

IV 水生生物への移行経路の検討

対象物質の生物への濃縮を考慮する上で重要と思われる取り込み経路の影響について検討するために、水生生物の餌生物に含まれる対象物質濃度の把握及び濃縮試験を行い水生生物への移行経路について検討した。

1. 実地調査

(1) 調査内容及び方法

手賀沼で餌生物となると考えられるプランクトン及び底生生物中のノニルフェノール濃度を調査した。プランクトンはプランクトンネット(XX13、目合い 100 μ m)を用い、手賀沼内全域を曳航することで収集した。底生生物及び胃内容物調査用のフナは手賀沼下流域で捕獲されたものを漁業者から購入した。

(2) 調査結果

プランクトン及び底生生物中のノニルフェノール濃度を表 1に、プランクトンネット採取物の内容は表 2に、フナの胃内容物分析結果は表 3に示した。

表 1 手賀沼におけるノニルフェノール濃度

	検出限界値	単位	ノニルフェノール濃度
プランクトン	15	μg/kg	250
底生生物（テナガエビ）	15	μg/kg	N.D.

表 2 プランクトンネット採取物の内容

区分	種・内容	存在割合（容積比）
動物プランクトン	ワムシ類、ケンミジンコ	40%
植物プランクトン	ケイ藻類、緑藻類	10%
その他	腐葉、微粒子	50%

表 3 手賀沼の魚類の胃内容物

	内容物	湿重量
フナ	空胃	—
フナ	コケムシ綱休芽	+
	チャヅツケイソウ属 フナガタケイソウ属 ユレモ属	0.16 g
	カイアシ亜綱	+
フナ	緑藻綱（微細単細胞） チャヅツケイソウ属 ワムシ綱	3.03 g

胃内容物に底質は認められなかった。

(3) 考察

手賀沼の湖沼生態系は冬季には植物プランクトンとしてケイ藻が多くなり、動物プランクトンとしてワムシ類が多い¹⁾。底生生物としてはイトミミズとユスリカ幼生が主であり、冬季にはイトミミズが大半を占める¹⁾。

一方、フナやコイは底生生物を中心とした雑食性で、仔魚はプランクトンや付着藻類、稚魚はユスリカ幼生、成魚は貝類、ユスリカ幼生、イトミミズ、ゴカイ類、付着ケイ藻類等を摂取する。今回実施した胃内容物調査からも付着藻類やプランクトンを摂取していることが明らかであった。

そこでプランクトンネット採集物のノニルフェノール濃度について調査をしたところ 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の値を得た。

しかし、懸濁物質吸着性に関する調査結果から、手賀沼の懸濁物質中のノニルフェノール濃度は約 4800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、プランクトンネット採集物にこれらが数%混入しただけで 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度の寄与になると考えられる。このため、この値が手賀沼でのコイ等の雑食性水生生物の食物中濃度と想定するのは困難と考えられた。実際、プランクトンネット採集物の顕微鏡観察では動物プランクトン及び植物プランクトン以外の浮遊物が約半量混入しており、胃内容物調査では動物プランクトン及び植物プランクトン以外は認められていないため、餌中のノニルフェノール濃度は 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ よりも小さいと推測される。他方、コイ等の餌と想定される底生生物（テナガエビ）中のノニルフェノール濃度は検出限界値（15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）未満であった。

以上のことから、手賀沼でのコイ等の雑食性水生生物の餌中濃度は検出限界値（15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）未満～250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間にあるものと考えられた。

なお、生物の濃縮係数も考慮した検討は後述するものとする。

2. 濃縮試験

ノニルフェノールの生物濃縮試験を行い、生物濃縮係数（水中濃度に対する魚中濃度の比：BCF_{ss}）、取込速度定数（ k_1 ）及び排出速度定数（ k_2 ）を求めた。また、餌にノニルフェノールを混入した試験を併せて行い餌からの取り込みについても検討した。

(1) 試験方法

OECD の「305 生物濃縮：魚による流水式試験」を参考に、実環境に近い曝露濃度条件を設定して試験を行った。

ア 試験物質

4-ノニルフェノール標準品（分岐型、関東化学、Lot No.210G7205、CASNo.84852-15-3）

イ 試験区分（濃度設定）

試験区分は4区分とした（表 4）。

表 4 生物濃縮試験 試験区分

区分	飼育水条件	餌料条件
1 区	50µg/L ノニルフェノール	添加なし
2 区	5µg/L ノニルフェノール	添加なし
3 区	添加なし	添加なし
4 区	5µg/L ノニルフェノール	100µg/kg ノニルフェノール

環境水中からの濃縮を検討するために、文献から得た濃縮係数を想定した魚体内濃度の推定値（最低で水質の 10 倍）及び魚体内濃度検出限界値（15µg/kg）を想定して最低濃度区分を設定し、その 10 倍濃度区をあわせて設定した。なお、高濃度区は平成 10 年度緊急全国一斉調査及び平成 11 年度全国一斉調査における水質の最大値のほぼ 2 倍に相当する。

また、環境水中からの濃縮と共に餌からの濃縮を検討するために、ノニルフェノール含量を調整（約 100µg/kg）した餌を与える試験区（4 区）

を設定した。飼料濃度は約 100 μ g/kg、水質の試験濃度は低濃度区と同じとした。

なお、ノニルフェノールは DMSO（ジメチルスルホキシド）に溶解して添加した。DMSO の飼育水中での最終濃度は 0.01%であった。

ウ 試験装置

試験にはステンレス水槽（350×600×650mm、内側ガラス張り）を用い、100L の飼育水を満たして使用した。

飼育水槽へ供給するノニルフェノール（対象区は DMSO のみ）は、それぞれ飼育水条件の 10 倍濃度の原液を作成して各区に用意した 15L の薬液槽から毎分 80mL で 1 L の混合槽に供給し、毎分 800mL で供給される希釈水と混合した後、飼育水槽に供給した。

全ての配管、水槽類、ポンプの材質にはステンレススチール、ガラス、テフロン（一部の配管ジョイント部分はシリコン）を用いた。

エ 試験水・餌

飼育水（希釈水）は、上水を 0.2 μ m のフィルターでろ過した後、活性炭カートリッジにより脱塩素したものをを用いた。

餌はこい稚魚用配合飼料を用いた（こい 4 号：日本農産工業）を用いた。

なお、試験に用いた飼育水（検出限界値：0.1 μ g/L）及び餌（検出限界値：15 μ g/kg）のノニルフェノール濃度が検出限界値未満であることは、事前に確認した。

オ その他の飼育条件

その他の飼育条件は表 5に示した。

表 5 飼育条件

項目	設定値	実測値
飼育水槽水温	22℃	20.2 ～ 22.1 °C
pH	—	6.8 ～ 7.5
溶存酸素量	—	62 ～ 100%
給餌量	体重の 1%×2 回／日	—

カ 魚類

試験には養魚場から入手したコイ（平均体重 20g、平均体長 8.9cm）を用いた。試験に先立って魚体内のノニルフェノール濃度が検出限界値未満であることを確認し、28 日間の馴致飼育を行った。各試験区に 65 匹前後のコイを用いた。

キ 試験の実施

（ア）取込試験

各試験区のノニルフェノール濃度で試験開始後の、2、4、8、14、21 及び 28 日目に各試験区 5 匹ずつのコイを取り上げ、速やかに冷凍保存して、分析に供した。

（イ）排出試験

取込試験開始後 28 日目に全ての飼育水及び餌をノニルフェノール無添加のものに切り替え、2、8、14 及び 16 日目に、各試験区 5 匹ずつのコイを取り上げ、速やかに冷凍保存して、分析に供した。

(2) 試験結果

各試験区の取込試験における飼育水のノニルフェノール濃度の実測値は表 6に、取込試験及び排出試験の魚体内濃度はそれぞれ表 7及び表 8に、ノニルフェノールを添加した餌の実測濃度は表 9に、試験開始時と終了時における魚体中の粗脂肪率は表 10に示した。

対照区（3 区）の結果から、使用した飼育水及び餌に含まれる可能性のある検出限界値未満のノニルフェノールの影響は認められなかった。

ノニルフェノールに曝露した試験区（1、2 及び 4 区）では速やかにノニルフェノールが取り込まれ、8 日目までには定常状態に達した（図 1）。定常状態における飼育水及び魚体内のノニルフェノール濃度から生物濃縮係数（ BCF_{ss} ＝定常状態に達した後の魚体内平均濃度／定常状態に達した後の水質平均濃度）を求めた（表 11）。1 区（高濃度区）の BCF_{ss} は 158 と、2 区（低濃度区）の 113 と比べて有意（ $p<0.05$ ）に高い値が得られた。

餌からの取り込みを検討するために低濃度の曝露に加えて餌にもノニルフェノールを混入した 4 区の BCF_{ss} は 124 となり、2 区の 113 と比べて高い値が得られたが、両区間の有意差（ $p<0.05$ ）は認められなかった。

表 6 飼育水のノニルフェノール濃度

(単位：μg/L)

	曝露日数								標準偏差
	0	2	4	8	14	21	28	平均	
1区	16	20	23	25	26	23	27	22.9	3.5
2区	1.9	1.8	2.3	2.9	2.9	2.2	3.1	2.4	0.5
3区	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
4区	2.0	1.8	2.4	2.6	2.6	3.3	2.7	2.5	0.5

検出限界値：0.1μg/L、「N.D.」：検出限界値未満

表 7 魚体内ノニルフェノール濃度（曝露試験）

(単位：μg/kg)

		曝露日数						
		0	2	4	8	14	21	28
1区	1	51	1200	3100	4300	4200	5000	4900
	2	N.D.	1400	3400	3000	5000	4400	2700
	3	N.D.	1500	5000	3400	5100	8900	3400
	4	N.D.	1300	2500	3600	3600	4200	3400
	5	N.D.	2000	2300	2700	2400	4900	3600
2区	1	—	100	350	340	240	300	280
	2	—	240	83	780	200	370	250
	3	—	61	93	300	270	270	290
	4	—	90	110	260	210	360	440
	5	—	130	63	300	260	350	250
3区	1	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2	—	N.D.	N.D.	23	N.D.	N.D.	N.D.
	3	—	N.D.	N.D.	N.D.	16	N.D.	N.D.
	4	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	5	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4区	1	—	310	110	240	160	190	380
	2	—	90	110	260	510	300	370
	3	—	94	130	660	540	330	310
	4	—	120	110	270	220	480	290
	5	—	160	150	360	370	350	350

検出限界値：15μg/kg、「N.D.」：検出限界値未満

表 8 魚体内ノニルフェノール濃度（排出試験）

（単位：μg/kg）

		排出日数				
		0 (曝露の28日に同じ)	2	4	6	16
1区	1	4900	200	16	N.D.	N.D.
	2	2700	140	25	N.D.	N.D.
	3	3400	260	24	N.D.	N.D.
	4	3400	330	22	N.D.	N.D.
	5	3600	180	26	N.D.	N.D.
2区	1	280	21	N.D.	N.D.	N.D.
	2	250	19	N.D.	N.D.	N.D.
	3	290	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	4	440	16	N.D.	N.D.	N.D.
	5	250	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3区	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4区	1	380	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2	370	29	N.D.	N.D.	N.D.
	3	310	16	27	N.D.	N.D.
	4	290	20	N.D.	N.D.	N.D.
	5	350	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

検出限界値：15μg/kg、「N.D.」：検出限界値未満

表 9 ノニルフェノール添加餌試料中の濃度

	ノニルフェノール濃度
単位	μg/kg
1	84
2	94
平均値	89

検出限界値：15μg/kg、設定値 100μg/kg

表 10 試験に用いたコイの粗脂肪率

		粗脂肪率 (g/100 g)
試験開始前		3.7
試験終了後	1 区 (高濃度区)	4.3
	2 区 (低濃度区)	3.6
	3 区 (対照区)	4.5
	4 区 (低濃度+餌区)	3.2

表 11 生物濃縮係数と取込・排出速度定数

試験区	定常状態			排泄速度定数	取込速度定数
	飼育水濃度	魚体内濃度	生物濃縮 係数	k_2	k_1
	μg/L	μg/kg		day ⁻¹	day ⁻¹
1 区 (高濃度)	25	3960	158	1.27	11.9
2 区 (低濃度)	2.8	316	113	1.43	37.9
4 区 (低濃度+餌)	2.8	347	124	1.44	39.6

※ 定常状態の濃度平均は、1 区は 4～28 日、2 及び 3 区は 8～28 日のデータを用いた。

※ $k_1 = (C_f \times k_2) / (C_w \times (1 - e^{-k_2 t}))$ (C_f : 取り込み曲線から読む時間 t における魚体内濃度、 C_w 水中濃度)

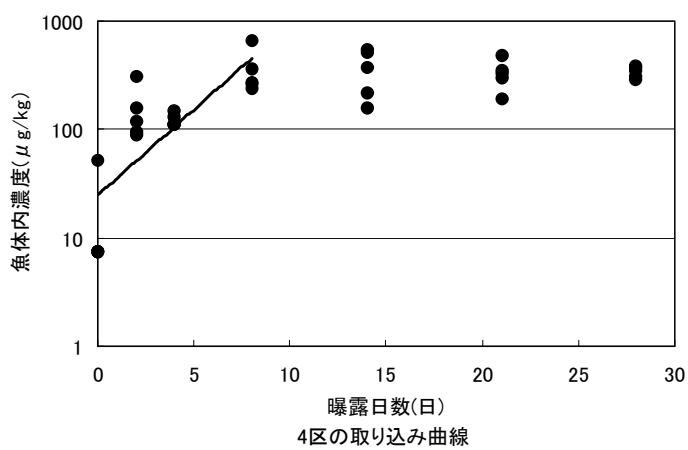
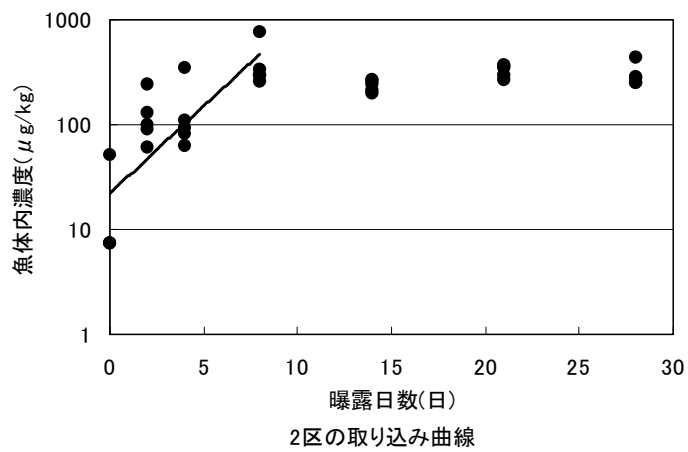
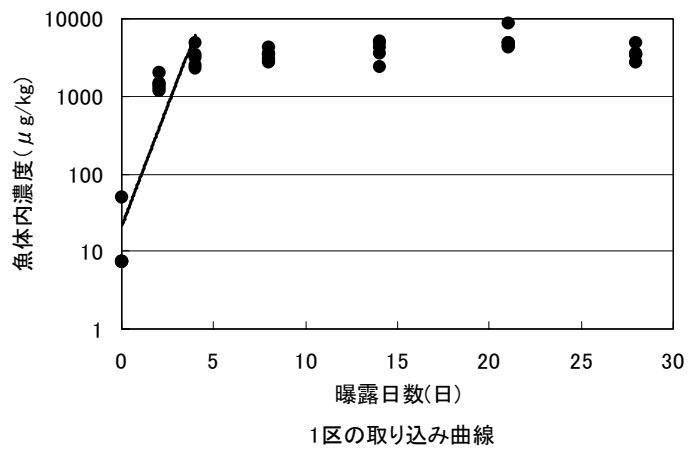
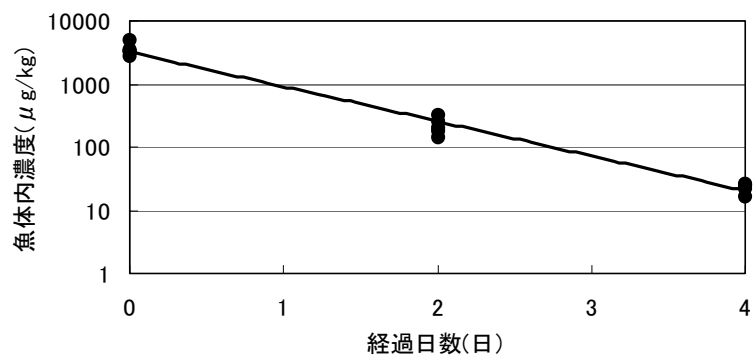
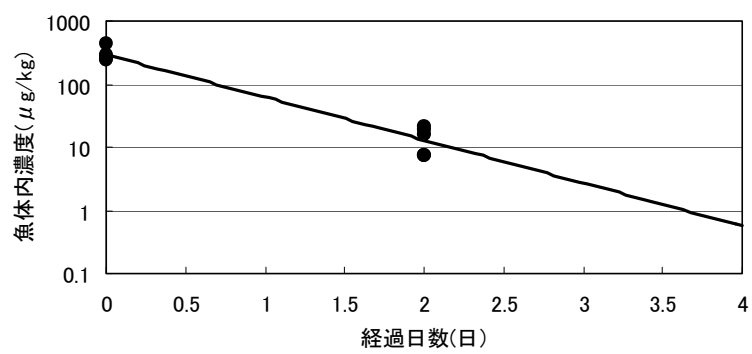


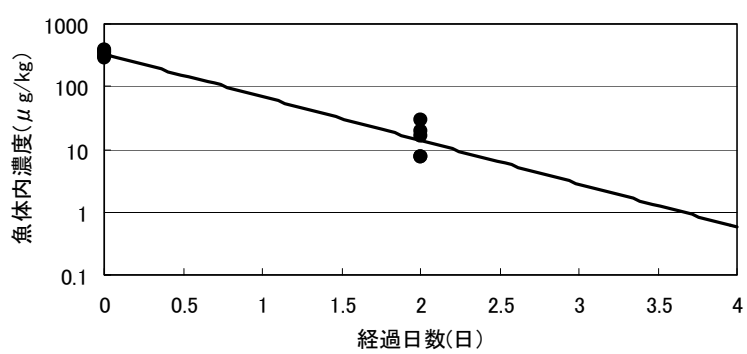
図 1 取り込み試験結果



1区の排出曲線



2区の排出曲線



4区の排出曲線

図 2 排出試験結果

(3) 考察

コイを用いた濃縮試験に関する既存の報告は、「化審法の既存化学物質安全性点検データ（1992）」に記載されている 90-220（曝露濃度：10 µg/L）および 250-330（曝露濃度：100µg/L）の 2 種類である。また、コイ以外の魚種に関するノニルフェノールの濃縮係数については、ファットヘッドミノーについて 271-984 の値が得られており、ブルーギルについて 191-253 の値が得られている（いずれも USEPA の採用値²⁾）。

今回の試験結果（158：曝露濃度 25 µg/L、113：曝露濃度 2.8 µg/L）は上記のコイに関する既存の報告値と良く一致するものであった。なお、本試験結果および上記の既存の報告値にもみられる高濃度区での濃縮係数の増加の根拠は明確にできなかった。

以上の結果から、報告値のうちの低濃度区（10 µg/L）での値（90、220）と今回の試験結果（2.5 µg/L と 25 µg/L）の値（113、158）を環境中の曝露濃度に相当するものと考えて、これらの値の平均値（145）がコイのノニルフェノールの生物濃縮係数と想定することが適当と考えられた。

餌の曝露を与えた区では生物濃縮係数は餌からの曝露のない区よりも約 10%高い濃縮係数を得た。餌の寄与率を推定するため、体内濃度の算出を試みた。

$$C_b = BCF(L/kgw) \times C_w(\mu g/L) + \frac{\alpha \cdot F \cdot C_f}{k_2}$$

C_b : 生体内濃度(µg/kgw)

C_w : 溶存態の化学物質水中濃度(µg/L)

BCF : (水からのみの)生物濃縮係数(L/kgw)

k_2 : 排泄率(1/day)

α : 餌からの化学物質の吸収率(%/100)

C_f : 餌中の化学物質濃度(µg/kg)

F : 1 日当りの摂餌量(kg/kgw/day)

上式に、BCF：113（水からのみの値）ⁱ⁾、C_w：2.8（μg/L）、α：0.5ⁱⁱ⁾、F：0.02（kg/kgw/day）ⁱⁱⁱ⁾、C_f：89（μg/kg）^{iv)}、k₂：1.27（1/day）^{v)}を代入すると、C_b=317（μg/kgw）となり、その時の飼育水中のノニルフェノールで割った見かけの BCF（餌を含んだ濃縮係数で、以降 BAF と呼ぶ。）は 317/2.8=113.2 となった。この値は餌からの曝露のない場合とほとんど変わらない値であり、実際の試験結果（平均値で 124）との有意差（p<0.05）は認められなかった。

試験に用いた餌中の濃度は 89 μg/kg で水質の約 30 倍の値であったが、生物濃縮係数に関する既存の報告値からみれば小さい値であった。そこで、餌中濃度をさらに 10 倍（濃縮係数では約 300）と想定して同様の計算をすると、BAF は 115 とやはりほとんど変わらない結果を得た（餌の寄与率は約 2%）。

以上のことから、ノニルフェノールのコイに対する生物濃縮係数について、今回の試験結果および報告値は良く一致し、それらの平均値として BCF =145 が使用できるものと考えられた。また、餌からの寄与は多く見積もっても全体の数%程度であると推測された。

ⁱ 本実験結果

ⁱⁱ ヒトに対するダイオキシン類の TDI 算出において用いられている係数で、ノニルフェノールについては妥当な値が得られなかったため、この値を代用した。

ⁱⁱⁱ 実験での設定量で OECD ガイドライン 305 に基づくもの

^{iv} 実験での設定濃度

^v 本実験結果

(4) 移行経路および体内蓄積量の推定

濃縮試験の「考察」に示した体内濃度の推定式は水生生物の移行経路の検討において有効であるものと考えられる。

$$C_b = BCF(L/kgw) \times C_w(\mu g/L) + \frac{\alpha \cdot F \cdot C_f}{k_2} \quad (A)$$

C_b : 生体内濃度($\mu g/kgw$)

C_w : 溶存態の化学物質水中濃度($\mu g/L$)

BCF : (水からのみの)生物濃縮係数(L/kgw)

k_2 : 排泄率($1/day$)

α : 餌からの化学物質の吸収率(%/100)

C_f : 餌中の化学物質濃度($\mu g/kg$)

F : 1日当りの摂餌量($kg/kgw/day$)

これまでに得た手賀沼での調査結果あるいは試験結果を用いて、環境中でのコイの曝露状況を推定した。

手賀沼の環境水中のノニルフェノール濃度は $0.38 \mu g/L$ である。また、餌中のノニルフェノール濃度としてはプランクトンネット採集物の値 ($250 \mu g/kg$) を用い、その他の値は先の考察に示した数値を用いると ($BCF: 145$ (水からのみの値)^{vi}、 $\alpha: 0.5$ ^{vii}、 $F: 0.02 (kg/kgw/day)$ ^{viii}、 $k_2: 1.27 (1/day)$ ^{ix}、 $C_b=55.1$ (水からの寄与) + 2.0 (餌から寄与) = $57.1 \mu g/kg$ で、餌からの寄与は全体の 4%程度と、これまでの考察と同様に餌からの寄与は大きくはないことが認められた。

上記の式は他の物質についても有効と考えられる。その場合、 BCF 、 α 、 F 、 C_f 、 k_2 が必要なパラメータであり、特に BCF 、 C_f 、 k_2 が重要なパラメ

^{vi} 本実験結果

^{vii} ヒトに対するダイオキシン類の TDI 算出において用いられている係数で、ノニルフェノールについては妥当な値が得られなかったため、この値を代用した。

^{viii} 実験での設定量で OECD ガイドライン 305 に基づくもの

^{ix} 本実験結果

ータとなる。

ノニルフェノールにおいては BCF が小さく、かつ k_2 が大きいため、 C_f をかなり大きく想定しても餌からの寄与は数%であると考えられたが (BAF $\approx$ BCF)、同じ BCF の値でも k_2 が小さい (排泄速度が小さい) 化学物質については餌の寄与率は高くなることになる (BAF $>$ BCF)。

したがって、今後はまず上記のパラメータに関する既存の報告値の集積・評価が必要であり、特に BCF に関する報告値のない物質 (フタル酸ジシクロヘキシル) については生物濃縮試験の実施が必要と考えられる。さらに予備検討の結果によって餌からの寄与が大きい可能性が認められた化学物質については餌からの曝露量を推定するための詳細な資料 (餌中の化学物質の濃度、摂餌量等) の入手が必要と考えられる。

¹ 高村健二他：手賀沼の水生生物現存量と一次生産量、国立公害研究所報告、96、45-58 (1986)

² USEPA Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria NONYLPHENOL(Draft) (2000/5/22)

V まとめ

昨年度の曝露経路調査では、水環境挙動モデルの構築・検証を目的に現地調査及びモデル検討を実施し、モデルの基本構成について確認を得るとともに、ノニルフェノールについて現地調査結果による検証を行った。

本年度は曝露評価をより広範に進めるために、下記の 4 項目に区分して作業を行った。主な内容は下記のとおりである。

1. 主要曝露媒体の推定

曝露評価の予備検討として、まず対象物質を物性に基づいて区分し、多媒体モデルによって環境中での存在状況を検討したところ、環境濃度の実測値とよく一致することを確認した。

次に同様のモデルによって、平成 12 年度の報告において優先的にリスク評価を実施するとした 8 物質(トリブチルスズ、ノニルフェノール、4-オクチルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレン)の環境中濃度を予測し、曝露媒体ごとの存在状況を比較したところ、水中及び大気中濃度と比較して、水生生物及び土壌の濃度が高いことを確認した。

2. 水環境挙動モデルの構築と検証

水生生物濃度が高くなると考えられる 8 物質について、水域に対する対象物質の流入による水質の変化を予測し、最終的には水生生物の曝露評価に資する水環境挙動モデルについて検討した。

昨年度の業務で、水環境において考えられる対象物質の移動、収着、分解及び揮発などの挙動のモデル化を試み、基本モデルの妥当性を確認し、ノニルフェノールについて実測値との検証を行った。ただし、他の対象物質については実測値が得られず検証を行うことができなかったため、本年

度新たにデータを収集し、モデルの構築及び検証を行った。

手賀沼における 4-t-オクチルフェノール、ベンゾフェノン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルのモデルの構築及び検討を行ったところ、信頼できる水中半減期や底泥中半減期の情報が少ないこと、また前駆物質からの生成過程の検討の必要性が確認された。

さらに、河川における 4-t-オクチルフェノール、ベンゾフェノン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルのモデルの構築及び検討を行ったところ、実測値と高い整合が見られた。

3. 水環境挙動モデルの充実

昨年度にモデルを構築・検証したノニルフェノールを対象に、水中での分解速度、懸濁物質への吸着性について室内試験及び現地調査を行い、パラメータの精度を向上した。また、エトキシレートからの生成をモデルに組み入れた。これらのことにより、昨年のモデルよりも現地調査結果との整合性は高まった。

4. 水生生物への移行経路の検討

水生生物の曝露評価の一環として、ノニルフェノールについての生物濃縮試験を実施し、生物濃縮係数や排泄速度を確認するとともに、水及び餌からの曝露を総合的に評価する手法の検討を試みた。

結果として、ノニルフェノールの水生生物に対する餌の寄与は、水からの寄与に比べて数%程度と少ないことが明らかになった。

今後は、8 物質のうち水・オクタノール分配係数から計算された高い生物濃縮係数(log 4.23)しか報告値のないフタル酸ジシクロヘキシルについて、生物濃縮試験の実施によって生物濃縮係数やこれに対する餌の影響を確認することが必要と考えられる。

表 平成 11 年度及び 12 年度における曝露経路調査の実施状況

対象物質	主要曝露媒体の 推定	水環境挙動モ デルの構築と 検証	水環境挙動 モデルの充実	水生生物への 移行経路の 検討
トリブチルスズ	○	○		
4-オクチルフェノール	○	○		
ノニルフェノール	○	●	○	○
フタル酸ジ-n-ブチル	○	○		
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	○	○		
フタル酸ジシクロヘキシル	○	(○)		
ベンゾフェノン	○	○		
オクタクロロスチレン	○	(○)		

●は平成 11 年度実施分であることを示す

○は平成 12 年度実施分であることを示す

(カッコは実地調査を行わなかったため、検証できなかったことを示す)

空白は未実施であることを示す