【サブテーマ 1】

1) The WET Excellent Presentation Award

Water and Environment Technology Conference 2021(12 Aug, 2021, Online)

Lee S., Tobino T., Nakajima F.: "Toxicity evaluation of 2-mercaptobenzothiazole and its degradation products by spiked sediment test" (筆頭著者が受賞)

IV. 英文Abstract

Developing Risk Assessment Methods for Chemicals in Sediment That Consider Exposure Routes and Bioavailability to Benthic Organisms

Principal Investigator: Fumiya NAKAJIMA

Institution: Environmental Science Center, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, JAPAN
Tel: +81-3-5841-2995 / Fax: +81-3-5841-2995
E-mail: nakajima@esc.u-tokyo.ac.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Japan

[Abstract]

Key Words: Comprehensive sediment risk assessment, Benthic organisms, Sediment toxicity, Equilibrium partitioning, Bioavailability, Passive sampling

In chemical regulations, sediment risk assessment is required for substances that accumulate in the sediment of aquatic environments. However, the exposure of benthic organisms to chemicals is complex, leaving various technical issues unresolved. The objective of this project was to establish comprehensive risk assessment methods that consider different routes of exposure and the bioavailability of chemicals. To this end, research was conducted under three Sub-themes: (1) Assessment of chemical toxicity to benthic organisms by sediment-water exposure tests; (2) evaluation of distribution behavior and bioavailability of chemicals in sediments; and (3) optimization of the equilibrium partition method (EPM) and development of comprehensive sediment risk assessment methods.

In Sub-theme 1, new toxicity data of 10 chemicals were generated for fresh water (*Hyalella azteca*) and brackish water (*Grandidierella japonica*) amphipods by spiked-sediment toxicity tests. By measuring total dissolved (C_{diss}) and freely dissolved (C_{free}) concentrations, direct comparison to water-only tests was possible. The results indicated that C_{free} in porewater is generally useful for explaining the toxicity under different exposure conditions, while overlying water may also contribute to the toxicity to *G. japonica*.

In Sub-theme 2, passive sampling methods using polymer-coated fibers were established to measure C_{free} in the sediment toxicity test system. Measuring C_{diss} and C_{free} demonstrated spatial and temporal variability of these concentrations, suggesting non-uniform exposure conditions. A mass transfer model was used to gain mechanistic understanding of the observed chemical distributions. Sorption tests with environmental sediments showed that the fraction of organic carbon (f_{oc}) can normalize the sorption properties of differing sediments for neutral hydrophobic chemicals.

In Sub-theme 3, 142 chemicals were screened for their potential risks in sediments by the EPM, of which 58 were identified as requiring more detailed assessment. Comparison of the results from the EPM and sediment toxicity tests indicated that toxicity estimation by the EPM can be improved by adopting toxicity data, f_{oc} and sorption coefficients more suitable for sediment risk assessment. Our recommendations for improved sediment risk assessment include the following: Exposure concentrations should be measured in sediment toxicity tests, preferably at locations relevant to the test species; C_{free} in porewater is a useful exposure metric, although other phases can also be relevant; the EPM with adjusted parameters can be used for screening purposes, while C_{free} measurements in toxicity testing and field monitoring can be considered for higher-tier assessments. Finally, a tiered approach for sediment risk assessment was proposed based on the results from the project.