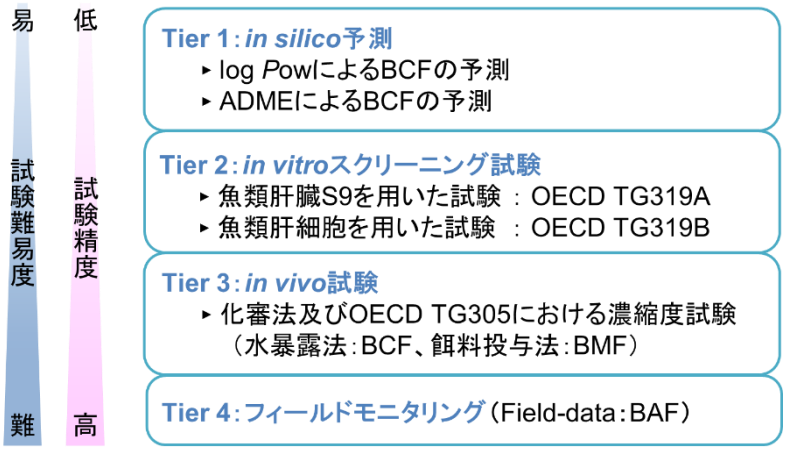
パッシブサンプラー法による
生物蓄積性評価の検討

発　表　者：村上　秀和（化学物質安全部門）

1. 背景及び目的

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）では、一般的に極性の低い物質（1-オクタノール／水分配係数の対数：log *P*ow が 3.5 以上）は、その生物蓄積性が懸念されるため、魚類を用いた生物試験（濃縮度試験）が要求される。しかしながら、魚類を用いた生物試験は時間とコストを要し、生物種や試験条件により試験結果が異なることが知られている。また、動物福祉の観点からも、既存の生物試験の代替法の開発が進められている。

一般に生物蓄積性評価方法は 4 段階（Tier）で構成されている（図 1 参照）。つまり、Tier 1 は log *P*ow や ADME（吸収・分布・代謝・排泄）に基づいた BCF（Bioconcentration factor）の *in silico* 予測であり、Tier 2 は魚類肝臓 S9 や肝細胞を用いた *in vitro* スクリーニング試験である。一方、Semi Permeable Membrane Device（SPMD）は、環境中の化学物質のモニタリングに用いられるパッシブサンプラー法であり、ポリエチレン膜にトリオレインを封入したものである。つまり、SPMD は環境中の化学物質をその濃度に応じて膜内のトリオレインに移行（濃縮）させるため、SPMD を生体（生物）とみなすことで Tier 1 と 2 の間に位置づけられる生物試験の代替法として期待できる。そこで、本研究では、パッシブサンプラー法による生物蓄積性評価について、極性の異なる 4 種のクロロベンゼン類を用いて、コイ及び SPMD による濃縮度試験を行い、その有用性を検討した。



BMF　：Biomagnification factor
BAF　：Bioaccumulation factor

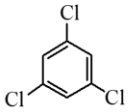
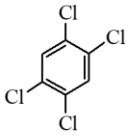
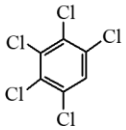
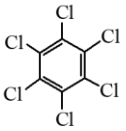
図 1　生物蓄積性評価方法

2.　実験方法

2.1 試験材料及び試験条件

表 1 に被験物質情報を示す。被験物質は、基本骨格がベンゼン環であり、塩素の数で極性が異なる 4 種のクロロベンゼン類を選定した。

表 1　被験物質情報

名称	トリクロロベンゼン (TriCB)	テトラクロロベンゼン (TeCB)	ペンタクロロベンゼン (PeCB)	ヘキサクロロベンゼン (HeCB)
構造式				
log *P*ow	4.19	4.64	5.17	5.73
k_M (/day)	1.1×10^{-1}	7.7×10^{-2}	5.0×10^{-2}	3.2×10^{-2}

log *P*ow（1-オクタノール／水分配係数の対数）：疎水性（生物蓄積性）の程度を示す指標

k_M（生体内変換速度定数）：代謝の程度を示す指標

表 2 に濃縮度試験条件を示す。試験魚は、化審法推奨魚種であるコイ（*Cyprinus carpio*）を用いた。SPMD は、ENVIRONMENTAL SAMPLING TECHNOLOGIES 社製のものをシーラーで約 3 cm 幅に圧着させて水槽に投入した。試験原液調製のための溶解補助剤については、テトラヒドロフラン及び *N,N*-ジメチルホルムアミドを用いた。図 2 に試験装置の概要を示す。取込期間は、各試験水槽を直列に設置し、被験物質を SPMD 及びコイに流水状態で暴露した。排泄期間においては、水槽を並列（個別）に設置し、水槽に試験用水のみをそれぞれ供給した。

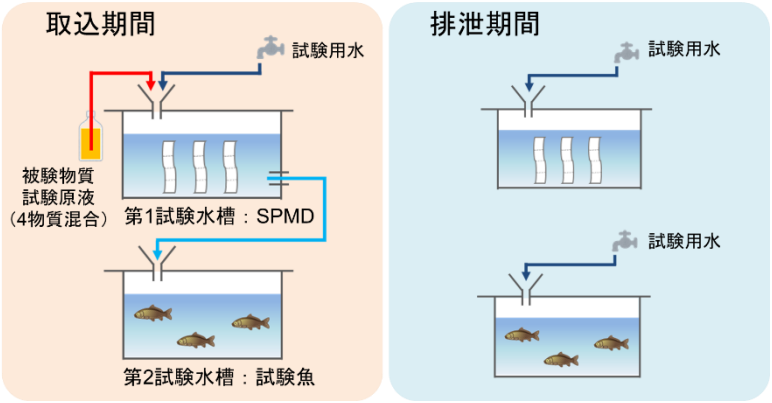


図 2　試験装置の概要

表 2　濃縮度試験条件

試験区	第 1 試験水槽：SPMD、第 2 試験水槽：コイ
濃度	5 μg/L（各被験物質の水溶解度未満）
試験用水	脱塩素水道水（エアレーションなし）
試験水流量	取込期間：試験原液 0.04 mL/min、試験用水 2000 mL/min 排泄期間：試験用水 2000 mL/min
試験期間	取込期間：28 日間、排泄期間：28 日間
サンプリング	試験魚：取込 3, 7, 14, 21, 28 日後及び排泄 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 日後 SPMD　：取込 1, 3, 7, 14, 21, 28 日後及び排泄 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 日後 分析数：各 n=2

2.2 前処理及び測定方法

表 3 に試験試料の前処理方法を示す。試験試料は前処理後、ガスクロマトグラフー質量分析計（Agilent Technologies）による定量分析に供した。

表 3　前処理方法

試験試料	前処理方法
試験魚	細切→ホモジナイズ抽出（アセトン）→クリーンアップ（DisQuE 抽出）
SPMD	アセトン中で SPMD を切断→撹拌（トリオレインの抽出）

2.3 1－オクタノール/水分配係数（*P*ow）及び生体内変換速度係数（k_M）の算出

被験物質の log *P*ow 及び k_M は、計算ソフト「Kowwin ver.1.68（EPI Suite ver.4.1）」及び「BCFBAF ver.3.01（EPI Suite ver.4.1）」を用いて、それぞれ算出した。

3.　結果及び考察

3.1 取込及び排泄期間におけるコイ及び SPMD 中の被験物質濃度の経時変化

取込及び排泄期間におけるコイ及び SPMD 中の被験物質濃度の経時変化を図 3 に示す。経時変化は、実測の被験物質濃度と時間（期間）に対して逐次法（Sequential method）により、モデルフィッティングさせることにより求めた。いずれの被験物質も取込期間において、徐々にコイ又は SPMD に取り込まれ、排泄期間では、徐々に体外（膜外）に排泄（溶出）された。また、コイ及び SPMD 共に log *P*ow が高い物質ほど取込の程度は大きく、排泄の程度は小さかった。

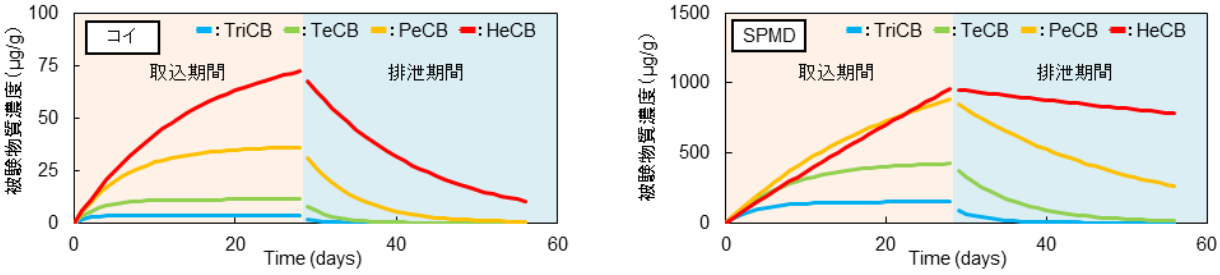


図 3　取込及び排泄期間におけるコイ及び SPMD 中の被験物質濃度の経時変化

3.2 log *P*ow とコイ及び SPMD 中の被験物質濃度の関係

log *P*ow 及び取込 28 日後の被験物質濃度との相関を図 4 に示す。一般的に化学物質は log *P*ow と生物蓄積性の間に相関があるとされており、log *P*ow による生物蓄積性の予測が可能である。本試験の結果、コイ及び SPMD 共に log *P*ow と被験物質濃度との間に良好な相関があり、*P*ow と同様に SPMD を用いた生物蓄積性の予測が可能であることが示唆された。

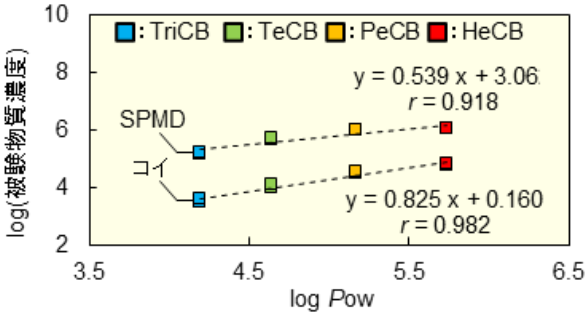


図 4　log *P*ow 及び被験物質濃度の相関

3.3 脂質含量標準化した被験物質濃度及び代謝との関係

一般的に化学物質の生物蓄積性は脂質含量に依存することが知られている。そこで、コイ及び SPMD における取込 28 日後の被験物質濃度について、各脂質含量（試験魚：6.68%、SPMD：100%）を 5%に標準化し、両者を比較した（図 5 上）。その結果、コイ及び SPMD における HeCB 濃度は同程度であったが、log *P*ow の小さい物質ほど、両者の乖離は大きくなり、この乖離は、生物固有の代謝によるものと予想された。そこで、代謝の程度を示す指標である k_M 及び 5%標準化した被験物質濃度との相関を調べた（図 5 下）。その結果、コイ及び SPMD 共に k_M と被験物質濃度に良好な相関があり、k_M が大きくなるほど、両者の乖離は大きくなった。以上のことから、k_M が代謝の程度を示す指標であることを考慮すると、HeCB のように代謝され難い物質は、SPMD による濃縮度試験の代替が可能である一方で、TriCB のように代謝され易い物質については、SPMD では生物固有の代謝を正確に再現できないことが示唆された。

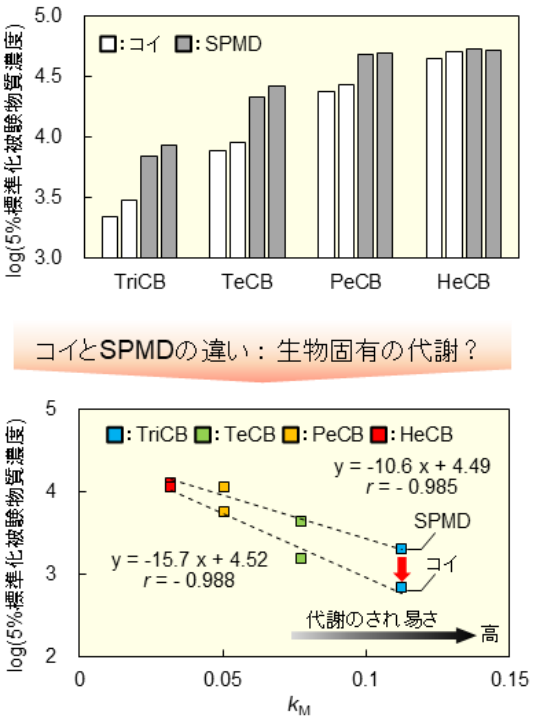


図 5　k_M 及び 5%標準化した被験物質濃度の相関

4.　まとめ

本研究では、極性の異なる 4 種のクロロベンゼン類について、コイ及び SPMD を用いた濃縮度試験を実施し、その有用性を検討した。その結果、4 種のクロロベンゼン類において、SPMD を用いた生物蓄積性の予測が可能であることが示唆された。一方で、生物固有の代謝を考慮した場合、HeCB のような代謝され難い物質は、SPMD による濃縮度試験の代替が可能である一方で、TriCB のような代謝され易い物質は、SPMD において生物固有の代謝を正確に再現できないことが示唆された。以上のことから、本法は生物固有の代謝を考慮した模擬試験としての課題はあるものの、新しい生物蓄積性評価のスクリーニング試験として期待される。

5.　謝辞

本研究は、経済産業省委託事業である九州大学、大嶋雄治教授による「パッシブサンプラーを用いた化学物質の生物濃縮試験代替え法の検討」において、本機構が濃縮度試験及び分析を実施し、試験結果を考察したものである。