

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340087

研究課題名(和文) 界面活性剤等の助剤の共存による化学物質の毒性変化を予測する手法の開発

研究課題名(英文) Predicting changes in aquatic toxicity of chemicals resulting from solvent or dispersant use as vehicle

研究代表者

菊地 幹夫 (Kikuchi, Mikio)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・名誉教授

研究者番号：70308534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質の生態毒性試験を行うにあたって、難水溶性物質の場合には試験溶液を調製することが難しく、また試験溶液の濃度が試験中に変化してしまう場合がある。そこで試験にあたって有機溶剤や界面活性剤等を助剤として使用するが、その助剤の影響により毒性が変化することがある。本研究では助剤使用による毒性への影響を予測する手法を開発した。

数種の化合物の急性毒性とモデル生体膜への吸着に及ぼす助剤の影響を検討し、対象物質の物理化学的性質あるいは吸着性の変化から毒性の変化を予測できることを明らかにした。また文献で報告されている毒性データを解析して、著者らの開発した毒性変化を予測する手法の有用性を検証した。

研究成果の概要(英文)：In aquatic toxicity testing of poorly water-soluble substances, it can be difficult to prepare a concentrated stock solution and maintain a constant exposure concentration in the water. These cases typically involve preparation of the concentrated stock solution in a water-miscible organic solvent or a surface-active dispersant as a vehicle. It is necessary to select an appropriate type and concentration of vehicle prior to toxicity testing, as a substance's toxicity measured using a vehicle can differ from that of the substance alone. The purposes of this study is to develop a methodology for predicting the influence of vehicle on toxicity of test substances.

The adsorption changes on silicone film of a test substance by using vehicle was closely correlated with the changes in toxicity. The adsorption test and physicochemical properties of a substance can predict toxicity changes of the substance by using vehicle. The usefulness of our method was inspected by the published data.

研究分野：生態毒性学

キーワード：生態毒性 毒性 化学物質 ミジンコ類 魚類 吸着 濃縮性

1. 研究開始当初の背景

化学物質の管理は、ヒトの健康の保護のみならず、生態系の保全あるいは生物多様性の確保の観点から重要な課題である。我が国でも欧米に 30 年あまり遅れながら、化学物質審査規制法や農薬取締法で水生生物への安全性評価が要求され、それを踏まえて化学物質は商品化されることになった。

しかし水生生物への毒性試験を実施する上でいくつかの難しい問題が生じてきた。そのうちの一つが難水溶性物質についての試験である。水生生物への毒性試験では、試験生物を水中で化学物質に曝露 (exposure) させるので、その濃度を一定に維持することが試験の前提となる。しかし難水溶性物質では、毒性が現れる濃度の試験液を調製することあるいは曝露期間中に濃度を一定に保つことが容易でない。そこで以前から、水生生物に対して毒性の低い溶剤や分散剤 (界面活性剤) を用いて被検物質を試験溶液中に均一に分散させて、濃度を一定に維持して、試験することが行われてきた。そして時には、被試験物質の水溶解度を大きく超えた濃度で試験が行われたこともある。経済協力開発機構 (OECD) では、2000 年に作成した試験困難物質の水生生物毒性試験法についてのガイダンス文書の中で、「界面活性作用のある分散剤はやむを得ない場合を除き使用しないこと」と規定した。分散剤の使用が好ましくない理由としては、水溶液からの吸収率の低下により、毒性が過小評価される危険性があると指摘している。現実に毒性が 40 分の 1 に下がってしまう結果も出ている。一方界面活性剤と混合して使用する農薬の場合には、界面活性剤の共存時の農薬の毒性が共存しない場合にくらべて 10 倍以上も高くなる例が見られることが、文献調査 (例えば、環境省「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料」など) で明らかになってきた。

さて“exposure”は、試験生物の体表面に接する水中における化学物質の濃度で表わされる。化学物質が体表面から吸収されると、その化学物質は体内の組織および器官に投与量 (dose) を与えることになる。“dose”は組織中の濃度で表わされる。化学物質の生物に対する影響は、“exposure”よりも“dose”と関係が深い。“dose”は“effect”をもたらす部位 (生物体、組織、器官) の濃度ととらえることもできる。

このように考えると、「界面活性剤の共存による化学物質の毒性の変化は、“dose”の前提となる水生生物のエラ等の体表面の生体膜に濃縮し通過する物質量が界面活性剤の存在により変化することが原因」と仮定できる。これは化学物質と界面活性剤の相互作用に関係するので、それらの種類と濃度に特異的になるはずである。そこで毒性試験に先だって、被検物質本来の毒性を変化させないように助剤の種類、濃度を選択することが、

信頼性の高い毒性試験を行う上で必須となるが、そのような選択を科学的に行う方法は見当たらない。

2. 研究の目的

難水溶性物質の毒性試験では、使用される助剤 (有機溶媒や界面活性剤) の影響により毒性が変化することがあるので、毒性試験に先立ち、適切な助剤の種類、濃度の選択が重要となる。本研究では、信頼性の高い毒性試験を行うために、事前に助剤の毒性への影響を簡便・安価に予測する手法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の実験と解析を行った。

(1) 対象化学物質

曝露濃度が安定した水溶液をつくりにくい物質を水溶解度と揮発性をパラメータにして対象化学物質として選定した。具体的には難水溶性 (水溶解度 数 10 mg/L 以下で溶解度が異なったもの) でかつ揮発性の異なる化合物として *p*-ペンチルフェノール(4-PP), 3-クロロ-4-フルオロニトロベンゼン (CFNB), 4-クロロトルエン (ChTo) 等 8 物質を選んだ。助剤としては、毒性試験に最も一般的に用いられてきた有機溶剤ジメチルホルムアミド (DMF) と界面活性剤 HCO-40 を用いた。

(2) 化学物質の水生生物毒性に及ぼす助剤の影響の解明
毒性試験のモデルとしてオオミジンコ遊泳阻害試験を用いた。この試験は、化学物質審査規制法、農薬取締法でそのデータを要求される最も一般的な「水生生物を用いる毒性試験」であり、また実験室で再現性良く実施できるなどの理由から選定した。

(3) 化学物質のモデル生体膜への濃縮に及ぼす助剤の影響の解明

モデル生体膜 (シリコーン膜) を対象化合物 (濃度: 1~10 mg/L) に数時間曝露し、対象化合物の生体膜への濃縮率を「シリコーン膜中の濃度 / 水中の濃度」から求めた。

(4) 上記(2), (3)の試験結果を比較しながら解析し、助剤の使用に伴う毒性の変化と濃縮率の変化について関連性を明らかにした。

(5) 助剤添加による毒性や濃縮率の変化を対象化合物の物理化学的性質 (分子量, 分子表面積, 水溶解度, log Pow 等) との関係を重ね回帰分析により検討した。

(6) 異なる条件下で行われた毒性試験の信頼性の検討

オオミジンコ遊泳阻害試験では定期的に陽性対照物質 (ニクロム酸カリウム) について試験し、その毒性値がある一定の変動幅に収まるように試験を管理している。しかし試験機関が異なるとその毒性値は場合によっては 10 倍も異なり (変動係数 >50%), 毒性値の相互比較ができるか疑問が生じる。毒性値にどの程度のバラツキがあるかを、ニクロム

酸カリウムを用いて、オオミジンコ遊泳阻害試験で水質条件について検討するとともに、実施した試験機関が異なると毒性値がどの程度ばらつくかを検討した。

(7)環境省は数カ所の試験機関に委託して約700の化学物質について水生生物への毒性試験を実施し、化学物質の生態影響に関する知見を収集してきた。そのうちいくつかの化合物についてはHCO-40を使って得られたデータと使わないで得られたデータとがある。これらのデータを上記(6)で明らかにしたデータのバラツキを踏まえて解析し、(2)~(4)までに得られた結果と整合するか検証した。

4. 研究成果

(1)対象化学物質8物質について、オオミジンコへの急性遊泳阻害濃度48-h EC₅₀(mg/L)に及ぼす助剤の種類と濃度の影響について明らかにした。

(2)これらの化学物質について、モデル生体膜(シリコン膜)への濃縮性に及ぼす助剤の種類と濃度の効果について明らかにした。

(3)助剤の種類と濃度の条件を変えて試験した結果を整理したところ、図1に示したように、対象化学物質において助剤添加による毒性の変化と濃縮性の変化について非常に高い関連性を見いだした。

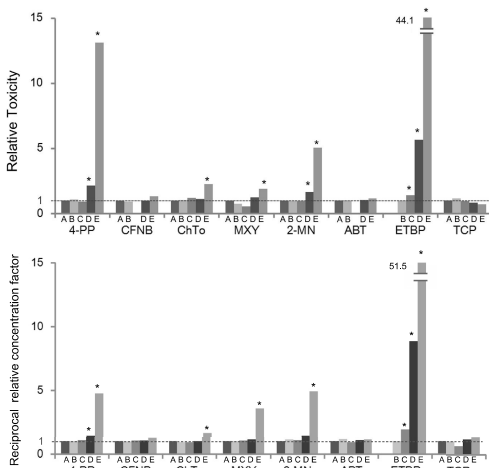


図1 8種の化学物質(4-PP,CFNB,ChTo等)における毒性の変化(上図)と濃縮性の変化(下図)に及ぼす助剤の種類と濃度の影響(条件:A~E)(詳しくは発表論文(2)参照のこと)

DMFは全ての物質で毒性にもまたモデル生体膜への濃縮性にも影響を及ぼさなかった。しかしHCO-40ではいずれの濃度においても毒性の変化もモデル生体膜への濃縮性の変化も起きない物質群(A群)とある濃度以上になると毒性の変化と濃縮性の変化が起きる群(B群)の二群があることがわかった。

(4)中性条件下で測定したlog Powを用いて検討したところ、log Powの値が約3以下の物質はA群に、約3以上の群はB群に分けられることがわかった。

(5)これらのことから、毒性試験の実施に先立ち、log Powの値を調べるとともに、その化学物質のモデル生体膜への濃縮試験を行うことにより、濃縮性の変化から毒性の変化を予測することができ、信頼性の高い毒性試験を行うための助剤の使用条件を簡便に明らかにできることがわかった。

(6)助剤を使用した場合の毒性変化については、対象化合物の物理化学的性質(分子表面積、log Pow)と助剤の使用濃度、臨界ミセル濃度から重回帰式により予測した相対毒性比(log)と相対毒性比(log)の実測値の相関は $r^2 = 0.73$ であり、複数の物性値を用いることである程度の精度で毒性変化を予測できることがわかった。この方法は濃縮試験と比べて精度はやや低いものの、簡便に様々な助剤濃度での毒性変化を予測することができた。

(7)生態毒性試験で定期的に試験されている陽性対照物質(ニクロム酸カリウム)の毒性値についてバラツキの原因を検討したところ、一定水質の下で試験すると室内・室間の変動は20%以下と小さくなり、データの信頼性は高くなることがわかった(表1)。

表1 試験機関内と試験機関間の毒性値の再現性

Dilution water sample	Test lab.	48-h EC ₅₀ , mg/L	CV, %	Sample size	
		Average ± SD			
M4 medium	A	0.78*	—	13	
	B	0.74 ± 0.12 ^a	16	32	
	C	0.81 ± 0.15 ^a	19	27	
	D	0.80 ± 0.12 ^a	15	20	
	E	1.07 ± 0.26 ^b	24	14	
	G	0.73 ± 0.17 ^{a,d}	24	7	
Subtotal average		0.82	20		
SD		0.13			
CV, %		15			
Dechlorinated tap water	H	0.24 ± 0.06 ^c	25	77	
	I	0.21 ± 0.022 ^{c,e}	10	4	
	J	0.53 ± 0.12 ^d	23	11	
	K	0.092 ± 0.029 ^a	32	23	
	L	0.20 ± 0.043 ^{c,e}	22	4	
	M	0.41 ± 0.11 ^{c,d,e}	27	3	
	N	0.35 ± 0.11 [*]	31	—	
	O	0.61 ± 0.141 ^{a,d}	23	6	
	Subtotal average		0.33	24	
	SD		0.18		
	CV, %		54		

—: Not shown in the ref. (Ministry of the Environment, Japan, 1996-2014). Different small letters(a-e) show that the numbers in column are significantly different from each other, significantly (Linear contrast, Sheffé's method, $p < 0.05$). *: Not statistically analyzed.

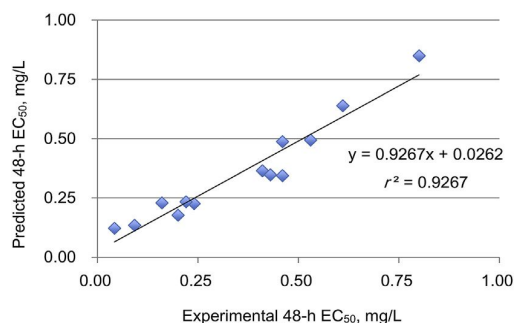


図2 水質から重回帰式により予測した毒性値と実測した毒性値の相関

また毒性値は水質に大きく依存し(表1),水

質から重回帰式により予測した毒性値と実測した毒性値の相関は $r^2 = 0.9267$ となった(図 2)。各試験機関では試験生物の健康管理が適切に行われており、試験結果の相互比較が可能であることがわかった。

(8) (5) で得られた研究成果を検証するために、(7) で得られたパラツキを考慮して環境省のデータを解析した。「同じ物質を異なった機関でまったく同じ条件下で行った」2,4-キシレノールの値の比較から、データの再現性は 2 倍以内に収まることがわかった。

「助剤として DMF を使った場合と何も助剤を使わない場合とを比較できる」1-ノナノールの値から、DMF の使用は毒性値に影響しないことがわかった。エチルフェニルアミンの値の比較から、「log Pow 2.16 の物質では」用いた株の違いも考慮すると毒性値に差が生じたとは言えなかった。ピレンの値の比較から、「log Pow 4.88 の物質では」HCO-30 88mg/L の使用によって毒性値に大きな変化が生じたことがわかった。これらの結果は、濃縮性の変化による毒性変化の予測結果とよく一致し、私たちの提案する予測手法の有用性を実証できた。

(9) OECD のガイダンス文書では、「界面活性作用のある分散剤はやむを得ない場合を除き使用しないこと」と規定されているが、分散剤使用による毒性変化の定量的な評価はこれまでになされてこなかった。今回の研究で分散剤の使用により毒性が過小評価され、毒性が 40 分の 1 に下がってしまう例も明らかになった。一方界面活性剤と混合して使用する農薬の場合には、界面活性剤の共存時の農薬の毒性が共存しない場合にくらべて 10 倍以上も高くなる例も文献で見られている。しかし試験の実施にあたって分散剤の使用はメリットも大きい。このように考えると、試験対象化学物質の本来の毒性を変化させない範囲で分散剤の種類、濃度を選択できれば、信頼性の高い毒性試験を行うことができる。今回の研究成果はそのような選択を科学的に簡便に行う方法の提案であり、利用価値が高いと考える。またこの方法は毒性変化と生体内への吸収の変化を関連づけて明らかにする手法の提案でもあり、難水溶性の物質の生体への作用を扱う広い分野に応用できると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者は下線)

[雑誌論文：査読有り](計 2 件)

(1) Mikio Kikuchi, Ayaka Syudo, Makoto Hukumori, Chihiro Naito, Jun Sawai (2017) Changes in aquatic toxicity of potassium dichromate as a function of water quality parameters. *Chemosphere*, **170**, 113-117.

(2) Mikio Kikuchi, Masamitsu Nakagawa, Suguru Tone, Hotaka Saito, Tatsuhiko Niino, Natsumi Nagasawa, Jun Sawai (2016) Predicting changes in aquatic toxicity of

chemicals resulting from solvent or dispersant use as vehicle. *Chemosphere*, **154**, 34-39.

[学会発表：査読無し](計 2 件)

(1) 菊地幹夫, 主藤綾夏, 福森誠, 澤井淳 (2016) ニクロム酸カリウムの毒性の変動要因. 第 22 回日本環境毒性学会研究発表会, 2016.9.7, 愛媛大学(愛媛県)

(2) 長澤夏実, 菊地幹夫, 澤井淳 (2014) 界面活性剤の共存による有機化合物の毒性変化を予測する手法の開発. 第 20 回日本環境毒性学会研究発表会, 2014.9.11, 富山国際会議場(富山県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 幹夫 (KIKUCHI Mikio)

神奈川工科大学応用バイオ科学部・名誉教授

研究者番号：70308534

(2) 研究分担者

澤井 淳 (SAWAI Jun)

神奈川工科大学応用バイオ科学部・教授

研究者番号：80288216